



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년03월18일

(11) 등록번호 10-1503341

(24) 등록일자 2015년03월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/24 (2006.01) **C12N 5/0783** (2010.01)
 (21) 출원번호 10-2014-0029198
 (22) 출원일자 2014년03월12일
 심사청구일자 2014년03월12일
 (56) 선행기술조사문헌
 KR100882445 B1
 KR1020100043130 A
 US20040224402 A1
 US6905685 B2

(73) 특허권자
국립암센터
 경기도 고양시 일산동구 일산로 323 (마두동)
 (72) 발명자
권병세
 경기도 고양시 일산서구 하이파크3로 61 402동
 2503호 (덕이동, 하이파크시티 일산 파밀리에 4단지)
강현귀
 서울특별시 강남구 남부순환로 2803, 110동 1802호 (도곡동, 삼성래미안아파트)
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
특허법인충정

전체 청구항 수 : 총 11 항

심사관 : 안규정

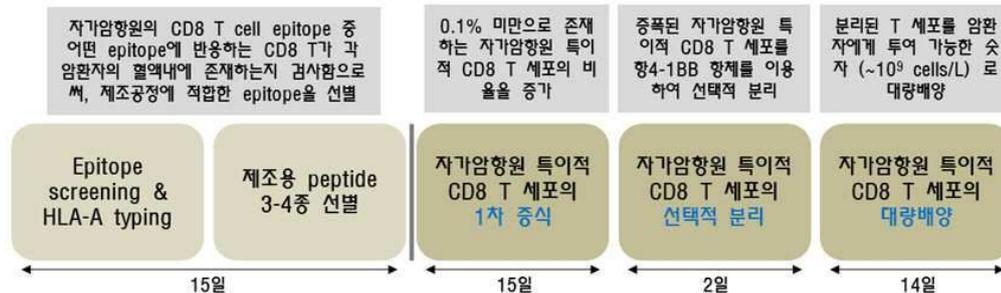
(54) 발명의 명칭 **자가암항원 특이적 CD8+ T 세포의 분리 및 증식방법**

(57) 요약

본 발명은 자가암항원 특이적 CD8⁺ T 세포의 분리 및 증식방법에 관한 것으로, 상세하게는 암 환자 개개인의 혈액 내에 존재하는 자가암항원으로부터 CD8⁺ T 세포에 의해 인식되는 에피토프를 선별하고 선별된 에피토프의 펩티드를 이용하여 자가암항원에 특이적인 CD8⁺ T 세포를 분리하는 방법, 및 이를 이용한 CD8⁺ T 세포의 대량증식방법에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 외래항원이 아닌 암 환자의 개개인의 혈액에 존재하는 자가암항원 CD8 T 세포 에피토프의 펩티드를 이용하여 자가암항원에 특이적인 CD8⁺ T 세포를 분리할 수 있다. 따라서 자가암항원을 인식하는 T 세포를 이용하면 암 환자 자신의 세포로부터 유래된 암세포를 효과적으로 선택하여 제거할 수 있으므로, 암 질환의 치료 및 개선에 부작용 없이 응용될 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

김광휘

경기도 고양시 일산동구 산두로 65-5, 202호 (마두동)

김영우

경기도 고양시 일산동구 위시티4로 46, 205동 701호 (식사동, 위시티일산자이2단지아파트)

김영호

경기도 고양시 일산서구 산현로17번길 38, 1103동 1502호 (탄현동, 탄현마을11단지아파트)

박병규

서울특별시 양천구 목동동로 257, 101동 1901호 (목동, 하이패리온)

박상윤

서울특별시 강남구 언주로30길 13, A동 2204호 (도곡동, 대림아크로빌)

박상재

경기도 고양시 일산서구 강선로 189, 1001동 901호 (일산동, 후곡마을10단지)

엄현석

서울특별시 서초구 잠원로12길 13, 342동 102호 (잠원동, 신반포한신아파트)

오호식

울산광역시 동구 월봉8길 6, 101동 204호 (화정동, 현대미포아파트)

유현

서울특별시 강남구 남부순환로 3032, 212동 1203호 (대치동, 미도아파트)

이돈길

경기도 고양시 일산동구 일산로330번길 50-5, 101호 (마두동)

이승훈

서울특별시 노원구 노원로 62, 306동 602호 (공릉동, 공릉효성화운트빌)

이영주

서울특별시 은평구 연서로27길 16-13 (갈현동)

이진수

경기 고양시 일산동구 노루목로 79, 401동 804호 (장항동, 호수마을4단지아파트)

최범규

경기도 파주시 와석순환로 347, 180동 1502호 (목동동, 월드메르디앙1차아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	13104301
부처명	보건복지부
연구관리전문기관	국립암센터
연구사업명	기관고유사업
연구과제명	자가유래 항암 T 세포치료제의 개발 및 이행성 연구
기여율	1/1
주관기관	국립암센터
연구기간	2013.01.01 ~ 2013.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

하기 단계들을 포함하는 자가암항원 특이적 CD8⁺ T 세포의 분리방법:

- a) 암 환자 혈액내에 존재하는 자가암항원 CD8⁺ T 세포 에피토프를 선별하는 단계;
- b) 암 환자의 혈액으로부터 분리된 PBMC(peripheral blood mononuclear cell)를 상기 에피토프의 펩티드 및 IL-2와 함께 배지에서 배양하는 단계;
- c) 상기 배양된 세포를 b) 단계와 동일한 펩티드를 첨가하여 4-1BB 발현을 유도하는 단계; 및
- d) 4-1BB 발현이 유도된 세포를 항-4-1BB 항체가 코팅된 배양 플레이트에서 배양한 후 부착하지 않은 세포를 제거하는 단계.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 a) 단계의 자가암항원은 hTERT (GenBank: BAC11010.1), WT1 (GenBank: AA061088.1), NY-ESO1 (GenBank: CAA05908.1), 및 MAGE-A3 (NCBI Reference Sequence: NP_005353.1)로 구성된 군에서 선택된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 b) 단계에서 에피토프는 서열번호 1 내지 15로 구성된 군에서 선택된 아미노산 서열로 이루어진 펩티드인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 b) 단계의 배지는 자가혈장이 포함된 배지인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 b) 단계의 배양은 12 내지 16일 동안 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 c) 단계의 발현 유도는 12 내지 36시간 동안 배양하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 d) 단계의 배양은 1 내지 20분간 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제 1항에 따른 방법으로 분리된 자가암항원 특이적 CD8⁺ T 세포와 방사선 조사된 동종이계(allogeneic) PBMC를 IL-2, 항-CD3 항체 및 자가혈장이 포함된 배지로 현탁한 후 배양용 백에 주입하고, 상기 배지를 추가로 주입하

여 배양하는 것을 포함하는 자가암항원 특이적 CD8⁺ T 세포의 대량배양방법.

청구항 9

제 8항에 있어서, 상기 PBMC는 정상 공여자로부터 분리된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제 8항에 있어서, 상기 배양은 4 내지 15일간 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제 10항에 있어서, 상기 배양은 배양 4일, 7일, 9일, 11일 및 14일째에 배지를 추가 주입하는 것을 특징으로 하는 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 자가암항원 특이적 CD8⁺ T 세포의 분리 및 증식방법에 관한 것으로, 상세하게는 암 환자 개개인의 혈액 내에 존재하는 자가암항원으로부터 CD8⁺ T 세포에 의해 인식되는 에피토프를 선별하고 선별된 에피토프의 펩티드를 이용하여 자가암항원에 특이적인 CD8⁺ T 세포를 분리하는 방법, 및 이를 이용한 CD8⁺ T 세포의 대량증식 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] CD8⁺ T 세포는 수지상세포, CD4⁺ T, 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 세포사멸에 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, 이에 본 발명자는 오랫동안 면역조절 단백질인 4-1BB (CD137) 과 관련된 연구를 진행해왔다.

[0003] 4-1BB는 유도성 공동자극 분자로 활성화된 T 세포에서 발현되며, 특히 CD8⁺ T 세포의 활성을 증진시킬 뿐 아니라, Bcl-2, Bcl-XL, Bfl-1 등과 같은 항-세포사멸 분자(anti-apoptotic molecules)의 발현을 증가시켜, 활성화 후 세포사멸(AICD; activation-induced cell death)을 억제하는 기능을 나타내는 것으로 잘 알려져 있다. 이러한 4-1BB 자극의 특성들은 암 치료에 적합한 특성들이며, 이를 기반으로 항-4-1BB mAb를 이용한 암 치료 효과에 대해 동물모델을 이용하여 검증하였다. 이에 본 발명자는 이전 연구에서 항원 특이적으로 활성화된 CD8⁺ T 세포의 4-1BB의 발현을 이용하여 항-4-1BB 항체를 이용한 항원 특이적 CD8⁺ T 세포의 분리 및 증식 방법을 확립하였으나 (대한민국 등록특허 제10-0882445호), 항체의 경우 *in vitro* 및 *in vivo* 반감기가 길고, Fc 수용체를 통한 신호전달 결과와 항체가 인식하는 표적 단백질을 통한 신호전달의 효과가 통합되어 전체 결과가 나타나게 된다. 또한 동일한 항원에 대해 다양한 항체가 존재하는 경우가 많으며, 이들이 서로 조금씩 다른 효과가 나타나게 된다. 이러한 한계점을 극복하기 위하여 오중합체인 COMP-4-1BBL 단백질을 이용하여 성공적으로 항원 특이적 CD8⁺ T 세포를 분리 및 증식하는 방법을 개발한 바 있다 (대한민국 등록특허 제10-1103603호).

[0004] 이 두 가지 특허는 외래항원인 바이러스항원 (EBV/LMP2A, CMV/pp65) 특이적 CD8 T 세포를 분리/대량 배양하는 기술로, 체내 이들 세포의 비율이 높아 비교적 쉽게 구현이 가능하다. 그러나 대부분의 암세포는 우리 몸을 구성하는 세포로부터 형성되므로, 우리 몸을 구성하는 단백질이지만, 정상세포에서는 낮은 비율로 존재하며 암세포에서는 과발현되어 있는 자가암항원(self tumor Ag)을 인식하는 CD8 T 세포의 선택적 분리 및 대량배양이 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 따라서 본 발명의 목적은 체내에 극히 낮은 비율로 존재하는 자가암항원에 특이적인 CD8⁺ T 세포를 31일내 선택적으로 분리하고 대량 배양할 수 있는, 자가암항원 특이적 CD8⁺ T 세포의 분리 및 증식방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 a) 암 환자 혈액내에 존재하는 자가암항원 CD8⁺ T 세포 에피토프를 선별하는 단계; b) 암 환자의 혈액으로부터 분리된 PBMC(peripheral blood mononuclear cell)를 상기 에피토프의 펩티드 및 IL-2와 함께 배지에서 배양하는 단계; c) 상기 배양된 세포를 b) 단계와 동일한 펩티드를 첨가하여 4-1BB 발현을 유도하는 단계; 및 d) 4-1BB 발현이 유도된 세포를 항-4-1BB 항체가 코팅된 배양 플레이트에서 배양한 후 부착하지 않은 세포를 제거하는 단계하기 단계를 포함하는 자가암항원 특이적 CD8⁺ T 세포의 분리방법을 제공한다.

[0007] 본 발명의 분리방법에 있어서, 상기 a) 단계의 자가암항원은 hTERT, WT1, NY-ES01 및 MAGE-A3로 구성된 군에서 선택될 수 있다.

[0008] 본 발명의 분리방법에 있어서, 상기 b) 단계에서 에피토프는 서열번호 1 내지 15로 구성된 군에서 선택된 아미노산 서열로 이루어진 펩티드일 수 있다.

[0009] 본 발명의 분리방법에 있어서, 상기 c) 단계의 발현 유도는 12 내지 36시간 동안 배양하는 것을 특징으로 한다.

[0010] 본 발명의 분리방법에 있어서, 상기 d) 단계의 배양은 1 내지 20분간 수행될 수 있다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 방법으로 분리된 자가암항원 특이적 CD8⁺ T 세포와 방사선 조사된 동종이계(allogeneic) PBMC를 IL-2, 항-CD3 항체 및 자가혈장이 포함된 배지로 현탁한 후 배양용 백에 주입하고, 상기 배지를 추가로 주입하여 배양하는 것을 포함하는 자가암항원 특이적 CD8⁺ T 세포의 대량배양방법을 제공한다.

[0012] 본 발명의 대량배양방법에 있어서, 상기 PBMC는 정상 공여자로부터 분리된 것일 수 있다.

[0013] 본 발명의 대량배양방법에 있어서, 상기 배양은 4 내지 15일간 수행될 수 있다.

발명의 효과

[0014] 본 발명에 따르면, 외래항원이 아닌 암 환자의 개개의 혈액에 존재하는 자가암항원 CD8 T 세포 에피토프의 펩티드를 이용하여 자가암항원에 특이적인 CD8⁺ T 세포를 분리할 수 있다. 따라서 본 발명의 방법으로 분리된, 정상인에서 극히 낮은 비율로 존재하는 자가암항원을 인식하는 T 세포를 이용하면 암 환자 자신의 세포로부터 유래된 암세포를 효과적으로 선택하여 제거할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 본 발명에 따른 자가암항원 특이적 CD8⁺ T 세포의 선택적 분리 및 대량배양 과정을 설명하는 도면이다.

- 도 2는 본 발명에 따른 에피토프 스크리닝 과정의 공정 흐름도를 나타낸 도면이다.
- 도 3은 정상인(healthy doner)으로부터 얻은 PBMC를 이용한 hTERT 에피토프 스크리닝 결과를 보여주는 도면이다.
- 도 4는 정상인으로부터 얻은 PBMC를 이용한 WT1 에피토프 스크리닝 결과를 보여주는 도면이다.
- 도 5 내지 7은 각각 위암(gastric cancer), 폐암(lung cancer) 및 췌장암(pancreatic cancer) 환자로부터 얻은 PBMC를 이용한 hTERT 에피토프 스크리닝 결과를 보여주는 도면이다.
- 도 8 및 9는 각각 뇌종양(glioblastoma) 및 폐암 환자로부터 얻은 PBMC를 이용한 WT1 에피토프 스크리닝 결과를 보여주는 도면이다.
- 도 10 및 11은 각각 난소암(ovarian cancer) 및 육종(sarcoma) 환자로부터 얻은 PBMC를 이용한 NY-ES01 에피토프 스크리닝 결과를 보여주는 도면이다.
- 도 12 및 13은 각각 육종 및 폐암 환자로부터 얻은 PBMC를 이용한 MAGE-A3 에피토프 스크리닝 결과를 보여주는 도면이다.
- 도 14는 hTERT T 세포 치료제의 파일럿 생산 과정을 설명하는 도면이다.
- 도 15는 WT1 T 세포 치료제의 파일럿 생산 과정을 설명하는 도면이다.
- 도 16은 NY-ES01 T 세포 치료제의 파일럿 생산 과정을 설명하는 도면이다.
- 도 17은 MAGE-A3 T 세포 치료제의 파일럿 생산 과정을 설명하는 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016]

암세포는 우리 몸을 구성하는 세포로부터 유래되므로 암세포를 선택적으로 제거하기 위해서는 암세포에서 과발현되는 자가암항원(self tumor Ag) 특이적 CD8⁺ T 세포의 선택적 분리 및 대량배양이 필요하다. 그러나 자가암항원을 인식하는 T 세포는 정상인의 경우 비율이 극히 낮게 존재할 뿐 아니라, 면역관용(immune tolerance)에 의해 활성이 억제된 상태로 존재한다. 따라서 암환자의 혈액으로부터 자가암항원 특이적 CD8⁺ T 세포를 선택적으로 분리하여 대량배양 하는 규격화된 공정은 아직 개발되지 못하고 있다. 이에 본 발명자들은 항4-1BB 항체를 이용하여 체내에 극히 낮은 비율로 존재하는 hTERT, WT1, NY-ES01, 및 MAGE-A3과 같은 자가암항원 특이적 CD8⁺ T 세포를 31일내 선택적으로 분리 및 대량배양 할 수 있는 규격화된 공정기술을 개발하였다.

[0017]

따라서 본 발명은 자가암항원 특이적 CD8⁺ T 세포의 분리방법을 제공한다. 구체적으로, 본 발명의 자가암항원 특이적 CD8⁺ T 세포의 분리방법은, a) 암 환자 혈액내에 존재하는 자가암항원 CD8⁺ T 세포 에피토프를 선별하는 단계; b) 암 환자의 혈액으로부터 분리된 PBMC(peripheral blood mononuclear cell)를 상기 에피토프의 펩티드 및 IL-2와 함께 배지에서 배양하는 단계; c) 상기 배양된 세포를 b) 단계와 동일한 펩티드를 첨가하여 4-1BB 발현을 유도하는 단계; 및 d) 4-1BB 발현이 유도된 세포를 항-4-1BB 항체가 코팅된 배양 플레이트에서 배양한 후 부착하지 않은 세포를 제거하는 단계를 포함한다.

[0018]

본 발명의 분리방법에서, 상기 a) 단계의 자가암항원은 암 환자 자신의 체내에 존재하는 어떠한 암 항원일 수 있으며, 암종에 따라 적합한 자가암항원을 선택하여 사용할 수 있다. 바람직하게는 항암면역치료에 이용되고 있는 대표적인 자가암항원으로서 hTERT (GenBank: BAC11010.1), WT1 (GenBank: AA061088.1), NY-ES01 (GenBank: CAA05908.1), MAGE-A3 (NCBI Reference Sequence: NP_005353.1) 등을 사용할 수 있다. 상기 hTERT는 염색체 말단에서 텔로미어 DNA(telomeric DNA)를 합성하는 효소로서 암 세포는 이 효소를 과도하게 활성화시켜 텔로미어의 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), 상기 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-ES01은 cancer testis antigen (CTA)에 속하는 단백질 중 하나로 주로 생식세포 (germ cell)와 육종(sarcoma), 유방암을 포함한 다양한 암세포에 발현하는 것으로 잘 알려져 있지만, 이들 세포에서 어떤 기능을 하는지에 대해서는 잘 알려져 있지 않다 (Gnjatic S, et al., *Adv Cancer Res*. 2006;95:1-30). 상기 MAGE-A3은 melanoma-associated antigen family에 속하는 단백질로 정상세포

에서 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).

- [0019] 본 발명의 분리방법에서, 상기 b) 단계에서 에피토프는 서열번호 1 내지 15로 구성된 군에서 선택된 아미노산 서열로 이루어진 펩티드인 것을 특징으로 한다.
- [0020] 본 발명의 분리방법에서, 상기 b) 단계의 배지는 자가혈장이 포함된 배지인 것을 특징으로 하며, 또한 상기 b) 단계의 배양은 12 내지 16일 동안 수행되는 것을 특징으로 한다.
- [0021] 본 발명의 분리방법에서, 상기 c) 단계의 발현 유도는 12 내지 36시간 동안 배양하는 것을 특징으로 하며, 상기 d) 단계의 배양은 1 내지 20분간 수행되는 것을 특징으로 한다.
- [0022] 또한, 본 발명은 상술한 분리방법으로 분리된 자가암항원 특이적 CD8⁺ T 세포와 방사선 조사된 동종이계 (allogeneic) PBMC를 IL-2, 항-CD3 항체 및 자가혈장이 포함된 배지로 현탁한 후 배양용 백에 주입하고, 상기 배지를 추가로 주입하여 배양하는 것을 포함하는 자가암항원 특이적 CD8⁺ T 세포의 대량배양방법을 제공한다.
- [0023] 본 발명의 대량배양방법에서, 상기 PBMC는 정상 공여자로부터 분리된 것을 특징으로 하며, 상기 배양은 4 내지 15일간 수행되는 것을 특징으로 한다. 특히 상기 배양을 수행하는 동안 배양 4일, 7일, 9일, 11일 및 14일째에 배지를 추가 주입할 수 있다.
- [0024] 이하, 본 발명의 자가암항원 특이적 CD8⁺ T 세포의 분리 및 증식방법을 단계별로 설명한다.
- [0025] (1) Epitope screening (사전선별검사)
- [0026] 본 발명은 펩티드를 이용하여 자가유래 암항원 특이적 CD8 T 세포를 선택적으로 증식 및 분리한다. CD8 T 세포에 의해 인식되는 자가암항원의 에피토프(epitope)들은 환자 개개인의 HLA-A type 및 상태에 따라 서로 다르므로 epitope screening을 통해 암환자 개개인의 혈액내에 존재하는 자가암항원 CD8 T cell epitope을 선별하여 T 세포치료제 제조용 펩티드 3-4종류를 선별한다.
- [0027] (2) 자가암항원 특이적 CD8 T 세포의 증식
- [0028] 자가암항원 특이적 CD8 T 세포는 혈액내 0.1% 이하로 존재하므로, 혈액으로부터 분리된 PBMC에 제조용 펩티드 3-4종 및 IL-2를 첨가하여 14일간 배양함으로써 자가암항원으로부터 유래된 펩티드에 특이적인 CD8 T 세포의 증식을 유도한다. 배양 14일째 모든 세포를 수거하여 동일한 펩티드들로 24시간 재활성화함으로써 펩티드-특이적 CD8 T 세포들이 동시에 4-1BB를 발현하도록 유도한다.
- [0029] (3) 자가암항원 특이적 CD8 T 세포의 선택적 분리
- [0030] 항4-1BB 항체가 코팅된 배양 플레이트에 펩티드로 재활성화시킨 세포를 분주하여 10분간 배양함으로써 4-1BB를 발현하는 CD8 T 세포들이 부착되도록 하며, 부착되지 않은 세포들은 모두 세척하여 제거한다. 이후 IL-2가 포함된 배지를 첨가하여 이틀간 배양함으로써 분리된 T 세포들이 증식과 함께 배양 플레이트로 떨어지도록 한다.
- [0031] (4) 자가암항원 특이적 CD8 T 세포의 대량배양
- [0032] 1L 배양용 백(culture bag)에 분리된 CD8 T 세포 5×10⁵ 세포, 방사선 조사된(irradiated allogeneic) PBMCs 1×10⁸ 세포, 1000U/ml IL-2, 40ng 항-CD3 mAb를 혼합하여 14일간 정기적으로 배지를 첨가하여 ~10⁹ 세포/L 수준으로 세포를 대량 배양하여, 암환자에게 투여 가능한 수준으로 증식시킨다.
- [0033] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명하기로 한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0034]

실험예. 에피토프 스크리닝 공정

[0035]

알고리즘을 통해 자가암항원의 CD8 T 세포 에피토프(epitope)들을 선별하였다. 암 환자의 혈액 내 존재하는 T 세포들이 어떤 CD8 T 세포의 에피토프에 반응하는지 확인하기 위해, 암 환자의 혈액으로부터 PBMC(peripheral blood mononuclear cell)를 분리하여 세척한 후, CTL 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. 알고리즘을 통해 분석하여 선별된 각 에피토프의 펩티드들(peptides)을 각 튜브에 1 μg/ml 농도로 첨가하여 CO₂ 인큐베이터에서 배양을 시작하였다. 배양 이틀째, 50 U/ml IL-2가 포함된 CTL 배지를 각 튜브에 1 ml씩 첨가하였다. 배양 7, 9, 11, 및 13일째 1 ml 배지를 제거한 후, 50 U/ml IL-2가 포함된 CTL 배지를 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 펩티드를 5 μg/ml 농도로 첨가하여 배양하였다. 24 시간 후, 각 튜브의 세포를 수거하여 항-CD8-PE-Cy5 및 항-4-1BB-PE 항체로 염색하여 유세포 분석하였으며, 4-1BB를 발현하는 CD8 T 세포의 비율을 분석함으로써, 어떤 펩티드에 반응하여 CD8 T 세포가 활성화 되었는지를 분석하였다. 도 2는 본 발명에 따른 에피토프 스크리닝 과정의 공정 흐름도를 나타낸 도면이다.

[0036]

실험에 사용된 항-CD8-PE-Cy5, 항-4-1BB-PE는 e바이오사이언스(eBioscience, San Diego, CA)에서 구매하였다. RPMI1640, L-글루타민, HEPES, 2-메르캅토에탄올은 인비트로젠 사(Invitrogen, San Diego, CA)로부터 구매하였다.

[0037]

실시예 1. 자가암항원 선별 및 CD8 T 세포 에피토프 선별

[0038]

각 암종별로 어떤 암항원이 암의 면역치료에 적합한지에 대해 평가한 논문들(Scanlan MJ, et a., *Immunol Rev.* 2002 Oct. 188:22-32; Ramakrishnan S, et al., *Cancer research.* 1998. 58:622-625; Nakahara Y, et al., *Brain Tumor Pathol.* 2004. 21(3):113-6)을 기반으로 한국인 호발암 및 난치성암(위암, 폐암, 췌장암 등)의 면역치료에 적합한 자가암항원을 선별하였다. hTERT (GenBank: BAC11010.1), WT1 (GenBank: AA061088.1), NY-ESO1 (GenBank: CAA05908.1), MAGE-A3 (NCBI Reference Sequence: NP_005353.1)은 다양한 방식으로 항암면역치료에 이용되고 있는 대표적인 자가암항원으로 이들 네 가지 암 항원의 적용이 가능한 암종들을 선별하여 하기 표 1에 정리하였다.

표 1

Target antigen	Patients
EBV	
EBNA1, LMP1, LMP2	EBV-related Tumors Gastric Cancer Nasopharyngeal Carcinoma Hodgikin's lymphoma Non Hodgikin's lymphoma
hTERT	Lung cancer, Gastric cancer, Pancreatic cancer, melanoma, and other solid cancers
WT-1	Glioblastoma, lung cancers Leukemia
NY-ESO-1	Ovarian cancer, Sarcoma
MAGE-3	Sarcoma, Lung cancer, Melanoma

[0039]

[0040]

선별된 자가암항원의 아미노산 서열을 알고리즘을 통해 분석하여 CD8 T 세포 에피토프로 추정되는 아미노산 서열을 결정하였으며 (CTLPred: <http://www.imtech.res.in/raghava/ctlpred/>, NetCTL: <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetCTL/>, SYFPEITHI: <http://www.syfpeithi.de/>), 선별된 에피토프를 대상으로 펩티드를 화학합성 (Pepton Inc; www.pepton.com)하여 에피토프 스크리닝(epitope screening)에 사용하였

다. 각 자가암항원으로부터 선별된 CD8 T 세포 에피토프는 하기 표 2 내지 표 5와 같다.

표 2

[0041]

Amino acid sequence of hTERT CTL epitopes	
hTERT-1 AAFRALVAQCL	hTERT-21 QTQLSRKLP
hTERT-2 CLKELVARV	hTERT-22 ALEAAANPAL
hTERT-3 LAFGFALL	hTERT-23 ILAKFLHWL
hTERT-4 VGDDVLVH	hTERT-24 RLVDDFLLV
hTERT-5 FVLVAPSCA	hTERT-25 EARPALLTSRLRFIPK
hTERT-6 GAATQARP	hTERT-26 RLFFYRKSV
hTERT-7 SGTRHSH	hTERT-27 YLFFYRKSV
hTERT-8 KEQLRPSFLLSSLRPSL	hTERT-28 DLQVNSLQTV
hTERT-9 PLFLELL	hTERT-29 YLQVNSLQTV
hTERT-10 AAVTPAA	hTERT-30 GLLGASVLGL
hTERT-11 QSIGIRQ	hTERT-31 ALLTSRLRFI
hTERT-12 IVNMDYV	hTERT-32 RLTSRVKAL
hTERT-13 RPGLLGASV	hTERT-33 TYVPLLGSL
hTERT-14 TLIDLQP	hTERT-34 CYGDMENKL
hTERT-15 LLCSLCYG	hTERT-35 AYQVCGPP
hTERT-16 LVRGVPEYGCVVNLR	hTERT-36 VYGFVRACL
hTERT-17 YSSYARTSIRASL	hTERT-37 VYAETKHFL
hTERT-18 IYKILLQAY	hTERT-38 DYVVGARTF
hTERT-19 LGAKGAA	
hTERT-20 YVPLLGSL	

표 3

[0042]

Amino acid sequence of WT1 CTL epitopes			
HLA-A type	Amino acid sequence	HLA-A type	Amino acid sequence
HLA-A*02	WT1-1 ALLPAVPSL	HLA-A*24	WT1-10 QYRIHTHGVF
HLA-A*02	WT1-2 DLNALLPAV	HLA-A*24	WT1-11 AFTVHFSGQF
HLA-A*02	WT1-3 SLGEQQYSV	HLA-A*24	WT1-12 RWPSCQKKF
HLA-A*02	WT1-4 RMFPNAPYL	HLA-A*24	WT1-13 RVPGVAPTL
HLA-A*02	WT1-5 GVFRGIQDV	HLA-A*24	WT1-14 DFKDCERRF
HLA-A*02	WT1-6 CMTWNQMNL	HLA-A*24	WT1-15 RTPYSSDNL
HLA-A*02	WT1-7 SGQFTGTAGA	HLA-A*24	WT1-16 TSEKPFSCR
HLA-A*02	WT1-8 VLDFAPPGA	HLA-A*24	WT1-17 FSRSDQLKR
HLA-A*24	WT1-9 APGCNKRYF	HLA-A*24	WT1-18 LSHLQMSR

표 4

[0043]

Amino acid sequence of NY-ESO-1 CTL epitopes			
HLA-A type	Amino acid sequence	HLA-A type	Amino acid sequence
HLA-A*02	NY-1 SLAQDAPPL	HLA-A*24	NY-11 EFTVSGNIL
HLA-A*02	NY-2 SISSCLQQL	HLA-A*24	NY-12 SGLNGCCR
HLA-A*02	NY-3 LLMWITQCFL	HLA-A*24	NY-13 SSCLQQLSL
HLA-A*02	NY-4 RLLEFYLAM	HLA-A*24	NY-14 FATPMEAEI
HLA-A*02	NY-5 DAPPLPVPV	HLA-A*24	NY-15 ITQCFLPVF
HLA-A*02	NY-6 TVSGNILTI	HLA-A*24	NY-16 LTAADHRQL
HLA-A*02	NY-7 QLQLSISSCL	HLA-A*24	NY-17 YLAMPFATPM
HLA-A*02	NY-8 GVLLKEFTV	HLA-A*24	NY-18 ATPMEAEIAR
HLA-A*02	NY-9 ILTIRLTAA	HLA-A*24	NY-19 ASGPGGGAPR
HLA-A*02	NY-10 SLLMWITQC	HLA-A*24	NY-20 PVPGVLLKEF

표 5

Amino acid sequence of MAGE-A3 CTL epitopes			
HLA-A type	Amino acid sequence	HLA-A type	Amino acid sequence
HLA-A*02	M3-1 ALSRKVAEL	HLA-A*24	M3-13 VFEGREDSIL
HLA-A*02	M3-2 LLIIVLAI I	HLA-A*24	M3-14 EGLEARGEAL
HLA-A*02	M3-3 GLLIIVLAI	HLA-A*24	M3-15 TFPDLESEF
HLA-A*02	M3-4 KIWEELSVL	HLA-A*24	M3-16 EFLWGPRL
HLA-A*02	M3-5 ILGDPKLL	HLA-A*24	M3-17 VAELVHFL
HLA-A*02	M3-6 TLVEVTLGEV	HLA-A*24	M3-18 IFSKASSL
HLA-A*02	M3-7 ALVETSYVKV	HLA-A*24	M3-19 KVLHHMVKI
HLA-A*02	M3-8 AALSRKVAEL	HLA-A*24	M3-20 VDPIGHLYI
HLA-A*02	M3-9 LVFGIELMEV	HLA-A*24	M3-21 IMPKAGLLI
HLA-A*02	M3-10 SLPTTMNYPL	HLA-A*24	M3-22 SILGDPKLL
HLA-A*24	M3-11 SYPPLHEWVL	HLA-A*24	M3-23 VKISGGPHI
HLA-A*24	M3-12 YIFATCLGL	HLA-A*24	M3-24 LGLSYDGLL

실시예 2. 임상 암 환자를 대상으로 한 에피토프 스크리닝

실시예 1에서 선별된 hTERT, WT1, NY-ESO1, MAGE-A3 자가암항원의 CD8 T 세포 에피토프들이 실제 임상 암 환자의 혈액에 존재하는 CD8 T 세포 증식을 유도할 수 있는지 검증하기 위해, 도 2에 모식된 에피토프 스크리닝을 수행하였다. hTERT 에피토프 스크리닝은 위암, 폐암, 췌장암을 주 대상으로 수행하였으며, WT1 에피토프 스크리닝은 뇌척수암 및 폐암, NY-ESO1 에피토프 스크리닝은 난소암 및 육종, 그리고 MAGE-A3 에피토프 스크리닝은 육종 및 폐암을 주 대상으로 수행하였다.

도 3은 정상인(healthy doner)으로부터 얻은 PBMC를 이용한 hTERT 에피토프 스크리닝 결과를 보여주는 도면이다.

도 4는 정상인으로부터 얻은 PBMC를 이용한 WT1 에피토프 스크리닝 결과를 보여주는 도면이다.

도 3과 4에서 볼 수 있듯이, hTERT 및 WT1의 CD8 T 세포 에피토프들은 정상인의 혈액으로부터 분리된 PBMC로부터 T 세포 반응을 유도하지 못하였다. 따라서 본 발명의 선별된 에피토프들은 정상인의 T 세포가 인식하지 못하는 것으로 확인되었다.

도 5 내지 7은 각각 위암(gastric cancer), 폐암(lung cancer) 및 췌장암(pancreatic cancer) 환자로부터 얻은 PBMC를 이용한 hTERT 에피토프 스크리닝 결과를 보여주는 도면이다.

도 8 및 9는 각각 뇌종양(glioblastoma) 및 폐암 환자로부터 얻은 PBMC를 이용한 WT1 에피토프 스크리닝 결과를 보여주는 도면이다.

도 10 및 11은 각각 난소암(ovarian cancer) 및 육종(sarcoma) 환자로부터 얻은 PBMC를 이용한 NY-ESO1 에피토프 스크리닝 결과를 보여주는 도면이다.

도 12 및 13은 각각 육종 및 폐암 환자로부터 얻은 PBMC를 이용한 MAGE-A3 에피토프 스크리닝 결과를 보여주는 도면이다.

도 5 내지 13에서 볼 수 있듯이, 임상 암 환자의 혈액으로 분리한 PBMC를 대상으로 에피토프 스크리닝을 수행하여 hTERT, WT1, NY-ESO1, 및 MAGE-A3에 대한 CD8 T 세포 반응성을 조사한 결과, 정상인과는 달리 선별된 자가암항원들에 대한 T 세포 반응이 높게 나타나는 것으로 확인되었다. 따라서 위암, 폐암, 췌장암, 육종, 난소암 등을 대상으로 각각의 자가암항원에 대한 반응성을 에피토프 스크리닝을 반복적으로 수행하여 확인하였다.

[0055]

또한, 상기 에피토프 스크리닝 결과를 객관적으로 분석하기 위해, 스코어링 시스템(scoring system)을 하기 표 6과 같이 만들었다.

표 6

Score	The ratio of 4-1BB ⁺ CD8 ⁺ T cells	The ratio of CD8 ⁺ T cells (compare with average ratio of CD8 ⁺ T)
0	0-3 %	< 1.0 fold
1	0-3 %	≥ 1.0 fold
2	4-10 %	≥ 1.0 fold
3	11-15 %	≥ 1.0 fold
4	16-20 %	≥ 1.0 fold
5	≥ 20 %	≥ 1.0 fold
Although CD8 ⁺ T cells express the 4-1BB on their surface, in case that the percentage of CD8 ⁺ T cells is lower than average ratio one point will be deducted from final scores.		

[0056]

[0057]

상기 표 6의 기준에 따라 에피토프 스크리닝 결과를 분석하였으며, 그 결과는 하기 표 7 내지 15에 나타내었다.

[0058]

하기 표 7은 위암 환자로부터 얻은 PBMC를 이용한 hTERT 에피토프 스크리닝을 분석한 결과이다.

표 7

Patients	# Peptide																																											
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38						
1	KYH	2	1	2	1	2	1	0	2	2	1	3	2	0	2	1	1	1	1	1	2	1	1	2	1	1	0	1	3	2	1	1	1	1	1	1	2	1	1	2				
2	SKP	1	1	1	2	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0				
3	KOS	3	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0	1	2	1	1	2	1	0	0	0	0	1	1	1				
4	JHT	1	0	1	1	1	1	2	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0				
5	AHS	4	1	0	1	0	0	0	0	3	0	0	2	0	4	1	3	3	2	1	2	2	3	1	2	3	2	3	3	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1			
6	POH	2	1	2	1	2	1	1	3	1	1	1	2	1	1	1	0	2	2	3	2	1	2	1	2	1	0	1	1	2	1	2	1	2	1	0	1	0	1	0	2			
7	LHK	4	2	2	4	2	3	2	2	4	4	2	2	5	1	4	4	3	4	3	2	2	2	2	4	2	3	1	3	3	2	1	0	2	3	1	1	1	0	1				
8	LOK	4	3	4	3	3	3	2	2	3	3	4	3	4	3	3	3	3	3	3	3	4	4	3	3	3	2	3	3	3	4	2	2	4	3	3	2	3	3	4				
9	LMY	4	0	1	1	1	3	1	1	2	1	1	1	2	1	3	3	2	0	2	2	1	1	2	1	0	1	3	1	0	0	1	2	2	2	1	1	0	1	0				
10	KYI	3	1	3	2	1	4	4	1	4	0	1	1	1	2	0	4	0	2	2	2	0	0	2	2	1	3	4	2	3	2	1	1	3	1	0	1	2	1	0	1			
11	LUY	2	1	1	1	2	1	1	2	1	1	1	1	2	1	1	1	0	2	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	2	2	2	1	1	0	2	1	0	2	1			
12	JCH	2	1	1	3	3	1	1	1	1	2	2	3	2	3	1	0	3	2	0	1	1	1	1	1	2	3	3	2	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1			
13	QYK	2	3	1	3	0	0	3	2	2	4	1	3	1	0	1	1	3	2	0	0	4	1	1	3	3	0	1	2	2	2	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1			
14	HBV	2	1	3	3	2	3	2	2	3	2	2	1	3	3	2	1	3	3	2	1	3	2	1	2	1	2	3	3	2	1	2	3	1	1	0	2	2	2	2	2			
15	CHS	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3			
16	HWK	0	0	0	3	1	0	1	1	2	2	0	3	0	3	2	3	0	0	0	0	2	1	1	0	1	2	2	1	3	3	1	0	2	1	1	1	1	1	1	1			
17	KTG	2	1	1	3	2	2	2	2	1	3	3	3	3	3	1	1	2	0	3	3	1	1	2	2	2	2	1	1	2	1	1	0	1	3	1	2	1	1	1	1			
18	YSH	1	2	2	1	1	1	1	1	1	3	3	1	3	3	3	1	1	1	3	3	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1			
19	KIS	4	3	4	3	3	3	3	4	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3		
20	JHK	2	0	0	0	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
21	PBO	1	4	1	1	1	3	2	3	2	1	3	2	1	1	1	1	3	1	2	2	2	3	2	1	0	3	2	2	1	3	2	1	0	0	1	0	0	1	2	2	2		
22	HSY	3	1	1	1	3	2	3	3	3	2	0	3	1	1	1	3	0	3	4	2	1	0	1	1	3	4	2	2	1	1	0	1	2	1	0	1	2	1	0	2	1		
23	KDH	3	4	2	2	1	1	2	1	3	1	3	3	1	1	3	3	2	2	1	1	1	4	4	2	2	1	3	2	1	1	1	2	1	1	1	2	4	1	2	2	1		
24	PBS	2	3	1	3	0	3	0	3	3	2	0	4	3	1	0	1	1	1	3	3	0	0	2	1	1	1	1	2	2	4	2	1	1	1	1	2	1	1	2	2	2		
25	KJO	2	0	2	0	1	0	2	0	1	2	0	0	2	1	2	0	0	1	0	3	2	1	3	1	2	1	2	2	0	1	2	2	2	1	1	2	2	1	1	2	2	1	
26	BJS	0	4	2	0	3	0	0	0	3	2	0	0	2	3	1	0	0	0	2	0	3	3	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	4	2	2	1	2	1	1	1	1		
27	OYL	0	3	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
28	YBS	3	1	0	0	0	4	0	0	0	3	2	3	0	0	3	3	0	0	0	2	0	3	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
29	OUJ	1	4	0	0	0	3	3	0	1	0	3	0	2	0	2	0	1	3	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	2	2	1	0	1	0	1	
30	IJI	3	3	4	4	3	1	3	3	4	3	0	4	2	3	1	3	1	4	1	1	4	4	1	3	1	2	0	0	1	2	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	
31	YSJ	1	1	1	1	0	1	1	2	1	2	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	2	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	
32	LKS	0	2	0	0	0	3	0	0	4	0	0	0	0	0	0	1	0	2	1	1	1	2	3	0	1	2	2	0	4	2	3	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	2	
33	HKG	1	1	2	0	1	2	2	0	2	0	2	2	1	0	1	1	1	0	2	1	0	2	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	2	0	1	0	1	0	1	1	
34	LMS	1	0	2	0	1	0	1	2	2	2	0	0	0	0	1	0	0	1	3	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	3	1	2	1	0	1	2	1	0	1	2	1	2	
35	YOK	3	1	3	1	1	2	1	1	3	1	1	3	2	1	2	3	3	2	1	2	1	2	3	0	1	1	2	0	1	2	3	0	1	2	3	3	1	2	2	0	1	1	
36	AKJ	2	2	2	2	2	2	3	4	2	3	2	2	2	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
37	PIH	2	1	4	1	1	1	3	2	4	3	2	2	1	3	1	3	1	1	2	3	1	3	1	1	2	2	1	3	4	1	0	0	1	2	3	2	3	2	3	1	1	1	
38	KYS	2	2	2	4	2	2	2	1	1	2	2	2	3	3	4	1	1	1	2	3	2	3	3	3	1	0	1	2	2	1	4	3	3	2	1	3	1	1	1	1	1	1	
39	JJM	2	3	3	3	3	3	2	3	3	4	2	3	3	2	3	3	3	2	3	2	3	2	2	2	1	2	2	1	1	2	3	3	2	3	2	3	2	2	2	1	2	2	1
40	NMO	4	3	4	3	3	2	2	3	4	3	2	4	3	3	4	3	4	2	4	3	4	3	3	2	1	1	3	3	4	2	1	1	1	2	2	1	1	1	2	2	1	2	
41	SSS	2	1	2	1	1	2	3	3	3	2	3	2	2	2	1	1	2	3	3	3	2	2	3	2	1	1	2	2	3	2	1	1	3	2	1	1	3	3	2	1	1	1	
42	YKJ	0	2	0	0	2	2	4	0	2	3	2	3	1	1	4	2	2	4	1	4	2	3	3	3	1	1	2	2	1	0	1	0	3	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0
43	BJK	1	0	0	3	0	3	0	1	2	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	3	0	1	0	0	1	2	3	2	3	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	
44	IYS	3	1	2	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	
45	JJN	2	2	3	3	2	3	2	2	1	3	3	3	2	3	3	2	3	3	2	3	3	2	3	2	2	2	3	3	1	1	0	1	2	2	3	1	1	2	3	1	1	2	3
46	HYJ	1	3	3	4	4	4	3																																				

표 8

		# Peptide																								
Patients		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
1	BGO	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	2	1	2	1	2	2	1	0	0	1	0	0	0	0	0
2	LCS	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	4	0	1	0	0	0	1	0	0
3	KKH	3	2	4	1	4	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	1	1	1	1	1
4	NSD	1	2	4	1	2	3	2	2	1	2	2	2	2	2	2	3	2	2	1	1	2	1	2	1	1
5	CHS	3	3	3	3	2	3	3	0	3	3	2	2	3	3	3	1	0	3	3	3	2	3	0	4	3
6	KCH	1	0	2	2	0	0	0	0	1	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
7	CMR	0	1	1	3	0	0	1	2	0	1	2	0	1	0	0	1	2	2	1	2	1	3	1	1	4
8	HJS	0	0	1	0	2	2	2	1	2	0	0	1	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
9	PBS	3	0	0	1	1	1	3	2	3	1	0	0	2	1	3	4	2	3	1	2	4	1	3	1	1
10	KSH	5	3	2	1	1	3	2	2	4	3	1	1	3	1	1	5	4	1	3	1	2	3	0	3	3
11	LJS	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1
12	LKS	1	1	3	2	3	2	1	1	2	2	0	1	1	2	1	5	0	2	2	3	3	1	3	4	2
13	LYS	2	1	2	2	2	2	2	2	0	2	1	0	0	0	0	2	2	1	1	2	1	0	0	1	2
14	SMS	0	0	1	0	1	0	1	2	0	5	0	1	1	0	2	3	2	2	0	0	2	0	2	0	1
15	KHS	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1
16	LKT	0	1	2	1	0	0	2	0	0	2	2	2	0	2	2	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0
17	EHR	1	0	2	3	1	2	3	0	1	4	0	1	0	0	1	0	0	3	4	1	1	2	2	1	5
18	KYH	4	3	4	4	4	4	4	2	3	5	1	5	1	4	3	2	2	3	3	1	1	1	1	3	2
19	CEH	1	2	0	0	0	0	0	2	1	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	2
20	KSJ	0	0	1	0	1	0	2	2	1	1	2	2	1	0	1	0	0	2	1	1	0	0	0	0	0

[0061]

[0062]

하기 표 9는 췌장암 환자로 부터 얻은 PBMC를 이용한 hTERT 에피토프 스크리닝을 분석한 결과이다.

표 9

		# Peptide																								
Patients		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
1	KEH	2	4	4	5	4	4	4	5	5	5	4	5	3	5	5	4	4	4	5	4	3	2	4	4	2
2	LSS	1	2	1	1	1	1	2	0	0	1	2	1	1	1	1	0	2	1	1	1	1	2	1	1	1
3	KKS	1	3	0	0	1	1	0	1	0	5	1	5	0	0	0	2	1	0	1	4	0	1	3	1	1
4	KBN	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	2	2	0	2	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1
5	JKK	4	1	1	4	2	1	0	1	5	4	0	1	0	4	3	1	2	1	2	2	0	2	0	2	2
6	HIS	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	2	2	5	1	1	0	0	0	3	1	1	0	0
7	PSN	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1
8	LJO	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	2	1	1	3	2	4	0	0	1	2	0	0	0	1
9	SSH	1	2	4	2	2	3	1	1	0	5	1	1	1	3	1	3	2	2	3	2	2	2	1	1	0
10	KBM	0	0	1	2	1	1	2	3	2	1	1	1	0	2	2	0	2	1	1	1	0	1	1	2	2
11	JTJ	3	1	1	0	1	1	2	1	2	3	0	1	1	0	0	5	3	0	1	1	0	1	0	4	2
12	KKH	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2	2	1	0	0	0	0	0	2
13	PBH	5	1	1	0	0	1	0	1	1	3	1	0	0	0	0	2	1	1	0	2	1	0	1	0	1
14	LSB	1	1	3	3	0	1	5	0	2	4	1	0	3	1	1	3	1	2	4	2	1	1	4	4	2
15	KMY	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
16	KCJ	2	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	3	0	2	2	0	2	0	1	2	0	0	0
17	CSH	2	1	3	4	4	4	3	2	2	2	1	1	3	3	3	4	3	2	2	2	2	2	1	2	1
18	CH	4	4	5	5	4	5	4	4	5	5	1	4	4	5	4	2	3	3	3	4	4	4	3	4	4
19	HKS	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1
20	YSC	1	1	0	2	0	0	0	0	1	3	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1

[0063]

[0064] 하기 표 10은 뇌종양 환자로부터 얻은 PBMC을 이용한 WT1 에피토프 스크리닝을 분석한 결과이다.

표 10

Patients	# Peptide																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
1	KSK	5	5	5	2	2	4	5	5	5	2	2	3	0	3	5	2	5	4	5	5
2	PJY	3	1	1	2	2	1	0	2	0	1	0	0	1	3	1	3	2	2	2	1
3	JJY	3	1	1	1	1	1	1	1	5	3	2	2	2	2	2	2	2	2	3	1
4	OJH	3	3	2	2	2	2	1	4	3	1	2	2	3	1	1	3	3	2	5	3
5	KYA	0	0	1	1	0	1	1	1	3	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0
6	YSB	0	0	0	2	1	0	0	0	0	5	5	0	3	0	1	0	0	0	0	1
7	KKJ	1	1	2	1	1	2	1	1	1	1	1	2	2	2	1	2	2	1	2	1
8	NKH	2	3	1	2	3	2	2	3	2	2	1	1	1	3	3	4	4	2	2	3
9	AKM	0	0	0	0	1	1	0	2	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0
10	HIS	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1
11	CHY	4	3	4	3	2	3	2	4	5	4	3	2	2	3	2	3	2	3	3	3
12	JYS	3	4	2	2	4	5	2	4	4	4	2	3	2	3	3	4	4	2	3	3
13	HIS	2	1	1	1	1	0	1	1	1	2	0	0	1	0	1	0	0	1	0	2
14	ABS	2	2	2	1	4	1	1	4	3	3	4	1	1	1	2	4	2	2	2	2
15	LVJ	3	2	2	2	2	0	1	2	1	2	3	1	1	3	0	1	1	1	3	0
16	SBS	1	2	0	0	1	1	0	1	2	1	0	0	0	2	2	1	2	2	1	1
17	PJB	2	2	2	1	4	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1
18	JJS	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
19	LYH	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1
20	SSO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

[0065]

[0066] 하기 표 11은 폐암 환자로부터 얻은 PBMC을 이용한 WT1 에피토프 스크리닝을 분석한 결과이다.

표 11

Patients	# Peptide																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
1	BGO	2	1	0	0	1	0	2	2	3	1	1	1	0	0	2	4	1	1	1	1
2	LCS	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0
3	KKH	0	1	1	2	2	0	2	2	4	5	2	1	1	1	1	1	3	1	2	1
4	NSD	2	1	2	1	2	1	1	2	2	1	2	3	3	3	3	2	3	1	1	1
5	CHS	3	4	3	3	3	3	3	3	0	2	2	1	4	4	3	5	3	3	4	3
6	KCH	0	0	1	1	2	2	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	2
7	CMR	2	0	2	2	1	3	0	0	0	1	0	0	3	0	0	0	1	0	0	0
8	HJS	0	0	0	1	1	2	1	1	1	1	4	0	0	0	1	0	1	0	0	3
9	PBS	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0	2	3	3	1	3	2	3	1	1	3
10	KSH	3	3	3	3	3	1	3	3	4	3	2	2	1	1	2	3	3	3	3	3
11	LJS	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1
12	LKS	2	2	2	1	3	3	2	1	2	0	2	2	2	4	4	1	0	4	2	0
13	LVS	0	3	2	0	1	1	3	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1
14	SMS	2	1	1	2	1	1	1	1	4	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
15	KHS	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
16	LKT	2	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	2	1	1	0	0	5	1	0
17	EHR	2	1	0	3	2	1	1	1	3	1	4	2	1	2	1	1	3	0	3	2
18	KYH	4	3	3	3	3	4	3	3	3	3	1	1	1	2	3	2	2	1	1	3
19	CEH	0	1	2	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2
20	KSJ	2	1	1	2	1	0	3	1	1	5	3	0	0	1	2	1	1	0	1	1

[0067]

[0068]

하기 표 12는 난소암 환자로부터 얻은 PBMC을 이용한 NY-ES01 에피토프 스크리닝을 분석한 결과이다.

표 12

Patients	# Peptide																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
1	CEH	0	0	0	1	0	0	2	1	2	0	2	2	0	1	1	0	0	2	1	0
2	LBS	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	2	0	0
3	KSY	1	0	3	2	3	1	1	2	0	2	1	2	1	1	0	1	1	0	0	1
4	KMS	1	1	1	2	2	3	4	2	4	1	5	1	1	3	1	2	4	3	1	1
5	HSY	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	1	0	0	0	0	1	0	3
6	KHJ	1	2	3	1	1	1	2	1	1	3	3	1	2	2	3	1	1	1	1	2
7	LKS	1	0	5	1	1	1	1	1	1	5	3	2	1	1	4	1	1	1	5	1
8	KHM	1	1	5	3	0	1	2	0	2	1	1	0	0	2	0	1	1	1	0	3
9	JMJ	2	1	1	2	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0
10	YSG	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0
11	KMH	1	0	2	2	0	2	0	2	1	2	0	2	1	1	1	2	0	2	2	2
12	JYS	3	3	2	3	2	4	2	2	3	1	3	2	2	1	1	4	2	2	2	2
13	PJS	0	0	1	0	1	0	2	1	2	1	1	0	0	1	1	0	3	0	0	0
14	SSS	0	2	1	2	2	3	1	0	0	0	0	0	0	2	0	0	1	1	0	0
15	HYH	0	2	0	2	0	1	2	0	2	2	0	0	0	0	1	1	0	1	2	0
16	KHS	3	3	3	3	5	5	4	4	3	3	5	5	2	2	4	3	3	2	4	4
17	KYS	0	1	5	3	1	0	1	2	0	2	1	2	0	2	0	4	0	1	2	2
18	YEK	1	1	2	0	0	3	0	5	2	1	1	2	3	4	0	2	0	4	0	5
19	LYJ	1	1	2	2	1	2	2	2	1	2	1	0	1	1	0	1	0	2	1	1
20	KKS	0	1	0	0	0	1	0	0	2	3	1	0	0	0	1	2	2	2	1	3
21	HHS	0	0	1	0	0	2	2	0	1	0	0	0	0	1	2	1	1	1	0	0
22	LKS	1	2	4	2	0	1	2	1	1	1	2	0	2	2	0	1	2	1	0	1
23	PSD	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	SES	3	1	0	0	0	0	1	2	2	1	2	0	1	0	0	0	2	0	0	0
25	JHY	2	1	2	1	1	2	2	1	2	2	2	2	1	1	2	2	2	1	1	1
26	KKH	1	0	1	3	3	4	0	1	3	2	3	1	1	2	2	1	3	3	4	2
27	KYJ	2	2	2	3	2	2	1	2	1	2	2	2	1	1	0	1	1	2	0	0
28	KGH	5	5	5	4	4	5	5	4	5	4	4	5	4	4	4	5	4	5	5	4
29	KSK	1	1	4	1	3	1	1	1	2	3	3	1	2	2	2	1	1	2	0	1
30	SJH	5	2	1	3	2	5	4	4	3	0	4	1	3	2	1	4	2	2	5	2

[0069]

[0070]

하기 표 13은 육종 환자로부터 얻은 PBMC를 이용한 WT1 에피토프 스크리닝을 분석한 결과이다.

표 13

Patients	# Peptide																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
1	LYS	1	3	5	1	1	1	1	2	1	1	1	1	2	1	1	2	2	2	1	1
2	SJY	3	3	3	4	5	1	0	3	1	1	1	1	3	2	1	3	4	4	1	1
3	AYS	1	1	2	2	3	1	2	1	2	4	2	2	1	1	2	1	2	3	1	1
4	KDS	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	3	1	1
5	LSM	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
6	CSK	0	2	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	2	1	0	2
7	JJS	2	1	0	2	4	3	1	2	2	1	3	0	4	2	2	0	2	1	1	3
8	PYS	1	1	3	2	0	0	2	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0
9	LYS	1	1	5	1	1	1	1	1	3	2	4	4	1	0	2	5	1	1	1	0
10	KYS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	YJH	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0
12	KYC	1	1	0	1	1	0	0	0	0	3	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0
13	LSH	1	2	5	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	2	1	0	0	1
14	ESJ	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
15	HBH	0	0	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
16	PCI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	KJS	2	2	5	2	2	0	1	1	1	3	0	0	1	0	2	2	1	1	1	1
18	JBK	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1
19	CYR	2	0	2	1	1	2	0	1	1	3	2	1	0	1	0	5	2	3	0	0
20	KNY	0	1	0	1	1	2	1	0	2	0	1	1	0	0	1	1	0	2	2	1
21	KKC	4	3	2	3	3	3	5	5	5	4	3	2	5	3	5	2	5	4	3	2
22	KMS	1	0	5	5	3	5	2	2	1	1	3	3	0	0	3	0	0	3	2	1
23	KJM	1	1	5	1	2	1	1	1	0	3	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0
24	LMJ	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25	PHS	0	0	2	4	2	5	1	3	1	3	1	1	1	1	5	2	2	1	1	4
26	YSH	2	1	2	2	1	1	1	1	3	5	2	2	0	1	1	2	1	2	1	1
27	HSW	0	1	5	1	2	1	3	0	3	2	1	2	0	2	0	0	1	1	0	1
28	SSB	1	0	1	2	2	2	2	2	1	1	1	2	1	2	1	1	2	1	2	2
29	JSH	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	2	1	1
30	RCH	2	3	2	2	1	2	3	1	3	1	3	1	2	4	1	2	1	1	1	3

[0071]

[0072]

하기 표 14는 육종 환자로부터 얻은 PBMC를 이용한 MAGE-A3 에피토프 스크리닝을 분석한 결과이다.

표 14

		# Peptide																							
Patients		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1	LYS	1	2	1	0	1	1	1	1	2	1	1	0	1	1	1	1	0	2	2	2	2	1	1	1
2	SJY	3	1	0	2	3	3	0	2	1	1	2	5	1	4	3	5	0	0	1	1	4	4	1	1
3	AYS	1	2	3	2	1	1	1	3	2	2	1	0	3	2	2	2	3	4	2	1	2	3	2	1
4	KDS	0	1	1	1	1	2	2	2	1	0	1	0	4	1	2	3	1	0	1	1	0	1	2	5
5	LSM	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	CSK	2	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	3	0	0	1	1	1	1	0	1	1
7	JJS	1	0	2	1	0	3	3	1	4	3	0	1	1	1	2	2	0	1	0	2	0	0	1	1
8	PYS	1	1	0	1	1	1	1	0	1	2	1	0	1	0	0	0	0	0	2	1	2	1	0	0
9	LYS	3	1	4	0	1	2	0	1	1	1	1	1	0	0	3	0	1	1	4	1	0	0	1	1
10	KYS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	YJH	0	1	2	0	0	0	0	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	KYC	2	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	0	0
13	LSH	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	3	0	2	0	0	1	1	1	1	2	0	0	0
14	ESJ	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
15	HBH	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	PCI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	KJS	2	2	2	1	1	0	0	1	2	2	1	3	0	2	2	0	1	1	1	1	0	2	1	0
18	JBK	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0
19	CYR	0	1	1	0	2	0	1	1	1	0	5	0	5	1	2	2	0	0	3	0	2	0	2	1
20	KNY	1	1	1	2	2	2	2	1	1	1	2	0	1	1	1	3	0	0	2	1	1	1	0	3
21	KKC	2	2	5	4	3	4	4	3	4	3	1	3	3	4	3	2	4	4	4	5	2	3	3	3
22	KMS	1	1	2	1	0	2	1	3	1	1	0	2	2	0	1	1	1	1	2	1	2	4	5	3
23	KJM	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1
24	LMJ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25	PHS	1	1	2	1	0	1	4	3	0	4	0	1	0	2	1	0	0	1	1	2	1	2	4	2
26	YSH	0	1	1	2	1	5	1	1	2	0	3	3	1	1	2	1	1	1	3	0	0	1	1	1
27	HSW	0	1	1	1	1	1	3	1	0	4	2	0	2	1	0	0	1	0	0	1	2	4	0	1
28	SSB	2	1	2	2	2	2	3	2	0	1	2	0	3	0	2	1	0	2	0	2	0	0	0	3
29	JSH	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
30	RCH	1	1	1	3	2	1	1	3	1	3	3	1	2	1	1	1	2	1	3	2	2	1	2	1

[0073]

[0074]

하기 표 15는 폐암 환자로부터 얻은 PBMC를 이용한 MAGE-A3 에피토프 스크리닝을 분석한 결과이다.

표 15

		# Peptide																							
Patients		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1	BGO	2	1	3	1	1	4	1	1	1	1	2	2	2	1	1	1	1	1	2	1	2	3	0	1
2	LCS	0	0	0	0	0	0	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
3	KKH	1	1	1	1	5	1	1	5	5	5	1	1	1	1	1	1	1	1	5	1	5	1	1	1
4	NSD	1	1	2	2	2	1	1	2	2	2	2	1	1	3	0	4	0	2	3	1	1	2	1	1
5	CHS	3	2	3	3	4	4	3	2	3	3	2	3	3	3	3	4	4	3	0	2	1	2	2	1
6	KCH	0	0	0	0	2	1	1	1	0	2	0	1	0	0	2	0	0	0	0	2	0	0	1	1
7	CMR	0	0	2	0	4	0	0	0	2	0	0	3	2	2	0	0	2	0	0	2	0	0	0	2
8	HJS	0	0	2	0	1	0	0	2	1	0	0	2	1	1	1	1	1	2	0	0	0	0	3	2
9	PBS	0	4	2	3	2	1	2	4	1	1	0	4	1	2	2	0	1	1	2	3	2	0	0	2
10	KSH	2	3	1	1	2	2	2	3	3	3	1	2	1	2	2	2	2	3	4	1	3	2	2	3
11	LJS	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
12	LKS	3	5	2	0	2	2	1	5	4	1	1	0	4	1	0	2	1	1	2	2	0	2	2	2
13	LVS	1	4	0	1	0	2	1	0	2	0	2	2	0	0	0	2	2	5	0	2	1	1	1	1
14	SMS	1	2	2	2	0	2	1	0	2	0	1	1	2	1	1	0	2	1	0	1	2	1	0	3
15	KHS	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0
16	LKT	1	0	0	0	2	0	2	2	1	1	2	0	0	3	2	2	1	1	0	2	1	1	1	1
17	EHR	3	1	2	1	1	1	1	4	0	0	1	1	3	1	3	2	2	0	0	0	1	5	1	3
18	KYH	1	4	3	2	2	2	3	2	1	3	1	2	3	2	2	2	2	2	1	3	2	3	3	2
19	CEH	0	0	2	2	0	0	0	0	0	2	3	0	1	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
20	KSJ	2	1	1	0	0	0	0	2	0	2	3	1	2	1	2	0	0	0	0	3	2	2	3	2

[0075]

[0076]

상기 표 7 내지 13에서와 같이, 스코어 3 이상으로 CD8 T 세포가 펩티드 자극에 의해 4-1BB를 발현할 경우, 항 4-1BB 항체를 이용하여 효과적으로 이들 세포를 분리할 수 있다. 각 암종에서 스코어 3 이상으로 자가암항원에 T 세포가 반응하는 비율 40-50% 수준이었으므로, 선별된 자가암항원의 에피토프들을 이용하여 T 세포치료제를 제조하는 것이 가능할 것으로 판단하였다. 선별된 펩티드들은, hTERT 펩티드: CLKELVARV (서열번호 1), PLFLELL (서열번호 2), AAVTPAA (서열번호 3); WT1 펩티드: SLGGEQVSV (서열번호 4), RMFPNAPVL (서열번호 5), CMTWNQMN (서열번호 6), VLDFAAPGA (서열번호 7); NY-ESO1 펩티드: SSSSCLQQL (서열번호 8), RLLEFYLAM (서열번호 9), GVLLKEFTV (서열번호 10), ILTIRLTAA (서열번호 11); 그리고 MAGE-A3 펩티드: LLIIVLAI (서열번호 12), KIWEELSVL (서열번호 13), LVFGIELMEV (서열번호 14), SLPTTMNYPL (서열번호 15)이다.

[0077]

실시예 3. 자가암항원 특이적 T 세포치료제의 시험제조

[0078]

에피토프 스크리닝을 통해 T 세포치료제 제조에 적합한 각 자가암항원에 대한 3-4종의 에피토프의 펩티드를 선별한 후, 이들 펩티드를 이용하여 hTERT, WT1, NY-ESO1, 및 MAGE-A3 특이적 T 세포치료제의 시험생산을 수행하였다. T 세포치료제의 생산은 자가유래 항암 T 세포의 1차 증식, 분리, 대량배양 세 단계로 구성되어 있다.

[0079]

(1) 자가암항원 특이적 CD8 T 세포의 증식

[0080]

에피토프 스크리닝을 통해 스코어 3 이상의 에피토프가 하나 이상 존재하는 것을 확인한 암 환자로부터 50 ml 혈액을 분리하였다.

[0081]

1) 환자의 혈액으로부터 PBMC 분리: 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.

[0082]

2) 분리된 PBMC를 CTL 배지(RPMI1640 medium + 4mM L-glutamine + 12.5 mM HEPES + 50 μM 2-mercaptoethanol + 3% autoplasm)에 1×10⁶ 세포/ml로 현탁하고, 에피토프 스크리닝을 통해 본 발명에서 선별된 3-4종의 펩티드들이 각각 1 μg/ml 농도가 되도록 첨가하였다. 이들 세포 현탁액을 14 ml 튜브(round tube)에 1 ml씩 분주하여

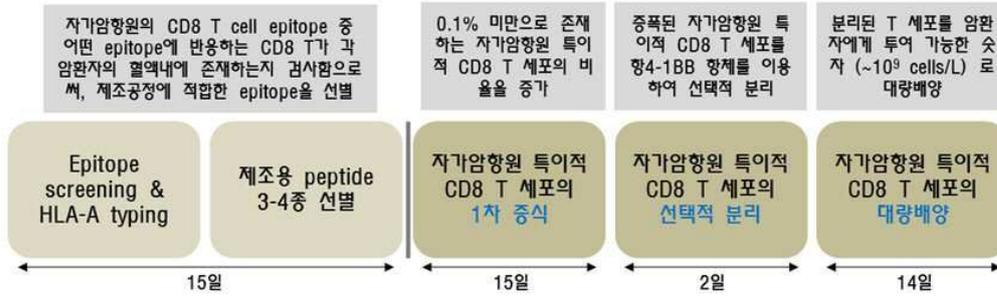
CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다.

- [0083] 3) 배양 이틀째 50 U/ml IL-2(Proleukin, Novatis)가 포함된 CTL 배지를 각 튜브에 1 ml씩 첨가하였다.
- [0084] 4) 배양 7, 9, 11, 및 13일째 1 ml 상층배지를 제거한 후, 50 U/ml IL-2가 포함된 CTL 배지를 첨가하였다.
- [0085] 5) 배양 14일째 각 튜브의 세포를 50 ml 코니컬 튜브(cornical tube)에 수거한 후, RPMI1640 배지를 첨가하여 1400rpm에서 5분간 원심분리하여 세포를 세척하였다. 이 과정을 두 번 더 반복하였다.
- [0086] 6) 세척된 세포를 2×10^6 세포/ml의 농도로 CTL 배지로 현탁한 후, 동일한 켈티드 3-4종 각각을 5 µg/ml 농도로 첨가하여 배양하였다.
- [0087] (2) 자가암항원 특이적 CD8 T 세포의 선별
- [0088] 1) 배양 24시간째, 하루 동안 재활성화시킨 PBMC를 수거하여 RPMI1640 배지로 두 번 세척한 후, 5×10^6 세포/ml의 농도로 CTL 배지를 현탁하고 50 U/ml IL-2를 첨가하였다.
- [0089] 2) 항4-1BB 항체를 50 µg/ml의 농도로 하루 동안 코팅한 6웰 또는 12웰 플레이트(culture plate)에, 이들 세포를 1 ml 씩 첨가하여 10분간 CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다.
- [0090] 3) 배양 10분 후, 플레이트에 부착되지 않은 세포를 모두 세척하여 제거한 후, 1000 U/ml IL-2가 포함된 CTL 배지 2-4 ml을 각 웰에 첨가하여 CO₂ 인큐베이터에서 이틀간 배양하였다.
- [0091] (3) 자가암항원 특이적 CD8 T 세포의 대량배양
- [0092] 1) 항4-1BB 항체로 분리하여 이틀간 배양한 세포를 모두 수거하여 RPMI1640 배지로 두 번 세척하여 계수하였다.
- [0093] 2) 정상 공여자로부터 PBMC를 분리하여 1×10^8 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.
- [0094] 3) 50 ml 코니컬 튜브에 분리된 CD8 T 세포 5×10^5 세포와 irradiated allogeneic PBMCs 1×10^8 세포를 첨가한 후, 1,000 U/ml IL-2, 40 ng/ml 항-CD3 mAb(BD Bioscience) 및 3% 자가혈장(autoplasma)이 포함된 ALyS505N 배지(CELL SCIENCE & TECHNOLOGY INST., INC. (CSTI))를 50 ml까지 첨가하였다.
- [0095] 4) 50 ml 세포현탁액을 1L 배양용 백(culture bag)에 주입한 후, CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다.
- [0096] 5) 배양 4일째, 1,000 U/ml IL-2, 3% 자가혈장이 포함된 ALyS505N 배지 50 ml을 1L 배양용 백에 추가 주입하였다.
- [0097] 6) 배양 7일째, 1,000 U/ml IL-2, 3% 자가혈장이 포함된 ALyS505N 배지 100 ml을 1L 배양용 백에 추가 주입하였다.
- [0098] 7) 배양 9일째, 1,000 U/ml IL-2, 3% 자가혈장이 포함된 ALyS505N 배지 300 ml을 1L 배양용 백에 추가 주입하였다.
- [0099] 8) 배양 11일째, 1,000 U/ml IL-2, 3% 자가혈장이 포함된 ALyS505N 배지 500 ml을 1L 배양용 백에 추가 주입하였다.
- [0100] 9) 배양 14일째, 1L 배양용 백의 모든 세포를 수거하여 주사용 생리식염수로 세 번 세척하며, 5% 알부민이 포함된 주사용 생리식염수에 세포를 현탁하여 완제품 T 세포치료제를 충전하였다.
- [0101] 상기와 같이, 임상 암 환자로 부터 본 발명의 에피토프 스크리닝을 통해 T 세포 반응을 유도할 수 있는 스코어 3 이상의 켈티드 3-4종을 선별한 후, 50 cc 혈액을 이용하여 hTERT, WT, NY-ESO1, MAGE-A3 T 세포치료제의 시험 생산을 수행하였으며, 그 결과를 도 6 내지 9에 정리하였다.

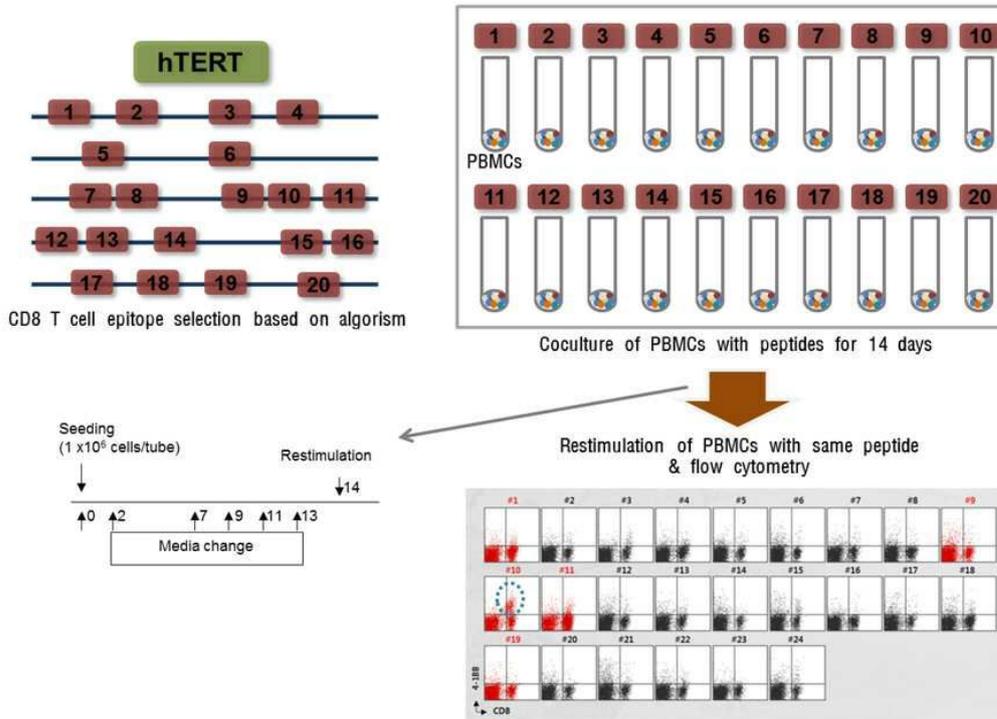
- [0102] 도 14는 hTERT T 세포 치료제의 파일럿 생산 과정을 설명하는 도면이다.
- [0103] 도 14는 HLA-A*24 allele를 가진 위암환자의 50 cc 혈액으로부터 PBMC를 분리하여 세 종류의 hTERT peptide [CLKELVARV (서열번호 1), PLFLELL (서열번호 2), AAVTPAA (서열번호 3)]를 각각 1 µg/ml 농도로 첨가한 후, 상기 실시예 3의 “(1) 자가암항원 특이적 CD8 T 세포의 증식”에 기술된 과정에 따라 배양하였다. 배양 14일째 모든 세포를 수거하여 “(2) 자가암항원 특이적 CD8 T 세포의 선별” 과정에 따라 hTERT peptide에 반응하여 증식한 T 세포를 분리/증식하였다. 분리된 T 세포는 “(3) 자가암항원 특이적 CD8 T 세포의 대량배양” 과정을 통해 암환자에게 투여 가능한 수준으로 대량배양하였으며, 최종 배양된 세포는 낮은 노화도와 작용기능 가지고 있는 특정 TCRVb type의 T 세포인 것으로 유세포 분석되었다.
- [0104] 도 15는 WT1 T 세포 치료제의 파일럿 생산 과정을 설명하는 도면이다.
- [0105] 도 15는 HLA-A*02 allele를 가진 악성신경교종환자의 50 cc 혈액으로부터 PBMC를 분리하여 네 종류의 WT1 peptide [SLGEQQVSV (서열번호 4), RMFPNAPVL (서열번호 5), CMTWNQMNL (서열번호 6), VLDFAPPGA (서열번호 7)]를 각각 1 µg/ml 농도로 첨가한 후, 상기 실시예3의 “(1) 자가암항원 특이적 CD8 T 세포의 증식”에 기술된 과정에 따라 배양하였다. 배양 14일째 모든 세포를 수거하여 “(2) 자가암항원 특이적 CD8 T 세포의 선별” 과정에 따라 WT1 peptide에 반응하여 증식한 T 세포를 분리/증식하였다. 분리된 T 세포는 “(3) 자가암항원 특이적 CD8 T 세포의 대량배양” 과정을 통해 암환자에게 투여 가능한 수준으로 대량배양하였으며, 최종 배양된 세포는 낮은 노화도와 작용기능 가지고 있는 특정 TCRVb type의 T 세포인 것으로 유세포 분석되었다.
- [0106] 도 16은 NY-ESO1 T 세포 치료제의 파일럿 생산 과정을 설명하는 도면이다.
- [0107] 도 16은 HLA-A*02 allele를 가진 난소암환자의 50 cc 혈액으로부터 PBMC를 분리하여 네 종류의 NY-ESO1 peptide [SISSCLQQL (서열번호 8), RLLEFYLAM (서열번호 9), GVLLKEFTV (서열번호 10), ILTIRLTAA (서열번호 11)]를 각각 1 µg/ml 농도로 첨가한 후, 상기 실시예 3의 “(1) 자가암항원 특이적 CD8 T 세포의 증식”에 기술된 과정에 따라 배양하였다. 배양 14일째 모든 세포를 수거하여 “(2) 자가암항원 특이적 CD8 T 세포의 선별” 과정에 따라 NY-ESO-1 peptide에 반응하여 증식한 T 세포를 분리/증식하였다. 분리된 T 세포는 “(3) 자가암항원 특이적 CD8 T 세포의 대량배양” 과정을 통해 암환자에게 투여 가능한 수준으로 대량배양하였으며, 최종 배양된 세포는 낮은 노화도와 작용기능 가지고 있는 특정 TCRVb type의 T 세포인 것으로 유세포 분석되었다.
- [0108] 도 17은 MAGE-A3 T 세포 치료제의 파일럿 생산 과정을 설명하는 도면이다.
- [0109] 도 17은 HLA-A*02 allele를 가진 육종환자의 50cc 혈액으로부터 PBMC를 분리하여 네 종류의 MAGE-A3 peptide [LLIIVLAI (서열번호 12), KIWEELSVL (서열번호 13), LVFGIELMEV (서열번호 14), SLPTTMNYPL (서열번호 15)]를 각각 1 µg/ml 농도로 첨가한 후, 상기 실시예 3의 “(1) 자가암항원 특이적 CD8 T 세포의 증식”에 기술된 과정에 따라 배양하였다. 배양 14일째 모든 세포를 수거하여 “(2) 자가암항원 특이적 CD8 T 세포의 선별” 과정에 따라 MAGE-A3 peptide에 반응하여 증식한 T 세포를 분리/증식하였다. 분리된 T 세포는 “(3) 자가암항원 특이적 CD8 T 세포의 대량배양” 과정을 통해 암환자에게 투여 가능한 수준으로 대량배양하였으며, 최종 배양된 세포는 낮은 노화도와 작용기능 가지고 있는 특정 TCRVb type의 T 세포인 것으로 유세포 분석되었다.
- [0110] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

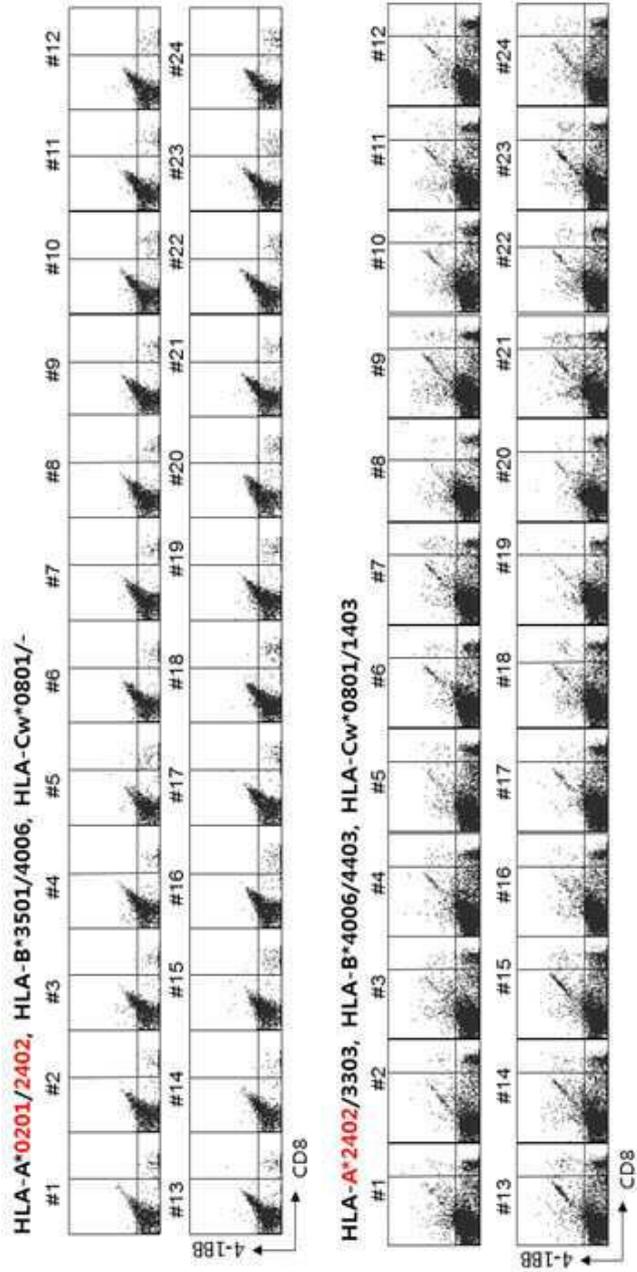
도면1



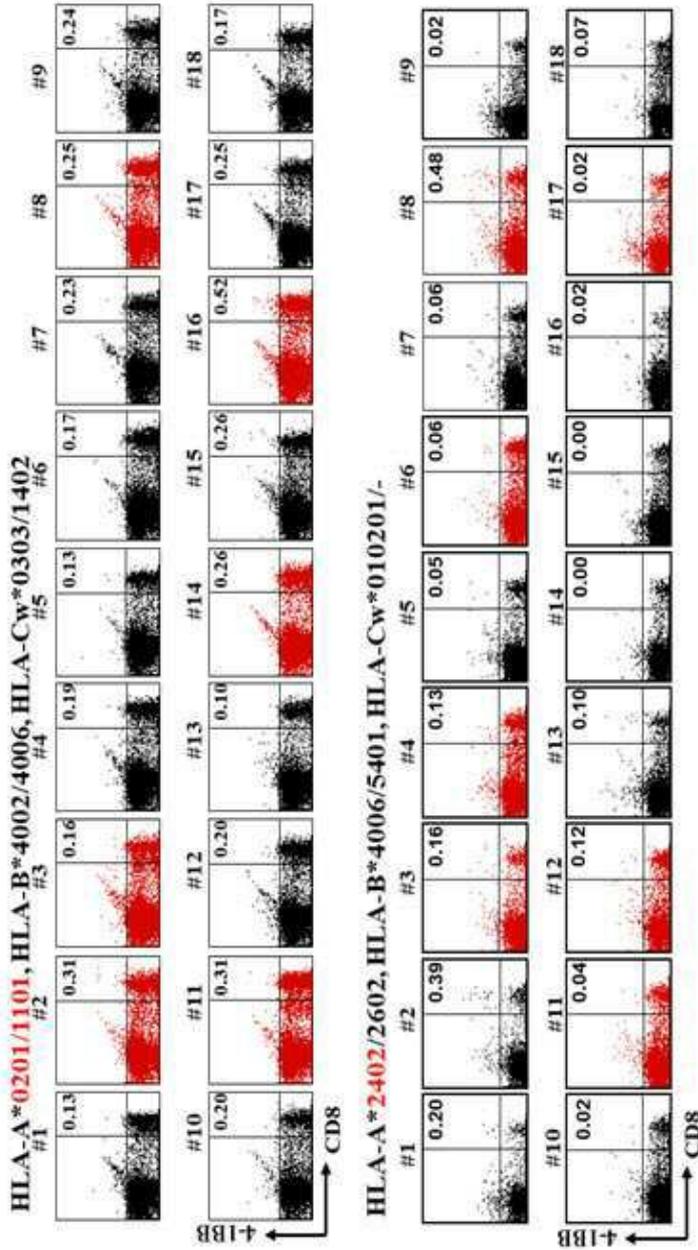
도면2



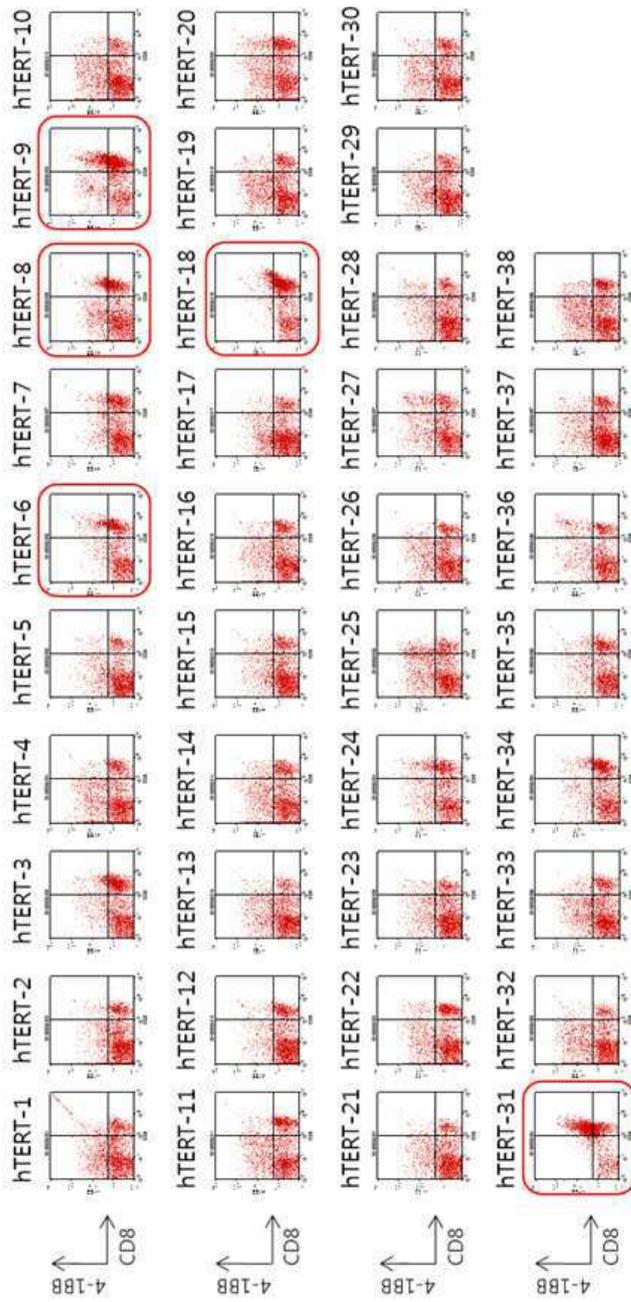
도면3



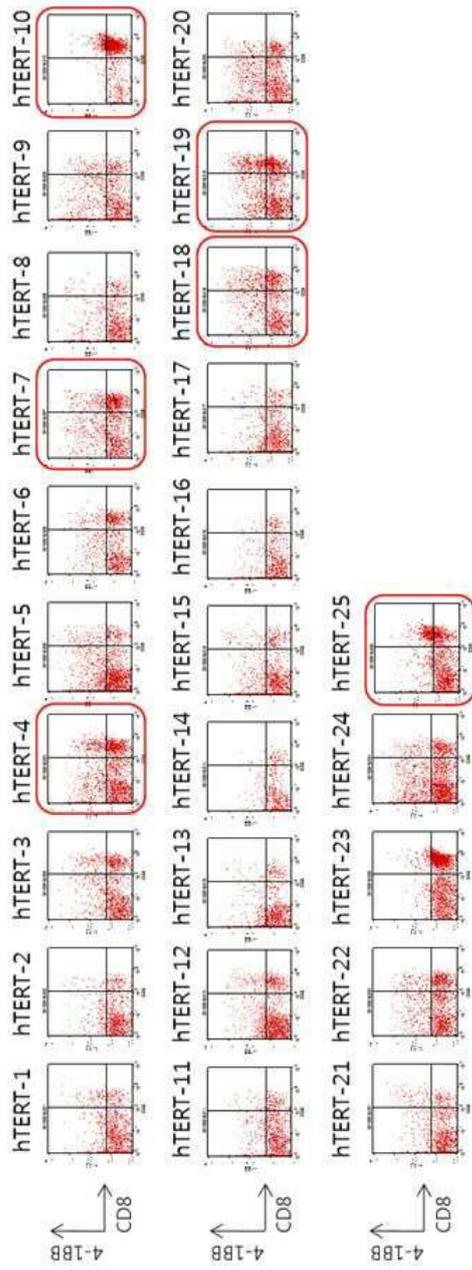
도면4



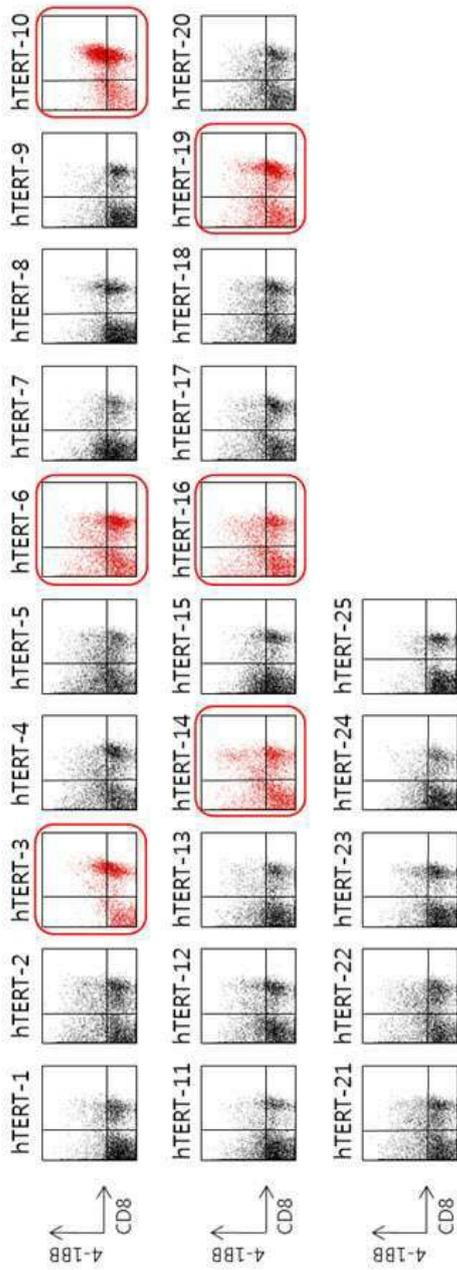
도면5



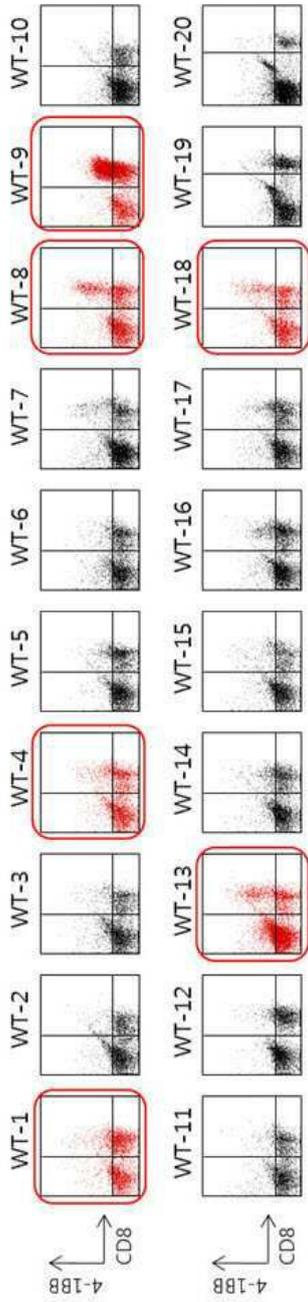
도면6



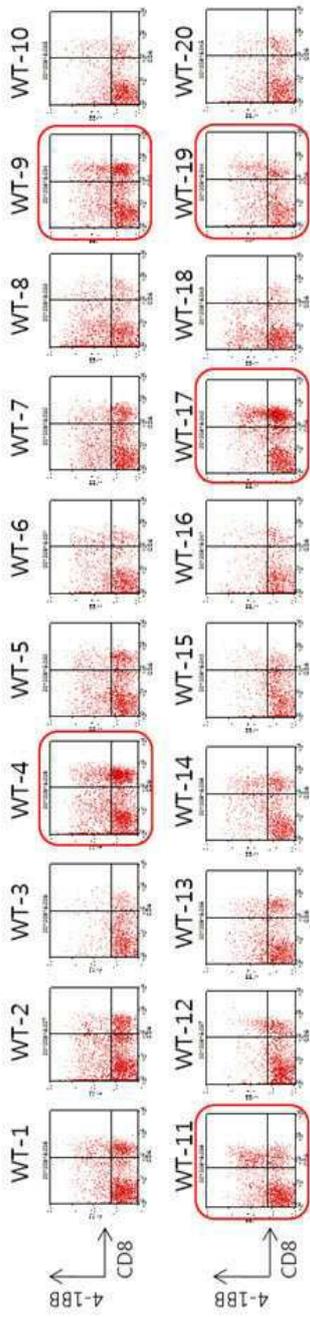
도면7



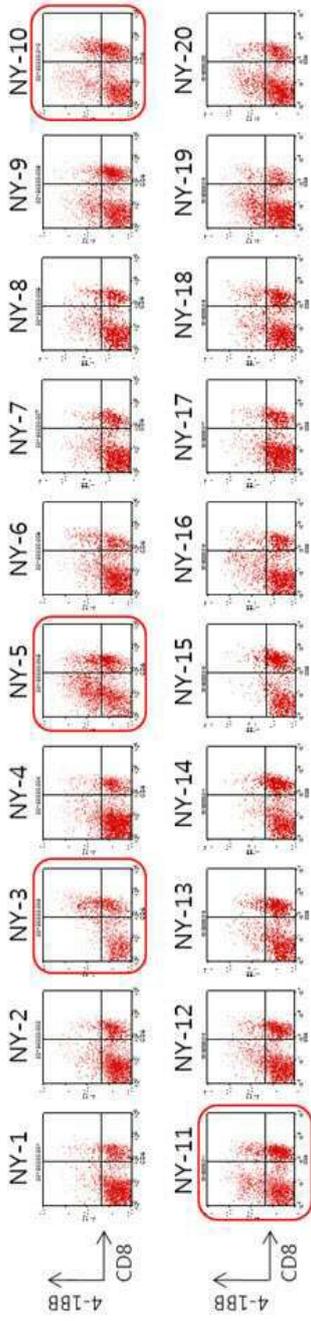
도면8



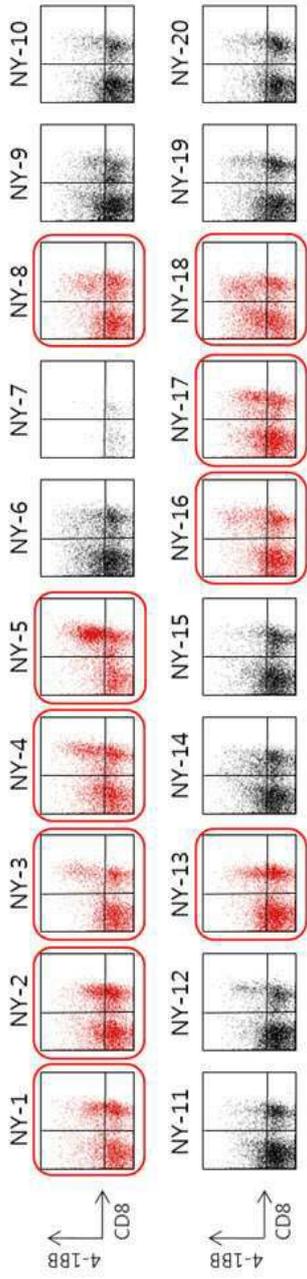
도면9



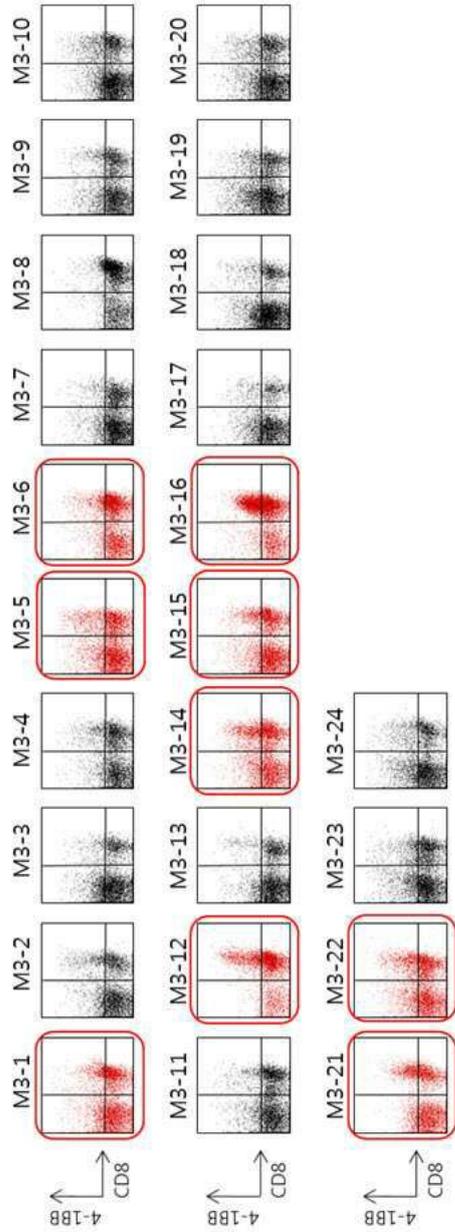
도면10



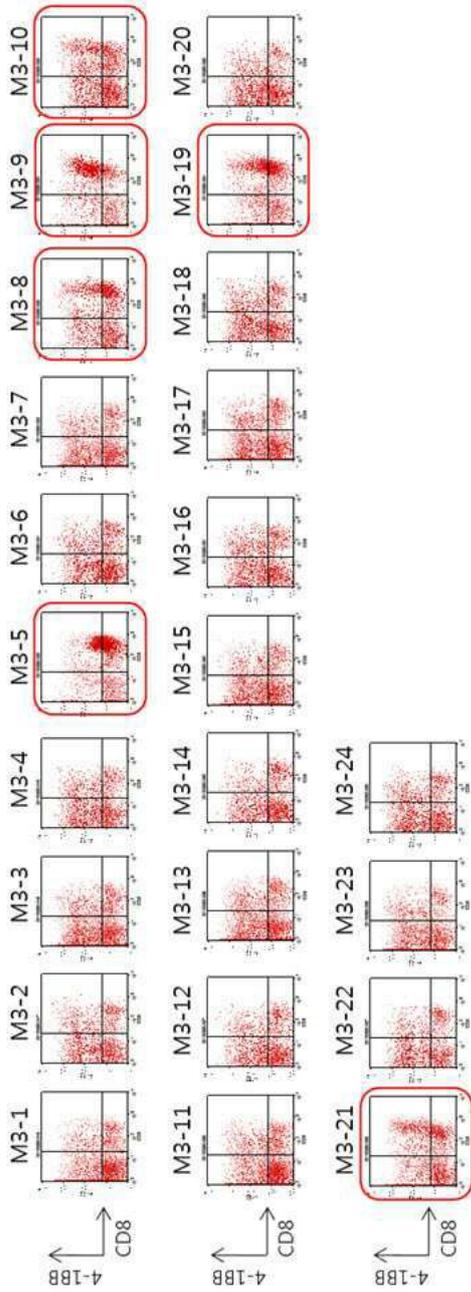
도면11



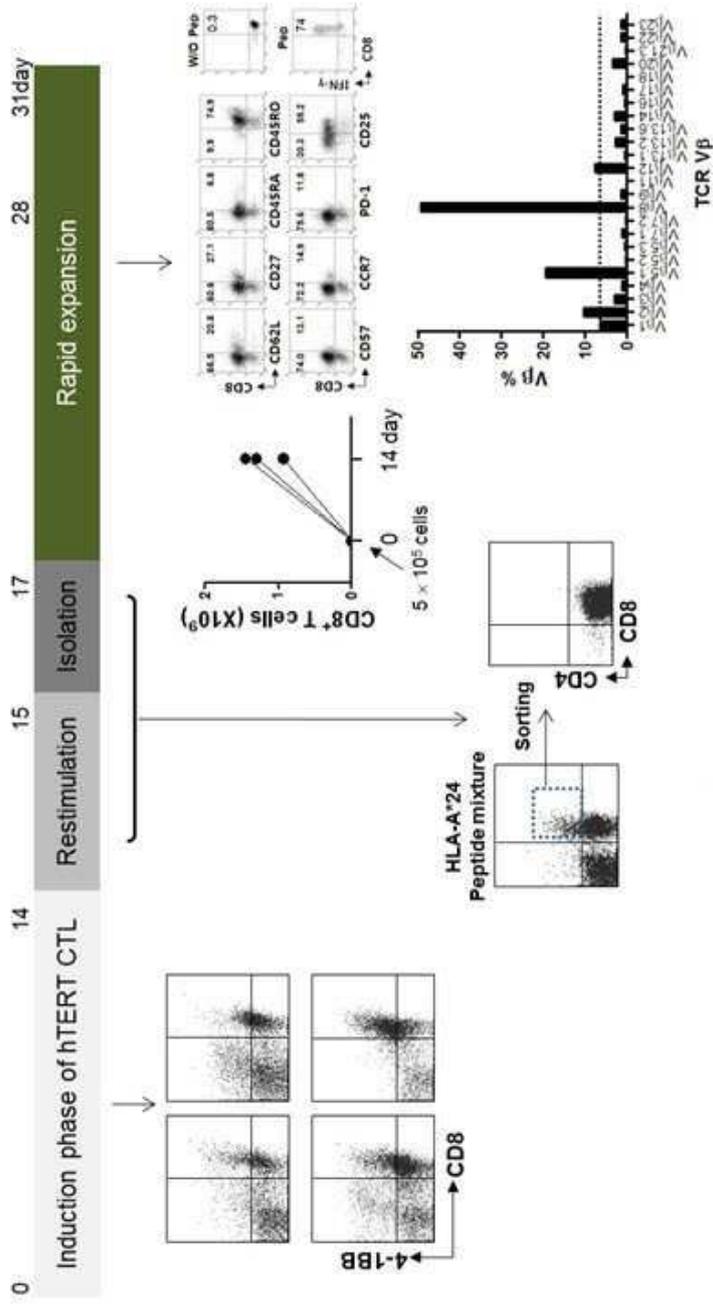
도면12



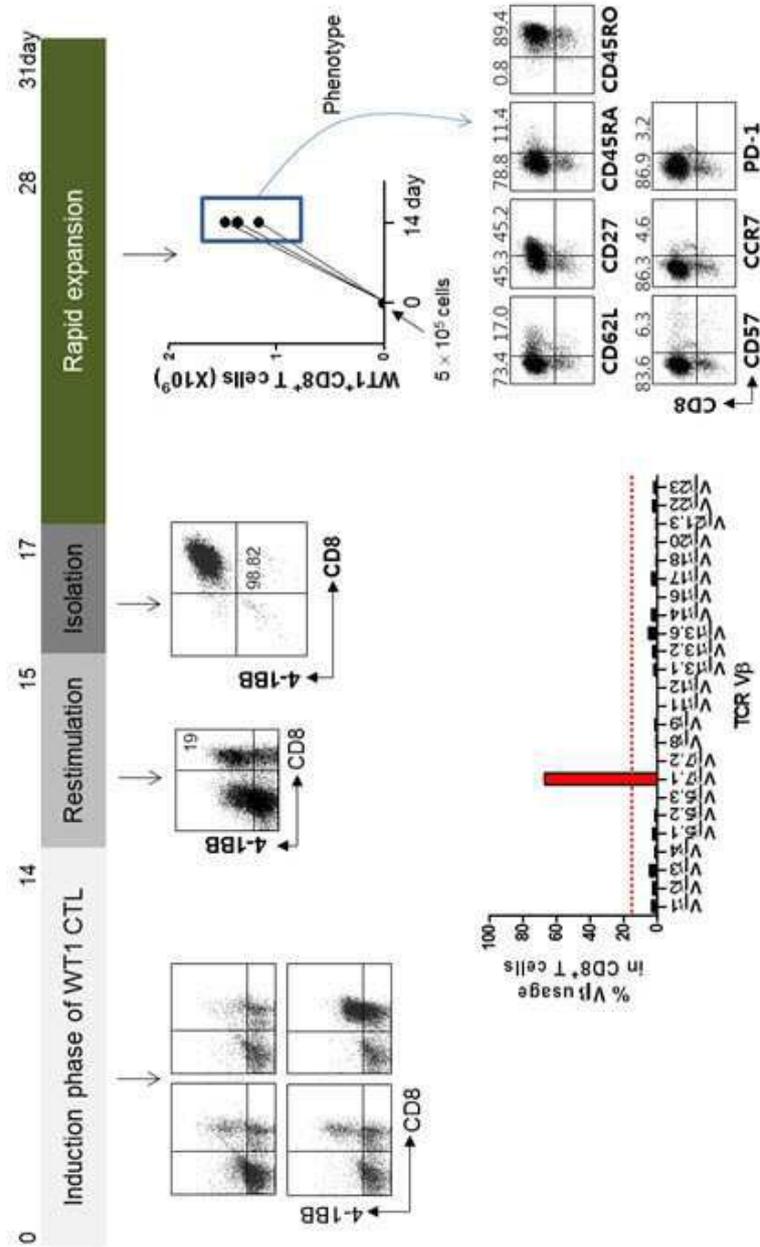
도면13



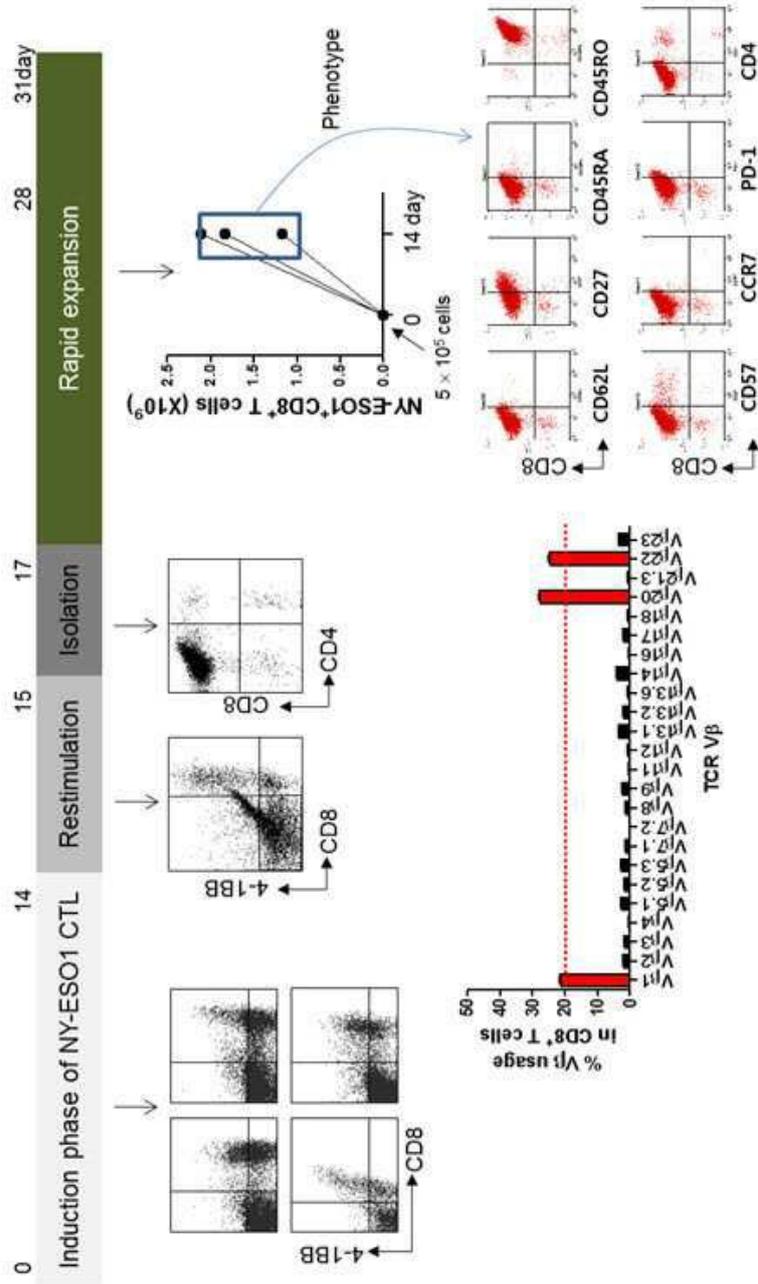
도면14



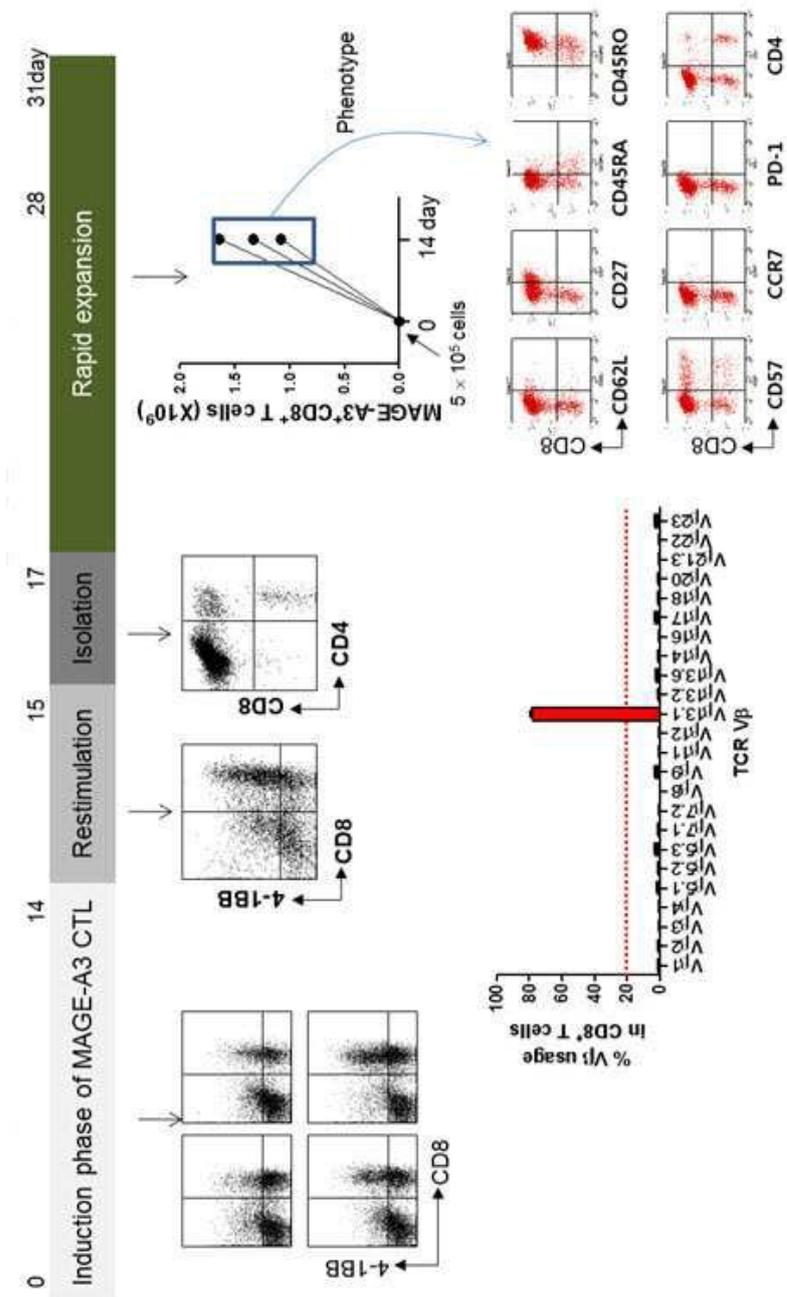
도면15



도면16



도면17



서열목록

- <110> NATIONAL CANCER CENTER
- <120> Methods for isolation and proliferation of autologous cancer antigen-specific CD8+ T cells
- <130> NP14-1064
- <160> 15
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> epitope of hTERT
 <400> 1
 Cys Leu Lys Glu Leu Val Ala Arg Val

1 5

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> epitope of hTERT

<400> 2

Pro Leu Phe Leu Glu Leu Leu

1 5

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> epitope of hTERT

<400> 3

Ala Ala Val Thr Pro Ala Ala

1 5

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> epitope of WT1

<400> 4

Ser Leu Gly Glu Gln Gln Val Ser Val

1 5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> epitope of WT1

<400> 5

Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Val Leu

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> epitope of WT1

<400> 6

Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu

1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> epitope of WT1

<400> 7

Val Leu Asp Phe Ala Pro Pro Gly Ala

1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> epitope of NY ES01

<400> 8

Ser Ile Ser Ser Cys Leu Gln Gln Leu

1 5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> epitope of NY ES01

<400> 9
 Arg Leu Leu Glu Phe Tyr Leu Ala Met

1 5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> epitope of NY ES01

<400> 10

Gly Val Leu Leu Lys Glu Phe Thr Val

1 5

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> epitope of NY ES01

<400> 11

Ile Leu Thr Ile Arg Leu Thr Ala Ala

1 5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> epitope of MAGE A3

<400> 12

Leu Leu Ile Ile Val Leu Ala Ile Ile

1 5

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> epitope of MAGE A3

<400> 13

Lys Ile Trp Glu Glu Leu Ser Val Leu

1 5

<210> 14

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> epitope of MAGE A3

<400> 14

Leu Val Phe Gly Ile Glu Leu Met Glu Val

1 5 10

<210> 15

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> epitope of MAGE A3

<400> 15

Ser Leu Pro Thr Thr Met Asn Tyr Pro Leu

1 5 10