

발간등록번호

11-1543000-000987-01

체외 대량 증폭시킨 개 NK세포를 이용한 동종  
암면역세포치료제 개발  
(Development of allogeneic NK cell-based immunotherapy  
against cancers in dogs)

공주대학교

농림축산식품부

## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “체외 대량 증폭시킨 개 NK세포를 이용한 동종 암면역세포치료제 개발” 과제 (세부과제 “체외 대량 증폭시킨 개 NK세포를 이용한 동종 암면역세포치료제 개발에 관한 연구”)의 보고서로 제출합니다.

2015년 09월 20일

주관연구기관명 : 공주대학교

주관연구책임자 : 김 상 기

세부연구책임자 : 김 상 기

연 구 원 : 신 동 준

연 구 원 : 이 윤 경

연 구 원 : 이 수 현

연 구 원 : 김 요 섭

# 요 약 문

I. 제 목 : 체외 대량 증폭시킨 개 NK세포를 이용한 동종 암면역세포치료제 개발

## II. 연구성과 목표 대비 실적

- 연구개발과제 진행 결과 2건의 특허등록 (등록번호: 10-14993451, 10-1440915)을 완료하였으며, 1건의 기술이전을 완료하였고, 1건의 추가적인 기술이전을 협의 중 (개 자연살해세포 체외 증폭배지 및 이를 이용한 개 자연살해세포 체외 배양방법) 이며, 4편의 논문을 SCI 국제학술지에 게재 완료하였음.
- 추가적으로 3편의 논문 (체외 대량 증폭된 NK세포의 냉동 보관 및 냉동에 의해 현저히 저하된 NK세포의 항암 기능을 회복 방법, 재조합 개 IL-15의 생체 투여 후 안전성 및 면역학적 효능, 개 NK세포 표현형의 특성) 은 SCI국제학술지에 투고 준비가 거의 마무리되고 있으며, NK세포의 임상적 적용에 대한 Data 보완 후 2편~3편의 논문을 추가적으로 더 게재할 예정임.
- 종합하여 지금까지 연구과제 수행을 통해 달성한 성과는 특허등록 2건 국제학술논문 4편 게재 완료 및 5편 추가 게재예정, 기술이전완료 1건, 추가 기술이전 계획 1건으로 애초 계획하였던 성과 목표 (특허출원 2건, 특허등록 1건, SCI논문 4편, 비 SCI논문 1편)를 월등히 초과하여 달성하였음.

## III. 연구개발의 목적 및 필요성

- 의학과 수의학 분야에서 일반적으로 사용되는 외과적 수술, 항암 화학요법 및 방사선치료의 세 가지 암치료법은 완치율이 낮을 뿐만 아니라 부작용이 심하고, 재발률이 높다는 문제점이 있어 세계적으로 암 정복을 위해 차세대의 새로운 치료제 개발이 요구되고 있음. 본 연구과제에서는 강력한 차세대의 암 치료제를 개발하기 위하여 체외에서 대량으로 증폭시킨 강력한 항암 기능을 갖는 개 NK세포를 이용한 동종 면역세포치료제를 개발하고, 동종면역세포요법의 안전성을 확인하기 위한 면역 monitoring방법을 확립하는 한편, 개 NK세포의 암세포에 대한 세포독성 능력을 강화시켜 암 치료 효과를 극대화시킬 수 있는 동종 개 NK세포를 이용한 암면역세포치료제를 개발함으로써 산업화의 기틀을 마련하기 위하여 수행되었음.

## IV. 연구개발 내용 및 범위

- 본 연구과제에서는 체외 증폭된 강력한 항암기능을 갖는 개 NK세포를 이용한 동종의 입양 면역세포치료요법 확립을 위한 임상용 large scale NK세포 증폭시스템 개발과 생체 주입된 NK세포 모니터링 용 chimera 검출법 및 면역 모니터링 방법 개발 확립하고, 이를 토대로 공혈개의 말초혈액에서 분리한 단핵세포 (PBMCs)에서 NK세포만을 선택적으로 체외 증폭시킨 후 T세포를 제거하지 않은 동종 NK세포를 환견의 체내 주입 후 GVHD 발생 등 안전성 확인 및 동종 NK세포를 이용한 입양면역치료요법 확립하였으며, 체외 증폭된 강력한 개 NK세포와 방사선치료의 병합요법을 이용한 개 난치성 악성 종양에 대한 면역세포치료제 개발함.

## V. 연구개발결과

- 본 연구에서는 실제 임상에 적용하기 위해 대량의 세포를 한꺼번에 증폭시킬 수 있는 대량 증폭을 위한 large scale NK세포 증폭 system을 확립하였고,

○ NK세포의 수명을 연장하고 NK세포의 증식을 활성화시키기 위하여 rcIL-21을 이용한 개 NK세포 체외 증폭배지의 조성을 확립하고 이를 이용한 강력한 NK세포 체외 배양방법을 확립하였으며 (**특허등록 완료, 등록번호: 10-14993451, 발명의 명칭: 개 자연살해세포 체외 증폭배지 및 이를 이용한 개 자연살해세포 체외 배양방법**),

○ rcIL-21의 시간차 자극을 통해 실제 임상에 사용할 수 있는 수준으로 개 NK세포의 체외 증폭 효율 및 암세포살상 능력을 향상시킬 수 있음을 입증하였으며, 그 결과를 수의학분야 상위 10% 이내의 SCI 국제학술지에 게재하였음 (Interleukin-21 induces proliferation and modulates receptorexpression and effector function in canine natural killer cells, **Vet Immunol Immunopathol 165:22-33**) .

○ 동종 NK세포의 실제 임상적 활용을 용이할 수 있도록 할 목적으로 체외 대량 증폭된 NK세포의 냉동 보관방법 및 냉동 보관을 위한 배지의 조성을 확립하였으며, 냉동 보관 후 NK세포를 치료제로 주입하기 위해 해동 시 냉동에 의해 현저히 저하된 NK세포의 항암 기능을 회복시키기 위한 방법을 확립하였음 (연구원 김주선 **석사학위논문**, 논문제목: Comparison of different media for cryopreservation of peripheral blood mononuclear cells and expanded Natural Killer cells, SCI 국제학술지 투고 준비중).

○ 이와 아울러 NK세포의 대용량 증폭을 용이하게 수행하기 위하여 방사선조사 후 냉동 보관한 feeder cell을 이용한 신선한 feeder 세포와 동등한 정도의 NK세포 증폭 조건을 확립하여 그 결과를 SCI 국제학술지에 게재하였음 (**Anticancer Research 2013;33(5):2011-9**).

○ 환자에 주사된 동종 NK세포의 생체 내 생착 여부 및 주사 후 생존기간에 대한 평가를 위한 chimera 검출법을 확립하였으며, 체외 증폭된 개 NK세포 주입 후 항암 효과 및 효능 평가를 위한 immune monitoring 방법을 확립하였음.

○ 생체내에서 NK 세포의 분화를 촉진하여 개 말초혈액 내 NK세포의 수를 증가시켜 체외 증폭효율을 극대화시킴과 아울러, 주사된 동종 NK세포의 암세포 살상기능을 최적화시키기 위한 면역증강제로 재조합 개 Interleukin-15의 정제 생산기술을 개발 확립하였으며 (**특허등록 완료, 등록번호: 10-1440915, 발명의 명칭: 개 인터루킨-15 체외 증폭용 프라이머 세트, 이의 용도 및 이를 이용한 재조합 개 인터루킨-15 제조방법**),

○ 동종 NK세포를 이용한 암치료제의 효율을 극대화시키기 위한 재조합 개 Interleukin-15의 생산기술의 사업화를 위해 최근 이 기술을 (주)박셀바이오에 **기술이전을 실시하였음**.

○ 정제 생산된 재조합 개 Interleukin-15 (rcIL-15)가 효율적으로 개 NK세포의 체외 증폭을 유도할 뿐만 아니라 체내 주입 후 면역기능을 향상시킴을 확인하여, 그 결과들을 SCI 국제학술지에 게재하였음 (Generation of recombinant canine interleukin-15 and evaluation of its effects on the proliferation and function of canine NK cells. **Vet Immunol Immunopathol 165:1-13**).

○ 이와 아울러 정제된 rcIL-15를 주사한 개체의 안전성 평가에서 전혀 부작용 없이 말초혈액 내 NK세포의 개체 수와 이들의 항암능력을 현저히 증가시킴을 확인하여 이 결과를 **SCI 국제학술지에 투고할 준비 중에 있음**.

○ 개 NK세포와 관련되어 세계적으로 지금까지 논란의 대상이 되고 있는 개 NK세포 표현형 (phenotype)의 특성에 관하여 본 연구의 1차년도와 2차년도 연구 수행 과정에서 처음으로 밝혀내 유수한 **SCI 국제학술지에 투고 준비중임** - 이 결과는 동종 개 NK세포를 이용한 암면역세포치료제 상업화를 위한 임상시험 승인을 위해 매우 중대한 결과임.

○ 체외 증폭된 동종 NK 세포 주사 후 GVHD 등 중요한 부작용 발생 여부를 확인하여 동종 NK세포 주사의 안전성을 입증하였고, 임상시험을 통한 암치료시 주사된 NK세포의 수여자 내 안정적인

생착을 위한 효과적인 면역억제 (특히 lymphocyte의 제거) 방법을 확립하였으며, 이를 통해 면역억제 후 동종 NK세포의 주사 적기, 반복 주입 횟수, 간격 및 주입 세포 수를 결정하였음 (**data 보완 후 투고 예정**).

○ 이와 아울러 체외 증폭시킨 개 NK세포가 개 디스템퍼바이러스 (CDV)의 증식을 강력히 억제하고 바이러스에 감염된 세포를 파괴시키는 것으로 나타나 증폭된 NK세포를 바이러스감염 치료에도 사용할 수 있음이 증명되어 이 결과를 수의학분야 상위 5%이내의 SCI 국제학술지에 게재하였음 (The anti-canine distemper virus activities of ex vivo-expanded canine natural killer cells. **Vet Microbiol 176:239-249**).

○ 체외 증폭된 동종 NK세포의 암치료 효과를 확인하기 위해 악성 종양에 이환된 8마리의 개체에 면역억제 후 동종 NK세포를 1주일 간격으로 총 6회 정맥주사 ( $1 \times 10^9$ 개 NK세포/마리/회)한 다음 5개월간 주기적으로 방사선 사진과 PET-CT를 촬영하여 종양의 변화양상을 확인함으로써 치료효과를 판정하였으며, 8마리 중 2마리에서 괄목할만한 치료 효과가 있음을 확인하였음. 이를 통해 암 치료 효과를 위한 대량 증폭된 동종 NK세포 투여 protocol (투여 세포수, 투여 경로, 투여간격)을 확립하였음. 장기간 추적조사를 위해 지속적으로 관찰 예정임 (**data 보완 후 투고 예정**).

○ 동종 NK세포에 대한 표적 암세포의 면역원성을 높이기 위한 방사선치료 선량 및 protocol 확립하고, 치료효과 극대화를 위한 cytokine (IL-15, IL-2, IL-21) 투여 protocol 및 화학요법제와의 병합 요법 확립하였고,

○ 방사선치료의 선량 및 화학요법제 병합에 따라 유도된 암세포 표면의 NK 세포 활성수용체에 대한 ligands와 chemokine 수용체 ligands 발현 변화 분석을 통한 암종 별 적정 조사선량 및 화학요법제와의 병합치료 조건 확립 및 방사선치료 및 화학요법제 치료 전후 암세포에 대한 NK세포의 세포독성능 등 기능 비교 분석을 통한 동종 NK세포에 대한 표적 암세포의 면역원성을 높이기 위한 최적의 병합요법 조건 확립하는 등

○ 체외 증폭된 동종 NK세포의 암치료 효과를 극대화하기 위한 방사선치료, 재조합사이토카인 및 화학요법과의 병합치료요법 개발을 완료하여 **data 보완 후 투고예정**임.

## VI. 연구성과 및 성과활용 계획

본 연구개발을 통해 확립한 개 NK세포의 체외 증폭방법 및 이를 이용한 면역세포치료 기술을 참여 기업에 이전함으로써 종양이나 바이러스질환 치료를 위한 면역세포치료제의 제품화 및 상품화를 앞당기기 위해 활용될 것임. 개는 질병연구에 많이 사용되는 실험용 쥐 등의 설치류에 비해 생리적으로 사람과 매우 유사하며, 개에서 다양한 종류의 질환이 사람의 질병과 매우 흡사하기 때문에 본 연구과제를 통해 도출한 연구성과를 사람의 면역세포치료제 개발 및 효과적인 면역세포치료요법 확립하는데 활용될 것임. 본 연구 개발을 통해 도출된 결과물에 대한 특허 등의 지적재산권은 국가적 핵심기술인 암 치료를 위한 신약개발 분야의 국가 경쟁력을 높이는데 활용될 계획임.

## SUMMARY

Natural killer (NK) cells are lymphocytes of the innate immune system that are responsible for eradication of cancer cells and virus-infected cells. Adoptive transfer of NK cells to cancer patients is an attractive therapeutic approach, because NK cells have powerful anti-tumor activity without the side effect of graft versus host disease (GVHD). One of the major issues in the development of NK cell therapy is the low numbers of NK cells that can be obtained from donor blood, since successful NK cell immunotherapies require an adequate number of NK cells with strong effector function. In this study, we developed the techniques for large scale *ex vivo* expansion of canine NK cells to facilitate adoptive transfer for cancer immunotherapy. We also established the cryopreservation technique using a new xeno-free cryopreserve-media containing DMSO and anhydrous dextrose, and the method for restoration activity of cryopreserved expanded NK cells after thawing. The chimera assay for immune monitoring is developed to confirm the safety and anticancer effect of allogeneic NK cells after infusion. The results of this study strongly suggest that the adoptive transfer of allogeneic NK cells to cancer patients in the context of radiation therapy, or following lymphocyte depleting chemotherapy have provided encouraging results without the side effect of graft versus host disease (GVHD).

## CONTENTS

- Chapter 1 Overview of Research and Development and Performance Goals
- Chapter 2 Development Status of the Technique
- Chapter 3 Informations of the Performance of Research and Development, and the Results of Research and Development
- Chapter 4 Attainment of Performance Goals, and Contributions in the Related Research Areas
- Chapter 5 Results of the Research and Development, and Utilization Plan
- Chapter 6 Implementation Performance of Laboratory Safety Management
- Chapter 7 Reference

## 목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 및 성과목표

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 6 장 연구실 안전관리 이행실적

제 7 장 참고문헌

<별첨 1> 특허, 논문 및 시장분석 보고서

<별첨 2> 연구개발보고서 초록

<별첨 3> 자체평가 의견서

<별첨 4> 연구성과 활용계획서



# 제 1 장 연구개발과제의 개요 및 성과목표

## 1절. 연구개발과제의 개요

### 1. 개발 기술의 개요

#### 가. 암 치료용 항암백신으로서의 동종 NK세포 치료요법 :

○ 선천면역을 담당하는 중요한 면역세포중 하나인 NK세포는 T세포나 수지상세포(dendritic cells)와 달리 특정 항원에 미리 노출되지 않더라도 활성화되면 자발적으로 암세포나 바이러스감염세포 등 비정상세포를 공격하여 사멸시키는 항암, 항바이러스 작용을 하는 세포임.

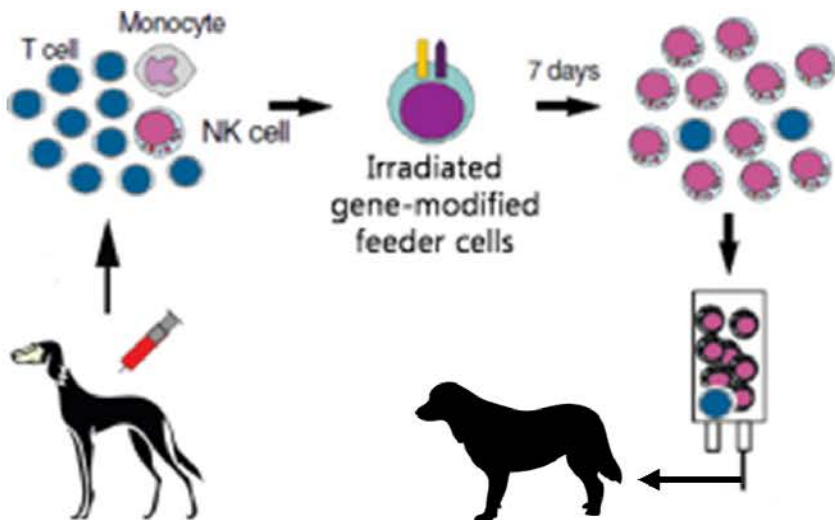
○ NK세포는 T세포 등 다른 면역세포들과 달리 이식편대숙주병(GVHD)과 같은 심각한 부작용을 유발하지 않으므로 allogeneic(동종) model에서도 사용이 가능하므로 다른 정상 개체의 NK세포를 암환자에 적용할 수 있다는 장점이 있음.

○ 그러나 NK세포를 암이나 바이러스감염의 치료에 사용하기 위해서는 활성화된 강력한 NK세포를 대량 ( $1 \times 10^7$ 개/체중 Kg) 주입하여야하는 문제가 있음.

○ 그러므로 임상에서 암 등 난치성질환 치료나 예방목적으로 NK세포를 사용하기 위해서는 비정상세포에 대한 살상능력이 매우 강력한 NK세포를 체외에서 대량 증폭할 수 있어야함.

○ 동종 NK세포 치료요법은 정상 개의 말초혈액에서 분리된 단핵구(PBMCs)를 싸이토카인 조합을 통해 14~21일간 배양하여 강력한 NK세포만을 선택적으로 대량 증폭시킨 후 이를 환자에 주사하고, 이렇게 주입된 NK세포가 종양부위로 이동하여 정상세포에는 영향을 주지 않고 비정상 암세포만을 선택적으로 죽이는 강력한 항암효과를 발휘하도록 하는 환자 맞춤형 치료요법임.

○ 그러므로 암세포나 바이러스 감염세포 같은 비정상세포에 대한 강력한 살상기능을 갖는 NK세포를 체외에서 대량 증폭시키는 기술이 NK세포를 이용한 면역세포치료제 개발에 핵심기술임.

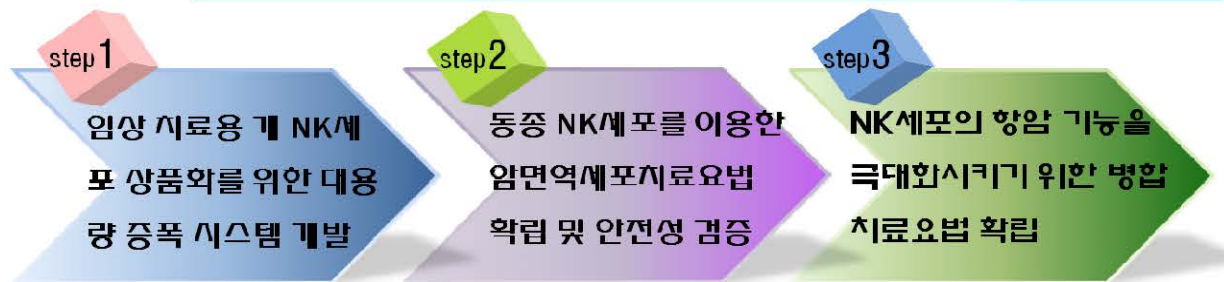


<그림> 동종 NK세포를 이용한 암면역치료요법의 기본 개념

**나. NK세포를 이용한 동종 암면역세포치료제 개발의 목적:**

- 수의학 분야에서 사용되는 주요 암 치료요법은 사람에서와 마찬가지로 외과적 수술, 항암 화학요법 및 방사선치료의 3가지 치료법임.
- 의학과 수의학 분야에서 일반적으로 사용되는 이 세 가지 암치료법은 완치율이 낮을 뿐만 아니라 부작용이 심하고, 재발률이 높다는 문제점이 있어 세계적으로 암 정복을 위해 부작용이 작고 치료효과가 높은 새로운 강력한 치료제 개발이 요구되고 있음.
- 암 발생의 원인에는 유전적 요인, 환경적 요인 등 여러 가지가 생각되고 있지만 결국은 면역력의 억압으로 귀결되는 것이기 때문에 암 치료에 있어 면역력의 증강 등 면역계를 이용한 치료법의 사용이 오래전부터 고려되어 왔음.
- 암치료의 효과를 높이고 부작용 및 재발률을 극소화시킬 수 있으면서 암세포에만 특이적인 치료효과를 나타내는 새로운 치료요법으로 면역요법(immunotherapy) 중 표적치료제와 면역세포치료 (암백신) 요법이 가장 주목을 받고 있으며, 전 세계적으로 이에 대한 개발 노력이 활발히 진행되고 있음.
- 면역세포를 이용한 암 치료요법 중 수지상세포(DC)와 NK세포 및 T세포를 이용한 면역세포치료요법이 가장 관심의 대상이 되고 있음.
- 이중 NK세포는 다른 면역세포치료제들과 달리 특정항원의 인식 없이 암세포 등 비정상세포를 바로 찾아 살상할 수 있고, 비정상세포에 대한 다양한 세포독성기전을 가지며, 특히 GVHD를 유발하지 않아 면역세포치료제로서 이상적인 조건을 갖추고 있음.
- 그래서 본 연구는 체외에서 대량으로 증폭시킨 강력한 항암 기능을 갖는 개 NK세포를 이용한 동종 면역세포치료제를 개발하고, 동종면역세포요법의 안전성을 확인하기 위한 면역 monitoring 방법을 확립하는 한편, 개 NK세포의 암세포에 대한 세포독성 능력을 강화시켜 암치료 효과를 극대화시킬 수 있는 병합치료요법을 개발함으로써 산업화의 기틀을 마련하기 위하여 실시되었음.

**연구최종목표 동종 NK세포를 이용한 암 면역세포치료제 개발 및 최적의 병합요법 확립에 의한 사업화 기틀 마련**

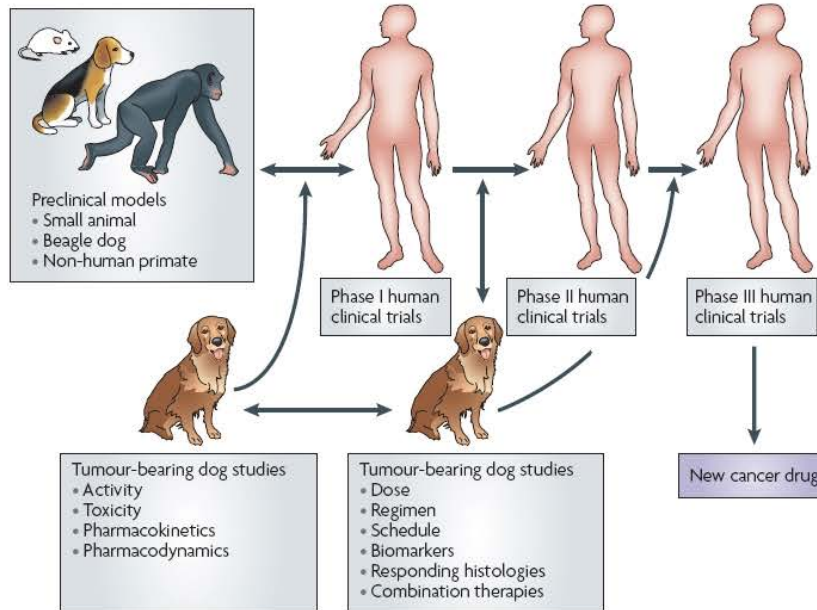


**안전성이 우수하고 항암치료효능이 탁월한 면역세포 치료제 개발**

## 2. 연구 개발의 필요성

### 가. 개 암 면역세포치료제 개발의 중요한 두 가지 의의

- **첫 번째 의의**는 앞서 설명하였듯이 개에서 암발생률은 사람에 비해 현저히 높기 때문에 부작용이 없고 강력한 항암 기능을 갖는 면역세포치료제가 개발되어 임상에서 실용화되면 이를 통한 부가가치 창출은 물론 '산업성'과 '공익성'을 모두 갖추고 있어 세계 바이오 시장의 주목을 받을 것이며,
- 면역세포치료제 중에서도 가장 높은 효율을 나타내는 NK세포를 이용한 암 면역세포치료법의 확립으로 암과 같은 난치성질병으로 고통 받는 개의 삶의 질 향상과 수명 연장에 기여할 수 있으며, 막대한 의료비 절감에도 기여할 수 있다는 중대한 의의를 갖음.
- **두 번째 의의**는 개에서 새로운 암치료법에 대한 연구 결과는 사람에게서 암을 극복하기 위한 연구에 꼭 필요한 귀중한 실질적 자료를 제공할 수 있다는데 있음. 이를 좀 더 구체적으로 설명하면 다음과 같음.
- 새로 개발된 암치료제의 치료 효능이나 안전성을 평가하기 위한 동물실험에 암세포를 이식한 mouse model이 가장 일반적으로 사용되고 있지만, mouse model에서 효과적인 치료 효능을 보인 대부분의 새로운 암치료제는 사람에게서 거의 효과를 보이지 않거나 사람에게 심각한 독성을 유발하여 사용이 어려운 경우가 일반적임 (Kamb A et al, 2007; Kola I et al, 2004).
- 암세포를 이식한 **mouse model**과 달리 사람의 경우 종양세포 및 종양의 미세 환경이 현저하게 불균일하고, 유전적으로 불안정하며, 상당히 오랜 시간에 걸쳐 암조각이 성장하는 등 사람에게 발생한 암의 양상이 **mouse**와 차이가 있기 때문임.
- 그러므로 mouse model을 이용한 동물실험의 결과는 한계를 가짐 (Paoloni M & Khanna C, 2008).
- 최근 개의 genome 판독 결과 **인간과 개의 genome이 매우 유사하며**, 특히 개에서 자연적으로 발생된 암의 유전적, 분자 생물학적, 병리조직학적 양상과 일반적으로 사용되고 있는 암치료법에 대한 반응이 사람에게서 발생하는 암과 거의 비슷하다는 사실이 밝혀짐 (Lindblad-Toh K et al, 2005; Hoffman MM & Birney E, 2007).
- 아울러 개의 유전적 다양성은 사람의 경우와 비슷하며, 암 발생과 관련된 많은 gene family들이 실험용 쥐와 비교하여 사람과 현저하게 유사할 뿐만 아니라, **개에서는 사람 처럼 면역계가 손상되지 않은 개체에서 암이 자연적으로 발생되며, 암의 종류도 사람에서 처럼 다양함.**
- 이와 같은 생물학적 유사성 때문에 **개에서 암에 관한 연구는 사람 또는 실험동물만을 대상으로 한 암연구와 차별화되는 귀중한 정보를 제공하며, 이와 같은 가치에 대한 인식은 특히 새로운 암치료법 개발 및 효능 평가 등의 연구 분야에서 현저히 높아지고 있음** (Paoloni M & Khanna C, 2008).
- 그러므로 **개에서 새로운 암치료법에 대한 연구는 사람에게서 암을 극복하기 위한 연구에 귀중한 실질적 자료를 제공할 수 있을 뿐만 아니라, 개 난치성질환 치료제 개발을 통한 산업화로 막대한 경제적 효과를 창출할 수 있으며, 과학적으로도 크게 기여할 수 있을 것으로 기대되고 있음.**



<그림> 개를 대상으로 한 새로운 암치료제에 대한 연구는 사람에서 암을 극복하기 위한 연구에 귀중한 실질적 정보를 제공할 수 있음 (Paoloni M & Khanna C, 2008).

#### 나. 개 동종 NK세포를 이용한 암 면역세포치료제 (동종요법) 개발의 필요성

○ 사람에서 NK세포를 이용한 면역치료요법은 haploidentical BMT 모델에서 AML 및 solid tumor의 치료를 위해 시도되고 있으며, 최근에는 동종 NK세포를 이용한 입양면역요법이 시도되고 있음 (Leung W 2014, Cancer Research; Miller JS 2013, Hematology Am Soc Hematol Educ Program; Cheng M et al 2013, Cellular & Molecular Immunol).

○ 암이나 바이러스감염이 발생될 경우 면역계는 현저히 억압되며, 이로 인해 환자의 면역세포는 정상세포에 비해 항암 기능이나 항바이러스 기능이 급격히 저하됨.

○ 그러므로 정상 개체의 NK세포를 체외에서 활성화시켜 환자에 주입할 경우 (동종요법) 환자 자신의 자가 면역세포를 사용하는 것 보다 항암, 항바이러스 효능을 현저히 높일 수 있을 것으로 생각되고 있음.

○ NK세포를 이용한 효과적인 면역세포치료요법을 위해서는 대량의 NK세포 ( $1 \times 10^7$ 개 이상/체중 Kg)를 수차례 일정 (약 1주일) 간격으로 투여하여야 함으로 일주일 간격의 반복 채혈을 피하기 위해 한 번에 많은 양의 채혈이 필요함.

○ 이와 같은 채혈 양은 소형견종에서는 매우 부담스러운 일이며, 특히 말기 암 환자에서는 채혈이 매우 어렵고 NK세포 등 면역세포들의 기능도 극도로 저하된 상태인 경우가 대부분임.

○ 이와 아울러 활성화되어 강력한 기능을 갖는 NK세포를 충분한 양으로 증폭하기 위해 약 14일~21일 정도가 소요됨.

○ 그러므로 대형의 정상 개체의 혈액에서 NK세포를 대량으로 체외 증폭하여 냉동 보관시킨 후 필요할 때 다시 활성화 시켜 사용할 경우 비정상세포에 대한 강력한 살상기능을 갖는 세포를 바로 사용함으로써 면역세포치료 효능을 극대화 시킬 수 있다는 장점이 있으며, 상품화가 더욱 용이함.

○ 최근 활성수용체의발현이 향상되어 강력한 암세포 살상효과를 보이는 NK세포의 대량 증폭 기술의 도입으로 사람에서도 앞으로 동종 NK세포의 입양면역치료에 의한 효과적인 암치료법

의 개발이 예측되고 있음.

○ 그러므로 동종 NK세포를 이용한 암치료요법의 개발은 반드시 수행되어야 하는 것이며, 일차적으로 동종요법의 부작용 발생 유무를 확인하기 위한 안전성 검증 및 NK세포 주입 후 면역 모니터링 방법의 개발이 꼭 필요한 것임.

#### 다. 개 NK세포의 임상 치료용 대용량 (large scale) 증폭 시스템 개발의 필요성

○ 앞서 설명한 바와 같이 본 연구진은 세계에서 최초로 강력한 항암 효과를 갖는 개 NK세포의 체외 대량 증폭 방법 개발에 성공하였으며, 그 결과에 대한 특허를 출원하여 이를 등록하였음 (등록번호:10-1384203).

○ 그러나 이 방법은 24-well plate에서 FBS 등 생체에 영향을 미칠 수 있는 재료를 이용하여 증폭시키는 방법이므로 실제 임상에 사용하기 위한 상품화를 위해서는 본 연구과제 수행을 통해 대용량 팩이나 flask에서 FBS없이 대량의 NK세포를 한꺼번에 증폭할 수 있는 시스템 개발이 필요한 것임.

#### 라. 개 NK세포와 병합요법을 이용한 암치료요법 개발연구의 필요성

○ NK 세포의 항암 능력을 극대화시키기 위한 두 가지 큰 전략으로 NK세포를 더욱 강하게 만들거나 표적 암세포를 NK세포에 더욱 감수성 있게 만드는 방법임.

○ 구체적인 방법으로 1) NK 세포 표면에 NKG2D와 같은 활성화수용체 (activating receptors)의 발현을 증가시키거나, KIR와 같은 억제수용체 (inhibitory receptors)의 발현을 감소시키는 방법과 2) NK세포의 표적이 되는 암세포의 표면에 MICA, MICB와 같은 NK세포의 활성화수용체에 대한 ligands의 발현을 증가시키거나 억제수용체에 대한 ligands의 발현을 감소시키는 방법이 있음.

○ 본 연구자에 의해 개발된 방법으로 시험관에서 대량 증폭된 NK세포는 NKG2D나 NCR같은 활성화수용체의 발현이 현저히 증가되고 ADCC기능이 향상된 활성화상태의 강력한 세포임이 이미 확인되었음.

○ 그러므로 암세포의 NK세포에 대한 감수성을 더욱 증가시키는 방법을 병합하여 사용할 경우 NK세포의 항암 기능을 더욱 증가시켜 암 치료 효과를 극대화시킬 수 있음.

○ 암세포의 표면에 NK세포의 활성화수용체에 대한 ligands의 발현을 증가시키는 대표적인 방법으로 암조직의 방사선조사 (irradiation)를 들 수 있음 (Kim et al, 2006, Exp Mol Med; Cho et al, 2010, Clinic Cancer Res).

○ 아울러 암조직의 방사선조사는 암세포의 표면에 Chemokine의 발현을 촉진시키기 때문에 효과적으로 NK세포를 종양조직으로 이동시킬 (migration) 수 있을 것으로 생각됨 (Burger et al, 2006, Blood; Luker et al, 2006 Cancer Lett).

○ 하지만 암세포에 방사선을 조사할 경우 암세포 표면의 chemokines 발현 증가가 NK 세포의 암조직으로 migration에 미치는 효과에 대한 연구는 국내외에서 아직 시행된 바가 없으며, NK 세포의 활성화수용체에 대한 ligands 발현 연구도 부분적이어서 이에 대한 구체적이고 전반적인 연구가 필요함.

- NK 세포의 항암 기전에 관여하는 신호전달이 한 가지 활성화 신호에 의해 암세포를 죽이는 것이 아니라 한 가지 이상의 신호에 의해 이루어지기 때문에,
- 본 연구에서는 암에 걸린 개에서 암조직에 방사선요법을 통해 암세포에 발생한 면역학적 변화를 분석하고, NK 세포의 종양조직으로 이동을 확인하는 한편,
- 체외 증폭시킨 강력한 NK 세포를 이용한 암면역세포치료의 효과를 극대화시킬 수 최적의 병합요법 조합을 확인하여 효과적인 암치료 방법을 확립하고자 하는 것임.

#### 마. 연구필요성의 요약

- 본 연구진은 2010년 한국연구재단의 지원을 받아 개 NK세포의 체외 대량 증폭 방법을 개발하기 위한 연구를 실시한 결과 세계에서 최초로 강력한 항암 효과를 갖는 개 NK세포의 체외 대량 증폭 방법 개발에 성공하였으며, 그 결과에 대한 특허를 출원하여 이를 등록하였음 (등록번호:10-1384203).
- 이상과 같이 개 NK세포 연구 및 개 NK를 이용한 면역세포치료제 개발에 대해서는 현재까지 본 연구진이 세계에서 가장 앞서나가고 있어, 그동안의 연구결과를 상품화하여 세계시장을 선점하기 위하여 본 연구과제를 수행하였음.

## 2절. 연구개발과제의 성과목표

### 1. 연구성과 목표

- 본 연구 과제는 체외에서 대량으로 증폭시킨 강력한 항암 기능을 갖는 개 NK세포를 이용한 동종 면역세포치료를 개발하고, 동종면역세포요법의 안전성을 확인하기 위한 면역 monitoring 방법을 확립하는 한편, 개 NK세포의 암세포에 대한 세포독성 능력을 강화시켜 암치료 효과를 극대화시킬 수 있는 병합치료요법을 개발함으로써 산업화의 기틀을 마련하기 위하여 실시되었음.
- 이러한 목표 달성을 위하여 1차년도에 동종 NK세포를 이용한 입양면역치료요법체를 위한 임상치료용 large scale NK세포 증폭법 정립 및 냉동보관 세포 안정성 확보, NK세포 증폭 후 냉동보관방법 확립 및 activity에 대한 안정성 확보, 주입된 NK 세포 모니터링 용 chimera 검출법 확립 및 면역 monitoring 방법 확립의 성과 목표를 설정하였으며,
- 2차년도에는 동종 NK세포를 이용한 면역세포치료의 안전성을 확인하고, 동종 NK세포를 이용한 면역치료요법 개발하고자 하였으며, 3차년도 최종적으로 동종 NK세포와 방사선요법의 병합요법 확립을 위한 최적의 방사선조사 선량 및 protocol 확립하는 한편, 방사선 조사 후 암 치료 효능을 증진시키기 위한 동종 NK세포 투여 protocol 확립의 성과 목표를 설정하였음.

### 2. 연구성과 목표 대비 실적

- 본 연구진이 최초로 개발한 개 NK세포의 체외 증폭방법은 24-well plate에서 실시한 것으로 실제 입상에 사용하기 위해 대량의 세포를 한꺼번에 증폭시키기에는 많은 제약 사항이 있어, 이를 극복하기

위하여 먼저 대용량 flask (T24, T75) 에서 대량 증폭을 위한 large scale NK세포 증폭 system을 확립하였고,

○ NK세포에서 STAT3를 활성화시키는 신호전달을 통해 염색체 말단인 텔로미어(telomere)의 길이를 연장시킴으로써 세포 수명을 연장하고 NK세포의 증식을 활성화시키기 위하여 rcIL-21을 이용한 개 NK세포 체외 증폭배지의 조성을 확립하고 이를 이용한 강력한 NK세포 체외 배양방법을 확립하였으며 (특허등록 완료, 등록번호: 10-14993451, 발명의 명칭: 개 자연살해세포 체외 증폭배지 및 이를 이용한 개 자연살해세포 체외 배양방법),

○ 아울러 rcIL-21의 자극이 개 NK세포의 증식 및 항암 기능 향상에 영향을 미침을 확인하고, 특히, rcIL-21의 시간차 자극을 통해 실제 임상에 사용할 수 있는 수준으로 개 NK세포의 체외 증폭 효율 및 암세포살상 능력을 향상시킬 수 있음을 입증하였으며, 그 결과를 수의학분야 상위 10% 이내의 SCI 국제학술지에 게재하였음 (Interleukin-21 induces proliferation and modulates receptorexpression and effector function in canine natural killer cells. *Vet Immunol Immunopathol* 165:22-33) .

○ 동종 NK세포의 실제 임상적 활용을 용이할 수 있도록 할 목적으로 체외 대량 증폭된 NK세포의 냉동 보관방법 및 냉동 보관을 위한 배지의 조성을 확립하였으며, 냉동 보관 후 NK세포를 치료제로 주입하기 위해 해동 시 냉동에 의해 현저히 저하된 NK세포의 항암 기능을 회복시키기 위한 방법을 확립하였음 (연구원 김주선 석사학위논문, 논문제목: Comparison of different media for cryopreservation of peripheral blood mononuclear cells and expanded Natural Killer cells, SCI 국제학술지 투고 준비중).

○ 이와 아울러 NK세포의 대용량 증폭을 용이하게 수행하기 위하여 방사선조사 후 냉동 보관한 feeder cell을 이용한 신선한 feeder 세포와 동등한 정도의 NK세포 증폭 조건을 확립하여 그 결과를 SCI 국제학술지에 게재하였음 (Anticancer Research 2013;33(5):2011-9).

○ 환자에 주사된 동종 NK세포의 생체 내 생착 여부 및 주사 후 생존기간에 대한 평가를 위한 chimera 검출법 및 CFSE를 이용한 검출법을 확립하였으며, 체외 증폭된 개 NK세포 주입 후 항암 효과 및 효능 평가를 위한 immune monitoring 방법을 확립하였음.

○ 이상과 같이 1차년도 성과목표를 100% 달성하였음.

○ 생체내에서 NK 세포의 분화를 촉진하여 개 말초혈액 내 NK세포의 수를 증가시켜 체외 증폭효율을 극대화시킴과 아울러, 주사된 동종 NK세포의 암세포 살상기능을 최적화시킬 뿐만 아니라 주사 후 동종 NK세포가 장기간 살아남아 항암 기능을 오래 지속적으로 발휘할 수 있도록 함으로서 동종 NK세포를 이용한 암치료제의 효율을 극대화시키는 adjuvant로 사용하기 위해 재조합 개 Interleukin-15의 정제 생산기술을 개발 확립하였으며 (특허등록 완료, 등록번호: 10-1440915, 발명의 명칭: 개 인터루킨-15 체외 증폭용 프라이머 세트, 이의 용도 및 이를 이용한 재조합 개 인터루킨-15 제조방법),

○ 동종 NK세포를 이용한 암치료제의 효율을 극대화시키기 위한 재조합 개 Interleukin-15의 생산기술의 사업화를 위해 최근 이 기술을 (주)박셀바이오에 기술이전을 실시하였음.

○ 정제 생산된 재조합 개 Interleukin-15 (rcIL-15)가 효율적으로 개 NK세포의 체외 증폭을 유도할 뿐만 아니라 체내 주입 후 면역기능을 향상시킴을 확인하여, rcIL-15의 제조기술과 함께, 그 결과들을 종합하여 SCI 국제학술지에 게재하였음 (Generation of recombinant canine interleukin-15 and evaluation of its effects on the proliferation and function of canine NK cells. *Vet Immunol Immunopathol* 165:1-13).

○ 이와 아울러 정제된 rcIL-15를 주사한 개체의 안전성 평가에서 전혀 부작용 없이 말초혈액 내 NK세포의 개체 수를 현저히 증가시킴으로써 개 NK세포의 체외 증폭 효율을 실제 임상에서 시술할 수 있는 수준의 대용량 증폭기술을 확립하는데 이용할 수 있고, 주사된 동종 NK세포의 증가된 암세포 살상능력

을 장기간 유지할 수 있음을 증명하여 이 결과를 **SCI 국제학술지에 투고할 준비 중에 있음.**

○ 개 NK세포와 관련되어 세계적으로 지금까지 논란의 대상이 되고 있는 개 NK세포 표현형 (phenotype)의 특성에 관하여 CD3+CD5dim 세포는 NK세포의 특성을 갖는 세포로 개 말초혈액 내 주로 존재하는 유형의 NK세포이며, 개 non-B, non-T large granular NK lymphocytes는 이 CD3+CD5dim 세포에서 유래되는 가장 성숙된 NK세포임을 본 연구의 1차년도와 2차년도 연구 수행 과정에서 처음으로 밝혀내 유수한 **SCI 국제학술지에 투고 준비중임** - 이 결과는 동종 개 NK세포를 이용한 암면역세포치료제 상업화를 위한 임상시험 승인을 위해 매우 중대한 결과임.

○ 체외 증폭된 동종 NK 세포 주사 후 GVHD 등 중요한 부작용 발생 여부를 확인하여 동종 NK세포 주사의 안전성을 입증하였고, 임상시험을 통한 암치료시 주사된 NK세포의 수여자 내 안정적인 정착을 위한 효과적인 면역억제 (특히 lymphocyte의 제거) 방법을 확립하였으며, 이를 통해 면역억제 후 동종 NK세포의 주사 적기, 반복 주입 횟수, 간격 및 주입 세포 수를 결정하였음 (**data 보완 후 투고 예정**).

○ 이와 아울러 본 과제를 통해 확립한 방법으로 체외 증폭시킨 개 NK세포가 개에서 가장 중요한 바이러스 질환을 일으키는 바이러스 중 하나인 개 디스토펜바이러스 (CDV)의 증식을 강력히 억제하고 바이러스에 감염된 세포를 파괴시키는 것으로 나타나 증폭된 NK세포를 바이러스감염 치료에도 사용할 수 있음이 증명되어 이 결과를 수의학분야 상위 5%이내의 SCI 국제학술지에 게재하였음 (*The anti-canine distemper virus activities of ex vivo-expanded canine natural killer cells. **Vet Microbiol 176:239-249***).

○ 이상과 같이 2차년도 계획한 성과목표를 추가 달성하였음.

○ 체외 증폭된 동종 NK세포의 암치료 효과를 확인하기 위해 악성 종양에 이환된 8마리의 개체에 면역억제 후 동종 NK세포를 1주일 간격으로 총 6회 정맥주사 (1X10<sup>9</sup>개 NK세포/마리/회)한 다음 5개월간 주기적으로 방사선 사진과 PET-CT를 촬영하여 종양의 변화양상을 확인함으로써 치료효과를 판정하였으며, 8마리 중 2마리에서 괄목할만한 치료 효과가 있음을 확인하였음. 이를 통해 암 치료 효과를 위한 대량 증폭된 동종 NK세포 투여 protocol (투여 세포수, 투여경로, 투여간격)을 확립하였음. 장기간 추적조사를 위해 지속적으로 관찰 예정임 (**data 보완 후 투고 예정**).

○ 동종 NK세포에 대한 표적 암세포의 면역원성을 높이기 위한 방사선치료 선량 및 protocol 확립하고, 치료효과 극대화를 위한 cytokine (IL-15, IL-2, IL-21) 투여 protocol 및 화학요법제와의 병합 요법 확립하였고,

○ 방사선치료의 선량 및 화학요법제 병합에 따라 유도된 암세포 표면의 NK 세포 활성수용체에 대한 ligands와 chemokine 수용체 ligands 발현 변화 분석을 통한 암종 별 적정 조사선량 및 화학요법제와의 병합치료 조건 확립 및 방사선치료 및 화학요법제 치료 전후 암세포에 대한 NK세포의 세포독성능 등 기능 비교 분석을 통한 동종 NK세포에 대한 표적 암세포의 면역원성을 높이기 위한 최적의 병합요법 조건 확립하는 등

○ 체외 증폭된 동종 NK세포의 암치료 효과를 극대화하기 위한 방사선치료, 재조합사이토카인 및 화학요법과의 병합치료요법 개발을 완료하여 **data 보완 후 투고예정임.**

○ 국내에서 동물용 생물학 제제 (세포치료제 포함) 의 품목 허가 절차가 수행된 경우가 아직 전무하여 생물학 제제 (세포치료제 포함) 의 임상시험 가이드라인이 마련되어 있지 않음. 연구 종료 후 사업화를 앞당기기 위해 임상시험 가이드라인 마련을 위해 농림축산검역본부와 상담 및 협의를 실시함.

○ 이상에서 언급한 바와 같이 3차년의 본 과제를 통해 **2건의 특허등록 (등록번호: 10-14993451, 10-1440915)을 완료하였으며, 1건의 기술이전을 완료하였고, 1건의 추가적인 기술이전을 협의 중 (개**



자연살해세포 체외 증폭배지 및 이를 이용한 개 자연살해세포 체외 배양방법)이며, 4편의 논문을 SCI 국제학술지에 게재 완료하였음.

○ 추가적으로 3편의 논문 (체외 대량 증폭된 NK세포의 냉동 보관 및 냉동에 의해 현저히 저하된 NK세포의 항암 기능을 회복 방법, 재조합 개 IL-15의 생체 투여 후 안전성 및 면역학적 효능, 개 NK세포 표현형의 특성) 은 SCI국제학술지에 투고 준비가 거의 마무리되고 있으며, NK세포의 임상적 적용에 대한 Data 보완 후 2편~3편의 논문을 추가적으로 더 게재할 예정임 (제 3장 연구개발 수행 내용 및 결과 참조).

○ 종합하여 지금까지 연구과제 수행을 통해 달성한 성과는 특허등록 2건 국제학술논문 4편 게재 완료 및 5편 추가 게재예정, 기술이전완료 1건, 추가 기술이전 계획 1건으로 애초 계획하였던 성과 목표 (특허출원 2건, 특허등록 1건, SCI논문 4편, 비 SCI논문 1편)를 월등히 초과하여 달성하였음.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 1절. 국내외 관련분야에 대한 기술개발현황

#### 1. 국내외 현황, 문제점 및 전망

##### 가. 개에서의 암 발생 및 암 치료의 현황

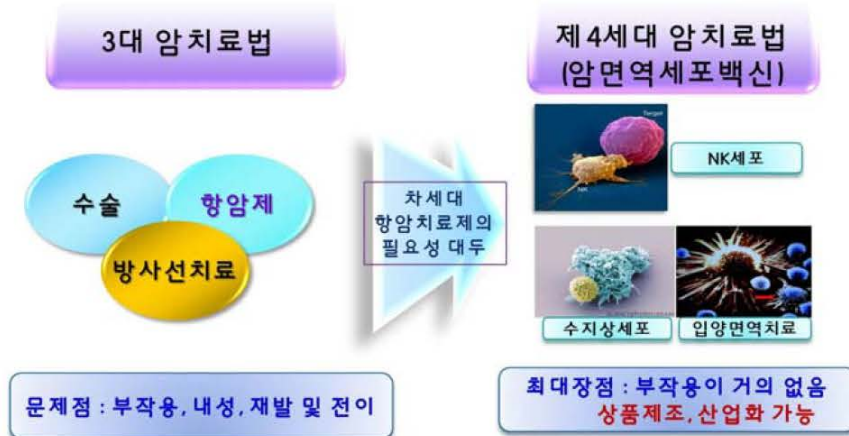
- 과학의 발달과 함께 동물에 대한 영양학과 수의학 전반에 걸친 눈부신 발전 등에 의해 개의 평균 수명이 현저히 연장됨에 따라 노령성 질병과 같이 개에서 암발생이 현저히 증가하고 있는 추세임.
- 개에서의 암발생률은 사람에서의 발생률에 비해 현저히 높음.
- 구체적인 예로 개에서 백혈병의 발생은 사람에서보다 두배 높으며, 유방암의 발생은 4배, 골육종 등 뼈에 발생하는 암은 8배 가량 높고, 피부암의 경우 사람에서보다 무려 35배나 높은 발생률을 나타내는 것으로 알려짐 ([http://dogs.lovetoknow.com/wiki/Cancer\\_in\\_Dogs](http://dogs.lovetoknow.com/wiki/Cancer_in_Dogs)).
- 국내에서도 노령견의 수가 급속히 증가하면서 각종 악성 종양의 발생률은 매년 급격히 증가하면서 이에 의한 폐사율이 현저히 증가하고 있음.
- 수의학 분야에서 사용되는 주요 암 치료요법은 사람에서의 마찬가지로 외과적 수술, 항암 화학요법 및 방사선치료의 3가지 치료법임.
- 의학과 수의학 분야에서 일반적으로 사용되는 이 세 가지 암치료법은 완치율이 낮을 뿐만 아니라 부작용이 심하고, 재발률이 높다는 문제점이 있어 세계적으로 암 정복을 위해 차세대의 새로운 치료제 개발을 위한 노력이 계속되고 있음.

##### 나. 암 면역세포치료의 국내외 현황 및 전망

- 암의 발병원인은 유전적인 요인을 포함해 환경적 요인, 식이적 요인 등 여러 가지 요인들의 복합적인 작용으로 인식되고 있으나, 결과적으로 이들 요인에 의한 면역력의 억제가 암발생의 주된 원인으로 생각되고 있음.
- 그러므로 사람에서는 암치료를 위해 면역력을 증가시킬 수 있는 방법 등 환자의 면역계를 이용한 암치료법인 면역치료 (immunotherapy) 에 대한 개발 연구가 전세계적으로 활발히 진행되고 있음.
- 암치료의 효과를 높이고 부작용 및 재발률을 극소화시킬 수 있으면서 암세포에만 특이적인 치료효과를 나타내는 새로운 면역치료요법 중 암세포에 발현된 특이 단백질에 대한 항체를 사용하는 표적치료제와 암세포만을 특이적으로 살상하는 면역세포치료 (암백신) 요법이 가장 주목을 받고 있음.
- 면역세포를 이용한 암 치료요법 중 수지상세포(DC)와 NK세포 및 T세포를 이용한 면역세포치료요법이 가장 관심의 대상이 되고 있음.
- 이중 NK세포는 다른 면역세포치료제들과 달리 특정항원의 인식 없이 암세포 등 비정상세포를 바로 찾아 살상할 수 있고, 비정상세포에 대한 다양한 세포독성기전을 가지며, 특히 GVHD를 유발하지 않아 면역세포치료제로서 이상적인 조건을 갖추고 있음.

○ 안전성이 우수하고 항암치료 효능이 탁월한 NK세포-기반 면역세포치료는 일본과 유럽 및 미국 등지에서 사람의 암치료를 위한 임상적 적용을 위한 연구가 지속되고 있고 우수병원에서 임상에 활용되고 있음.

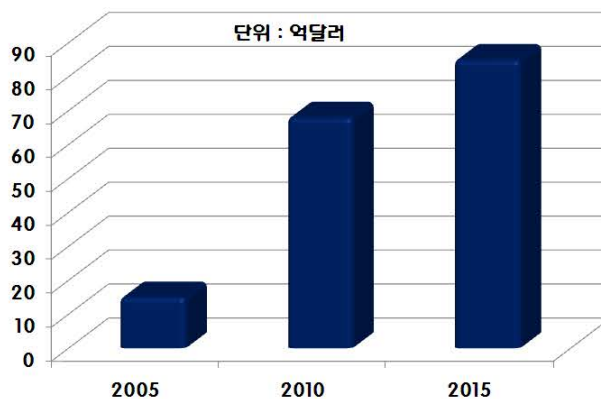
○ 국내에서도 사람을 대상으로 NK세포-기반 면역세포치료제의 임상시험이 진행되고 있으며, 동종 NK세포를 이용한 동종 요법도 임상시험 중에 있음 (녹십자 복암연구소).



<그림> 차세대 암치료법으로 면역세포치료법 개발의 필요.

○ 항암제의 세계시장은 320억 달러 규모이며, 국내 항암제 시장 규모는 '05년 3,489원에서 '15년 9,995억 원 정도로 연평균 11.1%의 성장률을 보일 것으로 전망되며, 암백신 개발 사업을 포함한 세포치료 시장은 전세계적으로 300개가 넘는 회사들이 참여하고 있고 총 가치는 '05년 18억불 정도에서 '15년에는 80억불 정도로 급성장하여 막대한 시장이 될 것으로 예측됨.

○ 최근 효용성이 인정되고 있는 면역세포(NK세포 등)를 이용한 보다 효율적인 세포요법을 개발하여 환자에 적용함으로써 암으로 인한 사망률을 감소시킬 수 있을 것으로 전망되며, 면역세포 치료제의 산업 규모는 엄청나게 성장할 것으로 전망되고 있음.



<그림> 사람에서 암 면역세포치료제의 세계시장 규모 및 전망

#### 다. 개 암 면역세포치료제의 국내외 현황

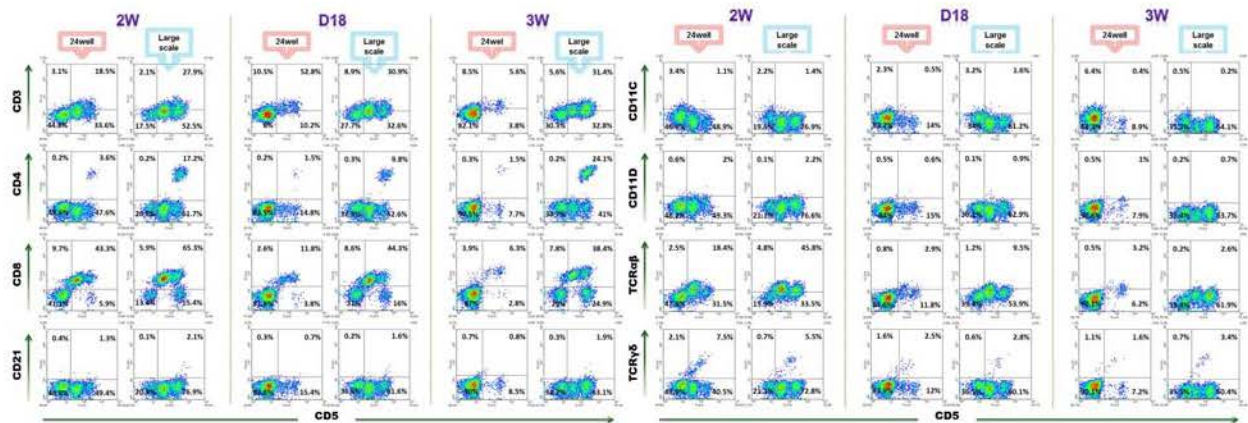
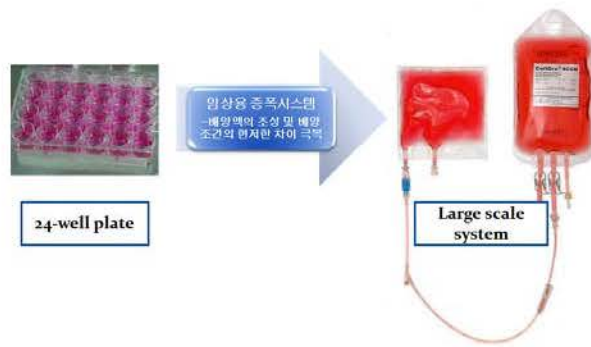
- 개를 대상으로 한 면역세포치료제에 관한 연구는 최근 해외 일부 연구자들에 의해 일부 연구되고 있으나 사람에 비해 매우 미비한 상태로 주로 수지상세포(DC)와 CD40-activated B세포에 관한 것들이며, 개 NK세포에 대한 연구는 극히 미약함.
- 개 NK세포에 대한 연구가 극히 미약한 가장 큰 이유로는 현재까지 개 NK세포에 대해서는 그 특성이 아직 정확히 밝혀지지 않았으며, 개 NK세포를 다른 세포와 구별할 수 있는 특이 마커조차 알려져 있지 않다는 현실임.
- 이러한 이유로 개 NK세포의 임상적용에 대한 연구는 아직까지 본연구진에 의한 연구를 제외하고 거의 없으며, 1970년대부터 2012년 현재까지 개 NK세포와 관련된 연구 논문은 단지 수십편에 불과한 실정임.
- 이와 같은 현실로 착안하여 본 연구진은 최근 개 NK세포의 체외 대량 증폭 방법을 개발하기 위한 연구를 실시한 결과 세계에서 최초로 강력한 항암 효과를 갖는 개 NK세포의 체외 대량 증폭 방법 개발에 성공하였으며, 그 결과에 대한 두건의 특허를 등록하였음 (등록번호:10-1384203, 개 유래 자연살해세포의 대량 증식방법; 등록번호:10-1499345, 개 자연살해세포 체외 증폭매지 및 이를 이용한 개 자연살해세포 체외 배양방법).
- 이상과 같이 개 NK세포 연구 및 개 NK를 이용한 면역세포치료제 개발에 대해서는 현재까지 본 연구진이 세계에서 가장 앞서나가고 있으며, 그동안 본 연구과제를 통해 도출한 연구결과를 토대로 상품화하여 세계시장을 선점하기 위한 노력을 지속하고 있음.

# 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

## 1절. 연구개발 수행 내용 및 결과

### 가. 임상용 large scale NK세포 증폭조건을 확립

○ 본 연구진이 최초로 개발한 개 NK세포의 체외 증폭방법은 24-well plate에서 실시한 것으로 실제 임상에 사용하기 위해 대량의 세포를 한꺼번에 증폭시키기에는 많은 제약 사항이 있어, 이를 극복하기 위하여 대용량 flask (T24, T75) 에서 대량 증폭을 위한 large scale NK세포 증폭조건을 확립하였으며,  
 ○ 임상용 대용량 증폭 조건에서 체외 증폭시킨 개 NK세포의 특성이 24-well plate 조건에서 증폭시킨 NK세포와 동일한 특성 및 동일한 항암 능력을 가지고 있음을 확인하였음.



<그림> 체외 증폭 2~3주 후 24-well plate 배양군과 large scale 배양군에서 표현형 특성의 비교.

### 나. 증폭배지 조성의 개선을 통한 개 NK세포 체외 증폭률 향상 및 항암기능의 최적화 조건 확립

○ NK세포에서 STAT3를 활성화시키는 신호전달을 통해 염색체 말단인 텔로미어(telomere)의 길이를 연장시킴으로써 세포 수명을 연장하고 NK세포의 증식을 활성화시키기 위하여 rcIL-21을 이용한 개 NK세포 체외 증폭배지의 조성을 확립하고 이를 이용한 강력한 NK세포 체외 배양방법을 확립하였으며 (특허등록 완료, 등록번호: 10-14993451, 발명의 명칭: 개 자연살해세포 체외 증폭배지 및 이를 이용한 개 자연살해세포 체외 배양방법),

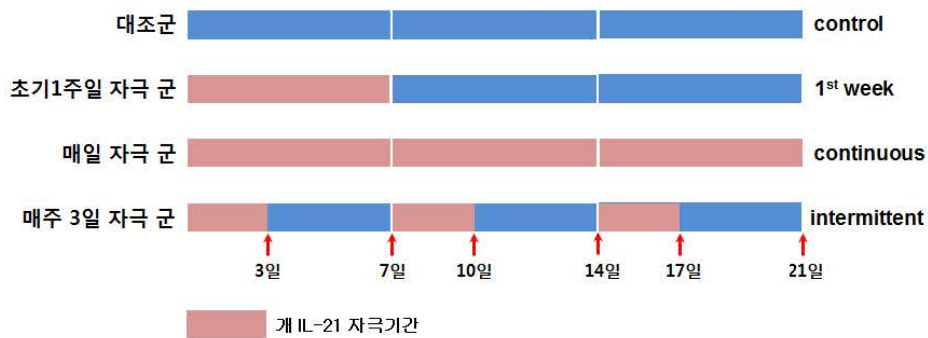
○ 아울러 rcIL-21의 자극이 개 NK세포의 증식 및 항암 기능 향상에 영향을 미침을 확인하고, 특히, rcIL-21의 시간차 자극을 통해 실제 임상에 사용할 수 있는 수준으로 개 NK세포의 체외 증폭 효율 및 암세포살상 능력을 향상시킬 수 있음을 입증하였으며, 그 결과를 수의학분야 상위 10% 이내의 SCI 국제학술지에 게재하였음 (Interleukin-21 induces proliferation and modulates receptorexpression and effector function in canine natural killer cells. Vet Immunol Immunopathol 165:22-33) .

① 개 NK세포 증폭과정에서 rcIL-21의 시간차 자극

○ 개 NK세포 체외 증폭률을 향상시키기 위하여 사이토카인 단백질인 재조합 개 IL-21을 시간대별로 다르게 자극하는 방법을 고안하였다. 자극농도는 예비실험을 통해 10 ng/mL 보다 5 ng/mL이 적합한 것을 확인하였다.

○ 또한 개 IL-21 시간차 자극에 따른 효과를 평가하기 위해 IL-21을 자극하지 않은 것을 대조군으로 하였고 이 대조군에 자극 시점과 기간을 다르게 설정하였다. 자극 방법에 따라 대조군에 rcIL-21을 배양초기 1주일간만 자극한 군(1st week), 대조군에 개 IL-21을 매주 3일간만 자극한 군(intermittent), 대조군에 개 IL-21을 매일 자극한 군(continuous)으로 나누어 시행하였다. 개 NK세포 체외 증폭과정에서의 개 IL-21 자극 시점과 기간은 다음과 같다.

개 인터루킨-21 시간차 자극에 따른 실험군



②rcIL-21 시간차 자극에 의한 개 NK세포 증폭 효율 검증

○ 개 IL-21을 시간차로 자극하여 개 유래의 NK세포의 체외 증폭률을 비교하였다. 건강한 개로부터 채혈한 말초혈액에서 단핵구들은 분리하여 총 21일간 증폭하였다.

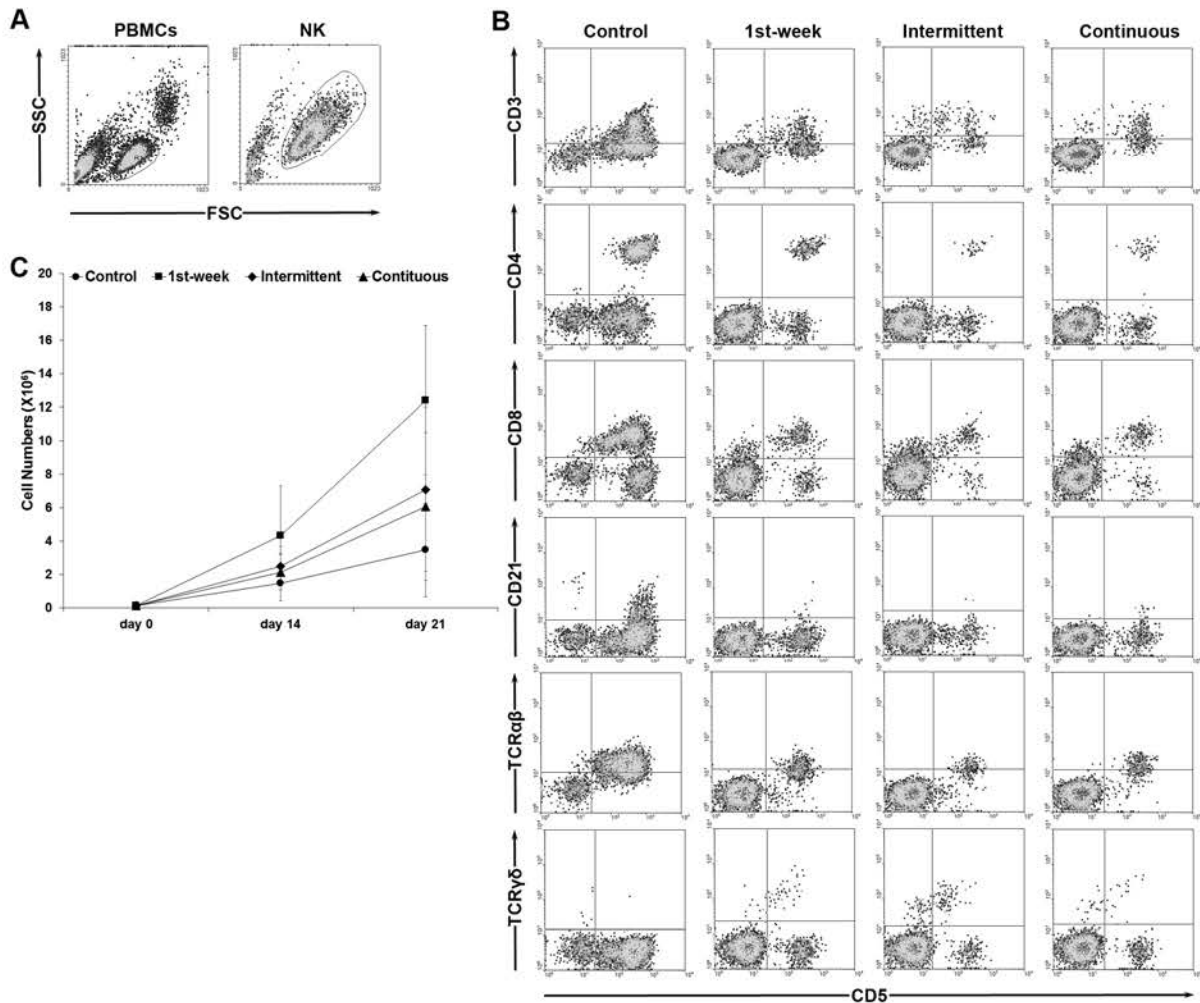
○ 배양 당일부터 14일째, 21일째 세포수를 조사하고 May-Grunwald-Giemsa 염색으로 세포 비율을 계산한 결과, 개 IL-21이 첨가된 그룹들에서 모두 개 NK세포 증폭률이 IL-21로 자극하지 않은 대조군에 비해 증가하였으며, 특히 IL-21을 체외 증폭 초기 1주일간만 자극한 군에서 현저하게 증폭률이 향상된 것을 확인하였다.

○ 증폭률 : 3주 동안 증폭과정에서 대조군이 74배 증가한 것과 비교해 초기 1주일 자극군에서 약 305배로 현저하게 증폭률이 개선됨. 매일 자극군과 매주 3일 자극군에서는 각각 125배와 118배의 증폭률을 보임. 결과적으로 기존의 증폭방법에 비해 410% 증가되었음.

③ 재조합 개 IL-21의 시간차 자극으로 체외 증폭된 개 NK세포의 표현형 분석

○ 개 IL-21의 시간차 자극으로 체외 증폭된 각 군들의 개 NK세포들의 표현형(phenotype)의 변화를 분석하였다. 그 결과, 개 NK세포의 특성으로 알려진 CD5low 세포 및 non-B, non-T

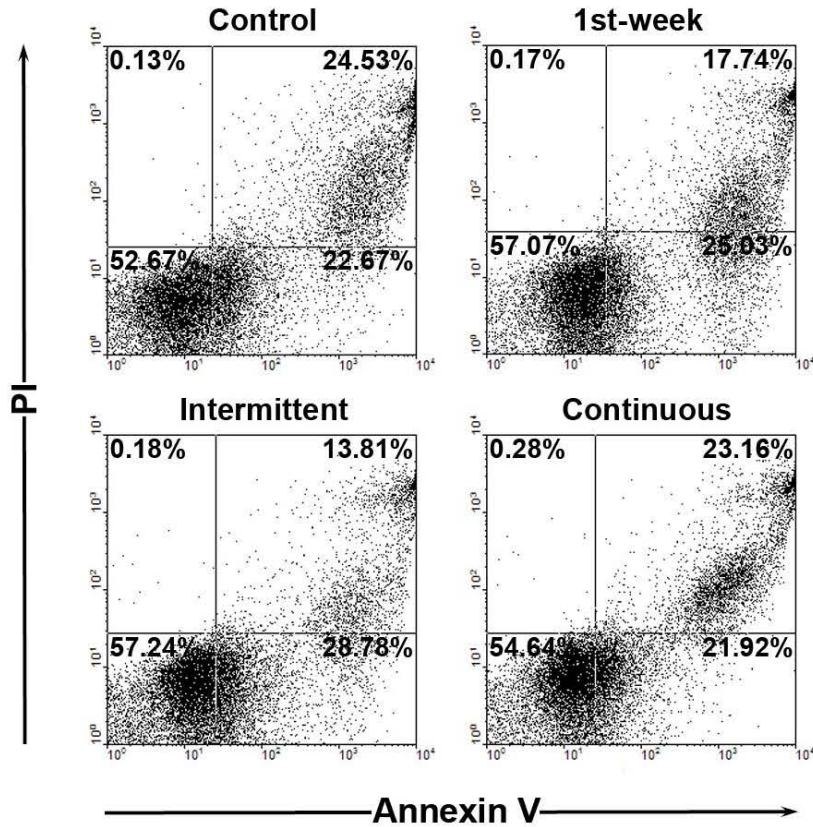
군체가 대조군에 비해 개 IL-21로 자극된 군에서 증가하였으며 특히 배양 초기 1주일 간 자극한 군과 매일 자극한 군에서 현저하게 이들 세포군이 증가함을 확인하였다. 또한 PBMC와 체외증폭된 세포군에서는 CD11c와 CD11d, TCR-gamma delta를 발현하는 세포는 증폭되지 않았으며, 특히 IL-21을 자극하지 않은 control군에 비해 자극한 군들에서 CD5-세포수가 증가하였고, IL-21을 자극한 그룹들에서 CD4+세포수가 현저하게 감소하였으며 CD8+세포 수가 증가함을 확인함.



<그림> crIL-21 시간차 자극 후 개 NK세포의 표현형 변화 (A, B) 및 증폭률 (C) 분석.

④ IL-21의 시간차 자극을 통한 체외증폭 14일 후 annexin V 와 propidium iodide (PI) 염색을 통한 각 군의 세포 자멸사 분석.

○ 각각의 군에서 체외배양 14일째 세포를 회수하여 annexin V 와 propidium iodide (PI)로 염색한 후 자멸사나 괴사를 통한 세포사의 비율을 비교한 결과 IL-21의 시간차 자극 및 자극시간에 따른 차이는 너터내지 않음을 확인함.

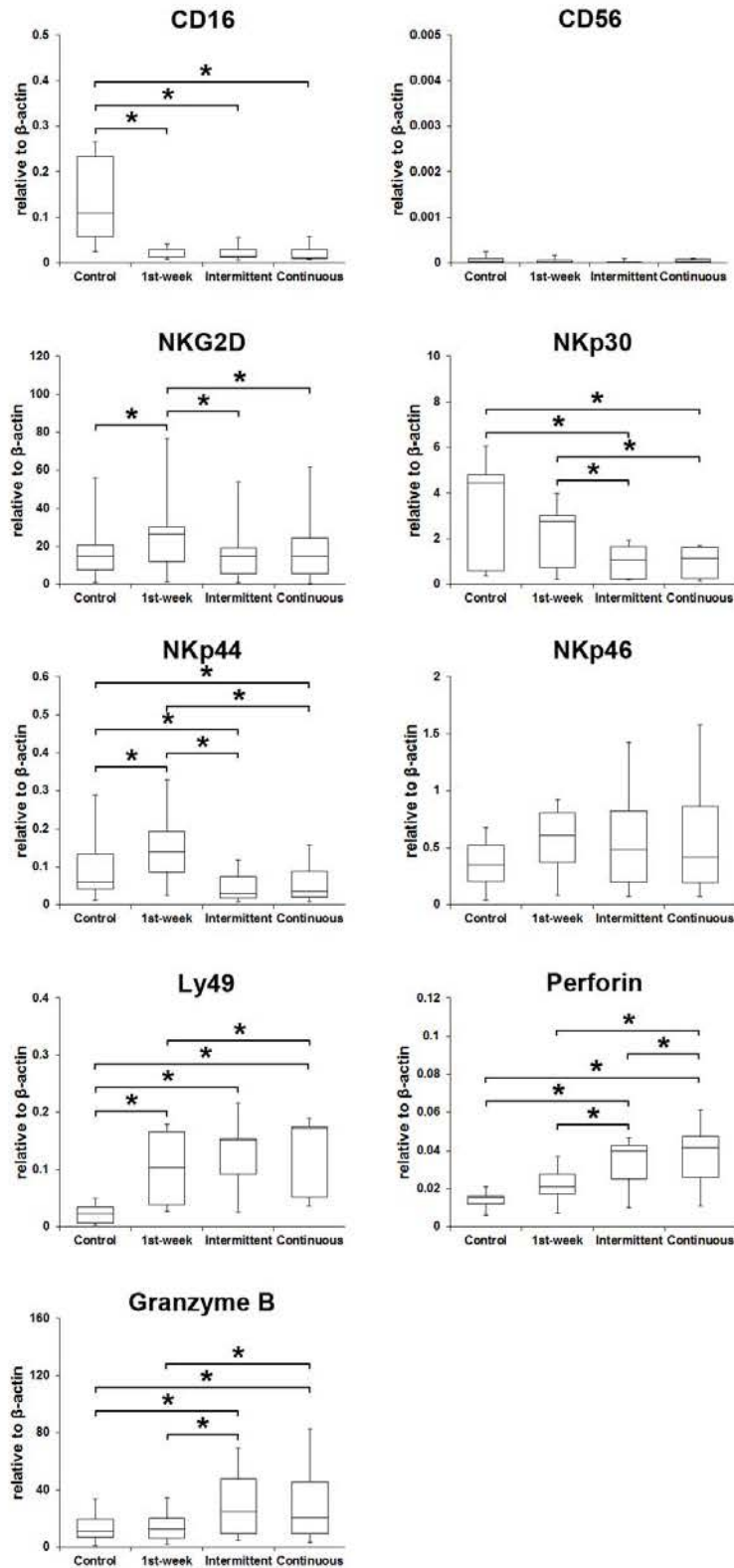


<그림> crIL-21 시간차 자극 14일 후 각 군에서 annexin V 와 propidium iodide (PI) 염색을 통한 세포사의 비율 비교.

⑤ rcIL-21의 시간차 자극으로 체외 증폭된 개 NK세포의 NK세포-관련 유전자 발현

○ 다음으로 IL-21 자극 조건을 달리하여 체외 증폭시킨 각 군별 NK-연관 유전자들의 mRNA 발현을 real-time RT-PCR 분석법으로 확인한 결과 CD56 및 NKp46의 발현은 IL-21자극에 의한 변화가 인정되지 않았으나 CD16의 발현은 IL-21자극 후 대조군 (PBMC)에 비해 현저히 감소한 결과를 보였고, Ly49의 발현은 IL-21자극에 의해 모든 군에서 대조군에 비해 현저히 증가함을 보였음. 퍼포린과 그랜자임 B의 발현은 지속자극(continuous) 및 간헐자극(intermittent) 군에서 현저한 증가를 나타내었고, NKG2D와 NKp44의 mRNA는 배양 처음 1주일간만 IL-21으로 자극한 군 (1st week)에서 다른 군에 비해 발현이 증가함을 확인함.



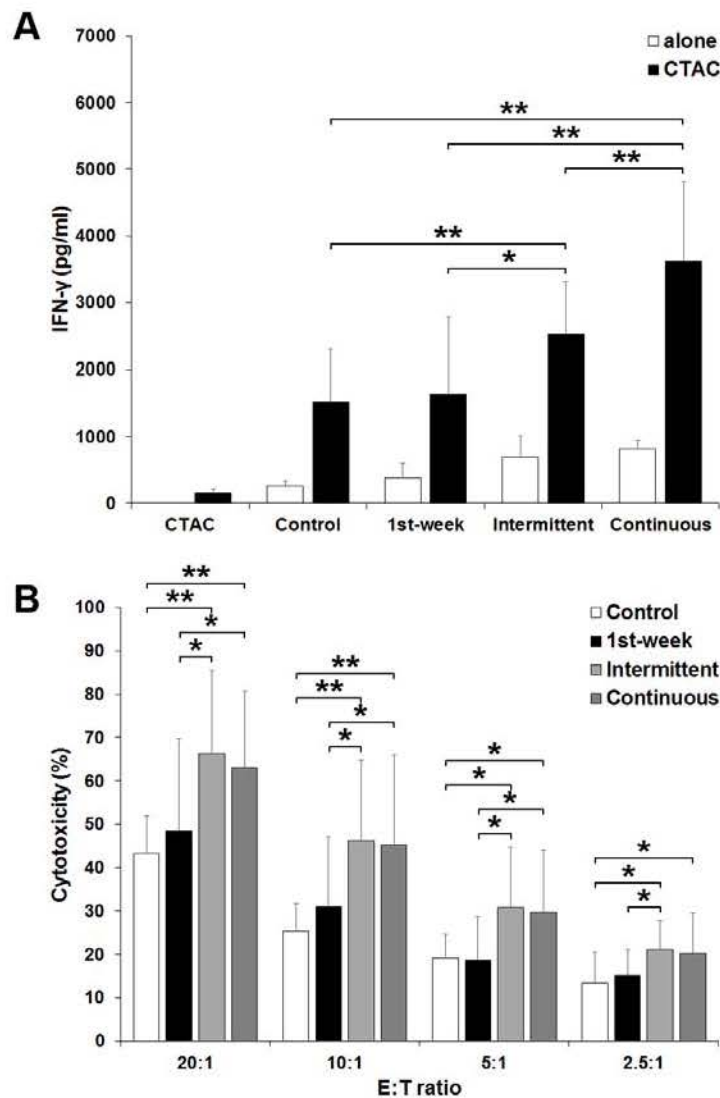


<그림> crIL-21 자극 조건에 따른 체외 증폭시킨 개 NK세포 내 real-time PCR을 이용한 CD16을 비롯한, CD56, NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46, Ly49, perforine, granzyme B 등의 NK세포-관련 mRNA 유전자발현 양의 비교.

⑥ rcIL-21의 시간차 자극으로 체외 증폭된 개 NK세포의 CTAC 암세포주에 대한 세포독성능 및 IFN-gamma 생성능

○ 체외 증폭과정에서 제조합 개 IL-21로 시간차 자극된 각 군들의 항암 기능을 평가하기 위해 CTAC에 대한 세포독성능을 평가하였다. 그 결과, 대조군에 비하여 제조합 개 IL-21이 첨가된 그룹들에서 모두 CTAC 암세포주에 대한 세포독성능이 증가하였으나, 배양 초기 1주일 간 자극한 군에 비해 매일 자극한 군과 매주 3일간 자극한 군에서 현저하게 세포살상능력이 증가된 것을 확인하였다.

○ IL-21 자극 조건을 달리하여 체외증폭시킨 각 군들에 비해서 개 NK세포 감수성 암세포주인 canine thyroid adenocarcinoma cells (CTAC)을 이용하여 10:1의 E:T ratio로 혼합하고 24시간 공조배양하여 인터페론-감마 생성능을 분석한 결과 continuous 군에서 현저하게 높은 생성능을 나타냄을 확인함.



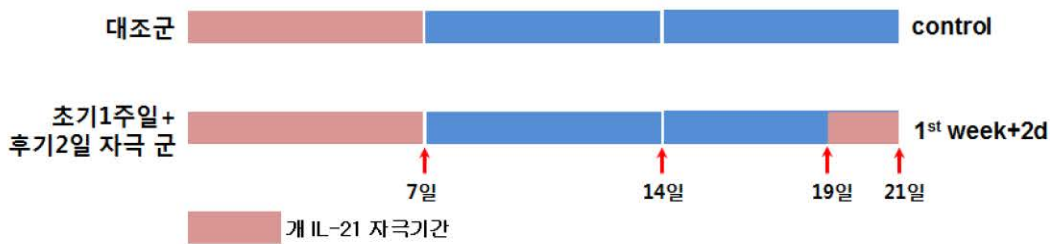
<그림> rcIL-21의 시간차 자극으로 체외 증폭된 개 NK세포의 CTAC 암세포주에 대한 IFN-gamma 생성능 (A) 및 세포독성능(B).

⑦ 재조합 개 IL-21의 시간차 자극으로 체외 증폭된 개 NK세포의 항암효능 증진을 위한 개 IL-21 후기 자극

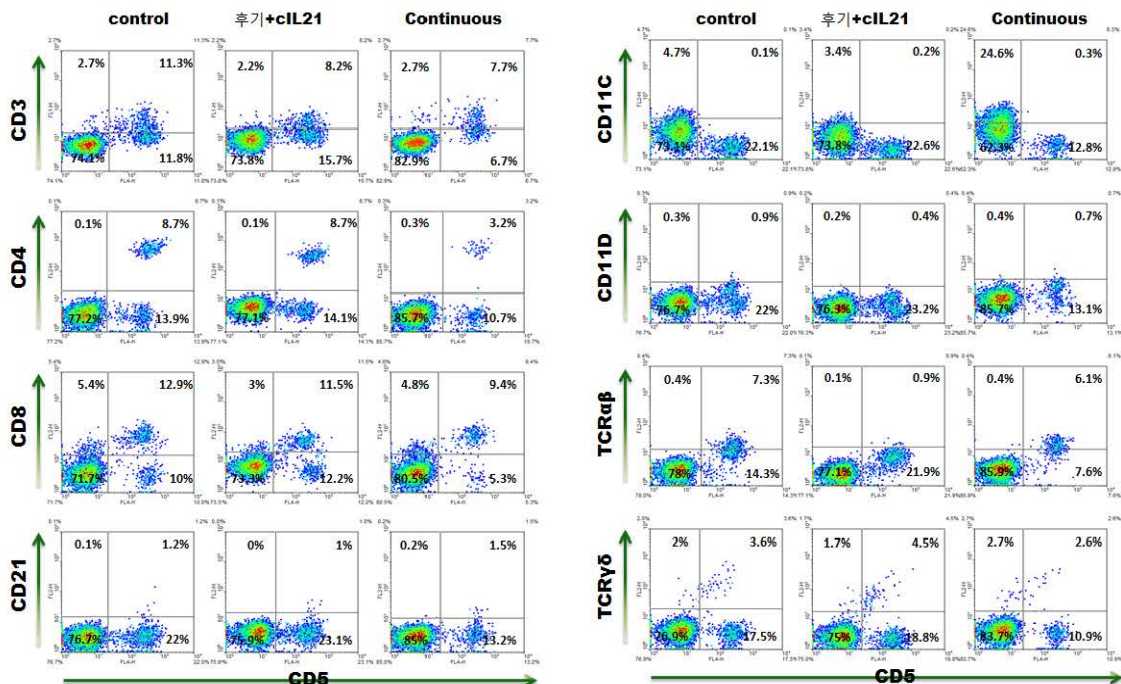
○ 개 IL-21의 시간차 자극으로 체외 증폭된 개 NK세포들의 세포독성능 결과로부터 체외 증폭과정에서 배양 초기 1주일 간 자극한 군에 비해 매일 자극한 군과 매주 3일간 자극한 군에서 현저하게 세포살상능력이 증가됨이 확인됨.

○ 개 IL-21을 배양 초기 1주일 간 자극한 군의 경우 NK세포의 증폭 효율이 다른 군에 비해 현저히 증가한 반면 매일 자극한 군이나 매주 3일간 반복 자극한 군에 비해 암세포살상능력이 낮기 때문에 항암기능을 증진시키기 위한 실험을 수행하기 위해 개 IL-21의 추가적인 자극 시점과 기간을 아래와 같이 디자인하였다.

개 인터루킨-21 후기 자극에 따른 실험군

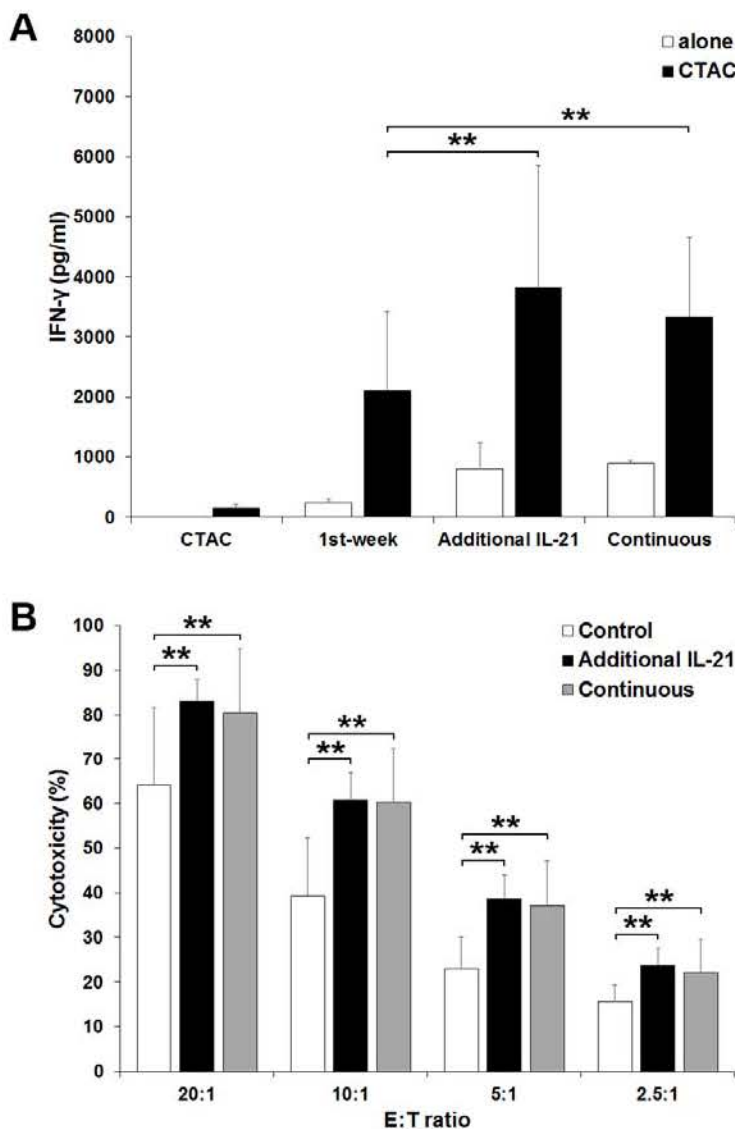


○ 3주동안 IL-21 자극 조건을 달리하여 증폭시킨 각 군을 분석한 결과 초기 1주 자극군이 가장 높은 증폭률을 보인 반면, continuous와 intermittent 군에서 비교적 높은 세포독성능과 인터페론 감마 생성능을 보였으므로 세포독성능이 우수한 다수의 개 NK세포를 증식시키고자 초기 1주 자극군에 다시 IL-21을 추가자극하는 방법을 통하여 NK세포의 항암 기능성 증가시키고자 세포수집 2일전에 IL-21을 48시간 자극하여 세포표현형을 유세포분석기법으로 분석한 결과 표면분자의 발현에는 큰 변화가 없음을 확인함.



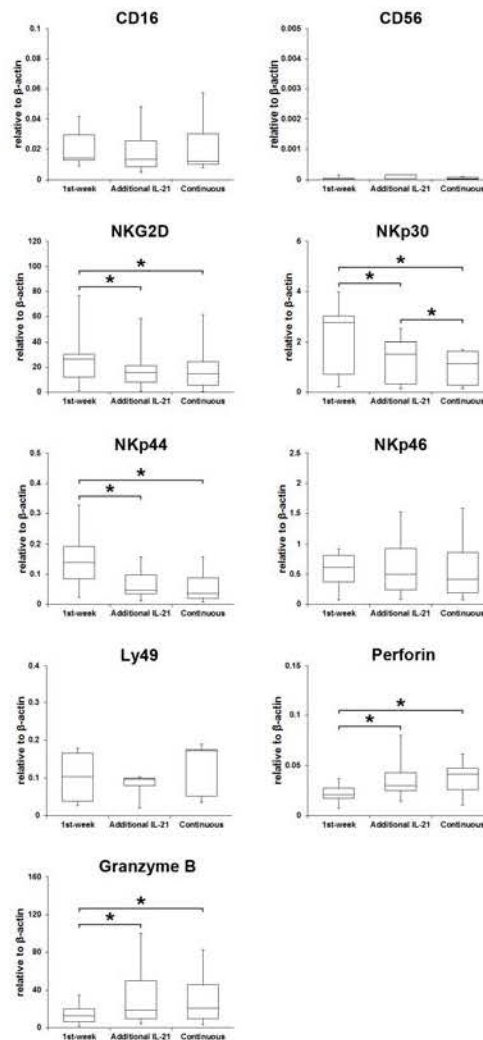
○ 체외 증폭률이 현저하게 증가된 조건에서 항암기능을 증진시키기 위해 초기 1주일간 개 IL-21을 자극한 군(1st week)에서 증폭 19일째에 추가적으로 개 IL-21을 5 ng/mL의 농도로 2일간 자극한 군(1st week+2d)과 자극하지 않은 군(control) 그리고 매일 자극한 군(continuous)들의 CTAC 세포주에 대한 세포독성능을 비교한 결과, 후기에 IL-21을 자극 하지 않은 control에 비해 세포독성능이 증진되었으며 매일 자극한 군(continuous)과 유사한 세포독성능을 보여주었다.

○ 초기 1주 자극군에 다시 IL-21을 48시간 추가자극시킨 각 군에 대해 개 NK세포 감수성 암세포주인 canine thyroid adenocarcinoma cells (CTAC)에 대한 10:1의 E:T ratio로 혼합하고 24시간 공조배양하여 인터페론-감마 생성능을 분석한 결과 마찬가지로 초기 1주 자극 군에 비해 생성능이 증진되었으며 continuous군보다 약간 더 높은 인터페론-감마 생성능을 보였다.



<그림> 재조합 개 IL-21의 시간차 자극으로 체외 증폭된 개 NK세포의 항암효능 증진을 위한 개 IL-21 후기 48시간 재 자극 후 CTAC 암세포주에 대한 IFN-gamma 생성능 (A) 및 세포독성능(B).

○ 아울러 체외 증폭률이 현저하게 증가된 조건에서 항암기능을 증진시키기 위해 초기 1주일 간 개 IL-21을 자극한 군(1st week)에서 증폭 19일째에 추가적으로 개 IL-21을 5 ng/mL의 농도로 2일간 자극한 군(1st week+2d)과 추가 자극하지 않은 대조군(1st week) 및 매일 자극한 군(continuous) 세포에서 NK-관련 유전자 발현을 real-time RT-PCR 방법을 통해 비교한 결과 IL-21의 추가 자극군 세포의 CD16을 비롯한, CD56, NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46, Ly49, perforine, granzyme B의 mRNA 수준은 매일 자극한 군 세포와 동일한 pattern으로 변화하였음. 특히 IL-21의 추가 자극군 세포의 perforine과 granzyme B 발현이 현저히 증가하여 추가 자극에 의한 세포독성능 증가는 이 두 분자의 발현증가에 기인한 것임을 확인할 수 있었음.



<그림> 체외 증폭률이 현저하게 증가된 조건에서 항암기능을 증진시키기 위해 초기 1주일간 개 IL-21을 자극한 군(1st week)에서 증폭 19일째에 추가적으로 개 IL-21을 5 ng/mL의 농도로 2일간 자극한 군(1st week+2d)과 추가 자극하지 않은 대조군(1st week) 및 매일 자극한 군 (continuous) 세포에서 NK-관련 유전자 발현의 real-time RT-PCR 방법을 통한 비교.

○ 이상의 결과 개 NK세포의 체외 증폭시 배양액의 조성은 IL-2, IL-15와 함께 초기 1주일 간만 IL-21를 첨가하여 배양한 후 세포 회수 48시간 전에 IL-21로 추가자극할 경우 최대의 체

의 증폭효율과 함께 항암기능을 극대화시킬 수 있음을 확인하여 최적의 배양 조건을 확립하였음.

**다. 냉동 보관된 개 NK 세포의 안정성 확보를 위한 NK세포의 냉동보관 방법 확립**

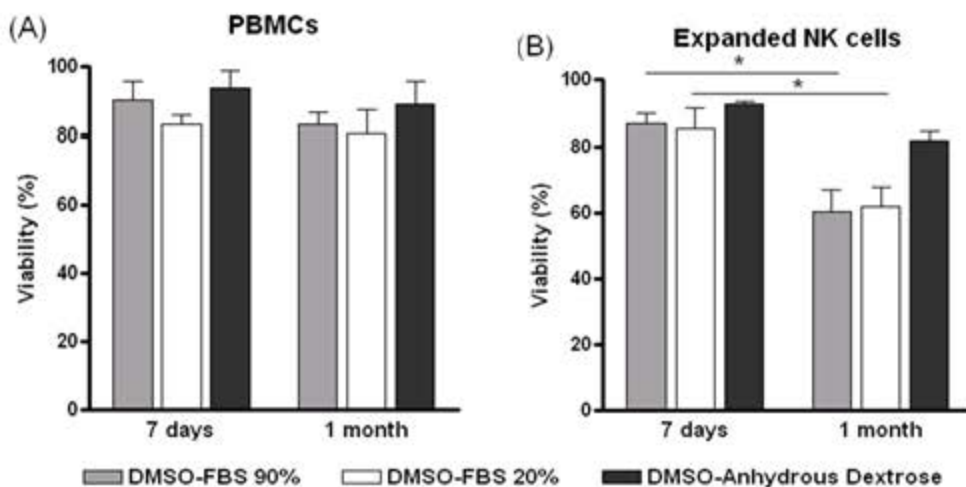
○ 동종 NK세포의 실제 임상적 활용을 용이할 수 있도록 할 목적으로 체외 대량 증폭된 NK세포의 냉동 보관방법 및 냉동 보관을 위한 배지의 조성을 확립하였으며, 냉동 보관 후 NK세포를 치료제로 주입하기 위해 해동 시 냉동에 의해 현저히 저하된 NK세포의 항암 기능을 회복시키기 위한 방법을 확립하였음 (연구원 김주선 공주대학교 석사학위논문, 논문제목: Comparison of different media for cryopreservation of peripheral blood mononuclear cells and expanded Natural Killer cells, SCI 국제학술지 투고 준비중).

○ 항암치료를 위해 NK세포를 이용하여 면역세포치료를 수행하는 경우, 말초혈액으로부터 단핵구를 분리하고 NK세포를 체외 증폭하기까지 2주에서 3주 정도 시간이 소요되므로 긴급상황 시에는 바로 적용하기 어려운 장애가 존재한다.

○ 이러한 시간적 장애를 극복하기 위해서 사전에 NK세포를 충분히 체외 증폭하여 극저온 냉동보관을 하면 필요시 마다 사용할 수 있는 장점이 있으나, 극저온 동결후 해동하여 사용할 경우 NK세포의 항암기능이 저하되는 문제가 발생할 수 있다.

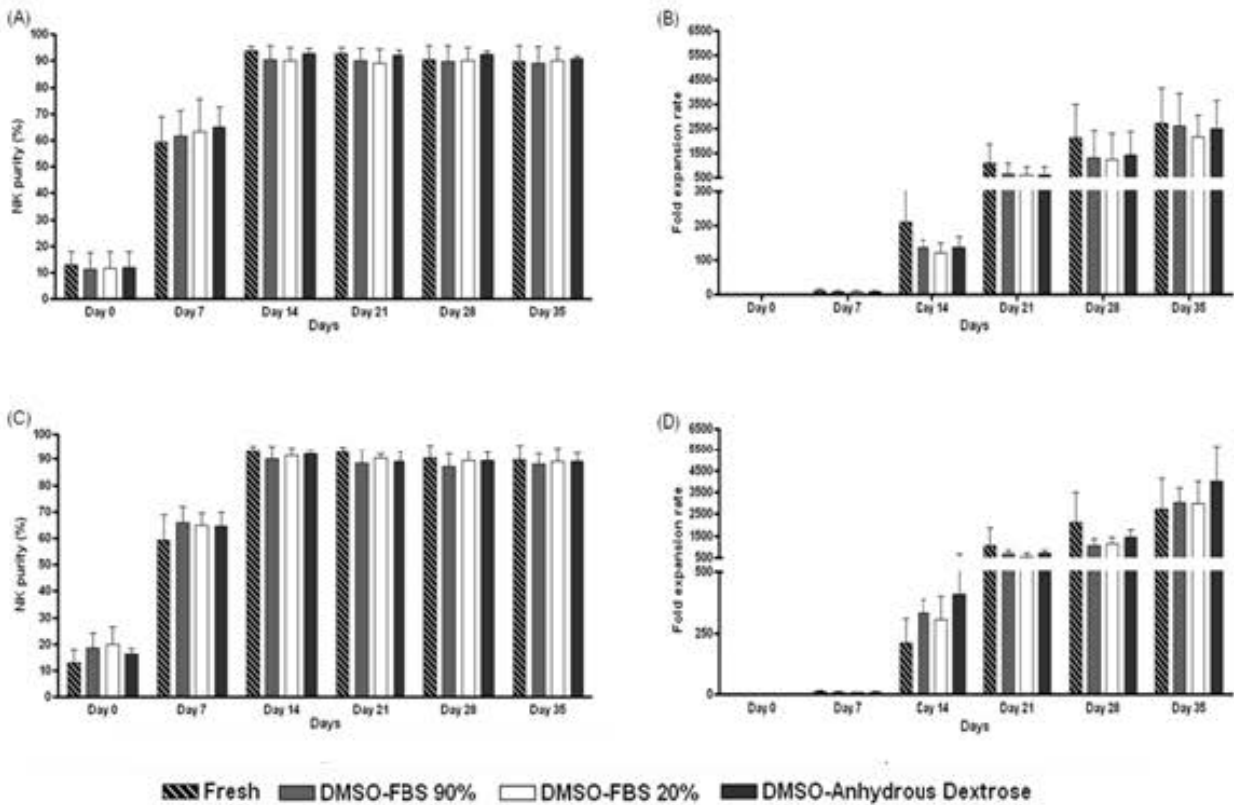
○ 냉동배지를 제조하여 액체질소(-196℃)에서 냉동 후 이를 다시 해동하여 그것들의 생존력을 평가하였다. 이를 위해 각각의 극저온 냉동 배지로 NK세포들을 현탁한 후 튜브당 백만개의 세포를 함유하는 1 mL 용량으로 분주하여 액체질소에 보관한 후 1 주일 및 1개월 후에 해동하여 1시간 정도 된 배양 배지에서 안정화시킨 후 4% trypan blue 용액으로 염색하여 살아 있는 세포수를 계수하였다. 그 결과, 1주일내에는 90% 이상이 생존하였으며 1달 보관시에는 80%이상이 생존함을 확인하였다.

○ 냉동보관을 위한 배지 조성에 따른 냉동보관 1개월 후 PBMC와 증폭된 NK세포의 생존률을 비교한 결과 DMSO와 함께 Anhydrose-Dextrose를 함유한 배지에서 약 83% 이상의 세포가 생존하여 10% DMSO 90% FBS 냉동배지 및 10% DMSO 20% FBS 70% media로 구성된 냉동배지에 비해 가장 높은 생존율을 나타냄을 확인하였음.



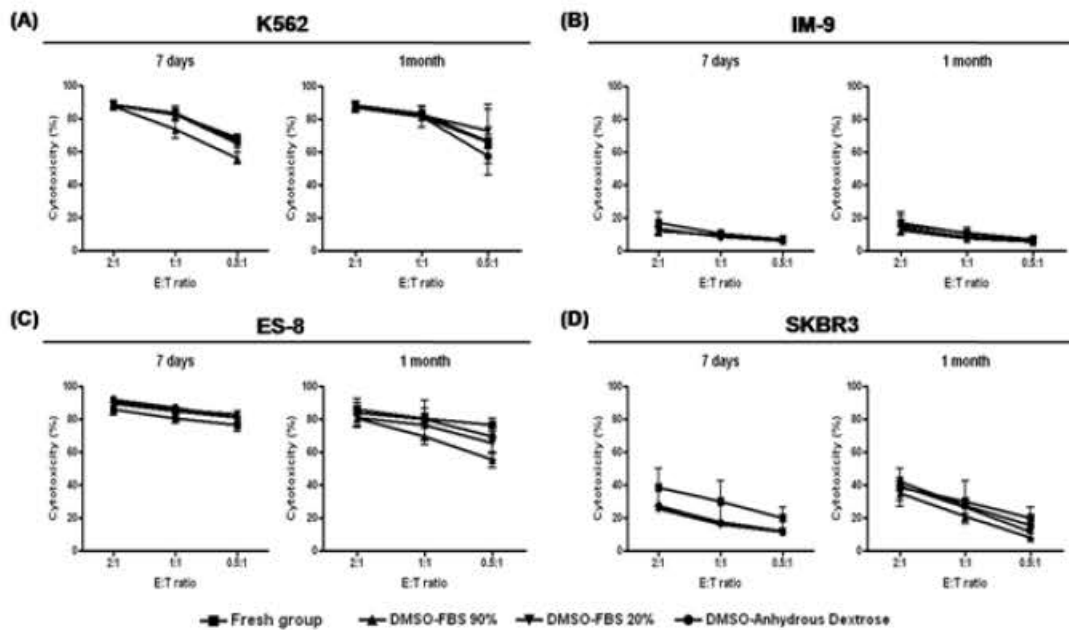
<그림> 냉동보관을 위한 배지 조성에 따른 냉동보관 1개월 후 PBMC와 증폭된 NK세포의 생존률 비교.

○ 이와 아울러 말초혈액에서 PBMC를 분리한 후 조성이 다른 냉동보관 배지에 1개월간 냉동 보관시킨 후 해동한 다음 NK세포를 채취에서 14일간 증폭시킨 결과 NK세포 증폭률을 신선한 혈액에서 바로 분리한 PBMC의 동일 조건에서 NK세포 증폭률을 비교한 결과 NK세포의 순도와 증폭률에 차이가 없음을 확인하였음.



<그림> 말초혈액에서 PBMC를 분리한 후 조성이 다른 냉동보관 배지에 1개월간 냉동 보관시킨 후 해동한 다음 NK세포를 채취에서 14일간 증폭시킨 결과 NK세포 증폭률을 신선한 혈액에서 바로 분리한 PBMC의 동일 조건에서 NK세포 증폭률 비교.

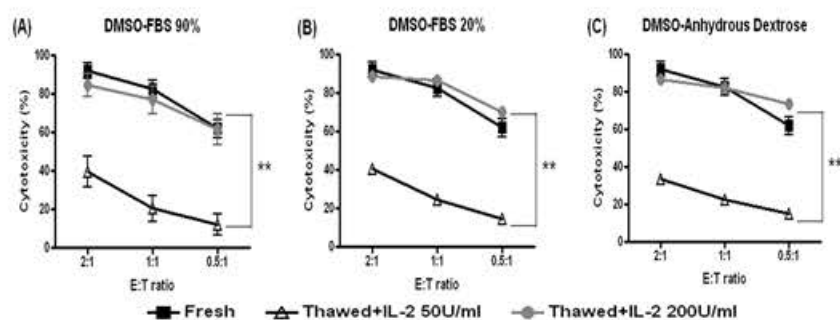
○ 말초혈액에서 PBMC를 분리한 후 조성이 다른 3가지의 냉동보관 배지에 각각 1개월간 냉동 보관시킨 후 해동한 다음 채취에서 14일간 증폭시킨 NK세포의 각종 암세포에 대한 세포독성능을 비교한 결과 냉동배지의 조성에 관계 없이 세균에서 모두 동일한 정도의 암세포에 대한 세포독성능을 나타냄을 확인하였음.



<그림> 말초혈액에서 PBMC를 분리한 후 조성이 다른 3가지의 냉동보관 배지에 각각 1 개월 간 냉동 보관시킨 후 해동한 다음 체외에서 14일간 증폭시킨 NK세포의 각종 암세포에 대한 세포독성능 비교.

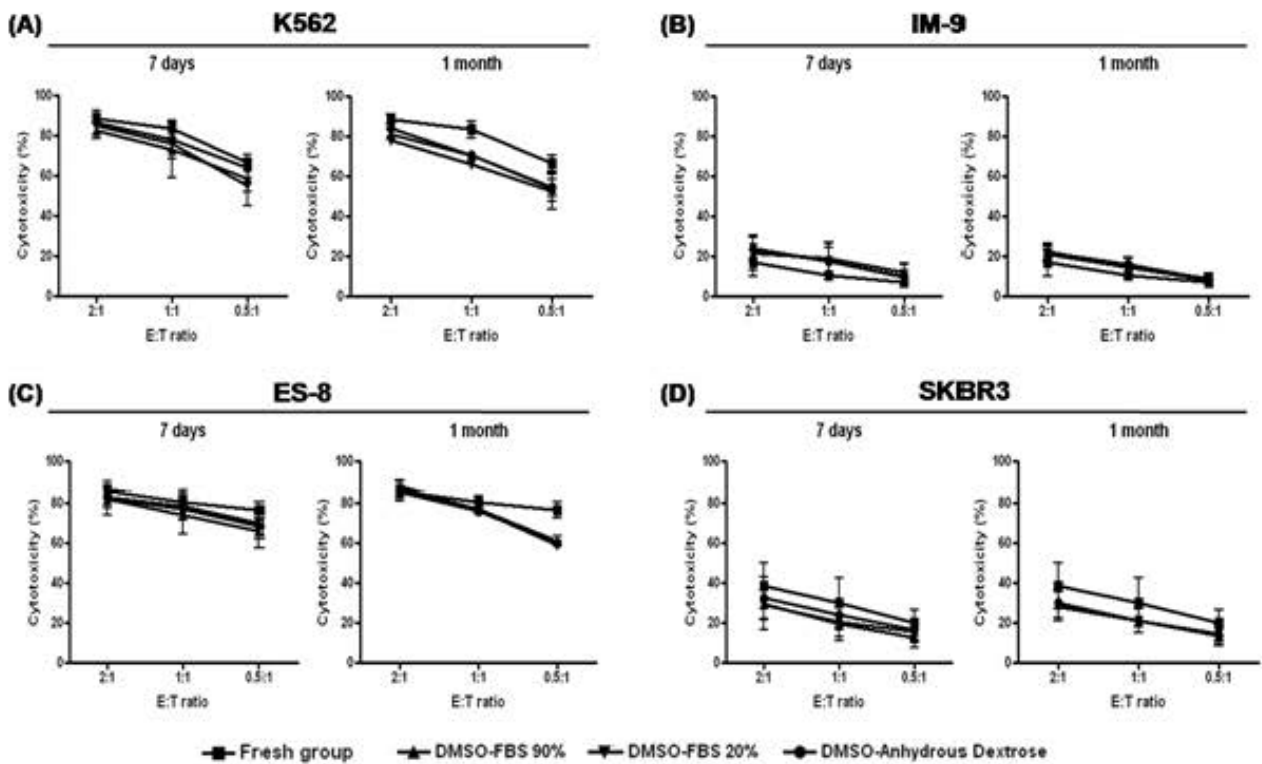
○ 신선한 말초혈액에서 PBMC를 분리한 후 14일간 체외 배양 시킨 NK세포를 조성이 다른 3 가지 냉동보관배지에 넣어 1개월간 냉동 보관 후 해동시킨 다음 암세포 (K562)에 대한 세포 독성능을 비교한 결과 냉동보관하지 않은 신선한 증폭 NK세포에 비해 냉동 보관시킨 후 해동 한 증폭 NK세포의 세포독성능이 현저히 저하됨을 관찰하였음.

○ 이와 같은 냉동된 NK세포의 해동 후 항암기능의 저하 문제를 해결하기 위해 극저온에서 냉동보 관을 위한 배지의 조성을 확립하였으며, 냉동보관 후 NK세포를 해동시킨 후 IL-2가 200 IU/mL이 첨가 된 배지에서 18시간 안정화시켜 냉동시키지 않은 신선한 NK세포와의 viability 및 암 세포주에 대한 세포독성능을 비교한 결과, 세포독성능은 신선한 군의 NK세포 세포독성능에 대한 90% 이상의 수준으로 세포독성능이 회복되었음을 확인하였다.



<그림> 해동시킨 후 IL-2가 200 IU/mL이 첨가된 배지에서 18시간 안정화시켜 냉동시키지 않은 신선한 NK세포와의 암 세포주에 대한 세포독성능을 비교.





<그림> 냉동된 NK세포의 해동 후 항암기능의 저하 문제를 해결하기 위해 극저온에서 냉동보관을 위한 각각 다른 3가지 냉동매질의 조성에서 7일 또는 1개월간 냉동보관 후 해동시킨 다음 IL-2가 200 IU/mL이 첨가된 매지에서 해동 NK세포를 18시간 안정화시켜 냉동시키지 않은 신선한 NK세포와 암 세포주에 대한 세포독성능 비교.

○ 이상의 결과 본 연구의 냉동매질 조성에서 세포를 정기적으로 해동시켜 검사한 결과 냉동 1~5개월까지 생존율이 변화가 없는 것을 확인하였습니다.

○ 위의 결과로 제조한 냉동 media를 이용해 극저온 냉동보관 중인 체외 증폭 NK세포들을 해동 후에 높은 생존율을 유지하였고, 해동 후 세포독성능을 높은 수준으로 유지하기 위하여 IL-2가 첨가된 매지에서 overnight 안정화시키는 방법을 활용하여 저장한 NK세포들은 필요시마다 언제든지 꺼내서 사용할 수 있어 신속한 면역세포치료제 임상적 응용이 가능한 냉동보관 방법을 확립하였음.

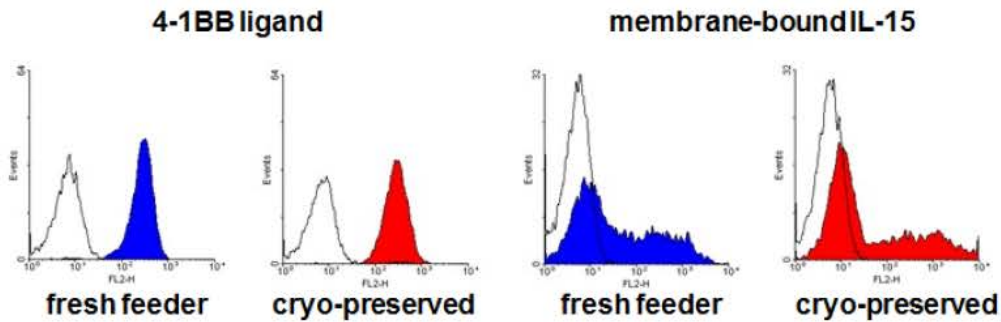
**라. 방사선조사 후 냉동 보관한 feeder cell을 이용한 신선한 feeder 세포와 동등한 정도의 NK세포 증폭 조건을 확립**

○ NK세포의 대용량 증폭을 용이하게 수행하기 위하여 방사선조사 후 냉동 보관한 feeder cell을 이용한 신선한 feeder 세포와 동등한 정도의 NK세포 증폭 조건을 확립하여 그 결과를 SCI 국제학술지에 게재하였음 (Anticancer Research 2013;33(5):2011-9).

**① 방사선 조사 후 feeder 세포주 표면상의 IL-15와 4-1BB 리간드 발현 변화 분석**

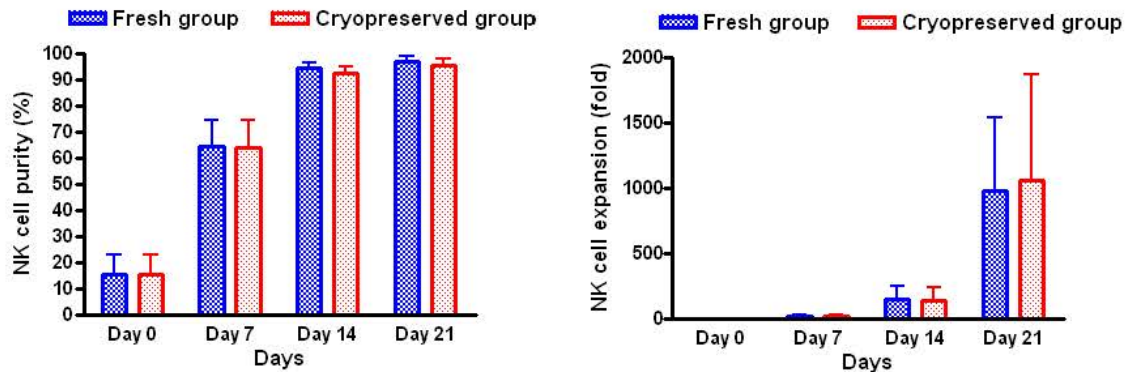
○ 감마선 조사(irradiation) 후 극저온 냉동보관 시 NK세포 증폭에 필수적인 역할을 수행하는 feeder 세포주 표면상의 4-1BB 리간드와 막단백질형태로 제조된 IL-15의 발현이 변화하는가를 확인하기 위해 방사선 조사 후 feeder세포주의 극저온 냉동보관 전(fresh) 후(cryo-preserved)로 각각의 담침용 명광함체로

결합시켜 유세포 분석을 실시하였다. 그 결과 냉동보관 전 후로 두 인자들의 발현상의 변화가 없음을 확인하였다.



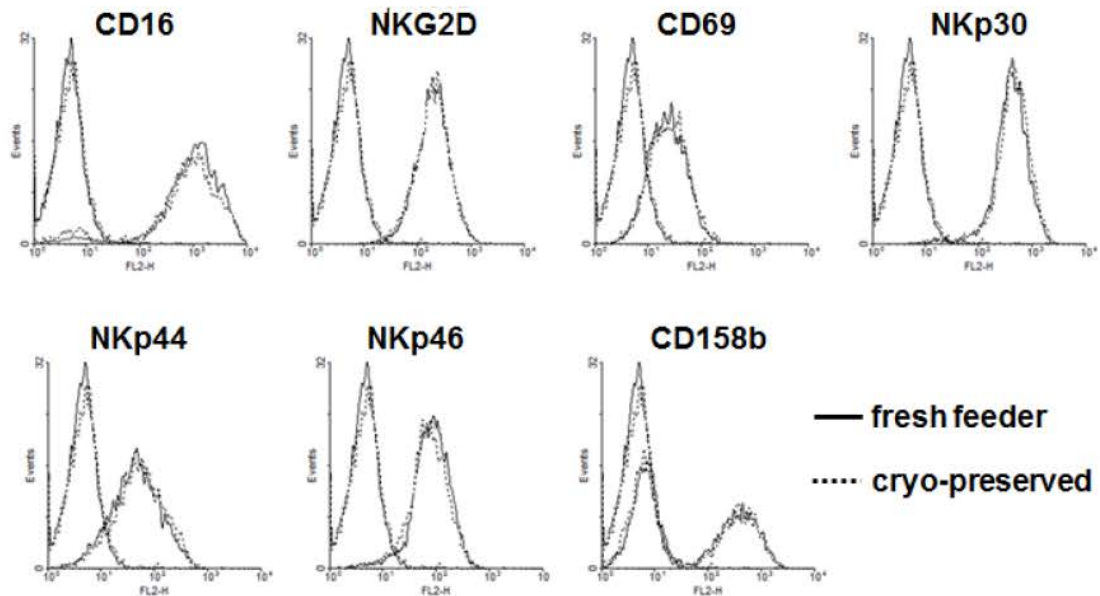
② 극저온 냉동 보관 feeder 세포주를 이용한 NK세포의 체외 증폭효율 변화 분석

○ 감마선 조사 후 극저온 냉동보관된 feeder 세포주를 이용하여 말초혈액으로부터 NK세포 체외 증폭 시 증폭효율이 변화하는 지를 확인하기 위해 감마선 조사 및 극저온 냉동보관 전 후의 feeder세포주로 3주간의 체외 증폭하여 각각의 NK세포의 증폭 효율을 비교하였다. 그 결과 냉동보관 전 후로 증폭된 NK세포의 순도(purity)와 증폭률에 변화가 없음을 확인하였다.



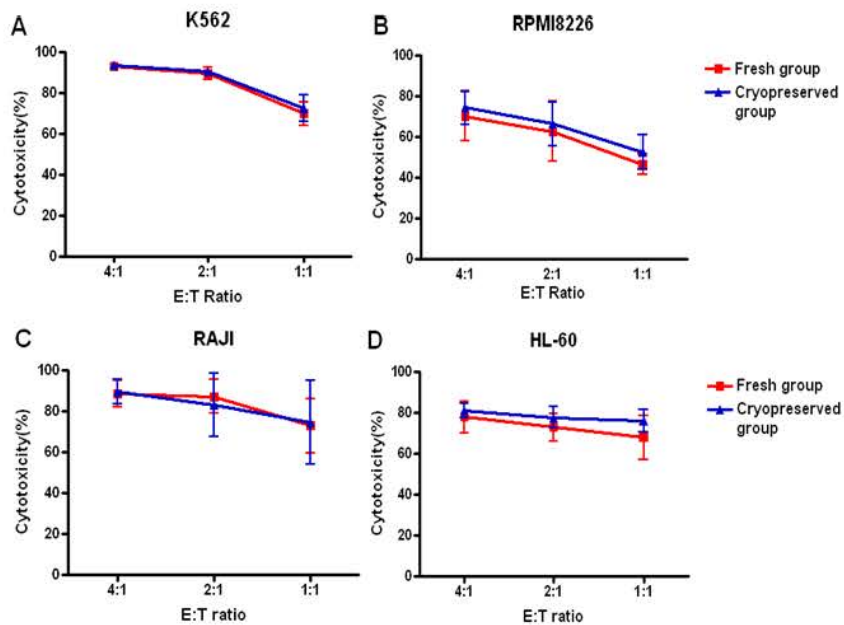
③ 극저온 냉동 보관 feeder 세포주로 체외 증폭된 NK세포의 수용체 변화 분석

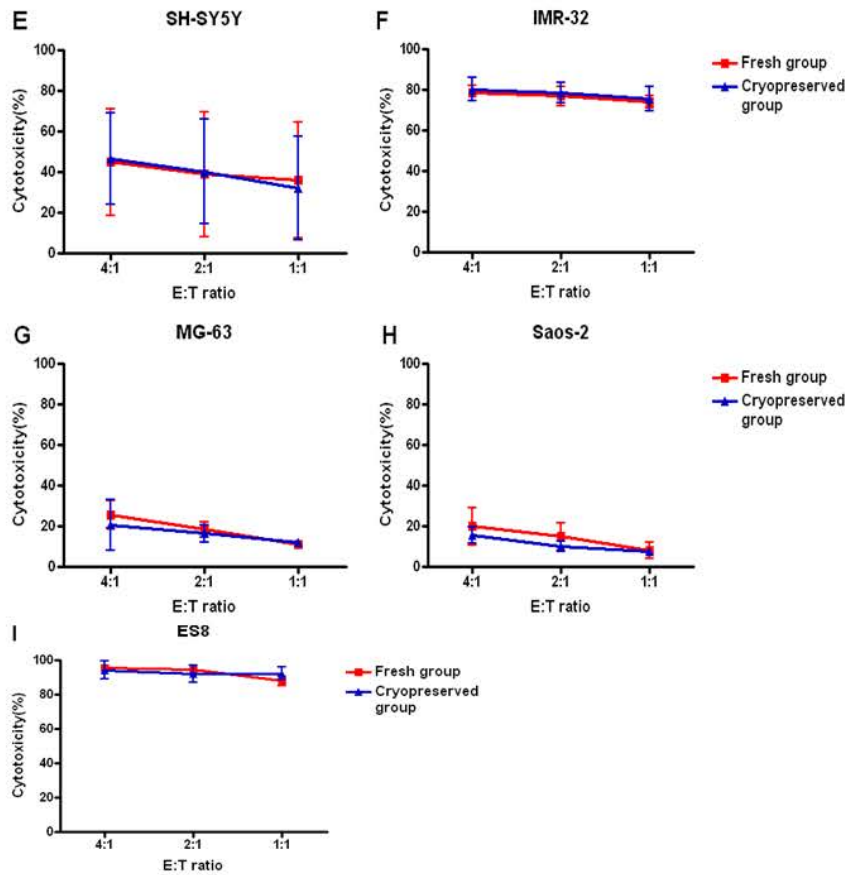
○ 상기의 방법으로 체외 증폭된 NK세포 표면상의 활성화 및 저해 수용체의 발현이 변화하는 가를 확인하기 위해 극저온 냉동보관 전 후의 feeder세포주로 2주간 체외 증폭된 NK세포에 대하여 해당 형광항체를 결합시켜 유세포 분석을 수행한 결과, 냉동보관 전 후로 증폭된 NK세포 표면상의 수용체 분자의 발현 변화가 없음을 확인하였다.



④ 극저온 냉동보관 feeder 세포주로 채의 증폭된 NK세포의 세포독성능 분석

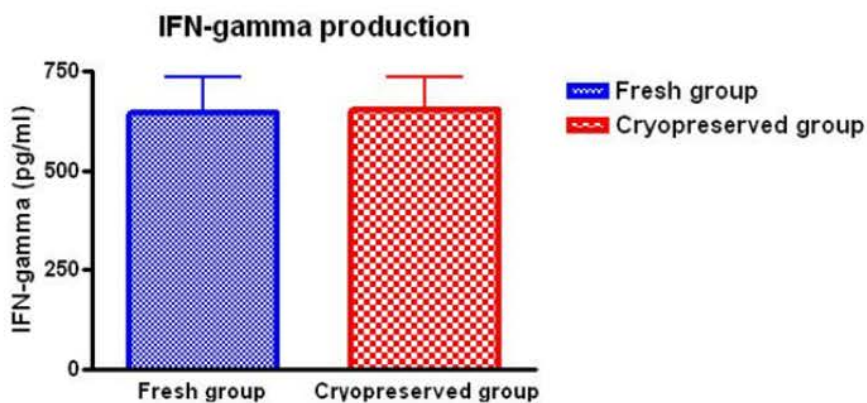
○ 극저온 냉동보관 feeder 세포주로 증폭시 NK세포의 항암기능에 변화를 유발하는 가를 확인하기 위해 극저온 냉동보관 전 후의 feeder세포주로 3주간 채의 증폭시킨 NK세포에 대하여 다양한 암세포주에 대하여 세포독성능을 평가한 결과, 냉동보관 전 후로 증폭된 NK세포의 세포독성능에 유의미한 변화가 없음을 확인하였다.





⑤ 극저온 냉동보관 feeder 세포주로 체외 증폭된 NK세포의 인터페론-감마 생성능 분석

○ 극저온 냉동보관 feeder 세포주로 증폭시 NK세포의 항암기능을 유지하는 가를 확인하기 위해 극저온 냉동보관 전 후의 feeder세포주로 3주간 체외 증폭시킨 NK세포를 이용하여 K562 암세포주에 대하여 인터페론-감마 생성을 비교한 결과, 냉동보관 전 후로 증폭된 NK세포의 인터페론-감마 생산에 유의미한 변화가 없음을 확인하였다.



○ 이상의 결과들로부터, 극저온 냉동보관 feeder 세포주로부터 증폭된 NK세포들의 증폭률과 순도, 세포 표면 활성화 수용체의 발현, 그리고 세포독성능과 인터페론-감마 생성능 등을 포함한 항암기능에 영향이 없음을 확인하였다.

**마. 주입된 동종 NK세포의 생체내 생착 여부에 대한 평가를 위한 chimera 검출법 및 체외 증폭된 개 NK세포 주입 후 항암 효과 및 효능 평가를 위한 immune monitoring 방법 확립**

○ 체외 증폭된 NK세포의 임상적용을 위한 효능 검증 시 주사된 동종 NK세포가 환자의 체내에서 생착된 후 얼마나 오랫동안 살아남아 항암효과를 발휘하는지를 평가하기 위한 방법으로 chimera 검출법을 확립하였음.

○ chimera 검출 방법을 확립하기 위한 방법으로 개체마다 특징적인 길이를 갖는 짧은 반복서열인 미세위성(microsatellite) DNA 검출법을 이용하였고, 그 감별능력을 실험실 수준에서 평가하였다.

○ 이를 위해 이종의 개의 말초혈액에서 백혈구들을 수집하고 공여체의 백혈구세포들을 1/10의 일정비율로 희석이 되는 형태로 혼합하였다. 혼합비율은 수용체의 백만개의 혈구세포 당 공여체 한 개의 세포가 포함되도록 하면서 각 혼합시료의 전체 세포수를  $1 \times 10^7$ 이 되도록 하였다.

○ chimera검출을 위한 실험에 사용된 primer서열과 PCR 증폭조건은 다음과 같음.

Selected Microsatellite Marker

Primer	FluorescentDye		Sequence of primer
SRY	NED	F	GAACGCATTCTTGGTGIGGTCCTC
		R	GGCCATTTTTCGGCTTCTGTAAG

Microsatellite DNA의 PCR 증폭 반응 조성물

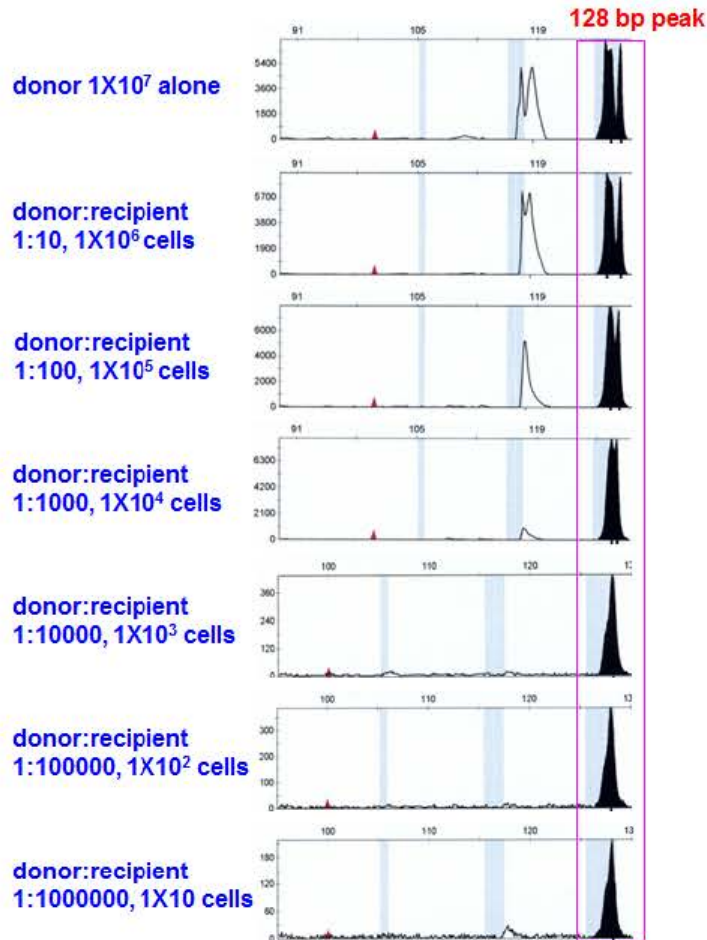
PCR mixture 조성은 총  $15 \mu\text{l}$ 로 10 uM fluorescent dye-labelled primer 각각  $1 \mu\text{l}$ , 2.5mM MgCl<sub>2</sub>  $1.5 \mu\text{l}$ , 10X GeneAmp PCR Gold buffer  $1.5 \mu\text{l}$ , dNTP(각각 250uM)  $1.5 \mu\text{l}$  와 AmpliTaq Gold DNA polymerase  $0.12 \mu\text{l}$ , template로 100ng의 genomic DNA가 포함되었다.

PCR condition

Initial incubation step	35 cycles			Final Extention	Final step
	Melting	Annealing	Extend		
95°C 10 min.	94°C	58°C	72°C	72°C 30 min	4°C ∞
	30 sec.	30 sec.	30 sec.		

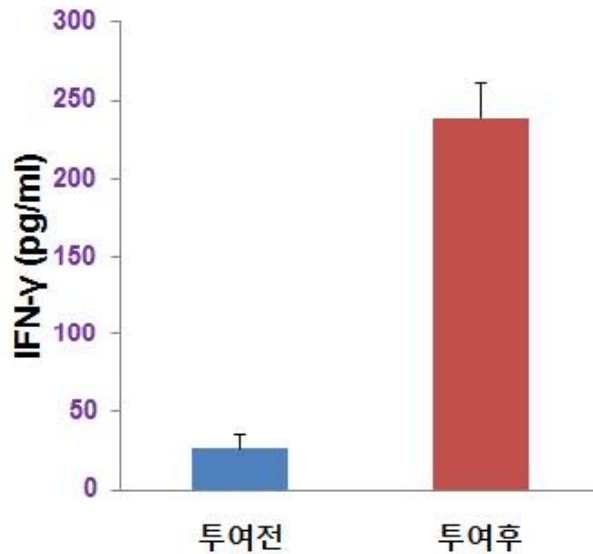
○ 각각의 혼합시료에서 염색체 DNA를 분리정제하였고, 공여체의 미세위성 DNA를 검출할 수 있는 특이 프라이머를 이용하여 PCR 증폭을 통해 그 검출 감도를 분석한 결과 백만 개당 1개의 chimera 세포까지도 유효범위(형광감도 120이상)에서 검출됨을 확인하였음.

○ 이상에서와 같이 주사된 세포의 생체 내 생착 여부에 대한 평가를 위해 1:1,000,000의 세포까지 확인할 수 있는 chimera 검출법을 확립하였음.



<그림> 공여혈액의 증폭 NK세포를 환자의 PBMC와 혼합한 혼합시료에서 염색체 DNA를 분리정제한 후 공여체의 미세위성 DNA를 검출할 수 있는 특이 프라이머를 이용하여 PCR 증폭을 통해 그 검출 감도를 분석한 결과

- 환자에 주사된 동종 NK세포의 생체 내 생착 여부 및 주사 후 생존기간에 대한 평가를 위한 chimera 검출법 및 CFSE를 이용한 검출법을 확립하였으며, 체외 증폭된 개 NK세포 주입 후 항암 효과 및 효능 평가를 위한 immune monitoring 방법을 확립하였음.
- NK세포가 효과세포(effector cells)로서 갖는 중요한 특징으로는 암세포에 대한 세포독성능(cytotoxicity)과 인터페론-감마생성능력이다. 특히 인터페론-감마는 항암·항염증 등의 면역반응 조절에 필수적인 사이토카인이며,
- NK세포에서는 항암효능 및 활성도의 기본 지표로 사용되고 있다. 따라서 체외 증폭된 개 NK세포 주입 후 임상적 효능 검사는 생체주입 후 일정 기간 후에 말초혈액에서 분리한 단핵구들의 인터페론-감마 생성능을 조사함으로써 그 항암 효능을 평가할 수 있다.
- 인터페론-감마 생성능 분석을 통한 면역모니터링을 확립하기 위해서 14일간 배양한 개 NK세포를 주사한 후 말초혈액을 채혈하여 혈액내 인터페론-감마의 농도를 투여 전 후로 비교함과 아울러 일정기간 후 단핵구를 분리한 후 감수성 CTAC 세포주와 공조배양하여 그 세포배양액을 회수하고 ELISA 방법으로 생성된 인터페론-감마의 농도를 투여 전 후로 비교함으로써 투여된 개 NK세포의 항암효능을 평가할 수 있었다.



<그림> 증폭된 동종 개 NK세포 주입 후 함압 효과 및 임상적 효능 평가를 위한 immune monitoring 방법 확립.

○ 인터페론-감마 검출을 위한 ELISA를 실시하기 위하여 EDTA 튜브에 혈액 1ml을 채혈한 후 1200rpm에서 5분간 원심분리하여 혈장 얻음. 혈장 50 $\mu$ l를 ELISA kit에 첨가하여 지시대로 분석하였음.

**바. 동종 NK세포를 이용한 암치료제의 효능을 극대화시키는 adjuvant로 사용하기 위해 재조합 개 Interleukin-15의 정제 생산기술을 개발 확립**

○ 생체내에서 NK 세포의 분화를 촉진하여 개 말초혈액 내 NK세포의 수를 증가시켜 체외 증폭효율을 극대화시킴과 아울러, 주사된 동종 NK세포의 암세포 살상기능을 격화시킬 뿐만 아니라 주사 후 동종 NK세포가 장기간 살아남아 함압 기능을 오래 지속적으로 발휘할 수 있도록 함으로서 동종 NK세포를 이용한 암치료제의 효능을 극대화시키는 adjuvant로 사용하기 위해 재조합 개 Interleukin-15의 정제 생산기술을 개발 확립하였으며 (특허등록 완료, 등록번호: 10-1440915, 발명의 명칭: 개 인터루킨-15 체외 증폭용 프라이머 세트, 이의 용도 및 이를 이용한 재조합 개 인터루킨-15 제조방법),

○ 동종 NK세포를 이용한 암치료제의 효능을 극대화시키기 위한 재조합 개 Interleukin-15의 생산기술의 사업화를 위해 최근 이 기술을 (주)박셀바이오에 기술이전을 실시하였음.

○ 정제 생산된 재조합 개 Interleukin-15 (rcIL-15)가 효율적으로 개 NK세포의 체외 증폭을 유도할 뿐만 아니라 체내 주입 후 면역기능을 향상시킴을 확인하여, rcIL-15의 제조기술과 함께, 그 결과들을 종합하여 SCI 국제학술지에 게재하였음 (Generation of recombinant canine interleukin-15 and evaluation of its effects on the proliferation and function of canine NK cells, Vet Immunol Immunopathol 165:1-13).

○ 개의 말초혈액에는 NK세포의 개체수(전체 림파구세포 중 0~5% 차지)가 사람(평균 10~15%)에 비해 현저하게 낮음. 면역세포치료를 수행하기 위해 개의 말초혈액으로부터 극소량으로 존재하는 NK세포를 분리하고 정제하여 함압치료에 직접 사용하는 것은 사실상 불가능할 뿐만 아니라 말초혈액으로부터 NK세포를 체외 증폭하는데 심각한 장애 요인이 됨.

○ 따라서 본 발명에서는 골수세포에서 NK세포의 발생과 분화에 필수적인 사이토카인

(cytokine)인 IL-15를 개에 투여하여 말초혈액 내의 개 NK세포의 개체수를 증가시킴으로써 개 NK세포의 체외증폭 효율을 증진시켜 궁극적으로 체외 증폭된 개 유래의 NK세포를 실제 임상에서 시술할 수 있는 수준의 대용량 체외 증폭기술을 확립하는데 이용하고자 실시하였음.  
 ○ IL-15는 생체내에서 NK 세포의 분화를 촉진하여 개 말초혈액 내 NK세포의 수를 증가시켜 체외 증폭효율을 극대화시킴과 아울러, 주사된 동종 NK세포의 암세포 살상기능을 최적화시킬 뿐만 아니라 주사 후 동종 NK세포가 장기간 살아남아 항암 기능을 지속적으로 발휘할 수 있도록 함으로서 동종 NK세포를 이용한 암치료제의 효율을 극대화시키는 adjuvant로 사용이 가능함.

① 개 IL-15 유전자 클로닝

○ 개에 수용성 IL-15 단백질의 생체투여를 위해서는 재조합 개 IL-15를 정제해야 하고 이를 위해서는 재조합 개 IL-15를 대장균에서 발현하는 벡터를 제조해야 한다. 재조합 발현 시스템을 구축하기 위해 첫 단계로 유전자를 클로닝하였다.  
 ○ 이를 위해, 먼저 개 IL-15 mRNA 염기서열(Genbank accession number, NM\_001197188.1)을 토대로 하여 단백질로 번역되는 유전자 암호화 서열 (open reading frame, ORF)인 243-731 뉴클레오타이드 489 염기쌍을 증폭할 수 있는 프라이머를 제조하였다.

cIL-15 forward primer : AAAGAATTCATGAGAATTTTCGAAACCACATTTG

cIL-15 reverse primer : AACTGCAGTCAAGAGGAGTTGATGAACATTTG

○ 개의 말초혈액에서 백혈구 세포들을 분리 및 수집한 후 배지에 지질다당류(LPS)를 1 μg/mL 농도로 첨가하여 16시간 자극한 후 백혈구세포들을 수집하고 Trizol이라는 용액을 이용하여 전체 RNA 분자들을 분리 정제한 후 Promega사의 Improm-II 역전사 효소를 이용하여 상보적 cDNA를 합성하고, 합성된 상보적 DNA를 주형으로 이용하고 상기의 프라이머로 PCR을 수행하여 507 bp의 증폭된 DNA 단편을 얻었다.

○ 증폭된 단편을 정제한 후, 이를 pGEM T easy vector와 16°C에서 16시간 ligation하고, ligation 산물은 대장균 DH5α에 형질전환시켰다. 다음날 형질전환된 클론 10개를 진탕배양하고 플라스미드 DNA를 iNtRON사의 DNA-spin plasmid DNA purification Kit로 정제하고 바이오니아사에 DNA 염기서열분석을 의뢰하였다. 그 결과, 변이가 없는 정상 IL-15 coding 서열을 운반하는 클론을 획득하였고, 이를 pGEMT-cIL15라 명명하였다.

② 개 IL-15의 대장균 유래의 발현시스템 구축

○ IL-15는 세포내에서 합성 후 세포 밖으로 분비되는 단백질이므로 실제 생체내 생물학적 기능을 수행하는 성숙형의 단백질을 생산하기 위해서 분비신호서열을 제외한 나머지 폴리펩타이드 서열만을 증폭하기 위한 프라이머를 작성하였다.

mature IL-15 forward primer :

GAAGAATTCATATGAATTGGCAGGACGTGATACTT

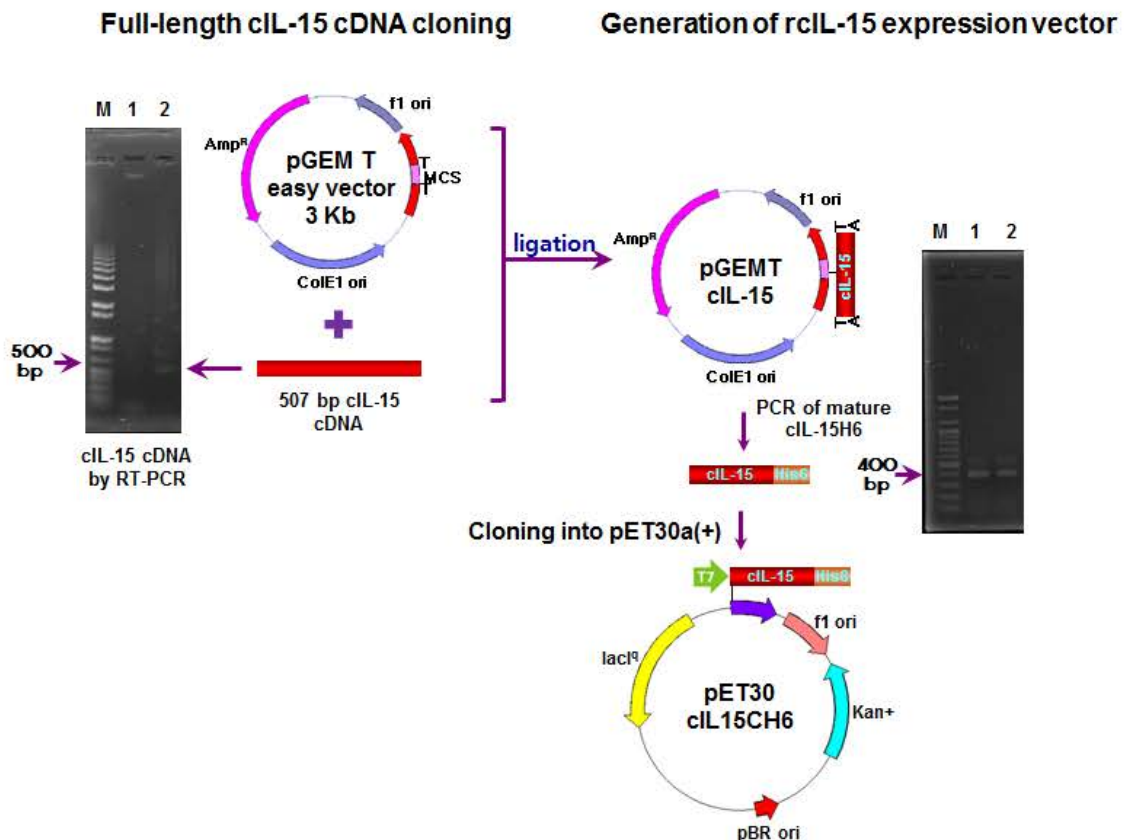
mature IL-15 reverse primer :

TTTTTGTCGACTCAATGATGATGATGATGGTGGCCAGAGGAGTTGATGAACATTTG



○ 상기의 pGEMT-cIL15를 주형으로 하고 상기의 프라이머를 이용하여 PCR를 수행한 후 392 bp의 증폭된 DNA 단편을 얻었다.

○ 이 증폭산물을 정제한 후 NdeI과 SalI 제한효소로 절단하고 다시 정제하였다. 또한 pET30a(+)벡터를 NdeI과 XhoI (SalI과 접착이 됨) 제한효소로 절단하고 정제한 후 ligation을 수행하고 형질전환시켜 그 중 20개의 콜로니를 진탕배양하고, 플라스미드 DNA를 정제하고, 염기서열 분석을 의뢰하였다. 그 결과, 대장균 발현벡터에 변이가 없는 정상의 IL-15 서열을 운반하는 클론을 획득하였고, 이를 pET30cIL15CH6라 명명하였다.



<그림> 재조합 개 인터루킨-15 유전자 클로닝 및 대장균 유래의 발현벡터 제조

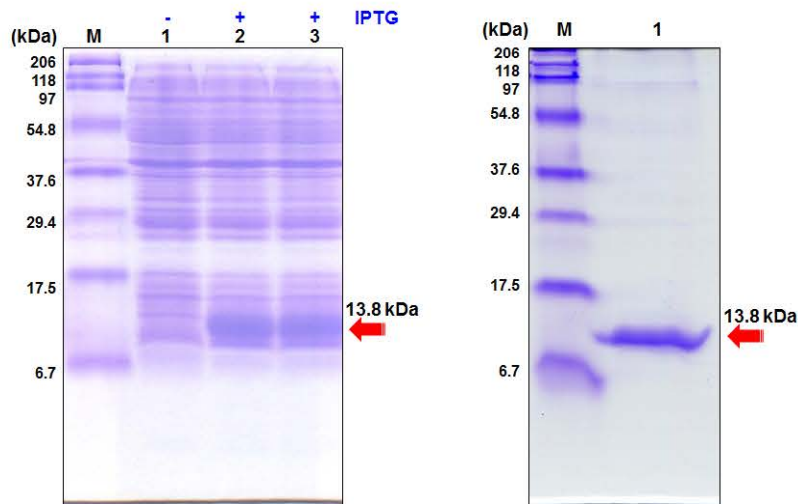
### ③ 재조합 개 IL-15 발현유도 및 단백질 대량 정제 (mg/ml)

○ 재조합 개 IL-15 단백질을 발현시키기 위하여 상기 제조된 pET30cIL15CH6를 발현용 균주인 대장균 BL-21(DE3)에 형질전환시켰다. 형질전환된 클론을 10 mL의 LB-가나마이신 배지에서 접종하고 37°C에서 진탕배양하면서 최종 0.25 mM 농도의 IPTG를 첨가하여 16시간 동안 배양한 후 IPTG 첨가 전의 200  $\mu$ L의 배양액과 첨가 후 50  $\mu$ L의 배양액에서 수집한 균체를 15% SDS-PAGE 젤 상에서 전기영동하여 IL-15의 발현이 잘 유도됨을 확인하였고 예상했던 성숙 단백질의 크기인 12.8 kDa에 6개의 히스티딘 His-태그가 부착되어 약 13.8 kDa 크기의 재조합 개 IL-15 융합 단백질이 발현되는 것을 확인하였다.

○ 현재 실험실 수준에서 NK세포를 자극하기 위하여 사용되는 농도는 5ng/ml수준이며, 생체 투여량은 20  $\mu$ g/kg수준으로 사용됨으로 mg수준의 재조합 IL-15 단백질 정제가 필요함 (상용화된 재조합 IL-15

의 경우 10 µg당 30만원정도로 매우 고가의 단백질이며, 주사용으로 개발 시판되고 있는 개 IL-15는 아직 없음).

○ 재조합 개 IL-15 단백질을 대량으로 발현시키기 위해 상기의 형질전환된 대장균 BL-21(DE3) 세포를 200 mL의 LB-가나마이신 배지에서 진탕배양하고 최종 0.25 mM 농도의 IPTG를 첨가하여 재조합 IL-15 단백질의 대량발현을 유도하였다. 배양완료 후에, 균체만을 원심분리기로 수집하고 세척하였으며 Triton X-100과 초음파분쇄기(sonicator)로 세포를 파쇄시키고 원심분리기로 상등액만을 회수하였다. QIAGEN사의 Ni-NTA agarose 컬럼(column)을 이용하여 해당사의 매뉴얼대로 단백질을 정제하였고 15% SDS-PAGE 상에서 전기영동하여 재조합 개 IL-15 단백질이 성공적으로 정제되는 것을 확인함.



<그림> 재조합 개 인터루킨-15 발현유도 및 단백질 정제.

④ 주사제용 rcIL-15 제조 : rcIL-15의 정제 후 지질다당류 및 내독소 제거와 완충액 교환 및 멸균

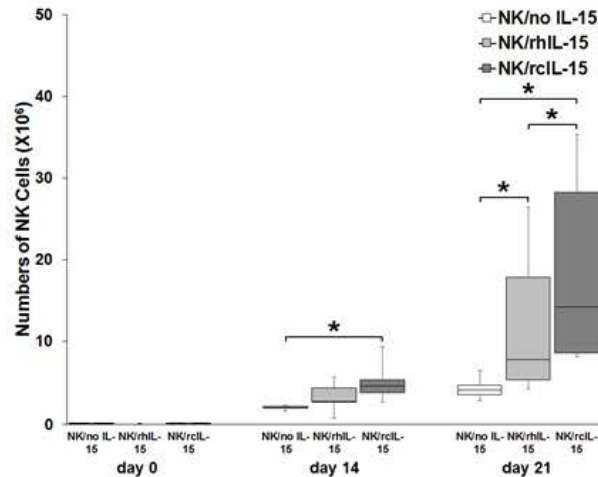
○ 내독소(endotoxin A)와 지질다당류(LPS)는 강력한 염증유발 물질이므로 재조합 개 IL-15 단백질을 대량으로 정제한 후 이들 내독소 및 지질다당류를 제거하기 위하여 Thermo SCIENTIFIC사의 Pierce High-Capacity Endotoxin Removal Resin을 이용하여 해당사의 매뉴얼에 따라 재조합 개 IL-15 단백질 시료에서 내독소 성분을 제거하였다.

○ 또한 용출액 성분 중에서 이미다졸(imidazole) 성분과 완충액 Tris 성분을 제거하고 단백질 시료내의 액상을 생리식염수로 교체하기 위해서 PALL사의 Macrosep Advance Centrifugal Device 10K MWCO를 이용하여 완충액 교체작업을 수행하였다. 또한 단백질 정량에 사용되는 BIORAD사의 브래드포드(Bradford) 시약으로 단백질의 농도를 결정하였고, 1 mL 당 110 µg의 용량으로 재조합 개 IL-15 단백질을 생리식염수로 희석하였다. 그리고 최종적으로 멸균용 0.2 µm 주사기 필터(PALL사)를 통과시켜 멸균하였다.

○ 상기의 과정에서 단백질의 파쇄유무를 확인하기 위하여 15% SDS-PAGE 상에서 전기영동을 수행한 결과 내독소 제거와 생리식염수로 교체하는 과정에서 단백질의 분해 등의 물리화학적 변형이 유도되지 않았으며 순수한 재조합 개 IL-15 단백질이 얻어졌음을 확인하였다.

⑤ 정제 생산된 rcIL-15의 기능성 확인

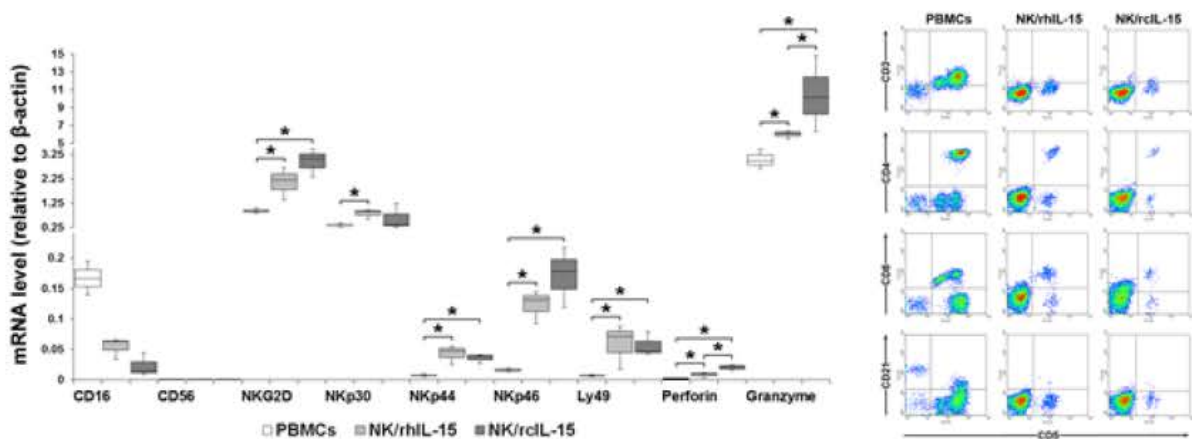
○ 정제된 재조합 개 IL-15의 기능성을 테스트하기 위해 개의 말초혈액에서 PBMC를 분리한 후 재조합 개 IL-15와 인간의 IL-15로 각각 3주간 배양한 후 개 NK세포의 증폭률을 비교한 결과 사람의 IL-15로 증폭한 그룹보다 증진된 증폭효율을 보임.



<그림> 재조합 개 IL-15에 의한 자연살해세포(NK세포) 체외증식능력 확인.

○ 3주간 체외 배양된 NK세포에서 유전자 발현변화와 표현형의 변화를 비교한 결과 재조합 개 IL-15(NK/rcIL-15)로 배양된 NK세포에서 수용체 분자들의 유전자 발현이 현저하게 증가하였으며, 표현형 확인 결과 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>CD21<sup>-</sup> 개체군이 증가함을 확인함.

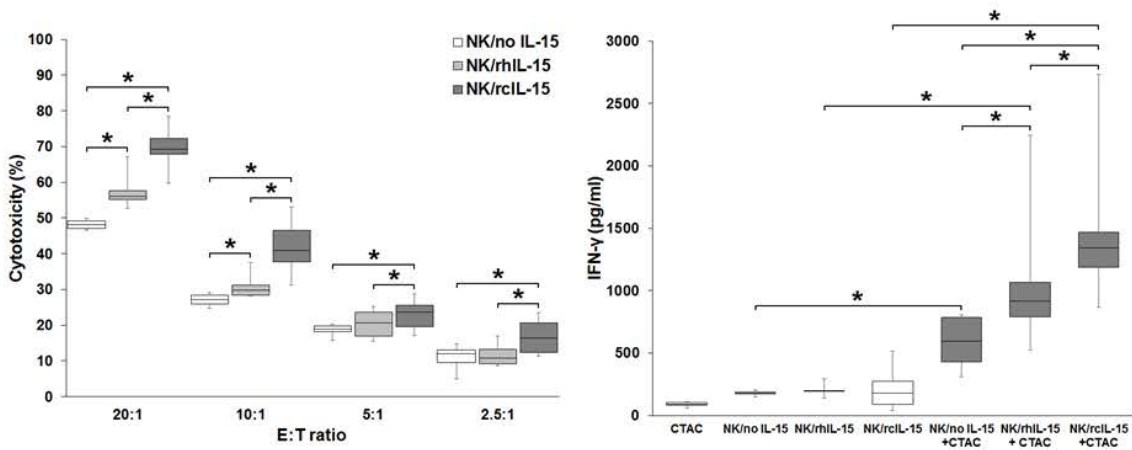
○ 인간의 IL-15와 정제된 재조합 개 IL-15로 증폭된 세포들에 대하여 RNA를 정제한 후 NK-연관 유전자들의 mRNA 발현을 real-time RT-PCR 분석법으로 확인한 결과 퍼포린, 그랜자임 B의 발현이 증가함을 확인하였음.



<그림> 재조합 개 인터루킨-15에 의해 체외증식된 NK세포 유전자발현/표현형 확인.

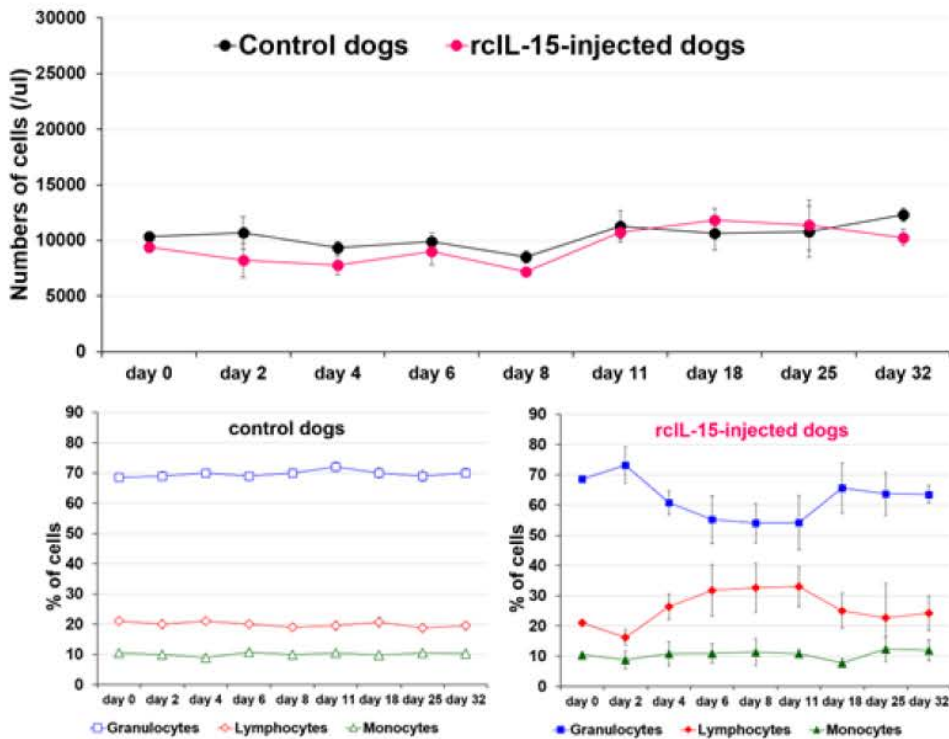
○ 개 NK세포 감수성 암세포주인 canine thyroid adenocarcinoma cells (CTAC)을 이용하여 각 E:T ratio별로 4시간 세포독성능을 분석한 결과 사람의 IL-15로 증폭한 그룹보다 정제된 재조합 개 IL-15로 증폭된 개 NK세포들이 향상된 세포독성능을 나타냈으며, CTAC를 이용

하여 10:1의 E:T ratio로 혼합하고 24시간 공조배양하여 인터페론-감마 생성능을 분석한 결과 사람의 IL-15로 증폭한 그룹보다 정제된 재조합 개 IL-15로 증폭된 개 NK세포들이 향상된 인터페론-감마 생성능을 보임을 확립함.



<그림> 재조합 개 인터루킨-15에 의해 체외증식된 NK세포의 암세포에 대한 세포독성능 및 INF-gamma 생성능에 의한 항암효능 확인.

○ 정제된 재조합 개 IL-15의 생체 내 투여 후 부작용의 발생 및 말초혈액 내 백혈구의 변화를 확인한 결과 부작용에 의한 임상증상은 확인되지 않았으며, 말초혈액내 과립구, 림프구 및 단구의 변화를 확인하였고, 투여군에서 다핵구(파란색)는 투여 개시 4일부터 11일까지 감소한 반면 임파구(빨간색) 비율은 증가함을 확인함.



<그림> 재조합 개 IL-15 생체 투여 후 개의 말초혈액에서 면역학적 변화 검증.

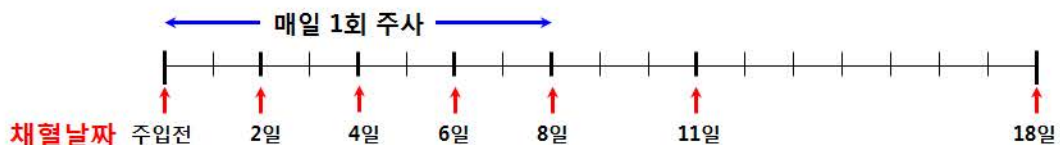
**사. 정제된 rcIL-15 투여의 안전성 평가 및 생체 투여 후 면역세포 및 항암기능 강화에 대한 효과확인**

○ 이와 아울러 정제된 rcIL-15를 주사한 개체의 안전성 평가에서 전혀 부작용 없이 말초혈액 내 NK세포의 개체 수를 현저히 증가시켰으므로 개 NK세포의 체외 증폭 효율을 실제 임상에서 시술할 수 있는 수준의 대용량 증폭기술을 확립하는데 이용할 수 있고, 주사된 동종 NK세포의 증가된 암세포 살상능력을 장기간 유지할 수 있음을 증명하여 이 결과를 **SCI 국제학술지에 투고할 준비 중**에 있음.

**① 재조합 개 IL-15의 투여 및 안전성 평가 및 말초혈액 내 면역세포 변화**

○ 정제된 재조합 개 IL-15 단백질을 개 6마리에 투여하였다. 실험에 사용된 개 품종은 ‘비글’이고 투여방법은 개 kg당 20 µg의 정제된 IL-15를 정맥주사로 투여했고, 매일 1회, 총 8일간 투여하였다. 정제된 개 IL-15가 말초혈액 내의 NK세포수를 증가시키고 체외증폭 효율을 증진시키는지를 확인하기 위하여 아래 표시된 날짜별 별로 각각 채혈하여 분석하였다. 그리고 IL-15 투여과정 동안에 염증반응이나 임상적 증상 등 부작용은 관찰되지 않았다.

1회 투여량: 20µg/kg  
 투여기간: 8일  
 투여회수: 매일 1회  
 투여방법: 정맥주사

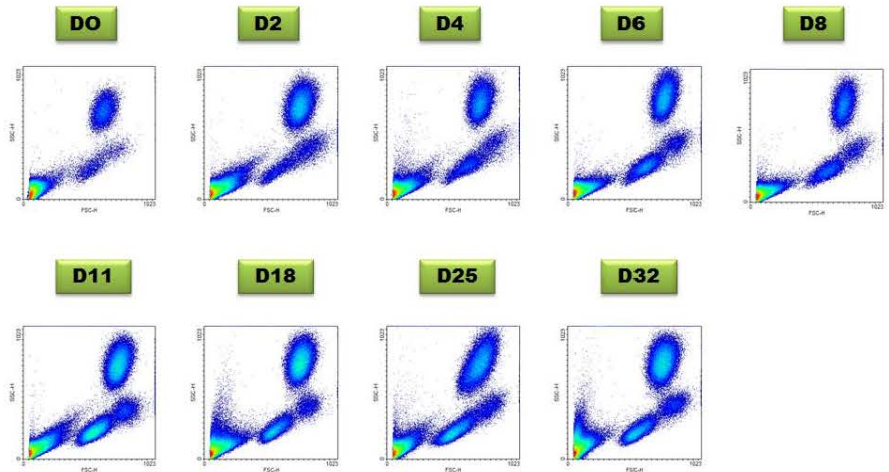


<그림> 재조합 개 IL-15의 생체 내 주사 후 면역학적 효과 및 안전성 평가를 위한 주사 프로토콜.

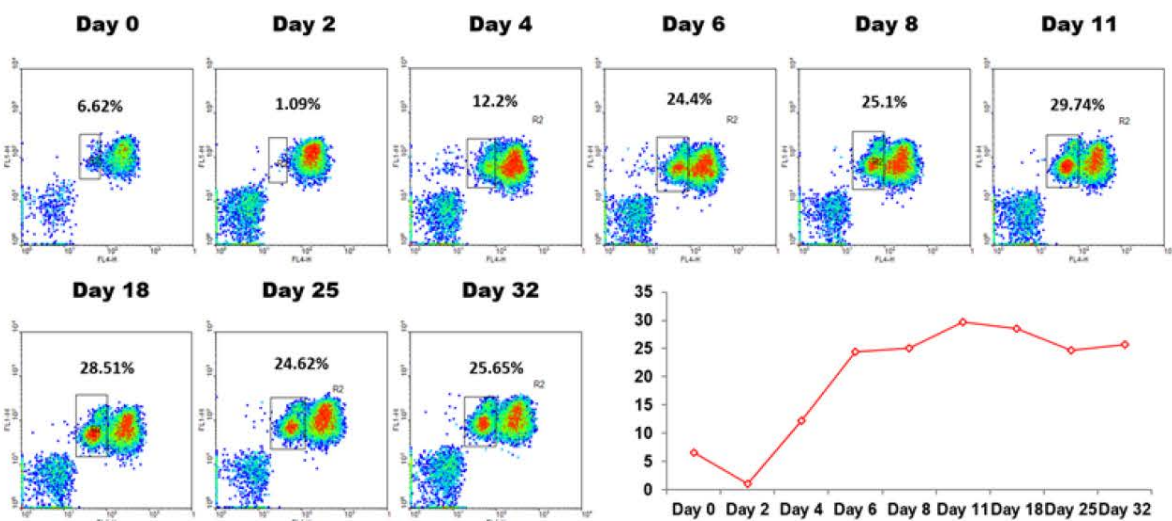
○ IL-15 투여과정 동안에 염증반응이나 임상적 증상 등 부작용은 관찰을 위해 32일까지 정기적으로 철저한 신체검사를 실시하였으며, 채혈된 말초 혈액에서 백혈구 배분을 검사와 각종 혈구세포 검사를 실시하고, 각 주요장기의 손상 유무를 확인하기 위하여 혈액화학치 검사를 실시하여 비정상 변화가 없음을 확인하였음. 주사 후 임상적인 변화도 전혀 관찰되지 않았음.

○ 재조합 개 IL-15 투여 전 후로 말초혈액을 EDTA 튜브에 채혈하여 혈액 50 µL를 5 mL 용량의 유세포 분석 튜브에 첨가하고 1 mL의 적혈구 용혈 완충액으로 적혈구를 용혈시킨 후 백혈구들의 분포를 유세포 분석기로 분석한 결과, 재조합 개 IL-15 투여에 따라 개의 말초혈액에 과립구는 점점 감소하는 반면 임파구는 점점 증가하는 것을 확인하였다.

○ 재조합 개 인터루킨-15를 몸무게 1 kg당 20 ug의 용량으로 총 8일간 투여된 개에서 날짜별 말초혈액 내의 과립구와 임파구 그리고 모노사이트의 개체수의 변화를 비율로 확산한 결과 생체투여 시작일로부터 11일째에 개의 말초혈액내 임파구의 개체수가 최고수준으로 증가된 것을 보여주고 있으며 32일째에 원래의 수준으로 회복되는 반면에 모노사이트는 큰 변화 없이 유지됨을 확인하였음.

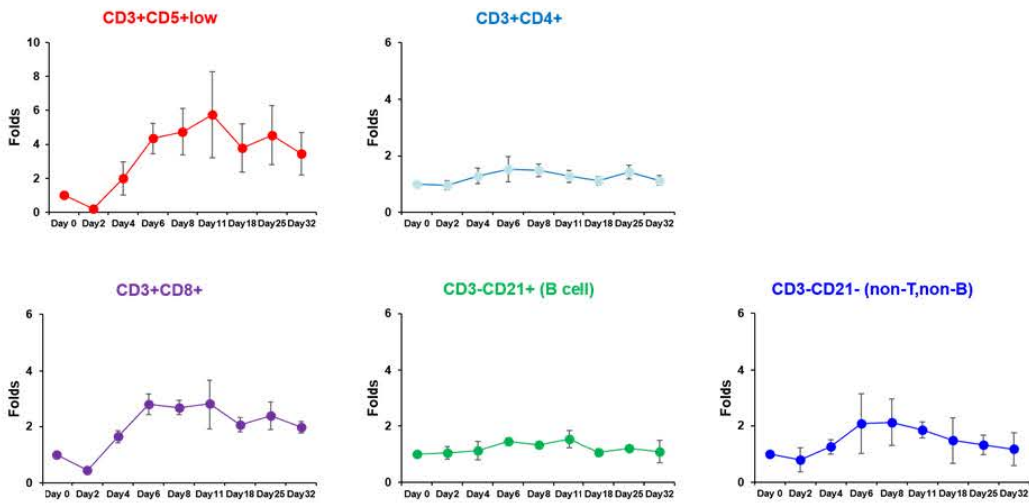


- 또한 전혈액을 염색하였을 때 특징적으로 임파구 내에서 NK세포의 특징을 보이는 CD5low 세포 수가 투여일로부터 점점 증가하여 투여 시작으로부터 8일째 가장 높은 빈도수를 보였으며 투여 중지 후에도 다수의 CD5low 세포가 잔존하고 있음을 확인하였다.
- 재조합 개 인터루킨-15가 8일간 투여된 개의 말초혈액 내 임파구 세포내에 존재하는 NK 세포의 특성을 보인다고 알려진 CD5low 세포의 변화를 유세포 분석법으로 조사한 결과 생체투여 시작일로부터 6일부터 증가하여 11일째에 최대가 되었고 심지어 32일째까지도 큰 변화 없이 유지되고 있음을 보여줌. 이는 투여된 재조합 개 인터루킨-15가 기능을 하여 생체내에서 NK세포의 특성을 나타내는 특정 임파구의 생성과 분화를 촉진시키고 있음을 나타냄
- 재조합 개 인터루킨-15가 8일간 투여된 개의 말초혈액 내 단핵구 세포들에 대하여 NK세포의 특성을 보인다고 알려진 CD5low 세포의 변화를 유세포 분석법으로 조사한 결과 생체투여 시작일로부터 6일부터 증가하여 11일째에 최대가 되었고 심지어 32일째까지도 높은 비율로 유지하고 있음을 확인함



<그림> 생체투여 후 말초혈액 개 NK세포의 변화 확인.

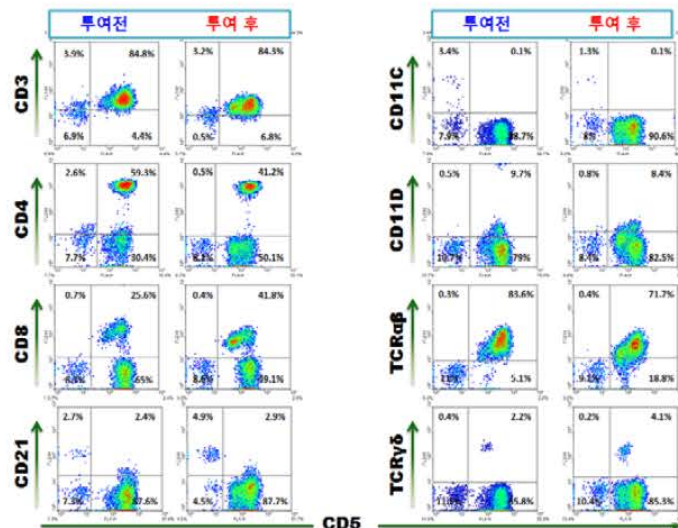
○ IL-15를 20ug/kg-용량으로 하루에 1번 8일간 주사한 결과 말초혈액 내의 개 NK세포 (CD5low+)와 CD8 T세포들이 현저하게 증가함을 확인함.



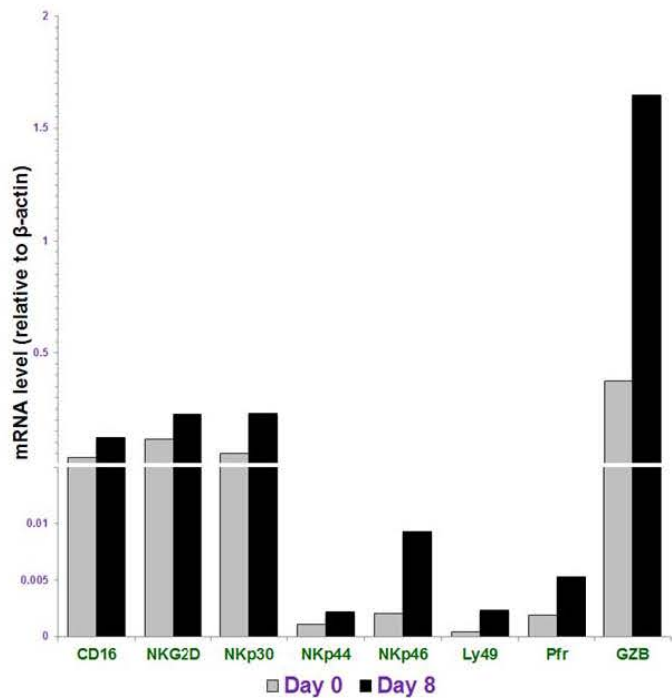
<그림> 생체투여 후 말초혈액 임파구 변화 확인.

○ 재조합 개 IL-15 투여에 의한 말초혈액 내 단핵구의 표현형의 변화 분석: 재조합 개 IL-15 투여 전 후로 말초혈액을 채혈하고 비중이 1.077 g/mL인 Lymphoprep으로 단핵구 (mononuclear cell)를 수집하고 형광 항체들로 염색한 후 유세포 분석을 실시하였다. 그 결과, 재조합 개 IL-15 투여 이후로 개 NK세포의 특성으로 알려진 CD5low이면서 CD4, CD21, CD11음성 세포들이 증가하였음을 확인하였다.

○ 재조합 개 인터루킨-15 투여 전, 그리고 8일간 투여 후 개의 말초혈액에서 단핵구 세포들을 분리하여 그 표현형을 유세포 분석법으로 확인한 결과 투여 후에 CD5 low와 CD8 세포들의 개체 수는 증가하였으며 TCRa/b는 다소 감소하였고 TCRr/d는 증가하는 경향을 나타냄

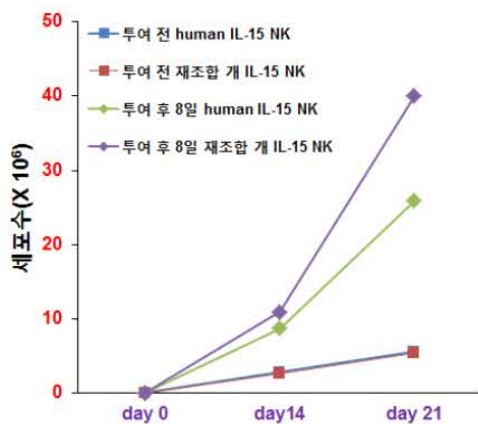


○ 재조합 개 인터루킨-15 투여에 의해 말초혈액내의 NK세포 개체 수가 증가되면 투여 전에 비해 NK세포와 관련된 유전자의 발현이 증가될 것이 예상되므로 투여 전과 8일간 투여 후의 말초혈액에서 단핵구 세포들을 분리하고 RNA를 정제한 후 real-time RT-PCR 방법으로 확인한 결과 재조합 개 인터루킨-15 투여 후에 모든 NK-관련 유전자들의 발현이 증가함을 확인함.



② 재조합 개 IL-15 투여에 의한 개 NK세포의 체외 증폭 효율 증진

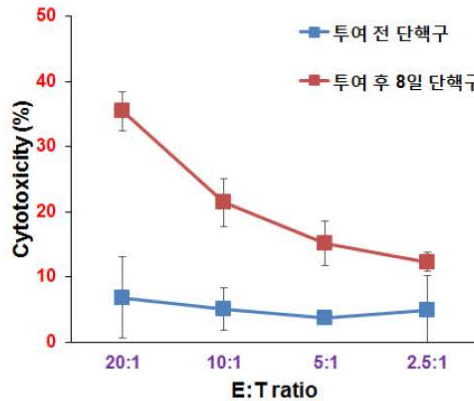
○ 재조합 개 IL-15 단백질이 8일 동안 투여된 개의 말초혈액에서 단핵세포들을 농도밀도구 배 피플-하이파크 방법으로 분리하고 3주 동안 NK세포의 체외 증폭을 실시하였으며, 배양 3주후 재조합 개 IL-15가 투여된 개의 말초혈액에서 증폭한 NK세포의 증폭율이 약 330배로 현저하게 증가된 것을 확인하였다.



<그림> IL-15 투여 전 후의 말초혈액에서 분리한 단핵구로부터 증폭률 비교.

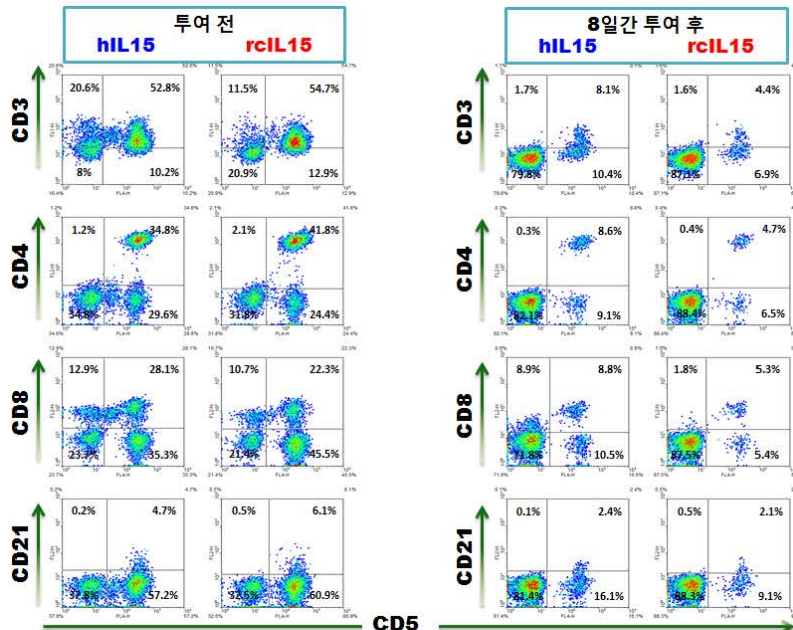


○ CTAC 암세포주에 대한 증폭된 개 NK세포의 세포독성능 평가: 증폭된 개 NK세포가 효과 세포(effector cell)로서 기능을 조사하기 위하여 NK세포에 감수성인 개 갑상선 암세포주 (canine thyroid adenocarcinoma)인 CTAC세포에 대한 세포독성능(cytotoxicity)을 수행하였다. 일정 세포비율로 CTAC 세포주와 증폭된 개 NK세포를 혼합하고 4시간 공조배양한 후 WST-1이라는 발색시약을 사용하여 분석한 결과 재조합 개 IL-15가 투여 후 8일째의 말초혈액에서 증폭시킨 NK세포가 CTAC세포주에 대하여 현저하게 높은 세포독성능을 나타냄으로써 효과세포 기능을 잘 수행함을 확인하였다.



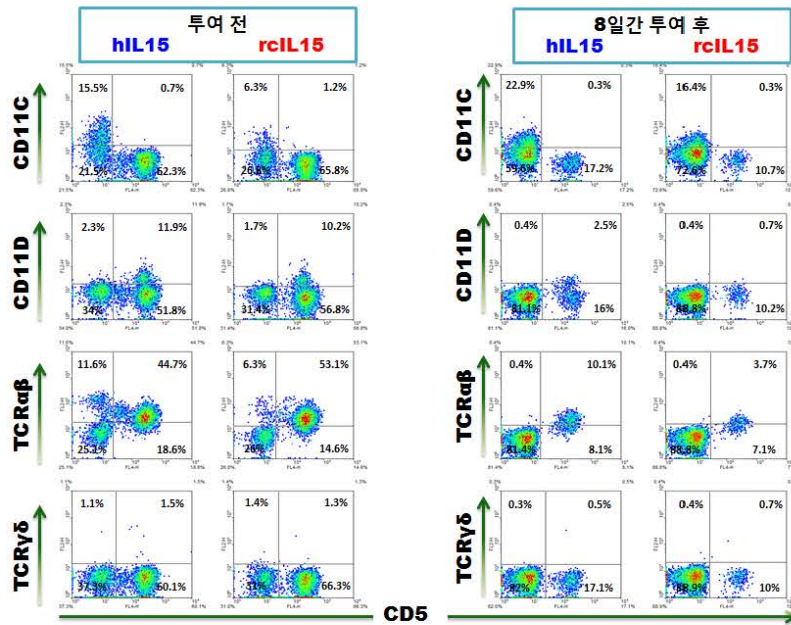
효과세포:표적세포 비율

○ NK세포의 표현형의 변화를 유세포 분석기로 분석한 결과 투여 전에 비해 재조합 개 인터루킨-15를 8일간 투여한 후에 수집한 단핵구로부터 3주간 증폭 후에 거의 대부분의 세포들이 non-B, non-T NK lymphocytes (CD3-CD5-CD8-CD21-)세포들이었으며 정제된 재조합 개 IL-15가 사람의 IL-15과 비교하여 향상된 기능을 보여줌을 확인하였음.



○ 또한 CD11c, CD11d, TCRa/b, TCRr/d 세포들이 모두 투여 전에 비해 재조합 개 인터루킨-15를 8일간 투여한 후에 수집한 단핵구로부터 3주간 증폭 한 그룹에서 발현이 저하되는 것

을 확인하였음.



○ 재조합 개 인터루킨-15 투여 전, 그리고 8일간 투여 후 개의 말초혈액에서 단핵구 세포들을 분리하여 사람의 IL-15와 재조합 개 인터루킨-15로 3주 동안 체외증폭한 NK세포를 이용하여 감수성 암세포주인 CTAC에 NK세포를 일정비율로 혼합한 후 각 E:T ratio별로 4시간 세포독성능을 분석한 결과 증폭된 NK세포가 양-의존적 방식으로 암세포주에 대해 높은 항암 활성을 갖는 것을 보여주었으며 사람의 IL-15로 증폭한 그룹보다 정제된 재조합 개 IL-15로 증폭된 개 NK세포들이 향상된 세포독성능을 갖는다는 것을 확인함.

**아. 말초혈액 내 CD3+CD5dim 세포는 말초혈액 내 주로 존재하는 유형의 NK세포이며, 활성화에 의해 non-B, non-T large granular NK lymphocytes로 성숙되는 NK세포임을 규명**

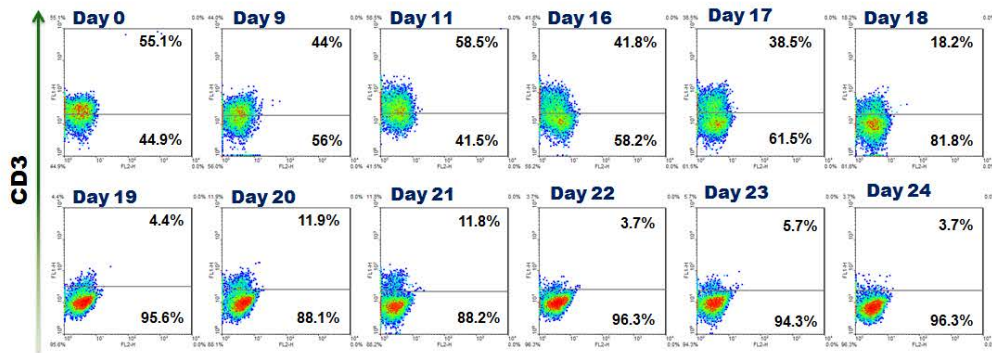
- 개 NK세포와 관련하여 세계적으로 지금까지 논란의 대상이 되고 있는 개 NK세포 표현형 (phenotype)의 특성에 관하여 CD3+CD5dim 세포는 NK세포의 특성을 갖는 세포로 개 말초혈액 내 주로 존재하는 유형의 NK세포이며, 사이토카인 자극에 의해 활성화된 개 non-B, non-T large granular NK lymphocytes는 이 CD3+CD5dim 세포에서 유래되는 가장 성숙된 NK세포임을 본 연구의 1차년도와 2차년도 연구 수행 과정에서 처음으로 밝혀내 우수한 SCI 국제학술지에 투고 준비중임 - 이 결과는 동종 개 NK세포를 이용한 암면역세포치료제 상업화를 위한 임상시험 승인을 위해 매우 중대한 결과임.
- NK세포는 B림프구나 T림프구와 모양이 같아 육안적으로 구분하기 어려우며, 세포 표면에 특이적으로 발현하는 분자로 구분할 수 있음. 그러나 사람의 NK세포와 달리 개의 NK세포는 B림프구나 T림프구와 구별할 수 있는 특이 마커가 아직 알려져 있지 않음.
- 그래서 개의 NK세포는 오래전부터 non-B, non-T large granular lymphocyte인 것으로 생각되어져 왔음.
- 하지만 최근 본 연구진을 포함한 여러 연구자들의 연구 결과 개 NK의 표면에는 T세포의 표면에 발현하는 특이 분자가 발현되어 있을 가능성을 제기하였고, 개 말초혈액 내

CD3+CD5low 세포들이 NK세포의 특성을 갖는 세포임을 확인하였음.

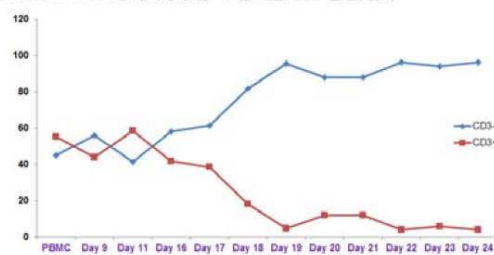
○ 그러나 세계적으로 많은 학자들이 CD3+CD5low 세포는 T세포일 가능성이 크고 순수 NK 세포가 아닐 것으로 생각하여 논란이 되어 왔음.

○ 이후 본 연구진은 이 과제를 수행하는 과정에서 CD3+CD5low과 함께 non-B, non-T large granular lymphocyte를 선택적으로 제외 대량 증폭하는 기술을 확립하였으며, CD3+CD5low세포와 non-B, non-T large granular lymphocyte 모두 NK세포의 특성을 보이는 세포임을 확인하였고, non-B, non-T large granular lymphocyte가 더욱 강력한 항암효과를 보이는 것을 확인함.

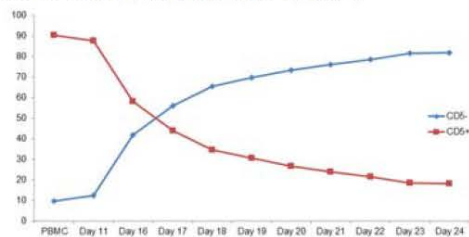
○ 본 연구의 방법으로 개의 말초혈액에서 PBMC를 분리한 후 NK세포의 체외 증폭하는 과정에서 CD3CD5low세포가 T세포의 특이 분자인 CD3와 CD5의 발현을 소실함을 관찰하였음.



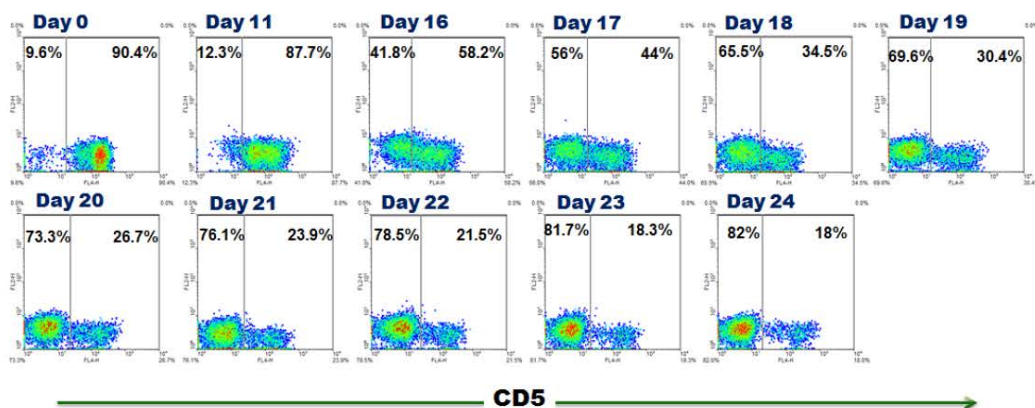
Canine NK cell 증폭과정동안 각 날짜별 CD3 발현 변화



Canine NK cell 증폭과정동안 각 날짜별 CD5 발현 변화



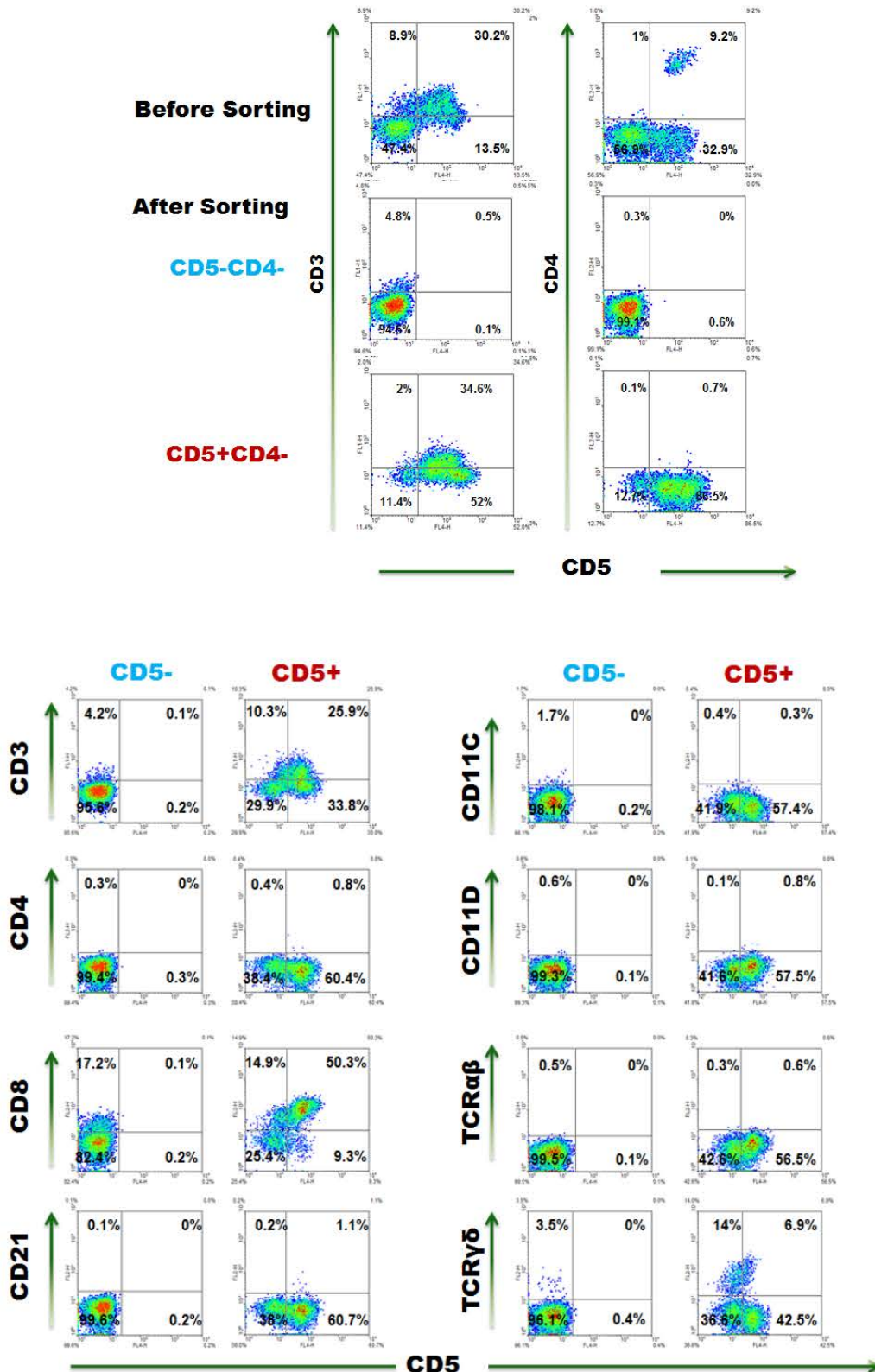
Canine NK cell 증폭과정동안 각 날짜별 CD5 발현 변화



○ 14일간 증폭 후 CD5+CD21- 세포와 CD5-CD21-를 cell sorter를 이용하여 분리한 다음 표현형을 비교한 결과 CD5-CD21-세포는 모두 CD3를 발현하지 않았고 T세포의 중요 분자인 T cell receptor (TCR)를 발현하지 않은 non-B, non-T NK lymphocytes였으며, CD5+CD21-세포

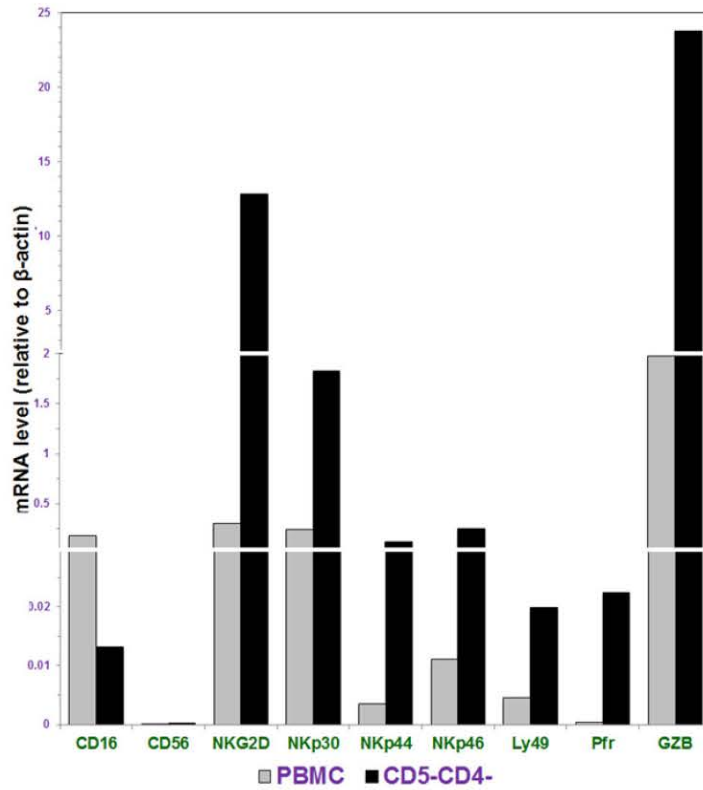
는 약 40% 정도 CD3를 발현하고 약 60% 정도의 세포는 CD8을 발현하였으나 이들 세포 역시 TCR $\alpha\beta$ 를 발현하지 않아 T세포가 아님을 확인할 수 있었다.

증폭중인 canine NK cells의 Sorting 전 후 분리확인

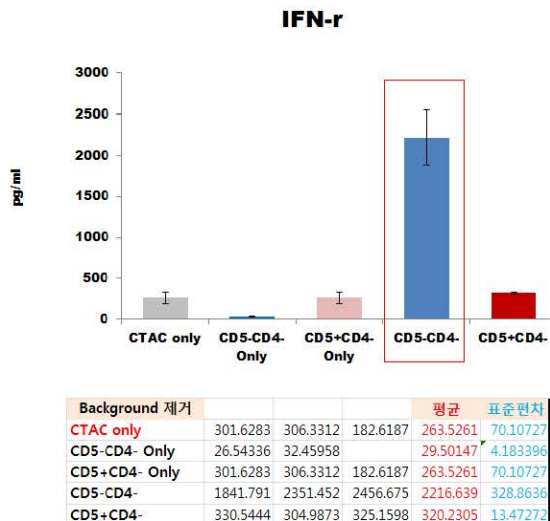


○ PBMCs와 sorting된 CD5-CD21-세포들에서 NK-related 유전자 mRNA 변화양상을 real-time RT-PCR로 분석한 결과 NK세포 NKG2D를 비롯한 고유의 활성화 수용체인 NCR들

의 유전자 발현이 현저하게 증가하였으며 세포살상과 관련된 단백질 분자들인 퍼포린과 그랜자임 B가 극도로 증가되었음. CD16유전자는 감소의 경향을 보임과 동시에 CD56의 발현은 미미하였으며 변화가 거의 없었음

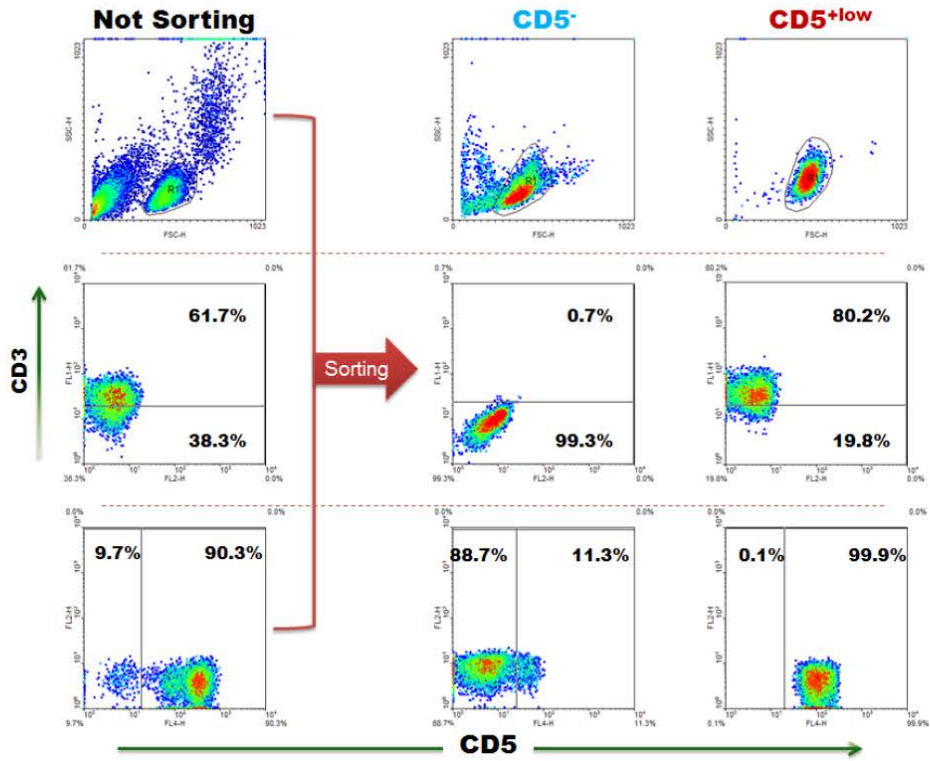


○ 증폭된 NK 세포에서 분리된 CD5-CD4-세포군들이 CD5+CD4- 세포군들에 비해 CTAC에 대하여 현저하게 높은 세포독성능을 나타내었으며, CTAC에 대하여 높은 인터페론-감마 생성능을 나타내었음.

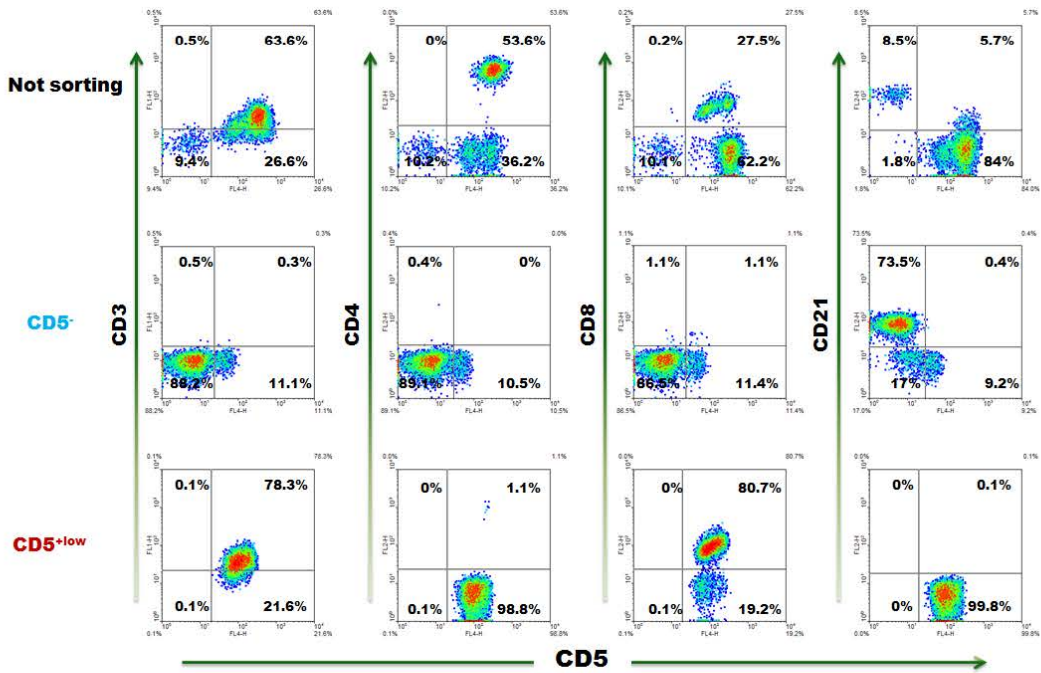


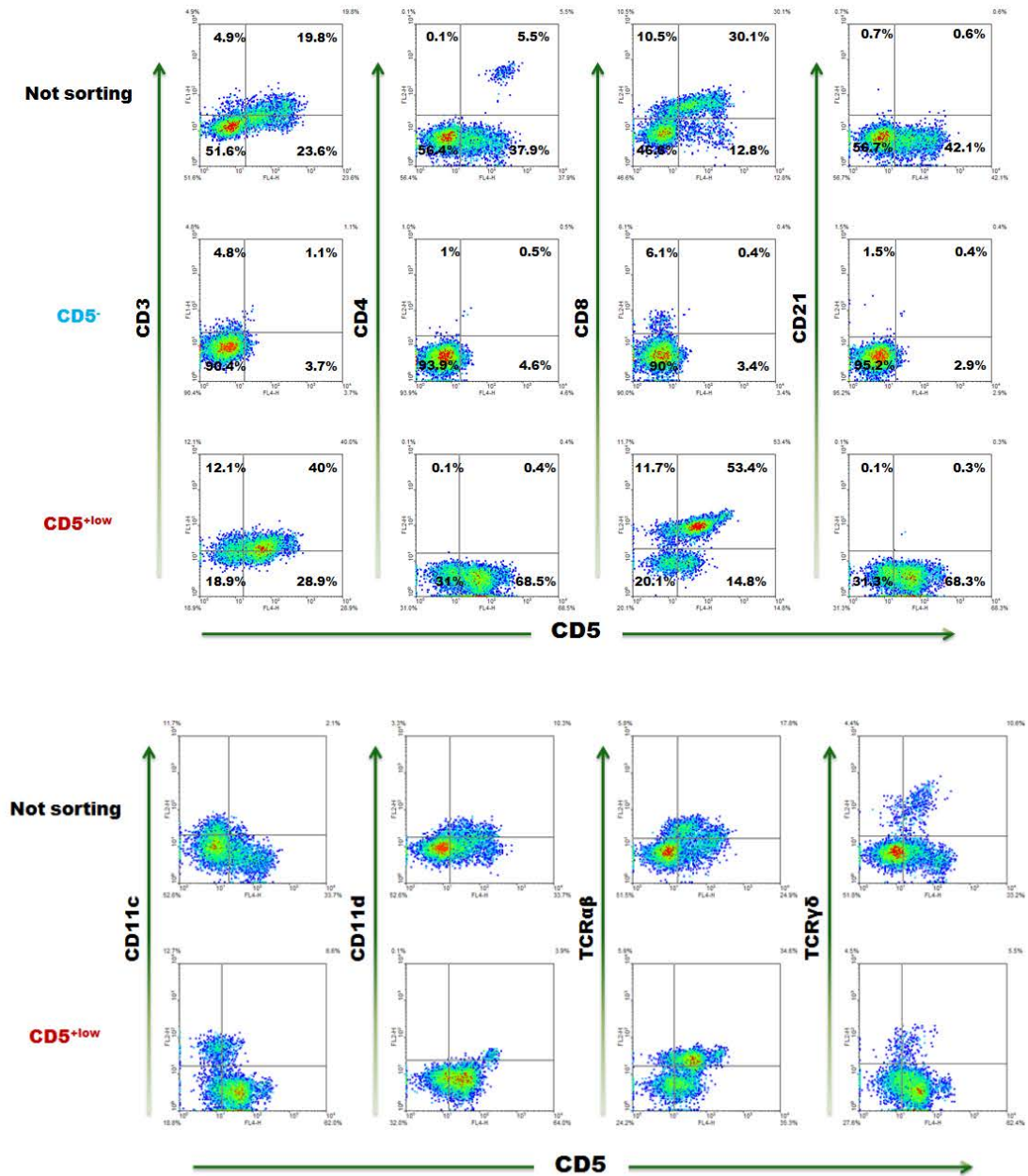
○ 체외 증폭된 CD3-CD5-CD21- (non-B, non-T NK) 세포가 CD3+CD5low 세포와 동일한 계통의 세포이며, 그러므로 non-B, non-T NK세포가 CD3+CD5low 세포에서 유래된 활성형이라는 것을 입증하기 위하여 말초혈액에서 PBMC를 분리한 후 CD3+CD5low세포만을 cell

sorter를 이용해 순수 분리하였고,



○ 순수 분리된 CD3CD5<sup>low</sup>세포를 2주와 3주간 체외 배양한 다음 표현형을 조사한 결과 증폭된 세포중 CD3-CD5-세포가 배양 2주후 다수 출현하고, 배양 3주후에는 이 세포가 주로 존재함을 확인함으로써 CD3-CD5-CD21- (non-B, non-T NK)는 CD3CD5<sup>low</sup>세포로부터 유래한다는 것을 증명하였다.

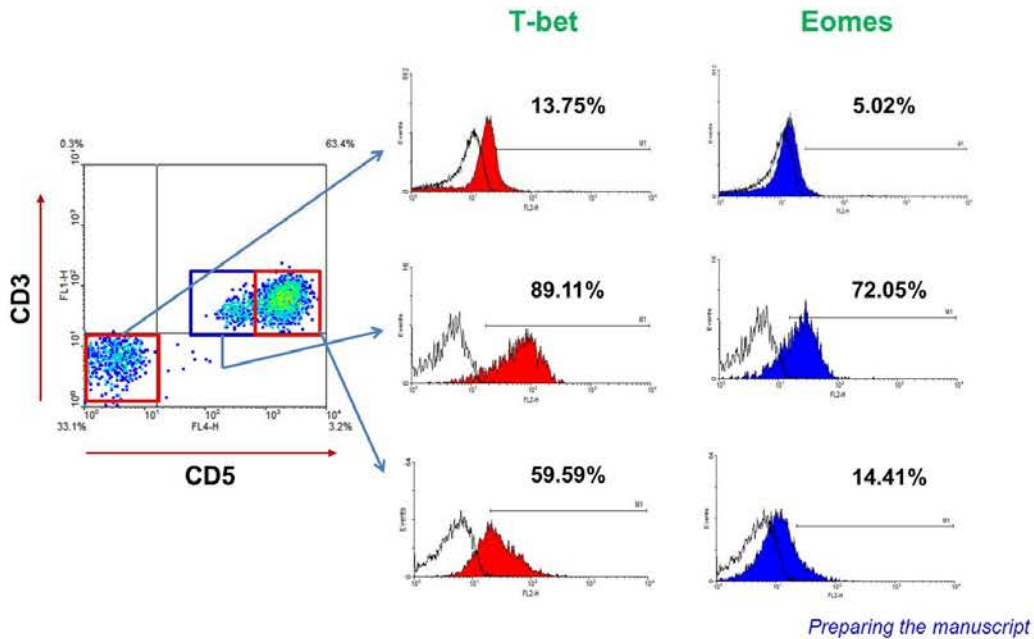




<그림> 순수 분리된 CD3CD5<sup>low</sup>세포를 2주와 3주간 체외 배양한 다음 표현형을 조사한 결과.

○ 아울러 말초혈액 내 존재하는 CD3-CD21-세포는 세포질에 과립을 가지고 있지 않은 림프구로 NK 세포에 존재하는 두가지 전사효소인 t-bet과 Eomes를 포함하고 있지 않아 이세포들은 NK세포가 아니라 innate lymphoid cells (ILC)임을 세계최초로 확인하였음.

## Non-B, non-T cell population – ILCs? or NK cells?



<그림> 말초혈액 내 존재하는 CD3-CD21-세포는 세포질에 과립을 가지고 있지 않은 림프구로 NK 세포에 존재하는 두가지 전사효소인 t-bet과 Eomes를 포함하고 있지 않아 이세포들은 NK세포가 아니라 innate lymphoid cells (ILC)임을 확인.

### 자. 동종 NK세포 주사의 안전성 입증 및 임상시험을 통한 암치료 시 주사된 NK세포의 수여자 내 안정적인 생착을 위한 효과적인 면역억제 (lymphocyte의 제거) 방법 확립

○ 체외 증폭된 동종 NK 세포 주사 후 GVHD 등 중요한 부작용 발생 여부를 확인하여 동종 NK세포 주사의 안전성을 입증하였고, 임상시험을 통한 암치료시 주사된 NK세포의 수여자 내 안정적인 생착을 위한 효과적인 면역억제 (특히 lymphocyte의 제거) 방법을 확립하였으며, 이를 통해 면역억제 후 동종 NK세포의 주사 적기, 반복 주입 횟수, 간격 및 주입 세포 수를 결정하였음 (data 보완 후 투고 예정).

#### ① 면역억제

○ 체외 증폭된 동종 NK 세포 주사 후 GVHD 등 중요한 부작용 발생 여부를 확인하여 동종 NK세포 주사의 안전성을 입증함과 동시에, 임상시험을 통한 암 치료 시 체외 증폭 후 주사된 동종 NK세포의 수여자 내 안정적인 생착을 위해서는 효과적인 면역억제 (특히 lymphocyte의 제거)를 통해 주입된 세포에 대한 이식 거부를 방지하여야 함.

○ 가장 적절한 면역억제 방법을 마련하기 위하여 전신방사선조사 (total body irradiation; TBI) 와 화학요법제 (chemotherapeutic agent) 투여 및 두 가지를 혼용하는 방법을 비교하였음.

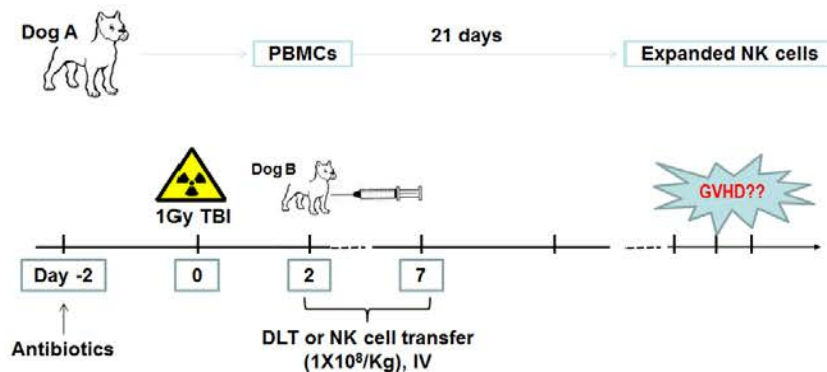
○ 방사선 피폭에 의한 부작용 (radiation toxicity)를 최소화하며, 적절한 lymphodepletion 결과를 얻을 수 있는 TBI의 양을 결정하기 위하여 선형가속방사선발생장치 (linear X-ray beam accelerator (Varian, USA))에서 발생하는 6-MV photon beams를 이용하여 4 가지의 다른 선량 (10 Gy, 6 Gy, 4 Gy, 1 Gy)으로 정상 개에 방사선을 조사한 후 2주간 임상증상 및 혈액 검사를 실시하였음.



- 방사선 피폭은 12.5cGy/min씩 단일 fraction을 전신에 조사하였으며 (12.5cGy/min, 10 Gy single fractionated TBI, 12.5cGy/min, 6 Gy single fractionated TBI, 12.5cGy/min, 4 Gy single fractionated TBI, 12.5cGy/min, 1 Gy single fractionated TBI), 방사선 조사 후 면역 억제에 의한 감염 등의 문제를 방지하기 위하여, 최대한 부균적으로 급식, 급수 관리하였음.
- 방사선 조사된 모든 군의 개체는 방사선 조사 2일 후부터 백혈구 수가 급격히 감소하여 4일후 zero 상태가 되었으며, 10 Gy, 6 Gy, 4 Gy에 피폭된 개체는 모두 10일 내 radiation toxicity에 의해 폐사하였고, 1 Gy의 양으로 TBI를 실시한 군에서만 모두 생존하여 이 선량을 면역 억제를 위한 TBI 선량으로 결정하였음.
- 화학요법제 중 고용량 cyclophosphamide (30 mg/kg IV X 2일: -5 Day, -4Day)와 fludarabine (20 mg/m<sup>2</sup> IV X 5 :-6Day ~ -2Day)을 투여한 결과 가장 효과적인 lymphodepletion 효과를 얻음.
- 1 Gy TBI + cyclophosphamide (15 mg/kg IV X 2일) 역시 효과적인 lymphodepletion 결과를 얻음.

② 동종 NK세포 주사 후 GVHD 등 부작용 발생 조사 (안전성 검사)

○ 면역억제 후 동종 NK세포의 주사 적기, 반복 주입 횟수, 간격 및 주입 세포 수를 결정하였으며, 다음과 같은 방법으로 안전성 검사를 실시하였으며, 동종 PBMC를 주입한 5마리 중 3마리에서 GVHD가 발생하여 극심한 증상을 보인 반면, 체외 증폭된 동종 NK세포를 주사한 5 마리 개체에서는 GVHD의 증상을 전혀 보이지 않았고, 경미한 증상도 나타내지 않았으며, 주사 후 30일까지 혈액화학적 검사에서도 비정상 결과를 보이지 않아 안전성이 입증됨.



○ 동종 PBMC 주입과 동종 NK세포 주입 후 각 개체별 임상증상 및 혈액학적 변화 발생 비교현황

	증상 및 변화	동종 PBMC 주입					동종 NK세포 주입				
임상증상	피부 홍반 또는 발진	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-
	간 (황달, 간효소치 상승)	0	-	0	0	-	-	-	-	-	-
	안구 (각막염)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	구강 (구강건조, 홍반, 위축)	-	0	-	0	-	-	-	-	-	-
	호흡기 (기관지염)	0	-	-	0	-	-	-	-	-	-
	소화기 (설사, 복통)	0	-	0	0	-	-	-	-	-	-
혈액학적 변화	혈구수 변화	0	-	0	-	-	-	-	-	-	-
	혈액화학치 변화	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-

③ 동종 NK세포 주사 후 생착

- 면역억제 후 주입된 동종 NK세포의 생체 내 생착 여부를 chimera 검출법을 이용하여 세포 주입 후 28일까지 말초혈액에서 다음과 같은 조건으로 실시하였음.
- chimera검출을 위한 실험에 사용된 primer서열과 PCR 증폭조건은 다음과 같음.
- Selected Microsatellite Marker (수캐 Y염색체 특이 마커)

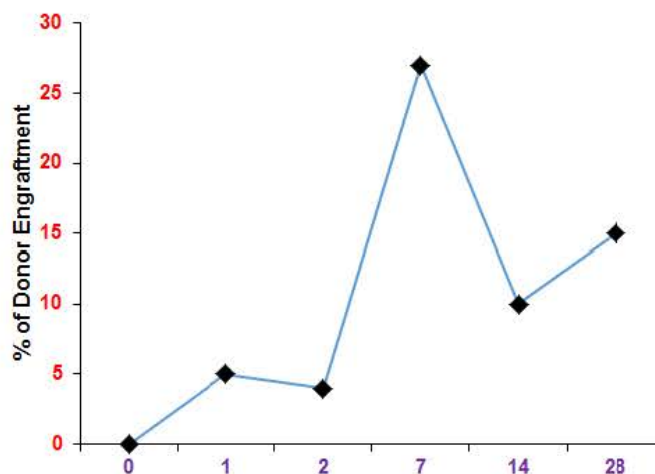
Primer	FluorescentDye		Sequence of primer
SRY	NED	F	GAACGCATTCTTGGTGIGGTCTC
		R	GGCCATTTTTCGGCTTCTGTAAG

○ Microsatellite DNA의 PCR 증폭 반응 조성물은 총 15  $\mu$ l로 10 uM fluorescent dye-labelled primer 각각 1 $\mu$ l, 2.5mM MgCl<sub>2</sub> 1.5  $\mu$ l, 10X GeneAmp PCR Gold buffer 1.5 $\mu$ l, dNTP(각각 250uM) 1.5 $\mu$ l 와 AmpliTaq Gold DNA polymerase 0.12 $\mu$ l, template로 100ng의 genomic DNA가 포함되었다.

○ PCR condition

Initial incubation step	35 cycles			Final Extention	Final step
	Melting	Annealing	Extend		
95 $^{\circ}$ C 10 min.	94 $^{\circ}$ C 30 sec.	58 $^{\circ}$ C 30 sec.	72 $^{\circ}$ C 30 sec.	72 $^{\circ}$ C 30 min	4 $^{\circ}$ C $\infty$

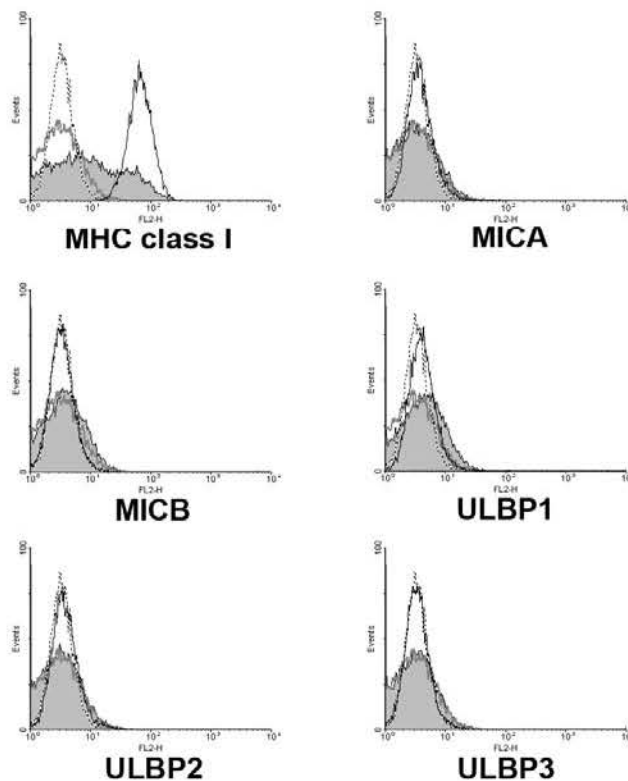
○ 면역 억제 후 체외 증폭한 동종 NK세포를 주입 받은 모든 개체에서 RT-PCR-based chimerism assay를 통해 28일 간 조사한 결과 말초혈액에서 지속적으로 주사한 NK세포가 존재하여 생착 후 생체내에서 부작용을 일으키지 않고 증식 유지됨을 확인하였음.



<그림> 면역 억제 후 체외 증폭한 동종 NK세포를 주입 받은 모든 개체 초혈액에서 지속적으로 주사한 NK세포가 존재하여 생체 후 생체내에서 부작용을 일으키지 않고 증식 유지됨을 확인.

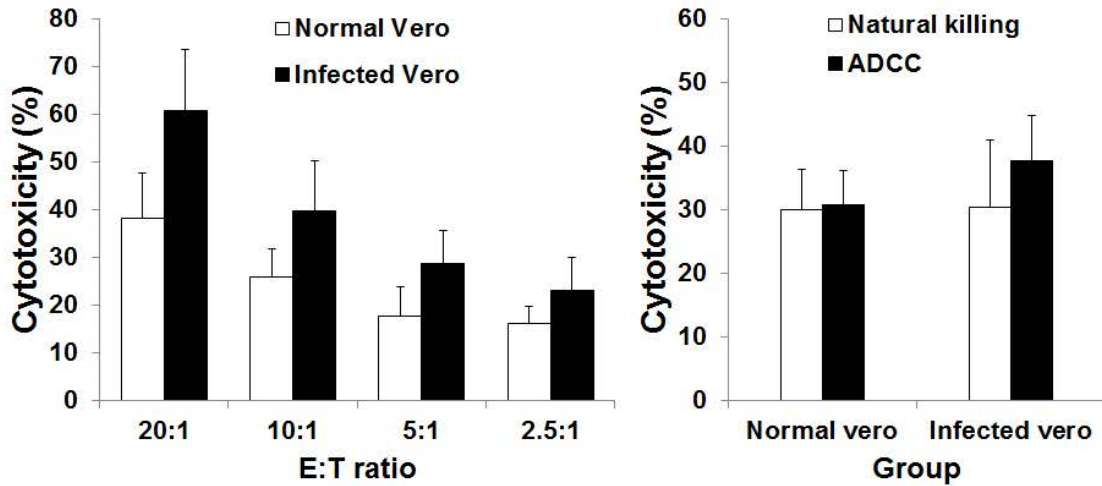
**차. 체외 증폭된 개 NK세포의 개 디스토펜바이러스 (CDV) 에 대한 항-바이러스효과 확인**

- 본 과제를 통해 확립한 방법으로 체외 증폭시킨 개 NK세포가 개에서 가장 중요한 바이러스 질환을 일으키는 바이러스 중 하나인 개 디스토펜바이러스 (CDV)의 증식을 강력히 억제하고 바이러스에 감염된 세포를 파괴시키는 것으로 나타나 증폭된 NK세포를 바이러스감염 치료에도 사용할 수 있음이 증명되어 이 결과를 수의학분야 상위 5%이내의 SCI 국제학술지에 게재하였음 (The anti-canine distemper virus activities of ex vivo-expanded canine natural killer cells. *Vet Microbiol* 176:239-249).
- CDV에 감염된 세포는 NK세포의 활성 수용체인 NKG2D를 자극함으로써 NK세포가 활성화되고 감염세포를 정상세포와 구분하여 감염세포만을 공격할 수 있도록하는 NKG2D-ligand의 발현에는 변화가 없으나, NK세포의 활성을 억제하는 MHC-I 분자의 발현이 현저히 감소됨을 나타내어 CDV에 감염된 세포를 NK세포가 잘 구분해 낼 수 있는 기전을 확인함.



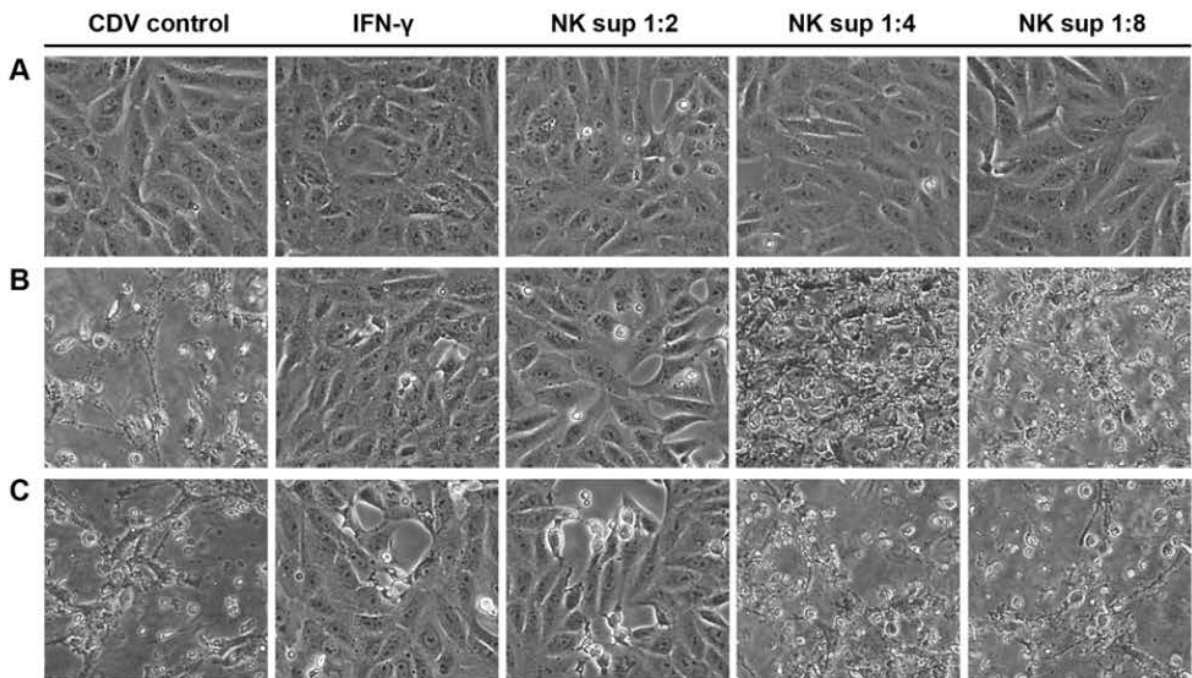
<그림> CDV에 감염된 Vero세포 표면에 MHC-I 분자와 NKDG2D-ligand (MIC-A, MIC-B, ULBP-1, 2, 3)의 발현 변화

- 체외 증식된 NK세포가 디스토펜바이러스에 감염된 세포주에 대해 높은 세포독성능(왼쪽 그림 검은색 막대그래프)을 보여주었으며, 또한 감염된 세포주에 항혈청 처리시 대해 항체의 존성세포살상기전으로 세포살상능이 증진됨을 확인하였음.



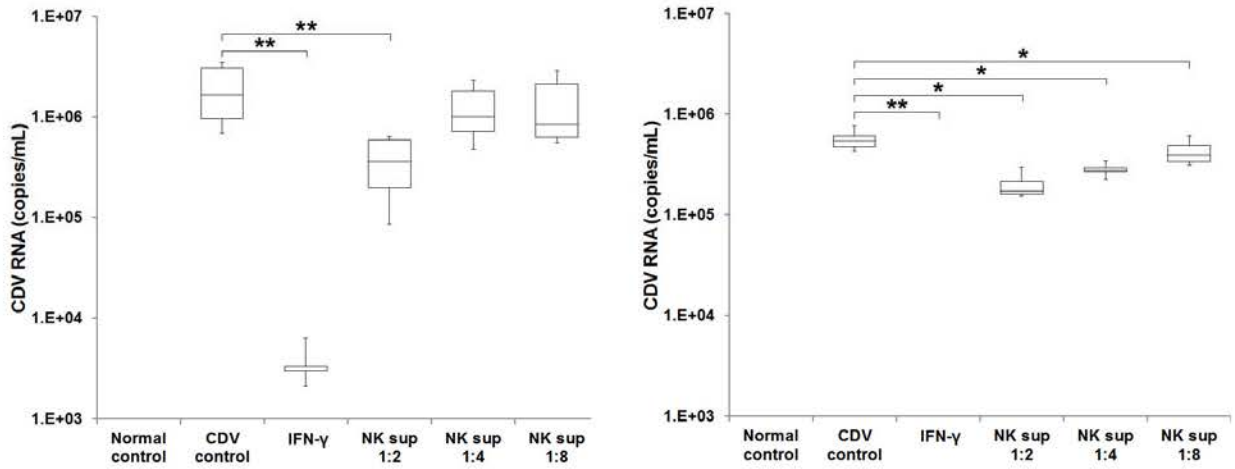
<그림> 체외증식 NK세포의 CDV감염세포에 대한 항바이러스 효능.

○ 디스토펜바이러스 감염 전(C)과 감염 후(B)로 IL-15로 체외 증식된 NK세포가 생산하는 사이토카인과 인터페론-감마(NK sup 1:2)가 처리된 세포에서 바이러스 감염 및 바이러스에 의한 세포의 병적변화 효과 (CPE)가 현저히 억제되는 것을 확인하였음.



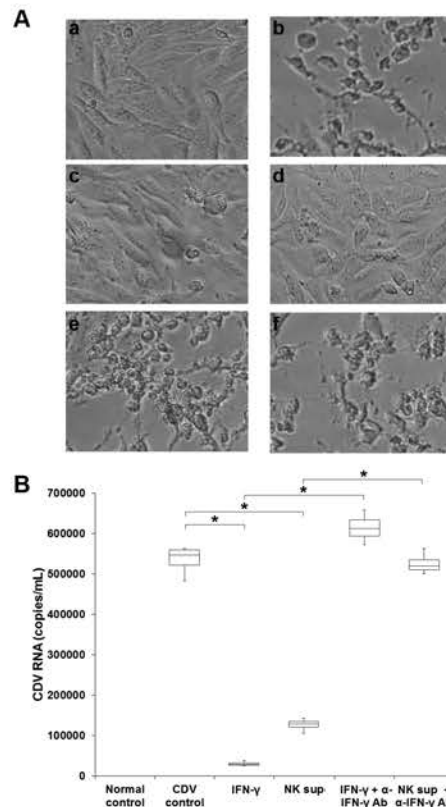
<그림> IL-15 체외증식 NK세포가 생산하는 인터페론-감마에 의한 항바이러스 효능 (CPE).

○ 디스토펜바이러스 감염 후(왼쪽)와 감염 전(오른쪽)로 IL-15로 체외증식된 NK세포가 생산하는 인터페론-감마(NK sup 1:2, 1:4, 1:8)가 처리된 세포에서 바이러스 증식이 감소되는 것을 real-time RT-PCR기법으로 확인하였음.



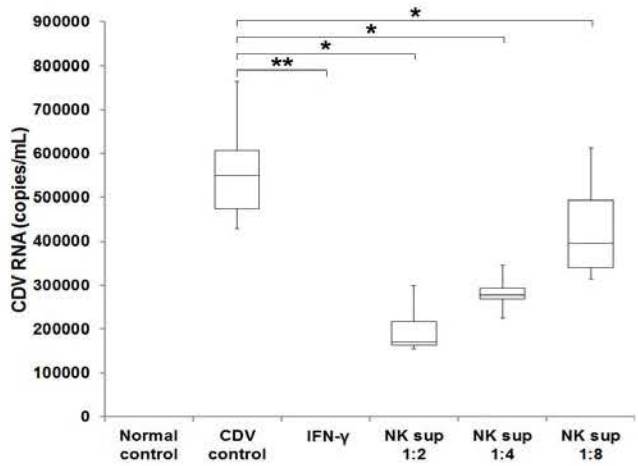
<그림> IL-15 체외증식 NK세포가 생산하는 인터페론-감마에 의한 항바이러스 효능 (바이러스 복제 수).

○ 디스토펙퍼바이러스 감염 후 인터페론-감마에 대한 항체로 IL-15로 체외증식된 NK세포가 생산하는 인터페론-감마의 기능을 억제한 결과 바이러스 증식이 복원되는 것을 real-time RT-PCR기법으로 확인하였음. 따라서 디스토펙퍼바이러스에 대한 항바이러스에 결정적인 인자는 NK세포가 생산하는 인터페론-감마임을 확인함.



<그림> 체외 증식 NK세포가 생산하는 인터페론-감마에 의한 항바이러스 효능 (인터페론-감마 불록항체실험).

○ 아울러 활성화된 NK세포에 의해 분비되는 인터페론-감마가 CDV의 감염 및 증식을 예방하는 효과가 있음을 확인하여, NK세포를 활성화시키는 방법을 이용하여 CDV 감염을 예방하거나 치료의 효과를 높일 수 있다는 사실을 확인하였음.



<그림> 체외 증식 NK세포가 생산하는 인터페론-감마에 의한 CDV 감염 예방효과.

**카. 동종 NK세포를 이용한 암 면역세포치료요법 protocol 확립 및 치료 효과**

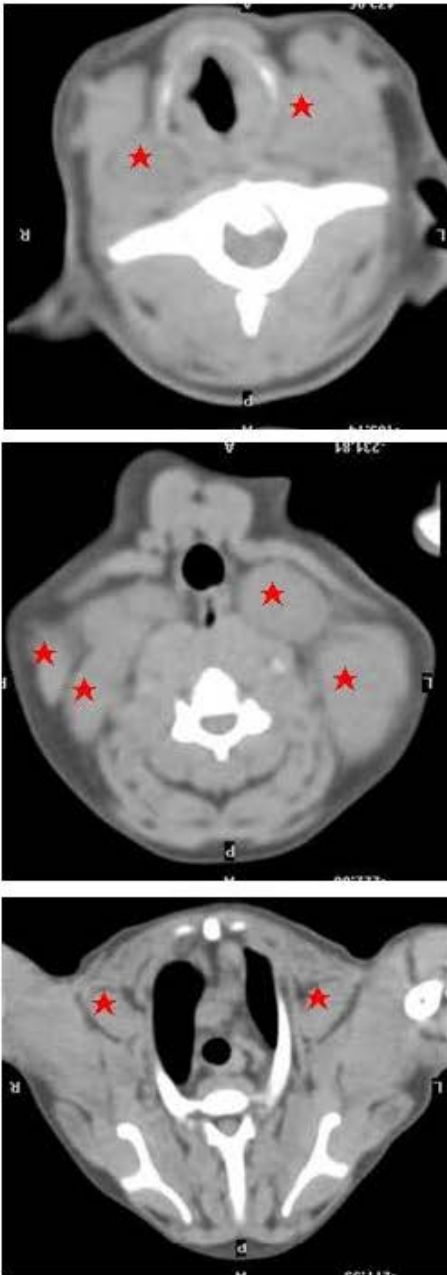
○ 체외 증폭된 동종 NK세포의 암치료 효과를 확인하기 위해 악성 종양에 이환된 8마리의 개체에 면역억제 후 동종 NK세포를 1주일 간격으로 총 6회 정맥주사 ( $1 \times 10^9$ 개 NK세포/마리/회)한 다음 5개월간 주기적으로 방사선 사진과 PET-CT를 촬영하여 종양의 변화양상을 확인함으로써 치료효과를 판정하였으며, 8마리 중 2마리에서 괄목할만한 치료 효과가 있음을 확인하였음. 이를 통해 암 치료 효과를 위한 대량 증폭된 동종 NK세포 투여 protocol (투여 세포수, 투여경로, 투여간격)을 확립하였음. 장기간 추적조사를 위해 지속적으로 관찰 예정임 (data 보완 후 투고 예정).

○ 체외 증폭된 동종 NK세포의 암치료 효과를 확인하기 위해 악성 종양에 이환된 8마리의 개체에 면역억제 후 동종 NK세포를 1주일 간격으로 총 6회 주입 ( $1 \times 10^9$ 개 NK세포/마리/회)한 다음 5개월간 주기적으로 방사선 사진과 PET-CT를 촬영하여 종양의 변화양상을 확인함으로써 치료효과를 판정하였으며,

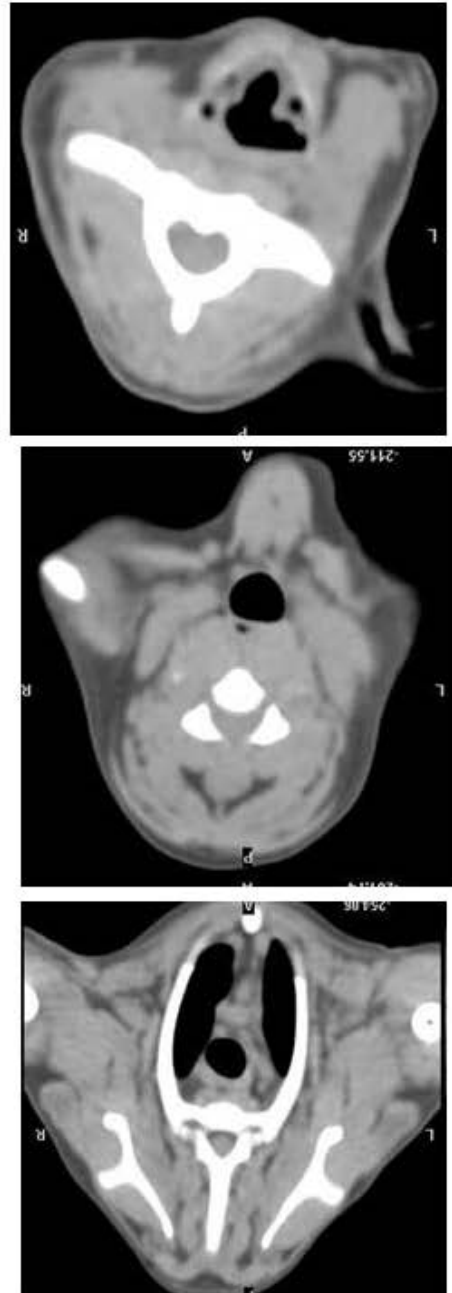
○ 치료를 실시한 8마리 중 T-cell lymphoma에 이환된 개와 multiple myeloma에 이환된 개 2마리에서 괄목할만한 치료 효과가 있음을 확인하였음 (현재까지의 치료효과 complete remission 25%, partial remission 13%로 치료반응은 총 38%임, 지속적인 추적 관찰을 통해 치료를 확인 예정).

○ Case I (T-cell lymphoma): 치료 전 후 CT 촬영 결과 치료전 다발성으로 존재하는 (빨간색 별표) 암괴가 치료 후 대부분 소실되어 있음을 확인할 수 있으며, 치료 후 지금까지 재발되지 않음. 지속적으로 추적 조사를 위해 관찰 중임.

치료전



치료후



<그림> 악성 T-cell 림프종에 이환된 8살된 Shih Tzu 종 개에 체외 증폭된 동종 NK세포 치료제 5회 주입 ( $1 \times 10^8$  세포 정맥주사) 후 치료 사진 (빨간색 별표: 암종).

○ Case 2 (Multiple myeloma): 치료 전 후 PET-CT 촬영 결과 치료 전 좌측 후지에 존재하는 (회색) 암괴 (화살표) 가 치료 후 대부분 소실되어 있음을 확인할 수 있으며, 치료 후 지금까지 재발되지 않음. 지속적으로 추적 조사를 위해 관찰 중임.



<그림> 다발성골수종에 이환된 Schnauzer (9살 암캐)에 체외 증폭된 동종 NK세포 치료제 투여 ( $1 \times 10^9$  세포 정맥주사) 후 치료 사진 (빨간색 화살표: 암종).

**타. 체외 증폭된 동종 NK세포의 암치료 효과를 극대화하기 위한 방사선치료, 제조합사이토카인 및 화학요법과의 병합치료요법 개발**

① 동종 NK세포에 대한 표적 암세포의 면역원성을 높이기 위한 방사선치료 선량 및 protocol 확립하고, 치료효과 극대화를 위한 cytokine (IL-15, IL-2, IL-21) 투여 protocol 및 화학요법 제와의 병합 요법 확립

가장 적절한 면역억제 방법을 마련하기 위하여 전신방사선조사 (total body irradiation; TBI) 와 화학요법제 (chemotherapeutic agent) 투여 및 두 가지를 혼용하는 방법을 비교하였음.

○ 방사선 피폭에 의한 부작용 (radiation toxicity)를 최소화하며, 적절한 lymphodepletion 결과를 얻을 수 있는 TBI의 양을 결정하기 위하여 선형가속방사선발생장치 (linear X-ray beam accelerator (Varian, USA))에서 발생하는 6-MV photon beams를 이용하여 4 가지의 다른 선량 (10 Gy, 6 Gy, 4 Gy, 1 Gy) 으로 정상 개에 방사선을 조사한 후 2주간 임상증상 및 혈액 검사를 실시하였음.

○ 방사선 피폭은 12.5cGy/min씩 단일 fraction을 전신에 조사하였으며 (12.5cGy/min, 10 Gy single fractionated TBI, 12.5cGy/min, 6 Gy single fractionated TBI, 12.5cGy/min, 4 Gy single fractionated TBI, 12.5cGy/min, 1 Gy single fractionated TBI), 방사선 조사 후 면역 억제에 의한 감염 등의 문제를 방지하기 위하여, 최대한 무균적으로 급식, 급수 관리하였음.

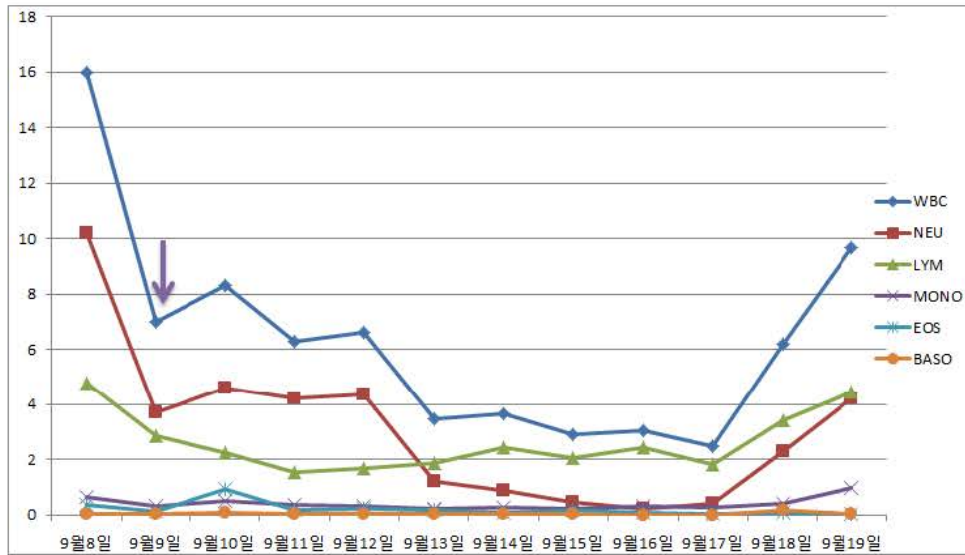
○ 방사선 조사된 모든 군의 개체는 방사선 조사 2일 후부터 백혈구 수가 급격히 감소하여 4일후 zero 상태가 되었으며, 10 Gy, 6 Gy, 4 Gy에 피폭된 개체는 모두 10일 내 radiation toxicity에 의해 폐사하였고, 1 Gy의 양으로 TBI를 실시한 군에서만 모두 생존하여 이 선량을 면역 억제를 위한 TBI 선량으로 결정하였음.

○ 화학요법제 중 고용량 cyclophosphamide (30 mg/kg IV X 2일: -5 Day, -4Day)와 fludarabine (20



mg/m<sup>2</sup> IV X 5 :-6Day ~ -2Day)을 투여한 결과 가장 효과적인 lymphodepletion 효과를 얻음.

○ 1 Gy TBI + cyclophosphamide (15 mg/kg IV X 2일) 역시 효과적인 lymphodepletion 결과를 얻음.

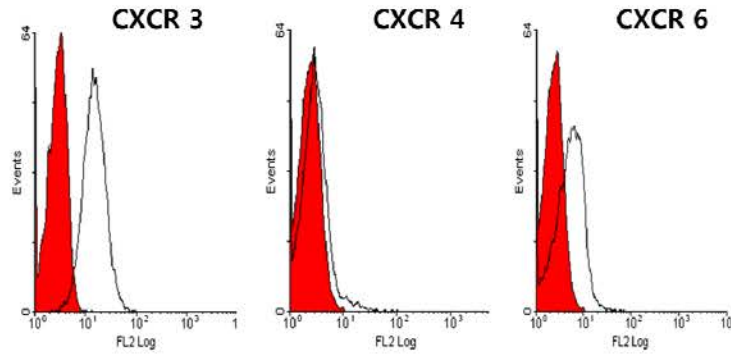


<그림> 고용량 cyclophosphamide (30 mg/kg IV X 2일: -5 Day, -4Day)와 fludarabine (20 mg/m<sup>2</sup> IV X 5 :-6Day ~ -2Day)을 투여한 후 lymphodepletion 효과.

② 방사선치료의 선량 및 화학요법제 병합에 따라 유도된 암세포 표면의 NK 세포 활성수용체에 대한 ligands와 chemokine 수용체 ligands 발현 변화 분석을 통한 암종 별 적정 조사선량 및 화학요법제와의 병합치료 조건 확립 및 방사선치료 및 화학요법제 치료 전후 암세포에 대한 NK세포의 세포독성능 등 기능 비교 분석을 통한 동종 NK세포에 대한 표적 암세포의 면역원성을 높이기 위한 최적의 병합요법 조건 확립

○ 암세포에 방사선 조사는 NK세포의 중앙부위로 이동을 촉진하는 chemokine의 발현과 분비를 증가시킬 수 있으므로 NK세포 표면에 발현되는 chemokine에 대한 수용체의 종류를 확인한 결과 활성화된 NK세포 표면에 발현된 CXCR3와 CXCR6의 발현이 증가됨을 확인하였음.

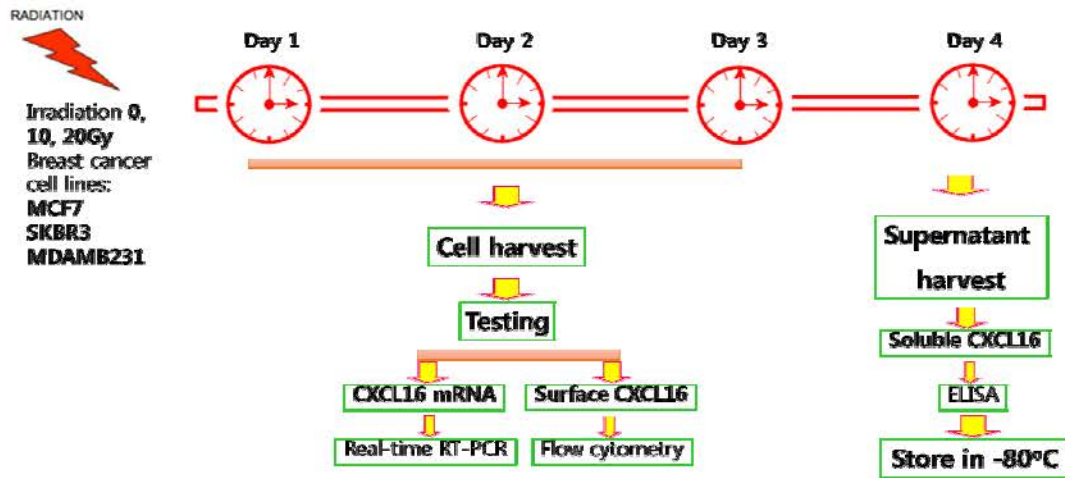
# 1.Expression chemokine receptor on expanded NK cells



The expanded NK cells were positive for CXCR3 and CXCR6, very low extent CXCR4

<그림> 체외 증폭시킨 NK세포의 표면에 발현된 chemokine receptor.

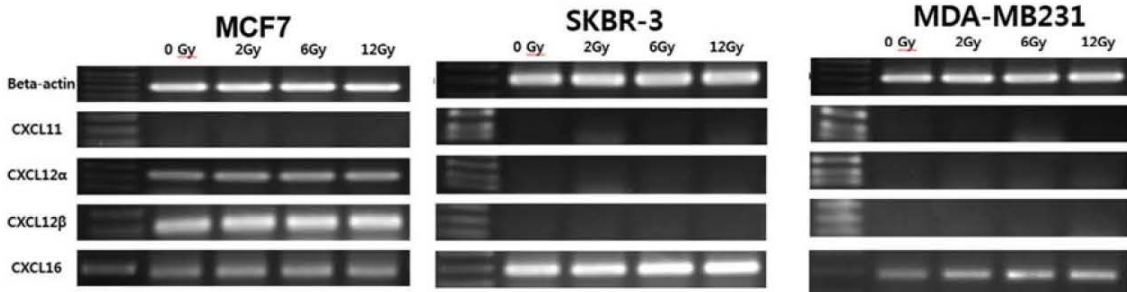
○ 이상의 결과로 NK세포의 표면에 발현된 chemokine receptor에 대한 암세포에서 발현하는 chemokine의 발현 및 분비량에 미치는 방사선조사의 효과를 확인하기 위하여 다음과 같은 protocol로 암세포에 방사선 조사함.



<그림> 세포에서 발현하는 chemokine의 발현 및 분비량에 미치는 방사선조사의 효과를 확인하기 위한 protocol.

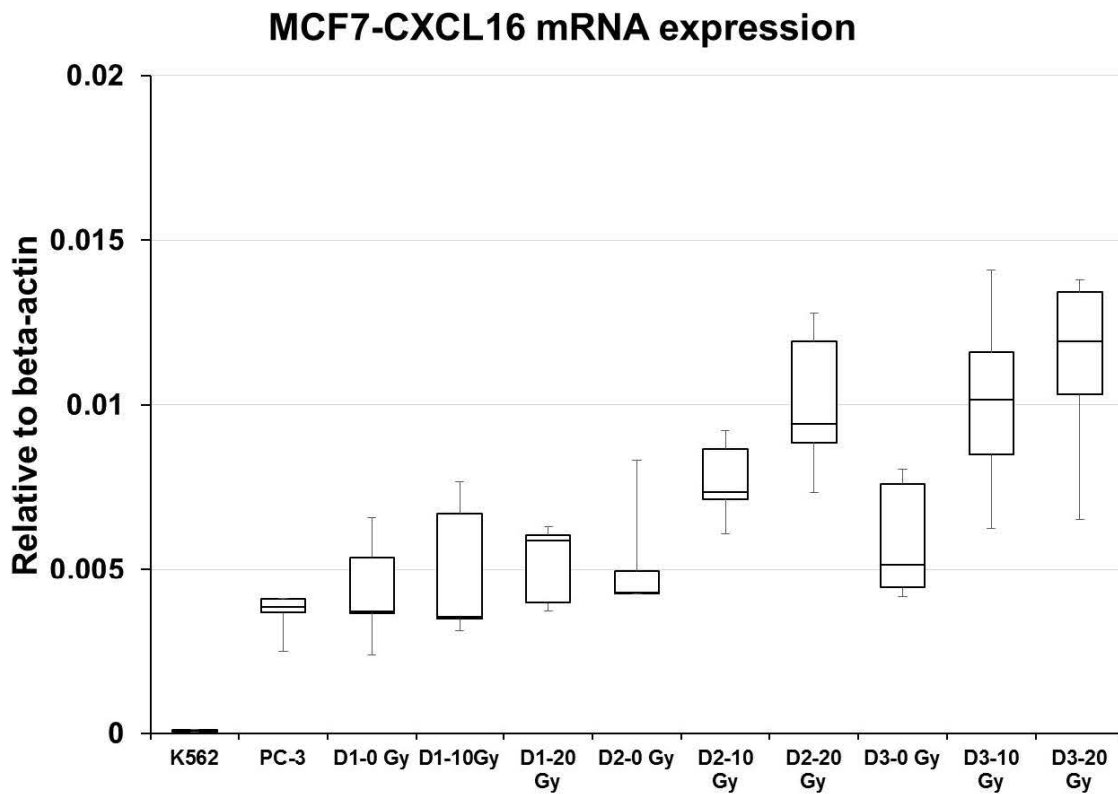
○ 방사선 조사량을 달리하여 유방암세포에 방사선을 조사시킨 후 CXCL16 mRNA 유전자 발현 양을 확인한 결과 2Gy 이상의 TBI 조사량에 의해 ahems 암세포에서 CXCL16 유전자 발현이 증가함을 PCR 을 통해 확인함.

## 2. CXCL16 mRNA expression in breast cancer cells (RT-PCR)

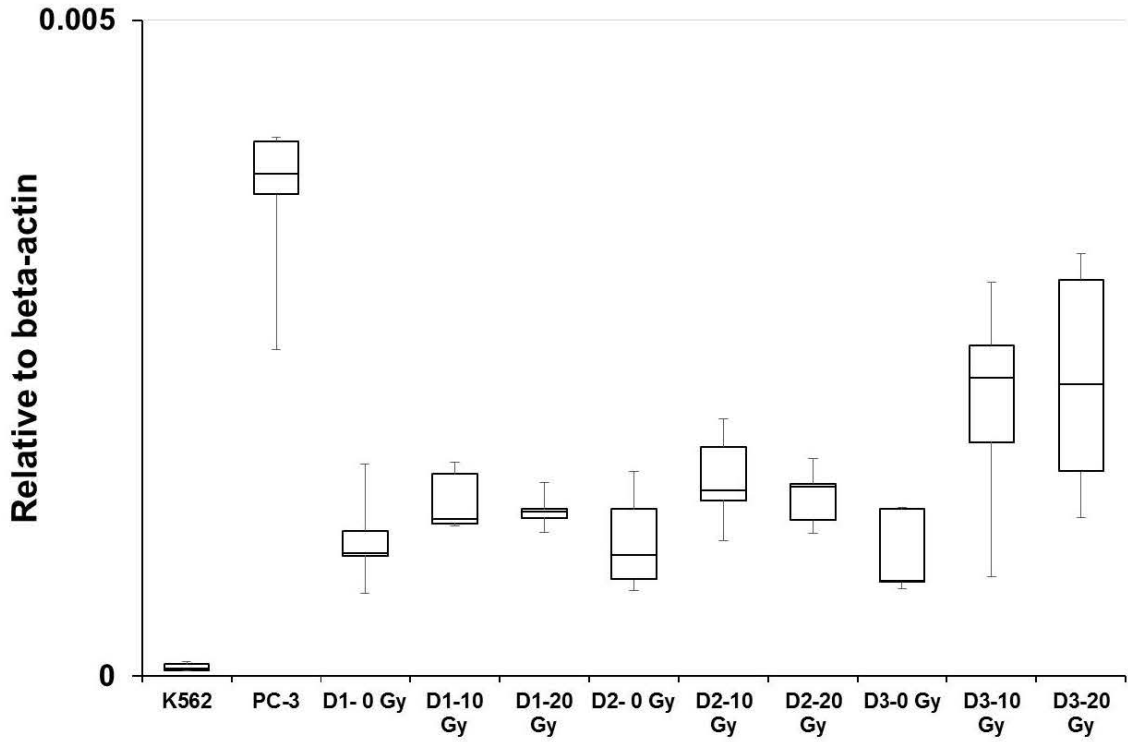


<그림> 유방암 세포에 방사선 조사량에 따른 CXCL16 유전자의 발현량 변화.

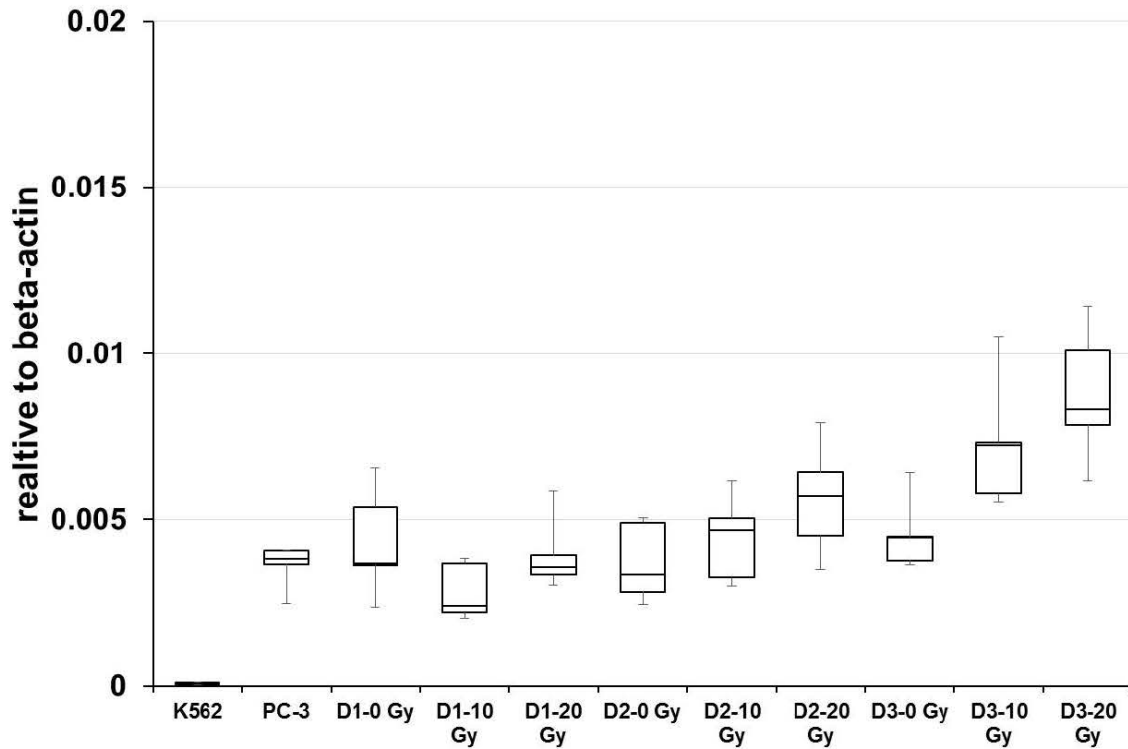
○ 방사선 조사 후 유방암 세포에 발현되는 CXCL16 유전자의 양은 방사선 조사량이 증가할수록 그리고 방사선 조사 후 시간이 경과할수록 모든 암세포에서 현저히 증가함을 real-time RT-PCR을 통해 확인하였음.



### MDAMB231-CXCL16 mRNA expression

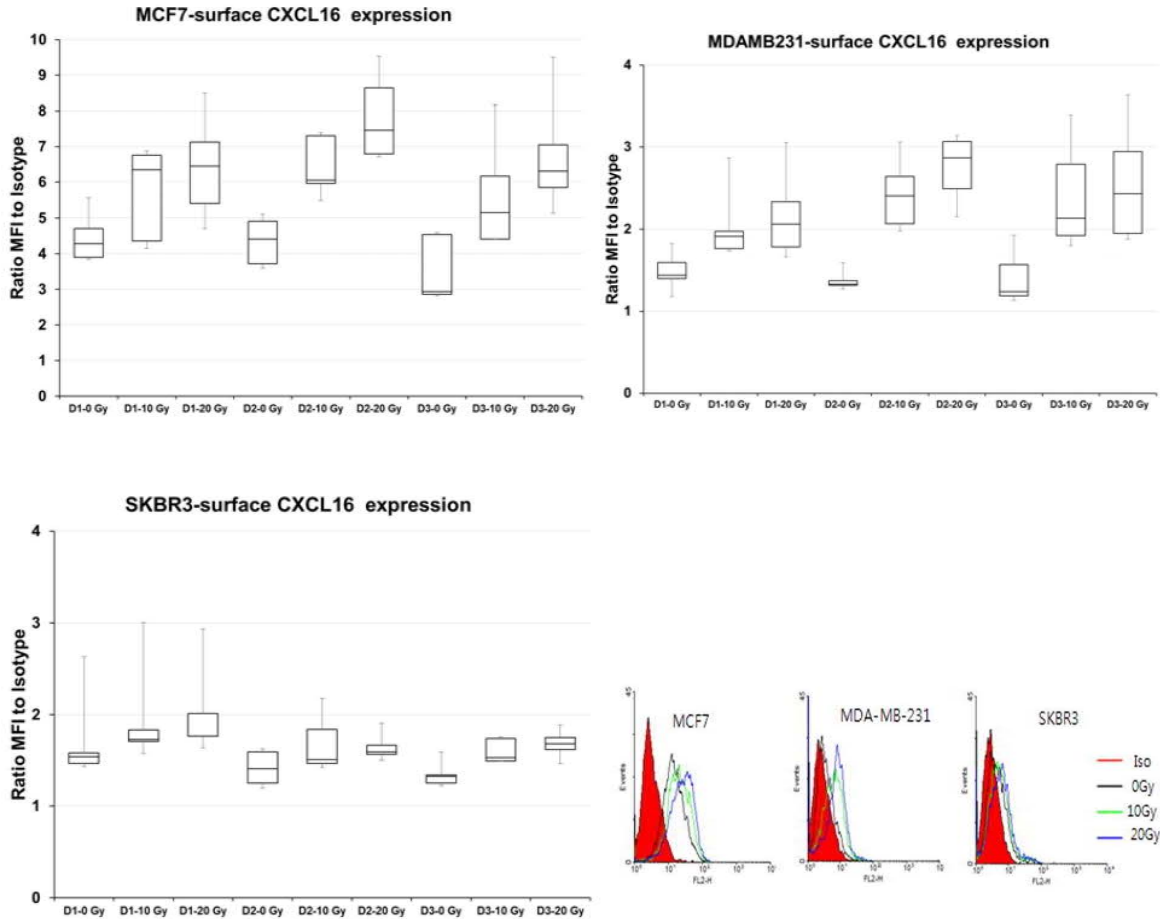


### SKBR3-CXCL16 mRNA expression



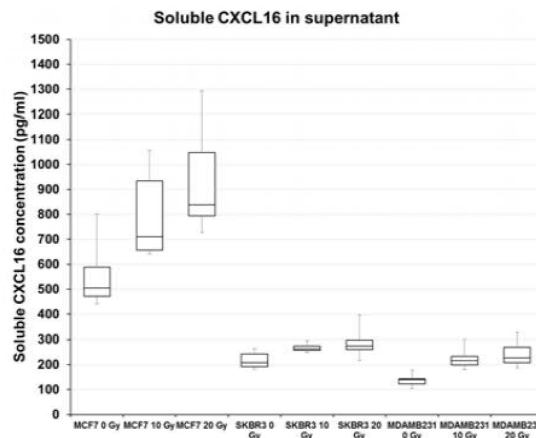
<그림> 방사선 조사 후 유방암 세포에 발현되는 CXCL16유전자의 양

○ 방사선 조사 후 유방암 세포 표면에 발현되는 CXCL16 발현량을 유세포분석적으로 확인한 결과 방사선 조사량이 증가할수록 그리고 방사선 조사 후 시간이 경과할수록 모든 암세포의 표면에 CXCL16의 발현이 증가함을 확인함.



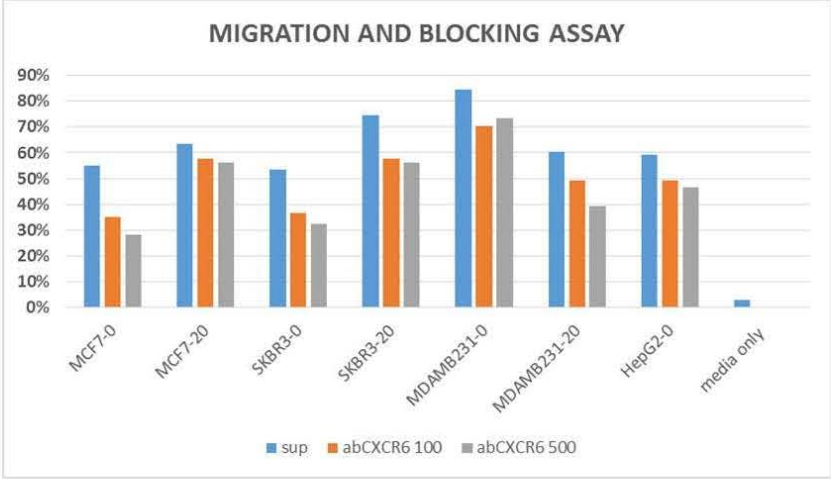
<그림> 방사선 조사 후 유방암 세포 표면에 발현되는 CXCL16의 양.

○ 방사선 조사 후 유방암 세포 표면에서 ADAMI7에 의해 분비되는 CXCL16의 분비양을 real-time RT-PCR로 확인한 결과 방사선 조사량이 증가할수록 그리고 방사선 조사 후 시간이 경과할수록 모든 암세포의 표면에서 CXCL16이 잘려 분비되는 양이 증가함을 확인함.



<그림> 방사선 조사 후 유방암 세포 표면에서 ADAMI7에 의해 분비되는 CXCL16의 분비양.

○ 이상의 결과 암세포에 20Gy로 방사선 조사 후 72시간에 암세포에 발현하는 CXCL16의 발현량과 분비량이 가장 증가하여 방사선 조사 후 72시간 이후에 체외 증폭한 NK세포를 주입하는 것이 주입된 NK세포의 종양부위로의 이동을 최대화시킬 수 있어 NK세포의 항암기능을 극대화시킬 수 있음을 확인하고, 최적의 NK세포와 방사선치료의 병합요법 protocol을 확립하였음.



<그림> 20Gy로 방사선 조사 후 72시간에 암세포에 발현하는 CXCL16의 발현량과 분비량이 가장 증가하여 방사선 조사 후 72시간 이후에 체외 증폭한 NK세포를 주입하는 것이 주입된 NK세포의 종양부위로의 이동을 최대화시킬 수 있어 NK세포의 항암기능을 극대화시킬 수 있음을 확인.

○ 이상의 결과는 병합요법에 의한 임상치료 결과 data를 보완한 후 SCI 국제학술지에 투고할 예정임.

○ 국내에서 동물용 생물학 제제 (세포치료제 포함) 의 품목 허가 절차가 수행된 경우가 아직 전무하며 생물학 제제 (세포치료제 포함) 의 임상시험 가이드라인이 마련되어 있지 않음. 연구 종료 후 사업화를 앞당기기 위해 이상의 결과를 토대로 임상시험 가이드라인 마련을 위해 농림축산검역검사본부와 지속적으로 상담 및 협의를 진행할 예정임.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 1절. 목표달성도

#### 가. 연도별 연구목표에 입각한 연구목표의 달성도

년도	연구목표	목표 달성도	세부 연구목표
1차년도	● 임상치료용 large scale NK세포 증폭조건 확립	100%	-대용량 팩이나 flask에서 임상치료용 large scale NK세포 증폭조건 확립 -개 말초혈액 내 NK세포 수 증가 방법
		100%	-사이토카인 조합에 의한 NK 세포 증폭률 개선 방법 확립
		100%	-방사선조사 후 냉동 보관한 feeder cell을 이용한 증폭 조건 확립
		100%	-냉동 보관된 NK 세포의 안정성 확보를 위한 NK세포의 냉동보관 방법 확립
	● 주입된 동종 NK세포 확인을 위한 chimera 검출법 확립	100%	- 주입된 동종 NK세포의 생체내 생착 여부에 대한 평가를 위한 chimera 검출법 확립
● 증폭된 동종 NK세포 주입 후 항암 효과 및 임상적 효능 평가를 위한 immune monitoring 방법 확립	100%	- 증폭된 동종 NK세포 주입 후 항암 효과 및 임상적 효능 평가를 위한 immune monitoring 방법 확립	
2차년도	● 동종 NK세포를 이용한 면역세포 치료의 안전성 확인	100%	- 동종 면역세포에 의해 GVHD를 유발시키기 위한 면역억제 방법 (TBI) 결정
		100%	- TBI 후 면역 monitoring을 통한 동종 세포의 주사 적기, 반복 주입 횟수, 간격 확인 및 주입 세포 수 결정
		100%	- 동종 PBMCs 주입 후 GVHD와 같은 심각한 부작용 발생 확인
		100%	- 체외 증폭된 동종 NK세포 주입 후 GVHD 발생 여부 확인을 통한 동종 요법의 안전성 검증
	● 동종 NK세포를 이용한 면역치료 요법 개발	100%	- 정상 개와 유선암이 발생한 개에 증폭된 동종 NK세포 이식 후 종양부위로 migration 양상 확인
		100%	- 동종 NK세포 주입 후 암 치료 효과 확인
3차년도	● 동종 NK세포와 방사선요법의 병합요법 확립을 위한 최적의 방사선조사 선량 및 protocol 확립	100%	- 동종 NK세포에 대한 표적 암세포의 면역원성을 높이기 위한 최적의 방사선조사 선량 및 protocol 확립
		100%	- 유선암이 발생한 개에 방사선 조사 후 암치료 효능을 증진시키기 위한 대량 증폭된 동종 NK세포 투여 protocol (투여량, 투여경로, 투여간격 등) 확립
	● 방사선 조사 후 암 치료 효능을 증진시키기 위한 동종 NK세포 투여 protocol 확립	100%	- 유선암이 발생한 개에서 최적의 병합요법 확립

## 나. 연구목표의 추가달성

- 당초 계획한 연구목표 이외에 추가적으로 ①동종 NK세포를 이용한 암치료제의 효율을 극대화시키는 위해 재조합 개 Interleukin-15의 정제 생산기술을 개발 확립하였으며, ②재조합 개 Interleukin-15의 생체내 주입을 통해 안전성 및 면역학적 효능을 검증하여 사업화의 기틀을 마련하였고,
- 아울러 ③체외 증폭된 개 NK세포의 개 디스토펜바이러스 (CDV) 에 대한 항-바이러스효과 확인하여 목표를 추가 달성하였으며, ④말초혈액 내 CD3+CD5dim 세포는 말초혈액 내 주로 존재하는 유형의 NK세포이며, 활성화에 의해 non-B, non-T large granular NK lymphocytes로 성숙되는 NK세포임을 규명함과 아울러 말초혈액 내 존재하는 CD3-CD21-세포는 NK세포가 아닌 innate lymphoid cells (ILCs) 임을 규명하여 계획한 목표를 추가 달성하였음.

## 다. 연구성과

- 이상에서 언급한 바와 같이 3차년의 본 과제를 통해 2건의 특허등록 (등록번호: 10-14993451, 10-1440915)을 완료하였으며, 1건의 기술이전을 완료하였고, 1건의 추가적인 기술이전을 협의 중 (개 자연살해세포 체외 증폭배지 및 이를 이용한 개 자연살해세포 체외 배양방법) 이며, 4편의 논문을 SCI 국제학술지에 게재 완료하였고,
- 추가적으로 3편의 논문 (체외 대량 증폭된 NK세포의 냉동 보관 및 냉동에 의해 현저히 저하된 NK세포의 항암 기능을 회복 방법, 재조합 개 IL-15의 생체 투여 후 안전성 및 면역학적 효능, 개 NK세포 표현형의 특성) 은 SCI국제학술지에 투고 준비가 거의 마무리되고 있으며, NK세포의 임상적 적용 및 방사선요법과의 병합요법에 대한 Data 보완 후 2편~3편의 논문을 추가적으로 더 게재할 예정임 (제 3장 연구개발 수행 내용 및 결과 참조).
- 종합하여 지금까지 연구과제 수행을 통해 달성한 성과는 특허등록 2건 국제학술논문 4편 게재 완료 및 5편 추가 게재예정, 기술이전완료 1건, 추가 기술이전 계획 1건으로 애초 계획하였던 성과 목표 (특허출원 2건, 특허등록 1건, SCI논문 4편, 비 SCI논문 1편)를 월등히 초과하여 달성하였음.

## 2절. 관련분야에의 기여도

- 본연구를 통해 확립된 임상용 개 NK 세포의 효과적인 대용량 증폭기술 및 안전성이 확인된 동종 NK세포를 이용한 암면역세포치료제 생산에 대한 기술을 (주)박셀바이오에 이전을 협의하고 있으며, 개 NK세포를 이용한 동종 면역세포 치료요법의 효과를 극대화시키기 위한 면역증강제로 개 IL-15의 대량 정제기술을 확립하여 기술이전을 실시함으로써 개 바이러스질환이나 종양치료를 위한 면역세포치료제의 생산 및 제품화의 토대를 마련하여 국내에서 면역세포치료를 정착시키는데 기여하였음.
- 동종 NK세포요법의 방사선치료요법과 최적의 병합요법을 확립하여 항암효능을 극대화시킴으로써 면역세포치료 산업화를 조기에 정착의 가능성을 높이고 면역세포치료요법에 대한 저변확대에 기여하였음.
- 개는 질병연구에 많이 사용되는 실험용 쥐 등의 설치류에 비해 생리학적으로 사람과 유사한 점이 많고, 개에서 다양한 종류의 질환이 사람의 질병과 매우 흡사하기 때문에 자연 발생된 난치성질환의 개에서 동종 NK세포치료를 이용하여 생체의 면역학적 변화나 기전, 치료효과, 부작용 등과 관련된 체계적인 생체 조사가 가능함으로 사람의 세포치료제 개발 및 효과적인 병합치료방법 확립 등 의학분야의 연구에 학문적 그리고 과학적으로 기여하였음.



○ 본 연구책임자가 이미 개발한 시험관내 증폭기술을 토대로 임상용 개 NK 세포의 효율적 대용량 증폭 방법이 확립되어 사람에서 암 뿐만 아니라 바이러스성질환 및 면역매개성질환 등 난치성질환 치료를 위한 세포면역치료제 개발을 위한 효과적인 전임상연구의 동물모델로 활용될 수 있는 기틀을 마련하여 과학적인 기여를 하였음.

○ 암세포를 공격하는 개 면역세포치료제는 우리나라가 강점을 보이고 있는 분야로 현재 세계적으로 면역세포치료제를 허가한 나라는 미국과 우리나라뿐임. 이동성이 개선된 면역세포치료제를 항암백신으로 사용함으로써 기존의 면역세포치료제보다 현저히 우수한 항암효과를 보여, 새로운 암치료제의 정착에 기여할 것임..

○ 이동성에 관련된 새로운 인자들의 연구로 인한 원천기술의 획득과 그로인한 새로운 차세대 강력한 면역세포치료제 제조법을 확립하였으며, 암면역세포치료백신의 기능을 강화시키는 물질들을 개발하여 강력한 면역세포치료백신의 원천기술을 획득하고 고효율의 면역세포치료백신의 제조를 가능하게 할 것임.

○ 암의 정복은 사회적으로 매우중요한 과제이며 그 차세대 대안으로 부작용 없는 암 면역치료제의 개발은 과학 기술 발전에 크게 기여하리라 사료되며, 본 기술개발에서 파생되는 결과는 암 면역 관련 학문적 및 임상적 치료법에 지대한 영향을 미칠 것으로 예상됨.

○ 정확하며 부작용이 적은 동종 NK세포를 이용한 세포치료법의 개발은 암 환자들의 완치의 가능성을 높임으로써, 암으로 인한 국가적 경제 손실(연간 약 15조원)을 감소시킬 수 있을 뿐만 아니라 사회경제적 손실을 줄임으로써 개인뿐만 아니라 사회적으로 공동의 이익을 추구할 수 있을 것으로 기대됨.

○ 세포치료제 산업은 세포은행, 세포조작장비, 대량세포배양장치 및 시설, 배지공급, 마커 및 항체 발굴, bioinformatics, 임상시험, 세포치료서비스 등 고도로 플랫폼화된 형태의 산업으로 발전될 것이며 향후 글로벌 제약기업과 세포치료 벤처기업과의 협력 및 합병 또한 다양한 형태로 추진될 것으로 예상됨.

○ 개 NK세포의 제조 및 기능 강화와 사용되는 시약들은 절대적으로 수입에 의존하고 있기 때문에, 싸이토카인 및 천연물에 대한 연구 및 개발의 활성화로 관련시장의 동반성장을 유도하여 수입 의존도를 낮출 수 있으며, 관련분야 전문인력의 고용증대로 인한 지역산업 활성화에 기여할 것으로 기대됨.

○ 또한 독보적인 개 NK세포치료제의 개발로 세계 환자를 국내에 유치하여 이로 인한 막대한 국가적, 지역적 경제 이익 창출. 특허 등의 지적 재산권 확보를 통해 국가적 핵심기술인 암 치료를 위한 신약개발 분야의 국가 경쟁력을 높이는데 기여하였음.

# 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

## 1절. 연구개발성과

### 가. 연구개발 성과

- 본 연구진이 최초로 개발한 개 NK세포의 체외 증폭방법은 24-well plate에서 실시한 것으로 실제 임상에 사용하기 위해 대량의 세포를 한꺼번에 증폭시키기에는 많은 제약 사항이 있어, 이를 극복하기 위하여 먼저 대용량 flask (T24, T75) 에서 대량 증폭을 위한 large scale NK세포 증폭 system을 확립하였고,
- NK세포에서 STAT3를 활성화시키는 신호전달을 통해 염색체 말단인 텔로미어(telomere)의 길이를 연장시킴으로써 세포 수명을 연장하고 NK세포의 증식을 활성화시키기 위하여 rcIL-21을 이용한 개 NK세포 체외 증폭배지의 조성을 확립하고 이를 이용한 강력한 NK세포 체외 배양방법을 확립하였으며 (특허등록 완료, 등록번호: 10-14993451, 발명의 명칭: 개 자연살해세포 체외 증폭배지 및 이를 이용한 개 자연살해세포 체외 배양방법),
- 아울러 rcIL-21의 자극이 개 NK세포의 증식 및 항암 기능 향상에 영향을 미침을 확인하고, 특히, rcIL-21의 시간차 자극을 통해 실제 임상에 사용할 수 있는 수준으로 개 NK세포의 체외 증폭 효율 및 암세포살상 능력을 향상시킬 수 있음을 입증하였으며, 그 결과를 수의학분야 상위 10% 이내의 SCI 국제학술지에 게재하였음 (Interleukin-21 induces proliferation and modulates receptorexpression and effector function in canine natural killer cells. *Vet Immunol Immunopathol* 165:22-33) .
- 동종 NK세포의 실제 임상적 활용을 용이할 수 있도록 할 목적으로 체외 대량 증폭된 NK세포의 냉동 보관방법 및 냉동 보관을 위한 배지의 조성을 확립하였으며, 냉동 보관 후 NK세포를 치료제로 주입하기 위해 해동 시 냉동에 의해 현저히 저하된 NK세포의 항암 기능을 회복시키기 위한 방법을 확립하였음 (연구원 김주선 석사학위논문, 논문제목: Comparison of different media for cryopreservation of peripheral blood mononuclear cells and expanded Natural Killer cells, SCI 국제학술지 투고 준비중).
- 이와 아울러 NK세포의 대용량 증폭을 용이하게 수행하기 위하여 방사선조사 후 냉동 보관한 feeder cell을 이용한 신선한 feeder 세포와 동등한 정도의 NK세포 증폭 조건을 확립하여 그 결과를 SCI 국제학술지에 게재하였음 (Anticancer Research 2013;33(5):2011-9).
- 환자에 주사된 동종 NK세포의 생체 내 생착 여부 및 주사 후 생존기간에 대한 평가를 위한 chimera 검출법 및 CFSE를 이용한 검출법을 확립하였으며, 체외 증폭된 개 NK세포 주입 후 항암 효과 및 효능 평가를 위한 immune monitoring 방법을 확립하였음.
- 이상과 같이 1차년도 성과목표를 100% 달성하였음.
- 생체내에서 NK 세포의 분화를 촉진하여 개 말초혈액 내 NK세포의 수를 증가시켜 체외 증폭효율을 극대화시킴과 아울러, 주사된 동종 NK세포의 암세포 살상기능을 최적화시킬 뿐만 아니라 주사 후 동종 NK세포가 장기간 살아남아 항암 기능을 오래 지속적으로 발휘할 수 있도록 함으로서 동종 NK세포를 이용한 암치료제의 효율을 극대화시키는 adjuvant로 사용하기 위해 제조합 개 Interleukin-15의 정제 생산기술을 개발 확립하였으며 (특허등록 완료, 등록번호: 10-1440915, 발명의 명칭: 개 인터루킨-15 체외 증폭용 프라이머 세트, 이의 용도 및 이를 이용한 제조합 개 인터루킨-15 제조방법),
- 동종 NK세포를 이용한 암치료제의 효율을 극대화시키기 위한 제조합 개 Interleukin-15의 생산기술

의 사업화를 위해 최근 이 기술을 주)박셀바이오에 기술이전을 실시하였음.

○ 정제 생산된 재조합 개 Interleukin-15 (rcIL-15)가 효율적으로 개 NK세포의 체외 증폭을 유도할 뿐만 아니라 체내 주입 후 면역기능을 향상시킴을 확인하여, rcIL-15의 제조기술과 함께, 그 결과들을 종합하여 SCI 국제학술지에 게재하였음 (Generation of recombinant canine interleukin-15 and evaluation of its effects on the proliferation and function of canine NK cells. Vet Immunol Immunopathol 165:1-13).

○ 이와 아울러 정제된 rcIL-15를 주사한 개체의 안전성 평가에서 전혀 부작용 없이 말초혈액 내 NK세포의 개체 수를 현저히 증가시켰으므로 개 NK세포의 체외 증폭 효율을 실제 임상에서 시술할 수 있는 수준의 대용량 증폭기술을 확립하는데 이용할 수 있고, 주사된 동종 NK세포의 증가된 암세포 살상능력을 장기간 유지할 수 있음을 증명하여 이 결과를 SCI 국제학술지에 투고할 준비 중에 있음.

○ 개 NK세포와 관련되어 세계적으로 지금까지 논란의 대상이 되고 있는 개 NK세포 표현형 (phenotype)의 특성에 관하여 CD3+CD5dim 세포는 NK세포의 특성을 갖는 세포로 개 말초혈액 내 주로 존재하는 유형의 NK세포이며, 개 non-B, non-T large granular NK lymphocytes는 이 CD3+CD5dim 세포에서 유래되는 가장 성숙된 NK세포임을 본 연구의 1차년도와 2차년도 연구 수행 과정에서 처음으로 밝혀내 우수한 SCI 국제학술지에 투고 준비중임 - 이 결과는 동종 개 NK세포를 이용한 암면역세포치료제 사업화를 위한 임상시험 승인을 위해 매우 중대한 결과임.

○ 체외 증폭된 동종 NK 세포 주사 후 GVHD 등 중요한 부작용 발생 여부를 확인하여 동종 NK세포 주사의 안전성을 입증하였고, 임상시험을 통한 암치료시 주사된 NK세포의 수여자 내 안정적인 정착을 위한 효과적인 면역억제 (특히 lymphocyte의 제거) 방법을 확립하였으며, 이를 통해 면역억제 후 동종 NK세포의 주사 적기, 반복 주입 횟수, 간격 및 주입 세포 수를 결정하였음 (data 보완 후 투고 예정).

○ 이와 아울러 본 과제를 통해 확립한 방법으로 체외 증폭시킨 개 NK세포가 개에서 가장 중요한 바이러스 질환을 일으키는 바이러스 중 하나인 개 디스텔페바이러스 (CDV)의 증식을 강력히 억제하고 바이러스에 감염된 세포를 파괴시키는 것으로 나타나 증폭된 NK세포를 바이러스감염 치료에도 사용할 수 있음이 증명되어 이 결과를 수의학분야 상위 5%이내의 SCI 국제학술지에 게재하였음 (The anti-canine distemper virus activities of ex vivo-expanded canine natural killer cells. Vet Microbiol 176:239-249).

○ 이상과 같이 2차년도 계획한 성과목표를 추가 달성하였음.

○ 체외 증폭된 동종 NK세포의 암치료 효과를 확인하기 위해 악성 종양에 이환된 8마리의 개체에 면역억제 후 동종 NK세포를 1주일 간격으로 총 6회 정맥주사 (1X10<sup>8</sup>개 NK세포/마리/회)한 다음 5개월간 주기적으로 방사선 사진과 PET-CT를 촬영하여 종양의 변화양상을 확인함으로써 치료효과를 판정하였으며, 8마리 중 2마리에서 괄목할만한 치료 효과가 있음을 확인하였음. 이를 통해 암 치료 효과를 위한 대량 증폭된 동종 NK세포 투여 protocol (투여 세포수, 투여경로, 투여간격)을 확립하였음. 장기간 추적조사를 위해 지속적으로 관찰 예정임 (data 보완 후 투고 예정).

○ 동종 NK세포에 대한 표적 암세포의 면역원성을 높이기 위한 방사선치료 선량 및 protocol 확립하고, 치료효과 극대화를 위한 cytokine (IL-15, IL-2, IL-21) 투여 protocol 및 화학요법제와의 병합 요법 확립하였고,

○ 방사선치료의 선량 및 화학요법제 병합에 따라 유도된 암세포 표면의 NK 세포 활성수용체에 대한 ligands와 chemokine 수용체 ligands 발현 변화 분석을 통한 암종 별 적정 조사선량 및 화학요법제와의 병합치료 조건 확립 및 방사선치료 및 화학요법제 치료 전후 암세포에

대한 NK세포의 세포독성능 등 기능 비교 분석을 통한 동종 NK세포에 대한 표적 암세포의 면역원성을 높이기 위한 최적의 병합요법 조건 확립하는 등

○ 체외 증폭된 동종 NK세포의 암치료 효과를 극대화하기 위한 방사선치료, 제조합사이토카인 및 화학요법과의 병합치료요법 개발을 완료하여 **data 보완 후 투고예정임.**

○ 국내에서 동물용 생물학 제제 (세포치료제 포함) 의 품목 허가 절차가 수행된 경우가 아직 전무하여 생물학 제제 (세포치료제 포함) 의 임상시험 가이드라인이 마련되어 있지 않음. 연구 종료 후 사업화를 앞당기기 위해 임상시험 가이드라인 마련을 위해 농림축산검역검사본부와 상담 및 협의를 실시함.

○ 이상에서 언급한 바와 같이 3차년의 본 과제를 통해 **2건의 특허등록 (등록번호: 10-14993451, 10-1440915)을 완료하였으며, 1건의 기술이전을 완료하였고, 1건의 추가적인 기술이전을 협의 중 (개 자연살해세포 체외 증폭배지 및 이를 이용한 개 자연살해세포 체외 배양방법) 이며, 4편의 논문을 SCI 국제학술지에 게재 완료하였음.**

○ 추가적으로 3편의 논문 (체외 대량 증폭된 NK세포의 냉동 보관 및 냉동에 의해 현저히 저하된 NK세포의 항암 기능을 회복 방법, 제조합 개 IL-15의 생체 투여 후 안전성 및 면역학적 효능, 개 NK세포 표현형의 특성) 은 SCI국제학술지에 투고 준비가 거의 마무리되고 있으며, NK세포의 임상적 적용에 대한 Data 보완 후 2편~3편의 논문을 추가적으로 더 게재할 예정임 (제 3장 연구개발 수행 내용 및 결과 참조).

○ 종합하여 지금까지 연구과제 수행을 통해 달성한 성과는 특허등록 2건 국제학술논문 4편 게재 완료 및 5편 추가 게재예정, 기술이전완료 1건, 추가 기술이전 계획 1건으로 애초 계획하였던 성과 목표 (특허출원 2건, 특허등록 1건, SCI논문 4편, 비 SCI논문 1편)를 월등히 초과하여 달성하였음.

## 2절. 연구개발성과 활용계획

### 가. 실용화 및 산업화 계획

#### ① 개 동종 NK세포를 이용한 암면역세포치료제의 사업화 진행 계획

○ 국내에서 동물용 생물학 제제 (세포치료제 포함) 의 품목 허가 절차가 수행된 경우가 아직 전무하여 생물학 제제 (세포치료제 포함) 의 임상시험 가이드라인이 마련되어 있지 않아 임상시험 승인을 위한 서류제출이 지연되고 있어 연구 종료 후 사업화를 앞당기기 위해 임상시험 가이드라인 마련을 위해 농림축산검역검사본부와 지속적으로 상담 및 협의를 실시해나갈 예정임.

○ 개 NK세포의 체외 대량 증폭에 관한 특허를 (주) 박셀바이오에 기술이전하기 위하여 협의 중이며, 본 연구결과의 성과를 토대로 먼저 비임상 진입을 위하여 일차적으로 제품화공정개발 (scale-up) 및 효능시험을 실시할 예정임.

○ 개 동종 NK세포를 이용한 암 치료제의 상용화를 앞당기기 위하여 농림축산검역검사본부로부터 임상시험 가이드라인이 확정되기 전 개 유선암 및 악성 림프종에 이환된 개체에 대한 연구자임상을 실시하고 최적의 치료 프로토콜을 확립하는 한편, 안전성 및 치료효과에 대한 data를 축적하여 이를 제출함으로써 품목허가의 자료로 활용할 예정임.

○ 이와 같은 과정을 거쳐 2016년도에 연구자 임상을 완료할 예정이며, 2017년도 내에는 제품으로 출시를 목표로 함.

○ 제품 출시후 빠른 시장 확대를 위하여 2016년 주)박셀바이오를 주축으로 임상수의사, 동물병원 관계자, 수의학회 및 한국소동물병원협의 등을 대상으로 SWOT분석에 따른 마케팅 전략을 토대로 연구결과와 NK세포 치료제의 안전성, 효능에 대한 적극 홍보를 계획이며 중에 있음.

**항암 개 NK세포치료제 SWOT 분석에 따른 마케팅전략**

<b>내부환경</b>  <b>외부환경</b>	<b>강점 (Strength)</b>	<b>약점 (Weak)</b>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 암치료 전문기업</li> <li>• NK세포 증폭 원천기술 보유</li> <li>• 기초연구와 임상치료 유기적 조화</li> <li>• 강력한 비교우위기술</li> <li>• 유관의료기관 제휴</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 항암 치료제 개발의 어려운 여정</li> <li>• 지속적인 연구개발</li> <li>• 많은 자본이 필요</li> <li>• 자금조달의 어려움</li> <li>• 고급인력의 필요</li> </ul>
<b>기회 (Opportunity)</b>	<b>SO전략</b>	<b>WO전략</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 지속적인 동물 암환자급증 추세</li> <li>• 신규 항암제 개발에 대한 수요 증가</li> <li>• 기존 암 면역치료제의 한계점</li> <li>• 최첨단 기술의 확대</li> <li>• 동물의료시장의 확대</li> </ul>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) World Best 동물면역세포치료 Maker</li> <li>2) 동물암 면역치료 전문기관</li> <li>3) 바이러스 질환 치료제로서 상용화</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) 생산공정 전문화 시스템 구축</li> <li>2) 효율적인 인원 배정으로 생산성 확대</li> <li>3) 동물환자홍보에 대한 전략구축</li> <li>4) 지속적인 연구개발을 통한 제품의 우수성 확보</li> </ol>
<b>위협 (Threat)</b>	<b>ST전략</b>	<b>WT전략</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 원부자재 가격 상승</li> <li>• 의료시장의 개방화</li> <li>• 국외 경쟁업체 출현가능성</li> <li>• 품질(불량)에 대한 고객불만족</li> </ul>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) 품질 신뢰성확보 필요</li> <li>2) NK세포치료제에 대한 양산화 확립</li> <li>3) 원가 절감으로 이익 증대</li> <li>4) 고객만족강화</li> <li>5) 고객신뢰 확보</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) 좋은 기업이미지 구축화</li> <li>2) 기업의 사회적 책임 완수</li> <li>3) 윤리교육 강화</li> <li>4) 지속적인 연구 및 품질개선활동</li> </ol>

○ 구체적인 시장 출시 계획 및 예상 매출 규모는 다음과 같음.

**시장출시계획**

제품	출시년도	사업계획
항암 개 NK세포치료제 (Vax-cNK)	2016	국내 출시
	2019	미국 유럽 등 주요 국가 출시

**예상 매출규모**

구분	사업연도			
	2016년 (개발종료 후 1년)	2017년 (개발종료 후 2년)	2018년 (개발종료 후 3년)	
사업의 제품	VAC-cNK	VAC-cNK	VAC-cNK	
투자계획 (백만원)	1,000	2,000	2,500	
국내 판매 계획	판매량(건)	400	1000	2,000
	판매단가 (천원)	2,500	2,500	2,500
	매출액 (백만원)	1,000	2,500	5,000

○ 연구자 임상에서는 품목허가를 위한 충분한 data확보를 위해 지금까지 치료제를 투여한 개체의 지속적인 추적 조사 뿐만 아니라 치료 성적의 재관성 확보를 위해 암 종류별 5마리 이상의 치료 성적을 확보할 계획이며, 유선암 및 림프종 이외의 경결암에 대해서 치료 성적에 대한 data를 확보할 예정이다. 치료시험을 진행하는 동안 부작용 발생 여부에 대해서도 지속적으로 추적 조사할 예정이다.

② 동물용 면역증강제 개 IL-15 복합단백질의 사업화를 위한 생산공정 및 품질 기준 정립

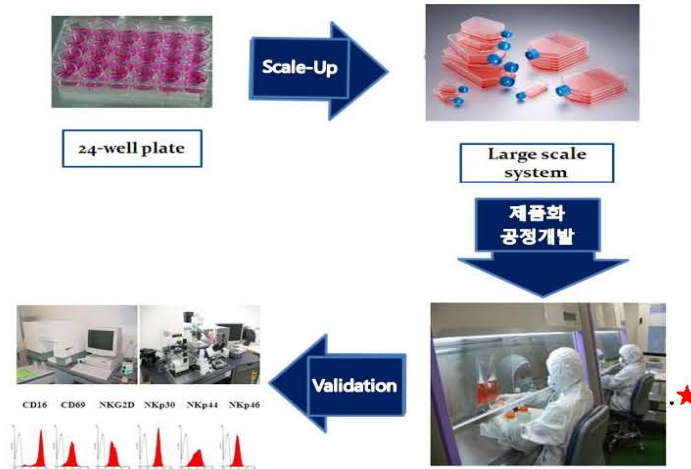
○ 특허기술을 이전한 제조합 개 IL-15 단백질의 대량정제 기술을 사업화하기 위하여 ㈜ 박셀바이오와 공동으로 동물용 면역증강제로서 제조합 개 인터루킨 IL-15의 단백질을 유전자 제조합 기술로 제조하고 대량생산을 위한 공정 확립을 통한 동물의학품을 개발하고자 함.



○ 이를 위해 우선적으로 제조합 복합단백질 IL-15 품질관리 기준을 다음과 같이 확립하고, 안전성 평가 및 유효농도 평가를 위한 전임상시험을 실시하며, 이를 위해 동물용 면역증강제 IL-15 단백질 대량생산 공정 확립 및 안정성 확인할 예정이다.

<표 1> 제품화공정개발 (scale-up) 및 효능시험을위한 목표

주요 성능지표 <sup>1)</sup>	단위	최종 개발목표 <sup>2)</sup>	세계최고수준 (보유국/보유기업)	가중치 <sup>3)</sup> (%)	객관적 측정방법	
					시료수 <sup>4)</sup> (n≥5개)	시험규격 <sup>5)</sup>
1. 순도	%	90%	95%(미국)	20%		FACS analysis
2. Activation receptor (NKG2D)	%	80%	80%(미국)	10%		FACS analysis
3. CD69	%	80%	80%(미국)	10%		FACS analysis
4. IFN- $\gamma$	%	50%	50%(미국)	20%		FACS analysis
5. CD107a	%	50%	50%(미국)	10%		FACS analysis
6. GRZ B	%	70%	70%(미국)	15%		FACS analysis
7. Perforin	%	70%	70%(미국)	15%		FACS analysis
8. 안정성시험						농림축산검역검사본부에서 제공한 동물용 의약품등의 안정성시험 기준
<input type="checkbox"/> 시료수 5개 미만 (n<5개)시 사유 <input type="checkbox"/> 해당없음						
<input type="checkbox"/> 측정결과의 증빙방법 <input type="checkbox"/> SCI급 저널에 게재된 관련논문에 소개된 시험법을 이용하여 재현성있는 데이터를 수집함 <input type="checkbox"/> 안정성시험에 관련된 시험 중 무균시험, 엔도톡신시험, 마이코플라스마부정시험, 외래성 바이러스부정시험은 식약처에서 GMP인증을 받은 전남생물의약연구원에 의뢰할 계획임						



<그림> 기술개발의 계획도.

○ Assay(QC, IPC)법 확립

- SOP작성 및 검증
- 수율 및 순도 확인 : 분광광도계 및 전기영동법(SDS-PAGE)으로 각 생산번호 별 재조합 개 인터루킨-15의 수율 및 순도에 대한 시각적이고 정량적인 평가법을 확립함.
- 역가 시험법 확립 : ‘인터루킨-15의 세포 내 신호전달기전’을 응용하여 생산된 재조합 개 인터루킨-15의 역가 분석법을 확립함. 세포표면 수용체에 인터루킨-15가 결합하면 JAK1 과 JAK3 그리고 STAT3와 STAT5가 ‘인산화’되는 현상이 존재하므로 이들의 ‘인산화’ 정도를 정량화하면 그 역가를 확인할 수 있음. 각 생산번호 별 제품들로부터 평균역가를 산출함으로써 제품의 품질기준을 표준화할 수 있음.
- 내독소(endotoxin) 및 지질다당류(LPS) 함량 평가 : 재조합 대장균 유래의 단백질 산물이므로 정제과정 중에 염증유발 물질인 ‘내독소’ 및 LPS가 함유되므로 제품의 안전성을 위해 정제 후 내독소제거 과정 후 잔량을 정량화하기 위한 평가법을 확립함

○ 안전성 평가

- ▶ 건강한 ‘개’에 정맥주사 방식으로 투여한 후 육안관찰 및 화학검사법과 혈액검사를 통하여 아래와 같은 항목으로 수행하고 이에 대한 평균값을 산출하고 통계적으로 분석하여 이상 유무를 평가함.
  - 체온 및 체중 검사, 설사 유무
  - 임상 혈액화학검사 (serum chemistry)



항 목	단 위	정 상 범 위
포도당 (GLU)	mg/dL	74 - 143
혈중요소 (BUN)	mg/dL	7 - 27
크레아티닌 (CREA)	mg/dL	0.5 - 1.8
요소/크레아티닌 비율		
인산 (PHOS)	mg/dL	2.5 - 6.8
칼슘 (CA)	mg/dL	7.9 - 12.0
전체 단백질 (TP)	g/dL	5.2 - 8.2
알부민 (ABL)	g/dL	2.3 - 4.0
글로불린 (GLOB)	g/dL	2.5 - 4.5
ALB/GLOB 비율		
알라닌아미노전이효소 (ALT)	U/L	10 - 125
알카리인산분해효소(ALKP)	U/L	23 - 212
감마글루타밀 전이효소(GGT)	U/L	0 - 11
전 빌리루빈 (TBIL)	mg/dL	0.0 - 0.9
콜레스테롤 (CHOL)	mg/dL	110 - 320
아밀라제 (AMYL)	U/L	500 - 1500
리파제 (LIPA)	U/L	200 - 1800

- 일반혈액검사 (CBC)

항 목	단 위	정 상 범 위
적혈구 (RBC)	M/ $\mu$ L	5.65 - 8.87
적혈구 용적율 (HCT)	%	37.3 - 61.7
헤모글로빈 (HGB)	g/dL	13.1 - 20.5
평균적혈구 용적 (MCV)	fL	61.6 - 73.5
평균혈색소량 (MCH)	pg	21.2 - 25.9
평균혈색소농도 (MCHC)	g/dL	32.0 - 37.9
적혈구분포폭 (RDW)	%	13.6 - 21.7
망상적혈구 (RETIC)	K/ $\mu$ L	
망상적혈구비율 (%RETIC)	%	10.0 - 110.0
백혈구 (WBC)	K/ $\mu$ L	5.05 - 16.76
호중구 (%NEU)	%	
림파구 (%LYM)	%	
모노사이트 (%MONO)	%	
호산구 (%EOS)	%	
호염구 (%BASO)	%	
호중구 (NEU)	K/ $\mu$ L	2.95 - 11.64
림파구 (LYM)	K/ $\mu$ L	1.05 - 5.10
모노사이트 (MONO)	K/ $\mu$ L	0.16 - 1.12
호산구 (EOS)	K/ $\mu$ L	0.06 - 1.23
호염구 (BASO)	K/ $\mu$ L	0.00 - 0.10
혈소판 (PLT)	K/ $\mu$ L	148 - 484
평균혈소판 용적 (MPV)	fL	
혈소판분포폭 (PDW)	fL	
프로칼시토닌 (PCT)	%	

○ 유효농도 결정

- ▶ 8일간 매일 1회 정맥주사 투여 후에 혈액학적 분석을 통해 각 혈구세포들의 분포 및 변화 결과에 대한 각 군간의 평균수치를 산출하고 통계적으로 비교분석하여 생체 내 기능에 필요한 최소 유효농도를 확립함.

- 후보 유효농도 : 체중 1 kg 당 1 µg, 5 µg, 10 µg
- 산출근거 : 원숭이 및 임상시험 최소유효농도 평균(4.3 µg) < 5 µg < 개 실험
  - \* 재조합 인간 인터루킨-15에 대한 해외 원숭이 실험: 체중 1 kg 당 2.5, 5, 10, 15, 20, 50 µg
  - \* 재조합 인간 인터루킨-15에 대한 해외 임상시험: 체중 1 kg 당 0.3, 1, 3 µg
  - \* 재조합 개 인터루킨-15에 대한 '개'를 이용한 선행실험: 20 µg

- 동물용 면역증강제 IL-15 단백질 대량생산 공정 확립 및 안정성 확인
  - Bioreactor를 이용한 재조합 단백질 IL-15 의 scale-up 및 생산공정 검증
    - 5L scale의 bioreactor에서 생산조건 최적화 수행
    - 5L scale의 발효 공정을 통한 수율(yield) 확인
    - 5L scale의 발효를 통한 정제 후 순도(purity) 확인



[그림] 전남생물의약연구원 공장동 전경

- 유효성 평가
  - ▶ 인터루킨-15는 말초혈액에서 특정 임파구의 개체 수를 증진시키며 수용성 사이토카인의 생산을 촉진하므로 면역학적 분석 및 통계적 비교를 통하여 유효성을 평가함
    - 투여 전 후의 혈구세포(자연살해세포, 메모리 T 세포) 변화 분석
    - 투여 전 후의 혈청 내 인터페론 감마 농도의 변화 분석

- 재조합 단백질 IL-15 안정성 시험

- 개발기술 활용 및 사업화방안

국내외 시장현황

- 목표시장의 경쟁상황

- ▶ 애완동물 수요증가

- 우리나라는 핵가족화와 1인 가구 증가 등으로 가족규모가 축소되면서 점차 애완동물 수요가 증가
- 애완동물을 가족으로 받아들이는 가구가 증가, 청소년의 57.7%는 애완동물을 가족으로 볼 수 있다고 응답 (출처, 2009년 한국청소년정책연구원에서 발간한 '세대간 의식구조 비교를 통한 미래사회 변동 전망')
- 가장 많이 기르는 개와 고양이는 2012년 기준으로 전체가구의 17.9% 정도인 359만 가구

가 총 556만 마리 (개: 440만마리, 고양이: 110만마리)를 기르고 있음. (출처. 2012년 농림수산물검역검사 정보지)

- 경제적으로 여유있는 노령층을 중심으로 반려동물 수요가 증가하여 관련 산업 성장이 예상된다.

▶ 동물용 의약품 시장 증가

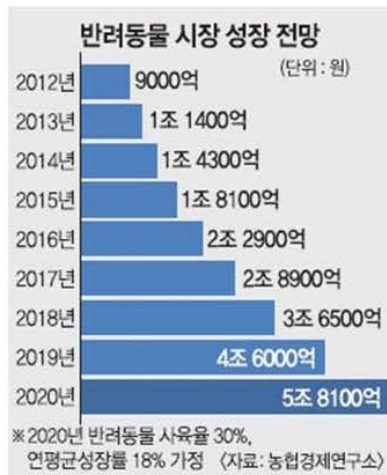
- 우리나라 동물용 의약품 시장 규모는 2011년 기준 5,953억원으로 2001년 3,999억원에 비해 48.9% 증가하였으나, 국내생산품은 2001년 3,031억원에서 2011년 3,679억원으로 21.4% 증가에 그친 반면, 수입 완제품은 같은 기간 동안 968억원에서 2,274억원으로 135.0% 증가하여 수입산 동물용의약품의 국내 시장 잠식이 급격하게 진행되고 있는 것을 알 수 있음
- 2010년 말 기준으로 우리나라 동물용의약품 관련 제조업체수는 총 345개인데, 이 중 제조업체는 158개소이고 수입업체는 187개소로 수입업체의 비중이 상대적으로 높음
- 동물용의약품 제조업체도 다른 제조 산업과 비슷하게 상위 몇 업체가 전체시장을 과점하고 있음. 이를 수치로 보면 2013년 기준 상위 20% 업체가 전체 판매금액의 80%를 점유하고 있으며, 제조업체 216중 실제로 영업을 영위하고 있는 업체는 113개사이며 이중 매출 10억원 미만인 업체가 65개로 사실상 대부분의 업체가 영세한 상황임
- 세계 제약시장은 평균수명 증가와 함께 지속적으로 증가하고 있는 난치성 질환 (예 : 암, 당뇨, 비만, 순환기성 장애, 면역질환 등)을 대상으로 하는 신규의 단백질치료제의 발전 가능성은 증가하고 있으며, 반려동물인 개 역시 평균수명이 연장됨으로써 자가면역, 퇴행성 및 감염성 질환, 그리고 암 등 각종 면역질환이 현저하게 증가하고 있으나 기존의 치료제로는 완치가 불가능한 실정
- 동물용의약품 제조사들은 주로 복제약 내지 신형 항바이러스 백신 개발 및 사업화에 주력하고 있으며 제조된 백신들의 효능을 증강시키거나, 항암치료에서 특이적인 면역반응을 증진시킬 수 있는 사이토카인의 개발은 전무한 실정임
- 이는 대부분의 동물약품 제조업체가 영세한 수준인데다 원료공급을 대부분 수입에 의존하는 상황에서 기인한 것임
- 따라서 유전공학에 기반한 동물약품 최초 개발은 국내에서 동물용 재조합단백질치료제의 시장개척 및 선점과 효능이 우수한 단백질의약품 수입제품에 대한 국제의존도를 낮추어 수입 대체효과를 유발하고 나아가 동물용 바이오 의약품의 수출을 통한 국제적 경쟁력 확보에 밑거름이 될 것으로 보임
- 또한 질병수의학에서 예방수의학으로의 국내시장 전환이 예상되고 있으며, 국내기업과 다국적 기업간의 경쟁심화가 예상되며, 국내 동물용의약품 국내시장은 FTA의 확대에 의해 국내 축산업에 대한 위기의식이 확산됨에 따라 동물용의약품 내수시장의 지속적인 감소가 예상되고 특히 동물용의약품 사용규제 강화 및 수의사 처방제 도입 등으로 인해 성장 한계에 직면하고 있음
- 또한 다국적기업의 시장 점유율 확대에 대응할 수 있는 생산기반 구축, 연구개발 및 수출시장 개척이 되지 않을 경우 국내 동물용의약품 산업은 쇠퇴할 것으로 우려됨
- 이러한 환경변화로 인해 국내기업의 구조조정이 예상되어지며 영업, 자본, 제품력이 취약한 기업은 퇴출될 것이라는 전망이 우세함

- 하지만 이는 본 의약품 개발에 호재로 작용할 것이며, 국내의 시장에 경쟁자가 존재하지 않으며, 또한 전문의약품이기 때문에 수의사 처방전에 의해서만 판매되어야 하기 때문임

<표 2> 국내·외 시장 규모

(단위 : 억원)

구 분	현재의 시장규모(2015년)	예상 시장규모(2018년)
세계 시장규모	25,940백만달러	40,000백만달러
국내 시장규모	9,663억원	1조8000억원
산출 근거	국제동물보건연맹 IFAH ( 매년 성장률의 평균으로 추산함)	



[ 가정 내 반려동물 수 추산 ]

	개			고양이			전체
	06년	10년	12년	06년	10년	12년	
가구수(천가구)	17,858	19,261	20,033	17,858	19,261	20,033	20,033
사육비율(%)	22.1	16.3	16.0	1.4	1.7	3.4	17.9
평균 마리수(마리)	1.66	1.47	1.38	1.91	1.92	1.70	1.55
총 사육 동물수(마리)	6,551,206	4,615,198	4,397,275	477,510	628,689	1,158,932	5,556,207

<표 3> 국내·외 주요시장 경쟁사

경쟁사명	제품명	판매가격 (천원)	연 판매액 (천원)
① 버락코리아	울트라콘	280,250	
② 녹십자수의약품	이문가드		
③ Mastavit GmbH	비에스케이(BSK) - 주사제		
④ (주)동방	피닉스 - 주사제		
⑤ (주)대성미생물연구소	이뮤노스티 - 주사제		
	이뮤노스티 - 주사제		

○ 개발기술 활용 및 제품개발 계획

○ 다양한 감염질환 및 난치성 질환에 대한 면역증강제 활용

- IL-15는 항암과 항바이러스에 중요한 NK세포의 발생과 분화, 성숙에 중추적 인자이며, 메모리 T세포의 생성 및 T세포와 NK세포의 활성화 및 증식에 중요한 기능을 함. 또한 활성화된 B세포의 증식과 항체생산력을 증가시킴. IL-15만으로도 강력한 항암 기능을 갖는 것으로 보고됨
- 난치성 질환은 기존의 치료제로서는 완치가 불가능하기 때문에 체내에 세포면역반응을 유도시키는 면역증강제를 이용하여 치료효과를 높이는 전략이 사용되고 있음.
- 당사는 제4의 항암요법이라고 불리는 부작용이 없는 항암면역세포치료제의 임상실험을 진행중에 있어, IL-15를 이용하여 체내에 주입된 면역세포들의 수명연장이나 기능성 유지를 목적으로 치료효능을 강화시킬 수 있는 제품을 개발할 계획임
- IL-15를 면역증강제로 개발하면 항암 및 항바이러스, 백신화 등과 세균이나 진균류들을 포함한 광범위한 감염질환에 치료효능이 증진될 것으로 예상되어, 동물뿐만 아니라 사람에게 까지 그 활용범위가 넓어질 것으로 기대됨.

○ 화순백신클러스터 주요 기관과의 협력을 통한 제품 개발

- 기술이전 기관인 공주대학교 연구팀으로부터 이전받은 재조합 DNA기술 및 단백질 정제 기술을 이용하여 재조합 사이토카인에 대한 유전자 발현시스템 구축
- 지역내 대표적인 CMO(Contact Manufacturing Organization)기관인 전남생물의약연구원과 대량생산 및 정제를 통한 제품생산 공정 개발
- 면역세포치료제의 생산과 품질관리에 대한 노하우를 보유한 당사의 경험을 바탕으로 한 재조합단백질의 품질관리 기준 마련
- 전남대학교 수의과대학의 협조와 자문을 통해 안전성과 효능평가에 대한 세부적 항목과 지침 수립을 통한 성공적인 임상진행과 시장진입 계획임.

○ 양산 및 판로 확보 계획

○ 국내 CMO를 활용한 위탁생산



- 본 제품은 대장균을 이용, 재조합단백질을 생산하여 제품을 만들기 때문에 세포, 배양조건, 정제방법에 따라 효능이 달라질 수 있어 높은 기술수준이 요구됨
- 국내 CMO업체는 높은 세포배양 기술과 경험 등의 강점을 갖고 있어 최근 대다수의 바이오의약품 회사에서는 비용절감 차원에서 제품생산을 위해 아웃소싱이 증가하고 있음



○ 판로

- 2011년 농협경제연구소에 따르면 전국 동물병원의 매출액은 약 2,600억원 규모의 매출이 발생한다고 보고함.
- 전국적으로 약 3,876여개의 동물병원이 분포되어 있음 (통계청, 2013)
- 1인 가구의 증가로 반려견 규모는 더욱 증가할 것으로 예측되며, 노령견의 증가, 수명 연장 등으로 암 발생 및 감염성 질환 등은 더욱 증가할 것으로 예상됨

[ 가정 내 반려동물 수 추산 ]

	개			고양이			전체
	06년	10년	12년	06년	10년	12년	
가구수(천가구)	17,858	19,261	20,033	17,858	19,261	20,033	20,033
사육비율(%)	22.1	16.3	16.0	1.4	1.7	3.4	17.9
평균 마리수(마리)	1.66	1.47	1.38	1.91	1.92	1.70	1.55
총 사육 동물수(마리)	6,551,206	4,615,198	4,397,275	477,510	628,689	1,158,932	5,556,207

- 사업초기 전국 10% 정도의 병원과 계약체결 계획. 매년 5%성장 목표 설정
  - ▶ Target : 전국 4,000 여개의 동물병원
  - ▶ Marketing
    - 온라인 통한 보호자 대상의 홍보
    - 임상수의학회 및 전국 또는 지역별 대/소 그룹 세미나를 통한 수의임상가들에게 공격적인 홍보
  - ▶ Channels : 직접공급형태가 아닌 동물약품 전문판매점을 통해 동물병원에 납품

<표 5> 기술개발 후 국내·외 주요 판매처 현황

판매처	국가 명	판매 단가 (천원)	예상 연간 판매량(개)	예상 판매기간(년)	예상 총판매금 (천원)	관련제품
동물병원	대한민국	50	10,000	10	5,000,000	Vax-IL15 K9

<표 6> 사업화 계획 및 기대효과

구 분	사업화 년도			
	( 2017 )년 (개발종료 해당년)	( 2018 )년 (개발종료 후 1년)	( 2019 )년 (개발종료 후 2년)	
사업화 제품	Vax-IL15 K9	Vax-IL15 K9	Vax-IL15 K9	
투자계획(백만원)	500	500	1,000	
판매 계획 (백만원)	내 수	550	1,000	1,500
	수 출	-	-	100
	계	550	1,000	1,600
수입대체효과(백만원) (해당시)	550	1,000	1,500	
고용 창출(명)	1	1	2	

#### 나. 기술확산 계획

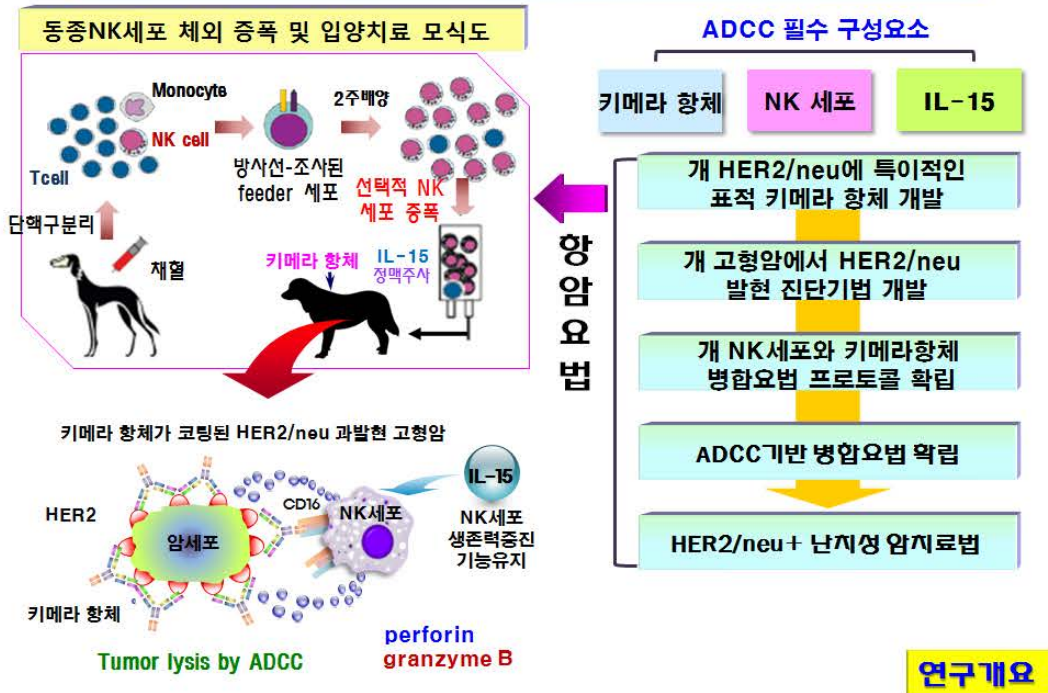
○ 지금까지 도출된 연구개발 결과에 대한 국내외 학술회의 발표 및 논문 발표를 통해 우수성을 홍보하고 다른 연구자들과 활발한 교류를 통해 기술을 지속적으로 발전시켜나가는 동시에 전문 인력에 대한 교류 및 양산을 통해 지금까지의 기술을 확산시켜 나갈 계획임.

#### 다. 후속연구 및 타연구에 활용계획

○ 본 연구 개발을 통해 도출한 결과 및 축적된 기술을 토대로 더욱 강력한 항암, 항바이러스 기능을 발휘할 수 있는 면역세포치료제 및 병합요법을 개선해 나가기 위하여 다음과 같은 후속 연구에 활용할 계획임.

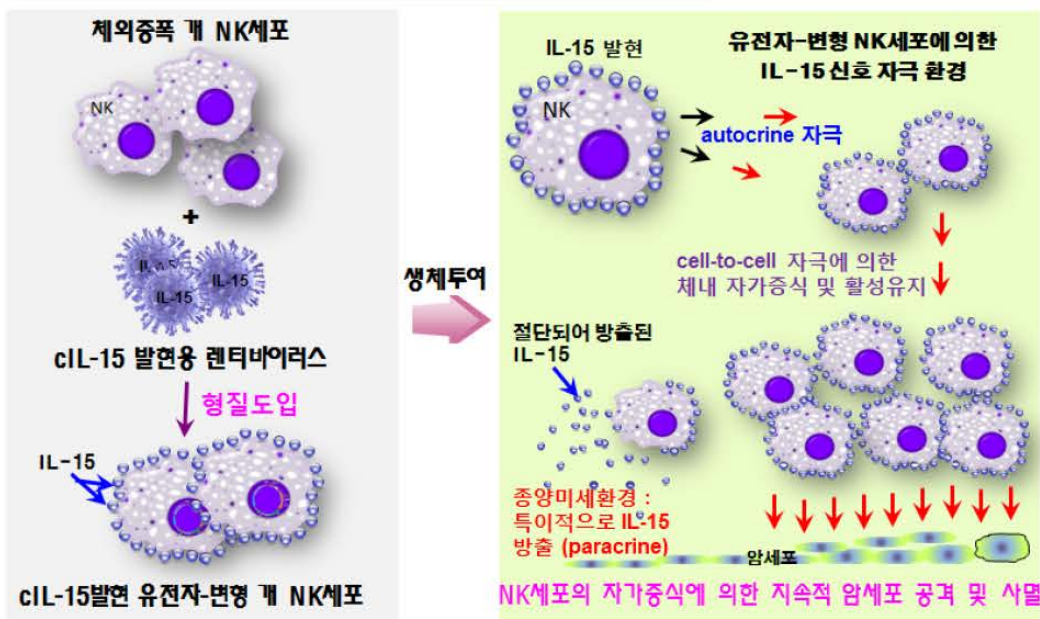
○ 안전성 및 항암효능이 증진되고 실제 임상에 적용할 수 있는 한 단계 업그레이드된 항암면역세포치료법을 확립하기 위하여 개 고형암에서 과발현되는 유전자들 중 하나인 HER2/neu(EGFR2, epidemic growth factor receptor 2, 상피세포 성장인자 수용체 2)를 표적항원으로 하는 개 키메라 표적항체를 개발하고 항체의존성 세포살상기전(ADCC)을 갖는 자연살해 세포(NK세포)와의 병합치료요법을 확립함으로써 소동물 항암 임상치료의 새로운 패러다임을 창조하는데 활용할 것임.

# NK세포와 키메라 항체를 이용한 ADCC에 의한 병합요법



○ 유전자-변형을 통해 개 NK세포 표면에 IL-15를 발현시키고, 특정의 병적 미세 환경에서 이와 같이 발현시킨 IL-15가 절단되어 방출됨으로서 NK세포뿐만 아니라 (autocrine) 병변 주위에서 국소적으로 다른 면역세포들을 활성화시킴으로서 (paracrine) 치료효과를 극대화시킬 수 있는 유전자-변형 NK세포 치료제를 개발하기 위한 후속 연구에 활용할 것임.

## 연구개발의 개요 : 유전자-변형 개 NK세포





○ 개 인터루킨-15 (interleukin-15, 이하 IL-15)와 인터루킨-15 수용체 $\alpha$ (interleukin-15 receptor $\alpha$ , 이하 IL-15Ra)로 구성된 복합 단백질을 유전자 재조합기술로 제조하고 동물실험을 통해 생체 내 안전성 및 유효성을 검증함으로써 수의학 임상에서 적용가능한 면역조절용 재조합 사이토카인이라는 재조합 단백질 의약품 소재를 개발하고 실용화 기술을 확립하기 위한 후속연구에도 활용할 계획임.

**연구개요: 면역조절치료제 재조합 개 인터루킨-15 복합체 제조 및 안전성/유효성 검증을 통한 동물약품개발**



## 제 6 장 연구실 안전관리규정 이행실적 (2014년 이후)

이행내용	세부 이행내용	이행시기	비고
연구실 안전관리 인프라 구축	연구실 안전관리업무 추진계획 수립	2014. 04. 2015. 05.	
	연구실 안전관리규정 개정	2014. 05.	
	연구실 안전관리 조직 정비	상시	
	연구실 안전관리위원회 개최	2014. 03. 2015. 04.	
	연구실 안전관리부서장 및 연구실안전환경관리자 지정 운영	상시	
연구실 안전점검	정기교육-사이버교육(1학기) 6시간	상·하반기	
	일상점검기록부 작성(시스템 등록)	매월	
	연구실 안전관리 현장점검	2014. 08. 2015. 07.	
	정밀안전진단	2015. 01.	
	점검 후 조치사항: 보완 및 개선 완료	2015. 01. 2015. 06.	
연구활동종사자 관리	연구활동종사자 보험 가입	2014. 08. 2015. 08.	
	일반건강검진 및 특수건강검진 실시	2014. 09. 2015. 04. 2015. 09.	
사고 대응	연구실 사고보고 조치사항 안내	2014. 01.	
	연구실 사고사례 전파 및 안전관리 강화 안내	2014. 03.	
	연구실 사고대응 매뉴얼 배포 - 비상연락망 및 보고체계 등 정비	2014. 12.	
기타 사항	연구실 폐기물처리	2015. 04.	
	연구실안전관리통합시스템 운영 ( <a href="http://safety.kongju.ac.kr">http://safety.kongju.ac.kr</a> )	2014. 04. 이후 상시	

## 제 7 장 참고문헌

- Kamb A et al (2007). Why is cancer drug discovery so difficult? *Nat Rev Drug Discov* 6(2):115-120.
- Lindblad-Toh K et al (2005). Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature* 438:803-818.
- Hoffman MM & Birney E (2007). Estimating the neutral rate of nucleotide substitution using introns. *Mol Biol Evol* 24:522-531.
- Paoloni M and Khanna C (2008). Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans. *Nat Rev Cancer* 8:147-156.
- Leung W (2014). Infusion of allogeneic natural killer cells as cancer therapy. *Cancer Research* 20(13):3390-3400.
- Miller JS (2013). Therapeutic applications: natural killer cells in the clinic. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2013:247-253.
- Cheng M et al (2013). NK cell-based immunotherapy for malignant diseases. *Cellular & Molecular Immunol* 10:230-252.
- Kim JY et al (2006). Increase of NKG2D ligands and sensitivity to NK cell-mediated cytotoxicity of tumor cells by heat shock and ionizing radiation. *Exp Mol Med* 38:474-484.
- Burger JA et al (2006). CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood* 107:1761-1767.
- Luker KE et al (2006). Functions of CXCL12 and CXCR4 in breast cancer. *Cancer Lett* 238:30-41.

[별첨 1]

## 특허, 논문, 제품(시장) 분석보고서

<b>신청과제명</b>	체외 대량 증폭시킨 개 NK세포를 이용한 동종 암면역세포치료제 개발		
<b>주관연구책임자</b>	김상기	<b>주관기관</b>	공주대학교

### 1. 본 연구관련 국내의 기술수준 비교

개발기술명	관련기술 최고보유국	현재 기술수준		기술개발 목표수준	비고
		우리나라	연구신청팀		
임상치료용 개 NK세포 대용량 증폭 기술	대한민국	100	100	150	개 NK세포의 체외 증폭기술은 본 연구진이 처음으로 성공한 기술임
NK세포를 이용한 동종 면역세포 치료요법	미국	70	600	70	사람 포함

1

### 2. 특허분석

#### 가. 특허분석 범위

<b>대상국가</b>	국내, 국외(미국, 일본, 유럽)
<b>특허 DB</b>	특허정보원 DB(www.kipris.or.kr), Aureka DB
<b>검색기간</b>	최근 5년간
<b>검색범위</b>	제목 및 초록

#### 나. 특허분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명		임상치료용 개 NK세포 대용량 증폭 기술	개 NK세포를 이용한 동종 면역세포 치료요법
Keyword		canine, NK cells expansion, clinical glade	canine, allogeneic, NK cell-based immunotherapy
검색건수		53	1
유효특허건수		1	0
핵심특허 및 관련성	특허명	Modified cell line and method for expansion of NK cell	
	보유국	미국	
	등록년도	2005	
	관련성(%)	30%	
	유사점	악성 종양 치료를 위한 NK 세포의 시험관내 증폭 기술	
	차이점	사람의 NK cell 증폭기술	

### 3. 논문분석

#### 가. 논문분석 범위

대상국가	미국, 일본, 유럽, 동남아시아
논문 DB	Aureka DB, pubmed DB( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">www.ncbi.nlm.nih.gov</a> ), 국회도서관( <a href="http://www.nanet.go.kr">www.nanet.go.kr</a> )
검색기간	최근 5년간
검색범위	제목, 초록 및 키워드

#### 나. 논문분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명		canine NK cell expansion ex vivo	allogeneic NK cell-based cancer immunotherapy
Keyword		canine, NK cell expansion	NK cell, cancer, dog
검색건수		2	34
유효논문건수		0	6
핵심논문 및 관련성	논문명	Heterogeneous but conserved natural killer receptor gene complexes in four major orders of mammals	Natural killer (NK) and lymphokine-activated killer (LAK) cell functions from healthy dogs and 29 dogs with a variety of spontaneous neoplasms
	학술지명	Proc Natl Acad Sci	Cancer Immunol Immunother
	저자	Hao L, Klein J, Nei M	Funk J, Schmitz G, Failing K, Burkhardt E
	게재년도	2006	2005
	관련성(%)	0	20%
	유사점		개에서 종양에 대한 NK 세포의 작용
	차이점		종양치료제로 NK 세포를 사용하기 위해 혈액내에서 NK 세포를 순수 분리하거나, 시험관내에서 기능을 향상시킨 NK세포를 대량 증폭시킨 것이 아님.

#### 4. 제품 및 시장 분석

##### 가. 생산 및 시장현황

###### 1) 국내 제품생산 및 시장 현황

\* 개를 포함한 반려동물의 난치성 암 치료를 위한 면역세포치료제는 아직 초기 연구단계로 제품 생산에는 없음

년도	(2011년) 현재년도	( 2018 년) 개발 종료후 1년	( 2020 년) 개발 종료후 3년
세계 시장 규모	20억 달러	80억달러	100억달러
한국 시장 규모	400,000	700,000	1,000,000
년도	(2009년) 2년 전	(2010년) 1년 전	(2011년) 현재년도
수출 규모			
수입 규모			

(단위 : 백만원)

※작성근거

한국보건산업진흥원 (2005), 세포치료제 시장동향 및 전망  
 디지털 타임스 (2007. 11. 16), “맞춤형의약품, 세포치료제개발 활기”  
 뉴시스(2004. 3)

<질환별 세포치료제 시장규모 및 전망>

(단위 : USD billion)

질환	2005	2010	2015	CAGR
근골격계 질환	28	49	78	10.8%
암	18	67	85	16.8%
심혈관계 질환	21	39	59	10.9%
당뇨	17	32	53	12.0%
혈액질환	25	53	74	11.5%
간질환	15	20	29	6.8%
신경질환	57	101	218	14.4%
피부, 상처 치료	13	28	55	15.5%
비노기 질환	7	15	33	16.8%
기타	45	92	181	14.9%
총계	246	495	865	13.4%

※출처 : Jain PharmaBiotech Report 2005년

\* 국내 NK세포를 이용한 항암면역세포치료제는 NKM (엔케이바이오), 크레아젠, 이노메디시스 등 몇몇 국내 바이오회사에서 제품이 생산되어 10대 암에 대한 전임상시험을 통해 효과를 입증한 후 임상시험을 실시되고 있다. 그러나 이들은 모두 사람을 대상으로 한 사람 NK 세포 치료제이며, 동물 NK 세포를 이용한 면역세포치료제는 아직 생산되고 있지 않다.

2) 국외 제품생산 및 시장 현황 (출처: <http://cytotherapy.wcyte.com/136>)

▶ 세포기원별 향후 10년 후의 전망에서 Kalorama Information(2004)은 면역반응문제가 해결되지 않는 한 동종이식의 한계가 예상되어 자가이식의 중요성은 지속될 것 이라는 예측과 현재까지 주된 세포치료제인 골수세포의 역할은 말초혈액 관련 기술의 향상으로 점진적 감소를 예상하고 있다. 현재 논쟁에 있는 배아줄기세포의 경우 2015년경에 상업화된 제품의 등장을 기대하고 있다. 따라서 앞으로 체세포나 말초혈액 기원의 자가이식이 세포치료제 개발에 주요한 비중을 차지할 것이라고 전망하고 있다.

▶ 질환별 시장에서 Jain PharmaBiotech Report(2005)는 신경질환 치료가 57억 달러로 가장 큰 비중을 차지하고 있고 근골격계질환과 혈액질환이 그 뒤를 잇고 있어 상위 3대 질환이 전체치료의 약 45%를 차지하고 있으며 향후 10년 후에도 큰 차이를 보이지 않을 것으로 예상하고 있다. 다만, 암 관련 세포치료 비중이 급격히 높아져 신경질환 치료에 이어 두 번째로 높은 비중을 차지할 것으로 전망하고 있다. 향후에도 여전히 경제적 부담률이 크고 치료가 힘든 질병에 대한 치료의 수요 증가와 현재로서는 별다른 대체치료법이 존재하지 않

는 신경계는 임상시험이 급속도로 증가할 것으로 예상된다. 기존의 치료법으로 치료가 불가능한 질병과 난치병에 대한 치료방법이 세포치료제를 통해 확립될 경우 그 시장성은 무한한 것으로 평가된다. 세포치료제를 통한 치료가 가능한 당뇨병, 신경계질환, 면역체계 질환, 연골 및 뼈 치료, 피부이식 등을 주요 치료대상만을 고려해도 그 규모는 향후 10년 내에 약 1천 억 달러 이상으로 전문가들은 추정하고 있다.

- ▶ 세포치료제 산업은 세포은행, 세포조작장비, 대량세포배양장치 및 시설, 배지공급, 마커 및 항체 발굴, 바이오인포매틱스, 임상시험, 세포치료서비스 등 고도로 platform화된 형태의 산업으로 발전될 것이며 향후 글로벌 제약기업과 세포치료 벤처기업과의 협력 및 합병 또한 다양한 형태로 추진될 것으로 예상된다. 예상되는 관련 산업의 유형으로 자가이식의 세포치료 특화병원과 임상 의들에 의한 직접 세포조작을 가능케 하는 관련 장비 및 시설 업체들의 출현이고, 동종이식과 연관된 세포은행, 세포조작장비, 대량세포배양장치 및 시설, 배지공급, 마커 및 항체의 발굴, 임상시험등 관련사업의 활성화가 기대된다. 임상의 편의적인 자동화된 세포조작장비 및 기구의 상업화로 직접 임상의들에 의한 자가 이식치료제와 제약회사 및 바이오회사에서 의사에게 제공하는 세포치료제의 경쟁도 예상된다. 세포치료제의 세계시장규모는 2010년에 약 495억달러, 2015년에는 약 865억달러 정도의 시장이 형성될 것으로 예상되고 있다. 이 가운데 신경질환 세포치료 분야는 2010년에 101억달러, 2015년에는 218억달러 정도가 될 것으로 예상되며, **암 관련 세포치료분야도 2015년에는 85억달러에 이를 것으로 전망된다.**

## 나. 개발기술의 산업화 방향 및 기대효과

### 1) 산업화 방향(제품의 특징, 대상 등)

○ 개에서 NK세포를 체외 증폭할 수 있는 기술은 현재까지 본 연구진이 최초로 성공한 것임. 그러므로 암치료에 바로 사용할 수 있는 임상용 개 NK 세포의 체외 대용량 증폭시스템 개발은 바로 산업화로 연결될 수 있는 기술임.

○ NK 세포의 기능 향상이 가능하고 대량투여가 가능하며, 부작용 없이 동종요법이 가능함. 수지상세포 등 다른 면역세포와 병합치료를 실시할 경우 증양 치료효과를 높일 수 있음.

○ 증폭된 강력한 개 NK 세포는 악성종양뿐만 아니라 바이러스성질환이나 항생제에 효과를 보지 않는 세균성질환 등 난치성 질환의 치료에도 사용될 수 있으므로 산업화 후 경제적인 효과는 매우 클 것으로 전망됨.

### 2) 산업화를 통한 기대효과

(단위 : 백만원)

항 목 \ 산업화 기준	1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	5차년도	계
직접 경제효과	0	0	0	500		500
경제적 파급효과	200	500	1,000	3,000		4,700
부가가치 창출액	400	1,000	4,000	8,000		13,400
합 계	600	1,500	5,000	11,500		18,600



- 1) 직접 경제효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 제품의 매출액 추정치
- 2) 경제적 파급효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통한 농가소득효과, 비용절감효과 등 추정치
- 3) 부가가치 창출액 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 수출효과, 브랜드가치 등 추정치

## 5. 3P(특허,논문,제품)분석을 통한 연구추진 결과

### 가. 연구추진 결과 및 계획 (특허, 논문, 제품 측면에서 연구 진행 결과 및 계획)

#### 1) 특허분석 측면

- 기존 특허는 사람 NK 세포와 관련된 분야에서만 등록되어 있으므로, 본 연구과제에서는 개 NK 세포의 증폭 및 기능 향상을 목표로 연구를 추진하여 개 NK 세포 증폭 시스템에 대한 특허와 개 NK세포를 이용한 세포면역치료제에 대한 특허를 국내에 등록하였습니다.
- 임상용 개 NK세포 대용량 증폭시스템을 개발하여 특허를 등록하였습니다.

#### 2) 논문분석 측면

- NK 세포를 이용한 종양 및 바이러스질환의 면역세포치료에 관한 기존 논문은 대부분 사람에서 실시되었으며, 개 NK 세포에 대한 연구는 매우 미비한 실정으로 아직 개 NK세포를 구분할 수 있는 특이 표지자 조차도 밝혀져 있지 않음.
- 시험관에서 NK 세포의 대량 증폭 시스템이 확립된 사람에서는 이를 이용한 암 치료 및 난치성 바이러스성 질환 치료에 대해 활발히 연구가 활발히 진행되고 있으나, 개 NK 세포는 증폭이 까다로워 개 NK세포를 활성화시켜 시험관에서 대량 증폭할 수 있는 방법은 본 연구진만이 가지고 있음
- 본 연구과제에서는 이미 수행된 연구 결과를 토대로 세포독성 기능이 향상된 NK 세포의 임상용 대량 증폭시스템을 확립하고 동종 NK세포를 이용한 종양의 치료요법에 대한 연구를 추진하여 국제적인 학술지 등에 게재하였음.

#### 3) 제품 및 시장분석 측면

- 국내 및 국외시장 분석결과 사람에서 종양 및 바이러스질환 치료를 위한 사람 NK세포를 이용한 면역세포치료제가 개발되어 임상시험을 마치고 제품 생산이 이루어지고 있으나, 개에서는 아직 증폭시스템이 개발되지 않아 이에 관한 연구가 매우 미약할 뿐만 아니라 국제적으로 상품화된 것이나 상품화를 시도한 적이 없음. 본 연구과제에서는 기능이 향상된 강력한 개 NK 세포의 임상용 대량 증폭시스템을 개발하고, 동종 세포를 이용한 악성종양 치료에 관한 방향으로 연구를 추진하여 목표 이상의 성과를 도출하였으며, 이를 토대로 암면역세포치료제를 제품화 할 계획임. 기술이전을 통해 제품 생산을 위한 기틀을 마련하고, 전임상시험과 임상시험을 실시한 후 국내 및 국외에 판매할 계획임.

[별첨 2]

## 연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 체외 대량 증폭시킨 개 NK세포를 이용한 동종 암면역세포치료제 개발				
	(영문) Development of allogeneic NK cell-based immunotherapy against cancers in dogs				
주관연구기관	공주대학교		주 관 연 구 책 임 자	(소속) 공주대학교	
참 여 기 업	주) 박셀바이오			(성명) 김상기	
총연구개발비 (360,000천원)	계	360,000,000원	총 연구 기간	2012.8.10.~ 2015.8.9. (3년)	
	정부출연 연구개발비	90,000,000원	총 참 연 구 원 수	총 인 원	7명
	기업부담금	30,000,000원		내부인원	6명
	연구기관부담금	0		외부인원	1명
<p>○ 연구개발 목표 및 성과                      개 NK세포의 대용량 체외 증폭 기술을 확립하여 체외에서 대량으로 증폭시킨 강력한 항암 기능을 갖는 개 NK세포를 이용한 동종 면역세포치료제를 개발하기 위해 실시한 본 연구과제를 수행한 결과 도출된 성과를 토대로 사업화의 기틀을 마련하였음.</p> <p>○ 연구내용 및 결과                      본 연구과제에서는 체외 증폭된 강력한 항암기능을 갖는 개 NK세포를 이용한 동종의 입양면역세포치료요법 확립을 위한 임상용 large scale NK세포 증폭시스템 개발과 생체 주입된 NK세포 모니터링용 chimera 검출법 및 면역 모니터링 방법 개발 확립하고, 이를 토대로 공혈개의 말초혈액에서 분리한 단핵세포 (PBMCs)에서 NK세포만을 선택적으로 체외 증폭시킨 후 T세포를 제거하지 않은 동종 NK세포를 환견의 체내 주입 후 GVHD 발생 등 안전성 확인 및 동종 NK세포를 이용한 입양면역치료요법 확립하였으며, 체외 증폭된 강력한 개 NK세포와 방사선치료의 병합요법을 이용한 개 난치성 악성 종양에 대한 면역세포치료제 개발함.</p> <p>○ 연구성과 활용실적 및 계획                      본 연구개발을 통해 등록된 특허 2건 중 1건을 사업화를 위해 기술이전 하였음. 확립한 개 NK세포의 체외 증폭방법 및 이를 이용한 면역세포치료 기술도 조속히 참여 기업에 이전함으로써 종양이나 바이러스질환 치료를 위한 면역세포치료제의 제품화 및 상품화를 앞당기기 위해 활용할 것임.</p>					

## 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.