



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년01월23일
(11) 등록번호 10-0797050
(24) 등록일자 2008년01월16일

(51) Int. Cl.

A61K 35/14 (2006.01) A61K 35/28 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2006-0081512

(22) 출원일자 2006년08월28일

심사청구일자 2006년08월28일

(56) 선행기술조사문헌

Am. J. Respir. Crit. Care Med., vol.161,
pp.1790-1796 (2000)

(73) 특허권자

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내

(72) 발명자

박용근

서울 도봉구 도봉동 한신아파트 122-1304

김정진

서울 서대문구 연희동 69-48 20/1

윤원석

서울 노원구 공릉1동 590-1 현대아파트 101-202

(74) 대리인

양부현, 윤여강, 이문섭

전체 청구항 수 : 총 3 항

심사관 : 한정희

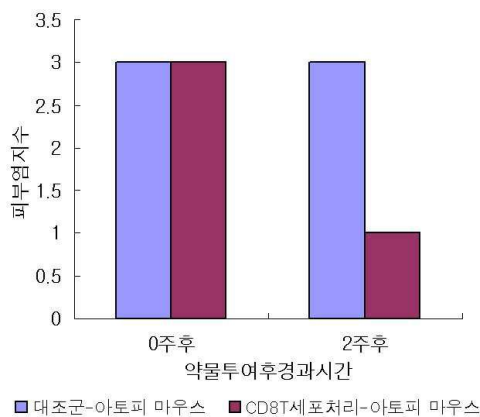
(54) 아토피성 피부염에 치료효과를 갖는 CD8 T 세포

(57) 요약

본 발명은 아토피성 피부염에 대한 치료효과를 보이는 CD8 T 세포의 새로운 용도에 관한 것으로서, 더욱 구체적으로는 CD8 T 세포를 유효성분으로 함유하는 아토피성 피부염 치료용 세포치료제에 관한 것이다.

본 발명이 제공하는 CD8 T 세포치료제는 동물에 주사할 때 체내 사이토카인의 변화를 유도하여 아토피피부염의 억제인자중 하나인 인터루킨12의 발현을 높여주었다. 그리고 이런 체내 면역계의 변화로인하여 아토피 피부염 질환동물의 피부염완화를 유도하였고 아토피성 피부염의 증상인 가려움증 및 피부염증의 증상완화효과를 보여주었다. 따라서, 본 발명의 CD8 T 세포치료제는 난치성 질환으로 적절한 치료제가 부재한 아토피성질환의 치료 및 보조 예방제제로서 의약산업에 매우 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도2c



특허청구의 범위

청구항 1

과립구-마크로파지 콜로니자극인자(GM-CSF), 인터페론-감마(IFN-gamma), 종양괴사인자-알파(TNF-alpha), 렉틴(Lectin), 인터루킨-2(IL-2) 및 인터루킨-4(IL-4)를 첨가한 배지에서 활성화된 CD8 T 세포를 유효성분으로 함유하는 아토피성 피부염 치료용 세포치료제.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 CD8 T 세포는 환자에서 분리된 자가(autologous) 세포인 것을 특징으로 하는 아토피성 피부염 치료용 세포치료제.

청구항 3

CD8 T 세포를 과립구-마크로파지 콜로니자극인자(GM-CSF), 인터페론-감마(IFN-gamma), 종양괴사인자-알파(TNF-alpha), 렉틴(Lectin), 인터루킨-2(IL-2) 및 인터루킨-4(IL-4)를 첨가한 배지에서 활성화시키는 단계를 포함하는 아토피성 피부염 치료 활성을 갖는 CD8 T 세포의 제조방법.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- <4> 본 발명은 아토피성 피부염에 대한 치료효과를 보이는 CD8 T 세포의 새로운 용도에 관한 것으로서, 더욱 구체적으로는 CD8 T 세포를 유효성분으로 함유하는 아토피성 피부염 치료용 세포치료제에 관한 것이다.
- <5> 아토피성 피부염(Atopic dermatitis)은 현대의학기술로도 정확하게 규정지을수 없는 난치성질환으로 면역학적으로 외부의 자극에 대해 체내의 면역계가 과민반응을 유도하여 발생하는 것으로 알려져 있다. 주로 혈액중 IgE의 농도 상승을 지표로하여 과민하게 히스타민(histamine)류의 분비가 가려움증 및 염증을 유도하는 것으로 알려져 있다. 하지만 그 원인이 다양하고 복잡하여 적절한 치료제가 현재 개발되어 있지 않은 상황이다.
- <6> 한편 최근들어 국내외적으로 아토피성 피부염발병이 소아에서 성인에 이르기까지 광범위하게 발생하고 있어 치료제의 개발이 시급하다. 현재는 스테로이드 계열의 아토피성 피부염 억제제가 치료제로 사용되고 있으나 아토피성 피부염의 원천적인 해결방법이 아닌 일시적인 경감효과를 보여주며 동시에 내성이 생기는 부작용이 알려진 바 적절하고 광범위한 치료제개발이 필요하다.
- <7> 본 발명에서는 기존의 화학제제처럼 면역계를 저하하는 물질이 아닌 체내면역세포를 생물학적 치료제제로 사용하였다. 제조된 세포제제를 피하주사하였을때 체내 면역학적 환경을 활성화시켜서 아토피성 피부염의 개선을 유도하는 기술로 체내 면역시스템의 원천적인 변화로 아토피성 피부염의 증상완화 및 해결을 기술적 목표로 한다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

- <8> 따라서, 본 발명의 목적은 아토피성 피부염에 대한 뛰어난 치료효과를 보이는 새로운 세포치료제를 제공하는데 있다.
- <9> 본 발명의 세포치료제는 적절한 치료제가 없는 아토피성 피부질환에 대한 치료제로서 유용하게 이용될 수 있다.

발명의 구성 및 작용

- <10> 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 CD8 T 세포를 유효성분으로 함유하는 아토피성 피부염 치료용 세포치료제를 제공한다.
- <11> 본 발명에 있어서, 상기 CD8 T 세포는 바람직하게는 GM-CSF, IFN-gamma, TNF-alpha, Lectin, IL-2 및 IL-4를 첨가한 배지에서 활성화된 CD8 T 세포인 것을 특징으로 한다.

- <12> 본 발명에 있어서, 상기 CD8 T 세포는 바람직하게는 아토피성 피부염 환자에서 분리된 자가(autologous) 세포인 것을 특징으로 한다.
- <13> T 세포는 면역 반응에 관여하는 세포로, 특정 세포 표면 마커(cell surface marker)를 발현하는 T 세포 집단(population)을 의미한다. 본 발명은 T 세포 집단 중에서 CD8 표면 마커를 가지는 T 세포만을 분리하여 사용하고자 한다. CD8 항원을 가지는 CD8 T 세포에는 Tc 세포(cytotoxic T 세포)가 있다. Tc 세포는 타겟 세포를 용해할 수 있는 세포로, 바이러스 감염된 세포 및 암세포 등을 직접적으로 제거하는 역할을 한다. 또한, CD8 항원을 가지는 CD8 T 세포에는 Ts 세포(suppressor T 세포)가 있다.
- <14> T 세포, 보다 구체적으로 CD8 T 세포는 개체의 단핵세포(mononuclear cell)를 포함하는 다양한 생물학적 시료, 예를 들면 혈액(blood), 혈장(plasma), 림프구(lymph node), 비장(spleen), 흉선(thymus), 골수(bone marrow) 등으로부터 분리될 수 있다.
- <15> T 세포를 분리하는 방법은 특별히 제한되지 않는다. 예를 들어, 세포 밀도(cell density), 세포 표면 에피토프에 대한 항체 친화도, 세포 크기(cell size), 형광 방출(fluorescent emission) 정도에 의존하여 분리할 수 있다. 구체적으로, 알부민(albumin), 덱스트란(dextran), 피콜(Ficoll), 메트라자미드(metrizamid), 퍼콜(Percoll) 등을 이용하는 밀도 구배 원심분리(density gradient centrifugation) 방법이, 항체를 이용하는 방법으로는 MACS(magnetic activated cell sorter) 등의 방법이, 세포 크기를 이용하는 방법으로는 centrifugal elutriation 등의 방법이, 형광을 이용하는 방법으로는 FACS 등의 방법이 있다. 본 발명에서는 단핵세포에서 CD8 T 세포만을 분리하기 위하여, 항-CD8 T 세포 항체를 사용하여 MACS를 실시하였다.
- <16> 분리한 CD8 T 세포는 통상의 방법으로 배양되어 시험관내(in vitro)에서 활성화된다. 배양에 사용되는 배지는 일반적으로 세포의 성장과 생존에 필수적인 영양소를 함유한다. 상기 배지는 다양한 탄소원, 질소원 및 미량원소 성분을 포함한다. 또한, 바람직하게는 혈청을 포함하는 배지다. 구체적으로 DMEM, RPMI 같은 배지를 사용할 수 있다.
- <17> 본 발명에서 용어 “T 세포 활성화”란 면역반응을 담당할 수 있도록 자극을 주는 것을 의미하고, 다양한 신호에 의해 활성화될 수 있다. 본 발명자는 CD8 T 세포 활성화에 상기 GM-CSF, IFN-gamma, TNF-alpha, Lectin, IL-2 및 IL-4의 배합물이 상승적으로(synergistically) 작용함을 확인하였다. 배합물에서 각각의 사이토카인 농도는 바람직하게는, 배지 1ml 당, 0.05 내지 0.2 μ g의 GM-CSF, 0.5 내지 2 μ g의 IFN-gamma, 0.05 내지 0.2 μ g의 TNF-alpha, 40 내지 60 μ g의 Lectin, 0.05 내지 0.2 μ g의 IL-2 및 0.05 내지 0.2 μ g의 IL-4이다.
- <18> 상기 사이토카인 배합물은 CD8 T 세포를 활성화시키는 유효량 내에서, 이를 세포 배양액에 첨가하는 방법, 시기, 첨가 횟수에 특별히 제한되지 않는다. 분리한 CD8 T 세포를 배양과 동시에 첨가할 수도 있고, 세포 배양 후 일정 시간적 간격을 두고 첨가할 수도 있다. 또한, 유효량 내에서 단일 투여할 수도 있고 몇 차례에 걸쳐 다중 첨가할 수도 있다. 또한, 사이토카인 각각이 첨가되는 시기도 조절될 수 있다. 바람직하게는, 모든 사이토카인을 세포 배양과 동시에 단일 처리하는 것이다. 사이토카인을 첨가 후 배지에서 1일 내지 4일 배양하는 것이 바람직하다.
- <19> 상기 CD8 T 세포 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 비경구 투여, 예를 들어, 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 상기 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다. 상기 조성물은 세포 치료에 일반적으로 사용되는 약제학적 담체와 함께 투여될 수 있으며, 이런 담체로 생리학적 식염수를 예로 들 수 있다.
- <20> 본 발명의 CD8 T 세포는 치료학적으로 유효한 양으로 투여한다. 용어 “치료학적으로 유효한 양(therapeutically effective amount)”은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효량은 질병의 중증도, 연령, 성별, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있으며, 예컨대, 성인기준으로 1회 1mg 내지 1000mg의 본 발명의 CD8 T 세포를 투여할 수 있다.
- <21> 본 발명을 위해 CD8 T Cell 을 사용하였다. 이 세포는 체내에서 바이러스에 대한 억제효과를 유도하는데 관여하는 면역세포이다. 이 세포에 대해서 GM-CSF(Sigma, USA), Interferon-gamma(Sigma, USA), TNF-alpha(Sigma, USA), Interleukin-2(Sigma, USA), lectin (Sigma, USA) 등을 처리하여 세포의 활성을 유도하였다.

- <22> 이 세포를 추출한 마우스와 동일 유전자를 가진 마우스에 처리함으로 이 세포는 치료동물군에 있어서 독성이 제기되지 않으며 자가세포치료제 형식의 제제라 할수있다. 본 발명에서 추출배양한 방법은 다음과 같다. 마우스의 비장을 꺼내어 cell grinder로 파쇄한다. 파쇄된 세포를 RPMI 배지 상태에서 1500rpm으로 원심분리후에 RBC lysingbuffer(Sigma,USA) 10ml을 더하여 상온에서 10분간 반응후 1500rpm으로 원심분리후 3회 RPMI 배지 10ml로 교환하여 적혈구를제거한다. 이후 얻어진 단핵면역세포들에 대하여 anti-CD8 T cell antibody 를 사용하여 MACS System 하에서 CD8 T Cell 을 분리한다. 분리된 CD8 T cell 은 10%FBS 를 포함하는 RPMI 배지에 넣어서 48시간 배양하며 이때 싸이토카인을 첨가한다.
- <23> 첨가되는 사이토카인의 양은 다음과 같다. (RPMI 배지 1ml 당 GM-CSF 0.1ug, IFN-gamma 1ug, TNF-alpha 0.1ug, Lectin 50ug, IL-2 0.1ug, IL-4 0.1ug의 사이토카인을 첨가하였다.) 배지로부터 세포를 수득하여 이를 PBS 에 현탁하여 10^6 Cell 을 마우스 치료제로 마리당 피하로 투여한다.
- <24> 본 발명에서 제조된 CD8 T Cell 은 아토피피부염질환동물모델의 피부염증상을 완화 시켜주어 병증을 치료하는것으로 확인되었다. 이는 위 세포치료제가 아토피 피부염에 대한 치료효과를 발생할수있음을 보여준다.
- <25> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.
- <26> **실시예 1: 아토피성 피부염을 억제하기 위한 CD8 T Cell의 제조**
- <27> 마우스(BALB/c, SLC Japan)의 비장을 꺼내어 cell grinder로 파쇄하였다. 파쇄된 세포를 RPMI 배지 상태에서 1500rpm으로 원심분리한 뒤, RBC lysing buffer(Sigma,USA) 10ml을 더하여 상온에서 10분간 반응시켰다. 1500rpm으로 원심분리 후 RPMI 배지 10ml로 3회 교환하여 적혈구를 제거하였다. 얻어진 단핵면역세포에서 항-CD8 T 세포 항체를 사용하여 MACS 방법(Miltenyi Biotec, Germany)을 이용하여 CD8 T 세포를 분리하였다. 분리된 CD8 T 세포를 사이토카인 및 10% FBS를 포함하는 RPMI 배지에 넣어서 48시간 배양하였다.
- <28> 첨가되는 사이토카인의 양은 배지 1ml 당 GM-CSF 0.1 μ g, IFN-gamma 1 μ g, TNF-alpha 0.1 μ g, Lectin 50 μ g, IL-2 0.1 μ g, IL-4 0.1 μ g이 되도록 하였다. 배양된 세포를 수집하여 이를 PBS에 현탁하여 세포치료제로 사용하였다. 도 1은 아토피 피부염치료를 위해 사용하는 CD8 T 세포를 제작하는 과정의 모식도이다.
- <29> **실시예 2: 본 발명의 세포치료제의 아토피성 피부염 억제효과 확인**
- <30> 1) 동물모델에서 화학적 피부염 조성법
- <31> 5-6주령이된 Nc/Nga 마우스(SLC. Japan)의 등부위를 제모한후에 피부의 미세 상처가 치유되도록 24시간 방치하였다. 이후 아세톤과 올리브오일이 3:1로 혼합되어있는 용액에 1% DNCB(Sigma, USA)가 혼합된 반응액을 준비하여 혼합액 200ul 를 등부위에 도포하였다. 4일후부터 1주일예 2-3번씩 0.2% DNCB용액 150ul 를 등 부위에 도포하였다. 4-5주 처리후에 피부염이 유발되었고 이 상태에서 10^6 의 CD8T 세포가 포함된 PBS용액 100ul 를 피하주사하고 증상의 변화를 관찰하였다.
- <32> 2) 세포치료제의 투여에 의한 사이토카인의 발현변화
- <33> 본 발명의 세포치료제를 투여후 2주후 비장세포를 분리하여 10^5 의 비장세포에 대해 PHA를 첨가하여 10% FBS가 첨가된 RPMI 세포배양배지하에서 2일간 배양후에 배지내에 발현된 사이토카인의 변화를 ELISA실험법을 통해서 확인하였다.
- <34> 도 2a는 CD8T 세포를 처리한 피부염 쥐에서의 아토피관련 사이토카인의 발현양상을 비교하여 보여주었다. 도 2a의 결과를 통해 CD8 T 세포를 투여한 마우스의 실험군에서는 마우스의 체내에 인터루킨 12(IL-12)의 발현이 세포를 처리하지 않은 마우스보다 증가되어있는 것으로 확인할수 있었다. 이사실은 인터루킨 12 사이토카인이 체내에 항아토피반응에 관련되었다고 보고된 자료와관련하여 의미 있는 결과로 해석되며 이런 증후를 통해 세포에 의해 질환마우스의 면역계의 변화가 유도되어 아토피 피부염증상의 완화가 유도되는 것으로 추정할수 있었다.
- <35> 3) 마우스에서 세포치료제 투여로 인한 피부염의 증상완화
- <36> 또한, 본 발명의 세포치료제를 투여후 2주후 피부염의 양상을 Nc/Nga 마우스 피부염의 임상적인 육안 평가법을 이용하여 관능평가를 하였다.
- <37> 도 2b는 CD8 T 세포를 투여한후에 대조군(세포를 처리하지 않은 질환마우스)에 비하여 스크래치(가려움으로 인

해 급는것)의 정도를 핫수로 비교하여 표현한 것이다. 결과를 통해 CD8T T세포를 처리한 마우스에 있어서 가려움증의 정도가 현격하게 나아지는것을 확인할수 있었다.

<38> 도 2c는 CD8 T 세포를 투여한후에 대조군(세포를 처리하지 않은 질환마우스)에 비하여 CD8T 세포를 처리한 마우스의 피부의 상태를 나타낸 지수(Dermatitis score)를 보여준 도면이다. 0-3.5 까지 관찰에 의한 피부염정도를 측정한결과 CD8 T 세포를 투여한 마우스에 피부염정도의 완화가 상당히 유도됨을 확인할수 있었다.

<39> 도 3에서는 CD8 T 세포를 처리한 쥐에서의 피부염 완화증상을 관찰한 도면을 비교하여 제시하였다. (A) 대조군 아토피마우스, (B) CD8T 세포처리 아토피마우스. 그림과 같이 피부염의 정도가 외관상으로 뚜렷하게 구분되어 증상의 완화를 CD8T 세포를 투여한 질환마우스에서 확인할수 있었다.

발명의 효과

<40> 이상 상기 실시예를 통하여 명백히 알 수 있는 바와 같이, 본 발명이 제공하는 CD8 T 세포치료제는 동물에 주사할 때 체내 사이토카인의 변화를 유도하여 아토피피부염의 억제인자중 하나인 인터루킨12의 발현을 높여주었다. 그리고 이런 체내 면역계의 변화로인하여 아토피 피부염 질환동물의 피부염완화를 유도하였고 아토피성 피부염의 증상인 가려움증 및 피부염증의 증상완화효과를 보여주었다. 따라서, 본 발명의 CD8 T 세포치료제는 난치성 질환으로 적절한 치료제가 부재한 아토피성질환의 치료 및 보조 예방제제로서 의약산업에 매우 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

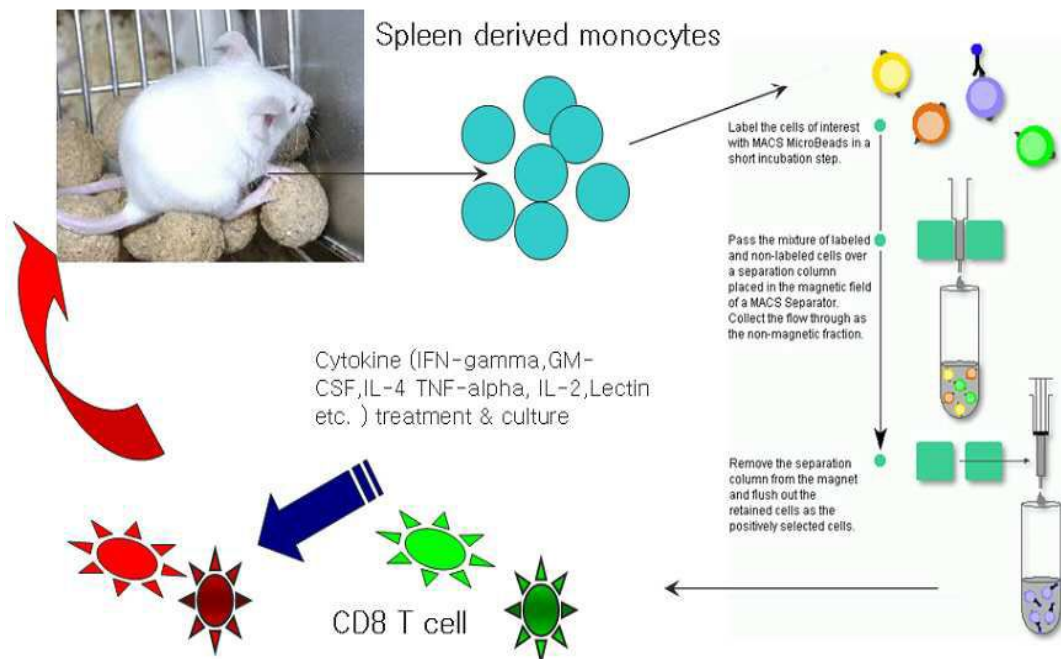
<1> 도 1은 아토피 피부염에 치료효과를 보이는 CD8 T Cell 을 분리해서 배양하는 모식도이다.

<2> 도 2는 아토피성 피부염을 유도한 마우스에 있어서 피부염증상을 나타내는 지표의 완화를 보여주는 도면이다.

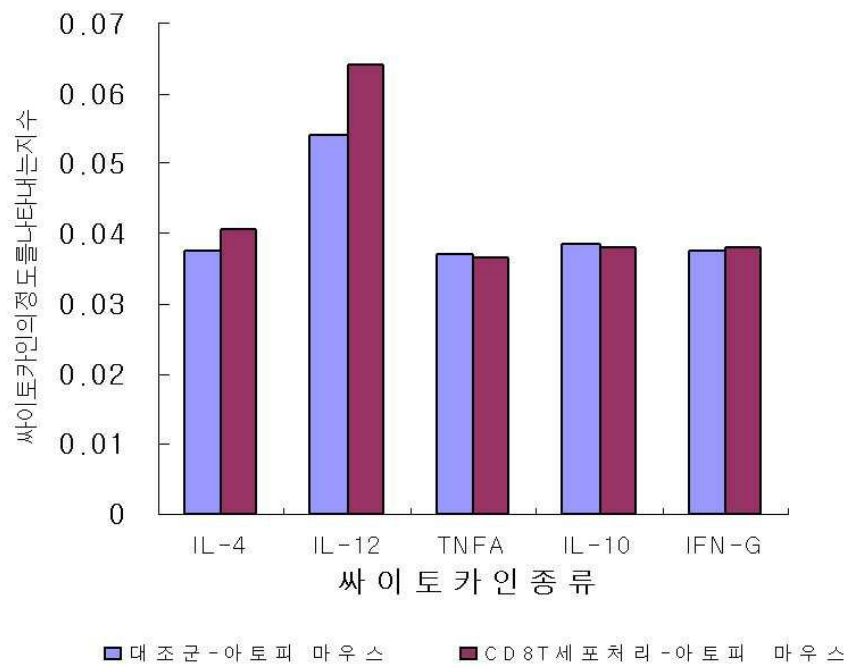
<3> 도 3은 아토피성 피부염을 유도한 마우스에 있어서 피부의 염증의 완화를 보여주는 도면이다.

도면

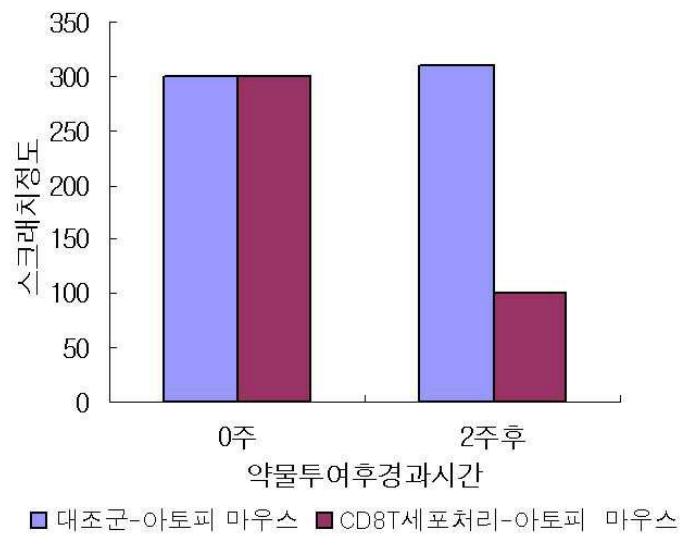
도면1



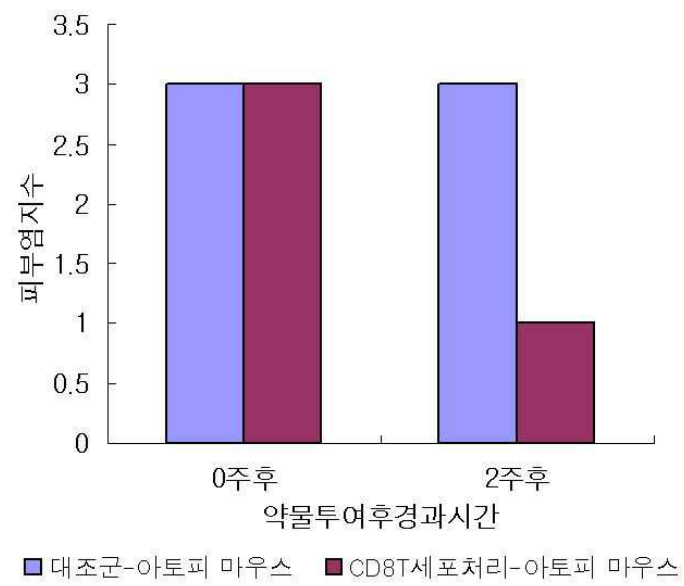
도면2a



도면2b



도면2c



도면3a



도면3b

