(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0035496
(43) 공개일자 2012년04월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/395 (2006.01) *A61P 29/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0097035
(22) 출원일자 2010년10월05일
심사청구일자 2010년10월05일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가 1
(72) 발명자
이경미
서울특별시 서초구 서초1동 극동 디아망아파트 101-904
김태진
충청북도 청주시 상당구 율봉로209번길 40, 럭키아파트 2동 1105호 (율량동)
(74) 대리인
이문섭

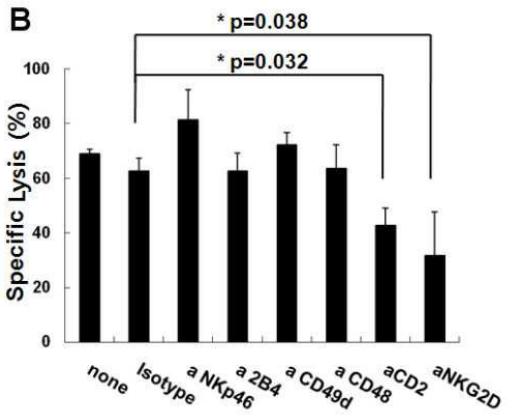
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **자연살상 세포-매개 면역반응 억제용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 자연살상 세포-매개 면역반응 억제용 조성물에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 항-CD2 항체 및 항-NKG2D 항체를 유효성분으로 포함하는 자연살상 세포에 기인하는 면역반응 억제용 조성물에 관한 것이다. 발명에 따르면, 이종장기 세포를 인식하는 다수의 자연 살상 세포 활성 수용체들 중 자연살상 세포의 활성에 가장 주요한 역할을 하는 수용체가 CD2 및 NKG2D 수용체임을 밝혀내고 이에 대한 중화항체를 이용할 경우 NK 세포에 기인하는 면역반응을 억제할 수 있다.

대 표 도 - 도1b



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

항-CD2 항체 또는 항-NKG2D 항체를 유효성분으로 포함하는 NK 세포에 기인하는 면역반응 억제용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 항-CD2 항체 및 항-NKG2D 항체의 조합을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 항-CD2 항체 또는 항-NKG2D 항체는 모노클로날 항체인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 조성물은 이종(xenogeneic) 장기, 조직 또는 세포의 이식에 대한 면역거부 반응(immune rejection)을 억제하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 이종 장기, 조직 또는 세포는 돼지 혈관내피세포, 돼지 각막내피세포 또는 돼지 간세포를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 조성물은 NK 세포에서 염증성 사이토카인의 분비를 감소시켜 면역반응을 억제하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 염증성 사이토카인은 IFN-γ 및 TNF-α인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

항-CD2 항체 및 항-NKG2D 항체를 이용하여 NK 세포의 살상능을 억제하는 것을 특징으로 하는 면역반응 억제방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 자연살상 세포-매개 면역반응 억제용 조성물에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 항-CD2 항체 및 항-NKG2D 항체를 유효성분으로 포함하는 자연살상 세포에 기인하는 면역반응 억제용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 성공적인 장기이식수술은 말기 장기부전 환자에서 생명을 지속시킬 수 있는 가장 효과적인 방법이나 점차적으로 장기 공여의 수는 감소하는 반면 이식 대기환자는 현저히 증가하고 있어 공여 장기의 부족이 심각한 문제로 부각되고 있다. 따라서 공여 장기 부족문제를 해결하기 위한 방안으로 이종장기 이식기술 개발이 시급한 실정이다. 수월한 공급, 적절한 가격 및 빠른 번식력을 갖추며 이에 따른 형질전환이 수월한 미니 돼지(miniature pig)가 가장 최적인 장기공급 동물로 최근 학술계에서 판명되고 있다.

[0003] 그러나 이종(xenogeneic)에 대한 장기 수혜자(host)의 심한 면역거부반응(immune rejection)이 동종에 비해 훨씬 심각하여 영장류인 원숭이에 돼지 장기를 이식시술 후 수개월, 심지어는 수 일, 수 시간 이내에 장기파손을 일으킨다. 따라서 성공적인 돼지 장기이식을 위해서는 초급성 거부반응, 급성 혈관성 거부반응, 세포매개성 및 만성 거부반응 등의 면역거부반응의 극복이 시급하다.

[0004] 초급성 거부반응은 장기 수혜자의 자연항체를 제거하거나 보체반응을 조절하는 인자의 억제, 그리고 자연항체와 결합하는 항원(pig cell surface antigen) 등을 유전자 조작에 의해 넉-아웃(knock-out) 시킴으로써 극복할 수 있다. 이를 바탕으로 2003년에는 자연항체 중 가장 대표적인 항원인 galactose-α(1,3)-galactose(αGal)가 발현되지 않는 유전자전환 돼지(α1,3-Galactosyl transferase-deficient pig)를 제작함으로써 초급성 면역반응의 극복에 커다란 기여가 예측되었다. αGal 등의 이종항원에 대한 이종반응항체는 초급성 면역반응을 매개할 뿐만 아니라 급성 혈관성 거부반응에도 중요한 역할을 한다. 이는 자연항체가 donor의 혈관 등에 발현된 항원에 결합되어 항체의 Fc 부분이 자연살상 세포 및 단핵세포에 결합하여 자연살상 세포를 활성화시킴으로써 TNF-α나 IFN-α 등의 사이토카인을 생성하여 염증을 일으키며 또한 혈전증(thrombosis)을 일으켜 허혈(ischemia)을 형성한다.

[0005] 그러나 항체에 의한 활성화 외에 자연살상 세포는 장기 이식부분에 침윤된 이종장기세포와 MHC class I의 성질이 판이하게 다르기 때문에 "missing self" hypothesis에 의해 더욱더 활성화 된다. 따라서 자연살상 세포에 의한 장기 이식거부반응은 크게 “MHC class I difference에 의한 자연살상 세포 활성화에 의한 장기거부반응과 “항체에 의한 세포독성(ADCC, antibody-dependent cell mediated cytotoxicity)”에 의해 발생한다. 급성면역거부반응 과정에서 자연살상 세포는, 세포표면에서 발현하고 있는 자연살상 세포 수용체와 이종혈관 및 장기세포에서 발현하는 특정 리간드와의 결합에 의해 활성화 되어, 그 결과 이종으로 인식한 장기를 세포-매개 세포독성(cell-mediated cytotoxicity)에 의해 공격하고 IFN-gamma 나 TNF-alpha와 같은 염증성 사이토카인을 분비하여 염증반응을 초래한다. 따라서 자연살상 세포가 이종 세포를 공격하는 수용체가 무엇인지를 밝히고 이에 대한 활성을 억제할 수 있는 억제제를 발굴하는 것이 급성 면역반응을 제어할 수 있는 최적의 방법이다. 자연살상 세포 활성억제는 초급성 면역반응의 주매개체인 이종항원에 대한 항체매개반응(ADCC)도 함께 제어가 가능하기 때문에 이식면역 거부반응의 전 단계를 억제할 수 있는 가능성을 포함한다.

[0006] 뿐만 아니라 자연살상 세포의 활성화는 B세포와 T세포가 관여하는 세포매개성 만성거부반응 조절에도 없어서는 안 될 중요한 중간단계이므로 자연살상 세포를 불활성화시킴으로써 급성혈관성 거부반응과 만성거부반응을 동시에 조절할 수 있는 이점이 있다.

[0007] 따라서 본 발명에서는 이종장기 이식시 자연살상 세포에 의해 매개되는 급성혈관성 이종이식 거부반응의 차단을 목적으로 자연살상 세포에서 발현하는 수용체에 대한 특이적인 중화항체를 이용하여 돼지 내피세포에 대한 일차(human primary) 자연살상 세포의 활성화를 저해하고자 하였다.

[0008] 이에, 본 발명자들은 상기 종래기술들의 문제점들을 극복하기 위하여 예의 연구노력한 결과, 이종장기세포를 인식하는 다수의 자연살상 세포 활성 수용체들 중 자연살상 세포의 활성에 가장 주요한 역할을 하는 수용체가 CD2 및 NKG2D 수용체임을 밝혔고 이에 대한 중화항체를 이용할 경우 NK 세포에 기인하는 면역반응을 성공적으로 억제할 수 있음을 처음으로 규명하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 따라서, 본 발명의 주된 목적은 이종장기 세포를 인식하는 NK 세포 활성 수용체를 블로킹함으로써 이종장기 거부반응을 억제시킬 수 있는, 항-CD2 항체, 항-NKG2D 항체, 또는 이들의 조합을 유효성분으로 포함하는 NK 세포

에 기인하는 면역반응 억제용 조성물을 제공하는 데 있다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 상기 항-CD2 항체 및 항-NKG2D 항체를 이용하여 NK 세포의 살상능을 억제하는 것을 특징으로 하는 면역반응 억제방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 항-CD2 항체 또는 항-NKG2D 항체를 유효성분으로 포함하는 NK 세포에 기인하는 면역반응 억제용 조성물을 제공한다. 또한 본 발명은 상기 항-CD2 항체 및 항-NKG2D 항체의 조합을 유효성분으로 포함하는 NK 세포에 기인하는 면역반응 억제용 조성물을 제공한다.

[0012] 본 발명자들은 최근 학계에서 가장 최적의 장기공급 동물로서 판명된 미니 돼지가 장기 이식시 이종장기 세포에 대한 면역거부 반응으로 인해 장기이식 후 면역 거부반응이 일어나 몇 시간 내지 몇 개월 이내에 장기파손이 일어나는 원인을 파악하고, 이를 극복하고자 이들 이종장기 이식 거부반응을 억제할 수 있는 방법을 탐색하였다. 특히 급성면역 거부반응을 일으키는 원인 중 하나인 NK 세포에 의한 면역반응에서 NK 세포 수용체들의 역할을 연구하였다.

[0013] 본 발명의 바람직한 실시예에서는 이종 장기세포를 인식하는 자연살상 세포(이하, 'NK 세포')의 활성 수용체로 알려진 수용체들, 예컨대 NKp46, 2B4, CD49d, CD48, CD2 및 NKG2D 중, NK 세포에 기인하는 면역반응에서 가장 주요한 역할을 하는 수용체가 CD2와 NKG2D임을 처음으로 밝혀내고 (도 1b 참조), 이를 CD2와 NKG2D에 대한 항체를 이용하여 NK 세포 매개 면역거부 반응을 억제할 수 있는지를 실험으로 확인하였다.

[0014] 본 발명의 실험결과에서, 상기 항-CD2 항체와 항-NKG2D 항체는 각각 NK 세포의 살상능을 억제하였으며 (도 2 참조), 특히 항-CD2 항체와 항-NKG2D 항체를 조합하여 처리하는 경우 항체를 단독으로 처리한 경우보다 현저히 감소한 NK 세포 살상능을 나타내었다 (도 3 참조). 따라서 상기 항-CD2 항체와 항-NKG2D 항체를 이용하여 NK 세포에 의한 면역반응을 억제할 수 있으며, 더욱 상승된 면역반응 억제 효과를 얻기 위해서는 항-CD2 항체와 항-NKG2D 항체를 함께 투여하는 것이 바람직하다.

[0015] 본 발명의 면역반응 억제용 조성물에서, 상기 항-CD2 항체 또는 항-NKG2D 항체는 항원인 NK 세포의 CD2 수용체 또는 NKG2D 수용체에 결합가능한 중화항체로서, 이종장기 세포를 인식하는 부위에 경쟁적으로 결합(블로킹 또는 중화)함으로써 NK 세포의 활성을 억제시키는 역할을 하게 된다. 본 명세서에서 "항체"란 항원의 항원결정기(epitope)에 특이적으로 결합할 수 있는 단백질을 의미하며, 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 및 재조합 항체를 모두 포함하는 개념이다. 상기 폴리클로날 항체와 모노클로날 항체는 모두 상업적으로 입수하거나 당업계에 공지된 방법에 따라 제조할 수 있다.

[0016] 본 발명에서, 상기 폴리클로날 항체(polyclonal antibodies)는 당업자에 알려진 종래방법에 따라 항원인 CD2, NKG2D 수용체 또는 그 항원결정기를 갖는 단편을 외부 숙주에 주사함으로써 제조될 수 있다. 외부 숙주는 마우스, 래트, 양, 토끼와 같은 포유동물을 포함한다. 면역원은 근내, 복강내 또는 피하 주사방법으로 주사되며, 일반적으로 항원성을 증가시키기 위한 보조제(adjuvant)와 함께 투여된다. 외부숙주로부터 정기적으로 혈액을 채취하여 향상된 역가 및 항원에 대한 특이성을 보이는 혈청을 수거하거나 이로부터 항체를 분리?정제한다.

[0017] 또한 상기 모노클로날 항체(monoclonal antibodies, mAbs)는 당업자에 알려진 융합에 의한 불멸화된 세포주 생성기술(Koeher and Milstein (1975) Nature, 256:495)에 의해 제조될 수 있다. 그 제조방법을 간단히 설명하면 다음과 같다. 먼저 순수한 단백질을 20 μg을 얻어서 Balb/C 쥐에 면역화를 시키거나 펩티드를 합성하여 소혈청 알부민과 결합시켜 쥐에 면역화 시킨다. 그 후에 쥐에서 분리된 항원-생산 임파구를 인간 또는 마우스의 미엘로마와 융합하여 불멸화된 하이브리도마를 생성하며, ELISA 방법을 사용하여 원하는 단일클론 항체를 생성하는 하이브리도마 세포만을 선택하여 증식한 후 배양물로부터 단일클론 항체를 분리?정제한다.

[0018] 본 발명에 있어서, 상기 면역반응 억제용 조성물은 이종(xenogeneic) 장기, 조직 또는 세포의 이식에 대한 면역거부 반응(immune rejection)을 억제할 수 있으며, 상기 이종 장기, 조직 또는 세포는 돼지 혈관내피세포, 돼지 각막내피세포 또는 돼지 간세포를 포함하는 장기 또는 조직일 수 있다.

[0019] 본 발명의 바람직한 실시예에서는, 미니어처 피그에서 직접분리한 돼지 혈관내피세포(PAEC), 돼지 각막내피세포(PCEC) 또는 돼지 간세포(PLC)를 이용하여 돼지의 각종 장기세포에 대한 항-NKG2D 항체와 항-CD2 항체의 NK 세포 살상능 억제 효과를 확인하였다. IL-2로 활성화시킨 NK 세포에 NKG2D 및 CD2의 중화항체를 처리한 후 돼지

세포들과 10:1, 3:1, 1:1의 E:T ratio (효력세포:표적세포)로 공동배양한 결과, 항-NKG2D 항체와 항-CD2 항체가 NK 세포의 살상능을 억제하는 효과가 있었으며, 특히 두 항체를 모두 처리한 경우에서는 더욱 더 감소된 시너지 효과를 나타내었다 (도 5 참조).

[0020] 본 발명에 있어서, 상기 면역반응 억제용 조성물은 NK 세포에서 염증성 사이토카인의 분비를 감소시켜 면역반응을 억제할 수 있으며, 상기 염증성 사이토카인은 바람직하게는 IFN-γ 및 TNF-α이다.

[0021] 본 발명의 바람직한 실시예에서는, NK 세포에 NKG2D와 CD2에 대한 중화항체를 처리하여 NK 세포의 돼지 혈관내피세포주에 대한 사이토카인 분비능을 확인한 결과, 항-NKG2D 항체와 항-CD2 항체의 처리로 인하여 NK 세포에서 IFN-γ와 TNF-α의 분비능이 감소하였으며, 특히 두 항체를 조합하여 처리한 경우 더욱 감소된 사이토카인 분비능을 보였다 (도 4 참조).

[0022] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 항-CD2 항체 및 항-NKG2D 항체를 이용하여 NK 세포의 살상능을 억제하는 것을 특징으로 하는 면역반응 억제방법을 제공한다.

[0023] 본 발명은 돼지 세포들에 대한 인간 NK 세포의 반응에 있어서 CD2와 NKG2D가 결정적인 역할을 함을 증명하였다. 따라서 본 발명에 따른 항-CD2 항체 및 항-NKG2D 항체를 이용한 처리는 급성 및 세포성 이종장기 이식 거부반응을 방지하기 위해 NK 세포의 기능을 블로킹함으로써 강력하고 안전한 면역 억제 방법을 제공한다.

[0024] 본 발명의 면역반응 억제용 조성물이 약학 조성물로 사용되는 경우에는, 조성물 총 중량에 대하여 항-NKG2D 항체, 항-CD2 항체, 또는 이들을 조합을 0.1 내지 50 중량%로 포함한다.

[0025] 본 발명의 항-NKG2D 항체 또는 항-CD2 항체를 포함하는 약학 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

[0026] 본 발명의 항-NKG2D 항체 또는 항-CD2 항체의 약학적 투여 형태는 이들의 약학적 허용가능한 염의 형태로도 사용될 수 있고, 또한 단독으로 또는 타 약학적 활성 화합물과 결합뿐만 아니라 적당한 집합으로 사용될 수 있다.

[0027] 본 발명에 따른 항-NKG2D 항체 또는 항-CD2 항체를 포함하는 약학조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 시클로크레아틴을 포함하는 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 시클로크레아틴에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔 (witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0028] 본 발명의 항-NKG2D 항체 또는 항-CD2 항체의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나, 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 항-NKG2D 항체 또는 항-CD2 항체는 1일 0.0001 내지 100 mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 100 mg/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위을 한정하는 것은 아니다.

[0029] 본 발명의 항-NKG2D 항체 또는 항-CD2 항체는 인간을 포함한 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내

(intracerebroven tricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.

발명의 효과

[0030] 이상 설명한 바와 같이, 본 발명에 따르면 이종장기 세포를 인식하는 다수의 자연살상세포 활성 수용체, NKp46, 2B4, CD49d, CD48, CD2 및 NKG2D를 돼지 세포를 이용하여 스크리닝한 결과, NKG2D와 CD2 수용체가 가장 주요한 역할을 한다는 사실을 확인하였다. 따라서 NKG2D와 CD2에 대한 항체를 투여하는 경우 자연살상 세포의 활성화가 억제되었으며 이들 항체를 병용 투여했을 경우 그 억제 효과가 상승적으로 증가함을 발견하였다.

도면의 간단한 설명

[0031] 도 1a는 IL-2 활성화된 NK 세포가 표적세포로서 돼지 혈관내피세포주인 MPN3와 돼지 대동맥에서 직접분리한 혈관내피세포인 PAEC에 대한 특이적 세포 살상능(lysis)을 보여주는 결과이다.

도 1b는 MPN3 세포의 lysis에 있어서 NK 세포 표면 활성화 수용체들을 중화항체들로 블로킹한 결과를 나타낸다.

도 2는 NKG2D와 CD2에 대한 항체의 농도별 lysis 저해 효과를 나타낸 결과이다.

도 3은 anti-NKG2D mAb 및 anti-CD2 mAb를 단독 또는 조합하여 처리한 경우 NK 세포의 살상능을 확인한 결과이다.

도 4는 NK 세포에 anti-NKG2D mAb와 anti-CD2 mAb를 처리하여 MPN3 세포에 대한 사이토카인 분비능을 확인한 결과이다.

도 5는 anti-NKG2D mAb와 anti-CD2 mAb 처리에 의하여 미니어쳐 피그에서 직접 분리한 1차 돼지 세포들에 대한 NK 세포 살상능이 감소되는지를 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0032] 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.

[0033] **실시예 1. NK 세포 분리 및 배양**

[0034] 인간 1차 NK 세포(Human primary NK cells)는 56명의 건강한 지원자로부터 얻은 전혈로부터 분리하였다. 혈액에 Rosettesep (Stem cell technology)을 30분간 처리하고 Ficoll (GE heathcare)에 overlay 한 후 2,500 rpm에서 30분간 원심분리 후 buffy coat를 얻어 자연살상(NK) 세포를 획득하였다. 분리된 NK 세포는 10% FBS(fetal bovine serum; Lonza), 100 U/ml의 페니실린(Lonza), 100 U/ml의 스트렙토마이신(Lonza), 및 300 U/ml의 인간 재조합 인터루킨-2(hrIL-2; Chiron)가 첨가된 RPMI-1640 (Welgene, Korea)로 배양하였다. 10-14일간 배양된 상기 IL-2 활성화된 NK 세포를 분석을 위해 사용되었다.

[0035] **실시예 2. 돼지 세포 분리 및 배양**

[0036] 시미안 바이러스(simian virus) 40-불멸화된 돼지 동맥혈관 내피세포주(porcine aortic endothelial cell line, PAEC)인, MPN3은 10% 우태아혈청, 100 U/ml의 페니실린 및 100 U/ml의 스트렙토마이신이 첨가된 RPMI-1640 (이하, ‘complete RPMI’)에서 배양하였다. 1차(primary) PAEC는 서울대학교 병원에서 특이적 병원체가 없는 시설(specific pathogen-free facilities)에서 사육된 미니돼지(Minnesota miniature pigs)로부터 분리하였다. 돼지 1차 간세포(Porcine primary liver cells, PLC) 및 돼지 1차 각막 내피세포(porcine primary cornea endothelial cells, PCEC)는 서울대학교 의과대학의 XRC(Xenotransplantation Research Center)에서 제공받았다. 상기 세포들은 complete RPMI에서 배양하였다.

[0037] **실시예 3. 유세포 분석**

[0038] FITC(fluorescein isothiocyanate), PE(phycoerythrin) 또는 APC(allophycocyanin)로 표지된 anti-human CD3 (Clone UCHT-1), CD56 (MEM188), CD107a (eBio H4A3), interferon-γ (IFN-γ 4S.B3) 및 tumour necrosis factor-α (TNF-α MAb11) 항체들(monoclonal antibodies, 이하 'mAbs')과 이소타입 대조군(isotype controls)은 eBioscience (San Diego, CA)로부터 구입하였다. 유세포 분석(flow cytometry)은 FACScalibur (BD Bioscience, San Diego, CA)로 수행하였으며, 데이터는 CELLQUEST software (BD Pharmingen, San Jose, CA)로 분석하였다. 림프구는 forward scatter/side scatter로 분석되었고 NK 세포는 CD3-CD56+로 정의하였다.

[0039] **실시예 4. NK 세포의 살상능 측정**

[0040] 돼지 세포들에 대한 IL-2 활성화된 인간 NK 세포의 살상능은 4-hr ^{51}Cr release assay로 테스트하였다. NK 수용체와 그 동족 리간드(cognate ligands) 상호작용을 블로킹하기 위해, 포화농도(saturating dose; 10㎍/ml)의 mAb를 각 실험에 사용하였다. 간단히 설명하면, NK 세포들은 10 ㎍/ml의 anti human NKG2D mAb (Clone 149810; R&D Systems), anti-human CD2 mAb (RPA-210; e-Bioscience), anti-human NKp44 mAb (253415; R&D Systems) 단독 또는 조합으로 4℃에서 30분간 반응시켰다. 또한 Anti-2B4 (C1.7; Beckman Coulter, Brea, CA), anti-CD48 (TU145; BD Pharmingen), anti-CD49d (44H6; Serotec), 및 anti-NKp46(195314; R&D Systems) mAbs는 10 ㎍/ml로 사용되었다. 반응 4시간 후, 상층액을 수집하여 ^{51}Cr-release를 감마-카운터(gamma-counter)로 분석하였다. 용해(lysis)의 퍼센트는 다음과 같이 계산되었다: (experimental release - spontaneous release)/(maximum release - spontaneous release)×100.

[0041] **실시예 5. 사이토카인 분비정도 측정**

[0042] IFN-γ와 TNF-α 분비능 측정은 intracellular FACS 분석법으로 측정하였다. 간단히 설명하면, IL-2 활성화된 NK 세포는 anti-CD2 mAb 또는 anti-NKG2D mAb 단독 또는 조합으로 존재 하에 E:T = 1:1에서 MPN3 세포와 공동-배양하였다. 1시간 동안 37℃ 배양기에서 반응한 후 Golgistop (BD Pharmingen)을 첨가하여 마지막 5시간 동안 배양하였다. 배양 후, 샘플을 수집하여 APC로 표지된 CD56으로 20분간 반응시켰다. 상기 샘플을 Cytofix/Cytoperm Intracellular Staining kits (BD Pharmingen)를 이용하여 고정하고 염색하였다. 이후 NK 세포를 anti-IFNγ-PE 또는 anti-TNFα-PE mAb로 추가 30분간 세포내로 염색하였다. 유세포 분석은 FACScalibur (BD Pharmingen)로 수행하였으며 데이터는 CELLQUEST software (BD Pharmingen)로 분석하였다.

[0043] **실험결과 1. NK 세포의 살상능 측정**

[0044] (1) 인간 NK 세포의 돼지 내피세포주에 대한 살상능을 평가하기 위하여, 동위원소인 Chromium 51 50㎕ci를 50 ㎕l의 FBS로 현탁되어 있는 MPN3(porcine aortic endothelial cell line)와 돼지에서 직접 분리한 1차(primary) 돼지 동맥혈관 내피세포(PAEC)에 각각 넣은 후, 1시간 동안 37℃에서 반응시킨 후 각각의 인간 NK 세포에 10:1, 3:1, 1:1의 비율(Effector: Target ratio)로 처리하였고, 4시간 동안 반응시킨 후 상등액을 취하여 분비된 동위원소의 수치를 측정하였다.

[0045] 도 1a는 IL-2 활성화된 NK 세포가 표적세포로서 MPN3와 PAEC에 대한 특이적 세포 용해를 보여주는 결과로서, 도 1a에서 MPN3와 PAEC는 모두 인간 NK 세포에 의해 비슷한 수준에서 효율적으로 lysis되었음을 확인하였다.

[0046] (2) 분리한 NK 세포를 300 U/ml의 IL-2로 10-14일 동안 배양한 후 수집하고 각각의 수용체에 대한 중화항체(aNKp46, a2B4, aCD49d, aCD2, aCD48, aNKG2D)를 10㎍/ml 씩 인간 NK 세포에 처리한 후 4℃에서 20분간 반응시켰다. 반응 후, 동위원소인 ^{51}Cr이 표지된 MPN3 세포를 10:1의 E:T ratio (Effector: Target ratio)로 4시간 동안 반응시킨 후 상등액을 취해 분석하였다.

[0047] 도 1b는 MPN3 세포의 lysis에 있어서 NK 세포 표면 활성화 수용체들을 중화항체들로 블로킹한 결과를 나타낸다. 도 1b에서, 시험된 항체들(aNKp46, a2B4, aCD49d, aCD2, aCD48, aNKG2D) 중에서 anti-CD2와 anti-NKG2D만 MPN3 세포의 lysis를 억제하는 것으로 확인되었다. anti-CD2 또는 anti-NKG2D의 처리는 MPN3 세포의 lysis를 각각 약 34%, 51% 정도 저해하였다. 이러한 결과는 IL-2 활성화된 인간 NK 세포의 lysis가 NK 세포 표면의 CD2 및

NKG2D의 활성화에 의해 주로 매개됨을 설명한다.

[0048] (3) 도 1b에서 우수한 lysis 억제 효과를 보인 NKG2D와 CD2에 대한 중화항체에 대하여 농도별 저해(inhibition) 정도를 측정하기 위해, NK 세포를 300 U/ml의 IL-2로 10-14일 동안 배양시킨 후 수집하고 각각의 수용체에 대한 중화항체 (anti-NKG2D mAb 및 anti-CD2 mAb)를 각각의 농도별(5, 10, 15 μg/ml)로 처리한 후 20분간 4℃에서 반응시킨 후 돼지 혈관내피세포주인 MPN3 세포주에 대해 ^{51}Cr release assay를 수행하였다.

[0049] 도 2는 NKG2D와 CD2에 대한 항체의 농도별 lysis 저해 효과를 나타낸 결과이다. anti-NKG2D mAb 및 anti-CD2 mAb 둘 다 5-15 μg/ml 농도 범위에서 우수한 lysis 저해 효과를 보였다.

[0050] (4) NKG2D와 CD2에 대한 중화항체를 각각 또는 함께 처리하는 경우 NK 세포 매개 이종장기 이식 거부반응을 감소시킬 수 있는지 확인하기 위하여, NKG2D와 CD2 항체를 함께 또는 각각 처리하여 돼지 혈관 내피 세포주인 MPN3 세포주에 대한 세포 살상능 정도를 측정하였다.

[0051] 도 3은 anti-NKG2D mAb 및 anti-CD2 mAb를 단독 또는 조합하여 처리한 경우 NK 세포의 살상능을 확인한 결과이다. anti-NKG2D mAb와 anti-CD2 mAb를 단독으로 처리한 경우와 비교하여 조합한 경우 MPN3 세포에 대한 NK 세포의 살상능이 더욱 감소하였다 (synergistic decrease).

[0052] **실험결과 2. 사이토카인 분비 측정 결과**

[0053] 인간 NK 세포에 NKG2D와 CD2에 대한 중화항체를 처리하여 중화할 경우 돼지혈관내피세포주인 MPN3 세포주에 대한 사이토카인 분비능 정도를 확인하기 위하여, Intracellular FACS 분석법을 이용하여 분석하였다. 10-14일간 배양시킨 IL-2 활성화 NK 세포에 anti-CD2와 NKG2D 항체를 각각 또는 함께 NK 세포에 처리한 후 20분간 4℃에 반응시켜 중화한 후, MPN3 세포주를 1:1의 비율로 공동배양하고 Golgistop를 처리하여 분비되는 사이토카인을 세포내로 축적(accumulation)시켰다. 반응 6시간 후, 세포내 축적된 사이토카인의 분비량을 BD cytofix/cytoperm buffer (BD ParMingen)를 이용하여 IFN-gamma와 TNF-alpha를 염색하여 FACS를 이용하여 분석하였다.

[0054] 도 4는 NK 세포에 anti-NKG2D mAb와 anti-CD2 mAb를 처리하여 MPN3 세포에 대한 사이토카인 분비능을 확인한 결과이다. 세포내 IFNγ(A)와 TNFα(B)는 CD56+ NK 세포에서 검출되었다. 측정값은 CD56+ IFNγ+ 세포 또는 CD56+ TNFα+ 세포의 퍼센트를 나타낸다. 분석 결과, anti-NKG2D mAb와 anti-CD2 mAb의 처리로 인하여 NK 세포에서 IFNγ와 TNFα의 분비능이 감소하였으며, 특히 anti-NKG2D mAb와 anti-CD2 mAb를 조합하여 처리한 경우 더욱 감소된 사이토카인 분비능을 보였다.

[0055] **실험결과 3. CD2 및 NKG2D의 블로킹에 의한 1차 돼지 세포들에 대한 NK 세포 살상능 감소**

[0056] NK 세포 매개 이종장기 거부반응에 NKG2D와 CD2 수용체가 관여하는지를 세포주 외에 직접 미니 돼지(miniature pig)에서 분리한 각각의 장기에 대한 1차 돼지세포들, 돼지 혈관내피세포(PAEC), 돼지 각막혈관내피세포(PCEC), 및 돼지 간세포(PLC)를 이용하여 NK 세포 살상능을 측정하였다. 10-14일간 IL-2로 활성화한 NK 세포에 NKG2D와 CD2 중화항체를 각각 또는 함께 처리한 후, 각각의 1차 돼지 세포들과 각각 10:1, 3:1, 1:1의 E:T ratio로 4시간 동안 공동배양한 후 상등액을 취하여 감마 카운터로 분석하였다.

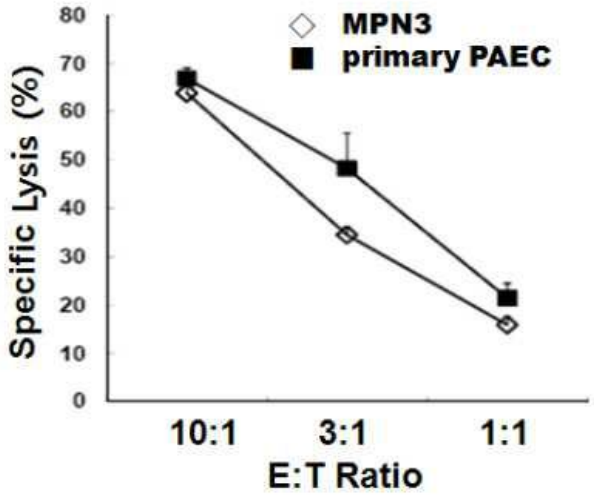
[0057] 도 5는 anti-NKG2D mAb와 anti-CD2 mAb 처리에 의하여 1차 돼지 세포들에 대한 NK 세포 살상능이 감소되는지를 확인한 결과이다. 측정결과, anti-NKG2D mAb와 anti-CD2 mAb를 단독 처리 또는 조합 처리한 경우, 돼지 각막혈관내피세포(B) 및 돼지 간세포(C)에 대한 NK 세포 살상능이 돼지 혈관내피세포(A)와 유사한 수준으로 저해되었다.

[0058] 도 5에서, anti-NKG2D mAb는 PAEC lysis를 블로킹하는데 더 효과적인 반면 anti-CD2 mAb는 PCEC와 PLC의 lysis를 저해하는 효과가 비슷하였다. 그럼에도 불구하고, anti-NKG2D mAb와 anti-CD2 mAb를 조합하여 처리한 경우 모든 표적세포에 대하여 가장 높은 NK 살상능 억제 효과를 나타내었다. 이러한 결과는 anti-NKG2D mAb와 anti-CD2 mAb을 조합하여 처리하는 것이 다양한 이종 장기 이식 모델에서 거부반응을 조절하는데 사용될 수 있음을

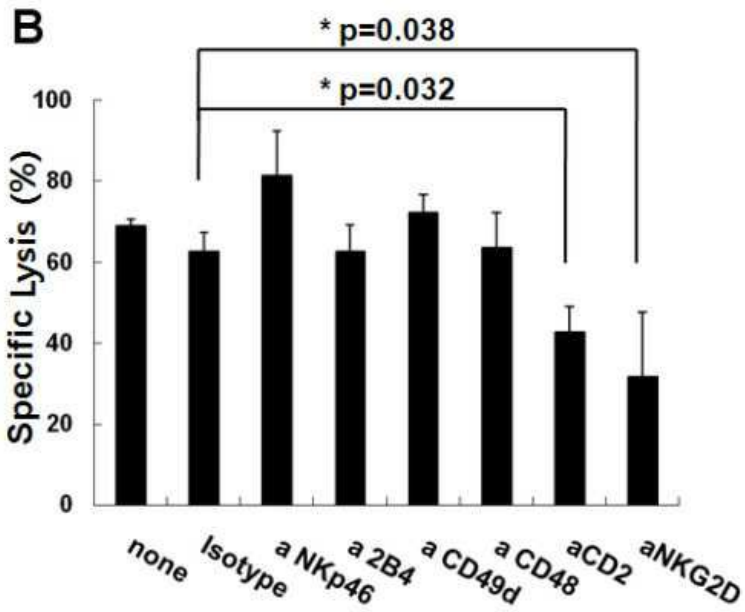
의미한다.

도면

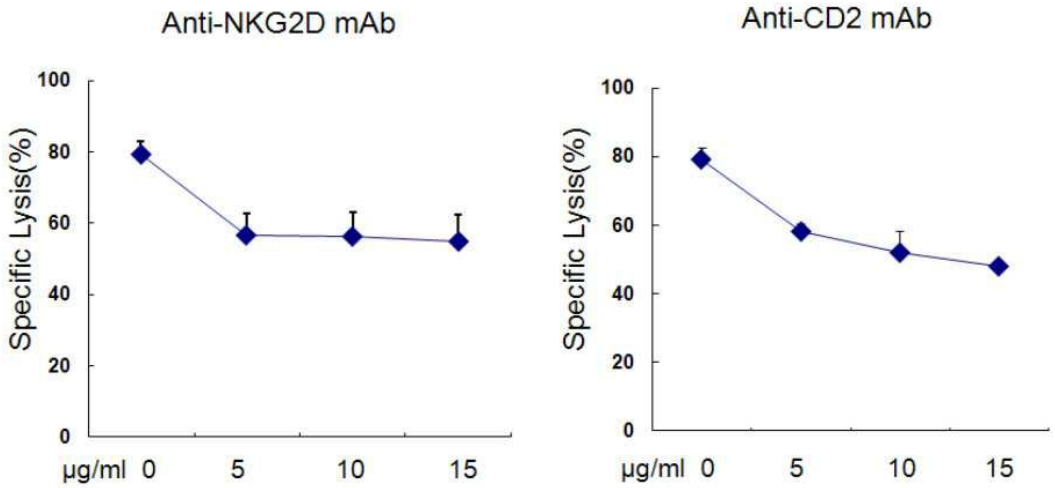
도면1a



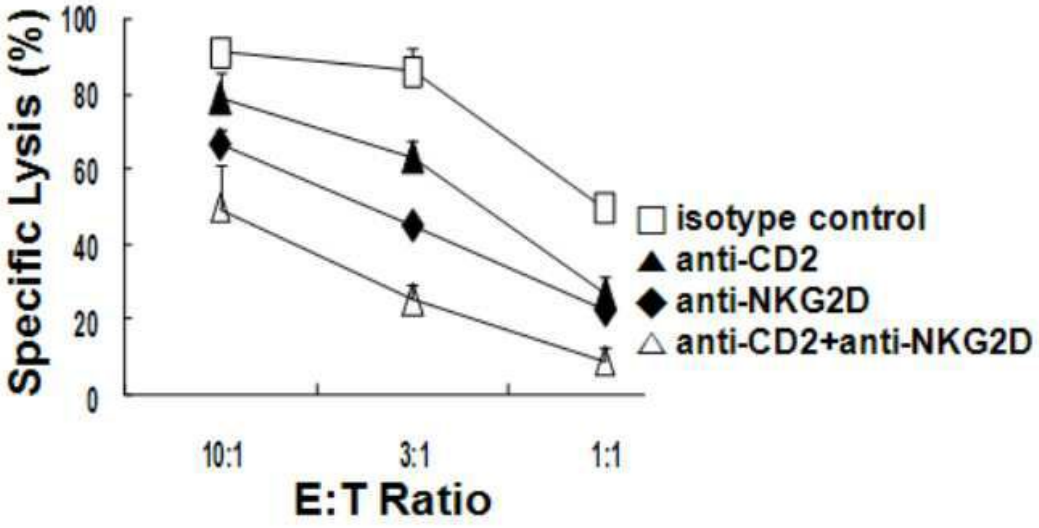
도면1b



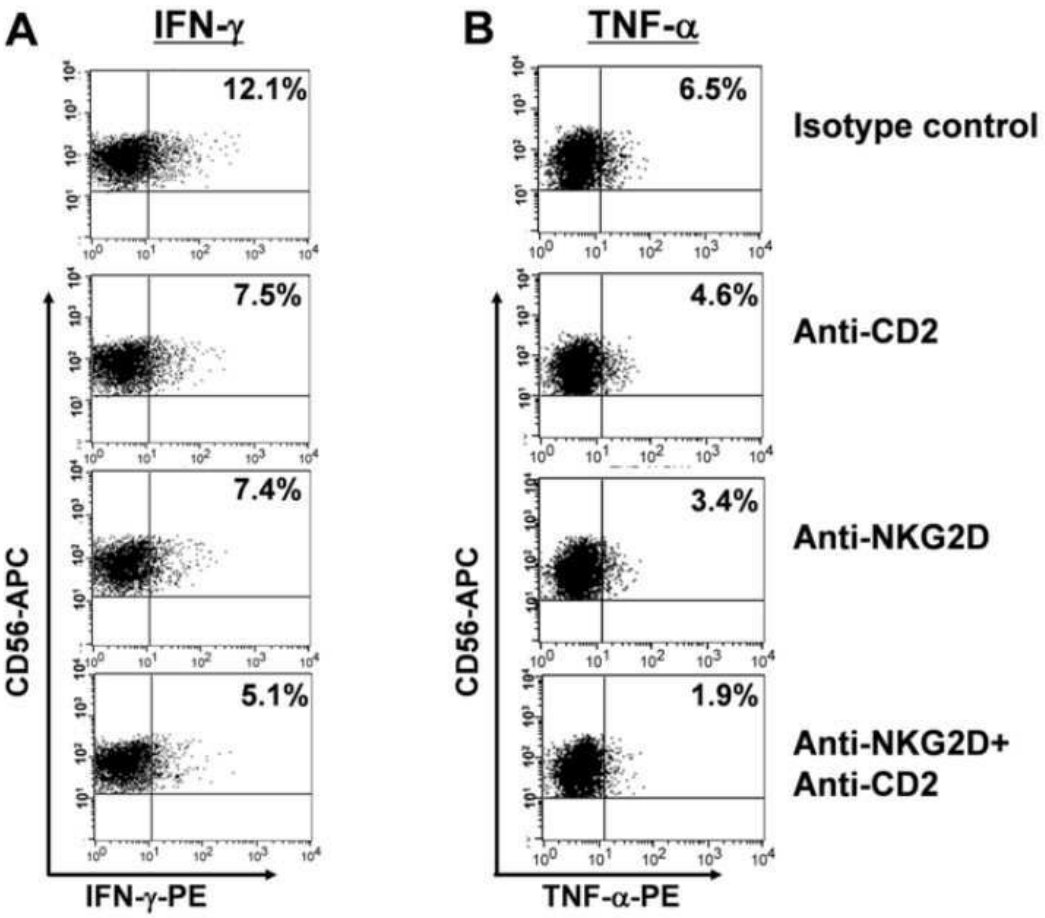
도면2


Anti-NKG2D mAb
Anti-CD2 mAb
Specific Lysis(%)
100
80
60
40
20
0
μg/ml 0
5
10
15

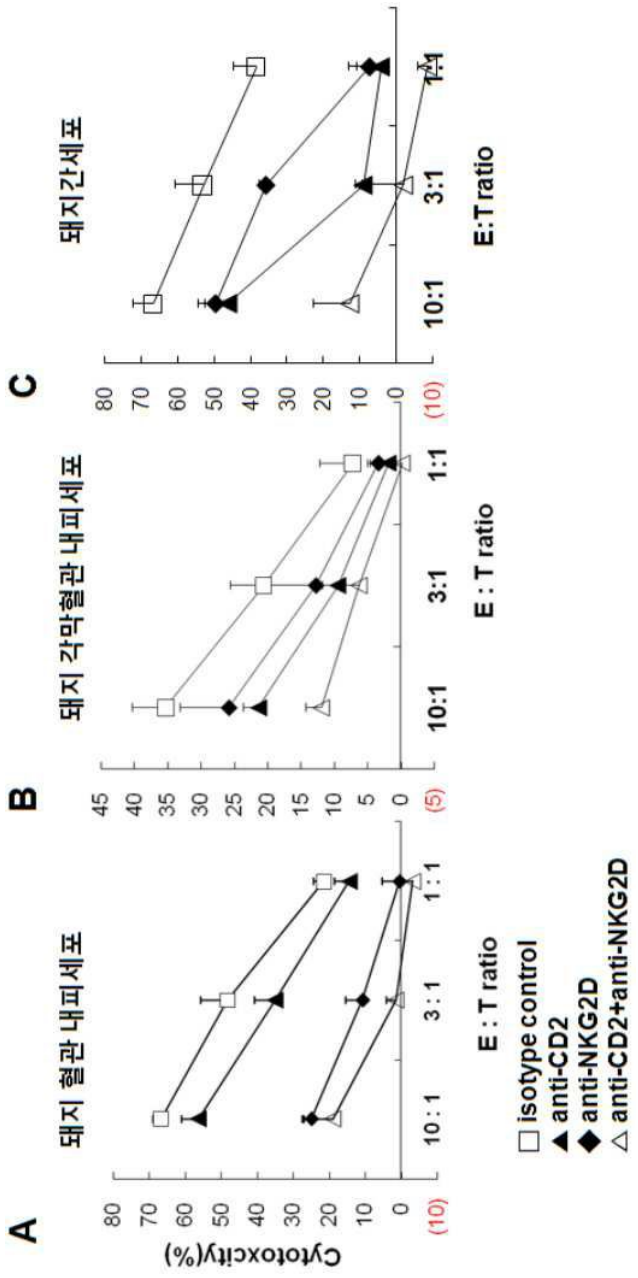
도면3


Specific Lysis (%)
100
80
60
40
20
0
10:1
3:1
1:1
E:T Ratio
isotype control
anti-CD2
anti-NKG2D
anti-CD2+anti-NKG2D

도면4


A
IFN-γ
B
TNF-α
12.1%
6.5%
Isotype control
7.5%
4.6%
Anti-CD2
7.4%
3.4%
Anti-NKG2D
5.1%
1.9%
Anti-NKG2D+
Anti-CD2
CD56-APC
IFN-γ-PE
TNF-α-PE

도면5


A
돼지 혈관 내피세포
Cytotoxcity(%)
10 : 1
3 : 1
1 : 1
(10)
E : T ratio
□ isotype control
▲ anti-CD2
◆ anti-NKG2D
△ anti-CD2+anti-NKG2D
B
돼지 각막혈관 내피세포
10:1
3:1
1:1
(5)
(10)
E : T ratio
C
돼지간세포
10:1
3:1
1:1
E:T ratio