



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년01월13일
(11) 등록번호 10-2753589
(24) 등록일자 2025년01월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/17 (2025.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) C12N 5/071 (2010.01)
(52) CPC특허분류
A61K 35/17 (2025.01)
A61K 40/11 (2025.01)
(21) 출원번호 10-2024-0108093(분할)
(22) 출원일자 2024년08월13일
심사청구일자 2024년08월13일
(65) 공개번호 10-2024-0125907
(43) 공개일자 2024년08월20일
(62) 원출원 특허 10-2021-0191265
원출원일자 2021년12월29일
심사청구일자 2021년12월29일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020170122270 A
KR1020180081532 A
KR1020170096199 A

(73) 특허권자
의료법인 명지의료재단
경기도 고양시 덕양구 화수로14번길 55 (화정동)
(72) 발명자
이왕준
서울특별시 강남구 선릉로 206, 104동 1101호(동부센트레빌)
문현중
경기도 고양시 덕양구 화중로 164, 553동 101호
임선기
경기도 고양시 일산동구 강송로 33, 101-4904호(일산와이시티)
(74) 대리인
김정현

전체 청구항 수 : 총 1 항

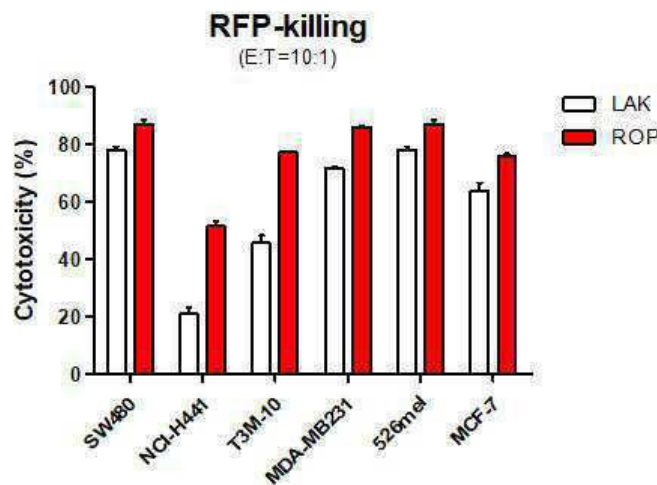
심사관 : 윤미란

(54) 발명의 명칭 K-ras 특이적 활성화 T 세포를 포함하는 흑색종의 예방 및 치료용 약제학적 조성물 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명의 K-ras 특이적 활성화 T 세포를 포함하는 흑색종(melanoma)의 예방 및 치료용 약제학적 조성물은 항원 조성물로서 K-ras 돌연변이(G12D, G12V, 및 G13D) 재조합 증첩 펩타이드를 K-ras의 아미노산 서열에서 순차적으로 30개의 아미노산을 단위로 총 12개의 에피토프(epitope, n=1 내지 12이며 단, 마지막 에피토프(n=12)는 23개 (뒷면에 계속)

대표도 - 도9



의 아미노산이다.)로 구분하되 에피토프 사이에 15개의 아미노산 서열이 중첩되도록 디자인하여 사용하므로 K-ras, K-ras 돌연변이 G12V, K-ras 돌연변이 G12D, 또는 K-ras 돌연변이 G13D가 검출되는 흑색종(melanoma)을 인식하고 사멸시키는데 보다 효과적인 장점이 있다.

따라서 본 발명의 K-ras 특이적 활성화 T 세포를 포함하는 흑색종(melanoma)의 예방 및 치료용 억제학적 조성물을 이용하면 K-ras 뿐 아니라 K-ras 돌연변이가 검출되는 흑색종(melanoma)을 효과적으로 예방하고 치료 할 수 있는 장점이 있다.

(52) CPC특허분류

A61K 40/4253 (2025.01)

A61P 35/00 (2018.01)

C12N 5/0626 (2013.01)

A61K 2239/57 (2023.05)

C12N 2501/22 (2013.01)

C12N 2501/2301 (2013.01)

C12N 2501/2304 (2013.01)

C12N 2501/25 (2013.01)

C12N 2501/998 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

K-ras 특이적 활성화 T 세포 유도용 항원 조성물;과 싸이토카인(cytokine);을 포함하는 배지에서 유도한 K-ras 특이적 활성화 T 세포를 포함하는 흑색종(melanoma)의 예방 또는 치료용 억제학적 조성물로서,

상기 K-ras 특이적 활성화 T 세포 유도용 항원 조성물은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 K-ras 돌연변이 재조합 중첩 펩타이드를 유효성분으로 포함하며;

상기 싸이토카인(cytokine)은 인터루킨-4(Interleukin-4), 과립구 대식세포 콜로니 자극인자(Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor, GM-CSF), 종양괴사인자- α (Tumor Necrosis Factor- α), 인터루킨-1 β (Interleukin-1 β) 및 프로스타글란딘 E2(Prostaglandin E2)을 포함하는 것을 특징으로 하는 흑색종(melanoma)의 예방 또는 치료용 억제학적 조성물이며,

상기 K-ras 특이적 활성화 T 세포는 상기 K-ras 특이적 활성화 T 세포 유도용 항원 조성물과 1차 싸이토카인(cytokine)을 포함하는 배지에서 말초혈액단핵세포(Peripheral Blood Mononuclear Cell, PBMC)를 배양하여 수지상 세포(dendritic cell)를 성숙시키는 동시에 K-ras 특이적 활성화 T 세포를 유도하는 제 1 단계;

상기 배양된 PBMC에 2차 싸이토카인을 첨가하고 배양하여 K-ras 특이적 활성화 T 세포를 더 유도하는 제 2 단계; 및

상기 2차 싸이토카인을 첨가하고 배양한 PBMC를 배양하여 K-ras 특이적 활성화 T 세포를 증폭시킨 후 수득하는 제 3 단계;를 포함하며,

상기 K-ras 특이적 활성화 T 세포 유도용 항원 조성물은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 K-ras 돌연변이 재조합 중첩 펩타이드를 유효성분으로 포함하며;

상기 1차 싸이토카인은 인터루킨-4(Interleukin-4) 및 과립구 대식세포 콜로니 자극인자(Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor, GM-CSF)이며;

상기 2차 싸이토카인은 종양괴사인자- α (Tumor Necrosis Factor- α), 인터루킨-1 β (Interleukin-1 β), 및 프로스타글란딘 E2(Prostaglandin E2)인 것을 특징으로 하는 K-ras 특이적 활성화 T 세포 유도용 항원 조성물을 이용한 K-ras 특이적 활성화 T 세포의 유도 방법으로 제조되는 것을 특징으로 하는 흑색종(melanoma)의 예방 또는 치료용 억제학적 조성물.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 K-ras 특이적 활성화 T 세포를 포함하는 흑색종(melanoma)의 예방 및 치료용 억제학적 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 종래의 항암 화학요법은 암의 재발 및 전이를 억제하는데 한계가 있으며 정상세포들을 사멸시키는 부작용이 있었다. 이를 극복하기 위하여 종양에 대한 면역반응을 증강시켜 암을 치료하는 다양한 면역항암치료방법들이 연구되고 있다.

[0003] 면역항암치료법은 암 환자의 면역계를 활성화시켜 암 치료효과를 높이는 치료법으로 암 특이적인 CTL(Cytotoxic T Lymphocyte)를 내인성으로 유도하거나 이를 주입하여 암세포를 사멸시키는 방법이다. 면역항암치료법 중 면역세포를 이용하는 방법으로 Lymphokine activate killer (LAK) 면역세포 치료법이 있다. 상기 LAK 면역세포 치료법은 수술, 항암요법, 방사선 치료등에 실패 했던 암 환자들에 대해 고무적인 임상결과들을 보여주었다. 그러나 상기 LAK 면역세포 치료법은 비특이적 면역 반응으로 인해 암세포 사멸 효율이 낮은 문제점이 있을 뿐 아니라 배양공정에서 인터루킨-2(IL-2) 림포카인만을 사용하므로 면역세포가 탈진(Exhaustion)되어 생체내 생존 능

력이 떨어지므로 주기적이며 반복적인 치료가 필요한 임상적 한계가 있었다.

- [0004] 상기 문제점을 해결하기 위하여 항암용 펩타이드 백신이 개발되고 있다. 상기 펩타이드 백신은 암항원 중 면역원성이 높은 부분을 선별하고 이를 펩타이드로 디자인한 후 이를 이용하여 면역세포를 활성화시킨다. 따라서 IL-2 림포카인의 사용으로 인한 면역세포의 탈진에 대한 우려가 없는 장점이 있다. 그러나 상기 펩타이드 백신은 암세포의 타겟 부위가 돌연변이를 일으키게 되면 면역회피가 일어날 수 있을 뿐 아니라 면역반응에서 CD4 T 세포의 도움을 받지 못하여 면역 반응성이 낮을 수 있고 MHC class I 분자에 올려지는 펩타이드로 디자인되었기 때문에 인간백혈구 항원(Human leukocyte antigen, HLA) 타입에 제한이 있는 단점이 있었다.
- [0005] 상기 문제를 해소하기 위해 항원전체를 포함하고 면역원성이 높은 부분의 펩타이드를 중첩하여 설계하는 중첩 펩타이드(overlapping peptide, OLP) 백신이 개발되고 있다. 상기 OLP 백신은 종래의 펩타이드 백신과 달리 항원전체를 포함하므로 CD4 T세포 도움을 받아 면역 반응성이 높을 뿐 아니라 면역 반응기간도 더 오래 지속되며 HLA 타입에 대한 제한이 없는 장점이 있다. 그러나 상기 OLP 백신은 제조비용이 높고 면역조절이 상대적으로 어렵다는 문제점이 있었다.
- [0006] 면역세포 치료법에 있어서 백신을 이용하여 항원 특이적 T 세포를 제조하는 방법 또한 중요한 요소이다. 일반적으로 항원 특이적 T 세포를 제조하기 위해서는 혈액으로부터 단핵구(monocyte)를 분리한 후 성숙(maturation)과정을 통해 모수지상 세포(mo dendritic cell)를 수득한 후 항원을 별도로 처리한 환경에서 상기 수지상 세포와 T 세포를 공배양(co-culture)하므로 항원 특이적 T 세포(Ag-specific T cell)를 제조하게 된다. 상기 moDC를 이용한 방법은 항원 특이적 T 세포유도 방법은 DC 세포의 성숙공정과 T 세포 배양 공정을 나누어 진행하게 되므로 추가적인 시간, 비용, 혈액이 요구되는 단점이 있었다.
- [0007] 여러 암 항원 중 K-ras 돌연변이는 고형암의 약 20%에서 발견되고 있는 발암유발변이로, 주로 췌장 및 대장의 선암, 폐암 등에서 발견되고 있다. K-ras 돌연변이 유전자에 의존성을 보이는 종양을 타겟으로 하는 치료법은 K-ras 돌연변이 유전자에 의해 발현되는 K-ras 돌연변이체들에 개별적으로 결합하는 항체를 만들기 어려운 이유로 K-ras의 기능을 억제하거나 비활성화 하는 간접적인 치료법에 국한되어 있어 효과가 제한적이었다.
- [0008] 따라서 K-ras의 가장 빈번하게 나타나는 여러 돌연변이 부위를 포함하되 상기 문제점을 해결한 항원을 제시하여 K-ras 돌연변이에 결합하여 직접적인 면역반응을 일으킬 수 있는 내인성 면역세포를 선택적으로 증폭하고 이를 타겟 암 치료제로 개발하게 되면 효율적으로 암세포를 표적하고 이를 사멸 할 수 있으므로 암 치료 효과가 극대화되고 항암효과 지속력이 높은 효율적인 치료제로서 사용 가능할 것으로 기대된다.
- [0009] 본 명세서에서 언급된 특허문헌 및 참고문헌은 각각의 문헌이 참조에 의해 개별적이고 명확하게 특정된 것과 동일한 정도로 본 명세서에 참조로 삽입된다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0010] (특허문헌 0001) 한국공개특허 10-2018-0010229
- (특허문헌 0002) 한국공개특허 10-2020-0141994

비특허문헌

- [0011] (비특허문헌 0001) Vaccines. 2014 Jul 2;2(3):515-36.
- (비특허문헌 0002) Adv Protein Chem Struct Biol. 2015;99:1-14.
- (비특허문헌 0003) Nat Rev Cancer. 2008 May;8(5):351-60).

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0012] 본 발명의 목적은 K-ras 전체 아미노산 서열 및 돌연변이를 포함하도록 디자인되며 제조합 기술을 이용하여 제

조되어 경제적 효율성이 뛰어난 K-ras 특이적 활성화 T 세포 유도용 항원으로 유도된 K-ras 특이적 활성화 T 세포를 포함하는 흑색종(melanoma)의 예방 및 치료용 약제학적 조성물 및 이의 제조방법을 제공하는데 있다.

[0013] 본 발명의 다른 목적 및 기술적 특징은 이하의 발명의 상세한 설명, 청구의 범위 및 도면에 의해 보다 구체적으로 제시된다.

과제의 해결 수단

[0014] 본 발명은 K-ras 특이적 활성화 T 세포 유도용 항원 조성물과 싸이토카인(cytokine)을 이용하여 유도한 K-ras 특이적 활성화 T 세포를 포함하는 흑색종(melanoma)의 예방 및 치료용 약제학적 조성물을 제공하는 것을 특징으로 하며 상기 흑색종(melanoma)의 암세포는 K-ras, K-ras 돌연변이 G12V, K-ras 돌연변이 G12D, 또는 K-ras 돌연변이 G13D가 검출되는 것을 특징으로 한다.

[0015] 상기 K-ras 특이적 활성화 T 세포 유도용 항원 조성물은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 K-ras 돌연변이 재조합 중첩 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하며 상기 K-ras 돌연변이 재조합 중첩 펩타이드는 서열번호 2로 이루어진 K-ras의 아미노산 서열에서 어느 하나의 아미노산으로부터 순차적으로 나열된 아미노산 서열을 단위로 하는 총 12 종류의 에피토프(epitope(n=1, 2, 3...10, 11, 12); 여기서 n은 에피토프의 순번을 의미하며 에피토프(n=1 내지 11)는 30개의 아미노산 서열을 포함하고 마지막 에피토프(n=12)는 23개의 아미노산 서열을 포함한다.)를 포함하되 에피토프(n=1)를 제외한 에피토프(n=2, 3,...12)는 N-terminal 방향 15개의 아미노산 서열이 직전 순번의 에피토프(n-1)의 C-terminal 방향 15개의 아미노산 서열과 서로 중첩되도록 디자인된 것을 특징으로 한다.

[0016] 상기 K-ras 돌연변이 재조합 중첩 펩타이드는 상기 에피토프(n=1, 2, 3...10, 11, 12)가 순번에 따라 위치하며 상기 에피토프 사이는 LRMK-링커로 연결되는 것을 특징으로 한다.

[0017] 상기 에피토프(n=1)는 K-ras 돌연변이 G12V를 포함하며; 상기 에피토프(n=1)의 N-terminal에는 K-ras 돌연변이 G12D를 포함하는 에피토프(n=1)가 LRMK-링커로 더 연결되고; 상기 에피토프(n=12)의 C-terminal에는 K-ras 돌연변이 G13D를 포함하는 에피토프(n=1)가 LRMK-링커로 더 연결되며; 상기 K-ras 돌연변이 G13D를 포함하는 에피토프(n=1)의 C-terminal에는 K-ras 돌연변이가 포함되지 않은 에피토프(n=1)가 LRMK-링커로 더 연결되는 것을 특징으로 한다.

[0018] 상기 K-ras 특이적 활성화 T 세포는 상기 K-ras 특이적 활성화 T 세포 유도용 항원 조성물과 1차 싸이토카인(cytokine)을 포함하는 배지에서 말초혈액단핵세포(Peripheral Blood Mononuclear Cell, PBMC)를 배양하여 수지상 세포(dendritic cell)를 성숙시키는 동시에 K-ras 특이적 활성화 T 세포를 유도하는 제 1 단계; 상기 배양된 PBMC에 2차 싸이토카인을 첨가하고 배양하여 K-ras 특이적 활성화 T 세포를 더 유도하는 제 2 단계; 및 상기 2차 싸이토카인을 첨가하고 배양한 PBMC를 배양하여 K-ras 특이적 활성화 T 세포를 증폭시킨 후 수득하는 제 3 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 K-ras 특이적 활성화 T 세포 유도용 항원 조성물을 이용한 K-ras 특이적 활성화 T 세포의 유도 방법으로 제조되는 것을 특징으로 한다.

[0019] 상기 1차 싸이토카인은 인터루킨-4(Interleukin-4) 및 과립구 대식세포 콜로니 자극인자(Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor, GM-CSF)이며; 상기 2차 싸이토카인은 종양괴사인자- α (Tumor Necrosis Factor- α), 인터루킨- 1β (Interleukin- 1β), 및 프로스타글란딘 E2(Prostaglandin E2)인 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

[0020] 본 발명의 K-ras 특이적 활성화 T 세포를 포함하는 흑색종(melanoma)의 예방 및 치료용 약제학적 조성물은 항원 조성물로서 K-ras 돌연변이(G12D, G12V, 및 G13D) 재조합 중첩 펩타이드를 K-ras의 아미노산 서열에서 순차적으로 30개의 아미노산을 단위로 총 12개의 에피토프(epitope, n=1 내지 12이며 단, 마지막 에피토프(n=12)는 23개의 아미노산이다.)로 구분하되 에피토프 사이에 15개의 아미노산 서열이 중첩되도록 디자인하여 사용하므로 K-ras, K-ras 돌연변이 G12V, K-ras 돌연변이 G12D, 또는 K-ras 돌연변이 G13D가 검출되는 흑색종(melanoma)을 인식하고 사멸시키는데 보다 효과적인 장점이 있다.

[0021] 따라서 본 발명의 K-ras 특이적 활성화 T 세포를 포함하는 흑색종(melanoma)의 예방 및 치료용 약제학적 조성물을 이용하면 K-ras 뿐 아니라 K-ras 돌연변이가 검출되는 흑색종(melanoma)을 효과적으로 예방하고 치료 할 수 있는 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

- [0022] 도 1은 본 발명의 K-ras(M)-ROP의 아미노산 서열 구조를 보여준다.
- 도 2는 본 발명의 K-ras(M)-ROP에 대한 PBMC의 반응성을 분석한 결과를 보여준다.
- 도 3은 본 발명의 K-ras(M)-ROP 농도에 따른 LP-1 PBMC의 특이적 CD3+ T 세포 비율을 분석한 결과를 보여준다.
- 도 4는 본 발명의 K-ras(M)-ROP, K-ras₁₋₂₄Wild-type, 및 K-ras₁₋₂₄돌연변이에 대한 LP-1 PBMC의 항원 특이적 CD3+ T 세포 비율을 분석한 결과를 보여준다.
- 도 5는 본 발명의 Fast-IVS 공정과 No-Cytokine 공정을 비교한 결과를 보여준다.
- 도 6은 본 발명의 ROP-T 세포에 대한 K-ras 돌연변이 에피토프 스크리닝 결과를 보여준다.
- 도 7은 본 발명의 HLA-DQ blocking 에세이 결과를 보여준다.
- 도 8은 본 발명의 조건별 IFN- γ 를 분비(IFN- γ +)하는 CD3+ T 세포의 비율을 보여준다.
- 도 9는 본 발명의 ROP-T 세포와 LAK-T 세포가 암세포를 사멸하는 정도를 보여준다.
- 도 10는 본 발명의 ROP-T 세포와 LAK-T 세포가 대장암 환자로부터 수득한 대장암세포(K-ras-G12D)의 성장을 억제하는 정도를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0023] 본 발명은 K-ras 특이적 활성화 T 세포 유도용 항원 조성물과 싸이토카인(cytokine)을 이용하여 유도한 K-ras 특이적 활성화 T 세포를 포함하는 흑색종(melanoma)의 예방 및 치료용 약제학적 조성물을 제공한다. 본 발명의 "예방"이란 본 발명의 흑색종(melanoma)의 예방 및 치료용 약제학적 조성물 투여에 의해 암이 억제되거나 지연되는 모든 행위를 의미하며, 본 발명의 "치료"란 흑색종(melanoma)의 예방 및 치료용 약제학적 조성물 투여에 의해 암의 증세가 호전되거나 이렇게 변경하는 모든 행위를 의미한다.
- [0024] 본 발명의 흑색종(melanoma)은 암세포에서 K-ras, K-ras 돌연변이 G12V, K-ras 돌연변이 G12D, 또는 K-ras 돌연변이 G13D가 검출되는 것을 특징으로 한다. 상기 K-ras의 유전자인 KRAS는 대표적인 원종양유전자(proto-oncogene)로서 척추동물에서 세포의 성장, 분화에 관여하며 점돌연변이(point mutation), 염색체전위(chromosomal translocation), 유전자 증폭(gene amplification)등에 의해 종양유전자(oncogene)로 바뀌는 경우 K-ras의 활성을 비정상적으로 증가시켜 암을 유발한다. 따라서 본 발명의 흑색종(melanoma) 암세포에서 K-ras, K-ras 돌연변이 G12V, K-ras 돌연변이 G12D, 또는 K-ras 돌연변이 G13D가 검출된다는 것은 KRAS가 종양유전자로서 발현되어 K-ras의 활성이 비정상적으로 증가된 상태를 의미한다.
- [0025] 상기 K-ras 돌연변이 G12V, G12D, G13D는 흑색종, 폐선암, 췌장선암, 결장선암, 결장직장선암 및 직장선암에서 발견되는 돌연변이로서 GTPase-activating proteins (GAPs)에 의한 GTP hydrolysis가 원활하게 일어나지 못하게 하여 GTP-bound RAS protein의 cellular level을 증가시키고 이로 인하여 하위 신호전달체계를 비정상적으로 활성화시키므로 암세포의 증식을 유도하는 것으로 알려져 있다.
- [0026] 본 발명의 K-ras 특이적 활성화 T 세포를 포함하는 흑색종(melanoma)의 예방 및 치료용 약제학적 조성물은 K-ras 특이적 활성화 T 세포 유도용 항원 조성물 및 싸이토카인(cytokine)을 이용하여 유도한 K-ras 특이적 활성화 T 세포를 포함하므로 K-ras, K-ras 돌연변이 G12V, K-ras 돌연변이 G12D, 또는 K-ras 돌연변이 G13D가 검출되는 폐암, 대장암, 유방암, 흑색종 등의 암 치료에 사용 가능하며 바람직하게는 K-ras, K-ras 돌연변이 G12V, K-ras 돌연변이 G12D, 또는 K-ras 돌연변이 G13D가 검출되는 흑색종(melanoma)의 치료에 사용 가능하다.
- [0027] 본 발명에 기재된 "조성물"은 활성 성분으로서 본 발명에 따른 K-ras 특이적 활성화 T 세포와 함께 천연 또는 인공의 담체, 라벨 또는 탐지제와 같은 불활성 성분 또는 애주버트, 희석제, 결합제, 안정화제, 완충제, 염, 친지방성 용매, 보존제와 같은 활성 성분과의 조합을 의미하며, 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함한다.
- [0028] 상기 담체는 약학적 부형제 및 부가적인 단백질, 펩티드, 아미노산, 지질, 및 탄수화물 (예를 들어, 단당류; 이당류; 삼당류; 사당류; 올리고당류; 알디톨, 알도산, 에스테르화된 설탕과 같은 설탕의 유도체, 폴리사카라이드, 또는 당 중합체 등)을 단독으로 또는 조합하여 포함할 수 있으며, 1 내지 99.99 중량% 또는 부피%로 포함할 수 있다.

- [0029] 단백질 부형제는 인간 혈청 알부민, 재조합 인간 알부민, 젤라틴, 카제인 등을 포함할 수 있으며 이에 제한되지 않는다.
- [0030] 완충 역할을 할 수 있는 대표적인 아미노산 성분으로는 알라닌, 알기닌, 글리신, 베타인, 히스티딘, 글루탐산, 아스파르트산, 시스테인, 라이신, 루신, 아이소루신, 발린, 메티오닌, 페닐알라닌, 아스파탐 등을 포함할 수 있으며 이에 제한되지 않는다.
- [0031] 탄수화물 부형제는 프락토스, 말토스, 갈락토스, 글루코스, D-만노스, 솔보스와 같은 단당류; 락토스, 수크로스, 트레할로스, 셀로비오스와 같은 이당류, 라피노스, 말토덱스트린, 텍스트란, 전분과 같은 다당류, 및 만니톨, 자일리톨, 말티톨, 락티톨, 소르비톨, 및 마이오이노시톨과 같은 알디톨 등을 포함할 수 있으며 이에 제한되지 않는다.
- [0032] 본 발명의 K-ras 특이적 활성화 T 세포를 포함하는 흑색종(melanoma)의 예방 및 치료용 약제학적 조성물은 당업자에 의해 공지된 방법으로 제제화할 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물은 필요에 따라서 물 또는 그 외의 약학적으로 허용되는 액상의 무균성 용액, 또는 현탁액제의 주사제의 형태로 비경구적으로 사용할 수 있으며 약학적으로 허용되는 담체 또는 매체, 구체적으로는, 멸균수나 생리 식염수, 식물유, 유화제, 현탁제, 계면활성제, 안정제, 부형제, 비히클(vehicle), 방부제, 결합제 등과 적당 조합하여, 일반적으로 인정된 제약 실시예에 요구되는 단위 용량 형태로 혼화함으로써 제제화 할 수 있다. 상기 제제화에 있어서 유효성분량은 지시받은 범위의 적당한 용량을 얻을 수 있도록 하는 것을 의미한다.
- [0033] 본 발명의 K-ras 특이적 활성화 T 세포를 포함하는 흑색종(melanoma)의 예방 및 치료용 약제학적 조성물을 주사를 위한 무균 조성물로서 제제화 하는 경우 주사용 증류수와 같은 부형액을 이용해 통상의 제제 실시예에 따라 처방할 수 있다. 주사용의 수용액으로서 생리 식염수, 포도당 및 그 외의 보조약을 포함한 등장용액 예를 들어, D-소르비톨, D-만노스, D-만니톨, 염화 나트륨을 사용할 수 있으며 적당한 용해 보조제 예를 들어, 에탄올류인 폴리 알코올, 프로필렌 글리콜, 및 폴리에틸렌 글리콜과 비이온성 계면활성제류인 폴리소르베이트 80(TM), 및 HCO-50을 병용하여 사용 할 수 있다. 또한 유성액으로서 참기름, 콩기름을 사용 할 수 있으며 용해 보조제로서 안식향산벤질, 벤질 알코올과 병용하여 사용 할 수 있다.
- [0034] 상기 주사제형의 예로서는 정맥내 주사제형, 동맥내 주사제형, 선택적 동맥내 주사제형, 근육내 주사제형, 복강내 주사제형, 피하주사제형, 뇌실내 주사제형, 뇌내 주사제형, 골수액강내 주사제형이 있으며 바람직하게는 상기 주사제형은 정맥내 주사제형이다.
- [0035] 본 발명의 K-ras 특이적 활성화 T 세포를 포함하는 흑색종(melanoma)의 예방 및 치료용 약제학적 조성물은 약제학적 유효량의 K-ras 특이적 활성화 T 세포를 포함한다. 상기 유효량의 결정은 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 본 명세서에 개시된 내용을 기반으로 용이하게 결정될 수 있다.
- [0036] 일반적으로 상기 약제학적 유효량은 유효성분을 낮은 농도로 1차 투여한 후, 대상체에서 부작용이 없으면서도 요망되는 효과 예를 들어, 암과 관련된 증상이 감소되거나 제거되는 효과를 얻을 때까지 점진적으로 증량시키는 방법으로 결정된다. 본 발명의 흑색종(melanoma)의 예방 및 치료용 약제학적 조성물의 적절한 투여량이나 투여 간격을 결정하는 방법은 Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, Goodman et al., eds., 11th Edition, McGraw-Hill 2005, 및 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th and 21st Editions, Gennaro and University of the Sciences in Philadelphia, Eds., Lippencott Williams & Wilkins (2003 and 2005)에 상세히 설명되어 있다.
- [0037] 본 발명의 흑색종(melanoma)의 예방 및 치료용 약제학적 조성물의 투여 방법은 암의 종류, 환자의 나이, 체중, 성별, 의학적 상태, 질환의 중증도, 투여 경로, 및 별도로 투여되는 약물과 같은 다양한 인자를 고려하여 결정될 수 있다. 본 발명의 흑색종(melanoma)의 예방 및 치료용 약제학적 조성물이 환자에 투여되는 양은 투여 방법, 환자의 건강 상태, 체중, 의사의 처방과 같은 많은 인자에 의하여 결정될 수 있으며, 이는 당해 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자의 지식 범위 내에 있다.
- [0038] 본 발명의 흑색종(melanoma)의 예방 및 치료용 약제학적 조성물은 약 1×10^6 cells/ml 이상, 약 2×10^6 cells/ml 이상, 약 3×10^6 cells/ml 이상, 약 4×10^6 cells/ml 이상, 약 5×10^6 cells/ml 이상, 약 6×10^6 cells/ml 이상, 약 7×10^6 cells/ml 이상, 약 8×10^6 cells/ml 이상, 약 9×10^6 cells/ml 이상, 약 1×10^7 cells/ml 이상, 약 2×10^7 cells/ml 이상, 약 3×10^7 cells/ml 이상, 약 4×10^7 cells/ml 이상, 약 5×10^7 cells/ml 이상, 약 6×10^7 cells/ml 이상, 약

7×10^7 cells/ml 이상, 약 8×10^7 cells/ml 이상, 약 9×10^7 cells/ml 이상, 약 1×10^8 cells/ml 이상, 약 2×10^8 cells/ml 이상, 약 3×10^8 cells/ml 이상, 약 4×10^8 cells/ml 이상, 약 5×10^8 cells/ml 이상, 약 6×10^8 cells/ml 이상, 약 7×10^8 cells/ml 이상, 약 8×10^8 cells/ml 이상, 또는 약 9×10^8 cells/ml 이상의 K-ras 특이적 활성화 T 세포를 포함하나, 통상의 기술자는 동일한 효과를 얻기 위하여 변형 가능한 범위 내에서 조성물 내의 K-ras 특이적 활성화 T 세포의 농도를 조절할 수 있을 것이다.

[0039] 상기 “약”은 당해 기술 분야에서 통상적으로 관용되는 범위, 예를 들어, 평균 표준 편차 범위 내로 이해될 수 있으며 언급된 값의 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, 0.1%, 0.05%, 또는 0.01% 이내로 이해될 수 있다.

[0040] 또한, 인산염 완충액, 및 초산나트륨 완충액과 같은 완충제, 염산 프로카인과 같은 무통화제, 벤질 알코올, 또는 페놀과 같은 안정제, 및 산화 방지제와 더 배합할 수 있다. 상기 조제된 주사액은 통상, 적당한 앰플에 충전시킨다. 현탁액 및 유탁액은, 담체로서, 천연 검, 한천, 알긴산 나트륨, 펙틴, 메틸셀룰로스, 카복시메틸셀룰로스, 또는 폴리비닐알코올을 함유할 수 있다. 근육 내 주사를 위한 현탁액 또는 용액은 활성 화합물과 함께, 약학적으로 허용되는 담체 예를 들어, 멸균수, 올리브 오일, 에틸 올레이트, 글리콜류 및 적합한 양의 리도카인 염산염을 함유할 수 있다.

[0041] 본 발명의 흑색종(melanoma)의 예방 및 치료용 약제학적 조성물은 정맥 주사 (bolus injection) 또는 연속주입 (continuous infusion)으로 환자에 투여될 수 있다. 본 발명의 흑색종(melanoma)의 예방 및 치료용 약제학적 조성물은 1시간 이하, 1시간 이상, 2시간 이상, 3시간 이상, 4시간 이상, 8시간 이상, 12시간 이상, 1일 이상, 2일 이상, 3일 이상, 4일 이상, 5일 이상, 6일 이상, 7일 이상, 2주 이상, 3주 이상, 4주 이상, 1개월 이상, 3개월 이상, 6개월 이상에 적어도 1회, 적어도 2회, 적어도 3회, 적어도 4회, 또는 적어도 5회에 걸쳐, 연속적으로, 또는 일정 시간 간격으로, 또는 임상적 판단에 의하여 결정된 시간 간격을 두고 투여될 수 있다.

[0042] 주사제는 앰플형으로, 또는 복수회 투여 용기의 단위 용량형으로 제형화 될 수 있다. 그러나 통상의 기술자는 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여량은 환자의 나이, 체중, 키, 성별, 일반적 의학적 상태 및 기존 치료 이력과 같은 다양한 인자들에 따라 변경될 수 있음을 이해할 것이다.

[0043] 본 발명은 상기 K-ras 특이적 활성화 T 세포는 K-ras 특이적 활성화 T 세포 유도용 항원 조성물과 1차 사이토카인(cytokine)을 포함하는 배지에서 말초혈액단핵세포(Peripheral Blood Mononuclear Cell, PBMC)를 배양하여 수지상 세포(dendritic cell)를 성숙시키는 동시에 K-ras 특이적 활성화 T 세포를 유도하는 제 1 단계; 상기 배양된 PBMC에 2차 사이토카인을 첨가하고 배양하여 K-ras 특이적 활성화 T 세포를 더 유도하는 제 2 단계; 및 상기 2차 사이토카인을 첨가하고 배양한 PBMC를 배양하여 K-ras 특이적 활성화 T 세포를 증폭시킨 후 수득하는 제 3 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 K-ras 특이적 활성화 T 세포 유도용 항원 조성물을 이용한 K-ras 특이적 활성화 T 세포의 유도 방법으로 제조되는 것을 특징으로 한다.

[0044] 본 발명의 K-ras 특이적 활성화 T 세포의 유도 방법은 Fast-IVS(in vitro stimulation)로서 종래의 IVS와 구분된다. 상기 IVS는 혈액에서 분리한 단핵구(monocyte)로부터 분화와 성숙(maturation) 과정을 통해 단핵구 유도 수지상 세포(monocyte-derived dendritic cell, moDC)를 수득한 후 본 발명의 K-ras 특이적 활성화 T 세포 유도용 항원 조성물을 처리한 환경에서 T 세포와 공배양(co-culture)하는 방법을 의미한다. 이에 반하여 본 발명의 Fast-IVS는 PBMC 내의 DC세포에 대하여 성숙과정과 항원(K-ras 특이적 활성화 T 세포 유도용 항원 조성물)처리를 동시에 수행하는 차이점이 있다.

[0045] 상기 T 세포 유도과정에서 항원으로 사용되는 K-ras 특이적 활성화 T 세포 유도용 항원 조성물은 DC 세포의 성숙 및 생장에 필요한 사이토카인(cytokine), 호르몬 및 완충용액을 더 포함할 수 있다. 바람직하게는 사이토카인(cytokine)은 인터루킨-4(interleukin-4), 인터루킨-1 β , 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자(Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor, GM-CSF), 종양괴사인자- α (Tumor Necrosis Factor- α , TNF- α)일 수 있으며 상기 호르몬은 프로스타글란딘 E2(Prostaglandin E2, PGE2)일 수 있다.

[0046] 본 발명의 일 실시예에 따르면 상기 인터루킨-4(Interleukin-4) 및 과립구 대식세포 콜로니 자극인자(Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor, GM-CSF)는 1차 사이토카인으로서 PBMC내 단핵구(Monocyte)를 DC(Dendritic cell)로 분화 유도하는데 사용되었으며 상기 종양괴사인자- α (Tumor Necrosis Factor- α), 인터루킨-1 β (Interleukin-1 β), 및 프로스타글란딘 E2(Prostaglandin E2)은 2차 사이토카인으로서 미성숙DC(Immature DC)를 성숙시키기 위하여 사용되었다.

- [0047] 본 발명의 다른 실시예에 따르면 상기 제 1 단계의 배양은 1 day 동안 수행하며, 상기 제 2 단계의 배양은 2 days 동안 수행하며, 상기 제 3 단계의 배양은 10 days 동안 수행하는 것을 특징으로 한다. 상기 단계별 배양 기간은 실시예를 통해 가장 효율적으로 K-ras 특이적 활성화 T 세포를 유도할 수 있는 방법으로 최적화 된 것이다.
- [0048] 본 발명은 K-ras 특이적 활성화 T 세포 유도용 항원 조성물은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 K-ras 돌연변이 재조합 중첩 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0049] 상기 서열번호 1은 189개의 아미노산으로 구성된 K-ras 단백질의 아미노산서열(서열번호 2)에서 유래한다. 상기 K-ras 돌연변이는 12번째 아미노산이 글리신(Glycine, G)에서 아스파르트산(Aspartic acid, D)으로 치환되었거나, 12번째 아미노산이 글리신(Glycine, G)에서 발린(Valine, V)으로 치환되었거나, 13번째 아미노산이 글리신(Glycine, G)에서 아스파르트산(Aspartic acid, D)으로 치환된 것을 의미한다.
- [0050] 상기 재조합(recombinant)은 디자인된 항원의 유전정보를 포함하는 재조합 플라스미드 DNA에 끼워 넣는 것을 의미하며 상기 재조합 플라스미드 DNA를 미생물에 형질전환시켜 단백질을 발현시키고 이를 정제하게 되면 본 발명의 K-ras 특이적 활성화 T 세포 유도용 항원이 수득된다.
- [0051] 본 발명의 K-ras 돌연변이 재조합 중첩 펩타이드는 서열번호 2로 이루어진 K-ras의 아미노산 서열에서 어느 하나의 아미노산으로부터 순차적으로 나열된 아미노산 서열을 단위로 하는 총 12 종류의 에피토프(epitope(n=1, 2, 3...10, 11, 12)); 여기서 n은 에피토프의 순번을 의미하며 에피토프(n=1 내지 11)는 30개의 아미노산 서열을 포함하고 마지막 에피토프(n=12)는 23개의 아미노산 서열을 포함한다.)를 포함하되 에피토프(n=1)를 제외한 에피토프(n=2, 3,...12)는 N-terminal 방향 15개의 아미노산 서열이 직전 순번의 에피토프(n-1)의 C-terminal 방향 15개의 아미노산 서열과 서로 중첩되도록 디자인된다.
- [0052] 상기 K-ras 돌연변이 재조합 중첩 펩타이드는 상기 에피토프(n=1, 2, 3...10, 11, 12)가 순번에 따라 위치하며 상기 에피토프 사이는 LRMK-링커로 연결된 것을 특징으로 하며 상기 LRMK-링커는 루신(Leucine, L), 아르기닌(Arginine, R), 메티오닌(Methione, M), 라이신(Lysine, K)으로 구성된 링커로서 수지상세포에 의한 항원제시 과정(MHC class I pathway)에 유리한 장점이 있다.
- [0053] 상세하게는 본 발명의 K-ras 특이적 활성화 T 세포 유도용 항원 조성물은 하기와 같이 디자인된다. 상기 에피토프(n=1)는 K-ras 돌연변이 G12V를 포함하며; 상기 에피토프(n=1)의 N-terminal에는 K-ras 돌연변이 G12D를 포함하는 에피토프(n=1)가 LRMK-링커로 더 연결되고; 상기 에피토프(n=12)의 C-terminal에는 K-ras 돌연변이 G13D를 포함하는 에피토프(n=1)가 LRMK-링커로 더 연결되며; 상기 K-ras 돌연변이 G13D를 포함하는 에피토프(n=1)의 C-terminal에는 K-ras 돌연변이가 포함되지 않은 에피토프(n=1)가 LRMK-링커로 더 연결된다.
- [0054] 본 발명의 K-ras 특이적 활성화 T 세포 유도용 항원 조성물을 이용하면 K-ras 돌연변이(G12D, G12V, G13D)에 대해 특이적인 T 세포를 유도할 수 있으며 상기 K-ras 돌연변이(G12D, G12V, G13D)에 대해 특이적인 T 세포는 K-ras 돌연변이(G12D, G12V, G13D)를 가지는 암세포를 치료하는데 사용 가능하다.
- [0055] K-ras는 ras 단백질의 일종으로 세포의 분화, 증식 및 생존과 관련된 신호전달체계에서 중요한 역할을 하는 small GTPases 단백질이며 K-ras 단백질의 활성이 비정상적으로 증가하게 되면 암이 유발되는 것으로 알려져 있다. 상기 ras 단백질의 유전자인 KRAS는 여러 가지 암종에서 돌연변이로 발견되는 oncogene으로 잘 알려져 있으며 ras-유래 암종의 85%가 K-ras 돌연변이에 의한 것으로 알려져 있다. 따라서 암세포에 발현된 K-ras 및 그 돌연변이를 특이적으로 인식하는 T 세포를 증폭시키게 되면 K-ras의 활성이 비정상적으로 증가된 암을 효과적으로 제거하여 이를 치료 할 수 있게 된다. 상기 암은 K-ras 활성이 증가된 암이라면 제한되지 않으며 그 예로서 부신피질 암종(ACC), 방광요로상피 암종(BLCA), 유방 침습 암종(BRCA), 경부 편평 세포 암종 및 자궁경부내 선암종(CESC), 결장 선암종(COAD), 만성 림프성 백혈병(PLL), 대장암(CRC), 미만성 거대 B-세포 림프종(DLBCL), 다형성아교모세포종(GBM), 두경부 편평 세포 암종(HNSC), 혈액소 신장(KICH), 신장 투명 세포 암종(KIRC), 신장 유두상 세포 암종(KIRP), 급성 골수성 백혈병(LAML), 간세포 암종(LIHC), 폐 선암종(LUAD), 폐 편평 세포 암종(LUSC), 다발성 골수종(MM), 난소 장액낭선암종(OV), 췌장 선암종(PAAD), 전립선 선암종(PRAD), 직장 선암종(READ), 피부 흑색종(SKCM), 위 선암종(STAD), 고환 생식 세포 종양(TGCT), 갑상선 선암종(THCA), 자궁체부 자궁내막 암종(UCEC) 또는 자궁 암육종(UCS)일 수 있다.
- [0056] 하기에서 실시예를 통해 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0058] 실시예

[0060] **1. K-ras(WT)의 제조**

[0061] 먼저 K-ras 아미노산 서열(서열번호 2)을 발현벡터에 삽입하였다. K-ras(WT)는 189개의 아미노산으로 이루어져 있으며 아미노산 서열은 하기 표 1과 같다.

표 1

[0062]

이름	아미노산 서열(189aa)
K-ras(WT)	MTEYKLVVVG ¹⁰ AGGVGKSALT ²⁰ IQLIQNHFVD ³⁰ EYDPTIEDSY ⁴⁰
	RKQVVIDGET ⁵⁰ CLLDILDTAG ⁶⁰ QEEYSAMRDQ ⁷⁰ YMRTGEGFLC ⁸⁰
	VFAINNTKSF ⁹⁰ EDIHHYREQI ¹⁰⁰ KRVKDSSEV ¹¹⁰ MVLVGNKCDL ¹²⁰
	PSRTVDTKQA ¹³⁰ QDLARSYGIP ¹⁴⁰ FIETSAKTRQ ¹⁵⁰ RVEDAFYTLV ¹⁶⁰
	REIRQYRLKK ¹⁷⁰ ISKEEKTPGC ¹⁸⁰ VKIKKCIIM ¹⁸⁹

[0063] 상기 K-ras-WT를 제한효소로 처리한 후 pET30a 벡터에 넣어 발현벡터를 제조 하였으며 상기 발현벡터는 E.coli 에 형질전환하여 단백질을 발현시켰다.

[0065] **2. K-ras(M)-ROP의 제조**

[0066] K-ras Mutant Recombinant Overlapping Peptide(K-ras(M)-ROP)의 항원을 디자인하고 K-ras(WT)와 동일한 방법으로 발현벡터를 제조하였다. 상기 K-ras(M)-ROP은 K-ras 아미노산 12번째 위치의 G(Glycine)가 D(Asapartic acid)로 변이한 G12D, K-ras 아미노산 12번째 위치의 G(Glycine)가 V(Valine)로 변이한 G12V, 또는 K-ras 아미노산 13번째 위치의 G(Glycine)가 D(Asapartic acid)로 변이한 G13D를 포함한다.

[0067] 상기 K-ras(M)-ROP은 500개의 아미노산 서열을 가지는 것을 특징으로 하며 아미노산이 순차적으로 30개씩 구분되되 하나의 에피토프(epitope)는 15개의 아미노산 서열이 서로 중복되도록 디자인되었다. 표 2는 K-ras(M)-ROP의 아미노산 서열(서열번호 1) 및 K-ras(M)-ROP 에피토프의 아미노산 서열을 보여준다.

[0068] 도 1은 본 발명의 K-ras(M)-ROP의 에피토프 구조를 보여준다.

표 2

[0069]

이름	아미노산 서열(500aa)
K-ras(M)-ROP	MTEYKLVVVG ¹⁰ ADGVGKSALT ²⁰ IQLIQNHFVD ³⁰ LRMK ³⁴ MTEYKLVVVG ⁴⁴ AVGVGKSALT ⁵⁴ IQLIQNHFVD ⁶⁴ LRMK ⁶⁸ KSALTIQLIQ ⁷⁸ NHFVDEYDPT ⁸⁸ IEDSYRKQVV ⁹⁸ LRMK ¹⁰² EYDPTIEDSY ¹¹² RKQVVIDGET ¹²² CLLDILD ¹³² TAG ¹³⁶ LRMK ¹³⁶ IDGETCLLDI ¹⁴⁶ LDTAGQEEYS ¹⁵⁶ AMRDQYMRGTG ¹⁶⁶ LRMK ¹⁷⁰ QEEYSAMRDQ ¹⁸⁰ YMRGTGEGFLC ¹⁹⁰ VFAINNTKSF ²⁰⁰ LRMK ²⁰⁴ EGFLCVFAIN ²¹⁴ NTKSFEDIHH ²²⁴ YREQIKRVKD ²³⁴ LRMK ²³⁸ EDIHHYREQI ²⁴⁸ KRVKDS ²⁵⁸ EDVPMVLVGNKCDL ²⁶⁸ LRMK ²⁷² SEDPV ²⁸² MVLVGNKCDL ²⁹² DTKQAQDLAR ³⁰² LRMK ³⁰⁶ PSRTVD ³¹⁶ TKQA ³²⁶ QDLARSYGIP ³³⁶ FIETSAKTRQ ³⁴⁰ LRMK ³⁴⁰ SYGIP ³⁵⁰ FIETS ³⁶⁰ AKTRQ ³⁷⁰ RVEDAFYTLV ³⁷⁴ REIRQ ³⁷⁴ ISKEE ⁴⁰⁴ TPGC ⁴⁰⁸ LRMK ⁴⁰⁸ YRLK ⁴¹⁸ KISKEE ⁴²⁸ KTPGCVKIKK ⁴³² CIIM ⁴³⁶ LRMK ⁴³⁶ MTEYKLVVVG ⁴⁴⁶ AGDVGKSALT ⁴⁵⁶ IQLIQNHFVD ⁴⁶⁶ LRMK ⁴⁷⁰ MTEYKLVVVG ⁴⁸⁰ AGGVGKSALT ⁴⁹⁰ IQLIQNHFVD ⁵⁰⁰
에피토프 이름	아미노산 서열 (서열번호는 K-ras ^{WT} 을 기준으로 부여하였음)
에피토프1(E1, n=1)	MTEYKLVVVG ¹⁰ AGGVGKSALT ²⁰ IQLIQNHFVD ³⁰
에피토프2(E2, n=2)	KSALT ²⁰ IQLIQNHFVD ³⁰ EYDPTIEDSY ⁴⁰ RKQVV ⁴⁵
에피토프3(E3, n=3)	EYDPTIEDSY ⁴⁰ RKQVVIDGET ⁵⁰ CLLDILD ⁶⁰ TAG ⁶⁰
에피토프4(E4, n=4)	IDGET ⁵⁰ CLLDILD ⁶⁰ TAG ⁶⁰ QEEYSAMRDQ ⁷⁰ YMRGTG ⁷⁵
에피토프5(E5, n=5)	QEEYSAMRDQ ⁷⁰ YMRGTGEGFLC ⁸⁰ VFAINNTKSF ⁹⁰
에피토프6(E6, n=6)	EGFLC ⁸⁰ VFAINNTKSF ⁹⁰ EDIHHYREQI ¹⁰⁰ KRVKD ¹⁰⁵
에피토프7(E7, n=7)	EDIHHYREQI ¹⁰⁰ KRVKDS ¹¹⁰ EDVPMVLVGNKCDL ¹²⁰
에피토프8(E8, n=8)	SEDPV ¹¹⁰ MVLVGNKCDL ¹²⁰ PSRTVD ¹³⁰ TKQA ¹³⁵ QDLAR ¹³⁵
에피토프9(E9, n=8)	PSRTVD ¹³⁰ TKQA ¹⁴⁰ QDLARSYGIP ¹⁴⁰ FIETSAKTRQ ¹⁵⁰
에피토프10(E10, n=10)	SYGIP ¹⁴⁰ FIETSAKTRQ ¹⁵⁰ RVEDAFYTLV ¹⁶⁰ REIRQ ¹⁶⁵
에피토프11(E11, n=11)	RVEDAFYTLV ¹⁶⁰ REIRQYRLKK ¹⁷⁰ ISKEE ¹⁸⁰ TPGC ¹⁸⁰
에피토프12(E12, n=12)	YRLK ¹⁷⁰ KISKEE ¹⁸⁰ TPGC ¹⁸⁰ VKIKKCIIM ¹⁸⁹
에피토프1-G12D(E1-G12D)	MTEYKLVVVG ¹⁰ ADGVGKSALT ²⁰ IQLIQNHFVD ³⁰
에피토프1-G12V(E1-G12V)	MTEYKLVVVG ¹⁰ AVGVGKSALT ²⁰ IQLIQNHFVD ³⁰
에피토프1-G13D(E1-G13D)	MTEYKLVVVG ¹⁰ AGDVGKSALT ²⁰ IQLIQNHFVD ³⁰

[0070]

상기 K-ras(M)-ROP은 합성한 후(Genescript Co. Ltd.) pET30a 벡터에 클로닝(cloning)하였으며 E.coli에 형질 전환하여 발현시켰다. 발현된 단백질을 APC(Activated protein C)를 이용하여 절단하는 방법으로 K-ras(M)-ROP을 제조하였다.

[0072]

3. K-ras(M)-ROP 반응성 스크리닝 분석

- [0073] 정상인의 말초 혈액 단핵세포 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC)에서 K-ras(M)-ROP의 반응성을 스크리닝 하였다. 상기 스크리닝은 고착화효소항체법(enzyme-linked immune absorbent spot assay, ELISpot assay)을 이용하였다.
- [0074] 도 2는 본 발명의 K-ras(M)-ROP에 대한 PBMC의 반응성을 분석한 결과를 보여준다. 패널 A는 ELISpot(IFN- γ) assay의 SFC 이미지를 보여주며 패널 B는 ELISpot(IFN- γ) assay의 SFC 그래프를 보여준다.
- [0075] 먼저 정상인 자원자의 백혈구 분반술에서 얻어진 PBMC(LP-1 PBMC, LP-4 PBMC, 및 LP-6 PBMC) 1×10^5 cell을 파종(seeding)하여 세포배양한 후 항원을 처리하였다. 상기 항원으로 K-ras(M)-ROP $5 \mu\text{g/ml}$, $1.0 \mu\text{g/ml}$, $0.1 \mu\text{g/ml}$ 을 사용하였으며 양성대조군(positive control)로서 anti-CD3을 사용하였다. 세포배양은 37°C , CO_2 5%, overnight(O/N)의 조건으로 수행하였으며 배양한 세포는 IFN- γ 로 염색하여 SFC(Spot Forming Cell)를 읽어 분석하였다. 실험결과 정상인 PBMC중 LP-1에서 K-ras(M)-ROP에 대한 반응성이 가장 우수한 것으로 확인되었다.
- [0077] **4. K-ras(M)-ROP 농도별 특이적 CD3+ T 세포 비율 분석**
- [0078] 상기 LP-1 PBMC에 대하여 K-ras(M)-ROP 농도에 따른 K-ras(M)-ROP 특이적 CD3+ T세포 비율을 분석하였다. 이를 위하여 LP-1 PBMC에 항원을 처리한 후 IFN- γ capture staining을 수행하고 이를 분석하였다.
- [0079] 도 3은 본 발명의 K-ras(M)-ROP 농도에 따른 LP-1 PBMC의 K-ras(M)-ROP 특이적 CD3+ T 세포 비율을 분석한 결과를 보여준다. 패널 A는 ELISpot(IFN- γ) assay의 조건별 SFC 이미지를 보여주며 패널 B는 ELISpot(IFN- γ) assay의 조건별 SFC 그래프를 보여준다. 패널 C는 IFN- γ capture staining의 원리 빛 방법을 보여주며 패널 D는 IFN- γ capture FACS 분석결과를 보여준다. 패널 E는 IFN- γ 분비 CD3+ T 세포 비율(%) 그래프를 보여준다.
- [0080] 먼저 LP-1 PBMC 1×10^6 cell을 파종(seeding)하여 세포배양한 후 농도를 달리하여 항원(K-ras(M)-ROP $5 \mu\text{g/ml}$, K-ras(M)-ROP $1.0 \mu\text{g/ml}$, K-ras(M)-ROP $0.1 \mu\text{g/ml}$)을 처리하였다. 또한 과상풍 백신(Tetanus toxoid vaccine, TT X)을 $5 \mu\text{g/ml}$, $1.0 \mu\text{g/ml}$ 으로 처리한 LP-1 PBMC과 anti-CD3를 양성대조군(positive control)으로 사용하였다. 세포배양은 37°C , CO_2 5%, overnight(O/N)의 조건으로 수행하였다.
- [0081] IFN- γ capture staining은 항원이 처리된 LP-1 PBMC에 1차 포획 항체(1^{st} capture antibody)를 처리한 후 37°C 에서 45분간 배양하고 2차 검출 항체(2^{nd} detection antibody)와 CD3, CD4, CD8, 및 CD137을 처리하는 방법으로 수행하였다. 상기 IFN- γ capture staining이 수행된 LP-1 PBMC는 세포자동해석분리장치(Fluorescence activated cell sorter, FACS)를 이용하여 세포특성을 분석하였다.
- [0082] 실험결과 LP-1 PBMC에 농도에 따라 항원을 처리하게 되면 K-ras(M)-ROP 특이적 CD2+ T 세포 비율이 증가하는 것이 확인되었으며 이는 상기 ELISpot(IFN- γ) 결과와 잘 일치하였다. 따라서 LP-1 PBMC의 반응성은 K-ras(M)-ROP에 농도 의존적으로 증가하는 것으로 판단된다. 또한 LP-1 PBMC에 K-ras(M)-ROP에 대한 반응성을 정량적으로 평가한 결과 K-ras(M)-ROP $5 \mu\text{g/ml}$ 을 처리하는 경우 K-ras(M)-ROP 특이 CD3+ T 세포의 비율이 2.4% 수준인 것으로 확인되었다.
- [0084] **5. 항원의 종류에 따른 항원 특이적 CD3+ T 세포 비율 비교 분석**
- [0085] LP-1 PBMC에 K-ras(M)-ROP(500aa), K-ras₁₋₂₄Wild-type(Peptide Wt, 24aa), 또는 K-ras₁₋₂₄돌연변이(24aa)를 처리한 후 항원 특이적 CD3+ T 세포 비율을 비교 분석하였다.
- [0086] 도 4는 본 발명의 K-ras(M)-ROP, K-ras₁₋₂₄Wild-type, 및 K-ras₁₋₂₄돌연변이에 대한 LP-1 PBMC의 항원 특이적 CD3+ T-세포 비율을 분석한 결과를 보여준다. 패널 A는 K-ras(M)-ROP, K-ras₁₋₂₄Wild-type, 및 K-ras₁₋₂₄돌연변이가 처리된 LP-1 PBMC의 IFN- γ capture FACS 분석결과를 보여준다. 패널 B는 IFN- γ 분비 CD3+ T 세포 비율(%) 그래프를 보여주며, 패널 C는 항원 특이 CD3+ T 세포 비율(%) 그래프를 표로 정리한 결과를 보여준다. No Ag는 실행기(effector)만을 사용한 것을 의미하며, @CD3는 양성대조군(positive control)로서 anti-CD3를 사용한 것을 의미한다.
- [0087] 상기 K-ras₁₋₂₄돌연변이는 K-ras₁₋₂₄Wild-type에서 12번째 아미노산인 G가 D, 또는 V로 치환되거나 12번째 아미노산인 G가 D된 것(Pep.G12D, Pep.G12V, Pep.G13D)을 의미한다. 항원 특이적 CD3+ T-세포 비율은 상기와 동일한 방법으로 분석하였으며 항원으로 K-ras(M)-ROP(500aa), Peptide Wt, Pep.G12D, Pep.G12V, 및 Pep.G13D를 사용

하였다.

[0088] 실험결과 Peptide Wt에 반응한 CD3+ T세포는 확인되지 않았으며 Pep.G12D, Pep.G12V, 및 Pep.G13D에 반응한 CD3+ T 세포 역시 0.31%(Pep.G12D), 0.11%(Pep.G12V) 및 0.25%(Pep.G13D)로 현저히 낮은 것을 확인되었다. 상기 결과는 K-ras(M)-ROP에 반응하여 유도된 CD3+ T 세포의 비율이 2.41%임을 감안할 때 24개의 아미노산으로 구성된 펩타이드인 에피토프만으로는 항원 특이 CD3+ T 세포의 유도가 미미하다는 것을 의미한다.

[0090] **6. K-ras(M)-ROP 및 Fast-IVS를 이용한 ROP-T 세포의 제조**

[0091] 상기 실험결과를 바탕으로 K-ras(M)-ROP에 반응하는 CD3+ T 세포(ROP-T 세포)를 제조하였다. 본 발명에서는 Fast-IVS(Fast-In vitro Stimulation)을 적용하여 ROP-T 세포를 제조하였다.

[0092] 도 5는 본 발명의 Fast-IVS 공정과 No-Cytokine 공정을 비교한 결과를 보여준다. 패널 A는 Fast-IVS를 이용한 ROP-T 세포의 제조공정 및 평가 과정 및 ROP-T 세포의 특성 분석 과정을 보여준다. 패널 B는 Fast-IVS 공정 조건과 No-Cytokine 공정 조건에서 증폭된 T 세포의 IFN- γ + CD3+ T 세포 비율을 비교한 결과를 보여준다.

[0093] 상기 Fast-IVS 공정은 항원을 이용하여 항원 특이적 CD3+ T 세포를 유도하는 것과 싸이토카인을 처리하여 세포 증폭(Cell Expansion)을 수행하는 공정을 동시에 수행하는 것을 특징으로 한다. 이에 반하여 상기 No-Cytokine 공정은 항원에 의해 유도된 항원 특이적 CD3+ T 세포에 대하여 싸이토카인을 처리하지 않고 세포 증폭을 수행하는 것을 특징으로 한다.

[0094] 상기 Fast-IVS 공정의 세포 증폭에 사용한 싸이토카인(cytokine)은 인터루킨-4(Interleukin-4, IL-4), 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자(Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor, GM-CSF), 종양괴사인자- α (Tumor Necrosis Factor- α , TNF- α), 인터루킨-1b(Interleukin-1 β , IL-1 β) 및 프로스타글란딘 E2(Prostaglandin E2, PGE2)이다.

[0095] 하기 표 3은 본 발명의 Fast-IVS 공정과 No-Cytokine 공정을 보여준다.

표 3

	Fast-IVS 공정	No-Cytokine 공정
Day-0	LP-1 PBMC Seeding with Ag, IL-4, and GM-CSF	LP-1 PBMC Seeding Without Cytokine
Day-1	Adding TNF- α , IL-1 β and PGE2	No Cytokine Adding
Day 3	Expansion	Expansion
Day 5, 7, 9, 11, 12	Media Adding	Media Adding
Day 13	Harvest	Harvest

[0097] 분석결과 Fast-IVS 공정에서 No-Cytokine 공정보다 IFN- γ 를 분비하는 항원 특이적 CD3+ T 세포 비율이 4배가량 더 많이 증폭된 것이 확인되었다.

[0099] **7. ROP-T 세포 제조용 Fast-IVS 공정의 최적화**

[0100] K-ras(M)-ROP의 처리 농도 및 Fast-IVS 공정조건을 변경하여 ROP-T 세포 제조용 Fast-IVS 공정을 최적화하였다. 하기 표 4는 Fast-IVS 공정의 최적화를 위한 실시예를 보여준다.

표 4

			실시예1	실시예2	실시예3
실험조건	Scale	PBMCs	10M@24well	10M@24well	10M@24well
	Cytokine	제조사	JW Creagene	JW Creagene	JW Creagene
	K-ras(M)-ROP	$\mu\text{g/ml}$	5.0	1.0	1.0
	Fast-IVS(배지 AIM-V) 기간	Days	5	5	7
	Expansion 기간	Days	10	10	10
실험결과	Expansion Fold	No Ag-T	45	34	55
		ROP-T	55	49	65
	Helper T cell	No Ag-T	54.7	35.8	21.1
		ROP-T	64.4	75.3	60.4
	K-ras(M)-ROP specific T cell(IFN- γ +, CD3+)(%)	No Ag-T	4.6	1.1	1.2
		ROP-T	19.7	18.6	52.9

[0102] 실험결과 모든 실시예에서 ROP-T 세포가 증폭된 것이 확인되었으며 최적의 Fast-IVS 공정은 K-ras(M)-ROP의 처리 농도 1.0 μ g/ml 및 Fast-IVS 기간 7일 인 것으로 확인되었다.

[0104] **8. ROP-T 세포 특성 분석**

[0105] K-ras 돌연변이 에피토프(epitope) 스크리닝을 수행하여 증폭된 ROP-T 세포의 특성을 분석하였다. 이를 위하여 PBMC로부터 자가 수지상세포(Autologous Dendritic Cell)를 유도하고 상기 자가 수지상세포에 항원을 감작시켜 항원 특이적인 T 세포를 자극할 수 있는 항원 감작수지상 세포(Antigen pulsed Dendritic Cell, Ag pulsed DC)를 제조하여 ROP-T 세포의 반응성을 확인하였다. 상기 반응성은 재자극 IFN- γ 분비 T 세포 비율(Restimulation IFN- γ secretion T frequency)(%)을 산출하여 분석하였다.

[0106] 도 6은 본 발명의 ROP-T 세포에 대한 K-ras 돌연변이 에피토프 스크리닝 결과를 보여준다. 패널 A는 IFN- γ +, CD3+, CD4+에 대한 FACS 분석결과를 보여준다. 패널 B는 조건 별 재자극 IFN- γ 분비 T 세포 비율의 세포 비율(%)을 분석한 결과를 보여준다.

[0107] 먼저 자가 수지상세포(Autologous DC)를 4일간 배양하고 항원에 감작시켜 Ag pulsed DC를 준비하였다. 상기 Ag pulsed DC는 96well에 5x10³ cells/100 μ l로 분주하였다. K-ras(M)-ROP 특이 CD3+ T 세포를 상기 96well에 1x10⁵ cells/100 μ l가 되도록 분주하되 상기 Ag pulsed DC와 K-ras(M)-ROP 특이 CD3+ T 세포의 세포수가 1:20의 비율이 되도록 하였다. Ag pulsed DC와 K-ras(M)-ROP 특이 CD3+ T 세포가 혼합된 배지는 4시간동안 배양하였다. 상기 FACS를 이용하여 배양된 세포들의 CD3+, CD4+, CD137+, IFN- γ cap, 및 IFN- γ 분비 T 세포 비율(%)을 분석하였다. 상기 Ag pulsed DC의 제조에 사용한 항원은 K-ras(M)-ROP(500aa)(ROP_DC), K-ras₁₋₂₄wild type peptide(WT_DC), K-ras₁₋₂₄G12D mutant peptide(G12D_DC), K-ras₁₋₂₄G12V mutant peptide(G12V_DC), 및 K-ras₁₋₂₄G13D mutant peptide(G13D_DC)이었다. 또한 비교를 위하여 항원(Ag) 없이 실행기(effector)만을 사용한 DC(NoAg_DC)를 사용하였다.

[0108] 실험결과 ROP_DC를 사용하여 재자극한 경우 CD3+ ROP-T 세포에 존재하는 K-ras(M)-ROP 특이 CD3+/CD4+ T 세포와 K-ras(M)-ROP 특이 CD3+/CD8+ T 세포의 비율(%)이 각각 10% 및 5%인 것이 확인되었다. G12D_DC를 사용하여 재자극한 경우 CD3+ ROP-T 세포에 존재하는 K-ras(M)-ROP 특이 CD3+/CD4+ T 세포와 K-ras(M)-ROP 특이 CD3+/CD8+ T 세포의 비율(%)이 각각 1.5% 및 0.5%인 것이 확인되었다. G13D_DC를 사용하여 재자극한 경우 CD3+ ROP-T 세포에 존재하는 K-ras(M)-ROP 특이 CD3+/CD4+ T 세포와 K-ras(M)-ROP 특이 CD3+/CD8+ T 세포의 비율(%)이 각각 3.0% 및 1.5%인 것이 확인되었다. 이에 반하여 Wt_DC 및 G12V_DC를 사용하여 재자극한 경우 K-ras(M)-ROP 특이 CD3+/CD4+ T 세포와 K-ras(M)-ROP 특이 CD3+/CD8+ T 세포가 거의 검출되지 않았다.

[0110] **9. ROP-T 세포의 HLA 제한 분석**

[0111] 유도된 ROP-T 중 K-ras G13D mutant 특이 T 세포의 HLA 제한(restriction)을 확인하기 위해 인간 백혈구 항원(Human leukocyte antigen DQ, HLA-DQ) 에세이를 수행하였다.

[0112] 도 7은 본 발명의 HLA-DQ blocking 에세이 결과를 보여준다.

[0113] 먼저 항원을 감작시킨 DC(Ag pulsed DC)를 제조하였다. 상기 Ag pulsed DC의 제조에 사용한 항원은 K-ras(M)-ROP(500aa)(ROP_DC), K-ras₁₋₂₄Wild type peptide(WT_DC), K-ras₁₋₂₄G12D mutant peptide(G12D_DC), K-ras₁₋₂₄G12V mutant peptide(G12V_DC), 및 K-ras₁₋₂₄G13D mutant peptide(G13D_DC)이었다. 상기 제조한 Ag pulsed DC에 대하여 1시간동안 HLA-DQ 항체로 처리하는 방법으로 HLA-DQ blocking을 실시하였다. HLA-DQ blocking된 Ag pulsed DC를 이용하여 ROP-T를 재자극(re-stimulation)한 후 FACS 분석을 통해 IFN- γ +, CD3+, CD4+를 분석하였다.

[0114] 분석결과 항원 비특이 T 세포(NoAg-T)은 재자극에 사용한 DC의 종류 및 상기 DC에 대한 HLA-DQ blocking의 여부에 상관없이 IFN- γ 를 분비하는 CD3+CD4+ T 세포의 비율이 미미한 것으로 확인되었다. 이에 반하여 ROP-T 세포는 ROP_DC를 사용하여 재자극하게 되면 DC에 대한 HLA-DQ blocking 여부에 상관없이 IFN- γ 를 분비하는 CD3+CD4+ T 세포의 비율이 15% 이상으로 증가하는 것으로 확인되었다. 또한 ROP-T 세포는 HLA-DQ blocked G13D_DC를 이용하여 재자극을 수행한 경우 IFN- γ 를 분비하는 CD3+CD4+ T 세포의 비율이 HLA-DQ unblocked G13D_DC를 사용하여 재자극한 경우에 대비하여 6% 가량 감소(7% →1%)하는 것이 확인 되었다.

[0115] 결과적으로 본 발명의 ROP-T 세포는 ROP 항원에 특이적이며 HLA-DQ에 제한적이며 G13D 돌연변이에 특이성을 보이는 CD4+ T 세포의 증폭을 유도하는 것으로 판단된다.

[0117] **10. 대조군 native K-ras-T 세포와 peptide mix-T 세포의 비교**

[0118] K-ras(M)-ROP의 K-ras 돌연변이에 대한 특이적인 반응 유도를 검증하였다.

[0119] 도 8은 본 발명의 조건별 IFN- γ 를 분비(IFN- γ +)하는 CD3+ T 세포의 비율을 보여준다. 먼저 K-ras(M)-ROP 또는 native K-ras(189aa)을 항원으로 사용하는 Fast-IVS 공정을 이용하여 T 세포를 유도하였다. 또한 K-ras₁₋₂₄wild type 펩타이드, K-ras₁₋₂₄G12D 펩타이드, K-ras₁₋₂₄G12V 펩타이드, 및 K-ras₁₋₂₄G13D 펩타이드 혼합물을 항원으로 사용하는 Fast-IVS 공정을 이용하여 T 세포를 유도하였다. 대조군으로는 항원없이 실행기만을 사용하는 Fast-IVS 공정을 이용하여 T 세포를 유도하였다. 상기 유도한 T 세포는 ROP_DC를 이용하여 재자극하고 FACS를 이용하여 IFN- γ + CD3+ T 세포의 비율을 분석하였다.

[0120] 하기 표 5는 K-ras(M)-ROP의 K-ras 돌연변이에 대한 특이적인 반응 유도 검증 실험방법을 보여준다. 하기 표 5에 있어서 K-ras epitope wild type은 Native K-ras₁₋₂₄(24aa)를 의미하며; K-ras epitope G12D는 K-ras₁₋₂₄G12D(24aa)를 의미하며; K-ras epitope G12V는 K-ras₁₋₂₄G12V(24aa)를 의미하며; K-ras epitope G13D는 K-ras₁₋₂₄G13D(24aa)를 의미한다.

표 5

conditions	Fast-IVS			Expansion	
	Antigen	Cytokine	Days	Media	Days
No Ag-T	-	DO: IL-4, GM-CSF	7 Days	Alys+IL-2+SR3%	10 Days
ROP-T	K-ras(M)-ROP(8.5 μ M=5 μ g/ml)	D+1: TNF- α , IL-1b, PGE2			
Pep.-T	K-ras epitope(24mer) 4종 혼합물(wild type, G12D, G12V, G13D)(8.5 μ M)				
WT-T	Native K-ras(8.5 μ M=2 μ g/ml)				

[0122] 실험결과 항원을 사용하지 않고 Fast-IVS를 통해 유도한 T 세포(No Ag-T)의 경우 IFN- γ + CD3+ T 세포의 비율이 8% 수준인 것으로 확인되었다. K-ras(M)-ROP을 항원으로 사용하는 Fast-IVS 공정을 통해 유도한 T 세포(ROP-T)의 경우 IFN- γ + CD3+ T 세포의 비율이 37.4%에 달하는 것으로 확인되었다. Native K-ras를 항원으로 사용하는 Fast-IVS 공정을 통해 유도한 T 세포(WT-T)의 경우 IFN- γ + CD3+ T 세포의 비율이 18.4% 수준인 것으로 확인되었다. K-ras₁₋₂₄wild type 펩타이드, K-ras₁₋₂₄G12D 펩타이드, K-ras₁₋₂₄G12V 펩타이드, 및 K-ras₁₋₂₄G13D 펩타이드 혼합물을 항원으로 사용하는 Fast-IVS 공정을 통해 유도한 T 세포(Pep_T)의 경우 IFN- γ + CD3+ T 세포의 비율이 19.0% 수준인 것으로 확인되었다.

[0123] 정리하면 K-ras(M)-ROP 항원이 Native K-ras 또는 K-ras 돌연변이를 포함하는 에피토프를 사용하는 것보다 2배 가량 우수한 IFN- γ + CD3+ T 세포 유도 효과가 있는 것으로 판단된다.

[0125] **11. ROP-T 세포의 암세포 독성 효과 확인**

[0126] Fast-IVS 공정을 통해 유도한 T 세포(ROP-T)의 암세포 용해(killing) 효과를 확인하였다. 이를 위하여 유방선암(breast adenocarcinoma), 흑색종(melanoma), 대장선암(colorectal adenocarcinoma), 폐유두선암(lung papillary adenocarcinoma), 또는 폐대세포암(lung large cell carcinoma)의 세포주와 ROP을 항원으로 사용하는 Fast-IVS 공정을 이용하여 유도한 T 세포(ROP-T) 또는 항원을 사용하지 않는 Fast-IVS 공정을 이용하여 유도한 T 세포(LAK-T)를 함께 배양하여 각각의 T 세포가 각 암세포를 얼마나 용해하는지 확인하였다.

[0127] 하기 표 6은 각 암종의 세포주에 대한 분석 정보를 보여준다.

표 6

세포주명	암종	K-ras 돌연변이	HLA-type		
			HLA-A	HLA-DR(B1)	HLA-DQ(B1)

MCF7	유방선암 (breast adenocarcinoma)	없음	02:01, 02:01	15:01, 15:01	06:02, 06:02
526mel	흑색종 (melanoma)	없음	02:01, 03	-	-
MDA MB231	유방선암 (breast adenocarcinoma)	G13D	02:17, 02:01	13:05, 07:01	03:04, 03:04
SW480	대장선암 (colorectal adenocarcinoma)	G12V	24:02, 02:01	13:27, 15:01	06:03, 05:01
NCI-H441	폐유두선암 (lung papillary adenocarcinoma)	G12V	03:01, 02:01	13:23, 14:10	06:07, 06:07
T3M-10	폐대세포암 (lung large cell carcinoma)	G12D	24:02, 11:01	11:01, 08:03	06:01, 03:04

[0129] 분석결과 유방선암(breast carcinoma)의 세포주인 MCF7와 색종(melanoma)의 세포주인 526mel은 K-ras가 검출되었으나 돌연변이는 검출되지 않은 것으로 확인되었으며 유방선암(breast adenocarcinoma)의 세포주인 MDA MB231은 K-ras G13D 돌연변이; 대장선암(colorectal adenocarcinoma)의 세포주인 SW480 및 폐유두선암(lung papillary adenocarcinoma)의 세포주인 NCI-H441는 K-ras G12V 돌연변이; 및 폐대세포암(lung large cell carcinoma)의 세포주인 T3M-10은 K-ras G12D 돌연변이를 포함하고 있는 것으로 확인되었다.

[0130] 도 9는 본 발명의 ROP-T세포의 암세포에 대한 독성실험결과를 보여준다.

[0131] 실험결과 본 발명의 ROP-T 세포는 ROP 항원처리를 수행하지 않은 LAK-T 세포에 대비하여 유방선암세포, 흑색종 세포, 대장선암세포, 폐유두선암세포, 및 폐대세포암세포에 대한 독성이 유의미한 수준으로 높은 것으로 확인되었다.

[0132] 대장암 환자로부터 암조직을 수득한 후 HLA-typing 및 K-ras 돌연변이에 대한 검사를 수행하였다.

[0133] 하기 표 7은 대장암 환자로부터 수득한 암세포(primary culture)에 대한 검사결과를 보여준다.

표 7

암종	K-ras 돌연변이	HLA-type		
		HLA-A	HLA-DR(B1)	HLA-DQ(B1)
대장암(Colorectal cancer)	G12D	02:01, 24:02	04:06, 12:01	03:01, 03:02

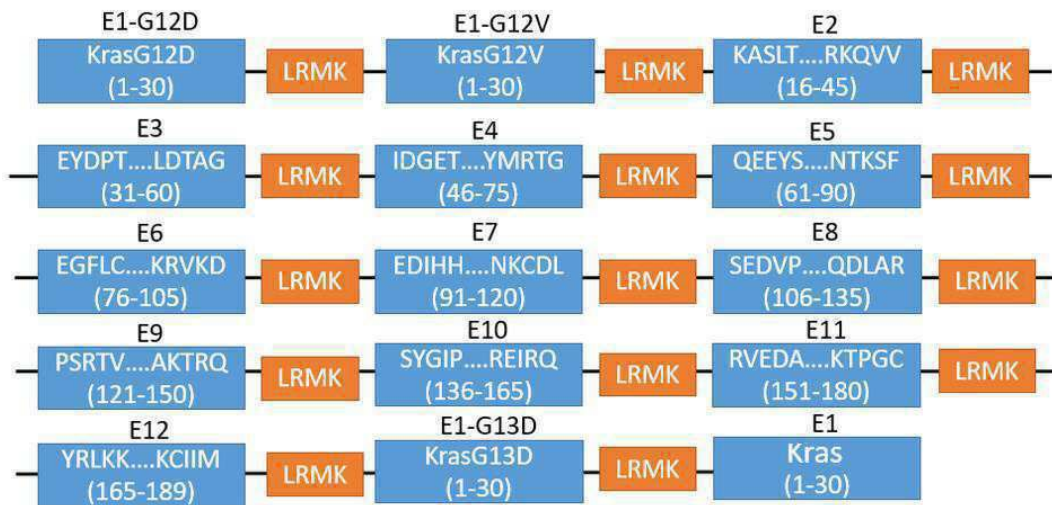
[0135] 상기 대장암 환자의 암조직으로부터 primary culture 수행하여 대장암 세포를 수득하고 ROP을 항원으로 사용하는 Fast-IVS 공정을 이용하여 유도한 T 세포(ROP-T) 또는 항원을 사용하지 않는 Fast-IVS 공정을 이용하여 유도한 T 세포(LAK-T)를 함께 배양하여 각각의 T 세포가 대장암세포의 성장을 얼마나 억제하는지 확인하였다.

[0136] 도 10은 본 발명의 ROP-T세포의 대장암 환자의 암세포에 대한 growth curve를 분석한 결과를 보여준다. 실험 결과 본 발명의 ROP-T세포는 LAK-T세포에 대비하여 10%가량 대장암세포의 성장을 억제하는 것으로 확인되었다.

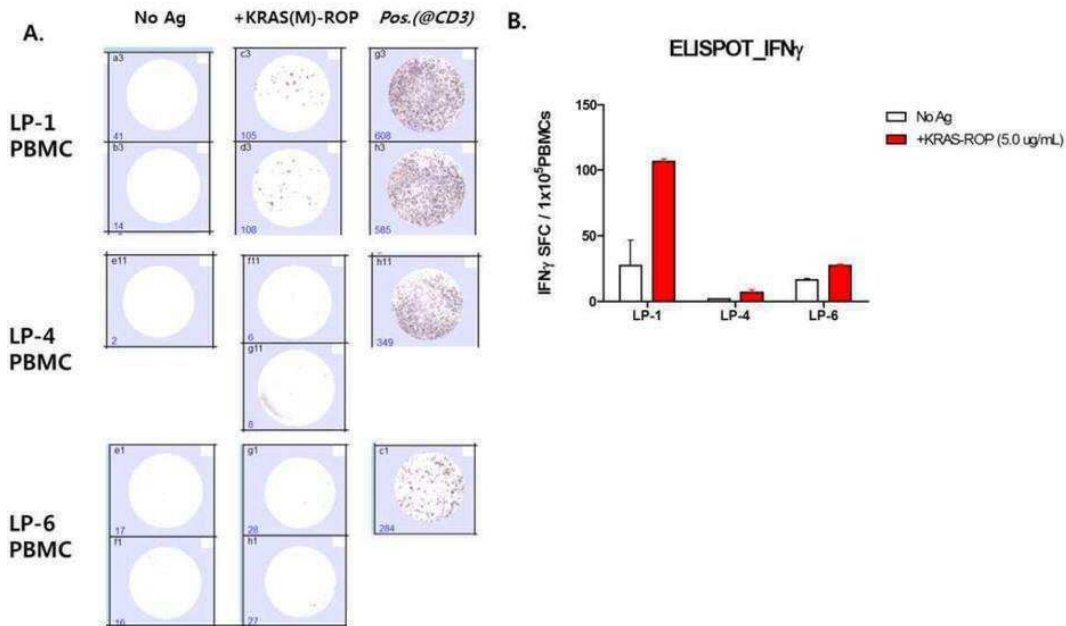
[0138] 본 명세서에서 설명된 구체적인 실시예는 본 발명의 바람직한 구현에 또는 예시를 대표하는 의미이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 한정되지는 않는다. 본 발명의 변형과 다른 용도가 본 명세서 특허청구범위에 기재된 발명의 범위로부터 벗어나지 않는다는 것은 당업자에게 명백하다.

도면

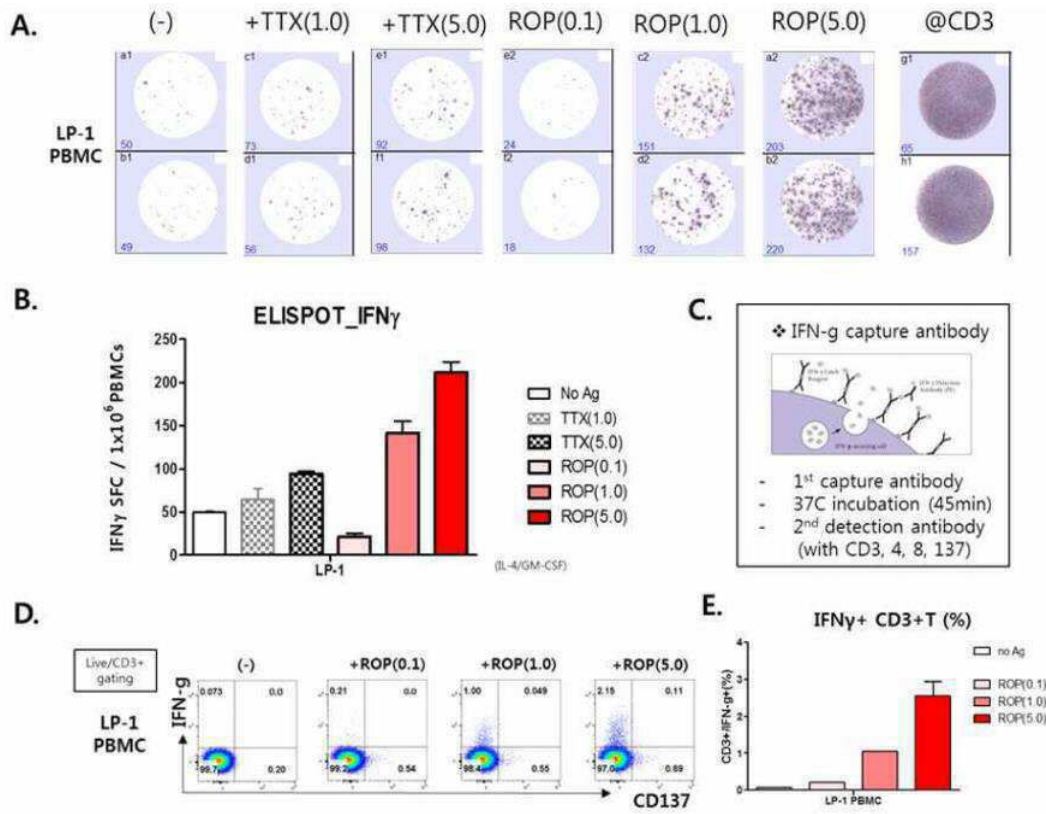
도면1



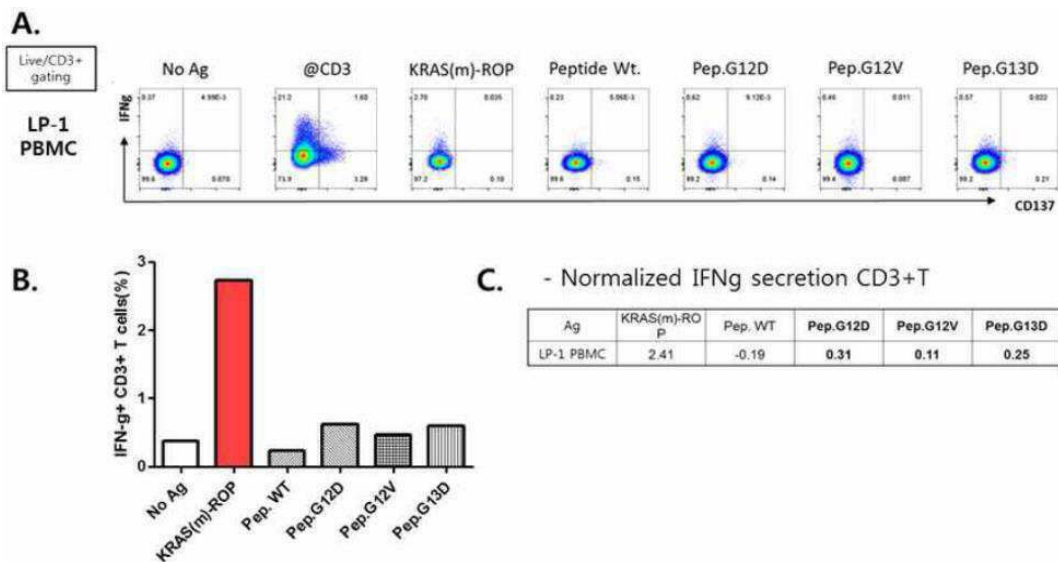
도면2



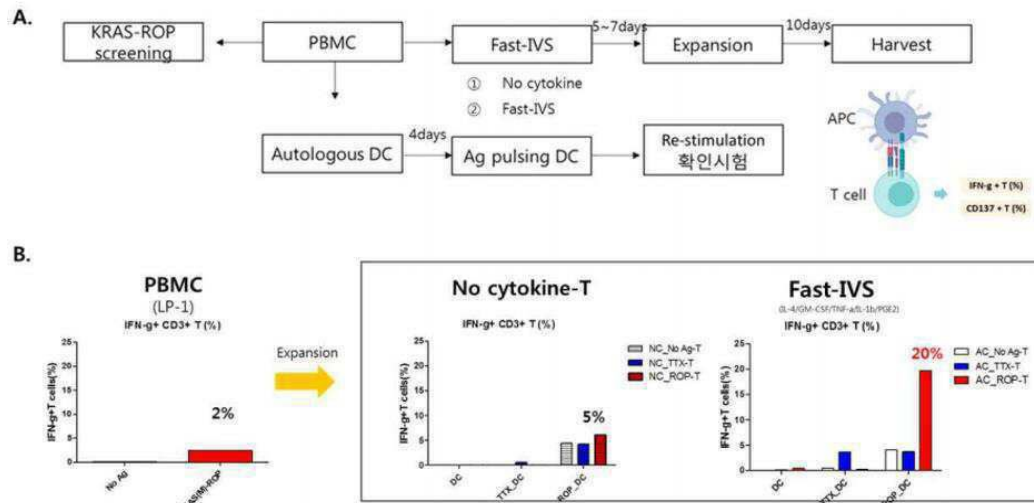
도면3



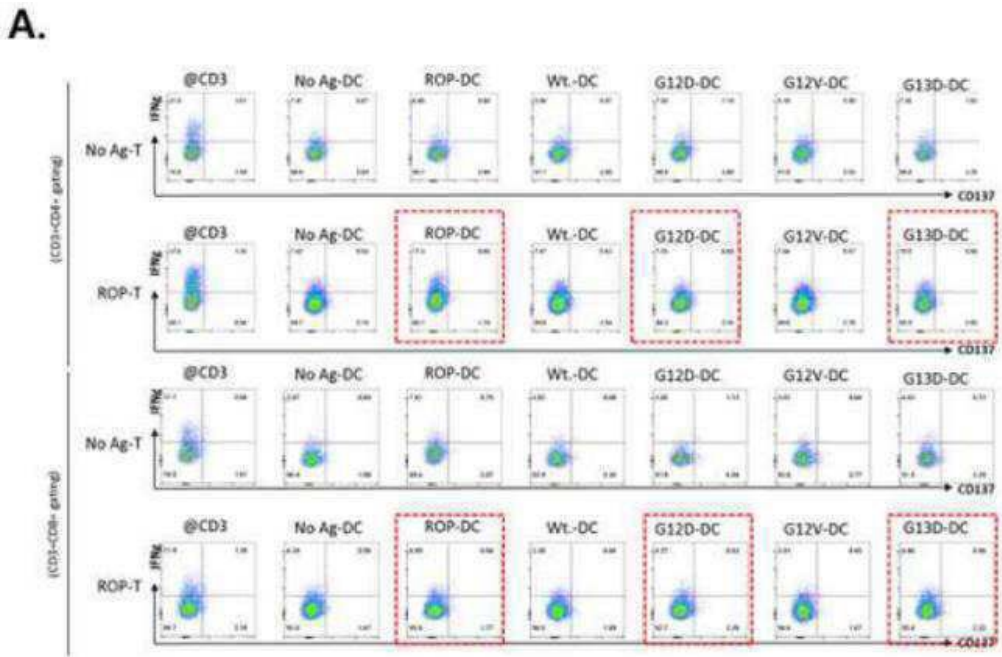
도면4



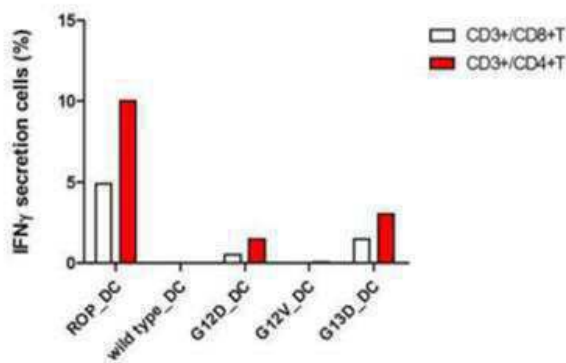
도면5



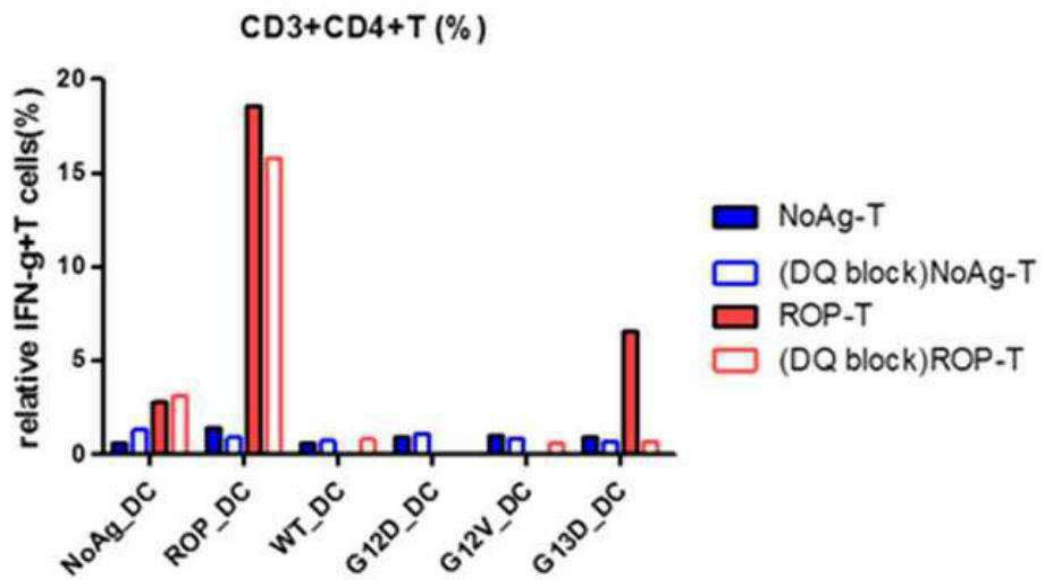
도면6



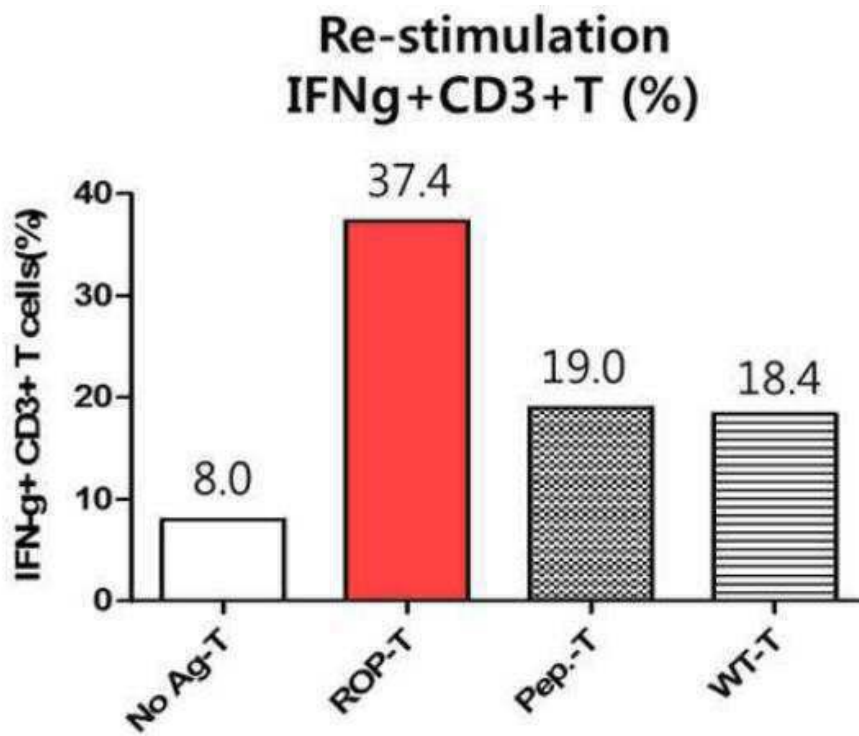
B. Re-stimulation IFN γ secretion T (%)



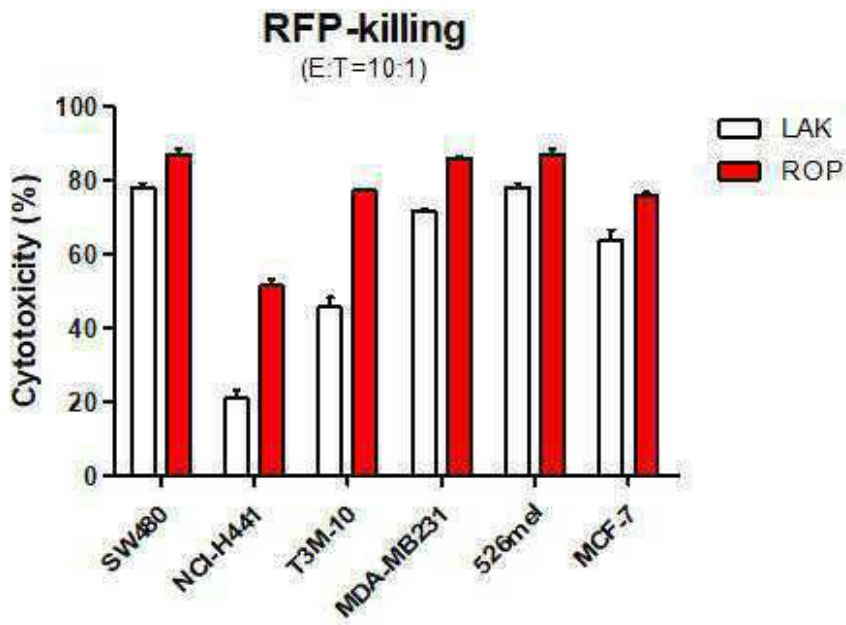
도면7



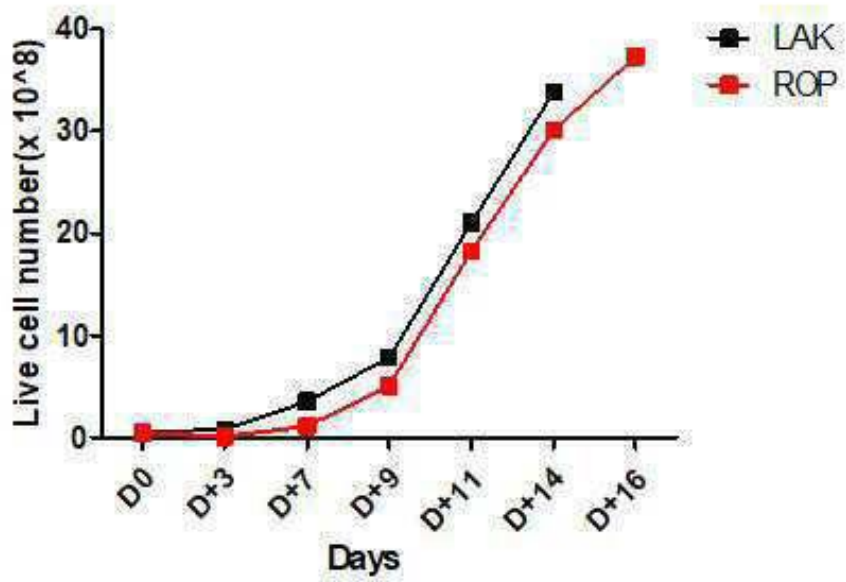
도면8



도면9



도면10



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.