



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2009년09월08일
(11) 등록번호 10-0916670
(24) 등록일자 2009년09월02일

(51) Int. Cl.

C12N 5/08 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2004-7001217

(22) 출원일자 2002년07월25일

심사청구일자 2007년06월08일

(85) 번역문제출일자 2004년01월27일

(65) 공개번호 10-2004-0021662

(43) 공개일자 2004년03월10일

(86) 국제출원번호 PCT/IT2002/000488

(87) 국제공개번호 WO 2003/012086

국제공개일자 2003년02월13일

(30) 우선권주장

PCT/IT01/00419 2001년07월30일 이탈리아(IT)

(56) 선행기술조사문헌

Jpn. J. Cancer Res., 1996, Vol.87,
pp.751-756.*

J. Immunol., 1999, Vol.22, No.1, pp.16-24.

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

시그마타우 인두스트리에 파르마슈티케 리우니테
에스.피.에이.

이탈리아 로마 00144 비알레 샤케스파아레 47

(72) 발명자

데산티스, 리타

이탈리아포메이자I-00040, 케이엠30.400, 비아폰티
나, 시그마-타우인두스트리에 파르마슈티케 리우니테
에스.피.에이.내

(74) 대리인

김영우, 백남훈

전체 청구항 수 : 총 20 항

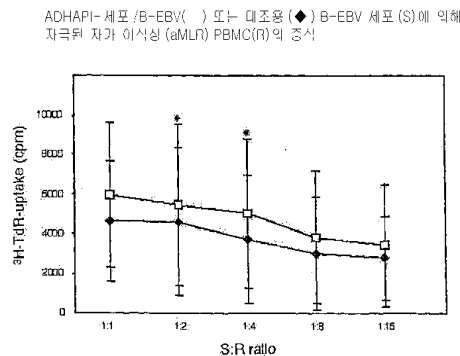
심사관 : 김경미

(54) 항원 제공 세포, 그의 제조 방법 및 그의 암 백신용 용도

(57) 요약

본 발명은 a) 대상자로부터 항원 제공 세포를 수집하고; b) 상기 수집된 세포를 활성화시키고; c) 상기 활성화된 세포를 생체 외에서 배양하고 임의로 확장시키고; d) 상기 배양되고 임의로 확장된 세포를 상기 세포가 다수의 종양 관련 항원들을 동시에 발현하도록 DNA 저 메틸화제로 처리함을 포함하는, 상기 항원 제공 세포의 제조 방법을 개시한다. 본 발명의 방법에 따라 수득할 수 있는 세포뿐만 아니라, 단독적이든지 또는 상기 세포와 함께든지 간에 상기 세포의 세포 성분들은 상기 세포에서 발현되는 다수 개의 종양 관련된 항원들 중 하나 이상을 구조적으로 발현하는 상이한 조직유형을 갖는 암의 예방 및 치료에 유용하다. 편의상, 상기 세포 및/또는 세포 성분들은 백신의 형태이다. 상기 백신은 다수/모든 메틸화-조절된 종양 관련 항원을 동시에 발현한다는 점에서 종래 기술보다 유리하다.

대표도 - 도1



데이터는 4 개의 독립적인 실험들에서 수득한 [3H]-THN 흡수의 평균 값 (cpm) ± SD를 나타낸다.

특허청구의 범위

청구항 1

- a) 인간 대상자로부터 분리된 PBMC 세포를 활성화시키고;
- b) 상기 활성화된 세포를 생체 외에서 배양하고 임의로 확장시키고;
- c) 상기 배양되고 임의로 확장된 세포를 DNA 저메틸화제(hypomethylating agent)로 매 12 시간마다 4회 처리하고, 배양 배지의 반을 새로운 배지로 대체하고 배양을 추가로 48 시간 동안 진행하여 상기 세포가 다수의 고환 암 항원들을 동시에 발현하도록 하는 것을 포함하는 상기 고환 암 항원 제공 세포의 제조 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 인간 대상자가 암 환자인 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 세포가 엡스타인-바(Epstein-Barr) 바이러스-고정화된 B-림프모세포성 세포 주인 방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 세포가 억제물질 분열제(PWM)-활성화된 B-림프구인 방법.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 세포가 CD40 활성화된 B-림프구인 방법.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 세포가 피토헤마글루티닌(PHA) + 재조합 인간 인터류킨-2(rhIL-2)-활성화된 PBMC인 방법.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 세포가 피토헤마글루티닌(PHA) + 재조합 인간 인터류킨-2(rhIL-2) + 억제물질 분열제(PWM)-활성화된 PBMC인 방법.

청구항 8

제 1 항에 있어서, 세포가 수지상 세포, 단핵구, 대식세포인 방법.

청구항 9

제 1 항에 있어서, DNA 저메틸화제가 5-아자-시티딘 및 5-아자-2'-데옥시시티딘 중에서 선택되는 방법.

청구항 10

제 1 항 내지 제 9 항 중에서 선택된 어느 한 항의 방법에 의해 수득할 수 있고, 다른 계열에 해당하는 다수의 암 고환 항원을 동시에 발현하는 세포.

청구항 11

제 10 항에 있어서, MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3, MAGE-4, NY-ESO-1, GAGE 1-6, SSX-2의 암 고환 항원을 발현하는 세포.

청구항 12

제 10 항의 세포 및/또는 그의 세포 성분을 포함하며, 하나 이상의 암 항원을 구조적으로 발현하는 상이한 조직 유형을 갖는 암의 예방 및 치료를 위한 약학조성물.

청구항 13

제 12 항에 있어서, 상기 세포를 모아진(pooled) 항원들의 저장소(reservoir)로서 사용하는 약학조성물.

청구항 14

암 백신으로서 사용하기 위한 제 13 항의 모아진 항원.

청구항 15

제 10 항의 세포를 포함하는 암 백신.

청구항 16

제 15 항에 있어서, 자가이식성인 백신.

청구항 17

제 15 항에 있어서, 동종이형인 백신.

청구항 18

제 15 항에 있어서, 세포가 모아진(pooled) 항원들의 저장소로서 사용되는 백신.

청구항 19

제 17 항 또는 제 18 항에 있어서, 상기 세포의 세포 성분이 사용되는 백신.

청구항 20

제 10 항에 있어서, 면역 작동 세포(immune effector cells)의 제조를 위하여 사용되는 세포.

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

명세서

기술분야

- <1> 본 발명은 의학 분야, 특히 인간 또는 동물 대상자의 치료, 보다 특히 암의 진단, 치료 및 예방을 위한 방법에 사용하기 위한 생성물, 물질 및 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 암 백신 및 그의 제조 방법에 관한 것이다.

배경기술

- <2> 상이한 조직 유형의 형질전환된 세포들에 의해 구조적으로 발현되는 다수의 종양 관련 항원들(TAA)이 최근에 동정되었다(Renkvis N. et al. Cancer Immunol. Immunother. 50:3-15, 2001).
- <3> 다수의 이들 TAA는 특정한 HLA I 군 동종특이성(allospecificities)과 관련하여 CD8+ 세포독성 T 림프구(CTL)에 의해 인식되는 다수의 면역우세 항원 펩티드를 제공할 수 있고(Renkvis N. et al. Cancer Immunol. Immunother. 50:3-15, 2001); 더욱 또한 소정의 TAA, 예를 들어 MAGE(Jager E. et al., J. Exp. Med., 187:265-270, 1998), NY-ESO-1(Jager E. et al., J. Exp. Med., 187:265-270, 1998), SSX(Tureci O, et al. Cancer Res; 56(20):4766-72, 1996), 티로시나제(Topalian S.L. et al., J. Exp. Med., 183:1965-1971, 1996), Melan-A/MART-1(Zarour H.M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:400-405, 2000)은 부수적으로 특정한 HLA II 군 동종특이성과 관련하여 CD4+ T 림프구에 의해 인식되는 에피토프를 포함하여, TAA-지배되는 호르몬 면역 반응을 유도할 수 있다(Wang R.F., Trends Immunol., 22:269-276, 2001).
- <4> 치료 표적으로서 중요한 역할을 할 수 있는 상이한 TAA 군들이 하기와 같이 동정되었다:
- <5> i) 고환 및 태반 이외에 정상 조직이 아닌 다양한 조직구조의 종양에서 발현되는 암-고환 항원(CTA), 예를 들어, MAGE, GAGE, SSX SART-1, BAGE, NY-ESO-1, XAGE-1, TRAG-3 및 SAGE가 있고, 이들 중 일부는 다수의 계열들로 나타난다(Traversari C., Minerva Biotech, 11:243-253, 1999);
- <6> ii) 정상 및 종양 멜라닌세포에서 발현되는 분화 특이적인 항원, 예를 들어 티로시나제, Melan-A/MART-1, gp100/Pmel17, TRP-1/gp75, TRP-2(Traversari C., Minerva Biotech, 11:243-253, 1999);
- <7> iii) 상이한 조직구조의 악성 조직들에서 과 발현되나 양성 대응물에서도 존재하는 항원, 예를 들어 PRAME(Ikeda H. et al., Immunity, 6:199-208, 1997), HER-2/neu(Traversari C., Minerva Biotech, 11:243-253, 1999), CEA, MUC-1(Monges G.M. et al., Am. J. Clin. Pathol., 112:635-640, 1999), 알파-태아 단백질(Meng W.S. et al., Mol. Immunol., 37:943-950, 2001);
- <8> iv) 도처에 발현되는 단백질을 암호화하는 유전자의 점 돌연변이로부터 유래되는 항원, 예를 들어 MUM-1, β -카테닌, HLA-A2, CDK4 및 카스파제 8(Traversari C., Minerva Biotech, 11:243-253, 1999);
- <9> v) 바이러스 항원(Traversari C., Minerva Biotech, 11:243-253, 1999).
- <10> TAA 이외에, 효과적인 면역원성과 숙주의 T 림프구에 의한 유효한 인식에 중요한 세포 원소들로는 HLA I 군 및 HLA II 군 항원, 및 공동자극/보조 분자(예를 들어, CD40, CD54, CD58, CD80, CD81)가 있다(Fleuren G.J. et al., Immunol. Rev., 145:91-122, 1995).
- <11> 공지된 TAA 군 중에서, CTA가 암 환자의 유효한 특이적 면역요법에 특히 적합한 치료 표적인데, 그 이유는 정상 조직에서의 그의 제한된 발현 및 살아있는 대상자, 특히 인간을 포함한 포유동물에서의 그의 공지된 생체 내 면역원성때문이다(Jager E. et al., J. Exp. Med., 187:265-270, 1998; Reynolds S.R. et al., Int. J. Cancer, 72:972-976, 1997). 그러나, 상이한 환자들의 종양 병변들 중에서 특정한 CTA의 이중 발현은 CTA-지배된 치료 백신화에 대한 그의 생물학적 적격성을 제한한다. 실제로, 명백한 암 환자의 악성 병변들은 흔히 오직 소정의

CTA만을 발현할 수 있으며(Sahin U. et al., Clin. Cancer Res., 6:3916-3922, 2000), 개별적인 종양 병변 내에서의 특정한 CTA의 추가적인 하향 조절(Lethz B. et al., Melanoma Res., 7:S83-S88, 1997) 및/또는 이중(dos Santos N.R. et al., Cancer Res., 60:1654-1662, 2000) 발현이 추가로 보고되었다(Jungbluth A.A. et al., Br. J. Cancer, 83:493-497, 2000). 생체 내에서 별도로 또는 동시에 발생할 수 있는 이러한 사건들은 또한 질병의 진행을 촉진시키는 악성 세포의 구조적으로 불량한 면역원성에 기여할 수 있으며(Speiser D.E. et al., J. Exp. Med., 186:645-653, 1997), 특정한 CTA에 대한 면역학적 치료 도중에 CTA-음성 클론들의 출현과 함께 종양 세포의 생체 내 면역선택이 또한 도출될 수도 있다. 따라서, 단일 CTA의 독특한 면역원성 에피토프의 면역학적 표적화에 초점을 둔 면역요법적 접근법은 종양 병변에서의 표적 CTA의 부재 또는 어쩌면 하향 조절된 발현으로 인해 다수의 암 환자에게 적용될 수 없으며; 더욱 또한, 생체 내에서 단일 CTA의 면역학적 표적화는 처리-유도/증폭된 CTA-특이적인 면역 반응을 효율적으로 벗어나는 CTA-상실 종양 변이체를 생성시킬 수도 있다. 단일 CTA를 표적화하는 치료학적 접근법에 대한 추가적인 제한은 상기의 이중 병변 내 발현으로부터 유래하며(Schultz-Thater E. et al., Br. J. Cancer, 83:204-208, 2000), 더욱이 특정한 HLA I 군 또는 HLA II 군 동종특이성에 의한 단일 CTA의 독특한 면역원성 에피토프의 제공은 몇몇의 한정된 HLA 표현형을 갖는 환자들에 대한 치료만을 허용한다.

<12> 이러한 제한들을 부분적으로 피하고자, 최근의 치료학적 전략은 백신화제로서 단일 또는 다중 CTA, 또는 전체 CTA 단백질의 하나 이상의 면역원성 에피토프를 사용하고 있다(Conference on Cancer Vaccines, Eds. Ferrantini M. and Belardelli F., Rome-Italy, November 15-16, 1999; <http://www.cancerresearch.org>).

<13> 따라서, 현재 기술 수준의 결점, 특히 불량한 면역원성, 생체 내 면역선택성, 특정한 단일 표적화된 CTA 또는 TAA로만 제한되지 않고 광범위한 암 환자 집단에 대해 암 백신화가 수행될 가능성을 극복할 수 있고 상기 암 백신이 소정의 HLA I 군 및/또는 HLA II 군 항원으로 "제한되지" 않는 암 백신에 대한 필요성이 강하게 느껴지고 있다.

<14> 최근의 생체 내 증거는 조사된 모든 CTA 유전자의 발현이 지금까지 공지된 것들 중에서, DNA 저 메틸화제(hypomethylating agent)에의 노출에 이어 상이한 조직구조를 갖는 종양 세포에서 유도되거나 상향 조절됨을 입증하였다(dos Santos N.R. et al., Cancer Res., 60:1654-1662, 2000; Weber J. et al., Cancer Res., 54:1766-1771, 1994). CTA 유도는 안정적이어서 처리가 끝난 후에도 여전히 수 주일간 검출될 수 있는 것으로 밝혀졌다. 이러한 발견은 CTA가 DNA 메틸화에 의해 광범위하게 조절되는 TAA 군에 속한다는 개념을 지지한다. 더욱 또한, DNA 저 메틸화제에 의한 종양 세포의 처리는 HLA I 군 항원 및 조사된 HLA I 군 동종특이성의 발현에 대한 동시적이고 안정적인 상향 조절을 유도하고, 또한 동시 자극/보조 분자 CD54 및 CD58의 발현을 상향 조절하였다(Coral S. et al., J. Immunother., 22:16-24, 1999).

<15> 그러나, CTA는 그의 유망한 치료 프로파일에도 불구하고, 다수의 결점들을 나타낸다, 예를 들어 지금까지 조사된 특정한 CTA는 CTA-양성 및 -음성의 악성 세포가 공존하는 명백한 종양 병변 내에서 이중 발현을 나타내며; 지금까지 동정된 것들 중에서 오직 소정의 CTA만이 그의 조직학적 기원과 무관하게 명백한 종양 병변 상에서 발현될 수 있고; 종양 세포 상에서의 특정한 CTA의 한계적인 발현 수준이 CTA-특이적인 CTL에 의한 인식에 필요하며; 특정한 CTA에 대한 백신화는 적합한 HLA I 군을 필요로 하고 소정의 CTA의 경우 환자의 HLA II 군 표현형을 또한 필요로 한다.

<16> 소정의 CTA는 그의 독특한 생물학적 특징으로 인해, 상이한 조직구조의 악성 질환에 걸린 환자들에서 CTA-특이적인 면역 반응을 유도하거나 강화시킬 것을 목적으로 하는 다양한 임상 시도에 사용되고 있다. 당해 분야의 전문가들이 알고 있는 바와 같이, 다양한 전략들이 현재 임상에서 치료학적 CTA의 생체 내 투여를 위해서, 또는 전 임상 수준에서 보다 강력한 백신화 도구의 생성을 위해서 사용되고 있다(dos Santos N.R. et al., Cancer Res., 60:1654-1662, 2000; Weber J. et al., Cancer Res., 54:1766-1771, 1994). 현재까지는, 주로 다수의 기술적 및 실용적 제한으로 인해, 특정한 CTA 또는 단일의 전체 CTA 단백질의 오직 제한된 수의 면역원성 에피토프들만이 치료 목적으로 현재 임상에 사용되고 있다. 하기는 암 환자에게 CTA를 투여하기 위해 이미 사용된 또는 지금까지 가설화된 주요 전략을 포함하는 목록이며; 동일한 전략들이 지금까지 공지된 TAA의 다른 군들에 속하는 TAA를 환자에게 투여하기 위해 사용되고 있으며 상이한 보조제 및/또는 담체가 때때로 치료제의 면역원성을 강화시키기 위해 사용되고 있음이 또한 강조되어야 한다.

<17> · CD8+ T 세포에 의해 인식되는 단일 또는 다중 CTA의 면역원성 에피토프(들)를 나타내는 합성 펩티드(Conference on Cancer Vaccines, Eds. Ferrantini M. and Belardelli F., Rome-Italy, November 15-16, 1999; <http://www.cancerresearch.org>).

- <18> · 단일 또는 다중 CTA의 면역원성 에피토프(들)를 나타내는 리포솜-캡슐화된 합성 펩티드(Steller M.A. et al., Clin. Cancer Res., 4:2103-2109, 1998).
- <19> · 단일 CTA의 전체 합성 단백질(Conference on Cancer Vaccines, Eds. Ferrantini M. and Belardelli F., Rome-Italy, November 15-16, 1999; <http://www.cancerresearch.org>).
- <20> · CD8+ T 세포에 의해 인식되는 단일 또는 다중 CTA의 에피토프를 발현하는 재조합 바이러스 벡터(Jenne L. et al., Trends Immunol., 22:102-107, 2001).
- <21> · 노출된 DNA 주사(Park J.H. et al., Mol. Cells, 9:384-391, 1999).
- <22> · CD8+ T 세포에 의해 인식되는 단일 또는 다중 CTA의 에피토프를 나타내는 합성 펩티드와 함께 생체 외에서 부하된 자가 이식된 PBMC/대식세포(Conference on Cancer Vaccines, Eds. Ferrantini M. and Belardelli F., Rome-Italy, November 15-16, 1999; <http://www.cancerresearch.org>).
- <23> · CD8+ T 세포에 의해 인식되는 단일 또는 다중 CTA의 에피토프를 나타내는 합성 펩티드와 함께 생체 외에서 부하되거나 또는 단일 CTA의 전체 합성 단백질과 함께 부하되거나, 또는 전체 종양 세포 제체와 함께 부하된 자가 이식된 수지상 세포(Conference on Cancer Vaccines, Eds. Ferrantini M. and Belardelli F., Rome-Italy, November 15-16, 1999; <http://www.cancerresearch.org>; Jenne L. et al., Trends Immunol., 22:102-107, 2001).
- <24> · 완전 길이의 CTA를 발현하기 위해 DNA/RNA에 의해 생체 외에서 형질감염 또는 형질도입되거나 또는 전체 종양 세포와 융합된 자가 이식된 수지상 세포(Jenne L. et al., Trends Immunol., 22:102-107, 2001);
- <25> · 완전 길이의 CTA를 발현하기 위해 DNA/RNA에 의해 생체 외에서 형질감염 또는 형질도입된 자가 이식된 T 림프구.
- <26> 본 발명이 주요 목적으로서 언급한 자가 이식된 암 백신에 관해, 다수의 특허 참고 문헌들이 인용될 수 있다. WO 99/42128에는 충실성 종양의 HLA 전사 또는 발현 프로파일을 측정하고, 적합한 치료를 선택하고/하거나 종양의 진행을 감시하는 방법이 개시되어 있다. 상기 참고문헌의 목적은 고유의 항종양 반응을 증가시키기 위해서 HLA-G의 일부 동형들을 억제시키는 것이다. 상기 방법은 종양 샘플로부터 세포를 추출하고, 이를 용해시키고, 용해물을 HLA I 군 항원에 대한 항체와 반응시킴을 포함한다.
- <27> DE 29913522는 종양 세포를 그의 표면은 완전하게 남겨둔채로 죽이거나 손상시키고 이어서 상기 세포를 환자에게 다시 주입하기 위해서 환자로부터 추출된 상기 종양 세포를 200 내지 9000 바의 압력으로 제공함으로써 암 백신을 제조하는 장치를 제공한다.
- <28> WO 00/02581에는 종양 유전자 또는 돌연변이 종양 억제 인자 단백질 또는 펩티드에 대해 T 세포 반응을 유도할 수 있는 텔로머라제 단백질 또는 펩티드가 개시되어 있다. 상기 펩티드는 암 백신에 사용된다.
- <29> WO 00/18933에는 DNA, RNA의 전사 및 번역, 또는 항원 펩티드의 발생 효율은 변하지 않고, 기능상 불활성으로 변경된 항원의 발현을 일으키는 DNA의 제작이 개시되어 있다.
- <30> 암에 걸린 환자를 변경된 인간 암 관련 항원, 특히 PSMA 항원을 암호화하는 RNA 또는 플라스미드 DNA의 투여에 의해 치료한다. 상이한 실시태양에서, 생체 외에서 RNA 또는 플라스미드 DNA에 노출된 자가 이식된 수지상 세포를 백신으로 사용한다.
- <31> WO 00/20581에는 신규의 단리된 MAGE-A3 인간 백혈구 항원(HLA) II 군 결합 펩티드를 포함하는 암 백신이 개시되어 있다. 상기 펩티드를 또한 T 림프구의 집단을 상기 펩티드에 특이적인 CD4+ T 림프구로 선택적으로 강화시키는데 사용할 수 있다. 상기 강화된 림프구를 또한 암 백신으로서 사용한다.
- <32> WO 00/25813에는 주요 조직적합성 복합 분자에 결합하는 광범위한 종양 관련 항원(TAA)이 개시되어 있다. 상기 치료 방법은, 세포독성 림프구를 활성화시키고 TAA를 발현하는 세포를 죽이는 항원 제공 세포에 의해 가공되는 상기 TAA를 암호화하는 핵산 분자를 투여함을 포함한다. 특정한 hTERT 펩티드 이외에, 상이한 TAA의 동정은 컴퓨터-고안된 펩티드의 복합적인 컴퓨터-지원 합성 방법 및 상기 펩티드의 유용성의 확인을 위한 생물학적 분석에 의해 가능하다.
- <33> WO 00/26249에는 인간 WT-1 단백질 또는 인간 gata-1 단백질의 단편들이 개시되어 있다. 상기 펩티드 단편들은 세포독성 T 림프구(CTL)의 활성화를 통해 암 백신에 사용된다.

- <34> US 6077519는 종양 조직으로부터의 에피토프의 산 용출을 통해 회수된 T 세포 에피토프의 조성물을 포함하는 암 백신을 제공한다.
- <35> WO 00/46352는 기능적인 CD86 분자를 발현하는 인간 T 림프구를 포함하는 암 백신을 제공한다. T 림프구는 T 세포에 2 개 이상의 연속적인 자극을 가하여 수득되며, 상기 자극은 각각 하나 이상의 활성화제(항체 항 CD2, 3 또는 28) 및 T 세포 증식을 자극하는 사이토카인(인터류킨)을 포함한다.
- <36> 문헌[Coral S. et al. Journal of Immunotherapy 22(1):16-24, 1999]은 흑색종 세포 및 숙주의 세포독성 세포에 의한 그의 인식에 대한 면역원성 능력이 인간 백혈구 항원(HLA) I 군 항원, 공동 자극 분자 및 종양 세포 상의 흑색종 관련 항원(MAA)의 발현 수준 및 그의 존재에 따라 변함을 교시한다. 인간 흑색종의 능동 및/또는 수동적인 특이적인 면역요법에 사용하기 위한 5-AZA-CdR이 전신적인 투여를 통해 세포독성 세포에 의한 흑색종 세포 인식을 향상시킬 수도 있음을 제안할 수 있다.
- <37> 문헌[Momparker, Anticancer Drugs Apr; 8(4):358-68, 1997]은 5-AZA-CdR을 화학요법제로서 언급한다.
- <38> 문헌[Shichijo S. et al. Jpn. J. Cancer Res. 87, 751-756, July 1996]은 세포에서의 발현 기전을 보다 잘 이해하기 위해서 탈 메틸화제 5-AZA-CDR이 정상 및 악성 림프 세포에서 MAGE 1, 2, 3 및 6을 유도하는지를 조사하였다. 상기 저자들은 소정의 샘플에서 조사된 CTA의 유도를 시험하고, 탈 메틸화가 모든 경우에 MAGE 유전자를 유도하기에 충분한 자극이 아니며 그 결과는 세포에서의 MAGE 유전자의 발현에 대한 보다 양호한 이해를 도출시킨다고 논의하였다. 어떠한 전망있는 치료적 암시도 제시되지 않았다.
- <39> 발명의 요약
- <40> 본 발명에 이르러
- <41> a) 대상자로부터 항원 제공 세포를 수집하고;
- <42> b) 상기 수집된 세포를 활성화시키고;
- <43> c) 상기 활성화된 세포를 생체 외에서 배양하고 임의로 확장시키고;
- <44> d) 상기 배양되고 임의로 확장된 세포를 상기 세포가 다수의 종양 관련 항원들을 동시에 발현하도록 DNA 저 메틸화제로 처리함
- <45> 을 포함하는, 상기 항원 제공 세포의 제조 방법이 밝혀졌다.
- <46> 본 발명의 방법에 따라 수득할 수 있는 세포 및 그의 세포 성분들은(단독이든지 상기 세포와 함께든지 간에) 특히 인간을 포함하여 포유동물에서, 상기 세포에서 발현되는 다수개의 종양 관련 항원들 중 하나 이상을 구조적으로 발현하는 상이한 조직유형의 암을 예방 및 치료하는데 유용하다.
- <47> 본 발명의 상기 부분에서, 상기 세포를 간단히 ADHAPI-세포라 칭한다.
- <48> 가장 편리하게는, 상기 언급한 방법으로부터 수득할 수 있는 세포를 암 백신의 형태로 사용한다.
- <49> 상기에서, 본 발명을 또한 실시예 및 도면에 의해 상세히 개시할 것이며, 도면에서:
- <50> 도 1은 ADHAPI-세포/B-EBV 또는 대조용 B-EBV 세포(S)에 의해 자극된 자가 이식된 (aMLR)PBMC(R)의 증식을 나타내고;
- <51> 도 2는 ADHAPI-세포/PWM-B 또는 대조용 PWM-B 세포(S)에 의해 자극된 자가 이식된 (aMLR)PBMC(R)의 증식을 나타내고;
- <52> 도 3은 ADHAPI-세포/CD40L-B 또는 대조용 CD40L-B 세포(S)에 의해 자극된 자가 이식된 (aMLR)PBMC(R)의 증식을 나타내고;
- <53> 도 4는 ADHAPI-세포/PWM-PBMC 또는 대조용 PWM-PBMC 세포(S)에 의해 자극된 자가 이식된 (aMLR)PBMC(R)의 증식을 나타내고;
- <54> 도 5는 ADHAPI-세포/PHA-PBMC 및 대조용 PHA-PBMC에 의해 자극된 자가 이식된 (aMLR)PBMC(R)의 증식을 나타내고;

<55> 도 6은 ADHAPI-세포/PHA-+PWM-PBMC 또는 대조용 PHA-+PWM-PBMC(S)에 의해 자극된 자가 이식된 (aMLR)PBMC(R)의 증식을 나타낸다.

발명의 상세한 설명

- <56> 본 발명에 따라, 항원 제공 세포를 생성시키기 위해 처리될 수 있는 세포는 저 메틸화제에 의해 적합하게 활성화되고 처리되는 한, 그 유형에 대한 제한은 실질적으로 없다.
- <57> 본 발명에 따라, 상기 세포는 대상자, 특히 포유동물, 보다 특히 인간으로부터 수집된다. 본 발명의 가능한 실시태양에서, 상기 인간은 암 환자이다.
- <58> 본 발명의 첫 번째 바람직한 실시태양에서, 상술한 방법에 의해 수득될 수 있는 항원 제공 세포는 면역 세포이다.
- <59> 본 발명의 두 번째 바람직한 실시태양에서, 상술한 방법에 의해 수득될 수 있는 항원 제공 세포는 비 면역 세포이다.
- <60> 본 발명에 따라 수득될 수 있는 세포는 공유된 면역우세 암 항원을 발현하거나 공유되지 않은 면역우세 암 항원을 발현할 수 있다.
- <61> 본 발명의 몇몇 특정한 실시태양에서, 본원에 개시된 방법에 적합한 세포는 하기와 같다:
- <62> · 질병이 진행된 단계의 암 환자 또는 건강한 대상자의 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)로부터 생성된, 엡스타인-바(Epstein-Barr) 바이러스-고정화되고, DNA 저 메틸화제-처리된 B-림프모세포 주(ADHAPI-세포/B-EBV).
- <63> · 질병이 진행된 단계의 암 환자 또는 건강한 대상자의 PBMC로부터 정제된 B-림프구로부터 제조된, 역새플 분열제(PWM)-활성화되고, DNA 저 메틸화제 처리된 B-림프구(ADHAPI 세포/PWM-B).
- <64> · 질병이 진행된 단계의 암 환자 또는 건강한 대상자의 PBMC로부터 정제된 B-림프구로부터 제조된, CD40 활성화되고, DNA 저 메틸화제 처리된 B-림프구(ADHAPI 세포/CD40-B).
- <65> · 질병이 진행된 단계의 암 환자 또는 건강한 대상자의 정제된 PBMC로부터 제조된, 역새플 분열제(PWM)-활성화되고, DNA 저 메틸화제 처리된 PBMC(ADHAPI 세포/PWM-PBMC).
- <66> · 질병이 진행된 단계의 암 환자 또는 건강한 대상자의 정제된 PBMC로부터 제조된, 피토헤마글루티닌(PHA) + 재조합 인간 인터류킨-2(rhIL-2)-활성화되고, DNA 저 메틸화제 처리된 PBMC(ADHAPI 세포/PHA-rhIL2-PBMC).
- <67> · 질병이 진행된 단계의 암 환자 또는 건강한 대상자의 정제된 PBMC로부터 제조된, 피토헤마글루티닌(PHA) + 재조합 인간 인터류킨-2(rhIL-2) + 역새플 분열제(PWM)-활성화되고, DNA 저 메틸화제 처리된 PBMC(ADHAPI 세포/PHA-rhIL2-PWM-PBMC).
- <68> · 수지상 세포, 단핵구, 대식세포.
- <69> · CD34+ 세포, 섬유아세포, 줄기 세포, 섬유아세포 및 각질 세포.
- <70> 본 발명에 따른 방법에 의해 수득될 수 있는 세포는 면역우세든지 면역우세가 아니든지 간에 하나 이상의 암 항원을 구조적으로 발현하는 상이한 조직유형을 갖는 암의 예방 및 치료제로서 사용하기에 적합하다.
- <71> 본 발명의 또 다른 가능한 실시태양을 백신화 세포의 직접적인 항원 제공 능력을 이용하고자 하지 않거나 상기 능력이 필요하지 않은 경우들에 적용시킬 수 있다. 이 경우에, 본 발명의 방법에 의해 수득될 수 있는 백신화 세포 또는 그의 세포 성분들을 환자의 백신접종을 위해 모든 암 항원의 "저장소"로서 사용할 수 있다.
- <72> 본 발명의 바람직한 실시태양에서, 선택된 TAA는 CTA이다.
- <73> 본 발명의 상기 실시태양은 숙련가에게 하기의 이점들을 제공한다:
- <74> CTA는 HLA I 군-제한된 CTA-특이적인 CD8+ CTL에 의해 인식되는 에피토프를 포함하기 때문에 면역원성이다.
- <75> CTA는 HLA II 군-제한된 CTA-특이적인 CD4+ T 림프구에 의해 인식되는 에피토프를 포함하기 때문에 면역원성이다.
- <76> 선택된 CTA는 HLA I 군 및 HLA II 군 항원들에 의해 제공된 에피토프를 동시에 포함하며; 따라서 선택된 CTA는

CD8+ CTL과 CD4+ T 림프구 반응을 동시에 유도할 수 있다.

- <77> CTA는 고환과 태반을 제외하고 양성 조직에서 발현되지 않는다.
- <78> 상이한 CTA는 충실성 및 조혈성 암의 종양 세포에서 동시에 발현되어, 형질전환된 세포 상에서 동시 발현되는 다중 요법적 표적을 제공할 수 있다.
- <79> 독특한 CTA는 소정의 환자들의 동시적이고 연속적인 전이성 병변들 사이에 균일하게 발현된다.
- <80> 독특한 CTA는 상이한 조직 기원의 악성 조직에서 발현되어 특정한 조직유형에 관계없이 인간 종양에 의해 공유되는 공통의 치료 표적을 제공할 수 있다.
- <81> 독특한 CTA는 상이한 HLA I 군 및 HLA II 군 동종특이성과 관련하여 제공되는 다수개의 면역원성 펩티드를 암호화할 수 있다.
- <82> 본 발명의 추가의 실시태양에서, 히스톤 데아세틸라제 억제제는 CTA, HLA 항원, 및 상이한 조직구조의 종양 세포 상의 동시 자극/보조 분자의 발현을 유도/상향 조절함에 있어서 DNA 저 메틸화제와 상승적으로 작용할 수 있다. 실제로, DNA 메틸화와 히스톤 탈아세틸화는 암에서 후생성 유전자 잠복에 대해 상승작용적인 증으로서 작용하며(Fuks F. et al., Nat. Genet., 24:88-91, 2000), 종양 억제인자 기능을 갖는, 선택된 과 메틸화된 유전자의 강한 재 활성화가, 초기의 최소 DNA 탈메틸화에 이은 히스톤 데아세틸라제 억제제 처리 후의 결장 암종 세포에서 관찰되었다(Cameron E.E. et al., Nat. Genet., 21:103-107, 1999).
- <83> 본 발명에 따른 방법에서 활성화 단계는 일반적인 상식에 따라 수행되며, 어쨌든 문헌[Current Protocols in Immunology, Coligan J.E. et al. Eds, Wiley]을 참고로 할 수 있다.
- <84> 본 발명에 따른 방법에서 탈 메틸화 처리는 일반적으로 널리 공지되어 있으며 문헌에는 일반적으로 과정이 보고되어 있고, 추가의 정보에 대해서 또한 문헌[Santini V. et al., Ann. Intern. Med., 134:573-586, 2001]을 참조하시오.
- <85> 본 발명의 목적에 유용한 저 메틸화제(당해 분야에 탈 메틸화제로서도 공지되어 있음)는 당해 분야에 널리 공지되어 있다. DNA 탈 메틸화제가 문헌에 광범위하게 개시되어 있으며, 예를 들어 WO 01/29235, US 5,851,773을 참조하시오. 바람직한 DNA 탈 메틸화제는 5-아자-시타딘이며, 5-아자-2'-데옥시시타딘(5-AZA-CdR)이 보다 바람직하다.
- <86> 본 발명에 따른 항원 제공 세포는 암 백신의 제조에 적합하다. 본 발명의 바람직한 실시태양에서, 상기 백신은 자가백신이다.
- <87> 본 발명의 또 다른 바람직한 실시태양에서, 상기 백신은 동종이형 백신이다. 상기 실시태양에서, 상기 개시된 방법에 따라 수득될 수 있는 세포를, 세포로서 또는 그의 세포 성분으로서든지 간에, 항원 제공 세포로서 및 모아놓은 암 항원들의 "저장소"의 형태로서 모두 사용할 수 있다.
- <88> 본 발명의 더욱 또 다른 실시태양에서, 상기 세포 및/또는 세포 성분들을 면역 작동 세포(immune effector cells)의 제조 방법에 사용할 수 있으며, 이때 상기 면역 작동 세포는 널리 공지된 입양 면역요법에 유용한 산물의 제조에 사용된다. 본 발명의 또 다른 실시태양에서, 본원에 개시된 백신을 저 메틸화제, 예를 들어 데시타빈과 함께 암 환자의 전신적인 전 처리와 병행 사용할 수 있다. 상기 실시태양을 본 발명에 따른 백신 및 저 메틸화제, 예를 들어 데시타빈의 전신 투여에 적합한 약학 조성물을 포함하는 제조사의 제품, 예를 들어 키트를 사용하여 수행할 수 있다.
- <89> 백신을 단지 일반적인 상식에 의뢰하여, 당해 분야의 숙련가에게 널리 공지된 기법에 따라 제조할 수 있다. 예를 들어, 본 설명에 언급된 특허 참고 문헌들, 예를 들어 WO 00/25813 또는 WO 00/46352에 암 백신의 제조가 충분히 개시되어 있다.
- <90> 숙련가는 어려움 없이 본 발명에 따른 백신의 적합한 사용 방식, 특히 투여 프로토콜에 관한 방식을 확립할 수 있을 것이다.
- <91> 하기의 실시예들은 본 발명을 추가로 예시한다.

실시예

실시예 1

ADHAPI-세포/B-EBV

PBMC 정제

PBMC를 진행된 질병 단계의 암 환자 또는 건강한 대상자의 폐파린 처리된 말초 혈액으로부터 표준 Ficoll-Hypaque 밀도 구배 원심분리에 의해 정제하였다.

엡스타인-바 바이러스(EBV)를 사용한 PBMC의 고정화에 의한 자가 이식된 B-림프모 세포 주의 제조

B-EBV+림프모 세포 주를, PBMC를 10% 열-불활성화시킨 송아지 태아 혈청(또는 인간 AB 혈청) 및 2 mM L-글루타민이 보충된 RPMI 1640 배지에서 5% CO₂ 가습 분위기 하에 37 °C에서 B95.8 명주원숭이 세포 주로부터의 상등액과 배양함으로써 제조하였다.

ADHAPI-세포/B-EBV 및 대조용 B-EBV 세포의 제조

B-EBV+ 림프모 세포 주(7.5x10⁶ 세포/ml)를 10% 열-불활성화시킨 송아지 태아 혈청(또는 10% 열-불활성화시킨 인간 AB 혈청) 및 2 mM L-글루타민이 보충된 RPMI 1640 배지에서 5% CO₂ 가습 분위기 하에 37 °C에서 배양하고 매 12 시간 마다 1 μM 5-아자-2'-데옥시시티딘(5-AZA-CdR)을 4 회 약동시키고(pulse); 이어서 상기 배양 배지의 반을 새로운 배지로 대체하고 배양을 추가로 48 시간 동안 진행시켰다. 이어서 세포를 실험 과정에 사용하고/하거나 생육 조건 하에서 냉동시켰다. 대조용 세포(B-EBV 세포)를 5-AZA-CdR의 약동 없이 유사한 실험 조건 하에서 배양하였다.

ADHAPI-세포/B-EBV 및 대조용 B-EBV 세포의 최종 회수

결과에 대해서, 표 I을 참조하십시오.

자가 혼합된 림프구 반응(aMLR) 및 MLR

ADHAPI-세포/B-EBV 및 대조용 B-EBV 세포(자극인자=S)를 모으고, 행크스(Hanks') 균형 염 용액(HBSS)으로 2 회 세척하고 x-선 처리(75 Gy)하였다. aMLR 및 MLR을 위해서 스칼라 농도(1x10⁶ 세포/ml 내지 6x10⁴ 세포/ml)의 ADHAPI 세포/B-EBV 또는 대조용 B-EBV 세포를 10% 열-불활성화된 인간 AB 혈청, 2 mM L-글루타민, 100 U/ml 페니실린, 100 μg/ml 스트렙토마이신 설페이트가 보충된 기본 아이스코브(Iscove)의 배지 중의 자가이식된 또는 동종이형의 PBMC(1x10⁶ 세포/ml)(반응자=R)에 가하고, 96 웰 U-바닥 플레이트에 200 μl/웰의 최종 부피로 시딩하였다. 5% CO₂ 가습 분위기 하에 37 °C에서 24 시간 배양한 후에, 배양 상등액 100 μl를 모으고 사이토카인 분석에 사용될 때까지 -80 °C에서 즉시 보관하였다. 이어서, 100 μl의 새로운 배지를 각 웰에 가하고 배양을 추가로 5 일간 진행시키며, 이때 배양액을 ³H-TdR(1 μLCi/웰)로 약동시키고(O/N); 이어서 플레이트를 수확하고 R 세포에 의한 ³H-TdR 결합을 β-계수기로 측정하였다.

aMLR에서 ADHAPI-세포/B-EBV 또는 대조용 B-EBV에 의해 자극된 자가 이식된 PBMC(R)의 증식

도 1을 참조하십시오.

ADHAPI-세포/B-EBV 및 대조용 B-EBV 세포의 표현형 프로파일

결과에 대해서 표 II를 참조하십시오.

ADHAPI-세포/B-EBV 및 대조용 B-EBV 세포에 의해 발현된 CTA의 RT-PCR 분석

조사된 세포 상에서의 CTA 발현을 평가하는데 사용되는 실험 조건 및 프라이머들은 하기와 같다:

MAGE-1, -2, -3, -4의 경우 Brasseur, F., et al., Int. J. Cancer 63:375-380, 1995; GAGE 1-6의 경우 Van den Eynde, B., et al. J. Exp. Med. 182:689-698, 1995; NY-ESO-1의 경우 Stockert, E. et al. J. Exp. Med. 187:265-270, 1998; SSX-2의 경우 Sahin, U., et al. Clin. Cancer Res. 6:3916-3922, 2000.

5-AZA-CdR	-	+
MAGE-1	0/4 ^a	4/4
MAGE-2	NT	NT

MAGE-3	0/4	4/4
MAGE-4	NT	NT
NY-ESO-1	0/4	4/4
GAGE-1-6	0/4	4/4
SSX-2	2/4	4/4
^a 양성/시험된 것; NT, 시험되지 않음		

<112> ADHAPI-세포/B-EBV 또는 대조용 B-EBV 세포(S)에 의해 aMLR에서 자극된 PBMC(R)에 의해 방출된 IFN- γ 의 ELISA 평가

<113> 결과에 대해서 표 III을 참조하십시오.

<114> 실시예 2

<115> ADHAPI-세포/PWM-B

<116> B-림프구 정제

<117> PBMC를 진행된 질병 단계의 암 환자 또는 건강한 대상자의 헤파린 처리된 말초 혈액으로부터 표준 Ficoll-Hypaque 밀도 구배 원심분리에 의해 정제하고, 정제된 B 림프구를 뉴라미니다제-처리된 양 적혈구를 사용하여 통상적인 E 로세팅(rosetting) 기법에 의해 수득하였다.

<118> PWM-활성화된 B 세포의 제조

<119> 정제된 B-림프구(1.5×10^6 세포/ml)를 PWM($3 \mu\text{g/ml}$)와 가하고 10% 열-불활성화시킨 인간 AB 혈청, 2 mM L-글루타민, 100 U/ml 페니실린, 100 $\mu\text{g/ml}$ 스트렙토마이신 설페이트가 보충된 기본 아이스코브 배지에서 5% CO₂ 가습 분위기 하에 37 °C에서 48 시간 동안 배양하였다.

<120> ADHAPI-세포/PWM-B 및 대조용 PWM-B 세포의 제조

<121> PWM-활성화된 B-림프구에 매 12 시간 마다 1 μM 5-아자-2'-데옥시시티딘(5-AZA-CdR)을 4 회 약동시키고; 이어서 상기 배양 배지의 반을 새로운 배지로 대체하고 배양을 추가로 48 시간 동안 진행시켰다. 이어서 세포를 실험 과정에 사용하고/하거나 생육 조건 하에서 냉동시켰다. 대조용 세포(PWM-B 세포)를 5-AZA-CdR의 약동 없이 유사한 실험 조건 하에서 배양하였다.

<122> ADHAPI-세포/PWM-B 및 대조용 PWM-B 세포의 최종 회수

<123> 결과에 대해서, 표 I을 참조하십시오.

<124> 자가 혼합된 림프구 반응(aMLR) 및 MLR

<125> ADHAPI-세포/PWM-B 및 대조용 PWM-B 세포(자극인자=S)를 모으고, 0.5% α -메틸만노피라노사이드가 보충된 헥스 균형 염 용액으로 3 회 세척하고 x-선 처리(30 Gy)하였다. aMLR 및 MLR을 위해서 스칼라 농도(1×10^6 세포/ml 내지 6×10^4 세포/ml)의 ADHAPI 세포/PWM-B 또는 대조용 PWM-B 세포를 10% 열-불활성화된 인간 AB 혈청, 2 mM L-글루타민, 100 U/ml 페니실린, 100 $\mu\text{g/ml}$ 스트렙토마이신 설페이트가 보충된 기본 아이스코브의 배지 중의 자가이식된 또는 동종이형의 PBMC(1×10^6 세포/ml)(반응자=R)에 가하고, 96 웰 U-바닥 플레이트에 200 μl /웰의 최종 부피로 시딩하였다. 5% CO₂ 가습 분위기 하에 37 °C에서 6 일간 배양한 후에, 각각의 웰로부터 배양 상등액 100 μl 를 모으고 사이토카인 분석에 사용될 때까지 -80 °C에서 즉시 보관하였다. 이어서, 100 μl 의 새로운 배지를 각 웰에 가하고 배양액을 ³H-TdR(1 μLCi /웰)로 약동시키고(0/N); 이어서 플레이트를 수확하고 R 세포에 의한 ³H-TdR 결합을 β -계수기로 측정하였다.

<126> ADHAPI-세포/PWM-B 및 대조용 PWM-B 세포의 표현형 프로파일

<127> 결과에 대해서 표 II를 참조하십시오.

<128> ADHAPI-세포/PWM-B 및 대조용 PWM-B 세포에 의해 발현된 CTA의 RT-PCR 분석

<129>

5-AZA-CdR	-	+
MAGE-1	0/4 ^a	4/4
MAGE-2	0/4	4/4
MAGE-3	0/4	4/4
MAGE-4	0/4	4/4
NY-ESO-1	0/4	4/4
GAGE-1-6	0/4	4/4
SSX-2	1/4	4/4
^a 양성/시험된 것; NT, 시험되지 않음		

<130> aMLR에서 ADHAPI-세포/PWM-B 또는 대조용 PWM-B 세포(S)에 의해 자극된 자가이식된 PBMC(R)의 증식

<131> 결과에 대해서 도 2를 참조하십시오.

<132> ADHAPI-세포/PWM-B 또는 대조용 PWM-B 세포(S)에 의해 자극된 동형이종(MLR) 및 자가이식된(aMLR) PBMC(R)에 의해 방출된 IFN- γ 의 ELISA 평가

<133> 결과에 대해서 표 III을 참조하십시오.

<134> 실시예 3

<135> ADHAPI-세포/CD40L-B

<136> PBMC 정제

<137> PBMC를 진행된 질병 단계의 암 환자 또는 건강한 대상자의 헤파린 처리되거나 산 시트레이트 텍스트로즈(ACD)-응고억제된 말초 혈액으로부터 표준 Ficoll-Hypaque 밀도 구배 원심분리에 의해 정제하였다.

<138> NIH3T3-CD40L-활성화된 PBMC의 제조

<139> PBMC(2×10^6 세포/ml)를 10% 열-불활성화시킨 인간 AB 혈청, 2 mM L-글루타민, 2 ng/ml 재조합 인간(rh) 인터류킨 4(rhIL-4), 50 μ g/ml 인간 트랜스페린, 5 μ g/ml rh 인슐린, 5.5×10^{-7} M 사이클로스포린 A(CsA), 100 U/ml 페니실린 및 100 μ g/ml 스트렙토마이신 섀페이트가 보충된 기본 아이스코브 배지(완전 배지)에서 5% CO₂ 가습 분위기 하에 37 °C에서 반합류성의 x-선 처리된(75 Gy) NIH3T3-CD40L과 함께 배양하였다. 6 일의 배양 후에, PBMC를 수거하고, HBSS로 2 회 세척하고, 완전 배지에서 1×10^6 세포/ml로 재 현탁시키고 상술한 바와 같이 새로 제조된 NIH3T3-CD40L과 5% CO₂ 가습 분위기 하에 37 °C에서 추가로 3 일간 함께 배양하였다. 상기 과정을 최대 16 내지 18 일의 배양 시간까지 매 2-3일마다 반복하였다.

<140> ADHAPI-세포/CD40L-B 및 대조용 CD40L-B 세포의 제조

<141> 16 내지 18 일의 배양 후에, 활성화된 PBMC를 상술한 바와 같이 수확하고 NIH-3T3-CD40L로 다시 자극하고; 5% CO₂ 가습 분위기 하에 37 °C에서 O/N 배양 후에, 배양액을 매 12 시간마다 1 μ M 5-아자-2'-데옥시시티딘(5-AZA-CdR)으로 4 회 약동시키고; 이어서 상술한 바와 같이 세포를 수확하고 NIH3T3-CD40L로 다시 자극하고 배양을 추가로 48 시간 동안 진행시켰다. 이어서 세포를 실험 과정에 사용하고/하거나 생육 조건 하에서 냉동시켰다. 대조용 세포(CD40L-B 세포)를 5-AZA-CdR의 약동 없이 유사한 실험 조건 하에서 배양하였다.

<142> ADHAPI-세포/CD40L-B 및 대조용 CD40L-B 세포의 최종 회수

<143> 결과에 대해서, 표 I을 참조하십시오.

<144> 자가 혼합된 림프구 반응(aMLR) 및 MLR

<145> ADHAPI-세포/CD40L-B 및 대조용 CD40L-B 세포(자극인자=S)를 수거하고, 행크스 균형 염 용액으로 3 회 세척하고

x-선 처리하였다(50 Gy). aMLR 및 MLR을 위해서 스칼라 농도(1×10^6 세포/ml 내지 6×10^4 세포/ml)의 ADHAPI 세포/CD40L-B 또는 대조용 CD40L-B 세포를 10% 열-불활성화된 인간 AB 혈청, 2 mM L-글루타민, 100 U/ml 페니실린, 100 $\mu\text{g/ml}$ 스트렙토마이신 설페이트가 보충된 기본 아이스코브의 배지 중의 자가이식된 또는 동종이형의 PBMC(1×10^6 세포/ml)(반응자=R)에 가하고, 96 웰 U-바닥 플레이트에 200 μl /웰의 최종 부피로 시딩하였다. 5% CO₂ 가습 분위기 하에 37 °C에서 24 시간 배양한 후에, 배양 상등액 100 μl 를 모으고 사이토카인 분석에 사용될 때까지 -80 °C에서 즉시 보관하였다. 이어서, 100 μl 의 새로운 배지를 각 웰에 가하고 배양을 추가로 5 일간 진행시키며 이때 배양액을 ³H-TdR(1 μLCi /웰)로 약동시키고(O/N); 이어서 플레이트를 수확하고 R 세포에 의한 ³H-TdR 결합을 β -계수기로 측정하였다.

<146> ADHAPI-세포/CD40L-B 및 대조용 CD40L-B 세포의 표현형 프로파일

<147> 결과에 대해서 표 II를 참조하십시오.

<148> ADHAPI-세포/CD40L-B 및 대조용 CD40L-B 세포에 의해 발현된 CTA의 RT-PCR 분석

5-AZA-CdR	-	+
MAGE-1	0/10 ^a	10/10
MAGE-2	0/10	9/10
MAGE-3	0/11	10/11
MAGE-4	0/11	11/11
NY-ESO-1	0/14	14/14
GAGE-1-6	0/14	14/14
SSX-2	0/14	13/14
^a 양성/시험된 것.		

<150> aMLR에서 ADHAPI-세포/CD40L-B 또는 대조용 CD40L-B 세포(S)에 의해 자극된 자가이식된(aMLR) PBMC(R)의 증식

<151> 결과에 대해서 도 3을 참조하십시오.

<152> ADHAPI-세포/CD40L-B 또는 대조용 CD40L-B 세포(S)에 의해 aMLR에서 자극된 PBMC(R)에 의해 방출된 IFN- γ 의 ELISA 평가

<153> 결과에 대해서 표 III을 참조하십시오.

<154> 실시예 4

<155> ADHAPI-세포/PWM-PBMC

<156> PBMC 정제

<157> PBMC를 진행된 질병 단계의 암 환자 또는 건강한 대상자의 헤파린 처리된 말초 혈액으로부터 표준 Ficoll-Hypaque 밀도 구배 원심분리에 의해 정제하였다.

<158> PWM-활성화된 PBMC의 제조

<159> PBMC(1.5×10^6 세포/ml)를 PWM(3 $\mu\text{g/ml}$)과 가하고 10% 열-불활성화시킨 인간 AB 혈청, 2 mM L-글루타민, 100 U/ml 페니실린 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 스트렙토마이신 설페이트가 보충된 기본 아이스코브 배지에서 5% CO₂ 가습 분위기 하에 37 °C에서 48 시간 동안 배양하였다.

<160> ADHAPI-세포/PWM-PBMC 및 대조용 PWM-PBMC 세포의 제조

<161> PWM-활성화된 PBMC를 매 12 시간마다 1 μM 5-아자-2'-데옥시시티딘(5-AZA-CdR)으로 4 회 약동시키고; 이어서 상기 배양 배지의 반을 새로운 배지로 대체하고 배양을 추가로 48 시간 동안 진행시켰다. 이어서 세포를 실험 과정에 사용하고/하거나 생육 조건 하에서 냉동시켰다. 대조용 세포(PWM-PBMC)를 5-AZA-CdR의 약동 없이 유사한 실험 조건 하에서 배양하였다.

<162> ADHAPI-세포/PWM-PBMC 및 대조용 PWM-PBMC 세포의 최종 회수

<163> 결과에 대해서, 표 I을 참조하십시오.

<164> 자가 혼합된 림프구 반응(aMLR) 및 MLR

<165> ADHAPI-세포/PWM-PBMC 및 대조용 PWM-PBMC 세포(자극인자=S)를 수거하고, 0.5% α-메틸만노피라노사이드가 보충된 헹크스 균형 염 용액으로 3 회 세척하고 x-선 처리하였다(30 Gy). aMLR 및 MLR을 위해서 스칼라 농도(1×10^6 세포/ml 내지 6×10^4 세포/ml)의 ADHAPI 세포/PWM-PBMC 또는 대조용 PWM-PBMC 세포를 10% 열-불활성화된 인간 AB 혈청, 2 mM L-글루타민, 100 U/ml 페니실린, 100 μg/ml 스트렙토마이신 섀페이트가 보충된 기본 아이스코브의 배지 중의 자가이식된 또는 동종이형의 PBMC(1×10^6 세포/ml)(반응자=R)에 가하고, 96 웰 U-바닥 플레이트에 200 μl/웰의 최종 부피로 시딩하였다. 5% CO₂ 가습 분위기 하에 37 °C에서 6 일간 배양한 후에, 각각의 웰로부터 배양 상등액 100 μl를 모으고 사이토카인 분석에 사용될 때까지 -80 °C에서 즉시 보관하였다. 이어서, 100 μl의 새로운 배지를 각 웰에 가하고 배양액을 ³H-TdR(1 μCi/웰)로 약동시키고(O/N); 이어서 플레이트를 수확하고 R 세포에 의한 ³H-TdR 결합을 β-계수기로 측정하였다.

<166> ADHAPI-세포/PWM-PBMC 및 대조용 PWM-PBMC 세포의 표현형 프로파일

<167> 결과에 대해서 표 II를 참조하십시오.

<168> ADHAPI-세포/PWM-PBMC 및 대조용 PWM-PBMC 세포에 의해 발현된 CTA의 RT-PCR 분석

5-AZA-CdR	-	+
MAGE-1	0/4 ^a	4/4
MAGE-2	0/4	3/4
MAGE-3	0/4	4/4
MAGE-4	1/4	3/4
NY-ESO-1	0/4	4/4
GAGE-1-6	0/4	3/4
SSX-2	0/4	3/4
^a 양성/시험된 것; NT, 시험 안됨		

<170> aMLR에서 ADHAPI-세포/PWM-PBMC 또는 대조용 PWM-PBMC 세포(S)에 의해 자극된 자가이식된(aMLR) PBMC(R)의 증식

<171> 결과에 대해서 도 4를 참조하십시오.

<172> ADHAPI-세포/PWM-PBMC 또는 대조용 PWM-PBMC 세포(S)에 의해 aMLR에서 자극된 자가이식된 PBMC(R)에 의해 방출된 IFN-γ의 ELISA 평가

<173> 결과에 대해서 표 III을 참조하십시오.

<174> 실시예 5

<175> ADHAPI-세포/PHA-PBMC

<176> PBMC 정제

<177> PBMC를 진행된 질병 단계의 암 환자 또는 건강한 대상자의 폐파된 처리된 말초 혈액으로부터 표준 Ficoll-Hypaque 밀도 구배 원심분리에 의해 정제하였다.

<178> PHA-활성화된 PBMC의 제조

<179> PBMC(1.5×10^6 세포/ml)를 PHA-M(10 μg/ml) 및 100 UI/ml rhIL-2와 가하고, 10% 열-불활성화시킨 송아지 태아 혈청(또는 10% 열-불활성화시킨 인간 AB 혈청이 보충된 기본 아이스코브 배지), 2 mM L-글루타민, 100 U/ml 페니

실린, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 스트렙토마이신 설페이트가 보충된 RPMI 1640 배지(완전 배지)에서 5% CO_2 가습 분위기 하에 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 48 시간 동안 배양하였다.

<180> ADHAPI-세포/PHA-PBMC 및 대조용 PHA-PBMC의 제조

<181> PHA-활성화된 PBMC를 매 12 시간마다 1 μM 5-아자-2'-데옥시시티딘(5-AZA-CdR)으로 4 회 약동시키고; 이어서 상기 배양 배지의 반을 PHA-M이 없는 새로운 완전 배지로 대체하고 배양을 추가로 48 시간 동안 진행시켰다. 이어서 세포를 실험 과정에 사용하고/하거나 생육 조건 하에서 냉동시켰다. 대조용 세포(PHA-PBMC)를 5-AZA-CdR의 약동 없이 유사한 실험 조건 하에서 배양하였다.

<182> ADHAPI-세포/PHA-PBMC 및 대조용 PHA-PBMC의 최종 회수

<183> 결과에 대해서, 표 I을 참조하시오.

<184> 자가 혼합된 림프구 반응(aMLR) 및 MLR

<185> ADHAPI-세포/PHA-PBMC 및 대조용 PHA-PBMC 세포(자극인자=S)를 수거하고, 0.5% α -메틸만노피라노사이드가 보충된 헥스 균형 염 용액으로 3 회 세척하고 x-선 처리하였다(50 Gy). aMLR 및 MLR을 위해서 스칼라 농도 (1×10^6 세포/ ml 내지 6×10^4 세포/ ml)의 ADHAPI 세포/PHA-PBMC 또는 대조용 PHA-PBMC를 10% 열-불활성화된 인간 AB 혈청, 2 mM L-글루타민, 100 U/ ml 페니실린, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 스트렙토마이신 설페이트가 보충된 기본 아이스코브의 배지 중의 자가이식된 또는 동종이형의 PBMC(1×10^6 세포/ ml)(반응자=R)에 가하고, 96 웰 U-바닥 플레이트에 200 μl /웰의 최종 부피로 시딩하였다. 5% CO_2 가습 분위기 하에 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 24 시간 동안 배양한 후에, 각각의 웰로부터 배양 상등액 100 μl 를 모으고 사이토카인 분석에 사용될 때까지 -80 $^{\circ}\text{C}$ 에서 즉시 보관하였다. 이어서, 100 μl 의 새로운 배지를 각 웰에 가하고 배양을 추가로 5 일간 진행시키고 이때 배양액을 ^3H -TdR(1 μCi /웰)로 약동시키고(O/N); 이어서 플레이트를 수확하고 R 세포에 의한 ^3H -TdR 결합을 β -계수기로 측정하였다.

<186> ADHAPI-세포/PHA-PBMC 및 대조용 PHA-PBMC의 표현형 프로파일

<187> 결과에 대해서 표 II를 참조하시오.

<188> ADHAPI-세포/PHA-PBMC 및 대조용 PHA-PBMC에 의해 발현된 CTA의 RT-PCR 분석

<189>

5-AZA-CdR	-	+
MAGE-1	0/12 ^a	12/12
MAGE-2	0/3	3/3
MAGE-3	0/12	12/12
MAGE-4	0/4	4/4
NY-ESO-1	0/6	6/6
GAGE-1-6	0/4	4/4
SSX-2	0/6	6/6
^a 양성/시험된 것; NT, 시험 안됨		

<190> aMLR에서 ADHAPI-세포/PWM-PBMC 및 대조용 PWM-PBMC 세포(S)에 의해 자극된 자가이식된 PBMC(R)의 증식

<191> 결과에 대해서 도 5를 참조하시오.

<192> ADHAPI-세포/PHA-PBMC 또는 대조용 PHA-PBMC(S)에 의해 자극된 동종이형(MLR) 및 자가이식된(aMLR) PBMC(R)에 의해 방출된 IFN- γ 의 ELISA 평가

<193> 결과에 대해서 표 III을 참조하시오.

<194> 실시예 6

<195> ADHAPI-세포/PHA+PWM-PBMC

<196> PBMC 정제

- <197> PBMC를 진행된 질병 단계의 암 환자 또는 건강한 대상자의 혈액에서 채취되거나 또는 ACD-응고억제된 말초 혈액으로부터 표준 Ficoll-Hypaque 밀도 구배 원심분리에 의해 정제하였다.
- <198> PHA+PWM-활성화된 PBMC의 제조
- <199> PBMC(1.5×10^6 세포/ml)를 PHA-M($10 \mu\text{g/ml}$), PWM($3 \mu\text{g/ml}$), 100 UI/ml rhIL-2와 가하고, 10% 열-불활성화시킨 인간 AB 혈청(또는 10% 열-불활성화시킨 자가 혈청), 2 mM L-글루타민, 100 U/ml 페니실린, $100 \mu\text{g/ml}$ 스트렙토마이신 설페이트가 보충된 기본 아이스코브 배지(완전 배지)에서 5% CO_2 가습 분위기 하에 37°C 에서 48 시간 동안 배양하였다.
- <200> ADHAPI-세포/PHA+PWM-PBMC 및 대조용 PHA+PWM-PBMC의 제조
- <201> PHA+PWM-활성화된 PBMC를 매 12 시간마다 $1 \mu\text{M}$ 5-아자-2'-데옥시시티딘(5-AZA-CdR)으로 4 회 약동시키고; 이어서 상기 배양 배지의 반을 PHA 또는 PWM이 없는 새로운 완전 배지로 대체하고 배양을 추가로 48 시간 동안 진행시켰다. 이어서 세포를 실험 과정에 사용하고/하거나 생육 조건 하에서 냉동시켰다. 대조용 세포(PHA+PWM-PBMC)를 5-AZA-CdR의 약동 없이 유사한 실험 조건 하에서 배양하였다.
- <202> ADHAPI-세포/PHA+PWM-PBMC 및 대조용 PHA+PWM-PBMC의 최종 회수
- <203> 결과에 대해서, 표 I을 참조하십시오.
- <204> 자가 혼합된 림프구 반응(aMLR) 및 MLR
- <205> ADHAPI-세포/PHA+PWM-PBMC 및 대조용 PHA+PWM-PBMC(자극인자=S)를 수거하고, 0.5% α -메틸만노피라노사이드가 보충된 헥스 균형 염 용액으로 3 회 세척하고 x-선 처리하였다(50 Gy). aMLR 및 MLR을 위해서 스칼라 농도(1×10^6 세포/ml 내지 6×10^4 세포/ml)의 ADHAPI 세포/PHA-rhIL2-+PWM-PBMC 또는 대조용 PHA+PWM-PBMC를 10% 열-불활성화된 인간 AB 혈청, 2 mM L-글루타민, 100 U/ml 페니실린, $100 \mu\text{g/ml}$ 스트렙토마이신 설페이트가 보충된 기본 아이스코브의 배지 중의 자가이식된 또는 동종이형의 PBMC(1×10^6 세포/ml)(반응자=R)에 가하고, 96 웰 U-바닥 플레이트에 $200 \mu\text{l}$ /웰의 최종 부피로 시딩하였다. 5% CO_2 가습 분위기 하에 37°C 에서 6 일 동안 배양한 후에, 각각의 웰로부터 배양 상등액 $100 \mu\text{l}$ 를 모으고 사이토카인 분석에 사용될 때까지 -80°C 에서 즉시 보관하였다. 이어서, $100 \mu\text{l}$ 의 새로운 배지를 각 웰에 가하고 배양액을 ^3H -TdR($1 \mu\text{Ci}$ /웰)로 약동시키고(O/N); 이어서 플레이트를 수확하고 R 세포에 의한 ^3H -TdR 결합을 β -계수기로 측정하였다.
- <206> ADHAPI-세포/PHA+PWM-PBMC 및 대조용 PHA+PWM-PBMC의 표현형 프로파일
- <207> 결과에 대해서 표 II를 참조하십시오.
- <208> ADHAPI-세포/PHA+PWM-PBMC 및 대조용 PHA+PWM-PBMC에 의해 발현된 CTA의 RT-PCR 분석
- <209>

5-AZA-CdR	-	+
MAGE-1	0/7 ^a	7/7
MAGE-2	0/7	7/7
MAGE-3	0/7	7/7
MAGE-4	0/7	7/7
NY-ESO-1	0/7	7/7
GAGE-1-6	0/7	7/7
SSX-2	0/7	7/7
^a 양성/시험된 것.		
- <210> aMLR에서 ADHAPI-세포/PHA+PWM-PBMC 또는 대조용 PHA+PWM-PBMC에 의해 자극된 자가이식된(aMLR) PBMC(R)의 증식
- <211> 결과에 대해서 도 6을 참조하십시오.
- <212> ADHAPI-세포/PHA+PWM-PBMC 또는 대조용 PHA+PWM-PBMC(S)에 의해 자극된 동종이형(MLR) 및 자가이식된

(aMLR)PBMC(R)에 의해 방출된 IFN- γ 의 ELISA 평가

<213> 결과에 대해서 표 III을 참조하십시오.

<214> ADHAPI-세포의 생체 내 종양발생성

<215> 생육성 ADHAPI 세포/PHA-rhIL2-PWM-PBMC(12×10^6) 및 그의 대조군 세포(14×10^6), ADHAPI-세포/CD40L-B(8×10^6) 및 그의 대조군 세포(8×10^6) 또는 x-선-처리된(30 Gy) ADHAPI-세포/PHA-rhIL2PWM-PBMC(12×10^6) 및 그의 대조군 세포(14×10^6), x-선 처리된(50 Gy) ADHAPI-세포/CD40L-B(15×10^6) 및 그의 대조군 세포(18×10^6)의 단일 피하 이종 이식편들은 ADHAPI-세포 투여 후 180 일째에 BALB/c nu/nu 마우스의 주입 부위 또는 원격(임상적으로 검진 가능한) 부위에서 종양 형성을 유도하지도, 일반적인 건강 및 체중에 영향을 미치지도 않았다. 생육성 ADHAPI-세포/B-EBV(5×10^6 /1 차 주입; 1×10^7 /2 차 주입 및 연속 주입) 및 대조용 B-EBV 세포(5×10^6 /1 차 주입; 1×10^7 /2 차 및 연속 주입) 또는 x-선-처리된 ADHAPI-세포/B-EBV(75 Gy)(5×10^6 /1 차 주입; 1×10^7 /2 차 및 연속 주입) 및 x-선-처리된(75 Gy) 대조용 B-EBV 세포(5×10^6 /1 차 주입; 1×10^7 /2 차 및 연속 주입)의 반복된 피하 이종이식편들은 0, 33, 63 및 96 일째에, 상기 1 차 투여 후 180 일째에 BALB/c nu/nu 마우스의 주입 부위 또는 원격(임상적으로 검진 가능한) 부위에서 종양 형성을 유도하지도, 일반적인 건강 및 체중에 영향을 미치지도 않았다. ADHAPI-세포-처리된 동물의 일반적인 건강 및 체중은 처리되지 않았거나 또는 B-EBV 세포를 이식한 대조용 동물에 필적할만하였다.

<216> 다가의 세포 CTA 백신으로서 ADHAPI-세포의 이점

<217> 암 환자에게 공지된 CTA를 가장 효과적으로 투여하기 위해 이미 사용되었거나 또는 지금까지 가정된 주요 전략들에 비해, ADHAPI-세포는 전적으로 새롭고 혁신적인 접근방법을 나타내며 다수의 탁월하고/현저한 이점들을 포함한다. 여기에는 하기의 것들이 포함된다:

<218> ADHAPI-세포 대 유전자 변경되지 않은 세포 CTA 백신

<219> ADHAPI-세포는 다수/모든 메틸화-조절된 CTA를 동시에 발현하므로 새롭고 독특한 APC 백신이고; 내생적으로 합성되는 CTA는 ADHAPI-세포 내에서 HLA I 군 및 HLA II 군 항원 가공 경로 모두에 직접적이고 동시에 접근할 수 있다(Jenne L. et al., Trends Immunol., 22:102-107, 2001).

<220> 따라서, HLA I 군과 HLA II 군 항원 모두의 구조적인 세포막 발현으로 인해, ADHAPI-세포는 CD8+ 및 CD4+ T 자가이식된 림프구 모두에 대해 내생적으로 합성된 CTA의 면역원성 에피토프를 제공하며; 따라서 ADHAPI-세포는 CTA-지배 CTL과 체액 면역 반응을 동시에 유도/증폭시킬 수 있다. 또한, ADHAPI-세포는 아직 확인되지 않고 특성화되지 않은(또한 공지 및 아직 공지되지 않은 CTA의 면역유세 에피토프도 아닌) 숙주의 T 세포 메틸화-조절된 CTA를 발현하여 제공할 수 있다.

<221> ADHAPI-세포와 상반되게, 합성 CTA 펩티드-약동된, 합성 CTA 전체 단백질-약동된, 또는 전체 종양 세포 체제-약동된 자가 APC 백신(예를 들어 수지상 세포, PBMC) 뿐만 아니라 전기융합-발생시킨 종양 세포 수지상 세포 하이브리드(Kugler A. et al., Nat. Med., 6:332-336, 2000. Tureci O. et al., Cancer Res., 56:4766-4772, 1996. Eds)는 하기를 포함한 주요 한계들을 공유한다: i) 전체 합성 CTA 단백질 또는 종양-유도된 CTA의 생체 외-부하된 합성 CTA 펩티드(들)의 미지의 생체 내 운명으로, 이는 숙주의 면역체계에 대한 항원 제공의 수명에 크게 영향을 미칠 수 있고; ii) 세포 백신의 HLA I 군 및/또는 HLA II 군 항원 상으로 생체 외에서 부하될 수 있는 합성 CTA 펩티드(들), 전체 합성 CTA 단백질 또는 종양-유도된 CTA의 제한된 양으로, 이는 투여된 CTA의 면역원성을 크게 제한할 수 있으며; iii) 환자의 HLA 표현형에 의한 제한, 및 지금까지 확인된 CTA의 공지된 HLA I 군 항원의 여전히 비교적 제한된 수와 훨씬 더 많은 HLA II군 항원 제한된 면역원성 에피토프; iv) 적합한 양의 새로운 종양 조직의 입수성으로, 이들 조직은 또한 종양 병변에서 발현되는 다양한 CTA를 충분하게 대리해야 한다(Jenne L. et al., Trends Immunol., 22:102-1-7, 2001).

<222> ADHAPI-세포에 의해 내생적으로 합성된 CTA의 발현은 오래 지속되며; 따라서 생체 외 합성 CTA 펩티드-약동되거나 합성 CTA 전체 단백질-약동되거나 전체 종양 세포 체제-약동된 자가 APC 백신과 모순되게, ADHAPI 세포는 숙주 면역 반응의 연장된 생체 내 자극과 환자에 대한 보다 낮은 투여 횟수를 제공할 수 있다. 이러한 가설은 생체 내의 장기적인 종양발생성의 부재로 인해 생육성의, x-선 비 처리된 세포 백신으로서의 ADHAPI-세포의 투여

에 대한 예견된 가능성에 의해 강화된다. 더욱 또한, 일단 ADHAPI-세포가 생체 내에서 생리적인 사망을 겪을 경우, 상기 세포는 여전히 내생적으로 합성된 CTA 펩티드 및 단백질의 "저장소"로서 작용하여 교차-시동의 면역학적 기전을 통한, 환자의 수지상 세포에 의한 CD8+ T 세포에의 CTA의 HLA I 군-제한된 에피토프의 제공뿐만 아니라 항원 가공의 잘 규명된 외래 경로를 통한, CD4+ T 세포에의 CTA의 HLA II 군-제한된 에피토프의 제공을 추가적이고 효율적으로 부양시킬 수 있다.

<223> ADHAPI-세포는 그의 APC 기능을 보유하며; 실제로, 상기 세포는 자가 및 동종이형 PBMC의 증식과 IFN- γ 방출을 효율적으로 자극하고; 따라서 ADHAPI-세포는 대부분의 경우에 그의 각 대조용 세포에 비해 보다 효능있는 자극 인자이다. 이에 대해서, ADHAPI-세포는 CTA 이외에 그의 각 대조용 세포에 비해 HLA I 군 항원 및/또는 상이한 공동자극/보조 분자를 보다 높은 수준으로 동시에 발현시킬 수 있음도 타당하다. 이러한 증거는 불충분하게 면역원성이고 다수의 공동자극/보조 분자를 구조적으로 발현시키지 않는 자가이식된 종양 세포에 비해, 자가이식된 세포 백신으로서 ADHAPI-세포의 큰 이점을 명백히 나타낸다. 더욱 또한, 생체 외 발생되고 확장된 자가이식된 수지상 세포에 비해, ADHAPI-세포 백신은 완전히 성숙하고 면역성인 APC에 의해 제조되며; 이러한 면은 면역원적 능력보다는 면역허용성에 영향을 미칠 수 있는 세포 백신의 제조에 사용되는 성숙 단계의 수지상 세포에 의해 나타나는 잠재적인 한계를 극복한다.

<224> 다른 세포 백신들에 비해, 다수/모든 메틸화 조절된 CTA를 동시에 발현하는 ADHAPI-세포 백신의 생체 외 제조는 단순하고, 대부분의 경우에 신속하며 성가스러운 생체 외 세포 조작을 필요로 하지 않고, 유전자 조작을 수반하지 않으며, 자가 이식된 종양 조직을 요구하지 않고, 건강한 개인과 암 환자의 PBMC 모두로부터 생산이 매우 가능하다.

<225> 더욱 또한, ADHAPI-세포 체제는 거의 100%에 가깝게 APC에서 탈메틸화-유도성인 모든 조사된 CTA를 발현한다. 이러한 특징들로 인해, ADHAPI-세포 백신의 제조는 품질(예를 들어 소정의 세포 표면 분자의 경우 유식 세포층정에 의해, 소정의 CTA의 경우 RT-PCR에 의해) 및 효능(예를 들어 소정의 CTA의 경우 정량적인 RT-PCR에 의해)에 대한 표준화와 조절이 용이하다. 또한, 지금까지 환자에게 투여하기 위해 매번 새로 제조해야 하고, 따라서 명백한 제조간 가변성(예를 들어 세포 생육성, 백신접종 세포의 표현형 프로파일, 부하된 합성 CTA 펩티드(들) 또는 합성 CTA 전체 단백질 또는 전체 종양 세포 체제의 양, 전기융합에 의한 종양 세포-수지상 세포의 발생 효율)을 발생시키는 다른 세포 백신들에 비해, ADHAPI-세포 백신은 일단 제조되어 생육성, 품질 및 효능에 대해 검사되면 분액화하여 적절히 냉동시키고 치료 목적에 사용될 때까지 생육 조건 하에서 보관할 수 있다. 더욱 또한, 상기는 자가이식된 세포 백신을 약동시키거나 종양 세포-수지상 세포 하이브리드를 생체 외에서 발생시키기 위한 자가이식된 종양 조직의 입수를 필요로 하지 않고, 반복된 백혈구성분 채집술로부터 신속히 다수로 제조할 수 있기 때문에, ADHAPI-세포 백신은 각 환자에 대해 실제적으로 제한되지 않은 치료제 공급원을 나타낸다.

<226> 내생적으로 합성되고 HLA I 군 및 HLA II 군 항원-가공 경로에 직접적이고 동시에 접근할 수 있는 다수/모든 메틸화-조절된 CTA의 동시적인 발현은, 아직 확인되지 않고 특성화되지 않은(또한 공지 및 아직 공지되지 않은 CTA의 면역우세 에피토프도 아닌) 숙주의 T 세포 메틸화-조절된 CTA를 발현하여 제공할 가능성과 따라서 환자의 HLA 표현형에 따른 치료 용도에 사용될 수 있는 지금까지 확인된 CTA의 공지된 HLA I 군 항원- 및 HLA II 군 항원-제한된 면역원성 에피토프의 여전히 제한된 수로 비추어, ADHAPI-세포의 추가적인 이점은 상기가 임의적이고 다수의 HLA I 군 및 HLA II 군 동종특이성과 관련하여 상이한 CTA의 공지 및 여전히 비 공지된 면역원성 에피토프를 가장 동시에 제공할 수 있을 것 같다는 것이다. 따라서, 합성 CTA 펩티드(들)-약동된 또는 합성 CTA 전체 단백질-약동된 세포 백신에 비해, ADHAPI-세포 백신에 의한 처리는 한정된 HLA 표현형을 갖는 환자들로 국한되지 않으며; 따라서 종양 병변이 하나 이상의 CTA를 발현하는 모든 암 환자들에서 그들의 HLA 표현형에 관계없이 ADHAPI-세포 백신에 의한 치료에 후보가 될 수 있다. 이와 관련하여, 지금까지 공지된 CTA 중에서 하나 이상이 상이한 조직유형을 갖는 대부분의 조사된 종양들에서 일반적으로 발현되며; 따라서, ADHAPI-세포에 의한 백신 접종이 대다수의 암 환자들에 적합하다. 중요한 정보는 MAGE, GAGE 또는 NY-ESO-1이 인간 종양의 96%에서 발현된다는 것이다(Cancer Immunol. Immunother. 50:3-15, 2001).

<227> 제한된 양의 단백질(들)이 세포 백신의 HLA I 군 및/또는 HLA II 군 항원 상으로 생체 외에서 부하되어 투여된 CTA의 면역원성을 현저하게 저해하는, 합성 CTA 펩티드(들)-약동화 및 합성 CTA 전체 단백질-약동화된 세포 백신에 비해, 다수의 모든 메틸화-조절된 CTA의 동시적인 발현으로 인해 ADHAPI-세포 백신은 단일 또는 몇몇 CTA에 대한 치료 과정 중에 발생하는 CTA-음성 종양 변체들의 면역 선택성을 극복하고 특정 종양 병변에서 발생하는 독특한 CTA의 구조적으로 이중이고 때때로 하향 조절된 발현을 극복할 수 있다.

<228> ADHAPI-세포 백신은 다수/모든 공지된 메틸화-조절된 CTA를 동시에 발현하고 발현이 DNA 메틸화에 의해 조절되는 여전히 확인되지 않은 CTA를 가장 발현할 것 같은 자가이식된 작용성 APC에 의해 구성되며; 따라서 ADHAPI-세포 백신을 상이한 조직유형의 CTA-양성 종양이 있는 환자에 사용할 수 있다. 이러한 작용 및 표현형적 특징은 현재 사용되는 동종이형 종양 세포 백신(예를 들어 모아진 전체 종양 세포 주의 용해물 또는 그의 정제되지 않은 추출물, 모아진 종양 세포 주에서 흘린 항원)에 비해 뚜렷한 이점을 나타낸다. 실제로, 이들 종양 세포 백신은 불충분한 양의 공지 및 여전히 비 공지된 면역학적으로 관련된 CTA를 함유하지 않거나 또는 함유할 수 있으며, 면역학적 반응에 대해서 CTA와 경쟁할 수도 있는 관련없는 세포 성분들을 함유하고, 동종이형인 증가된 독성을 가질 수도 있으며, 환자의 면역체계에 의한 효율적인 가공을 필요로하고, 동일한 조직유형을 갖는 암에 걸린 환자들에서만 사용될 수 있다.

<229> ADHAPI-세포 대 유전자 변경된 세포 CTA 백신

<230> ADHAPI-세포의 제조는 형질감염 또는 형질도입에 따른 소정의 CTA를 발현하는 유전자 변경된 세포 백신의 생산에 필요한 자가이식된 수지상 세포 또는 다른 자가이식된 APC의 생체 외 유전자 조작을 수반하지 않는다. 더욱또한, ADHAPI-세포에 비해, 다수의 제한들이 유전자 변경된 세포 백신에 영향을 미친다, 즉 여기에는 하기의 것들이 포함된다: i) 이용할 수 있는 형질감염 방법의 비교적 제한된 효율; ii) 세포 형질도입에 사용되는 바이러스 벡터의 항원에 대한 세포 면역 반응의 유도(이로 인해 유전자 변경된 백신접종 세포의 파괴가 일어난다); iii) 백신 투여를 방해하는 기존 또는 백신접종 유도된 중화 항체의 존재; iv) 형질도입된 세포의 생육성, 성숙 및 항원 제공 능력에 대한 바이러스 벡터의 직접적인 영향(Jenne L. et al., Trends Immunol., 22:102-107, 2001).

표 I

<231>

ADHAPI-세포 및 대조용 세포의 회수		
세포 유형	ADHAPI-세포	대조용 세포
B-EBV ^a	114±25	175±51
PWM-B ^b	16±5	38±17
CD40L-B ^c	75±27	96±5
PWM-PBMC ^d	26±11	45±16
PHA-PBMC ^e	23±10	63±25
PHA+PWM-PBMC ^f	35±28	63±36

^a 데이터는 3(a), 4(b), 4(c), 4(d), 7(e) 및 5(f)의 독립된 실험에서 제조에 사용된 세포의 수(100%)에 대한 회수된 세포의 평균%±SD를 나타낸다.

표 II

<232>

자가 대조용 세포 ^a 에 대한 ADHAPI-세포의 표현형 프로파일						
항원	ADHAPI 세포					
	CD40L-B ^{a†}	B-EBV ^b	Pwm-PBMC ^c	PWM-B ^d	PHA-PBMC ^e	PHA+PWM-PBMC ^f
HLA I군	ns ^f	ns	ns	ns	ns	0.02 ^g
HLA-A좌	ns	ns	nt ^h	nt	0.004	nt
HLA-B좌	ns	ns	nt	nt	0.05	nt
HLA-A 대립유전자	0.01	ns	ns	ns	0.008	0.006
HLA-B 대립유전자	ns	ns	nt	nt	ns	nt

CD40	ns	0.01	ns	0.005	ns	ns
CD54	0.03	0.01	ns	ns	0.003	ns
HLA II 군	ns	ns	ns	0.03	ns	0.05
CD56	nt	nt	nt	ns	nt	nt
CD58	ns	ns	nt	nt	ns	ns
CD59	nt	nt	ns	ns	nt	0.04
CD80	0.05	ns	ns	ns	ns	ns
CD81	nt	0.002	nt	nt	ns	nt
CD86	0.008	nt	ns	ns	nt	ns

* 데이터는 6(a), 6(b), 4(c), 4(d), 6(e) 및 2(f)의 독립적인 실험에서 유식 세포측정에 의해 수득된 평균 형광 강도의 평균 값을 스튜던츠 짝 t-시험에 의해 비교하여 수득되었다. 통계학으로 의미있는 차이는 자가이식된 대조용 세포와 비교하여 ADHAPI-세포에 대한 조사된 항원의 상향조절된 발현을 일정하게 나타내었다.

^f 의미없음;

^g p 값;

^h 시험 안됨;

[†] ADHAPI-세포/CD40L-B=82-100% CD20+; 대조용 CD40L-B 세포=87-99% CD20+.

표 III

<233>

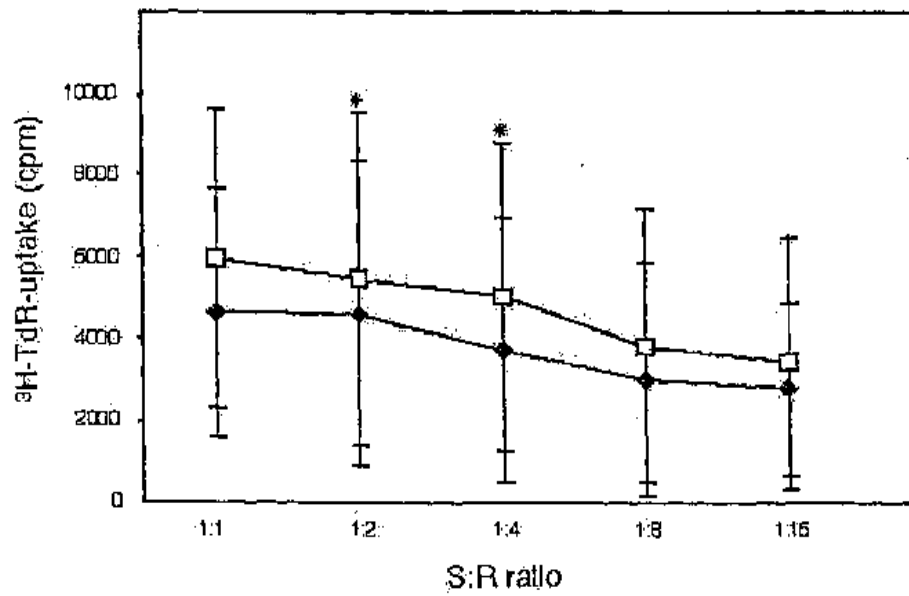
ADHAPI-세포(S) 또는 대조용 세포(S)에 의해 자극된 자가이식(R)(aMLR) 및 동종이형(MLR) PBMC(R)에 의해 방출된 IFN- γ 의 효소-결합된 면역흡수성 분석(ELISA) 평가*				
세포 유형	AMLR		MLR	
	대조용 세포	ADHAPI-세포	대조용 세포	ADHAPI-세포
B-EBV ^a	1770 \pm 919	2360 \pm 85 0.5 ^g	nt ^h	nt
PWM-B ^b	4330 \pm 629	5530 \pm 804 0.06	4040 \pm 721	4950 \pm 476 0.08
CD40L-B ^c	330 \pm 197	429 \pm 153 0.1	nt	nt
PWM-PBMC ^d	1500 \pm 135	1520 \pm 175 0.6	nt	nt
PHA-PBMC ^e	140 \pm 70	956 \pm 436 0.1	267 \pm 119	1040 \pm 545 0.07
PHA+PWM+PBMC ^f	790 \pm 236	831 \pm 244 0.09	819 \pm 184	830 \pm 169 0.7

* 데이터는 2 개의 (a), 4 개의 (b), 4 개의 (c), 4 개의 (d), 3 개의 (e) 및 4 개의 (f)의 독립적인 실험에서 방출된 IFN- γ (pg/ml)의 평균값 \pm SD를 나타낸다. S/R 비는 3:1(a), 1:1(b), 1:2(e), 1:1(d), 1:1(e), 1:2(f)이었다. IFN- γ 방출을 배양 시작 후 24 시간(a), 6 일(b), 24 시간(c), 6 일(d), 24 시간(e) 및 6 일(f)째에 분석하였다;^g 스튜던츠 짝 t-시험에 의해 수득된 p 값 대 대조용 세포; ^h 시험 안됨.

도면

도면1

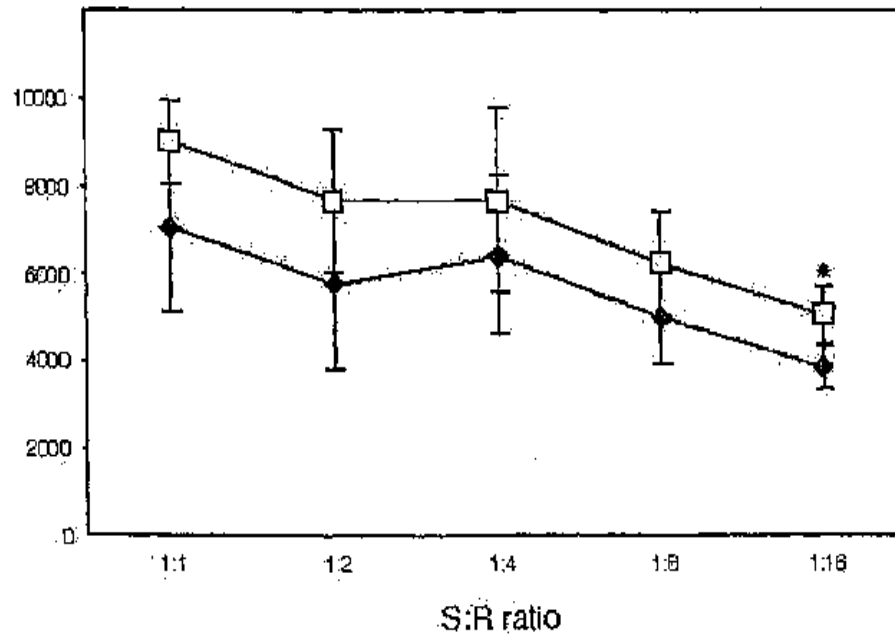
ADHAPI-세포 /B-EBV() 또는 대조용 (◆) B-EBV 세포 (S)에 의해 자극된 자가 이식상 (aMLR) PBMC(R)의 증식



데이터는 4 개의 독립적인 실험들에서 수득한 [3H]-THR 흡수의 평균 값 (cpm) ± SD를 나타낸다.

도면2

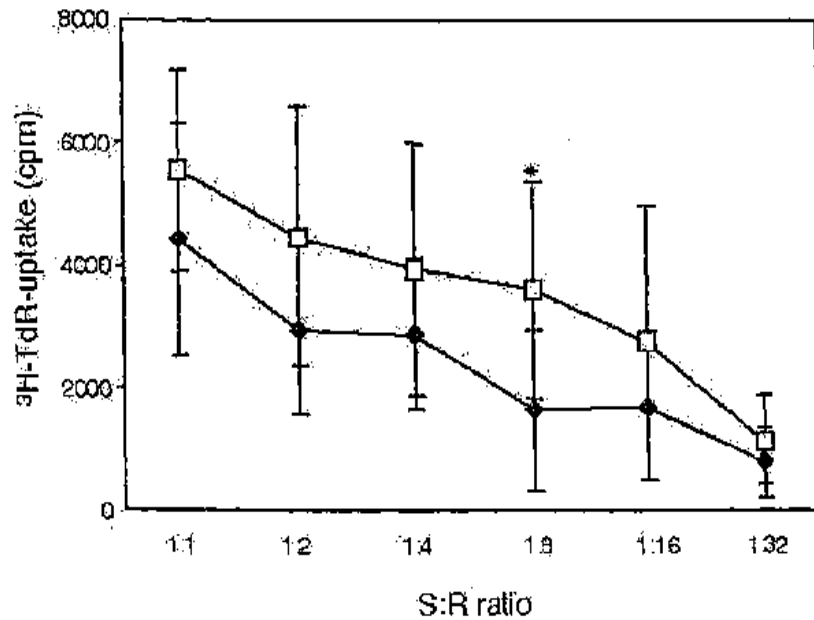
ADHAPI-세포 /PWM-B() 또는 대조용 (◆) PWM-B 세포 (S)에 의해 자극된 자가 이식성 (aMLR) PBMC(R)의 증식



데이터는 4 개의 독립적인 실험들에서 수득한 [3H]-THR 흡수의 평균 값 (cpm) ± SD 를 나타낸다 .

도면3

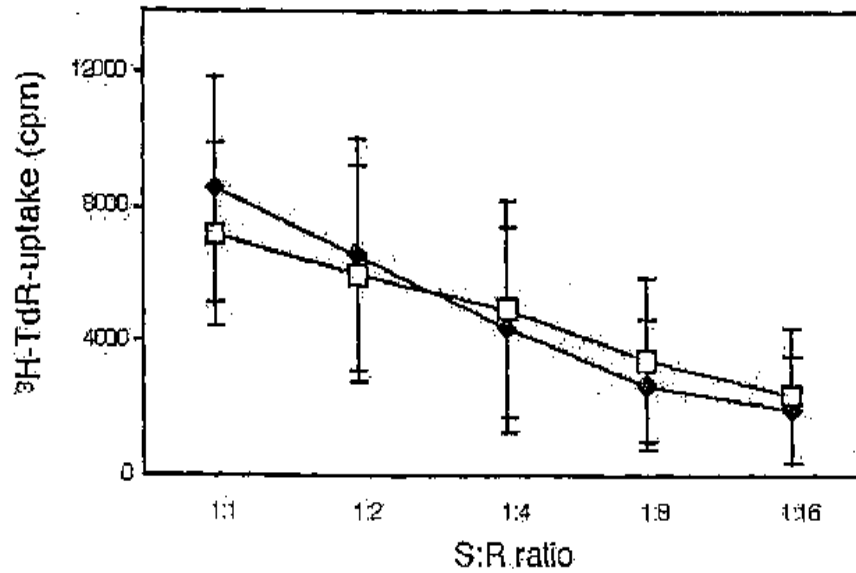
ADHAPI-세포 /CD40L-B() 또는 대조용 (◆) CD40L-B 세포 (S)에 의해 자극된 자가 이식성 (aMLR) PBMC(R)의 증식



데이터는 4 개의 독립적인 실험들에서 수득한 [3H]-THR 흡수의 평균 값 (cpm) ± SD를 나타낸다.

도면4

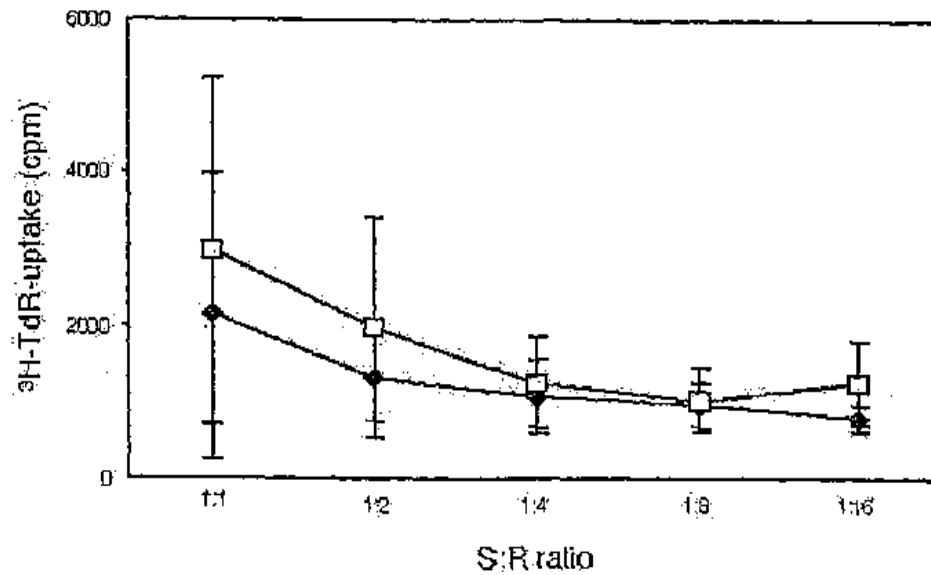
ADHAPI-세포 /PWM-PBMC() 또는 대조용 (◆) PWM-PBMC 세포 (S)에 의해 자극된 동종이형 (MLR) 및 자가이식성 (aMLR) PBMC(R)의 증식



데이터는 4 개의 독립적인 실험들에서 수득한 [3H]-THR 흡수의 평균 값 (cpm) ± SD를 나타낸다.

도면5

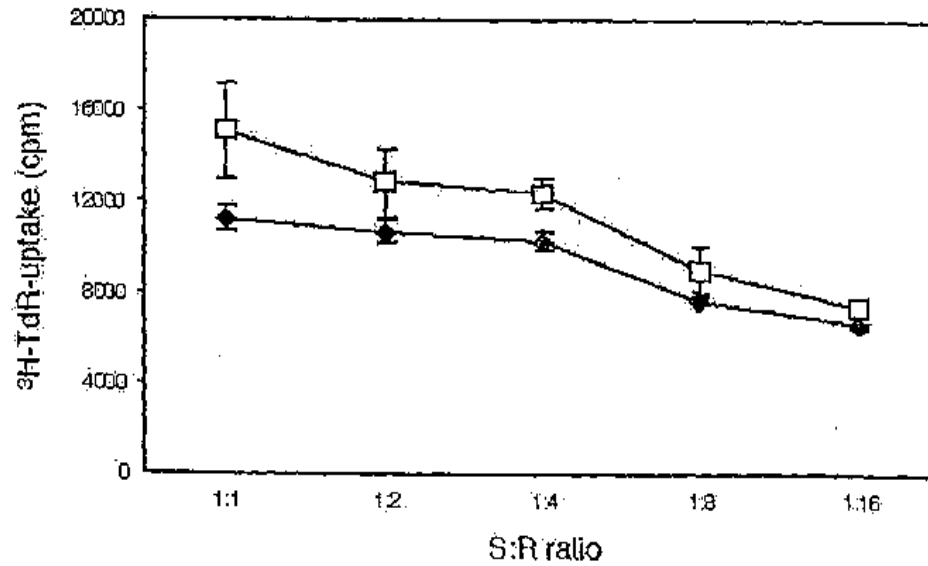
ADHAPI-세포 /PHA-PBMC() 또는 대조용(◆) PHA-PBMC에 의해 자극된 자가이식상 (aMLR) PBMC(R)의 증식



데이터는 4 개의 독립적인 실험들에서 수득한 [3H]-THR 흡수의 평균 값 (cpm) ± SD를 나타낸다.

도면6

ADHAPI- 세포 /PHA+PWM-PBMC() 또는 대조용 (◆)
PHA+PWM-PBMC(S)에 의해 자극된 자가이식성 (aMLR) PBMC(R)의 증식



데이터는 4 개의 독립적인 실험들에서 수득한 [3H]-THR 흡수의 평균 값 (cpm) ± SD 를 나타낸다.