(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0035503
(43) 공개일자 2012년04월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*A61K 31/352* (2006.01) *A61K 31/35* (2006.01)
*A61P 37/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0097044
(22) 출원일자 2010년10월05일
심사청구일자 2010년10월05일

(71) 출원인
**고려대학교 산학협력단**
서울 성북구 안암동5가 1
(72) 발명자
**이경미**
서울특별시 서초구 서초1동 극동 디아망아파트 101-904
**김태진**
서울특별시 강서구 화곡동 107-33 301호
(74) 대리인
**이문섭**

전체 청구항 수 : 총 8 항

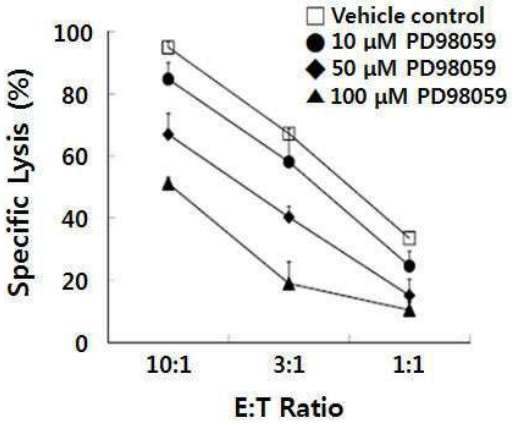
(54) 발명의 명칭 **신호전달 억제제를 이용한 NK 세포 매개 면역반응 억제제**

## (57) 요 약

본 발명은 NK 세포에 대한 신호전달 억제제를 이용한 NK 세포 매개 면역반응 억제제에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 ERK(extracellular signal-regulated protein kinase) 억제제를 유효성분으로 함유하는 NK 세포 매개 면역반응 억제제에 관한 것이다.

본 발명에 따르면 ERK 억제제를 이용하여 이종간 세포에 대한 NK 세포의 살상능을 효과적으로 억제시킬 수 있다. 이는 이종이식시 NK 세포에 의해 매개되는 면역반응을 억제시킬 수 있음을 시사한다. 따라서 본 발명에 따른 NK 세포 매개 면역반응 억제제를 이용하면 이종간 장기이식시 발생하는 급성혈관성 거부반응 및 만성거부반응을 효과적으로 억제시킬 수 있을 것이며, 또한 NK 세포 매개 면역반응 억제제를 함유하는 이종이식 거부반응 억제용 약학적 조성물로서의 활용이 기대된다.

*대 표 도* - 도2a



이 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 ~ 2010.08.31

## *특허청구의 범위*

**청구항 1**

ERK(extracellular signal-regulated protein kinase) 억제제를 유효성분으로 함유하는 NK 세포 매개 면역반응 억제제.

**청구항 2**

제 1항에 있어서, 상기 면역반응은 세포 매개성 면역반응인 것을 특징으로 하는 NK 세포 매개 면역반응 억제제.

**청구항 3**

제 2항에 있어서, 상기 세포 매개성 면역반응은 NK 세포에 의해 매개되는 급성혈관성 면역반응인 것을 특징으로 하는 NK 세포 매개 면역반응 억제제.

**청구항 4**

제 3항에 있어서, 상기 급성혈관성 면역반응은 ERK와 MEK(mitogen-activated protein kinase)의 신호전달기전에 의해 활성화된 NK 세포의 표적세포 살상능에 의해 나타나는 것을 특징으로 하는 NK 세포 매개 면역반응 억제제.

**청구항 5**

제 1항에 있어서, 상기 ERK 억제제는 ERK와 MEK의 신호전달기전을 억제시키는 것을 특징으로 하는 NK 세포 매개 면역반응 억제제.

**청구항 6**

제 1항에 있어서, 상기 EKR 억제제는 2'-아미노-3'-메톡시플라본(2'-amino-3'-methoxyflavone)인 것을 특징으로 하는 NK 세포 매개 면역반응 억제제.

**청구항 7**

제 1항의 NK 세포 매개 면역반응 억제제를 함유하는 이종이식 거부반응 억제용 약학적 조성물.

**청구항 8**

시험관 내에서 돼지 혈관내피세포와 ERK 억제제 후보물질을 처리한 인간 NK 세포를 함께 배양하는 단계; 및 상기 배양액 내 NK 세포의 살상능을 측정하는 단계를 포함하는 NK 세포 매개 면역반응 억제제의 스크리닝 방법.

## *명 세 서*

### *기 술 분 야*

[0001] 본 발명은 NK 세포에 대한 신호전달 억제제를 이용한 NK 세포 매개 면역반응 억제제에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 ERK(extracellular signal-regulated protein kinase) 억제제를 유효성분으로 함유하는 NK 세포 매개 면역반응 억제제에 관한 것이다.

## *배 경 기 술*

[0002] 장기 이식 수술은 말기 장기부전환자에게 생명연장의 유일하면서도 가장 효과적인 방법으로, 전 세계적으로 시행 중이다. 그러나 뇌사자 장기 공여의 수는 최근 들어 감소하는 반면, 이식 대기 환자는 점차 증가하고 있어 공여 장기의 부족이 심각한 문제로 부각되고 있다. 이에, 공여 장기 부족 문제를 해결하기 위한 방안으로 이종 장기 이식기술 개발이 시급한 실정이다.

[0003] 이종 간의 장기이식의 공급원으로 가장 적합한 동물은 진화상 인간과 가까운 유인원이나 원숭이가 있는데, 원숭이의 장기 크기는 어린 아이의 장기와 비슷하므로 성인의 장기를 대체 할 수 없고 현실적으로 많은 수의 장기를 확보하기가 어렵다. 그러나 돼지의 경우, 이종이식을 위한 장기공급이 수월하고 형질전환이 가능하여 환자에게 맞춤 장기나 세포를 공급할 수 있다. 돼지의 장기는 크기와 생리적 구조가 비교적 사람과 유사해서 이식 수술을 하기에 적절하다. 그러나 이종(xenogeneic)에 대한 장기 수혜자(host)의 심한 면역거부반응(immune rejection)이 동종(allogeneic)에 비해 훨씬 심각하여 영장류인 원숭이에 돼지장기를 이식시술 후 수 개월, 심지어는 수일, 수 시간 이내에 장기파손을 일으킨다. 따라서 성공적인 돼지 장기이식을 위해서는 초급성 거부반응, 급성 혈관성 거부반응, 세포 매개성 및 만성 거부반응 등의 면역거부반응의 극복이 시급하다.

[0004] 초급성 면역반응은 자연항체-항원 결합에 의해 혈액응고 및 혈청보체의 과도한 활성화가 일어나면서 수분 이내에 혈전이 형성되어 이식 장기의 기능이 소실되는 과정으로, 장기 수혜자의 자연항체를 제거하거나 보체반응을 조절하는 인자의 억제, 그리고 자연 항체와 결합하는 pig cell surface antigen 등을 유전자 조작에 의해 knock-out 시킴으로써 극복할 수 있다. 이를 바탕으로 2003년에는 자연항체 중 가장 대표적인 항원(antigen)인 αGal(galactos-α(1,3)-galactose)가 발현되지 않는 유전자 전환 돼지(α1,3-Galactosyl transferase-deficient pig)를 제작함으로써 초급성 면역반응의 극복에 크게 기여하였다.

[0005] 급성 혈관성 거부반응은 인체에서 자연적으로 생성되는 이종 반응 항체가 이식된 이종 장기의 세포에 결합하여 유도되는 면역반응과 수혜자의 자연살해세포(NK cells), 단핵세포가 활성화됨으로써 복합적인 작용에 의해 일어난다. 또한 이식되는 장기의 내피 세포가 활성화되어 염증반응과 혈전증이 발생된다. αGal 등의 이종항원에 대한 이종반응항체는 초급성 면역반응을 매개할 뿐만 아니라, 급성 혈관성 거부반응에도 중요한 역할을 한다. 이는 자연항체가 공여자(donor)의 혈관 등에 발현된 항원에 결합되어 항체의 Fc 부분이 NK 세포 및 단핵세포에 결합하여 NK 세포를 활성화시킴으로써 TNF-α나 IFN-α 등의 사이토카인(cytokine)을 생성하여 염증을 일으키며 또한 혈전증(thrombosis)을 일으켜 허혈(ischemia)을 형성한다.

[0006] 세포 매개성 거부반응은 급성 혈관성 거부반응에서 나타나는 자연살해세포, 대식세포에 의한 자연 면역반응(innate immunity)과 T 세포 중심으로 형성되는 적응 면역반응(adaptive immunity)으로 크게 나누어진다. 이중 자연 면역반응을 유도하는 대표적인 세포는 NK 세포이다.

[0007] NK 매개 급성거부반응에서 NK 세포는 대부분 퍼포린(perforin)/그랜자임 B(granzyme B)를 분비하여 장기거부반응을 유발하게 된다. NK 세포 장기거부반응시 신호전달 초기에는 PLC-γ(phospholipase C-γ)에 의해서 세포 내부의 칼슘 농도가 증가하고, MEK-ERK 신호전달기전에 의해 NK 세포의 퍼포린/그랜자임 분비기전에 의해 표적세포 살상능을 갖게 된다. ERK는 일반적으로 세포증식과 분화에 연관되어 있으며, NK 세포에서는 퍼포린(perforin)과 프랜자임 B(granzyme B)의 분비에 의한 세포살상능에 관여되어 있는 중요한 신호전달 분자이다. 또한 ERK는 암환자의 암 조직에서 일반적으로 높은 활성을 가지고 있기 때문에, 세계유수의 제약업체에서 ERK 억제제를 이용한 항암치료제 등을 개발하여 임상실험중이다.

[0008] 이에, 본 발명자들은 상기 종래기술들의 문제점들을 극복하기 위하여 예의 연구 노력한 결과, 이종장기 이식시 NK 세포에 의해 매개되는 급성 혈관성 면역반응의 억제를 위하여 과립 엑소사이토시스(granule exocytosis)에 필수적인 ERK의 활성을 억제시키는 경우, NK 세포 매개성 면역거부반응이 억제됨을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0009] 따라서 본 발명의 주된 목적은 NK 세포에 의해 매개되는 면역반응을 효과적으로 억제시키는 장점을 갖는 NK 세포 매개 면역반응 억제제를 제공하는데 있다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 상기 NK 세포 매개 면역반응 억제제를 이용한 이종이식 거부반응 억제용 약학적 조성물을 제공하는데 있다.

### 과제의 해결 수단

[0011] 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 ERK(extracellular signal-regulated protein kinase) 억제제를 유효성분으로 함유하는 NK 세포 매개 면역반응 억제제를 제공한다.

[0012] 상기 "ERK"는 세포 증식과 분화에 관여하는 단백질 키나아제로써, NK 세포에서는 퍼포린(perforin)과 그랜자임 B(granzyme B)의 분비에 의해 세포 살상능에 관여하는 중요한 신호전달 분자이다.

[0013] 본 발명에서는 NK 세포에 있는 ERK가 xenogeneic target을 만났을 때 활성화가 일어나서 거부반응에 관여한다는 점과 이를 억제시 NK 세포의 활성화가 제어된다는 점을 처음으로 밝혀내었다.

[0014] 본 발명에 있어서, 상기 면역반응은 세포 매개성 면역반응이며, 이는 NK 세포에 의해 매개되는 급성혈관성 면역반응인 것을 특징으로 한다.

[0015] 상기 "세포 매개성 면역반응"은 자연살해세포(NK 세포), 대식세포에 의한 자연 면역반응(innate immunity)과 T 세포 중심으로 형성되는 적응 면역반응(adaptive immunity)으로 나뉘며, NK 세포는 자연 면역반응을 유도하는 대표적인 세포이다. NK 세포에 의한 면역반응은 크게 'MHC class I difference에 의한 NK 세포 기능 억제 불능'과 '항체에 의한 cytotoxicity(ADCC, antibody-dependent cell mediated cytotoxicity)'에 의해 발생한다. 게다가 NK 세포의 활성화는 급성 반응뿐만 아니라 B 세포와 T 세포가 관여하는 세포 매개성 만성 거부반응 조절에도 없어서는 안될 중요한 중간단계이므로 NK 세포를 불활성화시킴으로써 급성 혈관성 거부반응과 만성 거부반응을 동시에 조절할 수 있는 이점이 있다.

[0016] 상기 급성혈관성 면역반응은 ERK와 MEK(mitogen-activated protein kinase)의 신호전달기전에 의해 활성화된 NK 세포의 표적세포 살상능에 의해 나타나는 것을 특징으로 한다.

[0017] 상기 "MEK"는 MEK1과 MEK2로 구성되어 있으며 ERK kinase로 통칭되며 세포증식, 분화, 사멸 등의 기전을 조절하는 MAPK(mitogen activated protein kinase)의 한 부분이며, MAPK는 Ras-Raf-MEK-ERK의 순서로 신호전달이 이루어진다. MEK는 다양한 성장인자(growth factor)와 사이토카인(cytokine)에 의해 활성화되며 또한 막 탈분극(membrane depolarization)과 칼슘 유입(calcium influx)에 의해 활성화 된다. 또한 MEK의 인산화에 의해 ERK가 활성화된다.

[0018] 본 발명에 있어서, 상기 ERK 억제제는 ERK와 MEK의 신호전달기전을 억제시키는 것을 특징으로 한다. 상기 기술한 바와 같이, 급성혈관성 면역반응이 ERK-MEK 신호전달기전이 활성화됨에 따라 활성화된 NK 세포의 표적세포 살상능에 의해 나타나므로, 본 발명의 억제제를 통해 ERK의 활성을 억제시키면 NK 세포의 표적세포 살상능이 억제되므로 결과적으로 NK 세포에 의해 매개되는 면역반응을 억제시킬 수 있다.

[0019] 본 발명의 구체적인 실시예에서 확인한 바와 같이, 사람의 NK 세포와 돼지의 혈관내피세포를 배양하기 전에 NK 세포에 ERK 억제제를 처리하게 되면 ERK의 활성이 억제제 처리 전에 비해 현저하게 감소되는 것을 확인할 수 있다. 이러한 ERK 억제제 처리에 따른 ERK의 활성은 처리 농도에 의존적(농도가 증가할수록)으로 감소하며, NK 세포와 돼지혈관내피세포의 배양비율에 따라서도 달라진다 (도 2a 참조).

[0020] 본 발명의 억제제에 있어서, 유효성분으로 함유하는 ERK 억제제는 종래 ERK의 활성을 억제시킬 수 있다고 알려진 예컨대, 플라본, PD98059, U0126 또는 EGTA도 가능하나 [이병호 et al., The Korean J. Anat. 33(5), 587~594, 2000; 류정화, 박사학위논문, 이화여자대학교, 2010], 바람직하게는 PD98059(2'-amino-3'-methoxyflavone)인 것을 특징으로 한다.

[0021] 상기 ERK 억제제는 칼슘 킬레이터(calcium chelator) 또는 EGTA(ethylene glycol tetraacetic acid)를 더 포함

하는 것을 특징으로 한다.

[0022] 일반적으로 MEK와 ERK는 칼슘 유입(calcium influx)에 의해 활성화가 이루어진다. 따라서 칼슘 유입을 EGTA를 통하여 억제할 경우, MAPK 경로의 신호전달이 일어나지 않게 되어 ERK의 인산화가 일어나지 않게 되고, NK 세포 매개의 면역반응의 주된 역할을 하는 과립 방출(granule release)이 일어나지 않게 되어 NK 세포 매개성 면역반응이 억제되게 된다.

[0023] 본 발명의 구체적인 실시예에서는 EGTA에 의해 ERK의 활성이 농도 의존적으로 억제됨을 확인하였다 (도 2b 참조).

[0024] 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 NK 세포 매개 면역반응 억제제를 함유하는 이종이식 거부반응 억제용 약학적 조성물을 제공한다.

[0025] 본 발명의 이종이식 거부반응 억제용 약학적 조성물이 약제로 이용되기 위해서는 약제학적 분야에서 공지된 방법에 의해 제조될 수 있으며, 이 경우 유효성분으로서의 본 발명의 추출물 이외에 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences(19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.

[0026] 본 발명의 약제학적 조성물은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 이용하여 제제화됨으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제, 캅셀제 또는 주사제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다. 이들은 비경구 투여(예컨대, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)하거나 경구 투여될 수 있다.

[0027] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여방식, 환자의 연령, 체중, 성, 건강상태, 질병증상의 정도, 음식, 투여시간, 투여방법 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 적절히 선택될 수 있으며, 바람직하게는 성인기준 1일 당 0.01 ~ 100 mg이 투여될 수 있다.

[0028] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 시험관 내에서 돼지 혈관내피세포와 ERK 억제제 후보물질을 처리한 인간 NK 세포를 함께 배양하는 단계; 및 상기 배양액 내 NK 세포의 살상능을 측정하는 단계를 포함하는 NK 세포 매개 면역반응 억제제의 스크리닝 방법을 제공한다.

## *발명의 효과*

[0029] 이상 설명한 바와 같이, 본 발명에 따르면 ERK 억제제를 이용하여 이종간 세포에 대한 NK 세포의 살상능을 효과적으로 억제시킬 수 있다. 이는 이종이식시 NK 세포에 의해 매개되는 면역반응을 억제시킬 수 있음을 시사한다. 따라서 본 발명에 따른 NK 세포 매개 면역반응 억제제를 이용하면 이종간 장기이식시 발생하는 급성혈관성 거부반응 및 만성거부반응을 효과적으로 억제시킬 수 있을 것이며, 또한 NK 세포 매개 면역반응 억제제를 함유하는 이종이식 거부반응 억제용 약학적 조성물로서의 활용이 기대된다.

## *도면의 간단한 설명*

[0030] 도 1의 (A)는 사람의 NK 세포와 돼지혈관내피세포주와의 반응시 ERK의 활성화 정도를 측정한 결과이며, (B)는 사람의 NK 세포와 돼지혈관내피세포주와의 반응시 ERK 억제제의 사용으로 ERK의 활성이 억제됨을 보여주는 도면

이다.

도 2a는 사람의 NK 세포와 돼지의 혈관내피세포주(MPN3)와의 반응시 ERK의 억제제에 따른 NK 세포 살상능의 변화를 측정한 결과이며, 도 2b는 사람의 NK세포와 돼지의 혈관내피세포주와의 반응시 칼슘 킬레이터(Calcium Chealator)의 사용에 따른 NK세포 살상능의 변화를 측정한 결과이다.

도 3은 사람의 NK 세포와 돼지의 일차 혈관내피세포와(primary PAEC)의 반응시 ERK의 억제제에 따른 NK 세포 살상능의 변화를 측정한 결과이다.

## *발명을 실시하기 위한 구체적인 내용*

[0031] 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.

[0032] **실시예 1. 세포 분리 및 배양**

[0033] **1-1. 인간 NK 세포 분리 및 배양**

[0034] 정상인으로부터 채취한 말초혈액을 RosetteSep(STEMCELL technology)으로 30 분간 처리한 후, Ficoll(GE Healthcare Inc.)에 overlay하고 2500 rpm에서 30 분간 원심분리한 후 연막(buffy coat) 층을 얻어 NK 세포를 획득하였다. 획득된 NK 세포는 24-웰 플레이트(well plate; SPL)에서 10 % 우태아혈청(fetal bovine serum; Lonza) 및 300 U/ml의 인간 재조합 인터루킨-2(hrIL-2; Chiron)가 첨가된 RPMI-1640(Welgene, Korea) 배지로 7 ~ 10일간 배양하였다.

[0035] **1-2. 돼지 세포 분리 및 배양**

[0036] 돼지혈관내피세포주(MPN3)는 서울대학교 의과대학의 XRC (Xenotransplantation Research Center)에서 제공받았으며, 일차(primary) 돼지혈관내피세포(primary porcine aortic endothelial cell; primary PAEC)는 XRC에서 공급받은 미니돼지(miniature pig)의 대동맥에서 분리하였다. 상기 분리된 세포들은 10% 우태아혈청이 첨가된 RPMI-1640 배지에서 배양하였다.

[0037] **실시예 2. 웨스턴 블롯(Western blot) 분석**

[0038] 사람의 NK 세포가 돼지 혈관내피세포주(MPN3)와의 반응시 ERK의 활성화 정도를 분석하기 위해, ERK의 인산화 단백질 발현정도를 측정하였다.

[0039] 사람의 말초혈액으로부터 분리한 NK 세포를 10 일간 배양한 후 수확하였으며, 돼지 혈관내피세포주(MPN3)는 1.6% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde)를 처리하여 돼지혈관내피세포에서 발생하는 신호전달을 배제시켰다. 이후 상기 돼지 혈관내피세포주(MPN3)를 NK 세포와 1 : 1의 비율로 공동배양한 후, 0 ~ 30(0, 2, 5, 10 및 30) 분간 37 ℃에서 반응시킨 후 수확하여 단백질 용해 버퍼(Protein lysis buffer)를 이용하여 전체 단백질(whole protein)을 분리하였다. 상기 분리된 단백질들을 12% SDS PAGE를 이용하여 전기 이동시키고, PDVF(polyvinylidene diffuoride) membrane(Gelman Inc.)에 전이(transfer)시킨 후, 5% 탈지 우유(skim milk)로 밤새도록(overnight) 블로킹(bloking)시켰다. 그러고 나서, phospho ERK mAb(Cell signaling Inc.)를 이용하여 1 시간 동안 반응시키고, HRP-컨쥬게이트된 2nd mouse(GE Healthcare Inc.) 항체를 이용하여 45 분간 분석한 후, Immobilon Western(Mikkipore Inc.)을 이용하여 1 분간 반응시킨 뒤 필름에 감광하였다.

[0040] 측정 결과, 도 1의 (A)에 나타낸 바와 같이 NK 세포와 돼지 혈관내피세포주를 반응시킨지 10 ~ 30 분 정도에 ERK의 활성화가 가장 강하게 일어남을 확인할 수 있다.

[0041] 그리고 NK 세포와 돼지 혈관내피세포주와의 반응시 활성화되는 ERK의 인산화정도를 ERK의 억제제가 감소시키는지를 확인하기 위해, ERK 억제제를 처리하여 억제 효과를 관찰하였다. ERK 억제제인 PD98059(Sigma-Aldrich. Inc.)의 처리는 NK 세포와 돼지 혈관내피세포주를 공동배양하기 20 분전 NK 세포에 50 μM의 농도로 처리하였다.

[0042] 그 결과, 도 1의 (B)에 나타낸 바와 같이 ERK 억제제의 처리에 따라 ERK의 인산화가 현격하게 감소됨을 확인하

였다.

[0043] **실시예 3. NK 세포 살상능 측정**

[0044] 돼지 세포에 대한 사람의 NK 세포의 살상능을 4-hr $^{51}Cr$ release assay로 테스트하였다.

[0045] 먼저 돼지 혈관내피세포주(MPN3)를 $5\times10^5$ 세포로 준비하여 $^{51}Cr$ 100 μci를 1 시간 동안 표지하였다. 이후 실시예 1에서와 같이 배양시킨 NK 세포와 상기 돼지 혈관내피세포주를 10 : 1, 3 : 1, 1 : 1 비율로 섞어 4 시간 동안 공동배양한 후, 상등액을 얻어 감마 카운터(gamma counter; perkin Elmer, USA)로 측정하였다. 이때 ERK 억제제인 PD98059와 Calcium Chealator(EGTA)는 공동배양하기 전 NK 세포에 농도별(10, 50, 및 100 μM)로 처리하여 20 분간 37 ℃, 5% $CO_2$ 조건으로 반응시켰다. 용해(lysis) 퍼센트는 하기 수학식 1에 따라 계산하였다.

[0046] <수학식 1>

[0047]
$$\text{Specific Lysis(\%)} = \frac{\text{Experimental release} - \text{Spontaneous release}}{\text{Maximum release} - \text{Spontaneous release}} \times 100$$

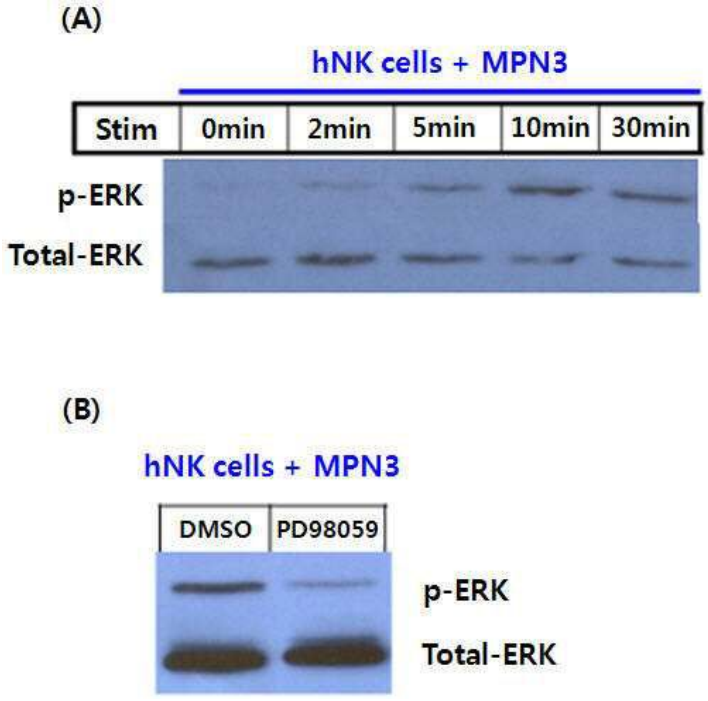
[0048] 측정 결과는 도 2a 및 도 2b에 나타내었으며, 도면에 나타낸 바와 같이 ERK 억제제인 PD98059 또는 EGTA를 처리하는 경우 사람의 NK 세포의 살상능이 농도 의존적으로 감소함을 알 수 있다. 특히 NK 세포와 돼지 혈관내피세포주를 1 : 1의 비율로 배양하는 경우에는 모든 농도에서 현저하게 NK 세포의 살상능이 감소하였다.

[0049] 그리고, 일차 돼지혈관내피세포(primary PAEC)도 상기와 같이 준비하여 $^{51}Cr$ 100 μci를 1 시간 동안 표지한 후, NK 세포와 3 : 1의 비율로 혼합하여 4 시간 동안 공동배양한 후, 상등액을 얻어 감마 카운터로 측정하였다. 이때 ERK 억제제(PD98059)는 공동배양하기 전 NK 세포에 100 μM로 처리하여 20 분간 37 ℃, 5% $CO_2$ 조건으로 반응시켰다. 용해(lysis) 퍼센트는 상기 수학식 1에 따라 계산하였다.

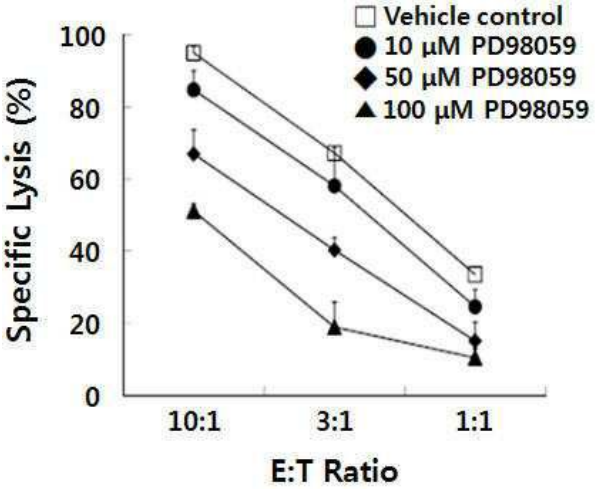
[0050] 측정 결과는 도 3에 나타내었으며, ERK 억제제 처리시 NK 세포의 살상능이 현저하게 감소됨을 확인할 수 있다.

도면

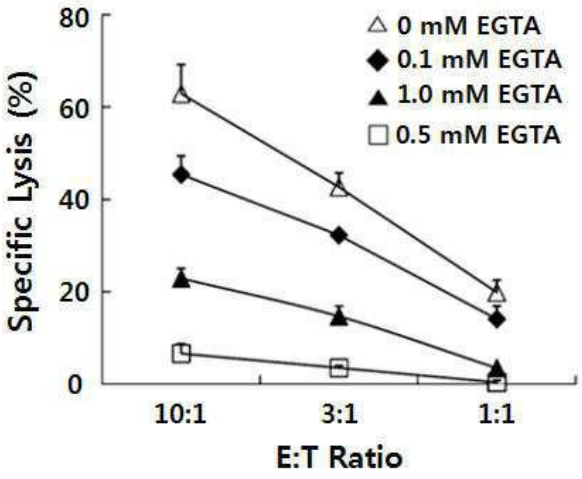
도면1


(A)
hNK cells + MPN3
Stim
0min
2min
5min
10min
30min
p-ERK
Total-ERK
(B)
hNK cells + MPN3
DMSO
PD98059
p-ERK
Total-ERK

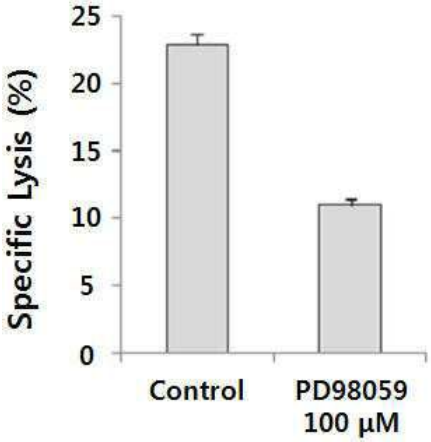
도면2a


Vehicle control
10 μM PD98059
50 μM PD98059
100 μM PD98059
Specific Lysis (%)
100
80
60
40
20
0
10:1
3:1
1:1
E:T Ratio

도면2b


80
60
40
20
0
Specific Lysis (%)
0 mM EGTA
0.1 mM EGTA
1.0 mM EGTA
0.5 mM EGTA
10:1
3:1
1:1
E:T Ratio

도면3


25
20
15
10
5
0
Specific Lysis (%)
Control
PD98059
100 μM