



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0084323
(43) 공개일자 2016년07월13일

- | | |
|---|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/53 (2006.01) G01N 33/535 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
G01N 33/53 (2013.01)
G01N 33/535 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2016-0001253</p> <p>(22) 출원일자 2016년01월05일
심사청구일자 2016년01월05일</p> <p>(30) 우선권주장
1020150000901 2015년01월05일 대한민국(KR)</p> | <p>(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)</p> <p>(72) 발명자
강희정
서울특별시 강동구 동남로79길 26 (고덕동, 고덕아이파크 106동 901호)</p> <p>(74) 대리인
특허법인 천지</p> |
|---|---|

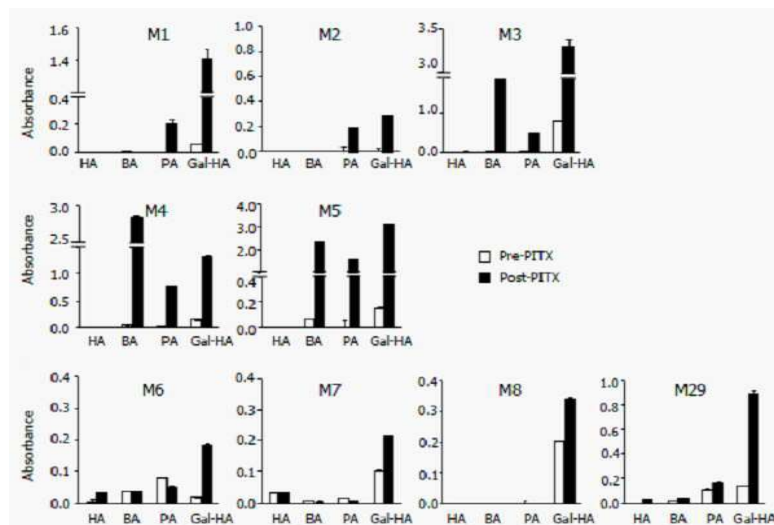
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 이중 알부민을 이용한 장기 이식 거부반응 검사용 키트

(57) 요약

본 발명은 본 발명은 이중장기의 장기 이식에 따른 이식 거부반응을 효과적으로 측정하는 이중 알부민을 이용한 장기 이식 거부반응 검사용 키트, 구체적으로 기존 이중장기의 장기 이식에 따른 이식 거부반응의 원인으로 알려진 당단백질인 gal- α -1,3-gal에 대한 항체에 의한 항원항체반응이 아닌 이중 단백질인 이중 알부민에 대한 항체에 의한 항원항체반응을 측정하여, 보다 효과적으로 이중장기의 장기 이식에 따른 이식 거부반응을 예측할 수 있는 검사용 키트에 관한 것이다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

G01N 33/6854 (2013.01)

G01N 2333/765 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI13C-2363-050014

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 2단계바이오이종장기개발사업

연구과제명 체액성 거부반응 제어 및 임상적 평가를 위한 체외진단검사 기술 개발

기 여 율 1/1

주관기관 한림대학교 산학협력단

연구기간 2013.12.01 ~ 2015.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

이종장기의 장기 이식에 따른 이종 항체에 의한 이식 거부반응을 항-이종알부민 항체반응을 측정하여 확인하는 검사용 키트에 관한 것으로,

상기 검사용 키트는 돼지 유래 알부민 및 소 유래 알부민으로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상의 이종 알부민을 항원으로 포함하는 것인 이종장기의 장기 이식에 따른 이식 거부반응을 측정하는 이종 알부민을 이용한 장기 이식 거부반응 검사용 키트.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 이종 알부민은 돼지 유래 알부민 또는 소 유래 알부민인 것을 특징으로 하는 이종장기의 장기 이식에 따른 이식 거부반응을 측정하는 이종 알부민을 이용한 장기 이식 거부반응 검사용 키트.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 이종 알부민은 돼지 유래 알부민인 것을 특징으로 하는 이종장기의 장기 이식에 따른 이식 거부반응을 측정하는 이종 알부민을 이용한 장기 이식 거부반응 검사용 키트.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 이종 알부민은 상기 이종 알부민을 포함하는 항원액인 것을 특징으로 하는 이종장기의 장기 이식에 따른 이식 거부반응을 측정하는 이종 알부민을 이용한 장기 이식 거부반응 검사용 키트.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 이종 알부민은 상기 이종 알부민을 포함하는 기관 또는 멤브레인에 코팅된 것을 특징으로 하는 이종장기의 장기 이식에 따른 이식 거부반응을 측정하는 이종 알부민을 이용한 장기 이식 거부반응 검사용 키트.

청구항 6

돼지 유래 알부민 및 소 유래 알부민으로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상의 이종 알부민을 포함한 항원을 포함하고;

상기 이종 알부민에 대한 항원항체반응을 측정할 수 있는;

이종장기의 장기 이식에 따른 이식 거부반응을 측정하는 이종 알부민을 이용한 장기 이식 거부반응 검사용 키트.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 이종 알부민을 이용한 장기 이식 거부반응 검사용 키트는 효소면역분석법(Enzyme-linked Immunosorbent assay, ELISA)을 수행하기 위한 검사용 키트인 것을 특징으로 하는 이종장기의 장기 이식에 따른 이식 거부반응을 측정하는 이종 알부민을 이용한 장기 이식 거부반응 검사용 키트.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 장기 이식 거부반응 검사용 키트, 구체적으로 이종장기의 장기 이식에 따른 이종 항체에 의한 이식 거부반응을 이종장기의 수여자의 이종 알부민에 대한 항원항체반응 즉, 돼지 알부민에 대한 항원항체반응을 측정함으로써 이종장기의 장기 이식 거부반응 여부를 측정할 수 있는 검사용 키트에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 다양한 질환에 있어서, 장기이식은 임상적으로 효과적인 치료법으로 받아들여지고 있으나, 장기의 제한적 공급은 임상적 치료에 있어서, 가장 심각한 제한요소로 작용되고 있다. 이러한 측면에서, 이종장기는 차후 부족한 공여장기를 대체할 새로운 신기술로 받아들여지고 있으며, 특히 돼지의 장기는 손쉽게 활용가능하고 개념적으로 거의 제한이 없는 대체제로 받아들여지고 있다. 이 중 돼지의 체도를 이용한 이종체도이식은 가장 임상적용이 근접한 연구분야로 확인되고 있다. 그러나, 이종장기를 이용한 장기이식의 임상활용에 있어서, 아직 많은 장벽이 존재하고 있으며, 특히 면역학적 장벽이 존재하고 있다.

[0003] 이와 관련하여, 기존에는 1,3-알파갈락토오스 전달효소(α -1,3-galactosyltransferase, α -1,3-gal)에 의해 만들어진 당단백질인 gal- α -1,3-gal(Gal α -1,3 Gal, α -Gal)에 대한 항체 즉, 항-알파갈 항체(Anti-Gal)는 이종장기 이식 후 인간이 아닌 영장류 실험동물에서의 초급성 거부반응(hyperacute rejection)의 원인이 되는 것으로 보고되고 있다. 그리고, 이는 α -1,3-galactosyltransferase의 합성효소를 유전적으로 결여시킨 돼지의 장기를 이용함으로써 극복할 수 있는 것으로 보고되고 있다. 상기 항-알파갈 항체(Anti-Gal)는 인간의 다양한 항체 즉, IgM, IgG 및 IgA isotype에서 확인되었다.

[0004] 상기 α -Gal은 영장류 이하의 하등동물에서 확인되는 단백질로, 하등동물의 장기 즉, 이종장기를 이식하는 경우, 영장류에서 거부반응을 일으키는 원인이므로, 상기 α -Gal에 대한 거부반응을 측정하는 것은 장기훼손 여부의 확인 및 상기 α -Gal에 의해 유도되는 다른 면역반응을 모니터링함에 있어서 중요한 판단 근거가 될 수 있는 것으로 보고되고 있다. 그러므로, 상기 α -Gal에 대한 거부반응을 정확하게 측정하는 것은, 이종장기 이식에 있어서 고위험성 환자군에 대한 판단 여부 및 면역억제제 사용과 관련된 기본적인 자료를 제공함에 있어서 매우 중요한 것으로 보고되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) KR10-0313841B
(특허문헌 0002) KR10-2002-0090087A
(특허문헌 0003) KR10-0987547B

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 상기와 같은 종래기술의 문제점을 해결하기 위한 것으로서, 본 발명은 이종장기의 장기 이식에 따른 이식 거부반응을 효과적으로 확인할 수 있는 검사방법 및 검사용 키트에 관한 것이다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 이종장기의 장기 이식에 따른 이종 항체에 의한 이식 거부반응을 항-이종알부민 항체반응을 측정하여 확인하는 검사용 키트에 관한 것으로, 상기 검사용 키트는 돼지 유래 알부민 및 소 유래 알부민으로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상의 이종 알부민을 항원으로 포함하는 것인 이종장기의 장기 이식에 따른 이식 거부반응을 측정하는 이종 알부민을 이용한 장기 이식 거부반응 검사용 키트를 제공한다.

[0008] 상기 이종 알부민은 바람직하게는 돼지 유래 알부민 또는 소 유래 알부민, 더욱 바람직하게는 돼지 유래 알부민일 수 있다.

[0009] 상기 이중 알부민은 상기 이중 알부민을 이용한 장기 이식 거부반응 검사용 키트에 상기 이중 알부민을 포함하는 항원액 또는 상기 이중 알부민을 포함하는 기관 또는 멤브레인에 코팅된 형태로 제공될 수 있다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 목적을 달성하기 위하여, 돼지 유래 알부민 및 소 유래 알부민으로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상의 이중 알부민을 포함한 항원을 포함하고; 상기 이중 알부민에 대한 항원항체반응을 측정할 수 있는; 이중장기의 장기 이식에 따른 이식 거부반응을 측정하는 이중 알부민을 이용한 장기 이식 거부반응 검사용 키트를 제공한다.

[0011] 상기 이중 알부민을 이용한 장기 이식 거부반응 검사용 키트는 효소면역분석법(Enzyme-linked Immunosorbent assay, ELISA)을 수행하기 위한 검사용 키트인 것을 특징으로 하는 이중장기의 장기 이식에 따른 이식 거부반응을 측정하는 이중 알부민을 이용한 장기 이식 거부반응 검사용 키트일 수 있다.

발명의 효과

[0012] 본 발명의 검사용 키트의 경우, 통상적으로 이중장기의 항체이식에 의해 발생하는 면역반응과 관련하여, 초급성 거부반응의 원인이 되는 하등동물에서 발현되는 탄수화물 유래 항원인 이중항원 즉, α -Gal을 측정할 수 있는 검사용 키트와 달리, 이중단백 유래 항원 즉, 돼지 유래 알부민 또는 소 유래 알부민을 이용하여 항원항체반응을 통해 이중장기의 수혜자 내에서 장기 이식 후 발생할 수 있는 항체반응을 측정함으로써, 보다 정확하게 이중 장기 이식에 따른 거부반응을 효과적으로 예측할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 돼지 채도 이식 후의 인간의 영장류 동물에서 이중장기이식에 의해 유발되는 Anti-Gal IgG 및 Anti-non-Gal IgG의 항체 생성 여부를 확인을 그래프로, 도 1a는 Anti-Gal IgG는 ELISA를 통해 확인한 결과를 나타낸 그래프이고, 도 1b는 Anti-non-Gal IgG는 1,3 - 알파갈락토오스 전달효소 유전자를 제거한 돼지(1,3 - α - galactosyltransferase gene knockout(GTKO))의 돼지 내피세포(porcine endothelial cell, PEC69)를 이용하여, flow cytometry로 측정된 결과를 나타낸 그래프이다

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 돼지 채도 이식 후의 인간의 영장류 동물에서 이중장기이식에 의해 유발되는 구체적인 IgG 항체의 종류를 확인하기 위한 것으로, 도 2a는 2-DE gel을 이용하여 웨스턴블롯팅(Western blot)을 수행한 결과를 나타낸 사진이고, 도 2b는 인간의 영장류 동물에서 이중장기 이식 전후에 의해 유발되는 사람 알부민(HA), 돼지 알부민(PA), 소 알부민(BA) 및, HA 접합 α -Gal에 대한 항체 반응성을 ELISA로 측정된 결과를 나타낸 그래프이다. 도 2a에서 항원항체 반응이 나타난 항원을 화살표로 표시하였으며, 1은 BA(bovine serum albumin, gi 1351907)을 의미하고, 2는 PA(albumin, partial(Sus scrofa), gi 164318)을 의미하며, 3은 calreticulin precursor(Sus scrofa, gi 291622246)을 의미하고, 4는 poly 4-hydroxylase beta polypeptide(Sus scrofa, gi 358009193)을 의미하며, 5는 cytoskeletal beta actin(partial(Sus scrofa), gi 45269029)을 의미한다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 채도 이식 후의 인간의 영장류 동물에서 이중장기이식에 의해 유발되는 돼지 알부민에 대한 항체 유발을 확인하기 위하여, 이식 전후의 인간의 영장류 혈장에서 사람 알부민(HA), 돼지 알부민(PA), 소 알부민(BA) 및, HA 접합 α -Gal에 대한 항체 반응성을 ELISA로 측정된 결과를 나타낸 그래프로, 첫 번째 줄과 두 번째 줄은 그룹 1에 대한 이중장기이식 전후의 각 항체에 대한 ELISA 결과를 나타낸 것이고, 세 번째 줄은 그룹 2에 대한 이중장기이식 전후의 각 항체에 대한 ELISA 결과를 나타낸 것이다. 각각의 그래프에서 흰색 막대 그래프는 장기이식 전을 의미하고, 검은색 막대 그래프는 장기이식 후를 의미한다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 채도 이식 후의 영장류 동물에서 이중장기이식에 의해 돼지 알부민에 대한 항체 유발을 확인하기 위하여, 그룹 2에 대한 이중장기이식 전후의 인간의 영장류 혈장에서 사람 알부민(HA), 돼지 알부민(PA), 소 알부민(BA) 및, HA 접합 α -Gal에 대한 항체 반응성을 ELISA로 측정된 결과를 나타낸 그래프이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 이중장기 이식에 의한 사람 알부민(HA), 돼지 알부민(PA), 소 알부민(BA) 및 HA 접합 α -Gal에 대한 IgG 항체반응을 이중장기 이식 후 180일 동안 확인한 각 항체에 대한 ELISA 결과로, 각각의 그래프에서 점선은 이중장기 이식이 실패한 시점을 의미하고, $\rightarrow$ anti-Gal은 anti-Gal 항체가 이중장기 이식 후 증가하지 않은 것을 의미하며, $\uparrow$ anti-Gal은 anti-Gal 항체가 이중장기 이식 후 증가한 것을 의미한다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 2차 이중장기 이식에 의한 사람 알부민(HA), 돼지 알부민(PA), 소 알부민

(BA) 및 HA 접합 α -Gal에 대한 IgG 항체반응 정도를 확인한 그래프로, 도 6a는 실험동물(NHP) M4에 대한 결과이고, 도 6b는 실험동물(NHP) M5에 대한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0014] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 이종장기의 장기 이식에 이식 거부반응을 효과적으로 확인할 수 있는 검사용 키트 및 검사방법을 제공한다. 상기 검사용 키트 및 검사방법은 이종 항원 즉, 이종 알부민을 이용한 검사용 키트 및 검사방법일 수 있다.
- [0015] 상기 검사용 키트는 이종 알부민, 구체적으로 돼지 알부민 또는 소 알부민을 항원으로 이용한 장기 이식에 따른 이종 항체에 의한 이식 거부반응을 효과적으로 확인할 수 있는 검사용 키트일 수 있다.
- [0016] 구체적으로, 본 발명은 돼지 유래 알부민(Porcine albumin, PA) 및 소 유래 알부민(Bovine albumin, BA)으로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상의 이종 알부민, 바람직하게는 돼지 유래 알부민 또는 소 유래 알부민, 더욱 바람직하게는 돼지 유래 알부민을 항원으로 이용한 장기 이식에 따른 이종 항체에 의한 이식 거부반응을 효과적으로 확인할 수 있는 이종 알부민을 이용한 장기 이식 거부반응 검사용 키트일 수 있다. 상기 이종 알부민은 상기 이종 알부민을 이용한 장기 이식 거부반응 검사용 키트에 액상 형태의 항원액으로 제공되거나, 기판 또는 멤브레인(membrane)에 코팅된 형태로 제공될 수 있다.
- [0017] 또한, 본 발명은 돼지 유래 알부민(Porcine albumin, PA) 및 소 유래 알부민(Bovine albumin, BA)으로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상의 이종 알부민을 항원으로 포함하고, 상기 이종 알부민에 대한 항체의 함량을 측정하는 이종장기의 장기 이식에 따른 이식 거부반응을 효과적으로 확인할 수 있는 장기 이식 거부반응 검사용 키트에 관한 것이다.
- [0018] 본 발명의 발명자들은 이종항체의 장기이식, 구체적으로 돼지 유래 장기인 돼지 췌도를 영장류, 구체적으로 인간과 가장 유사한 영장류 실험모델 중 하나인 붉은털 원숭이에 장기이식한 경우, 발생하는 거부반응과 관련하여 항원항체 반응에 대해 연구하던 중, 해당 거부반응과 관련된 면역반응은 초급성 거부반응의 원인이 되는 α -Gal에 대한 Anti-Gal의 항체반응뿐만 아니라, 돼지 알부민에 대한 항체(Anti-PA)에 의한 항체반응 및 소 알부민에 대한 항체(Anti-BA)에 의한 항체반응이 동반될 수 있으며, 다양한 실험 조건에서도 이러한 항원항체반응 중, 탄수화물 항원(carbohydrate antigen)인 α -Gal에 대한 Anti-Gal의 항체반응과 단백질로 구성된 anti-돼지 알부민 항체반응은 구분될 수 있음이 확인되었으며, 이러한 결과로부터 기존 α -Gal에 대한 항체반응의 측정만으로는 이종장기의 이식에 따른 면역반응을 효과적으로 예상할 수 없으며, 이와 별도로 이종 단백질에 대한 항체반응도 측정하는 것이 필요함을 확인하였으며, 이에 따라 대표적인 장기 공여체인 돼지와 관련하여, 돼지알부민 또는 소알부민에 대한 항체반응을 측정함으로써, 보다 정확한 이종장기 이식에 따른 면역반응을 예상할 수 있을 것으로 확인하여, 본 발명을 완성하였다.
- [0019] 이하, 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다.
- [0020] 본 발명에 있어서, 개체(subject) 또는 실험동물이란 이종 조직 또는 기관의 이식에 의한 면역반응을 수행할 수 있는 모든 동물이 포함될 수 있는 개념으로 특별히 한정되는 것은 아니며, 바람직하게는 인간, 원숭이, 소, 말, 양, 돼지, 염소, 낙타, 영양, 개, 토끼, 마우스 등의 척추동물일 수 있고, 더욱 바람직하게는 영장류일 수 있으며, 더욱더욱 바람직하게는 인간을 제외한 영장류일 수 있다.
- [0021] 본 발명에 있어서, 효소면역분석법(Enzyme-linked Immunosorbent assay, ELISA)이란 효소면역측정법의 하나이다. 상기 효소면역측정법은 항원 및 항체에 대한 정량적 분석기법을 의미하며, 항원 및 항체 반응의 결과를 효소 및 기질의 반응 결과로 나타는 물질의 변색 정도를 이용하여 측정하는 방법을 의미한다. 페르옥시데이즈, 알칼리-포스포테이즈, 베타-갈락토시데이즈 등의 효소를 화학적으로 항원 또는 항체와 결합시켜, 특이적인 항원 항체 반응 후에 효소염색을 시행함으로써, 그 변색정도를 측정하는 방법이다. 상기 효소면역분석법은 효소를 표식자로 이용하여 항원항체반응을 이용한 항원 또는 항체량을 측정하는 방법이다.
- [0022] 본 발명은 이종장기의 장기 이식에 따른 이종 항체에 의한 이식 거부반응을 효과적으로 확인할 수 있는 검사용 키트에 관한 것이다.
- [0023] 구체적으로, 본 발명은 이종장기의 장기 이식에 따른 이종 항체에 의한 이식 거부반응을 항-이종알부민 항체반응을 측정하여 확인하는 검사용 키트에 관한 것으로, 상기 검사용 키트는 돼지 유래 알부민 및 소 유래 알부민으로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상의 이종 알부민, 바람직하게는 돼지 유래 알부민 또는 소 유래 알부민, 더욱 바람직하게는 돼지 유래 알부민을 항원으로 포함하는 것인 이종장기의 장기 이식에 따른 이식 거

부반응을 측정하는 이중 알부민을 이용한 장기 이식 거부반응 검사용 키트에 관한 것이다.

- [0024] 상기 이중 알부민은 상기 이중 알부민을 이용한 장기 이식 거부반응 검사용 키트에 상기 이중 알부민을 포함하는 항원액 또는 상기 이중 알부민을 포함하는 기관 또는 멤브레인에 코팅된 형태로 제공될 수 있다.
- [0025] 상기 장기 이식 거부반응 검사용 키트는 항원항체결합반응을 측정하는 방법, 바람직하게는 효소면역분석법(Enzyme-linked Immunosorbent assay, ELISA)을 수행하기 위한 검사용 키트일 수 있으며, 이러한 점에서 통상적으로 효소면역분석법에 사용되는 완충액(buffer), 구체적으로 반응액을 희석시키기 위해 사용되는 희석 완충액(dilution buffer) 또는 비특이성 반응을 억제하기 위한 차단 완충액(blocking buffer)과 항원액을 포함할 수 있다. 또한, 상기 항원액은 항원으로 돼지 유래 알부민(Porcine albumin, PA) 및 소 유래 알부민(Bovine albumin, BA)으로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상의 이중 알부민, 바람직하게는 돼지 유래 알부민 또는 소 유래 알부민, 더욱 바람직하게는 돼지 유래 알부민을 포함한 항원액일 수 있다.
- [0026] 또한, 본 발명은 돼지 유래 알부민 및 소 유래 알부민으로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상의 이중 알부민을 포함한 항원을 포함하고; 상기 이중 알부민에 대한 항원항체반응을 측정할 수 있는; 이중장기의 장기 이식에 따른 이식 거부반응을 측정하는 이중 알부민을 이용한 장기 이식 거부반응 검사용 키트에 관한 것이다.
- [0027] 상기 이중 알부민을 이용한 장기 이식 거부반응 검사용 키트는 돼지 유래 알부민(Porcine albumin, PA) 및 소 유래 알부민(Bovine albumin, BA)으로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상의 이중 알부민, 바람직하게는 돼지 유래 알부민 또는 소 유래 알부민, 더욱 바람직하게는 돼지 유래 알부민을 항원으로 이용하여 실험동물의 혈액 등 개체로부터 분리된 샘플에 포함된 이중 알부민에 대한 항체의 함량을 측정하거나, 이중 알부민에 대한 항원항체반응을 측정하여, 실험동물 또는 개체에서 발생할 수 있는 이중 알부민 항체반응에 의한 거부반응을 확인할 수 있으며, 이로부터 기존 Anti-Gal 항체반응에 의한 거부반응의 측정만으로는 확인할 수 없었던 이중장기 이식에 의한 거부반응을 확인할 수 있다는 측면에서 이중장기 이식에 따른 거부반응을 보다 정확하게 예측할 수 있는 특징이 있다.
- [0028] 상기 이중 알부민에 대한 항체반응에 대한 정량적 확인은 항원항체결합반응을 측정하는 방법, 바람직하게는 효소면역측정법, 더욱 바람직하게는 효소면역분석법(Enzyme-linked Immunosorbent assay, ELISA)일 수 있다. 이러한 측면에서, 본 발명의 키트는 효소면역분석법을 수행하기 위해 요구되는 추가적인 구성수단, 구체적으로 효소면역측정법 또는 효소면역분석법의 수행과 관련하여 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 추가할 수 있는 구성수단, 일 예로 이중 알부민에 대한 항체, 일 예로 Anti-non-Gal IgG 등에 대한 2차 항체 등을 더 포함할 수 있다.
- [0029] 상기 항원항체결합반응을 측정하는 방법은 상기 효소면역분석법 외에 방사선 면역측정법(radioimmunoassay, RIA), 샌드위치 측정법(sandwich assay), 면역 블롯팅 분석법 등일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0030] 이하, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 본 발명의 실시예에 대하여 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시예에 한정되지 않는다.
- [0031] <실시예. 돼지 췌장 이식에 의해 유발된 항원항체반응의 확인>
- [0032] 본 발명에서 기존 이중장기 즉, 돼지 췌장의 이식에 의한 거부 반응을 진단하기 위한 시스템의 문제점을 개선하기 위해, 우선적으로 돼지 췌장 이식에 의해 유발되는 영장류 동물에서의 항체 종류를 확인하기 위하여, 비인간성 영장류(non-human primates, NHPS)로 Rh factor를 가진 의학 실험용 원숭이인 붉은털 원숭이(rhesus monkey)에 대해 돼지 췌장 이식(intraportal porcine islet transplantation(PITX))을 수행하고(Kang HJ *et al.*, Transplantation 97 : 999 - 1008(2014)), 투여된 면역억제제의 종류에 따른 항체의 발생 여부를 확인하였다.
- [0033] 간략하게, 돼지의 췌장(porcine islet)은 축소된 성인 돼지(miniature adult pig, 서울대학교, 대한민국)로부터 변형된 리코르디법(Ricordi method)으로 분리하고(Kim HI, *et al.*, Xenotransplantation 16 : 11 - 18(2009), Jin SM *et al.*, Xenotransplantation 18 : 369 - 379(2011)), 돼지 췌장 이식(porcine islet transplantation((PITX)) 전 24시간 동안 10% 돼지 혈청(porcine serum)이 첨가된 Medium 199(Gibco BRL, Life Technologies Ltd., 영국)를 이용하여 37℃에서 부유배양법(free-floating method)으로 배양하였다.
- [0034] 상기 붉은털 원숭이 30마리에 대해 실험을 수행하였고, 상기 분리된 췌장 클러스터(islet cluster)를 실험동물 1 kg 당 100,000 islet equivalents/kg의 함량으로 면역억제제(immunosuppression, IS) 처리를 수행한 스트랩

토조토신 유래 제1형 당뇨병(streptozotocin-induced type 1 diabetes)을 갖는 붉은털 원숭이(rhesus monkey)에 주입하였다.

[0035] 상기 붉은털 원숭이에 대한 면역억제제 처리 종류 및 함량(regimen)을 달리하여 실험을 수행하였다. 상기 면역억제제 처리 종류 및 함량에 따라, 하기 표 1과 같이 그룹을 구분하여 실험동물을 구분하였다. 하기 표 1에 기재된 면역억제제와 관련하여, ATG는 anti-thymocyte globulin(Thymoglobulin[®] Genzyme, Cambridge, USA)를 의미하고, anti-ICAM1는 anti-human intercellular adhesion molecule 1 antibody를 의미하며, MMF는 mycophenolate mofetil를 의미하고, anti-CD154(5C8, National Institutes of Health, Bethesda, USA)는 CD154에 대한 항체를 의미하며, anti-CD40(2C10R4, National Institutes of Health, Bethesda, USA)는 CD40에 대한 항체를 의미하고, sirolimus는 시판되는 면역억제제인 sirolimus(Rapamune[®] Wyeth, USA)를 의미한다.

[0036] 구체적으로, 그룹 1(group I)의 경우, CD40-CD154 차단제가 아닌 통상적인 면역 억제제 치료만을 투여한 5마리로 구분하였다. 반면에, 그룹 2(group II)는 CD40-CD154 차단제에 기초한 면역 억제제를 투여한 25마리로 구분하였다. 그룹 2-A는 anti-ICAM1, sirolimus 및 anti-CD154를 투여한 10마리로 구분하였고, 그룹 2-B는 ATG, sirolimus 및 anti-CD154를 투여한 7마리로 구분하였으며, 그룹 2-C는 ATG, sirolimus 및 anti-CD40를 투여한 7마리로 구분하였고, 그룹 2-D는 sirolimus 및 anti-CD154를 투여한 1마리로 구분하였다.

[0037] 상기 anti-CD154의 투여와 관련하여, 정맥주사를 통하여, 장기이식 4일전, 장기이식 당일, 장기이식 3일 후 및 7일후 각각 20 mg/kg 함량으로 투여하였고, 이 후, 3개월 동안 매주 1회 투여하였다. 이후, 그룹 2-A의 경우, 투여를 중단하였고, 그룹 2-B는 실험이 끝날 때까지 격주로 투여하였다. 상기 anti-CD40의 투여는 정맥주사를 통하여, 장기이식 4일전, 장기이식 당일, 장기이식 3일 후, 7일 후 및 12일후 각각 30 mg/kg 함량으로 투여하였고, 이 후, 실험이 끝날 때까지 매주 1회 투여하였다. 상기 sirolimus의 투여와 관련하여, 장기이식 9일전부터 매일 3 µg/ml 내지 8 µg/ml의 범위에서 안정적인 최저 혈중 농도가 유지되는 함량으로 구강으로 투여하였다. 상기 anti-ICAM1의 투여는 정맥주사를 통하여, 장기이식 9일전, 6일전 및 3일전 각각 8 mg/kg 함량으로 투여하였고, 상기 ATG(anti-thymocyte globulin)의 투여는 정맥주사를 통하여, 장기이식 3일전 및 1일전 5 mg/kg 함량으로 투여하였다. 상기 tacrolimus(Prograf, Astellas Pharma Inc., 일본)의 투여는 경구투여를 통하여, 장기이식 6일전부터 2일에 한번씩 각각 0.1 mg/kg 함량으로 투여하였고, 상기 leflunomide(Arava, 사노비-아벤티스, 독일)의 투여는 경구투여를 통하여, 장기이식 6일전부터 2일에 한번씩 각각 10 mg/kg 함량으로 투여하였다. 상기 mycophenolate mofetil(MMF, Roche Pharmaceuticals, NJ)의 투여는 경구투여를 통하여, 장기이식일부터 실험이 끝날 때까지 2일에 한번씩 각각 25 mg/kg 함량으로 투여하였고, 상기 Alemtuzumab(Bayer Schering Pharma 영국)의 투여는 정맥주사를 통하여, 장기이식일에 2시간 동안 30 mg/kg 함량으로 투여하였다. 상기 Rituximab(Roche Pharmaceuticals, 스위스)는 정맥주사를 통하여, 장기이식 15일전, 8일전 및 1일전 각각 100 mg 함량으로 투여하였고, 상기 Bortezomib(Millennium Pharmaceuticals, MA)의 투여는 정맥주사를 통하여, 장기이식 후 1일, 4일, 8일 및 11일 시점에 각각 0.6 mg/m²(BSA) 함량으로 투여하였고, 상기 BSA(body surface area)는 하기 계산식에 의해 측정하였다.

[0038] [계산식]

[0039] $BSA(cm^2) = body\ weight^{0.6046}(kg) \times length^{0.1862}(from\ head\ to\ anus,\ cm) \times 514$

[0040] 하기 표 1에서 Anti-Gal은 이중항원인 gal-α-1,3-gal(Gal α 1,3 Gal, α-gal)에 대한 항체를 의미하며, Anti-PA는 항-돼지알부민 항체를 의미하고, Anti-BA는 항-소알부민 항체를 의미하며, 상기 표에 기재된 수치는 실험동물 중 해당 항체가 확인된 개체수를 의미한다.

표 1

그룹	실험동물ID (recipient)	면역억제제	장기이식 후 1달 후, 유발된 항체		
			Anti-Gal	Anti-PA	Anti-BA

그룹 1 (n=5)	M1	campath, tacrolimus, leflunomide, MMF	5	5	3
	M2	ATG, bortezomib, leflunomide, MMF			
	M3	anti-ICAM1, rituximab			
	M4	anti-ICAM1			
	M5	anti-ICAM1, bortezomib, leflunomide			
그룹 2 (n=5)	Total		4	0	0
	그룹 2-A (n=10)	M6, M9, M10, M11, M12, M13, M14, M15, M16, M21	1	0	0
	그룹 2-B (n=7)	M7, M8, M17, M18, M19, M20, M22	2	0	0
	그룹 2-C (n=7)	M23, M24, M25, M26, M27, M28, M29	1	0	0
	그룹 2-D (n=1)	M30	0	0	0

[0042] 상기 각 실험동물의 혈액 샘플을 장기이식 전, 장기이식 당일 및 장기이식 후 장기이식이 실패된 것으로 확인될 때까지 1주일에 1회씩 채취하여, EDTA 튜브(EDTA tube)에 보관한 후, 실험에 사용될 때까지 -70℃에서 보관하였다.

[0043] 본 실험에서, 수혜자가 외인성 인슐린(exogenous insulin) 즉, 인슐린의 추가 투여 없이 장기이식 전과 유사한 혈당 정도의 정상 혈당(euglycemia)을 유지하지 못하는 상태일 때, 장기이식 실패(graft failure)로 판명하였다. 또한, 모든 수혜자는 장기이식 실패로 판명된 때에도 인슐린 처치(insulin therapy)를 통해 생존하였다.

[0044] 상기 표 1에 나타난 바와 같이, 그룹 1의 수혜자의 경우, Anti-Gal(100%) 및 Anti-PA(100%)와 관련하여 모두 개체에서 확인되었고, Anti-BA의 경우, 3개체(60%)에서 확인된 반면, 그룹 2의 수혜자의 경우, Anti-Gal과 관련하여 4개의 개체(16%)에서 항체가 확인되었을 뿐, Anti-PA와 Anti-BA에 대해서는 항체가 확인되지 아니하였다.

[0045] 구체적으로, 돼지 췌장 이식 후의 영장류 동물에서 이종장기이식에 의해 유발되는 이종 단백질에 의한 항체 즉, Anti-non-Gal 즉, α -1,3-galactosyltransferase (α -1,3-gal) 유전자가 결여된 돼지 내피세포(α -1,3-galactosyltransferase gene knockout(GTKO) porcine endothelial cell)에서의 이종 단백질에 대한 항체를 측정하기 위하여, Anti-Gal과 Anti-non-Gal을 상기 표 1의 M4 실험동물의 샘플을 이용하여 ELISA 및 유동세포계수법(flow cytometry)으로 측정한 결과를 도 1에 나타내었다. 상기 도 1a 및 도 1b에 나타난 바와 같이, Anti-Gal과 Anti-non-Gal 모두 이종장기이식 이후에 비인간성 영장류 수혜자인 붉은털 원숭이로부터 채취한 혈액 샘플에서 급격한 증가가 확인되었다.

[0046] 상기 Anti-Gal 항체(anti-Gal IgG)를 매주 확인하기 위한 ELISA는 100 μ L의 Gal-HA(Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-human albumin, 5 μ g/ml, GlycoTech)를 이용해 각 well을 코팅한 후, PBS로 희석한 5% human albumin(HA, Green Cross CORP, 대한민국) 용액으로 차단시킨 후, 1% HA가 포함된 PBS를 이용하여 1:100으로 희석시킨 수혜자 즉, 원숭이의 혈액 샘플(Recipient monkey plasma)을 주입하고, 37℃에서 30분 동안 반응시키는 방법으로 수행하였다. 항체는 anti-human IgG(Sigma-Aldrich)를 이용하였고, 음성 대조군으로는 1% HA가 포함된 PBS 용액을 이용하였다.

[0047] 또한, 상기 유동세포계수법은 Anti-nol-Gal 항체(Anti-non-Gal) 반응을 측정하기 위해 사용하였다. 상기 실험은 GTKO 내피세포(PEC6)의 단일세포 희석액(Single-cell suspension, 10^5 /tube)과 1% HA와 30 mM EDTA가 포함

된 PBS로 1:10 희석된 원숭이의 혈액 샘플(Recipient monkey plasma) 50 μ L를 상온에서 30분 동안 반응시킨 후, human IgG에 대한 특이적인 즉, IgM이나 IgA와 반응하지 않는 항체인 토끼 항체의 F(ab)₂와 결합된 FITC(FITC-conjugated F(ab)₂ fragments of a rabbit immunoglobulin specific for human IgG)와 반응시켜 항체와 반응한 세포를 확인하였다. 해당 세포의 측정은 FACS(FACSAliubr flow cytometer, BD Biosciences, 캐나다)를 이용하였다. 항체 결합 정도는 형광 정도(mean fluorescence intensity, MFI)로 확인하였다.

[0048] 상기 결과로부터, 급격하게 증가가 유발된 anti-non-Gal 항체의 항원을 규명하기 위하여, 이종장기 이식 전후의 상기 표 1의 M4 실험동물의 샘플을 이용하여 웨스턴블롯팅을 수행하였다.

[0049] 상기 실험은 GTKO 내피세포(PEC6)로부터 DUALXtract total membrane protein extraction kit(Dualsystems biotech AG, Switzerland)을 이용하여 추출한 단백질 150 μ g을 7 cm immobilized pH gradient(IPG) strips에서 rehydration sample buffer(Bio-Rad Laboratories, USA)을 이용하여 20℃에서 12시간 동안 재수화하였다. 이후, 2DE gel에서 분리를 수행하였다. 우선, Isoelectric focusing은 2-DE system(PROTEAN[®] IEF Cell, Bio-Rad Laboratories, USA)을 이용하여, 50 V에서 4시간 수직, 250 V에서 20분 수직, 2,000 V에서 40분 수평, 4,000 V에서 2시간 수평의 조건으로 수행하였다. 상기 Isoelectric focusing을 수행한, IPG strip을 평형화시킨 후, 10 % SDS-PAGE(Bio-Rad Laboratories)에서 2-DE 과정을 수행하였다.

[0050] 상기 2DE 과정을 수행한 후, Coomassie brilliant blue(Coomassie brilliant blue G-250(Bio-Rad Laboratories, USA))를 이용하여 염색하고, 상기 표 1의 M4 실험동물의 이종장기 이식 전후의 혈액샘플을 이용하여 1% HA와 Amersham™ ECL prime western blotting detection reagent(GE Healthcare, USA)를 이용하여, 웨스턴블롯팅을 수행한 후, 단백질을 확인하는 방법으로 수행하였다. 상기 면역염색 결과 후 단백질 확인은 트립신을 이용하여 단백질을 분리한 후, MALDI-TOF/TOF 질량분석법(mass spectrometry)으로 질량을 측정하여 방법으로 수행하였다. 상기 측정결과를 도 2a에 나타내었다.

[0051] 상기 도 2a에 나타난 바와 같이, 상기 도 2a의 1번 단백질은 69,248, 2번 단백질은 71,348, 3번 단백질은 48,429, 4번 단백질은 56,763, 5번 단백질은 40,194로 분자량이 측정되었고, MASCOT 분석(MASCOT analysis, MASCOT 2.3.01) 결과, 각각, 1번 단백질은 BA, 2번 단백질은 PA, 3번 단백질은 calreticulin 전구체, 4번 단백질은 porcine poly 4-hydroxylase beta polypeptide, 5번 단백질은 porcine cytoskeletal beta actin으로 확인되었다.

[0052] 상기 측정 결과, anti-non-Gal 항체 반응의 원인이 된 항원으로, BA, porcine poly 4-hydroxylase beta polypeptide 및 porcine cytoskeletal beta actin로 예상되었다.

[0053] 상기 결과와 관련하여, 장기이식 자체에 의해 어떤 항체가 증가되는지 여부를 명확하게 하기 위하여, 이종장기 이식 전후의 M4 실험동물의 혈액 샘플에 대해, 사람 알부민(HA), 돼지 알부민(PA), 소 알부민(BA) 및, HA 접합 α -Gal(HA-conjugated Gal, Gal-HA)를 각각 포함하는 항원액을 이용하여 상기와 같은 실험을 수행하였고, 항체 결합 정도를 ELISA로 분석하였다. 상기 분석 결과를 도 2b에 나타내었다.

[0054] 상기 이종장기이식에 의한 이종반응 항체(Xenoreactive antibodies)의 반응정도는 다음과 같은 방법으로 측정하였다(Choi HJ, Kim MK, Lee HJ, *et al.* Investigative ophthalmology & visual science 52:6643 - 6650(2011)).

[0055] 구체적으로, 각각의 well에 HA, PA, BA 및 HA 접합 α -Gal(Gal-HA, 5 μ g/mL; GlycoTech, USA) 포함 항원액 100 μ L를 각각 첨가하여 도포하고, 하루 저녁 동안 보관한 후, 항원액을 버리고, PBS로 희석한 5% HA 차단 완충액을 100 μ L씩 첨가한 다음, 37℃에서 30분 동안 반응시켰다. 이후, 반응액을 버리고, 0.05% Tween 20이 첨가된 세척 완충액으로 5회 세척한 후, 1% HA를 첨가한 PBS로 희석시킨 실험동물의 혈액 샘플 100 μ L을 각 웰에 첨가한 후, 37℃에서 30분 동안 반응시켰다. 이후, peroxidase-conjugated anti-human IgG(Sigma-Aldrich, USA)를 이용하여 항원항체 반응 후, 발색반응을 진행하고, 흡광도를 측정하였다. 상기 측정된 흡광도에 대한 수치와 1% HA를 첨가한 PBS 샘플(음성대조군) 흡광도를 뺀 결과를 도 2b에 나타내었다.

[0056] 상기 도 2b에 나타난 바와 같이, 이종장기이식 후에는 HA에서 항체반응이 거의 증가되지 않는 것에 비하여, BA, PA 및 Gal-HA의 경우에는 현저하게 반응성이 증가되는 것이 확인되었다.

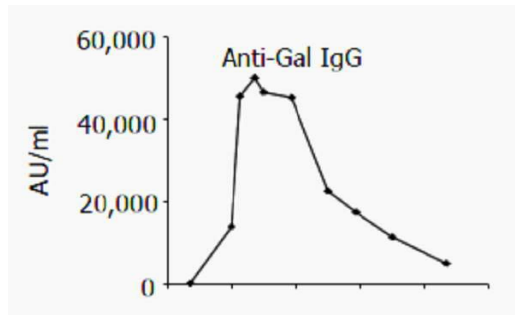
[0057] 상기 이종항원 항체반응이 면역억제제에 따라 어떻게 영향을 받는지 확인하기 위하여, 일반적인 면역억제제와 CD40와 CD154에 의한 항원항체반응의 차단제(CD40-CD154 blockade)를 사용하였을 경우 이종항원항체반응의 억제에 대해 실험을 수행하였다. 상기 실험은 상기 표 1의 실험동물 중에서 그룹 1 및 그룹 2-A에 대해

수행하였다. 상기 실험결과를 상기 표 1 및 도 3에 나타내었다.

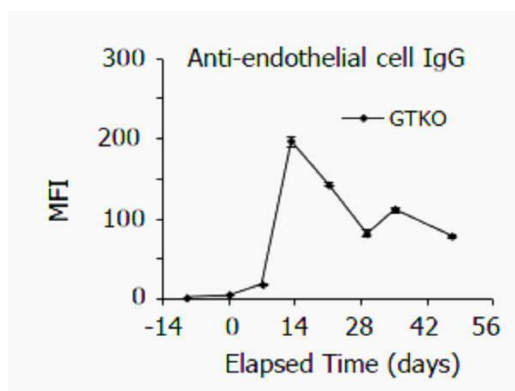
- [0058] 상기 표 1 및 도 3에 나타난 바와 같이, CD40-CD154 blockade를 위한 면역억제제가 투여되지 않은 그룹 1의 실험동물에서, anti-PA IgG에 대한 항체반응이 100% 유도된 반면, 상기 표 1 및 도 3과 도 4에 나타난 바와 같이, 그룹 2의 실험동물에서는 anti-PA IgG에 대한 항체반응이 확인되지 않았다. 또한, anti-BA IgG의 경우, CD40-CD154 blockade를 위한 면역억제제가 투여되지 않은 그룹 1의 실험동물의 60%에서 항체반응이 유도된 반면, 그룹 2의 경우, 항체반응이 확인되지 않았다.
- [0059] 한편, anti-Gal IgG의 경우, 그룹 1의 실험동물에서는 모두 확인이 되었고, 장기이식 후 1달이 경과된 시점에서 그룹 2의 실험동물에서도 25마리중 4마리 즉, 16%에서 확인되었다. 또한, anti-Gal IgG의 정도가 그룹 2의 4개의 개체(0.29 ± 0.15)의 면역반응에 비하여 그룹 1(1.66 ± 0.49)이 현저히 높은 것으로 확인되었다 ($P=0.0275$, t test).
- [0060] 상기 결과로부터, CD40-CD154 blockade를 위한 면역억제제와 sirolimus는 장기이식 후, anti-PA와 anti-BA에 대한 면역반응을 완벽히 차단하는 반면, anti-Gal에 대한 면역반응은 부분적으로 차단하는 것으로 확인되었다.
- [0061] 또한, anti-Gal에 대한 면역반응과 달리 anti-PA와 anti-BA에 대한 면역반응은 항원에 대한 접촉 후 천천히 진행되는 경향이 있으므로, 6개월 동안 면역반응을 관찰하였다. 확인결과, 그룹 1의 경우, 모두 장기이식에 실패한 것으로 확인되었으나, 그룹 2의 경우, 장기이식 성공여부가 각각 상이하게 나타난 것으로 확인되었다. 특히, 그룹 2의 C 및 D의 경우, 항체반응은 효과적으로 억제되었음에도 불구하고, 장기이식은 실패한 것으로 확인되었다. 장기이식 후, 그룹 2의 A의 9 개체와 그룹 2의 B의 6개체가 인슐린의 외부 주입 없이 1개월 이상 생존하여, 장기이식에 성공한 것으로 확인되었다.
- [0062] 도 5에 나타난 바와 같이 이식 후 180일까지 추적 관찰하였을 때, 상기 실험동물에 적용한 면역억제제의 처방에 따라 나타난 상이한 결과로, Anti-BA 및 Anti-PA에 대한 항체반응은 anti-CD154 및 sirolimus에 의해 효과적으로 억제되는 반면, Anti-Gal에 대한 항체반응은 제한적으로 억제되는 것으로 확인되었다.
- [0063] 또한, 상기 이중항원 항체반응에 의해 장기이식이 실패된 그룹 1의 실험동물에 대해서, 6개월 후에, M4 및 M5 실험동물에 대해서, 돼지 채도 이식 즉, 2차 장기이식을 다시 수행하였다. 2차 이중장기 이식에 앞서서, 상기 개체에 대해 그룹 2-A와 같이, anti-ICAM1, anti-CD154 및 sirolimus의 면역억제제를 투여하였다. 상기 면역억제제 투여 이전에 측정한 결과, 1차 이중장기 이식 보다 HA, BA, PA 및 Gal-HA에 대한 항원항체반응이 더 높은 것으로 확인되었다. 2차 이중장기 이식 전 및 후 실험동물로부터 혈액을 채취하여, 혈액 샘플에서의 HA, BA, PA 및 Gal-HA에 대한 항원항체반응을 수행한 결과를 도 6에 나타내었다.
- [0064] 상기 도 6에 나타난 바와 같이, Anti-Gal에 대한 항체반응은 오히려 낮아진 반면, Anti-BA 및 Anti-PA에 대한 항체반응은 급격히 높아지거나, 높은 상태를 유지하는 것으로 확인되었다. 이러한 결과로부터, Anti-Gal에 대한 항체반응과 Anti-BA 및 Anti-PA에 대한 항체반응은 상이한 경로에 의해 조절되는 것으로 예상되었으며, 상기 Anti-PA에 의한 반응과 Anti-BA에 의한 반응은 연관성이 있는 것으로 확인되었다.
- [0065] 상기에서 확인된 결과로부터, Anti-Gal 뿐만 아니라, PA를 포함한 비영장류 동물 유래 알부민과 같은 이중단백 모두 이중장기에 의한 거부반응의 원인이 되는 것으로 확인되었으며, 이러한 결과로부터 단순히 α -Gal에 대한 면역억제뿐만 아니라, 이중 알부민 즉, 이중 단백질에 대한 면역억제와 관련된 방법도 제안되어야, 효과적인 장기 이식에 의한 거부반응의 억제 전략이 수립될 수 있는 것으로 확인되었다.
- [0066] 상기 결과로부터, 이중장기 이식에 있어서, 초급성 거부반응의 원인이 되는 이중항원인 α -gal과 관련된 거부반응뿐만 아니라, 이중 단백질이 항원이 되는 면역반응도 이중장기의 이식의 성공여부를 결정하는 요인이 됨이 확인되었고, 따라서, 장기이식과 관련하여, 이중 알부민에 대한 면역반응을 확인함으로써, 이중장기를 공급받는 수여자 즉, 환자의 장기이식 가능성을 보다 정확하고 면밀하게 예측할 수 있을 것으로 확인되었다.
- [0067] 이상에서 본 발명의 바람직한 실시예에 대하여 상세하게 설명하였지만 본 발명의 권리범위는 이에 한정되는 것은 아니고 다음의 청구범위에서 정의하고 있는 본 발명의 기본 개념을 이용한 당업자의 여러 변형 및 개량 형태 또한 본 발명의 권리범위에 속하는 것이다.

도면

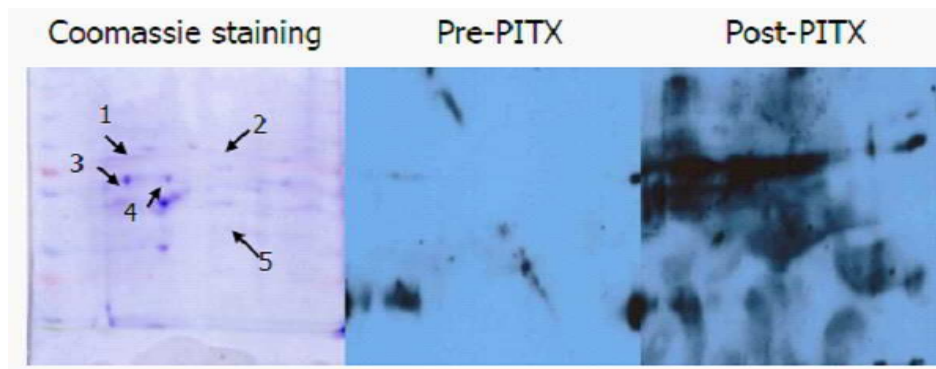
도면1a



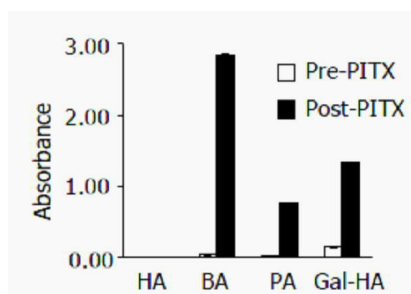
도면1b



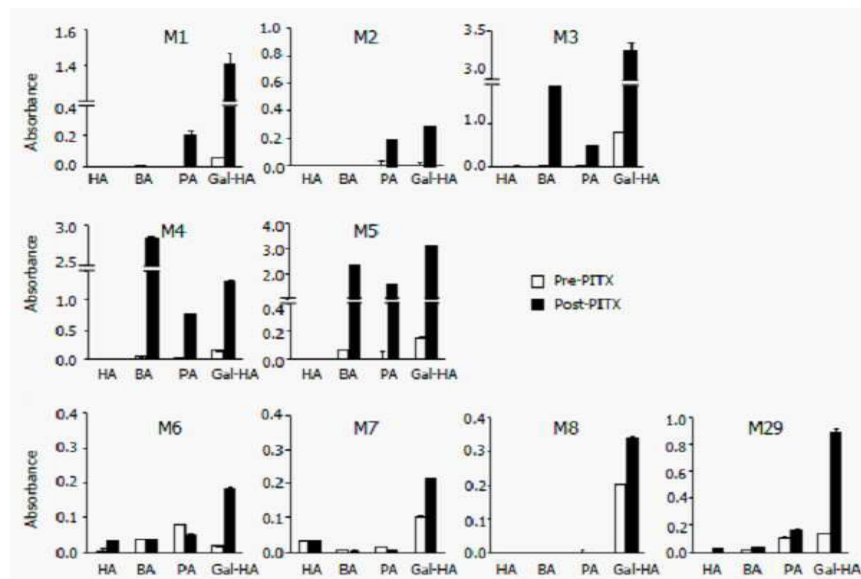
도면2a



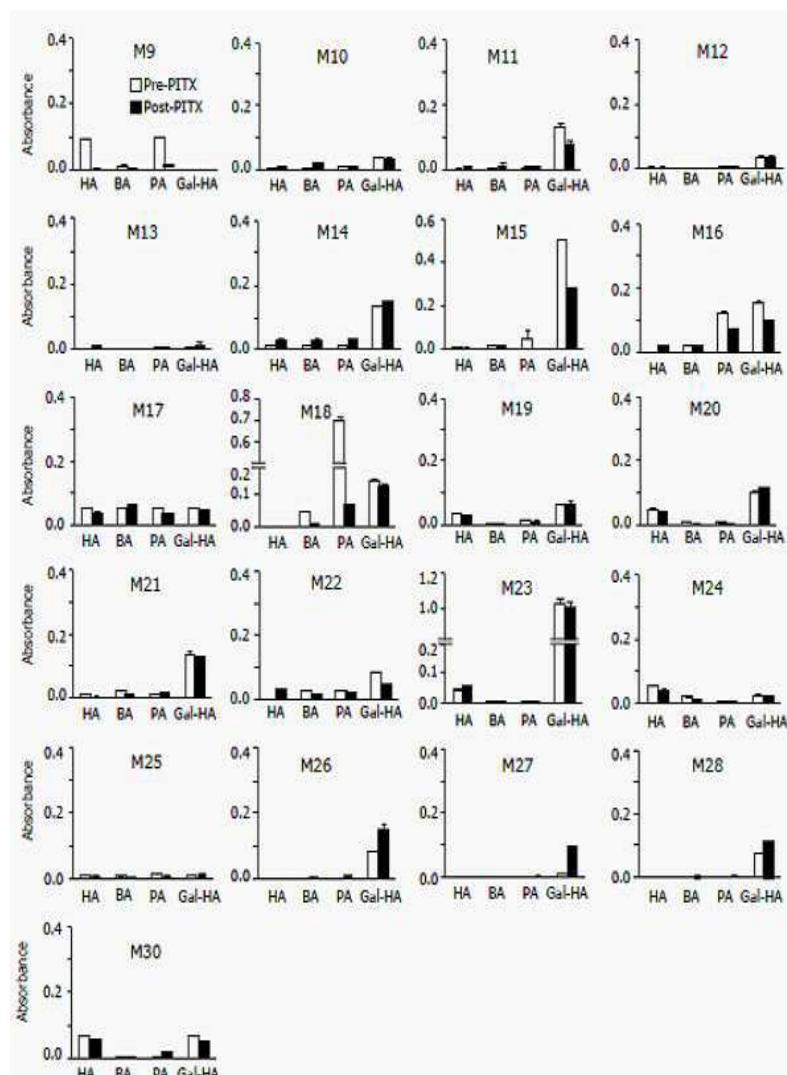
도면2b



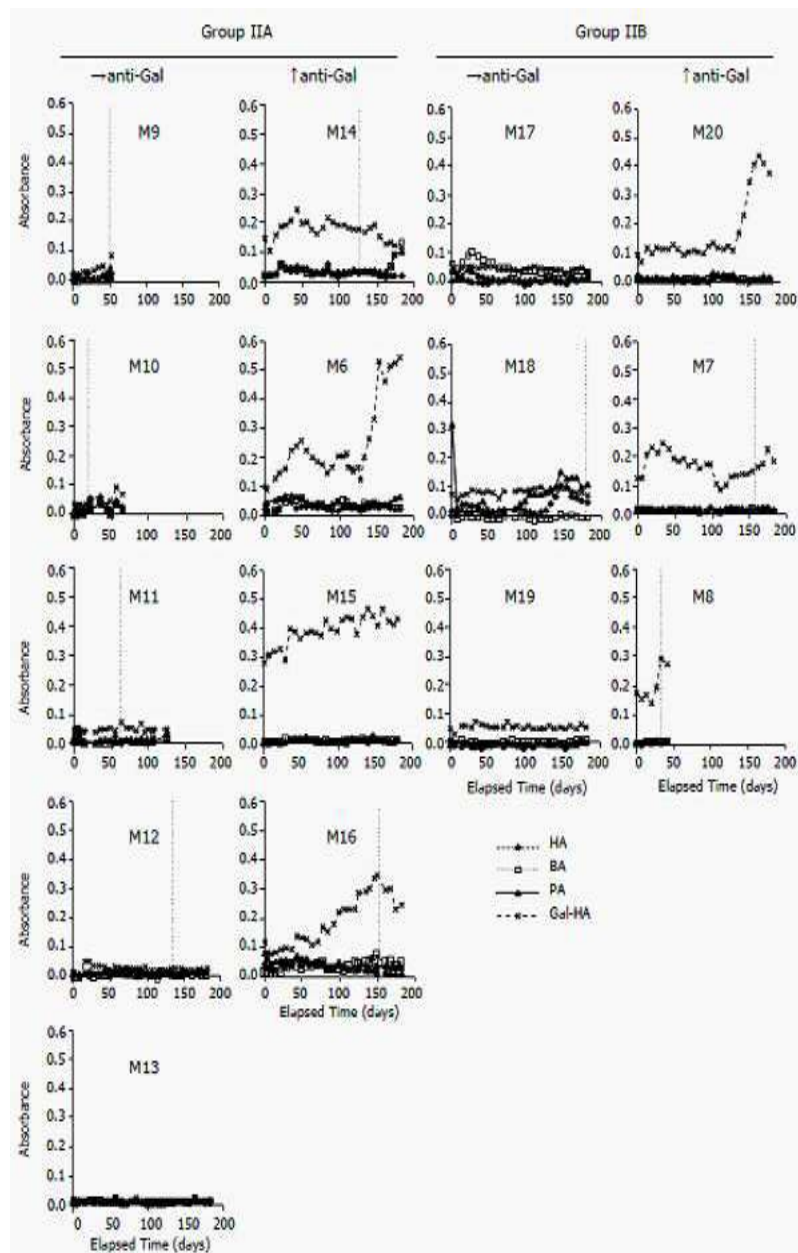
도면3



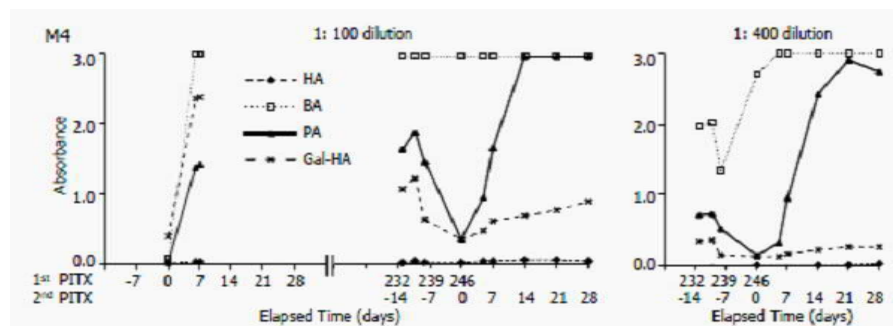
도면4



도면5



도면6a



도면6b

