



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(11) 공개번호 10-2013-0088807  
 (43) 공개일자 2013년08월08일

- |  |  |
|--|--|
| (51) 국제특허분류(Int. Cl.)<br>C07K 19/00 (2006.01) A61K 38/17 (2006.01)<br>A61P 37/06 (2006.01)<br>(21) 출원번호 10-2013-0011443<br>(22) 출원일자 2013년01월31일<br>심사청구일자 2013년01월31일<br>(30) 우선권주장<br>1020120009982 2012년01월31일 대한민국(KR) | (71) 출원인<br>서울대학교산학협력단<br>서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)<br>(72) 발명자<br>박정규<br>서울특별시 서초구 대림아파트 1동 306호<br>김봉기<br>서울특별시 종로구 연건동 299-1번지<br>(74) 대리인<br>김순용 |
|--|--|

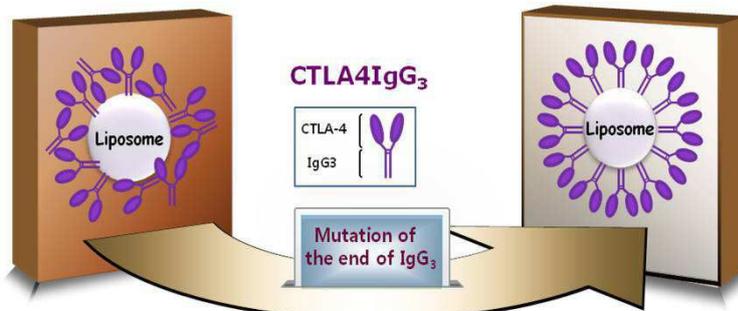
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **새로운 CTLA-4 IgG 융합 단백질**

**(57) 요약**

본 발명은 면역 글로불린 CH3 도메인 잔기의 C 말단의 아미노산인 라이신이 시스테인으로 치환된 CTLA-4IgG 융합 단백질, 상기 CTLA-4IgG 융합 단백질을 유효성분으로 포함하는 면역 억제용 약학적 조성물, 및 CTLA-4IgG 융합 단백질의 C 말단의 아미노산인 라이신을 시스테인으로 치환하는 단계;를 포함하는 CTLA-4IgG 융합 단백질과 지질 비히클과의 결합력을 높이는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 CTLA-4IgG 융합 단백질은 면역 글로불린 CH3 도메인 잔기의 C 말단의 아미노산인 라이신을 시스테인으로 치환함으로써, 지질 비히클에 효과적으로 결합하며, T 세포를 높은 활성으로 억제하는바, 효과적인 자가면역 질환 치료제 또는 장기이식반응 억제제 등 면역 억제용 약학적 조성물로 이용될 수 있다.

**대표도** - 도2



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	A040004
부처명	보건복지부
연구사업명	보건의료연구개발사업
연구과제명	영장류 전임상시험 및 임상시험 면역반응 분석 자원과 치료용 단백질 및 항체의 개발
주관기관	서울대학교 의과대학
연구기간	2004.05.01 ~ 2013.03.31

---

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

서열번호 3의 아미노산 서열로 표시되는, 면역 글로불린 CH3 도메인 잔기의 C 말단의 아미노산인 라이신이 시스테인으로 치환된 CTLA-4IgG (cytotoxic T lymphocyte antigen 4-Immunoglobulin G) 융합 단백질.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 IgG는 IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> 및 IgG<sub>4</sub>로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, CTLA-4IgG 융합 단백질.

### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 CTLA-4IgG 융합 단백질은 지질 비히클과 결합한 것을 특징으로 하는, CTLA-4IgG 융합 단백질.

### 청구항 4

제3항에 있어서, 상기 지질 비히클은 리포솜 또는 마이셀인 것을 특징으로 하는, CTLA-4IgG 융합 단백질.

### 청구항 5

제1항에 있어서, 상기 CTLA-4IgG 융합 단백질은 T 세포의 활성을 억제하는 것을 특징으로 하는, CTLA-4IgG 융합 단백질.

### 청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 하나의 CTLA-4IgG 융합 단백질을 유효성분으로 포함하는 면역 억제용 약학적 조성물.

### 청구항 7

제6항에 있어서, 상기 약학적 조성물은 장기이식반응 억제용 또는 자가면역질환의 예방 또는 치료용인 것을 특징으로 하는, 면역 억제용 약학적 조성물.

### 청구항 8

제7항에 있어서, 상기 자가면역질환은 류마티스 관절염, 전신 홍반성 낭창, 소화기 당뇨병, 아토피 피부염, 천식 및 크론병으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 면역 억제용 약학적 조성물.

### 청구항 9

CTLA-4IgG 융합 단백질의 C 말단의 아미노산인 라이신을 시스테인으로 치환하는 단계;를 포함하는 CTLA-4IgG 융합 단백질과 지질 비히클과의 결합력을 높이는 방법.

## 명세서

### 기술분야

[0001] 본 발명은 새로운 CTLA-4IgG 융합 단백질에 관한 것이다. 보다 구체적으로 본 발명은 면역 글로불린 CH3 도메인 잔기의 C 말단의 아미노산인 라이신이 시스테인으로 치환된 CTLA-4IgG 융합 단백질, 상기 CTLA-4IgG 융합 단백질을 유효성분으로 포함하는 면역 억제용 약학적 조성물, 및 CTLA-4IgG 융합 단백질의 C 말단의 아미노산인 라이신을 시스테인으로 치환하는 단계;를 포함하는 CTLA-4IgG 융합 단백질과 지질 비히클과의 결합력을 높이는 방법에 관한 것이다.

## 배경 기술

- [0002] 세포성 면역 반응은 T 림프구의 아구변형, 세포분열 및 세포 분화 등의 순차적인 과정을 통한 T 림프구 활성화를 통해 일어난다. T 림프구의 활성화는 세포 부착, 자극 또는 인지 그리고 동조자극의 순서로 일어나며, T 림프구와 항원제시세포가 갖는 세포 표면 항원 단백질 간의 상호 작용에 의해 형성되는 신호 전달체계에 의해 이루어진다.
- [0003] 세포 부착(접촉)은 T 림프구와 항원제시세포가 서로 자극을 주고받기 위하여 만나는 단계를 말하며, 각 세포의 표면 단백질인 백혈구 항원에 의해 중재 된다. 이때 T 림프구에서는 ICAM (CD54), LFA-1(CD11a/18), VLA (CD49d/29) CD2 등이, 항원제시세포에서는 LFA-1(CD11a/18), ICAM-1 (CD45), VCAM (CD106), LFA-3 등이 백혈구 항원으로 관여하는 것으로 알려져 있다.
- [0004] 자극은 인지라고도 하며 T 림프구가 클론 특이적 항원을 인식하여 항원 특이성을 나타내는 단계이다. 이 단계에 관여하는 백혈구 항원으로 T 세포에는 T 세포 수용체 (T cell receptor, TCR)와 CD3, CD4, CD8 등이 있으며, 항원제시세포에는 MHC class I, II 등이 있다.
- [0005] 동조자극은 항원을 인식한 T세포가 아구변형과 세포분열 및 세포분화를 개시하도록 하는 단계로서, 이 단계에 관여하는 대표적인 백혈구 항원으로는 T 림프구의 CD2, CD40L, CD28, CTLA-4 등과 항원제시세포의 LFA-3, CD40, B7-1, B7-2 등이 있다.
- [0006] T 세포의 활성화는 항원제시세포 표면의 항원 펩타이드 함유 MHC II 분자가 T 세포의 TCR/CD3 분자 복합체에 결합함으로써 시작된다. 그러나 TCR/CD3에 의한 항원특이적 신호체계만으로는 완전한 면역 반응을 일으키기에 불충분하며 후속되는 이차 신호체계 즉 동조자극이 없는 상태에서 TCR/CD3에 항원이 재차 결합하게 되면 오히려 면역무력증(nergy) 혹은 클론 불활성화를 일으키게 된다. 동조자극은 주로 항원제시세포 표면 항원인 B7과 T 세포 표면 항원인 CD28의 상호결합에 의한 이차신호체계에 의해 유도되며, 이때 CTLA-4는 CD28과 경쟁적으로 B7에 결합함으로써 면역 반응 억제 기능을 하는 것으로 보고되고 있다. 이와 같이 후속되는 동조자극에 관여하는 수용체군을 부속분자라 부르며, CD28과 CTLA-4가 핵심적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다.
- [0007] CD28은 T 림프구의 표면에 존재하는 호모다imer 당단백질 (homodimer glycoprotein)로 T 림프구의 활성화 후에 증가하며, 단독으로 T 림프구를 활성화하지는 못하나, PHA(phytohemagglutinin)나 PMA(phorbtor myristate acetate)의 자극이 있을 때, 또는 CD3과 CD28에 대한 항체 자극이 있을 때 T 림프구 활성을 현저히 강화시키는 것으로 알려져 있다.
- [0008] 한편, CTLA-4는 휴지기의 T 림프구에서는 발현하지 않고 활성화된 T 림프구 표면에 CD28의 2~3% 정도의 수준에서 발현되어 있다고 알려져 있으며, CD28과 마찬가지로, 호모다imer 당단백질 (homodimer glycoprotein)로 존재하고, 단백질을 코딩하는 유전자 구성에 있어서 CD28과 67%의 동일성을 가지는 것으로 알려져 있다.
- [0009] 백혈구 항원의 신호 전달에 의해 일어나는 면역반응은 이식거부반응과 자가면역질환 등을 유발하게 하는 원인이 된다. 특히, 세포독성 (cytotoxic) T 림프구가 최종적으로 목적세포를 사멸시킨다는 점에서 이의 활성을 저하시킴으로써 면역 반응을 억제하고자 하는 연구가 많이 이루어지고 있다.
- [0010] 본 발명자들은 리포솜에의 효과적인 방향성을 부여하고, 높은 T 세포 억제 효과를 갖는 신규한 CTLA-4IgG 융합 단백질을 개발하기 위하여 예의 노력한 결과, 면역 글로불린 CH3 도메인 잔기의 C 말단의 아미노산인 라이신을 시스테인으로 치환시킨 돌연변이체가 리포솜에의 결합력을 높이며, 높은 T 세포 억제능을 나타냄을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0011] 본 발명의 목적은 신규한 CTLA-4IgG 융합 단백질을 제공함에 있다.
- [0012] 또한 본 발명의 목적은 상기 CTLA-4IgG 융합 단백질을 유효성분으로 포함하는 면역 억제용 약학적 조성물을 제공함에 있다.
- [0013] 또한 본 발명의 목적은 CTLA-4IgG 융합 단백질의 C 말단의 아미노산인 라이신을 시스테인으로 치환하는 단계;를

포함하는 CTLA-4IgG 융합 단백질과 지질 비히클과의 결합력을 높이는 방법을 제공함에 있다.

### 과제의 해결 수단

- [0014] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 면역 글로불린 CH3 도메인 잔기의 C 말단의 아미노산인 라이신이 시스테인으로 치환된 CTLA-4IgG (cytotoxic T lymphocyte antigen 4-Immunoglobulin G) 융합 단백질을 제공한다.
- [0015] 또한, 본 발명은 상기 CTLA-4IgG 융합 단백질을 유효성분으로 포함하는 면역 억제용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0016] 또한, 본 발명은 CTLA-4IgG 융합 단백질의 C 말단의 아미노산인 라이신을 시스테인으로 치환하는 단계;를 포함하는 CTLA-4IgG 융합 단백질과 지질 비히클과의 결합력을 높이는 방법을 제공한다.

### 발명의 효과

- [0017] 본 발명에 따른 CTLA-4IgG 융합 단백질은 면역 글로불린 CH3 도메인 잔기의 C 말단의 아미노산인 라이신을 시스테인으로 치환함으로써, 지질 비히클에 효과적으로 결합하며, T 세포를 높은 활성으로 억제하는바, 효과적인 자가면역 질환 치료제 또는 장기이식반응 억제제 등 면역 억제용 약학적 조성물로 이용될 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

- [0018] 도 1은 CTLA-4IgG의 면역 반응에서의 다양한 역할을 나타낸 도이다.
- 도 2는 본 발명에 따른 CTLA-4IgG<sub>3</sub>의 돌연변이에 의한 효과를 나타낸 도이다.
- 도 3은 본 발명에 따른 신규한 CTLA-4IgG<sub>3</sub>(K397C)를 확인한 결과를 나타낸 도이다. ((A) CTLA-4IgG<sub>3</sub> 아미노산 서열의 구성도임 (빨간색, 파란색, 초록색 및 짙은 빨간색은 각각 CTLA-4IgG의 세포 외 도메인, 경첩 영역 (hinge region), CH2 및 CH3을 나타냄) (B) PCR 산물의 1% 아가로오스 겔 전기영동 결과, (C) CTLA-4IgG<sub>3</sub>의 야생형 및 돌연변이형의 in vitro 전사 및 번역 결과)
- 도 4는 본 발명에 따른 신규한 CTLA-4IgG<sub>3</sub>(K397C)의 웨스턴 블로팅 에세이 결과를 나타낸 도이다. ((A) K397C의 IgG<sub>3</sub> 부분은 항마우스-IgG와 결합된 알칼리 포스파타아제 (alkaline phosphatase, AP)에 의하여 확인됨, (B) K397C의 CTLA-4 세포 외 도메인은 4F10과 HRP conjugated anti-hamster IgG (H+L)를 이용하여 확인됨)
- 도 5는 야생형 CTLA-4IgG<sub>3</sub> 또는 K397C의 P815B7-1 결합 에세이 결과를 나타낸 도이다. ((A) 5x10<sup>5</sup>의 B7-1가 표면에 발현되는 P815 (P815B7-1) 세포를 항 마우스 CD80-FITC 및 isotype control로 염색함, (B) 및 (C) 50, 1,000, 및 20,000 ng/mL의 야생형 CTLA-4IgG<sub>3</sub> (B) 및 K397C (C)와 함께 배양함.)
- 도 6은 야생형 CTLA-4IgG<sub>3</sub> 또는 K397C의 P815B7-1 세포와의 결합을 나타낸 도이다.
- 도 7은 야생형 CTLA-4IgG<sub>3</sub> 또는 K397C의 혼합 림프구 반응 결과를 나타낸 도이다.
- 도 8은 야생형 CTLA-4IgG<sub>3</sub> 또는 K397C가 리포솜 분자에 결합된 분자 수 계산 결과를 나타낸 도이다.
- 도 9는 자유 CTLA-4IgG<sub>3</sub> 또는 K397C 리포솜의 경쟁적 결합 에세이 결과를 나타낸 도이다.
- 도 10은 자유 CTLA-4IgG<sub>3</sub> 또는 K397C 리포솜의 P815B7-1 세포와의 결합을 나타낸 도이다.
- 도 11은 자유 CTLA-4IgG<sub>3</sub>, CTLA-4IgG<sub>3</sub> 리포솜 또는 K397C 리포솜의 혼합림프구반응 억제 효과를 나타낸 결과를 나타낸 도이다.
- 도 12는 K397C 또는 K397C 리포솜의 동종 체도 이식 모델에서의 이식 거부 반응을 확인한 결과를 나타낸

도이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0019] 본 발명은 서열번호 3의 아미노산 서열로 표시되는, 면역 글로불린 CH3 도메인 잔기의 C 말단의 아미노산인 라이신이 시스테인으로 치환된 CTLA-4IgG (cytotoxic T lymphocyte antigen 4-Immunoglobulin G) 융합 단백질을 제공한다.
- [0020] 상기 CTLA-4IgG 융합 단백질은 야생형인 CTLA-4IgG 융합 단백질에 비해 지질 비히클에의 방향성이 높으며, 지질 비히클과 결합하여 T 세포의 활성을 효과적으로 억제하는 작용을 수행함으로써 효과적인 면역 억제가 가능하다.
- [0021] 본 발명에 있어서 용어 “CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte antigen-4)” 는 CD28과 유사한 구조를 갖는 단백질로, T 림프구가 활성화되었을 때 발현하는 T 세포 활성 항원의 일종이다. CTLA-4는 항원 제시세포 (APC) 표면의 B7-1 (CD80), B7-2 (CD86)와의 결합력이 CD28의 20배 이상이며, B7과 결합한 후 T 림프구의 활성을 억제하는 신호를 전달하는 역할을 담당한다. CTLA-4의 면역 반응에서의 다양한 역할을 도 1에 나타내었다.
- [0022] 본 발명의 CTLA-4는 CTLA-4가 존재할 수 있는 모든 개체로부터 유래할 수 있으며, 바람직하게는 인간, 영장류, 설치류 등의 포유류일 수 있다.
- [0023] 본 발명에 있어서 용어 “CTLA-4IgG” 는 CTLA-4와 면역 글로불린의 Fc 부위를 유전자 재조합을 통해 융합시킨 구조이다. 본 발명의 “CTLA-4IgG” 은 생체 투여시 항원 제시세포 (APC) 표면에 존재하는 B7 (CD80 및 CD86)에 결합하여 APC로부터 T 림프구의 표면에 존재하는 CD28에 가해지는 공조 자극(Costimulation signal)을 차단하고 면역무력상태(anergy)를 유도함으로써 면역반응을 억제하는 효과를 발생시킨다.
- [0024] 본 발명자는 CTLA-4IgG를 지질 비히클에 결합하여 B7 분자와 결합능을 증가시키고 T세포의 활성을 억제하는 방법에 있어서, 지질 비히클 바람직하게는 리포솜과의 결합능력을 높이기 위하여 CTLA-4IgG 융합 단백질의 면역 글로불린 CH3의 C 말단 (C-terminal)의 아미노산이 시스테인 (cystein)에 해당하면 지질 비히클에의 높은 결합 효율을 보인다는 것을 최초로 밝혔다. 돌연변이가 발생한 재조합 CTLA-4IgG 융합 단백질의 지질비히클과의 결합을 도식한 결과는 도 2와 같다.
- [0025] 본 발명에 있어서, 상기 면역 글로불린 IgG의 종류는 제한되지 않으며, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub> 일 수 있고, 본 발명에서는 일례로 IgG<sub>3</sub> 을 이용하였다.
- [0026] 본 발명에서 CTLA-4IgG 융합 단백질은 지질 비히클(vehicle)과 결합한 것일 수 있다. 상기 지질 비히클은 지질을 포함하고 있으며, CTLA-4IgG를 표적세포에 전달할 수 있는 모든 비히클을 포함하며, 바람직하게는 리포솜(liposome) 또는 마이셀 (Micelle)일 수 있으며, 보다 바람직하게는 리포솜일 수 있다.
- [0027] 또한, 본 발명은 상기 신규한 CTLA-4IgG (cytotoxic T lymphocyte antigen 4-Immunoglobulin G) 융합 단백질을 유효성분으로 포함하는 면역 억제용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0028] 상기 면역 억제는 장기이식반응 억제용 또는 자가면역질환의 예방 또는 치료용 일 수 있으며, 상기 자가면역 질환은 이에 제한되지는 않으나, 류마티스 관절염, 전신 홍반성 낭창, 소화기 당뇨병, 아토피 피부염, 천식 또는 크론병 일 수 있다.
- [0029] 상기 융합 단백질은 전체 약학적 조성물에서 0.001 내지 50중량%, 바람직하게는 0.01 내지 20중량% 포함될 수 있다. 또한, 상기 융합 단백질은 전체 약학적 조성물에서 상기 약학적 조성물이 투여되는 개체의 1kg당 적정량이 투여될 수 있도록 함량을 조절할 수 있다.
- [0030] 본 발명의 약학적 조성물은 약효를 증가시키지는 않으나 약학적 조성물에 통상 사용되어 냄새, 맛, 시각 등을 향상시킬 수 있는 성분을 추가로 포함할 수 있다. 또한, 상기 조성물은 비타민 B1, B2, B6, C, E, 니아신, 카르니틴, 베타인, 엽산 판토텐산, 비오틴, 아연, 철, 칼슘, 크롬, 마그네슘 및 이들의 혼합물 등의 무기 또는 유기 첨가물들을 추가로 포함할 수 있다.
- [0031] 본 발명의 상기 약학적 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하고 경구 또는 비경구용의 인체 또는 수의용으로 제형화될 수 있다. 본 발명의 조성물을 제제화하는 경우 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제 및 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용할 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제 및 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 본 발명의 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전

분, 칼슘카보네이트(Calcium carbonate), 수크로오스(Sucrose), 락토오스(Lactose) 또는 젤라틴 등을 섞어 조제한다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘, 스테레이트, 탈크 같은 윤활제를 사용할 수 있다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물 및 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제 및 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제 및 좌제가 포함된다. 비수성용제 및 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜 및 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.

[0032] 본 발명의 상기 약학적 조성물은 개체에 투여하여 면역작용을 억제할 수 있다.

[0033] 본 발명에서 사용된 용어, “투여”는 어떠한 적절한 방법으로 개체에 본 발명의 약학적 조성물을 도입하는 것을 의미한다. 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 경구 또는 비경구 투여될 수 있다. 또한, 본 발명의 약학적 조성물이 표적 세포로 이동할 수 있도록 하는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

[0034] 본 발명의 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에서 사용된 용어, “약학적으로 유효한 양”은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체의 성별, 연령, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0035] 본 발명의 조성물은 면역억제를 위하여 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0036] 또한, 본 발명은 CTLA-4IgG 융합 단백질의 C 말단의 아미노산인 라이신을 시스테인으로 치환하는 단계;를 포함하는 CTLA-4IgG 융합 단백질과 지질 비히클과의 결합력을 높이는 방법을 제공한다. 상기 지질 비히클의 종류는 제한되지 않으나, 바람직하게는 리포솜 또는 마이셀일 수 있으며, 보다 바람직하게는 리포솜이다.

[0037] 이하, 본 발명을 실시예에 의거하여 보다 구체적으로 설명한다. 이는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0038] **실시예 1. 치료 및 방법**

[0039] **1-1. 실험동물**

[0040] BALB/c (NIH, Bethesda, Maryland, USA)와 C57BL/6 (NIH, Bethesda, Maryland, USA)마우스는 Koatech (Kyunggi-do, KOREA)에서 구매하였으며, 서울대학교 의과대학 무병 동물 사육시설에서 보관하였다.

[0041] **1-2. 세포배양**

[0042] 항-마우스 CTLA4 항체를 분비하는 하이브리도마 세포주인 4F10 (HB304, American Type Culture Ccollection, Manassas, VA, USA) 및 형질감염된 마우스 비만세포인 P815B7.1 세포주 (TIB-64, American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)는 고 글루코오스 함유 DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium, Gibco/BRL, Grand Island, NY, USA)에서 배양 및 유지하였으며, 상기 배지는 10 mM의 HEPES (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA), 100M의 불필수 아미노산, 55M의 2-머캅토에탄올( $\beta$ -ME) 및 50 g/mL의 겐타마이신 (Gibco/BRL, Grand Island, NY, USA), 및 열불활성화 (heat-inactivated) 소태아혈청 (fetal bovine serum, FBS, Gibco/BRL, Grand Island, NY, USA)을 포함한다.

[0043] 중국 햄스터 난소 (Chinese hamster ovary, CHO) K-1 세포 (SNUMC의 Dr. Cho가 제공)는 DMEM 배지에서 성장하

였으며, 단백질 준비를 위하여 완전 무혈청배지인 Opti-CHO (Gibco/BRL, Grand Island, NY, USA)에서 대량배양하였다.

[0044] 모든 세포는 37 °C에서 7% CO<sub>2</sub>의 조건에서 성장하였다.

[0045] **1-3. DNA 구조체 및 형질감염**

[0046] 마우스 CTLA-4IgG<sub>3</sub>의 DNA구조체는 Dr. Jeffery A. Bluestone의 실험실에서 얻었다. 모든 플라스미드 DNA는 DNA preparation kit (Genenmed, Seoul, Korea)를 이용하여 준비하였다.

[0047] C-말단 잔기의 AAA(lysine)를 ACA(cysteine)로 돌연변이 시키는 IgG<sub>3</sub>의 말단의 점돌연변이는 공지된 PCR 방법에 의하여 제작하였다. 보다 구체적으로, PCR 반응은 시스테인 (하기 안티센스 프라이머 서열 중 굵게 표시)을 포함하는 두 프라이머와 Han-pfu 중합효소 (Genenmed, Seoul, Korea)에 의하여 수행되었다 (Sense: 5' -GTG GTA CCT TTA ATG AAA-3' (18 mer) (서열번호 1), antisense: 5' -GCT CTA GAG CTG TTC TCA **ACA** ACC AGG GGA GCG A-3' (34 mer) (서열번호 2)). 1 ng의 CTLA-4IgG<sub>3</sub> DNA, 0.2 uM의 센스 및 안티센스 프라이머, 5 µl의 10 x 반응 완충액 (Han-pfu 폴리머라아제가 보충됨), 10 mM의 dNTP, 1 µl의 Han-pfu 중합효소를 최종 부피 50 µl이 되게 혼합한 후, 94°C에서 3 분간 전-변성 (pre-denaturation) 후, 94 °C에서 1분간 변성, 58°C에서 1분간 어닐링, 72°C에서 1분간 신장 단계를 35 사이클 반복한 후, 72°C에서 10분간 후-신장 (post elongation)을 수행하였다.

[0048] PCT 결과물은 KpnI 및 XbaI에 의하여 절단하였으며, pcDNA3.1 (Invitrogen Life Technology, Carlsbad, CA, USA)에 라이게이션하였다.

[0049] 이 후, 준비된 플라스미드 DNA를 E. coli DH5 알파에 형질전환하였다. 돌연변이 자리는 전체 길이의 DNA 시퀀싱 분석을 이용하여 확인하였다. CHO 세포는 대수성장기에서 수집하였으며, 전기천공법을 아래와 같은 조건으로 수행하였다. 10 µg의 pcDNA3.1-CTLA4 야생형 또는 본 발명의 pcDNA3.1-CTLA-4IgG<sub>3</sub> Cys (이하 "K397C"라고 표기)를 각각 전기천공 크벳 (cuvette)의 5x10<sup>6</sup> 세포와 혼합한 뒤, 25F와 무한저항 (infinite resistance)에서 300 volt로 Gene pulser X cell system (Bio-RAD Laboratories, Hercules, California, USA)을 이용하여 전기천공하였으며, 100 mm의 배양 디쉬에 플레이팅 하였다.

[0050] **1-4. in vitro 전사 및 번역**

[0051] in vitro 전사 및 번역에는 TNT Quick Coupled Transcription/Translation System (Promega)을 사용하였으며, 번역 산물을 검출하기 위해 Transcend™ Non-Radioactive Translation Detection System (Promega)을 사용하였다.

[0052] 보다 구체적으로, 1 µg의 pcDNA3.1-CTLA4IgG<sub>3</sub> 및 pcDNA3.1-CTLA4IgCys는 50 µl의 반응 혼합물 (40 µl TNT T7 quick master mix, 1 mM 메티오닌 및 2 µl Transcend™ Biotin-Lysyl-tRNA를 포함)에서 30°C, 90분간 전사 및 번역되었다. 반응 산물은 SDS-PAGE로 분리하였으며, PVDF 막 (membrane)으로 옮겼다. 구체적으로 막 이동 (Membrane Transfer)은 193 mM의 글리신 (glycine), 25 mM의 Trisand, 20%의 메탄올에서 2시간 동안 100V 및 4 °C 조건에서 수행하였다. 이후, 막을 5%의 무지방 분유 및 0.1%의 Tween-20을 포함한 20 mM의 Tris/HCl(pH 7.3)/137 mM NaCl(TBST) 완충액에 담근 후, 실온에서 3시간 동안 방치하였다. 웨스턴 블랏을 위해 1:10,000으로 희석된 검출 항체인 streptavidin-HRP conjugate를 첨가한 후, 2시간 동안 실온에서 배양하였다. 검출은 Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce, Thermo scientific, Rockford, IL, USA)를 이용하였다.

[0053] **1-5. 분비된 단백질 측정 및 정량**

[0054] 선발 및 대량 배양 중에서의 CTLA-4IgG량을 정량하기 위하여, 샌드위치-ELISA가 아래의 항체들을 이용하여 수행하였다. 포획 항체 (Capturing antibody), 검출항체 (detecting antibody)로 항-CTLA4 단클론성 항체 (4F10), HRP conjugated 항-마우스 IgG<sub>3</sub> 항체)를 이용하였다. 2 µg/mL의 PBS 에 희석된 항-CTLA4 모노클로날 항체는 96-

well MaxiSorp™ ELISA plate (Nunc, Rochester, NY, USA)에 코팅하였으며, 4℃에서 하룻밤 배양하였으며, 0.05%의 Tween-20 (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA)을 포함하는 PBST로 3 차례 세척하였다. PBST에 포함된 5%의 탈지분유 (Difco, Spark, MD, USA)를 이용하여 각 웰을 블로킹한 뒤, 희석된 샘플 (1:100~1:100,000)을 각각의 웰에 첨가한 후 상온에서 2시간 동안 반응하였으며, PBST를 이용하여 5차례 세척하였다. 100 μl의 TMB 기질 용액 (eBioscience, San Diego, CA, USA)이 각 웰에 5분간 더해졌으며, 동일한 부피의 0.18M의 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>가 발색반응을 멈추기 위하여 사용되었다. 플레이트는 450nm의 흡광도에서 판독되었다.

[0055] 1-6. CTLA-4IgG<sub>3</sub>의 준비

[0056] 총 배양 상층액을 수득하고 Avanti J-E high speed centrifuge (Beckman Coulters, Fullerton, CA, USA)를 이용하여 12000 x g로 4℃에서 원심분리하였다. 원심 분리 후, 상층액을 수확하여 sterile top 필터 (Millipore, Billerica, MA, USA)로 여과하였다. 4F10-sepharose 컬럼을 3 bed volume의 PBS와 평형시킨 뒤, 여과된 샘플을 컬럼에 적용시키고 겔 속으로 완전히 흐르도록 하였다. 몇 번의 회전 뒤, 30 mL의 Immunopure® IgG 용출 완충액 (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA)을 컬럼에 더하였으며, pH 8.0인 100 μl의 1M Tris를 포함하는 1.5 mL 튜브에 1.0 mL의 분획물을 수집하였다. 수집된 분획물은 NanoDrop, ND-1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA)을 이용하여 정량하였으며, Amicon Ultra centrifugal filter (Millipore, Billerica, CA, USA)로 농축하였다. 농축된 분획물은 BCA assay kit (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA)로 정량하였다.

[0057] 1-7. 웨스턴 블롯팅

[0058] 5 μg~10 μg의 정제된 CTLA-4IgG<sub>3</sub> 단백질을 환원 (reducing)과 비-환원(non-reducing)의 2가지 조건에서 SDS-PAGE로 로딩하였으며, PVDF 막으로 옮겼다. 그 뒤, PVDF 막을 5%의 탈지분유를 포함하는 PBST에서 2시간 동안 상온에서 배양하였으며, 15mL의 2%의 탈지분유를 포함하는 PBST에서 10 μg의 항-마우스 CTLA4 항체인 4F10로 프로브화하였다. 이를 상온에서 2시간 또는 4℃에서 밤새도록 가벼운 셰이킹 상태로 배양한 뒤, PBST로 3차례 세척하였으며, 검출 항체 (detection antibody)로서 HRP-conjugated anti Armenian hamster IgG (Santa Cruz Biotechnology, Delaware, CA, USA)를 첨가한 후, 2시간 동안 상온에서 배양하였다. 2mL의 Enhanced Chemiluminescent (ECL) 시약 (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA)을 이용하여 검출하였다.

[0059] 1-8. 결합 에세이

[0060] 각기 다른 농도의 CTLA-4IgG<sub>3</sub> 단백질을 5x10<sup>5</sup>의 마우스 B7.1 발현 세포주인 P815 B7.1에 부가하였으며, 4℃에서 1시간 동안 배양하였다. 상기 세포를 소혈청알부민 (bovine serum albumin) (0.5%, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA)과 아지드화나트륨 (sodium azide) (0.05%, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA)을 포함하는 FACS 완충액을 이용하여 2차례 세척하였으며, FITC-conjugated 항 마우스 IgG 다클론 항체 (SC-2010, Santa Cruz Biotechnology, Delaware, CA, USA)와 함께 1시간 동안 다시 배양하였다. FITC 양성 세포를 FACS Canto II (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA)를 이용하여 검출하였고, FACS Diva software(Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA)를 이용하여 분석하였다.

[0061] 1-9. 동종 혼합 림프구 반응 (Allogeneic Mixed Lymphocyte Reaction, allogeneic MLR)

[0062] 정상 BALB/c mice에서 5x10<sup>5</sup>의 비장세포를 수확하였으며, 이를 동종 혼합 림프구 반응에서 자극자 세포로 이용하였다. 이 자극자는 20 Gy로 γ-선 조사하여 T 세포를 제거하였다. 동일한 수의 반응자 세포는 C57BL/6 mice의 비장세포로부터 준비하였다. 자극자 및 반응자 세포 모두 96-웰 둥근 바닥 플레이트 (Falcon, Becton Dickinson, CA, USA)에 총 부피가 0.2mL이 되도록 동일한 세포 수 (5x10<sup>5</sup>)로 혼합하였다. 다양한 농도의 CTLA-4IgG<sub>3</sub> (야생형), CTLA-4IgG<sub>3</sub> 리포솜, K397C (돌연변이형) 및 K397C 리포솜이 웰에 분리되어 더해졌다. 혼합된 세포들은 24, 48, 72시간 동안 37℃에서 배양하였으며, 18시간 동안 1 μ Ci의 [<sup>3</sup>H]-thymidine (Amersham

Bioscience, Bucks, UK)로 펄스 (pulse)되었다. T 세포의 증식에 따른 <sup>3</sup>H-thymidine의 흡수량은 Wallac MicroBeta<sup>®</sup> TriLux (PerkinElmer, Waltham, MA, USA)를 이용한 신텔레이션 계수 (scintillation counting)로 측정하였다.

[0063] **1-10. 경쟁적 결합 에세이**

[0064] 배양한 P815 세포와 세포 표면에 B7-1을 표현하는 P815 세포 (B7.1 cells)를 수확하여 카운트하였으며, FACS 완충액으로 (0.5%의 소혈청알부민과 0.05%의 아지드화 나트륨을 포함하는 PBS) 2차례 세척한 뒤,  $5 \times 10^6$  cells/mL로 희석하여 튜브에 분배하였다. 20mL의 각각의 다른 농도의 CTLA-4IgG<sub>3</sub> 리포솜, K397C 리포솜 또는 자유 CTLA-4IgG<sub>3</sub>가 세포에 더해졌으며, 30분간 4°C에서 배양하였다. 그리고 10 mL의 0.5 mg/mL CTLA-4IgG<sub>3</sub>-FITC (WT의 CTLA-4IgG<sub>3</sub>과 함께 형성)가 각 샘플에 더해졌으며 4°C에서 45분간 배양하였다. 반응을 끝낸 세포들은 모두 FACS 완충액으로 3차례 세척하였으며, 형광은 488/530 nm에서 FACS Canto II (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA)로 측정하고, FACS Diva software (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA)로 측정하였다.

[0065] **1-11. 리포솜의 준비**

[0066] 리포솜은 말레이미드 작용기를 갖는 PE의 유도체인 2 mole %의 MPB-PE(maleimideparabenzoic-PE)와 2:1의 몰랄비의 포스파티딜콜린 (phosphatidycholine) (PC, Avanti Lipid Inc., Alabaster, AL, USA)과 콜레스테롤 (Calbiochem, La Jolla, CA, USA)로 구성하였다. 이를 혼합한 뒤, 용매를 증발시키고 (Rotovapor R-200, Buchi), 다층상 지질 필름을 HBSE (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.0)로 수화시켰다. 지질 용액은 4차례의 동결-용해 반복을 받았으며, 0.1mm 크기의 폴리카보네이트 필터 (polycarbonate filters) (Nucleopore Corning, Acton, MA, USA)를 이용하여 4차례의 막 압출 (Lipex, Vancouver, BC, Canada)을 수행하였다. 압출 후, 리포솜은 사용될 때까지 4°C에서 아르곤 가스 하에 보관하였다.

[0067] **1-12. CTLA-4IgG<sub>3</sub>의 리포솜에의 결합**

[0068] SATA(Succinimidyl-S-Acetylthioacetate)를 이용한 CTLA-4IgG<sub>3</sub>의 변형

[0069] 2 mg/mL 농도로 PBS에 담겨진 CTLA-4IgG<sub>3</sub>는 25 °C에서 25분동안 메틸 포말레이드에 용해될 수 있는 SATA와 함께 배양하였다. CTLA-4IgG<sub>3</sub>와 SATA의 몰랄 비 및 부피비는 각각 1:20 및 1:100이다. 반응하지 않은 SATA는 4 °C에서 투석을 통하여 밤새 제거하였다. 탈아세틸화는 리포솜과의 혼합 바로 뒤에 25°C에서 2시간 동안 탈아세틸화 용액 (0.5 M hydroxylamine, 50 mM sodium phosphate, 25 mM EDTA, pH 7.0)에서 수행하였다.

[0070] 디티오프레이톨(dithiothreitol, DTT)을 이용한 K397C의 변형

[0071] K397C 단백질은 25°C에서 15분간 2 mM의 DTT로 환원하였다. 반응이 끝난 뒤, 환원된 단백질은 세파덱스 G-25 컬럼(GE Healthcare, San Jose, CA, USA)을 이용하여 DTT로부터 정제하였다. 용출액을 농축하였으며 단백질 농도는 UV 흡광도를 통하여 결정하였다.

[0072] maleimide-PE-포함 리포솜에의 결합

[0073] Maleimide-포함 리포솜을 지질과 CTLA-4IgG<sub>3</sub>이 290:1의 몰랄비를 갖도록 탈아세틸화된 CTLA-4IgG<sub>3</sub>-linked SATA 용액 (야생형) 및 환원된 K397C (돌연변이형)에 첨가하였으며, 4°C에서 아르곤 가스 존재 하에서 가벼운 교반으로 밤새 배양하였다. 결합 후, 결합되지 않은 자유 CTLA-4IgG<sub>3</sub> 단백질은 겔 여과 (1 x 20 cm sepharose CL-4B column) (GE Healthcare, San Jose, CA, USA)를 통하여 제거하였으며, 용출액은 수집하였다. 결합된 CTLA-4IgG<sub>3</sub>와 컬럼에서의 리포솜 분획에의 인지질의 양은 각각 양적 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-

polyacrylamide gel electrophoresis)와 포스포타아제 어세이를 이용하여 검사하였다. 결합된 리포솜 당 CTLA-4IgG<sub>3</sub> 분자는 100 nm의 리포솜 크기에 기초하여 계산하였다.

[0074] **실시예 2. 결과**

[0075] **2-1. CTLA-4 IgG<sub>3</sub>과 돌연변이의 DNA 구조체**

[0076] IgG<sub>3</sub>의 CH3 도메인의 C 말단의 아미노산은 본래 라이신이지만, 이를 PCR을 이용한 돌연변이 생성을 통해 시스템으로 변경하였다. 최종 생성된 돌연변이 CTLA-IgG<sub>3</sub> 융합 단백질의 아미노산 서열은 서열번호3 및 도 3A에 표시하였다.

[0077] 돌연변이를 갖는 PCR 산물은 1 % 아가오로스 겔에서의 전기영동을 통해 확인하였다. 그 결과를 도 3B에 나타내었다.

[0078] 도 3B에 나타낸 바와 같이, 1.2 kb 크기임을 확인하였다.

[0079] 또한, 상기 DNA 구조체는 진균세포 발현 벡터인 pcDNA3.1으로 서브클론하였으며, PCR 산물의 총 DNA 서열은 DNA 시퀀싱 분석(Macrogen corp. Seoul)에 의해 확인하였다. pcDNA3.1-CTLA-4IgG<sub>3</sub> 단백질 발현은 TNT<sup>®</sup> Quick Coupled Transcription/Translation System (Promega, Madison, MI, USA), SDS-PAGE 및 웨스턴 블랏을 통하여 확인하였다. 그 결과를 도 3C에 나타내었다.

[0080] 도 3C에 나타낸 바와 같이, 야생형과 돌연변이형 CTLA-4IgG<sub>3</sub> 모두 45 KDa의 단백질 밴드를 나타내었다.

[0081] **2-2. DNA의 형질주입 및 세포주의 정제 및 안정화**

[0082] pcDNA3.1-CTLA-4IgG<sub>3</sub>와 pcDNA3.1-CTLA-4IgG<sub>3</sub> Cys의 두 가지 형태의 구조체를 endotoxin free plasmid maxi prep kit (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Neumann-Neander-Straße, Duren, Germany)를 이용하여 정제하였다. 정제된 DNA 구조체를 중국 햄스터 난소 (CHO)세포 안으로 전기천공법을 이용하여 형질주입하였다. 2 mg/mL의 Geneticin<sup>®</sup> (G-418) 존재하에서 형질주입된 세포를 선발한 뒤, 안정화된 세포주의 확보를 위하여 콜로니를 선발하였으며, 높은 수준의 CTLA-4IgG<sub>3</sub> 단백질을 분비하는 세포를 선택하기 위하여, ELISA를 이용하여 분비된 단백질을 측정 및 정량하였다.

[0083] **2-3. 대량 배양 및 정제**

[0084] 안정화된 세포주의 설계 이후, 세포 대량배양을 위하여 무혈청 CHO 세포 배지에 접종하였다. 총 6L의 배양 상층액을 수득하였으며, 본 발명의 CTLA-4IgG<sub>3</sub>의 돌연변이형 (K397C)은 protein G 세파로오스 비드 (sepharose bead)에 대한 낮은 결합력 때문에, 세파로오스 비드 (sepharose bead)에 결합된 항-CTLA4 mAb인 4F10에 의하여 정제하였다. 정제된 4F10 항체는 생산자가 제공한 프로토콜에 따라 CNBr-활성화된 세파로오스 비드와 교차연결하였다. 4F10-세파로오스 비드 (sepharose bead)와 CTLA4와의 결합력은 1mL의 비드 슬러리 당 1mg이다. 총 2L의 배양 상층액이 단백질 정제를 위하여 1차례의 반응 당 3 mL의 4F10 세파로오스 비드를 사용하였다. 정제된 단백질은 SDS-PAGE 수행 결과 환원 조건에서는 55 KDa, 비-환원 조건에서는 110 KDa로 확인되었다 (도 4). 이러한 단백질 크기의 상승은 CHO세포에서 타겟 단백질의 글루코시레이션 때문일 것으로 판단된다.

[0085] **2-4. K397C의 B7-1과의 결합 에세이**

[0086] 정제된 K397C 단백질이 그의 타겟 분자인 B7-1(CD80)에 결합하는지를 확인하기 위하여, 다양한 함량의 정제된 단백질이 B7-1이 발현되는 P815 세포주인 P815B7-1에 첨가하였다. 유동세포계수 (flow cytometry)를 이용하여 검출하기 위하여 0.5mg의 FITC-conjugated anti-mouse IgG 항체와 함께 배양하였다. 그 결과를 도 5 및 6에 나타내었다.

- [0087] 도 5 및 도 6에 나타난 바와 같이, 평균 형광강도가 농도비례적으로 증가하였다. 특히, K397C는 야생형인 CTLA-4IgG<sub>3</sub>와 비교하여 유사한 결합효력을 보였다.
- [0088] **2-5. K397C의 MLR 반응 억제 효과**
- [0089] 면역반응에서의 K397C의 역할을 확인하기 위하여, K397C 또는 야생형인 CTLA-4IgG<sub>3</sub>를 MHC-disparate allogeneic (BALB/c 및 C57BL/6) MLR 조건에 첨가하였다. 그 결과를 도 7에 나타내었다.
- [0090] 도 7에 나타난 바와 같이, 음성대조군에서는 시간 의존적으로 CPM 값 (count per minute, proliferation index)이 증가하였으나, K397C (0.5 ~6.0 mg) 처리시, 성장 반응이 농도의존적으로 현저하게 감소하였다. 이러한 결과를 통해 K397C가 T 세포 증식 억제 효과를 가지고 있음을 확인하였다.
- [0091] **2-6. K397C의 리포솜과의 결합 효율**
- [0092] 단백질이 지질 비히클 (예, 리포솜)에 공유결합하는 몇 가지 방법이 종래 개시된 바가 있다. 단백질에 리포솜을 결합하는 방법 중 하나는 헤테로이기능시약 (heterobifunctional reagent)인 SATA(succinimidy-S-actylthioacetate) 및 4MPB-PE(4-(p-phenylbutyryl)phosphatidyl ethanolamine)을 이용한 티올화 (thiolation)이다. 상기 방법을 이용하여 K397C 또는 야생형인 CTLA-4IgG<sub>3</sub>(1.3 mg) 을 리포솜에 결합하였다. 리포솜과의 결합 후, 결합효율은 양적 SDS-PAGE를 이용하여 측정하였다. 그 결과를 도 8 및 표 1에 나타내었다.
- [0093] 아래는 CTLA-4IgG<sub>3</sub>에 사용된 기본 방정식이다.
- [0094]  $y=7 \times 10^6 x-437870$
- [0095] y는 단백질의 강도, x는 단백질의 질량.
- [0096] 또한, CTLA-4IgG<sub>3</sub> 리포솜 및 K397C 리포솜에서의 CTLA-4IgG<sub>3</sub>의 질량을 계산하기 위하여, 아래의 식을 이용하였다.
- [0097]  $x=y/7 \times 10^6 +437870$
- [0098] 또한, CTLA-4IgG<sub>3</sub> 분자는 아래의 식을 이용하여 계산하였다.
- [0099] CTLA-4IgG<sub>3</sub> 의 분자=(CTLA-4IG<sub>3</sub> × 10<sup>-4</sup>의 질량/분자량) × 6.02 × 10<sup>23</sup>

표 1

	CTLA-4IgG <sub>3</sub> liposomes	K397C liposomes
Mass of protein	0.424033	0.971426
Molecules of CTLA-4Ig	4.4 x 10 <sup>12</sup>	1.0 x 10 <sup>13</sup>
Loading volume (μL)	2.5	2.5
nmole/μL of lipid	1.82	4.87
nmol of lipid	4.55	12.175
the number of 100 nm liposomes	2.4 x 10 <sup>16</sup>	6.4 x 10 <sup>16</sup>
CTLA-4Ig per liposomes	183	156
ug of CTLA-4Ig per liposomes	0.169613	0.388571
Total volume of liposome complex (mL)	5.1	3.26
Total amounts of CTLA-4Ig (ug)	865.0274	1266.74

[0100]

[0101]

도 8 및 표 1에 나타난 바와 같이, 리포솜 샘플의 인산염 (또는 지질)의 양은 포스파타아제 에세이 (phosphatase assay)를 통하여 결정된 알려진 양을 가지고 있었다. 리포솜의 크기는 100 nm이며, 1 지질 머리 (lipid head group)의 부분은 50 Å<sup>2</sup>이며, 지질 이중층의 두께는 5 nm이며, 하나의 리포솜에서 지질의 수는 113,725 lipid 정도였다. 이에 따라, 리포솜의 수를 계산하기 위하여 이 샘플의 지질의 몰량에 따른 아보가드로 수 및 지질:리포솜의 비율이 사용되었다. 결론적으로, CTLA-4IgG<sub>3</sub> 리포솜 및 K397C 리포솜에서, 하나의 리포솜 당 CTLA-4IgG<sub>3</sub> 분자는 각각 183 및 156 분자로 확인되었다. 특히, K397C 리포솜의 CTLA-4IgG<sub>3</sub> 총질량은 1.267 mg였다. K397C 1.3mg의 K397C 단백질이 결합에 사용된 것을 보면, 대부분의 모든 K397C이 리포솜과 결합됨을 알 수 있다. 이러한 결과는 K397C가 리포솜의 말레이미드 (maleimide)와 직접적으로 결합함에 따라 야생형인 CTLA-4IgG<sub>3</sub>보다 높은 결합 효율을 나타냄을 확인하였다.

[0102]

2-7. K397C 리포솜의 P815B7-1과의 결합 확인

[0103]

P815 B7-1 세포를 62.5 μg/mL 농도의 자유 CTLA-4IgG<sub>3</sub> 또는 K397C 리포솜과 선배양한 뒤, 4°C에서 CTLA-4IgG<sub>3</sub> W-FITC과 후배양하였다. 이것은 높은 농도의 CTLA-4IgG<sub>3</sub>-FITC와 경쟁될 P815B7-1 세포의 블록되지 않고 남은 B7-1 리간드 혹은 선결합된 B7 조각을 모니터링하기 위한 것이다. 그 결과를 도 9에 나타내었다.

[0104]

도 9에 나타난 바와 같이, P815B7-1 세포에 결합한 CTLA-4IgG<sub>3</sub>-FITC는 하나의 피크를 나타내고 있다 (도 9의 오렌지색). CTLA-4IgG<sub>3</sub>-FITC는 B7-1을 발현하지 않는 P815 세포에는 결합하지 않았다. 이것은 CTLA-4IgG<sub>3</sub>-FITC가 B7-1에 특이적인 방법으로 결합함을 확인한 결과이다. 또한, 62.5 mg/mL의 K397C 리포솜과 선배양한 P815B7.1는 추가적인 CTLA-4IgG<sub>3</sub>-FITC의 B7-1에의 결합이 블록됨에 반하여 (도 9의 빨간색 피크), 62.5 mg/mL의 자유 CTLA-4IgG<sub>3</sub>와 함께 선배양한 경우 B-7에의 결합이 부분적으로 블록되었다(도 9의 파란색). 이러한 결과를 통하여, K397C 리포솜이 야생형인 자유 CTLA-4IgG<sub>3</sub>보다 B-7에 높은 결합효율을 가지고 있음을 확인하였다.

[0105]

또한, 농도의존성 및 자유 CTLA-4IgG<sub>3</sub>와 비교한 결합활성을 확인하기 위하여, P815 B7-1 세포를 다양한 농도의 자유 CTLA-4IgG<sub>3</sub>, CTLA-4IgG<sub>3</sub> 리포솜 또는 K397C 리포솜과 선배양한 후, CTLA-4IgG<sub>3</sub>-FITC로 염색하였다. 그 결과를 도 10에 나타내었다.

[0106] 도 10에 나타낸 바와 같이, P815 B7-1 세포에 10 mL의 CTLA-4IgG<sub>3</sub>-FITC의 부과는 유세포분석에서 100%에 가까운 FITC 염색을 나타내었다. 염색 컨트롤의 %는 P815 B7-1세포의 B7-1에 CTLA-4IgG<sub>3</sub>-FITC의 결합 경쟁 수준을 나타낸 것이다. CTLA-4IgG<sub>3</sub>-FITC로 모니터링 하였을 때(도 10에서 검은색의 채워진 사각형), 약 190 mg/mL 농도에서 자유 CTLA-4IgG<sub>3</sub>는 세포 표면의 B7-1 분자의 50%를 블록하였다. 각각 50 mg/mL (도 10에서 파란색 채워진 삼각형)과 2.5mg/mL (도 10에서 빨간색 채워진 삼각형)에서 CTLA-4IgG<sub>3</sub> 리포솜과 K397C 리포솜은 50%의 경쟁을 나타내었다. 이러한 결과를 통하여, K397C 리포솜이 CTLA-4IgG<sub>3</sub> 또는 CTLA-4IgG<sub>3</sub> 리포솜에 비하여 현격한 블로킹 효과를 보임을 확인하였다. 특히, K397C 리포솜은 자유 CTLA-4IgG<sub>3</sub>에 비하여 100배의 높은 결합 효율을 가지고 있었다. 이는 리포솜 표면의 IgG의 방향성에의 다가 리간드 효과 (multivalent ligand effect)를 통한 것으로 예상된다.

[0107] **2-8. K397C 리포솜으로 인한 동종이계(allogeneic) MLR의 봉쇄 효과**

[0108] APC의 B7에 대한 K397C 리포솜의 블로킹 효과 및 그에 의한 T 세포 활성화 및 성장 저해를 확인하였다. 이를 위하여 동종이계 혼합림프구반응 (allogeneic mixed lymphocyte reaction, allogeneic MLR)이 수행하였다. 다양한 농도의 자유 CTLA-4IgG<sub>3</sub>, CTLA-4IgG<sub>3</sub> 리포솜, 또는 K397C 리포솜을 BALB/c 마우스의 방사선 조사된 비장 세포와 함께 혼합하였으며, T 세포의 <sup>3</sup>H-티미딘 (thymidine)의 C57BL/6 비장세포에의 용합을 모니터링하였다. 그 결과를 도 11에 나타내었다.

[0109] 도 11에 나타난 것과 같이, 72시간의 혼합 림프구 배양에서, <sup>3</sup>H-티미딘은 K397C 리포솜에 의하여 효과적으로 흡수가 억제되었으며, K397C 리포솜의 농도에 의존적으로 증가하였다. 특히, K397C 리포솜은 자유 CTLA-4IgG<sub>3</sub>와 CTLA-4IgG<sub>3</sub> 리포솜보다 T세포의 성장 억제에 높은 효과를 나타내었다.

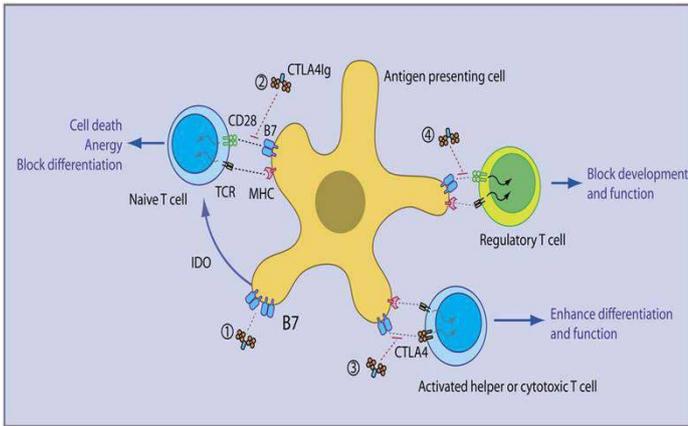
[0110] **2.9. 동종 췌도 이식모델에서의 이식 거부반응의 비교.**

[0111] Balb/c 마우스의 췌도에서 인슐린의 분비하는 췌도(islet)를 분리하고, STZ를 처리하여 당뇨를 유발시킨 C57BL/6 마우스의 신장 캡슐에 이식한 후, K397C와 K397C 리포솜을 투여하였다. K397C와 K397C 리포솜은 이식 당일(day 0)부터 2주 간 격일로 투여하였다 (0,2,4,6,8,10,12,14 일). 이식받은 마우스의 꼬리 끝에서 혈액을 소량 얻어 혈당을 측정하고, 혈당이 250mg/dl을 2일 연속으로 넘어가면 거부반응이 왔다고 판정하였다. 그 결과를 도 12에 나타내었다.

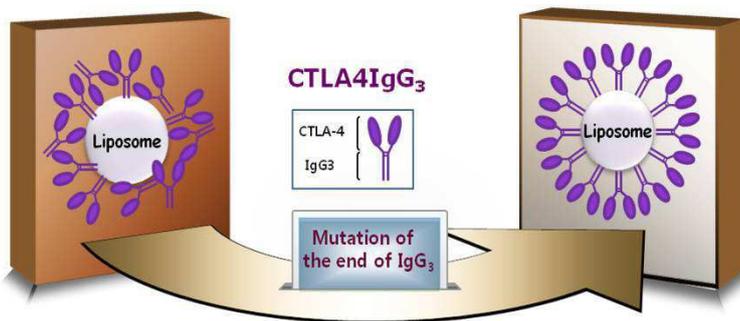
[0112] 도 12에 나타낸 바와 같이, K397C 리포솜은 K397C에 비해 이식 거부반응이 나타나지 않음을 확인하였다.

도면

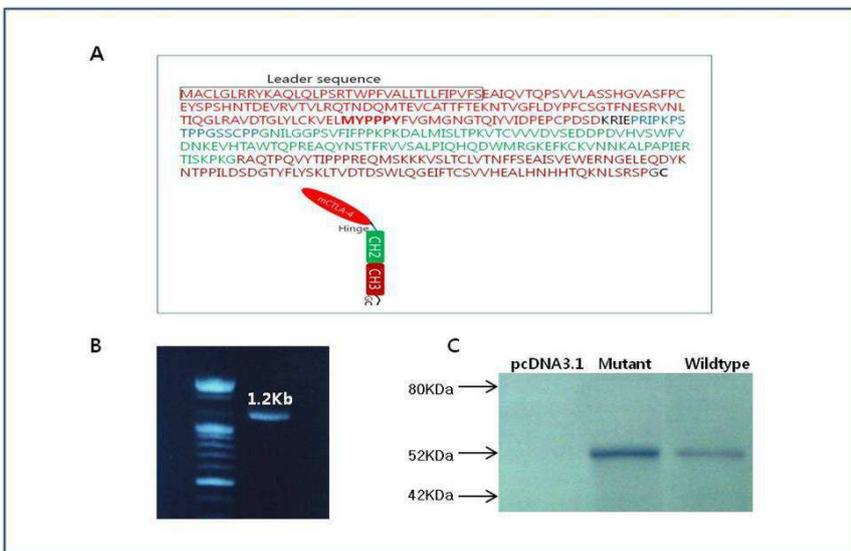
도면1



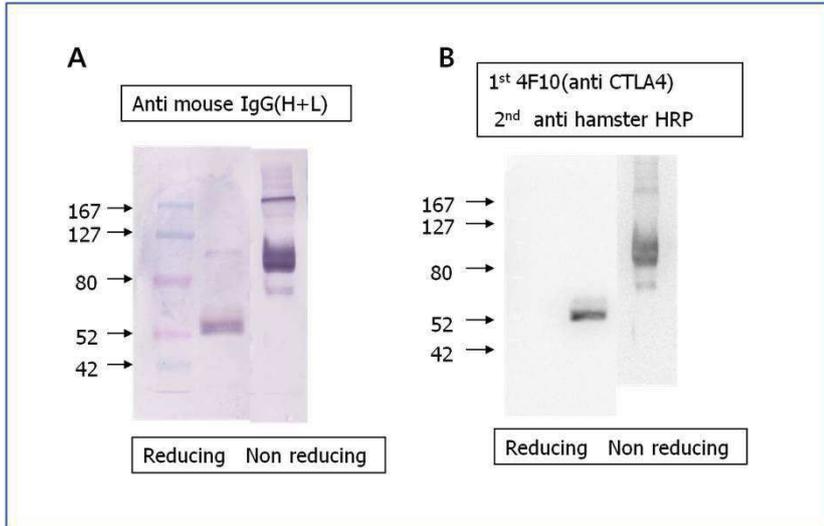
도면2



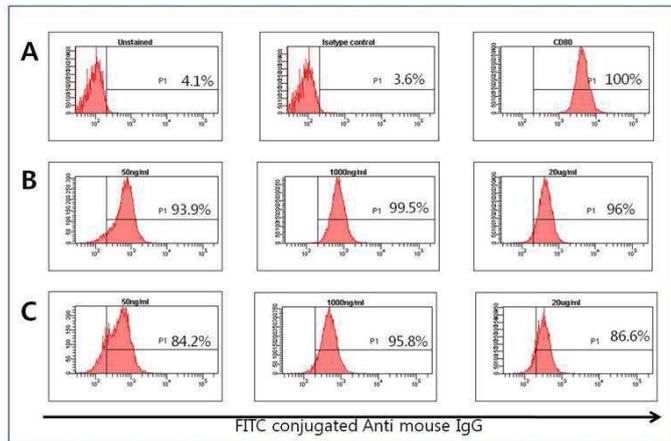
도면3



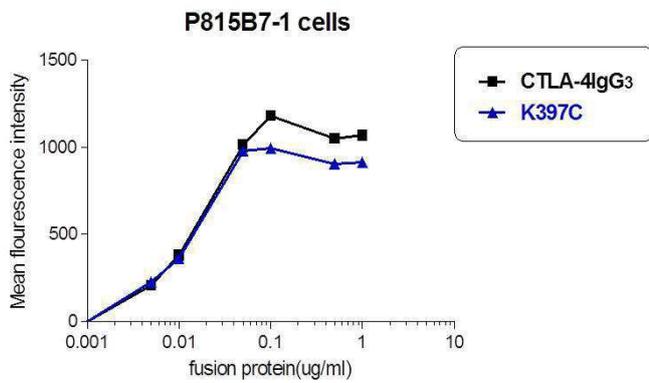
도면4



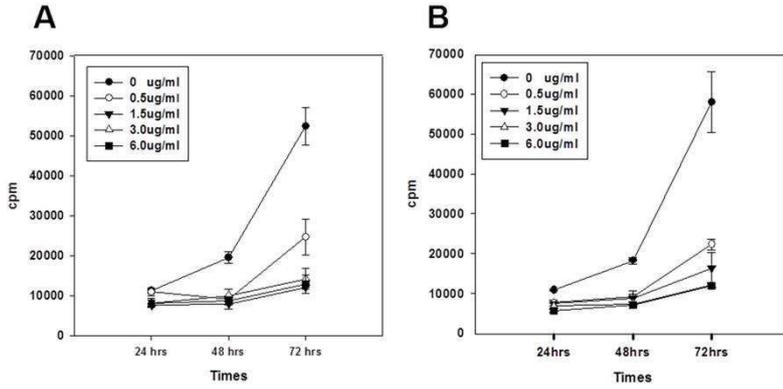
도면5



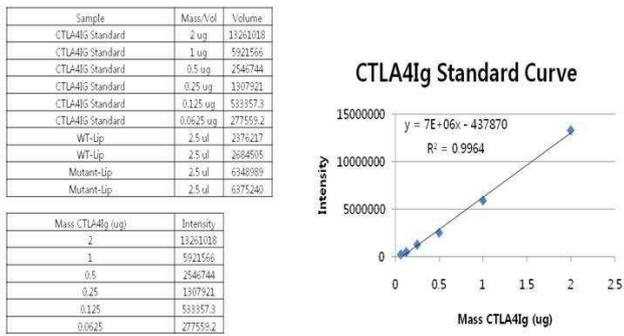
도면6



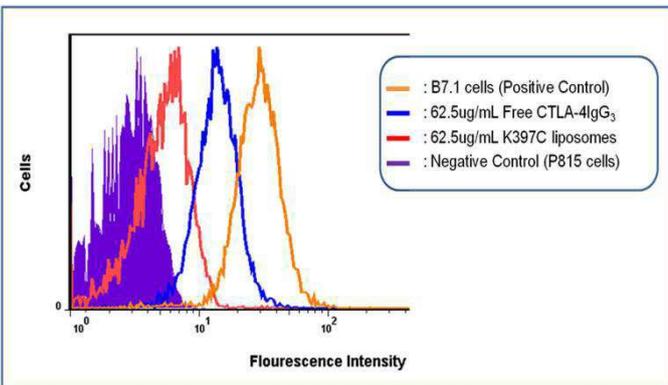
도면7



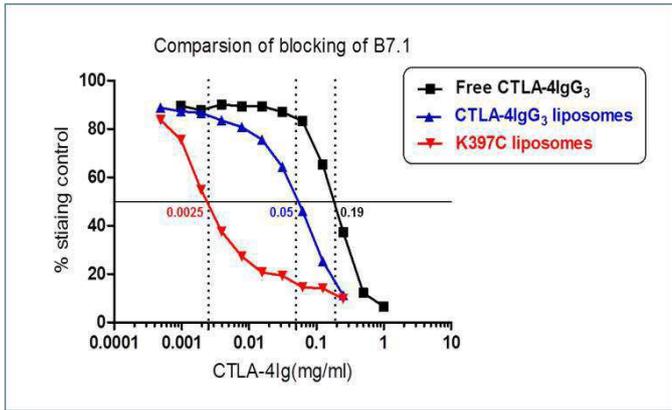
도면8



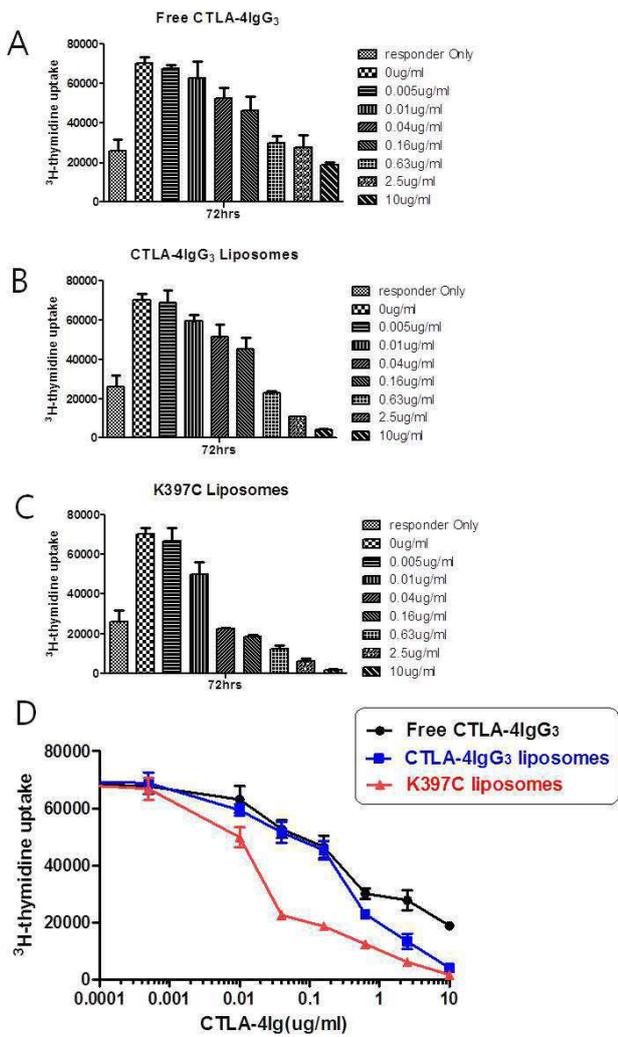
도면9



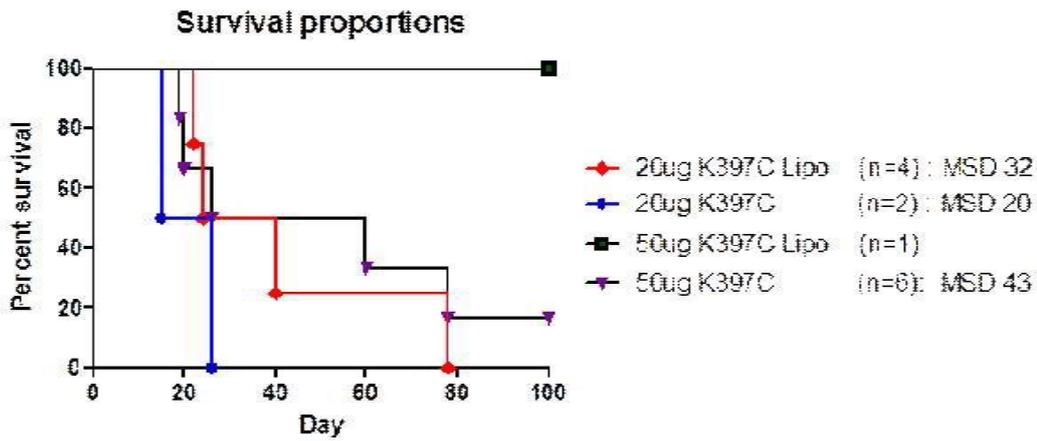
도면10



도면11



도면12



서열목록

<110> SNU R&DB FOUNDATION

<120> Novel CTLA-4IgG (cytotoxic T lymphocyte antigen 4-Immunoglobulin G) fusion protein

<160> 3

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer-Sense

<400> 1

gtggtacctt taatgaaa 18

<210> 2

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer-Antisense

<400> 2

gctctagagc tgtttcacaac aaccagggga gcga 34

<210> 3

<211> 397

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CTLA-IgG

<400> 3

Met Ala Cys Leu Gly Leu Arg Arg Tyr Lys Ala Gln Leu Gln Leu Pro  
 1 5 10 15  
 Ser Arg Thr Trp Pro Phe Val Ala Leu Leu Thr Leu Leu Phe Ile Pro  
 20 25 30  
 Val Phe Ser Glu Ala Ile Gln Val Thr Gln Pro Ser Val Val Leu Ala  
 35 40 45  
 Ser Ser His Gly Val Ala Ser Phe Pro Cys Glu Tyr Ser Pro Ser His  
 50 55 60  
 Asn Thr Asp Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Thr Asn Asp Gln  
 65 70 75 80  
 Met Thr Glu Val Cys Ala Thr Thr Phe Thr Glu Lys Asn Thr Val Gly  
 85 90 95  
 Phe Leu Asp Tyr Pro Phe Cys Ser Gly Thr Phe Asn Glu Ser Arg Val  
 100 105 110  
 Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Val Asp Thr Gly Leu Tyr Leu  
 115 120 125  
 Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Phe Val Gly Met Gly  
 130 135 140  
 Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser  
 145 150 155 160  
 Asp Lys Arg Ile Glu Pro Arg Ile Pro Lys Pro Ser Thr Pro Pro Gly  
 165 170 175  
 Ser Ser Cys Pro Pro Gly Asn Ile Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile  
 180 185 190  
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Ala Leu Met Ile Ser Leu Thr Pro Lys  
 195 200 205  
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val His  
 210 215 220  
 Val Ser Trp Phe Val Asp Asn Lys Glu Val His Thr Ala Trp Thr Gln

225                      230                      235                      240  
 Pro Arg Glu Ala Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Ala Leu  
                                  245                      250                      255  
 Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Arg Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys  
                                  260                      265                      270  
  
 Val Asn Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys  
                                  275                      280                      285  
 Pro Lys Gly Arg Ala Gln Thr Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro  
                                  290                      295                      300  
 Arg Glu Gln Met Ser Lys Lys Lys Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Thr  
 305                      310                      315                      320  
 Asn Phe Phe Ser Glu Ala Ile Ser Val Glu Trp Glu Arg Asn Gly Glu  
                                  325                      330                      335  
 Leu Glu Gln Asp Tyr Lys Asn Thr Pro Pro Ile Leu Asp Ser Asp Gly  
  
                                  340                      345                      350  
 Thr Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Thr Asp Ser Trp Leu  
                                  355                      360                      365  
 Gln Gly Glu Ile Phe Thr Cys Ser Val Val His Glu Ala Leu His Asn  
                                  370                      375                      380  
 His His Thr Gln Lys Asn Leu Ser Arg Ser Pro Gly Cys  
 385                      390                      395