

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호

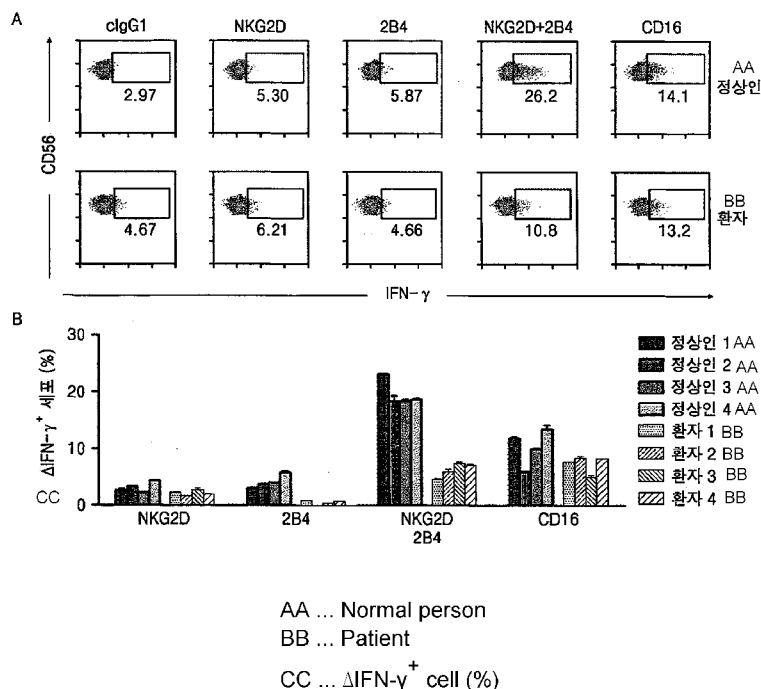
(43) 국제공개일
2017년 11월 30일 (30.11.2017) WIPO | PCT

WO 2017/204446 A2

- (51) 국제특허분류: *G01N 33/68* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2017/002870
- (22) 국제출원일: 2017년 3월 17일 (17.03.2017)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2016-0063735 2016년 5월 24일 (24.05.2016) KR
10-2017-0033207 2017년 3월 16일 (16.03.2017) KR
- (71) 출원인: 울산대학교 산학협력단 (UNIVERSITY OF ULSAN FOUNDATION FOR INDUSTRY COOPERATION) [KR/KR]; 44610 울산시 남구 대학로 93, Ulsan (KR). 재단법인 아산사회복지재단 (THE ASAN FOUNDATION) [KR/KR]; 05505 서울시 송파구 올림픽로43길 88, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 김현식 (KIM, Hun Sik); 05118 서울시 광진구 광나루로56길 32, 201-501, Seoul (KR). 명승재 (MYUNG, Seung Jae); 06215 서울시 강남구 역삼로 309, 103-601, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 리앤목 특허법인 (Y.P.LEE, MOCK & PARTNERS); 06292 서울시 강남구 언주로 30길 13 대림아크로텔 12층, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN,

(54) Title: METHOD FOR TESTING NK CELL ACTIVITY USING SYNERGISTIC ACTIVITY OF RECEPTOR, AND METHOD FOR DIAGNOSING DISEASE ASSOCIATED WITH NK CELL ACTIVITY USING SAME

(54) 발명의 명칭: 수용체 시너지 활성을 이용한 NK 세포의 활성도 검사 방법 및 이를 이용한 NK 세포의 활성도가 관련된 질환의 진단 방법



(57) Abstract: The present invention relates to a method for testing NK cell activity and a composition for testing NK cell activity, the method for testing NK cell activity comprising the steps of: specifically stimulating at least two distinguishable factors in an NK cell in a sample; measuring the synergistic activation level of the NK cell; and comparing the synergistic activation level of the NK cell against that of a normal NK cell. In addition, the present invention relates to a kit for diagnosing a disease associated with the synergistic activity of a NK cell, the kit comprising the composition.

[다음 쪽 계속]



MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))

(57) 요약서: 본 발명은 시료 내의 NK 세포 상에 구별되는 두 개 이상의 인자를 특이적으로 자극하는 단계; 상기 NK 세포의 시너지 활성화 정도를 측정하는 단계; 및 정상 NK 세포 대비 상기 NK 세포의 시너지 활성화 정도를 비교하는 단계를 포함하는 NK 세포의 활성화 검사 방법 및 NK 세포의 활성화 검사용 조성물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 NK 세포의 시너지 활성화 관련된 질환의 진단용 키트에 관한 것이다.

명세서

발명의 명칭: 수용체 시너지 활성을 이용한 NK 세포의 활성화 검사 방법 및 이를 이용한 NK 세포의 활성화가 관련된 질환의 진단 방법 기술분야

- [1] 본 발명은 NK 세포의 수용체 시너지 활성을 이용한 NK 세포의 활성도를 검사하는 방법 및 이를 이용한 NK 세포의 활성화와 관련된 질환을 진단하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] NK 세포(natural killer cell)는 선천적 면역 및 후천적(adaptive) 면역계에 중요한 세포독성 림프구의 한 종류이다. NK 세포는 바이러스 감염된 세포나 암세포에 반응하는데, 전형적으로 세포 표면에 MHC(major histocompatibility complex)의 이상 현상을 감지한다. 이러한 NK 세포는 퍼포린(perforin)을 분비해 감염 세포나 암세포의 세포막에 구멍을 내고, 여기에 그랜짐(granzyme)을 내어 이 세포들을 사멸시키는 세포독성을 갖는다. B 세포 림프종 및 많은 암환자의 경우 NK 세포의 수나 항암활성에 결함이 발견되고 있으며 NK 세포의 기능 이상은 이러한 암의 발생과 밀접한 관련을 가지고 있음이 알려져있다 (Annu. Rev. Immunol. 2013; 31:227-258).
- [3] NK 세포의 활성화에는 다양한 활성화 및 저해성 수용체가 관여(engage)한다. 지배적이라 간주되는 수용체 중에는 면역 수용체 티로신-기반 활성 모티프(immunoreceptor tyrosine-based activation motif: ITAM)-관련 신호전달 분자 (예를 들어, FcR γ 사슬 또는 TCR ζ 사슬)와 관련된 NKp46 및 신호전달 분자 DAP10와 관련된 수용체 NKG2D (EMBO J. 2004; 23:255.-9, Annu. Rev. Immunol. 2005; 23:225-74)에 관련한 것들이 있다. 공동자극성이라 간주되는 수용체로는, 2B4 (CD244)와 같은 신호전달 림프구 활성 분자 (signaling lymphocytic activation molecule: SLAM) 패밀리의 구성원들 뿐만아니라, DNAM-1 (CD226), CD2, 및 NKp80 (*KLRF1* 유전자 산물)과 같이 다양한 수용체를 포함한다.
- [4] ITAM-관련 분자는 NK 세포의 여러 다른 활성화 수용체에 의한 신호전달에 기여하는데, 자연 세포독성 수용체 (natural cytotoxicity receptor: NCR)가운데 NKp46 및 NKp30은 FcR γ 및/또는 TCR ζ 과 관련되고, 반면에 NKp44는 신호 어댑터(adaptor) DAP12와 관련된다 (EMBO J. 2004; 23:255-9).
- [5] 혈구탐식성 림프조직구증(Hemophagocytic lymphohistiocytosis: HLH)은 단구(monocyte) 또는 대식세포(macrophage)의 증식을 보이는 질환으로 조절되지 않는 혈구탐식과 염증성 시토킨(cytokine)의 과분비 현상을 보인다. 여기서 특히 면역결핍성 X-연관 림프증식증후군 1 (immunodeficiency X-linked lymphoproliferative disease 1: XLP1)은 HLH과 같은 증상을 보이는 질환으로, 엡스타인 바 바이러스(EBV: Epstein-Barr virus)에 감염되어 발병하거나, 선천적

XLP1의 경우 SAP 단백질을 만드는 *SH2D1A*의 돌연변이가 XLP1의 유전적 기반을 형성한다.(Annu. Rev. Immunol. 2007; 25:337-79, Annu. Rev. Immunol. 2011; 29:665-705).

- [6] 2B4는 세포질적 말단(tail)에 ITSM 모티프를 함유하고 있고 소형 어댑터 SAP 및 SAP-관련 티로신 키나제 Fyn의 모집을 통한 활성화 신호를 전달한다 (*J. Exp. Med.* 202, 181-192 (2005), *Immunity* 36, 974-985 (2012)). 2B4의 신호전달은 Vav1, p38 MAPK, Erk, 및 PLC-g2 활성화를 이끌어 낸다 (*Nat. Immunol.* 9, 495-502 (2008)). 주목할 점은, 기능적인 SAP 발현이 부족한 선천적 XLP1 환자로부터 얻은 NK 세포에서, 2B4가 활성화하지 못하고, 대신 억제적 신호를 전달할 수 있다는 것이다 (*Annu. Rev. Immunol.* 25, 337-379 (2007)). 이러한 NK 세포 결함은 엡스타인 바 바이러스 (EBV)-감염된 B 세포의 살해 결함, IFN-g 생산 결함, 전격성 단핵증(fulminant mononucleosis) 및 B-세포 림프종과 같은 임상적인 XLP1의 징후에 기여하는 것으로 생각된다.
- [7] 한편, 암환자의 NK 세포에서 항암수용체인 NKG2D (*J. Immunol.* 175, 5541-5550 (2005), *Cancer Res.* 69, 7775-7783 (2009), *J. Immunol.* 189, 1360-1371 (2012)), DNAM-1 (*Immunol. Cell Biol.* 90, 109-115 (2012))을 통한 NK 세포활성화에 결함이 관찰된 바 있다. 또한, B 형간염 바이러스 감염환자의 NK 세포에서도 NKG2D, 2B4의 발현과 기능이 감소되어있는 것으로 알려져 있다 (*PloS Pathog.* 8, e1002594 (2012)).
- [8] 따라서, HLH 뿐 아니라, 암과 바이러스 감염질환에서도 NK 세포활성도 검사를 통해 상기 질환을 진단하고자 하나, NK 세포 활성도를 측정하는 기존의 기술은 방사성 동위원소, 또는 형광표지 탐침(probe)을 이용한 것으로서, 비용이나 시간면에서 임상적으로 적용하기에 부적합하므로, NK 세포의 활성도를 간편하고 신속하면서도 유의적으로 측정할 수 있는 방법이 다양한 면역 관련 질환의 조기 진단 및 예후 판단에 중요하게 인식되고 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [9] 일 양상은 시료 내의 NK 세포 상에 구별되는 두 개 이상의 인자를 특이적으로 자극하는 단계; 상기 두 개 이상의 인자에 대한 자극으로 유발된, 상기 NK 세포의 시너지 활성화 정도를 측정하는 단계; 및 정상 NK 세포 대비 상기 NK 세포의 시너지 활성화 정도를 비교하는 단계를 포함하는 NK 세포의 활성화도 검사 방법을 제공한다.
- [10] 다른 양상은 NK 세포의 시너지한 활성을 일으키는 자극 물질로서, 상기 NK 세포 상에 구별되는 두 개 이상의 인자에 각각 또는 동시에 특이적인 항체 또는 그 단편, 특이적인 활성을 유발하는 표적 세포 또는 폴리펩티드, 특이적으로 활성을 유도하는 조성물, 및 가역적 또는 비가역적인 작용자 중 선택된 하나 이상을 포함하는 NK 세포의 활성화도 검사용 조성물을 제공한다.

- [11] 또 다른 양상은 시료 내의 NK 세포 상에 구별되는 두 개 이상의 인자를 자극하여 상기 NK 세포의 시너지한 활성을 일으키는 자극 물질로서, 두 개 이상의 인자에 각각 또는 동시에 특이적인 항체 또는 그 단편, 특이적인 활성을 유발하는 표적 세포 또는 폴리펩티드, 특이적으로 활성을 유도하는 조성물, 및 가역적 또는 비가역적인 작용자 중 선택된 하나 이상; 및 정상 NK 세포 대비 상기 NK 세포의 활성화 존재 여부를 검출하는 물질을 포함하는 NK 세포의 시너지 활성화와 관련된 질환의 진단용 키트를 제공한다.

과제 해결 수단

- [12] 일 양상은 시료 내의 NK 세포 상에 구별되는 두 개 이상의 인자를 특이적으로 자극하는 단계; 상기 두 개 이상의 인자에 대한 자극으로 유발된, 상기 NK 세포의 시너지 활성화 정도를 측정하는 단계; 및 정상 NK 세포 대비 상기 NK 세포의 시너지 활성화 정도를 비교하는 단계를 포함하는 NK 세포의 활성화 검사 방법을 제공한다.
- [13] 상기 시료는 개체, 예를 들면, 인간을 포함한 포유류 등으로부터 유래된 생물학적 시료일 수 있다. 또한, 상기 생물학적 시료는 개체로부터 분리된 것일 수 있으며, 혈액, 전혈, 혈청, 혈장, 림프액, 소변, 분변, 조직, 세포, 기관, 골수, 타액, 객담, 뇌척수액 또는 그들의 조합일 수 있다. 또한 상기 생물학적 시료는 PBMC, 정제된 NK 세포 또는 일차성 휴지기의 세포(primary resting cell) (즉, 혈액에서 바로 분리한)를 포함하는 것일 수 있다. 일 구체예에서, 상기 시료는 혈액이다.
- [14] 상기 용어 "구별"은 세포에서의 위치, 구조, 및 기능 등에서 동등하지 않은 모든 경우를 포함한다. 구체적으로, 자극 후 세포 내에서 유발하는 신호전달 과정을 상이하게 하거나, 세포 상의 위치 또는 인자 그 자체가 구조적으로 상이하여 자극 수단 또는 방법을 다르게 해야 하거나, 단일 자극된 경우 세포 내에서의 역할이 상이하거나 효과적으로 유효하게 활성을 일으키기에 부족한 것을 의미할 수 있다.
- [15] 상기 용어 "인자"는 NK 세포의 시너지 활성화를 일으키는 모든 분자적 요소를 의미한다. 구체적으로, 상기 인자는 세포 내외의 수용체, 채널(channel), 및 특이적인 리간드와 결합할 수 있는 세포 내외의 어댑터(adaptor), 단백질, 당단백질, 펩티드, 및 모티프를 포함할 수 있다.
- [16] 일 구체예에서, 상기 인자는 수용체일 수 있다. 상기 용어 "수용체"는 특정 물질과 결합하여 NK 세포의 활성을 변화시키는 모든 분자를 말한다. 상기 특정 물질은 화학적 조성물, 체내 유래 또는 인공적인 특정 단백질, 펩티드, 콜레스테롤, 당단백질을 포함하며, 다른 면역 세포 또는 NK 세포 스스로에 의한 시토킨 또는 케모킨, 또는 표적 세포 또는 NK 세포 자체의 특정 수용체 또는 막단백질을 포함할 수 있다.
- [17] 일 구체예에 있어서, 상기 인자는 세포 표면 또는 세포 내에 존재하는 것일 수

있다. 따라서, 예를 들어, 상기 인자가 수용체일 경우, NK 세포의 세포 표면에 위치하여 특정 물질과 결합하여 세포 내로 신호 전달하여 NK 세포의 활성을 일으키는 경우 뿐만 아니라, 세포막을 통과하여 세포막 내면 또는 세포질에 존재하는 수용체로서 외부 특정 자극 물질과 결합하여 신호전달 작용을 일으킬 수 있는 모든 수용체를 포함한다.

[18] 상기 용어 "자극"은 인자에 작용하여 NK 세포 내외의 특정 신호전달을 일으키는 것을 의미한다. 상기 자극을 일으키는 방법은 상기 인자의 하나 이상에 대해 특이적인 항체, 그 단편, 또는 펩티드, 특이적으로 유도 또는 억제하는 조성물, 및 가역적 또는 비가역적인 작용자(agonist) 또는 길항제(antagonist)를 이용할 수도 있고, NK 세포를 자극 할 수 있는 다양한 표적세포 (예를 들어, K562, 721.221, 또는 특정 수용체자극 항체로 코팅된 P815)를 포함하는 배양물과 배양하는 것을 포함할 수 있다.

[19] 상기 용어 "시너지"는 단일 인자 각각의 효과는 NK 세포활성을 효과적으로 유효하게 활성화 시키기에 부족하나 구별되는 각 인자가 동시적 또는 순차적으로 공동자극된 경우, 단일 인자 각각 자극된 것 대비 현저하게 변화를 유발하거나, NK 세포 활성을 효과적으로 유효하게 활성화 시킬 수 있는 것을 의미한다. 따라서, NK 세포의 "시너지 활성" 또는 "시너지 활성화"는 NK 세포 상에 구별되는 두 개 이상의 인자를 각각 및 이들의 조합에 대해 특이적으로 자극하여, 상기 각 인자 및 이들의 조합에 대한 자극에 의한 상기 NK 세포의 활성을 측정하여, 상기 각 인자의 자극에 의한 NK 세포 활성 정도 대비 (바람직하게는, 상기 각 인자 중 더 많이 활성화된 NK 세포 활성 정도 대비)상기 각 인자의 조합의 자극에 의한 NK 세포 활성 정도가 1.5배 이상, 2배 이상, 또는 3배 이상인 경우, 시너지 활성이 유발된 것으로 결정할 수 있고, 바람직하게는 2배 이상인 경우 시너지 활성이 유발된 것으로 결정할 수 있다. 상기 시너지 활성화 정도는 본 명세서에 기재된 바와 같이, 유동세포계측분석, 면역블롯(immunoblotting) 등을 이용하여, 하위인자의 인산화 또는 발현 정도, 탈과립화 활성, 세포독성 활성 및 NK 세포 자극에 의해 분비된 시토킨을 측정한 것을 기준으로 수치화할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[20] 본 발명의 NK 세포의 활성도를 검사하는 방법에서, 정상 NK 세포 대비 상기 NK 세포의 시너지 활성화를 비교하는 단계는, 구체적으로 정상적인 NK 세포를 대조군으로 실험군과 동등한 조건에서 구별되는 두 개 이상의 인자를 각각 또는 특정 조합으로 자극하였을 때, 정상적인 NK 세포에서 나타나는 시너지한 활성화 현상이 실험군에서 현저하게 높거나, 나타나지 않거나 그 정도가 현저하게 적은 경우 비정상적으로 판단하는 것을 포함한다. 또한 단일 인자를 자극한 경우에 비해 공동 자극한 경우 비교가 용이하여 인위적으로 시너지 활성화를 유발하여 그 데이터를 비교함으로써 판단하는 것을 포함한다. 상기 단계에 의하여 비정상적인 NK 세포와 관련한 질환의 병리학적 징후, 바이러스 감염, 암 세포의 존재, 및 특정 암을 판단하고 상기 질병들에 대해 예후 예측 할 수 있다. 상기

"정상 NK 세포"는 질병을 갖지 않는 개체가 갖는 또는 그러한 개체로부터 유래된 NK 세포를 말하며, 상기 질병을 갖지 않는 개체는 적어도 NK 세포 활성화에 영향을 미치는 것이라 알려진 신체적, 유전적, 또는 외래적 조건을 갖지 않는다.

- [21] 일 구체예에서, 상기 방법은 상기 시료 중 필요로 하는 NK 세포를 분리하는 단계를 더 포함할 수 있다. 필요에 따라 다른 혈구 또는 림프구와 함께 존재하는 중에 자극 후 상기 단계가 이루어질 수 있고, 림프구로서 NK 세포만을 포함하는 시료로 하기 위해 상기 단계가 이루어진 후 상기 자극하는 단계가 이루어질 수 있다. 분리된 NK 세포의 정제도 및 그 시료의 구성은 실험에 필요한 정도로 다양할 수 있다. NK 세포는 필요에 따라 시료에서 정제된 그대로를 사용할 수 있고, 실험에 적합한 조건 또는 세포량을 확보하기 위하여 증식시킨 후 사용할 수 있다.
- [22] 그러나, 특정 인자의 조합의 경우 NK 세포에 특이적이므로 (실시예 6), 본 발명의 방법에서 상기 NK 세포에 특이적인 인자의 조합을 이용하는 경우, 상기 NK 세포를 분리하는 단계는 필수적이지 않을 수 있다.
- [23] 일 구체예에 있어서, 상기 자극은 상기 인자에 동시에 또는 순차적으로 이루어지는 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 인자에 구조적으로 결합하거나, 상기 인자를 개조(modify)하여 자극할 수 있다. 상기 개조는 예를 들어 인산화, 유비퀴틴화, 설폰화, 메틸레이션(methylation), 파릴레이션(parylation) 또는 당화(glycosylation)와 같은 번역후 개조(post-translation modification) 또는 절단을 포함할 수 있다.
- [24] 일 구체예에 있어서, 상기 인자는 ITAM-함유하는 신호전달 분자(예를 들어, CD16, NKp46, NKp30 또는 NKp44 등), NKG2D, 2B4 (CD244), DNAM-1 (CD226), CD2 및 NKp80 중 선택된 것일 수 있다. Bryceson Y 등(Blood 2006;107:159-166) 및 Kim HS 등(Immunity 2010;32:175-186)에 의하면 NK 세포 시너지 활성화는 상기 나열된 인자들의 다양한 조합에 의해 가능할 수 있으며, 상기 인자의 조합의 예로는 2B4 및 DNAM-1, DNAM-1 및 NKG2D, 2B4 및 NKG2D, 또는 2B4, DNAM-1 및 NKG2D가 있을 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [25] 일 구체예에서, 상기 자극하는 단계에서 상기 자극은 상기 두 개 이상의 인자에 각각 또는 동시에 특이적인 항체 또는 그 단편, 특이적인 활성을 유발하는 표적 세포 또는 폴리펩티드, 특이적으로 유도 또는 억제하는 화합물, 및 가역적 또는 비가역적인 작용자(agonist) 또는 길항제(antagonist) 중 선택된 하나 이상에 의해서 유발될 수 있다. 상기 인자에 특이적인 항체 또는 그 단편은 이소형을 포함하며, 구별되는 두 개 이상의 인자에 동시에 결합할 수도 있다. 구체적으로, 상기 구별되는 두 개 이상의 인자에 동시 결합하는 예로 CD244/2B4 또는 CD226/DNAM-1으로 코팅된 P815이 있을 수 있다. 상기 작용자 또는 길항제는 대상 인자에 대해 구조적으로 특이적인 성질을 갖는 화합물일 수 있고, 3차 구조적으로 특이성을 가지는 폴리펩티드일 수 있다.

- [26] 일 구체예에서, 상기 인자에 특이적인 활성을 유발하는 표적 세포는 NK 세포 상에 구별되는 두 개 이상의 인자에 대한 항체, 단편 및 이들의 조합 중 선택된 하나 이상의 것으로 코팅된 것일 수 있다. 상기 NK 세포 상에 구별되는 두 개 이상의 인자는 상기 서술한 바와 같다. 항체는 상기 인자들의 이소형에 대한 항체일 수 있으며, 단편은 항체의 단편으로서 활성을 일으키기에 충분한 상기 항체의 특정 부분만을 포함할 수 있다. 코팅은 하기 실시예에서 서술하는 바와 같이, 표적 세포와의 프리인큐베이션으로 수행할 수 있고, 또는 가교(cross-linking) 기법을 이용해서 상기 항체, 단편 또는 그 조합으로 코팅할 수 있다.
- [27] 일 구체예에서, 상기 활성화 정도를 측정하는 단계는 상기 NK 세포 상에 구별되는 두 개 이상의 인자의 하위인자의 인산화 또는 발현 정도, 탈과립화(degranulation) 활성, 세포독성(cytotoxicity) 활성 및 NK 세포 자극에 의해 분비된 시토킨의 측정 중 선택된 하나 이상을 포함하는 것일 수 있다. 용어 "하위인자"는 상기 NK 세포 상의 인자가 자극되는 경우 영향을 받아 발현이 증가되거나, 인산화되는 세포 내 단백질 또는 변화되는 폴리펩티드 등을 의미하는 것으로서, 특히 인산화 반응에 대한 경우, 상기 하위인자는 기질(substrate)과 동일한 의미로 사용될 수 있다.
- [28] 상기 하위인자의 발현 정도는 예를 들어, 자극된 NK 세포를 용해시킨 후, NK 세포 활성화에 관여하는 세포 내 단백질 중 하나인 Erk 또는 pY174-Vav1에 특이적인 항체를 이용하는 종래의 잘 알려진 면역블롯(immunoblot) 방식을 이용하여 측정할 수 있다.
- [29] 상기 탈과립화 활성은 예를 들어, 퍼포린(perforin) 또는 그란짐(granzyme) 분비로 표적 세포의 용해를 유도하는 것을 의미할 수 있고, 이를 FACS를 이용해 분석할 수 있다. 구체적으로, 시료에서 분리한 PBMC 혹은 순수 분리된 NK 세포를 자극한 후, 탈과립화와 비례하는 CD107a 발현을 플루오로크롬-접합된 항체를 이용하여 측정하는 방법을 이용할 수 있다.
- [30] 상기 세포독성 활성은 예를 들어, 유로피움(europium) 형광 염료로 표지된 NK 세포를 활성화시킬 수 있는 표적 세포를 포함하는 배양물과 배양한 후, 표적 세포 용해를 통해 배출된 형광 염료의 양을 마이크로플레이트 리더(microplate reader)를 이용하여 측정할 수 있다.
- [31] 일 구체예에서, 상기 시토킨은 IFN- γ , TNF- α , TNF- β , MIP-1 α , MIP-1 β , PANTES, IL-8 및 IL-10 중 선택되는 것일 수 있다. 상기와 같은 NK 세포의 면역활성인자 발현 분석은 FACS, 세포 내 시토킨 염색 또는 ELISA 등을 이용하여 이루어질 수 있다. 구체적으로 플루오로크롬-접합된 특정 항체를 이용하여 NK 세포 표면을 염색한 후 세포를 투과성화(permeabilization)하고 플루오로크롬-접합된 다른 특정 면역활성인자(예를 들어, IFN- γ) 항체로 상기 시토킨 등을 염색하여 NK 세포 내의 면역활성인자의 발현을 측정하는 방법을 이용할 수 있다.

- [32] 본 발명의 실시예에 따르면, 시토킨 분비량 또는 세포독성 탈과립화 정도에서 환자에 비해 정상인은 두 개의 인자 중 더 높게 나온 것을 기준으로 시너지 활성화를 유발한 경우 2배 이상의 차이를 보였으며, NK 세포의 시너지 활성화를 유발한 후 비교하였을 때도, 시너지 활성화된 시토킨 분비량 또는 세포독성 탈과립화 정도의 차이에서 2배 이상의 차이를 보였다.
- [33] 따라서, 일 구체예에서, 상기 정상 NK 세포 대비 상기 NK 세포의 시너지 활성화 정도를 비교하는 단계는 상기 하위인자의 인산화 또는 발현 정도, 탈과립화 활성, 세포독성 활성 및 NK 세포 자극에 의해 분비된 시토킨 분비량 정도의 차이가 2배 이상, 구체적으로는 두 개의 인자 중 더 높게 나온 것을 기준으로 2 배 이상인 경우 상기 시료 중에 NK 세포의 활성이 정상인 것으로 판단할 수 있다. 다른 구체예에서, 상기 NK 세포의 시너지 활성화된 시토킨 분비량 또는 세포독성 탈과립화 정도의 차이가 2배 이하, 구체적으로 정상 NK 세포의 시너지 활성화된 시토킨 분비량 또는 세포독성 탈과립화 정도를 기준으로 2배 이하인 경우, 상기 시료 중에 NK 세포의 활성이 비정상인 것으로 판단할 수 있다.
- [34] 본 발명의 NK 세포의 활성도 검사 방법은 NK 세포의 시너지 활성과 관련된 질환의 진단에 대한 정보를 제공하는데 이용될 수 있다.
- [35] 본 발명자들은 HLH 환자 및 췌장암 환자에서 NK 세포의 활성화는 유발되기는 하나, 정상인은 시너지 활성화 정도가 큰 반면, 상기 환자들은 시너지 활성화에서 실패하거나 그 정도가 현저히 적음을 발견하였다. 특히 시너지 활성화를 유발시켜 비교하는 경우, 단순히 NK 세포 활성화를 유발하여 비교하는 것보다 시너지 활성화를 유발시켜 비교하는 것이 HLH 또는 췌장암을 진단하기에 유의성을 높이고, 더 쉽고 정확함을 발견하였다. 따라서, 본 발명의 NK 세포의 활성도 검사 방법은 비정상적인 NK 세포 시너지 활성을 보이는 시료를 구별하여, HLH 및 췌장암을 포함한 NK 세포의 시너지 활성과 관련된 질환의 진단에 대한 정보를 제공하는데 유용할 수 있다.
- [36] 일 구체예에서, 상기 NK 세포의 시너지 활성과 관련된 질환은 비정상적인 NK 세포의 시너지 활성도를 보이는 것으로서, 예를 들어, 과민성 면역질환, 자가면역질환, 면역거부반응, 면역결핍질환, 조직구증, 암, 2형 당뇨병, 기생충 감염 질환 및 바이러스 질환일 수 있다. 상기 과민성 면역질환은 천식 및 축농증 중 선택된 하나 이상의 것이거나, 상기 자가면역질환은 루푸스, 다발성 경화증(multiple sclerosis), 1형 당뇨병 및 류마티스 관절염 중 선택된 하나 이상의 것이거나, 또는 상기 조직구증은 HLH, XLP1, 및 XLP2에서 선택된 어느 하나 이상의 것일 수 있다. 혈구탐식성 림프조직구증(HLH)은 제 2군 랑게르한스 세포 조직구증, 적혈구탐식성 림프조직구증식증(가족성, 산발성), 감염연관성 혈구탐식증후군, 바이러스 연관성 혈구탐식증후군, 거대한 림프절병증을 동반한 조직구증, 또는 망상조직구증의 의미를 포함할 수 있다. 상기 "암"은 종양, 혈액암 또는 고형암을 포함하는 의미로서, 개체의 NK 세포의 시너지

활성을 손상시키거나 또는 특정 조건에서 표적 세포로서 NK 세포의 시너지 활성을 일으키지 않는 것을 포함한다. 일 구체예에서, 상기 암은 폐암, 간암, 식도암, 위암, 대장암, 소장암, 췌장암, 흑색종, 유방암, 구강암, 뇌종양, 갑상선암, 부갑상선암, 신장암, 자궁경부암, 육종, 전립선암, 요도암, 방광암, 고환암, 혈액암, 림프종, 피부암, 건선 및 섬유선종으로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있다. 일 구체예에서, 상기 암은 췌장암 또는 B 세포 림프종(B cell lymphoma)일 수 있다. 일 구체예에서, 상기 바이러스 질환은 B형 간염일 수 있다. 일 구체예에서, 상기 면역결핍 질환은 디조지증후군(DiGeorge syndrome) 또는 체디악히가시증후군(Chediak-Higashi syndrome)일 수 있다.

[37] 상기 NK 세포의 활성과 관련된 질환에 대한 정보는, 정상 NK 세포 대비 실험군 NK 세포의 시너지 활성화가 검출되지 않는 경우 비정상적인 NK 세포로 판단할 수 있고, 또는 특정 수용체에 대해 시너지 활성을 상실한 NK 세포가 표적 세포에 대해 비정상적으로 시너지 활성을 일으키거나 일으키지 않는 경우 상기 표적 세포가 특정한 질병과 관련이 있음을 판단할 수 있다. 상기 특정한 질병의 판단을 보다 용이하게 하기 위해서 상기 표적 세포는 NK 세포 상에 구별되는 두 개 이상의 인자에 대한 항체, 단편 및 이들의 조합 중 선택된 하나 이상의 것으로 코팅하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[38]

[39] 다른 양상은 NK 세포의 시너지한 활성을 일으키는 자극 물질로서, 상기 NK 세포 상에 구별되는 두 개 이상의 인자에 각각 또는 동시에 특이적인 항체 또는 그 단편, 특이적인 활성을 유발하는 표적 세포 또는 폴리펩티드, 특이적으로 활성을 유도하는 화합물, 및 가역적 또는 비가역적인 작용자 중 선택된 하나 이상을 포함하는 NK 세포의 활성도 검사용 조성물을 제공한다.

[40] 일 구체예에서, 상기 NK 세포 상에 인자는 NKG2D, 2B4 (CD244), DNAM-1 (CD226), CD2, CD16, NKp30, NKp44, NKp46, 및 NKp80 중 선택된 것일 수 있다.

[41] 일 구체예에서, 정상 NK 세포 대비 상기 NK 세포의 시너지 활성화 존재 여부를 검출하기 위하여, 상기 조성물은 상기 인자의 하위인자의 인산화 또는 발현 정도, 탈과립화 활성, 세포독성 활성 및 NK 세포 자극에 의해 분비된 시토킨의 측정 중 선택된 하나 이상을 검출하기 위한 항체 또는 그 단편을 더 포함할 수 있다.

[42] 일 구체예에서, 상기 NK 세포의 시너지 활성화 존재 여부를 검출하는 물질은 퍼포린, 그란짐, CD107a, CD107b, IFN- γ , MIP-1 α , MIP-1 β , TNF- α , TNF- β , PANTES, IL-8 및 IL-10 중 선택된 하나 이상에 대한 항체, 단편 또는 이들의 조합 중 선택된 하나 이상의 것일 수 있다.

[43] 일 구체예에서, 상기 NK 세포의 활성도 검사용 조성물은 상기 NK 세포의 시너지 활성화 존재 여부를 검출 결과를 시각적으로 표시하기 위한 물질로서, 염료(dye), 형광 염료, 2차 항체, 또는 생물학적 또는 분자적 탐침(probe)을 더 포함할 수 있다.

- [44] 상기 조성물에서 언급된 용어 또는 요소 중 청구된 NK 세포의 활성화 검사 방법에 대한 설명에서 언급된 것과 같은 것은, 청구된 NK 세포의 활성화 검사 방법에서 언급된 바와 같은 것으로 이해된다.
- [45]
- [46] 또 다른 양상은 시료 내의 NK 세포 상에 구별되는 두 개 이상의 인자를 자극하여 상기 NK 세포의 시너지한 활성을 일으키는 자극 물질로서, 두 개 이상의 인자에 각각 또는 동시에 특이적인 항체 또는 그 단편, 특이적인 활성을 유발하는 표적 세포 또는 폴리펩티드, 특이적으로 활성을 유도하는 화합물, 및 가역적 또는 비가역적인 작용자 중 선택된 하나 이상; 및 정상 NK 세포 대비 상기 NK 세포의 활성화 존재 여부를 검출하는 물질을 포함하는 NK 세포의 시너지 활성화와 관련된 질환의 진단용 키트를 제공한다.
- [47] 일 구체예에서, 상기 NK 세포의 시너지 활성화 존재 여부를 검출하는 물질은 퍼포린, 그란짐, CD107a, CD107b, IFN- γ , MIP-1 α , MIP-1 β , TNF- α , TNF- β , PANTES, IL-8 및 IL-10 중 선택된 하나 이상에 대한 항체, 단편 또는 이들의 조합 중 선택된 하나 이상이거나 또는 형광 염료(dye)일 수 있다. 상기 항체, 단편 또는 이들의 조합은 형광 프로브(probe)로 표지되거나 표지되지 않은 것일 수 있다. 상기 형광 염료 또는 형광 프로브는 검출하고자 하는 대상, 상기 대상의 조합 또는 개수, 원하는 파장, 검출기 등의 조건에 따라 다양할 수 있고, 예를 들어, 페리딘인 클로로필(peridinin chlorophyll; PerCP), 피코에리트린(phycoerythrin; PE), 형광 이소티오시아네이트(fluorescein isothiocyanate; FITC), 또는 유로피움(europium)일 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 실시예에 따르면, IFN- γ 및 TNF- α 에 형광 프로브인 FITC로 표지함으로써 2차적 처리 없이, 유동세포계측기로 상기 IFN- γ 및 TNF- α 를 직접 검출할 수 있다. 또한, 본 발명의 실시예에 따르면, 형광 염료로 염색한 표적 세포(예를 들어, P815)에 대한 NK 세포의 활성화에 의해, 상기 표적 세포가 용해되어 배출되는 형광 염료를 측정함으로써, NK 세포의 시너지 활성화 정도를 측정할 수 있다. 따라서, 상기 NK 세포의 시너지 활성화 존재 여부를 검출하는 물질로 형광 염료를 사용하는 것은, 세포 독성을 측정하는데 특히 유리할 수 있다.
- [48] 일 구체예에서, 상기 NK 세포 상의 인자에 특이적인 활성을 유발하는 표적 세포는 NK 세포 상에 구별되는 두 개 이상의 인자에 대한 항체, 단편 및 이들의 조합 중 선택된 하나 이상의 것으로 코팅된 것일 수 있다.
- [49] 일 구체예에서, 상기 NK 세포의 활성화 검사용 키트는 상기 NK 세포의 시너지 활성화 존재 여부의 검출 결과를 시각적으로 표시하기 위한 물질로서, 염료, 형광 염료, 2차 항체, 또는 생물학적 또는 분자적 탐침을 더 포함할 수 있다.
- [50] 일 구체예에서, 상기 NK 세포의 시너지 활성화와 관련된 질환은 과민성 면역질환, 자가면역질환, 면역거부반응, 조직구증, 암, 2형 당뇨병, 기생충 감염 질환 및 바이러스 감염 질환 중 선택된 것일 수 있다.
- [51] 상기 키트에서 언급된 용어 또는 요소 중 청구된 NK 세포의 활성화 검사 방법

또는 NK 세포의 활성화도 검사용 조성물에 대한 설명에서 언급된 것과 같은 것은, 상기 청구된 방법 또는 조성물에서 언급된 바와 같은 것으로 이해된다.

[52]

발명의 효과

[53]

일 양상에 따른 시료 내의 NK 세포 상에 구별되는 두 개 이상의 인자를 특이적으로 자극하는 단계; 상기 NK 세포의 시너지 활성화 정도를 측정하는 단계; 및 정상 NK 세포 대비 상기 NK 세포의 시너지 활성화 정도를 비교하는 단계를 포함하는 NK 세포의 활성화도 검사 방법을 이용하여, 기존에 알려진 기술보다 간편하고 신속하면서도, 유의성 있게 NK 세포의 활성도를 검사할 수 있어, NK 세포의 활성화와 관련된 질환을 용이하게 조기 진단 및 예후 판단할 수 있다.

[54]

다른 양상에 따른 NK 세포의 시너지한 활성을 일으키는 자극 물질로서, 상기 NK 세포 상에 구별되는 두 개 이상의 인자에 각각 또는 동시에 특이적인 항체 또는 그 단편, 특이적인 활성을 유발하는 표적 세포 또는 폴리펩티드, 특이적으로 활성을 유도하는 조성물, 및 가역적 또는 비가역적인 작용자 중 선택된 하나 이상을 포함하는 NK 세포의 활성화도 검사용 조성물을 이용하여, NK 세포의 활성화와 관련된 질환의 조기 진단, 예후 판단 등을 위한 방법을 용이하게 수행할 수 있고, 키트를 용이하게 제조 또는 이용할 수 있다.

[55]

또 다른 양상에 따른 시료 내의 NK 세포 상에 구별되는 두 개 이상의 인자를 자극하여 상기 NK 세포의 시너지한 활성을 일으키는 자극 물질로서, 두 개 이상의 인자에 각각 또는 동시에 특이적인 항체 또는 그 단편, 특이적인 활성을 유발하는 표적 세포 또는 폴리펩티드, 특이적으로 활성을 유도하는 조성물, 및 가역적 또는 비가역적인 작용자 중 선택된 하나 이상; 및 정상 NK 세포 대비 상기 NK 세포의 활성화 존재 여부를 검출하는 물질을 포함하는 NK 세포의 시너지 활성화와 관련된 질환의 진단용 키트를 이용하여, 기존에 알려진 기술보다 간편하고 신속하면서도, 유의성 있게 NK 세포의 활성화와 관련된 질환을 조기 진단 또는 예후 판단할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[56]

도 1은 구별되는 인자 NKG2D 및/또는 2B4를 특이적으로 자극한 경우 NF- κ B p65 서브유닛의 인산화 정도에 대한 유동세포계측 분석 결과를 나타낸다.

[57]

도 2는 구별되는 인자 NKG2D 및/또는 2B4를 특이적으로 자극한 경우 IFN- γ 또는 TNF- α 를 발현시키는 세포의 빈도에 대한 유동세포계측 분석 결과를 나타낸다.

[58]

도 3은 특정 수용체를 단일 또는 공동자극한 경우 NK 세포의 시너지한 활성을 세포독성으로서 확인한 것이다.

[59]

도 4는 정상 또는 XLP1 환자 공여자로부터 획득한 NK 세포를 구별되는 인자 NKG2D 및/또는 2B4로 자극한 경우, NK 세포 활성화와 관련된 인자의 발현

정도를 보여준다.

- [60] 도 5은 (A) 정상 또는 XLP1 환자 공여자로부터 획득한 NK 세포를 구별되는 인자 NKG2D 및/또는 2B4로 자극한 경우, IFN- γ 발현 정도를 유동세포계측기에 의해 분석한 것이다. (B) NK 세포에 자극을 가하지 않은 경우 (Δ IFN- γ + 세포) 대비 자극을 가한 경우(IFN- γ + NK 세포) IFN- γ 를 발현하는 NK 세포 증가 백분율을 나타낸다.
- [61] 도 6은 공동활성화에 대한 XLP1 NK 세포의 결합적 세포독성 탈과립화를 나타내는 것으로, (A) 정상 또는 XLP1 공여자로부터 획득한 NK 세포를 구별되는 인자 NKG2D 및/또는 2B4로 자극한 경우, CD107a의 발현 정도를 유동세포계측기에 의해서 분석한 것이다. (B) NK 세포에 자극을 가하지 않은 경우(Δ CD107a+ 세포) 대비자극을 가한 경우 (CD107a+ NK 세포) CD107a+ NK 세포의 증가 백분율을 나타낸다.
- [62] 도 7은 다양한 혈구 세포에서 NKG2D/2B4 조합의 자극에 의한 활성 정도에 대한 유동세포계측 분석 결과를 나타낸다.
- [63] 도 8은 NK 세포에서 NKG2D/2B4 조합의 자극에 의한 활성 정도에 대한 유동세포계측 분석 결과를 나타낸다.

발명의 실시를 위한 형태

- [64] 이하 본 발명을 실시예에 의해 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.
- [65] 실시예 1. 구별되는 인자인 NKG2D 및 2B4의 공동활성화에 의한 정상 NK 세포에서의 시너지한 활성도 존재 여부 확인
- [66] **1-1. NK 세포의 획득**
- [67] 아산 메디컬 센터, UCL Institute of Child Health, 및 필라델피아 소아 병원의 기관심의 위원회에 의해 승인받은 프로토콜 하에 고지에 입각하여 건강한 공여자 및 XLP1 공여자로부터 인간 혈액 시료를 연구를 목적으로 혈액을 채취하였다. 밀도 구배 원심분리기 (림프구 분리 배지(lymphocyte separation medium: LSM) (MP Biomedicals)를 이용)에 의해 말초혈액 단핵세포 (Peripheral blood mononuclear cells: PBMCs)를 혈액 시료로부터 분리하고 이 과정을 진행하는 동안 저온 보존(cryopreserved)하였다. 인간 NK 세포를 종래에 알려진 바와 같이(Sci. Signal. 5, ra49 (2012)), NK 세포 분리 키트 (StemCell Technologies)를 이용하여 음성선택(negative selection)에 의해 PBMC로부터 정제하였다. 이들 세포는 유동세포계측법에 의해 평가된 바에 따라, 97 내지 99%의 CD3-CD56+였다. 인간 NK 세포 주인 NKL (M.Robertson의 기증)을 10% FBS, 1 mM 소듐 피루베이트, 및 200 U/ml 재조합 IL-2 (rIL-2)로 보충된 RPMI1640에서 배양하였다. NKL 세포를 rIL-2 없이, 24시간 동안 5% FBS 및 0.5 mM 소듐 피루베이트로 보충된 RPMI1640에서 휴지시켰다.

- [68] **1-2.** NKG2D 및 2B4의 공동활성화에 의한 NK 세포의 시너지한 활성의 지표로서 NF- κ B p65 서브유닛의 인산화
- [69] NK- κ B는 선천적 및 후천적 면역 반응에서 조절자로서 중요한 전사 인자로서, NK- κ B 서브유닛 p65 Ser536 잔기의 인산화가 되는 경우 NK 세포의 활성이 증가하게 된다(Front Immunol. 2014; 5: 662.). 따라서, NK 세포의 활성도 인자로 일차 휴지기의 NK 세포 중에 NF- κ B p65 서브유닛의 인산화를 측정하였다.
- [70] NK 세포의 활성화를 일으키는 특정 인자를 자극하기 위하여 하기의 수용체 가교를 실시하였다.
- [71] 정제된 인간 일차 NK 또는 NKL 세포를 30분 동안 얼음에서 NK 수용체 (모두 10 μ g/ml에서)에 NKG2D 및/또는 2B4에 특이적인 mAb 또는 이소형 대조군 mAb (cIgG1)와 프리인큐베이션(preincubation) 하였다. 배지로 세척한 후, NK 세포를 5분간 37°C에서 염소 항-마우스 F(ab')₂ 이차 Ab로 수용체 가교함으로써 자극하였다. 세포를 DPBS로 세척하고 4% 파라포름알데히드로 37°C에서 10분간 고정시켰다. 그런 다음 고정된 세포를 90% 메탄올로 30분간 얼음에서 투과성화(permeabilize)하고 0.5% BSA로 실온에서 10분간 블로킹하였다. 세포를 Alexa Fluor 488-접합된 항-pS536 p65 Ab (93H1) 또는 이소형 대조군 토끼 IgG (DA1E) (Cell Signaling)로 염색한 후, p65 인산화에 대해 유동세포계측 분석기를 이용하여 분석하였다.
- [72] 그 결과, 도 1에서 보여지는 바와 같이 반응하는 세포의 비율이 일차성 NK 세포의 NKG2D 및 2B4로 결합된 자극에 따라 시너지하게 증가하는 반면, 수용체 단독에 대한 반응은 공동활성화 된 경우보다 현저하게 적은 것으로 나타났다.
- [73] **1-3.** NKG2D 및 2B4의 공동활성화에 의한 NK 세포의 시너지한 활성의 지표로서 면역활성인자 측정
- [74] NK 세포가 활성화되는 경우 면역활성인자(또는 시토킨)인 IFN- γ 또는 TNF- α 등을 분비한다. 따라서, 구별되는 특정 인자의 공동활성화에 의해서 시토킨의 분비량이 시너지하게 증가하는지 여부를 테스트 하였다.
- [75] 상기 서술한 바와 같이 NK 세포를 채취하였고, NKG2D 및/또는 2B4에 특이적인 mAb 또는 이소형 대조군 mAb로 프리인큐베이션한 P815 세포(American Type Culture Collection)로 PBMC를 자극하였다. 그 후 6시간 인큐베이션하고, 세포 표면 마커를 CD3 및 CD56로 염색하였다. NK 세포에 의한 시토킨 생산을 CD3-CD56+ NK 세포 중에 IFN- γ 또는 TNF- α 의 세포 내 발현을 유동세포계측기로서 측정하였다. 구체적으로는, PBMC 또는 일차 휴지기의 NK 세포를 동일한 수의 지정된 표지 세포로 1시간 동안 37°C에서 자극하였다. 그런 다음, 브레펠딘 A(brefeldin A) (GolgiPlug; BD Bioscience)을 첨가하고, 총 6시간에 대한 추가적인 5시간의 인큐베이션을 하였다. 그런 다음 세포를 4°C 암실에서 30분간 항-CD56-PE 및/또는 항-CD3-PerCP mAbs로 표면 마커를 염색하였다. FACS 완충액으로 두 번 세포를 세척한 후, 이들을 BD Cytotfix/Cytoperm 용액 (BD Bioscience)에 20 분간 암실 4°C에서 인큐베이션하였다. 4°C 암실에서 30분간

항-IFN- γ -FITC 또는 항-TNF- α -FITC mAb로 세포 내 염색한 전후, 세포를 BD Perm/Wash 완충액 (BD Bioscience)으로 두 번 세척하였다. 그런 다음 세포를 NK 세포에 대해 게이팅하여 유동세포계측기에 의해서 분석하였다.

- [76] 그 결과, 도 2에서 보여지는 바와 같이 NKG2D 및 2B4의 공동관여(coengagement)는 면역활성인자인 IFN- γ 또는 TNF- α 를 발현하는 NK 세포의 비율에서 시너지한 증가를 유발하는 것을 볼 수 있었다.
- [77] 이를 모두 종합하면, 이러한 결과는 NKG2D 및 2B4 각각의 단일한 자극으로는 NF- κ B 활성화를 NK 세포 활성화에 유효하게 자극하는데 있어 충분하지 않으며, NKG2D 및 2B4 공동활성화를 가한 경우 NF- κ B 활성화에 대한 임계점(threshold)을 극복하여, NK 세포에 의한 시너지한 시토킨 생성을 유발한다는 것을 보여준다.
- [78] 각 그래프는 3회 이상의 독립적인 실험에 의해서 제작되었다. 결과는 평균 $\pm$ SD로서 나타내었다. 통계적 분석을 GraphPad Prism software을 이용하여 양측 스튜덴트 t-검정 (two-tailed student's *t*-test)에 의해서 수행되었다.
- [79]
- [80] 실시예2. 구별되는 인자들의 공동활성화에 의한 NK 세포의 시너지한 활성의 지표로서 세포독성 측정
- [81] 상기 NKG2D 및 2B4의 공동활성화에 의해 면역활성인자인 IFN- γ 또는 TNF- α 를 발현하는 NK 세포의 비율에서 시너지한 증가가 유발되는 것을 관찰한 것과 같이, 시너지한 활성을 측정하는 한 방법으로서 세포독성에서도 시너지한 증가가 유발되는지 테스트 하였다.
- [82] P815 세포를 CD56, CD16 및 NKG2D 및/또는 2B4, DNAM-1 및/또는 2B4에 특이적인 mAb 또는 이소형 대조군 mAb로 프리인큐베이션하고, 상기 NK 세포 특정 수용체자극 항체로 코팅된 P815를 유로피움(europium) 형광 염료(dye)로 표시하였다. 이후 상기 서술한 바와 같이 일차성 휴지기 NK 세포를 상기 P815 세포로 함께 배양함으로써 자극하였다. 이후 원심분리를 통해 배양액을 회수하고 세포 독성의 한 지표인 표적 세포 용해(lysis)를 통해 배출된 형광 염료 양을 측정하였다. 상기 배양액 내의 형광 정도는 마이크로플레이트 리더를 통해 분석하였다.
- [83] 그 결과, 도 3에서 보여지는 바와 같이 CD16이 예외적으로 단일하게 강한 세포독성을 유발하였으나, NKG2D+2B4 및 DNAM-1+2B4로 자극된 경우는 각각 자극된 경우에 비해 시너지한 세포 독성을 유도하는 것을 볼 수 있었다. 예외적인 경우가 있을 수 있으나, 이는 특정 수용체 자극(예를 들어, 상기와 같이 특정 수용체 자극 항체의 이용)으로써 배제할 수 있으므로, 구별되는 두 인자를 특이적으로 자극하여 시너지 활성 측정을 실현할 수 있을 뿐만 아니라, 단일하게 자극하는 경우에 비해 동시 자극하여 유발된 시너지 활성이 NK 활성도를 비교하기에 현저한 차이를 가져 구별하기 용이할 수 있음을 확인하였다.

[84]

- [85] 실시예3. 정상 및 XLP1 환자의 NKG2D 및 2B4의 공동활성화에 의한 특정 인자 발현의 시너지한 차이를 이용한 NK 세포 활성화도 비교
- [86] 구별되는 인자 NKG2D 및 2B4를 특이적으로 공동활성화하여 NK 세포의 시너지한 활성을 유발할 수 있음을 확인하였다. 따라서 이러한 시너지한 활성 존재여부를 이용하여 HLH 질환인 XLP1 환자를 진단할 수 있을지 확인하기 위해 특정 인자 발현의 시너지한 차이를 볼 수 있는 웨스턴 블롯(western blot)을 수행하였다.
- [87] **3-1. XLP1 환자의 NK 세포 획득**
- [88] 상기 서술한 바와 같이 XLP1의 환자로부터 NK 세포를 공여 받았다. 여기에 선천적 XLP1의 대상으로서 유전성 *SH2D1A* 유전자 돌연변이 환자를 포함하였다. 환자 NK 세포의 공급 한계 때문에, XLP1 환자의 NK 세포를 NF- κ B 활성화 및 효과자(effector) 기능에 대한 분자적 신호전달을 연구하기 위해 상기 서술한 바와 같이 증식시켰다. 정상인 공여자의 NK 세포 또한 증식시켰고, 휴지기를 거친 후, NKG2D 및 2B4로 자극하여 효과자 기능 및 신호전달에서의 시너지한 증가를 재생산시켰다.
- [89] XLP1 환자의 NK 세포가 질환의 지표가 될 수 있는지 웨스턴 블롯을 수행하였다. 종래에 알려진 바(*Nat. Rev. Immunol.* **6**, 56-66 (2006))에 따르면, SAP는 2B4를 포함하여, 면역 자극에 의한 활성화 신호들을 송신하는데 요구되는 수용체 어답터 단백질인데 XLP1 환자들의 경우 NK 세포 내 SAP 발현량이 고갈되어 있거나 감소되어 있다고 알려져있다. 정상 또는 XLP1 환자 공여자로부터 증식된 일차성 NK 세포의 총 용해물을 SAP 및 액틴에 대해 웨스턴 블롯하여 그 발현량을 알아본 결과, 실험된 네 명의 XLP1 환자 중에, 세 명의 환자가 SAP 발현의 완전한 손실을 유발하는 *SH2D1A* 유전자에 거시결손(macrodeletion)을 갖고 있었고, 한 명의 환자는 SAP 발현이 감소되어 있지만 완전히 소실되지 않은 미스센스(missense) 돌연변이를 갖고 있음을 확인하였다.
- [90] **3-2. Erk 및 인산화 된 p65의 시너지한 발현 정도의 비교**
- [91] 정상 NK 세포와 XLP1 환자의 NK 세포에서 활성화 차이를 웨스턴 블롯을 이용하여 비교하였다. 구체적으로, 정상 또는 XLP1 환자 공여자로부터 증식시킨 후의 일차성 휴지기 NK 세포를 지정된 수용체에 대해 특이적인 mAb 또는 이소형 대조군 mAb (cIgG1)와 함께 프리인큐베이션하였다. 2분(p-Akt 및 p-Erk1/2) 및 5분(pS536-p65 및 pS276-p65) 동안 수용체를 가교한 후, 용해물을 지정된 인산화로 면역블롯하였다. 그 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이, NKG2D 및 2B4가 각각 자극된 경우 NK 세포의 활성지표인 NF- κ B 활성화에 의한 p65의 인산화가 관찰되기는 하나, 그 정도가 NKG2D 및 2B4의 공동활성화에 의한 시너지 인산화에 비하여 현저하게 구별되지 않는다. 반면, NKG2D 및 2B4의 공동활성화에 따른 p65의 세린 536 및 276 시너지 인산화는 XLP1 NK 세포에서 현저하게 감소하는 것을 확인할 수 있다. 이는 공동활성화에 의해 유도된 Erk의

시너지한 인산화에서 또한 마찬가지로 나타나서 XLP1 NK 세포에서 정상에 비해 현저하게 감소한 것이 보였다. 따라서 XLP1을 진단하는데 있어, 각각의 구별되는 인자를 자극하여 NK 세포의 활성도를 측정하는 것보다 공동활성화한 경우 그 차이가 현저하게 관찰되므로 NK 세포의 구별되는 인자를 공동활성화함으로써 유발되는 시너지한 활성도를 기준으로 XLP1을 진단하는 것이 유리할 수 있음을 보여준다.

[92]

[93] 실시예 4. 정상 및 XLP1 환자의 NKG2D 및 2B4의 공동활성화에 의한 IFN- γ 발현량에서의 시너지한 차이를 이용한 NK 세포 활성 비교

[94] XLP1 진단에 구별되는 두 인자의 자극으로 인한 시너지한 활성을 비교하는 것이 더 유리한지 여부를 알아보기 위하여 면역활성인자 중 하나인 IFN- γ 의 발현량을 비교하는 시험을 수행하였다. 구체적으로, 정상 또는 XLP1 환자 공여자로부터 증식시킨 후의 일차성 휴지기 NK 세포를 지정된 수용체에 특이적인 mAb와 프리인큐베이션한 P815 세포와 혼합하였다. 6시간 동안 인큐베이션한 후, CD56에 대한 플루오로크롬-접합된 mAb로 염색하고 IFN- γ 으로 세포 내 염색한 후 상기 서술된 바와 같이 유동세포계측기에 의해 분석하였다.

[95] 그 결과, 도 5에서 나타난 바와 같이, CD16 자극은 XLP1에서의 NK 세포 활성화에서 의의를 갖지 않을지라도, NKG2D 및 2B4의 결합된 자극에 의하여 IFN- γ 을 발현하는 NK 세포의 비율이 XLP1 NK 세포에서 현저하게 감소되는 것으로 보였다. 그 차이는 도 5B 에서와 같이 지정된 수용체로 자극한 후, 자극이 없는 세포(Δ IFN- γ + 세포) 대비 IFN- γ + NK 세포 대비 지정된 수용체로 자극한 후 각각의 정상 또는 XLP1 환자 공여자로부터의 IFN- γ + NK 세포의 증가 백분율로 측정하였다. NKG2D 및 2B4를 각각 단일하게 자극한 것에 비해 NKG2D 및 2B4의 공동결합된 자극에 의한 시너지한 활성도가 더욱 현저하고 분명하게 차이가 나는 것을 볼 수 있다. 이 역시 단일한 자극 후에 비교하는 것에 비해 시너지한 활성화를 일으킨 후 비교하는 것이 더욱 유의하게 판단할 수 있다는 증거를 제시한다.

[96] 요약하여, 상기 결과들은 정상 및 XLP1 환자의 NK 세포에서의 유전적 및 분자적 차이가 공동활성화 자극에 대한 결과와 일치함을 증명하면서, XLP1의 진단에 상기 실험에 적용된 인자들의 동태를 판단하는 것이 충분한 근거를 가짐을 보여주며, 진단하는데 있어 단일 인자를 자극하는 것에 비해 시너지한 활성화를 유발할 수 있는 두 개 이상의 인자를 자극함으로써 그에 의한 시너지한 활성도를 비교하는 것이 더욱 유의하게 XLP1을 진단할 수 있는 방법이 될 수 있음을 보여준다. 뿐만 아니라, 여기서 보이는 특정 인자 (Erk)에서만 나타나는 시너지한 인산화, 특정 수용체 조합(NKG2D 및 2B4)에 의한 시너지한 활성화 결과는 특정 수용체의 특이적인 공동활성화를 통해 적어도 XLP1 및 관련 임상예후 예측을 진단하는데 적합함을 증명한다.

- [97] 각 그래프는 3회 이상의 독립적인 실험에 의해서 제작되었다. 결과는 평균 $\pm$ SD로서 나타내었다. 통계적 분석을 GraphPad Prism software을 이용하여 양측 스튜덴트 t-검정에 의해서 수행되었다.
- [98]
- [99] 실시예 5. 정상 및 XLP1 환자의 NKG2D 및 2B4의 공동활성화에 의한 탈과립화에서의 시너지한 차이를 이용한 NK 세포 활성 비교
- [100] NK 세포의 활성지표 중 하나인 탈과립화와 비례하는 NK 세포 표면에서의 CD107a의 발현정도를 측정함으로써 구별되는 두 인자의 자극에 의하여 발생하는 시너지한 효과의 차이로 XLP1을 진단 할 수 있을지 알아보았다.
- [101] NK 세포의 탈과립화(degranulation)는 세포 표면의 CD107a 발현 및 그란집 B 방출 (BioLegend)에 의해서 평가하였다. 요약하면, 상기 서술한 바와 같이 정상 및 XLP1 환자의 일차성 휴지기 NK 세포를 증식시킨 후, 플루오로크롬-접합된 항-CD107a mAb 존재 하에 지정된 수용체에 대해 특이적인 mAb와 프리인큐베이션한 P815와 혼합하였다. 그 후 2시간 동안 인큐베이션하고, 세포를 유동세포계측기를 이용하여 분석하였다. 구체적으로 30 x g에서 3분간 스핀 다운하고, 37°C에서 두 시간 동안 인큐베이션하고, 다시 스핀 다운하였다. 세포 펠렛(pellet)을 FACS 완충액 (2% FBS 포함 PBS)에 재현탁하고 항-CD56-PE로 4°C에서 30분간 암실에 염색하였다. 림프구를 전방 산란(forward scatter)/측방 산란(side scatter)으로 게이팅(gate)하고 NK 세포에서 CD107a 발현을 유동세포계측기 및 FlowJo software로써 분석하였다.
- [102] 그 결과, 도 6A에서 보여지는 바와 같이, CD16를 자극한 경우에는 시너지한 활성도의 한 측면인 탈과립화에서 정상 NK 세포와 현저한 차이가 관찰되지 않았으나, NKG2D 및 2B4의 결합된 자극에 의하여는 현저한 차이가 보이는 탈과립화가 유도되는 것을 관찰할 수 있다. 여기서 또한 상기 면역활성인자인 IFN- γ 을 측정된 경우와 마찬가지로 NKG2D 및 2B4를 각각 단일하게 자극하여 비교하는 것보다 공동활성화에 의한 시너지한 활성도를 유발한 후 그 현저한 차이의 존재여부를 판단하는 것이 진단 방법으로서 더욱 유의하게 의의를 가짐을 알 수 있다. 이는 자극이 없는 세포인 Δ CD107a+ 세포 대비 CD107a+ NK 세포의 백분율을 나타내는 도 6B 그래프에서 더 분명하게 확인할 수 있다.
- [103]
- [104] 실시예 6. NKG2D 및 2B4의 공동활성화에 의한 NK 세포 활성의 특이성 평가
- [105] NKG2D/2B4 조합을 이용한 시너지 측정이 다른 세포들 중에서도 NK 세포에만 특이적인지 확인하기 위하여 NK 세포의 활성지표 중 하나인 탈과립화와 비례하는 NK 세포 표면에서의 CD107a의 발현정도를 측정하였다.
- [106] 구체적으로, 정상인의 단핵구(PBMC)를 플루오로크롬-접합된 항-CD107a mAb 존재 하에 지정된 수용체에 대해 특이적인 리간드(NKG2D에 대해 ULBP1, 및 2B4에 대해 CD48)를 발현하는 P815 세포와 혼합하였다. 그 후 실시예 5에서와 같이, 각 세포 펠렛을 수득하여 재현탁하고, 항-CD3-PerCP, 항-CD56-PE로

4°C에서 30분간 암실에 염색하였다. 림프구를 전방 산란/측방 산란으로 게이팅하고 NK 세포(CD3-CD56+), NKT 세포(CD3+CD56+), T 세포(CD3+CD56-), 나머지 세포(CD3-CD56-)의 CD107a 발현을 유동 세포계측기 및 FlowJo software로써 분석하였다.

- [107] 그 결과, 도 7에서 보여지는 바와 같이, NKG2D 및 2B4를 각각 단일하게 자극한 경우에는 NK 세포를 포함한 다른 세포 모두에서 탈과립화가 관찰되지 않았으나, NKG2D 및 2B4의 결합된 자극에 의하여는 NK 세포 특이적으로 현저한 차이를 보이는 탈과립화가 유도되는 것을 관찰할 수 있었다. 따라서 NKG2D 및 2B4를 각각 단일하게 자극하여 비교하는 것보다 공동활성화에 의한 시너지한 활성도를 유발하면 NK 세포에 특이적으로 활성화를 유도하여 진단 방법으로서 더욱 유의하게 의의를 가짐을 알 수 있다.

[108]

- [109] 실시예 7. 암 환자에서 NKG2D 및 2B4의 공동활성화에 의한 NK 세포 시너지 활성 비교

- [110] NKG2D/2B4 조합을 이용한 시너지 측정이 암진단에 적용 가능한지를 알아보기 위해, 췌장암환자 시료를 이용하여 NK 세포의 활성지표 중 하나인 탈과립화와 비례하는 NK 세포 표면에서의 CD107a의 발현정도를 측정하였다.

- [111] 구체적으로, 정상 및 췌장암 환자의 단핵구(PBMC)를 플루오로크롬-접합된 항-CD107a mAb 존재 하에 지정된 수용체에 대해 특이적인 리간드(NKG2D에 대해 ULBP1, 및 2B4에 대해 CD48)를 발현하는 P815 세포와 혼합하였다. 비교군으로 NK 세포 활성도 측정에 활용되는 혈액암 세포주인 K562를 사용하였다. 그 후 실시예 5에서와 같이, 각 세포 펠렛을 수득하여 재현탁하고, 항-CD3-PerCP, 항-CD56-PE로 4°C에서 30분간 암실에 염색하였다. 림프구를 전방 산란/측방 산란으로 게이팅하고 NK 세포(CD3-CD56+)에서 CD107a 발현을 유동세포계측기 및 FlowJo software로써 분석하였다.

- [112] 그 결과, 도 8에서 보여지는 바와 같이, NKG2D 및 2B4의 결합된 자극에 의하여는 정상인과 췌장암 환자에서 현저한 차이가 보이는 NK 세포의 탈과립화가 유도되는 것을 관찰할 수 있고, 따라서, NKG2D/2B4 조합을 이용한 시너지 측정이 암진단에도 적용 가능함을 알 수 있다.

- [113] 특이적인 것은, 비교군인 K562로 NK 세포를 자극한 경우에는 NKG2D 및 2B4를 특이적으로 자극한 경우와 달리, 정상인과 췌장암환자에서 NK 세포의 탈과립화 유도에 별로 차이가 없는 것을 알 수 있었다. 따라서, NKG2D 및 2B4의 결합된 자극과 같이, NK 세포 상에 특이적인 인자의 자극에 의한 시너지 활성화는 K562를 사용하는 것보다 NK 세포 활성도 진단 방법으로서 더욱 유의하게 의의를 가짐을 알 수 있다.

[114]

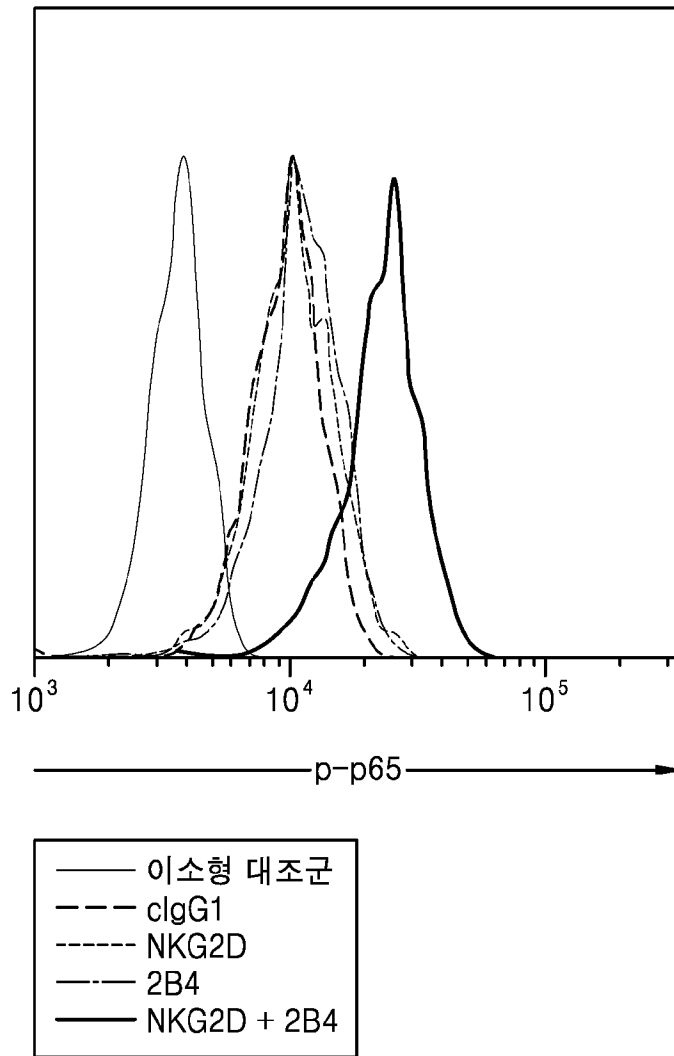
[115]

청구범위

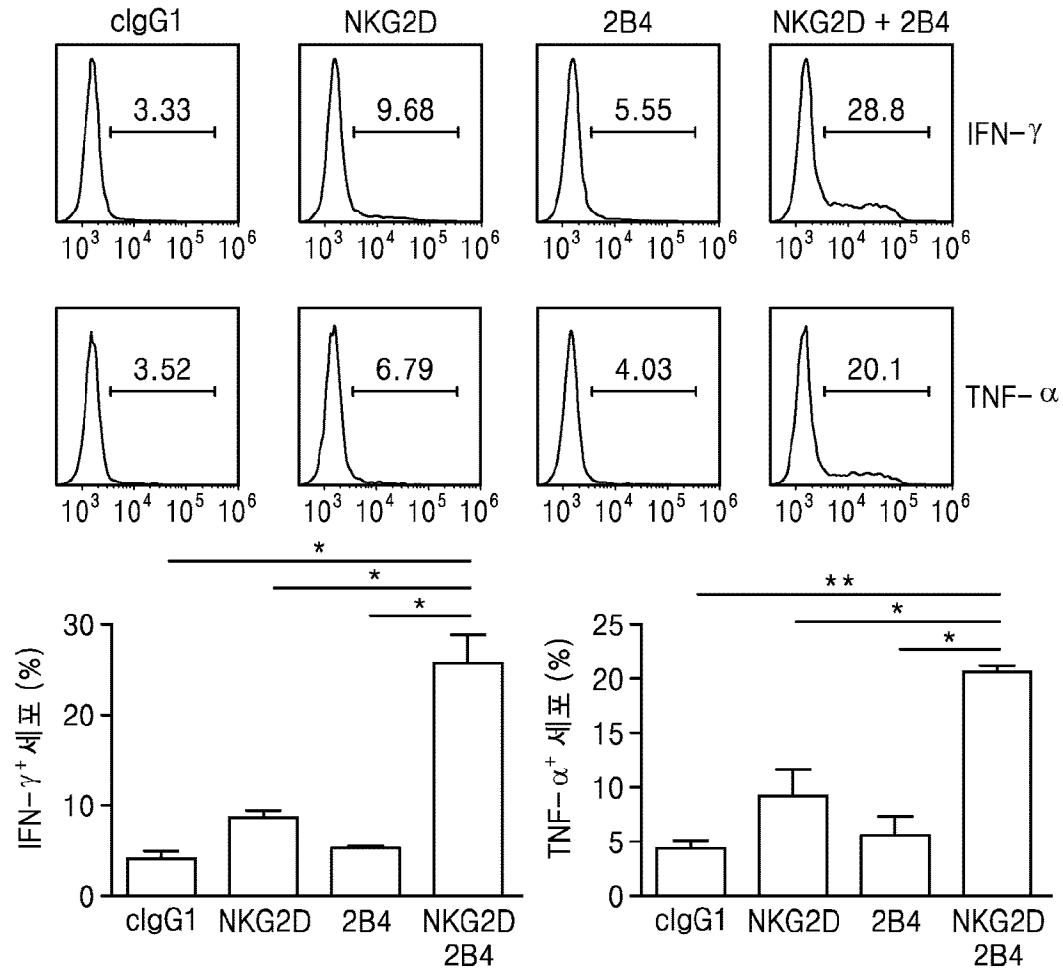
- [청구항 1] 시료 내의 NK 세포 상에 구별되는 두 개 이상의 인자를 특이적으로 자극하는 단계;
상기 두 개 이상의 인자에 대한 자극으로 유발된, 상기 NK 세포의 시너지 활성화 정도를 측정하는 단계; 및
정상 NK 세포 대비 상기 NK 세포의 시너지 활성화 정도를 비교하는 단계를 포함하는 NK 세포의 활성화도 검사 방법.
- [청구항 2] 청구항 1에 있어서, 상기 방법은 상기 시료 중 필요로 하는 NK 세포를 분리하는 단계를 더 포함하는 NK 세포의 활성화도 검사 방법.
- [청구항 3] 청구항 1에 있어서, 상기 인자는 세포 표면 또는 세포 내에 존재하는 것인 NK 세포의 활성화도 검사 방법.
- [청구항 4] 청구항 3에 있어서, 상기 인자는 NKG2D, 2B4 (CD244), DNAM-1 (CD226), CD2, CD16, NKp30, NKp44, NKp46, 및 NKp80 중 선택된 것인 NK 세포의 활성화도 검사 방법.
- [청구항 5] 청구항 1에 있어서, 상기 자극은 상기 인자에 동시에 또는 순차적으로 이루어지는 것인 NK 세포의 활성화도 검사 방법.
- [청구항 6] 청구항 1에 있어서, 상기 자극은 상기 인자에 각각 또는 동시에 특이적인 항체 또는 그 단편, 특이적인 활성을 유발하는 표적 세포 또는 폴리펩티드, 특이적으로 활성을 유도하는 화합물, 및 가역적 또는 비가역적인 작용자(agonist) 중 선택된 하나 이상에 의한 것인 NK 세포의 활성화도 검사 방법.
- [청구항 7] 청구항 6에 있어서, 상기 인자에 특이적인 활성을 유발하는 표적 세포는 NK 세포 상에 구별되는 두 개 이상의 인자에 대한 항체, 단편 및 이들의 조합 중 선택된 하나 이상의 것으로 코팅된 것인 NK 세포의 활성화도 검사 방법.
- [청구항 8] 청구항 1에 있어서, 상기 활성화 정도를 측정하는 단계는 상기 인자의 하위인자의 인산화 또는 발현 정도, 탈과립화 활성, 세포독성 활성 및 NK 세포 자극에 의해 분비된 시토킨의 측정 중 선택된 하나 이상을 포함하는 것인 NK 세포의 활성화도 검사 방법.
- [청구항 9] 청구항 8에 있어서, 상기 시토킨은 IFN- γ , TNF- α , TNF- β , MIP-1 α , MIP-1 β , PANTES, IL-8 및 IL-10 중 선택된 것인 NK 세포의 활성화도 검사 방법.
- [청구항 10] 청구항 1에 있어서, 상기 방법은 NK 세포의 시너지 활성화와 관련된 질환의 진단에 대한 정보를 제공하기 위한 것인, NK 세포의 활성화도 검사 방법.
- [청구항 11] 청구항 10에 있어서, 상기 NK 세포의 시너지 활성화와 관련된 질환은 과민성 면역질환, 자가면역질환, 면역결핍질환, 면역거부반응, 조직구증, 암, 2형 당뇨병, 기생충 감염 질환 및 바이러스 감염 질환 중 선택된 것인 방법.

- [청구항 12] NK 세포의 시너지한 활성을 일으키는 자극 물질로서, 상기 NK 세포 상에 구별되는 두 개 이상의 인자에 각각 또는 동시에 특이적인 항체 또는 그 단편, 특이적인 활성을 유발하는 표적 세포 또는 폴리펩티드, 특이적으로 활성을 유도하는 화합물, 및 가역적 또는 비가역적인 작용자 중 선택된 하나 이상을 포함하는 NK 세포의 활성화 검사용 조성물.
- [청구항 13] 청구항 12에 있어서, 상기 인자는 NKG2D, 2B4 (CD244), DNAM-1 (CD226), CD2, CD16, NKp30, NKp44, NKp46, 및 NKp80 중 선택된 것인 조성물.
- [청구항 14] 청구항 12에 있어서, 정상 NK 세포 대비 상기 NK 세포의 시너지 활성화 존재 여부를 검출하는 물질로서, 상기 인자의 하위인자의 인산화 또는 발현 정도, 탈과립화 활성, 세포독성 활성 및 NK 세포 자극에 의해 분비된 시토킨의 측정 중 선택된 하나 이상을 검출하기 위한 항체 또는 그 단편을 더 포함하는 것인 조성물.
- [청구항 15] 청구항 14에 있어서, 상기 NK 세포의 시너지 활성화 존재 여부를 검출하는 물질은 퍼포린, 그란짐, CD107a, CD107b, IFN- γ , MIP-1 α , MIP-1 β , TNF- α , TNF- β , PANTES, IL-8 및 IL-10 중 선택된 것에 대한 항체, 단편 또는 이들의 조합 중 선택된 하나 이상인 것인 조성물.
- [청구항 16] 시료 내의 NK 세포 상에 구별되는 두 개 이상의 인자를 자극하여 상기 NK 세포의 시너지한 활성을 일으키는 자극 물질로서, 두 개 이상의 인자에 각각 또는 동시에 특이적인 항체 또는 그 단편, 특이적인 활성을 유발하는 표적 세포 또는 폴리펩티드, 특이적으로 활성을 유도하는 화합물, 및 가역적 또는 비가역적인 작용자 중 선택된 하나 이상; 및 정상 NK 세포 대비 상기 NK 세포의 활성화 존재 여부를 검출하는 물질을 포함하는 NK 세포의 시너지 활성화와 관련된 질환의 진단용 키트.
- [청구항 17] 청구항 16에 있어서, 상기 NK 세포의 시너지 활성화 존재 여부를 검출하는 물질은 퍼포린, 그란짐, CD107a, CD107b, IFN- γ , MIP-1 α , MIP-1 β , TNF- α , TNF- β , PANTES, IL-8 및 IL-10 중 선택된 것에 대한 항체, 단편 또는 이들의 조합 중 선택된 하나 이상 또는 형광 염료(dye)인 것인 진단용 키트.
- [청구항 18] 청구항 16에 있어서, 상기 인자에 특이적인 활성을 유발하는 표적 세포는 NK 세포 상에 구별되는 두 개 이상의 인자에 대한 항체, 단편 및 이들의 조합 중 선택된 하나 이상의 것으로 코팅된 것인 진단용 키트.
- [청구항 19] 청구항 16에 있어서, NK 세포의 시너지 활성화와 관련된 질환은 과민성 면역질환, 자가면역질환, 면역결핍질환, 면역거부반응, 조직구증, 암, 2형 당뇨병, 기생충 감염 질환 및 바이러스 감염 질환 중 선택된 것인 진단용 키트.

[도1]

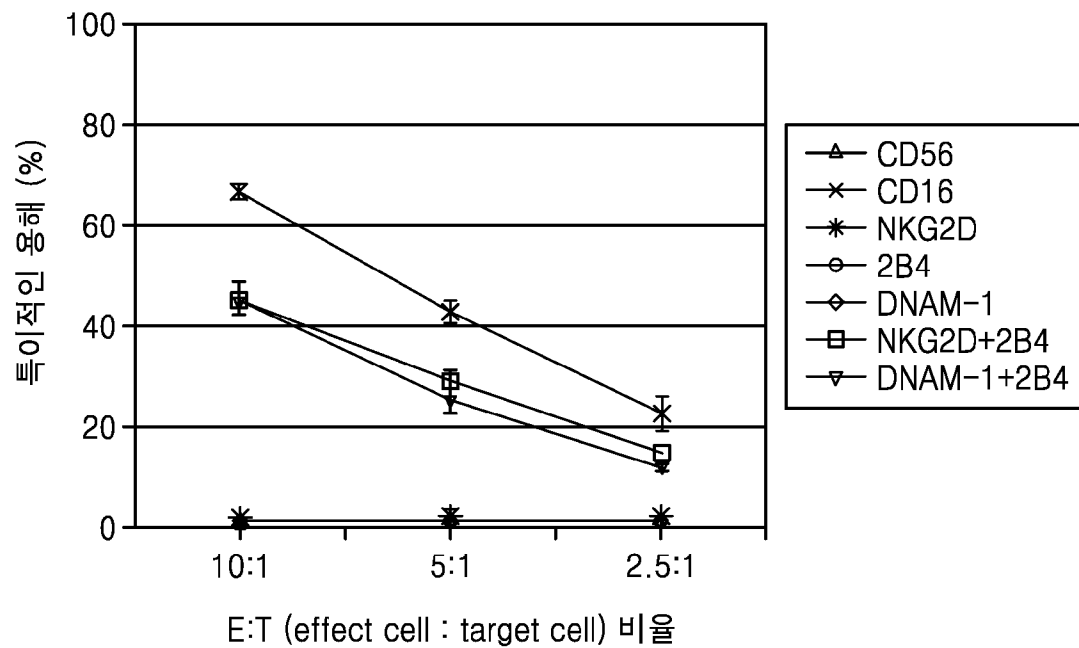


[도2]

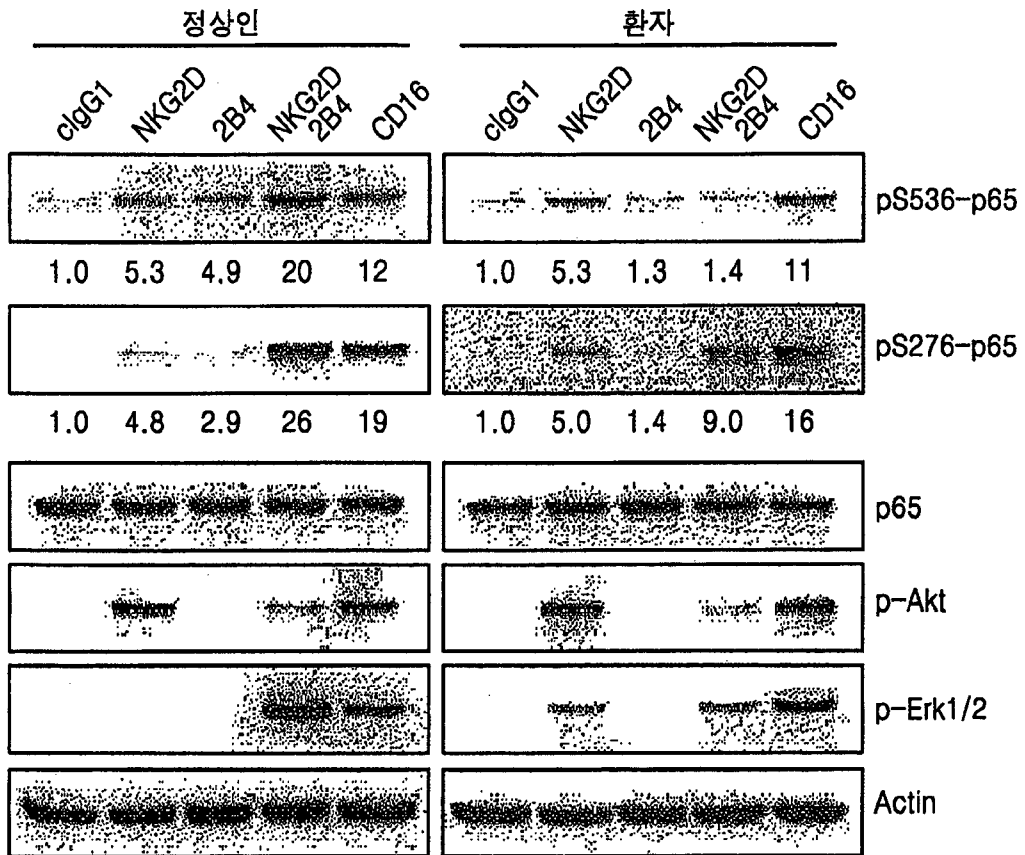


[도3]

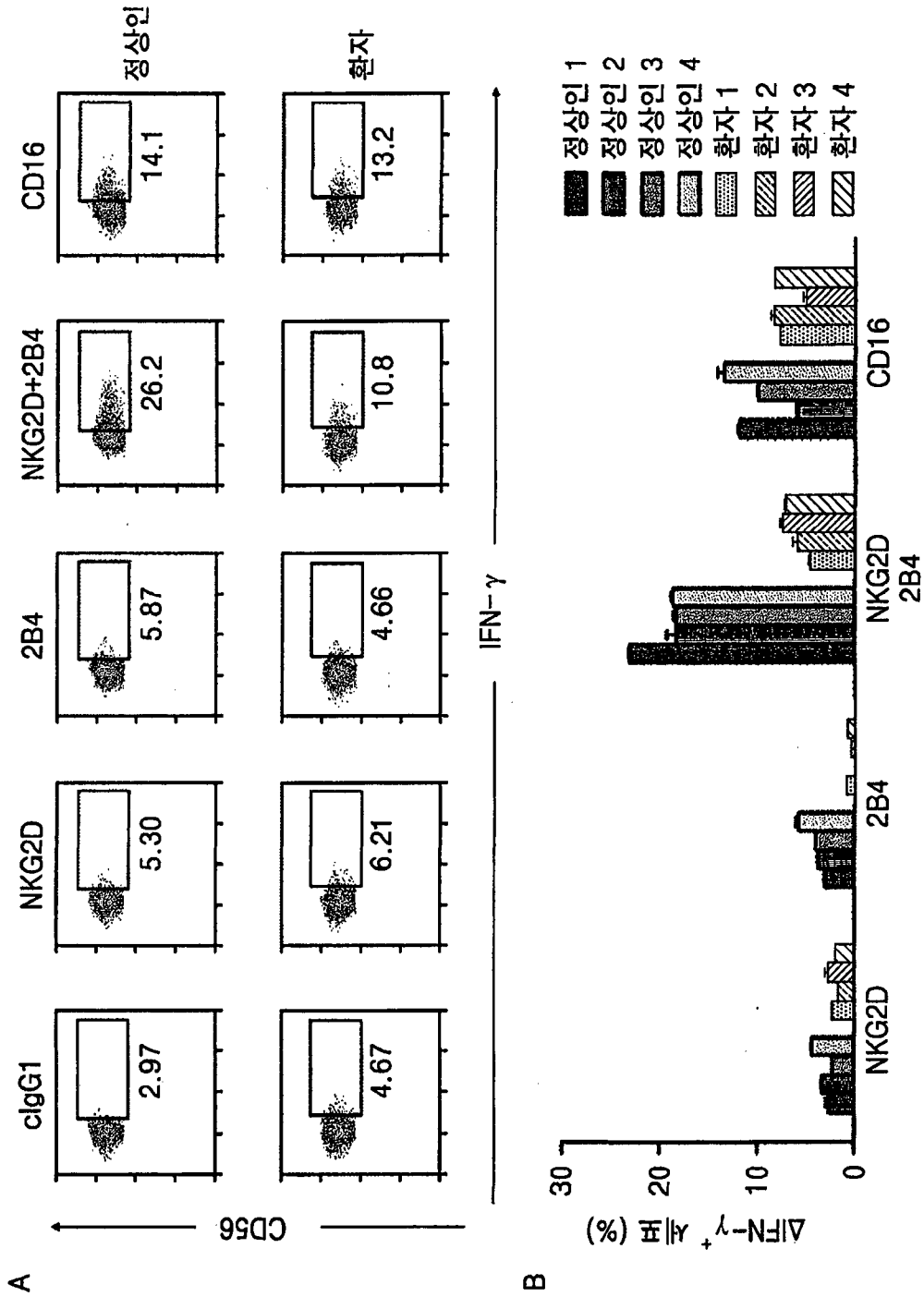
휴지기 NK-역 항체-의존적 세포 독성
(reverse antibody-dependent cellular cytotoxicity: rADCC)-P815



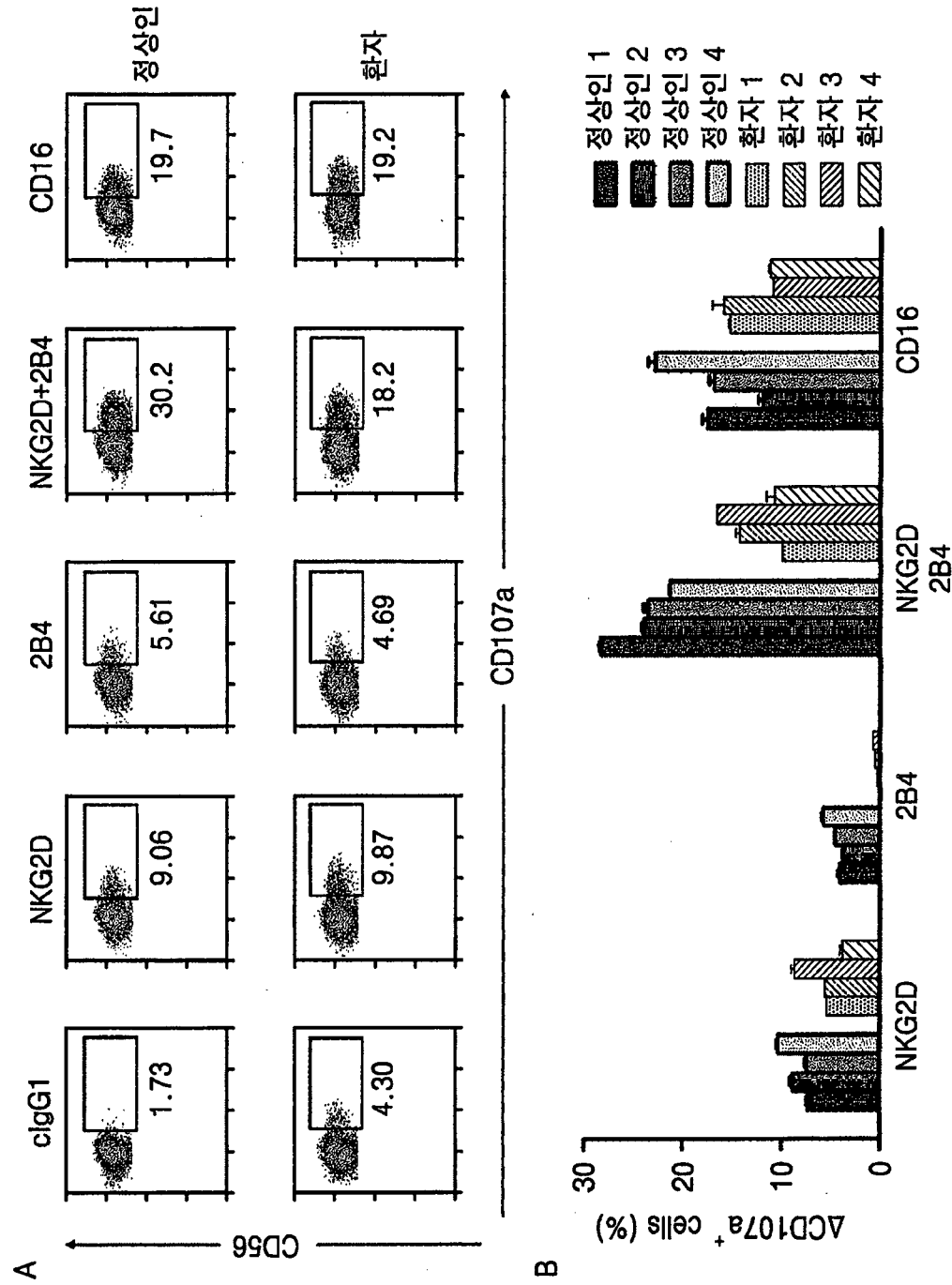
[도4]



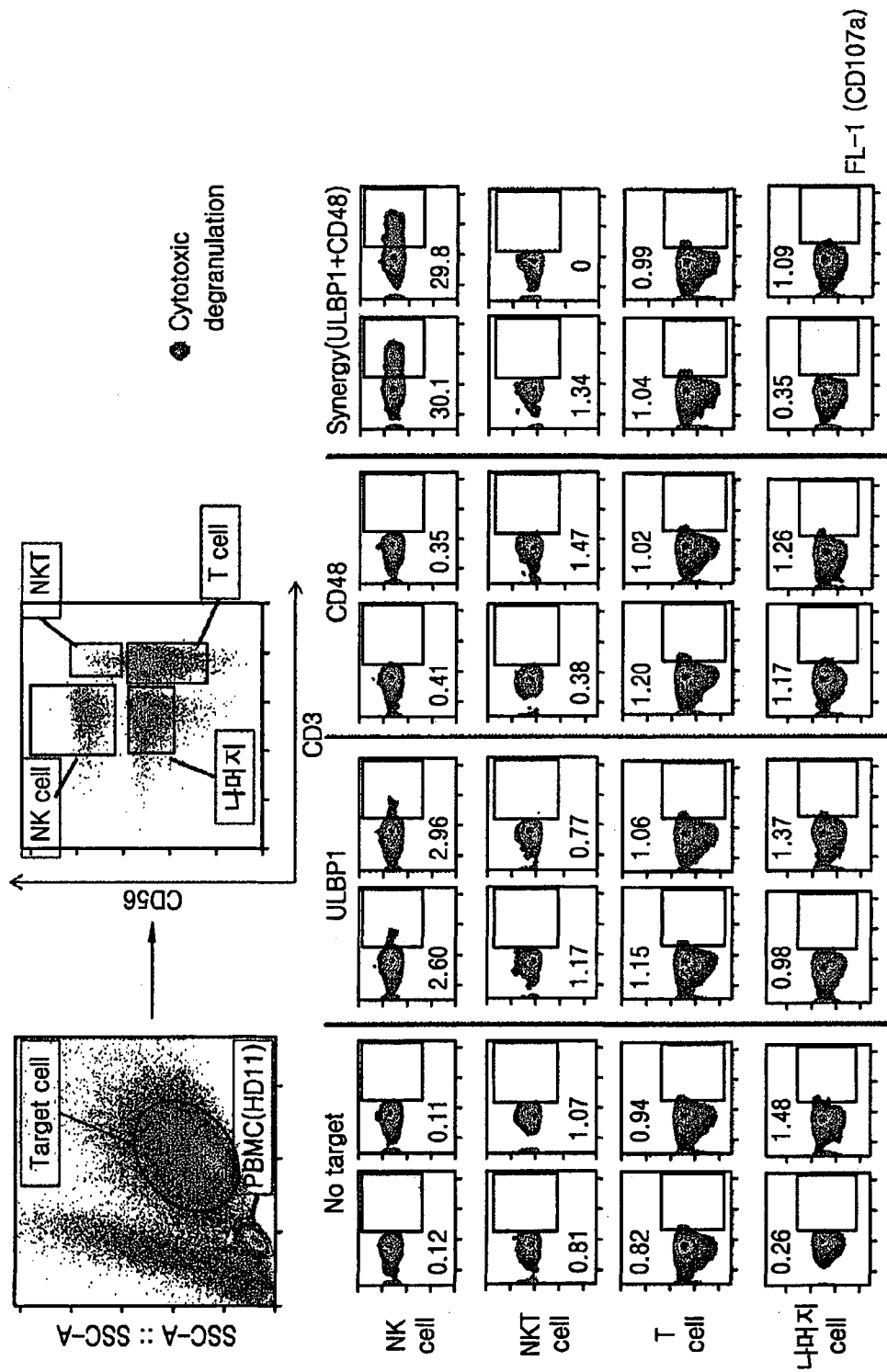
[도5]



[도6]



[도7]



[도8]

