명세서

발명의 명칭: 형질전환된 T세포를 이용한 제대혈 유래 자연살해세포의 배양방법

기술분야

[1] 본 발명은 형질전환된 T세포를 이용한 제대혈 유래 자연살해세포의 배양방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

[3] 암환자들의 치료 및 재발 방지를 위한 치료법으로 환자의 면역기능을 이용한 면역치료법이 개발되고 있다. 특히, 대량 생산 및 동결이 가능한 자연살해세포를 이용한 면역치료법이 연구되고 있다. 자연살해세포는 말초혈 림프구(peripheral blood lymphocyte)의 약 15% 정도를 차지하는 림프구계 세포로서, 선천성 면역반응에 중요한 역할을 한다.

[4] 구체적으로, 자연살해세포는 수지상세포를 활성화시키고 세포독성 T 임파구(cytotoxic T lymphocyte, CTL)를 종양에 특이적으로 반응하도록 유도하여 종양세포를 제거한다. 자연살해세포는 육종(sarcoma), 골수종(myeloma), 암종(carcinoma), 림프종(lymphomas) 및 백혈병(leukemia)과 같은 악성 종양을 직접적으로 사멸시킨다. 하지만, 정상인의 체내에 존재하는 대부분의 자연살해세포는 비활성화 상태로 존재하며, 종양을 제거하기 위해서는 활성화된 자연살해세포가 필요하다. 또한, 암환자의 체내에 존재하는 자연살해세포의 경우 암세포의 면역회피 기전에 의해 자연살해세포의 기능적 결함이 존재한다.

[5] 따라서, 자연살해세포를 치료제로서 이용하기 위해서는 자연살해세포를 활성화 시키는 것이 매우 중요하다. 또한, 체내에 존재하는 자연살해세포의 세포수는 한정되어 있으므로, 정상인의 혈액 또는 환자의 혈액의 자연살해세포를 대량으로 증식시키고 동결하는 기술의 개발이 필수적이다.

[6] 자연살해세포를 대량으로 증식시키기 위한 방법으로는 체외 확장 방법을 이용하고 있으며, 말초혈 림프구(peripheral blood lymphocyte, PBMC), 제대혈(cord blood, CB) 또는 사람유도 만능줄기세포(human-induced pluripotent stem cell)를 원료로 이용한 자연살해세포의 대량 배양방법에 대해 연구되고 있다.

[7] 특히, 제대혈은 골수와는 달리 분만과정에서 버려지는 제대혈로부터 간단한 시술을 통해 얻을 수 있다. 또한, 제대혈의 보관산업이 활성화되어 있고, 공여자를 구하는 것도 용이하여 제대혈을 이용한 자연살해세포의 배양방법에 대한 연구가 활발히 연구되고 있다.

[8] 구체적으로, 제대혈 유래 자연살해세포의 체외 확장 배양방법은

단핵세포(MNC)를 원료세포로 사용하여 증식하는 방법 및 조혈전구세포(hematopoietic progenitor cell, CD34+ 세포)를 원료세포로 하여 증식하는 방법이 있다. 단핵세포를 원료세포로 사용하는 방식은 인터루킨-2(IL-2), 인터루킨-15(IL-15), FLT-3L 등을 단독 혹은 혼합 사용하여 자연살해세포를 증식을 돕지만, 증식률 및 순도가 낮은 문제가 있다(Biossel L. *et al.*, *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 14, 1031-1038, 2008). 또한, 조혈전구세포를 원료로 사용하는 방식은 증식률이 좋고 순도가 높지만, 배양기간이 길고 다양한 사이토카인과 성장인자를 혼합하여 사용해야 하므로 비용 측면에서 상업화에 어려움이 있다(Fias A.M. *et al.*, *Experimental Hematology* 36(1):61-68, 2008).

[9] 자연살해세포의 체외 확장 배양에는 PBMC, CD3- 세포, CD3-CD56+ 세포, CD56+ 세포 등이 원료세포로 사용되며, 자연살해세포 증식 인자로 IL-2, IL-12, IL-15, IL-21 등의 사이토카인들과 LPS(Goodier *et al.*, *J. Immunol.* 165(1):139-147, 2000), CD3을 자극하는 OKT-3 항체(Condiotti et al., Experimental Hematol. 29(1):104-113, 2001)를 이용하고 있다. 상기 언급된 증식인자만으로 자연살해세포를 3배 내지 10배 정도 증식시킬 수 있다. 하지만, 상기 증식율 정도로는 자연살해세포를 치료제로 상업화시키기 어렵다.

[10] 최근 여러가지 형태의 지지세포(feeder cell)를 이용하여 자연살해세포를 대량 증식시키는 방법에 대해 연구되고 있다. 지지세포로 이용되고 있는 세포주로는 말초혈 단핵구, EBV-LCL, K562 세포주가 대표적이다. K562 세포주는 HLA가 결여된 혈액암 유래 세포주로 자연살해세포가 쉽게 공격할 수 있는 대표적인 타겟 세포주이다. 자연살해세포를 배양하는 대부분의 지지세포는 K562 세포주에 4-1BBL과 막 고정된(membrane-bound) IL-15를 발현시켜 증식시키는 방법(*Fujisaki et al.*, *Cancer Res.* 69(9):4010-4017, 2009), MICA, 4-1BBL, 및 IL-15를 발현시켜 증식시키는 방법(Gong *et al.*, *Tissue Antigens*, 76(6):467-475, 2010), 및 4-1BBL과 막에 고정된 IL-21을 발현시켜 증식시키는 방법(Cecele JD *et al*, *PloSONE*, 7(1):e30264, 2012) 등이 알려져 있다.

[11]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[12] 이에, 본 발명자들은 제대혈로부터 자연살해세포를 효율적으로 증식시키기 위해, 자연살해세포의 증식을 높일 수 있는 보조자극인자 및 성장인자를 발현시킨 CD4+ T세포와 제대혈 유래 자연살해세포를 공동배양하여 체외 증식시키는 방법을 개발하였다.

[13] 구체적으로, 본 발명자들은 상기 CD4(+) T세포를 지지세포로 이용한 자연살해세포 배양방법의 효율을 증가시키기 위해, 형질전환된 CD4(+) T세포를 제작하였다. 상기 형질전환된 CD4(+) T세포와 제대혈 유래 단핵구 세포와

공동배양 하였고, 이러한 공동배양을 통해 자연살해세포의 증식율 및 세포살해능이 증가됨을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[14]

과제 해결 수단

[15] 본 발명의 일 측면은, 형질전환된 CD4+ T세포와 원료세포를 공동배양하는 단계를 포함하는 자연살해세포 배양방법을 제공한다.

[16] 본 발명의 다른 측면은, 상기 배양방법에 의해 제조된 자연살해세포를 제공한다.

[17]

발명의 효과

[18] 본 발명의 형질전환된 T세포를 이용한 자연살해세포의 배양방법은 소량의 제대혈 유래의 원료세포로부터 자연살해세포를 효과적으로 증식시켜 제조할 수 있다. 또한, 이와 같이 제조된 자연살해세포는 세포살해능도 향상되었다. 따라서, 본 발명의 형질전환된 T세포를 이용한 자연살해세포의 배양방법은 세포치료제 상용화에 유용하게 사용될 수 있다. 나아가, 본 발명의 배양방법으로 제조된 자연살해세포는 세포치료제로서 유용하게 사용될 수 있다.

[19]

도면의 간단한 설명

[20] 도 1a는 Hut78 세포주에 유전자의 발현 여부를 FACS를 통해 확인한 도면이다.

[21] 도 1b는 Hut78 세포주에 도입한 단일 유전자의 발현 여부를 FACS를 통해 확인한 도면이다.

[22] 도 1c는 Hut78 세포주에 도입한 mTNF-α/OX40L 및 mTNF-α/4-1BBL 이중 유전자의 발현 여부를 FACS를 통해 확인한 도면이다.

[23] 도 1d는 Hut78 세포주에 도입한 mbIL-21/OX40L 및 mbIL-21/4-1BBL 이중 유전자의 발현 여부를 FACS를 통해 확인한 도면이다.

[24] 도 1e는 Hut78 세포주에 도입한 삼중 유전자의 발현 여부를 FACS를 통해 확인한 도면이다.

[25] 도 1f는 Hut78 세포주에 도입한 사중 유전자의 발현 여부를 FACS를 통해 확인한 도면이다.

[26] 도 2a는 유전자가 도입된 Hut78 세포주와 제대혈 유래 CD3(-) 단핵세포를 공동배양하여 제조한 자연살해세포의 증식률을 도입 유전자별로 나타낸 도면이다.

[27] 도 2b는 유전자가 도입된 H9 세포주와 제대혈 유래 CD3(-) 단핵세포를 공동배양하여 제조한 자연살해세포의 증식률을 도입 유전자별로 나타낸 도면이다.

[28] 도 2c는 유전자가 도입된 Jurkat 세포주와 제대혈 유래 CD3(-) 단핵세포를 공동배양하여 제조한 자연살해세포의 증식률을 도입 유전자별로 나타낸

도면이다.

[29] 도 2d는 유전자가 도입된 Peer 세포주와 제대혈 유래 CD3(-) 단핵세포를 공동배양하여 제조한 자연살해세포의 증식률을 도입 유전자별로 나타낸 도면이다.

[30] 도 2e는 삼중 유전자가 도입된 Hut78 세포주와 제대혈 유래 CD3(-) 단핵구 세포를 공동배양할 때, 14일 혹은 16일 간격으로 재자극하여 제조한 자연살해세포의 증식률을 나타낸 도면이다.

[31] 도 3a는 유전자가 도입된 Hut78 세포주와 제대혈 유래 CD3(-) 단핵세포를 공동배양하여 제조한 자연살해세포의 생존률을 도입 유전자별로 나타낸 도면이다.

[32] 도 3b는 유전자가 도입된 H9 세포주와 제대혈 유래 CD3(-) 단핵세포를 공동배양하여 제조한 자연살해세포의 생존률을 도입 유전자별로 나타낸 도면이다.

[33] 도 3c는 유전자가 도입된 Jurkat 세포주와 제대혈 유래 CD3(-) 단핵세포를 공동배양하여 제조한 자연살해세포의 생존률을 도입 유전자별로 나타낸 도면이다.

[34] 도 3d는 유전자가 도입된 Peer 세포주와 제대혈 유래 CD3(-) 단핵세포를 공동배양하여 제조한 자연살해세포의 생존률을 도입 유전자별로 나타낸 도면이다.

[35] 도 3e는 삼중 유전자가 도입된 Hut78 세포주와 제대혈 유래 CD3(-) 단핵구 세포를 공동배양할 때, 14일 혹은 16일 간격으로 재자극하여 제조한 자연살해세포의 생존률을 나타낸 도면이다.

[36] 도 4a는 유전자가 도입된 Hut78 세포주와 제대혈 유래 CD3(-) 단핵세포를 공동배양하여 제조한 자연살해세포의 순도(CD3-CD56+)를 도입 유전자별로 나타낸 도면이다.

[37] 도 4b는 유전자가 도입된 H9 세포주와 제대혈 유래 CD3(-) 단핵세포를 공동배양하여 제조한 자연살해세포의 순도(CD3-CD56+)를 도입 유전자별로 나타낸 도면이다.

[38] 도 4c는 유전자가 도입된 Jurkat 세포주와 제대혈 유래 CD3(-) 단핵세포를 공동배양하여 제조한 자연살해세포의 순도(CD3-CD56+)를 도입 유전자별로 나타낸 도면이다.

[39] 도 4d는 유전자가 도입된 Peer 세포주와 제대혈 유래 CD3(-) 단핵세포를 공동배양하여 제조한 자연살해세포의 순도(CD3-CD56+)를 도입 유전자별로 나타낸 도면이다.

[40] 도 4e는 삼중 유전자가 도입된 Hut78 세포주와 제대혈 유래 CD3(-) 단핵구 세포를 공동배양할 때, 14일 혹은 16일 간격으로 재자극하여 제조한 자연살해세포의 순도(CD3-CD56+)를 나타낸 도면이다.

[41] 도 5a는 유전자가 도입된 Hut78 세포주와 제대혈 유래 CD3(-) 단핵세포를

공동배양하여 제조한 자연살해세포의 활성(CD16+CD56+)을 도입 유전자별로 나타낸 도면이다.

[42] 도 5b는 유전자가 도입된 Hut78 세포주와 제대혈 유래 CD3(-) 단핵세포를 공동배양하여 제조한 자연살해세포의 NKG2D 표현형 마커의 발현량을 도입 유전자별로 나타낸 도면이다.

[43] 도 5c는 유전자가 도입된 Hut78 세포주와 제대혈 유래 CD3(-) 단핵세포를 공동배양하여 제조한 자연살해세포의 NKp30 표현형 마커의 발현량을 도입 유전자별로 나타낸 도면이다.

[44] 도 5d는 유전자가 도입된 Hut78 세포주와 제대혈 유래 CD3(-) 단핵세포를 공동배양하여 제조한 자연살해세포의 NKp44 표현형 마커의 발현량을 도입 유전자별로 나타낸 도면이다.

[45] 도 5e는 유전자가 도입된 Hut78 세포주와 제대혈 유래 CD3(-) 단핵세포를 공동배양하여 제조한 자연살해세포의 NKp46 표현형 마커의 발현량을 도입 유전자별로 나타낸 도면이다.

[46] 도 5f는 유전자가 도입된 Hut78 세포주와 제대혈 유래 CD3(-) 단핵세포를 공동배양하여 제조한 자연살해세포의 DNAM-1 표현형 마커의 발현량을 도입 유전자별로 나타낸 도면이다.

[47] 도 5g는 유전자가 도입된 Hut78 세포주와 제대혈 유래 CD3(-) 단핵세포를 공동배양하여 제조한 자연살해세포의 CXCR3 표현형 마커의 발현량을 도입 유전자별로 나타낸 도면이다.

[48] 도 6a는 유전자가 도입된 H9 세포주와 제대혈 유래 CD3(-) 단핵세포를 공동배양하여 제조한 자연살해세포의 활성(CD16+CD56+)을 도입 유전자별로 나타낸 도면이다.

[49] 도 6b는 유전자가 도입된 H9 세포주와 제대혈 유래 CD3(-) 단핵세포를 공동배양하여 제조한 자연살해세포의 NKG2D 표현형 마커의 발현량을 도입 유전자별로 나타낸 도면이다.

[50] 도 6c는 유전자가 도입된 H9 세포주와 제대혈 유래 CD3(-) 단핵세포를 공동배양하여 제조한 자연살해세포의 NKp30 표현형 마커의 발현량을 도입 유전자별로 나타낸 도면이다.

[51] 도 6d는 유전자가 도입된 H9 세포주와 제대혈 유래 CD3(-) 단핵세포를 공동배양하여 제조한 자연살해세포의 NKp44 표현형 마커의 발현량을 도입 유전자별로 나타낸 도면이다.

[52] 도 6e는 유전자가 도입된 H9 세포주와 제대혈 유래 CD3(-) 단핵세포를 공동배양하여 제조한 자연살해세포의 NKp46 표현형 마커의 발현량을 도입 유전자별로 나타낸 도면이다.

[53] 도 6f는 유전자가 도입된 H9 세포주와 제대혈 유래 CD3(-) 단핵세포를 공동배양하여 제조한 자연살해세포의 DNAM-1 표현형 마커의 발현량을 도입 유전자별로 나타낸 도면이다.

[54] 도 6g는 유전자가 도입된 H9 세포주와 제대혈 유래 CD3(-) 단핵세포를 공동배양하여 제조한 자연살해세포의 CXCR3 표현형 마커의 발현량을 도입 유전자별로 나타낸 도면이다.

[55] 도 7a는 삼중 유전자가 도입된 Hut78 세포주와 제대혈 유래 CD3(-) 단핵구 세포를 공동배양할 때, 14일 혹은 16일 간격으로 재자극하여 제조한 자연살해세포의 활성(CD16+CD56+) 및 NKG2D 표현형 마커의 발현량을 나타낸 도면이다.

[56] 도 7b는 삼중 유전자가 도입된 Hut78 세포주와 제대혈 유래 CD3(-) 단핵구 세포를 공동배양할 때, 14일 혹은 16일 간격으로 재자극하여 제조한 자연살해세포의 NKp30, NKp44, NKp46, DNAM-1, CXCR3 표현형 마커의 발현량을 나타낸 도면이다.

[57] 도 8a는 유전자가 도입된 Hut78 세포주와 제대혈 유래 CD3(-) 단핵세포를 공동배양하여 제조한 자연살해세포의 종양세포 살해능을 도입 유전자별로 나타낸 도면이다.

[58] 도 8b는 유전자가 도입된 H9 세포주와 제대혈 유래 CD3(-) 단핵세포를 공동배양하여 제조한 자연살해세포의 종양세포 살해능을 도입 유전자별로 나타낸 도면이다.

[59] 도 8c는 유전자가 도입된 Jurkat 세포주와 제대혈 유래 CD3(-) 단핵세포를 공동배양하여 제조한 자연살해세포의 종양세포 살해능을 도입 유전자별로 나타낸 도면이다.

[60] 도 8d는 유전자가 도입된 Peer 세포주와 제대혈 유래 CD3(-) 단핵세포를 공동배양하여 제조한 자연살해세포의 종양세포 살해능을 도입 유전자별로 나타낸 도면이다.

[61] 도 8e는 삼중 유전자가 도입된 Hut78 세포주와 제대혈 유래 CD3(-) 단핵구 세포를 공동배양할 때, 14일 혹은 16일 간격으로 재자극하여 제조한 자연살해세포의 종양세포 살해능을 나타낸 도면이다.

[62] 도 9a는 Raji 마우스 동물모델을 이용한 효능 평가를 위한 투여 일정을 나타낸 도면이다.

[63] 도 9b는 Raji 동물모델에서 NK 세포, RTX 및 병용 투여의 효능을 확인하기 위해 생존율을 측정한 결과를 보여주는 도면이다.

[64] 도 10a는 Ramos 마우스 동물모델을 이용한 효능 평가를 위한 투여 일정을 나타낸 도면이다.

[65] 도 10b는 Ramos 동물모델에서 NK 세포, RTX 및 병용 투여의 효능을 확인하기 위해 생존율을 측정한 결과를 보여주는 도면이다.

[66]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[67] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

[68] 본 발명의 일 측면은, 형질전환된 CD4+ T세포와 원료세포를 공동배양하는 단계를 포함하는 자연살해세포 배양방법을 제공한다.

[69] 상기 형질전환된 CD4+ T세포는 4-1BBL 유전자, mbIL-21 유전자, OX40L 유전자 및 mTNF-α 유전자로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 유전자가 발현되는 것일 수 있다.

[70] 구체적으로, 상기 형질전환된 CD4+ T세포에 하나의 유전자가 도입된 경우, 상기 유전자는 4-1BBL, mbIL-21, OX40L 또는 mTNF-α일 수 있다. 또한, 상기 형질전환된 CD4+ T세포에 두 개의 유전자가 도입된 경우, 상기 유전자 조합은 mbIL-21/4-1BBL, 4-1BBL/OX40L, mTNF-α/4-1BBL, mbIL-21/OX40L, mbIL-21/mTNF-α 또는 mTNF-α/OX40L일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 mbIL-21/4-1BBL, mTNF-α/OX40L, mTNF-α/4-1BBL 및 mbIL-21/OX40L 조합의 유전자를 T세포에 도입하였다.

[71] 또한, 상기 형질전환된 CD4+ T세포에 세 개의 유전자가 도입된 경우, 상기 유전자 조합은 4-1BBL/mbIL-21/OX40L, mbIL-21/OX40L/mTNF-α, mTNF-α/ mbIL-21 /4-1BBL 또는 4-1BBL/OX40L/mTNF-α일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는, mTNF-α/ mbIL-21 /4-1BBL 조합의 유전자를 T세포에 도입하였다.

[72] 또한, 상기 형질전환된 CD4+ T세포에 네 개의 유전자가 도입된 경우, 상기 유전자 조합은 mTNF-α/mbIL-21/OX40L/4-1BBL 일 수 있다. 본 발명의 일실시예에서는 mTNF-α/mbIL-21/OX40L/4-1BBL 조합의 유전자를 T세포에 도입하였다.

[73] 본 발명에서 사용하는 용어 '4-1BBL'이란, CD137L로 불리는 TNFSF(TNF superfamily) 중 하나로, 삼중합체(trimer)를 형성하여 수용체인 4-1BB와 결합하는 리간드를 의미한다. 상기 4-1BBL 유전자는 인간으로부터 유래된 것일 수 있다.

[74] 구체적으로, 상기 4-1BBL 유전자는 NCBI Reference Sequence: NM_003811일 수 있으나, 이에 제한하는 것은 아니다. 상기 4-1BBL 유전자는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열일 수 있다. 상기 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열은 서열번호 2로 표시되는 염기서열일 수 있다.

[75] 본 발명에서 사용하는 용어 'mbIL-21'은 세포막에 결합될 수 있도록 고안된 IL-21일 수 있다. 이때, mbIL-21은 IL-21과 막통과단백질이 결합된 융합 단백질일 수 있다. 상기 막통과단백질은 CD8α일 수 있다. 구체적으로는, CD8α의 트랜스멤브레인 도메인(transmembrane domain)일 수 있다.

[76] 구체적으로, 상기 IL-21 유전자는 NCBI Reference Sequence: NM_021803.3일 수 있으나, 이에 제한하는 것은 아니다. 또한, 상기 CD8α 유전자는 NCBI Reference Sequence: NM_001768일 수 있으나, 이에 제한하는 것은 아니다. 상기 mbIL-21은 세포막에 결합된 IL-21 형태로 발현한다. 또한, 상기 mbIL-21 유전자는 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열일 수 있다. 상기 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열 서열번호 4로 표시되는

염기서열일 수 있다.

[77] 본 발명에서 사용하는 용어 'OX40L'은 TNFSF4, gp34, TXGP1, CD252 및 CD134L로도 불리며, OX40에 결합하는 리간드를 의미한다. 구체적으로, 상기 OX40L 유전자는 NCBI Reference Sequence: NM_003326일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 OX40L 유전자는 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열일 수 있다. 상기 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열은 서열번호 6로 표시되는 염기서열일 수 있다.

[78] 본 발명에서 사용하는 용어 'mTNF-α'는 종양 괴사 인자-알파(tumor necrosis factor-alpha)의 아미노산 서열에서 TACE(tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme) 인식부위인 알라닌-발린(Alanine-Valine)을 프롤린-발린(Proline-Valine)이 되도록 DNA 상에서 점 돌연변이(point mutation) 시킨 유전자를 의미한다. 알라닌을 프롤린으로 돌연변이시킨 것은 랜덤하게 선택한 것이다.

[79] 구체적으로, 상기 mTNF-α 유전자는 서열번호 8로 표시되는 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열일 수 있다. 상기 서열번호 8로 표시되는 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열은 서열번호 9로 표시되는 염기서열일 수 있다.

[80] 상기 4-1BBL 유전자, mbIL-21 유전자, OX40L 유전자 또는 mTNF-α 유전자는 재조합 렌티 바이러스를 통해 도입될 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[81] 상기 유전자를 세포 내로 형질도입 시키는 방법은 생화학적 방법, 물리적 방법 또는 바이러스를 매개로 하는 형질도입 방법이 사용될 수 있다. 또한, 생화학적 방법으로 FuGene6(Roche, USA), 리포펙타민(LipofectamineTM 2000, Invitrogen, USA) 또는 ExGen 500(MBI Fermentas International Inc. CANADA)를 이용할 수 있다. 또한, 리포펙타민을 이용한 지질 매개법을 사용할 수 있다.

[82] 본 발명에서 사용하는 용어 "벡터"란, 상기 벡터가 도입된 세포에서 목적 유전자를 발현할 수 있는 발현벡터로서, 벡터 내에 도입된 유전자 삽입물이 발현되도록 작동 가능하게 연결된 필수적인 조절요소를 포함하는 유전자 제작물을 말한다.

[83] 또한, 상기 유전자를 포함하는 발현벡터는 CD4+ 세포주에서 발현시킬 수 있는 모든 발현벡터를 사용할 수 있으며, 본 발명의 구체적인 실시예에서는 pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro(SBI, CD510B-1) 또는 pCDH-CMV-MCS-EF1-Neo(SBI, CD514B-1) 렌티 바이러스 벡터를 사용하였다.

[84] 상기 렌티 바이러스는 장기간의 잠복기를 특징으로 하는 레트로 바이러스과의 바이러스를 의미한다. 렌티 바이러스는 숙주세포의 DNA 내에 유전정보를 전달할 수 있다. 비분열 세포에서 복제할 수 있는 유전자 전달 벡터의 가장 효과적인 방법 중 하나이다.

[85]

[86] *상기 CD4+ T세포는 체외로 분리된 CD4+ T세포, 체외 확장 배양된 CD4+ T세포 또는 CD4+ 세포주(T 림포마 세포주)일 수 있다. 또한, 상기 CD4+ T세포는

보조 T세포일 수 있으며, CD4+ T세포와 암세포를 융합하여 얻은 하이브리도마(hybridoma)일 수 있다. 구체적으로, CD4+ T세포는 Hut78, H9, Jurkat, Loucy, Molt-3, Molt-13, Peer, RPMI8402 및 TALL-01 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다. 바람직하게는 Hut78, H9, Jurkat 또는 Peer 세포일 수 있다.

[87] 본 발명에서 사용하는 용어 '지지세포(feeder cell)'란, 배양보조세포로도 불리며, 증식하지는 못하지만 대사활성이 있어 여러 가지 대사물질을 생산하여 목적세포의 증식을 도와주는 세포를 의미한다. 상기 지지세포는 4-1BBL 유전자, mbIL-21 유전자, OX40L 유전자 및 mTNF-α 유전자로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 유전자가 발현되는 형질전환된 CD4+ T세포일 수 있다.

[88] 상기 지지세포로 이용되는 T세포는 분열증식이 억제된 불활성화 세포 또는 불활성화시키지 않은 것일 수 있으며, 바람직하게는 불활성화시킴으로써 안전성을 확보할 수 있다. 불활성화시키는 방법으로는 당업계에 공지된 통상의 방법을 사용하여도 무방하며, 예를 들어 감마선(gamma-ray)을 조사하는 방법을 사용할 수 있다. 불활성화를 시키는 않은 T세포를 사용할 경우 대부분 종양세포들이므로 활성화된 자연살해세포에 의해 배양 중 사멸될 수 있다.

[89] 본 발명에서 사용하는 용어 "원료세포(seed cell)"란, 적절한 배양을 통해 자연살해세포로 증식될 수 있는 세포를 의미한다. 구체적으로, 상기 원료세포는 제대혈(cord blood) 유래 단핵세포일 수 있으며, 제대혈 유래의 자연살해세포일 수 있다. 이에 제한되는 것은 아니며, 바람직하게는, 상기 원료세포는 CD3(+) 세포를 제거시킨 CD3(-) 세포일 수 있다.

[90] 상기 자연살해세포의 배양방법은 지지세포와 원료세포의 비율을 0.1 이상으로 혼합하여 배양할 수 있다. 구체적으로, 지지세포와 원료세포의 비율은 0.1:1 내지 50:1 일 수 있다. 보다 구체적으로 0.5:1 내지 40:1 일 수 있다. 보다 더 구체적으로는 1:1 내지 30:1 일 수 있다. 가장 구체적으로는 2:1 내지 20:1 일 수 있다. 일구체예로, 지지세포와 원료세포의 비율은 2.5:1의 비율일 수 있으며, 특별히 이에 제한하지 않는다. 상기 "비율"은 세포수를 기준으로 한 비율을 의미한다.

[91] 상기 자연살해세포의 배양방법에서 원료세포는 지지세포와 1회 혼합하여 5일 내지 60일간 배양하거나, 지지세포와 2회 이상 혼합하여 60일 이상 배양할 수 있다. 바람직하게, 원료세포는 지지세포와 1회 혼합하여 14일 내지 21일간 배양할 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.

[92] 상기 자연살해세포 배양방법은 AIM-V media, RPMI1640, CellGro SCGM, X-VIVO20, IMDM, DMEM과 같은 통상의 동물세포배양용 배지에 자연살해세포 및 T 림포마 세포주를 공동배양한다. 공동배양 시 T세포에 저친화성을 가지며 T세포를 자극하는 항체 및 인터루킨을 첨가하여 배양할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[93] 본 발명에서 사용하는 용어 'T세포에 저친화성(low affinity)을 가지며 T세포를

자극하는 항체'란, T세포 수용체(TCR)와 회합하여 항원인식복합체를 형성하는 분자군인 CD3 항원에 특이적으로 반응하는 단백질을 의미한다. 상기 CD3 분자는 TCR과 비교하여 세포 내 영역이 길고 항원인식신호를 세포 내에 전달하는 역할을 담당하고 있다.

[94] 본 발명에서 사용할 수 있는 T세포에 저친화성(low affinity)을 가지며 T세포를 자극하는 항체는, 바람직하게는 항-CD3 항체일 수 있다. 구체적으로, 항-CD3 항체는 OKT-3, UCHT1 또는 HIT3a일 수 있다.

[95] 본 발명에서 사용하는 용어 '인터루킨(Interleukin, IL)'이란, 사이토카인(cytokine) 내 하나의 군으로, 림프구나 단핵구 및 대식세포 등 면역담당세포가 생산하는 단백질성 생물 활성물질을 의미한다. 상기 인터루킨은 IL-2, IL-15, IL-12, IL-18 또는 IL-21일 수 있다.

[96] 본 발명의 일실시예에서는 OKT-3 항체와 IL-2를 첨가하여 배양하였다. 첨가하는 OKT-3 항체의 농도는 0.1 ng/㎖ 내지 1,000 ng/㎖일 수 있다. 바람직하게, OKT-3 항체의 농도는 10 ng/㎕일 수 있다. IL-2의 농도는 10 U/㎖ 내지 2,000 U/㎖일 수 있다. 바람직하게, IL-2의 농도는 1,000 U/ml일 수 있다. 또한, 혈청 또는 혈장과 림프구의 증식을 지지하는 추가의 증식인자를 첨가하여 배양할 수 있다. 배지에 첨가하는 혈청 또는 혈장의 종류는 특별히 한정되지 않으며, 시판되는 각종 동물 유래의 혈청 또는 혈장을 사용할 수 있다. 바람직하게는 인간 유래로서 본인 유래의 혈청 또는 혈장을 사용할 수 있다.

[97] 본 발명의 용어 "배양"이란, 세포를 적당히 인공적으로 조절한 환경조건에서 생육시키는 방법을 의미한다. 상기 형질전환된 CD4+ T세포를 배양하는 방법은 당업계에 널리 알려져 있는 방법을 이용하여 수행할 수 있다. 구체적으로 상기 배양은 배치 공정 또는 주입 배치(fed batch) 또는 반복 주입 배치 공정(repeated fed batch process)에서 연속식으로 배양할 수 있다.

[98] 또한, 배양배지에 적절한 전구체들이 사용될 수 있다. 상기된 원료들은 배양과정에서 배양물에 적절한 방식에 의해 회분식, 유가식 또는 연속식으로 첨가될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다. 수산화나트륨, 수산화칼륨, 암모니아와 같은 기초 화합물 또는 인산 또는 황산과 같은 산 화합물을 적절한 방식으로 사용하여 배양물의 pH를 조절할 수 있다.

[99] 상기 T세포를 지지세포로 사용하는 배양방법은 원료세포에서 선택적으로 자연살해세포의 배양을 유도하고, 공여자의 PBMC 지지세포를 사용하는 경우보다 자연살해세포의 증식 시 공여자에 따른 차이가 없이 안정적으로 배양할 수 있다. 또한 공여자의 MNC를 지지세포로 사용 시 제대혈 원료세포는 체외 배양이 어렵다. 따라서, T세포를 지지세포로 사용하는 배양방법이 많은 양의 치료용 자연살해세포 치료제를 효율적이고 안정적으로 확보할 수 있다.

[100] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 자연살해세포 배양방법에 의해 제조된 자연살해세포를 제공한다.

[101] 상기 자연살해세포 배양방법에 따라 배양된 자연살해세포는 동결이 가능하고

다시 해동할 경우에도 세포의 기능이 손상되지 않는다. 또한, NKp46과 같은 활성화 수용체(activating receptor)의 발현이 높아 종양 세포주에 대한 살해능 및 사이토카인 분비가 증가하므로, 탁월한 항암 효과를 기대할 수 있다. 따라서, 임상 적용이 가능한 다량의 활성화된 자연살해세포를 이용하여 종양치료에 유효한 세포치료제를 제조할 수 있다.

[102] 또한, 상기 자연살해세포 배양방법에 의해 제조된 자연살해세포를 유효성분으로 포함하는 감염성 질환의 예방 또는 치료용 조성물의 총 중량에 대하여 10 내지 95 중량%로 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 또는 감염성 질환의 예방 또는 치료용 조성물은 상기 유효성분 외에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 추가로 포함할 수 있다.

[103] 상기 감염성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 투여를 위해 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약학적으로 허용가능한 담체를 1종 이상 포함하여 약학적 조성물로 제제화할 수 있다.

[104] 상기 감염성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물의 투여량은 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 포함된 유효성분 및 다른 성분의 종류 및 함량, 제형의 종류 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 그러나, 바람직한 효과를 위해서, 본 발명에 따른 자연살해세포의 투여량은 $0.01x10^7$ cells/kg 내지 $1.0x10^9$ cells/kg일 수 있고, $0.5x10^7$ cells/kg 내지 $1.0x10^8$ cells/kg일 수 있다. 이때 투여는 하루에 한 번 투여할 수 있고, 수회에 나누어 투여할 수도 있다.

[105] 또한, 상기 감염성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 당업계에 공지된 다양한 방법으로 개체에 투여될 수 있다. 상기 투여 경로는 투여 방법, 체액의 부피, 점성도 등을 고려하여 통상의 기술자가 적절히 선택할 수 있다.

[106] 본 발명의 또 다른 측면은, 형질전환된 CD4+ T세포를 유효성분으로 포함하는 자연살해세포 배양용 조성물을 제공한다. 본 발명에서 이용되는 CD4+ T세포 및 상기 세포에 도입되는 유전자에 대해서는 이미 상술하였으므로, 과도한 중복을 피하기 위해 그 기재를 생략한다.

[107]

발명의 실시를 위한 형태

[108] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예로 한정되는 것은 아니다.

[109]

[110] **실시예 1. 재조합 렌티 바이러스 제작**

[111] **실시예 1.1. 재조합 렌티 바이러스 벡터 제작**

[112] 렌티 바이러스 벡터는 pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro(SBI, CD510B-1) 또는 pCDH-CMV-MCS-EF1-Neo(SBI, CD514B-1)를 사용하였다. 유전자는

4-1BBL(TNF superfamily member 9, TNFSF9), mbIL-21(membrane bound IL-21), OX40L(TNF superfamily member 4(TNFSF4) transcript variant 1) 및 mTNF-α(membrane bound TNF alpha)를 도입 유전자로 사용하였다.

[113] 구체적으로, 4-1BBL 유전자(서열번호 2)는 4-1BBL 유전자 발현벡터(Origene, RC211160)를 사용하였다. mbIL-21 유전자(서열번호 4)는 코돈-최적화(codon-optimization)된 mbIL-21 유전자 서열이 삽입된 pcDNA3.1 벡터(Genscript, US)를 사용하였다. OX40L 유전자(서열번호 6)는 바이오니아(Bioneer)에 합성을 의뢰하였다.

[114] mTNF-α 유전자(서열번호 9)는 말초혈 단핵구 세포(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)에서 RNA를 추출한 후, RT(Reverse transcriptase)-PCR로 CDS를 얻었다. TNF-α가 분비되기 위해서 TACE(tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme)에 의해 잘리게 되는데, TNF-α 아미노산 서열에서 TACE 인식 부위인 A-V(Alanine-Valine)을 P-V(Proline-Valine)가 되도록 DNA 상에서 점 돌연변이(point mutation)를 일으켜서 세포막에 부착된 상태를 유지하게 하였다. 상기 점 돌연변이는 서열번호 7로 표시되는 인간 mTNF-α 유전자에서 226번째 염기인 구아닌(guanine)을 시토신(cytosine)으로 치환하고, 228번째 염기인 아데닌(adenine)을 구아닌(guanine)으로 치환하여 수행하였다.

[115] 각각의 도입 유전자에 맞는 프라이머를 사용하여 도입 유전자의 CDS(Coding Sequence)를 PCR을 통해 증폭시켰다(표 1).

[116] [표1]

유전자	프라이머	서열정보 (5'->3')	서열번호
4-1BBL	4-1BBL Forward	TCTAGAGCTAGCGAATTCGCCACCATGGAATACGCCTCTGACGCTT	서열번호 10
	4-1BBL Reverse	TTCGCGGCCGCGGATCCTTATTCCGACCTCGGTGAAGG	서열번호 11
mbIL-21	mbIL-21 Forward	TAGAGCTAGCGAATTCGCCACCGCCACCATGGCTCTGCCC	서열번호 12
	mbIL-21 Reverse	TCGCGGCCGCGGATCCTCAATACAGGGTGATGACC	서열번호 13
OX40L	OX40L Forward	TAGAGCTAGCGAATTCGCCACCATGGAACGGGTGCAAC	서열번호 14
	OX40L Reverse	TCGCGGCCGCGGATCCTCACAAGACACAGAACTCCCC	서열번호 15
mTNF-α	mTNF-α Forward	TAGAGCTAGCGAATTCGCCACCGCCACCATGGCTCTGCCC	서열번호 16
	mTNF-α Reverse	TCGCGGCCGCGGATCCTCACAGGGCAATGATCCC	서열번호 17

[117] 상기 표 1은 실험에 사용된 프라이머들을 나타낸 것이다. 도입 유전자와 렌티 바이러스 벡터에 EcoRI과 BamHI 제한효소를 처리하였다. 그 후, In-Fusion HD cloning kit(Clontech, 639649)를 이용하여 라이게이션시켰다. 라이게이션시킨 렌티 바이러스 벡터를 DH5α 수용성 세포(competent cell)에 형질전환시켜 배양하였다. 형질전환시킨 DH5α 수용성 세포로부터 plasmid mini-prep kit(MACHEREY-NAGEL/740422.50)을 이용하여 플라스미드 DNA를 수득하였다. 모든 플라스미드 DNA는 외부 업체에 시퀀싱(sequencing)을 의뢰하여 DNA 서열이 일치하는 것을 확인하였다.또한, 외주 제작사에서 cLV-CMV-MCS-IRES-Puro(puromycin) 또는 cLV-CMV-MCS-IRES-Neo(neomycin), cLV-CMV-MCS-IRES-Bsd(blasticidin)에 원하는 도입 유전자를 상기와 동일한 방법으로 삽입하였다.

[118]

[119] **실시예 1.2. 농축된 렌티 바이러스 제작**

[120] 재조합 렌티 바이러스 생산을 위해 293T 세포주를 형질도입(transfection) 2일 전에 $1.5x10^6$ 내지 $2x10^6$ cells로 75T 플라스크(Nunc, 156499)에 접종하여 5% CO_2, 37℃ 온도 조건의 인큐베이터에서 배양하였다. 293T 세포의 세포 포화도가 80%

내지 90% 정도가 되었을 때, 6 ㎖ OPTI-MEM(Gibco, 31985-088)으로 배지를 교체하여 37℃ 온도에서 5% CO_2 조건으로 30분 동안 배양하였다. DNA 혼합액과 리포펙타민(lipofectamine 2000, Life technologies, 11668500) 혼합액을 준비하였다(표 2).

[121] [표2]

구 분	성 분
DNA 혼합액	6 ㎍ 타겟 DNA, 6 ㎍ Gag, 6 ㎍ REV, 3 ㎍ VSVG, 1 ㎖ OPTI-MEM
리포펙타민 혼합액	36 ㎕ lipofectamine 2000, 1 ㎖ OPTI-MEM

[122] 상기 표 2는 DNA 혼합액과 리포펙타민(lipofectamine 2000, Life technologies, 11668500) 혼합액을 나타낸 것이다. 상기 각각의 혼합액 성분을 볼텍서(vortexer)를 이용해 잘 섞고 상온에서 3분간 방치하였다. 그 후, 두 혼합액을 섞어 상온에서 20분 이상 방치하였다. DNA와 리포펙타민이 혼합된 용액 2 ㎖를 배지를 6 ㎖ OPTI-MEM 배지에서 배양중인 293T 세포에서 처리하였다. 4시간 후, 10%(v/v) FBS가 첨가된 DMEM(Gibco, 11995073) 배지로 교체하고 48시간 동안 37℃ 온도에서 5% CO_2 조건으로 배양하였다. 48시간 동안 배양한 293T 세포의 배양액 8 ㎖를 수거하여 0.45 ㎛ 필터(Millipore, SLHP033RS)로 걸러주었다. 걸러진 배양액을 Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit with Ultracel-100 membrane(Merckmillipore, UFC910096)을 이용하여 250 ㎕ 이하로 농축하였다. 농축된 바이러스는 적당량으로 분주하여 -80℃ 온도에 보관하였다.

[123]

[124] **실시예 2. 유전자 도입 T세포 제작**

[125] **실시예 2.1. 렌티 바이러스 감염**

[126] 배양중인 0.5x10^6 개의 세포주와 1 ㎖ OPTI-MEM 배지, 50 ㎕ 렌티 바이러스 해동액, 10 ㎍/㎖ 폴리브렌(polybrene, Santa Cruz, C2013)을 혼합하여 6-웰 플레이트(6-well plate, Nunc, 140675)에 넣고 1800×g, 32℃ 온도에서 90분간 회전접종(spinoculation)을 진행하였다. 그 후, 2시간 동안 5% CO_2, 37℃ 온도 조건의 인큐베이터에서 배양한 후, 기존 배양배지로 교체해주고 48시간 동안 배양하였다.

[127] Hut78 세포주(ATCC, TIB-161™)는 20%(v/v) FBS를 포함하는 IMDM(ATCC, 30-2005)배지에서 배양하였다. 계대배양시 세포 농도는 1.5x10^5 cells/㎖ 내지 2.0x10^5 cells/㎖로 유지하였다. H9 세포주(ATCC, HTB-176™)와 Jurkat 세포주(ATCC, TIB-152™)는 10%(v/v) FBS를 포함하는 RPMI1640(ATCC, 30-2001) 배지에서 배양하였다. 계대 배양 시 세포 농도는 각각 1.0x10^5 cells/㎖ 내지 1.5x10^5 cells/㎖과 0.5x10^5 cells/㎖ 내지 1.0x10^5 cells/㎖로 유지하였다. Peer

세포주는 20%(v/v) FBS를 포함하는 RPMI1640 배지에서 배양하였다. 계대배양시 세포 농도는 3.0x10^5 내지 5.0 x10^5 cells/㎖로 유지하였다. 모든 세포주의 계대배양은 2일 내지 3일 간격으로 진행하였다. 배양용기는 75T 플라스크를 사용하였고, 배지량은 15 ㎖ 내지 20 ㎖을 유지하였다.

[128] 재조합 렌티 바이러스에 감염된 세포주는 항생제를 이용하여 선별하였다(표 3).

[129] [표3]

	도입 유전자 조합	사용한 vector	세포주	항생제 사용 농도
단일 유전자 발현	mTNF-ambIL-21	pCDH(System Biosciences, SBI)	Hut78	0.5 ㎍/㎖ puromycin (Life technologies, A1113802)
	OX40L4-1BBL	pCDH(System Biosciences, SBI)	Hut78	1 ㎎/㎖ G148(Sigma Aldrich, A1720-5G)
이중 유전자 발현	mTNF-a/OX40L mbIL-21/OX40L mTNF-a/4-1BBL	pCDH(System Biosciences, SBI)	Hut78	0.5 ㎍/㎖ puromycin1 ㎎/㎖ G418
	mbIL-21/4-1BBL	cLV (Sirion)	Hut78H9 JurkatPeer	6 ㎍/㎖ Blasticidin(Invitrogen, R210-01)1 ㎎/㎖G418
삼중 유전자 발현	mTNF-a/mbIL-21/4-1BBL	cLV (Sirion)	Hut78H9 Jurkat	0.5 ㎍/㎖ puromycin6 ㎍/㎖ Blasticidin1 ㎎/㎖ G418
사중 유전자 발현	mTNF-a/mbIL-21/OX40L/4-1BBL	mTNF-a/mbIL-21/4-1BBL: cLVOx40L: pCDH	Hut78	0.5 ㎍/㎖ puromycin6 ㎍/㎖ Blasticidin1 ㎎/㎖ G418

[130] 상기 표 3은 유전자가 도입된 세포주에 사용된 항생제를 나타낸 것이다.

[131]

[132] **실시예 2.2. 도입 유전자 발현 확인**

[133] 유세포 분석을 통해 도입 유전자의 발현을 확인하기 위해, 상기 실시예 2.1.에서

계대배양한 세포주를 수거하여 1,200 rpm으로 5분간 원심분리하였다. 그 후, 배양액을 흡입(suction)하여 제거하였다. PBS에 2%(v/v) FBS를 첨가하여 FACS 버퍼를 만들었다. 1 ㎖의 FACS 버퍼로 희석하여 세포수를 측정하고, 5x10^6 cells/㎖ 농도가 되도록 FACS 버퍼로 희석하였다. 5 ㎖ FACS 튜브 (Falcon, 352052)에 희석한 세포용액을 100 ㎕씩 넣었다. 항-인간 TNF-a(membrane)-PE(R&D systems, FAB210P), 항-인간 OX40L-PE(BD, 558184), 항-인간 4-1BBL-PE(BD, 559446), 항-인간 IL-21-PE(eBioscience, 12-7219-42), 7-AAD(Beckman coulter, IM3630c), PE 마우스 IgG1 κ 아이소타입 컨트롤(BD Pharmingen, 555749), PerCP-Cy5.5 마우스 IgG1 κ 아이소타입 컨트롤(BD, 550795) 항체로 염색한 후 FACS 장비를 이용하여 각 유전자의 발현율을 분석하였다(도 1a 내지 도 1f).

[134] 또한, RT-qPCR(Real time qPCR)을 통해 도입 유전자의 발현을 확인하기 위해, 상기 실시예 2.1.에서 계대배양한 세포주를 수거하여 1,200 rpm으로 5분간 원심분리하였다. 그 후, 배양액을 흡입(suction)하여 제거하였다. PBS로 희석하여 세포 수를 측정하고, 1x10^6 cells을 RNA prep kit를 이용하여 RNA를 분리하고 정량하였다. 또한, cDNA synthesis kit를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 이용하여 RT-qPCR을 수행하였다. RT-qPCR에 사용된 프라이머는 하기 표 4와 같다.

[135] [표4]

	프라이머	서열정보 (5'->3')	서열번호
4.1BBL	Forward primer	TCTGAGACAGGGCATGTTTG	서열번호 18
	Reverse primer	CCACCAGTTCTTTGGTGTCC	서열번호 19
mTNF-α	Forward primer	AACCTCCTCTCTGCCATCAA	서열번호 20
	Reverse primer	ATAGTCGGGCCGATTGATCT	서열번호 21
mbIL-21	Forward primer	TGGAAACAATGAGCGAATCA	서열번호 22
	Reverse primer	AACCGCTCCAGGAACTCTTT	서열번호 23
hTOP1	Forward primer	CCAGACGGAAGCTCGGAAAC	서열번호 24
	Reverse primer	GTCCAGGAGGCTCTATCTTGAA	서열번호 25

[136] 상기 표 4는 RT-qPCR 실험에 사용된 프라이머들을 나타낸 것이다. 세포주 내 도입 유전자의 발현량을 하기 표 5에 나타내었다.

[137] [표5]

Ct value	TOP1	mTNF-α	mbIL-21	4.1BBL
H9	20.3	21.5	n.d	n.d
H9-mbIL-21-4.1BBL	20.0	22.2	19.5	19.4
H9-mTNF-α-mbIL-21-4.1BBL	19.9	18.2	18.1	18.2
Jurkat	20.1	30.7	n.d	n.d
Jurkat-mbIL-21-4.1BBL	27.4	37.0	36.4	34.1
Jurkat-mTNF-α-mbIL-21-4.1BBL	20.4	19.8	19.2	19.8
Peer	21.4	26.2	34.2	34.9
Peer-mbIL-21-4.1BBL	26.8	33.8	29.0	25.6
* n.d: not detected				

[138] 상기 표 5에 나타난 바와 같이 세포주에 도입시킨 유전자의 발현량이 증가하는 것을 확인하였다.

[139]

[140] **실시예 3. CD3(-) PBMC 및 유전자 도입 T세포 공동배양**

[141] **실시예 3.1. 제대혈 유래 CD3(-) PBMC 원료세포의 준비**

[142] 연구용 제대혈을 50 ㎖ 튜브에 담아 1,500 rpm 조건으로 10분간 원심분리하였다. 상층의 혈장을 제거하고 PBS(phosphate buffered saline, LONZA, 17-516Q)를 1:1 비율로 추가하였다. 그 후, 피콜(Ficoll-Paque Plus, GE Healthcare, 17-1440-03) 밀도 구배 원심분리(ficoll density gradient centrifugation) 방법을 통해 제대혈 단핵세포(mononuclear cell, MNC)를 분리한 후, ADAM 세포 계수기 시스템(ADAM cell counter system, 나노엔텍)을 이용하여 세포수를 측정하였다.

[143] CD3(+) 세포를 제거시킨 원료세포를 수득하기 위해, $5x10^7$ 개의 제대혈 단핵세포를 새로운 50 ㎖ 튜브로 옮긴 후 1,200 rpm, 4℃ 온도에서 5분간 원심분리 하였다. PBS에 2%(v/v) FBS와 2 mM 농도의 EDTA가 포함된 MACS 러닝버퍼를 제조하였다. 원심분리가 끝난 후, 펠렛에 400 ㎕의 MACS 러닝버퍼와 100 ㎕의 CD3 자기비드(Miltenyi biotech, 130-050-101)를 넣고 4℃ 온도에서 20분간 반응시켰다. 10 ㎖ MACS 러닝버퍼를 넣어 세척한 뒤 13,500 rpm, 4℃ 온도에서 8분간 원심분리하고 0.5 ㎖의 MACS 러닝버퍼에 현탁하였다.

[144] VarioMACS(Miltenyi Biotech)에 CS 컬럼(column, Miltenyi Biotech, 130-041-305)을 장착하여 세포를 분리하였다. 최종 20 ㎖이 될 때까지 컬럼을 세척하여 세포를 회수하였다. 회수한 세포를 새로운 50 ㎖ 튜브에 담아 1,200 rpm, 4℃ 온도에서 5분간 원심분리하고 동결배지에 현탁하였다. ADAM 세포

계수기 시스템을 이용하여 세포수를 측정하여 1 바이알(vial)당 5x10^{6}개의 세포를 액체 질소에 동결하였다.

[145] 동결된 CD3(-) 제대혈 단핵세포 1 바이알을 37℃ 온도의 항온수조(water bath)에서 해동하여 50 ㎖ 튜브로 옮기고, 0.6%(v/v) ACD(Citrate-dextrose solution, Sigma-Aldrich, C3821), 0.2%(v/v) FBS(Fetal serum bovine)와 2 mM EDTA를 포함하는 PBS로 현탁하여 1,500 rpm, 4℃ 온도에서 10분간 원심분리하였다. CD3(-) 제대혈 단핵세포를 CellGro 배지(Cellgenix, 20802-0500)에 현탁하고, ADAM 세포 계수기 시스템을 이용하여 세포수를 측정하였다. CD3(-) 제대혈 단핵세포를 1x10^6 cells/㎖ 농도에 맞춰 CellGro 배지에 현탁하였다.

[146]

[147] **실시예 3.2. CD3(-) 제대혈 단핵세포와 유전자 도입 T세포 공동배양**

[148] 실시예 2에서 제조한 유전자 도입 T세포를 배양 플라스크에서 회수하여 1,200 rpm, 4℃ 온도에서 5분간 원심분리하였다. 그 후, CellGro 배지에 현탁하고, ADAM 세포 계수기 시스템을 이용하여 세포수를 측정하였다. 유전자 도입 T세포를 2.5x10^6 cells/㎖ 농도에 맞춰 CellGro 배지에 현탁한 뒤, 감마선 조사기에서 20,000 cGy로 조사하여 불활성화시켜 준비하였다.

[149] 자연살해세포 배양시 1,000 IU의 IL-2(프로류킨 주, 한국노바티스)와 10 ng/㎖의 OKT-3(eBioscience, 16-0037-85)를 배양 플라스틱 플레이트에 넣어주었다. 배양 0일째 CD3(-) 제대혈 단핵세포와 유전자 도입 T세포를 1:2.5의 비율로 각각 0.25 ㎖ 넣고 2%(v/v) 인간 혈장이 포함된 CellGro 배지를 0.25 ㎖ 넣어 37℃ 온도 조건의 인큐베이터에서 4일 동안 정치 배양하였다.

[150] 배양 4일째에 1%(v/v) 인간 혈장, 1,000 IU/㎖의 IL-2가 포함된 CellGro 배지를 동량으로 넣어준 뒤, 다시 정치 배양하였다. 이후 2일 내지 3일 간격으로 세포수를 측정하여 1x10^{6}cells/㎖ 농도가 되도록 1%(v/v) 인간 혈장, 1,000 IU/㎖의 IL-2가 포함된 CellGro 배지를 추가하며 21일까지 부유 배양하였다. 21일까지 부유 배양하여 증식된 자연살해세포를 수득하였다. 이때, Jurkat 세포주 또는 Peer 세포주를 지지세포로 사용한 경우, 11일까지 부유 배양하였다. H9 및 Hut78 세포주에 유전자를 도입하여 지지세포로 사용한 경우, 21일까지 부유 배양하였다.

[151] 배양된 자연살해세포의 증식률을 비교한 결과, 총 세포수(Total nucleated cells, TNC)를 기준으로 유전자가 도입되지 않은 Hut78 세포주와 공동배양하였을 때 93배 증식하였다. 하나 이상의 유전자(mTNF-α, mbIL-21, 4-1BBL)가 도입된 Hut78 세포주와 공동배양 하였을 때 월등하게 자연살해세포의 증식률이 높아지는 것을 확인하였다. 특히, mbIL-21/4-1BBL의 유전자가 도입된 Hut78 세포주와 공동배양하였을 때 957배 증식하였다. 또한, mTNF-α/mbIL-21/4-1BBL가 도입된 Hut78 세포주와 공동배양하였을 때 1,138배 증식하였다(표 6, 도 2a).

[152] [표6]

HuT78 + 도입유전자	**Average**	**STDEV**
HuT78 parental	92.7	90.4
mTNF-α	112.3	67.2
mbIL-21	448.1	251.4
OX40L	50.5	30.7
4.1BBL	274.9	189.6
mTNF-α+OX40L	204.5	123.2
mTNF-α+4.1BBL	389.1	352.1
mbIL-21+OX40L	372.0	189.2
mbIL-21+4.1BBL	957.0	537.4
mTNF-α+mbIL21+4.1BBL	1138.5	192.0
mTNF-α+OX40L+mbIL21+4.1BBL	823.1	330.0

[153] 또한, 유전자가 도입되지 않은 H9 세포주와 공동배양하였을 때 13배 증식하였지만, mbIL-21/4-1BBL 또는 mTNF-α/mbIL-21/4-1BBL가 도입된 H9 세포주와 공동배양하였을 때, 각각 367배, 979배 증식하였다(표 7 및 도 2b).

[154] [표7]

H9 + 도입유전자	**Average**	**STDEV**
H9 parental	12.6	4.3
mbIL21+4.1BBL	367.4	80.1
mTNF-α+mbIL21+4.1BBL	978.8	287.7

[155] 다른 세포주인 Jurkat 세포주 또는 Peer 세포주와 공동배양하였을 때 배양 11일차까지 배양이 가능하였다. mbIL-21/4.1BBL 유전자가 도입된 세포주나, mTNF- α/mbIL-21/4-1BBL 유전자가 도입된 세포주에서 상대적으로 높은 증식률을 보였다. (표 8 및 표 9, 도 2c 및 도 2b)

[156] [표8]

Jurkat + 도입유전자	**Average (11일 배양)**	**STDEV**
Jurkat Parental	0.9	0.7
mbIL21+4.1BBL	36.3	4.8
mTNF-α+mbIL21+4.1BBL	43.6	6.6

[157] [표9]

Peer + 도입유전자	Average (11일 배양)	STDEV
Peer Parental	1.6	0.7
mbIL21+4.1BBL	14.3	4.1

[158] 상기 결과는 제대혈 단핵세포로부터 분리된 CD3(-) 세포를 유전자가 도입된 지지세포로 21일간 배양하여, 자연살해세포 배양이 가능함을 보여주며, 유전자 비도입 지지세포보다 높은 증식률을 보였다.

[159]

[160] **실시예 3.3. mTNF-α/mbIL-21/4-1BBL 유전자가 도입된 HuT78 세포를 이용한 자연살해세포 배양의 재자극**

[161] 실시예 2에서 제조한 유전자 도입 T세포를 배양 플라스크에서 회수하여 1,200 rpm, 4℃ 온도에서 5분간 원심분리하였다. 그 후, CellGro 배지에 현탁하고, ADAM 세포 계수기 시스템을 이용하여 세포수를 측정하였다. 유전자 도입 T세포를 $2.5x10^6$ cells/㎖ 농도에 맞춰 CellGro 배지에 현탁한 뒤, 감마선 조사기에서 20,000 cGy로 조사하여 불활성화시켜 준비하였다.

[162] 자연살해세포 배양시 1,000 IU의 IL-2와 10 ng/㎖의 OKT-3를 배양 플라스틱 플레이트에 넣어주었다. 배양 0일째 CD3(-) 제대혈 단핵세포와 유전자 도입 T세포를 1:2.5의 비율로 각각 0.25 ㎖ 내지 1 ㎖ 넣고 2%(v/v) 인간 혈장이 포함된 CellGro 배지를 0.25 ㎖ 내지 1 ㎖ 넣어 37℃ 온도 조건의 인큐베이터에서 4일 동안 정치 배양하였다.

[163] 배양 4일째에 1%(v/v) 인간 혈장, 1,000 IU/㎖의 IL-2가 포함된 CellGro 배지를 동량으로 넣어준 뒤, 다시 정치 배양하였다. 이후 2일 내지 3일 간격으로 세포수를 측정하여 $1x10^6$ cells/㎖ 농도가 되도록 1%(v/v) 인간 혈장, 1,000 IU/㎖의 IL-2가 포함된 CellGro 배지를 추가하며 배양하였다.

[164] 재자극은 배양 0일째 mTNF-α/mbIL-21/4-1BBL 유전자가 도입된 HuT78 세포를 같은 비율로 사용하였다. 배양 16일째 첫 번째 재자극을 주었다. 먼저, ADAM 세포 계수기 시스템을 이용하여 배양중인 자연살해세포의 수를 측정하고, $1.5x10^6$ cells/㎖이 되도록 CellGro 배지로 희석하여 0.25 ㎖을 배양 플라스틱 플레이트에 준비하였다. mTNF-α/mbIL-21/4-1BBL 유전자가 도입된 HuT78 세포는 $2.5x10^6$ cells/㎖이 되도록 CellGro 배지에 현탁한 뒤, 감마선 조사기에서 10,000 cGy로 조사하여 불활성화시켜 준비하였다.

[165] 불활성화시킨 mTNF-α/mbIL-21/4-1BBL 유전자가 도입된 HuT78 세포를 배양 플라스틱 플레이트에 0.25 ㎖을 넣어주었다. 1000 IU/㎖의 IL-2와 10 ng/㎖의 OKT-3, 1%(v/v) 인간 혈장을 배양 플라스틱 플레이트에 넣고 37℃ 온도의 인큐베이터에서 3일간 정치 배양하였다. 이후 2일 내지 3일 간격으로 세포수를 측정하여 $1x10^6$ cells/㎖이 되도록 1%(v/v) 인간 혈장 과 1000 IU/㎖의 IL-2가

포함된 CellGro 배지를 추가하며 배양하였다. 첫 번째 재자극 후 14일마다 동일한 방법으로 각각 배양 32일째, 46일째, 60일째에 지지세포를 통한 재자극을 진행하였고, 70일까지 배양 진행하였다.

[166] 그 결과, 첫 번째 재자극 후 배양 32일째 자연살해세포의 증식률은 $6.9x10^4$ 배, 두 번째 재자극 후에는 $3.7x10^6$ 배였고, 세 번째 재자극 후인 배양 60일째에는 $2.3x10^8$ 배, 네 번째 재자극을 준 후 배양 70일째 $5.9x10^9$ 배로 지속적인 증식이 유지되어 높은 증식률을 보였다(표 10, 도 2e).

[167] [표10]

배양일차	Average	STDEV
32일	$6.9x10^4$	$3.2x10^3$
46일	$3.7x10^6$	$3.1x10^5$
60일	$2.3x10^8$	$1.4x10^8$
70일	$5.9x10^9$	$1.1x10^8$

[168] 이를 통해 mTNF-α/mbIL-21/4-1BBL 유전자가 도입된 HuT78 세포주로 주기적인 재자극을 주었을 때, 증식배수가 계속적으로 증가하여 우수한 지지세포로 사용될 수 있음을 확인하였다.

[169]

[170] **실험예 1. 도입 유전자에 따른 자연살해세포의 세포생존율 확인**

[171] 인-비트로(in-vitro) 세포생존율을 비교, 평가하기 위하여 세포내 핵과 결합할 수 있는 PI 염색액을 사용하는 세포계수기(Cell counter) 중에 하나인 ADAM cell counter system 사용하였다. 측정된 총 세포수에서 사멸 세포수를 감하여 생존 세포수를 계산한 후, 하기 수학식 I을 이용하여 세포생존율(Cell viability)을 계산하였다.

[172] [수학식 I]

[173] 세포생존율 (%) = (생존 세포수/총 세포수) x 100

[174] 유전자가 도입된 HuT78 세포주와 공동배양한 자연살해세포의 경우, 유전자 도입 유무와 관계없이, 90% 내외의 생존율을 보였다(표 11, 도 3a).

[175] [표11]

HuT78 + 도입유전자	Average	STDEV
Parental	91	2.6
mTNF-α	92.8	2.1
mbIL-21	92.8	1.5
OX40L	90.3	1.3
4.1BBL	91.3	1.3
mTNF-α+OX40L	93.5	1.7
mTNF-α+4.1BBL	92.5	1.7
mbIL-21+OX40L	89	2.4
mbIL-21+4.1BBL	89.8	2.6
mTNF-α+mbIL-21+4.1BBL	89	3.4
QD	88.5	3.4

[176] 그 외 H9, Jurkat 또는 Peer 세포주의 경우, mbIL-21/4-1BBL 유전자가 도입된 세포주, mTNF-α/mbIL-21/4-1BBL 유전자가 도입된 세포주에서 배양된 자연살해세포의 생존율은 21일 배양(H9), 11일 배양(Jurkat, Peer) 시 90% 이상의 생존율을 보였다(표 12 내지 표 14, 도 3b 내지 도 3d).

[177] [표12]

H9 +도입유전자	Average	STDEV
Parental	86	6.1
mbIL21+4.1BBL	91	3.1
mTNF-α+mbIL21+4.1BBL	94	0.6

[178] [표13]

Jurkat +도입유전자	Average	STDEV
Parental	80	6.1
mbIL21+4.1BBL	91	0.6
mTNF-α+mbIL21+4.1BBL	92	2.0

[179] [표14]

Peer +도입유전자	Average	STDEV
Parental	83.5	6.1
mbIL21+4.1BBL	91	0.6

[180] 또한, mTNF-α/mbIL-21/4-1BBL 유전자가 도입된 HuT78 세포주로 재자극 횟수를 늘려가며 배양한 결과, 자연살해세포의 생존율은 재자극 횟수가 많아져도 약 90%이상의 높은 생존율을 보였다(표 15, 도 3e).

[181] [표15]

배양일차	32일	42일	60일	70일
Average	96.0	93.5	97.5	91.5
STDEV	1.4	0.7	0.7	4.9

[182] 이를 통해, 장기간 배양이 지속되어도 자연살해세포는 높은 생존율을 유지하므로, 자연살해세포의 장기간 확장 배양이 가능함을 확인하였다.

[183]

[184] **실험예 2. 자연살해세포의 순도 확인**

[185] 21일 배양된 자연살해세포 또는 반복적인 재자극으로 배양된 자연살해세포를 수거하여 1,200 rpm으로 5분간 원심분리하고, 배양액을 흡입하여 제거하였다. 1 ㎖의 FACS 버퍼로 희석하여 세포 수를 측정하고, $5x10^6$ cells/㎖이 되도록 FACS 버퍼로 희석하였다. 5 ㎖ FACS 튜브(Falcon, 352052)에 희석한 세포 용액을 100 ㎕씩 넣고, 하기 항체로 표현형을 분석하였다:

[186] 튜브 1: 항-인간 CD3-FITC(BD Pharmingen, 555332), 항-인간 CD16-PE(BD Pharmingen, 555407), 항-인간 CD56-BV421(BD Pharmingen, 562751)

[187] 튜브 2: 항-인간 CD14-FITC(BD Pharmingen, 555397), 항-인간 CD19-PE(BD Pharmingen, 555413), 항-인간 CD3-BV421(BD Pharmingen, 562438)

[188] 튜브 3: 항-인간 CD3-FITC, 항-인간 NKG2D-PE(R&D system, FAB139P), 항-인간 CD56-BV421

[189] 튜브 4: 항-인간 CD3-FITC, 항-인간NKp30-PE(BD Pharmingen, 558407), 항-인간 CD56-BV421

[190] 튜브 5: 항-인간 CD3-FITC, 항-인간 NKp44-PE(BD Pharmingen, 558563), 항-인간 CD56-BV421

[191] 튜브 6: 항-인간 CD3-FITC, 항-인간 NKp46-PE(BD Pharmingen, 557991), 항-인간 CD56-BV421

[192] 튜브 7: 항-인간 CD3-FITC, 항-인간 DNAM-1-PE(BD Pharmingen, 559789), 항-인간 CD56-BV421

[193] 튜브 8: 항-인간 CD3-FITC, 항-인간 CXCR3-PE(BD Pharmingen, 557185), 항-인간 CD56-BV421

[194] 튜브 9: 항-인간 CD3-FITC, PE 마우스 IgG1 κ 아이소타입 컨트롤(BD Pharmingen, 555749), 항-인간 CD56-BV421

[195] 튜브 10: FITC 마우스 IgG1 κ 아이소타입 컨트롤(BD Pharmingen, 555748), PE 마우스 IgG1 κ 아이소타입 컨트롤, BV421 마우스 IgG1 κ 아이소타입 컨트롤(BD

Pharmingen, 562438)

[196] 상기 튜브 1에서 항-인간(anti-human) CD56은 세 가지 형광 중에 한 가지를 선택하여 진행하였고, 그에 따라 튜브 2의 CD3와 튜브 3부터 9까지의 CD56, 튜브 10의 아이소타입 컨트롤의 형광을 같은 것으로 선택하였다.

[197] 상기 튜브들을 30분간 냉장 온도에서 염색하였다. 그 후, 염색이 끝난 세포에 2 ㎖ FACS 버퍼를 넣고, 1,500 rpm으로 3분간 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 다시 2 ㎖ FACS 버퍼를 넣고 2,000 rpm으로 3분간 원심분리하였다. 다시 상층액을 제거하고, 200 ㎕ cytofix 버퍼(fixation buffer, BD, 554655)를 넣어 현탁한 후 FACS LSRII Fortessa(BD Biosciences)를 이용하여 세포의 확인 및 순도와 여러 표현형을 조사하였다.

[198] 제대혈 단핵세포로부터 분리된 CD3(-) 세포를 유전자를 도입한 HuT78 세포주와 21일간 공동배양 후, 자연살해세포의 확인 및 순도를 분석한 결과, 유전자 도입 유무 관계없이 모든 조건에서 90% 이상의 높은 자연살해세포(CD3-CD56+) 함량을 확인하였다(표 16, 도 4a).

[199] [표16]

HuT78 + 도입유전자	Average	STDEV
Parental	92.4	9.6
mTNF-α	96.8	2.5
mbIL-21	98.6	0.9
OX40L	95.7	3.6
4.1BBL	98	1.8
mTNF-α+OX40L	97.2	2.5
mTNF-α+4.1BBL	98.6	1
mbIL-21+OX40L	98.4	1.3
mbIL-21+4.1BBL	98.5	0.9
mTNF-α+mbIL-21+4.1BBL	98.7	0.9
QD	99.3	0.5

[200] 그 외 H9, Jurkat 또는 Peer 세포주의 경우도 유전자를 도입하지 않은 조건보다 mbIL-21/4-1BBL 유전자 또는 mTNF-α/mbIL-21/4-1BBL 유전자를 도입한 세포주와 공동배양한 자연살해세포의 확인 및 순도가 더 높게 유지되는 것을 확인하였다(표 17 내지 표 19, 도 4b 내지 도 4d).

[201] [표17]

H9 +도입유전자	Average	STDEV
Parental	91.5	4.1
mbIL21+4.1BBL	98.5	0.7
mTNF-α+mbIL21+4.1BBL	99	0.3

[202] [표18]

Jurkat +도입유전자	Average	STDEV
Parental	88.6	6.9
mbIL21+4.1BBL	97.6	1.3
mTNF-α+mbIL21+4.1BBL	97.5	0.8

[203] [표19]

Peer +도입유전자	Average	STDEV
Parental	79.2	14.6
mbIL21+4.1BBL	94.9	2.1

[204] 또한, mTNF-α/mbIL-21/4-1BBL 세가지 유전자가 도입된 세포주로 재자극 횟수를 늘려가며 배양된 자연살해세포는 배양 60일까지 90% 이상의 높은 자연살해세포(CD3-CD56+) 함량을 확인하였다(표 20, 도 4e)

[205] [표20]

배양일차	32일차	60일차
Avergage	99.7	97.8
STDEV	0.1	0.8

[206] **실험예 3. 자연살해세포의 활성마커 분석**또한, 제대혈 단핵세포로부터 분리된 CD3(-) 세포를 유전자가 도입된 지지세포와 21일간 공동배양한 후, 대표적인 자연살해세포의 수용체(receptor) 발현을 분석하였다.

[207] HuT78 세포주와 공동배양한 경우, CD16은 모두 높게 발현하였고, 활성 마커 인 NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46, DNAM-1이 유전자를 도입하지 않은 조건이나 단일 유전자 도입 지지세포 조건에 비해 이중 유전자 도입 지지세포 조건에서 공여자 간 편차(variation)없이 모두 높게 발현하였다(도 5a 내지 도 5g).

[208] 또한, H9 세포주와 공동배양한 경우, 유전자를 도입하지 않은 조건보다 mbIL-21/4-1BBL 유전자와 mTNF-α/mbIL-21/4-1BBL 세 가지 유전자가 도입된 지지세포와 공동배양한 경우에 CD16 및 NKG2D, DNAM-1, CXCR3의 발현도가 더 높아지는 것을 확인하였다. 다른 활성 마커인 NKp30, NKp44, NKp46의

발현은 공여자간 편차 없이 높게 발현되었다. 따라서, 이중 및 삼중 유전자 도입 지지세포는 NK 세포의 활성 및 종양 타겟팅을 높일 수 있는 유용한 지지세포임을 확인하였다(도 6a 내지 도 6g).

[209] 또한, mTNF-α/mbIL-21/4-1BBL 세 가지 유전자가 도입된 Hut78 세포주를 이용해 재자극 하여 공동배양한 자연살해세포 표현형을 확인한 결과, 재자극 1회 조건보다 4회 조건으로 배양한 경우에 NKG2D, NKp44, NKp46, DNAM-1, CXCR3 등 활성 마커의 발현이 감소하는 경향을 보였다. 이를 통해, 재자극 횟수가 늘어날수록 배양 기간이 길어지면서 일부 활성 마커의 발현도에 영향을 줄 수 있음을 확인하였다(도 7a 및 도 7b).

[210]

[211] **실험예 4. T세포의 도입 유전자 및 공동배양에 따른 자연살해세포의 세포살해능 확인**

[212] $1x10^6$ 개의 K562 암세포주를 15 ㎖ 튜브에 담아 원심분리하였다. 세포 펠렛을 1 ㎖의 10%(v/v) FBS가 첨가된 RPMI1640 배지로 현탁하였다. 그 후, 1 mM의 Calcein-AM(Molecular probe, C34852)을 30 ㎕ 넣은 다음 은박지로 빛을 차단하여 37℃ 온도 조건의 인큐베이터에서 한 시간 동안 염색했다.

[213] Calcein-AM 염색이 끝난 종양 세포주는 10 ㎖ 내지 15 ㎖의 10%(v/v) FBS가 첨가된 RPMI1640 배지를 넣어 세척하고 원심 분리한 뒤 펠렛을 10 ㎖의 10%(v/v) FBS가 첨가된 RPMI1640 배지로 현탁하여 $1x10^5$ cells/㎖의 농도가 되도록 하였다. 자연살해세포는 $1x10^6$ cells를 15 ㎖ 튜브에 담아 원심분리하고, 펠렛을 K562 암세포주에 대비하여 원하는 비율(1:1)로 10%(v/v) FBS가 첨가된 RPMI1640 배지에 현탁하였다. 준비된 K562 암세포주와 자연살해 세포주를 둥근 바닥 96-웰 플레이트(96-well U-bottom plate, Nunc, 163320)에 100 ㎕씩 섞어서 분주하고, 각 웰을 3 개씩(triplicate) 준비하여 평균값을 얻었다.

[214] 스판(Spontaneous release) 웰에는 염색된 K562 암세포주를 100 ㎕씩 넣고 10%(v/v) FBS가 첨가된 RPMI1640 배지를 100 ㎕씩 넣어주었다. 맥스(Maximum release) 웰에는 염색된 K562 암세포주를 100 ㎕씩 넣고 2%(v/v) Triton-X 100이 첨가된 3차 증류수를 100 ㎕씩 넣어주었다.

[215] 10%(v/v) FBS가 첨가된 RPMI1640 배지 및 2%(v/v) Triton-X 100이 첨가된 RPMI1640 배지에 존재하는 자가 형광값(auto-fluorescence)을 보정하기 위해 10%(v/v) FBS가 첨가된 RPMI1640 배지 200 ㎕를 넣어 배지값을 준비하고, 10%(v/v) FBS가 첨가된 RPMI1640 배지 100 ㎕에 2%(v/v) Triton-X 100이 첨가된 RPMI1640 배지 100 ㎕를 넣어 두 용액의 혼합액의 값을 준비하였다. 배지값에서 혼합액의 값을 뺀 차(A)를 맥스(Maximum release)값에 더하여 자가 형광값을 보정하였다.

[216] 빛을 차단하여 37℃ 온도 조건의 인큐베이터에서 4시간 동안 반응시킨 후, 플레이트를 2,000 rpm에서 3분간 원심분리하였다. 상층액을 96-웰 블랙 플레이트(96 well black plate, Nunc, 237108)에 100 ㎕씩 분주하였다. 형광

플레이트 리더기(Perkin Elmer, VICTOR X3)를 이용하여 형광값($OD_{480/535}$ nm)을 측정하고, 자연살해세포의 종양 세포살해능은 하기 수학식 II를 이용하여 계산하였다.

[217] [수학식 II]

[218] % of killing = (Sample well 평균 형광값 - Spon well 평균 형광값)/{(Max well 평균 형광값 + A) - Spon well 평균형광값} x 100

[219] 다양한 지지세포로 배양된 자연살해세포들을 K562 암세포주와 반응시켜 직접적인 세포살해능을 측정하였다. 그 결과, 모든 지지세포에 대해 유전자를 도입하지 않은 조건보다 mbIL-21/4-1BBL 유전자와 mTNF-α/mbIL-21/4-1BBL 유전자를 도입한 조건에서 배양된 자연살해세포의 세포살해능이 증가하였다(도 8a 내지 도 8d).

[220] mTNF-α/mbIL-21/4-1BBL 유전자가 도입된 HuT78 세포주의 재자극 횟수에 따른 자연살해세포의 세포살해능은 큰 차이 없이 배양 60일까지 높은 살해능을 나타내었다(도 8e).

[221] 이를 통해, 유전자 미도입 지지세포보다 mbIL-21/4-1BBL 유전자 또는 mTNF-α/mbIL-21/4-1BBL 유전자가 도입된 지지세포는 높은 활성과 더불어 우수한 세포살해능을 갖는 고순도 자연살해세포를 체외 확장 배양하는데 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.

[222]

[223] **실시예 4. 동물 실험**

[224] **실시예 4.1. 유전자 도입 T 지지세포를 이용한 자연살해세포의 배양**

[225] 자연살해세포 배양 시 500 혹은 1000 IU/mL의IL-2 (프로류킨 주, 한국노바티스)와 10ng/mL의OKT-3 (eBioscience, 16-0037-85)를 배양 플라스틱 플레이트에 넣어주었으며, 배양 0일째 CD3(-) 제대혈 단핵세포 혹은 말초혈액 단핵세포와 유전자 도입 T 지지세포를 1:2.5의 비율로 넣고 2v/v% 인간 혈장이 포함된 CellGro 배지를 넣어 37℃ 인큐베이터에서 4일간 정치 배양하였다. IL-2는 제대혈 단핵세포의 경우, 1000 IU/mL, 말초혈액 단핵세포의 경우, 500 IU/ml을 사용하였다.

[226] 이후 제대혈 유래 자연살해세포의 배양은 다음과 같은 절차로 수행하였다: 배양 4일째에 1 v/v% 인간 혈장, 1000 IU/mL의 IL-2가 포함된 CellGro 배지를 동량으로 넣어준 뒤 다시 정치 배양하였다. 이후 2~3일 간격으로 세포수를 측정하여 1 x 10^6cells/mL이 되도록 1 V/V% 인간 혈장과 1000 IU/mL의IL-2가 포함된 CellGro 배지를 추가하여 14일까지 배양하였다. 배양 14일차 유전자 도입 T 지지세포를 1:2.5의 비율로 재자극하고 1 V/V% 인간 혈장과 OKT3, IL-2가 포함된 CellGro 배지에 배양하였다. 이후 2-3일 간격으로 세포수를 측정하여 1 x 10^6cells/mL이 되도록 1 V/V% 인간 혈장과 1000 IU/mL의IL-2가 포함된 CellGro 배지를 추가하여 14일 동안 추가 배양하여 총 28일 동안 세포를 배양하였다.

[227] 이후 말초혈액 유래 자연살해세포의 배양은 다음과 같다: 배양 4일째에 1

V/V% 인간 혈장, 500 IU/mL의 IL-2가 포함된 CellGro 배지를 동량으로 넣어준 뒤 다시 정치 배양하였다. 이후 2 - 3일 간격으로 세포수를 측정하여 1 x 10^6 cells/mL이 되도록 1 V/V% 인간 혈장과 500 IU/mL의 IL-2가 포함된 CellGro 배지를 추가하여 11일까지 배양하였다. 배양 11일차 유전자 도입 T 지지세포를 1:2.5의 비율로 재자극하고 1 V/V% 인간 혈장과 OKT3, IL-2가 포함된 CellGro 배지에 배양하였다. 이후 2 - 3일 간격으로 세포수를 측정하여 1 x 10^6cells/mL이 되도록 1 V/V% 인간 혈장과 1000 IU/mL의 IL-2가 포함된 CellGro 배지를 추가하여 8 - 10일 동안 추가 배양하여 총 19 ~ 21일 동안 세포를 배양하였다.

[228] 배양된 세포는 1 x 10^6cells/mL이 되도록 동결배지에 부유하여, 온도제어 세포동결기를 이용하여 동결 후 액체질소에 보관한다.

[229] 배양된 자연살해세포의 증식률을 비교한 결과, CB-enFeeder는 약 80,000배, PBMC-enFeeder는 55,000배 증식하여 큰 차이는 없었다(표 21).

[230] [표21]

	평균	STDEV
CB-enFeeder	79288.3	37381.0
PBMC-enFeeder	53649.3	16827.9

[231]

[232] **실시예 4.2. Raji 동물모델 효능평가**

[233] Raji-luci 세포주는 배양 최종일 암세포를 수거하고 PBS를 이용하여 세포 농도를 5 x 10^5cells/mL로 맞춘 후, 마우스당 0.2 mL (1 x 10^5cells/mouse)씩 꼬리 정맥에 주사하였다. 자연살해세포는 2 x 10^7cells/200μL로 꼬리 정맥에 주사하였고, 리툭산(이하 RTX, 맙테라주, 한국로슈)은 PBS를 이용하여 0.01μg/100μL농도로 희석하여 마우스 견갑부와 흉벽 사이의 약화 부위 피하에 100μL 주사하였다. NK세포는 암세포 이식 다음날 고정기를 이용하여 꼬리 정맥에 총 6회 투여하였고 RTX는 피하에 1회 투여하였다(표 22, 도 9a)

[234] [표22]

군	용량	투여경로	액량(μl)	마리수
1	동결배지+IgG 0.01 μg /head	i.v+s.c	200+100	10
2	RTX 0.01 μg /head	s.c	100	10
3	PBMC-enFeeder NK 2x10^7cells/head	i.v	200	10
4	CB-eFeeder NK 2x10^7cells/head	i.v	200	10
5	PB-eFeeder NK +RTX	i.v+s.c	200+100	10
6	CB-eFeeder NK +RTX	i.v+s.c	200+100	10

[235]

[236] 모든 동물의 관찰은 하루 2회 일반증상 및 사망동물을 관찰하였으며, 사망 여부를 관찰한 뒤 동결배지 대조군 및 자연살해세포 및 RTX 처리군의 중앙 생존기간(Median survival time)을 계산하여 생존율 연장효과를 평가하였다. Raji-luci 세포주 이식 후 2종의 자연살해세포 및 RTX 단독 및 병용 투여군에서는 26 - 122일에 걸쳐 사망동물이 관찰되었으며, 최종일(122일차)까지 중앙생존기간은 동결배지 대조군의 30일과 비교하여 RTX, PBMC-enFeeder, CB-enFeeder 단독 투여군에서는 48.5일, 43일 및 47일이었다. PBMC-enFeeder + RTX, CB-enFeeder + RTX 병용 투여군에서의 중앙생존기간은 55일 및 75.5일 이상으로 나타났다(표 23, 도 9b)

[237] [표23]

Raji-luci 모델	동결배지	RTX	PBMC-enFeeder	CB-enFeeder	RTX +PBMC-enFeeder	RTX +CB-enFeeder
평균생존율	29.5	48.5	43	47	55	75.5

[238]

[239] **실시예 4.3. Ramos 동물모델 효능평가**

[240] Ramos 세포주는 배양 최종일 암세포를 수거하고 PBS를 이용하여 세포 농도를 5 x 10^6cells/mL로 맞춘 후, 마우스당 0.2 mL(1 x 10^6cells/mouse)씩 꼬리 정맥에 주사하였다. 자연살해세포는 2 x 10^7cells/200μL로 꼬리 정맥에 주사하였고, RTX는 PBS를 이용하여 0.3μg/100μL 농도로 희석하여 마우스 견갑부와 흉벽 사이의 약화 부위 피하에 100μL 주사하였다. 자연살해세포는 암세포 이식 넷째 날부터 고정기를 이용하여 꼬리 정맥에 총 6회 투여하였고 RTX는 암세포 이식 셋째 날부터 고리 정맥에 6회 투여하였다(표 24, 도 10a).

[241] [표24]

군	용량	투여경로	액량(μl)	마리수
1	동결배지+IgG 0.3 μg /head	i.v+i.v	200+100	10
2	RTX 0.3 μg /head	i.v	100	10
3	PBMC-enFeeder NK 2x10^7cells/head	i.v	200	10
4	CB-eFeeder NK 2x10^7cells/head	i.v	200	10
5	PB-eFeeder NK +RTX	i.v+i.v	200+100	10
6	CB-eFeeder NK +RTX	i.v+i.v	200+100	10

[242]

[243] 모든 동물의 관찰은 하루 2회 일반증상 및 사망동물을 관찰하였으며, 사망

여부를 관찰한 뒤 동결배지 대조군 및 자연살해세포 및 RTX 처리군의 중앙 생존기간을 계산하여 생존율 연장 효과를 평가하였다. Ramos 세포주 이식 후 2종의 자연살해세포 및 RTX 단독 및 병용 투여군에서는 34 - 110일에 걸쳐 사망동물이 관찰되었으며, 최종일(124일차)까지 중앙생존기간은 동결배지 대조군의 31일과 비교하여 RTX, PBMC-enFeeder, CB-enFeeder 단독 투여군에서는 49.5일, 42일 및 42.5일이었다. PBMC-enFeeder + RTX, CB-enFeeder + RTX 병용 투여군에서의 중앙생존기간은 63.5일 및 87.5일로 나타났다(표 25, 도 10b)

[244] [표25]

Ramos 모델	동결배지	RTX	PBMC-enFeeder	CB-enFeeder	RTX +PBMC-enFeeder	RTX + CB-enFeeder
평균생존율	31	49.5	42	42.5	63.5	87.5

[245]

[246] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[247]

청구범위

[청구항 1] 형질전환된 CD4+ T세포와 원료세포를 공동배양하는 단계를 포함하는 자연살해세포 배양방법.

[청구항 2] 제 1항에 있어서, 상기 형질전환된 CD4+ T세포는 4-1BBL 유전자, mbIL-21 유전자, OX40L 유전자 및 mTNF-α 유전자로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 유전자가 발현되는 것인, 자연살해세포 배양방법.

[청구항 3] 제 2항에 있어서, 상기 4-1BBL 유전자는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열인 것인, 자연살해세포 배양방법.

[청구항 4] 제 3항에 있어서, 상기 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열은 서열번호 2로 표시되는 염기서열인, 자연살해세포 배양방법.

[청구항 5] 제 2항에 있어서, 상기 mbIL-21 유전자는 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열인 것인, 자연살해세포 배양방법.

[청구항 6] 제 5항에 있어서, 상기 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열은 서열번호 4로 표시되는 염기서열인, 자연살해세포 배양방법.

[청구항 7] 제 2항에 있어서, 상기 OX40L 유전자는 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열인 것인, 자연살해세포 배양방법.

[청구항 8] 제 7항에 있어서, 상기 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열은 서열번호 6으로 표시되는 염기서열인, 자연살해세포 배양방법.

[청구항 9] 제 2항에 있어서, 상기 mTNF-α 유전자는 서열번호 8로 표시되는 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열인 것인, 자연살해세포 배양방법.

[청구항 10] 제 9항에 있어서, 상기 서열번호 8로 표시되는 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열은 서열번호 9로 표시되는 염기서열인, 자연살해세포 배양방법.

[청구항 11] 제 2항에 있어서, 상기 유전자는 재조합 렌티 바이러스를 통해 도입된 것인, 자연살해세포 배양방법.

[청구항 12] 제 1항에 있어서, 상기 CD4+ T세포는 4-1BBL 유전자 또는 mbIL-21 유전자가 발현되는 것인, 자연살해세포 배양방법.

[청구항 13] 제 1항에 있어서, 상기 CD4+ T세포는 4-1BBL 유전자 및 mbIL-21 유전자가 발현되는 것인, 자연살해세포 배양방법.

[청구항 14] 제 1항에 있어서, 상기 CD4+ T세포는 4-1BBL 유전자, mbIL-21 유전자 및 mTNF-α 유전자가 발현되는 것인, 자연살해세포 배양방법.

[청구항 15] 제 1항에 있어서, 상기 CD4+ T세포는 4-1BBL 유전자, mbIL-21 유전자, OX40L 유전자 및 mTNF-α 유전자가 발현되는 것인, 자연살해세포 배양방법.

[청구항 16] 제 1항에 있어서, 상기 CD4+ T세포가 Hut78, H9, Jurkat, Loucy, Molt-3,

Molt-13, Peer, RPMI8402 및 TALL-01 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는, 자연살해세포 배양방법.

[청구항 17] 제 1항에 있어서, 상기 원료세포는 제대혈(cord blood) 유래 단핵세포인 것을 특징으로 하는, 자연살해세포 배양방법.

[청구항 18] 제 1항에 있어서, 상기 원료세포는 CD3(+) 세포가 제거된 세포인 것을 특징으로 하는, 자연살해세포 배양방법.

[청구항 19] 제 1항에 있어서, 형질전환된 CD4+ T세포와 원료세포의 비율을 0.1:1 내지 50:1로 혼합하여 배양하는 것을 특징으로 하는, 자연살해세포 배양방법.

[청구항 20] 제 1항에 있어서, 상기 원료세포는 지지세포와 1회 혼합하여 5일 내지 60일간 배양하거나, 지지세포와 2회 이상 혼합하여 60일 이상 배양하는 것을 특징으로 하는, 자연살해세포의 배양방법.

[청구항 21] 제 1항에 있어서, 항-CD3 항체 및 인터루킨 단백질이 함유된 배지에서 배양하는 것을 특징으로 하는, 자연살해세포 배양방법.

[청구항 22] 제 21항에 있어서, 상기 항-CD3 항체는 OKT3, UCHT1 및 HIT3a로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 것을 특징으로 하는, 자연살해세포 배양방법.

[청구항 23] 제 21항에 있어서, 상기 인터루킨 단백질은 IL-2, IL-12, IL-15, IL-18 및 IL-21로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 것을 특징으로 하는, 자연살해세포 배양방법.

[청구항 24] 제1항의 자연살해세포 배양방법에 의해 제조된 자연살해세포.

[청구항 25] 형질전환된 CD4+ T세포를 유효성분으로 포함하는 자연살해세포 배양용 조성물.

[청구항 26] 제 25항에 있어서,
상기 형질전환된 CD4+ T세포는 4-1BBL 유전자, mbIL-21 유전자, OX40L 유전자 및 mTNF-α 유전자로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 유전자가 발현되는 것인, 조성물.