

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2012-0025942 (43) 공개일자 2012년03월16일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12N 5/0783 (2010.01) C12N 5/02 (2006.01) C07K 14/775 (2006.01) C07K 14/55 (2006.01)		(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울 성북구 안암동5가 1
(21) 출원번호	10-2010-0088148	(72) 발명자
(22) 출원일자	2010년09월08일	이경미
심사청구일자	2010년09월08일	서울특별시 서초구 서초1동 극동 디아망아파트 101-904
		손정희
		서울특별시 노원구 동일로177길 14, 303호 (공릉동)
		(뒷면에 계속)
		(74) 대리인
		이문섭

전체 청구항 수 : 총 8 항

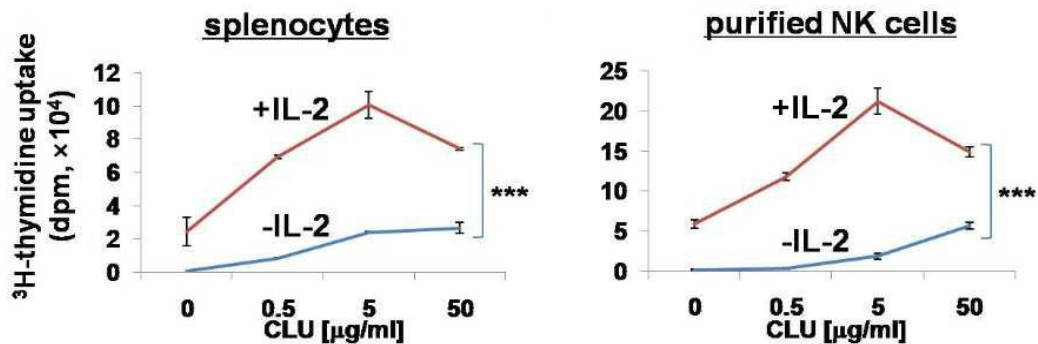
(54) 발명의 명칭 클러스테린을 포함하는 자연살상 세포 증식 촉진용 조성물

(57) 요약

본 발명은 클러스테린을 포함하는 자연살상 세포 증식 촉진용 조성물에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 사람의 혈액에서 정제한 클러스테린을 유효성분으로 포함하는 자연살상 세포의 증식을 촉진시키기 위한 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 클러스테린은 자연살상 세포 배양 시 배양 배지에 첨가되어 자연살상 세포의 증식에 효과가 있으며, 클러스테린과 IL-2를 함께 자연살상 세포에 처리하는 경우 클러스테린 또는 IL-2 단독 처리하는 경우에 비하여 현저히 상승된 자연살상 세포 증식효과를 나타낸다.

대표도 - 도1a



(72) 발명자

민본홍

경기도 용인시 수지구 이종무로170번길 11 (고기동)

심영준

경기도 의정부시 평화로150번길 26, 현대아이파크 206동 502호 (호원동)

홍영주

경기도 안산시 상록구 건건동 아이비스

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	A06226009221100101
부처명	보건복지부
연구사업명	보건의료기술개발사업
연구과제명	조절 T 림프구 활성 억제제를 통한 종양면역 치료의 확립
주관기관	고려대학교 산학협력단
연구기간	2009.12.01 ~ 2010.11.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	20100017421
부처명	교육과학기술부
연구사업명	원자력연구개발사업
연구과제명	저준위 방사선의 면역세포에 대한 영향 연구를 통한 장수인자 발굴
주관기관	고려대학교 산학협력단
연구기간	2010.04.01 ~ 2011.03.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	K2070400000709A050000710
부처명	교육과학기술부
연구사업명	글로벌연구실사업
연구과제명	종양 및 장기이식모델에서 자연 살상세포와 조절 T세포의 면역 방어/조절 연구를 통한 세포치료기술의 확립
주관기관	고려대학교 산학협력단
연구기간	2009.09.01 ~ 2010.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	K2060100000209E010000210
부처명	교육과학기술부
연구사업명	해외우수연구기관유치사업
연구과제명	바텔연구소 유치활용을 통한 급성 호흡기 감염 및 중증 패혈증 조기진단용 나노바이오 시스템 개발
주관기관	고려대학교 산학협력단
연구기간	2009.07.01 ~ 2010.06.30

특허청구의 범위

청구항 1

클러스테린(clusterin)을 유효성분으로 포함하는 자연살상 세포 증식 촉진용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 클러스테린은 혈청으로부터 분리된 것을 특징으로 하는 자연살상 세포 증식 촉진용 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 조성물은 인터루킨-2(interleukin-2)를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 자연살상 세포 증식 촉진용 조성물.

청구항 4

클러스테린(clusterin)을 포함하는 자연살상 세포 증식용 배지 조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 클러스테린은 0.5 내지 100 $\mu\text{g/ml}$ 로 포함되는 것을 특징으로 하는 배지 조성물.

청구항 6

제 4항에 있어서, 상기 배지 조성물은 인터루킨-2(interleukin-2)를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 배지 조성물.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 배지조성물은 1 내지 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 클러스테린, 및 10 내지 600 U/ml의 인터루킨-2를 포함하는 것을 특징으로 하는 배지 조성물.

청구항 8

클러스테린(clusterin)과 인터루킨-2(interleukin-2)를 자연살상 세포에 처리하는 것을 포함하는 자연살상 세포의 증식방법.

명세서

기술분야

본 발명은 클러스테린을 포함하는 자연살상 세포 증식 촉진용 조성물에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 사람의 혈액에서 정제한 클러스테린을 유효성분으로 포함하는 자연살상 세포의 증식을 촉진시키기 위한 조성물에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0002] 클러스테린(Clusterin, CLU)은 아포지단백질 J(apolipoprotein J)로 알려져 있으며, 광범위한 조직 등에서 널리 발현하고 있는 당단백질이다. CLU는 1983년도 세포 응집(cell aggregation)을 높여주는 물질로서 처음 밝혀졌다. 지금까지 알려진 CLU의 기능은 지방 수송(lipid transportation), 보체 저해(complement inhibition), 조직 재형성(tissue remodeling), 세포-세포 상호작용, 세포-기층 상호작용(cell-substratum interaction), 아포토시스(apoptosis) 촉진 및 억제 등의 기능이 밝혀졌다. 게다가 CLU는 발암(carcinogenesis)과 종양형성(tumor formation)을 촉진시킨다고 알려져 있고, 암 바이오마커(cancer biomarker)로도 알려져 있어서 성장조절물질(growth regulator)로서 그 기능이 있음을 알 수 있다.
- [0003] 최근에는 CLU가 염증(inflammation)과 면역(immunity)에 역할을 한다고 보고되었다. MAC(membrane attack complex)와 복합체(complex)를 이루면서 보체 공격(complement attack)에 의한 손상(damage)으로부터 조직을 보호할 수 있다. CLU가 사구체 신염(glomerulonephritis)을 앓고 있는 환자의 신장 사구체(renal glomeruli)에서 발견되며, 루푸스-유사 신염(lupus-like nephritis)에서 CLU mRNA 발현이 증가하는 등 염증 등에 의한 조직 손상(tissue damage)을 방어하는 기작으로서 기능을 하는 것으로 생각된다.
- [0004] 자연면역계에 속하는 자연살상(natural killer, NK) 세포는 감염이나 암세포에 대한 체내 1차 방어선으로서, 혈액 내 순환하고 있는 림프구이다. 분비성 전염증 사이토카인(secretory proinflammatory cytokines)과 세포독성(cytotoxicity)을 자극함으로써 자연살상 세포는 체내에 있는 감염된 세포나 전이된 세포를 제거한다.
- [0005] 자연살상 세포는 병원체(pathogen)를 인식함과 동시에 즉각적으로 활성화되기도 하며, 대식세포(macrophage)와 수지상세포(dendritic cell)가 내는 인터루킨 12(interleukin 12)와 인터루킨 18(interleukin 18)에 의해서 활성화되기도 한다. 홍미류계도, 미성숙 수지상 세포에서 성숙되면서 CLU의 발현량은 30배 이상 증가한다. 또한 사람 혈청 안에 있는 CLU의 농도도 염증 동안 발현이 크게 증가한다.
- [0006] 이렇게 증가된 CLU는 혈액 내 순환하고 있는 림프구와의 접촉이 빈번해지며, 따라서 이러한 접촉이 혈액 내 순환하고 있는 림프구로 하여금 수적 증가를 가져와 보다 효과적으로 외부 항원에 대항할 수 있는 세포의 수를 늘릴 수 있게 된다.
- [0007] 이에, 본 발명자들은 CLU의 알려진 기능들 이외에도 자연살상 세포의 증식에 영향을 미칠 수 있는지 연구하던 중 자연살상 세포의 증식에 효과가 있음을 확인하였고, 뿐만 아니라 자연살상 세포 활성화 및 증식에 효과가 있는 것으로 알려진 IL-2와 함께 자연살상 세포에 처리 시 현저히 상승된 자연살상 세포 증식 효과를 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 따라서, 본 발명의 주된 목적은 자연살상 세포의 증식에 효과가 있는 클러스테린을 유효성분으로 포함하는 자연살상 세포 증식 촉진용 조성물을 제공하는 데 있다.
- [0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 클러스테린과 IL-2를 유효성분으로 포함하는 자연살상 세포 증식 촉진용 조성물을 제공하는 데 있다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 클러스테린을 포함하는 자연살상 세포 증식용 배지 조성물을 제공하는 데 있다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 클러스테린과 IL-2를 포함하는 자연살상 세포 증식용 배지 조성물을 제공하는 데 있다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 클러스테린과 IL-2를 자연살상 세포에 처리하는 것을 포함하는 자연살상 세포의 증식 방법을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

- [0013] 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 클러스테린(clusterin)을 포함하는 자연살상 세포 증식 촉진용 배지 조성물을 제공한다.
- [0014] 본 발명에서 용어 “자연살상 세포 증식”이란 순수 분리된 자연살상(Natural killer) 세포를 생체내(in vivo) 또는 생체외(in vitro)에서 자연살상 세포의 수를 증가시키는 과정을 의미하는 것으로, 용어 “자연살상 세포 증식 촉진”이란 클러스테린을 처리하지 않은 대조군에 비해 클러스테린을 처리하였을 때 자연살상 세포 증식능이 증가하는 것을 의미한다.
- [0015] 본 발명의 조성물에 포함되는 클러스테린은 다양한 조직에서 발현되는 것으로 알려져 있으며, 주로 혈액내 존재하는 단백질로 더 잘 알려져 있다. 상기 클러스테린은 상업적으로 정제된 제품을 입수하여 사용할 수 있으나, 본 발명에서는 혈청으로부터 직접 분리한 것을 사용하였다.
- [0016] 본 발명의 자연살상 세포 증식 촉진용 배지 조성물에서, 클러스테린(clusterin)과 함께 인터루킨-2(interleukin-2, 이하 ‘IL-2’)를 더 포함하는 것을 특징으로 한다. 상기 IL-2는 본 발명의 클러스테린과 함께 자연살상 세포에 처리하는 경우 클러스테린 또는 IL-2를 단독으로 처리하는 것보다 자연살상 세포 증식에서 현저한 시너지 효과를 얻을 수 있다.
- [0017] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 클러스테린(clusterin)을 포함하는 자연살상 세포 증식용 배지 조성물을 제공한다.
- [0018] 본 발명의 자연살상 세포 증식용 배지 조성물에서, 상기 클러스테린은 0.5 내지 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 포함되는 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 5 내지 50 $\mu\text{g/ml}$ 로 포함할 수 있다.
- [0019] 본 발명의 실시예에서는, 클러스테린의 농도에 따른 자연살상 세포의 증식 속도를 측정하였으며, 그 결과 상기 범위에서 클러스테린의 첨가량에 따라 자연살상 세포의 증식이 유의하게 증가함을 확인하였다 (도 1a 참조).
- [0020] 본 발명의 배지 조성물은 클러스테린을 통상적인 자연살상 세포 배양에 이용되는 기본 배지에 첨가시켜 이용할 수 있다. 본 발명에서 “기본 배지”는 사용 목적에 따라 차이가 있으나 무기염류, 탄소원, 아미노산, 소 혈청 알부민(BSA) 및 보조인자 등을 기본적으로 포함하는 동물세포 배양용 배지로서, 당업자들에게 잘 알려진 일반적인 배지를 모두 포함할 수 있다. 특히 바람직하게, 상기 배지는 무기염류로서 NaCl, KCl 및 NaHCO_3 등을 포함하고, 탄소원으로서 글루코즈, 나트륨 피루베이트 및 젖산칼슘염 등을 포함하며, 아미노산으로서 글루타민을 비롯한 필수아미노산 및 비필수아미노산을 포함하며, 보조인자로서 기타 미량원소 및 완충액 등을 포함할 수 있다. 더욱 바람직하게는, 상기 배지는 또한 항생제를 포함할 수 있다. 바람직한 실시예로서 상기 기본 배지로는 동물 세포 배양용으로 공지되어 상업화된 여러 배지, 예를 들어, DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium), EDM(Endothelial differentiation medium), MEM(Minimal Essential Medium), BME(Basal Medium Eagle), RPMI 1640, F-10, F-12, α -MEM(α -Minimal Essential Medium), G-MEM(Glasgow's Minimal Essential Medium) 및 Iscove's Modified Dulbecco's Medium 등을 그대로 사용할 수 있으며, RPMI 1640을 사용하는 것이 바람직하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0021] 본 발명에 있어서, 상기 자연살상 세포 증식용 배지 조성물은 클러스테린(clusterin)과 함께 인터루킨-2(IL-2)를 더 포함하는 것이 바람직하다.
- [0022] 상기 IL-2는 자연살상 세포의 활성화 및 증식 효과가 있는 것으로 알려진 면역 사이토카인으로서, 본 발명의 클러스테린과 함께 자연살상 세포 배양용 배지에 첨가하는 경우 클러스테린 또는 IL-2를 단독으로 첨가하는 것보다 자연살상 세포 증식에서 현저한 시너지 효과를 얻을 수 있다.
- [0023] 본 발명에 따른 클러스테린과 IL-2를 포함하는 자연살상 세포 증식용 배지 조성물은, 1 내지 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 클러스테린 및 10 내지 600 U/ml의 IL-2를 포함하는 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 5 $\mu\text{g/ml}$ 의 클러스테린 및 100 U/ml의 IL-2를 포함할 수 있다.
- [0024] 본 발명의 실시예에서, 상기 자연살상 세포 증식용 배지 조성물에 포함되는 클러스테린 및 IL-2의 최적 농도를 실험하였으며, 그 결과 5 $\mu\text{g/ml}$ 의 클러스테린 및 100 U/ml의 IL-2에서 최적의 자연살상 세포 증식 효과를 나타내었다 (도 1b 참조).
- [0025] 본 발명에서는, 클러스테린과 IL-2를 자연살상 세포 배양용 배지에 첨가하는 경우 각각을 단독으로 첨가한 경우에 비하여 자연살상 세포의 증식에서 현저한 상승적 효과를 확인하였다 (도 2a 참조).
- [0026] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 클러스테린(clusterin)과 인터루킨-2(interleukin-2)를 자연살상 세

포에 처리하는 것을 포함하는 자연살상 세포의 증식방법을 제공한다.

[0027] 상기 “자연살상 세포에 처리”는 자연살상 세포를 포함하는 조직, 혈액, 혈청 등으로 직접 투여하거나 in vitro 상에서 순수 분리된 자연살상 세포를 배양 전 또는 배양 중에 배양용 배지에 첨가하는 것을 포함한다. 상기 클러스테린(clusterin)과 인터루킨-2(interleukin-2)를 자연살상 세포에 처리함으로써 클러스테린 또는 IL-2에 의한 자연살상 세포 증식 효과 보다 현저히 증가된 증식 효과를 얻을 수 있다.

발명의 효과

[0028] 이상 설명한 바와 같이, 본 발명에 따르면 클러스테린은 자연살상 세포 배양 시 배양 배지에 첨가되어 자연살상 세포의 증식에 효과가 있다. 뿐만 아니라 클러스테린과 IL-2를 함께 자연살상 세포에 처리하게 되면, 클러스테린 또는 IL-2 단독 처리하는 경우에 비하여 현저히 상승된 자연살상 세포 증식효과를 나타낸다.

도면의 간단한 설명

[0029] 도 1a는 CLU를 전체 비장세포와 순수분리된 자연살상 세포에 처리한 후 세포증식 효과를 나타낸 결과이다. 인터루킨 2(IL-2)의 농도는 suboptimal한 조건으로 하고 CLU의 농도는 각각 0, 0.5, 5, 50 $\mu\text{g/ml}$ 로 하였다.

도 1b는 CLU와 IL-2 단독, CLU + IL-2를 각각 전체 비장세포와 순수분리된 자연살상 세포에 처리한 후 세포증식 효과를 나타낸 결과이다.

도 2a는 형광물질(CFSE)로 세포를 표지한 후, IL-2 단독, 및 CLU + IL-2 동시에 처리하면서 2~6일째에 날짜별로 세포의 증식 분열을 FACScalibur 기기를 이용하여 측정한 결과이다.

도 2b는 6일 동안 배양한 후, IL-2와 CLU 단독, 및 IL-2 + CLU 그룹의 세포수를 측정한 결과이다.

도 3은 순수 분리된 자연살상 세포에서 IL-2의 농도 변화에 따른 IL-2 + CLU의 시너지 효과를 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] 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.

[0031] 실시예 1. 클러스테린의 정제

[0032] 클러스테린(Clusterin, CLU)은 정상인의 혈청으로부터 분리하였다. 사람 혈청은 12-23%의 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol; PEG, molecular weight 3350, Sigma)을 이용해서 4℃에서 밤새동안 침전시켜서, diethylamino ethanol (DEAE)-Sepharose와 heparin-Sepharose column chromatography를 사용하였으며, CLU-positive fraction은 CLU 단일항체(1G8)-affinity chromatography column으로 분리하였다. 분리정제된 단백질을 PBS 완충용액으로 투석한 후, -80℃에 보관하여 사용하였다.

[0033] 실시예 2. Carboxyfluorescein succinimidyl ester(CFSE) dilution assay

[0034] 자연살상 세포의 증식을 조사하기 위하여, CFSE dividing 방법을 사용하였다. CFSE dilution은 세포내 단백질을 형광물질로 표지한 후 세포 분열(핵 분열 및 세포질 분열) 시 형광 표지된 단백질들이 절반으로 나뉘어져 모세포가 딸세포 2개로 나누어지는 것을 측정함으로써 세포증식을 확인할 수 있는 방법이다.

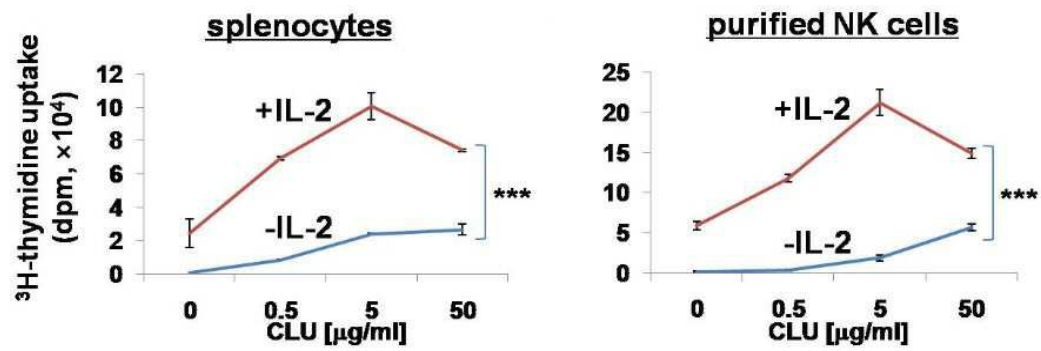
[0035] 신선하게 분리한 자연살상 세포를 5 μM CFSE로 37℃에서 10분간 반응시키고, PBS 완충용액으로 3번 세척한 후, CFSE-표지된 자연살상 세포를 IL-2 (100 U/ml), CLU (5 $\mu\text{g/ml}$), 및 IL-2 + CLU를 각각 처리한 후, 일별로 수확하여, FACScalibur를 이용하여 형광의 세기를 측정하였다.

[0036] 실시예 3. ^3H -thymidine uptake assay

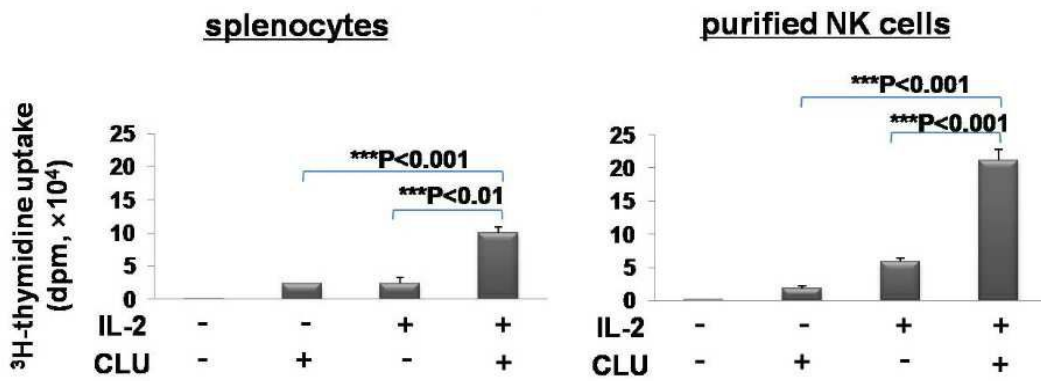
- [0037] 살아있는 세포의 수는 트립판 블루 배제(Trypan Blue exclusion) 방법으로 측정하였다. 전체 비장세포와 순수분리된 자연살상 세포의 증식효과를 분석하기 위해, 전체 비장세포와 순수분리된 자연살상 세포를 RPMI 1640 배지가 있는 96웰 플레이트에서 특정 농도의 IL-2, 및 IL-2 + CLU를 처리하고 3일간 배양한 후, 1 μ Ci의 ³H-thymidine을 각 웰에 처리하고 18시간 더 배양한 후, 세포수집기(cell harvester)를 이용하여 세포를 필터 페이퍼(filter paper)로 수집한 후, 방사능(radioactivity)을 측정하였다.
- [0038] **실험결과 1. CLU의 세포증식 및 시너지 효과**
- [0039] 실시예 1에서 정제한 CLU를 전체 비장세포와 순수분리된 자연살상 세포에 처리하여 세포증식 효과 분석하였다.
- [0040] 도 1a는 CLU를 전체 비장세포와 순수분리된 자연살상 세포에 처리한 후 세포증식 효과를 나타낸 결과이다. 인터루킨 2(IL-2)의 농도는 100 U/ml의 suboptimal한 조건으로 하고 CLU의 농도는 각각 0, 0.5, 5, 50 μ g/ml로 하였다.
- [0041] 도 1a에서, CLU 단독 처리 조건에서 CLU의 처리 농도에 따라 자연살상 세포의 증식 속도가 유의하게 증가하였으며, 50 μ g/ml의 농도에서 가장 높은 세포 증식을 보였다. 또한 CLU와 IL-2 단독 보다 CLU + IL-2 처리 조건에서 전체 비장세포와 순수분리된 자연살상 세포의 증식 속도가 현저하게 증가하였다. 특히 CLU + IL-2 처리 조건에서 5 μ g/ml의 CLU 농도에서 가장 높은 증식 속도를 보였으며 50 μ g/ml의 CLU 농도에서는 오히려 감소하는 결과를 나타내었다.
- [0042] 따라서 자연살상 세포에 CLU를 처리함으로써 자연살상 세포의 증식을 유도할 수 있을 뿐만 아니라, CLU와 IL-2를 동시 처리함으로써 자연살상 세포의 증식을 현저히 증가시킬 수 있음을 확인하였다.
- [0043] 또한 CLU + IL-2 처리 조건에서 CLU의 농도는 5 μ g/ml일 때 가장 높은 세포 증식 속도를 보였으며, 이 조건에서 CLU와 IL-2 단독 보다 CLU + IL-2 처리시 더욱 높은 세포 증식을 보임을 도 1b에 나타내었다.
- [0044] 도 2a는 형광물질(CFSE)로 세포를 표지한 후, IL-2 단독, 및 CLU + IL-2 동시에 처리하면서 2~6일째에 날짜별로 세포의 증식 분열을 FACScalibur 기기를 이용하여 측정한 결과이다. IL-2 단독 처리한 경우와 비교하여 IL-2 + CLU 처리 시 세포분열이 더 많이 일어났음을 확인하였다.
- [0045] 도 2b는 6일 동안 배양한 후, IL-2와 CLU 단독, 및 IL-2 + CLU 그룹의 세포수를 측정한 결과이다. 측정결과, suboptimal 조건(100 U/ml)의 IL-2 및 0.5 μ g/ml의 CLU 농도의 경우 IL-2와 CLU 단독과 비교하여 IL-2 + CLU는 순수분리된 자연살상 세포의 증식을 현저히 향상시켰다.
- [0046] 이상의 결과에서, IL-2와 CLU 단독과 비교하여 IL-2 + CLU 처리에 의해 자연살상 세포의 증식이 현저히 증가함을 확인하였다.
- [0047] 또한 도 3은 순수분리된 자연살상 세포에서 IL-2 농도 변화에 따른 IL-2 + CLU의 시너지 효과를 확인한 결과이다. 도 3에서, CLU의 농도 5 μ g/ml일 때, IL-2의 처리 농도에 따라 농도 의존적으로 높은 자연살상 세포 증식 효과를 보였으며, 0 ~ 600 U/ml의 IL-2 농도에서 IL-2 단독 처리군에 비하여 IL-2 + CLU 처리군에서 더 높은 세포 증식효과를 나타내었다. 따라서 IL-2의 농도는 0 ~ 600 U/ml 범위에서 CLU (5 μ g/ml)와 시너지 효과를 보였으며, 최대 시너지 효과를 보이는 농도는 100 U/ml임을 알 수 있었다.

도면

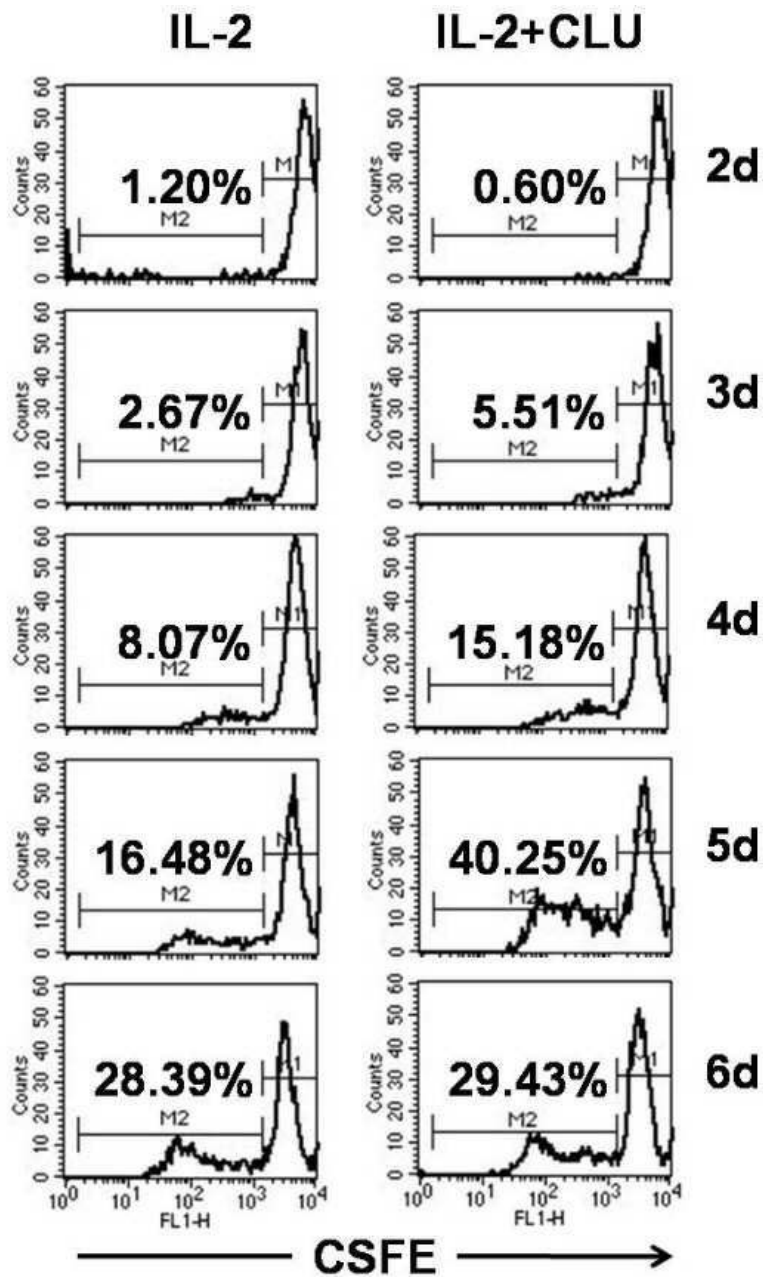
도면1a



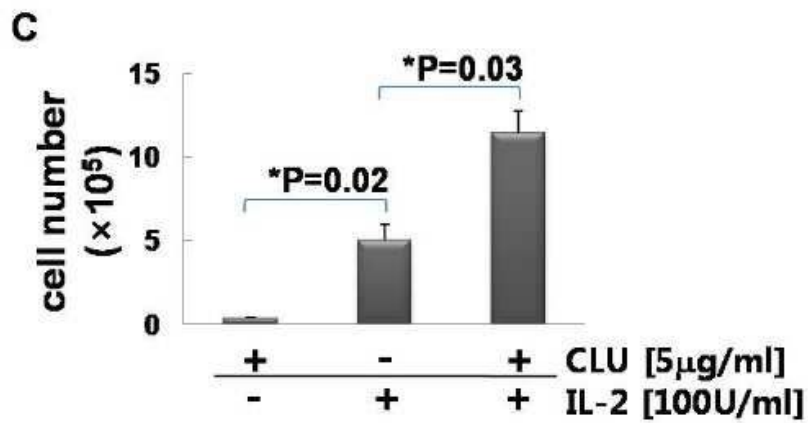
도면1b



도면2a



도면2b



도면3

