



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년04월15일  
(11) 등록번호 10-2387595  
(24) 등록일자 2022년04월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 5/00 (2006.01) C12N 5/0783 (2010.01)  
(52) CPC특허분류  
C12N 5/0068 (2013.01)  
C12N 5/0636 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2020-0035171  
(22) 출원일자 2020년03월23일  
심사청구일자 2020년03월23일  
(65) 공개번호 10-2021-0118648  
(43) 공개일자 2021년10월01일  
(56) 선행기술조사문헌  
▶ 인용발명 1: Bowers, J. et al., Frontiers in Immunology (2017) 8:1221\*  
▶ 인용발명 2: 공개특허공보 제10-2017-0007527호(2017.01.18.) 1부.\*  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
연세대학교 산학협력단  
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)  
(72) 발명자  
조병철  
서울특별시 용산구 이촌로 310, 102동 404호(이촌동, 래미안 첼리투스)  
표경호  
서울특별시 마포구 성암로 19, 101동 202호(성산동, 성제센트리움)  
(74) 대리인  
(뒷면에 계속)  
특허법인인벤싱크

전체 청구항 수 : 총 23 항

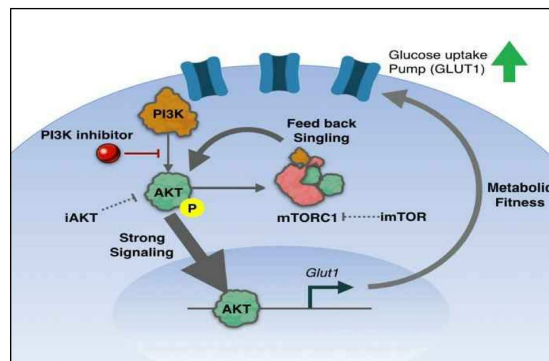
심사관 : 이효진

(54) 발명의 명칭 면역 세포의 면역 기능 향상을 위한 방법 및 이에 따른 면역 세포주

(57) 요약

본 명세서에서는 생체 외(ex vivo)에서 AKT/mTOR 하위 신호를 활성화하도록 면역 세포에 PI3K 억제제가 처리하는 단계 및 감소되어 있는 AKT가 반동(rebound)되도록 PI3K 억제제가 처리된 면역 세포를 배양하는 단계를 포함하는 면역 세포의 면역 기능 향상 방법 및 이에 따른 면역 세포주에 대하여 제공한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

**C12N 5/0646** (2013.01)

**C12N 2501/999** (2013.01)

**C12N 2502/30** (2013.01)

(72) 발명자

**김창곤**

서울특별시 서초구 고무래로 35, 107동 804호(반포동, 반포리체)

**김성은**

서울특별시 용산구 한강대로 211, 101동 704호(한강로1가, 대우월드마크)

**김재환**

서울특별시 동작구 동작대로29길 110, 405동 402호(사당동, 신동아아파트)

**변영선**

서울특별시 은평구 백련산로 161, 202호(응암동, 에스클래스)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017R1D1A1B03032110

부처명 교육부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 개인기초연구(교육부)(R&D)

연구과제명 EML4-ALK 비소세포성폐암의 면역관문억제제 효능증대를 위한 종양 내 T림프구의 대  
사기전연구

기 여 율 1/1

과제수행기관명 연세대학교

연구기간 2020.03.01 ~ 2020.05.31

공지예외적용 : 있음

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

생체 외(ex vivo)에서 AKT/mTOR 하위 신호를 활성화하도록 면역 세포에 PI3K 억제제가 처리하는 단계, 및 감소되어 있는 AKT가 반동(rebound)되도록 상기 PI3K 억제제가 처리된 면역 세포를 배양하는 단계를 포함하고, 상기 면역 세포는, T 세포이고, 상기 PI3K 억제제는, 부팔리십(buparlisib/BKM120)이고, 상기 면역 세포의 GLUT1 발현율은, PI3K 억제제를 처리하지 않은 대조군보다 2 내지 3배 높은, 면역 세포의 대사 기능 향상 방법.

#### 청구항 2

제 1항에 있어서, 면역 세포를 활성화하도록 CD3 및 CD28 항체 처리하는 단계를 더 포함하는, 면역 세포의 대사 기능 향상 방법.

#### 청구항 3

제 1항에 있어서, 배양된 상기 면역 세포를 종양 세포와 공생배양(co-culture)하는 단계; 및 상기 면역 세포에 의해 사멸(apoptosis)된 종양 세포를 백분율로 평가하는 단계를 더 포함하는, 면역 세포의 대사 기능 향상 방법.

#### 청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 종양 세포는, 폐암, 비소세포성폐암, 췌장암, 위암, 간암, 유방암, 자궁경부암, 갑상선암, 부갑상선암, 전립선암, 담낭암, 담도암, 비호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 혈액암, 방광암, 신장암, 난소암, 흑색종, 결장암, 골암, 피부암, 두부암, 자궁암, 직장암, 뇌종양, 항문부근암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 질암, 음문암종, 식도암, 소장암, 내분비선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 수뇨관암, 신장세포 암종, 신장골반 암종, 중추신경계(CNS central nervous system) 종양, 1차 CNS 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종 또는 뇌하수체 선종으로 이루어진 그룹 중 적어도 하나를 포함하는, 면역 세포의 대사 기능 향상 방법.

#### 청구항 5

제 3항에 있어서, 상기 공생 배양은, 일반적인(normal), 저산소(hypoxic), 저당(low glucose) 배양 환경 중 적어도 하나에서 배양되는, 면역 세포의 대사 기능 향상 방법.

#### 청구항 6

제 3항에 있어서,

상기 사멸된 종양 세포의 백분율은,  
일반적인 배양 환경인 경우, 60 내지 65 % 인, 면역 세포의 대사 기능 향상 방법.

#### 청구항 7

제 3항에 있어서,  
상기 사멸된 종양 세포의 백분율은,  
저산소 배양 환경인 경우, 45 내지 50 % 인, 면역 세포의 대사 기능 향상 방법.

#### 청구항 8

제 3항에 있어서,  
상기 사멸된 종양 세포의 백분율은,  
저당 배양 환경인 경우, 35 내지 40 % 인, 면역 세포의 대사 기능 향상 방법.

#### 청구항 9

제 1항에 있어서,  
생물학적 시료로부터 면역 세포를 분리하는 단계를 더 포함하는, 면역 세포의 대사 기능 향상 방법.

#### 청구항 10

제 9항에 있어서,  
상기 생물학적 시료는,  
혈액(blood), 혈장(plasma), 림프절(lymph node), 비장(spleen), 흉선(thymus) 및 골수(bone marrow)로 이루어진 그룹 중 적어도 하나를 포함하는, 면역 세포의 대사 기능 향상 방법.

#### 청구항 11

제 1항에 있어서,  
상기 배양하는 단계는,  
3 내지 4주 중 적어도 하나의 기간 동안 배양되는, 면역 세포의 대사 기능 향상 방법.

#### 청구항 12

제 1항에 있어서,  
상기 면역 세포는,  
수지상 세포, 대식 세포, B 세포 및 NK 세포로 이루어진 그룹 중 적어도 하나를 더 포함하는, 면역 세포의 대사 기능 향상 방법.

#### 청구항 13

제 1항에 있어서,  
상기 T 세포는,  
도움 T 세포, 세포독성 T 세포, 기억 T 세포, 효과 T 세포, 조절 T 세포, 자연살해 T 세포, 점막 관련 불변 T 세포, 알파-베타 T 세포, 및 감마-델타 T 세포로 이루어진 그룹 중 적어도 하나를 포함하는, 면역 세포의 대사 기능 향상 방법.

#### 청구항 14

제 1항에 있어서,

상기 T 세포는,  
표적 세포의 항원을 인지할 수 있는 TCR 또는 CAR;  
상기 TCR 또는 CAR을 인코딩하는 핵산, 및  
상기 핵산을 포함하는 벡터를 포함하는, 면역 세포의 대사 기능 향상 방법.

#### 청구항 15

제 12항에 있어서,  
상기 NK 세포는,  
표적 세포의 항원을 인지할 수 있는 TCR 또는 CAR;  
상기 TCR 또는 CAR을 인코딩하는 핵산, 및  
상기 핵산을 포함하는 벡터를 포함하는, 면역 세포의 대사 기능 향상 방법.

#### 청구항 16

제 1항에 있어서,  
상기 PI3K 억제제는,  
1일에 1 내지 2회씩 처리되는, 면역 세포의 대사 기능 향상 방법.

#### 청구항 17

제 1항에 있어서,  
상기 PI3K 억제제는,  
0.5 내지 1  $\mu$ M의 농도를 가지는, 면역 세포의 대사 기능 향상 방법.

#### 청구항 18

제 1항에 있어서,  
상기 PI3K 억제제는,  
p110  $\alpha$ , p110  $\beta$ , p110  $\gamma$  및 p110  $\delta$  억제제 중 적어도 하나를 더 포함하는, 면역 세포의 대사 기능 향상 방법.

#### 청구항 19

제 18항에 있어서,  
상기 PI3K 억제제는,  
p110  $\delta$  억제제인, 면역 세포의 대사 기능 향상 방법.

#### 청구항 20

제 19항에 있어서,  
상기 p110  $\delta$  억제제는,  
선택티브 PI3K  $\delta$  억제제(compound 7n), 이델라리십(idelalisib/CAL-101, GS-1101), IC-87114, ZSTK474, PIK-294, PIK-293, 레니올리십(leniolisib/CDZ173), GSK2292767, 네미랄리십(nemiralisib/GSK2269557), 아칼리십(acalisib/GS-9820), PI-3065, AMG319, 셀레탈리십(seletalisib/UCB-5857), 움브랄리십(umbralisib/TGR-1202), PIK-3, IPI-3063, XL147 아날로그(XL147 analogue), PIK-90, 타셀리십(taselisib/GDC0032), SRX3207, 필라랄리십(Pilaralisib/XL147), 픽틸리십(pictilisib/GDC-0941), AZD8835, LY294002, 닥톨리십(dactolisib/BEZ235), PI-103, NU7441(KU-57788), 보르트만닌(wortmannin), 오미팔리십(omipalisib/GSK2126458), PF-04691502, 아피톨리십(apitolisib/GDC-0980), GSK1059615, 코판리십

(copanlisib/BAY80-6946), PKI-402, TG100713, VS-5584(SB2343), VVPS34억제제1(compound 19), 사모톨리십(samotlisib/LY3023414), MTX-211, 오토피넵(autophinib), VPS34-IN1, GNE-317, GDC-0084, 비미랄리십(bimiralisib/PQR309), SAR405, PF-49892416, 듀벨리십(duvelisib/IPI-145), TG100-115, 테날리십(tenalisib/RP6530) 및 AZD8186으로 이루어진 그룹 중 적어도 하나를 포함하는, 면역 세포의 대사 기능 향상 방법.

#### 청구항 21

제 18항에 있어서,

상기 p110  $\alpha$  억제제는,

XL147 아날로그(XL147 analogue), PIK-90, 타셀리십(taselisib/GDC0032), SRX3207, 필라칼리십(Pilaralisib/XL147), 알펠리십(alpilisib/BYL719), PIK-71 HCL, A66, 게다톨리십(gedatolisib/PKI-587), 피메피노스타트(fimepinostat/CUDC-907), CH5132799, 데라벨리십(serabelisib/TAK-117), 2-D08, HS-173, GDC-0326, GNE-477, 픽틸리십(pictilisib/GDC-0941), AZD8835, LY294002, 닥톨리십(dactolisib/BEZ235), 부팔리십(buparlisib/BKM120), PI-103, NU7441(KU-57788), 보르트만닌(wortmannin), 오미팔리십(omipalisib/GSK2126458), PF-04691502, 아피톨리십(apitolisib/GDC-0980), GSK1059615, 코판리십(copanlisib/BAY80-6946), PKI-402, TG100713, VS-5584(SB2343), VVPS34억제제1(compound 19), 사모톨리십(samotlisib/LY3023414), MTX-211, 오토피넵(autophinib), VPS34-IN1, GNE-317, GDC-0084, 비미랄리십(bimiralisib/PQR309), SAR405, PF-49892416, BGT226 말레이트(maleate) 및 SF2523으로 이루어진 그룹 중 적어도 하나를 포함하는, 면역 세포의 대사 기능 향상 방법.

#### 청구항 22

제 18항에 있어서,

상기 p110  $\beta$  억제제는,

TGX-221, AZD6482, GSK2636771, LY294002, 닥톨리십(dactolisib/BEZ235), 부팔리십(buparlisib/BKM120), PI-103, NU7441(KU-57788), 보르트만닌(wortmannin), 오미팔리십(omipalisib/GSK2126458), PF-04691502, 아피톨리십(apitolisib/GDC-0980), GSK1059615, 코판리십(copanlisib/BAY80-6946), PKI-402, TG100713, VS-5584(SB2343), VVPS34억제제1(compound 19), 사모톨리십(samotlisib/LY3023414), MTX-211, 오토피넵(autophinib), VPS34-IN1, GNE-317, GDC-0084, 비미랄리십(bimiralisib/PQR309), SAR405, PF-49892416, BGT226 말레이트(maleate) 및 AZD8186으로 이루어진 그룹 중 적어도 하나를 포함하는, 면역 세포의 대사 기능 향상 방법.

#### 청구항 23

제 18항에 있어서,

상기 p110  $\gamma$  억제제는,

AS-605240, 3-메틸라데닌(3-methyladenine/3-MA), 복스탈리십(voxtalisisib/XL765), AS-252424, AS-604850, CAY10505, CZC24832, IPI-549, 닥톨리십(dactolisib/BEZ235), 부팔리십(buparlisib/BKM120), PI-103, NU7441(KU-57788), 보르트만닌(wortmannin), 오미팔리십(omipalisib/GSK2126458), PF-04691502, 아피톨리십(apitolisib/GDC-0980), GSK1059615, 코판리십(copanlisib/BAY80-6946), PKI-402, TG100713, VS-5584(SB2343), VVPS34억제제1(compound 19), 사모톨리십(samotlisib/LY3023414), MTX-211, 오토피넵(autophinib), VPS34-IN1, GNE-317, GDC-0084, 비미랄리십(bimiralisib/PQR309), SAR405, PF-49892416, 듀벨리십(duvelisib/IPI-145), TG100-115, 테날리십(tenalisib/RP6530), BGT226 말레이트(maleate) 및 SF2523으로 이루어진 그룹 중 적어도 하나를 포함하는, 면역 세포의 대사 기능 향상 방법.

#### 청구항 24

삭제

#### 청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 면역 세포의 면역 기능 향상을 위한 방법 및 이에 따른 면역 세포주에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] 면역 세포 치료제는 수지상 세포(dendritic cell), 자연 살해 세포(natural killer cell), T 세포 등의 면역 세포를 이용하여 체내의 면역반응을 활성화시켜 질병을 치료할 목적으로 사용되는 의약품을 의미한다. 특히, 면역 세포 치료제는 항암 치료제로 각광을 받고 있다. 보다 구체적으로, 종래의 항암 치료인 화학 요법 항암제 및 방사선 치료는 암 세포의 사멸과 동시에 체내 면역 세포의 사멸로 인한 면역 기능의 저하, 위장관 장애 및 탈모 등의 부작용을 초래할 수 있다. 그러나, 면역 세포 치료제는 암세포를 공격하도록 체내의 면역 세포를 활성화시키는 방법으로 전술한 치료법에 대한 부작용을 최소화할 수 있다.

[0003] 한편, 이러한 면역 세포 치료제에 있어서, 암세포의 대사적 변이 즉, 종양 미세환경(tumor microenvironment)으로 인하여 항암 효과가 감소된다. 암세포는 다양한 방법으로 T 세포와 같은 면역 세포들에게 영향을 미칠 수 있다. 보다 구체적으로, 암세포는 글루코스(glucose) 및 아미노산(amino acid)과 같은 영양의 고갈, 젖산 축적으로 인한 높은 산도, 저산소 및 면역 체크포인트의 상향 조절 등의 종양 미세환경을 초래하여, 면역 세포들의 해당 작용과 같은 대사를 억제한다. 해당 작용 및 기타 대사들이 억제된 면역 세포들에서 결국 면역 기능 즉, 항암 효과가 떨어질 수 있다.

[0004] 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

[0005] 변형 면역 세포(engineered T cell)의 출현은 암과 같은 복잡한 질병에 대한 대처 방법을 제공할 수 있다. 이 때, 변형 면역 세포에서 필요한 것은 종양 미세환경에서의 면역 억제를 극복하거나 개조할 수 있는 능력일 수 있다. 예를 들어, 면역 세포가 종양 세포에 대한 추적 및 인식을 정확하게 할 수 있더라도, 종양 미세환경에 의해 면역 기능이 저하된다면 암을 효과적으로 공격할 수 없다.

[0006] 한편, PI3K(phosphoinositide 3 - kinase)는 지질 및 단백질 촉매 효소로서, 세포내에서 신호체계에 관여하며 포스포이노시티드(phosphoinositide) 화합물들의 이노시톨 링(inositol ring)의 D3 위치를 인산화하는 기능을 수행할 수 있다. PI3K는 구조 및 기능에 따라 세 종류(Class I, II, III로 분류될 수 있으며, 4개의 p110 촉매 아단위(p110 $\alpha$ , p110 $\beta$ , p110 $\delta$  및 p110 $\gamma$ )를 포함한다. 보다 구체적으로, Class I PI3K는 효소의 활성 기작과 관여하는 아단위 조절인자들의 종류에 따라 다시 Class IA 및 IB로 분류되며, Class IA는 PI3K $\alpha$ ,  $\beta$  및  $\delta$ 를 포함하고, Class IB는 PI3K $\gamma$ 를 포함한다. 이러한, Class I PI3K는 PIP2(phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate)를 인산화시켜 신호전달체계에서 중요한 2차 전령 물질로 작용하는 PIP3(phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate)를 생성한다. 나아가, PIP3는 AKT(Protein kinase B)를 활성화시키고, 활성화된 AKT는 mTOR(mechanistic target of rapamycin)을 활성화시킨다. 이에, mTOR의 활성을 통하여 진행 세포의 성장 및 대사가 증진될 수 있다.

- [0007] 이때, mTOR은 PIKK(PI3K-related kinase) 그룹에 속하는 세린(serine)/트레오닌(threonine)단백질 인산화 효소로, 세포의 성장 및 대사를 조절하는 mTORC1(mTOR complex 1) 및 세포의 증식 및 생존을 조절하는 mTORC2(mTOR complex 2)를 포함한다. mTORC1은 PI3K/AKT 신호전달경로의 하위 조절자이다. 많은 암환자들은 PI3K/AKT 신호전달경로에 관여하는 PTEN(phosphatase tensin homolog) 등과 같은 유전자 돌연변이로 인하여 mTOR1이 과활성화 되어 있다. 이에, 종래의 암치료는 PI3K 억제제를 통하여 mTOR1을 억제시켜 암세포의 사멸(apoptosis)을 유도하였다.
- [0008] 그러나, 본 발명의 발명자들은 암세포가 종양 미세환경을 통하여 T 세포의 활성을 억제한다는 것을 인지하였다. 암세포는 저산소(hypoxic) 상태, 영양 결핍 및 다른 억제 신호를 통하여 mTORC1을 억제시킨다. 나아가, mTORC1이 억제됨에 따라, 주변 T 세포는 면역성 결여(anergy) 즉, 항원 노출을 실패하게 되어, 암세포에 대한 면역 기능이 저하된다.
- [0009] 따라서, 본 발명의 발명자들은 PI3K/AKT 신호전달경로의 조절을 통하여 mTORC1을 활성화시켜 T 세포의 면역 기능을 증진시키고자 하였다.
- [0010] 한편, 종래의 PI3K 억제는 암세포의 사멸을 유도하기 위하여 사용되어 왔다. 그러나, 본 발명의 발명자들은 PI3K 억제에 의해 대사 활성화에 중요한 브릿지 신호전달역할을 수행하는 AKT가 반동(rebound)되고, 반동된 AKT는 보다 강력한 신호로 대사 활성을 향상시킬 수 있다는 것을 인지하였다.
- [0011] 이에, 본 발명의 발명자들은 T 세포에서 PI3K 억제를 억제함으로써 AKT가 감소되고, AKT 감소 신호를 통하여 mTORC1이 활성화되고, 활성화된 mTORC1은 다시 AKT를 자극하여, AKT의 발현이 증가되는 것을 확인하였다. 나아가, 증가된 AKT의 발현은 T 세포의 해당 작용을 향상시켜, T 세포의 대사 체력(metabolic fitness)이 증진된다는 것을 확인하였다.
- [0012] 따라서, 본 발명의 발명자들은 열악한 종양 미세환경에서도 면역 기능이 효과적으로 장시간 지속될 수 있는 대사 체력이 증진된 T 세포를 개발하는데 이르렀다.
- [0013] 이에, 본 발명이 해결하고 하는 과제는, 생체 외(ex vivo)에서 AKT/mTOR 하위 신호를 활성화하도록 면역 세포에 PI3K 억제제가 처리하는 단계 및 감소되어 있는 AKT가 반동(rebound)되도록 PI3K 억제제가 처리된 면역 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 면역 세포의 면역 기능 향상 방법을 제공하는 것이다.
- [0014] 나아가, 본 발명이 해결하고자 하는 다른 과제는, 전술한 방법에 의해 PI3K 억제제가 처리되고, GLUT1 발현율이 전체 면역 세포주에 대하여 40 % 이상인, 면역 세포주를 제공하는 것이다.
- [0015] 본 발명의 과제들은 이상에서 언급한 과제들로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

### 과제의 해결 수단

- [0016] 전술한 바와 같은 과제를 해결하기 위해, 본 발명의 일 실시예에 따르면, 생체 외(ex vivo)에서 AKT/mTOR 하위 신호를 활성화하도록 면역 세포에 PI3K 억제제가 처리하는 단계 및 감소되어 있는 AKT가 반동(rebound)되도록 PI3K 억제제가 처리된 면역 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 면역 세포의 면역 기능 향상 방법이 제공된다.
- [0017] 나아가, 면역 세포의 면역 기능 향상 방법은, PI3K 억제제를 처리하는 단계에 앞서, 생물학적 시료로부터 면역 세포를 분리하는 단계를 더 포함할 수 있다. 이때, 본 발명의 특징에 따르면, 생물학적 시료는 혈액(blood), 혈장(plasma), 림프절(lymph node), 비장(spleen), 흉선(thymus) 및 골수(bone marrow)로 이루어진 그룹 중 적어도 하나를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0018] 본 발명의 다른 특징에 따르면, 면역 세포는, 수지상 세포, 대식 세포, B 세포, T 세포, NK 세포로 이루어진 그룹 중 적어도 하나를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0019] 보다 구체적으로, 전술한 면역 세포에서의 T 세포는 도움 T 세포, 세포독성 T 세포, 기억 T 세포, 효과 T 세포, 조절 T 세포, 자연살해 T 세포, 점막 관련 불변 T 세포, 알파-베타 T 세포, 및 감마-델타 T 세포로 이루어진 그룹 중 적어도 하나를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0020] 또한, 전술한 T 세포 및 NK 세포는 표적 세포의 항원을 인지할 수 있는 TCR 및/또는 CAR, 상기 TCR 및 CAR을 인코딩하는 핵산 및 상기 핵산을 포함하는 벡터를 포함할 수 있다.
- [0021] 한편, 면역 세포의 면역 기능 향상 방법은, 면역 세포를 활성화하도록 CD3 및 CD28 항체 처리하는 단계를 더 포



함할 수 있다.

- [0022] 더 나아가, 면역 세포의 면역 기능 향상 방법에서 배양하는 단계는 3 내지 4주 중 적어도 하나의 기간 동안 배양될 수 있다.
- [0023] 본 발명의 또 다른 특징에 따르면, 면역 세포의 면역 기능 향상 방법에서 사용되는 PI3K 억제제는, 1일에 1 내지 2회씩 처리되며, 0.5 내지 1  $\mu$ M의 농도를 가질 수 있다.
- [0024] 나아가, PI3K 억제제는, PI3K  $\alpha$ , PI3K  $\beta$ , PI3K  $\gamma$  및 PI3K  $\delta$  억제제 중 적어도 하나를 포함할 수 있으며, 바람직하게는, PI3K  $\delta$  억제제일 수 있다. 이때, PI3K  $\delta$  억제제는, 선택적 PI3K  $\delta$  억제제1(compound 7n), 이델라리십(idelalisib/CAL-101, GS-1101), IC-87114, ZSTK474, PIK-294, PIK-293, 레니올리십(leniolisib/CDZ173), GSK2292767, 네미랄리십(nemiralisib/GSK2269557), 아칼리십(acalisib/GS-9820), PI-3065, AMG319, 셀레탈리십(seletalisib/UCB-5857), 움브랄리십(umbralisib/TGR-1202), PIK-3, IPI-3063, XL147 아날로그(XL147 analogue), PIK-90, 타셀리십(taselisib/GDC0032), SRX3207, 필라랄리십(Pilaralisib/XL147), 픽틸리십(pictilisib/GDC-0941), AZD8835, LY294002, 닥톨리십(dactolisib/BEZ235), 부팔리십(buparlisib/BKM120), PI-103, NU7441(KU-57788), 보르트만닌(wortmannin), 오미팔리십(omipalisib/GSK2126458), PF-04691502, 아피톨리십(apitolisib/GDC-0980), GSK1059615, 코판리십(copanlisib/BAY80-6946), PKI-402, TG100713, VS-5584(SB2343), VVPS34억제제1(compound 19), 사모톨리십(samotlisib/LY3023414), MTX-211, 오토피닉(autophinib), VPS34-IN1, GNE-317, GDC-0084, 비미랄리십(bimiralisib/PQR309), SAR405, PF-49892416, 듀벨리십(duvelisib/IPI-145), TG100-115, 테날리십(tenalisib/RP6530) 및 AZD8186으로 이루어진 그룹 중 적어도 하나를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0025] 나아가, 전술한 PI3K  $\alpha$  억제제는, XL147 아날로그(XL147 analogue), PIK-90, 타셀리십(taselisib/GDC0032), SRX3207, 필라랄리십(Pilaralisib/XL147), 알펠리십(alpilisib/BYL719), PIK-71 HCL, A66, 게다톨리십(gedatolisib/PKI-587), 피메피노스타트(fimepinostat/CUDC-907), CH5132799, 테라벨리십(serabelisib/TAK-117), 2-D08, HS-173, GDC-0326, GNE-477, 픽틸리십(pictilisib/GDC-0941), AZD8835, LY294002, 닥톨리십(dactolisib/BEZ235), 부팔리십(buparlisib/BKM120), PI-103, NU7441(KU-57788), 보르트만닌(wortmannin), 오미팔리십(omipalisib/GSK2126458), PF-04691502, 아피톨리십(apitolisib/GDC-0980), GSK1059615, 코판리십(copanlisib/BAY80-6946), PKI-402, TG100713, VS-5584(SB2343), VVPS34억제제1(compound 19), 사모톨리십(samotlisib/LY3023414), MTX-211, 오토피닉(autophinib), VPS34-IN1, GNE-317, GDC-0084, 비미랄리십(bimiralisib/PQR309), SAR405, PF-49892416, BGT226 말레이트(maleate) 및 SF2523으로 이루어진 그룹 중 적어도 하나를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0026] 더 나아가, PI3K  $\beta$  억제제는, TGX-221, AZD6482, GSK2636771, LY294002, 닥톨리십(dactolisib/BEZ235), 부팔리십(buparlisib/BKM120), PI-103, NU7441(KU-57788), 보르트만닌(wortmannin), 오미팔리십(omipalisib/GSK2126458), PF-04691502, 아피톨리십(apitolisib/GDC-0980), GSK1059615, 코판리십(copanlisib/BAY80-6946), PKI-402, TG100713, VS-5584(SB2343), VVPS34억제제1(compound 19), 사모톨리십(samotlisib/LY3023414), MTX-211, 오토피닉(autophinib), VPS34-IN1, GNE-317, GDC-0084, 비미랄리십(bimiralisib/PQR309), SAR405, PF-49892416, BGT226 말레이트(maleate) 및 AZD8186으로 이루어진 그룹 중 적어도 하나를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0027] 더 나아가, PI3K  $\gamma$  억제제는, AS-605240, 3-메틸라데닌(3-methyladenine/3-MA), 복스탈리십(voxtalisib/XL765), AS-252424, AS-604850, CAY10505, CZC24832, IPI-549, 닥톨리십(dactolisib/BEZ235), 부팔리십(buparlisib/BKM120), PI-103, NU7441(KU-57788), 보르트만닌(wortmannin), 오미팔리십(omipalisib/GSK2126458), PF-04691502, 아피톨리십(apitolisib/GDC-0980), GSK1059615, 코판리십(copanlisib/BAY80-6946), PKI-402, TG100713, VS-5584(SB2343), VVPS34억제제1(compound 19), 사모톨리십(samotlisib/LY3023414), MTX-211, 오토피닉(autophinib), VPS34-IN1, GNE-317, GDC-0084, 비미랄리십(bimiralisib/PQR309), SAR405, PF-49892416, 듀벨리십(duvelisib/IPI-145), TG100-115, 테날리십(tenalisib/RP6530), BGT226 말레이트(maleate) 및 SF2523으로 이루어진 그룹 중 적어도 하나를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0028] 또한, 면역 세포의 면역 기능 향상 방법은, 배양된 면역 세포를 종양 세포와 공생배양(co-culture)하는 단계 및 면역 세포에 의해 사멸(apoptosis)된 종양 세포를 백분율로 평가하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0029] 이때, 본 발명의 또 다른 특징에 따르면, 종양 세포는, 폐암, 비소세포성폐암, 췌장암, 위암, 간암, 유방암, 자

궁경부암, 갑상선암, 부갑상선암, 전립선암, 담낭암, 담도암, 비호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 혈액암, 방광암, 신장암, 난소암, 흑색종, 결장암, 골암, 피부암, 두부암, 자궁암, 직장암, 뇌종양, 항문부근암, 나팔관암, 자궁내막암, 질암, 음문암, 식도암, 소장암, 내분비선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 수뇨관암, 신장세포암, 신장골반암, 중추신경계(CNS central nervous system) 종양, 1차 CNS 림프종, 척수종양, 뇌간 신경교종 또는 뇌하수체 선종으로 이루어진 그룹 중 적어도 하나를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0030] 또한, 본 발명의 또 다른 특징에 따르면, 공생 배양은, 일반적인(normal), 저산소(hypoxic), 저당(low glucose) 배양 환경 중 적어도 하나에서의 배양일 수 있다.

[0031] 이에, 본 발명의 또 다른 특징에 따르면, 사멸된 종양 세포를 백분율로 평가하는 단계에서 사멸된 종양 세포의 백분율은, 일반적인 배양 환경인 경우, 60 내지 65 % 이고, 저산소 배양 환경인 경우, 45 내지 50 %이며, 저당 배양 환경인 경우, 35 내지 40 %일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 면역 세포의 종류 및 각 환경의 조건 등에 따라 달라질 수 있다.

[0032] 또 다른, 본 발명의 일 실시예에 따르면, PI3K 억제제가 처리되고, GLUT1 발현율이 전체 면역 세포주에 대하여 40 % 이상인, 면역 세포주가 제공된다.

[0033] 이때, 본 발명의 특징에 따르면, 면역 세포주의 GLUT1 발현율은 PI3K 억제제를 처리하지 않은 대조군보다 2 내지 3배 높을 수 있다.

[0034] 또한, 본 발명의 특징에 따르면, 면역 세포주는 도움 T 세포, 세포독성 T 세포, 기억 T 세포, 효과 T 세포, 조절 T 세포, 자연살해 T 세포, 점막 관련 불변 T 세포, 알파-베타 T 세포, 및 감마-델타 T 세포로 이루어진 그룹 중 적어도 하나를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이때, 도움 T 세포 및 세포독성 T 세포에서 감소된 AKT가 반동되어 48시간 동안 PI3K 억제제 처리전 보다 1.5배 이상 증가할 수 있다. 나아가, 세포독성 T 세포는 GLUT1 발현율이 전체 면역 세포주에 대하여 80 % 이상일 수 있다.

[0035] 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

[0036] 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 세포의 면역 기능 향상 방법 및 이에 따른 면역 세포주는 면역 세포의 면역 기능을 향상시킬 수 있다. 보다 구체적으로, 암의 치료에 있어, 외과 수술, 방사선 요법 및 화학 요법과 병용함으로써 보다 효과적인 치료를 실시할 수 있다.

[0037] 나아가, 면역 세포의 면역 기능 향상 방법 및 이에 따른 면역 세포주는 예후 개선뿐만 아니라, 생체 내의 자체 면역 세포의 기능을 증, 생존력을 증가시킴에 따라, 질병의 재발을 억제할 수 있는 효과가 있다.

[0038] 더 나아가, 자가 면역 세포에 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 세포의 면역 기능 향상 방법이 이용됨으로써, 면역 거부 반응과 같은 부작용을 최소화하여 자체 면역 세포의 기능을 향상시킬 수 있다.

[0039] 더 나아가, 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 세포의 면역 기능 향상 방법 및 이에 따른 면역 세포주는 열악한 종양 미세환경 내에서도 장기간 유지 및 성장될 수 있음에 따라, 연쇄적인 면역 신호를 장기간 초래하여, 보다 많은 생체 내 면역 세포들의 면역 기능을 활성화시킬 수 있다.

[0040] 본 발명에 따른 효과는 이상에서 예시된 내용에 의해 제한되지 않으며, 더욱 다양한 효과들이 본 명세서 내에 포함되어 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0041] 도 1은 PI3K 억제제로 인한 면역 세포내의 대사 작용을 도시한 것이다.

도 2는 PI3K 억제제 처리에 따른 종양 미세환경에서 T 세포의 암세포 사멸 능력 확인 방법을 도시한 것이다.

도 3a 내지 3c는 PI3K 억제제의 처리에 따른 종양 미세환경에서 T 세포의 암세포 사멸능력 결과를 도시한 것이다.

도 4a는 해당 작용에 대한 경로를 도시한 것이다.

도 4b는 PI3K 억제제 처리에 따른 T 세포의 해당 작용에 관여하는 효소들의 mRNA 발현 결과를 도시한 것이다.

도 5a는 PI3K 억제제 처리에 따른 T 세포의 GLUT1 단백질 발현을 결과를 도시한 것이다.

도 5b는 PI3K 억제제 처리에 따른 T 세포의 세포의 산성화 속도(Extracellular Acidification Rate, ECAR) 결과를 도시한 것이다.

도 6은 PI3K 억제제 처리에 따른 T 세포에서의 활성화 상태인 pAKT(phosphoAKT) 발현 정도를 도시한 것이다.

도 7은 PI3K 억제제 및 AKT 억제제 처리에 따른 T 세포에서의 GLUT1 발현 정도를 도시한 것이다.

도 8은 PI3K 억제제 및 mTORC1 억제제 처리에 따른 T 세포에서의 AKT 및 GLUT1 발현 정도를 도시한 것이다.

도 9a는 PI3K 억제제 처리에 따른 폐암 세포주인 LLC2에서의 항암 효과에 대한 결과를 도시한 것이다.

도 9b는 PI3K 억제제 처리에 따른 폐암 세포주인 LLC2에서의 면역 세포의 비율을 도시한 것이다.

도 10a는 PI3K 억제제 처리에 따른 폐암 세포주인 KLN205에서의 항암 효과에 대한 결과를 도시한 것이다.

도 10b는 PI3K 억제제 처리에 따른 폐암 세포주인 KLN205에서의 면역 세포의 비율을 도시한 것이다.

도 11은 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 세포의 면역 기능 향상 방법에 대한 절차를 도시한 것이다.

도 12는 T 세포에서의 PI3K 억제제의 종류에 따른 GLUT1 발현에 대한 결과를 도시한 것이다.

도 13은 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 세포주에 대한 항암 효과에 대한 결과를 도시한 것이다.

도 14는 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 세포주의 종양 내 면역 세포의 침윤도에 대한 결과를 도시한 것이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0042] 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.
- [0043] 본 명세서에서 사용되는 용어 "글루코스 흡수(glucose uptake)"는, 세포 내 미토콘드리아가 에너지인 ATP를 생성하는 데 필요한 에너지원의 하나인 글루코스를 흡수하는 것을 의미한다.
- [0044] 본 명세서에서 사용되는 용어 "활성 및/또는 활성화(activation)"는, 다양한 신호들에 의하여 자극을 받아 물질의 양이 변화하거나, 물질의 변화에 따라 기능이 발휘되는 작용을 의미할 수 있다. 나아가, 이러한 활성화는 또 다른 물질에게 신호를 전달하여, 연쇄적인 반응을 일으킬 수 있다.
- [0045] 이하에서는, 도 1을 참조하여, 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 세포의 면역 기능 향상 방법의 기작에 대하여 구체적으로 설명한다.
- [0046] 도 1을 참조하면, PI3K 억제제로 인한 면역 세포내의 대사 작용이 도시된다. 종래의 T 세포 면역 기능 증진은 PI3K 활성화를 통한 AKT/mTOR 활성을 유도하여 이루어졌다. 나아가, PI3K 억제제의 이용은 암세포에서 암 세포의 사멸을 유도하기 위함으로 사용되어 왔다.
- [0047] 그러나, 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 세포의 면역 기능 향상 방법은 전술한 종래의 방법과 달리, PI3K의 억제를 통하여 AKT/mTOR 활성을 유도하여 면역 세포의 면역 기능을 증진시킬 수 있다. 보다 구체적으로, 먼저, 면역 세포에서의 PI3K 억제제는 면역 세포의 세포막에 존재하는 PI3K를 억제시키고, PI3K가 억제됨에 따라 AKT의 활성이 감소된다.
- [0048] 그 다음, AKT의 활성 감소에 의한 신호는 mTORC1을 자극하고, 감소 신호에 의해 자극된 mTORC1은 활성화될 수 있다.
- [0049] 그 다음, 활성화된 mTORC1은 피드백 신호(feedback signal)로 감소되어 있는 AKT의 활성을 증가시킬 수 있다. 이때, mTORC1의 피드백 신호는 종래의 PI3K의 활성화에 의해 증가된 AKT 활성 신호보다 더 강력한 신호로서, 보다 증진된 AKT의 활성을 야기시킬 수 있다.
- [0050] 그 다음, 활성화된 AKT는 GLUT1의 발현을 증가시키고, 세포 표면에 존재하는 GLUT1 수용체를 통하여 세포 내로

글루코스를 수용(glucose uptake)을 증가시킬 수 있다. 이에, T 세포는 종양 미세환경에서 암세포와 경쟁력 있는 영양 상태를 유지할 수 있으며, 이에 따른 활발한 대사 활동을 통하여 면역 기능을 향상시킬 수 있다.

[0051] 이하에서는 도 2 내지 도 10b를 참조하여, 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 세포의 면역 기능 향상 방법에 대한 기작 확인을 설명한다.

[0052] **실험예 1. PI3K 억제제 처리에 따른 면역 기능 향상 확인**

[0053] 도 2는 PI3K 억제제 처리에 따른 종양 미세환경에서 T 세포의 암세포 사멸 능력 확인 방법을 도시한 것이다.

[0054] 먼저, 6 내지 8주령의 동종 이계(Allogeneic) 모델인 BALBc 마우스에 폐암 세포주인 LLC2로부터 수득된 신생물(neoplasm) 용해액 3  $\mu$ g 및 보조약물(adjuvant)인 LPS(Lipopolysaccharide) 1  $\mu$ g를 1주일에 1번씩 근육주사(intramuscular injection)로 주입하였다. 이와 동시에, PI3K 억제제에 대한 실험군은 PI3K 억제제(PI3K inhibitor, iPI3K)인 BKM-120을 50 mpk(mg/kg)씩 1일에 1번씩 경구투여(peroral injection)하였다.

[0055] 그 다음, 총 3주간의 주입이 완료된 마우스의 비장세포(splenocyte)에서 림프구를 분리하고, 자성 활성 세포 분류기(Magnetic-activated cell sorting, MACS)를 이용하여 CD3+ T 세포만 수득하였다.

[0056] 그 다음, 수득된 CD3+ T 세포를 용해액에 이용되었던 폐암 세포주와 함께 24시간 동안 공생배양(co-culture)한다. 이때, T 세포 및 폐암 세포주의 비율은 폐암 세포주 1에 대하여 T 세포 10일 수 있다. 나아가, 열악한 종양 미세환경에서의 암세포 사멸 능력을 확인하기 위하여, 정상 환경(normal condition), 저산소 환경(hypoxic condition) 및 저당 환경(low glucose condition)에서 각각 T 세포 및 폐암 세포주를 배양하였다.

[0057] 그 다음, 공생배양된 T 세포 및 폐암 세포주를 세포사멸(apoptosis kit) 및 CD3+ 항체를 이용하여 유세포(flow cytometry)분석을 수행하였다.

[0058] 이에, 도 3a 내지 3c를 참조하면, PI3K 억제제의 처리에 따른 종양 미세환경에서 T 세포의 암세포 사멸능력 결과를 도시한 것이다.

[0059] 먼저, 도 3a의 (a)를 참조하면, PI3K 억제제의 처리에 따른 정상 환경(normal condition)에서 T 세포의 암세포 사멸능력 결과가 도시된다. 이때, x축 및 y축은 각각 annexin V 및 PI(propidium iodine)인 염색 시약으로 세포 사멸을 나타낸다.

[0060] 대조군의 1사분면은 24.3 %, 2사분면은 30.2 %, 3사분면은 35.1 % 및 4사분면은 10.4 %인 것으로 나타나며, PI3K 억제제 실험군의 1사분면은 62.8 %, 2사분면은 15.5 %, 3사분면은 10.2 % 및 4사분면은 11.5 %인 것으로 나타난다. 이때, 1사분면은 annexin V 및 PI가 모두 염색되어 완전한 암세포의 사멸을 의미할 수 있다. 이에, 도 3a의 (a)의 1사분면을 그래프로 나타낸 도 3a의 (b)를 참조하면, PI3K 억제제를 처리한 실험군이 62.8 %로 대조군의 24.3 %보다 유의하게 높은 것으로 나타난다( $p < 0.05$ ). 즉, PI3K 억제로 인하여 정상 환경에서 T 세포의 암세포 사멸 능력이 향상된 것으로 나타난다.

[0061] 도 3b의 (a)를 참조하면, PI3K 억제제의 처리에 따른 저산소 환경(hypoxic condition)에서 T 세포의 암세포 사멸능력 결과가 도시된다.

[0062] 대조군의 1사분면은 22.1 %, 2사분면은 56.4 %, 3사분면은 19.7 % 및 4사분면은 1.73 %인 것으로 나타나며, PI3K 억제제 실험군의 1사분면은 47.4 %, 2사분면은 26.7 %, 3사분면은 18.5 % 및 4사분면은 7.36 %인 것으로 나타난다.

[0063] 이에, 도 3b의 (a)의 1사분면을 그래프로 나타낸 도 3b의 (b)를 참조하면, PI3K 억제제를 처리한 실험군이 47.4 %로 대조군의 22.1 %보다 유의하게 높은 것으로 나타난다( $p < 0.05$ ). 즉, PI3K 억제로 인하여 저산소 환경에서 T 세포의 암세포 사멸 능력이 향상된 것으로 나타난다.

[0064] 도 3c의 (a)를 참조하면, PI3K 억제제의 처리에 따른 저당 환경(low glucose condition)에서 T 세포의 암세포 사멸능력 결과가 도시된다.

[0065] 대조군의 1사분면은 23.7 %, 2사분면은 18.1 %, 3사분면은 50.7 % 및 7.46 %인 것으로 나타나며, PI3K 억제제 실험군의 1사분면은 36.1 %, 2사분면은 47.2 %, 3사분면은 13.1 % 및 4사분면은 3.71 %인 것으로 나타난다.

[0066] 이에, 도 3c의 (a)의 1사분면을 그래프로 나타낸 도 3c의 (b)를 참조하면, PI3K 억제제를 처리한 실험군이 36.1 %로 대조군의 23.7 %보다 유의하게 높은 것으로 나타난다( $p < 0.05$ ). 즉, PI3K 억제로 인하여 저당 환경에서 T 세포의 암세포 사멸 능력이 향상된 것으로 나타난다.



[0067] 실험예 2. PI3K 억제제 처리에 따른 글루코스 대사 증진 확인

[0068] 이하에서는 도 4a 내지 5b를 참조하여, PI3K 억제제 처리에 따른 T 세포의 글루코스 대사에 대하여 구체적으로 설명한다.

[0069] 먼저, 도 4a를 참조하면, 해당 작용에 대한 경로가 도시된다. 해당 작용은 세포가 글루코스를 분해해 에너지와 생합성에 필요한 재료를 얻는 핵심 물질대사 과정이다. 보다 구체적으로, 해당 작용에 대한 경로에는 GPI1, ALDOa, GAPDH, PGAM1, PGAM2, PGAM5, ENO2, PKM2, GLUT1 및 PGM1 등의 다양한 효소가 관여하는 것으로 나타난다.

[0070] 이에, 도 4b를 참조하면, PI3K 억제제 처리에 따른 T 세포의 해당 작용에 관여하는 효소들의 mRNA 발현 결과가 도시된다. 이때, PI3K 억제제 처리에 따른 T 세포의 해당 작용에 관여하는 효소들을 확인하기 위하여, 도 2에서 수득된 CD3+ T 세포가 사용되었다. 나아가, 수득된 CD3+ T 세포는 항-CD3 및 항-CD28 소구체(beads)를 이용하여 72시간 동안 활성화하여 해당 작용에 관여하는 효소들의 mRNA 발현을 확인하였다. 이때, CD3은 단백질 면역조절제인 사이토카인을 분비시키고, CD28은 세포사멸을 억제하는 역할을 한다. CD3만 활성화된 T 세포는 세포사멸로 이어질 수 있다. 이에, T 세포는 기능 및 생존율을 높이기 위하여 CD3 및 CD28 신호가 모두 사용되었다.

[0071] 각 효소들의 mRNA 발현은 PI3K 억제제를 처리하고 CD3+CD28이 자극된 T 세포 그룹이 비장 세포로부터 분리된 T 세포 및 CD3+CD28이 자극된 T 세포 그룹보다 모두 높은 것으로 나타난다. 즉, PI3K 억제제 처리로 인하여 T 세포의 해당 작용에 작용하는 단백질들의 발현이 향상된 것으로 나타난다.

[0072] 나아가, 도 5a를 참조하면, PI3K 억제제 처리에 따른 T 세포의 GLUT1 단백질 발현을 결과가 도시된다. 이때, T 세포는 도 4b와 동일한 방법을 통하여 처리되었다.

[0073] PI3K 억제제가 처리된 T 세포는 GLUT1 발현율이 대조군보다 유의하게 6 내지 7배 높은 것으로 나타나며, 전체 T 세포에 대하여 GLUT1을 발현하는 T 세포는 60 내지 70 %인 것으로 나타난다. 즉, 글루코스 흡수에 있어 주요 단백질인 GLUT1은 PI3K 억제제로 발현이 증가할 수 있으며, 이에 따라, T 세포의 글루코스 흡수가 향상될 수 있다.

[0074] 나아가, 도 5b를 참조하면, PI3K 억제제 처리에 따른 T 세포의 세포외 산성화 속도(Extracellular Acidification Rate, ECAR) 결과가 도시된다. 이때, 세포외 산성화 속도를 측정하기 위하여, 도 5a에서 이용된 T 세포가 이용되었으며,  $1 \times 10^5$  개의 T 세포가 이용되었다. 나아가, 세포외 산성화 속도는 배지 내에서 젖산염 분비에 의해 만들어진 pH 변화를 통해 글루코스 분해를 계측한 것이다.

[0075] 먼저, 1 단계(phase 1)에서의 세포외 산성화 속도는, PI3K 억제제를 처리한 T 세포군이 대조군(control)보다 더 높은 것으로 나타난다. 즉, PI3K 억제제 처리로 인하여 T 세포의 글루코스 분해 즉, 해당 작용이 향상된 것을 의미할 수 있다.

[0076] 그 다음, 글루코스(glucose)가 주입된 2 단계(phase 2)에서의 세포외 산성화 속도는, 1 단계에서의 세포외 산성화 속도보다 두 그룹 모두 높은 것으로 나타나며, PI3K 억제제를 처리한 T 세포군과 대조군(control)의 세포외 산성화 속도 차이는 더 커진 것으로 나타난다. 즉, 2 단계에서의 세포외 산성화 속도 향상은 주입된 글루코스를 사용하기 위하여 T 세포의 해당 작용이 증가한 것으로 의미할 수 있다. 나아가, PI3K 억제제를 처리한 T 세포군은 증가된 GLUT1 단백질로 인하여 대조군보다 더 많은 포도당 흡수하여 해당 작용이 보다 활발하게 일어남에 따라, 차이가 더 커진 것으로 나타난다.

[0077] 그 다음, T 세포 내 미토콘드리아의 대사를 억제하기 위하여 올리고마이신(oligomycin)이 주입된 3 단계(phase 3)에서는 두 그룹 모두 감소되어 있던 세포외 산성화 속도가 다시 높아지는 것으로 나타난다. 나아가, PI3K 억제제를 처리한 T 세포군과 대조군의 세포외 산성화 속도 차이는 2 단계와 유사한 것으로 나타나며, PI3K 억제제를 처리한 T 세포군이 대조군보다 세포외 산성화 속도가 높은 것으로 나타난다.

[0078] 이때, 미토콘드리아의 대사를 억제하기 위하여 올리고마이신이 주입됨에 따라, T 세포는 해당 작용(glycolysis)만 이용하여 ATP를 생산해야 한다. 이에, 3 단계에서의 세포외 산성화 속도는 순수한 해당 작용 수용력을 의미할 수 있다.

[0079] 따라서, 해당 작용을 통한 ATP 생산은 PI3K 억제제를 처리한 T 세포군이 더 많은 것으로 나타나며, 이를 통하여 T 세포는 면역 기능이 더 활성화될 수 있다.

[0080] 그 다음, 2-데옥시-D-글루코스(2DG)가 주입된 4 단계(phase 4)에서는 두 그룹 모두 3 단계보다 세포외 산성화

속도가 감소하는 것으로 나타난다. 그러나, PI3K 억제제를 처리한 T 세포군이 대조군보다 세포의 산성화 속도 차이가 높은 것으로 나타난다.

[0081] 이때, 2DG는 글루코스의 2-하이드록실 그룹을 수소로 대체되어, 글루코스가 분해될 수 없는 분자이다. 나아가, 2DG를 처리한 경우, 글루코스 대사의 상위 단계에서 제어할 수 있다. 이에, 4 단계에서의 세포의 산성화 속도는 세포 내 글루코스 비축량(glucose reserve)을 의미할 수 있다.

[0082] 따라서, T 세포 내 비축되어 있는 글루코스의 양은 PI3K 억제제를 처리한 T 세포군이 더 많은 것으로 나타나며, 이를 통하여 T 세포는 영양이 더 이상 공급되지 않는 열악한 환경에서도 보다 장시간 면역 기능을 유지할 수 있다.

[0083] 전술한 실험에 2에 따르면, PI3K 억제제의 처리로 인하여 면역 세포는 GPI1, ALDOa, GAPDH, PGAM1, PGAM2, PGAM5, ENO2, PKM2, GLUT1 및 PGM1 등과 같은 해당 작용에 관여하는 다양한 단백질들의 발현이 증가되며, 이를 통하여 해당 작용에 대한 대사가 증가하는 것으로 나타난다. 나아가, PI3K 억제제의 처리로 인하여 면역 세포는 해당 작용이 향상됨에 따라 더 많은 ATP를 생산할 수 있으며, 면역 세포 내 글루코스 비축량이 향상될 수 있다. 이에, T 세포의 면역 기능에 대한 활성화가 향상되고, 에너지가 공급이 원활하지 못한 열악한 환경에서도 장시간 면역 기능이 유지될 수 있다.

### [0084] 실험예 3. PI3K 억제제 처리에 따른 AKT 활성화 확인

[0085] 이하에서는, 도 6 내지 8를 참조하여, PI3K 억제제 처리에 따른 T 세포의 AKT 활성화에 대하여 구체적으로 설명한다.

[0086] 먼저, 도 6을 참조하면, PI3K 억제제 처리에 따른 T 세포에서의 활성화 상태인 pAKT(phosphoAKT) 발현 정도가 도시된다. 이때, PI3K 억제제 처리에 따른 T 세포의 AKT 활성화를 확인하기 위하여, 도 2에서 획득된 CD3+ T 세포가 사용되었다. 나아가, 획득된 CD3+ T 세포는 CD11c 양성 수지상 세포, 항-CD3 및 항-CD28와 함께 48시간 공생배양하였으며, pAKT 발현은 공생배양 시작 후 6시간 및 48 시간에 유세포분석을 통하여 측정하였다. 더 나아가, pAKT의 발현은 평균 형광강도(mean fluorescence intensity, MFI)로 나타났다. 더 나아가, pAKT의 발현을 측정하는 T 세포로 CD4 및 CD8 양성 세포가 사용되었다. 이때, CD4 및 CD8은 T 세포의 세포막에 존재하며, 각각 class II MHC 및 class I MHC의 비 다형성 영역(non-polymorphic region)에 결합하는 세포결합단백질이다. CD4는 T 세포의 계통 표지자로써 조력 T 세포(helper T cell)를 의미할 수 있으며, CD8은 세포독성 T 세포(cytotoxic T cell)를 의미할 수 있다.

[0087] 보다 구체적으로, 도 6의 (a)를 참조하면, PI3K 억제제 처리에 따른 조력 T 세포에서 AKT의 발현 변화가 도시된다. PI3K 억제제가 처리된 그룹은 0 내지 20 시간동안, 대조군보다 AKT 발현이 낮은 것으로 나타난다. 그러나, 20 시간 이후, PI3K 억제제가 처리된 그룹은 대조군보다 AKT 발현이 높아지는 것으로 나타난다. 나아가, 48 시간 경과 후, PI3K 억제제가 처리된 그룹의 AKT 발현은 대조군보다 1.5 내지 2배 이상 증가한 것으로 나타난다.

[0088] 결과적으로, PI3K 억제제에 따른 조력 T 세포의 AKT 발현은 시간 경과에 따라 증가되는 것으로 나타난다. 즉, 조력 T 세포에서의 PI3K 억제는 AKT의 발현을 반동(rebound)시킬 수 있다.

[0089] 도 6의 (b)를 참조하면, PI3K 억제제 처리에 따른 세포독성 T 세포에서 AKT의 발현 변화가 도시된다. PI3K 억제제가 처리된 그룹은 0 내지 25 시간동안, 대조군보다 AKT 발현이 낮은 것으로 나타난다. 그러나, 25 시간 이후, PI3K 억제제가 처리된 그룹은 대조군보다 AKT 발현이 높아지는 것으로 나타난다. 나아가, 48 시간 경과 후, PI3K 억제제가 처리된 그룹의 AKT 발현은 대조군보다 1.3 내지 1.7배 이상 증가한 것으로 나타난다.

[0090] 즉, PI3K 억제제에 따른 세포독성 T 세포의 AKT 발현은 시간 경과에 따라 증가되는 것으로 나타난다. 즉, 세포독성 T 세포에서의 PI3K 억제는 AKT의 발현을 반동(rebound)시킬 수 있다.

[0091] 나아가, 도 7을 참조하면, PI3K 억제제 및 AKT 억제제 처리에 따른 T 세포에서의 GLUT1 발현 정도가 도시된다. 보다 구체적으로, 조력 및 세포독성 T 세포 모두에서 GLUT1 발현은 PI3K 억제제만 처리한 그룹(iPI3K+/iAKT-)이 PI3K 및 AKT 억제제를 처리하지 않은 그룹(iPI3K-/iAKT-), AKT 억제제만 처리한 그룹(iPI3K-/iAKT+) 및 PI3K 및 AKT 억제제를 처리한 그룹(iPI3K+/iAKT+)보다 유의하게 2 내지 3 배 높은 것으로 나타난다(p<0.05).

[0092] 나아가, PI3K 및 AKT 억제제를 처리하지 않은 그룹(iPI3K-/iAKT-), AKT 억제제만 처리한 그룹(iPI3K-/iAKT+) 및 PI3K 및 AKT 억제제를 처리한 그룹(iPI3K+/iAKT+)에서의 GLUT1의 발현은 통계적으로 차이가 없는 것으로 나

타난다.

- [0093] 즉, PI3K 억제제를 통하여 AKT의 활성이 향상되고, 활성화된 AKT는 T 세포의 글루코스 수송체인 GLUT1의 발현을 향상시킬 수 있다. 나아가, T 세포에서의 GLUT1의 발현 향상은 PI3K 억제제를 통해서만 나타나며, 억제제를 통한 직접적인 AKT의 억제는 GLUT1의 발현에 영향을 미치지 못하는 것으로 나타난다.
- [0094] 나아가, 도 8를 참조하면, PI3K 억제제 및 mTORC1 억제제 처리에 따른 T 세포에서의 AKT 및 GLUT1 발현 정도가 도시된다. 이때, mTORC1 억제제로서 RAD001이 사용되었다.
- [0095] 먼저, 도 8의 (a)를 참조하면, PI3K 억제제 및 mTORC1 억제제 처리에 따른 T 세포에서의 AKT 발현 정도가 도시된다. 보다 구체적으로, AKT 발현은 PI3K 억제제만 처리한 그룹(iPI3K+/imTOR-)이 PI3K 및 AKT 억제제를 처리하지 않은 그룹(iPI3K-/imTOR-), mTORC1 억제제만 처리한 그룹(iPI3K-/imTOR+) 및 PI3K 및 imTOR 억제제를 처리한 그룹(iPI3K+/imTOR+)보다 유의하게 1.5 내지 2.3 배 높은 것으로 나타난다( $p < 0.05$ ). 이는, mTORC1 억제될 경우, AKT 발현이 감소됨에 따라, mTORC1이 AKT의 발현을 반동시킬 수 있는 중요한 신호임을 의미할 수 있다.
- [0096] 나아가, 도 8의 (b)를 참조하면, PI3K 억제제 및 mTORC1 억제제 처리에 따른 T 세포에서의 GLUT1 발현 정도가 도시된다. 보다 구체적으로, GLUT1 발현은 PI3K 억제제만 처리한 그룹(iPI3K+/imTOR-)이 PI3K 및 AKT 억제제를 처리하지 않은 그룹(iPI3K-/imTOR-), mTORC1 억제제만 처리한 그룹(iPI3K-/imTOR+) 및 PI3K 및 mTORC1 억제제를 처리한 그룹(iPI3K+/imTOR+)보다 유의하게 6 내지 7 배 높은 것으로 나타난다( $p < 0.05$ ).
- [0097] 즉, PI3K 억제제를 통하여 mTORC1의 활성이 증진되고, 활성화된 mTORC1은 AKT을 활성화시켜 GLUT1의 발현을 향상시킬 수 있다.
- [0098] 전술한 실험에 3에 따르면, 종래의 일반적인 세포 및 암세포에서의 PI3K 억제제 처리는 PI3K/AKT/mTOR 신호전달 경로의 활성을 감소시켜 세포사멸을 이르게 하였다. 그러나, T 세포에서의 PI3K 억제제 처리는 더욱 강력한 신호로 PI3K/AKT/mTOR 신호전달경로를 활성화시킬 수 있다. 보다 구체적으로, 종래의 일반적인 세포 및 암세포에서는 PI3K 억제제 처리로 인하여, AKT 활성이 감소되고, 이에 따른 하위 신호들이 모두 감소되어 세포가 사멸된다. 그러나, 면역 세포인 T 세포에서는 PI3K 억제제 처리로 인하여, AKT 활성이 감소되고, AKT 활성 감소로 인한 신호가 mTORC1을 활성화시킬 수 있다. 나아가, 활성화된 mTORC1은 피드백 신호(feedback signal)로 감소되어 있는 AKT을 재자극시켜 AKT의 활성을 증가시킬 수 있다. 이에, AKT는 PI3K 억제제 처리 0 내지 25 시간 동안에는 발현이 감소되지만, 20 시간 이후, AKT가 재자극되어 AKT 발현이 더 강력한 신호로 반동되어 증가하는 것으로 나타난다. 이에, AKT 발현 증가로 인하여 GLUT1의 발현이 이질적으로 증가될 수 있다.
- [0099] **실험예 4. PI3K 억제제 처리에 따른 항암 효과 확인**
- [0100] 이하에서는, 도 9a 내지 10b를 참조하여, PI3K 억제제 처리에 따른 폐암 세포주에서의 항암 효과에 대하여 구체적으로 설명한다.
- [0101] 먼저, 도 9a를 참조하면, PI3K 억제제 처리에 따른 폐암 세포주인 LLC2에서의 항암 효과에 대한 결과가 도시된다. 대조군인 공시험액(Vehicle)을 처리한 경우, 처리일(days of treatment)이 증가할수록 급격히 종양의 크기가 증가하여, 15일째의 종양 크기는 500 내지 550 mm<sup>3</sup> 것으로 나타난다. 그러나, PI3K 억제제가 처리된 경우, 대조군보다 종양 크기가 감소된 것으로 나타난다. 보다 구체적으로, PI3K 억제제인 BKM 120을 35 mpk로 처리한 경우, 15일째의 종양 크기는 300 내지 350 mm<sup>3</sup> 것으로 나타나며, BKM 120을 50 mpk로 처리한 경우, 15일째의 종양 크기는 90 내지 100 mm<sup>3</sup> 것으로 나타난다.
- [0102] 즉, PI3K 억제제의 용량이 증가할수록 종양의 크기가 감소함에 따라, PI3K 억제제의 용량에 따라 비례적으로 항암 효과가 증가하는 것으로 나타난다.
- [0103] 도 9b를 참조하면, PI3K 억제제 처리에 따른 폐암 세포주인 LLC2에서의 면역 세포의 비율 도시된다.
- [0104] 먼저 도 9b의 (a)를 참조하면, PI3K 억제제 처리에 따른 폐암 세포주인 LLC2에서 CD3+CD8+ T 세포의 비율이 도시된다. 이때, CD3+CD8+ T 세포는 손상된 세포, 감염된 세포 및 종양 세포를 파괴할 수 있는 세포독성 T 세포(cytotoxic T cell, Tc cell)를 의미할 수 있다.
- [0105] 공시험액을 처리한 경우, CD3+CD8+ T 세포에 대한 비율의 분포는 30 내지 40 %로, 평균 35 %의 비율을 갖는 것으로 나타난다. 나아가, PI3K 억제제인 BKM 120을 35 mpk로 처리한 경우, CD3+CD8+ T 세포에 대한 비율의 분포

은 35 내지 42 %로, 평균 38 %의 비율을 갖는 것으로 나타나며, BKM 120을 50 mpk로 처리한 경우, CD3+CD8+ T 세포에 대한 비율의 분포는 37 내지 50 %로, 평균 42 %의 비율을 갖는 것으로 나타난다.

- [0106] 나아가, BKM 120을 50 mpk로 처리한 경우의 평균 비율은 공시험액을 처리한 경우의 평균 비율보다 유의하게 높은 것으로 나타난다( $p < 0.05$ ).
- [0107] 즉, PI3K 억제제의 용량이 증가할수록 항암 효과를 증가시킬 수 있는 CD3+CD8+ T 세포의 비율이 증가함에 따라, PI3K 억제제의 용량에 따라 비례적으로 항암 효과가 증가하는 것으로 나타난다.
- [0108] 그 다음, 도 9b의 (b)를 참조하면, PI3K 억제제 처리에 따른 폐암 세포주인 LLC2에서 CD3+CD4+CD25+Foxp3 T 세포의 비율이 도시된다. 이때, CD3+CD4+CD25+Foxp3 T 세포는 자기관용(immune-tolerance)을 유지하고 자가 면역을 유지, 즉, 다른 세포들의 면역 반응을 억제할 수 있는 조절 T 세포(regulatory T cell, Treg)를 의미할 수 있다.
- [0109] 공시험액을 처리한 경우, CD3+CD4+CD25+Foxp3 T 세포에 대한 비율의 분포는 17 내지 26 %로, 평균 21 %의 비율을 갖는 것으로 나타난다. 나아가, PI3K 억제제인 BKM 120을 35 mpk로 처리한 경우, CD3+CD4+CD25+Foxp3 T 세포에 대한 비율의 분포는 16 내지 19 %로, 평균 17 %의 비율을 갖는 것으로 나타나며, BKM 120을 50 mpk로 처리한 경우, CD3+CD4+CD25+Foxp3 T 세포에 대한 비율의 분포는 13 내지 17 %로, 평균 15 %의 비율을 갖는 것으로 나타난다.
- [0110] 나아가, BKM 120을 35 mpk로 처리한 경우의 평균 비율은 공시험액을 처리한 경우의 평균 비율보다 유의하게 낮은 것으로 나타나며( $p < 0.05$ ), BKM 120을 50 mpk로 처리한 경우의 평균 비율은 BKM 120을 35 mpk로 처리한 경우의 평균 비율보다 유의하게 낮은 것으로 나타난다( $p < 0.05$ ).
- [0111] 즉, PI3K 억제제의 용량이 증가할수록 면역 세포의 항암 효과를 감소시킬 수 있는 CD3+CD4+CD25+Foxp3 T 세포의 비율이 감소함에 따라, PI3K 억제제의 용량에 따라 비례적으로 항암 효과가 증가하는 것으로 나타난다.
- [0112] 그 다음, 도 9b의 (c)를 참조하면, PI3K 억제제 처리에 따른 폐암 세포주인 LLC2에서 CD3+TIL 세포의 비율이 도시된다. 이때, CD3+TIL 세포는 종양 세포 군집에 침윤하여 T 세포의 종양 살상 능력 즉, 항암 효과를 높여줄 수 있는 종양 침윤 림프구 세포(tumor infiltrating lymphocyte, TIL)를 의미할 수 있다.
- [0113] 공시험액을 처리한 경우, CD3+TIL 세포에 대한 비율은 평균적으로 0.4 %인 것으로 나타난다. 나아가, PI3K 억제제인 BKM 120을 35 mpk로 처리한 경우, CD3+TIL 세포에 대한 비율은 평균적으로 0.4 %인 것으로 나타나며, BKM 120을 50 mpk로 처리한 경우, CD3+TIL 세포에 대한 비율은 평균적으로 0.9 %인 것으로 나타난다.
- [0114] 즉, PI3K 억제제의 용량이 증가할수록 항암 효과를 증가시킬 수 있는 CD3+TIL T 세포의 비율이 증가함에 따라, PI3K 억제제의 용량에 따라 비례적으로 항암 효과가 증가하는 것으로 나타난다.
- [0115] 그 다음, 도 9b의 (d)를 참조하면, PI3K 억제제 처리에 따른 폐암 세포주인 LLC2에서 MDSC 세포의 비율이 도시된다. 이때, MDSC 세포는, T 세포 및 NK세포와 같은 면역 세포들의 면역 반응을 억제하고, 조절 T 세포(Treg)의 생성을 유도하여 암세포의 성장을 촉진시키는 미성숙 골수성 세포(myeloid cell)을 의미할 수 있다.
- [0116] 공시험액을 처리한 경우, MDSC 세포에 대한 비율의 분포는 33 내지 35 %로, 평균 34 %의 비율을 갖는 것으로 나타난다. 나아가, PI3K 억제제인 BKM 120을 35 mpk로 처리한 경우, MDSC 세포에 대한 비율의 분포는 31 내지 33 %로, 평균 32 %의 비율을 갖는 것으로 나타나며, BKM 120을 50 mpk로 처리한 경우, MDSC 세포에 대한 비율의 분포는 22 내지 26 %로, 평균 24 %의 비율을 갖는 것으로 나타난다.
- [0117] 나아가, BKM 120을 50 mpk로 처리한 경우의 평균 비율은 공시험액을 처리한 경우의 평균 비율보다 유의하게 낮은 것으로 나타난다( $p < 0.05$ ).
- [0118] 즉, PI3K 억제제의 용량이 증가할수록 면역 세포의 항암 효과를 감소시킬 수 있는 MDSC 세포의 비율이 감소함에 따라, PI3K 억제제의 용량에 따라 비례적으로 항암 효과가 증가하는 것으로 나타난다.
- [0119] 도 10a를 참조하면, PI3K 억제제 처리에 따른 폐암 세포주인 KLN205에서의 항암 효과에 대한 결과가 도시된다. 대조군인 공시험액을 처리한 경우, 처리일이 증가할수록 급격히 종양의 크기가 증가하여, 15일째의 종양 크기는 400 내지 500 mm<sup>3</sup> 것으로 나타난다. 그러나, PI3K 억제제가 처리된 경우, 대조군보다 종양 크기가 감소된 것으로 나타난다. 보다 구체적으로, PI3K 억제제인 BKM 120을 35 mpk로 처리한 경우, 15일째의 종양 크기는 200 내지 250 mm<sup>3</sup> 것으로 나타나며, BKM 120을 50 mpk로 처리한 경우, 15일째의 종양 크기는 90 내지 100 mm<sup>3</sup> 것으로



나타난다.

- [0120] 즉, PI3K 억제제의 용량이 증가할수록 종양의 크기가 감소함에 따라, PI3K 억제제의 용량에 따라 비례적으로 항암 효과가 증가하는 것으로 나타난다.
- [0121] 도 10b를 참조하면, PI3K 억제제 처리에 따른 폐암 세포주인 KLN205에서의 면역 세포의 비율 도시된다.
- [0122] 먼저 도 10b의 (a)를 참조하면, PI3K 억제제 처리에 따른 폐암 세포주인 KLN205에서 CD3+CD8+ T 세포의 비율이 도시된다.
- [0123] 공시험액을 처리한 경우, CD3+CD8+ T 세포에 대한 비율의 분포는 30 내지 40 %로, 평균 35 %의 비율을 갖는 것으로 나타난다. 나아가, PI3K 억제제인 BKM 120을 35 mpk로 처리한 경우, CD3+CD8+ T 세포에 대한 비율의 분포는 35 내지 49 %로, 평균 39 %의 비율을 갖는 것으로 나타나며, BKM 120을 50 mpk로 처리한 경우, CD3+CD8+ T 세포에 대한 비율의 분포는 32 내지 50 %로, 평균 41 %의 비율을 갖는 것으로 나타난다.
- [0124] 나아가, BKM 120을 50 mpk로 처리한 경우의 평균 비율은 공시험액을 처리한 경우의 평균 비율보다 유의하게 높은 것으로 나타난다( $p < 0.05$ ).
- [0125] 즉, PI3K 억제제의 용량이 증가할수록 항암 효과를 증가시킬 수 있는 CD3+CD8+ T 세포의 비율이 증가함에 따라, PI3K 억제제의 용량에 따라 비례적으로 항암 효과가 증가하는 것으로 나타난다.
- [0126] 그 다음, 도 10b의 (b)를 참조하면, PI3K 억제제 처리에 따른 폐암 세포주인 KLN205에서 CD3+CD4+CD25+Foxp3 T 세포의 비율이 도시된다.
- [0127] 공시험액을 처리한 경우, CD3+CD4+CD25+Foxp3 T 세포에 대한 비율의 분포는 15 내지 26 %로, 평균 21 %의 비율을 갖는 것으로 나타난다. 나아가, PI3K 억제제인 BKM 120을 35 mpk로 처리한 경우, CD3+CD4+CD25+Foxp3 T 세포에 대한 비율의 분포는 13 내지 24 %로, 평균 17 %의 비율을 갖는 것으로 나타나며, BKM 120을 50 mpk로 처리한 경우, CD3+CD4+CD25+Foxp3 T 세포에 대한 비율의 분포는 12 내지 17 %로, 평균 15 %의 비율을 갖는 것으로 나타난다.
- [0128] 즉, PI3K 억제제의 용량이 증가할수록 면역 세포의 항암 효과를 감소시킬 수 있는 CD3+CD4+CD25+Foxp3 T 세포의 비율이 감소함에 따라, PI3K 억제제의 용량에 따라 비례적으로 항암 효과가 증가하는 것으로 나타난다.
- [0129] 그 다음, 도 10b의 (c)를 참조하면, PI3K 억제제 처리에 따른 폐암 세포주인 KLN205에서 CD3+TIL 세포의 비율이 도시된다.
- [0130] 공시험액을 처리한 경우, CD3+TIL 세포에 대한 비율은 평균적으로 3 %인 것으로 나타난다. 나아가, PI3K 억제제인 BKM 120을 35 mpk로 처리한 경우, CD3+TIL 세포에 대한 비율은 평균적으로 5 %인 것으로 나타나며, BKM 120을 50 mpk로 처리한 경우, CD3+TIL 세포에 대한 비율은 평균적으로 6 %인 것으로 나타난다.
- [0131] 나아가, BKM 120을 35 및 50 mpk로 처리한 경우의 평균 비율은 공시험액을 처리한 경우의 평균 비율보다 유의하게 높은 것으로 나타난다( $p < 0.05$ ).
- [0132] 즉, PI3K 억제제의 용량이 증가할수록 항암 효과를 증가시킬 수 있는 CD3+TIL T 세포의 비율이 증가함에 따라, PI3K 억제제의 용량에 따라 비례적으로 항암 효과가 증가하는 것으로 나타난다.
- [0133] 그 다음, 도 10b의 (d)를 참조하면, PI3K 억제제 처리에 따른 폐암 세포주인 KLN205에서 MDSC 세포의 비율이 도시된다.
- [0134] 공시험액을 처리한 경우, MDSC 세포에 대한 비율의 분포는 26 내지 28 %로, 평균 27 %의 비율을 갖는 것으로 나타난다. 나아가, PI3K 억제제인 BKM 120을 35 mpk로 처리한 경우, MDSC 세포에 대한 비율의 분포는 23 내지 25 %로, 평균 24 %의 비율을 갖는 것으로 나타나며, BKM 120을 50 mpk로 처리한 경우, MDSC 세포에 대한 비율의 분포는 17 내지 19 %로, 평균 18 %의 비율을 갖는 것으로 나타난다.
- [0135] 나아가, BKM 120을 50 mpk로 처리한 경우의 평균 비율은 공시험액을 처리한 경우의 평균 비율보다 유의하게 낮은 것으로 나타난다( $p < 0.05$ ).
- [0136] 즉, PI3K 억제제의 용량이 증가할수록 면역 세포의 항암 효과를 감소시킬 수 있는 MDSC 세포의 비율이 감소함에 따라, PI3K 억제제의 용량에 따라 비례적으로 항암 효과가 증가하는 것으로 나타난다.
- [0137] 전술한 실험에 4에 따르면, PI3K 억제제의 처리로 인하여 면역 세포는 세포독성 및 항암 기능을 가진 세포들에

대한 비율이 증가하고, 이를 억제하는 기능을 가진 세포들에 대한 비율이 감소하는 것으로 나타난다. 즉, 면역 기능을 억제하는 면역 세포들에 대한 비율이 감소함에 따라, 세포독성 및 항암 기능을 가진 세포들이 더욱 활성화되어, 항암 효과가 보다 향상될 수 있다. 이에, PI3K 억제제를 통하여 손상된 세포, 감염된 세포 및 종양 세포에 대한 면역 세포의 면역 반응을 더 향상시킬 수 있다.

[0138] **실시예 1. 면역 세포의 면역 기능 향상 방법 및 이에 따른 면역 세포주**

[0139] 이하에서는, 도 11 내지 12를 참조하여, 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 세포의 면역 기능 향상 방법 및 이에 따른 면역 세포주에 대하여 구체적으로 설명한다.

[0140] 먼저, 도 11을 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 세포의 면역 기능 향상 방법에 대한 절차를 도시한 것이다. 면역 세포에 PI3K 억제제가 처리하는 단계(S110) 및 PI3K 억제제가 처리된 면역 세포를 배양하는 단계(S120)를 포함할 수 있다.

[0141] 보다 구체적으로, 면역 세포에 PI3K 억제제가 처리하는 단계(S110)는 생물학적 시료로부터 분리된 면역 세포를 생체 외(ex vivo)에서 AKT/mTOR 하위 신호를 활성화되도록, 면역 세포에 PI3K 억제제가 처리될 수 있다. 이에, 면역 세포에 대한 PI3K 신호전달체계에서 PI3K의 하위 신호인 AKT가 감소된다.

[0142] 이때, 주입되는 PI3K 억제제는 0.5 내지 2  $\mu\text{M}$  농도로 처리될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 면역 세포의 종류 및 상태 등에 따라 달라질 수 있다. 그러나, 바람직하게는, PI3K 억제제의 농도는 1  $\mu\text{M}$ 일 수 있다. 나아가, PI3K 억제제는 1일에 1 내지 2회(1 내지 2/day) 주입되며, 면역 세포가 배양되는 기간 내내 지속적으로 처리될 수 있다.

[0143] 본 명세서에서 사용되는 용어 "면역 세포"는 침입한 세균, 바이러스, 독소, 종양 및 다른 비-숙주 물질로부터 숙주를 방어하는 작용을 할 수 있는 세포를 의미하며, 수지상 세포, 대식 세포, B 세포, T 세포, NK 세포를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이때, T 세포는 상기 T 세포는 도움 T 세포, 세포독성 T 세포, 기억 T 세포, 효과 T 세포, 조절 T 세포, 자연살해 T 세포, 점막 관련 불변 T 세포, 알파-베타 T 세포, 및 감마-델타 T 세포로 이루어진 그룹 중 적어도 하나를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0144] 나아가, 전술한 면역 세포들은 표적 세포의 항원을 인지할 수 있는 TCR 및/또는 CAR, TCR 및 CAR을 인코딩할 수 있는 핵산 및 전술한 핵산을 포함할 수 있는 벡터를 포함할 수 있다.

[0145] 예를 들어, TCR 및 CAR을 인코딩할 수 있는 핵산은 벡터를 통하여 면역 세포에게 도입될 수 있다. 이때, 벡터(vector)는 핵산 분자를 전이시키거나 수송할 수 있는 핵산 분자를 의미할 수 있다. 벡터는 세포에서의 자율적 복제를 지시하는 서열을 포함하거나, 숙주 세포 DNA 내로 통합을 가능하게 할 수 있는 충분한 서열을 포함할 수 있다. 이러한, 벡터는 RNA 플라스미드, DNA 플라스미드, 트랜스포존, 코스미드, 세균 인공 염색체 및 바이러스 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0146] 이러한, 면역 세포는 단핵세포(mononuclear cell)를 포함하는 다양한 생물학적 시료로서 혈액(blood), 혈장(plasma), 림프절(lymph node), 비장(spleen), 흉선(thymus) 및 골수(bone marrow) 등으로부터 분리될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 면역 세포가 분리될 수 있는 모든 시료를 포함할 수 있다.

[0147] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어 "PI3K 억제제"는 PI3K의 활성화 중 적어도 하나와 결합하고, PI3K의 신호 전달을 억제하는 핵산, 펩티드, 화합물 또는 유기 소분자를 의미할 수 있으며, PI3K 아단위 조절인자(p110  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  및  $\delta$ 에 대하여 선택적으로 억제하거나, PI3K 아형을 모두 억제할 수 있다.

[0148] 그러나, 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 세포의 면역 기능 향상 방법에서 면역 세포의 면역 기능이 가장 향상될 수 있는 억제제는 p110  $\delta$ 를 억제할 수 있는 PI3K  $\delta$  억제제일 수 있다.

[0149] 보다 구체적으로, 도 12의 (a)를 참조하면, 조력 T 세포에서의 PI3K 억제제의 종류에 따른 GLUT1 발현에 대한 결과가 도시된다. 이때, PI3K 억제제로서, 아형을 모두 억제할 수 있는 BKM 120, p110  $\delta$ 에 대해서만 억제할 수 있는 CAL-101, p110  $\gamma$  및  $\delta$ 를 억제할 수 있는 IPI-145, p110  $\alpha$ 에 대해서만 억제할 수 있는 BYLT719 및 p110  $\beta$ 에 대해서만 억제할 수 있는 TGX-211 억제제가 이용되었다.

[0150] PI3K 억제제를 처리한 실험군은 모두 PI3K 억제제의 종류와 상관없이 대조군(vehicle)보다 GLUT1 발현이 증가한 것으로 나타난다. 나아가, BKM 120, CAL-101, IPI-145 억제제가 BYLT719 및 TGX-211 억제제보다 GLUT1 발현이 높은 것으로 나타난다. 즉, 전술한 BKM 120, CAL-101, IPI-145는 모두 p110  $\delta$ 를 억제할 수 있는 억제제로서, PI3K  $\delta$  억제제가 GLUT1 발현을 보다 효과적으로 증가시킬 수 있다는 것을 의미할 수 있다.

- [0151] 도 12의 (b)를 참조하면, 세포독성 T 세포에서의 PI3K 억제제의 종류에 따른 GLUT1 발현에 대한 결과가 도시된다.
- [0152] PI3K 억제제를 처리한 실험군은 모두 PI3K 억제제의 종류와 상관없이 대조군(vehicle)보다 GLUT1 발현이 증가한 것으로 나타난다. 나아가, BKM 120, CAL-101, IPI-145 억제제가 BYLT719 및 TGX-211 억제제보다 GLUT1 발현이 높은 것으로 나타난다. 즉, 세포독성 T 세포에서도 조력 T 세포와 마찬가지로, PI3K  $\delta$  억제제가 GLUT1 발현을 보다 효과적으로 증가시킬 수 있다는 것을 의미할 수 있다.
- [0153] 이에, PI3K 신호의 억제를 통하여, AKT를 반동시키고, 반동되어 더욱 강력한 신호로 해당 작용을 증진시킬 수 있는 PI3K 억제제는 PI3K  $\delta$  일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 그러나, 면역 세포의 대사 작용을 이질적으로 증가시킬 수 있는 PI3K 억제제는 바람직하게, PI3K  $\delta$  억제제일 수 있다.
- [0154] 나아가, PI3K 아단위 조절인자 p110  $\delta$  를 억제할 수 있는 PI3K  $\delta$  억제제는, 셀렉티브 PI3K  $\delta$  억제제1(compound 7n), 이델라리십(idelalisib/CAL-101, GS-1101), IC-87114, ZSTK474, PIK-294, PIK-293, 레니올리십(leniolisib/CDZ173), GSK2292767, 네미랄리십(nemiralisib/GSK2269557), 아칼리십(acalisib/GS-9820), PI-3065, AMG319, 셀레탈리십(seletalisib/UCB-5857), 움브랄리십(umbralisib/TGR-1202), PIK-3, IPI-3063, XL147 아날로그(XL147 analogue), PIK-90, 타셀리십(taselisib/GDC0032), SRX3207, 필라랄리십(Pilaralisib/XL147), 픽틸리십(pictilisib/GDC-0941), AZD8835, LY294002, 닥톨리십(dactolisib/BEZ235), 부팔리십(buparlisib/BKM120), PI-103, NU7441(KU-57788), 보르트만닌(wortmannin), 오미팔리십(omipalisib/GSK2126458), PF-04691502, 아피톨리십(apitolisib/GDC-0980), GSK1059615, 코판리십(copanlisib/BAY80-6946), PKI-402, TG100713, VS-5584(SB2343), VVPS34억제제1(compound 19), 사모톨리십(samotlisib/LY3023414), MTX-211, 오토피닙(autophinib), VPS34-IN1, GNE-317, GDC-0084, 비미랄리십(bimiralisib/PQR309), SAR405, PF-49892416, 듀벨리십(duvelisib/IPI-145), TG100-115, 테날리십(tenalisib/RP6530) 및 AZD8186으로 이루어진 그룹 중 적어도 하나를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0155] 또한, PI3K 아단위 조절인자 p110  $\alpha$  를 억제할 수 있는 PI3K  $\alpha$  억제제는, XL147 아날로그(XL147 analogue), PIK-90, 타셀리십(taselisib/GDC0032), SRX3207, 필라랄리십(Pilaralisib/XL147), 알펠리십(alpilisib/BYL719), PIK-71 HCL, A66, 게다톨리십(gedatolisib/PKI-587), 피메피노스타트(fimepinostat/CUDC-907), CH5132799, 데라벨리십(serabelisib/TAK-117), 2-D08, HS-173, GDC-0326, GNE-477, 픽틸리십(pictilisib/GDC-0941), AZD8835, LY294002, 닥톨리십(dactolisib/BEZ235), 부팔리십(buparlisib/BKM120), PI-103, NU7441(KU-57788), 보르트만닌(wortmannin), 오미팔리십(omipalisib/GSK2126458), PF-04691502, 아피톨리십(apitolisib/GDC-0980), GSK1059615, 코판리십(copanlisib/BAY80-6946), PKI-402, TG100713, VS-5584(SB2343), VVPS34억제제1(compound 19), 사모톨리십(samotlisib/LY3023414), MTX-211, 오토피닙(autophinib), VPS34-IN1, GNE-317, GDC-0084, 비미랄리십(bimiralisib/PQR309), SAR405, PF-49892416, BGT226 말레이트(maleate) 및 SF2523으로 이루어진 그룹 중 적어도 하나를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0156] 또한, PI3K 아단위 조절인자 p110  $\beta$  를 억제할 수 있는 PI3K  $\beta$  억제제는, TGX-221, AZD6482, GSK2636771, LY294002, 닥톨리십(dactolisib/BEZ235), 부팔리십(buparlisib/BKM120), PI-103, NU7441(KU-57788), 보르트만닌(wortmannin), 오미팔리십(omipalisib/GSK2126458), PF-04691502, 아피톨리십(apitolisib/GDC-0980), GSK1059615, 코판리십(copanlisib/BAY80-6946), PKI-402, TG100713, VS-5584(SB2343), VVPS34억제제1(compound 19), 사모톨리십(samotlisib/LY3023414), MTX-211, 오토피닙(autophinib), VPS34-IN1, GNE-317, GDC-0084, 비미랄리십(bimiralisib/PQR309), SAR405, PF-49892416, BGT226 말레이트(maleate) 및 AZD8186으로 이루어진 그룹 중 적어도 하나를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0157] 또한, PI3K 아단위 조절인자 p110  $\gamma$  를 억제할 수 있는 PI3K  $\gamma$  억제제는, AS-605240, 3-메틸라데닌(3-methyladenine/3-MA), 복스탈리십(voxtalisib/XL765), AS-252424, AS-604850, CAY10505, CZC24832, IPI-549, 닥톨리십(dactolisib/BEZ235), 부팔리십(buparlisib/BKM120), PI-103, NU7441(KU-57788), 보르트만닌(wortmannin), 오미팔리십(omipalisib/GSK2126458), PF-04691502, 아피톨리십(apitolisib/GDC-0980), GSK1059615, 코판리십(copanlisib/BAY80-6946), PKI-402, TG100713, VS-5584(SB2343), VVPS34억제제1(compound 19), 사모톨리십(samotlisib/LY3023414), MTX-211, 오토피닙(autophinib), VPS34-IN1, GNE-317, GDC-0084, 비미랄리십(bimiralisib/PQR309), SAR405, PF-49892416, 듀벨리십(duvelisib/IPI-145), TG100-115, 테날리십(tenalisib/RP6530), BGT226 말레이트(maleate) 및 SF2523으로 이루어진 그룹 중 적어도 하나를 포함

할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0158] 나아가, 면역 세포에 PI3K 억제제가 처리하는 단계(S110)는 시험관 내(in vitro)에서 면역 세포의 활성화를 위하여, PI3K 억제제와 같이 CD3 및 CD28 항체가 처리될 수 있다. 예를 들어, 면역 세포는 소구체(Bead) 표면에 고정화된 CD3 및 CD28 항체에 노출시켜, 활성화될 수 있다. 그러나, 면역 세포의 활성화를 위한 방법은 전술한 항체의 처리 방법에 제한되는 것은 아니며, T 세포의 증식 및 유지하기 위한 활성 방법은 모두 포함될 수 있다. 예를 들어, CD3 항체 및 인터루킨-2를 병용 처리하는 방법 및 고온 입자의 표면에 CD3 항체 및 4-IBBL 단백질을 포함하는 인공 항원 제시 세포(artificial antigen presenting cell)를 처리하는 방법 등이 이용될 수 있다.
- [0159] 그 다음, PI3K 억제제가 처리된 면역 세포를 배양하는 단계(S120)는 3 내지 4주 중 적어도 하나의 기간 동안 진행될 수 있다. 이때, PI3K 억제제가 처리된 면역 세포는 당, 아미노산, 각종 영양물질, 혈청, 성장인자, 무기질 등의 세포의 성장 및 증식 등에 필수적인 요소를 포함하는 생체 외(In vitro)에서 세포 등의 세포의 성장 및 증식을 위한 혼합 배지에서 배양될 수 있으며, 이러한 혼합 배지는 이글 최소 필수 배지(Eagle's MEM), 돌베코 수정 이글 배지(Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM), Ham's F 12, SF 12 및 RPMI 1640 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 이외의 추가적인 물질도 더 포함할 수 있다.
- [0160] 나아가, PI3K 억제제가 처리된 면역 세포를 배양하는 단계(S120)에서는 면역 세포에 PI3K 억제제가 처리에 의하여 감소되어 있던 AKT가 반동되어 증가된다. 보다 구체적으로, PI3K 억제제의 처리로 인하여 AKT는 배양시작 20 시간 이후, PI3K 처리가 되기 전 수준까지 다시 증가된다. 이후, AKT는 배양 시작 48시간까지 지속적으로 상승되어 배양 시작시의 AKT 발현 수준에 비하여 3배 이상 증가하는 된다. 즉, 면역 세포는 PI3K 억제제를 처리한 뒤 지속적으로 배양할 경우, AKT 발현이 반동되어 증가할 수 있다.
- [0161] 이에, 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 세포의 면역 기능 향상 방법은, 전술한 과정에 의하여, 면역 세포 내의 AKT 발현이 감소되고, AKT 발현 감소로 인한 신호가 mTORC1을 활성화시킬 수 있으며, 활성화된 mTORC1은 피드백 신호(feedback signal)로 감소되어 있는 AKT를 재자극시켜 AKT의 발현을 증가시킬 수 있다. 나아가, 증가된 AKT는 PI3K 억제제가 처리되기 전보다 더 강력한 신호로 GLUT1의 발현이 이질적으로 증가될 수 있다. 더 나아가, 증가된 GLUT1을 통하여 더 많은 해당작용을 할 수 있고, 활발한 해당작용을 통하여 더 많은 에너지를 이용 및 비축할 수 있다. 이에, 면역 세포의 면역 기능이 향상될 수 있다.
- [0162] 그 다음, 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 세포의 면역 기능 향상 방법은, 도 11에 도시되지는 않았지만, PI3K 억제제가 처리된 면역 세포를 배양하는 단계(S120)이후, 면역 세포의 향상된 면역 기능을 확인하기 위하여, 배양된 면역 세포를 종양 세포와 공생 배양(co-culture)하는 단계 및 면역 세포에 의해 사멸(apoptosis)된 종양 세포를 백분율로 평가하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0163] 먼저, 배양된 면역 세포를 종양 세포와 공생 배양(co-culture)하는 단계는, 일반적인 배양 환경, 저산소 배양 환경 및 저당 배양 환경 중 적어도 하나의 환경에서 배양될 수 있다.
- [0164] 예를 들어, 체내의 암세포들은 특이적인 대사적 변이를 통하여 열악한 환경 즉, 종양 미세환경을 야기시켜, 면역 세포들로부터 면역 회피를 할 수 있다. 이러한, 종양 미세환경의 특징은 글루코스(glucose) 및 아미노산(amino acid)과 같은 영양의 고갈, 젖산 축적으로 인한 높은 산도 및 저산소일 수 있다.
- [0165] 이에, 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 세포의 면역 기능 향상 방법으로 생산된 면역 세포주의 향상된 기능을 확인하기 위하여 종양 미세환경과 유사한 저산소 배양 환경 및 저당 배양 환경에서 수행될 수 있다. 그러나, 제공될 수 있는 배양 환경은 이에 제한되는 것은 아니며, 체내의 다양한 환경이 모사될 수 있는 배양 환경을 모두 포함할 수 있다.
- [0166] 이때, 종양 세포는 폐암, 비소세포성폐암, 췌장암, 위암, 간암, 유방암, 자궁경부암, 갑상선암, 부갑상선암, 전립선암, 담낭암, 담도암, 비호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 혈액암, 방광암, 신장암, 난소암, 흑색종, 결장암, 골암, 피부암, 두부암, 자궁암, 직장암, 뇌종양, 항문부근암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 질암, 음문암종, 식도암, 소장암, 내분비선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 수뇨관암, 신장세포 암종, 신장골반 암종, 중추신경계(CNS central nervous system) 종양, 1차 CNS 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종 또는 뇌하수체 선종으로 이루어진 그룹 중 적어도 하나를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0167] 그 다음, 면역 세포에 의해 사멸(apoptosis)된 종양 세포를 백분율로 평가하는 단계는 PI(propidium iodine) 및 annexin V와 같이 사멸 세포를 구별할 수 있는 염색을 통한 형광 분석법으로 평가할 수 있다. 그러나, 이에 제한되는 것은 아니며, 분리방법, 전기화학적 특징, 질량분석 등과 같은 다양한 방법이 이용될 수 있다.



- [0168] 이에, 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 세포의 면역 기능 향상 방법을 통하여 생산된 면역 세포주에 의해 사멸된 종양 세포는 일반적인 배양 환경인 경우, 60 내지 65 %이며, 저산소 배양 환경인 경우, 45 내지 50 %이며, 저당 배양 환경인 경우, 30 내지 40 %일 수 있다. 나아가, 이러한 사멸된 종양 세포의 비율은, 일반적인 배양 환경인 경우, 일반 면역 세포보다 2.5배 많은 것으로 나타나며, 저산소 배양 환경인 경우, 2.2배 많은 것으로 나타나며, 저당 배양 환경인 경우, 1.5배 많은 것으로 나타난다.
- [0169] 따라서, 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 세포의 면역 기능 향상 방법 및 이에 따른 면역 세포주는, 열악한 미세 종양환경에서도 일반 면역 세포보다 종양 세포를 사멸할 수 있는 면역 기능이 향상되어, 보다 효과적인 항암 효과를 가질 수 있다.
- [0170] 나아가, 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 세포의 면역 기능 향상 방법 및 이에 따른 면역 세포주는 전술한 바와 같이, 보다 효과적인 항암 효과와 같은 면역 기능을 가짐에 따라, 약제학적 조성물로서 이용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 세포의 면역 기능 향상 방법 및 이에 따른 면역 세포주는 약제학적 조성물 즉, 면역 조절 세포 치료제로 이용될 수 있다. 이때, 면역 조절 세포 치료제는 면역 세포들을 이용하여 체내의 면역 반응을 활성화시켜 질병을 치료할 목적으로 사용되는 약제학적 조성물을 의미한다.
- [0171] 나아가, 약제학적 조성물로서 이용됨에 있어, 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 세포의 면역 기능 향상 방법 및 이에 따른 면역 세포주는 사이토카인, 성장 인자, 호르몬, 소분자, 화학 요법제, 프로-드러그 및 항체 중 적어도 하나의 약제학적 활성제를 포함할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0172] 더 나아가, 약제학적 조성물로서 이용됨에 있어, 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 세포의 면역 기능 향상 방법 및 이에 따른 면역 세포주는 약제학적으로 허용되는 담체, 희석제, 보조제, 부형제, 보존제, 현탁제, 안정화제, 계면활성제, 유화제, 습윤제, 감미제, 용매 등을 포함할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0173] 이에, 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 세포의 면역 기능 향상 방법 및 이에 따른 면역 세포주는 전술한 바와 같은 추가적인 제제를 포함하는 약제학적 조성물로서, 면역이 손상(immunocompromised)되거나 면역 증강이 요구되는 개체에게 투여되어, 질환을 치료 및 예방할 수 있다.
- [0174] 이때, 본 명세서에서 사용되는 용어 "약제학적 조성물"은, 단독 또는 하나 이상의 기타 양식의 요법과 조합하여, 세포 또는 동물에게 투여하기 위한 약제학적 및 생리학적으로 허용되는 제형화된 조성물을 의미한다.
- [0175] **실시예 2. 면역 세포의 면역 기능 향상 방법 및 이에 따른 면역 세포주의 항암 효과**
- [0176] 이하에서는, 도 13 내지 14를 참조하여, 전술한 방법에 의하여 생성된 면역 세포주의 항암 효과에 대하여 구체적으로 설명한다.
- [0177] 먼저, 도 13를 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 세포주에 대한 항암 효과에 대한 결과가 도시된다. 이때, 항암 효과 검증 실험에 앞서, 먼저, 내제성(endogenous) T 세포가 결여되어 있는 누드마우스에 폐암 세포주인 LLC2를 이식하였다. 그 다음, 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 세포주를 누드마우스에 주입하고, 종양의 크기를 측정하여, 항암 효과를 검증하였다.
- [0178] 먼저, 아무것도 주입되지 않은 경우(No Tcell), 처리일(days of treatment)이 증가할수록 급격히 종양의 크기가 증가하여, 26일째의 종양 크기는 240 내지 270 mm<sup>3</sup> 것으로 나타나며, 공시험액을 처리한 경우의 26일째 종양 크기는 190 내지 220 mm<sup>3</sup> 것으로 나타난다. 또한, PI3K가 처리되지 않은 항원 시험액(antigen challenge)의 경우의 26일째 종양 크기는 150 내지 170 mm<sup>3</sup> 것으로 나타난다. 한편, 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 세포주를 처리한 경우의 26일째 종양 크기는 110 내지 120 mm<sup>3</sup> 것으로 나타나며, 전술한 다른 처리군보다 유의하게 작은 것으로 나타난다(p<0.05).
- [0179] 즉, 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 세포주가 주입됨으로써, 종양의 크기를 효과적으로 줄일 수 있는 항암 효과가 향상될 수 있다는 것을 의미할 수 있다.
- [0180] 그 다음, 도 14을 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 세포주의 종양 내 면역 세포의 침윤도에 대한 결과가 도시된다. 이때, DAPI를 이용하여 종양 침윤 림프구 세포의 핵(blue)을 염색하여, CD3 발현(green)과 대조적으로 확인하였다.
- [0181] 보다 구체적으로, 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 세포주를 주입한 경우, 종양 침윤 림프구 및 CD3 발현이 대조군보다 더 많은 것으로 나타난다. 이는, 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 세포주를 주입으로 인하여 종양을

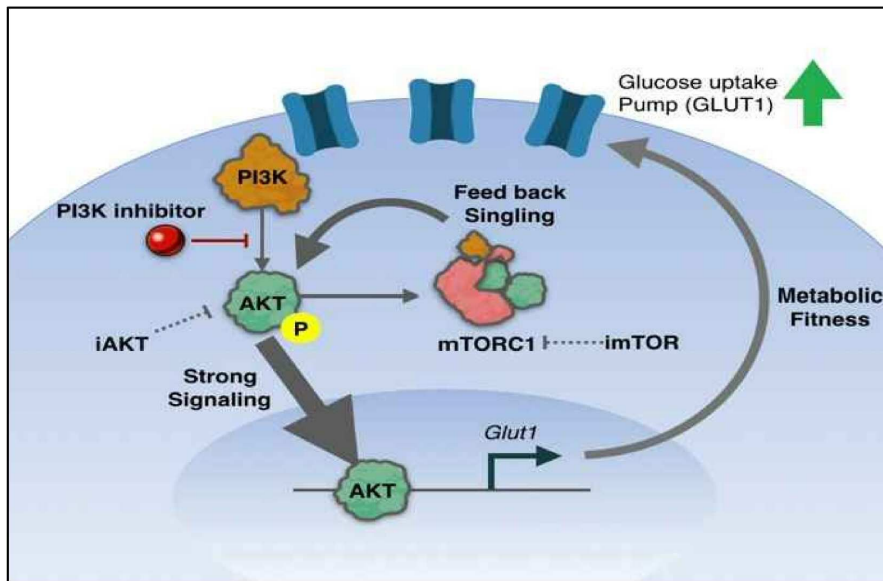
침투하여 면역 반응을 할 수 있는 면역 세포가 증가할 수 있다는 것을 의미할 수 있다.

[0182]

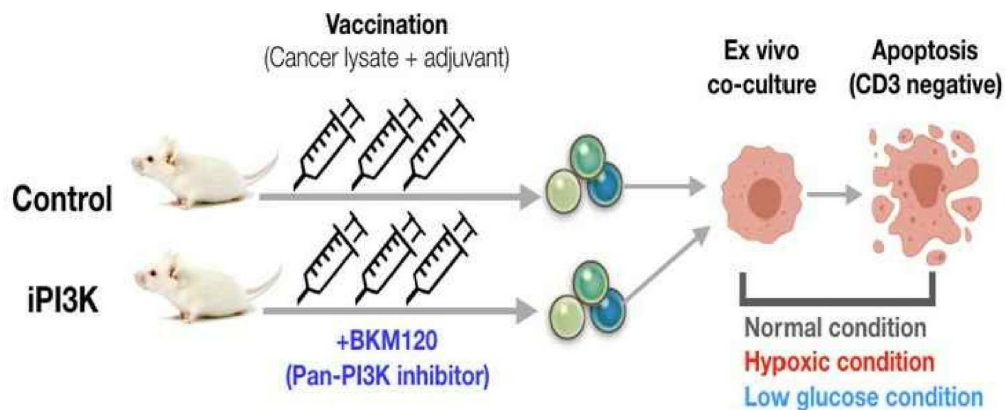
이상 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시 예들을 더욱 상세하게 설명하였으나, 본 발명은 반드시 이러한 실시 예로 국한되는 것은 아니고, 본 발명의 기술사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 다양하게 변형 실시될 수 있다. 따라서, 본 발명에 개시된 실시 예들은 본 발명의 기술 사상을 한정하기 위한 것이 아니라 설명하기 위한 것이고, 이러한 실시 예에 의하여 본 발명의 기술 사상의 범위가 한정되는 것은 아니다. 그러므로, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 보호 범위는 아래의 청구범위에 의하여 해석되어야 하며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 기술 사상은 본 발명의 권리범위에 포함되는 것으로 해석되어야 할 것이다.

## 도면

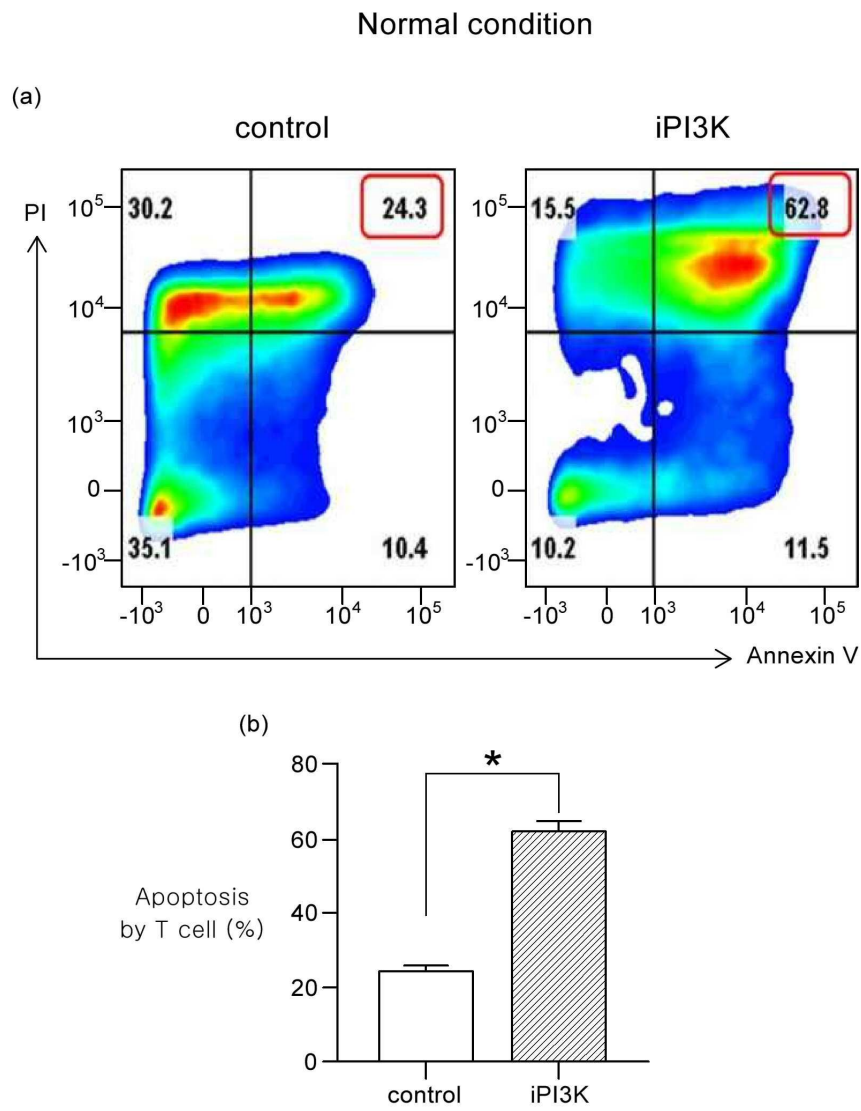
### 도면1



### 도면2



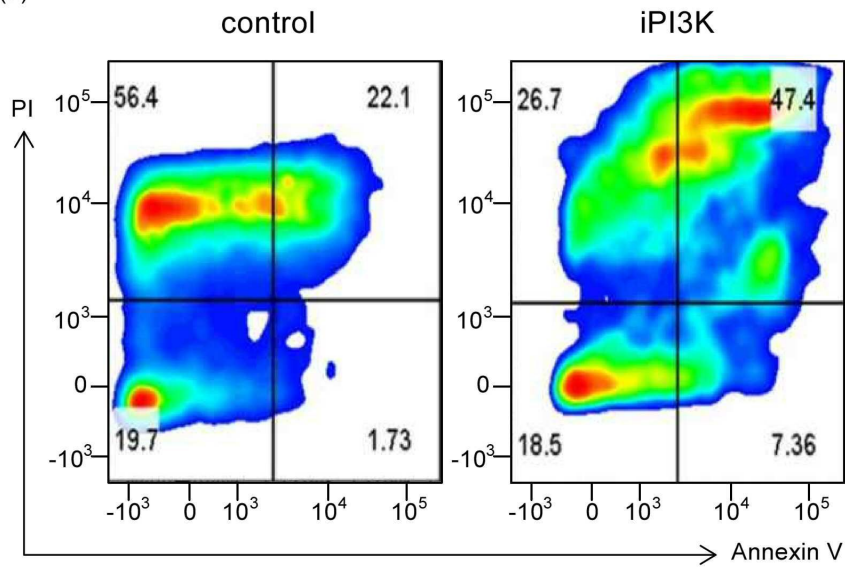
도면3a



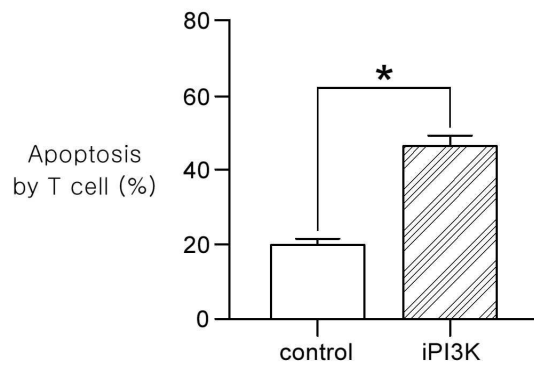
도면3b

hypoxic condition

(a)



(b)

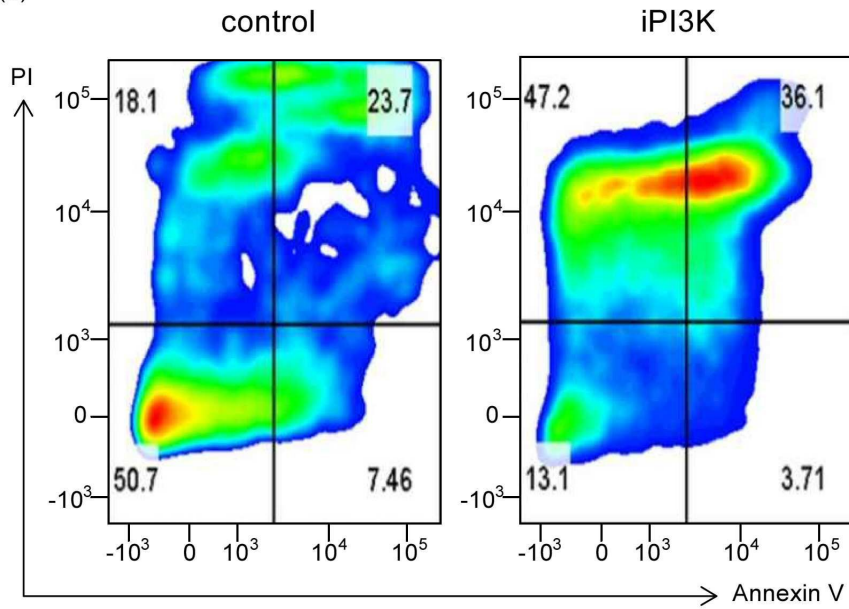




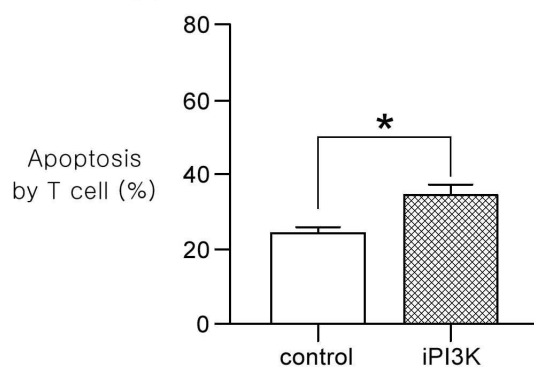
도면3c

Low glucose condition

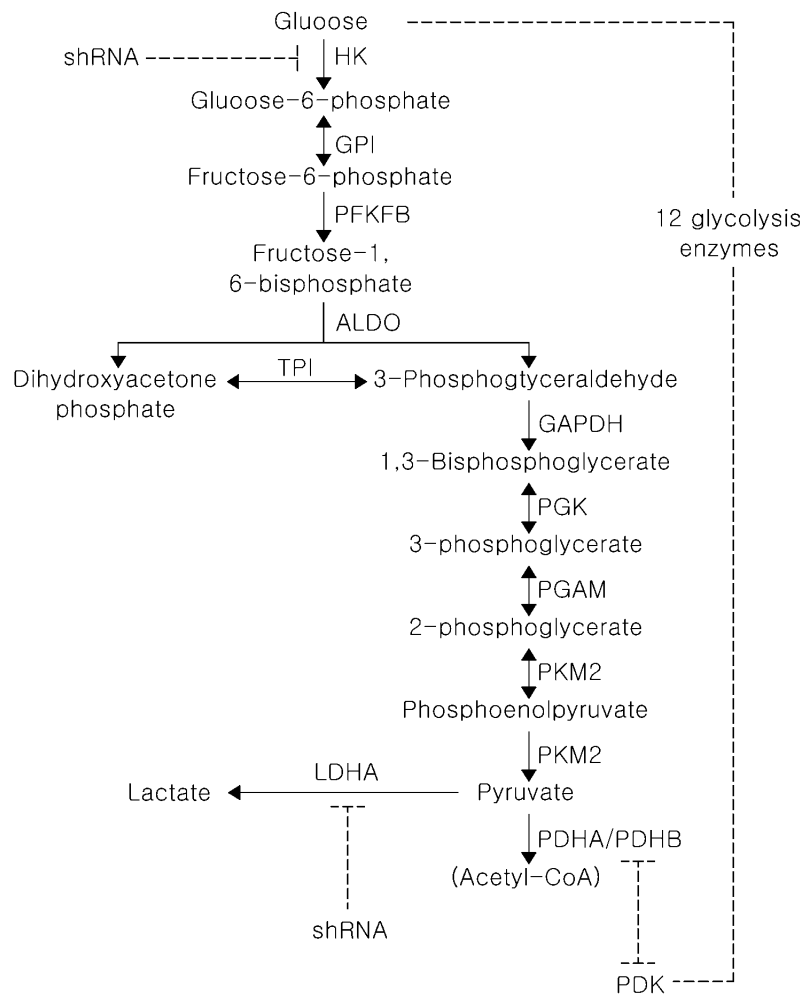
(a)



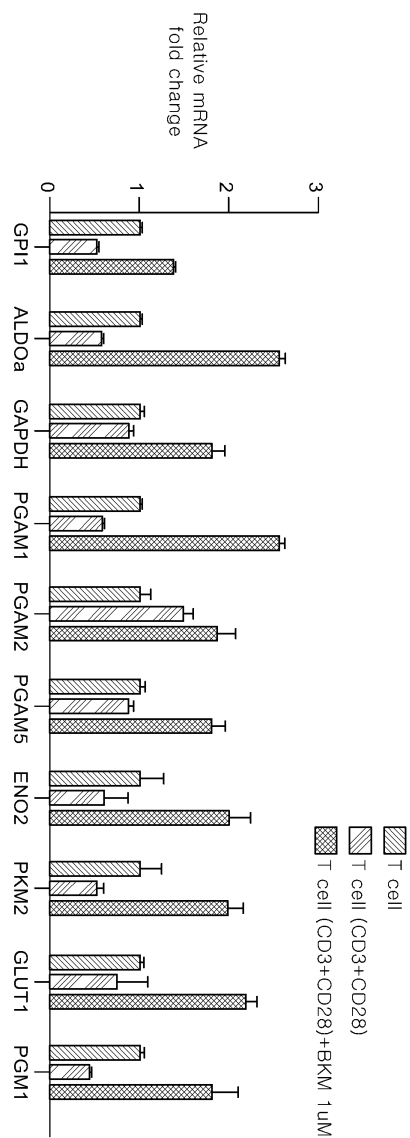
(b)



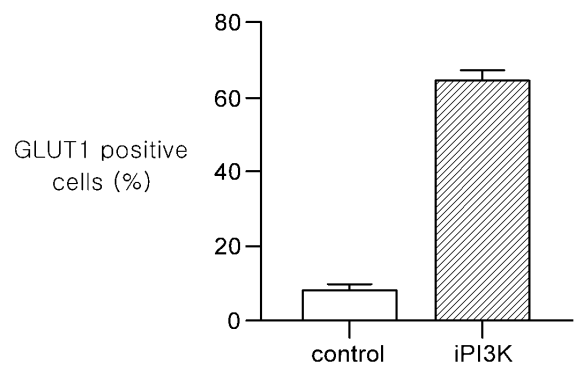
도면4a



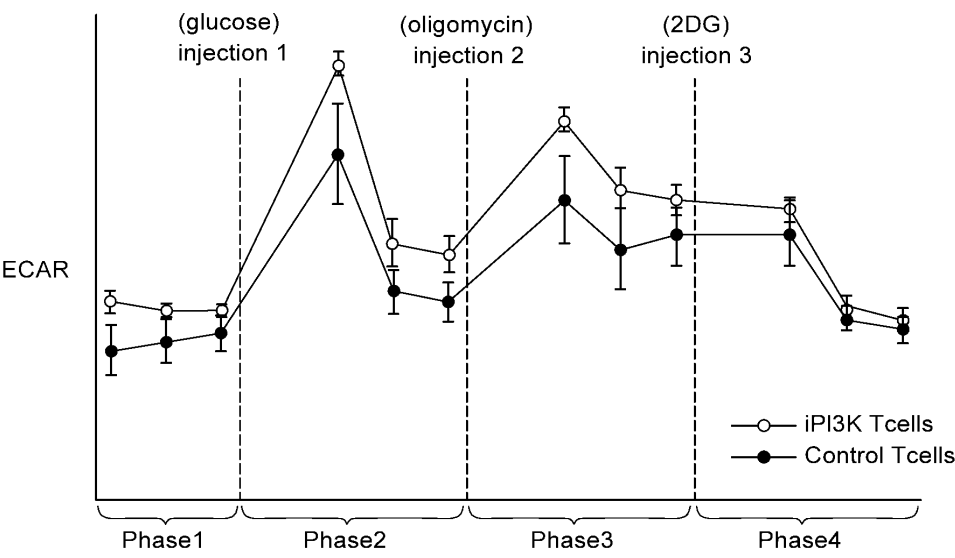
도면4b



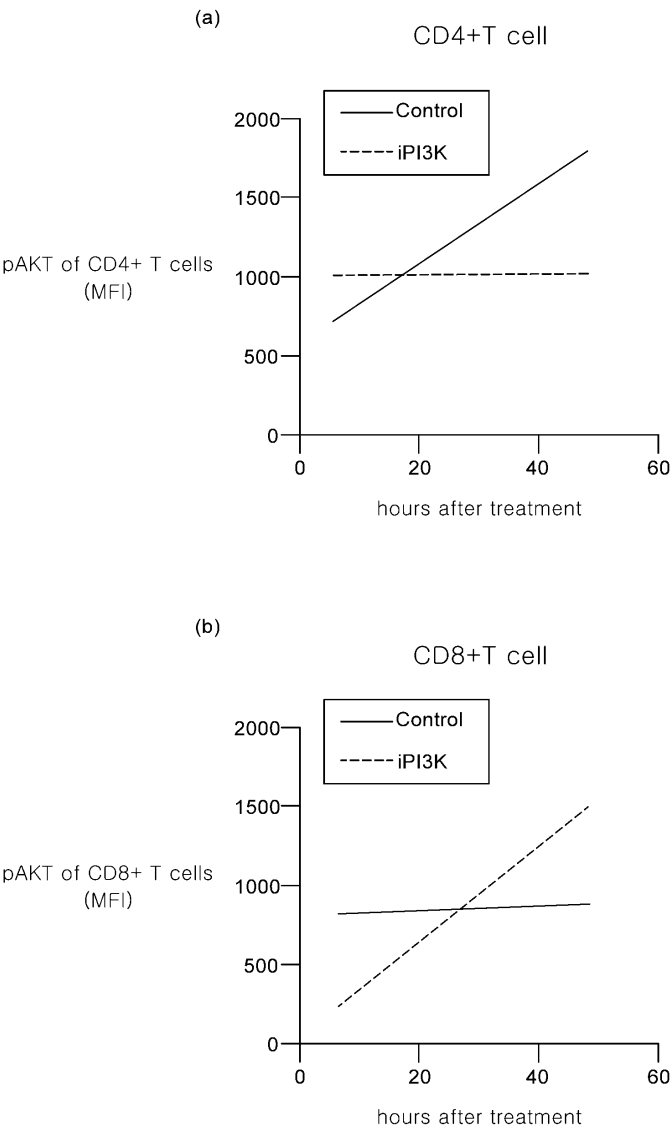
도면5a



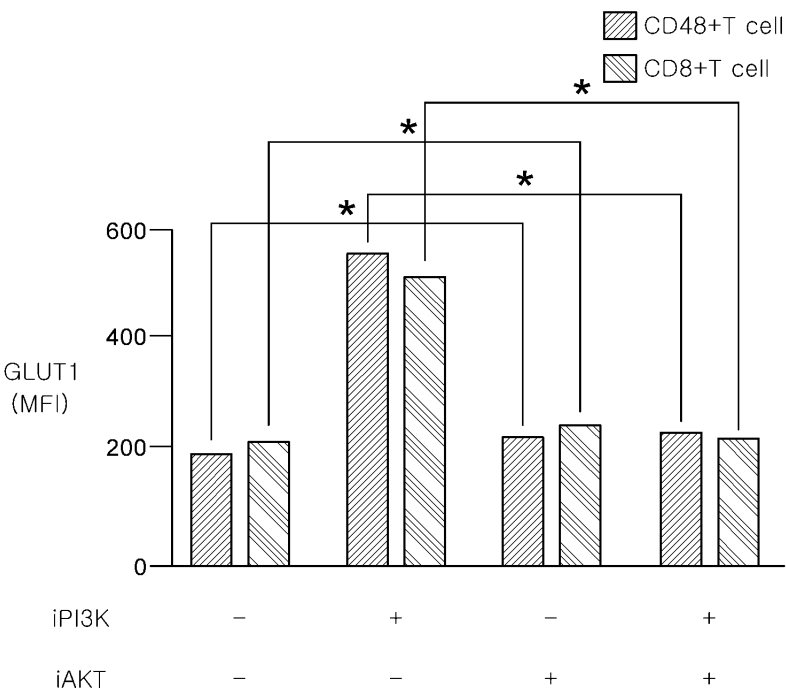
도면5b



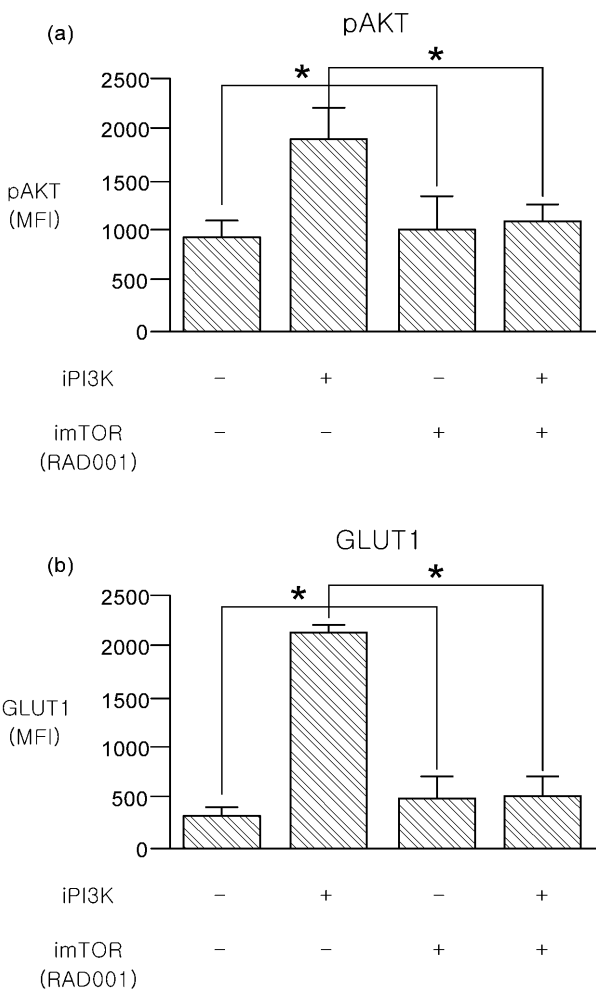
도면6



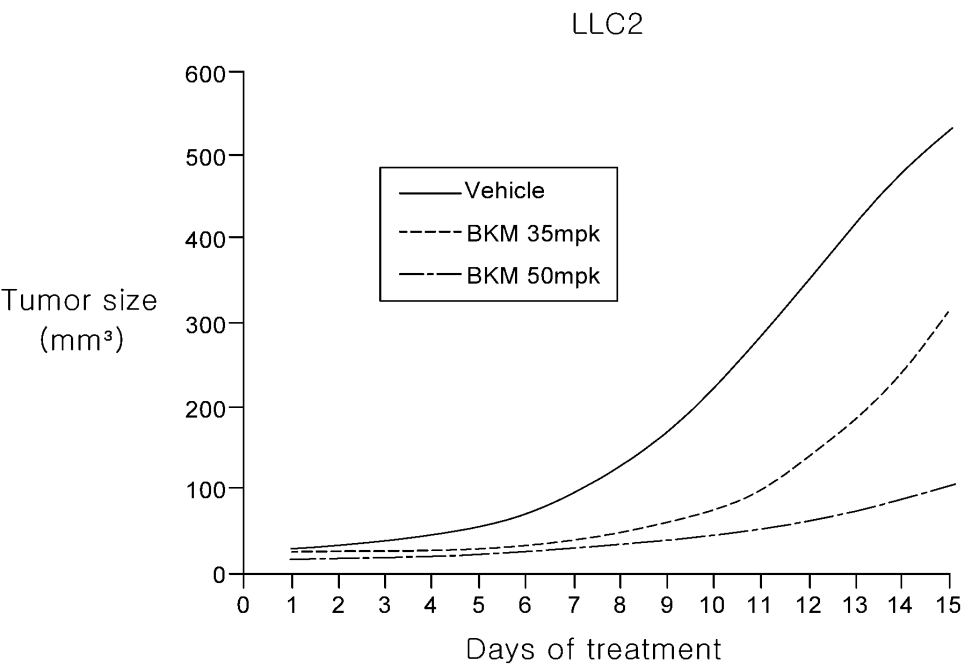
도면7



도면8

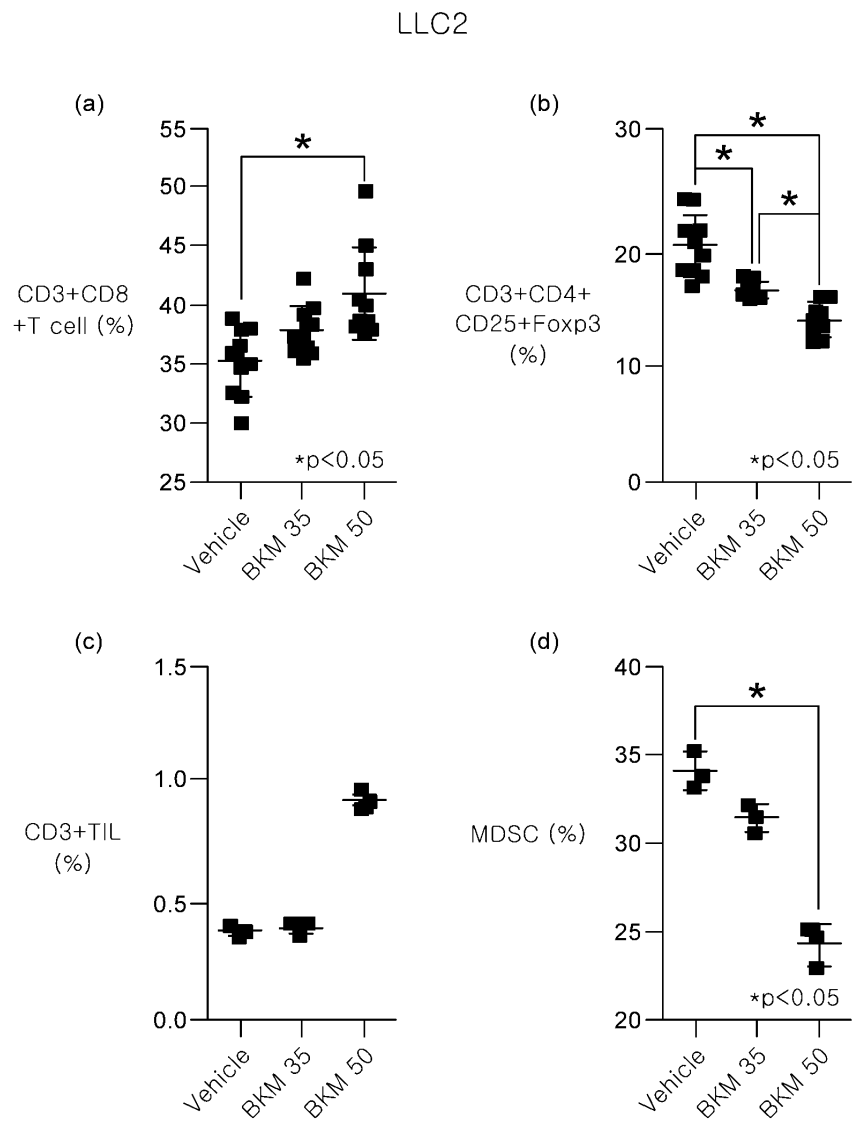


도면9a

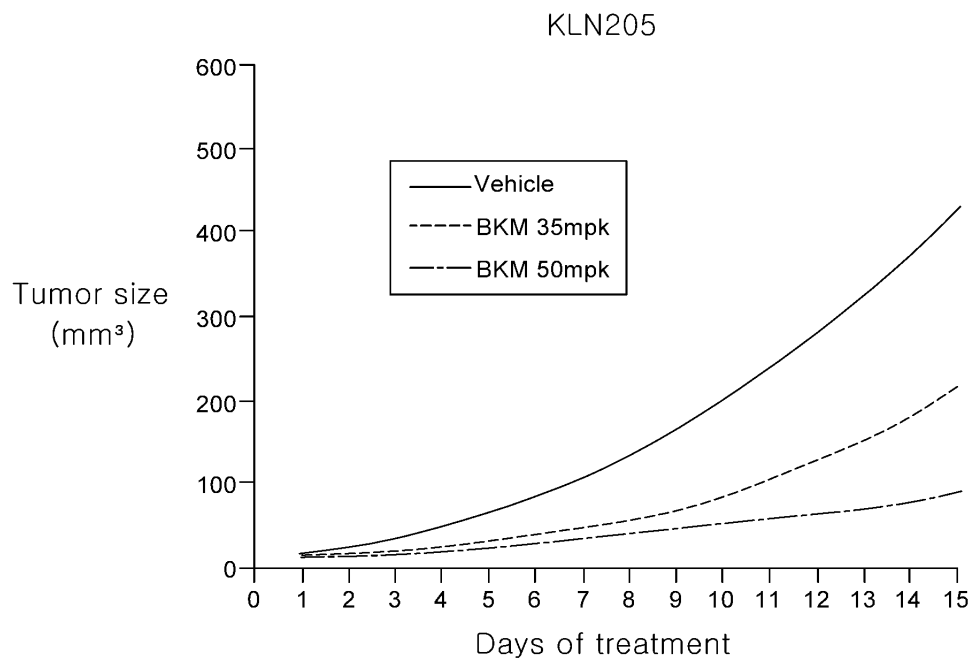




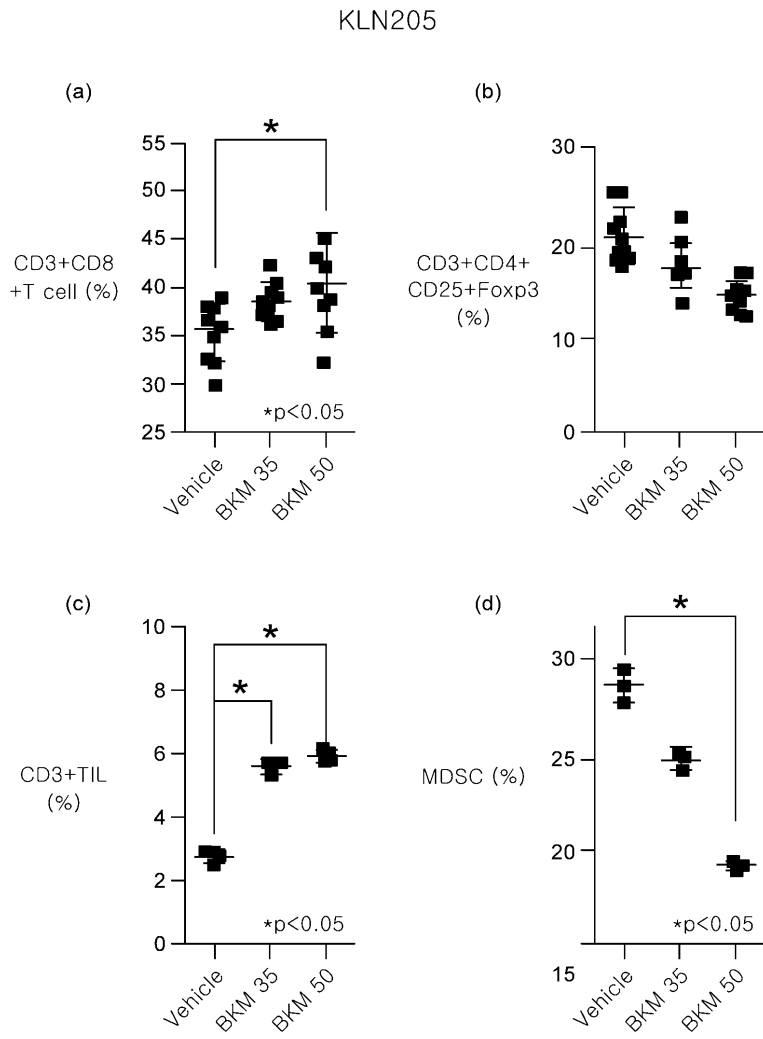
도면9b



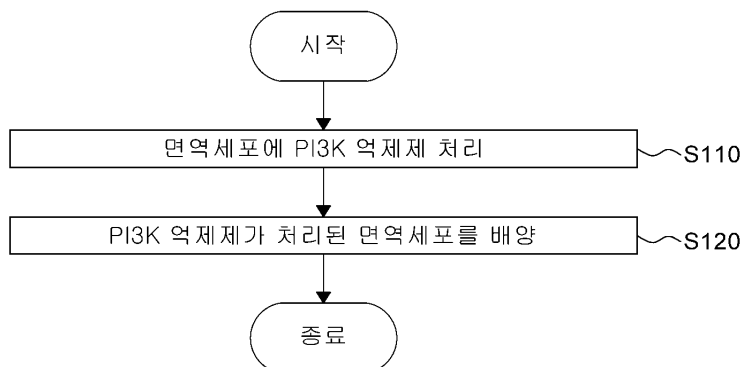
도면10a



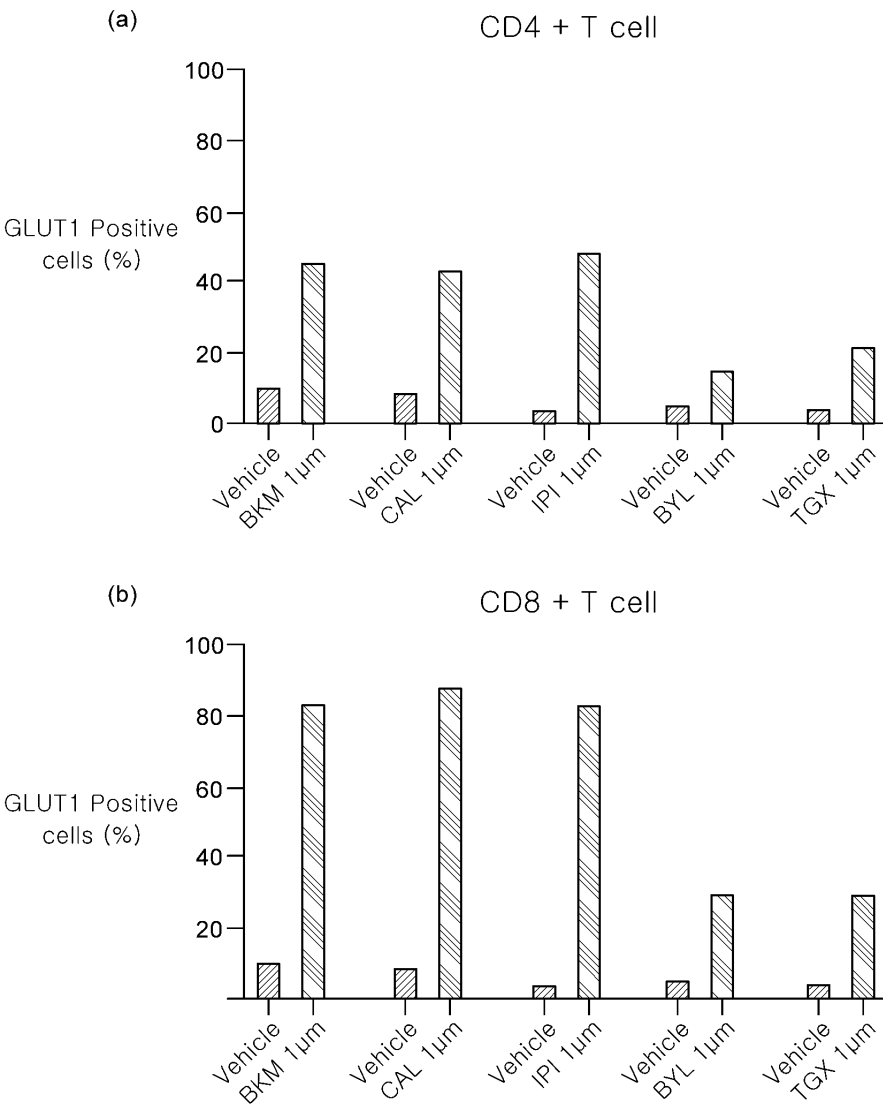
도면10b



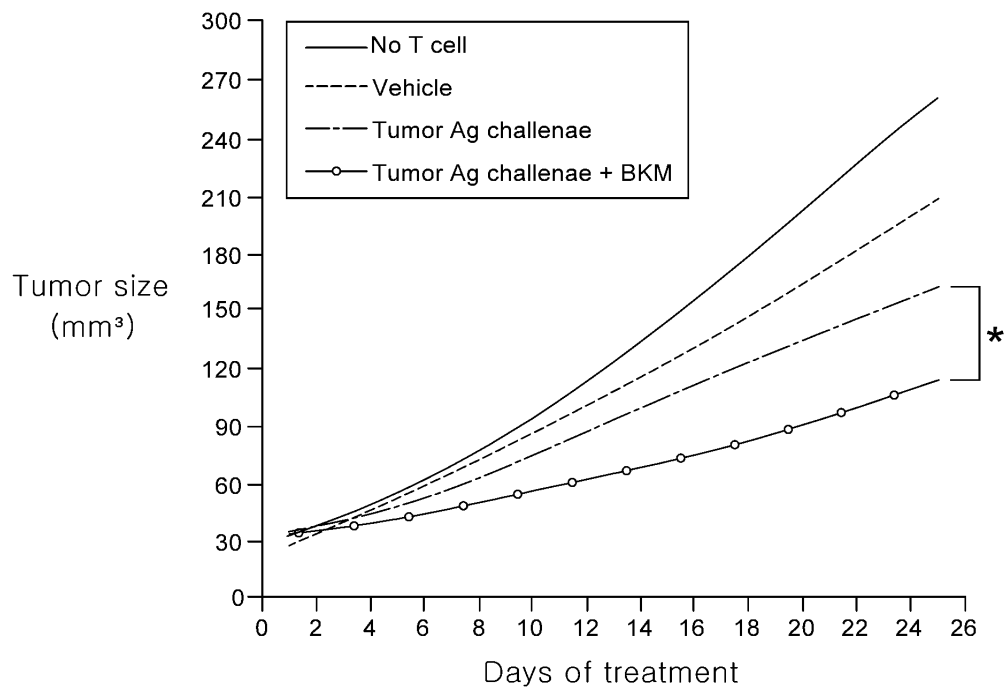
도면11



도면12



도면13



도면14

