

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2012-0083814 (43) 공개일자 2012년07월26일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12N 15/33 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01) A61P 37/00 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01) (21) 출원번호 10-2011-0005159 (22) 출원일자 2011년01월18일 심사청구일자 2011년01월18일		(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울 성북구 안암동5가 1 (72) 발명자 전태훈 서울특별시 송파구 양재대로 1218, 올림픽선수촌 아파트 236동 1802호 (방이동) 한지혜 서울특별시 서대문구 성산로 695, 극동아파트 10 6동 1404호 (현저동) 이석준 인천광역시 계양구 굴현길 39-2, 중앙 E 클래스 502호 (굴현동) (74) 대리인 김선애

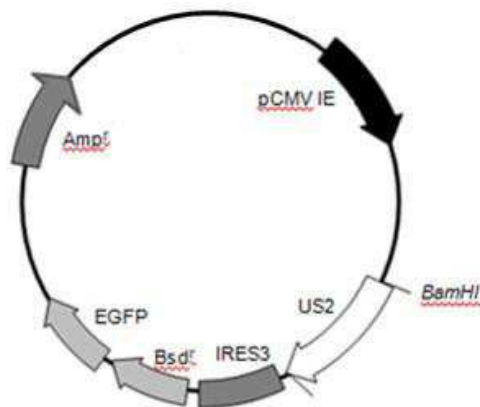
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 CD1d 발현을 감소조절하는 US2 단백질 유전자를 포함하는 자연 살해 T 세포활성 억제용 조성물 및 이를 이용한 자연 살해 T 세포 활성 억제 방법

(57) 요약

본 발명은 CD1d 발현을 감소조절하는 싸이토메갈로바이러스(Cytomegalovirus)의 US2(unique short 2) 유전자를 포함하는 자연살해 T 세포(NKT cell) 활성 억제용 조성물 및 이를 이용한 NKT 세포 활성 억제 방법에 관한 것이다. 상기한 본 발명에 의하면, 생체 내 면역계에 중요한 작용을 하는 NKT 림프구 활성을 제어할 수 있고 이를 이용하여 자가면역질환을 치료 또는 예방할 수 있다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

CD1d 발현을 감소조절하는 싸이토메갈로바이러스(Cytomegalovirus)의 US2(unique short 2) 유전자를 포함하는 자연살해 T 세포(NKT cell) 활성화 억제용 조성물.

청구항 2

제1항 기재의 자연살해 T 세포(NKT cell) 활성화 억제용 조성물을 유효성분으로 함유하는 자가면역질환 치료 또는 예방용 조성물.

청구항 3

인간외 동물에서, 싸이토메갈로바이러스(Cytomegalovirus) US2 단백질의 과발현에 의한 CD1d 분자의 발현을 감소조절하는 것을 포함하는 자연살해 T 세포(NKT cell) 활성화 억제 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 US2 단백질에 의한 CD1d 분자의 발현 감소는 유비퀴틴-프로테아좀 단백질 분해기전에 의한 것임을 특징으로 하는 자연살해 T 세포(NKT cell) 활성화 억제 방법.

청구항 5

싸이토메갈로바이러스(Cytomegalovirus) US2 단백질을 코딩하는 유전자를 증폭시키기 위한 서열번호 1 및 서열번호 2의 염기서열을 갖는 PCR 프라이머세트.

청구항 6

도 1의 개열지도로 표시되는 싸이토메갈로바이러스(Cytomegalovirus) US2 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 발현 벡터.

청구항 7

제6항에 따른 벡터로 형질전환된 것을 특징으로 하는 숙주 세포.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 CD1d 발현을 감소조절하는 US2 단백질 유전자를 포함하는 자연 살해 T 세포 활성화 억제용 조성물 및 이를 이용한 자연 살해 T 세포 활성화 억제 방법에 관한 것이다. 더욱 상세하게 본 발명은 유비퀴틴-프로테아좀에 의한 단백질 분해과정을 통해 매개되는 싸이토메갈로바이러스(Cytomegalovirus) US2 단백질에 의한 인간 CD1d 분자의 발현 감소 기작을 이용하는 US2 단백질 유전자를 포함하는 자연 살해 T 세포 활성화 억제용 조성물 및 이를 이용한 자연 살해 T 세포 활성화 억제 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 싸이토메갈로바이러스(Cytomegalovirus; CMV)는 US2 (Unique short 2) 유전자를 인코드(encode)하는데, 이는 소포체(Endoplasmic reticulum) 표면에 존재하는 당단백질로, CMV에 감염된 숙주세포에서의 면역반응을 회피하는 기전에 관여한다(de Jong et al., 1998; Pleogh, 1998; Seriger et al., 2006).

[0003] 주요조직 적합성 항원(Major histocompatibility complex, MHC)은 1형과 2형으로 나뉘며 제 1형 MHC는 핵을 가지는 모든 세포에서 발현되며 소포체에서 세포내부에서 유래된 항원과 결합하여 세포 표면으로 발현됨으로써 세포 내부의 항원을 특정 세포독성 T 림프구(cytotoxic T lymphocyte)에 제시하여 세포성 면역 반응을 매개하는 역

할을 한다(Van Kaer, 2002). 제 2형 MHC는 전문 항원 제시세포(professional antigen presenting cell)에서 발현되며, 세포질에서 소포 형태로 이동하는데, 이때 세포내이입(endocytosis)을 통해 세포 내부로 들어온 외부항원과 결합하여, 이를 보조 T 림프구(helper T lymphocyte)에 전달하여 면역반응을 일으킨다(Wolf and Ploegh, 1995).

[0004] 항원제시를 통한 면역 반응 활성 과정에서 CMV의 US2는 직접적인 단백질간의 결합을 통해 인간의 제 1형과 제 2형 MHC를 소포체 내부로부터 세포질로 이동시키고, 이로 인해 두 주요조직 적합성 항원을 유비퀴틴-프로테오솜 단백질 분해 시스템을 통하여 분해시키는 역할을 한다(Tomazin et al., 1999; Boss et al., 1997; Ahn et al., 1996; Gewurz et al., 2001). 결과적으로 세포 내부의 주요조직 적합성 항원의 세포 표면으로의 발현이 감소되고 이로 인해 이들의 항원 제시 기능이 억제되어 특정 T세포와 이들의 상호작용을 통해 매개되는 면역반응이 억제시켜, 바이러스 감염시 숙주 세포에서의 면역반응을 회피할 수 있도록 돕는 역할을 한다(Ploegh, 1998; Seliger et al., 2006).

[0005] 인간 CD1은 제 1형 MHC와 구조적으로 유사한 분자로서, 43-49kDa의 heavy chain과 12kDa의 $\beta 2$ -microglobulin ($\beta 2m$) light chain으로 구성되며 항원인식물질로 알려져 있다(Martin et al., 1986). CD1 유전자는 인간 염색체 1q22-23에 위치하고, 5개 유전자(CD1A, CD1B, CD1C, CD1D, CD1E)가 존재한다(Moseley et al., 1989). CD1은 두 그룹으로 분리되는데, 그룹 1은 CD1a, CD1b, CD1c로 구성되고 전문 항원 제시세포에서 발현 된다. 또한 그룹 2는 CD1d로 구성되고, 주로 수지상 세포(dendritic cells), 위장의 상피세포(gastrointestinal epithelial cells)에서 발현한다(Canchis et al., 1993). CD1d는 매우 hydrophobic한 항원인식부위를 가지고 있어서 기존의 펩티드(peptide) 항원을 인식하는 것이 아니라 당지질(glycolipid)을 인식한다. 또한 이런 당지질 항원을 기존의 conventional T 림프구에 전달해주는 것이 아니라 자연 살해 T 세포(NKT cell)에 제시하는 분자로 알려졌다(Spada et al., 1998).

[0006] 자연 살해 T 세포(NKT cell)는 NK receptor와 T cell receptor를 공동으로 발현하는 특별한 T 림프구이다(Bendelac et al., 2007). 자연 살해 T 세포(NKT cell)는 주로 흉선과 간에 존재하며, 주요 subset은 CD1d에 의해 제공되는 당지질(alpha-galactosylceramide; KRN 7000)의 자극 시에 활성화되며, 활성화된 NKT 림프구는 IL-4와 IFN- γ 와 같은 사이토카인(cytokine)을 매우 다량 분비하여 여러 질병에서 빠른 반응을 일으킨다(Carnaud et al., 1999; Kitamura et al., 2000). 따라서, 자연 살해 T 세포(NKT cell)는 박테리나 기생충의 감염(Chackerian et al., 2002; Gonzalez-Aseguinolaza et al., 2000), 암의 발생(Kawano et al., 1998), 자가면역 질환의 숙주 보호(Hong et al., 2001)의 경우에서 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 결국 자연 살해 T 세포(NKT cell)의 활성 기전 연구는 의학적으로 매우 중요하게 여겨지고 있다.

[0007] CMV US2 단백질에 의한 면역 회피작용은 주요조직 적합성 항원의 발현 감소를 통한 것으로 알려져 있으나, 자연 살해 T 세포(NKT cell)에 항원을 제시하는 CD1d 분자의 발현에 어떠한 영향을 미치는 지에 대해서는 아직 연구되어지지 않았다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0008] (비특허문헌 0001) Ahn K, Angulo A, Ghazal P, Peterson PA, Yang Y, FrK. 1996. Human cytomegalovirus inhibits antigen presentation by a sequential multistep process. Proc Natl Acad Sci USA. 93:10990-10995.
- (비특허문헌 0002) Bendelac A, Savage PB, Teyton L. 2007. The biology of NKT cells. Annu Rev Immunol. 25:297-336.
- (비특허문헌 0003) Boss JM. Regulation of transcription of MHC class II genes. 1997. Curr Opin Immunol. 9:107-113.
- (비특허문헌 0004) Canchis PW, Bhan AK, Landau SB, Yang L, Balk SP, Blumberg RS. 1993. Tissue distribution of the non-polymorphic major histocompatibility complex class I-like molecule, CD1d. Immunology. 80:561-565.
- (비특허문헌 0005) Carnaud C, Lee D, Donnars O, Park SH, Beavis A, Koezuka Y, Bendelac A. 1999. Cross-

talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells. *J Immunol.* 163:4647-4650.

(비특허문헌 0006) Chackerian A, Alt J, Perera V, Behar SM. 2002. Activation of NKT cells protects mice from tuberculosis. *Infect Immun.* 70:6302-6309.

(비특허문헌 0007) Chen YH, Wang B, Chun T, Zhao L, Cardell S, Behar SM, Brenner MB, Wang CR. Expression of CD1d2 on thymocytes is not sufficient for the development of NKT cells in CD1d1-deficient mice. 1999. *J Immunol.* 162:4560-4566.

(비특허문헌 0008) de Jong MD, Galasso GJ, Gazzard B, Griffiths PD, Jabs DA, Kern ER, Spector SA. 1998. Summary of the II International Symposium on Cytomegalovirus. *Antiviral Res.* 39:141-162.

(비특허문헌 0009) Gewurz BE, Gaudet R, Tortorella D, Wang EW, Ploegh HL, Wiley DC. 2001. Antigen presentation subverted: Structure of the human cytomegalovirus protein US2 bound to the class I molecule HLA-A2. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98:6794-6799.

(비특허문헌 0010) Gonzalez-Aseguinolaza G, de Oliveira C, Tomaska M, Hong S, Bruna-Romero O, Nakayama T, Taniguchi M, Bendelac A, Van Kaer L, Koezuka Y, Tsuji M. alpha-galactosylceramide-activated Valpha 14 natural killer T cells mediate protection against murine malaria. 2000. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97:8461-8496.

(비특허문헌 0011) Hong S, Wilson MT, Serizawa I, Wu L, Singh N, Naidenko OV, Miura T, Haba T, Scherer DC, Wei J, Kronenberg M, Koezuka Y, Van Kaer L. 2001. The natural killer T-cell ligand alpha-galactosylceramide prevents autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice. *Nat Med.* 7:1052-1056.

(비특허문헌 0012) Ito H, Fukada Y, Murata K, Kimura A. 1983. Transformation of intact yeast cells treated with Alkali Cations. *J Bacteriol.* 153:163-168.

(비특허문헌 0013) Kawano T, Cui J, Koezuka Y, Toura I, Kaneko Y, Sato H, Kondo E, Harada M, Koseki H, Nakayama T, Tanaka Y, Taniguchi M. 1998. Natural killer-like nonspecific tumor cell lysis mediated by specific ligand-activated Valpha14 NKT cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95:5690-5693.

(비특허문헌 0014) Kitamura H, Ohta A, Sekimoto M, Sato M, Iwakabe K, Nakui M, Yahata T, Meng H, Koda T, Nishimura S, Kawano T, Taniguchi M, Nishimura T. 2000. alpha-galactosylceramide induces early B-cell activation through IL-4 production by NKT cells. *Cell Immunol.* 199:37-42.

(비특허문헌 0015) Martin LH, Calabi F, Milstein C. 1986. Isolation of CD1 genes: A family of major histocompatibility complex-related differentiation antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83:9154-9158.

(비특허문헌 0016) Moseley WS, Watson ML, Kingsmore SF, Seldin MF. 1989. CD1 defines conserved linkage group border between human chromosomes 1 and mouse chromosomes 1 and 3. *Immunogenetics* 30:378-382.

(비특허문헌 0017) Ploegh HL. 1998. Viral strategies of immune evasion. *Science.* 280:249-253.

(비특허문헌 0018) Seliger B, Ritz U, Ferrone S. 2006. Molecular mechanisms of HLA class I antigen abnormalities following viral infection and transformation. *Int J Cancer.* 118:129-138.

(비특허문헌 0019) Spada FM, Koezuka Y, Porcelli, SA. 1998. CD1d-restricted recognition of synthetic glycolipid antigens by human natural killer T cells. *J Exp Med.* 188:1529-1534.

(비특허문헌 0020) Tomazin R, Boname J, Hegde NR, Lewinsohn DM, Altschuler Y, Jones TR, Cresswell P, Nelson JA, Riddell SR, Johnson DC. 1999. Cytomegalovirus US2 destroys two components of the MHC class II pathways, preventing recognition by CD4+ T cells. *Nat Med.* 5:1039-1043.

(비특허문헌 0021) Van Kaer L. 2002. Major histocompatibility complex class I-restricted antigen processing and presentation. *Tissue Antigens.* 60:1-9.

(비특허문헌 0022) Wolf PR, Ploegh HL. 1995. How MHC molecules acquire peptide cargo: biosynthesis and trafficking through the endocytic pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 11:267-306.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명은 상기 종래 기술의 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로, 본 발명의 목적은 CD1d 발현을 감소조절하는 US2 단백질 유전자를 포함하는 자연 살해 T 세포(NKT cell) 활성 억제용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 다른 목적은 상기 조성물을 유효성분으로 함유하는 자가면역질환 치료 또는 예방용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은, 유비퀴틴-프로테아좀에 의한 단백질 분해과정을 통해 매개되는 사이토메갈로바이러스(Cytomegalovirus) US2 단백질에 의한 인간 CD1d 분자의 발현을 감소조절하는 것을 포함하는 자연 살해 T 세포(NKT cell) 활성 억제 방법을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 더욱 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0013] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 CD1d 발현을 감소조절하는 사이토메갈로바이러스(Cytomegalovirus)의 US2(unique short 2) 유전자를 포함하는 자연살해 T 세포(NKT cell) 활성 억제용 조성물을 제공한다.
- [0014] 본 발명에서, 일반적으로 CD1d는 당지질을 항원으로 인지하여 NKT 세포를 활성화한다고 알려져 있다. 본 발명의 실시예에서 CMV US2 단백질이 과발현된 CD1d.C1R 세포주에서 세포 전체와 세포표면에서의 CD1d의 발현량이 감소하고, 이로 인하여 NKT 세포의 활성이 억제됨을 확인하였다.
- [0015] 본 발명에서는, NKT 세포로 항원을 전달하는 CD1d의 발현을 조절함으로써 생체 내 면역계에 중요한 작용을 하는 NKT 세포 활성 제어를 할 수 있으며, 이를 이용할 경우 자연 살해 T 세포(NKT cell) 활성 억제용 조성물을 제공할 수 있다.
- [0016] 본 발명에서, 상기 사이토메갈로바이러스(Cytomegalovirus)의 US2(unique short 2) 유전자는 발현 벡터로 포함되는 것이 바람직하다. 상기 발현 벡터는 상기 US2 유전자의 발현을 유도할 수 있는 한 특별한 제한이 없으며, 본 발명의 실시예에서는 bsd EGFP IRES3 CL 발현 vector를 이용하였다(도 1 참조). 상기 US2 유전자 발현 벡터는 숙주세포에 도입될 수 있다. 본 발명의 실시예에서는 CD1d 분자의 발현 감소를 확인하기 위해 CD1d.C1R 세포주에 도입되었다.
- [0017] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 자연 살해 T 세포(NKT cell) 활성 억제용 조성물을 유효성분으로 함유하는 자가면역질환 치료 또는 예방용 조성물을 제공한다.
- [0018] 본 발명의 자가면역질환 치료 또는 예방용 조성물에서, NKT 림프구는 보통의 T 림프구와는 인식하는 항원의 종류와 기능 등에서 차이가 나며 면역조절세포로서의 기능을 수행한다. NKT 림프구는 Th1 type의 사이토카인 IFN- γ 와 Th2 type의 사이토카인 IL-4를 분비하는데, 여러 가지 면역반응이 Th1 또는 Th2 사이토카인들에 의해 조절되는 상황에 비추어보면 특정 면역과정의 조절에 매우 중요한 역할을 한다는 것을 의미한다. 전신성 홍반성 루푸스(Systemic Lupus Erythematosus, SLE)와 같은 자가면역질환에서 CD1d-autoreactive한 NKT 세포는 IFN- γ 를 분비하는 세포들이 병세를 악화시킨다는 것이 알려져 있다(Zeng D, et al., 1998). 또한 NKT 세포들이 정상적인 종양 면역감시(tumor immunosurveillance) 과정을 억제하여 암의 발생을 촉진한다는 보고가 있다(Cui J, et al., 1997; Kodama T, et al., 1999; Terabe M, et al., 2005).
- [0019] 따라서, CMV US2 단백질을 과발현하면 항원제시세포(antigen presenting cell, APC)에서 발현하는 CD1d 발현양도 감소되고 NKT 세포가 불활성화 될 것이다. 그러면, 자가면역질환 및 감염성 질환을 치료 및/또는 예방할 수 있다.
- [0020] 본 발명의 약학적 조성물은 본 발명의 US2 유전자와 약학적으로 허용 가능한 담체와 함께 함유하는 것을 포함하며, 상기 US2 유전자는 적절한 벡터, 예컨대 동물세포 발현용 벡터, 렌티바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터,

아데노바이러스 벡터 등에 삽입된 형태로 포함하는 것이 바람직하다.

- [0021] 본 발명의 US2 유전자를 유효성분으로 함유하는 자가면역질환 치료용 조성물은 임상투여 시에 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며 일반적인 의약품제제의 형태로 사용될 수 있다.
- [0022] 즉, 본 발명의 약학적 조성물은 실제 임상투여시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있으며, 제제화할 경우 주사제 등 당업계에서 약제학적으로 잘 알려진 방법을 사용하여 제제화할 수 있다.
- [0023] 본 발명의 약학적 조성물의 유효용량은 0.1 ? 5 mg/kg 이고, 바람직하게는 1 ? 2 mg/kg 이며, 하루 1 ~ 3회 투여될 수 있다.
- [0024] 본 발명의 약학적 조성물에서, 상기 조성물은 본 발명의 유효성분인 상기 US2 유전자를 포함하는 바이러스 클론 또는 그 발현 단백질 외에 생물체제에 통상 사용되는 안정화제 및 담체, 보조 활성성분 등을 더 포함할 수 있으며, 면역활성 억제제를 위해 주사제 형태로 인체에 투여될 수 있다. 이 때 환자에게 투여될 바이러스 클론 입자의 적정 수는 환자의 중한 상태에 따라 다르나 바람직하게는 체중 kg당 100 ~2000 MOI 정도이고, 발현 단백질의 경우는 성인 기준 일당 100 μ g ~ 1000 mg 정도이다.
- [0025] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 인간의 동물에서, 싸이토메갈로바이러스(Cytomegalovirus) US2 단백질의 과발현에 의한 CD1d 분자의 발현을 감소조절하는 것을 포함하는 자연살해 T 세포(NKT cell) 활성 억제 방법을 제공한다.
- [0026] 본 발명에 있어서, 상기 US2 단백질에 의한 CD1d 분자의 발현 감소는 유비퀴틴-프로테오좀 단백질 분해기전에 의한 것임을 특징으로 한다.
- [0027] 본 발명에 있어서, 상기 NKT 세포 활성 억제 방법은 상기 US2 단백질 유전자를 삽입할 수 있는 벡터를 사용하여 클로닝 한 후, CD1d를 세포표면에 발현하는 세포 예컨대, 면역세포 예컨대 수지상 세포, 위장의 상피세포, 또는 B 세포 등에서 트랜스펙션시켜 CD1d의 세포표면 발현을 억제함으로써 CD1d에 의한 NKT 세포에 대한 항원 제공을 억제하여 NKT 세포의 활성을 억제시키는 방법을 포함한다.
- [0028] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 싸이토메갈로바이러스(Cytomegalovirus) US2 단백질을 코딩하는 유전자를 증폭시키기 위한 다음의 서열번호 1 및 서열번호 2의 염기서열을 갖는 PCR 프라이머세트를 제공한다. 상기 프라이머세트를 이용하면 US2 유전자를 효율적으로 증폭시킬 수 있다.
- [0029] 정방향 5'- ATG AAC AAT CTC TGG AAA GCC TGG - 3'(서열번호 1)
- [0030] 역방향 5'- TCA GCA CAC GAA AAA CCG CAT CCA - 3'(서열번호 2)

발명의 효과

- [0031] 상술한 바와 같이, 본 발명은 CMV US2 당단백질에 의해 인간 CD1d 분자의 발현이 유비퀴틴-프로테오좀 단백질 분해 기전을 통해 감소된다는 것을 증명하였다. 따라서 본 발명은 NKT 세포에 항원을 전달하는 CD1d의 세포표면 발현량을 조절함으로써 생체 내 면역계에 중요한 작용을 하는 NKT 세포 활성제에 응용될 수 있고, 나아가 자가면역질환 치료 및/또는 예방 분야에 매우 유용한 발명이라 할 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0032] 도 1은 본 발명에 의한 US2 단백질을 과발현하는 세포 구축을 위한 US2/BsdEGFP-IRES3-CL 모식도를 나타낸다.
- 도 2a ~ 도 2c는 인간 CD1d 분자가 도입된 B세포에서 US2 단백질 과발현을 확인한 결과를 나타낸다. 도 2a에서 NC., negative control을, 인간 CD1d 분자가 도입된 B세포주를 나타내고, 도 2b에서 점선은 negative control을, 굵은 실선은 EGFP가 발현되는 transfectant를 나타낸다.
- 도 3은 본 발명에 의한 US2 단백질에 의한 인간 CD1d 분자의 발현 감소를 확인한 결과를 나타낸다. 점선은 Isotype control을, 가는실선은 MOCK에서 항 human-CD1d수용체를, 굵은 실선은 US2 transfectant의 항 human

CD1d 항체를 나타낸다.

도 4a는 이스트 투 하이브리드 시스템(yeast two hybrid system)을 위한 인간 CD1d 분자의 각 부위 별 절단 모형을 나타낸다.

도 4b는 이스트 투 하이브리드 시스템(yeast two hybrid system)을 위한 싸이토메갈로바이러스 US2 단백질의 각 부위 별 절단 모형을 나타낸다.

도 5a ~ 도 5c는 이스트 투 하이브리드 시스템(yeast two hybrid system)을 통한 인간 CD1d 분자의 α3 부위와 US2 단백질의 소포체(Endoplasmic reticulum) 내부 부위의 단백질 간 결합을 확인한 결과를 나타낸다.

도 6은 본 발명에 의한 US2 단백질 발현에 의한 미성숙 CD1d 분자의 유비퀴틴화(Ubiquitination) 정도의 증가를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0033] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0034] < 실시예 1 > US2 단백질을 과발현하는 세포 구축

[0035] CMV의 US2 cDNA(NCBI accession no. BK000394.5)가 도입되어 있는 pcDNA3.1 vector (Ahn et al., 1996)의 US2 유전자를 KpnI, XhoI 제한효소로 절단 후 pBluescript KS+에 subcloning한 후, 이를 BamHI 제한효소로 절단하여 US2 유전자 부위를 bsd EGFP IRES3 CL 발현 vector에 삽입하였다(도 1 참조). 이 때 사용된 벡터는 클로닝 부위 뒷부분에 brastycin 항생제 저항성 유전자와 EGFP 유전자가 fusion되어 있으며 이 fusion된 유전자는 IRES 시스템을 이용하여 타겟 유전자를 동시에 발현한다.

[0036] 그 후 US2 cDNA가 삽입된 bsd EGFP IRES3 CL 벡터를 사용하여 Tetracycline off system의 293GPG세포와 인간 CD1d가 과발현 된 C1R 세포주(CD1d.C1R 세포; human B 세포주; Chen et al., 1999)를 이용하여 형질 전환을 시행하였다. 우선 293GPG 세포를 6 well 조직 배양 플레이트에 well 당 5×10^5 세포가 되도록 접종하고 10% 송아지 혈청을 함유한 DMEM 배지에서 배양하였다. 세포가 24시간 후 well 표면의 70-80% 정도를 덮을 정도로 자라면서, 혈청이 없는 DMEM 배지에서 1ug의 US2 단백질 유전자 발현 벡터 DNA를 6 ug의 Lipofectamine plus (Invitrogen)를 사용하여, 도입된 발현 벡터를 레트로바이러스로 packaging하는 세포주인 293GPG 세포에 도입시켜 24시간 배양하였다. 293GPG 세포로부터 생성된 US2 단백질 유전자를 함유하는 바이러스가 포함된 배양 상층액을 이용하여 숙주세포를 4-5 시간 배양 후 혈청이 10% 함유된 배지로 바꿔서 4시간 배양하였으며 이 과정을 3회 반복하였다. 이 때 사용된 숙주세포는 CD1d.C1R 세포주이며, US2 형질 도입된 세포를 얻기 위해 blasticidin 항생제 0.7 mg/ml를 처리하여 US2 유전자가 발현되는 세포를 얻었다.

[0037] CMV US2 단백질이 과발현 된 CD1d.C1R 세포주는 10% 송아지 혈청과 1% 페니실린/스트렙토마이신을 포함하고 있는 RPMI1640 배지에서 세포 배양하였다. 그 후, 이 세포주에서 RT-PCR, 유세포 분석기(flow cytometry)와 공초점 레이저 주사 현미경(confocal microscopy)을 이용하여 US2 유전자의 발현을 확인하였다.

[0038] 우선 RT-PCR을 수행하기 위해, US2 단백질이 과발현 된 CD1d.C1R 세포주를 트리졸(Trizol, Invitrogen) 1 ml 당 200 ul의 chloroform (sigma)을 넣고 전체 RNA를 분리하였고, 이때 추출한 5 ug의 mRNA를 주형으로 Superscript III (Invitrogen) 역전사 효소를 이용하여 역전사 연쇄중합반응에 의해 cDNA를 합성한 후, US2 단백질(가)과 GAPDH(나) 프라이머를 이용하여 연쇄중합반응을 실시하였다.

[0039] 이 때 사용한 중합 효소는 Tag polymerase (Gene craft)이며 사용한 프라이머는 아래와 같다.

[0040] (가) US2 단백질 프라이머

[0041] 정방향 5'- ATG AAC AAT CTC TGG AAA GCC TGG - 3'(서열번호 1)

[0042] 역방향 5'- TCA GCA CAC GAA AAA CCG CAT CCA - 3'(서열번호 2)

[0043] (나) GAPDH 프라이머

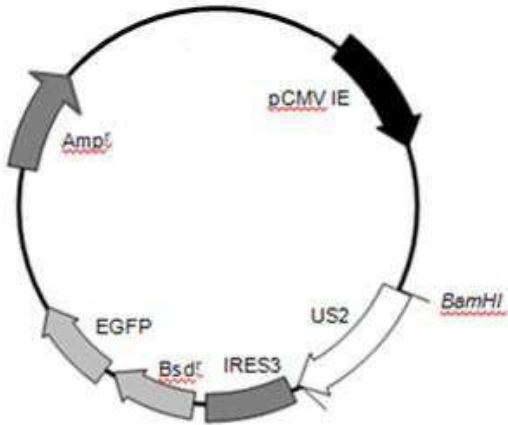
- [0044] 정방향 5'- ATG ACC ACA GTC CAT GCC ATC - 3'(서열번호 3)
- [0045] 역방향 5'- CCT GCT TCA CCA CCT TCT TG - 3'(서열번호 4)
- [0046] 이때 PCR condition은 denaturation 95도에서 30초, anealing 65도에서 30초, extension 72도에서 30초의 온도, 시간 조건으로 35 사이클로 진행하였다.
- [0047] 또한, 이 때 사용되어진 음성대조군(N.C., negative control)은 US2 유전자가 삽입되지 않은 IRES EGFP와 blasticidine 항생제 저항성유전자를 발현시키는 벡터를 발현시킨 CD1d.C1R 세포주의 mRNA가 사용되었다. RT-PCR 결과 600 bp의 싸아토메갈로바이러스 US2 단백질 유전자의 mRNA transcript 산물이 US2를 도입한 세포에서만 발견됐다(도 2a 참조). 내적 대조군(Internal control)인 GAPDH 산물(271 bp)은 음성대조군(N.C.)와 US2를 도입한 세포 모두에서 발견되었다(도 2a 참조).
- [0048] 또한 US2와 함께 발현되는 EGFP 단백질의 발현을 확인하기 위하여 공초점 레이저 주사 현미경(confocal microscopy)과 유세포 분석기(flow cytometry)를 이용해 형광강도를 측정하였다(도 2b, 도 2c 참조). 그 결과 US2와 함께 발현되는 EGFP 단백질의 발현을 확인하였다.
- [0049] < 실시예 2 > US2단백질에 의한 인간 CD1d분자의 발현 감소
- [0050] 유세포 분석기(flow cytometry)를 이용하여 CMV US2 단백질에 의한 인간 CD1d 분자의 발현 감소를 측정하기 위하여 US2 단백질이 과발현 된 CD1d.C1R 세포주에 PE-conjugated 항 CD1d 수용체 항체(BDpharmingen)를 처리하고, 유세포 분석기를 이용해 형광강도를 측정하였다. 이 때 사용되어진 isotype control은 ratIgG1k로 BDpharmingen에서 구입하였다. 그 결과 US2 단백질이 과발현 된 CD1d.C1R 세포 전체와 세포표면에서의 CD1d 단백질의 발현 감소를 확인하였다(도 3 참조).
- [0051] < 실시예 3 > 이스트 두 하이브리드 시스템(yeast two hybrid system)을 통한 인간 CD1d 분자의 α3 부위와 US2 단백질의 소포체(Endoplasmic reticulum) 내부 부위의 단백질 간 결합 확인
- [0052] 이스트 두 하이브리드 시스템(yeast two hybrid system)을 통해 CD1d, US2 두 분자 간 직접적인 단백질 결합을 확인하기 위해 인간 CD1d 단백질을 전사 인자의 DNA 결합 부위(DNA binding domain)와 융합시키고, US2 단백질을 전사 인자의 활성 부위(activation domain)에 융합시켜 이 두 단백질 간의 결합 여부와 정도를 측정하였다. 먼저, 인간 CD1d를 bait로 사용하기 위해 전체 CD1d cDNA와 CD1d를 α1, α2 (아미노산 1-202) 부위와 α3 (아미노산 203-295) 그리고 소포체 막 투과부위와 세포질 부위(아미노산 296-335) 세 부분으로 절단한 DNA 시퀀스를 pGilda 벡터(CLONTECH, #6183-1)에 삽입하였다 (도 4a 참조).
- [0053] 또한 US2 단백질은 prey로 전체 단백질 시퀀스와 각각의 부위를 절단한 cDNA를 제한 효소 *EcoRI*과 *XhoI* 절단 부위를 이용하여 pJG4-5벡터에 삽입하여 B42 융합 단백질을 형성하는데 이용하였다. 이 때, US2 단백질의 각 부위는 signal peptide 부위 (아미노산 1-21), 소포체 내부부위 (22-160), 소포체 막 투과부위와 세포질 부위 (161-199)로 절단하였으며 이 절단된 cDNA fragment는 연쇄중합반응을 통하여 합성되었다(도 4b 참조).
- [0054] 이 때 사용한 중합 효소는 Tag polymerase (Gene craft)이며 사용한 프라이머는 아래와 같다.
- [0055] (가) US2 signal peptide 부위
- [0056] 정방향 5'- CGGGAATTCATGAACAATCTCTGGAAA- 3'(서열번호 5)
- [0057] 역방향 5'- ATTCTCGAGTCACAGGCGGATCAAGGG - 3'(서열번호 6)
- [0058] (나) 소포체 내부부위 (ER luminal domain)

- [0059] 정방향 5'- CGGGAATTCCCCGATGGAATCACTAAA - 3'(서열번호 7)
- [0060] 역방향 5'- ATTCTCGAGTCACGTGTATGACTTCG - 3'(서열번호 8)
- [0061] (다) 소포체 막 투과부위와 세포질 부위 (ER transmembrane domain & Cytoplasmic tail domain)
- [0062] 정방향 5'- CGGGAATTCATGTGGCCTGGACAATA - 3'(서열번호 9)
- [0063] 역방향 5'- ATTCTCGAGTCAGCACGAAAAACCG - 3'(서열번호 10)
- [0064] 그 후 전체와 각 부위별 human CD1d cDNA가 삽입된 pGilda 벡터는 Bait으로서 효모 스트레인인 EGY48 [MATa, his3, trp1, ura3-52, leu2::pLeu2-LexAop6/pSH18-34 (LexAop-lacZ reporter)]에 modified lithium acetate 방법을 이용하여 도입하였다(Ito et al., 1983). US2 단백질의 전체 cDNA와 각 부위의 cDNA 서열을 포함하는 pJG4-5 벡터를 이미 인간 CD1d를 포함하고 있는 효모의 competent cell에 도입하였고, 이 형질 도입된 세포는 2%의 포도당을 함유하고 있는 합성 배지(Ura⁻, His⁻, Trp⁻)에서 tryptophan prototrophy를 통해 선별하였다.
- [0065] 인간 CD1d 분자와 US2 당단백질의 단백질 간 결합 여부는 β -galactosidase의 발현정도를 정량화함으로써 측정하였다. β -galactosidase의 활성도는 각각의 cDNA를 포함하고 있는 효모세포를 mid-long phase에 도달할 때까지 2%의 포도당을 함유하고 있는 효모 합성 배지(Yeast synhyetic media, Ura⁻, His⁻, Trp⁻)에서 배양한 후, 2%의 galactose를 함유하는 효모 배지로 옮겨 배양하였다. 그 후 동일한 수의 세포를 Z buffer(60mM Na₂HPO₄, 40mM NaH₂PO₄, 10mM MgSO₄, and 50mM β -mercaptoethanol, pH7.0)를 이용하여 30℃에서 30분간 배양한 후, σ -nitrophenyl β -D-galactosidase를 첨가한 후, 노란색으로 변색되면 1M Na₂CO₃ 0.4 ml를 첨가하여 반응을 멈춘 후, 420 nm와 550nm 흡광도를 측정함으로써 β -galactosidase의 활성을 측정하였다. 그 결과 CD1d와 US2 전체 단백질 간의 결합과 CD1d의 소포체 내부에 존재하는 아미노산 203-295번째에 해당되는 α 3부위와 US2전체 단백질 간의 결합을 확인하였고 (도 5a 참조), CD1d 전체 단백질과 아미노산 22-160번째에 해당되는 US2의 소포체 내부 부위의 결합 (도 5b 참조), 그리고 CD1d의 α 3 부위와 US2의 소포체 내부 부위간의 결합을 확인하였다 (도 5c 참조).
- [0066] < 실시예 4 > US2 단백질 발현에 의한 미성숙 CD1d 분자의 유비퀴틴화(Ubiquitination) 정도의 증가
- [0067] US2에 의한 CD1d 분자의 발현 감소가 유비퀴틴화 (Ubiquitination)에 의해 매개되는 프로테오좀 단백질 분해 기작에 의한 것인지 알아보기 위해 co-immunoprecipitation을 통해 CD1d의 유비퀴틴화 정도를 측정하였다.
- [0068] 먼저 US2 단백질이 과발현 된 CD1d.C1R 세포를 proteinase inhibitor cocktail이 포함된 NP-40 lysis buffer (50mM Tris HCl pH8.0, 150mM NaCl, 1.0% NP-40)로 lysis시킨 후, 골지체에서 글라이코실화되어 성숙한 형태가 된 CD1d분자에 특이적으로 결합하는 항 CD1d 항체인 51.1과 모든 형태의 CD1d와 특이적으로 결합할 수 있는 항 CD1d 항체인 NOR3.2 항체를 이용하여 면역 침전시킨 후, 10% SDS polyacrylamide gel에 전기 영동시켜 Hybond-P PVDF membrane (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)에 transfer하였다, 그 후, 항 유비퀴틴 항체를 membrane에 처리한 후 ECL system (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)을 이용하여 발색시켜 CD1d 단백질의 유비퀴틴화 정도를 측정하였다.
- [0069] 그 결과, 성숙한 형태의 CD1d 분자의 경우, US2 당단백의 발현 여부와 관계없이 유비퀴틴화 정도가 동일한 것을 확인하였고, 모든 형태의 CD1d는 US2 당단백이 과발현 된 경우에 유비퀴틴화 정도가 증가한 것을 확인할 수 있었다. 이로 인해 글라이코실화되지 않은 CD1d 분자가 US2 단백질이 발현되는 경우 유비퀴틴화 정도가 증가하는 것을 확인하였다 (도 6 참조). 이 때 사용되어진 membrane은 항 CD1d 항체를 처리하여 위와 같은 방법으로 CD1d 분자의 밴드를 확인하여 면역침전 반응 여부를 확인 하였다. Internal control은 항 β -actin 항체에 의한 β -actin의 발현량으로, 항 CD1d 항체를 이용하여 면역침전하기 전의 모든 샘플에서 동일한 β -actin이 검출되어 동일한 양의 단백질을 가지고 면역침전 반응을 수행 한 것임을 확인하였다.
- [0070] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였으나, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어 이러한 구

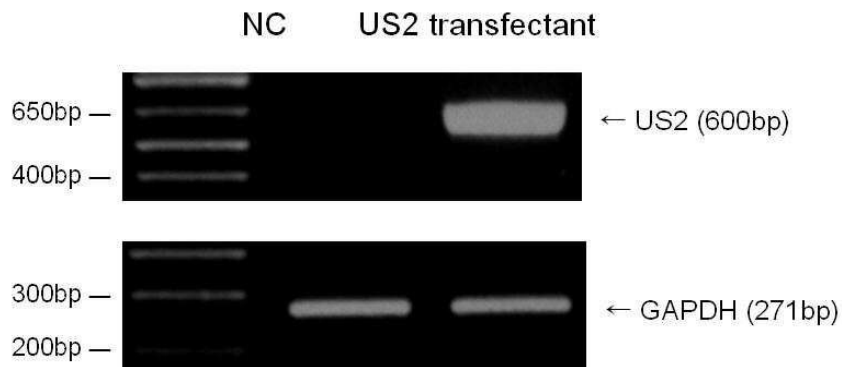
체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 균등물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

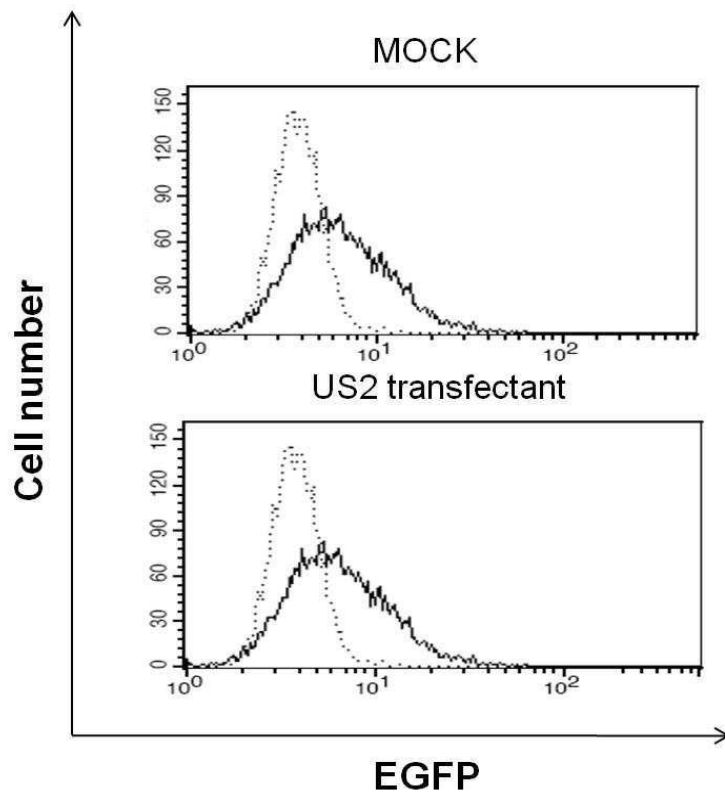
도면1



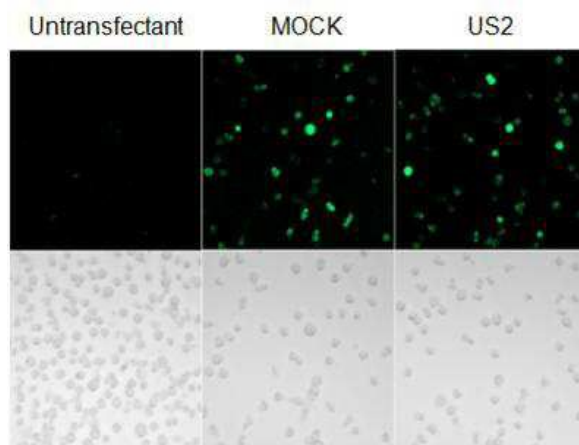
도면2a



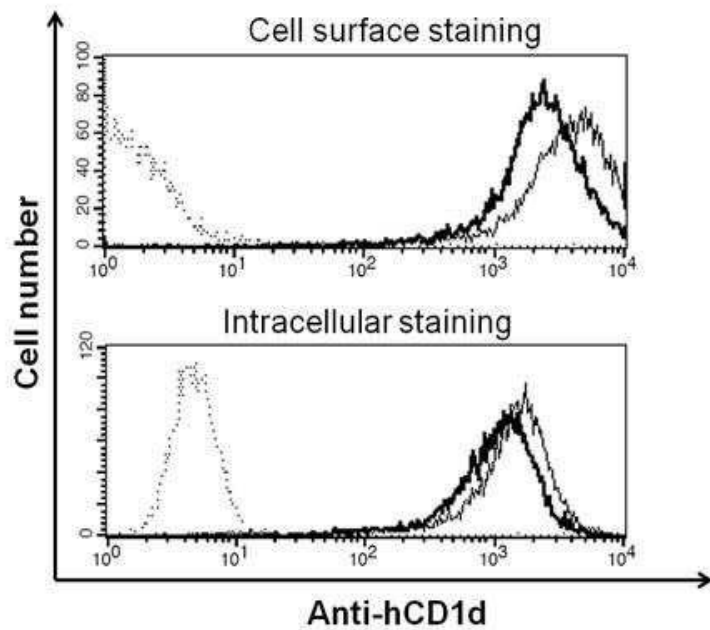
도면2b



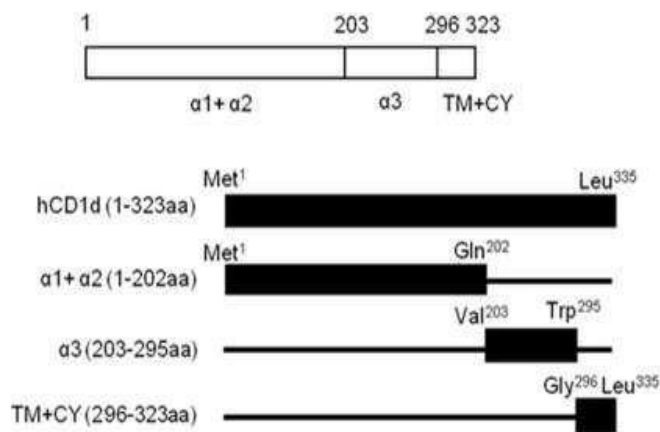
도면2c



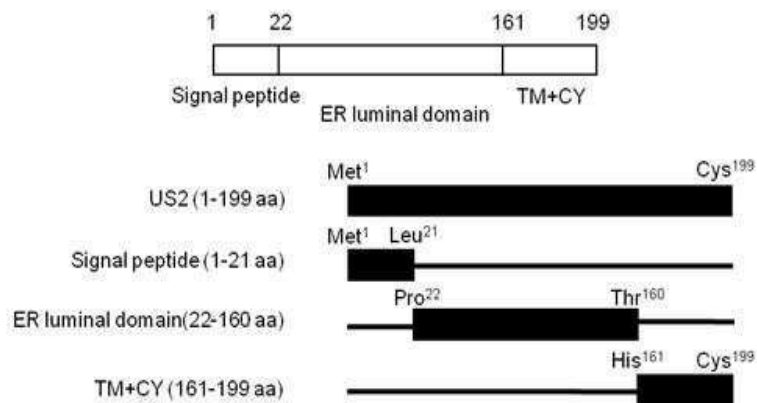
도면3



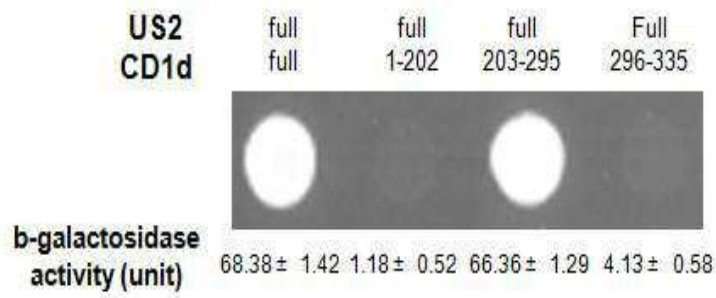
도면4a



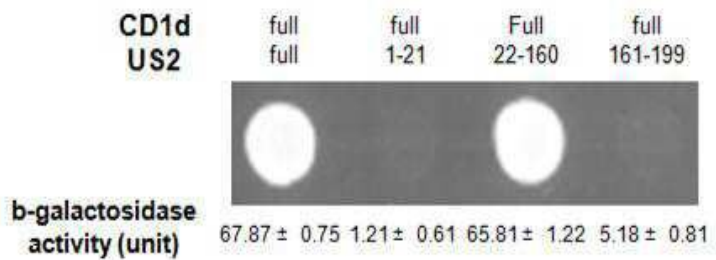
도면4b



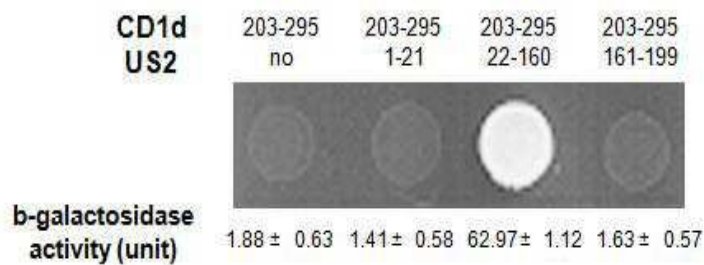
도면5a



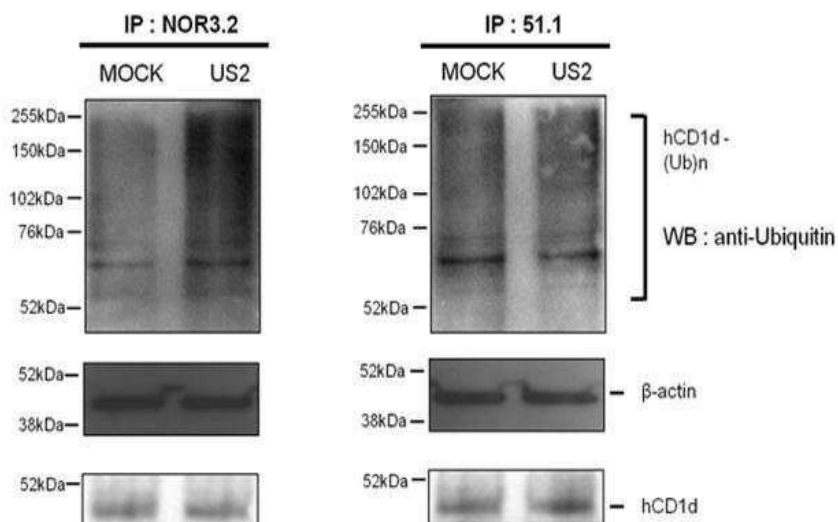
도면5b



도면5c



도면6



서열 목록

<110> KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION

<120> Composition comprising US2 protein gene downregulating CD1d expression for suppressing NKT cell activity and method of suppressing NKT cell using the same

<130> P11-101224-01

<160> 10

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR PRIMER

<400> 1

atgaacaatc tctggaaagc ctgg 24

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR PRIMER

<400> 2

tcagcacacg aaaaaccgca tcca 24

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR PRIMER

<400> 3

atgaccacag tccatgccat c 21

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR PRIMER

<400> 4

cctgcttcac caccttcttg

20

<210> 5

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR PRIMER

<400> 5

cgggaattca tgaacaatct ctggaaa

27

<210> 6

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR PRIMER

<400> 6

attctcgagt cacaggcgga tcaaggg

27

<210> 7

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR PRIMER

<400> 7

cgggaattcc ccgatggaat cactaaa

27

<210> 8

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR PRIMER

<400> 8

attctcgagt cacgtgtatg acttccg

27

<210> 9

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR PRIMER

<400> 9

cgggaattcc atgtggcctg gacaata

27

<210> 10

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR PRIMER

<400> 10

attctcgagt cagcacacga aaaaccg

27