(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。Int. Cl.
A61K 38/19 (2006.01)

(45) 공고일자 2006년08월18일
(11) 등록번호 10-0613950
(24) 등록일자 2006년08월10일

(21) 출원번호 10-2001-7003199
(22) 출원일자 2001년03월13일
번역문 제출일자 2001년03월13일
(86) 국제출원번호 PCT/EP1999/006844
국제출원일자 1999년09월16일

(65) 공개번호 10-2001-0075060
(43) 공개일자 2001년08월09일
(87) 국제공개번호 WO 2000/16796
국제공개일자 2000년03월30일

(81) 지정국 국내특허 : 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 헤르체고비나, 바르바도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 중국, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 에스토니아, 스페인, 핀란드, 영국, 그루지야, 헝가리, 이스라엘, 아이슬랜드, 일본, 케냐, 키르키즈스탐, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 리베이라, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아공화국, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 폴란드, 포르투칼, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 슬로베니아, 슬로바키아, 타지키스탄, 투르크맨, 터어키, 트리니아드토바고, 우크라이나, 우간다, 미국, 우즈베키스탄, 베트남,

AP ARIPO특허 : 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 우간다, 시에라리온, 가나, 감비아, 짐바브웨,

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르키즈스탐, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크맨,

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 사이프러스, 독일, 덴마크, 스페인, 핀란드, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투칼, 스웨덴,

OA OAPI특허 : 부르키나파소, 베닌, 중앙아프리카, 콩고, 코트디브와르, 카메룬, 가봉, 기니, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고, 기니 비사우,

(30) 우선권주장 98117697.7 1998년09월18일 유럽특허청(EPO)(EP)

(73) 특허권자
어플라이드 리서치 시스템스 에이알에스 홀딩 엔.브이.
네덜란드, 큐라카오, 피터마엘 15

(72) 발명자
그로네,헤르만-조세프
독일,무니치데-80336,휠레스트라쎄42,메디지니치폴리클리닉데르루드위그-막시밀리안스-유니버시타트문첸에이지킬리니쉬바이오케미

넬손,피터제이.
독일,무니치데-81545,하르타우세르스트라쎄70

프라우드푸트,아만다
프랑스,첸스수르레만에프-74140,소우스첸스

웰스,티모시엔.씨.

프랑스,프레베신모엔스에프-01280,루우트벨레부712

(74) 대리인 강석용
강명구

심사관 : 임혜준

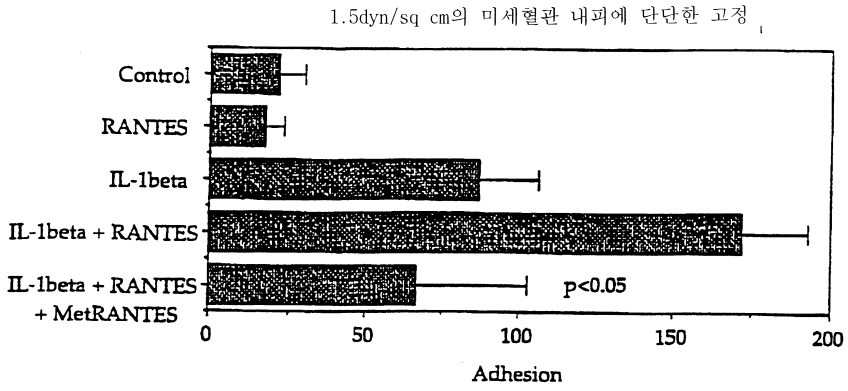
(54) 복합요법에서 케모킨 수용체 길항물질과 사이클로스포린

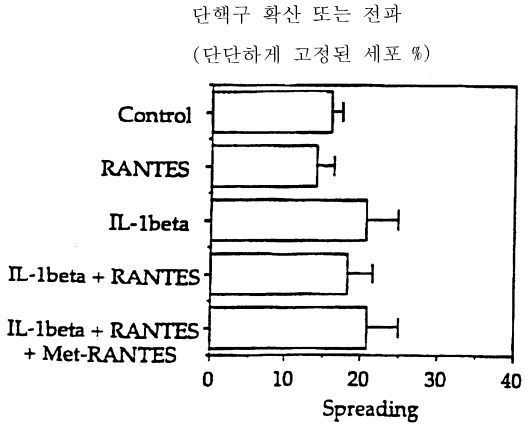
요약

본 발명은 사이클로스포린과 복합하여 이식된 장기, 조직 또는 세포의 거부반응을 치료 또는 예방하기 위한 제약학적 조성물의 생산에 사용되는 케모킨 수용체 길항물질의 용도에 관한다.

특히, 사이클로스포린 A와 복합하여 신장 타가이식 거부반응을 예방하기 위한 제약학적 조성물의 생산에 사용되는 Met-RANTES의 용도에 관한다.

대표도





명세서

기술분야

본 발명은 사이클로스포린과 복합하여 이식된 장기, 조직 또는 세포의 거부반응을 치료 또는 예방하기 위한 제약학적 조성물의 생산에 사용되는 케모킨 수용체 길항물질의 용도에 관한다.

특히, 사이클로스포린 A와 복합하여 신장 타가이식 거부반응을 예방하기 위한 제약학적 조성물의 생산에 사용되는 Met-RANTES의 용도에 관한다.

배경기술

외래(동종 또는 이종)단백질, 세포 또는 기관에 대한 T 세포 반응이 개시되는 기작은 상당히 잘 알려져 있다. 항원 제시 세포(APCs)는 염증 또는 손상(외과적 이식에 의해 유도될 수 있음) 부위로 유인된다. 말초내 T 세포의 레퍼토리는 병원균의 증거 또는 외래(동종 또는 이종)조직의 존재에 대하여 조직을 지속적으로 조사한다. 이들 경고 신호중의 하나가 인지되면, APC는 단백질을 삼켜 이를 분해하고 숙주 면역계에 이를 제시한다.

면역계는 신속하게 외래조직, 병든 조직 또는 염증조직을 인식하고 이를 파괴한다. 이것은 유전자요법을 비롯하여 조직, 장기, 세포 이식의 가장 큰 장벽이다. 주요 과제는 장기 면역억제, 캡슐화 또는 면역차단과 관련된다. 장기 면역억제의 불필요한 부작용에는 기회적 감염과 종양형성에 대한 감수성 증가가 포함된다.

특히, 급성 신장이식 거부반응은 동종이계항원-의존 인자 및 동종이계항원-독립 인자에 의해 매개되고, T 림프구, 단핵구/대식세포, 일부 호산구로 구성된 단핵세포 침투물로 특징지어진다(Grone H.J., 1996, Valente J.F. et al., 1998, Bishop G.A. et al., 1986). 이들 백혈구의 말초순환계로부터 이식장기로의 동원에는 백혈구와 내피표면에서 발현되는 일련의 분자사이의 복잡한 상호작용이 관여한다(Butcher E.C., 1991, Butcher E.C. et al., 1996, Springer T.A., 1994).

지속적인 면역억제없이 이식된 조직을 장기간 수용하는 것은 인체대상 약물의 오랜 숙원이다.

구조적으로 관련된 사이토킨의 대과(大科)인 케모킨은 특정 백혈구 주효체 소개체군의 신속한 유착, 화학주성, 활성화를 선택적으로 촉진하는 것으로 보인다(Springer T.A., 1994, Nelson P.J. et al., 1998, Luster A.D., 1998, SchlondorffD. et al., 1997).

케모킨은 C, C-C, C-X-C, C-X_3-C 케모킨 하부군(여기서, X는 첫 2개의 아미노 말단 인접 시스테인사이의 중간아미노산을 나타낸다)을 정의하기 위하여 사용되는 보존된 시스테인 잔기를 포함한 공유구조요소로 특징지어진다. 케모킨의 다양한 모든 생물학적 작용은 7개-막통에 걸쳐있는 C-단백질 결합된 수용체 대과와의 상호작용을 통하여 조절되는 것으로 보인다(Nelson P.J. et al., 1998, Luster A.D., 1998, SchlondorffD. et al., 1997). 이들 수용체의 세포형 특이적 발현은 케모킨 작용의 백혈구 특이성을 상당부분 조절하는 것으로 보인다(Nelson P.J. et al., 1998, Luster A.D., 1998, SchlondorffD. et al., 1997).

C-C 케모킨 소과의 일원인 케모킨 RNATES(활성화직후에 조절, 정상적인 T-세포 발현 및 분비)는 사람에서 CCR1, CCR3, CCR5, CCR9, DARC(케모킨에 대한 Duffy 항원 수용체)를 비롯한 다수의 케모킨 수용체에 대한 리간드이다(Nelson P.J. et al., 1998, Luster A.D., 1998, SchlondorffD. et al., 1997, Nibbs R.J. et al., 1997). RANTES는 T 세포, 단핵구, 자연 살해능 세포, 호중구, 호산구에 대한 강력한 화학유인물질이다(Nelson P.J. et al., 1998).

RANTES와 같은 케모킨은 다양한 질병과정에 관여하는 세포 침투물에서 중추적인 역할을 하는 것으로 생각된다. 가령, RNATES는 지연형 초민감성, 괴사형 사구체신염, 염증성 폐질환, 신장 동종이식 거부반응을 비롯한 단핵세포 침투물로 특징지어지는 질병에서 *in vivo* 발현된다(Schlondorff D. et al., 1997, Nelson P.J., 1998, Devergne O. et al., 1994, Luckas N.W. et al., 1996, Lloyd C.M. et al., 1997, Pattison J. et al., 1994, Wiedermann C.J. et al., 1993). 급성 세포 거부반응을 일으킨 사람 신장조사에서, RANTES 단백질은 단핵구 침투 세포, 신장 세관 내피세포, 세관주위 미세혈관의 타일내피에 위치하는 것으로 밝혀졌다(Pattison J. et al., 1994, Wiedermann C.J. et al., 1993). 급성 세포 거부반응은 단핵구/대식세포, T 림프구, 선택적으로 호산구로 구성되는 혈관내 악성 간질(間質)성 침투물로 특징지어지기 때문에, RANTES는 급성 거부반응의 발병에 핵심적인 역할을 한다(Schlondorff D. et al., 1997, Nelson P.J., 1998, Pattison J. et al., 1994, Wiedermann C.J. et al., 1993).

이들 관찰에 기초하여, 신장 동종이식 거부반응시 RANTES의 역할에 대한 모델을 제시하였다(Nelson P.J. et al., 1998, Pattison J. et al., 1994, Wiedermann C.J. et al., 1993). 초기 거부반응에서, 미세혈관 내피에 염증이 발생하고 혈소판의 과립이 감소되어, 내피 표면에 유착되는 RNATES 단백질이 방출된다. 염증이 발생한 신장세관 및 내피세포는 RANTES를 비롯한 추가의 케모킨을 생산한다. 이후, 축적된 표면결합 케모킨은 내피표면을 통과하면서 순환 백혈구에 안내신호를 제공한다(Butcher E.C., 1991, Butcher E.C. et al., 1996, Springer T.A., 1994, Nelson P.J. et al., 1998, Pattison J. et al., 1994, Wiedermann C.J. et al., 1993). 백혈구는 표면결합 단백질을 인식하고, 인테그린을 상향조절하고, 내피표면에 강하게 유착되어 유출 및 혈관외 유출된다. 활성화된 백혈구는 추가의 사이토킨 및 케모킨을 생산하여 염증반응을 증폭하고 확대시킨다(Nelson P.J. et al., 1998, Pattison J. et al., 1994, Wiedermann C.J. et al., 1993).

RANTES 단백질의 아미노말단을 수식하여 이의 성질을 급격하게 변화시킬 수 있다(Proudfoof A.E. et al., 1996, Gong J.H. et al., 1996, Simmons G. et al., 1997). 단일 메티오닌 잔기를 추가하면, 작용단백질은 나노몰 효능의 RANTES 수용체 길항물질로 전환된다(Proudfoof A.E. et al., 1996). 길항물질 Met-RANTES은 생쥐와 쥐(Proudfoot 비공개)에서 활성을 나타내는데, 알레르기 피부와 류머티스 관절염의 뮤린 모델에서 염증을 억제하고 괴사성 사구체신염을 부분적으로 저해하는 것으로 밝혀졌다(Teixeira M.M et al., 1997, Plater-Zyberk C. et al., 1997, Llyoyd C.M et al., 1997).

사이클로스포린은 면역억제 활성을 보유하고 톨리포클라디움 인플라툼(*Tolypocladium inflatum*) 및 다른 불완전균류에 의해 생산되는 비극성 고리형 올리고펩티드 군을 대표한다. 주요 성분인 사이클로스포린 A는 다른 소량의 대사물질인 사이클론 B-N과 함께 확인되었다. 또한, 다수의 합성 유사체가 만들어지고 있다. 사이클로스포린 A는 상업적으로 판매되고 있는 약물로, 장기 이식과정에서 면역억제제로 광범위하게 사용되고 있다.

사이클로스포린의 주요 과제는 체액저류, 혈청 크레아티닌과 요소농도 증가, 사구체 침투율 감소, 나트륨과 칼슘 배출감소로 특징지어지는 신독성이다(Martindale, 1996). 특히, 신장 이식편 수용개체에서 신독성과 이식편 거부반응을 구분하는 것은 힘들다.

발명의 상세한 설명

본 발명의 공개

출원인은 케모킨 수용체 길항물질과 저량의 사이클로스포린을 복합하여 처리하면, 사이클로스포린 단독처리에 비하여 이식거부반응과 관련된 염증이 감소된다는 것을 발견하였다.

특히, Met-RANTES가 혈관과 세관에 대한 손상을 감소시키고 신장 동종이식에서 간질성 거부반응을 상당히 감소시킨다는 것을 확인하였다.

따라서, 본 발명의 목적은 케모킨 수용체 길항물질을 사이클로스포린과 복합하여 이식된 장기, 조직 또는 세포의 거부반응을 치료 또는 예방하기 위한 제약학적 조성물을 생산하는 것이다. 케모킨 수용체 길항물질과 사이클로스포린은 동시에, 개별적으로 또는 순차적으로 투여할 수 있다.

본 발명의 다른 목적은 케모킨 수용체 길항물질의 효과량, 사이클로스포린의 효과량, 제약학적 수용가능한 부형제를 동시에, 개별적으로 또는 순차적으로 투여하여 이식된 장기, 조직 또는 세포의 거부반응을 예방 또는 치료하는 방법에 관한다.

"효과량"은 이식된 장기, 조직 또는 세포의 거부반응 과정과 심한 정도에 영향을 주어, 이런 병리를 감소 또는 완화시키는 활성성분의 충분량을 의미한다. 효과량은 투여경로와 환자의 상태에 따라 달라진다.

본 발명의 또 다른 목적은 이식된 장기, 조직 또는 세포의 거부반응을 치료 또는 예방하는 활성성분의 동시, 개별 또는 순차 투여를 위한 제약학적으로 수용가능한 하나 또는 복수의 부형제 존재하에, 케모킨 수용체 길항물질과 사이클론을 함유한 제약학적 조성물을 제공하는 것이다.

2가지 활성성분의 개별 또는 순차 투여의 경우, 본 발명의 제약학적 조성물은 2가지 상이한 제형으로 구성되는데, 각각은 제약학적으로 수용가능한 하나 또는 복수의 부형제 및 2가지 활성성분중 하나로 구성된다.

"제약학적으로 수용가능한"에는 활성성분의 생리활성의 효능을 간섭하지 않고 투여된 숙주에 독성을 보이지 않는 임의의 담체가 포함된다. 가령, 상기 활성성분은 장관외 투여를 위해 식염수, 덱스트로스액, 혈청알부민, 링거액과 같은 담체형태의 주사용 단위 약형으로 제조할 수 있다.

본 발명의 조성물은 제약학적으로 수용가능한 담체이외에, 소량의 첨가제, 예를 들면, 안정제, 부형제, 완충액, 방부제를 추가로 함유할 수 있다.

이런 활성성분은 정맥, 근육내 또는 피하경로로 투여한다. 개별 성분의 혈액수준을 원하는 수준으로 정립할 수 있는 다른 투여경로 또한, 본 발명에 포함된다.

본 발명의 복합요법은 임의의 이식된 장기, 조직 또는 세포의 거부반응을 치료 또는 예방하는데 적합하지만, 사이클로스포린 A의 신독성으로 인해 특히 신장이식에 바람직하다.

"케모킨 수용체 길항물질"은 성숙한 전장 자연발생 케모킨에 대한 길항물질로, 가급적 화학주성 활성을 별로 보이지 않는 임의의 분자를 의미한다. 이런 화학주성활성의 측정은 Nelson P.J. et al., 1998에서 예시한다.

케모킨 수용체 길항물질은 가급적, 국제 특허 출원 WO 97/44462에서 기술한 RANTES 분자; 국제 특허 출원 WO 98/06751에서 기술한 절두된 MCP-3, RANTE, MIP-1α; 유럽 특허 출원 NO. 97116863.8에서 기술한 RANTES와 MCP-2; 또는 WO 96/17935에서 기술한 N-말단 확장된 RANTES에서 선택된다. 특히, Met-RANTES가 바람직하다. 전술한 특허출원에서 언급한 케모킨 수용체 길항물질의 제조방법을 또한 참고로 한다.

사이클로스포린은 사이클로스포린 A, 대사물질 또는 이의 합성 유도체에서 선택된다. 이중 사이클로스포린 A가 바람직하다.

따라서, 본 발명의 적절한 구체예는 Met-RANTES와 사이클로스포린 A를 병용하여 신장 동종이식의 거부반응을 치료 또는 예방하는 것이다. 출원인은 이런 경우에, 사이클로스포린의 효과량을 줄이는 것이 가능하다는 것을 발견했는데, 이것은 사이클로스포린 치료와 관련된 약량-의존한 신장 독성을 고려할 때 상당히 진보한 것이다.

상기 효과는 쥐에서 실시한 생체실험으로 입증하였다.

본 발명은 다음의 실시예로 상술하지만, 이들 실시예는 본 발명을 제한하지 않는다. 실시예는 하기에 명시한 도면을 참고로 한다.

도면의 간단한 설명

도1: IL-1β(5ng/㎖) 자극전 및 자극 12시간후에, 미세혈관 내피와 직접 결합하는 RANTES 능력을 측정하였다. DMVEC는 96웰 평판에서 배양하고, 변형된 ELISA 과정을 이용하여 RANTES를 측정하였다.

도2a와 b: 생리유동하의 활성화된 미세혈관 내피에서 MonoMac 6 세포의 유착, 확산 또는 전파에 대한 Met-RANTES의 효과. 페트리 접시에서 융합수준까지 성장시킨 DMVEC는 IL-1㎖(5ng/㎖)로 12시간동안 자극하거나 또는 처리하지 않고(대조군), RANTES(10ng/㎖)유무하에 30분동안 사전-배양하였다. MonoMac 6 세포는 Met-RANTES(1㎍/㎖)유무하에 30분동안 사전-처리하고, 1.5dyn/㎠의 일정유속으로 관류하였다. (a) DMVEC에 대한 유착은 5분동안 다중 필드에서 견고하게 유착된 단핵구의 수를 계수하여 측정하고, 세포/㎟로 표시하였다. (b) 확산 또는 전파되는 단핵구는 다중 고등 파워 필드에서 5분후에 계수하고, 초기에 유착된 세포의 퍼센트로 표시하였다. 데이터는 3번의 개별실험의 평균 ±SD이다(주의: 이들 결과는 0.01 내지 1㎍/㎖의 Met-RANTES 범위에서 재현가능하였다).

실시예

재료와 방법

사용한 세포

단핵구성 종양 세포주 MonoMac 6은 전술한 바와 같이 10% FCS를 보충한 RPMI 1640에서 배양하였다(Ziegler-Heitbrock H.W.L. et al., 1988). 세포는 주기적으로 24-웰 평판(Costar)에 옮기고, 배지와 혈청은 저 LPS 함량에 대하여 조사하였다. 사람 신생아 포피의 일차 사람 진피 미세혈관 내피 세포(DMVEC)는 Dr. K. Degitz(Dermatology, LMU, Munich, Germany)로부터 구하였다. 세포는 10% 태아 소 혈청(Boehringer Mannheim, Germany), 1㎎/㎖ 하이드로코르티손 아세테이트(Sigma, Deisenhofen, Germany), $5x10^5$ M 디부틸일아데노신모노포스페이트(Sigma, Deisenhofen, Germany), 2mM 글루타민(Seromed, Berlin, Germany), 100U/㎖ 페니실린, 100㎎/㎖ 스트렙토마이신, 25㎎/㎖ 암페테리신 B(항생제/항진균제 Sol. Gibco BRL, Eggenstein Germany)로 보충한 MCDB 131(Gibco BRL, Eggenstein Germany)에 옮기고, 37℃, 5% CO2에서 배양하였다. 세포는 T75 플라스크, 35㎜ 페트리접시(Costar, Corning, New York), 또는 0.5% 젤라틴(Sigma, Deisenhofen, Germany)으로 선피복한 96 웰 편평 바닥 평판(Nunc, Wiesbaden, Germany)에서 배양하였다. 배지는 매 2-3일마다 교체하였다. 세포는 특성화하고, 배양물의 순도는 형태 및 CD31 표면 발현에 대한 면역형광 유세포분석법으로 담보하였다.

재료

조직연구를 위한 재료는 Merck(Darmstadt, Germany)로부터 구하였다. 화학적, 면역학적 측정을 위한 재료는 Sigma (Munich, Germany)로부터 구하였다. IL-1β와 TNFα는 Sigma(Munich, Germany)로부터 구매하였다. 재조합 RANTES 및 RANTES 특이적 단클론 항체 VL1은 전술한 바와 같이 준비하였다(Von Luettichau I., 1996). 준비한 Met-RANTES 전술한 바와 같이 생체내 연구를 위해 내독소를 제거하였다(Proudfoof A.E. et al., 1996, Teixeira M.M et al., 1997, Plater-Zyberk C. et al., 1997, Lloyd C.M et al., 1997).

동물과 신장이식

모든 실험에 동계 수컷쥐를 사용하였다. 루이스(LEW, $RT1^1$)쥐를 Fisher 344(F344 $RT1^{1v1}$) 또는 Brown Norway(BN RT1*) 신장의 수용개체로 하였다. 동물은 Charles River GmbH(Sulzfeld, Germany)로부터 구매하였다. 쥐의 체중은 190 내지 50gm(Lew와 F344) 및 140 내지 170gm(BN)으로 정량하여 수뇨관 직경을 조정하였다. 이식은 Fisher와 Lee (Fisher B. et al., 1965)가 기술한 기술을 변형하여 실시하였다. 간단히 말하면, 동물은 에테르-방울 마취로 마취시키고, 공여 신장은 100㎍ Met-RNATES 유무하에 5㎖ 냉각 0.9% NaCl(4℃)로 세척하였다. 신장과 수뇨관은 일괄적으로 떼어내는데, 5-㎜ 대동맥 소대(cuff)로 신장동맥을, 3-㎜ 정맥 패치로 신장정맥을 떼어냈다. 신장은 0.9%NaCl 4℃에 저장하였다.

공여 신장은 8-0 비흡수성 단일필라멘트 나일론 봉합선으로 말단-측면 문합시켜, 좌측 신동맥아래 수용동물의 복부 대동맥과 하대정맥에 이식하였다. 수뇨관 문합은 11-0 비흡수성 단일필라멘트 나일론 봉합선으로 말단-말단에 실시하였다. 공여 신장의 전체 국소빈혈 시간은 30내지 40분이었다. 히로네프로시스(hyronephrosis)는 희생시점에 육안 및 광현미경으로 평가하였다. 히로네프로시스(hyronephrosis) 동물은 실험군에서 모두 배제하였다. 수용개체의 좌측신장은 이식시점에 떼어냈다. Fisher 신장의 루이스 이식에서, 우측 신장은 평판에 남겨두어, Met-RANTES 효과를 내부조절하였다. Brown Norway 신장의 루이스 이식에서, 양측면 신장절제술은 이식시점에서 실시하였다.

실험군:

실험군은 다음과 같다:

1 군: 1개의 내재된 신장을 보유한 루이스 쥐에 Fisher 344 신장이식

1a 군: 7일동안 Met-RANTES 200㎍/day 처리(n=9)

1b 군: 7일동안 Met-RANTES 처리하지 않음(n=9)

2 군: 일일 CyA 2.5㎎/㎏ BW를 투여하고 양측면 신장절제된 루이스 쥐에 Brown Norway 신장이식

2a 군: 12일동안 Met-RANTES 50㎍/일 처리(n=4)

2b 군: 12일동안 Met-RANTES 처리하지 않음(n=4)

사이클로스포린 A(CyA)(Sandoz, Basel, Switzerland)는 올리브유에 녹이고, 이식-4시간후부터 시작하여 12일동안 일일 2.5㎎/㎏ BW 농도로 피하에 투여하였다. Met-RANTES는 물에 녹이고, 0.9% 염화나트륨에서 조정하고, Fisher 신장 이식된 루이스 쥐에 일일 200㎍ 용량, Brown Norway 신장 이식된 루이스 쥐에 일일 50㎍ 용량으로 하루에 한번 주사하였다.

혈청 분석

희생시점에서 대동맥에서 취한 혈액은 자동화 혈청분석기를 이용하여 크레아티닌, 요소, 글루코스, 빌리루빈에 대하여 분석하였다. 이런 분석에서, Fisher 신장 이식된 루이스 쥐의 경우 이식된 동물이 1개의 내재된 신장을 보유하고 있었기 때문에 신장기능에 대한 정보를 얻을 수 없었지만, Brown Norway 신장 이식된 루이스 쥐의 경우 관련된 수치를 얻을 수 있었다.

조직학

장기(폐, 간, 신장, 비장)는 완전 마취후 떼어냈다. 장기는 혈액을 신속하게 빨아내고, 칭량하고, 조직학, 면역조직화학 또는 *in situ* 하이브리드형성에 필요한대로 처리하였다. 장기는 1-mm 조각으로 자르고, 염산염 완충식염수(PBS)pH 7.35 (PBS:99mM NaH_2PO_4 x H_2O, 108mM NaH_2PO_4 x $2H_2O$ and 248mM NaCl)에 녹인 4% 포름알데하이드에서 24시간동안 담금-고정시키거나 또는 8시간동안 메타캄에서 고정시키고, 파라민에 함침시키거나 또는 액체 질소에서 동결시키고, 최종적으로 면역조직화학에 사용할 때까지 -80℃로 저장하였다. 광현미경 사용은 과옥소산-Schiff 또는 Goldenr-Elasica로 염색한 3㎛ 조각에서 실시하였다.

면역조직화학

메타캄 고정된 파라핀 함침된 조직(3㎛)에 단클론 항체 ED1(Serotech/Camon, Wiesbaden, Germany)을 사용하여 단핵구/대식세포를 입증하였다. 세포독성 T 림프구에 발현된 CD8 항원을 탐지하기 위하여, 단클론 생쥐 항체는 얼음 냉각한 아세톤-고정후 5분동안 동결 조각에 첨가하였다(Serotech/Camon, Wiesbaden, Germany). 알칼린 포스파타제 안티-알칼린 포스파타제 탐지 시스템을 적용하였다(Dako, Hamburg, Germany). 제 1 항체 또는 제 2 항체를 생략한 대조군은 각 실험 조각에 대하여 음성을 나타냈다.

형태 계측 검사

혈관 손상 스코어: 내피 손상, 혈전, 내피염을 보유한 사구체 혈관이 없슴(0), 경미(1), 중등도(2), 심각(3) 등급의 손상을 보이는 지 평가하고, 대뇌피질과 내외 골수를 비롯한 전체 신장 조각에서 값을 구하였다. 특정 등급의 혈관 손상 지수는 전체 신장 조각에서 상대적인 손상 등급을 보이는 혈관의 퍼센트로 정의한다. 전체 혈관 손상 스코어는 모든 혈관 손상 등급을 보이는 혈관의 총합으로 계산하였는데, 여기서 1등급 혈관의 수치는 1등급의 인수를 곱하고, 2등급 혈관의 수치는 2등급의 인수를 곱하고, 3등급 혈관의 수치는 3등급의 인수를 곱하였다(Stojanovic T. et al., 1996).

세관 염증 스코어: 세관 손상은 대뇌피질의 20 고등 파워 필드(HPF) 및 외부 골수의 미세절단기로, 없슴(1), 경미(1), 중등도(2), 심각(3)등급으로 평가하였다. 전체 세관 손상 스코어는 전체 혈관 손상 스코어에 대하여 전술한 바와 같이 계산하였다. 간질 염증 스코어: 단핵구 세포에 의한 간질 염증의 정도는 없슴(0), 경미(1), 중등도(2), 심각(3)등급으로 판단하고, 전체 스코어는 전체 혈관 손상 스코어에 대하여 전술한 바와 같이 계산하였다. 사구체의 모세혈관 포선체내 단핵구/대식세포와 T 세포의 수는 1개의 신장 조각내 모든 사구체의 상대적 개수의 평균으로 계산하였다.

in situ 하이브리드형성

단일-가닥 RNA 프로브는 쥐 RANTES(Dr. H Sprenger, Marburg, Germany)의 cDNA 클론의 시험관내 전사로 만들었다. 시험관내 전사는 Trans-Probe-T 키트(Pharmacia, Freiburg, Germany)와 디곡시게닌-표지된 우리딘 트리포스페이트(Boehringer, Mannheim, Germany)를 이용하여 수행하였다. 벡터(pBluescript KS (+) Stratagene, Heidelberg, Germany)는 BamHI로 자르고 T3-RNA 중합효소로 전사하여 안티센스 프로브와 센스 프로브를 만들고, 플라스미드는 EcoRI로 자르고 T7 RNA 중합효소로 전사시켰다. 파라핀제거후, 신장 조각은 PBS에 녹인 20㎍/㎖ 프로테이나제 K (Boehringer)로 16분동안 절단하였다. 조각은 4% 포름알데하이드에서 5분동안 고정시키고, 아세틸화(0.1M 트리에탄올

아민에 녹인 0.25% 아세트무수물, 10분)시켰다. 디곡시게닌 표지된 mRNA와의 *in situ* 하이브리드형성을 위해, 다음의 하이브리드형성 완충액을 사용하였다: 5x 표준 구연산식염수(SSC), 50% 포름아마이드, 50㎍/㎖ tRNA, 50㎍/㎖ 헤파린, 0.1% 도데실황산나트륨.

56℃에서 16시간동안 하이브리드형성시킨 후, 슬라이드는 37℃에서 10분동안 4 x SSC와 2 X SSC에서 한번 세척하고, 이후 30분동안 0.55 x SSC 및 22℃에서 15분동안 0.1 SSC에서 세척하였다. 안티디곡시게닌 항체 배양과 알칼린 포스파타제 반응은 제조업자(Boehringer, Mannheim, Germany)의 가이드라인에 따라 실시하였는데, 질소-블루 테트라졸륨과 5-브로모-4-클로로-3-인돌일포스페이트를 착색시약으로 사용하였다(Stojanovic T. et al., 1996, Simon M. et al., 1995).

RNase 보호 분석

전체 RNA는 전술한 바와 같이 전체 쥐 신장으로부터 분리하였다(Simon M. et al., 1995). RNase 보호 실험은 상업적 RPA 키트(PharMingen, San Diego, California, probe rCK-1)를 이용하여 실시하였다. 이 키트를 사용하여 쥐에 대한 mRNA종: IL-1α, IL-1β, TNF-α, TNF-β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IFN-r 및 하우스키핑 유전자(GAPDH와 L32)를 동시에 측정하였다. 각 측정에는 20㎍의 전체 RNA를 사용하였다. 보호된 샘플은 미리 만든 겔(제조업자 지침에 따라 만든 Quickpoint^{TM} 급속 핵산 분리장치, Novex, San Diego, California)에서 걸었다. 특정 밴드의 강도는 Molecular Dynamics Storm 840 Phosphorimager를 이용하여 정량하고, L32 유전자 발현에 대하여 표준화시키고, 3번의 동물분석에서 평균하였다.

시험관내 결합 분석

DMVEC는 피복된 96웰 편평 바닥 평판에서 융합수준까지 배양하였다. 생성된 내피 단일층은 12시간동안 처리하지 않거나 또는 다양한 농도의 IL-1β(0.1 내지 5ng/㎖)로 처리하였다. RANTES 결합 분석은 전술한 과정(Pattison J. et al., 1994, Wiedermann C.J. et al., 1993)을 변형한 것이다. 양고추냉이 페록시다제(HRP) 공액된 항-사람-RANTES 단클론 항체VL1(0.1㎍)은 DMVEC 성장 배지(보충물질없슴)에서 과량의 재조합 사람 RANTES(20㎍/㎖)와 함께 25℃, 30분동안 사전-배양하였다. 미세혈관 내피의 상대적인 케모킨 결합능력을 분석하기 위하여, 케모킨-항체 복합체를 첨가하였다. 내피 단일층은 무(無)보충 성장 배지(25℃)로 부드럽게 1x 세척하고, 케모킨-항체 복합체를 첨가하고 25℃에서 30분동안 배양하였다. 이후, 웰은 25℃ 무(無)혈청 배지로 4번 세척하였다. HRP 반응은 5분내에 발생하였다. 406nm에서 평판의 광학적 밀도는 ELISA 평판 판독기를 사용하여 측정하였다. 결과는 내피 세포의 활성화 후, 염증발생된 미세혈관 내피의 RANTES 단백질에 대한 결합능력의 변화를 입증한다. 모든 실험은 4번씩 실시하고, 결과는 3번의 개별실험을 나타낸다.

형광 활성화된 세포 분류(*FACS*) 분석

진피 미세혈관 세포(DMVEC)의 유세포분석은 전술한 바와 같이 실시하였다(Weber C. et al., 1995). 간단히 말하면, 12시간동안 IL-1β(5ng/㎖)로 자극하거나 또는 처리하지 않은 융합 DMVEC는 트립신처리하고, ICAM-1 mAb RR1/1(Dr. R. Rothlein 제공)의 IL-포화 농도와 반응시켰다. E-셀렉틴 mAb(Serotec), VCAM-1 mAb(Serotec) 또는 이소타입 대조군은 30분동안 얼음위에서, 형광 이소티오시아네이트(FITC)-공액된 염소 안티-생쥐 IgG(Boehringer Mannheim)로 염색하고, FACScan(Becton Dickinson)에서 분석하였다. 데이터는 비특이적 결합에 대하여 보정한 후, 채널에 종량 평균 로그 형광 강도(sMFI)로 표시하였다.

생리유동조건하의 미세혈관 내피에서 단핵구 동원의 시험관내 모델 시스템

단핵구와 DMVEC의 상호작용은 전술한 바와 같이 실시한 유선형 흐름 분석에서 조사하였다(Weber C. et al., 1997, Kukerti S. et al., 1997, Piali L. et al., 1998). 간단히 말하면, DMVEC는 35mm 페트리 접시에서 융합수준까지 배양하고, 12시간동안 IL-1β(5ng/㎖)로 자극하거나 또는 처리하지 않았다. 평판은 평행 내벽 유동 체임버에서 아래쪽 내벽으로 모으고, 20x와 40x 위상차 대물렌즈가 달린 Olympus IMT-2 도립현미경의 재물대에 올려놓았다. 단일형(MonoMac 6 세포)은 보고된 바와 같이 배양하고(Ziegler-Heitbrock H.W.L. et al., 1988, Weber C. et al., 1993), 10mM 헤르페스/pH 7.4와 0.5% HAS를 함유한 분석 완충액(HBSS)에서 10^6/㎖으로 재현탁시켰다. 분석직전, 1mM Mg^{2+}와 1mM Ca^{2+}를 첨가하였다. 세포 현탁액은 분석동안 37℃ 열블럭에 유지시키고, 1.5dyn/㎠의 속도로 5분동안 유동 체임버내로 관류시켰다. 저해 실험에서, 단핵구는 30분동안 얼음위에서, 상이한 농도(0.01-1㎍/㎖)의 Met-RANTES로 사전배양하였다. 5번의 레인(rain)후 견고하게 유착된 세포의 개수는 긴 통합 JVC 3CCD 비디오 카메라와 JVC SR L 900 E 비디오 레코드로 기록한 이미지를 분석하여 다중 필드(실험당 적어도 5개)에 정량하고, 세포/㎟으로 표시하였다. 분석한 유착 형태는 일차, 다시 말

하면, 단핵구와 내피세포의 직접적인 상호작용에 국한시켰다. 내피에서 순환속도가 감소된 세포의 수는 5분의 간격중 마지막 30초동안 견고한 유착의 역 수치로서 측정하고, 필드내 모든 상호작용의 퍼센트로 평가하였다. 5분 간격후 확산 또는 전파되는 세포의 수는 전술한 바와 같이 고등 파워 필드에서 측정하고(Luscinskas F.W. et al., 1994), 견고하게 유착된 세포의 퍼센트로 표시하였다.

통계 분석

수치는 평균 +/- SEM으로 제시한다. 통계분석은 Mann-Whithney U-Wilcoxon 랭크 합계 테스트를 이용하여 실시하였다. <0.05의 p 수치는 2군간에 상당한 유의성을 보인 것으로 간주하였다.

결과

Fisher 344(F344RT1 ^{lvl}) 신장의 루이스(LEW, RT1 ^{1})로의 동종이식

면역억제없이 Fisher(344) 쥐 신장을 루이스 쥐로 이식하면, 수술후 7일까지 특징적인 단핵구 세포 침투와 조직손상이 발생하였다. 조직학적 검사에서, 국소적 단핵구 세포의 전사구체 대동맥과 세관간질 속막으로의 침투가 나타났다. 이런 간질 단핵구 침투물의 주요성분은 단핵구/대식세포로 구성되었다. 대동맥, 동맥, 세관에 대한 손상등급 및 간질의 단핵구세포 침투등급은 세미정량 형태계측검사에 기초한 전술한 과정을 이용하여, 없음(0), 경미(1), 중등도(2), 심각(3)등으로 평가하였다.

Met-RANTES의 이런 과정에 대한 효과는 동물당 200㎍의 Met-RANTES을 정맥주사로 이식동물을 처리하여 평가하였다. Met-RANTES의 초기 주사는 이식수술동안 혈관 문합의 형성후 1시간내에 투여하였다. 실험과정동안 추가의 면역억제제는 투여하지 않았다. 광현미경과 면역조직검사에서, 내재된 신장에 대한 Met-RANTES의 효과는 명확하지 않았다.

일반적으로, 장기 이식 거부반응동안 이식장기는 염증으로 인해 점진적으로 중량이 증가한다. 표1에 요약한 결과는 Met-RANTES 처리한 동물에서 이식장기의 중량이 처리하지 않은 동물에 비하여 통계학적 유의성 수준으로 감소한다는 것을 보여준다. 이들 결과는 또한, 사구체의 T 세포와 단핵구 침투의 감소를 암시하긴 하지만, 이런 교정은 통계학적 유의성이 없다(Mann-Whitney U-Wilcoxon). Met-RANTES 처리의 가장 의미있는 효과는 표2에 요약한다. 데이터는 Met-RANTES 처리한 동물의 혈관손상과 세관 거부반응 스코어가 처리하지 않은 동물에 비하여 상당히 감소된다는 것을 보여준다. 간질 거부반응 스코어는 일반적으로, Met-RANTES 처리된 동물에서 명확한 감소를 보이긴 하지만, 이것은 통계학적 유의성이 없었다(Mann-Whithney U-Wilcoxon rank sum test).

거부반응 과정에 대한 Met-RANTES의 효과를 평가하기 위하여, 조직 일부와 면역조직화학적 염색을 검사하였다. 이식 7일후 신장을 떼어내고 재료와 방법에서 밝힌 대로 준비하였다.

처리하지 않은 신장에서 내강 및 대동맥 내벽에 존재하는 단핵구 세포로 인한 혈관손상이 관찰되었다. 대조적으로, Met-RANTES 처리한 동물은 혈관 거부반응을 보이지 않았다. 처리하지 않은 동물의 간질 영역은 간질 및 세관에 검게 염색된 다수의 단핵구 세포의 침투를 보였다. 대조적으로, Met-RANTES 처리한 동물은 근위 요세관의 잘-발달된 레드 블러시 경계에서, 감소된 단핵구 침투와 줄어든 세관 손상을 보였다.

in situ 하이브리드형성에 의한 쥐 RANTES mRNA의 국소화

거부반응을 일으킨 신장에서 RANTES mRNA의 세포 특이적 발현을 입증하기 위한 *in situ* 하이브리드형성에, Fisher 쥐 신장에서 취한 조직을 사용하였다. 결과는 사람 신장 타가이식의 거부반응동안 RANTES 발현에 대하여 전술한 결과와 유사하였다(Pattison J. et al., 1994, Widermann C.J. et al., 1993, Von Luettichau I., 1996). 침투성 단핵구 세포와 신장 세관에 의한 강한 발현 및 일부 내피세포에 의한 제한적이지만 확인가능한 발현이 관찰되었다.

Met-RANTES 처리한 동물은 RNase 보호 분석에서, 친염증성 사이토킨 mRNA의 발현 감소를 보인다.

친염증성 사이토킨, 예를 들면, IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-3, IL-6, TNFβ, TNF, IFNr의 발현 증가는 신장 이식 거부반응의 특징이다(Nickerson P. et al., 1997. Schmouder R.L. et al., 1995, Strom T.B. et al., 1996, Castro M.D. et al., 1998). 이들 사이토킨의 발현은 이후 염증 반응의 징후가 된다. 이식된 Fisher 쥐 신장에서 정량 RNase 보호 분석을 이용하여, 연속된 사이토킨의 발현에 대한 Met-RANTES의 효과를 검사하였다. 전체 장기 RNA 샘플은 정상 신장, 처리되지 않은 이

식 신장, Met-RANTES 처리된 이식 신장으로부터 분리하였다. 사이토킨: IL-1α, IL-1β, TNFβ, TNFα, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IFNr을 나타내는 mRNA 수준은 내부 기준인 L32와 GAPDH와 비교하여 측정하였다. 결과에서, 이식 7일후 처리되지 않은 신장이 IL-1α(24 배), TNFβ(3.2 배), IFNr(1.7)을 코딩하는 mRNA를 상향조절하고, IL-1β(8.4 배)와 TNFα(4.6 배)에서 가장 큰 증가를 보인다는 것을 알 수 있다. IL-2, IL-4 또는 IL-5의 mRNA 발현은 이 시점(이식 7일후)에서 탐지되지 않았다. 대응하는 Met-RANTES 처리된 동물은 처리되지 않은 동물에 비하여 감소된 IL-1α(25%), IL-β(48%), TNFβ(34%), TNFα(24%), IFNr(24%) 발현을 보였다.

Brown Norway 쥐 신장의 루이스 쥐로의 이식: 저량 사이클로스포린 A(CyA)와 병용한 Met-RANTES의 효과.

신장 이식 거부반응에서 Met-RANTES가 저량 CyA 처리를 보완할 수 있는 가를 측정하기 위한 실험을 실시하였다. 이를 위해, 좀더 활발한 거부반응을 보이는 신장이식 모델, 다시 말하면 Brown Norway 쥐 신장의 루이스 쥐로의 이식을 선택하였다. 양측면 신장절제술은 이식시점에 실시하였다. 사용한 CyA의 수준 및 일일 피하에 투여된 2.5㎎/㎏ 체중은 이 모델에서 신장 거부반응을 별로 차단하지 못하는 것으로 밝혀졌다(Stojanovic T. et al., 1996). 최종적으로, 임의의 상승작용을 좀더 효율적으로 탐지하기 위하여, 동물당 일일 50㎍의 감량된 Met-RANTES을 이들 실험에 사용하였다. 표3에 요약한 결과는 저량-CyA만을 처리한 동물에 비하여 Met-RANTES/저량-CyA 처리한 동물에서 혈관손상과 세관손상이 통계학적으로 유의성있게 감소된다는 것을 보여준다. 또한, 간질 영역에 단핵구 세포 침투의 상당한 감소가 관찰되었다. 이들 조직학적 관찰은 기능측정으로 확인하였는데, 여기서 혈청 크레아티닌은 처리하지 않은 동물에 비하여 Met-RANTES 처리한 동물에서 감소되었다(0.98 ±0.12 vs. 1.42 + 0.17㎎%, (n=3)).

활성화된 미세혈관 내피에서 직접적인 RANTES 결합과 유착분자 발현

양 이식모델에서 단핵구의 혈관 내강 공간으로의 침투감소는 Met-RANTES 처리의 주된 특성이기 때문에, 이런 효과의 잠재적 기작을 조사하였다. 신장 이식 거부반응시 RANTES의 역할 모델에서, 활성화된 혈소판에 의해 방출된 또는 국소적 염증조직에 의해 분비된 RANTES 단백질은 염증발생된 내피의 표면에 축적되는데, 이것은 단핵구 동원을 뒷받침하는 것으로 보인다(Nelson P.J. et al., 1998, Pattison J. et al., 1994, Wiedermann C.J. et al., 1993). 미세혈관 내피와 RANTES의 직접적인 결합을 조사하기 위하여, 이전에 RANTES의 내피표면 결합을 탐지하기 위하여 이용한 분석(Pattison J. et al., 1994, Wiedermann C.J. et al., 1993)을 변형하여, 조직에서 활성화된 진피 미세혈관 내피(DMVEC)가 RANTES 단백질을 격리시키는 지를 검사하였다. RANTES에 특이적인 HRP-공액된 mAb인 VL1은 과량의 RANTES 단백질과 함께 배양하고, 생성된 복합체는 96웰 편평 원형 배양 평판에서 배양한 휴면상태의 또는 IL-1β-활성화된 미세혈관 내피에 첨가하였다. DMVEC가 항원-mAb 복합체와 결합하는 능력은 ELISA-유사 형태를 이용하여, mAb 단독과 비교하여 측정하였다. 미세혈관 내피는 사전자극없이 일부 RANTES 단백질과 결합할 수 있지만, 친염증성 사이토킨인 IL-1α로 사전자극한 후에 결합이 크게 증가하였다(도1). 처리하지 않은 또는 활성화된 내피에 대한 비복합 mAb의 기본 염색은 무시할 수준이었다.

미세혈관 내피의 염증활성화를 추가로 특성화하기 위하여, 전술한 유세포 분석과정(Weber C. et al., 1995)을 이용하여 DMVEC에서 단핵구 유착에 관여하는 분자, 다시 말하면, E-셀렉틴 및 Ig 대과중 일부(ICAM-1과 VCAM-1)의 표면발현을 측정하였다. 이런 분석에서, 휴면상태의 DMVEC는 ICAM-1을 구성적 표면수준으로 발현하지만, VCAM-1 또는 E-셀렉틴은 거의 탐지되지 않는다는 것이 밝혀졌다(표4). 12시간동안 IL-1로 DMVEC를 활성화시키면, ICAM-1 발현이 상향조절되고, VCAM-1과 E-셀렉틴 표면발현이 두드러지게 유도된다(표4).

Met-RANTES는 단핵구가 염증발생된 미세혈관 내피에 견고하게 유착되는 것을 차단하지만, 유출을 야기하지는 않는다.

Met-RANTES 작용의 잠재적 기작을 간파하기 위하여, RANTES 수용체의 차단이 미세혈관 내피에서 단핵구의 견고한 유착과 유출을 저해하는 가를 조사하였다. 이를 위해, 성숙 단핵구의 유착특성 및 인테그린 레퍼토리를 보이고 CCR1(Erl W. et al., 1995)을 비롯한 몇몇 케모킨 수용체를 발현하는 단핵구성 MonoMac 6 세포를 사용하였다. DMVEC는 페트리 접시에서 융합수준까지 배양하였는데, 이것은 12시간동안 처리하지 않거나 또는 IL-1β(5ng/㎖)로 활성화시켰다. 이후, 미세혈관 내피는 평행 내벽 유동 체임버에서 검사하였는데, 여기서 MonoMac 6 세포는 5분동안 1.5dyn/㎠ 전단속도로 관류하였다. 이런 생리유동 조건하에, MonoMac 6 세포는 단기간 순환되고, 세포 일부의 협착은 전단-저항성 유착으로 용이하게 전환시킬 수 있다. 5분동안 축적시킨 후, 내피에 견고하게 유착된 MonoMac 6 세포의 수를 측정하였다(도2(a)).

단핵구성 세포는 자극하지 않은 미세혈관 내피에 거의 유착되지 않았고, 내피 세포를 RANTES에 사전-노출시키는 것은 별다른 효과를 보이지 않았다. IL-1β로 미세혈관 내피를 사전자극하면, 단핵구의 전단저항성 유착이 증가하였다. mAb 저해는 이런 과정이 활성화된 내피에서 각각 ICAM-1 및 VCAM-1과 상호작용하는 단핵구 α4와 β2 인테그린에 의해 매개된다는 이전의 발견을 뒷받침한다(Kukerti S. et al., 1997, Luscinskas F.W. et al., 1994). 직접적인 결합분석시

RANTES의 유착에서와 같이, IL-1β-활성화된 미세혈관 내피를 RANTES 단백질에 사전-노출시키면 5분이내에 단핵구의 견고한 유착과 축적이 두드러지게 향상되었다(도2a). 특히, 다양한 농도(0.01-1㎍/㎖)의 Met-RANTES와 함께 단핵구를 사전-배양하면, IL-1β활성화된 DMVEC에서 단핵구의 RANTES-매개된 전단 저항성 유착이 완전히 차단되었다(도2a). 동시에, 견고한 유착의 역 수치로 사용할 수 있는 활성화된 미세혈관 내피에서 순환하는 단핵구의 단편은 RANTES에 사전노출된 후 감소되는 반면 Met-RANTES에 의해 복구되는데, 이것은 활성화된 내피와의 초기 상호작용의 회수가 영향을 받지 않는다는 것을 시사한다. 견고하게 유착된 후, 단핵구의 단편은 형태변화 또는 확산되고, 일부는 궁극적으로 내피세포 사이 또는 이의 중간으로 이동한다. 하지만, RANTES 또는 Met-RANTES는 확산 또는 전파를 변화시키지 않는데(도2b), 이로부터 다른 신호의 관여를 추측할 수 있다. 따라서, 이들 결과는 Met-RANTES가 염증발생된 미세혈관 내피에 대한 단핵구 유착을 차단함으로써, 신장 이식 거부반응동안 단핵구 동원을 감소시킬 수 있다는 것을 시사한다.

[표 1]

루이스 쥐에 이식된 Fisher 쥐 신장. 사구체의 모세혈관 포선체내 모세혈관 단핵구/대식세포 및 T 세포의 수는 1개의 신장 조각내 모든 사구체의 상대적인 개수의 평균으로 계산하였다.

	대조군 (n=9)	Met-RANTES (n=9)
체중(g)	211.8 ± 5.15	195 ± 5.98
이식-신장 중량	1.41 ± 0.048	1.15 ± 0.08*
내재된 신장 중량	0.91 ± 0.04	0.8 ± 0.04
사구체내 T 세포	3.98 ± 0.81	2.75 ± 0.45
사구체내 대식세포	9.16 ± 1.69	5.98 ± 0.87

* 실험군 사이에 상당한($p<0.05$) 차이를 시사한다.

[표 2]

루이스 쥐에 이식된 Fisher 신장. 혈관 손상 및 간질 단핵구 침투에 대한 Met-RANTES 효과의 조직학적, 면역조직학적 분석의 요약

	혈관 손상		세관 손상		간질 염증	
	Control	Met-RANTES	Control	Met-RANTES	Control	Met-RANTES
Grade0	50.67 ± 9.02	85.5 ± 2.66	15.56 ± 6.03	46.00 ± 12.15	1.39 ± 1.11	16.00 ± 7.14
Grade 1	40.44 ± 5.5	12.8 ± 4.17	32.22 ± 8.25	30.00 ± 6.06	44.17 ± 12.39	58.00 ± 8.7
Grade 2	4.44 ± 2.22	0.9 ± 0.6	20.56 ± 5.68	13.00 ± 4.1	18.33 ± 5.95	9.50 ± 4.62
Grade 3	5.55 ± 5.55	0 ± 0.0	31.67 ± 14.19	8.50 ± 7.46	36 11 ± 14.88	10.50 ± 9.44
SCORE	62.67 ± 18.64	16.1 ± 5.2*	33.00 ± 6.44	15.70 ± 5.22	37.78 ± 5.58	24.45 ± 4.62

* 실험군 사이에 상당한($p<0.05$) 차이를 시사한다.

[표 3]

루이스 쥐에 이식된 Brown-Norway 쥐 신장. 혈관 손상 및 간질 단핵구 침투에 대한 Met-RANTES 효과의 조직학적 분석의 요약

스코어	사이클로스포린 2.5 mg/kg b.w./d	사이클로스포린 2.5 mg/kg b.w./d + Met-RANTES 50 μg/d
혈관 손상	60.7 ± 1.8	13.7 ± 7.5*
세관 손상	124.3 ± 28.7	28.3 ± 14.8*
간질 염증	157.3 ± 21.3	71 ± 6.1*

* 실험군 사이에 상당한($p<0.05$) 차이를 시사한다.

[표 4]

사람 미세혈관 내피 세포에서 부착 분자의 표면 발현에 대한 IL-1β 효과. DMVEC는 12시간동안 IL-1β (5ng/㎖)로 활성화시키거나 또는 처리하지 않고(대조군), ICAM-1, VCAM-1, E-셀렉틴 또는 이소타입 대조군 mAbs와 반응시켰다. 표면 단백질 발현은 3번의 개별 실험에서 FACS로 분석하였고, 비특이적 결합에 대하여 보정한 후 채널에 종량 평균으로 제시한다.

SMFI (channels)		대조군	IL-1β
ICAM-1	Exp. 1	339	502
	Exp. 2	386	592
	Exp. 3	327	432
VCAM-1	Exp. 1	10	76
	Exp. 2	72	236
	Exp. 3	25	129
E-selectin	Exp. 1	1	120
	Exp. 2	44	265
	Exp. 3	28	177

REFERENCES

Bishop G.A. et al., Kidney Int., 29, 708-717, 1986.

Butcher E.C., Cell, 67, 1033-1036, 1991.

Butcher E.C. et al, Science, 272, 60-66, 1996.

Castro M.D. et al., Transpl. Int., 11 1,S15-S18, 1998.

Devergne O. et al., J. Exp. Med., 179, 1689-1694, 1994.

Erl W. et al., Atherosclerosis, 113, 99-107, 1995.

Fisher B. et al., Surgery, 58, 904-917, 1965.

Gong J.H. et al., J. Biol. Chem., 271, 10521-10527, 1996.

Grone H.J. Neph. Dial. Transplant, 11, 1916-1917, 1996.

Kukerti S. et al., Blood, 89, 4104-4111, 1997.

Lloyd C.M. et al., J. Exp. Med., 185, 1371-1380, 1997.

Lloyd C.M. et al., J. Leukoc. Biol., 62, 676-680, 1997.

Luckas N.W. et al., J. Leukoc. Biol., 59, 13-17, 1996.

Luscinskas F.W. et al., J. Immunol., 156, 326-335, 1994.

Luster A.D., N. Engl. J. Med., 338, 436-445, 1998.

Martindale, The Extra Pharmacopoeia, 31st edition, London, Royal Pharmaceutical Industry, 1996, 557-562.

Nelson P.J. et al., Curr. Opin., Immunol., 10, 265-270, 1998.

Nelson P.J. et al., The Chemokine RANTES. IN Cytokines, Handbook of Immunopharmacology Series. R. Thorpe and A. Mire-Sluis, editors. Academic Press. London. 433-448, 1998.

Nibbs R.J. et al., J. Biol. Chem., 272, 32078-32083, 1997.

Nickerson P. et al., Transplantation, 27, 489-494, 1997.

Pattison J. et al., Lancet, 343, 209-211. 1994.

Piali L. et al., Eur. J. Immunol., 28, 961-972, 1998.

Plater-Zyberk C. et al., Immunol. Lett., 57, 117-120, 1997.

Proudfoof A.E. et al., J. Biol. Chem. 271, 2599-2603, 1996.

Schlondorff D. et al., Kidney Int., 51, 610-621, 1997.

Schmouder R.L. et al., Nephrol. dial. Transplant., 10 Suppl 1, 36-43, 1995.

Simmons G. et al., Science, 276, 276-279, 1997.

Simon M. et al., Am. J. Physio., 268, F240-F250, 1995.

Springer T.A., Cell, 76, 301-314, 1994.

Stojanovic T. et al., Lab. Invest., 74, 496-512, 1996.

Strom T.B. et al., Curr. Opin. Immunol., 8, 688-693, 1996.

Teixeira M.N. et al., J. Clin. Invest., 100, 1657-1666, 1997.

Valente J.F. et al., Surg. Clin. North. Am., 78, 1-26, 1998.

Von Luettichau I., et al., Cytokine, 8, 89-98, 1996.

Weber C. et al., Eur. J. Immunol., 23, 852-859, 1993.

Weber C. et al., J. Immunol., 155, 445-451, 1995.

Weber C. et al., J. Clin. Invest., 100, 2085-2093, 1997.

Wiedermann C.J. et al., Curr. Biol., 3, 735-739, 1993.

Ziegler-Heitbrock H.W.L. et al., Internat. J. Cancer, 41, 456-461, 1988.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

삭제

청구항 2.
삭제

청구항 3.
삭제

청구항 4.
삭제

청구항 5.
삭제

청구항 6.
삭제

청구항 7.
삭제

청구항 8.
삭제

청구항 9.

케모킨 수용체 길항물질 Met-RANTES 및 사이클로스포린을 활성물질로 하고, 제약학적으로 수용가능한 하나 또는 복수의 부형제를 포함하며, 이식된 장기, 조직 또는 세포의 거부반응을 치료 또는 예방용 제약학적 조성물.

청구항 10.

케모킨 수용체 길항물질 Met-RANTES 및 사이클로스포린을 활성물질로 하고, 활성성분의 동시, 개별 또는 순차사용을 위한 제약학적으로 수용가능한 하나 또는 복수의 부형제를 포함하며, 이식된 장기, 조직 또는 세포의 거부반응을 치료 또는 예방용 제약학적 조성물.

청구항 11.
삭제

청구항 12.
삭제

청구항 13.
삭제

청구항 14.

제 9항 또는 10항에 있어서, 사이클로스포린은 사이클스포린 A, 대사물질 또는 이의 합성 유사체에서 선택되는 것을 특징으로 하는 제약학적 조성물.

청구항 15.

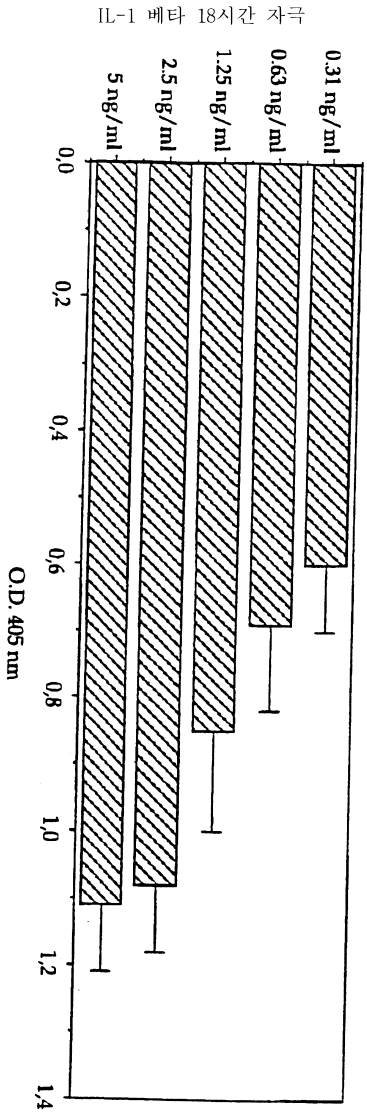
제 14항에 있어서, 사이클로스포린은 사이클로스포린 A인 것을 특징으로 하는 제약학적 조성물.

청구항 16.

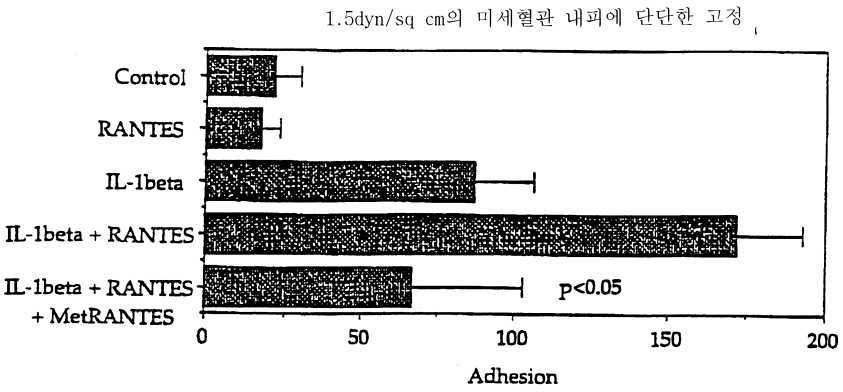
제 9항 또는 제10항에 있어서, 신장 타가이식의 거부반응을 치료 또는 예방하기 위한 제약학적 조성물.

도면

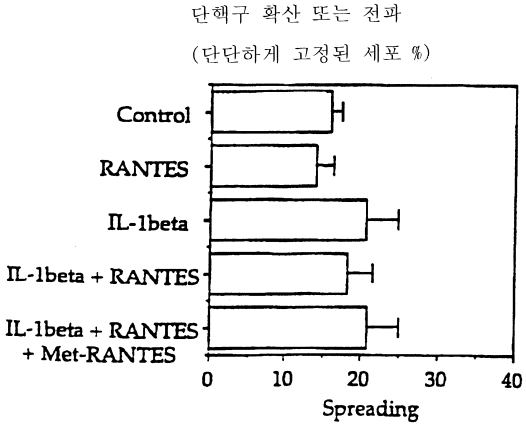
도면1



도면2a


1.5dyn/sq cm의 미세혈관 내피에 단단한 고정
Control
RANTES
IL-1beta
IL-1beta + RANTES
IL-1beta + RANTES
+ MetRANTES
p<0.05
0
50
100
150
200
Adhesion

도면2b


단핵구 확산 또는 전파
(단단하게 고정된 세포 %)
Control
RANTES
IL-1beta
IL-1beta + RANTES
IL-1beta + RANTES
+ Met-RANTES
0
10
20
30
40
Spreading