



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0132480  
(43) 공개일자 2022년09월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
G01N 33/50 (2017.01) G01N 33/68 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
G01N 33/505 (2013.01)  
G01N 33/6863 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2022-0103218(분할)  
(22) 출원일자 2022년08월18일  
심사청구일자 2022년08월18일  
(62) 원출원 특허 10-2020-0184741  
원출원일자 2020년12월28일  
심사청구일자 2020년12월28일

(71) 출원인  
연세대학교 산학협력단  
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)  
대한민국 (식품의약품안전처장)  
충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 187  
(72) 발명자  
하상준  
서울특별시 서대문구 가재울미래로 2, 118동 220  
5호(남가좌동, DMC파크뷰자이)  
김명준  
서울특별시 마포구 삼계로 33, 13동 1105호(도화동, 도화3지구우성아파트)  
홍경희  
서울특별시 마포구 만리재로16안길 23-6, 3층(공덕동)  
(74) 대리인  
특허법인인벤싱크

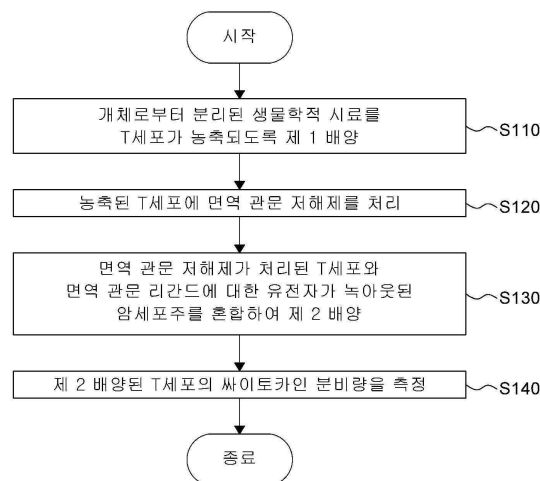
전체 청구항 수 : 총 21 항

(54) 발명의 명칭 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법

(57) 요약

본 명세서에서는 개체로부터 분리된 생물학적 시료를 T세포가 농축(enrichment)되도록 제 1 배양하는 단계, 농축된 상기 T세포에 면역 관문 저해제(immune checkpoint inhibitors)를 처리하는 단계, 면역 관문 저해제가 처리된 상기 T세포와 면역관문 리간드(immune checkpoint ligand)에 대한 유전자가 녹아웃(knock-out)된 암 세포주를 혼합하여 제 2 배양하는 단계, 및 제 2 배양된 상기 T세포의 싸이토카인 분비량을 측정하는 단계를 포함하는, 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법을 제공한다.

대표도 - 도2



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1475010911  
 과제번호 18182임상평408  
 부처명 식품의약품안전처  
 과제관리(전문)기관명 식품의약품안전평가원  
 연구사업명 안전성 평가기술 개발 연구 사업-한국인 임상시험 평가기반 구축연구  
 연구과제명 면역항암제 약물반응 예측/평가 방법 개발 연구  
 기 여 율 3/10  
 과제수행기관명 연세대학교 산학협력단  
 연구기간 2018.05.16 ~ 2020.11.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711108900  
 과제번호 2018R1A2A1A05076997  
 부처명 과학기술정보통신부  
 과제관리(전문)기관명 한국연구재단  
 연구사업명 개인기초연구-후속연구지원(도전)  
 연구과제명 암-면역 분자네트워크를 활용한 환자별 면역억제에 대한 분자기전 규명 및 정밀 면

역항암치료 플랫폼 개발

기 여 율 2.5/10  
 과제수행기관명 연세대학교 산학협력단  
 연구기간 2018.09.01 ~ 2021.08.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711105688  
 과제번호 2019M3A9B6065221  
 부처명 과학기술정보통신부  
 과제관리(전문)기관명 한국연구재단  
 연구사업명 바이오의료기술개발사업-차세대응용오믹스사업  
 연구과제명 단일세포 다중오믹스 기술을 활용한 면역리액툼 유도기전 규명  
 기 여 율 2.5/10  
 과제수행기관명 연세대학교 산학협력단  
 연구기간 2019.06.01 ~ 2021.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711055832  
 과제번호 2017R1A5A1014560  
 부처명 과학기술정보통신부  
 과제관리(전문)기관명 한국연구재단  
 연구사업명 집단연구지원-이학분야(SRC)  
 연구과제명 비임파성 장기 면역 연구센터  
 기 여 율 2/10  
 과제수행기관명 성균관대학교 산학협력단  
 연구기간 2017.06.01 ~ 2024.02.28

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

개체로부터 분리된 생물학적 시료를 T세포가 농축(enrichment)되도록 제 1 배양하는 단계;

농축된 상기 T세포에 면역 관문 저해제(immune checkpoint inhibitors)를 처리하는 단계;

면역 관문 저해제 처리된 상기 T세포와 면역 관문 리간드(immune checkpoint ligands)에 대한 유전자가 녹아웃(knock-out)된 암 세포주를 혼합하여 제 2 배양하는 단계, 및

제 2 배양된 상기 T세포를 면역 관문 수용체(immune checkpoint receptor) 발현에 따라 게이팅(gating)하는 단계를 포함하는, 제 2 배양된 상기 T세포의 싸이토카인 분비량을 측정하는 단계를 포함하고,

상기 면역 관문 수용체는,

PD-1, TIM-3, TIGIT, CTLA-4, 2B4, CD160, BTLA, CD200R, SIRPA, SIRPG, VSIG3, VISTA, TMIGD2 및 ILT3으로 이루어진 그룹 중 적어도 하나인, 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법.

#### 청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 생물학적 시료는,

말초 혈액 단핵세포(peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 또는 골수유래 단핵세포(bone marrow mononuclear cell, BMNC)인, 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법.

#### 청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 T세포는,

CD8+ T세포를 포함하는, 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법.

#### 청구항 4

제 3항에 있어서,

상기 CD8+ T세포는,

상기 제 1 배양하기 전보다 150배 이상 세포수가 증가된, 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법.

#### 청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 농축된 T세포는,

PD-1-TIM-3-TIGIT-CD8+T세포, PD-1+TIM-3-TIGIT-CD8+T세포, PD-1-TIM-3+TIGIT-CD8+T세포, PD-1-TIM-3-TIGIT+CD8+T세포, PD-1+TIM-3+TIGIT-CD8+T세포, PD-1+TIM-3-TIGIT+CD8+T세포, PD-1-TIM-3+TIGIT+CD8+T세포 및 PD-1+TIM-3+TIGIT+CD8+T세포로 이루어진 그룹 중 적어도 하나를 포함하는, 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법.

#### 청구항 6

제 5항에 있어서,

상기 PD-1+TIM-3+TIGIT+CD8+T세포는,

상기 농축된 T세포 전체에 대하여 9 % 이상 발현되는, 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법.

#### 청구항 7

제 1항에 있어서,  
상기 게이팅하는 단계는,  
형광 활성화 세포 분류(fluorescence-activated cell sorting: FACS) 또는 면역자기 세포 분류(immunomagnetic cell sorting: MACS)를 이용하여 수행되는, 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법.

#### 청구항 8

제 1항에 있어서,  
상기 제 1 배양하는 단계는,  
상기 생물학적 시료에 제 1 T세포 자극 인자(Tcell activating factor)를 처리하는 단계, 및 상기 자극 인자가 처리된 상기 생물학적 시료를 배양하는 단계를 포함하는, 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법.

#### 청구항 9

제8항에 있어서,  
상기 제 1 T세포 자극 인자는,  
0.5 내지 2  $\mu\text{g/ml}$ 의  $\alpha$ -CD3, 5 내지 20 ng/ml의 hIL-2 및 5 내지 20 ng/ml의 hIL-7을 가지는, 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법.

#### 청구항 10

제8항에 있어서,  
상기 배양된 생물학적 시료는,  
CD8+ T세포를 90 %이상 포함하는, 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법.

#### 청구항 11

제 1항에 있어서,  
상기 제 1 배양하는 단계는,  
7 내지 21일 중 적어도 하나의 기간 동안 수행되는, 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법.

#### 청구항 12

제 1항에 있어서,  
상기 암 세포주는,  
HCC4006인, 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법.

#### 청구항 13

제 1항에 있어서,  
상기 암 세포주는,  
PD-L1, Galectin-9, CEACAM1 및 PVR으로 이루어진 그룹 중 적어도 하나의 면역 관문 리간드에 대한 유전자가 녹아웃된, 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법.

#### 청구항 14

제 1항에 있어서,  
상기 면역 관문 리간드는,

PD-L1, PD-L2, PVR(CD155), B7-1, B7-2, CD112, CD113, Galectin-9, CEACAM1, HMGB1, CD48, HVEM, CD200, CD47, B7-H3, B7-H4, VISTA, VSIG3, VSIG4, HHLA2, BTN1A1, BTN2A2, BTN3A1, BTNL2, TIM-1, TIM-4 및 ALCAM으로 이루어진 그룹 중 적어도 하나인, 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법.

#### 청구항 15

제 1항에 있어서,

상기 암 세포주는,

공동자극 리간드 또는 싸이토카인 발현 유전자를 더 포함하는, 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법.

#### 청구항 16

제15항에 있어서,

상기 공동 자극 리간드는,

B7-1, B7-2, ICOSL, HHLA2, CD70, OX40L, 4-1BBL, GITRL, TL1A, CD40, CD155, CD30L 및 LIGHT으로 이루어진 그룹 중 적어도 하나이며, 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법.

#### 청구항 17

제 1항에 있어서,

상기 면역 관문 저해제는,

항체, 단백질, 올리고 펩타이드, 유기 분자, 다당류, 폴리뉴클레오티드로 이루어진 그룹 중 적어도 하나인, 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법.

#### 청구항 18

제 1항에 있어서,

상기 싸이토카인은,

TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-25, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, SLF, LIF, Eta-1 및 Oncostatin M 으로 이루어진 그룹 중 적어도 하나인, 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법.

#### 청구항 19

제 1항에 있어서,

제 2 배양하는 단계는,

14 내지 20일 중 적어도 하나의 기간 동안 수행되는, 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법.

#### 청구항 20

제 1항에 있어서,

제 2 배양하는 단계는,

혼합된 상기 T세포 및 암 세포주에 제 2 T세포 자극 인자를 처리하는 단계를 포함하는, 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법.

#### 청구항 21

제20항에 있어서,

상기 제 2 T세포 자극 인자는,

10 내지 30  $\mu\text{g/ml}$ 의  $\alpha\text{-CD3}$  및 3 내지 7  $\mu\text{g/ml}$ 의  $\alpha\text{-CD28}$ 을 가지는, 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 면역 관문 저해제에 의한 사이토카인 분비량을 측정할 수 있는 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] 종래의 항암치료로서 종양 절제법과 같은 수술적 치료, 방사선 치료, 화학 치료 및 표적 치료제가 수행되어 왔다. 그러나, 진술한 치료 방법 중 방사선 치료 또는 화학 치료는 암세포만 특이적으로 저해하는 것이 아니기 때문에 정상 세포까지 사멸시키는 부작용을 가지고 있으며, 표적 치료제는 암세포가 치료제의 내성 즉, 회피 기작을 획득할 경우, 이를 표적하지 못하지 못한다는 한계를 가지고 있다.

[0003] 이에, 생체 내 면역 체계를 활성화시킴으로써 자가 면역력을 높여 면역세포가 암세포를 직접적으로 공격하도록 하는 면역 항암 요법이 주목을 받고 있다. 나아가, 면역 항암 요법 즉, 면역 항암제는 암세포 표적뿐만 아니라 암세포 주변에 존재하는 세포 즉, 종양미세환경환경(tumor microenvironment)까지도 영향을 미쳐 보다 향상된 항암 효과를 가진다. 또한, 면역 항암제는 면역 세포의 기억 능력으로 인하여 종래의 항암 치료들보다 향상된 치료 지속기간을 갖는다. 이에, 면역 항암제는 환자의 생존기간을 대폭 연장시킬 뿐만 아니라 환자의 삶의 질을 높일 수 있다.

[0004] 이러한, 면역 항암제는 크게 면역 관문 억제제(immune checkpoint inhibitor), 면역세포치료제(immune cell therapy), 치료용 항체(therapeutic antibody) 및 항암백신(anticancer vaccine)을 포함하고 있다. 이 중, 면역 관문 억제제는 T세포 억제에 관여하는 면역 관문 단백질의 활성을 차단하여, T세포를 활성화시켜 암세포를 공격하는 약물이다.

[0005] 보다 구체적으로, 면역 관문 억제제로서, 항 PD-1 항체는 T세포 표면에 분포하는 PD-1(programmed cell death)과 이의 암세포 리간드인 PD-L1의 결합(binding)을 차단함으로써, 종양의 면역 회피기작을 차단하고 T세포를 활성화시켜 암세포를 공격하도록 할 수 있다. 실제, 항 PD-1 및 항 PD-L1과 같은 면역 관문 억제제인 니볼루맙(Nivolumab, BMS사) 및 펌브롤리주맙(Pembrolizumab, MSD사)이 실제 악성 흑색종이나 폐암에서 항암 완치 효과가 입증됨에 따라, 다양한 면역 관문 억제제에 대한 개발이 활발하게 이루어지고 있다.

[0006] 이러한, 다양한 면역 관문을 갖는 종양에서 최적의 효과를 갖는 면역 항암제(면역 관문 저해제) 후보 물질을 예측하기 위하여, 환자 유래 3차원 배양 및 유전자 편집 기술 등을 이용하여 항암제 후보물질을 선별 또는 개발하기 위한 스크리닝 기술이 개발되고 있다. 그러나, 면역 항암제는 종래의 화학 항암제와 작용기전이 상이하여 기존의 약물 반응 평가 방법이 아닌 새로운 약물 반응 평가 기술 개발이 필요하나, 현재까지 표준화되어 이를 객관적으로 평가할 수 있는 방법은 없는 실정이다.

[0007] 발명의 배경이 되는 기술은 본 발명에 대한 이해를 보다 용이하게 하기 위해 작성되었다. 발명의 배경이 되는 기술에 기재된 사항들이 선행기술로 존재한다고 인정하는 것으로 이해되어서는 안 된다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0008] 한편, 면역 항암제 즉, 면역 관문 억제제의 후보 물질을 선별하기 위해서는 in-vitro 및/또는 in-vivo에서 효능이 평가되어야 한다. 보다 구체적으로, 면역 관문 억제제는 T세포의 활성화 즉, IFN- $\gamma$  및 TNF- $\alpha$ 와 같은 사이토카인(cytokine)의 분비를 향상시킬 수 있다. 이에, 면역 관문 억제제 후보 물질 평가는 in-vitro에서 사이토카인의 분비는 측정을 통하여 이루어질 수 있다. 그러나, 이러한 평가 방법은 실험하는 사람 및 기관에 따라 매우 다양하고, 표준화되어 있지 않아 일관적인 결과가 도출되기 어려운 실정이다.

[0009] 보다 구체적으로, 종래의 방법은 CD4+ T세포 및 CD8+ T세포와 같은 다양한 종류의 면역세포가 포함되어 있는 상태에서 조기 활성화(early activation)하여 사이토카인의 분비를 측정하였다. 이에, 사이토카인을 분비하는 CD8+ T세포의 비율이 낮을 경우, 분비하는 사이토카인 양도 적어짐에 따라, 이를 정량화하여 비교하는 것이 어

려울 수 있다.

- [0010] 나아가, CD8+ T세포가 다량으로 배양되었어도, 면역 관문 수용체를 발현하지 않을 수 있다. 이에, 종래의 평가 방법에서는 표적하고자 하는 면역 관문 수용체를 발현한 환자의 혈액으로부터 이를 분리하여 사용되어 왔으며, 이는 환자로부터 공급됨에 따라, 시료 확보가 한정적이라는 한계가 있다.
- [0011] 즉, 종래의 방법은 사이토카인을 분비하는 T세포의 비율 및 분포가 일정치 않음에 따라, 일괄적인 사이토카인의 분비를 측정하기 어렵다.
- [0012] 이에, 본 발명의 발명자들은 전술한 시료 확보에 대한 한계성을 극복할 수 있으며, 획일화된 방법으로 일관적인 결과를 도출할 수 있는 표준화된 면역 관문 저해제에 대한 스크리닝 방법을 개발하고자 하였다.
- [0013] 나아가, 본 발명의 발명자들은 T세포의 활성화가 다양한 면역 관문을 통하여 억제된다는 것을 인지하여, 측정하고자 하는 표적 면역 관문을 제외한 나머지 변수 요인이 제거될 경우, 보다 향상된 T세포의 활성화 즉, 사이토카인의 분비량을 확인할 수 있다는 것을 인지하였다.
- [0014] 또한, 본 발명의 발명자들은 특정 배양 방법을 통하여, 건강한 개체로부터 수집된 생물학적 시료에서도 표적하고자 하는 면역 관문 수용체가 발현된 다량의 CD8+ T세포를 획득할 수 있음을 확인하였으며, 이를 통하여 시료 확보에 대한 한계성을 극복할 수 있다는 것을 인지하였다.
- [0015] 또한, 본 발명의 발명자들은 변수 즉, 표적하고자하는 면역 관문 리간드가 제거된 녹아웃 세포주와 고농축된 CD8+ T세포의 공동배양을 통하여, 향상된 사이토카인 분비량을 확인하였다.
- [0016] 그 결과, 본 발명의 발명자들은 향상된 사이토카인 분비량을 기초로 면역 관문 억제제에 대한 후보물질에 대한 평가를 정량화하여 평가할 수 있는 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법을 개발하기에 이르렀다.
- [0017] 이에, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는, 고농축화된 CD8+ T세포와 특정 면역 관문 리간드가 녹아웃된 암 세포주를 통하여, 면역 관문 저해제에 대한 효과를 분명하게 확인할 수 있는 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.
- [0018] 본 발명의 과제들은 이상에서 언급한 과제들로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

### 과제의 해결 수단

- [0019] 전술한 바와 같은 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 개체로부터 분리된 생물학적 시료를 T세포가 농축(enrichment)되도록 제 1 배양하는 단계, 농축된 상기 T세포에 면역 관문 저해제(immune checkpoint inhibitors)를 처리하는 단계, 면역 관문 저해제가 처리된 상기 T세포와 면역 관문 리간드(immune checkpoint ligand)에 대한 유전자가 녹아웃(knock-out)된 암 세포주를 혼합하여 제 2 배양하는 단계, 및 제 2 배양된 상기 T세포의 사이토카인 분비량을 측정하는 단계를 포함하는 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0020] 본 발명의 특징에 따르면, 생물학적 시료는, 말초 혈액 단핵세포(peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 또는 골수유래 단핵세포(bone marrow mononuclear cell, BMNC)를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 면역 세포 즉, T세포를 포함하고 있는 다양한 시료를 모두 포함할 수 있다.
- [0021] 본 발명의 다른 특징에 따르면, T세포는, CD8+ T세포를 포함할 수 있으며, CD8+ T세포는 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법에서 제 1 배양하기 전보다 150배 이상 세포수가 증가될 수 있다. 나아가, T세포는 전술한 CD8+ T세포 즉, 세포 독성 T 세포(cytotoxic T cell)뿐만 아니라, 도움 T 세포(helper T cell), 조절 T 세포(regulatory T cell), 기억 T 세포(memory T cell) 및 자연 살해 T 세포(natural killer T cell) 등을 모두 포함할 수 있다.
- [0022] 본 발명의 또 다른 특징에 따르면, 농축된 T세포는, PD-1-TIM-3-TIGIT-CD8+T세포, PD-1+TIM-3-TIGIT-CD8+T세포, PD-1-TIM-3+TIGIT-CD8+T세포, PD-1-TIM-3-TIGIT+CD8+T세포, PD-1+TIM-3+TIGIT-CD8+T세포, PD-1+TIM-3-TIGIT+CD8+T세포, PD-1-TIM-3+TIGIT+CD8+T세포 및 PD-1+TIM-3+TIGIT+CD8+T세포로 이루어진 그룹 중 적어도 하나를 포함할 수 있으며, 이때, PD-1+TIM-3+TIGIT+CD8+T세포는, 농축된 T세포 전체에 대하여 9 %이상 발현될 수 있다.
- [0023] 본 발명의 또 다른 특징에 따르면, 측정하는 단계는, 제 2 배양된 상기 T세포를 게이팅(gating)하는 단계를 더 포함할 수 있으며, 게이팅하는 단계는, 면역 관문 수용체(immune checkpoint receptor) 발현에 따라 게이팅할 수 있다. 이때, 면역 관문 수용체는, PD-1, TIM-3, TIGIT, CTLA-4, 2B4, CD160, BTLA, CD200R, SIRPA, SIRPG,

VSIG3, VISTA, TMIGD2 및 ILT3으로 이루어진 그룹 중 적어도 하나를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, T세포에서 발현될 수 있는 다양한 면역 관문 수용체를 모두 포함할 수 있다. 나아가, 게이팅하는 단계는, 형광 활성화 세포 분류(fluorescence-activated cell sorting: FACS) 또는 면역자기 세포 분류(immunomagnetic cell sorting: MACS)를 이용하여 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 면역 관문 수용체의 종류에 따라 T세포를 선별 및 분류할 수 있는 다양한 방법을 모두 포함할 수 있다.

[0024] 본 발명의 또 다른 특징에 따르면, 제 1 배양하는 단계는, 생물학적 시료에 제 1 T세포 자극 인자(Tcell activating factor)를 처리하는 단계, 및 자극 인자가 처리된 생물학적 시료를 배양하는 단계를 포함할 수 있으며, 이때, 제 1 T세포 자극 인자는, 0.5 내지 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의  $\alpha$ -CD3, 5 내지 20 ng/ml의 hIL-2 및 5 내지 20 ng/ml의 hIL-7을 가질 수 있다. 나아가, 배양된 생물학적 시료는, CD8+ T세포를 90 %이상 포함할 수 있다. 더 나아가, 제 1 배양하는 단계는, 7 내지 21일 중 적어도 하나의 기간 동안 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0025] 본 발명의 또 다른 특징에 따르면, 암 세포주는, HCC4006이며, PD-L1, Galectin-9, CEACAM1 및 PVR으로 이루어진 그룹 중 적어도 하나의 면역 관문 리간드에 대한 유전자가 녹아웃된 암 세포주일 수 있다. 그러나, 암 세포주는 HCC4006에 제한되는 것은 아니며, 면역 관문 리간드를 발현할 수 있는 다양한 암 세포주를 모두 포함할 수 있다.

[0026] 본 발명의 또 다른 특징에 따르면, 면역 관문 리간드는, PD-L1, PD-L2, PVR(CD155), B7-1, B7-2, CD112, CD113, Galectin-9, CEACAM1, HMGB1, CD48, HVEM, CD200, CD47, B7-H3, B7-H4, VISTA, VSIG3, VSIG4, HHLA2, BTN1A1, BTN2A2, BTN3A1, BTNL2, TIM-1, TIM-4 및 ALCAM으로 이루어진 그룹 중 적어도 하나일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0027] 본 발명의 또 다른 특징에 따르면, T세포의 기능을 증진시키기 위해 암 세포주에 공동자극 리간드(co-stimulatory ligand) 또는 싸이토카인(cytokine) 발현 유전자를 더 포함할 수 있다. 공동자극 리간드는, B7-1, B7-2, ICOSL, HHLA2, CD70, OX40L, 4-1BBL, GITRL, TL1A, CD40, CD155, CD30L 및 LIGHT으로 이루어진 그룹 중 적어도 하나일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이때, 공동자극 리간드 및 싸이토카인은 유전자 편집 기술을 이용하여 암 세포주 내에 이를 발현하는 유전자가 삽입(Gene insertion)되어 발현될 수 있다.

[0028] 본 발명의 또 다른 특징에 따르면, 싸이토카인은, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$  IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-25, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, SLF, LIF, Eta-1 및 Oncostatin M으로 이루어진 그룹 중 적어도 하나일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 또 다른 특징에 따르면, 2 배양하는 단계는, 면역 관문 저해제가 처리된 상기 T세포 및 암 세포주에 제 2 T세포 자극 인자를 처리하는 단계를 포함할 수 있으며, 이때, 제 2 T세포 자극 인자는, 10 내지 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의  $\alpha$ -CD3 및 3 내지 7  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의  $\alpha$ -CD28을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0029] 본 발명의 또 다른 특징에 따르면, 2 배양하는 단계는, 14 내지 20일 중 적어도 하나의 기간 동안 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0030] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 다만, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것에 불과하므로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 한정되는 것으로 해석되어서는 아니된다.

### 발명의 효과

[0031] 본 발명의 일 실시예에 따른, 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법은 개조된 녹아웃 암 세포주와 T세포를 통하여, 싸이토카인 분비량을 차이를 명확하게 확인할 수 있음에 따라, 직관적으로 면역 관문 저해제에 대한 효과를 평가할 수 있다.

[0032] 보다 구체적으로, 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법은 여러 면역세포가 혼합되어 존재하는 PBMC와는 달리 순도 90% 이상의 고농축화된 CD8+ T세포를 포함함에 따라, T세포의 항암효과를 보다 명확하게 관찰할 수 있다.

[0033] 나아가, 이러한 고농축화된 T세포는 PD-1, TIM-3 및 TIGIT를 모두 발현하는 세포뿐만 아니라 PD-1, TIM-3 및 TIGIT 중 적어도 하나인 단일(single) 또는 이중(double) 양성 T세포를 모두 포함할 수 있다. 이에, 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법은 이들 중 표적하고자 하는 수용체를 발현하는 T세포를 선별하여, 면역 관문 저해제의 효과를 확인할 수 있다.



- [0034] 더 나아가, 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법에 따른 고농축화된 T세포는 표적하고자 하는 수용체만을 발현하는 T세포를 선별하여 제공할 수 있음에 따라, 보다 명확한 싸이토카인의 분비량을 확인할 수 있다.
- [0035] 또한, 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법에서의 녹아웃 암 세포주는 시험하고자 하는 표적 면역 관문 리간드 이외의 면역 관문 리간드 즉, 변수가 제거됨에 따라, 표적 면역 관문 리간드의 차단에 따른 싸이토카인 분비 효과를 더 명확하게 확인할 수 있다.
- [0036] 결국, 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법은 증진된 싸이토카인의 분비량을 통하여, 특정 면역 관문 수용체 및 리간드를 표적할 수 있는 저해제에 대한 효과를 정량적으로 뚜렷하게 관찰할 수 있음에 따라, 저해제의 후보 물질 비교 및 선정을 보다 쉽고 용이하게 수행할 수 있다.
- [0037] 이에, 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법은 시료 및 실험자 등과 같은 변수 요인이 제외된 획일화된 방법으로서, 면역 관문 저해제에 대한 후보물질에 대한 평가를 표준화시킬 수 있다.
- [0038] 나아가, 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법은 개조된 녹아웃 암 세포주와 T세포 또한 제공함에 따라, 시료 확보의 한계성을 극복할 수 있다. 이에, 시료 한계에 의하여 제한되어 있는 면역 관문 저해제의 스크리닝을 보다 많이 수행할 수 있게 됨에 따라, 면역 함암 치료제를 개발 속도를 더 증진시킬 수 있다.
- [0039] 본 발명에 따른 효과는 이상에서 예시된 내용에 의해 제한되지 않으며, 더욱 다양한 효과들이 본 명세서 내에 포함되어 있다.

### 도면의 간단한 설명

- [0040] 도 1a 및 1b는 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 관문 저해제의 기작을 예시적으로 도시한 것이다.
- 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법에 대한 순서도를 도시한 것이다.
- 도 3a 내지 3c는 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법에서 T세포의 고농축화(enrichment)에 대한 결과를 도시한 것이다.
- 도 4a 내지 4b는 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법에 따른 고농축화된 T세포의 공동 배양 기간에 대한 결과를 도시한 것이다.
- 도 5a 및 5b는, 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법에서 CD8+ T세포의 면역 관문 수용체 발현에 따른 싸이토카인 분비량에 대한 결과를 도시한 것이다.
- 도 6a 내지 6d는 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법에서 T세포의 게이팅(gating)에 따른 싸이토카인 분비량에 대한 결과를 도시한 것이다.
- 도 7a 내지 7b는 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법에 따른 녹아웃 암 세포주 및 고농축화 T세포의 예시도를 도시한 것이다.
- 도 8a 내지 8b는 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법에서 고농축화된 T세포 및 녹아웃(knock out) 암 세포주에 따른 싸이토카인 분비에 대한 결과를 도시한 것이다.
- 도 9a 내지 9b는 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법에서 고농축화된 T세포 및 녹아웃 암 세포주에 따른 면역 관문 저해제의 효능 평가에 대한 결과를 도시한 것이다.
- 도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법에서 공동 배양에 의한 면역 관문 수용체 및 리간드 간의 직접적인(direct) 상호작용 검증에 대한 결과를 도시한 것이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0041] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 첨부되는 도면과 함께 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나, 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

- [0042] 본 명세서에 사용되는 용어 "포함하다" 또는 "포함하는"은 일반적으로 즉, 하나 이상의 추가적인 (명시되지 않은) 특징 또는 성분의 존재를 허용하는 것을 포함하는 의미로 사용된다. 나아가, 본 명세서에 사용되는 용어 "포함한"뿐만 아니라 다른 형태, 예컨대, "포함하다(include, includes)" 및 "포함된 (included)"은 제한적인 것이 아니다.
- [0043] 본 명세서에서 사용되는 용어 "비소세포성 폐암"은, 상피성 암의 일종으로 폐소성암 (small lung cancer) 이 아닌 모든 상피성 폐암을 의미한다.
- [0044] 본 명세서에서 사용되는 "유의 확률(p-value)"은 \*, \*\*, \*\*\* 및 \*\*\*\* 으로 표기되었으며, \*은  $p < 0.05$ 를 의미하며, \*\*은  $p < 0.01$ 를 의미하며, \*\*\*은  $p < 0.001$ 를 의미하며, \*\*\*\*은  $p < 0.0001$ 을 의미한다.
- [0045] **면역 관문 저해제의 스크리닝 방법**
- [0046] 이하에서는 도 1a 내지 2를 참조하며, 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법에 관하여 설명하도록 한다.
- [0047] 먼저, 도 1a를 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 관문 저해제의 기작에 대하여 구체적으로 설명한다.
- [0048] 암 세포(cancer cell)를 공격할 수 있는 세포 독성(cytotoxic) T세포 즉, CD8+ T세포는 다양한 면역 관문 수용체(immune checkpoint receptor)를 발현할 수 있으며, 암 세포는 이러한 면역 관문 수용체를 통하여 면역 기능을 회피할 수 있다. 보다 구체적으로, 암 세포는 PD-L1, CECAM1 및 PVR과 같은 세포막 단백질인 면역 관문 리간드를 발현시켜, T세포 표면에 발현된 면역 관문 수용체와 결합할 수 있다. 전술한 결합에 의하여, T세포 내부에 억제 신호(inhibitory signal)가 전달되어, 암 세포를 공격할 수 있는 IFN- $\gamma$  및 TNF- $\alpha$ 와 같은 사이토카인의 분비가 감소(-)될 수 있다.
- [0049] 이에, 전술한 면역 관문 수용체를 차단할 수 있는 물질(antagonist)을 처리하여 T세포의 면역 반응을 증진시키는 것이 종래의 항암 치료의 한계를 극복할 수 있는 좋은 대안으로 주목을 받고 있으며, 이에 따라, 다양한 면역 관문 저해제가 활발히 개발되고 있다.
- [0050] 한편, 건강한 개체로부터 획득한 CD8+ T세포는 면역 관문 수용체의 발현율이 매우 낮다. 이에, 면역 관문 저해제의 후보 물질을 선별하기 위하여, 환자로부터 획득한 CD8+ T세포를 사용되어 왔으나, 환자로부터 획득한 CD8+ T세포는 일정하게 면역 관문 수용체를 발현하고 있는 것이 아닌, 개체 및 시료에 따라 상이하게 면역 관문 수용체를 발현하고 있어, 균일한 사이토카인 분비량을 측정하기 어렵다. 나아가, 전술한 CD8+ T세포는 환자로부터 획득됨에 따라, 이의 양은 매우 한정적일 수 있다.
- [0051] 또한, 암 세포주는 한 종류의 면역 관문 리간드만 발현하는 것이 아닌 다양한 면역 관문 리간드를 발현하고 있다. 보다 구체적으로, 도 1b를 참조하면, 암 세포주는 CD8+ T세포와 마찬가지로 개체 및 시료에 따라 상이하게 면역 관문 리간드를 발현하고 있어, 일반적인 암 세포주로는 표적하고자 하는 특정 리간드에 대한 차단 효과를 측정하기 어렵다. 예를 들어, CEACAM1 및 TIM3의 결합을 차단할 수 있는 TIM-3 항체에 대한 효과를 측정하고자 할 경우, 이에 대한 결합이 차단되었어도, 여전히 PD-L1 및 PD-1과 PVR 및 TIGIT 등의 다양한 면역 관문 결합에 의한 저해 신호를 차단하지 못하여, 표적 면역 관문 차단에 의하여 향상된 사이토카인 분비량을 관찰하기 어려울 수 있다.
- [0052] 결국, 본 발명의 발명자들은, 특정 면역 관문 차단에 의한 명확한 사이토카인 분비량 차이를 측정하기 위하여, 측정하고자 하는 표적 면역 관문 리간드를 제외한 불특정 다수의 리간드가 제거된 암 세포주와 건강한 개체로부터 획득하여도 면역 관문 수용체가 발현되어 있는 고농축화된 CD8+ T세포를 개발하였다. 나아가, 본 발명의 발명자들은 전술한 암 세포주와 T 세포 통하여 면역 관문 저해제의 평가에 있어, 실험자 및 시료와 같은 환경적 요인에 영향받지 않고, 일관적인 결과를 도출해 낼 수 있는 스크리닝 방법을 더 개발하였다.
- [0053] 이에, 도 2를 참조하면, 전술한 암 세포주와 T세포를 이용한 본 발명의 일 실시예에 따른, 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법에 대한 순서도가 도시된다.
- [0054] 본 발명의 일 실시예에 따른, 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법은 개체로부터 분리된 생물학적 시료를 T세포가 농축되도록 제 1 배양하는 단계(S110), 농축된 T세포에 면역 관문 저해제를 처리하는 단계(S120), 면역 관문 저해제가 처리된 T세포와 면역 관문 리간드 그룹에 대한 유전자가 녹아웃된 암 세포주를 혼합하여 제 2 배양하는 단계(S130) 및 제 2 배양된 T세포의 사이토카인 분비량을 측정하는 단계(S140)을 포함할 수 있다.
- [0055] 먼저, 개체로부터 분리된 생물학적 시료를 T세포가 농축되도록 제 1 배양하는 단계(S110)는, 생물학적 시료에

제 1 T세포 자극 인자(Tcell activating factor)를 처리하는 단계 및 자극 인자가 처리된 상기 생물학적 시료를 배양하는 단계를 포함하는 단계를 포함할 수 있다. 이때, 제 1 T세포 자극 인자는,  $\alpha$ -CD3, hIL-2 및 hIL-7을 포함할 수 있으며, 각각의 양은 anti-CD3 0.5 내지 2  $\mu$ g/ml, IL-2 5 내지 20 ng/ml 및 IL-7 5 내지 20 ng/ml일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 바람직하게는  $\alpha$ -CD3 1  $\mu$ g/ml, IL-2 10 ng/ml 및 IL-7 10 ng/ml일 수 있다.

[0056] 이러한, 제 1 배양하는 단계는, 7 내지 21일 중 적어도 하나의 기간 동안 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 그러나, 바람직하게, 종양 세포를 파괴할 수 있는 CD8+ T세포가 가장 많이 배양될 수 있는 제 1 배양하는 단계의 기간은, 14일일 수 있다.

[0057] 이에, 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법에서의 생물학적 시료는, 제 1 배양하는 단계(S110)를 통하여, CD8+ T세포를 전체 생존 세포에 대하여 90 %이상 포함할 수 있으며, CD8+ T세포는 제 1 배양하기 전보다 150배 이상 세포수가 증가될 수 있다.

[0058] 이때, 본 발명의 일 실시예에 따른 생물학적 시료는 말초 혈액 단핵세포(peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 또는 골수유래 단핵세포(bone marrow mononuclear cell, BMMC)를 포함할 수 있으나, 바람직하게는 PBMC 일 수 있다. 나아가, PBMC는 다양한 면역 세포를 포함할 수 있다. 보다 구체적으로, PBMC는 T세포, B세포 및 NK세포를 포함하는 림프구 및 단핵구를 포함하고 있으나, 전술한 본 발명의 제 1 배양하는 단계(S110)에 의하여, CD8+ T세포가 고농축화되어 있을 수 있다. 즉, PBMC 내에 있는 T세포 중 CD8+ T세포가 제 1 T세포 자극 인자의 처리 및 배양으로 인하여, 증식이 활발해져 세포 수(population)이 증가될 수 있으며, 나아가 면역 관문 수용체의 발현도 증가될 수 있다.

[0059] 그 다음, 농축된 T세포에 면역 관문 저해제를 처리하는 단계(S120)에서 농축된 T세포는 다양한 면역 관문 수용체를 발현하고 있을 수 있다. 보다 구체적으로, 농축된 T세포는 CD8+ T세포가 전체 생존 세포에 대하여 90%이상 차지하는 T세포를 의미할 수 있으며, T세포에 발현될 수 있는 면역 관문 수용체는 PD-1, TIM-3, TIGIT, CTLA-4, 2B4, CD160, BTLA, CD200R, SIRPA, SIRPG, VSIG3, VISTA, TMIGD2 및 ILT3으로 이루어진 그룹 중 적어도 하나일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며 T세포에서 발현될 수 있는 면역 관문 수용체를 모두 포함할 수 있다.

[0060] 나아가, 면역 관문 수용체가 발현된 T세포는 PD-1-TIM-3-TIGIT-CD8+T세포, PD-1+TIM-3-TIGIT-CD8+T세포, PD-1-TIM-3+TIGIT-CD8+T세포, PD-1-TIM-3-TIGIT+CD8+T세포, PD-1+TIM-3+TIGIT-CD8+T세포, PD-1+TIM-3-TIGIT+CD8+T세포, PD-1-TIM-3+TIGIT+CD8+T세포 및 PD-1+TIM-3+TIGIT+CD8+T세포로 이루어진 그룹 중 적어도 하나를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 이때, PD-1+TIM-3+TIGIT+CD8+T세포는, 농축된 T세포 전체에 대하여 9 %이상 발현될 수 있다.

[0061] 이때, 면역 관문 저해제(immune checkpoint inhibitor)는 본 발명의 고농축된 T세포의 표면에 발현된 면역 관문 수용체의 작용을 억제할 수 있는 길항제(antagonist)를 의미할 수 있으며, 면역 관문 억제제와 동일한 의미로 호환되어 사용될 수 있다. 나아가, 면역 관문 저해제는 길항제로서, 항체, 단백질, 올리고 펩타이드, 유기 분자, 다당류, 폴리뉴클레오티드로 이루어진 그룹 중 적어도 하나일 수 있으며, T세포의 면역 관문 수용체의 작용을 억제함으로써 사이토카인 분비량을 증가시킬 수 있다. 즉, 면역 관문 저해제는 면역 관문의 작용을 억제하여, T세포의 사이토카인 분비량을 증가시킬 수 있는 모든 물질을 포함할 수 있으며, 이에 따라, T세포의 면역 관문 수용체를 표적할 수 있는 물질뿐만 아니라, 암 세포에서 발현되는 면역 관문 리간드를 표적하여, 이의 작용을 저해시킬 수 있는 물질 또한 포함될 수 있다.

[0062] 그 다음, 면역 관문 저해제가 처리된 T세포와 면역 관문 리간드에 대한 유전자가 녹아아웃된 암 세포주를 혼합하는 단계(S130)에서 암 세포주는 HCC4006인 폐암 세포주일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 다양한 암 세포주를 모두 포함할 수 있다. 나아가, 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법에서의 암 세포주는 다양한 유전자 편집 기술을 통하여 면역 관문 리간드의 발현에 관여하는 유전자를 녹아아웃시킨 녹아아웃 암 세포주를 포함할 수 있다. 보다 구체적으로, 암 세포주는, PD-L1, Galectin-9, CEACAM1 및 PVR으로 이루어진 그룹 중 적어도 하나에 대한 유전자가 녹아아웃될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이때, 녹아아웃될 수 있는 유전자는 암 세포주에서 발현될 수 있는 다양한 면역 관문 리간드의 발현에 관여하는 유전자를 모두 포함할 수 있다. 나아가, 암 세포주에서 발현될 수 있는 면역 관문 리간드는 PD-L1, PD-L2, PVR(CD155), B7-1, B7-2, CD112, CD113, Galectin-9, CEACAM1, HMGB1, CD48, HVEM, CD200, CD47, B7-H3, B7-H4, VISTA, VSIG3, VSIG4, HHLA2, BTN1A1, BTN2A2, BTN3A1, BTN2L2, TIM-1, TIM-4 및 ALCAM으로 이루어진 그룹 중 적어도 하나를 포함할 수 있으며, 이의 발현에 관여하는 모든 유전자가 녹아아웃될 수 있다.

- [0063] 나아가, 암 세포주에서 면역 관문 리간드의 제거는 CRISPR(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)/Cas9 시스템을 이용하여 수행될 수 있다. 그러나, 전술한 시스템에 제한되는 것은 아니며, 표적하고자 하는 면역 관문 리간드의 발현을 제거할 수 있는 다양한 유전자 편집 기술을 모두 포함할 수 있다. 예를 들어, ZFN(Zinc Finger Nuclease) 및 TALEN(Tranor Activator-Like Effector Nuclease) 등과 같은 다양한 기술이 이용될 수 있다.
- [0064] 더 나아가, 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법에서의 녹아웃 암 세포주는 T세포의 사이토카인 분비량 증진을 위하여, 공동자극 리간드(co-stimulatory ligand) 또는 사이토카인(cytokine)과 같은 T세포 자극 인자들을 더 포함할 수 있다. 이때, 암세포주에서의 공동자극 리간드 및 사이토카인은 이를 발현시킬 수 있는 유전자가 암 세포주 내에 삽입되어 발현될 수 있다. 이때, 면역 관문 리간드가 녹아웃된 암 세포주에서 발현될 수 있는 공동 자극 리간드는 B7-1, B7-2, ICOSL, HHLA2, CD70, OX40L, 4-1BBL, GITRL, TL1A, CD40, CD155, CD30L 및 LIGHT로 이루어진 그룹 중 적어도 하나일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 사이토카인은 TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$  IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  IFN- $\gamma$   $\alpha$ , IL-1 $\beta$  IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-25, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, SLF, LIF, Eta-1 및 Oncostatin M으로 이루어진 그룹 중 적어도 하나일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이에, 녹아웃된 암 세포주는 공동자극 리간드 또는 사이토카인을 더 포함함으로써, T세포를 자극하여 사이토카인 분비능을 더 향상시킬 수 있다.
- [0065] 그 다음, 면역 관문 저해제가 처리된 T세포 및 면역 관문 리간드에 대한 유전자가 녹아웃된 암 세포주를 혼합하여 제 2 배양하는 단계(S130)는, 혼합된 T세포 및 암 세포주에 제 2 T세포 자극 인자를 처리하는 단계를 포함할 수 있다. 이때, 제 2 T세포 자극 인자는,  $\alpha$ -CD3 및  $\alpha$ -CD28를 포함하고 있으며, 각각의 양은  $\alpha$ -CD3 10 내지 30  $\mu$ g/ml 및  $\alpha$ -CD28 3 내지 7  $\mu$ g/ml일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 바람직하게는  $\alpha$ -CD3 20  $\mu$ g/ml 및  $\alpha$ -CD28 5  $\mu$ g/ml일 수 있다. 나아가, 제 2 배양하는 단계(S130)는 사이토카인의 분비량이 가장 많이 분비되는 14 내지 20일 중 적어도 하나의 기간 동안 수행될 수 있다.
- [0066] 그 다음, 제 2 배양된 T세포 및 암 세포주의 사이토카인 분비량을 측정하는 단계(S140)는 제 2 배양된 T세포를 게이팅(gating)하는 단계를 더 포함할 수 있다. 나아가, 게이팅 하는 단계는 면역 관문 수용체(immune checkpoint receptor) 발현에 따라 게이팅이 수행될 수 있다. 즉, T세포에서 발현되는 면역 관문 수용체의 형광 발현을 이용하여, 표적하고자 하는 특정 면역 관문 수용체만을 발현하는 T세포를 선별할 수 있다. 이때, 게이팅하는 단계는, 형광 활성화 세포 분류(fluorescence-activated cell sorting: FACS) 또는 면역자기 세포 분류(immunomagnetic cell sorting: MACS)를 이용하여 수행될 수 있다. 이에, 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법은 측정하는 단계(S140)를 통하여 표적 저해제에 대한 효과 즉, 사이토카인의 분비량 차이를 명확하게 확인할 수 있다.
- [0067] 나아가, 측정하는 단계(S140)를 통하여, 측정되는 사이토카인은 사이토카인은, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$  IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  IFN- $\gamma$   $\alpha$ , IL-1 $\beta$  IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-25, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, SLF, LIF, Eta-1 및 Oncostatin M 으로 이루어진 그룹 중 적어도 하나일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 면역 세포에서 분비되어 암 세포를 공격할 수 있는 다양한 물질을 모두 포함할 수 있다.
- [0068] 결국, 본 발명의 일 실시예에 따른, 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법은 개조된 암 세포주와 T세포를 통하여, 표적하고자 하는 면역 관문 저해제의 효과 즉, 사이토카인 분비량을 차이를 명확하게 확인할 수 있다.
- [0069] **T세포의 고농축화(enrichment)**
- [0070] 이하에서는 도 3a 내지 3c를 참조하여, 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법에서 T세포의 고농축화(enrichment)에 대하여 설명하도록 한다.
- [0071] 도 3a를 참조하면, 인간 말초 혈액 단핵세포(human peripheral blood mononuclear cell, hPBMC)을 통한 CD8+ T세포의 고농축화에 대한 결과가 도시된다. 먼저, 도 3a의 (a)를 참조하면, 건강한 개체(healthy donor)의 혈액으로부터 획득한 PBMC에 anti-CD3, growth factor interleukin 2(IL-2) 및 growth factor interleukin 7(IL-7)을 처리하여 9일 동안 배양한다. 이때, 배양기간은 9일로 도시되었지만, 이에 제한되는 것은 아니며, 7 내지 14일 중 적어도 하나의 기간동안 배양할 수 있다.
- [0072] 이때, 인간 말초 혈액 단핵세포(human peripheral blood mononuclear cell, hPBMC)은 둥근 핵을 가진 혈액의 모든 세포로서, T세포, B세포 및 NK세포를 포함하는 림프구 및 단핵구를 포함하고 있으며, 배양을 통하여 다양



한 면역세포로 분화될 수 있다.

- [0073] 또한, anti-CD3, human growth factor interleukin 2(hIL-2) 및 human growth factor interleukin 7(hIL-7)는 CD8+ T세포를 활성화시키기 위한 자극 인자로서, T세포 수용체를 자극하여 증식(proliferation)을 유발하고, CD3 complex와 관련된 T세포 표면의 항원 수용체(antigen receptor)를 교란하여 항원 수용체를 활성화시킬 수 있다. 나아가, PBMC 배양 시 첨가되는 각각의 양은 anti-CD3 0.5 내지 2  $\mu\text{g/ml}$ , IL-2 5 내지 20 ng/ml 및 IL-7 5 내지 20 ng/ml일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 바람직하게는  $\alpha$ -CD3 1  $\mu\text{g/ml}$ , IL-2 10 ng/ml 및 IL-7 10 ng/ml일 수 있다.
- [0074] 이에, 도 3a의 (b)를 참조하면, 전술한 도 3a의 (a) 과정에 의하여 배양된 T세포의 발현 결과가 도시된다. SSC-A로 생존 세포(live cell)을 선별한 결과, 세포 생존은 배양 7일 및 14일째에 가장 높은 것으로 나타나며, 이때의 세포 생존율은 각각 91 % 및 90 %인 것으로 나타난다. 나아가, 배양 기간이 21일 이상 진행될수록 생존 세포수가 감소하는 것으로 나타난다.
- [0075] 또한, 생존 세포 중 CD8+ T세포의 비율은 배양이 진행될수록 증가하며, 배양 14일째에 CD8+ T세포의 비율은 91%로 가장 높은 것으로 나타난다. 이와는 반대로, CD4+ T세포의 비율은 배양이 진행될수록 감소하며, 배양 14일 이후부터 급격하게 5% 이하의 낮은 비율을 차지하는 것으로 나타난다.
- [0076] 보다 구체적으로, 도 3a의 (c)를 참조하면, 도 3a의 (b)에 대한 결과를 그래프로 도시한 결과가 도시된다. 배양 기간에 따른 PBMC로 유래된 전체 세포 수는 배양 7일부터 증가하여 배양 21일에 약  $300 \times 10^6$ 로 가장 높은 것으로 나타나며, 21일 초과 배양이 진행될 경우, 세포 수가 감소하는 것으로 나타난다. 즉, 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법을 통한 PBMC로부터 유래된 전체 세포는 배양 7 내지 21일 기간 사이에 가장 높은 증식율을 갖는 것을 의미할 수 있으며, 배양 기간이 21일 초과하여 진행될 경우, 세포의 증식율이 감소하는 것을 의미할 수 있다.
- [0077] 나아가, 배양 기간에 따른 PBMC로부터 유래된 전체 세포의 생존 세포 비율은 배양 7 내지 21일기간 내에는 87 % 이상인 것으로 나타나며, 21일 초과 배양이 진행될 경우, 생존 세포 수가 감소하는 것으로 나타난다.
- [0078] 나아가, PBMC로 유래된 전체 세포 중 CD8+ T세포의 비율은 배양 7일부터 급격하게 증가하여, 배양 14일부터는 90% 이상 유지하는 것으로 나타나며, 이와 대조적으로 CD4+ T세포의 비율은 7일부터 급격하게 감소하여, 배양 14일부터는 5% 미만인 것으로 나타난다.
- [0079] 이에, PBMC로 유래된 전체 세포 중 CD8+ T세포의 수는 배양 7일째에는 약 15 내지 20  $\times 10^6$ 인 것으로 나타나지만, 이후 배양 14일 내지 21일 기간 동안에는 급격하게 CD8+ T세포가 증가하여 약  $150 \times 10^6$ 인 것으로 나타난다. 이에, 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법에서 T세포의 고농축화를 통하여 CD8+ T세포를 첫 세포수의 약 150배 정도 분화(증식) 즉, 고농축화시킬 수 있다. 이때, CD8+ T세포를 증식시키기 위한 최소한의 배양 기간은, CD8+ T세포가 급속도로 증가하는 7 내지 14일 중 적어도 하나의 기간일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 바람직하게는 9일일 수 있다.
- [0080] 한편, 배양 28일째에는 CD8+ T세포 수가 급격히 감소하는 것으로 나타나나, 이는 전술한 바와 같이, 전체 세포의 수가 감소됨에 따라, 감소된 것으로 나타난다. 이에, PBMC로부터 가장 많은 수의 CD8+ T세포를 얻기 위한 최장 배양기간으로 21 내지 28일 중 적어도 하나의 기간일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 바람직하게는 21일일 수 있다.
- [0081] 전술한 과정에 따라, 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법은 여러 면역세포가 혼합되어 존재하는 PBMC와는 달리 순도 90% 이상의 CD8+ T세포를 포함함에 따라, T세포의 항암효과를 보다 명확하게 관찰할 수 있다.
- [0082] 도 3b를 참조하면, 전술한 과정에 의하여 고농축화된 T세포의 면역 관문 수용체 발현 결과가 도시된다. 먼저, 도 3b의 (a)를 참조하면, 배양 0일째에는 PBMC가 건강한 개체로부터 획득됨에 따라, CD8+ T세포 및 CD4+ T세포에서 면역 관문 수용체(immune checkpoint receptor)인 PD-1, TIGIT 및 TIM-3가 발현이 거의 되지 않은 것으로 나타난다. 그러나, 배양 기간이 진행될수록, TIGIT 및 TIM-3를 발현하는 CD8+ T세포 및 CD4+ T세포 수가 증가하는 것으로 나타난다.
- [0083] 보다 구체적으로, 도 3b의 (b)를 참조하면, 도 3b의 (a)에 대한 결과를 그래프로 도시한 결과가 도시된다. 먼저, 배양 기간에 따른 PD-1을 발현하는 CD8+ T세포 및 CD4+ T세포의 비율은 배양 3일 차를 제외하곤 모두 각각

약 70% 및 20% 대로 유지되는 것으로 나타난다.

- [0084] 그 다음, TIM-3을 발현하는 CD8+ T세포의 비율은 배양 3 내지 14일에 80% 이상인 것으로 나타나며, 배양 21일부터는 감소하는 것으로 나타난다. 나아가, TIM-3을 발현하는 CD4+ T세포의 비율은 배양 기간 동안 60 내지 80 % 대로 일정하게 유지되는 것으로 나타난다.
- [0085] 그 다음, TIGIT를 발현하는 CD8+ T세포의 비율은 배양 기간이 증가함에 따라, 증가하는 것으로 나타나며, TIGIT을 발현하는 CD4+ T세포의 비율은 약 20 %대로 일정하게 유지되는 것으로 나타난다.
- [0086] 결과적으로, CD8+ T세포에서 면역 관문 수용체인 PD-1, TIGIT 및 TIM-3가 공통적으로 가장 많이 발현되는 배양 기간은 3 내지 14일인 것으로 나타나며, 바람직하게는 14일일 수 있다. 그러나, 배양 기간은 이에 제한되는 것은 아니며, 발현하고자 하는 면역 관문 수용체의 종류에 따라, 배양 기간이 다양하게 달라질 수 있다.
- [0087] 나아가, 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법에 의하여 고농축화된 T세포는 *In-vivo*와는 달리 PD-1 발현이 높지 않아도, 배양 7 내지 14일 동안 높은 TIM-3 및 TIGIT 발현율을 가질 수 있다. 보다 구체적으로, *In-vivo*에서의 T세포는 PD-1이 발현되어야 다른 면역 관문 수용체들이 발현된다. 이에, PD-1 발현이 낮은 T세포는 TIM-3 및 TIGIT를 포함하는 다른 면역 관문 수용체에 대한 발현이 낮을 수 있다. 그러나, 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법에 의하여 고농축화된 T세포는 PD-1 발현이 되지 않아도, TIM-3 및 TIGIT를 포함하는 면역 관문 수용체의 높은 발현율을 가질 수 있다. 나아가, 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법에 의하여 고농축화된 T세포는 각각의 면역 관문 수용체를 포함하는 T세포만을 선별하여 활용할 수 있다.
- [0088] 한편, 도 3c를 참조하면, 전술한 도 3b에서 배양 14일에 대한 CD8+ T세포의 면역 관문 수용체 발현 결과가 도시된다. 먼저, 도 3c의 (a)를 참조하면, 배양 14일에 TIM-3(+) 및 PD-1(+) 모두를 발현하는 CD8+ T세포는 전체 CD8+ T세포 중 17%인 것으로 나타나며, TIM-3+PD-1+CD8+ T세포 중 TIGIT(+)을 발현하는 세포는 49%인 것으로 나타난다.
- [0089] 보다 구체적으로, 3c의 (b)를 참조하면, 3c의 (a)의 결과를 그래프로 도시한 결과가 도시된다. 배양 14일에 대한 CD8+ T세포 중 PD-1만 발현하는 세포는 약 2%인 것으로 나타나며, TIM-3만 발현하는 세포는 약 47%인 것으로 나타나며, TIGIT만 발현하는 세포는 약 5%인 것으로 나타난다.
- [0090] 또한, 배양 14일에 대한 CD8+ T세포 중 PD-1 및 TIM-3을 동시에 발현하는 세포는 약 9%인 것으로 나타나며, PD-1 및 TIGIT을 동시에 발현하는 세포는 약 4%인 것으로 나타나며, TIM-3 및 TIGIT을 동시에 발현하는 세포는 약 14%인 것으로 나타난다.
- [0091] 또한, 배양 14일에 대한 CD8+ T세포 중 PD-1, TIM-3 및 TIGIT을 모두 발현하는 세포는 약 9%인 것으로 나타난다.
- [0092] 즉, 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법에 의하여 고농축화된 T세포는 PD-1, TIM-3 및 TIGIT를 모두 발현하는 세포뿐만 아니라 PD-1, TIM-3 및 TIGIT 중 적어도 하나인 단일(single) 또는 이중(double) 양성 T세포를 모두 포함할 수 있다. 이에, 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법은 이들 중 표적하고자 하는 수용체를 발현하는 T세포를 선별하여, 면역 관문 저해제의 효과를 확인할 수 있다.
- [0093] **고농축화된 T세포의 공동 배양 기간 설정**
- [0094] 이하에서는 도 4a 내지 4b를 참조하여, 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법에 따른 고농축화된 T세포가 최대의 싸이토키인을 분비할 수 있는 공동 배양 기간에 대하여 설명하도록 한다.
- [0095] 먼저, 도 4a를 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법에 따른 고농축화된 T세포 및 암 세포주의 예시도가 도시된다.
- [0096] 암 세포주는 HCC4006(Human lung adenocarcinoma cell line, HCC) wild type(WT)의 폐암 세포주가 사용되었으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 면역 관문 리간드를 발현할 수 있는 다양한 암 종류의 세포주를 모두 포함하여 사용할 수 있다.
- [0097] 나아가, 폐암 세포주는 면역 관문 리간드인 PD-L1, PVR, CEACAM1 및 Galecitn-9을 모두 발현하고 있는 것으로 나타난다. 이에, 전술한 폐암 세포주와 고농축화된 T세포와의 공동 배양(co-culture)을 통하여, 싸이토키인의 분비능이 가장 극대화될 수 있는 시기를 확인할 수 있다. 이때, 고농축화된 T세포는 본 발명의 일 실시예에 따

른 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법에 의하여 선별된 PD-1+TIM-3+TIGIT+CD8+ T세포를 의미한다.

- [0098] 이에, 도 4b를 참조하면, 공동 배양 기간에 따른 고농축화된 T세포의 싸이토카인 분비량에 대한 결과가 도시된다. 이때, 공동 배양 기간에 따른 싸이토카인 분비량을 확인하기 위하여, 본 발명의 고농축화된 T세포(PD-1+TIM-3+TIGIT+CD8+ T세포)에 폐암 세포주(PD-L1+CEACAM1+PVR+),  $\alpha$ -CD3 및  $\alpha$ -CD28을 처리하여 공동 배양하였다. 나아가,  $\alpha$ -CD3 및  $\alpha$ -CD28는 CD8+ T세포를 활성화시키기 위한 자극 인자로서, T세포 수용체를 자극하여 싸이토카인의 분비량을 증진시키고, 세포의 사멸을 억제할 수 있으며, 공동 배양 시 첨가되는 각각의 양은,  $\alpha$ -CD3 10 내지 30  $\mu$ g/ml 및  $\alpha$ -CD28 3 내지 7  $\mu$ g/ml일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 바람직하게는  $\alpha$ -CD3 20  $\mu$ g/ml 및  $\alpha$ -CD28 5  $\mu$ g/ml일 수 있다.
- [0099] 먼저, 도 4b의 (a)를 참조하면, 공동 배양 0일째에는 제 1 사분면, 제 2사분면 및 제 4사분면의 싸이토카인 분비량이 거의 관찰되지 않은 것으로 나타나나, 배양 기간이 경과될수록 제 1사분면, 제 2사분면 및 제 4사분면의 싸이토카인의 분비량이 증가되는 것으로 나타난다.
- [0100] 보다 구체적으로, 도 4b의 (b)를 참조하면, 도 4b의 (a)에 대한 결과를 그래프로 도시한 결과가 도시된다. IFN- $\gamma$ 를 분비하는 CD8+ T세포 수는 공동 배양 14 및 20일째에 가장 많은 것으로 나타나며, 이때, IFN- $\gamma$ 를 분비하는 CD8+ T세포가 차지하는 비율은 전체 T세포에 대하여 약 30%인 것을 나타낸다.
- [0101] 나아가, TNF- $\alpha$ 를 분비하는 CD8+ T세포 수는 공동 배양 14일째에 가장 많은 것으로 나타나며, 이때, IFN- $\gamma$ 를 분비하는 CD8+ T세포가 차지하는 비율은 전체 T세포에 대하여 약 43%인 것을 나타낸다.
- [0102] 더 나아가, IFN- $\gamma$  및 TNF- $\alpha$ 를 분비하는 CD8+ T세포 수는 공동 배양 14 및 20일째에 가장 많은 것으로 나타나며, 이때, IFN- $\gamma$  및 TNF- $\alpha$ 를 분비하는 CD8+ T세포가 차지하는 비율은 전체 T세포에 대하여 약 25%인 것을 나타낸다.
- [0103] 이에, 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법에서의 고농축화된 T세포는 공동 배양 시 14일 내지 20일째에 가장 많은 싸이토카인을 분비하는 것으로 나타남에 따라, 면역 관문 저해제의 뚜렷한 효과를 확인하기 위한 암 세포주와의 공동 배양 기간은 싸이토카인의 분비량이 가장 많이 분비될 수 있는 14 내지 20일 중 적어도 하나의 기간일 수 있다.
- [0104] **고농축화된 T세포의 선별(gating)에 따른 싸이토카인 분비 차이 확인**
- [0105] 이하에서는 도 5a 내지 6d를 참조하여, 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법에서 T세포의 게이팅에 따른 싸이토카인 분비에 대하여 설명하도록 한다.
- [0106] 먼저, 도 5a 및 5b를 참조하면, 공동 배양 시 CD8+ T세포의 면역 관문 수용체 발현에 따른 싸이토카인 분비량에 대한 결과가 도시된다. 이때, 면역 관문 수용체 발현에 따른 싸이토카인 분비량을 확인하기 위하여, 도 5a에서는 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법에 의하여 고농축화된 T세포 중 PD-1이 발현되지 않은 CD8+ T세포가 사용되었으며, 도 5b에서는 고농축화된 T세포 중 PD-1이 발현된 CD8+ T세포가 사용되었다. 나아가, 폐암 세포주로는 PD-L1, CEACAM1 및 PVR이 모두 발현된 폐암 세포주(PD-L1+CEACAM1+PVR+)가 사용되었다.
- [0107] 먼저, 도 5a의 (a)를 참조하면, 면역 관문 수용체인 TIM-3 또는 TIGIT의 발현이 많아질수록 싸이토카인의 분비량이 감소하는 것으로 나타난다.
- [0108] 보다 구체적으로, 도 5a의 (b)를 참조하면, 도 5a의 (a)에 대한 결과를 그래프로 도시한 결과가 도시된다. IFN- $\gamma$ 를 분비하는 PD-1-CD8+ T세포 수는 TIM-3 및 TIGIT 발현이 모두 음성(-)인 경우, 가장 많은 것으로 나타나며, 이때의 IFN- $\gamma$ 를 분비하는 TIM-3-TIGIT-PD-1-CD8+ T세포 수는 전체 PD-1-CD8+ T세포에 대하여 약 50 %인 것으로 나타난다.
- [0109] 반면에, IFN- $\gamma$ 를 분비하며 TIM-3 및 TIGIT 발현이 모두 양성(+)인 PD-1-CD8+ T세포(TIM-3+TIGIT+PD-1-CD8+ T세포) 수는 전체 PD-1-CD8+ T세포에 대하여 약 10 %로 가장 적은 것으로 나타난다.
- [0110] 또한, IFN- $\gamma$  및 TNF- $\alpha$  모두를 분비하는 TIM-3-TIGIT-PD-1-CD8+ T세포 수는 전술한 바와 마찬가지로, 전체 PD-1-CD8+ T세포에 대하여 약 42 %로 가장 많은 것으로 나타나며, TIM-3+TIGIT+PD-1-CD8+ T세포 수는 전체 PD-1-CD8+ T세포에 대하여 약 8 %로 가장 적은 것으로 나타난다.
- [0111] 나아가, 도 5b의 (a)를 참조하면, 4c와 마찬가지로, 면역 관문 수용체인 TIM-3 또는 TIGIT의 발현이 많아질수록 싸이토카인의 분비량이 감소하는 것으로 나타난다.

- [0112] 보다 구체적으로, 도 5b의 (b)를 참조하면, 도 5b의 (a)에 대한 결과를 그래프로 도시한 결과가 도시된다. IFN- $\gamma$ 를 분비하는 PD-1+CD8+ T세포 수는 TIM-3 및 TIGIT 발현이 모두 음성(-)인 경우, 가장 많은 것으로 나타나며, 이때의 IFN- $\gamma$ 를 분비하는 TIM-3-TIGIT-PD-1+CD8+ T세포 수는 전체 PD-1+CD8+ T세포에 대하여 약 63 %인 것으로 나타난다.
- [0113] 반면에, IFN- $\gamma$ 를 분비하며 TIM-3 및 TIGIT 발현이 모두 양성(+)인 PD-1-CD8+ T세포(TIM-3+TIGIT+PD-1+CD8+ T세포) 수는 전체 PD-1+CD8+ T세포에 대하여 약 20 %로 가장 적은 것으로 나타난다.
- [0114] 나아가, IFN- $\gamma$  및 TNF- $\alpha$  모두를 분비하는 TIM-3-TIGIT-PD-1+CD8+ T세포 수는 전술한 바와 마찬가지로, 전체 PD-1+CD8+ T세포에 대하여 약 59 %로 가장 많은 것으로 나타나며, TIM-3+TIGIT+PD-1+CD8+ T세포 수는 전체 PD-1+CD8+ T세포에 대하여 약 18 %로 가장 적은 것으로 나타난다.
- [0115] 결국, CD8+ T세포는 표적 수용체가 차단되어도, 이외의 면역 관문 수용체 즉, PD-1, TIM-3 및 TIGIT 중 적어도 하나와 암 세포주의 면역 관문 리간드와의 결합에 의하여, 억제 신호가 전달되어 사이토카인의 분비량이 감소될 수 있음에 따라, 표적 수용체 이외의 결합을 제거하여 표적 수용체 저해제를 확인하는 것이 보다 뚜렷한 효과를 관찰할 수 있다.
- [0116] 이에, 이하에서는, 도 6a 내지 6d를 참조하여, CD8+ T세포의 선별 즉, 표적하고자 하는 면역 관문 수용체를 발현하는 T세포의 게이팅(gating)에 따른 사이토카인 분비량에 대하여 설명하도록 한다.
- [0117] 먼저, 도 6a를 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법에서의 게이팅 방법을 예시적으로 도시한 것이다.
- [0118] Isotype control을 처리하는 경우, 일반적으로 사용되는 staining 항체로 PD-1 및 TIM-3가 염색될 수 있다. 그러나, 차단 항체(blocking antibody)를 처리할 경우, 일반적으로 사용되는 staining 항체와 경쟁(competition)을 하게 됨에 따라, PD-1 및 TIM-3가 염색되지 않을 수 있다. 즉, 차단 항체에 의하여 일반적으로 사용되는 staining 항체가 결합되지 못하여 원하고자 하는 표적 수용체에 대한 발현 확인이 어려울 수 있다.
- [0119] 이에, 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법에서는 차단 항체 즉, 면역 관문 저해제에 대한 항체를 표적할 수 있는 2차 항체(secondary antibody)를 사용하여, 표적하고자 하는 수용체의 발현을 확인하고, 이를 게이팅할 수 있다.
- [0120] 도 6b를 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법에서 고농축화된 T세포의 PD-1 게이팅에 따른 사이토카인 분비량에 대한 결과가 도시된다. 이때, PD-1을 발현하는 CD8+ T세포는 항 PD-1 항체( $\alpha$ PD-1 antibody)를 이용하여 게이팅되었다.
- [0121] 먼저, 도 6b의 (a)를 참조하면, 전체 CD8+ T세포의 경우, PD-1 항체 처리에 따른 사이토카인 변화 즉, 제 1사분면, 2사분면 및 4사분면에 대한 차이가 없는 것으로 나타난다. 그러나, 항 PD-1 항체를 이용하여, PD-1을 발현하는 CD8+ T세포(PD-1+CD8+ T세포)만을 게이팅한 경우, 제 1사분면, 2사분면 및 4사분면의 사이토카인을 분비하는 세포가 증가하는 것으로 나타난다.
- [0122] 보다 구체적으로, 도 6b의 (b)를 참조하면, 도 6b의 (a)에 대한 결과를 그래프로 도시한 결과가 도시된다. 전체 CD8+ T세포에서는 PD-1 항체를 처리할 경우, IFN- $\gamma$ 를 분비하는 세포 수의 변화가 없는 것으로 나타난다( $p=0.51$ ). 그러나, 항 PD-1 항체를 이용하여 게이팅된 PD-1+CD8+ T세포에서는 PD-1 항체를 처리할 경우, IFN- $\gamma$ 를 분비하는 세포 수가 유의하게 증가하는 것으로 나타난다( $p<0.01$ ).
- [0123] 또한, 전체 CD8+ T세포에서는 PD-1 항체를 처리할 경우, TNF- $\alpha$ 를 분비하는 세포 수의 증가가 없는 것으로 나타난다. 그러나, 항 PD-1 항체를 이용하여 게이팅된 PD-1+CD8+ T세포에서는 PD-1 항체를 처리할 경우, TNF- $\alpha$ 를 분비하는 세포 수가 유의하게 증가하는 것으로 나타난다( $p<0.01$ ).
- [0124] 또한, 전체 CD8+ T세포에서는 PD-1 항체를 처리할 경우, IFN- $\gamma$  및 TNF- $\alpha$ 를 분비하는 세포 수의 변화가 없는 것으로 나타난다( $p=0.23$ ). 그러나, 항 PD-1 항체를 이용하여 게이팅된 PD-1+CD8+ T세포에서는 PD-1 항체를 처리할 경우, IFN- $\gamma$  및 TNF- $\alpha$ 를 분비하는 세포 수가 유의하게 증가하는 것으로 나타난다( $p<0.01$ ).
- [0125] 즉, CD8+ T세포에서는 PD-1 항체의 처리에 따른 사이토카인의 분비량 차이가 나타나지 않으나, 게이팅을 통하여 선별된 PD-1+CD8+ T세포에서는 PD-1 항체의 처리에 따른 사이토카인의 분비량 차이를 확인할 수 있다. 이에, 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법에 의하여 선별된 PD-1+CD8+ T세포는 다양한 PD-1 저해제에 대한 효과를 보다 명확하게 확인할 수 있다.



- [0126] 도 6c를 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법에서 고농축화된 T세포의 TIM-3 게이팅에 따른 싸이토카인 분비량에 대한 결과가 도시된다. 이때, TIM-3을 발현하는 CD8+ T세포는 항 TIM-3 항체( $\alpha$  TIM-3 antibody)를 이용하여 게이팅되었다.
- [0127] 먼저, 도 6c의 (a)를 참조하면, 전체 CD8+ T세포의 경우, TIM-3 항체 처리에 따른 싸이토카인 변화 즉, 제 1사분면 및 4사분면에 대한 차이가 없는 것으로 나타난다. 그러나, 항 TIM-3 항체를 이용하여, TIM-3을 발현하는 CD8+ T세포(TIM-3+CD8+ T세포)만을 게이팅한 경우, 제 1사분면, 2사분면 및 4사분면의 싸이토카인을 분비하는 세포가 증가하는 것으로 나타난다.
- [0128] 보다 구체적으로, 도 6c의 (b)를 참조하면, 도 6c의 (a)에 대한 결과를 그래프로 도시한 결과가 도시된다. 전체 CD8+ T세포에서는 TIM-3 항체를 처리할 경우, IFN- $\gamma$ 를 분비하는 세포 수의 변화가 없는 것으로 나타난다( $p=0.74$ ). 그러나, 항 TIM-3 항체를 이용하여 게이팅된 TIM-3+CD8+ T세포에서는 TIM-3 항체를 처리할 경우, IFN- $\gamma$ 를 분비하는 세포 수가 유의하게 증가하는 것으로 나타난다( $p<0.001$ ).
- [0129] 또한, 전체 CD8+ T세포에서는 TIM-3 항체를 처리할 경우, TNF- $\alpha$ 를 분비하는 세포 수의 증가 및 변화가 없는 것으로 나타난다( $p=0.68$ ). 그러나, 항 TIM-3 항체를 이용하여 게이팅된 TIM-3+CD8+ T세포에서는 TIM-3 항체를 처리할 경우, TNF- $\alpha$ 를 분비하는 세포 수가 유의하게 증가하는 것으로 나타난다( $p<0.05$ ).
- [0130] 또한, 전체 CD8+ T세포에서는 TIM-3 항체를 처리할 경우, IFN- $\gamma$  및 TNF- $\alpha$ 를 분비하는 세포 수의 변화가 없는 것으로 나타난다( $p=0.64$ ). 그러나, 항 TIM-3 항체를 이용하여 게이팅된 TIM-3+CD8+ T세포에서는 TIM-3 항체를 처리할 경우, IFN- $\gamma$  및 TNF- $\alpha$ 를 분비하는 세포 수가 유의하게 증가하는 것으로 나타난다( $p<0.01$ ).
- [0131] 즉, CD8+ T세포에서는 TIM-3 항체의 처리에 따른 싸이토카인의 분비량 차이가 나타나지 않으나, 게이팅을 통하여 선별된 TIM-3+CD8+ T세포에서는 PD-1 항체의 처리에 따른 싸이토카인의 분비량 차이를 확인할 수 있다. 이에, 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법에 의하여 선별된 TIM-3+CD8+ T세포는 다양한 TIM-3 저해제에 대한 효과를 보다 명확하게 확인할 수 있다.
- [0132] 도 6d를 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법에서 고농축화된 T세포의 TIGIT 게이팅에 따른 싸이토카인 분비량에 대한 결과가 도시된다. 이때, TIGIT을 발현하는 CD8+ T세포는 항 TIGIT 항체( $\alpha$  TIGIT antibody)를 이용하여 게이팅되었다.
- [0133] 먼저, 도 6d의 (a)를 참조하면, 전체 CD8+ T세포의 경우, TIGIT 항체 처리에 따른 싸이토카인 변화 즉, 제 1사분면, 2사분면 및 4사분면에 대한 차이가 거의 없는 것으로 나타난다. 그러나, 항 TIGIT 항체를 이용하여, TIGIT을 발현하는 CD8+ T세포(TIGIT+CD8+ T세포)만을 게이팅한 경우, 제 1사분면, 2사분면 및 4사분면의 싸이토카인을 분비하는 세포가 증가하는 것으로 나타난다.
- [0134] 보다 구체적으로, 도 6d의 (b)를 참조하면, 도 6d의 (a)에 대한 결과를 그래프로 도시한 결과가 도시된다. 전체 CD8+ T세포에서는 TIGIT 항체를 처리할 경우, IFN- $\gamma$ 를 분비하는 세포 수의 변화가 없는 것으로 나타난다( $p=0.36$ ). 그러나, 항 TIGIT 항체를 이용하여 게이팅된 TIGIT+CD8+ T세포에서는 TIGIT 항체를 처리할 경우, IFN- $\gamma$ 를 분비하는 세포 수가 유의하게 증가하는 것으로 나타난다( $p<0.01$ ).
- [0135] 또한, 전체 CD8+ T세포에서는 TIGIT 항체를 처리할 경우, TNF- $\alpha$ 를 분비하는 세포 수의 증가가 없는 것으로 나타난다( $p=0.41$ ). 그러나, 항 TIGIT 항체를 이용하여 게이팅된 TIGIT+CD8+ T세포에서는 TIGIT 항체를 처리할 경우, TNF- $\alpha$ 를 분비하는 세포 수가 유의하게 증가하는 것으로 나타난다( $p<0.05$ ).
- [0136] 또한, 전체 CD8+ T세포에서는 TIGIT 항체를 처리할 경우, IFN- $\gamma$  및 TNF- $\alpha$ 를 분비하는 세포 수의 변화가 없는 것으로 나타난다( $p=0.53$ ). 그러나, 항 TIGIT 항체를 이용하여 게이팅된 TIGIT+CD8+ T세포에서는 TIGIT 항체를 처리할 경우, IFN- $\gamma$  및 TNF- $\alpha$ 를 분비하는 세포 수가 유의하게 증가하는 것으로 나타난다( $p<0.05$ ).
- [0137] 즉, CD8+ T세포에서는 TIGIT 항체의 처리에 따른 싸이토카인의 분비량 차이가 나타나지 않으나, 게이팅을 통하여 선별된 TIGIT+CD8+ T세포에서는 PD-1 항체의 처리에 따른 싸이토카인의 분비량 차이를 확인할 수 있다. 이에, 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법에 의하여 선별된 TIGIT+CD8+ T세포는 다양한 TIGIT 저해제에 대한 효과를 보다 명확하게 확인할 수 있다.
- [0138] 이상의 결과에 따라, 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법에 따른 고농축화된 T세포는 표적하고자 하는 수용체만을 발현하는 T세포를 선별하여 제공할 수 있음에 따라, 보다 명확한 싸이토카인의 분비량을 확인할 수 있다. 이때, T세포의 게이팅은 PD-1, TIM-1 및 TIGIT 중 적어도 하나의 면역 관문 수용체에 의하여 수행되었지만, 이에 제한되는 것은 아니며, T세포에서 발현될 수 있는 다양한 면역 관문 수용체를 모

두 이용하여 수행될 수 있다. 예를 들어, T세포의 게이팅에 이용될 수 있는 면역 관문 수용체는 PD-1, TIM-3, TIGIT, CTLA-4, 2B4, CD160, BTLA, CD200R, SIRPA, SIRPG, VSIG3, VISTA, TMIGD2 및 ILT3으로 이루어진 그룹 중 적어도 하나일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0139] **고농축화된 T세포 및 녹아웃(knock out) 암 세포주에 따른 싸이토카인 분비 차이 확인**

[0140] 먼저, 도 7a 및 7b를 참조하여, 고농축화된 T세포 및 녹아웃(knock out) 암 세포주에 따른 싸이토카인 분비 확인을 위하여 결정된 고농축화된 T세포 및 녹아웃(knock out) 암 세포주에 대하여 설명하도록 한다.

[0141] 도 7a를 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법에 따른 녹아웃 암 세포주의 예시도가 도시된다.

[0142] 암 세포주는 HCC4006(Human lung adenocarcinoma cell line, HCC) 폐암 세포주가 사용되었으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 면역 관문 리간드를 발현할 수 있는 다양한 암 종류의 세포주를 모두 포함하여 사용할 수 있다.

[0143] 나아가, 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법에 따른 녹아웃 암 세포주는 싸이토카인의 분비량의 차이를 분명하게 확인하기 위하여, 면역 관문 리간드의 발현이 제거될 수 있다. 이때, 암 세포주에서 면역 관문 리간드의 제거는 면역 관문 리간드의 발현에 관여하는 유전자를 녹아웃(knock out)하여 수행될 수 있으며, CRISPR(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)/Cas9 시스템을 이용하여 수행될 수 있다. 그러나, 전술한 시스템에 제한되는 것은 아니며, 표적하고자 하는 면역 관문 리간드의 발현을 제거할 수 있는 다양한 유전자 편집 기술을 모두 포함할 수 있다. 예를 들어, 유전자 편집 기술로서, ZFN(Zinc Finger Nuclease) 및 TALEN(Transcription Activator-Like Effector Nuclease) 등과 같은 다양한 기술이 이용될 수 있다.

[0144] 즉, 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법에서의 녹아웃 암 세포주는 전술한 유전자 편집 기술을 이용하여, 면역 관문 리간드의 발현이 조작된 녹아웃 암 세포주이다. 이때, 발현이 제거될 수 있는 면역 관문 리간드는, 암 세포주에서 발현될 수 있는 다양한 면역 관문 리간드를 모두 포함할 수 있으며, 예를 들어, PD-L1, PD-L2, PVR(CD155), B7-1, B7-2, CD112, CD113, Galectin-9, CEACAM1, HMGB1, CD48, HVEM, CD200, CD47, B7-H3, B7-H4, VISTA, VSIG3, VSIG4, HHLA2, BTN1A1, BTN2A2, BTN3A1, BTNL2, TIM-1, TIM-4 및 ALCAM으로 이루어진 그룹 중 적어도 하나일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0145] 또한, 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법에서의 녹아웃 암 세포주는 T세포의 싸이토카인 분비량 증진을 위하여, 공동자극 리간드(co-stimulatory ligand) 또는 싸이토카인(cytokine)과 같은 T세포 자극 인자들을 더 포함할 수 있다. 보다 구체적으로, 암 세포주에서의 공동자극 리간드 및 싸이토카인은 이를 발현시킬 수 있는 유전자가 암 세포주 내에 삽입되어 발현될 수 있다. 이때, 면역 관문 리간드가 녹아웃된 암 세포주에서 발현될 수 있는 공동 자극 리간드는 B7-1, B7-2, ICOSL, HHLA2, CD70, OX40L, 4-1BBL, GITRL, TL1A, CD40, CD155, CD30L 및 LIGHT로 이루어진 그룹 중 적어도 하나일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 싸이토카인은 TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-25, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, SLF, LIF, Eta-1 및 Oncostatin M으로 이루어진 그룹 중 적어도 하나일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 나아가, 공동자극 리간드 및 싸이토카인을 발현시킬 수 있는 유전자는 전술한 유전자 편집 기술을 이용하여, 암 세포주 내로 삽입(Gene insertion)될 수 있으며, 이에 암 세포주에 공동자극 리간드 또는 싸이토카인이 포함(발현)될 수 있다.

[0146] 이에, wild type의 폐암 세포주는 면역 관문 리간드인 PD-L1, PVR, CEACAM1 및 Galectin-9을 모두 발현하고 있는 것으로 나타나나, 본 발명의 녹아웃 암 세포주는 PD-L1(-) 및/또는 PVR(-)에 대한 발현이 없는 것으로 나타난다. 즉, 고농축화된 T세포 및 녹아웃(knock out) 암 세포주에 따른 싸이토카인 분비 차이 확인을 위하여 도 8a 및 8b에서 사용될 암 세포주는 면역 관문 리간드가 모두 발현되어 있는 WT의 폐암 세포주(HCC4006), 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법에서의 녹아웃 암 세포주인 PD-L1-/- 폐암 세포주, PVR-/- 폐암 세포주 및 PD-L1-/-PVR-/- 폐암 세포주이다.

[0147] 결국, 녹아웃 암 세포주와 고농축화된 T세포와의 공동 배양(co-culture)을 통하여, 싸이토카인의 분비능이 가장 극대화될 수 있는 녹아웃 암 세포주를 확인할 수 있다.

[0148] 도 7b를 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법에 따른 고농축화 T세포의 예시도가 도시된다.

- [0149] 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법에 의하여 고농축화된 T세포는 다양한 면역 관문 수용체를 포함할 수 있으나, 고농축화된 T세포 및 녹아웃(knock out) 암 세포주에 따른 사이토카인 분비 차이 확인을 위하여, 특정 면역 관문 수용체를 발현하는 T세포를 선별(gating)할 수 있다.
- [0150] 예를 들어, TIM-3는 세포 면역 반응을 조절하는 세포막 분자로서, T세포 활성화에 의하여 증가하며 단핵구에서는 항상 발현될 수 있다. 나아가, TIM-3와 결합할 수 있는 면역 관문 리간드는 다수 존재하며, 이 중 가장 우세한(dominant) 면역 관문 리간드가 명확하지 않아 특정 면역 관문 리간드를 제거하여도, 밝혀지지 않은 리간드에 의한 억제 신호를 차단하기 어려울 수 있다.
- [0151] 이에, 고농축화된 T세포 및 녹아웃(knock out) 암 세포주에 따른 사이토카인 분비 차이 확인을 위하여, TIM3의 발현에 기초하여 선별한 다음, 이 중 표적하고자 하는 수용체 즉, 도 7a에서의 암 세포주의 리간드에 대응하는 PD-1 및 TIGIT을 발현하는 T세포를 선별할 수 있다. 그러나, 이에 제한되는 것은 아니며, 녹아웃(knock out) 암 세포주에 따라, 이에 대응하는 면역 관문 수용체를 발현하는 T세포가 선별될 수 있다. 관련하여, 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법에 의하여 고농축화된 T세포 중 TIM-3을 발현하는 CD8+ T세포(TIM-3+CD8+ T세포)는 82 %를 차지하는 것으로 나타나며, 전술한 TIM-3+CD8+ T세포 중 PD-1 및 TIGIT을 동시에 더 발현하는 세포(PD-1+TIM-3+TIGIT+CD8+ T세포)는 13 %를 차지하는 것으로 나타난다.
- [0152] 이에, 고농축화된 T세포 및 녹아웃(knock out) 암 세포주에 따른 사이토카인 분비 차이 확인을 위하여, TIM-3+CD8+ T세포 및 PD-1+TIM-3+TIGIT+CD8+ T세포가 선별(gating)될 수 있다. 이하에서는 도 8a 내지 8b를 참조하여, 전술한 과정에 의하여 결정된 고농축화된 T세포 및 녹아웃(knock out) 암 세포주에 따른 사이토카인 분비에 대하여 설명하도록 한다.
- [0153] 도 8a를 참조하면, 녹아웃 암 세포주에 따른 PD-1+TIM-3+TIGIT+CD8+ T세포의 사이토카인 분비량에 대한 결과가 도시된다.
- [0155] \*먼저, 도 8a의 (a)를 참조하면, 면역 관문 리간드의 발현이 적을수록 제 1사분면 및 제 2사분면의 사이토카인 분비량이 증가되는 것으로 나타난다.
- [0156] 보다 구체적으로, 도 8a의 (b)를 참조하면, 도 8a의 (a)에 대한 결과를 그래프로 도시한 결과가 도시된다. IFN- $\gamma$ 를 분비하는 PD-1+TIM-3+TIGIT+CD8+ T세포 수는 PD-L1-/- 폐암 세포주, PVR-/- 폐암 세포주 및 PD-L1-/-PVR-/- 폐암 세포주와 공동 배양을 하였을 경우에 가장 많은 것으로 나타나며, WT와 공동 배양을 하였을 경우에 가장 적은 것으로 나타난다. 이때, PD-L1-/- 폐암 세포주, PVR-/- 폐암 세포주 및 PD-L1-/-PVR-/- 폐암 세포주 간 IFN- $\gamma$ 를 분비하는 PD-1+TIM-3+TIGIT+CD8+ T세포 수의 차이는 없는 것으로 나타난다( $p=0.25$ ).
- [0157] 나아가, IFN- $\gamma$  및 TNF- $\alpha$ 를 분비하는 PD-1+TIM-3+TIGIT+CD8+ T세포 수는 전술한 바와 마찬가지로, PVR-/- 폐암 세포주 및 PD-L1-/-PVR-/- 폐암 세포주와 공동 배양을 하였을 경우에 가장 많은 것으로 나타나며, WT와 공동 배양을 하였을 경우가 가장 적은 것으로 나타난다. 이때, PVR-/- 폐암 세포주 및 PD-L1-/-PVR-/- 폐암 세포주 간 IFN- $\gamma$  및 TNF- $\alpha$ 를 분비하는 PD-1+TIM-3+TIGIT+CD8+ T세포 수의 차이는 없는 것으로 나타난다( $p=0.58$ ).
- [0158] 이에, 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법에 의하여 고농축된 PD-1+TIM-3+TIGIT+CD8+ T세포는 암 세포주의 면역 관문 리간드가 편집될 경우, 보다 많은 양의 사이토카인을 분비하는 것으로 나타난다.
- [0159] 나아가, 도 8b를 참조하면, 녹아웃 암 세포주에 따른 TIM-3+CD8+ T세포의 사이토카인 분비량에 대한 결과가 도시된다.
- [0160] 먼저, 도 8b의 (a)를 참조하면, 면역 관문 리간드의 발현이 적을수록 제 1사분면 및 제 2사분면의 사이토카인 분비량이 증가되는 것으로 나타난다.
- [0161] 보다 구체적으로, 도 8b의 (b)를 참조하면, 도 8b의 (a)에 대한 결과를 그래프로 도시한 결과가 도시된다. IFN- $\gamma$ 를 분비하는 TIM-3+CD8+ T세포 수는 PVR-/- 폐암 세포주 및 PD-L1-/-PVR-/- 폐암 세포주와 공동 배양을 하였을 경우에 가장 많은 것으로 나타나며, WT와 공동 배양을 하였을 경우에 가장 적은 것으로 나타난다. 이때, PVR-/- 폐암 세포주 및 PD-L1-/-PVR-/- 폐암 세포주 간 IFN- $\gamma$ 를 분비하는 TIM-3+CD8+ T세포 수의 차이는 없는 것으로 나타난다( $p=0.19$ ).
- [0162] 나아가, IFN- $\gamma$  및 TNF- $\alpha$ 를 분비하는 TIM-3+CD8+ T세포 수는 전술한 바와 마찬가지로, PVR-/- 폐암 세포주 및

PD-L1-/-PVR-/- 폐암 세포주와 공동 배양을 하였을 경우에 가장 많은 것으로 나타나며, WT와 공동 배양을 하였을 경우가 가장 적은 것으로 나타난다. 이때, PVR-/- 폐암 세포주 및 PD-L1-/-PVR-/- 폐암 세포주간 IFN- $\gamma$  및 TNF- $\alpha$ 를 분비하는 TIM-3+CD8+ T세포 수의 차이는 없는 것으로 나타난다(p=0.74).

[0163] 이에, 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법에 의하여 고농축된 TIM-3+CD8+ T세포는 암 세포주의 면역 관문 리간드가 편집될 경우, 보다 많은 양의 싸이토카인을 분비하는 것으로 나타난다.

[0164] 결국, 표적 면역 관문 리간드 이외의 다른 면역 관문 리간드로 인한 억제 신호가 차단됨에 따라, 싸이토카인의 분비량이 증가되어 표적 면역 관문 리간드에 대한 차단 효과를 보다 뚜렷하게 확인할 수 있다.

[0165] 이에, 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법에서의 녹아웃 암 세포주는 시험하고자 하는 표적 면역 관문 리간드 이외의 면역 관문 리간드 즉, 변수가 제거됨에 따라, 표적 면역 관문 리간드의 차단 에 따른 싸이토카인 분비 효과를 명확하게 확인할 수 있다.

[0166] **본 발명의 일 실시예에 따른 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법에 따른 면역 관문 저해제 평가**

[0168] \*이하에서는, 도 9a 내지 10을 참조하여, 전술한 과정의 의하여, 선택된 고농축된 T세포 및 녹아웃 암 세포주에 따른 면역 관문 저해제의 효능 평가에 대하여 설명하도록 한다.

[0169] 도 9a를 참조하면, TIM-3+CD8+ T세포 및 PD-L1-/-PVR-/- 폐암 세포주에 따른 TIM-3 항체에 대한 싸이토카인 분비량에 대한 결과가 도시된다.

[0170] 먼저, 도 9a의 (a)를 참조하면, WT 세포주의 경우, TIM-3 항체 처리에 따른 제 1사분면 및 2사분면의 TIM-3+CD8+ T세포 수의 차이가 거의 없는 것으로 나타난다. 그러나, PD-L1-/-PVR-/- 폐암 세포주의 경우, TIM-3 항체 처리에 따른 제 1사분면 및 2 사분면의 TIM-3+CD8+ T세포 수가 증가하는 것으로 나타난다.

[0171] 보다 구체적으로, 도 9a의 (b)를 참조하면, 도 9a의 (a)에 대한 결과를 그래프로 도시한 결과가 도시된다. WT 폐암 세포주에서 TIM-3 항체 처리에 따른 IFN- $\gamma$ 를 분비하는 TIM-3+CD8+ T세포 수는 isotype control 항체 처리한 그룹과 차이가 거의 없는 것으로 나타난다. 즉, WT 세포주에서는 TIM-3 항체 처리에 따른 싸이토카인 분비량의 차이 즉, TIM-3 면역 관문 차단에 의한 IFN- $\gamma$  증가 효과가 관찰되지 않는다.

[0172] 그러나, PD-L1-/-PVR-/- 폐암 세포주에서 TIM-3 항체 처리에 따른 IFN- $\gamma$ 를 분비하는 TIM-3+CD8+ T세포 수는 isotype control 항체 처리한 그룹보다 유의하게 증가한 것으로 나타난다(P<0.01). 즉, PD-L1-/-PVR-/- 폐암 세포주에서는 TIM-3 항체 처리에 따른 IFN- $\gamma$ 의 분비량이 증가됨에 따라, TIM-3 면역 관문 차단에 의한 IFN- $\gamma$ 의 분비량에 대한 차이를 분명하게 관찰할 수 있다.

[0173] 이와 마찬가지로, PD-L1-/-PVR-/- 폐암 세포주에서 TIM-3 항체 처리에 따른 IFN- $\gamma$  및 TNF- $\alpha$ 를 분비하는 TIM-3+CD8+ T세포 수는 isotype control 항체 처리한 그룹보다 유의하게 증가한 것으로 나타난다(P<0.01). 즉, PD-L1-/-PVR-/- 폐암 세포주에서는 TIM-3 항체 처리에 따른 싸이토카인의 분비량이 증가됨에 따라, TIM-3 면역 관문 차단에 의한 싸이토카인의 분비량에 대한 차이를 분명하게 관찰할 수 있다.

[0174] 나아가, 도 9b를 참조하면, TIGIT+CD8+ T세포 및 PD-L1-/- 폐암 세포주에 따른 TIGIT 항체에 대한 싸이토카인 분비량에 대한 결과가 도시된다.

[0175] 먼저, 도 9b의 (a)를 참조하면, PD-L1-/- 폐암 세포주의 경우, WT 폐암 세포주보다 TIGIT 항체 처리에 따른 제 1사분면, 2 사분면 및 4사분면의 TIGIT+CD8+ T세포 수가 크게 증가하는 것으로 나타난다.

[0176] 보다 구체적으로, 도 9b의 (b)를 참조하면, 도 9b의 (a)에 대한 결과를 그래프로 도시한 결과가 도시된다. PD-L1-/- 폐암 세포주에서 TIGIT 항체 처리에 따른 IFN- $\gamma$ 를 분비하는 TIGIT+CD8+ T세포 수는 WT 폐암 세포주에서 보다 큰 폭을 가지며, isotype control 항체 처리한 그룹보다 유의하게 증가한 것으로 나타난다(P<0.05). 즉, PD-L1-/- 폐암 세포주에서는 TIGIT 항체 처리에 따른 IFN- $\gamma$ 의 분비량이 WT보다 크게 증가됨에 따라, TIGIT 면역 관문 차단에 의한 IFN- $\gamma$ 의 분비량에 대한 차이를 분명하게 관찰할 수 있다.

[0177] 이와 마찬가지로, PD-L1-/- 폐암 세포주에서 TIGIT 항체 처리에 따른 IFN- $\gamma$  및 TNF- $\alpha$ 를 분비하는 TIGIT+CD8+ T세포 수는 WT 폐암 세포주에서 보다 큰 폭을 가지며, isotype control 항체 처리한 그룹보다 유의하게 증가한 것으로 나타난다(P<0.0001). 즉, PD-L1-/- 폐암 세포주에서는 TIGIT 항체 처리에 따른 싸이토카인의 분비량이 WT보다 크게 증가됨에 따라, TIGIT 면역 관문 차단에 의한 싸이토카인의 분비량에 대한 차이를 분명하게 관찰할

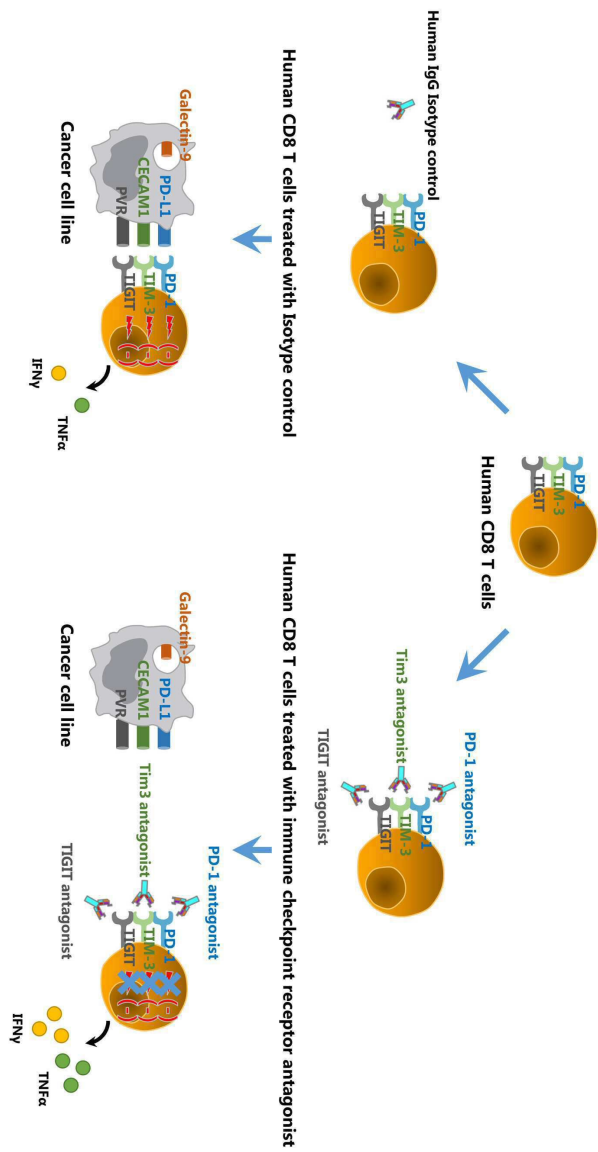


수 있다.

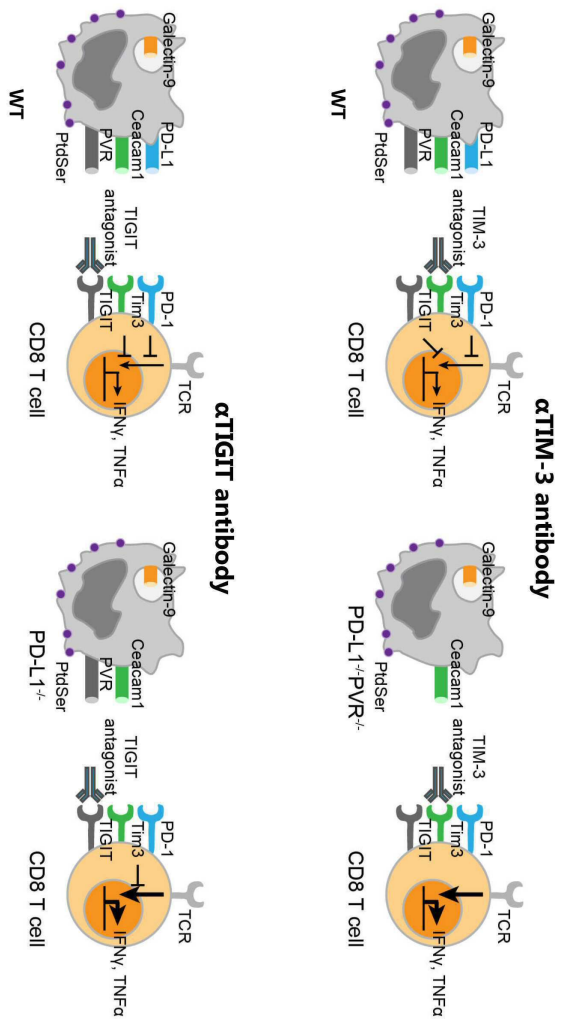
- [0178] 이에, 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법은 표적 면역 관문 수용체 및 리간드 이외의 변수 요인을 제거함에 따라, 표적하고자 하는 특정 면역 관문 저해제에 대한 효과 즉, 싸이토카인의 증가를 뚜렷하게 관찰할 수 있다.
- [0179] 결국, 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법은 증진된 싸이토카인의 분비량을 통하여, 특정 면역 관문 수용체 및 리간드를 표적할 수 있는 저해제에 대한 효과를 정량적으로 뚜렷하게 관찰할 수 있음에 따라, 저해제의 후보 물질 비교 및 선정을 보다 쉽고 용이하게 수행할 수 있다.
- [0180] 한편, 도 10을 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 관문 저해제의 스크리닝 방법에서 공동 배양에 의한 면역 관문 수용체 및 리간드 간의 직접적인(direct) 상호작용 검증에 대한 결과가 도시된다.
- [0181] 먼저, 도 10의 (a)를 참조하면, TIGIT 항체를 처리한 경우, WT 폐암 세포주에서는 제 1사분면의 TIGIT+CD8+ T세포 수가 증가하는 것으로 나타나나, PVR-/- 폐암 세포주에서는 TIGIT+CD8+ T세포 수의 차이가 없는 것으로 나타난다.
- [0182] 보다 구체적으로, 도 10의 (b)를 참조하면, 도 10의 (a)에 대한 결과를 그래프로 도시한 결과가 도시된다. TIGIT 항체를 처리한 경우, WT 폐암 세포주에서는 IFN- $\gamma$ 를 분비하는 TIGIT+CD8+ T세포 수가 유의하게 증가하는 것으로 나타나나( $p < 0.01$ ), PVR-/- 폐암 세포주에서는 IFN- $\gamma$ 를 분비하는 TIGIT+CD8+ T세포 수의 차이가 없는 것으로 나타난다( $p = 0.39$ ).
- [0183] 나아가, TIGIT 항체를 처리한 경우, WT 폐암 세포주에서는 IFN- $\gamma$  및 TNF- $\alpha$ 를 분비하는 TIGIT+CD8+ T세포 수가 유의하게 증가하는 것으로 나타나나( $p < 0.01$ ), PVR-/- 폐암 세포주에서는 IFN- $\gamma$  및 TNF- $\alpha$ 를 분비하는 TIGIT+CD8+ T세포 수의 차이가 없는 것으로 나타난다( $p = 0.33$ ).
- [0184] 즉, CD8+ T세포의 면역 관문 수용체 TIGIT과 직접적으로 상호작용하는 면역 관문 리간드 PVR이 폐암 세포주에서 제거됨에 따라, 이를 표적으로 하는 항체 즉, 면역 관문 저해제에 대한 효능이 관찰되지 않는 것으로 나타난다. 이에, 본 발명의 폐암 세포주는 특정 면역 관문 리간드의 발현이 제거될 수 있음에 따라, 면역 관문 저해제의 효과의 검증뿐만 아니라, 다양한 바이오 마커를 확인할 수 있다.
- [0185] 이상 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시 예들을 더욱 상세하게 설명하였으나, 본 발명은 반드시 이러한 실시 예로 국한되는 것은 아니고, 본 발명의 기술사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 다양하게 변형 실시될 수 있다. 따라서, 본 발명에 개시된 실시 예들은 본 발명의 기술 사상을 한정하기 위한 것이 아니라 설명하기 위한 것이고, 이러한 실시 예에 의하여 본 발명의 기술 사상의 범위가 한정되는 것은 아니다. 그러므로, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 보호 범위는 아래의 청구범위에 의하여 해석되어야 하며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 기술 사상은 본 발명의 권리범위에 포함되는 것으로 해석되어야 할 것이다.

## 부호의 설명

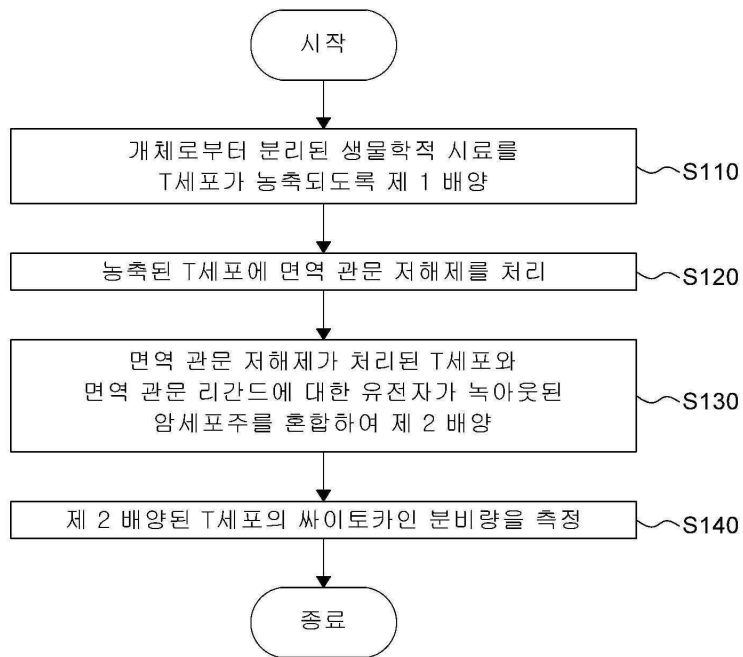
도면  
도면1a



도면1b

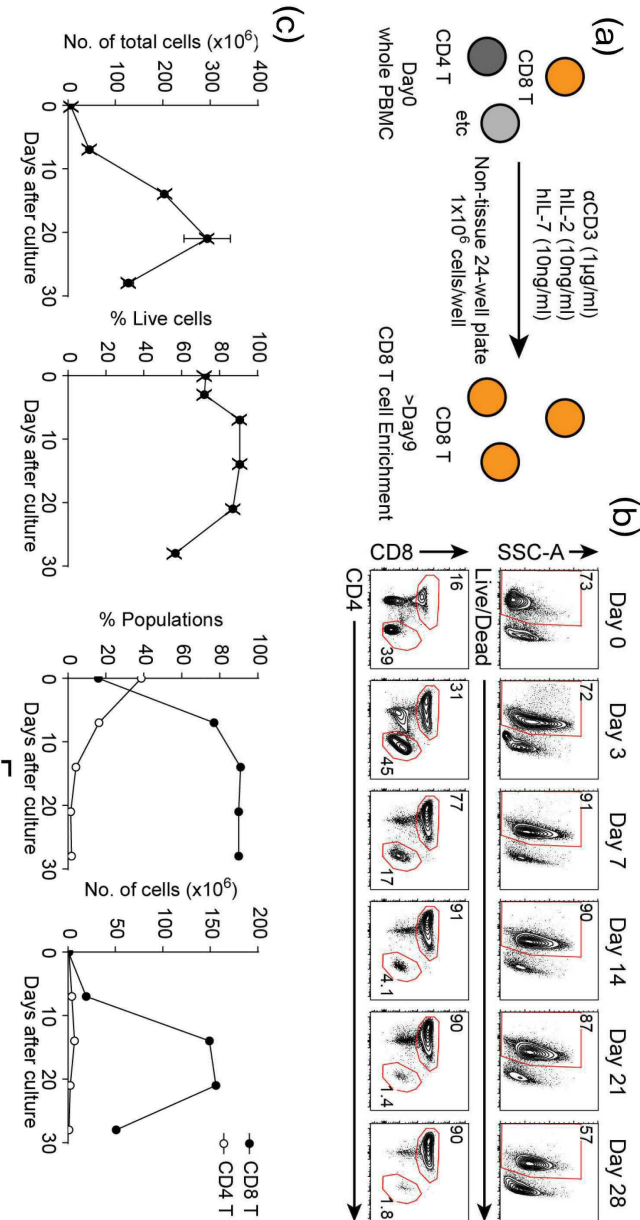


도면2

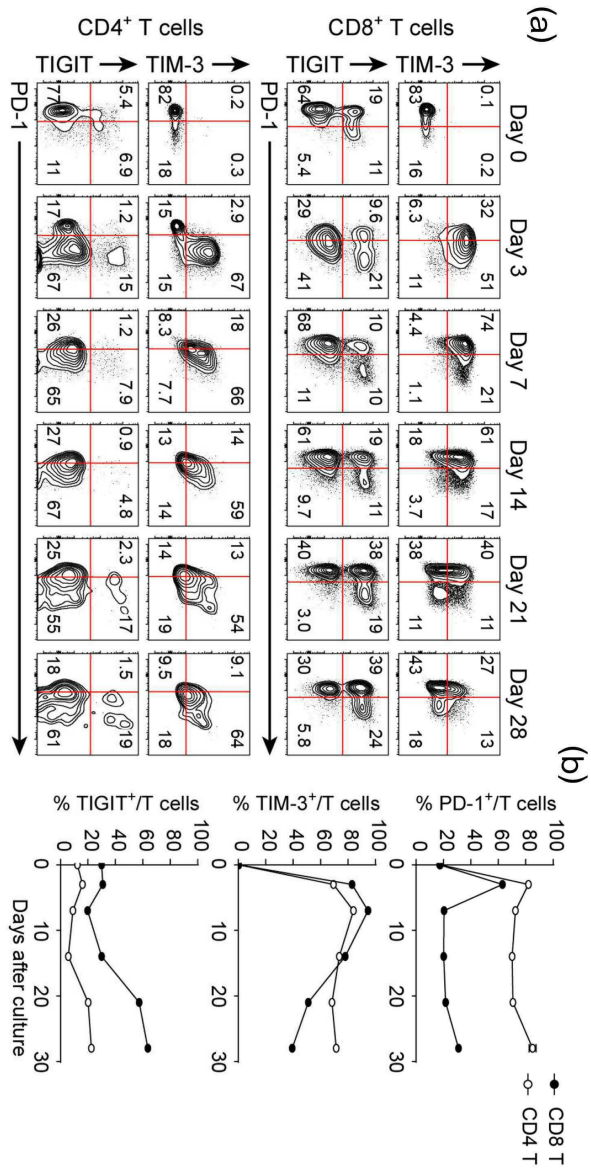




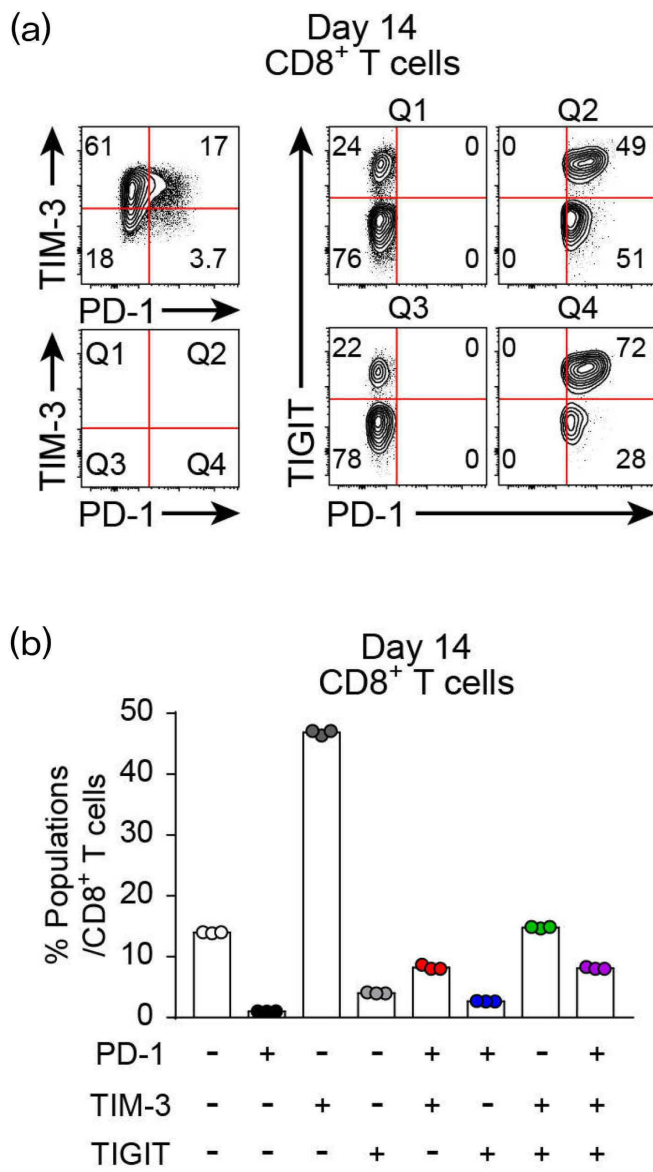
도면3a



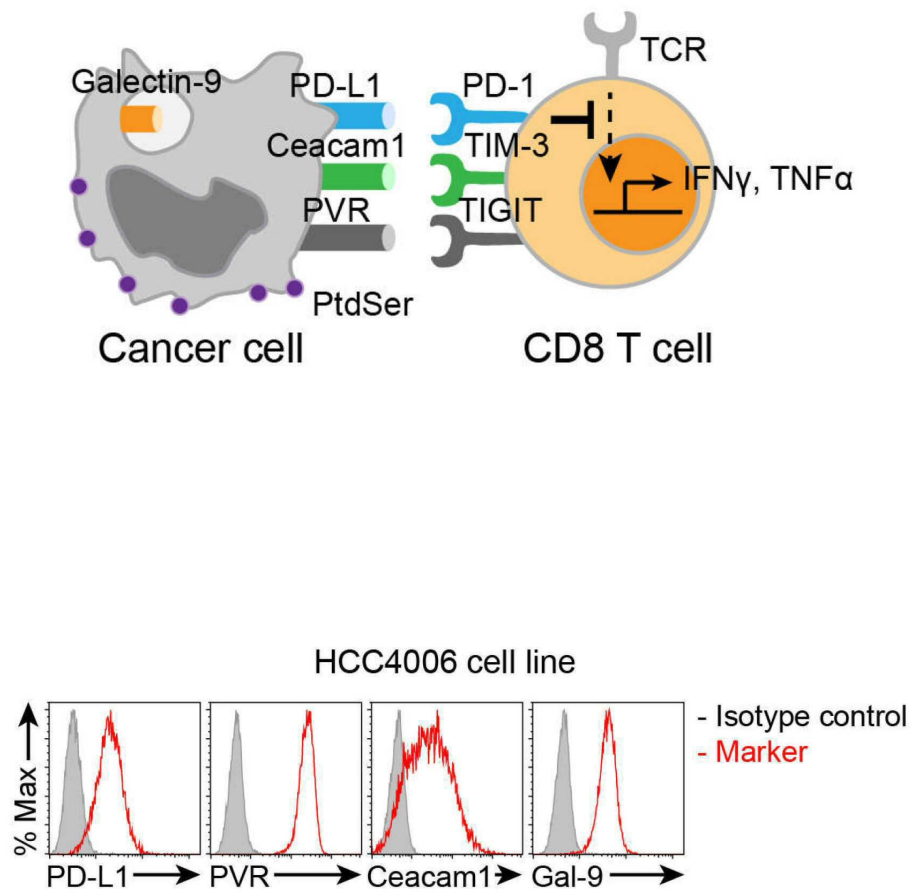
도면3b



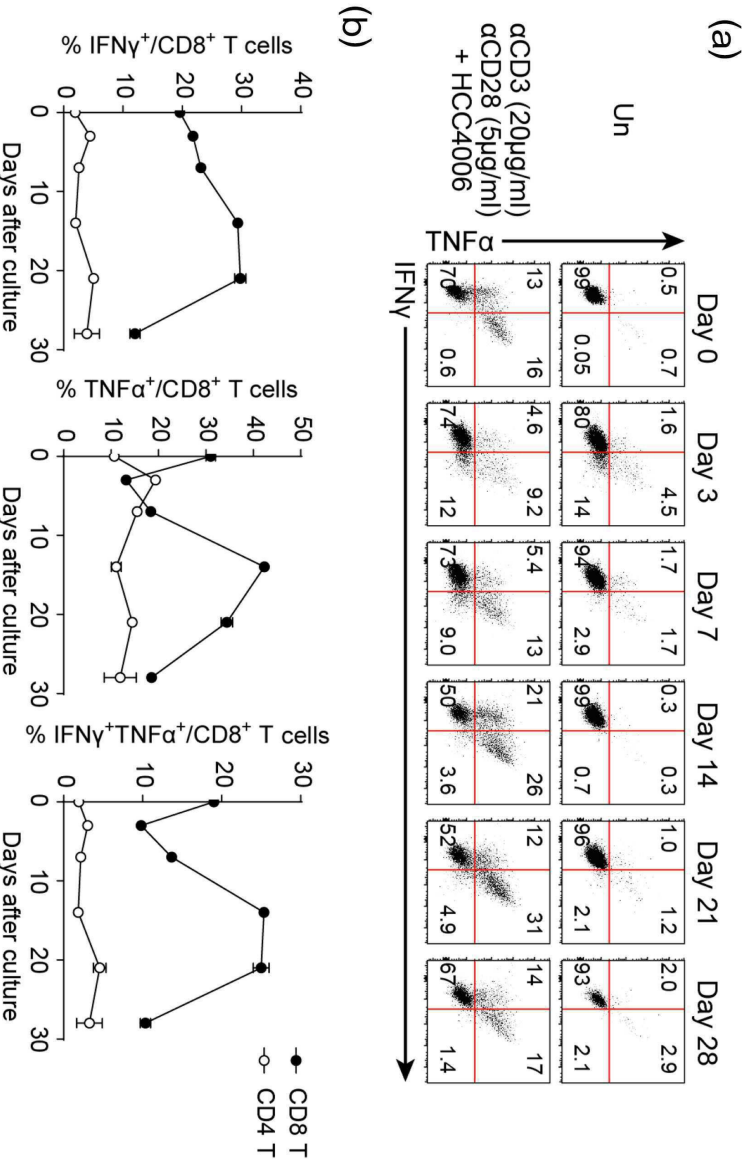
도면3c



도면4a

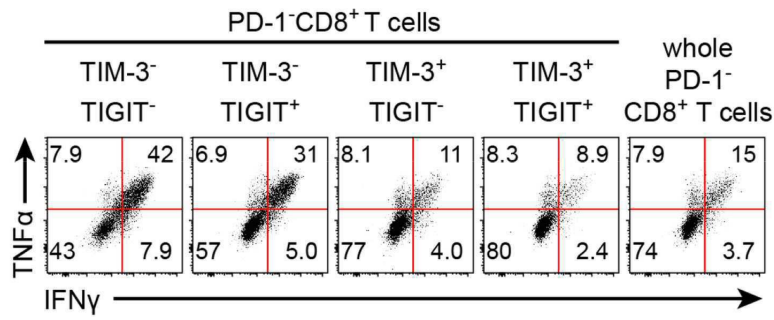


도면4b

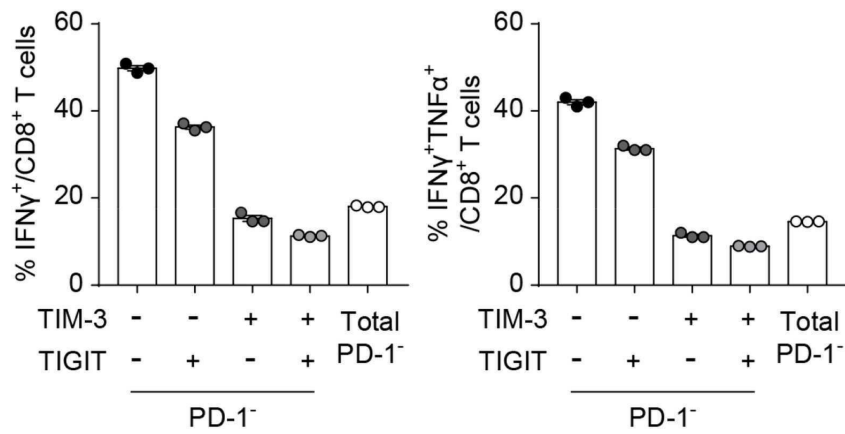


도면5a

(a)

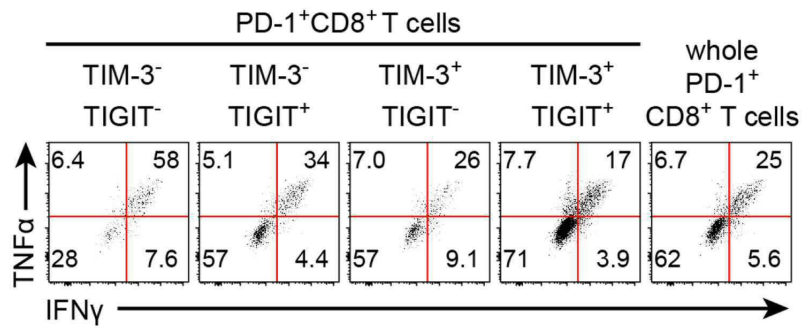


(b)

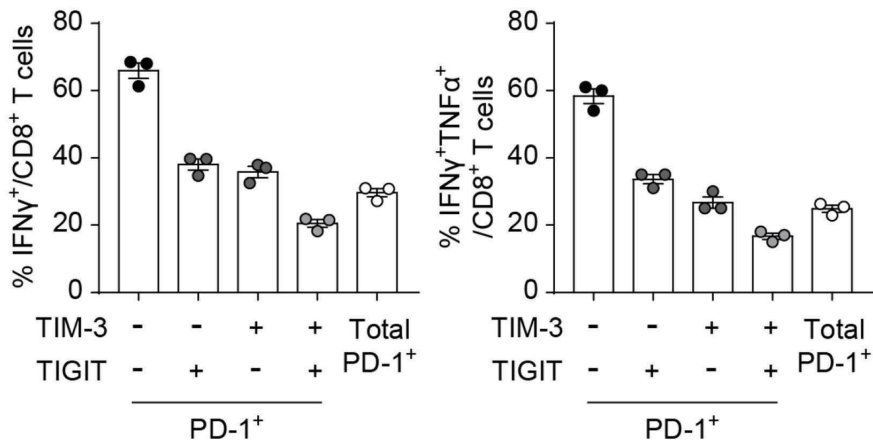


도면5b

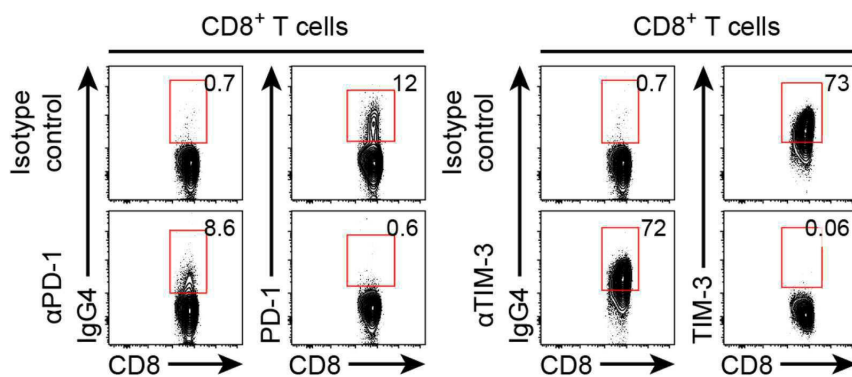
(a)



(b)



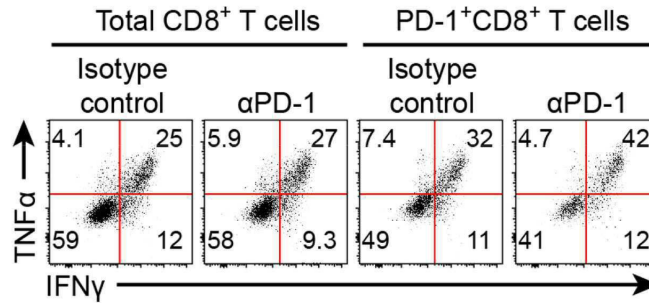
도면6a



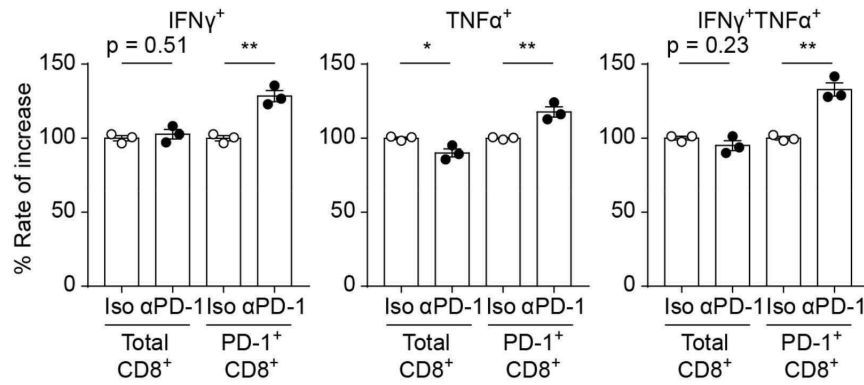
도면6b

## $\alpha$ PD-1 antibody

(a)



(b)

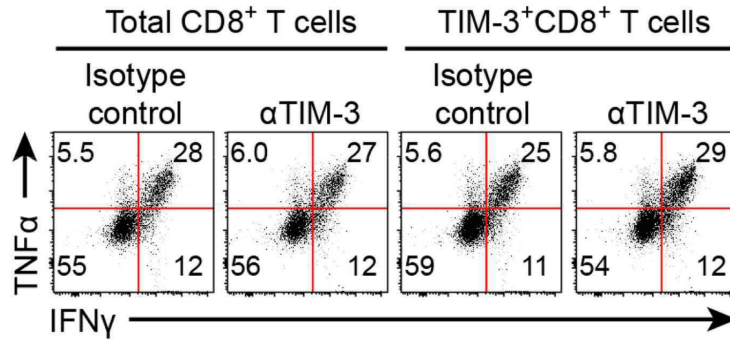




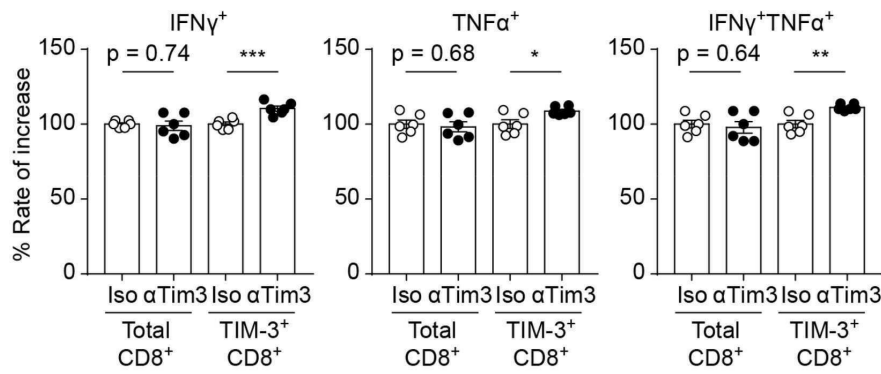
도면6c

# $\alpha$ TIM-3 antibody

(a)

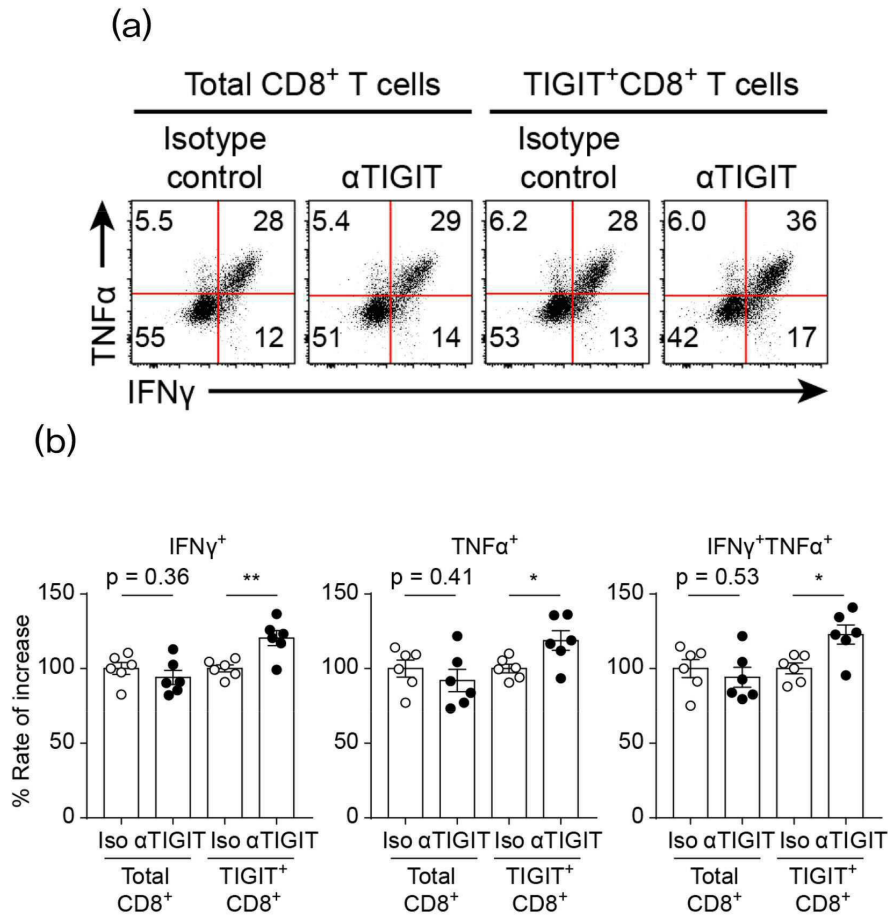


(b)

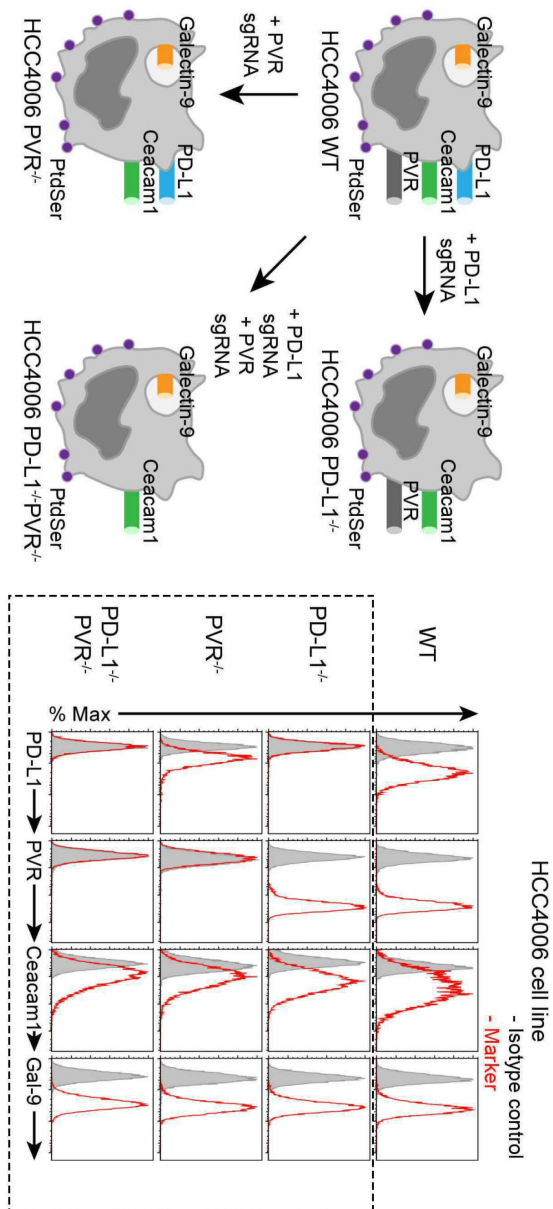


도면6d

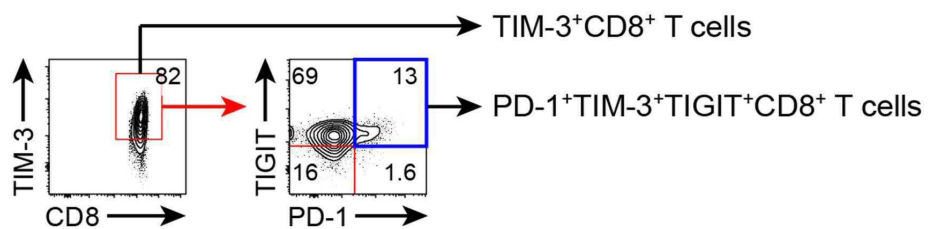
# $\alpha$ TIGIT antibody



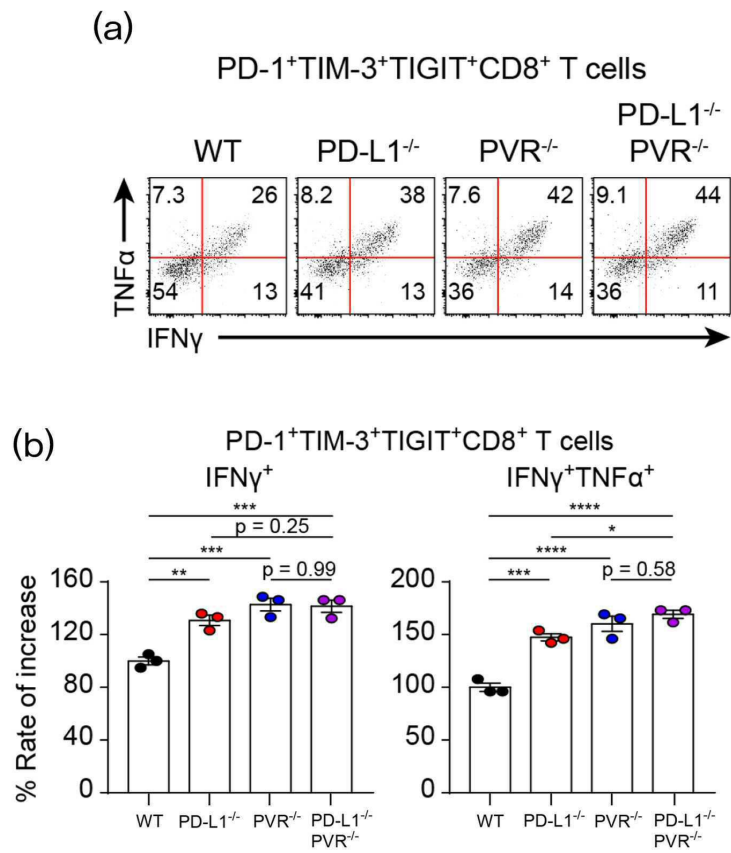
도면7a



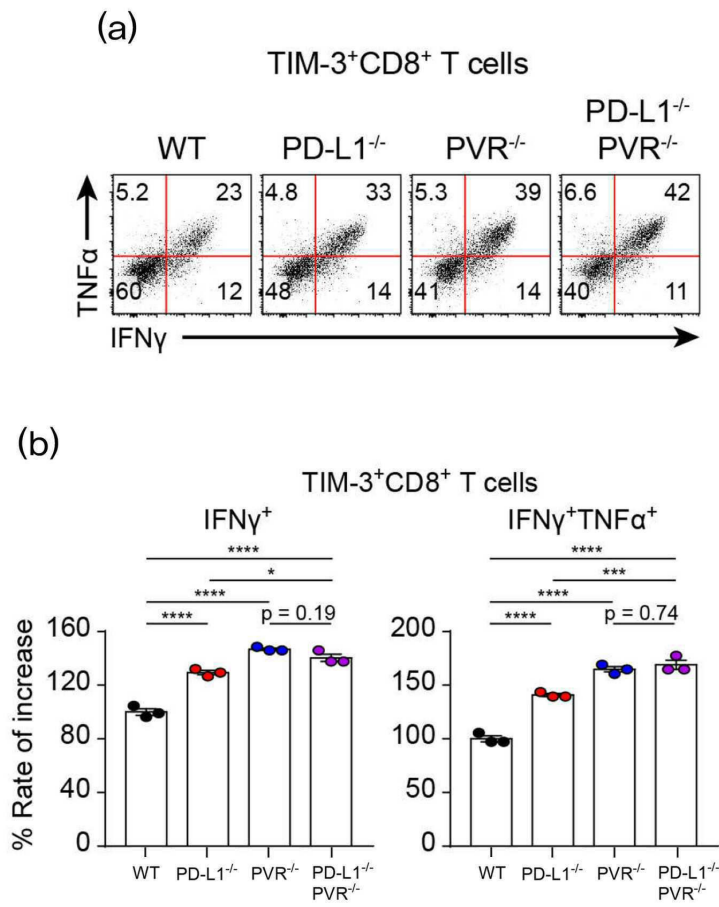
도면7b



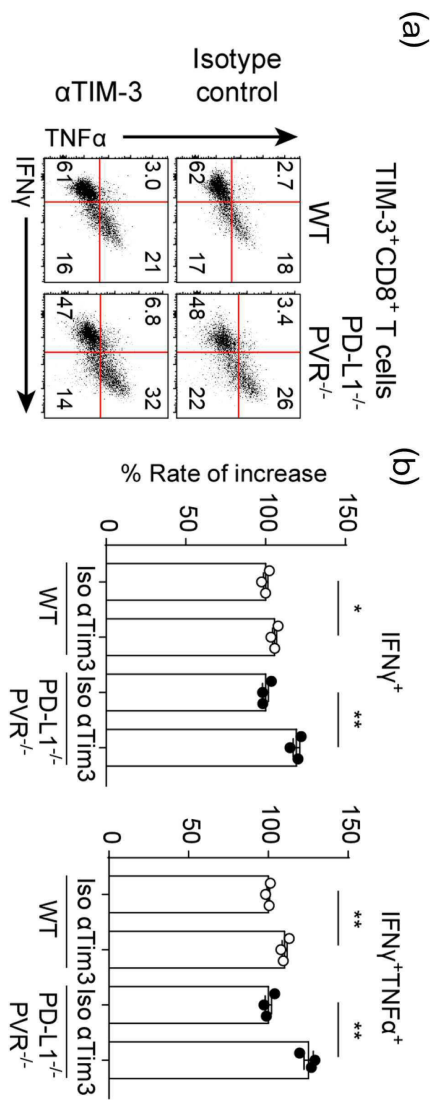
도면 8a



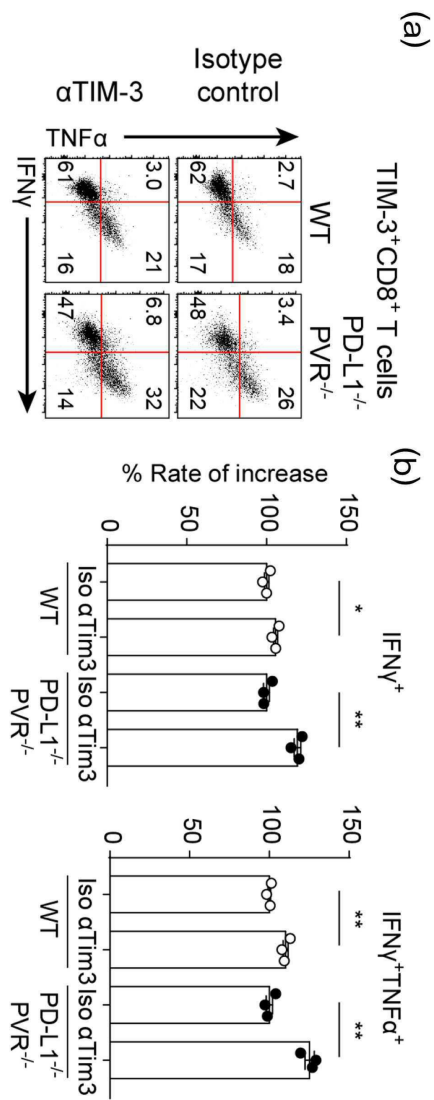
도면8b



도면 9a



도면 9b



도면10

