

수지상세포 활성화를 위한 세포투과 펩타이드가 결합된 재조합 전립성 산성 인산분해효소의 정제

이기완 · 류 강*

크레아젠(주) 단백질 공학팀

Purification of Recombinant CTP-Conjugated Human prostatic acid phosphatase for activation of Dendritic Cell

Ki-Wan YI and Kang RYU*

Protein Engineering Team, CreaGene Inc., 138-6 Seongnam-si, Gyeonggi-do, KOREA, 462-120.

Abstract Human prostatic acid phosphatase (PAP), with comprehensive homology to glandular kallikrein, are representative serum biomarkers of prostate cancer. Dendritic cell (DC), which is the potent antigen-presenting cells(APC) in the immune system, can induce strong T cell responses against viruses, microbial pathogens, and tumors. Therefore, the immunization using DC loaded with tumor-associated antigens is a powerful method for inducing anti-tumor immunity. The CTP (Cytoplasmic Transduction Peptide) technology developed by Creagene which can transport attached bio-polymers like nucleic acids or proteins into the cell with high permeation efficiency. As the active forms of PAP can mediate apoptotic processing, we used multimer forms of PAP as an inactive form for antigen pulsing of DCs. In this study, multimeric forms of CTP-rhPAP was obtained according to the advanced purification process and subsequently confirmed by gel filtration chromatography, western blot and Dynamic Light Scattering. Therefore, CTP-conjugated PA multimers transduced into the cytoplasm were efficiently presented on the cell surface without any harm effect on cells via MHC class I molecules and result in induction of a large number of effector cell.

Keywords: Human prostatic acid phosphatase, Dendritic cell, antigen, Cytoplasmic Transduction Peptide, multimer, nanoparticle

서 론

전립선암의 약 90%는 자신의 몸에서 만들어지는 남성 호르몬에 의해 증식한다는 특징을 가지고 있다. 대부분의 전립선암은 초기에 호르몬 치료에 잘 반응하여 80-90%의 높은 반응률을 보인다. 하지만, 평균적으로 18-24개월 후에는 다시 재발함으로써 남성호르몬 비의존성 (androgen independent) 상태로 진행된다(1, 2). 재발된 전립선암은 진행성 호르몬 불응 상태로 발전하여 1-2년 이내에 사망

하게 된다. 결국 모든 전립선암으로 인한 사망은 호르몬 불응성 전립선암 (hormone refractory prostate cancer, HRPC)으로의 진행에 의해 발생한다고 보고되었다(3). 호르몬 불응성 전립선암 치료를 위한 새로운 항암 치료제의 개발이 시급한 실정이며, 그 중 하나가 맞춤형 치료제인 수지상 세포 백신을 이용한 면역치료법이다. 최근까지 전립선암은 이에 대한 면역반응이 낮은 종양으로 알려져 있었으나 최근에 전립선암 조직에 림프구의 침윤이 발견되고 전립선암 환자에서 면역 반응의 증거가 발견되어 면역치료법이 전립선암의 새로운 치료법이 될 가능성을 제시하였다. 특히 인체에서 전문적인 항원제시세포인 수지상 세포를 이용한 백신요법이 제 1상 및 제 2상 임상 연구를 통해 안전성이 입증되었으며 종양항원에 특이적인

*Corresponding author

Tel: +82-31-737-3329, Fax: +82-31-737-3388
e-mail: rg@creagene.com

면역반응을 유도할 수 있다는 점이 알려졌다. 수지상세포 (Dendritic Cell, DC)는 면역계에 존재하는 세포 중에서 항원을 전달하는 능력이 가장 강력한 항원제시세포이다. 수지상 세포는 항원과 접한 적이 없는 원시 T 세포를 자극 시킬 수 있는 일차면역반응 유도 능력을 지니며, 또한 면역 기억을 유도할 수 있는 특성을 갖는 유일한 면역세포이다(4, 5). 수지상 세포가 강력한 면역반응 활성화 기능을 할 수 있는 것은 항원제시세포 (APC, Antigen Presenting Cell)로서 세포 표면에 MHC 분자(I/II) 뿐만 아니라, 보조자극분자 (co-stimulatory molecules) CD80, CD86등과 부착분자 (adhesion molecule) ICAM-1들을 고농도로 발현하고 있으며, 여러 가지의 IFN-알파, IL-12, IL-18 등과 같은 사이토카인을 분비하기 때문인 것으로 알려져 있다(6, 7). 수지상세포는 세포 표면에 항원제시분자들 (MHC 분자와 보조자극분자들)을 많이 발현하고 있고, IFN-알파, IL-12 등 여러 가지 사이토카인을 분비하기 때문에 항원 특이 세포살해 T 세포의 생성, Th1 세포의 증식 및 활성화를 유도할 수 있다고 알려져 있다(8, 9). 항암 면역반응을 유도하기 위해서는 세포독성 T 세포의 유도가 중요하게 여겨지는데, 세포독성 T 세포 유도 반응은 바이러스의 침입에 의해 주로 이루어진다. 일반적으로 바이러스 항원과 달리 종양 항원은 대개 면역 유도능력이 약하여 그 자체만으로는 지속적이고 효과적인 항암면역 반응을 유도할 수 없기 때문에, 효과적인 항암면역반응을 유도하기 위해서 인체내에서 새로운 항원에 대한 면역유도를 담당하는 가장 강력한 항원전달세포인 수지상세포를 암치료 백신 제작에 사용하고 있다(10, 11).

전립선암 환자에게 발견되는 대표적인 특이항원은 전립선특이항원 (prostate specific antigen, PSA)(12, 13)과 전립성 산성 인산분해효소 (prostate acid phosphatase, PAP), 전립선특이 막 항원 (prostate-specific membrane antigen, PSMA) 등이다. 이들 항원중에서, 전립성 산성 인산분해효소는 산성 조건하에서 인산 모노에스테르을 가수분해하는 효소 (산성인산효소)이고, 전립선 상피세포에서 생산되며(14), 전립선 조직에 가장 많이 험유된 당단백질이다(15). 전립성 산성 인산분해효소는 phosphotyrosine이나 뉴클레오타이드를 함유하는 광범위한 alkyl/aryl orthophosphate monoesters를 가수분해하며(16, 17) 또한 phosphopeptides나 phosphoproteins과 같은 거대분자를 탈인산하는 것으로 알려져 있다(18, 19). 전립성 산성 인산분해효소의 세포 성장 조절기능은 tyrosine phosphatase (PTP)의 고유 활성을 포함하는 것으로 보고되어있다(20). 전립선 상피세포에서 세포증식 (proliferation)은 높은 protein tyrosin kinase (PTK) 활성과 낮은 활성을 보여주는 전립성 산성 인산분해효소사이에 상반된 상관관계가 있으나, 반면에 세포분화 (differentiation)는 반대의 양상을 보인다(21). 대다수 알려진 PTP의 활성은 signal transduction 경로의 negative regulators이며(22, 23) 세포 배양에서 PTKs에 의해 유도된 transformation phenotype을 억제하는 역할을 한다(24, 25). 생체내에서 hPAP는 PTP

활성을 가지며 phosphotyrosine proteins과 유사한 거동을 한다(26, 27). hPAP는 중성 조건에서 상피세포 성장인자 수용체를 선택적으로 탈인산화시키며 결과적으로 수용체 단백질의 특이적 PTK 활성을 감소시킨다(28). 최근의 연구에서 전립선암의 세포내 전립성 산성 인산분해효소 활성은 세포성장속도와 상반된 상관관계를 보여준다(29, 30). 단백질 수준에서 ErbB-2의 인산화된 Tyr의 정도는 세포 증식의 androgen의 반응성을 가지고 hPAP의 증가가 수반된 탈인산화는 이와 상반된 상관관계를 가져 증식을 저해한다(31). 따라서 세포내 hPAP에 의해 조절된 ErbB-2의 tyrosine 탈인산화는 androgen 매개 세포증식 신호체계의 주된 조절인자라고 보여진다(32). 이러한 보고들은 hPAP의 활성이 수지상세포의 증식에 저해 요소로 작용될 수 있음을 시사하는 바가 크다.

수지상 세포를 이용한 항암치료를 위해서는 항원 감작시 수지상세포의 분화를 억제하지 않으며 수지상 세포를 안전하고 효과적으로 감작할 수 있는 항원의 분리 및 정제 공정의 개발이 필요하다. 크레아젠(주)에서는 세포 내로의 높은 침투 효율성을 가지며 핵산이나 단백질과 같은 생체 고분자 물질을 접합하여 세포내로 수송할 수 있는 기술인 세포막 투과성 웹티드 (cytoplasmic transduction peptide, CTP)를 개발하였다(33). 본 연구에서는 수지상 세포의 분화시 세포사멸을 유발시키지 않고 감작시에 수지상 세포의 분화를 억제하지 않는 전립선암 면역치료법에 사용되는 수지상 세포의 감작용 항원으로서 불활성화 CTP-rhPAP 단백질을 다량체의 나노미립자형태로 생산하는 공정을 개발하였다.

재료 및 방법

CTP-rhPAP 발현 균주의 제작

LNCap 세포를 수획하여 Trizol (Gibco BRL)을 사용하여 총 RNA를 추출하였고, 이소프로판을 침전 및 70% 에탄올 세척과정을 통하여 정제하였다. cDNA 합성은 10 µg의 총 RNA를 1 µg의 올리고 (dT) 12-18와 혼합하여 65°C에서 5분간 변성 (denaturation)시킨 후, 즉시 얼음에 옮기고 여기에 역전사효소 반응 완충액 및 10 mM DTT, 1 mM dNTP 혼합물, 그리고 20 Unit RNAsin을 첨가하였다. 이 시료를 42°C에서 2분간 전반응시킨 후 200 Unit의 MMLV (Molony Murine Leukemia Virus) 역전사효소를 첨가하여 다시 42°C에서 60분간 반응 시켰다. 이 반응이 완전히 끝난 후 70°C에서 15분간 방치하여 효소를 비활성화하였으며, 이렇게 합성된 cDNA를 주형으로하여 전립성 산성 인산분해효소의 유전자를 증폭하였다. PCR은 PAP-Hind III (sense; 139-159 : 5'-TACCCAAGCTTCGCCACCATGGATAAGGA GTTGAAGTTGTGACT-3')와 PAP-BamH I (anti-sense; 1200-1815 : 5'-TACGGATCCATCTGTACTGTCCTCAGTAC

-3') 프라이머를 사용하여 94°C, 30초; 52°C, 30초; 72°C, 50초; 총 25 사이클을 행하여 PAP (1062 bp)의 DNA 단편을 확보하였다. 중폭시킨 전립성 산성 인산분해효소 유전자단편과 Washington University에서 제공받은 pTD 벡터를 변형한 pCTP 벡터를 Hind III와 BamH I로 처리한 후 함께 접합하여 클로닝하였다. 벡터에 삽입한 DNA 서열 분석을 수행하여 cDNA가 인코딩 (encoding)하는 아미노산 서열을 확인하였다. C-말단 근처에 위치한 트랜스멤브레인에 결합되는 것이 예상되는 부위가 제외된 부분으로서 잔기서열 38-386 (354aa)에 해당된다. 제작된 플라스미드를 DH5 α 대장균 균주에 열충격방법 (heat-shock method)으로 형질전환후 LB/amp+ 한천배지에 도말하여 16시간 동안 37°C 배양기에서 배양하였다. 콜로니 형성 후 3개를 콜로니를 선별하여 플라스미드 DNA를 분리하여 서열 분석을 의뢰 및 확인하여 BL21 대장균 균주에 재형질전환하였다. 형질전환된 CTP-hPAP 콜로니를 선택하여 DNA 염기서열과 아미노산 서열을 확인한 후 최종적으로 선별하였다. 선별된 CTP-hPAP 클론을 100 µg/ml ampicillin 이 첨가된 100 ml LB 액체배지에 접종한 다음 37°C에서 180 rpm으로 16시간동안 배양하였다. 배양된 CTP-hPAP 균주를 원심분리하여 상등액을 제거하고 100 µg/ml ampicillin 이 첨가된 100 ml LB 액체배지로 세포 세척을 한 후 원심분리하여 상등액을 제거하였다. 이 과정을 2번 반복 수행하였다. 새로운 100 µg/ml ampicillin이 첨가된 100 ml LB 액체배지로 세포를 재현탁한 후 최종농도가 20% 글리세롤이 되도록 한 후 저장용 균주를 만든 후 -80°C에 보관하였다.

CTP-rhPAP 단백질 발현 균주 배양

생산용 균주를 37°C에서 1시간 동안 녹인 후 새로운 100 µg/ml ampicillin이 첨가된 100 ml LB 액체배지에 접종하여 37°C 배양기에서 180 rpm으로 16시간 동안 배양하였다. 배양된 균주를 100 µg/ml ampicillin이 첨가된 LB 액체배지 2 L에 재접종하여 O.D = 0.4에서 최종 농도 0.4 mM IPTG (isopropylthio-β-D-galactoside)를 처리하여 37°C 배양기에서 180 rpm으로 4시간 더 배양한 후, 단백질 발현된 균주를 원심분리 (5,000 rpm, 37°C, 10 min)를 통해서 펠렛 형태로 회수하였다.

봉입체 (inclusion body)의 제조

회수된 균주 펠렛에 W1 완충액 (50 mM Tris, pH 8.0)을 20 ml (10 ml/g)을 첨가하여 1시간 동안 실온에서 세포 세척을 수행하였다. 얼음상에서 초음파 파쇄 (sonication) (40%, output 5)을 수행한 후 원심분리기로 봉입체 (inclusion body, IB)를 포함하는 침전물을 회수하였다. 위의 과정을 W2 세척완충액 (50 mM Tris, 0.1% Triton X-100, 0.1 M NaCl, pH 8.0), W3 세척완충액 (50 mM Tris, 0.1% Triton X-100, 0.2 M NaCl, pH 8.0), W4 세척

완충액 (50 mM Tris, 0.1% Triton X-100, 0.3 M NaCl, pH 8.0, 5 ml/1g)으로 반복 수행하여 봉입체를 세척하였다. 얻어진 봉입체를 단백질 농도가 약 1 mg/ml이 되도록 용해 완충액 (6 M GnHCl, 50 mM Tris, 0.1% Triton X-100, 0.1M NaCl, pH 8.0)으로 용해시켰다. 용해된 봉입체를 4°C, 13,000 rpm에서 1시간 동안 원심분리한 후 상등액을 0.2 µm 사이즈의 멤브레인으로 여과하였다.

친화성 크로마토그래피 (affinity chromatography)에 의한 정제

Ni-NTA 아가로즈 레진 (20 ml, Qiagene, Hilden, Germany) 을 컬럼 (GE Healthcare, USA)에 충전하여 FPLC (AKTA explore, GE Healthcare, USA)에 장착하여 사용하였다. 평형화 완충액 (6 M GnHCl, 50 mM Tris, 0.05% Triton X-100, 0.1M NaCl, pH 8.0)으로 컬럼을 평형화시킨 후, 용해된 봉입체를 주입하여 컬럼 레진에 결합시켰다. 세척 완충액 (8 M Urea, 50 mM Tris, 0.05% Triton X-100, 0.1 M NaCl, pH 8.0)으로 단백질 결합 레진을 10 CV (column volume)으로 세척한 후, 농도구배 완충액 (1 M Urea, 50 mM Tris, 0.05% Triton X-100, 0.1 M NaCl, pH 8.0)으로 1 min/ml의 속도로 우레아 (urea) 농도를 8 M에서 1 M 까지 낮추면서 40 CV로 수행하였다. 용출 완충액 (1 M imidazole, 1 M Urea, 50 mM Tris, 0.05% Triton X-100, 0.1 M NaCl, pH 8.0)으로 단백질을 용출시켰다. 이후 잔여 단백질은 세척완충액으로 완전 세척하여 제거하였다.

겔 여과 크로마토그래피 (gel filtration chromatography)에 의한 정제

HiPrep 16/60 Sephadex S-100 HR 컬럼 (GE Healthcare, USA)을 FPLC (AKTA explore, GE Healthcare, USA)에 장착하여 사용하였으며 분자량에 따라 용출하였다. 완충액 (10 mM Tris, 50 mM Glycine, pH 8.0)의 조성에서 다량체 (multimer)를 분리하였다.

투석 (dialysis)에 의한 완충액 교환

시료를 Slide-A-Lyzer Cassette (Pierce, IL, USA)를 이용하여 투석을 통하여 완충액을 교환하였다. 10 mM Tris, 50 mM Glycine, 2% Glycerol, pH 8.0 완충액 (2 L)에서 4°C에서 16시간 이상 두어 투석을 행하였다. 투석공정은 제조사의 프로토콜로 행하였다.

단백질 정량

봉입체 (IB) 및 분리한 시료는 UV 분광광도계 (Bio-Rad, CA, USA)를 사용하여 595 nm에서 단백질 정량을 행하였다. CTP-rhPAP 단백질은 Bradford 분석법으로 595 nm에

서 정량하였으며, 단백질 표준물질로 bovine serum albumin (Pierce, IL, USA)을 사용하였다.

SDS-PAGE와 면역블로팅 (immunoblotting)

SDS-PAGE와 웨스턴 블로팅 (western blotting)을 통해 단백질의 순도를 확인하였다. 발현된 단백질이 인체유래 PAP 임을 확인하기 위하여 Ausubel F. M. 등이 기술한 방법(33)에 따라 western blot을 수행하였다. Anti PAP mAB (AbD Serotech, Oxford, UK)과 Anti-His-taq mAb (Qiagene, Hilden, Germany)를 1차 항체로, anti-mouse IgG-AP (A3438, Sigma, CA, USA)를 2차 항체로 사용하였으며, 각각의 항체는 phosphate buffered saline (pH 7.4)에 Anti-His-taq mAb (1 : 2,000)와 Anti PAP mAB (1 : 100)으로 희석하여 사용하였다. Immobilon-NC membrane (Wattman, Dassel, Germany) 상으로 이동시킨 단백질들은 AP-conjugate substrate kit (Sigma, Steinheim, Germany)를 사용하여 발현된 인체유래 PAP를 확인하였다.

엔도톡신(endotoxin) 농도 측정

CTP-rhPAP의 최종 산물중에 엔도톡신 농도를 측정하였다. 엔도톡신 측정 실험은 LAL (Limulus Amebocyte Lysate) 실험의 키네틱 방법 (Charles River Endosafe)에 의하여 행하였다. 샘플을 LAL Reagent water에 희석한 후, LAL Reagent 100 μl 를 첨가하여 반응을 진행하였다.

동적 광 산란 광도계 (Dynamic Light Scanning)에 의한 CTP-rhPAP 다양체 항원의 분석

분리정제된 비활성형의 CTP-rhPAP 다양체 항원의 평균 입자 크기를 분석하기 위하여 동적 광 산란 광도계(DLS-8000 series, Otsuka, Japan)를 사용하였다. 산란광선의 강도는 입사광의 90°에서 검출하였으며 CTP-rhPAP 항원을 상대산란강도를 확인함으로써 입자 분포를 분석하였다. 분리정제된 비활성형의 CTP-rhPAP 다양체 항원을 10 mM Tris, 50 mM Glycine, 2% Glycerol, PH 8.0 완충용액에 적정량을 희석한 다음 분석하였으며 표준물은 동일한 완충 용액을 사용하였다. 모든 데이터 분석은 자동 모드에서 실행되었으며 분석은 최종 공정에서 분리 정제된 CTP-rhPAP 다양체 항원의 시료를 3회를 반복하여 입자의 분포를 측정하였으며 평균값으로 입자의 분포와 크기를 산정하였다.

수지상세포의 제조와 항원에 의한 감작

2×10^7 세포/ ml 의 PBMC (peripheral blood mononuclear cell)을 풀어, 1% 인간 혈청이 포함된 RPMI 1640 배지 (Lonza, MD, USA)를 넣어 37°C 인큐베이터에서 두 시간 동안 배양하였다. 두 시간 후에 비-부착성 (non-adherent)

세포를 제거하고 부착성 (adherent) 세포에 수지상세포 분화배지 (X-VIVO 배지 (Lonza, MD, USA), 500 ng/ml IL-4 (Creagene, Korea), 100 ng/ml GM-CSF (Creagene, Korea)를 첨가하여 37°C CO₂ 배양기에서 배양하였다. 배양 5일 째 정제된 CTP-rhPAP를 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 또는 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 양으로 각각 처리하고 IFN 감마를 1000 U/ml이 되도록 처리하였다. 배양 6일 째, 성숙화 사이토카인 혼합물 [IL-6, IL-1 β , TNF- α (Endogen, IL, USA), PGE₂, Poly I : C (Sigma, Steinheim, Germany), Picibanil (Chugai, Tokyo, Japan)]를 처리하여 수지상세포의 성숙화를 유도시켰다. 배양 7일 째 성숙화된 수지상세포를 수거하여 수지상 세포 (DC) 표면 표지로 사용되는 항체 (HLA-DR, CD86, CD80, HLA-ABC, CD1a, CD40, CD83, CD14, CD19, PI (BD Bioscience, CA, USA)로 반응시킨 후 FACS (BD Bioscience, CA, USA)로 분석하였다.

결과 및 고찰

CTP-rhPAP 단백질 발현 확인 및 내포체의 회수와 용해

유전자 클로닝을 통해 선별된 CTP-rhPAP 발현 형질 전환 균주를 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ampicillin이 첨가된 LB 액체배지에 배양한 후 O.D = 0.4에서 최종농도 0.4 mM IPTG를 첨가하여 시간별로 시료를 채취한 후 동일한 단백질양으로 단백질 발현을 확인하였다. IPTG를 첨가한 후 30분부터 발현이 시작되었고 3시간부터 단백질이 과발현됨을 SDS-PAGE로 확인하였다 (fig. 1). 과발현된 CTP-rhPAP는 모두 불용성 내포체 형태로 존재하였고 발현량은 불용성 총단백의 80% 이상이었다. 수득한 세포들을 초음파 파쇄한 후 원심분리한 침전물을 세척 완충액 (50 mM Tris, 0.1% Triton X-100, 0.1~0.3 M NaCl, pH 8.0)을 사용하여 총 3회 세척하였다. 분리된 침전물을 각 용해 완충액으로 용해시킨 다음 침전물을 원심분리를 통하여 상층액을 제거하고 각 단계의 상등액을 SDS-PAGE로 확인하였다. 회수된 불용성 내포체를 용해 완충액으로 완전히 용해시킨 후 0.2 μm 의 마이크로필터로 여과하여 CTP-rhPAP 단백질을 재회수하였다. 세포내 단백질 불순물은 완전히 제거되어 목적단백질의 순도는 95% 이상임을 확인하였다 (fig. 2, fig. 5). 이때 회수된 용해된 내포체 CTP-rhPAP는 5 EU/ μg 이상의 엔도톡신을 함유하고 있었다 (Table 1).

Table 1. The purification table of recombinant human CTP-rhPAP on purification process step

	total protein (mg)	yield (%)	endotoxin (EU/ μg)
Solubilized Inclusion Body	200	100	>5.000
Ni ²⁺ affinity chromatography	170	85	0.06
After dialysis	88	44	<0.005

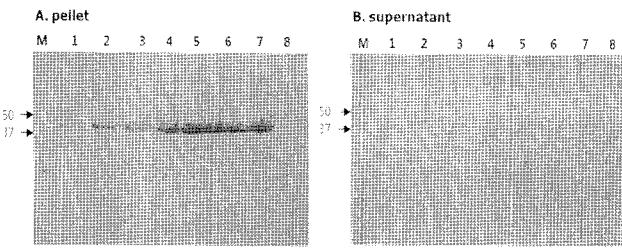


Fig. 1. SDS-PAGE analyses of expression of CTP-rhPAP after induction.

expressed recombinant human EC-SOD was loaded on a pre-cast gradient (4-12%) gel (A) pellet after cell disrupt by sonication, (M : molecular weight marker, 1 : before induction, 2 : 30 min., 3 : 2 hr, 4 : 3 hr., 5 : 4 hr., 6 : 5 hr., 7 : 19 hr., 8 : control after 19 hr, without induction). (B) supernatant after cell disrupt by sonication (the lane is same as A).

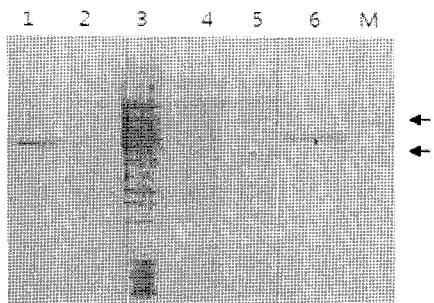


Fig. 2. SDS-PAGE analyses of preparation and isolation of inclusion body of CTP-rhPAP.

inclusion body was loaded on a pre-cast gradient (4-12%) gel, after removed precipitated pellet by centrifuge (M: molecular weight marker, 1 : inclusion body, 2~5 : supernatant after washing step 1~4, 6 : solubilized inclusion body after solubilization step).

친화성 크로마토그래피 (Affinity Chromatography)에 의한 정제

용해 완충액에 용해되어 있는 CTP-rhPAP를 친화성 컬럼을 이용하여 선택적으로 1차 분리하였다. Ni-NTA 아가로즈 레진 (20 ml)을 컬럼에 충진하여 FPLC (AKTA explore)에 장착하여 사용하였다. 평형화 완충액으로 컬럼을 평형화 시킨 후, 용해시킨 내포체를 주입하여 결합시켰다. 세척 완충액 10 CV로 단백질 결합 레진을 세척하면서 완충액을 교환한 후, 용출완충액상의 이미다졸 농도를 0 M에서 1 M로의 농도구배로 1 ml/min로 40 CV로 흘리면서 단백질을 용출시켰다. 총 170 mg의 CTP-rhPAP 항원의 분리 정제를 SDS-PAGE로 확인한 후, 분획 No. 2-12를 수집하여(Fig. 3), 다음 공정을 수행하였다. 정제된 목적 단백질은 순도 98% 이상을 유지하였으며(Fig. 5) 엔도톡신은 0.06 EU/ μ l 정도로 분석되었으며 대다수의 엔도톡신이 계면활성제인 Triton X-100에 의해 목적 단백질과 유리되어 효과적으로 제거되는 것으로 사료된다(Table 1).

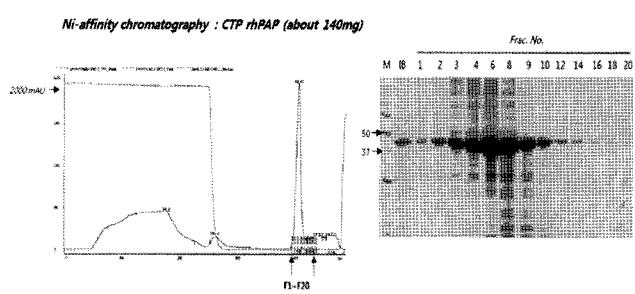


Fig. 3. Purification profile of CTP-rhPAP by Ni^{2+} affinity chromatography.

Purification of CTP-rhPAP from solubilized inclusion body was performed with packed Ni^{2+} affinity Columns. A. Purification profile by FPLC with Ni^{2+} affinity chromatography. B. SDS-PAGE analyses of Ni^{2+} affinity chromatography. (M : molecular weight marker, IB : inclusion body, 1~20 : fraction number of elution step).

투석에 의한 정제와 겔 여과 크로마토그래피를 이용한 분석

Ni^{2+} affinity chromatography에 의해 분리된 시료를 50 mM Tris, 1% Tween 20, 0.1 M NaCl, pH 8.0 완충액을 사용하여 겔 여과 크로마토그래피를 수행한 결과 이량체 (dimer)의 크기에서 분리됨을 확인하였다(Fig. 4. B). 이는 계면활성제인 1% Tween 20이 겔 여과 크로마토그래피 공정중에 과량의 이미다졸이 희석되면서 발생되는 CTP-rhPAP의 다중화 (aggregation)를 저해하여 재접합 (refolding) 형태의 CTP-rhPAP를 형성하여 활성을 가지는 이량체 (dimer)를 형성하는 것으로 보여진다. 생물학적 활성을 가지는 이량체 형태의 CTP-rhPAP의 경우, 수득율이 낮았으며, 수지상 세포에 처리하는 경우 수지상 세포의 사멸을 유도하고 분화를 저해하여 생존률이 떨어지는 이유 때문에 (data not shown) 불활성 형태인 다량체 (multimer) 크기의 CTP-rhPAP을 선택하였다.

Ni^{2+} affinity chromatography에 의해 분리된 CTP-rhPAP 항원 시료를 10 mM Tris, 50 mM Glycine, pH 8.0 완충액을 사용하여 Sephadryl S-100 HR 컬럼을 이용하여 겔 여과 크로마토그래피를 수행한 결과, 균일하게 다량체 (multimer) 형태인 blue dextran (200 KDa) 크기에서 분리됨을 확인하였다(Fig. 4. A). 이는 1% Tween 20를 사용하는 공정에 비하여 Ni^{2+} affinity chromatography에 의해 분리된 CTP-rhPAP 항원 시료에 포함되어 있는 Triton X-100의 급격한 희석에 의해 다량체 (multimer) 형태인 CTP-rhPAP 항원이 제조되는 것으로 사료된다. 그리고 Ni^{2+} affinity chromatography에 의해 분리 정제된 CTP-rhPAP 항원 시료를 투석 (MWCO = 25 KDa)을 통해 용출에 사용되어진 과량의 이미다졸을 제거하고 최종 저장 완충액으로 교환한 후 시료를 겔 여과 크로마토그래피로 분석하였다(Fig. 4. A). Ni^{2+} affinity chromatography에 의해 1차 분리 정제된 CTP-rhPAP 시료와 동일한 위치에서

분리되는 것이 확인되었고 분리 정제된 CTP-rhPAP 목적 단백질이 전체 단백질의 98% 이상의 순도를 가지는 것을 크로마토그램을 통하여 확인하였다. 엔도톡신은 0.005 EU/ μ g 이하로 분석되었으며 이는 생물학적 단백질제제의 기준 치에 적합하는 것으로 판명되었다(Table 1). 각 단계별 CTP-rhPAP 항원의 수득율과 엔도톡신 잔유량을 분석한 결과는 Table 1과 같다. SDS-PAGE에서 환원 (reducing) 과 비환원 (non-reducing)에서 분리 정제된 CTP-rhPAP 목적 단백질이 전체 단백질의 98% 이상의 순도를 가지는 것으로 확인되었으며(Fig. 5. A), 웨스턴 블로팅 (western blotting)에서는 환원은 99%, 비-환원에서는 전체단백질의 98% 이상을 차지하는 것으로 확인하였다(Fig. 5. B).

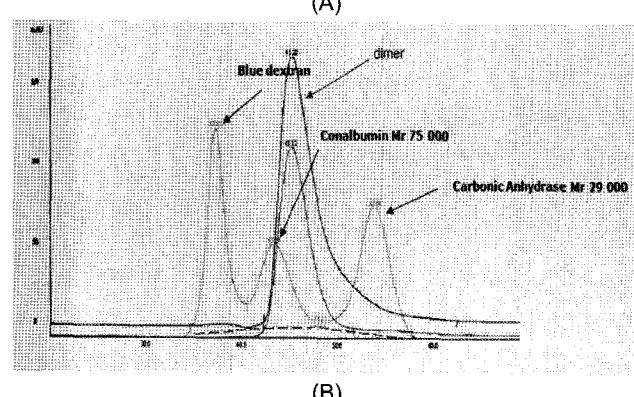
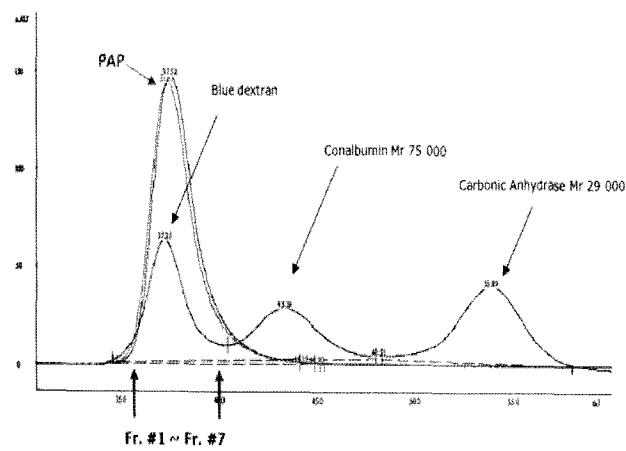


Fig. 4. Purification profile of the CTP-rhPAP by Gel Filtration chromatography.

The multimeric **CTP-rhPAP** (retention volume = 37.52 ml) eluted around retention volume of blue dextran (A) and dimeric **CTP-rhPAP** (retention volume = 45.2 ml) was eluted around conalbumin retention time (B), indicating that it was a dimeric **CTP-rhPAP** of around 75 kDa. Properly assembled multimeric **CTP-rhPAP** and dimeric were assessed against blue dextran ($M_w = 200,000$, retention volume = 37.25 ml), conalbumin ($M_w = 75,000$, retention volume = 43.39 ml) and carbonic anhydrase ($M_w = 29,000$, retention volume = 53.29 ml) standards using gel filtration chromatography on a HiPrep 16/60 Sephadex S-100 HR FPLC column.

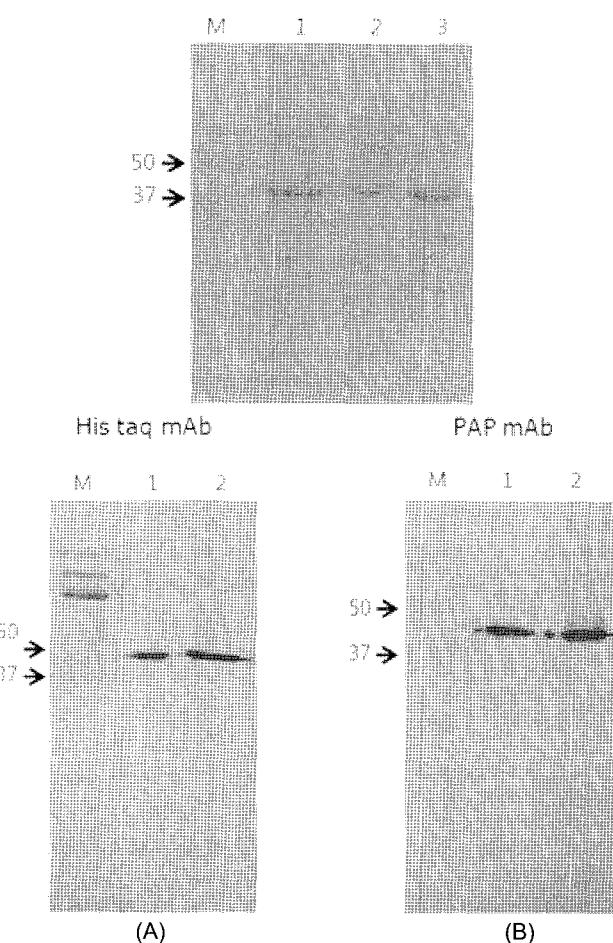


Fig. 5. SDS-PAGE and western blot analyses of CTP-rhPAP during purification process.

Purified recombinant human CTP-rhPAP was loaded on a pre-cast gradient (4-12%) gel (A) and then visualized using western blot (B). (M : molecular weight marker, 1 : reduced form of CTP-rhPAP after Ni^{2+} affinity chromatography, 2 : reduced form of CTP-rhPAP after dialysis, 3 : non-reduced form of CTP-rhPAP after dialysis).

동적 광산란 분석에 의한 CTP-rhPAP 다량체 항원의 크기 분석

최종 공정에서 분리 정제된 CTP-rhPAP 다량체 항원의 시료를 3회를 반복하여 입자의 분포를 측정하였으며 평균 값으로 입자의 분포와 크기를 산정하였다. CTP-rhPAP 다량체 항원의 평균 입자 분포는 114.6 ± 9.8 nm 크기로 분석되었으며 나노입자 형태의 다량체 항원으로 확인되었다(Fig. 6). 이러한 다량체화된 나노입자의 항원으로 불활성 CTP-rhPAP를 제조함으로써 수지상세포의 사멸을 유도하고 분화를 저해하는 요소를 제거하여 항원 감작시 효과적인 수지상세포의 분화를 유도할 수 있으며 이미 보고된 것처럼 항원의 크기를 증가시킴으로써 수지상세포로의 항원 up-take 능을 증가시킬 수 있다고 판단된다(34, 35).

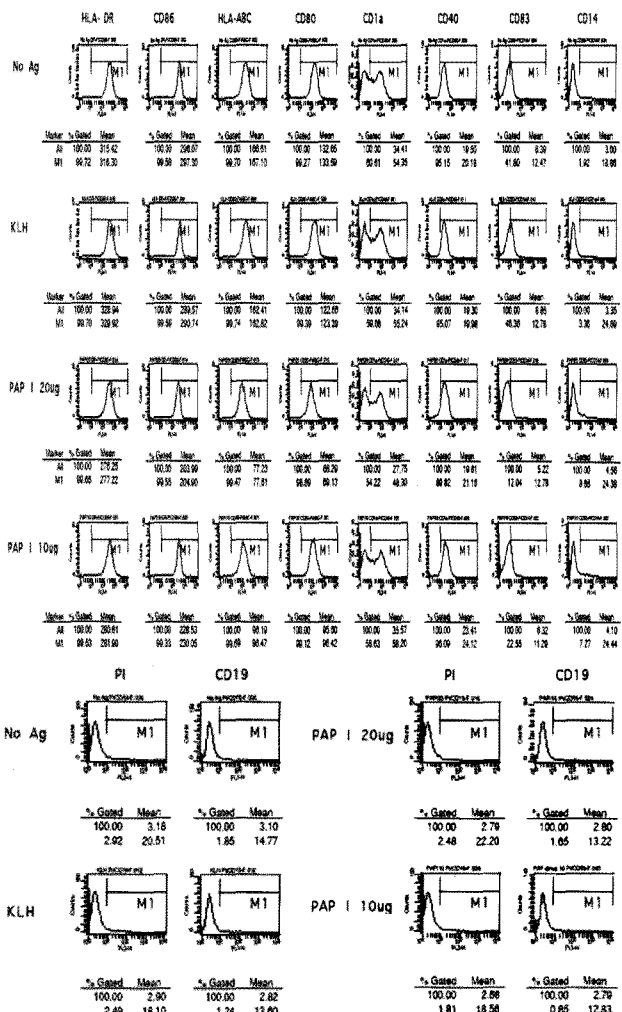


Fig. 6. FACS analysis on cell surface phenotypes of human dendritic cells.

DCs were generated from PBMC and cultured in supplemented with GM-CSF and IL-4. To induce DCs maturation, PC antigens was added and the cells were further cultured for 48 hs. Then cells were harvested, and expression of HLA-DR, CD86, HLA-ABC, CD80, CD1a, CD40, CD83, CD14, PI, CD19 was determined by FACS analysis.

유세포 분석기 (FACS)에 의한 수지상 세포 표면분자 표지의 분석

수지상세포는 T세포에 항원을 제시할 수 있는 세포표면분자로 MHC 분자를 다양으로 발현하고 있으며, T세포를 더욱 활성화 시킬 수 있는 CD80, CD86과 같은 공동자극분자 (co-stimulatory molecule)는 물론, 부착분자 (adhesion molecule)인 CD11c를 발현하고 있다. 뿐만 아니라, 이러한 공동자극분자와 부착분자의 발현을 증가시키는 CD40을 발현하고 있어 수지상세포에 의한 T세포의 면역 활성을 더욱 증진시킬 수 있다. 따라서 분리 정제된 다량체 형태의 CTP-rhPAP 항원을 10과 20 μ g의 농도로 처리하였을 때 수지상 세포의 세포표면분자의 발현 증가를 관찰하기 위하여 각 분자에 특이적인 단클론항체를 이용하여 2중 염색 (double staining)한 후 유세포 분석기로 분석하였다.

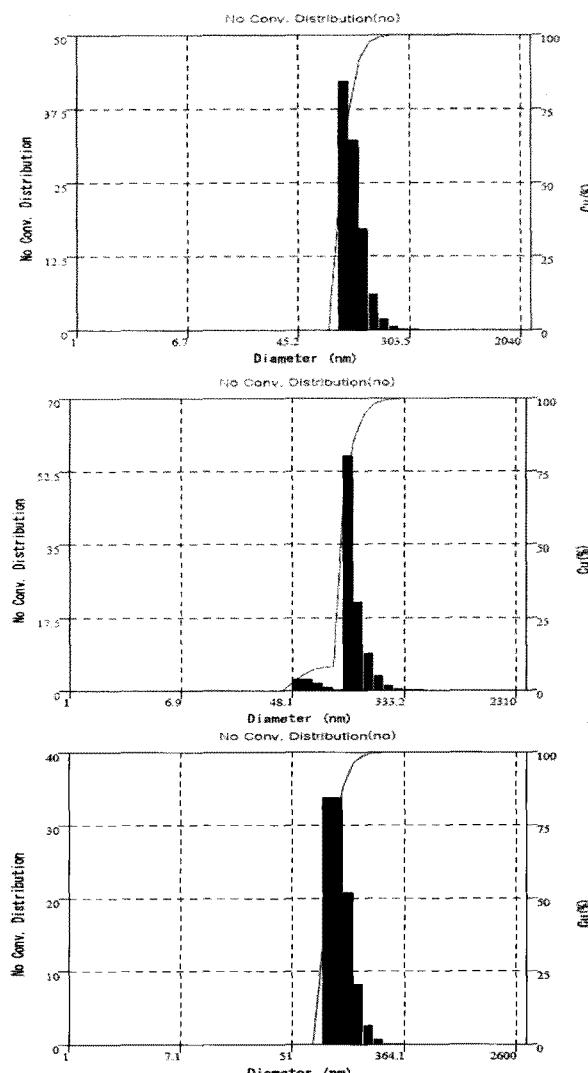


Fig. 7. Size characterization of hCTP-PAs using Dynamic Light Scattering (DLS).

Size distribution of hCTP-PAP was determined by DLS which prepared at pH 8.0 in 10 mM Tris, 50 mM Glycine, 2% Glycerol buffer. DLS measurement of CTP-rhPAP; The average diameter of CTP-rhPAP is 115 nm after 3 measurements.

그 결과 분리 정제된 다량체 형태의 CTP-rhPAP 항원을 처리한 각 실험군의 경우, 관찰한 세포표면분자 중 공동자극분자인 CD80, CD86의 발현이 항원을 처리하지 않은 대조군과 유사하게 99% 이상 발현되었으며, T-세포 수용

체의 표지인 CD40 또한 낮은 농도 ($10 \mu\text{g}$)의 항원처리에서는 대조군과 유사하게 95% 이상 발현됨이 확인되었으나 높은 농도 ($20 \mu\text{g}$)의 항원처리에서는 대조군보다는 약간 낮은 81% 만이 발현되어 낮은 농도의 항원 처리가 더 효율적인 것으로 판단된다. 아울러 항원제시분자들의 표지인 HLA-ABC, HLA-DR 모두 대조군과 마찬가지로 99% 이상 발현되었고 세포의 생존율의 표지인 P1은 대조군보다 낮아 항원이 처리된 수지상세포의 생존율이 높은 것으로 분석이 되었다. 하지만 monocyte의 표지인 CD14의 경우는 항원 처리시 대조구보다 높아 수지상세포의 성숙화 과정에서 미량의 세포가 monocyte로의 역분화가 일어나는 것으로 판단된다. B-세포의 표지인 CD19의 경우는 높은 농도에서는 대조군과 유사하게 발현되었지만 낮은 농도에서는 대조군보다 2배 이상 낮게 발현되어 상대적으로 CLASS 1 형태의 수지상세포로 성숙화가 진행되었음을 보여준다. 따라서, 다량체 CTP-rhPAP 항원으로 수지상세포를 감작시키고 성숙화 시키는 경우에 낮은 농도 ($10 \mu\text{g}$)에서 수지상세포의 분화와 감작에 더욱 효율적이며 항원의 적합성에 문제가 없음이 확인되었다(Fig. 6). 이 결과는 일반적으로 전립성 산성 인산분해효소가 가지는 수지상세포의 사멸을 유도하고 분화를 저해하는 요소를 다량체화된 나노입자의 항원으로 불활성 CTP-rhPAP으로 감작함으로써 제거하여 항원 감작시 효과적인 수지상세포의 분화를 유도할 수 있음을 제시하여준다.

요약

glandular kallikrein에 광범위한 상동성을 가지는 인간 전립성 산성 인산 가수분해 효소는, 전립선암의 대표적인 혈청 biomarkers이다. 수지상세포는 유력한 항원 제시 세포이며, 바이러스, 미생물 병원체 및 종양에 대하여 면역계통에서 강력한 T 세포 응답을 유도할 수 있다. 따라서, 종양 특이적인 항원으로 감작된 수지상세포를 이용한 면역요법은 anti-tumor 면역 유도를 위한 강력한 방법중의 하나이다. 크레아젠(주)에서 개발된 CTP (세포막 투과성 펩티드) 기술은 세포 내로의 높은 침투 효율성을 가지며 핵산이나 단백질과 같은 생체 고분자 물질을 접합하여 세포내로 수송할 수 있는 기술이다(36). 하지만 활성형의 인간 전립성 산성 인산 가수분해 효소는 세포사멸을 막개할 수 있기 때문에, 본 연구진은 항암 치료용 백신으로의 수지상세포 감작을 위해 비활성형 형태의 다중체 (multimer) 항원을 개발하였다. 본 연구에서, 수지상세포의 감작과 활성화에 안전하고 효율적인 다중체 형태 (multimeric form)의 세포막 투과성 펩티드가 융합된 인간 전립성 산성 인산 가수분해 효소를 얻기 위한 정제공정을 기법을 개발하였고

젤 여과 크로마토그래피, western blot과 Dynamic Light Scattering을 이용하여 확인하였다. 아울러, 정제된 다중체 형태 (multimeric form)의 세포막 투과성 펩티드가 융합된 인간 전립성 산성 인산 가수분해 효소는 수지상 세포의 감작시 세포질 내로 효과적으로 침투되었다. 결과적으로 세포의 사멸의 부작용이 없이 MHC class I 분자를 통해 수지상세포의 표면으로 효과적으로 제시되었다.

접수 : 2008년 12월 22일, 게재승인 : 2009년 1월 14일

REFERENCES

1. 전립선암의 역학과 자연사, *한국비뇨기종양학회지* 2003, **1**(1), 6-9.
2. 한국인의 전립선암의 역학적 고찰, *한국비뇨기종양학회지* 2004, **2**(1), 27-30.
3. Small EJ and Vogelzang NJ (1997), Second-line hormonal therapy for advanced prostate cancer: a shifting paradigm. Variety. *J Clin Oncol*, **15**, 382-8.
4. Banchereau J and Steinman RM (1998), Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**, 245-252.
5. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, and Palucka K (2000), Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* **18**, 767-811.
6. Steinman RM and Cohn ZA (1973), Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* **137**, 1142-1162.
7. Young-Woock Noh and Jong-Seok Lim (2006), Effect of Lipofectin on Antigen-presenting Function and Anti-tumor Activity of Dendritic Cells, *Immune Network*, **6**(2), 102-110.
8. Hilken CM, Kalinski P, de Boer M, and Kapsenberg ML (1997), Human dendritic cells require exogenous interleukin-12-inducing factors to direct the development of naive T-helper cells toward the Th1 phenotype. *Blood* **90**, 1920-1926.
9. Hyunah Lee, Kwang-Min Choi, Soyoung Baek, Hong-Ghi Lee, and Chul-Won Jung (2004), Dendritic Cell Based Cancer Immunotherapy: in vivo Study with Mouse Renal Cell Carcinoma Model, *Immune Network*, **4**(1), 44-52.
10. Nouri-Shirazi M, Banchereau J, Fay J, and Palucka K (2000), Dendritic cell based tumor vaccines. *Immunol Letter* **74**, 5-10.
11. Whiteside TL and Odoux C (2004), Dendritic cell biology and cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother* **53**, 240-248.
12. Steven P. Balk, Yoo-Joung Ko, and Glenn J. Bubley

- (2003), Biology of Prostate-Specific Antigen. *J Clin Oncol* **21**(2), 383-391.
13. A. R. O' Connell and C. Stenson-Cox (2007), A more serine way to die: Defining the characteristics of serine protease-mediated cell death cascade. *Biochimica et Biophysica Acta* **1773**(10), 1491-1499.
 14. Rönnberg L Vihko P, Sajanti E & Vihko R (1981), Clomiphene citrate administration to normogonadotropic subfertile men: Blood hormone changes and activation of acid phosphatase in seminal fluid. *Int J Androl* **4**, 372-378.
 15. Hakalahti L, Vihko P, Henttu P, Autio-Harmainen H, Soini Y & Vihko R (1993), Evaluation of PAP and PSA gene expression in prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma using Northern blot analysis, in situ hybridization and immunochemical stainings with monoclonal and bispecific antibodies. *Int J Cancer* **55**, 590-597.
 16. Apostol I, Kuciel R, Wasylewska E & Ostrowski WS (1985), Phosphotyrosine as a substrate of acid and alkaline phosphatases. *Acta Biochim Pol* **32**, 187-197.
 17. Vihko P, Kurkela R, Porvari K, Herrala A, Lindfors A, Lindqvist Y & Schneider G (1993), Rat acid phosphatase: Overexpression of active secreted enzyme by recombinant baculovirus-infected insect cells, molecular properties and crystallization. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 799-803.
 18. Wasylewska E, Czubak J & Ostrowski WS (1983), Phosphoprotein phosphatase activity of human prostate acid phosphatase. *Acta Biochim Pol* **30**, 175-184.
 19. Li HC, Chernoff J Chen LB & Kirschbaum A (1984), A phosphotyrosyl-protein activity associated with acid phosphatase from human prostate gland. *Eur J Biochem* **138**, 45-51.
 20. Boissonneault M, Chapdelaine A & Chevalier S (1995), The enhancement by pervanadate of tyrosine phosphorylation on prostatic proteins occurs through the inhibition of membraneassociated tyrosine phosphatase. *Mol Cell Biochem* **153**, 139-144.
 21. Tessier S, Chapdelaine A & Chevalier S (1987), Effect of vanadate on protein phosphorylation and on acid phosphatase activity in the canine prostate. *Mol Cell Endocrinol* **64**, 87-94.
 22. Chernoff J (1999), Protein tyrosine phosphatases as negative regulators of mitogenic signaling. *J Cell Physiol* **180**, 173-181.
 23. Li L & Dixon JE (2000), Form, function, and regulation of protein tyrosine phosphatases and their involvement in human diseases. *Semin Immunol* **12**, 75-84.
 24. Woodford-Thomas TA, Rhodes JD & Dixon JE (1992), Expression of a protein tyrosine phosphatase in normal and v-src-transformed mouse 3T3 fibroblasts. *J Cell Biol* **117**, 401-414.
 25. Tonks NK & Neel BG (1996), From form to function: signaling by protein tyrosine phosphatases. *Cell* **87**, 365-368.
 26. Li HC, Chernoff J Chen LB & Kirschbaum A (1984), A phosphotyrosyl-protein activity associated with acid phosphatase from human prostate gland. *Eur J Biochem* **138**, 45-51.
 27. Lin MF & Clinton GM (1986), Human prostatic acid phosphatase has phosphotyrosyl-protein phosphatase activity. *Biochem J* **235**, 351-357.
 28. Lin MF & Clinton GM (1988), The epidermal growth factor receptor from prostate cells is dephosphorylated by a prostate-specific phosphotyrosyl phosphatase. *Mol Cell Biol* **8**, 5477-5485.
 29. Lin MF & Meng TC (1996), Tyrosine phosphorylation of a 185 kDa phosphoprotein (pp185) inversely correlated with the cellular activity of human prostatic acid phosphatase. *Biochem Biophys Res Comm* **226**, 206-213.
 30. Lin MF, Meng TC, Rao PS Chang C, Schönthal AH & Lin FF (1998), Expression of human prostatic acid phosphatase correlates with androgen-stimulated cell proliferation in prostate cancer cell lines. *J Biol Chem* **273**, 5939-5947.
 31. Meng TC, Lee MS & Lin MF (2000), Interaction between protein tyrosine phosphatase and protein tyrosine kinase is involved in androgen-promoted growth of human prostate cancer cells. *Oncogene* **19**, 2664-2677.
 32. Luchter-Wasylewska E (2001), Cooperative kinetics of human prostatic acid phosphatase, *Biochim Biophys Acta* **1548**, 257-264.
 33. Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl (2002), Short Protocols in Molecular Biology : A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, 5th ed. John Wiley & Sons, Inc.
 34. Patricia L. Mottram, David Leong, Blessing Crimeen-Irwin, Simone Gloster, Sue D. Xiang, Jayesh Meanger, Reena Ghildyal, Nicholas Vardaxis, and Magdalena Plebanski (2007), Mol. Pharmaceutics, **4**(1), pp73-84.
 35. Vania Manolova, Anna Flace, Monika Bauer, Katrin Schwarz, Philippe Saudan, and Martin F. Bachmann (2008), Nanoparticles target distinct dendritic cell populations according to their size, European *Journal of Immunology*, Vol. **38** Issue 5, Pages 1404-1413.
 36. Daeyou Kima, Choonju Jeon, Jeong-Hwan Kim, Mi-Seon Kim, Cheol-Hee Yoon, In-Soo Choi, Sung-Hoon Kim, and Yong-Soo Bae (2006), Cytoplasmic transduction peptide (CTP) : New approach for the delivery of biomolecules into cytoplasm in vitro and in vivo, *Experimental Cell Research*, Vol. **312**, Issue 8, Pages 1277-1288.