

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호

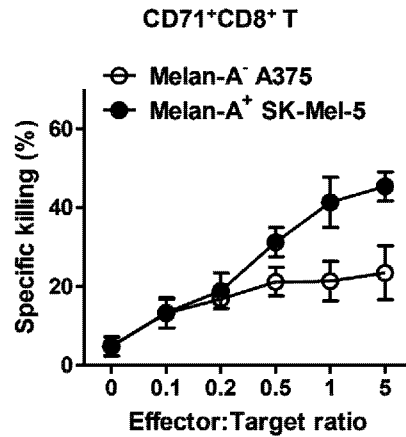
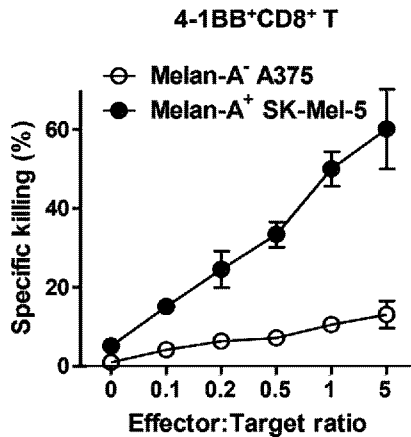
WO 2021/157993 A1

2021년 8월 12일 (12.08.2021) WIPO | PCT

- (51) 국제특허분류: *C12N 5/0783* (2010.01) *A61K 35/17* (2014.01)
C12N 5/0789 (2010.01) *A61P 35/00* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2021/001346
- (22) 국제출원일: 2021년 2월 2일 (02.02.2021)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2020-0012409 2020년 2월 3일 (03.02.2020) KR
- (71) 출원인: 삼다바이오텍 주식회사 (SAMDA BIOTEC CO., LTD) [KR/KR]; 10408 경기도 고양시 일산동구 일산로 323, 국립암센터 연구동 4층 9호(마두동), Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: 최범규 (CHOI, Beom Kyu); 10893 경기도 파주시 와석순환로 347, 204동 703호 (목동동, 해솔마을 2단지 월드메르디앙), Gyeonggi-do (KR). 김선희 (KIM, Seon Hee); 10450 경기도 고양시 일산동구 일산로 78, 909호 (백석동, 백석위브센터움), Gyeonggi-do (KR). 이은숙 (LEE, Eun Sook); 13836 경기도 과천시 별양로 111, 506동 1404호 (별양동, 주공아파트), Gyeonggi-do (KR).
- (74) 대리인: 파도특허법인(유한) (PADO IP LAW PLLC); 06194 서울특별시 강남구 테헤란로78길 16, 9층 (대치동, 노벨빌딩), Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(54) Title: METHOD FOR ISOLATING AUTOLOGOUS TUMOR ANTIGEN-REACTIVE CD8 T CELL BY USING CD71, AND APPLICATION THEREOF

(54) 발명의 명칭: CD71을 이용한 자가암항원 반응성 CD8 T 세포 분리방법 및 이의 응용



(57) Abstract: The present invention relates to: a method for isolating an autologous tumor antigen-reactive CD8 T cell by using CD71; and an application thereof. When an autologous tumor antigen-reactive CD8 T cell is isolated using an isolation method according to the present invention, CD8 T cells that react to various tumor antigens are also isolated in addition to the CD8 T cell specific for autologous tumor antigens, and thus the number of CD8 T cells can be amplified in large quantities to provide a significant antitumor effect, even with lower quantities of blood. Therefore, the method can be effectively used for immunotherapy, etc., in which a temporary immunodeficiency is induced in order to perform a treatment such as adoptive cell treatment.

(57) 요약서: 본 발명은 CD71을 이용하여 자가암항원 반응성 CD8 T 세포를 분리하는 방법 및 이의 응용에 대한 것이다. 본 발명의 분리방법을 이용하여 자가암항원 반응성 CD8 T 세포를 분리하는 경우 자가암항원에 특이적인 CD8 T 세포 이외에 다양한 암항원에 반응하는 CD8 T 세포도 함께 분리되므로, 보다 적은 혈액으로도 대량으로 CD8 T 세포수를 증폭시켜 유의적인 항암효과를 제공할 수 있다. 따라서 입양 세포 치료 등 치료를 위해 일시적인 면역결핍을 유도하는 면역치료 등에 효과적으로 사용될 수 있다.



WO 2021/157993 A1

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: CD71을 이용한 자가암항원 반응성 CD8 T 세포 분리방법 및 이의 응용

기술분야

- [1] 본 출원은 2020년 02월 03일 출원된 대한민국 특허출원 제10-2020-0012409호를 우선권으로 주장하고, 상기 명세서 전체는 본 출원의 참고문헌이다.
- [2]
- [3] 본 발명은 CD71을 이용하여 자가암항원 반응성 CD8 T 세포를 분리하는 방법 및 이의 응용에 대한 것이다.
- [4]

배경기술

- [5] 입양 T 세포 치료(Adoptive T cell therapy)는 암항원 특이적 T 세포를 분리 및 대량배양하여 암환자에게 투여함으로써 암을 치료하는 방법이다. 초기연구에서는 암에 대한 특이성 없이 암환자의 혈액이나 암조직의 T 세포를 대량증식시켜 CIK (cytokine-induced killer cells), LAK(lymphokine-activated killer cell) 또는 TIL(tumor-infiltrating lymphocyte)를 생산한 후 암환자에게 투여함으로써 안전성과 유효성을 평가하였다. 그러나 대부분 암환자에서 안전성은 확인된 반면, 유효성은 없었는데, 임상시험에 사용된 CIK, LAK 및 TIL 세포들의 암에 대한 특이성이 낮은 것이 그 원인으로 판단되었다. 암항원 특이적 T 세포를 분리 및 대량배양하기 위한 배양방법들이 적용된 T 세포치료제의 임상시험들이 순차적으로 진행되었으며, 암세포에 대한 특이성이 부여될 경우 항암효과는 증가하는 것으로 보고되었다. 그러나 암세포 특이적 T 세포를 사용하여도 재발한 암환자를 완치시키는 비율은 극히 낮은 것으로 나타났다. T 세포치료제의 낮은 효력 문제를 해결하기 위한 방법으로, 화학 항암제의 사전투여를 통해 일시적 면역결핍을 유도한 후 T 세포치료제를 투여하는 방법이 사용되고 있다.
- [6] 현재 개발되었거나 개발 중인 항암 T 세포치료제들은 암항원 특이적 T 세포의 분리 및 대량배양 개념을 필수적으로 포함하고 있다. 모든 T 세포치료제가 암세포 특이적 T 세포의 분리 및 투여라는 동일한 목표를 가지고 있지만, T 세포의 분리 및 대량배양과정, 그리고 배양된 T 세포의 특성은 모두 다르다. 혈액이나 암조직내 암항원 특이적 T 세포의 비율이 극히 낮기 때문에, 일반적으로 암항원 특이적 T 세포의 분리전에, 이들 세포의 비율을 높이기 위한 증폭과정을 대부분 필요로 한다. 암항원 특이적 CD8 T 세포를 분리할 수 있는 가장 대표적인 방법은 MHC I/peptide multimer를 이용하여 분리하는 방법이지만, 사용 가능한 MHC I/peptide multimer가 제한적이어서 다양한 환자에게 적용하지는 못하고 있다. 이러한 한계를 극복하기 위해, 활성화된 T 세포에서만

선택적으로 발현하는 4-1BB의 특성을 이용한 항원 특이적 T 세포분리공정이 개발되었다(대한민국 등록특허 제10-1503341호).

- [7] 상기 4-1BB를 이용하는 방법은 이론적으로 모든 종류의 암항원에 대해 적용할 수 있다는 장점을 가지고 있다. 그러나, 입양 T 세포 치료를 위해 일시적인 면역결핍을 유도할 경우 약 10^{11} 개 이상의 림프구가 제거되는데, 상기 방법으로는 하나의 암항원 특이적 CD8 T 세포를 10^9 개의 규모로 제공하는데 그친다. 이는 암세포의 면역회피 가능성 내지 면역결핍에 따른 부작용이 발생할 가능성을 높일 수 있어 이에 대한 해결책이 요구되는 실정이다.

[8]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [9] 이에 본 발명자들은 자가암항원에 반응하는 CD8 T 세포를 소량의 혈액에서 분리하여 단기간 내에 세포치료제에 적용할 수 있을 정도의 유의적인 수준으로 증폭하는 방법을 제공하고자 예의 노력한 결과, 자가암항원으로 말초혈액단핵구(PBMC)를 자극하는 경우 자가암항원 특이적 CD8 T 세포 이외에 다양한 암항원에 반응할 수 있는 CD8 T 세포가 함께 증식하고, 이를 CD71를 이용하여 분리해내는 경우 유의적인 항암효과를 제공할 수 있는 CD8 T 세포를 분리 및 증식시킬 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.
- [10] 따라서, 본 발명의 목적은 CD71을 이용하여 자가암항원 반응성 CD8 T 세포를 분리하는 방법 및 이의 응용을 제공하는 것이다.

[11]

과제 해결 수단

- [12] 본 발명은 a) 암 환자의 혈액 유래 PBMC에 자가암항원 유래 펩타이드를 첨가 및 배양한 후, 자가암항원 특이적 CD8 T 세포의 증식을 유도하는 단계;
- [13] b) 상기 단계 a)에서 자가암항원 특이적 CD8 T 세포의 증식 수준이 높은 자가암항원 유래 펩타이드를 선별하는 단계;
- [14] c) 상기 단계 b)에서 선별된 자가암항원 유래 펩타이드를 상기 단계 a)의 암 환자와 동일한 암 환자의 혈액 유래 PBMC에 첨가 및 배양하는 단계; 및
- [15] d) 상기 단계 c)의 배양된 PBMC에서 CD71+CD8+ T 세포를 분리하는 단계;
- [16] 를 포함하는 자가암항원 반응성 CD8 T 세포 분리방법 및 상기 방법으로 분리된 자가암항원 반응성 CD8 T 세포를 제공한다.
- [17] 본 발명의 바람직한 일실시에 따르면 상기 단계 a)의 암은 위암, 폐암, 췌장암, 흑색종, 뇌종양, 백혈병, 난소암 및 육종으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것이다.
- [18] 본 발명의 바람직한 일실시에 따르면 상기 단계 a)의 자가암항원은 hTERT, WT-1, NY-ESO-1 및 MAGE-3 으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것이다.

- [19] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면 상기 단계 b)의 선별은 4-1BB를 발현하는 자가암항원 특이적 CD8 T 세포를 높게 발현하는 자가암항원 유래 펩타이드를 선별하는 것이다.
- [20] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면 상기 단계 c)의 암 환자의 혈액은 10 내지 100 ml 인 것이다.
- [21] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면 상기 단계 c)의 배양은 12일 내지 17일 동안 수행하는 것이다.
- [22] 본 발명은 또한, 상기 분리된 자가암항원 반응성 CD8 T 세포를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [23] 본 발명은 또한, 암 환자에 상기 분리된 자가암항원 반응성 CD8 T 세포를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 암 개선 또는 치료방법을 제공한다.
- [24] 본 발명은 또한, a) 암 환자의 혈액 유래 PBMC에 자가암항원 유래 펩타이드를 첨가 및 배양한 후, 자가암항원 특이적 CD8 T 세포의 증식을 유도하는 단계;
- [25] b) 상기 단계 a)에서 자가암항원 특이적 CD8 T 세포의 증식 수준이 높은 자가암항원 유래 펩타이드를 선별하는 단계;
- [26] c) 상기 단계 b)에서 선별된 자가암항원 유래 펩타이드를 상기 단계 a)의 암 환자와 동일한 암 환자의 혈액 유래 PBMC에 첨가 및 배양하는 단계;
- [27] d) 상기 단계 c)의 배양된 PBMC에서 CD71+CD8+ T 세포를 분리하는 단계; 및
- [28] e) 상기 단계 d)에서 분리된 CD71+CD8+ T 세포를 증폭하는 단계;
- [29] 를 포함하는 항암 세포치료제용 조성물의 제조방법 및 상기 방법으로 제조된 항암 세포치료제용 조성물을 제공한다.
- [30] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면 상기 단계 d)의 분리는 PBMC에서 CD71+CD8+ T 세포의 비율이 1 내지 25% 인 경우 수행하는 것이다.
- [31] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면 상기 단계 e)의 증폭은 12일 내지 17일 동안 수행하여 CD71+CD8+ T 세포가 10^9 내지 10^{11} 개가 되도록 증폭하는 것이다.
- [32]
- [33] 본 발명의 '자가암항원 반응성 CD8 T 세포'는, 자가암항원을 포함하여 다양한 암항원에 반응할 수 있는 CD8 T 세포를 의미한다.
- [34] 본 발명의 '방관자 활성화(bystander activation)'는 특정 항원에 대한 면역반응 동안 다른 항원에 특이적인 T 세포가 활성화되는 것을 의미한다.
- [35] 본 발명의 '세포치료제'는 개체로부터 분리, 배양 또는 특수한 조작을 통해 제조된 세포 및 조직으로, 치료, 진단 또는 예방의 목적으로 사용되는 의약품으로서, 세포 혹은 조직의 기능을 복원시키기 위하여 살아있는 자가, 동종 또는 이종세포를 체외에서 증식 선별하거나 다른 방법으로 세포의 생물학적 특성을 변화시키는 등의 일련의 행위를 통하여 이러한 세포가 질병의 치료, 진단 또는 예방의 목적으로 사용되는 의약품을 의미한다.
- [36]

- [37] 상기 기재한 바와 같이, 기존 세포치료시 사용되는 CD8 T 세포 증폭방법은 세포치료를 위해 유도된 면역 결핍을 회복하기에는 증폭되는 CD8 T 세포의 양이 부족하고, 하나의 암항원에만 특이적으로 반응하는 경우가 많아 유의적인 항암효과를 얻기에는 부족하였다.
- [38]
- [39] 본 발명의 자가암항원 반응성 CD8 T 세포 분리방법을 사용하는 경우, 50 내지 100 ml의 암환자 혈액으로부터 약 25일간의 배양과정을 통해 $>10^{10}$ 개의 항암 CD8 T 세포를 배양할 수 있으므로, CD8 T 세포의 항암효과를 높이기 위해 항암제 투여를 통해 grade 3-4 수준의 림프구감소증(lymphopenia)이 발생하여 대량의 림프구가 제거되어도 이를 보완할 수 있는 수준으로 투여 가능한 항암 CD8 T 세포를 생산할 수 있다.
- [40] hTERT 및 WT1은 대표적인 자가암항원으로 건강한 사람의 체내에서는 극히 낮은 비율로 존재하여 증식이 어려우나, 암환자는 hTERT를 포함하여 다양한 암항원에 대한 CD8 T 세포반응이 활성화되어 있어 건강한 사람과는 다르게 hTERT와 같은 자가암항원 특이적 CD8 T 세포의 증식 및 분리가 가능하다. 다만, 자가암항원으로부터 유래된 펩타이드를 이용하여 항암 CD8 T 세포를 배양하는 과정은, 암환자의 체내에 이들 세포가 충분히 높은 비율로 존재할 경우에만 배양이 가능하다.
- [41] 본 발명은 CD71+CD8 T 세포 분리를 통해, CD8 T 세포 증식에 사용한 hTERT 또는 WT1 펩타이드 특이적 CD8 T 세포뿐 아니라, 암환자 스스로 암세포의 증식에 대응하여 지속적으로 높여온 자가암항원 특이적 CD8 T 세포 중 일부를 방관자 활성화(bystander activation)를 통해 증식 및 분리할 수 있다. 따라서 최종 배양된 항암 CD8 T 세포들은 hTERT 또는 WT1와 함께 암환자가 스스로 증식시킨 또 다른 암항원 특이적 CD8 T 세포들을 포함하고 있으므로 매우 우수한 항암효과를 유발할 수 있다.
- [42]
- [43] 따라서, 본 발명은 a) 암 환자의 혈액 유래 PBMC에 자가암항원 유래 펩타이드를 첨가 및 배양한 후, 자가암항원 특이적 CD8 T 세포의 증식을 유도하는 단계;
- [44] b) 상기 단계 a)에서 자가암항원 특이적 CD8 T 세포의 증식 수준이 높은 자가암항원 유래 펩타이드를 선별하는 단계;
- [45] c) 상기 단계 b)에서 선별된 자가암항원 유래 펩타이드를 상기 단계 a)의 암 환자와 동일한 암 환자의 혈액 유래 PBMC에 첨가 및 배양하는 단계; 및
- [46] d) 상기 단계 c)의 배양된 PBMC에서 CD71+CD8+ T 세포를 분리하는 단계;
- [47] 를 포함하는 자가암항원 반응성 CD8 T 세포 분리방법 및 상기 분리방법으로 분리된 자가암항원 반응성 CD8 T 세포를 제공할 수 있다.
- [48] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면 상기 단계 a)의 암은 위암, 폐암, 췌장암, 흑색종, 뇌종양, 백혈병, 난소암 및 육종으로 이루어진 군에서 선택되는

어느 하나 이상인 것일 수 있다.

- [49] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면 상기 단계 a)의 자가암항원은 hTERT, WT-1, NY-ESO-1 및 MAGE-3 으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있으며, 보다 바람직하게는 hTERT 및 WT-1 으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있다.
- [50] 상기 자가암항원 유래 펩타이드는 hTERT, WT-1, NY-ESO-1 및 MAGE-3 으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 자가암항원에서 유래된 펩타이드일 수 있으나, 바람직하게는 hTERT 또는 WT-1에서 유래된 펩타이드일 수 있고, 보다 바람직하게는 서열번호 2 내지 서열번호 59의 펩타이드일 수 있다.
- [51] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면 상기 단계 b)의 선별은 4-1BB를 발현하는 자가암항원 특이적 CD8 T 세포를 높게 발현하는 자가암항원 유래 펩타이드를 선별하는 것일 수 있다. 구체적으로, 전체 CD8 T 세포 중 4-1BB를 발현하는 CD8 T 세포의 비율이 10% 이상인 자가암항원 유래 펩타이드를 선별하는 것일 수 있다.
- [52] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면 상기 단계 c)의 암 환자의 혈액은 10 내지 100 ml 인 것일 수 있다. 바람직하게는 암 환자의 혈액은 20 내지 80 ml인 것이 바람직하며, 보다 바람직하게는 30 내지 50 ml인 것일 수 있다.
- [53] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면 상기 단계 c)의 배양은 12일 내지 17일 동안 수행하는 것일 수 있다. 바람직하게는 13일 내지 16일 동안 수행하는 것일 수 있으며, 보다 바람직하게는 14일 내지 15일 동안 수행하는 것일 수 있다.
- [54]
- [55] 본 발명은 또한, 상기 분리된 자가암항원 반응성 CD8 T 세포를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공할 수 있다.
- [56] 본 발명의 약학적 조성물은 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁용제, 유제, 동결건조제 또는 좌제 등이 포함된다. 비수성용제 및 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [57] 본 발명의 약학적 조성물은 비경구로 투여될 수 있으며, 비경구 투여시 피부외용; 복강내, 직장, 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내 주사하는 주사제의 형태로 당업계에 공지된 방법에 따라 제형화할 수 있다.
- [58] 상기 주사제의 경우에는 반드시 멸균되어야 하며 박테리아 및 진균과 같은 미생물의 오염으로부터 보호되어야 한다. 주사제의 경우 적합한 담체의 예로는 이에 한정되지는 않으나, 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 이들의 혼합물 및/또는 식물유를 포함하는 용매 또는 분산매질일 수 있다. 보다 바람직하게는, 적합한 담체로는

헵크스 용액, 링거 용액, 트리에탄올 아민이 함유된 PBS (phosphate buffered saline) 또는 주사용 멸균수, 10% 에탄올, 40% 프로필렌 글리콜 및 5% 텍스트로즈와 같은 등장 용액 등을 사용할 수 있다. 상기 주사제를 미생물 오염으로부터 보호하기 위해서는 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르빈산, 티메로살 등과 같은 다양한 항균제 및 항진균제를 추가로 포함할 수 있다. 또한, 상기 주사제는 대부분의 경우 당 또는 나트륨 클로라이드와 같은 등장화제를 추가로 포함할 수 있다.

- [59] 본 발명의 약학적 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 약제학적으로 유효한 양은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 즉, 본 발명의 약학적 조성물의 총 유효량은 단일 투여량(single dose)으로 환자에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량(multiple dose)으로 장기간 투여되는 분할 치료 방법(fractionated treatment protocol)에 의해 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [60] 본 발명의 조성물은 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [61]
- [62] 본 발명은 또한, 암 환자에 상기 분리된 자가암항원 반응성 CD8 T 세포를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 암 개선 또는 치료방법을 제공할 수 있다.
- [63] 본 발명의 상기 조성물은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양으로 투여되며, 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 즉, 본 발명의 조성물의 총 유효량은 단일 투여량(single dose)으로 환자에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량(multiple dose)으로 장기간 투여되는 분할 치료 방법(fractionated treatment protocol)에 의해 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[64]

[65] 본 발명은 또한, a) 암 환자의 혈액 유래 PBMC에 자가암항원 유래 펩타이드를 첨가 및 배양한 후, 자가암항원 특이적 CD8 T 세포의 증식을 유도하는 단계;

[66] b) 상기 단계 a)에서 자가암항원 특이적 CD8 T 세포의 증식 수준이 높은 자가암항원 유래 펩타이드를 선별하는 단계;

[67] c) 상기 단계 b)에서 선별된 자가암항원 유래 펩타이드를 상기 단계 a)의 암 환자와 동일한 암 환자의 혈액 유래 PBMC에 첨가 및 배양하는 단계;

[68] d) 상기 단계 c)의 배양된 PBMC에서 CD71+CD8+ T 세포를 분리하는 단계; 및

[69] e) 상기 단계 d)에서 분리된 CD71+CD8+ T 세포를 증폭하는 단계;

[70] 를 포함하는 항암 세포치료제용 조성물의 제조방법 및 상기 방법으로 제조된 항암 세포치료제용 조성물을 제공할 수 있다.

[71] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면 상기 단계 d)의 분리는 PBMC에서 CD71+CD8+ T 세포의 비율이 1 내지 25% 인 경우 수행하는 것일 수 있으며, 바람직하게는 비율이 4 내지 25% 인 것이 바람직하고, 보다 바람직하게는 10 내지 25%인 것이 바람직하다. PBMC에서 CD71+CD8+ T 세포의 비율이 10% 를 초과하는 경우, PBMC에서 분리되는 CD71+CD8+ T 세포의 순도와 유사한 수준의 회수율(recovery rate)을 안정적으로 얻을 수 있다(실시예 6).

[72] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면 상기 단계 e)의 증폭은 12일 내지 17일 동안 수행하여 CD71+CD8+ T 세포가 10^9 내지 10^{11} 개가 되도록 증폭하는 것이다. 상기 단계 e)의 증폭은 바람직하게 13일 내지 16일 동안 수행하는 것일 수 있으며, 보다 바람직하게는 14일 내지 15일 동안 수행하는 것일 수 있다. 상기 CD71+CD8+ T 세포가 바람직하게 10^9 내지 10^{10} 개가 되도록 증폭하는 것일 수 있다.

[73]

발명의 효과

[74] 본 발명의 분리방법을 이용하여 자가암항원 반응성 CD8 T 세포를 분리하는 경우 자가암항원에 특이적인 CD8 T 세포 이외에 다양한 암항원에 반응하는 CD8 T 세포도 함께 분리되므로, 보다 적은 혈액으로도 대량으로 CD8 T 세포수를 증폭시켜 유의적인 항암효과를 제공할 수 있다. 따라서 입양 세포 치료 등 치료를 위해 일시적인 면역결핍을 유도하는 면역치료 등에 효과적으로 사용될 수 있다.

[75]

도면의 간단한 설명

[76] 도 1은 증식하는 Melan-A 특이적이고 방관자 활성화된 CD8+ T 세포에서 4-1BB 및 CD71 발현을 나타낸다.

[77] 도 2는 Melan-A 펩티드의 존재 하에 방관자 활성화에 의해 증식된 CD8+ T 세포는 인간-종양-반응성 CD8 + T 세포를 포함함을 나타낸다.

- [78] (A) 배양된 PBMC를 PE-conjugated Melan-A peptide/MHC class I multimer(pMelan) 및 anti-CD8-PE-Cy5로 염색 하였다. 게이팅된 CD8+ 세포를 CFSE 대 pMelan으로 플롯팅하고 표시된 CD8+ T 세포를 유세포분석한 결과를 나타낸다. (B-C) pMelan+ CD8 T(R1), CFSE-pMelan-CD8 T(R2) 및 CFSE+ CD8 T(R3) 세포의 3 가지 상이한 CD8+ T 세포를 rapid expansion method를 사용하여 증폭시켜 anti-CD8-PE-Cy5 및 anti-CD25-PE로 염색한 후 유세포분석한 결과를 나타낸다.
- [79] 도 3은 확장된 CD71+ CD8+ T 세포로 Melan-A+ 및 Melan-A- 흑색종 세포의 사멸을 나타낸다.
- [80] 도 4는 hTERT 펩티드에 의해 활성화된 CD8+ T 세포에서 4-1BB 및 CD71의 발현을 나타낸다. 빨간 점선 박스는 더 높은 백분율의 4-1BB+CD8+ T 세포를 포함하는 PBMC를 의미하며, 상기 PBMC는 최종적으로 CD71+CD8+ T 세포를 분류하는데 사용하였다.
- [81] 도 5는 분류된 CD71+ CD8+ T 세포의 확장 및 이의 표현형을 나타낸다. (A)선택된 PBMC를 플링하고 CD71+CD8+ T 세포를 유세포분석한 결과를 나타낸다. (B)분류된 CD71+ CD8+ T 세포를 rapid expansion method을 사용하여 증식시켜, 5×10^5 세포는 13 일 이내에 $>1 \times 10^9$ 세포가 되었다. (C)확장된 CD8+ T 세포를 anti-CD8-PE-Cy5와 함께 PE-접합된 anti-CD45RA, anti-CD45RO, anti-CD57 또는 anti-PD-1로 염색하였다. (D)확장된 CD8 T 세포를 Annexin V-FITC 및 PI로 염색하여 이의 생존력을 확인한 결과를 나타낸다.
- [82] 도 6은 CD71+ CD8+ T 세포는 WT1 펩티드-특이적 CD8+ T 세포를 포함하는 것을 나타낸다.
- [83] 도 7의 (A)HLA-A*0201 대립 유전자를 갖는 건강한 지원자의 PBMC로부터 Melan-A CTL 펩티드를 이용하여 Melan-A-양성 또는 음성 CD8+ T 세포를 분리하였다. (B)확장된 pMelan+ 및 pMelan-CD8+ T 세포를 상이한 비율로 혼합하고, pMelan-CD8+ T 세포를 자동 세포 분류기(Tyto)를 사용하여 5106 개의 세포 혼합물로부터 분류 및 계수하여 유세포분석하였다. (C) (B)의 결과로부터 pMelan+ CD8+ T 세포의 순도 및 회수율(recovery rate)을 계산한 결과를 나타낸다.
- [84] 도 8은 암 환자의 혈액으로부터 hTERT-특이적 CD8 T 세포를 포함하는 종양-반응성 CD8 T 세포를 생산하기 위한 작업 흐름을 나타낸다.

[85]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[86] [실시예 1]

[87] **CD8 T 세포에서 CD71 발현 측정**

[88] 자가항원인 Melan-A 특이적 CD8 T 세포를 이용하여 CD8 T 세포 증식용 펩타이드에 의해 증식하는 CD8 T 세포들이 CD71을 발현하는지 증명하고자

- 하였다. 모든 혈액 샘플은 HLA-A*02 대립형질(allele)을 가지고 있으며, HLA-A0201/Melan-A₂₆₋₃₅(서열번호 1: ELAGIGILTV) multimer(pentamer) 양성인 CD8 T 세포를 가진 건강한 자원자로부터 연구에 대한 서면동의 후 제공 받았다.
- [89] 구체적으로, Melan-A₂₆₋₃₅ 특이적 CD8 T 세포는 Melan-A 항원의 세포독성 T 림프구(cytotoxic T lymphocyte, CTL) 에피토프인 Melan-A₂₆₋₃₅(서열번호 1: ELAGIGILTV) 펩타이드를 이용하여 증식유도 하였다. 상기 건강한 자원자(Donor #1 및 #2)의 혈액을 10ml BD Vacutainer Heparin Tube(BD Bioscience)에 채혈하였다. 채혈한 혈액으로부터 말초혈액단핵구(peripheral blood mononuclear cell; PBMC)를 분리하기 위해 15ml conical tube에 5ml Ficoll-Paque(GE Healthcare) 첨가한 후, 채혈된 혈액 10ml을 Ficoll 용액 상층에 천천히 분주하였다. 800×g, no brake, 20분간 원심분리한 후, 맨 상층의 혈장은 수거하여 0.2 μM syringe filter로 여과시켜 자가혈장으로 사용하였으며, PBMC 들은 수거하여 RPMI1640 배지로 2회 세척하여 배양에 사용하였다.
- [90] 상기 분리한 PBMC를 10 μM CFSE(CellTrace CFSE Cell Proliferation kit, Thermo Fisher)로 5분간 염색하였다. CFSE-labeled PBMC는 3% 자가혈장이 포함된 RPMI1640 배지에 1×10⁶ cells/ml 농도로 현탁하였으며, 14ml 둥근 원심관(round tube, BD Bioscience)에 1ml씩 분주하였다. 각 튜브에 2μg/ml 농도로 상기 Melan-A₂₆₋₃₅ 펩타이드를 2 μg/ml 농도로 첨가한 후, CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다. 배양 이틀째, 100 IU/ml IL-2와 3% 자가혈장이 포함된 RPMI1640 배지를 1ml씩 각 튜브에 첨가하였다. 배양 7, 9, 11 또는 13일째에 각 튜브에서 1ml 배지를 제거한 후, 100 IU/ml IL-2와 3% 자가혈장이 포함된 새로운 RPMI1640 배지를 1ml 첨가하여 14일 동안 배양하였다. 배양 7, 9, 11 또는 14일에 튜브의 PBMC를 수거하여 RPMI1640 배지로 1회 세척한 후, anti-CD8-PE-Cy5와 함께 pMelan-PE, anti-4-1BB-PE, 또는 anti-CD71-PE 항체로 염색하여 FACSCalibur(BD Bioscience)로 유세포분석하였다.
- [91] 그 결과, [도 1]에서 나타나는 바와 같이, 배양 7일째 대부분의 pMelan+CD8 T 세포들은 9회 이상 세포분열이 발생하여 CFSE-negative 상태가 되었으며, 동시에 방관자 활성화(bystander activation)된 CFSE-pMelan-CD8 T 세포들도 높은 비율로 발견되었다. Donor #1은 pMelan+CD8 T 세포의 비율이 높게 검출된 자원자로 CD8 T 세포의 증식을 역시 높게 나타냈으며, Donor #2는 pMelan+CD8 T 세포의 비율이 낮게 검출된 자원자로 pMelan+CD8 T 세포의 증식이 낮게 나타났다. 배양 11일까지 pMelan+CD8 T 세포의 비율이 꾸준히 증가하였지만, 배양 14일에는 부분적으로 감소하는 것으로 확인되었다(도 1의 왼쪽). 배양 7일째, 증식 중인 CFSE-CD8 T 세포 중 일부에서 4-1BB의 발현이 검출되었지만, 9일 이후에는 검출되지 않았다(도 1의 중간). CD8 T 세포의 증식이 진행되어 CFSE 형광 값이 감소할수록 CD71의 발현이 증가하는 것으로 나타났으며, 배양 14일째 9-10회 이상 증식한 CD8 T 세포 대부분이 CD71을 발현하고 있는 것으로 확인되었다(도 1의 오른쪽).

- [92] 상기 결과는 Melan-A 펩타이드 특이적 및 비특이적으로 증식한 CD8 T 세포 대부분이 CD71을 발현하고 있음을 의미하는 것으로 판단하였다.
- [93]
- [94] **[실시예 2]**
- [95] **Melan-A 유래 CTL 펩타이드에 의한 CD8 T 세포 활성화**
- [96] 상기 <실시예 1>에서 확인된 방관자 활성화(Bystander activation)를 통해 증식한 CD8 T 세포들이 흑색종을 인식할 수 있는지 여부를 확인하고자 하였다.
- [97] 구체적으로, 상기 <실시예 1>의 배양된 PBMC들을 모두 수거하여 pMelan-PE와 anti-CD8-PE-Cy5로 염색한 후, FACSAria(BD Bioscience)를 이용하여 gated CD8 T 세포 중 pMelan+CD8 T(R1), CFSE-pMelan-CD8 T(R2) 및 CFSE+CD8 T(R3) 세포를 각각 분리하였다. 분리된 세 종류의 CD8 T 세포는 rapid expansion method를 이용하여 14일간 배양하여 $>10^9$ 수준으로 대량증식시켰다. 50ml ALyS505N(CSTI, Japan) 배지에 최종 분리된 CD8 T 세포 5×10^5 개, 1×10^8 irradiated allogeneic PBMCs, 40ng/ml anti-human CD3 mAb, 1,000 IU/ml rhIL-2, 및 3% 자가혈장을 혼합한 후, 배양 4일째 50ml, 7일째 100ml, 배양 9일째 300ml, 11일에 500ml 첨가하여 1L culture bag(Nipro, Japan)에 주입하여 14일간 배양하였다. 최종 배양된 CD8 T 세포 2×10^6 개와 사람 흑색종 세포주인 SK-Mel-5 2×10^5 개(10:1)를 24 well culture plate에 분주한 후 100 IU/ml rhIL-2와 3% 자가혈장이 포함된 상태에서 24시간 배양하였으며, 음성대조군으로는 SK-Mel-5 없이 CD8 T 세포만을 배양하였다. 배양 후 세포를 수거하여 anti-CD8-PE-Cy5와 anti-CD25-PE 항체로 염색 및 FACSCalibur(BD Bioscience)로 분석하여 SK-Mel-5에 의해 활성화된 CD8 T 세포의 비율을 결정하였다.
- [98] 그 결과, [도 2]에서 나타나는 바와 같이, pMelan+CD8 T 세포의 증식과 함께 일부 pMelan-CD8 T 세포들이 방관자 활성화를 통해 함께 증식함을 확인할 수 있었다(도 2의 A). pMelan+CD8 T (R1), CFSE-pMelan-CD8 T (R2) 및 CFSE+CD8 T (R3) 세포만을 24시간 배양할 경우, 활성 마커인 CD25의 발현은 3-5%대로 낮은 수준을 유지하였다. 그러나 HLA-A*02+ SK-Mel-5 세포와 CD8 T 세포를 하루 동안 공동배양한 경우, pMelan+CD8 T 세포는 빠르게 활성화되어 CD25를 발현하는 세포의 비율이 60% 수준으로 나타났다. 따라서 HLA-A*02+ SK-Mel-5 세포는 정상적으로 Melan-A 펩타이드를 MHC class I에 탑재하여 세포표면에 나열함으로써, CD8 T 세포의 활성을 유도할 수 있는 것으로 판단하였다. 동시에 R2 및 R3에 해당되는 CD8 T 세포 중에도 SK-Mel-5와의 공동배양 후 CD25 발현이 증가하였으며, non-dividing CD8 T 세포인 CFSE+CD8 T 세포 보다는 CFSE-pMelan-CD8 T 세포에 SK-Mel-5에 반응하는 세포의 비율이 높은 것을 확인할 수 있었다(도 2의 C).
- [99] 상기 결과는 Melan-A 펩타이드의 방관자 활성화 효과에 의해 증식한 CD8 T 세포에는 암항원 특이적 CD8 T 세포가 높은 비율로 포함되어 있음을 의미하는 것으로 판단하였다.

[100]

[101] [실시예 3]

[102] **CD71+CD8+ T 세포의 암세포 제거능력 확인**

[103] HLA-A*0201-제한 Melan-A-특이적 CD8+ T 세포를 가지고 있는 건강한 자원자의 PBMC에 Melan-A CTL 펩타이드를 첨가하여 14일간 배양한 후 CD71+CD8+ 및 4-1BB+CD8+ T 세포를 분리하여 대량배양한 후, Melan-A-양성인 SK-Mel-5 세포주와 Melan-A-음성인 A375 세포주와 공동배양하여 암세포 제거능력을 비교하고자 하였다.

[104] 구체적으로, 상기 <실시예 1>에서 배양한 PBMC에서, 배양 14일째 CD71+CD8+ T 세포를 cell sorter(FACSAria, BD Bioscience)로 분리하였다. 4-1BB+CD8+ T 세포의 경우, 배양 14일째 세포를 수거하여 RPMI1640 배지로 두 번 세척한 후, 2×10^6 cells/ml로 CTL media에 세포 현탁하여 12 well culture plate에 분주하였으며, 동일한 Melan-A CTL 펩타이드를 $5 \mu\text{g/ml}$ 농도로 첨가하여 하루 동안 재자극하여 4-1BB+CD8+ T 세포를 분리하였다. 분리된 4-1BB+CD8+ T 및 CD71+CD8+ T 세포는 rapid expansion method를 통해 14일간 대량배양하였다.

[105] HLA-A*0201 대립형질을 가지고 있으며 Melan-A-양성 SK-Mel-5 세포주 또는 Melan-A-음성 A375 세포주를 $10 \mu\text{M}$ CFSE로 5분간 염색하여 형광표지한 후 RPMI1640 배지로 세척하여 표적세포를 준비하였다. 1×10^5 개의 형광표지된 SK-Mel-5 또는 A375 세포주와 상기 최종 배양된 4-1BB+CD8+ T 및 CD71+CD8+ T 세포를 0, 0.1, 0.2, 0.5, 1 또는 5배 비율로 혼합하였으며, 100 IU/ml rhIL-2와 3% 자가혈장이 포함된 CTL 배지 상태로 6시간 동안 37°C , 5% CO_2 배양기에서 배양. 배양 완료 후 세포를 annexin-PE로 염색하여 유세포분석 하여 사멸되는 세포의 비율을 분석하였다.

[106] 그 결과, [도 3]에서 나타나는 바와 같이 Melan-A-특이적 CD8 T 세포만을 포함하고 있는 4-1BB+CD8+ T 세포는 Melan-A+ SK-Mel-5 세포주만을 선택적으로 제거하였으며, Melan-A-특이적 CD8 T 세포와 함께 방관자 활성화된 CD8 T 세포를 포함하고 있는 CD71+CD8+ T 세포의 경우 Melan-A+ SK-Mel-5 세포주뿐 아니라, Melan-A- A375 세포주를 모두 제거하는 것을 확인할 수 있었다.

[107]

[108] [실시예 4]

[109] **hTERT 유래 CTL 펩타이드에 의한 CD8 T 세포 활성화**

[110] 암환자의 PBMC에서도 hTERT로부터 유래된 CTL 펩타이드들을 이용하여 hTERT 특이적 및 방관자 활성화(bystander activation) 된 CD8 T 세포들을 증식할 수 있는지 조사하고자 하였다.

[111] [표1]

명칭	서열	서열목록
hTERT 1	AAFRALVAQCL	서열번호 2
hTERT 2	CLKELVARV	서열번호 3
hTERT 3	LAFGFALL	서열번호 4
hTERT 4	VGDDVLVH	서열번호 5
hTERT 5	FVLVAPSCA	서열번호 6
hTERT 6	GAATQARP	서열번호 7
hTERT 7	SGTRHSH	서열번호 8
hTERT 8	KEQLRPSFLLSSLRPSL	서열번호 9
hTERT 9	PLFLELL	서열번호 10
hTERT 10	AAVTPAA	서열번호 11
hTERT 11	QSIGIRQ	서열번호 12
hTERT 12	IVNMDYV	서열번호 13
hTERT 13	RPGLLGASV	서열번호 14
hTERT 14	TLTDLQP	서열번호 15
hTERT 15	LLCSLCYG	서열번호 16
hTERT 16	LVRGVPEYGCVVNLR	서열번호 17
hTERT 17	YSSYARTSIRASL	서열번호 18
hTERT 18	IYKILLQAY	서열번호 19
hTERT 19	LGAKGAA	서열번호 20
hTERT 20	YVPLLGSL	서열번호 21
hTERT 21	QTQLSRKLP	서열번호 22
hTERT 22	ALEAAANPAL	서열번호 23
hTERT 23	ILAKFLHWL	서열번호 24
hTERT 24	RLVDDFLLV	서열번호 25
hTERT 25	EARPALLTSRLRFIPK	서열번호 26
hTERT 26	RLFFYRKSIV	서열번호 27
hTERT 27	YLFFYRKSIV	서열번호 28
hTERT 28	DLQVNSLQTV	서열번호 29
hTERT 29	YLQVNSLQTV	서열번호 30

hTERT 30	GLLGASVLGL	서열번호 31
hTERT 31	ALLTSRLRFI	서열번호 32
hTERT 32	RLTSRVKAL	서열번호 33
hTERT 33	TYVPLLGSL	서열번호 34
hTERT 34	CYGD MENKL	서열번호 35
hTERT 35	AYQVC GPP	서열번호 36
hTERT 36	VYGFV RACL	서열번호 37
hTERT 37	VYAET KHFL	서열번호 38
hTERT 38	DYVVG ARTF	서열번호 39

[112]

[113] 구체적으로, 표준치료에 불응하여 재발한 폐암환자의 30ml 혈액으로부터 상기 <실시예 1>과 동일한 방법으로 분리한 PBMC를 상기 [표 1]의 38 종류의 hTERT로부터 유래된 CTL 펩타이드와 함께 14일간 배양하였다. 배양 14일째 동일한 펩타이드로 하루 동안 재자극하였으며, 배양 15일째 각 튜브의 PBMC 중 일부를 anti-4-1BB-PE 또는 anti-CD71-PE와 anti-CD8-PE-Cy5로 염색하였다. 유세포분석을 통해 4-1BB+CD8+ T 세포를 포함하고 있으며, 동시에 CD71+CD8+ T 세포의 비율이 높게 나타나는 hTERT 펩타이드들을 선별하였다. 선별된 튜브의 PBMC들을 풀링(pooling)한 후, CD71+CD8+ T 세포를 FACS Aria를 이용하여 분리하고, 분리된 CD8 T 세포는 상기 rapid expansion method를 이용하여 14일간 대량배양하였으며, 최종 배양된 CD8 T 세포는 ani-CD45RA, anti-CD45RO, anti-CD57 또는 anti-PD-1 항체를 이용하여 표현형을 분석하였다.

[114] 또한, 이와는 별도로 최종 선별한 8개 튜브의 PBMC들을 풀링하였으며, FACS Aria를 이용하여 CD71+CD8+ T 세포 분리하여 annexin V-FITC와 PI로 염색하여 세포의 생존률을 결정하였다(도 5의 A).

[115] 그 결과, [도 4]에서 나타나는 바와 같이 다양한 hTERT 펩타이드 자극에 의해 4-1BB+CD8 T 세포가 증가함을 확인할 수 있었다.

[116] 4-1BB+CD8+ T 세포는 첨가된 펩타이드에 특이적으로 활성화된 CD8 T 세포임을 기존 연구를 통해 규명하였으며, 선별된 튜브의 PBMC(빨간 점선 박스)들은 4-1BB 뿐 아니라 더 높은 비율로 CD71을 발현하고 있어, 첨가된 hTERT 펩타이드 특이적 및 방관자 활성화된 CD8 T 세포를 포함하고 있는 것으로 판단하였다.

[117] 또한, [도 5]의 B에서 나타나는 바와 같이 분리된 CD71+CD8+ T 세포를 rapid expansion method를 이용하여 14일간 대량증식시켰을 때, 14일 내에 5×10⁵ 세포가 1-3×10⁹ 세포로 증식하였다. 최종 증식시킨 CD8 T 세포들은 CD45RA-CD45RO+로 memory type의 세포이고, CD57을 발현하는 노화된 세포의 비율은 15%

이내이며, PD-1을 발현하는 고갈성(exhausted) CD8 T 세포의 비율은 10% 이내인 것으로 확인하였다(도 5의 C). Annexin V와 PI 염색을 통해 세포 생존율을 측정하였을 때, 사멸된 세포의 비율은 5% 이내인 것으로 확인하였다(도 5의 D).

[118] 상기 결과는 암환자의 혈액 내에 존재하는 PBMC 내에 hTERT 특이적 CD8 T 세포가 존재할 경우, 이들의 증식과 함께 방관자 활성화된 CD8 T 세포가 증가하며, CD71을 이용하여 hTERT 특이적 CD8 T 세포와 함께 hTERT 펩타이드에 의해 방관자 활성화된 CD8 T 세포를 분리 및 대량배양하는 것이 가능함을 의미하는 것으로 판단하였다.

[119]

[120] **[실시예 5]**

[121] **WT1 유래 CTL 펩타이드에 의한 CD8 T 세포 활성화**

[122] hTERT의 경우와 유사하게 WT1 암항원으로부터 유래된 CTL 펩타이드들을 이용하여 암환자의 PBMC로부터 WT1 특이적 및 방관자 활성화(bystander activation)된 CD8 T 세포들을 증식시킬 수 있는지 조사하고자 하였다.

[123] [표2]

명칭	서열	서열목록
WT1 1	ALLPAVPSL	서열번호 40
WT1 2	DLNALLPAV	서열번호 41
WT1 3	SLGEQQYSV	서열번호 42
WT1 4	RMFPNAPYL	서열번호 43
WT1 5	GVFRGIQDV	서열번호 44
WT1 6	CMTWNQMNL	서열번호 45
WT1 7	SGQFTGTAGA	서열번호 46
WT1 8	VLDFAPPGA	서열번호 47
WT1 9	AYPGCNKRYF	서열번호 48
WT1 10	QYRIHTHGVF	서열번호 49
WT1 11	AFTVHFSGQF	서열번호 50
WT1 12	RWPSCQKKF	서열번호 51
WT1 13	RVPGVAPTL	서열번호 52
WT1 14	DFKDCERRF	서열번호 53
WT1 15	RTPYSSDNL	서열번호 54
WT1 16	TSEKPFSCR	서열번호 55
WT1 17	FSRSDQLKR	서열번호 56
WT1 18	LSHLQMHSR	서열번호 57
WT1 19	YMFPNAPYL	서열번호 58
WT1 20	CYTWNQMNL	서열번호 59

[124]

[125] 구체적으로, 상기 <실시예 4> 와 동일한 방법으로 연구에 서면동의한 난소암환자의 혈액으로부터 분리한 PBMC를 상기 [표 2]의 WT1 아미노산 서열로부터 유래된 20종류의 CTL 펩타이드들과 함께 14일 동안 배양하고, 배양 14일째 동일한 펩타이드로 하루동안 재자극하였다. 배양 15일째 각 튜브의 PBMC를 anti-4-1BB-PE 또는 anti-CD71-PE와 anti-CD8-PE-Cy5로 염색하고 유세포분석을 통해 4-1BB+CD8+ T 세포를 포함하고 있으며, 동시에 CD71+CD8+ T 세포의 비율 분석하였다.

[126] 그 결과, [도 6]에서 나타나는 바와 같이 다양한 WT1 펩타이드 자극에 의해 4-1BB+CD8 T 세포가 증가함을 확인할 수 있었다.

[127] 또한, 배양 15일째 CD8 T 세포만을 gating하여 CD71 및 4-1BB의 발현을 유세포분석 결과, 4-1BB와 CD71의 발현이 비례적인 4-1BB+CD71+CD8 T 세포가 대부분인 경우(red), 4-1BB+CD71+CD8 T 세포를 포함하여 방관자 활성화된 4-1BB CD71+CD8 T 세포가 상대적으로 다수 포함된 경우(yellow), 방관자 활성화된 4-1BB-CD71+CD8 T 세포가 대부분인 경우(blue)가 관찰됨으로써, 난소암 환자의 상태와 WT1 펩타이드의 종류에 따라 WT1 펩타이드-특이적 CD8 T 세포의 증식과 함께 방관자 활성화된 CD8 T 세포의 증식이 서로 다르게 발생하는 것을 확인할 수 있었다.

[128]

[129] [실시예 6]

[130] 자동세포분리기를 이용한 항원 특이적 CD8 T 세포 분리

[131] 항원 특이적 CD8+ T 세포를 무균상태에서 고순도로 분리하기 위해, 자동세포분리기를 이용한 분리 과정 확립하고자 하였다.

[132] 구체적으로, 상기 <실시예 1>과 동일한 방법으로 자가항원인 Melan-A 특이적 CD8 T 세포를 가지고 있는 HLA-A*0201 양성 자원자로부터 혈액을 채혈하여 PBMC를 분리한 후, melan-A CTL 펩타이드를 첨가하여 14일간 펩타이드-특이적 CD8 T 세포로 1차 증식시켰다. 1차 배양된 PBMC를 PE-conjugated Melan-A peptide/MHC class I multimer(pMelan)와 anti-CD8-PE-Cy5로 염색하였으며, Melan-A-specific(pMelan+) 및 Melan-A-nonspecific(pMelan-) CD8+ T 세포를 cell sorter (BD Bioscience, FACSAria)를 이용하여 분리하였다. 분리된 pMelan+CD8+ T 세포와 pMelan-CD8+ T 세포는 각각 rapid expansion method에 의해 14일간 대량증식시켰다(도 7의 A). 최종 배양된 pMelan+CD8+ T 세포와 pMelan-CD8+ T 세포를 다양한 비율로 혼합하여 pMelan+CD8+ T 세포의 비율을 조절하였으며, 이들을 무균상태로 자동세포분리가 가능한 Tyto(Miltenyi Biotec)를 이용하여 pMelan+CD8+ T 세포를 분리함으로써, pMelan+CD8+ T 세포의 비율에 따라 최종 분리되는 pMelan+CD8+ T 세포의 순도 recovery rate를 결정하였다.

[133] 그 결과, [도 7]의 B에서 나타나는 바와 같이 최종 배양된 pMelan+CD8+ T 세포와 pMelan-CD8+ T 세포는 각각 63%와 3% 수준으로 확인되었다.

[134] 또한, pMelan+CD8+ T 세포와 pMelan-CD8+ T 세포를 다양한 비율로 혼합하여 pMelan+CD8+ T 세포의 비율이 3 내지 20% 되도록 한 후, Tyto를 이용하여 분리된 pMelan+CD8+ T 세포의 순도를 재확인한 결과, pMelan+CD8+ T 세포의 비율이 높은 샘플일수록 분리된 세포내 pMelan+CD8+ T 세포의 비율이 높아지는 것을 확인할 수 있었다. 또한 5×10^6 cells/ml 조건으로 pMelan+CD8+ T 세포를 분리한 후, 소팅 전 샘플에 포함된 pMelan+CD8+ T 세포의 숫자와 최종분리된 pMelan+CD8+ T 세포의 총 숫자를 비교하여 recovery rate를 결정하였다. 분석결과 소팅 전 샘플내 pMelan+CD8+ T 세포의 비율이 4% 이상일 경우 안정적으로 40% 이상의 세포가 세포분리 후 회수되는 것으로 나타났다(도 7의 C).

[135] 종합적으로, >65% purity, >40% recovery rate를 표적세포 분리를 위한 최소 기준으로 고려할 경우, 세포분리 전 CD71+CD8+ T 세포의 비율이 약 4% 이상이 되어야 하는 것으로 판단하였다.

[136]

산업상 이용가능성

[137] 본 발명의 분리방법을 이용하여 자가암항원 반응성 CD8 T 세포를 분리하는 경우 자가암항원에 특이적인 CD8 T 세포 이외에 다양한 암항원에 반응하는 CD8 T 세포도 함께 분리되므로, 보다 적은 혈액으로도 대량으로 CD8 T 세포수를 증폭시켜 유의적인 항암효과를 제공할 수 있다. 따라서 입양 세포 치료 등 치료를 위해 일시적인 면역결핍을 유도하는 면역치료 등에 효과적으로 사용될 수 있으므로 산업상 이용가능성이 크다.

[138]

서열목록 Free Text

[139] 서열번호 1은 HLA-A0201/Melan-A₂₆₋₃₅(Melan-A₂₆₋₃₅)의 아미노산 서열이다.

[140] 서열번호 2는 hTERT로부터 유래된 CTL 펩타이드로서 hTERT 1의 아미노산 서열이다.

[141] 서열번호 3은 hTERT로부터 유래된 CTL 펩타이드로서 hTERT 2의 아미노산 서열이다.

[142] 서열번호 4는 hTERT로부터 유래된 CTL 펩타이드로서 hTERT 3의 아미노산 서열이다.

[143] 서열번호 5는 hTERT로부터 유래된 CTL 펩타이드로서 hTERT 4의 아미노산 서열이다.

[144] 서열번호 6은 hTERT로부터 유래된 CTL 펩타이드로서 hTERT 5의 아미노산 서열이다.

[145] 서열번호 7은 hTERT로부터 유래된 CTL 펩타이드로서 hTERT 6의 아미노산 서열이다.

[146] 서열번호 8은 hTERT로부터 유래된 CTL 펩타이드로서 hTERT 7의 아미노산 서열이다.

[147] 서열번호 9는 hTERT로부터 유래된 CTL 펩타이드로서 hTERT 8의 아미노산 서열이다.

[148] 서열번호 10은 hTERT로부터 유래된 CTL 펩타이드로서 hTERT 9의 아미노산 서열이다.

[149] 서열번호 11은 hTERT로부터 유래된 CTL 펩타이드로서 hTERT 10의 아미노산 서열이다.

[150] 서열번호 12는 hTERT로부터 유래된 CTL 펩타이드로서 hTERT 11의 아미노산 서열이다.

[151] 서열번호 13은 hTERT로부터 유래된 CTL 펩타이드로서 hTERT 12의 아미노산

- 서열이다.
- [152] 서열번호 14는 hTERT로부터 유래된 CTL 펩타이드로서 hTERT 13의 아미노산 서열이다.
- [153] 서열번호 15는 hTERT로부터 유래된 CTL 펩타이드로서 hTERT 14의 아미노산 서열이다.
- [154] 서열번호 16은 hTERT로부터 유래된 CTL 펩타이드로서 hTERT 15의 아미노산 서열이다.
- [155] 서열번호 17은 hTERT로부터 유래된 CTL 펩타이드로서 hTERT 16의 아미노산 서열이다.
- [156] 서열번호 18은 hTERT로부터 유래된 CTL 펩타이드로서 hTERT 17의 아미노산 서열이다.
- [157] 서열번호 19는 hTERT로부터 유래된 CTL 펩타이드로서 hTERT 18의 아미노산 서열이다.
- [158] 서열번호 20은 hTERT로부터 유래된 CTL 펩타이드로서 hTERT 19의 아미노산 서열이다.
- [159] 서열번호 21은 hTERT로부터 유래된 CTL 펩타이드로서 hTERT 20의 아미노산 서열이다.
- [160] 서열번호 22는 hTERT로부터 유래된 CTL 펩타이드로서 hTERT 21의 아미노산 서열이다.
- [161] 서열번호 23은 hTERT로부터 유래된 CTL 펩타이드로서 hTERT 22의 아미노산 서열이다.
- [162] 서열번호 24는 hTERT로부터 유래된 CTL 펩타이드로서 hTERT 23의 아미노산 서열이다.
- [163] 서열번호 25는 hTERT로부터 유래된 CTL 펩타이드로서 hTERT 24의 아미노산 서열이다.
- [164] 서열번호 26은 hTERT로부터 유래된 CTL 펩타이드로서 hTERT 25의 아미노산 서열이다.
- [165] 서열번호 27은 hTERT로부터 유래된 CTL 펩타이드로서 hTERT 26의 아미노산 서열이다.
- [166] 서열번호 28은 hTERT로부터 유래된 CTL 펩타이드로서 hTERT 27의 아미노산 서열이다.
- [167] 서열번호 29는 hTERT로부터 유래된 CTL 펩타이드로서 hTERT 28의 아미노산 서열이다.
- [168] 서열번호 30은 hTERT로부터 유래된 CTL 펩타이드로서 hTERT 29의 아미노산 서열이다.
- [169] 서열번호 31은 hTERT로부터 유래된 CTL 펩타이드로서 hTERT 30의 아미노산 서열이다.
- [170] 서열번호 32는 hTERT로부터 유래된 CTL 펩타이드로서 hTERT 31의 아미노산

- 서열이다.
- [171] 서열번호 33은 hTERT로부터 유래된 CTL 펩타이드로서 hTERT 32의 아미노산 서열이다.
- [172] 서열번호 34는 hTERT로부터 유래된 CTL 펩타이드로서 hTERT 33의 아미노산 서열이다.
- [173] 서열번호 35는 hTERT로부터 유래된 CTL 펩타이드로서 hTERT 34의 아미노산 서열이다.
- [174] 서열번호 36은 hTERT로부터 유래된 CTL 펩타이드로서 hTERT 35의 아미노산 서열이다.
- [175] 서열번호 37은 hTERT로부터 유래된 CTL 펩타이드로서 hTERT 36의 아미노산 서열이다.
- [176] 서열번호 38은 hTERT로부터 유래된 CTL 펩타이드로서 hTERT 37의 아미노산 서열이다.
- [177] 서열번호 39는 hTERT로부터 유래된 CTL 펩타이드로서 hTERT 38의 아미노산 서열이다.
- [178] 서열번호 40은 WT1 암항원으로부터 유래된 CTL 펩타이드로서 WT1 1의 아미노산 서열이다.
- [179] 서열번호 41은 WT1 암항원으로부터 유래된 CTL 펩타이드로서 WT1 2의 아미노산 서열이다.
- [180] 서열번호 42는 WT1 암항원으로부터 유래된 CTL 펩타이드로서 WT1 3의 아미노산 서열이다.
- [181] 서열번호 43은 WT1 암항원으로부터 유래된 CTL 펩타이드로서 WT1 4의 아미노산 서열이다.
- [182] 서열번호 44는 WT1 암항원으로부터 유래된 CTL 펩타이드로서 WT1 5의 아미노산 서열이다.
- [183] 서열번호 45는 WT1 암항원으로부터 유래된 CTL 펩타이드로서 WT1 6의 아미노산 서열이다.
- [184] 서열번호 46은 WT1 암항원으로부터 유래된 CTL 펩타이드로서 WT1 7의 아미노산 서열이다.
- [185] 서열번호 47은 WT1 암항원으로부터 유래된 CTL 펩타이드로서 WT1 8의 아미노산 서열이다.
- [186] 서열번호 48은 WT1 암항원으로부터 유래된 CTL 펩타이드로서 WT1 9의 아미노산 서열이다.
- [187] 서열번호 49는 WT1 암항원으로부터 유래된 CTL 펩타이드로서 WT1 10의 아미노산 서열이다.
- [188] 서열번호 50은 WT1 암항원으로부터 유래된 CTL 펩타이드로서 WT1 11의 아미노산 서열이다.
- [189] 서열번호 51은 WT1 암항원으로부터 유래된 CTL 펩타이드로서 WT1 12의

아미노산 서열이다.

- [190] 서열번호 52는 WT1 암항원으로부터 유래된 CTL 펩타이드로서 WT1 13의 아미노산 서열이다.
- [191] 서열번호 53는 WT1 암항원으로부터 유래된 CTL 펩타이드로서 WT1 14의 아미노산 서열이다.
- [192] 서열번호 54는 WT1 암항원으로부터 유래된 CTL 펩타이드로서 WT1 15의 아미노산 서열이다.
- [193] 서열번호 55는 WT1 암항원으로부터 유래된 CTL 펩타이드로서 WT1 16의 아미노산 서열이다.
- [194] 서열번호 56는 WT1 암항원으로부터 유래된 CTL 펩타이드로서 WT1 17의 아미노산 서열이다.
- [195] 서열번호 57은 WT1 암항원으로부터 유래된 CTL 펩타이드로서 WT1 18의 아미노산 서열이다.
- [196] 서열번호 58은 WT1 암항원으로부터 유래된 CTL 펩타이드로서 WT1 19의 아미노산 서열이다.
- [197] 서열번호 59는 WT1 암항원으로부터 유래된 CTL 펩타이드로서 WT1 20의 아미노산 서열이다.

청구범위

- [청구항 1] a) 암 환자의 혈액 유래 PBMC에 자가암항원 유래 펩타이드를 첨가 및 배양한 후, 자가암항원 특이적 CD8 T 세포의 증식을 유도하는 단계;
 b) 상기 단계 a)에서 자가암항원 특이적 CD8 T 세포의 증식 수준이 높은 자가암항원 유래 펩타이드를 선별하는 단계;
 c) 상기 단계 b)에서 선별된 자가암항원 유래 펩타이드를 상기 단계 a)의 암 환자와 동일한 암 환자의 혈액 유래 PBMC에 첨가 및 배양하는 단계; 및
 d) 상기 단계 c)의 배양된 PBMC에서 CD71+CD8+ T 세포를 분리하는 단계;
 를 포함하는 자가암항원 반응성 CD8 T 세포 분리방법.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 단계 a)의 암은 위암, 폐암, 췌장암, 흑색종, 뇌종양, 백혈병, 난소암 및 육종으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 자가암항원 반응성 CD8 T 세포 분리방법.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 단계 a)의 자가암항원은 hTERT, WT-1, NY-ESO-1 및 MAGE-3 으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 자가암항원 반응성 CD8 T 세포 분리방법.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 단계 b)의 선별은 4-1BB를 발현하는 자가암항원 특이적 CD8 T 세포를 높게 발현하는 자가암항원 유래 펩타이드를 선별하는 것을 특징으로 하는 자가암항원 반응성 CD8 T 세포 분리방법.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 단계 c)의 암 환자의 혈액은 10 내지 100 ml 인 것을 특징으로 하는 자가암항원 반응성 CD8 T 세포 분리방법.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 단계 c)의 배양은 12일 내지 17일 동안 수행하는 것을 특징으로 하는 자가암항원 반응성 CD8 T 세포 분리방법.
- [청구항 7] 제1항의 방법으로 분리된 자가암항원 반응성 CD8 T 세포.
- [청구항 8] 제7항의 자가암항원 반응성 CD8 T 세포를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 9] 암 환자에 제7항의 자가암항원 반응성 CD8 T 세포를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 암 개선 또는 치료방법.
- [청구항 10] a) 암 환자의 혈액 유래 PBMC에 자가암항원 유래 펩타이드를 첨가 및 배양한 후, 자가암항원 특이적 CD8 T 세포의 증식을 유도하는 단계;
 b) 상기 단계 a)에서 자가암항원 특이적 CD8 T 세포의 증식 수준이 높은 자가암항원 유래 펩타이드를 선별하는 단계;
 c) 상기 단계 b)에서 선별된 자가암항원 유래 펩타이드를 상기 단계 a)의 암 환자와 동일한 암 환자의 혈액 유래 PBMC에 첨가 및 배양하는 단계;
 d) 상기 단계 c)의 배양된 PBMC에서 CD71+CD8+ T 세포를 분리하는 단계; 및

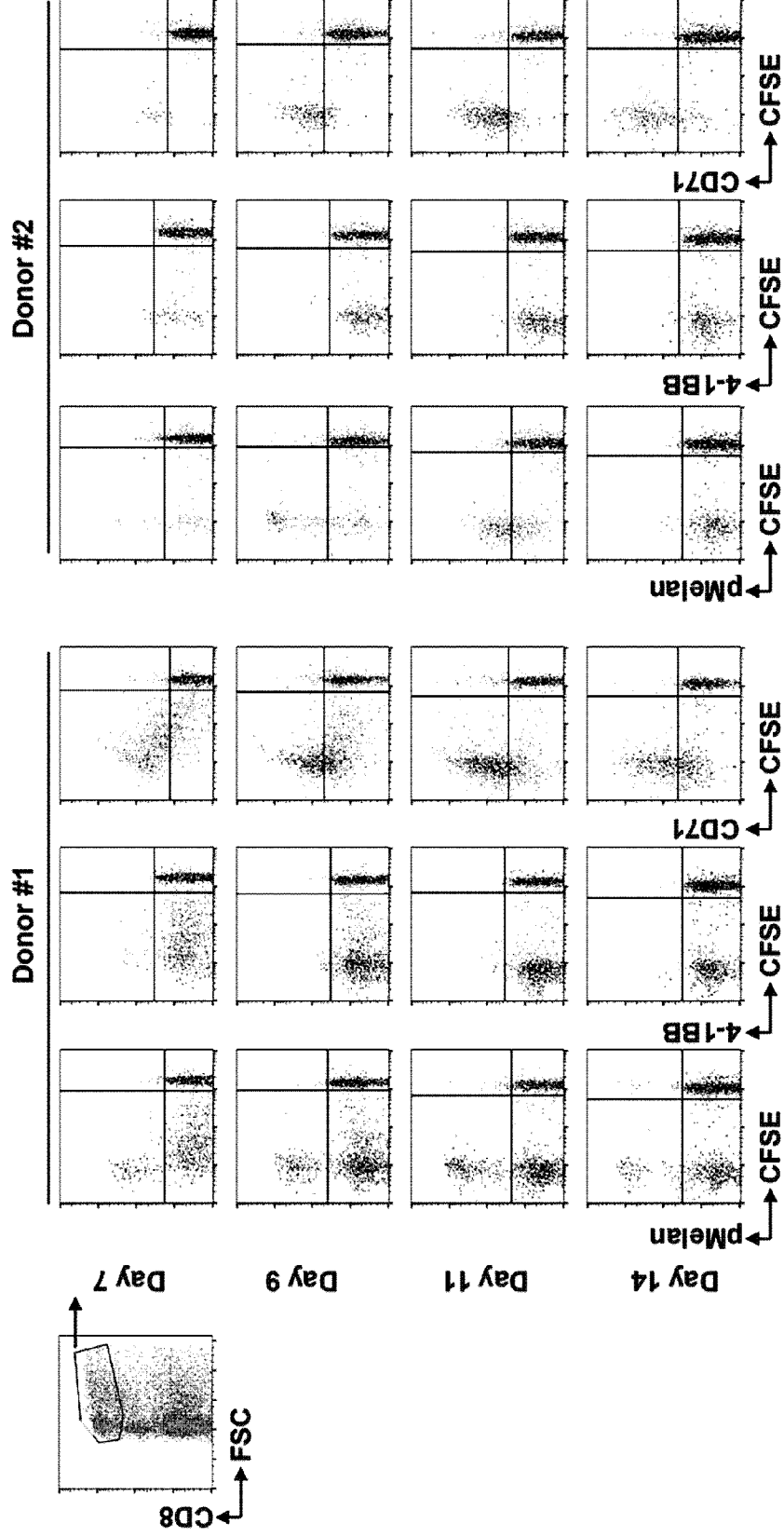
e) 상기 단계 d)에서 분리된 CD71+CD8+ T 세포를 증폭하는 단계;
를 포함하는 항암 세포치료제용 조성물의 제조방법.

[청구항 11] 제10항에 있어서, 상기 단계 d)의 분리는 PBMC에서 CD71+CD8+ T 세포의 비율이 1 내지 25% 인 경우 수행하는 것을 특징으로 하는 항암 세포치료제용 조성물의 제조방법.

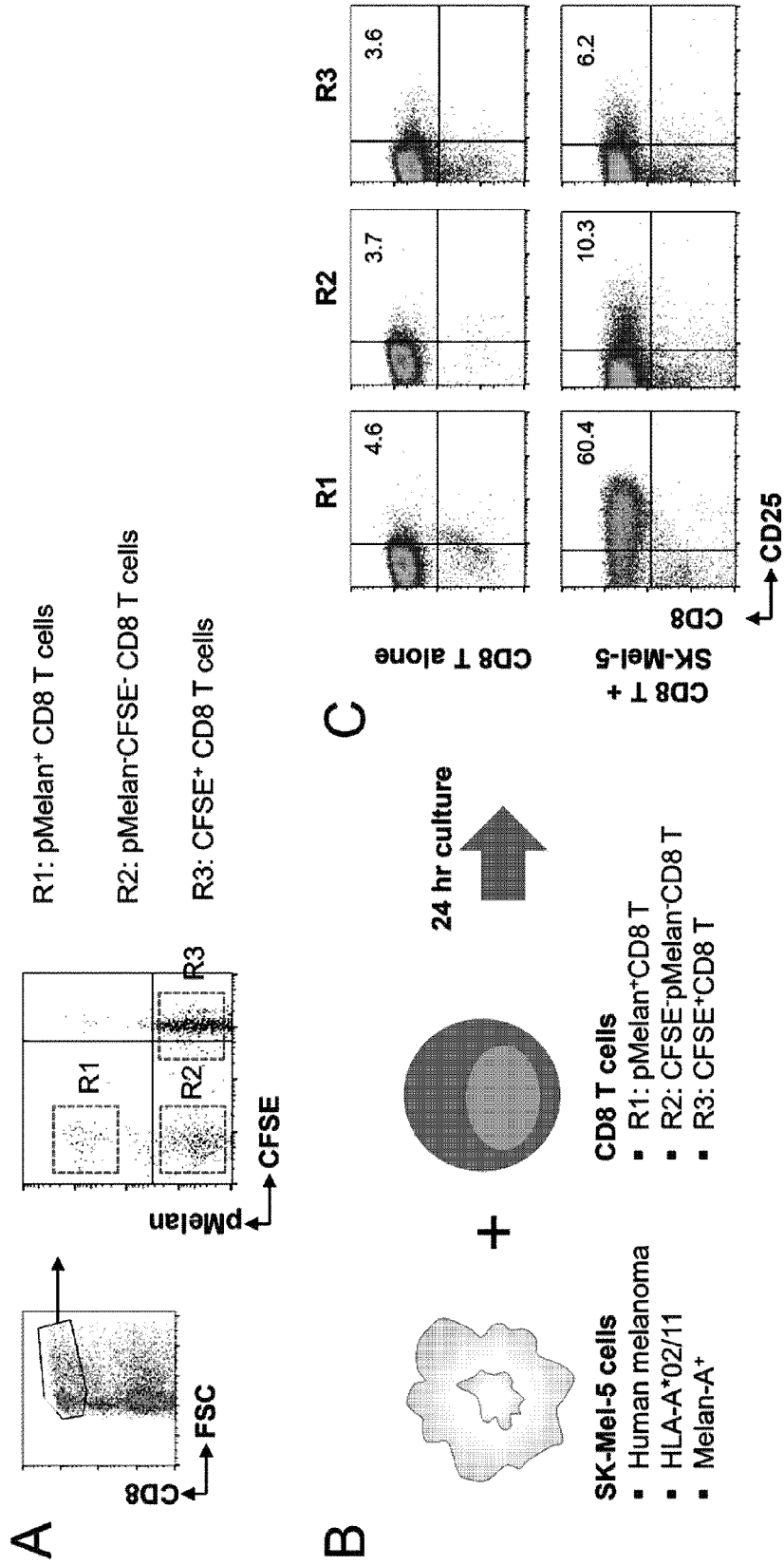
[청구항 12] 제10항에 있어서, 상기 단계 e)의 증폭은 12일 내지 17일 동안 수행하여 CD71+CD8+ T 세포가 10^9 내지 10^{11} 개가 되도록 증폭하는 것을 특징으로 하는 항암 세포치료제용 조성물의 제조방법.

[청구항 13] 제10항의 제조방법으로 제조된 항암 세포치료제용 조성물.

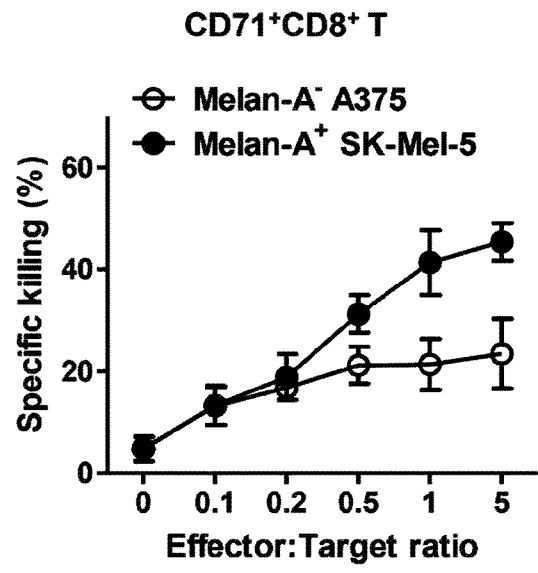
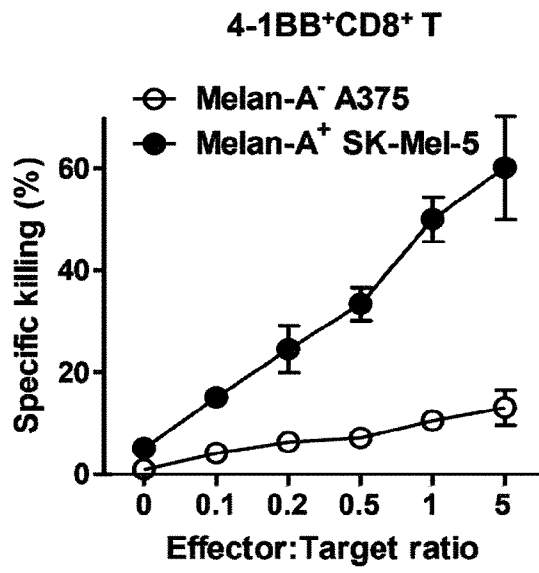
[5]



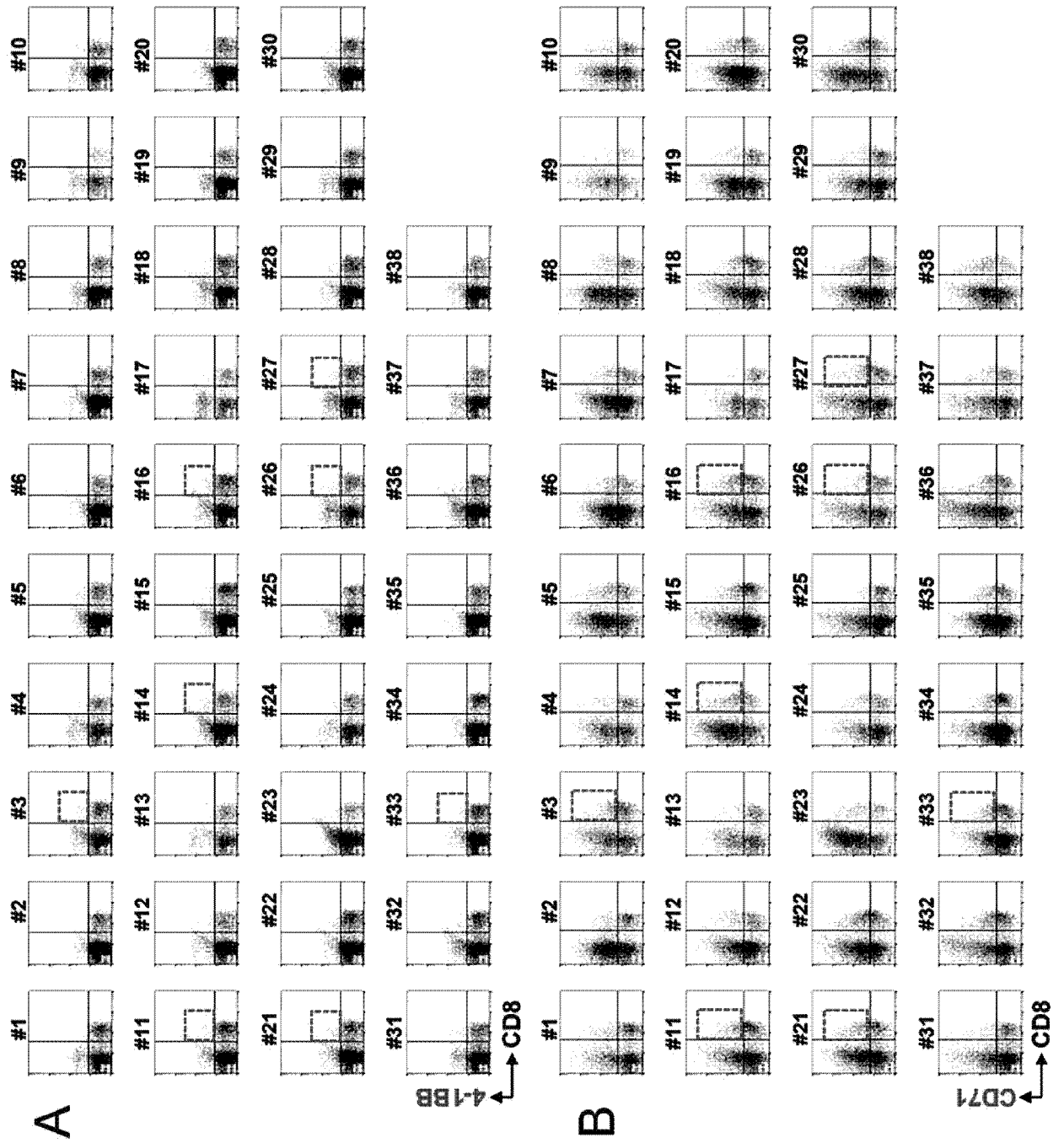
[도2]



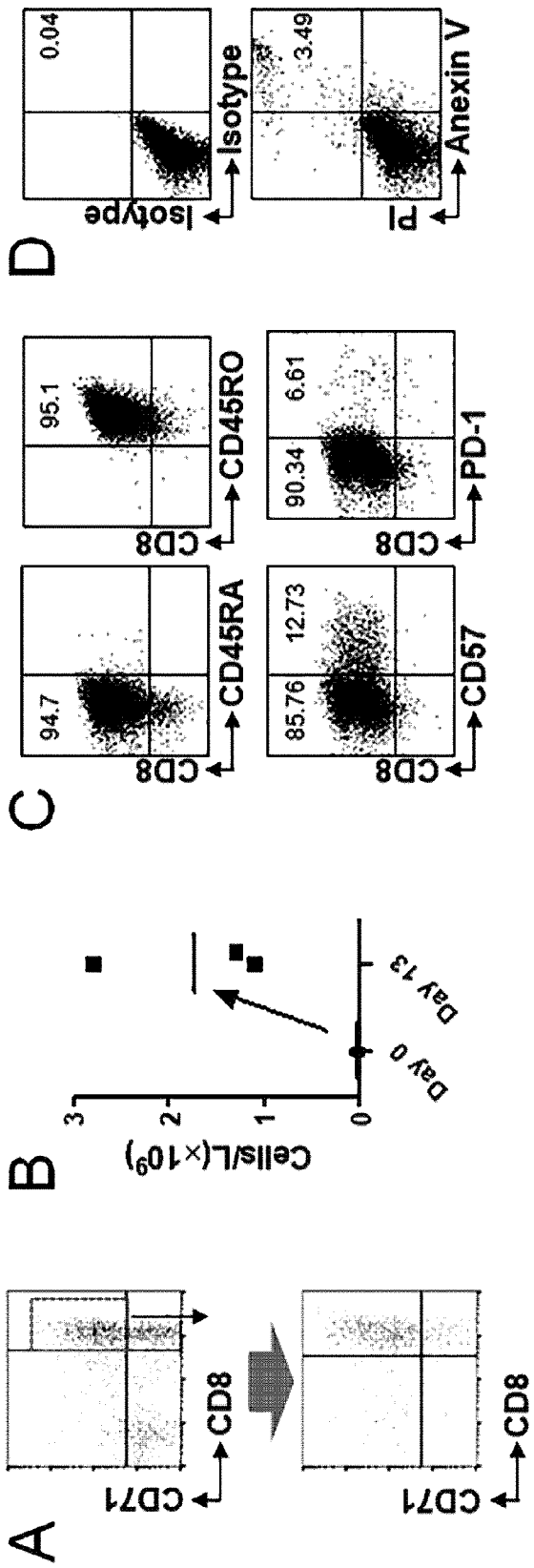
[도3]



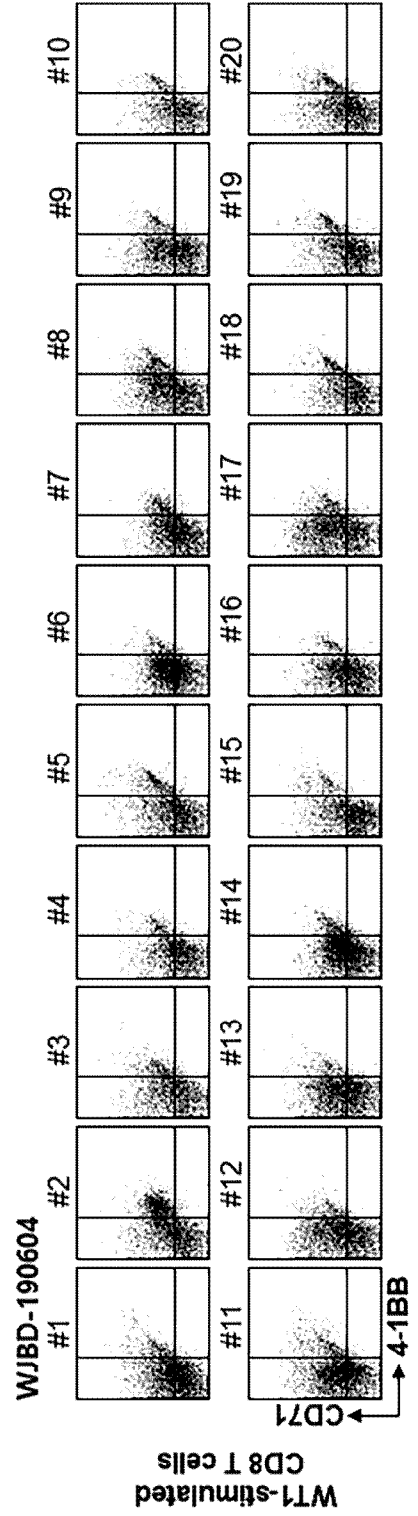
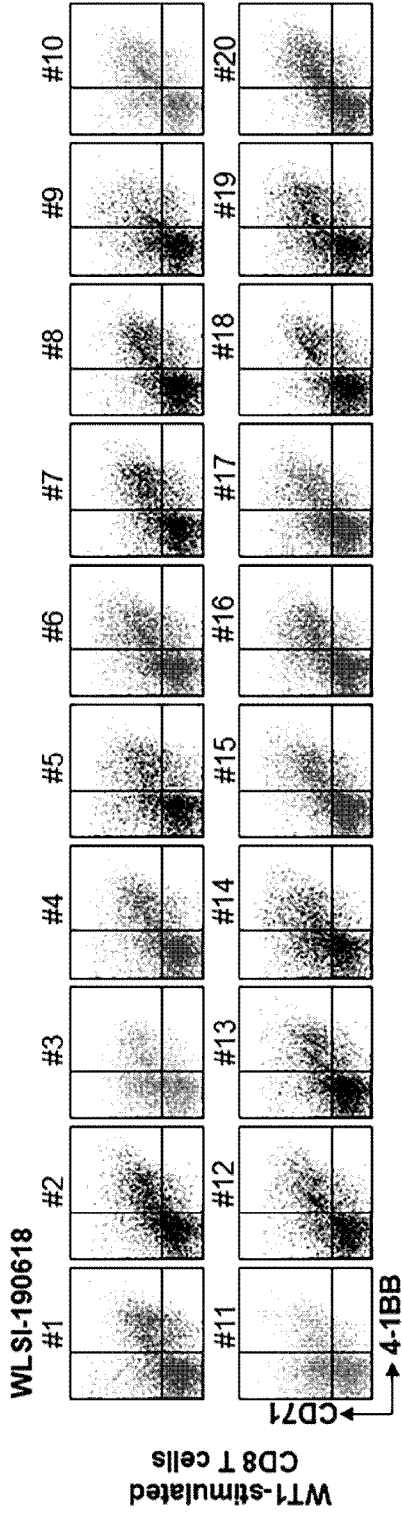
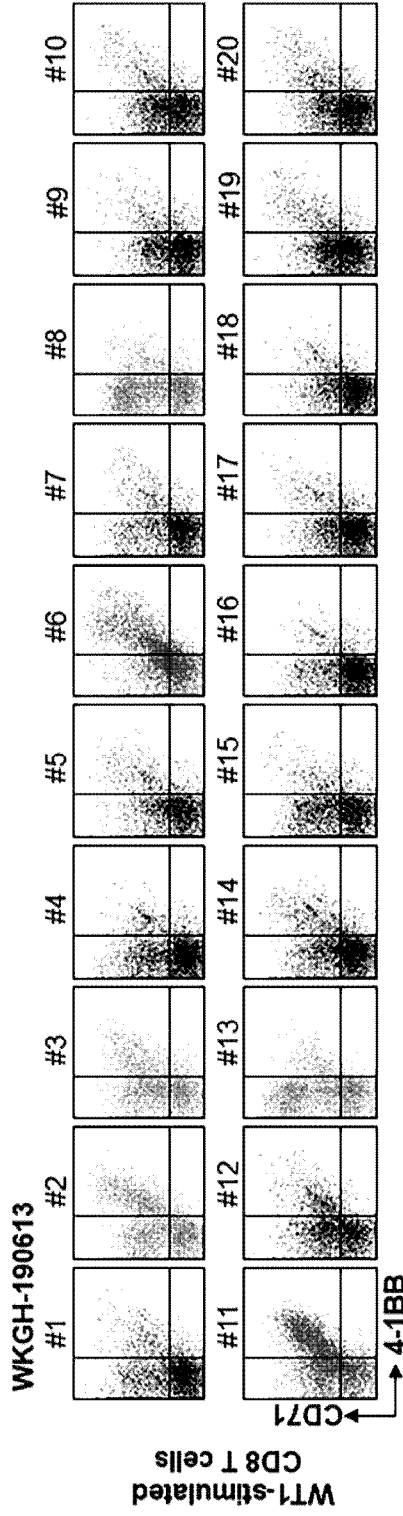
[도4]



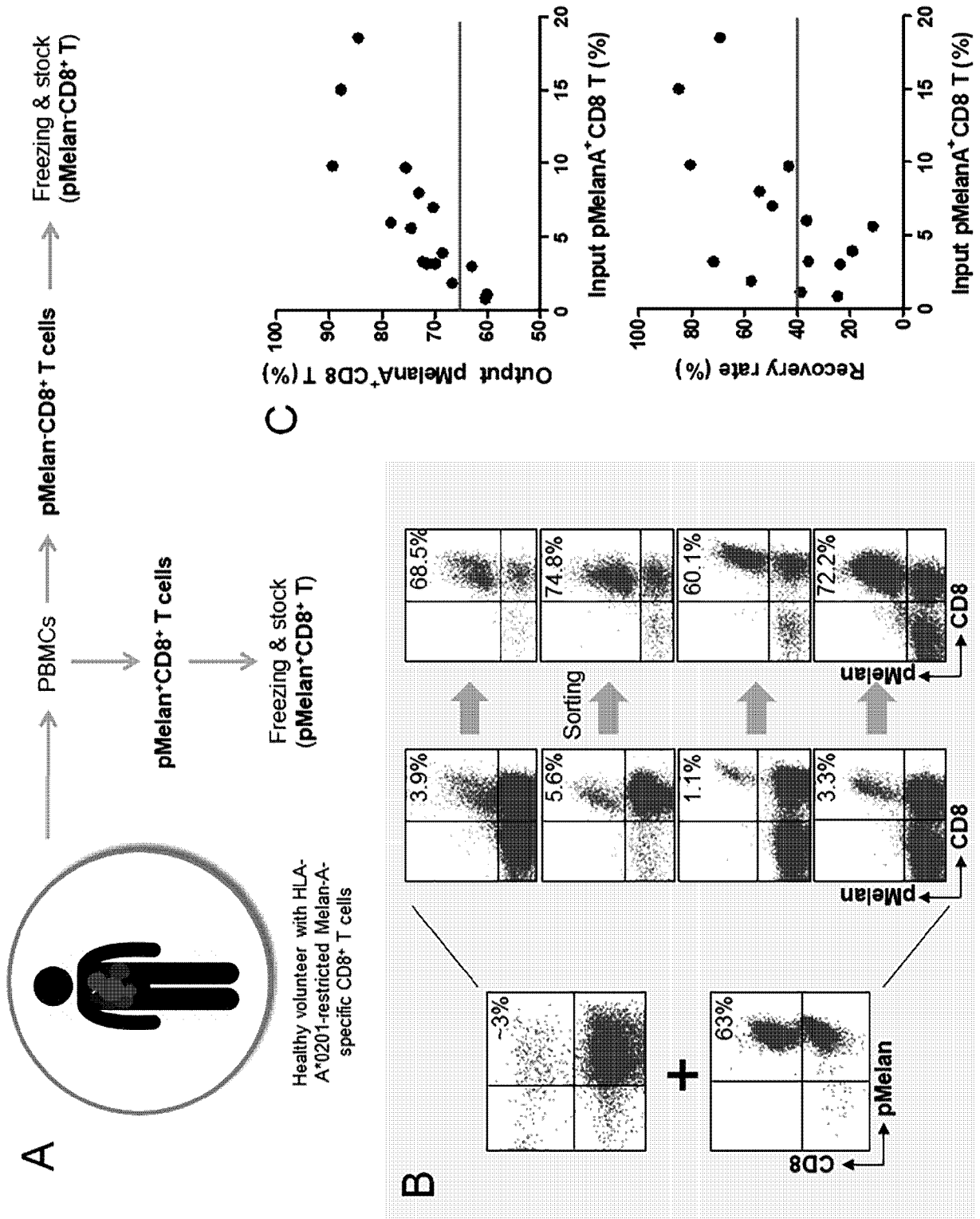
[도5]



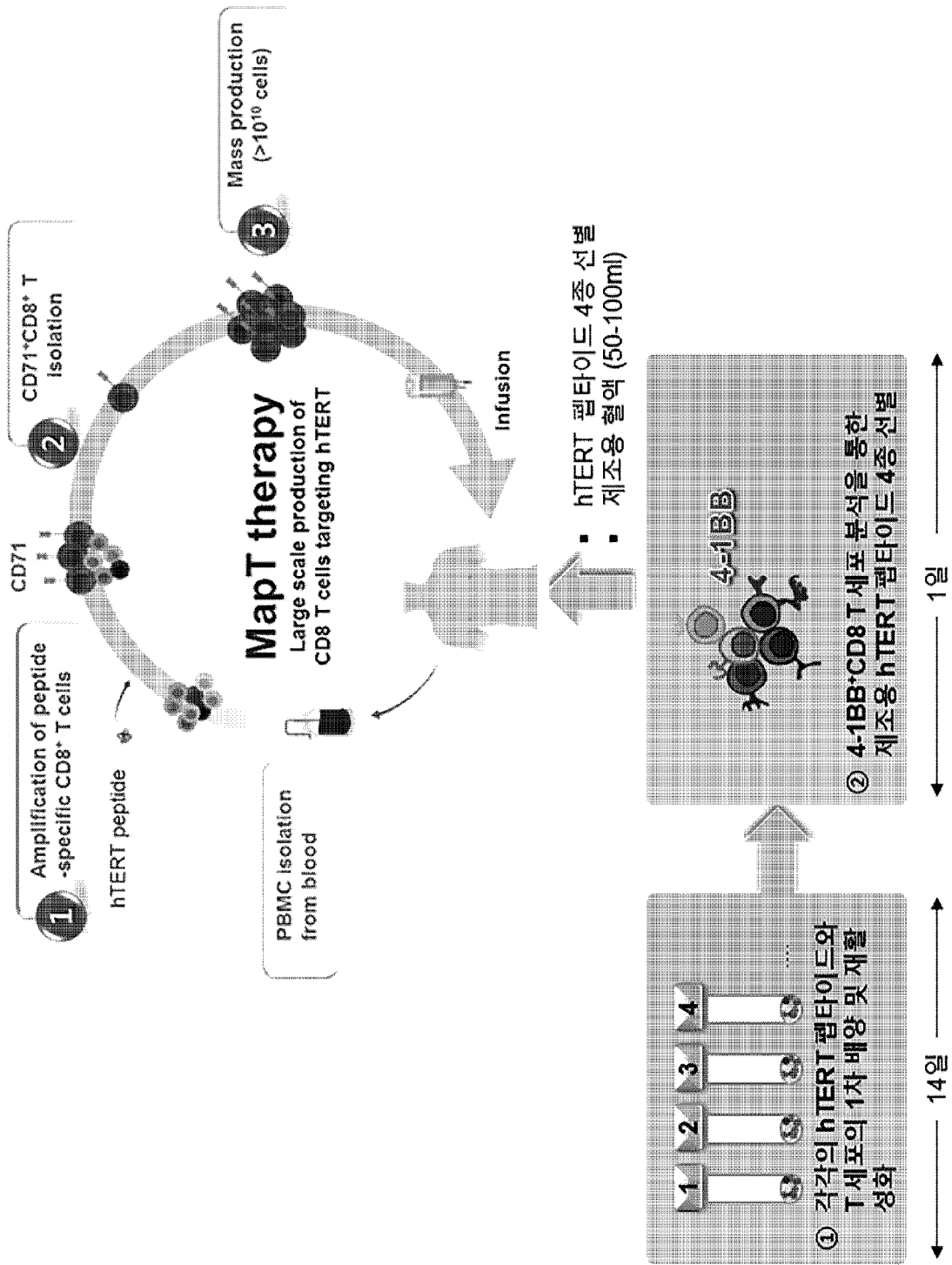
[도 6]



[도7]



[도8]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/001346

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C12N 5/0783(2010.01)i; C12N 5/0789(2010.01)i; A61K 35/17(2014.01)i; A61P 35/00(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N 5/0783(2010.01); C12N 5/071(2010.01); G01N 33/53(2006.01)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models: IPC as above Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 자가암항원 특이적 CD8 T 세포(autologous cancer antigen-specific CD8 T cell), 펩타이드(peptide), 암(cancer), PBMC, 4-1BB, CD71, 세포치료제		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
DY	KR 10-1503341 B1 (NATIONAL CANCER CENTER) 18 March 2015 (2015-03-18) See abstract; claim 10; and paragraphs [0024]-[0110].	1-8,10-13
Y	FISCHER, Karin et al. Antigen recognition induces phosphatidylserine exposure on the cell surface of human CD8+ T cells. Blood. 15 December 2006, vol. 108, no. 13, pp. 4094-4101. See pages 4096 and 4097.	1-8,10-13
A	US 7932045 B2 (KWON, Byoung Se) 26 April 2011 (2011-04-26) See abstract; and claims 1-13.	1-8,10-13
A	KR 10-2010-0011821 A (NATIONAL CANCER CENTER) 03 February 2010 (2010-02-03) See abstract; and claims 1-11.	1-8,10-13
A	SCHMIDT, Nathalie et al. Tumor-associated antigen specific CD8+ T cells in hepatocellular carcinoma - a promising target for immunotherapy. Oncoimmunology. 06 December 2014(online publication date), vol. 3, no. 9, article no. e954919, inner pp. 1-3. See abstract; and inner pages 1-3.	1-8,10-13
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 28 May 2021		Date of mailing of the international search report 31 May 2021
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsang-ro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/001346

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GAHN, Benedikt et al. In vitro activation of hTERT-specific T cell responses in lung cancer patients following chemotherapy. Journal of Thoracic Disease. June 2013, vol. 5, no. 3, pp. 240-250. See abstract; and pages 240-250.	1-8,10-13
.....		

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
 - b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: **9**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 9 pertains to a method for treatment of the human body by surgery or therapy, as well as a diagnostic method (PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv)).
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2021/001346

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR	10-1503341	B1	18 March 2015	AU	2015-230611	A1	29 September 2016
				AU	2015-230611	A1	17 September 2015
				AU	2015-230611	B2	19 April 2018
				AU	2018-204924	A1	26 July 2018
				AU	2018-204924	B2	30 January 2020
				AU	2020-202832	A1	21 May 2020
				CA	2942557	A1	17 September 2015
				CN	105473731	A	06 April 2016
				CN	105473731	B	20 July 2018
				CN	108865994	A	23 November 2018
				EP	3118322	A1	18 January 2017
				EP	3118322	A4	16 August 2017
				HK	1224340	A1	18 August 2017
				JP	2017-508480	A	30 March 2017
				JP	2019-050826	A	04 April 2019
				JP	2020-124214	A	20 August 2020
				JP	6522671	B2	29 May 2019
				US	10570371	B2	25 February 2020
				US	10801011	B2	13 October 2020
				US	2015-0259646	A1	17 September 2015
US	2018-0057793	A1	01 March 2018				
US	2018-0216066	A1	02 August 2018				
WO	2015-137724	A1	17 September 2015				
US	7932045	B2	26 April 2011	KR	10-0882445	B1	09 February 2009
				KR	10-2008-0084308	A	19 September 2008
				US	2008-0261307	A1	23 October 2008
KR	10-2010-0011821	A	03 February 2010	KR	10-1103603	B1	09 January 2012

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 5/0783(2010.01)i; C12N 5/0789(2010.01)i; A61K 35/17(2014.01)i; A61P 35/00(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 5/0783(2010.01); C12N 5/071(2010.01); G01N 33/53(2006.01) 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 자가암항원 특이적 CD8 T 세포(autologous cancer antigen-specific CD8 T cell), 펩타이드(peptide), 암(cancer), PBMC, 4-1BB, CD71, 세포치료제		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
DY	KR 10-1503341 B1 (국립암센터) 2015.03.18 요약; 청구항 10; 및 단락 [0024]-[0110]	1-8,10-13
Y	FISCHER, KARIN 등, 'Antigen recognition induces phosphatidylserine exposure on the cell surface of human CD8+ T cells', Blood, 2006년 12월 15일, 108권, 13호, 페이지 4094-4101 페이지 4096, 4097	1-8,10-13
A	US 7932045 B2 (BYOUNG SE KWON) 2011.04.26 요약; 및 청구항 1-13	1-8,10-13
A	KR 10-2010-0011821 A (국립암센터) 2010.02.03 요약; 및 청구항 1-11	1-8,10-13
A	SCHMIDT, NATHALIE 등, 'Tumor-associated antigen specific CD8+ T cells in hepatocellular carcinoma - a promising target for immunotherapy', Oncoimmunology, 2014년 12월 6일(온라인 게재일), 3권, 9호, 아티클 e954919호, 내부페이지 1-3 요약; 및 내부페이지 1-3	1-8,10-13
<input checked="" type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌		
국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일	
2021년05월28일(28.05.2021)	2021년05월31일(31.05.2021)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소	심사관	
대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)	정다원	
팩스 번호 +82-42-481-8578	전화번호 +82-42-481-5373	

C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	GAHN, BENEDIKT 등, 'In vitro activation of hTERT-specific T cell responses in lung cancer patients following chemotherapy', Journal of Thoracic Disease, 2013년 6월, 5권, 3호, 페이지 240-250 요약; 및 페이지 240-250	1-8,10-13

제1기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.
 - a. 아래의 형태로 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
 - 부록 C/ST.25 텍스트 파일
 - 서면 혹은 이미지 파일
 - b. PCT 규칙 13의3.1(a)에 따라 국제출원과 함께 국제조사만을 목적으로 부록 C/ST.25 텍스트 파일의 형태로 제출된 서열목록
 - c. 국제조사만을 목적으로 국제출원일 이후에 아래 형태로 제출된 서열목록
 - 부록 C/ST.25 텍스트 파일 (규칙 13의3.1(a))
 - 서면 혹은 이미지 파일 (규칙 제13의3.1(b) 및 시행세칙 713).
2. 추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시 출원의 일부를 구성하는 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.
3. 추가 의견:

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. 청구항: 9
 이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
 청구항 9는 수술 또는 치료에 의한 사람의 처치방법 및 진단방법에 관한 것입니다(PCT 제17조(2)(a) (i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)).

2. 청구항:
 이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,

3. 청구항:
 이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-1503341 B1	2015/03/18	AU 2015-230611 A1	2016/09/29
		AU 2015-230611 A1	2015/09/17
		AU 2015-230611 B2	2018/04/19
		AU 2018-204924 A1	2018/07/26
		AU 2018-204924 B2	2020/01/30
		AU 2020-202832 A1	2020/05/21
		CA 2942557 A1	2015/09/17
		CN 105473731 A	2016/04/06
		CN 105473731 B	2018/07/20
		CN 108865994 A	2018/11/23
		EP 3118322 A1	2017/01/18
		EP 3118322 A4	2017/08/16
		HK 1224340 A1	2017/08/18
		JP 2017-508480 A	2017/03/30
		JP 2019-050826 A	2019/04/04
		JP 2020-124214 A	2020/08/20
		JP 6522671 B2	2019/05/29
		US 10570371 B2	2020/02/25
		US 10801011 B2	2020/10/13
		US 2015-0259646 A1	2015/09/17
US 2018-0057793 A1	2018/03/01		
US 2018-0216066 A1	2018/08/02		
WO 2015-137724 A1	2015/09/17		
US 7932045 B2	2011/04/26	KR 10-0882445 B1	2009/02/09
		KR 10-2008-0084308 A	2008/09/19
		US 2008-0261307 A1	2008/10/23
KR 10-2010-0011821 A	2010/02/03	KR 10-1103603 B1	2012/01/09