(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2020 년 1 월 9 일 (09.01.2020)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2020/009437 A1

(51) 국제특허분류:
A61K 35/17 (2014.01) *C12N 5/0783* (2010.01)
A61K 38/21 (2006.01) *A61P 25/00* (2006.01)
A61K 38/20 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2019/008066

(22) 국제출원일: 2019 년 7 월 2 일 (02.07.2019)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2018-0077922 2018 년 7 월 4 일 (04.07.2018) KR

(71) 출원인: 서울대학교산학협력단 (**SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION**) [KR/KR]; 08826 서울시 관악구 관악로1, Seoul (KR).

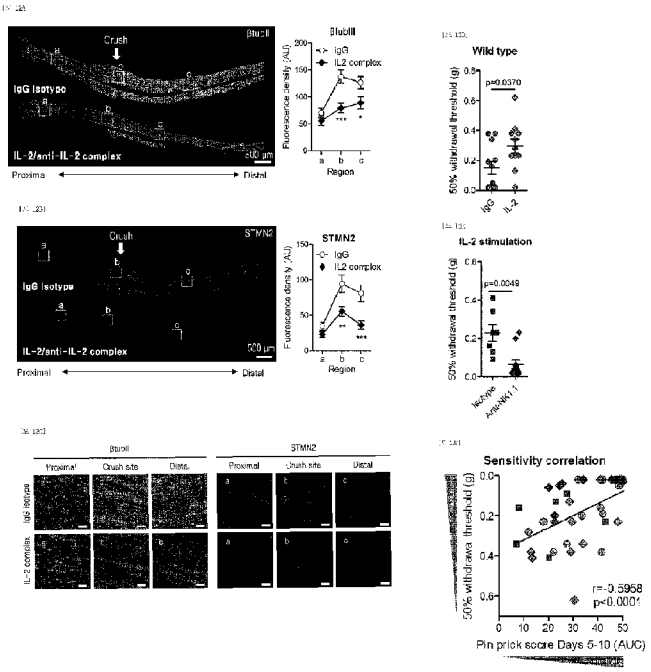
(72) 발명자: 오석배 (**OH, Seog Bae**); 13831 경기도 과천시 별양로 180, 812동 901호, Gyeonggi-do (KR). 데이비스알렉산더 제임스 (**DAVIES, Alexander James**); 11920 경기도 구리시 동구릉로66번길 14, 102동 402호, Gyeonggi-do (KR). 김형우 (**KIM, Hyoung Woo**); 02862 서울시 성북구 보문로 171, 1002호, Seoul (KR).

(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, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK,

(54) **Title:** IMMUNE CELL TREATMENT OF NERVE DAMAGE

(54) **발명의 명칭:** 신경손상의 면역세포치료



(57) **Abstract:** The present invention relates to a composition for treating a nerve damage, comprising natural killer cells, immune cells, or a substance for increasing the activity of the cells, and the natural killer cells, immune cells, or substance for increasing the activity of the cells, according to one aspect, can be usefully used in a fundamental treatment of a neurological disorder due to a nerve damage or an abnormal nerve, by allowing the natural killer cells to invade a damaged nerve part and directly remove damaged nerve cells.

(57) **요약서:** 자연살해세포, 면역세포, 또는 그의 활성을 증가시키는 물질을 포함하는 신경손상 치료용 조성물에 관한 것으로, 일 양상에 따른 자연살해세포, 면역세포 또는 그의 활성을 증가시키는 물질에 의하면, 자연살해세포가 손상된 신경부위로 침투하여 손상된 신경세포를 직접 제거함으로써 신경 손상 또는 비정상적 신경에 의한 신경계 질환의 근본적 치료에 유용하게 사용될 수 있는 효과가 있다.

[다음 쪽 계속]

WO 2020/009437 A1

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:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

명세서

발명의 명칭: 신경손상의 면역세포치료

기술분야

[1] 자연살해세포, 면역세포, 또는 그의 활성을 증가시키는 물질을 포함하는 신경손상 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[2] 면역체계는 해로운 물질로부터 신체를 보호하는 역할을 한다. 면역체계가 반응하는 해로운 물질에는 박테리아, 바이러스, 독소, 암세포 혹은 다른 개체의 혈액과 조직이 해당되는 것으로 알려져 있다. 면역체계가 작용하는 것으로 알려진 다양한 질병에서 면역체계의 활성을 조절하는 면역치료 방법이 개발되었다. 하지만 그 중 면역세포치료제를 이용한 방법은 현재 암 치료에만 한정적으로 사용되고 있다.

[3] 한편, 당뇨병, 항암제, 외상 등으로 인한 신경손상에 기인한 신경병증은 심각한 만성통증 및 운동장애를 일으키지만 치료방법으로 대증적 약물요법이 주로 사용되고 있다. 예를 들어 통증을 억제할 수 있는 약물로 알려진 삼환계항우울제(tricyclic antidepressants), 항경련제, 세로토닌/노르아드레날린 재흡수억제제(serotonin and noradrenaline reuptake inhibitor), 아편유사제가 말초신경병증에 의한 통증을 감소시키는 목적으로 사용되고 있다. 이러한 약물들은 다양한 부작용을 일으키며 증상을 억제하기 위한 방법일 뿐 근본적 원인인 손상된 신경을 치료하는 방법은 현재까지 알려진바 없다.

[4] 따라서 상기 문제점을 극복할 수 있는 신경병증의 근본적 원인에 근거하여 면역세포를 이용한 새로운 치료방법의 개발이 필요하다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[5] 일 양상은 분리된 자연살해세포, 그의 세포 집단, 자연살해세포의 활성을 증가시키는 물질, 또는 이들의 조합을 포함하는 신경 손상 또는 비정상적 신경에 의한 신경계 질환 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

[6] 다른 양상은 분리된 자연살해세포, 그의 세포 집단, 자연살해세포의 활성을 증가시키는 물질, 또는 이들의 조합을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 신경 손상 또는 비정상적 신경에 의한 신경계 질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공하는 것이다.

[7] 또 다른 양상은 신경 손상 또는 비정상적 신경에 의한 신경계 질환을 예방 또는 치료하기 위한 약학적 조성물의 제조에 사용하기 위한 분리된 자연살해세포, 그의 세포 집단, 자연살해세포의 활성을 증가시키는 물질, 또는 이들의 조합의 용도를 제공하는 것이다.

[8] 또 다른 양상은 분리된 자연살해세포, 그의 세포 집단, 자연살해세포의 활성을

증가시키는 물질, 또는 이들의 조합을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 손상된 또는 비정상적인 신경 세포를 제거하는 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

[9] 일 양상은 분리된 자연살해세포, 그의 세포 집단, 자연살해세포의 활성을 증가시키는 물질, 또는 이들의 조합을 포함하는 신경 손상 또는 비정상적 신경에 의한 신경계 질환 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[10] 본 명세서에서 용어 "치료"는 질환, 장애 또는 병태, 또는 그의 하나 이상의 증상의 경감, 진행 억제 또는 예방을 지칭하거나, 그를 포함하며, "유효성분" 또는 "약제학적 유효량"은 질환, 장애 또는 병태, 또는 그의 하나 이상의 증상의 경감, 진행 억제 또는 예방에 충분한 본원에서 제공되는 발명을 실시하는 과정에서 이용되는 조성물의 임의의 양을 의미할 수 있다.

[11] 본 명세서에서 용어, "투여하는," "도입하는" 및 "이식하는"은 상호교환적으로 사용되고 일 구체예에 따른 조성물의 원하는 부위로의 적어도 부분적 국소화를 초래하는 방법 또는 경로에 의한 개체내로의 일 구체예에 따른 조성물의 배치를 의미할 수 있다. 일 구체예에 따른 조성물의 세포 또는 세포 성분의 적어도 일부를 생존하는 개체 내에서 원하는 위치로 전달하는 임의의 적절한 경로에 의해 투여될 수 있다. 개체 투여 후 세포의 생존 기간은 짧으면 수 시간, 예를 들면 24시간 내지 수일 내지 길면 수년일 수 있다.

[12] 본 명세서에서 용어 "분리된 세포", 예컨대, "분리된 자연살해세포" 등은 세포가 기원하는 조직, 예컨대, 조혈 세포로부터 실질적으로 분리된 세포를 의미한다.

[13] 본 명세서에서 용어 "면역 세포"는 생체에 침입한 병원균이나, 독소에 저항하여 면역력을 조절하는 세포를 의미하고, 자연살해세포, T세포, T 림프구, B세포, 수지상세포, 또는 대식세포를 포함할 수 있다. 또한, 상기 면역 세포는 자가 또는 타가의 면역 세포일 수 있다.

[14] 이하에서는, 본 명세서의 자연살해세포에 대해 상세히 설명한다.

[15] 본 명세서에서 용어 "자연살해세포(Natural Killer cells)" 또는 "NK 세포"는 선천성 면역계의 주요 성분을 구성하는 세포독성 림프구로서, 대형과립림프구(large granular lymphocyte, LGL)로 정의되고 림프계 전구세포(common lymphoid progenitor, CLP) 생성 B 및 T 림프구로부터 분화된 제3의 세포를 구성한다. 상기 "자연살해세포" 또는 "NK 세포"는 임의의 조직 공급원(source)으로부터 유래된 추가적인 변형이 없는 자연살해세포를 포함하고, 성숙한 자연살해세포뿐 아니라, 자연살해 전구세포를 포함할 수 있다. 상기 자연살해세포는 인터페론 또는 대식세포-유래 사이토카인에 대한 반응으로 활성화되고, 자연살해 세포는 "활성화 수용체" 및 "억제성 수용체"로 표지되는, 세포의 세포 독성 활성을 제어하는 2가지 유형의 표면 수용체를 포함한다. 자연살해세포는 임의의 공급원, 예를 들어 태반 조직, 태반 관류액,

제대혈, 태반혈, 말초혈, 지라, 간 등으로부터의 조혈 세포, 예를 들어 조혈 줄기 또는 전구체로부터 생성될 수 있다.

[16] 일 구체예에 있어서, 상기 자연살해세포는 활성화된 자연살해세포 일 수 있다. 상기 활성화된 자연살해세포는 모세포, 예를 들면, 조혈 세포, 또는 자연살해전구세포에 비해, 세포 독성, 또는 자연살해세포의 본연의 면역조절능이 활성화된 세포를 의미할 수 있다. 구체적 실시양태에서, 활성화된 자연살해세포는 CD3-CD56+이다. 구체적 실시양태에서, 활성화된 자연살해세포는 CD3-CD56+CD16-이다. 다른 구체적 실시양태에서, 활성화된 자연살해세포는 추가로 CD94+CD117+이다. 다른 구체적 실시양태에서, 활성화된 자연살해세포는 추가로 CD161-이다. 다른 구체적 실시양태에서, 활성화된 자연살해세포는 추가로 NKG2D+이다. 다른 구체적 실시양태에서, 활성화된 자연살해세포는 추가로 NKp46+이다. 다른 구체적 실시양태에서, 활성화된 자연살해세포는 추가로 CD226+이다. 특정 실시양태에서, 상기 활성화된 자연살해세포의 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 92%, 94%, 96%, 98% 초과는 CD56+ 및 CD16-이다. 다른 실시양태에서, 상기 활성화된 자연살해세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 82%, 84%, 86%, 88% 또는 90%는 CD3- 및 CD56+이다. 다른 실시양태에서, 상기 활성화된 자연살해세포의 적어도 50%, 52%, 54%, 56%, 58% 또는 60%는 NKG2D+이다. 다른 실시양태에서, 상기 세포의 30%, 20%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4% 또는 3%는 NKB1+이다. 특정 다른 실시양태에서, 상기 활성화된 자연살해세포의 30%, 20%, 10%, 8%, 6%, 4% 또는 2% 미만은 NKAT2+이다. 특정 다른 실시양태에서, 상기 활성화된 자연살해세포의 30%, 20%, 10%, 8%, 6%, 4% 또는 2% 미만은 CD56+ 및 CD16+이다. 보다 구체적인 실시양태에서, 상기 CD3-, CD56+ 활성화된 자연살해세포의 적어도 10%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65% 또는 70%는 NKp46+이다. 다른 보다 구체적인 실시양태에서, 상기 CD3-, CD56+ 활성화된 자연살해세포의 적어도 10%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80% 또는 85%는 CD117+이다. 다른 보다 구체적인 실시양태에서, 상기 CD3-, CD56+ 활성화된 자연살해세포의 적어도 10%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% 또는 50%는 CD94+이다. 다른 보다 구체적인 실시양태에서, CD3-, CD56+ 활성화된 자연살해세포의 적어도 10%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% 또는 50%는 CD161-이다. 다른 보다 구체적인 실시양태에서, 상기 CD3-, CD56+ 활성화된 자연살해세포의 적어도 10%, 12%, 14%, 16%, 18% 또는 20%는 CD226+이다. 다른 보다 구체적인 실시양태에서, 상기 CD3-, CD56+ 활성화된 자연살해세포의 적어도 20%, 25%, 30%, 35% 또는 40%는 CD7+이다. 보다 구체적인 실시양태에서, 상기 CD3-, CD56+ 활성화된 자연살해세포의 적어도 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55% 또는 60%는 CD5+이다.

[17] 일 구체예에 있어서, 활성화된 자연살해세포 또는 활성화된 자연살해세포가 풍부한(enriched) 집단은 1종 이상의 기능적으로 관련된 마커, 예를 들어 CD94,

CD161, NKp44, DNAM-1, 2B4, NKp46, CD94, KIR, 및 활성화 수용체의 NKG2 패밀리(예를 들어, NKG2D)를 검출함으로써 평가될 수 있다.

[18] 일 구체예에 있어서, 활성화된 자연살해세포는 상기 기재된 조혈 세포로부터 생성될 수 있다. 특정 실시양태에서, 활성화된 자연살해세포는 증식된 조혈 세포, 예를 들어 조혈 줄기 세포 및/또는 조혈 전구 세포로부터 수득될 수 있다. 구체적 실시양태에서, 조혈 세포는 영양 세포의 사용 없이 제1 배지에서 지속적으로 증식 및 분화된다. 이후에, 세포는 영양 세포의 존재 하에 제2 배지에서 배양된다. 이러한 분리(단리), 증식 및 분화는 중앙 시설에서 수행될 수 있고, 이는 사용 지점, 예를 들어 병원 등에서의 증식 및 분화를 위한 증식된 조혈 세포를 제공한다.

[19] 일 구체예에 있어서, 활성화된 자연살해세포의 생성은 조혈 세포의 집단을 증식시키는 단계를 포함한다. 세포 증식 동안, 조혈 세포 집단 내 복수개의 조혈 세포는 자연살해세포로 분화한다.

[20] 본 명세서에서 활성화된 자연살해세포는 자연살해세포의 증식/분화 및 성숙의 2단계 방법에 의해 생성될 수 있다. 제1 및 제2 단계는 세포 인자의 특유의 조합을 갖는 배지에서 세포를 배양하는 단계를 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 방법은 (a) 인터루킨 등을 포함하는 제1 배지에서 조혈 세포의 집단을 배양 및 증식시키고, 여기서 상기 조혈 세포 집단 내 복수개의 조혈 줄기 또는 전구 세포를 자연살해세포로 분화시키는 단계; 및 (b) 단계 (a)로부터의 자연살해세포를 인터루킨 등을 포함하는 제2 배지에서 증식시키고, 여기서 자연살해세포가 더 증식 및 분화되고, 자연살해세포가 성숙되는 단계(예를 들어, 활성화되거나, 다르게는 세포독성 활성을 포함함)를 포함한다. 다른 구체예에 있어서, 상기 방법은 단계 (a) 및 (b) 사이의 중간 단계, 단계 (a) 이전의 추가 배양 단계, 및/또는 단계 (b) 이후의 추가 단계(예를 들어, 성숙 단계)를 포함하지 않을 수 있다.

[21] 본 명세서에서 용어 "자연살해 전구세포", 또는 "NK 전구 세포", 또는 그의 세포 집단은 예를 들어, 1종 이상의 표현형 마커(marker), 예를 들어 CD56, CD16, 및 KIR의 발현 수준으로 나타낸 바와 같은, 아직 성숙한 자연살해세포로 발전하지 않은 자연살해세포 계통의 세포를 포함하는 세포 또는 그의 집단을 의미할 수 있다. 일 실시양태에서, 자연살해 전구 세포 집단은 낮은 CD16 및 높은 CD56을 갖는 세포를 포함한다. 예를 들어, 자연살해 전구 세포 집단은 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 또는 50%의 CD3-CD56+ 세포를 포함한다. 다른 구체적 실시양태에서, 상기 자연살해 전구 세포 집단은 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 또는 50% 이하의 CD3-CD56+ 세포를 포함한다. 다른 구체적 실시양태에서, 상기 자연살해 전구 세포 집단은 0%-5%, 5%-10%, 10%-15%, 15%-20%, 20%-25%, 25%-30%, 30%-35%, 35%-40%, 40%-45%, 또는 45%-50% 사이의 CD3-CD56+ 세포를 포함한다.

[22] 일 구체예에 있어서, 상기 자연살해 전구 세포 집단에서 상기 CD3-CD56+

세포는 추가로 CD117+이다. 구체적 실시양태에서, 상기 자연살해 전구 세포 집단에서 상기 CD3-CD56+ 세포의 약 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99%가 CD117+이다. 다른 구체적 실시양태에서, 상기 자연살해 전구 세포 집단에서 상기 CD3-CD56+ 세포의 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 이상이 CD117+이다. 다른 구체적 실시양태에서, 상기 자연살해 전구 세포 집단에서 상기 CD3-CD56+ 세포의 65%-70%, 70%-75%, 75%-80%, 80%-85%, 85%-90%, 90%-95%, 또는 95%-99% 사이가 CD117+이다.

[23] 다른 구체예에 있어서, 자연살해 전구 세포 집단에서 상기 CD3-CD56+ 세포는 추가로 CD161+이다. 구체적 실시양태에서, 상기 자연살해 전구 세포 집단에서 상기 CD3-CD56+ 세포의 약 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 또는 75%가 CD161+이다. 다른 구체적 실시양태에서, 상기 자연살해 전구 세포 집단에서 상기 CD3-CD56+ 세포의 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 또는 75% 이상이 CD161+이다. 다른 구체적 실시양태에서, 상기 자연살해 전구 세포 집단에서 상기 CD3-CD56+ 세포의 40%-45%, 45%-50%, 50%-55%, 55%-60%, 60%-65%, 65%-70%, 또는 70%-75% 사이가 CD161+이다.

[24] 또 다른 구체예에 있어서, 상기 자연살해 전구 세포 집단에서 상기 CD3-CD56+ 세포는 추가로 NKp46+이다. 구체적 실시양태에서, 상기 자연살해 전구 세포 집단에서 상기 CD3-CD56+ 세포의 약 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 그 이상이 NKp46+이다. 다른 구체적 실시양태에서, 상기 자연살해 전구 세포 집단에서 상기 CD3-CD56+ 세포의 약 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 또는 55%가 NKp46+이다. 다른 구체적 실시양태에서, 상기 자연살해 전구 세포 집단에서 상기 CD3-CD56+ 세포의 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 또는 55% 이하가 NKp46+이다. 다른 구체적 실시양태에서, 상기 자연살해 전구 세포 집단에서 상기 CD3-CD56+ 세포의 25%-30%, 30%-35%, 35%-40%, 40%-45%, 45%-50%, 50%-55%, 55%-60%, 60%-65%, 65%-70%, 70%-75%, 75%-80%, 80%-85%, 85%-90% 사이 또는 그 이상이 NKp46+이다. 보다 구체적인 실시양태에서, 상기 자연살해 전구 세포 집단에서 상기 CD3-CD56+ 세포의 25%-30%, 30%-35%, 35%-40%, 40%-45%, 45%-50%, 또는 50%-55% 사이가 NKp46+이다.

[25] 또한, 예를 들면, 상기 자연살해 전구 세포 집단은 CD52+, CD16+, CD244+ CD94+, 또는 CD94+에 대해서도 상기한 바와 같다.

[26] 본 명세서에서 상기 자연살해세포는 유전적으로 변형 또는 조작된 것일 수 있다.

[27] 본 명세에서 "유전적 변형(genetical modification)" 또는 "유전적 조작 (genetical engineering)"이란 세포의 유전물질의 구성 또는 구조를 인위적으로 변경시키는 것을 포함한다.

[28] 일 구체예에 있어서, 자연살해세포는 유전적으로 변형되어, 표적 특이성 및/또는 호밍 특이성이 향상된 것일 수 있다.

[29] 일 구체예에 있어서, 유전적으로 변형된 자연살해세포는 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하는 자연살해세포이다. CAR은 항원에 대한 면역 세포(예를 들어, T 림프구)를 유도하고, 상기 면역 세포를 자극하여 항원을 나타내는 세포를 치사시키는 인공 막 결합 단백질이다. CAR은 항원, 예를 들어 세포 상의 항원에 결합하는 세포외 도메인, 막관통 도메인, 및 면역 세포에 1차 활성화 신호를 전송하는 세포내(세포질) 신호전달 도메인(즉, 세포내 자극 도메인), 및/또는 공동-자극 도메인을 포함한다. 다른 모든 조건이 충족되며, CAR이, 예를 들어 T 림프구, 예를 들어 1차 T 림프구의 표면 상에 발현되고, CAR의 세포외 도메인이 항원에 결합할 때, 세포외 신호전달 도메인은 T 림프구에 신호를 전송하여 활성화 및/또는 증식시키며, 또한 상기 항원이 세포 표면 상에 존재하는 경우, 항원을 발현하는 세포를 치사시킨다. 일부 면역 세포, 예를 들어 T 림프구 및 자연살해세포는 최대 활성화를 위해 2개의 신호, 즉 1차 활성화 신호 및 공동자극 신호가 필요하고, CAR은 또한 세포외 도메인에 대한 항원의 결합이 1차 활성화 신호 및 공동자극 신호 둘다의 전송을 야기하도록, 공동자극 도메인을 포함할 수 있다.

[30] 다른 구체예에 있어서, 유전적으로 변형된 자연살해세포는 호밍 수용체를 포함하는 자연살해세포일 수 있다. 이는 상기 호밍 수용체를 포함하는 세포가 특정 해부학적 구역, 특히 조직, 또는 특정 유형의 세포, 예를 들어 림프절, 위장관, 또는 피부의 B 세포 구역에 머물게 한다.

[31] 또 다른 구체예에 있어서, 유전적으로 변형된 자연살해세포는 본원에 기재되는 바와 같이 CAR 및 호밍 수용체 둘다를 포함하는 자연살해세포이다.

[32] CAR 및/또는 호밍 수용체를 포함하는 자연살해세포는 당업계에 공지된 임의의 방법에 의해 생성될 수 있다. 일부 실시양태에서, CAR 및/또는 호밍 수용체를 포함하는 자연살해세포는 CAR 및/또는 호밍 수용체를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 1종 이상의 벡터에 자연살해세포를 도입(예를 들어, 형질주입(transfection)에 의해)함으로써, CAR 및/또는 호밍 수용체를 발현하도록 조작된다. 일부 실시양태에서, 자연살해세포가 생성될 수 있는 세포(예를 들어, CD34+ 조혈 줄기 세포)는 우선 세포에 CAR 및/또는 호밍 수용체를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 1종 이상의 벡터를 도입(예를 들어, 형질주입에 의해)함으로써, CAR 및/또는 호밍 수용체를 발현하도록 조작되고, 이후에 상기한 바와 같은 방법에 의해 CAR 및/또는 호밍 수용체를 포함하는 자연살해세포가 유도될 수 있다.

[33] 일 구체예에 있어서, CAR의 세포외 도메인은 항원 결합 도메인이다. 구체적 실시양태에서, 항원 결합 도메인은 scFv 도메인이다. 특정 실시양태에서, 항원 결합 도메인은 TAA에 특이적으로 결합한다. 구체적 실시양태에서, TAA는 CD123, CLL-1, CD38, CD20, 및 CS-1로 이루어진 군으로부터 선택된다. 보다 구체적인 실시양태에서, 항원 결합 도메인은 CS-1에 결합하는 항체로부터 유래된 단일쇄 Fv(scFv) 또는 항원 결합 단편을 포함한다. 보다 구체적인

실시양태에서, 항원 결합 도메인은 엘로투주맙의 단일쇄 및/또는 엘로투주맙의 항원 결합 단편을 포함한다. 구체적 실시양태에서, 항원 결합 도메인은 CD20에 결합하는 항체로부터 유래된 단일쇄 Fv(scFv) 또는 항원 결합 단편을 포함한다.

[34] 일 구체예에 있어서, CAR의 세포내 자극 도메인은 CD3 제타(zeta) 신호전달 도메인이다.

[35] 일 구체예에 있어서, CAR의 공동-자극 도메인은 CD28, 4-1BB, PD-1, OX40, CTLA-4, NKp46, NKp44, NKp30, DAP10 또는 DAP12의 세포내 도메인을 포함한다.

[36] 일 구체예에 있어서, 호밍 수용체는 주화성 수용체(chemotactic receptor)이다. 구체적 실시양태에서, 주화성 수용체는 CXCR4, VEGFR2, 및 CCR7로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[37] 이하에서는, 본 명세서의 자연살해세포의 활성을 증가시키는 물질에 대해 상세히 설명한다.

[38] 본 명세서에서 용어 "자연살해세포의 활성을 증가시키는 물질"은 생체 내에 투여되어 자연살해세포의 활성, 예를 들면, 세포독성 활성을 증가시키거나, 활성화된 자연살해세포를 생성, 증가, 또는 증식시킬 수 있는 임의의 물질을 의미할 수 있다.

[39] 일 구체예에 있어서, 자연살해세포 자체 뿐만 아니라, 자연살해세포의 활성을 증가시킬 수 있는 물질을 시험관 내(*in vitro*) 또는 생체 내(*in vivo*)에 투여하여 손상된 신경 세포를 제거할 수 있음을 확인하였으므로, 일 구체예에 따른 자연살해세포의 활성을 증가시키는 물질은 손상된 신경 또는 비정상적 신경의 제거, 또는 치료, 또는 신경 병증 등에 유용하게 사용될 수 있다.

[40] 일 구체예에 있어서, 자연살해세포의 활성을 증가시키는 물질은 면역 사이토카인, NK 세포 활성화 수용체의 작용제, 또는 NK 세포 억제성 수용체의 길항제를 포함할 수 있다.

[41] 본 명세서에서 사용되는 용어, "사이토카인 (Cytokine)"은 신체 내 방어 체계를 제어하고, 생체를 자극하는 신호 물질로서, 생리활성 조절 단백질을 의미할 수 있다. 사이토카인은 자가분비 (autocrine), 파라크라인 (paracrine) 작용을 통하여 다양한 세포에서 세포 활성화, 분화, 세포 이동, 노화, 사멸 유도 등 다양한 생물학적 활성을 조절한다. 상기 사이토카인은 예를 들어, INF(Interferon) 패밀리, IL (Interleukin) 패밀리, TNF (Tumor necrosis factors) 패밀리, 또는 이들의 조합일 수 있다. 더욱 상세하게는, 상기 사이토카인은 IL-2, IL-5, IL-8, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21 및 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것일 수 있다. 더욱 상세하게는, 상기 인터페론은 1형 인터페론(예를 들면, 인터페론-α, 인터페론-β, 인터페론-κ, 인터페론-ω), 2형 인터페론(예를 들면, 인터페론-γ), 3형 인터페론 또는 이들의 조합일 수 있다. 또한, 상기 TNF는 TNF-α, TNF-β, 또는 TNF-γ 등을 포함할 수 있다. 또한, 상기 면역 사이토카인은 사이토카인-항체 복합체를 포함할 수 있다. 예를 들면, 인터루킨(예를 들면,

IL-2)-항-인터루킨(예를 들면, anti-IL-2) 항체 복합체를 포함할 수 있다.

[42] 상기 NK 세포 활성화 수용체의 작용제는, 활성화 수용체에 결합하는 항체 또는 앱타머, BiKEs(Bispecific Killer Engagers) 또는 TriKEs(Trispecific Killer Engagers)를 포함할 수 있다.

[43] 상기 활성화 수용체에 결합하는 항체 또는 앱타머의 예시는, GITR에 대한 항체, OX40에 대한 항체, CD137에 대한 항체, CD27에 대한 항체, OX40 작용성 앱타머(angoistic aptamer), CD137 작용성 앱타머, NKG2D 리간드 (예를 들면, 마우스에서의 MULT-1 (murine UL16-binding protein-like-1) 또는 H60, 또는 사람에서의 MICA (MHC I-related chain A), MICB(MHC I-related chain B) 또는 ULBPs(unique long 16-binding proteins)), 또는 CD226 작용제를 포함할 수 있다.

[44] 상기 BiKE 또는 TriKEs는 2개의 단일쇄 가변 단편(scFvs)을 함유하고, 표적 세포 사멸을 중재하기 위해 표적 세포(예를 들어, 손상된 신경세포, 종양 세포 또는 감염된 세포) 및 자연살해세포 둘 다에 특이적으로 결합하는 시약이다(TriKES의 경우, 자연살해세포의 두 개의 표면 항원 또는 수용체에 결합한다).

[45] 이들은 자연살해세포를 이용하여 표적 세포(예를 들어, 손상된 신경세포, 종양 세포 또는 감염된 세포)를 공동 중재시키고, 이에 따라 자연살해세포 중재 항체-의존성 세포성 세포독성(ADCC)을 유발하는데 사용된다. BiKE는 당업계에 공지된, 예를 들어 Gleanson, M. K., et al., Mol Cancer Ther, 11: 2674-2684 (2012); Vallera, D. A., et al., Cancer Biother Radiopharm, 28: 274-282 (2013); Wiernik, A., et al., Clin Cancer Res, 19: 3844-3855 (2013); Reiners, K. S., et al., Mol Ther, 21: 895-903 (2013); Singer, H., et al., J Immunother, 33: 599-608 (2010); 또는 Gleason, M. K., et al., Blood, 123: 3016-3026 (2014)에 기재된 바와 같은 임의의 방법에 의해 생성될 수 있다. BiKE의 1종의 scFv는 표적 세포(예를 들어, 손상된 신경세포, 종양 세포 또는 감염된 세포)의 표면 상의 항원에 특이적으로 결합하고, 다른 scFv는 자연살해세포 상의 수용체(예를 들어, CD16과 같은 Fc 수용체)에 특이적으로 결합한다. 일 구체예에 있어서, BiKE는 TAA 또는 RAE1(Retinoic Acid Early 1)에 특이적으로 결합하는 제1 scFv와 활성화 수용체, 예를 들면, CD16에 특이적으로 결합하는 제2 scFv를 포함한다.

[46] 상기 NK 세포 억제성 수용체의 길항제는, 억제성 수용체에 결합하는 항체 또는 앱타머를 포함할 수 있다. NK 세포 억제성 수용체의 예시는, CTLA-4, PD-1, PD-L1, Tim-3, CD96, KIR, NKG2A, 또는 TIGIT(T-cell immunoglobulin and ITIM domain)를 포함할 수 있다. 따라서, NK 세포 억제성 수용체는 상기 열거된 수용체에 대한 항체를 포함할 수 있다.

[47] 이하에서는, 본 명세서의 신경 손상 또는 비정상적 신경에 의한 신경계 질환에 대해 상세히 설명한다.

[48] 본 명세서에서 "신경 손상(nerve injury)"은 축삭 변성 또는 월러변성(Wallerian degeneration) 등을 포함하는 신경 조직, 또는 신경 세포의 손상을 의미할 수 있다.

또한, 상기 신경 손상은 손상 정도에 따라 (말초에서), 월러 변성을 동반하지 않는 신경압박(Neuropraxia), 월러 변성을 동반하는 축삭손상(Axonotmesis), 또는 축삭의 연속성이 끊어지는 신경절단(Neurotmesis)를 포함할 수 있다.

[49] 본 명세서에서 "비정상적 신경(abnormal nerve)"은 원시적 또는 후발적 요인으로 신경조직 또는 신경 세포의 일부분 또는 전부에 변화가 발생하여 비정상적인 신경 활성을 나타내는 것을 의미할 수 있다. 상기 비정상적 신경은 신경 손상 또는 그 외의 요인으로 인해 유도되는 변화를 포함하며, 퇴화, 괴사, 비대화, 비정상적 증식, 전도기능 저하 등의 구조적 또는 기능적 변형을 포함할 수 있다. 예를 들어, 혈관성 치매 또는 뇌경색 등과 같이 혈관이 막힘에 따라 산소 공급 부족으로 신경 퇴화가 발생하는 경우, 중추신경 흥분독성이 유발되어 신경 퇴화가 발생하는 경우 등을 포함할 수 있다.

[50] 본 명세서에서 “신경 손상 또는 비정상적 신경에 의한 신경계 질환”은 중추신경계의 신경 손상 또는 비정상적 신경에 의한 신경계 질환 또는 말초신경계의 신경 손상 또는 비정상적 신경에 의한 신경계 질환일 수 있고, 손상 등이 발생한 부위와 정도에 따라 마비, 경련, 발작, 인지장애, 언어장애, 기억장애, 이상행동, 감정조절장애, 어지럼증, 구토, 보행장애, 호르몬 이상, 평형감각 이상, 통증, 감각이상, 운동기능 저하, 저림, 시림, 화끈거림 등의 증상을 동반하거나 동반하지 않는 것일 수 있다. 예를 들어, 중추신경계의 신경손상 또는 비정상적 신경에 의한 신경계 질환의 경우 마비, 경련, 발작, 인지장애, 언어장애, 기억장애, 이상행동, 감정조절장애, 어지럼증, 구토, 보행장애, 호르몬 이상, 평형감각 이상 등의 증상을 주된 증상으로 동반할 수 있고, 말초신경계의 신경 손상 또는 비정상적 신경에 의한 신경계 질환의 경우 통증, 감각이상, 운동기능 저하, 저림, 시림, 화끈거림 등의 증상을 주된 증상으로 동반할 수 있다. 중추신경계는 뇌와 척수를 포함하는 신경계로, 외상 또는 질병 등에 의해 척수가 손상되면 뇌와 신체 사이에 신경전달이 정상적으로 이루어지지 못하여 운동 또는 감각 등의 마비를 초래하는 것일 수 있다. 말초신경계는 12쌍의 뇌신경, 31쌍의 척수신경, 및 자율신경을 포함하는 신경계로, 손상 부위에 따라 안면신경 손상으로 인한 안면마비, 시신경 손상으로 인한 실명, 동안신경 손상으로 인한 눈꺼풀 마비, 청신경 손상으로 인한 난청 또는 현기증 등의 증상을 초래하는 것일 수 있다.

[51] 일 구체예에 있어서, 상기 중추신경계의 신경 손상 또는 비정상적 신경에 의한 신경계 질환은 중추 신경 계통의 기질적 질환 및 기능장애, 뇌전증, 다발성 경화증, 근위축성 측색 경화증, 알츠하이머, 루이체 치매, 헌팅턴병, 파킨슨병, 조현병, 외상성 뇌손상, 뇌졸중, 픽크병, 크로이츠펠트 야콥병, 진행성 핵상마비, 다계통 위축증, 피질-기저핵 퇴행증, 척수소뇌 변성증, 소뇌 위축증, 외상 후 스트레스 장애, 기억상실증, 혈관성 치매, 및 뇌경색으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 일 수 있다. 본 명세서에서 “중추 신경 계통의 기질적 질환 및 기능장애”는 중추신경계의 신경 손상 또는 비정상적 신경으로 인해 마비, 경련,

발작, 인지장애, 언어장애, 기억장애, 이상행동, 감정조절장애, 어지럼증, 구토, 보행장애, 호르몬 이상, 평형감각 이상, 통증 등의 증상을 나타내는 질환을 의미할 수 있다. 특정 실시양태에서, 상기 중추신경계의 신경 손상 또는 비정상적 신경에 의한 신경계 질환은 중추신경계 흥분독성(excitotoxicity)과 관련된 것일 수 있다. 예를 들어, 뇌전증, 다발성 경화증, 근위축성 측생 경화증, 알츠하이머, 루이체 치매, 헌팅턴병, 파킨슨병, 조현병, 외상성 뇌손상, 뇌졸중 등일 수 있으며, 그 외 중추신경계 흥분독성과 관련된 퇴행성 뇌질환을 포함할 수 있다.

[52] 일 구체예에 있어서, 상기 말초신경계의 신경 손상 또는 비정상적 신경에 의한 신경계 질환은 말초신경병증, 당뇨성 신경병증, 말초신경병증성 통증, 항암화학요법 치료로 인한 말초신경병증, 복합부위통증증후군, 시신경병증, 단일신경병증, 다발성 단일신경병증(다발성 단일신경염), 다발신경병증, 길랭-바래 증후군(급성 염증성 탈수초 다발신경병증), 만성 염증성 탈수초 다발신경병증, 유전성 신경병증, 신경총 장애, 녹내장, 황반변성, 근위축성 측생 경화증, 진행성 근육위축, 진행성 연수마비, 소아마비, 소아마비 후 증후군, 강직-인간 증후군, 아이작스 증후군, 중증근육무력증, 신생아 근육 무력증, 보툴리누스 중독, 이튼-람베르트 증후군, 흉곽출구 증후군, 샤르코-마리-투스병, 및 척수성 근육위축으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[53] 일 구체예에 있어서, 상기 당뇨성 신경병증은 다발성 말초신경병증 (polyneuropathy) 또는 국소성 말초신경병증 (focal neuropathy)인 것일 수 있다. 일 구체예에 있어서, 상기 다발성 말초신경병증은 고혈당성 신경병증 (hyperglycemic neuropathy), 원위부 대칭성 다발신경병증 (distal symmetric polyneuropathy), 자율신경병증 (autonomic neuropathy), 급성 감각신경병증 (acute sensory neuropathy), 급성 통증성 감각신경병증 (acute painful sensory neuropathy) 및 만성 운동성 감각신경병증 (chronic sensorimotor neuropathy)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나인 것인 것일 수 있다. 일 구체예에 있어서, 상기 국소성 말초신경병증은 뇌신경병증 (cranial neuropathy), 몸통 신경병증 (truncal neuropathy), 사지 신경병증 (limb neuropathy), 흉요추신경병증 (thoracolumbar radiculoneuropathy) 및 요천골 신경총근병증 (lumbosacral radiculoplexus neuropathy)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나인 것일 수 있다.

[54] 본 명세서에서 "신경병증성 통증"은 IASP에 의해 신경계의 일차적인 손상 또는 기능장애에 의해 개시되거나 유발된 통증으로 규정될 수 있다(IASP, Classification of chronic pain, 2nd Edition, IASP Press(2002), 210). 신경병증성 통증은 만성적, 비악성(non-malignant) 통증의 전형적인 타입으로, 말초 또는 중추 신경계의 손상 또는 부전(malfunction)의 결과이며 보호의 생물학적 기능을 제공하지 않는다. 병인학적으로 외상(trauma), 외과수술(surgery), 추간판 탈출증, 척수손상, 당뇨병, 대상포진으로 인한 감염, HIV/AIDS, 말기암, 유방절제술을

포함하는 절단수술, 손목 터널 증후군, 만성적 알콜섭취, 방사선 노출 및 특정 항-HIV 및 화학요법 약물들과 같은 신경독성 치료제의 예상치 못한 부작용으로 인하여 발생할 수 있다.

[55] 본 명세서에서 "말초 신경계의 신경 손상 또는 비정상적 신경에 의해 유도되는 신경병증성 통증" 또는 "말초신경병증성 통증"은 말초신경계의 일차 손상, 기능장애에 의해 개시되거나 유발되는 신경병증성 통증을 의미할 수 있다.

[56] 일 구체예에 있어서, 상기 말초신경병증성 통증은 말초신경계 이상 또는 손상에 의한 통증, 삼차 신경통(trigeminal neuralgia), 당뇨성 신경병증성 통증(diabetes neuropathy pain), 환지통(phantom limb pain), 바이러스 감염, 외상, 암, 또는 알코올 중독에 의한 통증, 항암 약물치료(chemotherapy) 후에 오는 통증, 비정형 안면통증(atypical facial pain), 포진성 신경통(post herpetic neuralgia), 및 신경학적 장애로부터 야기되는 신경병증성 통증을 포함할 수 있다.

[57] 일 구체예에 있어서, 상기 당뇨성 신경병증은 다발성 말초신경병증 (polyneuropathy) 또는 국소성 말초신경병증 (focal neuropathy)인 것일 수 있다. 일 구체예에 있어서, 상기 다발성 말초신경병증은 고혈당성 신경병증 (hyperglycemic neuropathy), 원위부 대칭성 다발신경병증 (distal symmetric polyneuropathy), 자율신경병증 (autonomic neuropathy), 급성 감각신경병증 (acute sensory neuropathy), 급성 통증성 감각신경병증 (acute painful sensory neuropathy) 및 만성 운동성 감각신경병증 (chronic sensorimotor neuropathy)으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나인 것인 것일 수 있다. 일 구체예에 있어서, 상기 국소성 말초신경병증은 뇌신경병증 (cranial neuropathy), 몸통 신경병증 (truncal neuropathy), 사지 신경병증 (limb neuropathy), 흉요추신경병증 (thoracolumbar radiculoneuropathy) 및 요천골 신경총근병증 (lumbosacral radiculoplexus neuropathy)으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나인 것일 수 있다.

[58] 일 구체예에 따른 분리된 자연살해세포, 면역세포, 그의 세포 집단, 자연살해세포 또는 면역세포의 활성을 증가시키는 물질, 또는 이들의 조합은 손상된 또는 비정상적인 축삭(신경 세포)의 제거를 촉진할 수 있다. 그러므로 상기 질환들 외에도 손상된 또는 비정상적인 신경 세포를 제거함으로써 해당 손상 또는 비정상으로부터 비롯된 마비, 경련, 발작, 인지장애, 언어장애, 기억장애, 이상행동, 감정조절장애, 어지럼증, 구토, 보행장애, 호르몬 이상, 평형감각 이상, 통증, 감각이상, 운동기능 저하, 저림, 시림, 화끈거림 등의 증상을 완화시킬 수 있는 질환에 적용될 수 있으며, 특히, 문제가 되는 부위를 수술적으로 제거하거나 신경의 활성을 억제시켜 증상을 완화하는 질환에 유용하게 사용될 수 있다.

[59] 특정 실시양태에서, 자연살해세포, 면역세포 또는 그의 세포 집단, 유전적으로 변형된 자연살해세포, 면역세포 또는 그의 세포 집단은 개체에 대한 검출 가능한 치료상 이익을 야기하는 임의의 양 또는 수, 예를 들어 유효량으로 개체에 사용,

예를 들어 투여될 수 있다. 세포는 세포의 절대수 또는 상대수로 이러한 개체에 투여될 수 있으며, 예를 들어 상기 개체는 약, 적어도 약, 또는 최대 약 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 5×10^8, 1×10^9, 5×10^9, 1×10^{10}, 5×10^{10}, 또는 1×10^{11}개의 세포로 투여 받을 수 있다. 또한, 일구체예 따른 자연살해세포의 활성을 증가시키는 물질은 조성물 총 중량에 대하여 0.001 중량% 내지 80 중량%로 포함될 수 있다. 자연살해세포의 활성을 증가시키는 물질의 투여 용량은 0.01mg 내지 10,000mg, 0.1mg 내지 1000mg, 1mg 내지 100mg, 0.01mg 내지 1000mg, 0.01mg 내지 100mg, 0.01mg 내지 10mg, 또는 0.01mg 내지 1mg일 수 있다. 다만, 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성별, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있고, 당업자라면 이러한 요인들을 고려하여 투여량을 적절히 조절할 수 있다. 투여 횟수는 1회 또는 임상적으로 용인가능한 부작용의 범위 내에서 2회 이상이 가능하고, 투여 부위에 대해서도 1개소 또는 2개소 이상에 투여할 수 있다. 인간 이외의 동물에 대해서도, kg당 인간과 동일한 투여량으로 하거나, 또는 예를 들면 목적의 동물과 인간과의 기관(심장 등)의 용적비(예를 들면, 평균값) 등으로 상기의 투여량을 환산한 양을 투여할 수 있다. 가능한 투여 경로에는 경구, 설하, 비경구 (예를 들어, 피하, 근육내, 동맥내, 복강내, 경막내, 또는 정맥내), 직장, 국소 (경피 포함), 흡입, 및 주사, 또는 이식성 장치 또는 물질의 삽입을 포함할 수 있다. 더욱 상세하게는, 자연살해세포의 단리 집단 또는 이의 약제학적 조성물을 개체에게 투여하는 단계는 주사, 주입, 정맥내 투여, 대퇴부내 투여, 또는 통증 부위의 투여에 의한 것일 수 있다. 일 구체예에 따른 치료의 대상동물로서는, 인간 및 그 밖의 목적으로 하는 포유동물을 예로 들 수 있고, 구체적으로는 인간, 원숭이, 마우스, 래트, 토끼, 양, 소, 개, 말, 돼지 등이 포함된다.

[60] 일 구체예에 따른 약학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체 및/또는 첨가물을 포함할 수 있다. 예를 들어, 멸균수, 생리식염수, 관용의 완충제(인산, 구연산, 그 밖의 유기산 등), 안정제, 염, 산화방지제(아스코르브산 등), 계면활성제, 현탁제, 등장화제, 또는 보존제 등을 포함할 수 있다. 국소 투여를 위해, 생체고분자(biopolymer) 등의 유기물, 하이드록시아파타이트 등의 무기물, 구체적으로는 콜라겐 매트릭스, 폴리락트산 중합체 또는 공중합체, 폴리에틸렌글리콜 중합체 또는 공중합체 및 그의 화학적 유도체 등과 조합시키는 것도 포함할 수 있다. 일 구체예에 따른 약학적 조성물이 주사에 적당한 제형으로 조제되는 경우에는, 자연살해세포, 면역세포, 또는 그의 활성을 증가시키는 물질은 약학적으로 허용가능한 담체 중에 용해되어 있거나 또는 용해되어 있는 용액상태로 동결된 것일 수 있다.

[61] 일 구체예에 따른 약학적 조성물은 그 투여방법이나 제형에 따라 필요한 경우, 현탁제, 용해보조제, 안정화제, 등장화제, 보존제, 흡착방지제, 계면활성화제, 희석제, 부형제, pH 조정제, 무통화제, 완충제, 환원제, 산화방지제 등을 적절히

포함할 수 있다. 상기에 예시된 것들을 비롯하여 본 발명에 적합한 약학적으로 허용되는 담체 및 제제는 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed., 1995]에 상세히 기재되어 있다. 일 구체예에 따른 약학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질 중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 분말, 과립, 정제 또는 캡슐 형태일 수 있다.

[62]

[63] 다른 양상은 분리된 자연살해세포, 그의 세포 집단, 자연살해세포의 활성을 증가시키는 물질, 또는 이들의 조합을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 신경 손상 또는 비정상적 신경에 의한 신경계 질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다. 상기 방법에 있어서, 분리된 자연살해세포, 면역세포, 그의 세포 집단 또는 자연살해세포, 또는 면역세포의 활성을 증가시키는 물질, 신경 손상에 의한 신경계 질환, 예방, 치료에 대해서는 상술한 바와 같다.

[64]

[65] 또 다른 양상은 신경 손상 또는 비정상적 신경에 의한 신경계 질환을 예방 또는 치료하기 위한 약학적 조성물의 제조에 사용하기 위한 분리된 자연살해세포, 그의 세포 집단, 자연살해세포의 활성을 증가시키는 물질, 또는 이들의 조합의 용도를 제공한다. 상기 용도에 있어서, 분리된 자연살해세포, 면역세포, 그의 세포 집단 또는 자연살해세포, 또는 면역세포의 활성을 증가시키는 물질, 신경 손상에 의한 신경계 질환, 예방, 치료에 대해서는 상술한 바와 같다.

[66]

[67] 또 다른 양상은 분리된 자연살해세포, 그의 세포 집단, 자연살해세포의 활성을 증가시키는 물질, 또는 이들의 조합을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 손상된 또는 비정상적인 신경 세포를 제거하는 방법을 제공한다. 상기 방법에 있어서, 분리된 자연살해세포, 면역세포, 그의 세포 집단 또는 자연살해세포, 또는 면역세포의 활성을 증가시키는 물질, 신경 세포 손상에 대해서는 상술한 바와 같다.

발명의 효과

[68] 일 양상에 따른 자연살해세포, 면역세포 또는 그의 활성을 증가시키는 물질에 의하면, 자연살해세포가 손상된 신경부위로 침투하여, 손상된 신경세포를 직접 제거함으로써 신경 손상 또는 비정상적 신경에 의한 신경계 질환의 근본적 치료에 유용하게 사용될 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[69] 도 1은 성체 마우스의 비장으로부터 자연살해세포를 분리, 농축, 활성화하여 배아 DRG 뉴런에 대한 IL-12로 자극된 자연살해세포의 세포독성을 확인한

결과이다: (도 1A) 비자극된 자연살해세포(왼쪽)와 IL-12로 자극된 자연살해세포(오른쪽)에 대해 세포내 그랜자임 B를 염색한 결과; (도 1B) 음성 MACS 농축 처리에 의한 비장 림프구 내 NKp46+DX5+ 자연살해세포의 변화(오른쪽 상단 4분면)를 유세포 분석을 통해 확인한 결과; (도 1C) 직접 접촉 조건 또는 트랜스-웰 막에 의해 분리된 조건 하에서, IL-12로 자극된 NK세포와 공동 배양시킨 후 배아 DRG 뉴런에 대한 면역염색(β-tubulin III)을 수행한 결과; (도 1D) 자연살해세포-DRG 뉴런 공동 배양 배지에서 그랜자임 B를 ELISA로 검출한 결과; 및 (도 1E) DRG 뉴런의 자연살해세포-매개 용해에 NKG2D 수용체가 미치는 영향를 확인한 결과이다.

[70] 도 2는 배양된 배아 DRG 뉴런에서 RAE1에 의한 NK-매개된 세포 독성에 대한 감수성을 확인한 결과이다: (도 2A) IL-12로 자극된 자연살해세포와 공동 배양된 배아 DRG 뉴런 또는 성체 DRG 뉴런 내의 β-tubulin(자홍색)과 NKp46(녹색)을 면역표지한 결과; (도 2B) 다양한 비율의 작용인자(NK): 표적 (DRG) (E:T)으로 처리된 급성 배양된 배아 DRG 뉴런 또는 성체 DRG 뉴런을 대상으로 LDH-방출 세포 독성 분석을 수행한 결과; (도 2C) 로다민-3AM으로 처리된 배아 DRG 뉴런 또는 성체 DRG 뉴런과, NKp46-YFP 수컷 성체 마우스 유래 IL-12로 자극된 자연살해세포를 공동 배양하면서, 시험관 내 저속(time-lapse) 공초점 Ca^{2+} 이미지를 확인한 결과; (도 2D) 배아 DRG 뉴런 또는 성체 DRG 뉴런과 IL-12로 자극된 자연살해세포를 공동 배양하면서, 신경돌기 Ca2+ 이벤트에 대한 빈도수를 시간의 경과에 따라 확인한 결과; (도 2E) 비처리된 비장 자연살해세포, 배아 DRG 뉴런, 또는 성체 DRG 뉴런에서 mRNA 전사체(Raet1, NK1.1, Advillin)의 발현을 RT-PCR로 확인한 결과; (도 2F) 배아 DRG 뉴런 또는 성체 DRG 뉴런에서의 Raet1 mRNA 발현을 qRT-PCR로 확인한 결과; (도 2G) 배아 DRG 뉴런 또는 성체 DRG 뉴런에서 pan-RAE1 항체를 사용하여 웨스턴 블롯을 수행한 결과; (도 2H) Raet1 선택적인 siRNA를 사용하여 배아 DRG 뉴런에서의 Raet1 mRNA을 넉다운시킨 결과; 및 (도 2I) Raet1 mRNA을 넉다운시킨 배아 DRG 뉴런을 대상으로 LDH-방출 세포 독성 분석을 수행한 결과이다.

[71] 도 3은 손상된 성체 DRG 뉴런에서 Raet1의 발현 증가와 자연살해세포-매개 신경돌기의 단편화를 확인한 결과이다: (도 3A) IL-12로 자극된 자연살해세포에 노출된 채로 성체 DRG 뉴런을 미세유체 배양시킨 뒤, 신경돌기 내 β-tubulin III을 면역표지한 결과; (도 3B) DRG 신경돌기의 밀도를 정량화한 결과; (도 3C) 성체 DRG 뉴런 배양물에서 시간의 경과에 따른 Raet1 mRNA 발현의 변화를 qRT-PCR을 통해 확인한 결과; (도 3D) 1일 및 2일째, 시험관 내 성체 DRG 배양물의 RAE1 단백질 발현을 웨스턴 블롯으로 확인한 결과; (도 3E) 성체 DRG 단독 배양물(시험관 내 2일째), 또는 IL-12로 자극된 자연살해세포와 공동 배양된 성체 DRG 배양물 내 β-tubulin III을 면역표지한 결과; (도 3F) DRG 신경돌기의 단편화를 정량화한 결과; (도 3G) Raet1 선택적인 siRNA를 사용하여 시험관 내 성체 DRG 뉴런에서의 Raet1 mRNA을 넉다운시킨 결과; (도 3H) Raet1 siRNA로

형질감염된, 성체 DRG 단독 배양물 (시험관 내 2일째), 또는 IL-12로 자극된 자연살해세포와 공동 배양된 성체 DRG 배양물 내 β-tubulin III을 면역표지한 결과; 및 (도 3I) DRG 신경돌기의 단편화를 정량화한 결과이다.

[72] 도 4는 자연살해세포에 대한 NKG2D 수용체의 차단이 성체 DRG 뉴런의 신경돌기 퇴행에 미치는 영향을 확인한 결과이다: (도 4A) 성체 DRG 뉴런에 항-NKG2D 항체를 전처리하고, IL-12로 자극된 자연살해세포와 공동 배양시킨 뒤, β-tubulin III을 면역표지한 결과; 및 (도 4B) DRG 신경돌기의 단편화를 정량화한 결과이다.

[73] 도 5는 말초 신경의 손상이 Raet1의 발현에 미치는 영향, 그리고, 감각 뉴런의 손상이 자극된 자연살해세포에 의한 신경돌기의 단편화에 미치는 영향을 확인한 결과이다: (도 5A) 요추(L3, L4, 및 L5) DRG와 관련된 척추 신경 절단 부위를 나타낸 다이어그램; (도 5B) 대측성 DRG에 대한 척추 신경 절제술 이후, 시간의 경과에 따른 동측성 L5 DRG 내 Raet1 mRNA의 발현을 qRT-PCR로 확인한 결과; (도 5C) 성체 DRG 뉴런(시험관 내 1일째)에서 손상과 연관된 Raet1 mRNA의 발현을 qRT-PCR로 확인한 결과; (도 5D) IL-12로 자극된 자연살해세포와, 손상되지 않은 (sham) DRG 뉴런을 공동 배양(4시간)시키고, 이로부터 7일째 분리된 L5 DRG 뉴런 내 β-tubulin III을 면역표지한 결과; (도 5E) 상기 DRG 뉴런 신경돌기의 단편화를 정량화한 결과; (도 5F) IL-12로 자극된 자연살해세포와, 신경 절제술이 실시된 DRG 뉴런을 공동 배양(4시간)시키고, 이로부터 7일째 분리된 L5 DRG 뉴런 내 β-tubulin III을 면역표지한 결과; (도 5G) 상기 DRG 뉴런 신경돌기의 단편화를 정량화한 결과; (도 5H) L5 척수 신경 절단 손상이 유도된 성체 수컷 NKp46-YFP 마우스로부터 얻어진 좌골 신경 조직 절편을 항-GFP로 면역표지한 결과; (도 5I) 전체 좌골 신경 세포 분쇄액으로부터 게이팅된 림프구 FCC/SSC 내 YFP-양성 이벤트 총 수를 정량화한 결과; (도 5J) L5x 손상을 유도한 후, 야생형 마우스의 전체 좌골 신경 내 그랜자임 B의 함량을 ELISA로 정량화한 결과; 및 (도 5K) L5x 손상을 유도한 후, NKp46-DTR 마우스의 전체 좌골 신경 내 그랜자임 B의 함량을 ELISA로 정량화한 결과이다.

[74] 도 6은 NKp46-cre 마우스의 특성을 확인한 결과이다: (도 6A) 항-NKp46 및 항-CD3 항체로 표지된 NKp46-YFP 마우스로부터 유래된 말초 혈액 림프구에 대하여 유세포 분석을 실시한 결과; (도 6B) 야생형 및 NKp46-YFP 마우스로부터 얻은 비장 조직 절편을 항-GFP 항체(녹색)로 면역표지한 결과; 및 (도 6C) DTx (100ng)을 정맥 내로 투여한지 24시간 경과 후, 야생형 및 NKp46-DTR 마우스로부터 유래된 말초 혈액 림프구에 대하여 유세포 분석을 실시한 결과이다.

[75] 도 7은 말초 신경 엑손 내 RAE1에 좌골 신경의 압착이 미치는 영향을 확인한 결과이다: (도 7A) 요추(L3, L4, 및 L5) DRG와 관련된 좌골 신경 압착 손상을 나타낸 다이어그램; (도 7B) 수술 후 3일 및 7일째, 동측성 L3-5 DRG 내 압착 손상과 연관된 Raet1 mRNA의 발현을 qRT-PCR로 확인한 결과; (도 7C) 말초

신경 압착 손상 후 (3일 및 7일째), 좌골 신경 내 RAE1 단백질의 발현을 확인한 결과; (도 7D) 말초 신경 압착 손상 후(3일 및 7일째), DRG 뉴런 내 RAE1 단백질의 발현을 확인한 결과; 및 (도 7E) 강력한 결찰 후(3일 및 7일째), 좌골 신경 내 엑손 마커 β- tubulin III(자홍색)과 RAE1(녹색)의 공동 국소화를 확인한 결과이다.

[76] 도 8은 전신성 자연살해세포 고갈이 좌골 신경 손상 이후 감각 신경 손상에 미치는 영향을 확인한 결과이다: (도 8A) 좌골 신경 압착 손상 후 7일째, 성체 수컷 NKp46-YFP 마우스로부터 유래한 좌골신경 조직 절편을 확인한 결과; (도 8B) 좌골 신경 압착 손상 후 3일째, 성체 수컷 NKp46-YFP 마우스로부터 얻는 좌골 신경 세포분쇄액을 대상으로 유세포 분석을 실시한 결과; (도 8C) 전체 좌골 신경 세포분쇄액 유래의 림프구 FSC/SSC 게이트 내 CD45+/YFP+ 이중 양성 이벤트의 총 수를 정량화한 결과; (도 8D) 4일 내지 5일마다 DTx를 정맥투여한 NKp46-DTR 마우스를 대상으로 일일 핀 자극 반응 점수(Daily pin prick response score)의 변화를 확인한 결과; (도 8E) 전체 좌골 신경 손상 및 회복 과정에서 누적되는 감각과 관련된 AUC(Area under the curve) 값을 나타낸 결과; (도 8F) 외측 뒷발을 대상으로 핀 자극에 대한 평균 민감도 나타낸 히트 맵; 및 (도 8G) 좌골 신경 압착 후 16일째 말초 혈액 내 NKp46+/DX5+ 이중 양성 림프구를 정량화한 결과이다.

[77] 도 9는 압착 손상 또는 sham 손상 후, 전체 좌골 신경 내 그랜자임 B를 정량화한 결과이다: (도 9A) 야생형 마우스를 대상으로 압착 손상 또는 sham 손상 후, 전체 좌골 신경 내 그랜자임 B를 정량화한 결과; 및 (도 9B) NKp46-DTR 마우스를 대상으로 압착 손상 또는 sham 손상 후, 전체 좌골 신경 내 그랜자임 B를 정량화한 결과이다.

[78] 도 10은 IL-2/IL-2 항체 복합체가 부분적 좌골 신경 압착에 의한 자연살해세포-의존성 급성 감각 상실에 미치는 영향을 확인한 결과이다: (도 10A) IL-2/IL-2 항체 복합체의 처리에 의한 일시적인 민감성의 감소를 일일 핀 자극 반응 점수를 통해 확인한 결과; (도 10B) IL-2/IL-2 항체 복합체를 처리한 마우스에서 누적되는 감각의 상실과 관련된 AUC 값을 나타낸 결과; (도 10C) 외측 뒷발을 대상으로 핀 자극에 대한 평균 민감도 나타낸 히트 맵; (도 10D) IL-2/IL-2 항체 복합체의 처리에 의한 말초 혈액 내 NKp46+DX5+ 자연살해세포, CD3+CD8+ T 세포, 또는 CD3+CD4+ T 세포의 변화를 확인한 결과; (도 10E) 자연살해세포를 고갈시키기 위한 항-NK1.1을 처리한 마우스에서, IL-2/IL-2 항체 복합체의 처리에 의한 일시적인 민감성의 감소를 일일 핀 자극 반응 점수를 통해 확인한 결과; (도 10F) IL-2/IL-2 항체 복합체를 처리한 마우스에서 누적되는 감각의 상실과 관련된 AUC 값을 나타낸 결과; (도 10G) 외측 뒷발을 대상으로 핀 자극에 대한 평균 민감도 나타낸 히트 맵; 및 (도 10H) IL-2/IL-2 항체 복합체의 처리에 의한 말초 혈액 내 NKp46+DX5+ 자연살해세포, CD3+CD8+ T 세포, 또는 CD3+CD4+ T 세포의 변화를 확인한 결과이다.

[79] 도 11은 자연살해세포의 고갈이, 부분적인 좌골 신경 압착 후 IL-2 복합체 처리에 의한 급성 감각 상실에 미치는 영향을 확인한 결과이다: (도 11A) NKp46-DTR 마우스에 부분적 좌골 신경 압착과 함께, DTx를 처리한 경우, IL-2/IL-2 항체 복합체의 처리에 의한 일시적인 민감성의 감소를 일일 핀 자극 반응 점수를 통해 확인한 결과; (도 11B) 외측 뒷발을 대상으로 핀 자극에 대한 평균 민감도 나타낸 히트 맵; 및 (도 11C) IL-2/IL-2 항체 복합체의 처리에 의한 말초 혈액 내 NKp46+DX5+ 자연살해세포, CD3+CD8+ T 세포, 또는 CD3+CD4+ T 세포의 변화를 확인한 결과이다.

[80] 도 12는 IL-2/IL-2 항체 복합체가 좌골 신경 내 액손 손상에 의한 장기 기계적 역치에 미치는 영향을 확인한 결과이다: (도 12A) IL-2/IL-2 항체 복합체를 처리한 마우스에 부분적 손상을 유도한 지 6일째, 전장 이방성 좌골 신경 절편내 β-tubulin III을 면역표지하고 이를 정량화한 결과 (a-근위부, b-손상 부위, c-원위부); 및 (도 12B) IL-2/IL-2 항체 복합체를 처리한 마우스에 부분적 손상을 유도한 지 6일째, 전장 이방성 좌골 신경 절편내 Stathmin 2를 면역표지하고 이를 정량화한 결과; (도 12C) 상기 (도 12A) 및 (도 12B)에서 β-tubulin III 및 Stathmin 2의 면역형광을 고배율로 관찰한 결과; (도 12D) IL-2/IL-2 항체 복합체를 처리한 마우스에 부분적 손상을 유도한 지 16일째, 뒷발의 동측성 기계적 민감도 역치를 확인한 결과; (도 12E) 항-NK1.1 항체를 처리한 마우스에 부분적 손상을 유도하고, IL-2/IL-2 항체 복합체를 처리한지 15일째, 뒷발의 동측성 기계적 민감도 역치를 확인한 결과; 및 (도 12F) 손상된 사지의 기계적 민감도 결과와 누적된 핀 자극 민감도와의 상관관계를 확인한 결과이다.

[81] 도 13은 만성적으로 결찰된 좌골 신경에서 RAE1(녹색) 및 STMN2(자홍색)를 동시에 면역표지한 결과이다.

[82] 도 14A 내지 도 14C는 자연살해세포가 중추신경의 흥분독성이 유발된 뇌 조직에 선택적으로 침투함을 확인한 사진이다.

발명의 실시를 위한 형태

[83] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[84]

[85] <u>참고예 1. 실험재료</u>

[86] 모든 절차는 서울 대학교의 동물 윤리 관리위원회 (IACUC) (승인 번호 : SNU-121011-1)의 승인을 받았으며, ARRIVE 지침(Kilkenny et al., 2010)에 따라 보고되었다. 성체 수컷 및 임신 암컷 야생형 C57BL / 6 마우스는 대한바이오링크(Taconic, Korea)로부터 구입하였다. Rosa26eyfp (RRID : IMSR_JAX : 006148) (Srinivas et al., 2001)와 Rosa26dtr (RRID : IMSR_JAX : 007900) (Buch et al., 2005)은 Jackson Laboratories (USA)로부터 구입되었다. Ncr1

(Nkp46) 유전자(Narni-Mancinelli et al., 2011)의 3' 말단에서 상동재조합에 의해 삽입된 cre-재조합효소를 함유한 Ncr1icre 마우스 (RRID : MGI : 5308422)는 Eric Vivier 박사의 연구실로부터 제공받았다. 모든 마우스는 SPF 시설에서 동형 접합체로 유지되었다. 이중 이형 접합체 Nrc1icre / wt; rosa26eyfp / wt (약칭 NKp46-YFP) 및 Nrc1icre / wt; rosa26dtr / wt (약칭 NKp46-DTR) 마우스를 SPF 시설에서 단교배시키고 적어도 실험 1 주일 전에 conventional room으로 옮겼다. 마우스를 12 시간 : 12 시간의 명암주기(8:00 a.m.에 켜짐)로 유지시키고, 케이지 당 4-6 마리의 마우스를 wood chip bedding에 넣고 표준적인 실험실 사료 및 물을 임의로 제공하였다. DRG 뉴런 및 자연살해세포를 수컷 C57BL / 6 마우스(6-8 주차)로부터 준비하였다; 배아 DRG 뉴런은 안락사된 암컷 C57BL / 6 마우스 자궁의 15 일째 배아(E15)로부터 준비되었다. 신경 손상 실험은 7-9주차의 표시된 유전형을 가진 수컷 마우스에게 수행되었다. 동물들은 1986년 영국동물(과학적 절차)법의 부칙 1에 따라 치사량의 아이소플루레인(isoflurane)을 흡입하게 한 후 조직 배양을 위해 치사량의 이산화탄소를 흡입하게 하는 등의 방법을 통해 처리하였다.

[87]

[88] **참고예 2. 실험과정**

[89] **2-1. 자연살해세포 고갈**

[90] NKp46-DTR 마우스는 레트로-오비탈 주사(retro-orbital injection) (Yardeni et al., 2011)에 의해 정맥 내로 디프테리아 독소 (DTx; 100 ng) 또는 멸균 PBS 용액(100 μl)이 주입되었다. 아이소플루레인 (3 % 유도, 100 % O2에서 1-2 % 유지) 마취 하에 한 쪽 눈에 안과용 시약 (0.5 % proparacaine, Alcon, Belgium)을 국소마취제로서 도포하였다. 인슐린 (0.3 ml, BD Biosciences)을 눈의 부비강에 삽입하여 천천히 주사했고, 양 쪽 눈에 번갈아 주사하였다. 수술 전 하루 전에 시작되는 눈을 멀게 하는 디프테리아 독소 또는 멸균 PBS 용액의 주사는 실험 기간 동안 4 ~ 5일 간격으로 계속되었다. 유세포 분석기에 의해 실험 마지막 단계에서 고갈 효율 확인을 위하여, 모든 마우스로부터 혈액 샘플이 채취되었다. 자연살해세포의 항체 고갈을 위해, 야생형 C57BL / 6 마우스에 100 μg의 LEAF 정제된 항-마우스 NK1.1 (클론 PK136) (Biolegend, cat no. 108712, RRID : AB_313399) 또는 LEAF 정제된 IgG2a, κ 이소타입 대조군 (클론 MOPC-173) (Biolegend, cat no 400224, RRID : AB_326472)을 레트로-오비탈 주사(retro-orbital injection)에 의해 신경 손상 하루 전에 정맥내로 주입하였다.

[91] **2-2. L5 척추 신경 절개 (L5x)**

[92] 7-9 주차 수컷 마우스를 아이소플루레인 흡입 하에 놓고, 등의 요추 부위를 면도한 뒤, 요오드 용액(Potadine)으로 처리하여 L6 척추와 평행하게 일측성 절개를 하였다. 차가운 광원으로 조명된 x 20 해부 현미경에서 L6 횡축 process가 드러나도록 둔성 분리로 근육조직을 분해했고, 그 후 절단 및 제거되었다. L6 process 바로 아래를 지나는 L5 척수 신경은 결합 조직을 조심스럽게 제거하고

미세한 스프링 가위로 잘라내었다; 1 mm의 신경을 제거하여 신경 재생을 막았다. 상처는 멸균 생리 식염수로 세척하고 6-0 실크 봉합사(Ailee, Korea)와 9mm 스킨 클립(MikRon Precision, CA, USA)으로 두 층 구조로 닫았다. 마우스는 수술에서 회복하기 위해 따뜻하고 어두운 케이지에 두었다.

[93] **2-3. 궁둥 신경 압착**

[94] 성체 수컷 마우스(7-9 주차)의 궁둥 신경(Bridge et al., 1994)에 단일한 일측의 압착 손상을 수행하였다. 상세하게는, 아이소플루레인 마취하에 오른쪽 넓적 다리를 면도하고 요오드를 처리하여 중간 길이로 절개하였다. 궁둥 신경은 무딘 포셉 파열로 근육을 분리함으로써 궁둥 구멍으로부터 나오며 노출되었다. 신경은 결합 조직으로부터 조심스럽게 제거되고 미세하게 경면 처리된 포셉(No 5, Dumont, Fine Science Tools, Germany)을 사용하여 15 초 동안 완전하게 압착하였다. 상처 부위는 겹쳐지는 근막을 두 개의 봉합과 하나의 피부 클립을 사용하여 두 층으로 닫았다. 궁둥 신경의 완전한 압착은 수술 후 다음 날 pin-frick 검사에서 감각 점수 0점에 해당하여 성공한 것으로 간주되었다; 수술 후 24 시간 이내에 pin-frick 반응을 보인 마우스는 분석에서 제외시켰다. 부분 (보통) 압착을 위해서는 궁둥 신경을 완전히 닫았을 때 30μm의 틈새를 만들고자 초 미세 헤모스타트(haemostat) (Cat no. 13020-12, Fine Science Tools, Germany)에 두 층의 알루미늄 호일(두께 15㎛)로 제작된 주문형 스페이서를 장착하였다. 궁둥 신경은 조심스럽게 결합 조직을 제거하고, 불꽃 연마 된 유리 막대를 사용하여 부드럽게 들어올려 (팁에서 2-3 mm) 헤모스타트의 스페이서 사이에 놓았다. 그 다음 헤모스타트는 제 1 잠금 위치에서 닫히고 신경이 조심스럽게 풀리기 전 15 초 동안 유지되었다. 상처 부위는 겹쳐지는 근막을 두 개의 봉합과 하나의 피부클립을 사용하여 두 층으로 닫았다. 마우스는 따뜻하고 어두운 케이지에서 회복되었다. 모든 도구는 수술 전에 오토클레이브(autoclaved)되었고, 엄격한 무균 상태는 유지되었다.

[95] **2-4. IL-2/항-IL-2 항체 복합체 처리**

[96] 재조합 마우스 IL-2 (Cat no. 212-12, lot no. 0608108, Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA)는 PBS (캐리어 단백질 없이)에서 0.1 mg/ml의 원료로서 준비되었으며, 제조사의 지시에 따라 4℃에서 1 주일 동안 보관되었다. 처리 당일에, IL-2(마우스 당 1.5㎍)를 항-마우스 IL-2 단일 클론 항체(마우스 당 50㎍) (S4B6-1 클론) (BioXCell; RRID : AB_1107705)와 미리 혼합하고 실온에서 15 분 동안 배양하였다. 결합된 사이토카인 / 항체 복합체를 추가로 500㎕의 총 부피로 멸균 PBS에서 희석하고 복강 내 주사하였다. 주사는 하루에 한 번(저녁 시간)씩 4 일 동안 받았다. 대조 실험을 위해 마우스에게 동일한 양의 래트(rat) IgG2a 이소타입 펩타이드(클론 2A3) (BioXCell; RRID : AB_1107769)를 주사하였다. IL-2 항체 복합체 처리의 효능은 최종 주사 후 다음날 PBS 주사 마우스와 비교하여 비장의 확대에 의해 확인되었다 (Boyman et al., 2006).

[97] **2-5. 행동학적 평가**

[98] 모든 감각 검사는 22 ± 2℃및 50 ± 10% 습도로 유지되는 격리된 방에서 오전 9시에서 오후 6시 사이에 수행되었다. 기계적 역치 (von Frey 필라멘트) 검사를 위해 마우스를 동물 콜로니에서 가져 와서 금속 메쉬 바닥에 5x5 mm 구멍이 있는(Ugo Basile, Italy) 투명 플라스틱 상자에 넣었다. 그 다음, 마우스를 검사 전에 적어도 30 분 동안 익숙해지도록 하였다. 기계적 민감성을 평가하기 위해 일련의 von Frey 필라멘트(미국, IL, Wood Dale, Stoelting의 0.20, 0.40, 0.70, 1.6, 3.9, 5.9, 9.8 및 13.7 mN, 그램 당 0.02, 0.04, 0.07, 0.16, 0.40, 0.60, 1.0 및 1.4)를 사용하여 영향을 받은 뒷발의 withdrawal 역치를 측정하였다. 이전에 기술된 바와 같이 up-down 방법을 사용하여 50 % withdrawal 역치를 결정하였다(Chaplan et al., 1994). von Frey 필라멘트 자극에 반응하는 활발한 뒷발 리프트 또는 움츠림은 withdrawal 반응으로 간주되었다. 0.4g 필라멘트는 첫 번째로 사용된 자극이었으며, withdrawal 반응이 얻어지면 다음으로 약한 필라멘트가 사용되었다. 반응이 없을 때까지 이 과정을 반복하였고, 그 다음으로 강한 필라멘트가 사용되었다. Dixon (Dixon, 1980)의 방법을 사용하여 50% 역치의 보간법(interpolation)을 수행하였다. 모든 행동실험은 마우스의 처리를 볼 수 없는 실험자에 의해 수행되었다. Pin-prick 감각 회복 검사는 이전에 설명한 바에 약간의 수정을 가하여 수행되었다 (Ma et al., 2011). 마우스는 분리 된 구획 내의 상승된 메쉬에 익숙해졌다. 영향을 받은 뒷발의 측면은 발가락부터 발 뒤꿈치까지 다섯 개의 영역으로 분리되어 스테인리스 강 Austerlitz insect pin (Size 000, FST, Germany)으로 자극되었다. 감각 반응은 발의 급속한 리프팅 또는 움츠림에 의해 확인되었다. 피부에 대한 두 개의 연속적인 핀 적용에 대한 반응의 수는 영역 당 10 점 만점으로 기록되었다. 발이나 뒷발의 직접적인 운동으로 인한 반응 (extraterritorial proprioception)을 나타내는 것)은 제외되었다. 모든 마우스에 대해 전체 감각 회복 (10 점)이 관찰될 때까지 매일 테스트를 수행하였다.

[99] **2-6. DRG 뉴런의 배양**

[100] 성체 또는 배아 DRG는 얼음처럼 차가운 Ca^{2+} - 및 Mg^{2+}- 가 없는 Hank의 완충액 생리 식염수(HBSS, Welgene) (20mM HEPES 포함)에서 빠르게 해부되었고, collagenase A (1mg/ml) 및 dispase II (2.4U/ml) (Roche, Switzerland)에서 37℃로 30-60분 동안 소화되었다. 추가적인 소화를 트립신(0.25 %)에서 5-7 분 동안 수행하고, PBS 중의 트립신 저해제(2.5 mg/ml) (Sigma, T9003)로 중단시킨 후, 10% 혈청 (Gibco, Life Technologies)을 함유하는 Dubellco의 변형된 이글 배지(Dubellco's Modified Eagle Medium) (Gibco, Life Technologies)에서 세척하였다. DRG를 DNase I (125U/ml)를 함유하는 DMEM 내에서 불꽃 연마된 유리 피펫으로 분쇄(trituration)하여 해리시키고, B27 보충제, L-글루타민 (1 mM), 페니실린 (100U/ml) 및 50 ng/ml의 신경 성장 인자(NGF 2.5S)가 보충된 스트렙토마이신(100 U / ml)을 갖는 신경 섬유 배지(neurobasal medium)(Gibco, Life Technologies)에서 재현탁시키기 전에 소 혈청 알부민 층(15 % BSA 용액;

Sigma)에서 200g로 원심 분리하였다. 폴리-D-라이신 (10 μg/ml) 및 라미닌(10 μg/ml)으로 코팅된 10 mm 직경의 유리 커버 슬립, 유리 바닥 접시(glass bottom dishes) 또는 96 웰 평평한-바닥 배양 플레이트(96 well flat-bottom culture plates) (Nunclon, Thermo Scientific) 상에 성체 DRG (103 세포) 및 배아 DRG(8 × 103 세포)를 플레이팅시켰다. 손상된 DRG 실험에서, 동측 L5 DRG는 L5x 또는 거짓 수술(sham surgery) 7 일 후에 성체 마우스로부터 얼음처럼 차가운 HBSS에서 빠르게 해부되고, 모아져서 (그룹당 n = 3 DRG) 상기와 같은 단일 세포 현탁액으로 해리되었다. DRG를 폴리-D-라이신 및 라미닌-코팅된 유리 바닥 접시(1 접시 당 103 세포)에 씨딩하고 NGF (50 ng/ml)를 함유하는 신경 섬유 배지에서 밤새 배양하였다. 미세유체(microfluidic) 공동배양을 위해, 성체 마우스에서 분리된 DRG 뉴런(위와 같음)을 신경 섬유 배지에 현탁시키고, 폴리 - D - 라이신 (10 μg/ml) 및 라미닌(10μg/ml)(시그마)으로 코팅된 미세유체장치(Xona Microfluidics, 캘리포니아, 미국)의 somal reservoir에 시드시켰다 (104 세포). NGF (100 ng / ml)를 신경 돌기 reservoir의 배지에 첨가하였다. 뉴런은 신경 돌기가 신경 돌기 reservoir에 연결된 3 μm x 500 μm 채널을 따라 자라나는 5일 동안 배양되었다.

[101] **2-7. NK세포 분리 및 자극**

[102] 자연살해세포는 성체 수컷 C57BL / 5 마우스(6-8 주령)의 비장으로부터 준비하였다. 비장 세포를 70 ㎛ 및 40 ㎛ 세포 여과기(Falcon, BD Biosciences)를 순차적으로 통과시킴으로써 균질화시켰다. 적혈구는 ACK 용해 완충액(mM : 150 NH_4Cl, 10 $KHCO_3$, 0.1 Na_2EDTA, pH 7.3)에서 2 분 동안 배양하여 용해시켰다. 이후 단일 세포 현탁액을 B 세포 및 대식세포로 구성된 부착형 집단의 고갈을 위해 나일론 울 컬럼(nylon wool columns) (Polysciences, Warrington, PA)을 통과시켰다. 용출된 세포를 0.01M 인산 완충 식염수 (PBS) + 2mM EDTA 및 2 % FBS에 재현탁시켰다. 자연살해세포는 제조사의 지침에 따라 음성 선택 프로토콜(마우스 자연살해세포 분리 키트 II, cat no. 130-096-892, Miltenyi Biotech GmbH, Germany)과 조합하여 자기 관련 세포 분류(magnetic associated cell sorting) (MACS) 방법을 사용하여 농축시켰다. 상세하게는, 세포 현탁액을 비 자연살해세포에 대한 비오틴-접합된 단일 클론 항체의 칵테일, 이후 항-비오틴 마이크로 비드와 함께 4 ℃에서 순차적으로 배양하였다. 이어서, 세포 현탁액을 자기장(MidiMACS Separator, Miltenyi Biotech GmbH)에 놓인 LS 컬럼을 통과시켰다. 비드 - 접합된 비 자연살해세포는 컬럼 내에 남아 있었지만 비 표적화된 자연살해세포는 용리액을 통과하였다. 농축된 자연살해세포는 실험에 사용하기 전 이틀 동안 1000 U/ml에서 직접 사용되거나(대조군) 또는 재조합 마우스 인터루킨 (IL) - 2 (cat no. 212-12, 로트 번호 0608108, Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA)로 자극되었다. 자연살해세포는 96-웰 U-bottomed (Falcon, BD Biosciences) 플레이트에서 48 시간 동안 소태아혈청(FBS) (10 %)과 페니실린 / 스트렙토마이신(100 U/ml)으로 보충된 RPMI 1640 배지(Gibco, Life

Technologies)에서 2 x 10^6 세포/ml로 배양되었다. 용리액에서의 자연살해세포 (NKp46 + DX5 +)의 순도는 유동 세포 계측법에 의해 90 % 이상으로 일관되게 검사되었다. 그 후 세포들은 수확되고 공동 배양 및 세포 독성 실험에서 이펙터 세포(effecter cell)로서 사용되었다.

[103] **2-8. DRG - NK 공동배양**

[104] 대조군 또는 IL-2 자극된 자연살해세포를 수확하고, RPMI로 세척하고, 신경 섬유 배지에서 재현탁시켰다. DRG는 신경 배지(NGF- 부존재)에서 1회 세척하고 NK는 미세 유체 배양을 위해 신경 돌기 구획(5 × 10^5 cells)에 추가되거나 유리 커버 슬립 배양을 위해 DRG 바로 위에 직접 시드되었고 (2.5x10 ^{5} 세포), 37℃와 5 % CO_2에서 4시간 동안 공동배양되었다. 공동배양은 조심스럽게 따뜻한 HBSS에서 1회 세척되었고, 실온에서 30분 동안 0.01M PBS (pH 7.4)에서 2 ~ 4 % PFA로 고정시킨 후, β-튜블린 III와 NKp46(면역 형광법 참조)에 대한 면역 표지 전에 4℃에서 보관하여 PBS (3 x 10 분)로 세척한다. 트랜스-웰 실험을 위해 DRG의 유리 커버 슬립 배양은 500 μl 신경 미디어의 24-웰 플레이트로 옮겨졌다. 자연살해세포(웰당 2.5x10^5)를 0.4 μm의 구멍 크기(코닝)의 6.5 mm 직경의 폴리 카보네이트 트랜스-웰 막 삽입물에 시드하고 37℃ 및 5 % CO_2에서 4 시간 동안 배양한 후 상기와 같이 막 및 고정액을 제거하였다. NKG2D 기능의 항체 봉쇄를 위해, 자연살해세포는 표적 DRG 뉴런에 첨가되기 전에 실온에서 15분 동안 LEAF 정제된 항-마우스 CD314 (NKG2D) (CX5 클론) (Biolegend, cat no. 130204.RRID : AB_1227715) 또는 LEAF 정제된 래트 IgG1 이소타입 대조군 (클론 RTK2071) (Biolegend, cat no. 400414.RRID : AB_326520) 30 μg/ml로 배양되었다 (2.5 x 10^6 자연살해세포/㎖).

[105] **2-9. LDH-방출 세포 독성**

[106] LDH Cytotoxicity Assay Kit (Thermo Scientific Pierce, IL, US)를 사용하여 배양 배지로 lactate dehydrogenase (LDH)의 방출을 측정하여 이펙터 자연살해세포를 DRG 뉴런 표적에 대한 세포 독성을 분석하였다. 대조군 또는 IL-2 자극 된 자연살해세포를 수확하고, RPMI로 세척하고, 다양한 비율의 신경 혈청 배지에서 96 웰 플레이트(Nunclon, Thermo Scientific)의 DRG 배양물에 첨가하여, 4 시간 동안 배양한 후, 제조사의 지시에 따라 LDH 활성을 분석한 배지 상등액을 샘플링 하였다. 흡광도 값은 마이크로 플레이트 분광 광도계(BioTek Instruments, VT, US)에서 획득하였다. 각 비율은 3 중으로 결정되었다. 특정 세포 독성은 다음과 같이 계산되었다: 세포 독성 % = [(실험적 방출 - 자연 방출) / (최대 방출 - 자연 방출)] × 100. 최대 LDH 방출 감지를 위한 최적의 목표 세포 수(DRG 뉴런)는 실험 (8x10 배아 DRG 뉴런, 10^3 성체 DRG 뉴런) 전에 결정되었다.

[107] **2-10. 라이브 공초점 이미징**

[108] PDL 및 라미닌-코팅 된 유리-바닥 페트리 접시에서 하루 동안 배양된 성체 또는 배아 마우스 DRG (각각 10^3 및 8x10^3 뉴런)를 Vybrant DiI (Molecular Probes, cat no. V-22886)로 형광으로 표지하거나 Ca^{2+} 지표 로다민 3-AM(Molecular

Probes, cat no. R10145)을 제조자의 지시에 따라 첨가하였다. 이전에 NKp46-YFP 마우스로부터 분리 되어 48 시간 동안 IL-2 (1000U/㎖)를 자극한 자연살해세포를 신경 섬유 배지에 현탁시키고 커버 슬립(접시 당 2.5×10^5 세포)에 시딩하였다. DRG-NK 공동 배양물을 포함하는 접시를 즉시 공초점 현미경(LSM 700, Zeiss)으로 옮기고 37 ℃ 및 5 % CO2(Live Cell Instruments, Seoul Korea)의 가습 대기에서 유지시켰다. 단일 z- 섹션 이미지(512 x 512)의 시계열은 30-60초 간격으로 멀티 트랙 설정(488 nm 및 555 nm 형광 방출 및 미분 간섭 대조 (DIC) 명-시야)을 사용하고 Definite Focus의 제어하에 여러 위치를 사용하여 획득하였다. 이미지는 최대 3 시간 동안 수집되어 AVI 형식의 연속 저속으로 내보낼 수 있었다.

[109] **2-11. 생체 내 2 광자 궁둥 신경 이미지**

[110] 수컷 NKp46-YFP 마우스(8-9 주차)는 일측에 궁둥 신경 압착 또는 sham 수술을 받았다. 3 일째에, 기록 직전에 20 mg/kg을 보충한 펜토바비탈(pentobarbital) (80 mg/kg, i.p.)로 마우스를 마취시켰다. 일부 마우스는 레트로-오비탈 주사(100 μl, 10 mg/ml)를 통해 Dextran-Texas red (중성 40,000 m.w.) (Molecular Probes)를 투여하여 혈관을 시각화하고 기록하는 동안의 혈류 유지를 확인하였다. 궁둥 신경을 다시 노출시키고 멸균 생리 식염수에서 세척하였다. 마우스는 영상을 얻는 동안 35 ℃로 유지되는 따뜻한 패드 상에 놓였다. 신체로부터 신경을 기계적으로 분리하고 호흡에 의해 유발된 운동 인공물을 최소화하기 위해 궁둥 신경을 노출 된 신경의 양쪽 말단에서 미세 조작 장치를 통해 두 개의 유리 막대로 조심스럽게 들어올렸다. 혈관과 YFP-양성 세포를 확인하기 위해 W plan-Apochromat 20X 수침 렌즈를 압착 부위로부터 1-2mm 떨어진 신경 표면으로 낮추었다. Ti-sapphire 레이저(Chameleon, COHERENT)를 YFP와 텍사스 레드의 여기(excitation)를 위해 900nm의 파장으로 튜닝 한 후, 다음과 같이 레이저 스캐닝 공 초점 현미경(LSM 7MP, Zeiss)을 사용하여 3D 시간-경과 영상을 수행하였다: 단일 이미지 당 1024 x 512 픽셀, 픽셀 드웰 0.79μs, 30 초 간격으로 z-스택 당 2 μm x 25 개 단면 (총 50 μm 깊이). 2-광자 레이저 파워는 전체 파워의 5 ~ 8 %의 깊이에 따라 보정되었다. 이미지는 이미징 소프트웨어 (Zeiss Efficient Navigation 2012)를 사용하여 2D 비디오로 렌더링되었다.

[111] **2-12. DRG 작은 간섭 RNA 유전자 knockdown**

[112] 급속 분리된 성체 또는 E15 배아 DRG는 제조 업체의 지시에 따라 전기천공법 (네온, Invitrogen)에 의해 siRNA로 형질감염되었다. 상세하게는, DRG의 단일 세포 현탁액을 siRNA 올리고 뉴클레오타이드를 함유하는 전기 천공 배지에 현탁시키고, 금도금 전극(10μl 당 5x104 세포)을 함유하는 팁으로 끌었다(drawn into). 세포 팁을 전해질 완충액(electroporated) (1500V, 20ms)을 함유하는 튜브에 넣고, 전기천공 시키고(1500V, 20ms), 50ng / ml NGF를 함유한 페니실린 / 스트렙토마이신이 없는 신경 섬유 배지에 즉시 분출시키고 37 ℃, 5 % CO_2에서 48 시간 배양하여 knockdown 또는 기능적 실험을 평가하였다. 실험에 앞서 형질

감염 효율은 녹색 형광 단백질을 코딩하는 cDNA 플라스미드로 DRG를 전기 천공하는 것과 배양 2 일 후에 GFP 형광 검사를 통해 최적화되었다. 표적 당 2 개의 siRNA 올리고 뉴클레오타이드를 실시간 PCR에 의해 knockdown 효율을 시험하였다; 음성 대조군 인 siRNA 올리고 뉴클레오타이드와 비교하여 mRNA 발현을 70% 이상 감소시킨 siRNA 올리고체를 기능적 실험에 사용하였다. Gapdh siRNA 올리고 뉴클레오타이드 (10nM) (Silencer Select, Ambion, Life Technologies, cat no..4390849)를 양성 대조군으로 사용하였다.

[113] **2-13. 말초 혈액 림프구 분리**

[114] 레트로-오비탈 출혈로 얻은 말초 혈액 샘플에서 실험 종료 시 자연살해세포의 전신 고갈이 확인되었다. 상세하게는, 아이소플루레인 마취하에서 15ml 유리 파스퇴르 피펫을 레트로-오비탈 부비동에 삽입하고 천천히 비틀어 안와 정맥 신경총을 파열시켰다. 50-100μl의 혈액을 모세관 작용으로 제거하고 헤파린-코팅 튜브(Idexx Laboratories, USA)로 분출시켰다. 혈액 샘플을 동일한 부피의 무 혈청 RPMI로 희석하고, 림프구 분리 배지 (Lympholyte Mammal, Cedarlane Labs, Canada) 위에 부유시키고, 1000g에서 20 분 동안 느린 가속도 구배로 원심분리하였다. 말초 혈액 단핵 세포를 단층에서 채취하여 RPMI로 세척하고 유동 세포 계측법 분석을 위해 FACS 완충액(5 % FBS, 0.01M PBS 중의 0.002 % NaN_3)에 현탁시켰다.

[115] **2-14. 유세포 분석**

[116] 표면 표지를 위해 세포 현탁액을 5 ml 둥근 바닥 튜브로 옮기고 Fc 수용체를 비접합 된 래트 항-마우스 CD16 / CD32 (클론 2.4G2) 단일 클론 항체 (1 : 100; BD Biosciences, cat no. 553142.RRID : AB_394657)를 4 ℃에서 15 분간 처리하고 4 ℃에서 30 분 동안 형광-접합 항-마우스 1 차 항체의 조합으로 표지하였다. FACS 완충액으로 세척한 후 세포 현탁액을 4 색 유동 세포 계측기 (FACSCalibur, BD Biosciences)에서 실행하고 게이팅 된(gated) 집단을 Cell Quest 소프트웨어 (BD Biosciences)로 분석하였다. 림프구는 초기에 FSC-SSC 산포 프로파일(scatter profile)에 따라 게이팅되었다; 세포 집단은 비 표지 또는 IgG 대조군과 비교하여 형광 게이팅에 의해 동정되었다. 사용된 항체는 PE 래트 항-마우스 NKp46 (클론 29A1.4) 단일 클론 항체 (1 : 200, eBioscience, cat no. 12-3351.RRID : AB_1210743), APC 래트 항-마우스 CD49b (클론 DX5) 단일 클론 항체 (1:500; eBioscience, cat no. 17-5971. RRID:AB_469484), FITC 아르메니아 햄스터 항-마우스 CD3e (클론 145-2C11) 단일 클론 항체 (1 : 1000 , eBioscience, cat no. 11-0031.RRID : AB_464881), APC 래트 항-마우스 CD45 (클론 30-F11) 단일 클론 항체 (1 : 200, eBioscience, cat no 17-0451, RRID : AB_469393), PE 래트 항 - 마우스 CD4 (클론 GK1.5) 단일 클론 항체 (1 : 1000, eBioscience, cat no. 12-0041, RRID : AB_465507), APC 래트 항-마우스 CD8a (클론 53-6.7) 단일 클론 항체 (1 : 1000; eBioscience, cat no. 17-0081, RRID : AB_469335)였다. 유동 세포 계측법 항체의 titres는 동등한 농도의 형광-접합 IgG 이소타입 대조군과 비교하여 실험 전에 결정되었다. 말초

혈액 세포 집단의 백분율은 2 만개의 게이팅 된 림프구 이벤트로부터 계산되었다.

[117] **2-15. 세포 내 염색**

[118] 그랜자임 B 세포 현탁액을 세포 내로 표지 하기 위해 RPMI로 세척 하였고, FACS 완충액에 재현탁시키고, Fc 수용체를 4 ℃에서 15 분 동안 차단시켰다. 그 후 BD Cytofix/Cytoperm 완충액 (BD Biosciences, cat no. 554714)에서 4 ℃에서 20 분간 세포 고정 및 침윤(permeablisation)을 실시한 후, PE 래트 항-마우스 그랜자임 B (클론 NGZB) 단일 클론 항체(1:100; eBioscience, cat no. 12-8898. RRID:AB_10853811) 또는 PE 래트 IgG2a 이소타입 대조군 (1 : 100; eBioscience, cat no. 12-4321, RRID : AB_470052)으로 4℃에서 30 분 동안 표지하였고, BD Perm/Wash 완충액으로 세척하였다

[119] **2-16. 궁둥 신경 현탁액의 준비 및 유동 세포 계측법**

[120] 궁둥 신경에 존재하는 자연살해세포의 유동 세포 계측 분석을 위해, NKp46-YFP 마우스를 펜토바비탈(100mg / kg, i.p.)로 깊게 마취시킨 다음, 말초 신경 손상 후 다양한 시점에서 PBS (0.01M, pH 7.4)로 심근 관류를 실시하여 말초 혈액을 순환계에서 제거하였다. 양측성 궁둥 신경은 얼음처럼 차가운 Ca2 + 및 Mg2 +가 없는 HBSS (Welgene) (20mM HEPES 포함)로 빠르게 제거하고 1-2mm 조각으로 자른다. 조직을 15 ml 튜브에 옮기고 5 분 동안 500g에서 원심 분리 하였다. HBSS를 collagenase A (1mg/ml) 및 dispase II (2.4U/ml) (Roche, Switzerland)로 대체하고 자주 교반하면서 37℃에서 90 분간 배양하였다. 추가 소화는 트립신 (0.25 %)에서 5 분 동안 수행하고 PBS에서 트립신 억제제 (2.5 ㎎ / ㎖) (시그마, T9003)로 중지시킨 후 10 % 혈청을 함유하는 RPMI (Gibco, Life Technologies)에서 세척하였다. DNase I (125 U/ ml)를 함유하는 RPMI 내에서 불꽃-연마 된 유리 피펫을 사용하여 신경을 분쇄하여 해리시키고, 파편 (Miltenyi)을 제거하기 위해 30 ㎛ 분리 필터를 통과시켜 5 ml 둥근 바닥 튜브에서 FACS 완충액에 재현탁시켰다. 궁둥 신경 유동 세포 계측법을 시행하기 전에, CD45 + 림프구와 NKp46-YFP 세포 게이팅을 야생형 및 NKp46-YFP 마우스의 말초 혈액 림프구에 설정하였다. 궁둥 신경 샘플은 총 이벤트 수가 초당 50 개 이하가 될 때까지 느린 설정으로 실행되거나 게이팅된 이벤트는 5 초당 1 회 미만이었다. 자연살해세포는 림프구 FSC-SSC 산란 프로파일 및 YFP 형광에 의해 동정되었다; 일부 실험에서 총 림프구는 추가적으로 APC- 접합 항-마우스 CD45 항체 (1 : 400, eBioscience, cat no. 17-0451, RRID : AB_469393)로 표지되었다.

[121] **2-17. 조직 준비**

[122] 신경 손상 또는 sham 수술 후 특정 시점에서, 마우스를 펜토바비탈 (100 mg / kg, i.p.)로 깊게 마취시킨 후 헤파린 (500 U/L)을 함유한 PBS (0.01 M, pH 7.4)로 심근 관류에 의한 방혈을 하였다. 전체 DRG (요추 L3-L5) 및 전장 궁둥 신경 (말초 삼각화에 대한 척수 신경) 조직을 절개하여 액체 질소에서 즉시 동결시키고 분자

분석을 위해 -70℃에서 보관 한 샘플 튜브에서 수집하였다. 면역 조직 화학 염색을 위해 PBS 관류 후에 파라 포름 알데하이드 고정액 고정액 (0.1M PBS, pH 7.4에서 4 % PFA, 0.2 % 픽크릭 산)을 투여 하였다. 궁둥 신경을 24 시간까지 고정 후 4 ℃에서 자당 용액 (0.01M PBS, pH 7.4 중 30 % sucrose)에 동결 보존 하였다. 고정 된 궁둥 신경 조직을 냉동 섹션 화합물 (Optimal Cutting Temperature, Leica)에 묻고, 저온 유지 장치 (14μm)로 절단하고 유리 현미경 슬라이드 (Superfrost Plus, Fischer Scientific)에 해동시켰다.

[123] **2-18. 면역 형광법**

[124] PBS (3 x 10 분)에서 세척 후, 세포 및 조직을 실온에서 1 시간 동안 PBS 중의 0.1-0.3 % triton-X 100 및 10 % 정상 당나귀 혈청 (NDS, Jackson ImmunoResearch)에서 차단 및 투과시켰다. 일차 항체를 PBS 중 1 % NDS, 0.01-0.03 % triton-X 100에 가하고 가습된 방에서 4 ℃로 밤새 배양하였다. 사용된 1 차 항체는 다음과 같다: 토끼 항-β-튜불린 III (1 : 400-500, Sigma, cat no T2200.RRID : AB_262133), 염소 항-NKp46 (1 : 200, R & D Systems, cat no. AF2225, RRID : AB_355192), 토끼 항-STMN2 (1 : 500, Novus Biologicals, cat no. NBP1-49461 RRID : AB_10011569), 염소 항 마우스 pan-RAE1 항체 (1:40, R & D systems, cat no.AF1136.RRID : AB_2238016. 형광 접합된 2차 항체를 실온에서 1 시간 동안 1 % NDS, PBS 중의 0.1-0.3 % triton-X 100에서 1 시간 동안 항온 배양하였다. 사용 된 2 차 항체는 다음과 같다: Alexa Fluor 647 당나귀 항-토끼 (1 : 200, Molecular Probes, cat no. A31573, RRID : AB_2536183) 및 Alexa Fluor 488 당나귀 항-염소 (1 : 200, Jackson ImmunoResearch, cat no. 705- 545-003.RRID : AB_2340428). β- 튜불린 III 및 STMN2로 RAE1 이중 표지를 하기 위해, 1 차 및 2 차 표지를 각각의 항체에 대해 순차적으로 반복 차단 단계를 수행하였다. Zen 2012 소프트웨어 (v8.1 SP1, Zeiss)가 장착 된 레이저 스캐닝 공 초점 현미경 (LSM 700 Zeiss)에서 형광 이미지 (1024 x 1024)를 순차적으로 수집하였다. 커버 슬립은 단일 z-섹션에서 이미징되었다. 조직 절편을 DAPI 함유 경질(hardsetting) 수용성 실장 배지 (Vectorsheild, Vector Laboratories)로 장착하고 4-5 x 2㎛ z-섹션의 적층으로 이미지화하고 최대 강도 투영 TIFF로 내보냈다.

[125] **2-19. 웨스턴 블랏**

[126] 조직 및 세포를 protease 억제제 칵테일 (Sigma, P8340) 및 phosphatase 억제제 칵테일 (Gendepot, Cat # P3200)을 함유하는 RIPA 완충액 (Millipore, Cat # 20-188)에서 균질화시켰다. 배양 된 세포를 가온 된 HBSS로 세척하고 스크래핑 (scraping)에 의해 단백질 용해 완충액 중에 수집 하였다; 냉동 조직을 Minilys bead homogenizer (Precellys, Bertin, France) 또는 유리 분쇄기에서 파쇄시켰다. 균질화 된 샘플을 얼음 위에서 초음파 처리 (3 x 10 s, 25 % 진폭) 한 다음 얼음에서 40분 배양한 후 4℃에서 10 분간 고속 (10,000g)으로 회전시키고 펠릿을 폐기하였다. 동량의 5X SDS 샘플 완충액을 9℃ 열 블록에서 5 분간 끓인 샘플 용해물에 첨가하였다. 단백질 함량을 비색 분석 (Lowry, BioRad)으로

측정하였다. 동량의 단백질 (25-40 μg)과 단백질 크기 마커를 SDS- 폴리 아크릴아마이드 젤 전기 영동으로 분리 (5% stacking gel, 10% resolving gel)한 후 PVDF 막으로 옮겼다. 막은 실온에서 Tris 완충 식염수 및 0.1 % 트윈 -20 (TBS-T)을 함유하는 5 % 탈지유 용액에서 1 시간 동안 차단시킨 후 4℃의 차단용액에서 밤새도록 염소 항-마우스 Pan-RAE1 항체 (1 : 500, R & D systems, cat no. AF1136.RRID : AB_2238016)와 함께 배양하였다. 블롯을 TBS-T (3 x 10 분)로 세척 한 후, 실온에서 1 시간 동안 항-염소 HRP- 접합 2 차 항체 (1 : 10,000; Santa Cruz, cat no. 2020, RRID : AB_631728)와 배양하였다. TBS-T로 세척 한 후, 제조사의 지시에 따라 서양 ECL 기질 (BioRad, cat no. 1705061)을 적용하여 발색하였고, 순차적 노출 시간의 이미지를 디지털 방식으로 획득하였다 (ChemiDoc, BioRad). 그 다음 블롯을 50℃에서 30분 동안 스트립 핑 완충액으로 스트리핑 한 후 TBS-T 세척하고 이어서 마우스 항-베타-액틴 (1 : 10,000; Sigma, cat no.A5441.RRID : AB_476744) 및 토끼 항-N-cadherin (1 : 10,000, Millipore, cat no. 04-1126, RRID : AB_1977064)을 블로킹 용액에 넣었다. 염소 항-마우스 다클론 (1 : 10,000, Komabiotech, cat no. K-0211589, RRID : AB_2636911) 또는 염소 항-토끼 (1 : 10,000; Santa Cruz, cat no. sc-2004.RRID : AB_631746) HRP 접합 2차 항체를 각각 도포한 후 ECL 처리 후 노출시켰다. 배아 마우스 머리 조직을 RAE1에 대한 양성 대조군으로 사용하였다.

[127] **2-20. 효소-결합 면역 흡착 분석 (ELISA)**

[128] 궁둥 신경의 그랜자임 B 함량은 제조자의 지시 (DuoSet, R & D Systems, cat no DY1865)에 따라 ELISA에 의해 결정되었다. 상세하게는, 96 웰-플레이트를 실온에서 밤새 포획 항체로 코팅하고, 세척하고, 1 시간 차단하였다. 냉동 조직을 RIPA 용해 완충액 (Millipore)에서 1.4 mm 지르코늄 비드 (Precellys, Bertin)가 있는 진탕기(shaker)에서 균질화시키고 용해물을 13,000 rpm으로 5 분간 원심 분리시켰다. 상등액을 시약 희석액으로 1 : 1로 희석하고, 그랜자임 B 표준 시리즈와 함께 코팅 된 웰에 2 회 첨가하고 실온에서 2 시간 동안 배양하였다. Streptavidin-HRP를 첨가하기 전에 플레이트를 완전히 씻은 다음 기질 완충액을 가하였다. 정지 용액을 적용하고 마이크로 플레이트 분광 광도계 (BioTek Instruments, VT, US)에서 흡광도 (450nm - 540 =nm 보정)를 읽는다. 샘플의 그랜자임 B 수준은 표준 곡선 값을 참조하여 4 가지 매개 변수 물류 곡선 피팅 알고리즘을 사용하여 분석되었으며 온라인 소프트웨어 (http://www.elisaanalysis.com/)를 사용하여 수행되었다.

[129] **2-21. 역전사 중합 효소 연쇄 반응 (RT-PCR)**

[130] 총 RNA를 L5x 또는 sham 마우스(샘플 당 2 마리의 마우스)의 L5 DRG 및 궁둥 압착 또는 sham 마우스(샘플 당 1 마리의 마우스) L3-L5 DRG로부터 추출하였다. 조직을 얼음에 미니 유리 모르타르 및 유봉을 사용하여 1 % β- 메르 캅토 에탄올을 포함하는 RTL Plus 용해 완충액 (Qiagen)에서 파괴시키고, Minilys 비드 균질기 (Precellys, Bertin, France)를 사용하여 추가로 균질화시켰다; DRG

배양물을 따뜻한 HBSS에서 1 회 세척한 후, 피펫팅에 의해 용해시켰다; 고정된 세포 펠릿을 용해 완충액에서 볼텍싱하였다. RNA는 게놈 DNA 제거를 포함한 용해된 샘플로부터 제조자의 지시에 따라 on-column extraction (RNeasy Plus, Qiagen)에 의해 정제되었다. RNA는 RNase가 없는 물에서 용출되었으며 분광 광도계에서 순도 (약 2.0의 260/280 nm 비율이 수용 가능한 것으로 간주됨)와 뉴클레오티드 함량에 대해 분석되었다.

[131] 제조사의 지침에 따라 20㎕ 반응 부피에서 M-MLV (200 U / rxn), dNTP 및 oligo (dT) 12-18 프라이머(Invitrogen)를 사용하여 같은 양의 RNA (전체 DRG 150-250 ng, 세포 배양물 500ng)를 역전사시켰다. 그 후, Go Taq Flexi DNA 중합 효소 (Promega)를 사용하는 PCR 반응 (25 μl)을 열 순환기 (MJ Mini, BioRad)상의 cDNA로부터 수행하였다. PCR 조건은 95℃ (2 분), 95℃ (30 초)에서 60℃ (30 초), 72℃ (30초), 72℃ (5 분), 4℃까지 35 회 반복하였다. cDNA 없이 수행된 반응은 음성 대조군으로 사용되었다. PCR 산물을 DNA 염색 시약 (SafePinky, GenDepot, USA)을 포함하는 아가로오스 (1.5 %) 겔에서 작동시키고 UV 투과 조명기로 시각화시켰다.

[132] **2-22. 정량 실시간 PCR**

[133] 유전자 발현은 Power SYBR Green PCR Master Mix (적용된 바이오시스템) 및 7500 실시간 PCR 시스템(적용된 바이오시스템)의 마이크로 암페어 광 튜브(20 ㎕ 반응 부피)에서의 표적 특이적 프라이머(500 ㎚)의 쌍를 사용하여 DRG로부터의 cDNA상에서 수행되었다. PCR 조건은 50℃ (2 분), 95℃ (10 분), 및 95℃ (15 초)에서 60℃ (1분)로 40 회 반복하였다. 샘플은 3 중으로 수행하였다. 데이터는 내장 된 7500 소프트웨어 (v2.0.4, Life Technologies)를 사용하여 분석하였고, 발현은 비교 Ct 방법을 사용하여 (Schmittgen and Livak, 2008) 배양을 위한 성체 DRG의 기준유전자 (Gapdh) 또는 신경 손상 실험을 위한 대측성 DRG와 관련하여 결정되었다. Primer는 Primer-BLAST 소프트웨어 (NIH)를 사용하여 디자인되었다 (Ye 외, 2012). 프라이머는 BLAST 검색, 엑손-엑슨 경계의 중첩, 잠재적 헤어핀 형성 또는 자체 프라이밍 영역의 결핍, 해리 곡선 (단일 밴드 PCR 산물)의 단일 피크 및 동등한 증폭 효율(cDNA의 연속 희석시 Ct 값의 선형 이동)에서 원하는 표적 유전자에 대한 특이성에 기초하여 선택되었다. RNA 또는 M-MLV (-RT)를 생략 한 역전사 반응 생성물은 음성 대조군으로 사용되었다.

[134] **2-23. 레이저 스캐닝 공초점 이미징 및 분석**

[135] 미세 유체 공동배양에서 신경 돌기의 밀도 분석을 위해, 0.5 배 줌 (LSM700, Zeiss)에서 단일 z- 섹션 저배율 (x10) 공 초점 이미지가 신경 돌기 구획의 전체 길이를 따라 β- 튜불린 III 면역 형광 (647nm 방출)에서 획득되었다. 감마 하이 채널 이미지는 Zeiss 이미징 소프트웨어 (v8.1, ZEN 2012 SP1, Zeiss)를 사용하여 변경되지 않은 TIFF로 내보내졌다. 설정된 임계값으로 조정하여 이미지를 흑백으로 변환하고, 이미지 J의 플롯 프로파일 기능 (v1.46r, NIH)을 사용하여

스케일 보정 및 수평 픽셀 밀도를 측정하였다. 50 % 신경 돌기 밀도까지의 거리는 정규화 된 누적 픽셀 밀도로부터 계산되었다. 미세 유체 장치 당 6-8 개의 이미지가 수집되었으며, 그룹당 n=3 개의 장치가 사용되었다. NK - DRG 공동 배양의 신경 돌기 단편의 분석을 위해, 5-10 개의 시야가 저배율 (x20) 및 0.5 배 줌 (LSM700, Zeiss)에서 단일 또는 이중 z- 섹션 공 초점 이미지에서 획득하기 위해 체계적이지 않은 방식으로 각 커버 슬립에서 무작위로 선택되었다. 총 신경 돌기 단편화를 위해 β- 튜불린 III 면역 형광의 감마 고 채널 이미지는 변형되지 않은 TIFF로 내보내졌다. 이미지 J에서 이미지는 스케일 보정 (1.6 pixels / μm) 및 밝기 임계 값을 흑백 모드로 설정하여 선택을 위한 전체 뉴런 실루엣을 생성한다. 신경돌기 단편은 입자 분석 기능 (크기 0.5-25 μm2, 원형도 0-1)을 사용하여 선택되고 도면으로 저장되었다. 총 면적 및 특정 면적 값 (μm2)은 측정 기능을 사용하여 얻었으며 각 시야에 대한 신경 돌기 단편의 백분율을 계산하는 데 사용되었다. 궁둥 신경 조직에서 β-튜불린 III와 STMN2 표지 분석을 위해 전장 신경의 복합체는 x10 배율로 획득 한 개별 z- 섹션 이미지와 신경 길이를 따라 0.5 배 확대 한 이미지 (LSM700, Zeiss)로 만들었다. 압착 부위뿐만 아니라 근위 및 원위부 (압착 부위로부터 ± 1mm)를 포함하는 이미지를 ImageJ로 스케일 보정 (0.8 pixels / μm) 및 밝기 임계 값을 흑백 모드로 설정하였다. 신경 중간-이미지의 9000 μm2 선택에서 평균 픽셀 밀도는 처리 당, 마우스 당, 신경 영역 당 3-4 이미지에서 기록되었다. β- 튜불린 III 및 STMN2를 사용한 RAE1 이중 표지의 동일 위치 영역은 양쪽 형광 채널 (채널 당 1000 단위)에서 임계 이미지 강도를 설정 한 후 Zen 2012 소프트웨어상의 동일 위치 파악 기능을 사용하여 내보내졌다.

[136] **2-24. 통계적 분석**

[137] Student 's t test (paired 또는 unpaired) 또는 비정규 분포에 대한 Mann-Whitney test (Kolmogorov-Smirnov test로 확인 됨)를 통해 두 그룹의 데이터를 비교하였다. 3 개 이상의 데이터 그룹 간의 비교는 일방 분산 분석 (One-way ANOVA)을 사용하여 수행되었다. 신경 세포 독성 및 행동 민감도 분석에 대한 처리 효과를 비교하기 위해 양방향 ANOVA 테스트를 사용하였다. 데이터는 달리 명시되지 않는 한 평균의 평균 ± 표준 오차로 제시한다. GraphPad Prism 버전 5.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com을 사용하여 분석을 수행하였다. 이전 문헌과 동물의 유용성에 근거한 표본 크기를 미리 결정하기 위해 통계적 방법을 사용하지 않았다. 행동 테스트를 위해 실험자는 수술과 감각 테스트를 하는 동안 마우스의 처리 또는 유전자형에 대해 볼 수 없었다. 처리는 독립적인 관찰자에 의해 무작위로 litter 동료에게 배정되었다. $p < 0.05$는 유의 한 것으로 간주되었다.

[138]

[139] <u>실시예 1. 활성화된 자연살해세포가 배아 감각 뉴런에서 RAE1-매개된 메커니즘에 의하여 세포 독성을 유도함을 확인</u>

[140] 자연살해세포는 사이토카인 IL-2에 의해 활성화되며, 이는 그랜자임 B의 세포 내 함유량을 증가시킴으로써 세포 독성 공격을 유발시킨다 (도 1A). 본 실시예에서는 분리되어진, 비자극된 비장 자연살해세포를 대조군으로 사용하여(도 1B), 배아 (E15) 및 성체 마우스 (체외에서<24 시간)에서 급성으로 분리된 DRG 뉴런에 대한 IL-2로 자극된 자연살해세포의 영향을 조사하였다. 기존의 보고에서와 마찬가지로, 배아 DRG 뉴런은 자연살해세포 매개 세포 독성에 매우 민감하였다 (도 2A 및 2B). DRG 뉴런에 대한 세포 독성 효과가 자연살해세포와 직접 접촉을 필요로 한다는 것을 나타내는 배양 배지 (도 1D)에서 나노 그램 수준의 그랜자임 B의 존재에도 불구하고 트랜스-웰 막으로 자연살해세포 및 배아 DRG를 분리하여 신경 돌기 단편화를 차단하였다 (도 1C). 대조적으로, IL-2로 자극된 자연살해세포와 함께 배양된 급성으로 분리된 성체 DRG 뉴런에서는, 비록 일부 신경 돌기가 절단된 것처럼 보였음에도 불구하고, 훨씬 높은 이펙터 대 타겟 (E : T) 비율 (도 2B)에서도 LDH 방출 세포 독성 분석에 따른 세포 용해의 증거를 발견할 수 없었다 (도 2A). IL-2 자극 황색 형광 단백질 (YFP) 발현-자연살해세포와 함께 배양 된 DiI- 표지된 DRG 뉴런의 저속 공 초점 이미징은 자극된 자연살해세포는 고도의 운동성을 가지므로 자연살해세포와 감각 뉴런 사이의 직접적인 세포-세포 접촉을 가능하게 한다는 것을 나타내었다. 이는 배아 DRG에서 신경 돌기의 파괴와 세포 사멸을 초래하였다 (미도시 1); 그러나, 급성 배양된 성체 DRG 신경 돌기 막은 유사한 직접적인 세포-세포 접촉에도 불구하고 부수적인 세포 사멸 없이 크게 손상되지 않았다 (미도시 2). 다음으로, 본 실시예에서는 IL-2로 자극된 자연살해세포를 적용하기 전에 Ca^{2+} 민감성 지표 rhodamine 3-AM을 DRG 뉴런에 로딩하고, 시간 경과에 따른 영상을 측정하였다. 자연살해세포와의 접촉은 종종 배아 DRG 신경 돌기 (도 2C, 2D 및 미도시 3)에서 세포 내 Ca2 + 이벤트와 동기화되어 신경 돌기의 단편화를 유도하였다. 자연살해세포와 접촉 (도 2C 및 2D) 후 성체 DRG에서도 Ca2 + 현상이 관찰되었고, 때로는 신경 돌기 단편화가 발생했지만(미도시 4), 배아 뉴런 (도 1D)보다 훨씬 낮은 빈도로 나타났다. Raet1 유전자 계열 (α, β, γ, δ, ε)에 의해 코딩되는 단백질 Retinoic Acid Early 1 (RAE1)은 마우스 활성화 수용체 NKG2D (Cerwenka 등, 2000)에 대한 막-결합 리간드로서 작용하며, 이는 배아 DRG의 자연살해세포 매개 용해와 관련되어 있었다 (Backstrom et al., 2003); 그러나, DRG 뉴런에 대한 자연살해세포 독성에서 Raet1의 기능은 아직 밝혀진 바가 없다. 본 실시예에서는 배아 DRG 뉴런에 대한 자연살해세포 독성이 NKG2D 수용체 차단 항체에 의해 약화될 수 있다는 것을 확인하였다 (도 1D). 5 개의 Raet1 동형단백질(isoform) (α, β, γ, δ, ε) 모두를 검출하도록 설계된 보편적인 프라이머로 RT-PCR을 사용하여, 급성 해리된 배아 및 성체 DRG 뉴런에서 Raet1 전사체를 관찰하였다 (도 2E). 정량적 RT-PCR (qRT-PCR)은 Raet1 전사체가 성체 DRG에 비해 배아 DRG에서 17 배 가량 더 농축되어 있음을 보여 주었다 (도 2F). 이 차이는 단백질 수준에서도 나타났다: 약 40-50 kDa의 단일 큰 밴드가 배아의

웨스턴 블랏에서 pan-RAE1 항체에 의해 검출되었지만, 성체 DRG 조직에서는 검출되지 않았다 (도 2G). 배아 DRG 뉴런에 Raet1의 기능성을 평가하기 위해, Raet1 siRNA를 사용하여 모든 Raet1 동형단백질을 선택적으로 넉아웃시켰다 (도 2H). 음성 대조군 siRNA와 비교하여, 배아 DRG 뉴런을 Raet1- 선택 siRNA로 형질감염시키 경우, 자연살해세포 매개의 세포 용해가 20% 가량 감소되었다 (도 2I). 이러한 결과는 배아 DRG 뉴런의 Raet1 발현이 자극 자연살해세포와 직접 관계(engagement)에 의해 유도된 세포 독성에 관여하고 있다는 것을 보여주는 것이다.

[141]

[142] **실시예 2. 성체 감각 뉴런에서 신경 손상이 활성화된 자연살해세포에 의한 세포 독성 공격을 허용하는 RAE1 발현을 유도함을 확인**

[143] 성숙한 감각 뉴런에 대한 활성화 된 자연살해세포의 잠재적인 효과를 조사하기 위해, DRG 뉴런을 미세유체 챔버에서 배양하여 (시험관 내에서 5 일) 신경 돌기 구획의 자극된 자연살해세포에 축색 돌기를 선택적으로 노출시켰다. 자극된 자연살해세포에 노출 된 후에는, 분리된 대조군 자연살해세포와 비교하여 신경 돌기 범위의 25 % 손실을 나타내었다 (도 3A 및 3B). 이후, RAE1이 장기적인 성체 DRG 배양물의 자연살해세포 매개 신경 돌기 단편화에 역할을 하는지 확인하고자 하였다. Raet1 mRNA는 시험 관내에서 2일 후 RAE1 단백질의 상응하는 de novo 발현(도 3D)과 함께 성체 DRG 배양물에서 시간 의존적으로 상향 조절되었다 (도 3C). 자연살해세포 공격에 대한 민감성에서 RAE1의 역할과 일치되게, 2 일 동안 배양된 성인 DRG 뉴런은 자극된 자연살해세포의 존재하에 신경 돌기 단편화에서 대조군에 비해 10배 이상 증가하였다 (도 3E 및 3F). 배양 전 Raet1 siRNA로 해리된 성체 DRG 뉴런의 형질감염은 Raet1의 상향 조절을 지연시켰고 (도 3G), 음성 대조군 siRNA와 비교하여 DRG 신경 돌기를 분열시키는 자극된 자연살해세포의 능력을 감소시켰다 (도 3H 및 3I). 또한 공동 배양에 앞서, 자연살해세포에서 NKG2D 수용체를 차단함으로써, 성체 DRG 신경 돌기 (시험 관내에서 2 일)의 분열이 감소될 수 있음을 확인하였다 (도 4A 및 4B). 따라서, 장기적인 성체 DRG 배양물에서 RAE1의 de novo 발현은 자연살해세포에 의한 NKG2D-매개 신경 돌기 단편화에 대한 민감성을 부여하였다. 또한, 시험관 내 해리된 DRG에서 Raet1의 상향 조절이 생체 내의 손상된 세포에서 일어나는지를 확인하고자 하였다. 이를 위하여, 성체 마우스 내 DRG (L5x)의 말초에서 다섯 번째 요추 신경을 절단하였다 (도 5A). L5x 손상 후 4 일 및 7 일에 L5 DRG로부터 분리된 RNA를 사용하여 qRT-PCR에 의해 Raet1의 손상-의존적인 상향 조절이 밝혀졌다 (도 5B). L5x 손상 7 일 후 동측성 및 대측성 L5 DRG 사이의 Raet1 전사체 수준의 차이는 배양에서의 처음 24 시간 동안 유지되었다 (도 5C). IL-2 자극된 자연살해세포가 이들 배양물에 도입되었을 때 손상된 DRG (L5x)의 뉴런은 손상되지 않은 (sham) 동물의 DRG (도 3D 및 3E)보다 신경 돌기의 3.5 배 더 많은 분열을 나타내었다 (도 5F 및 5G). 이러한

결과는 말초 신경 손상이 성체 감각 뉴런에서 Raet1를 유도하고 이 발현이 자연살해세포-매개 신경 돌기 파괴와 관련이 있음을 나타내는 것이다.

[144]

[145] **실시예3. 자극된 자연살해세포가 부분적으로 손상된 감각 축삭을 퇴화시킴을 확인**

[146] 생체 내에서 자연살해세포의 반응과 기능을 특징화하기 위해 Ncr1 유전자 프로모터 (Ncr1icre) (Narni-Mancinelli et al., 2011)에 의해 유도된 유도성 Cre 재조합 효소 (iCre)를 발현하는 마우스를 이용하여 cre-매개된 재조합 후 향상된 황색 형광 단백질 (Rosa26eyfp, YFP) (Srinivas et al., 2001) 또는 디프테리아 독소 수용체 (Rosa26dtr; DTR) (Buch et al., 2005)를 발현하는 리포터 마우스와 교차시켰다. Ncr1은 모든 자연살해세포에서 발현되는 NKp46 수용체뿐만 아니라 그룹 1 ILC (ILC1s) 및 그룹 3 ILC (NCR1 + ILC3s)의 하위 집합을 포함하는 조직-상주 ILC를 암호화한다. 이 유전자 접근법은 생체 내에서 NKp46+ 세포를 확인(YFP 발현을 통해)하거나 전신적으로 파괴(DTR을 통해)할 수 있게 해주었다 (도 6A, 6B 및 6C). 나이브 마우스(naive mice) 또는 sham 수술 마우스의 궁둥 신경에서는 YFP-양성 자연살해세포가 관찰되지 않았다 (도 5H와 5I). 대조적으로, 척수 신경 절개 (L5x)는 손상된 궁둥 신경에 YFP-양성 자연살해세포의 현저한 모집을 유도하였다 (도 5H 및 5I). 궁둥 신경에 대한 자연살해세포의 침투는 NKp46-DTR 마우스에서 DTx 처리에 의한 자연살해세포의 이전의 전신 소모로 현저히 감소된 손상 후 7 일째의 그랜자임 B 수준의 큰 증가(도 5J)와 유사하였다 (도 5K).

[147] 손상 후 축삭의 퇴행에 자연살해세포의 잠재적인 역할을 검사하기 위해 미세포셉으로 완전한 궁둥 신경 압착 손상을 수행하였다 (도 7A). 신경 절개의 효과와 일치하여 압착 손상은 동측성 DRG에서 Raet1 발현을 유도하였다 (도 7B). RAE1은 전사 후 변형(Raulet et al., 2013)의 다양한 형태에 의해 조절되는 것으로 알려져 있으므로, 단백질의 모든 동형(isoform)을 인식하는 pan-RAE1 항체를 사용하여 압착 및 sham 손상 후 궁둥 신경 및 DRG 조직의 용해물에 대한 웨스턴 블럿을 수행하였다. 압착 손상은 동측 궁둥 신경에서 더 높은 분자량 밴드 (약 45 kDa)를 유발 하였지만 sham-손상 마우스에서 반대쪽 신경 또는 궁둥 신경에서는 그러하지 않았다. 45 kDa 크기는 동측성 손상된 궁둥 신경에서는 글리코실화된 성숙한 형태의 RAE1 (Arapovic et al., 2009) 증가를 나타내었지만 (도 7C), DRG에서는 그렇지 않았다 (도 7D). 또한 축삭의 수송을 차단하기 위한 신경의 만성 결찰은 압착 부위 근위의 축삭 내에서 RAE1 면역 표지(immunolabeling)를 나타냈다 (도 7E). 이러한 데이터는 손상 부위에 RAE1 단백질의 축삭에 특이적인 shipping 및/또는 번역이 있음을 나타낸다. NKp46-YFP 마우스의 압착 손상은 손상된 동측 궁둥 신경 내에서 자연살해세포의 모집을 유발하였으며 (도 8A), 유세포 분석은 동측 궁둥 신경에서 검출 된 CD45 + YFP + 림프구 - 게이팅된 이벤트 (자연살해세포의 지표)의 수가 (도 8B) 상해 후 3 일 30 배

증가하였고, 7일째에는 50% 증가함을 보여주었다 (도 8C). 압착 손상은 궁둥 신경에서 그랜자임 B 수준을 증가시켰다 (도 9A 및 9B). 압박 손상 3 일 후 생체 내에서 궁둥 신경의 2-광자 이미징을 사용하여 NKp46-YFP 세포가 신경 내 혈관의 벽을 따라 움직이는 것을 관찰할 수 있었다 (미도시 5). 궁둥 신경 자체 내에서, 자연살해세포는 매우 운동성이 좋았고 시험관 내에서 자극된 자연살해세포를 연상시키는 다극 형태를 나타내었다 (미도시 6). 이러한 세포는 자연살해세포 표적 단백질 RAE1을 선택적으로 발현하는 손상된 말초 신경 축색 돌기와 기능적으로 이상적이게 상호작용하도록 놓여졌다. sham 손상된 마우스의 신경에서 2-광자 이미징에 의해 YFP + 세포는 관찰되지 않았다 (데이터는 표시되지 않음).

[148]

[149] **실시예 4. 내인성 NK 반응이 손상 후 민감성을 감소시킴을 확인**

[150] 궁둥 신경 압착 손상은 손상 부위의 원위 구심성 축색 돌기의 급격한 감각 상실 및 Wallerian 퇴화를 유도하고 약 2 주 이내에 감각 회복을 일으킨다 (Ma et al., 2011). 미세 포셉을 사용하여 압착한 후, 모든 마우스에서 외측 뒷발의 pin-frick 자극에 대한 반응의 완전한 상실을 확인하였다 (도 8D 및 8E). 대조군 (PBS-처리) NKp46-DTR 마우스는 감각 회복의 전형적인 패턴을 나타내었고 (Ma et al., 2011; Painter et al., 2014), 손상 후 10-11 일 정도에 비교적 빠른 회복이 시작될 때까지 거의 완전히 둔감(insensitive)하였다 (도 8D, PBS). 또한, 생체 내 신경 압착 손상 후 축삭 무결성(axonal integrity)에 대한 자연살해세포의 역할을 조사하기 위해 디프테리아 독소 (DTx) 처리로 자연살해세포를 만성적으로 고갈시킨 NKp46-DTR 마우스에서 말초 민감도를 측정하였다 (도 8G). 이 마우스는 pin-frick 자극에 대한 초기 및 지속적인 민감도를 나타냈다 (도 8D, DTx). 감각 회복의 발 뒤꿈치부터 발가락 패턴을 보여주는 (도 8F, PBS) 대조군 마우스와는 대조적으로, 자연살해세포 고갈 마우스는 전체 회복 이전에 뒷발 전체에 걸쳐 자극에 대한 해부학적으로 광범위한 반응 패턴을 보였으며 (도 8F, DTx), 이는 조직 전체에 남아있는 산발적인 신경분포(innervations)를 나타낸다.

[151]

[152] **실시예 5. 자극된 자연살해세포가 부분적으로 손상된 감각 축삭을 퇴화시킴을 확인**

[153] 자연살해세포가 부분적으로 손상된 축색 돌기를 선택적으로 퇴행시킬 수 있는지를 결정하기 위해, 30μm 스페이서가 있는 미세 지혈제를 사용하여 일관된 부분 궁둥 압착을 실시하였다. 대조군 동물은 전형적으로 압착 후 1일 동안 약간의 잔류 pin-frick 민감성을 나타냈고, 6 일째에는 최대 60 % 이상의 빠른 기능 회복을 보였고 (도 10A, IgG), 이는 섬유의 일부분이 불완전하게 축삭이 절단되어 있음을 나타낸다. 이 부분적인 민감성은 압착 후 11 일까지 유지되었으며, 특정 시점에서의 감각 회복은 발 뒤꿈치부터 발가락 패턴으로 발생하여 재생 섬유와 일치하여 15 일째에 완전히 회복되었다 (도 10B, IgG).

생체 내에서 IL-2에 의한 자연살해세포의 자극을 재현하기 위해, 마우스에 전신적으로 IL-2/항-IL-2 단일 클론 (S4B6) 항체 복합체를 처리하였다. IL-2/항-IL-2 항체 복합체 처리는 NK 및 CD8 + T 세포 집단을 강화시키는 것으로 알려져 있다 (Boyman et al., 2006). 실제로, 대조군과 비교하여 실험 종료시 (16 일)에 IL-2 복합체 - 처리 된 마우스의 혈액에서 NKp46 + DX5 + 및 CD3 + CD8 + (도 10D) 세포 집단 모두가 풍부해졌지만, CD3 + CD4 + T 세포의 비율은 감소하였다 (도 10D). IgG 처리된 대조군과 비교하여, 손상 후 IL-2 복합체로 처리된 동물은 pin-frick 반응에서 급격한 하락을 나타내었다 (도 10A 및 10C, IL-2 복합체); 그러나 두 그룹의 동물은 약 2 주 후에 완전한 pin-frick 민감성을 회복하였다 (도 10B). 또한, 이 과정에서 자연살해세포의 특정 기여를 확인하고자 하였다. 자연살해세포를 전신적으로 고갈시키고자 항-NK1.1 항체로 전처리한 후, 상기 마우스에서 IL-2 복합체의 효과를 조사하였다. 동형 대조군 처리된 마우스에서 IL-2 복합체 처리는 상기와 마찬가지로, pin-frick 반응의 급격한 손실을 가져 왔지만 (도10E, 10F 및 10G, 이소폼), 자연살해세포가 고갈된 마우스는 손상 후 11 일부터 재생이 계속될 때까지 발 전체에 걸쳐 일정 수준의 '유지된' 민감성을 유지하였다 (도 10E, 10F 및 10G). 또한, DTx 처리된 야생형과 NKp46-DTR 마우스에서 IL-2 복합체의 효과에 대한 자연살해세포의 의존성을 확인하였다 (도 11A 및 11B). 회복 후 말초 혈액의 유동 분석 (16 일째)은 NKp46 + DX5 + 자연살해세포가 야생형 마우스에서 항-NK1.1 (도 10H) 및 NKp46-DTR에서는 DTx에 의해 고갈되었음을 확인할 수 있었다 (도 11C). CD3 + CD4 + T 세포의 비율은, 이소폼 대조군에 비해 항체 고갈 그룹에서 20% 가량 더 높았지만(도 10H) CD3 + CD8 + T 세포 집단에서는 유의적인 차이가 관찰되지 않았다. IL-2 복합체 처리 후, 자연살해세포-의존 감각 손실의 기전을 결정하기 위해, 부분적 압착 6일 후 궁둥 신경 내의 축색 섬유를 검사하였다. 대조군 (IgG-처리) 마우스에서 궁둥 신경을 통해 원위부로 연장되는 압착 부위로부터의 β-튜불린 III- 표지 된 축색 섬유 밀도의 증가는 IL-2 복합체 처리에 의해 감소되었다 (도 12A 및 12C, 인서트 b 및 c). 그러나, 근위 신경 영역의 축삭 밀도는 처리 그룹간에 차이가 없었다 (도 12A와 12C, 인서트 a). 또한 손상된 DRG 뉴런에 의해 특이적으로 발현되는 미세 소관 -관련 단백질인 stathmin 2 (STMN2)의 분포를 조사하였다 (Cho et al., 2013). β-튜불린 III의 분포와 유사하게, 압착된 신경을 통해 STMN2 표지가 관찰되었고, 압착 부위 및 말초 영역에서 IgG 대조군에 비해 IL-2 복합체 처리에 의해 감소되었다 (도 12B 및 12C, 인서트 b 및 c). STMN2는 또한 손상 부위에서 RAE1 면역 표지와 함께 국부화되었다 (도 13). 이러한 결과는 부분 압착 손상 후 IL-2 복합체 처리에서 관찰된 일시적인 감각 상실은 궁둥 신경에서 손상된 축색 섬유의 제거로부터 기인함을 알 수 있었다.

[154]

[155] <u>실시예 6. 부분적으로 손상된 축삭의 제거가 손상 후 통증 과민 반응을</u>

경감시킴을 확인

[156] 본 실시예에서는 외측 뒷발의 von Frey 모발 자극에 대한 반응을 측정함으로써 부분 압착 손상(15-16 일)으로부터 회복한 후에 기계적 역치를 평가하였다. IL-2 복합체 처리는 상대적으로 과민증을 보이는 대조군 (IgG) 동물에 비해 이전에 압착된 (동측성) 팔다리의 뒷발에서 현저하게 더 높은 기계적 역치를 가져왔다 (도 12D). 또한, 부분 압착 후 IL-2 복합체 처리에 의한 기계적 역치의 정상화는 자연살해세포의 사전 고갈에 의해 차단되었다 (도 12E). 모든 동물의 데이터를 종합하면 처리의 피크 효과 (5 일 내지 10 일까지) 동안 누적 pin-frick 민감도 (곡선 아래 영역)는 부분 압착에서 회복한 후 손상된 팔다리의 기계적 민감도와 관련이 있음을 알 수 있다 (도 12F). 종합하면, 이러한 결과는 신경 손상 후 자연살해세포에 의한 부분적으로 손상된 축색 돌기의 효과적인 제거가 궁동 신경 내에서 부분적으로 손상된 축색 돌기의 지속적인 기계적 민감도의 출현을 방지하는 데 중요함을 나타내는 것이다.

[157]

[158] 실시예 7. 중추신경 흥분독성 마우스 모델에서 자연살해세포의 손상부위로의 침투 증가 확인

[159] 자연살해세포가 중추신경계에서도 손상된 또는 비정상적인 신경을 선택적으로 제거할 수 있는지를 확인하기 위하여, 중추신경의 흥분독성(excitotoxicity)이 유발된 마우스에서 자연살해세포가 중추신경계에 침투하는지 여부를 관찰하였다.

[160] 구체적으로, 중추신경의 흥분독성을 유발하기 위해 카이닌산(Kainic acid) (35mg/kg)를 마우스의 복강 내로 주사하였고, 대조군으로 Saline을 주사한 마우스를 사용하였다. 중추신경의 흥분독성은 알츠하이머, 뇌전증, 파킨슨병 등 대표적인 뇌 질환에서 관찰되는 현상으로 (Dong et al., 2009), 중추신경 흥분 독성 모델은 발작을 일으키는 대표적인 모델로도 알려져 있다. 카이닌산은 중추신경계의 주요 흥분 신경전달물질인 글루탐산(glutamate) 수용체를 활성화시켜 작용하는 강력한 신경흥분 아미노산 작용제로, 마우스에 고농도의 카이닌산을 처치하면 중추신경의 흥분독성 및 신경퇴화가 유도된다 (Levesque et al., 2013). 도 14A 내지 도 14C는 자연살해세포가 중추신경의 흥분독성이 유발된 뇌 조직에 선택적으로 침투함을 확인한 사진이다.

[161] 그 결과, 도 14A 내지 도 14C에 나타난 바와 같이, 카이닌산 처치군에서만 자연살해세포(NKp46발현)가 뇌 조직 내로 침투함을 확인하였다. 이는 자연살해세포가 중추신경 흥분독성이 유발된 부위에 침투하여 손상된 또는 비정상적인 신경 부위를 선택적으로 제거할 수 있음을 시사하는 바, 자연살해세포를 중추신경계의 신경 손상 또는 비정상적 신경으로 인한 신경계 질환으로 인해 발생되는 발작 또는 신경 퇴화로 인한 증상들의 치료에 유용하게 사용될 수 있음을 의미한다.

청구범위

[청구항 1] 분리된 자연살해세포, 그의 세포 집단, 자연살해세포의 활성을 증가시키는 물질, 또는 이들의 조합을 유효성분으로 포함하는 신경 손상 또는 비정상적 신경에 의한 신경계 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 2] 청구항 1에 있어서, 상기 분리된 자연살해세포 또는 그의 세포 집단은 자연살해 전구 세포(natural killer progenitor cell)에 비해 활성이 증가된 것이거나, 또는 활성이 증가되도록 유전적으로 변형된 것인 조성물.

[청구항 3] 청구항 2에 있어서, 상기 유전적으로 변형된 자연살해세포 또는 그의 세포 집단은 키메라 항원 수용체(CAR), 또는 호밍 수용체(homing recetor)가 발현되도록 조작된 것인 조성물.

[청구항 4] 청구항 3에 있어서, 상기 키메라 항원 수용체는 세포외 도메인, 막관통 도메인, 및 세포내 자극 도메인을 포함하는 것인 조성물.

[청구항 5] 청구항 1에 있어서, 상기 자연살해세포의 활성을 증가시키는 물질은 인터페론, 인터루킨, 인터루킨-항체 복합체, 자연살해세포 활성화 수용체의 작용제, 면역글로불린-유사 수용체(immunoglobulin-like receptor)에 대한 항체, GITR (glucocorticoid-induced TNF-related protein)에 대한 항체, CD137에 대한 항체, CD27에 대한 항체, OX40에 대한 항체, CTLA-4에 대한 항체, PD-1에 대한 항체 및 NKG2A에 대한 항체로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것인 조성물.

[청구항 6] 청구항 5에 있어서, 상기 인터루킨은 IL-2, IL-5, IL-8, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21 및 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것인 조성물.

[청구항 7] 청구항 5에 있어서, 상기 자연살해세포 활성화 수용체의 작용제는 BiKEs(Bispecific Killer Engagers) 또는 TriKEs(Trispecific Killer Engagers)인 것인 조성물.

[청구항 8] 청구항 1에 있어서, 상기 신경 손상은 신경압박(Neuropraxia), 축삭손상(Axonotmesis), 또는 신경절단(Neurotmesis)인 것인 조성물.

[청구항 9] 청구항 1에 있어서, 상기 신경 손상 또는 비정상적 신경에 의한 신경계 질환 은 중추신경계의 신경 손상 또는 비정상적 신경에 의한 신경계 질환 또는 말초신경계의 신경 손상 또는 비정상적 신경에 의한 신경계 질환인 것인 조성물.

[청구항 10] 청구항 9에 있어서, 상기 중추신경계의 신경 손상 또는 비정상적 신경에 의한 신경계 질환은 중추 신경 계통의 기질적 질환 및 기능장애, 뇌전증, 다발성 경화증, 근위축성 측생 경화증, 알츠하이머, 루이체 치매, 헌팅턴병, 파킨슨병, 조현병, 외상성 뇌손상, 뇌졸중, 픽크병, 크로이츠펠트 야콥병, 진행성 핵상마비, 다계통 위축증, 피질-기저핵 퇴행증, 척수소뇌 변성증, 소뇌 위축증, 외상 후 스트레스 장애,

기억상실증, 혈관성 치매, 및 뇌경색으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것인 조성물.

[청구항 11] 청구항 9에 있어서, 상기 말초신경계의 신경 손상 또는 비정상적 신경에 의한 신경계 질환은 말초신경병증, 당뇨성 신경병증, 말초신경병증성 통증, 항암화학요법 치료로 인한 말초신경병증, 복합부위통증증후군, 시신경병증, 단일신경병증, 다발성 단일신경병증(다발성 단일신경염), 다발신경병증, 길랭-바래 증후군(급성 염증성 탈수초 다발신경병증), 만성 염증성 탈수초 다발신경병증, 유전성 신경병증, 신경총 장애, 녹내장, 황반변성, 근위축성 측생 경화증, 진행성 근육위축, 진행성 연수마비, 소아마비, 소아마비 후 증후군, 강직-인간 증후군, 아이작스 증후군, 중증근육무력증, 신생아 근육 무력증, 보툴리누스 중독, 이튼-람베르트 증후군, 흉곽출구 증후군, 샤르코-마리-투스병, 및 척수성 근육위축으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것인 조성물.

[청구항 12] 청구항 11에 있어서, 상기 말초신경병증성 통증은 삼차 신경통, 당뇨성 신경병증성 통증, 환지통(phantom limb pain), 바이러스 감염, 또는 외상에 의한 통증, 항암 약물치료(chemotherapy) 후에 오는 통증, 비정형 안면통증(atypical facial pain), 및 포진성 신경통(post herpetic neuralgia)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것인 조성물.

[청구항 13] 청구항 11에 있어서, 상기 당뇨성 신경병증은 다발성 말초신경병증 (polyneuropathy) 또는 국소성 말초신경병증 (focal neuropathy)인 것인 조성물.

[청구항 14] 청구항 13에 있어서, 상기 다발성 말초신경병증은 고혈당성 신경병증 (hyperglycemic neuropathy), 원위부 대칭성 다발신경병증 (distal symmetric polyneuropathy), 자율신경병증 (autonomic neuropathy), 급성 감각신경병증 (acute sensory neuropathy), 급성 통증성 감각신경병증 (acute painful sensory neuropathy) 및 만성 운동성 감각신경병증 (chronic sensorimotor neuropathy)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나인 것인 조성물.

[청구항 15] 청구항 13에 있어서, 상기 국소성 말초신경병증은 뇌신경병증 (cranial neuropathy), 몸통 신경병증 (truncal neuropathy), 사지 신경병증 (limb neuropathy), 흉요추신경병증 (thoracolumbar radiculoneuropathy) 및 요천골 신경총근병증 (lumbosacral radiculoplexus neuropathy)으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나인 것인 조성물.

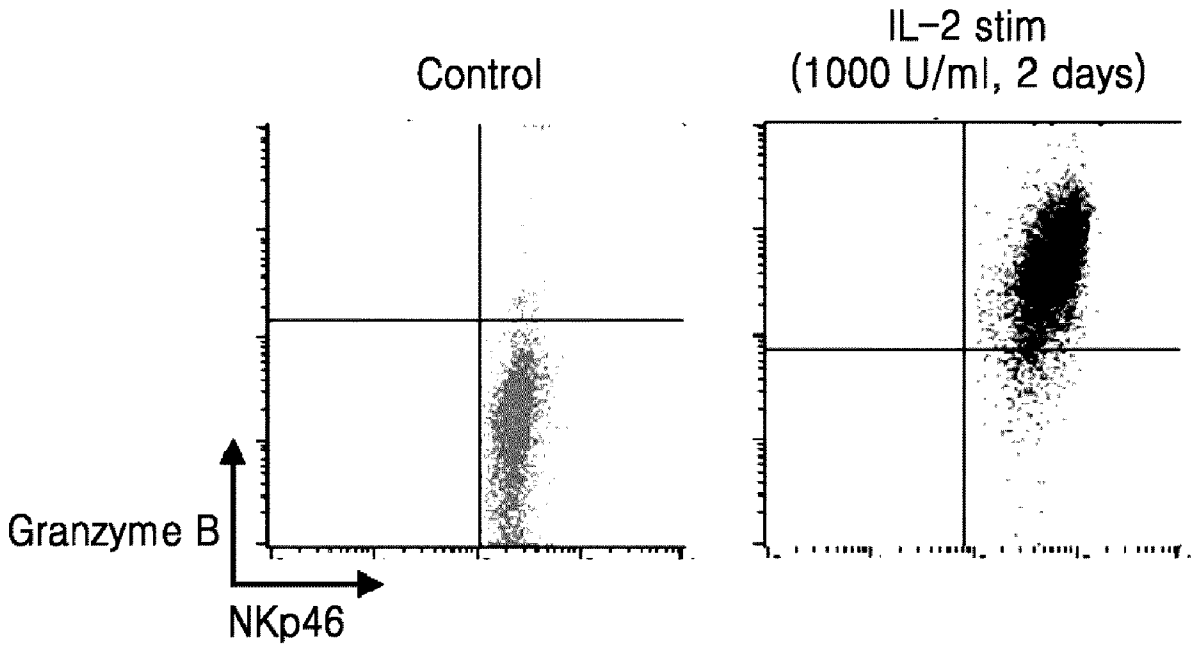
[청구항 16] 청구항 1에 있어서, 분리된 자연살해세포, 그의 세포 집단, 자연살해세포의 활성을 증가시키는 물질, 또는 이들의 조합은 손상된 또는 비정상적인 신경 세포를 제거하는 것인 조성물.

[청구항 17] 분리된 자연살해세포, 그의 세포 집단, 자연살해세포의 활성을 증가시키는 물질, 또는 이들의 조합을 개체에 투여하는 단계를 포함하는

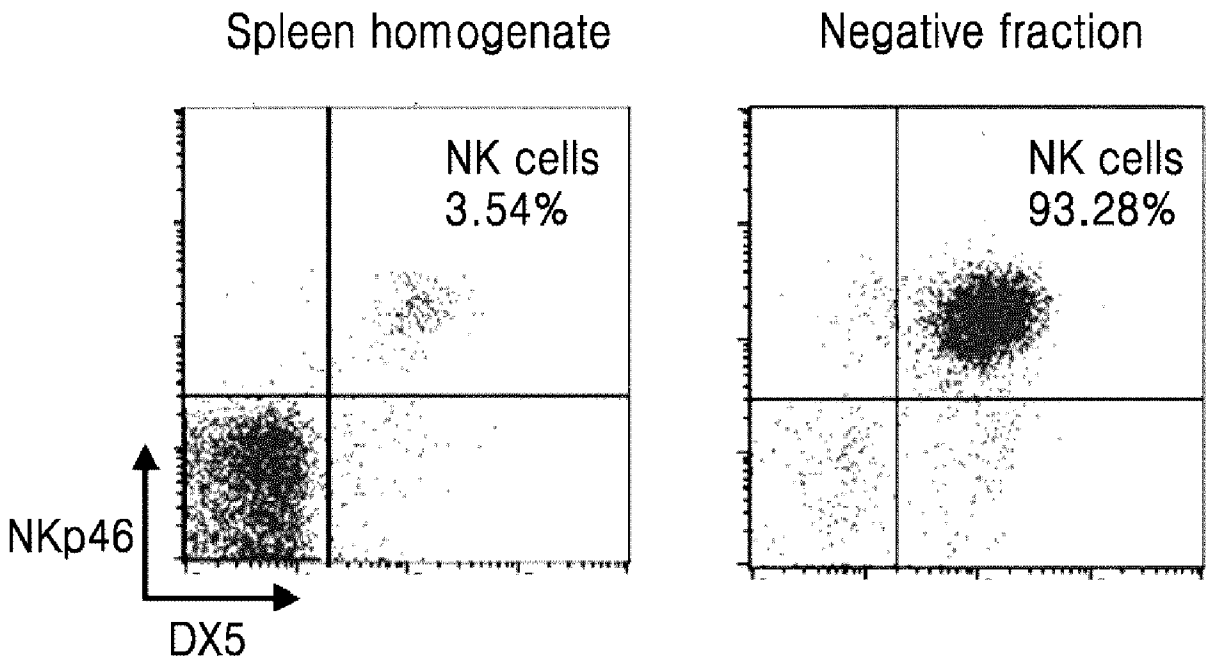
신경 손상 또는 비정상적 신경에 의한 신경계 질환을 예방 또는 치료하는 방법.

[청구항 18] 신경 손상 또는 비정상적 신경에 의한 신경계 질환을 예방 또는 치료하기 위한 약학적 조성물의 제조에 사용하기 위한 분리된 자연살해세포, 그의 세포 집단, 자연살해세포의 활성을 증가시키는 물질, 또는 이들의 조합의 용도.

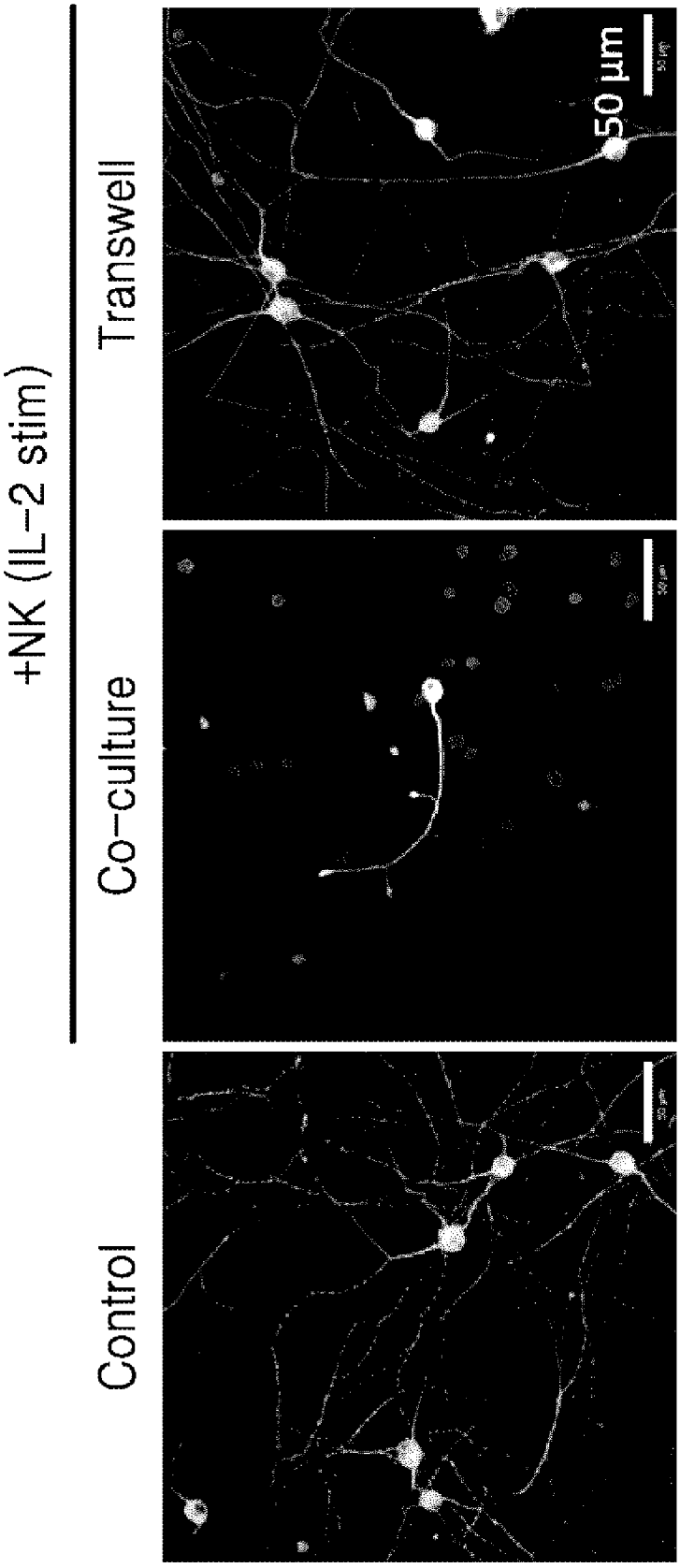
[도 1A]


Control
IL-2 stim
(1000 U/ml, 2 days)
Granzyme B
NKp46

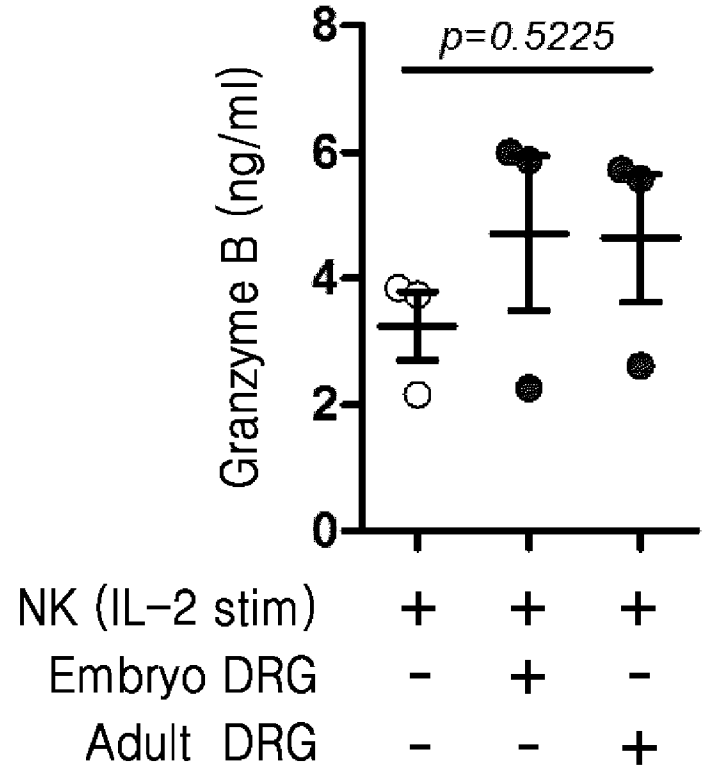
[도 1B]


Spleen homogenate
Negative fraction
NK cells
3.54%
NK cells
93.28%
NKp46
DX5

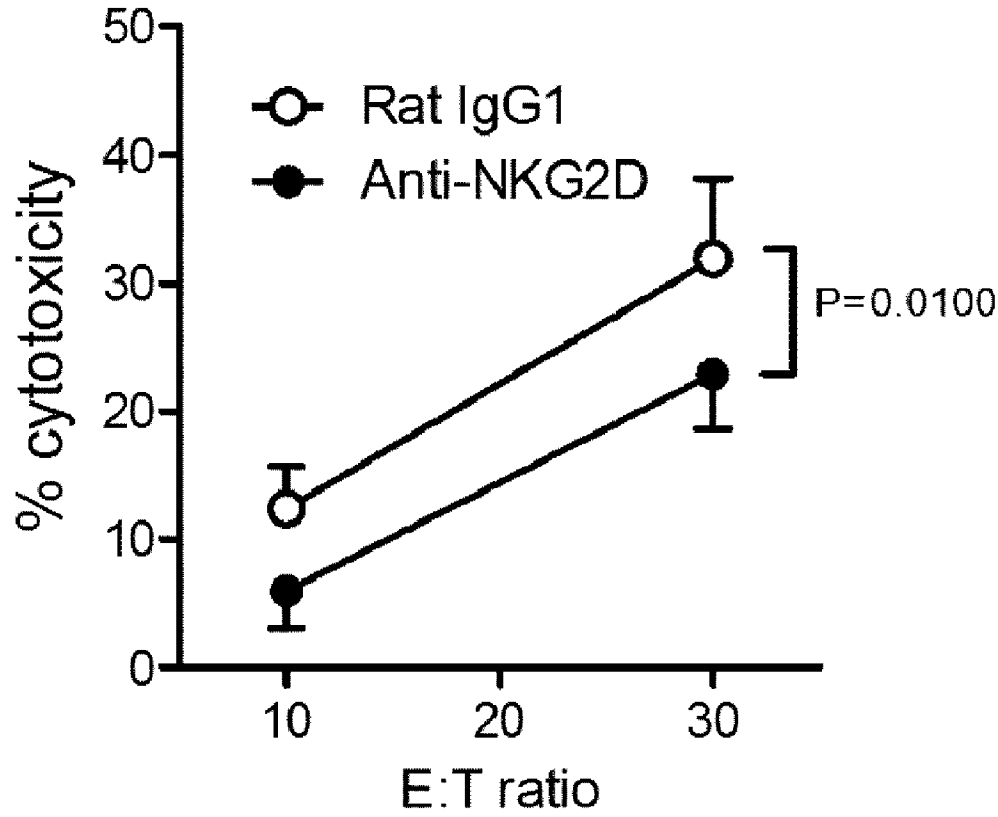
[도 1C]



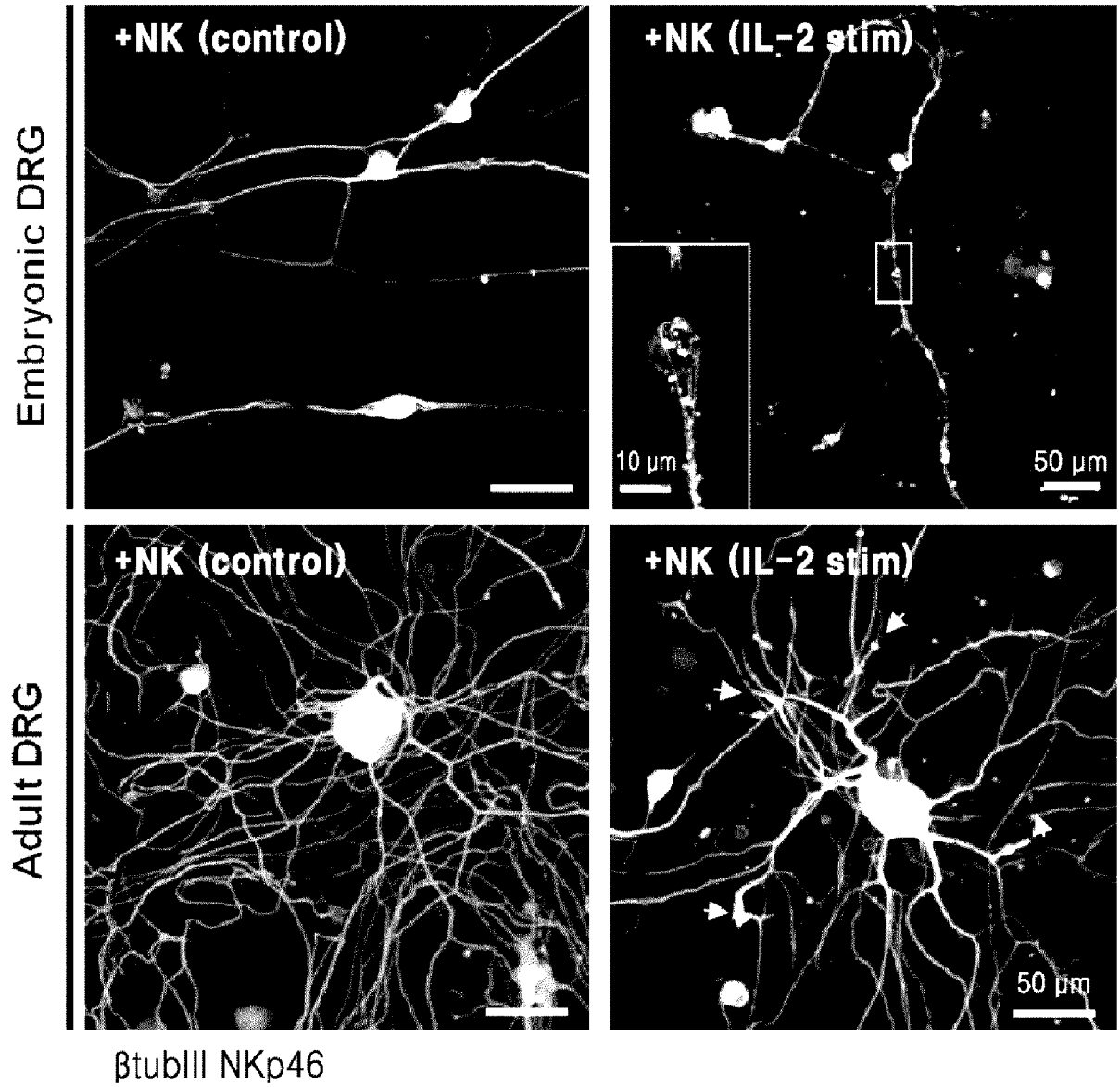
[도 1D]


p=0.5225
Granzyme B (ng/ml)
8
6
4
2
0
NK (IL-2 stim) + + +
Embryo DRG - + -
Adult DRG - - +

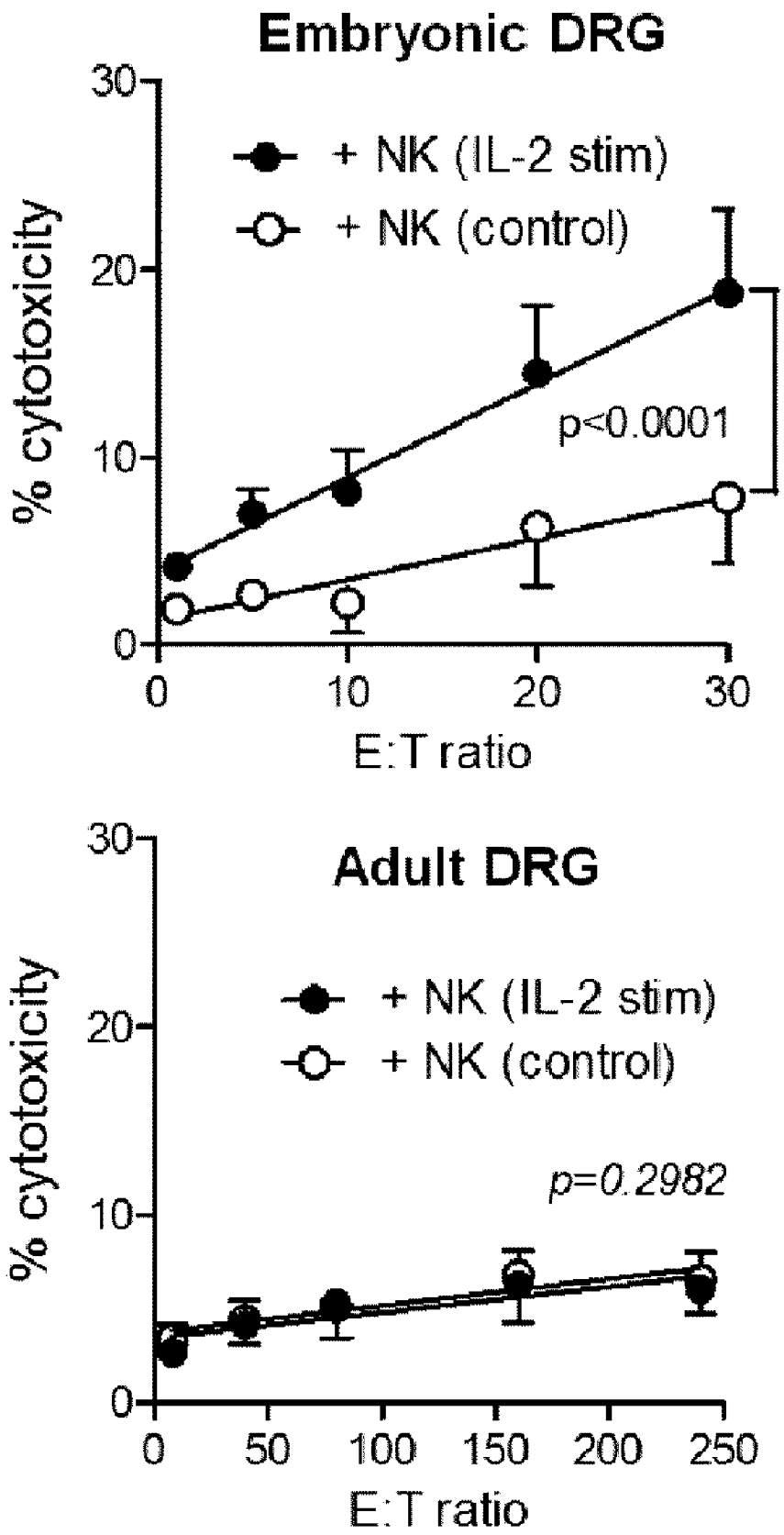
[도 1E]


Rat IgG1
Anti-NKG2D
P=0.0100
% cytotoxicity
50
40
30
20
10
0
10
20
30
E:T ratio

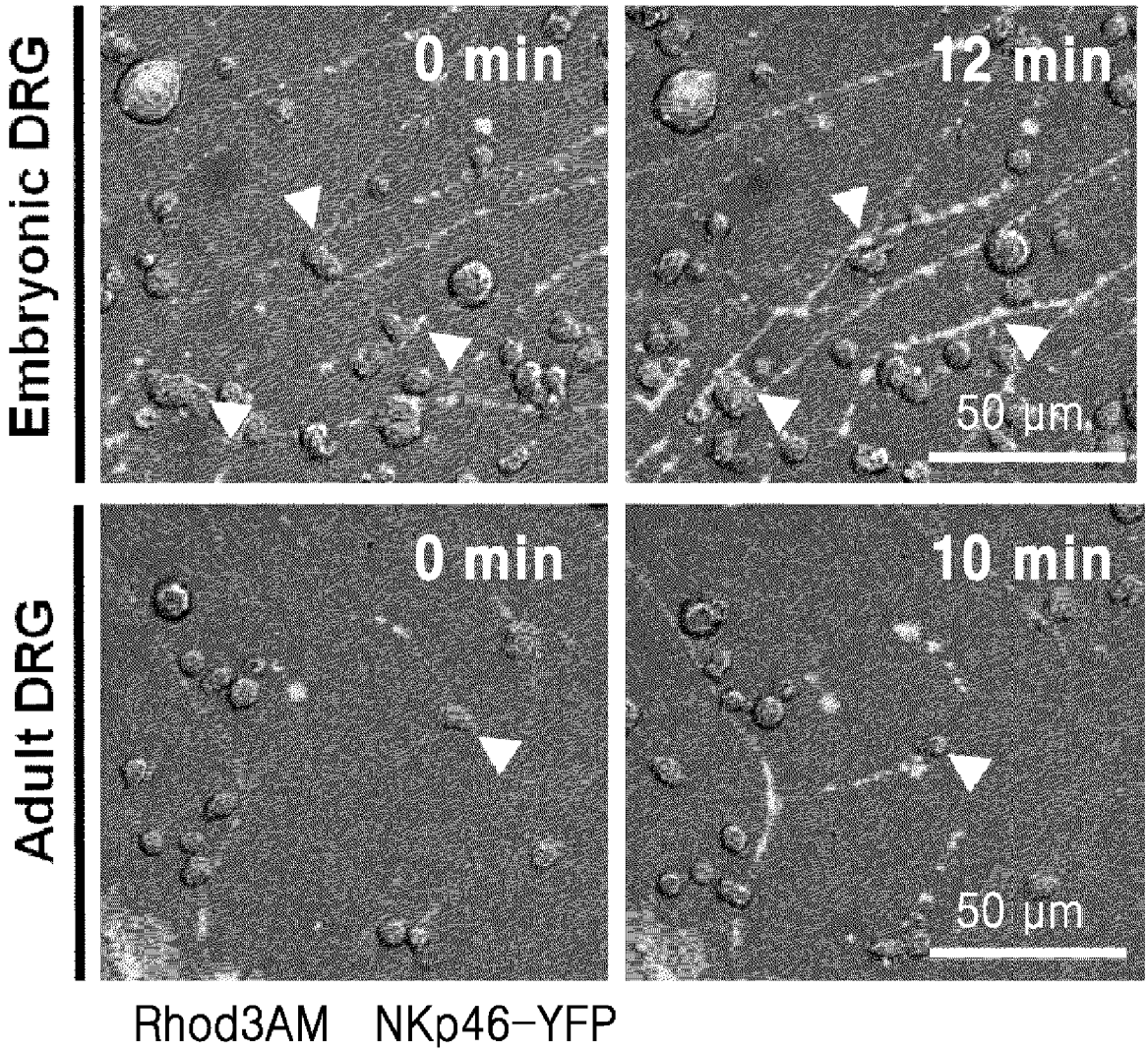
[도 2A]


Embryonic DRG
+NK (control)
+NK (IL-2 stim)
10 μm
50 μm
Adult DRG
+NK (control)
+NK (IL-2 stim)
50 μm
βtubIII NKp46

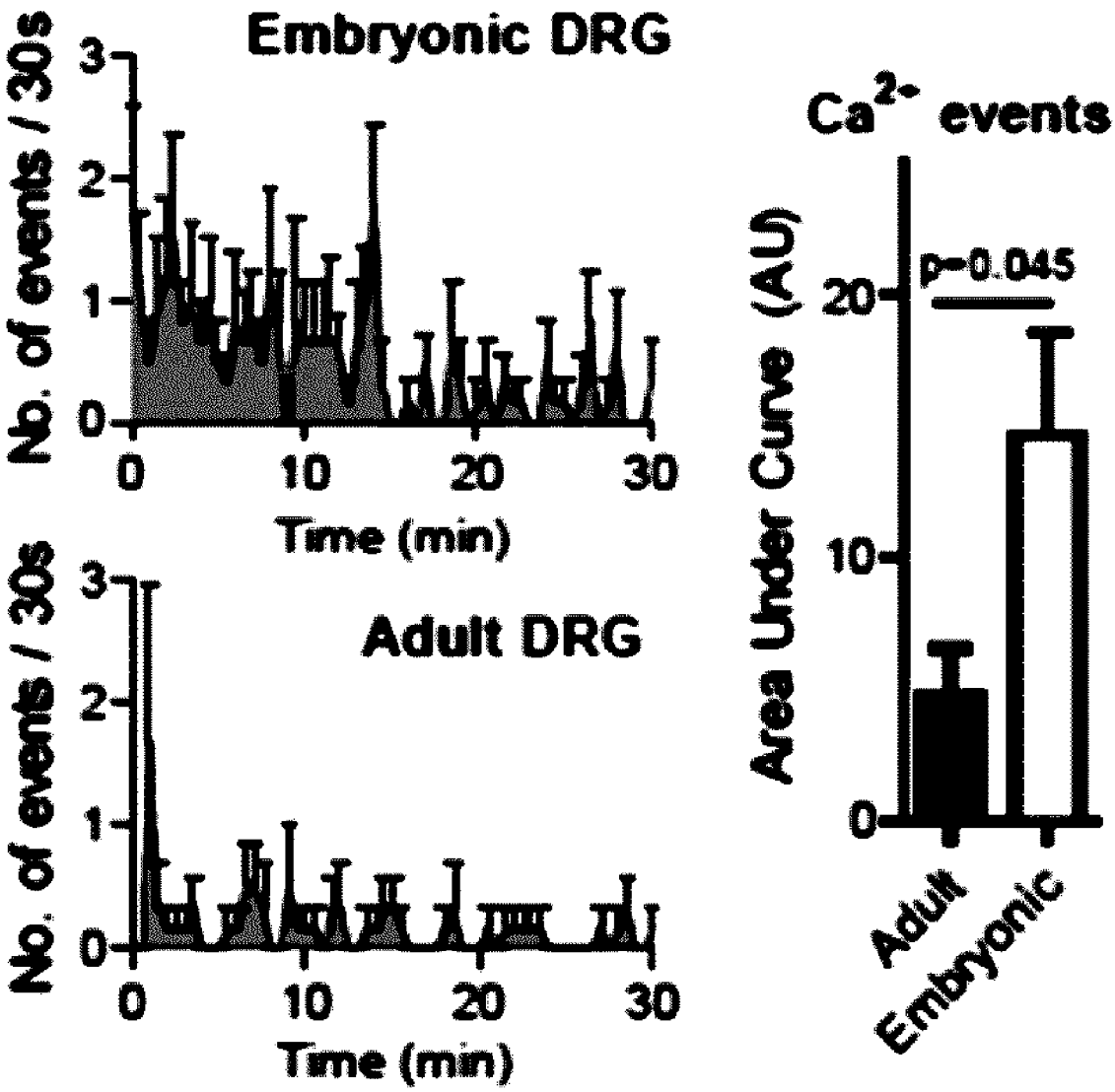
[도 2B]


Embryonic DRG
+ NK (IL-2 stim)
+ NK (control)
% cytotoxicity
p<0.0001
E:T ratio
Adult DRG
+ NK (IL-2 stim)
+ NK (control)
% cytotoxicity
p=0.2982
E:T ratio

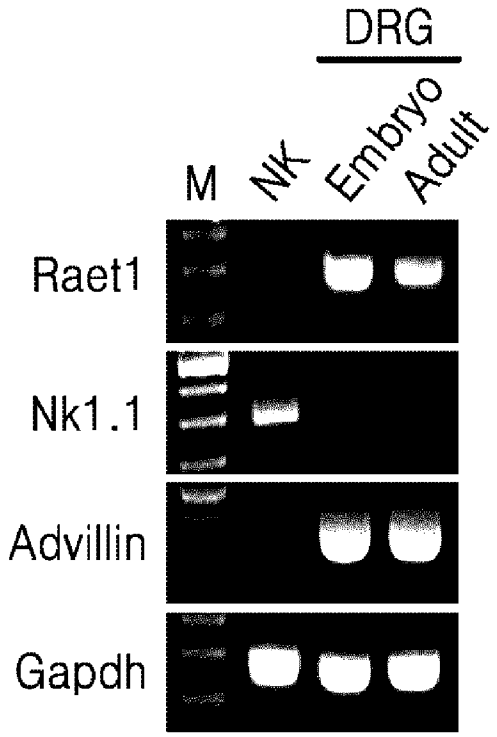
[도 2C]


Embryonic DRG
0 min
12 min
50 μm
Adult DRG
0 min
10 min
50 μm
Rhod3AM NKp46-YFP

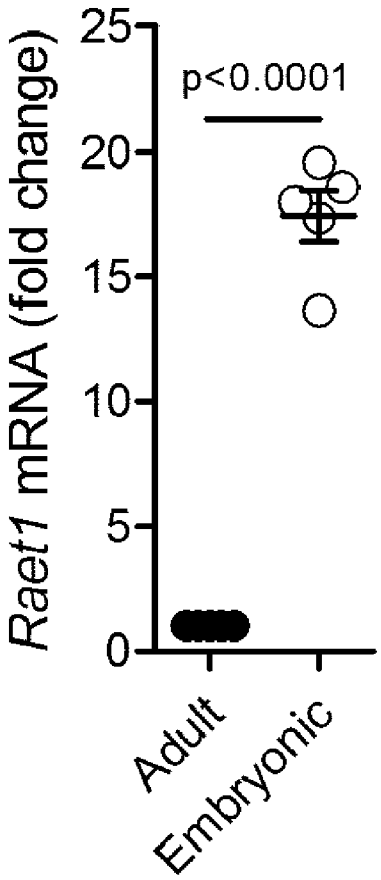
[도 2D]


Embryonic DRG
No. of events / 30s
Time (min)
Adult DRG
No. of events / 30s
Time (min)
Ca2+ events
Area Under Curve (AU)
P=0.045
Adult
Embryonic

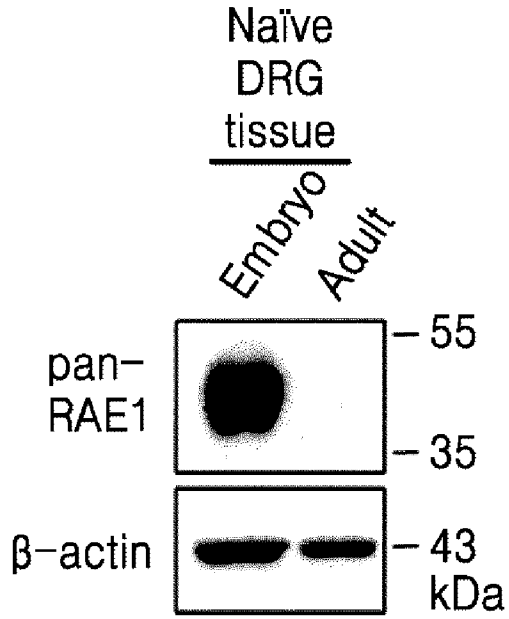
[도 2E]


DRG
M
NK
Embryo
Adult
Raet1
Nk1.1
Advillin
Gapdh

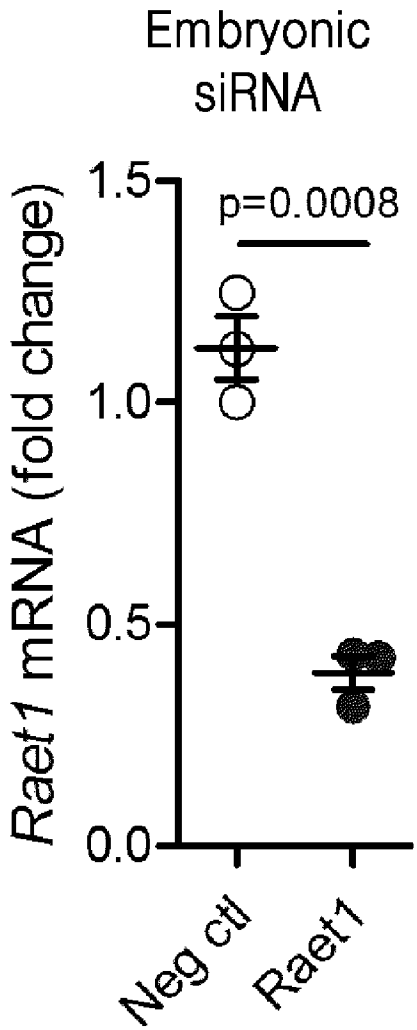
[도 2F]


p<0.0001
Raet1 mRNA (fold change)
25
20
15
10
5
0
Adult
Embryonic

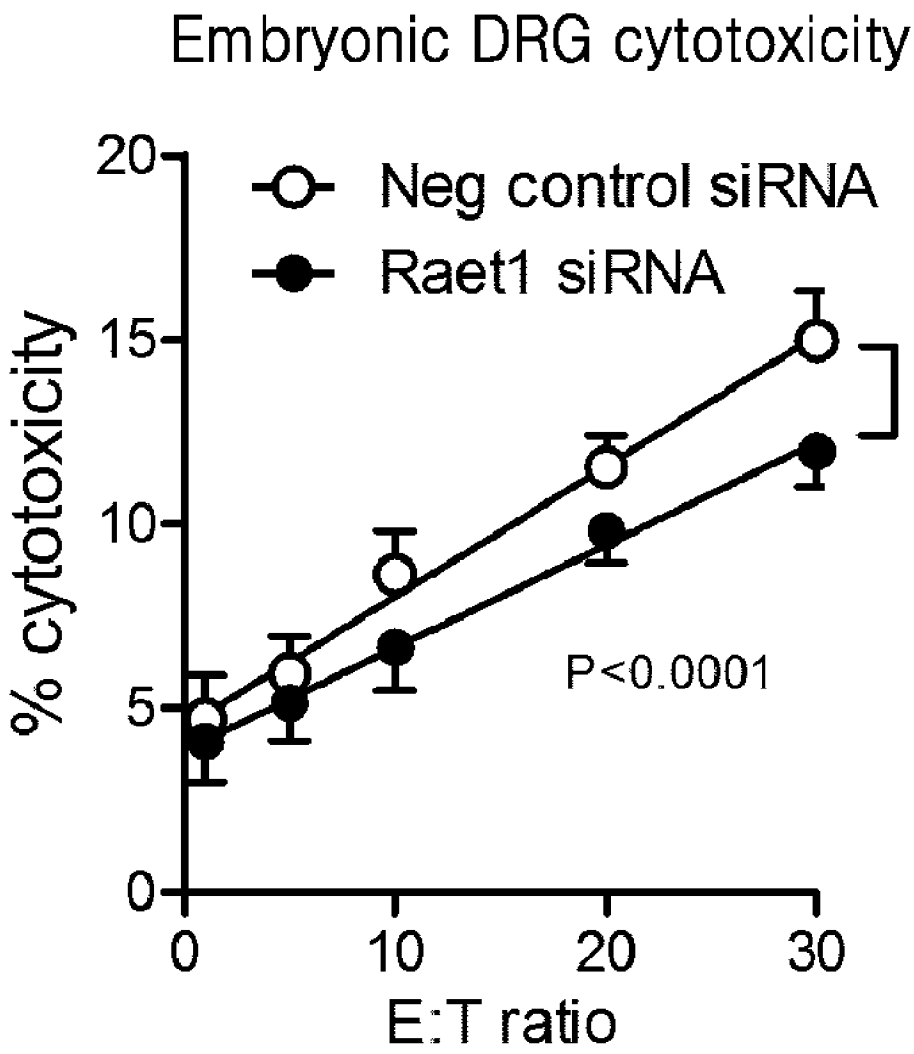
[도 2G]


Naïve
DRG
tissue
Embryo
Adult
pan-
RAE1
β-actin
55
35
43
kDa

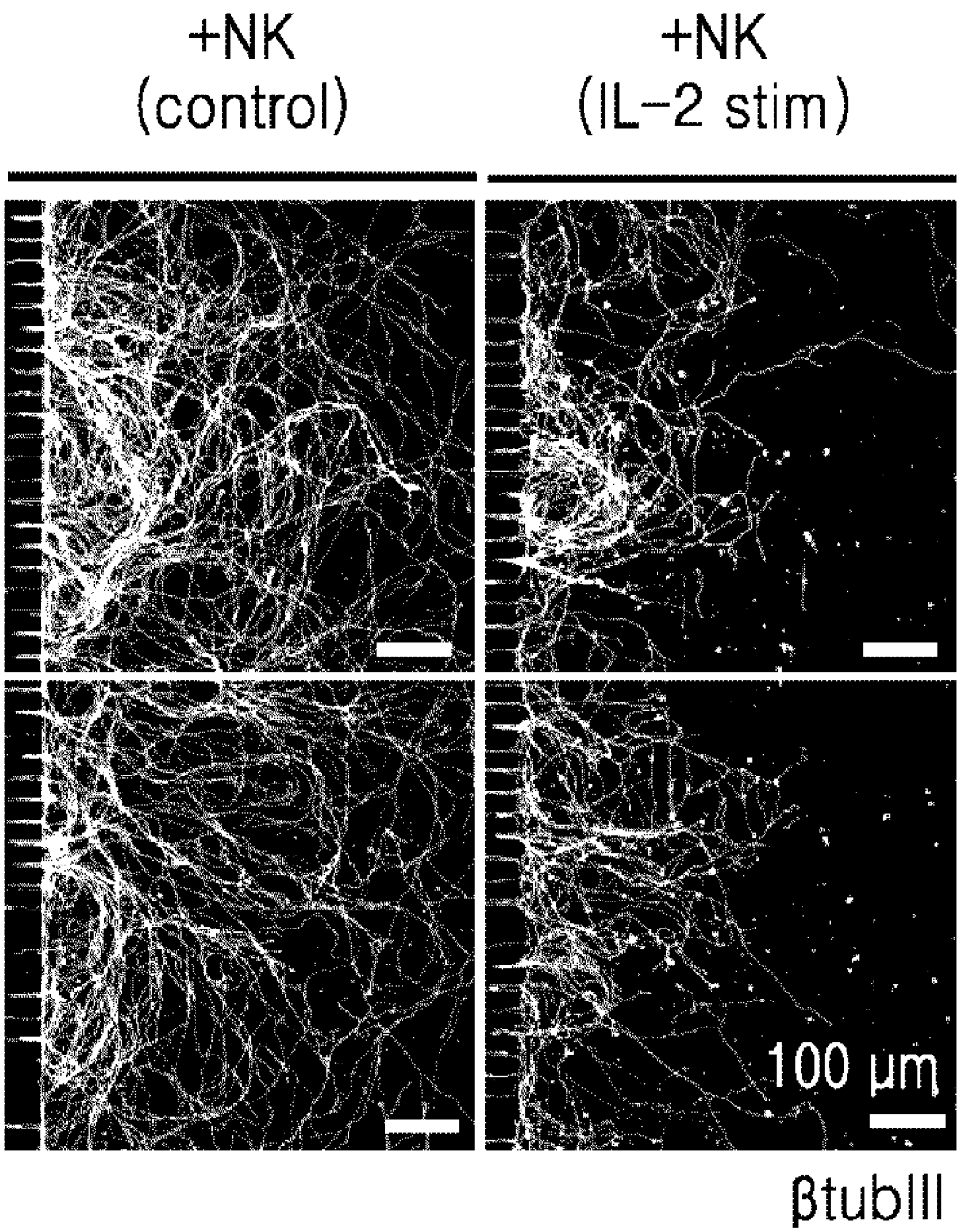
[도 2H]


Embryonic
siRNA
p=0.0008
Raet1 mRNA (fold change)
1.5
1.0
0.5
0.0
Neg ctl
Raet1

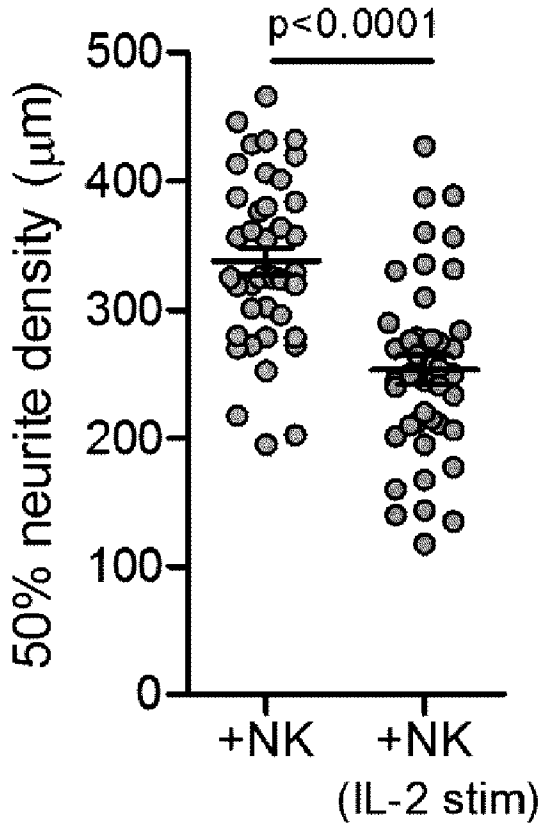
[도 2I]


Embryonic DRG cytotoxicity
Neg control siRNA
Raet1 siRNA
% cytotoxicity
20
15
10
5
0
P<0.0001
0
10
20
30
E:T ratio

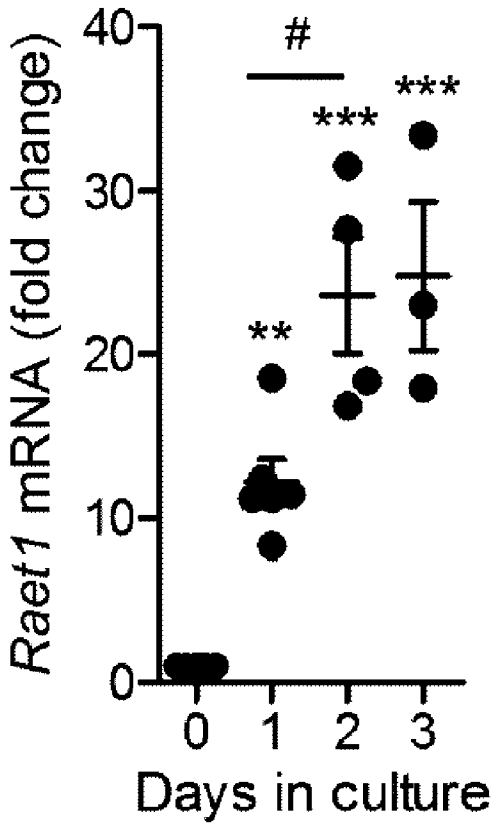
[도 3A]



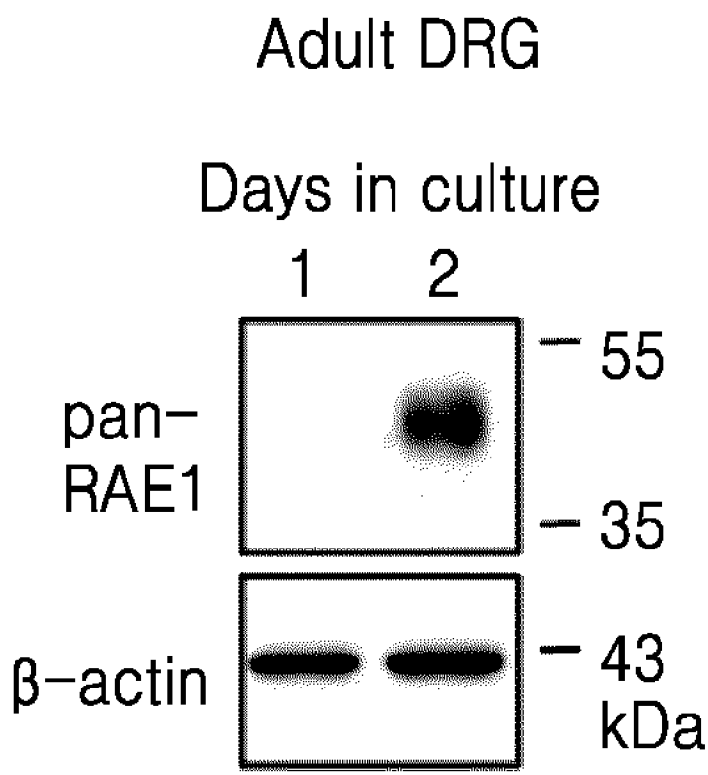
[도 3B]


p<0.0001
500
400
300
200
100
0
50% neurite density (μm)
+NK
+NK
(IL-2 stim)

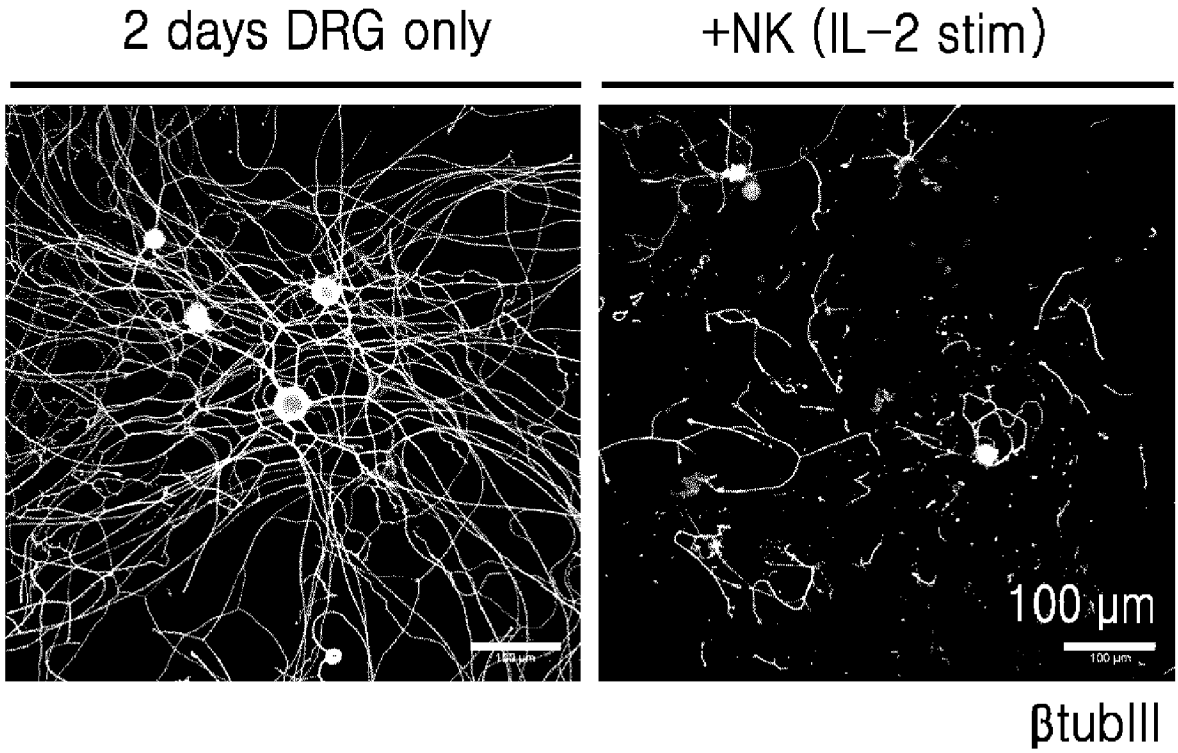
[도 3C]


#
***
***
**
40
30
20
10
0
Raet1 mRNA (fold change)
0 1 2 3
Days in culture

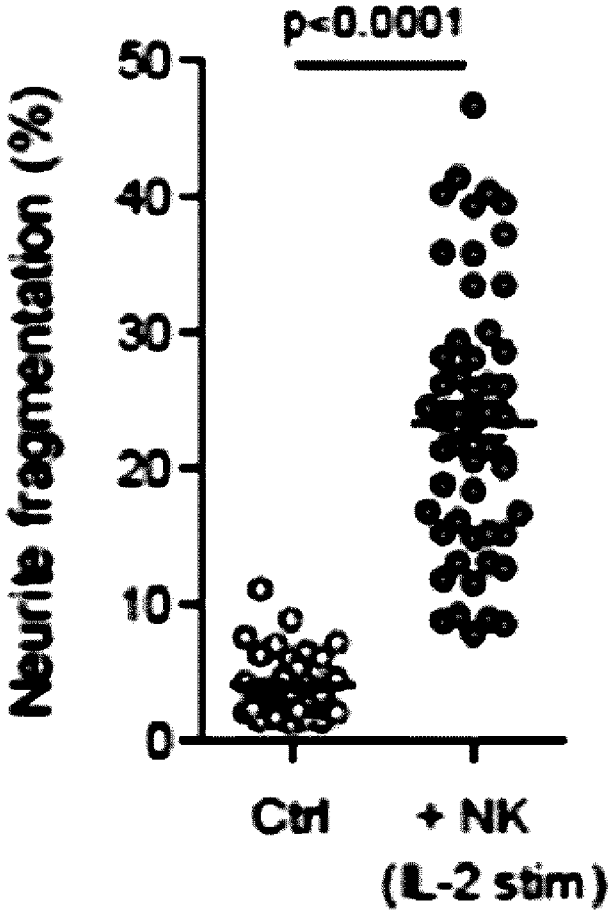
[도 3D]


Adult DRG
Days in culture
1
2
pan-
RAE1
β-actin
55
35
43
kDa

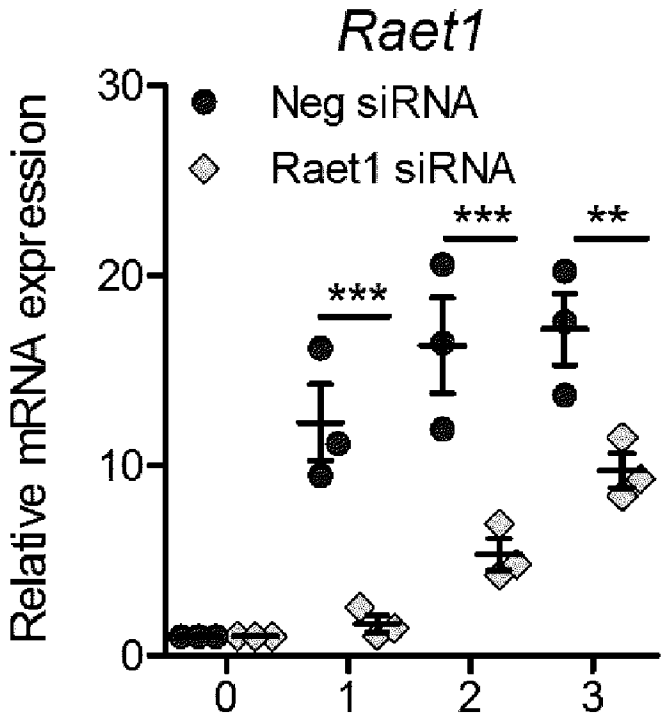
[도 3E]


2 days DRG only
+NK (IL-2 stim)
100 μm
βtubIII

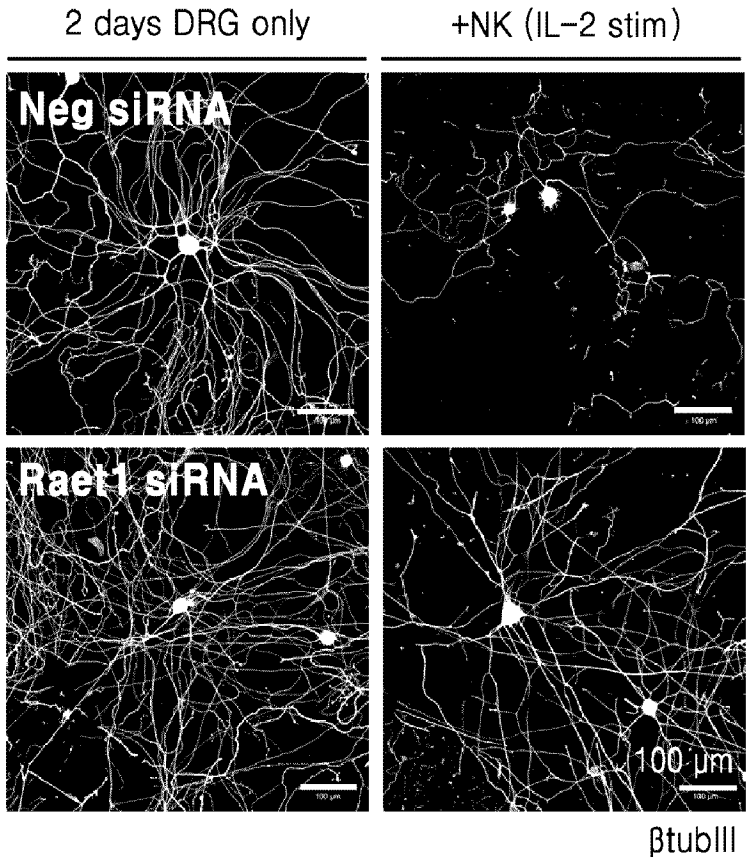
[도 3F]


p<0.0001
Neurite fragmentation (%)
50
40
30
20
10
0
Ctrl
+ NK
(IL-2 stim)

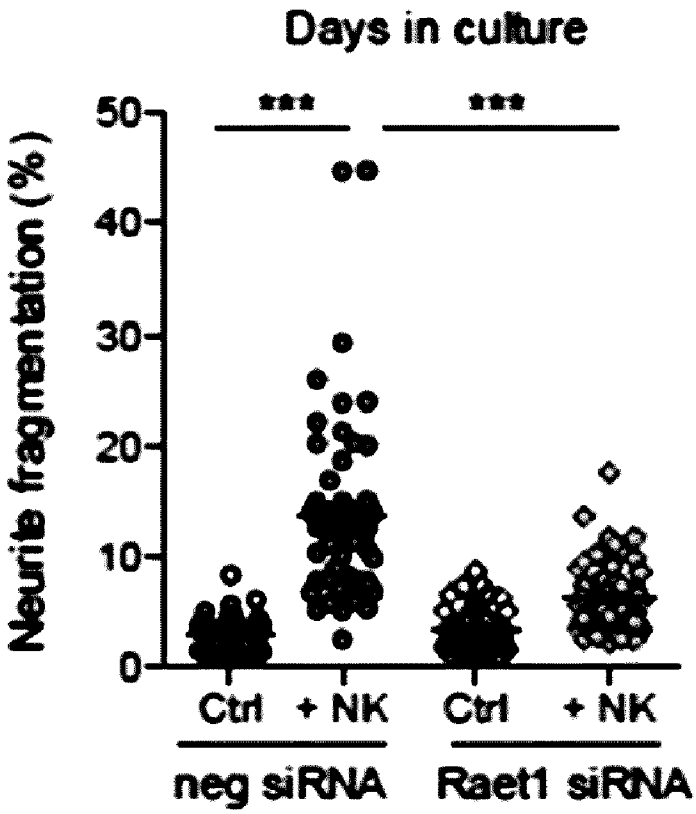
[도 3G]


Raet1
Relative mRNA expression
30
20
10
0
Neg siRNA
Raet1 siRNA
***
***
**
0
1
2
3

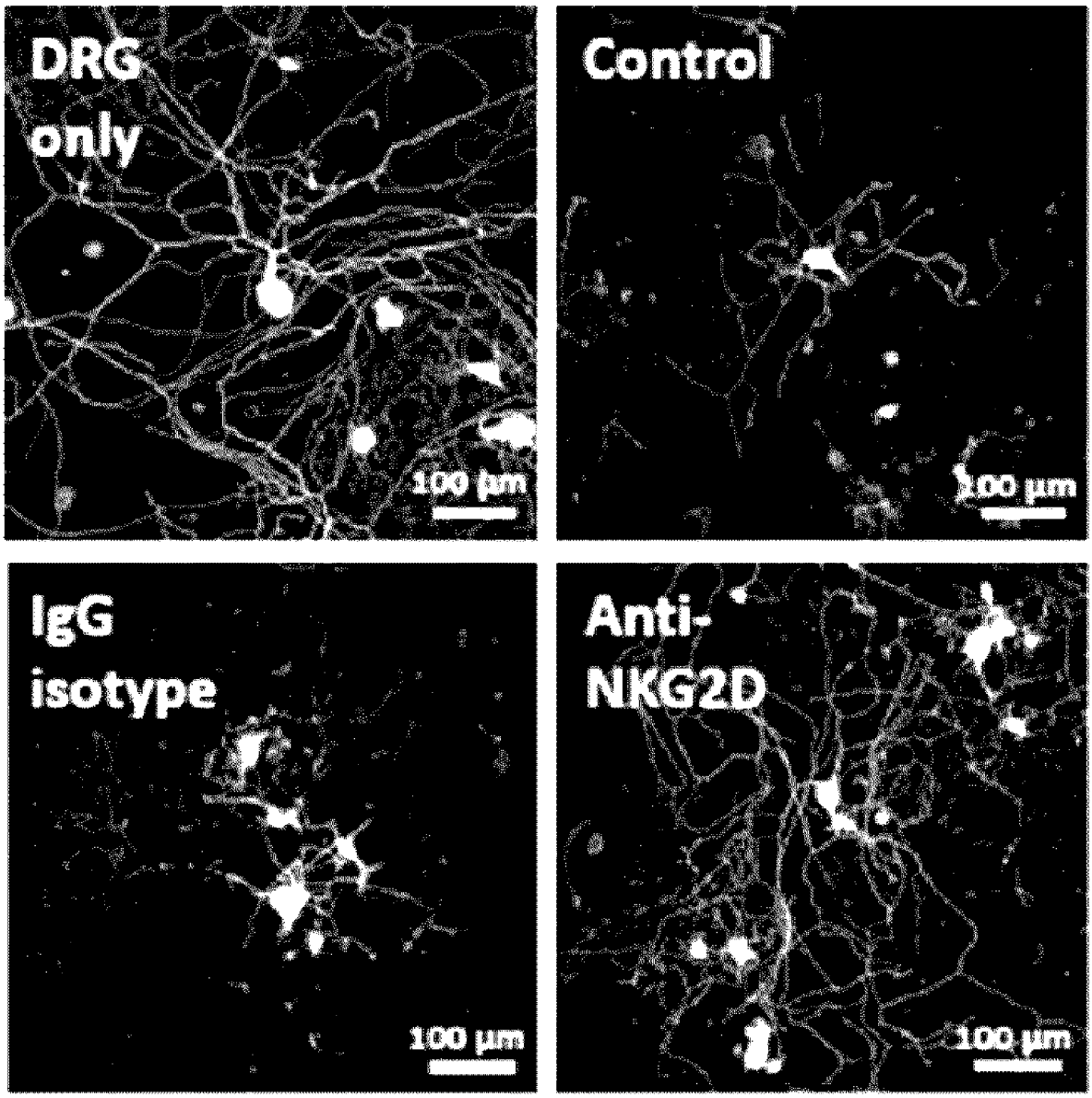
[도 3H]


2 days DRG only
+NK (IL-2 stim)
Neg siRNA
Raet1 siRNA
100 μm
βtubIII

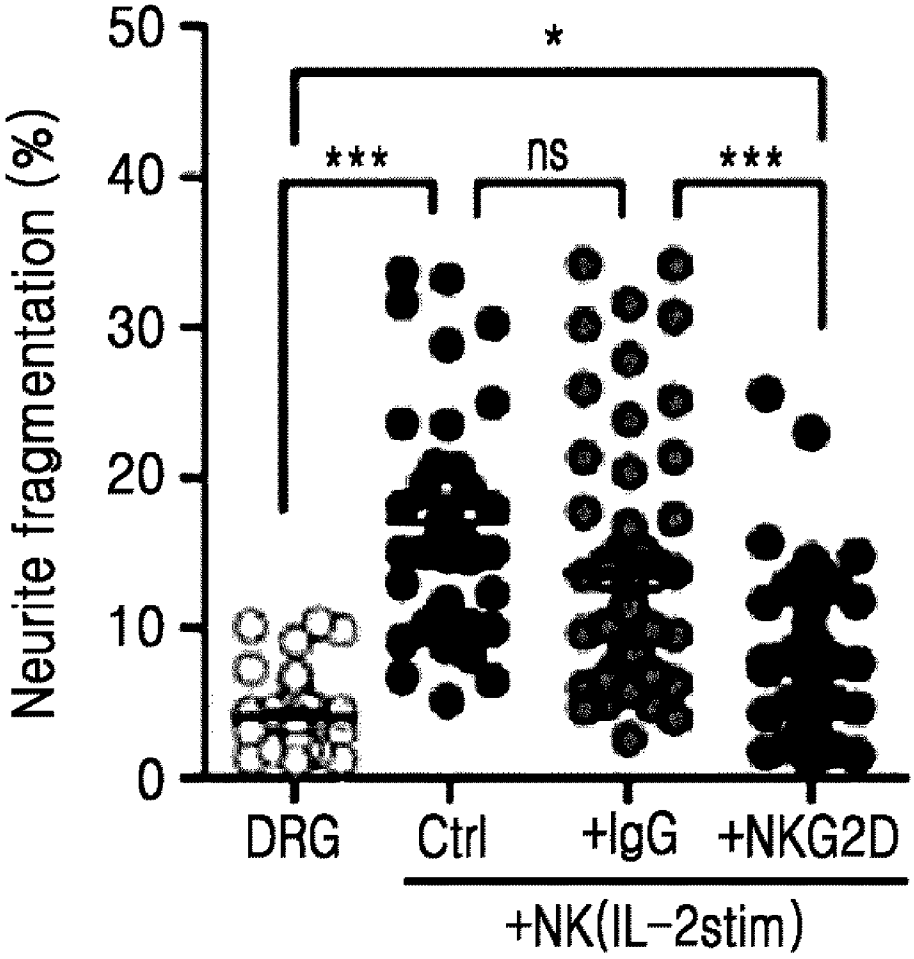
[도 3I]


Days in culture
***
***
Neurite fragmentation (%)
50
40
30
20
10
0
Ctrl
+ NK
Ctrl
+ NK
neg siRNA
Raet1 siRNA

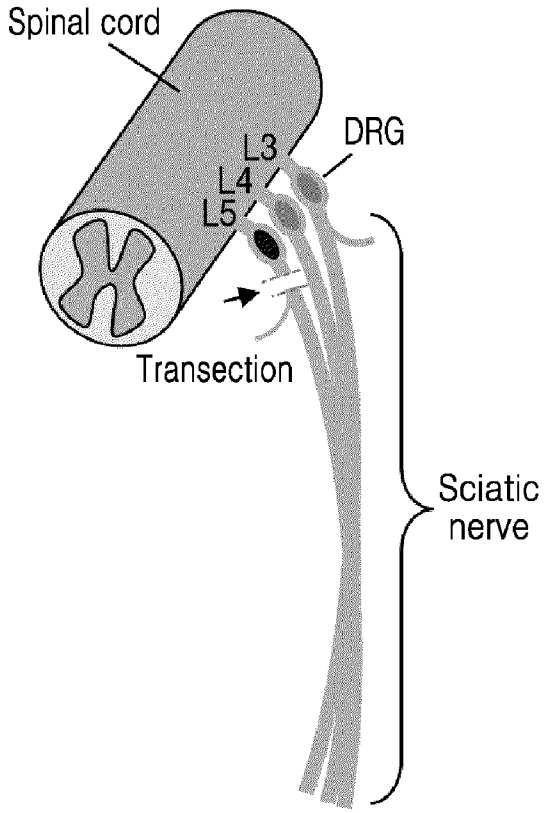
[도 4A]


DRG only
100 μm
Control
100 μm
IgG isotype
100 μm
Anti-NKG2D
100 μm

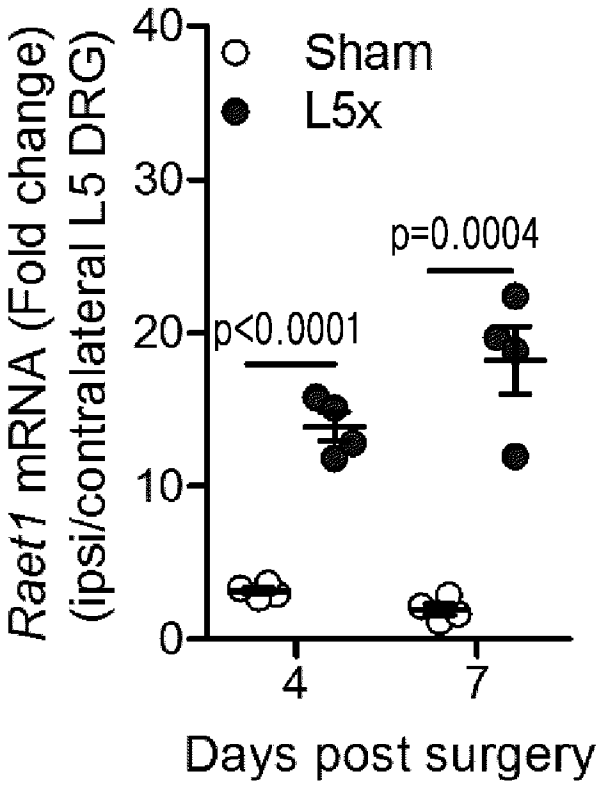
[도 4B]


Neurite fragmentation (%)
50
40
30
20
10
0
*
***
ns
***
DRG
Ctrl
+IgG
+NKG2D
+NK(IL-2stim)

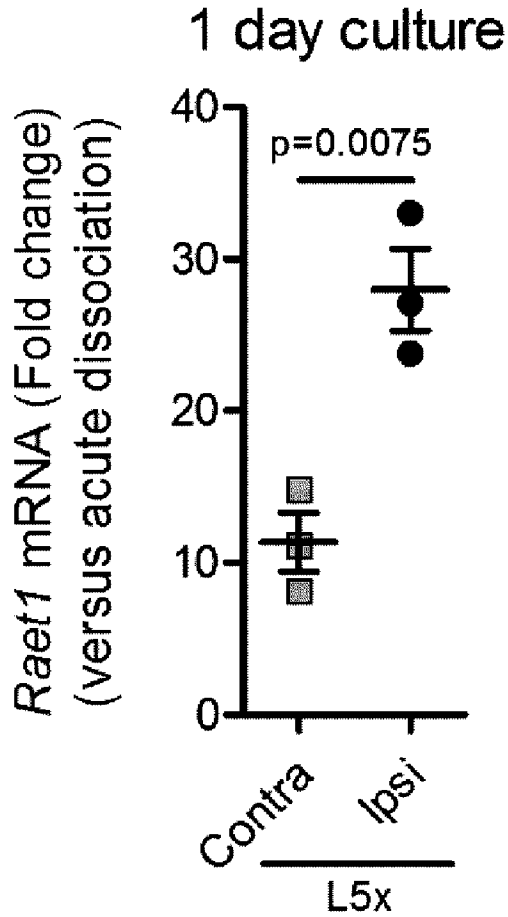
[도 5A]


Spinal cord
DRG
L3
L4
L5
Transection
Sciatic nerve

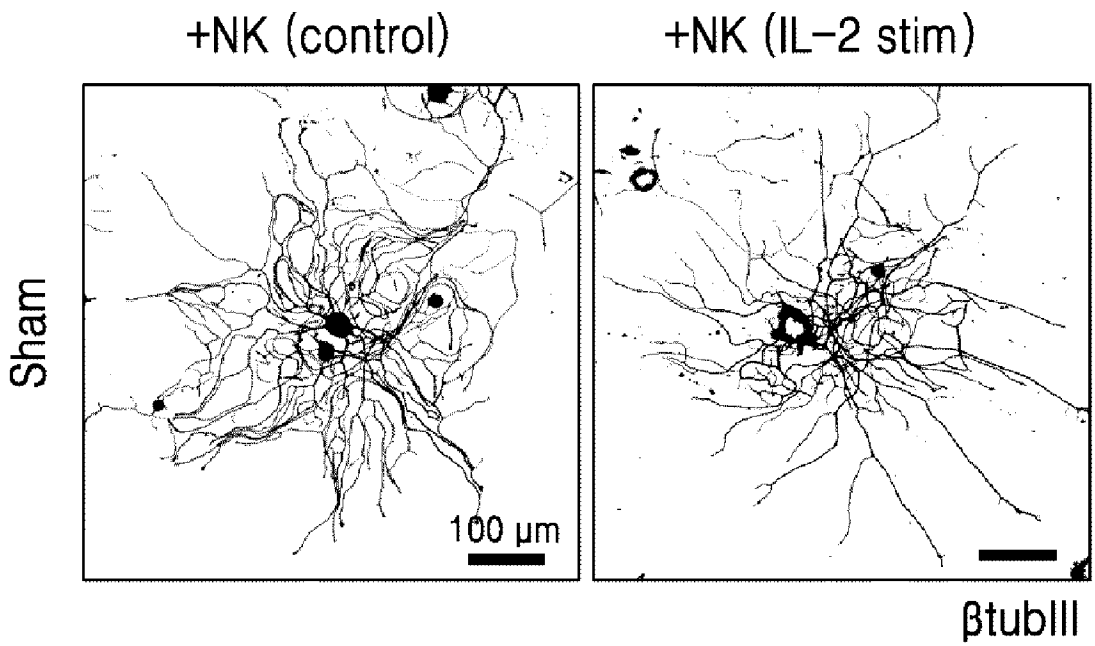
[도 5B]


Raet1 mRNA (Fold change) (ipsi/contralateral L5 DRG)
40
30
20
10
0
Sham
L5x
p=0.0004
p<0.0001
4
7
Days post surgery

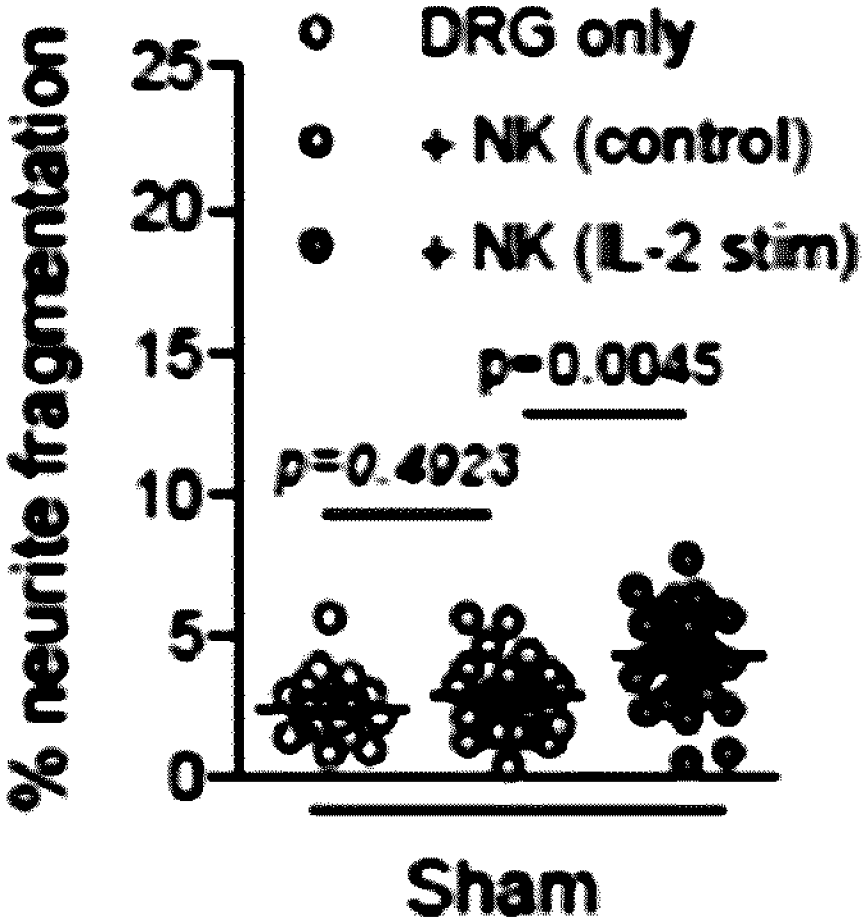
[도 5C]


1 day culture
Raet1 mRNA (Fold change)
(versus acute dissociation)
40
30
20
10
0
p=0.0075
Contra
Ipsi
L5x

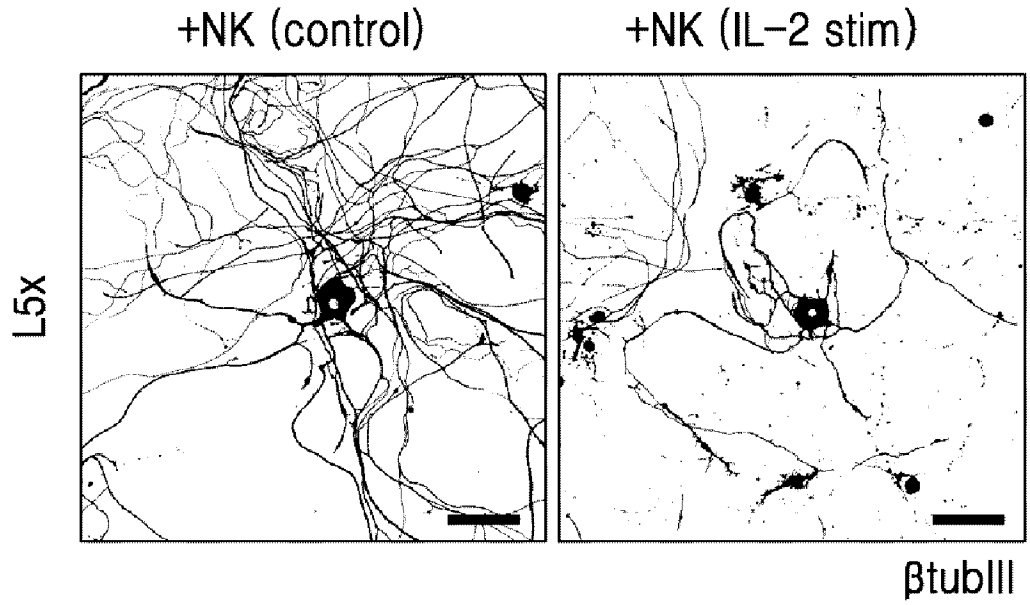
[도 5D]


+NK (control)
+NK (IL-2 stim)
Sham
100 μm
βtubIII

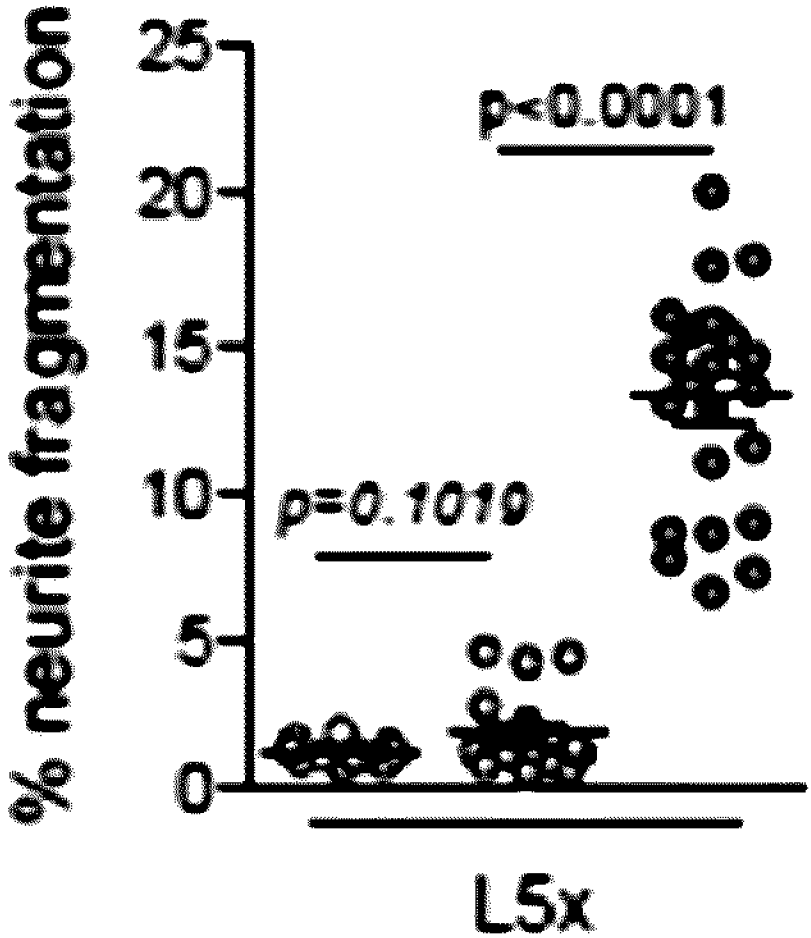
[도 5E]


DRG only
+ NK (control)
+ NK (IL-2 stim)
p=0.0045
p=0.4923
% neurite fragmentation
25
20
15
10
5
0
Sham

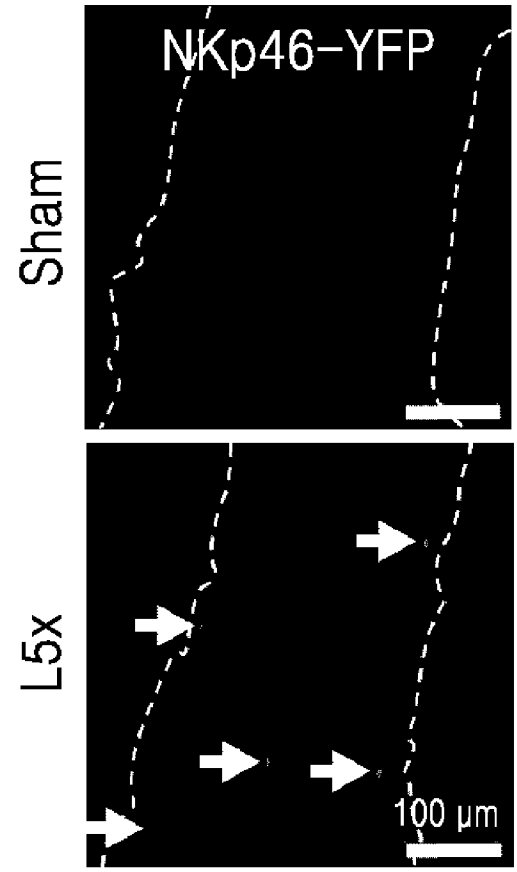
[도 5F]


+NK (control)
+NK (IL-2 stim)
L5x
βtubIII

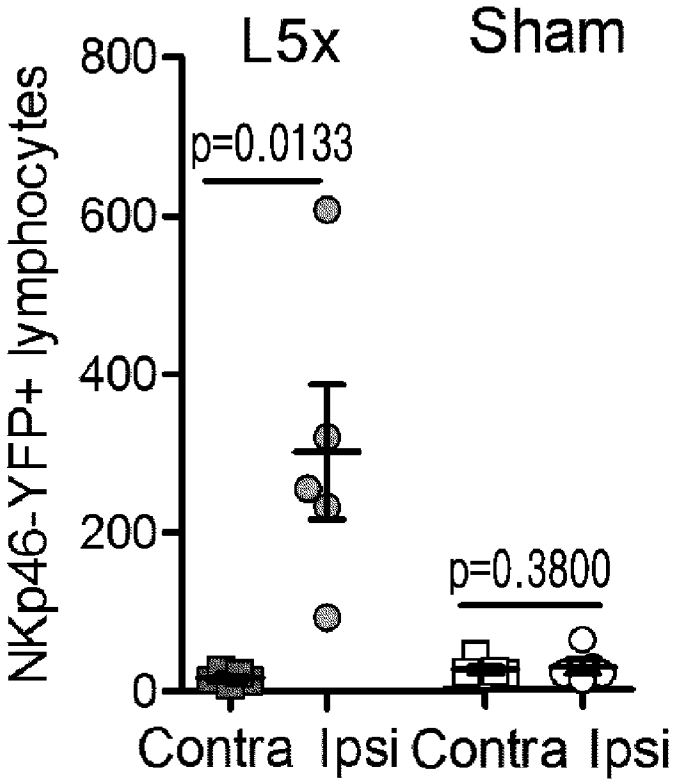
[도 5G]


% neurite fragmentation
25
20
15
10
5
0
p<0.0001
p=0.1010
L5x

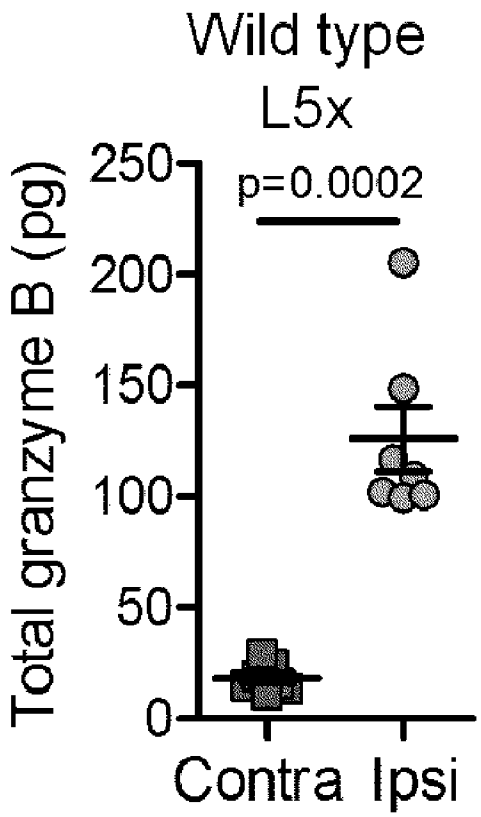
[도 5H]


NKp46-YFP
Sham
L5x
100 μm

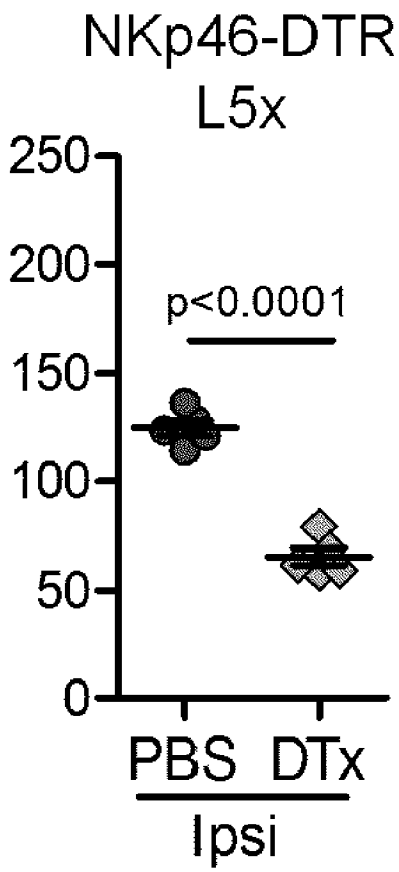
[도 5I]


L5x
Sham
NKp46-YFP+ lymphocytes
800
600
400
200
0
p=0.0133
p=0.3800
Contra
Ipsi
Contra
Ipsi

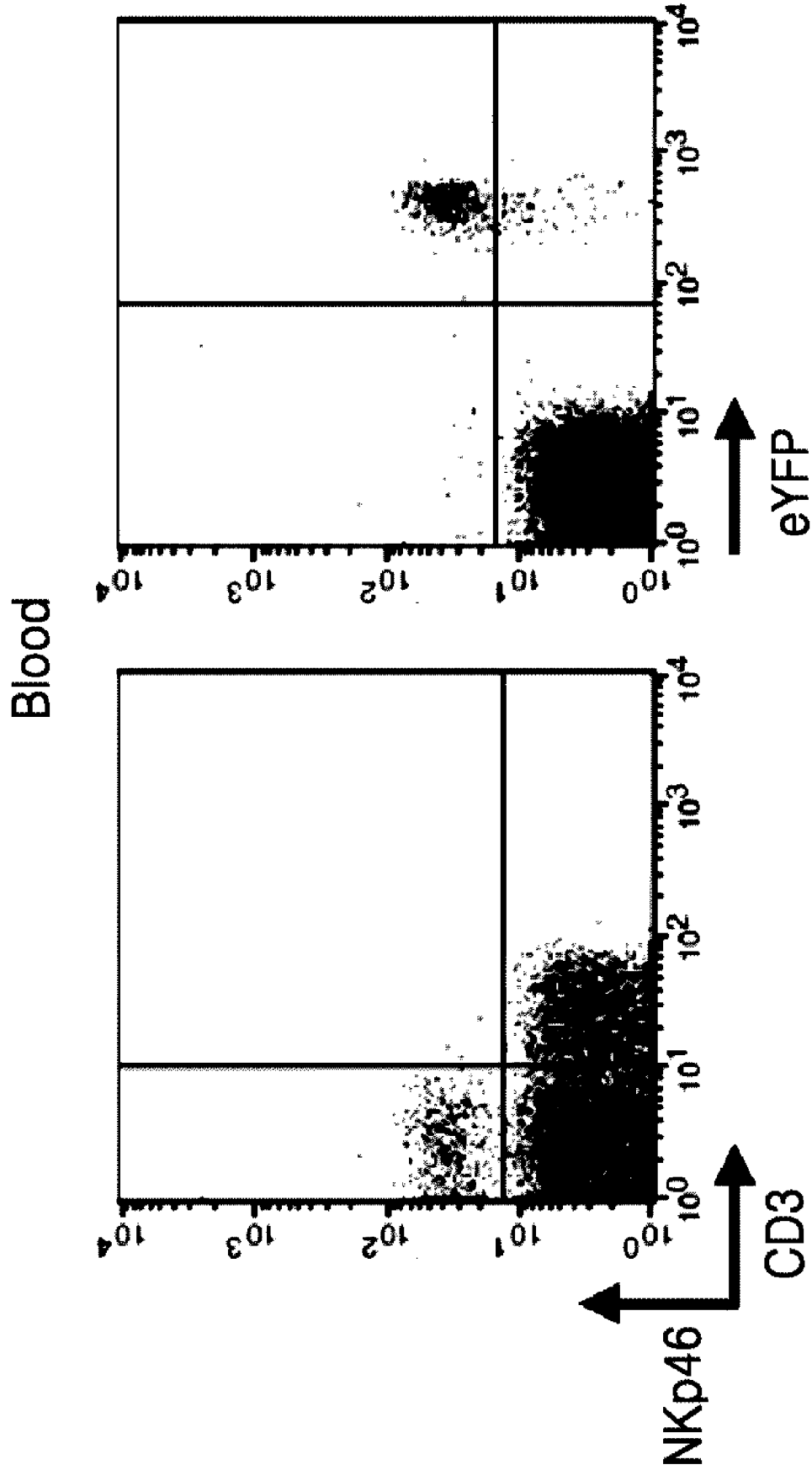
[도 5J]


Wild type
L5x
p=0.0002
Total granzyme B (pg)
250
200
150
100
50
0
Contra
Ipsi

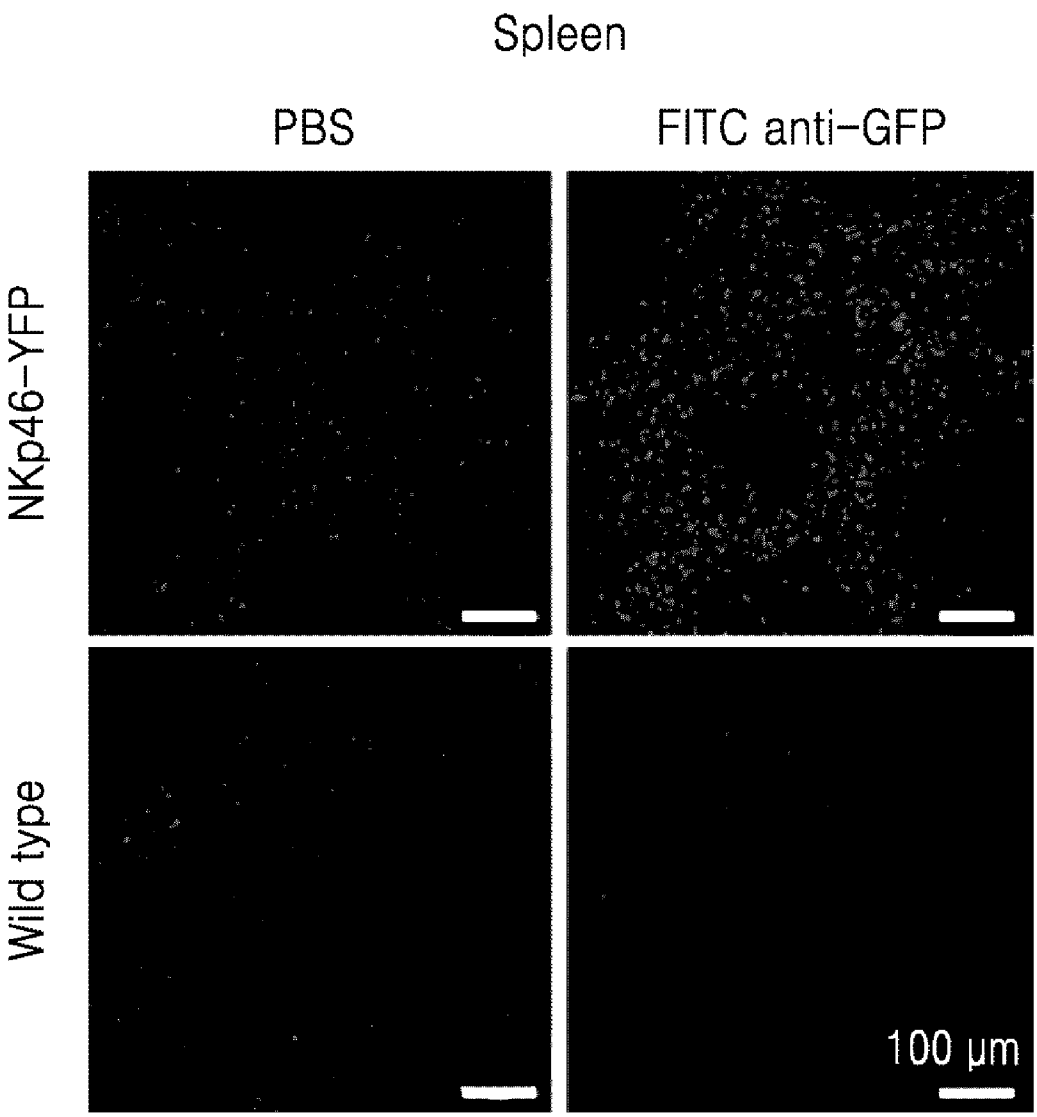
[도 5K]


NKp46-DTR
L5x
p<0.0001
250
200
150
100
50
0
PBS
DTx
Ipsi

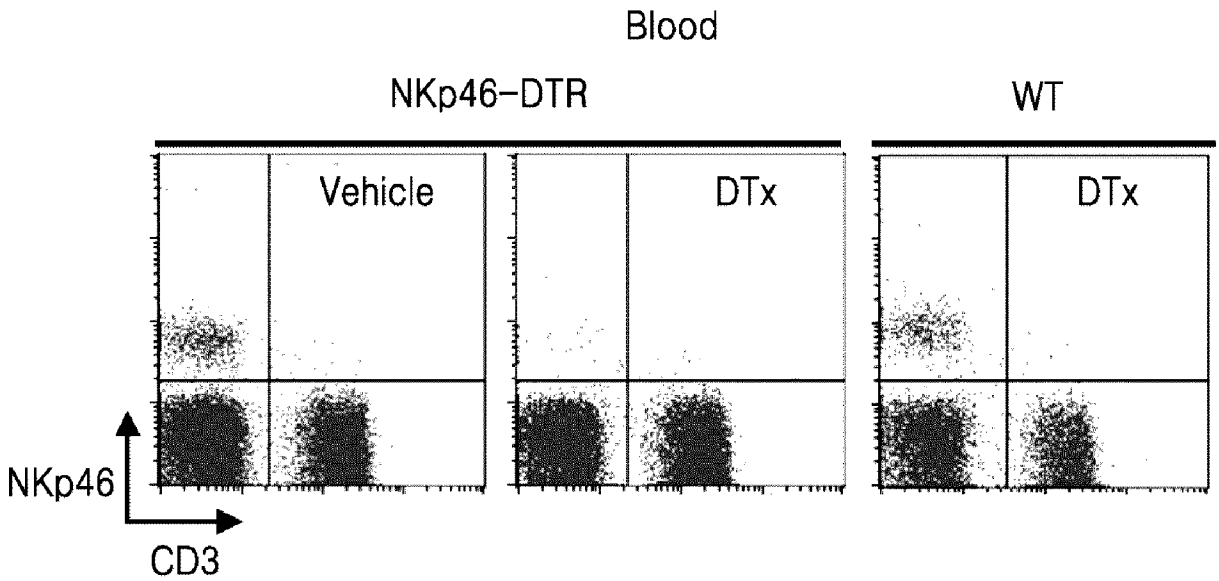
[도 6A]



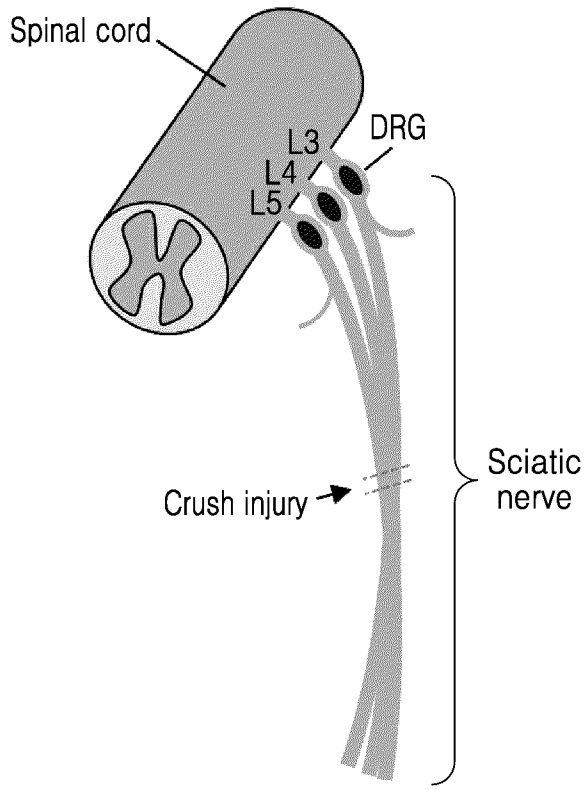
[도 6B]


Spleen
PBS
FITC anti-GFP
NKp46-YFP
Wild type
100 μm

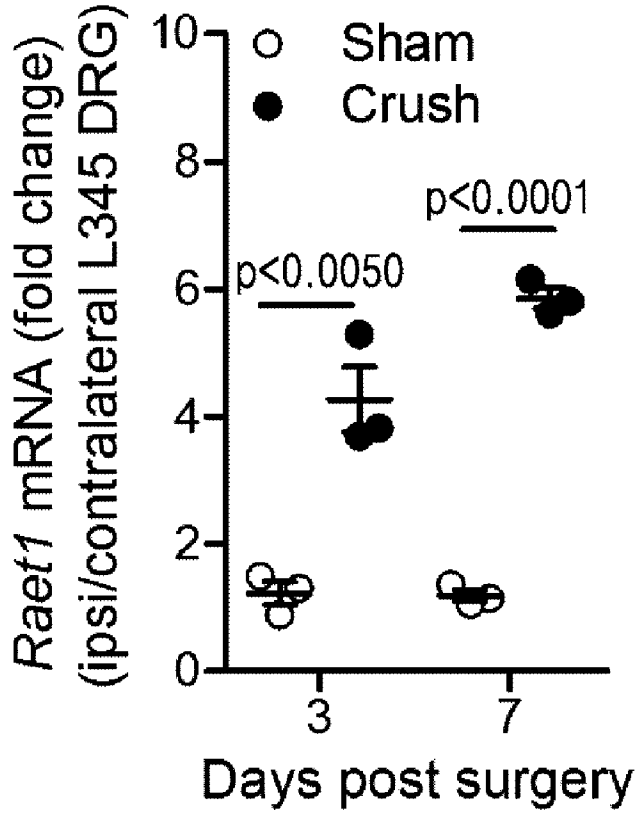
[도 6C]


Blood
NKp46-DTR
WT
Vehicle
DTx
DTx
NKp46
CD3

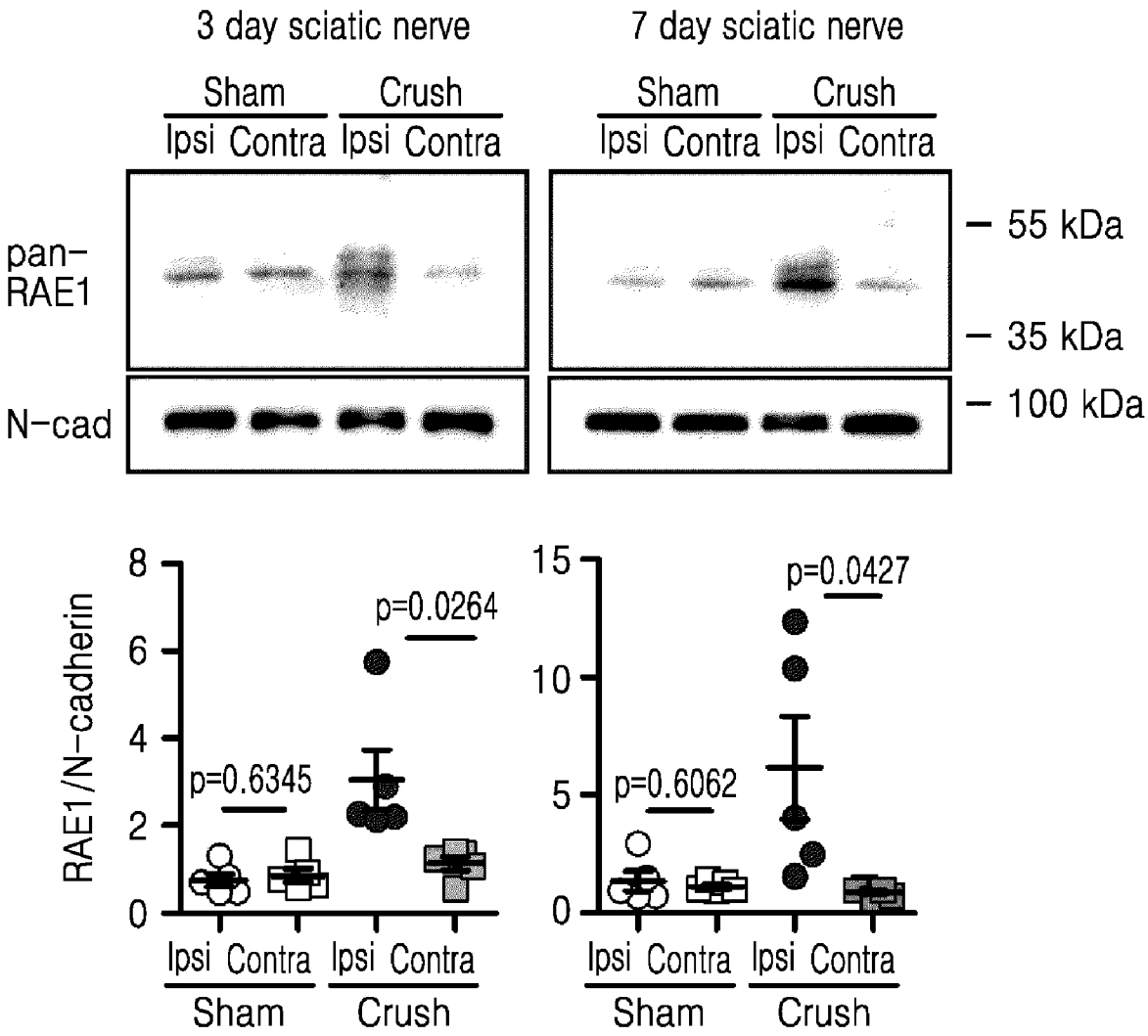
[도 7A]


Spinal cord
L3
L4
L5
DRG
Crush injury
Sciatic nerve

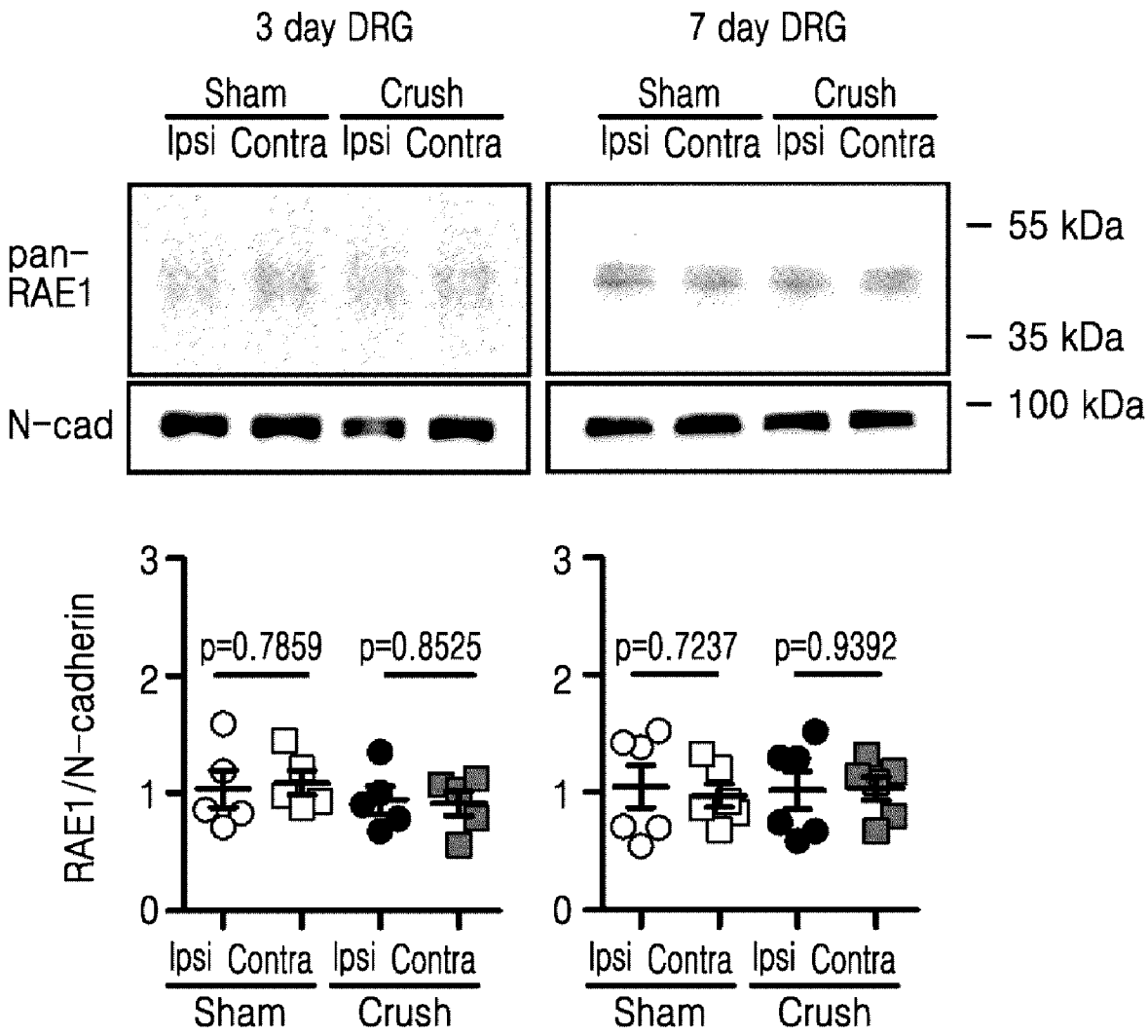
[도 7B]


Raet1 mRNA (fold change)
(ipsi/contralateral L345 DRG)
10
8
6
4
2
0
Sham
Crush
p<0.0001
p<0.0050
3
7
Days post surgery

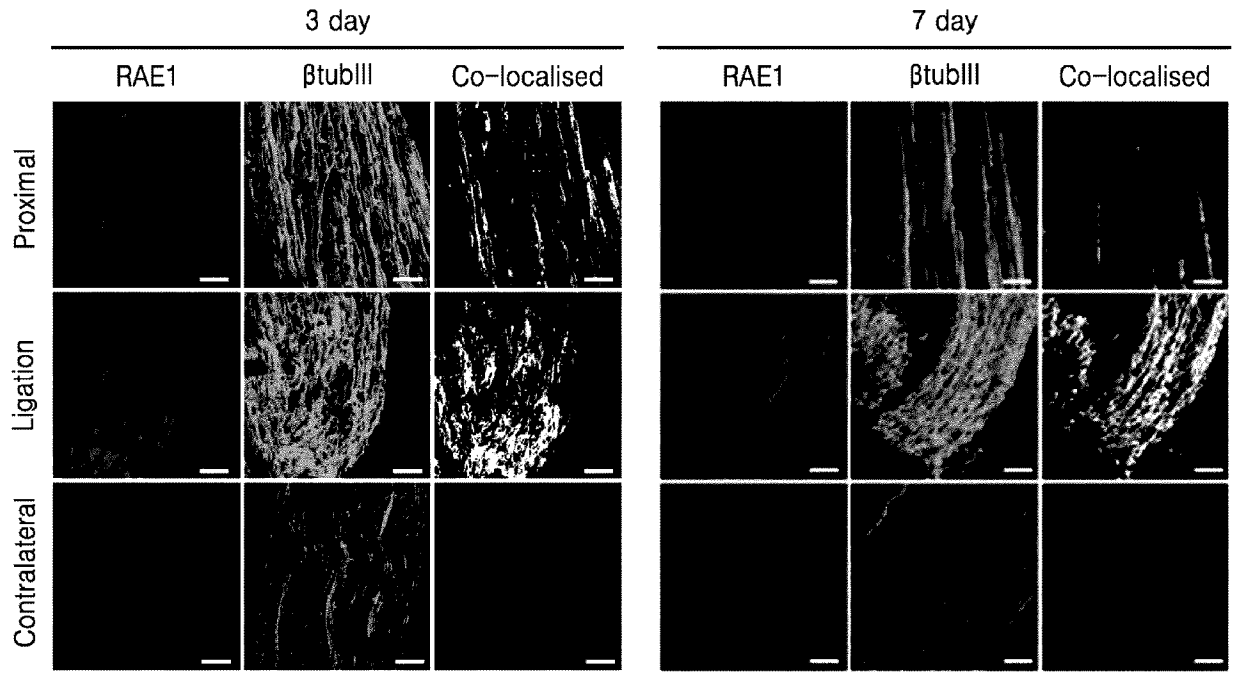
[도 7C]


3 day sciatic nerve
7 day sciatic nerve
Sham
Crush
Ipsi Contra Ipsi Contra
pan-RAE1
N-cad
55 kDa
35 kDa
100 kDa
RAE1/N-cadherin
p=0.6345
p=0.0264
p=0.6062
p=0.0427
Sham
Crush

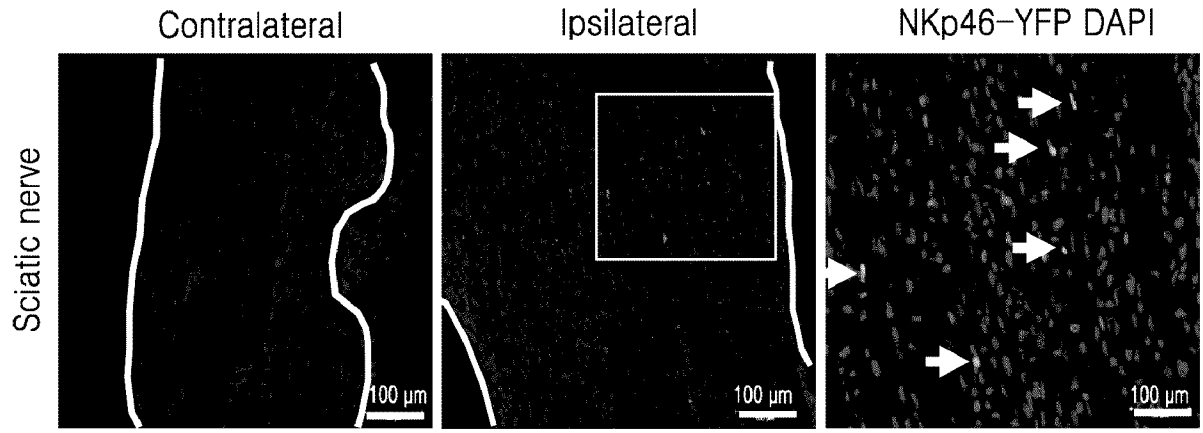
[도 7D]


3 day DRG
7 day DRG
Sham
Crush
Ipsi Contra Ipsi Contra
Sham Crush
Ipsi Contra Ipsi Contra
pan-RAE1
N-cad
55 kDa
35 kDa
100 kDa
RAE1/N-cadherin
p=0.7859
p=0.8525
p=0.7237
p=0.9392
0
1
2
3
Ipsi Contra Ipsi Contra
Sham Crush
Ipsi Contra Ipsi Contra
Sham Crush

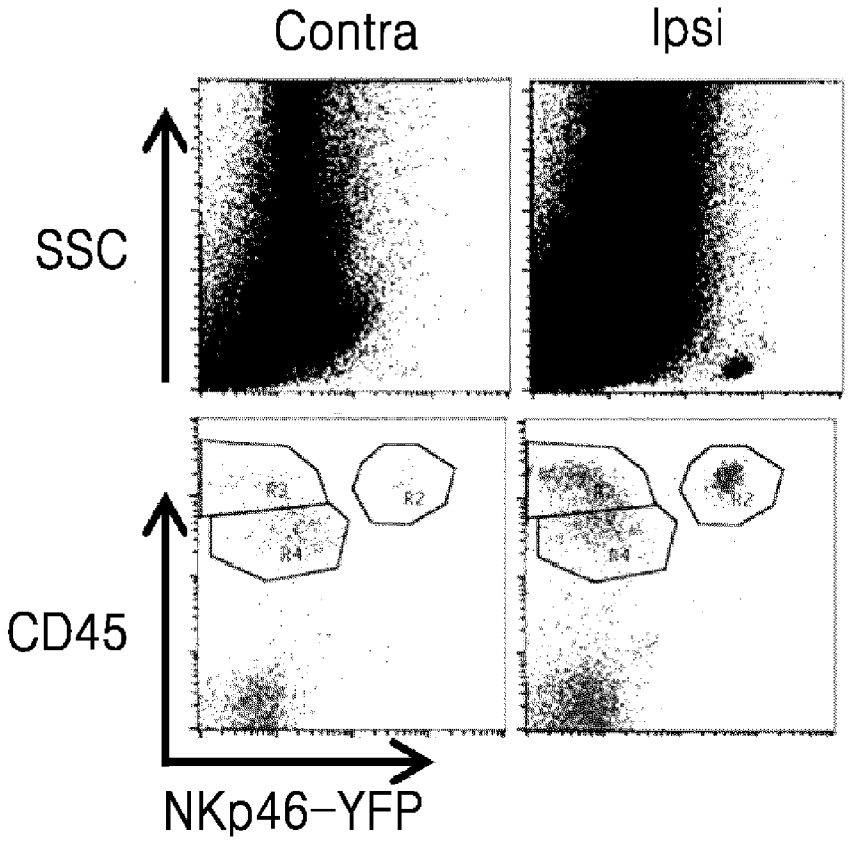
[도 7E]


3 day
7 day
RAE1
βtubIII
Co-localised
RAE1
βtubIII
Co-localised
Proximal
Ligation
Contralateral

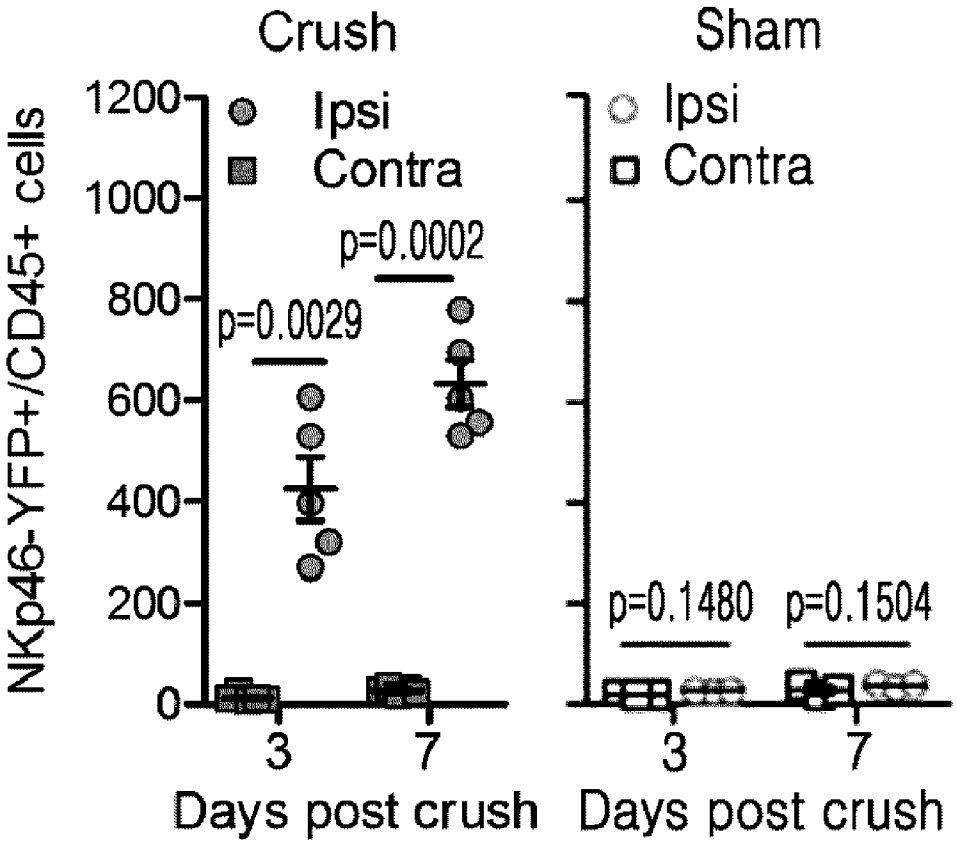
[도 8A]


Contralateral
Ipsilateral
NKp46-YFP DAPI
Sciatic nerve
100 μm
100 μm
100 μm

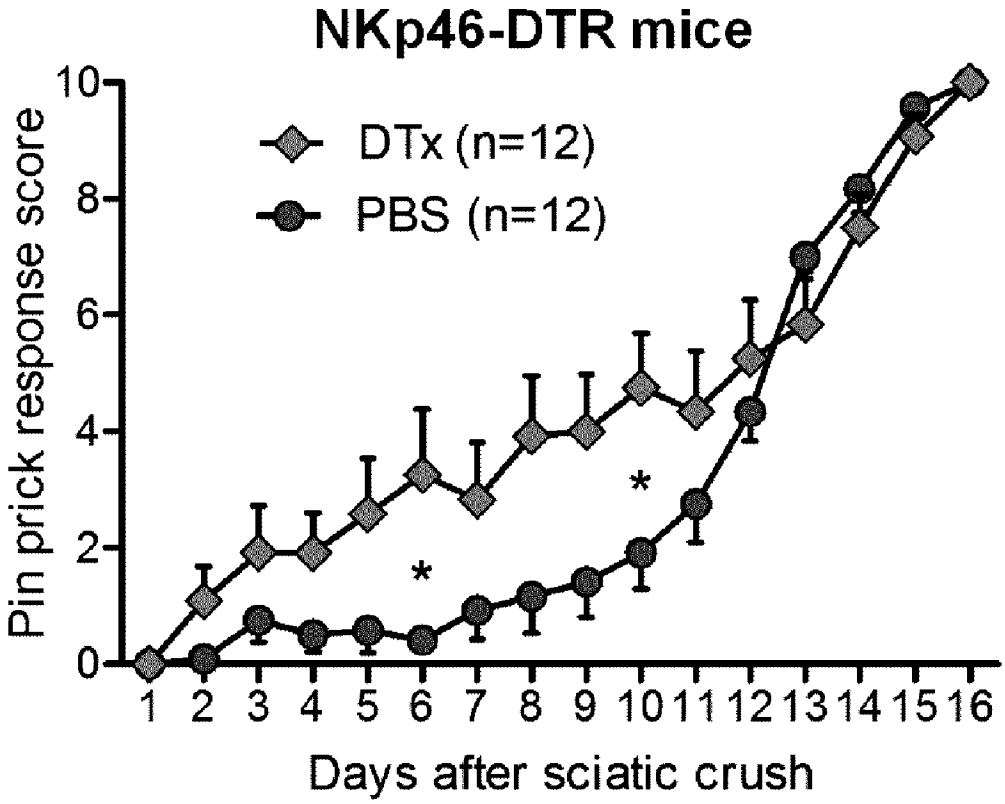
[도 8B]


Contra
Ipsi
SSC
CD45
NKp46-YFP
R2
R4

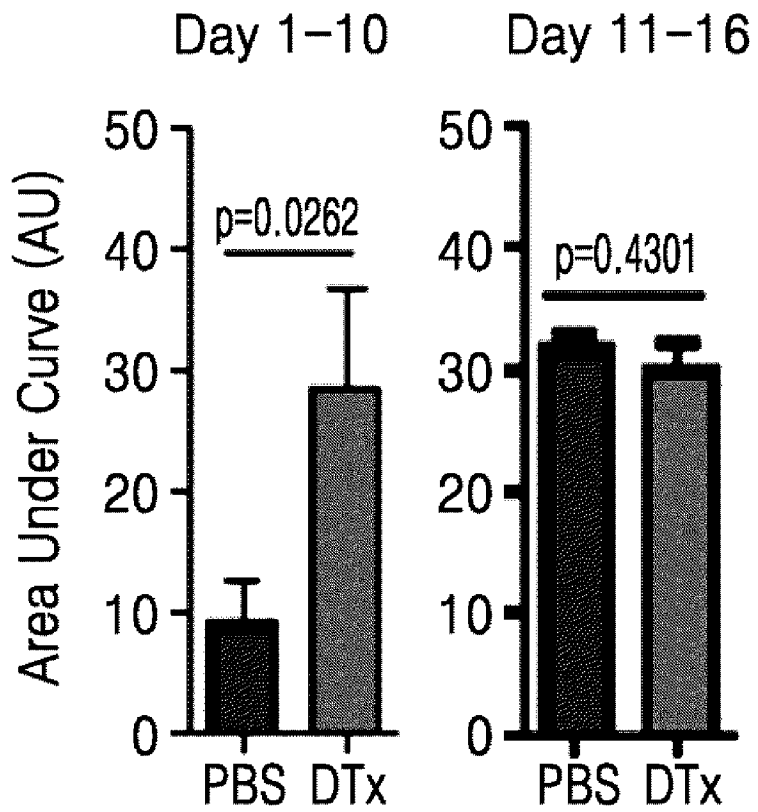
[도 8C]


Crush
Sham
Ipsi
Contra
Ipsi
Contra
NKp46-YFP+/CD45+ cells
1200
1000
800
600
400
200
0
p=0.0002
p=0.0029
p=0.1480
p=0.1504
3
7
3
7
Days post crush
Days post crush

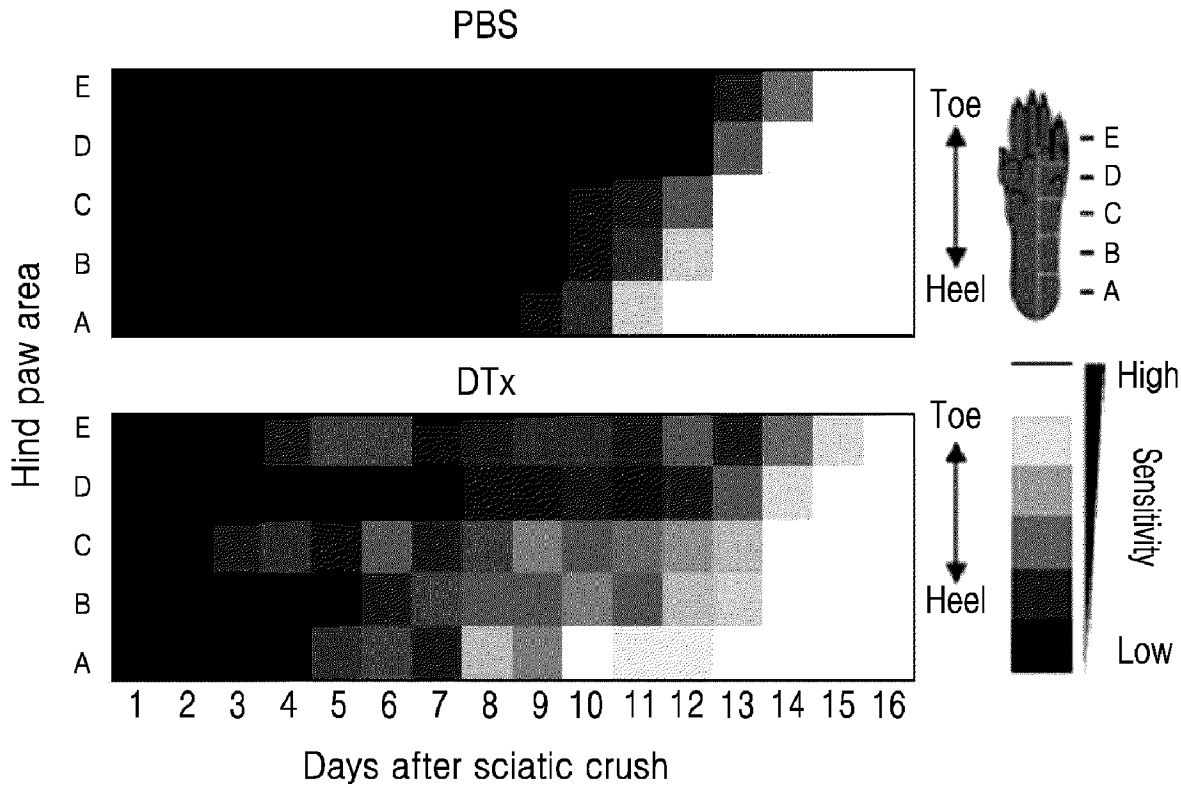
[도 8D]


NKp46-DTR mice
DTx (n=12)
PBS (n=12)
Pin prick response score
10
8
6
4
2
0
*
*
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16
Days after sciatic crush

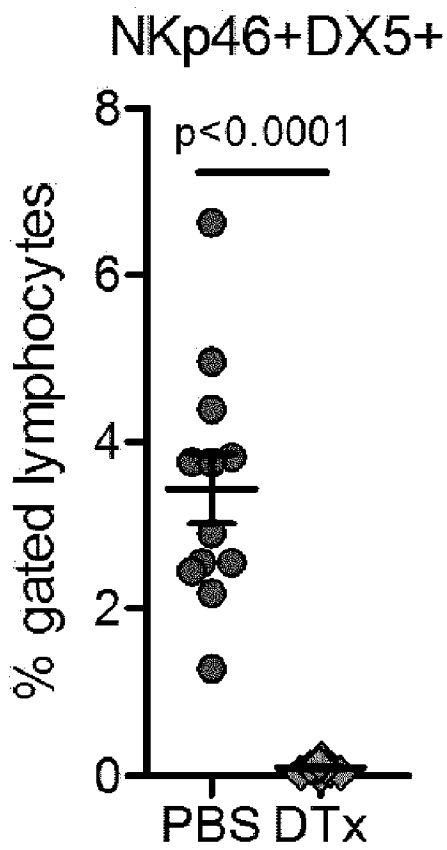
[도 8E]


Day 1-10
Day 11-16
Area Under Curve (AU)
50
40
30
20
10
0
p=0.0262
p=0.4301
PBS
DTx
PBS
DTx

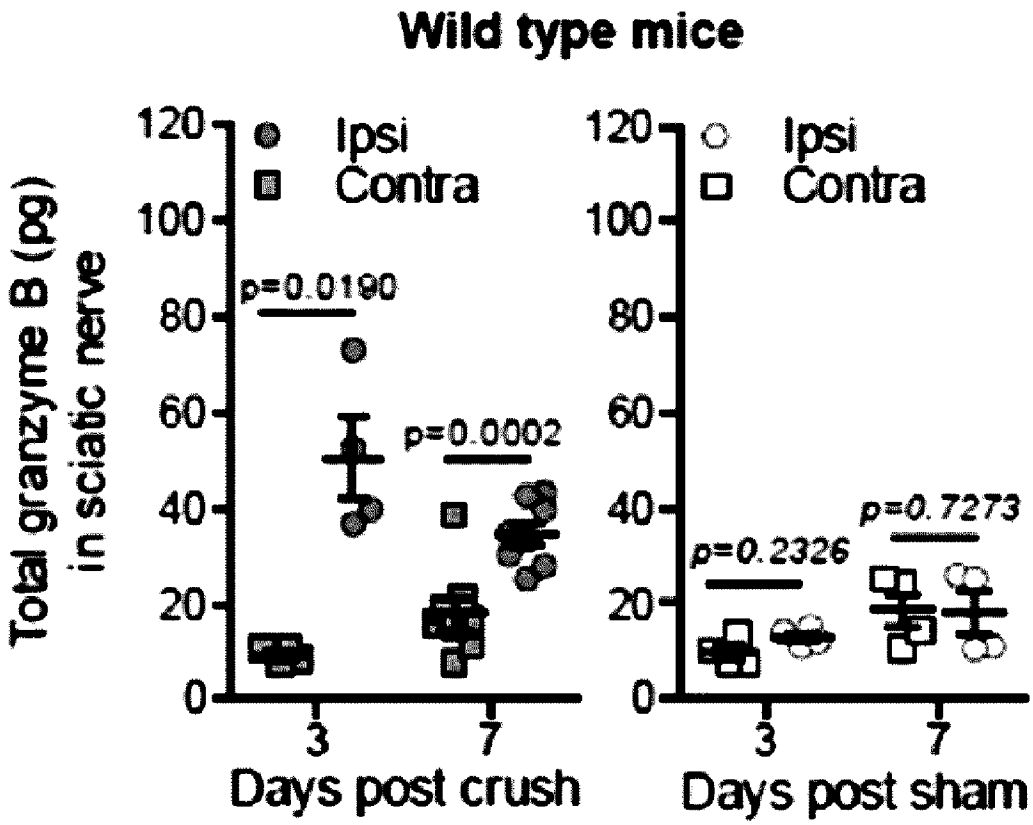
[도 8F]


PBS
DTx
Hind paw area
E
D
C
B
A
Toe
Heel
High
Sensitivity
Low
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16
Days after sciatic crush

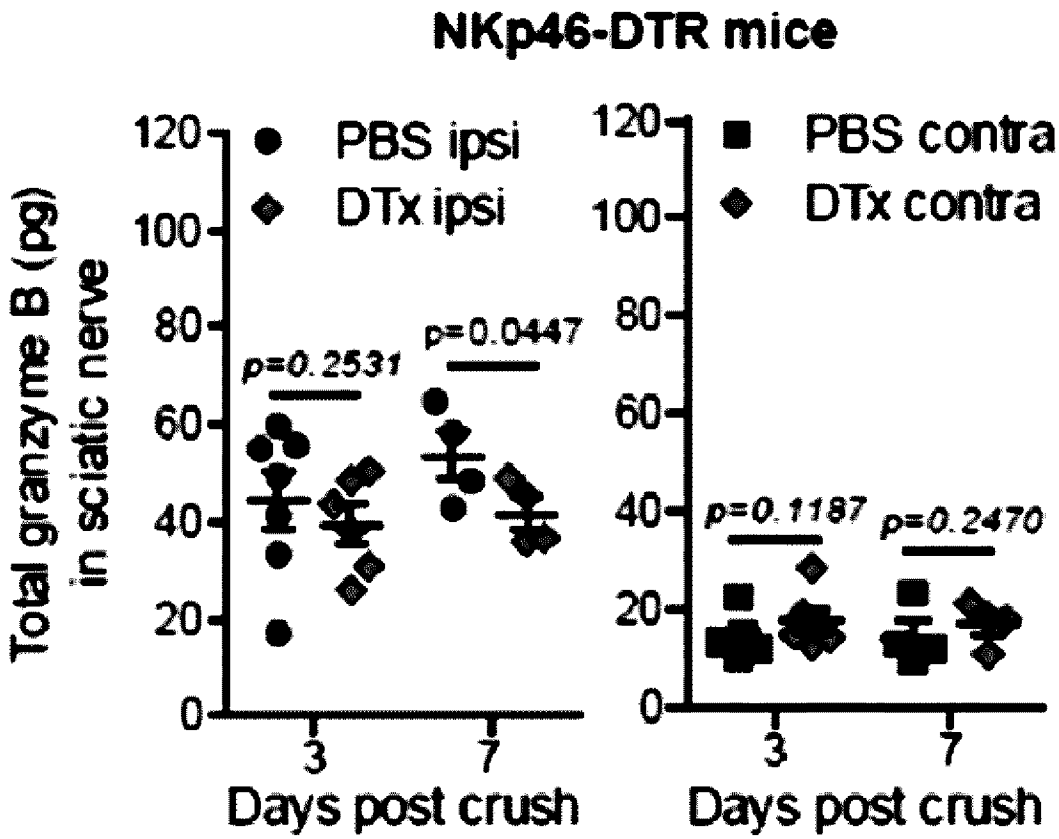
[도 8G]



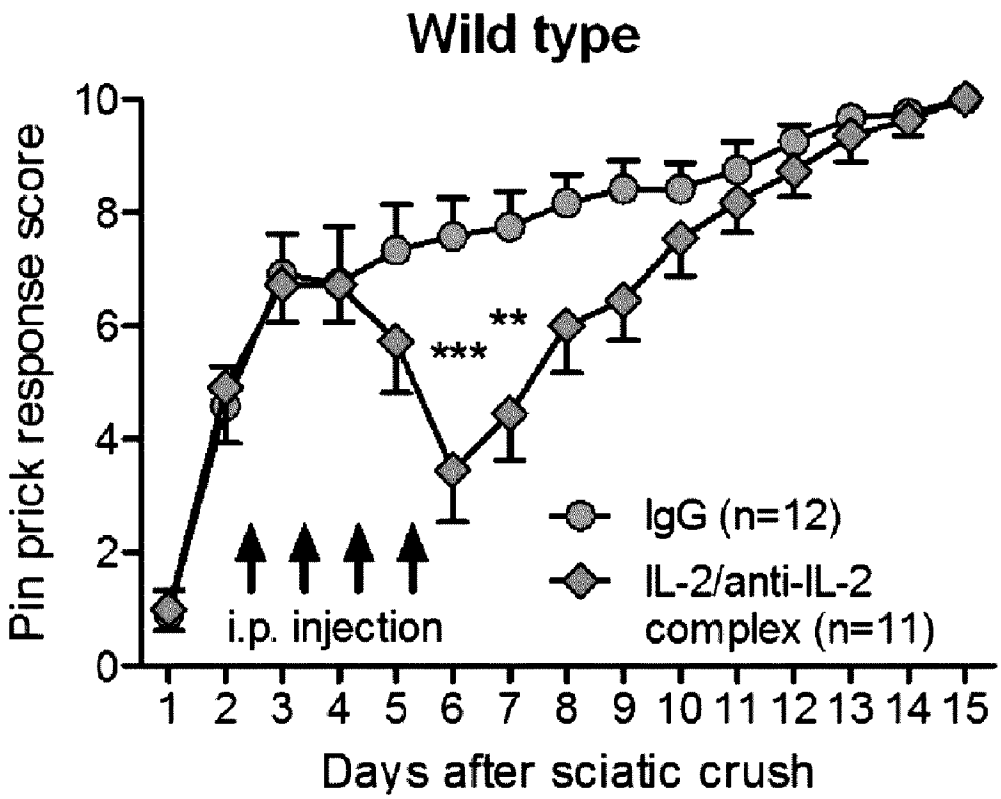
[도 9A]


Wild type mice
Total granzyme B (pg) in sciatic nerve
Ipsi
Contra
p=0.0190
p=0.0002
p=0.2326
p=0.7273
120
100
80
60
40
20
0
3
7
Days post crush
Days post sham

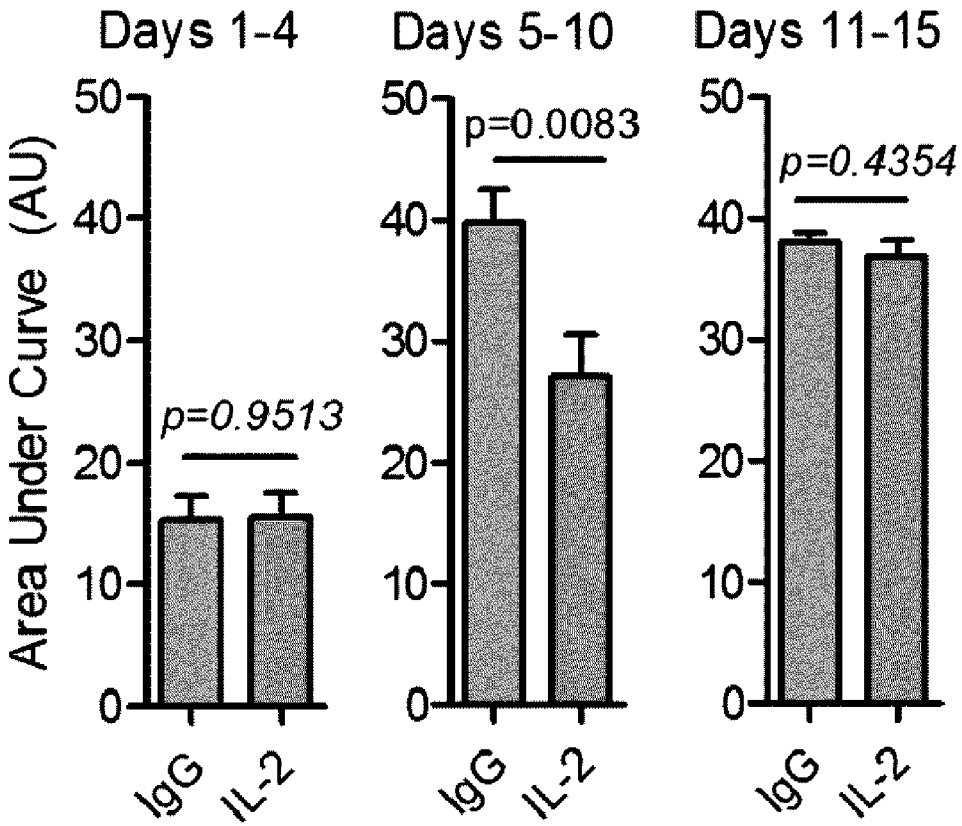
[도 9B]


NKp46-DTR mice
Total granzyme B (pg) in sciatic nerve
PBS ipsi
DTx ipsi
PBS contra
DTx contra
p=0.2531
p=0.0447
p=0.1187
p=0.2470
120
100
80
60
40
20
0
3
7
Days post crush
Days post crush

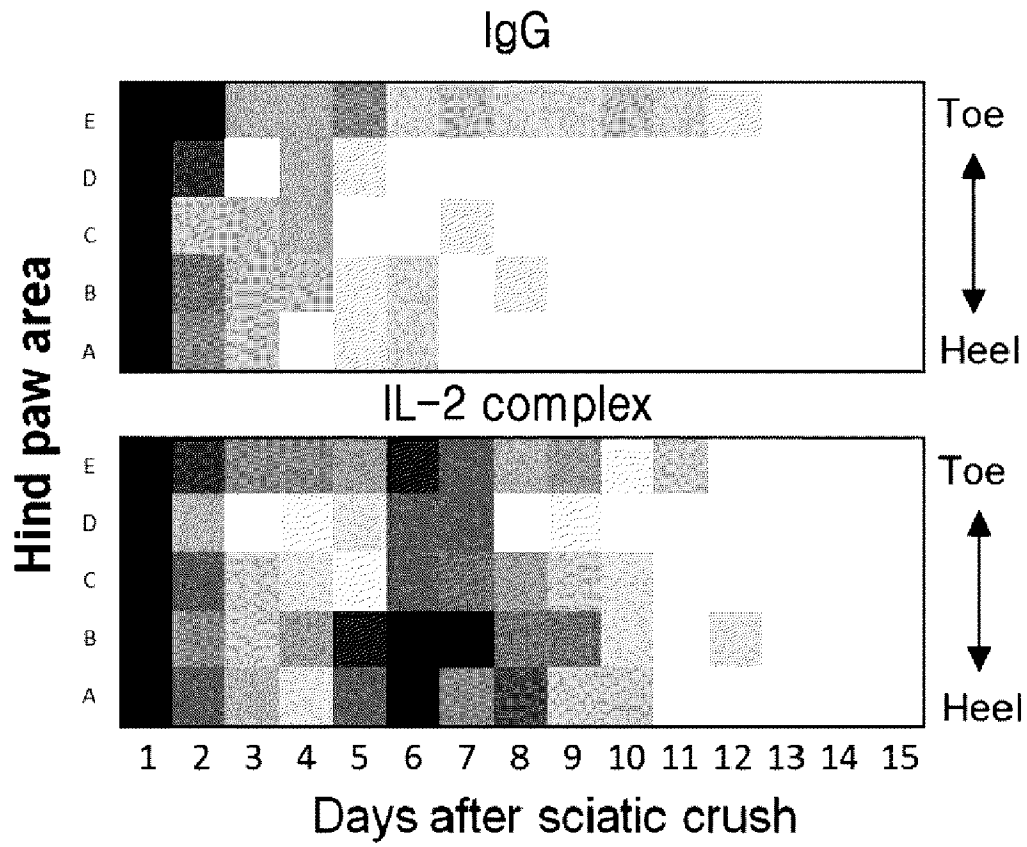
[도 10A]


Wild type
Pin prick response score
Days after sciatic crush
i.p. injection
IgG (n=12)
IL-2/anti-IL-2 complex (n=11)
***
**

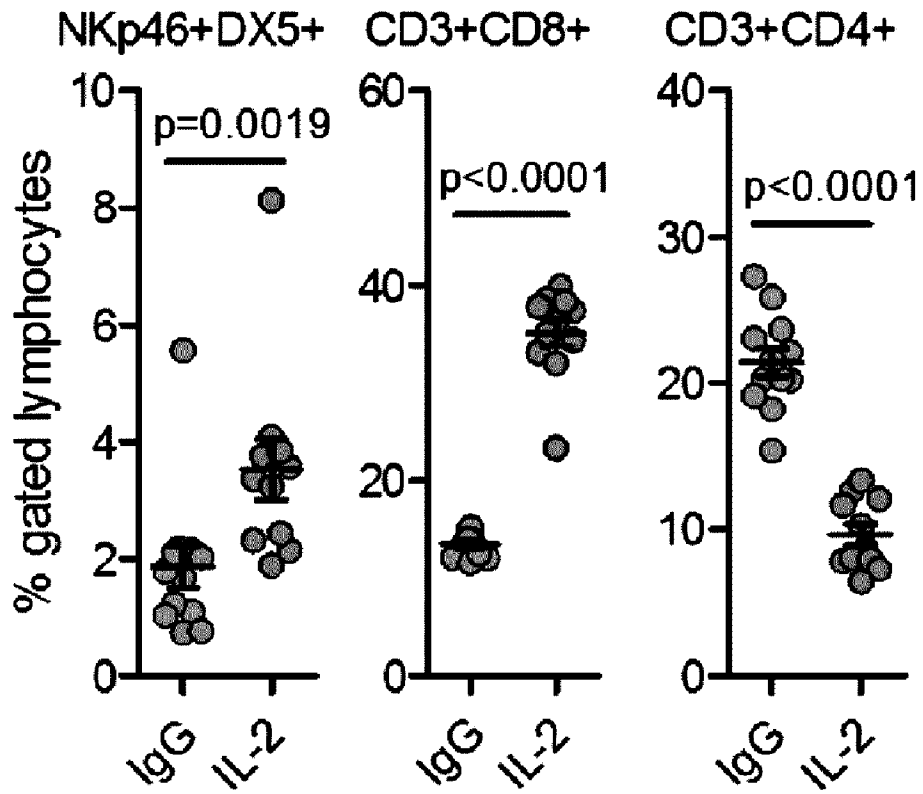
[도 10B]


Days 1-4
Days 5-10
Days 11-15
Area Under Curve (AU)
p=0.9513
p=0.0083
p=0.4354
IgG
IL-2

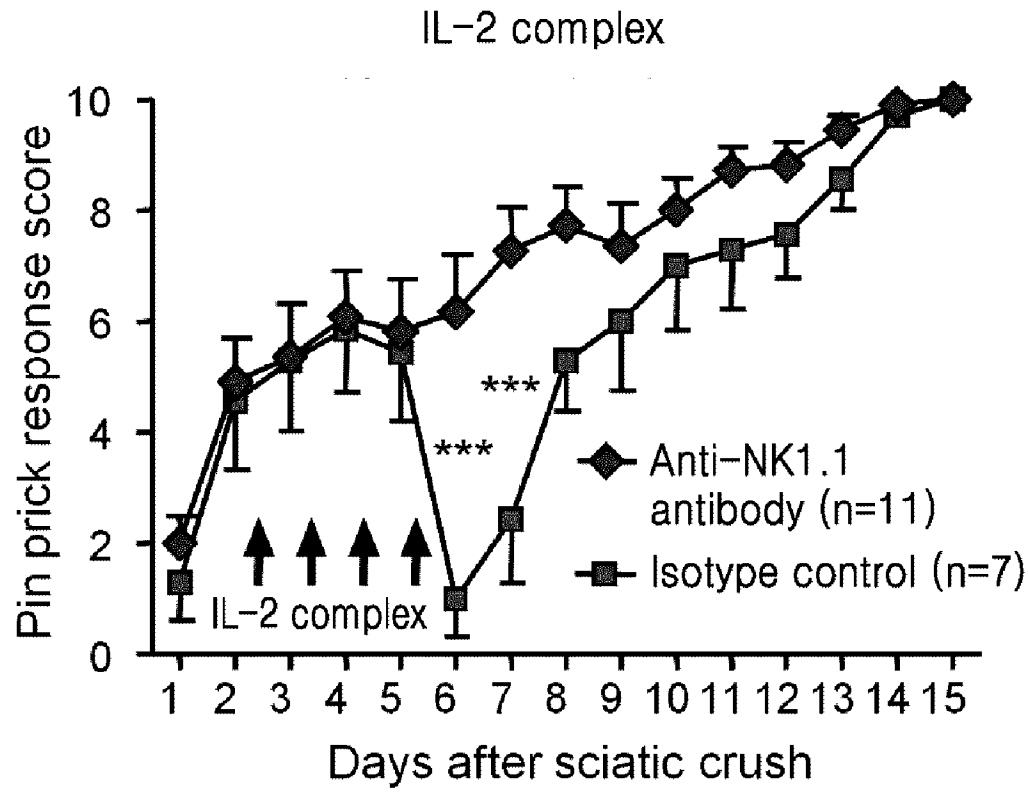
[도 10C]


IgG
IL-2 complex
Hind paw area
E
D
C
B
A
Toe
Heel
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
Days after sciatic crush

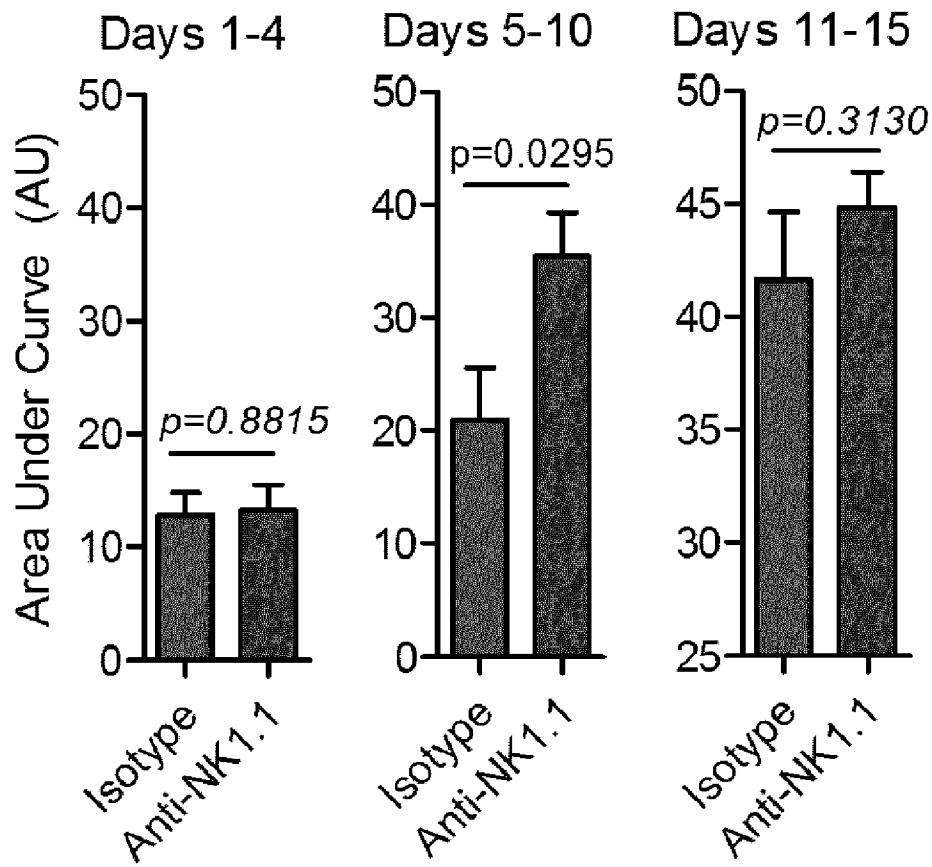
[도 10D]


NKp46+DX5+
CD3+CD8+
CD3+CD4+
% gated lymphocytes
p=0.0019
p<0.0001
p<0.0001
IgG
IL-2

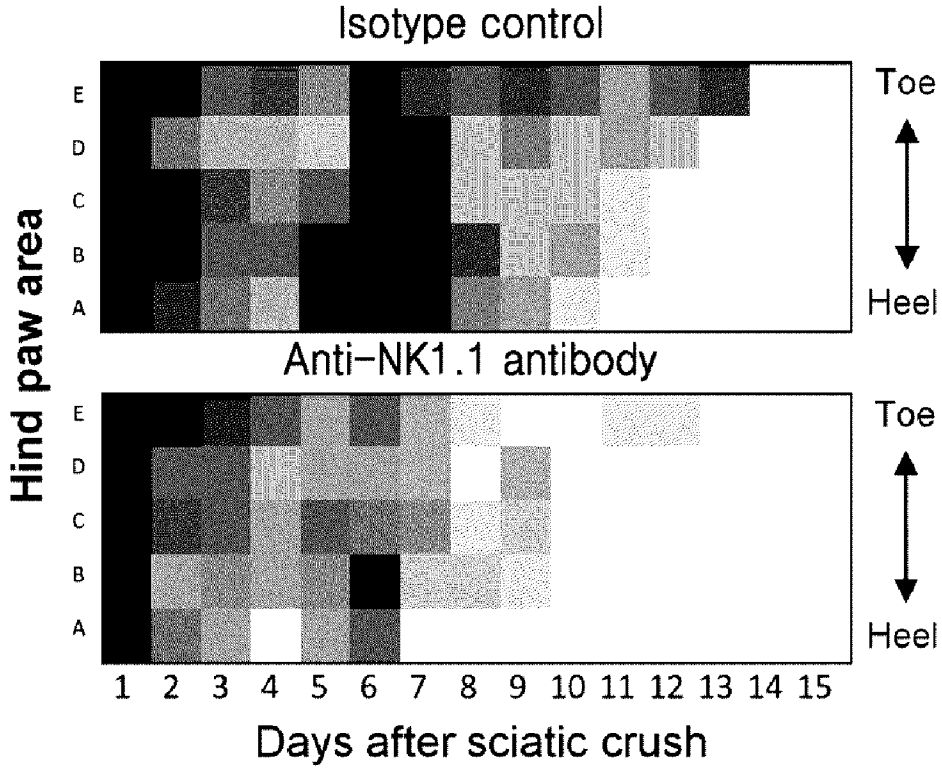
[도 10E]


IL-2 complex
Pin prick response score
Days after sciatic crush
IL-2 complex
***
***
Anti-NK1.1 antibody (n=11)
Isotype control (n=7)

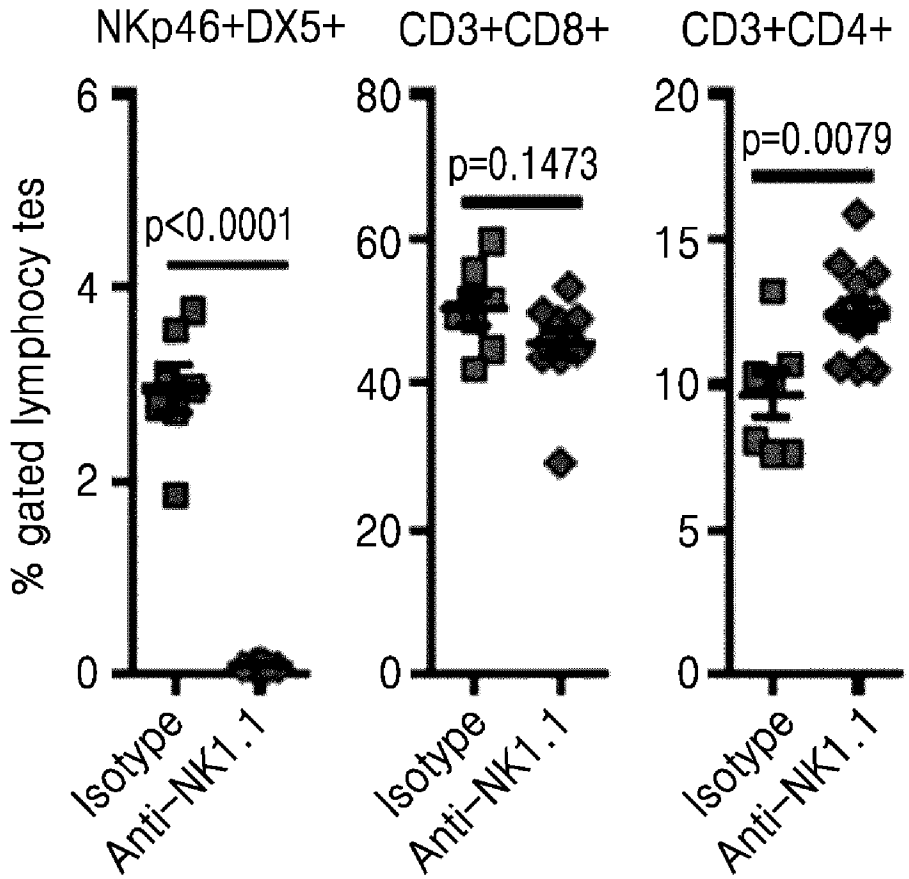
[도 10F]


Days 1-4
Days 5-10
Days 11-15
Area Under Curve (AU)
p=0.8815
p=0.0295
p=0.3130
Isotype
Anti-NK1.1

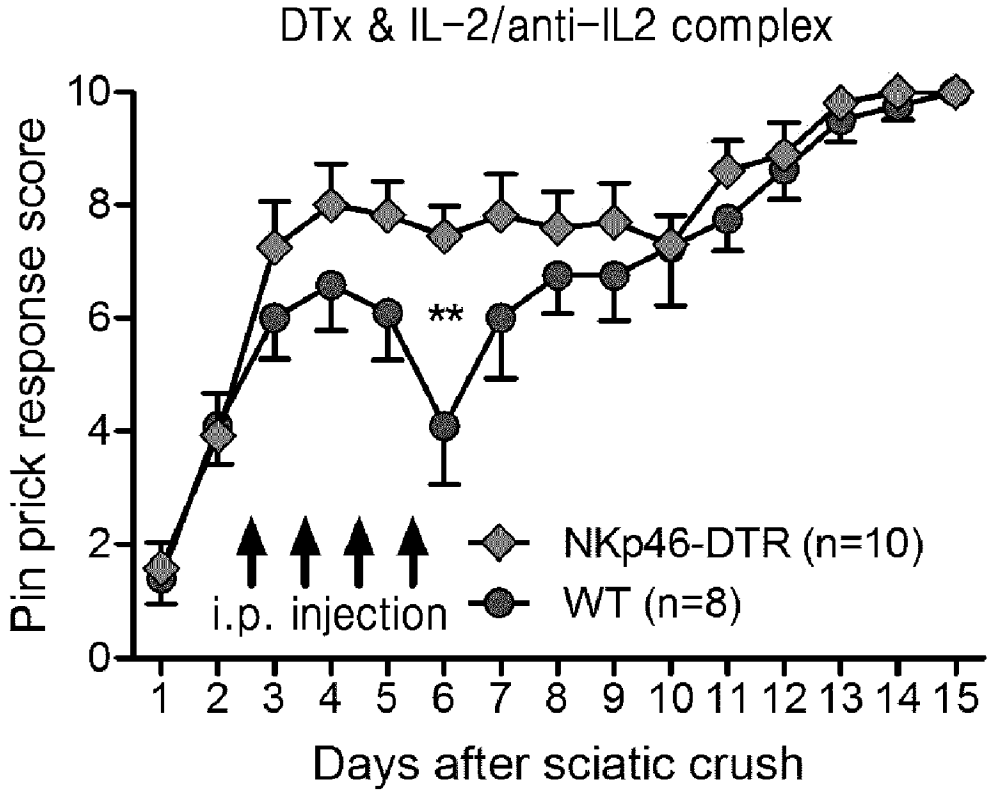
[도 10G]


Isotype control
Anti-NK1.1 antibody
Hind paw area
E
D
C
B
A
Toe
Heel
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
Days after sciatic crush

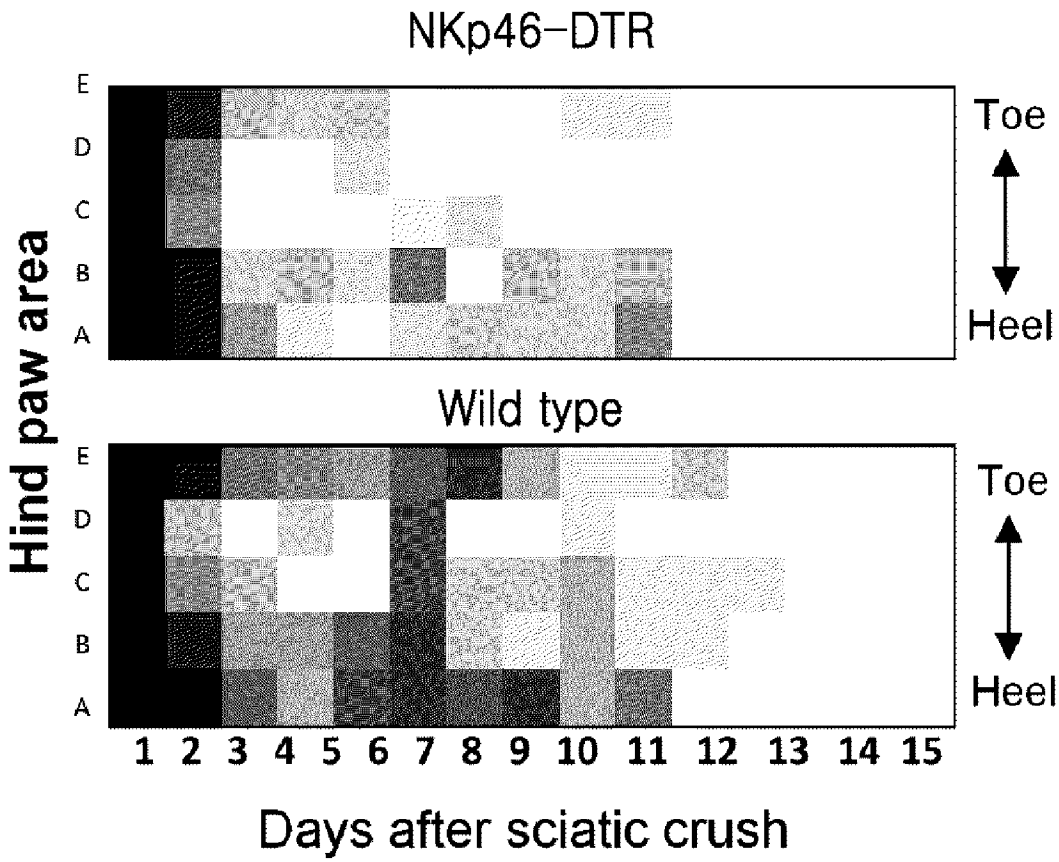
[도 10H]


NKp46+DX5+
CD3+CD8+
CD3+CD4+
% gated lymphocy tes
p<0.0001
p=0.1473
p=0.0079
Isotype
Anti-NK1.1

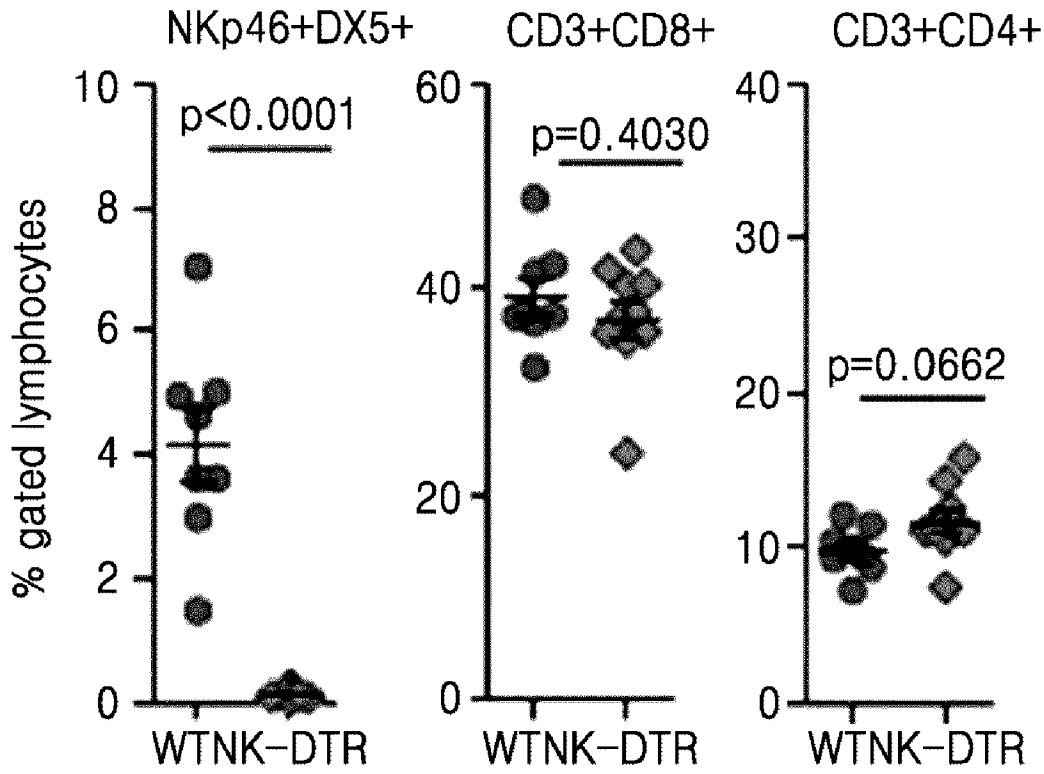
[도 11A]


DTx & IL-2/anti-IL2 complex
Pin prick response score
10
8
6
4
2
0
**
i.p. injection
NKp46-DTR (n=10)
WT (n=8)
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
Days after sciatic crush

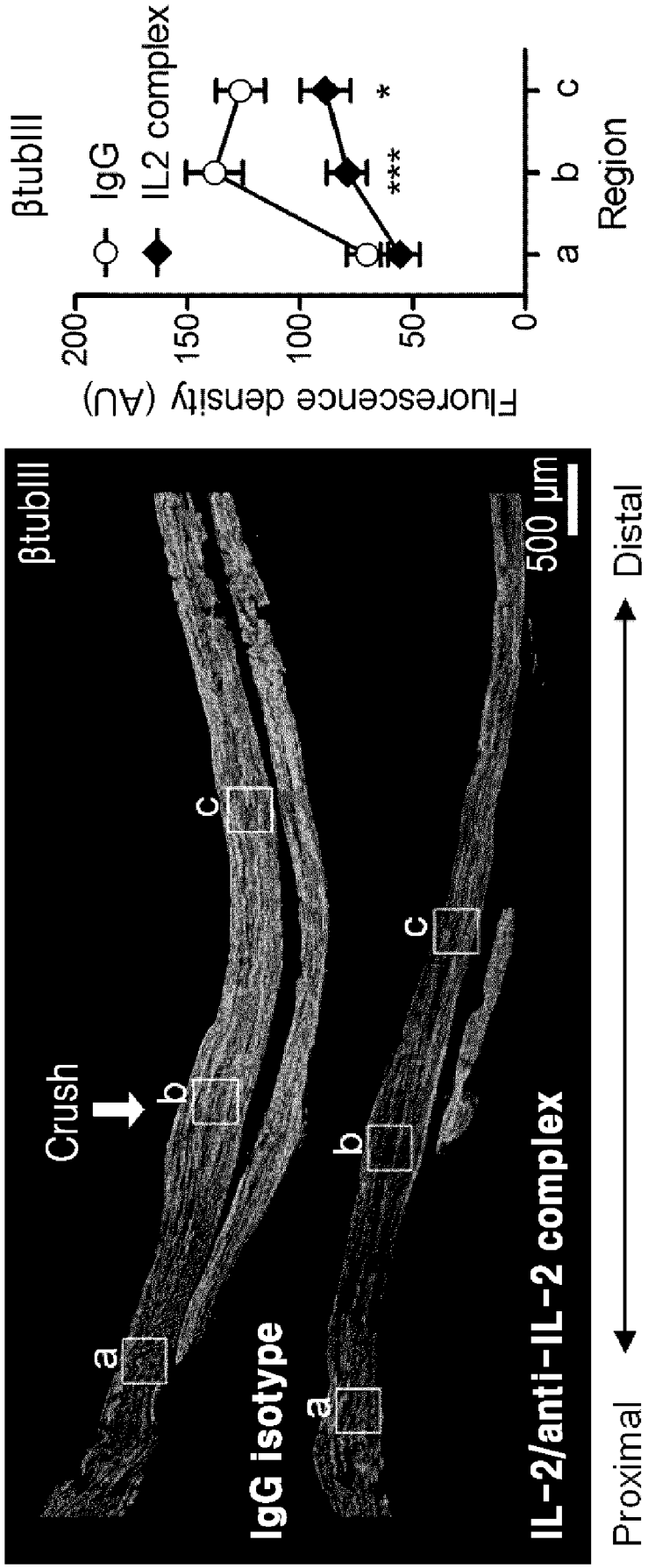
[도 11B]


NKp46-DTR
Hind paw area
E
D
C
B
A
Toe
Heel
Wild type
E
D
C
B
A
Toe
Heel
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
Days after sciatic crush

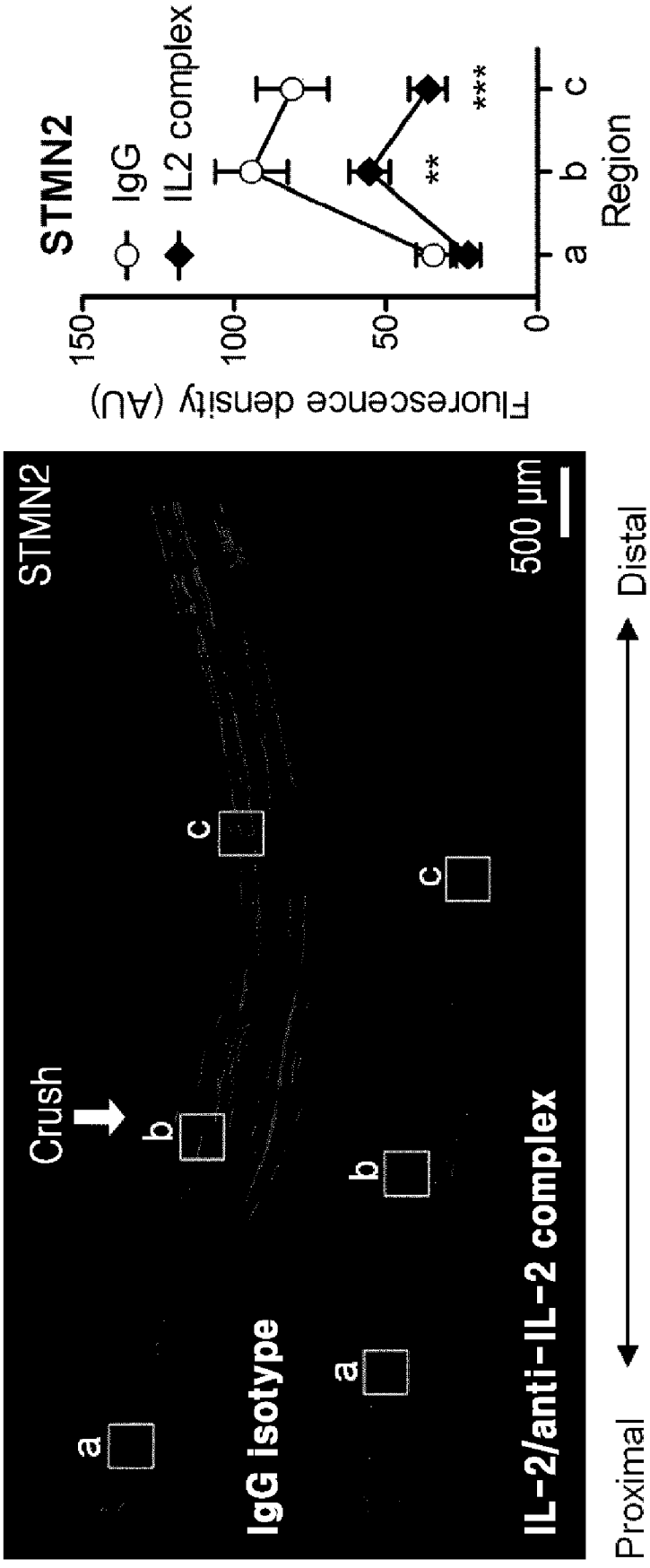
[도 11C]


NKp46+DX5+
CD3+CD8+
CD3+CD4+
% gated lymphocytes
p<0.0001
p=0.4030
p=0.0662
WTNK-DTR
WTNK-DTR
WTNK-DTR

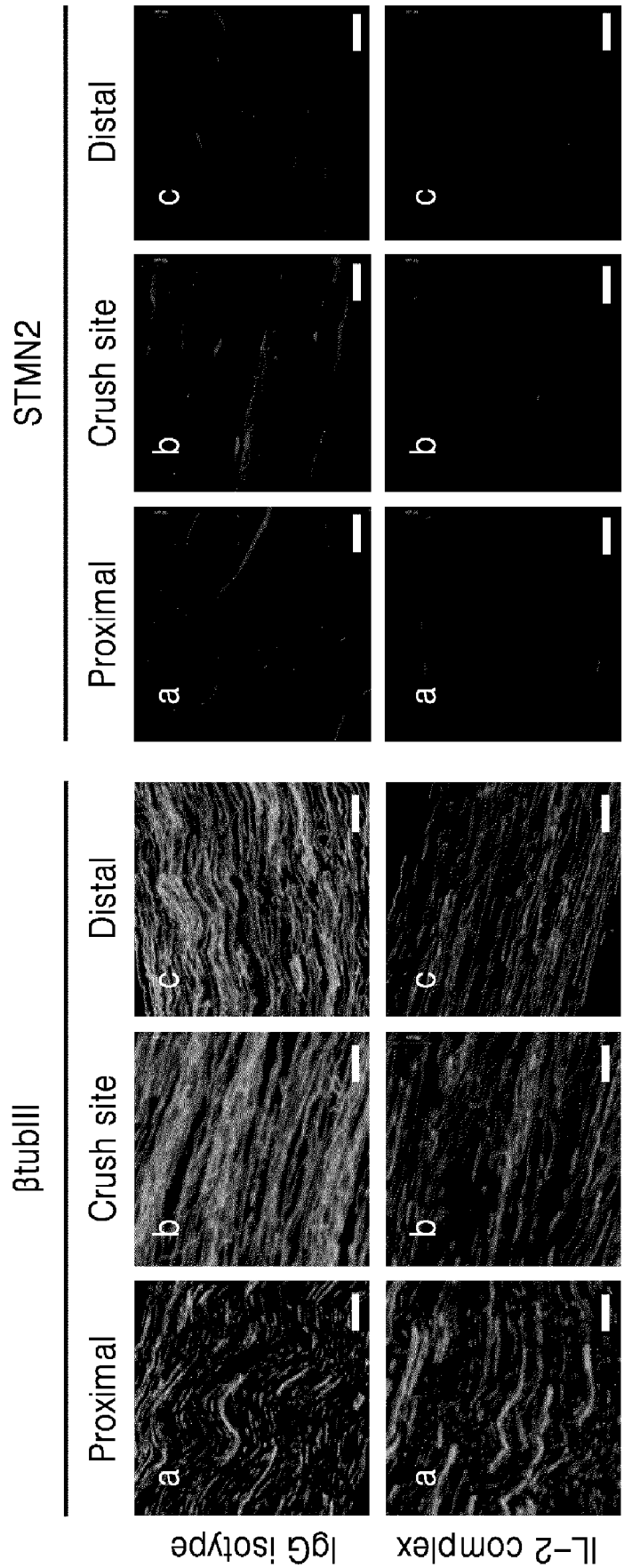
[도 12A]


βtubIII
IgG
IL2 complex
Fluorescence density (AU)
200
150
100
50
0
a
b
c
Region
*
***
βtubIII
Crush
a
b
c
IgG isotype
IL-2/anti-IL-2 complex
500 μm
Proximal
Distal

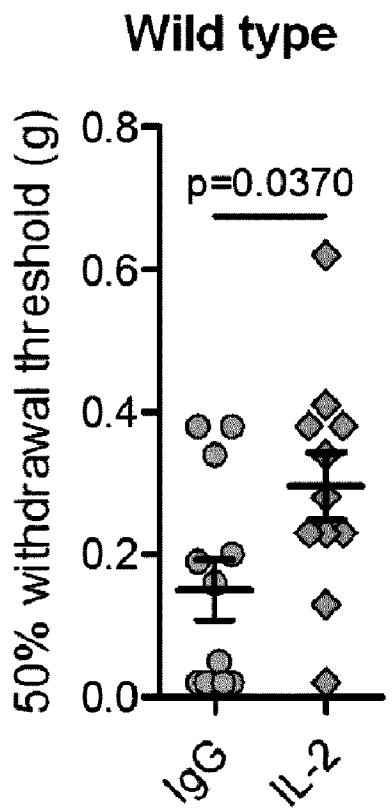
[도 12B]


STMN2
IgG
IL2 complex
Fluorescence density (AU)
150
100
50
0
a
b
c
Region
**
***
STMN2
Crush
a
b
c
IgG isotype
IL-2/anti-IL-2 complex
500 μm
Proximal
Distal

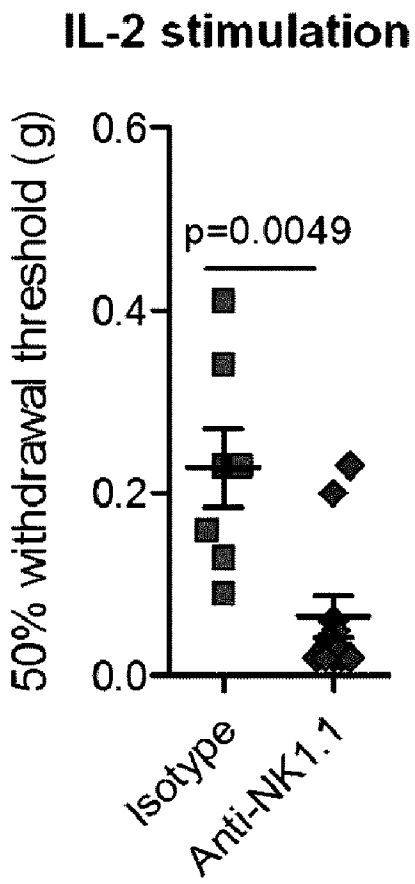
[도 12C]


βtubIII
STMN2
Proximal
Crush site
Distal
a
b
c
IgG isotype
IL-2 complex

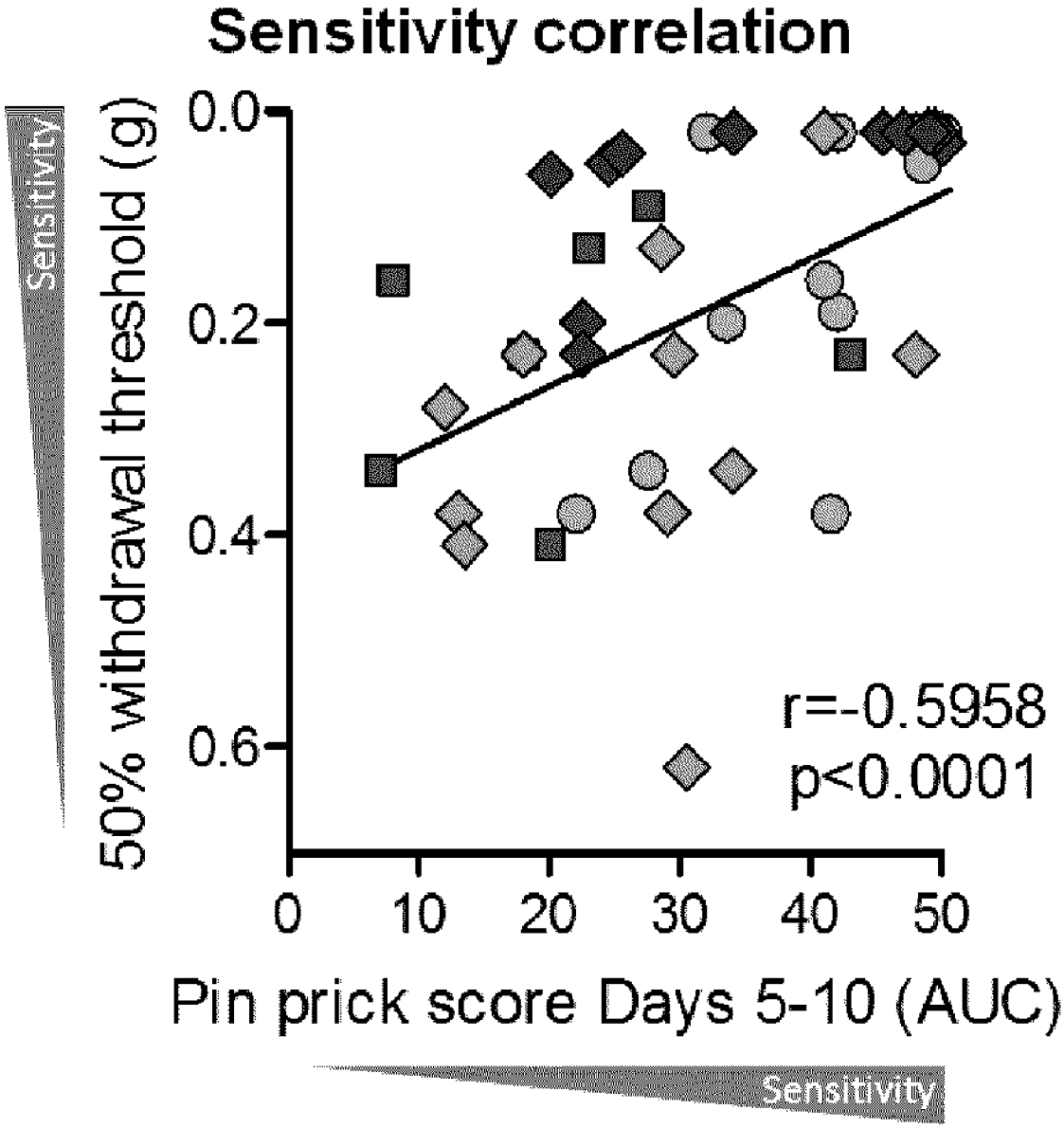
[도 12D]


Wild type
50% withdrawal threshold (g)
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
p=0.0370
IgG
IL-2

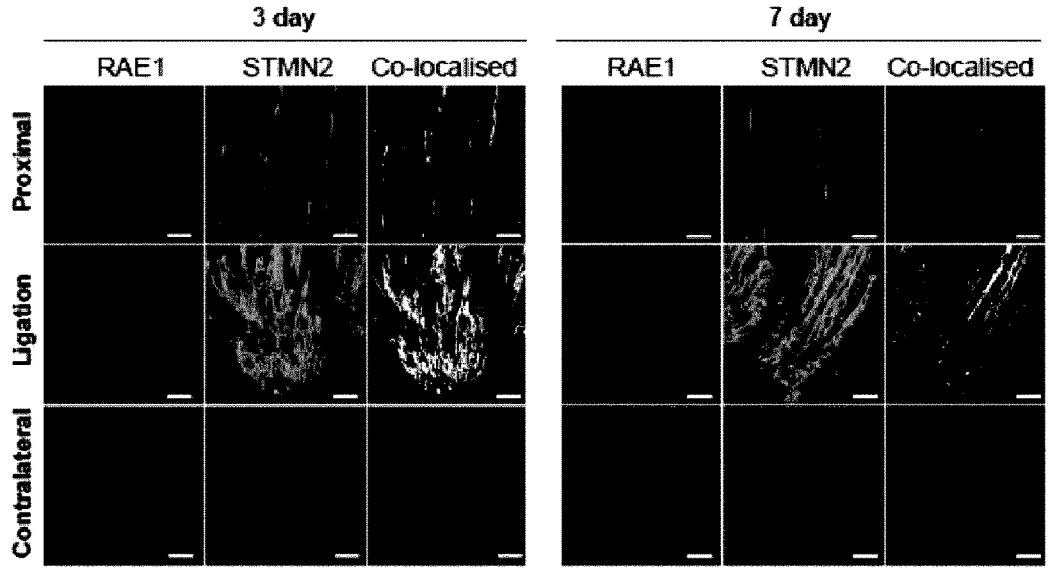
[도 12E]


IL-2 stimulation
50% withdrawal threshold (g)
0.6
0.4
0.2
0.0
p=0.0049
Isotype
Anti-NK1.1

[도 12F]

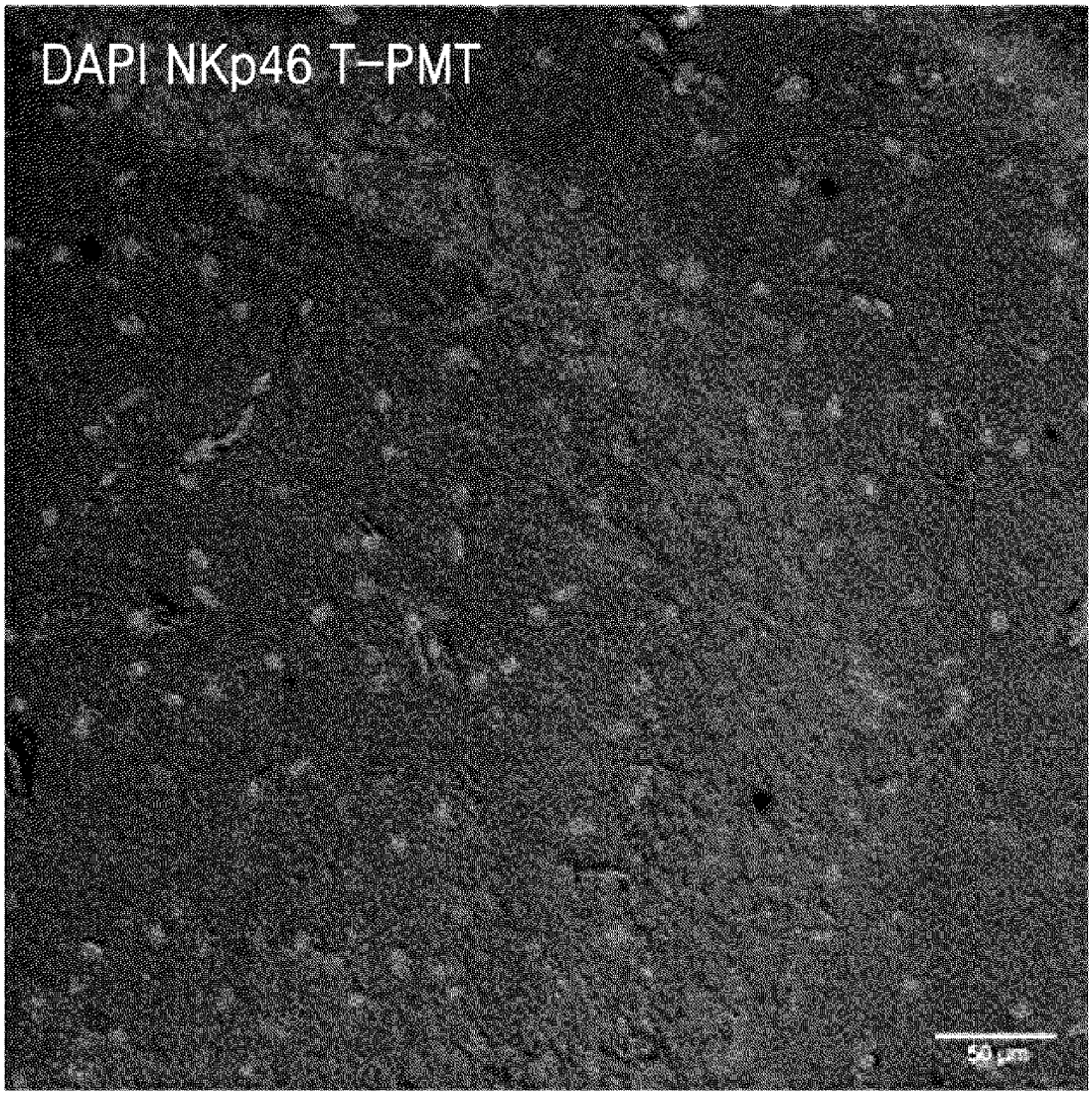

Sensitivity correlation
Sensitivity
50% withdrawal threshold (g)
0.0
0.2
0.4
0.6
r=-0.5958
p<0.0001
0
10
20
30
40
50
Pin prick score Days 5-10 (AUC)
Sensitivity

[도13]

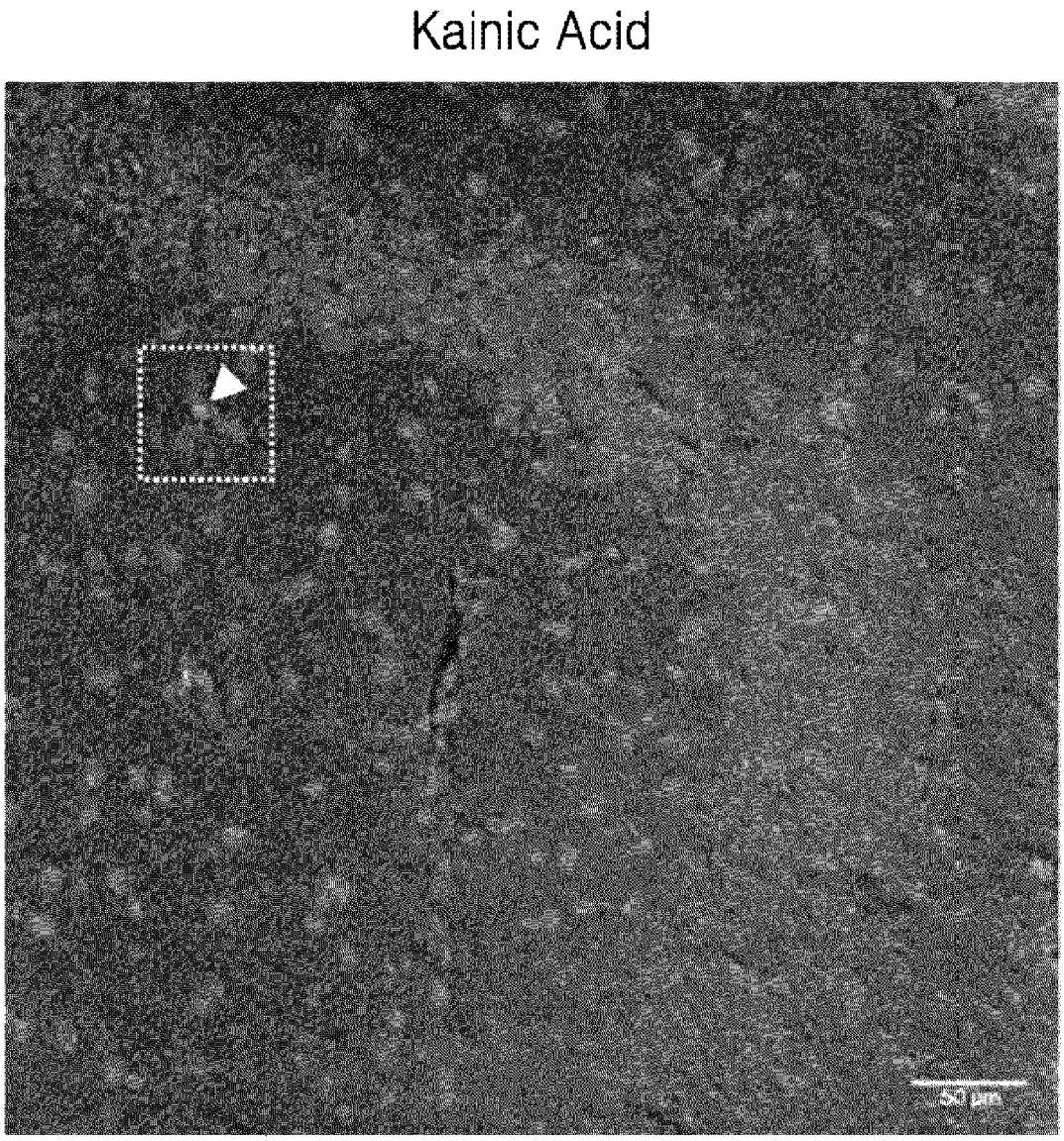

3 day
7 day
RAE1
STMN2
Co-localised
RAE1
STMN2
Co-localised
Proximal
Ligation
Contralateral

[도 14A]

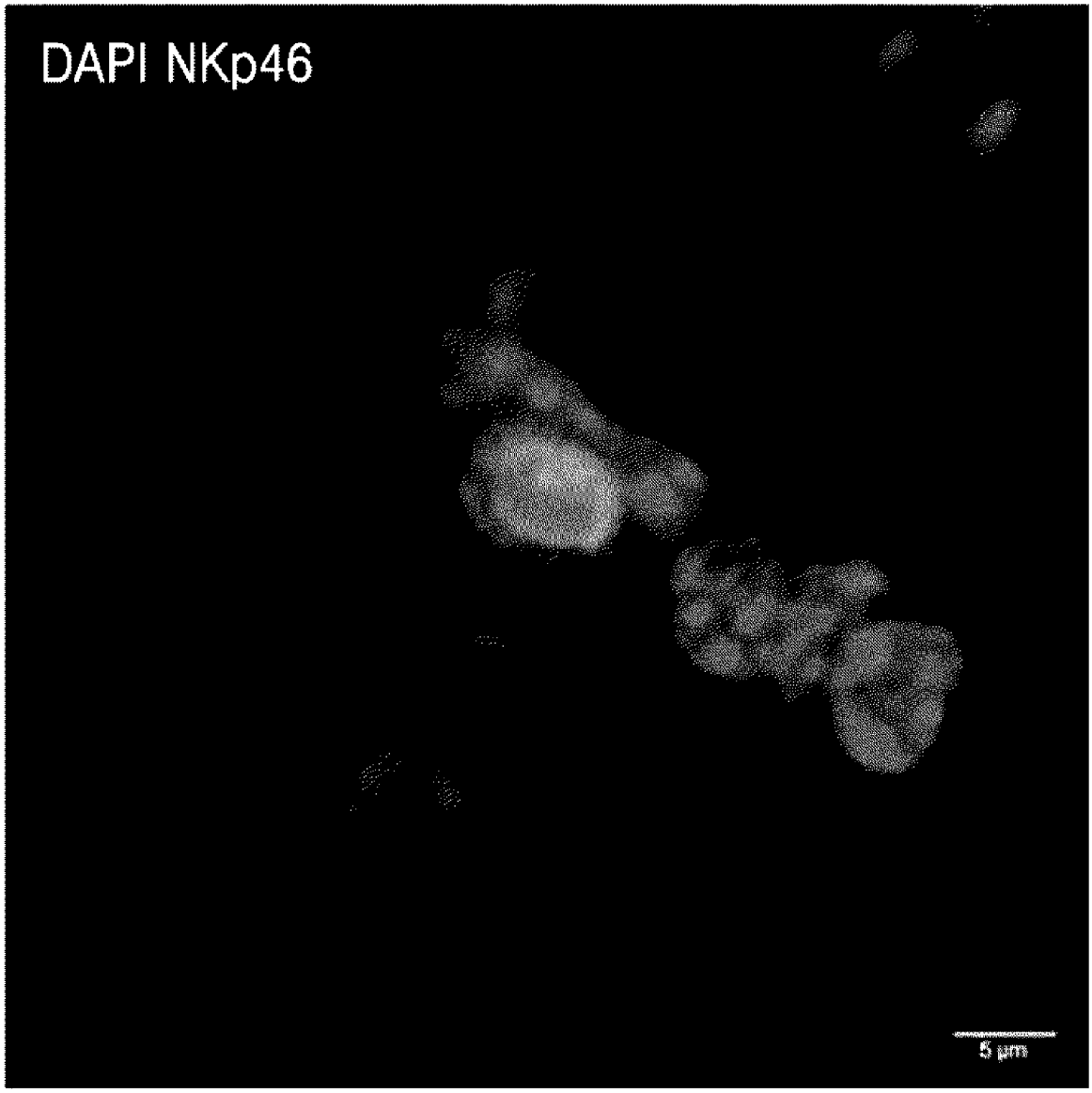
Saline



[도 14B]



[도 14C]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2019/008066

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 35/17(2014.01)i, A61K 38/21(2006.01)i, A61K 38/20(2006.01)i, C12N 5/0783(2010.01)i, A61P 25/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
; A61K 35/17; A61K 48/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: natural killer cell, interleukin, chimeric antigen receptor, damage, axon, neuropathy

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	서울대학교. 말초 신경손상 후 신경병증성 통증에서 자연살해세포의 역할 연구. 이공학개인기초연구지원사업 최종보고서. August 2015, pages 1-17 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY. The Response and Function of Natural Killer Cells After Peripheral Nerve Injury and Their Contribution to Neuropathic Pain. Science and Engineering Personal Fundamental Research Support Business Final Report). See pages 4, 8, 11, 15 and 16; figures 1, 5 and 8.	1,2,5,6,8-16,18
Y		3,4,7
Y	BOLLINO, D. et al. Chimeric antigen receptor-engineered natural killer and natural killer T cells for cancer immunotherapy. Translational Research. 2017, vol. 187, pages 32-43 See abstract; page 36, left column, first paragraph; page 39, right column, second paragraph; figure 1.	3,4,7
A	CUI, J.-G. et al. Possible role of inflammatory mediators in tactile hypersensitivity in rat models of mononeuropathy. Pain. 2000, vol. 88, pages 239-248 See the entire document.	1-16,18
A	POLI, A. et al. NK cells in central nervous system disorders. The Journal of Immunology. 2013, vol. 190, pages 5355-5362 See the entire document.	1-16,18
A	US 2007-0244066 A1 (DELEO, Joyce A. et al.) 18 October 2007 See the entire document.	1-16,18

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
27 SEPTEMBER 2019 (27.09.2019)	**01 OCTOBER 2019 (01.10.2019)**
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon, 35208, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2019/008066

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	DAVIES, A. J. et al. Natural Killer Cells Degenerate Intact Sensory Afferents following Nerve Injury. Cell. 07 February 2019, vol. 176, pages 716-728 See abstract; pages 717-726.	1,2,5,6,8-16,18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2019/008066

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **17**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 17 pertains to a method for treatment of the human body by therapy, and thus pertains to a subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2019/008066

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2007-0244066 A1	18/10/2007	US 7943588 B2	17/05/2011

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2019/008066

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 35/17(2014.01)i, A61K 38/21(2006.01)i, A61K 38/20(2006.01)i, C12N 5/0783(2010.01)i, A61P 25/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
; A61K 35/17; A61K 48/00

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌
한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))
eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드:자연살해세포(natural killer cell), 인터루킨(interleukin), 키메라 항원 수용체(chimeric antigen receptor), 손상(damage), 축색(axon), 신경장애(neuropathy)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	서울대학교, "말초 신경손상 후 신경병증성 통증에서 자연살해세포의 역할 연구", 이공학개인기초연구지원사업 최종보고서, 2015.08, 1-17 페이지 페이지 4, 8, 11, 15 및 16; 도면 1, 5 및 8 참조.	1,2,5,6,8-16,18
Y		3,4,7
Y	BOLLINO, D. 등, 'Chimeric antigen receptor-engineered natural killer and natural killer T cells for cancer immunotherapy', Translational Research, 2017, 제187권, 32-43 페이지 초록; 페이지 36, 좌컬럼, 첫번째 단락; 페이지 39, 우컬럼, 두번째 단락; 도면 1 참조.	3,4,7
A	CUI, J.-G. 등, 'Possible role of inflammatory mediators in tactile hypersensitivity in rat models of mononeuropathy', Pain, 2000, 제88권, 239-248 페이지 전체 문헌 참조.	1-16,18
A	POLI, A. 등, 'NK cells in central nervous system disorders', The Journal of Immunology, 2013, 제190권, 5355-5362 페이지 전체 문헌 참조.	1-16,18
A	US 2007-0244066 A1 (DELEO, JOYCE A. 등) 2007.10.18 전체 문헌 참조.	1-16,18

☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2019년 09월 27일 (27.09.2019)	2019년 10월 01일 (01.10.2019)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관
이기철
전화번호 +82-42-481-3353

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2019/008066

C (계속). 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
PX	DAVIES, A. J. 등, 'Natural killer cells degenerate intact sensory afferents following nerve injury', Cell, 2019.02.07, 제176권, 716-728 페이지 초록; 페이지 717-726 참조.	1,2,5,6,8-16,18

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2019/008066

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: 17
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 17은 치료에 의한 사람의 처치방법에 관한 것이므로 PCT 조약 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.

2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,

3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.

2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.

3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.

4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에 관한 기재

☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.

☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.

☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2019/008066

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2007-0244066 A1	2007/10/18	US 7943588 B2	2011/05/17