

기관고유연구사업 결과보고서

편집순서 1 : 겉표지 (앞면)

(과제번호 : 0710890-1)

생체암치료기술개발을 위한 GMP 시설 기반구축

Establishment of GMP facility to generate biological
therapeutics for clinical trials

과제책임자 : 이 진 수

국 립 암 셴 터

편집순서 1 : 겉표지 (측면, 뒷면)

(뒷면)

(측면)

<div data-bbox="252 1140 1123 1704"><ol style="list-style-type: none">1. 이 보고서는 국립암센터 기관고유연구사업 결과보고서입니다.2. 이 보고서 내용을 인용할 때에는 반드시 국립암센터 연구사업 결과임을 밝혀야 합니다.<p>(14 pont, 고딕체)</p></div>	<p>↑ 5cm ↓ 생체암치료기술개발을 위한 GMP 시설 기반구축 국립암센터 ↑ 3cm ↓</p>
---	--

↑
6cm
↓

제 출 문

국립암센터 원장 귀하

이 보고서를 기관고유연구사업 “생체암치료기술개발을 위한 GMP 시설 기반구축” 과제의 결과보고서로 제출합니다.

2008. 1. 8.

국립암센터

과제책임자 : 이진수

연구원 : 최범규

” :

” :

제1세부과제명(과제책임자) :

제2세부과제명(과제책임자) :

.

.

.

참여기업명 :

목 차

< 요약 문 >

(한글)

(영문)

1. 연구사업의 최종목표
2. 연구사업의 내용 및 결과
3. 연구결과 고찰 및 결론
4. 연구성과 및 목표달성도
5. 연구결과의 활용계획
6. 참고문헌
7. 첨부서류

※ 여러개의 세부과제로 과제가 구성된 경우 위 목차와 동일하게 세부과제별로 작성함

(I. 총괄과제, II. 제1세부과제, III. 제2세부과제.....)

< 요약 문 >

연구분야(코드)		과제번호	0710890-1
과제명	생체암치료기술개발을 위한 GMP 시설 기반구축		
연구기간/연구비 (천원)	합계	년 월 일 ~ 년 월 일	220,000
	1차년도	2007년 9월 1일 ~ 2009년 8월 31일	220,000
	2차년도	년 월 일 ~ 년 월 일	
	3차년도	년 월 일 ~ 년 월 일	
과제책임자	성명	이진수	주민등록번호
	전화번호	920-1601	전자우편
색인단어	국문	GMP, CD8 T, 암, 면역치료제	
	영문	GMP, CD8 T, tumor, immunotherapeutics	

◆ 연구목표

<최종목표>

항원 특이적 CD8 T 세포를 이용한 암세포 치료제 개발 및 임상실험

<당해연도목표>

1. GMP 시설 구축
2. 면역억제기능 제거를 통한 항암효과 증진기작 규명

◆ 연구내용 및 방법

1. GMP 시설 기반 구축

치료용 항암 CTL 세포를 생산하기 위한 GMP 시설 구축의 준비 작업을 수행함. GMP 시설을 위한 공간 및 인력 총원 계획을 확립함. GMP 시설을 위한 준비 위원회를 결성하고 개념 설계 및 시공자 선정의 계획을 확립함. 새로이 발족한 면역/세포 치료과를 위한 기기 및 소모품 발주를 완료함. Korea-Japan Translational Research Conference를 12월 1일 본 국립 암센터에서 개최.

2. 면역억제기전 제거를 통한 CD8 T 항암효과 증진기작 연구

본 연구는 환자로 부터 분리한 면역세포 중 시험관내에서 항원 특이적 CD8 T 세포 (CTL) 를 대량 생산하여 암환자에게 투여함으로써 항암반응을 증진시켜 암을 치료하는 것을 목표로 함. 자가 유래 CD8 T 세포를 이용한 암 치료 방법은 오랜 역사를 가진 연구 분야이며, 암 항원 특이적 CD8 T 세포를 형성하기 위한 다양한 방법들이 연구됨. 특히 오랜 임상실험을 통해 안전한 면역치료방법임이 증명되어 왔으며, 최근에는 CD8 T 세포치료법을 임상적용시 가장 문제가 되었던 투여된 CTL 세포의 생체내 증식을 강력하게 유도할 수 있는 방법들이 알려짐. 따라서 최근 CTL 세포치료은 다양한 adoptive cell therapy 중 가장 안전하며 효과적인 암치료법으로 증명되었음.

최근의 연구보고들은 암세포가 증식하는 과정에서 다양한 방법을 통해 면역반응을 억제함을 보고. 이로 인해 암치료를 위해 사용하는 면역세포들은 환자의 몸속에서 충분히 역할을 하지 못하는 경우가 발생하며, 특히 이미 암 조직이 넓게 형성된 암환자에게 시험관내에서 증식시킨 CTL을 대량 투여할 경우, 이들은 충분한 항암반응을 유도하지 못하는 경우가 발생하게 됨.

암세포 증식에 따른 항암 면역반응 억제현상에 관한 집중적인 연구를 통해, 암세포에 의한 면역억제 기전과 CTL 치료법이 생체 내에서 낮은 효율을 나타내는 원인이 밝혀졌음. 암세포는 증식과정동안 면역 억제를 유발하는 CD4+CD25+ regulatory T 세포 (Treg)를 암 조직내에 선택적으로 축적시키며, 또한 tumor draining lymph node (TDLN)내에 indoleamine

2,3-dioxygenase (IDO)를 발현하는 수지상세포를 증가시켜 항암 T 세포반응을 억제. 따라서 암 조직이 형성된 환자는 항암반응을 유도가 저해됨. 이러한 암 조직에 의한 면역억제기전을 제거할 경우, CTL 세포치료의 효율증대를 규명할 필요가 있음.

따라서 본 연구에서는 암세포에 의한 면역억제기전을 제거할 수 있는 방법을 연구하였으며, 그 결과로 anti-CD4 항체를 이용하여 CD4 양성인 세포를 제거함으로써 CD4를 발현하는 Treg 및 IDO를 발현하는 수지상세포의 대부분을 제거할 수 있으며, 이를 통해 항암 면역반응을 증진시킬 수 있음을 연구하였음. 또한 CD4 T 세포 제거를 통해 부분적인 lymphopenia를 유도함으로써 항원 특이적 CD8 T 세포의 증식을 더욱 증가시켜 항암 면역반응을 유도할 수 있음을 증명. 따라서 anti-CD4 항체와 함께 CD8 T 세포의 반응을 선택적으로 유도할 수 있는 anti-4-1BB 항체로 암을 복합치료 함으로써, 암세포에 의한 면역억제기전을 극복할 경우 CD8 T 세포에 의한 항암반응을 극대화 할 수 있음을 증명하였음.

본 연구결과는 암세포에 의한 면역억제기전의 제거 및 lymphopenia를 유발함이 CTL 세포 치료 효과를 증가시킴을 증명함.

연구방법

- 1. 암 모델 및 항체치료:** 쥐에 4×10^5 B16F10 흑색종을 등 중앙 부위에 피하주사. 쥐에게 암 세포를 주사함과 동시에 $100 \mu\text{g}$ 의 항 4-1BB 단일 항체 (3E1) 그리고/또는 $400 \mu\text{g}$ 의 anti-CD4 단일 항체 (GK1.5)를 5일마다 복강주사. 각 시간대 별로 암의 성장을 관찰하고 암의 크기를 각 그룹에서 측정. 자연 치료에서 항암 효과를 보기 위해서는 암의 지름이 3-5mm가 되었을 때부터 위와 같은 항체를 가지고 치료.
- 2. 세포 증식의 분석:** 생체내에서 세포의 증식을 측정하기 위해서, 암이 투여된 생쥐는 1mg BrdU (BD biosciences)를 가지고 복강 주사. BrdU를 주사한 뒤 1 시간 쯤 암 조직 근처의 림프절 (Inguinal lymph nodes)를 분리하고, 세포들은 PE-anti-CD4, -항 CD8, 또는 -항 B220 단독, 또는 PE-항 CD11c 그리고 PE-Cy5-항 CD8으로 표면을 염색.
- 3. 유세포 분석:** 단일 세포 현탁액은 암 조직 근처의 림프절과 암 조직에서 분리되었다. 이러한 세포들은 표면 분자에 특이적인 항체를 가지고 염색되었다. 이렇게 준비된 시료들은 유세포 분석기 (Becton-Dickinson)를 사용하여 표면 분자 표현형을 분석되었다.
- 4. CD107 이동 분석 (CD107 mobilization assay):** EL4 세포는 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 암에 관련된 펩티드 gp100, TRP2, Tyrosinase, 그리고 Mage로 자극 및 표지. 작용세포는 쥐의 암세포 근처의 림프절로부터 준비. 사용된 작용세포와 표적세포의 비율은 일반적으로 1:2 이며, 이때 작용세포는 2×10^6 세포. 각 well에 2mM monensin (Sigma)을 $1 \mu\text{l}$, target cells을 $100 \mu\text{l}$, effector cells을 $100 \mu\text{l}$, CD107a 항체를 $1 \mu\text{l}$ 씩 첨가. 이 세포들은 multichannel pipette으로 혼합되었으며, plate를 300g로 1분 동안 원심분리한 후 세포들을 가라앉혀서 37°C 에서 5시간동안 배양. 배양 후에 plate를 500g로 원심분리 되어졌으며, 상층 액은 제거되었다. 시료들을 PE-항 CD11c와 PE-Cy5-항 CD8으로 염색한 뒤 유세포 분석기로 분석하였다.

◆ 연구성과

<당해연도 성과>

-정량적 성과

구분	달성치/목표치 ¹⁾	달성도(%)
SCI 논문 편수	1/1	100
IF 합	7.6/8	95

<차기년도 목표 연구성과>

-정량적 성과¹⁾

SCI 논문 편수 ²⁾	IF 합 ²⁾	기타 성과 ³⁾
8	60	

◆ 참여연구원

(최종연도 참여인원)	성 명	최범규
		주민등록번호

※ 요약문의 총분량은 2page 이내로 제한함

Project Summary

Title of Project	Establishment of GMP facility to generate biological therapeutics for clinical trials
Key Words	GMP, CD8 T, tumor, immunotherapeutics
Project Leader	
Associated Company	
<p>◆ Research purpose <Final goal of current research> Development of anti-cancer immunotherapeutics using antigen-specific CD8 T cells and its clinical application.</p> <p><Specific aims of 2007> 1. Establishment of GMP facility 2. Enhancement of anti-cancer immunity by removing tumor-mediated immune suppression</p> <p>◆ Results 1. Establishment of GMP facility - Form a committee and draw up the plan to establish GMP facility including space, man power, and design of GMP facility. - Place an order the equipments and basic supplies. - Korea-Japan Translational Research Conference on Dec. 1, 2007.</p> <p>2. Enhancement of anti-cancer immunity by removing tumor-mediated immune suppression Immunotherapy is an approach to treating intractable diseases such as tumors, autoimmune diseases, transplantation rejection, and chronic infections by enhancing, suppressing, or modifying the immune system. Immunotherapy of cancer patient with antigen-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) have been tested in clinic for several decades, but the therapeutic effects was not sufficient to completely treat the cancer patients. Recent reports suggest that tumor cells actively induces the suppression of tumor-specific immune responses by massively increasing infiltration of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in tumor tissue and indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO)-expressing DCs in tumor-draining lymph nodes. We describe here the therapeutic effect of an agonistic anti-4-1BB in combination with a depleting anti-CD4 monoclonal antibody (mAb) in a B16-F10 melanoma model. We found that anti-4-1BB treatment resulted in the polyclonal expansion and differentiation of CD8⁺ T cells into effective tumor killers. CD4⁺ T-cell depletion facilitated the infiltration of immune cells into the tumors and removed regulatory barriers</p>	

such as T regulatory (Treg) and IDO+ dendritic cells. Both mAbs contributed to creating a CD8+ T-susceptible tumor microenvironment by inducing class I molecules on the surface of the melanoma cells. These results indicate that the combination of the two mAbs, agonistic anti-4-1BB and depleting anti-CD4, results in enhanced production of efficient tumor-killing CTLs, facilitation of their infiltration, and production of a susceptible tumor microenvironment.

Taken together, these results suggest that the removal of tumor-mediated suppressive barriers and induction of transient lymphopenia would enhance the anti-tumor immunity of adoptively transferred CTLs in tumor patient.

3. 연구방법

Treatments. Mice were challenged s.c. on the back with 4×10^5 B16-F10 melanoma cells. For preventative therapy, mice were injected i.p. with 100 μ g anti-4-1BB and/or 400 μ g anti-CD4 every 5 days. To deplete NK cells, tumor-bearing mice received 400 μ g anti-NK1.1 i.p. every 5 days. For NKG2D blocking, mice were given 500 μ g anti-NKG2D every 5 days. For assessing the antitumor effects of delayed therapy, mice were treated as described above when tumors were 3 to 5 mm in diameter.

Proliferation assay in vivo. Tumor-draining lymph nodes (TDLN) were harvested 1 h after injecting 1 mg BrdUrd into tumor-bearing mice. The cells were surface-stained with PE-conjugated anti-CD4, anti-CD8, or anti-B220 alone, or with PE-conjugated anti-CD11c and PE-Cy5-conjugated anti-CD8, and then fixed, permeabilized, and intracellularly stained with FITC-conjugated anti-BrdUrd (BD Bioscience).

Flow cytometry. Cells were incubated with the Fc blocker 2.4G2 for 10 min at 4°C and stained with specific antibodies to surface markers. The expression of MHC class I or IFN- γ R on B16-F10 melanoma were determined by staining with PE-conjugated anti-H-2Kb, H-2Db, or IFN- γ R as well as an FITC-conjugated anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD11c, anti-B220, anti-F4/80, anti-NK1.1, or anti-Gr-1. All samples were analyzed on a FACScalibur (BD Bioscience).

CD107 mobilization assay. CD107 mobilization was determined as described on TDLN-derived effector cells in the presence of tumor antigen-pulsed EL4 cells on propidium iodide (PI) day 15.

※ 연구사업의 목표, 연구방법, 연구성과를 영문으로 요약하여 2쪽이내의 분량으로 작성

편집순서 6 : 연구사업결과

1. 연구사업의 최종목표

<최종목표>

항원 특이적 CD8 T 세포를 이용한 암세포 치료제 개발 및 임상실험

<당해연도목표>

1. GMP 시설 구축
2. 면역 억제기능 제거를 통한 항암효과 증진기작 규명

2. 연구사업의 내용 및 결과

2-1. 연구수행방법

- 1) GMP 시설 구축

GMP 시설 구축 추진단을 중심으로 진행

- 2) 면역 억제기능 제거를 통한 항암효과 증진기작

1. 생쥐와 세포주

실험에 사용된 C57BL/6 생쥐는 6-8 주령으로써 Harlan Laboratories (Indianapolis, IN) 에서 구입되었다. B16F10 흑색종 암세포는 10% FBS (Gibco BRL, Grand Island, NY)와 2mM L-glutamine 그리고 100U/ml penicillin, 100µg/ml streptomycin이 포함된 DMEM 배양액을 배양 되어 졌다.

2. 항체 투여

쥐에 4×10^5 B16F10을 등 중앙 부위에 피하주사 하였다. 쥐에게 암 세포를 주사함과 동시에 100µg의 항 4-1BB 단일 항체 (3E1) 그리고/또는 400µg의 anti-CD4 단일 항체 (GK1.5)를 5일마다 복강주사 하였다. 500µg의 항 CD25 단일항체 (PC61.5.3)는 암을 투여하기 4일 전에 한번 주사하였다. 그리고 각 시간대 별로 암의 성장을 관찰하고 암의 크기를 각 그룹에서 측정하였다. 지연 치료에서 항암 효과를 보기 위해서는 암의 지름이 3-5mm가 되었을 때부터 위와 같은 항체를 가지고 치료하였다.

3. 암조직 침윤 세포 (TIL; tumor infiltrating lymphocytes) 분리

TILs을 분리하기 위해서는, 먼저 출혈에 의해 암 조직에 세포들이 오염되는 것을 막기 위해 생쥐로부터 완전히 피를 제거하였다. 그런 후에 암 조직이 분리되었고, PBS로 세척하고 작은 조각으로 잘라져 2% fetal calf serum과 1.5mg/ml의 collagenase D (collagenase D solution)가 포함된 DMEM 배양액에 넣어서 37°C shaking 배양기에서 40분 동안 반응되었다. 40분 후에 세포 현탁액은 36와 63% Percoll의 상층에 올려진 후 상온에서 400g로 45분 동안 원심분리를 되었다. 암 조직으로 침윤하는 세포들은 36와 63% Percoll의 경계면으로부터 회수되어 졌고, 세척 후 유세포 분석기로 분석되어졌다. 그런 다음 CD8⁺ T 세포의 분리는 MACS system (Miltenyi Biotech)를 사용하여 정제되었다.

4. 세포 증식의 분석

생체내에서 세포의 증식을 측정하기 위해서, 암이 투여된 생쥐는 1mg BrdU (BD biosciences)를 가지고 복강 주사 (intraperitoneally) 되었다. BrdU를 주사한 뒤 1 시간 쯤 암 조직 근처의 림프절 (Inguinal lymph nodes)를 분리하고, 세포들은 PE-anti-CD4, -항 CD8, 또는 -항 B220 단독, 또는 PE-항 CD11c 그리고 PE-Cy5-항 CD8으로 표면을 염색하였다. 표면이 염색된 세포들은 고정, 투과 과정 후 제품 설명에 따라서 (BD bioscience) FITC-항 BrdU로 세포내 염색되었다.

2-2. 연구결과

2-2-1. GMP 시설 기반 구축

치료용 항암 CTL 세포를 생산하기 위한 GMP 시설 구축의 준비 작업을 수행함. GMP 시설을 위한 공간 및 인력 총원 계획을 확립함. GMP 시설을 위한 준비 위원회를 결성하고 개념 설계 및 시공자 선정의 계획을 확립함. 새로이 발족한 면역/세포 치료과를 위한 기기 및 소모품 발주를 완료함. Korea-Japan Translational Research Conference를 12월 1일 본 국립 암센터에서 개최.

2-2-2. 면역억제기전 제거를 통한 CD8 T 항암효과 증진기작 연구

1. 항진성 anti-4-1BB와 제거용 anti-CD4 단클론 항체의 조합은 공동 상승적으로 항암 면역반응을 증진.

제거용 anti-CD4 단클론 항체는 암 조직 내부에 침윤하는 CD4⁺CD25⁺ 조절 T 세포를 제거함으로써 항암 반응을 증가시키고, 항진성 anti-4-1BB 단일 클론 항체는 CD8⁺ T 세포들의 반응을 높이는 것으로 알려져 있다. 따라서 우리는 B16-F10 흑색종 모델에서 항진성 anti-4-1BB 그리고/또는 제거용 anti-CD4 단일 클론 항체의 항암면역 효과를 시험하였다. C57BL/6 생쥐의 등쪽 정중양에 50 μ l 의 4 x 10⁵ B16-F10 흑색종을 피하 주사하였으며, 0, 5, 10, 15 그리고 20 일에 100 μ g의 anti-4-1BB 그리고/또는 400 μ g의 anti-CD4 단일 클론 항체를 복강 주사하였다. 예방효과를 보기위한 단일 클론 항체의 초기치료에서, anti-4-1BB 또는 anti-CD4 단클론 항체의 단독투여는 암의 성장이 부분적으로 억제되었고, 생쥐의 생존 비율도 대조군에 비하여 연장되었다 (그림. 1A). 단독 투여된 생쥐에 비하여, anti-4-1BB와 함께 anti-CD4 단클론 항체를 함께 처리하였을 때 암의 성장이 성공적으로 억제되었을 뿐만 아니라, 생존 비율도 월등히 증가되었다 (그림. 1A). 이러한 생쥐는 B16-F10 흑색종의 투여 후 50일 이상 생존 하였으며, 암의 성장이 지속적으로 억제되었다. 또한 치료효과를 보기위해, 생쥐의 암의 크기가 직경에서 2-3mm인 암세포 투여 후 6일 쯤부터 5일 간격으로 100 μ g의 anti-4-1BB 그리고/또는 400 μ g의 anti-CD4 단클론 항체를 복강 주사하였다. Anti-4-1BB 또는 anti-CD4 단클론 항체의 단독 투여는 부분적인 암 증식 억제 및 약간의 생존을 증가만을 유발하였으며, anti-4-1BB 보다 anti-CD4의 투여가 좀더 효과적인 것으로 관찰되었다 (그림. 1B). Anti-4-1BB와 anti-CD4 단클론 항체를 함께 처리한 경우, 단독투여에 비해 암 세포 증식이 우수하게 억제되었을 뿐만 아니라, 생존 비율도 역시 유의적으로 증가되었다 (그림. 1B). 그러나 anti-4-1BB와 anti-CD4 단클론 항체를 함께 처리한 경우에도 완전한 B16-F10 melanoma의 성장 억제나 그로 인한 생쥐의 죽음은 막을 수 없었다. 초기치료(예방효과) 시에는 70일에서 80까지 생쥐가 생존하였으며, 지연치료(치료효과) 시에는 55일에서 60일 까지 생존하였다 (data not shown).

CD8⁺ T 세포는 성공적인 항암 치료에 필수적이기 때문에, 우리는 먼저 anti-4-1BB 그리고/또는 anti-CD4 단클론 항체가 처리된 생쥐에서 CD8⁺ T 세포의 증식을 측정하였다. 실험을 위해, B16-F10 흑색종이 투여된 C57BL/6 생쥐에 anti-4-1BB 그리고/또는 anti-CD4 단클론 항체

를 복강주사 하였으며, 암세포 주사 후 10일 째 1mg BrdU를 생쥐에 주사함으로써 출수림프절 (DLN) 세포의 증식을 측정하였다. 그림. 1C의 결과 처럼, rat IgG를 처리한 생쥐 (대조군)에서는 CD8⁺, CD4⁺ 그리고 B220⁺ B 세포의 증식이 극소수로 확인되었고, 이에 반에 anti-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. Anti-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. Anti-4-1BB와 anti-CD4 단클론 항체를 함께 처리했을 때 CD8⁺ T 세포 (9.7±2.3%)의 증식이 강하게 유도 되었으며, 그 양은 anti-4-1BB 항체 처리 보다 5배 그리고 anti-CD4 항체 처리 때 보다 4배 더 높은 비율이었다.

이미 우리는 anti-4-1BB 단클론 항체 투여시 항원 특이적이며 4-1BB 의존적으로 CD8⁺ T 세포로부터 CD11c⁺CD8⁺ T 세포가 분화될 수 있음을 보고 하였다. 따라서 anti-4-1BB 항체 투여에 의해 증식하는 CD8⁺ T 세포가 CD11c⁺CD8⁺ T 세포인지 확인하였다. BrdU로 표지된 출수림프절 세포를 anti-CD11c, CD8aa⁺ DCs를 배제하기 위해 anti-CD8b, 그리고 anti-BrdU 로 염색한 후, CD11c⁻CD8⁺ T와 CD11c⁺CD8⁺ T 세포는 유세포 분석기의 dot plot 상에서 CD8 대 CD11c로 각각 분리되어져 각 세포군에서 증식하는 세포가 얼마나 되는지 측정되었다. CD11c⁺CD8⁺ T 세포의 증식은 anti-4-1BB 의존적으로 그리고 anti-CD4 단일클론 항체의 추가에 의해 증가되었다 (그림. 1D).

이러한 결과들은 anti-4-1BB와 anti-CD4 단일클론 항체의 조합이 CD8⁺ T 세포의 강력한 증식을 통해 항암 면역반응을 공동 상승적으로 유도한다는 것을 보여준다. Anti-4-1BB 항체에 의한 CD8⁺ T 세포 반응의 증진효과는 anti-CD4 항체를 조합함으로써 더욱 강화될 수 있으며, 결과적으로 다량의 CD11c⁺CD8⁺ T 세포 분화를 유도한다. 또한 anti-4-1BB와 anti-CD4 항체의 복합 투여에 의해 CD11c⁺CD8⁺ T 세포가 다량 증식된 되는 결과는, anti-4-1BB 항체가 CD8⁺ T 세포의 분화에 필요한 CD4⁺ T 세포의 도움 기능을 대신할 수 있다는 것을 증명한다.

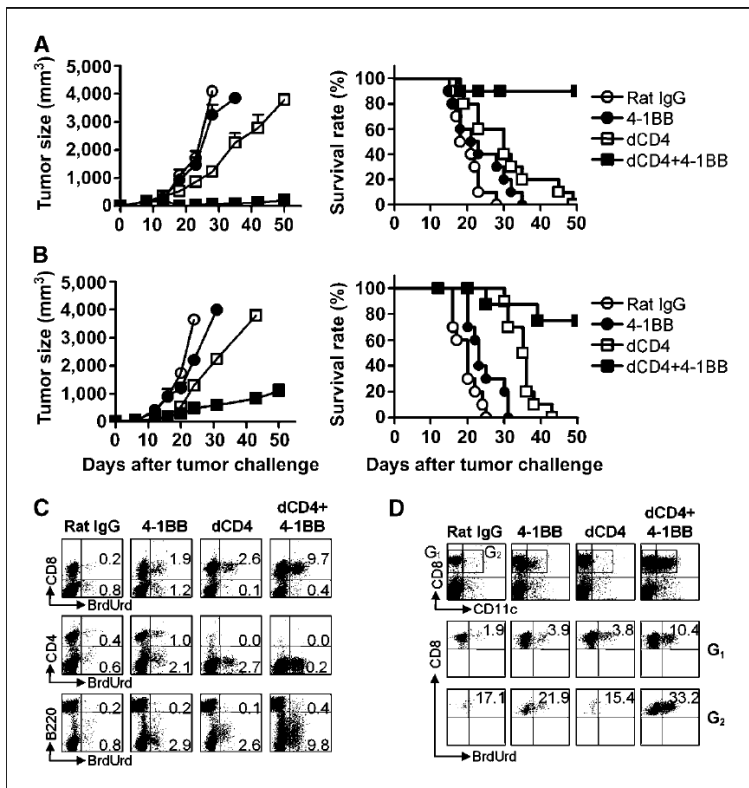


Figure 1. Antitumor effects of combined therapy with anti-4-1BB and anti-CD4 mAb. C57BL/6 mice were challenged s.c. on the back with 4×10^5 B16-F10 melanoma cells. The mice were also injected i.p. with 100 μ g anti-4-1BB (3E1) and/or 400 μ g anti-CD4 (GK1.5), or 100 μ g rat IgG as a control, five times every 5 d (A). For delayed therapy, B16-F10 melanoma-bearing mice were treated in the same way starting on PI day 6 when the tumors were 3 to 5 mm in diameter (B). They were monitored every day, and tumor volume and survival were measured as described above. To assess BrdUrd incorporation *in vivo*, the mice were i.p. injected with 1 mg BrdUrd on PI day 12. One hour after the BrdUrd labeling, TDLN cells were harvested and surface-stained with PE-conjugated anti-CD8, anti-CD4, or anti-B220 mAb, and then stained intracellularly with FITC-conjugated BrdUrd mAb (BD Bioscience; C). For detailed analysis of BrdUrd incorporation into the CD8⁺ T cells, TDLN cells were surface-stained with PE-conjugated anti-CD11c and PE-Cy5-conjugated anti-CD8 mAbs. Following intracellular staining of BrdUrd, CD11c⁻CD8⁺ T, and CD11c⁺CD8⁺ T cells were separately analyzed by gating on a CD8 versus CD11c dot plot (D). Points, means ($n = 10$ mice per group in A and B and $n = 5$ mice per group in C and D); bars, SD. The results are representative of five independent experiments.

2-2. Anti-4-1BB와 anti-CD4 항체의 조합에 의한 암 항원에 대한 CTL 숫자의 증가

Anti-4-1BB와 anti-CD4 항체가 투여된 생쥐에서 암증식의 억제와 CD11c⁺CD8⁺ T 세포의 증식이 비례 관계에 있음을 발견하였기 때문에, anti-4-1BB와 anti-CD4 항체의 투여시 공동 상승적으로 암 항원들에 특이적인 세포용해성 CD8⁺ T 세포 (CTL) 숫자를 증가 시킬 것으로 예상하였다. 이를 검증하기 위해, gp100, tyrosinase-related protein 2 (TRP2), tyrosinase, 그리고 melanoma-associated Ag A1 (MAGE-A1)와 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 측정함으로써 결정되었다. Anti-4-1BB 그리고/또는 anti-CD4 항체가 투여된 생쥐로부터 15일 째 출수림프절 세포를 준비한 후, gp100, TRP2, tyrosinase, 또는 MAGE-A1의 펩티드로 표지된 EL-4 세포와 2 : 1의 비율로 모넨신 (monensin), 항 LAMP-1과 함께 5시간 동안 배양되었다. 유세포 분석 결과 CD107a를 발현하는 세포는 rat IgG 처리된 생쥐의 CD8⁺ T 세포의 표면에서 거의 발견되지 않았으며, anti-4-1BB 또는 anti-CD4 투여된 생쥐의 CD8⁺ T 에서는 1%미만으로 측정되었다 (그림. 2A). 그러나 anti-4-1BB와 함께 anti-CD4를 투여한 생쥐에서는 전체 세포 중에 5% 이상이 CD107a⁺CD8⁺ T 세포였다. Anti-4-1BB와 함께 anti-CD4 처리된 생쥐에서 CD8⁺ T 세포 중 CD107a⁺ 세포는 4가지 다른 암 항원에 대해 모두 약 10% 정도였다 (그림. 2A 및 2B).

출수림프절에서 각 암 항원에 대해 특이적인 CTL 숫자는 살아있는 전체 세포 숫자에 유세포 분석기의 분석에 의한 퍼센트를 곱함으로써 결정되어 졌다 (그림. 2C). Anti-4-1BB 또는 anti-CD4 투여된 생쥐는 rat IgG 처리된 생쥐에 비해 항원 특이적인 CTL 숫자에서 3-10배 더 높게 나타났다. 반면에 anti-4-1BB와 anti-CD4가 함께 처리된 생쥐에서는 모든 암 항원에 대해 CTL의 수가 40배 이상 증가된 것으로 나타났다. 또한 anti-4-1BB 항체에 의해 특이적으로 형성되는 CD11c⁺CD8⁺ T 세포들이 항원 특이적 CTL의 대부분을 차지하였다 (그림 2D). 이러한 결과들은 anti-4-1BB와 anti-CD4 항체의 복합투여에 항암효과는 CD11c를 발현하는 암세포 특이적인 CD8⁺ T 세포의 증가를 통해서 매개 된다는 것을 입증한다.

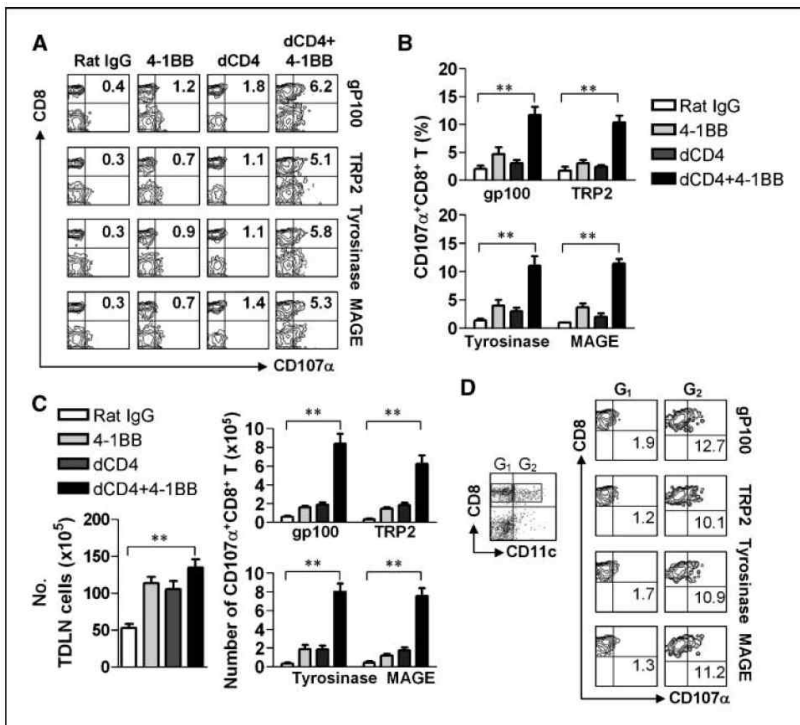


Figure 2. Combination therapy results in polyclonal expansion of tumor-specific CTL. Tumor-bearing mice were treated with antibodies as described above. TDLN cells were cocultured with EL4 cells pulsed with each peptide (gp100, TRP2, tyrosinase, and MAGE) at a 2:1 ratio in the presence of 3 μmol/L monensin and 1 μg CD107α (anti-LAMP-1) mAb for 5 h. Cell-to-cell conjugates were disrupted by washing the cells with PBS with 0.02% azide and 0.5 mmol/L EDTA. CD107α-positive cells were detected by staining the cells with anti-rat IgG-FITC as well as PE-conjugated anti-CD11c and PE-Cy5-conjugated anti-CD8 mAbs. All samples were subsequently analyzed by FACS. A, representative data acquired by flow cytometry. B, average percentage of CD107α-positive cells among the CD8⁺ T cells in three independent experiments. C, absolute number of CD107α⁺CD8⁺ T cells calculated from (B). D, CD107α-positive cells among the CD11c⁺CD8⁺ and CD11c⁺CD8⁻ T cells from the anti-4-1BB plus anti-CD4-treated group. Columns and points, means (n = 10 mice per group); *, P < 0.05; **, P < 0.01; bars, SD. Results are representative of three independent experiments.

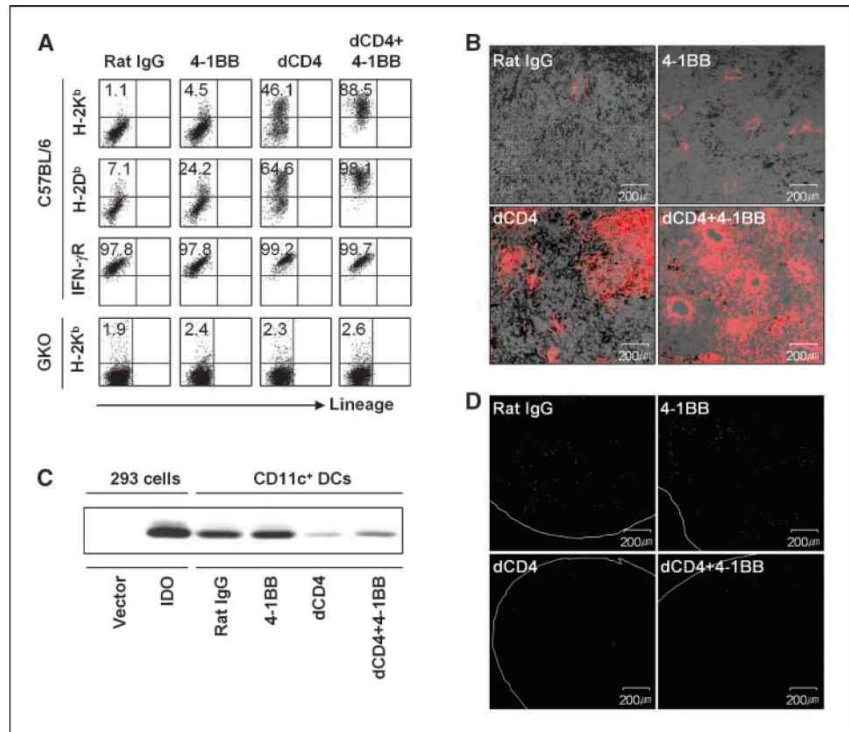
2-3. 제거용 anti-CD4 단클론 항체에 의한 CD4⁺CD25⁺ 조절 T 세포 및IDO 발현 수지상 세포의 제거

Anti-CD4 항체를 이용한 CD4⁺ 세포의 제거는 암에 침윤하는 CD4⁺CD25⁺ 조절 T 세포의 제거함으로써 암 항원에 대해 증가된 반응을 야기하는 것으로 알려져 있다. 그러나 그 이외의 효과에 대해서는 알려진 것이 없다. 본 연구결과에서 나타난 anti-4-1BB 및 anti-CD4에 의한 암치료효과는 CD8 T 세포에 의해 대부분 매개된다. 따라서 암항원 특이적 CD8 T 세포가 암세포를 제거하기 위해서는 암세포 상에 MHC class I의 발현이 증가되어야만 한다. 각각의 실험 군으로부터 분리한 암조직 내의 B16-F10 흑색종의 MHC class I 발현수준을 조사한 결과, anti-CD4 또는 복합 투여시 MHC class I의 발현이 증가한 것으로 조사되었다 (그림 3A 및 3B).

또한 암세포에 의한 항암면역반응 억제기전에 관여하는 것으로 알려진 IDO 발현 수지상 세포를 조사하였다. 각 실험군의 tumor draining lymph node (TDLN)로부터 CD11c⁺ 수지상세포를 분리하여 IDO의 발현을 western blot으로 조사하였다. 그 결과 anti-CD4 항체 투여시 수지상세포내 IDO의 발현이 대부분 감소하는 것으로 나타났으며, anti-4-1BB 항체를 투여하여도 IDO의 발현양을 큰 변화를 나타내지 않았다 (그림 3C). IDO를 발현하는 세포의 수를 TDLN의 조직절편을 염색하여 관찰한 경우에도 IDO를 발현하는 세포의 수가 anti-CD4 항체 투여시 감소하였으며, anti-4-1BB 항체를 공동투여하여도 크게 변화하지 않았다 (그림 3D).

이러한 결과들은 anti-CD4 항체 투여시 Treg 뿐 아니라 IDO를 발현하는 CD4⁺ 수지상세포를 함께 제거함으로써 암세포에 의한 면역억제기전을 제거할 수 있으며, 그 결과로 암세포 특이적인 CD8 T 세포의 활성을 촉진할 수 있음을 증명한다.

Figure 3. Combined therapy alters the tumor microenvironment to be susceptible to CD8⁺ T cells. Tumor-bearing C57BL/6 or IFN- γ -deficient (GKO) mice were treated with 100 μ g anti-4-1BB and/or 400 μ g anti-CD4 mAb, and rat IgG as a control, on PI days 0, 5, and 10. **A**, tumor tissues were collected from each group of mice on PI day 15 and stained with FITC-conjugated lineage marker along with PE-conjugated anti-H-2D^b, H-2K^b, or IFN- γ R. **B**, frozen sections (5 μ m thickness) of tumor tissue were prepared from each group of mice on PI day 15 and stained with PE-conjugated anti-H-2K^b mAb. **C**, TDLNs was collected from the four groups of mice on PI day 15 and digested with 0.1% collagenase and 0.2 mg/mL DNase I for 30 min. Cells were incubated with Thy1.2 microbeads and loaded on a column to deplete T cells. CD11c⁺ dendritic cells were purified from the T cell-depleted TDLN cells using CD11c microbeads (Miltenyi Biotec), and Western blotting was done using 5 μ g of cell lysates and anti-mouse IDO mAb. **D**, frozen sections (5 μ m thickness) were prepared from TDLN on PI day 15 and stained with FITC-conjugated anti-IDO mAb after alcohol fixation. Sections were viewed and photographed using a laser-scanning confocal fluorescence microscope system (Fluoview FV500, original magnification, \times 10). *Points*, mean ($n = 5$ mice per group); *bars*, SD. All results are representative of three independent experiments.



3. 연구결과 고찰 및 결론

본 연구결과는 암세포에 의해 매개되는 면역억제기전을 제거하지 않으면 시험관내에서 생산된 CTL을 이용한 adoptive CTL therapy는 효과적으로 암세포를 제거할 수 없음을 증명함. 또한 암환자의 면역치료를 위해서는 최소한 세가지 조건 - 면역억제기전의 제거, 일시적 면역결핍, 암세포의 CTL 감수성 증가 -이 충족되어야만 기대수준의 항암효과를 얻을 수 있음을 시사함. 이 결과들은 최근 보고되고 있는 암세포에 의한 면역조절기전 과정과 일맥상통하며, 더 나아가 이 과정에 다양한 세포와 다양한 인자가 관여하고 있음을 증명함.

4. 연구성과 및 목표달성도

(1) 연구성과

가. 국내 및 국제 전문학술지 논문 게재 및 신청

논문명	저자 (저자구분)	저널명(I.F.)	Vol(No)Page	구분	과제 관련성
Mechanisms involved in synergistic anti-cancer immunity of anti-4-1BB and anti-CD4 therapy	최범규, 김영호, 강우진, 이선경, 김광휘, 신수미, Wayne M. Yokoyama, 김태윤, 권병세	Cancer Research (7.6)	67(18),8891	국외 SCI	상

※저자구분 : 교신, 제1, 공동

※구분 : 국내, 국내 SCI, 국내 SCIE, 국외, 국외SCI, 국외SCIE 등

※과제관련성 : 상(Acknowledgement 가 있는 경우), 중, 하

나. 국내 및 국제 학술대회 논문 발표

논문명	저자	학술대회명	지역	과제 관련성
Mechanisms involved in synergistic anti-cancer immunity of anti-4-1BB and anti-CD4 therapy	최범규, 김영호, 강우진, 이선경, 김광휘, 신수미, Wayne M. Yokoyama, 김태윤, 권병세	대한면역학회	국내	

※지역 : 국내, 국외

다. 산업재산권

구분	특허명	출원인	출원국	출원번호
발명특허				

라. 저서

저서명	저자	발행기관(발행국, 도시)	쪽수	Chapter 제목, 쪽수 (공저일 경우)

마. 연구성과의 정부정책 기여

보고서명	정부정책	기여내용

바. 기타연구성과

(2) 목표달성도

가. 연구목표의 달성도

최종목표	연차별목표		달성내용	달성도(%)	
				연차	최종
	1차년도	GMP 시설 구축	GMP 시설 구축을 위한 committee 구성 및 GMP 시설을 구축을 위한 개념설계, 인력확보방안 및 시공자 선정	1	100
		면역 억제기능 제거를 통한 항암효과 증진기작 규명	암세포에 의한 면역억제과정을 제거할 경우 항암효과가 극대화됨을 동물실험을 통해 증명.		
	2차년도				
	3차년도				

나. 평가의 착안점에 따른 목표달성도에 대한 자체평가

평가의 착안점	자 체 평 가

5. 연구결과의 활용계획

(1) 연구종료 2년후 예상 연구성과

구 분	건 수	비 고
학술지 논문 게재	4	
산업재산권 등록	2	
기 타		

(2) 연구성과의 활용계획

본 연구결과는 효과적인 항암 면역반응을 유도하기 위해서는 암세포에 의해 매개되는 면역억제기전을 제거해야함을 증명한다. 특히 항원 특이적 CD8 T 세포를 이용한 CTL therapy의 경우 생체내 증식을 및 면역기억 형성을 촉진하며, 암치료효과를 극대화하기 위해 일시적 면역결핍유도를 통해 암세포에 의해 형성되는 항암면역억제기전을 제거해야만 한다. 이러한 관점에서, 본 연구결과는 항암면역반응을 증가시키기 위한 세가지 필수조건 - 면역억제기전의 제거, 일시적 면역결핍, 암세포의 CTL 감수성 증가 - 을 증명한다.

6. 참고문헌

1. Pollok KE, Kim YJ, Zhou Z, et al. Inducible T cell antigen 4-1BB. Analysis of expression and function. *J Immunol* 1993;150:771-81.
2. Seo SK, Choi JH, Kim YH, et al. 4-1BB-mediated immunotherapy of rheumatoid arthritis. *Nat Med* 2004;10:1088-94.
3. Xu D, Gu P, Pan PY, Li Q, Sato AI, Chen SH. NK and CD8+ T cell-mediated eradication of poorly immunogenic B16-10 melanoma by the combined action of IL-12 gene therapy and 4-1BB costimulation. *Int J Cancer* 2004;109:499-506.
4. Ito F, Li Q, Shreiner AB, et al. Anti-CD137 monoclonal antibody administration augments the antitumor efficacy of dendritic cell-based vaccines. *Cancer Res* 2004;64:8411-9.
5. Kim JA, Averbook BJ, Chambers K, et al. Divergent effects of 4-1BB antibodies on antitumor immunity and on tumor-reactive T-cell generation. *Cancer Res* 2001;61:2031-7.
6. Ju SA, Lee SC, Kwon TH, et al. Immunity to melanoma mediated by 4-1BB is associated with enhanced activity of tumour-infiltrating lymphocytes. *Immunol Cell Biol* 2005;83:344-51.
7. Ho EL, Carayannopoulos LN, Poursine-Laurent J, et al. Costimulation of multiple NK cell activation receptors by NKG2D. *J Immunol* 2002;169:3667-75.
8. Rubio V, Stuge TB, Singh N, et al. Ex vivo identification, isolation and analysis of tumor-cytolytic T cells. *Nat Med* 2003;9:1377-82.
9. Freeman GJ, Sharpe AH, Kuchroo VK. Protect the killer: CTLs need defenses against the tumor. *Nat Med* 2002;8:787-9.
10. Brentjens RJ, Latouche JB, Santos E, et al. Eradication of systemic B-cell tumors by genetically targeted human T lymphocytes co-stimulated by CD80 and interleukin-15. *Nat Med* 2003;9:279-86.
11. Arens R, Schepers K, Nolte MA, et al. Tumor rejection induced by CD70-mediated quantitative and qualitative effects on effector CD8+ T cell formation. *J Exp Med* 2004;199:1595-605.
12. Voehringer D, Koschella M, Pircher H. Lack of proliferative capacity of human effector and memory T cells expressing killer cell lectin like receptor G1 (KLRG1). *Blood* 2002;100:3698-702.
13. Markiewicz MA, Carayannopoulos LN, Naidenko OV, et al. Costimulation through NKG2D enhances murine CD8+ CTL function: similarities and differences between NKG2D and

CD28 costimulation. *J Immunol* 2005;175:2825–33.

14. Yu P, Lee Y, Liu W, et al. Intratumor depletion of CD4⁺ cells unmasks tumor immunogenicity leading to the rejection of late-stage tumors. *J Exp Med* 2005;201:779–91.
15. Munn DH, Sharma MD, Hou D, et al. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes. *J Clin Invest* 2004;114:280–90.
16. Shortman K, Liu YJ. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* 2002;2:151–61.
17. Kai S, Goto S, Tahara K, et al. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase suppresses NK cell activity and accelerates tumor growth. *J Exp Ther Oncol* 2003;3:336–45.
18. Berner V, Liu H, Zhou Q, et al. IFN- γ mediates CD4⁺ T-cell loss and impairs secondary antitumor responses after successful initial immunotherapy. *Nat Med* 2007;13:354–60.
19. May KF, Jr., Chen L, Zheng P, Liu Y. Anti-4-1BB monoclonal antibody enhances rejection of large tumor burden by promoting survival but not clonal expansion of tumor-specific CD8⁺ T cells. *Cancer Res* 2002;62:3459–65.
20. Laderach D, Movassagh M, Johnson A, Mittler RS, Galy A. 4-1BB co-stimulation enhances human CD8(+) T cell priming by augmenting the proliferation and survival of effector CD8(+) T cells. *Int Immunol* 2002;14:1155–67.
21. Kim YH, Seo SK, Choi BK, et al. 4-1BB costimulation enhances HSV-1-specific CD8⁺ T cell responses by the induction of CD11c⁺CD8⁺ T cells. *Cell Immunol* 2005;238:76–86.
22. Choi BK, Asai T, Vinay DS, Kim YH, Kwon BS. 4-1BB-mediated amelioration of experimental autoimmune uveoretinitis is caused by indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent mechanisms. *Cytokine* 2006;34:233–42.
23. Wilcox RA, Flies DB, Zhu G, et al. Provision of antigen and CD137 signaling breaks immunological ignorance, promoting regression of poorly immunogenic tumors. *J Clin Invest* 2002;109:651–9.[Abstract/Free Full Text]
24. Tirapu I, Arina A, Mazzolini G, et al. Improving efficacy of interleukin-12-transfected dendritic cells injected into murine colon cancer with anti-CD137 monoclonal antibodies and alloantigens. *Int J Cancer* 2004;110:51–60.
25. Lin X, Zhou C, Wang S, et al. Enhanced antitumor effect against human telomerase reverse transcriptase (hTERT) by vaccination with chemotactic-hTERT gene-modified tumor cell and the combination with anti-4-1BB monoclonal antibodies. *Int J Cancer*

2006;119:1886-96.

26. Shi W, Siemann DW. Augmented antitumor effects of radiation therapy by 4-1BB antibody (BMS-469492) treatment. *Anticancer Res* 2006;26:3445-53.
27. Xu DP, Sauter BV, Huang TG, et al. The systemic administration of Ig-4-1BB ligand in combination with IL-12 gene transfer eradicates hepatic colon carcinoma. *Gene Ther* 2005;12:1526-33.
28. Ye Z, Hellstrom I, Hayden-Ledbetter M, et al. Gene therapy for cancer using single-chain Fv fragments specific for 4-1BB. *Nat Med* 2002;8:343-8.
29. Yang Y, Yang S, Ye Z, et al. Tumor cells expressing anti-CD137 scFv induce a tumor-destructive environment. *Cancer Res* 2007;67:2339-44.
30. Verneris MR, Karami M, Baker J, Jayaswal A, Negrin RS. Role of NKG2D signaling in the cytotoxicity of activated and expanded CD8+ T cells. *Blood* 2004;103:3065-72.
31. Maccalli C, Pende D, Castelli C, Mingari MC, Robbins PF, Parmiani G. NKG2D engagement of colorectal cancer-specific T cells strengthens TCR-mediated antigen stimulation and elicits TCR independent anti-tumor activity. *Eur J Immunol* 2003;33:2033-43.
32. Diefenbach A, Jensen ER, Jamieson AM, Raulet DH. Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity. *Nature* 2001;413:165-71.
33. Carayannopoulos LN, Naidenko OV, Fremont DH, Yokoyama WM. Cutting edge: murine UL16-binding protein-like transcript 1: a newly described transcript encoding a high-affinity ligand for murine NKG2D. *J Immunol* 2002;169:4079-83.
34. Rosenberg SA, Dudley ME. Cancer regression in patients with metastatic melanoma after the transfer of autologous antitumor lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:14639-45.
35. Dudley ME, Wunderlich JR, Yang JC, et al. Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 2005;23:2346-57.

7. 첨부서류

Choi BK, Kim YH, Kang WJ, Lee SK, Kim KH, Shin SM, Yokoyama WM, Kim TY, Kwon BS. **Mechanisms involved in synergistic anticancer immunity of anti-4-1BB and anti-CD4 therapy.** *Cancer Res.* 67:8891-9. 2007.