(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2007-0098475
(43) 공개일자 2007년10월05일

(51) Int. Cl.
A61K 39/395(2006.01) *A61P 35/00*(2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-0011745
(22) 출원일자 2007년02월05일
심사청구일자 2007년02월05일
(30) 우선권주장
1020060028556 2006년03월29일 대한민국(KR)

(71) 출원인
울산대학교 산학협력단
울산 남구 무거동 산29
(72) 발명자
권병세
울산광역시 울주군 청량면 삼정리 755 쌍용하나빌리지 307-120
(74) 대리인
윤동열

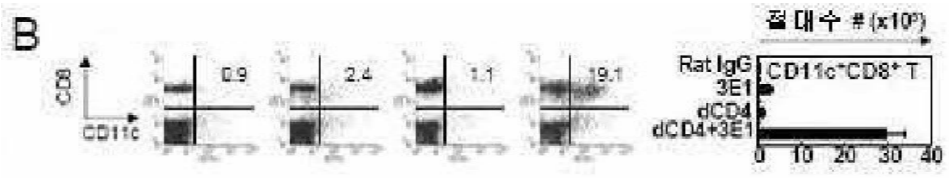
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 항-4-1BB 항체 및 항-CD4 항체를 포함하는 암 및자가면역질환 치료제 조성물

(57) 요 약

본 발명은 암 및 자가면역질환 치료제 조성물에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 $CD11c^{+}CD8^{+}$ T 세포의 증가를 유도하는 항-4-1BB 및 항-CD4 항체를 유효성분으로 함유하는 암, 및 류마티스 관절염을 포함하는 자가면역질환 치료제 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도4b



특허청구의 범위

청구항 1

$CD11c^{+}CD8^{+}$ T 세포의 증가를 유도하는 항-4-1BB 항체 및 항-CD4 항체를 유효성분으로 동시에 함유하고, 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 암 또는 자가면역질환 치료제 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 항-4-1BB 항체 및 항-CD4 항체는 조성물 총 중량에 대하여 각각 0.1~50 중량%로 함유됨을 특징으로 하는 암 또는 자가면역질환 치료제 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 자가면역질환은 류마티스 관절염임을 특징으로 하는 암 또는 자가면역질환 치료제 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 암은 자궁경부암, 폐암, 췌장암, 비소세포성폐암, 간암, 결장암, 골암, 피부암, 두부 또는 경부 암, 피부 또는 안구내 흑색종, 자궁암, 난소암, 직장암, 위암, 항문부근암, 결장암, 유방암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병(Hodgkin's disease), 식도암, 소장암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 방광암, 신장 또는 수뇨관암, 신장세포 암종, 신장골반 암종, 중추신경계(CNS central nervoussystem) 종양, 1차 CNS 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종 및 뇌하수체 선종으로 이루어진 군에서 선택된 것임을 특징으로 하는 암 또는 자가면역질환 치료제 조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 암은 폐암, 간암, 피부 및 안구내 흑색종으로 이루어진 군에서 선택된 것임을 특징으로 하는 자가면역질환 암 또는 자가면역질환 치료제 조성물.

명 세 서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<8> 본 발명은 암 및 자가면역질환 치료제 조성물에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 $CD11c^{+}CD8^{+}$ T 세포의 증가를 유도하는 항-4-1BB 및 항-CD4 항체를 유효성분으로 함유하고, 암, 및 류마티스 관절염을 포함하는 자가면역질환 치료제 조성물에 관한 것이다.

<9> 수많은 연구자들은 화학요법과 방사능치료의 부작용과 실패 때문에 성공적인 암 치료를 개발하기 위해서 노력해 왔다. 암과 면역세포에 관한 생물학이 진보함으로서 암 치료를 위한 새로운 방법들이 고안되었으며, 흥미로운 방법 중 하나가 숙주의 면역반응을 올려주거나 암에 대항하는 항암 면역반응을 증가시키기 위해 면역관용을 깨는 면역치료법이다(Waldmann TA. *Nat Med Rew.* 9, pp 269-77, 2003; Ye Z et al., *Nat Med.* 8, pp 343-8, 2002; Yu P et al., *Nat Immunol.* 5, pp 141-9, 2004). 자연 살해 세포(NK 세포), 수지상세포(dendritic cell; DC), $CD4^{+}$ T 세포와 같은 다양한 면역세포들이 항암 면역치료에 관여하는 것으로 보고되었지만, 세포 용해성 $CD8^{+}$ T 세포의 작용이 가장 필수적이며, 특히 항암 면역치료는 암세포에 대항할 수 있는 $CD8^{+}$ T 세포가 증식 및 활성화되어 암이 증식하는 부위로 이동하여 작용함으로써 치료효과를 나타낼 것이라는 전제로 하고 있다(Freeman GJ et al., *Nat Med.* 8, pp 787-9, 2002; Brentjens RJ et al., *Nat Med.* 9, pp 279-86, 2003; Arens R et al., *J. Exp. Med.* 199, p 1595605, 2004; Xu D et al., *Int J Cancer.* 109, pp 499-506, 2004; Kelly JM et al., *Nat Immunol.* 3, pp 83-90, 2002; Ito F et al., *Cancer Res.* 64, pp 8411-9, 2004; Toes RE et al., *J Exp Med.* 189, pp 753-6, 1999; Wang RF, *Trends Immunol Rev.* 22, pp 269-76, 2001;

Ostberg JR et al., *Immunol Invest.* 34, pp 259-72, 2005; Allendorf DJ et al., *J Immunol.* 174, pp 7050-6, 2005).

<10> 기존의 보고에 의하면, 환자에서 암 세포는 항원임과 동시에 면역반응을 유도 할 수 있으며, $CD8^+$ T 세포들은 전신에서 혹은 암조직 내에서 항암 기능을 가질 수 있음에도 불구하고, 암 세포에 의한 면역억제 기전으로 인해 질병을 개선할 수 없음이 보고되었다(Dunn GP et al., *Nat Immunol Rev.* 3, pp 991-8, 2002; Dong H et al., *Nat Med.* 8, pp 793-800, 2002; Wick M et al., *J Exp Med.* 186, pp 229-38, 1997; Dunn GP et al., *Annu Rev Immunol.* 22, pp 329-60, 2004). 최근 연구는 암세포들이 암조직내로 $CD4^+CD25^+$ 조절 T 세포를 축적시킴으로써, 또한 암조직에 인접한 출수림프절(tumor draining lymph node; TDLN)로 IDO(indolamine 2,3-dioxygenase)을 발현하는 형질세포상 수지상 세포(plasmacytoid dendritic cells)를 증가시킴으로써 항암반응을 억제시킨다고 보고하였다(Yu P et al., *J Exp Med.* 201, pp 779-91, 2005; Wang RF, *Semin Cancer Biol.* 2005; Munn DH et al., *J Clin Invest.* 114, pp 280-90, 2004). 따라서, 이러한 세포들을 제거함으로써 항암 면역반응은 회복되거나 증대되어 질 수 있다(Yu P et al.,*J Exp Med.* 201, pp 779-91, 2005).

<11> 암치료에 있어서, 항진성(agonistic) 항-4-1BB 항체의 효능은 이미 증명되어져 있으며, 그 치료 효과는 자연 살해 세포와 $CD8^+$ T 세포 활성, 그리고 IFN-γ의 생산을 증가시킴으로써 매개되는 것으로 알려져 있다(Xu D et al., *Int J Cancer.* 109, pp 499-506, 2004; Ito F et al., *Cancer Res.* 64, pp 8411-9, 2004; Sun Y et al., *J Immunol.* 168, pp 1457-65, 2002; Ju SA et al., *Immunol Cell Biol.* 83, pp 344-51, 2005). 그러나 항-4-1BB 항체의 단독투여로는 흑색종(melanoma)의 성장을 완전하게 억제하지는 못한다(Ju SA et al., *Immunol Cell Biol.* 83, pp 344-51, 2005). 따라서 암 세포들이 숙주의 면역 체계를 억제하기 위해 이용하는 $CD4^+CD25^+$ 조절 T 세포와 형질세포상 수지상세포(plasmacytoid DCs) 표면에 CD4 분자가 발현하기 때문에(Munn DH et al., *J Clin Invest.* 114, pp 280-90, 2004; Shortman K et al., *Nat Rev Immunol.* 2, pp 151-61, 2002), 세포 제거용 항-CD4 항체와 항진성 항-4-1BB 항체를 복합하여 사용할 경우, 암의 성장을 억제하는데 효과적일 것이라는 가설을 세웠다. 비록 $CD4^+$ T 세포가 항-CD4 단일 항체의 처리에 의해 제거되지만, 기존의 연구와 같이 항 4-1BB 단일 항체가 $CD4^+$ T 세포의 도움 기능을 보충할 수 있을 것으로 예상하였다(May KF Jr et al., *Cancer Res.* 62, pp 3459-65, 2002; Lee HW et al., *Eur J Immunol.* 33, pp 2133-41, 2003; Lee HW et al., *J Immunol.* 169, pp 4882-8, 2002; Laderach D et al., *Int Immunol.* 14, pp 1155-67, 2002).

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<12> 이에 본 발명자들은 항-4-1BB 단클론항체-매개된 $CD11c^+CD8^+$ T 세포가 인터페론-γ를 대량 생산하여 면역살해 세포로서 효과적인 기능을 수행하고, 또한 동시에 $CD4^+$ T 세포를 선택적으로 억제하여 이를 항-$CD4^+$ 항체와 함께 사용하여 그 효과를 증폭시킴으로써 면역치료제로서도 중요한 역할을 수행할 수 있음을 발견하고 본 발명을 완성하였다.

<13> 또한 본 발명자들은 항-4-1BB 및 항-CD4 항체 투여시 선택적으로 암조직 내로 CD11c 표현형을 가진 $CD8^+$ T 세포를 축적시키며, $CD11c^+CD8^+$ T 세포의 수에 직접적으로 비례하여 암을 억제한다는 사실을 확인하였고, 또한 항-4-1BB 항체를 이용한 항암치료 효과에서 $CD4^+CD25^+$ 조절 T 세포와 IDO를 발현하는 형질세포상 수지상세포를 제거해주는 항-CD4 단일 항체와 복합 투여함으로써 그 효과를 상승적으로 증가시킬 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

<14> 본 발명의 목적은 $CD11c^+CD8^+$ T 세포의 증가를 유도하는 항-4-1BB 및 항-CD4 항체를 유효성분으로 함유하는 암 치료제 조성물을 제공하는 것이다.

<15> 또한 본 발명의 목적은 $CD11c^+CD8^+$ T 세포의 증가를 유도하는 항-4-1BB 및 항-CD4 항체를 유효성분으로 함유하는 류마티스 관절염을 포함하는 자가면역질환 치료제 조성물을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

<16> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명에서는 $CD11c^+CD8^+$ T 세포의 증가를 유도하는 항-4-1BB항체 및 항

-CD4 항체를 유효성분으로 함유하는 암 치료제 조성물을 제공한다.

<17> 또한 본 발명에서는 $CD11c^{+}CD8^{+}$ T 세포의 증가를 유도하는 항-4-1BB 및 항-CD4 항체를 유효성분으로 함유하는 류마티스 관절염을 포함하는 자가면역질환 치료제 조성물을 제공한다.

<18> 이하 본 발명을 보다 상세히 설명한다.

<19> 생체 내에서 항-4-1BB의 효과를 도 1에 도시하였다. 도 1에서 보여지는 바와 같이, 생체내에서 항-4-1BB 단클론항체의 투여는 그들을 공동자극하는 세포 유형보다 더 억제효과가 우수하며 자가면역, 암 및 이식을 포함하는 다양한 임상 질환에 대항하는 보호 효과를 제공한다.

<20> 지금까지 4-1BB 시그널의 역할은 류마티스성 관절염(rheumatoid arthritis, RA), 실험용 자가면역 뇌척수염 및 전신 낭창성 홍반을 포함하는 몇몇의 자가면역 과정에서 연구되어 왔다. 이들 연구는 생체 내에서 4-1BB 시그널링의 몇몇의 새로운 측면을 해결하기까지 연구된 자가면역 질환에 대항하는 현저한 보호 효과를 보였다. Sun 등의 연구에서 지적한 바와 같이, 항-4-1BB 단클론항체의 투여, 자가면역 낭창의 전(pre)-유도 때에 그것의 중성화가 많은 항-4-1BB 단클론항체 효과를 바꾸었기 때문에 자기반응성 $CD4^{+}$ T 세포 및 자가항체-생성 B 세포의 현저한 상실에 의해 IFN-γ의 수준을 높이게 된다(Sun Y et al., Administration of agonistic anti-4-1BB monoclonal antibody leads to the amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis, J. Immunol. 168:1457-1465, 2002).

<21> 또한 항-4-1BB 단클론항체 치료는 자가항체 생성을 억제하기 위하여 전반적으로 체액 면역의 둔화를 초래하는 B-세포 수와 기능에 따로 영향을 준다. 무엇이 B 세포에서 항-4-1BB 단클론항체-매개된 기능의 상실을 야기하는지 아직 명확하지 않지만 B 세포가 항원 촉진의 부재에서도 독자적인 항-4-1BB 단클론항체 치료에 영향을 받기 쉽다고 여겨지고 있다. Sun 등은 낭창성 마우스(lupus-prone mice)의 항-4-1BB 단클론항체 치료에서 B-세포 기능 상실이 생체 내에서 IFN-γ가 중성화된 이후에 현저하게 회복됨을 증명하였다(Sun Y, et al., Costimulatory molecule-targeted antibody therapy of a spontaneous autoimmune disease, Nat. Med. 8:1405-1413, 2003). 비록 전신적 항-4-1BB 단클론항체 치료가 수행되지 않더라도 췌장 B 세포에서 막결합 작용제적(agonistic) 단일쇄 항-4-1BB Fv를 과발현하는 형질전환 NOD(nonobese diabetic mice)를 이용하여 그들의 비형질전환 리터메이트(littermate, 한배새끼)보다 심한 당뇨를 보였다. 4-1BB 시그널링에 의한 당뇨진행의 이러한 악화에 대한 근거가 명확하지 않지만, 생체 내에서 작용제적 단클론항체에 의한 4-1BB의 결찰(ligation)은 상기 연구에서 보여지는 생리적 교차결합의 결찰과 다르게 나타난다.

<22> Seo 등은 자가면역 류마티스성 관절염 모델을 사용하여, 항-4-1BB 단클론항체-매개된 보호 효과의 근거에 관한 흥미로운 관찰 결과를 보고하였다(Seo SK, et al., 4-1BB-mediated immunotherapy of rheumatoid arthritis, Nat. Med. 10:1088-1094, 2004). 이들은 항-4-1BB 단클론항체 치료에 따른 자기반응성 $CD4^{+}$ T 세포가 IFN-γ 및 인돌아민 2,3-디옥시게나아제(IDO)-의존 방법에서 결실되는 것을 증명하였다. 많은 세포 유형들이 항-4-1BB 단클론항체-매개된 면역 보호에서 표적되지만, 수지상세포(DCs) 및 $CD11c^{+}CD8^{+}$ T 세포는 이들의 증명된 조절 기능을 상실하게 된다. 항-4-1BB 단클론항체 치료가 대식세포 및 수지상세포 내의 IDO를 상향조절하고, 이러한 $IDO^{+}CD11b^{+}$ 대식세포 또는 자기반응성 $CD4^{+}$ T 세포를 가지는 $IDO^{+}CD11c^{+}$DCs 의 상호작용이 자기반응성 $CD4^{+}$ T 세포를 제거한다고 생각된다. 이들은 또한 항-4-1BB 단클론항체 치료가 다른 것들 사이에서 CD11c 분자를 공동발현하는 $CD8^{+}$ T 세포 유형을 늘리는 발생가능성을 관찰하였다. 이들 $CD11c^{+}CD8^{+}$ T 세포는 CD3, 퍼포린(perforin)을 발현할 수 있는 그들의 능력과 MHC II, CD11b, B220, CD205 및 33D1 발현에 대한 그들의 무능에 기초하는 $CD8^{+}$ T 세포의 서브세트(subset)가 되는 것으로 간주되고, 그들의 비-T-세포 기원으로 인하여 수지상세포와 별개이다. 이들 $CD11c^{+}CD8^{+}$ T 세포는 제한된 유사분열 활성도를 보이고, IFN-γ를 발현하며, 정상적인 이동성을 가지고, 잠재적 면역억제제이며 4-1BB 시그널링에 배타적이다. $CD11c^{+}CD8^{+}$ T 세포의 관절염성(arthritis-susceptible) DBA/1 마우스로의 선택적 트랜스퍼(transfer)는 관절염의 진행이 현저하게 늦추어졌다. 그러나, 동일한 항원의 존재하에 시험관 내에서 재배양하는 경우, 마우스 유래의 분별되지 않은 비장림프구(unfractionated splenocytes)를 항원과 항-4-1BB 단클론항체로 미리 처리하고, 수지상 세포의 존재하에 배양하였는데도 불구하고 생체 밖에서 $CD11c^{+}CD8^{+}$ T 세포의 급속한 소멸로 인하여 세포 증식이 명백하게 작용하지 않았다. 이는 항-4-1BB 시그널링의 시험관내 및 생체내 효과 사이에 명확한 경계를 증명한 것이다. 이들 자료는

IFN-γ 수지상세포 및 $CD11c^+CD8^+$ 조절 T 세포가 모두 모델 테스트에서 항-4-1BB 단클론항체-매개된 면역치료의 결정적인 역할을 함을 제시한다.

<23> $CD11c^+CD8^+$ T 세포는 항-4-1BB의 이중 역할을 유도한다. 본 발명자들은 $CD11c^+CD8^+$ T 세포의 괴상확장(massive expansion)이 항-4-1BB 콜라겐-유도된 관절염 모델뿐만 아니라 실험실 자가면역 포도막염(uveitis), 멜라노마, HSV1과 같은 바이러스 감염 모델 및 수포성 구내염 바이러스에서도 항원과 함께 투여되면 발생하는 것을 발견하였다(Kim YH, et al., 4-1BB costimulation enhances HSV-1-specific $CD8^+$ T cell responses by the induction of $CD11c^+CD8^+$ T cells, Cell Immunol. 238: 76-86, 2005). 바이러스 감염 및 종양 모델에서 $CD11c^+CD8^+$ T 세포는 세포독성이 강하고 대부분의 바이러스 항원-특이적 $CD8^+$ T 세포를 포함한다. 따라서, 상기에서 $CD11c^+CD8^+$ T 세포 자체는 암 및 바이러스 감염에서 일차 킬러 세포가 되고, 이들 세포에 의해 생성된 IFN-γ 수지상세포에서 IDO를 유도하고, 유도된 IDO가 자가면역질환 모델에서 항원-특이적 $CD4^+$ T 세포의 억제자가 되는 항-4-1BB(증강 기능 및 억제제 기능)의 겉보기에 모순되는 이중 역할이 이러한 신규 $CD11c^+CD8^+$ T 세포 집단에 의해 매개된다고 생각하였다. 이것의 예외는 항-4-1BB와 함께 스타필로코커스 장독소 A와 같은 슈퍼 항원이 투여된 마우스의 경우뿐이다. 비록 이 슈퍼 항원이 $CD11c^+CD8^+$ T 세포를 생산하기는 하지만, 결과는 $CD4^+$ T 세포를 억제하지 않고 증가된 $CD8^+$ T 세포 수와 같은 수로 증가하였다.

<24> 따라서, 항-4-1BB 단클론항체-매개된 $CD11c^+CD8^+$ T 세포는 생체 내에서 억제작용을 하는데 매우 중요한 추가적인 공격장비이다. 이 $CD11c^+CD8^+$ T 세포가 인터페론-γ를 대량 생산하여 면역살해 세포로서 효과적인 기능을 수행하고, 또한 동시에 $CD4^+$ T 세포를 선택적으로 억제하여 이를 통한 면역치료제로서도 중요한 역할을 수행한다.

<25> 본 발명에서는 상기 항-4-1BB 단클론항체-매개된 $CD11c^+CD8^+$ T 세포가 인터페론-γ를 대량 생산하여 면역살해 세포로서 효과적인 기능을 수행하는 것에 착안하여 항-4-1BB와 항-CD4 단클론항체를 함께 처리함으로써 이들을 단독 투여할 때보다 자가면역질환 치료 및 억제 효과가 우수한 자가면역질환 치료제 조성물을 제공한다. 즉, 본 발명에 의한 조성물은 항-4-1BB와 항-CD4 단클론항체를 함께 처리함으로써 이들을 단독으로 처리하였을 때보다 $CD8^+$ T 세포의 수가 증가하고 $CD8^+$ 및 $CD4^+$ T 세포가 IFN-γ 세포를 발현하는 작용세포(effector cell)로 분화하는 과정을 촉진하였으며, 항-4-1BB 단클론항체-매개된 $CD11c^+CD8^+$ T 세포의 증식을 더욱 증진시킬 수 있었다. 따라서, 본 발명에 의한 자가면역질환 치료제 조성물은 항-4-1BB 단클론항체-매개된 $CD11c^+CD8^+$ T 세포의 증식에 의한 류마티스 관절염 치료에 매우 효과적이다.

<26> 본 발명에서 사용하는 항-4-1BB항체 및 항-CD4 항체는 자가면역억제 반응의 상승효과를 가지지만, CD4를 발현하는 세포를 제거하는 항-CD4 단클론 항체는 $CD8^+$ T 세포들의 증식을 높이는 특성을 나타내며, 항-4-1BB 단일 항체는 $CD8^+$ T 세포의 증식보다는 분화를 유도하는 것이 특징이다.

<27> 또한 본 발명은 $CD11c^+CD8^+$ 세포의 증가를 유도하는 항-4-1BB 및 항-CD4 항체를 유효성분으로 함유하는 암 치료제 조성물에 관한 것으로서, 성공적인 암세포 증식 억제를 위해서는 KLRG1 및 NKG2D를 발현하는 $CD11c^+CD8^+$ T 세포가 대량으로 암조직 내 축적되는 것이 필요하며, 본 발명에 의한 항-4-1BB항체 및 항-CD4 항체 투여시 선택적으로 암조직 내로 CD11c 표현형을 가진 $CD8^+$ T 세포를 축적시킬 수 있었다.

<28> 본 발명에서는 상기 항-4-1BB 항체 및 항-CD4 항체를 조성물 총 중량에 대하여 각각 0.1 ~ 50 중량%로 함유하는 것을 특징으로 한다.

<29> 상기 암은 자궁경부암, 폐암, 췌장암, 비소세포성폐암, 간암, 결장암, 골암, 피부암, 두부 또는 경부암, 피부 또는 안구내 흑색종, 자궁암, 난소암, 직장암, 위암, 항문부근암, 결장암, 유방암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병(Hodgkin's disease), 식도암, 소장암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 방광암, 신장 또는 수뇨관암, 신장세포 암종, 신장골반암종, 중추신경계(CNS central nervoussystem) 종양, 1차 CNS 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종, 뇌하수체 선

종, 바람직하게는 폐암, 간암, 피부 또는 안구내 흑색종인 것을 포함한다.

<30> 본 발명의 항-4-1BB 항체 및 항-CD4 항체를 포함하는 암 및 자가면역질환조성치료용 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 본 발명의 항-4-1BBC 항체 및 항-CD4 항체는 단독 또는 탁솔 등의 기존 항암제와 같은 타 약학적 활성 화합물과 결합뿐만 아니라 적당한 집합으로 사용될 수 있다.

<31> 본 발명에 따른 항-4-1BB 항체 및 항-CD4 항체를 포함하는 암 및 자가면역질환조성치료용 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 추출물을 포함하는 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜 (propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

<32> 본 발명의 항-4-1BB 항체 및 항-CD4 항체의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 바람직한 효과를 위해서는 본 발명의 항-4-1BB 항체 및 항-CD4 항체는 1일 0.0001 mg/kg 내지 100 mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 100 mg/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수 있다. 따라서 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

<33> 본 발명의 항-4-1BB 항체 및 항-CD4 항체는 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내 (intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.

<34> 본 발명의 항-4-1BB 항체 및 항-CD4 항체 자체는 독성 및 부작용은 거의 없으므로 장기간 복용 시에도 안심하고 사용할 수 있는 약제이다.

<35> 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.

<36> 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<37> **참고예 1. 항체의 준비**

<38> 항-4-1BB 단일항체를 생산하는 융합세포(3E1)는 로버트 미틀러 박사(Dr. Robert Mittler, Emory University, Atlanta, GA)로부터 제공 받았다. 생쥐 항-CD4 단일항체를 생산하는 융합세포(GK1.5)와 생쥐 항-NK1.1 단일항체를 생산하는 융합세포(PK136)는 ATCC로부터 구매하였다. 상기 항체들은 복수와 융합세포 배양액으로부터 생산하였으며, 단백질 G-컬럼(protein G-column, Sigma, St. Louis, MO)을 사용하여 실험실에서 정제하였다. 인간화 항 4-1BB 항체 클론 Hu75G1, Hu94-G1은 제조한 후 CHO 세포에서 배양한 다음 단백질 G-컬럼을 사용하여 정제하였다. 대조군의 항체로 사용된 정제된 쥐 IgG는 시그마사(Sigma-Aldrich)로부터 구입하였으며, 하기의 항체들은 BD 파밍겐(PharMingen, San Diego, CA)으로부터 구매하였다. FITC- 또는 PE-Cy5-항-CD8a(53-6.7), FITC- 또는 PE-Cy5-항-CD8b(Ly-3.2, 53-5.8), PE- 또는 PE-Cy5-항-CD4(H129.19), FITC-항-CD25, FITC- 또는 PE-항-CD11c(HL3), PE-항-CD11b(M1/70), FITC- 또는 PE-항-CD3(145-2C11), PE-항-B220(RA3-6B2), PE-항-NK1.1(PK136), PE-항-IFN-γ(XMG1.2), FITC-항-Klrg1(MAFA, 2F1), 정제된 항-CD16/CD32(2.4G2), 비오틴-항-CD40(3/23), 비오틴-항-B220(RA3-6B2). PE-항-NKG2D(CX5), PE-CY5-항-TCRb 및 비오틴-항-F4/80(BM8)를 e바이오

사이언스(eBioscience, San Diego, CA)에서 구입하였다. FITC- 또는 PE-항-PDCA-1(JF05-1C2.4.1)을 밀테나이 바이오텍(Miltenyi Biotech)에서 구입하였다. mgp100 (ITDQVPFSV), mMAGE(HNTQYCNL), m타이로시나아제(mTyrosinase, FMDGTMSQV), mTRP2 (VYDFFVWL)등의 암 펩티드들은 펩트론(Peptron, 대전, 한국)에서 합성하였다.

<39> **실시예 1. 항 4-1BB 항체 및 항-CD4 항체를 이용한 동물실험**

<40> 1-1. 생쥐와 세포주 및 항체투여

<41> 실험에 사용된 C57BL/6 생쥐는 6-8 주령으로서 할랜 레보라토리즈(Harlan Laboratories, Indianapolis, IN)에서 구입하였다. B16F10 흑색종 암세포는 10% FBS(Gibco BRL, Grand Island, NY), 2mM L-글루타민, 100U/ml 페니실린 및 100㎍/ml 스트렙토마이신이 포함된 DMEM 배양액에서 배양하였다.

<42> 쥐에 $4x10^5$ B16F10을 등 중앙 부위에 피하주사하였다. 쥐에게 암 세포를 주사함과 동시에 100㎍의 항 4-1BB 단일 항체(3E1) 및 400㎍의 항-CD4 단일 항체 (GK1.5)를 5일마다 복강주사하였다. 500㎍의 항 CD25 단일 항체(PC61.5.3)는 암을 투여하기 4일 전에 한번 주사하였으며, 각 시간대 별로 암의 성장을 관찰하고 암의 크기를 각 그룹에서 측정하였다. 지연 치료에서 항암 효과를 보기 위해서는 암의 지름이 3-5㎜가 되었을 때부터 상기 항체로 치료하였다.

<43> 1-2. 유세포 분석

<44> 단일 세포 현탁액은 암 조직 근처의 림프절과 암 조직에서 분리되었다. 이러한 세포들은 Fc 부위를 통한 염색항체들의 비 특이적인 결합을 막기 위해 2.4G2를 가지고 4℃에서 10분 동안 반응하였고, 이후 표면 분자에 특이적인 항체를 가지고 염색하였다. 상기 방법에 의해 준비된 시료들은 유세포 분석기(Becton-Dickinson)를 사용하여 표면 분자 표현형으로 분석하였다.

<45> 세포 내 IFN-γ 사이토카인 염색을 위해서, 암 조직 근처의 림프절로부터 분리한 세포들을 브레펠딘(Brefeldin) A가 포함된 배양액에서 50ng/ml PMA와 500ng/ml 아이오노마이신(Ionomycin)을 처리한 다음 6시간 동안 배양하였다. 6시간 후, 세포의 Fc 부위를 막는 2.4G2로 4℃에서 10분간 반응시키고, FITC-항 CD8 또는 항-CD4로 염색한 다음, 사이토픽스/사이토펌 키트(Cytofix/cytoperm kit, BD Pharmingen)를 사용하여 제품 설명서에 따라 고정/투과시켜 PE-항 IFN-γ로 염색하였다. 모든 시료들을 유세포 분석기로 분석하였다.

<46> 1-3. CD107 유동분석(CD107 mobilization assay)

<47> 표적세포로 사용된 EL4 세포는 50㎍/ml 농도로 암에 관련된 펩티드 gp100, TRP2, 티로시나아제(Tyrosinase) 및 메이지(Mage)로 자극, 표지하였다. 각 작용세포는 암을 투여한지 15일 된 쥐의 암세포 근처의 림프절로부터 준비하였다. 살아있는 세포들은 피콜(Ficoll)의 밀도구배를 이용하여 원심분리하였고, 반응에 사용되는 CTL 배양액에 1ml 당 $2x10^7$세포의 적정 농도로 혼합하였다. 상기 작용세포와 표적세포의 비율은 일반적으로 1 : 2 이며, 이때 작용세포는 $2x10^6$ 세포이다. 각 웰(well)에 2mM 모넨신(monensin, Sigma) 1㎕, 표적세포(target cells) 100㎕, 작용세포(effector cells) 100㎕ 및 CD107a 항체 1㎕를 각각 첨가하였다. 상기 세포들은 멀티채널 피펫(multichannel pipette)으로 혼합하였으며, 플레이트(plate)를 300g로 1분 동안 원심분리한 다음 세포들을 가라앉혀서 37℃에서 5시간 동안 배양하였다. 배양 후에 플래이트(plate)를 500g로 원심분리한 후, 상층액을 제거하였다. 세포와 세포 사이의 결합은 0.02% 아지드(azide)와 0.5mM EDTA가 들어있는 PBS로 세포들을 세척함으로써 파괴되었다. 시료들을 PE-항 CD11c와 PE-Cy5-항 CD8으로 염색한 뒤 유세포 분석기로 분석하였다.

<48> 1-4. $CD8^+$세포의 분리

<49> $CD8^+$ T 세포를 분리하기 위하여, 암 조직 근처의 림프절로부터 세포들을 준비하였고 B 세포, 수지상 세포 및 대식세포들을 제거하기 위해서 비오틴-항-CD40, 항 B220 및 항 F4/80 단일항체로 반응시킨 후 스트렙타비딘-마이크로비드(streptavidin-microbeads, Miltenyi Biotech)로 추가 결합시켰다. $CD11c^+CD8^+$ T 세포는 위의 과정에서 결합되지 않은 세포들로부터 $CD11c^-$ 마이크로비드를 사용하여 분리하였고, $CD11c^-CD8^+$ T 세포는 $CD8^-$ 마이크로비드를 사용하여 상기 과정에서 결합되지 않은 세포로부터 분리하였으며 상기 분리된 세포의 순도는 유세포 분석기를 통해 96-98% 이상임을 확인하였다.

<50> 1-5. 세포증식의 분석

<51> 생체 내에서 세포의 증식을 측정하기 위해서, 암이 투여된 생쥐에 1mg BrdU (BD biosciences)를 복강 주사(intraperitoneally)하였다. BrdU를 주사한 뒤 1 시간 째 암 조직 근처의 림프절(Inguinal lymph nodes)을 분리하고, 세포들은 PE-항-CD4, -항 CD8, -항 B220 단독, PE-항 CD11c 및 PE-Cy5-항 CD8으로 표면을 염색하였다. 표면이 염색된 세포들은 고정, 투과 과정을 거친 후 제품 설명에 따라 (BD bioscience) FITC-항 BrdU로 세포내 염색하였다.

<52> 1-6. 암과 비장 조직 내에서 사이토카인 함량 측정

<53> 암과 비장 조직을 분리한 다음 무게를 측정하고 단백질효소 억제제가 포함된 PBS에 넣어 분쇄하고, 원심분리를 통하여 상층액을 모았다. 상층액에서 사이토카인의 양은 제조사의 설명에 따라 셀퀘스트프로(CellQuestPro)와 CBA 소프트웨어 (Becton Dickinson)의 프로그램이 갖추어진 유세포 분석기에서 사이토메트릭 비드 어레이 키트(cytometric bead array kit, CBA; BD Biosciences)를 사용하여서 정량화 하였다.

<54> 1-7. RNA 분리, RT-PCR 및 Real-time PCR

<55> Total RNA는 RNazol 추출키트(Cinna/Biotecx Laboratories, Houston, Texas)를 사용하여서 준비된 세포들로부터 추출하였다. Total RNA(1㎍)는 랜덤 헥사머스(random hexamers) 또는 올리고-dT와 M-MLV RT(Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase, Promega)를 사용하여 역전사하였다. 생성된 cDNA를 58℃ 결합온도(annealing temperature)에서 40 사이클로 증폭하였다. 대조군(Negative controls :전사효소(transcriptase enzyme)가 없는 시료 또는 RNA 대신 물로 채워지거나 암 세포가 투여되지 않는 개체로부터의 RNA 시료)은 샘플을 준비하는 모든 단계에 포함시켰다. PCR은 0.5㎕ cDNA와 하기 표 1에 나열된 프라이머(primers)를 각각 0.5uM을 넣어 20㎕의 혼합물을 만들어 수행하였다.

【표 1】

<56> PCR에 사용된 프라이머의 염기서열

명칭	정위(Orientation)	프라이머	명칭	정위(Orientation)	프라이머
CD11c	sense	gtctgaacaagcactgtgaa	LAG3	sense	gtctccatcacgtacaacct
	antisense	aacagagtgactgtggttcc		antisense	cacaaatctttcctttccag
IFN-γ	sense	aacgctacacactgcatcttgg	NKD2	sense	cgattcacccttaacacatt
	antisense	ccaggataagaaactcga		antisense	gctggaatttgagacaaac
Granzyme B	sense	cccaggcgcaatgtcaat	CD68	sense	gcatatctgttttgaatccc
	antisense	ccaggataagaaactcga		antisense	ccttagagagagcaggtcaa
Granzyme C	sense	atcaaggctaaggaggagac	CCR2	sense	tcatggtcatctgctactca
	antisense	gatctttgagtctcccacac		antisense	ggagagataccttcggaact
Granzyme E	sense	gatactgtggaggcttcttg	CCR5	sense	gcctctctcccagaaataat
	antisense	tgctttagtgtcattgatgg		antisense	gggagtccagaagagaaagt
Perforin	sense	gtcacgtcgaagtacttggtg	CCR7	sense	tggttcaagaaggatgtgcgg
	antisense	atggctgatagcctgtctcag		antisense	gaggaaaaggatgtctgccacg

Klrg-1	sense	ctttgcaatggtggctt t	GAPDH	sense	gaacgggaagcttgtc atcaa
	antisense	ctccagccatcaatgtt c		antisense	ctaagcagttggtggt gcag
Klrg 2-A2	sense	tcctccagagaaactca ttg			
	antisense	tacagtttttggaaatg cag			

<57> PCR은 아래의 조건으로 수행되었다: 초기변성(initial denaturation)은 94℃에서 2분, 변성(denaturation)은 94℃에서 1분, 어닐링(annealing)은 58℃에서 1분, 및 신장(extension)은 72℃에서 1분 동안 수행하였고, 증폭된 생산물을 1.2% 아가로스 겔에서 전기영동으로 분석하였다.

<58> 실시간(Real-time) 정량 PCR 분석은 콴티텍 CYBR 그린 PCR 키트(QuantiTect CTBR Green kit, Qiagen, Valencia, CA)를 사용하여 PTC-100 프로그래머블 온도 조절기(Programmable Thermal Controller, MJ Research, Cambridge, MA)로 수행하였다. △Rn이 형광신호 임계값(fluorescence signal threshold)에서 PCR 사이클 횟수로 규정되는 증폭 역치(An amplification threshold value, Ct value)는 각 반응에 대하여 계산하였다. GAPDH에 근거하여 cDNA (표적 유전자)에서 시료 A와 시료 B 사이에서 증가 비율은 다음 수학식 1로 산출하였다.

$$증가\sim비율\sim=2^{-\triangle\triangle Ct},\sim\triangle\triangle Ct\sim=\sim(Ct_{target}-Ct_{GAPDH})_{시료A}-(Ct_{target}-Ct_{GAPDH})_{시료B}$$

<60> 1-8. 암세포 특이적인 $CD8^+$ T 세포의 입양 전달

<61> 암 조직 근처의 림프절과 비장은 작은 조각으로 분쇄한 다음 콜라게나아제 타입(collagenase type) II (1mg/ml; Sigma)와 DNase I (15ug/ml; Roche)를 넣어서 37℃에서 40분 동안 반응시켰다. 40분 후 세포 현탁액이 분리하였고, $CD8^+$ T 세포는 MACS 분리 컬럼(separation columns, Miltenyi Biotec)을 사용하여 분리하였다. $CD8^+$ T 세포는 $CD4^+$, $F4/80^+$, $CD40^+$ 및 $B220^+$ 세포군에 관련되는 항체를 사용하여 제거함으로써 정제하였다. $CD11c^+CD8^+$ T 세포는 위 과정에서 남은 세포에 $CD11c^-$마이크로비드를 사용하여 마이크로비드에 결합한 세포로부터 분리되었으며, $CD11c^-CD8^+$ T 세포는 $CD11c^-$마이크로비드를 사용 시 반응하지 않고 남아 있는 세포들을 추가적으로 $CD8^-$마이크로비드(Miltenyi Biotech)에 반응시킨 후 분리하였다. 이렇게 분리된 세포들의 순도는 약 96-98% 였고, 정제된 $CD11c^-CD8^+$ T 세포는 5uM CFSE로 표지하고, CFSE로 표지된 $CD11c^-CD8^+$ T 세포는 암이 자라고 있는 생쥐에게 정맥주사(생쥐 1마리당 $1.5x10^7$ 주사)로 입양 전달되었다. 세포가 입양 전달된 생쥐는 항-4-1BB 및 항 CD4 단일 클론 항체를 주사하였다. 세포의 입양 전달 후 3일, 5일 째 암 근처의 림프절과 암 조직을 생쥐로부터 분리하였으며, 세포들을 PE-항 CD11c와 PE-Cy5-항 CD8으로 염색하였다. 염색한 세포들의 세포분열과 CD11c 발현을 분석하였다.

<62> **실험예 1. 항-4-1BB 및 항-CD4 단클론 항체의 항암면역 반응 실험**

<63> 1-1. 암예방효과

<64> 제거용 항-CD4 단클론 항체는 암 조직 내부에 침윤하는 $CD4^+CD25^+$ 조절 T 세포를 제거함으로써 항암 반응을 증가시키고(Yu P et al., *J Exp Med.* 201, pp 779-91, 2005), 항진성 항-4-1BB 단일 클론 항체는 $CD8^+$ T 세포들의 반응을 높이는 것으로 알려져 있다(Shuford WW et al., *J Exp Med.* 186, pp 47-55, 1997). 이에 본 발명에서는 B16-F10 흑색종 모델에서 항진성 항-4-1BB 및 제거용 항-CD4 단일 클론 항체의 항암면역 효과를 시험하였다. 실험을 위해, C57BL/6 생쥐의 등 쪽 정중앙에 50㎕ 의 4 x 10^5 B16-F10 흑색종을 피하 주사한 후, 생쥐에 암세포를 투여한 다음 0, 5, 10, 15, 20 일에 100㎍의 항-4-1BB 및 400㎍의 항-CD4 단일 클론 항체를 복강 주사하였다.

<65> 실험결과, 단일 클론 항체의 초기치료에서, 항-4-1BB 또는 항-CD4 단클론 항체의 단독투여는 암의 성장

이 부분적으로 억제되었고, 생쥐의 생존 비율도 대조군에 비하여 연장되었다(도 2a 및 2b). 단독 투여된 생쥐에 비하여, 항-4-1BB와 항-CD4 단클론 항체를 함께 처리하였을 때 암의 성장이 성공적으로 억제되었을 뿐만 아니라, 생존 비율도 월등히 증가하였다(도 2 a 및 2b). 상기 생쥐는 B16-F10 흑색종의 투여 후 50일 이상 생존하였으며, 암의 성장이 지속적으로 억제되었다.

<66> 1-2. 항암치료효과

<67> 치료효과를 알아보기 위해, 생쥐의 암의 크기가 직경 2-3mm인 암세포 투여 후 6일 째부터 5일 간격으로 100㎍의 항-4-1BB 및 400㎍의 항-CD4 단클론 항체를 복강주사하였다.

<68> 실험결과, 항-4-1BB 또는 항-CD4 단클론 항체의 단독 투여는 부분적인 암 증식 억제 및 약간의 생존율 증가만을 유발하였으며, 항-4-1BB 보다 항-CD4의 투여가 효과적인 것으로 관찰되었다(도 2c 및 2d). 항-4-1BB와 항-CD4 단클론 항체를 함께 처리한 경우, 단독투여에 비해 암 세포 증식이 우수하게 억제되었을 뿐만 아니라, 생존 비율도 역시 유의적으로 증가되었다 (도 2c 및 2d).

<69> 1-3. $CD8^+$ T 세포의 증식

<70> $CD8^+$ T 세포는 성공적인 항암 치료에 필수적이기 때문에, 항-4-1BB 및 항-CD4 단클론 항체가 처리된 생쥐에서 $CD8^+$ T 세포의 증식을 측정하였다. B16-F10 흑색종이 투여된 C57BL/6 생쥐에 항-4-1BB 및 항-CD4 단클론 항체를 복강주사 하였으며, 암세포 주사 후 10일째 1mg BrdU를 생쥐에 주사함으로써 출수림프절(DLN) 세포의 증식을 측정하였다.

<71> 실험결과, 도 2e에서 보는 바와 같이 렛트 IgG를 처리한 생쥐(대조군)에서는 $CD8^+$, $CD4^+$ 및 $B220^+$ B 세포의 증식이 극소수로 확인되었고, 이에 반에 항-4-1BB 단클론 항체의 투여는 $CD4^+$ T(1.0±0.29%) 또는 B 세포(0.2±0.1%) 보다 $CD8^+$ T 세포(1.9±0.45%)의 증식을 유도하였다. 항-CD4 단클론 항체 또한 $CD8^+$ T 세포(2.6±0.5%)의 증식을 증가시켰으며 $CD4^+$ T 세포의 도움 기능 부족으로 B 세포(< 0.1%)의 증식은 유도되지 않았다. 항-4-1BB 및 항-CD4 단클론 항체를 함께 처리했을 때 $CD8^+$ T 세포(9.7±2.3%)의 증식이 강하게 유도되었으며, 그 양은 항-4-1BB 항체 처리 보다 5배, 항-CD4 항체 처리시보다 4배 높은 비율이었다.

<72> 1-4. $CD11c^+CD8^+$ T 세포의 증식

<73> 항-4-1BB 단클론 항체 투여시 항원 특이적이며 4-1BB 의존적으로 $CD8^+$ T 세포로부터 $CD11c^+CD8^+$ T 세포가 분화될 수 있음은 이미 보고 되어있다(Seo SK et al., *Nat Med.* 10, pp 1088-94, 2004). 따라서 항-4-1BB 항체 투여에 의해 증식하는 $CD8^+$ T 세포가 $CD11c^+CD8^+$ T 세포인지 확인하였다. BrdU로 표지된 출수림프절 세포를 항-CD11c, CD8αα$^+$ DCs를 배제하기 위해 항-CD8β 및 항-BrdU 로 염색한 후, $CD11c^-CD8^+$ T와 $CD11c^+CD8^+$ T 세포는 유세포 분석기의 점 그림(dot plot) 상에서 CD8 대 CD11c로 각각 분리되어져 각 세포군에서 증식하는 세포가 얼마나 되는지 측정하였다.

<74> 실험결과, $CD11c^+CD8^+$ T 세포의 증식은 항-4-1BB 의존적으로 항-CD4 단클론 항체의 추가에 의해 증가되었다(도 2f). 항-4-1BB 항체에 의한 $CD8^+$ T 세포 반응의 증진효과는 항-CD4 항체를 조합함으로써 더욱 강화될 수 있으며, 결과적으로 다량의 $CD11c^+CD8^+$ T 세포 분화를 유도하였다. 또한 항-4-1BB 및 항-CD4 항체의 복합 투여에 의해 $CD11c^+CD8^+$ T 세포가 다량 증식된 결과, 항-4-1BB 항체가 $CD8^+$ T 세포의 분화에 필요한 $CD4^+$T 세포의 도움 기능을 대신할 수 있다는 것을 확인하였다.

<75> **실험예 2. 항-CD4 단클론 항체에 의한 IDO 발현 세포의 제거**

<76> 2-1. $CD4^+CD25^+$ 조절 T 세포의 제거

<77> 항-CD4 항체를 이용한 $CD4^+$ 세포의 제거는 암에 침윤하는 $CD4^+CD25^+$ 조절 T 세포를 제거함으로써 암 항원에 대해 증가된 반응을 야기한다(Yu P et al., *J Exp Med.* 201, pp 779-91, 2005). 사람의 경우, 암세포는 출수림프절에 IDO를 발현하는 형질세포상(plasmacytoid) 수지상세포를 증가시켜 면역 반응 회피를 유도하고 CD4

를 발현시키는 것으로 보고 되어있다(Munn DH et al., *J Clin Invest.* 114, pp 280-90, 2004). 따라서 항-CD4 항체 투여 시 면역억제 유도에 관여하는 형질세포상 수지상세포 역시 제거되는 것으로 예상되었다. 이에 항-CD4 항체 투여 후 $CD4^+CD25^+$ 조절 T 세포뿐 아니라 IDO와 CD4 분자를 발현하는 형질세포상 수지상세포 역시 함께 제거되었는지 확인하였다.

<78> 그 결과, $CD4^+CD25^-$ T와 $CD4^+CD25^+$ 조절 T 세포 모두 항-CD4 처리에 의하여 암 근처의 림프절과 암 조직에서 완전히 제거된 것을 확인하였다(도 3a).

<79> 2-2. 형질세포상 수지상세포(Plasmacytoid dendritic cell)의 제거

<80> 형질 세포상 DCs의 제거 여부를 확인하기 위해서, 암 세포 투여 후 15일에 항-4-1BB 및 항-CD4 항체 처리된 생쥐로부터 출수림프절 세포를 분리였으며, 항-CD11c와 형질 세포상 DCs의 새로운 마커인 항-PDCA-1항체로 염색하였다(Krug A et al., *Immunity*. 21, pp 107-19, 2004).

<81> 유세포 분석 결과, 항-CD4 항체 투여 후 PDCA-1과 CD11c를 발현하는 형질 세포상 수지상세포의 50-70%가 제거되었으며, 항-4-1BB 항체가 투여되었을 때는 제거되지 않았다(도 3b 위). 또한 제거된 세포의 대부분은 CD4를 발현하는 세포였다 (도 3b 아래).

<82> 1-3. IDO 발현하는 세포제거 재검증 실험

<83> IDO를 발현하는 수지상세포의 종류와 항-CD4 항체 처리에 의해 IDO를 발현하는 세포의 제거를 한번 더 검증하기 위해서, 각 그룹의 생쥐로부터 출수림프절 절편을 준비하였으며, 본 실험실에서 제작된 항-IDO 항체와 항- CD11c 또는 항-PDCA-1 항체로 각 절편을 염색하였다.

<84> 그 결과, DO를 발현하는 수지상 세포는 렛트 IgG (대조군)- 또는 항-4-1BB 항체를 투여 한 생쥐의 출수림프절 절편에서 쉽게 발견되지만, 항-CD4- 또는 항-4-1BB + 항-CD4를 함께 처리한 생쥐의 림프절 절편에서는 IDO의 발현이 감소됨을 확인하였다(도 3c 및 3d). 상기에서 언급한 것과 같이, 출수림프절 절편 염색을 통해서도 항-4-1BB 또는 항-4-1BB 및 항-CD4 항체를 동시에 투여한 생쥐의 출수림프절내에 $CD11c^+$ 세포가 증가함을 관찰하였다. IDO와 PDCA-1의 동시 염색은 형질세포상 수지상세포가 렛트 IgG (대조군)- 또는 항-4-1BB를 처리된 생쥐에서 IDO를 발현하는 주요 세포라는 것을 증명하였으며, 항-CD4 항체 투여에 의해 IDO를 발현하는 세포가 감소한다는 것을 확인하였다. 따라서, 항-CD4 항체 투여 시 IDO를 발현하는 형질세포상 DCs와 $CD4^+CD25^+$ 조절 T 세포를 제거함으로써 항-4-1BB에 의해 매개되어지는 $CD8^+$ T 세포의 반응을 증진시킬 수 있음을 확인하였다.

<85> **실험예 3. 항-4-1BB 및 항-CD4 단클론 항체 조합에 의한 $CD11c^+CD8^+$ T 세포의 증식 및 IFN-γ의 생산유도**

<86> 도 2f에서 나타낸 바와 같이, 항진성 항-4-1BB 항체의 투여는 $CD8^+$ T 세포 반응을 유도하고, 항-CD4 항체를 추가함으로써 $CD11c^+CD8^+$ T 세포 증식을 더욱 증진시켰다. 이에 항-4-1BB 및 항-CD4 항체의 처리가 어떻게 $CD8^+$ T 세포 반응을 조절하는지, 세포의 비율 및 정량적으로 $CD11c^+CD8^+$ T 세포의 증식과 IFN-γ의 생산을 분석하였다. C57BL/6 생쥐에 B16-F10 흑색종을 주사하고, 상기에서 기술된 것처럼 항-4-1BB와 항-CD4 항체를 복강주사한 후, 암세포 투여 15일 후에 암 조직 근처의 출수림프절이 분리하였다.

<87> 실험결과, 항-4-1BB 항체의 투여는 $CD8^+$ T 세포를 증가시켰으며, 점차적으로 $CD8^+$ T 세포의 비율이 증가함에 따라 결국 $CD8^+$ T 세포의 비율이 $CD4^+$T 세포의 비율보다 높아졌다. 출수 림프절내 $CD8^+$ T 세포 수는 대조군인 렛트 IgG 투여군에 비해, 항-4-1BB 항체 투여 시 약 2.5배 증가하였고 항-CD4 항체 처리에 의해 4-5 배 증가하였으며, 항-4-1BB와 항-CD4 항체를 함께 처리했을 때 7-9배 증가하였다(도 4a). 또한 $CD11c^+CD8^+$ T 세포는 항-4-1BB 및 항-CD4 항체를 함께 처리된 그룹에서 렛트 IgG 투여군에 비해 50배 이상 증가하였고, 항-4-1BB 처리군과 비교해도 10배 이상 증가하였다(도 4b). IFN-γ를 발현하는 $CD8^+$ T 세포 역시 렛트 IgG 투여군에 비해 항-4-1BB 및 항-CD4 항체를 함께 투여한 실험군의 경우, 절대수(absolute number)로 50배 이상 증가하였기 때문에 그 차이가 뚜렷하였다(도 4d). 항-4-1BB 항체 투여군의 경우, $CD4^+$T 세포 또한 IFN-γ 발현이 유도됨을 관찰하였다(도 4c). 항-CD4 항체 투여시 출수 림프절에서 놀라울 정도로 $CD8^+$ T 세포 숫자를 증가시킴에도 불구하고, IFN-γ를 생산하는 $CD8^+$ T 세포는 렛트 IgG (대조군) 처리된 그룹에 비해 별 차이가 없었으나(도 4a 및 4e), 항

-4-1BB 항체 투여 시에는 $CD8^+$ T 세포의 수적인 증가뿐 아니라, $CD8^+$ 및 $CD4^+$T 세포가 IFN-γ를 발현하는 작용세포(effector cell)로 분화하는 것을 촉진하였다(도 4a, 4e 및 4f).

<88> **실험예 4. 항-4-1BB 및 항-CD4 항체 투여에 의한 염증성 사이토카인의 변화**

<89> 항-4-1BB 및 항-CD4 항체의 투여에 의해 염증성 사이토카인의 변화에 어떠한 영향을 주는지를 분석하기 위해서, 각 실험군의 암 조직(tumor tissue)과 비장 (splenn)을 분리하여 단백질효소 억제제가 포함된 PBS에 넣어 분쇄하고, 원심분리하여 상층액만을 수거하였다. 각 샘플 내 사이토카인의 양은 사이토메트릭 비드 어레이 키트(cytometric bead array kit, CBA; BD Biosciences)를 이용하여 정량하였다.

<90> 실험 결과, 암 조직에서는 염증성 사이토카인 중 IL-6만이 항-CD4 항체 투여 시 감소되었으며 IFN-γ, TNF, IL-12p70 및 MCP-1은 항-4-1BB 및 항-CD4 항체의 투여 시에 모두 증가되었다(도 4g). 비장은 IFN-γ와 TNF를 포함한 단 두 사이토카인이 항-4-1BB 항체 처리에 의해 크게 증가하였고, 항-CD4 항체 처리 시에는 변함이 없었다(도 4h). 따라서 항-4-1BB 항체 처리는 $CD8^+$ T 세포의 증식과 분화를 유도할 뿐 아니라, IFN-γ, TNF, MCP-1 및 IL-12p70을 포함한 사이토카인의 생산을 유도함을 알 수 있었다. 반면에 항-CD4 항체는 T 세포 활성을 위한 역치(반응치, threshold)를 낮춤으로써 $CD8^+$ T 세포를 작용세포로 분화시키기 보다는 증식을 유도하는 경향을 나타내었다. 이러한 두 가지 특성의 조합에 의해, 항-4-1BB 및 항-CD4 항체의 복합투여는 $CD11c^+CD8^+$ T 세포가 더 많이 분화되도록 하는 것으로 분석되었다(도 4b). 따라서, 항-4-1BB 및 항-CD4 항체의 복합 투여시 나타난 강력한 항암반응은 증가된 $CD11c^+CD8^+$ T 세포에 의해 매개되는 것을 알 수 있었다.

<91> **실험예 5. 항-4-1BB 및 항-CD4 항체의 조합에 의한 세포용해성 T 세포의 증가**

<92> 상기의 실험을 통해, 항-4-1BB와 항-CD4 항체가 투여된 생쥐에서 암 증식의 억제와 $CD11c^+CD8^+$ T 세포의 증식이 비례 관계에 있음을 발견했기 때문에, 항-4-1BB 및 항-CD4 항체의 투여 시 공동 상승적으로 암 항원들에 특이적인 세포용해성 $CD8^+$ T 세포(CTL) 숫자를 증가시킬 것으로 예상하였다. 이를 검증하기 위해, gp100, TRP2(tyrosinase-related protein 2), 타이로시나아제(tyrosinase) 및 MAGE-A1(melanoma-associated Ag A1)과 같은 흑색종 암 항원(melanoma tumor antigen)에 특이적인 CTL의 숫자를 계산하였다. 암 항원 특이적인 CTL은 이전에 보고된 것처럼 암 항원이 자극된 표적세포와 함께 배양하는 동안에 $CD8^+$ T 세포 표면에 노출된 라이소좀과 관련된 표면 단백질-1(lysosomal-associated membrane protein-1, lamp-1; CD107a)을 측정하여 결정하였다(Rubio V et al., *Nat Med.* 9, pp 1377-82, 2003). 항-4-1BB 및 항-CD4 항체가 투여된 생쥐로부터 15일 째 출수림프절 세포를 준비한 후, gp100, TRP2, 타이로시나아제 또는 MAGE-A1의 펩티드로 표지된 EL-4 세포와 2 : 1의 비율로 모넨신 및 항 LAMP-1과 함께 5시간 동안 배양하였다.

<93> 실험결과 세포 분석 결과 CD107α를 발현하는 세포는 렛트 IgG 처리된 생쥐의 $CD8^+$ T 세포의 표면에서 거의 발견되지 않았으며, 항-4-1BB 또는 항-CD4 투여된 생쥐의 $CD8^+$ T 세포에서는 1%미만으로 측정되었으나(도 5a), 항-4-1BB 및 항-CD4를 함께 투여한 생쥐에서는 전체 세포 중에 5% 이상이 $CD107α^+CD8^+$ T 세포였다. 특히 $CD107α^+CD8^+$ T 세포의 대부분은 $CD11c^+CD8^+$ T 세포에서 발견되었다(도 5b). 도 5b에서 나타낸 바와 같이, 항-4-1BB 및 항-CD4가 함께 처리된 생쥐에서 $CD8^+$ T 세포 중 $CD107α^+$ 세포는 4가지 다른 암 항원에 대해 모두 약 10% 정도였다. 출수 림프절에서 각 암 항원에 대해 특이적인 CTL 숫자는 살아있는 전체 세포 숫자에 유세포 분석기의 분석에 의한 퍼센트를 곱하여 결정하였다(도 5c). 항-4-1BB 또는 항-CD4 투여된 생쥐는 렛트 IgG 처리된 생쥐에 비해 항원 특이적인 CTL 숫자에서 3-10배 더 높게 나타난 반면에 항-4-1BB 및 항-CD4가 함께 처리된 생쥐에서는 모든 암 항원에 대해 CTL의 수가 40배 이상 증가된 것으로 나타났다. 상기 결과로 항-4-1BB 및 항-CD4 항체의 복합투여에 의한 암 성장 억제는 세포 표면에 CD11c를 발현하는 암세포 특이적인 $CD8^+$ T 세포의 증가를 통해서 매개 된다는 것을 확인할 수 있었다.

<94> **실험예 6. 항-4-1BB 및 항-CD4 항체투여에 의한 $CD11c^+CD8^+$ T 세포의 암조직내 축적**

<95> 6-1. $CD8^+$ T 세포의 암조직내 침윤

<96> 비록 $CD11c^+CD8^+$ T 세포가 암 조직 근처의 출수 림프절에서 항-4-1BB와 항-CD4 항체 투여에 의해 대량으

로 증식할지라도, 상기 세포군이 암의 성장을 방해하거나 억제하기 위해서는 암의 조직 내로 침윤되어야 한다. 또한 암의 성장을 부분적으로 억제하는 것으로 나타난 항-CD4 항체 투여 생쥐의 출수 림프절에서 $CD11c^+CD8^+$ T 세포를 발견할 수 없었다. 따라서 본 발명에서는 암조직 내로 침윤한 $CD8^+$ T 세포를 분석하였으며, B16-F10 흑색종이 투여된 C57BL/6 생쥐에 항-4-1BB 및 항-CD4 항체를 처리하였으며, 암 조직으로 침윤한 면역세포(TILs; tumor infiltrating lymphocytes)를 암세포 주사 후 15일 째에 63/36% 퍼콜(percoll) 밀도차 분리에 의해 각 그룹의 생쥐의 암 조직으로부터 준비하였다.

<97> 실험결과, 도 6a와 6b에 나타낸 바와 같이, 렛트 IgG 투여 생쥐에서는 극소수의 TILs만이 존재하였으며 $CD8^+$ T 세포 역시 극소수였으나, 항-4-1BB 항체가 처리된 그룹에서는 $CD8^+$ T 세포의 침윤이 증가되었으며, 침윤된 $CD8^+$ T 세포의 대부분이 $CD11c^+CD8^+$ T 세포였다. 항-4-1BB 및 항-CD4 항체를 함께 투여한 생쥐의 경우, $CD11c^+CD8^+$ T 세포의 침윤이 증가되어 있었으며, 전체 침윤 세포의 거의 80% 이상을 차지하였으나, 항-CD4 투여는 암 조직 내로 다양한 면역세포의 증가를 유발하였으며, 출수 림프절에서는 $CD11c^+CD8^+$ T 세포가 거의 발견되지 않았음에도 불구하고, 암 조직 내로 침윤하는 $CD8^+$ T 세포의 40% 이상이 $CD11c^+CD8^+$ T 세포였다. 암 조직으로 침윤한 면역세포 중 각 세포군을 절대 숫자로 계산했을 때, 항-4-1BB 및 항-CD4 항체 투여에 의한 세포 침윤 결과는 더욱 분명하였다. 항-4-1BB 항체는 $CD11c^+CD8^+$ T 인 $CD8^+$ T 세포의 침윤만이 선택적으로 증가되었으며, 항-CD4 항체 처리는 $CD3^+$T세포, NK 세포 및 대식세포를 포함한 다양한 면역세포의 침윤이 증가되었다(도 6b). 항-4-1BB 및 항-CD4 항체를 함께 투여한 생쥐의 경우, 전체 침윤세포의 숫자가 항-CD4 항체만을 투여한 생쥐의 절반임에도 불구하고, $CD8^+$ T 세포의 숫자는 훨씬 더 높았다. 특히, $CD11c^+CD8^+$ T 세포는 항-4-1BB 및 항-CD4 항체가 함께 처리된 생쥐에서는 항-CD4 항체만으로 처리된 생쥐에서 보다 2배 이상이었고, 항-4-1BB 항체 처리된 생쥐에 비해서 8배 이상이었으며, 이러한 세포군은 렛트 IgG 에서는 거의 발견되지 않았다.

<98> 6-2. $CD11^-CD8^+$ T세포와 $CD11c^+CD8^+$ T 세포간의 유전자 발현분포 비교

<99> 항암 면역반응을 유도하는 $CD11c^+CD8^+$ T 세포의 특성을 조사하기 위해, $CD11^-CD8^+$ T 세포와 $CD11c^+CD8^+$ T 세포간의 유전자 발현분포를 비교했다. $CD8^+$ T 세포는 렛트 IgG 또는 항-CD4를 투여한 생쥐로부터, $CD11c^+CD8^+$ T 세포는 항-4-1BB 또는 항-4-1BB 및 항-CD4 항체를 투여한 생쥐의 출수림프절로부터 마그네틱 비드(magnetic beads)를 사용하여 15일 째 분리하였다.

<100> 그 결과, 분리된 세포의 순도는 유세포 분석기에 의해 $CD8^+$ T 세포는 97% 이상, $CD11c^+CD8^+$ T 세포는 92% 이상임을 확인하였다(도 6c). 본 발명에서는 이미 콜라겐 유도성 관절염 모델 (CIA; collagen-induced arthritis)에서 항-4-1BB 항체 투여 후 분리한 $CD11c^-CD8^+$ T 세포와 $CD11c^+CD8^+$ T 세포를 이용하여 마이크로어레이(microarray)를 수행하였으며, 그 결과를 분석하여 선택되어진 다양한 유전자의 mRNA의 수준을 RT-PCR을 이용하여 확인하였다. 도 6d는 항-4-1BB 또는 항-4-1BB 및 항-CD4 항체를 함께 투여한 생쥐로부터 분리한 $CD11c^+CD8^+$ T 세포가 동일하게 T 세포 활성, 세포 이동, 작용 기능에 관련된 유전자 발현한다는 것을 보여주었으나 $CD8^+$ T 세포와 $CD11c^+CD8^+$ T 세포는 커다란 차이가 있었다. 라이소좀과 관련된 표면 단백질-1 분석(lamp-1 assay)과 동일하게, RT-PCR(도 6d) 및 실시간 PCR(도 6E) 분석결과는 $CD11c^+CD8^+$ T 세포가 세포 용해성 $CD8^+$ T 세포(CTL)의 작용 기능과 형성에 관련되어 지는 IFN-γ, 그랜자임(granzyme) B/ C/ E, Klrg-1(killer cell lectinlike receptor G1), LAG3(lymphocyte activation gene 3), CD68, NKG2D 및 CCR2와 같은 유전자 발현이 높음을 보여준다(Jenne DE et al., *Immunol Rev.* 103, pp 53-71, 1988, Pardo J et al., *Eur J Immunol.* 32, pp 1980-5, 2002, Voehringer D et al., *Blood.* 100, pp 3698-702, 2002, Voehringer D et al., *J Immunol.* 167, pp 4838-43, 2001, Avice MN et al., *J Immunol.* 162, pp 2748-53, 1999, El Mir S et al., *J Immunol.* 164, pp 5583-9, 2000, Smyth MJ et al., *J Exp Med.* 202, pp 583-8, 2005, Smyth MJ et al., *J Exp Med.* 200, pp 1325-35, 2004, Markiewicz MA et al., *J Immunol.* 175, pp 2825-33, 2005, Terwey TH et al., *Blood.* 106, pp 3322-30, 2005).

<101> 6-3. 항-4-1BB 또는 항-CD4항체 투여군에서 형성된 두 $CD11c^+CD8^+$ T 세포의 유전자 발현 성향 비교

<102> $CD11c^+CD8^+$ T 세포는 항-CD4 항체를 투여한 생쥐의 암 조직에서도 발견되었기 때문에(도 6a), 항-4-1BB 또는 항-CD4 항체 투여군에서 형성된 두 $CD11c^+CD8^+$ T 세포가 유사한 유전자 발현 성향을 나타내는지 조사하였다. 렛트 IgG 또는 항-4-1BB 처리된 생쥐에서는 $CD8^+$ T 세포의 비율과 숫자가 낮기 때문에, $CD11c^+CD8^+$ T 세포는 항-CD4 또는 항-CD4 및 항-4-1BB가 함께 투여된 실험군의 암조직으로부터 분리하였으며, RT-PCR에 의해 유전자 발현 성향을 비교하였다.

<103> 그 결과, 도 6f에서 나타낸 바와 같이, 항-4-1BB 또는 항-CD4 항체 투여 후 형성된 $CD11c^+CD8^+$ T 세포는 유사한 유전자 발현 분포를 나타내었다. 따라서 $CD11c^+CD8^+$ T 세포는 이전의 보고와 같이 (Huleatt JW., *J Immunol.* 154, pp 5684-93, 1995, Lin Y et al., *Eur J Immunol.* 33, pp 2736-43, 2003) 낮은 비율로 자연적인 면역 반응 과정에서도 $CD8^+$ T 세포로부터 형성되어질 수 있고, 항-4-1BB 항체로 인위적인 4-1BB 신호가 주어졌을 때 증가되는 것으로 판단되었다. $CD11c^+CD8^+$ T 세포는 대부분 항암 면역 반응을 유도하는 $CD8^+$ T 세포일 뿐만 아니라(도 5), 그랜자임(granzyme), IFN-γ, Klrg-1, NKG2D와 같은 CTL 기능에 관련된 다양한 분자들을 발현하는 특수화된 CTL 기능을 소유한 세포이다. 특히, Klrg-1과 NKG2D는 $CD11c^+CD8^+$ T 세포에서 증가되어 있었다. Klrg-1을 발현하는 세포들은 10회 이상 분열한 최종적으로 분화된 CTL을 의미하고 (Voehringer D et al., *Blood.* 100, pp 3698-702, 2002, Voehringer D et al., *J Immunol.* 167, pp 4838-43, 2001), NKG2D는 $CD11c^+CD8^+$ T 세포가 암 항원에 대해 TCR-비의존적으로 CTL 활성을 창출할 수 있다는 것을 의미한다 (Smyth MJ et al., *J Exp Med.* 202, pp 583-8, 2005, Smyth MJ et al., *J Exp Med.* 200, pp 1325-35, 2004, Markiewicz MA et al., *J Immunol.* 175, pp 2825-33, 2005). 상기의 결과들은 항-4-1BB와 및 항-CD4 항체의 처리에 의한 치료 효과는 암 조직에 $CD11c^+CD8^+$ T 세포가 축적됨으로써 매개된다는 것을 다시 한번 보여주었다.

<104> **실험예 7. $CD11c^+CD8^+$ T 세포에 의한 TCR-의존적 및 TCR 비의존적 암제거**

<105> 7-1. Klrg-1 및 NKG2D의 세포 표면 발현

<106> Klrg-1을 발현하는 $CD8^+$ T 세포가 최종적으로 분화된 기억 또는 작용 세포이고(Ibegbu CC et al., *J Immunol.* 174, pp 6088-94, 2005), $CD11c^+CD8^+$ T 세포에서 NKG2D 발현은 TCR-의존적 및 TCR-비의존적인 방법으로 암세포를 죽일 수 있음을 의미하기 때문에 (Markiewicz MA et al., *J Immunol.* 175, pp 2825-33, 2005), $CD11c^+CD8^+$ T 세포가 Klrg-1과 NKG2D의 mRNA를 높게 발현한다는 것은 주목할 만하다. 이에 본 발명은 유세포 분석에 의해 Klrg-1과 NKG2D의 세포 표면 발현을 확인하였다. 항-4-1BB 및 항-CD4 항체가 투여된 생쥐의 암 조직 근처의 출수림프절 세포들을 항-CD11c와 항-CD8α로 염색한 후 항-Klrg-1 또는 항-NKG2D 항체로 염색하였다.

<107> 실험결과, Klrg-1의 발현은 렛트 IgG 처리된 생쥐의 림프절 $CD8^+$ T 세포의 1%, 항-4-1BB 처리 시 7%, 항-CD4 처리 시 1-2%, 항-4-1BB 및 항-CD4 항체를 함께 처리했을 때 40-60% 정도였으며, NKG2D의 발현 또한 Klrg-1과 유사하였다. $CD8^+$ T 세포를 유세포 분석기의 점그림 상에서 CD8 대 CD11c에 의해 $CD11c^+$ 와 $CD11c^-$로 나눈 후 각 세포군 $CD11c^+$, $CD11c^-CD8^+$ T 세포에서 Klrg-1 과 NKG2D의 발현을 확인하였다. 도 7a-d에서의 결과와 같이, Klrg-1 또는 NKG2D는 $CD11c^-CD8^+$ T 세포 보다는 $CD11c^+CD8^+$ T 세포에서 발현되었다. 또한, 출수림프절과 암 조직내 $Klrg\text{-}1^+CD11c^+CD8^+$ T 세포의 비율은 렛트 IgG 처리시 3%에서 3% 로 변화가 없었으나, 항-4-1BB 처리 시 21%에서 75%, 항-CD4 처리 시 13%에서 37%, 항-4-1BB 및 항-CD4 항체 처리 시 76%에서 91%로 증가하였다(도 7a 및 7c). 또한, NKG2D를 발현하는 $CD11c^+CD8^+$ T 세포도 항-4-1BB 및 항-CD4 항체 투여 시 점차적으로 암 조직 내에서 증가되었다(도 7b 및 7d).

<108> 7-2. 항 4-1BB 처리 후, $CD11c^-CD8^+$ T 세포로부터 $CD11c^+CD8^+$ T 세포의 제공

<109> $CD11c^+CD8^+$ T 세포가 암 세포를 억제하거나 죽일 수 있는 놀라운 작용 세포임에도 불구하고, 이러한 결과들은 대부분의 $CD11c^+CD8^+$ T 세포가 최종적으로 분화된 세포의 표식 분자인 Klrg-1을 발현하기 때문에 더 이상 증식하지 않는다는 것을 의미한다(Voehringer D et al., *Blood.* 100, pp 3698-702, 2002). 따라서, $CD11c^+CD8^+$

T 세포는 항-4-1BB 항체 처리 후 $CD11c^{-}CD8^{+}$ T 세포로부터 지속적으로 제공될 것으로 예상되어, 본 발명에서는 항-4-1BB 및 항-CD4 항체를 처리한 생쥐로부터 $CD11c^{-}CD8^{+}$ T 세포를 정제하고 CFSE로 표식한 다음 항-4-1BB 및 항-CD4 항체가 처리된 생쥐에 상기 세포들을 입양 전달하였다.

<110> 그 결과, $CD11c^{-}CD8^{+}$ T 세포는 실제로 4-1BB 의존적으로 여러 번의 분열 거친 후 $CD11c^{+}$ 세포가 되었다(도 7e).

<111> 하기에 본 발명의 조성물을 포함하는 약학조성물의 제제예를 설명하나, 본 발명은 이를 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

<112> **제제예 1. 주사제제의 제조**

<113> 항-4-1BB 항체 및 항-CD4 항체.....100 mg

<114> 소디움 메타비설파이트.....3.0 mg

<115> 메틸파라벤.....0.8 mg

<116> 프로필파라벤.....0.1 mg

<117> 주사용 멸균증류수.....적량

<118> 상기의 성분을 혼합하고 통상의 방법으로 최종 부피가 2㎖이 되도록 제조한 후, 2㎖용량의 앰플에 충전하고 멸균하여 주사제를 제조하였다.

<119> **제제예 2. 환제의 제조**

<120> 항-4-1BB 항체 및 항-CD4 항체.....120mg

<121> 옥수수 전분.....100mg

<122> 멸균증류수.....적량

<123> 상기의 성분을 혼합하고, 통상의 환제 제조방법으로 0.3㎝ 지름으로 제환하여 환제를 제조하였다.

<124> **제제예 3. 정제의 제조**

<125> 항-4-1BB 항체 및 항-CD4 항체.....200 mg

<126> 유당.....100 mg

<127> 전분.....100 mg

<128> 스테아린산 마그네슘.....적량

<129> 통상의 정제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 타정하여 정제를 제조하였다.

<130> **제제예 4. 캡슐제의 제조**

<131> 항-4-1BB 항체 및 항-CD4 항체.....100 mg

<132> 유당.....50 mg

<133> 전분.....50 mg

<134> 탈크.....2 mg

<135> 스테아린산마그네슘.....적량

<136> 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

<137> **제제예 5. 액제의 제조**

<138> 항-4-1BB 항체 및 항-CD4 항체.....1000 mg

<139> 설탕.....20 g

<140> 이성화당.....20 g

<141> 레몬향.....적량

<142> 정제수를 가하여 전체 1000㎖로 맞추었다. 통상의 액제의 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 갈색병에 충전하고 멸균시켜 액제를 제조하였다.

발명의 효과

<143> 상기와 같이, 본 발명의 항-4-1BB 항체 및 항-CD4 항체의 복합투여는 강화된 CTL 능력을 갖는 $CD11c^{+}CD8^{+}$ T 세포의 증가로 인한 자가면역 질환 치료 및 암세포 제거능을 가지고 있으므로 암과 자가면역질환 치료제 또는 자가면역억제제로서 유용하게 사용될 수 있다. 또 본 발명은 인간화 항 4-1BB 항체 Hu75G1 혹은 Hu94G1 등을 이용하여 단백질 G-컬럼을 사용하여 정제한 후, 인간에서도 동일하게 사용될 수 있다.

<144>

도면의 간단한 설명

<1> 도 1은 생체 내에서 4-1BB 트리거링(triggering)의 신규 면역조절 경로를 보여주는 모식도이다.

<2> 도 2a 내지 도 2f는 항-4-1BB와 항-CD4 항체의 조합의 항암 면역반응 증진효과를 나타낸 그래프이다.

<3> 도 3a 내지 3d는 항-CD4 항체에 의한 $CD4^{+}CD25^{+}$ 조절 T 세포 및 IDO 발현 형질세포상 수지상 세포(plasmacytoid dendritic cell)의 제거효과를 보여주는 것이다.

<4> 도 4a 내지 4h는 항-4-1BB와 항-CD4 항체의 조합을 통한 출수림프절내 $CD11c^{+}CD8^{+}$ T 세포의 증식(도 3b)과 IFN-γ의 생산효과를 나타낸 것이다.

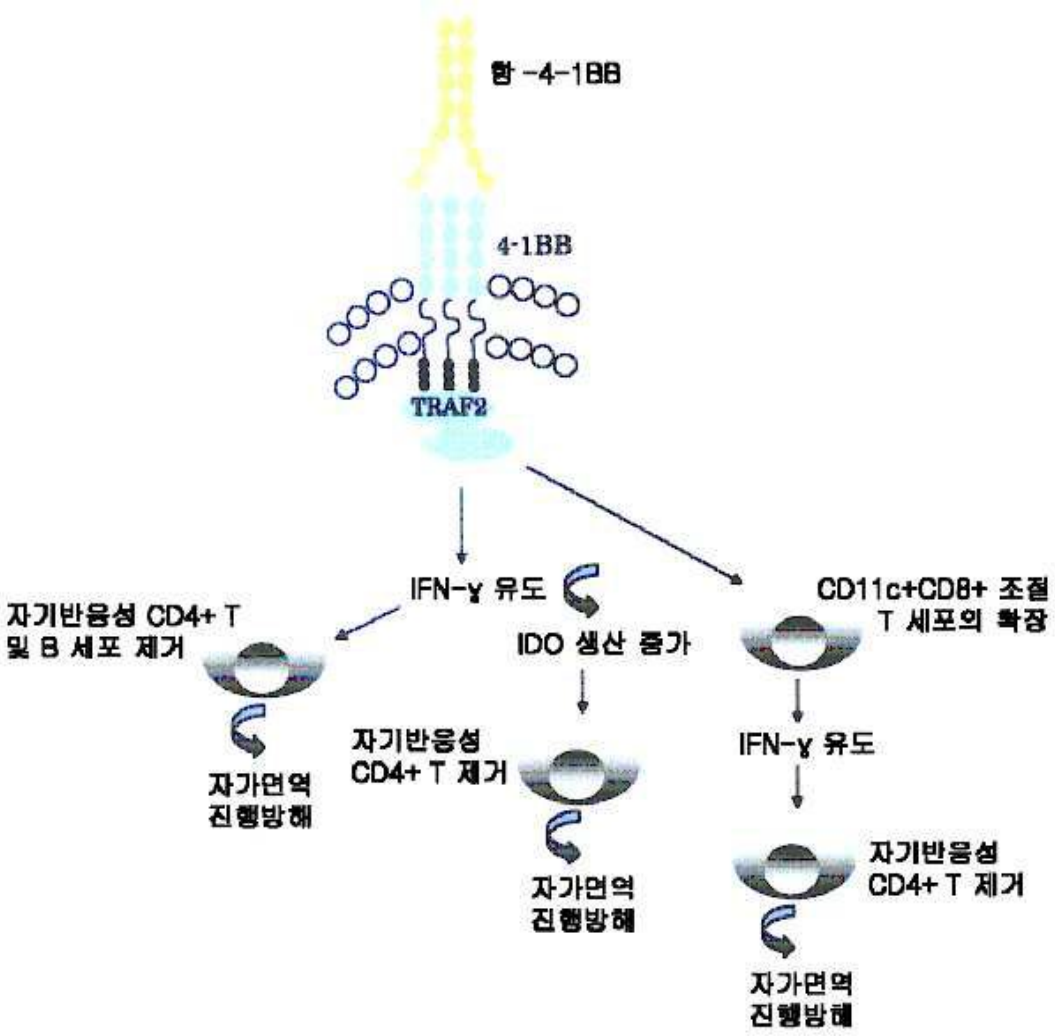
<5> 도 5a 내지 도 5c는 항-4-1BB와 항-CD4 항체의 조합에 의한 암 항원에 대한 CTL (세포용해성 T 세포)숫자의 증가를 나타낸 것이다.

<6> 도 6a 내지 도 6f는 항-4-1BB와 항-CD4 항체 투여에 의한 $CD11c^{+}CD8^{+}$ T 세포의 암조직내 축적을 나타낸 것이다.

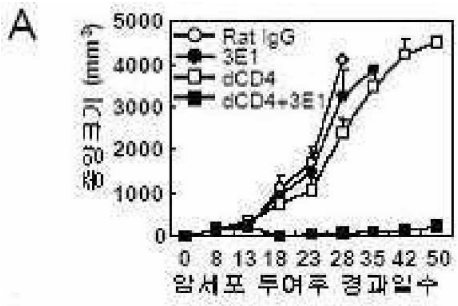
<7> 도 7은 $CD11c^{+}CD8^{+}$ T 세포의 TCR-의존적, TCR-비의존적으로의 암제거 효과를 나타낸 것이다.

도면

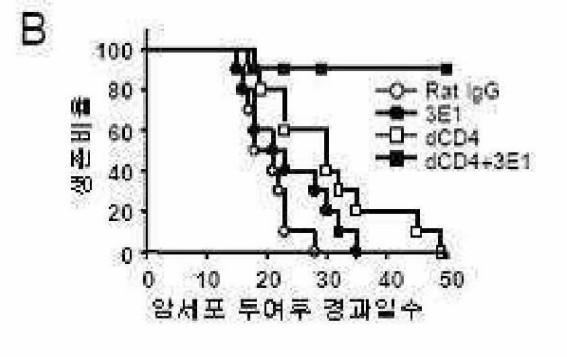
도면1


항 -4-1BB
4-1BB
TRAF2
IFN-γ 유도
IDO 생산 증가
자기반응성 CD4+ T
및 B 세포 제거
자가면역
진행방해
자기반응성
CD4+ T 제거
자가면역
진행방해
CD11c+CD8+ 조절
T 세포의 확장
IFN-γ 유도
자기반응성
CD4+ T 제거
자가면역
진행방해

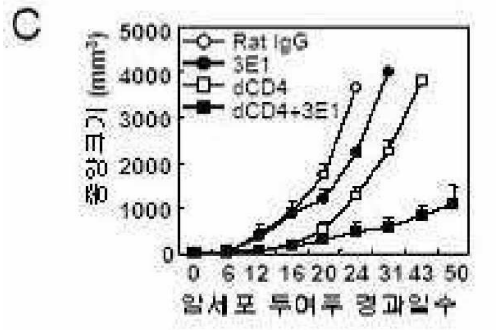
도면2a


A
5000
4000
3000
2000
1000
0
Rat IgG
3E1
dCD4
dCD4+3E1
0 8 13 18 23 28 35 42 50
암세포 투여후 경과일수

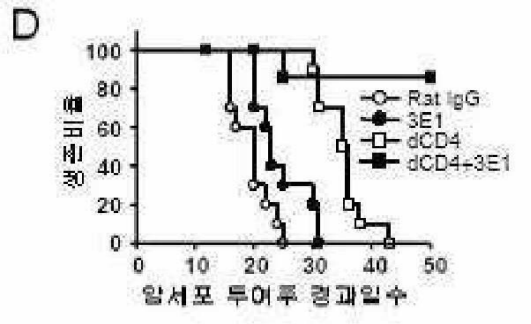
도면2b



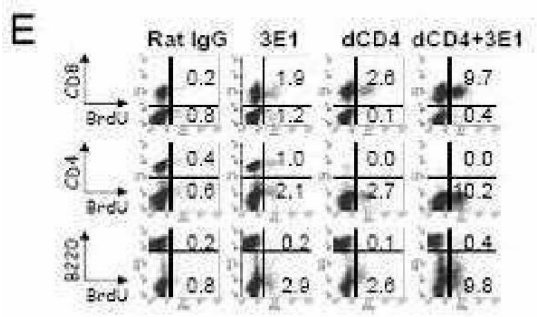
도면2c



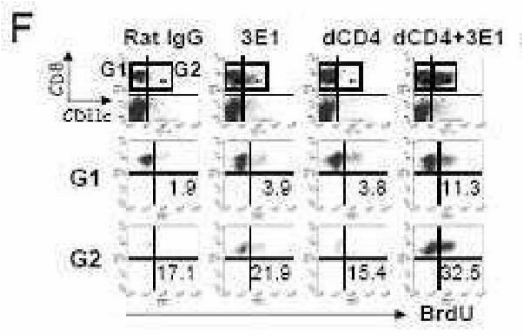
도면2d



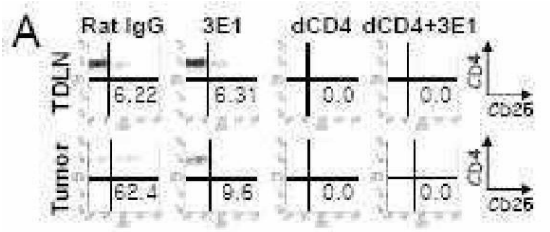
도면2e



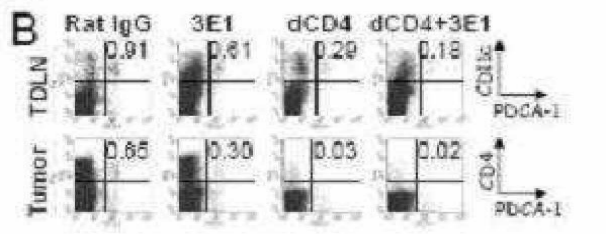
도면2f



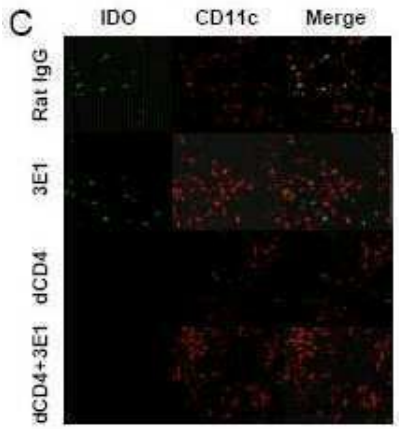
도면3a



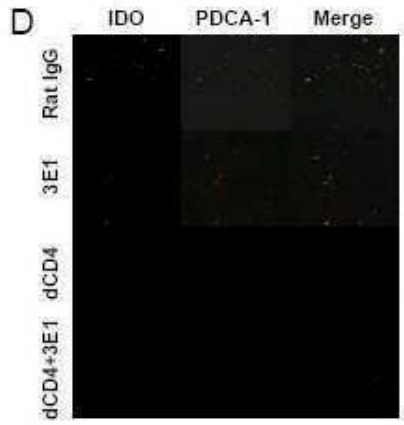
도면3b



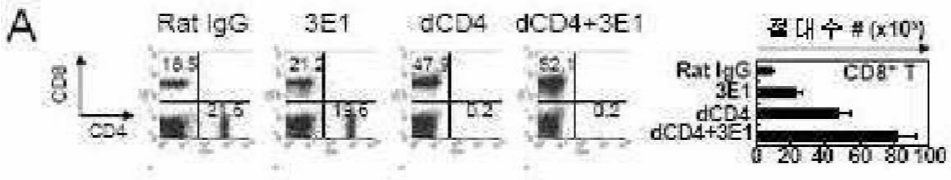
도면3c



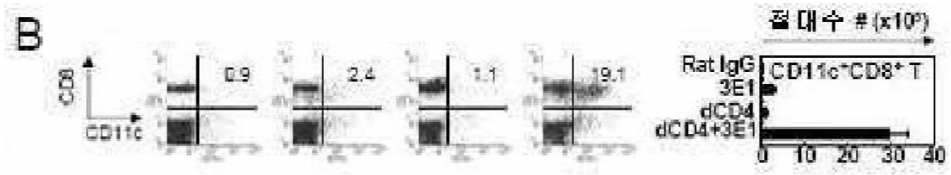
도면3d



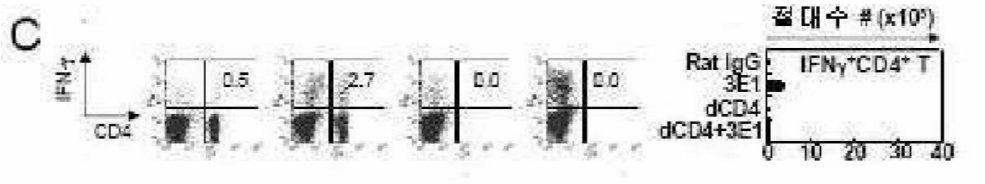
도면4a



도면4b



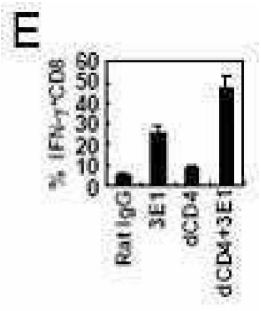
도면4c



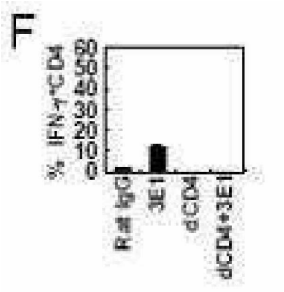
도면4d



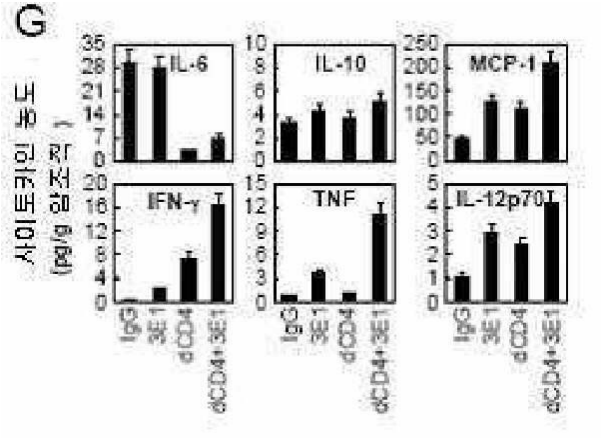
도면4e



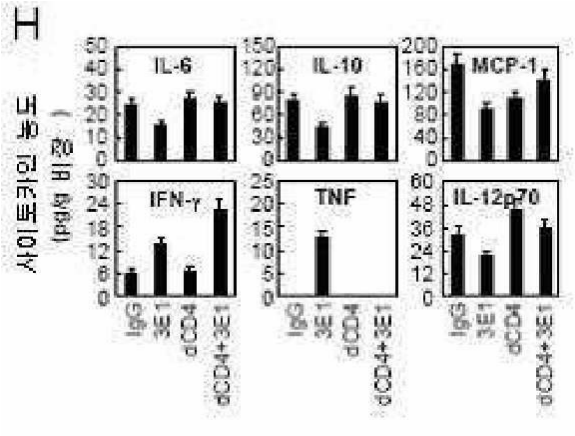
도면4f



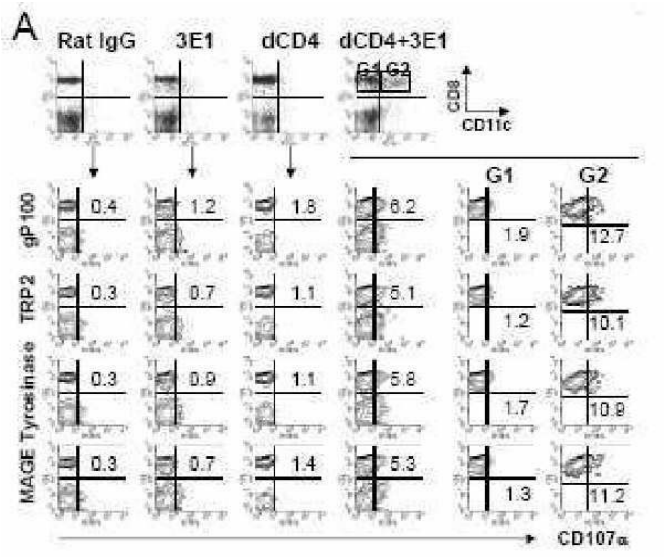
도면4g



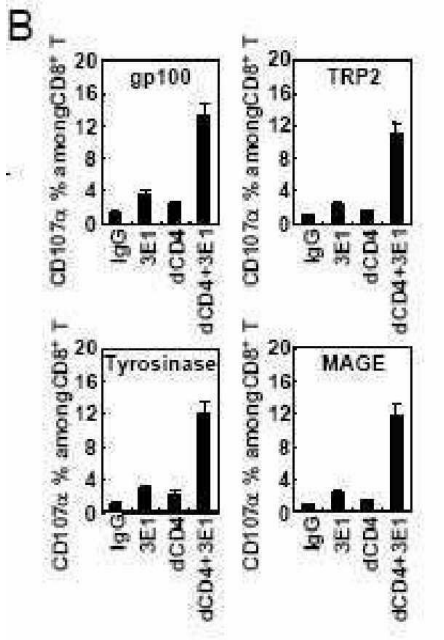
도면4h



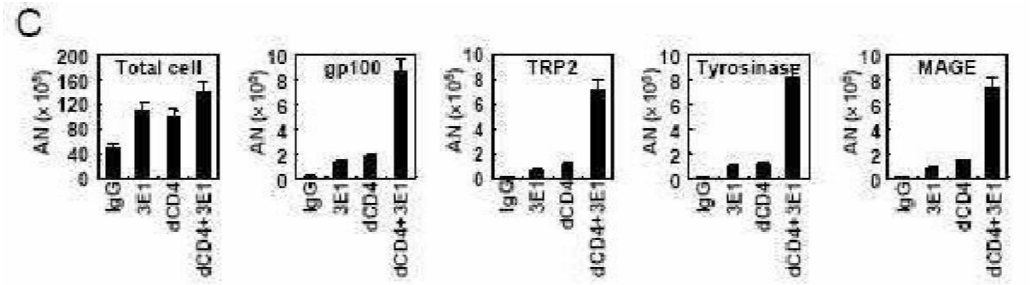
도면5a



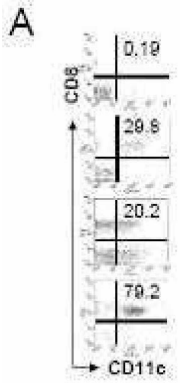
도면5b



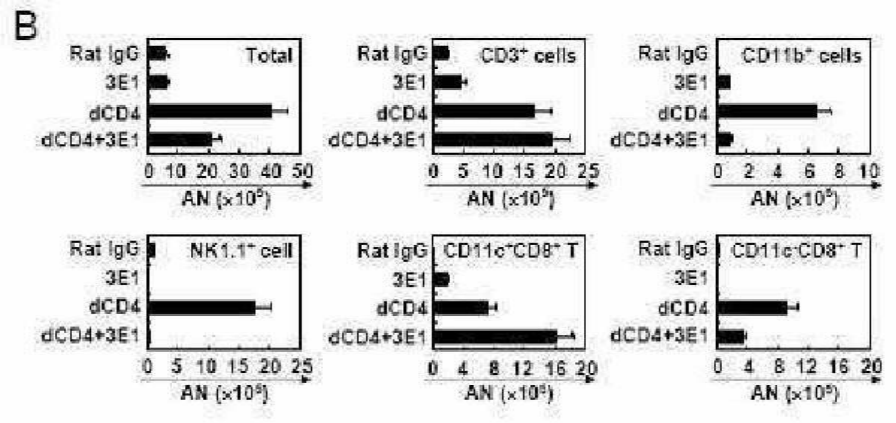
도면5c



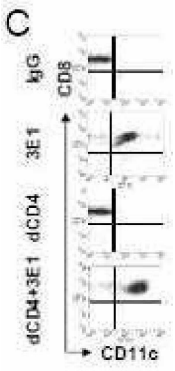
도면6a



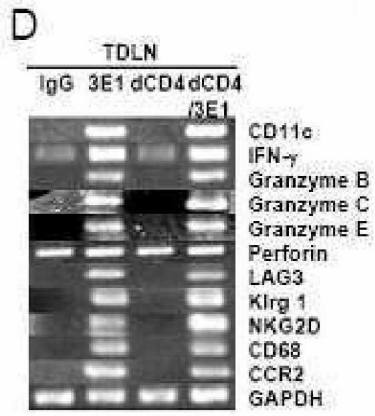
도면6b



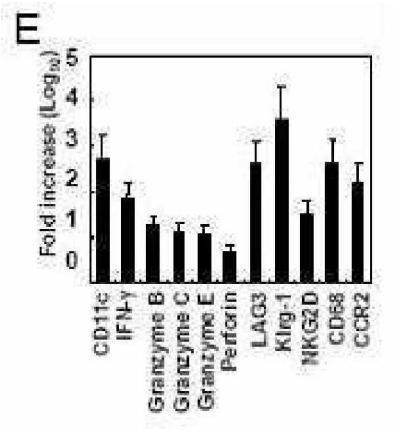
도면6c



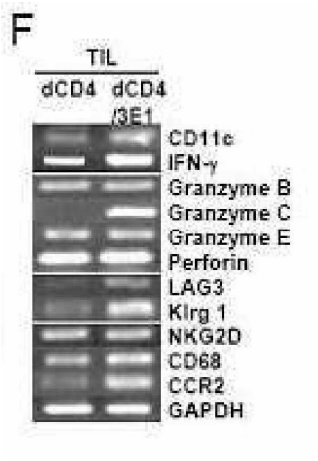
도면6d



도면6e



도면6f



도면7

