



- (51) 국제특허분류:
A61K 38/16 (2006.01) C12N 5/0784 (2010.01)
C12N 5/09 (2010.01) C12Q 1/68 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2016/011178
- (22) 국제출원일: 2016년 10월 6일 (06.10.2016)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2015-0140390 2015년 10월 6일 (06.10.2015) KR
- (71) 출원인: 전남대학교 산학협력단 (INDUSTRY FOUNDATION OF CHONNAM NATIONAL UNIVERSITY) [KR/KR]; 61186 광주광역시 북구 용봉로 77, Gwangju (KR). 주식회사 박셀바이오 (VAXCELL-BIO INC.) [KR/KR]; 58141 전라남도 화순군 화순읍 산단길 12-55, Jeollanam-do (KE).
- (72) 발명자: 이계중 (LEE, Je-Jung); 61101 광주광역시 북구 서강로 150, 105동 1301호, Gwangju (KR). 최누리 (CHOI, Nu-Ri); 61161 광주광역시 북구 밤실로 214, 4층, Gwangju (KR). 이현주 (LEE, Hyun-ju); 62296 광주

광역시 광산구 신창로 35번길 54, 1305동 401호, Gwangju (KR). 정성훈 (Jung, Sung-Hoon); 61737 광주광역시 남구 서문대로 627번길 19, 103동 1703호, Gwangju (KR).

- (74) 대리인: 특허법인 플러스 (PLUS INTERNATIONAL IP LAW FIRM); 35209 대전시 서구 한밭대로 809 10층, Daejeon (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, JP, KE, KG, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

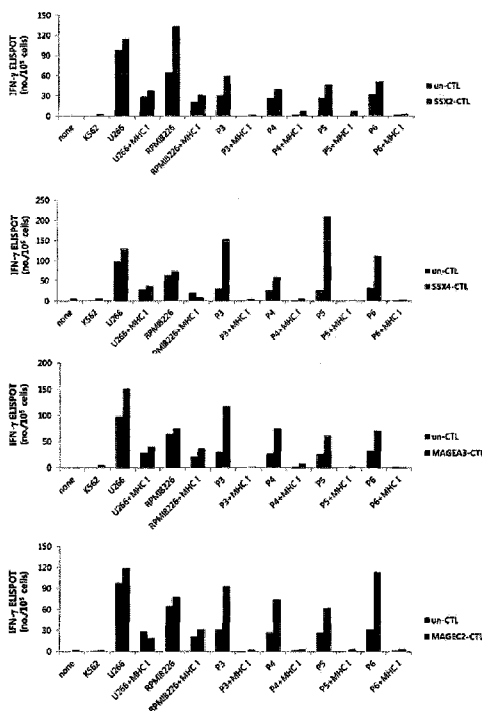
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: CELLULAR IMMUNOTHERAPEUTIC AGENT COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING KOREAN INTRACTABLE MULTIPLE MYELOMA, CONTAINING CANCER-TESTIS ANTIGEN, AND PREPARATION METHOD THEREFOR

(54) 발명의 명칭: 암-고환 항원을 포함하는 한국 난치성 다발골수종 예방 또는 치료용 세포 면역치료제 조성물 및 그 제조방법

[도 7]



(57) Abstract: The present invention relates to a composition for treating or preventing, by cancer immunotherapy, Korean intractable multiple myeloma, containing a cancer-testis antigen. It is expected that a cellular immunotherapeutic agent composition for preventing or treating multiple myeloma, containing, as active ingredients, dendritic cells, having an antigen loaded thereon, and cancer-testis antigen-specific cytotoxic τ lymphocytes derived therefrom, is used so as to induce a strong tumor-specific cytotoxic immune response in cancer immunotherapy and, simultaneously, be useful as a cancer treatment vaccine, which is safe and has no side effects.

(57) 요약서: 본 발명은 암-고환 항원을 포함하는 한국 난치성 다발골수종 암 면역치료 또는 예방용 조성물에 관한 것으로, 상기 항원을 탑재한 수지상세포 및 이로부터 유도되는 암-고환 항원 특이적 세포독성 τ 림프구세포를 유효성분으로 포함하는 다발골수종 예방또는 치료용 세포 면역치료제 조성물을 이용함으로써 암 면역 치료에 있어 강력한 중앙 특이적 세포독성 면역 반응을 유도하는 동시에 안전하고 부작용이 없는 암 치료용 백신으로 유용하게 활용할 수 있을 것으로 기대된다.



ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

규칙 4.17에 의한 선언서:

- 신규성을 해치지 아니하는 개시 또는 신규성 상실의 예외에 관한 선언 (규칙 4.17(v))

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 암-고환 항원을 포함하는 한국 난치성 다발골수종 예방 또는 치료용 세포 면역치료제 조성물 및 그 제조방법 기술분야

- [1] 본 발명은 암-고환 항원을 포함하는 한국 난치성 다발골수종 암 면역치료 또는 예방용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 상기 항원을 탑재한 수지상세포 및 이로부터 유도되는 암-고환 항원 특이적 세포독성 T 림프구세포를 유효성분으로 포함하는 다발골수종 예방 또는 치료용 세포 면역치료제 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 다발골수종(multiple myeloma)은 형질세포의 악성 증식에 의해 발생하는 혈액암의 일종으로 국내에서는 악성림프종과 급성 백혈병 다음으로 많이 발생하는 질병이다. 최근 30년간 국내에서 30배 정도로 발병률이 증가하였으며, 현재 5,000명 정도의 환자가 있는 것으로 추정된다. 이러한 환자의 급격한 증가로 인해 향후 사회적인 문제가 될 수 있는 질병이다.
- [3] 21세기 들어 다발골수종에 대하여 탈리도마이드, 보르테오미드 및 렌날리도마이드 등과 같은 표적 치료제가 임상에 도입되면서 긍정적인 치료 결과를 얻은 환자 또한 증가하였으나, 여전히 평균 생존률이 5년 정도로 짧으며 대부분의 환자들이 사망에 이르고 있다. 또한 상기 표적 치료제는 가격이 비싸고, 심각한 부작용을 초래함으로써 인해 지속적인 치료를 유지하는 데 어려움이 있다. 따라서 치료 효과가 좋고 사용에 따른 부작용이 적은 새로운 치료법이 필요하다.
- [4] 암의 치료를 위해 사용되고 있는 일반적 방법의 한계 극복을 위해 다양한 치료 방법에 대한 연구가 시도되었으며 이 중 근래 들어 암 특이적 치료효과를 보이고 부작용이 없는 암 면역 치료(cancer immunotherapy)가 주목 받고 있다. 상기 방법은 암세포만을 선택적으로 사멸시키고 부작용이 거의 없는 치료법으로 알려져 있다(2nd Novel Immunotherapeutics Summit 2013 Jan 30-Feb 1).
- [5] 현재 다발골수종 자체를 이용하여 암 면역치료제의 종양 항원으로 이용하고 있으나, 다수의 환자에서 치료를 위한 다발골수종 세포를 골수로부터 얻기에는 어려움이 있다. 따라서, 다발골수종에서 면역 세포를 이용한 암 면역 치료제 개발에 있어서의 최대 난제는 다발골수종에 특이성을 가지는 종양 항원의 개발이며, 이에 대한 발굴이 절실한 상황이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 상기 문제점의 해결을 위해 본 발명에서는 다발골수종의 세포 면역치료법으로 안전하고 부작용이 없으면서 종양 특이적인 면역반응을 증가시켜 해당 종양을

효과적으로 치료할 수 있는 예방 및 치료를 위한 암-고환 항원을 포함하는 조성물을 제공하고자 하였으며, 상기 조성물을 이용하여, 세포로부터 발현량의 비교 분석을 통해 악성 다발골수종 세포로부터 과발현 되는 종양항원 후보 단백질을 선별하는 정량적 방법을 제공하고자 하였다.

과제 해결 수단

- [7] 본 발명은 암-고환 항원인 CTAG1B, SSX2, SSX4, SSX5, MAGEA3, MAGEC1, MAGEC2, BAGE1, CTAG2 및 SPA17로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 단백질; 상기 단백질의 항원성 펩티드가 탑재된 수지상세포; 또는 상기 암-고환 항원-특이적 세포독성 T 림프구세포를 유효성분으로 포함하는 다발골수종 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.
- [8] 또한 본 발명은 a) 악성 다발골수종 세포를 준비하는 단계; b) 악성 다발골수종 세포의 순도를 확인하는 단계; c) 높은 순도로 수확된 악성 다발골수종 세포로부터 암-고환 항원의 프라이머를 이용한 정량분석을 통해 상기 세포로부터 과발현 여부를 판단하는 단계; 및 d) 상기 암-고환 항원을 재조합-종양항원 단백질로 제조하여 수지상세포에 적절히 탑재하는 단계; 를 포함하는 다발골수종 예방 또는 치료용 세포 면역치료제 조성물의 제조방법에 관한 것이다.

발명의 효과

- [9] 본 발명을 통한 암-고환 항원 단백질 또는 이의 항원성 펩티드를 포함하는 조성물을 이용함으로써 암 면역치료에 있어 강력한 종양 특이적 세포독성 면역 반응을 유도하는 동시에 안전하고 부작용이 없는 암 치료용 백신으로 유용하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [10] 도 1은 한국 난치성 다발골수종 환자의 골수 단핵세포에서 악성 종양세포의 분리 및 세포 표현형을 확인한 결과이며,
- [11] 도 2는 암-고환 항원 SSX2의 발현을 정량적으로 분석한 결과이며,
- [12] 도 3은 암-고환 항원 SSX42의 발현을 정량적으로 분석한 결과이며,
- [13] 도 4는 암-고환 항원 MAGE-A3의 발현을 정량적으로 분석한 결과이며,
- [14] 도 5는 암-고환 항원 MAGE-C2의 발현을 정량적으로 분석한 결과이며,
- [15] 도 6은 암-고환 항원 CTAG2(LAGE-1)의 발현을 정량적으로 분석한 결과이며,
- [16] 도 7은 암-고환 항원 재조합 단백질을 수지상세포에 적절히 탑재하는 단계 또는 이로부터 유도되는 암-고환 항원 특이적 세포독성 T 림프구세포를 이용한 타겟세포 인식 반응을 나타낸 결과이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [17] 본 발명은 암-고환 항원인 CTAG1B, SSX2, SSX4, SSX5, MAGEA3, MAGEC1, MAGEC2, BAGE1, CTAG2 및 SPA17로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 단백질; 상기 단백질의 항원성 펩티드가 탑재된 수지상세포; 또는

상기 암-고환 항원-특이적 세포독성 T 림프구세포를 유효성분으로 포함하는 다발골수종 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

- [18] 암 면역 치료법은 종양-특이 항원(tumor-associated antigen, TA)-특이적 치료법(수지상세포 치료, 펩티드 백신, DNA 백신 등)과 TA-비특이적인 치료법으로 구분할 수 있다. 수지상세포(DC)는 가장 강력한 항원제시세포로 종양 항원-특이적 면역 반응을 유도하여 강력한 항암 면역 반응을 유도할 수 있다. 상기 수지상세포를 이용한 암 면역치료법은 암 환자의 말초혈액으로부터 단구를 분리하여 시험관 내에서 사이토카인으로 분화 및 성숙시킨 후, 종양항원(TA)을 탑재하여 환자에게 투여 후 TA-특이적 면역 반응을 유도하는 것으로 강력한 항암 치료 효과를 나타낼 수 있다. 앞에서 언급한 바와 같이 다발골수종(multiple myeloma)은 형질세포의 악성 증식에 의해 발생하는 혈액암의 일종이다. 암 면역 치료에 가장 이상적인 종양 항원은 정상세포에서는 발현되지 않고, 암세포에서만 특이적으로 발현되는 특징을 가지며, 항원성(immunogenicity)을 갖는 것이 매우 중요한데, 이와 같은 조건을 충족하는 단백질이 암-고환 항원(cancer-testis antigen)이다.
- [19] 본 발명에서 제한되지는 않으나 상기 CTAG1B는 서열번호 1, SSX2는 서열번호 2, SSX4는 서열번호 3, SSX5는 서열번호 4, MAGEA3은 서열번호 5, MAGEC1은 서열번호 6, MAGEC2는 서열번호 7, BAGE1은 서열번호 8, CTAG2는 서열번호 9 및 SPA17은 서열번호 10의 아미노산 서열을 갖을 수 있다.
- [20]
- [21] 또한 본 발명은 a) 악성 다발골수종 세포를 준비하는 단계; b) 악성 다발골수종 세포의 순도를 확인하는 단계; c) 높은 순도로 수확된 악성 다발골수종 세포로부터 암-고환 항원의 프라이머를 이용한 정량분석을 통해 상기 세포로부터 과발현 여부를 판단하는 단계; 및 d) 상기 암-고환 항원을 재조합-종양항원 단백질로 제조하여 수지상세포에 적절히 탑재하는 단계; 를 포함하는 다발골수종 예방 또는 치료용 세포 면역치료제 조성물의 제조방법에 관한 것이다.
- [22] 본 발명에서 상기 악성 다발골수종 세포의 순도는 제한되지는 않지만 80% 이상일 수 있으며, 보다 좋게는 90% 이상, 바람직하게는 95% 이상 고순도를 가질수록 실험 결과의 정확도를 높이는 데 있어 바람직하다.
- [23] 본 발명의 상기 c) 단계의 프라이머는 CTAG1B 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 11의 정방향 프라이머, 서열번호 12의 역방향 프라이머; SSX2 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 13의 정방향 프라이머, 서열번호 14의 역방향 프라이머; SSX4 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 15의 정방향 프라이머, 서열번호 16의 역방향 프라이머; SSX5 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 17의 정방향 프라이머, 서열번호 18의 역방향 프라이머; MAGEA3 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 19의 정방향 프라이머, 서열번호 20의 역방향 프라이머; MAGEC1 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 21의 정방향

프라이머, 서열번호 22의 역방향 프라이머; MAGEC2 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 23의 정방향 프라이머, 서열번호 24의 역방향 프라이머; BAGE1 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 25의 정방향 프라이머, 서열번호 26의 역방향 프라이머; CTAG2 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 27의 정방향 프라이머, 서열번호 28의 역방향 프라이머; 및 SPA17 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 29의 정방향 프라이머, 서열번호 30의 역방향 프라이머를 사용하여 증폭할 수 있다.

[24] 본 발명에서 상기 c) 단계에서의 정량분석은 제한되지는 않으나 실시간-정량적 중합효소 연쇄반응(real-time quantitative polymerase chain reaction)으로 발현량을 측정하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[25] 본 발명에서 상기 정량분석은 제한되지는 않으나 베타-액틴(beta-actin)을 대조군으로 사용하여 대조군과의 발현량의 비율을 측정할 수 있다.

[26]

[27] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명에 대한 이해를 돕기 위한 것일 뿐, 어떤 의미로든 본 발명의 범위가 이들 예로만 한정되는 것은 아니다. 이 때, 사용되는 기술 용어 및 과학 용어에 있어서 특별한 다른 정의가 없다면, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 일반적으로 이해하고 있는 의미를 가지며, 하기의 설명 또는 첨부 도면에서 불필요하게 본 발명의 요지를 흐릴 수 있는 공지 기능 및 구성에 대한 설명은 생략한다.

[28]

[29] [실시예 1] 한국 난치성 다발골수종 환자의 골수 단핵세포에서 악성 종양세포의 분리 및 세포 표현형 확인

[30] 악성 종양 세포의 순수한 분리를 위하여 MACS(magnetic activated cell separation)법을 사용하였다. 악성 종양 세포의 세포 표현형의 순도 확인을 위해 분리키트로 human plasma cell isolation kit II(Miltenyi Biotec) 또는 CD138 microbeads(Miltenyi Biotec)을 이용하였다.

[31] 상기 두 가지 방법은 아래와 같이 약간의 차이점이 있다.

[32] 상기 키트를 이용하여 먼저 골수-단핵세포로부터 non-플라즈마 세포를 제거하고 CD138 microbeads를 이용하여 CD138 양성인 플라즈마 세포를 양성 분리(positive selection)하며, CD138 microbeads를 이용한 분리는 상기 non-플라즈마 세포 제거 과정을 생략하고 CD138 microbeads를 이용하여 양성 분리(positive selection)하게 된다.

[33] 상기 두 가지 방법을 이용하여 양성 분리된 플라즈마 세포(plasma cell)의 세포 표현형을 확인하기 위하여, BD사의 단클론성 항체(CD19-PE-Cy5, CD38-PE, CD56-PE-Cy5, CD138-TITC)를 $5 \times 10^4 \sim 10^5$ 개의 세포를 1% 혈청이 포함된 PBS(phosphate-buffered saline; Life Technologies) 완충용액 200 μ L 당 1 μ L를 처리하여 4 °C에서 30분간 반응시킨 후, 1% 혈청이 포함된 PBS로 2회 세척하고

CD19, CD38, CD56 및 CD138의 발현을 BD사의 유세포분석기(FACSCalibur, BD)를 이용하여 분석하였다.

[34] 악성 다발골수종 세포의 표준 세포 표현형은 CD19 Low, CD22 음성, CD34 음성, CD56 양성 및 CD 138 양성인 것 등이 악성 다발골수종 세포에 해당하는데 그 발현 정도를 확인하여 도 1에 도시하였다.

[35]

[36] [실시예 2] 실시간-정량적 중합효소 연쇄반응(real-time qPCR)을 이용한 암-고환 항원의 정량적 발현 비교

[37] 하기 표 1의 정상인과 다발 골수종 환자로부터 얻은 시료로부터 Rneasy mini kit(Qiagen)를 이용하여 고순도의 total RNA를 분리하고 Primerscript 1st strand cDNA synthesis kit(Takara)를 이용하여 cDNA를 합성하였다.

[38] [Table 1]

정상인/환자*	시료 (n)
NL-PB	7
NL-B	3
NL-BM	4
MM-PB	12
MM-BM IgA_CD138-	5
MM-BM IgA_CD138+	
MM-BM IgG_CD138-	8
MM-BM IgG_CD138+	
MM-BM lambda_CD138-	4
MM-BM lambda_CD138+	
MM-BM kappa_CD138-	4
MM-BM kappa_CD138+	

[39] *약어에 대한 설명은 하기 부호의 설명 항목 참고

[40]

[41] 합성된 cDNA 각 시료를 주형(template)으로 하여 실시간-정량적 중합효소 연쇄반응(real-time quantitative polymerase chain reaction)을 위해 SYBR Green PCR Master mix(QUANTI tech)와 표 2의 10개 암-고환 항원의 발현을 위한 서열번호 11 내지 30의 프라이머를 이용하였다.

[42]

[43] [Table 2]

유전자	프라이머 서열*	발현산물(bp)
CTAG1B (CT6.1)	F: 5'-GGC CCT GAC CTT CTC TCT G-3'	127
	R: 5'-CCT GGG CCA TCA GGA ATG-3'	
SSX2 (CT5.2a)	F: 5'-AGC ATC TGC CAT CTG CTT TT-3'	85
	R: 5'-GAG GGG AGT ACA TGC TGA CC-3'	
SSX4 (CT5.4)	F: 5'-CTT GCA GTG TGC CAT TCT GT-3'	155
	R: 5'-GGG GAG AGA GGA GGG TAG TG -3'	
SSX5 (CT5.5)	F: 5'-TTC CCA GAT GTG ACC ACT GA-3'	196
	R: 5'-GAC ACA TGG GGA AAA GCA GT-3'	
MAGEA3 (CT1.3)	F: 5'-CTC CAG CAA CCA AGA AGA GG-3'	151
	R: 5'-CAG CAT TTC TGC CTT TGT GA-3'	
MAGEC1 (CT7.1)	F: 5'-AGG CAG AGA TGC TGA CGA AT-3'	187
	R: 5'-CCC TGC TCA TCA CTC AGA CA-3'	
MAGEC2 (CT10)	F: 5'-TGC CTC TGA GGA GGT CAT CT-3'	116
	R: 5'-GTC CCT GCA CCC AAA CTT TA-3	
BAGE1 (CT2.1)	F: 5'-CCA ATT TAG GGT CTC CGG TA-3'	121
	R: 5'-CAC CAT CCA GAG TGA GAC GA-3'	
CTAG2 (CT6.2a: LAGE-1)	F: 5'-AGC TTT CCC TGT TGA TGT GG-3'	186
	R: 5'-CTC CTC CAG CGA CAA ACA AT-3'	
SPA17 (CT22)	F: 5'-CCA TTG AAA CAT GCC ACT TG-3'	186
	R: 5'-TGG GGG ATG TGA TAG AGA GG-3'	

[44] *F: Forward (정방향), R: Reverse (역방향)

[45]

[46] 실시간-정량적 중합효소 연쇄반응은 95 °C에서 30초, 52 °C에서 30초, 72 °C에서 30초의 조건으로 진행하였다. 상기 10개의 항원에 대한 대조군으로는 베타-액틴(beta-actin)을 사용하여 발현량을 측정하였다. 정량적 발현량의 분석은 RG-3000(Roger-gene) 기기의 Roger-gene 6 소프트웨어를 이용하였으며, 대조군인 베타-액틴과 비교한 10 가지 암-고환 항원의 정량적 발현을 GraphPad Prism 5 소프트웨어를 이용하여 도시하였다. 이 중 일부 항원에 대한 결과는 도 2-도 6에 도시하였다.

- [47] 도 2-도 6의 결과에서 확인할 수 있는 바와 같이 목적 mRNA와 베타-액틴의 정량적 발현량의 비를 비교한 결과, 다발골수종 환자의 경우 악성 다발 골수성 세포를 나타내는 CD138 양성에서의 발현량의 비가 현저히 증가함을 확인할 수 있으며, 이로부터 정상인과 환자를 명확하게 선별할 수 있음을 확인하였다.
- [48]
- [49] [실시예 3] 수지상세포의 제조, 악성 다발골수종 세포로부터 선별, 제조된 재조합 암-고환 항원을 수지상세포에 탑재 및 암-고환 항원 특이적 세포 독성 T 림프구세포(cytotoxic T lymphocytes; CTLs) 유도
- [50] 본 발명에 사용된 수지상세포는 동의서를 얻은 다발골수종 환자의 말초혈액으로부터 lymphoprep(Ficoll-Hypaque)을 이용한 원심분리를 통해 단핵세포(mononuclear cells)를 획득하였고, 이를 다시 퍼콜(Percoll) 밀도구배 혹은 CD14 양성 세포를 마그네틱 비드(magnetic bead)를 이용하여 단구세포(monocytes)를 수득하였다.
- [51] 상기 수득된 단구세포를 6-well 플레이트에 2×10^6 cells의 밀도로 분주(seeding)하고, 50 ng/mL 재조합 인간 GM-CSF와 20 ng/mL 재조합 인간 IL-4을 2일 간격으로 총 6일간 처리하여 미성숙 수지상세포로 분화시킨 다음, (주)박셀바이오에서 개발된 수지상세포(VaxDC) 표준 제조 프로토콜(SOP)에 따라, VaxDC 각테일을 2일간 처리 및 배양하여 성숙 수지상세포를 수득하였다.
- [52] 악성 다발골수종 세포로부터 상기 표 2의 프라이머를 이용한 정량분석을 통해, 선별 및 제조된 재조합 암-고환 항원 3-5개를 수지상세포에 2×10^5 내지 3×10^5 세포 당 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 내지 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하여 37 °C CO₂ 배양기에서 2시간 동안 반응시키고 CD3 또는 CD8 양성 T 림프구세포와 함께 공동 배양하여 세포 독성 T 림프구세포(cytotoxic T lymphocytes; CTLs)를 유도하였다.
- [53] 공동 배양 3일 후, 5 ng/mL 재조합 인간 IL-2와 10 ng/mL IL-7을 첨가하여 세포 독성 T 림프구세포를 증식시켰다. 이후 7일 간격으로, 증식된 세포 독성 T 림프구세포를 상기 항원이 탑재된 수지상세포로 2회 이상 자극하고 공동 배양하여 5일 후, 반응이 유도된 세포 독성 T 림프구세포를 수득하였다.
- [54] 이를 통해 암-고환 항원을 과발현하는 다발골수종 세포와 다발골수종 환자의 악성세포를 타겟 세포로 하여, 세포 독성 T 림프구세포와 공동 배양하여 암-고환 항원-특이적 세포독성반응 및 그 살상능을 확인하였다.
- [55]
- [56] [실시예 4] 인간 인터페론-감마 ELISPOT 기법을 이용한 암-고환 항원 특이적 세포독성 T 림프구 세포의 살상능
- [57] 본 실험에 사용된 인간 인터페론-감마 ELISPOT kit(BD)는 제조자의 프로토콜(BD™ ELISPOT human IFN- γ set, cat no.551849, BD)에 따라 사용하였다.
- [58] 암-고환 항원이 과발현되는 다발골수종 세포주와 다발골수종 환자의 악성세포를 1:10 또는 1:20 비율로 타겟 세포로 사용하여 인간 인터페론-감마 항체가 코팅된 96-well 플레이트에서 24시간 공동 배양한 다음, 발색된 인간

인터페론-감마의 스팟(spots)의 수를 확인하였다. 얻어진 스팟의 수는 곧 타겟 세포에 발현된 암-고환 항원을 인식하는 암-고환 항원 특이적 세포독성 T 림프구세포의 수를 의미한다.

- [59] 각각의 선별 제조된 암-고환 항원이 제시된 수지상세포로부터 특이적으로 제조된 세포독성 T 림프구세포에 의해 타겟 세포를 특이적으로 인식하여 인터페론 감마를 분비하는 정도를 확인하였다.

[60]

- [61] 실험 결과는 아래와 같다.

- [62] K562 세포주는 NK 세포에 의존적으로 살상되는 세포주이고, RPMI8226과 U266 세포주는 암-고환 항원을 과발현하는 다발골수종 세포주(n=2)이며, P3, P4, P5 및 P6은 암-고환 항원을 과발현하는 다발골수종 환자(n=4)의 다발골수종세포이다.

- [63] un-CTL은 상기 기술된 암-고환 항원이 탑재되지 않은 수지상세포에 의해 유도된 세포독성 T 림프구세포이며 도 7의 청색 그래프로부터 항원-비특이적 반응을 확인할 수 있다.

- [64] SSX2-, SSX4-, MAGEA3- 및 MAGEC2-CTL은 암-고환 항원이 탑재된 수지상세포에 의해 유도된 암-고환 항원-특이적 세포독성 T 림프구세포(도 7의 적색 그래프)이다.

- [65] 도 7의 그래프에서 스팟의 간격은 암-고환 항원-특이적 세포독성 T 림프구 반응의 강도를 의미하는데, 파란색과 빨간색 그래프의 간격이 크게 벌어질수록 항원-특이적 반응의 세기가 강함을 나타내는 것이다.

- [66] 도 7의 결과에서 확인할 수 있듯이, 암-고환 항원으로 유도된 세포독성 T 림프구세포의 경우, 암-고환 항원을 과발현하는 타겟세포에 반응하여 인터페론 감마를 분비하는 스팟이 특이적이고 강하게 생성되었으며, 이러한 반응은 MHC(major histocompatibility complex) 분자 I의 단클론 항체에 의해 특이적으로 저해되는 것으로부터, MHC 분자 I 매개에 의한 항원-특이적인 반응임을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[67]

- [68] NL-정상인, MM-다발골수종 환자, PB-말초혈액 단핵세포, B-B 세포, BM-골수 단핵세포, IgA, -면역글로블린 A, IgG-면역글로블린 G, lamda-lamda light chain, kappa-kappa light chain, CD138-CD138 음성의 다발골수종 세포, CD138⁺-CD138 양성 다발골수종 세포, MACS-magnetic activated cell separation.

서열목록 Free Text

- [69] 서열목록은 별도의 파일에 기재하였다.

청구범위

- [청구항 1] 암-고환 항원인 CTAG1B, SSX2, SSX4, SSX5, MAGEA3, MAGEC1, MAGEC2, BAGE1, CTAG2 및 SPA17로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 단백질; 상기 단백질의 항원성 펩티드가 탑재된 수지상세포; 또는 상기 암-고환 항원-특이적 세포독성 T 림프구세포를 유효성분으로 포함하는 다발골수종 예방 또는 치료용 세포 면역치료제 조성물.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서,
상기 CTAG1B는 서열번호 1, SSX2는 서열번호 2, SSX4는 서열번호 3, SSX5는 서열번호 4, MAGEA3은 서열번호 5, MAGEC1은 서열번호 6, MAGEC2는 서열번호 7, BAGE1은 서열번호 8, CTAG2는 서열번호 9 및 SPA17은 서열번호 10의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 3] a) 악성 다발골수종 세포를 준비하는 단계;
b) 상기 악성 다발골수종 세포의 순도를 확인하는 단계;
c) 높은 순도로 수확된 악성 다발골수종 세포로부터 암-고환 항원의 프라이머를 이용한 정량분석을 통해 상기 세포로부터 과발현 여부를 판단하는 단계; 및
d) 상기 암-고환 항원을 재조합-종양항원 단백질로 제조하여 수지상세포에 적절히 탑재하는 단계;
를 포함하는 다발골수종 예방 또는 치료용 세포 면역치료제 조성물의 제조방법.
- [청구항 4] 제 3항에 있어서,
상기 c) 단계의 프라이머는
CTAG1B 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 11의 정방향 프라이머, 서열번호 12의 역방향 프라이머;
SSX2 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 13의 정방향 프라이머, 서열번호 14의 역방향 프라이머;
SSX4 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 15의 정방향 프라이머, 서열번호 16의 역방향 프라이머;
SSX5 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 17의 정방향 프라이머, 서열번호 18의 역방향 프라이머;
MAGEA3 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 19의 정방향 프라이머, 서열번호 20의 역방향 프라이머;
MAGEC1 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 21의 정방향 프라이머, 서열번호 22의 역방향 프라이머;
MAGEC2 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 23의 정방향

프라이머, 서열번호 24의 역방향 프라이머;
BAGE1 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 25의 정방향
프라이머, 서열번호 26의 역방향 프라이머;
CTAG2 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 27의 정방향
프라이머, 서열번호 28의 역방향 프라이머; 및
SPA17 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 29의 정방향
프라이머, 서열번호 30의 역방향 프라이머를 사용하여 증폭시키는
것을 특징으로 하는 제조방법.

[청구항 5]

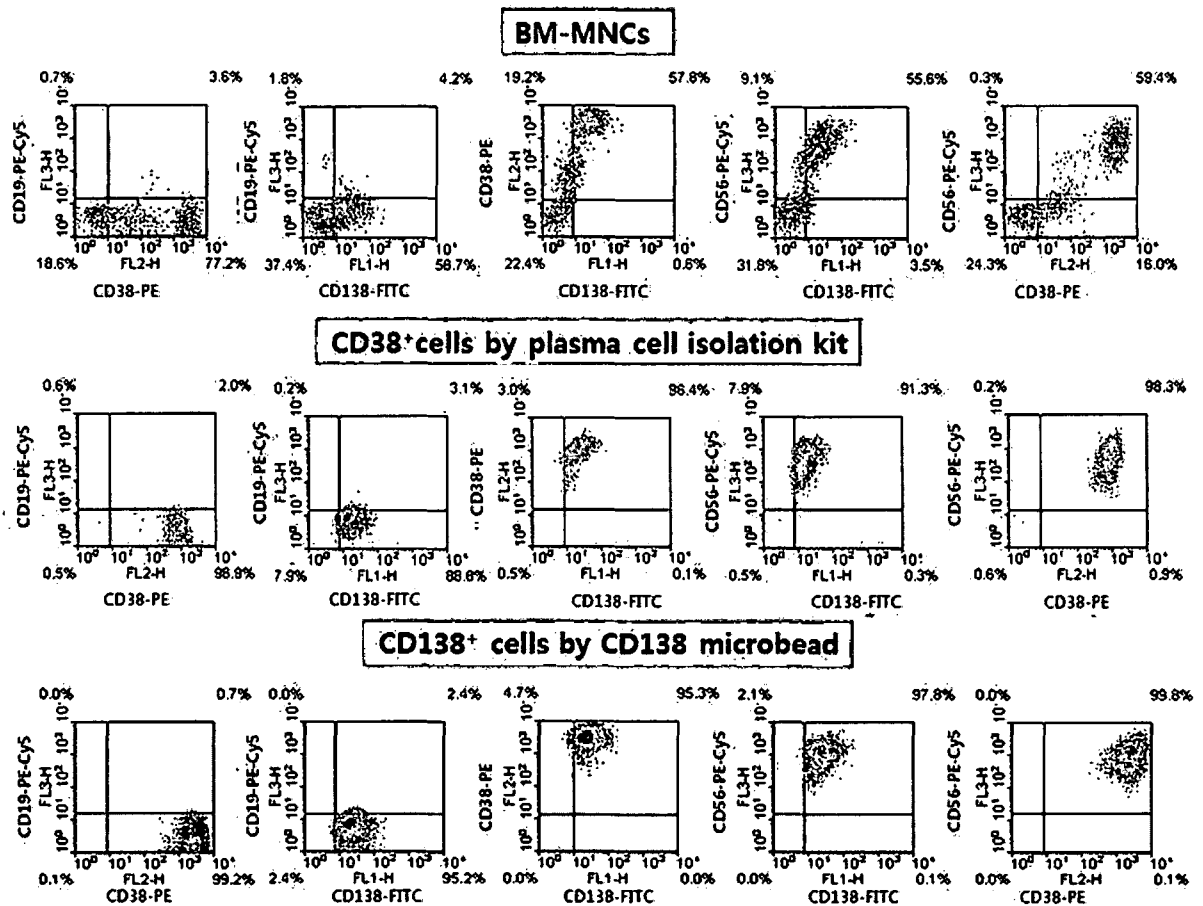
제 3항에 있어서,
상기 c) 단계에서의 정량분석은 실시간-정량적 중합효소
연쇄반응(real-time quantitative polymerase chain reaction)으로
발현량을 측정하는 것을 특징으로 하는 제조방법.

[청구항 6]

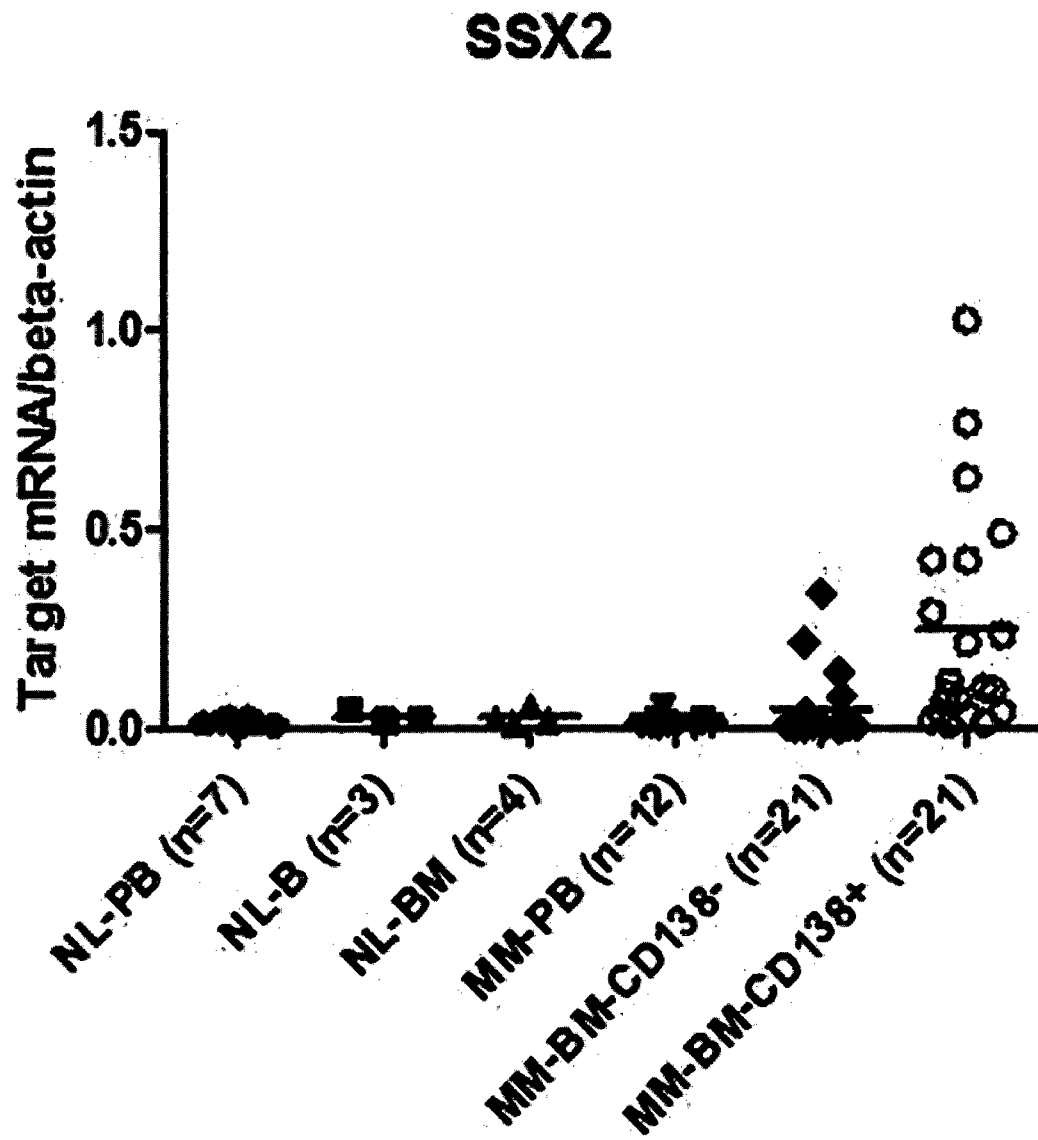
제 5항에 있어서,
상기 정량분석은 베타-액틴(beta-actin)을 대조군으로 사용하여
대조군과의 발현량의 비율을 측정하는 것을 특징으로 하는
제조방법.

1/7

[도 1]

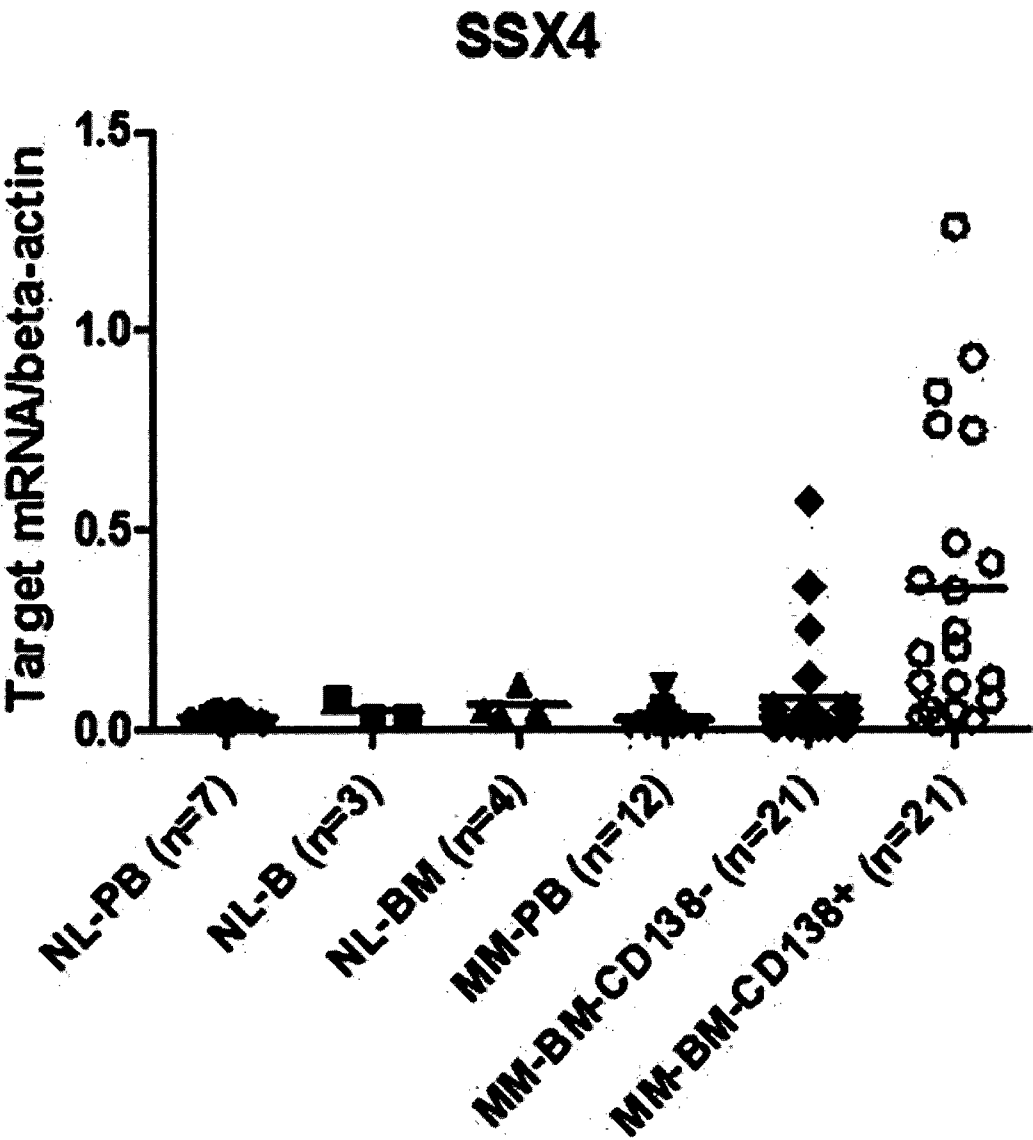


[도 2]

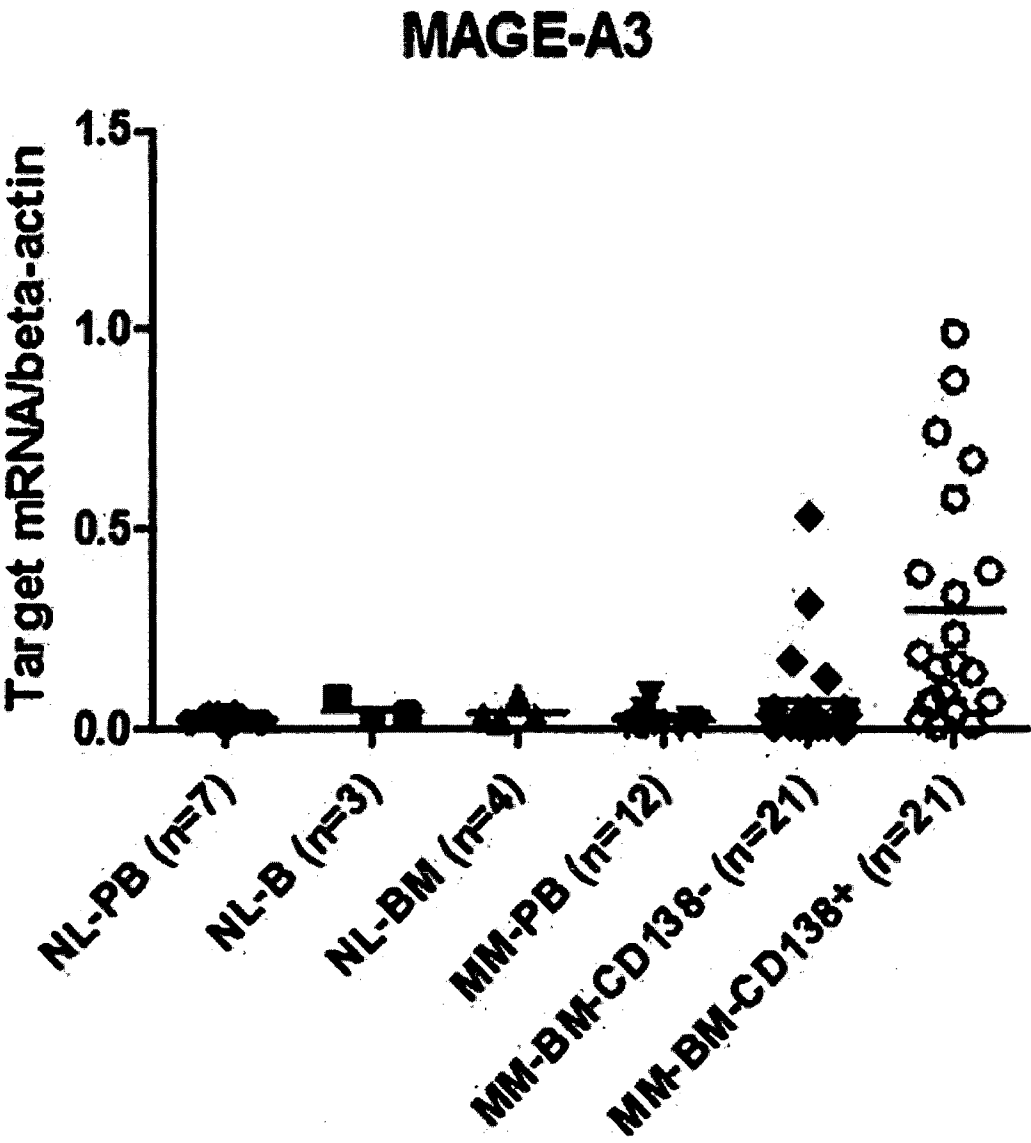


3/7

[도 3]

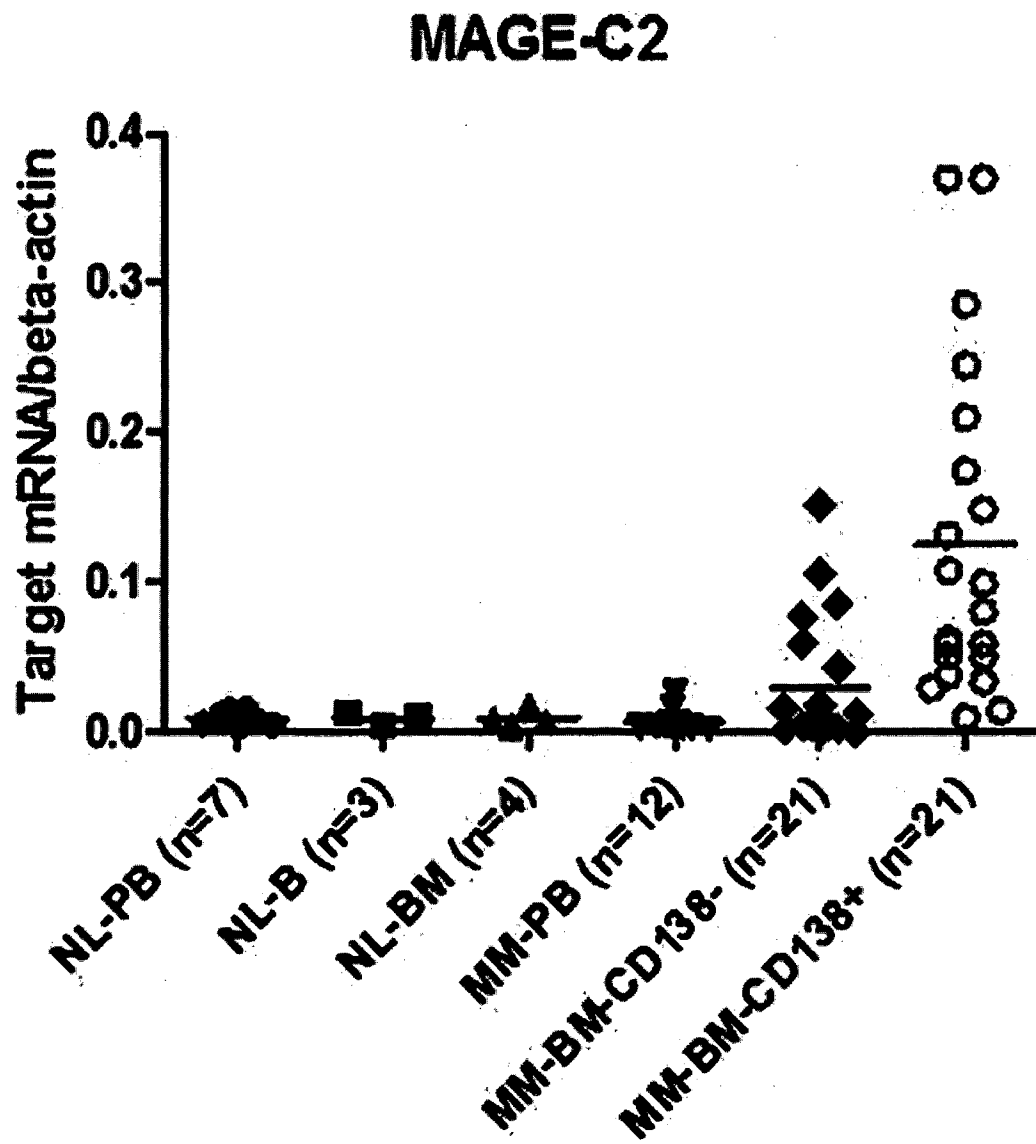


[도 4]

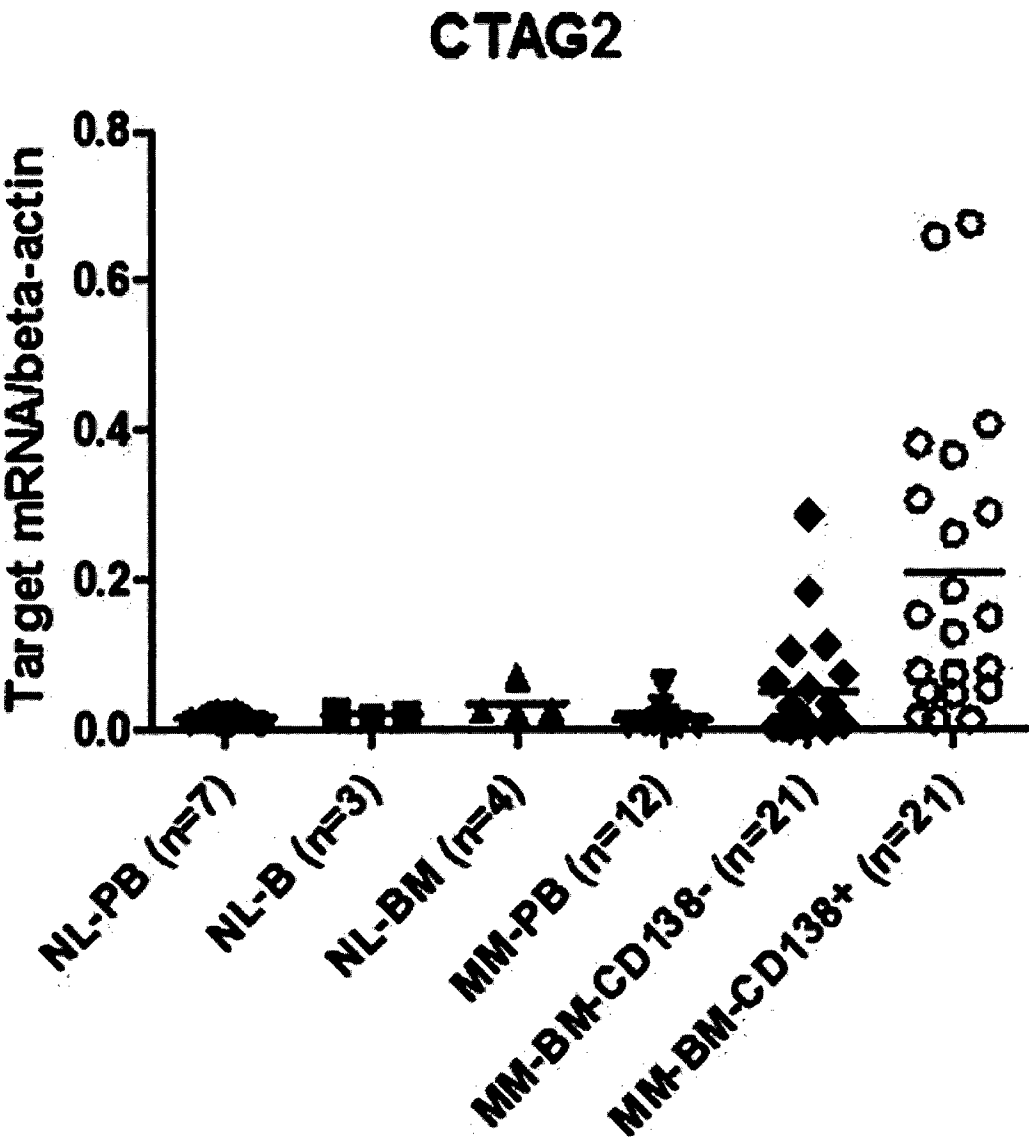


5/7

[도 5]

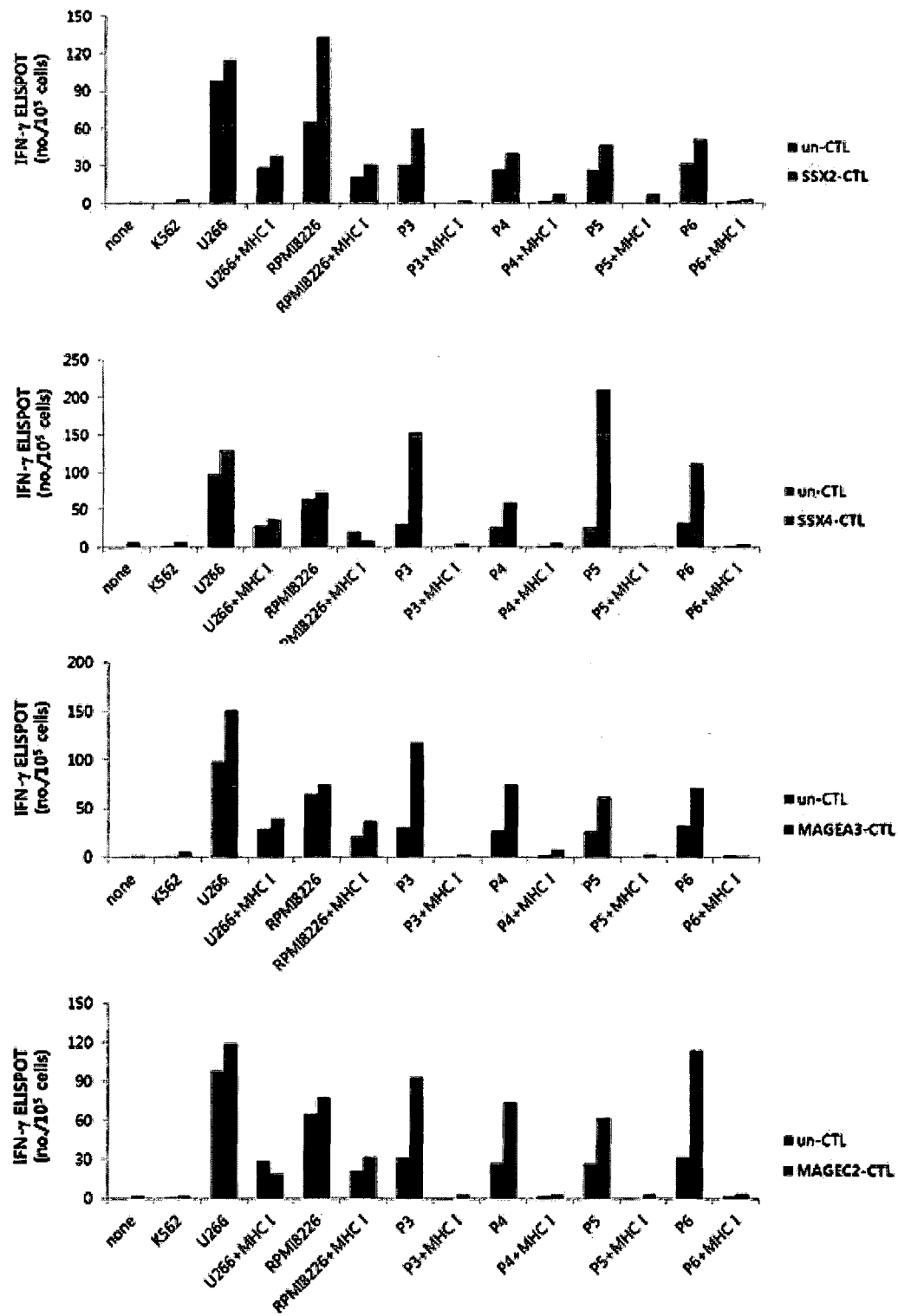


[도 6]



7/7

[도 7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/011178**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****A61K 38/16(2006.01)i, C12N 5/09(2010.01)i, C12N 5/0784(2010.01)i, C12Q 1/68(2006.01)i***

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 38/16; C12Q 1/68; C12N 5/09; C12N 5/0784

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-testis antigen, multiple myeloma, RT-qPCR, beta-actin

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHIRIVA-INTERNATI et al., "Sperm Protein 17 (Sp17) is a Suitable Target for Immunotherapy of Multiple Myeloma", Blood, vol. 100, no.3, pp. 961-965 (2002) See pages 961-963.	1-3,5-6
Y		4
X	ATANACKOVIC et al., "Cancer-testis Antigens are Commonly Expressed in Multiple Myeloma and Induce Systemic Immunity Following Allogeneic Stem Cell Transplantation, Blood, vol. 109, no. 3, pp. 1103-1112 (2007) See pages 1103-1105, 1110-1111.	1-2
Y		4
Y	DUIN, Van et al., "Cancer Testis Antigens in Newly Diagnosed and Relapse Multiple Myeloma: Prognostic Markers and Potential Targets for Immunotherapy Haematologica, vol. 96, no. 11, pp. 1662-1669 (2011) See abstract; table 1; and figure 1.	4
A	NCBI, GenBank accession no. NP_059121.1 (15 March 2015) See the entire document.	1-6



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

10 JANUARY 2017 (10.01.2017)

Date of mailing of the international search report

10 JANUARY 2017 (10.01.2017)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/011178

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	NCBI, GenBank accession no. NP_001318.1 (06 April 2014) See the entire document.	1-6
A	US 2013-0096025 A1 (SONNEVELD) 18 April 2013 See the entire document.	1-6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2016/011178

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2013-0096025 A1	18/04/2013	CN 102933965 A	13/02/2013
		CN 102933965 B	17/06/2015
		EP 2390662 A1	30/11/2011
		EP 2577306 A1	10/04/2013
		EP 2577306 B1	15/07/2015
		WO 2011-147987 A1	01/12/2011

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 38/16(2006.01)i, C12N 5/09(2010.01)i, C12N 5/0784(2010.01)i, C12Q 1/68(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 38/16; C12Q 1/68; C12N 5/09; C12N 5/0784

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: 암-고환 항원, 다발골수종, RT-qPCR, 베타-액틴

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	CHIRIVA-INTERNATI 등, 'Sperm protein 17 (Sp17) is a suitable target for immunotherapy of multiple myeloma' Blood, Vol.100, No.3, pp.961-965 (2002) 페이지 961-963 참조.	1-3,5-6
Y		4
X	ATANACKOVIC 등, 'Cancer-testis antigens are commonly expressed in multiple myeloma and induce systemic immunity following allogeneic stem cell transplantation' Blood, Vol.109, No.3, pp.1103-1112 (2007) 페이지 1103-1105, 1110-1111 참조.	1-2
Y		4
Y	VAN DUIN 등, 'Cancer testis antigens in newly diagnosed and relapse multiple myeloma: prognostic markers and potential targets for immunotherapy' Haematologica, Vol.96, No.11, pp.1662-1669 (2011) 요약; 표 1; 및 도면 1 참조.	4
A	NCBI, GenBank accession no. NP_059121.1 (2015.03.15) 전체 문헌 참조.	1-6

☒ 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

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2017년 01월 10일 (10.01.2017)

국제조사보고서 발송일

2017년 01월 10일 (10.01.2017)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

김승범

전화번호 +82-42-481-3371



C(계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	NCBI, GenBank accession no. NP_001318.1 (2014.04.06) 전체 문헌 참조.	1-6
A	US 2013-0096025 A1 (SONNEVELD) 2013.04.18 전체 문헌 참조.	1-6

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2013-0096025 A1	2013/04/18	CN 102933965 A	2013/02/13
		CN 102933965 B	2015/06/17
		EP 2390662 A1	2011/11/30
		EP 2577306 A1	2013/04/10
		EP 2577306 B1	2015/07/15
		WO 2011-147987 A1	2011/12/01