

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호

WO 2020/032780 A1

2020년 2월 13일 (13.02.2020)

(43) 국제공개일

(51) 국제특허분류:

A61K 35/17 (2014.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C12N 5/0783 (2010.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2019/010240

(22) 국제출원일:

2019년 8월 12일 (12.08.2019)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

62/717,236

2018년 8월 10일 (10.08.2018) US

(71) 출원인: 주식회사 유틸렉스 (EUTILEX CO.,LTD.)
[KR/KR]; 08594 서울시 금천구 가산디지털1로 25, 1401호(가산동, 대륭테크노타운17차), Seoul (KR).

(72) 발명자: 권병세 (KWON, Byoung Se); 08594 서울시 금천구 가산디지털1로 25, 1401호(가산동, 대륭테크노타운17차), Seoul (KR). 김영호 (KIM, Young Ho); 08594 서울시 금천구 가산디지털1로 25, 1401호(가산동, 대륭테크노타운17차), Seoul (KR). 김문기 (KIM, Mun Ki); 08594 서울시 금천구 가산디지털1로 25, 1401호(가산동, 대륭테크노타운17차), Seoul (KR). 김광희 (KIM, Kwang Hee); 08594 서울시 금천구 가산디지털1로 25, 1401호(가산동, 대륭테크노타운17차), Seoul (KR). 강유

현 (KANG, You Hyun); 08594 서울시 금천구 가산디지털1로 25, 1401호(가산동, 대륭테크노타운17차), Seoul (KR).

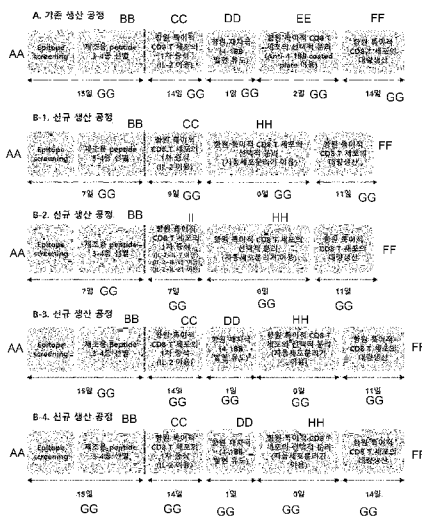
(74) 대리인: 특허법인리채 (LEECHAE INTELLECTUAL PROPERTY); 06236 서울시 강남구 테헤란로26길12, 3층, Seoul (KR).

(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, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 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,

(54) Title: CANCER ANTIGEN-SPECIFIC CYTOTOXIC T CELLS

(54) 발명의 명칭: 암항원 특이적 세포독성 T세포



A ... Existing production process
B ... Novel production process
AA ... Epitope screening
BB ... Selection of 3-4 peptides for production
CC ... Primary proliferation of antigen-specific CD8 T cells (using IL-2)
DD ... Antigen restimulation (induction of 4-1BB expression)
EE ... Selective isolation of antigen-specific CD8 T cells (using anti-4-1BB coated plate)
FF ... Mass production of antigen-specific CD8 T cells
GG ... Days
HH ... Selective isolation of antigen-specific CD8 T cells (using automatic cell separator)
II ... Primary proliferation of antigen-specific CD8 T cells (using IL-2 + IL-7) (using IL-2 + IL-15) (using IL-2 + IL-21)

(57) Abstract: The present invention relates to a pharmaceutical composition for preventing or treating cancer comprising cancer antigen-specific cytotoxic T cells. The pharmaceutical composition comprises cells of about 7 x 10⁶ cells/mL or more, wherein 90% or more of the cells of 7 x 10⁶ cells/mL are CD8⁺ T cells.

(57) 요약서: 본 발명은 암항원 특이적 세포독성 T 세포를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것으로서, 상기 약학 조성물은 약 7 x 10⁶ cells/mL 또는 그 이상의 세포를 포함하고, 상기 약 7 x 10⁶ cells/mL의 세포 중 CD8⁺ T 세포가 약 90% 또는 그 이상이다.



WO 2020/032780 A1

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).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

명세서

발명의 명칭: 암항원 특이적 세포독성 T세포

기술분야

[1] 본 발명은 암항원 특이적 세포독성 T세포, 및 이를 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다.

[2]

배경기술

[3] CD8 + T 세포는 수지상세포, CD4+ T 및 NK 세포와 같은 다른 세포들에 비해 비교적 단순한 기능을 가지고 있기 때문에, 항암 면역치료시 기대하지 않았던 부작용이 나타날 가능성이 적다. 일반적으로 MHC class I/peptide multimer를 이용하여 항원 특이적인 CD8 + T 세포를 분리하지만, 이 방법의 경우 세포 분리 후 세포자살에 의한 사멸율이 높아 충분한 양의 항원 특이적 CD8 + T 세포를 생산하기 위해 장기간 배양을 해야 하는 단점이 있었다. 따라서 TCR(T cell receptor)을 자극하는 MHC multimer를 대체하여 항원 특이적 CD8 + T 세포를 분리할 수 있는 서로게이트 마커(surrogate marker)가 필요하고, 여기에 이용되는 것이 면역조절 단백질인 4-1BB (CD137)이다.

[4] 4-1BB는 유도성 공동자극 분자로서 활성화된 T 세포에서 발현되며, 특히 4-1BB를 통한 자극은 CD8 + T 세포의 활성을 증진시킬 뿐 아니라, Bcl-2, Bcl-XL, 및 Bfl-1 등과 같은 항-세포사멸 분자(anti-apoptotic molecules)의 발현을 증가시켜, 활성화유도세포사멸(AICD; activation-induced cell death)을 억제하는 기능을 나타내는 것으로 잘 알려져 있다.

[5] 본 발명자에 의해 항원 특이적으로 활성화된 CD8 + T 세포의 4-1BB의 발현을 이용한, 항-4-1BB 항체 또는 오중합체 COMP-4-1BBL 단백질을 이용한 항원 특이적 CD8 + T 세포의 분리 및 증식 방법을 기존에 확립 (대한민국 등록특허 제100882445, 제 101103603, 제 101503341호)한 바 있다. 본 명세서의 기존의 방법은 상기 특허에 기재에 따른 T 세포 또는 그 제조방법으로 한다

[6] 상기 특허문헌은 외래항원인 바이러스항원 (EBV/LMP2A, CMV/pp65) 또는 자가암항원 (WT1, hTERT, NY-ESO-1 등)에 대한 항원 특이적 CD8 + T 세포의 분리와 분리된 세포를 대량 배양하는 기술을 개시하고 있다. 하지만, 항-4-1BB 항체가 코팅된 플레이트를 이용한 기존 항원 특이적 CD8 + T 세포의 분리 기술은 작업자의 숙련도에 따라 분리된 세포의 순도가 크게 달라지며, 세포를 배양하는 과정 또한 매우 복잡하다. 더욱이 생산 공정이 30일 이상 소요되어, 현재 임상 적용을 위한 세포치료제 생산에 요구되는 시간을 최대한 단축하는 것이 지속적인 과제이다.

[7] 따라서 항원 특이적 CD8 + T 세포를 보다 고순도로 쉽게 분리하고, 이를 빠른 시간 내에 대량 증식시켜 전체 배양공정을 단축시킬 필요가 있다.

[8]

발명의 상세한 설명**기술적 과제**

[9] 본 발명은 고순도로 제조된 CD8+T 세포 포함 약학 조성물을 제공하고자 한다.

[10] 또한, 본 발명은 암항원 특이적인 CD8+T 세포 생산에 필요한 암항원 유래의 에피토프를 7일 내, 신속하고 용이하게 선별할 수 있는 사전 에피토프 스크리닝 방법 및 항원 특이적인 CD8+T 세포를 20일 이내에 고순도로 선택적으로 분리하고 대량 배양할 수 있는 방법을 제공하고자 한다.

[11]

과제 해결 수단[12] 1. 암항원 특이적 세포독성 T 세포를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물로서, 약 7×10^6 cells/mL 이상의 세포를 포함하고, 상기 약 7×10^6 cells/mL 이상의 세포 중 CD8+T 세포가 약 90% 이상이고, 상기 CD8+T 세포 중 CD45RO를 발현하는 세포가 80% 이상이거나; 상기 CD8+T 세포 중 CD45RA를 발현하는 세포가 20% 이하인, 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[13] 2. 항목 1에 있어서, 상기 약학 조성물은 (a) 암 환자 혈액내에 존재하는 암항원 유래 에피토프를 선별하는 단계; (b) 암 환자의 혈액으로부터 분리된 PBMC(peripheral blood mononuclear cell)를 IL-2, IL-7, IL-15 및 IL-21으로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 어느 하나의 사이토카인 및 상기 에피토프와 함께 배양하는 단계; (c) 상기 (b) 단계에서 배양된 세포 중 CD8 및 4-1BB를 모두 발현하는 세포를 선별하는 단계; 및 (d) 상기 (c) 단계에서 선별된 T 세포를 항-CD3 항체 및 IL-2와 함께 배양하는 단계를 포함하여 제조된 것인, 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[14] 3. 항목 1에 있어서, 상기 암항원은 hTERT, NY-ESO1, MAGE-A3, WT1, CMV 및 EBV로 구성된 군에서 선택된 적어도 어느 하나인 것인, 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[15] 4. 항목 2에 있어서, 상기 (a) 단계 또는 (b) 단계에서 에피토프는 2종 이상인 것인, 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[16] 5. 항목 2에 있어서, 상기 (c) 단계는 외부 환경으로부터 폐쇄된 (closed-system) 유세포분석기를 사용하여 수행되는 것인, 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[17] 6. 암을 예방 또는 치료하기 위한 약학 조성물의 제조 방법으로서, (a) 암 환자 혈액내에 존재하는 암항원 유래 에피토프를 선별하는 단계; (b) 암 환자의 혈액으로부터 분리된 PBMC(peripheral blood mononuclear cell)를 IL-2, IL-7, IL-15 및 IL-21으로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 어느 하나의 사이토카인 및 상기 에피토프와 함께 배양하는 단계; (c) 상기 (b) 단계에서 배양된 세포 중 CD8 및 4-1BB를 모두 발현하는 세포를 선별하는 단계; 및 (d) 상기 (c) 단계에서 선별된 T 세포를 항-CD3 항체 및 IL-2와 함께 배양하는 단계를 포함하고, 상기 약학

조성물은 약 7×10^6 cells/mL 이상의 암항원 특이적 세포독성 T 세포를 포함하고, 상기 약 7×10^6 cells/mL 이상의 세포 중 CD8+T 세포가 약 90% 이상이고, 상기 CD8+T 세포 중 CD45RO를 발현하는 세포가 80% 이상이거나; 상기 CD8+T 세포 중 CD45RA를 발현하는 세포가 20% 이하인, 방법.

- [18] 7. 항목 6에 있어서, 상기 암항원은 hTERT, NY-ESO1, MAGE-A3, WT1, CMV 및 EBV로 구성된 군에서 선택된 적어도 어느 하나인 것인, 방법.
- [19] 8. 항목 6에 있어서, 상기 (a) 단계 또는 (b) 단계에서 에피토프는 2종 이상인 것인, 방법.
- [20] 9. 항목 6에 있어서, 상기 (c) 단계는 외부 환경으로부터 폐쇄된 (closed-system) 유세포분석기를 사용하여 수행되는 것인, 방법.
- [21] 10. 암을 예방 또는 치료하기 위한 방법으로서, 약제학적 유효량의 암항원 특이적 세포독성 T 세포를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 이룰 필요로 하는 피험자에게 투여하는 단계를 포함하고, 상기 약학 조성물은 약 7×10^6 cells/mL 이상의 세포를 포함하고, 상기 약 7×10^6 cells/mL 이상의 세포 중 CD8+T 세포가 약 90% 이상이고, 상기 CD8+T 세포 중 CD45RO를 발현하는 세포가 80% 이상이거나; 상기 CD8+T 세포 중 CD45RA를 발현하는 세포가 20% 이하인, 방법.
- [22] 11. 항목 10에 있어서, 상기 약학 조성물은 (a) 암 환자 혈액내에 존재하는 암항원 유래 에피토프를 선별하는 단계; (b) 암 환자의 혈액으로부터 분리된 PBMC(peripheral blood mononuclear cell)를 IL-2, IL-7, IL-15 및 IL-21으로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 어느 하나의 사이토카인 및 상기 에피토프와 함께 배양하는 단계; (c) 상기 (b) 단계에서 배양된 세포 중 CD8 및 4-1BB를 모두 발현하는 세포를 선별하는 단계; 및 (d) 상기 (c) 단계에서 선별된 T 세포를 항-CD3 항체 및 IL-2와 함께 배양하는 단계를 포함하여 제조된 것인, 방법.
- [23] 12. 항목 10에 있어서, 상기 암항원은 hTERT, NY-ESO1, MAGE-A3, WT1, CMV 및 EBV로 구성된 군에서 선택된 적어도 어느 하나인 것인, 방법.
- [24] 13. 항목 11에 있어서, 상기 (a) 단계 또는 (b) 단계에서 에피토프는 2종 이상인 것인, 방법.
- [25] 14. 항목 11에 있어서, 상기 (c) 단계는 외부 환경으로부터 폐쇄된 (closed-system) 유세포분석기를 사용하여 수행되는 것인, 방법.

[26]

발명의 효과

- [27] 본 발명의 CD8+T 세포 포함 약학 조성물은 암항원 특이적 CD8+T 세포를 고순도로 포함할 수 있다.
- [28] 본 발명의 CD8+T 세포 포함 약학 조성물은 항암 효능이 우수하다.
- [29] 본 발명의 CD8+T 세포 포함 약학 조성물은 T 세포치료제 임상효과가 우수하다.

- [30] 본 발명의 CD8+T 세포 생산방법은 암항원 특이적인 CD8+T 세포 생산에 필요한 암항원 유래의 에피토프를 신속하고 용이하게 선별할 수 있다.
- [31] 본 발명의 CD8+T 세포 생산방법은 암항원 특이적인 CD8+T 세포를 고순도로 선택적으로 분리, 대량 배양할 수 있다.
- [32] 본 발명의 CD8+T 세포 생산방법은 암항원 특이적인 CD8+T 세포를 신속하게 생산할 수 있다.
- [33] 본 발명의 CD8+T 세포 생산방법은 GMP 공정에 적용될 수 있다.
- [34] 본 발명의 CD8+T 세포 생산방법은 암항원 특이적인 CD8+T 세포를 고순도로 선택적으로 분리, 대량 배양할 수 있다.

[35]

도면의 간단한 설명

- [36] 도 1은 암항원 특이적인 CD8+T 세포를 생산하는 공정을 개략적으로 나타낸 도면이다.
- [37] 도 2는 종래 방법에 따른 에피토프 스크리닝 결과와 본 발명의 방법에 따른 에피토프 스크리닝 결과를 나타낸 도면이다.
- [38] 도 3은 항원 특이적 CD8+T 세포치료제의 생산 공정 및 20일 공정으로 생산된 항원 특이적 CD8+T 세포의 표현형을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.
- [39] 도 4는 T 세포치료제 완제품 자가 평가기준 및 상기 시험항목에 대한 검사 결과를 나타낸 도면이다.
- [40] 도 5는 항원 특이적 CD8+T 세포치료제의 생산 공정 및 15일 공정으로 생산된 항원 특이적 CD8+T 세포의 표현형을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.
- [41] 도 6은 T 세포치료제 완제품 자가 평가기준 및 상기 시험항목에 대한 검사 결과를 나타낸 도면이다.
- [42] 도 7 및 도 8은 EBV 특이적 CD8+T 세포를 자동세포분리기를 통하여 분리하고 유세포분석기를 이용하여 분석한 결과를 나타낸 도면이다.

[43]

발명의 실시를 위한 형태

- [44] 본 발명은 암항원 (예컨대, EBV, CMV, hTERT, NY-ESO-1, WT1, MAGE-A3 등)에 특이적인 세포독성 T 세포 높은 순도로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.
- [45] 또한 본 발명은 암세포 특이적인 면역세포를 이용한 암의 세포치료에 있어서 핵심기술인 암항원 특이적인 세포독성 T 세포의 생산에 필요한 항원펩티드(에피토프)를 7일 내에 신속하게 선별할 수 있고, 이를 이용하여 항원 특이적인 CD8+T 세포를 20일 내에 고순도로 신속하고 간편하게 분리하여 대량 배양할 수 있는, 암항원 특이적 세포독성 T 세포의 분리 및 증식방법에 관한 것이다.
- [46] 본 발명의 약학 조성물은 암항원 (예컨대, EBV, CMV, hTERT, NY-ESO-1, WT1,

MAGE-A3 등)에 특이적인 세포독성 T 세포를 포함하는 것으로서, 1차 증식으로부터 최종 T세포 대량배양 완료까지 31일이 소요되는 기존 공정으로 제조된 것일 수 있고, 또한, 26일, 20일 또는 15일이 소요되는 개량된 공정으로 제조된 것일 수 있다. (도 1)

- [47] 본 발명의 약학 조성물은 암항원 특이적 세포독성 T 세포 (예컨대, CD8 + T 세포)를 65% 이상 포함하는 것일 수 있다. 예컨대, 본 발명의 약학 조성물은 CD8 + T 세포를 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99% 이상 포함하는 것일 수 있다.
- [48] 본 발명의 일 실시예에서, 본 발명의 약학 조성물은 상기 CD8 + T 세포 중 10% 이상, 또는 20% 이상에서 발현되는 TCR β type이 1종 또는 그 이상일 수 있다.
- [49] 본 발명의 일 실시예에서, 본 발명의 약학 조성물의 CD8 + T 세포 중 CD45RO를 발현하는 세포가 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 또는 95% 이상이고, 본 발명의 다른 실시예에서, 본 발명의 약학 조성물의 CD8 + T 세포 중 CD45RO를 발현하는 세포가 80% 이상이다.
- [50] 본 발명의 일 실시예에서, 본 발명의 약학 조성물의 CD8 + T 세포 중 CD45RA를 발현하는 세포가 30% 이하, 20% 이하, 10% 이하, 5% 하이고, 본 발명의 다른 실시예에서, 본 발명의 약학 조성물의 CD8 + T 세포 중 CD45RA를 발현하는 세포가 20% 이하이다.
- [51] 본 발명의 약학 조성물은 하기의 제조방법으로 제조된 것일 수 있다.
- [52] 한 양태에서 본원은 암항원 특이적 CD8 + T 세포의 증식 및 분리 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 일 구현예에서 a) 암 환자의 혈액으로부터 분리된 PBMC(peripheral blood mononuclear cell)와 암항원 유래의 각 펩티드를 함께 배양한 후, 활성화 된 T 세포를 선별하여 암항원 CD8 + T 세포 에피토프를 선별하는 단계; b) 상기 암 환자의 혈액으로부터 분리된 PBMC를 IL-2, IL-7, IL-15 및 IL-21으로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 어느 하나의 사이토카인 및 상기 선별된 에피토프를 포함하는 배지에서 배양하여 상기 PBMC에서 4-1BB 발현을 유도하는 단계; 및 c) 상기 4-1BB 발현이 유도된 세포를 항 4-1BB 항체 및 항 CD8 항체로 염색한 후 분리하는 단계를 포함한다.
- [53] 이하, 본 발명의 항원 특이적 CD8 + T 세포 생산을 위한 항원 에피토프 선별, 항원 특이적 CD8 + T 세포의 분리 및 증식방법을 단계별로 설명한다.
- [54] 본원에 따른 방법에서 암항원 CD8 + T 세포 에피토프를 선별 또는 스크리닝(Epitope screening, 사전선별검사)하는 단계는 암세포에 결합력(avidity)이 높거나 또는 혈액 내 0.1% 이하의 낮은 농도로 존재하는 암항원 특이적 CD8 + T 세포의 농도를 높이기 위한 것으로, 암항원에 특이적인 CD8 + T 세포를 선택적으로 증식 및 분리할 수 있는 첫 번째 단계이다.
- [55] 이 단계에서는 CD8 + T 세포에 의해 인식될 수 있는 다양한 암항원 (예를 들면 EBV, CMV, hTERT, NY-ESO-1, WT1, MAGE-A3 등) 유래의 에피토프가 사용될 수 있다. 하지만 이는 환자 개개인의 상태에 따라 서로 다르다. 즉, 예를 들면

EBV, CMV, hTERT, NY-ESO-1, WT1, MAGE-A3 등과 같은 암 항원에서 동일한 종류의 암 항원이라도 각 환자에서 에피토프로 작용할 수 있는 부분은 환자 개개인의 HLA-A 유형 및 상태에 따라 달라진다. 따라서 동일한 암 항원 내에서도 각 환자별로 항원 에피토프로 작용할 수 있는 펩티드 부분이 상이하기 때문에 에피토프 스크리닝을 통해 암환자 개개인의 혈액 내에 존재하는 암항원 CD8 + T cell 에피토프를 선별하여 사용하는 것이 중요하다. 일반적으로 T 세포치료제 제조용으로는 에피토프로 작용하는 펩티드 3-4종류를 선별한다.

- [56] 본원에 따른 방법은 다양한 암항원으로부터 개인의 CD8 + T 세포 선별 및 증식에 최적인 에피토프를 선별하는 것을 포함하고, 암종에 따라 이러한 목적을 달성하는 자가(self) 또는 비자가(non-self)를 포함하는 다양한 암항원이 사용될 수 있다.
- [57] 예를 들면 환자 자신의 유전자에서 유래된 자가 암항원은 hTERT (GenBank: BAC11010.1), WT1 (GenBank: AAO61088.1), NY-ESO1 (GenBank: CAA05908.1), MAGE-A3 (NCBI Reference Sequence: NP_005353.1) 등과 암 특이적 돌연변이 항원 예를 들면 neoantigens, mutated P53, RAS 등의 종양억제 또는 유발유전자를 포함할 수 있으며, 외래 암항원으로 암유발 바이러스 항원 예를 들면 CMV, EBV, HPV 등을 포함할 수 있다.
- [58] 하지만, 암종별로 특이한 다양한 암항원에서 개인별로 최적의 에피토프를 선별하고 이를 이용하여 T 세포를 생산하는 본원 발명의 특징상 이로 제한하는 것은 아니다. 자가 암 항원으로는, 예를 들어, WT1, hTERT, NY-ESO1, Mesothelin, 및 MAGE's 등이 알려져 있다. 예를 들면 자가암항원인 hTERT는 염색체 말단에서 텔로미어 DNA(telomeric DNA)를 합성하는 효소로서 암 세포는 이 효소를 과도하게 활성화시켜 텔로미어 의존적 세포 사멸을 회피할 수 있도록 기능하고 폐암, 위암, 췌장암을 포함하는 다양한 고형암의 타겟 항원으로 알려져 있고 (Kim NW, et al. Science. 1994;266:2011-2015), WT1은 Wilms tumor와 관련된 유전자로서 zinc finger 전사인자를 암호화하여 세포의 증식과 분화, 자멸사, 기관의 발생에 관여를 하는 단백질로서 뇌척수암, 폐암 등의 타겟 항원으로 알려져 있다 (Call KM, et al., Cell. 1990. 60:509-520; Nakahara Y, et al., Brain Tumor Pathol. 2004. 21:113-6). 또한 상기 NY-ESO1은 cancer testis antigen (CTA)에 속하는 단백질 중 하나로 주로 생식세포(germ cell)와 육종(sarcoma), 유방암을 포함한 다양한 암세포에 발현하는 것으로 잘 알려져 있다 (Gnjatic S, et al., Adv Cancer Res. 2006;95:1-30). MAGE-A3은 melanoma-associated antigen family에 속하는 단백질로 정상세포에서 어떤 기능을 수행하는지에 대해서는 알려진 것이 없지만, 폐암, 육종 및 흑색종을 포함한 다양한 암세포에 과발현하는 것으로 알려져 있어 암의 면역치료에 적합한 표적 항원으로 평가되고 있다 (Decoster L, et al., Ann Oncol. 2012 Jun;23(6):1387-93). 따라서 특정 암과의 연관성이 알려진 암항원은 본원의 방법에서 개인별 암항원 CD8 + T cell 생산에 사용될 수 있다.

- [59] 또한 바이러스성 암 항원은, 예를 들어, EBV, HPV, MC polyoma 바이러스, HBV, HCV, 및 CMV 등이 알려져 있고, 엡스타인-바 바이러스 항원은 호치킨스 림프종, 코인두암종, 위암, 버키프 림프종, NK/T 림프종의 타겟 항원으로 알려져 있고, 인유두종 바이러스 항원은 자궁암 및 두경부암의 타겟 항원으로 알려져 있으며, MC 폴리오마 바이러스는 메르켈 세포암의 타겟 항원으로 알려져 있다. 또한, B형 간염 바이러스 및 C형 간염 바이러스는 간암의 표적 세포로 알려져 있다.
- [60] 조직 특이적 암 항원으로서, 타이로사나아제, GP100, 및 MNRT-1은 흑색종 타겟 항원으로, PSMA, PAP, 및 PSA는 전립선암 표적 항원으로서 알려져 있다.
- [61] 암항원 유래의 펩티드는 두 개, 세 개, 네 개, 다섯 개 또는 그 이상이 사용된다. 특히 일반적으로 T 세포치료제 제조용으로는 에피토프로 작용하는 펩티드 3-4종류가 사용되는 것을 고려하면, 사용되는 암항원 유래의 펩티드는 적어도 4개 이상, 5개 이상, 6개 이상, 7개 이상, 8개 이상, 9개 이상 또는 그 이상 사용될 수 있으나, 이로 제한하는 것은 아니며, 본원 방법의 특징 및 당업계의 기술을 고려하여 당업자의 수준에서 결정될 수 있을 것이다.
- [62] 본원의 방법에 포함되는 에피토프 스크리닝 단계는 기존의 에피토프 스크리닝 공정과는 달리 에피토프의 선별 시, 활성화된 T 세포 (예컨대, 4-1BB+ CD8 + T 세포)를 선별하는 방법으로 에피토프를 선별하는 것일 수 있다. 예컨대, 항원 자극 후 활성화된 T 세포를 선별하여, 활성화된 T 세포 (예컨대, 4-1BB+ CD8 + T 세포)의 존재 여부 및 얼마나 많은 양이 존재하는지를 검지하여 이러한 세포들을 유도할 수 있는 항원 에피토프를 선정할 수 있다. 상기 활성화된 T 세포 (예컨대, 4-1BB+ CD8 + T 세포) 선별은 자동세포분리기 (Automatic cell sorter)를 사용하여 수행될 수 있다. 상기 자동세포분리기는 GMP 공정에 적용 가능한 것일 수 있다. 예컨대 외부 환경으로부터 폐쇄된 (closed-system) 자동세포분리기일 수 있다.
- [63] 다음의 단계에서는 암 환자의 혈액으로부터 분리된 PBMC를 상기 선별된 에피토프 및 사이토카인의 조합을 포함하는 배지에서 배양하여 상기 PBMC에서 4-1BB 발현을 유도한다.
- [64] 암항원 특이적 CD8 + T 세포는 혈액 내에 0.1% 이하의 낮은 농도로 존재하므로, 혈액으로부터 분리된 PBMC에 에피토프 스크리닝을 통해 선별된 펩티드 3-4종 및 사이토카인 1종 또는 그 이상을 첨가하여 7 내지 9일간 배양함으로써 암항원으로부터 유래된 펩티드에 특이적인 CD8 + T 세포의 증식 및 4-1BB 발현의 유도가 가능하다 (도 1. B-1, B-2). 이로 인해 총 배양시간은 29일 이내, 26일 이내, 20일 이내, 18일 이내, 특히 15일로 단축시킬 수 있다.
- [65] 본원에 따른 일 구현예에서 상기 사이토카인은 IL-2, IL-7, IL-15 및 IL-21으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다. 또 다른 일 구현예에서 상기 사이토카인은 IL-2, IL-7, IL-15 및 IL-21으로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 어느 두 개의 조합일 수 있다. 예컨대, 상기 사이토카인은 IL-2 및 IL-7의 조합, IL-2 및 IL-15의 조합, IL-2 및 IL-21의 조합, IL-7 및 IL-15의 조합, IL-7 및 IL-21의

- 조합, 또는 IL-15 및 IL-21의 조합으로 사용될 수 있다.
- [66] 반면, 기존의 암항원 특이적 CD8+ T 세포의 증식은 14일 배양을 통해 이루어지며, 배양 14일째 항원 특이적 CD8+ T 세포에서 4-1BB 발현을 유도하기 위해 24시간 추가 재활성화 작업을 필요로 한다.
- [67] 일 구현예에서 본원에 따른 방법의 b)단계는 7일, 8일, 9일, 10일, 11일, 12일, 13일, 또는 14일 동안 수행될 수 있다.
- [68] 본원에 따른 방법의 첫 번째 단계와 두 번째 단계에서 사용되는 PBMC (peripheral blood mononuclear cell)는 본원에 따른 목적을 고려하여 동일 환자 유래의 것이 사용된다. PBMC는 당업계의 공지된 방법을 이용하여 전혈로부터 분리될 수 있다.
- [69] 세 번째 단계로 4-1BB 발현이 유도된 항원 특이적인 세포는 항 4-1BB 항체 및 항 CD8 항체로 염색한 후 분리된다. 분리하는 예를 들면 자동세포분리기 (Automatic cell sorter)를 이용하여 분리될 수 있다. 자동세포분리기를 사용한 항원 특이적인 4-1BB +CD8+ T 세포 분리는 기존 공정인 4-1BB 항체가 코팅된 플레이트 사용에 의해 발생하는 속도, 작업공정 난이도 등 여러 문제점들을 개선할 수 있다. 4-1BB 단백질은 항원 자극된 CD8+ T 세포 표면에서만 발현되는 마커에 대하여 형광 표지인자가 결합된 4-1BB 항체 그리고 CD8 항체로 염색한 후 두 가지 형광을 모두 가지는 항원 특이적인 CD8+ T 세포를 효율적으로 분리할 수 있다.
- [70] 위와 같이 자동세포분리기 (Automatic cell sorter)를 이용하여 4-1BB + CD8+ T 세포를 선별하는 제조방법은 EBV, hTERT, NY-ESO-1, WT1, 및 MAGE-A3 등의 암항원에 특이적인 CD8+ T 세포 제조에 적용될 수 있다. 위와 같이 자동세포분리기 (Automatic cell sorter)를 이용하여 4-1BB + CD8+ T 세포를 선별하는 제조방법으로 제조된 약학 조성물은 암항원 특이적 세포독성 T 세포를 90% 이상 (예컨대, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%) 포함하는 것일 수 있다.
- [71] 위와 같이 자동세포분리기 (Automatic cell sorter)를 이용하여 4-1BB + CD8+ T 세포를 선별하는 제조방법을 적용하여 제조된 약학 조성물 (예컨대, EBV, CMV, hTERT, NY-ESO-1, WT1, 또는 MAGE-A3 특이적 세포독성 T 세포 포함 조성물)은 암항원 특이적 세포독성 T 세포의 순도가 높아 T 세포치료제 임상효능 (예컨대, 항암 효능 등)이 우수하다.
- [72] 위의 선별 단계에 사용되는 자동세포분리기 (Automatic cell sorter)는 GMP 공정에 적용 가능한 것일 수 있다. 예컨대 외부 환경으로부터 폐쇄된 (closed-system) 자동세포분리기일 수 있다.
- [73] 본원에 따른 방법은 상기 분리된 4-1BB +CD8+ T 세포를 대량 증식시키는 단계를 추가로 포함한다.
- [74] 대량 생산하는 단계는 전단계에서 분리된 암항원 특이적 CD8+ T 세포 및 방사선 조사된 동종이계(allogeneic) PBMC를 IL-2, 항-CD3 항체 및 자가혈장이

포함된 배지에서 배양하는 단계를 포함할 수 있다. 일 구현예에서는 1L 배양용기 (culture bag 또는 G-Rex device)에 분리된 4-1BB⁺CD8⁺T 세포 ($5 \times 10^5 \sim 3 \times 10^6$ 세포), 방사선 조사된(irradiated allogeneic) PBMCs ($1 \times 10^8 \sim 3 \times 10^8$ 세포), 1000U/ml IL-2, 30ng 항-CD3 mAb를 혼합하여 7 ~ 11일간 정기적으로 배지를 첨가하여 1×10^9 세포/L 초과로 세포를 대량 배양하여, 암환자에게 투여 가능한 수준으로 증식시킨다.

- [75] 본 발명에 따른 암항원 특이적 세포독성 T 세포를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물은 약 1×10^6 cells/mL 이상, 약 2×10^6 cells/mL 이상, 약 3×10^6 cells/mL 이상, 약 4×10^6 cells/mL 이상, 약 8×10^6 cells/mL 이상, 약 6×10^6 cells/mL 이상, 약 7×10^6 cells/mL 이상, 약 8×10^6 cells/mL 이상, 약 9×10^6 cells/mL 이상, 약 1×10^7 cells/mL 이상, 약 2×10^7 cells/mL 이상, 약 3×10^7 cells/mL 이상, 약 4×10^7 cells/mL 이상, 약 5×10^7 cells/mL 이상, 약 6×10^7 cells/mL 이상, 약 7×10^7 cells/mL 이상, 약 8×10^7 cells/mL 이상, 약 9×10^7 cells/mL 이상, 약 1×10^8 cells/mL 이상, 약 2×10^8 cells/mL 이상, 약 3×10^8 cells/mL 이상, 약 4×10^8 cells/mL 이상, 약 5×10^8 cells/mL 이상, 약 6×10^8 cells/mL 이상, 약 7×10^8 cells/mL 이상, 약 8×10^8 cells/mL 이상, 또는 약 9×10^8 cells/mL 이상의 세포를 포함하나, 통상의 기술자는 동일한 효과를 얻기 위하여 변형 가능한 범위 내에서 조성물 내의 세포독성 T 세포의 농도를 조절할 수 있을 것이다. 또한 본 발명의 약학 조성물에 포함된 세포 중 CD8⁺T 세포가 약 90% 이상이다.
- [76] 상기 암항원은 OY-TES-1, hTERT, NY-ESO1, MAGE-A3, WT1, PSMA, TARP, Mesothelin, 타이로시나아제, GP100, MNRT-1, PAP, PSA, CMV, HCV, HBV, MC 폴리오마 바이러스, HPV 및 EBV로 구성된 군에서 선택된 적어도 어느 하나이다.
- [77] 본 발명에 기재된 “조성물”은 활성 성분으로서 본 발명에 따른 세포 독성 T 세포와 함께 천연 또는 인공의 담체, 라벨 또는 탐지제와 같은 불활성 성분 또는 애주번트, 희석제, 결합제, 안정화제, 완충제, 염, 친지방성 용매, 보존제와 같은 활성 성분과의 조합을 의미하며, 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함한다. 담체는 또한 약학적 부형제 및 부가적인 단백질, 펩티드, 아미노산, 지질, 및 탄수화물 (예를 들어, 단당류; 이당류; 삼당류; 사당류; 올리고당류; 알디톨, 알도산, 에스테르화된 설탕과 같은 설탕의 유도체, 폴리사카라이드, 또는 당 중합체 등)을 단독으로 또는 조합하여 포함할 수 있으며, 1 내지 99.99 중량% 또는 부피%로 포함할 수 있다. 단백질 부형제는, 예를 들어, 인간 혈청 알부민, 재조합 인간 알부민, 젤라틴, 카제인 등을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 완충 역할을 할 수 있는 대표적인 아미노산 성분은, 예를 들어, 알라닌, 알기닌, 글리신, 베타인, 히스티딘, 글루탐산, 아스파르트산, 시스테인, 라이신, 루신, 아이소루신, 발린, 메티오닌, 페닐알라닌, 아스파탐 등을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 탄수화물 부형제는 또한, 예를 들어, 프룩토스, 말토스,

- 갈락토스, 글루코스, D-만노스, 솔보스와 같은 단당류; 락토스, 수크로스, 트레할로스, 셀로비오스와 같은 이당류, 라피노스, 말토텍스트린, 텍스트란, 전분과 같은 다당류, 및 만니톨, 자일리톨, 말티톨, 락티톨, 소르비톨, 및 마이오이노시톨과 같은 알디톨을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [78] 본 발명의 약학 조성물은 당업자에 의해 공지 방법으로 제제화하는 것이 가능하다. 예를 들면, 필요에 따라서 물 또는 그 외의 약학적으로 허용되는 액과의 무균성 용액, 또는 현탁액제의 주사제의 형태로 비경구적으로 사용할 수 있다. 예를 들면, 약학적으로 허용되는 담체 또는 매체, 구체적으로는, 멸균수나 생리 식염수, 식물유, 유화제, 현탁제, 계면활성제, 안정제, 부형제, 비히클(vehicle), 방부제, 결합제 등과 적당 조합하여, 일반적으로 인정된 제약 실시예에 요구되는 단위 용량 형태로 혼화함으로써 제제화할 수 있다. 상기 제제에 있어서 유효 성분량은 지시받은 범위의 적당한 용량을 얻을 수 있도록 하는 것이다.
- [79] 또한, 주사를 위한 무균 조성물은 주사용 증류수와 같은 부형액을 이용해 통상의 제제 실시예에 따라 처방할 수가 있다. 주사용의 수용액으로서는, 예를 들면 생리 식염수, 포도당이나 그 외의 보조약을 포함한 등장용액, 예를 들면 D-소르비톨, D-만노스, D-만니톨, 염화 나트륨을 들 수 있어 적당한 용해 보조제, 예를 들면 알코올, 구체적으로는 에탄올, 폴리 알코올, 예를 들면 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 비이온성 계면활성제, 예를 들면 폴리소르베이트 80(TM), HCO-50으로 병용할 수 있다. 유성액으로서는 참기름, 콩기름을 들 수 있어 용해 보조제로서 안식향산벤질, 벤질 알코올과 병용할 수 있다.
- [80] 주사제형의 예로서는 예를 들면, 정맥내 주사, 동맥내 주사, 선택적 동맥내 주사, 근육내 주사, 복강내 주사, 피하주사, 뇌실내 주사, 뇌내 주사, 골수액강내 주사 등에 의해 투여할 수가 있지만, 바람직하게는 정맥내 주사이다.
- [81] 본 발명의 조성물은 약제학적 유효량의 T 세포를 포함한다. 유효량의 결정은 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 본 명세서에 개시된 내용을 기반으로 용이하게 결정될 수 있다. 일반적으로 약제학적 유효량은 유효 성분을 낮은 농도로 1차 투여한 후, 대상체에서 부작용이 없으면서도 요망되는 효과 (예를 들어, 암과 관련된 증상이 감소되거나 제거되는 것)를 얻을 때까지 점진적으로 증량시킴으로써 결정된다. 본 발명에 따른 조성물의 투여를 위한 적절한 투여량이나 투여 간격을 결정하는 방법은 예를 들어, Goodman and Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Goodman et al., eds., 11th Edition, McGraw-Hill 2005, and Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20th and 21st Editions, Gennaro and University of the Sciences in Philadelphia, Eds., Lippencott Williams & Wilkins (2003 and 2005)에 설명되어 있다.
- [82] 본 발명에 따른 조성물의 투여 방법은 암의 종류, 대상체의 나이, 체중, 성별, 의학적 상태, 질환의 중증도, 투여 경로, 및 별도로 투여되는 약물과 같은 다양한 인자를 고려하여 결정될 수 있다. 따라서, 투여 방법은 매우 다양하지만,

일반적으로 사용되는 방법에 따라 결정될 수 있다.

- [83] 대상체에 투여되는 본 발명에 따른 조성물의 양은 투여 방법, 대상체의 건강 상태, 체중, 의사의 처방과 같은 많은 인자에 의하여 결정될 수 있으며, 이러한 모든 인자는 당해 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자가 갖는 지식의 범위 내에 있다.
- [84] 본 발명에 따른 암항원 특이적 세포독성 T 세포를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물은 약 1×10^6 cells/mL 이상, 약 2×10^6 cells/mL 이상, 약 3×10^6 cells/mL 이상, 약 4×10^6 cells/mL 이상, 약 8×10^6 cells/mL 이상, 약 6×10^6 cells/mL 이상, 약 7×10^6 cells/mL 이상, 약 8×10^6 cells/mL 이상, 약 9×10^6 cells/mL 이상, 약 1×10^7 cells/mL 이상, 약 2×10^7 cells/mL 이상, 약 3×10^7 cells/mL 이상, 약 4×10^7 cells/mL 이상, 약 5×10^7 cells/mL 이상, 약 6×10^7 cells/mL 이상, 약 7×10^7 cells/mL 이상, 약 8×10^7 cells/mL 이상, 약 9×10^7 cells/mL 이상, 약 1×10^8 cells/mL 이상, 약 2×10^8 cells/mL 이상, 약 3×10^8 cells/mL 이상, 약 4×10^8 cells/mL 이상, 약 5×10^8 cells/mL 이상, 약 6×10^8 cells/mL 이상, 약 7×10^8 cells/mL 이상, 약 8×10^8 cells/mL 이상, 또는 약 9×10^8 cells/mL 이상의 세포를 포함하나, 통상의 기술자는 동일한 효과를 얻기 위하여 변형 가능한 범위 내에서 조성물 내의 세포독성 T 세포의 농도를 조절할 수 있을 것이다.
- [85] 또한, 완충제, 예를 들면 인산염 완충액, 초산나트륨 완충액, 무통화제, 예를 들면, 염산 프로카인, 안정제, 예를 들면 벤질 알코올, 페놀, 산화 방지제와 배합할 수 있다. 조제된 주사액은 통상, 적당한 앰플에 충전시킨다.
- [86] 현탁액 및 유탁액은, 담체로서, 예를 들어, 천연 검, 한천, 알긴산 나트륨, 펙틴, 메틸셀룰로스, 카복시메틸셀룰로스, 또는 폴리비닐알코올을 함유할 수 있다. 근육 내 주사를 위한 현탁액 또는 용액은, 활성 화합물과 함께, 약학적으로 허용되는 담체, 예를 들어, 멸균수, 올리브 오일, 에틸 올레에이트, 글리콜, 예를 들어, 프로필렌 글리콜, 및 필요하다면 적합한 양의 리도카인 염산염을 함유할 수 있다.
- [87] 본 발명에 따른 세포독성 T 세포를 포함하는 약학 조성물은 예를 들어, 정맥 주사 (bolus injection) 또는 연속 주입 (continuous infusion)으로 대상체에 투여될 수 있다. 예를 들어, 본 발명에 따른 약학 조성물은 1시간 이하, 1시간 이상, 2시간 이상, 3시간 이상, 4시간 이상, 8시간 이상, 12시간 이상, 1일 이상, 2일 이상, 3일 이상, 4일 이상, 5일 이상, 6일 이상, 7일 이상, 2주 이상, 3주 이상, 4주 이상, 1개월 이상, 3개월 이상, 6개월 이상에 적어도 1회, 적어도 2회, 적어도 3회, 적어도 4회, 또는 적어도 5회에 걸쳐, 연속적으로, 또는 일정 시간 간격으로, 또는 임상적 판단에 의하여 결정된 시간 간격을 두고 투여될 수 있다. 주사제는 앰플형으로, 또는 복수회 투여 용기의 단위 용량형으로 제형화될 수 있다. 그러나 통상의 기술자는 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여량은 대상체의 나이, 체중, 키, 성별, 일반적 의학적 상태 및 기존 치료 이력과 같은 다양한 인자들에 따라 변경될 수

있음을 이해할 것이다.

- [88] 본 발명에서 사용하는 용어 “암”은 비 정상적인, 제어되지 않는 세포 성장에 의해 야기되는 임의의 수 많은 질환 또는 질병을 의미한다. 암을 유발할 수 있는 세포를 암 세포라 하며, 제어되지 않은 증식, 불멸성, 전이 가능성, 빠른 성장 및 증식과 같은 특성을 갖으며, 독특한 형태적 특성을 갖는다. 종종, 암 세포는 종양의 형태에 존재할 수 있으나, 이러한 세포는 포유류에서 단독으로 존재하거나 백혈병 세포와 같은 비-종양성 세포일 수 있다. 암은 임상적 또는 방사선 의학적인 방법에 의해 종양의 존재를 검출하거나, 생검 등과 같은 수단으로 수득한 종양 또는 다른 생물학적 시료로부터의 세포를 시험하거나, CA125, PAP, PSA, CEA, AFP, HCG, CA 19-9, CA 15-3, CA 27-29, LDH, 및 NSE와 같은 암 혈액 표지를 측정하거나, TP53, 및 ATM와 같은 암 표지 유전자형을 검출함으로써 확인할 수 있다. 그러나 상기의 방법에 따라 음성으로 판별되더라도 반드시 암이 아닌 것으로 진단되는 것은 아니다: 예를 들어, 암 완치 판정을 받은 대상체는 여전히 암을 가질 수 있으며, 재발의 형태로 확인된다.
- [89] 본 명세서에서 사용된 용어 “약”은 당해 기술 분야에서 통상적으로 관용되는 범위, 예를 들어, 평균의 2 표준 편차 내로 이해될 수 있다. “약”은 언급된 값의 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, 0.1%, 0.05%, 또는 0.01% 이내로 이해될 수 있다.
- [90] 본 발명에서 용어, “항암”이란 “예방” 및 “치료”를 포함하며, 여기서 “예방”이란 본 발명의 항체를 포함하는 조성물 투여에 의해 암이 억제되거나 지연되는 모든 행위를 의미하고, “치료”란 본 발명의 항체 투여에 의해 암의 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.
- [91] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의해 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위를 이들 실시예로 한정하는 것은 아니다.
- [92]
- [93] **실시예 1: 암항원 선별 및 CD8+ T세포 에피토프 스크리닝**
- [94] EBV (Epstein-Bar virus)는 가장 흔하게 널리 퍼져있는 병원체로, 소아기에 감염되며 일반적으로 증상이 나타나지 않지만 대부분의 사람들이 면역기억을 형성하고 있다. 또한 EBV는 다양한 EBV 양성종양의 발병 원인이다. 따라서 정상인과 암환자 모두에서 면역반응을 유도할 수 있는 대표적 항원으로 EBV 항원을 이용하여 환자에 특이적인 에피토프 스크리닝을 다음과 같이 실시하였다.
- [95] EBV 아미노산 서열을 기존의 알고리즘 (CTLPred: <http://www.imtech.res.in/raghava/ctlpred/>, NetCTL: <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetCTL/>, SYFPEITHI: <http://www.syfpeithi.de/>)을 이용하여 분석하여 CD8 + T 세포 에피토프로 추정되는 아미노산 서열을

결정하였으며 선별된 에피토프 펩티드를 화학적으로 합성(Peptron Inc; www.peptron.com)하여 에피토프 스크리닝(epitope screening)에 사용하였다.

[96] EBV 항원으로부터 선별된 CD8 + T 세포 에피토프는 하기 표 1과 같다.

[97] [표1]

Amino Acid sequence of EBV LPM2a (Latent Membrane Protein 2a) CD8 T cell epitope	
EBV LMP2a-1 GLGTLGAAI	EBV LMP2a-10 ILTAGFLIFL
EBV LMP2a-2 LTAGFLIFL	EBV LMP2a-11 TYGPVFMSL
EBV LMP2a-3 LIVDAVLQL	EBV LMP2a-12 TYGPVFMCL
EBV LMP2a-4 CLGGLLTMV	EBV LMP2a-13 PYLFWLAAI
EBV LMP2a-5 FLYALALLI	EBV LMP2a-14 IYVLVMLVL
EBV LMP2a-6 TVCGGIMFL	EBV LMP2a-15 AYRRRWRL
EBV LMP2a-7 LLWTLVVLL	EBV LMP2a-16 RYCCYYCLTL
EBV LMP2a-8 GLATLVAML	EBV LMP2a-17 LYALALLLL
EBV LMP2a-9 SLGGLLTMV	EBV LMP2a-18 SYAAAQRKLL

[98] 표 1에서 선별된 EBV CD8 + T 세포 에피토프들을 이용하여 도 1 (A: 기존 에피토프 스크리닝 방법으로 총 15일 소요; B: 본원에 따른 에피토프 스크리닝 방법으로 총 7일 소요)에 기재된 바와 같은 단계를 거쳐 T 세포 반응성이 높은 에피토프 스크리닝을 수행하였다.

[99] 구체적으로 EBV CD8 + T 세포 에피토프 스크리닝은 EBV 양성 정상인 공여자의 말초혈액단핵구 (PBMCs, Peripheral blood mononuclear cells)를 이용하여 수행하였다. 상기 말초혈액으로부터 PBMC를 분리하여 세척한 후, CTL (Cytotoxic T Lymphocyte) 배지 (RPMI1640 배지 + 4 mM L-글루타민 + 12.5 mM HEPES + 50 μM 2-메르캅토에탄올 + 3% 자가혈장)에 1×10⁶ 세포/ml로 현탁하고, 14 ml 튜브(round tube)에 1 ml씩 분주하였다. 이어 상기 선별된 각 에피토프 펩티드를 상기 각 튜브에 2 μg/ml 농도로 첨가하여 CO₂ 인큐베이터에서 배양을 시작하였다.

[100] 이어, 본원에 따른 공정에서는 배양 이틀째, 100 U/ml IL-2가 포함된 CTL 배지를 각 튜브에 1 ml씩 첨가하였다. 배양 7일째 각 튜브로부터 배양액을 수거하여 IFN-γ의 양을 cytometric bead array (BD Bioscience)를 제조자의 방법대로 이용하여 분석하였다.

[101] 기존 에피토프 스크리닝 방법의 경우 배양 7, 9, 11, 및 13일째 1 ml 배지를 제거한 후, 100 U/ml IL-2가 포함된 CTL 배지 1ml을 첨가하였다. 배양 14일째, 각 튜브에 RPMI1640 배지를 첨가하여 1400 rpm에서 5분간 원심분리 하여 세포를 3회 세척하였다. 세척된 세포에 1 ml CTL 배지를 현탁한 후, 동일한 에피토프

펩티드를 2 µg/ml 농도로 첨가하여 배양하였다. 24시간 후, 각 튜브의 세포를 수거하여 항-CD8-PE-Cy5 및 항-4-1BB-PE 항체 (BD Bioscience)로 염색하여 유세포 분석을 하여, 4-1BB를 발현하는 CD8 + T 세포의 비율을 분석함으로써, CD8 + T 세포를 활성화시킨 에피토프 펩티드를 분석하였다.

[102] 기존 에피토프 스크리닝 방법의 경우 CD8 + T 세포에서 4-1BB의 발현을 강하게 유도하는 항원 에피토프는 1번, 3번, 9번, 11번, 13번, 14번인 것으로 나타났다 (도 2A). 본원에 따른 에피토프 스크리닝 방법의 경우, 배양 7일째 배양액으로부터 IFN-γ의 양은 에피토프 펩티드 1번, 9번, 11번, 13번 배양액에서 강하게 생산되는 것으로 나타났다 (도 2B).

[103] 상기 결과는 본원의 방법에 따른 에피토프 스크리닝 방법인 IFN-γ 생산량을 통해 선별된 암항원 에피토프와 기존의 CD8 + T 세포에서 4-1BB 발현량 분석을 통해 선별된 암항원 에피토프의 결과가 유사한 것으로 나타났다. 이러한 결과는 본원에 따른 방법은 기존의 방법과 비교하여 공정이 간단해지고, 시간도 15일에서 7일로 50% 이상 단축되었음에도 불구하고, 7일 이내의 짧은 시간에 비교적 쉽고 효과적으로 T 세포치료제 생산을 위해 필요한 암항원 에피토프의 선별이 가능하다는 것을 나타낸다. 기존 방법은 15일 공정으로 4-1BB 발현 CD8 + T 세포를 증가시키는 항원 에피토프를 최대 4종까지 선별하는 방법이며, 본원에 따른 방법은 7일 공정으로 IFN-γ를 생산량을 근거로 최대 4종의 항원 에피토프를 선별하는 방법이다. 두 방법에서 유사한 항원 에피토프가 선별되었음을 나타내며, 무엇보다 본원에 따른 공정은 현재 증식중인 항원 특이적인 CD8 + T 세포에서 생산되는 IFN-γ를 측정하는 것이므로, 15일 기존 공정 스크리닝에서 발생하는 문제를 보완할 뿐만 아니라, 보다 정확한 방법이다. 선별된 에피토프를 이용한 T 세포 증식의 실시예를 도 5, 도 6에서 참조할 수 있다.

[104]

[105] 실시예 2: 본원의 방법에 따른 항원 특이적 세포치료제의 시험제조 (20일 공정)

[106] CMV (Cytomegalovirus)는 대부분의 사람들의 성장과정 동안 감염되어 T 세포의 면역기억이 형성되어 있으며, 항원성이 강력하여 항원 특이적 CD8 + T 세포의 증식을 유도할 수 있으며, 항원 특이적 CD8 + T 세포를 검출하기 위한 MHC 클래스 I 펜타머 역시 개발되어 시중에서 구입이 가능하다. 따라서 항원 특이적 CD8 + T 세포치료제의 시험생산은 CMV 양성 정상인 혈액을 이용하여 도 3에 기재된 단계에 따라 수행하였다. T 세포 치료제 생산은 에피토프 펩티드에 특이적인 CD8 + T 세포의 증식, 분리, 및 대량 배양의 세 단계로 구성되며, 구체적인 실험방법 및 결과는 다음과 같다.

[107] 2-1. 항원 특이적 CD8+ T세포의 증식

[108] CMV 양성 정상인 혈액으로부터 PBMC는 다음과 같이 분리하였다. 7 ml 피콜-하이파크(Ficoll-hypaque)가 채워진 15 ml 튜브(cornical tube)에 7 ml 혈액을 천천히 흘러보내 피콜 용액 상층에 오버레이(overlay) 하였다. 튜브를 상온 2000 rpm에서 20분간 원심분리 하였으며, 피콜과 혈장 사이에 위치한 흰색의

세포층만을 수거하여 세척한 후 PBMC로 사용하였다. Autoplasma(자가혈장)은 PBMC 위층에 있는 밝은 노란색 층에서 분리되었으며, 필터를 이용하여 여과한 후 사용하였다.

[109] 이어 분리된 PBMC를 CTL 배지 (RPMI1640 medium + 4 mM L-glutamine + 12.5 mM HEPES + 50 μ M 2-mercaptoethanol + 3% autoplasma)에 1×10^6 세포/ml로 현탁하고, CMV 펩티드 2 μ g/ml (NLVPMVATV, CMV/pp65 495-504, (주)웹트론)를 2 μ g/ml 농도가 되도록 첨가하였다. 이들 세포 현탁액을 14 ml 튜브(round tube)에 1 ml씩 분주하여 CO₂ 인큐베이터에서 배양을 시작하였다.

[110] 배양 이틀째 100 U/ml IL-2 (Proleukin, Novatis) + 3% autoplasma가 포함된 CTL 배지를 각 튜브에 1 ml씩 첨가하였다.

[111] 배양 7일째 1 ml 상층배지를 제거한 후, 100 U/ml IL-2 + 3% autoplasma가 포함된 CTL 배지를 첨가하여, 2일 동안 추가 배양하였다.

[112] **2-2. 항원 특이적 CD8+ T세포의 선택적 분리**

[113] 이어 배양 9일째, 배양 중인 PBMC를 수거하여 PBS (Phosphate-buffered saline)로 두 번 세척하였다. 세척된 PBMC를 항-4-1BB 항체 및 항-CD8 항체로 4°C에서 30분간 염색한 후, PBS로 두 번 세척하였다. 염색 후 세척된 PBMC를 자동세포분리기 (Automatic cell sorter, 제조사 및 모델명 1: Miltenyi biotec. Tyto. 제조사 및 모델명 2: BD Bioscience. BD FACSAria)를 이용하여 분리하고, RPMI1640 배지로 두 번 세척하였다. 이어 자동세포계수기 (EVE Automatic cell counter, NanoEnTek)로 세포를 계수하여 5×10^5 세포/ml로 ALyS505N 배지 (CELL SCIENCE & TECHNOLOGY INST., INC.)를 이용하여 현탁한 후 다음 단계를 진행하였다.

[114] **2-3. 항원 특이적 CD8+ T세포의 대량 배양**

[115] 정상 공여자 200ml 혈액으로부터 PBMC를 분리하여 1×10^7 세포/ml로 현탁한 후, 3000 rad로 방사선 조사하여 세포의 사멸을 유도한 후, T 세포의 증식 유도에 필요한 공동자극(costimulation)을 제공할 수 있는 배양 첨가물로 사용하였다.

[116] 50 ml 코너컬 튜브에 실시예 2-1에서 분리된 항원 특이적 CD8 + T 세포 5×10^5 세포와 상기 방사선 조사된 allogenic PBMCs 1×10^8 세포를 첨가한 후, 1,000 U/ml IL-2, 30 ng/ml 항-CD3 mAb (BD Bioscience) 및 3% 자가혈장(autoplasma)이 포함된 ALyS505N 배지를 50 ml 까지 첨가하였다. 이어 50 ml 세포현탁액을 1L 배양용기 ((1L culture bag (NIPRO) 또는 1L G-Rex device (Wilson Wolf))에 주입한 후, CO₂ 인큐베이터에서 배양을 시작하였다.

[117] 배양 3일째, 1,000 U/ml IL-2, 3% 자가혈장이 포함된 ALyS505N 배지 150 ml을 1L 배양용기에 추가 주입하였다. 배양 6일째, 1,000 U/ml IL-2, 3% 자가혈장이 포함된 ALyS505N 배지 300 ml을 1L 배양용기에 추가 주입하였다. 배양 9일째, 1,000 U/ml IL-2, 3% 자가혈장이 포함된 ALyS505N 배지 500ml을 1L 배양용기에 추가 주입하였다. 배양 11일째, 1L 배양용기의 모든 세포를 수거하여 주사용 생리식염수로 세 번 세척하며, 5% 알부민이 포함된 주사용 생리식염수에 세포를

현탁하여 완제품 T 세포치료제를 충전하였다.

[118] 상기와 같이, 20일 공정으로 생산된 항원 특이적 CD8 + T 세포는 표현형이 CD3 +, CD8 +, CMV +, CD45RO +, CD45RA -, CD62L (CD62L +; ~7.4%), CCR7 -, CD27 - (CD27 +; ~7.5%)인 CMV 특이적 CD8 + T 세포인 것으로 나타났다(도 3).

[119] 현재 진행 중인 T 세포치료제 완제품 평가기준 (식품의약품안전처, T 세포치료제 임상시험 완제품 자가 평가기준)에 따라 완제품을 분석하였다.

[120] 평가기준의 시험항목은 표 2에 기재된 바와 같으며, 즉 1) 총세포수측정시험: 생산된 T 세포가 완제품 평가기준에 적합하게 생산되었는지를 시험. 2) 세포생존율: 생산된 T 세포치료제의 생존율이 평가기준, 70% 이상 인지를 시험. 3) 확인시험: 생산된 완제품의 CD8 + T 세포비율이 65% 이상인지를 시험. CD45RA는 생산된 T 세포가 Naive CD8 + T 표현형을 가지는지, CD45RO는 생산된 T 세포가 Effector/Memory CD8 + T 표현형을 가지는 지를 측정하는 시험. 4) 순도시험: CD57은 노화된 CD8 + T 세포가 얼마나 포함되었는지, PD-1은 기능이 없는 CD8 + T 세포(Exhausted CD8 + T)가 얼마나 포함되는지, Anti-CD3는 대량생산에 사용되었던 항체가 완제품에 남아있는지를 확인하기 위한 잔류물 검사. 5) 세포기능시험: TCR $\nu\beta$ typing은 세포 생산을 위해 넣어준 항원 에피토프에 대해 특정 TCR types을 가진 CD8 + T 세포가 최소 20% 이상 생산되었는지를 시험, IFN- γ production and LAMP1 expression은 항원 특이적으로 작용기전을 가진 CD8 + T 세포가 얼마나 있는지를 시험하는 것이다.

[121]

[표2]

시험항목		시험기준	기존 생산 공정 (항 4-1BB 항체가 코팅된 plate를 이용)	신규 생산 공정 (자동세포 분리기 이용)
총세포수측정시험		7.0×10^6 cell/ml ± 10%100ml/infusion bag	6.7×10^6 cell/ml,200ml, 2 bags	6.9×10^6 cell/ml,200ml, 2 bags
세포 생존율시험		≥ 70%	~ 92.3%	~ 95.0%
확인시험	CD8 T	≥ 65%	65.0% ~ 85.0%	~ 95.0%
	CD45RA	CD8 T 세포 중 ≤ 20 %	~ 13.3%	~1.7%
	CD45RO	CD8 T 세포 중 ≥ 80%	~98.5%	~99.7%
순도시험	CD57	CD8 T 세포 중 ≤ 35%	~19.5%	~16.8%
	PD-1	CD8 T 세포 중 ≤ 20%	~2.3%	~2.1%
	anti-CD3 mAb	음성	음성	음성
세포기능 시험	IFN-γ production	CD8 T 세포 중 ≥ 10%	~ 54.4%	~43%
	LAMP1 expression	CD8 T 세포 중 ≥ 10%	~83.2%	~65%
품질검사	무균시험	음성	-	-
	엔도톡신시험	≤ 1.0 EU/ml	-	-
	마이코플라즈마 시험	음성	-	-
	외래성바이러스 부정시험	음성	-	-

[122]

[123]

분석한 결과 식약처로부터 승인받은 T 세포치료제 완제품 자가 평가기준 및 상기 시험항목에 대한 검사결과 이에 적합한 T 세포치료제가 생산되어짐을 확인하였다 (도 4).

- [124] 추가로, 기존 생산 공정 (항 4-1BB 항체가 코팅된 플레이트를 이용한 세포 분리 공정)과 상술한 바와 같은 본원에 따른 자동세포분리기를 이용한 세포 분리 공정에 따라 생산된 T 세포치료제를 표 2에 기재된 시험항목 및 시험기준에 따라 품질을 비교한 경우, 두 공정에서 생산된 T 세포 치료제가 임상시험을 실시하기에 모두 적합한 것으로 나타났으나 (도 4), 본원의 방법에 따라 생산된 T 세포치료제가 총 세포 수, 순도 및 생존율 우수한 것으로 나타났다. 특히 본원에 따른 공정에 의해 생산된 CD8+ T 세포 치료제는 순도가 대부분 95% 이상인 것으로 나타났다. 이러한 결과는 본원에 따른 방법이 기존의 방법과 비교하여, 보다 짧은 시간에 순도가 높은 T 세포를 쉽고 빠르게 생산할 수 있음을 나타내는 것이다.
- [125]
- [126] 실시예 3: 본원의 방법에 따른 EBV 특이적 CD8+ T세포치료제의 시험제조 (20일 공정)
- [127] 3-1. EBV 특이적 CD8+ T 세포의 증식
- [128] EBV 양성 정상인 혈액으로부터 PBMC를 분리하여 사용하였으며, 실시예 2의 2-1의 과정에서 CMV 펩티드가 아닌 EBV 펩티드를 사용하였으며, 사용된 EBV 펩티드는 실시예 1 과정을 통하여 선별하였다.
- [129] 3-2. EBV 특이적 CD8+ T 세포의 선택적 분리
- [130] 실시예 2번의 2-2번 과정을 동일하게 수행하였으나 자동세포분리기의 경우 BD Bioscience 사의 FACSMelody를 사용하였으며, 자동세포계수기의 경우 Logos Biosystems의 LUNA-FL을 사용하였다.
- [131] 3-3. 항원 특이적 CD8+ T 세포의 대량배양
- [132] 정상 공여자 혈액을 방사선 조사하여 세포의 사멸을 유도하고, PBMC를 분리하여 1×10^7 cells/ml로 현탁 후 냉동하여 보관한다. 방사선이 조사된 PBMC (allogenic PBMC)는 T 세포의 증식 유도에 필요한 공동자극을 제공할 수 있는 배양 첨가물로 사용한다. 이때 분리한 alloplasma는 PBMC 위층에 있는 밝은 노란색 층에서 분리되었으며, 필터를 이용하여 여과한 후 사용하였다.
- [133] 50ml 튜브에 선택적으로 분리된 EBV 펩티드에 특이적 CD8+ T 세포와 방사선 조사된 allogenic PBMC를 분리된 세포 수의 200배만큼 수를 준비해서 3% alloplasma가 포함된 ALys505N 배지 30ml에 현탁 한다. 여기에 1,000 IU/ml IL-2와 항-CD3 항체 30 ng/ml을 첨가한다. 이어 30ml의 세포 현탁액을 75T flask에 넣고 CO₂ 인큐베이터에서 배양을 시작하였다.
- [134] 배양 3일째 1,000 IU/ml IL-2, 3% alloplasma가 포함된 ALys505N 배지 20ml을 75T 플라스크에 추가로 넣어준다. 배양 5일째부터 15일째가 되는 날까지 2~3일 간격으로, 1,000 IU/ml IL-2, 3% alloplasma가 포함된 ALys505N 배지를 동량만큼 추가로 넣어준다. 배양 15일째, 모든 배양중인 세포를 수거하였다.
- [135] 상기와 같이, 20일 공정으로 생산된 5명의 EBV 특이적 CD8+ T 세포에 대하여 확인 및 순도에 대한 시험을 수행하였을 때 아래 표 2와 같이 나왔으며, 표 2의

평가기준에 해당하는 항목에 대한 기준을 만족하였다.

[136] [표3]

공여자	CD8 (%) (≥ 80%)	CD57 : CD8 (%) (≤ 35%)	PD-1 : CD8 (%) (≤ 20%)	CD45RA : CD8 (%) (≤ 20%)	CD45RO : CD8 (%) (≥ 80%)
1	95.58	7.02	3.82	0.63	97.86
2	91.19	12.70	2.27	12.81	85.36
3	96.65	11.21	5.36	3.45	86.00
4	96.17	6.40	6.30	1.16	88.46
5	94.72	27.25	2.68	1.94	97.79

[137] 또한 역가에 대한 시험을 수행한 결과 아래 표와 같이 나왔으며, 모두 표 2의 평가기준에 만족하는 결과를 얻었다.

[138] [표4]

공여자	LAMP-1 : CD8 (%) (≥ 10%)	IFN-g : CD8 (%) (≥ 10%)
1	29.5	48.4
2	13.53	12.88
3	15.15	18.75
4	30.20	48.02
5	35.06	19.94

[139]

[140] 실시예 4: 본원의 방법에 따른 EBV 특이적 CD8+ T세포치료제의 시험제조 (26일 공정)

[141] 4-1. EBV 특이적 CD8+ T 세포의 증식

[142] 실시예 3의 3-1 과정을 동일하게 수행하였다.

[143] 4-2. EBV 특이적 CD8+ T 세포의 선택적 분리

[144] 배양 14일째, 배양 중인 PBMC를 수거하여 RPMI 배지에 세척하였다. 세척된 PBMC를 자동세포계수기 (Logos Biosystems, LUNA-FL)로 계수하고, 세포를 2x10⁶ cell/ml씩 배양할 수 있도록 세포를 CTL 배지에 현탁 하였다. 세포가 현탁된 CTL 배지에 3% 자가혈장(autoplasma)과 100 IU/ml IL-2를 넣어준 후, 24웰 플레이트의 칸마다 2x10⁶ 만큼의 세포가 1 ml씩 들어가도록 현탁 한 세포를 넣어 주었다. 배양 첫째 날 첨가했던 hTERT, WT1, NY-ESO-1 펩티드들을 2 ug/ml 농도가 되도록 첨가하고, CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다.

[145] 배양 15일째, 배양 중인 PBMC를 수거하여 RPMI 배지에 세척하였다. 세척된 PBMC를 항 4-1BB 항체 와 항-CD8 항체로 4°C에서 30분간 염색 후, 다시 RPMI

배지로 세척하였다. 염색 후 세척된 PBMC를 자동세포분리기 (BD Biosciences, FACSMelody)를 이용해서 4-1BB와 CD8을 발현하는 세포를 선택적으로 분리하였다. 선택적으로 분리된 세포는 RPMI 배지로 세척하고, 자동세포계수기로 세포를 계수하였다. 분리된 세포는 ALyS505N 배지를 이용하여 세포를 현탁 한 후 다음 단계를 진행하였다.

[146] 공여자 5의 경우 EBV 5번에 해당하는 펩티드를 이용하여 실시예 4의 4-1 과정을 진행하였으며, 자동세포분리기를 통하여 분리된 CD8 +4-1BB+ 세포에 PE-MHC Class I Pentamer (Proimmune, A*02:01 FLYALALLL)를 이용하여 염색을 실시하고, 유세포분석기 (BD Biosciences, FACSCelesta)를 이용하여 분석하였다. 그 결과, 96.9%의 세포가 EBV 특이적인 CD8 + T세포인 것을 확인할 수 있었다. (도 7, 및 도 8)

[147] **4.3. 항원 특이적 CD8+ T 세포의 대량배양**

[148] 정상 공여자 혈액을 방사선 조사하여 세포의 사멸을 유도하고, PBMC를 분리하여 1×10^7 cell/ml로 현탁 후 냉동하여 보관하였다. 방사선이 조사된 PBMC (allogenic PBMC)는 T 세포의 증식 유도에 필요한 공동자극을 제공할 수 있는 배양 첨가물로 사용하였다. 이때 분리한 alloplasma는 PBMC 위층에 있는 밝은 노란색 층에서 분리되었으며, 필터를 이용하여 여과한 후 사용하였다.

[149] 50ml 튜브에 선택적으로 분리된 EBV 펩티드에 특이적 CD8 + T 세포와 방사선 조사된 allogenic PBMC를 분리된 세포 수의 200배 만큼 수를 준비해서 3% alloplasma가 포함된 ALys505N 배지 30ml에 현탁 하였다. 여기에 1,000 IU/ml IL-2와 항 CD3 항체 30 ng/ml을 첨가하였다. 이어 30ml의 세포 현탁액을 75T 플라스크에 넣고 CO₂ 인큐베이터에서 배양을 시작하였다.

[150] 배양 3일째 1,000 IU/ml IL-2, 3% alloplasma가 포함된 ALys505N 배지 20ml을 75T 플라스크에 추가로 넣어주었다. 배양 5일째부터 11일째가 되는 날까지 2~3일 간격으로, 1,000 IU/ml IL-2, 3% alloplasma가 포함된 ALys505N 배지를 동량만큼 추가로 넣어주었다. 배양 11일째, 모든 배양중인 세포를 수거하였다.

[151] 상기와 같이, 26일 공정으로 생산된 항원 특이적 CD8 + T세포에 대하여 확인 및 순도를 확인하기 위한 시험을 진행한 결과 아래 표 5와 같이 표 2에 제시된 기준을 모두 만족하는 것을 확인하였다.

[152] [표5]

공여자	CD8 (%) (≥ 80%)	CD57 : CD8 (%) (≤ 35%)	PD-1 : CD8 (%) (≤ 20%)	CD45RA : CD8 (%) (≤ 20%)	CD45RO : CD8 (%) (≥ 80%)
5	97.47	4.60	6.97	1.03	98.49
6	99.13	8.31	2.27	6.28	90.25

[153] 또한 역가시험을 진행한 결과 아래 표 6에 나온 것처럼 표 2의 역가시험 기준을

충족하는 것을 확인하였다.

[154] [표6]

공여자	LAMP-1 (%) (≥ 10%)	IFN-g (%) (≥ 10%)
5	22.28	24.19
6	10.07	17.10

[155]

[156] 실시예 5: 본원의 방법에 따른 EBV 특이적 CD8+ T세포치료제의 시험제조 (29일 공정)

[157] 5-1. EBV 특이적 CD8+ T 세포의 증식

[158] 실시예 4의 4-1 과정을 동일하게 수행하였다.

[159] 5-2. EBV 특이적 CD8+ T 세포의 선택적 분리

[160] 실시예 4의 4-2 과정을 동일하게 수행하였다.

[161] 5-3. EBV 특이적 CD8+ T 세포의 대량배양

[162] 실시예 4의 4-3 과정을 동일하게 수행하였으나 차이점으로는 배양 11일 까지가 아닌 14일째가 되는 날까지 2~3일 간격으로, 1,000 IU/ml IL-2, 3% alloplasma가 포함된 ALys505N 배지를 동량만큼 추가로 넣어주었으며, 배양 14일째, 모든 배양중인 세포를 수거하였다.

[163] 상기와 같이, 29일 공정으로 생산된 항원 특이적 CD8+ T세포에 대하여 확인 및 순도를 확인하기 위한 시험을 진행한 결과 아래 표 7과 같이 표 2에 제시된 기준을 모두 만족하는 것을 확인하였다.

[164] [표7]

공여자	CD8 (%) (≥ 80%)	CD57 : CD8 (%) (≤ 35%)	PD-1 : CD8 (%) (≤ 20%)	CD45RA : CD8 (%) (≤ 20%)	CD45RO : CD8 (%) (≥ 80%)
7	98.6	1.85	2.92	1.25	97.94

[165] 또한 역가시험을 진행한 결과 아래 표 8에 나온 것처럼 표 2의 역가시험 기준을 충족하는 것을 확인하였다.

[166] [표8]

공여자	LAMP-1 (%) (≥ 10%)	IFN-g (%) (≥ 10%)
7	21.50	44.81

[167] 대량 배양으로 생산한 세포의 항원 특이성을 확인하고자 EBV 펩티드 5번으로 생산된 공여자 7의 세포를 PE-MHC Class I Pentamer (Proimmune, A*02:01 FLYALALLL)과 APC-MHC Class I Pentamer (Proimmune, A*02:01 LLWTLVVLL)을 이용하여 세포표면을 염색한 결과 92.6%의 EBV #5 특이적인

CD8 + T 세포인 것을 확인하였다. (도 8)

[168]

[169] 실시예 6: 본원의 방법에 따른 항원 특이적 CD8+ T세포치료제의 시험제조 (15일 공정)

[170] 실시예 3의 20일 공정과의 차이점은 다음과 같다. 20일 공정에서 1차 증식은 IL-2가 있는 조건에서 배양하였으나, 15일 공정은 사이토카인의 조합 즉 예를 들면 IL-2 + IL-21의 배양 조건에서 CD8 + T 세포를 증식하였다. 대량배양의 경우 20일 공정은 항원 특이적 CD8 + T 세포 5×10^5 세포와 방사선 조사된 동종이형(allogeneic) PBMCs 1×10^8 세포를 이용하였으나, 15일 공정은 CD8 + T 세포 1.5×10^6 의 세포와 방사선 조사된 동종이형 PBMCs 3×10^8 의 세포를 대량 배양에 사용하였다. 또한 전체 배양액은 1L로 동일하나 공정기간 중 추가되는 배양액의 양이 상이하다.

[171] EBV 양성 정상인 혈액을 이용하여 도 5에 기재된 단계에 따라 항원 특이적 T 세포치료제의 시험생산을 수행하였다. 구체적 실험방법 및 결과는 다음과 같다.

[172] **6-1. 항원 특이적 CD8+ T세포의 증식**

[173] EBV 양성 정상인 혈액으로부터 PBMC는 다음과 같이 분리하였다. 7 ml 피콜-하이파크(Ficoll-hypaque)가 채워진 15 ml 튜브(cornical tube)에 7 ml 혈액을 천천히 흘려보내 피콜 용액 상층에 오버레이(overlay)하였다. 튜브를 상온 2000 rpm에서 20분간 원심분리 하였으며, 피콜과 혈장 사이에 위치한 흰색의 세포층만을 수거하여 세척한 후 PBMC로 사용하였다. Autoplasma(자가혈장)은 PBMC 위층에 있는 밝은 노란색 층에서 분리되었으며, 필터를 이용하여 여과한 후 사용하였다.

[174] 이어 분리된 PBMC를 CTL 배지 (RPMI1640 medium + 4 mM L-glutamine + 12.5 mM HEPES + 50 μ M 2-mercaptoethanol + 3% autoplasma)에 1×10^6 세포/ml로 현탁하고, EBV 펩티드 (EBV LMP2a-1 GLGTLGAAI, EBV LMP2a-9 SLGGLTMMV, EBV LMP2a-11 TYGPVFMSL, EBV LMP2a-13 PYLFWLAAI, (주)펩트론)를 각 2 μ g/ml 농도가 되도록 첨가하였다. 이들 세포 현탁액을 14 ml 튜브(round tube)에 1 ml씩 분주하여 CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다.

[175] 배양 이틀째 100 U/ml IL-2 (Proleukin, Novatis) + 10 U/ml IL-21 (Miltenyi Biotec) + 3% autoplasma가 포함된 CTL 배지를 각 튜브에 1 ml씩 첨가하여, 5일 동안 추가 배양하였다.

[176] **6-2. 항원 특이적 CD8+ T세포의 선택적 분리**

[177] 이어 배양 7일째, 배양 중인 PBMC를 수거하여 PBS (Phosphate-buffered saline)로 두 번 세척하였다. 상기 세척된 PBMC를 항 4-1BB 항체 및 항 CD8 항체로 4°C에서 30분간 염색한 후, PBS로 두 번 세척하였다. 염색 후 세척된 PBMC를 자동세포분리기 (Automatic cell sorter, Miltenyi biotec. Tyto. 제조사 및 모델명 2: BD Bioscience. BD FACSAria)를 이용하여 분리하고, RPMI1640 배지로 두 번 세척하였다. 자동세포계수기 (EVE Automatic cell counter, NanoEnTek)로

세포를 계수하여 5×10^5 세포/ml로 ALyS505N 배지 (CELL SCIENCE & TECHNOLOGY INST., INC. (CSTI))를 이용하여 현탁하였다.

[178] **6-3. 항원 특이적 CD8+ T세포의 대량배양**

[179] 정상 공여자 300ml 혈액으로부터 PBMC를 분리하여 1×10^7 세포/ml로 현탁한 후, 3000 rad로 방사선 조사하여 세포의 사멸을 유도한 후, T 세포의 증식 유도에 필요한 공동자극(costimulation)을 제공할 수 있는 배양 첨가물로 사용하였다.

[180] 분리된 항원 특이적 CD8+ T 세포 1.5×10^6 세포와 irradiated allogeneic PBMCs 3×10^8 세포, 1,000 U/ml IL-2, 30 ng/ml 항-CD3 mAb (BD Bioscience) 및 3% 자가혈장(autoplasma)을 200ml ALyS505N 배지에 첨가하였다. 200 ml 세포현탁액을 1L 배양용기 (1L culture bag (NIPRO) 또는 1L G-Rex device (Wilson Wolf))에 주입한 후, CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다.

[181] 배양 3일째, 1,000 U/ml IL-2, 3% 자가혈장이 포함된 ALyS505N 배지 300 ml을 1L 배양용기에 추가 주입하였다. 배양 6일째, 1,000 U/ml IL-2, 3% 자가혈장이 포함된 ALyS505N 배지 500 ml을 1L 배양용기에 추가 주입하여, 2일 동안 추가 배양하였다. 배양 8일째, 1L 배양용기의 모든 세포를 수거하여 주사용 생리식염수로 세 번 세척하며, 5% 알부민이 포함된 주사용 생리식염수에 세포를 현탁하여 완제품 T 세포치료제를 충전하였다.

[182] 이어 상기 T 세포치료제의 품질을 검사하였다.

[183] 그 결과 도 5에 기재된 바와 같이 15일 공정으로 생산된 항원 특이적 CD8+ T 세포는 CD3⁺, CD8⁺, CD45RO⁺, CD45RA⁻, CD62L⁻, CCR7⁻, CD27⁻(CD27⁺; ~6.5%) 표현형을 가진 고순도의 항원 특이적 CD8+ T 세포인 것으로 나타났다. 표 2에서와 같이 세포치료제 완제품 평가기준에 따라 완제품을 분석하였을 때, 도 6에 나타난 바와 같이 평가기준에 적합한 T 세포치료제가 생산됨을 확인하였다.

[184]

[185] **실시예 7: EBV 유래 항원 특이적 CD8+ T세포 (앵비앤티셀) 완제의약품의 독성 시험 결과**

[186] 생쥐 유래 CTL의 투여군과 위약 투여군의 반복독성 시험 결과는 다음과 같다. 1) 실험기간 중 시험물질에 의한 사망동물 및 일반증상은 관찰되지 않았다. 2) 체중, 사료 및 물 섭취량, 안검사, 요검사 및 혈액학적 검사결과, 변화가 관찰되지 않았다. 3) 혈액생화학적 검사 및 장기중량 측정결과, 시험물질에 의한 변화가 관찰되지 않았다. 4) 부검 및 조직병리학적 소견에서 시험물질에 의한 변화는 관찰되지 않았다.

[187] 따라서, 생쥐 유래 CTL을 C57BL/6N 계통의 암수 마우스에 대한 3 주간 4 회 반복 정맥내 투여는 사망률, 일반증상, 체중변화, 사료 및 물 섭취량, 안검사, 요검사, 혈액학 및 혈액생화학적 검사, 부검소견, 장기중량 및 조직병리학적 검사에서 어떠한 독성학적 영향도 유발하지 않았다. 따라서, 본 시험조건하에서 본 시험물질의 무독성량(NOAE: no observed adverse effect level)은 암수 모두 6

× 10⁶ cells/head로 판단되었으며, 표적장기는 관찰되지 않았다.

[188]

[189] 실시예 8: 앵비엔티셀 완제의약품의 분포 시험 결과

[190] 앵비엔티셀 완제의약품 투여 후 생체 내 분포를 확인하였다.

[191] CD8 T 세포 투여 10일째는 투여된 CD8 T 세포 반응이 가장 강력한 시기로, 0.7배의 CD8 T 세포를 투여한 경우, 일부 생쥐 (male #3, female #8)의 secondary lymphoid organ에서만 낮은 비율 (0.1 - 0.2% 미만)로 검출되었다. 7배의 CD8 + T 세포를 투여한 경우, 대부분의 secondary lymphoid organ (inguinal, axillary, cervical, mesenteric LN 및 spleen)에서 투여된 CD8 T 세포가 1-5% 수준내에서 검출되었다. 그 외의 장기 중에서는 폐에서만 0.5 ~ 7% 수준으로 투여된 CD8 + T 세포가 검출되었으며, kidney, bone marrow, brain, liver, thymus, heart, sex organ 인 testis / ovary 에서는 투여된 CD8 + T 세포가 검출되지 않았다.

[192] CD8 + T 세포 투여 30일째는 투여된 CD8 + T 세포 반응이 면역기억을 형성한 시기로, 작용기능을 나타내는 CD8 + T 세포는 감소하고, 면역기억을 담당하는 일부 memory T 세포만 남게 된다. 3.32 × 10⁵ 의 CD8 + T 세포를 투여한 경우, 모든 생쥐에서 투여된 CD8 + T 세포가 검출되지 않았다. 3.32 × 10⁶ 의 CD8 + T 세포가 투여된 경우, male #1-5 생쥐의 secondary lymphoid organ (inguinal, axillary, cervical, mesenteric LN 및 spleen)에서만 투여된 CD8 + T 세포가 2% 수준내에서 검출되었고 그 외의 장기인 kidney, bone marrow, brain, liver, lung, thymus, heart, sex organ 인 testis / ovary 에서는 투여된 CD8 + T 세포가 검출되지 않았다.

[193] 따라서, 항원 특이적 CD8 + T 세포는 대부분 secondary lymphoid organ 으로 이동하여 축적되고 증식하여 항암효과를 나타내는 것으로 판단되며, 일반적인 장기에 투여된 항원 특이적 CD8 + T 세포가 축적되거나 증식하는 현상은 일어나지 않는 것으로 조사되었다.

[194]

[195] 예를 들어, 청구항 구성 목적을 위해, 이하 기재되는 청구항은 어떤 식으로든 이의 문자 그대로의 언어보다 좁게 해석되어선 안 되고, 따라서 명세서로부터의 예시적 구현예가 청구항으로 읽혀서는 안 된다. 따라서, 본 발명은 예시로서 기재되었고, 청구항의 범위에 대한 제한이 아님이 이해되어야 한다. 따라서, 본 발명은 하기 청구항에 의해서만 제한된다. 본 출원에 인용된 모든 간행물, 발행된 특허, 특허 출원, 서적 및 저널 논문은 이들의 전체내용이 참조로서 본원에 각각 포함된다.

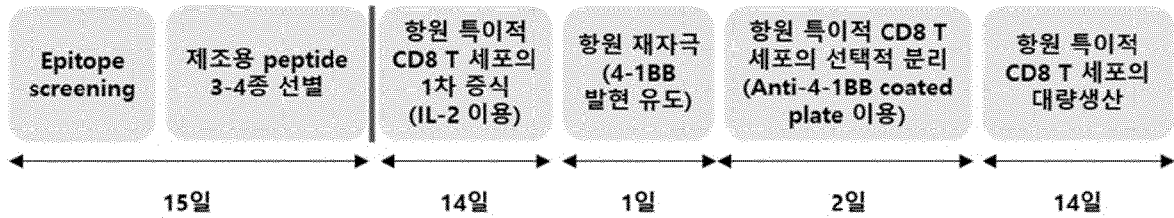
청구범위

- [청구항 1] 암항원 특이적 세포독성 T 세포를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물로서,
 약 7×10^6 cells/mL 이상의 세포를 포함하고,
 상기 약 7×10^6 cells/mL 이상의 세포 중 CD8+T 세포가 약 90% 이상이고,
 상기 CD8+T 세포 중 CD45RO를 발현하는 세포가 80% 이상이거나; 상기 CD8+T 세포 중 CD45RA를 발현하는 세포가 20% 이하인,
 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 2] 청구항 1에 있어서, 상기 약학 조성물은
 (a) 암 환자 혈액내에 존재하는 암항원 유래 에피토프를 선별하는 단계;
 (b) 암 환자의 혈액으로부터 분리된 PBMC(peripheral blood mononuclear cell)를 IL-2, IL-7, IL-15 및 IL-21으로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 어느 하나의 사이토카인 및 상기 에피토프와 함께 배양하는 단계;
 (c) 상기 (b) 단계에서 배양된 세포 중 CD8 및 4-1BB를 모두 발현하는 세포를 선별하는 단계; 및
 (d) 상기 (c) 단계에서 선별된 T 세포를 항-CD3 항체 및 IL-2와 함께 배양하는 단계를 포함하여 제조된 것인, 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 3] 청구항 1에 있어서, 상기 암항원은 hTERT, NY-ESO1, MAGE-A3, WT1, CMV 및 EBV로 구성된 군에서 선택된 적어도 어느 하나인 것인, 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 4] 청구항 2에 있어서, 상기 (a) 단계 또는 (b) 단계에서 에피토프는 2종 이상인 것인, 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 5] 청구항 2에 있어서, 상기 (c) 단계는 외부 환경으로부터 폐쇄된 (closed-system) 유세포분석기를 사용하여 수행되는 것인, 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 6] 암을 예방 또는 치료하기 위한 약학 조성물의 제조 방법으로서,
 (a) 암 환자 혈액내에 존재하는 암항원 유래 에피토프를 선별하는 단계;
 (b) 암 환자의 혈액으로부터 분리된 PBMC(peripheral blood mononuclear cell)를 IL-2, IL-7, IL-15 및 IL-21으로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 어느 하나의 사이토카인 및 상기 에피토프와 함께 배양하는 단계;
 (c) 상기 (b) 단계에서 배양된 세포 중 CD8 및 4-1BB를 모두 발현하는 세포를 선별하는 단계; 및
 (d) 상기 (c) 단계에서 선별된 T 세포를 항-CD3 항체 및 IL-2와 함께 배양하는 단계를 포함하고,
 상기 약학 조성물은 약 7×10^6 cells/mL 이상의 암항원 특이적 세포독성 T 세포를 포함하고,

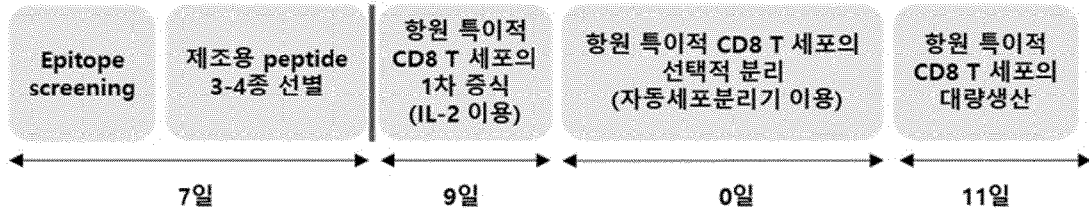
- 상기 약 7×10^6 cells/mL 이상의 세포 중 CD8+T 세포가 약 90% 이상이고, 상기 CD8+T 세포 중 CD45RO를 발현하는 세포가 80% 이상이거나; 상기 CD8+T 세포 중 CD45RA를 발현하는 세포가 20% 이하인, 방법.
- [청구항 7] 청구항 6에 있어서, 상기 암항원은 hTERT, NY-ESO1, MAGE-A3, WT1, CMV 및 EBV로 구성된 군에서 선택된 적어도 어느 하나인 것인, 방법.
- [청구항 8] 청구항 6에 있어서, 상기 (a) 단계 또는 (b) 단계에서 에피토프는 2종 이상인 것인, 방법.
- [청구항 9] 청구항 6에 있어서, 상기 (c) 단계는 외부 환경으로부터 폐쇄된 (closed-system) 유세포분석기를 사용하여 수행되는 것인, 방법.
- [청구항 10] 암을 예방 또는 치료하기 위한 방법으로서, 약제학적 유효량의 암항원 특이적 세포독성 T 세포를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 이를 필요로 하는 피험자에게 투여하는 단계를 포함하고, 상기 약학 조성물은 약 7×10^6 cells/mL 이상의 세포를 포함하고, 상기 약 7×10^6 cells/mL 이상의 세포 중 CD8+T 세포가 약 90% 이상이고, 상기 CD8+T 세포 중 CD45RO를 발현하는 세포가 80% 이상이거나; 상기 CD8+T 세포 중 CD45RA를 발현하는 세포가 20% 이하인, 방법.
- [청구항 11] 청구항 10에 있어서, 상기 약학 조성물은 (a) 암 환자 혈액내에 존재하는 암항원 유래 에피토프를 선별하는 단계; (b) 암 환자의 혈액으로부터 분리된 PBMC(peripheral blood mononuclear cell)를 IL-2, IL-7, IL-15 및 IL-21으로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 어느 하나의 사이토카인 및 상기 에피토프와 함께 배양하는 단계; (c) 상기 (b) 단계에서 배양된 세포 중 CD8 및 4-1BB를 모두 발현하는 세포를 선별하는 단계; (d) 상기 (c) 단계에서 선별된 T 세포를 항-CD3 항체 및 IL-2와 함께 배양하는 단계를 포함하여 제조된 것인, 방법.
- [청구항 12] 청구항 10에 있어서, 상기 암항원은 hTERT, NY-ESO1, MAGE-A3, WT1, CMV 및 EBV로 구성된 군에서 선택된 적어도 어느 하나인 것인, 방법.
- [청구항 13] 청구항 11에 있어서, 상기 (a) 단계 또는 (b) 단계에서 에피토프는 2종 이상인 것인, 방법.
- [청구항 14] 청구항 11에 있어서, 상기 (c) 단계는 외부 환경으로부터 폐쇄된 (closed-system) 유세포분석기를 사용하여 수행되는 것인, 방법.

[도 1]

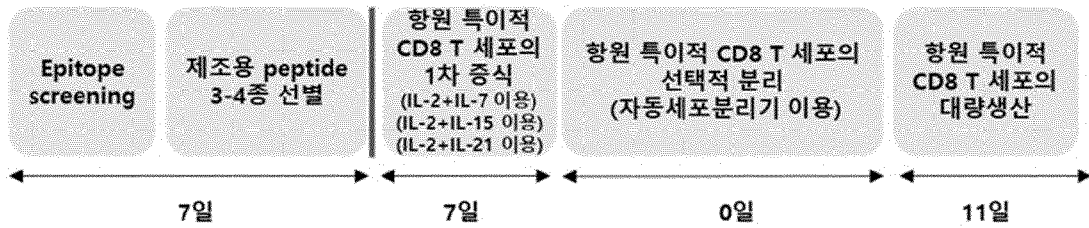
A. 기존 생산 공정



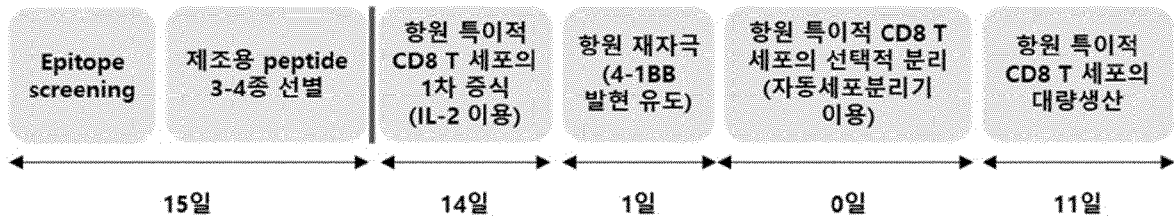
B-1. 신규 생산 공정



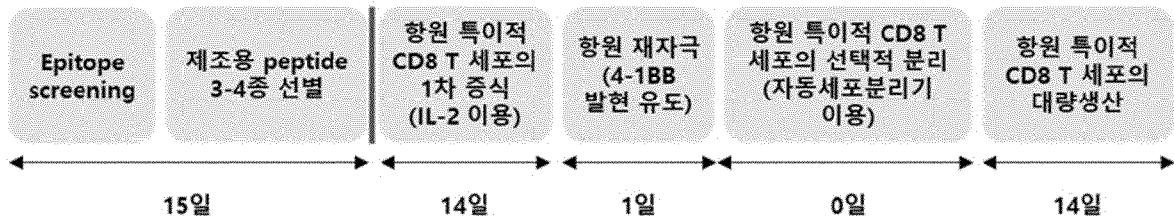
B-2. 신규 생산 공정



B-3. 신규 생산 공정

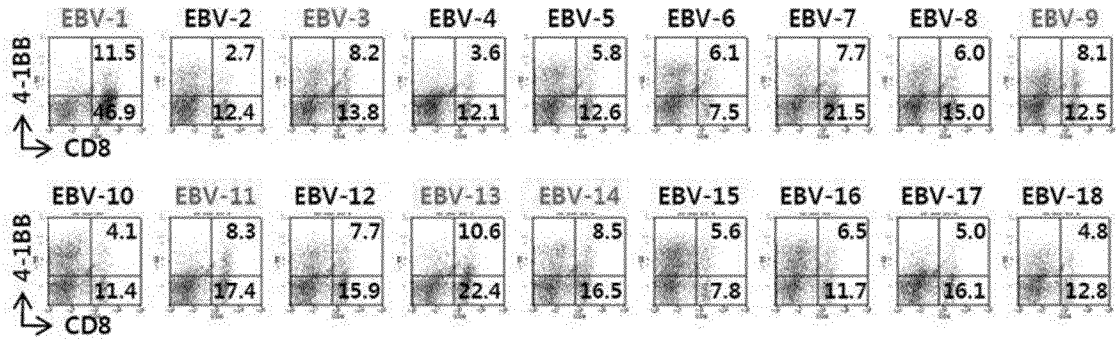


B-4. 신규 생산 공정

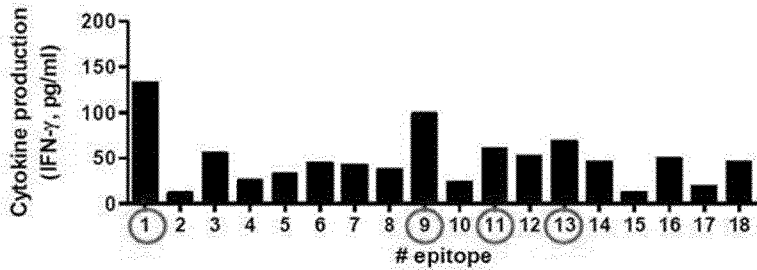


[도2]

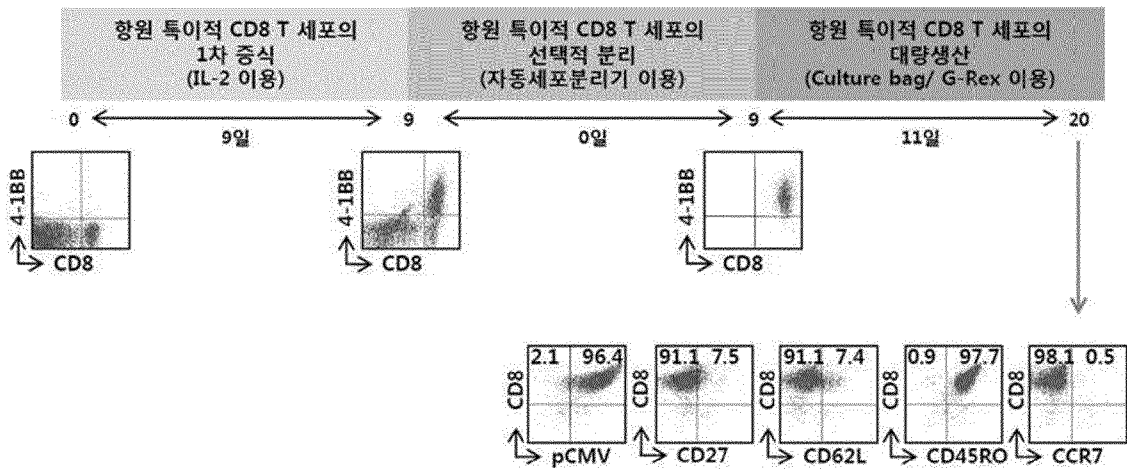
A. 기존 에피토프 스크리닝 결과



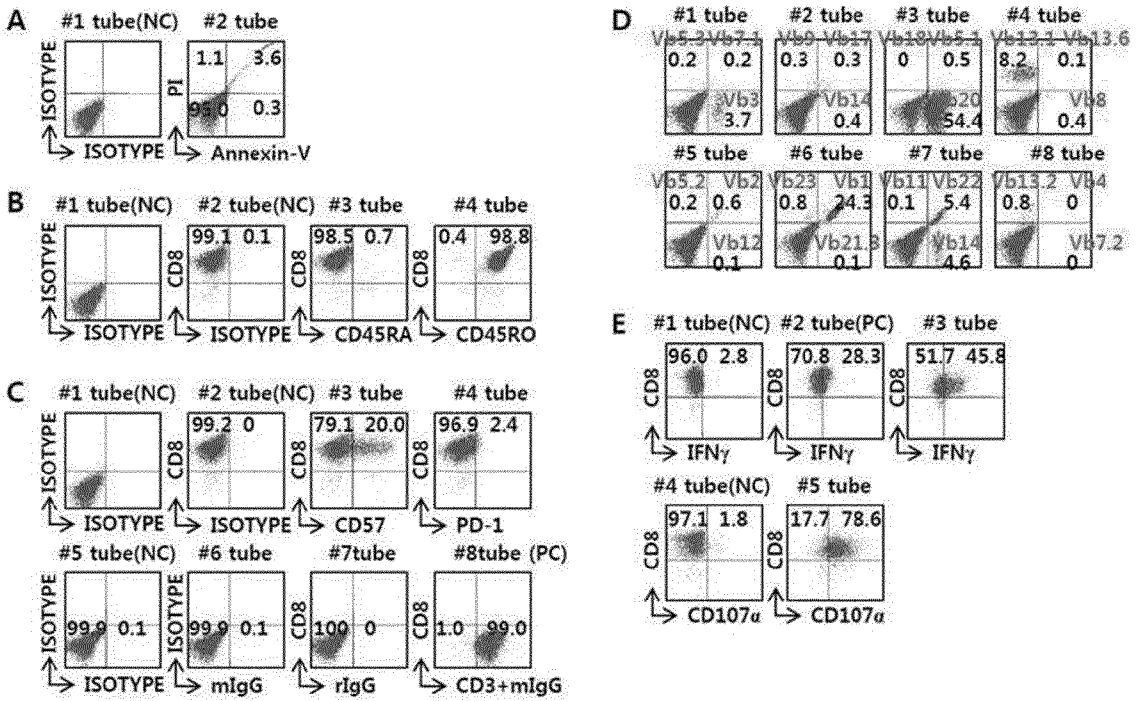
B. 신규 에피토프 스크리닝 결과



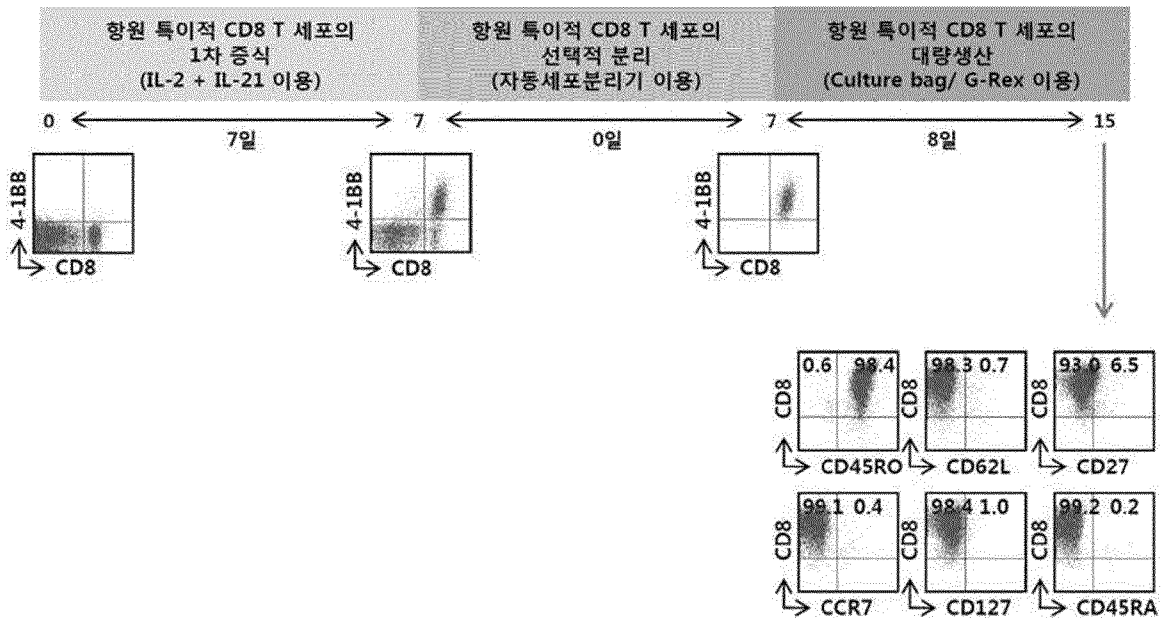
[도3]



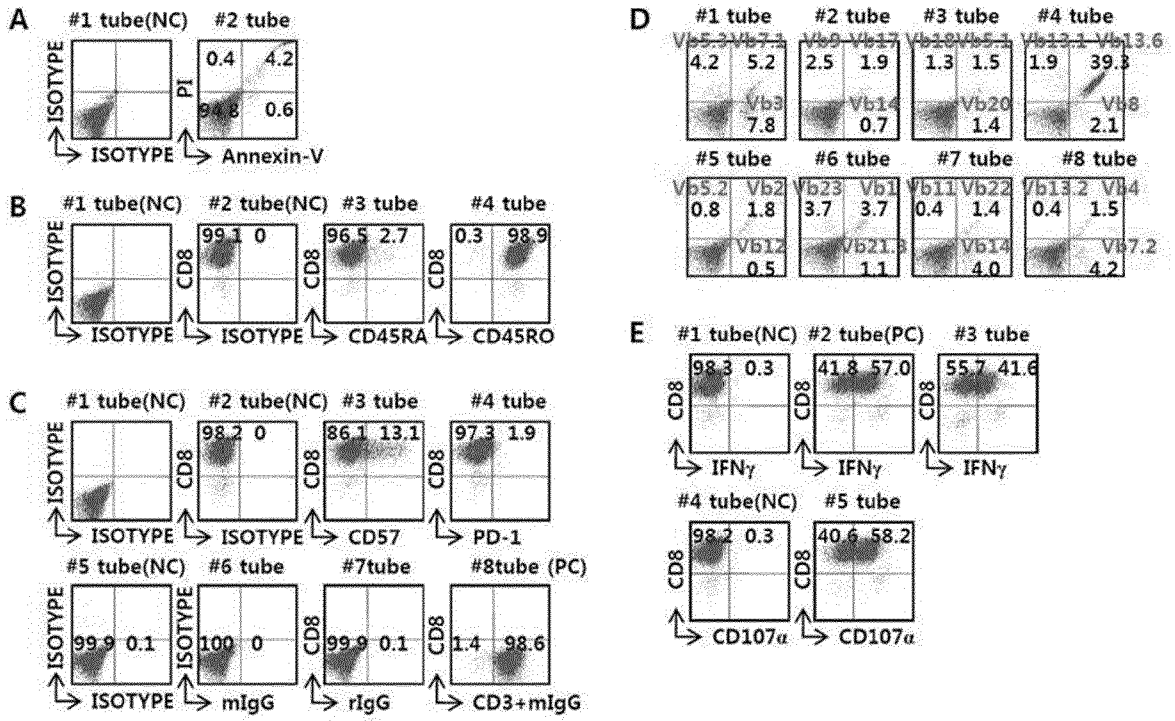
[도4]



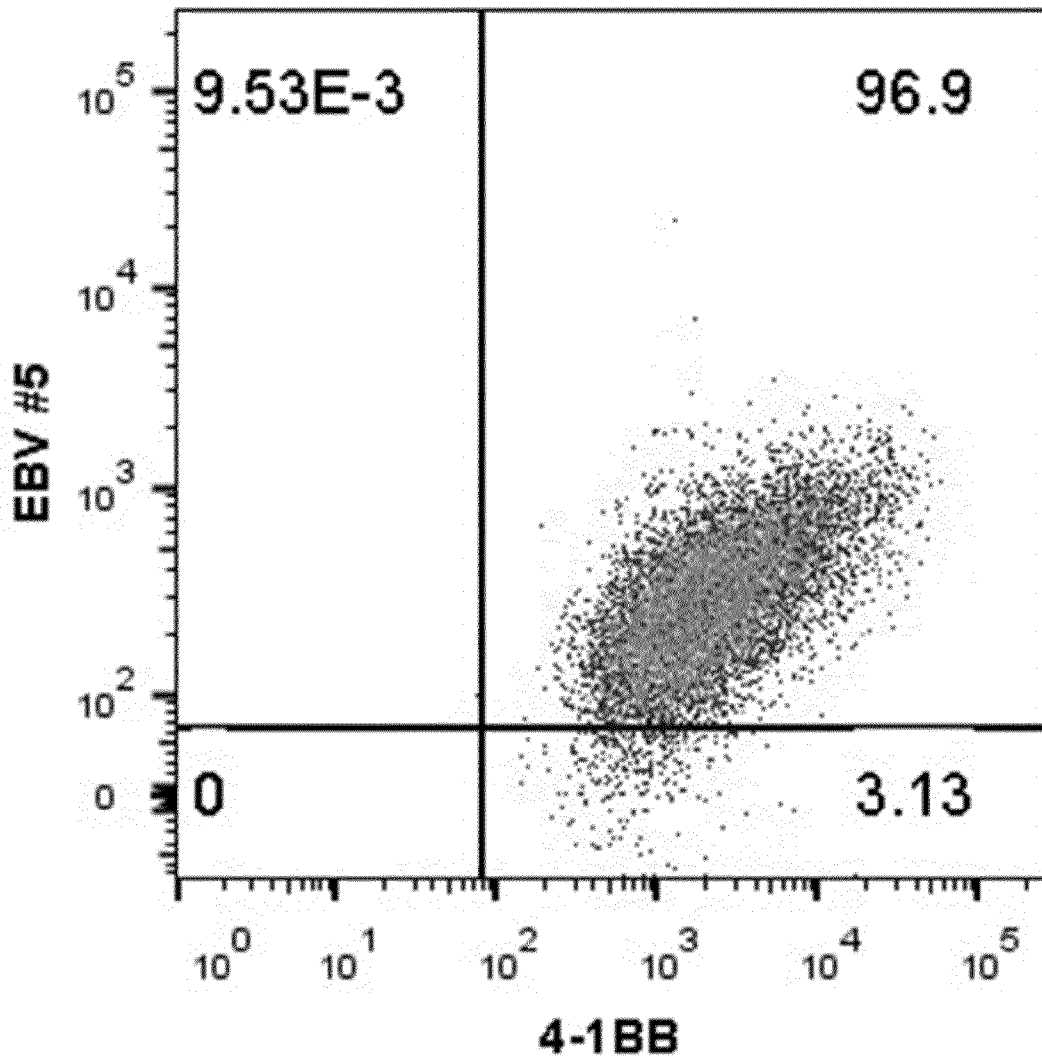
[도5]



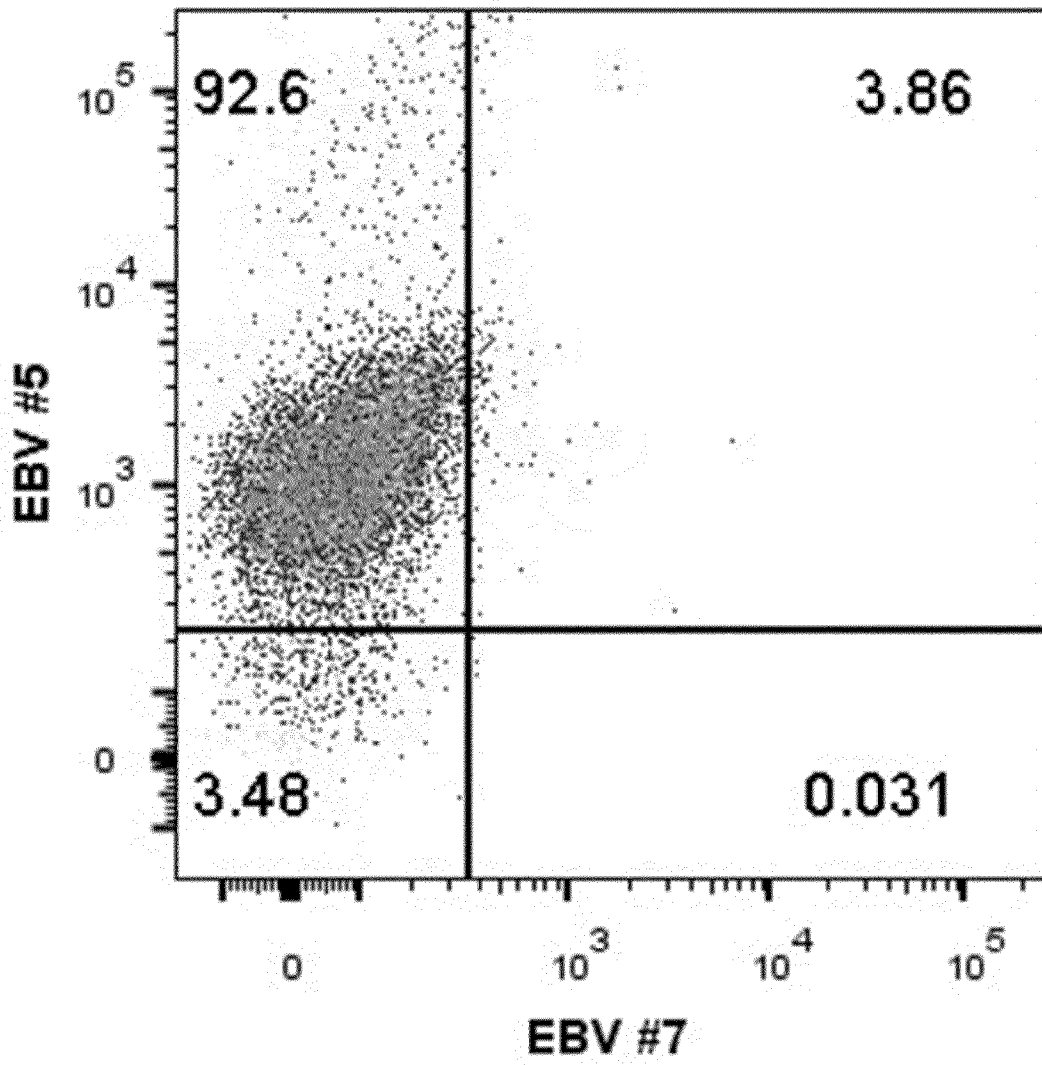
[도6]



[도7]



[도8]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/010240

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.: **10-14**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 10-14 pertain to a method for treatment of the human body, including a step for direct treatment of the human body, and thus pertain to a subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of 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).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/010240

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 35/17(2014.01)i, A61K 39/00(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i, C12N 5/0783(2010.01)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)

A61K 35/17; C07K 14/075; C12N 5/02; C12N 5/071; C12N 5/0783; A61K 39/00; A61P 35/00

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: cancer antigen, cytotoxic, CD8, T cells, CD45RO, CD45RA, 4-1BB(CD137), IL-2, CD3 antibody

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2015-0048783 A (FRED HUTCHINSON CANCER RESEARCH CENTER et al.) 07 May 2015 See claims 1, 4, 10, 19-21, 28-32; paragraphs [0030]-[0033], [0118]-[0122], [0176]-[0177].	1,3
Y		2,4-9
Y	KR 10-1503341 B1 (NATIONAL CANCER CENTER) 18 March 2015 See abstract; claims 1-9, paragraph [0035].	2,4-9
Y	KR 10-2010-0011821 A (NATIONAL CANCER CENTER) 03 February 2010 See abstract; claims 1-10; paragraphs [0078]-[0079], [0128], [0130].	2,4-9
Y	KR 10-2008-0084308 A (UNIVERSITY OF ULSAN FOUNDATION FOR INDUSTRY COOPERATION) 19 September 2008 See abstract; claims 1-13; paragraph [43].	2,4-9
A	US 2018-0072990 A1 (CHILDREN'S NATIONAL MEDICAL CENTER) 15 March 2018 See the entire document.	1-9



Further documents are listed in the continuation of Box C.



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

"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

15 NOVEMBER 2019 (15.11.2019)

Date of mailing of the international search report

18 NOVEMBER 2019 (18.11.2019)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu,
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/010240

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date		
KR 10-2015-0048783 A	07/05/2015	AU 2013-305838 A1	26/02/2015		
		AU 2018-204209 A1	05/07/2018		
		BR 112015002816 A2	28/11/2017		
		CA 2881981 A1	27/02/2014		
		CN 104780939 A	15/07/2015		
		EP 2884999 A1	24/06/2015		
		HK 1212205 A1	10/06/2016		
		IL 237315 A	30/04/2015		
		JP 2015-527070 A	17/09/2015		
		JP 6574381 B2	11/09/2019		
		MX 2015002101 A	14/07/2015		
		PH 12015500325 A1	06/04/2015		
		RU 2015109631 A	10/10/2016		
		SG 10201701339 A	30/03/2017		
		SG 11201501259 A	30/03/2015		
		US 2015-0306141 A1	29/10/2015		
		US 2018-0200298 A1	19/07/2018		
		WO 2014-031687 A1	27/02/2014		
		KR 10-1503341 B1	18/03/2015	AU 2015-230611 A1	29/09/2016
				AU 2015-230611 B2	19/04/2018
AU 2018-204924 A1	26/07/2018				
CA 2942557 A1	17/09/2015				
CN 105473731 A	06/04/2016				
CN 105473731 B	20/07/2018				
CN 108865994 A	23/11/2018				
EP 3118322 A1	18/01/2017				
HK 1224340 A1	18/08/2017				
JP 2017-508480 A	30/03/2017				
JP 2019-050826 A	04/04/2019				
JP 6522671 B2	29/05/2019				
US 2015-0259646 A1	17/09/2015				
US 2018-0057793 A1	01/03/2018				
US 2018-0216066 A1	02/08/2018				
WO 2015-137724 A1	17/09/2015				
KR 10-2010-0011821 A	03/02/2010	KR 10-1103603 B1	09/01/2012		
KR 10-2008-0084308 A	19/09/2008	KR 10-0882445 B1	09/02/2009		
		US 2008-0261307 A1	23/10/2008		
		US 7932045 B2	26/04/2011		
US 2018-0072990 A1	15/03/2018	AU 2016-235388 A1	21/09/2017		
		BR 112017020058 A2	05/06/2018		
		CA 2980039 A1	29/09/2016		
		CN 107429229 A	01/12/2017		
		EP 3271455 A1	24/01/2018		
		IL 254565 A	30/11/2017		
		JP 2018-509938 A	12/04/2018		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/010240

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		WO 2016-154112 A1	29/09/2016

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))
A61K 35/17(2014.01)i, A61K 39/00(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i, C12N 5/0783(2010.01)i

B. 조사된 분야
 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
 A61K 35/17; C07K 14/075; C12N 5/02; C12N 5/071; C12N 5/0783; A61K 39/00; A61P 35/00

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: 암항원(cancer antigen), 세포독성(cytotoxic), CD8, T 세포(T cells), CD45RO, CD45RA, 4-1BB(CD137), IL-2(인터루킨-2), CD3 항체(CD3 antibody)



C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-2015-0048783 A (프레드 핫친슨 켄서 리서치 센터 등) 2015.05.07 청구항 1, 4, 10, 19-21, 28-32; 단락 [0030]-[0033], [0118]-[0122], [0176]-[0177] 참조.	1,3
Y		2,4-9
Y	KR 10-1503341 B1 (국립암센터) 2015.03.18 요약; 청구항 1-9; 단락 [0035] 참조.	2,4-9
Y	KR 10-2010-0011821 A (국립암센터) 2010.02.03 요약; 청구항 1-10; 단락 [0078]-[0079], [0128], [0130] 참조.	2,4-9
Y	KR 10-2008-0084308 A (울산대학교 산학협력단) 2008.09.19 요약; 청구항 1-13; 단락 [43] 참조.	2,4-9
A	US 2018-0072990 A1 (CHILDREN'S NATIONAL MEDICAL CENTER) 2018.03.15 전체 문헌 참조.	1-9

추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. 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 이후 “X” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌
 “F” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신구성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.
 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.
 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
 “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일 2019년 11월 15일 (15.11.2019)	국제조사보고서 발송일 2019년 11월 18일 (18.11.2019)
--	---

ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578	심사관 박제현 전화번호 +82-42-481-3349 
---	---

제2기제란 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: 10-14
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉, 청구항 10-14는 인체에 대한 직접적인 처치 단계를 포함하는 인체의 치료방법에 관한 것이므로 PCT 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
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.

제3기제란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일		
KR 10-2015-0048783 A	2015/05/07	AU 2013-305838 A1	2015/02/26		
		AU 2018-204209 A1	2018/07/05		
		BR 112015002816 A2	2017/11/28		
		CA 2881981 A1	2014/02/27		
		CN 104780939 A	2015/07/15		
		EP 2884999 A1	2015/06/24		
		HK 1212205 A1	2016/06/10		
		IL 237315 A	2015/04/30		
		JP 2015-527070 A	2015/09/17		
		JP 6574381 B2	2019/09/11		
		MX 2015002101 A	2015/07/14		
		PH 12015500325 A1	2015/04/06		
		RU 2015109631 A	2016/10/10		
		SG 10201701339 A	2017/03/30		
		SG 11201501259 A	2015/03/30		
		US 2015-0306141 A1	2015/10/29		
		US 2018-0200298 A1	2018/07/19		
		WO 2014-031687 A1	2014/02/27		
		KR 10-1503341 B1	2015/03/18	AU 2015-230611 A1	2016/09/29
				AU 2015-230611 B2	2018/04/19
AU 2018-204924 A1	2018/07/26				
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				
HK 1224340 A1	2017/08/18				
JP 2017-508480 A	2017/03/30				
JP 2019-050826 A	2019/04/04				
JP 6522671 B2	2019/05/29				
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				
KR 10-2010-0011821 A	2010/02/03	KR 10-1103603 B1	2012/01/09		
KR 10-2008-0084308 A	2008/09/19	KR 10-0882445 B1	2009/02/09		
		US 2008-0261307 A1	2008/10/23		
		US 7932045 B2	2011/04/26		
US 2018-0072990 A1	2018/03/15	AU 2016-235388 A1	2017/09/21		
		BR 112017020058 A2	2018/06/05		
		CA 2980039 A1	2016/09/29		
		CN 107429229 A	2017/12/01		
		EP 3271455 A1	2018/01/24		
		IL 254565 A	2017/11/30		
		JP 2018-509938 A	2018/04/12		

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		WO 2016-154112 A1	2016/09/29