



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0128288  
(43) 공개일자 2015년11월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 14/705 (2006.01) A61K 38/17 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0055400

(22) 출원일자 2014년05월09일

심사청구일자 2014년05월09일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

전태훈

서울특별시 송파구 양재대로 1218 올림픽선수촌아파트 236동 1802호

배준범

경기도 광주시 중앙로 345번길 45-53, 103동 302호 (송정동, 태영하이츠빌)

(74) 대리인

김순용

전체 청구항 수 : 총 10 항

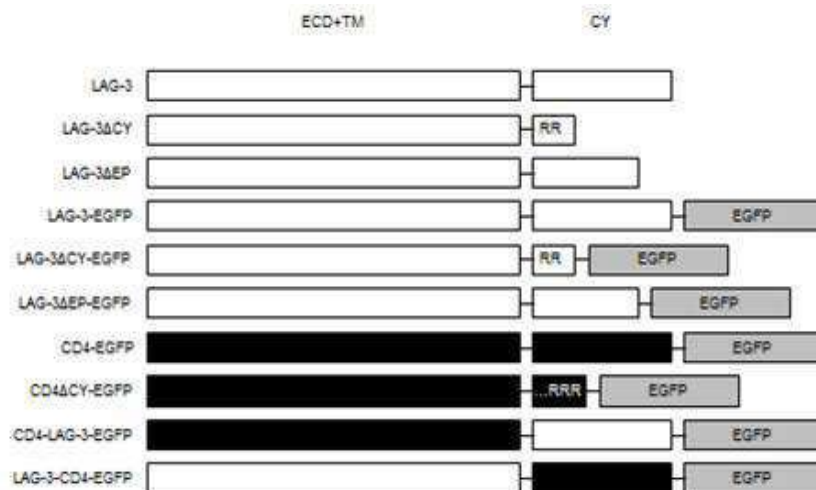
(54) 발명의 명칭 LAG-3의 세포질 도메인을 포함하는 면역세포 표면의 단백질 발현용 조성물 및 그의 이용

(57) 요약

본 발명은 LAG-3 (lymphocyte activation gene-3)의 세포질 도메인 (cytoplasmic domain)을 포함하는, 면역 세포 표면의 단백질 발현용 조성물, 이를 포함하는 LAG-3 관련 면역반응 조절용 조성물 및 면역 세포 활성 억제용 조성물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기를 포함하는 면역 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 LAG-3 (lymphocyte activation gene-3)의 세포질 도메인 (cytoplasmic domain)을 이용하여 면역 세포표면에 단백질 발현을 유도하는 방법에 관한 것이다.

본 발명에 있어서 LAG-3의 세포질 도메인은 LAG-3를 매개로 하는 면역조절에 있어서 핵심이 될 수 있다. 또한, LAG-3의 세포질 도메인 융합단백질을 이용한 세포 하위 신호 및 표현형 변화 연구에 사용될 수 있다. 또한, 상기 LAG-3의 세포질 도메인에 의한 LAG-3의 활성화는 T 림프구와 수지상 세포의 면역 활성을 억제할 수 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013R1A1A2013438

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 일반연구자지원사업

연구과제명 LAG-3 trafficking에 의한 하위 신호 전달이 T 림프구 활성화 조절에 미치는 기전 규명

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2013.06.01 ~ 2014.05.31

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

LAG-3 (lymphocyte activation gene-3)의 세포질 도메인 (cytoplasmic domain)을 포함하는, 면역세포 표면의 단백질 발현용 조성물.

#### 청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 LAG-3 (lymphocyte activation gene-3)의 세포질 도메인 (cytoplasmic domain)은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, 조성물.

#### 청구항 3

상기 면역세포는 T 림프구, NK 세포 또는 B 림프구인 것을 특징으로 하는, 조성물.

#### 청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 면역 세포표면에 발현되는 단백질은 면역 세포 표면에 존재하는 수용체 또는 면역 세포의 세포질 내부에 존재하는 단백질인 것을 특징으로 하는, 조성물.

#### 청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 면역세포 표면에 발현되는 단백질은 LAG-3 또는 CD4인 것을 특징으로 하는, 조성물.

#### 청구항 6

청구항 1 내지 5 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, LAG-3 관련 면역반응 조절용 조성물.

#### 청구항 7

청구항 1 내지 5 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 면역 세포 활성 억제용 조성물.

#### 청구항 8

청구항 1 내지 5 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 면역 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

#### 청구항 9

청구항 8에 있어서, 상기 면역 질환은 자가면역질환, 이식거부, 관절염, 이식편대숙주병, 및 세균감염으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인, 약학적 조성물.

#### 청구항 10

목적 단백질에 결합된 LAG-3 (lymphocyte activation gene-3)을 포함하는 벡터로 세포를 형질전환하는 단계를 포함하는, 면역 세포표면에 단백질 발현을 유도하는 방법.

## 발명의 설명

### 기술분야

본 발명은 LAG-3 (lymphocyte activation gene-3)의 세포질 도메인 (cytoplasmic domain)을 포함하는, 면역 세포표면의 단백질 발현용 조성물, 이를 포함하는 LAG-3 관련 면역반응 조절용 조성물 및 면역 세포 활성 억제용 조성물에 관한 것이다.

[0001]

- [0002] 또한, 본 발명은 상기를 포함하는 면역 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0003] 또한, 본 발명은 상기 LAG-3 (lymphocyte activation gene-3)의 세포질 도메인 (cytoplasmic domain)을 이용하여 면역 세포표면에 단백질 발현을 유도하는 방법에 관한 것이다.

## 배경 기술

- [0004] 면역계에서 T 림프구의 활성화는 여러 다른 면역계 세포를 조절하는 데 중요한 역할을 한다. 특히 싸이토카인 분비(CD4+) T 림프구는 생체 내 면역 반응의 조율사 역할을 수행하며, 따라서 면역조절의 성패는 T 림프구의 효율적인 활성화 조절에 달려 있다고 할 수 있다. 효과적으로 T 림프구의 활성화(activation) 및 불필요한 T 림프구의 비활성화를 위해서는 항원인식세포(antigen presenting cell)와 T 림프구에서 파생되는 상호작용과 그에 따른 신호 전달에 의해 일어난다. 이러한 신호전달 및 상호작용을 위해서는 T 림프구 표면 수용체의 일부인 co-receptor와 co-stimulatory molecule가 필요하다. 따라서, 현재 co-receptor와 co-stimulatory molecule를 target으로하는 수용체에 대한 재조합 항체제작 및 T 림프구 표면 항원과 그 리간드의 상호 작용에 의해 파생되는 신호 전달을 차단하는 등의 면역조절 작용에 대한 연구가 많이 진행되고 있다.
- [0005] LAG-3 (CD223)는 T 림프구와 NK 세포가 활성화 되었을 때 mRNA 전사가 증가되는 물질이며, 따라서 lymphocyte activation gene-3 (LAG-3)로 명명되었고, 그 후 CD antigen에 편입되어 CD223으로 불리워졌다. 최근에는 활성화 된 T 림프구와 NK 세포뿐만 아니라, 몇몇 B 림프구에서도 발현 된다는 것이 알려져 있다.
- [0006] LAG-3는 CD4와 구조적으로 매우 유사한 co-receptor로써, MHC class II에 binding하고, CD4와 같이 하나의 V-type과 세 개의 C-type immunoglobulin(Ig)-like domain을 가지고 있다. LAG-3는 MHC class II에 대한 binding affinity가 CD4보다 상대적으로 높기 때문에, 일단 활성화 된 T 림프구에서 LAG-3가 발현되면 CD4보다 먼저 MHC class II와 결합하여, T 림프구의 CD3/TCR 활성화 진행을 억제하게 된다. 따라서, T 림프구의 활성화 조절에 중요한 역할을 하는 것으로 보인다.
- [0007] LAG-3는 특히 조절 T 림프구(regulatory T lymphocyte)에 선택적으로 높게 발현되는 것으로 알려져 있어 조절 T 림프구의 세포표면 표지인자로 분류되며, T 림프구와 수지상 세포의 면역 활성을 억제하는 것으로 알려져 있다. 즉 조절 T 림프구에서 발현하는 LAG-3 신호는 T 림프구 자체의 활성화에 negative signal을 전달해 주며, 또한 수지상세포의 MHC class II와 결합하여 수지상세포의 활성화도 억제한다고 알려져 있다. 하지만 아직까지 LAG-3가 어떻게 활성화 된 T 림프구에만 발현이 되고, 어떻게 LAG-3의 세포표면 발현이 조절 되어지는 지에 대한 연구는 아직 알려져 있지 않다.
- [0008] 본 발명자들은 LAG-3는 활성화된 T 림프구의 세포표면에 발현하게 되는데, LAG-3의 cytoplasmic domain이 세포표면 발현하는데 필수적이라는 사실을 deletion mutant를 통해서 확인하고, LAG-3 (lymphocyte activation gene-3)의 세포질 도메인 (cytoplasmic domain)이 T 림프구의 세포표면에 단백질을 발현시키는데 매우 중요한 역할을 수행함을 확인하고 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0009] 본 발명의 일 양상은 LAG-3 (lymphocyte activation gene-3)의 세포질 도메인 (cytoplasmic domain)을 포함하는, 면역 세포표면에의 단백질 발현용 조성물, 이를 포함하는 LAG-3 관련 면역반응 조절용 조성물 및 면역 세포 활성화 억제용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0010] 또한, 본 발명의 다른 양상은 상기를 포함하는 면역 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0011] 또한, 본 발명의 또 다른 양상은 상기 LAG-3 (lymphocyte activation gene-3)의 세포질 도메인 (cytoplasmic domain)을 이용하여 면역 세포표면에 단백질 발현을 유도하는 방법을 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

- [0012] 본 발명의 일 양상은 LAG-3 (lymphocyte activation gene-3)의 세포질 도메인 (cytoplasmic domain)을 포함하는, 면역 세포표면의 단백질 발현용 조성물을 제공한다.
- [0013] 이하 본 발명을 자세히 설명한다.
- [0014] 본 발명에서 상기 LAG-3 (lymphocyte activation gene-3)는 CD223로도 명명되며, 이는 T 림프구와 NK 세포가 활성화 되었을 때 mRNA 전사가 증가되는 물질로서 lymphocyte activation gene-3 (LAG-3)로 명명되었으며 그 후 CD antigen에 편입되어 CD223으로 불리워 졌다.
- [0015] LAG-3는 CD4와 구조적으로 매우 유사한 공-수용체 (co-receptor)로써, MHC class II에 binding하고, CD4와 같이 하나의 V-type과 세 개의 C-type immunoglobulin(Ig)-like domain을 가지고 있다.
- [0016] LAG-3는 MHC class II에 대한 binding affinity가 CD4보다 상대적으로 높기 때문에, 일단 활성화 된 T 림프구에서 LAG-3가 발현되면 CD4보다 먼저 MHC class II와 결합하여, T 림프구의 CD3/TCR 활성화 진행을 억제하게 된다. 따라서, T 림프구의 활성화 조절에 중요한 역할을 하는 것으로 보인다.
- [0017] 본 발명에서 LAG-3 (lymphocyte activation gene-3)의 세포질 도메인 (cytoplasmic domain)은 면역세포 표면에 발현되는 경우 세포막을 기준으로 세포질에 위치하는 도메인으로서 하기의 아미노산 서열 (서열번호 1)을 포함한다.
- [0018] RRQWRPRFSALEQGIHPQAQSKIEELEQEPEPEPEPEPEPEPEPEQL (서열번호 1)
- [0019] 본 발명에 있어서 면역세포란 체내 면역반응에 관여하는 세포를 의미하며, 그 예로서, T 림프구, NK 세포 또는 B 림프구일 수 있다.
- [0020] 또한, 상기 면역 세포표면에 발현되는 단백질은 면역 세포 표면에 존재하는 수용체 또는 면역 세포의 세포질 내부에 존재하는 단백질일 수 있으며, 바람직하게는 LAG-3 또는 CD4일 수 있다.
- [0021] 또한, 본 발명의 일 양상은 상기 조성물을 포함하는 LAG-3 관련 면역반응 조절용 조성물 및 면역세포 활성화 억제용 조성물을 제공한다.
- [0022] 본 발명의 구체예에서는 LAG-3의 cytoplasmic domain이 T 림프구에서 LAG-3의 발현양상에 미치는 영향에 대해 알아보기 위해 LAG-3의 deletion mutant construct들을 제작하여 세포표면 발현을 비교분석 하였다. 그 결과 LAG-3의 cytoplasmic domain이 LAG-3가 세포표면에 발현하는 데 반드시 필요하다는 결과를 도출하였고, LAG-3의 cytoplasmic domain을 CD4의 extracellular domain과 fusion 시킨 결과 CD4의 세포표면 발현을 증가시킨다는 것을 발견하였다.
- [0023] 따라서, 본 발명에 있어서 LAG-3의 cytoplasmic domain은 LAG-3를 매개로 하는 면역조절에 있어서 핵심이 될 수 있다. 또한, LAG-3의 cytoplasmic domain 융합단백질을 이용한 세포 하위 신호 및 표현형 변화 연구에 사용될 수 있다.
- [0024] 또한, 상기 LAG-3의 세포질 도메인에 의한 LAG-3의 활성화는 T 림프구와 수지상 세포의 면역 활성을 억제할 수 있다. 즉 조절 T 림프구에서 발현하는 LAG-3 신호는 T 림프구 자체의 활성화에 negative signal을 전달해 주며, 또한 수지상세포의 MHC class II와 결합하여 수지상세포의 활성화도 억제할 수 있다.
- [0025] 또한, 본 발명의 일 양상은 상기 조성물을 포함하는 면역 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0026] 상기 면역질환은 자가면역질환, 이식거부, 관절염, 이식편대숙주병, 또는 세균감염 등일 수 있으며, 자가면역질환은 크론씨병, 홍반병, 아토피, 류마티스 관절염, 하시모토 갑상선염, 악성빈혈, 에디슨씨 병, 제1형 당뇨병, 루프스, 만성피로증후군, 섬유근육통, 갑상선기능저하증과 항진증, 경피증, 다발성 경화증, 중증 근무력증, 메니에르 증후군(Meniere's syndrome), 길리안-바레 증후군(Guillian-Barre syndrome), 쇼그렌 증후군(Sjogren's syndrome), 백반증, 자궁내막증, 건선, 백반증, 전신성 경피증, 천식 및 궤양성 대장염일 수 있다.
- [0027] 본 발명의 조성물은 약학 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수

있다. 또한 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 당해 기술 분야에 알려진 적합한 제제는 문헌(Remington's Pharmaceutical Science, 최근, Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 것을 사용하는 것이 바람직하다. 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시 벤조에이트, 프로필히드록시 벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 광물유 등이 있다. 상기 조성물을 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 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면 전분, 칼슘 카보네이트(calcium carbonate), 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 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, 동결건조 제제, 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔(witepsol), 마크로콜, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0028] 본 발명에서 사용되는 용어 "투여"는 임의의 적절한 방법으로 개체에게 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다.

[0029] 본 발명은 약학 조성물은 연구자, 의사, 또는 기타 임상에서 의해서 생각되는 조직, 동물 또는 인간에서 생물학적 또는 의학적 반응을 유도하는 유효 성분 또는 약학적 조성물의 양, 즉 치료되는 질환 또는 장애의 증상의 완화를 유도하는 양인 치료상 유효량으로 투여할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물에 대한 치료상 유효 투여량 및 투여횟수는 원하는 효과에 따라 변화될 것임은 당업자에게 자명하다. 그러므로, 투여될 최적의 투여량은 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있으며, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효성분 및 다른 성분의 함량, 제형의 종류, 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 약학 조성물은 0.001 내지 100mg/kg/day의 양으로 투여할 수 있으며, 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수 회에 나누어 투여할 수도 있다.

[0030] 본 발명의 약학 조성물은 개체에게 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내 주사에 의해 투여될 수 있다.

### 발명의 효과

[0031] 본 발명에 있어서 LAG-3의 세포질 도메인은 LAG-3를 매개로 하는 면역조절에 있어서 핵심이 될 수 있다. 또한, LAG-3의 세포질 도메인 융합단백질을 이용한 세포 하위 신호 및 표현형 변화 연구에 사용될 수 있다. 또한, 상기 LAG-3의 세포질 도메인에 의한 LAG-3의 활성화는 T 림프구와 수지상 세포의 면역 활성을 억제할 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0032] 도면 1은 본 발명에 의한 LAG-3, LAG-3△CY, LAG-3△EP, LAG-3-EGFP, LAG-3△CY-EGFP, LAG-3△EP-EGFP, CD4-EGFP, CD4△CY-EGFP, CD4-LAG-3-EGFP, LAG-3-CD4-EGFP 유전자 구조의 모식도를 나타낸다.

도면 2는 LAG-3, LAG-3△CY, LAG-3△EP 단백질이 과발현된 Jurkat 세포주에서 PMA (50 ng/ml)와 ionomycin (2 μM)으로 활성화 전, 후에 단백질의 과발현을 확인한 결과를 나타낸다.

도면 3a는 LAG-3, LAG-3△CY, LAG-3△EP 단백질이 과발현된 Jurkat 세포주에 PMA (50 ng/ml)와 ionomycin (2 μM)으로 활성화시키기 전, 후에 세포표면 LAG-3(surface LAG-3) 및 total LAG-3(intracellular LAG-3) 발현을 유세포분석기로 확인한 결과이다. 점선은 isotype control로 staining한 것이고, 실선은 항 LAG-3 항체로

staining한 것이다. Histogram 안에 나와 있는 수치는 항 LAG-3 항체로 staining하고 유세포분석기로 분석한 MFI (mean fluorescence intensity)를 나타낸다.

도면 3b는 유세포분석기로 확인한 도면 3a의 MFI (mean fluorescence intensity)를 그래프로 표현한 것이다.

도면 4a는 LAG-3, LAG-3△CY, LAG-3△EP 단백질이 과발현된 Jurkat 세포주에 CQ를 시간별로 처리한 후, 단백질의 발현을 western blot을 통해 확인한 결과를 나타낸다.

도면 4b는 LAG-3, LAG-3△CY, LAG-3△EP 단백질이 과발현된 Jurkat 세포주에 PMA (50 ng/ml)와 ionomycin (2 μM)으로 활성화 전, 후에 CQ를 시간별로 처리하여 세포표면 단백질 발현을 유세포분석기를 통해 확인한 결과를 나타낸다. 점선은 isotype control로 staining한 것이고, 실선은 항 LAG-3 항체로 staining한 것이다. Histogram 안에 나와 있는 수치는 항 LAG-3 항체로 staining하고 유세포분석기로 분석한 MFI를 나타낸다.

도면 4c는 유세포분석기로 확인한 도면 3a의 MFI (mean fluorescence intensity)를 그래프로 표현한 후, LAG-3의 발현과 cytoplasmic domain deletion mutant의 MFI 값이 유의적인 차이를 보이는지 나타낸 것이다.

도면 5a는 LAG-3-EGFP, LAG-3△CY-EGFP, LAG-3△EP-EGFP 단백질이 과발현된 Jurkat 세포주에 PMA (50 ng/ml)와 ionomycin (2 μM)으로 활성화시키기 전, 후에 LAG-3의 세포내 위치를 항 LAG-3 항체와 Alexa594-conjugated donkey anti-goat IgG로 staining하여 LAG-3의 발현 및 EGFP의 발현을 merge 시켜서 공초점현미경(confocal microscopy)을 통해 확인한 결과이다.

도면 5b는 LAG-3-EGFP, LAG-3△CY-EGFP, LAG-3△EP-EGFP 단백질이 과발현된 Jurkat 세포주에 PMA (50 ng/ml)와 ionomycin (2 μM)으로 활성화 전, 후에 LysoTracker Red DND-99로 염색하여 EGFP fusion 단백질의 발현과 merge 시켜서 공초점현미경(confocal microscopy)을 통해 확인한 결과이다.

도면 6a는 LAG-3-EGFP, LAG-3△CY-EGFP, LAG-3-CD4-EGFP, CD4-EGFP, CD4△CY-EGFP, CD4-LAG-3-EGFP 단백질이 과발현된 Jurkat 세포주에 PMA (50 ng/ml)와 ionomycin (2 μM)으로 활성화 전, 후에 EGFP fusion 단백질의 과발현을 항 GFP 항체를 이용하여 western blot을 통해서 확인한 결과이다.

도면 6b는 LAG-3-EGFP, LAG-3△CY-EGFP, LAG-3-CD4-EGFP가 과발현된 Jurkat 세포주에 PMA (50 ng/ml)와 ionomycin (2 μM)으로 활성화 전, 후에 세포표면 단백질 발현을 항 LAG-3 항체로 staining 한 후, 유세포분석기를 통해 확인한 결과 및 MFI를 그래프로 나타낸 결과이다. 점선은 isotype control로 staining한 것이고, 실선은 항 LAG-3 항체로 staining한 것이다. Histogram 안에 나와 있는 수치는 항 LAG-3 항체로 staining하고 유세포분석기로 분석한 MFI를 나타낸다.

도면 6c는 CD4-EGFP, CD4△CY-EGFP, CD4-LAG-3-EGFP가 과발현된 Jurkat 세포주에 PMA (50 ng/ml)와 ionomycin (2 μM)으로 활성화 전, 후에 세포표면 단백질 발현을 항 CD4 항체로 staining 한 후, 유세포분석기를 통해 확인한 결과 및 MFI를 그래프로 나타낸 결과이다. 점선은 isotype control로 staining한 것이고, 실선은 항 CD4 항체로 staining한 것이다. Histogram 안에 나와 있는 수치는 항 LAG-3 항체로 staining하고 유세포분석기로 분석한 MFI를 나타낸다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0033]

이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0034]

**실시예 1: LAG-3 및 LAG-3의 cytoplasmic domain deletion mutant 제작 및 과발현 T 림프구(Jurkat) 세포주 구축**

[0035]

LAG-3 및 LAG-3의 deletion mutant를 클로닝하기 위해 사람 혈구에서 mRNA를 추출하고, 이를 주형으로 역전사 연쇄중합반응에 의해 cDNA를 복제한 후, [표 1]과 같은 프라이머를 제작하여 연쇄중합반응을 실시하여 LAG-3 및 LAG-3 cytoplasmic domain deletion mutant (LAG-3△CY)와 cytoplasmic domain 중 glutamate-proline 서열이 반복되는 EP domain deletion mutant (LAG-3△EP)를 클로닝하였고, XhoI과 NotI site를 이용하여, retroviral vector(PLNCX2)에 삽입하였다 (도면 1a).

표 1

| Gene name | Primer  | Sequence (5'-3')                        |
|-----------|---------|-----------------------------------------|
| LAG-3     | Forward | CCGCTCGAGATGTGGGAGGCTCAGTT              |
|           | Reverse | ATAAGAATGCGGCCGCTCAGAGCTGCTCCGGCTC      |
| LAG-3△CY  | Forward | CCGCTCGAGATGTGGGAGGCTCAGTT              |
|           | Reverse | ATAAGAATGCGGCCGCTCATCTTCTCCAAAGGTGA     |
| LAG-3△EP  | Forward | CCGCTCGAGATGTGGGAGGCTCAGTT              |
|           | Reverse | ATAAGAATGCGGCCGCTCATTGCTCCAGCTCCTCTATCT |

그 후, LAG-3 및 LAG-3△CY와 LAG-3△EP가 삽입된 pLNCX2 벡터를 사용하여 Tetracycline off system의 293GPG 세포를 이용하여 사람 T 림프구인 Jurkat 세포주에 과발현시켰다. 우선 293GPG 세포를 6 well 조직 배양 플레이트에 well 당  $5 \times 10^5$  세포가 되도록 접종하고 10% 송아지 혈청을 함유한 RPMI 배지에서 배양하였다. 24시간 후, 세포가 well 표면의 70-80% 정도를 채울 정도로 자라면, 무혈청의 DMEM 배지에서 1  $\mu$ g의 LAG-3 및 LAG-3의 deletion mutant 유전자 발현 벡터 DNA를 6  $\mu$ g의 Lipofectamine plus (Invitrogen)를 사용하여, 293GPG 세포에 도입시켜 24시간 배양하여 도입된 발현 벡터를 레트로바이러스로 packaging하도록 했다. 293GPG 세포로부터 생성된 LAG-3 및 LAG-3 deletion mutant 유전자를 함유하는 바이러스가 포함된 배양 상층액을 이용하여 숙주세포를 4-5시간 배양 후 혈청이 10% 함유된 배지로 바꿔서 4시간 배양하였으며 이 과정을 3회 반복하였다. 이 때 사용된 숙주세포는 사람 T 림프구 Jurkat 세포주이며, 형질 도입된 세포를 얻기 위해 G418 항생제 1.5 mg/ml를 처리하여 LAG-3 및 LAG-3 deletion mutant 유전자가 발현되는 세포를 얻었다.

LAG-3 및 LAG-3△CY, LAG-3△EP단백질이 과발현된 Jurkat 세포주는 10% 송아지 혈청과 1% 페니실린/스트렙토마이신을 포함하고 있는 RPMI 배지에서 세포 배양하였다. 단백질의 과발현이 제대로 진행되었는지 확인하기 위하여 웨스턴블로팅(Western blotting)을 통해 LAG-3 및 LAG-3△CY, LAG-3△EP의 단백질 양을 측정하였다.

먼저 각 단백질이 과발현된 세포주를 proteinase inhibitor cocktail이 포함된 cell lysis solution (50 mM Tris, pH 7.2, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 200 mg/ml phenylmethylsulfonyl fluoride)로 lysis 시킨 후, 10% SDS polyacrylamide gel에 전기 영동시켜 Hybond-P PVDF membrane (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)에 transfer하였다. 그 후, LAG-3 분자에 특이적으로 결합하는 항 LAG-3 항체(R and D systems)를 membrane에 처리한 후 ECL system (GE healthcare, Buckinghamshire, UK)을 이용하여 발색시켜 LAG-3 단백질의 발현 정도를 측정하였다 (도면 2).

세포를 PMA (50 ng/ml)와 ionomycin (2  $\mu$ M)으로 활성화 전, 후로 각 단백질의 발현을 비교해본 결과, LAG-3, LAG-3△CY, LAG-3△EP 이 과발현된 세포주에서 비슷한 수준으로 단백질이 발현하는 것을 확인할 수 있었다.

이때 사용된 음성대조군(N.C., negative control)은 LAG-3 유전자가 삽입되지 않은 G418 항생제 저항성유전자를 발현시키는 벡터만을 발현시킨 Jurkat 세포주(Mock)의 단백질이 사용되었다. 또한 사용된 내적 대조구는 항  $\beta$ -actin 항체에 의한  $\beta$ -actin의 발현량으로, 모든 샘플에서 동일한  $\beta$ -actin이 검출되어 동일한 양의 단백질을 전기영동 한 것을 알 수 있었다.

## 실시예 2: LAG-3△CY 과발현 Jurkat 세포주에서 세포표면 발현 감소 측정 및 기전 분석

LAG-3, LAG-3△CY, LAG-3△EP 이 과발현된 Jurkat 세포주에서 각 단백질의 세포표면 발현에 어떤 차이를 보이는지 PMA (50 ng/ml)와 ionomycin (2  $\mu$ M)으로 활성화 전, 후의 세포의 세포표면 LAG-3(surface) 및 total LAG-3(intracellular) 단백질 발현을 비교하였다 (도면 3a).

세포표면 및 total LAG-3 분석을 위해서 유세포 분석기(flow cytometry)를 이용하여 Jurkat 세포주에 PE-conjugated 항 LAG-3 수용체 항체(R&D systems)를 처리하고 형광강도를 측정하였다. 이 때 isotype control은

PE-conjugated goat IgG (R&D system)를 이용하였다. 그 결과, LAG-3, LAG-3△CY, LAG-3△EP의 intracellular staining 결과는 세 종류의 단백질 과발현을 western blot으로 확인한 결과와 마찬가지로 비슷한 발현 양상을 보이고 있다. 한편, 세포를 PMA (50 ng/ml)와 ionomycin (2 μM)으로 활성화시키기 전의 세포표면 발현은 세 종류의 단백질 모두 비슷한 반면, 활성화 된 세포의 세포표면에서 LAG-3와 LAG-3△EP 단백질의 발현에 비해 LAG-3△CY의 발현이 현저히 낮음을 알 수 있었다. 도면 3b는 세포 자극 전, 후의 LAG-3, LAG-3△CY, LAG-3△EP 발현을 유세포분석기를 통해 나타낸 mean fluorescence intensity (MFI) 값을 수치화 한 것이다.

[0045] 실시예 3: LAG-3△CY 과발현 Jurkat 세포주에 lysosomal inhibitor 처리하여도 세포표면 발현 증가에 결함 측정

[0046] 기존에 밝혀진 것처럼, LAG-3는 세포가 활성화되어야 세포표면으로 발현이 된다고 알려져 있다. 그리하여 세포가 활성화되기 전, LAG-3는 대부분 세포 내부에 존재할 것이라고 생각하고, 일반적인 단백질 분해과정 중 하나인 lysosomal degradation을 억제하여 LAG-3 및 LAG-3△CY, LAG-3△EP 가 과발현된 세포주에서 단백질 발현량을 western blot으로 확인해 보았다 (도면 4a). Lysosomal inhibitor로 쓰이는 chloroquine (CQ) 100 μM을 시간 별로 처리해본 결과, LAG-3 및 LAG-3△CY, LAG-3△EP 세 종류의 단백질 발현이 모두 CQ를 처리함에 따라 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

[0047] 이러한 세포내 단백질 양의 증가가 세포표면 발현에도 영향을 미칠 것이라 생각되어 PMA (50 ng/ml)와 ionomycin (2 μM)으로 활성화 전, 후의 세포에 CQ를 시간별로 처리하여 세포표면 단백질 발현을 유세포분석기를 통해 확인하였다 (도면 4b). 그 결과, LAG-3 및 LAG-3△EP가 과발현 된 세포주에서는 CQ 처리 시간이 길어질수록 세포표면으로 단백질의 발현이 증가함을 확인할 수 있었던 반면, LAG-3△CY가 과발현된 세포주에서는 CQ를 처리했음에도 불구하고 세포표면으로 단백질의 발현이 현저하게 적게 됨을 확인할 수 있었다. 또한 이러한 세포표면 발현은 CQ를 처리한지 6시간부터 유의적으로 차이를 보였으며 CQ 처리시간이 길어질수록 형광강도의 차이가 더욱 벌어짐을 확인할 수 있었다 (도면 4c). 이를 통해 세포 자극 및 lysosomal inhibitor 처리 시에 EP motif를 제외한 LAG-3의 cytoplasmic domain이 세포표면으로 발현하는데, 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있었다.

[0048] 실시예 4: 세포활성 시 cytoplasmic domain을 통한 LAG-3의 lysosomal compartment에서 세포표면으로의 이동 측정

[0049] T 림프구 활성화 자극 전, 후의 LAG-3와 deletion mutant간의 세포 내부의 trafficking 양상을 비교하기 위해서, LAG-3 및 LAG-3△CY, LAG-3△EP의 종결코돈을 제거한 primer를 이용하여 연쇄중합반응을 실시한 후, EGFP.N1 벡터에 XhoI SmaI enzyme site를 이형하여 삽입하였다. 삽입된 construct를 다시 XhoI, NotI enzyme site를 이용하여 pLNCX2에 삽입하여 최종적으로 LAG-3-EGFP, LAG-3△CY-EGFP, LAG-3△EP-EGFP를 발현하는 EGFP fusion construct를 포함하는 벡터를 제작하였다 (도면 1). 이때 상용한 primer는 아래와 같다

표 2

| Gene name     | Primer  | Sequence (5'-3')                |
|---------------|---------|---------------------------------|
| LAG-3-EGFP    | Forward | CCGCTCGAGATGTGGGAGGCTCAGTT      |
|               | Reverse | TCCCCCGGGGAGCTGTCTCCGGCTCGGGCT  |
| LAG-3△CY-EGFP | Forward | CCGCTCGAGATGTGGGAGGCTCAGTT      |
|               | Reverse | TCCCCCGGGTCTTCTCCAAAGGTGAAAGC   |
| LAG-3△EP-EGFP | Forward | CCGCTCGAGATGTGGGAGGCTCAGTT      |
|               | Reverse | TCCCCCGGGGTGTCTCCAGCTCCTCTATCTT |

[0050] 제작된 세 종류의 단백질을 Jurkat 세포주에 도입시키고 상기 실험과 동일하게 western blot과 유세포분석기를

발현을 비교하였을 때, EGFP가 fusion 되어있지 않은 단백질과 발현양상이 동일함을 확인하였다. LAG-3-EGFP, LAG-3△CY-EGFP, LAG-3△EP-EGFP가 과발현된 Jurkat 세포주로부터 세포자극 전, 후의 세포내부 단백질의 trafficking 양상을 비교하기 위해 항 LAG-3 항체로 staining 한 후, Alexa594-conjugated donkey anti-goat IgG로 staining하여 공초점현미경(confocal microscopy)으로 재조합단백질의 발현을 측정하였다 (도면 5a).

[0052]

그 결과, 재조합단백질의 EGFP 발현이 항 LAG-3 항체가 staining되는 부분과 동일하다는 사실을 확인할 수 있었고, 세포가 활성화되기 전에는 세 종류의 단백질 모두 세포 내부에만 존재하다가 PMA (50 ng/ml)와 ionomycin (2 μM)로 세포가 활성화된 후에는 LAG-3-EGFP, LAG-3△EP-EGFP가 세포표면에도 발현이 됨을 확인할 수 있었다. LAG-3△CY-EGFP의 경우에는 세포활성 전, 후 모두 세포내부에만 존재함을 확인할 수 있었다.

[0053]

앞선 실험에서 LAG-3와 deletion mutant가 과발현 된 Jurkat 세포주에 CQ를 처리하였을 경우 total LAG-3 및 세포표면에 발현되는 LAG-3의 양이 증가함을 확인할 수 있었다. 그리하여 LAG-3가 세포내부의 lysosomal compartment에 존재하는지 확인하기 위해서 각 세포주를 LysoTracker Red DND-99로 37 °C incubator에서 1시간 동안 염색시켜 준 후, 각 EGFP fusion 단백질들이 얼마나 lysosomal compartment에 존재하는지를 비교 분석하였다 (도면 5b). 세포가 활성화되기 전에는 LAG-3-EGFP, LAG-3△CY-EGFP, LAG-3△EP-EGFP 모두 lysosomal compartment에 위치하는 것을 확인할 수 있었고, 세포가 활성화되면 LAG-3-EGFP와 LAG-3△EP-EGFP는 lysosomal compartment와 겹치지 않는 부분인 세포표면 발현을 확인할 수 있었으나 LAG-3△CY-EGFP는 대부분 lysosomal compartment에 그대로 존재하고 있음을 확인할 수 있었다. 이를 통해 LAG-3의 EP motif를 제외한 cytoplasmic domain은 세포가 활성화될 때, LAG-3가 lysosomal compartment로부터 세포표면으로 발현하는데 중요한 역할을 한다는 것을 확인할 수 있었다.

[0054]

실시예 5: CD4와 LAG-3의 chimeric mutant 제작 및 과발현 T 림프구(Jurkat) 세포주 구축

[0055]

CD4는 일반적으로 세포표면에 존재하다가 세포가 활성화되면 cytoplasmic domain의 인산화로 인해서 세포내부로 endocytosis된다고 알려져 있다. LAG-3의 경우에는 CD4와는 반대로 세포가 활성화되기 전에는 대부분 세포내부에 존재하다가 세포가 활성화 되었을 때, 세포표면에 발현한다.

[0056]

CD4와 LAG-3의 상반되는 trafficking 경로에 착안하여 [표 3]에 있는 primer를 이용하여 CD4 WT과 CD4△CY를 제작하였고, CD4와 LAG-3의 extracellular domain (ECD)와 cytoplasmic domain (CY)을 서로 치환한 chimeric mutant construct를 만들고 EGFP를 fusion시켰다. 그리하여 최종적으로 CD4-EGFP, CD4△CY-EGFP, CD4-LAG-3-EGFP, LAG-3-CD4-EGFP가 삽입된 pLNCX2 벡터를 상기 방법과 동일하게 Jurkat 세포주에 과발현 시켰다 (도면 1).

표 3

[0057]

| Gene name      | Primer  | Sequence (5'-3')               |
|----------------|---------|--------------------------------|
| CD4-EGFP       | Forward | CCGCTCGAGATGAACCGGGGAGTCCCTT   |
|                | Reverse | TCCCCCGGGGAATGGGGCTACATGTCTCTG |
| CD4△CY-EGFP    | Forward | CCGCTCGAGATGAACCGGGGAGTCCCTT   |
|                | Reverse | TCCCCCGGGGGCGCCTTCGGTGCCGGCA   |
| CD4-LAG-3-EGFP | Forward | GGCTTTCACCTTTGGTGTGTCAGGTGCC   |
|                | Reverse | GGCACCTGACACCAAAGGTGAAAGCC     |
| LAG-3-CD4-EGFP | Forward | CTAGGCATCTTCTCAGAAGACAGTGGCGA  |
|                | Reverse | TCGCCACTGTCTTCTGAAGAAGATGCCTAG |

[0058]

단백질의 과발현이 제대로 진행되었는지 확인하기 위하여 상기 기술한 방법과 동일하게 PMA (50 ng/ml)와 ionomycin (2  $\mu$ M)로 세포활성 전, 후의 LAG-3-EGFP, LAG-3 $\Delta$ CY-EGFP, LAG-3-CD4-EGFP, CD4-EGFP, CD4 $\Delta$ CY-EGFP, CD4-LAG-3-EGFP이 과발현된 Jurkat 세포주에서 단백질 양을 Western blot을 통해 측정하였다. 이 때 사용된 항체는 fusion된 EGFP에 붙을 수 있는 항 GFP 항체를 이용하였다 (도면 6a). 이 때 사용된 음성대조군 (N.C., negative control)은 G418 항생제 저항성유전자를 발현시키는 벡터만을 발현시킨 Jurkat 세포주(Mock)의 단백질이 사용되었다. 또한 사용된 내적 대조구는 항  $\beta$ -actin 항체에 의한  $\beta$ -actin의 발현양으로, 모든 샘플에서 동일한  $\beta$ -actin이 검출되어 동일한 양의 단백질을 전기영동 한 것을 알 수 있었다.

[0059]

**실시예 6: LAG-3의 cytoplasmic domain에 의한 CD4-LAG-3 융합단백질의 세포표면 발현 증가 측정**

[0060]

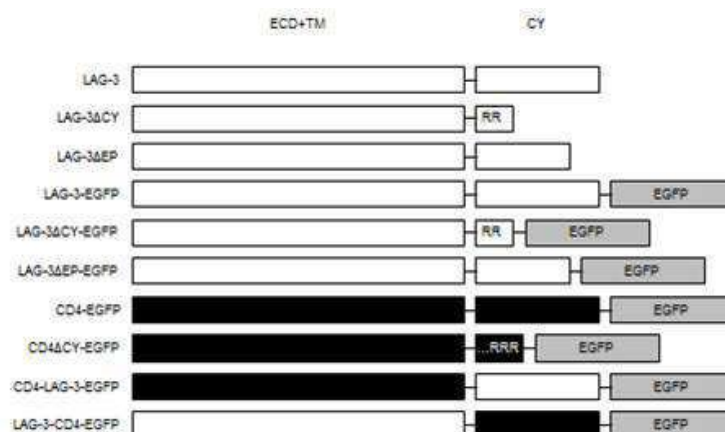
과발현이 확인된 각 세포주로부터 단백질의 세포표면 발현이 PMA (50 ng/ml)와 ionomycin (2  $\mu$ M)로 세포를 활성화시키기 전, 후로 어떻게 달라지는지 확인하기 위해 LAG-3-EGFP, LAG-3 $\Delta$ CY-EGFP, LAG-3-CD4-EGFP 단백질이 과발현된 세포주에 항 LAG-3 항체로 staining 한 후, 유세포분석기를 통해 확인하였다 (도면 6b). LAG-3의 extracellular domain에 CD4의 cytoplasmic domain을 fusion 시킨 단백질의 경우 wild type LAG-3에 비해, 세포 활성을 유발했음에도 불구하고 세포표면 발현이 잘 되지 않음을 확인할 수 있었다. 그 이유는 세포가 활성화 되었을 때, CD4의 cytoplasmic domain의 phosphorylation 매개 endocytosis가 일어났기 때문이라고 추측할 수 있다.

[0061]

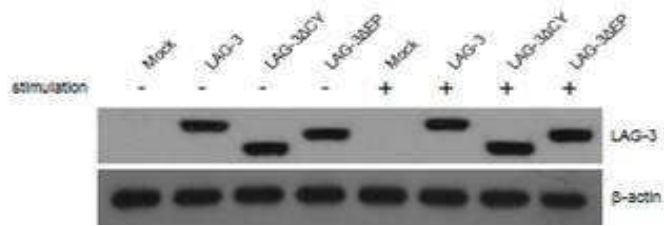
한편, LAG-3의 cytoplasmic domain이 CD4의 발현에 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위해 CD4-EGFP, CD4 $\Delta$ CY-EGFP, CD4-LAG-3-EGFP 단백질이 과발현된 세포주에 PE-conjugated 항 CD4 항체 (BD bioscience)로 staining 한 후, 유세포분석기를 통해 확인하였다 (도면 6c). 이때 사용된 isotype control은 PE-conjugated mouse IgG (BD bioscience) 이다. 그 결과, CD4-EGFP의 경우 세포 활성화전에 세포표면에 많이 존재하다가 세포가 활성화되면 세포표면 발현양이 감소하는 것을 확인할 수 있었고, CD4 $\Delta$ CY-EGFP의 경우는 cytoplasmic domain의 phosphorylation 매개 endocytosis가 일어나지 않기 때문에 세포표면 발현양이 줄어들지 않음을 확인할 수 있었다. 또한, CD4-LAG-3-EGFP는 세포를 활성화시키면 CD4-EGFP에 비해서 세포표면 발현이 거의 6배 가깝게 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이 결과를 통하여, LAG-3의 cytoplasmic domain이 LAG-3와 CD4-LAG-3 합성단백질 모두에서 세포표면의 발현을 증가시키는데 중요한 역할을 하는 것을 알 수 있었다.

**도면**

**도면1**

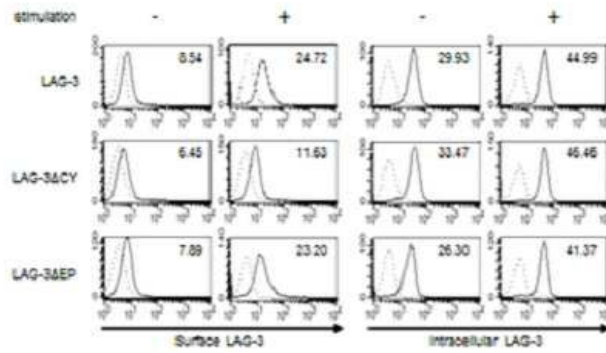


도면2

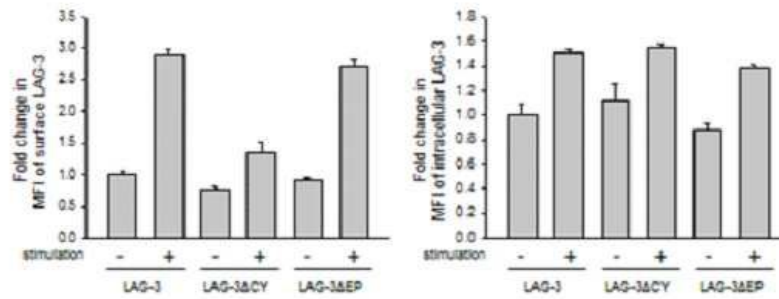


도면3

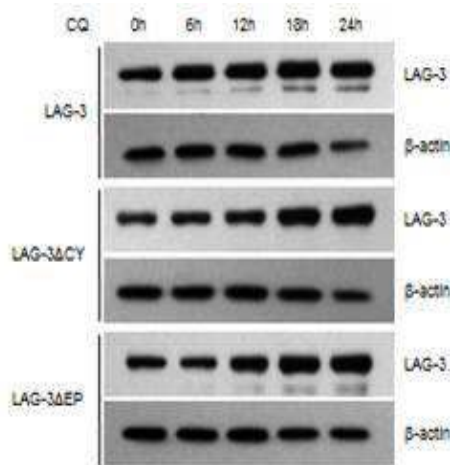
a



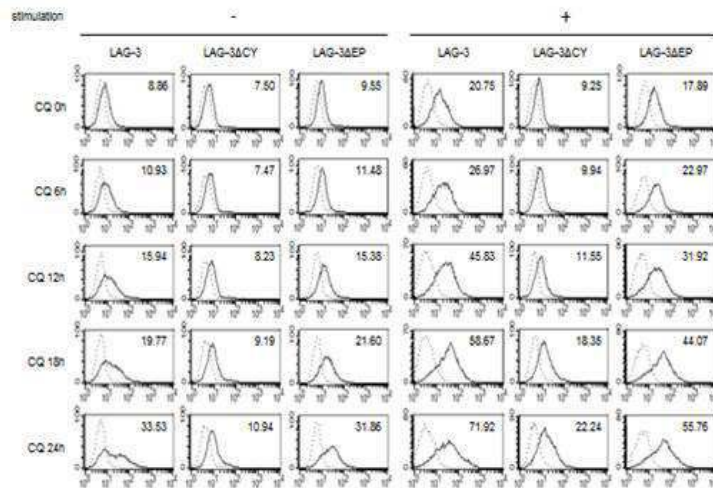
b



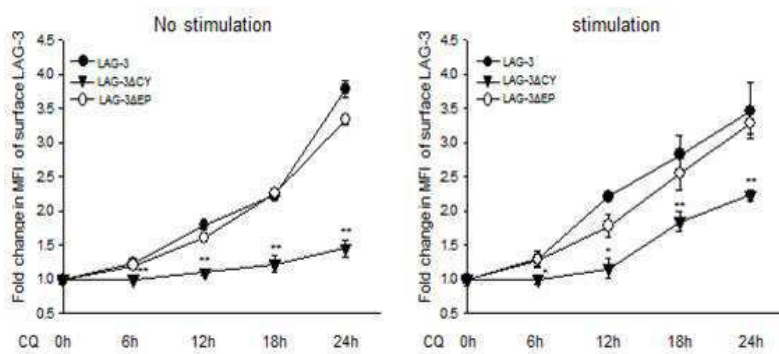
도면4a



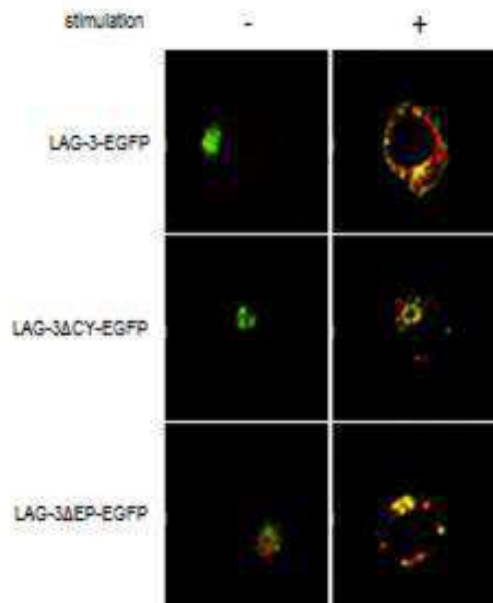
도면4b



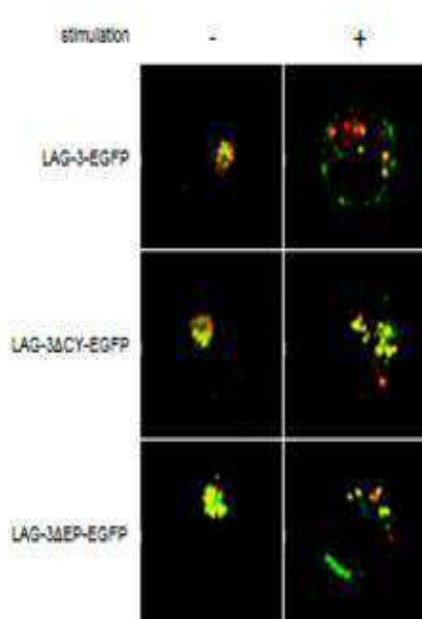
도면4c



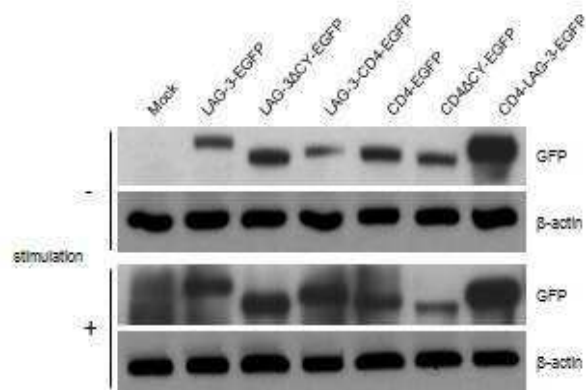
도면5a



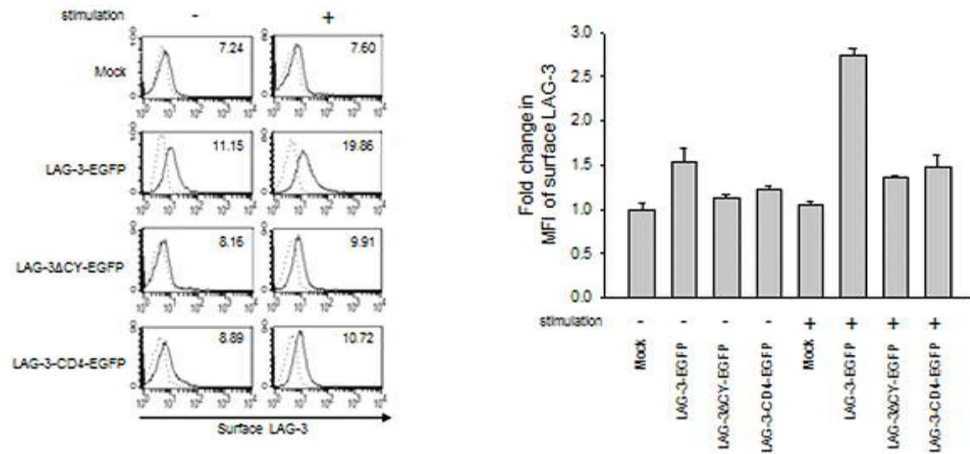
도면5b



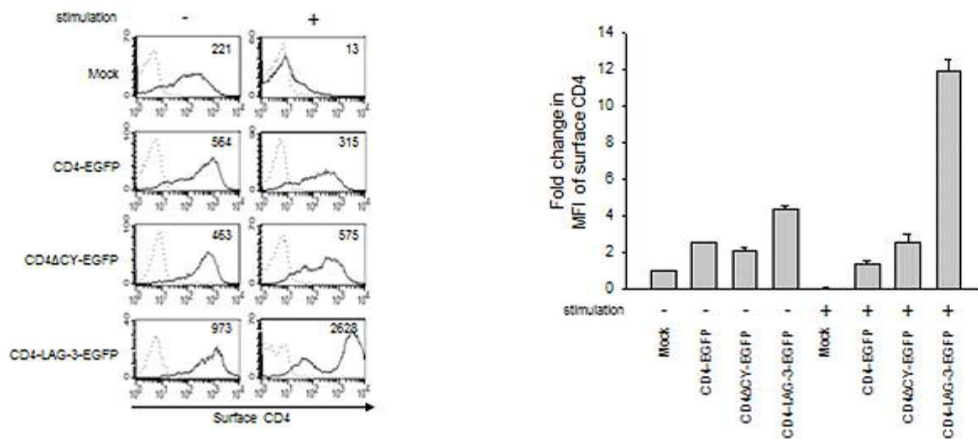
도면6a



도면6b



도면6c



## 서열 목록

<110> Korea University Research and Business Foundation

<120> Composition for expression protein on immune cell surface  
comprising cytoplasmic domain of lymphocyte activation gene-3 and  
use of the same

<130> 1-39p

<160> 1

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 51

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cytoplasmic domain of lymphocyte activation gene-3

<400> 1

Arg Arg Gln Trp Arg Pro Arg Arg Phe Ser Ala Leu Glu Gln Gly Ile

1 5 10 15

His Pro Pro Gln Ala Gln Ser Lys Ile Glu Glu Leu Glu Gln Glu Pro

20 25 30

Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro

35 40 45

Glu Gln Leu

50