

는 예방제로서의 수지상 세포의 효능을 분석하는 방법에 관한 것이다: (a) (a') 분석 대상의 수지상 세포를 인간을 제외한 정상동물에게 투여하는 단계 또는 (a'') 인간 전립선암-특이 항원을 발현하는 암 세포주를 인간을 제외한 정상동물에게 투여하여 암을 유발시키는 단계; (b) (b') 상기 단계 (a)에서 (a')을 실시한 경우, 상기 동물에게 인간 전립선암-특이 항원을 발현하는 암 세포주를 투여하는 단계 또는 (b'') 상기 단계 (a)에서 (a'')을 실시한 경우, 상기 암이 유발된 동물에게 분석 대상의 수지상 세포를 투여하는 단계; 및 (c) 상기 동물에서 암 세포의 형성 또는 성장을 측정하여 전립선암 면역치료제 또는 예방제로서의 수지상 세포의 효능을 결정하는 단계.

대표도

도 11a

특허청구의 범위

청구항 1.

다음의 단계를 포함하는 인간 전립선암 동물모델을 이용한 수지상세포-유래 전립선암 면역치료제의 전립선암 치료 효능을 분석하는 방법:

- (a) 인간 전립선암-특이 항원을 발현하는 암 세포주를 인간을 제외한 정상동물에게 투여하여 암을 유발시키는 단계;
- (b) 상기 암이 유발된 동물에 분석 대상의 수지상 세포를 투여하는 단계; 및
- (c) 상기 동물에서 암 세포의 형성 또는 성장을 측정하여 수지상세포-유래 전립선암 면역치료제의 치료 효능을 결정하는 단계.

청구항 2.

제 1 항에 있어서, 상기 동물은 설치류 동물인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3.

제 2 항에 있어서, 상기 설치류 동물은 마우스(*Mus musculus*)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4.

제 1 항에 있어서, 상기 인간 전립선암-특이 항원은 PCA(prostate cancer antigen), PSCA(prostate stem cell antigen), PSA(prostate-specific antigen), PAP(prostate acid phosphatase) 또는 PSMA(prostate-specific membrane antigen)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5.

제 4 항에 있어서, 상기 인간 전립선암-특이 항원은 PAP인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6.

제 1 항에 있어서, 상기 암 세포주는 마우스(*Mus musculus*)로부터 유래된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7.

제 6 항에 있어서, 상기 암 세포주는 상기 동물에 대하여 동종동질(syngeneic)의 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8.

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (a)에서 암 세포주의 투여는 피하 주입(subcutaneous injection) 방법으로 실시되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9.

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (b)에서 수지상 세포의 투여는 피하 주입(subcutaneous injection) 방법으로 실시되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10.

제 1 항에 있어서, 상기 인간 전립선암-특이 항원을 발현하는 암 세포주는 전립선암 세포주-유래가 아닌 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11.

인간 전립선암-특이 항원 중 PCA(prostate cancer antigen), PAP(prostate acid phosphatase) 또는 PSA(prostate-specific antigen)를 발현하며 전립선암 세포주-유래가 아닌 마우스(*Mus musculus*)-유래의 인간 전립선암-특이 항원 발현 신장암 세포주(RENCA).

청구항 12.

제 11 항에 있어서, 상기 세포주는 서열목록 제1서열의 아미노산 30-204, 서열목록 제3서열 또는 서열목록 제4서열의 아미노산 서열을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 벡터에 의해 형질전환된 것을 특징으로 하는 마우스-유래의 인간 전립선암-특이 항원 발현 신장암 세포주(RENCA).

청구항 13.

제 11 항에 있어서, 상기 세포주는 서열목록 제6서열의 뉴클레오타이드 88-612, 서열목록 제8서열 또는 서열목록 제9서열의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 벡터에 의해 형질전환된 것을 특징으로 하는 마우스-유래의 인간 전립선암-특이 항원 발현 신장암 세포주(RENCA).

청구항 14.

제 13 항에 있어서, 상기 세포주는 pcDNA3.1(+)-Tag/PAP, pcDNA3.1(+)-Tag/PSA 또는 pcDNA3.1(+)-Tag/PCA로 형질전환된 것을 특징으로 하는 마우스-유래의 인간 전립선암-특이 항원 발현 신장암 세포주(RENCA).

청구항 15.

제 11 항에 있어서, 상기 세포주는 PAP 항원을 발현하는 RENCA/PAP (KCTC 10808BP)인 것을 특징으로 하는 마우스-유래의 인간 전립선암-특이 항원 발현 신장암 세포주(RENCA).

청구항 16.

상기 제 11 항 내지 제 15 항 중 어느 한 항의 인간 전립선암-특이 항원 발현 신장암 세포주가 접종되어 암이 형성되어 있고, 전립선암-특이 항원으로 감작된 수지상 세포를 처리하는 경우에는 암의 전이 또는 성장이 억제되는 특징을 나타내는 전립선암 마우스(*Mus musculus*) 모델.

청구항 17.

제 16 항에 있어서, 상기 신장암 세포주는 상기 마우스에 대하여 동종동질(syngeneic)의 세포인 것을 특징으로 하는 전립선암 마우스 모델.

청구항 18.

제 16 항에 있어서, 상기 전립선암 마우스 모델은 상기 제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항의 방법을 실시하는 데 이용되는 것을 특징으로 하는 전립선암 마우스 모델.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 전립선암 면역치료제 또는 예방제로서의 수지상 세포의 효능을 분석하는 방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 인간 전립선암 동물모델을 이용한 전립선암 면역치료제 또는 예방제로서의 수지상 세포의 효능을 분석하는 방법에 관한 것이다.

전립선은 남성에게만 있는 장기로서 정액의 일부를 만들고, 방광 아래 측에 있으면서 직장에 인접해 있는 장기이다. 전립선암은 대부분 전립선 속의 선세포(gland cell)가 암화된 것으로 림프절과 뼈에 잘 전이된다. 전립선암의 약 90%는 자신의 몸에서 만들어지는 남성호르몬에 의해 증식한다. 그 때문에 남성호르몬의 작용을 억제함으로써 암 증식을 막고 암세포의 일부를 사멸시키는 호르몬 치료법이 전립선암의 치료에 가장 보편적으로 사용된다 (Greenlee, R. T et al., Cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.* 50:7 (2000)).

전립선암은 최근 우리나라 남성에서 가장 빠르게 증가하고 있는 암으로, 대부분 50세 이상의 노년층에서 발생한다. 북미나 서구 유럽 등의 선진국에서는 남성암 중 약 20% 를 차지하는 가장 흔한 암으로 미국의 경우 연간 발생하는 남성암 중에서 빈도가 가장 높으며, 암으로 인한 사망 원인 중 폐암에 이어 2위를 차지하고 있다. 우리나라의 경우에도 평균 수명의 증가, 노인층의 증가, 식생활 양식의 서구화, 진단 기술의 발달 및 전립선암에 대한 인식의 증가로 병원을 찾는 환자가 증가하여, 최근 들어 전립선암의 빈도가 크게 증가하고 있다. 중앙 암등록자료에 의하면 2001년에는 전립선암의 암발생 등록분율이 남성암의 2.7%, 2002년에는 3.0%로 6위였으며, 최근에 가장 빠르게 증가하고 있어 향후 발생률이 더욱 증가될 것으로 예측되는 암이다.

전립선암의 치료방법으로는 (a) 근치적 전립선 적출술 (b) 방사선 조사 (c) 화학요법 (d) 호르몬치료 등이 있다. 가장 널리 이용되는 치료방법은 호르몬 치료로서, 이는 전립선암세포의 상당 부분이 남성호르몬-의존적으로 증식하므로 남성호르몬 분비를 억제하거나 수술로 호르몬 생성을 차단하는 이른바 안드로젠(androgen) 제거방법이다. 이 방법은 80% 이상의 환

자에서 암 증식억제 혹은 병변 축소 등 일시적인 치료효과를 보인다. 하지만 일시적인 호르몬 치료법에 좋은 반응을 보이는 환자라도 일정 시간이 지나면 대부분 호르몬 저항성 전립선암(hormone-refractory prostate cancer: HRPC)으로 진전되며 이러한 HRPC 환자의 경우 평균 진단 후 1년 이내에 사망하게 된다. HRPC의 경우 기존의 항암제, 화학요법 또는 방사선 요법도 큰 효과를 나타내지 못하므로 새로운 치료방법이 요구되고 있다 (Fong, L. et al., Induction of tissue-specific autoimmune prostatitis with prostatic acid phosphatase immunization: implications for immunotherapy of prostate cancer. *J. Immunol.* 159:3113.(1997)).

최근 사이토카인과 수지상세포를 이용한 면역치료 가능성이 제시되면서 수지상세포치료제 (DC 백신)를 이용한 면역치료가 HRPC 환자의 차세대 치료법으로 대두되고 있다 (Fong, L. et al., Dendritic cells in cancer immunotherapy. *Annu. Rev. Immunol.* 18:245.(2000); Xue BH. et al., Induction of human cytotoxic T lymphocytes specific for prostate-specific antigen. *Prostate.* 30:73.78.(1997)). 이러한 수지상세포를 이용한 면역치료의 임상시험을 위해서는 우선 동물 모델에서 효과성과 안전성이 확인되어야 하지만, 현재까지 사람 전립선암에 대한 수지상세포 백신의 효능을 평가할 만한 전립선암 동물모델이 없는 실정이다.

본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허가 참조되고 그 인용은 괄호 내에 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 요지가 보다 명확하게 설명된다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명자들은 상술한 당업계의 요구를 해결하기 위하여 예의 연구 노력한 결과, 인간 전립선암-특이 항원을 발현하는 이종(xenogenic) 암 세포주를 구축하고 이를 이용하여 전립선암 동물모델을 구축한 다음 이를 이용하여 수지상 세포의 효능을 검사하였으며, 그 결과 수지상 세포의 전립선암 면역치료제 또는 면역예방제로서의 효능을 정확하게 분석할 수 있음을 확인하였다.

따라서, 본 발명의 목적은 인간 전립선암 면역치료제 또는 예방제로서의 수지상 세포의 효능을 분석하는 방법을 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적은 인간 전립선암-특이 항원 발현 마우스-유래 신장암 세포주를 제공하는 데 있다.

본 발명의 또 다른 목적은 전립선암 마우스(*Mus musculus*) 모델을 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

발명의 구성

본 발명의 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 인간 전립선암 동물모델을 이용한 수지상세포-유래 전립선암 면역치료제의 전립선암 예방 및 치료효능을 분석하는 방법을 제공한다: (a) (a') 분석 대상의 수지상 세포를 인간을 제외한 정상동물에게 투여하는 단계 또는 (a'') 인간 전립선암-특이 항원을 발현하는 암 세포주를 인간을 제외한 정상동물에게 투여하여 암을 유발시키는 단계; (b) (b') 상기 단계 (a)에서 (a')을 실시한 경우, 상기 동물에게 인간 전립선암-특이 항원을 발현하는 암 세포주를 투여하는 단계 또는 (b'') 상기 단계 (a)에서 (a'')을 실시한 경우, 상기 암이 유발된 동물에 분석 대상의 수지상 세포를 투여하는 단계; 및 (c) 상기 동물에서 암 세포의 형성 또는 성장을 측정하여 수지상세포-유래 전립선암 면역치료제의 예방 및 치료 효능을 결정하는 단계.

본 발명은 (i) 수지상 세포-유래 전립선암 면역치료제의 효능을 분석하는 방법과 (ii) 수지상 세포-유래 전립선암 면역예방제의 효능을 분석하는 방법으로 크게 구별될 수 있다.

따라서, 본 발명의 수지상 세포-유래 전립선암 면역치료제의 효능을 분석하는 방법은, (a'') 인간 전립선암-특이 항원을 발현하는 암 세포주를 인간을 제외한 정상동물에 투여하여 암을 유발시키는 단계; (b'') 상기 암이 유발된 동물에게 분석 대상의 수지상 세포를 투여하는 단계; 및 (c) 상기 동물에서 암 세포의 형성 또는 성장을 측정하여 수지상 세포-유래 전립선암 면역치료제의 효능을 결정하는 단계를 포함한다.

본 발명의 전립선암 면역예방제로서의 수지상 세포의 효능을 분석하는 방법은, (a) 분석 대상의 수지상 세포를 인간을 제외한 정상동물에게 투여하는 단계; (b) 상기 동물에게 인간 전립선암-특이 항원을 발현하는 암 세포주를 투여하는 단계; 및 (c) 상기 동물에서 암 세포의 형성 또는 성장을 측정하여 수지상 세포-유래 전립선암 면역치료제의 효능을 결정하는 단계를 포함한다.

본 발명은 인간 수지상 세포-유래 전립선암 면역치료제의 효능을 동물모델을 이용하여 처음으로 분석한 것이다. 종래에는, 이러한 효능 분석을 위해 적합한 동물모델이 제시된 바 없다.

본 발명의 방법에 있어서, 이용되는 동물은 인간을 제외한 어떠한 동물도 가능하며, 바람직하게는 포유동물, 보다 바람직하게는 설치류 동물이며, 보다 더 바람직하게는 마우스(*Mus musculus*)이고, 가장 바람직하게는 Balb/c 마우스이다. 본 명세서에서, 용어 “정상동물”은 암이 발생되지 않은 동물을 의미한다.

본 발명의 방법에 있어서, 인간 전립선암-특이 항원을 발현하는 암 세포주를 구축하기 위하여 이용되는 항원은 인간 전립선암에서 특이적으로 발현되는 어떠한 항원도 이용 가능하다 (Schmid, H. P. et al., Observations on the doubling time of prostate cancer: the use of serial prostate-specific antigen in patients with untreated disease as a measure of increasing cancer volume. *Cancer* 71:2031.(1993) ; Tjoa, B. A. et al., Evaluation of phase I/II clinical trials in prostate cancer with dendritic cells and PSMA peptides. *Prostate* 36:39.(1998)). 바람직하게는, 상기 인간 전립선암-특이 항원은 PCA(prostate cancer antigen, 참조: 서열목록), PSCA(prostate stem cell antigen), PSA(prostate-specific antigen), PAP(prostate acid phosphatase) 또는 PSMA(prostate-specific membrane antigen)이고, 보다 바람직하게는 PAP, PSA 또는 PCA이며, 보다 더 바람직하게는 PAP 또는 PSA이고, 가장 바람직하게는 PAP이다. 상기 항원들은 자연의(natural-occurring) 전장을 이용할 수 있지만, 전장의 일부일 수도 있다. 바람직하게는, PCA의 경우 아미노산 서열 30-204(참조: 서열목록 제1서열), PSCA의 경우 아미노산 23-93(참조: 서열목록 제2서열), PAP의 경우 아미노산 1-386 전장(참조: 서열목록 제3서열), PSA의 경우 아미노산 1-261 전장(참조: 서열목록 제4서열), 그리고 PSMA의 경우 아미노산 1-707 전장(참조: 서열목록 제5서열)에 해당하는 서열을 항원으로 이용한다.

정상동물에서 암을 유발하는 데 이용되는 암 세포주는 다양한 동물에서 유래된 것이 이용될 수 있으며, 바람직하게는 암 세포의 수용자(recipient)인 동물에 대하여 동종이질(allogeneic) 또는 동종동질(syngeneic)의 암 세포주이고, 보다 바람직하게는 동종동질의 암 세포주이다. 본 발명의 바람직한 구현예에서, 정상동물로서 마우스가 이용되고 암 세포주로서 마우스-유래 암 세포주가 이용되며, 보다 바람직한 구현예에서, 정상동물로서 Balb/c 마우스가 이용되고 암 세포주로 Balb/c 마우스-유래 암 세포주가 이용된다.

본 발명의 바람직한 구현예에서, 본 발명에서 이용되는 인간 전립선암-특이 항원을 발현하는 암 세포주는, 전립선암에서 유래된 것이 아니다. 한편, 마우스 유래 전립선암 세포주(C57BL/6 마우스 유래 RM 세포주)가 있기는 하지만, 상기 보고된 전립선암-특이 항원의 발현이 확인되지 않아 전립선암 항원 특이적인 수지상세포-유래 면역치료제의 효과를 확인할 수 없는 단점이 있기 때문에, 본 발명의 방법에 직접 사용하기에는 적합하지 않다.

본 발명에서 이용되는 암 세포주는 신장암 세포주(예컨대, RENCA), 위암 세포주, 뇌암 세포주, 폐암 세포주, 유방암 세포주, 난소암 세포주, 간암 세포주, 기관지암 세포주, 비인두암 세포주, 후두암 세포주, 췌장암 세포주, 방광암 세포주, 결장암 세포주 및 자궁경부암 세포주 등을 포함한다. 가장 바람직하게는, 동일 비뇨기계 암세포주인 신장암 세포주이다. 만일, 암 세포주로서 신장암 세포주가 이용되고, 암 세포주의 수용자로서 BALBb/c 마우스가 이용되는 경우에는, 동종동질의 신장암 세포주인 RENCA를 이용하는 것이 가장 바람직하다.

인간 전립선암-특이 항원을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열로 전립선암 이외의 다른 암 세포를 형질전환하여 본 발명의 암 세포주로 이용한다. 인간 전립선암-특이 항원을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 자연의(natural-occurring) 전장을 이용할 수 있지만, 전장의 일부일 수도 있다. 바람직하게는, PCA의 경우 아미노산 서열 30-204을 인코딩하는 서열, PSCA의 경우 아미노산 23-93을 인코딩하는 서열, PAP의 경우 아미노산 1-386 전장을 인코딩하는 서열, PSA의 경우 아미노산 1-261 전장을 인코딩하는 서열, 그리고 PSMA의 경우 아미노산 1-707 전장을 인코딩하는 서열이다. 보다 바람직하게는, PCA의 경우 서열목록 제6서열의 뉴클레오타이드 88-612, PSCA의 경우 제7서열의 뉴클레오타이드 67-279, PAP의 경우 제8서열의 뉴클레오타이드 1-1158, PSA의 경우 제9서열의 뉴클레오타이드 1-783, 그리고 PSMA의 경우 제10서열의 뉴클레오타이드 1-2121이다.

이러한 인간 전립선암-특이 항원을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 다양한 방법을 통하여 얻을 수 있으며, 예를 들어, 인간-유래 전립선암 세포주(예컨대, LNCaP.FGC)의 총 RNA를 분리한 다음, 공지된 인간 전립선암-특이 항원의 서열을

참조하여 제작된 프라이머를 이용하여 cDNA를 제조한다. 이어, 상기 cDNA를 적합한 동물세포 발현용 벡터(예컨대, pcDNA3.1(+))에 클로닝한 다음, 전립선암 세포 이외의 다른 암 세포(예컨대, 신장암 세포인 RENCA)에 형질감염시킨다. 형질감염된 암 세포 중 인간 전립선암-특이 항원을 발현하는 세포를 선별하여 최종적으로 인간 전립선암-특이 항원을 발현하는 암 세포주를 확립한다.

상술한 바와 같이, 인간 전립선암-특이 항원을 발현하는 전립선암-비유래 암 세포주는 본 발명자들이 최초로 구축한 것이다. 이러한 인간 전립선암-특이 항원을 발현하는 암 세포주는, 발현된 인간 전립선암항원을 프로세싱하여(펩타이드 형태로 분해되어) 조직적합항원인 클래스 I 분자에 실어 세포 표면에 제시(presentation)한다. 결국, 이러한 암 세포주는 인간 전립선암 항원에 특이적으로 반응하는 T 세포에 의해 인식되는 특성을 갖게 된다.

한편, 본 발명에서 분석 대상으로 사용되는 수지상 세포는 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 얻는다. 예를 들어, 수지상 세포는 단핵구, 조혈 모세포 또는 골수세포를 이용하여 수득할 수 있다.

구체적인 실시예로서, 골수세포를 이용하여 수지상 세포를 수득하는 과정은 다음과 같다: 우선, 마우스의 대퇴골과 경골로부터 골수세포를 추출한 다음, 골수세포를 수지상 세포로 분화시키기 위하여, 적합한 사이토카인(예컨대, IL-4 및 GM-CSF)을 포함하는 배지에서 골수세포를 배양한다. 이어, 분화 유도된 미성숙 수지상 세포를 인간 전립선암 특이 항원으로 감작(pulsing)시키고 적합한 사이토카인이 포함된 배지에서 배양하여 성숙 수지상 세포를 얻고 이를 분석 대상으로 이용한다. 상기 감작시키는 과정에서, 바람직하게는, 인간 전립선암 특이 항원에 본 발명자들이 개발한 CTP(cytoplasmic transduction peptide)가 결합된 것으로 감작시킨다. CTP는 인간 전립선암 특이 항원을 핵이 아닌 세포질로 운반하기 때문에, 수지상 세포가 보다 효과적으로 도입된 항원을 클래스 I 분자를 통해 제시할 수 있게 되어 DC 백신 투여 시 강력한 항원특이 CTL을 유도하는데 매우 유리하다. CTP의 상세한 내용은 WO 03/097671에 개시되어 있으며, 상기 특허문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입되어 있다.

분석 대상의 수지상 세포를 동물에게 투여하는 방법은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 실시할 수 있으며, 바람직하게는 정맥내 주입 및 피하 주입(subcutaneous injection)이며, 가장 바람직하게는 피하 주입이다. 인간 전립선암-특이 항원을 발현하는 암 세포주를 정상동물에게 투여하는 방법은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 실시할 수 있으며, 바람직하게는 정맥내 주입 및 피하 주입이며, 가장 바람직하게는 피하 주입이다 (Fong, L. et al., Dendritic cells injected via different routes induce immunity in cancer patients. *J. Immunol.* 166:4254.(2001)).

본 발명의 방법의 단계 (a)에서 투여되는 수지상 세포의 양은 일반적인 마우스를 기준으로 하여 $1 \times 10^4 - 1 \times 10^8$ 세포, 바람직하게는 $1 \times 10^5 - 1 \times 10^7$ 세포, 보다 바람직하게는 약 1×10^6 세포이다. 이러한 수지상 세포의 적합한 투여 간격(예컨대, 1주 간격)으로 2회 이상 투여하는 것이 바람직하다.

본 발명의 방법의 단계 (a)에서 투여되는 암 세포주의 양은 일반적인 마우스를 기준으로 하여 $1 \times 10^4 - 1 \times 10^8$ 세포, 바람직하게는 $1 \times 10^5 - 1 \times 10^7$ 세포, 보다 바람직하게는 약 1×10^6 세포이다.

일반적인 기술 상식에 따르면, 인간 전립선암-특이 항원을 발현하는 암 세포주는 인간을 제외한 동물에게 투여되면, 동물 내의 면역 반응을 촉발시켜 투여된 암 세포가 제거될 것으로 기대된다. 그러나, 놀랍게도, 본 발명에 따르면, 인간 전립선암-특이 항원을 발현하는 암 세포주를 인간을 제외한 동물에게 투여한 경우에도, 그 동물 내에서 암 조직을 형성한다. 인간 전립선암-특이 항원을 발현하는 암 세포주의 상술한 암 조직 형성능 때문에 본 발명의 방법이 성공적으로 실시된다.

본 발명의 방법에 있어서, 단계 (b)에서, 암 세포주의 투여방법 및 투여량은 상술한 단계 (a)의 내용이 적용될 수 있다.

본 발명의 방법에 있어서, 단계 (a')에서 투여된 수지상 세포를 감작하는 데 이용된 인간 전립선암-특이 항원과 단계 (b')에서 투여된 암 세포주에서 발현되는 인간 전립선암-특이 항원은 동일한 항원으로부터 유래된 것이다. 예를 들어, 단계 (a')에서 투여된 수지상 세포를 감작하는 데 이용된 인간 전립선암-특이 항원이 PAP인 경우에는 단계 (b')에서 투여되는 암 세포주는 PAP를 발현하는 것이다. 따라서, PAP를 제시하는 수지상 세포에 의해 유도된 세포독성 T 세포(cytotoxic T lymphocyte)가 PAP를 발현하는 암 세포주를 인식하여 암 세포를 사멸시킨다.

본 발명의 방법에 있어서, 단계 (a'')에서 투여된 암 세포주에서 발현되는 인간 전립선암-특이 항원과 단계 (b'')에서 투여된 수지상 세포를 감작하는 데 이용된 인간 전립선암-특이 항원은 동일한 항원으로부터 유래된 것이다. 예를 들어, 단계 (a'')

에서 투여된 암 세포주에서 발현되는 인간 전립선암-특이 항원이 PAP인 경우에는 단계 (b")에서 투여되는 수지상 세포를 감작하는 데 이용된 인간 전립선암-특이 항원은 PAP이다. 따라서, PAP를 제시하는 수지상 세포에 의해 유도된 세포독성 T 세포가 PAP를 발현하는 암 세포주를 인식하여 암 세포를 사멸시킨다.

본 발명의 최종 단계에서, 동물 내에서 암 세포의 형성 또는 성장을 측정하여 전립선암 면역치료제 또는 예방제로서의 수지상 세포의 효능을 결정한다. 암 세포의 형성 또는 성장은 육안으로 관찰할 수 있고 또는 캘리퍼스 같은 도구를 이용하여 측정할 수 있다. 암 세포의 추가적 형성이 억제되거나 성장이 억제된 경우에는, 분석 대상의 수지상 세포가 면역치료제 또는 예방제로서의 효능을 갖는다고 결정내릴 수 있다.

수지상 세포를 이용한 전립선암 면역치료 또는 면역예방을 임상 수준에서 실시하기 위해서는, 우선 동물모델에서 수지상 세포의 효능과 안전성이 확인되어야 하는 데, 본 발명은 이러한 동물모델-기초 시험을 가능하게 한다. 본 발명에 의해 스크리닝된 수지상 세포는 전립선암 면역치료제 또는 면역예방제로서 확실한 후보자(candidate)가 될 수 있다.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 인간 전립선암-특이 항원 중 PCA(prostate cancer antigen), PSA(prostate-specific antigen) 또는 PAP(prostate acid phosphatase)를 발현하며 전립선암 세포주-유래가 아닌 마우스(*Mus musculus*)-유래의 인간 전립선암-특이 항원 발현 신장암 세포주(RENCA)를 제공한다.

본 발명의 인간 전립선암-특이 항원 발현 신장암 세포주(RENCA)는 종래에는 없었던 세포주로서, 전립선암 마우스 모델을 구축하기 위하여 본 발명자들에 의해 처음으로 개발된 것이다.

본 발명의 신장암 세포주는 인간 전립선암-특이 항원 중 PCA, PSA 또는 PAP를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 의해 형질전환된 것이다. 인간 전립선암-특이 항원을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 자연의(natural-occurring) 전장을 이용할 수 있지만, 전장의 일부일 수도 있다. 바람직하게는, PCA의 경우 아미노산 서열 30-204을 인코딩하는 서열, PAP의 경우 아미노산 1-386 전장을 인코딩하는 서열, PSA의 경우 아미노산 1-261 전장을 인코딩하는 서열을 포함하는 벡터에 의해 형질전환된 것이다. 보다 바람직하게는, PCA-코딩 서열은 서열목록 제6서열의 뉴클레오타이드 88-612, PAP-코딩 서열은 제8서열의 뉴클레오타이드 1-1158, 그리고 PSA-코딩 서열은 제9서열의 뉴클레오타이드 1-783이다. 가장 바람직하게는, 본 발명의 마우스 전립선암-특이 항원 발현 신장암 세포주는 첨부한 도 2의 pcDNA3.1(+)-Tag/PAP, pcDNA3.1(+)-Tag/PSA 또는 pcDNA3.1(+)-Tag/PCA로 형질전환된 것이다. 도 2의 벡터에서 PCA, PAP 및 PSA는 각각 서열목록 제6서열의 뉴클레오타이드 88-612, 서열목록 제8서열의 뉴클레오타이드 1-1158 및 서열목록 제9서열의 뉴클레오타이드 1-783 뉴클레오타이드 서열을 나타낸다.

본 발명의 인간 전립선암-특이 항원을 발현하는 암 세포주는, 세포 내에서 발현된 인간 전립선암-특이 항원이 프로세싱되어(펩타이드 형태로 분해되어) 조직적합항원인 클래스 I 단백질에 실려 세포 표면에 인간 전립선암-특이 항원의 항원을 제시(presentation)한다. 결국, 이러한 암 세포주는 인간 전립선암 항원에 특이적으로 반응하는 T 세포에 의해 인식되는 특성을 갖게 된다.

본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 본 발명의 인간 전립선암-특이 항원 발현 신장암 세포주가 접종되어 암이 형성되어 있고, 전립선암-특이 항원으로 감작된(pulsing) 수지상 세포를 처리하는 경우에는 암의 전이 또는 성장이 억제되는 특징을 나타내는 전립선암 마우스(*Mus musculus*) 모델을 제공한다.

본 발명의 전립선암 마우스 모델은 인간 전립선암-특이 항원을 발현하는 마우스 신장암 세포주가 이식되어 암이 형성되어 있으며, 수지상 세포의 전립선암 치료 또는 예방 효능을 검증할 수 있는 동물 모델이다. 이와 같이 인간 전립선암 치료 또는 예방 효능을 검증할 수 있는 마우스 모델은 개발된 바가 없다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 마우스에 주입되는 신장암 세포주는 마우스에 대하여 동종동질(syngeneic)의 세포이다.

바람직하게는, 본 발명의 전립선암 마우스 모델은 상술한 수지상세포-유래 전립선암 면역치료제의 전립선암 예방 및 치료 효능을 분석하는 본 발명의 방법을 실시하는 데 이용된다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 마우스 모델은 주입된 암세포주와 동종동질의 특성을 나타내는 Balb/c 마우스이다.

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

실시예

실시예 1: 사람-유래 전립선암 항원을 발현하는 마우스 세포주 개발

실시예 1-1: 사람-유래 전립선암 특이항원 발현백터의 제작

(a) 사람-유래 전립선암 세포주 LNCaP.FGC 배양

본 실험에 사용된 LNCaP.FGC은 PCA(prostate cancer antigen), PSCA(prostate stem cell antigen), PSA(prostate-specific antigen), PAP(prostate acid phosphatase) 또는 PSMA(prostate-specific membrane antigen) 등의 전립선암 특이적인 항원을 발현하는 사람-유래 전립선암 세포주로 한국세포주은행으로부터 분양 받아 실험에 사용하였다. 이 전립선암 세포주는 10% FBS가 첨가된 RPMI-1640 배지(GIBCO/BRL)에서 배양/유지하였고, 계대배양 시에는 trypsin-EDTA를 약 1분간 처리하여 비부착성 단일세포로 분리하고 배양 균체가 약 80%가 넘지 않도록 1주일에 2-3차례 계대배양 하였다.

(b) LNCaP에서 PCA, PSCA, PSA, PAP 및 PSMA cDNA PCR 생성물 확보

LNCaP을 수확하기 전에 세포의 조건을 최적화하기 위해서 배양균체가 60% 넘지 않도록 유지하며 2-3차례 계대 후 trypsin-EDTA를 처리하여 수거하였다. 수거된 세포에 Trizol(Gibco BRL)을 처리하여 총 RNA를 추출하였고, 이소프로판올 침전 및 70% 에탄올 세척과정을 통하여 총 RNA를 정제하였다. cDNA합성을 위하여, 10 µg의 총 RNA를 1 µg의 올리고 (dT)₁₂₋₁₈와 혼합시킨 다음, 65°C에서 5분간 변성시킨 후, 즉시 얼음에 옮기고, 여기에 역전사효소 반응완충액, 10 mM DTT, 1 mM dNTP 혼합물 및 20 units RNAsin을 첨가하고, 42°C에서 2분간 전반응시킨 후 200 unit의 MMLV(Molony Murine Leukemia virus) 역전사효소(Invitrogen 사)를 첨가하여 다시 42°C에서 60분간 반응시켰다. 반응이 완전히 끝난 후 70°C에서 15분간 방치하여 효소를 비활성화시켰다. 이렇게 합성된 cDNA를 주형으로 하여 PCR을 수행하여 사람 PCA, PSCA, PAP, PSA 그리고 PSMA에 대한 cDNA를 확보하였다. 사용된 PCR 프라이머는 다음과 같다:

[표 1a]

원핵세포용 발현백터에 클로닝하기 위해 사용된 프라이머

타겟 유전자	프라이머	서열
PAP	PAP-XhoI/s	5'-TACCCCTCGAGAAGGAGTTGAAGTTTGTGACT-3'
	PAP-HindIII/as	5'-TACCCAAGCTTTTAATCTGTACTGTCCTCAGTAC-3'
PSA	PSA-XhoI/s	5'-TACCCCTCGAGCCCTCATCCTGTCTCGG-3'
	PSA-HindIII/as	5'-TACCCAAGCTTTTAGGGTTGGCCACGATGGT-3'
PSMA	PSMA-XhoI/s	5'-TACCCCTCGAGGTTGTTTCATGAAATTGTGAGG-3'
	PSMA-HindIII/as	5'-TACCCAAGCTTTTATCCTGGGAATGACTCCCCT-3'
PCA	PCA-XhoI/s	5'-TTGACCTCGAGCACGCGCCCTGGGACAAC-3'
	PCA-HindIII/as	5'-TCTAAAAGCTTCTAGAGGCTGCAGGCCTCCTG-3'
PSCA	PSCA-XhoI/s	5'-TTGACCTCGAGCAGCCAGGCACTGCCCTG-3'
	PSCA-HindIII/as	5'-TCTAAAAGCTTCTACGGCTGCAGGCATGG-3'

[표 1b]

진핵세포용 발현백터에 클로닝하기 위해 사용된 프라이머

타겟 유전자	프라이머	서열
--------	------	----

PAP	PAP-HindIII/s	5'-TACCCAAGCTTCGCCACCATGGGTAGAGCTGCACCCCTCCTC-3'
	PAP-XhoI/as	5'-TACCCCTCGAGCCAGCATAATCTGGAACATCATATGGATAATCTGTACTGTCTCAGTACC-3'
PSA	PSA-HindIII/s	5'-TACCCATGCTTCGCCACCATGGGTGTCCCGTTGTCTTCTCCTCA-3'
	PSA-XhoI/as	5'-TACCCCTCGAGCCAGCATAATCTGGAACATCATATGGATA GGGGTTGGCCACGATGGT-3'
PSMA	PSMA-HindIII/s	5'-TACCCAAGCTTCGCCACCATGGATTGGAATCTCCTTCACGAAAC-3'
	PSMA-XhoI/as	5'-TACCCCTCGAGCCAGCATAATCTGGAACATCATATGGATA TCCTGGGAATGACTCCCCT-3'
PCA	PCA-HindIII/s	5'-TTGACAAGCTTCGCCACCATGGGAGCCCGCTCGCCGTAG-3'
	PCA-XhoI/as	5'-TCTAACTCGAGCCAGCATAGTCTGGGACGTATATGGATA GAGGCTGCAGGCCTCTG-3'
PSCA	PSCA-HindIII/s	5'-TTGACAAGCTTCGCCACCATGGGAGCTGTGCTGCTTGCCTGT-3'
	PSCA-XhoI/as	5'-TCTAACTCGAGCCAGCATAGTCTGGGACGTATATGGATA GTTGACAAGTCGGTGTAC-3'

상기 표 1b에서 밑줄 친 서열은 HA(hemagglutinin)-Tag 서열이다.

상기한 프라이머 세트(Bionics 사) 표1a 및 PCR 중합효소(Intron Biotech 사)를 사용하여 94℃, 30sec; 52℃, 30sec; 및 72℃, 50sec, 총 25 사이클의 PCR을 실행하여 원핵세포용 PAP(1062 bp), PSA(729 bp), PSMA(942 bp), PCA(525 bp) 및 PSCA(213 bp)의 DNA 단편을 확보하였고, 프라이머 세트 표1b를 사용하여 진핵세포용 발현벡터에 클로닝할 PAP (1185 bp), PSA(810 bp), PSMA(2148 bp), PCA(552 bp) 및 PSCA(240 bp)의 DNA 단편을 확보하였다. 진핵세포 벡터에서 발현된 단백질의 확인을 용이하게 하기 위해 (주)크레아젠에서 개발된 36A Tag 유전자를 삽입하였다. Tag 도입에 사용한 프라이머는, Tag-XhoI/s(5'-ACCCTCGAGGTCCATGACCGGAGGTCAGCAGATGGG TCGCGACCTGTACGACGA-3') 및 Tag-XbaI/as(5'-ACCTCTAGATTAGCTTCCCCATCTGTCCCTTG TCGTCATCGTCGTACAGGTCGCG-3')이었고, 94℃, 30sec; 52℃, 30sec; 및 72℃, 5min, 총 1 사이클을 수행하여 tag DNA 단편을 확보하였다.

36A Tag의 아미노산 서열은 SMTGGQQMGRDLYDDDDKDRWGS 이고, 뉴클레오타이드 서열은 TCC ATG ACC GGA GGT CAG CAG ATG GGT CGC GAC CTG TAC GAC GAT GAC GAC AAG GAC AGA TGG GGA AGC 이다.

(c) 전립선암 항원 cDNA를 발현벡터(pCDNA3.1(+)) 벡터 및 pCTP 벡터)에 클로닝

발현확인을 위한 36A Tag 시스템을 벡터(pcDNA3.1(+); Invitrogen)에 도입하기 위하여, 상기 실시예에서 얻은 Tag 단편을 XhoI/XbaI 처리하여 pcDNA3.1(+)에 연결하여 pcDNA3.1(+)-Tag 벡터를 제조하였다. 그리고 각각의 인간 전립선암 항원 유전자 단편을 HindIII/XhoI 처리하여 pcDNA3.1(+)-Tag 벡터에 클로닝하였고, 재조합 벡터의 뉴클레오타이드 서열은 시퀀싱으로 확인하였다(참조: 도 2). 또한, 원핵세포에서도 재조합 전립선암 항원 단백질을 얻기 위하여, 우선 pCTP-Td 벡터를 제조하였다. pCTP-Td vector 는 다음과 같이 제조하였다.

pCTP-Td 벡터는 pTAT-HA 벡터(Washington 대학의 S. Dowdy 박사로부터 분양 받음, H. Nagahara et al., *Nature Med.* 4:1449(1998))를 유전자 조작하여 제작하였다. pTAT-HA 벡터를 제한효소 *Bam*HI 및 *Nco*I 으로 37℃에서 2시간 동안 절단하고 Tat 도메인과 HA-태그 도메인을 제거한 후 Gel extraction 키트(Nucleogen)를 사용하여 정제하였다. CTP DNA 단편(뉴클레오타이드 서열 TAC GGA CGC CGC GCA CGC CGC CGC CGC CGC CGC; 아미노산 서열 YGRRARRRRRR)을 제조하기 위해 CTP에 대한 전방향 프라이머 5'-GAT CCA TGT ACG GAC GCC GCG CAC GCC GCC GCC GCC GCT C-3'과 상보적인 역방향 프라이머 5'-CAT GGA GCG GCG GCG GCG GCG GCG TGC GCG GCG TCC GTA CAT G-3'를 각각 합성하여(Bionics 사) 95℃에서 5분간 가열한 다음 온도를 1℃/분의 속도로 천천히 상온까지 떨어뜨리면서 중쇄 (double strand)를 만들었다. 이때 CTP DNA 단편은 양쪽에 *Bam*HI와 *Nco*I 접착성말단 (cohesive end)이 나타나게 설계되었다. PCR purification 키트(Nucleogen)를 사용하여 어닐링된 CTP DNA 단편을 정제한 후 CTP DNA 단편과 상기 벡터를 16℃에서 18시간 동안 T4 DNA 리가아제(Roche 사)로 반응시키고 이를 *E. coli* JM109 (Stratagene)에 형질전환하여, 재조합 플라스미드 DNA인 pCTP-Td 벡터를 제조하였다. *Bam*HI 과 *Nco*I 제한효소로 절단 분석과 DNA 염기서열분석(솔젠트 사, 대전)으로 pCTP-Td 벡터가 정상적으로 제조되었음을 확인하였다.

각각의 인간 전립선암 항원 유전자 단편을 HindIII/XhoI 처리하여, 상기 제작된 pCTP 벡터에 클로닝하였다(참조: 도 2).

도입 유전자에 대하여 DNA 염기서열 분석을 수행하여, 도입된 cDNA가 인코딩하는 아미노산 서열이 공지된 PCA, PSCA, PAP, PSA 및 PSMA의 서열과 100% 일치함을 확인하였다(Blast 2 서열 검색). 원핵세포용 발현벡터에 삽입된 부위는 각 전립선암 항원의 N-말단 시그널 펩타이드에 해당하는 부위와 C-말단에 인접한 막투과 도메인으로 예상되는 부위가 제외

된 부분으로서, PCA의 경우 아미노산 서열 30-204(175 aa), PSCA의 경우 23-93(71 aa), PAP의 경우 33-386(354 aa), PSA의 경우 19-261 (243 aa), PSMA의 경우 394-707(314 aa)에 해당한다. 한편, 진핵세포용 발현벡터에 삽입되는 부위는, PCA의 경우 아미노산 서열 30-204(175 aa), PSCA의 경우 23-93(71 aa), PAP의 경우 1-386(386 aa), PSA의 경우 1-261 (261 aa), PSMA의 경우 1-707(707 aa)에 해당한다.

실시예 1-2: 사람유래 전립선암 항원 발현 마우스 세포주 개발

(a) 선별된 전립선암 항원 발현 세포주로부터 항원 발현 확인

전립선암 항원 발현 세포주 제작을 위해 pcDNA3.1(+)-Tag/전립선암 항원(PAP, PSA 또는 PCA) 벡터를 마우스 신장암 세포주 RENCA 세포(한국세포주은행)에 형질감염시켰다. 형질감염 전날 6-웰 플레이트에 웰당 5×10^5 세포를 도포하였고, 그 후 24시간째에 각각의 재조합 DNA 2 μg 을 GenePorter(Gene therapy system)를 이용하여 세포에 형질감염시켰다. 형질전환 48시간째부터 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ G418(DUCHEFA사, Haarlem, Netherland)을 지속적으로 처리하여 생존 세포를 선별하였다. 선별된 세포는 증식 후 수거하여 발현여부를 웨스턴 블롯팅 방법으로 확인하였다. 수거된 세포를 PBS로 2회 세척한 후, 단백질을 시료 완충액에 부유시켜 끓인 다음 원심분리하여 지놈 DNA를 제거하고, 상층액을 SDS-PAGE로 분리하였다. 분리된 단백질 밴드를 니트로셀룰로오스 막에 semi-dry transfer blotter(Bio-Rad사)를 사용하여 옮긴 다음, 1차 항체인 Tag 항원-특이 단일클론항체((주)크레아젠)를 처리하였고, 2차 항체 AP(alkaline phosphatase)-접합 항-마우스 IgG(Sigma)를 처리하였다. 그리고 나서, NBT/BCIP가 함유된 AP 반응용액(Promega 사)에 옮겨 밴드를 확인하였다. 도 3에서 볼 수 있듯이, 각각의 항원발현 벡터가 도입된 3 종류 세포주에서 원하는 단백질이 정상적으로 발현됨을 확인하였다.

제작된 전립선암 항원 발현 세포주 중, PAP를 발현하는 세포주를 "RENCA/PAP"라 명명하고, 한국유전자은행 (KCTC: Korean Collection for Type Cultures)에 2005년 5월 23일자로 기탁하고, 기탁번호 KCTC 10808BP를 부여받았다.

(b) 세포주의 항원 발현 안정성 확인

재조합 세포주를 마우스에 접종 시 항생제(G418)가 없는 조건에서 도입 항원발현이 유지될 수 있는지를 검증하기 위하여, 세포주를 G418이 없는 배지에서 지속적으로 계대하면서 도입한 유전자의 발현 안정성을 확인하였다. G418이 없는 조건에서 각각의 세포주 (RENCA/PAP, RENCA/PSA 및 RENCA/PCA)를 배양하면서 3일마다 1×10^6 세포를 수거하여 항원 발현 여부를 조사하였다. 항원 발현을 확인하기 위해, 항-Tag 단일클론항체를 사용하여 웨스턴 블롯팅을 실시하였다. 도 4에서 보듯이, 3 종류 세포주 모두 시간이 경과하면서 도입된 항원유전자의 발현 정도가 조금씩 감소하기는 하지만, 15일까지 항원 발현이 지속됨을 확인하였다. 따라서, 상기 실시예에서 제작한 인간 전립선암 항원-발현 세포주는 마우스 전립선암 모델확립에 사용가능한 세포주임을 알 수 있다.

실시예 2: 수지상세포 감작용 CTP-결합 재조합 단백질 정제 및 세포도입 활성 측정

실시예 2-1: CTP-결합 전립선암 재조합 항원의 발현 및 정제

각 전립선암 항원 cDNA를 도 2의 pCTP-Td 벡터에 도입하고 이를 *E. coli* BL21-gold(DE3) 컴피던트 세포(Stratagene 사)에 Hanahan 방법을 이용하여 형질전환시켜 발현 균주를 확보하고, 이 균주를 LB-암피실린 배지에서 대량 배양하였다. 배양 후 원심분리하고, PBS로 세척하여 세포를 수거한 다음, 12% SDS-PAGE로 전립선암 항원의 발현 여부를 확인하였다. 대량 발현 후 CTP-PCA, CTP-PSCA, CTP-PSA, CTP-PAP 및 CTP-PSMA 재조합 단백질은, Ni^{2+} -NTA 레진 (Qiagen) 칼럼으로 순수분리하였다. 확인된 단백질은 벡터 자체의 비지놈 서열에 의해 약 6 kDa 정도 증가된 크기로 확인되었다. 즉 CTP-PCA는 약 24 kDa, CTP-PSCA는 약 14 kDa, CTP-PAP은 약 45 kDa, CTP-PSA는 약 33 kDa 그리고 CTP-PSMA는 약 41 kDa로 발현되었다.

한편, 발현된 CTP-PSMA는 PSMA의 C-말단부위에 해당한다. PSMA의 경우 그 N-말단 시그널 서열이 모티프 예측 (motif prediction)에서 나타나지 않았기 때문에 2-707(706 aa)에 해당하는 부위의 발현을 일차적으로 시도하였다. 그러나 진핵세포에서와는 달리 *E. coli*에서는 PSMA의 발현이 관찰되지 않았다. 이어, N-말단 부위 (2-393) 및 C-말단부위 (394-707)로 나누어 pCTP 벡터에 삽입하고 발현시킨 결과 C-말단부위만 발현이 확인되었다. 이와 같은 결과는, N-말단 부위에 강한 소수성 잔기가 모여 있기 때문에 발현에 장애가 발생한 것으로 추측되어진다. PSMA 단백질에 대한 CTL 에 피토프가 C-말단부위에서도 밝혀진 바 있기 때문에, 이 C-말단부위의 발현 단백질을 면역치료용 백신제작에 사용하였다.

실시에 2-2: CTP-전립선암 항원 재조합 단백질의 세포 내로의 형질전환 효능

본 실험에서 정제된 5 종류의 단백질(CTP-PCA, CTP-PSCA, CTP-PAP, CTP-PSA 및 CTP-PSMA)을 세포에 처리하여 세포내로 형질도입되는 정도를 조사하였다. 1×10^5 마우스 비장세포를 6-웰에서 배양한 다음, 각각의 재조합 단백질을 웰 당 $50 \mu\text{g}$ 씩 처리하고, 24시간 후에 세포를 수거하여 트립신으로 표면에 부착된 단백질을 제거하였다. 이어, 세포를 초음파 분쇄기로 분쇄한 다음, 분쇄물을 PAGE 분리하고, His6-tag 단일클론항체(QIAGEN 사)를 이용하여 웨스턴 블롯팅을 수행하였다.

도 6에서 확인할 수 있듯이, 마우스 비장세포를 분리하여 CTP-부착된 전립선암 재조합항원을 처리하여 형질도입 정도를 조사한 결과, PCA는 약 24 kDa, PSCA는 약 14 kDa, PSA는 약 33 kDa, PAP는 약 40 kDa 그리고 PSMA는 약 41 kDa에서 관찰되었다. 그리고 PSCA의 경우 이량체 또는 다량체를 이루어 다중 밴드 양상을 보였다. 따라서, CTP-결합 전립선암 재조합항원은 세포내로 성공적으로 도입되었음을 확인하였다.

실시에 3: 전립선암 동물모델 구축

실시에 3-1: 전립선암 항원 발현 세포주의 마우스에서의 암 형성 및 성장 확인

인간 전립선암 항원을 발현하는 마우스 세포주가 마우스에서 암을 형성시킬 수 있는 지 여부와 형성된 고형암의 성장속도를 조사하였다. 제작된 세포주를 6주령 Balb/c 마우스(대한 바이오링크사)의 대퇴부에 주사하였다. 전립선암 항원 발현 재조합 세포주는 10% FBS와 $418 \text{ 500 } \mu\text{g/ml}$ 이 함유된 RPMI 배지에서 배양/유지하였다. 최적의 성장 상태에서 세포를 PBS로 2-3회 세척 후 트립신-EDTA를 처리하여 단일세포로 떼어내고 1×10^6 세포/ $100 \mu\text{l}$ 이 되도록 생리식염수에 현탁하였다. 상기 현탁액 $100 \mu\text{l}$ 를 마우스의 우측 하복부의 피내 조직에 접종하였다. 세포주 접종 후 2일 간격으로 고형암 형성 유무를 관찰하였다. 고형암의 크기는 칼리퍼스를 사용하여 측정하였다. 도 7a에서 볼 수 있듯이, 전립선암 세포주를 접종한 모든 마우스에서 고형암이 형성됨을 확인하였다. 그리고 1×10^5 세포만으로도 암을 형성하였으며 이종항원에 대한 자체 면역반응으로 생성된 암이 스스로 소멸되지 않음을 확인하였다.

암 성장속도를 관찰한 결과, 도 7b에서 보듯이 RENCA/PAP 재조합세포주를 투여한 경우는 다른 경우에 비해 비교적 느린 속도로 성장하였으나, RENCA/PCA 투여시는 정상 RENCA 투여 시와 유사한 속도로 성장하였다. 이러한 결과는 아마도 PAP의 발현이 다른 항원에 비해 비교적 높아 이종항원에 대한 면역이 다른 것 보다 강하게 유도되었기 때문으로 추측된다.

상술한 실험 결과는, 인간의 전립선암 항원을 발현하는 마우스 세포주가 비록 이종항원을 발현하고는 있지만 발현되는 이종항원에 대한 체내 기본 면역반응만으로는 전립선암 세포주의 암 형성을 억제하지 못함을 증명한다. 이로써 본 발명자들이 계획한 전립선암 마우스 모델이 완성되었으며, 수지상세포 백신을 이용한 암의 예방 및 치료 효능을 연구하는데 이를 활용할 수 있게 되었다.

실시에 4: 수지상세포의 항암 효과 분석

실시에 4-1: 수지상세포 백신에 의한 마우스 전립선암 예방효과(Prevention model)

수지상세포 백신에 의한 전립선암 예방 가능성을 조사하기 위하여, CTP-융합 전립선암 재조합 항원을 감작시킨 수지상세포를 마우스에 2차례 면역시키고 그 후에 전립선암 특이 항원을 발현하는 암세포주로 도전시험을 실시하여 고형암 형성 및 폐전이 여부를 조사하였다.

마우스 수지상세포는 대퇴골과 경골의 골수세포를 수지상세포로 분화시켜 사용하였다. 대퇴골과 경골의 양끝을 절단하고 골수세포를 추출하여 50 ml 튜브에 세포를 수거하였다. 수거된 골수세포를 0.83% 염화암모늄 용액으로 현탁시켜 적혈구를 제거하고 골수세포를 수지상세포 생산배지(RPMI-1640, 10% FBS, 10 ng/ml 의 마우스 재조합 IL-4와 10 ng/ml 의 마우스 GM-CSF)에서 2일간 배양하며 비흡착성 세포를 제거하고 용기 바닥에 부착된 세포만을 취하였다. 2-3일 간격으로 신선한 배지로 교체하여 사이토카인의 고갈을 방지하였다. 배양 6일째 미성숙 수지상세포를 수거하고 여기에 재조합 항원인 CTP-PSA와 CTP-PCA를 각각 또는 CTP-PSA와 CTP-PCA를 1:1로 혼합하여 처리하였다. 각 항원 단백질을 $50 \mu\text{g/ml}$

씩 20시간 처리하여 미성숙 수지상세포를 감작하였으며 24시간부터 수지상세포 성숙화에 필요한 사이토카인($100 \mu\text{g/ml}$ IFN- γ 와 $100 \mu\text{g/ml}$ TNF- α)을 첨가하여 수지상세포의 성숙화를 유도하였다. 항원으로 감작된 수지상세포 1×10^6 세포를 마우스 피하로 주사하여 항암면역을 유도하였다.

수지상세포 면역는 1주 간격으로 2회 접종하였으며, 2차 수지상세포 접종 1주 후에 CTP-PAP으로 감작된 수지상세포로 접종된 실험군에는 RENCA/PAP를, CTP-PSA로 감작된 수지상세포에 의해 면역된 마우스 실험군에는 RENCA/PSA를, 그리고 CTP-PCA가 감작된 수지상세포로 면역한 마우스 실험군에는 RENCA/PCA를 각 1×10^6 세포/마우스로 SC (subcutaneous) 주사하였다. 암의 크기(가로 x 세로)는 매 2일마다 측정하였다. 측정결과 도 8에서와 같이, CTP-PAP 또는 CTP-PSA 항원으로 감작된 수지상세포를 접종시킨 실험군에서는 전혀 종양괴가 형성되지 않음을 확인할 수 있었다. 그러나 PCA 항원을 감작시킨 수지상세포로 면역한 마우스군에서는 암의 형성을 거의 억제하지 못하였다.

한편, 수지상세포에 의한 암 예방모델에서 암 발생빈도를 그래프로 나타내면 도 9와 같다. 항원이 감작된 수지상세포를 면역시킨 마우스 중 RENCA/PAP나 RENCA/PSA 세포주를 투여한 군에서는 100% 암 예방효과를 보였다. RENCA/PCA주를 투여한 군에서는 암 형성이 지연되는 효과는 보였으나, RENCA/PAP나 RENCA/PSA 투여군과 같이 완벽한 예방효과는 보이지 않았다. 이는 PCA의 낮은 항원성 때문에 수지상세포백신에 의해서도 충분한 항암면역을 유도하지 못하였음을 시사한다. 따라서, 전립선암 DC 백신을 이용한 면역치료에 PCA 항원을 단독으로 사용하는 것은 지양하는 것이 바람직하다고 결정하였다.

실시예 4-2: 수지상세포 백신에 의한 마우스 전립선암 전이 억제 효과(Prevention model)

상기와 동일한 방법으로 수지상세포 백신을 마우스에 2차례 투여하여 면역을 유도하고 1주 후에 각각의 재조합 전립선암 항원 발현 세포주를 마우스당 1×10^6 세포가 되게 조정하여 각 마우스의 꼬리정맥을 통해 주사하였다. 그리고 30일 후 마우스를 안락사 시켜 폐전이 정도를 관찰하였다.

도 10에서 관찰할 수 있듯이, PAP나 PAP 인간전립선 암항원을 감작시킨 수지상세포로 면역한 군에서는 폐전이가 전혀 나타나지 않는 반면, 항원을 감작하지 않은 수지상세포나 PBS로만 투여한 대조군에서는 모두 강한 암의 폐전이 현상이 나타났다. 이는 수지상세포 백신에 의해 강력한 암항원 특이적인 면역이 유도되어 암의 생성 및 전이를 억제하였음을 시사한다.

실시예 4-3: CTP-전립선암 항원으로 감작된 수지상세포 백신에 의한 마우스 모델에서 전립선암 치료 효과(Regression model)

전립선암 항원(PAP, PSA 및 PCA)을 발현하는 재조합 세포주를 1×10^6 세포/마우스로 각 마우스 실험군에 피하주사하고, 3일 후에 CTP-결합항원(CTP-PAP, CTP-PSA 및 CTP-PCA)으로 감작된 DC를 마우스 당 1×10^6 세포가 되게 조절하여 피하에 1주 간격으로 2회 주사하였다. 2차 DC 투여 후 2일 간격으로 약 한 달 동안 고형암의 형성 및 성장을 관찰하였다. 도 11a 및 11b에서 볼 수 있듯이, RENCA/PAP, RENCA/PSA 및 RENCA/PCA 세포주로 만들어진 마우스 전립선암 모델 모두에서 암성장 억제효과가 관찰되었으며, 특히 RENCA/PAP 모델에서 가장 강력한 암 성장 억제효과가 나타났다.

실시예 4-4: 수지상세포 백신 투여로 유도된 항원 특이적인 CTL 확인

상기 폐전이 모델에서 실험된 마우스의 비장을 취하여 T 세포 증식 분석과 CTL 분석을 수행하였다. 각각의 마우스를 경추 탈구법으로 안락사시키고 비장을 채취하였다. 분리된 비장이 건조되지 않도록 RPMI에 보관하였다. 각각의 비장을 취하여 $70 \mu\text{m}$ 그물망에 통과시켜 부유조직을 제거하고 1회 원심분리하여 세포를 수확한 후 0.83% 염화암모늄 용액으로 현탁시켜 적혈구를 제거하였다. 준비된 비장세포는 나일론 울 컬럼을 통과시켜 T 림프구만을 분리하였고, 공격세포(effector cell) 자극을 위해 준비된 APC(antigen presenting cells)와 5:1 비율로 혼합하여 5일간 배양하였다. APC는 실험일로부터 2일 전에 준비하였다. 정상 마우스의 비장을 취해 적혈구를 제거하고 $3 \mu\text{g/ml}$ 의 Con-A로 24시간 자극하였다. 자극 후 1회 세척한 다음 각각의 항원 단백질(CTP-PAP, CTP-PSA 및 CTP-PCA)을 $50 \mu\text{g/ml}$ 로 처리하여 24시간 배양하였다. 배양시의 세포 농도는 1×10^6 cell/mice을 유지하였다. 24시간 배양 후 Mitomycin C를 40분간 처리하였고, 처리 후 3회 세척하여 APC를 준비하였다. 공격 T 세포(effector T cell)의 배양 5일 후에 Histopaque(Sigma)을 이용하여 죽은 세포를 제거하여 공격 T 세포를 분리하여 표적세포(target cell)와 E:T ratio 0:1, 5:1, 10:1, 20:1 그리고 40:1로 혼합하여 24시간 배양하였다. 표적세포로 사용된 세포주는 전립선암 항원 발현 세포주로, 공격세포와 혼합하기 하루 전에 웰 당 1×10^4 으로 96-웰 플레이트에서 배양한 후 사용하였다. 플레이트를 하나 더 준비하여 대조군으로 사용하였다. 공격세포를 넣지 않은

대조군 플레이트는 CTL 실험 당일 고정 및 염색하여 비세포용해(specific lysis) 활성 계산 시에 사용하였다. 공격세포와 혼합 24시간 후에 세포 상등액을 제거하고 10% 포르말린 100 μ l를 처리하여 1시간 동안 고정하였다. 포르말린 제거 후 4% 크리스탈 바이올렛 80 μ l을 첨가하여 30분간 염색한 후 3회 탭 워터로 세척하고 공기 중에 건조시켰다. 완전히 건조된 다음 80% 메탄올 용액을 첨가하여 10분간 방치한 후 570 nm에서 OD 값을 확인하였다. (시료 OD/대조군 OD) x 100으로 계산하여 각 실험군 간의 비세포용해 활성을 비교하였다.

도 12의 CTL 결과에서 보듯이 3가지 마우스 전립선암 모델 모두에서 CTL이 효과적으로 유도되었다. 이는 CTP-PAP, CTP-PSA 또는 CTP-PCA로 감염된 마우스 골수유래 수지상세포 백신 투여로 각각의 인간 전립선암항원에 특이적인 CTL이 효과적으로 유도되었으며 이로 인해 치료 및 예방에 항암효과가 나타난 것임을 보여주는 것이다. PAP의 경우 마우스 자체적으로 CTL 클론을 가지고 있어 폐전이 관찰 실험에서도 폐전이 병소가 다른 세포주에 비해 적게 나타난 것으로 추측되며, CTL 분석 결과에서도 이와 같은 경향으로 대조군에서도 다른 모델에 비해 항원특이적인 CTL이 다소 관찰되었다. 그 외의 PSA 및 PCA에서는 Ag 감염 DC에서만 강력한 CTL 활성을 보였다. 위의 결과로 수지상세포백신에 의해 항암 활성 CTL이 효과적으로 유도되었음을 확인할 수 있다. 흥미로운 사실은 PCA를 발현하는 세포주에 대한 항암면역 유도가 CTP-PCA를 감염시킨 수지상세포투여로 효과적으로 유도된다는 것이다. 이것은 PCA를 발현하는 세포주의 경우 전립선암 항원으로 알려진 PCA를 발현하게 됨으로 인해 종양세포의 성장력 증가되어 상대적으로 항암면역효과가 적은 것으로 나타나게 된 것으로 이해된다. 즉, 표면적으로 표출되어지는 항암효과는 결국 내부에서 백신에 의해 유도된 항암면역력과 종양세포의 증식력의 총괄적인 현상임을 시사한다.

발명의 효과

상기에서 상세히 설명한 바와 같이, 본 발명은 인간 전립선암 동물모델을 이용한 전립선암 면역치료제 또는 예방제로서의 수지상 세포의 효능을 분석하는 방법을 제공한다. 수지상 세포를 이용한 전립선암 면역치료 또는 면역예방을 임상 수준에서 실시하기 위해서는, 우선 동물모델에서 수지상 세포의 효능과 안전성이 확인되어야 하는 데, 본 발명은 이러한 동물모델-기초 시험을 가능하게 한다. 본 발명에 의해 효능이 검증된 수지상세포 백신 (DC 백신)은 전립선암 면역치료제 또는 면역예방제로서 확실한 후보자(candidate)가 될 수 있다.

이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면의 간단한 설명

도 1은 전립선암-특이 항원, PCA, PSCA, PSA, PAP 및 PSMA의 PCR 증폭산물을 보여주는 젤 사진이다. 재조합 항원 단백질을 얻기 위하여, LNCaP.FGC(인간 전립선암 세포주)로부터 cDNA를 합성하여 PCA, PSCA, PSA, PAP 및 PSMA를 PCR 증폭하였다. 각각의 PCR 증폭산물은 시그널 서열과 막투과 부위가 제외된 전장이다. M 레인은 1 kb 레더 마커, 1 레인은 PAP(잔기 33-386 해당; 1.062 kb), 2 레인은 PSA(잔기 19-261; 0.729 kb), 3 레인은 PSMA(잔기 394-707; 0.94 kb), 4 레인은 PCA(잔기 30-204; 0.52 kb) 그리고 5 레인은 PSCA(잔기 23-93; 0.21 kb)에 해당하는 것이다.

도 2는 전립선암-특이 항원을 발현하기 위한 재조합 발현 벡터의 유전자 지도 및 그의 일부 뉴클레오타이드 서열이다. LNCaP.FGC(인간 전립선암 세포주)로부터 합성된 cDNA를 주형으로 하여 PCA, PSCA, PSA, PAP 및 PSMA를 PCR 증폭하였다. 이들의 발현을 위하여, 진핵세포용 벡터(패널 A) 및 원핵세포용 벡터(패널 B)에 클로닝 하였다. 벡터의 유전자 지도에서, HA는 hemagglutinin을 코딩하는 서열이고, 36A는 36A Tag을 코딩하는 서열이며, P_{CMV}는 사이토메갈로바이러스(cytomegalovirus)의 프로모터이고, BGH pA는 소성장호르몬 유전자의 폴리 아데닐화 서열이며, f1 ori는 f1 복제원점을 나타내고, SV40 ori는 SV40 복제원점을 나타내며, 항생제 이름이 기재된 것은 그 항생제-내성 유전자를 나타낸다.

도 3은 형질전환 세포에서 발현된 전립선암 항원에 대한 웨스턴 블롯팅 분석결과를 보여준다. pcDNA3.1-HA-36A/PAP, pcDNA3.1-HA-36A/PSA 및 pcDNA3.1-HA-36A/PCA 재조합 플라스미드를 RENCA 세포에 형질감염시켜 G418으로 선별 후 안정화된 세포주에서 도입된 항원 발현을 웨스턴 블롯팅으로 확인하였다. 분석 항체는 36A Tag-특이 단일클론항체를 사용하였다. 레인 M은 분자량 마커, 레인 1은 RENCA, 레인 2는 RENCA/PAP, 레인 3은 RENCA/PSA, 그리고 레인 4는 RENCA/PCA에 대한 결과이다.

도 4는 RENCA 세포에 도입된 전립선암 항원(PAP, PSA 및 PCA)의 발현 안정성을 보여주는 웨스턴 블롯팅 분석 결과이다. 제작된 안정 세포주 각각을 G418이 첨가되지 않은 배지에서 배양하였고, 3일마다 1×10^6 세포를 수거하여 웨스턴 블롯팅을 실시하였다. Nc는 음성 대조군으로서, 형질전환 되지 않은 RENCA 세포를 사용하였다.

도 5는 전립선암 항원 단백질(PCA, PSCA, PAP, PSA 및 PSMA)의 SDS-PAGE 분석 및 웨스턴 블롯팅 결과를 보여준다. pCTP 벡터에 각각의 항원 유전자를 클로닝하고 BL21-gold(DE3)에서 발현시켰다. 발현된 CTP-결합 재조합 단백질을 12% SDS-PAGE와 웨스턴 블롯팅 방법으로 확인하였다. 레인 M은 분자량 마커, 레인 1은 CTP-PCA, 레인 2는 CTP-PSCA, 레인 3은 CTP-PAP, 레인 4는 CTP-PSA, 그리고 레인 5는 CTP-PSMA에 대한 것이다.

도 6은 재조합 CTP-결합 전립선암 항원을 비장세포(splenocytes)에 도입하고 비장세포를 웨스턴 블롯팅 한 결과를 보여준다. 정제된 CTP-결합 PCA, PSCA, PAP, PSA 및 PSMA 단백질 $50 \mu\text{g}$ 을 마우스 비장세포에 처리하고, 24시간 후에 웨스턴 블롯팅으로 단백질 도입 여부를 확인하였다. 레인 M은 분자량 마커, 레인 1은 음성 대조군 마우스 비장세포, 레인 2는 CTP-PCA, 레인 3은 CTP-PSCA, 레인 4는 CTP-PAP, 레인 5는 CTP-PSA, 레인 6은 CTP-PSMA에 대한 것이다.

도 7a 및 7b는 BALB/c 마우스에서 전립선 암 항원을 발현하는 재조합 RENCA 및 대조군 RENCA 세포를 투여 시 유도된 고형암의 상대적 성장속도를 보여준다. BALB/c 마우스에 1×10^6 재조합 RENCA 및 대조군 RENCA 세포를 피하로 주사하고(subcutaneous inoculation) 30일 이후에 암의 형성 및 성장을 관찰하였다. 재조합 암세포주 접종 후 2일 간격으로 암의 크기를 측정하였다.

도 8은 DC(dendritic cell) 백신 투여 시 재조합 RENCA 주에 의한 종양형성 억제 효과를 보여주는 그래프이다. 종양항원에 감염된 DC에 의한 종양 예방 효과를 확인하기 위하여, 1주 간격으로 1×10^6 항원감작 DC/마우스의 투여량으로 2회 SC(subcutaneous) 주사하였고, 1주일 후에 각각의 안정된 재조합 암세포주를 1×10^6 세포/마우스의 투여량으로 SC 주사하였다. 주사 후 2일 간격으로 종양 크기를 측정하였다.

도 9는 DC 백신의 종양형성 예방 효과를 보여주는 결과이다. DC 백신 2회 투여 후 각각의 재조합 종양세포주를 캘린징하고 2일 간격으로 종양형성 여부를 조사하여 종양이 생성되지 않은 마우스 수를 수치화 한 그래프이다.

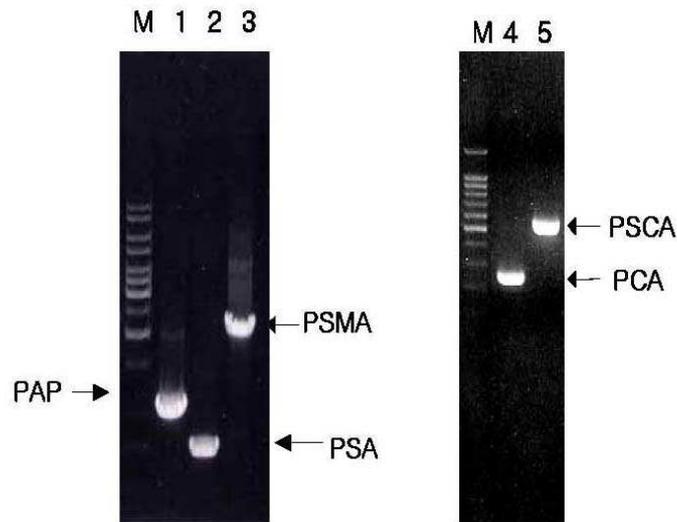
도 10은 DC 백신 투여 후 재조합 종양세포주의 폐전이(pulmonary metastasis) 도전실험에서 DC 백신의 폐전이 예방 효과를 보여주는 사진(A) 및 그래프(B)이다. CTP-PAP 및 CTP-PSA로 감염된(pulsed) DC를 1주 간격으로 2회 투여한 후 1주째에, 마우스 꼬리정맥으로 재조합 전립선암 세포주 (RENCA/PAP 또는 RENCA/PSA)를 접종하고 30일 후 폐를 추출하여 촬영하고 암 노드의 수를 측정한 그래프이다.

도 11a 및 11b는 종양이 형성된 마우스에서 종양 성장에 대한 DC 백신의 치료 효과를 보여준다. 인간 전립선암 항원을 발현하는 마우스 세포주를 1×10^6 세포/마우스로 피하에 접종하고 3일 후, CTP-PAP, CTP-PSA 또는 CTP-PCA 재조합 전립선암 항원으로 감염한 골수유래 수지상세포(Bm-DC)를 각 마우스군의 피하에 1주 간격으로 2차례 접종하였다. 접종 2일째부터 매 2일 간격으로 암의 형성 및 크기를 조사하고 (a) 28일째 사진을 촬영하였다 (b).

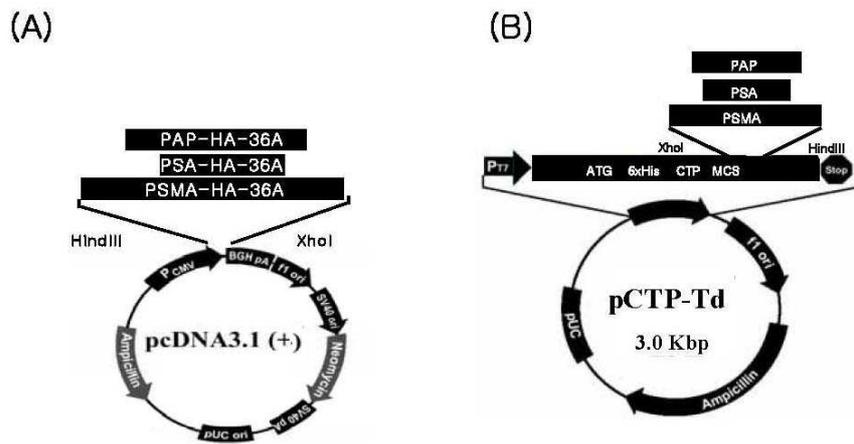
도 12는 DC 백신으로 치료한 마우스에서 암항원-특이적인 세포독성림파구(CTL) 생성정도를 보여주는 그래프이다. DC 백신을 투여받은 마우스에서 비장을 분리하여 T 세포를 분리하였고, 각각의 CTP-항원으로 처리된 항원제시세포(APC)와 5:1(T:APC)로 혼합하여 5일간 배양한 후 각각의 해당 전립선암 항원 발현 재조합 세포주를 표적세포(target cell)로 세포독성 림파구 생성정도를 측정한 그래프이다.

도면

도면1



도면2

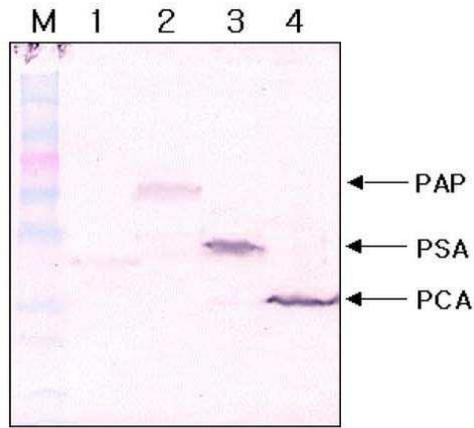


pCTP-Td vector sequence

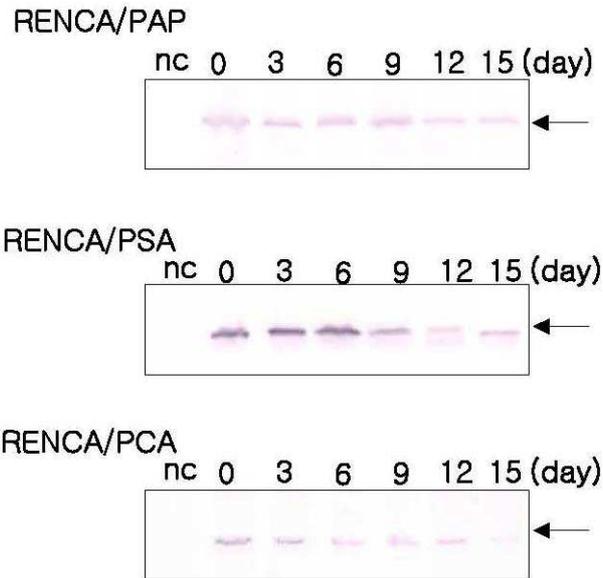
```

AAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGT
    T7 promoter
TTAACT TTAAGAAGGAGATATACAT ATG CGG GGT TCT CAT CAT CAT CAT CAT CAT
    M 6 His region
GGT ATG GCT AGC ATG ACT GGT GGA CAG CAA ATG GGT CGG GAT CTG TAC
GAC GAT GAC GAT AAG GAT CGA TGG GGA TCC ATG TAC GGA CGC CGC GCA
CGC CGC CGC CGC CGC CGC TCC ATG GCC GGT ACC GGT CTC GAG GTG CAT
    CTP-domain (11aa) NcoI KpnI AgeI XhoI
ATG GCC GGT ACC GGT CTC GAG GTG CAT GCG GTG AAT TCG AAG CTT GAT
    EcoRI BstBI HindIII
CCG GCT GCT AAC AAA GCC CGA AAG GAA GCT GAG TTG GCT GCT GCC ACC
GCT GAG CAA TAA CTA GCA T
    stop
    
```

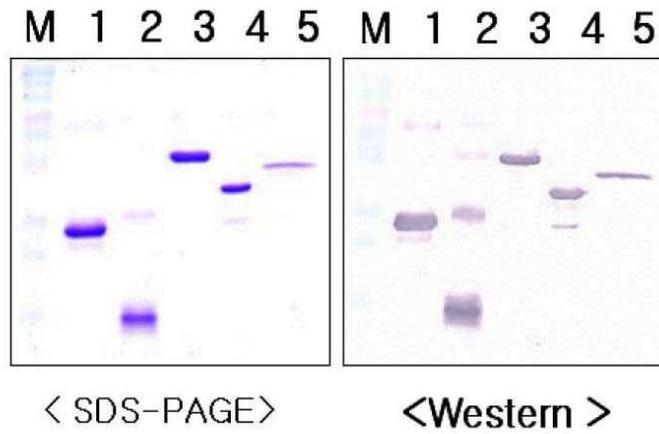
도면3



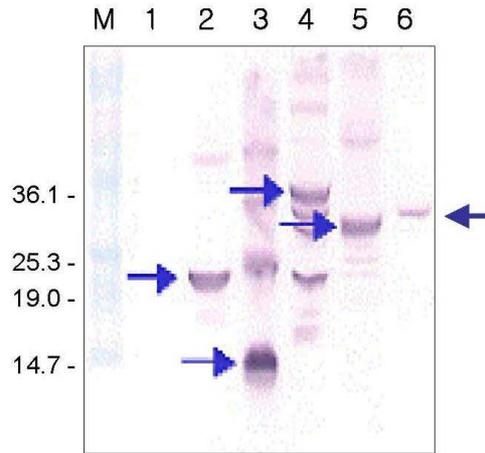
도면4



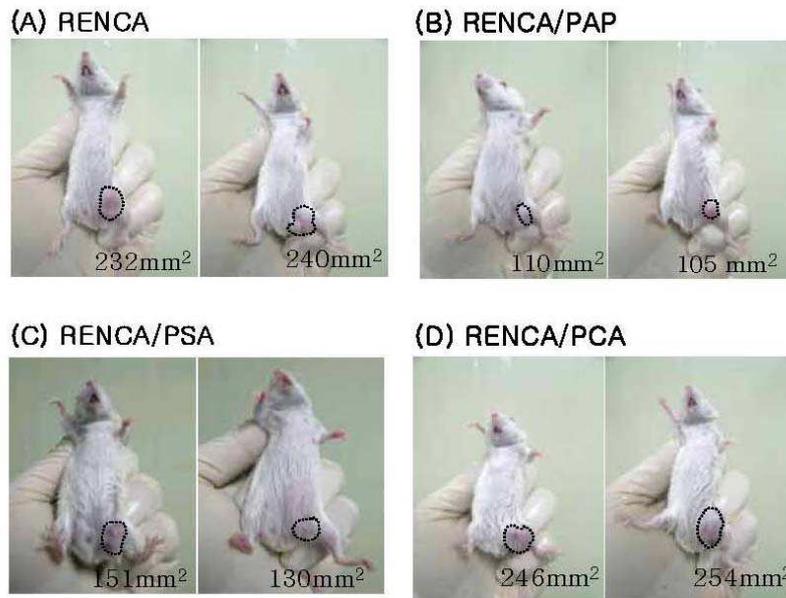
도면5



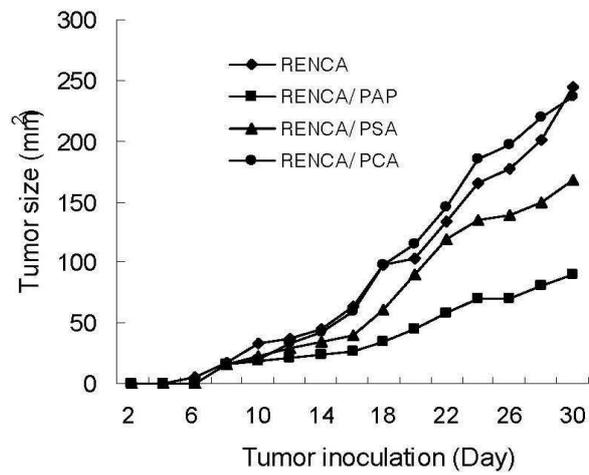
도면6



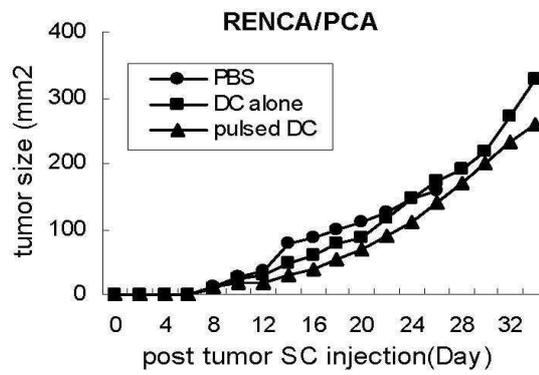
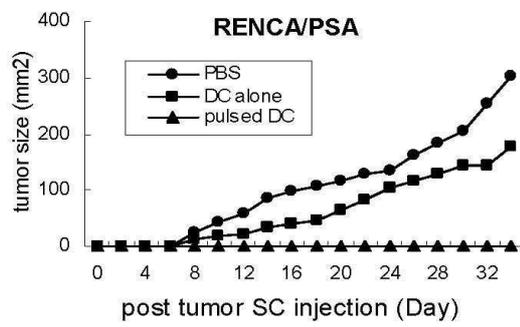
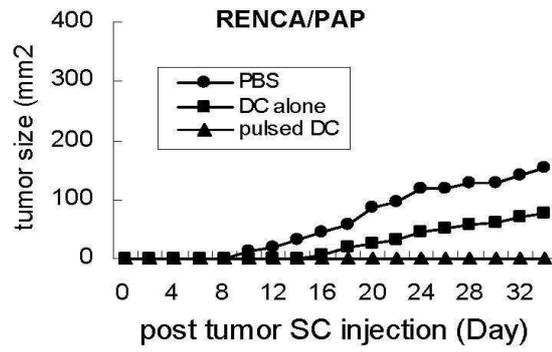
도면7a



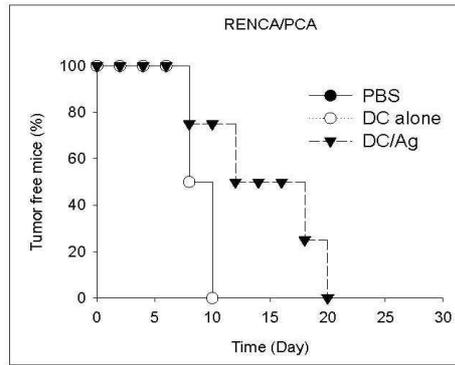
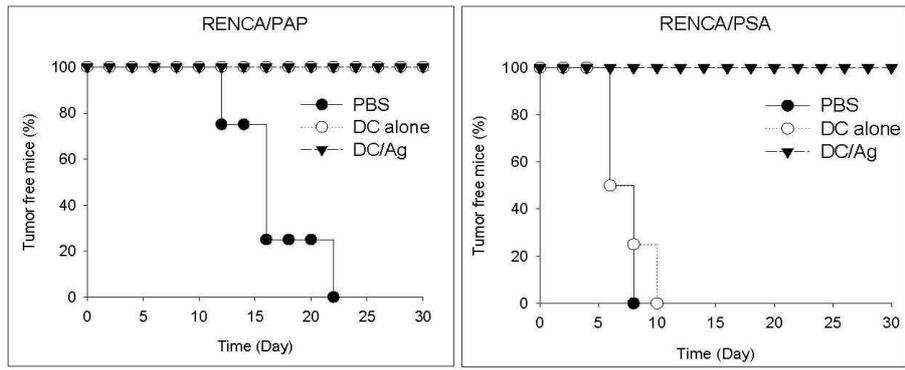
도면7b



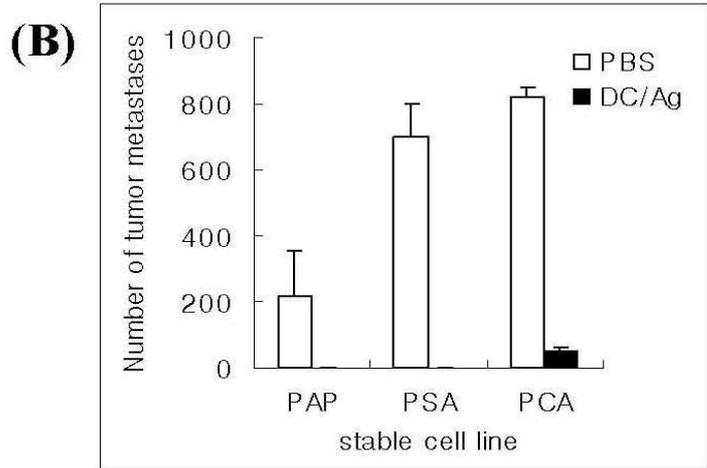
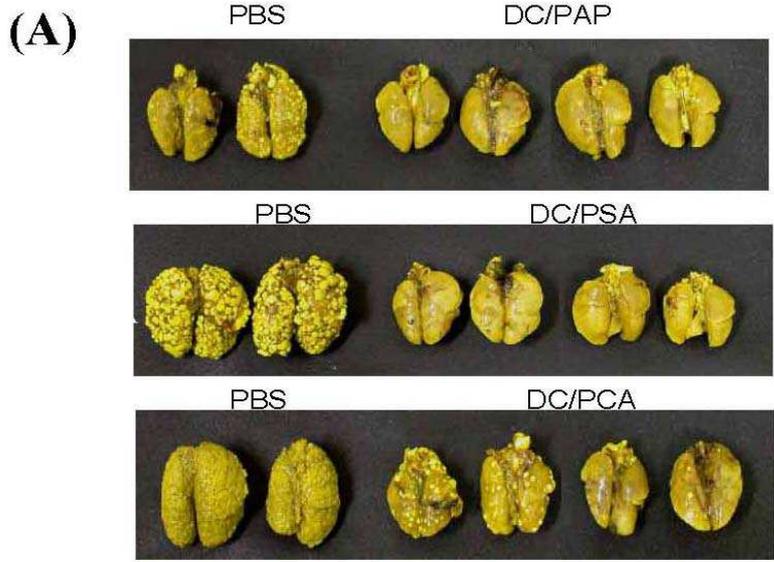
도면8



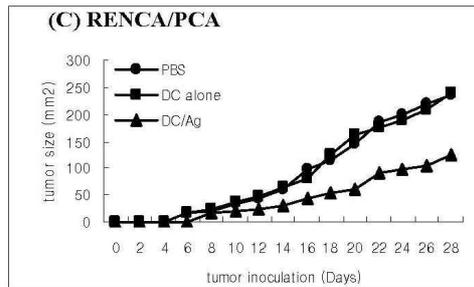
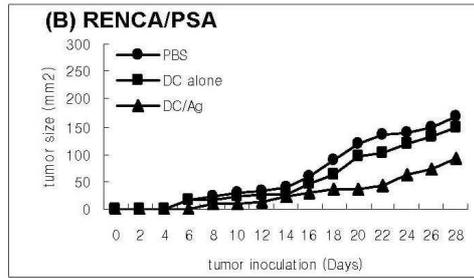
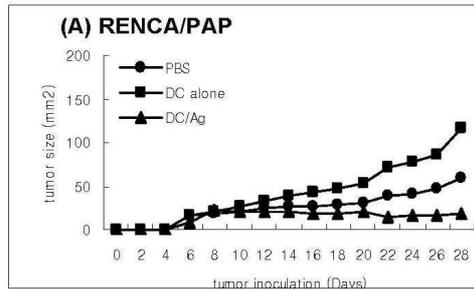
도면9



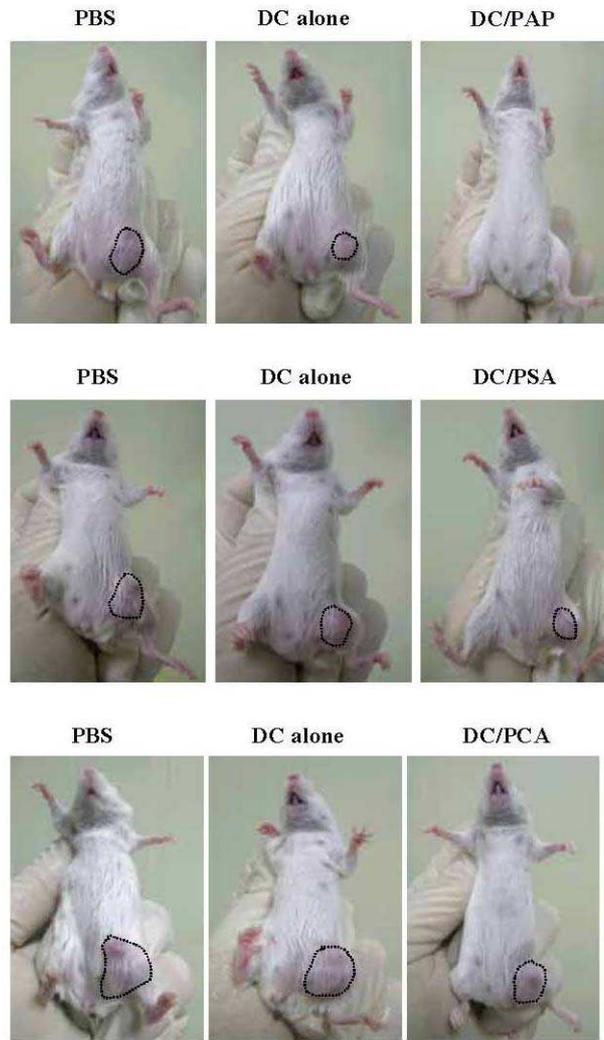
도면10



도면11a

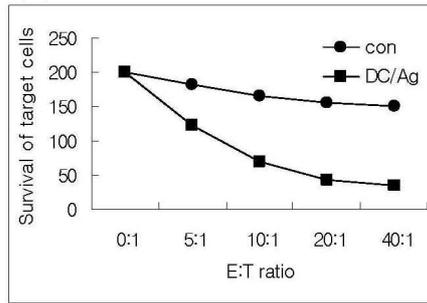


도면11b

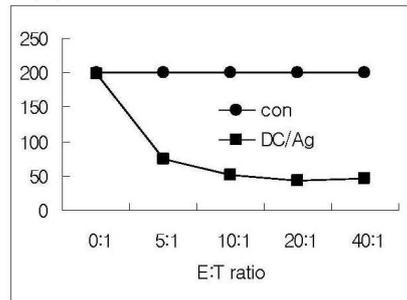


도면12

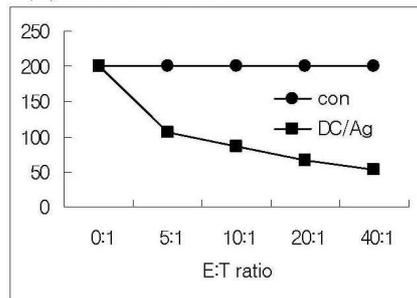
(A) RENCA/PAP



(B) RENCA/PSA



(C) RENCA/PCA



서열목록

서열목록 전자파일 첨부