



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0084308
(43) 공개일자 2008년09월19일

(51) Int. Cl.

C12N 5/00 (2006.01) C12N 5/08 (2006.01)

C12N 5/02 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0025814

(22) 출원일자 2007년03월16일

심사청구일자 2007년03월16일

(71) 출원인

울산대학교 산학협력단

울산 남구 무거2동 산29

(72) 발명자

권병세

울산광역시 울주군 청량면 삼정리 755 쌍용하나빌
리지 307-120

(74) 대리인

신동인

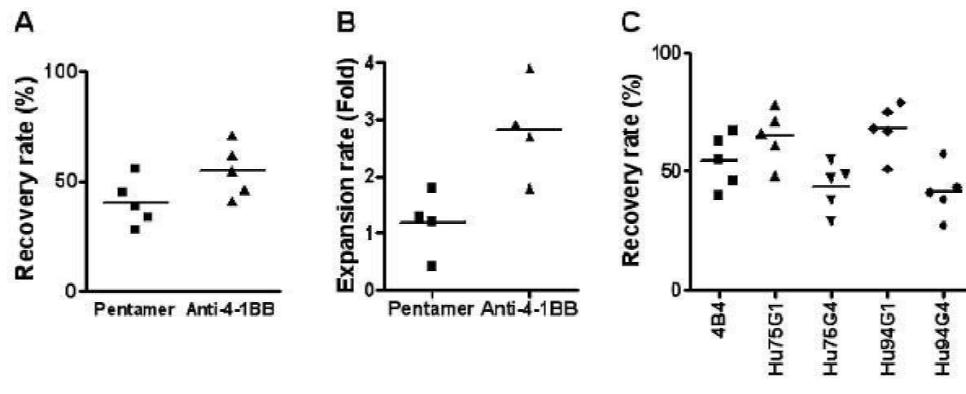
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 항-4-1BB 항체를 이용한 항원 특이적 자가유래 CD8+ T 세포의 분리 및 증식 방법

(57) 요약

본 발명은 항-4-1BB 항체를 이용한 항원 특이적 CD8+ T 세포의 분리방법 및 증식방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 본 발명의 CD8+ T 세포의 분리방법 및 증식방법은 기존의 분리방법과 비교하여 세포 회수율이 높고, 인간화 항-4-1BB 항체를 이용하여 항원 특이적 세포를 분리하는 경우에도 높은 세포 수거율을 나타내었으며, 또한 분리 이후 배양과정에서 높은 증식율을 나타내므로, 본 발명의 분리방법 및 증식방법으로 수득된 항원 특이적 CD8+ T 세포는 암 질환의 치료 및 개선에 부작용 없이 응용될 수 있다.

대표도 - 도9



특허청구의 범위

청구항 1

항-4-1BB 항체를 이용한 항원 특이적 CD8+ T 세포의 분리방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 혈액으로부터 PMBC (peripheral blood mononuclear cell)을 분리하여 CMV 또는 EBV 펩티드와 함께 배지에서 배양하는 제 1단계; 제 1단계와 동일한 혈액으로부터 PMBC를 분리하여 OKT3과 함께 배양하고 세척한 후 펩티드로 표지하는 제 2단계; 상기 제 1단계의 배양물 및 제 2단계의 표지된 배양물을 1:1 내지 10:1의 세포 비율로 1 내지 3일 동안 배양하는 제 3단계; 상기 제 3단계의 배양물을 항-4-1BB mAb로 코팅된 배양 플레이트에서 배양하고 부착되지 않은 세포 및 비특이적으로 결합한 세포를 제거하는 제 4 단계; 상기 제 4 단계의 부착 세포를 배양시켜 세포를 수득하는 5단계의 과정을 포함하는 분리 방법.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 제 1단계의 배지는 자가혈장 또는 자가혈청이 포함된 배지임을 특징으로 하는 분리방법.

청구항 4

제 2항에 있어서, 상기 제 1단계의 배양은 12 내지 16일 동안 배양됨을 특징으로 하는 분리방법.

청구항 5

제 2항에 있어서, 상기 제 2단계의 배지 및 배양 시간은 상기 1단계와 동일함을 특징으로 하는 분리방법.

청구항 6

제 2항에 있어서, 상기 제 2단계에서 CMV pp65 또는 EBV LMP2 유래 펩티트인 분리방법.

청구항 7

제 2항에 있어서, 상기 제 3단계의 세포는 IL-2와 자가혈장을 포함한 X-VIVO 배지에서 배양됨을 특징으로 하는 분리방법.

청구항 8

제 2항에 있어서, 상기 제 4단계의 배양시간은 1 내지 3시간임을 특징으로 하는 분리방법.

청구항 9

인간화 항-4-1BB 항체를 이용한 항원 특이적 CD8+T 세포의 분리 방법.

청구항 10

제 9항에 있어서, 상기 인간화 항-4-1BB 항체는 서열번호 2, 3, 5 및 6으로부터 선택된 항체임을 특징으로 하는 분리 방법.

청구항 11

제 1항 또는 제 9항의 분리방법으로 분리된 항원 특이적 CD8+ T 세포를 대량으로 증식하기 위한 증식 방법.

청구항 12

제 11항에 있어서, 상기 세포를 자가혈장 및 IL-2가 포함된 배지에서 배양함을 특징으로 하는 증식방법.

청구항 13

제 11항에 있어서, 상기 세포는 12 내지 16일 동안 배양됨을 특징으로 하는 증식방법.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<11> 본 발명은 항-4-1BB 항체를 이용한 항원 특이적 자가유래 CD8+ T 세포의 분리 및 증식 방법에 관한 것이다.

<12> 환자 자신의 면역체계를 이용하여 암을 치료하기 위한 시도는 오랫동안 연구되어 왔으며, 암의 면역치료를 위한 주요 대상은 수지상세포 (DC)와 CD8+ T 세포이다 (O'Neill DW et al., Manipulating dendritic cell biology for the active immunotherapy of cancer, *Blood*, 104, pp.2235-2246, 2004). 수지상세포는 강력한 항원제시세포로서 표지된 항원에 대한 면역반응을 높은 수준으로 유도한다는 장점으로 인해 유망한 면역치료제 후보로 연구되어 왔다 (Preynat-Seauve O et al., Tumor-infiltrating dendritic cells are potent antigen-presenting cells able to activate T cells and mediate tumor rejection, *J Immunol.*, 176, pp.61-67, 2006). 그러나 최근의 보고들은 수지상세포의 기능적 다양성으로 인해, 생체 내에서 기대했던 면역증진 효과뿐 아니라, 면역억제 효과를 나타내는 경우도 있음을 보고하고 있다 (Zhang X et al., CD4-8- dendritic cells prime CD4+ T regulatory 1 cells to suppress antitumor immunity, *J Immunol.*, 175, pp.2931-2937, 2005). 수지상세포를 이용한 암치료방법 역시 궁극적으로는 CD8+ T 세포의 강력한 활성을 목적으로 하며, 유도된 CD8+ T 세포 항암반응이 면역기억 세포 (memory T cells)를 형성함으로써 암세포의 재발을 억제할 것으로 예상하고 있다.

<13> CD8+ T 세포는 수지상세포, CD4+ T, NK 세포와 같은 다른 세포들에 비해 비교적 단순한 기능을 가지고 있기 때문에, 기대하지 않았던 부작용이 나타날 가능성이 적다. 본 발명자는 오랫동안 면역조절 단백질인 4-1BB (CD137)과 관련된 연구를 진행해왔으며, 4-1BB의 특성 및 4-1BB에 의한 면역조절에 관한 많은 분석을 하였다. 하기에 4-1BB 자극의 시험관 내 (in vitro) 및 생체 내 (in vivo)에서의 특성을 기재하였다. CD4+ 및 CD8+ T 세포에 대한 오랜 시험관 내 실험 결과들을 통해 4-1BB의 자극을 받은 CD8+ T 세포는 강력한 세포독성 (cytotoxicity)을 나타내며, IFN- γ 의 발현이 높아지고, AICD (activation-induced cell death)를 억제한다는 사실을 알게 되었다 (Hurtado JC et al., Signals through 4-1BB are costimulatory to previously activated splenic T cells and inhibit activation-induced cell death, *J Immunol.*, 158, pp.2600-2609, 1997). 이러한 4-1BB 자극의 특성들은 암치료에 적합한 특성들이며, 이를 기반으로 항-4-1BB mAb를 이용한 암치료효과를 동물모델을 통해 검증되었다 (Wilcox RA et al., Provision of antigen and CD137 signaling breaks immunological ignorance, promoting regression of poorly immunogenic tumors, *J Clin Invest.*, 109, pp.651-659, 2002).

<14> 세포내 4-1BB 연쇄반응의 효과와 관련하여, CD4+ T 세포의 연쇄 반응은 TCR 활성화에 의한 유도적 발현, 증가된 증식 (Enhanced proliferation), 세포 주기 진행 (Cell cycle progression), AICD (activation-induced cell death) 방지, IL-2, IFN- γ , IL-4와 같은 Th1 사이토카인 생산 및 기억 형성 증가 (Increased memory formation) 효과를 나타내고, CD8+ T 세포의 연쇄 반응은 TCR 활성화에 의한 유도적 발현, 증가된 증식, AICD (activation-induced cell death) 방지, IL-2, IFN- γ , TNF- α 와 같은 Th1 사이토카인 생산, 세포 독성 기능 증가 (Enhanced cytotoxic function) 및 기억 형성 증가 효과를 나타낸다.

<15> 생체내 4-1BB 연쇄반응의 효과와 관련하여, 암 모델에서는 담암 (tumor-bearing) 마우스의 생존 증가 및 CD8+ T 반응의 증가에 의한 암 성장 억제효과를 나타내고, 자가면역질환 (Autoimmune disease) 모델에서는 항원-특이적 CD4+ T 세포의 억제에 의한 질환의 진행 저해 효과를 나타내며, 대장염 (Colitis) 모델에서는 CD4+ T 세포에 의한 질환의 진행 저해 효과를 나타내고, 바이러스성 감염 (Viral infection) 모델에서는 CD4+ T 세포 반응 증가에 의한 바이러스 확산 저해 효과를 나타내며, 리스테리아 감염 (Listeria infection) 모델에서는 리스테리아-감염 마우스의 보호 효과를 나타내고, GVHD 모델에서는 CD4+ T 세포 반응 억제에 의한 GVHD의 방지 효

과를 나타내며, 이식 (Transplantation) 모델에서는 이식 거부 촉진을 나타낸다.

<16> 4-1BB는 유도성 공동자극 분자로서 활성화된 CD8+ T 세포에서 발현된다. 따라서 펩티드를 이용하여 CD8+ T 세포를 자극할 경우, 펩티드에 특이적으로 활성화된 CD8+ T 세포에서 대부분 4-1BB를 발현하게 되어 항원 특이적인 CD8+ T 세포를 분리할 수 있다. 이러한 원리를 이용하여 환자의 혈액으로부터 분리된 PMBC (peripheral blood mononuclear cell) 중 펩티드 특이적으로 활성화된 CD8+ T 세포만을 분리하게 된다. 분리된 CD8+ T 세포는 IL-2를 이용하여 필요한 수준의 숫자로 증식시켜 환자에게 투여할 예정이다. MHC 클래스 I/ 펜타머는 항원 특이적인 CD8+ T 세포를 구별해주는 시약으로, MHC 클래스 I 분자에 펩티드가 복합체를 이루어 TCR에 특이적으로 결합함으로써 항원 특이적 CD8+ T 세포를 구별시켜준다.

<17> CMV는 대부분의 사람들의 성장과정동안 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 상업적으로 사용가능하다.

<18> EBV (Epstein-Barr virus)는 가장 흔하며 널리 퍼져있는 병원체로, 소아기에 감염되며 일반적으로 증상이 나타나지 않지만 대부분의 사람들이 면역기억을 형성하고 있다. 또한 EBV는 다양한 사람의 악성 종양과 관련이 있으며, 특히 BL (African Burkitt lymphoma)과 NPC (nasopharyngeal carcinoma)의 주요 발병원인이 된다. 그 외에도 AIDS 또는 이식 후 면역억제제에 의한 T 세포 기능 장애 (T cell dysfunction)와 관련된 다양한 질병들, 모상 백반증 (hairy leukoplakia), B 세포 림프계 증식증 (B cell lymphoproliferative disease (EBV-LPD)), 호치킨 림프종 (Hodgkin's lymphoma), 위 암종 (gastric carcinoma), 일부 유방 암종 (breast carcinoma) 등이 EBV에 의해 유발되는 것으로 보고되었다. 많은 사람들이 EBV에 대한 기억 T 세포 (memory T)를 가지고 있으며, 바이러스 항원이기 때문에 일반적인 항원에 비해 강한 면역반응을 유도할 수 있다. 따라서 펩티드와 항-4-1BB 항체를 이용한 CTL 세포치료제 개발의 시험 모델로서 최적의 조건 (높은 CD8+ T 세포 반응성 및 다양한 환자)을 갖추고 있다.

<19> 따라서 본 발명은 CMV pp65 (cytomegarovirus pp65) 항원을 대상으로 암세포 제거에 필수적인 항원 특이적 CD8+ T 세포치료제 생산방법을 확립하기 위한 시도 끝에, CMV pp65+CD8+ T 세포를 대상으로 CD8+ T 세포 대량 생산 및 대량 증식방법을 확립하였으며, 상기 방법으로 수득된 CD8+ T 세포의 암 질환의 치료 효과를 확인 및 검증하여, 암 질환의 치료 및 개선에 부작용 없이 응용될 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<20> 본 발명의 목적은 항-4-1BB 항체를 이용하여 기존의 분리방법과 비교하여 세포 회수율이 높고, 인간화 항-4-1BB 항체를 이용하여 항원 특이적 세포를 분리하는 경우에도 높은 세포 수거율을 나타내며, 또한 분리 이후 배양과정에서 높은 증식율을 나타내는 항원 특이적 CD8+ T 세포의 분리방법 및 증식방법을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

<21> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 항-4-1BB 항체를 이용한 항원 특이적 CD8+ T 세포의 분리방법을 제공한다.

<22> 또한 본 발명은 상기 분리방법으로 분리된 항원특이적 CD8+ T 세포의 증식방법을 제공한다.

<23> 구체적으로, 본 발명은 혈액으로부터 PMBC (peripheral blood mononuclear cell)을 분리하여 CMV 펩티드와 IL-2를 첨가한 배지에서 배양하는 제 1단계; 제 1단계와 동일한 혈액으로부터 PMBC를 분리하여 OKT3 및 IL-2와 함께 배양하고 세척한 후 펩티드로 표지하는 제 2단계; 상기 제 1단계의 배양물 및 제 2단계의 표지된 배양물을 세포수 비율 1:1 내지 1:20, 바람직하게는 1:5 내지 1:10의 비율로 1 내지 5일, 바람직하게는 1 내지 2일 동안 혼합 배양하여 재활성 시키는 제 3단계; 상기 제 3단계의 배양물을 항-4-1BB mAb로 코팅된 배양 플레이트에서 배양하여 부착시키고 부착되지 않은 세포 및 비특이적으로 결합한 세포를 제거하는 제 4 단계; 상기 제 4 단계의 부착 세포를 배양시켜 세포를 수득하는 5단계의 과정을 포함하는 항-4-1BB 항체를 이용한 항원 특이적 CD8+ T 세포의 분리 방법을 제공한다.

<24> 상기 1단계의 배지는 IL-2 및 자가혈장 또는 자가 혈청이 포함된 배지임을 특징으로 하며, 또한 상기 1단계의 배양은 7 내지 21일 바람직하게는 12 내지 16일, 더욱 바람직하게는 14일 동안 배양됨을 특징으로 한다.

<25> 상기 2단계의 배지 및 배양 시간은 상기 1단계와 동일함을 특징으로 하며, 또한 상기 2단계의 펩티드는 CMV pp65 펩티드임을 특징으로 한다.

<26> 상기 3단계의 세포는 IL-2와 자가혈장 또는 자가혈청을 포함한 X-VIVO 배지에서 배양됨을 특징으로 한다.

<27> 상기 4단계의 배양시간은 1 내지 5시간, 바람직하게는 1 내지 3시간, 더욱 바람직하게는 30 분 내지 1 시간임을 특징으로 한다.

<28> 상기 5 단계의 배지는 IL-2 와 자가 혈장 또는 자가 혈청을 포함한 X-VIVO 배지에서 배양됨을 특징으로 하며, 배양 시간은 7 내지 21 일 , 바람직하게는 10 내지 18 일, 더욱 바람직하게는 10 내지 14일 동안 배양됨을 특징으로 한다.

<29> 또한 본 발명은 인간화 항-4-1BB 항체를 이용한 항원 특이적 CD8 T 세포의 분리 방법을 제공한다.

<30> 상기 인간화 항-4-1BB 항체는 서열번호 2, 3, 5 및 6으로부터 선택된 항체임을 특징으로 하며, 상세하게는 서열번호 2의 HBBK4-75G1 및 서열번호 3의 HBBK4-75G4는 이들 항체의 중사슬 (heavy chain)의 아미노산 서열을 나타낸 것이며, 상기 두 항체는 동일한 경사슬 (light chain)을 갖고, 이는 서열번호 4로 표기된다. 또한, 서열번호 5의 HBBK4-94G1 및 서열번호 6의 HBBK4-94G4는 이들 항체의 중사슬 아미노산 서열을 나타낸 것이고, 상기 두 항체는 동일한 경사슬을 가지며, 이는 서열번호 7로 표기된다. 본 발명에 사용된 HBBK4-75G1 항체는 서열번호 2의 중사슬과 서열번호 4의 경사슬로 구성된 항체이며, HBBK4-75G4 항체는 서열번호 3의 중사슬과 서열번호 4의 경사슬로 구성된 항체이며, HBBK4-94G1 항체는 서열번호 5의 중사슬과 서열번호 7의 경사슬로 구성된 항체이며, HBBK4-94G4 항체는 서열번호 6의 중사슬과 서열번호 7의 경사슬로 구성된 항체이다.

<31> 또한 상기 목적에 따라, 본 발명은 상기 분리방법으로 분리된 항원 특이적 CD8+ T 세포의 증식방법을 제공한다.

<32> 구체적으로, 본 발명은 상기 분리방법으로 분리된 항원 특이적 CD8+ T 세포를 자가혈장 및 IL-2가 포함된 배지에서 배양함을 특징으로 하는 항원 특이적 CD8+ T 세포의 증식방법을 제공한다.

<33> 상기 세포는 1 내지 20일, 바람직하게는 10 내지 18일, 더욱 바람직하게는 12 내지 16일 동안 배양됨을 특징으로 한다.

<34> 본 발명의 분리방법으로 분리된 항원 특이적 CD8+ T 세포 및 본 발명의 증식방법으로 증식된 항원 특이적 CD8+ T 세포는 세포치료제 (cell therapy)로서, 환자로부터 분리하여 동일한 환자에게 직접 세포로서 주입될 수 있음을 특징으로 한다.

<35> 본 발명에 의한 항원 특이적 CD8+ T 세포의 분리방법은 일반적으로 행하여지는 항원 특이적 CD8+ T 세포의 분리방법인 테트라머 (tetramer) 또는 펜타머 (pentamer)를 이용한 방법과 비교하여 높은 세포 회수율 및 분리된 세포의 높은 증식율을 나타내어 부작용을 억제하며, 또한 테트라머 (tetramer) 또는 펜타머 (pentamer)가 낮은 친화력을 나타낼 경우 매우 낮은 세포 회수율을 나타냄에 반하여 본 발명 항-4-1BB 항체를 이용한 분리방법은 4-1BB가 활성화된 CD8+ T 세포에 일정한 수준으로 발현되므로 친화력에 따른 기존의 방법으로 인한 단점이 없고, 인간화 항-4-1BB 항체를 이용하여 항원 특이적 CD8+ T 세포를 분리할 경우에도 뛰어난 세포 회수율을 나타냄을 특징으로 한다.

<36> 이하, 본 발명을 하기 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.

<37> 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실험예에 의해 한정되는 것은 아니다.

<38> 참고예 1. 실험 준비

<39> 실험에 사용된 항-CD8-FITC, 항-CD8-PE-Cy5, 항-4-1BB-PE, 항-CD11c-PE-Cy5, 항-CD57-FITC, 항-NKG2D-FITC, 항-CD62L-FITC, 항-CD27-FITC, 항-CD107a (LAMP-1)-비오틴(biotin), 스트렙타비딘-PE (streptavidin-PE)는 e바이오사이언스 (eBioscience, San Diego, CA)에서 구매하였다. EBV (LMP-2 CLGGLTMV) 및 CMV (pp65 NLVPMVATV) 특이적 펩티드는 펩트론(peptron, Dae-jeon, Korea)에서 주문 제작하였다. cGMP 표준 (grade)으로 사용 가능한 X-VIVO 배지는 바이오위테커사에서 구매 하였다 (BioWhittaker, Wakersville, MD). 1M HEPES, RPMI1640, L-글루타민 (L-glutamine), 2-머캅토에탄올 (2-mercaptoethanol) 및 페니실린/스트렙토마이신 (penicillin/streptomycin, x100)은 인비트로젠 사(Invitrogen, San Diego, CA)로부터 구매하였다. CMV 또는 EBV 특이적 CD8+ T 세포를 검출하기 위해 사용한 CMV pp65 및 EBV LMP-2 펜타머 (pentamer)는 프로이문 (Proimmune, Oxford, U.K)로부터 구매하였다. 항-PE-마이크로비드는 밀테니 바이오텍 (Miltenyi Biotec,

Auburn, CA)으로부터 구매하였다. 항-4-1BB (4B4) 및 인간화 항-4-1BB mAb (Hu75G1, Hu75G4, Hu94G1, Hu94G4)는 본 연구실에서 제작 및 생산하였다. 본 연구에 사용된 모든 혈액은 건강한 자원자들로부터 기증받았으며, 울산대학교 면역제어연구소의 지침 (Institutional review board의 guide-line)에 따라 혈액을 사용하였다.

<40> 참고예 2. 말초혈액 내 CMV 펜타머+CD8+T 세포를 포함한 자원자의 선별

<41> 20 여명의 자원자로부터 5ml의 혈액을 채혈하여, PBS와 1:1 비율로 희석하였다. 희석된 혈액을 15ml 튜브에 분주한 후 3ml 피콜 (Ficoll, Pharmacia)을 혈액 하층으로 서서히 주입하였다. 준비된 튜브를 2000rpm, 20분간 원심분리하여 PBMC (peripheral blood mononuclear cell)를 분리하였다. 분리된 세포를 PBS로 두 번 세척한 후, 10 μ l의 1mg/ml 인간 IgG를 첨가하여 비특이적 결합을 방지하였다. 세척 없이 항-CD8-FITC와 pCMV pp65 또는 EBV LMP-2 펜타머를 첨가하여 30분간 세포를 염색하였다. PBS로 세척한 후 유세포 분석기를 이용하여 CMV pp65 또는 EBV LMP-2 특이적 CD8+ T 세포의 비율을 조사하여 도 1에 나타내었다.

<42> 실험예 1. 항원 특이적 CD8+ T 세포의 분리 및 증식

<43> 암 치료용 CTL 세포치료제를 생산하기 위해, 환자의 말초혈액 50ml로부터 PBMC를 분리한 후 CMV pp65 펩티드를 첨가하여 자가 혈장 (autoplasma) 혹은 혈청이 (serum) 포함된 배지에 14일간 배양함으로써 CMV 펩티드-양성 CD8+ T 세포의 증식을 유도하였다 (1 그룹). 동시에 동일한 방식으로 OKT3를 이용하여 14일간 PBMC의 활성화 및 증식을 유도함으로써 미분화 T 세포 (blast T cell)를 생산하였다 (2 그룹). 14일간의 배양 후 준비된 두 종류의 세포 중 2 그룹의 세포는 펩티드로 표지하여, 1 그룹 세포의 재활성에 사용하였다. 1 그룹과 2 그룹의 세포를 1:1 - 1:10 비율로 섞어 배양함으로써 4-1BB의 발현을 유도하였으며, 이틀간의 배양 후 항-4-1BB mAb가 부착된 배양 플레이트 (anti-4-1BB mAb-coated culture plate)에 한 시간 동안 배양하여 4-1BB-양성 세포만을 수거하였다. 수거된 세포는 1000U/ml IL-2가 포함된 X-VIVO 배지에 2주간 배양하여 최종 증식시키며, 세포독성 (cytotoxicity) 검사를 통해 그 기능을 검증하여 환자 투여여부를 결정하였다. 상기 과정에 대한 간략한 개요 및 세포치료제 생산과정 중 각각의 단계에서 확인해야할 사항을 도 2 및 도 3에 나타내었다.

<44> 1-1. CMV 펩티드-특이적 CTLs의 유도 및 분화

<45> 1) HLA-A2 양성인 사람으로부터 헤파린 (heparin)을 이용하여 말초혈액 채혈 (50ml) (EDTA 또는 시트르산 (citric acid)은 사용금지).

<46> 2) RPMI1640 배지와 혈액을 1:1 비율로 섞은 후 4개의 50ml의 코르니칼 튜브 (cornical tube)에 25ml씩 분주하고, 혈액 아래쪽에 10ml 피콜 (Ficoll, 밀도 :1.077)을 넣어 밀도에 따른 층분리를 유도한 후 900 x g에서 20분간 원심분리 하였다.

<47> - RPMI1640 (Invitrogen, Cat # 11875-093)

<48> 3) 원심분리 후 도 4와 같은 형태로 PBMC 층이 형성되었으며, 1회용 10ml 피펫을 이용하여 자가혈장 (autoplasma)과 PBMC를 순서대로 수거하였으며, 자가혈장은 사용 전까지 4℃에 보관하였다.

<49> 4) 50ml 코르니칼 튜브에 수거된 PBMC는 RPMI1640 배지를 50ml까지 채워 1200 rpm에서 5분간 원심 분리하여 세척하는 과정을 두 번 반복하였다.

<50> 5) 세포를 5% 자가혈장이 포함된 RPMI1640 배지로 현탁하여, 세포의 수를 계산하여 1×10^6 세포/ml 농도로 조절하였다.

<51> 6) 현탁된 PBMC의 3/4에 CMV pp65 펩티드를 0.5-1 μ g/ml 농도로 첨가하였다.

<52> - CMV pp65 (서열번호 1: 495-504 아미노산, NLVPMVATV); HLA-A*0201-restricted

<53> 7) 펩티드가 첨가된 PBMC는 T-75 배양 플라스크에 1×10^7 세포/10ml/플라스크로 분주하였다.

<54> - T-75 배양 플라스크 (Nunc, Cat # 156499)

<55> 8) 세포가 분주된 플라스크를 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다.

<56> 9) 배양 이틀째 (PI day 2), 5% 자가혈장과 50 IU/ml 인간 IL-2가 포함된 RPMI1640 배지 10ml을 첨가하였다.

<57> 10) 배양 7일째 (PI day 7), 세포배양액 10ml을 제거한 후 5% 자가혈장과 50 IU/ml 인간 IL-2가 포함

된 RPMI1640 배지 10ml를 다시 첨가하였다.

<58> 11) 이를간격으로 10ml의 배양액을 덜어내고 5% 자가혈장과 50 IU/ml 인간 IL-2가 포함된 RPMI1640 배지 10ml를 다시 첨가하였다 (PI day 9, 11, 13).

<59> 12) 배양 14일째 EBV 또는 CMV-특이적 CTL의 형성을 MHC 펜타머 (pentamer)를 이용하여 확인하였다.

<60> - 서열번호 1 (CMV pp65 NLVPMVATV, Proimmune, HLA-A*0201)

<61> 상기에 기재된바와 같이, pCMV pp65 (CMV pp65 pentamer) 양성으로 나타난 자원자로부터 50ml의 혈액을 채혈하여 PBMC를 분리한 후, CMV pp65 NLVPMVATV 펩티드와 함께 T-75 플라스크에서 배양하고, PBMC와 펩티드 항원을 14일간 배양하였으며, 일부를 수거하여 pCMV pp65 양성인 CD8+ T 세포의 비율과 4-1BB 양성인 CD8+ T 세포의 비율을 조사한 결과, 도 5a에 나타난 바와 같이 배양시간이 지남에 따라 점진적으로 pCMV+CD8+T 세포의 비율이 증가하였으며, 4-1BB+CD8+ T 세포의 비율 또한 증가하였다. 그러나 4-1BB+CD8+ T 세포의 경우 약 7-9일 사이에 최고치에 달했으며 그 후에는 점차 감소하였다. 도 5b는 CD8+ T 세포중 pCMV pp65 양성과 4-1BB 양성인 세포의 비율을 나타낸 것이다.

<62> 상기 결과로 CMV pp65 특이적인 CD8+ T 세포가 CMV 펩티드에 의해 활성화 및 증식되며, 항원 특이적 CD8+ T 세포의 증가에 비례하여 4-1BB의 발현 역시 증가함을 확인하였다.

<63> 1-2. 펩티드 표지용 미분화 T 세포 (blast T cell)의 제작

<64> 1) 상기 1-1의 4)에서 수거된 PBMC 중 1/4를 펩티드 표지용 미분화 T 세포의 제작에 사용하였다.

<65> 2) 50ml의 코르니칼 튜브 (cornical tube)에 수거된 PBMC에 RPMI1640 배지를 50ml까지 채워 1200 rpm에서 5분간 원심분리하여 세척하는 과정을 두 번 반복하였다.

<66> 3) 세포를 X-VIVO 10 배지로 현탁하여, 세포의 수를 계산하여 1×10^6 세포/ml의 농도로 조절하였다.

<67> - X-VIVO 10 배지 (Cambrex BioWhittaker, cGMP grade)

<68> 4) 현탁된 PBMC에 OKT3 항체를 $1\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 첨가한 후, T-75 배양 플라스크에 1×10^7 세포/10ml/플라스크로 분주하였다.

<69> 5) 세포가 분주된 튜브를 37°C , 5% CO_2 배양기에서 배양하였다.

<70> 6) 배양 하루 후 (PI day 1), 1000 IU/ml 인간 IL-2가 포함된 X-VIVO 10 배지 10ml를 첨가하였다.

<71> 7) 배양 14일 (PI day 14)까지 세포를 배양하였으며, 이를 간격으로 10ml의 세포배양액을 새로운 1000 IU/ml 인간 IL-2가 포함된 X-VIVO 10 배지로 교체하였다.

<72> 8) 배지가 노란색으로 변할 경우 (약 이를간격), 10ml의 배양액을 덜어내고 1000 IU/ml의 인간 IL-2가 포함된 X-VIVO 10 배지 10ml를 다시 첨가하였다.

<73>

<74> 9) 배양 14일째 (PI day 14) 각 플라스크의 모든 세포를 수거하여 50ml의 코르니칼 튜브로 옮긴 후, X-VIVO 10 배지로 50ml까지 채워 1200 rpm에서 5분간 원심분리하여 세포를 세척하는 과정을 두 번 반복하였다.

<75> 10) 세척된 세포를 1×10^6 세포/ml의 농도로 현탁한 후 (X-VIVO 10, protein free), EBV LMP-2 또는 CMV 펩티드를 $1\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 첨가하여 표지하였다.

<76> 11) 30분간 상온에 방치하여 표지하였다.

<77> 12) X-VIVO 10 배지를 50ml까지 채워 1200 rpm에서 5분간 원심분리하여 세포를 세척하는 과정을 세 번 반복하여 CMV 펩티드-적용 OKT3-T 세포 (CMV peptide -pulsed OKT3-T)세포를 준비하였다.

<78> 1-3. 펩티드 특이적 CD8+ T 세포의 재활성

<79> 상기 실시예 1-1의 결과는 PBMC와 CMV 펩티드를 함께 배양할 경우, CMV pp65 특이적인 CD8+ T 세포가 증가함을 증명하였다. 그러나 배양 후 7-9일 사이에 4-1BB의 발현은 최고조에 이르며 그 후 감소하였다. 따라서 항원 특이적인 CD8+ T 세포의 재활성화가 필요하며, 이를 극대화하기 위해 미분화 T 세포를 제작하여 사용하였

다. 미분화 T 세포는 상기 1-2의 방법으로 제작하여 사용하였다.

<80> 1) 상기 실시예 1-1에서 준비된 펩티드 특이적 CTL과 실시예 1-2에서 준비된 펩티드-적용 OKT3-T 세포의 세포수 비율을 10:1 - 1:1 비율로 섞어 T-75 배양 플라스크에 배양한다. 배지는 50 IU/ml IL-2와 5% 자가혈장을 포함한 RPMI 1640 배지를 사용하였으며, 2×10^7 세포/10 ml/플라스크 농도로 배양하였다.

<81> - 12 웰 배양 플레이트 (Nuncclone, Cat # 150628)

<82> 2) 37°C CO₂ 배양기에서 48시간 동안 배양 하였다.

<83> 3) 배양 이틀 후 PE-결합 항-4-1BB 항체 (PE-conjugated anti-4-1BB antibody)를 이용하여 CD8⁺ T 세포 중 4-1BB 양성인 세포의 비율을 유세포 분석기로 분석하였다.

<84> - PE-결합 항-4-1BB mAb; BD Pharmingen

<85> - FITC-결합-CD8 mAb; BD Pharmingen

<86> 표지된 미분화 T세포와 펩티드로 활성화된 CD8⁺ T 세포를 1:1 - 1:10 비율로 섞어 이틀간 배양함으로써 항원 특이적 CD8⁺ T 세포의 재활성을 유도한 결과, 도 6에 나타난 것처럼, 펩티드로 표지된 미분화 T 세포와 배양된 CD8⁺ T 세포는 4-1BB의 발현이 증가되었다. 대부분의 실험에서 약 35 - 60%의 CD8⁺ T 세포에서 4-1BB의 발현이 확인되었으며, 또한 재활성화 된 세포를 4-1BB, pCMV pp65 펜타머 및 CD8 항체로 삼중 염색하여 pCMV pp65 펜타머 양성인 CD8⁺ T 세포와 4-1BB 발현이 일치하는지 확인하였다. 그 결과 도 7에 나타난 것처럼 pCMV pp65 펜타머 양성인 CD8⁺ T 세포의 대부분이 4-1BB를 발현하는 것으로 나타났다. 따라서 4-1BB 발현 세포와 pCMV pp65 펜타머 양성인 CD8⁺ T 세포가 서로 동일한 세포임을 확인하였다.

<87> 1-4. 4-1BB⁺CD8⁺ T 세포의 분리 및 대량 증식

<88> 항원으로 표지된 미분화 T 세포를 이용하여 증가시킨 4-1BB⁺CD8⁺ T 세포를 분리하기 위해, 항-4-1BB 항체를 이용한 패닝 (panning) 방법을 사용하였다.

<89> 1) 10 μ g/ml 농도로 PBS에 희석된 항-4-1BB (4B4 또는 75G1) 항체를 10ml/플라스크로 분주하여 4°C에서 20-24시간 보관하였다.

<90> 2) 보관 후 항체가 포함된 상층액을 제거하며, 세척 없이 PBS에 2.5% 농도로 용해된 BSA 용액을 10ml/플라스크로 분주하여 4°C에서 20-24시간 보관하였다.

<91> 3) BSA 용액을 제거한 후 15ml PBS로 각 플라스크를 두 번 세척하였다.

<92> 4) 상기 1-3에서 준비된 세포를 X-VIVO 10 배지에 현탁하여 인간화 항-4-1BB 항체가 코팅된 각 플라스크에 분주하여 37°C CO₂ 배양기에서 1시간동안 배양하였다.

<93> 5) 1시간 배양 후 상층액을 제거하고, 10ml RPMI1640 배지로 두 번 세척하여 비특이적으로 결합한 세포들을 제거하였다.

<94> 6) 1%의 자가혈장과 1000 IU/ml IL-2가 포함된 X-VIVO 10 배지를 각 플라스크에 첨가하여 14일간 배양 하였다.

<95>

<96> 먼저, 배양 하루 후 일부 세포를 수거하여 염색함으로써 분리된 세포의 순도와 표현형을 측정하였는데, CMV 펩티드로 표지된 미분화 (blast) T 세포를 이용하여 이틀간 재활성화된 pCMV pp65+CD8⁺ T 세포를 항-4-1BB 항체를 이용한 패닝 방법으로 분리하였다. 분리된 세포에 1000 IU/ml 인간 IL-2가 포함된 배지를 첨가하여 배양 하였으며, 배양 하루 후 일부세포를 수거하여 항-CD8-PE-Cy5와 pCMV pp65-PE, 그리고 항-CD27-, 항-CD62L-, 또는 항-NKG2D-FITC 항체로 염색하였다. 유세포 분석을 통하여 분리된 세포 중 pCMV pp65+CD8⁺ T의 비율, 그리고 CD8⁺ T 세포를 게이팅 (gating) 하여 pCMV vs. CD27 / CD62L/ NKG2D의 발현 수준을 확인하였다.

<97> 분석 결과, 도 8에 나타난 것처럼, 분리된 세포 중 pCMV+CD8⁺ T 세포의 비율은 60-80% 수준이었다. 분리된 세포는 CD27-CD62L-NKG2D+의 표현형을 나타내었으며, CD8⁺ T 세포는 활성화될 경우, CD27 및 CD62L 감소, 그리고 NKG2D가 증가하는 것으로 알려져 있다. 따라서 최종적으로 분리된 세포는 전형적인 효과기/기억 CD8⁺ T

세포 (effector/memory CD8+ T cell)인 것을 확인하였다.

<98> 실험예 2. 펜타머를 이용한 항원 특이적 CD8+ T 세포의 분리방법과의 비교

<99> 기존에 항원 특이적인 CD8+ T 세포를 분리하기 위한 방법으로 테트라머 (tetramer) 또는 펜타머 (pentamer)를 이용하는 방법이 사용되어 왔는데 (Luxembourg AT et al., Biomagnetic isolation of antigen-specific CD8+ T cells usable in immunotherapy, *Nat. biotechnol.*, 16, pp.281-285, 1998), 본 발명의 항-4-1BB 항체를 이용한 패닝방법과 펜타머를 이용한 분리 방법 중 어떤 방법이 더 우수한지를 검증하기 위해 앞에서 상기한 항-4-1BB 패닝방법에 의한 항원 특이적 세포의 수거율과 펜타머를 이용한 항원 특이적 세포의 회수율을 비교하였다.

<100> 상기 실험예 1-4에 기재된 방법에 따라 항-4-1BB 항체를 이용하여 pCMV pp65+CD8+ T 세포를 분리하였으며, 펜타머 (Pentamer)를 이용한 항원 특이적 CD8+ T 세포의 분리를 위해, pCMV pp65 펜타머와 항-PE-마이크로비드 (Miltenyi Biotec)를 이용하여 pCMV pp65+CD8+ T 세포를 분리하였다. 항-4-1BB 항체를 이용한 패닝 이전의 pCMV pp65+CD8+ T 세포수와 최종적으로 분리된 pCMV pp65+CD8+ T 세포 수를 비교함으로써 회수율 (recovery rate)을 결정하여 도 9a에 나타내었고, 상기 두 가지 방법으로 분리한 세포를 24 웰 플레이트에 1×10^6 세포/웰로 분주한 후 1000 IU/ml 인간 IL-2를 첨가하여 7일간 배양한 후 세포 수를 결정하여 증식율 (expansion rate)을 배수 (fold)로 계산하여 도 9b에 나타내었으며, 인간화 항-4-1BB 항체 (서열번호 2: HBBK4-75G1, 서열번호 3: HBBK4-75G4, 서열번호 5: HBBK4-94G1, 서열번호 6: HBBK4-94G4)를 이용한 항원 특이적 CD8+ T 세포의 분리 및 수거율을 비교하여 도 9c에 나타내었다.

<101> 그 결과, 도 9a에 나타난 바와 같이 펜타머와 항-R-피코에리트린 (PE)-마이크로비드 (anti-R-phycoerythrin (PE)-microbead)를 이용하여 CMV 특이적인 CD8+ T 세포를 분리할 경우, 30-55% 수준의 회수율을 나타내었고, 항-4-1BB 항체를 이용할 경우 50-75% 수준의 회수율을 나타내었다. 또한 두 가지 방법에 의해 분리된 세포를 상기 실시예 1-4에 기재된 조건으로 7일간 배양한 결과, 항-4-1BB 항체를 이용하여 분리된 CD8+ T 세포가 더 빠르게 증식하는 것으로 나타났다 (도 9b 참조). 또한 생쥐에서 제작된 항-4-1BB 항체 (4B4)를 기반으로 개발한 서열번호 2 내지 7의 인간화 항-4-1BB 항체를 사용하여 항원 특이적 CD8+ T 세포를 분리함으로써 수거율을 비교하였다. 예상과 달리 도 9c에 나타난 바와 같이 생쥐에서 제작된 항-4-1BB 항체인 4B4보다 사람의 IgG1 Fc 부분과 융합한 인간화 항체인 서열번호 2의 HBBK4-75G1과 서열번호 5의 HBBK4-94G1이 높은 수거율을 나타내었다.

<102> 상기의 결과들을 토대로, 항-4-1BB 항체를 이용하여 항원 특이적인 CD8+ T 세포를 분리하는 본 발명의 방법이 기존의 테트라머 또는 펜타머에 비해 효율적이며, 분리된 세포 또한 높은 생존율과 증식율을 나타냄을 확인하였다. 특히 도 1의 EBV 경우처럼, 낮은 친화력을 나타내는 테트라머 또는 펜타머를 사용해야 하는 경우에 항원 특이적 세포 회수율은 더욱 낮아질 것으로 사료되나, 4-1BB는 활성화된 CD8+ T 세포에 일정한 수준으로 발현되므로 이러한 단점이 없다 (Kim YH et al., 4-1BB costimulation enhances HSV-1-specific CD8+T cell responses by the induction of CD11c+CD8+T cells, *Cell Immunol.*, 238, pp.76-86, 2005; Wilcox RA et al., Provision of antigen and CD137 signaling breaks immunological ignorance, promoting regression of poorly immunogenic tumors, *J Clin Invest*, 109, pp.651-659, 2002). 항-4-1BB 항체를 이용하여 분리된 CD8+ T 세포의 생존율과 증식율이 높은 것은 세포분리 과정동안의 4-1BB 자극으로 인해 활성화 후 세포자사 (activation-induced cell death)를 억제하였기 때문인 것으로 사료되며, 또한 인간화 항-4-1BB 항체를 이용하여 항원 특이적 CD8+ T 세포를 분리할 경우에도 우수한 수거율을 나타냄을 확인하였다.

<103> 실험예 3. 항원 (CMV pp65) 특이적 CD8+ T 세포의 대량 배양

<104> 항-4-1BB 항체를 이용하여 4-1BB+CD8+ T 세포를 분리한 후, 상기 실시예 1-4에 기재된 방법에 따라 분리된 CMV pp65 특이적인 CD8+ T 세포를 1000 IU/ml 농도의 인간 IL-2를 이용하여 증식시켰다. 도 10a는 증식중인 CD8+ T 세포들이 콜로니 (colony)를 형성하며 증식하는 것을 나타내며 (배양 7일째 증식중인 세포의 사진을 촬영 (x10)), 그림 10b는 세포 배양 후 CMV pp65 특이적인 CD8+ T 세포의 증식율을 그래프로 나타낸 것으로, 배양중인 세포의 일부를 그림에 표시된 날짜에 수거하여 pCMV pp65-PE와 항-CD8-FITC로 염색하여 유세포 분석하였으며, 전체 세포의 수를 계산하여 pCMV pp65+CD8+ T 세포의 수를 측정한 것이다. 혈액 50ml에는 약 $5 \sim 10 \times 10^7$ PBMC가 포함되어 있으며, 이중 CMV pp65 특이적인 CD8+ T 세포의 비율은 약 0.2-0.5% 이다. 따라서 혈액 50ml내의 CMV pp65 특이적인 CD8+ T 세포는 5×10^5 미만이며, 대부분의 경우 $1 \sim 3 \times 10^5$ 수준의 세포가 존재한다. 도

10b에 나타난 것처럼 50ml의 혈액으로부터 증식된 CMV pp65 특이적인 CD8+ T 세포는 배양 30일째에 1×10^8 세포 이상이었다. 즉, 본 발명에 기재된 방법으로 세포를 배양할 경우에 항원 특이적 CD8+ T 세포를 500 내지 1500 배 수준으로 증식시킬 수 있다.

<105>

<106>

실험예 4. 유세포분석

<107>

대량 증식된 CMV 특이적 CD8+ T (CTL)의 표현형 분석을 통해 노화의 정도, 작용기능 및 활성화 단계를 측정하였다. 항-4-1BB 항체로 패닝하여 분리된 CMV pp65+CD8+ T 세포를 1000 IU/ml 인간 IL-2로 배양하였다. 배양 14일째에 세포를 수거하여 pCMV pp65-PE와 항-CD8-PE-Cy5 및 항-CD27-, 항-CD62L-, 항-NKG2D- 또는 항-CD57-FITC로 염색하였다. pCMV pp65+ T 세포만을 게이팅 (gating)하여 CD8 vs. CD27, CD62L, NKG2D, 및 CD57의 발현을 확인하였다. LAMP-1을 측정하기 위해서는 배양된 세포를 96웰 플레이트에 분주한 후, CMV 펩티드, 모넨신 (monensin), 항-LAMP-1 (CD107a)-비오틴 (biotin) 항체를 첨가하여 5시간 동안 배양하였다. 배양 후 스트렙타비딘-PE와 항-CD8-FITC로 염색하여 LAMP-1+CD8+ T 세포의 비율을 결정하여 도 11에 나타내었으며, 분석 방법은 하기와 같다.

<108>

Fc 부위를 통한 염색항체들의 비 특이적인 결합을 막기 위해 1mg/ml 인간 IgG 용액 10 μ l와 세포를 섞어 4℃에서 10분 동안 반응시켰으며, 이후 표면 분자에 특이적인 항체를 첨가하여 4℃에서 30분간 반응시킴으로써 염색하였다. 각각의 항체로 염색된 세포는 0.1% BSA가 포함된 PBS로 두 번 세척하였으며, 준비된 시료들은 유세포 분석기 (BD Bioscience, San Diego, CA)를 사용하여 표면 분자 표현형을 분석하였다.

<109>

분석 결과, 증식된 pCMV pp65+CD8+ T 세포들은 CD27-CD62L-NKG2D+ T 세포로 전형적인 효과기/기억 CD8+ T 세포 (effector/memory CD8+ T cell)였다. 노화의 지표로 사용되는 CD57의 경우 약 25-35%의 세포만이 양성반응을 나타내었으며, 작용기능 (effector function; cytotoxicity)을 측정하기 위해 LAMP-1의 세포표면 발현을 측정하였고, 40-60%의 세포들이 작용기능을 가진 세포인 것으로 측정되었다. 따라서 최종적으로 분화된 CD8+ T 세포는 작용기능을 포함한 최종분화 CD8+ T 세포와 작용기능보다는 증식 및 분화중인 세포들로 구성되어 있음을 확인하였다.

<110>

실험예 5. CD107 유동 분석 (CD107 mobilization assay)

<111>

항원 특이적인 CTL 기능을 조사하기 위해 CD107의 세포표면 노출정도를 측정하였다. CTL 능력을 시험할 세포를 2×10^6 세포/웰의 농도로 96웰 플레이트에 분주한 후, CMV 펩티드를 5 μ g/ml의 농도로 처리하였다. 동시에 각 웰에 1 μ l의 2mM 모넨신 (monensin, Sigma) 및 항-CD107a-비오틴 항체를 첨가하였다. 이 세포들은 다중채널 피펫 (multichannel pipette)으로 혼합하였으며, 플레이트를 300 x g로 1분 동안 원심분리한 후 세포들을 가라앉혀서 37℃에서 5시간 동안 배양하였다. 배양 후에 각 웰로부터 세포를 수거하였으며, 0.02% 아지드 (azide)와 0.5mM EDTA가 들어있는 PBS로 세포들을 세척함으로써 세포와 세포간의 결합을 파괴하였다. 시료들을 스트렙타비딘-FITC, 항-CD8-PE-Cy5 및 펩타머-PE (peptamer-PE)로 30분간 염색하였으며, 모든 염색된 세포는 유세포 분석기로 분석하였다.

<112>

발명의 효과

<113>

이상에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 항-4-1BB 항체를 이용한 항원 특이적 CD8+ T 세포의 분리방법 및 대량증식방법은 기존의 분리방법에서 테트라머 또는 펜타머가 낮은 친화력을 나타내는 경우 항원 특이적 세포의 회수율이 낮다는 단점을 극복할 수 있으며, 또한 인간화 항-4-1BB 항체를 이용하여 항원 특이적 세포를 분리하는 경우에도 높은 세포 수거율을 나타내었고, 분리 이후 배양과정에서 높은 증식율을 나타내므로, 본 발명의 분리방법 및 대량증식방법으로 수득된 항원 특이적 CD8+ T 세포는 암 질환의 치료 및 개선에 부작용 없이 응용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

<1>

도 1은 CMV 또는 EBV 특이적 CD8+ T 세포의 비율을 조사하여 나타낸 도이고, 도 2는 본 발명의 분리 및 증식방법의 생산 프로토콜을 나타낸 도이며,

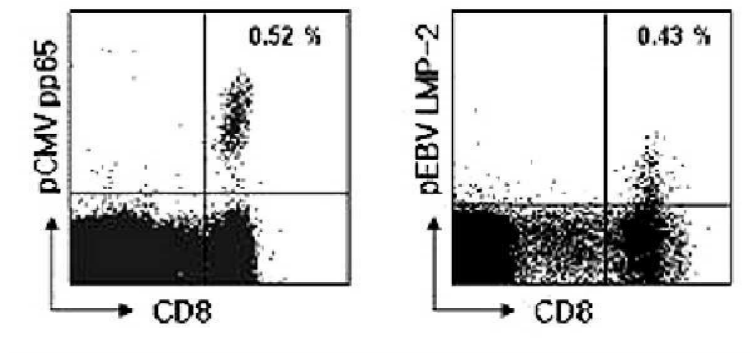
<2>

도 3은 EBV 특이적 CD8+ T 세포를 이용한 세포 치료제의 개발에 대한 개요를 나타낸 도이고,

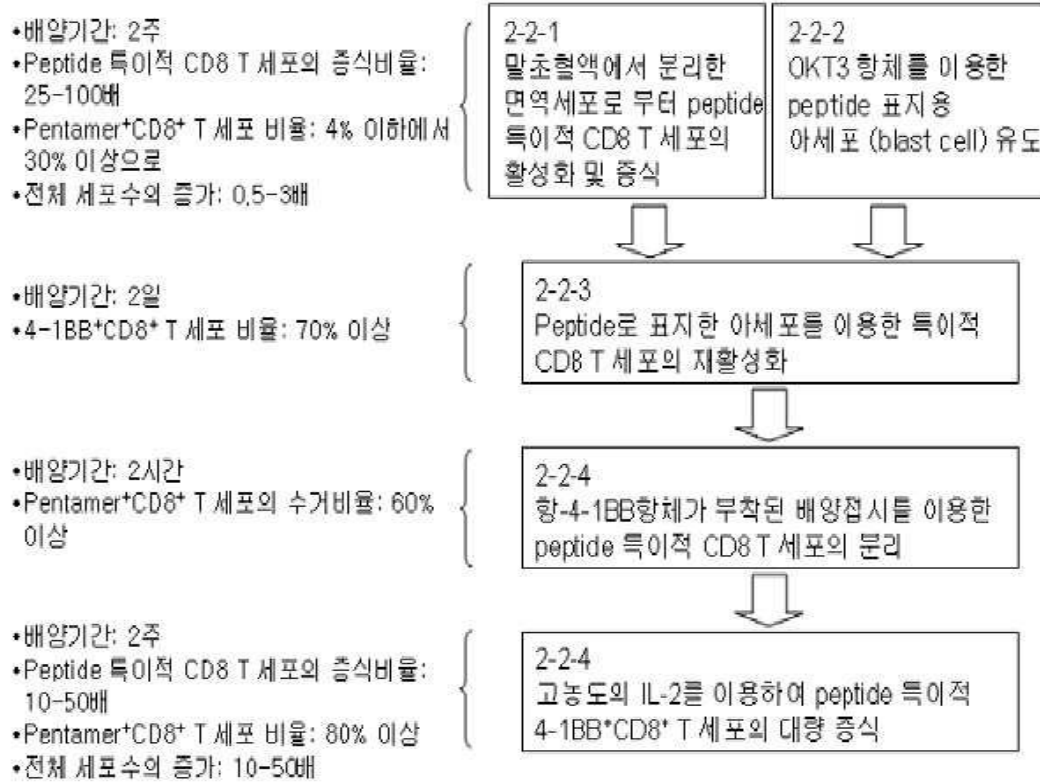
- <3> 도 4는 피콜을 이용한 밀도에 따른 PBMC의 분리를 나타낸 도이며,
 <4> 도 5는 펩티드 자극에 의한 pCMV pp65+ 및 4-1BB+ CD8+ T 세포의 분포를 나타낸 도이고,
 <5> 도 6은 CMV 펩티드 항원으로 표지된 미분화 T 세포 (blast T cell)를 이용한 CMV 특이적 CD8+ T 세포의 4-1BB 발현 증가를 나타낸 도이며,
 <6> 도 7은 4-1BB+ CD8+ T 세포와 pCMV pp65+ CD8+ T 세포의 호환성을 나타낸 도이고,
 <7> 도 8은 분리된 pCMV+ CD8+ T 세포의 표현형을 나타낸 도이며,
 <8> 도 9는 항-4-1BB 항체를 이용한 항원 특이적 CD8+ T 세포의 분리를 나타낸 도이고,
 <9> 도 10은 대량 증식된 항원 특이적 CD8+ T 세포를 확인한 도이며,
 <10> 도 11은 최종 생산된 CD8+ T 세포의 표현형을 나타낸 도이다.

도면

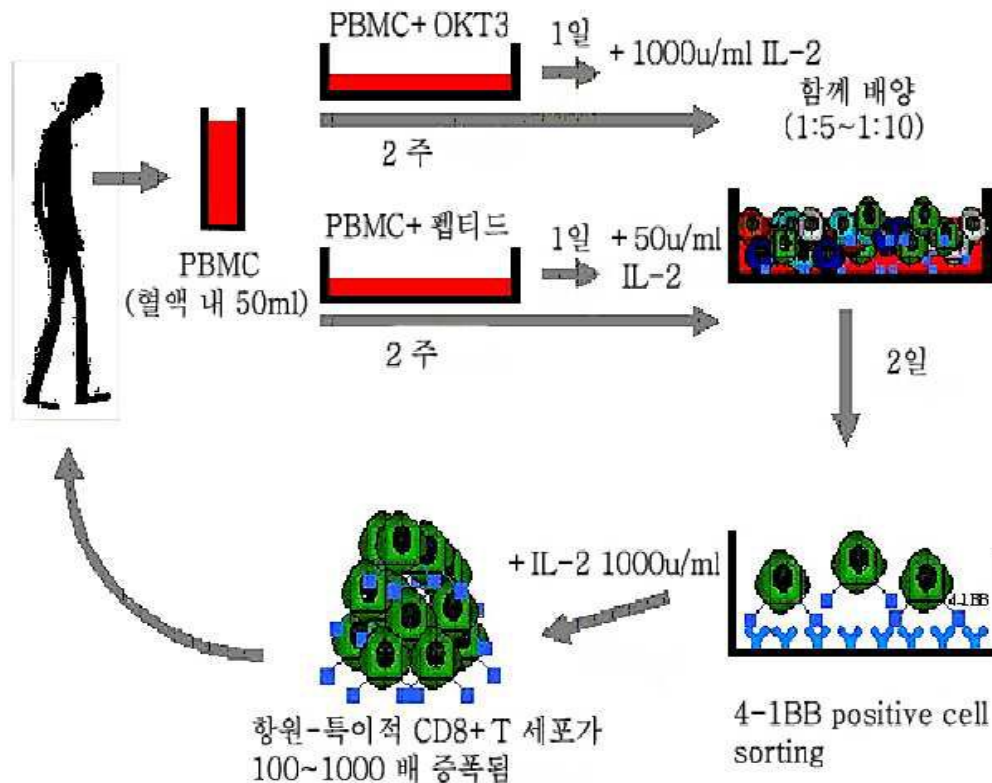
도면1



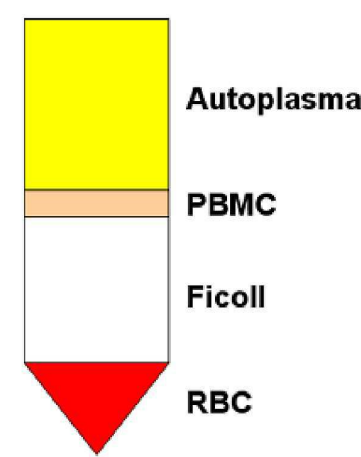
도면2



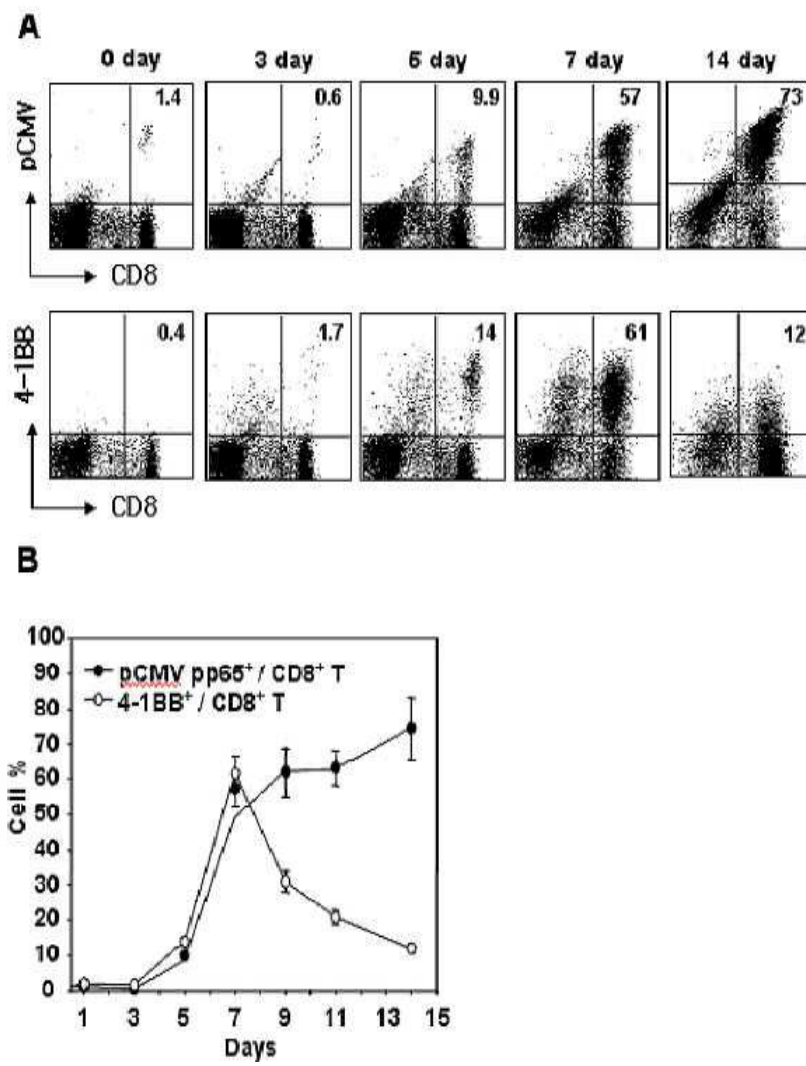
도면3



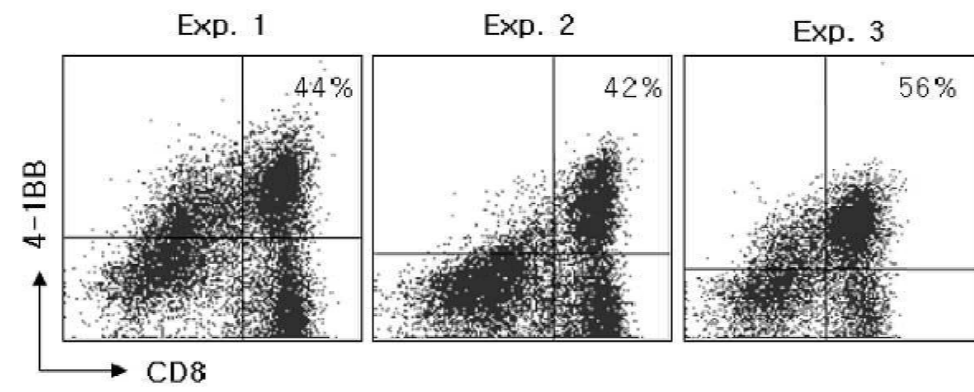
도면4



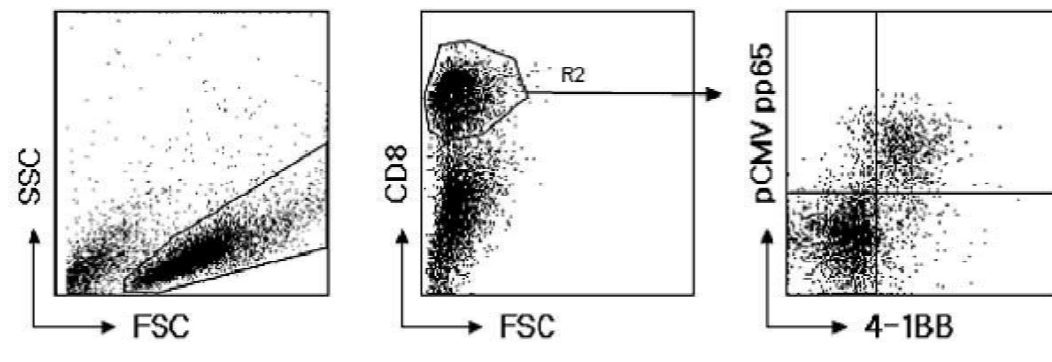
도면5



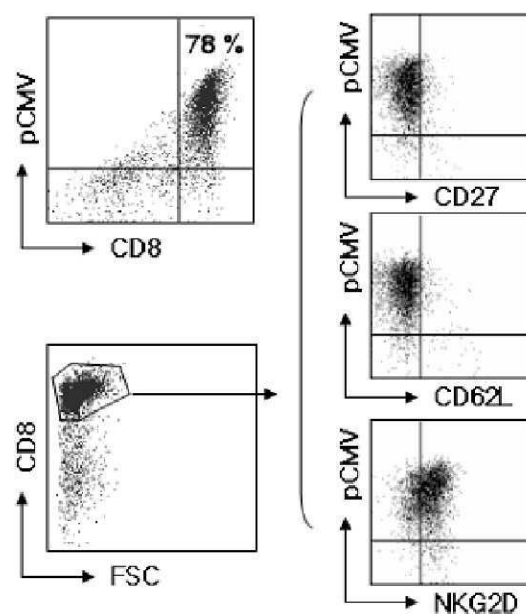
도면6



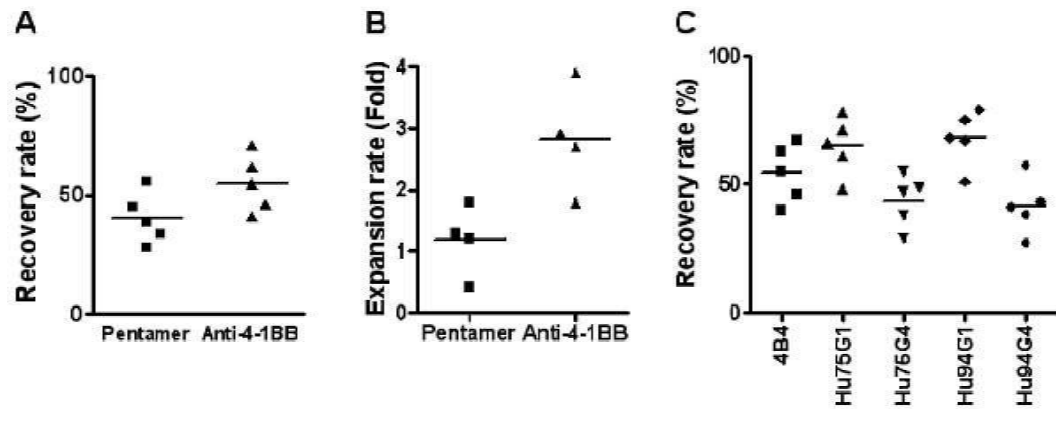
도면7



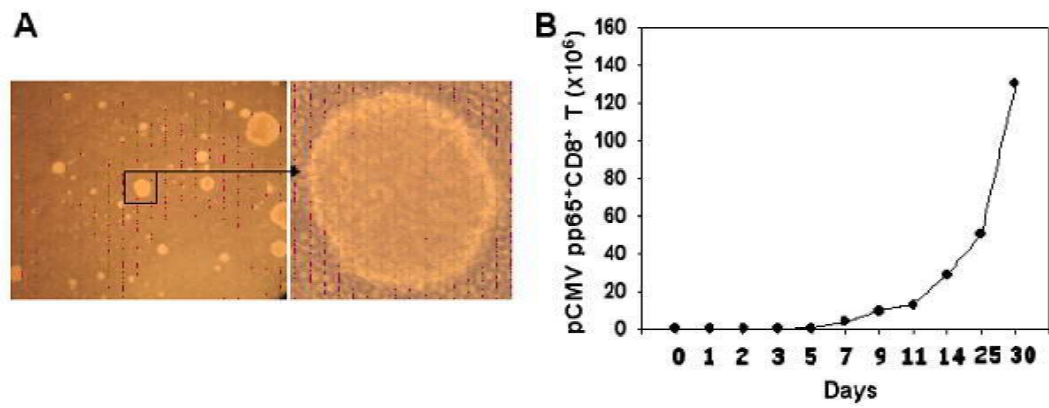
도면8



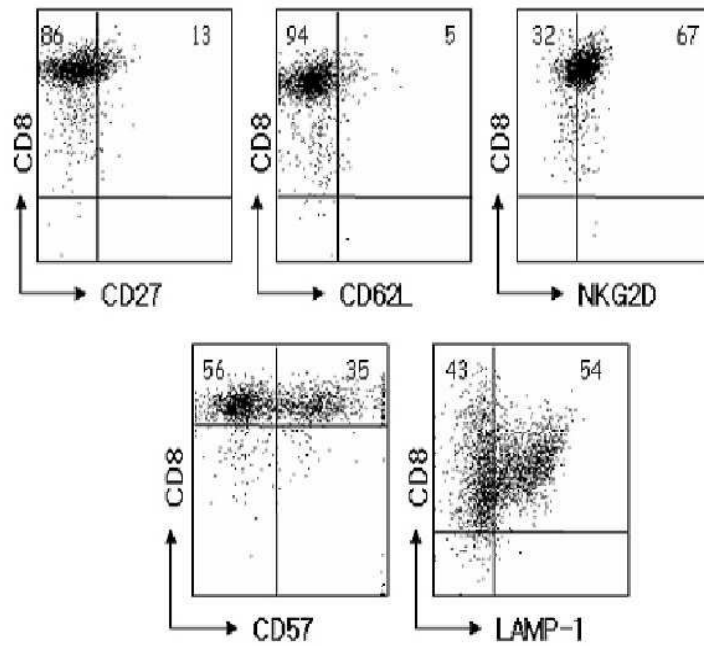
도면9



도면10



도면11



서열 목록

- <110> University of Ulsan Foundation For Industry Cooperation
- <120> A method for isolating and expanding autologous antigen-specific CD8+T cells using an anti-4-1BB antibody
- <130> DIF/2007-01-0014/MR
- <160> 7
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1
- <211> 9
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220>
- <223> Amino acid sequence of CMV pp65
- <400> 1
- Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val
- 1 5

<210> 2
 <211> 472
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amino acid sequence of HBBK4-75G1 heavy chain

<400> 2
 Asp Leu Thr Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr
 1 5 10 15

Ala Thr Gly Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu
 20 25 30

Val Ile Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly
 35 40 45

Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 50 55 60

Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Gly Asn Gly His Thr
 65 70 75 80

Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Ser Arg Ala Thr Leu Thr Gly Asp Thr
 85 90 95

Ser Thr Ser Thr Val Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp
 100 105 110

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Phe Thr Thr Ala Arg Ala Phe
 115 120 125

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 130 135 140

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 145 150 155 160

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 165 170 175

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
180 185 190

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
195 200 205

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
210 215 220

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Ser Leu
225 230 235 240

Ser Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
245 250 255

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
260 265 270

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
275 280 285

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
290 295 300

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
305 310 315 320

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
325 330 335

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
340 345 350

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
355 360 365

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
370 375 380

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
385 390 395 400

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
405 410 415

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
420 425 430

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
435 440 445

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
450 455 460

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470

<210> 3
<211> 465
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amino acid sequence of HBBK4-75G4 heavy chain

<400> 3
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Ile Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Ser Ser Tyr Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Gly Asn Gly His Thr Asn Tyr Asn
65 70 75 80

Glu Lys Phe Lys Ser Arg Ala Thr Leu Thr Gly Asp Thr Ser Thr Ser
85 90 95

Thr Val Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Phe Thr Thr Ala Arg Ala Phe Ala Tyr Trp
115 120 125

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
130 135 140

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
145 150 155 160

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
165 170 175

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
180 185 190

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
195 200 205

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
210 215 220

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr
225 230 235 240

Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro
245 250 255

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
260 265 270

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
275 280 285

Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
290 295 300

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
305 310 315 320

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
325 330 335

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys

340 345 350
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 355 360 365
 Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 370 375 380
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 385 390 395 400
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 405 410 415
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
 420 425 430
 Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 435 440 445
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 450 455 460
 Lys
 465
 <210> 4
 <211> 236
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Amino acid sequence of HBBK4-75G1 and 75G4 Light chain
 <400> 4
 Leu Asp Met Met Arg Phe Ser Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 Cys Phe Gln Gly Thr Arg Cys Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala
 20 25 30
 Phe Leu Ser Val Thr Pro Gly Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala

35	40	45
Ser Gln Thr Ile Ser Asp Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp		
50	55	60
Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly		
65	70	75
Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe		
85	90	95
Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln		
100	105	110
Asp Gly His Ser Phe Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu		
115	120	125
Ile Lys Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp		
130	135	140
Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn		
145	150	155
Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu		
165	170	175
Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp		
180	185	190
Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr		
195	200	205
Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser		
210	215	220
Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
225	230	235

<210> 5
 <211> 472
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of HBBK4-94G1 heavy chain

<400> 5

Asp Leu Thr Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr
1 5 10 15

Ala Thr Gly Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu
20 25 30

Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly
35 40 45

Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
50 55 60

Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Gly Asn Gly His Thr
65 70 75 80

Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Ser Arg Ala Thr Met Thr Arg Asp Thr
85 90 95

Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp
100 105 110

Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Phe Thr Thr Ala Arg Ala Phe
115 120 125

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
130 135 140

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
145 150 155 160

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
165 170 175

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
180 185 190

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
195 200 205

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys

210 215 220
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Ser Leu
 225 230 235 240
 Ser Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 245 250 255
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 260 265 270
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 275 280 285
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 290 295 300
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 305 310 315 320
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 325 330 335
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 340 345 350
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 355 360 365
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 370 375 380
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 385 390 395 400
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 405 410 415
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 420 425 430
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 435 440 445

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
450 455 460

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470

<210> 6
<211> 465
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amino acid sequence of HBBK4-94G4 Heavy chain

<400> 6
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Ser Ser Tyr Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Gly Asn Gly His Thr Asn Tyr Asn
65 70 75 80

Glu Lys Phe Lys Ser Arg Ala Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Phe Thr Thr Ala Arg Ala Phe Ala Tyr Trp
115 120 125

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
130 135 140

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr

145 150 155 160
 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 165 170 175
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 180 185 190
 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 195 200 205
 Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
 210 215 220
 His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr
 225 230 235 240
 Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro
 245 250 255
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 260 265 270
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
 275 280 285
 Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 290 295 300
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 305 310 315 320
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 325 330 335
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
 340 345 350
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 355 360 365
 Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 370 375 380

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
385 390 395 400

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
405 410 415

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
420 425 430

Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
435 440 445

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
450 455 460

Lys
465

<210> 7
<211> 236
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amino acid sequence of HBBK4-94G1 and 94G4 light chain

<400> 7
Leu Asp Met Met Arg Phe Ser Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15

Cys Phe Gln Gly Thr Arg Cys Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ala
20 25 30

Phe Leu Ser Val Thr Pro Gly Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala
35 40 45

Ser Gln Thr Ile Ser Asp Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp
50 55 60

Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly
65 70 75 80

Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe

85

90

95

Ser Ile Ser Ser Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ala Tyr Tyr Cys Gln
100 105 110

Asp Gly His Ser Phe Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu
115 120 125

Ile Lys Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
130 135 140

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
145 150 155 160

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
165 170 175

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
180 185 190

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
195 200 205

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
210 215 220

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235