



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0082529
(43) 공개일자 2012년07월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 39/04 (2006.01) A61K 39/02 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-0003830

(22) 출원일자 2011년01월14일

심사청구일자 2011년01월14일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동,
충남대학교)

(72) 발명자

신성재

대전광역시 중구 문화로 266, 충남대학교의과대
학 미생물학교실 (문화동)

민기남

대전광역시 중구 문화로 266, 충남대학교의과대
학 미생물학교실 230호 (문화동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김순웅

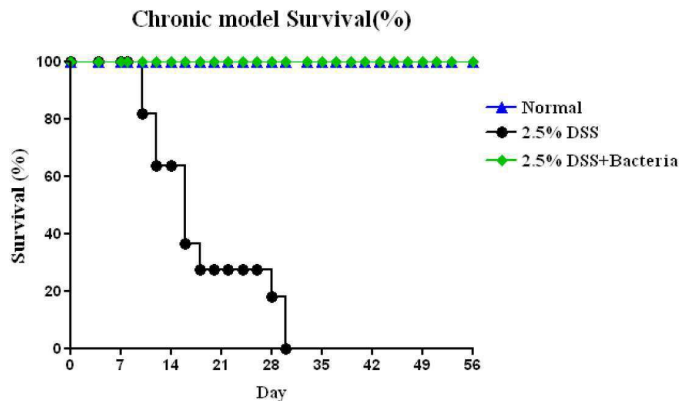
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 마이코박테리움 파라투버쿨로시스를 포함한 염증성 장질환의 예방 및 치료용 백신

(57) 요약

본 발명은 마이코박테리움 파라투버쿨로시스(*Mycobacterium paratuberculosis*)를 유효성분으로 포함하는 염증성 장질환의 예방 및 치료용 백신, 이를 포함한 백신 조성물 및 이를 이용한 염증성 장질환의 치료 또는 예방하는 방법에 관한 것이다. 상기 백신 및 백신 조성물은 난치성 질환으로 알려진 염증성 장질환에 대하여 우수한 방어효과를 갖는다.

대표도 - 도1a



(72) 발명자

원철재

대전광역시 중구 문화로 266, 충남대학교의과대학
미생물학교실 230호 (문화동)

김우식

대전광역시 중구 문화로 266, 충남대학교의과대학
미생물학교실 230호 (문화동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A090184

부처명 보건복지부

연구사업명 보건의료연구개발사업

연구과제명 크론씨병의 발병기전에 관련된 마이코박테리아의 전염성 유발인자 발굴 및 발굴 인자의
기능적 특성 분석

주관기관 충남대학교 산학협력단

연구기간 2009.05.01 ~ 2011.03.31

특허청구의 범위

청구항 1

마이코박테리움 파라투버쿨로시스(*Mycobacterium paratuberculosis*)를 유효성분으로 포함하는 염증성 장질환의 예방 및 치료용 백신.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 마이코박테리움 파라투버쿨로시스는 생균 또는 사균 형태인 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 백신은 장 조직에서 염증성 사이토카인을 감소시키는 활성을 가지는 것인 백신.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 염증성 장질환은 궤양성 대장염(ulcerative colitis) 또는 크론씨병(Crohn's disease)인 백신.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 백신, 약학적으로 허용가능한 담체 또는 면역보조제를 포함하는 염증성 장질환 예방 및 치료용 백신 조성물.

청구항 6

제5항의 조성물을 개체에 투여하여 염증성 장질환을 예방 또는 치료하는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 개체는 인간을 제외한 개체인 방법.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 투여는 개체의 경구 또는 복강 내로 염증 발생 2주 전 또는 염증 발생시에 투여하는 것인 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 마이코박테리움 파라투버쿨로시스(*Mycobacterium paratuberculosis*)를 유효성분으로 포함하는 염증성 장질환의 예방 및 치료용 백신, 이를 포함한 백신 조성물 및 이를 이용한 염증성 장질환의 치료 또는 예방하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 염증성 장질환(Inflammatory bowel disease, IBD)은 소화기 계통에 발생하는 원인불명의 심각한 만성적인 염증으로서 치료가 매우 어려운 난치성 질환으로 알려져 있으며, 대표적으로 궤양성 대장염 (Ulcerative colitis, UC)과 크론씨병 (Crohn's disease, CD)을 들 수 있다. 이러한 염증성 장질환은 백인이나 유대인 등 서양인에게 많이 발생하였으나, 최근 우리나라에서도 빠른 속도로 증가하고 있다. 국가에 따라 유병율은 다르나 미국에서는 750명당 1명, 캐나다에서는 500명당 1명이 크론씨병을 앓고 있다는 보고가 있다.

[0003] 상기 염증성 장질환에 대한 유병율이 증가하면서 국제적인 관심도 높아져 2008년 미국 미생물학회 (ASM)에서는 질병의 연구와 근절에 대한 컨소시엄이 구성되었고 과거 환자의 유전적인 소인 또는 자가면역질환으로는 더 이상 발병기전을 설명할 수 없으며 위의 요인보다는 환경적인 요인이 염증성 장질환의 병인에 더욱 중요하다고 결론지은 바 있다. 환경적 요인을 중심으로 다양한 발병기전에 대한 가능성이 제시되고 있으나 현재까지

정확한 발병기전에 대해서는 연구가 매우 미미한 실정이다.

[0004] 상기 염증성 장질환의 하나인 크론씨병의 병인 기전에 마이코박테리움 아비움 아종명 파라투버쿨로시스(*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, 이하 M. 파라투버쿨로시스)가 관여할 것이라는 가설이 최근 각광을 받고 있다. M. 파라투버쿨로시스는 소, 양, 염소, 사슴 등의 동물에서 만성육아종성 염증으로 특징화된 요네병(Johne's disease)을 유발시키며 사람의 크론씨병(Crohn's disease)과도 매우 밀접하게 연관되었다는 보고가 2000년 이후 선진국을 중심으로 보고되고 있다. 현재까지 보고된 연구 내용을 보면 사람의 크론씨병과 연관하여 Leprosy, tuberculosis, 파라투버쿨로시스와 크론씨병을 비교하여 mycobacteria가 크론씨병의 원인체로서 갖는 의의와, 사람의 크론씨병과 미생물과의 연관성을 규명, 크론씨병의 추정적인 원인체로서 M. 파라투버쿨로시스가 갖는 공중보건의 위험성 규명, in situ hybridization법을 이용하여 크론씨병에 걸린 사람으로부터 M. 파라투버쿨로시스의 분리 동정, M. 파라투버쿨로시스의 항원인 p35와 p36 단백질을 이용하여 사람의 크론씨병에 대한 혈청학적 연구 등이 수행되어 왔다. 그러나 이러한 연구에도 불구하고, M. 파라투버쿨로시스를 크론씨병의 원인체로 확신하지 못하는 이유는 이 병원체가 극도로 느리게 자라는 특성과 균체 배양의 어려움 등 많은 제약이 있기 때문이다. 따라서, 현재까지 M. 파라투버쿨로시스의 백신으로서의 가능성에 대한 연구는 전무한 실정이다.

[0005] 한편, 염증성 장질환의 임상적인 가장 큰 특징은 끊임없는 염증에 의하여 장관계에 존재하는 정상세포의 소실과 그에 따른 장 구조의 변화와 정상기능이 상실되는 것이다. 또한 이차적으로 정산균 무리의 내인성 감염에 의하여 그 염증이 심해진다고 알려져 있다. 따라서, 최근 임상연구에서 염증성 장질환 치료에 대해 관심이 높아지고 있으나, 현재까지도 염증성 장질환의 일차치료는 5-ASA, 6-MP, Sulfasalazine, 스테로이드, TNF- α 차단제 등의 면역억제제에 의존하고 있는 실정이다. 이는 지속적인 염증을 완화시킴으로써 정상세포의 상실을 막고 장관계의 기능을 회복시키지만 이차 감염에 대한 우려와 일시적 효과에 그친다는 문제점이 있다. 따라서, 이와 같이 염증성 장질환의 치료가 어렵고 이에 대한 효과적인 치료제 또한 부족한 실정에서, 염증성 장질환을 예방하고 악화되는 것을 막을 수 있는 효과적인 백신의 개발이 필요한 실정이다.

[0006] 이에 본 발명자는 염증성 장질환을 예방 및 치료할 수 있는 백신을 개발하고자 예의 노력한 결과, 텍스트란 설페이트 소듐 솔트(dextran sulfate sodium salt, 이하 DSS라 함)를 이용한 염증성 장질환의 가장 대표적인 모델에서 M. 파라투버쿨로시스가 염증 전 또는 동시에 투여시 면역억제 효과와 그에 따른 염증 방어효과를 나타내는 등 우수한 백신으로서의 효과를 가지는 것을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 하나의 목적은 마이코박테리움 파라투버쿨로시스(*Mycobacterium paratuberculosis*)를 유효성분으로 포함하는 염증성 장질환의 예방 및 치료용 백신을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 하나의 목적은 상기 백신, 약학적으로 허용가능한 담체 또는 면역보조제를 포함하는 염증성 장질환의 예방 및 치료용 백신 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또다른 하나의 목적은 상기 백신 조성물을 개체에 투여하여 염증성 장질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 마이코박테리움 파라투버쿨로시스(*Mycobacterium paratuberculosis*)를 유효성분으로 포함하는 염증성 장질환의 예방 및 치료용 백신을 제공한다.

[0011] 본 발명에서 상기 마이코박테리움 파라투버쿨로시스는 생균, 사균, 또는 약독화된 형태일 수 있으나, 생균 또는 사균 형태가 바람직하며 생균 형태로 투여할 때 가장 바람직하다.

[0012] 본 발명에서 상기 염증성 장질환은 궤양성 대장염(ulcerative colitis) 또는 크론씨병(Crohn's disease)일 수 있으며, 상기 염증성 장질환은 세균에 의한 염증성 장질환일 수 있으며, 상기 세균은 마이코박테리움 파라투버쿨로시스일 수 있다.

[0013] 본 발명에서 상기 궤양성 대장염은 소화관 중 대장의 점막에 발생하는 만성 염증성 질환으로서 직장으로부터 횡행 결장 또는 오른쪽 대장에 이르기까지 대장 전체에 걸쳐 염증이 존재하는 질환이며, 상기 크론씨병은 궤양성 대장염과 달리 염증이 전체적인 소화기 어느 부위에도 일어날 수 있는 질병이며 주로 회장의 말단부위에

병변을 보이며 소화기 질병 중 대표적인 난치성 질환을 말한다.

- [0014] 본 발명의 구체적인 실시예에서는 M. 파라투버쿨로시스에 의한 염증성 장질환의 방어 효과를 알아보기 위해, 가장 좋은 염증성 장질환 모델로 알려진 DSS의 섭취로 염증이 유발된 마우스에 대하여, 살아있는 M. 파라투버쿨로시스를 염증 유발 2주 전에 복강 내로 감염시키는 실험을 하였다. 그 결과, DSS를 매일 섭취한 그룹에서는 실험 29일째 모두 폐사한 반면, M. 파라투버쿨로시스가 감염된 그룹에서는 아무것도 처치하지 않은 음성대조군과 마찬가지로 100% 생존하였으며, 염증성 장질환의 대표적인 지표인 체중 변화 또한 DSS를 투여한 그룹에서는 DSS 섭취 후 급격한 체중의 감소가 관찰된 반면, M. 파라투버쿨로시스에 감염된 그룹은 35일까지 체중의 급격한 변화가 관찰되지 않아 M. 파라투버쿨로시스를 백신으로 투여할 경우 염증성 장질환에 대한 면역 방어 효과가 있음을 확인할 수 있었다 (도 1 참조).
- [0015] 또한, 상기 실험을 바탕으로 M. 파라투버쿨로시스의 백신 효과를 증명하기 위해, 생균 또는 사균 형태, 복강 내 또는 경구를 통한 투여, DSS 투여 2주 전 또는 동시 투여를 수행한 결과, DSS를 매일 섭취한 그룹에서는 실험 14일째 마우스가 모두 폐사한 반면, M. 파라투버쿨로시스를 투여한 그룹에서는 55%-80%까지 생존율이 향상되었으며, 체중의 변화를 또한 DSS를 투여한 그룹에서는 급격한 체중의 감소율을 나타낸 반면 M. 파라투버쿨로시스를 처치한 그룹에서는 14일째부터 더 이상의 체중 감소는 보이지 않았고 일정한 체중이 유지됨을 알 수 있었다 (도 2 참조).
- [0016] 또한, DSS를 섭취하여 염증이 유발된 마우스의 장 조직에서 염증 관여 사이토카인에 대한 M. 파라투버쿨로시스의 면역 억제를 조사하기 위해 사이토카인의 발현 생산 양상을 조사한 결과 DSS만을 섭취한 그룹에서는 높은 염증성 사이토카인이 관찰된 반면, 살아있는 M. 파라투버쿨로시스를 DSS 섭취 2주 전에 복강 내로 감염시킨 그룹에서는 유의적으로 사이토카인이 감소되었다 (도 3 참조).
- [0017] 또한, 보다 구체적인 기전을 알아보기 위하여 염증관련 사이토카인의 분비가 가장 왕성한 수지상 세포에 LPS를 처리하여 염증 매개 사이토카인의 양상을 조사한 결과, LPS를 처리한 수지상 세포에서는 유의적으로 높은 사이토카인이 분비된 반면, LPS 처리 후, M. 파라투버쿨로시스를 처리한 수지상 세포에서는 수지상 세포의 활성화에 관련된 표면 분자의 발현을 감소시키고 염증성 사이토카인의 분비를 감소시킴으로써 LPS에 의한 수지상 세포의 활성화를 억제하는 것을 확인할 수 있었다 (도 5 참조).
- [0018] 상기 결과를 통해, M. 파라투버쿨로시스를 염증 전 또는 염증과 동시에 투여시 장관 내 염증성 사이토카인을 감소시키고 수지상 세포의 활성화를 억제함으로써 염증을 억제하고 개체의 생존율을 높이는 등, 염증성 장질환의 치료 및 예방을 위한 백신으로서 우수한 방어 효과가 있음을 알 수 있었다.
- [0019] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 백신을 포함하는 염증성 장질환의 예방 및 치료용 백신 조성물에 관한 것이다.
- [0020] 본 발명에서 용어, “예방”이란 백신 조성물의 투여로 염증성 장질환의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 본 발명에서 용어, “치료”란 백신 조성물의 투여로 이미 유발된 염증성 장질환의 증세가 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 의미한다. 상기 염증성 장질환의 증세는 혈변, 점액질변, 복부통증, 구토, 고열, 부종 등을 예로 들 수 있다.
- [0021] 또한, 상기 백신 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체 또는 면역보조제(아쥘란트)를 추가로 포함할 수 있다. 약학적으로 허용되는 담체는 당 분야에 공지된 것으로 안정화제, 희석제 및 완충액을 포함한다. 적절한 안정화제는 솔비톨, 락토즈, 만니톨, 진분, 당, 텍스트란 및 포도당 같은 탄수화물; 알부민 또는 카제인 같은 단백질 등을 포함한다. 적절한 희석제에는 염, Hanks 균형 염 및 링거액 등을 포함한다. 적절한 완충액에는 알칼리 금속 인산염, 알칼리 금속 탄산염 및 알칼리 토금속 탄산염 등을 포함한다. 또한 본 발명의 백신 조성물에는 면역반응을 개선 또는 강화시키기 위하여 하나 이상의 면역보조제 등을 포함할 수 있다. 적절한 면역보조제에는 펩타이드; 알루미늄 하이드록사이드; 알루미늄 포스페이트; 알루미늄 옥사이드; Marcol 52 같은 미네랄 오일 또는 식물성 오일 및 하나 이상의 유화제로 구성된 조성물 또는 리졸세시틴, 다가 양이온, 다가 음이온 같은 표면 활성물질 등이 포함한다. 상기 백신 조성물의 제형화 방법은 당해 분야의 숙련자에게 공지된 방법을 사용할 수 있다.
- [0022] 또다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 백신 조성물을 개체에 투여하여 염증성 장질환을 예방 또는 치료하

는 방법에 관한 것이다.

[0023] 상기 개체는 쥐, 생쥐, 소, 양, 염소, 사슴 등의 동물과 인간을 포함하는 포유동물을 의미하며, 바람직하게는 인간이다.

[0024] 상기 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 본 발명에서 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 개체에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며, 인체 또는 수의학으로 제형화되어 다양한 경로로 투여될 수 있다. 상기 백신 조성물은 비경구 경로, 예컨대 복강내, 혈관내, 정맥내, 동맥내, 근육내 또는 피하 등의 경로로 투여될 수 있다. 또한, 경구, 비강, 직장, 경피 또는 에어로졸을 통한 흡입 경로로 투여될 수도 있다. 바람직하게는 복강 내 또는 경구로 투여될 수 있다.

[0025] 본 발명의 백신 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에서 용어, "약학적으로 유효한 양"이란 백신효과를 나타낼 수 있을 정도의 충분한 양과 부작용이나 심각한 또는 과도한 면역반응을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 치료될 장애, 장애의 중증도, 특정 화합물의 활성, 투여 경로, 치료 지속 기간, 상기 백신과 조합되거나 또는 동시에 사용되는 약물, 개체의 연령, 체중, 성별, 식습관, 일반적인 건강 상태, 및 의약 업계 및 의학 분야에 공지된 인자를 비롯한 다양한 인자들에 따라 달라질 것이다. 일반적으로 면역치료에 또는 면역예방에 유효한 양은 환자 체중당 약 0.1~10 mg/kg의 범위가 될 것이다. 단위 용량(unit dose)은 최초 투여 후 약 2개월 간격으로 2회 이상 부스팅될 수 있다. 하지만 더 낮은 용량 또는 더 높은 용량 및 다른 투여 스케줄이 적용될 수 있다.

발명의 효과

[0026] 상기에서 상세히 설명한 바와 같이, 본 발명의 마이코박테리움 파라투버쿨로시스를 유효성분으로 포함하는 백신 및 백신 조성물은 난치성 질환으로 알려진 염성 장질환에 대하여 우수한 방어효과를 갖는다.

도면의 간단한 설명

[0027] 도 1은 염증성 장질환에 대한 M. 파라투버쿨로시스의 방어 효과를 조사하기 위해 마우스에 2.5%의 DSS를 섭취 시키기 2주 전, 살아있는 M. 파라투버쿨로시스 ATCC19698을 1×10^6 CFU/mouse를 복강내 주사로 감염시킨 후 생존율(1a), 체중(1b), 및 체중 변화율(1c)을 조사한 결과를 나타낸 것이다.

도 2는 M. 파라파라투버쿨로시스의 생균과 사균, 감염 루트, 감염 시기에 따른 백신 효과를 살펴보기 위하여 마우스에 상기 조건을 달리하여 M. 파라투버쿨로시스 ATCC19698을 1×10^6 CFU/mouse를 감염시킨 후 생존율(2a), 체중(2b), 및 체중 변화율(2c)을 조사한 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 아무것도 처리하지 않은 대조군, DSS만을 섭취한 그룹, 및 DSS 섭취 2주 전에 살아있는 M. 파라투버쿨로시스를 복강 내로 감염시킨 그룹에 대하여 DSS를 섭취시킨 후 7일째에 마우스의 회장말단부에서 염증성 사이토카인(NF- α , IL-1 beta, IL-6, IL-8)의 양상을 나타낸 것이다 (* P<0.05, ** P<0.005).

도 4는 M. 파라투버쿨로시스의 LPS에 의한 수지상 세포 활성화의 억제 효과를 조사하기 위하여, 수지상 세포에 아무것도 처리하지 않은 대조군, LPS만을 처리한 군, 및 M. 파라투버쿨로시스를 MOI 1:1로 먼저 감염시키고 4시간 후 LPS 100ng/ml를 처리한 군에 대하여, 보조자극인자 (CD80, CD86)와 MHC class I, II 분자의 발현 여부를 조사한 결과이다.

도 5는 M. 파라투버쿨로시스가 LPS 자극에 의한 수지상 세포의 사이토카인 분비에 미치는 영향을 조사하기 위해, 수지상 세포에 아무것도 처리하지 않은 대조군, LPS만을 처리한 군, 및 수지상 세포에 M. 파라투버쿨로시스를 감염시키고 LPS를 처리한 군에 대하여 염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-6, IL-12, IL-1 beta의 분비 변화를 조사한 결과이다 (* P<0.05, ** P<0.005).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0028] 이하, 본 발명을 실시예를 통해 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0029] 본 발명의 백신 효과를 알아보기 위하여, in vivo 실험으로서 먼저 M. 파라투버쿨로시스에 의한 염증성 장질환

환의 백신으로서의 방어효과를 보기 위하여 스크리닝 차원에서 마우스에 DSS로 장에 염증을 유발하기 전에 살아있는 M. 파라투버쿨로시스를 2주 전 복강 내로 감염시키는 실험을 하였다. 또한, 상기 실험 결과를 바탕으로, 마우스에 다양한 루트(route)와 살아 있는 또는 heat-killed M. 파라투버쿨로시스를 이용하여 DSS 투여 2주 전에 또는 DSS와 동시에 투여하는 실험을 하였다.

[0030] 다음으로, M. 파라투버쿨로시스가 수지상 세포의 LPS에 의한 세포활성 억제를 함으로써 염증 억제 효과가 있는지 알아보는 실험을 하였다.

[0031] 이하, 상기 실험에 사용된 실험재료 및 실험방법과 이에 따른 실험결과는 하기와 같다.

[0032] 실험재료 및 실험방법

[0033] 1. 실험용 마우스의 준비

[0034] Female C57BL/6 mice (7weeks old)를 Charles River Laboratories Korea (Orient bio, Korea)에서 구입하고 일주일 동안 마우스를 안정시키기 위해 충남대학교 생태학 연구동에서 관리를 하였다. 실험은 8주령의 마우스에서 실시하였다.

[0035] 2. 사용된 M. 파라투버쿨로시스 균주

[0036] M. 파라투버쿨로시스 ATCC19698를 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas,VA,USA)에서 분양받아 10% OADC (BD Biosciences, SanJose, CA, USA)와 2 µg/ml의 MycobactinJ (AlliedMonitor, Fayette, MO, USA)가 포함된 7H9 broth에서 한 달간 배양 후, PBS로 세 번 washing하고 -80도 냉장고에 보관하였다. 1주일 후, CFU를 측정하였다.

[0037] 3. Mouse 그룹

[0038] 하기 각 그룹에 20마리의 마우스를 할당하여 실험하였다.

[0039] (1) 음성대조군: 아무것도 처치하지 않은 정상 대조군 그룹.

[0040] (2) 양성대조군, 2.5% DSS 그룹: Dextran sulfate sodium salt (M.W : 36,000 ~ 50,000 Da ; MP Biomedicals)를 멸균 수돗물에 2.5%로 희석하여 8주 동안 투여한 그룹.

[0041] (3) M. 파라투버쿨로시스의 백신 효과를 증명하기 위한 그룹 1: 살아있는 M. 파라투버쿨로시스 ATCC19698을 1×10^6 CFU/mouse로 DSS 투여 2주 전 복강 내 주사를 통하여 감염시킨 그룹.

[0042] (4) M. 파라투버쿨로시스의 백신 효과를 증명하기 위한 그룹 2: 살아있는 M. 파라투버쿨로시스 ATCC19698을 1×10^6 CFU/mouse로 DSS 투여 2주 전 경구로 감염시킨 그룹.

[0043] (5) M. 파라투버쿨로시스의 백신 효과를 증명하기 위한 그룹 3: 100℃에서 30분간 열처리를 하여 죽은 M. 파라투버쿨로시스 ATCC19698을 1×10^6 CFU/mouse로 DSS 투여 2주 전 복강 내 주사로 처치한 그룹.

[0044] (6) M. 파라투버쿨로시스의 백신 효과를 증명하기 위한 그룹 4: 살아있는 M. 파라투버쿨로시스 ATCC19698을 1×10^6 CFU/mouse로 DSS와 동시에 복강 내 주사로 감염시킨 그룹.

[0045] 3. 염증성 장질환의 유도

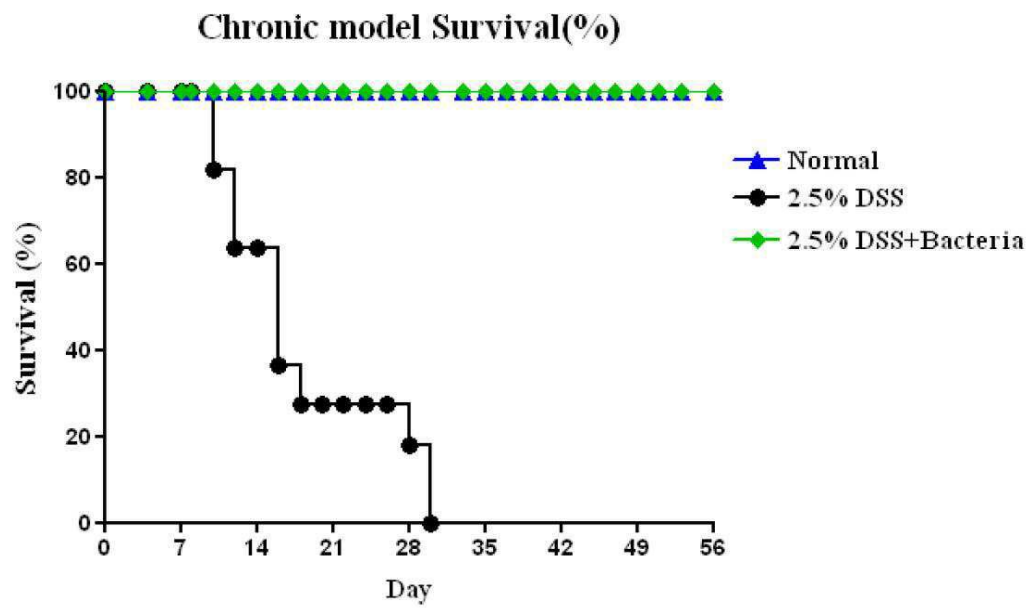
[0046] Nature protocols (Chemically induced mouse models of intestinal inflammation Nature protocols, Vol.2,No.3,2007)에 기술된 방법을 이용하여 2.5% dextran sulfate sodium salt (M.W : 36,000 ~ 50,000 Da ; MP Biomedicals)를 멸균 수돗물에 희석하여 매일 자유롭게 섭취하도록 하였다.

- [0047] 4. 체중 측정 및 상태 측정
- [0048] 체중과 혈변은 염증성 장질환의 가장 대표적인 지표이다. 실험 일주일 전부터 모든 마우스 체중, 혈변상태, 활동성을 실험 종료일까지 매일 측정하였다.
- [0049] 5. 조직 내에서 사이토카인의 측정
- [0050] DSS로 염증성 장질환을 유발한 후, M. 파라투버쿨로시스에 의한 염증성 사이토카인 억제 양상을 분석하기 위하여 ELISA kit (BD bioscience)을 이용하여 TNF- α , IL-1 beta, IL-6, IL-8의 염증성 사이토카인을 분석하였다. 각 그룹의 마우스의 동일한 장 부분 (회장부 말단)의 조직을 3cm로 자르고 1mL의 멸균 PBS를 첨가하여 bead beater를 이용하여 조직을 파쇄하고 13,000 x g에서 10분간 원심분리하여 상층액을 수거하였다. 수거된 상층액은 단백질을 1 mg/mL의 농도로 표준화시키고 실험에 사용하였다.
- [0051] 6. M. 파라투버쿨로시스에 의한 염증억제 작용 기전 분석
- [0052] (1) 수지상 세포는 염증에 관련된 사이토카인을 대량생산하는 대표적인 세포로서 LPS에 반응하여 TNF- α , IL-1 beta, IL-6 등 다양한 염증매개 사이토카인을 형성한다. 이에 수지상 세포에 M. 파라투버쿨로시스를 MOI 1:1로 감염시킨 후, LPS를 처리하여 염증에 관련된 사이토카인을 측정하였다.
- [0053] (2) 수지상 세포는 이전에 알려진 방법과 같이 마우스의 골수세포로부터 유도했다. 우선 C57BL/6마우스로부터 골수 채취용 주사를 이용해 골수를 채취하였다. 채취한 골수를 세척한 후 적혈구를 염화암모늄을 이용하여 제거하였다. 분리한 세포를 6-웰 플레이트에서 RPMI 1640(10% 열-불활화 FBS, 2 mM L-글루타민, 100 U/ml 페니실린, 100 μ g/ml 스트렙토마이신, 5×10^{-5} M 2-ME, 10mM HEPES (pH 7.4), 10 ng/ml GM-CSF, 10 ng/ml IL-4)를 첨가하여 배양하였다. 배양 후 3일과 5일째에는 부유 세포를 제거하고 새로운 배지를 첨가하였다. 본 발명의 실험들에서는 배양 6일째의 부착되지 않은 수지상 세포를 사용하였다. 일부 실험에서 CD11c⁺ 수지상 세포를 항-CD11c(N418) 마이크로비드와 자기 세포 분류 시스템(Vario MACS: Miltenyi Biotec, Auburn, CA)를 이용하여 분리 후 사용하였다. LPS(*E.coli* 055:B 타입, Sigma)는 수지상 세포의 활성화에 대한 양성대조군으로 사용하였다.
- [0054] (3) M. 파라투버쿨로시스에 의한 수지상 세포의 활성화 억제를 알아보기 위하여 실험을 실시하였다. 수지상 세포에 M. 파라투버쿨로시스를 감염시킨 후 4시간째 100 ng/ml 농도의 LPS를 각각 20시간 처리한 후 수지상 세포를 회수하였다. 미처리 대조군에는 배지만을 처리하였다. 비특이적인 결합을 억제하기 위하여 1 μ g/ml의 Fc γ I/III(BD bioscience)을 4℃에서 20분간 처리한 후, 수지상 세포 분석을 위해 CD11c-FITC(BD bioscience)로 4℃에서 20분간 염색하였다. 그리고, 보조자극인자와 MHC 분자의 발현 양상을 측정하기 위하여 항-CD80-PE(BD bioscience), 항-CD86-PE(BD bioscience), 항-MHC I 및 II-PE(BD bioscience)를 1 μ g/ml씩 처리하여 4℃에서 30분간 염색했다. PBS 완충액(2% FBS와 0.01% 아지드 나트륨 함유)로 2회 세척하고, 1% 파라포름알데히드로 고정 후에 FACScallibur(Beckson Dickinson, USA)로 분석하였다(도 2a).
- [0055] (4) 사이토카인은 상기 "5. 조직 내에서 사이토카인의 측정"에서 기술한 것과 동일한 방법으로 측정하였다.
- [0056] **실험결과**
- [0057] 1. 먼저 염증성 장질환에 대한 M. 파라투버쿨로시스의 백신으로서의 방어효과를 규명하기 위하여 스크리닝 차원에서 실험을 실시하였는데, 마우스에 2.5%의 DSS를 섭취시키기 2주 전, 살아있는 M. 파라투버쿨로시스 ATCC19698을 1×10^6 CFU/mouse를 복강내 주사로 감염시킨 후 생존율과 체중을 조사하였다.

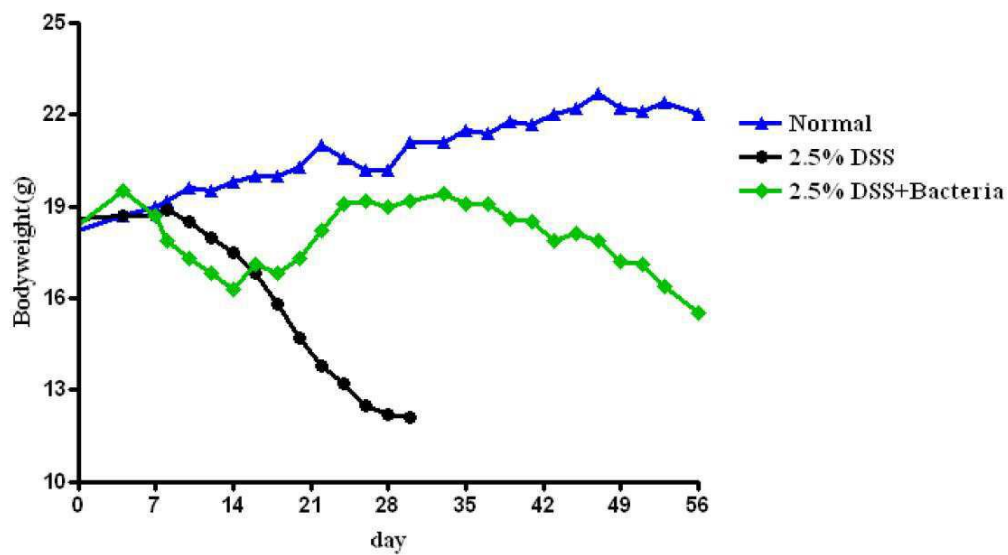
- [0058] 그 결과, 생존율을 나타낸 그래프인 도 1a에서 보듯이, 2.5% DSS를 매일 섭취한 그룹에서는 실험 29일째 모두 폐사한 반면, M. 파라투버쿨로시스가 감염된 그룹에서는 아무것도 처치하지 않은 음성대조군과 마찬가지로 100% 생존함을 알 수 있었다.
- [0059] 또한, 도 1b (wt)와 도 1c (체중 %)는 체중의 변화율을 나타낸 것인데, 2.5% DSS를 투여한 그룹에서는 DSS 섭취 후 급격한 체중의 감소가 관찰된 반면, M. 파라투버쿨로시스에 감염된 그룹은 35일까지 체중의 급격한 변화가 관찰되지 않았다.
- [0060] 2. 다음으로, M. 파라투버쿨로시스의 생균과 사균, 감염 루트, 감염 시기에 따른 효과를 조사한 결과, 도 2a의 생존율을 나타낸 그래프에서 보듯이, 2.5% DSS를 매일 섭취한 그룹에서는 실험 14일째 마우스가 모두 폐사한 반면, M. 파라투버쿨로시스를 투여한 그룹에서는 55%-80%까지 생존율이 향상됨을 알 수 있었다. 56일까지 생존율이 가장 높은 그룹은 DSS를 섭취시키기 시작한 0 day부터 M. 파라투버쿨로시스 생균을 동시에 처리한 그룹이었다.
- [0061] 또한, 도 2b와 도 2c는 체중의 변화율을 나타낸 그래프인데, 2.5% DSS를 투여한 그룹에서는 DSS 섭취 후 14일째까지 급격한 체중의 감소율을 나타낸 반면, M. 파라투버쿨로시스를 처리한 그룹에서는 14일째부터 더 이상의 체중 감소는 보이지 않았고 일정한 체중이 유지됨을 알 수 있었다.
- [0062] 3. 마우스 회장말단부에서 DSS 섭취 후, 7일째 염증성 사이토카인의 양상을 조사한 결과, 도 3에서 보듯이, DSS만을 섭취한 그룹에서는 유의적으로 높은 염증성 사이토카인 (NF- κ B, IL-1 β , IL-6, IL-8)이 관찰된 반면, 살아있는 M. 파라투버쿨로시스 DSS 섭취 2주 전에 복강 내로 감염시킨 그룹에서는 유의적으로 사이토카인이 감소되는 결과가 관찰되었다 (* $P < 0.05$. ** $P < 0.005$).
- [0063] 4. 수지상 세포가 활성화되면 보조자극인자 (CD80, CD86)와 MHC class I, II와 같은 분자의 발현이 현저히 증가하므로, 수지상 세포에서 M. 파라투버쿨로시스를 감염시킨 후 LPS에 의한 활성화 억제를 이들 분자에 대해 조사하였다. 수지상 세포에 M. 파라투버쿨로시스를 MOI 1:1로 먼저 감염시키고 4시간 후에 수지상 세포의 활성화를 통하여 염증 반응을 유도하는 LPS를 100ng/ml의 농도로 처리한 후 20시간 동안 37°C에서 배양했다. 그 결과, 도 4에서 보듯이, M. 파라투버쿨로시스는 LPS에 의한 수지상 세포의 표면 분자의 발현을 감소시켰다. 따라서, M. 파라투버쿨로시스는 LPS에 의한 수지상 세포의 활성화를 억제한다는 것을 알 수 있었다.
- [0064] 5. 또한, M. 파라투버쿨로시스가 LPS 자극에 의한 수지상 세포의 사이토카인 분비에 미치는 영향을 알아보기 위해 실험을 하였다. 즉, 수지상 세포가 LPS 처리에 의하여 활성화되면 분비하는 사이토카인 역시 변하게 되므로, 수지상 세포에 M. 파라투버쿨로시스를 감염시키고 LPS를 처리했을 때 염증성 사이토카인 분비의 변화에 영향을 주는지를 실험하였다. M. 파라투버쿨로시스에 감염된 수지상 세포는 LPS 자극에 의하여 분비되는 염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-6, IL-12, IL-1 β 의 모든 사이토카인을 유의적으로 감소시켰다 (* $P < 0.05$. ** $P < 0.005$).
- [0065] 6. 결론적으로, M. 파라투버쿨로시스는 마우스의 염증성 장질환 모델에서 장관 내 DSS에 의한 염증성 사이토카인의 감소와 급격한 체중 감소를 완화시키고, 염증성 사이토카인의 분비가 가장 왕성한 수지상세포의 활성화를 억제함으로써 염증을 억제하는 우수한 치료 및 예방 백신으로서의 방어적 효과를 나타냄을 확인할 수 있었다.

도면

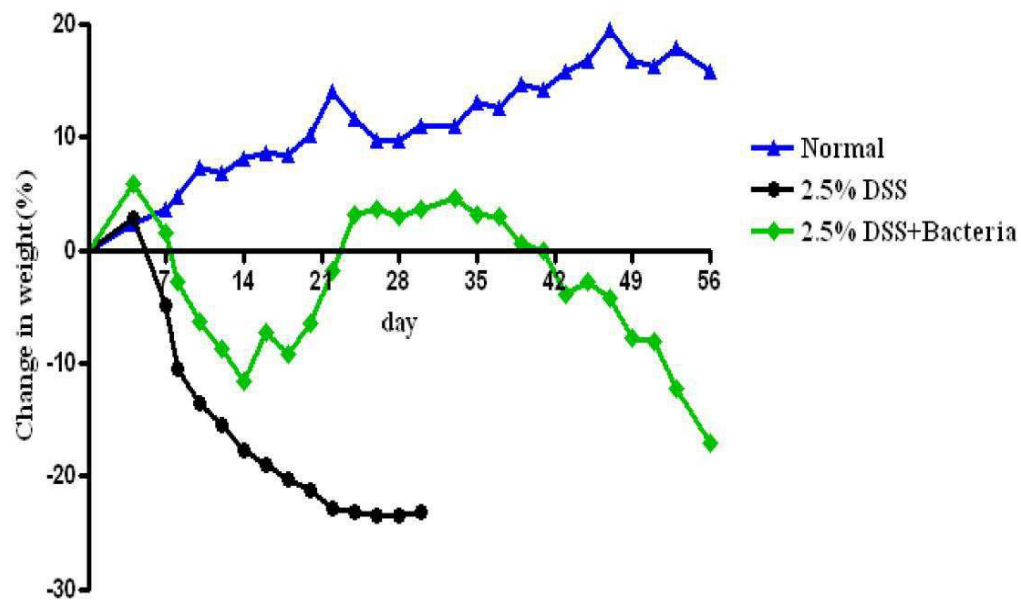
도면1a



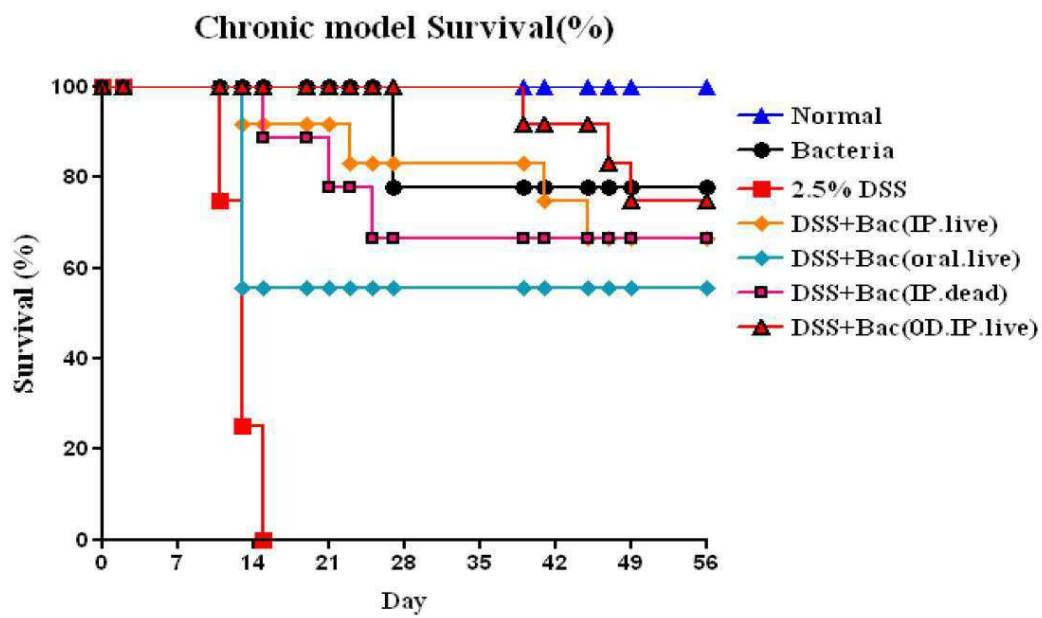
도면1b



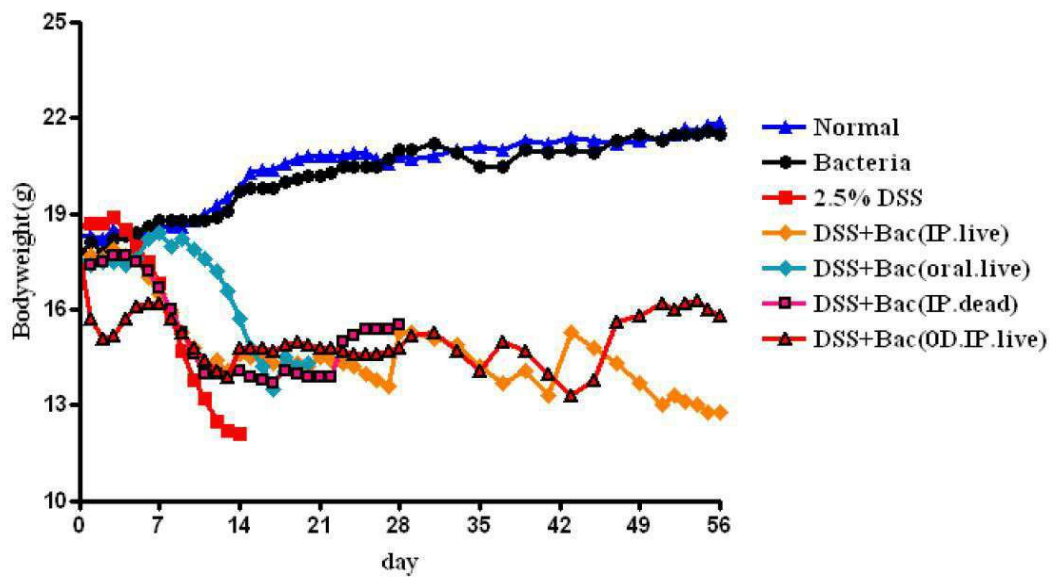
도면1c



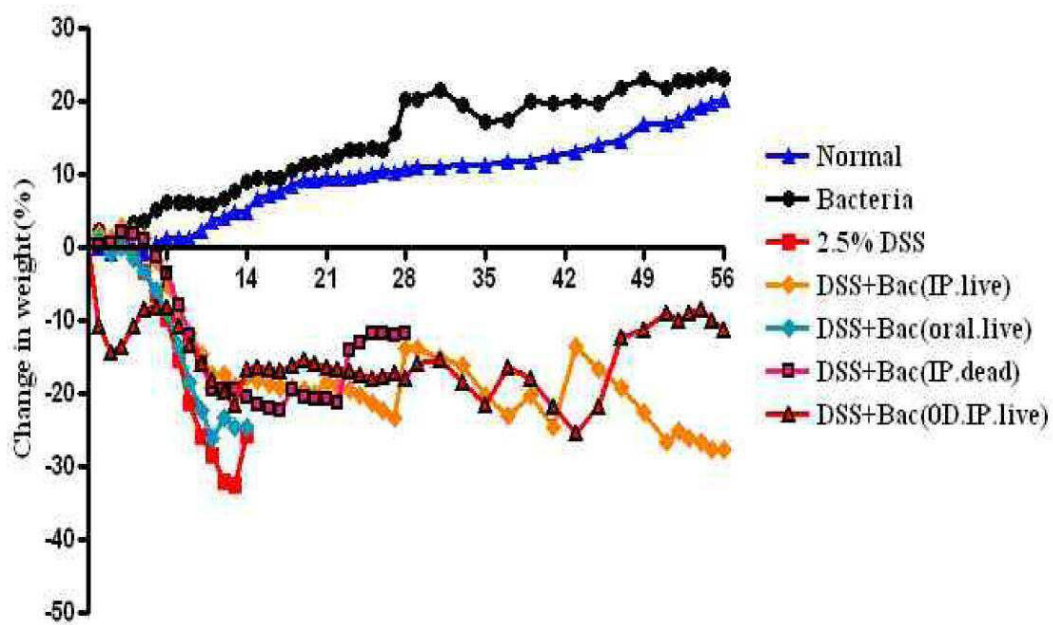
도면2a



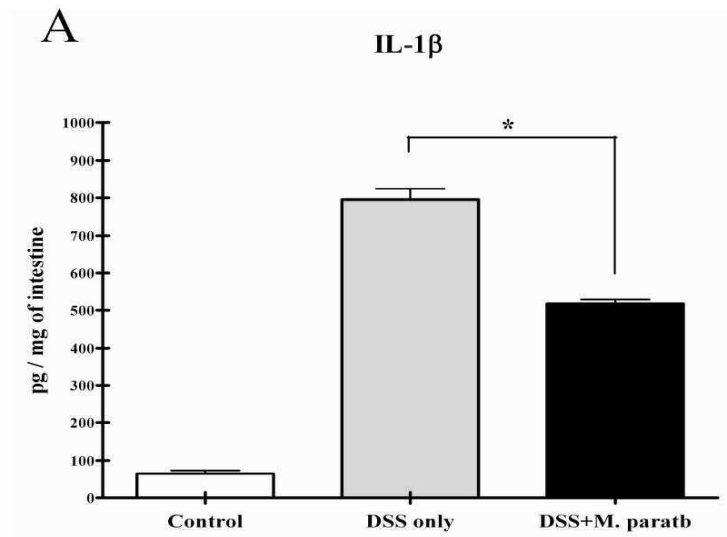
도면2b



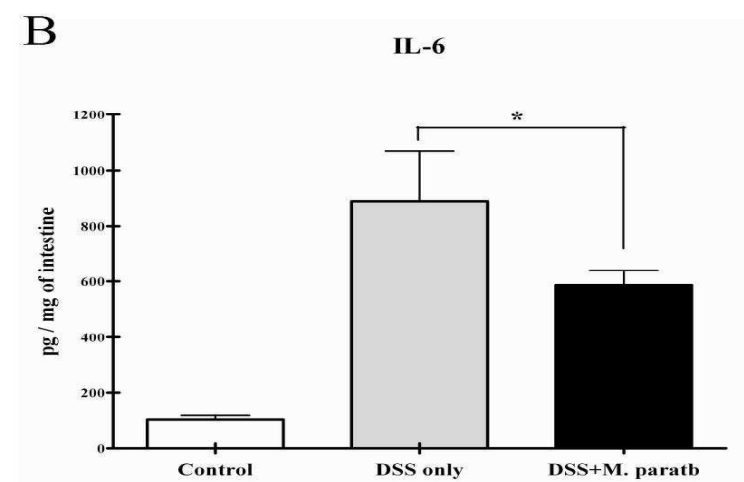
도면2c



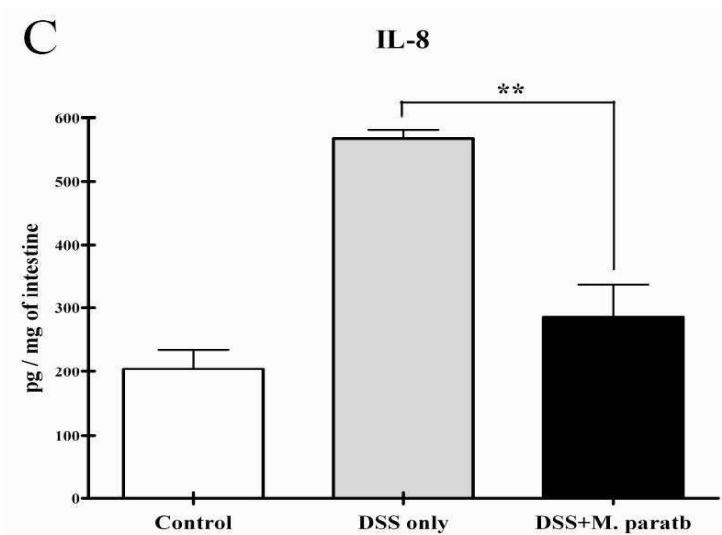
도면3a



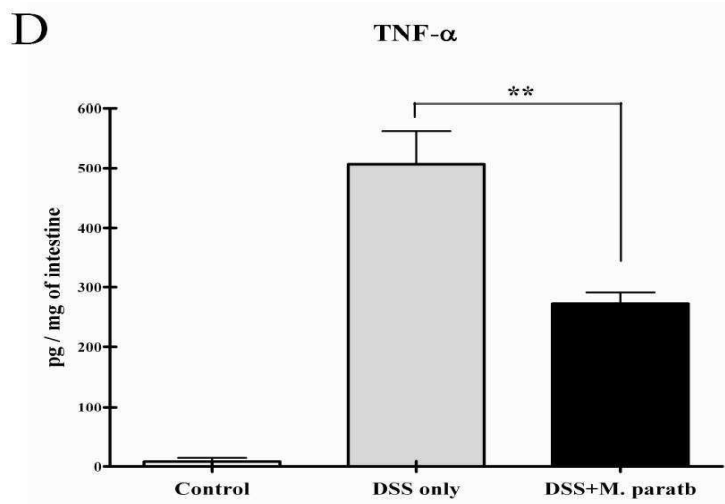
도면3b



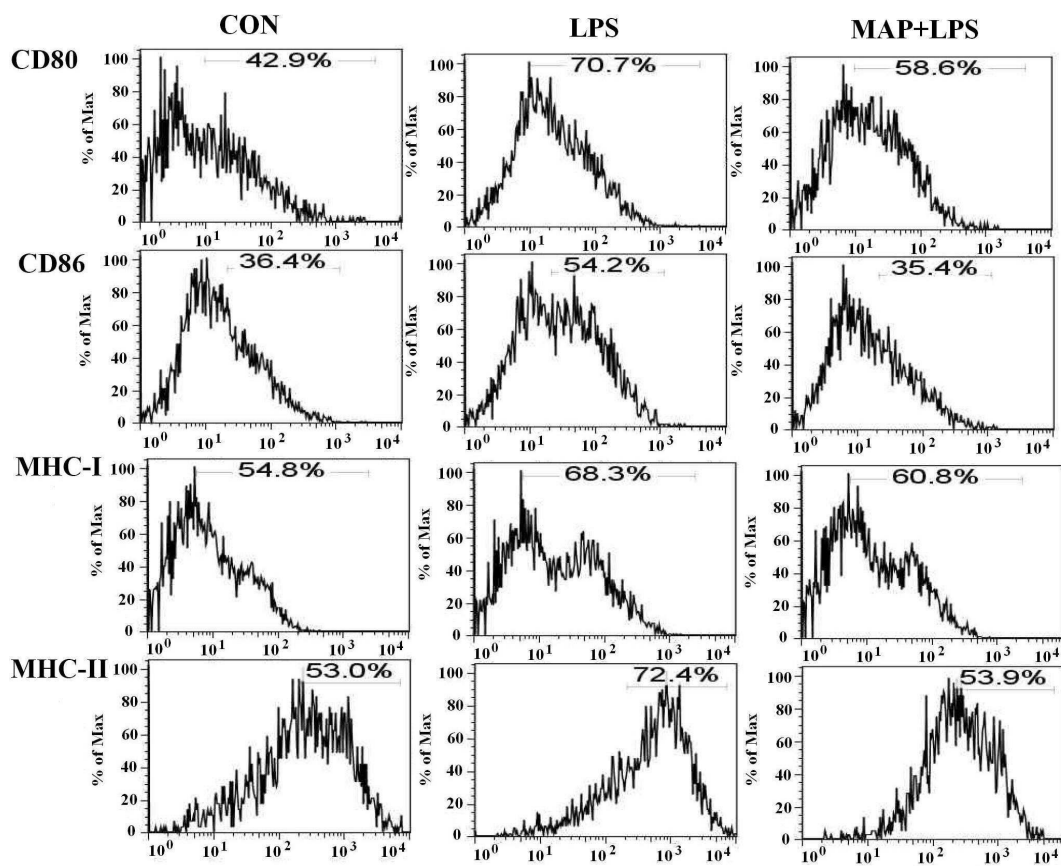
도면3c



도면3d

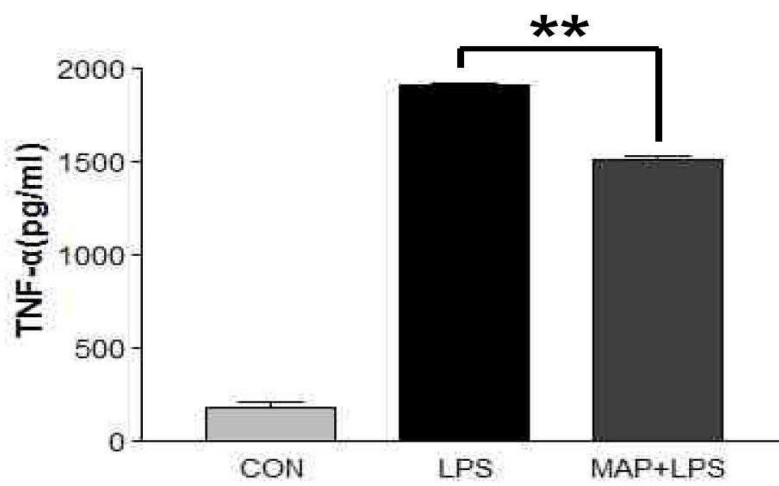


도면4



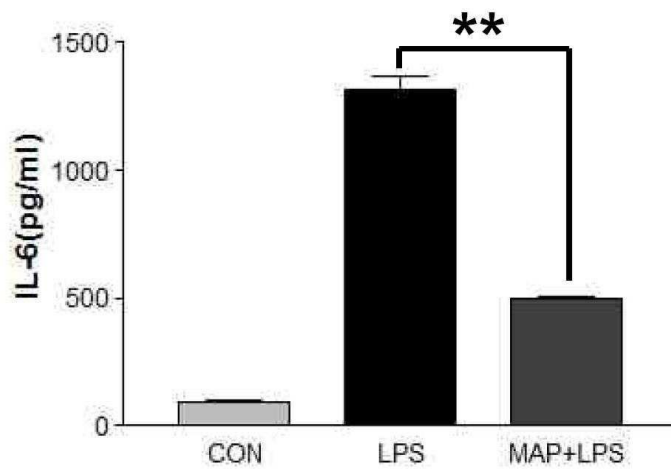
도면5a

A



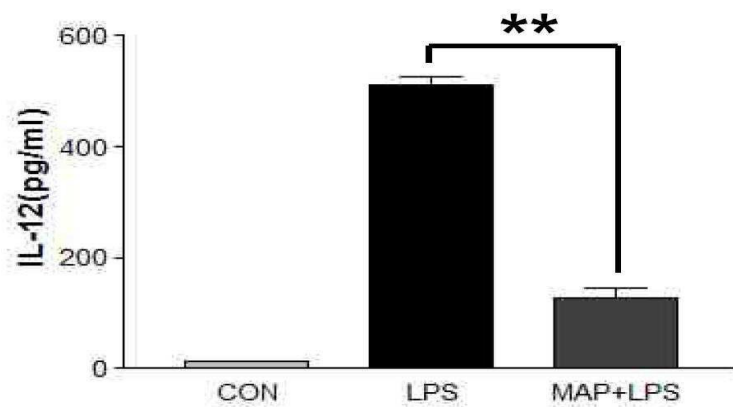
도면5b

B



도면5c

C



도면5d

D

