(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2021 년 5 월 27 일 (27.05.2021)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2021/101273 A2

(51) 국제특허분류:
C12N 5/0783 (2010.01) *A61P 29/00* (2006.01)
A61K 35/17 (2014.01) *A61P 19/02* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2020/016382

(22) 국제출원일: 2020 년 11 월 19 일 (19.11.2020)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2019-0149779 2019 년 11 월 20 일 (20.11.2019) KR
10-2020-0033229 2020 년 3 월 18 일 (18.03.2020) KR

(71) 출원인: 주식회사 지아이셀 (**GI CELL, INC.**) [KR/KR]; 13201 경기도 성남시 중원구 갈마치로288번길 14, 비동 1553호, Gyeonggi-do (KR).

(72) 발명자: 장명호 (**JANG, Myung Ho**); 03770 서울시 서대문구 북아현로 1길, 50, 101동902호, Seoul (KR). 홍천표 (**HONG, Chun-Pyo**); 13643 경기도 성남시 수정구 위례순환로 220, 5512동 101호, Gyeonggi-do (KR). 김채하 (**KIM, Chea Ha**); 08773 서울시 관악구 남부순환로 164길 6, 3층, Seoul (KR). 김혜리 (**KIM, Hye Ri**); 07275 서울시 영등포구 선유서로25길 19, 103동 302호, Seoul (KR).

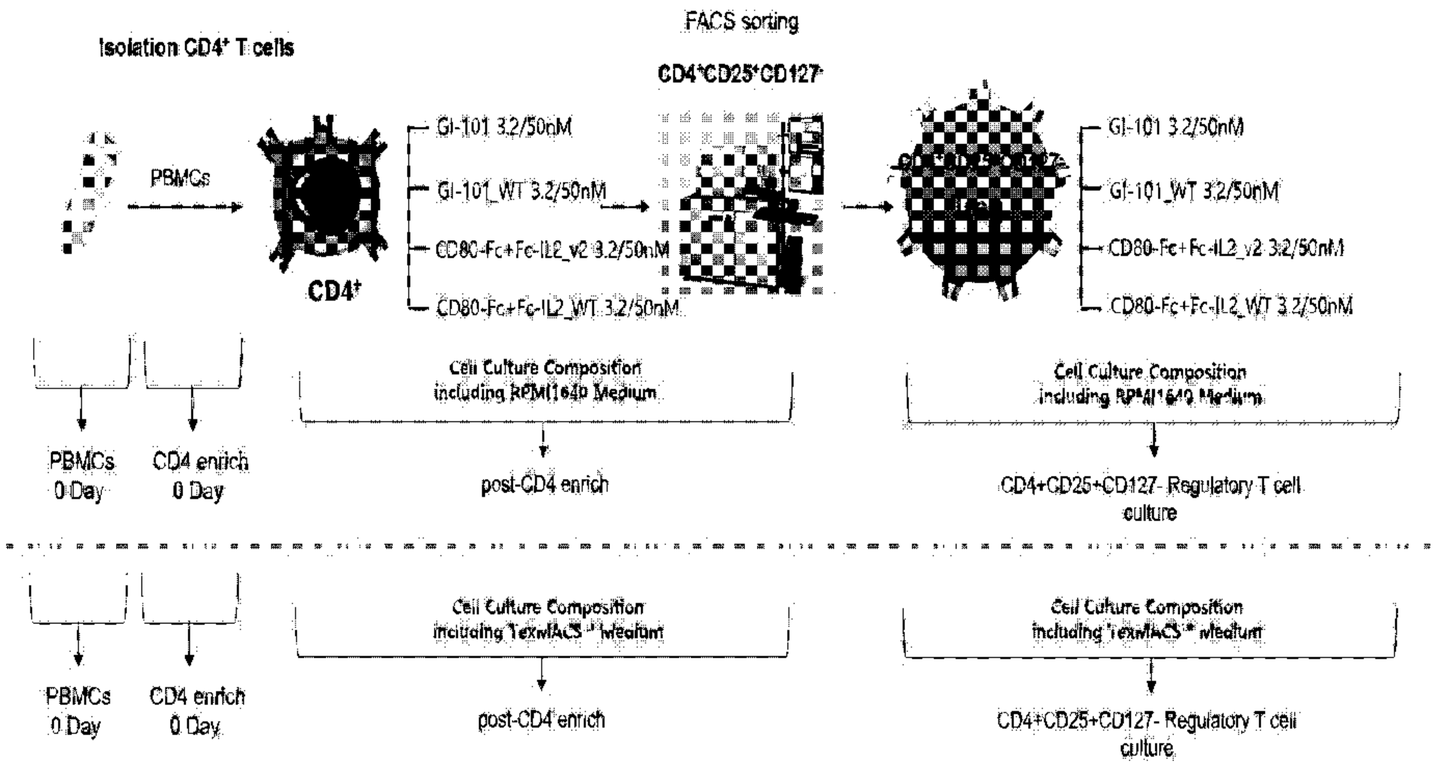
(74) 대리인: 류종우 등 (**RYU, Jong Woo** et al.); 06160 서울시 강남구 테헤란로69길 13, 명지빌딩 4층 선정국제특허법률사무소, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유

(54) **Title:** COMPOSITION FOR CULTURING REGULATORY T CELLS AND USE THEREOF

(54) **발명의 명칭:** 조절 T 세포 배양용 조성물 및 이의 용도



(57) **Abstract:** The present invention relates to a method for effectively proliferating regulatory T cells, by which, particularly, in the presence of a fusion protein dimer comprising IL-2 protein or a variant thereof and CD80 protein or a fragment thereof, CD4+, CD25+, and CD127- T cells can be effectively proliferated. In particular, when combined with a predetermined cell culture medium, regulatory T cells such as CD4+, CD25+, and CD127- can be effectively and specifically proliferated. In addition, when the method is used, it has been confirmed that the survival rate of regulatory T cells is remarkably increased as compared to a conventionally used culture method using IL-2, and a significant increase in the yield of Foxp3+ regulatory T cells has been confirmed. Thus, such a proliferation method can be used in the field of cell therapeutic agents using regulatory T cells.

(57) **요약서:** 본 발명은 조절 T 세포를 효과적으로 증식시키는 방법에 관한 것으로, 구체적으로, IL-2 단백질 또는 이의 변이체 및 CD80 단백질 또는 이의 단편을 포함하는 융합단백질 이량체 존재하에, CD4+, CD25+ 및 CD127- T 세포를 효과적으로 증식시킬 수 있다. 특히, 소정의 세포 배양 배지와 조합할 경우, 효과적으로 CD4+, CD25+ 및 CD127- 와 같은 조절 T 세포를 특이적으로 증식시킬 수 있다. 또한, 상기 방법을 이용할 경우 종래 이용했던 IL-2 를 이용한 배양법에 비해 조절 T 세포의 생존율이 현격히 증가함을 확인하였고, Foxp3+ 조절 T 세포의 수득량이 현저히 증가함을 확인하였다. 따라서, 이러한 증식 방법은 조절 T 세포를 이용한 세포 치료제 분야에 활용될 수 있다.

[다음 쪽 계속]

WO 2021/101273 A2

럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 조절 T 세포 배양용 조성물 및 이의 용도

기술분야

[1] 본 발명은 T 세포 배양을 위한 배양용 조성물 및 이를 이용한 조절 T 세포 배양 방법에 관한 것이다.

배경기술

[2] T 세포는 세포-매개 면역에서 중심적인 역할을 한다. T 세포는 T 세포 수용체(TCR)와 같은 T 세포 표면에 존재하는 수용체에 의해, B 세포를 비롯한 다른 림프구와 구분될 수 있다. 또한, T 세포는 도움 T 세포(TH 세포), 세포독성 T 세포(TC 세포, 또는 CTL), 중앙 메모리 T 세포(TCM 세포) 및 이펙터 메모리 T 세포(TEM 세포)가 포함되는 메모리 T 세포(TM 세포), 내츄럴 킬러(Natural killer) T 세포(NKT 세포), 감마 델타 T 세포(γδT 세포), 및 조절 T 세포(Treg 세포)와 같이 다양한 종류의 T 세포를 포함한다.

[3] 이중, 조절 T 세포(Treg)는 다른 세포의 면역 응답을 억제하는 작용을 하는 T 세포이다. 예를 들어, Treg 세포는 면역 반응 동안 T 세포-매개 면역을 억제하며, 흉선의 음성 선별 과정에서 탈출한 자가-반응성 T 세포를 억제하는 역할을 한다. Treg 세포는 크게 자연 조절 T 세포(natural regulatory T cells, nTreg) 및 유도 조절 T 세포(induced regulatory T cells, iTreg)로 구분될 수 있다. CD4+CD25+FoxP3+ 조절 T 세포로 알려진 자연 조절 T 세포는 흉선에서 생겨난다. 유도 조절 T 세포는 천연 발생 Treg 세포와 다수의 속성을 공유하지만, CD4+CD25-FoxP3- T 세포들로부터 CD4+CD25+FoxP3+ 조절 T 세포로 전환되는 특징이 대표적인 차이점으로 알려져 있다.

[4] 이처럼 각종 자가면역체계의 이상에 의해 발생되는 질병과 관련하여, 조절 T 세포의 중요성에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 1970년대 초 Gershon에 의해 억제 T 세포라는 개념을 도입하여 처음으로 제시된 이래(R K Gershon and K Kondo, Immunology, 1970, 18: 723-37), 면역학의 많은 분야에서 조절 T 세포의 생물학적 특성 및 기능을 규명하기 위한 연구가 이루어져 왔다. 특히, 1995년 Sakaguchi에 의해 CD25가 자연 발생 CD4+ 조절 T 세포의 중요한 표현형 마커로서 작용할 수 있음이 제시된 이래(S Sakaguchi et, al., J Immunol, 1995, 155: 1151-1164), 자가 항원(self-antigen)에 대한 말초 관용(peripheral tolerance)의 유도에 있어 조절 T 세포가 갖는 역할과 중요성에 대한 연구가 중점적으로 수행되었다.

[5] 조절 T 세포는 면역억제성 사이토카인으로 알려진 IL-10, TGF-β, IL-35 등을 분비할 수 있다고 알려져 있다(H Nishikawa et, al., Int. J. Cancer, 2010, 127: 759-767). 면역억제성 사이토카인을 분비하는 조절 T 세포는 IL-10 등을 분비하여 자가 면역 질환의 원인이 되는 항원 특이적 T 세포를 면역 관용성 항원

제시 세포로 유도함으로써, 면역학적으로 내성을 유도할 수 있음을 증명하는 연구가 진행되고 있다(S. Karumuthil-Melethil et, al., Diabetes, 2015, 64:1341-1357).

[6] 이와 같이 조절 T 세포의 자가면역 질환을 치료하는 용도는 많이 알려져 있지만, 이를 효과적으로 사용하기 위하여 증폭시킬 수 있는 구체적인 방법은 아직까지 부족한 상황이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[7] 따라서, 본 발명자들은 조절 T 세포를 효과적으로 배양하는 방법에 대해 연구한 결과, IL-2 단백질과 CD80 단백질을 한 분자 내에 포함하는 신규한 융합단백질 이량체가 조절 T 세포를 효과적으로 증식시킬 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

과제 해결 수단

[8] 상기 목적 달성을 위해, IL-2 단백질 또는 이의 변이체 및 CD80 단백질 또는 이의 단편을 포함하는 융합단백질 이량체를 유효성분으로 포함하는 조절 T 세포 배양용 조성물 또는 배지를 제공한다.

[9] 또한, IL-2 단백질 또는 이의 변이체 및 CD80 단백질 또는 이의 단편을 포함하는 융합단백질 이량체를 이용한 조절 T 세포 배양 방법을 제공한다.

[10] 또한, IL-2 단백질 또는 이의 변이체 및 CD80 단백질 또는 이의 단편을 포함하는 융합단백질 이량체가 포함된 배지에서 배양된 조절 T 세포를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[11] 본 발명의 배양 조성물을 이용할 경우, T 세포를 효과적으로 증식시킬 뿐 아니라, 특히, 조절 T 세포를 효과적을 증식시킬 수 있다. 특히, 종래에 활용했던 IL-2를 이용한 배양법에 비해 조절 T 세포의 생존율이 현격히 증가함을 확인하였다. 뿐만 아니라, 수득된 조절 T 세포에서 Foxp3+ 발현량이 증가함을 확인하였다. 따라서, 이러한 증식 방법은 조절 T 세포를 이용한 세포 치료제 분야에 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[12] 도 1a은 본 발명에서 사용된 융합단백질 이량체의 모식도를 나타낸 것이다.

[13] 도 1b는 수득한 융합단백질 이량체(GI-101)를 SDS-PAGE로 확인한 것이다.

[14] 도 1c는 흡광도에 따른 융합단백질 이량체(GI-101)의 함량을 나타낸 것이다.

[15] 도 1d는 수득한 융합단백질 이량체(GI-101)를 크기 배제 크로마토그래피(SEC)로 분석한 것이다.

[16] 도 2a는 수득한 hCD80-Fc 융합단백질 이량체를 SDS-PAGE로 확인한 것이다.

[17] 도 2b는 수득한 hCD80-Fc 융합단백질 이량체를 크기 배제 크로마토그래피(SEC)로 분석한 것이다.

[18] 도 3a는 수득한 Fc-IL2v2 융합단백질 이량체를 SDS-PAGE로 확인한 것이다.

[19] 도 3b는 수득한 Fc-IL2v2 융합단백질 이량체를 크기 배제 크로마토그래피(SEC)로 분석한 것이다.

[20] 도 3c는 수득한 Fc-IL2wt 융합단백질 이량체를 SDS-PAGE로 확인한 것이다.

[21] 도 3d는 수득한 Fc-IL2wt 융합단백질 이량체를 크기 배제 크로마토그래피(SEC)로 분석한 것이다.

[22] 도 4a는 수득한 hCD80-Fc-IL2wt 융합단백질 이량체를 SDS-PAGE로 확인한 것이다.

[23] 도 4b는 수득한 hCD80-Fc-IL2wt 융합단백질 이량체를 크기 배제 크로마토그래피(SEC)로 분석한 것이다.

[24] 도 5는 융합단백질 이량체를 이용하여 Treg 세포를 배양하는 방법에 관한 모식도를 나타낸 것이다.

[25] 도 6은 RPMI1640 배지 포함 조성물에서 배양된 조절 T 세포의 수를 나타낸 것이다.

[26] 도 7은 RPMI1640 배지 포함 조성물에서 배양된 조절 T 세포의 생존률을 나타낸 것이다.

[27] 도 8은 TexMACS 배지 포함 조성물에서 배양된 조절 T 세포의 수를 나타낸 것이다.

[28] 도 9는 TexMACS 배지 포함 조성물에서 배양된 조절 T 세포의 생존률을 나타낸 것이다.

[29] 도 10은 RPMI1640 배지 포함 조성물을 이용하여 배양한 조절 T 세포의 IL-10 분비능을 나타낸 것이다.

[30] 도 11은 TexMACS 배지 포함 조성물을 이용하여 배양한 조절 T 세포의 IL-10 분비능을 나타낸 것이다.

[31] 도 12a 및 도 12b는 최적화 공정에서 RPMI1640 배지를 포함한 조성물에서 배양시 증식된 조절 T 세포의 수를 나타낸 것이다.

[32] 도 13a 및 도 13b는 최적화 공정에서 RPMI1640 배지를 포함한 조성물에서 배양시 조절 T 세포의 생존률을 나타낸 것이다.

[33] 도 14a 및 도 14b는 최적화 공정에서 TexMACS 배지를 포함한 조성물에서 배양시 조절 T 세포의 수를 나타낸 것이다.

[34] 도 15a 및 도 15b는 최적화 공정에서 TexMACS 배지를 포함한 조성물에서 배양시 조절 T 세포의 생존률을 나타낸 것이다.

[35] 도 16a 내지 도 16c는 최적화 공정에서 RPMI1640 배지를 포함한 조성물에서 배양된 세포의 특성을 FACS로 분석한 결과를 나타낸 것이다.

[36] 도 17a 내지 도 17c는 최적화 공정에서 RPMI1640 배지를 포함한 조성물에서 배양시 Foxp3가 발현된 조절 T 세포의 수를 나타낸 것이다.

[37] 도 18a 내지 도 18c는 최적화 공정에서 TexMACS 배지를 포함한 조성물에서 배양된 세포의 특성을 FACS로 분석 결과를 나타낸 것이다.

[38] 도 19a 내지 도 19c는 최적화 공정에서 TexMACS 배지를 포함한 조성물에서

배양시 Foxp3가 발현된 조절 T 세포의 수를 나타낸 것이다.

[39] 도 20은 최적화 공정에서 RPMI1640 배지를 포함한 조성물에서 배양된 조절 T 세포의 IL-10 분비능을 나타낸 것이다.

[40] 도 21은 최적화 공정에서 TexMACS 배지를 포함한 조성물에서 배양된 조절 T 세포의 IL-10 분비능을 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[41] **조절 T 세포 증식용 조성물 및 배지**

[42] 본 발명의 일 측면으로, IL-2 단백질 또는 이의 변이체 및 CD80 단백질 또는 이의 단편을 포함하는 융합단백질 이량체를 유효성분으로 포함하는 조절 T 세포 증식용 조성물을 제공한다. 또한, 상기 융합단백질 이량체를 유효성분으로 포함하는 조절 T 세포 증식용 배지를 제공한다.

[43] 상기 조절 T 세포 증식용 배지는 T 세포 배양용 배지에 상기 IL-2 단백질 또는 이의 변이체 및 CD80 단백질 또는 이의 단편을 포함하는 융합단백질 이량체가 첨가된 배지일 수 있다. 이때, 상기 T 세포 배양용 배지는 아미노산(amino acids), 당류(sugars), 무기염(inorganic salts) 및 비타민으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나를 포함할 수 있다. 바람직하게는 상기 T 세포 배양용 배지는 아미노산, 당류, 무기염 및 비타민을 모두 포함하는 것일 수 있다. 또한, 상기 배지는 추가적으로, FBS(Fetal Bovine Serum), HEPES(Hydroxyethyl piperazine Ethane Sulfonicacid), 단백질, 탄수화물, 머캅토에탄올, 성장인자를 더 포함할 수 있다. 또한, 상기 조절 T 세포 배양용 배지는 레티노익산(retinoic acid)을 더 포함할 수 있다. 일 구체예로는 상기 조절 T 세포 증식용 배지는 하기 표 3 또는 표 4의 기본 성분을 포함할 수 있다.

[44] 본 명세서에서 사용된 용어, "세포 배양용 배지"는 세포를 배양하기 위해 사용된 배지를 의미하며, 구체적으로 조절 T 세포, 보다 구체적으로 CD4+CD25+CD127- 세포를 배양하기 위한 배지를 의미한다. 시험관 내에서(*in vitro*) 세포 성장 및 생존을 위해 세포가 필요로 하는 성분을 함유하거나, 세포 성장 및 생존을 돕는 성분을 함유한다. 구체적으로, 상기 성분은 비타민, 필수 또는 비필수 아미노산, 및 미량 원소일 수 있다. 상기 배지는 세포, 바람직하게는 진핵세포, 더 바람직하게는 조절 T 세포, 보다 더 바람직하게는 CD4+CD25+CD127- T 세포 또는 CD4+CD25+Foxp3+ T 세포의 배양에 사용되는 배지일 수 있다.

[45] 본 발명에 따른 상기 세포배양배지는 아미노산 성분, 비타민 성분, 무기염 성분, 기타 성분 및 정제수로 구성되며,

[46] a) 상기 아미노산 성분은 글리신, L-알라닌, L-발린, L-류신, L-이소류신, L-트레오닌, L-세린, L-시스테인, L-메티오닌, L-아스파르트산, L-아스파라긴, L-글루탐산, L-글루타민, L-리신, L-아르기닌, L-히스티딘, L-페닐알라닌, L-티로신, L-트립토판, L-프롤린, β-알라닌, 膨-아미노부티르산, 오르니틴,

시트룰린, 호모세린, 트리요드티로신, 티록신 및 디옥시페닐알라닌으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 아미노산 또는 이의 조합이고, 바람직하게는, 글리신, L-알라닌, L-아르기닌, L-시스테인, L-글루타민, L-히스티딘, L-라이신, L-메티오닌, L-프롤린, L-세린, L-트레오닌 및 L-발린으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 아미노산 또는 이의 조합이며,

[47] b) 상기 비타민 성분은 바이오틴, D-판토텐산칼슘, 엽산, 나이아신아미드, 피리독신 하이드로클로라이드, 리보플라빈, 티아민 하이드로클로라이드, 비타민 B12, 염화콜린, i-이노시톨 및 아스코르브산으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 비타민 또는 이의 조합이고, 바람직하게는, i-이노시톨, 티아민 하이드로클로라이드, 나이아신아마이드 및 피리독신 하이드로클로라이드로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나 이상의 비타민 또는 이의 조합이며,

[48] c) 상기 무기염 성분은 염화칼슘($CaCl_2$)(무수), 황산동 펜타하이드레이트($CuSO_4$-$5H_2O$), 황산제이철 헵타하이드레이트($FeSO_4$-$7H_2O$), 염화마그네슘(무수), 황산마그네슘($MgSO_4$)(무수), 염화칼륨(KCl), 염화나트륨(NaCl), 인산수소이나트륨(Na_2HPO_4), 인산수소나트륨 모노하이드레이트(NaH_2PO_4-H_2O), 황산아연 헵타하이드레이트($ZnSO_4$-$7H_2O$), 질산제이철 노나하이드레이트($Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$) 및 탄산수소나트륨($NaHCO_3$)으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 무기염 또는 이의 조합이고, 바람직하게는, 염화나트륨(NaCl), 탄산수소나트륨($NaHCO_3$), 염화칼륨(KCl), 염화칼슘($CaCl_2$)(무수) 및 인산수소나트륨 모노하이드레이트(NaH_2PO_4-H_2O)로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 무기염 또는 이의 조합이며,

[49] d) 상기 기타 성분은 D-글루코즈 (덱스트로즈), 소듐 피루베이트, 히포크산틴 Na, 티미딘, 리놀레산, 리포산, 아데노신, 시티딘, 구아노신, 우리딘, 2'-데옥시아데노신, 2'-데옥시시티딘 HCl 및 2'-데옥시구아노신으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 기타 성분 또는 이의 조합이고, 바람직하게는, 소듐 피루베이트일 수 있다.

[50] e) 정제수는 상기 아미노산, 비타민, 무기염 및 기타 성분을 용해시키기 위해 사용되며, 1차 이상의 증류를 거쳐 수득되거나, 필터를 통해 정제된 물일 수 있다.

[51] 또한, 본 발명에 따른 상기 세포배양배지에 성장인자 또는 사이토카인을 더 포함할 수 있다. 상기 성장인자로 IGF, bFGF, TGF, HGF, EGF, VEGF 또는 PDGF 등을 단독 또는 2종 이상 사용할 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다. 상기 사이토카인으로 IL-1, IL-4, IL-6, IFN-γ, IL-10 또는 IL-17 등을 단독 또는 2종 이상 사용할 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.

[52] 본 명세서에서 사용한 용어, "T 세포"는 항원 특이적인 적응 면역을 주관하는 림프구의 하나를 의미한다. T 세포는 아직 항원을 만나지 못한 미접촉 T 세포(naive T cell)와, 항원을 만나 성숙한 T 세포, 및 기억 T 세포로 분류된다.

이때, 상기 성숙한 효과 T 세포는 도움 T 세포, 세포독성 T 세포 및 자연살상 T 세포를 포함한다.

[53] 본 명세서에서 사용한 용어, "도움 T 세포(helper T cell, 또는 Th cell)"는 다른 백혈구들의 분화 및 활성화를 조절함으로써 체액성 면역을 촉진하는 세포를 말한다. 세포 표면에 CD4 단백질을 가지고 있기 때문에, CD4+ T 세포라고도 한다. 도움 T 세포는 세부 기능에 따라 다시 Th1, Th2, Th17, Treg으로 분류될 수 있다. Th1 세포는 인터페론 감마(interferon-gamma, IFN-γ)과 종양괴사인자 베타(tumor necrosis factor beta, TNF-β)를 분비함으로써 대식세포의 내부에서 엔도솜과 리소좀이 융합하여 엔도리소좀을 형성하도록 유도한다. 한편 Th2 세포는 여러 종류의 인터루킨(interleukin, IL)을 분비하여 B 세포가 형질 세포로 분화하도록 한다. Th17 세포는 인터루킨-17(IL-17)을 분비하여 호중성백혈구를 모이게 한다.

[54] 본 명세서에서 사용한 용어, "조절 T 세포(Regulatory T cell, Treg)"는 자연 조절 T 세포(natural regulatory T cells, nTreg) 또는 유도 조절 T 세포(induced regulatory T cells, iTreg)를 포함한다. 본 명세서에서 조절 T 세포는 CD4+CD25+ T 세포, CD4+CD25+CD127low/- T 세포 또는 CD4+CD25+Foxp3+ T 세포를 포함한다. 상기 조절 T 세포는 면역 반응을 억제함으로써 면역의 항상성을 유지하며 자가면역반응 등을 차단한다.

[55] 본 명세서에서 사용한 용어, "세포독성 T 세포"는 그랜자임(granzyme)이나 퍼포린(perforin)과 같은 세포독성물질을 분비하여 바이러스에 감염된 세포나 종양 세포 등을 죽이는 세포이다. 세포 표면에 CD8 단백질을 가지고 있기 때문에 CD8 T 세포라고도 한다. 도움 T 세포와는 반대로 세포성 면역을 매개하여 바이러스 및 암세포를 제거한다.

[56] 본 명세서에서 사용한 용어, "자연살상 T 세포"는 도움 T 세포 및 세포독성 T 세포에 비해 적은 비율로 분포하는 효과 T 세포의 하나를 의미한다. 자연살상 T 세포는 세포 표면에 T 세포와 같은 T 세포 항원수용체(T cell receptor, TCR)를 가지고 있으나, NK1.1과 같은 자연살해세포 특이적인 분자도 가지고 있다. 자연살상 T 세포는 감마인터페론, 인터루킨-4 등을 분비하여 면역 반응을 조절하는 역할을 한다.

[57] 본 명세서에서 사용한 용어, "기억 T 세포"는 항원을 인지한 T 세포가 분화 및 선별 과정을 거친 뒤 장기간 생존하고 있다가 나중에 항원이 재차 침입하였을 때 빠르게 활성화되어 효과 T 세포의 기능을 할 수 있는 잠재적 능력을 가진 세포를 의미한다. naive T 세포가 항원을 만나 활성화된 상태의 세포, 또는 효과 T 세포가 인터루킨-7과 인터루킨-15의 영향을 받아 장기 생존 가능한 기억 T 세포로 분화하게 된다.

[58] 이때, 상기 IL-2 단백질 또는 이의 변이체 및 CD80 단백질 또는 이의 단편을 포함하는 융합단백질 이량체는 배양 배지 내에 1 nM 내지 2,000 nM 포함될 수 있다. 또한, 상기 이량체는 1 nM 내지 1,000 nM, 또는 1 nM 내지 500 nM로 포함될

수 있다. 또한, 상기 이량체는 2 nM 내지 300 nM, 5 nM 내지 100 nM, 10 nM 내지 80 nM, 20 nM 내지 70 nM, 또는 40 nM 내지 50 nM로 포함될 수 있다. 구체적으로, 상기 융합단백질 이량체는 배지 내에 1 nM, 3.2 nM, 10 nM, 50 nM로 포함될 수 있다.

[59] **IL-2 단백질 또는 이의 변이체 및 CD80 단백질 또는 이의 단편을 포함하는 융합단백질 이량체**

[60] 본 명세서에서 사용하는 용어, "IL-2" 또는 "인터루킨-2"는 달리 언급되지 않는 한, 포유동물, 예를 들어, 영장류(예, 인간) 및 설치류(예, 마우스 및 래트)를 포함하여 임의의 척추동물 공급원으로부터 수득한 임의의 야생형 IL-2를 의미한다. 상기 IL-2는 동물 세포에서 수득된 것일 수도 있으나, IL-2를 생산할 수 있는 재조합 세포로부터 수득된 것도 포함한다. 또한, 상기 IL-2는 야생형 IL-2 또는 이의 변이체일 수 있다.

[61] 본 명세서에서는 IL-2 혹은 이의 변이체를 총칭하여 "IL-2 단백질" 혹은 "IL-2 폴리펩티드"의 용어로 표현하기도 한다. IL-2, IL-2 단백질, IL-2 폴리펩티드, 및 IL-2 변이체는 예를 들어 IL-2 수용체(receptor)에 특이적으로 결합한다. 이 특이적인 결합은 당업자에게 알려진 방법을 통해 확인할 수 있다.

[62] 상기 IL-2의 일 구체예는 서열번호 35 또는 서열번호 36의 아미노산 서열을 가질 수 있다. 또한, 이때, 상기 IL-2는 성숙된 형태일 수 있다. 구체적으로, 상기 성숙된 IL-2는 신호서열을 포함하지 않는 것일 수 있으며, 서열번호 10의 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있다. 이때, 상기 IL-2는 야생형 IL-2의 N-말단 또는 C-말단의 일부가 결실된(truncated) 단편을 포함하는 개념으로 이용될 수 있다.

[63] 또한, 상기 IL-2의 단편은 서열번호 35 또는 서열번호 36의 아미노산 서열을 가지는 단백질의 N 말단으로부터 연속적으로 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개 또는 25개의 아미노산이 결실된 형태일 수 있다. 또한 상기 IL-2의 단편은 서열번호 35 또는 서열번호 36의 아미노산 서열을 가지는 단백질의 C 말단으로부터 연속적으로 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개 또는 25개의 아미노산이 결실된 형태일 수 있다.

[64] 본 명세서에서 사용하는 용어, "IL-2 변이체"는 전장(full-length) IL-2 또는 상술한 IL-2의 단편의 아미노산 일부가 치환된 형태를 의미한다. 즉, IL-2 변이체는 야생형 IL-2 또는 이의 단편과 다른 아미노산 서열을 가질 수 있다. 그러나, 상기 IL-2 변이체는 야생형 IL-2와 동등하거나 유사한 활성을 가질 수 있다. 여기에서, "IL-2 활성"은 예를 들어 IL-2 수용체에 특이적으로 결합하는 것을 의미할 수 있으며, 이 특이적 결합은 당업자에게 알려진 방법을 통해 측정할 수 있다.

[65] 구체적으로, 상기 IL-2 변이체는 야생형 IL-2의 아미노산 일부가 치환된 것일

수 있다. 아미노산 치환에 의한 IL-2 변이체의 일 구체예로는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 38번째, 42번째, 45번째, 61번째 및 72번째 아미노산 중 적어도 하나가 치환된 것일 수 있다.

[66] 구체적으로, 상기 IL-2 변이체는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 38번째, 42번째, 45번째, 61번째 또는 72번째 아미노산 중 적어도 어느 하나가 다른 아미노산으로 치환된 것일 수 있다. 뿐만 아니라, IL-2가 서열번호 35의 아미노산 서열의 N 말단의 일 부분이 결실된 형태일 경우, 서열번호 10의 아미노산 서열에서 상보적으로 대응되는 위치의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환될 수 있다. 예를 들어, IL-2가 서열번호 35의 아미노산을 서열을 가질 경우에, 상기 IL-2의 변이체는 서열번호 35의 아미노산 서열에서 58번째, 62번째, 65번째, 81번째 또는 92번째 아미노산 중 적어도 어느 하나가 다른 아미노산으로 치환된 것일 수 있다. 이들은 각각 서열번호 10의 아미노산 서열의 38번째, 42번째, 45번째, 61번째 및 72번째 아미노산 잔기에 각각 해당한다. 일 구체예에 따르면, IL-2 활성이 유지되는 한, 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 혹은 10개의 아미노산이 치환될 수 있다. 또 다른 구체예에 따르면, 1개에서 5개까지의 아미노산이 치환될 수 있다.

[67] 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 두 군데의 아미노산이 치환된 형태일 수 있다. 구체적으로, 상기 IL-2 변이체는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 38번째 및 42번째 아미노산이 치환된 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 38번째 및 45번째 아미노산이 치환된 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 38번째 및 61번째 아미노산이 치환된 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 38번째 및 72번째 아미노산이 치환된 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 42번째 및 45번째 아미노산이 치환된 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 42번째 및 61번째 아미노산이 치환된 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 42번째 및 72번째 아미노산이 치환된 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 45번째 및 61번째 아미노산이 치환된 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 45번째 및 72번째 아미노산이 치환된 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 61번째 및 72번째 아미노산이 치환된 것일 수 있다.

[68] 나아가, 상기 IL-2 변이체는 세 군데의 아미노산이 치환된 형태일 수 있다. 구체적으로, 상기 IL-2 변이체는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 38번째, 42번째 및 45번째 아미노산이 치환된 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 38번째, 42번째 및 61번째 아미노산이 치환된 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는

서열번호 10의 아미노산 서열에서 38번째, 42번째 및 72번째 아미노산이 치환된 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 38번째, 45번째 및 61번째 아미노산이 치환된 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 38번째, 45번째 및 72번째 아미노산이 치환된 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 38번째, 61번째 및 72번째 아미노산이 치환된 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 42번째, 45번째 및 61번째 아미노산이 치환된 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 42번째, 45번째 및 72번째 아미노산이 치환된 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 45번째, 61번째 및 72번째 아미노산이 치환된 것일 수 있다.

[69] 또한, 상기 IL-2 변이체는 네 군데의 아미노산이 치환된 형태일 수 있다. 구체적으로, 상기 IL-2 변이체는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 38번째, 42번재, 45번째 및 61번째 아미노산이 치환된 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 38번째, 42번재, 45번째 및 72번째 아미노산이 치환된 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 38번째, 45번째, 61번째 및 72번째 아미노산이 치환된 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 38번째, 42번재, 61번째 및 72번째 아미노산이 치환된 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 42번재, 45번째, 61번째 및 72번째 아미노산이 치환된 것일 수 있다.

[70] 나아가, 상기 IL-2 변이체는 다섯 군데의 아미노산이 치환된 형태일 수 있다. 구체적으로, 상기 IL-2 변이체는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 38번째, 42번재, 45번째, 61번째 및 72번째 아미노산이 모두 다른 아미노산으로 치환된 것일 수 있다.

[71] 이때, 상기 치환에 의해 도입되는 "다른 아미노산"은 알라닌(alanine), 아르기닌(arginine), 아스파라긴(Asparagine), 아스파르트산(aspartic acid), 시스테인(cysteine), 글루탐산(glutamic acid), 글루타민(glutamine), 히스티딘(histidine), 이소루신(isoleucine), 루신(leucine), 리신(lysine), 메티오닌(methionine), 페닐알라닌(phenyl alanine), 프롤린(proline), 세린(serine), 트레오닌(threonine), 트립토판(tryptophan), 티로신(tyrosine) 및 발린(valine)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다. 단, 상기 IL-2 변이체의 아미노산 치환에 있어서, 상기 서열번호 10의 아미노산 서열에서 38번째는 아르기닌으로 치환될 수 없으며, 42번째는 페닐알라닌으로 치환될 수 없고, 45번째는 티로신으로 치환될 수 없으며, 61번째는 글루탐산으로 치환될 수 없고, 72번째는 루신으로 치환될 수 없다.

[72] 상기 IL-2 변이체의 아미노산 치환에 있어서, 서열번호 10의 아미노산

서열에서 38번째 아미노산인 아르기닌은 아르기닌을 제외한 다른 아미노산으로 치환될 수 있다. 바람직하게는, 상기 IL-2 변이체의 아미노산 치환에 있어서, 서열번호 10의 아미노산 서열에서 38번째 아미노산인 아르기닌은 알라닌으로 치환(R38A)될 수 있다.

[73] 상기 IL-2 변이체의 아미노산 치환에 있어서, 서열번호 10의 아미노산 서열에서 42번째 아미노산인 페닐알라닌은 페닐알라닌을 제외한 다른 아미노산으로 치환될 수 있다. 바람직하게는, 상기 IL-2 변이체의 아미노산 치환에 있어서, 서열번호 10의 아미노산 서열에서 42번째 아미노산인 페닐알라닌은 알라닌으로 치환(F42A)될 수 있다.

[74] 상기 IL-2 변이체의 아미노산 치환에 있어서, 서열번호 10의 아미노산 서열에서 45번째 아미노산인 티로신은 티로신을 제외한 다른 아미노산으로 치환될 수 있다. 바람직하게는, 상기 IL-2 변이체의 아미노산 치환에 있어서, 서열번호 10의 아미노산 서열에서 45번째 아미노산인 티로신은 알라닌으로 치환(Y45A)될 수 있다.

[75] 상기 IL-2 변이체의 아미노산 치환에 있어서, 서열번호 10의 아미노산 서열에서 61번째 아미노산인 글루탐산은 글루탐산을 제외한 다른 아미노산으로 치환될 수 있다. 바람직하게는, 상기 IL-2 변이체의 아미노산 치환에 있어서, 서열번호 10의 아미노산 서열에서 61번째 아미노산인 글루탐산은 아르기닌으로 치환(E61A)될 수 있다.

[76] 상기 IL-2 변이체의 아미노산 치환에 있어서, 서열번호 10의 아미노산 서열에서 72번째 아미노산인 루신은 루신을 제외한 다른 아미노산으로 치환될 수 있다. 바람직하게는, 상기 IL-2 변이체의 아미노산 치환에 있어서, 서열번호 10의 아미노산 서열에서 72번째 아미노산인 루신은 글리신으로 치환(L72G)될 수 있다.

[77] 구체적으로, 상기 IL-2 변이체는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 R38A, F42A, Y45A, E61R 및 L72G로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 치환이 일어난 것일 수 있다.

[78] 구체적으로, 상기 IL-2 변이체는 R38A, F42A, Y45A, E61R 및 L72G로 구성된 군에서 선택되는 위치에서 두 군데, 세 군데, 네 군데 또는 다섯 군데의 위치에서 아미노산 치환이 일어날 수 있다.

[79] 또한, 상기 IL-2 변이체는 두 군데의 아미노산이 치환된 형태일 수 있다. 구체적으로, 상기 IL-2 변이체는 R38A 및 F42A로 치환이 일어난 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 R38A 및 Y45A로 치환이 일어난 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 R38A 및 E61R로 치환이 일어난 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 R38A 및 L72G로 치환이 일어난 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 F42A 및 Y45A로 치환이 일어난 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 F42A 및 E61R로 치환이 일어난 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 F42A 및

L72G로 치환이 일어난 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 E61R 및 L72G로 치환이 일어난 것일 수 있다.

[80] 나아가, 상기 IL-2 변이체는 세 군데의 아미노산이 치환된 형태일 수 있다. 구체적으로, 상기 IL-2 변이체는 R38A, F42A 및 Y45A로 치환이 일어난 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 R38A, F42A 및 E61R로 치환이 일어난 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 R38A, F42A 및 L72G로 치환이 일어난 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 R38A, Y45A, E61R로 치환이 일어난 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 R38A, Y45A 및 L72G로 치환이 일어난 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 F42A, Y45A 및 E61R로 치환이 일어난 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 F42A, Y45A 및 L72G로 치환이 일어난 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 F42A, E61R 및 L72G로 치환이 일어난 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 Y45A, E61R 및 L72G로 치환이 일어난 것일 수 있다.

[81] 또한, 상기 IL-2 변이체는 네 군데의 아미노산이 치환된 형태일 수 있다. 구체적으로, 상기 IL-2 변이체는 R38A, F42A, Y45A 및 E61R로 치환이 일어난 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 R38A, F42A, Y45A 및 L72G로 치환이 일어난 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 R38A, F42A, E61R 및 L72G로 치환이 일어난 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 R38A, Y45A, E61R 및 L72G로 치환이 일어난 것일 수 있다. 또한, 일 구체예로 상기 IL-2 변이체는 F42A, Y45A, E61R 및 L72G로 치환이 일어난 것일 수 있다.

[82] 나아가 상기 IL-2 변이체는 R38A, F42A, Y45A, E61R 및 L72G로 치환이 일어난 것일 수 있다.

[83] 바람직하게는, 상기 IL-2 변이체의 일 구체예는 서열번호 10의 아미노산 서열에서 하기 (a) 내지 (d) 조합 중 선택되는 어느 하나의 조합의 치환이 일어난 것일 수 있다:

[84] (a) R38A/F42A

[85] (b) R38A/F42A/Y45A

[86] (c) R38A/F42A/E61R

[87] (d) R38A/F42A/L72G

[88] 이때, IL-2가 서열번호 35의 아미노산 서열을 가질 경우, 서열번호 10과 상보적으로 대응되는 위치에 아미노산 치환을 가질 수 있다. 또한, IL-2가 서열번호 35의 아미노산 서열의 단편인 경우에도, 서열번호 10과 상보적으로 대응되는 위치의 아미노산이 치환될 수 있다.

[89] 구체적으로, 상기 IL-2의 변이체는 서열번호 6, 22, 23 또는 24의 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있다.

[90] 또한, 상기 IL-2 변이체는 생체 내에서 낮은 독성을 가지는 것을 특징으로 하는

것일 수 있다. 이때, 상기 생체 내에서 낮은 독성이란, IL-2가 IL-2 수용체의 알파체인(IL-2Rα)과 결합하여 유발되는 부작용일 수 있다. 상기 IL-2와 IL-2Rα 결합에 의한 부작용을 개선시키기 위해서 다양한 IL-2 변이체가 개발되었으며, 이러한 IL-2 변이체는 미국특허 제5,229,109호 및 대한민국특허 제10-1667096호에 개시된 것들을 사용할 수 있다. 특히, 본 출원에서 기술되는 IL-2의 변이체는 IL-2 수용체의 알파체인(IL-2Rα)과 결합력이 낮아 생체내 독성이 야생형 IL-2에 비해 낮다.

[91] 본 명세서에서 사용하는 용어, "CD80"은 "B7-1"로도 불리며, 수지상세포, 활성화된 B세포 및 단핵구에 존재하는 막단백질이다. CD80은 T 세포의 활성화와 생존에 필수적인 공자극 신호를 제공한다. CD80은 T 세포 표면에 존재하는 서로 다른 두 단백질인 CD28 및 CTLA-4에 대한 리간드로 알려져 있다. CD80은 288개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 구체적으로 서열번호 11의 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있다. 또한, 본 명세서에서 "CD80 단백질"은 전장 CD80 또는 CD80 단편을 의미한다.

[92] 본 명세서에서 사용하는 용어, "CD80 단편"이란, CD80의 절단형을 의미한다. 또한, 상기 CD80 단편은 CD80의 세포외도메인일 수 있다. CD80 단편의 일 구체예로는 CD80의 신호서열인 N-말단으로부터 1번째 내지 34번째의 아미노산이 제외된 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 CD80 단편의 일 구체예는 서열번호 11의 35번째 내지 288번째의 아미노산으로 구성된 단백질일 수 있다. 또한, 상기 CD80 단편의 일 구체예는 서열번호 11의 35번째 내지 242번째 아미노산으로 구성된 단백질일 수 있다. 또한, 상기 CD80 단편의 일 구체예는 서열번호 11의 35번째 내지 232번째 아미노산으로 구성된 단백질일 수 있다. 또한, 또한, 상기 CD80 단편의 일 구체예는 서열번호 11의 35번째 내지 139번째 아미노산으로 구성된 단백질일 수 있다. 또한, 상기 CD80 단편의 일 구체예는 서열번호 11의 142번째 내지 242번째 아미노산으로 구성된 단백질일 수 있다. 상기 일 실시예로 CD80 단편은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있다.

[93] 또한, 상기 IL-2 단백질 및 상기 CD80 단백질은 링커 혹은 캐리어(carrier)에 의해 결합된 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 IL-2 또는 이의 변이체 및 상기 CD80(B7-1) 또는 이의 단편은 링커 혹은 캐리어에 의해 결합된 것일 수 있다. 본 명세서에서 링커와 캐리어는 호환적으로 사용되기도 한다.

[94] 상기 링커는 두 개의 단백질을 연결시켜준다. 링커의 일 구체예로는 1개 내지 50개의 아미노산, 알부민 또는 이의 단편, 또는 면역글로불린의 Fc 도메인 등을 포함할 수 있다. 이때, 상기 면역글로불린의 Fc 도메인은 면역글로불린의 중쇄 불변 영역 2(CH2) 및 중쇄 불변 영역 3(CH3)을 포함하며, 면역글로불린의 중쇄 및 경쇄의 가변 영역 및 경쇄 불변 영역 1(CH1)은 포함하지 않는 단백질을 의미한다. 상기 면역글로불린은 IgG, IgA, IgE, IgD 또는 IgM 일 수 있으며, 바람직하게는 IgG4일 수 있다. 이때, 야생형 면역글로불린 G4의 Fc 도메인은

서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있다.

[95] 또한, 상기 면역글로불린의 Fc 도메인은 야생형 Fc 도메인 뿐만 아니라, Fc 도메인 변이체일 수 있다. 또한, 본 명세서에서 사용하는 용어 "Fc 도메인 변이체"는 야생형 Fc 도메인의 당쇄 형태(glycosylation pattern)와 다르거나, 야생형 Fc 도메인에 비해 증가된 당쇄, 야생형 Fc 도메인에 비해 감소한 당쇄, 또는 당쇄가 제거된(deglycosylated) 형태일 수 있다. 또한, 무당쇄(aglycosylated) Fc 도메인도 포함된다. Fc 도메인 혹은 변이체는 배양조건 혹은 호스트의 유전자 조작을 통해 함량이 조절된 시알산(sialic acid), 퓨코실화(fucosylation), 당화(glycosylation)를 갖도록 한 것일 수 있다.

[96] 또한, 화학적 방법, 효소적 방법 및 미생물을 사용한 유전공학적 엔지니어링 방법 등과 같이 통상적인 방법으로 면역글로불린의 Fc 도메인의 당쇄를 변형시킬 수 있다. 또한, 상기 Fc 도메인 변이체는 면역글로불린은 IgG, IgA, IgE, IgD 또는 IgM의 Fc 영역이 혼합된 형태일 수 있다. 또한, 상기 Fc 도메인 변이체는 상기 Fc 도메인의 일부 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 형태일 수 있다. 상기 Fc 도메인 변이체의 일 구체예로는 서열번호 12의 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있다.

[97] 융합단백질은 Fc 도메인을 링커(혹은 캐리어)로 하여 이의 N-말단과 C-말단에 각각 CD80과 IL-2 단백질이 연결되거나 혹은 IL-2와 CD80이 연결된 구조를 가질 수 있다(도 1a). Fc 도메인의 N-말단 혹은 C-말단과 CD-80 혹은 IL-2의 연결은 임의적으로 링커 펩타이드에 의해 이루어질 수 있다.

[98] 구체적으로, 상기 융합단백질은 하기 구조식 (I) 또는 (II)로 이루어진 것일 수 있다:

[99] N'-X-[링커(1)]n-Fc 도메인-[링커(2)]m-Y-C' (I)

[100] N'-Y-[링커(1)]n-Fc 도메인-[링커(2)]m-X-C' (II)

[101] 이때, 상기 구조식 (I) 및 (II)에 있어서,

[102] 상기 N'은 융합단백질의 N-말단이고,

[103] 상기 C'는 융합단백질의 C-말단이며,

[104] 상기 X는 CD80 단백질이고,

[105] 상기 Y는 IL-2 단백질이며,

[106] 상기 링커(1) 및 링커(2)는 펩타이드 링커이고,

[107] 상기 n 및 m은 각각 독립적으로, 0 또는 1이다.

[108] 바람직하게는, 상기 융합단백질은 구조식 (I)로 이루어진 것일 수 있다. 상기 IL-2 단백질은 상술한 바와 같다. 또한, 상기 CD80 단백질은 상술한 바와 같다. 일 구체예에 따르면, IL-2 단백질은 야생형 IL-2와 비교하여 하나에서 다섯개까지의 아미노산이 치환된 IL-2 변이체일 수 있다. CD80 단백질은 야생형 CD80의 N-말단 혹은 C-말단으로부터 연속적으로 약 34개까지의 아미노산 잔기가 결실된(truncated) 단편일 수 있다. 혹은 CD80 단백질은 T-세포 표면 수용체(T cell surface receptors) CTLA-4와 CD28에 결합하는 활성을 갖는 세포외

면역글로불린-유사 도메인일 수 있다.

[109] 구체적으로, 상기 융합단백질은 서열번호 9, 26, 28 또는 30의 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있다. 또 다른 구체예에 따르면, 융합단백질은 서열번호 9, 26, 28 또는 30의 아미노산 서열에 대해 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 혹은 100%의 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이때, 동일성은, 예를 들어, 퍼센트 상동성, NCBI(National Center of Biotechnology Information)의 BlastN software와 같은 상동성 비교 소프트웨어를 통해 결정될 수 있다.

[110] 상기 CD80 단백질과 Fc 도메인의 사이에는 펩타이드 링커(1)가 포함될 수 있다. 상기 펩타이드 링커(1)은 5 내지 80개의 연속된 아미노산, 20 내지 60개의 연속된 아미노산, 또는 25 내지 50개의 연속된 아미노산, 또는 30 내지 40개의 아미노산으로 이루어질 수 있다. 일 구체예로 펩타이드 링커(1)은 30개의 아미노산으로 이루어질 수 있다. 또한, 펩타이드 링커(1)은 적어도 하나의 시스테인을 포함할 수 있다. 구체적으로, 한 개, 두 개 또는 세 개의 시스테인을 포함할 수 있다. 또한, 상기 펩타이드 링커(1)는 면역글로불린의 힌지에서 유래된 것일 수 있다. 일 구체예에서는, 상기 펩타이드 링커(1)이 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드 링커일 수 있다.

[111] 상기 펩타이드 링커(2)는 1 내지 50개의 연속된 아미노산, 또는 3 내지 30개의 연속된 아미노산, 또는 5 내지 15개의 아미노산으로 이루어질 수 있다. 일 구체예로 상기 펩타이드 링커(2)는 (G4S)n(이때, n은 1 내지 10의 정수) 일 수 있다. 이때, (G4S)n에서 n은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10일 수 있다. 일 실시예로, 상기 펩타이드 링커(2)가 서열번호 5의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드 링커일 수 있다.

[112] 본 발명의 다른 측면은, 상기 IL-2 단백질 및 상기 CD80 단백질을 포함하는 융합단백질 두 개가 결합된 이량체를 제공한다. 상기 IL-2 또는 이의 변이체 및 CD80 또는 이의 단편을 포함하는 융합단백질은 상술한 바와 같다.

[113] 이때, 이량체를 구성하는 융합단백질 간의 결합은 링커 내에 존재하는 시스테인에 의해 이황화 결합에 의해 이루어진 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이량체를 구성하는 융합단백질은 동일한 것일 수도 있으나, 서로 상이한 융합단백질일 수 있다. 바람직하게는, 상기 이량체는 동형이량체(homodimer)인 것일 수 있다. 상기 이량체를 구성하는 융합단백질의 일 실시예는 서열번호 9의 아미노산 서열을 갖는 단백질일 수 있다.

[114] **조절T 세포 배양 방법**

[115] 본 발명의 또 다른 측면으로는 IL-2 단백질 또는 이의 변이체 및 CD80 단백질 또는 이의 단편을 포함하는 융합단백질 이량체가 포함된 배지에서 CD4+CD25+CD127- T 세포를 배양하는 단계를 포함하는 조절 T 세포를 배양하는 방법을 제공한다.

[116] 이때, 상기 CD4+CD25+CD127- T 세포는 혈액세포에서 수득된 것일 수 있다.

이때, CD4+CD25+CD127- T 세포는 PBMC(peripheral blood mononuclear cells)에서 분리된 것일 수 있다. 또는 상기 CD4+CD25+CD127- T 세포는 혈액세포에서 CD4+CD25+CD127- T 세포를 특이적으로 증식시켜 수득한 것일 수 있다. 또는, 상기 CD4+CD25+CD127- T 세포는 PBMC에서 CD4- T 세포를 제거한 후, CD4+ 세포로부터 수득할 수 있다. 또한, CD4+ T 세포의 분리는 항 CD4 항체를 이용해 분리될 수 있으며, 일 실시예에서는 항 CD4 항체가 결합된 비드를 이용하여 분리하였다. 또한, CD25+ T 세포의 분리는 항 CD25+ 항체를 이용해 분리될 수 있다. 특히, CD4+, CD25+ 및 CD127-인 T 세포를 분리함으로써 조절 T 세포를 분리할 수 있다.

[117] 상기 배지는 종래에 사용되고 있는 배지일 수 있다. 바람직하게는 CD4+CD25+CD127- T 세포에 최적화된 배지일 수 있다. 일 구체예에서는 표 3 및 표 4에 개시된 바와 같이, RPMI1640 배지 또는 TexMACS 배지에 FBS, HEPES, L-Glutamine 및 2-Mercaptoethanol을 첨가한 배지일 수 있다. 또한, 상기 배지는 레티노익산(Retinoic acid)을 더 포함할 수 있다. 또한, 상기 배지는 페니실린(Penicillin) 및/또는 스트렙토마이신(Streptomycin)을 더 포함할 수 있다.

[118] 이때, 상기 조절 CD4+ T 세포를 상기 배지에, 1일 내지 30일, 2일 내지 20일 배양할 수 있다. 또한, 3일 내지 10일 배양할 수 있으며, 4일 내지 6일 배양할 수 있다.

[119] 한편, 상기 CD4+CD25+CD127- T 세포는 CD4+ T 세포를 배양하는 단계; 또는 CD25+ T 세포를 배양하는 단계를 통해 수득된 것일 수 있다.

[120] 이때, 상기 CD4+ T 세포 및 CD25+ T 세포는 각각 혈액세포에서 수득된 것일 수 있다. 이때, CD4+ T 세포 및 CD25+ T 세포 각각은 PBMC(peripheral blood mononuclear cells)에서 분리된 것이거나 혈액세포에서 CD4+ T 세포 또는 CD25+ T 세포를 특이적으로 증식시켜 수득한 것일 수 있다. 또는, PBMC에서 CD4- T 세포 또는 CD25- T 세포를 제거한 후 CD4+ T 세포 또는 CD25+ T 세포를 수득할 수 있다. 또한, CD4+ T 세포의 분리는 항 CD4 항체를 이용해 분리될 수 있으며, 일 실시예에서는 항 CD4 항체가 결합된 비드를 이용하여 분리하였다. 또한, CD25+ T 세포의 분리는 항 CD25+ 항체를 이용해 분리될 수 있다. 특히, CD4+ T 세포 또는 CD25+ T 세포로부터 CD4+, CD25+ 및 CD127-인 T 세포를 분리함으로써 조절 T 세포를 분리할 수 있다.

[121] **수득된 조절T 세포 및 이의 용도**

[122] 본 발명의 또 다른 측면으로, 상기 배양 방법에 의해 수득된 조절 T 세포를 제공한다.

[123] 본 발명의 또 다른 측면으로, 상술한 방법에 의해 수득된 조절 T 세포를 유효성분으로 포함하는 조절 T 세포 매개성 질환 치료용 조성물을 제공한다.

[124] 이때, 상기 배양 방법에 의해 수득된 조절 T 세포는 Foxp3+의 발현량이 증가된 것일 수 있다. 본 명세서에서 사용된 용어, "Foxp3"는 스컬핀(scurfin)이라고도 불리우는 단백질이다. 상기 단백질은 조절 T 세포의 조절 기작 경로에 관여하는

단백질로서, 조절 T 세포의 마커로 알려져 있다. 바람직하게, 상기에서 수득된 조절 T 세포는 CD4+CD25+CD127-Foxp3+ T 세포일 수 있다.

[125] 본 명세서에서 사용된 용어, "조절 T 세포 매개성 질환"은 조절 T 세포의 이상 또는 결핍에 의하여 유도되는 질환을 의미하며, 구체적으로는 염증성 질환 또는 자가면역성 질환인 것을 특징으로 할 수 있다.

[126] 본 발명의 일 구체예로, 상기 염증성 질환은 루푸스, 쇼그렌증후군, 류마티스 관절염, 섬유근염, 경피증, 강직성 척추염, 베체트병, 아프타 구내염, 길리안바레 증후군, 원형탈모증, 피부근염, 크론병, 대장염, 결절성 다발 동맥염, 재발성 다발 연골염 및 자가면역 혈소판 감소증으로 구성된 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 할 수 있다. 또한 본 발명의 일 구체예로, 상기 자가면역성 질환은 류머티스성 관절염, 전신성 경피증, 췌장세포 항체에 의한 인슐린 의존성 소아기 당뇨병, 원형탈모증, 건선, 천포창, 천식, 아프타 구내염, 만성 갑상선염, 일부 후천성 재생불량성 빈혈, 일차성 간경변, 궤양성 대장염, 베체씨병, 크론씨병, 실리코시스, 아스베스토시스, IgA 신장질환, 연쇄상구균 감염 후 사구체신염, 쇼그렌증후군, 길리안-바레증후군, 피부근염, 다발성 근염, 다발성 경화증, 자가면역성 용혈성 빈혈, 자가면역성 뇌척수염, 중증 근무력증, 그레이브씨 갑상선 항진증, 결절성 다발성 동맥염, 강직성 척추염, 섬유조직염, 측두동맥염, 윌슨병, 판코니증후군, 다발성 골수종 및 전신성 홍반성 루푸스로 이루어진 군에서 1종 이상인 것을 특징으로 할 수 있다.

[127] 본 발명의 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 첨가물 등을 포함할 수 있다. 예를 들면, 멸균수, 생리식염수, 관용의 완충제(인산, 구연산, 그 밖의 유기산 등), 안정제, 염, 산화방지제, 계면활성제, 현탁제, 등장화제, 또는 보존제 등을 포함할 수 있다. 또한, 바이오 폴리머 등의 유기물, 히드록시아파타이트(hydroxyapatite) 등의 무기물, 구체적으로는 콜라겐 매트릭스, 폴리락트산 폴리머 또는 코폴리머, 폴리에틸렌글리콜 폴리머 또는 코폴리머 및 그 화학적 유도체, 그리고 이들의 혼합조성물을 이용할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 안정제로는 예를 들어, 덱스트란 40, 메틸셀룰로오스, 젤라틴, 아황산나트륨, 메타황산나트륨 등을 사용할 수 있다. 상기 산화방지제로는 예를 들어, 에리소르브산, 디부틸히드록시톨루엔, 부틸히드록시아니솔, α-토코페롤, 아세트산 토코페롤, L-아스코르브산 및 그 염, L-아스코르브산 팔미테이트, L-아스코르브산 스테아레이트, 아황산수소나트륨, 아황산나트륨, 갈릭산트리아밀, 갈릭산프로필 또는 에틸렌디아민4아세트산나트륨 (EDTA), 피로인산나트륨, 메타인산나트륨 등의 킬레이트제를 사용할 수 있다. 상기 현탁제는 예를 들어, 메틸셀룰로오스, 폴리소르베이트 80, 히드록시에틸셀룰로오스, 아라비아고무, 트라간트말, 카르복시메틸 셀룰로스 나트륨, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노라우레이트 등을 사용할 수 있다. 상기 등장화제로는 예를 들어, D-만니톨, 소르비톨 등을 사용할 수 있다. 상기 보존제로는 예를 들어, 파라옥시벤조산메틸, 파라옥시벤조산

에틸, 소르브산, 페놀, 크레졸, 클로로크레졸 등을 사용할 수 있다.

[128] **수득된 조절T 세포를 이용한 치료 방법**

[129] 본 발명의 또 다른 측면으로, 상기 조절 T 세포를 조절 T 세포 매개성 질환을 가지고 있는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 조절 T 세포 매개성 질환 치료 방법을 제공한다. 이때, 조절 T 세포 및 조절 T 세포 매개성 질환은 상술한 바와 같다.

[130] 본 발명의 또 다른 측면으로, 조절 T 세포 매개성 질환의 치료를 위한 상기 조절 T 세포의 용도를 제공한다.

발명의 실시를 위한 형태

[131] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

[132] **제조예 1. hCD80-Fc-IL-2 변이체(2M)의 제조: GI-101**

[133] 인간 CD80 단편, Fc 도메인 및 IL-2 변이체를 포함하는 융합단백질을 생산하기 위하여, 시그널 펩타이드(서열번호 1), CD80 단편(서열번호 2), 링커가 결합된 Ig 힌지(서열번호 3), Fc 도메인(서열번호 4), 링커(서열번호 5) 및 두 개의 아미노산이 치환된 IL-2 변이체(2M)(R38A, F42A)(서열번호 6)를 N-말단으로부터 이 순서대로 포함하는 융합단백질을 코딩하는 염기서열(서열번호 8)을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 ThermoFisher Scientific 사의 Invitrogen GeneArt Gene Synthesis 서비스를 통해 폴리뉴클레오티드를 합성하여 pcDNA3_4 벡터에 적재하였다. 또한, 상기 벡터를 CHO 세포(Expi-CHO™)에 도입하여 서열번호 9의 융합단백질을 발현시켰다. 벡터를 도입한 후 37℃, 125 RPM, CO_2 8%의 농도인 환경에서 7일 배양 후 배양액을 수거하여 융합단백질을 정제하였다. 상기 정제한 융합단백질 이량체를 "GI-101"로 명명하였다.

[134] 정제는 MabSelect SuRe protein A resin이 포함된 크로마토그래피를 이용하여 정제하였다. 25 mM Tris, 25 mM NaCl, pH 7.4의 조건에서 융합단백질을 결합시켰다. 그 후, 100 mM NaCl, pH 3의 100 mM의 아세트산으로 용출하였다. pH 9의 20%의 1 M Tris-HCl를 수거용 튜브에 넣은 후, 융합단백질을 수거하였다. 수거된 융합단백질을 16시간 동안 PBS 버퍼로 투석하여 바꾸어 주었다.

[135] 그 후, TSKgel G3000SWXL column(TOSOH Bioscience)을 사용하여 크기 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography)를 이용하여 시간에 따른 280 nm 파장에서의 흡광도를 측정하여 고농도 융합단백질을 확보하였다. 이때, 분리 정제된 융합단백질은 환원(R) 또는 비-환원(NR) 조건하에서 SDS-PAGE를 실행하고, 코마시블루(coomassie blue)로 염색하여 그 순도를 확인하였다(도 1b). NanoDrop을 사용하여 검출시 2.78 ㎎/㎖의 농도로 융합단백질이 포함된 것을 확인하였다(도 1c). 또한, 크기 배제 크로마토그래피를 이용하여 분석한 결과는

도 1d에 나타난 바와 같다.

[136] **제조예 2. Fc-IL-2 변이체(2M) 이량체의 제조: Fc-IL-2v2**

[137] Fc 도메인 및 IL-2 변이체를 포함하는 융합단백질을 생산하기 위하여, 시그널 펩타이드(서열번호 1), Ig 힌지(서열번호 38), Fc 도메인(서열번호 4), 링커(서열번호 5) 및 두 개의 아미노산이 치환된 IL-2 변이체(2M)(R38A, F42A)(서열번호 6)를 포함하는 융합단백질을 코딩하는 염기서열(서열번호 45)을 N-말단으로부터 이 순서대로 포함하는 폴리뉴클레오티드를 ThermoFisher Scientific 사의 Invitrogen GeneArt Gene Synthesis 서비스를 통해 폴리뉴클레오티드 합성하여 pcDNA3_4 벡터에 적재하였다. 또한, 상기 벡터를 CHO 세포(Expi-CHOTM)에 도입하여 서열번호 44의 융합단백질을 발현시켰다. 벡터를 도입한 후 37℃, 125 RPM, CO_2 8%의 농도인 환경에서 7일 배양 후 배양액을 수거하여 융합단백질 이량체를 정제하였다. 상기 정제한 융합단백질 이량체를 "Fc-IL2v2"으로 명명하였다.

[138] 상기 정제 및 융합단백질 수거는 상기 제조예 1과 동일한 방법으로 수행하였다. 분리 정제된 융합단백질은 환원(R) 또는 비환원(NR) 조건 하에서 SDS-PAGE를 수행하고, 코마시블루로 염색하여 그 순도를 확인하였다(도 3a). 그 결과, 상기 융합단백질은 이량체를 형성함을 확인하였다. 또한, 크기 배제 크로마토그래피를 이용하여 분석한 결과는 도 3b에 나타낸 바와 같다.

[139] **제조예 3. Fc-IL-2 이량체의 제조: Fc-IL-2wt**

[140] Fc 도메인 및 야생형 IL-2를 포함하는 융합단백질을 생산하기 위하여, 시그널 펩타이드(서열번호 1), Ig 힌지(서열번호 38), Fc 도메인(서열번호 4), 링커(서열번호 5) 및 야생형 IL-2(서열번호 10)를 포함하는 융합단백질을 코딩하는 염기서열(서열번호 43)을 N-말단으로부터 이 순서대로 포함하는 폴리뉴클레오티드를 ThermoFisher Scientific 사의 Invitrogen GeneArt Gene Synthesis 서비스를 통해 폴리뉴클레오티드 합성하여 pcDNA3_4 벡터에 적재하였다. 또한, 상기 벡터를 CHO 세포(Expi-CHOTM)에 도입하여 서열번호 42의 융합단백질을 발현시켰다. 벡터를 도입한 후 37℃, 125 RPM, CO_2 8%의 농도인 환경에서 7일 배양 후 배양액을 수거하여 융합단백질 이량체를 정제하였다. 상기 정제한 융합단백질 이량체를 "Fc-IL2wt"으로 명명하였다.

[141] 상기 정제 및 융합단백질 수거는 상기 제조예 1과 동일한 방법으로 수행하였다. 분리 정제된 융합단백질은 환원(R) 또는 비환원(NR) 조건 하에서 SDS-PAGE를 수행하고, 코마시블루로 염색하여 그 순도를 확인하였다(도 3c). 그 결과, 상기 융합단백질은 이량체를 형성함을 확인하였다. 또한, 크기 배제 크로마토그래피를 이용하여 분석한 결과는 도 3d에 나타낸 바와 같다.

[142] **제조예 4. hCD80-Fc-IL-2 야생형 이량체의 제조: hCD80-Fc-IL-2wt**

[143] 인간 CD80 단편, Fc 도메인 및 IL-2 야생형 단백질을 포함하는 융합단백질을 생산하기 위하여, 시그널 펩타이드(서열번호 1), CD80 단편(서열번호 2), 링커가 결합된 Ig 힌지(서열번호 3), Fc 도메인(서열번호 4), 링커(서열번호 5) 및 IL-2

야생형(서열번호 10)을 N-말단으로부터 이 순서대로 포함하는 융합단백질을 코딩하는 염기서열(서열번호 41)을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 ThermoFisher Scientific 사의 Invitrogen GeneArt Gene Synthesis 서비스를 통해 폴리뉴클레오티드를 합성하여 pcDNA3_4 벡터에 적재하였다. 또한, 상기 벡터를 CHO 세포(Expi-CHO™)에 도입하여 서열번호 46의 융합단백질을 발현시켰다. 벡터를 도입한 후 37℃, 125 RPM, CO_2 8%의 농도인 환경에서 7일 배양 후 배양액을 수거하여 융합단백질 이량체를 정제하였다. 상기 정제한 융합단백질 이량체를 "hCD80-Fc-IL2wt"로 명명하였다.

[144] 정제는 MabSelect SuRe protein A resin이 포함된 크로마토그래피를 이용하여 정제하였다. 25 mM Tris, 25 mM NaCl, pH 7.4의 조건에서 융합단백질을 결합시켰다. 그 후, 100 mM NaCl, pH 3의 100 mM의 아세트산으로 용출하였다. pH 9의 20%의 1M Tris-HCl를 수거용 튜브에 넣은 후, 융합단백질을 수거하였다. 수거된 융합단백질을 16시간 동안 PBS 버퍼로 투석하여 바꾸어 주었다.

[145] 그 후, TSKgel G3000SWXL column(TOSOH Bioscience)을 사용하여 크기 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography)를 이용하여 시간에 따른 280 nm 파장에서의 흡광도를 측정하여 고농도 융합단백질을 확보하였다. 이때, 분리 정제된 융합단백질은 환원(R) 또는 비환원(NR) 조건 하에서 SDS-PAGE를 수행하고, 코마시블루(coomassie blue)로 염색하여 그 순도를 확인하였다(도 4a). 그 결과, 상기 융합단백질은 이량체를 형성함을 확인하였다. 또한, 크기 배제 크로마토그래피를 이용하여 분석한 결과는 도 4b에 나타낸 바와 같다.

[146] **제조예 5. hCD80-Fc 이량체의 제조: hCD80-Fc**

[147] 인간 CD80 단편 및 Fc 도메인을 포함하는 융합단백질을 생산하기 위하여, 시그널 펩타이드(서열번호 1), CD80 단편(서열번호 2), 링커가 결합된 Ig 힌지(서열번호 3) 및 Fc 도메인(서열번호 4)을 N-말단으로부터 이 순서대로 포함하는 융합단백질을 코딩하는 염기서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드(서열번호 39)를 ThermoFisher Scientific 사의 Invitrogen GeneArt Gene Synthesis 서비스를 통해 폴리뉴클레오티드를 합성하여 pcDNA3_4 벡터에 적재하였다. 또한, 상기 벡터를 CHO 세포(Expi-CHO™)에 도입하여 서열번호 40의 융합단백질을 발현시켰다. 벡터를 도입한 후 37℃, 125 RPM, CO_2 8%의 농도인 환경에서 7일 배양 후 배양액을 수거하여 융합단백질 이량체를 정제하였다. 상기 정제한 융합단백질 이량체를 "hCD80-Fc"로 명명하였다.

[148] 정제는 MabSelect SuRe protein A resin이 포함된 크로마토그래피를 이용하여 정제하였다. 25 mM Tris, 25 mM NaCl, pH 7.4의 조건에서 융합단백질을 결합시켰다. 그 후, 100 mM NaCl, pH 3의 100 mM의 아세트산으로 용출하였다. pH 9의 20%의 1 M Tris-HCl를 수거용 튜브에 넣은 후, 융합단백질을 수거하였다. 수거된 융합단백질을 16시간 동안 PBS 버퍼로 투석하여 바꾸어 주었다.

[149] 그 후, TSKgel G3000SWXL column(TOSOH Bioscience)을 사용하여 크기 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography)를 이용하여 시간에 따른 280 nm

파장에서의 흡광도를 측정하여 고농도 융합단백질을 확보하였다. 이때, 분리 정제된 융합단백질은 환원(R) 또는 비환원(NR) 조건 하에서 SDS-PAGE를 수행하고, 코마시블루(coomassie blue)로 염색하여 그 순도를 확인하였다(도 2a). 그 결과, 상기 융합단백질은 이량체를 형성함을 확인하였다. 또한, 크기 배제 크로마토그래피를 이용하여 분석한 결과는 도 2b에 나타낸 바와 같다.

[150] **준비예 1. 조절 T 세포 배양을 위한 배양용 조성물**

[151] **준비예 1.1. CD4+ 세포 배양 조성물**

[152] 하기와 같은 조성으로 CD4+ 세포 배양용 배지를 제조하였다. 이때, 기본성분의 배지를 제조한 후, 첨가성분인 GI-101, GI-101WT, hCD80-Fc, Fc-IL-2v2 또는 Fc-IL-2wt을 사용전 첨가하였다.

[153] [표1]

성분(Component)				용량	최종 농도
성분명		제조사	Cat.#		
기본성분	RPMI1640 medium	Welgene	LM 011-01	to 500 mL	
	FBS	Hyclone	SH30084.03	50 mL	10%
	HEPES	Welgene	BB 001-01	5 mL	10 mM
	Penicillin & Streptomycin	Welgene	LS 202-02	5 mL	Penicillin: 100 U/ml Streptomycin: 100 μg/ml
	Sodium pyruvate	Welgene	LS 013-01	5 mL	1 mM
	MEM Non-Essential Amino Acids Solution	GIBCO	11140050	5 mL	1 mM
	L-Glutamine	GIBCO	25030149	5 mL	2 mM
	2-Mercaptoethanol	GIBCO	21985-023	0.5 mL	55 μM
첨가성분	GI-101	GI-Innovation	-	사용 전 즉시 첨가	3.2 nM, 50 nM
	GI-101_WT	GI-Cell	-		3.2 nM, 50 nM
	hCD80-Fc	GI-Cell	-		3.2 nM, 50 nM
	Fc-IL-2v2	GI-Cell	-		3.2 nM, 50 nM
	Fc-IL-2wt	GI-Cell	-		3.2 nM, 50 nM

[154] [표2]

성분(Component)				용량	최종 농도
성분명		제조사	Cat.#		
기본 성분	TexMACS medium	Miltenyi Biotec	170-076-307	to 1000 mL	
	Human AB serum	Sigma	H4522	50 mL	5%
	Penicillin& Streptomycin	Welgene	LS 202-02	10 mL	100 U/ml (Penicillin) 및 100 μg/ml (Streptomycin)
첨가 성분	GI-101	GI-Innovation	-	사용 전 즉시 첨가	3.2 nM, 50 nM
	GI-101_WT	GI-Cell	-		3.2 nM, 50 nM
	hCD80-Fc	GI-Cell	-		3.2 nM, 50 nM
	Fc-IL-2v2	GI-Cell	-		3.2 nM, 50 nM
	Fc-IL-2wt	GI-Cell	-		3.2 nM, 50 nM

[155] 준비예 **1.2. CD4+CD25+CD127-** 세포 배양 조성물

[156] 하기와 같은 $CD4^{+}CD25^{+}CD127^{-}$ 세포 배양용 배지를 제조하였다.

[157] [표3]

성분(Component)				용량	최종 농도
성분명		제조사	Cat.#		
기본 성분	RPMI1640 medium	Welgene	LM 011-01	to 500 mL	
	FBS	Hyclone	SH30084.03	50 ml	10%
	HEPES	Welgene	BB 001-01	5 mL	10 mM
	Penicillin & Streptomycin	Welgene	LS 202-02	5 mL	Penicillin: 100 U/ml Streptomycin: 100 μg/ml
	Sodium pyruvate	Welgene	LS 013-01	5 mL	1 mM
	MEM Non-Essential Amino Acids Solution	GIBCO	11140050	5 mL	1 mM
	L-Glutamine	GIBCO	25030149	5 mL	2 mM
	2-Mercaptoethanol	GIBCO	21985-023	0.5 mL	55 μM
첨가 성분	GI-101	GI-Innovation	-	사용 전 즉시 첨가	3.2 nM, 50 nM
	GI-101_WT	GI-Cell	-		3.2 nM, 50 nM
	hCD80-Fc	GI-Cell	-		3.2 nM, 50 nM
	Fc-IL-2v2	GI-Innovation	-		3.2 nM, 50 nM
	Fc-IL-2wt	GI-Cell	-		3.2 nM, 50 nM

[158] [표4]

성분(Component)				용량	최종 농도
성분명		제조사	Cat.#		
기본 성분	TexMACS medium	Miltenyi Biotec	170-076-307	to 1000 mL	
	Human AB serum	Sigma	H4522	50 mL	5%
	Penicillin& Streptomycin	Welgene	LS 202-02	10 mL	100 U/ml (Penicillin) 및 100 μg/ml (Streptomycin)
첨가 성분	GI-101	GI-Innovation	-	사용 전 즉시 첨가	3.2 nM, 50 nM
	GI-101_WT	GI-Cell	-		3.2 nM, 50 nM
	hCD80-Fc	GI-Cell	-		3.2 nM, 50 nM
	Fc-IL-2v2	GI-Cell	-		3.2 nM, 50 nM
	Fc-IL-2wt	GI-Cell	-		3.2 nM, 50 nM

[159] **실시예 1. IL-2 단백질 및 CD80 단백질을 포함하는 융합단백질 이량체의 조절 T 세포 증식 정도 확인**

[160] **실시예 1.1. 조절 T 세포 증식 자극용 비드 제조**

[161] 분리된 CD4+ 세포에서 조절 T 세포의 증식을 자극하기 위하여, MACS GMP ExpAct Treg Kit(Cat#:170-076-119)(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)를 이용하여 조절 T 세포 증식 자극용 비드(bead)를 준비하였다. 구체적으로, 조절 T 세포의 증식 자극용 비드가 포함된 MACS GMP ExpAct Treg Kit 내 시약을 새로운 튜브(tube)에 옮겨 주고, 상기 튜브를 마그넷(magnet)에서 1분 동안 대기 후 상층액을 제거하여 비드(bead)를 분리하였다. 이때, MACS GMP ExpAct Treg Kit 내 시약은 2×10^5개의 세포수 당 1 μL를 사용하였다. 비드 분리 후, 첨가 성분을 포함하지 않는 표 1 또는 표 2(기본 성분만 포함)의 CD4+ 세포 배양 조성물을 0.5 mL 내지 1 mL 추가하여 비드를 풀어주었다.

[162] **실시예 1.2. CD4+ T 세포의 분리**

[163] 구입한 PBMC(Cat#: SER-PBMC-200-F)(Zen-Bio. Inc, NC 27709, USA)의 세포수를 측정하였다. 그 후, 300×g로 10분간 원심분리하였다. 그 후, 상층 버퍼액 제거 후 1×10^7 세포수 당 80 μL의 MACs 버퍼를 추가하여 세포 펠렛을 풀어주었다. 그 후, 1×10^7 세포수 당 20 μL의 CD4 MicroBeads(Cat#: 130-045-101)(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)를 분주하고 탭핑하여 충분히 섞어주었다. 그 후, 4℃ 내지 8℃에서 15분간 반응시켰다.

[164] 세척을 위해 10 mL의 MACs 버퍼를 추가 후 300×g로 10 분간 원심분리하였다. 그 후, 상층액 제거 후 1×10^8 세포수 당 500 μL의 MACs buffer를 추가하여 세포 펠렛(Cell pellet)을 풀어주었다. 그 후, LS Column을 준비 후 3 mL의 MACs 버퍼(buffer)를 흘려주었다. 상기에서 준비된 세포 현탁액을 LS column(Cat#: 130-042-401)(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)에 통과시켜주었다. LS Column에 붙어있는 세포(Cell)가 충분히 세척될 수 있도록 3 mL의 MACs 버퍼를 3회 흘려주었다. 그 후, LS column을 마그넷 스탠드(Magnet stand)에서 분리 후 3 mL의 MACs 버퍼를 넣고 피스톤으로 압력을 주어 CD4+ 세포를 회수하였다. 그 후, 300×g 로 5분간 원심분리하였다. 그 후, 상층액 제거 후 세포수를 측정하였다.

[165] 또한, 실시예 1.1에서 준비한 비드가 포함된 조절 T 세포 배양액을 상기에서 분리한 CD4+ T 세포에 접종하였다.

[166] **실시예 1.3. CD4+ T 세포 배양**

[167] 6-웰 플레이트에 실시예 1.2에서 준비된 CD4+ 세포를 1×10^7 cells/mL로 파종(seeding) 하고, 첨가물질로 GI-101(50 nM), GI-101_WT(50 nM), CD80-Fc 이량체(50 nM)+Fc-IL-2v2 이량체(50 nM) 또는 CD80-Fc 이량체(50 nM)+Fc-IL-2wt 이량체(50 nM)를 각각 포함하는 표 1 또는 표 2의 세포 배양 조성물 조건 하에 CD4+ 세포를 배양하였다. 6-웰 플레이트의 세포가 80% 이상의 컨플루언시(confluency)를 나타낼 때 25T 플라스크로 계대 배양하였다. 25T 플라스크의 세포가 80% 이상의 컨플루언시를 나타낼 때 75T 플라스크로 계대 배양하였다. 75T 플라스크의 세포가 80% 이상의 컨플루언시를 나타낼 때 최종적으로 세포를 수득하였다.

[168] **실시예 1.4. CD4+CD25+CD127- 세포 분리**

[169] 실시예 1.3에서 회수한 CD4+ 세포를 1,300 rpm, 4℃, 5분간 원심분리하였다. 또한, 상층액을 제거하고 1:200으로 FACS 버퍼에 희석한 Fc block(biolegend, cat#422302) 1 mL을 넣고 얼음에 10분간 방치한 후, 50 ul CD4-Pacific Blue(BioLegend, cat#317429), 50 ul CD25-PE/Cy7(BioLegend, cat#356108), 50 ul CD127-PE(BD, cat#557938)을 넣고 얼음에 20분간 방치하였다. 그 후, 4 mL FACS 버퍼를 추가로 넣고 1,300 rpm, 4℃, 5분간 원심분리하였다. 그 후, 상층액 제거 후 FACS 버퍼를 3 mL 넣고, 1,300 rpm, 4℃, 5분간 원심분리하였다. 이후, 상층액 제거하고 FACS 버퍼 3 mL에 세포를 풀어주었다. 마지막으로, BD FACS Aria를 이용하여 CD4+CD25+CD127- 세포를 분리하였다.

[170] **실시예 1.5. CD4+CD25+CD127- 세포 배양**

[171] 상기 실시예 1.4에서 분리된 CD4+CD25+CD127- 세포를 3×10^5 cells/mL로 48-웰 플레이트에 파종하고, 이와 동시에 실시예 1.1과 같이 조절 T 세포의 증식을 자극하기 위해 2×10^5개의 세포수 당 1 μL MACS GMP ExpAct Treg Kit(Cat#:170-076-119)(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)로부터 비드(beads)를 분리하였다. 상기 분리한 비드를 첨가 성분을 포함하지 않는 표 3 또는 표 4(기본 성분만 포함)의 세포 배양 조성물(0.5 mL 내지 1 mL)에 풀어준

다음, 실시예 1.4에서 수득한 CD4+CD25+CD127- 세포를 파종한 웰 플레이트에 첨가하였다. 그 후, 첨가물질로 GI-101(50 nM), GI-101_WT(50 nM), CD80-Fc(50 nM)+Fc-IL-2v2(50 nM) 또는 CD80-Fc(50 nM)+Fc-IL-2wt(50 nM)을 각각 포함하는 표 3 또는 표 4의 세포 배양 조성물 조건 하에 CD4+CD25+CD127- 세포를 배양하였다.

[172] 배양 시, 48-웰 플레이트 상에서 세포가 80% 이상의 컨플루언시를 나타낼 때 24-웰 플레이트로 계대 배양하였다. 24-웰 플레이트의 세포가 80% 이상의 컨플루언시를 나타낼 때 12-웰 플레이트로 계대 배양하였다. 12-웰 플레이트의 세포가 80% 이상의 컨플루언시를 나타낼 때 6-웰 플레이트로 계대 배양하였다. 6-웰 플레이트의 세포가 80% 이상의 컨플루언시를 나타낼 때 25T 플라스크로 계대 배양하였다. 25T 플라스크의 세포가 80% 이상의 컨플루언시를 나타낼 때 75T 플라스크로 계대 배양하였다. 175T 플라스크로 계대 배양 후 세포가 80% 이상의 컨플루언시를 나타낼때 최종 수득하였다.

[173] 그 결과, RPMI1640 배지를 포함한 조절 T 세포 배양 배지 조성물에서 조절 T 세포 증식 결과는 표 5 및 도 6, 세포 생존률은 표 6 및 도 7과 같다. 또한 TexMACS 배지 포함 배양 조성물에서 조절 T 세포 증식 결과는 표 7 및 도 8, 세포 생존률은 표 8 및 도 9에 나타내었다.

[174] [표5]

총 세포수($\times 10^6$)							
배양 조성물 첨가물질		CD4+CD25+CD127- 세포수					
		0일 (파종)	3일	5일	7일	9일	12일
50nM	GI-101	0.3	0.26	1.3	1.6	3	11.7
	GI-101 WT	0.3	0.23	1.3	1.5	2.1	8.4
	hCD80-Fc+Fc-IL-2_v2	0.3	0.25	1	1.4	3.2	10.3
	hCD80-Fc+Fc-IL-2_wt	0.3	0.3	1.2	1.5	1.9	9.36

[175] [표6]

배양 조성물 첨가물질		CD4+CD25+CD127- FACS 세포 생존률				
		3일	5일	7일	9일	12일
50nM	GI-101	71	91	93	94	91
	GI-101 WT	70	94	94	96	92
	hCD80-Fc+Fc-IL-2_v2	58	90	90	95	92
	hCD80-Fc+Fc-IL-2_wt	64	94	93	96	90

[176] [표7]

총 세포수($\times 10^6$)							
배양 조성물 첨가물질		CD4+CD25+CD127- 세포수					
		0일 (파종)	3일	5일	7일	9일	12일
50nM	GI-101	0.3	0.8	2.9	3	8.4	10.6
	GI-101 WT	0.3	0.5	1.1	0.8	1.8	2
	hCD80-Fc+Fc-IL-2_v2	0.3	0.7	2.7	2.4	8	9.6
	hCD80-Fc+Fc-IL-2_wt	0.3	0.7	2.9	2.4	5.4	7.3

[177] [표8]

배양 조성물 첨가물질		CD4+CD25+CD127- FACS 세포 생존률				
		3일	5일	7일	9일	12일
50nM	GI-101	92	88	95	93	88
	GI-101 WT	91	73	88	89	90
	hCD80-Fc+Fc-IL-2_v2	88	88	94	94	89
	hCD80-Fc+Fc-IL-2_wt	89	90	94	93	88

[178] **실시예 1.6. 면역 억제성 사이토카인 분비능 확인: 인터루킨-10**

[179] 상기 실시예 1.5에서 수득된 조절 T 세포의 IL-10 분비능을 평가하기 위하여 세포수를 1×10^6 cells/mL으로 맞춰 배양한 후 배양 상층액을 수득하여 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) 분석을 수행하였다.

[180] 먼저, Human IL-10 ELISA Kit(Invitrogen, Cat# KAC1321)의 인큐베이션 버퍼를

100 ul씩 마이크로플레이트(micro plate)에 분주한 후, 칼리브레이션(calibration), 컨트롤(control) 또는 조절 T 세포 배양 상층액 샘플(sample)을 각각 100 ul씩 넣어 분주하였다. 그 후, 마이크로플레이트를 접착 필름(Adhesive film)으로 덮고 쉐이커(shaker)에서 2시간 동안 실온(18℃ 내지 25℃)에서 700 rpm으로 쉐이킹하며 반응시켰다. 그 후, 웰(well) 당 약 150 μL 세척 버퍼로 마이크로웰 스트립(microwell strip)을 3회 세척하였다.

[181] 세척 후에, 표본 희석제(Specimen Diluent)를 100 ul씩 넣어주었다. 그 후, anti-IL-10-HRP를 50 ul 넣어준 후, 2시간 동안 실온에서 700 rpm으로 쉐이킹하며 반응시킨 뒤, 웰 당 약 150 μL 세척 버퍼로 3회 세척하였다. 세척 후, TMB를 100 ul씩 넣어 주고, 15분 동안 실온에서 반응시킨 다음, 100 ul 스탑 솔루션(stop solution)을 넣어 반응을 종료하였다. 그 후, 450 nm를 사용하여 각 마이크로웰의 형광 값을 측정하였다.

[182] 그 결과, RPMI1640 배지 포함 조성물로부터 배양된 세포의 인터루킨-10 분비능은 도 10과 같으며, TexMACS 배지 포함 조성물로부터 배양된 세포의 인터루킨-10 분비능은 도 11과 같다. 도 10 및 도 11를 통해 GI-101을 배양 조성물에 첨가한 조절 T 세포들로부터 인터루킨-10이 높게 발현하는 것을 확인하였다.

[183] **실시예 2. 최적화 배양 공정에서 GI-101에 의한 조절 T 세포 증식 확인**

[184] **실시예 2.1. CD4+ T 세포 분리**

[185] 구입한 PBMC(Cat#: SER-PBMC-200-F)(Zen-Bio. Inc, NC 27709, USA)의 세포수를 측정하였다. 그 후, 300×g로 10분간 원심분리하였다. 그후, 상층 버퍼액 제거 후 1×10^7 세포수 당 80 μL의 MACs 버퍼를 추가하여 세포 펠렛을 풀어주었다. 그 후, 1×10^7 세포수 당 20 μL의 CD4 MicroBeads(Cat#: 130-045-101)(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)를 분주하고 탭핑하여 충분히 섞어주었다. 그 후, 4℃ 내지 8℃에서 15분간 반응시켰다.

[186] 세척을 위해 10 mL의 MACs 버퍼를 추가 후 300×g로 10분간 원심분리하였다. 그 후, 상층액 제거 후 1×10^8 세포수 당 500 μL의 MACs buffer를 추가하여 세포 펠렛을 풀어주었다. 그 후, LS Column을 준비 후 3 mL의 MACs 버퍼를 흘려주었다. 상기에서 준비된 세포 현탁액을 LS column(Cat#: 130-042-401)(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)에 통과시켜주었다. LS Column에 붙어있는 세포가 충분히 세척될 수 있도록 3 mL의 MACs 버퍼를 3회 흘려주었다. 그 후, LS column을 마그넷 스탠드(Magnet stand)에서 분리 후 3 mL의 MACs 버퍼를 넣고 피스톤으로 압력을 주어 CD4+ 세포를 회수하였다. 그 후, 300×g로 5분간 원심분리하였다. 원심분리 후 상층액을 제거하고 세포수를 측정하였다.

[187] 상기 분리된 CD4+ 세포에서 조절 T 세포의 증식을 자극하기 위하여, 첨가 성분을 포함하지 않는 표 1 또는 표 2(기본 성분만 포함)의 CD4+ 세포 배양 조성물을 0.5 mL 내지 1 mL 추가하여 상기 실시예 1.1과 같이 분리하여 준비된

비드를 풀어주고, 이를 상기 PBMC로부터 분리된 CD4+ 세포에 접종하였다.

[188] **실시예 2.2. CD4+ T 세포 배양**

[189] 6-웰 플레이트에 실시예 2.1에서 준비된 CD4+ 세포를 1×10^7 cells/mL로 파종(seeding)하고, 첨가물질로 GI-101(3.2 nM/50 nM), GI-101_WT(3.2 nM/50 nM), CD80-Fc 이량체(3.2 nM/50 nM)+Fc-IL-2v2 이량체(3.2 nM/50 nM) 또는 CD80-Fc 이량체(3.2 nM/50 nM)+Fc-IL-2wt 이량체(3.2 nM/50 nM)를 각각 포함하는 표 1 또는 표 2의 세포 배양 조성물 조건 하에 CD4+를 배양하였다. 6-웰 플레이트의 세포가 80% 이상의 컨플루언시를 나타낼 때 25T 플라스크로 계대 배양하였다. 25T 플라스크의 세포가 80% 이상의 컨플루언시를 나타낼 때 75T 플라스크로 계대 배양하였다. 75T 플라스크의 세포가 80% 이상의 컨플루언시를 나타낼 때 최종적으로 세포를 수득하였다.

[190] **실시예 2.3. CD4+CD25+CD127- T 세포 분리**

[191] 실시예 2.2에서 회수한 CD4+ 세포를 1,300 rpm, 4℃, 5분간 원심분리하였다. 또한, 상층액을 제거하고 1:200으로 FACS 버퍼에 희석한 Fc block(biolegend, cat#422302) 1 mL을 넣고 얼음에 10분간 방치하였다. 그 후, 50 ul CD4-Pacific Blue(BioLegend, cat#317429), 50 ul CD25-PE/Cy7(BioLegend, cat#356108), 50 ul CD127-PE(BD, cat#557938)을 2번 샘플에 넣고 얼음에 20분간 방치하였다.

[192] 그 후, 4 mL FACS 버퍼를 추가로 넣고 1,300 rpm, 4℃, 5분간 원심분리하였다. 그 후, 상층액을 제거하고 3 mL의 FACS 버퍼를 넣은 다음 1,300 rpm, 4℃, 5분간 원심분리하였다. 그 후, 상층액을 제거하고 FACS 버퍼 3 mL에 세포를 풀어주었다. 마지막으로, BD FACS Aria로 CD4+CD25+CD127- 세포를 분리하였다.

[193] **실시예 2.4. CD4+CD25+CD127- T 세포 배양**

[194] 24-웰 플레이트에 실시예 2.3에서 분리된 모든 CD4+CD25+CD127- 세포를 파종하고, 이와 동시에 실시예 2.1과 같이 조절 T 세포의 증식을 자극하기 위해 2×10^5 세포수 당 1 μL MACS GMP ExpAct Treg Kit(Cat#:170-076-119)(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)로부터 비드(beads)를 분리하여 첨가 성분을 포함하지 않는 표 3 또는 표 4(기본 성분만 포함)의 세포 배양 조성물(0.5 mL 내지 1 mL)에 비드를 풀어주었다. 그 다음 상기 CD4+CD25+CD127- 세포를 파종한 웰 플레이트에 첨가하였다.

[195] 그 후, 첨가물질로 GI-101(3.2 nM/50 nM), GI-101_WT(3.2 nM/50 nM), CD80-Fc 이량체(3.2 nM/50 nM)+Fc-IL-2v2 이량체(3.2 nM/50 nM) 또는 CD80-Fc 이량체(3.2nM /50 nM)+Fc-IL-2wt 이량체(3.2 nM/50 nM)를 각각 포함하는 표 3 또는 표 4의 세포 배양 조성물 조건 하에 CD4+CD25+CD127- 세포를 배양하였다. 24-웰 플레이트의 세포가 80% 이상의 컨플루언시를 나타낼 때 12-웰 플레이트로 계대 배양하였다. 12-웰 플레이트의 세포가 80% 이상의 컨플루언시를 나타낼때 6-웰 플레이트로 계대 배양하였다. 6-웰 플레이트의 세포가 80% 이상의 컨플루언스를 나타낼 때, 25T 플라스크로 계대 배양하였다. 25T 플라스크의

세포가 80% 이상의 컨플루언시를 나타낼 때 75T 플라스크로 계대 배양하였다.

[196] 표 3 또는 표 4의 첨가물질이 3.2 nM 처리된 그룹에 대해서는 75T 플라스크의 세포가 80% 이상의 컨플루언시를 나타낼 때 최종 수득하였다. 상기 표 3 또는 표 4의 첨가물질이 50 nM 처리된 그룹에 대해선 175T 플라스크로 계대 배양 후 세포가 80% 이상의 컨플루언시를 나타낼 때 최종 수득하였다.

[197] 그 결과, RPMI1640 배지 포함 배양 조성물에서 세포 증식 결과는 표 9, 도 12a 및 도 12b, 세포 생존률은 표 10, 도 13a 및 도 13b와 같다. 또한 TexMACS 배지 포함 배양 조성물에서 세포 증식 결과는 표 11, 도 14a 및 도 14b, 세포 생존률은 표 12, 도 15a 및 도 15b와 같다.

[198] [표9]

총 세포수($\times 10^6$)										
배양 조성물 첨가물질		CD4+ 세포			CD4+CD25+CD127- FACS 분리 후 세포수					
		0일	3일	6일	0일	3일	5일	7일	9일	12일
3.2nM	GI-101	10	12.1	18.8	0.5	4.9	32	58	98	420
	GI-101 WT	10	13.1	12	0.6	2.77	30	45	70	300
	hCD80-Fc+ Fc-IL-2_v2	10	12.1	14.1	0.4	1.69	16	74	80	255
	hCD80-Fc+ Fc-IL-2_wt	10	11.1	13.5	0.3	1.07	6.4	63	88	196
50nM	GI-101	10	21	51.9	1.8	2.7	29	47	71	380
	GI-101 WT	10	23	45.8	0.8	2.6	22	64	65	206
	hCD80-Fc+ Fc-IL-2_v2	10	16.5	37.3	0.89	0.9	7.7	24	41	108
	hCD80-Fc+ Fc-IL-2_wt	10	18.9	49.3	1.1	2.4	10	38	52	200

[199] [표10]

세포 생존률(%)										
배양 조성물 첨가물질		CD4+ 세포			CD4+CD25+CD127- FACS 분리 후 세포 생존률					
		0일	3일	6일	0일	3일	5일	7일	9일	12일
3.2nM	GI-101	92	96.5	96	92	93	90	93	92	93
	GI-101 WT	92	96	95	89	92	89	93	92	92
	hCD80-Fc+ Fc-IL-2_v2	92	95	95	90	92	91	93	90	93
	hCD80-Fc+ Fc-IL-2_wt	92	95	94	90	91	90	92	91	92
50nM	GI-101	92	96.5	96	92	94	93	92	94	94
	GI-101 WT	92	96	95	90	92	94	92	93	93
	hCD80-Fc+ Fc-IL-2_v2	92	95	95	90	92	93	94	91	94
	hCD80-Fc+ Fc-IL-2_wt	92	95	94	91	92	92	93	92	94

[200] [표11]

총 세포수(×10⁶)										
배양 조성물 첨가물질		CD4+ 세포			CD4+CD25+CD127- FACS 분리 후 세포수					
		0일	3일	6일	0일	3일	5일	7일	9일	12일
3.2nM	GI-101	10	35	64	5.8	5.2	30	30	92	220
	GI-101 WT	10	27	57	5	2.14	46	16	74	200
	hCD80-Fc+ Fc-IL-2_v2	10	24	50	5.48	3.45	16	16	50	170
	hCD80-Fc+ Fc-IL-2_wt	10	25	55	3.5	2.7	15	15	42	72
50nM	GI-101	10	30	68	6.2	5.7	30.6	30	240	500
	GI-101 WT	10	28	60	5.4	5	21	20	276	370
	hCD80-Fc+ Fc-IL-2_v2	10	23.5	48	5	4.2	13.3	13.3	113	150
	hCD80-Fc+ Fc-IL-2_wt	10	24	54	3.73	3.8	19	19.6	248	220

[201] [표12]

세포 생존률(%)										
배양 조성물 첨가물질		CD4+ 세포			CD4+CD25+CD127- FACS 분리 후 세포 생존률					
		0일	3일	6일	0일	3일	5일	7일	9일	12일
3.2nM	GI-101	94	93	96	92	93	97	94	92	96
	GI-101 WT	94	93	95	90	92	93	93	92	94
	hCD80-Fc+ Fc-IL-2_v2	94	95	95	90	92	95	93	96	95
	hCD80-Fc+ Fc-IL-2_wt	94	94	94	91	91	90	92	91	95
50nM	GI-101	94	96.5	96	92	94	96	96	94	98
	GI-101 WT	94	96	95	90	92	94	92	96	93
	hCD80-Fc+ Fc-IL-2_v2	94	95	95	91	88	93	94	91	96
	hCD80-Fc+ Fc-IL-2_wt	94	95	94	93	92	92	93	92	94

[202] **실시예 2.5. 세포 특성 확인**

[203] 실시예 2.4에서 회수한 CD4+CD25+CD127- 세포를 1,300 rpm, 4℃, 5분간 원심분리하였다. 또한, 상층액을 제거하고 1:200으로 FACS 버퍼에 희석한 Fc block(biolegend, cat#422302) 100 ul을 넣고 얼음에 10분간 방치하고, 추가적으로 2.5 ul CD4-PerCP-Cy5.5(eBioscience, cat#45-0048-42), 2.5 ul CD25-APC/Cy7(BD, cat#557753), 2.5 ul CD127-Brilliant Violet 785(Biolegend, cat#351330)를 넣고 얼음에 20분간 방치하였다.

[204] 이후, 1 mL FACS 버퍼를 추가로 넣고 1,300 rpm, 4℃, 5분간 원심분리하였다. Fixation/Permeabilization concentrate와 Fixation/Permeabilization Diluent를 1:3으로 혼합한 용액을 준비하고, 상기 원심분리 하여 얻은 세포에서 상층액 제거 후 100 ul를 넣고 얼음에 30분간 방치하였다. 이후, 1 mL FACS 버퍼를 추가로 넣고 1,300 rpm, 4℃, 5분간 원심분리를 두 번 반복하였다. 그 후, 상층액 제거하고 100 ul FACS 버퍼와 2.5 ul Foxp3-Pacific Blue(Biolegend, cat#320116)를 넣고 얼음에 20분간 방치하였다. 그 후, 1 mL FACS 버퍼를 추가로 넣고 1,300 rpm, 4℃, 5분간 원심분리하였다. 그 후, 상층액을 제거하고 FACS 버퍼 200 ul에 세포를 풀어주었다. 마지막으로, Cytek Aurora 장비로 세포 특성을 분석하였다.

[205] 그 결과, RPMI1640 배지 포함 조성물로부터 배양된 세포 특성에 대한 FACS 분석 결과는 도 16a 내지 도 16c와 같으며, 상기 배양 조건에서 확인된

CD4+CD25+Foxp3+ 발현 T 세포수는 표 13, 도 17a 내지 도 17c와 같다. 또한, TexMACS 배지 포함 조성물로부터 배양된 세포 특성에 대한 FACS 분석 결과는 도 18a 내지 도 18c와 같으며, 상기 배양 조건에서 확인된 CD4+CD25+Foxp3+ 발현 T 세포수는 표 14 및 도 19a 내지 도 19c와 같다.

[206] [표13]

총 세포수($\times 10^6$)					
배양 조성물 첨가물질		CD4+ 세포		CD4+CD25+CD127- FACS 분리 후 세포 수	
		0일	6일	6일	12일
3.2nM	GI-101	0.25	2.1	33.3	61.3
	GI-101 WT	0.25	0.97	18.9	30
	hCD80-Fc+ Fc-IL-2_v2	0.25	0.99	2.96	67
	hCD80-Fc+ Fc-IL-2_wt	0.25	1.08	7.56	18
50nM	GI-101	0.25	7.27	27.7	98.8
	GI-101 WT	0.25	2.75	28.1	30.3
	hCD80-Fc+ Fc-IL-2_v2	0.25	2.35	1.2	11.2
	hCD80-Fc+ Fc-IL-2_wt	0.25	1.97	3.3	20

[207] [표14]

총 세포수(×10⁶)					
배양 조성물 첨가물질		CD4+ 세포		CD4+CD25+CD127- FACS 분리 후 세포 수	
		0일	6일	6일	12일
3.2nM	GI-101	0.3	38.4	18	118.8
	GI-101 WT	0.3	35.3	26.7	83.4
	hCD80-Fc+Fc-IL-2_v2	0.3	8.2	5.4	56.1
	hCD80-Fc+Fc-IL-2_wt	0.3	8.7	5.25	30.2
50nM	GI-101	0.3	43.1	20.8	353.5
	GI-101 WT	0.3	38.2	13.6	189.8
	hCD80-Fc+Fc-IL-2_v2	0.3	7.7	5.3	18
	hCD80-Fc+Fc-IL-2_wt	0.3	10.5	7.2	28.6

[208] **실시예 2.6. 면역 억제성 사이토카인 분비능 확인: 인터루킨-10**

[209] 상기 실시예 2.4에서 수득된 조절 T 세포의 IL-10 분비능을 평가하기 위하여, 세포수를 1×10⁶ cells/mL로 맞춰 배양한 후 배양 상층액을 수득하여 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) 분석을 수행하였다.

[210] 먼저, Human IL-10 ELISA Kit(Invitrogen, Cat# KAC1321)의 인큐베이션 버퍼를 100 ul씩 마이크로플레이트(micro plate)에 분주한 후, 칼리브레이션(calibration), 컨트롤(control) 또는 조절 T 세포 배양 상층액 샘플(sample)을 각각 100 ul씩 넣어 분주하였다. 그 후, 마이크로플레이트를 접착 필름(Adhesive film)으로 덮고 쉐이커(shaker)에서 2시간 동안 실온(18℃ 내지 25℃)에서 700 rpm으로 쉐이킹하며 반응시켰다. 그 후, 웰 당 약 150 μL 세척 버퍼로 마이크로웰 스트립(microwell strip)을 3회 세척하였다.

[211] 세척 후에, 표본 희석제(Specimen Diluent)를 100 ul씩 넣어주었다. 그 후, anti-IL-10-HRP를 50 ul 넣어준 후, 2시간 동안 실온에서 700 rpm으로 쉐이킹하며 반응시킨 뒤, 웰 당 약 150 μL 세척 버퍼로 3회 세척하였다. 세척 후, TMB를 100 ul씩 넣어 주고, 15분 동안 실온에서 반응시킨 다음, 100 ul 스탑 솔루션(stop solution)을 넣어 반응을 종료하였다. 그 후, 450 nm를 사용하여 각 마이크로웰의 형광 값을 측정하였다.

[212] 그 결과, RPMI1640 배지 포함 조성물로부터 배양된 세포의 인터루킨-10

분비능은 도 20과 같으며, TexMACS 배지 포함 조성물로부터 배양된 세포의 인터루킨-10 분비능은 도 21과 같다. 도 20 및 도 21을 통해 GI-101을 배양 조성물에 첨가한 조절 T 세포들로부터 인터루킨-10이 높게 발현하는 것을 확인하였다.

청구범위

[청구항 1] IL-2 단백질 또는 이의 변이체 및 CD80 단백질 또는 이의 단편을 포함하는 융합단백질 이량체를 유효성분으로 포함하는 조절 T 세포 증식용 조성물.

[청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 IL-2 단백질 또는 이의 변이체 및 CD80 단백질 또는 이의 단편은 링커에 의해 결합된 것인, 조절 T 세포 증식용 조성물.

[청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 IL-2 단백질은 서열번호 10의 아미노산 서열을 갖는 것인, 조절 T 세포 증식용 조성물.

[청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 CD80은 서열번호 11의 아미노산 서열을 갖는 것인, 조절 T 세포 증식용 조성물.

[청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 융합단백질은 서열번호 9의 아미노산 서열을 갖는 것인, 조절 T 세포 증식용 조성물.

[청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 조절 T 세포는 CD4+CD25+CD127- 세포인 것인, 조절 T 세포 증식용 조성물.

[청구항 7] IL-2 단백질 또는 이의 변이체 및 CD80 단백질 또는 이의 단편을 포함하는 융합단백질 이량체를 포함하는 조절 T 세포 증식용 배지.

[청구항 8] 제7항에 있어서,
CD4+ T 세포 배양용 배지를 더 포함하는 것인, 조절 T 세포 증식용 배지.

[청구항 9] 제8항에 있어서,
상기 CD4+ T 세포 배양용 배지는 아미노산(amino acids), 당류(sugars), 무기염(inorganic salts) 및 비타민을 포함하는, 조절 T 세포 증식용 배지.

[청구항 10] IL-2 단백질 또는 이의 변이체 및 CD80 단백질 또는 이의 단편을 포함하는 융합단백질 이량체가 포함된 배지에서 CD4+CD25+CD127- T 세포를 배양하는 단계를 포함하는 조절 T 세포 배양 방법.

[청구항 11] 제10항에 있어서,
상기 CD4+CD25+CD127- T 세포는 혈액세포에서 수득된 것인, 조절 T 세포 수득 방법.

[청구항 12] 제10항에 있어서,
1일 내지 20일 배양하는 것인, 조절 T 세포 수득 방법.

[청구항 13] 제10항에 있어서,
상기 CD4+CD25+CD127- T 세포는 CD4+ T 세포를 배양하는 단계; 또는 CD25+ T 세포를 배양하는 단계를 통해 수득된 것인, 조절 T 세포 수득

방법.

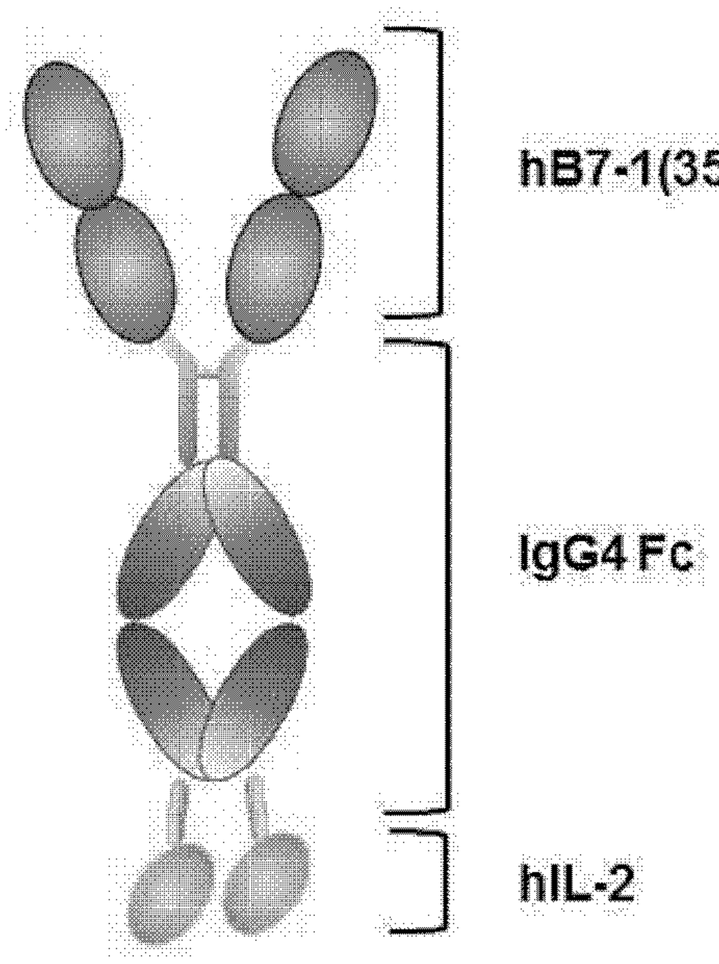
[청구항 14] 제10항 내지 제13항 중 어느 하나의 방법에 의해서 수득된 조절 T 세포.

[청구항 15] 제14항에 있어서,
상기 조절 T 세포는 Foxp3+ 발현량이 증가된 것인, 조절 T 세포.

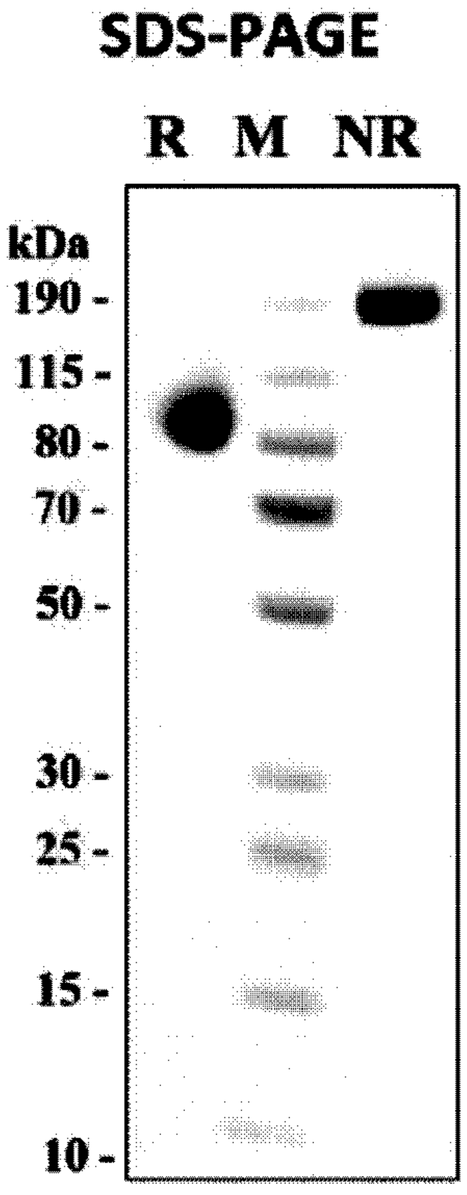
[청구항 16] 제14항의 조절 T 세포를 유효성분으로 포함하는 조절 T 세포 매개성 질환 치료용 조성물.

[청구항 17] 제14항의 조절 T 세포를 조절 T 세포 매개성 질환을 가지고 있는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 조절 T 세포 매개성 질환 치료 방법.

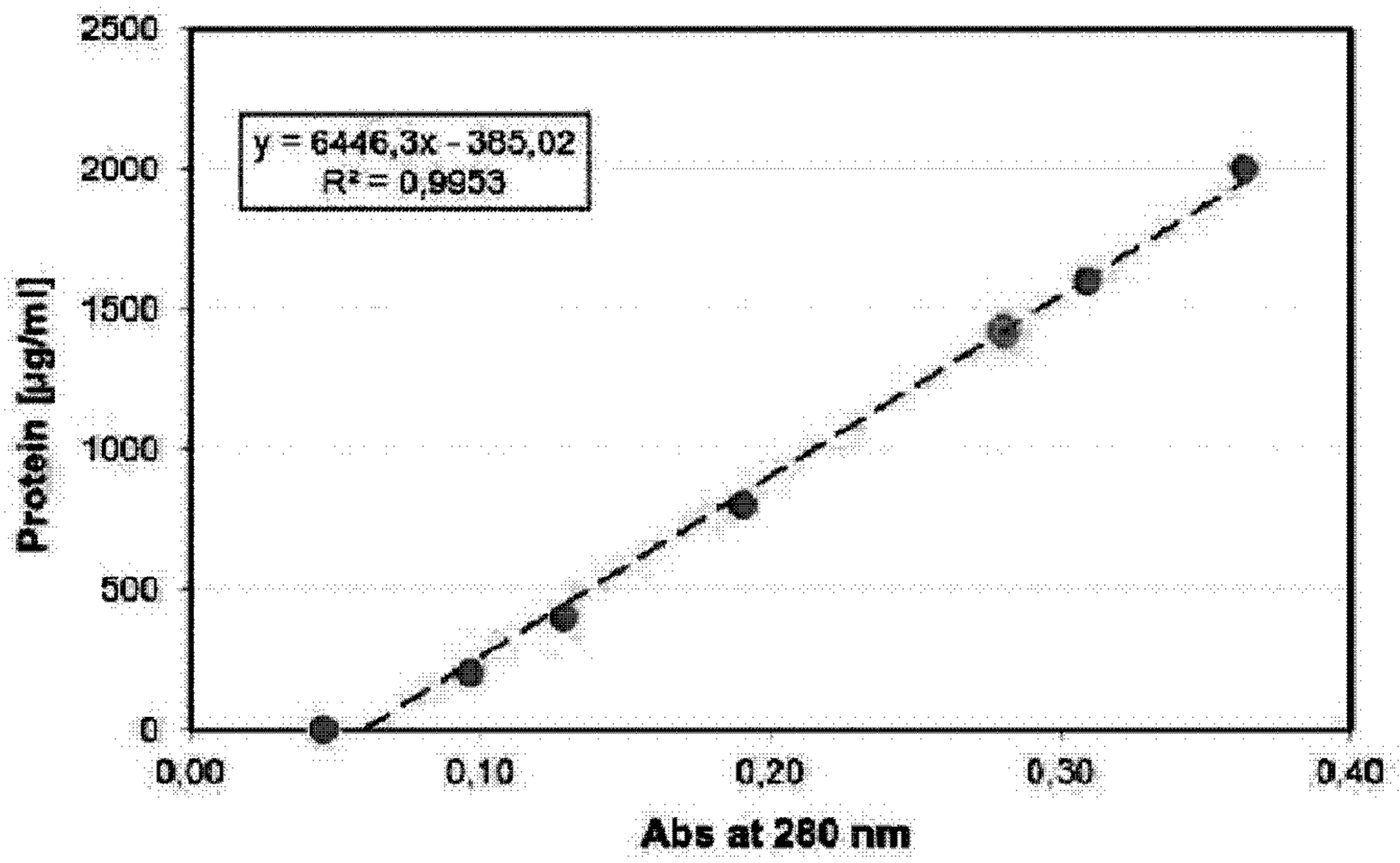
[도1a]


hB7-1(35-242)
IgG4 Fc
hIL-2

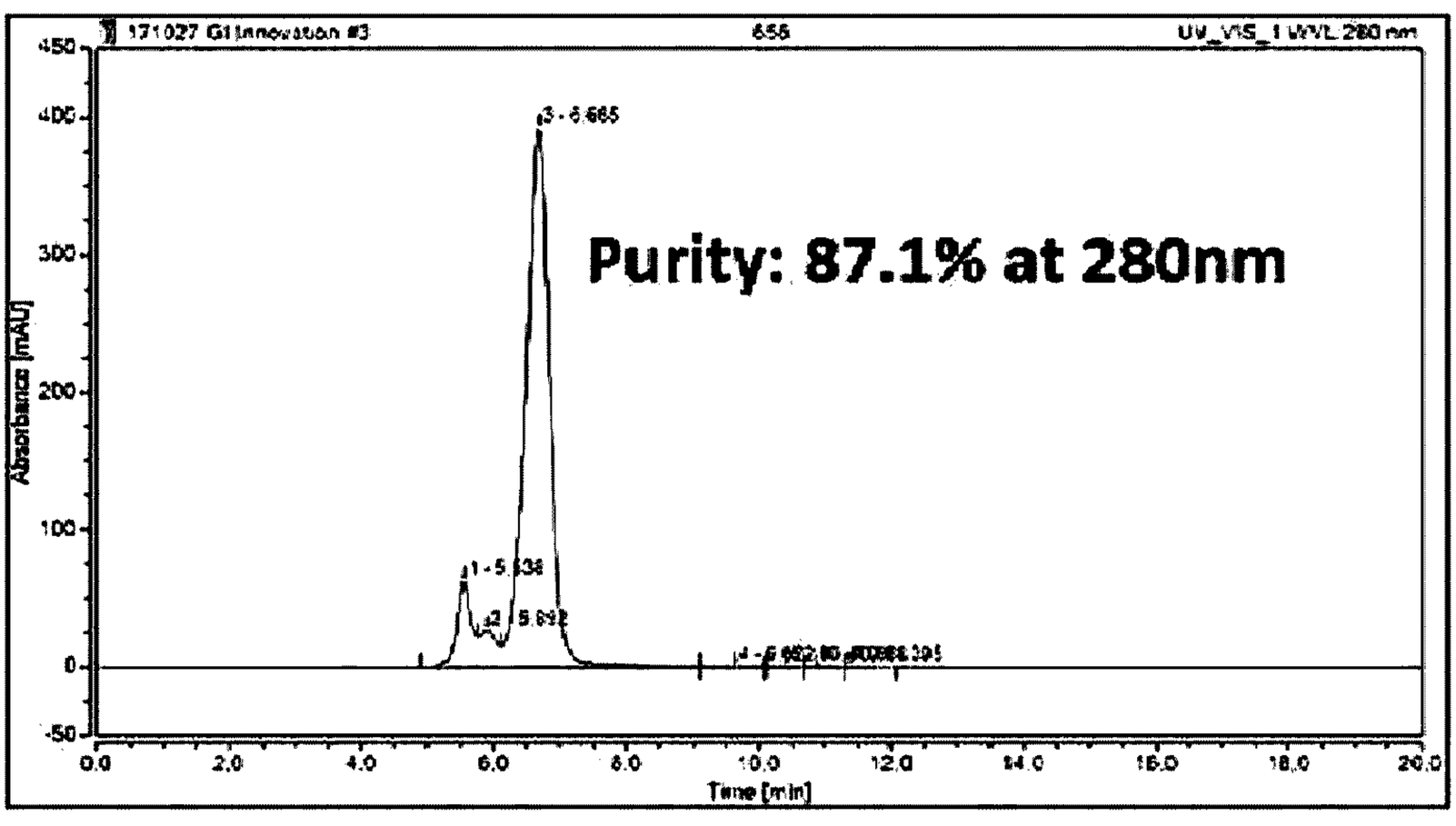
[도1b]


SDS-PAGE
R M NR
kDa
190 -
115 -
80 -
70 -
50 -
30 -
25 -
15 -
10 -

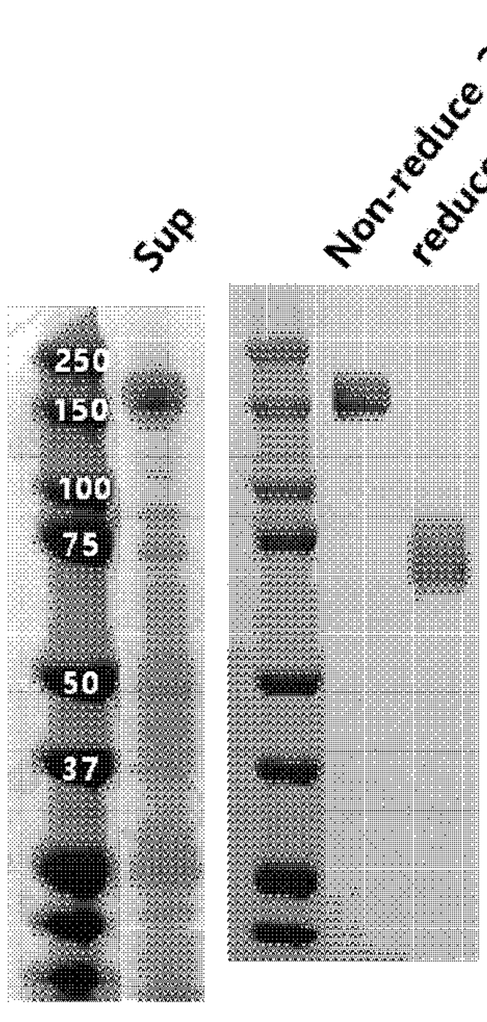
[도1c]


y = 6446,3x - 385,02
R² = 0,9953
Protein [µg/ml]
2500
2000
1500
1000
500
0
0,00
0,10
0,20
0,30
0,40
Abs at 280 nm

[도1d]

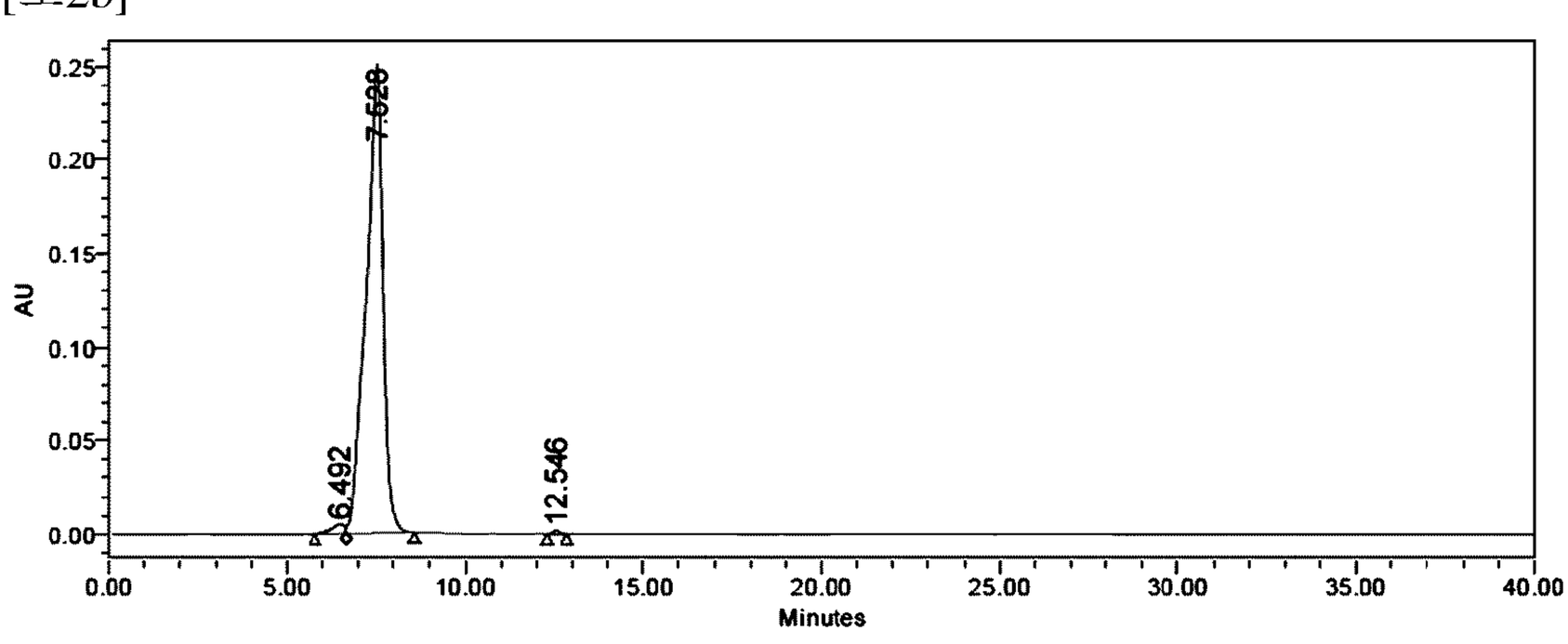

Anlytical size exclusion chromatography (SEC)
171027 G1Innovation #3
656
UV_VIS_1 WVL:280 nm
Purity: 87.1% at 280nm
Absorbance [mAU]
Time [min]

[도2a]



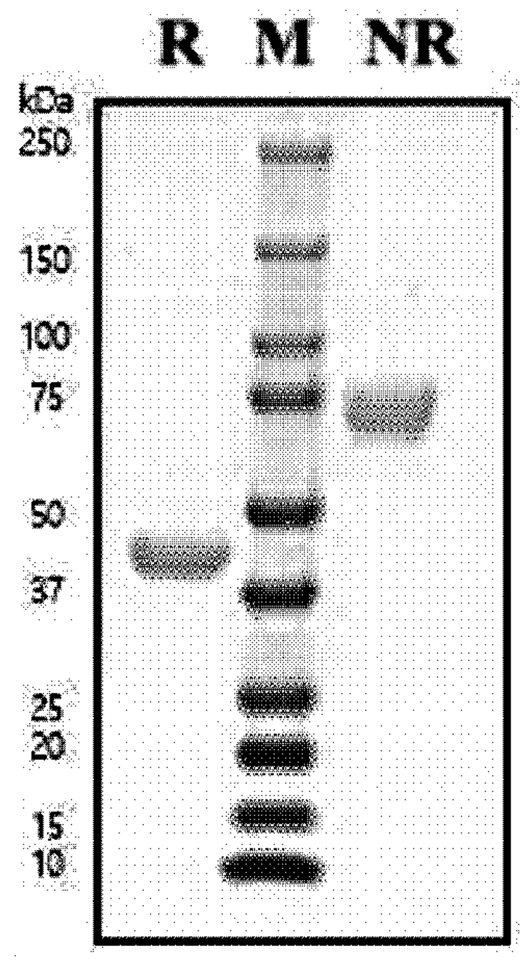
Expected size
(kDa)
monomer: 50.5
Dimer : 101

[도2b]

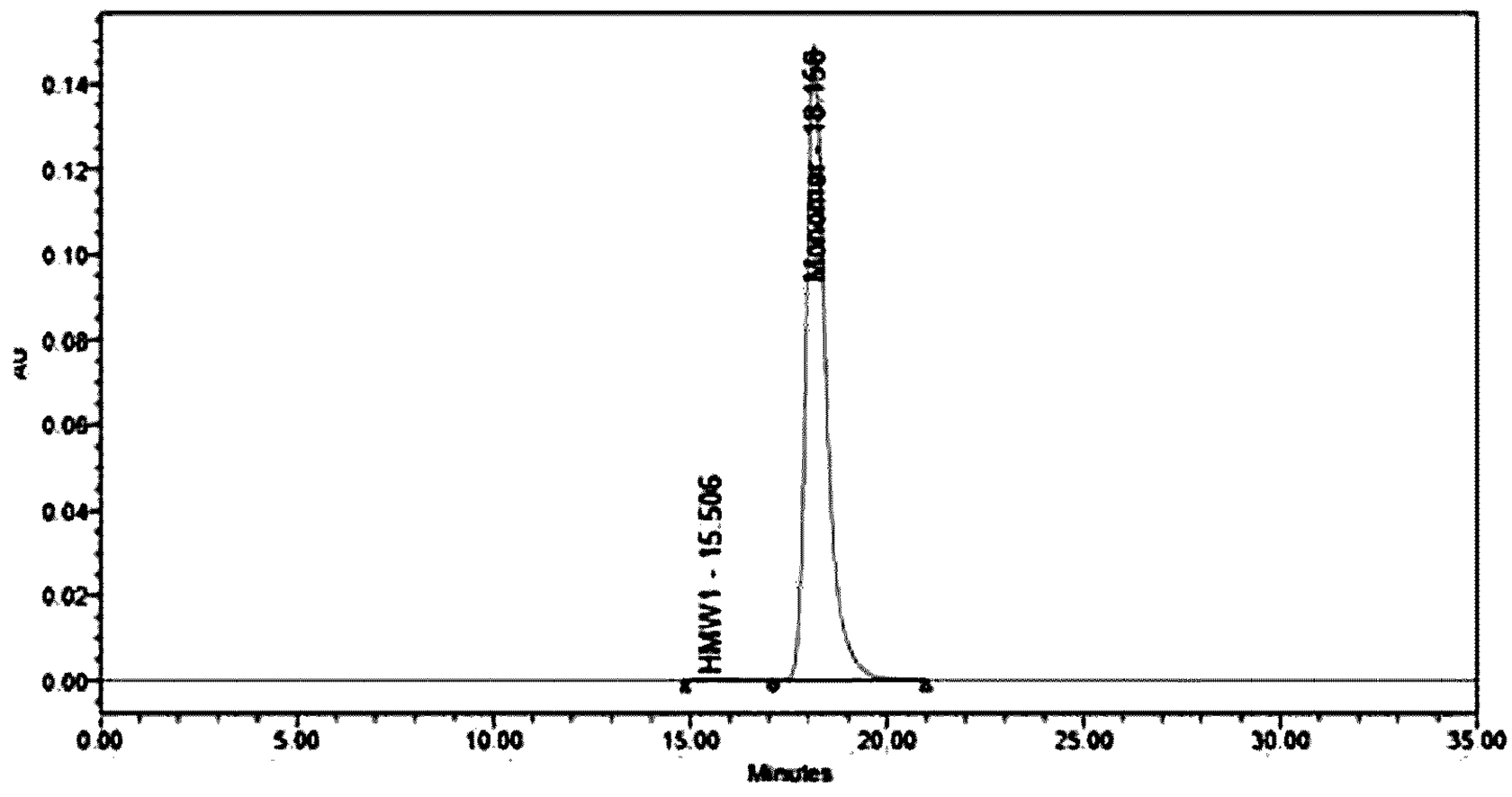


	RT	Area	% Area	Height
1	6.492	143663	1.66	5185
2	7.528	8497629	98.06	250509
3	12.546	24077	0.28	2005

[도3a]

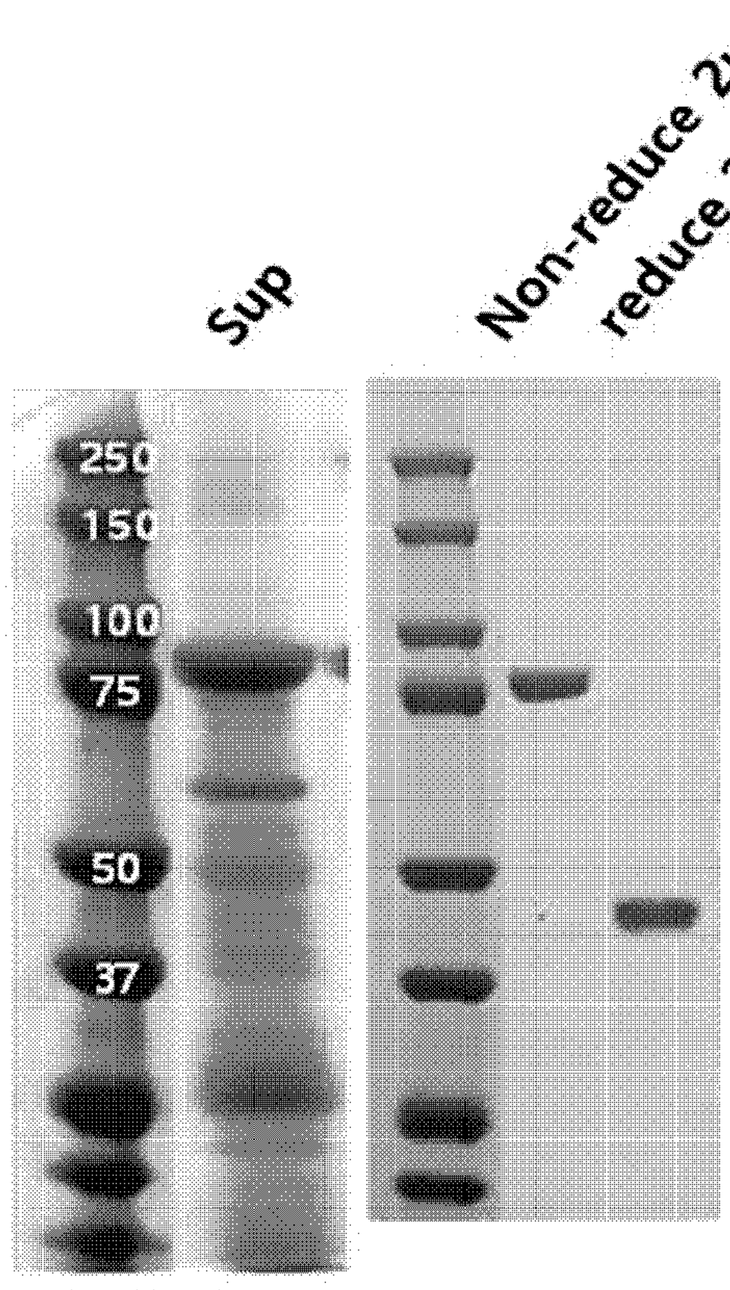


[도3b]



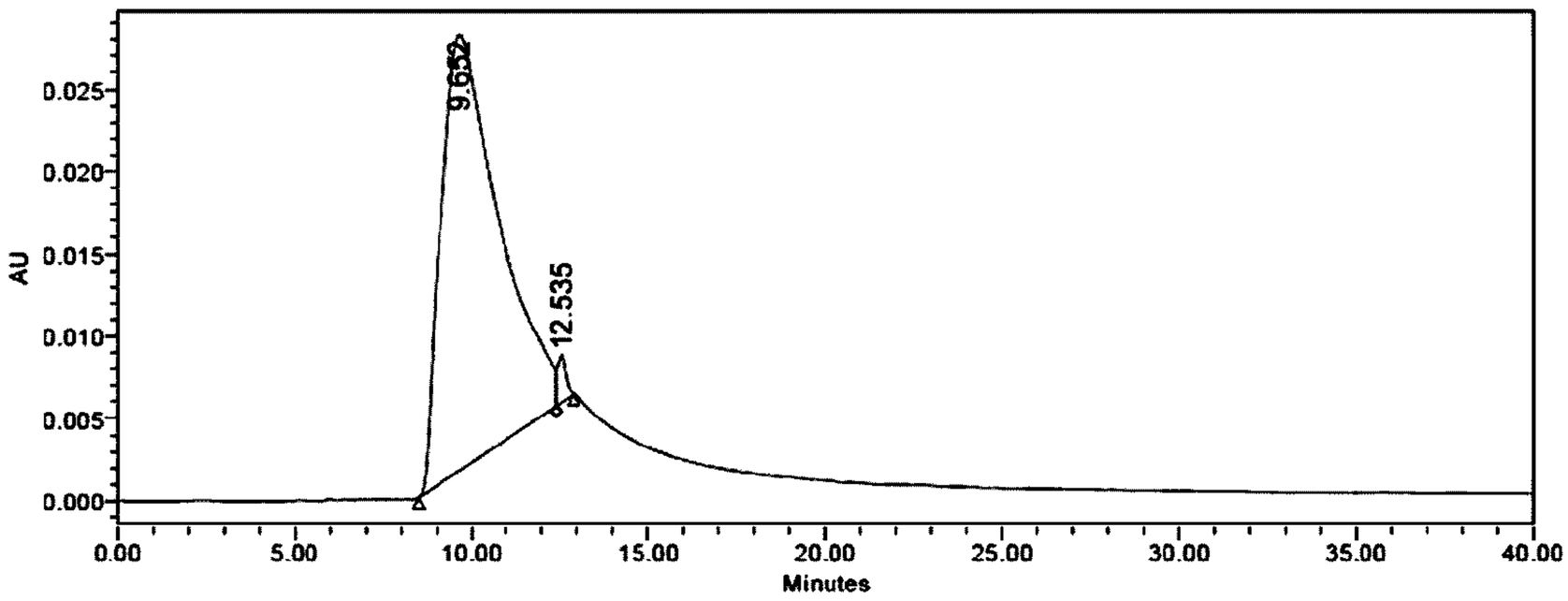
	Peak Name	RT	Area	% Area	Height
1	HMW1	15.506	28137	0.52	426
2	Monomer	18.158	5363386	99.48	148945

[도3c]



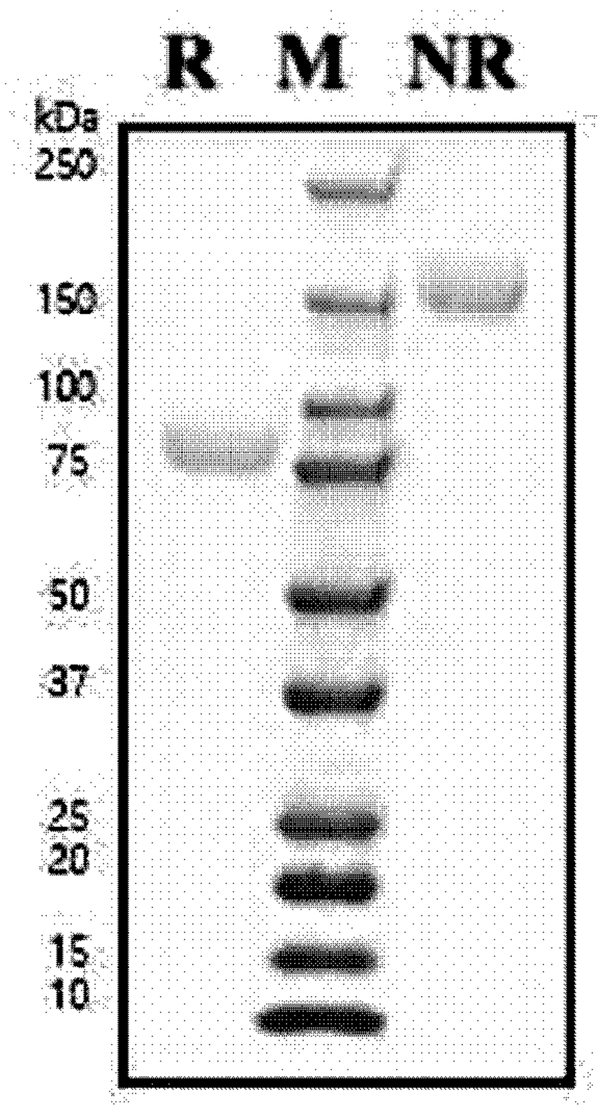
Expected size (kDa)
monomer: 41.3
Dimer : 82.6

[도3d]

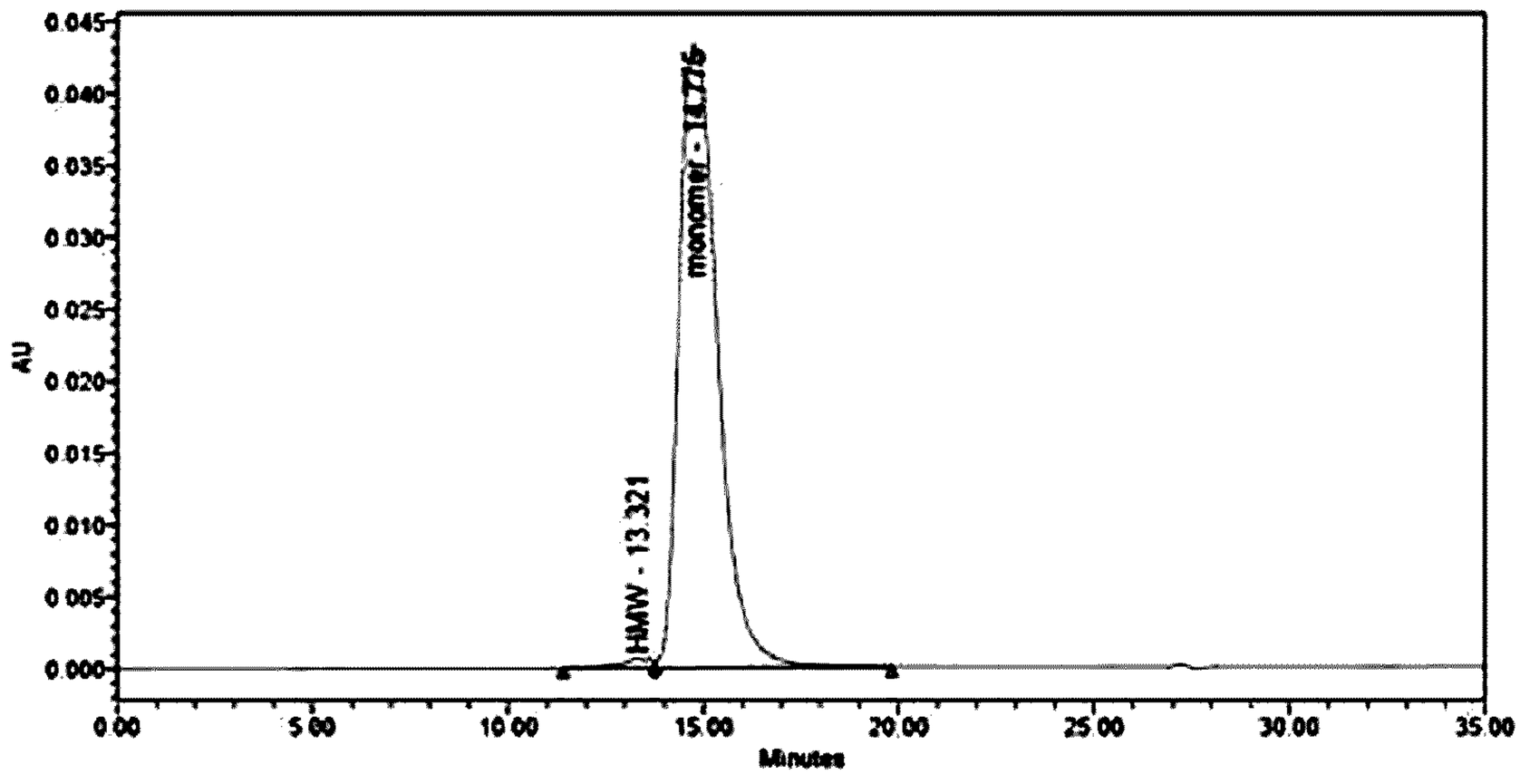


	RT	Area	% Area	Height
1	9.652	2996084	98.41	26478
2	12.535	48430	1.59	2882

[도4a]

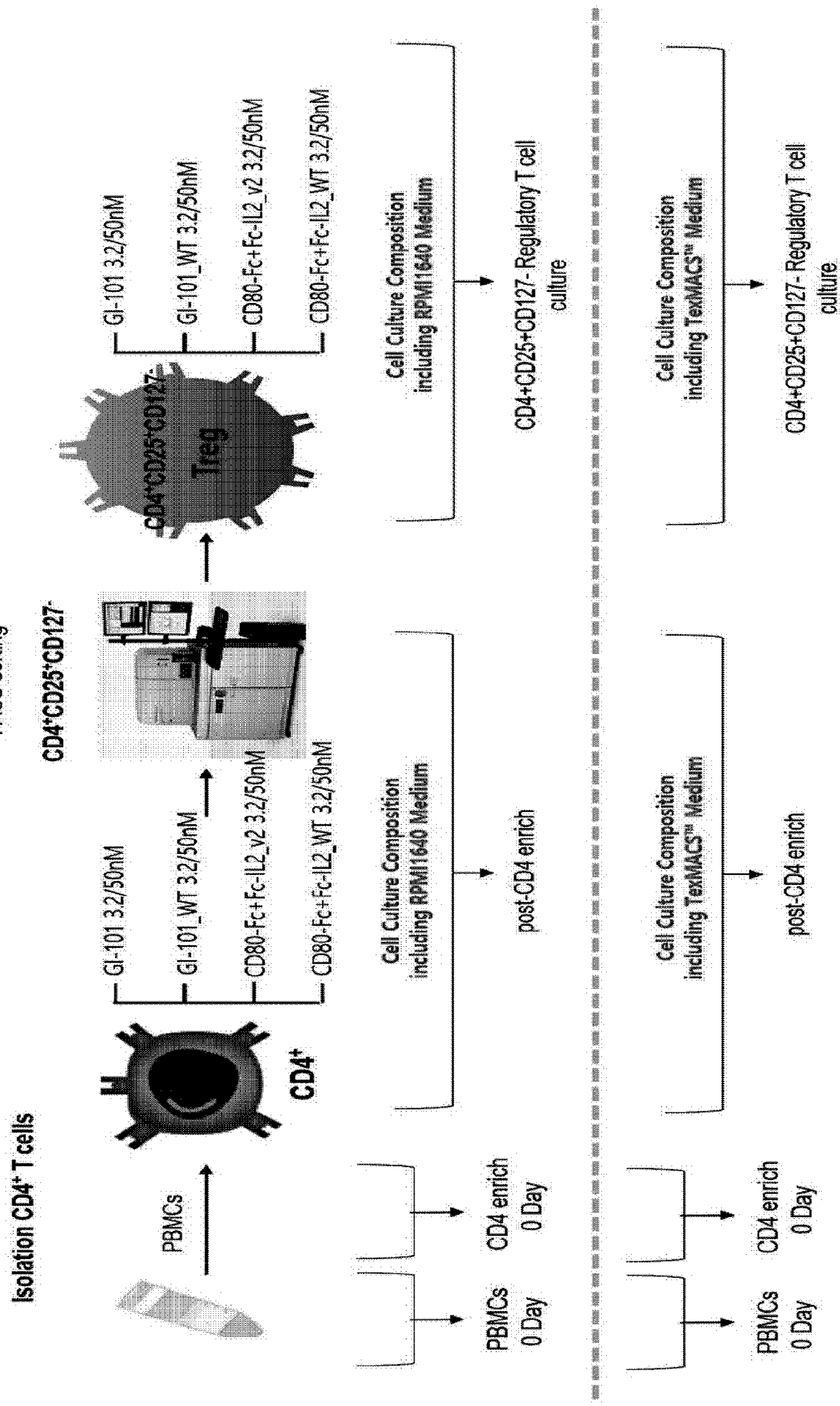


[도4b]

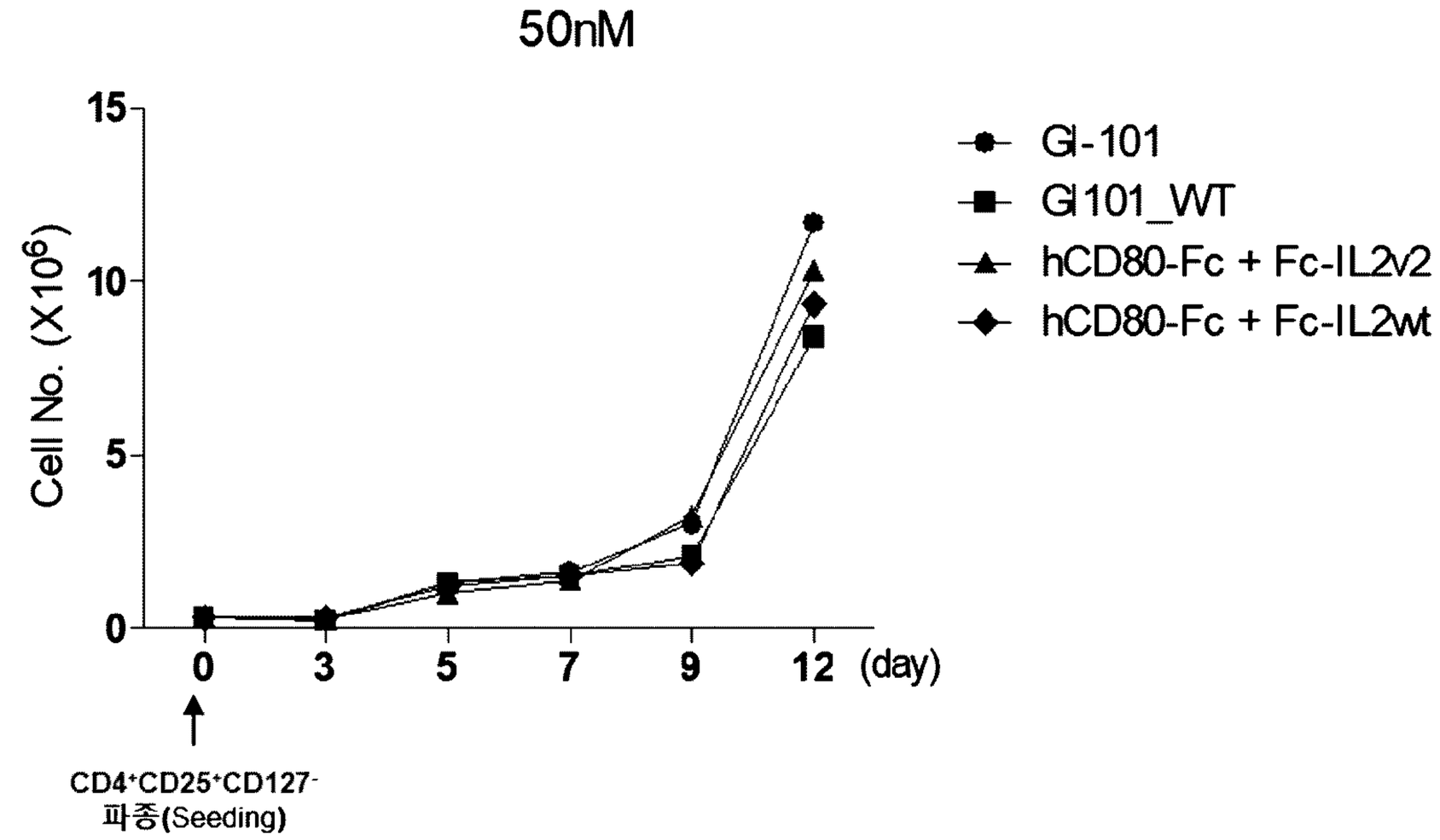


	Peak Name	RT	Area	% Area	Height
1	HMW	13.321	33675	1.13	625
2	monomer	14.775	2952831	98.87	43291

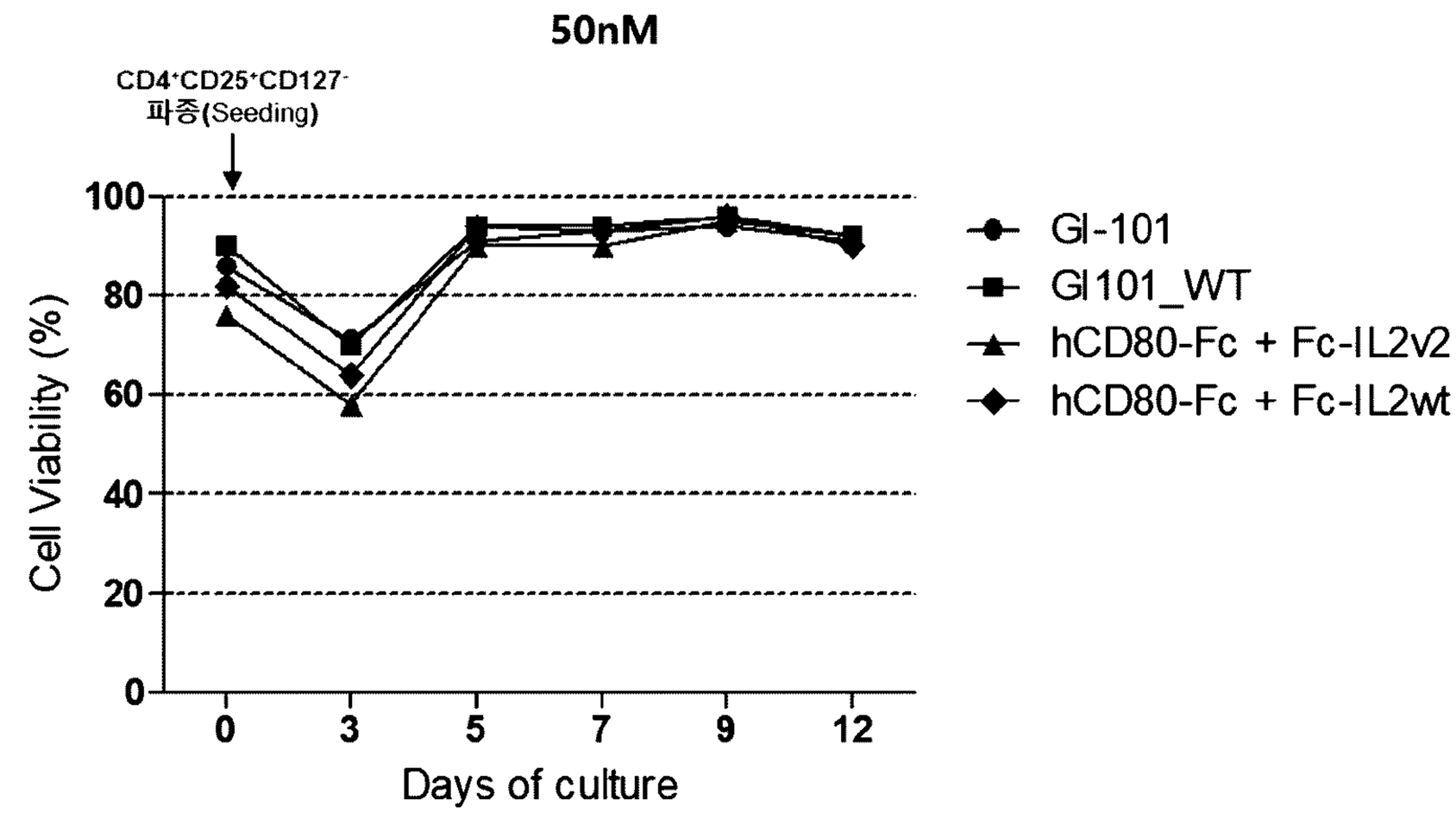
[도5]


Isolation CD4+ T cells
PBMCs
CD4+
FACS sorting
CD4+CD25+CD127-
Treg
GI-101 3.2/50nM
GI-101_WT 3.2/50nM
CD80-Fc+Fc-IL2_v2 3.2/50nM
CD80-Fc+Fc-IL2_WT 3.2/50nM
Cell Culture Composition including RPMI1640 Medium
Cell Culture Composition including TexMACS™ Medium
post-CD4 enrich
CD4 enrich
0 Day
PBMCs
0 Day

[도6]


50nM
Cell No. (X10^6)
15
10
5
0
0
3
5
7
9
12
(day)
CD4+CD25+CD127-
파종(Seeding)
GI-101
GI101_WT
hCD80-Fc + Fc-IL2v2
hCD80-Fc + Fc-IL2wt

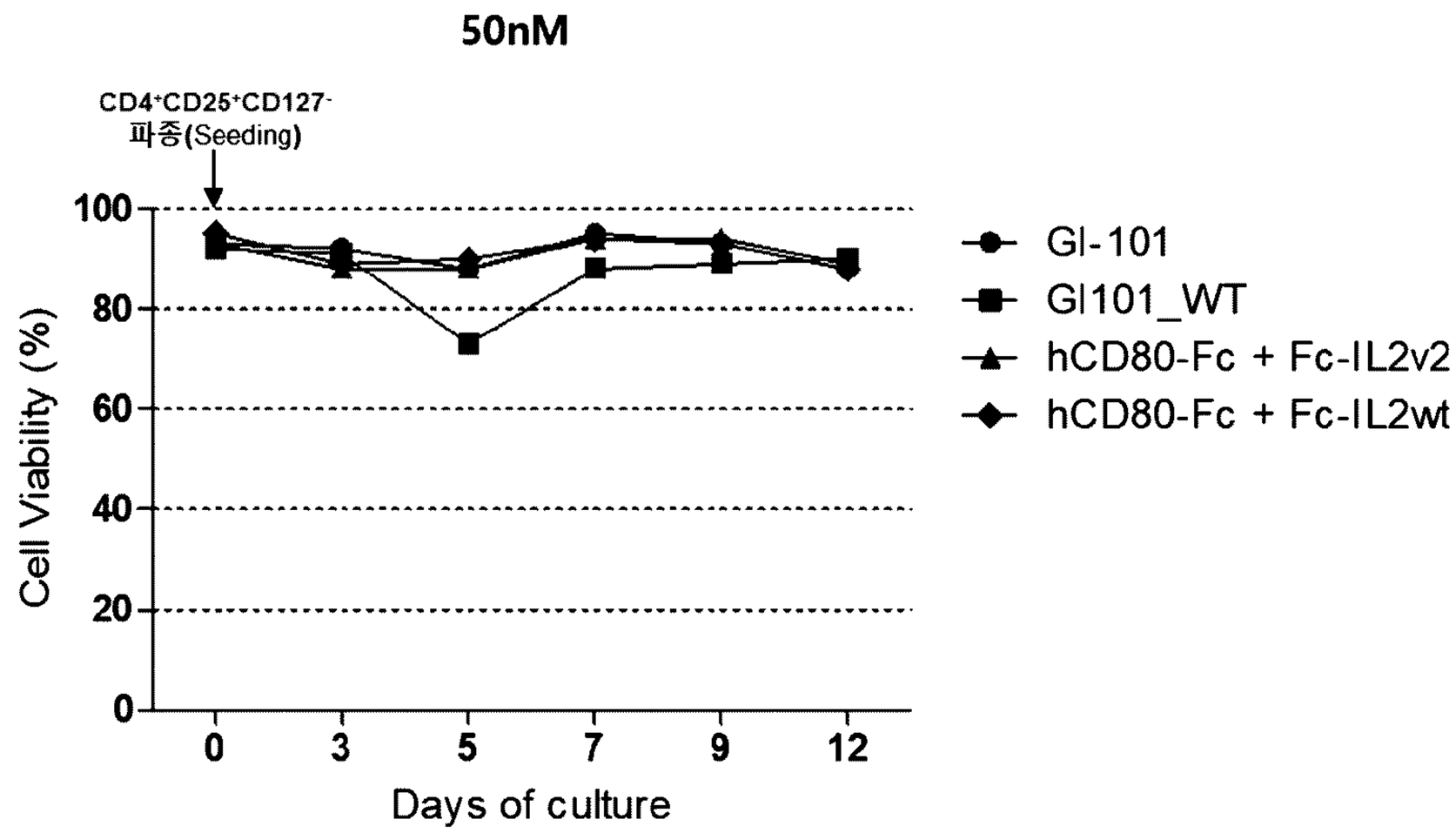
[도7]


50nM
CD4+CD25+CD127-
파종(Seeding)
Cell Viability (%)
100
80
60
40
20
0
0
3
5
7
9
12
Days of culture
GI-101
GI101_WT
hCD80-Fc + Fc-IL2v2
hCD80-Fc + Fc-IL2wt

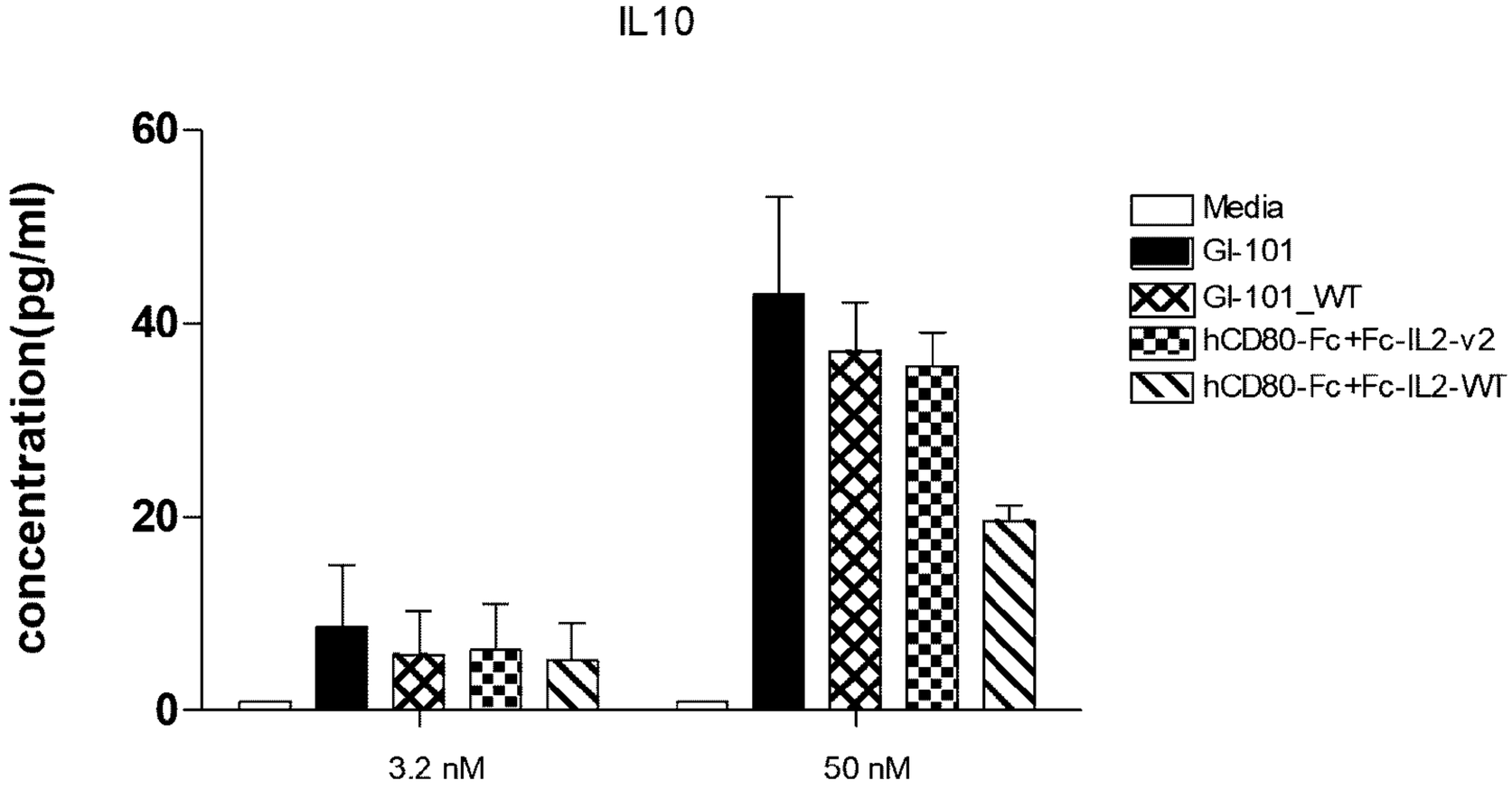
[도8]

50nM
Cell No. (X10^6)
15
10
5
0
0
3
5
7
9
12
(day)
CD4+CD25+CD127-
파종(Seeding)
GI-101
GI101_WT
hCD80-Fc + Fc-IL2v2
hCD80-Fc + Fc-IL2wt

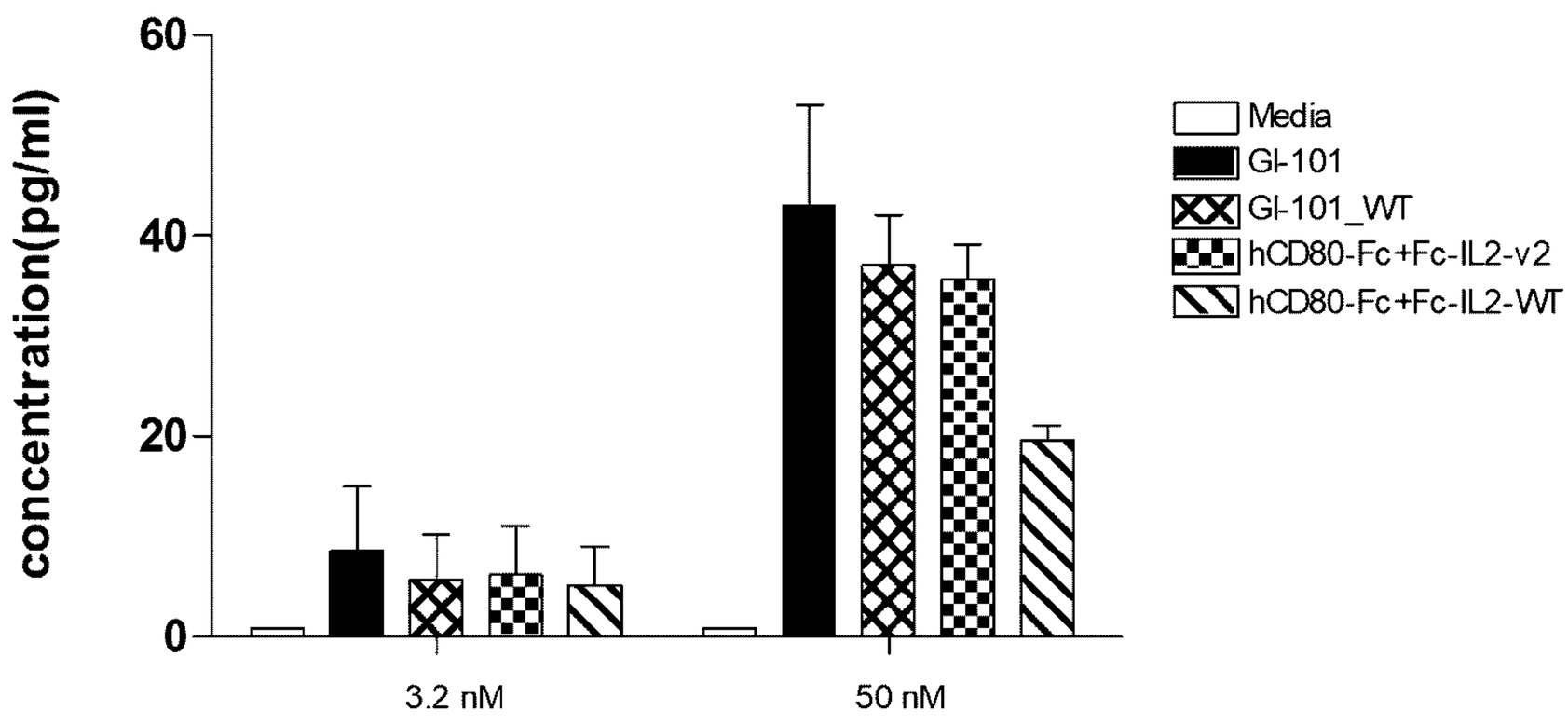
[도9]


50nM
CD4+CD25+CD127-
파종(Seeding)
Cell Viability (%)
100
80
60
40
20
0
0
3
5
7
9
12
Days of culture
GI-101
GI101_WT
hCD80-Fc + Fc-IL2v2
hCD80-Fc + Fc-IL2wt

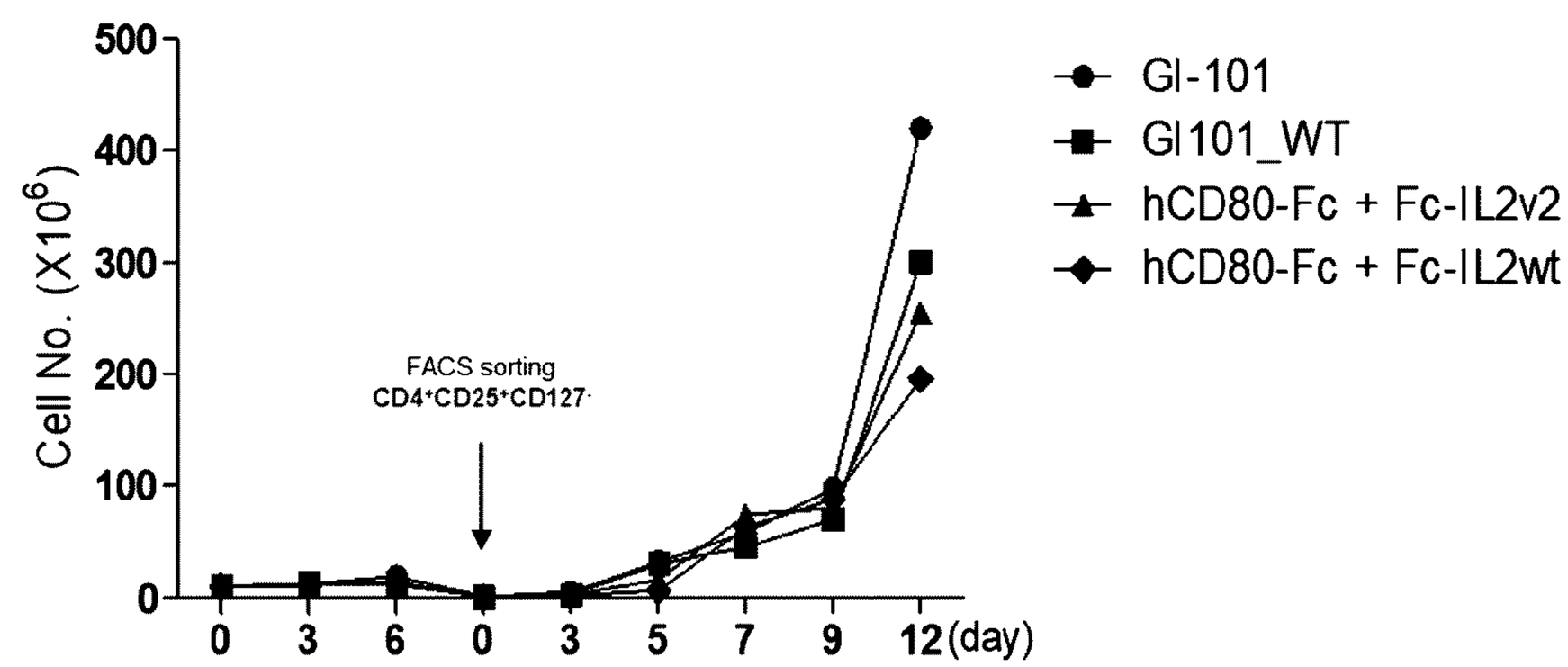
[도10]


IL10
concentration(pg/ml)
60
40
20
0
3.2 nM
50 nM
Media
GI-101
GI-101_WT
hCD80-Fc+Fc-IL2-v2
hCD80-Fc+Fc-IL2-WT

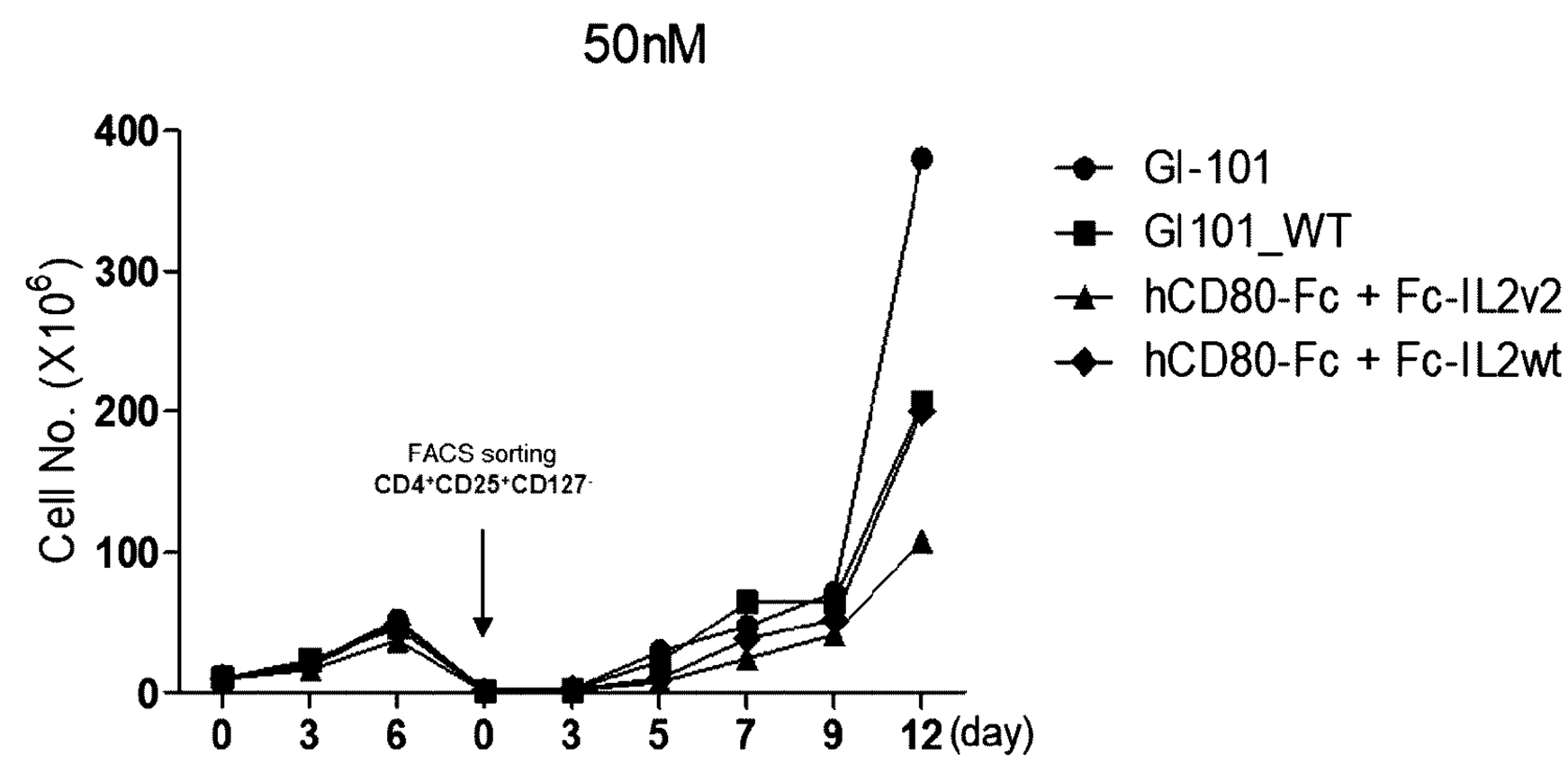
[도11]


IL10
concentration(pg/ml)
60
40
20
0
3.2 nM
50 nM
Media
GI-101
GI-101_WT
hCD80-Fc+Fc-IL2-v2
hCD80-Fc+Fc-IL2-WT

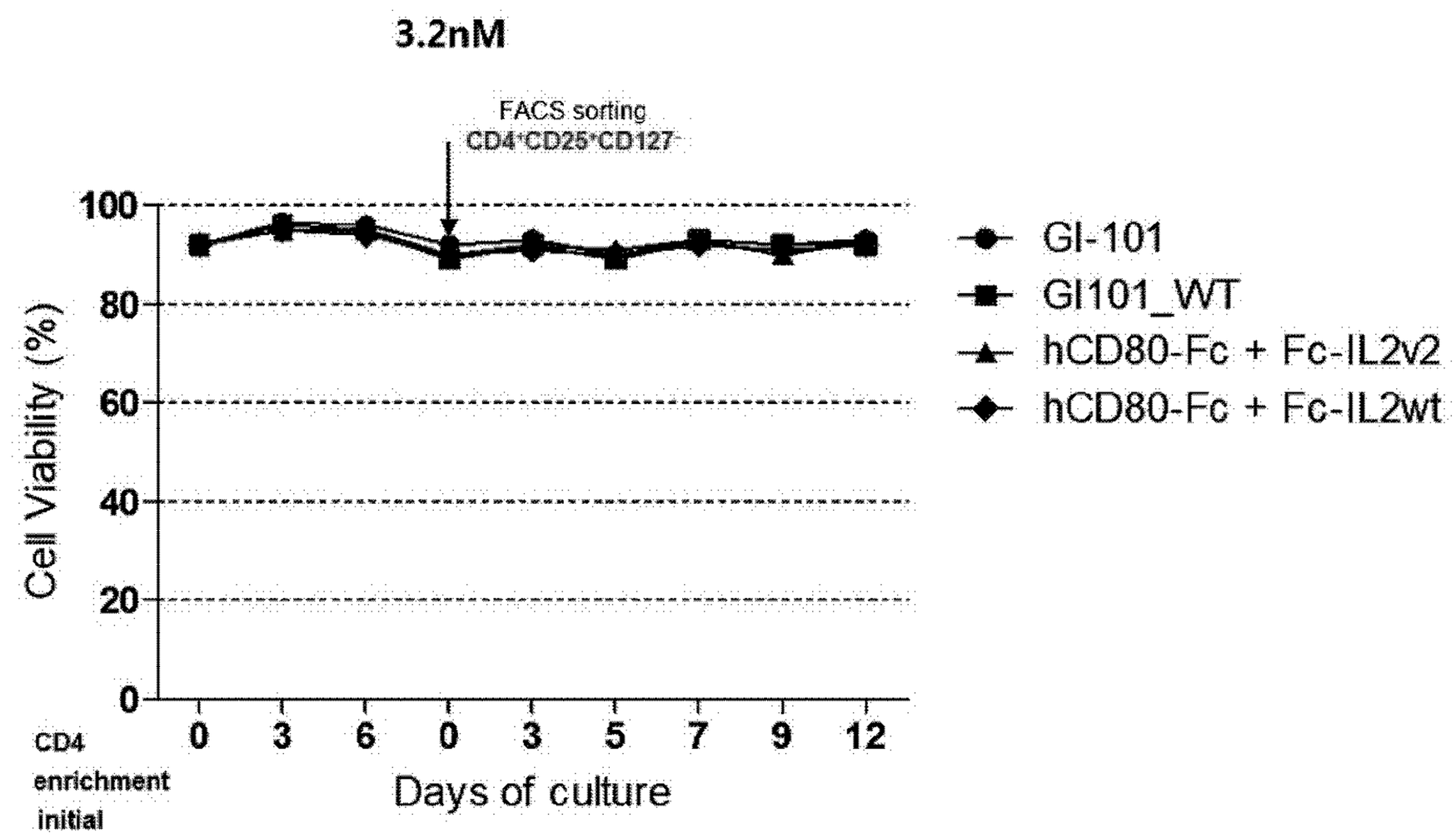
[도12a]



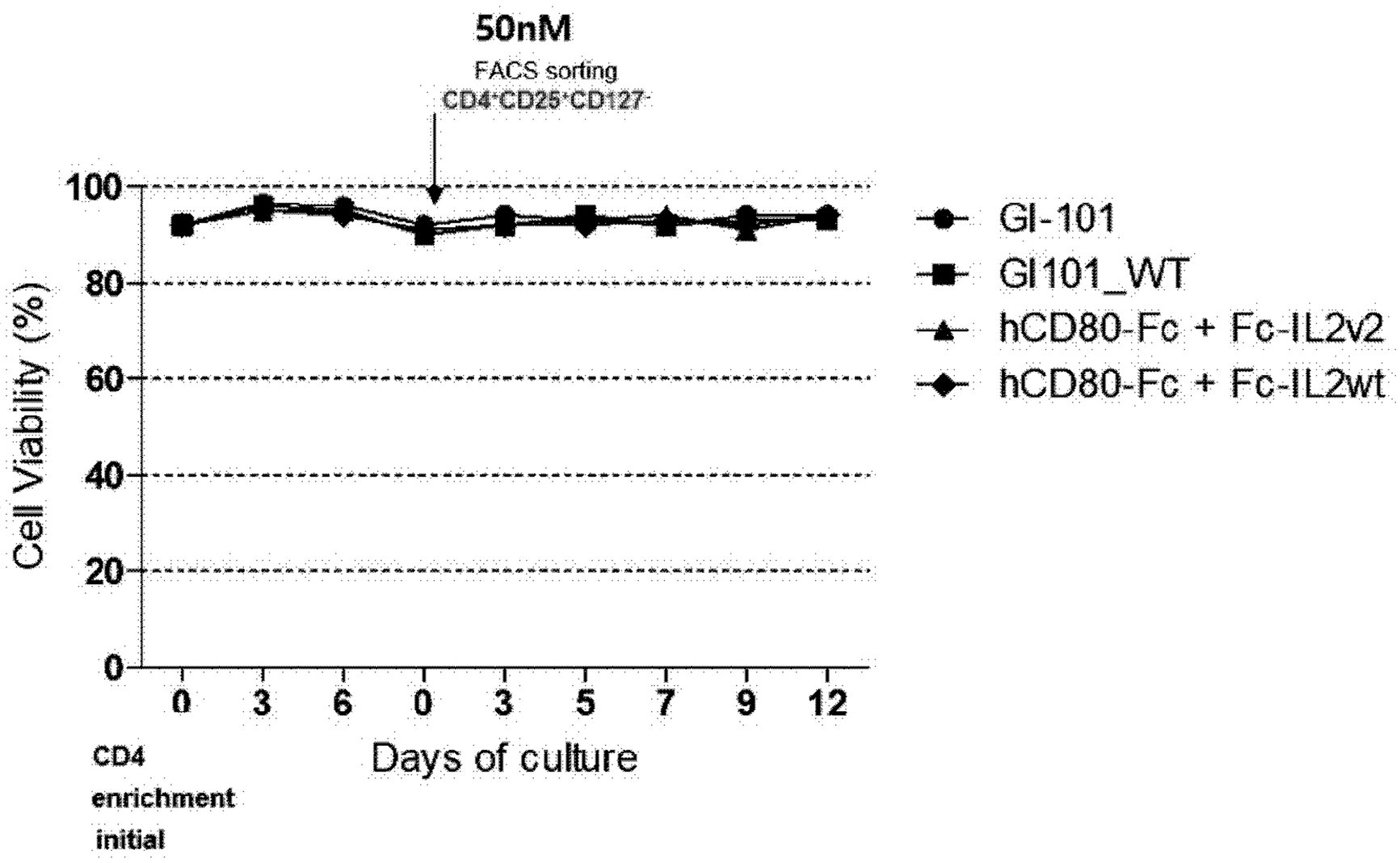
[도12b]



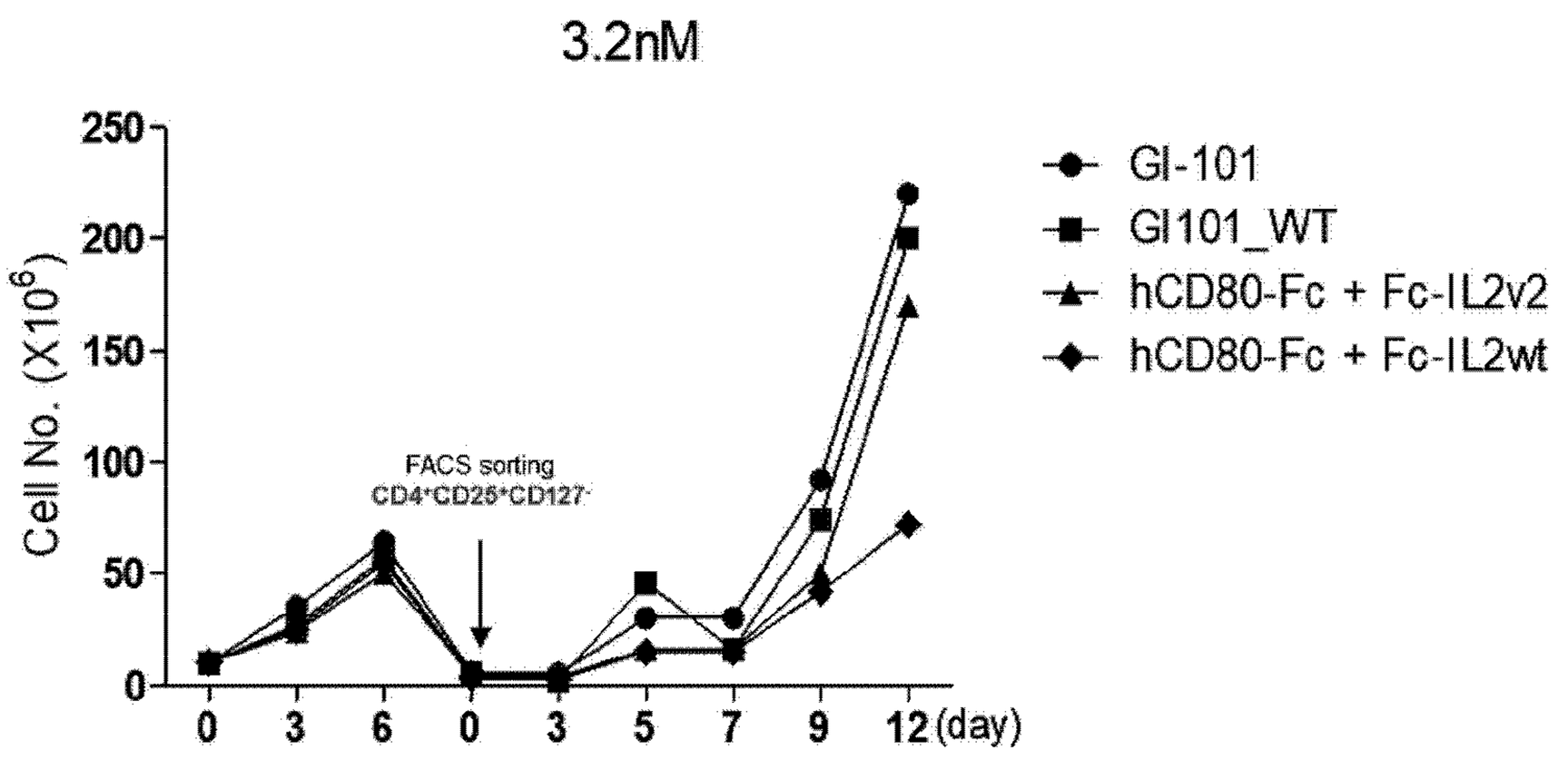
[도13a]



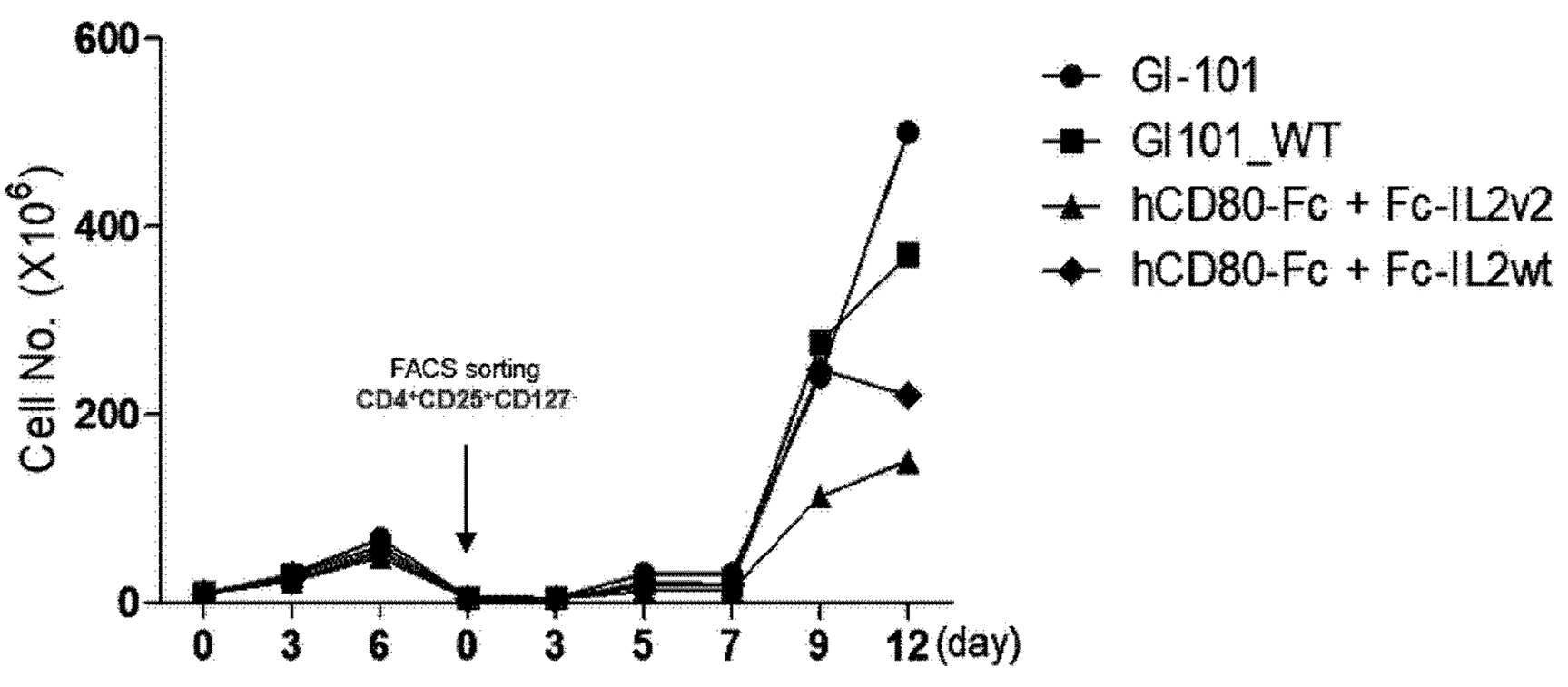
[도13b]



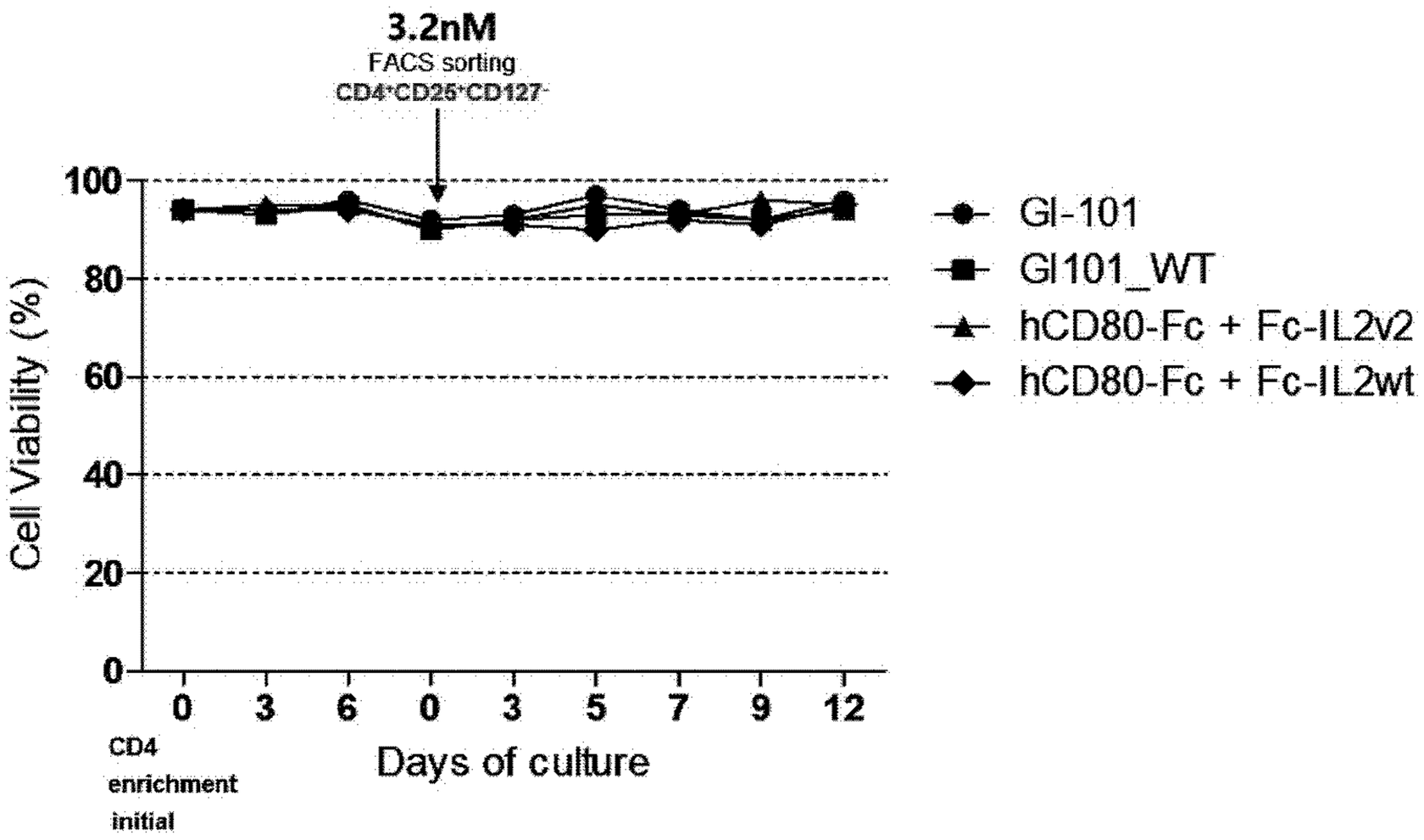
[도14a]



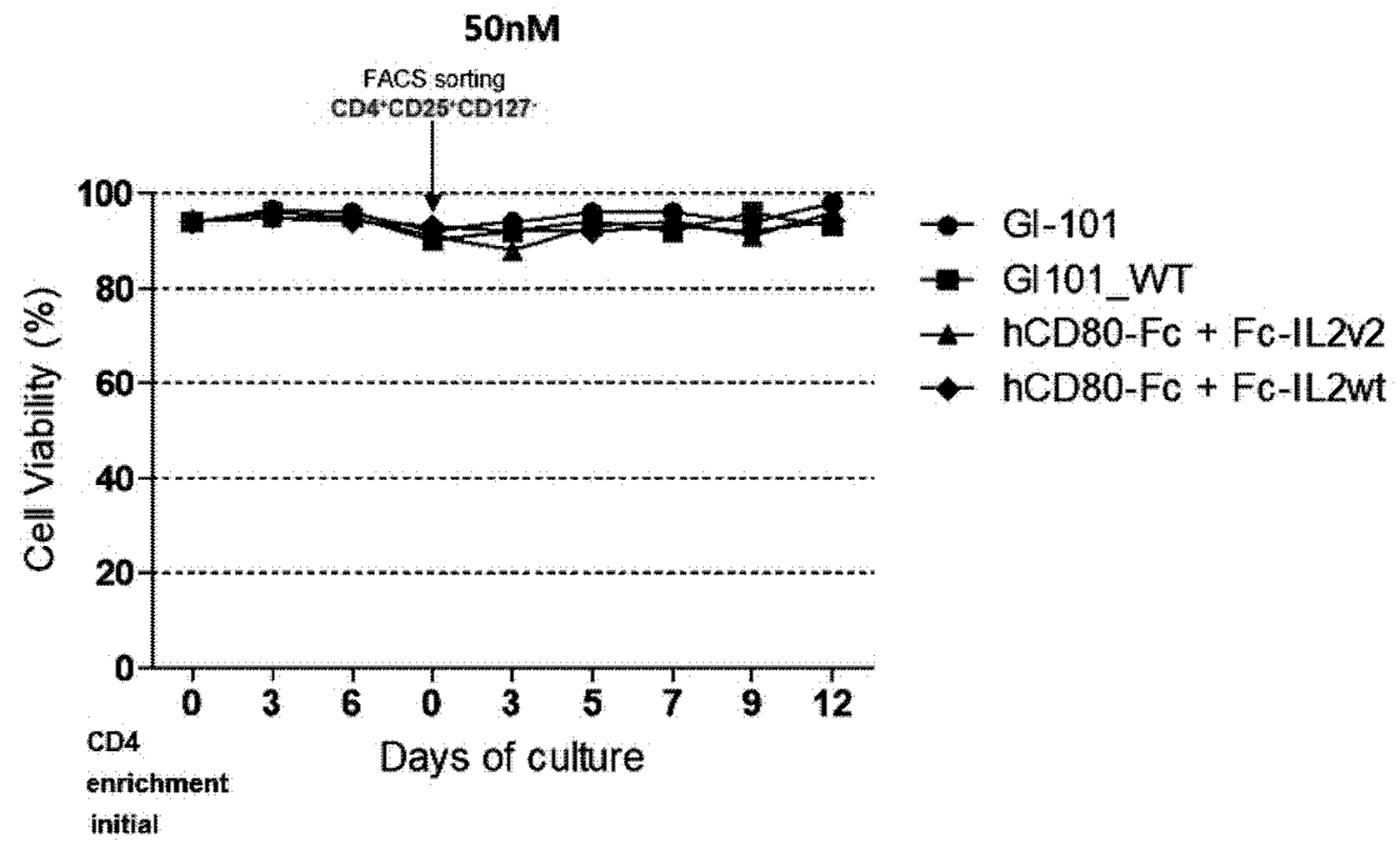
[도14b]



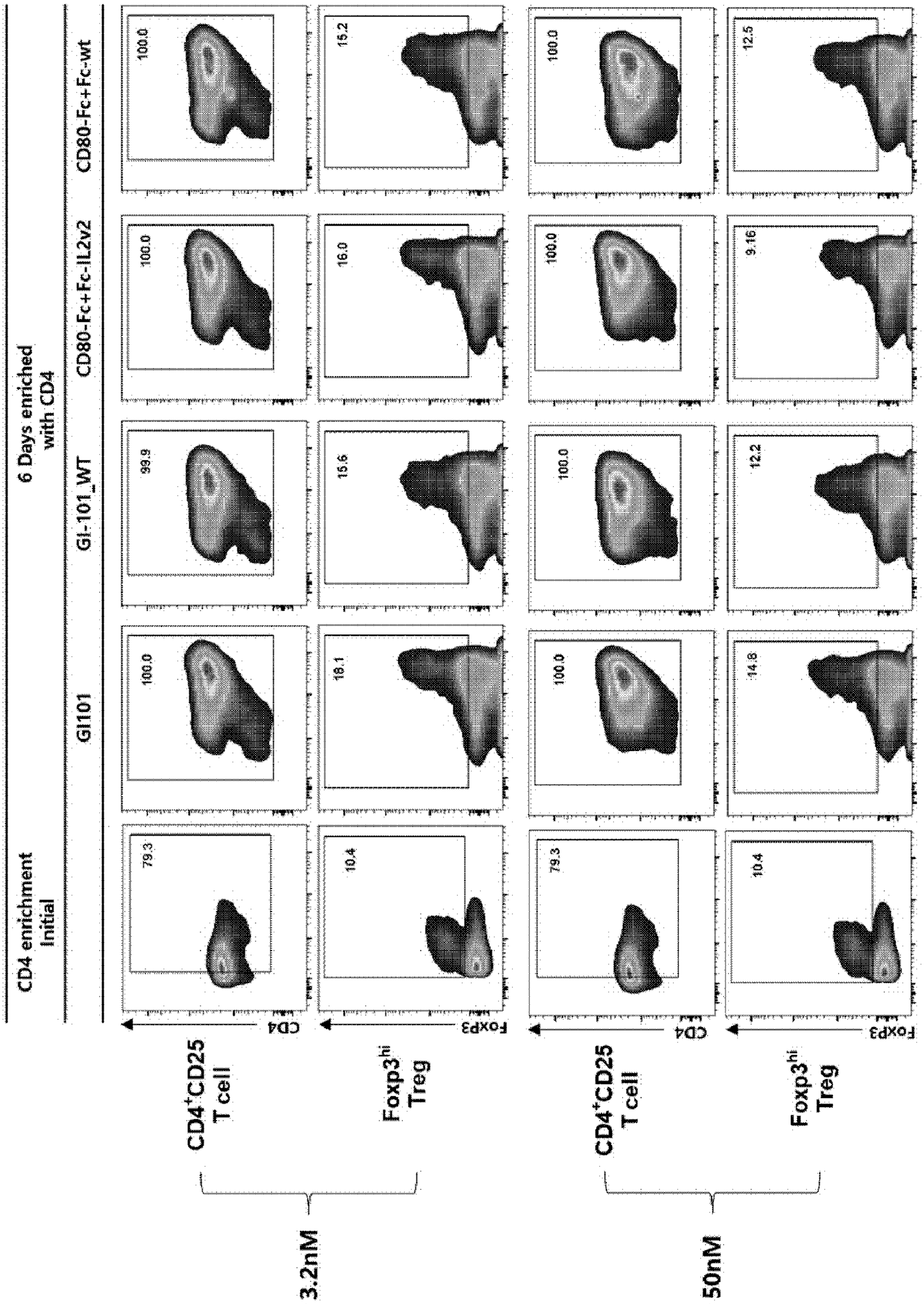
[도15a]


3.2nM
FACS sorting
CD4+CD25+CD127-
100
80
60
40
20
0
Cell Viability (%)
0 3 6 0 3 5 7 9 12
Days of culture
CD4 enrichment initial
GI-101
GI101_WT
hCD80-Fc + Fc-IL2v2
hCD80-Fc + Fc-IL2wt

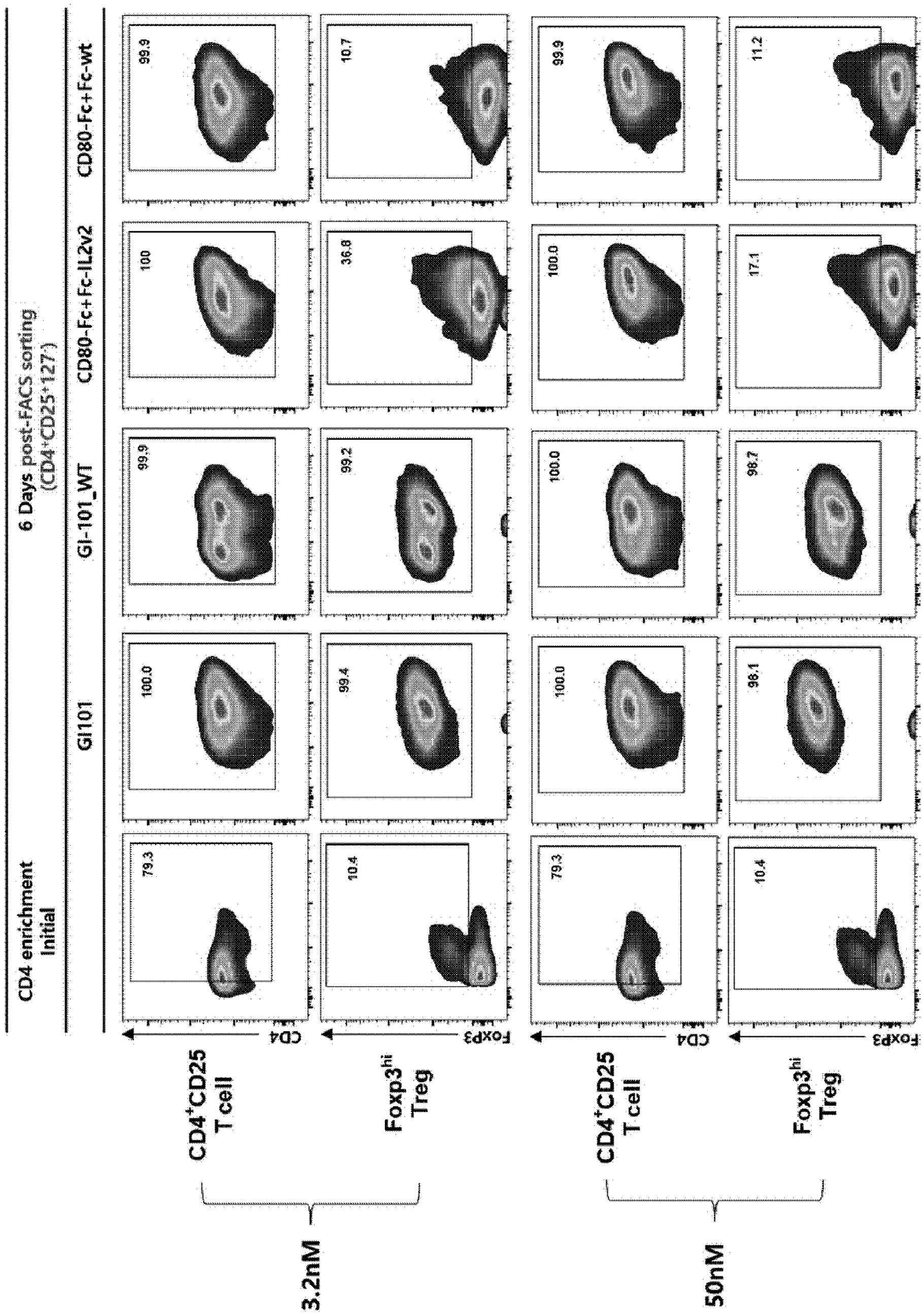
[도15b]


50nM
FACS sorting
CD4+CD25+CD127-
100
80
60
40
20
0
Cell Viability (%)
0 3 6 0 3 5 7 9 12
Days of culture
CD4 enrichment initial
GI-101
GI101_WT
hCD80-Fc + Fc-IL2v2
hCD80-Fc + Fc-IL2wt

[도16a]

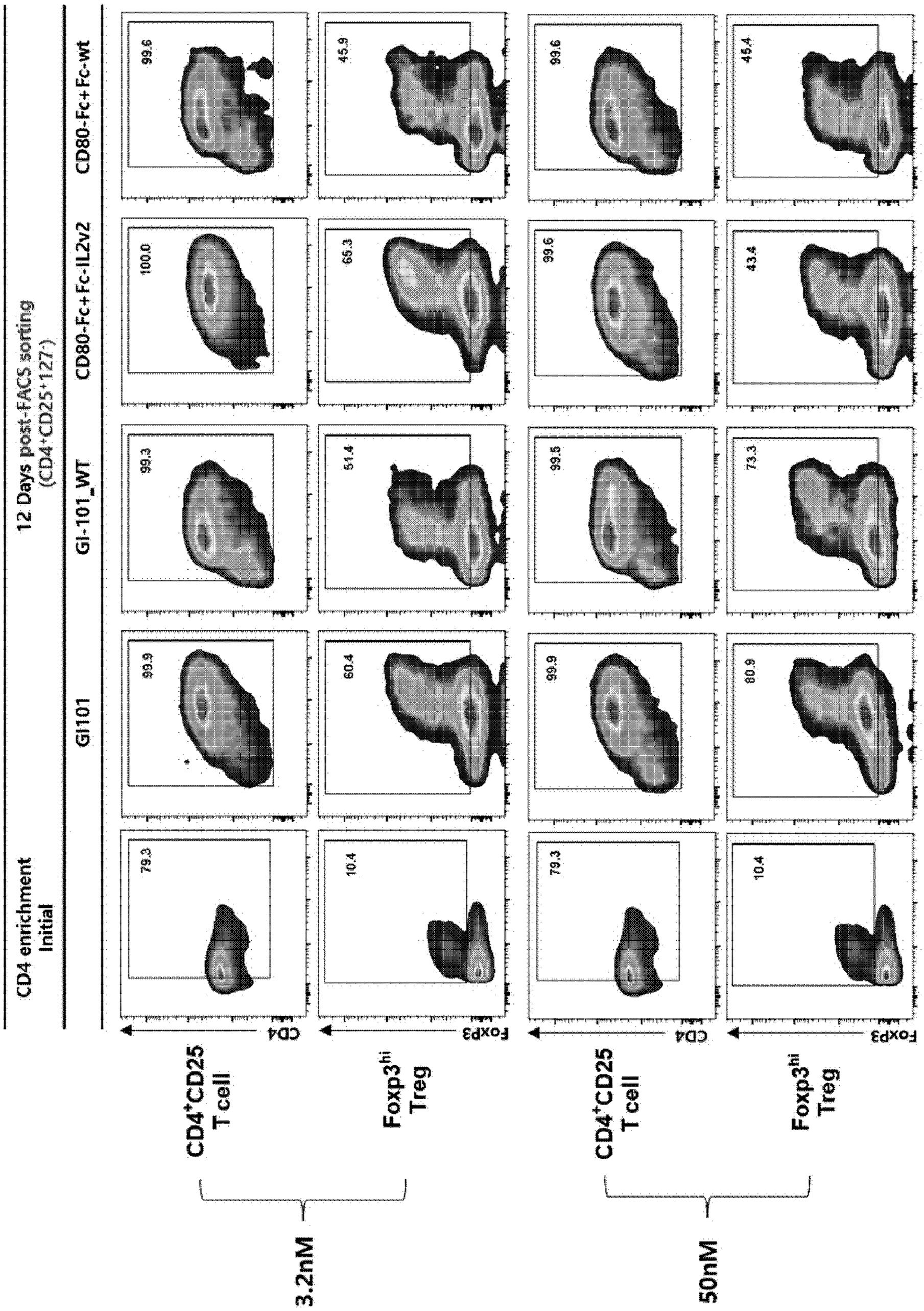

6 Days enriched with CD4
CD4 enrichment Initial
GI-101_WT
GI101
CD80-Fc+Fc-wt
CD80-Fc+Fc-IL2v2
100.0
15.2
100.0
12.5
100.0
16.0
100.0
9.16
99.9
15.6
100.0
12.2
100.0
18.1
100.0
14.8
79.3
10.4
79.3
10.4
CD4
FoxP3
CD4+CD25 T cell
Foxp3hi Treg
CD4+CD25 T cell
Foxp3hi Treg
3.2nM
50nM

[도16b]



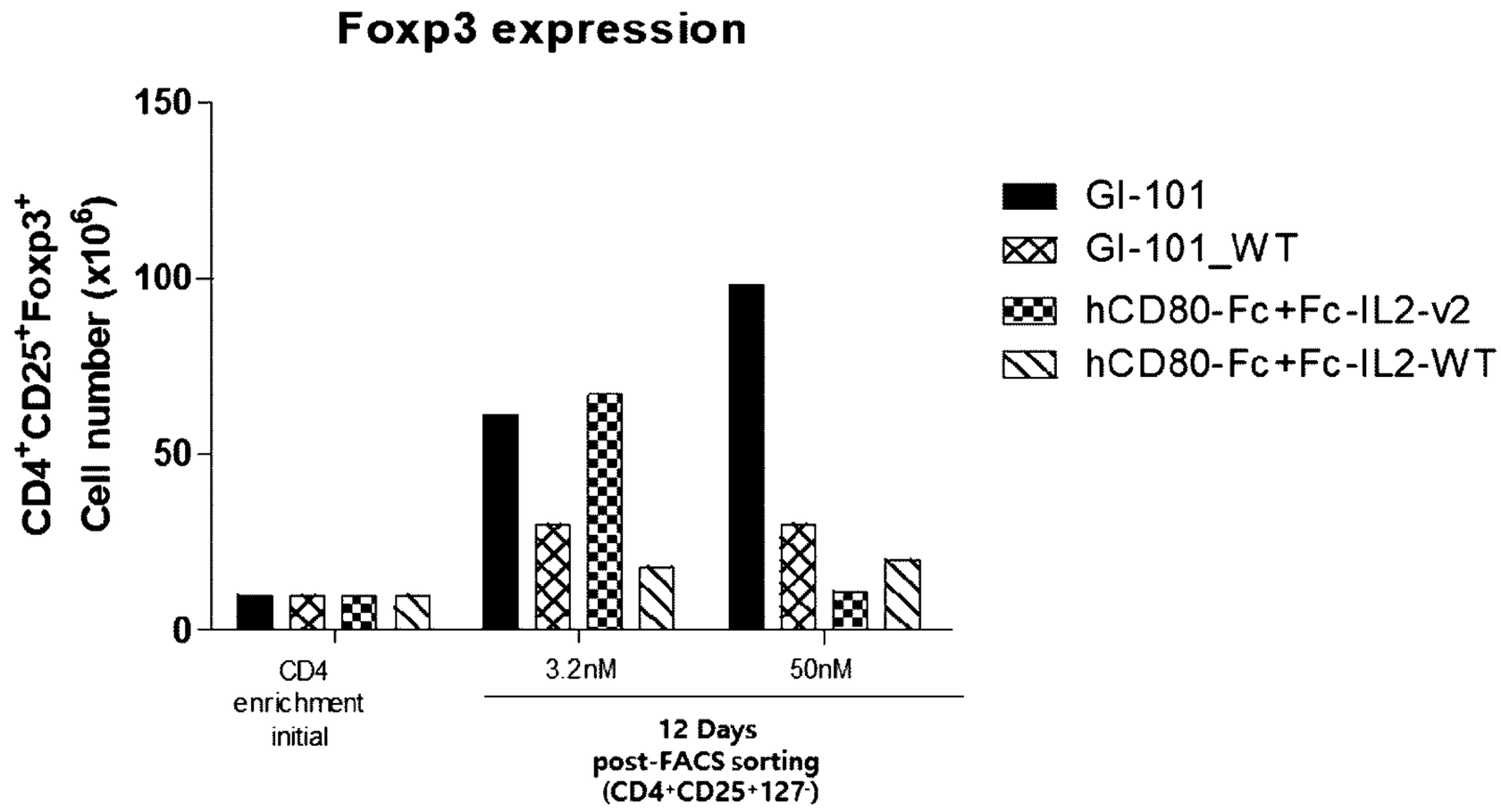
정정용지 (규칙 제91조) ISA/KR

[도16c]

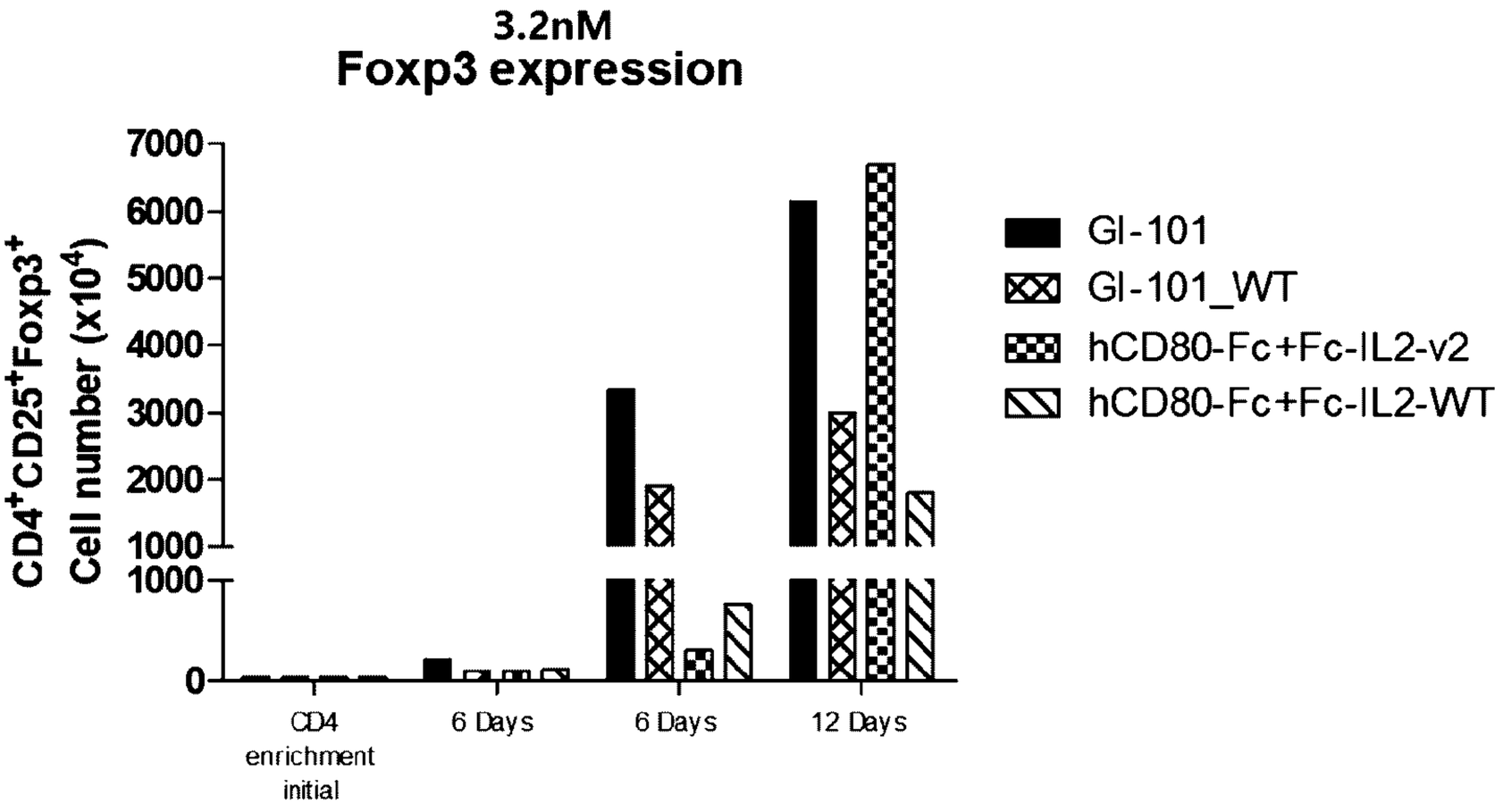


정정용지 (규칙 제91조) ISA/KR

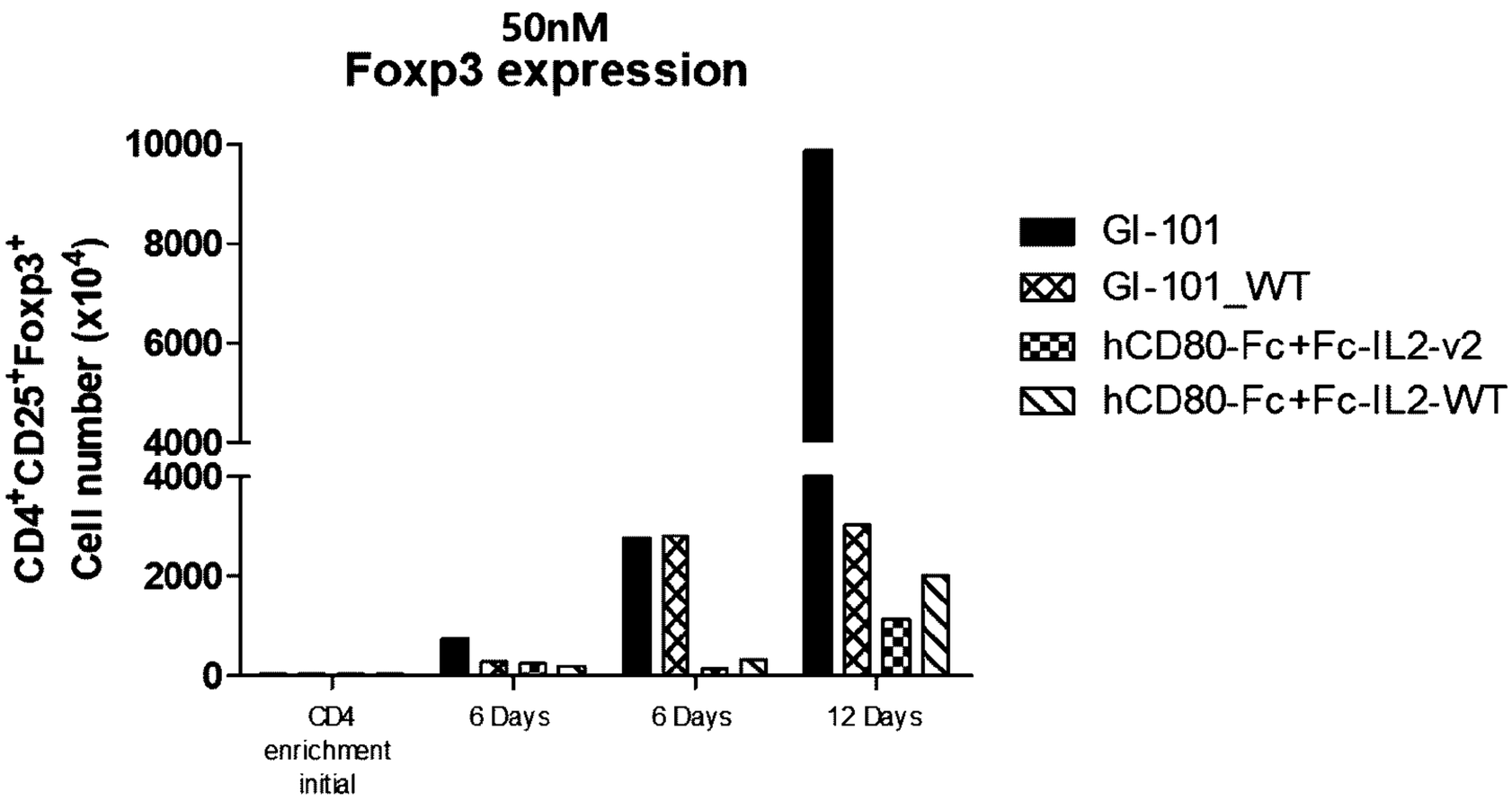
[도17a]



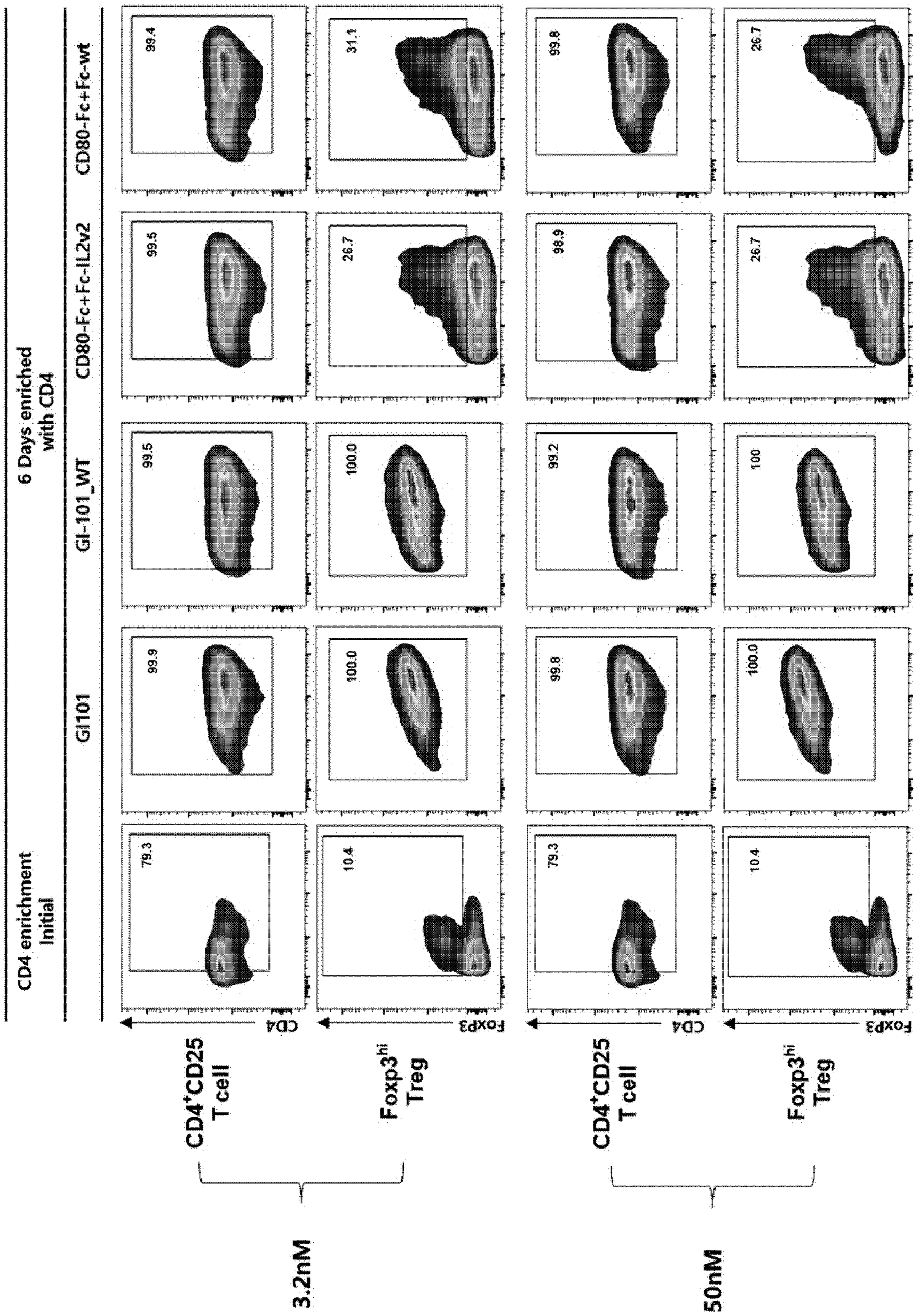
[도17b]



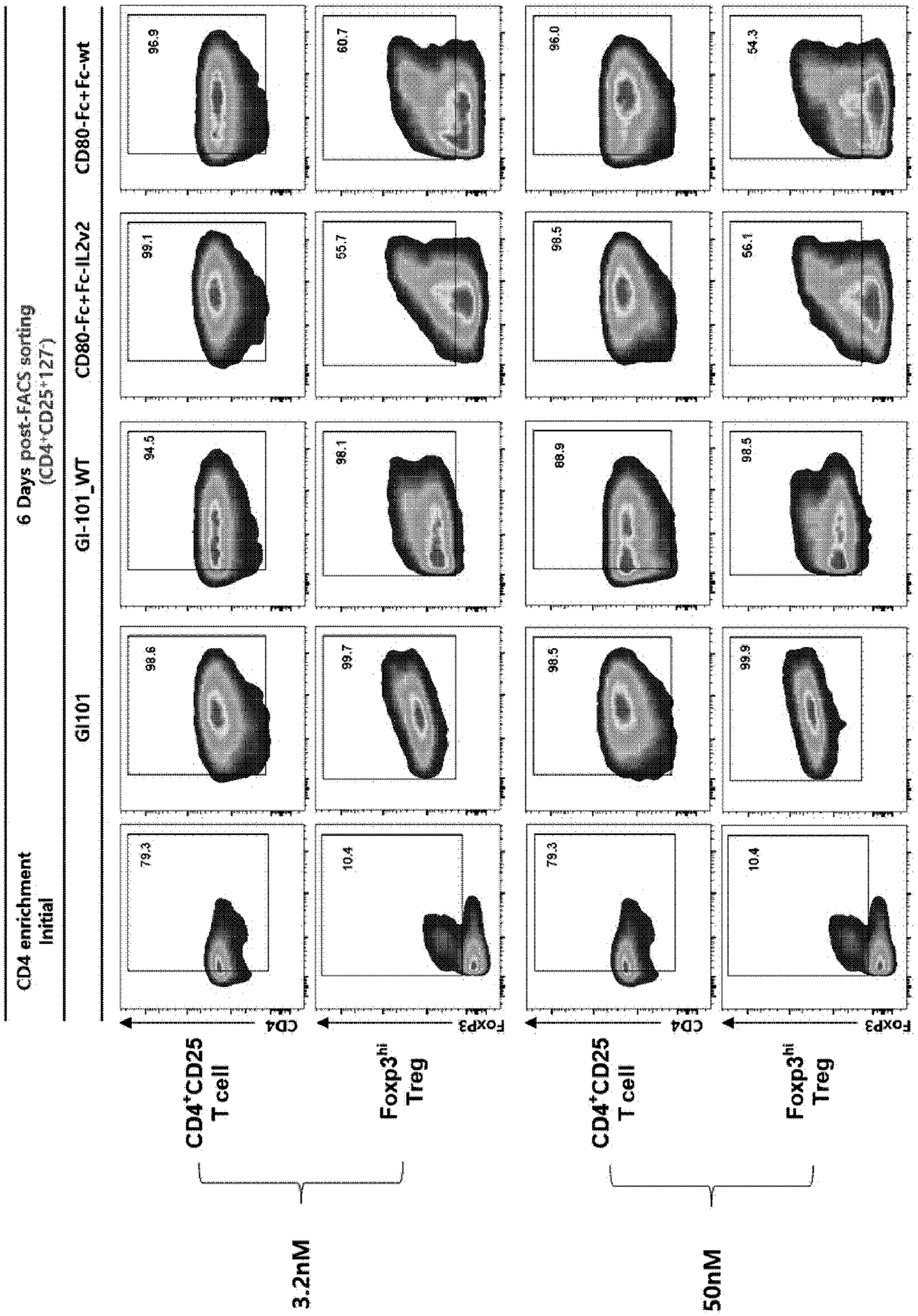
[도17c]



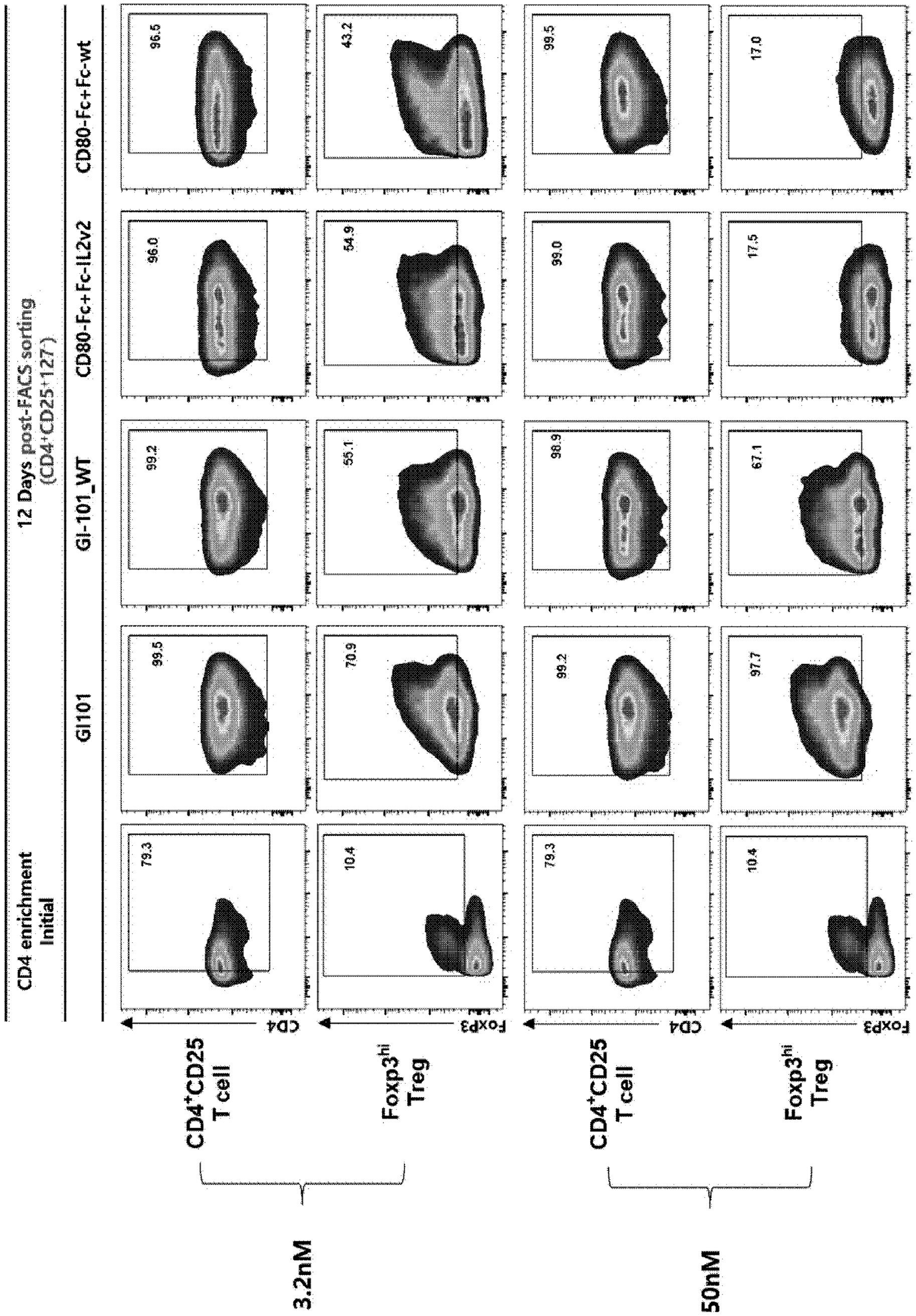
[도18a]


CD80-Fc+Fc-wt
CD80-Fc+Fc-IL2v2
GI-101_WT
GI101
6 Days enriched with CD4
CD4 enrichment Initial
99.4
31.1
99.8
26.7
99.5
26.7
98.9
26.7
99.5
100.0
99.2
100
99.9
100.0
99.8
100.0
79.3
10.4
79.3
10.4
CD4
FoxP3
CD4+CD25 T cell
Foxp3hi Treg
3.2nM
50nM

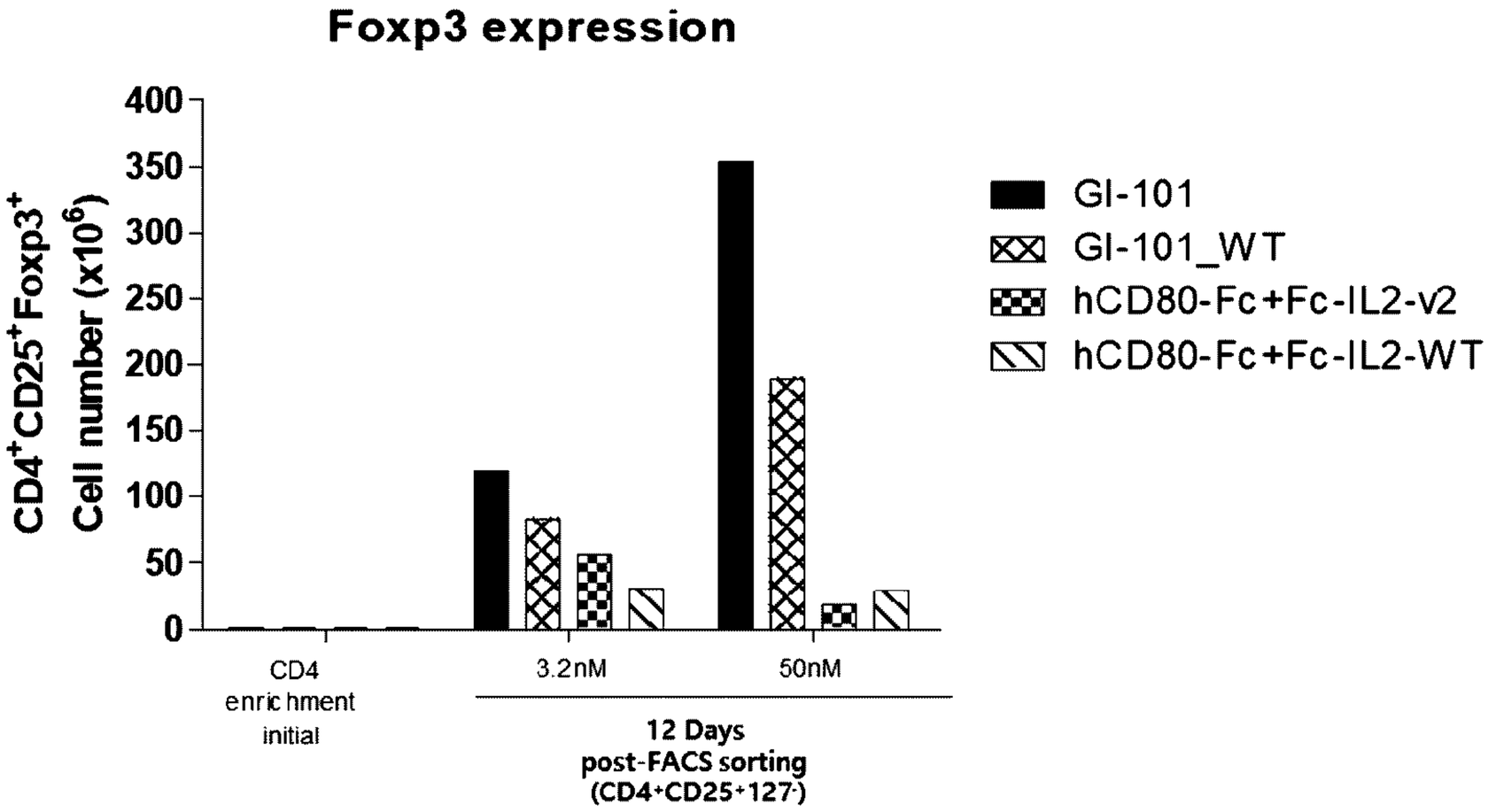
[도18b]


6 Days post-FACS sorting
(CD4+CD25+127-)
CD80-Fc+Fc-wt
CD80-Fc+Fc-IL2v2
GI-101_WT
GI101
CD4 enrichment
Initial
96.9
60.7
96.0
54.3
99.1
55.7
98.5
56.1
94.5
98.1
88.9
98.5
98.6
99.7
98.5
99.9
79.3
10.4
79.3
10.4
CD4
FoxP3
CD4+CD25- T cell
Foxp3hi Treg
CD4+CD25- T cell
Foxp3hi Treg
3.2nM
50nM

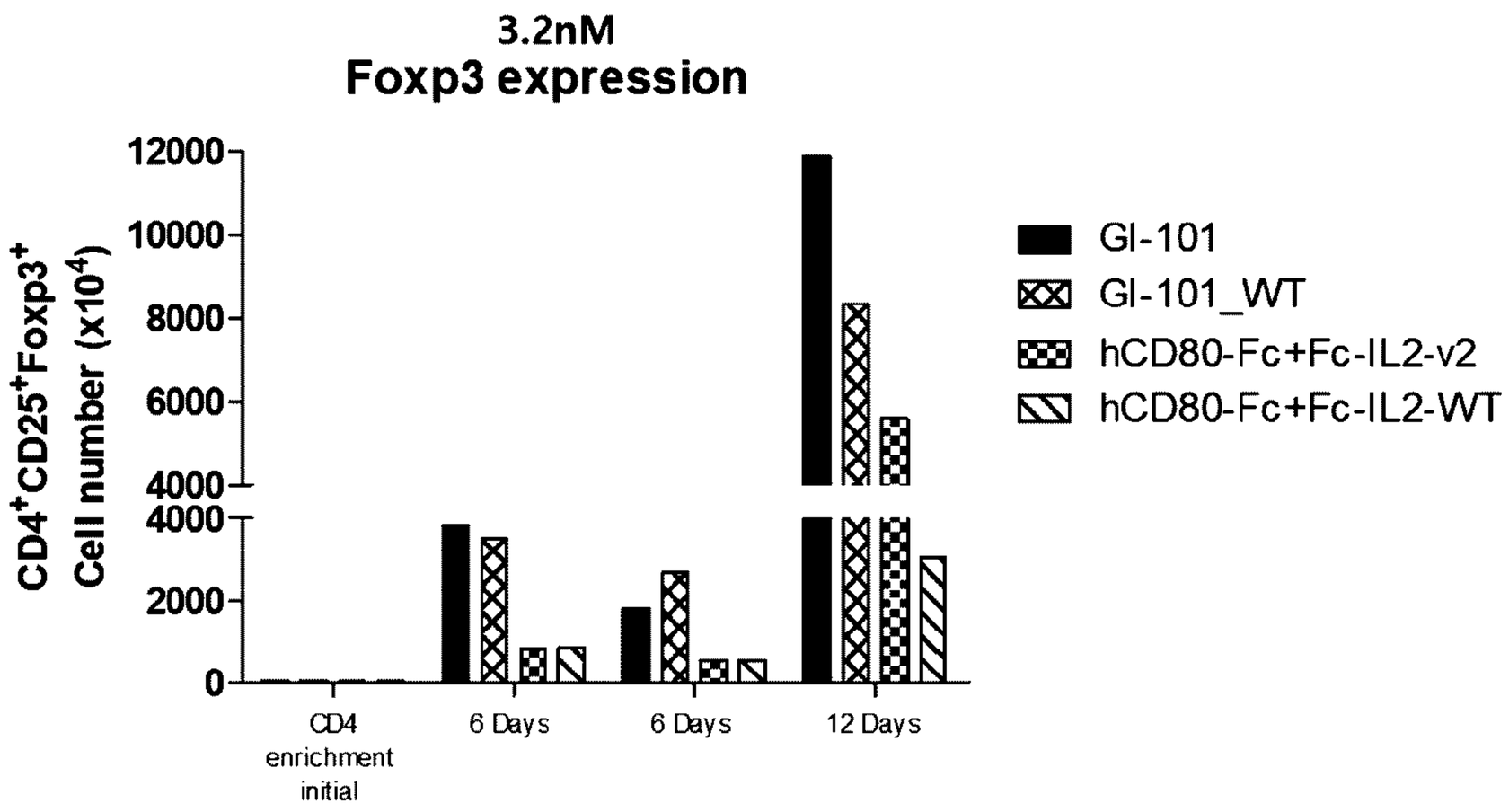
[도18c]


12 Days post-FACS sorting
(CD4+CD25+127-)
GI-101_WT
CD80-Fc+Fc-wt
CD80-Fc+Fc-IL2v2
GI101
CD4 enrichment
Initial
96.5
43.2
99.5
17.0
96.0
54.9
99.0
17.5
99.2
55.1
98.9
67.1
99.5
70.9
99.2
97.7
79.3
10.4
79.3
10.4
CD4
FoxP3
CD4+CD25+
T cell
Foxp3hi
Treg
3.2nM
50nM

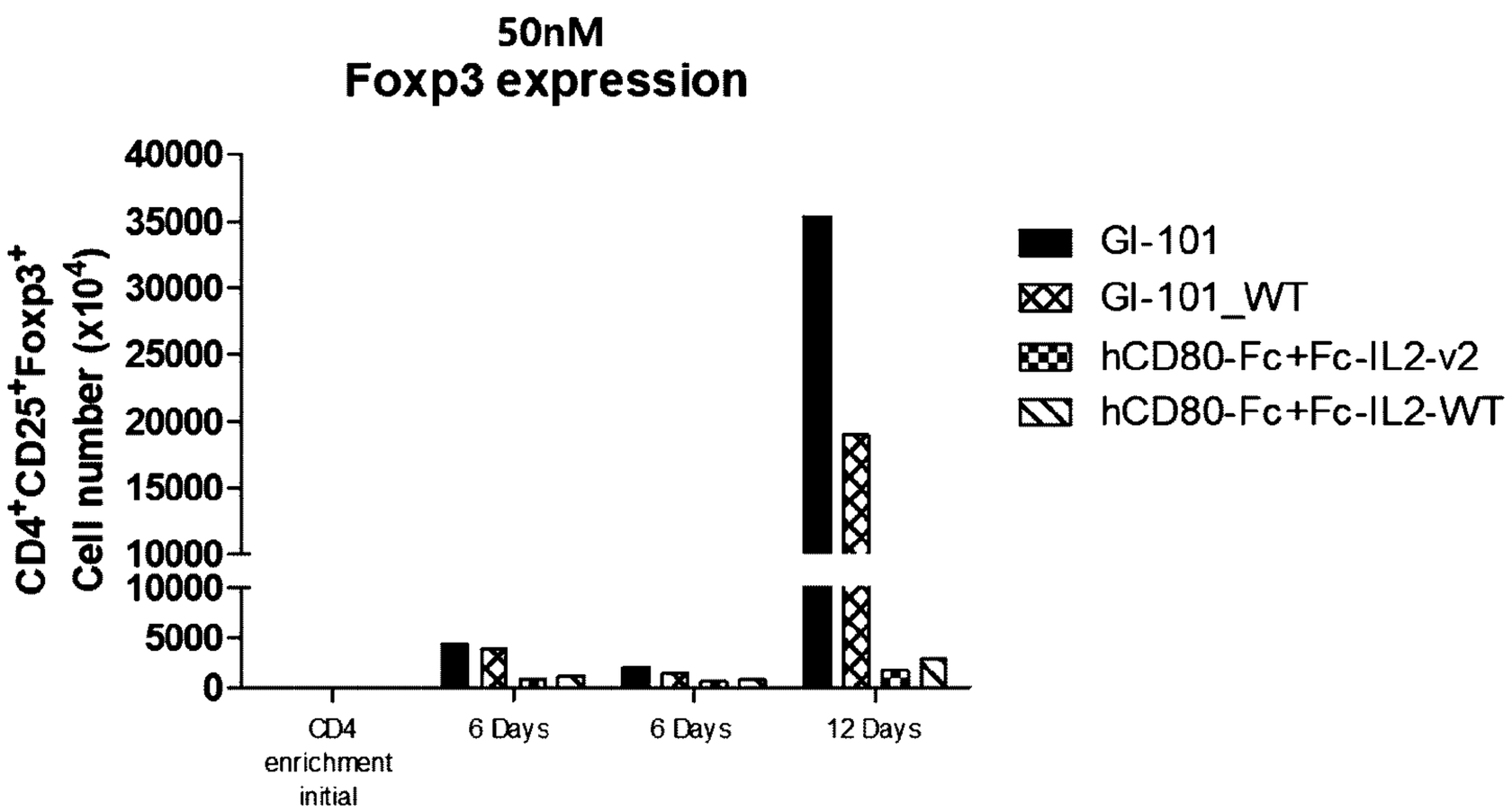
[도19a]



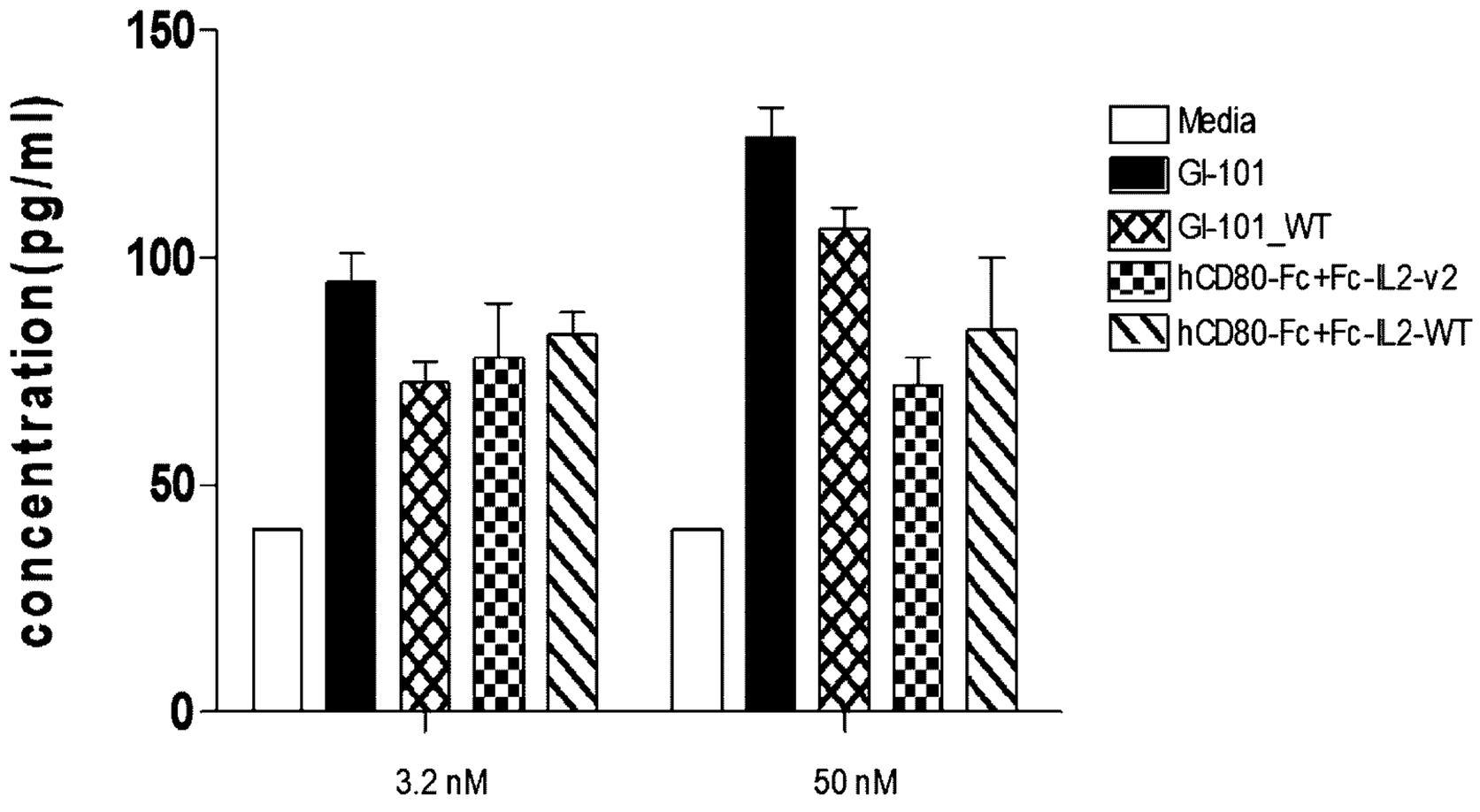
[도19b]



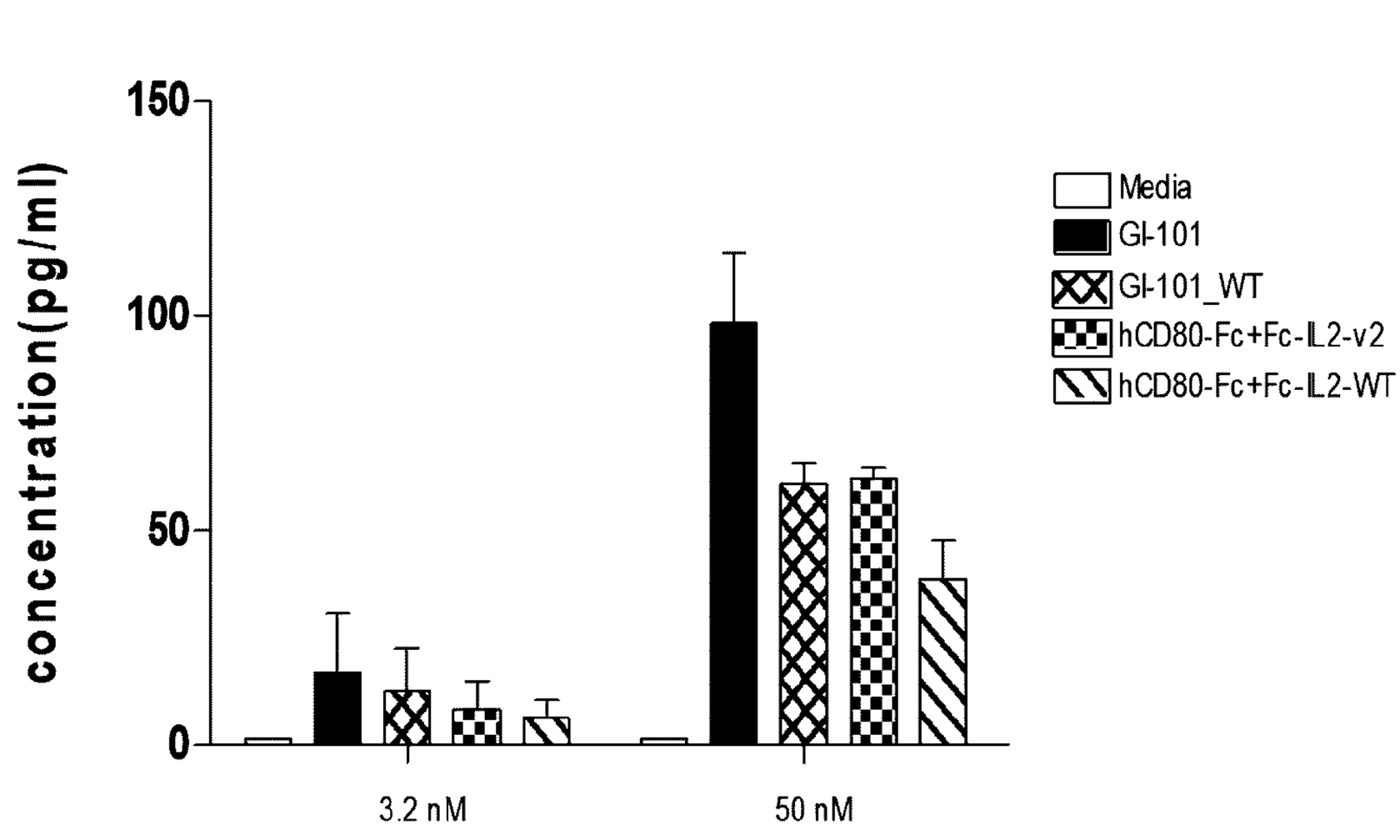
[도19c]



[도20]


IL10
concentration(pg/ml)
150
100
50
0
3.2 nM
50 nM
Media
GI-101
GI-101_WT
hCD80-Fc+Fc-IL2-v2
hCD80-Fc+Fc-IL2-WT

[도21]


IL10
concentration(pg/ml)
150
100
50
0
3.2 nM
50 nM
Media
GI-101
GI-101_WT
hCD80-Fc+Fc-IL2-v2
hCD80-Fc+Fc-IL2-WT