

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2023년 11월 2일 (02.11.2023)



(10) 국제공개번호
WO 2023/210908 A1

- (51) 국제특허분류:
G01N 33/574 (2006.01) *C12Q 1/6886* (2018.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2022/020248
- (22) 국제출원일: 2022년 12월 13일 (13.12.2022)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2022-0052961 2022년 4월 28일 (28.04.2022) KR
- (71) 출원인: 가톨릭대학교 산학협력단 (THE CATHOLIC UNIVERSITY OF KOREA INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 06591 서울특별시 서초구 반포대로 222, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 안스테반 (AHN, Stephen); 06552 서울특별시 서초구 동광로19길 138, 501호, Seoul (KR). 최혜연 (CHOI, Haeyoun); 06592 서울특별시 서초구 사평대로 240, 502동 1208호, Seoul (KR). 김태규 (KIM, Tai-Gyu);

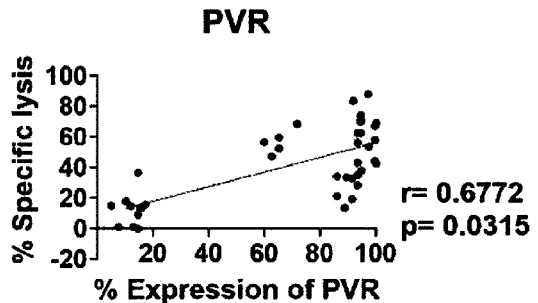
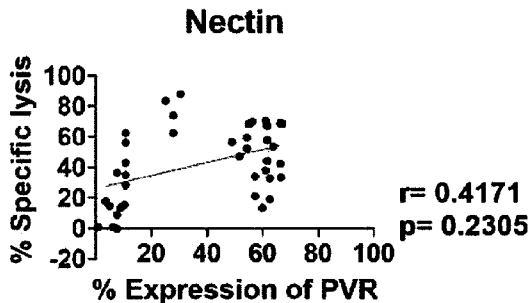
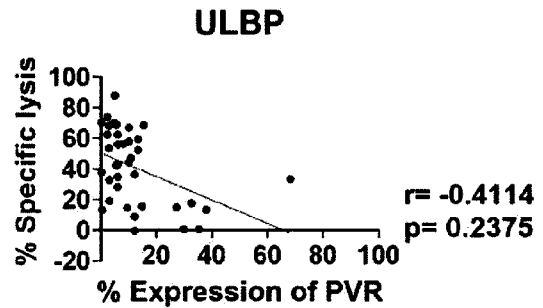
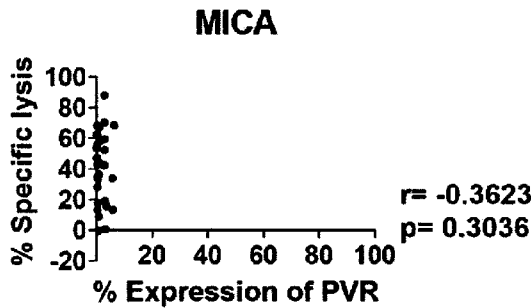
06002 서울특별시 강남구 압구정로29길 71, 20동 305호, Seoul (KR). 박순아 (PARK, Soon A); 03013 서울특별시 종로구 홍지문길 56, 6동 202호, Seoul (KR). 이윤경 (LEE, Yunkyung); 07040 서울특별시 동작구 상도로 390, 201호, Seoul (KR).

(74) 대리인: 특허법인 이룸리온 (ERUUM & LEEON INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM); 06575 서울특별시 서초구 사평대로 108, 3층 (반포동), 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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, 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,

(54) Title: METHOD FOR PREDICTING EFFECTIVENESS OF EFFECT OF TREATING GLIOBLASTOMA BY MEANS OF T CELLS

(54) 발명의 명칭: T 세포에 의한 교모세포종 치료 효과의 유효성 예측 방법



(57) Abstract: The present invention relates to a method for predicting the effectiveness of an effect of treating glioblastoma by means of T cells, the method comprising a step for measuring, from a biological sample, the expression level of a poliovirus receptor (PVR) protein or a gene coding therefor. By measuring the expression level of a PVR protein or a gene coding therefor in glioblastoma treatment, the effectiveness of an effect of treating by means of T cells may be predicted, and thus the present invention may be usefully employed for personalized glioblastoma treatment.

[다음 쪽 계속]

WO 2023/210908 A1



SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의
역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM,
KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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,
ME, 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).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

(57) 요약서: 본 발명은 생물학적 시료로부터 PVR(poliovirus receptor) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 T 세포에 의한 교모세포종 치료 효과의 유효성 예측 방법에 관한 것으로서, 교모세포종의 치료에 있어 PVR(poliovirus receptor) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정함으로써 T 세포에 의한 치료 효과의 유효성을 예측할 수 있어, 개인 맞춤형 교모세포종의 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

명세서

발명의 명칭: T 세포에 의한 교모세포종 치료 효과의 유효성 예측 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 T 세포에 의한 교모세포종 치료 효과의 유효성 예측 방법; T 세포에 의한 교모세포종 치료 효과의 유효성 예측용 조성물; 및 이를 포함하는 교모세포종 치료 효과의 유효성 예측용 키트에 관한 것이다.
- [2] 한편, 본 출원은 하기 국가연구개발사업에 의해 지원받았다.
- [3] [이 발명을 지원한 국가연구개발사업]
- [4] [과제고유번호] 1345352191
- [5] [과제번호] 2021R1I1A1A01055575
- [6] [부처명] 교육부
- [7] [과제관리(전문)기관명] 한국연구재단
- [8] [연구사업명] 이공학학술연구기반구축
- [9] [연구과제명] 교모세포종 치료를 위한 $\gamma\delta$ T 세포치료제 개발 연구
- [10] [기여율] 1/1
- [11] [과제수행기관명] 가톨릭대학교(성의교정)
- [12] [연구기간] 2022-03-01~2023-02-28
- [13]

배경기술

- [14] 교모세포종(glioblastoma)은 신경교종의 일종으로서, 뇌에서 발생하는 가장 흔하고 심한 형태의 종양으로 알려져 있다 (Journal of Neuro-Oncology, 108(1):11~27). 교모세포종의 증상은 투통, 성격 변화 또는 구역질 등이 있고, 증상이 악화되면 의식불명이 나타날 수 있다. 교모세포종은 극복이 어려운 대표적인 종양으로서, 발병자의 중간값은 약 12~15개월이며, 5년을 넘긴 환자는 약 3~5%에 불과하다.
- [15] 교모세포종의 발생 원인은 잘 알려져 있지 않으며, 다만 희귀한 원인으로 신경섬유종증이나 리 프라우메니 증후군이 있으며, 방사선에 노출되는 것도 원인으로 거론되고 있다. 교모세포종은 전체 뇌종양의 15%를 차지하며, CT, MRI 등 영상검사와 수술적 조직검사 등으로 진단된다. 교모세포종의 치료는 수술치료, 표준요법 항암방사선 동시치료(테모졸로마이드-방사선 복합치료) 및 표준요법 항암치료의 순서로 이뤄지게 된다. 환자의 상태와 세부 진단에 따라 추가적으로 수술, 항암치료 또는 방사선 치료 등을 고려할 수 있다.
- [16]
- [17] [선행기술문헌]
- [18] [특허문헌]

[19] (특허문헌 1) 한국등록특허 제10-1692044호

[20]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[21] 본 발명의 목적은 생물학적 시료로부터 PVR(poliovirus receptor) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 T 세포에 의한 교모세포종 치료 효과의 유효성 예측 방법을 제공하는 것이다.

[22] 본 발명의 다른 목적은 PVR(poliovirus receptor) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 T 세포에 의한 교모세포종 치료 효과의 유효성 예측용 조성물을 제공하는 것이다.

[23] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 T 세포에 의한 교모세포종 치료 효과의 유효성 예측용 조성물을 포함하는 T 세포에 의한 교모세포종 치료 효과의 유효성 예측용 키트를 제공하는 것이다.

[24]

과제 해결 수단

[25] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 생물학적 시료로부터 PVR(poliovirus receptor) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 T 세포에 의한 교모세포종 치료 효과의 유효성 예측 방법을 제공한다.

[26] 또한, 본 발명은 PVR(poliovirus receptor) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 T 세포에 의한 교모세포종 치료 효과의 유효성 예측용 조성물을 제공한다.

[27] 또한, 본 발명은 상기 T 세포에 의한 교모세포종 치료 효과의 유효성 예측용 조성물을 포함하는 T 세포에 의한 교모세포종 치료 효과의 유효성 예측용 키트를 제공한다.

[28] 또한, 본 발명은 상기 방법을 이용한 교모세포종 치료 효과의 유효성 예측 및 치료 방법을 제공한다.

[29] 또한, 본 발명은 교모세포종 환자로부터 분리된 생물학적 시료로부터 PVR(poliovirus receptor) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하여 발현 수준이 정상 대조군에 비해 높을 경우 T세포를 투여하는 단계를 포함하는 교모세포종 치료 방법을 제공한다.

[30]

발명의 효과

[31] 본 발명에 따른 방법은 교모세포종의 치료에 있어 PVR(poliovirus receptor) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하여 상기 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준이 대조군에 비해 높을 경우 T 세포에 의한 치료 효과가 유효할 수 있다고 예측할 수 있어, 개인 맞춤형 교모세포종의 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[32]

도면의 간단한 설명

[33]

도 1은 환자 유래 교모세포종 세포주에서 MICA, ULBP, PVR, Nectin의 발현량(expression %)을 유세포분석기로 측정한 결과이다.

[34]

도 2는 환자 유래 교모세포종 세포주에 $\gamma\delta$ T 세포를 20:1의 비율로 처리하여 4시간 동안 공배양한 후, 분해정도(specific lysis %)를 측정한 결과이다.

[35]

도 3은 환자 유래 교모세포종 세포주에서의 분해정도(specific lysis %)와 MICA, ULBP, PVR 및 Nectin의 발현량(expression %)의 상관관계를 분석한 결과이다.

[36]

도 4는 ROC 곡선 분석을 나타낸 결과이다.

[37]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[38]

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[39]

본 발명은 생물학적 시료로부터 PVR(poliovirus receptor) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 T 세포에 의한 교모세포종 치료 효과의 유효성 예측 방법을 제공한다.

[40]

본 발명의 용어, "PVR(poliovirus receptor) 단백질"은 CD155(cluster of differentiation 155)로도 알려진 PVR 유전자로 코딩된 단백질로서, 면역글로불린 패밀리어서 타입 I 막관통 당단백질(Type I transmembrane glycoprotein)이며, DNAM-1 수용체에 대한 주요 리간드 중 하나로 알려져 있다.

[41]

본 발명에 있어서, 상기 생물학적 시료는 조직, 세포, 혈액, 혈장 및 혈청으로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있고, 상기 조직은 종양 조직인 것일 수 있으며, 상기 종양 조직은 교모세포종 환자에서 절제된 것일 수 있다. 바람직하게는 상기 생물학적 시료는 교모세포종 환자에서 절제된 종양 조직인 것일 수 있고, 더욱 바람직하게는 교모세포종 환자에서 절제된 종양 조직으로부터 분리된 교모세포종 세포주인 것일 수 있다.

[42]

본 발명에 있어서, 상기 측정은 RT-PCR(reverse transcription polymerase chain reaction), competitive RT-PCR, real-time quantitative RT-PCR, RNase 보호 분석법(RNase protection method), 노던블롯(northern blot), DNA 칩 분석법(DNA chip technology assay), ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay), 웨스턴블롯(western blot), 면역블롯(immunoblot) 및 면역조직화학법(Immunohistochemistry)으로 이루어진 군에서 선택된 방법으로 수행된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[43]

본 발명에 있어서, 상기 측정된 발현 수준을 대조군과 비교하는 단계를 추가적으로 더 포함하는 것일 수 있다. 이 때의 대조군은 교모세포종이 없는 정상인을 의미하는 것일 수 있다.

[44]

또한, 상기 PVR(poliovirus receptor) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준이 대조군에 비해 높을 경우 T 세포에 의한 교모세포종 치료 효과가 유효할

- 것으로 예측 또는 판단하는 단계를 추가적으로 더 포함하는 것일 수 있다.
- [45] 본 발명에 있어서, 상기 T 세포는 $\gamma\delta$ T 세포(gamma delta T cell)인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [46] 또한, 본 발명은 PVR(poliovirus receptor) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 T 세포에 의한 교모세포종 치료 효과의 유효성 예측용 조성물을 제공한다.
- [47] 본 발명에 있어서, 상기 제제는 PVR(poliovirus receptor)에 특이적인 프라이머, 프로브, 앵타머 및 항체로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [48] 본 발명에서의 용어, "프라이머"는 짧은 자유 3'-말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 염기서열로서, 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍을 형성할 수 있고, 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작 지점으로서 작용하는 짧은 염기서열을 말한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응을 위한 시약(즉, DNA 폴리머레이트 또는 역전사효소) 및 상이한 4 가지의 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재 하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에 공지된 기술에 따라 적절히 선택될 수 있다.
- [49] 본 발명에서의 용어, "프로브"는 유전자에 특이적으로 결합을 이룰 수 있는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며, 표지되어 있어 특정 유전자의 존재 유무 및 발현양을 확인할 수 있다. 프로브는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide) 프로브, 단쇄 DNA(single strand DNA) 프로브, 이중쇄 DNA(double strand DNA) 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다. 적절한 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당해 기술 분야에 공지된 기술에 따라 적절히 선택할 수 있다.
- [50] 본 발명의 프라이머 또는 프로브는 포스포아미다이트(phosphoramidite) 고체 지지체 합성법이나 기타 널리 공지된 방법을 이용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 이러한 염기서열은 또한 당해 기술 분야에 공지된 다양한 방법을 통해 변형시킬 수 있다. 이러한 변형의 예로는 메틸화, 캡화, 천연 뉴클레오타이드 하나 이상의 동족체로의 치환 및 뉴클레오타이드 간의 변형, 예를 들면 하전되지 않은 연결체(예: 메틸 포스포네이트, 포스포트리아에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체(예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)로의 변형이 있다.
- [51] 본 발명에서의 용어, "앵타머"는 목적 분자에 특이적으로 결합하는 올리고뉴클레오타이드 또는 펩티드 분자로서, 핵산 앵타머의 경우 SELEX(systematic evolution of ligands by exponential enrichment)라 불리는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide) 라이브러리를 이용한 진화적인 방법의 의해 특정 화학 분자나 생물학적 분자에 높은 친화력과 선별력을 갖고 결합하는 올리고머를 분리하여 수득할 수 있다.

- [52] 본 발명에서의 용어, "항체"는 생체의 면역계에서 혈액이나 림프를 순환하면서 외부 물질인 항원이 침입한 경우 이에 반응하는 물질을 말하며, 림프조직에서 형성되는 글로불린계 단백질로 면역글로불린이라고도 불린다. 항체는 B 세포에 의해 생산되며, 항원과 특이적으로 결합한다. 하나의 항체 분자에는 두 개의 중사슬(heavy chain)과 두 개의 경사슬(light chain)이 있으며, 각각의 중사슬과 경사슬은 각각 N-말단에 가변영역을 포함하고 있다. 각각의 가변영역은 3 개의 상보성 결정부위 (Complementarity determining region: CDR)와 4 개의 구조 형성부위 (framework regions: FRs)로 구성되는데, 상보성 결정 부위들은 항체의 항원 결합 특이성을 결정하고, 가변영역의 구조형성 부위들로 유지되는 비교적 짧은 펩티드 서열로 존재한다.
- [53] 본 발명에 있어서, 상기 PVR(poliovirus receptor) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준은 교모세포종 환자에서 절제된 종양 조직으로부터 분리된 교모세포종 세포주에서 측정할 수 있다.
- [54] 또한, 본 발명은 T 세포에 의한 교모세포종 치료 효과의 유효성 예측용 조성물을 포함하는 T 세포에 의한 교모세포종 치료 효과의 유효성 예측용 키트를 제공한다.
- [55] 본 발명에 있어서, 상기 키트는 마이크로 어레이, 유전자 증폭 키트, 면역분석(immunoassay)용 키트, 단백질 마이크로어레이 키트 및 ELISA 키트로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있다.
- [56] 또한, 본 발명은 (a) 환자로부터 분리된 생물학적 시료로부터 PVR(poliovirus receptor) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계; (b) 상기 측정된 발현 수준을 정상 대조군과 비교하는 단계;
- [57] (c) 상기 발현 수준이 정상 대조군에 비해 높을 경우 T 세포에 의한 교모세포종 치료 효과가 유효할 것으로 예측 또는 판단하는 단계; 및 (d) 환자에게 교모세포종 치료를 위한 T세포를 투여하는 단계를 포함하는 교모세포종 치료 효과의 유효성 예측 및 치료 방법을 제공한다.
- [58] 교모세포종 치료 효과의 유효성 예측 및 치료 방법에 있어서, 생물학적 시료, 조직, 측정방법 및 T세포에 대해서는 전술한 바와 동일하게 적용이 가능한 바, 그 기재를 생략한다.
- [59] 또한, 본 발명은 교모세포종 환자로부터 분리된 생물학적 시료로부터 PVR(poliovirus receptor) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하여 발현 수준이 정상 대조군에 비해 높을 경우 T세포를 투여하는 단계를 포함하는 교모세포종 치료 방법을 제공한다.
- [60] 교모세포종 치료 방법에 있어서, 생물학적 시료, 조직, 측정방법 및 T세포에 대해서는 전술한 바와 동일하게 적용이 가능한 바, 그 기재를 생략한다.

[61]

발명의 실시를 위한 형태

[62] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[63]

[64] 실시예 1. 환자 유래 교모세포종 세포주의 준비 및 배양

[65] 총 10명의 교모세포종 환자로부터 종양 조직을 얻은 후, 종양 조직으로부터 교모세포종 세포주를 분리하였다. 간단히, 환자에서 분리된 교모세포종 조직은 차가운 PBS(phosphate buffer saline)로 세척하였으며, 세척 후, 1% Glutamax (Gibco), 1% Penicillin/streptomycin (Gibco) 및 2.5 µg/ml의 amphotericin B (Gibco)이 포함된 차가운 Hibernate-A 배지를 적용시킨 상태에서 조직을 외과용 가위와 0.5~1mm 크기로 잘게 조각내었다. 잘려진 종양조직 조각은 Conical tube에 모아 실온의 PBS로 3회 세척한 후, RBC(red blood cell) 용해 완충액(lysis buffer)로 5-10분간 적용시켰다. 이후, 원심분리하여 환자 유래 교모세포종 세포주만을 분리하였다.

[66]

[67] 실시예 2. $\gamma\delta$ T 세포(gamma delta T cell)의 준비 및 배양

[68] $\gamma\delta$ T 세포는 정상인 또는 교모세포종 환자로부터 말초혈액을 얻은 후 말초혈액으로부터 수득하였다. 간단히, Ficoll-Hypaque 위에 말초혈액을 1:1의 비율로 넣은 후, 2500 rpm으로 20분간 원심분리하였다. 이후, Buffy coat층에 있는 말초혈액단핵구(PBMC)를 모은 후, RPMI 배지로 세척하였다. 세척은 4회로 이루어졌으며, 각각 1800 rpm에서 15분, 1600 rpm에서 10분, 1400 rpm에서 5분 및 1400 rpm에서 5분 동안 수행하였다. 이후, 분리된 PBMC를 freezing media에 부유시킨 후, 이소프로필 알코올(isopropyl alcohol)이 담긴 freezing bottle에 넣어 -80°C 냉동고에 16시간 보관하고, 이후 액체질소통에 보관하였다.

[69] 보관된 PBMC를 37°C bath에 빠르게 녹인 후 10% FBS가 포함된 RPMI에 부유하여 세척하였다. 세척이 끝난 PBMC에 5 µM의 zoledronic acid와 1000 U/mL의 IL-2를 처리한 후, 24 well-plate에 분주하였다. 3일 째에 1000 U/mL의 IL-2를 추가로 처리하였고, 7일 째에 세포를 수확하여 세척하였다. 이후, 1000 U/mL의 IL-2를 처리하여 배양하거나, 인공항원제시세포로서 CD32, CD80, CD83, 4-1BBL, CD40L, CD70을 발현하는 K562 세포를 방사선조사(100 Gy)하여 공동배양하였다. 이로부터 배양된 $\gamma\delta$ T 세포는 14일째 또는 동일한 과정을 한번 더 반복하여 21일째 수확하여 freezing media에 부유시켜 CRF(Controlled-rate-freezer)를 이용하여 얼린 뒤, 실험 전까지 액체질소에 보관하였다.

[70]

[71] 실시예 3. T 세포에 의한 교모세포종 치료 효과의 유효성 평가

[72] 본 발명자들은 T 세포에 의한 교모세포종 치료 효과의 유효성을 평가하기 위한 실험을 수행하였다. 우선, 환자 유래 교모세포종 세포주에서 MICA(MHC class I

polypeptide-related sequence A), ULBP(UL16 binding protein 1), PVR(Poliiovirus receptor, CD155) 및 Nectin와 같은 리간드 발현 여부를 유세포분석기를 통해 측정하였다.

[73] 그 결과, 도 1에 나타낸 바와 같이, 총 10명의 환자에서 유래된 교모세포종 세포주에 $\gamma\delta$ T 세포를 처리한 경우, 10개의 세포주 모두에서 MICA의 발현이 확인되지 않았다. 또한, 2개의 세포주에서 ULBP의 발현이 강하게 확인되었으나, 4개의 세포주에서는 약하게 발현이 확인되었으며, 나머지 4개의 세포주에서는 ULBP의 발현이 나타나지 않았다. PVR의 경우에는 10개의 세포주 모두에서 발현이 확인되었고, 그 중 5번과 8번 세포주에서는 약하게 발현되었다. Nectin 역시 10개의 세포주 모두에서 발현이 확인되었고, 그 중 5번, 6번, 8번 및 10번 세포주에서는 약하게 발현되었다.

[74] 이후, 환자 유래 교모세포종 세포주에 $\gamma\delta$ T 세포(gamma delta T cell)를 처리한 후, $\gamma\delta$ T 세포에 의한 분해정도를 분석하는 실험을 수행하였다. 간단히, 환자 유래 교모세포종 세포주는 Calcein-AM로 표지하고, Calcein-AM으로 표지된 환자 유래 교모세포종 세포주에 $\gamma\delta$ T 세포를 20:1의 E(effector):T(target) 비율로 처리한 후, 4시간 동안 공배양하였다. T 세포에 의한 분해정도(Specific lysis %)는 다음의 수식을 통해 계산하였다: $\text{Specific lysis \%} = [(\text{Experimental Release} - \text{Spontaneous Release}) / (\text{Maximum Release} - \text{Spontaneous Release})] \times 100$.

[75] 그 결과, 도 2에 나타낸 바와 같이, 5번과 8번 세포주에서는 T 세포에 의한 분해정도가 낮았고, 7번 세포주 및 9번 세포주에서는 약 20~30%의 분해정도를 보였으며, 나머지 세포주에서는 40% 이상의 분해정도를 보임으로써, T 세포에 의한 세포독성 효과가 환자 개인에 따라 다양하게 나타날 수 있음을 확인하였다.

[76] 이후, 상기 MICA, ULBP, PVR 및 Nectin의 발현량(expression %)과 T 세포에 의한 분해정도(specific lysis %)의 상관관계를 분석하였다. 그 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이, PVR 발현과 T 세포에 의한 분해정도의 상관관계에서 유의성이 있는 것으로 나타났다. 즉, PVR 발현 수준이 높은 경우에는 T 세포에 의한 분해정도가 높게 나타남으로써, PVR 발현량의 측정을 통해 T 세포에 의한 치료 유효성을 예측 또는 평가할 수 있음을 확인하였다. 다만, 나머지 MICA, ULBP 및 Nectin의 발현은 T 세포에 의한 분해정도와 관련성이 없었다.

[77]

[78] 실시예 4. 민감도 및 특이도 분석

[79] 본 발명자들은 PVR 발현 여부로부터 T 세포에 의한 교모세포종 치료 효과의 유효성 예측에 대한 정확도를 평가하기 위해 ROC 곡선 분석을 수행하였다. 그 결과, PVR가 발현하는 89.2% 이상의 환자 유래 교모세포종 세포주에서 민감도(sensitivity) 71.4% 및 특이도(specificity) 100%로 확인되었다(도 4).

[80]

[81] 상기 결과로부터, 본 발명은 환자 유래 교모세포종 세포주에서 PVR 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현량을 측정함으로써, 교모세포종의 치료에

있어 T 세포에 의한 치료 효과가 유효한지 여부를 예측 또는 판단할 수 있음을 확인하였다.

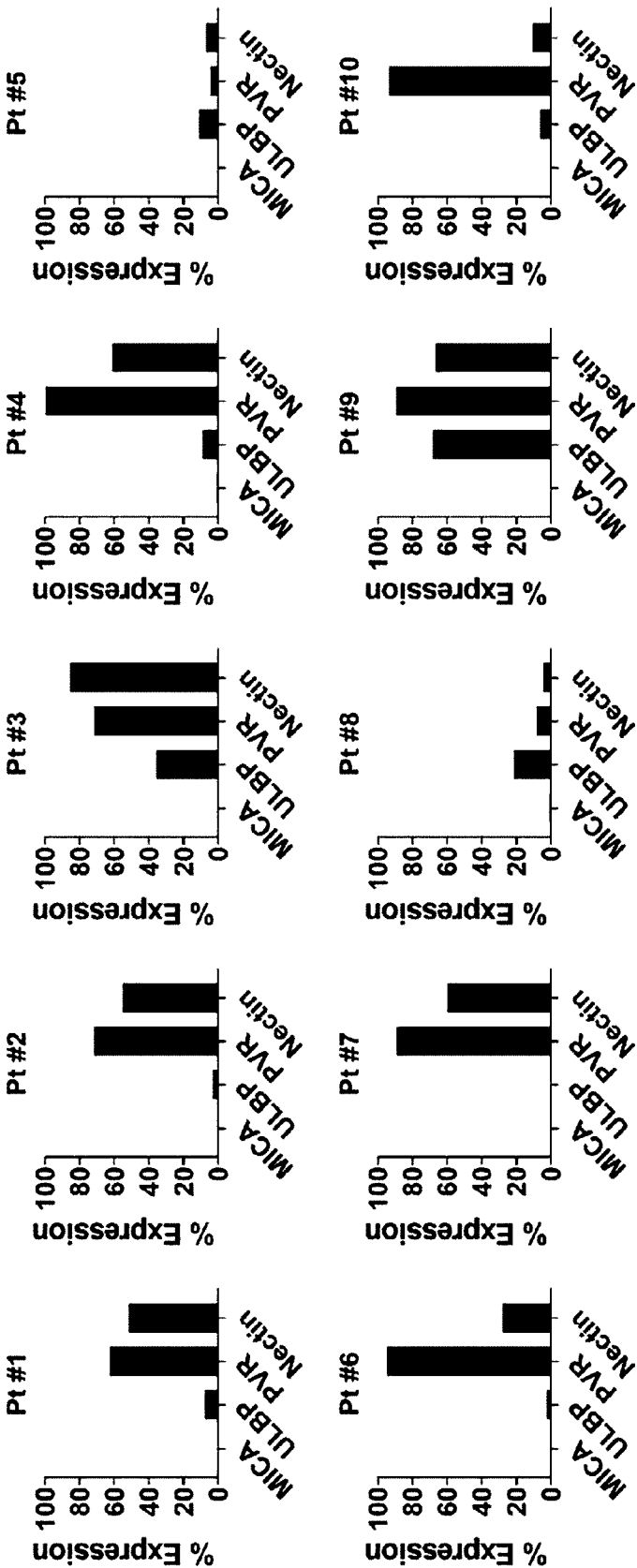
청구범위

- [청구항 1] 생물학적 시료로부터 PVR(poliovirus receptor) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 T 세포에 의한 교모세포종 치료 효과의 유효성 예측 방법.
- [청구항 2] 제 1 항에 있어서,
상기 생물학적 시료는 조직, 세포, 혈액, 혈장 및 혈청으로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 방법.
- [청구항 3] 제 2 항에 있어서,
상기 조직은 종양 조직인 것인, 방법.
- [청구항 4] 제 3 항에 있어서,
상기 종양 조직은 교모세포종 환자에서 절제된 것인, 방법.
- [청구항 5] 제 1 항에 있어서,
상기 측정은 RT-PCR(reverse transcription polymerase chain reaction), competitive RT-PCR, real-time quantitative RT-PCR, RNase 보호 분석법(RNase protection method), 노던블롯(northern blot), DNA 칩 분석법(DNA chip technology assay), ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay), 웨스턴블롯(western blot), 면역블롯(immunoblot), 면역조직화학법(Immunohistochemistry) 및 유세포분석법(flow cytometry)으로 이루어진 군에서 선택된 방법으로 수행된 것인, 방법.
- [청구항 6] 제 1 항에 있어서,
상기 측정된 발현 수준을 대조군과 비교하는 단계를 추가적으로 더 포함하는 것인, 방법.
- [청구항 7] 제 1 항에 있어서,
상기 PVR(poliovirus receptor) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준이 대조군에 비해 높을 경우 T 세포에 의한 교모세포종 치료 효과가 유효할 것으로 예측 또는 판단하는 단계를 추가적으로 더 포함하는 것인, 방법.
- [청구항 8] 제 1 항에 있어서,
상기 T 세포는 $\gamma\delta$ T 세포(gamma delta T cell)인 것인, 방법.
- [청구항 9] PVR(poliovirus receptor) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 T 세포에 의한 교모세포종 치료 효과의 유효성 예측용 조성물.
- [청구항 10] 제 9 항에 있어서,
상기 제제는 PVR(poliovirus receptor)에 특이적인 프라이머, 프로브, 앵타머 및 항체로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 조성물.
- [청구항 11] 제 9 항에 있어서,
상기 PVR(poliovirus receptor) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현

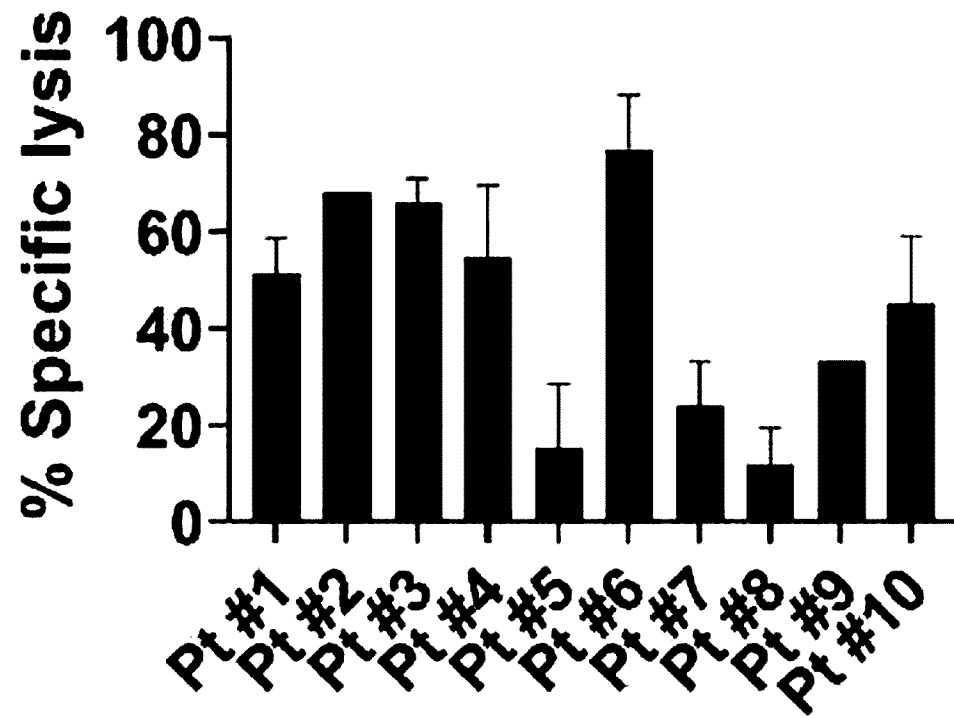
- 수준은 교모세포종 환자에서 절제된 종양 조직으로부터 분리된 교모세포종 세포주에서 측정하는 것인, 조성물.
- [청구항 12] 제 9 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 포함하는 T 세포에 의한 교모세포종 치료 효과의 유효성 예측용 키트.
- [청구항 13] 제 12 항에 있어서,
상기 키트는 마이크로 어레이, 유전자 증폭 키트, 면역분석(immunoassay)용 키트, 단백질 마이크로어레이 키트 및 ELISA 키트로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 키트.
- [청구항 14] (a) 환자로부터 분리된 생물학적 시료로부터 PVR(poliovirus receptor) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계;
(b) 상기 측정된 발현 수준을 정상 대조군과 비교하는 단계;
(c) 상기 발현 수준이 정상 대조군에 비해 높을 경우 T 세포에 의한 교모세포종 치료 효과가 유효할 것으로 예측 또는 판단하는 단계; 및
(d) 환자에게 교모세포종 치료를 위한 T세포를 투여하는 단계를 포함하는 교모세포종 치료 효과의 유효성 예측 및 치료 방법.
- [청구항 15] 제 14 항에 있어서,
상기 생물학적 시료는 조직, 세포, 혈액, 혈장 및 혈청으로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 방법.
- [청구항 16] 제 15 항에 있어서,
상기 조직은 종양 조직인 것인, 방법.
- [청구항 17] 제 16 항에 있어서,
상기 종양 조직은 교모세포종 환자에서 절제된 것인, 방법.
- [청구항 18] 제 14 항에 있어서,
상기 측정은 RT-PCR(reverse transcription polymerase chain reaction), competitive RT-PCR, real-time quantitative RT-PCR, RNase 보호 분석법(RNase protection method), 노던블롯(northern blot), DNA 칩 분석법(DNA chip technology assay), ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay), 웨스턴블롯(western blot), 면역블롯(immunoblot), 면역조직화학법(Immunohistochemistry) 및 유세포분석법(flow cytometry)으로 이루어진 군에서 선택된 방법으로 수행된 것인, 방법.
- [청구항 19] 제 14 항에 있어서,
상기 T 세포는 $\gamma\delta$ T 세포(gamma delta T cell)인 것인, 방법.
- [청구항 20] 교모세포종 환자로부터 분리된 생물학적 시료로부터 PVR(poliovirus receptor) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하여 발현 수준이 정상 대조군에 비해 높을 경우 T세포를 투여하는 단계를 포함하는 교모세포종 치료 방법.
- [청구항 21] 제 20 항에 있어서,
상기 생물학적 시료는 조직, 세포, 혈액, 혈장 및 혈청으로 이루어진

- 군에서 선택되는 것인, 방법.
- [청구항 22] 제 21 항에 있어서,
상기 조직은 종양 조직인 것인, 방법.
- [청구항 23] 제 20 항에 있어서,
상기 측정은 RT-PCR(reverse transcription polymerase chain reaction),
competitive RT-PCR, real-time quantitative RT-PCR, RNase 보호
분석법(RNase protection method), 노던블롯(northern blot), DNA 칩
분석법(DNA chip technology assay), ELISA(Enzyme-linked immunosorbent
assay), 웨스턴블롯(western blot), 면역블롯(immunoblot), 면역조직화학법
(Immunohistochemistry) 및 유세포분석법(flow cytometry)으로 이루어진
군에서 선택된 방법으로 수행된 것인, 방법.
- [청구항 24] 제 20 항에 있어서,
상기 T 세포는 $\gamma\delta$ T 세포(gamma delta T cell)인 것인, 방법.

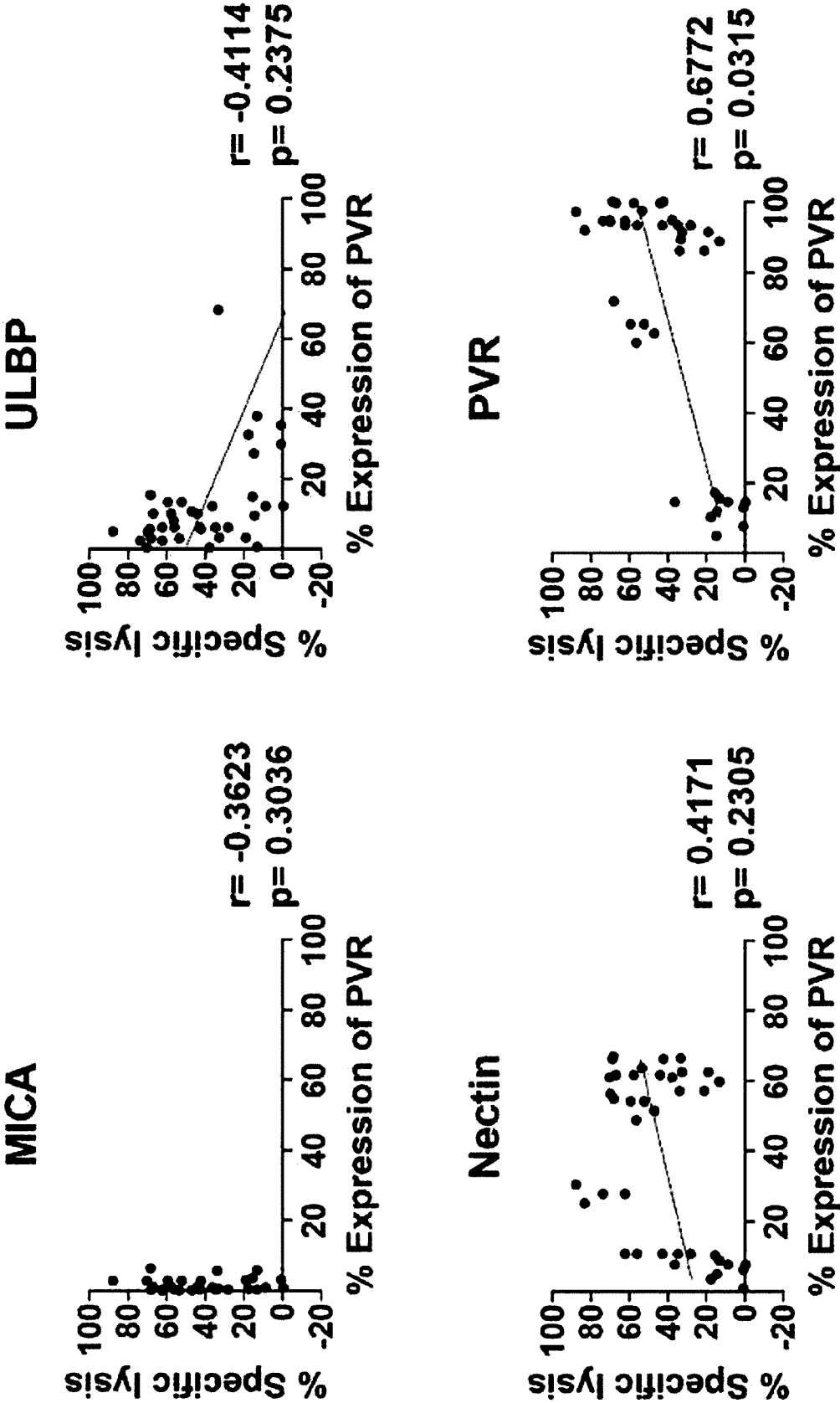
[51]



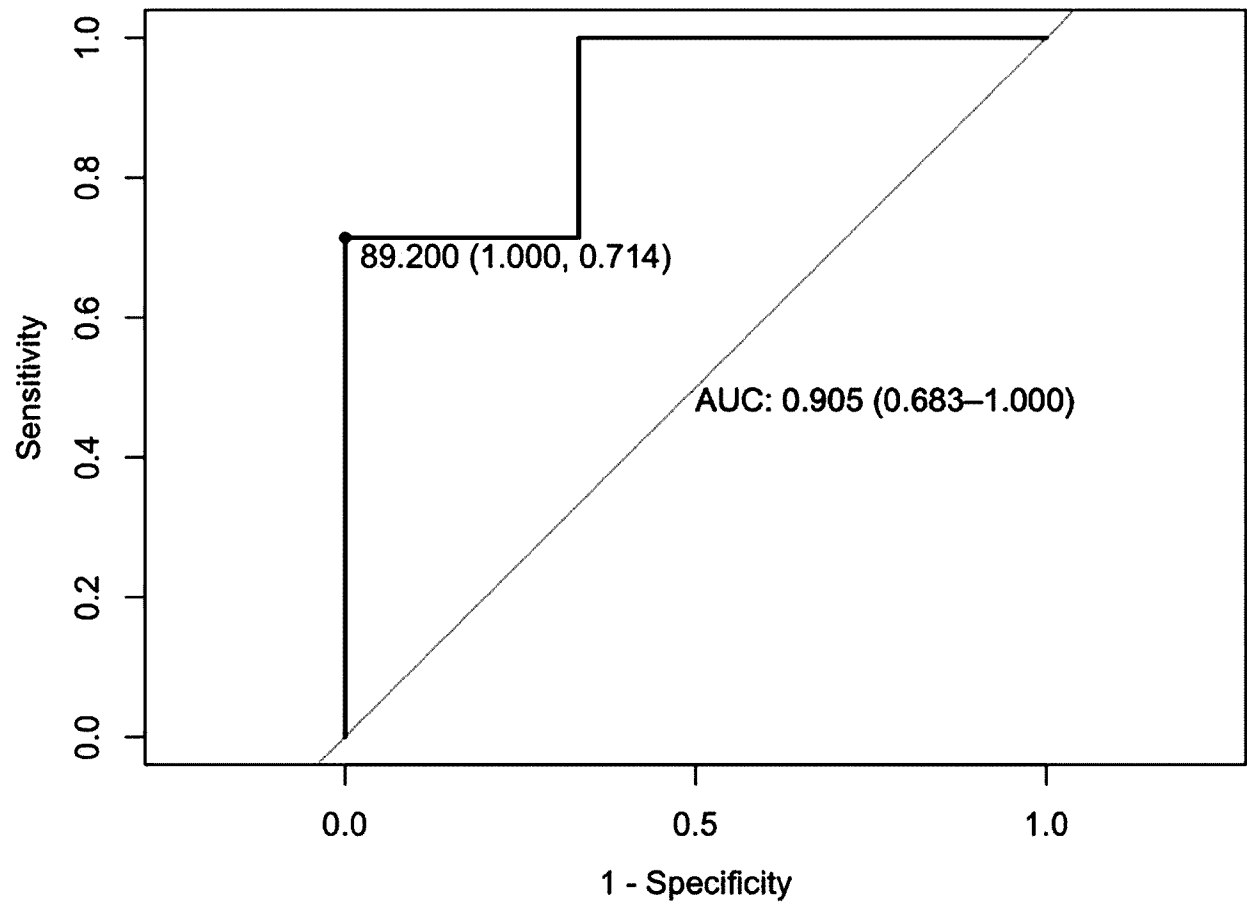
[도2]



[도3]



[도4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/020248

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N 33/574(2006.01)i; C12Q 1/6886(2018.01)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) G01N 33/574(2006.01); A61P 27/02(2006.01); A61P 29/00(2006.01); C07K 16/28(2006.01); G01N 33/53(2006.01); G01N 33/68(2006.01) Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models: IPC as above Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: PVR(poliovirus receptor), CD-155, 단백질(protein), 유전자(genome), 발현(expression), 수준(level), 측정(measurement), T-세포(T-cell), 교모세포종(glioblastoma), 치료(treatment), 유효성(validity)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2021-070181 A1 (NECTIN THERAPEUTICS LTD.) 15 April 2021 (2021-04-15) See abstract, claims 1, 45 and 48-49, and paragraph [0078].	1-13
A	CHANDRAMOHAN, V. et al. Validation of an immunohistochemistry assay for detection of CD155, the poliovirus receptor, in malignant gliomas. Archives of Pathology & Laboratory Medicine. 2017, vol. 141, pp. 1697-1704. See entire document.	1-13
A	LIU, Y. et al. The role of human $\gamma\delta$ T cells in anti-tumor immunity and their potential for cancer immunotherapy. Cell. 2020, vol. 9, thesis no. : 1206 (pp. 1-17). See entire document.	1-13
A	LUPO, K. B. et al. CD155 immunoregulation as a target for natural killer cell immunotherapy in glioblastoma. Journal of Hematology & Oncology. 2020, vol. 13, no. 76, pp. 1-10. See entire document.	1-13
A	BRLIĆ, P. K. et al. Targeting PVR (CD155) and its receptors in anti-tumor therapy. Cellular & Molecular Immunology. 2019, vol. 16, no. 1, pp. 40-52. See entire document.	1-13
☒ 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 "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 27 March 2023		Date of mailing of the international search report 28 March 2023
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/020248**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2019-102456 A1 (UNIVERSITY OF RIJEKA FACULTY OF MEDICINE et al.) 31 May 2019 (2019-05-31) See entire document.	1-13
A	WO 2018-067446 A1 (DUKE UNIVERSITY) 12 April 2018 (2018-04-12) See entire document.	1-13
PX	CHOI, H. et al. Human allogenic $\gamma\delta$ T cells kill patient-derived glioblastoma cells expressing high levels of DNAM-1 ligands. Oncoimmunology. 30 October 2022, vol. 11, thesis no. : e2138152 (pp. 1-10). See entire document.	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/020248

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.: **14-24**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 14-24 pertain to a method for treatment of the human body by surgery or therapy, as well as a diagnostic method (PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv)).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2022/020248

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2021-070181	A1	15 April 2021	CN	114502595	A	13 May 2022
				EP	4041392	A1	17 August 2022
				JP	2022-553129	A	22 December 2022
				KR	10-2022-0082007	A	16 June 2022
				US	2022-0372161	A1	24 November 2022
WO	2019-102456	A1	31 May 2019	None			
WO	2018-067446	A1	12 April 2018	EP	3532851	A1	04 September 2019
				US	11506666	B2	22 November 2022
				US	2021-0311063	A1	07 October 2021

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) G01N 33/574(2006.01)i; C12Q 1/6886(2018.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) G01N 33/574(2006.01); A61P 27/02(2006.01); A61P 29/00(2006.01); C07K 16/28(2006.01); G01N 33/53(2006.01); G01N 33/68(2006.01) 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: PVR(poliovirus receptor), CD-155, 단백질(protein), 유전자(genome), 발현(expression), 수준(level), 측정(measurement), T-세포(T-cell), 교모세포종(glioblastoma), 치료(treatment), 유효성(validity)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	WO 2021-070181 A1 (NECTIN THERAPEUTICS LTD.) 2021.04.15 요약, 청구항 1, 45, 48-49, 단락 [0078]	1-13
A	CHANDRAMOHAN, V. 등, "Validation of an immunohistochemistry assay for detection of CD155, the poliovirus receptor, in malignant gliomas", Archives of Pathology & Laboratory Medicine, 2017, 제141권, 페이지 1697-1704 전체 문헌	1-13
A	LIU, Y. 등, "The role of human $\gamma\delta$ T cells in anti-tumor immunity and their potential for cancer immunotherapy". Cell, 2020, 제9권, 논문번호 : 1206(페이지 1-17) 전체 문헌	1-13
A	LUPO, K. B. 등, "CD155 immunoregulation as a target for natural killer cell immunotherapy in glioblastoma", Journal of Hematology & Oncology, 2020, 제13권, 제76호, 페이지 1-10 전체 문헌	1-13
A	BRLLIC, P. K. 등, "Targeting PVR(CD155) and its receptors in anti-tumor therapy", Cellular & Molecular Immunology, 2019, 제16권, 제1호, 페이지 40-52 전체 문헌	1-13
☒ 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 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2023년03월27일 (27.03.2023)		국제조사보고서 발송일 2023년03월28일 (28.03.2023)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 전선애 전화번호 +82-42-481-8150

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	WO 2019-102456 A1 (UNIVERSITY OF RIJEKA FACULTY OF MEDICINE 등) 2019.05.31 전체 문헌	1-13
A	WO 2018-067446 A1 (DUKE UNIVERSITY) 2018.04.12 전체 문헌	1-13
PX	CHOI, H. 등, "Human allogenic $\gamma\delta$ T cells kill patient-derived glioblastoma cells expressing high levels of DNAM-1 ligands", Oncoimmunology, 2022.10.30, 제11권, 논문번호 : e2138152(페이지 1-10) 전체 문헌	1-13

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

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

1. ☒ 청구항: **14-24**
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 14-24는 수술 또는 치료에 의한 사람의 처치방법 및 진단방법에 관한 것입니다(PCT 17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)).
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2021-070181 A1	2021/04/15	CN 114502595 A	2022/05/13
		EP 4041392 A1	2022/08/17
		JP 2022-553129 A	2022/12/22
		KR 10-2022-0082007 A	2022/06/16
		US 2022-0372161 A1	2022/11/24
WO 2019-102456 A1	2019/05/31	없음	
WO 2018-067446 A1	2018/04/12	EP 3532851 A1	2019/09/04
		US 11506666 B2	2022/11/22
		US 2021-0311063 A1	2021/10/07