



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0039352
(43) 공개일자 2014년04월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 39/395 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-0103861

(22) 출원일자 2012년09월19일

심사청구일자 2012년09월19일

(71) 출원인

이화여자대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)

대한민국 (식품의약품안전처장)

충청북도 청원군 강외면 오송생명2로 187

(72) 발명자

유경하

서울 강남구 영동대로118길 76, 102동 202호 (삼성동, 삼성대우멤버스카운티1차)

우소연

서울 동대문구 정릉천동로 36, 102동 601호 (용두동, 래미안허브리츠)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

안소영

전체 청구항 수 : 총 6 항

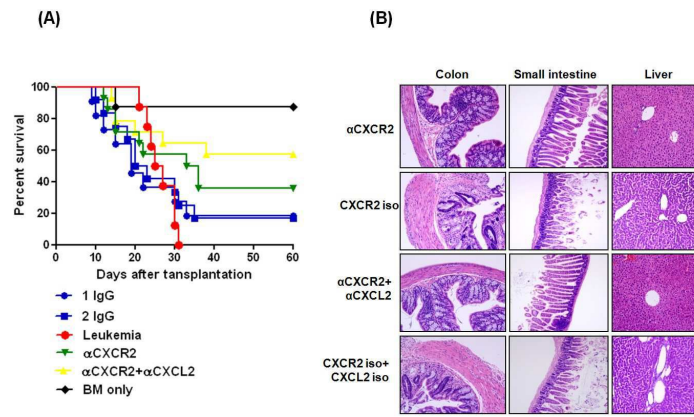
(54) 발명의 명칭 항-CXCL2 또는 항-CXCR2 단일클론 항체를 포함하는 이식편대숙주 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 항-CXCL2 또는 항-CXCR2 단일클론 항체를 포함하는 이식편대숙주 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

본 발명에 따른 약학적 조성물은 T-세포의 이식편대숙주 질환 표적장기로의 접근을 방해하여 상대적으로 암세포의 이동을 촉진시킴으로써 이식편대숙주 질환을 예방하고 항종양효과를 강화한다.

대표도 - 도3



(72) 발명자

조경아

서울특별시 강남구 일원동 615-1

유시형

경기 파주시 조리읍 대원로 45, 515동 804호 (동문
그린씨티아파트)

김선희

충북 청주시 흥덕구 창직로 50, 410동 102호 (사직
동, 청주푸르지오캐슬아파트)

백선영

충북 청원군 오송읍 오송생명3로 111, 602동 2903
호 (오송호반베르디움아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 11172바약안367

부처명 식품의약품안전청

연구사업명 바이오의약품 안전관리 연구

연구과제명 이식후 GVHD 발생억제 및 항종양효과 유도를 위한 세포치료제 평가기반 연구

기 여 율 1/1

주관기관 이화여자대학교

연구기간 2011.01.15 ~ 2012.11.30

특허청구의 범위

청구항 1

항-CXCL2 또는 항-CXCR2 단일클론 항체를 포함하는 이식편대숙주 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 이식편대숙주 질환이 수혈 또는 이식에 의해 유발된 것인 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 이식은 골수 이식, 줄기세포 이식 및 장기 이식으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 것인 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 항-CXCR2 단일클론 항체는 케모카인 CXCL-2 또는 CXCL1과의 결합을 억제하는 것인 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, T-세포의 이식편대숙주 질환 표적 장기로의 접근을 방해하여 항종양효과가 강화된 것인 조성물.

청구항 6

항-CXCL2 또는 항-CXCR2 단일클론 항체를 포함하는 이식편대숙주 질환 예방 및 개선용 건강기능식품.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 항-CXCL2 또는 항-CXCR2를 포함하는 이식편대숙주 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 이식편대숙주 질환(graft-versus-host disease, GVHD)은 동종이식 때 주입되는 공여자의 말초 혈액이나 골수내의 T-림프구를 환자의 몸에서 남의 것으로 인식하여 면역 반응이 일어나는 질환을 말한다. 즉, 수혈된 살아있는 림프구에 의해 유발되며 면역 반응으로 인해 간 기능 이상, 피부 병변, 황달, 설사, 발열, 범혈구 감소증 등의 증상이 나타나는 질환으로 심한 경우 환자가 사망할 수 있다.

[0003] 이식편대숙주 질환은 숙주의 부조직복합성 항원(minor histocompatibility (mH) antigen) 또는 자가 항원(auto-antigen)에 대한 동종 반응(alloreactivity) 후 생성된 병원성 공여 T 세포에 의해 매개되는 것으로 알려져 있으며, 이러한 T 세포는 직접적인 세포용해성 공격 외에 전염증성 및 섬유성 사이토카인의 분비 또는 자가 항체 생산의 촉진 등을 통해 표적 조직을 위협한다(Lee SJ, Blood, 105, 4200-4206, 2005). 그러나 부신피질호르몬(corticosteroids)의 전신성 전달을 제외하고는 이러한 GVHD의 치료에 대해 알려진 바가 없다.

[0004] GVHD의 발병을 위해서는 공여 CD4+ T 세포를 필요로 하는데, 흥미롭게도 공여 및 숙주의 항원제시 세포(APCs) 둘 다 CD4+ T 세포-매개 피부 GVHD를 매개하며, 이는 GVHD의 주된 특징으로 제2형 주 조직복합체 (MHC, (major histocompatibility complex) class II)에서 내인성 및 외인성 숙주 mH 항원들이 공여 CD4+ T 세포에 전달될 수 있음을 암시한다(Anderson BE 등, Blood, 105, 2227-2234, 2005).

[0005] 골수 이식 후에 이식된 T-세포는 숙주의 장기(간, 장, 피부, 폐 등)와 남아있는 암세포 모두를 타인의 것으로 인식하여 공격하는 이식편대숙주병(Graft versus Host Disease, GVHD)과 항종양효과(Graft versus Leukemia Response, GVL)를 동시에 유발하기 때문에 원하는 GVL과 원치 않는 GVHD의 차별화 적용에 큰 어려움이 있다. 그러나 현재까지 이를 해결할 방법은 없고 어느 한쪽의 효과를 얻기 위해서는 다른 한쪽을 희생하는 방법뿐이다. 즉, GVHD 발생을 예방하고자 하면 암의 재발에 대한 위험을 부담해야하고 GVL을 강화하고자 하면 GVHD 발생의

위험을 감수해야하는 어려움이 있다.

- [0006] 케모카인 (chemokines)은 케모카인 구배 (chemokine gradient)라고 알려져 있는 리간드의 화학적 구배를 따라, 특히, 면역 반응 시 백혈구의 이동을 조절하는 작은 분비 단백질이다 (Zlotnick A. et al., 2000). 그들은 NH₂-말단 시스테인 잔기의 위치에 기초하여 두 가지의 주요 서브패밀리, CC 및 CXC로 나누어지고, G 단백질과 연결된 수용체에 결합하며, 이들 두 가지 주요 서브패밀리는 CCR 및 CXCR 이라고 명명된다. 지금까지 50가지 이상의 인간 케모카인 및 18가지의 케모카인 수용체가 발견되어 왔다.
- [0007] 많은 암은 종양의 면역세포 침윤뿐만 아니라 종양세포 성장, 생존, 이동 (migration) 및 혈관형성 (angiogenesis)에 영향을 주는 복잡한 케모카인 연결망 (network)를 가진다. 면역세포, 내피세포 및 종양세포는 스스로 케모카인 수용체를 발현시키고 케모카인 구배에 반응할 수 있다. 인간 암 생검 시료와 마우스 암 모델의 연구는 암 세포의 케모카인-수용체 발현이 전이 능력 (metastatic capacity)의 증가와 관련된 것을 보여준다.
- [0008] 케모카인 수용체 2 (chemokine receptor 2, CXCR2)는 종양학에서 흥미로운 표적으로서 기술되고 있다. 즉, CXCR2는 여러 종양세포 유형에서 자가 분비 (autocrine) 세포성장 신호를 전달하고 또한 혈관생성을 촉진시킴으로써 직접적으로 종양 성장에 영향을 줄 수 있다 (Tanaka T. et al., 2005).
- [0009] CXCR2 케모카인 수용체는 360개 아미노산으로 구성된다. 이것은 주로 내피세포에서 특히 신생혈관 형성 시 발현된다. CXCL1(chemokine ligand 1), CXCL2(chemokine ligand 2), KC 등의 케모카인과 결합한다. CXCR2/리간드 주축은 전이(Singh R. K. et al., 1994), 세포 증식 (Owen J. D. et al., 1997)과 같은 여러 종양 성장 기작에 또한 ERL+케모카인-매개성 (chemokine-mediated) 혈관형성 (Strieter R. M. et al., 2004; Romagnani et al., 2004)에 관여한다. 마지막으로, 종양-관련 대식세포 및 호중성구는 염증-유도성 종양 성장의 중요한 요소이고, CXCL5, IL-8 및 GRO- α 은 호중성구 채용 (neutrophil recruitment)을 개시시킨다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0010] (특허문헌 0001) KR 10-2009-0035215, 2009.04.22
(특허문헌 0002) KR 10-2007-0054857, 2007.06.05

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명은 줄기세포 이식, 골수 이식, 장기 이식 등에 의해 발생하는 이식편대숙주 질환을 예방하고 항종양효과를 강화하는 약학적 조성물을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0012] 본 발명자들은 이식편대숙주병(Graft versus Host Disease, GVHD)과 항종양효과(Graft versus Leukemia Response, GVL)의 차별적 적용을 통한 GVHD 예방 및 GVL 효과 강화 방안을 위하여 연구를 진행하던 중, GVHD 표적장기에서 생성되는 다양한 사이토카인 및 케모카인 중에 CXCL2와 이의 수용체인 CXCR2가 GVHD 억제 효과 및 GVL 활성 효과를 갖는다는 사실을 발견하고 본 발명을 완성하였다.
- [0013] 본 발명의 조성물은 항-CXCL2 또는 항-CXCR2 단일클론 항체를 포함하는 이식편대숙주 질환의 예방 및 치료제이다.
- [0014] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 항-CXCL2 또는 항-CXCR2 단일클론 항체를 포함하는 이식편대숙주 질환의 약학적 조성물을 제공한다.
- [0015] 본 발명의 항-CXCL2 또는 항-CXCR2 단일클론 항체를 포함하는 이식편대숙주 질환의 약학적 조성물은 T-세포의 이식편대숙주 질환 표적 장기로의 접근을 방해하여 상대적으로 암세포로의 이동을 촉진시킴으로써 항종양효과를 강화시키고 상반되는 효과로 이식편대 숙주 질환을 약화시킨다.
- [0016] 본 발명에 있어서, 항-CXCL2 또는 항-CXCR2 단일클론 항체는 각각 선택적으로 CXCL2 또는 CXCR2를 인식하여

CXCL2 또는 CXCR2와 결합함으로써 각각의 발현을 억제하는 단일클론 항체이다. 항-CXCL2 또는 항-CXCR2 단일클론 항체로는 시판되는 것이나 포유류로부터 생성, 분리된 것을 사용할 수 있다.

[0017] 예를 들면, 본 발명의 조성물의 유효성분인 항-CXCL2 또는 항-CXCR2 단일클론 항체는 각각 CXCL2 또는 CXCR2를 면역원으로 하여 동물을 면역화시키고, 면역화된 동물의 비장세포를 골수종 세포와 융합하여 하이브리도마를 생성한 다음 CXCL2 또는 CXCR2를 선택적으로 인식하는 단일클론 항체를 생산하는 양성 클론을 선별한 후 선별한 하이브리도마를 배양하고, 하이브리도마의 배양액으로부터 항체를 분리하는 단계를 포함하는 방법에 의해 제조할 수 있다. 또한, 본 발명의 단일클론 항체는 상기의 하이브리도마를 동물의 복강에 주입하고, 주입 후 일정기간이 지난 다음 회수한 동물의 복수로부터 분리함으로써 제조할 수 있다. 단일클론 항체 및 하이브리도마에 대해서는 다음의 문헌을 참고로 할 수 있다[*Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses*, Kennet et al. (eds.), Plenum Press, New York (1980); and *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow and Land (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1988)].

[0018] 면역원으로는 천연형 CXCL2 또는 CXCR2 단백질, 유전자 재조합 CXCL2 또는 CXCR2 단백질, 또는 이들의 절편을 이용할 수 있다. 유전자 재조합 CXCL2 또는 CXCR2은 공지의 염기서열을 이용하여 당 분야의 통상적인 방법에 따라 cDNA를 제작하고 이를 발현벡터에 삽입한 다음 숙주세포에서 발현시킨 후 정제함으로써 획득할 수 있다.

[0019] CXCL2 또는 CXCR2를 각각 선택적으로 인식하고 동시에 이의 활성을 억제하는 활성을 지닌 항-CXCL2 또는 항-CXCR2 단일클론 항체를 얻기 위해 상기에서 얻어진 면역원을 항원으로 하여 동물을 면역화 시킨다. 특히 바람직하게는, 마우스를 사용한다. 상기 항원은 통상의 면역방법에 따라 복강 내, 근육 내, 안내 또는 피하 주사하여 투여한다. 필요한 경우, 여러 기술을 사용하여 단백질에 의해 발생하는 결과적인 면역 반응을 증가시키고, 보다 큰 항체 반응성을 전개시킬 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 항원 단백질에 프로인트(Freund)의 완전 보조제 또는 불완전 보조제를 사용하여 그 면역성을 증가시킬 수 있다. 면역성 부여 기간은 특별히 제한하지는 않지만 항원은 2회 내지 10회, 바람직하게는 2 내지 5회 투여하고 바람직하게는 수일 내지 수주 간격, 더욱 바람직하게는 1~3주의 간격을 두는 것이 바람직하다. 최종 면역성 부여기간 후에 1 내지 10일, 바람직하게는 2 내지 5일 후에 동물로부터 항체 생산세포를 획득할 수 있다. 항체 생산세포의 예는 비장세포, 임파선세포, 흉선세포 및 주변혈액세포이고, 일반적으로 비장세포가 가장 바람직하게 사용된다. 마우스의 경우, 한 마리당 0.01~1,000 μ g, 바람직하게는, 1~300 μ g의 항원을 투여한다.

[0020] 상기에서 획득한 항체 생산세포와 골수종 세포를 공지된 방법, 예를 들면 코흘러(Koehler)와 밀스테인(Milstein)의 방법으로 융합한다. 골수종 세포로는, 예를 들면 p3/x63-Ag8, p3-U1, NS-1, MPC-11, SP-2/0, F0, P3x63 Ag8, V653 및 S194등의 마우스 유래의 것이 사용될 수 있다. 또한, 랫트 유래 세포인 R-210 등의 세포주가 사용될 수 있다. 클론을 배양하여 효소 면역 흡착법을 이용하여 CXCL2 또는 CXCR2를 각각 선택적으로 인식하는 단일클론을 선택한다. CXCL2 또는 CXCR2를 선택적으로 인식하는 단일클론의 선별은 당 업계에 공지된 바와 같은 면역화학적 방법을 사용할 수 있다. 이에 한정되지는 않으나, 예를 들면, 방사능면역분석법(RIA), 효소면역분석법(ELISA), 면역화학염색법(Immunofluorescence), 웨스턴 블로팅(Western Blotting) 및 유세포 분석법(FACS)이 이에 속한다.

[0021] 또한, 항-CXCL2 또는 항-CXCR2 단일클론 항체를 코딩하는 DNA를 분리하는 재조합 방법에 의해 제조할 수 있다. 상기 분리된 DNA를 사용하여 당업계에 공지된 방법으로 높은 친화도로 CXCL2 또는 CXCR2에 각각 결합하여 각각의 발현을 억제하는 항체를 생산할 수 있다. 예를 들면, 유용한 방법으로는 헵텐 2-페닐로자줄-5-원에 대한 고친화성 항체를 제조하기 위해 사용된 체인 셔플링(chainshuffling)을 포함한다(Marks et al., *BioTechnology*, 10:779, 1992; Schier et al., *J. Mol. Biol.* 263:551, 1996).

[0022] 본 발명에 있어서, 이식편대숙주 질환은 수혈 또는 이식에 의한 것이다.

[0023] 상기 수혈은 전혈, 농축 적혈구, 혈소판 제제, 신선 동결 혈장 제제, 동결 침전 제제, 혈장 분획 제제, 백혈구 제거 혈액 제제, 방사선 조사 혈액 제제 등을 포함하며 이에 한정되는 것은 아니다.

[0024] 상기 이식은 줄기세포 이식, 골수 이식, 심장 이식, 각막 이식, 장 이식, 간 이식, 폐 이식, 췌장 이식, 신장 이식 및 피부이식 등을 포함하며 이에 한정되는 것은 아니다.

[0025] 본 발명의 조성물은 상기 유효성분을 조성물 총 중량에 대하여 0.001~20 중량 % 함유할 수 있다.

[0026] 본 발명의 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 첨가제를 추가적으로 포함할 수 있으며, 이때 약제학적으로 허용 가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이드실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 었, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오

스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바 납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당, 텍스트로스, 소르비톨 및 탈크 등이 사용될 수 있다.

[0027] 본 발명에 따른 약제학적으로 허용 가능한 첨가제는 항-CXCL2 또는 항-CXCR2 단일클론 항체를 포함하는 조성물 100중량부에 대해 0.1 ~ 90중량부 포함되는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0028] 즉, 본 발명의 조성물은 실제 임상 투여 시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(Calciumcarbonate), 수크로스(Sucrose), 락토오스(Lactose) 또는 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함될 수 있다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0029] 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여시 피부 외용 또는 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육 내 주사 또는 흉부 내 주사 주입방식을 선택하는 것이 바람직하다. 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설을 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하다.

[0030] 본 발명의 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설을 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하며, 일일 투여량은 항-CXCL2 또는 항-CXCR2 단일클론 항체를 포함하는 조성물의 양을 기준으로 0.0001 내지 100mg/kg이고, 바람직하게는 0.001 내지 10 mg/kg이며, 하루 1 ~ 6 회 투여될 수 있다.

[0031] 아울러, 본 발명은 항-CXCL2 또는 항-CXCR2 단일클론 항체를 포함하는 조성물을 유효성분으로 함유하는 이식편대숙주 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0032] 본 발명의 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.

[0033] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 조성물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 음료수, 차, 드링크제, 알코올음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

[0034] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다.

발명의 효과

[0035] 본 발명의 항-CXCL2 또는 항-CXCR2 단일클론 항체를 포함하는 이식편대숙주 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 T-세포의 이식편대숙주 질환 표적장기로의 접근을 방해하여 상대적으로 암세포의 이동을 촉진시킴으로써 이식편대숙주 질환을 예방하고 항종양효과를 강화한다.

도면의 간단한 설명

[0036] 도 1 (A)는 GVHD를 유발한 마우스의 생존율을 나타내는 그래프이며, 도 1 (B)는 GVHD를 유발한 마우스의 결장, 소장, 간의 H&E 염색 결과를 나타내는 도이다.

도 2는 GVHD를 유발한 마우스에서 사이토카인 및 케모카인의 발현 정도를 확인한 그래프이다.

도 3 (A)는 GVHD를 유발한 마우스에 항-CXCL2 또는 항-CXCR2 단일클론 항체를 처리하였을 때 생존율을 나타내는 그래프이며, 도 3 (B)는 항-CXCL2 또는 항-CXCR2 단일클론 항체를 처리하였을 때 결장, 소장, 간의 H&E 염색 결

과를 나타내는 도이다.

도 4는 항-CXCL2 또는 항-CXCR2 단일클론 항체를 처리하였을 때 표적장기에서 공여자 비장 세포의 GFP의 발현을 나타내는 도이다.

도 5는 항-CXCL2 또는 항-CXCR2 단일클론 항체를 처리하였을 때 G-CSF, KC, MIP-2 및 IL-23의 발현 정도를 나타내는 그래프이다.

도 6 (A)는 항-CXCL2 또는 항-CXCR2 단일클론 항체를 처리하였을 때 골수 세포와 말초 혈액 세포에서 PKH26의 발현 정도를 나타내는 도이며, 도 6 (B)는 골수 세포와 말초 혈액 세포에서 Bcl2의 발현량 변화를 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0037] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.
- [0038] **[실험예] 이식편대숙주 질환 동물모델 제작**
- [0039] 암컷 BALB/c(H-2Kd) 마우스를 OrientBio(Eumsung, Korea)에서 구입하였으며, EGFP-트랜스제닉(transgenic) 마우스를 RIKEN BRC (BRC No, C57BL/6-Tg (CAG-EGFP) C14-Y01-FM1310sb)에서 구입하였다. 마우스를 무병원 환경에서 12시간 Light/Dark 주기로 키웠다. 물과 음식은 자유식(ad libitum)으로 하였으며, 모든 과정은 이화여자대학교 동물관련 실험 위원회의 승인 하에 실시하였다.
- [0040] 골수 이식을 위하여, 복강내 주사로 하루에 1회씩, 2일간 시클로포스파미드(cyclophosphamide, 200mg/kg)를 투여하고 4일간 부설펜(busulfan, 80mg/kg)을 암컷 BALB/c(H-2Kd) 마우스에 투여하였다. 골수 세포는 EGFP-트랜스제닉(transgenic) C57BL 마우스의 대퇴골과 경골에서 추출하여 단일 세포 서스펜션(suspension)으로 준비되었다. 준비된 2×10^7 개의 골수 세포를 암컷 BALB/c(H-2Kd) 마우스에 전체 부피 250ul로 꼬리 정맥으로 주사하였다.
- [0041] GVHD 유발을 위하여, 복강내 주사로 하루에 1회씩, 2일간 시클로포스파미드(cyclophosphamide, 200mg/kg)를 투여하고 4일간 부설펜(busulfan, 80mg/kg)을 암컷 BALB/c(H-2Kd) 마우스에 투여하였다. 골수 세포는 EGFP-트랜스제닉(transgenic) C57BL 마우스의 대퇴골과 경골에서 추출하여 단일 세포 서스펜션(suspension)으로 준비되었다. 또한, 비장 단일 세포 서스펜션은 비장 분쇄에 의해 준비되었다. 준비된 세포를 암컷 BALB/c(H-2Kd) 마우스에 전체 부피 250ul로 2×10^7 개의 골수 세포와 3×10^7 개의 비장 세포를 섞어서 꼬리 정맥으로 주사하였다.
- [0042] 실험군으로 백혈병(Leukemia)을 가진 마우스 모델을 제작하였다. A20 세포를 RPMI-1640(Invitrogen), 10% FBS(Invitrogen), 100u/ml 페니실린, 100mg/ml 스트렙토마이신, 0.05mM 2-머캅토에탄올 하에서 이식 7일 내지 10일 전에 배양하였다. 배양된 A20 세포는 PKH(Paul Karl Horan)26 Red fluorescence cell linker kit (Sigma Aldrich, Cat. No. MINI26)의 매뉴얼에 따라 미리 형광 표지되었다. 배양된 세포 1×10^6 개를 GVHD 유발 모델 제작 날과 동일한 날에 시클로포스파미드와 부설펜이 GVHD 유발 마우스와 동일한 방법으로 투여된 암컷 BALB/c(H-2Kd) 마우스의 꼬리 정맥으로 주사하였다.
- [0043] GVHD 유발 여부는 GVHD의 다섯 가지 의학적 증상인 체중 감소(weight loss), 활동성(activity), 자세(posture), 털 상태(fur texture), 피부 상태(skin integrity)를 통해서 매일 평가하였다.
- [0044] **<실험예 1> 이식편대숙주 질환 동물 모델의 생존율 및 조직병리학적 확인** 상기 실험예에서 제작한 GVHD 유발 마우스, Leukemia 유발 마우스 및 골수만 이식한 마우스를 무병원 환경, 자유식 및 12시간 Light/Dark 주기 조건 하에서 키우면서 생존율을 확인하였다.
- [0045] 그 결과를 도 1 (A)에 나타내었다. 도 1 (A)에 나타낸 바와 같이, Leukemia 유발 마우스는 이식 후 30일 이내에 모두 죽었으며, GVHD를 유발한 마우스는 생존율이 꾸준히 떨어지며 30일 이후에 약 20%의 생존율을 보이는 것을 확인할 수 있었다.

- [0046] 생존율의 변화뿐만 아니라, 실제 장기에서의 조직병리학적 변화를 확인하기 위하여 헤마톡실린-에오진(Hematoxylin and eosin, H&E)염색을 하였다. GVHD를 유발한지 21일이 되는 날, 마우스의 간, 결장, 소장 조직을 취한 후, 포르말린(formalin)을 선처리하고 파라핀(paraffin)에 넣었다. 파라핀에 넣은 조직이 다 굳은 후에 5um 두께로 잘라서 H&E 염색을 하였다. 간, 폐, 소장, 결장 조직은 Olympus BX51 현미경 (Olympus, Japan)을 이용하여 분석하였다.
- [0047] 그 결과를 도 1 (B)에 나타내었다. 도 1 (B)에 나타난 바와 같이, 결장과 소장에서 이상증식(hyperplasia)과 세포과다증(hyperchromasi)을 확인할 수 있었다. 또한, 많은 세포들이 아포토시스(Apoptosis)한 형태를 보이고 있으며 조직이 불안정한 형태를 보였다. 간에서는 골수의 조혈 작용(extramedullary hematopoiesis)이 나타나는 것을 확인할 수 있으며, 문맥 삼분지(portal triad)에서 염증반응이 있는 것을 확인할 수 있었다.
- [0048] 즉, 상기 도 1 (A), (B)에 제시된 생존율과 조직병리학적 분석 결과를 확인하여 볼 때, GVHD 유발의 의학적 징후를 확인할 수 있었다.
- [0049] <실시예 2> 이식편대숙주 질환 동물 모델에서 사이토카인 및 케모카인 수치 확인
- [0050] 이식편대숙주질환(GVHD) 표적 장기에서 생산되는 사이토카인(cytokine) 및 케모카인(chemokine)으로부터 GVHD 예방 및 GVH 강화를 위한 대표 후보물질을 선정하기 위하여 luminex array를 이용하여 사이토카인(cytokine) 및 케모카인(chemokine)의 수치를 확인하였다.
- [0051] GVHD를 유발한지 3일이 되는 날 간, 피부, 장 조직을 취하여 용해물(lysate)을 얻어 luminex array를 하였다.
- [0052] Luminex Xmap Technology (Millipore, MILLIPLEX™)를 사용하여 측정하였으며, 형광 물질들의 정확한 농도를 사용함으로써 특정 포획 항체에 의해 개별 비드(bead)로 코팅된 100가지의 구별되는 비드를 만들었다. 제조된 비드를 이용하여 G-CSF, GM-CSF, IFN γ , IL-1 α , IL-2, IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17a, IP-10, KC, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, TNF α , MIP-2, IL-22, IL-25, TARC/CCL17, IL-23, IL-33/NF-HEV 및 TIMP-1의 수치를 측정하였다.
- [0053] 그 결과를 도 2에 나타내었다.
- [0054] 도 2 (A)는 간에서의 수치를 측정한 것이고, 도 2 (B)는 결장에서의 수치를 측정한 것이다. 총 31가지의 케모카인 및 사이토카인을 측정한 결과, 피부, 간, 장 조직에서 공통적으로 높은 수치를 나타내는 케모카인과 사이토카인 4가지를 확인할 수 있었다. G-CSF, IL-23, KC(CXCL1) 및 MIP-2(CXCL2)의 발현이 세 가지 조직에서 공통적으로 높게 발현되는 것을 확인할 수 있었다.
- [0055] 특히, KC(CXCL1) 및 MIP-2(CXCL2)의 수치가 공통적으로 가장 높게 나타나는 것을 확인하여 KC(CXCL1) 및 MIP-2(CXCL2)의 공통 T-세포 수용체인 CXCR2와 리간드 CXCL2를 후보물질로 선정할 수 있었다.
- [0056] <실시예 3> CXCL2 또는 CXCR2의 활성 차단에 의한 GVHD 감소 효과 확인 1. CXCL2 또는 CXCR2의 활성 차단
- [0057] CXCR2의 표면 발현을 차단하기 위하여 이식 전에 비장 세포에서 항-CXCR2 단일클론 항체(R&D Systems)를 처리하였다. 즉, 이식할 비장 세포에 항체를 처리한 후, 37℃에서 1시간 동안 배양한 후, (10 μ g/ml per 10⁶ cells/ml) 이 세포 3 $\times$ 10⁷ 개를 2 $\times$ 10⁷ 개의 골수 세포와 함께 전체 부피 250ul로, 시클로포스파미드(cyclophosphamide, 200mg/kg), 부설판(busulfan, 80mg/kg)이 투여된 암컷 BALB/c(H-2Kd) 마우스에 이식하였다. 대조군 항체로는 Rat IgG2a (R&D Systems)를 사용하였다.
- [0058] CXCL2 활성을 차단하기 위해 항-CXCL2(R&D Systems, MAB 452) 단일클론 항체는 골수 및 비장 세포 이식 2시간 전에 200ug 투여하였으며, 이식 이틀 후에 동일 농도로 다시 한번 복강 투여하였다. 대조군 항체로 IgG (rat IgG2b, R&D Systems)를 동일 방식으로 복강 투여하였다.
- [0059] 2. CXCL2 또는 CXCR2의 활성 차단에 의한 생존율 및 조직병리학적 확인
- [0060] 상기 실험예에서 제작한 마우스와 CXCL2 또는 CXCR2를 차단한 마우스를 무병원 환경, 자유식 및 12시간 Light/Dark 주기 조건 하에서 키우면서 생존율을 확인하였다.
- [0061] 그 결과를 도 3 (A)에 나타내었다. 도 3 (A)에 나타난 바와 같이, IgG를 처리한 군은 20% 대의 생존율을 보이는 반면, CXCR2를 차단하거나 CXCL2와 CXCR2를 동시에 차단한 실험군(α CXCR2, α CXCR2+ α CXCL2)에서 생존율이 40 내지 60%까지 올라갔다. 특히, CXCL2와 CXCR2(α CXCR2+ α CXCL2)를 동시에 차단한 실험군에서는 생존율이 60%에

가까울 정도로 그 효과가 현저한 것을 확인할 수 있었다.

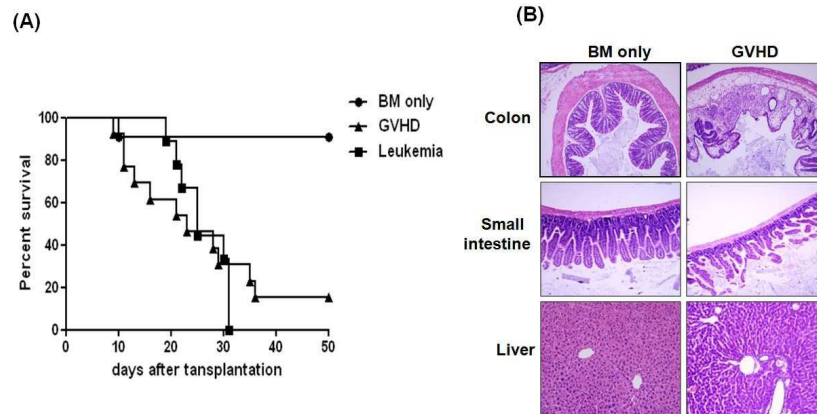
- [0062] 생존율의 변화뿐만 아니라, 실제 장기에서의 조직병리학적 변화를 확인하기 위하여 헤마톡실린-에오진(Hematoxylin and eosin, H&E)염색을 하였다. GVHD를 유발한지 21일이 되는 날, CXCL2 또는 CXCR2를 차단한 마우스의 간, 결장, 소장 조직을 취한 후, 포르말린(formalin)을 선처리하고 파라핀(paraffin)에 넣었다. 파라핀에 넣은 조직이 다 굳은 후에 5um 두께로 잘라서 H&E 염색을 하였다. 간, 폐, 소장, 결장 조직은 Olympus BX51 현미경 (Olympus, Japan)을 이용하여 분석하였다.
- [0063] 그 결과를 도 3 (B)에 나타내었다. 도 3 (B)에 나타난 바와 같이, CXCL2 또는 CXCR2를 차단에 의해 결장과 소장에서 이상증식(hyperplasia)과 세포과다증(hyperchromasi)이 크게 줄어든 것을 확인할 수 있었다. 또한, 간에서 염증반응이 크게 줄어든 것을 확인할 수 있었다.
- [0064] **3. CXCL2 또는 CXCR2의 활성 차단에 의한 공여자 세포 감소 및 사이토카인 및 케모카인 감소 확인**
- [0065] CXCL2 또는 CXCR2의 활성 차단에 의하여 공여자 비장 세포의 감소를 confocal 현미경으로 확인하였다.
- [0066] 공여세포를 이식받은 마우스의 간, 소장, 대장의 얼려진 조직을 얻어 5 um 두께로 절단한 후 봉입하였다.
- [0067] GFP 유전자변형 마우스 공여세포의 형광정도를 다촛점 형광현미경 (Carl Zeiss LSM 510META confocalmicroscope with a Plan Apochromat 663 N.A. 1.4 objective using the LSM510 software, version 3.2) 하에서 항체 처리한 군에 따라 비교 하였다.
- [0068] 그 결과를 도 4에 나타내었다. 도 4에 나타난 바와 같이, CXCR2를 차단하거나, CXCL2와 CXCR2를 함께 차단한 실험군(α CXCR2, α CXCR2+ α CXCL2)에서 비장세포의 GFP의 발현을 확인할 수 없었다. 즉, CXCL2 또는 CXCR2의 차단에 의하여 GVHD 표적장기로의 T 세포의 선택적 유도가 이루어져서 GVHD 표적 장기로의 T 세포의 접근을 막아 GVHD와 GVT를 분리 적용할 수 있음을 말해주는 것이다.
- [0069] 또한, CXCL2 또는 CXCR2의 차단에 의해 GVHD 유발시 가장 크게 증가하였던 케모카인 및 사이토카인이었던 G-CSF, IL-23, KC(CXCL1) 및 MIP-2(CXCL2)의 발현 변화를 luminex array를 통해 확인하였다.
- [0070] 그 결과를 도 5에 나타내었다. 도 5에 나타난 바와 같이, G-CSF, IL-23, KC(CXCL1) 및 MIP-2(CXCL2)는 CXCL2 또는 CXCR2의 차단에 의하여 장과 간에서 그 수치가 크게 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 즉, CXCL2 또는 CXCR2의 차단에 의하여 과다한 염증 반응에 의한 조직 손상을 감소시킬 수 있음을 알 수 있다.
- [0071] **<실시예 4> CXCL2 또는 CXCR2의 활성 차단에 의한 항종양(GVL) 효과 유지 확인**
- [0072] CXCL2 또는 CXCR2의 차단에 의해서도 항종양 효과가 유지되는 것을 확인하기 위하여 유세포 분석기(flow cytometry)를 이용하여 비장세포에 표지된 PKH26의 형광을 측정하고 RT-PCR을 통해서 Bcl2 mRNA의 발현 정도를 측정하였다.
- [0073] 유세포 분석을 위하여 GVHD 유발 21일 후, 골수 세포와 말초혈액 세포를 수집하여 PKH25의 형광을 측정하였다. 유세포 분석은 FACSCalibur system (BD Bioscience)을 사용하였으며, 결과를 CellQuest software (BD Bioscience)를 이용하여 분석하였다.
- [0074] 그 결과를 도 6 (A)에 나타내었다. 도 6 (A)에 나타난 바와 같이, CXCR2 또는 CXCL2와 CXCR2의 차단에 의하여 골수 세포와 말초혈액 세포에서의 PKH26의 양이 크게 준 것을 확인할 수 있었다.
- [0075] 또한, RT-PCR을 통하여 Bcl2 mRNA의 발현 정도를 확인하였다.
- [0076] total RNA를 TRIzol(Invitrogen)을 사용하여 매뉴얼에 따라 A20 세포로부터 추출하였다. total RNA 1ug은 reverse transcription system (Promega)을 이용하여 cDNA로 전사하였다. Bcl2에 대한 RT-PCR primer는 5'-TAC CGT CGT GAC TTC GCA GAG-3'(정방향), 5'-GGC AGG CTG AGC AGG GTC TT-3'(역방향)을 이용하였으며, GAPDH에 대한 RT-PCR primer는 5'- GTC TTC TCC ACC ATG GAG AAG GCT-3' (정방향), 5'-CAT GCC AGT GAG CTT CCC GTT CA-3' (역방향)을 이용하였다.
- [0077] 마우스에서 발현되는 Bcl2의 양을 측정하기 위하여, 골수 세포 또는 말초 혈액 세포로부터 추출된 total RNA를 real time PCR로 분석하였다. SYBR Green detection kit (Applied Biosystems)를 사용하여 수행하였다.
- [0078] 그 결과를 도 6 (B)에 나타내었다. 도 6 (B)에 나타난 바와 같이, CXCL2 또는 CXCR2의 활성 차단에 의하여 골수 세포(BM)와 말초 혈액 세포(PB)에서 모두 Bcl2의 발현량이 줄어드는 것을 확인할 수 있었다.

[0079] 즉, 도 6 (A), (B)를 통해서 CXCL2 또는 CXCR2의 차단에 의하여 GVHD의 영향은 감소하고 항종양 효과는 유지되는 것을 확인 할 수 있다.

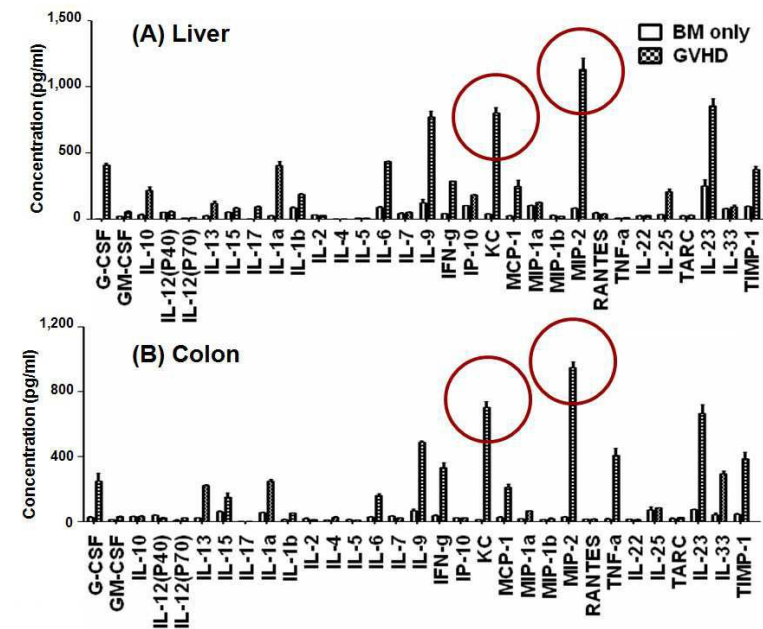
[0080] 상기 결과를 통해서, 항-CXCL2 또는 항-CXCR2 단일클론 항체를 포함하는 조성물이 T-세포의 이식편대숙주 질환 표적장기로의 접근을 방해하여 상대적으로 암세포의 이동을 촉진시킴으로써 이식편대숙주 질환을 예방하고 항종양효과를 강화할 수 있음을 확인 할 수 있었다. 즉, 이를 통해서 항-CXCL2 또는 항-CXCR2 단일클론 항체를 포함하는 조성물이 이식편대숙주 질환 특이적 치료에 효과가 있음을 확인 할 수 있었다.

도면

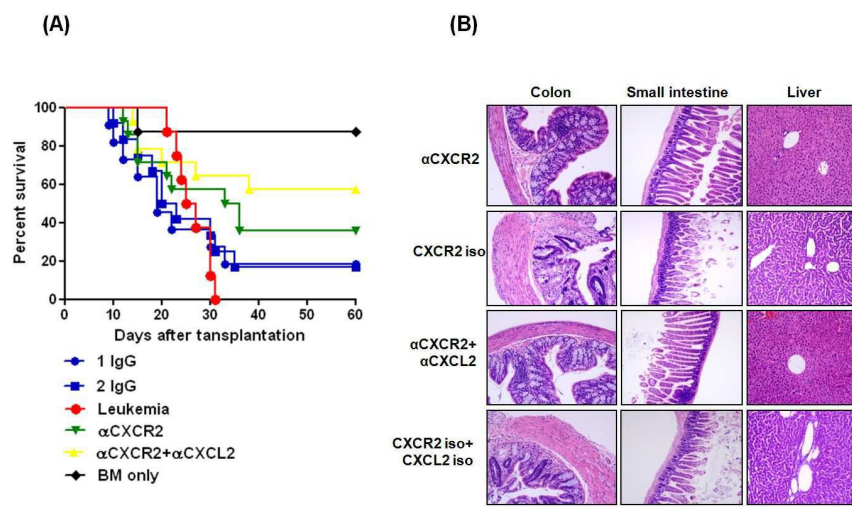
도면1



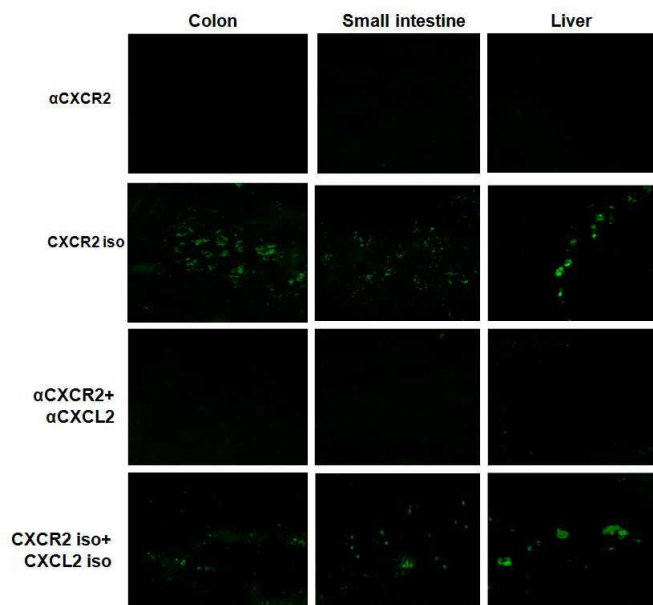
도면2



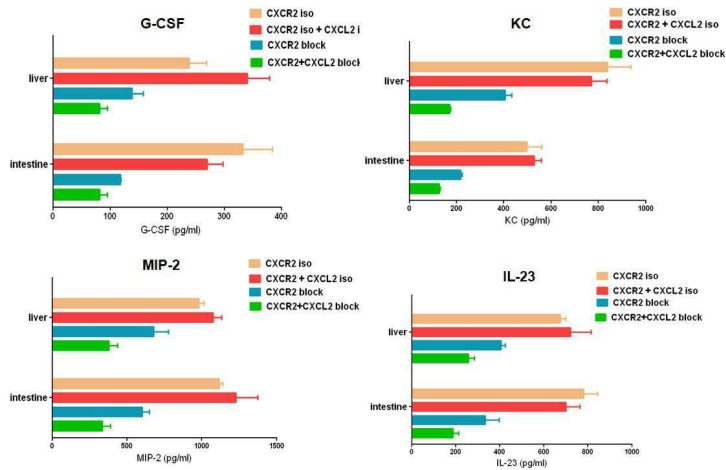
도면3



도면4



도면5



도면6

