(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2018 년 5 월 17 일 (17.05.2018)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2018/088875 A2

(51) 국제특허분류:
미분류

(21) 국제출원번호: PCT/KR2017/012883

(22) 국제출원일: 2017 년 11 월 14 일 (14.11.2017)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2016-0151411 2016 년 11 월 14 일 (14.11.2016) KR

(71) 출원인: 주식회사 파이안에스테틱스 (PAEAN AESTHETICS INC) [KR/KR]; 34028 대전시 유성구 테크노 2로 160 4층, Daejeon (KR).

(72) 발명자: 한규범 (HAN, Kyuboem); 34119 대전시 유성구 가정로 63 102동 1002호, Daejeon (KR). 이영준 (LEE, Youngjun); 05348 서울특별시 강동구 천호대로 1239, 101동 101호, Seoul (KR).

(74) 대리인: 제일특허법인 (FIRSTLAW P.C.); 06775 서울시 서초구 마방로 60, 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, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, 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).

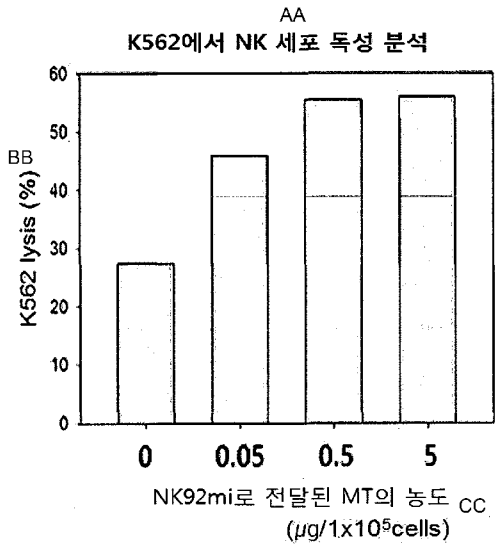
공개:

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

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: NATURAL KILLER CELL CONTAINING EXOGENOUS MITOCHONDRIUM AND PHARMACEUTICAL COMPOSITION COMPRISING SAME

(54) 발명의 명칭: 외래 미토콘드리아를 포함하는 자연살해세포 및 이를 포함하는 약학적 조성물



AA ... Assay for NK cytotoxicity in K562
BB ... K562 lysis %
CC ... Concentration of MT transferred to NK92mi (μg/1x10^5 cells)

(57) Abstract: The present invention relates to NK cells and PBMC, both having increased cytotoxicity. Particularly, NK cells and PBMC which have exogenous mitochondria introduced thereinto potentiate the immune system of the human body to enhance a therapeutic effect on infectious diseases or cancer. Therefore, the NK cells and PBMC can be used in a composition for prevention or treatment of infectious diseases and cancer. Specially, autogenous NK cells and PBMC guarantee stability without the incurrence of an immune reaction, and thus would be expected to have high commercial activity.

(57) 요약서: 본 발명은 세포독성이 증가한 NK 세포 및 PBMC에 대한 것이다. 특히, 외래 미토콘드리아가 도입된 NK 세포 및 PBMC는 인체의 면역 체계를 강화하여 감염질환이나 암에 대한 치료효과를 증진시켜준다. 따라서, 상기 NK 세포 및 PBMC를 포함하는 감염질환 및 암 예방 또는 치료용 조성물로 사용될 수 있다. 특히, 상기 NK 세포 및 PBMC가 자가 유래의 세포일 경우 면역반응을 유발하지 않아 안정성이 확보되는 바 상업적으로 활용가능성이 높을 것으로 기대된다.

WO 2018/088875 A2

【명세서】

【발명의 명칭】

외래 미토콘드리아를 포함하는 자연살해세포 및 이를 포함하는 약학적 조성물

【기술분야】

본 발명은 세포치료제에 관한 것이며, 보다 상세하게는 외래 미토콘드리아를 포함하는 자연살해세포와 말초혈액 단핵세포 및 이를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다.

【배경기술】

최근 다양한 난치병을 치료하기 위하여 바이오 의약품이 개발되고 있다. 바이오 의약품은 간단한 생체 단백질을 시작하여 항체 의약품 및 세포치료제로 발전하고 있다. 이때, 세포치료제는 자가, 동종, 이종 세포를 체외에서 분리, 증식, 선별하거나 여타 방법으로 세포의 생물학적 특성을 변화시키는 등 일련의 행위를 통하여 치료, 진단, 예방 목적으로 사용되는 의약품을 의미한다. 사용하는 세포의 종류에 따라 체세포치료제와 줄기세포치료제로 나눌 수 있다.

한편, 환자의 면역기능을 이용한 면역치료를 통한 암치료에 대해 관심이 높아지고 있다. 면역치료는 다양한 기능을 가진 면역세포들의 복잡한 상호작용을 통해 암세포를 제거하는 특성을 이용하는 것이다. 인간 혈액내에 있는 말초혈액 단핵세포(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)는 림프구(lymphocyte)나 단핵구(monocyte)처럼 둥근 모양의 핵을 가지는 혈액세포로서, 이러한 말초혈액 단핵세포 안에는 B 세포, T 세포, 대식세포, 수지상 세포(dendritic cell, DC),

자연살해세포(natural killer cell, 이하 NK 세포라 약칭함) 등의 면역세포들이 포함되어 있다. 암세포를 직접 제거하는 면역세포로는 NK 세포와 세포독성 T 림프구(cytotoxic T lymphocyte, CTL) 등이 있으며, 이들 효력세포(effector cell)에게 항원을 제시해 주는 항원제시세포(antigen presenting cell)로는 수지상세포나 B 세포가 있다. 그밖에 각종 사이토카인(cytokine)을 분비하는 보조 T 세포(helper T cell), 조절 T 세포(regulatory T cell) 등이 면역반응에 함께 관여하게 된다. 이들 중 NK 세포는 면역세포 치료법 중에서 가장 효과가 빠르고 효율적인 면역세포로 중요시되고 있다.

특히, NK 세포에 비특이적으로 암세포를 살상할 수 있는 능력이 밝혀지면서, NK 세포에 대해 많은 연구가 진행되었다. 이러한 연구들을 바탕으로 암 치료에 NK 세포를 이용하는 NK 세포 치료법이 대두 되고 있다. 특히, NK 세포는 숙주에 감염된 병원균 또는 암에 대항하기 위한 선천성 면역 반응과 사이토카인 분비를 통한 후천성 면역 반응에 중요한 역할을 하는 점이 보고되었다.

이에, 본 발명자들은 NK 세포 및 말초혈액 단핵세포의 세포독성을 조절하는 새로운 방법을 찾기 위해 노력한 결과, NK 세포 및 말초혈액 단핵세포의 세포독성을 활성화 시키고 이를 이용해 암을 치료할 수 있는 방법을 발견하여 본 발명을 완성하였다.

【발명의 상세한 설명】

【기술적 과제】

본 발명의 목적은 세포독성이 증가된 NK 세포 및 이를 포함하는 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 세포독성이 증가된 말초혈액 단핵세포 및 이를 포함하는 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

【기술적 해결방법】

상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 외래 미토콘드리아를 포함하는 NK 세포 및 이를 포함하는 암 또는 감염성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

또한, 본 발명은 외래 미토콘드리아를 포함하는 말초혈액 단핵세포 및 이를 포함하는 암 또는 감염성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

【발명의 효과】

외래 미토콘드리아가 도입된 NK 세포 및 말초혈액 단핵세포는 세포독성이 증가하여 암 특이적인 살상효과가 증가할 뿐 아니라, 생체 내에 존재하는 면역세포로서 부작용이 없다. 또한, 상기 NK 세포 및 말초혈액 단핵세포는 세포 자체의 능력이 향상되므로, NK 세포 및 말초혈액 단핵세포가 관여하는 다양한 질환에 폭넓게 적용될 수 있어, 상기 NK 세포 및 말초혈액 단핵세포를 포함하는 약학적 조성물은 상업적으로 이용가능성이 높을 것으로 기대된다.

【도면의 간단한 설명】

도 1은 사람 정상 간세포(WRL68) 유래 미토콘드리아가 NK 세포로 전달되었는지 여부를 PCR 분석 방법으로 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 2는 사람 정상 간세포 유래 미토콘드리아가 NK 세포로 전달되었는지 여부를 FACS로 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 사람 정상 간세포 유래 미토콘드리아가 NK 세포로 전달되었는지

여부를 형광현미경으로 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 4a 및 도 4b는 외래 미토콘드리아가 전달된 NK 세포의 항암 활성 변화를 CD107a 탈과립화 분석법(degranulation assay)으로 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 외래 미토콘드리아가 전달된 NK 세포의 항암 활성 변화를 K562에 대한 세포독성 분석법(cytotoxicity assay)으로 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 탯줄 유래 중간엽 줄기세포 미토콘드리아가 NK 세포로 전달되었는지 여부를 FACS로 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 탯줄 유래 중간엽 줄기세포 미토콘드리아가 전달된 NK 세포의 항암 활성 변화를 K562에 대한 세포독성 분석법으로 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 8a 내지 도 8c는 급성 골수성 백혈병 동물모델에서 탯줄 유래 중간엽 줄기세포 미토콘드리아가 전달된 NK 세포의 치료효과를 마우스의 체중 및 생존율로 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 9는 탯줄 유래 중간엽 줄기세포 유래 미토콘드리아가 전달된 NK 세포가 투여된 급성 골수성 백혈병 동물모델의 혈액 내 종양 표지자 발현 분포 결과를 나타낸 것이다.

도 10은 외래 미토콘드리아가 전달된 말초혈액 단핵세포(이하, PBMC라고 함)의 항암 활성 변화를 K562 세포독성 분석법으로 분석한 결과를 나타낸 것이다.

【발명의 실시를 위한 최선의 형태】

이하, 본 발명에 대하여 상세히 설명하도록 한다.

본 발명의 일 측면은 외래 미토콘드리아를 포함하는 NK 세포를 제공한다.

본 발명에서 사용한 용어 "외래 미토콘드리아"는 NK 세포내에 존재하는

미토콘드리아가 아닌 외부에서 도입된 미토콘드리아를 의미한다. 이때, 외래 미토콘드리아는 NK 세포를 수득한 개체와 동일한 개체에서 수득된 것일 수 있으나, 다른 개체에서 수득된 것일 수 있다. 이때, 상기 외래 미토콘드리아는 포유동물로부터 수득된 것일 수 있으며, 바람직하게는 인간으로부터 수득된 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 외래 미토콘드리아는 근육세포, 간세포, 섬유아세포, 상피세포, 신경세포, 지방세포, 골세포, 백혈구, 림프구 또는 점막세포에서 수득되며, 바람직하게는, 미토콘드리아 활성이 뛰어난 근육세포로부터 수득될 수 있다. 또한, 상기 미토콘드리아는 체외에서 배양된 세포에서 수득된 것일 수 있다.

한편, 외래 미토콘드리아는 상기 세포를 파쇄하여 원심분리를 통하여 미토콘드리아를 수득하거나, 상기 세포를 배양한 후 세포를 파쇄하여 원심분리를 통하여 미토콘드리아를 수득할 수 있다. 미토콘드리아를 수득하는 방법은 종래 세포 소기관을 수거하는데 이용되는 방법을 이용할 수 있다.

이때, 외래 미토콘드리아를 포함하는 NK 세포는 10^5개 NK 세포당 0.01 내지 500 ㎍, 0.1 내지 450 ㎍, 0.5 내지 300 ㎍, 1 내지 100 ㎍, 또는 2 내지 10 ㎍의 미토콘드리아를 도입시켜 수득한 것일 수 있다. 이때, 상기 NK 세포는 1 내지 10^3개, 10 내지 10^2개의 외래 미토콘드리아를 포함할 수 있다. 구체적으로, 외래 미토콘드리아의 수는 한 개의 NK 세포 내에 대략 1, 10, 100 또는 500개 정도가 포함될 수 있다. 이때, 외래 미토콘드리아의 수는 NK 세포에 외래 미토콘드리아를 도입시, 도입시키는 미토콘드리아의 양을 조절함으로써, NK에 포함되는 외래 미토콘드리아의 수를 조절할 수 있다. 개개의 NK 세포마다 포함하는 외래 미토콘드리아의 수는 상이할 수 있다.

또한, 상기 NK 세포는 포유동물 또는 인간에서 유래하는 것일 수 있다. 바람직하게는 NK 세포 치료를 받고자 하는 개체에서 수득한 것일 수 있다. 이때, 상기 NK 세포는 개체의 혈액에서 직접 분리하여 사용하거나, 개체에서 수득한 미성숙 NK 세포 또는 줄기세포를 분화시켜 사용할 수 있다.

한편, 상기 외래 미토콘드리아를 NK 세포에 도입하기 위하여, 외래 미토콘드리아와 NK 세포를 혼합한 후 원심분리하여 NK 세포에 미토콘드리아를 전달할 수 있다. 원심분리시의 조건은 세포를 손상시키지 않고 미토콘드리아를 효율적으로 도입하기 위하여 적절히 조절될 수 있다. 이때, 상기 원심분리는 실온에서 수행될 수 있으며, 세포의 안정성을 위해서 온도 조건은 적절히 선택될 수 있다. 이때, 외래 미토콘드리아를 도입할 때에, 계면활성제 존재하에 NK 세포와 외래 미토콘드리아를 혼합하여 NK 세포의 막의 투과성을 증가시켜 외래 미토콘드리아의 도입 효율을 증가시킬 수 있다.

이때, 원심분리는 100×g, 300×g, 500×g, 800×g, 1,000×g, 1,200×g, 1,500×g, 1,800×g, 2,000×g, 2,400×g, 3,000×g, 5,000×g 또는 10,000×g에서 수행될 수 있다. 또한, 원심분리 시간은 0.1분 내지 60분일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 구체적으로, 1분, 2분, 3분, 5분, 10분, 20분 또는 30분일 수 있다. 또한, 상기 원심분리는 0 내지 40℃, 20 내지 38℃ 또는 30 내지 37℃의 온도에서 수행될 수 있다.

이와 같이 NK 세포와 외래 미토콘드리아에 함께 원심력을 가해줌으로써, NK 세포에 손상이 적게 발생하면서도 높은 효율로 미토콘드리아를 NK 세포로 전달시킬 수 있다.

또한, NK 세포의 세포막 투과성을 증진시키기 위해 계면활성제를 사용할 수 있다. 계면활성제의 첨가 시점은 NK 세포와 외래 미토콘드리아를 혼합하기 전, 혼합 시 또는 혼합 후에 첨가될 수 있다. 또한, 계면활성제를 NK 세포에 첨가한 후 NK 세포의 세포막 투과성을 높이기 위해 일정 시간 NK 세포를 인큐베이션할 수 있다. 인큐베이션 시간은 0.1 내지 60분일 수 있다. 구체적으로 1분, 5분, 10분, 20분 또는 30분일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

구체적으로, 상기 계면활성제는 비이온성 계면활성제인 것이 바람직하며, 폴록사머(poloxamers)일 수 있다. 이때 폴록사머는 폴리옥시에틸렌의 두 개의 친수성 사슬에 의해 옆으로 배치된 폴리옥시프로필렌의 중심 소수성 사슬로 구성된 삼블록 공중합체이다. 또한, 상기 혼합물에서 계면활성제의 농도는 1 내지 100 mg/ml, 3 내지 80 mg/ml 또는 5 내지 40 mg/ml 일 수 있으며, 바람직하게는 10 내지 30 mg/ml일 수 있다.

또한, 상기 혼합물을 소정의 시간 및 온도 조건으로 인큐베이션을 하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 인큐베이션은 0 내지 40℃ 또는 20 내지 38℃ 또는 30 내지 37℃의 온도에서 수행될 수 있다. 또한, 0.1 내지 4시간, 0.5 내지 3.8시간 또는 0.8 내지 3.5시간 동안 수행될 수 있다. 또한, 인큐베이션은 원심분리를 수행하여 NK 세포에 외래 미토콘드리아가 전달된 후에 소정의 시간 동안 수행될 수 있다. 또한, 인큐베이션 시간은 세포의 종류 및 미토콘드리아의 양에 따라 적절히 선택될 수 있다.

본 발명의 또 다른 측면은 외래 미토콘드리아를 포함하는 NK 세포를 유효성분으로 포함하는 암 또는 감염성 질환 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

이때, 상기 암은 위암, 간암, 폐암, 대장암, 유방암, 전립선암, 난소암, 췌장암, 자궁경부암, 갑상선암, 후두암, 급성 골수성 백혈병, 뇌종양, 신경모세포종, 망막모세포종, 두경부암, 침샘암 및 림프종으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다. 또한, 상기 감염성 질환은 B형 간염, C형 간염, 인간 파필로마 바이러스(human papilloma virus: HPV) 감염, 사이토메갈로바이러스(cytomegalovirus) 감염, 바이러스성 호흡기 질환, 및 인플루엔자로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다.

또한, 상기 약학적 조성물은 액상 또는 동결된 형태의 제제로 제조될 수 있다. 동결 후 다시 해동할 경우에도 세포의 기능이 손상되지 않고 높은 세포생존율과 세포살상능을 유지할 수 있다. 따라서, 추가적인 처리과정 없이도 액상 또는 동결 보관된 형태로 보관 및 공급이 용이할 수 있다.

또 다른 측면은 외래 미토콘드리아를 포함하는 NK 세포를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 질병을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

이러한 방법은 질병에 걸린 개체 또는 질병에 걸린 것으로 의심되는 개체에 본 발명의 NK 세포의 유효량을 투여하는 단계를 포함한다. 예를 들면, 외래 미토콘드리아가 도입된 세포를 개체, 바람직하게는 포유류에게 치료학적 제제로서 투여할 수 있다. 상기 세포는 정맥 내, 피하 경로로 투여될 수 있다. 본 발명의 조성물이 정맥 내, 피하, 눈(ophthalmic), 복강 내, 근육 내와 같이 비경구적으로 제공되는 경우, 조성물은 바람직하게는 수성(aqueous) 이거나 생리학적으로 적용 가능한 체액, 현탁액 또는 용액을 포함하는 것이 바람직하다. 이에 따라, 담체 또는

운반체(vehicle)가 생리학적으로 허용 가능하므로 조성물에 첨가하여 환자에게 전달될 수 있고, 이는 환자의 전해질에 악영향을 끼치지 않는다. 따라서, 제제를 위한 담체로서 일반적으로 생리식염수를 사용할 수 있다.

본 발명의 세포를 이용하여 질병을 예방 또는 치료하는 방법은 본 발명의 세포와 병용하여 질병의 예방 또는 치료 효과를 갖는 다른 약물 혹은 생리학적 활성물질을 투여하는 것도 포함할 수 있는데, 병용 투여의 경로, 투여시기, 및 투여용량은 질병의 종류, 환자의 질병 상태, 치료 또는 예방의 목적, 및 병용되는 다른 약물 혹은 생리학적 활성물질에 따라 결정될 수 있다.

또한, 상기 질병은 암 또는 감염성 질환일 수 있으며, 이때, 상기 암은 상술한 바와 같이, 위암, 간암, 폐암, 대장암, 유방암, 전립선암, 난소암, 췌장암, 자궁경부암, 갑상선암, 후두암, 급성 골수성 백혈병, 뇌종양, 신경모세포종, 망막모세포종, 두경부암, 침샘암 및 림프종으로 구성된 군에서 선택될 수 있다. 또한, 상기 감염성 질환은 B형 간염, C형 간염, 인간 파필로마 바이러스(human papilloma virus: HPV) 감염, 사이토메갈로바이러스(cytomegalovirus) 감염, 바이러스성 호흡기 질환, 및 인플루엔자로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다.

본 발명의 또 다른 측면은 외래 미토콘드리아를 포함하는 말초혈액 단핵세포를 제공하는 것이다.

본 발명에서 사용한 용어 "말초혈액 단핵세포"는 말초혈액단핵구 또는 PBMC로 지칭되며, 말초혈액 내 존재하는 구형 핵을 가진 세포를 의미한다. 이러한 PBMC에는 B 세포, T 세포, 대식세포, 수지상 세포, NK 세포 등의 면역세포들이 포함될 수 있다. 상기 PBMC는 개체의 혈액을 통하여 수득될 수 있다. 이때, 상기 외래

미토콘드리아는 상술한 바와 같이 개체의 조직이나 세포로부터 수득될 수 있다.

이때, 외래 미토콘드리아를 포함하는 PBMC 세포는 10^5개 PBMC 세포당 0.01 내지 500 ㎍, 0.1 내지 450 ㎍, 0.5 내지 300 ㎍, 1 내지 100 ㎍, 또는 2 내지 10 ㎍의 미토콘드리아를 도입시켜 수득한 것일 수 있다. 이때, 상기 외래 미토콘드리아는 단핵구 세포당 1 내지 10^3개가 포함될 수 있거나, 10 내지 100개가 포함될 수 있다. 또한, 외래 미토콘드리아를 PBMC에 도입하는 방법은 상술한 바와 같이, 원심분리를 통하여 수행할 수 있다. 본 발명의 또 다른 측면은 상기 외래 미토콘드리아를 포함하는 PBMC를 유효성분으로 포함하는 암 또는 감염성 질환 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

이때, 상기 암은 상술한 바와 같이, 위암, 간암, 폐암, 대장암, 유방암, 전립선암, 난소암, 췌장암, 자궁경부암, 갑상선암, 후두암, 급성 골수성 백혈병, 뇌종양, 신경모세포종, 망막 모세포종, 두경부암, 침샘암 및 림프종으로 구성된 군에서 선택될 수 있다. 또한, 상기 감염성 질환은 B형 간염, C형 간염, 인간 파필로마 바이러스(human papilloma virus: HPV) 감염, 사이토메갈로바이러스(cytomegalovirus) 감염, 바이러스성 호흡기 질환, 및 인플루엔자로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다.

이하, 본 발명을 하기 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

【발명의 실시를 위한 형태】

I. 외래 미토콘드리아가 도입된 NK 세포의 제작 및 기능 확인

실시예 1. 외래 미토콘드리아가 도입된 NK 세포의 제작

사람의 정상 간세포(WRL-68)(CRL1458, ATCC)를 10% 우태아혈청(Fetal Bovine Serum, FBS, Gibco), 100 μg/ml 스트렙토마이신 및 100 U/ml 암피실린을 함유하는 DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium)배지에 접종하고 72시가 동안 배양하였다. 배양이 종료된 후, DPBS (Dulbecco Phosphate Buffered Saline, Gibco)를 이용하여 2회 세척하였다. 세척된 세포는 0.25% Trypsin-EDTA (TE, Gibco)를 처리하여 세포를 획득하였다. 획득한 세포는 미토콘드리아를 추출하기 위하여, 혈구계산기를 이용하여 세포수를 측정하여 3×10^6 cells/ml 정도의 세포를 회수하였다.

이후, 상기 세포주를 약 4℃의 온도에서 10분 동안 350×g의 속도로 제 1차 원심분리를 수행하였고, 이때 얻어진 펠렛을 회수하여 버퍼 용액에 재현탁시켜 10 내지 15분 동안 균질화시켰다. 상기 펠렛을 포함하는 조성물을 약 4℃의 온도에서 3분동안 1,100×g의 속도로 제2차 원심분리시켜 상청액을 수득하였다. 이후, 상기 상청액을 약 4℃의 온도에서 15분 동안 12,000×g의 속도로 제3차 원심분리시켜 세포주로부터 미토콘드리아를 분리하였다.

분리된 미토콘드리아를, 별도의 인간 NK 세포 (NK92mi)(CRL2408, ATCC)에 $1X10^5$의 양으로 시험관에 주입하고, 약 4℃의 온도에서, 15분 동안 2,500×g의 속도로 원심 분리하였다. 상등액 제거 후, PBS로 세척하고 약 4℃의 온도에서, 5분 동안 원심분리 하였다. 같은 조건으로 세척은 2회 수행하였다. 이때, 분리된 미토콘드리아는 대상세포 1×10^5 개당 0.05, 0.05, 0.5 및 5 μg의 중량으로 전달되었다.

실시예 2. NK 세포 내로 사람 정상 간세포(WRL68) 유래 미토콘드리아 전달

유무 확인(PCR 분석 방법)

상기 실시예 1에서 회수된 NK 세포에서 전체 유전자를 추출하기 위해 DNA Purification Kit (NucleoSpin, Macherey-Nagel)를 이용하였다. 추출한 DNA에 WRL-68 미토콘드리아 특이 식별 프라이머(F: 5'-CTA TTC TCT GTT CTT TCA TGG-3'(서열번호 1), R: 5'-AAG TAT TTA TGG TAC CGT ACG-3' (서열번호 2))를 각각 혼합한 후 2X PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)와 3차 증류수를 넣고 전체 부피를 10 ㎕로 만들고 Veriti 96-well Thermal Cycler (Applied Biosystems)를 사용하여 원하는 DNA 부분을 증폭하였다.

PCR 반응을 수행하여 증폭된 DNA를 수득하였고, 이를 확인하기 위하여 1.5% 한천 아가로즈겔에서 전기영동 한 후, loading star (DYNE Bio, Seongnam, Korea)로 염색하고 UV-spectrometer (Chemi-Doc XRS, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 증폭된 DNA 밴드를 확인하였다. 하우스키핑(House keeping) 유전자로는 GAPDH를 선정하였고, 이를 위해 GAPDH를 증폭시킬 수 있는 프라이머(F- 5'- GGA AGG TGA AGG TCG GAG-3' (서열번호 3), R- 5'-GGC AAC AAT ATC CAC TTT ACC-3'(서열번호 4)를 사용하였다. 이를 도 1에 나타내었다.

도 1을 통해, NK 세포와 혼합한 미토콘드리아의 양(0.005, 0.05, 0.5 및 5 ㎍)이 증가함에 따라 NK 세포에 전달된 외래 미토콘드리아의 양이 증가함을 확인하였다.

실시예 3. NK 세포 내로 사람 정상 간세포(WRL68) 유래 미토콘드리아 전달 유무 확인(FACS 분석 방법)

NK 세포 내로 간세포로부터 유래한 미토콘드리아의 전달 여부를 확인하기

위하여 FACS(Fluorescence-activated cell sorter) 분석을 수행하였다. 간세포로부터 분리한 미토콘드리아에 500 nM Green mitotracker(Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)를 처리하여 37℃, 5% CO_2 배양기에서 10 분간 반응시키고 세척하였다. 원심분리 방법을 사용하여 형광을 표지한 간세포의 미토콘드리아를 면역세포에 전달한 후 1 mL PBS에 세포를 재현탁하였다. 이어, FACS Calibur flow cytometer (BDBiosciences, San Jose, CA, USA)를 사용하여 미토콘드리아 전달여부를 확인 및 분석하였다. 그 결과를 도 2에 나타내었다.

도 2를 통해, NK 세포로 전달된 미토콘드리아의 양(0.005, 0.05, 0.5 및 5 ㎍)에 따라 NK 세포가 구분될 수 있음을 확인하였다.

실시예 4. NK 세포 내로 사람 정상 간세포(WRL68) 유래 미토콘드리아 전달 유무 확인(형광현미경 관찰법)

인간 NK 세포(NK92mi) 내로 정상 간세포(WRL-68)로부터 유래한 미토콘드리아의 전달 여부를 확인하기 위하여 NK 세포의 미토콘드리아는 500 nM Green mitotracker (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)를 처리하여 37℃, 5% CO_2 배양기에서 10 분간 반응시켰다. 분리된 간세포 미토콘드리아는 500 nM red mitotracker를 처리하여 37℃, 5% CO_2 배양기에서 10 분간 반응 후 면역세포에 전달되었다. 미토콘드리아를 5 ㎍ 전달한 뒤, 24-well plate에 접종(seeding)시켜 37℃, 5% CO_2 인큐베이터에서 배양시킨 후 24시간 이내에 형광현미경 (Fluorescence microscopy)을 이용하여 세포내 전달 유무를 확인하였다. 대조염색 시약으로 핵염색용 DAPI 시약을 사용하였다. 그 결과를 도 3에 나타내었다.

도 3을 통해, 외래 미토콘드리아가 NK 세포 내로 전달된 것을 확인하였다.

실시예 5. 미토콘드리아가 전달된 NK 세포의 항암 활성 변화 분석(CD107a 탈과립 분석)

상기 실시예 1에서 회수한 외래 미토콘드리아가 도입된 인간 NK 세포에서, NK 세포 활성 지표인 CD107a 탈과립 발현 유무를 확인하기 위해 인간 NK 세포(NK92mi)와 표적세포(K562)를 10:1 비율로 혼합한 뒤 형광물질이 접합된 항-CD107a 처리하여 4시간 동안 공배양 하였다. 공배양 후 표면염색을 위해 항-CD56을 처리한 뒤 30분 동안 반응한 후 FACS (Fluorescence-activated cell sorter) 분석을 수행하였다. 그 결과를 도 4a 및 도 4b에 나타내었다.

도 4a 및 도 4b를 통해, NK 세포의 항암 활성이 외래 미토콘드리아의 양(0.05, 0.5 및 5 ㎍)에 따라 증가함을 확인하였다.

실시예 6. 미토콘드리아가 전달된 NK 세포의 항암 활성 변화 확인(K562 cytotoxicity assay)

상기 실시예 1에서 회수한 NK 세포의 항암활성을 확인하기 위해, 회수된 NK 세포를 녹색 형광 염색(CFSE, Invitrogen)이 표지된 표적세포(K562)와 10:1로 혼합한 뒤 37℃, 5%, CO^2 조건의 배양기에서 4시간 동안 공배양 하였다. 공배양 후, NK 세포에 의해 살해된 표적세포를 분석하기 위해 빨간색 형광 염색(7-AAD, Invitrogen)을 처리한 뒤 10분간 반응시켜 살해된 표적세포의 형광농도를 FACS (Fluorescence-activated cell sorter)로 분석하였다. 그 결과를 도 5에 나타내었다.

도 5를 통해, K562에 대한 세포독성은 전달된 외래 미토콘드리아의 양(0.05, 0.5 및 5 ㎍)에 따라 증가함을 확인하였다.

실시예 7. 탯줄 유래 중간엽 줄기세포의 미토콘드리아가 도입된 NK 세포 제작

태반(분당차병원으로부터 제공받음, IRB No, 1044308-201511-BR-022-02) 유래 중간엽 줄기세포를 10% 우태아혈청(Fetal Bovine Serum, FBS, Gibco), 100 ㎍/ml 스트렙토마이신 및 100 U/ml 암피실린을 함유하는 Alpha-MEM (Alpha-Minimum Essential Medium)배지에 접종하고 72시가 동안 배양하였다.

배양이 종료된 후, DPBS (Dulbecco Phosphate Buffered Saline, Gibco)를 이용하여 2회 세척하였다. 세척된 세포는 0.25% Trypsin-EDTA (TE, Gibco)를 처리하여 세포를 획득하였다. 획득한 세포는 미토콘드리아를 추출하기 위하여, 혈구계산기를 이용하여 세포수를 측정하여 2×10^7 cells/ml 정도의 세포를 회수하였다.

이후, 상기 세포주를 약 4℃의 온도에서 10분 동안 350×g의 속도로 제 1차 원심분리를 수행하였고, 이때 얻어진 펠렛을 회수하여 버퍼 용액에 재현탁시켜 10 내지 15분 동안 균질화시켰다. 상기 펠렛을 포함하는 조성물을 약 4℃의 온도에서 3분동안 1,100×g의 속도로 제2차 원심분리시켜 상청액을 수득하였다. 이후, 상기 상청액을 약 4℃의 온도에서 15분 동안 12,000×g의 속도로 제3차 원심분리시켜 세포주로부터 미토콘드리아를 분리하였다.

분리된 미토콘드리아를, 별도의 인간 NK 세포 (NK92mi)(CRL2408, ATCC)에 $1X10^5$의 양으로 시험관에 주입하고, 약 4℃의 온도에서, 15분동안 2,500×g의 속도로 원심 분리하였다. 상등액을 제거하고 PBS로 세척하고 약 4℃의 온도에서, 5분 동안 원심분리 하였다. 같은 조건으로 세척은 2회 수행하였다. 이때, 분리된 미토콘드리아는 대상세포 1×10^5 개당 0.3, 1, 3, 5 및 10 ㎍의 중량으로 전달되었다.

실시예 8. NK 세포 내로 탯줄 유래 중간엽 줄기세포(UC-MSC) 미토콘드리아

전달 유무 확인(FACS 분석방법)

NK 세포 내로 탯줄 유래 중간엽 줄기세포로부터 유래한 미토콘드리아의 전달 여부를 확인하기 위하여 FACS(Fluorescence-activated cell sorter) 분석을 수행하였다. 탯줄 유래 중간엽 줄기세포로부터 분리한 미토콘드리아에 500 nM Red mitotracker(Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)를 처리하여 37℃, 5% CO2 배양기에서 30 분간 반응시키고 세척하였다. 원심분리 방법을 사용하여 형광을 표지한 탯줄 유래 중간엽 줄기세포의 미토콘드리아를 면역세포에 전달한 후 1 mL PBS에 세포를 재현탁하였다. 이어, FACS Calibur flow cytometer (BDBiosciences, San Jose, CA, USA)를 사용하여 미토콘드리아 전달여부를 확인 및 분석하였다. 그 결과를 도 6에 나타내었다.

도 6을 통해, NK 세포 내로 전달된 UC-MSCs 유래 미토콘드리아의 양에(0.3, 1, 3, 5 및 10 ㎍) 따라 NK 세포가 구분될 수 있음을 확인하였다.

실시예 9. 탯줄 유래 중간엽 줄기세포(UC-MSC) 유래 미토콘드리아가 전달된 NK 세포의 항암 활성 변화 확인(K562 cytotoxicity assay)

상기 실시예 7에서 회수한 NK 세포의 항암활성을 확인하기 위해, 회수된 NK 세포를 녹색 형광 염색(CFSE, Invitrogen)이 표지된 표적세포(K562)와 10:1로 혼합한 뒤 37℃, 5%, CO2 조건의 배양기에서 4시간 동안 공배양 하였다. 공배양 후, NK 세포에 의해 살해된 표적세포를 분석하기 위해 빨간색 형광 염색(7-AAD, Invitrogen)을 처리한 뒤 10분간 반응시켜 살해된 표적세포의 형광농도를 FACS (Fluorescence-activated cell sorter)로 분석하였다. 그 결과를 도 7에 나타내었다.

도 7을 통해, K562에 대한 세포독성은 전달된 외래 미토콘드리아의 양(0.5, 1,

3, 5 및 10 ㎍)에 따라 증가함을 확인하였다.

실시예 10. 체중변화 및 생존율을 통한 급성 골수성 백혈병 치료 평가 확인

코아텍(Koatech Co., Ltd., Gyeonggi-do, Korea)으로부터 6주 내지 8주령의 수컷 NOD.cg-Prkdcscid IL2rgtm1Sug/JicKoat 마우스를 구입하였다. 구입한 마우스는 차의과학대학교 실험동물센터의 청정구역에서 적응기간을 거친 후 실험을 진행하였다. 적응기간 동안 마우스가 지내는 환경은 12시간 간격으로 낮과 밤이 조성되고, 23 ± 2℃의 실내 온도 및 40 내지 60%의 습도가 유지되었다. 이러한 적응기간을 7일 거친 후 실험에 투입되었다. 이렇게 준비된 마우스는 꼬리정맥(i.v., Intravenous injection)을 통해 K562 세포를 $2X10^5$ cells/100 ㎕로 투여하여 급성 골수성 백혈병 모델을 제작하였다.

이때, 급성 골수성 백혈병이 유발된 마우스의 꼬리정맥(i.v., Intravenous injection)으로 실시예 7에 따라 제작된 NK 세포(NK92mi)를 $2X10^6$ cells/100 ㎕로 투여하여 실험군을 제작하였으며, 동일한 방법으로 미토콘드리아 전달되지 않은 일반 NK 세포(NK92mi)를 $2X10^6$ cells/100 ㎕로 투여하여 대조군을 제작하였다. 급성 골수성 백혈병 세포주(K562)가 투여된 시점부터 24일 동안 실험군과 대조군의 체중변화 및 생존율을 분석하였다. 그 결과를 도 8a 내지 도 8c에 나타내었다.

도 8a 내지 도 8c를 통해, 탯줄 유래 중간엽 줄기세포 미토콘드리아가 전달된 NK 세포를 투여한 군은 미토콘드리아가 전달되지 않은 일반 NK 세포를 투여한 군과 비교할 때 약 5% 체중이 증가하였으며, 생존율은 약 40%이상 증가함을 확인하였다.

실시예 11. 종양 관련 표지자 분석을 통한 급성 골수성 백혈병 치료 평가 확인

종양 관련 표지자인 p53과 c-Myc의 발현 분포를 확인하기 위해 실시예 10에 따라 수행된 실험군과 대조군의 혈액을 채취한 뒤 12,000×g에서 15분동안 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 이때 분리된 혈청은 Western Blot Kit (WB, Bio-rad)를 이용하여 p53과 c-Myc의 발현 분포를 분석하였다. 그 결과를 도 9에 나타내었다.

도 9를 통해, 탯줄 유래 중간엽 줄기세포 유래 미토콘드리아가 전달된 NK 세포가 투여된 군의 혈액 내 종양 표지자인 c-Myc의 발현이 감소하였으며, p53의 발현이 증가함을 확인하였다.

II. 외래 미토콘드리아가 도입된 PBMC 제작 및 기능 확인

실시예 12. 외래 미토콘드리아가 도입된 PBMC 제작

팰콘 튜브에 임상의(차병원)가 채취한 발명자의 말초혈액에 Ficoll-Paque (Amersham Biosciences)를 1:1로 처리한 뒤 400×g에서 35분 동안 원심분리하여 PBMC 펠렛을 회수하였다. 회수한 PBMC는 PBS를 이용하여 2회 세척한 뒤 실시예 1에 따라 분리된 인간 간세포(WRL-68) 유래 미토콘드리아를 대상세포 1×10^5 개당 0.05, 0.05, 0.5 및 5 μg의 중량으로 전달되었다.

실시예 13. 미토콘드리아가 전달된 PBMC의 항암 활성 변화 확인 (K562 cytotoxicity assay)

상기 실시예 12에서 회수한 PBMC의 항암활성을 확인하기 위해, 회수된 PBMC 세포를 녹색 형광 염색(CFSE, Invitrogen)이 표지된 표적세포(K562)와 10:1로 혼합한 뒤 37℃의 온도로 5% CO_2 조건의 배양기에서 4시간 동안 공배양 하였다. 공배양 후, NK 세포에 의해 살해된 표적세포를 분석하기 위해 빨간색 형광

염색(7-AAD, Invitrogen)을 처리한 뒤 10분간 반응시켜 살해된 표적세포의 형광농도를 FACS (Fluorescence-activated cell sorter)로 분석하였다. 그 결과를 도 10에 나타내었다.

도 10을 통해, K562에 대한 세포독성은 전달된 외래 미토콘드리아의 양(0.005, 0.05 및 0.5 μg)에 따라 증가함을 확인하였다.

【청구의 범위】

【청구항 1】

외래 미토콘드리아를 포함하는 자연살해세포.

【청구항 2】

제1항에 있어서,

상기 외래 미토콘드리아가 근육세포, 간세포, 섬유아세포, 상피세포, 신경세포, 지방세포, 골세포, 백혈구, 림프구 또는 점막세포에서 수득되는, 자연살해세포.

【청구항 3】

제1항에 있어서,

상기 외래 미토콘드리아가 자연살해세포당 1 내지 10^3개가 포함되는, 자연살해세포.

【청구항 4】

제1항에 있어서,

상기 외래 미토콘드리아와 자연살해세포가 혼합된 조성물을 원심분리하여, 외래 미토콘드리아가 자연살해세포 내로 전달된 것인, 자연살해세포.

【청구항 5】

제1항의 자연살해세포를 유효성분으로 포함하는 암 또는 감염성 질환 치료용 약학적 조성물.

【청구항 6】

제5항에 있어서,

상기 암이 위암, 간암, 폐암, 대장암, 유방암, 전립선암, 난소암, 췌장암,

자궁경부암, 갑상선암, 후두암, 급성 골수성 백혈병, 뇌종양, 신경모세포종, 망막모세포종, 두경부암, 침샘암 및 림프종으로 구성된 군에서 선택되는 것인, 약학적 조성물.

【청구항 7】

제5항에 있어서,

상기 감염성 질환이 B형 간염, C형 간염, 인간 파필로마 바이러스(human papilloma virus: HPV) 감염, 사이토메갈로바이러스(cytomegalovirus) 감염, 바이러스성 호흡기 질환, 및 인플루엔자로 구성된 군에서 선택되는 것인, 약학적 조성물.

【청구항 8】

제5항에 있어서,

상기 조성물이 액상 또는 동결된 형태인, 약학적 조성물.

【청구항 9】

제1항의 자연살해세포를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 질병을 예방 또는 치료하는 방법.

【청구항 10】

제9항에 있어서,

상기 조성물의 투여경로가 정맥 내, 피하, 눈, 복강 내, 근육 내로 구성된 군에서 선택되는 것인, 질병을 예방 또는 치료하는 방법.

【청구항 11】

제9항에 있어서,

상기 방법이 상기 세포와 병용하여 질병의 예방 또는 치료 효과를 갖는 다른 약물 혹은 생리학적 활성 물질을 투여하는 것을 포함하는, 질병을 예방 또는 치료하는 방법.

【청구항 12】

외래 미토콘드리아를 포함하는 말초혈액 단핵세포.

【청구항 13】

제12항에 있어서,

상기 외래 미토콘드리아가 근육세포, 간세포, 섬유아세포, 상피세포, 신경세포, 지방세포, 골세포, 백혈구, 림프구 또는 점막세포에서 수득되는, 말초혈액 단핵세포.

【청구항 14】

제12항에 있어서,

상기 외래 미토콘드리아가 자연살해세포당 1 내지 10^3개인, 말초혈액 단핵세포.

【청구항 15】

제12항의 말초혈액 단핵세포를 포함하는 암 또는 감염성 질환 치료용 약학적 조성물.

【청구항 16】

제15항에 있어서,

상기 암이 위암, 간암, 폐암, 대장암, 유방암, 전립선암, 난소암, 췌장암, 자궁경부암, 갑상선암, 후두암, 급성 골수성 백혈병, 뇌종양, 신경모세포종, 망막모세포종, 두경부암, 침샘암 및 림프종으로 구성된 군에서 선택되는 것인, 약학적

조성물.

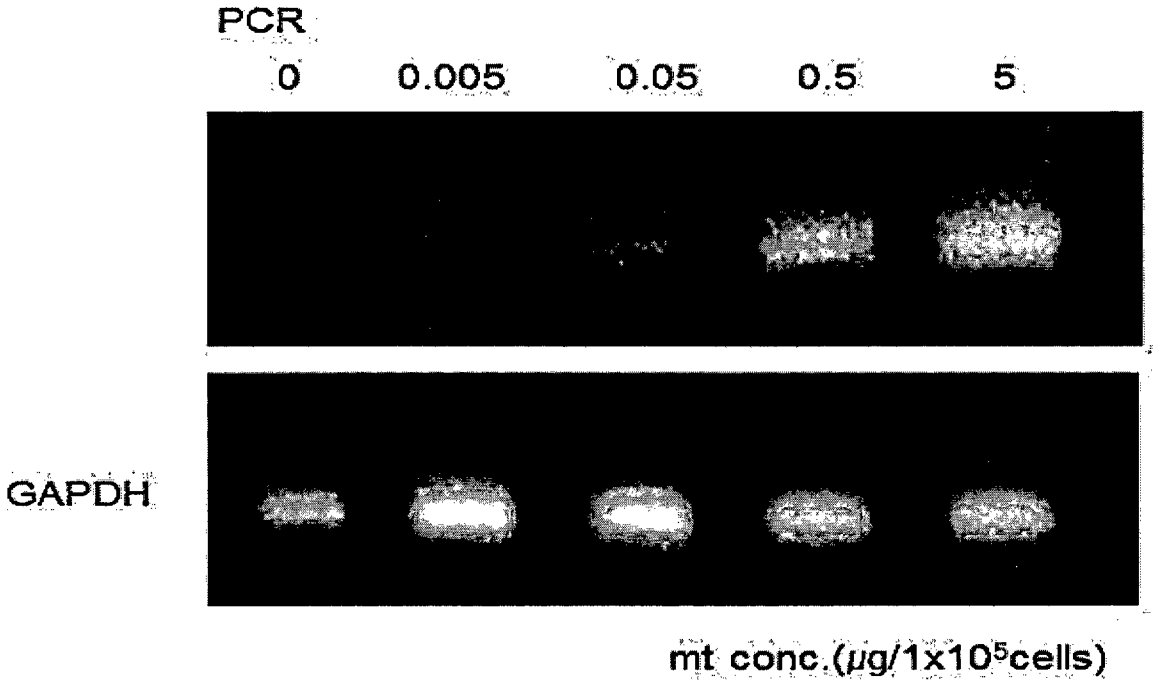
【청구항 17】

제15항에 있어서,

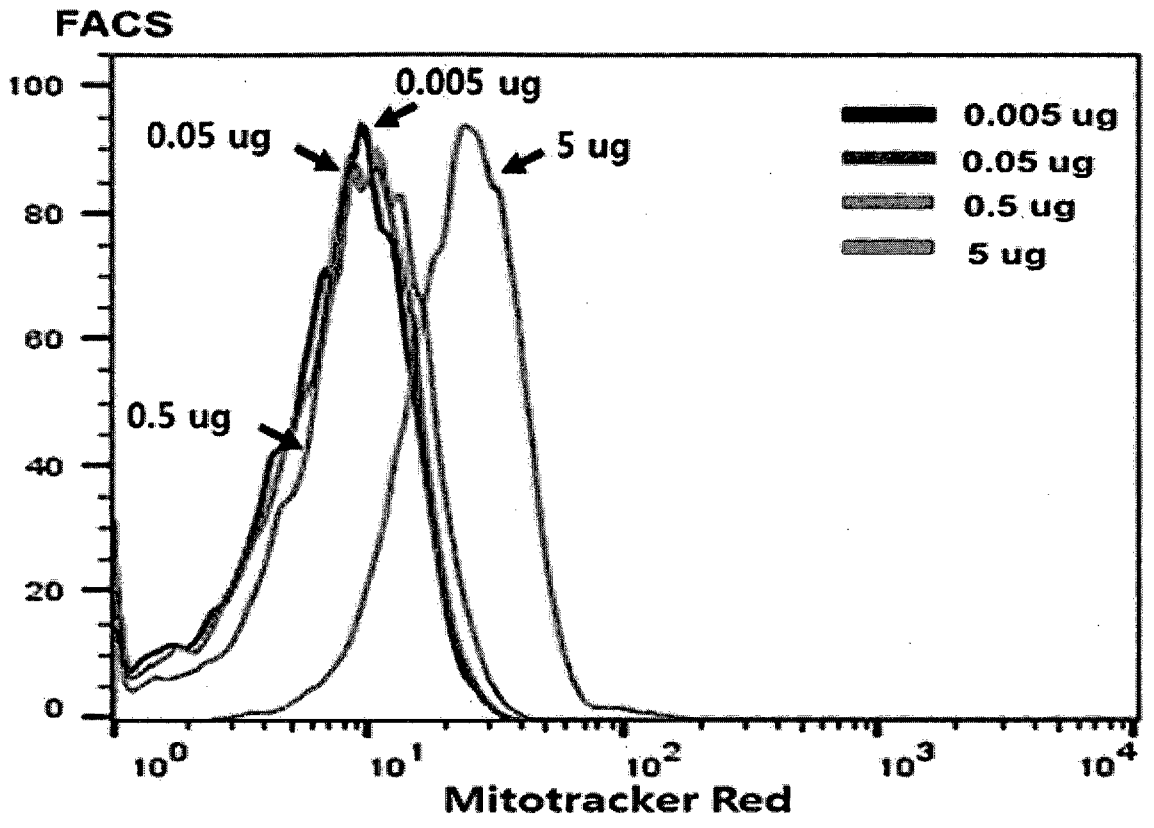
상기 감염성 질환이 B형 간염, C형 간염, 인간 파필로마 바이러스(human papilloma virus: HPV) 감염, 사이토메갈로바이러스(cytomegalovirus) 감염, 바이러스성 호흡기 질환, 및 인플루엔자로 구성된 군에서 선택되는 것인, 약학적 조성물.

【도면】

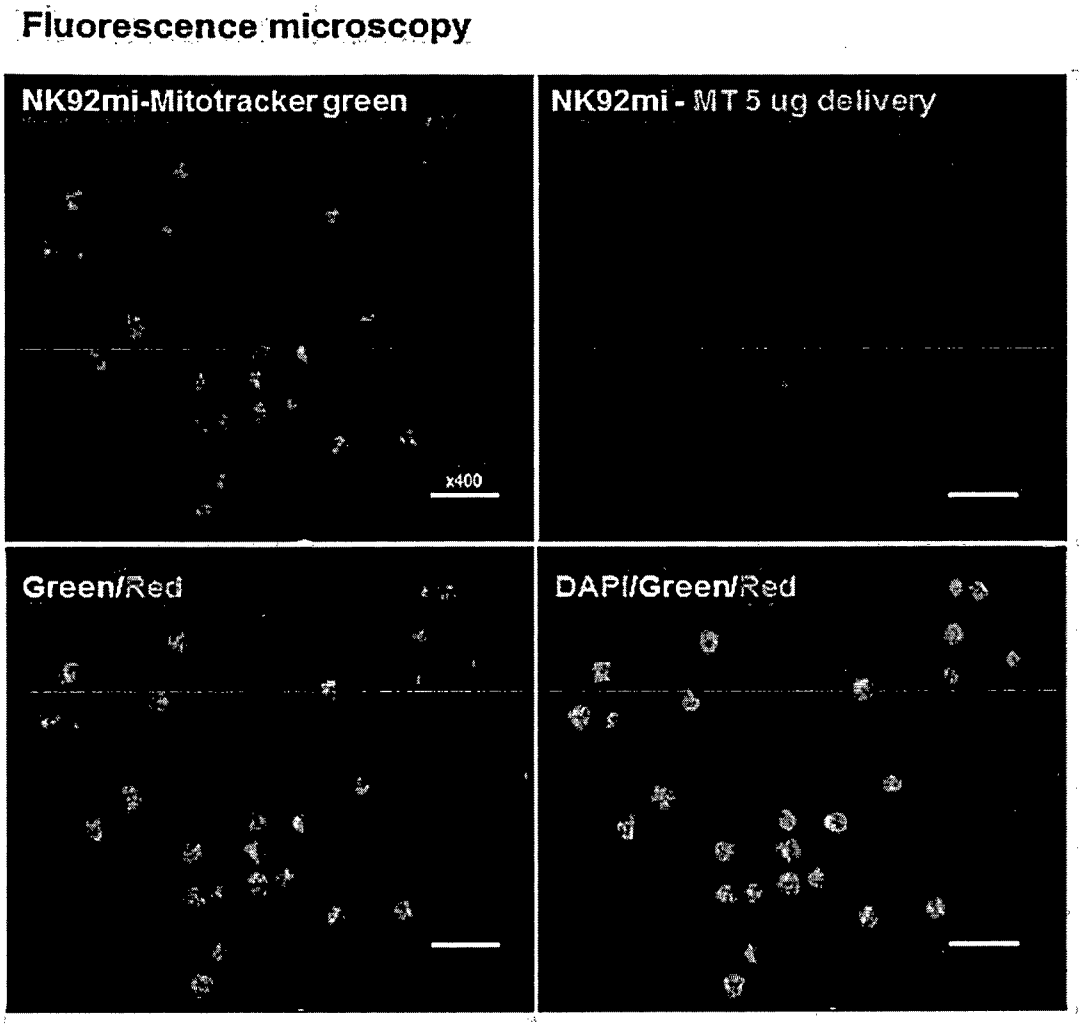
【도 1】



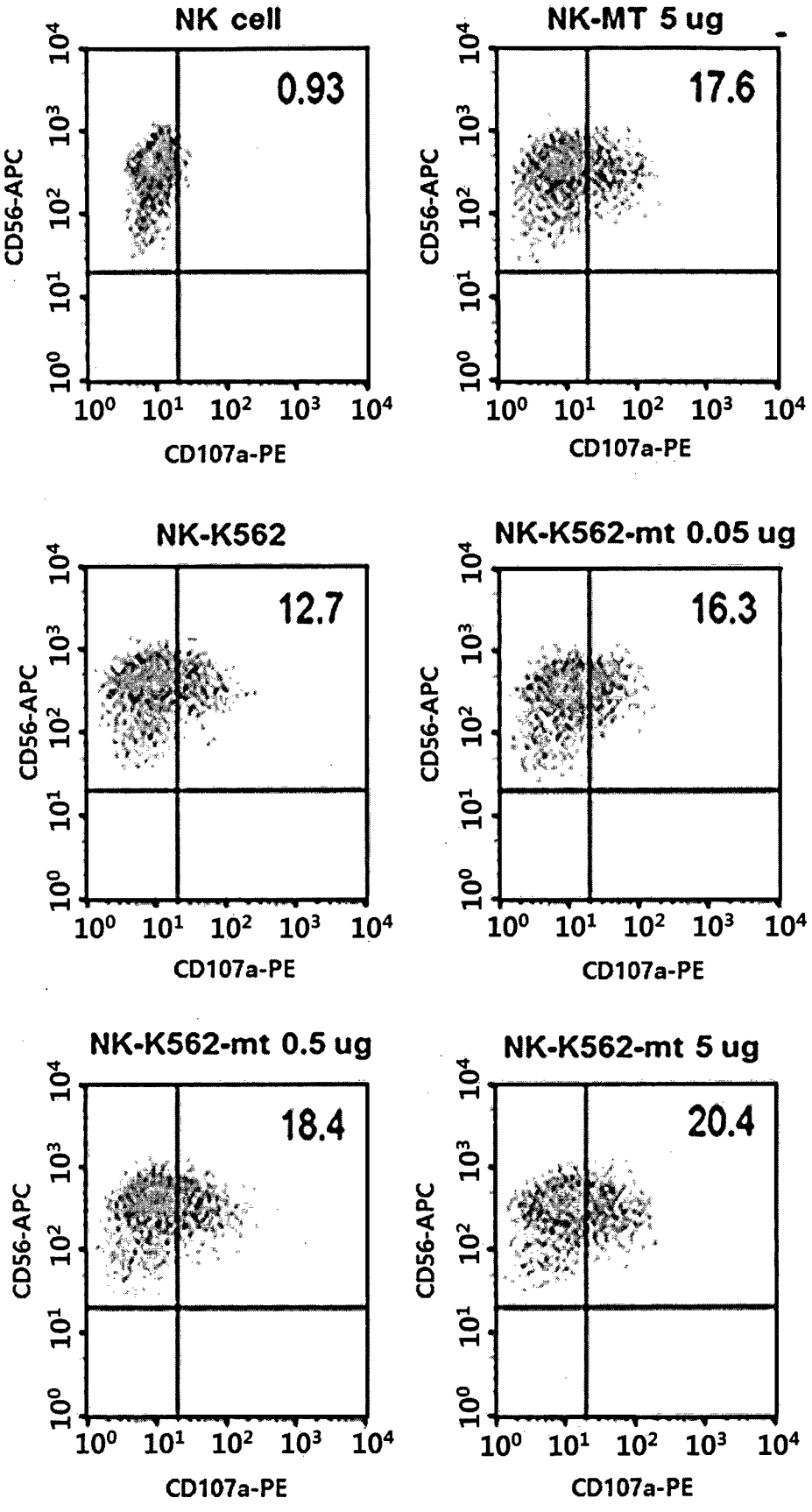
【도 2】


FACS
100
80
60
40
20
0
0.005 ug
0.05 ug
5 ug
0.5 ug
0.005 ug
0.05 ug
0.5 ug
5 ug
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
Mitotracker Red

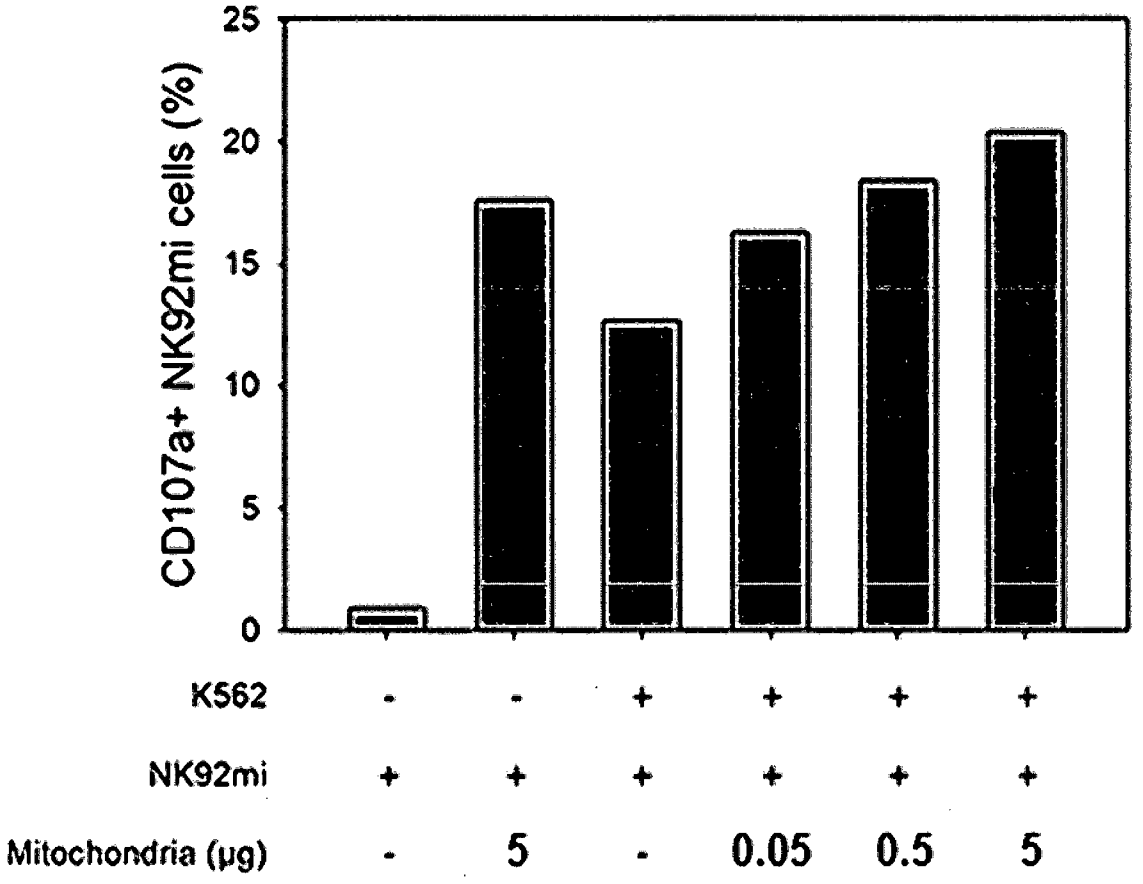
【도 3】


Fluorescence microscopy
NK92mi-Mitotracker green
x400
NK92mi - MT 5 ug delivery
Green/Red
DAPI/Green/Red

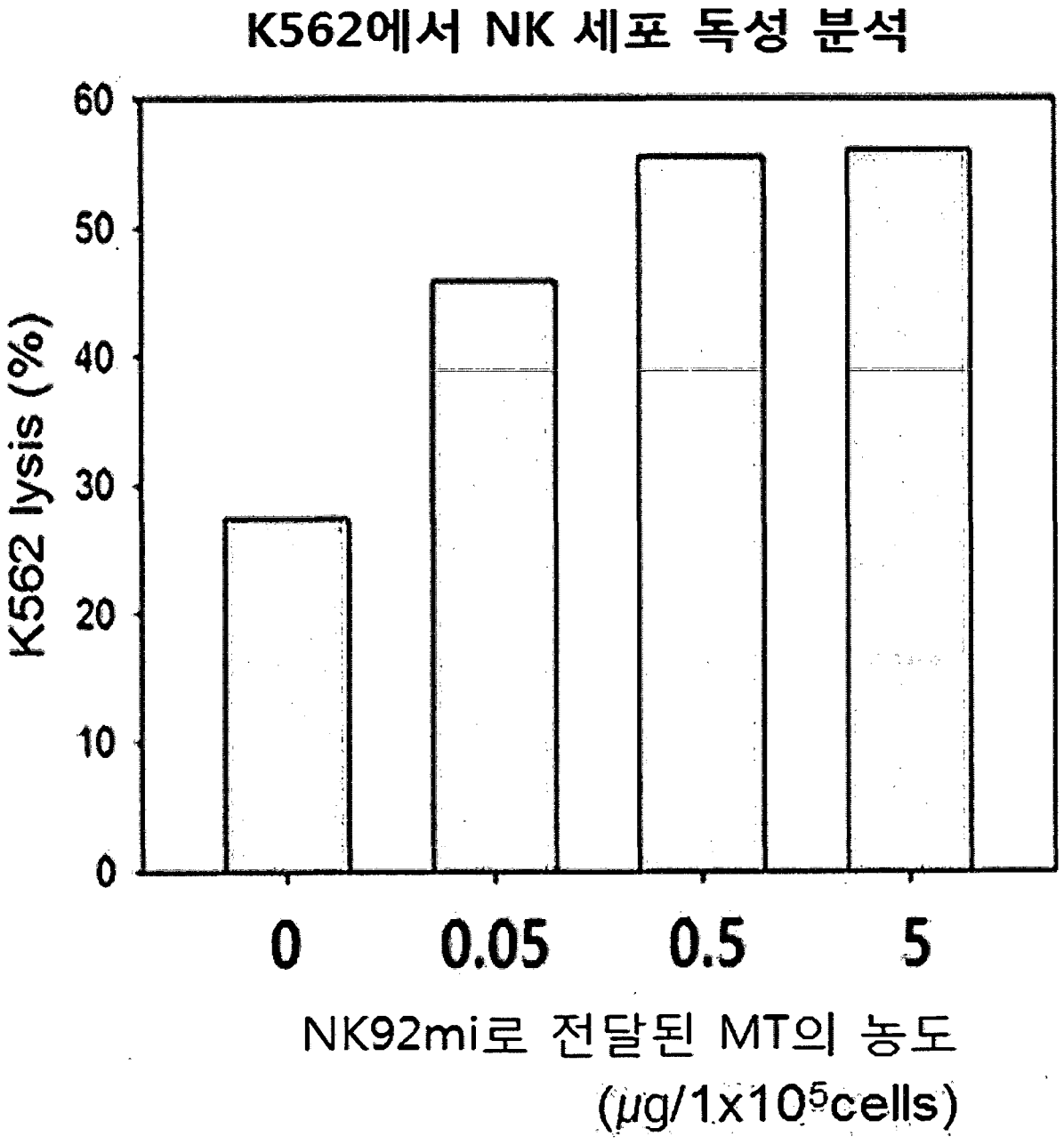
【도 4a】


NK cell
0.93
NK-MT 5 ug
17.6
NK-K562
12.7
NK-K562-mt 0.05 ug
16.3
NK-K562-mt 0.5 ug
18.4
NK-K562-mt 5 ug
20.4
CD56-APC
CD107a-PE
10^0 10^1 10^2 10^3 10^4

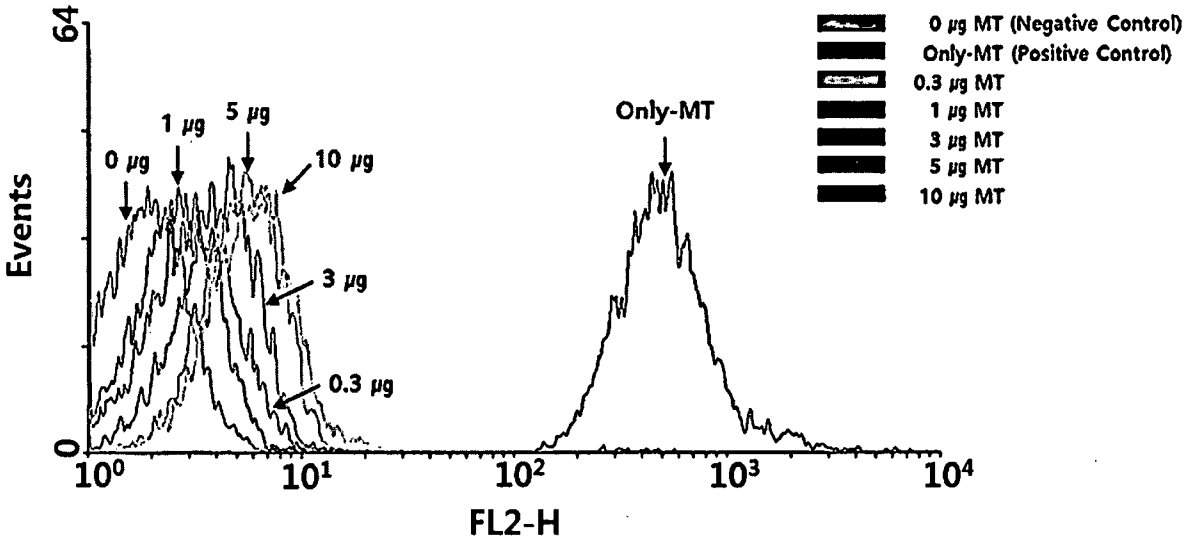
【도 4b】


CD107a+ NK92mi cells (%)
25
20
15
10
5
0
K562 - - + + + +
NK92mi + + + + + +
Mitochondria (μg) - 5 - 0.05 0.5 5

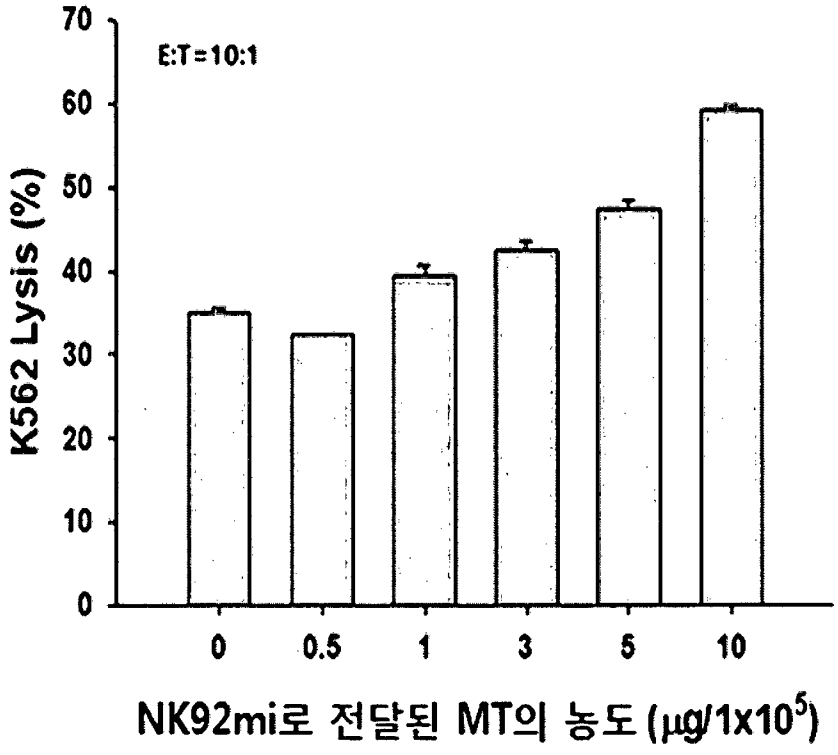
【도 5】


K562에서 NK 세포 독성 분석
K562 lysis (%)
60
50
40
30
20
10
0
0
0.05
0.5
5
NK92mi로 전달된 MT의 농도
(μg/1x10⁵cells)

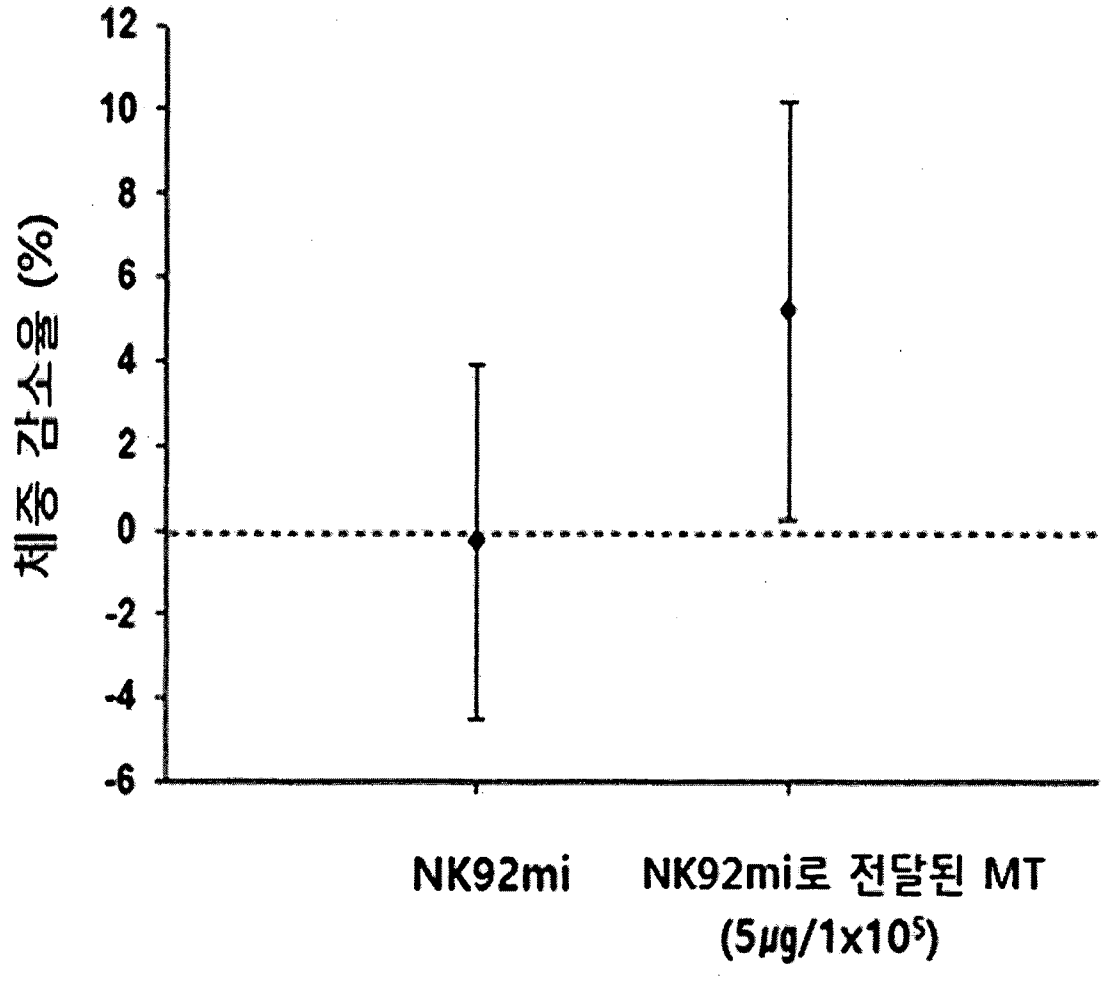
【도 6】


64
Events
0
0 μg
1 μg
5 μg
10 μg
3 μg
0.3 μg
Only-MT
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
FL2-H
0 μg MT (Negative Control)
Only-MT (Positive Control)
0.3 μg MT
1 μg MT
3 μg MT
5 μg MT
10 μg MT

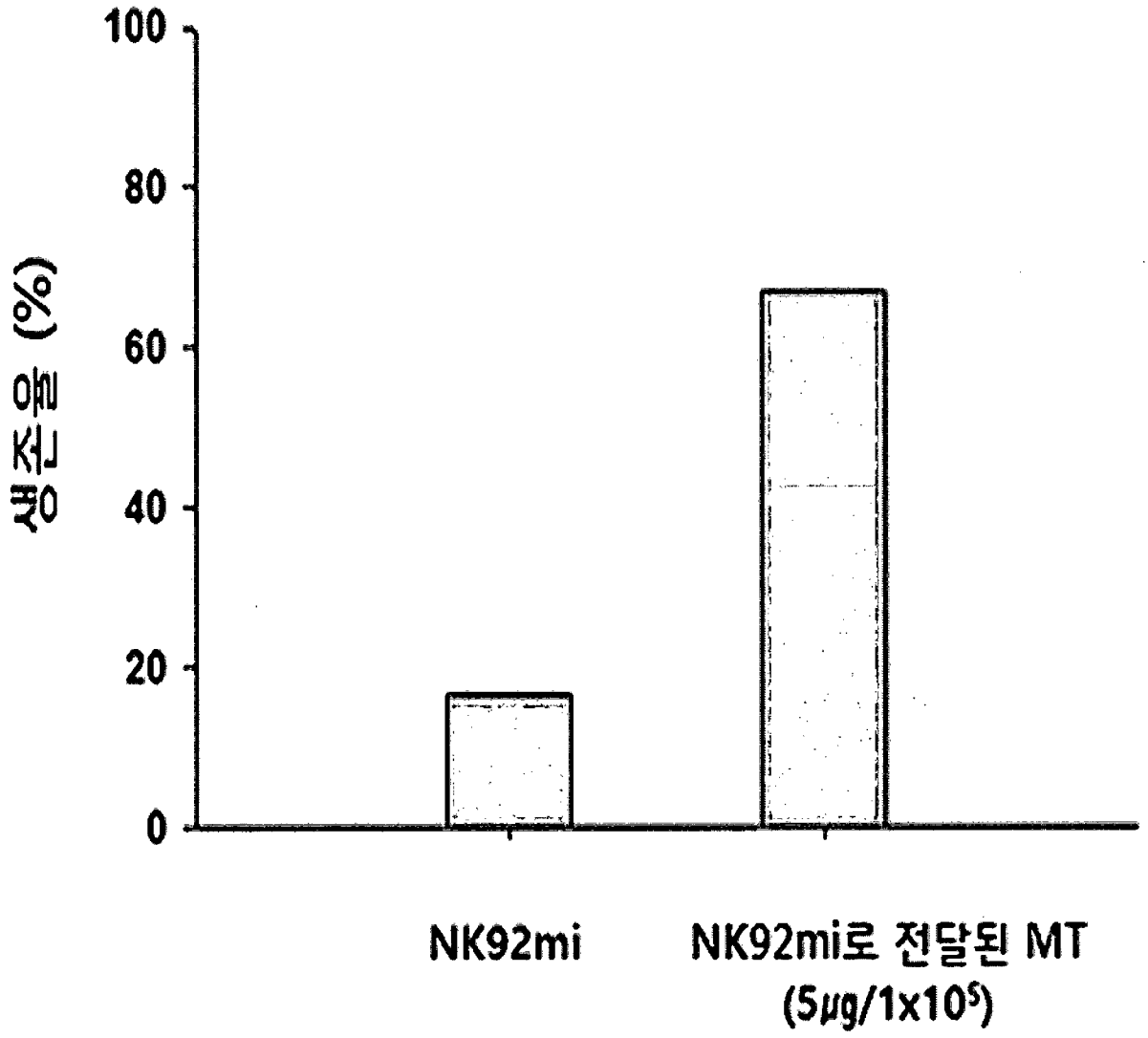
【도 7】


E:T=10:1
K562 Lysis (%)
70
60
50
40
30
20
10
0
0
0.5
1
3
5
10
NK92mi로 전달된 MT의 농도 (μg/1x10^5)

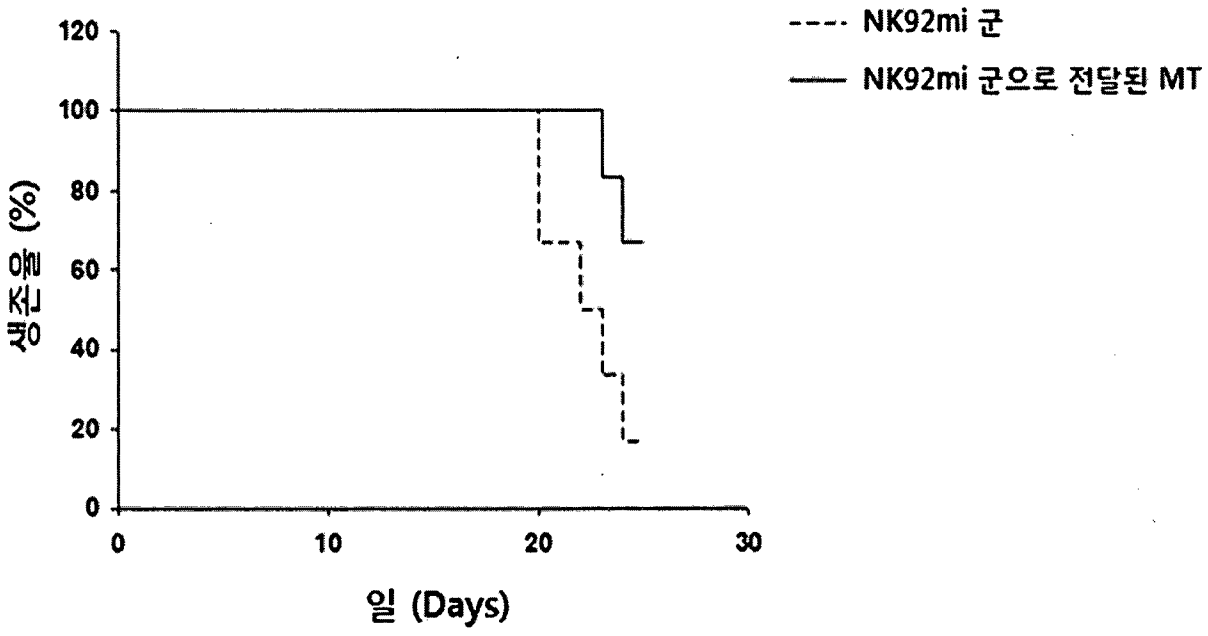
【도 8a】



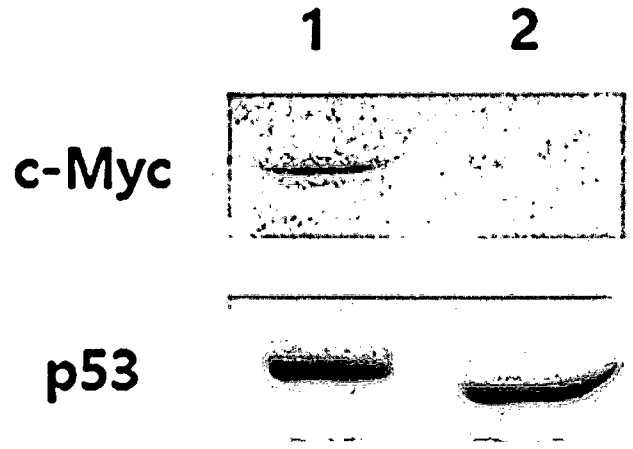
【도 8b】



【도 8c】


NK92mi 군
NK92mi 군으로 전달된 MT
생존율 (%)
120
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
일 (Days)

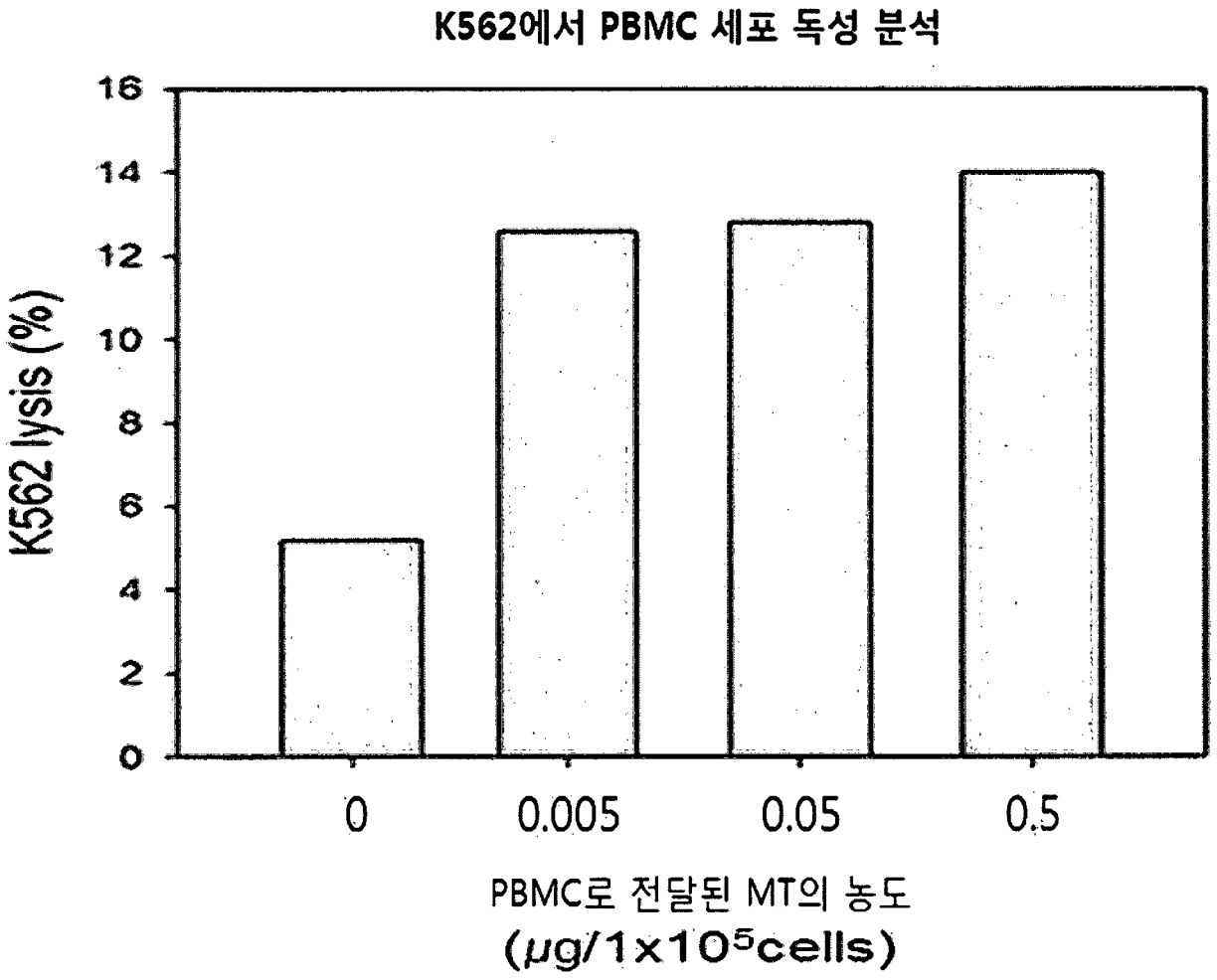
【도 9】



1: NK92mi 군

2: NK92mi(5μg/1x10^5) 군으로 전달된 MT

【도 10】


K562에서 PBMC 세포 독성 분석
K562 lysis (%)
16
14
12
10
8
6
4
2
0
0
0.005
0.05
0.5
PBMC로 전달된 MT의 농도
(μg/1x10⁵cells)