



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년01월18일
 (11) 등록번호 10-1697473
 (24) 등록일자 2017년01월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0783 (2010.01) *A61K 35/14* (2015.01)
A61P 31/00 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C12N 5/02 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2014-0166705
 (22) 출원일자 2014년11월26일
 심사청구일자 2014년11월26일
 (65) 공개번호 10-2016-0063114
 (43) 공개일자 2016년06월03일
 (56) 선행기술조사문헌
 KR1020140123503 A

(73) 특허권자
주식회사 녹십자랩셀
 경기도 용인시 기흥구 이현로30번길 107 (보정동)
재단법인 목암생명과학연구소
 경기도 용인시 기흥구 이현로30번길 93(보정동)
 (72) 발명자
민보경
 경기도 용인시 기흥구 이현로 30번길 107 (목암생명
 공학연구소)
최하나
 경기도 용인시 기흥구 이현로 30번길 107 ((주)녹
 십자랩셀)
황유경
 경기도 용인시 기흥구 이현로 30번길 107 ((주)녹
 십자랩셀)
 (74) 대리인
이처영, 장제환

전체 청구항 수 : 총 20 항

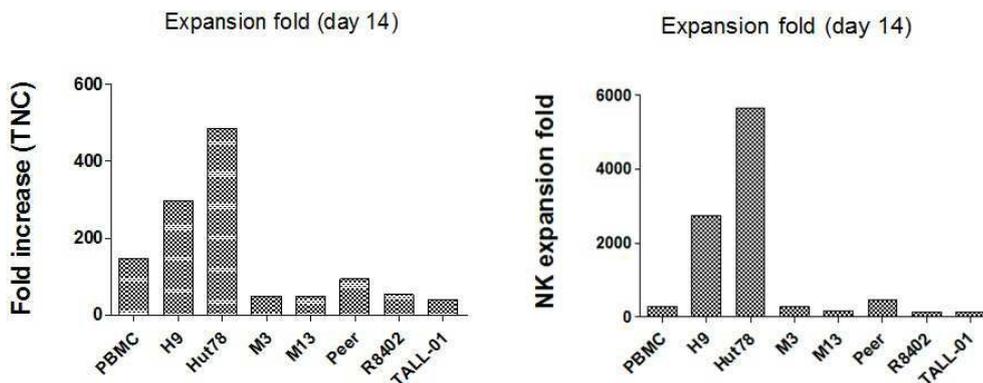
심사관 : 이효진

(54) 발명의 명칭 T 세포를 이용한 자연살해세포의 배양방법

(57) 요약

본 발명은 T 세포를 이용한 자연살해세포의 제조방법에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 CD4(+) T 세포를 지지세포로 이용하여 원료세포를 배양하는 것을 특징으로 하는 자연살해세포의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 T 세포를 이용한 자연살해세포의 제조방법은 자연살해세포의 높은 살해능을 유지하면서 소량의 원료세포로부터 자연살해세포만 선택적으로 증식시켜 제조할 수 있는 방법으로, 동결이 가능한 자연살해세포를 대량으로 제조할 수 있어, 세포치료제로서의 상용화에 유용하다.

대표도 - 도1a



명세서

청구범위

청구항 1

지지세포(feeder cell)로 H9 또는 HuT78 세포주인 CD4(+) T 세포를 이용하여, 원료세포(seed cell)를 배양하는 것을 특징으로 하는 자연살해세포의 제조방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 CD4(+) T 세포는 분열증식이 억제된 불활성화 세포 또는 불활성화시키지 않은 세포인 것을 특징으로 하는 자연살해세포의 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 원료세포는 말초혈액, 말초혈 백혈구 세포, PBMC(말초혈 단핵구 세포), 농축된(enriched) 자연살해세포 및 분리된 자연살해세포로 구성된 군에서 선택된 하나 이상임을 특징으로 하는 자연살해세포의 제조방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 원료세포는 CD3(+) 세포를 제거시킨 세포임을 특징으로 하는 자연살해세포의 제조방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 지지세포와 원료세포의 비율을 1 이상으로 혼합하여 배양하는 것을 특징으로 하는 자연살해세포의 제조방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 지지세포와 원료세포의 비율은 2:1 내지 20:1인 것을 특징으로 하는 자연살해세포의 제조방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 5~60일간 배양하는 것을 특징으로 하는 자연살해세포의 제조방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 항-CD3 항체 및 인터루킨 단백질이 함유된 배지에서 배양하는 것을 특징으로 하는 자연살해세포

포의 제조방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 항-CD3 항체는 OKT3, UCHT1 및 HIT3a로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 자연살해세포의 제조방법.

청구항 12

제10항에 있어서, 상기 인터루킨 단백질은 IL-2, IL-12, IL-15, IL-18 및 IL-21로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 자연살해세포의 제조방법.

청구항 13

제1항에 있어서, 원료세포 대비 2~20 배수의 CD4(+) T 세포를 지지세포로 이용하여, CD3(+) 세포를 제거시킨 원료세포를 재자극하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 자연살해세포의 제조방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 5~12일 간격으로 재자극하는 것을 특징으로 하는 자연살해세포의 제조방법.

청구항 15

제13항에 있어서, 1회 이상 반복 재자극하는 것을 특징으로 하는 자연살해세포의 제조방법.

청구항 16

제13항에 있어서, 상기 재자극하는 단계에서 이용되는 CD4(+) T 세포는 H9 또는 HuT78인 것을 특징으로 하는 자연살해세포의 제조방법.

청구항 17

제13항에 있어서, 상기 재자극하는 단계에서 이용되는 CD4(+) T 세포는 분열증식이 억제된 불활성화 세포 또는 불활성화시키지 않은 세포인 것을 특징으로 하는 자연살해세포의 제조방법.

청구항 18

제13항에 있어서, 항-CD3 항체 및 인터루킨 단백질이 함유된 배지에서 배양하는 것을 특징으로 하는 자연살해세포의 제조방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 항-CD3 항체는 OKT3, UCHT1 및 HIT3a로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 자연살해세포의 제조방법.

청구항 20

제18항에 있어서, 상기 인터루킨 단백질은 IL-2, IL-12, IL-15, IL-18 및 IL-21로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 자연살해세포의 제조방법.

청구항 21

제1항 및 제4항 내지 제20항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조된 자연살해세포.

청구항 22

제21항의 자연살해세포를 유효성분으로 포함하는 암 또는 감염성 질환의 예방 또는 치료용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 T 세포를 이용한 자연살해세포의 제조방법에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 CD4(+) T 세포를 지지세포로 이용하여 원료세포(seed cell)를 배양하는 것을 특징으로 하는 자연살해세포의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 암의 전이와 재발 방지 및 말기암 환자들의 생존기간을 연장시키는 치료법으로 환자의 면역기능을 이용한 면역치료(immunotherapy)법이 관심을 받고 있다. 최근, 항원에 특정한 키메라 항원 수용체(chimeric antigen receptors, CARs)를 발현하는 유전자 변형 T 세포를 이용한 면역 치료법은 암 치료의 희망적인 접근법으로 인식되고 있다. 하지만 T 세포는 타인의 것을 사용하였을 경우 MHC 제한(Major histocompatibility complex restriction)을 받아 심각한 이식편대숙주병 (graft-versus-host disease, GVHD)를 유발할 수 있으므로 세포치료제의 상업화를 위해서는 동종으로 사용가능하며 대량 생산 및 동결이 가능한 자연살해 (natural killer, NK) 세포의 사용이 훨씬 유용하다.

[0003] 자연살해세포는 말초혈 림프구(peripheral blood lymphocyte)의 약 10~15% 정도를 차지하는 선천성 면역반응에 중요한 역할을 하는 림프구계 세포로 알려져 있다. 자연살해세포는 T 세포와 다르게 MHC 비제한적인 방식으로 타겟(target)을 인지하는데, NKG2D, NCR(NKp30, NKp44, NKp46)과 같은 활성화 수용체(Activating receptors)가 KIR나 CD94/NKG2A와 같은 억제 수용체와 경쟁하여 활성을 나타내고 종양 타겟을 제거한다. 자연살해세포는 항바이러스, 항-GvH, 항암 효능을 발휘할 수 있지만, 특히 sarcoma, myeloma, carcinoma, lymphomas, leukemia를 포함하는 악성 종양을 직접적으로 죽이거나 수지상 세포(dendritic cell, DC) 활성화 또는 종양 특이적인 세포독성 T 임파구(cytotoxic t lymphocyte, CTL)을 유도하여 적응(adaptive) 면역 활성화에 기여하여 종양화되거나 종양화가 진행되는 이상 세포를 제거하는 역할을 수행한다.

[0004] 자연살해세포의 항암 효능은 동종 조혈모세포 이식을 통해 입증되었고 T 세포 제거 조혈모세포 이식에서도 공여자가 자연살해세포가 잔존하는 미세 종양을 억제함을 확인하였다. 또한 공여자 자연살해세포의 GVT(graft-versus-tumor) 효과가 공여자와 수여자간에 KIR(killer cell immunoglobulin-like receptors)-MHC 불일치 시에 유의성 있게 증가되므로, 동종 자연살해세포의 사용은 암환자 자신의 기능이 약화된 자가 자연살해세포를 활용하는 것보다 훨씬 효과적이다. 이러한 자연살해세포의 암이나 감염성 질환의 치료제로서의 가능성에도 불구하고, 정상인의 체내에 존재하는 대부분의 자연살해세포는 비활성화 상태(resting state)로 존재하고 암환자의 체내에 존재하는 자연살해세포의 경우 암세포의 면역회피기전에 의해 기능의 결함이 존재한다. 실제로 자연살해세포를 치료제로 이용하기 위해서는 종양을 인지하고 파괴할 수 있는 활성화된 자연살해세포가 필요하기 때문에 정상혈액 혹은 환자혈액으로부터 체외 확장 배양을 통해 자연살해세포를 활성화시키는 것은 매우 중요하다. 또한 체내에 존재하는 자연살해세포수는 한정되어 있으므로, 항암효능을 충분히 발휘할 수 있는 양의 자연살해세포를 대량으로 생산하고 동결하는 기술의 개발이 필수적이다.

[0005] 자연살해세포의 체외 확장 배양에는 PBMC, CD3- 세포, CD3-CD56+ 세포, CD56+ 세포 등이 원료세포로 사용되며, 자연살해세포 증식 인자로 IL-2, IL-12, IL-15, IL-21 등의 사이토카인들과 LPS (Goodier *et al.*, *J. Immunol.* 165(1):139-147, 2000), CD3을 자극하는 OKT-3 항체(Condiotti *et al.*, *Experimental Hematol.* 29(1):104-113, 2001)를 이용하고 있다. 하지만 상기에서 언급된 증식인자만으로는 자연살해세포를 3~10 배 정도 증식시킬 수 있으며, 충분한 증식이 어려우므로 몇몇 연구에서 여러가지 형태의 지지세포(feeder cell)로 사용하여 자연살해세포를 증폭시키고자 하였다. 백혈병 세포주인 CTV-1의 사용에서는 증식의 개선이 거의 없었으며 (North *et al.*, *J. Immunol.* 178(1):85-94, 2007), EBV-LCL을 사용하여 21일간 배양한 것은 평균 490배 정도 증식된 것으로 보고된 바 있다(Berg *et al.*, *Cytotherapy*, 11(3):341-355, 2009). K562 세포주에 4-1 BBL과 막 고정된(membrane-bound) IL-15를 발현시킨 인공 항원제시세포(artificial APC(antigen presenting cell))를 사용하여 7일~3주간 배양한 결과, 평균 90~209배 증가되었다(Fujisaki *et al.*, *Cancer Res.* 69(9):4010-4017, 2009). MICA, 4-1BBL, 그리고 IL-15를 K562 세포주에 발현시켜 3 주간 배양하여 평균 350배 증식시켰다는 보고도 있으며(Gong *et al.*, *Tissue Antigens*, 76(6):467-475, 2010), K562 세포주에 막 고정된 IL-21을 발현시켜 7일 간격으로 재자극하며 3주간 배양하여 평균 21,000배 증식시켰다는 보고도 있다(Denman *et al.*, *PlosOne*, 7(1):e30264, 2012). 최근에 KL-1(human T lymphoblast)과 EBV-transformed B 세포를 지지세포로 이용하여 PBMC를 14일 배양하여 평균 740배 자연살해세포의 증식을 유도하기도 하였다(Lim *et al.*, *Cancer Res.*, 73(8):2598-6607, 2013).

[0006] 본 발명자들은 대한민국 등록특허 제 10-1133185에 PBMC를 OKT-3로 자극시켜 지지세포로 사용하는 것을 개시하였으며, 14일 배양시 691배의 증식을 유도할 수 있음을 밝힌바 있다(Lim *et al.*, *PlosOne*, 7(1):e53611, 2012). 또한 PBMC를 지지세포로 2회 이상 재자극하는 경우 수천~수만배의 증식을 유도할 수 있음을 개시하였다(PCT /KR2012/011114). 하지만 대량배양의 경우 지지세포로 사용되는 PBMC의 필요량이 증가하고 각 공여자의 특성에 따라 자연살해세포 배양 결과가 달라져서 상업화를 위한 원료물질의 원활한 공급과 대량 배양 및 공여자 관리가 현실적으로 어렵다.

[0007] 이에, 본 발명자들은 PBMC를 대체할 수 있는 지지세포를 개발하고자 예의 노력한 결과, PBMC 중 T 림프사이트 세포, 그중에서도 헬퍼 T 세포(Helper T cell; Th 세포)가 자연살해세포 증식에 매우 중요함을 밝히고, Th 세포의 특성을 가지면서 증식이 가능한 T-세포 백혈병-림포마 세포주(T-cell leukemia-lymphoma cell lines)들이 선택적으로 자연살해세포의 배양을 유도하고 안정적으로 자연살해세포를 증식시키는 것을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 자연살해세포를 효율적이고 안정적으로 배양, 증식시켜 제조하는 방법을 제공하는데 있다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 방법에 의해 제조된 자연살해세포 및 상기 자연살해세포를 유효성분으로 포함하는 암 또는 감염성 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 자연살해세포를 자극하는 지지세포로 T 세포, 바람직하게는 CD4(+) T 세포를 이용하는 것을 특징으로 하는 자연살해세포의 제조방법을 제공한다.

[0011] 본 발명은 또한, 상기 방법에 의해 제조한 자연살해세포를 제공한다.

[0012] 본 발명은 또한, 상기 자연살해세포를 유효성분으로 포함하는 암 또는 감염성 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명에 따른 T 세포를 이용한 자연살해세포의 제조방법은 자연살해세포의 높은 살해능을 유지하면서 소량의

원료세포로부터 자연살해세포만 선택적으로 증식시켜 제조할 수 있는 방법으로, 동결이 가능한 자연살해세포를 대량으로 제조할 수 있어, 세포치료제로서의 상용화에 유용하다.

도면의 간단한 설명

[0014]

도 1a는 다양한 T 세포를 지지세포로 이용하여 PBMC 원료세포를 14일간 배양한 총세포 및 자연살해세포의 증식을 변화를 나타낸 결과이다(표1의 조건 1).

도 1b는 다양한 T 세포를 지지세포로 이용하여 PBMC 원료세포를 배양 후, 다양한 T 세포 지지세포로 재자극하여 21일간 배양한 총세포 및 자연살해세포의 증식을 변화를 나타낸 결과이다(표 1의 조건 2).

도 1c는 다양한 T 세포를 지지세포로 이용하여 CD3(+) 세포를 제거시킨 PBMC 원료세포를 14일간 배양한 총세포의 증식을 변화를 나타낸 결과이다(표 1의 조건 3).

도 1d는 PBMC 지지세포를 이용하여 CD3(+) 세포를 제거시킨 PBMC 원료세포를 배양 후, 다양한 T 세포 지지세포로 재자극하여 21일간 배양한 총세포의 증식을 변화를 나타낸 결과이다(표 1의 조건 4).

도 1e는 표 1의 조건 3에서 증식이 부진한 공여자의 총세포의 증식을 변화를 나타낸 결과이다.

도 2는 다양한 T 세포를 지지세포로 이용하여 배양한 자연살해세포의 세포생존율을 나타낸 결과이다. (a) 표 1의 조건 1, (b) 표 1의 조건 2, (c) 표 1의 조건 3, (d) 표 1의 조건 4, (e) 표 1의 조건 3에서 증식부진 공여자의 자연살해세포의 세포생존율.

도 3a는 다양한 T 세포를 지지세포로 이용하여 PBMC 원료세포를 14일간 배양한 자연살해세포의 확인 및 순도를 나타낸 결과이다(표1의 조건 1).

도 3b는 다양한 T 세포를 지지세포로 이용하여 PBMC 원료세포를 배양 후, 다양한 T 세포 지지세포로 재자극하여 21일간 배양한 자연살해세포의 확인 및 순도를 나타낸 결과이다(표 1의 조건 2).

도 3c는 다양한 T 세포를 지지세포로 이용하여 CD3(+) 세포를 제거시킨 PBMC 원료세포를 14일간 배양한 자연살해세포의 확인 및 순도를 나타낸 결과이다(표 1의 조건 3).

도 3d는 PBMC 지지세포를 이용하여 CD3(+) 세포를 제거시킨 PBMC 원료세포를 배양 후, 다양한 T 세포 지지세포로 재자극하여 21일간 배양한 자연살해세포의 확인 및 순도를 나타낸 결과이다(표 1의 조건 4).

도 3e는 표 1의 조건 3에서 증식이 부진한 공여자의 자연살해세포의 확인 및 순도를 나타낸 결과이다.

도 4a는 다양한 T 세포를 지지세포로 이용하여 PBMC 원료세포를 14일간 배양한 자연살해세포의 활성화마크를 나타낸 결과이다(표 1의 조건 1).

도 4b는 다양한 T 세포를 지지세포로 이용하여 CD3(+) 세포를 제거시킨 PBMC 원료세포를 14일간 배양한 자연살해세포의 활성화마크를 나타낸 결과이다(표 1의 조건 3).

도 5a는 다양한 T 세포를 지지세포로 이용하여 PBMC 원료세포를 14일간 배양한 자연살해세포의 다양한 암종에 대한 세포살상능을 나타낸 결과이다(표1의 조건 1).

도 5b는 다양한 T 세포를 지지세포로 이용하여 PBMC 원료세포를 배양 후, 다양한 T 세포 지지세포로 재자극하여 21일간 배양한 자연살해세포의 다양한 암종에 대한 세포살상능을 나타낸 결과이다(표 1의 조건 2).

도 5c는 다양한 T 세포를 지지세포로 이용하여 CD3(+) 세포를 제거시킨 PBMC 원료세포를 14일간 배양한 자연살해세포의 다양한 암종에 대한 세포살상능을 나타낸 결과이다(표 1의 조건 3).

도 5d는 PBMC 지지세포를 이용하여 CD3(+) 세포를 제거시킨 PBMC 원료세포를 배양 후, 다양한 T 세포 지지세포로 재자극하여 21일간 배양한 자연살해세포의 K562에 대한 세포살상능을 나타낸 결과이다(표 1의 조건 4).

도 5e는 표 1의 조건 3에서 증식이 부진한 공여자의 자연살해세포의 K562에 대한 세포살상능을 나타낸 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015]

다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술

분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

- [0016] 본 발명에서는, 다양한 T 세포를 지지세포로 이용하여 자연살해세포를 증식시켜 제조함에 있어, T 세포, 특히 바람직하게는 CD4(+) T 세포가 자연살해세포를 선택적으로 증식시켜, 자연살해세포의 증식율이 증가할뿐 아니라 세포 살상능 또한 증가한다는 것을 확인하였다.
- [0017] 따라서, 본 발명은 일 관점에서 자연살해세포를 자극하는 지지세포로 CD4(+) T 세포를 이용하는 것을 특징으로 하는 자연살해세포의 제조방법에 대한 것이다.
- [0018] 바람직하게는 지지세포로 체외로 분리된 CD4(+) T 세포, 체외 배양된 CD4(+) T 세포 또는 CD4(+) T 세포주를, 원료세포(seed cell)로 말초혈액, 말초혈 백혈구 세포, PBMC(말초혈 단핵구 세포), 농축된(enriched) 자연살해세포 및 분리된 자연살해세포로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 세포, 바람직하게는 CD3(+) 세포를 제거시킨 세포를 이용하는 것을 특징으로 하는 자연살해세포의 제조방법에 대한 것이다.
- [0019] 본 발명의 자연살해세포의 증식방법은 바람직하게는 다음과 같은 공정을 포함하여 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0020] (i) 인간 말초혈액으로부터 말초혈 백혈구 세포, 말초혈 단핵구 세포(PBMC), T 세포가 제거된 단핵구 세포 또는 자연살해세포를 분리하는 공정;
- [0021] (ii) 자연살해세포를 T 세포에 저친화성(low affinity)을 가지며 T 세포를 자극하는 항체 및 인터루킨 단백질이 함유된 배지에서 불활성화 되거나 불활성화 되지 않은 T 세포 존재하에 배양하는 공정;
- [0022] (iii) 자연살해세포를 T 세포에 저친화성(low affinity)을 가지며 T 세포를 자극하는 항체 및 인터루킨 단백질이 함유된 배지에서 T 세포로 재자극하여 추가 배양하는 공정.
- [0023] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [0024] 자연살해세포 (Natural killer cell, NK cell)는 정상인 혈액 내에 약 10~15% 가량 존재하며, 비자기(nonsel f)와 반응할 때 높은 살해능을 가진다. 각종 virus에 감염된 세포나 세균 침투, 혹은 비정상 세포의 생성에 있어, 자연살해세포는 비특이적으로 즉각적으로 반응하여 이물질을 제거한다. 그러나, 체내에 존재하는 자연살해세포의 수는 그다지 많지 않고, 치료적 효과를 보이기 위해 필요한 유효 자연살해세포의 수는 매우 많아야 하므로, 효과적인 자연살해세포 증식 및 제조 방법에 대한 필요성이 요구되고 있는 실정이다.
- [0025] 자연살해세포를 증식시키는 방법은, 자연살해세포 만을 순수하게 분리한 다음 지지세포(feeder cell)을 사용하면서 적절한 자극을 주어 증폭하는 방법이 있고, 전체 말초혈 백혈구 세포(PBL; peripheral blood lymphocyte) 또는 말초혈 단핵구 세포(PBMC; peripheral blood mononuclear cell)에서 자연살해세포를 선택적으로 증폭하여 상대적으로 많은 자연살해세포를 얻는 방법이 있다. 말초 혈액으로부터 자연살해세포를 분리하는 방법은 당업자에게 공지되어 있는 통상의 방법을 사용할 수 있고, 시판되어 있는 것을 구입하여 사용할 수도 있다.
- [0026] PBMC는 림프구와 단핵구로 나뉘며, 림프구는 T 세포, B 세포, 자연살해세포로 구분된다. 이중 T 세포는 헬퍼 T 세포(Helper T cell; Th 세포)와 세포독성 T 세포(Cytotoxic T cell; Tc 세포)로 다시 구분되며, PBMC 지지세포를 이용하여 자연살해세포를 배양하는 방법은 T 세포의 대량 증식이 유도되고 자연살해세포의 증식이 제한되어, 배양 전·후에 T 세포를 제거하는 고비용의 복잡한 공정 단계가 필요하였다. 이에, 본 발명에서는 지지세포인 PBMC 중 어떤 세포군이 자연살해세포 증식에 기여하는지 조사한 결과 T 세포가 자연살해세포 증식에 기여하며 그 중에서도 Th 세포가 자연살해세포 증식에 매우 중요함을 확인하고, PBMC를 대체할 수 있는 지지세포로서 Th 세포의 특성을 가지면서 증식이 가능한 T 세포들을 대상으로 자연살해세포 배양에 적용하였다.
- [0027] 본 발명의 용어 "지지세포(Feeder cell, 배양보조세포라고도 한다)"란, 분열증식하지는 못하지만 대사활성이 있기 때문에 여러 가지 대사물질을 생산하여 목적 세포의 증식을 돕는 세포를 의미한다.
- [0028] 본 발명에서 사용하는 지지세포(feeder cell)는 체외로 분리된 CD4(+) T 세포, 체외 확장 배양된 CD4(+) T 세포 또는 CD4(+) T 세포주(T 림포마 세포주)인 것을 특징으로 할 수 있다. 본 발명의 CD4(+) T 세포주(T 림포마 세

포주)는 H9, HuT78, Loucy, Molt3, Molt-13, PEER, RPMI8402, TALL-01인 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 H9 또는 HuT78인 것이나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0029] 상기 지지세포로 이용되는 T 세포는 분열증식이 억제된 불활성화 세포 또는 불활성화시키지 않은 것임을 특징으로 할 수 있으며, 바람직하게는 불활성화시키므로써 안전성을 확보할 수 있다. 불활성화시키는 방법으로는 당업계에 공지된 통상의 방법을 사용하여도 무방하며, 예를 들어 감마선(gamma-ray)을 조사하는 방법을 사용할 수 있다. 불활성화를 시키는 않은 T 세포를 사용할 경우 대부분 종양세포들이므로 활성화된 자연살해세포에 의해 배양중에 사멸될 수 있다.
- [0030] 본 발명과 같이 T 세포를 지지세포로 사용하는 증식 방법은 T 세포의 제거 없이 PBMC 등의 원료세포에서 선택적으로 자연살해세포의 배양을 유도하므로, 배양 성적이 공여자에 따라 큰 차이 없이 안정적으로 배양할 수 있는 장점이 있다. 따라서, 보다 많은 양의 치료용 자연살해세포 치료제를 효율적이고 안정적으로 확보할 수 있다.
- [0031] 본 발명의 용어 "원료세포(seed cell)"는 적절한 배양을 통해 자연살해세포로 증식될 수 있는 세포를 의미하며, 바람직하게는 말초혈액, 말초혈 백혈구 세포, PBMC(말초혈 단핵구 세포), 농축된(enriched) 자연살해세포 및 분리된 자연살해세포로 구성된 군에서 선택된 하나 이상이 사용될 수 있지만 이에 제한되는 것은 아니며, 특히 바람직하게는 CD3(+) 세포를 제거시킨 세포(CD3(-) 세포)를 사용할 수 있다.
- [0032] 또한, 본 발명의 자연살해세포의 제조방법은, 자연살해세포를 T 세포에 저친화성(low affinity)을 가지며 T 세포를 자극하는 항체 및 인터루킨 단백질이 함유된 배지에서 배양하는 것이 바람직하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. T 세포에 저친화성(low affinity)을 가지며 T 세포를 자극하는 항체란, T 세포 수용체(TCR)과 회합하여 항원인식복합체를 형성하는 분자군인 CD3 항원에 특이적으로 반응하는 단백질로서, CD3 분자는 TCR과 비교하여 세포내 영역이 길고 항원인식신호를 세포 내에 전달하는 역할을 담당하고 있다. 본 발명에서 사용할 수 있는 T 세포에 저친화성(low affinity)을 가지며 T 세포를 자극하는 항체는, 바람직하게는 항-CD3 하항체, 더욱 바람직하게는 OKT-3, UCHT1, HIT3a 등을 들 수 있고, 가장 바람직하게는 OKT-3 항체이다.
- [0033] 인터루킨(Interleukin, IL) 단백질이란 림프구나 단구 및 대식세포 등 면역담당세포가 생산하는 단백질성 생물활성물질의 총칭으로, 사이토카인(cytokine) 내의 일 군의 분자종을 가리킨다. 본 발명에서 사용할 수 있는 인터루킨 단백질의 예로서는, IL-2, IL-15, IL-12, IL-18, IL-21 등을 들 수 있고, 바람직하게는 IL-2 단백질이다.
- [0034] 본 발명의 자연살해세포 제조방법은 AIM-V media, RIMI1640, CellGro SCGM, X-VIVO20, IMDM, DMEM과 같은 통상의 동물세포배양용 배지에 자연살해세포 및 T 림프모 세포주를 가하고, 상기 배양물에 T 세포에 저친화성(low affinity)을 가지며 T 세포를 자극하는 항체 및 인터루킨 단백질을 첨가하여 배양하는 것이 바람직하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 일 구체예에서는 OKT-3 항체와 IL-2를 첨가하여 배양하였다. 첨가하는 OKT-3 항체의 농도는 0.1~100 ng/ml 바람직하게는 약 10 ng/ml을 사용하고, IL-2의 농도는 10~2000 U/ml 바람직하게는 약 500U/ml을 사용한다. 또한, 여기에 혈청 또는 혈장과 림프구의 증식을 지지하는 추가의 증식인자를 첨가하여 배양할 수도 있다. 배지에 첨가하는 혈청 또는 혈장의 종류는 특별히 한정되지 않아, 시판의 각종 동물 유래의 것을 사용할 수 있지만, 인간 유래로서 본인 유래의 것이 더욱 바람직하다.
- [0035] 본 발명에 따른 자연살해세포의 제조방법은 자연살해세포를 자극하는 지지세포로 T 세포의 존재하에 T 세포에 저친화성(low affinity)을 가지며 T 세포를 자극하는 항체 및 인터루킨 단백질이 함유된 배지에서 자연살해세포를 배양하는 공정을 포함한다. 상기 배양은 지지세포와 원료세포의 비율을 1 이상으로 혼합하여 배양하는 것이 바람직하며, 지지세포와 원료세포를 2:1 ~ 20:1의 비율로 혼합하여 배양하는 것이 더욱 바람직하고, 5:1의 비율을 사용하는 것이 가장 바람직하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 "비율"은 세포수를 기준으로 한 것을 말한다.
- [0036] 또한, 본 발명에 따른 자연살해세포의 제조방법에 있어, 보다 많은 자연살해세포를 수득하기 위하여 CD4(+) T 세포를 지지세포로 이용한 자연살해세포의 자극 및 배양을 반복 수행할 수 있다. 따라서, 본 발명에서는 지지세포와 원료세포의 비율을 1 이상, 바람직하게는 2:1 ~ 20:1, 가장 바람직하게는 5:1로 하여, 자연살해세포를 재 자극하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 "비율"은 세포수를 기준으로 한 것을 말한다.
- [0037] 상기 재자극에 이용되는 CD4(+) T 세포는 H9 또는 HuT78인 것이 바람직하지만, 이에 한정되는 것은 아니며, 분열증식이 억제된 불활성화된 세포, 또는 불활성화시키지 않은 세포가 사용될 수 있다.

- [0038] 또한, 상기 재자극은 T 세포에 저친화성(low affinity)을 가지며 T 세포를 자극하는 항체 및 인터루킨 단백질이 함유된 배지에서 5~12일 간격으로 수행하는 것이 바람직하며 더욱 바람직하게는 7일 간격으로 재자극할 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니며, 1회 이상 반복 재자극할 수 있다. 또한, T 세포에 저친화성(low affinity)을 가지며 T 세포를 자극하는 항체 및 인터루킨 단백질이 함유된 배지에서 배양한 후, 상기 항체가 없는 배지에서 추가 배양하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0039] 상기 T 세포에 저친화성(low affinity)을 가지며 T 세포를 자극하는 항체는 항-CD3 항체, 바람직하게는 OKT3, UCHT1 및 HIT3a로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상, 가장 바람직하게는 OKT3일 수 있으며, 상기 인터루킨 단백질은 IL-2, IL-12, IL-15, IL-18 및 IL-21로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상, 바람직하게는 IL-2일 수 있다.
- [0040] 본 발명에서의 "자극"이란 지지세포 등을 첨가하여 자연살해세포의 증식을 유도하는 것을 의미하며, T 세포에 저친화성(low affinity)을 가지며 T 세포를 자극하는 항체가 함께 사용될 수도 있다. 본 발명에서의 "재자극"은 일정 배양 시간이 경과한 후, 배지에 지지세포 및/또는 T 세포에 저친화성(low affinity)을 가지며 T 세포를 자극하는 항체를 다시 첨가하여 자연살해세포 증식을 재유도하는 것을 의미한다.
- [0041] 전체적으로 본 발명에서 상기 자연살해세포는 5일 이상, 바람직하게는 5~60일간, 가장 바람직하게는 14~21일간 배양하는 것이 바람직하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0042] 자극 기간은 배양 0일째 시작하여 5~12일 간격으로 자극하는 것을 특징으로 할 수 있으며, 바람직하게는 7일 간격으로 자극할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 세포의 수득은 마지막 자극 후 5일째 수득하는 것을 특징으로 할 수 있으며, 바람직하게는 14일째 수득하는 것이나, 이 또한 제한되는 것은 아니다.
- [0043] 상기 방법에 따라 배양된 자연살해세포는 동결이 가능하고 다시 해동할 경우에도 세포의 기능이 손상되지 않으며, 기존의 PBMC를 지지세포로 사용하여 배양한 경우보다 NKp44, NKp46과 같은 활성화 수용체(activating receptor)의 발현이 높아 종양 세포주에 대한 살해능 및 싸이토카인 분비능이 증가하므로, 탁월한 항암 효과를 기대할 수 있다. 따라서, 임상 적용이 가능한 다량의 활성화된 자연살해세포를 이용하여 종양치료에 유효한 세포치료제를 제조할 수 있다.
- [0044] **[실시예]**
- [0045] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.
- [0046] **실시예 1: PBMC 및 다양한 T 세포의 준비**
- [0047] 1-1: PBMC 원료세포 및 CD3(+)를 제거시킨 원료세포의 준비
- [0048] 건강한 공여자로부터 채취한 말초혈 단핵구 세포(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)를 1회 생산할 분량으로 소분하여 바이알(vial)에 담아 액체 질소에 동결하여 둔다. 얼려둔 하나의 PBMC 바이알을 녹여 50 mL 튜브로 옮기고, 1 %의 FBS(fetal serum bovine) 또는 자기 혈장 (autoplasma)를 포함하는 20 mL의 PBS (phosphate buffered saline)로 현탁하여 1200 rpm, 4°C에서 10 분간 원심분리 하였다. PBMC 펠렛을 10 mL MACS 런닝 버퍼(running buffer)에 현탁하고, Adam cell counter system을 사용하여 세포수를 측정하였다.
- [0049] PBMC 원료세포 1×10^7 (cell)을 50 mL 튜브로 옮기고, PBMC 지지세포와 CD3(+) 세포를 제거시킨(depletion) 원료 세포를 수득하기 위해 각각 5×10^7 (cell)씩 새로운 50 mL 튜브로 옮긴 후 각각 1200 rpm, 4°C에서 10분간 원심분리 하였다. PBMC 원료세포의 경우 세포 펠렛을 10 mL의 1 부피% 자기 혈장이 포함된 CellGro 배지(Celligenix) 10 mL에 현탁하였다.
- [0050] CD3(+)를 제거시킨 원료세포를 얻기 위하여 5×10^7 (cell)의 PBMC 세포 펠렛에 400 μ L의 MACS 런닝 버퍼(running buffer)와 100 μ L의 CD3 자기비드 (Miltenyi biotech)를 넣고 4°C에서 20분간 반응시켰다. 10 ~ 20 mL의 MACS 런닝 버퍼를 넣어 세척한 뒤 1200 rpm, 4°C에서 10분간 원심분리하고 다시 2 mL의 MACS 런닝 버퍼에 현탁하였다. VarioMACS (Miltenyi Biotech)에 CS 컬럼(column) (Miltenyi Biotech, 130-041-305)을 장착하여

세포를 분리하고, 최종 20 mL이 될 때까지 컬럼을 세척하여 세포를 회수하였다. Adam cell counter system을 사용하여 세포수를 측정하고 1×10^7 의 세포를 새로운 50 mL 튜브에 담아 1200rpm, 4°C에서 10분간 원심분리하였다. 세포 펠렛을 10 mL의 1 부피% 자기 혈장이 포함된 CellGro 배지(Cellgenix) 10 mL에 현탁하였다.

[0051] 1-2: PBMC 지지세포 및 다양한 T 지지세포의 준비

[0052] 실시예 1-1에서 분리된 5×10^7 (cell) PBMC 지지세포는 펠렛을 1 부피% 자기 혈장이 포함된 CellGro 배지(Cellgenix) 10 mL에 현탁한 뒤, 감마선 조사기에서 2000 cGy로 조사하여 PBMC 지지세포를 준비하였다.

[0053] 다양한 T 세포는 배양 플라스크에서 회수하여 1200 rpm, 4°C에서 10 분간 원심분리 한 후, 5×10^7 세포씩 튜브로 옮기고 1200 rpm, 4°C에서 10분간 원심분리 하였다. T 지지세포는 1 부피% 자기 혈장이 포함된 CellGro 배지(Cellgenix) 10 mL에 현탁한 뒤, 감마선 조사기에서 15000~30000 cGy로 조사하여 불활성화시켜 준비하였다.

[0054] 실시예 2: 다양한 T 세포를 지지세포로 이용한 자연살해세포의 배양

[0055] T 세포를 지지세포로 이용하여 PBMC 원료세포 및 CD3(+)를 제거시킨 원료세포의 배양조건을 표 1로 나타냈다.

표 1

	Seed 세포	지지세포		배양기간
		D0 자극	D7 자극	
조건 1	PBMC	PBMC 및 T 림포마	없음	14일
조건 2	PBMC	PBMC 및 T 림포마	PBMC 및 T 림포마	21일
조건 3	CD3(-)	PBMC 및 T 림포마	없음	14일
조건 4	CD3(-)	PBMC	PBMC 및 T 림포마	21일

[0056]

[0057] 2-1: 14일 배양조건

[0058] 자연살해세포 배양시 500 IU의 IL-2와 10 ng/mL의 OKT-3를 배양 용기(플라스틱 또는 세포 배양백 등)에 넣어주었으며, 배양 0일째 PBMC 원료세포와 PBMC 지지세포 또는 T 지지세포를 1:5의 비율로 각각 0.5~10 mL로 넣고 1 부피% 자기 혈장이 포함된 CellGro 배지 (Cellgenix)를 0.5~10 mL 넣어 37°C 인큐베이터에서 3~5일간 정치 배양하였다(조건 1). 또한, 배양 0일째 CD3(-) 원료세포와 PBMC 지지세포 또는 T 지지세포를 1:5의 비율로 각각 0.5~10 mL로 넣고 1 부피% 자기 혈장이 포함된 CellGro 배지 (Cellgenix)를 0.5~10 mL 넣어 37°C 인큐베이터에서 3~5일간 정치 배양하였다(조건 3).

[0059] 표 1의 조건 1 및 조건 3 모두, 배양 3~5일째에 세포수를 측정하여 약 $2 \sim 5 \times 10^5$ cells/mL이 되도록 500 IU의 IL-2 (Proleukin)과 1 부피% 자기 혈장이 포함된 CellGro 배지 (Cellgenix)로 희석하여 적절한 배양용기에 넣어 다시 정치 배양하였다. 이후 2~3일 간격으로 세포수를 측정하고 $5 \sim 10 \times 10^5$ cells/mL이 되도록 500 IU의 IL-2와 1 부피% 자기 혈장이 포함된 CellGro 배지(Cellgenix)로 희석하며 14일까지 부유 배양하였다. 부유배양 14일째 자연살해세포를 수득하였다.

[0060] 조건 1로 배양된 자연살해세포의 증식율을 비교한 결과, 총세포수(Total nucleated cells, TNC) 기준 증식율은 지지세포의 종류에 따라 PBMC 147배, H9 298배, HuT78이 485배로 PBMC보다 월등히 높은 증식율을 보여주었다. 총세포 중 자연살해세포 증식율은 지지세포의 종류에 따라 PBMC 247배, H9 2752배, HuT78 5649배로 PBMC보다 H9은 약 10배, HuT78은 약 20배 이상 높은 증식율 차이를 보여주었다. 그 외에 다른 T 세포들은 PBMC보다 낮은 증식율을 보여주었다(도 1a).

[0061] 또한, 조건 3으로 배양된 자연살해세포의 증식율을 비교한 결과, 총세포수를 기준으로 PBMC 184배, H9 62배,

HuT78 217배의 증식률을 보였다(도 1c). 나머지 T 지지세포들은 모두 H9보다 낮은 증식률을 나타냈다.

[0062]

[0063] 2-2: 21일 배양의 재자극 조건

[0064] 자연살해세포 배양시 500 IU의 IL-2와 10 ng/mL의 OKT-3를 배양 용기(플라스틱 또는 세포 배양백 등)에 넣어주었으며, 배양 0일째 PBMC 원료세포와 PBMC 지지세포 또는 T 지지세포를 1:5의 비율로 각각 0.5~10 mL로 넣고 1 부피% 자기 혈장이 포함된 CellGro 배지 (Cellgenix)를 0.5~10 mL 넣어 37°C 인큐베이터에서 배양하여 자극하였다. 배양 7일째 재자극은, 0일째 PBMC 지지세포로 자극해 배양된 자연살해세포는 PBMC 및 다양한 T 지지세포를 사용하여 재자극하였고, 0일째 T 지지세포로 자극해 배양된 세포들은 동일한 세포를 지지세포로 사용하였다(조건 2). 또한, 배양 0일째 CD3(-) 원료세포와 PBMC 지지세포를 1:5의 비율로 각각 0.5~10 mL로 넣고 1 부피% 자기 혈장이 포함된 CellGro 배지 (Cellgenix)를 0.5~10 mL 넣어 37°C 인큐베이터에서 배양하여 1차 자극한 경우에는, 배양 7일째 재자극은 PBMC 지지세포와 다양한 T 지지세포를 사용하여 21일 배양하여 재자극하였다(조건 4).

[0065] 배양 7일째 재자극은, 배양중인 자연살해세포수를 측정하고 세포수를 기준으로 $2\sim 5 \times 10^5$ cells/mL이 되도록 1 부피% 자기 혈장이 포함된 CellGro 배지 (Cellgenix)로 희석하였으며, PBMC 및 T 지지세포는 3~10 배수로 준비하여 1 부피% 자기 혈장이 포함된 CellGro 배지 (Cellgenix)에 현탁한 뒤, 감마선 조사기에서 각각 2000 및 15000~30000 cGy로 조사하여 불활성화시켜 준비하였다. 500 IU의 IL-2와 10 ng/mL의 OKT-3를 넣어주고 준비된 두 세포를 3 일간 공배양(co-culture)하였다. 이후 2~3일 간격으로 세포수를 측정하고 $5\sim 10 \times 10^5$ cells/mL이 되도록 500 IU의 IL-2와 1 부피% 자기 혈장이 포함된 CellGro 배지(Cellgenix)로 희석하며 21일까지 부유 배양하였다. 부유배양 21일째 자연살해세포를 수득하였다.

[0066] 표 1의 조건 2로 배양된 자연살해세포의 증식율을 비교한 결과, 총세포수 기준으로 증식율은 지지세포의 종류에 따라 PBMC 334배, H9 358배, HuT78 2282배 순으로 증가되었다. 자연살해세포수 기준으로 증식율은 PBMC 1257배, H9 2677배, HuT78 29455배였다(도 1b).

[0067] 또한, 1차 자극은 모두 PBMC 지지세포로 수행하고, 배양 7일째 PBMC 지지세포 및 각각의 T 지지세포들로 2차 재자극을 수행한, 표 1의 조건 4로 배양된 자연살해세포의 증식율을 비교한 결과, 총세포수를 기준으로 PBMC 1402배, H9 720배, HuT78 1393배로 증식률이 나타났다(도 1d). 나머지 T 세포들은 약 500배 전후의 세포증식율을 보여주었다.

[0068] 상기와 같이, 14일 배양과 21일 배양시 H9과 HuT78은 PBMC 보다 증식률 측면에서 매우 뛰어난 지지세포로 사용할 수 있음을 확인할 수 있었다.

[0069] CD3(-) 세포를 원료세포로 사용하여 다양한 T 지지세포로 평가한 결과는, PBMC를 지지세포로 사용한 것과는 조금 다르게 PBMC 지지세포와 HuT78 지지세포의 자연살해세포 증식률이 비슷했고 H9 지지세포는 PBMC 지지세포보다 자연살해세포의 감소된 증식률을 보여주었다.

[0070] 2-3: 증식 부진 공여자 세포의 배양

[0071] 표 1의 조건 4에서 PBMC 지지세포로 배양시 증식이 부진했던 공여자만을 선별하여 자연살해세포의 증식률을 비교하였다.

[0072] 그 결과, PBMC 지지세포로 배양시 평균 21배 증식하였지만, H9과 HuT78에서는 각각 64배, 161배 증식하였다. 특히 HuT78의 경우 PBMC 지지세포보다 약 8배 이상 높은 증식율을 보여주었다(도 1e). 따라서 T 지지세포는 PBMC 지지세포보다 자연살해세포 증식능에 있어 공여자간의 차이를 극복할 수 있음을 확인할 수 있었다.

[0073] PBMC 지지세포의 경우 원료세포 내 T 세포가 존재할 경우 자연살해세포보다 T 세포의 증식을 유도하므로 원료세포 내 T 세포를 제거하는 공정이 필수적이다. 그리고 공여자간의 증식률 차이가 크므로 사전에 공여자를 선별하는 사전 배양 과정을 필요로 한다. 그러나 T 세포, 바람직하게는 CD4를 발현하는 T 세포의 경우 원료세포 내에 T 세포의 존재 여부에 상관없이 자연살해세포를 선택적으로 증식시키고 PBMC 지지세포로 배양시 증식이 부진한 공여자의 세포도 증식을 잘 유도할 수 있는 것을 확인하였다.

[0074] 실시예 3 : 인-비트로(in-vitro) 세포생존률

[0075] 인-비트로(*in-vitro*) 세포생존율을 비교, 평가하기 위하여 세포내 핵과 결합할 수 있는 PI 염색액을 사용하는 세포계수기(Cell counter)중에 하나인 ADAM 세포계수기 시스템을 사용하였다. 측정된 총 세포수에서 사멸 세포수를 감하여 생존 세포수를 계산한 후 다음 식을 이용하여 세포생존율(Cell viability)을 계산하였다.

[0076]
$$\text{세포생존율 (\%)} = (\text{생존 세포수} / \text{총 세포수}) \times 100$$

[0077] 표 1의 조건 1과 조건2(즉, PBMC 원료세포를 대상으로 다양한 지지세포를 활용한 조건의 14일과 21일 배양)로 배양한 후 자연살해세포의 생존율을 측정한 결과, PBMC 지지세포를 사용한 경우 80%미만의 생존율을 보였고 H9과 HuT78은 80% 이상의 생존율을 보여주었다(도 2a, 2b).

[0078] 표 1의 조건 3과 조건4(CD3(+)) T 세포가 제거된 원료세포를 대상으로 다양한 T 지지세포로 14일과 21일 배양)로 배양한 후 자연살해세포의 생존율을 측정한 결과, 모든 조건에서 약 90%이상의 높은 세포생존율을 보여주었다. 이중 증식이 부진한 공여자의 경우 PBMC 지지세포일 때 생존율이 82%였고 HuT78의 경우 93%로 10% 이상의 생존율 차이를 보였다(도 2c, 2d).

[0079] PBMC 및 다양한 T 지지세포를 사용하여 14일 또는 21일 배양한 세포는 전반적으로 PBMC 원료세포 보다 CD3(-) 원료세포에서 생존율이 높게 나타났으며, 지지세포간의 큰차이를 보이지 않았다. 다만, 증식이 부진한 공여자의 경우 PBMC 지지세포보다 HuT78이 약 10%이상 높은 생존율 보여주었다.

[0080] 따라서, 세포 생존율 측면에서 HuT78은 PBMC와 비교하여 자연살해세포를 배양하기 위한 유용한 지지세포임을 확인할 수 있었다.

[0081] 실시예 4 : 인-비트로(in-vitro) 세포 표면형분석

[0082] 실시예 1 및 2에 따른 배양 방법으로 배양된 자연살해세포의 배양 전과 후의 세포를 수거하여 1200 rpm으로 5분간 원심분리하고, 배양액을 흡입(suction)하여 제거하였다. 1 mL의 FACS 버퍼(2.5 % FBS가 포함된 PBS)로 희석하여 세포 수를 측정하고, 5×10^6 cells/mL이 되도록 FACS 버퍼로 희석하였다. 5 mL FACS 튜브 (Falcon, 35205 2)에 희석한 세포 용액을 100 L씩 넣고, 다음과 같은 항체로 표현형을 분석하였다.

[0083] 튜브 1: 항-인간(anti-human) CD3-FITC (BD Pharmingen, 555332), 항-인간 CD16-PE (BD Pharmingen, 555407), 항-인간 CD56-PE-Cy5 (BD Pharmingen, 555517)

[0084] 튜브 2: 항-인간 CD14-FITC (BD Pharmingen, 555397), 항-인간 CD19-PE (BD Pharmingen, 555413), 항-인간 CD3-PE-Cy5 (BD Pharmingen, 555341)

[0085] 튜브 3: 항-인간 CD3-FITC, 항-인간 NKG2A-PE (R&D system, FAB1059P), 항-인간 CD56-PE-Cy5

[0086] 튜브 4: 항-인간 CD3-FITC, 항-인간 NKG2C-PE (R&D system, FAB138P), 항-인간CD56-PE-Cy5

[0087] 튜브 5: 항-인간 CD3-FITC, 항-인간 NKG2D-PE (R&D system, FAB139P), 항-인간 CD56-PE-Cy5

[0088] 튜브 6: 항-인간 CD3-FITC, anti-human NKp30-PE (BD Pharmingen, 558407), 항-인간 CD56-PE-Cy5

[0089] 튜브 7: 항-인간 CD3-FITC, 항-인간 NKp44-PE (BD Pharmingen, 558563), 항-인간CD56-PE-Cy5

[0090] 튜브 8: 항-인간 CD3-FITC, 항-인간 NKp46-PE (BD Pharmingen, 557991), 항-인간 CD56-PE-Cy5

[0091] 튜브 9: 항-인간 CD3-FITC, 항-인간 DNAM-1-PE (BD Pharmingen, 559789), 항-인간CD56-PE-Cy5

[0092] 튜브 10: 항-인간 CD3-FITC, 항-인간 CD25-PE (BD Pharmingen, 555432), 항-인간 CD56-PE-Cy5

[0093] 튜브 11: 항-인간 CD3-FITC, 항-인간 CD62L-PE (eBioscience, 12-0629-42), 항-인간 CD56-PE-Cy5

[0094] 튜브 12: 항-인간 CD3-FITC, 항-인간 CD69-PE (R&D systems, FAB23591P), 항-인간 CD56-PE-Cy5

[0095] 튜브 13: 항-인간 CD3-FITC, 항-인간 CXCR3-PE (BD Pharmingen, 557185), 항-인간 CD56-PE-Cy5

[0096] 튜브 14: 항-인간 CD3-FITC, 항-인간 CD57-PE (BD Pharmingen, 560844), 항-인간 CD56-PE-Cy5

[0097] 튜브 15: 항-인간 CD3-FITC, PE 마우스 IgG1 k 아이소토프 컨트롤 (BD Pharmingen, 555749), 항-인간 CD56-PE-

Cy5

- [0098] 튜브 16: FITC 마우스 IgG1 k 아이소토프 컨트롤 (BD Pharmingen, 555748), PE 마우스 IgG1 k 아이소토프 컨트롤 (BD Pharmingen, 555749), PE-Cy5 마우스 IgG1 k 아이소토프 컨트롤 (BD Pharmingen)
- [0099] 상기 튜브들을 30분간 냉장 온도에서 염색한 후, 염색이 끝난 세포에 2 mL FACS 버퍼를 넣고, 1500 rpm으로 5분간 원심 분리하였다. 상층액을 제거하고 다시 2 mL FACS 버퍼를 넣고 1500 rpm으로 5분간 원심 분리하였다. 다시 상층액을 제거하고, 300 μ L FACS 버퍼를 넣어 현탁한 후 FACS LSRII Fortessa (Becton Dickinson)를 이용하여 표현형을 분석하여, 세포의 확인 및 순도를 조사하였다. 확인은 CD3(-)CD56(+) 세포와 CD16(+)/CD56(+) 세포의 함량으로 표시하였고 순도 측정은 CD3(+)는 T 세포, CD14(+)는 단세포(monocyte), CD19(+)는 B 세포로 측정하였다.
- [0100] 4-1: 세포 확인 및 순도
- [0101] 표1의 조건 1과 2로 배양한 자연살해세포의 확인 및 순도를 분석한 결과, PBMC 원료세포를 다양한 지지세포로 14일간 배양 후 자연살해세포의 함량을 평가한 경우에는 PBMC 15.9%, H9 73.3%, HuT78 83.3%였고, 21일 배양 후에 평가한 경우에는 PBMC 17.4%, H9 61.1%, HuT78 83.5%였다(도 3a, 3b). 이로써, T 세포를 포함하는 PBMC를 원료세포로 사용할 때 PBMC 지지세포의 경우 T 세포들이 80%이상 증식한 반면, H9과 HuT78의 경우 T 세포가 아닌 자연살해세포가 선별적으로 증식됨을 확인할 수 있었다. 특히 HuT78의 경우 80%이상의 높은 자연살해세포 함량을 보여주었다.
- [0102] 표1의 조건 3과 4로 배양한 자연살해세포의 확인 및 순도를 분석한 결과, 두 조건 모두 T 세포가 제거된 CD3(-) 원료세포를 사용하기 때문에 모든 종류의 지지세포에 대해 95% 이상의 높은 자연살해세포 함량을 보였으며, T 세포, 단세포, B 세포의 함량이 모두 1% 이하로 측정되었다(도 3c, 3d).
- [0103] 또한, 표1의 조건 3으로 배양한 증식이 부진한 공여자인 경우, PBMC 지지세포로 배양시 HuT78에 비해 자연살해세포 순도가 약 4% 정도 떨어지고 CD16의 발현도 약 16% 정도 감소되는 것을 확인하였다(도 3e). 따라서 CD4를 발현하는 T 세포는 자연살해세포만을 선택적으로 증식시킬 수 있으며, 공여자에 따른 자연살해세포 배양 차이도 상당히 개선될 수 있음을 확인할 수 있었다.
- [0104] 4-2: 세포 발현 마커
- [0105] 세포의 종류 확인 및 순도 이외에 지지세포에 따라 차이가 나타나는 대표적인 자연살해세포의 수용체(receptors) 발현을 분석하였다.
- [0106] 표1의 조건 1로 배양 후 자연살해세포의 세포 표현형을 분석한 결과, NKp44, NKp46 그리고 CD69에 대해 배양 조건에 따른 표현형의 차이가 관찰되었다(도 4a).
- [0107] 또한, 표1의 조건 3으로 배양 후 자연살해세포의 세포 표현형을 분석한 결과, NKp44와 NKp46은 PBMC보다 H9과 HuT78로 배양시 발현이 증가했고 CD69의 경우 PBMC와 HuT78에서는 비슷하게 발현되지만 H9으로 배양시 높아지는 것을 확인하였다(도 4b).
- [0108] 따라서, 원료세포의 타입에 따라 세포 표현형의 발현 차이가 나타나지만, NKp44와 NKp46 같은 자연살해세포 활성 마커들이 PBMC 지지세포보다 T 지지세포로 배양시 발현이 현저히 증가하는 경향을 보여주었다. 이 마커들은 자연살해세포의 활성화에 있어 중요한 인자들로 PBMC 지지세포로 배양하는 것보다 T 지지세포로 배양하는 경우 높은 효능을 기대할 수 있음을 나타낸다.
- [0109] **실시예 5 : 다양한 종양 세포주에 대한 인-비트로(in-vitro) 세포살상능**
- [0110] 타겟 종양 세포주(K562, HuT78, HuH-7 등) 1×10^6 개의 세포를 15 mL 튜브에 담아 원심 분리 후, 세포 펠렛을 1 mL의 RPMI1640-10% FBS 배지로 현탁한 뒤 1 mM의 Calcein-AM(Molecular probe, C34852)을 30 μ L 넣은 다음은 박지로 빛을 차단하여 37°C 인큐베이터에서 한 시간 동안 염색했다. Calcein-AM 염색이 끝난 종양 세포주는 10~15 mL의 RPMI1640-10% FBS 배지를 넣어 세척하고 원심 분리한 뒤 펠렛을 10 mL의 RPMI 배지로 현탁하여

1×10^5 cells/mL의 농도가 되도록 하였다.

- [0111] 자연살해세포는 3×10^6 개를 15 mL 튜브에 담아 원심분리하고, 펠렛을 타겟 종양 세포주에 대비하여 원하는 비율로 RPMI1640-10% FBS 배지에 현탁하였다. 준비된 타겟 종양 세포주와 자연살해 세포주를 둥근 바닥 96-웰 플레이트(well plate)에 100 μ L씩 섞어서 분주하고, 각 웰을 3 개씩(triplicate) 준비하여 평균값을 얻었다. 스판(Spontaneous release) 웰(well)에는 염색된 종양 세포주를 100 μ L씩 넣고 RPMI1640-10% FBS 배지를 100 μ L씩 넣어준다. 맥스(Maximum release) 웰(well)에는 염색된 종양 세포주를 100 μ L씩 넣고 2% Triton-X 100 용액을 100 μ L씩 넣어준다. RPMI1640-10% FBS 배지 및 2% Triton-X 100 용액에 존재하는 자가 형광값을 보정하기 위해 RPMI1640-10% FBS 배지 200 μ L를 넣어 배지값을 준비하고, RPMI 1640-10% FBS 배지 100 μ L에 2% Triton-X 100 솔루션 100 μ L를 넣어 두 용액의 혼합액의 값을 준비한다. 배지값에서 혼합액의 값을 뺀 차(A)를 맥스(Maximum release)값에 더하여 자가 형광값을 보정하였다.
- [0112] 빛을 차단하여 37°C 인큐베이터에서 4시간 동안 반응 시킨 후, 플레이트를 2000 rpm에서 3 분간 원심 분리했다. 상층액을 96 웰 블랙 플레이트(96 well black plate)에 100 μ L씩 담아내고 형광 플레이트 리더기 (Perkin Elmer, VICTOR X3)를 이용하여 형광값 (OD_{480/535 nm})을 측정하고, 자연살해세포의 종양 세포살상능은 다음과 같이 계산했다.
- [0113] % of killing = (Sample well 평균 형광값 - Spon well 평균 형광값) / {(Max well 평균 형광값 + A) - Spon well 평균형광값} x 100
- [0114] 다양한 지지세포로 배양된 자연살해세포들을 다양한 종양세포주와 반응시켜 직접적인 세포살상능을 측정하였다.
- [0115] 표1의 조건1 (PBMC 원료세포에 다양한 지지세포로 14일 간 배양)로 배양한 자연살해세포의 세포살상능 측정은, 혈액암 세포주 K562, 간암 세포주 HuH-7, 림포마 세포주 HuT78, 뇌종양 세포주 U87-MG, 망막모세포종 세포주 SNUOT-Rb1, 신경모세포종 세포주 SK-N-SH, 난소암 세포주 OVCAR-3를 대상으로 평가하였다. 그 결과, 모든 종양 타겟에 대해 H9과 HuT78로 배양한 경우 PBMC 지지세포로 배양한 경우보다 높은 세포살상능을 나타냈다(도 5a).
- [0116] 표1의 조건2 (PBMC 원료세포를 21일 배양)로 배양한 자연살해세포의 세포살상능을 측정한 결과, K562 종양 세포주에 대해 HuT78>H9>PBMC 순으로 세포살상능을 나타냈다(도 5b).
- [0117] 또한, 표1의 조건3 (CD3(-) 원료세포에 다양한 지지세포로 14일 간 배양)으로 배양한 자연살해세포의 세포살상능 측정은, 혈액암 세포주 K562, 간암 세포주 HuH-7, 림포마 세포주 HuT78, 뇌종양 세포주 U87-MG, 망막모세포종 세포주 SNUOT-Rb1, 신경모세포종 세포주 SK-N-SH, 난소암 세포주 OVCAR-3를 대상으로 평가하였다. 그 결과, K562를 제외한 대부분의 종양 타겟에 대해 H9과 HuT78로 배양한 경우 PBMC 지지세포로 배양한 경우보다 높은 세포살상능을 나타냈으며, 특히 자연살해세포의 살상능에 저항성을 가지는 암세포일수록 그 차이가 크게 나타났다(도 5c).
- [0118] 표1의 조건4 (CD3(-) 원료세포를 21일 배양)로 배양한 자연살해세포의 세포살상능을 측정한 결과, K562 종양 세포주에 대한 세포살상능이 지지세포의 종류와 상관없이 비슷한 수준으로 나타났다(도 5d). 이는 원료세포를 1차 자극시 동일하게 PBMC를 사용하고, 2차 자극시에만 PBMC와 다양한 T 세포를 사용함에 따라 지지세포에 따른 특이성이 크게 나타나지 않은 것으로 보여진다.
- [0119] 표1의 조건 3으로 배양한 증식이 부진한 공여자인 경우의 자연살해세포의 세포살상능 결과는, K562 종양 세포주에 대해 HuT78이 가장 높은 살상능을 보였고 H9과 PBMC 지지세포의 경우 비슷한 수준의 값을 나타냈다(도 5e).
- [0120] 따라서, HuT78의 경우 대부분의 조건에서 다양한 종양세포주를 대상으로 가장 높은 세포살상능을 보여주었다. 특히, H9과 HuT78로 배양된 자연살해세포는 저항성을 보이는 종양세포주에서 보다 높은 살해능을 보여줌으로써 PBMC보다 효능 측면에서 우수한 지지세포임을 확인할 수 있었다.
- [0121] 조건 1, 2, 3 및 4에서 배양한 자연살해세포의 특성을 표로 요약하였다.

표 2

조건 1로 배양한 자연살해 세포의 특성

	Mean (SD)				
	Expansion fold TNC	Expansion fold NK	Viability	% of CD3-CD56+	% of Cytotoxicity against K562 E:T ratio = 3:1
PBMC	147 (62)	272 (180)	77% (0)	15.9% (12.5)	41.5% (13.5)
H9	298 (108)	2752 (386)	83% (2)	73.3% (7.0)	58.7% (5.9)
HuT78	485 (31)	5649 (2966)	87% (1)	83.3% (0.5)	56.2% (3.9)

[0122]

표 3

조건 2로 배양한 자연살해 세포의 특성

	Mean (SD)				
	Expansion fold TNC	Expansion fold NK	Viability	% of CD3-CD56+	% of Cytotoxicity against K562 E:T ratio = 3:1
PBMC	334 (183)	1257 (1498)	76% (2)	17.4% (9.1)	26.0% (8.7)
H9	358 (60)	2677 (268)	72% (3)	61.1% (12.9)	59.4% (11.8)
HuT78	2282 (509)	29455 (21088)	87% (5)	83.5% (2.8)	80.3% (6.2)

[0123]

표 4

조건 3으로 배양한 자연살해 세포의 특성

	Mean (SD)			
	Expansion fold TNC	Viability	% of CD3-CD56+	% of Cytotoxicity against K562 E:T ratio = 3:1
PBMC	184 (81)	92% (2)	99.3% (0.4)	84.2% (4.0)
H9	62 (24)	90% (1)	99.5% (0.4)	81.9% (2.8)
HuT78	217 (1)	91% (2)	99.8% (0.1)	81.9% (2.8)

[0124]

표 5

조건 4로 배양한 자연살해 세포의 특성

	Mean (SD)			
	Expansion fold TNC	Viability	% of CD3-CD56+	% of Cytotoxicity against K562 E:T ratio = 3:1
PBMC	1402 (506)	91% (4)	99.5% (0.3)	87.0% (2.4)
H9	720 (288)	88% (4)	99.6% (0.3)	85.2% (6.0)
HuT78	1393 (161)	91% (5)	99.8% (0.1)	85.3% (4.1)

[0125]

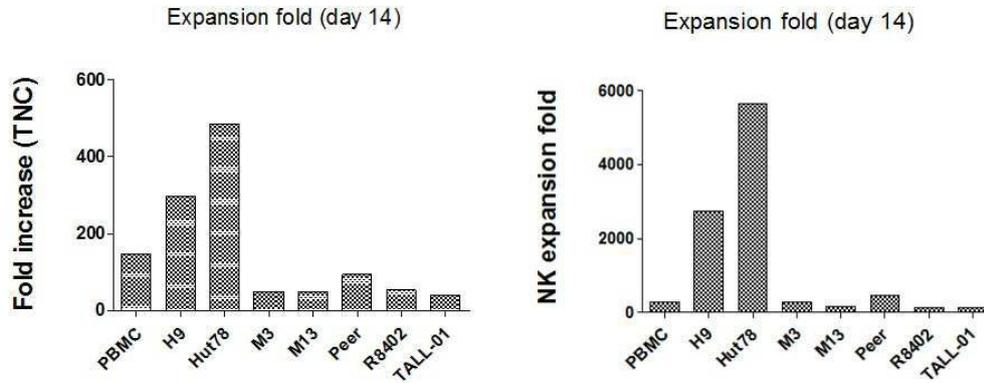
[0126]

이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시태양일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고

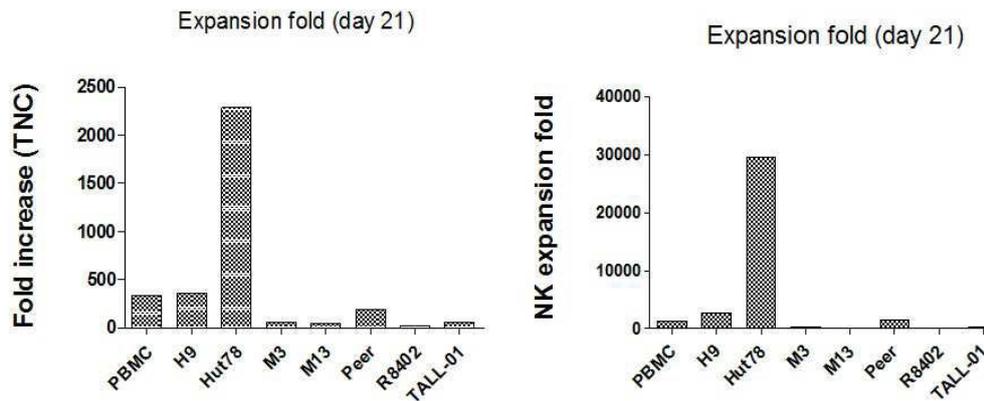
할 것이다.

도면

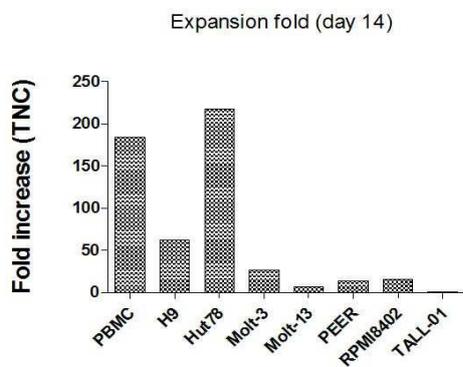
도면1a



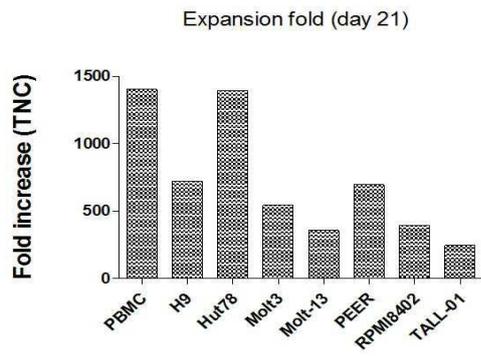
도면1b



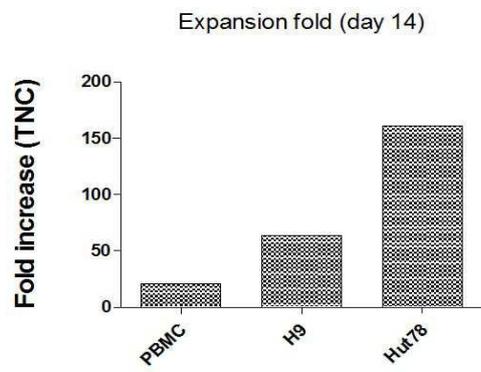
도면1c



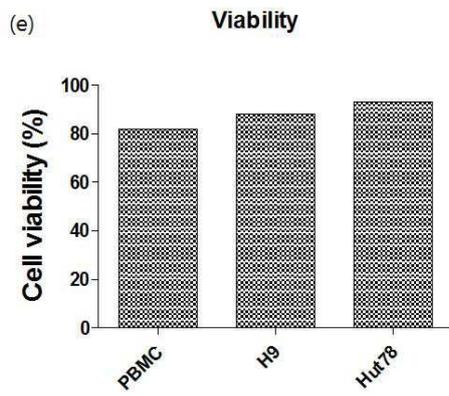
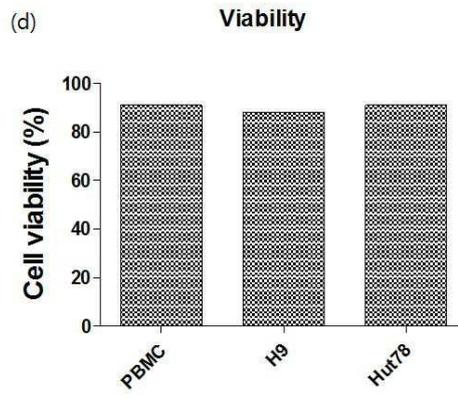
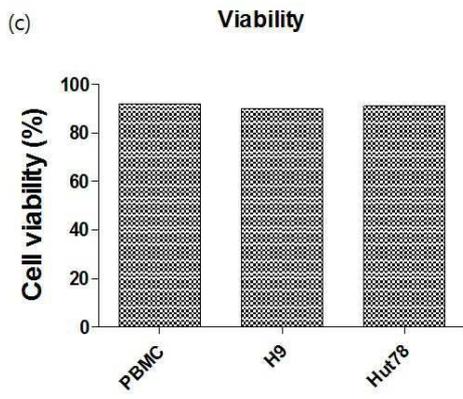
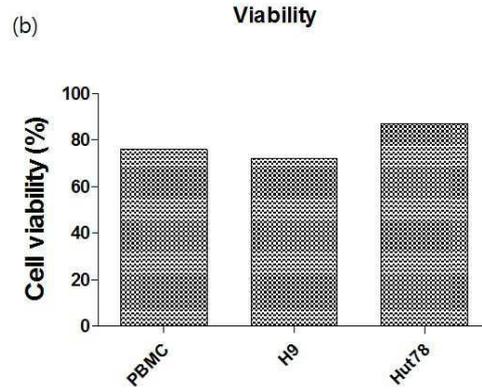
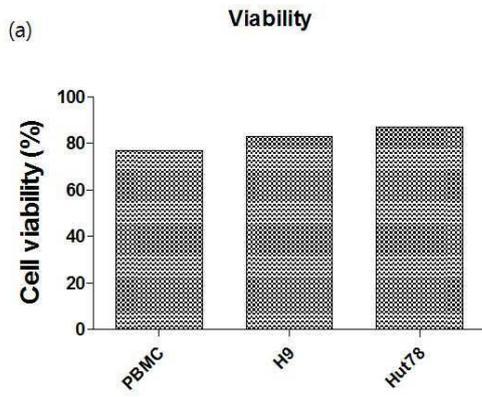
도면1d



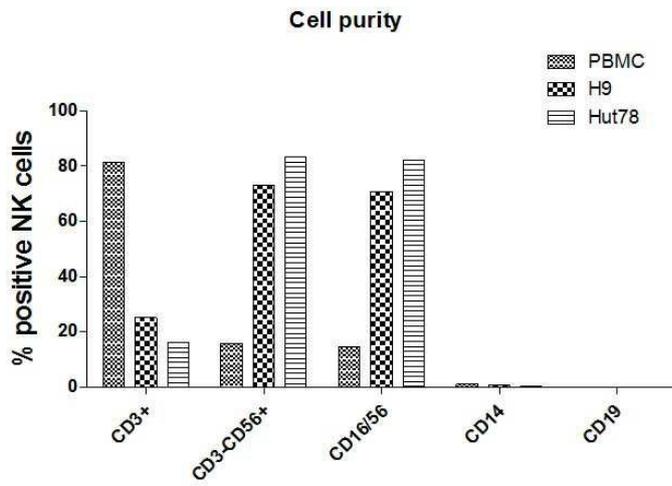
도면1e



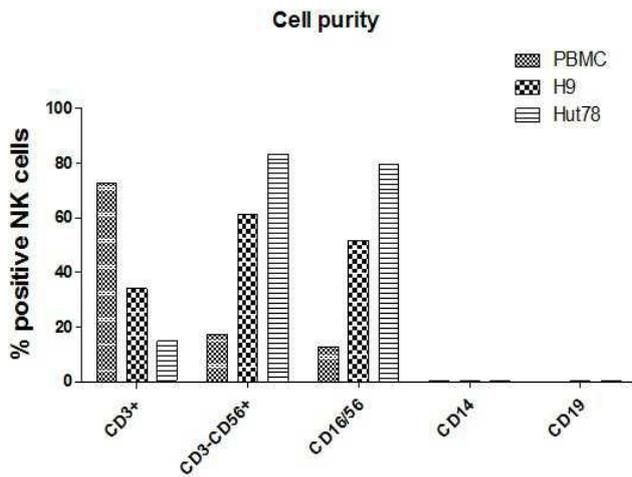
도면2



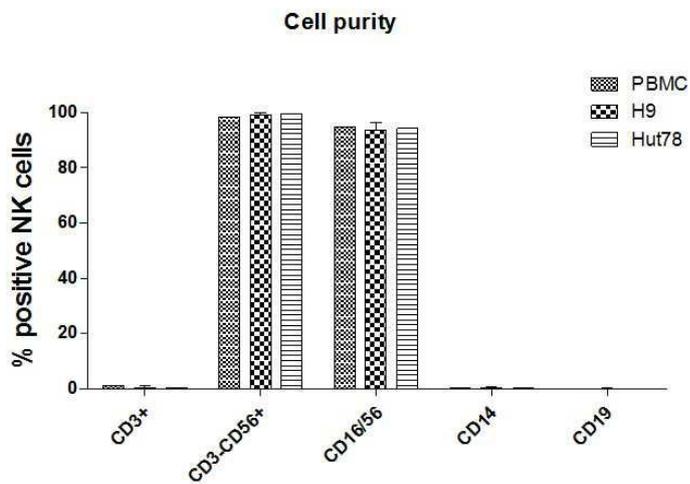
도면3a



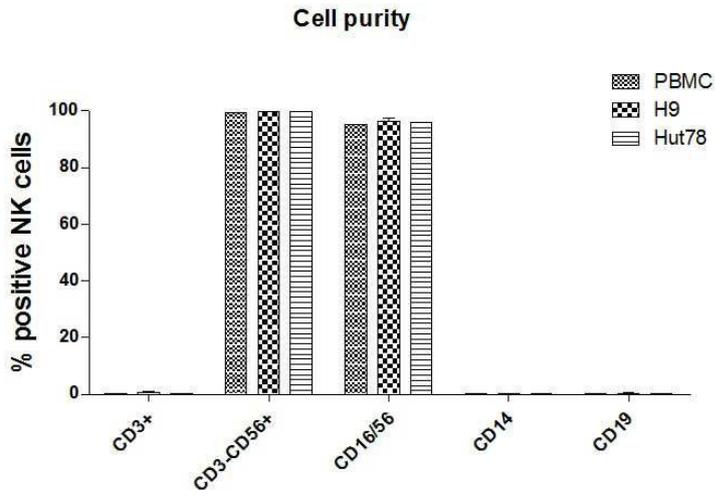
도면3b



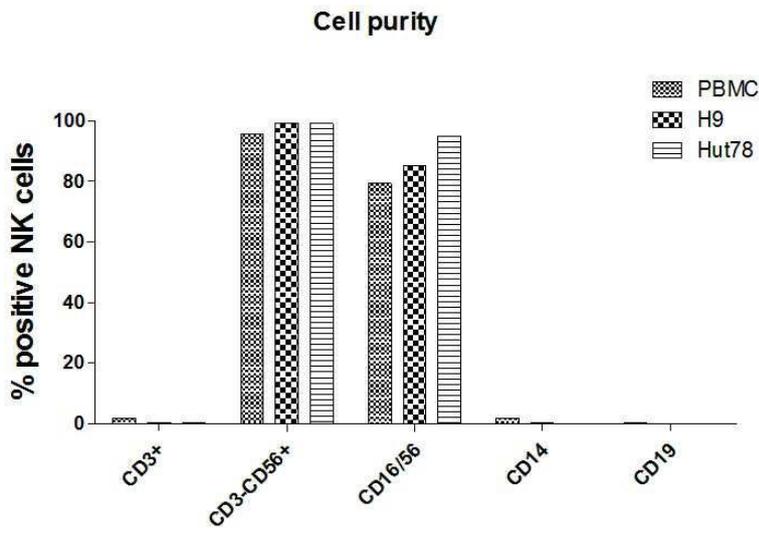
도면3c



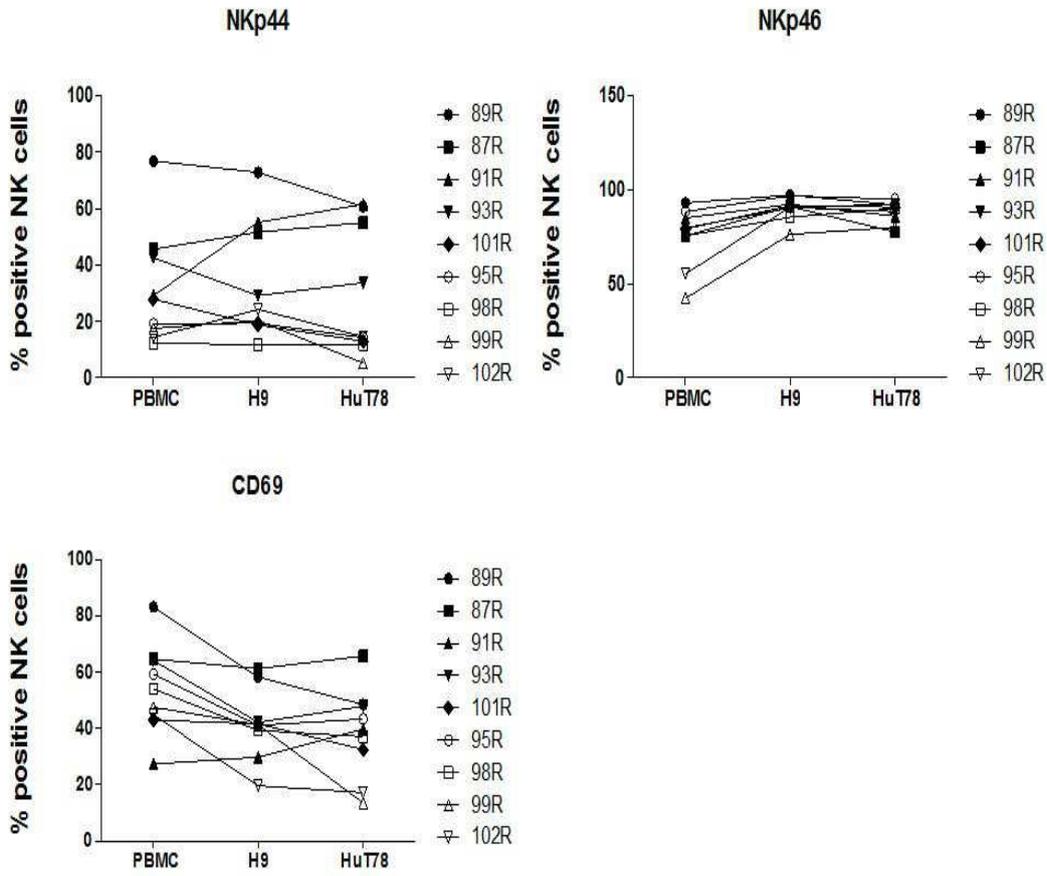
도면3d



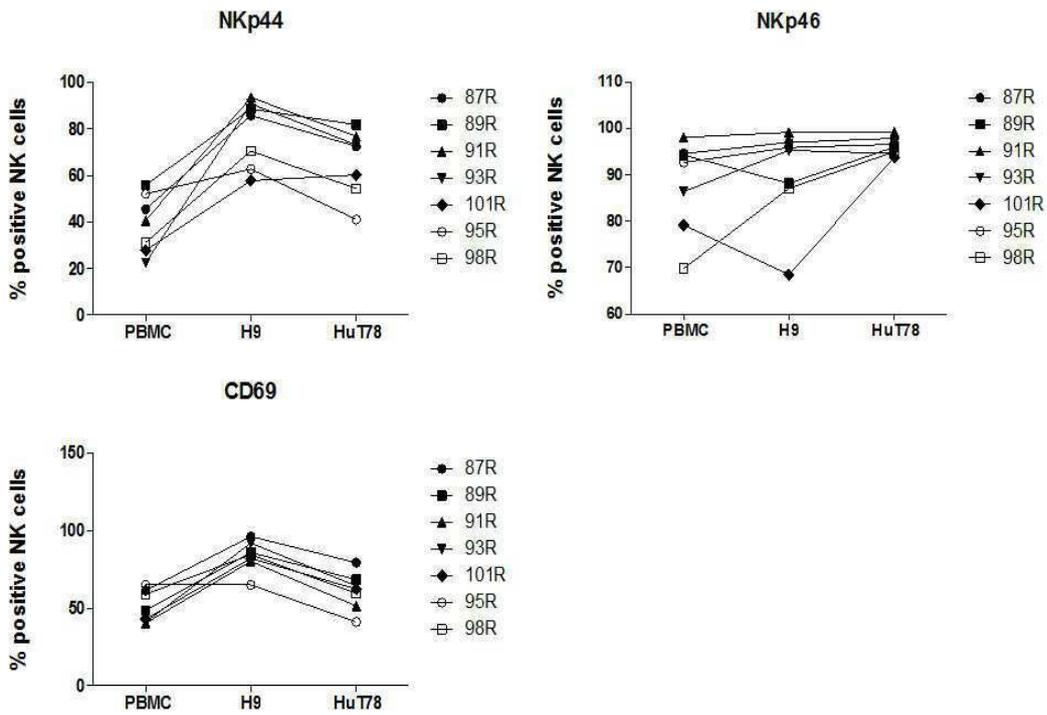
도면3e



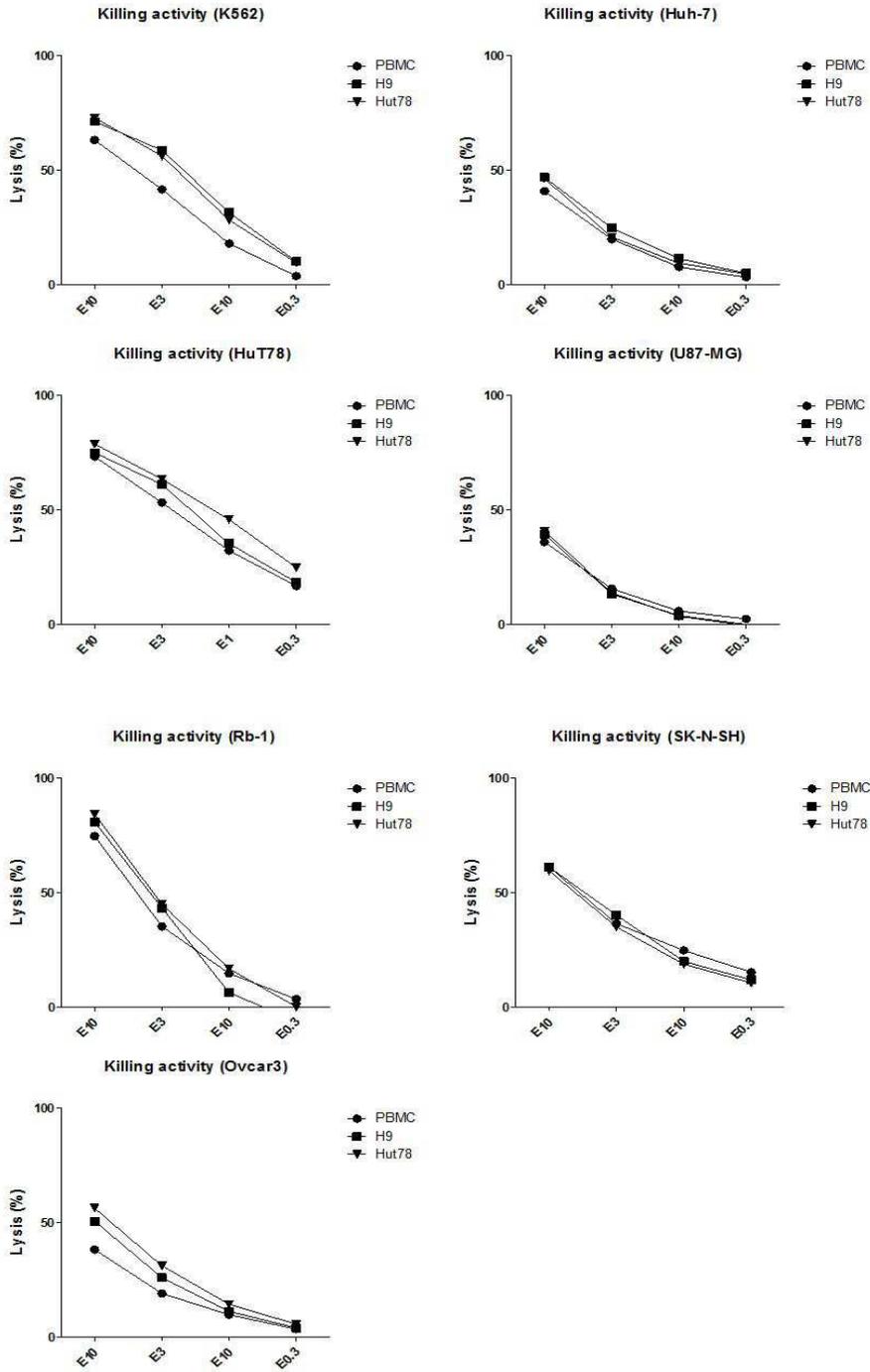
도면4a



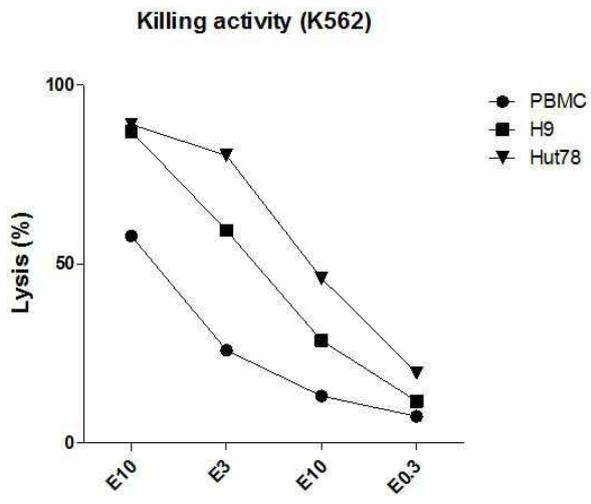
도면4b



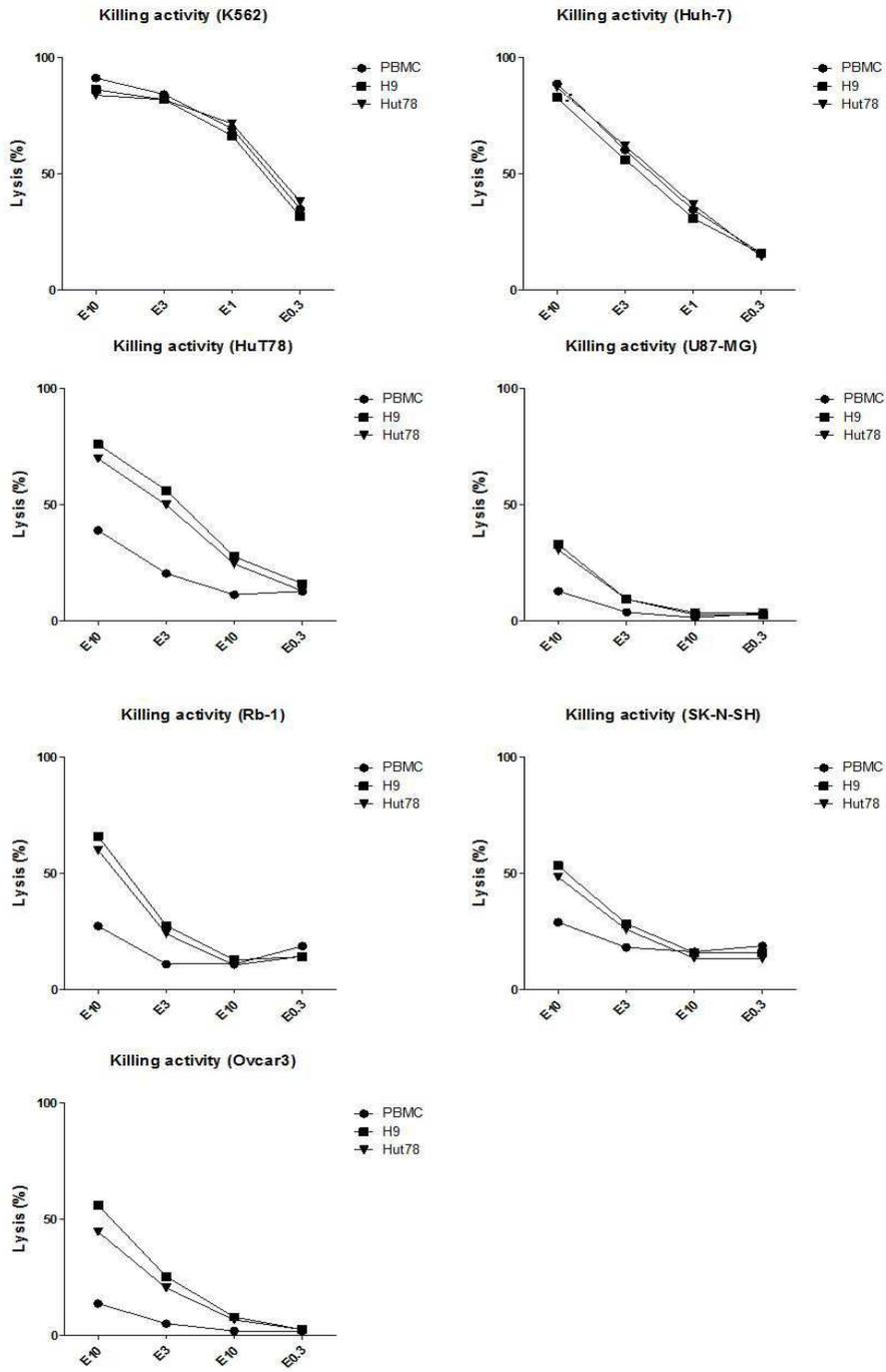
도면5a



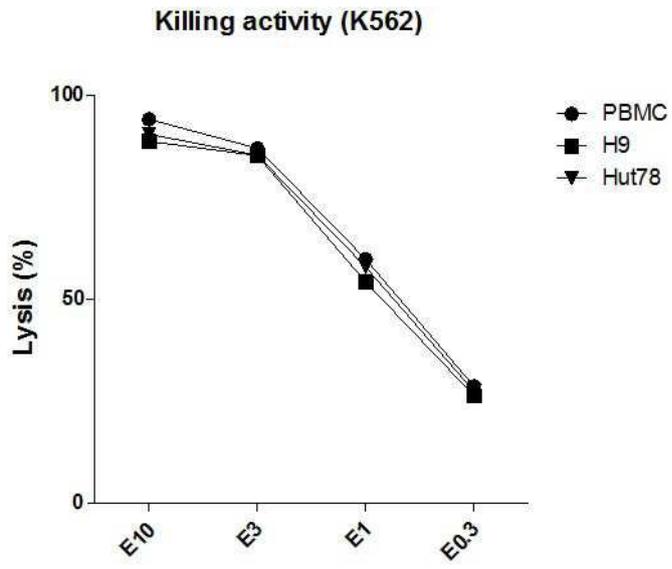
도면5b



도면5c



도면5d



도면5e

