



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0071689
(43) 공개일자 2019년06월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0783 (2010.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01) A61P 31/20 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0636 (2013.01)
A61K 39/12 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-7009766
(22) 출원일자(국제) 2017년09월15일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2019년04월04일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2017/073274
(87) 국제공개번호 WO 2018/050818
국제공개일자 2018년03월22일
(30) 우선권주장
62/395,440 2016년09월16일 미국(US)
15/331,659 2016년10월21일 미국(US)

(71) 출원인
베이롤 칼리지 오브 메드신
미합중국, 텍사스 77030, 휴스턴, 원 베이롤 플라
자
(72) 발명자
라모스 카를로스 에이.
미국, 텍사스 77019, 휴스턴, 3009 아발론 플레이
스
루니 클리오나 엠.
미국, 텍사스 77401, 벨레르, 1802 윌로우 스트리
트
나라라 니하리카
미국, 텍사스 77382, 더 우드랜즈, 38엔 레간 미
드 서클
(74) 대리인
손민

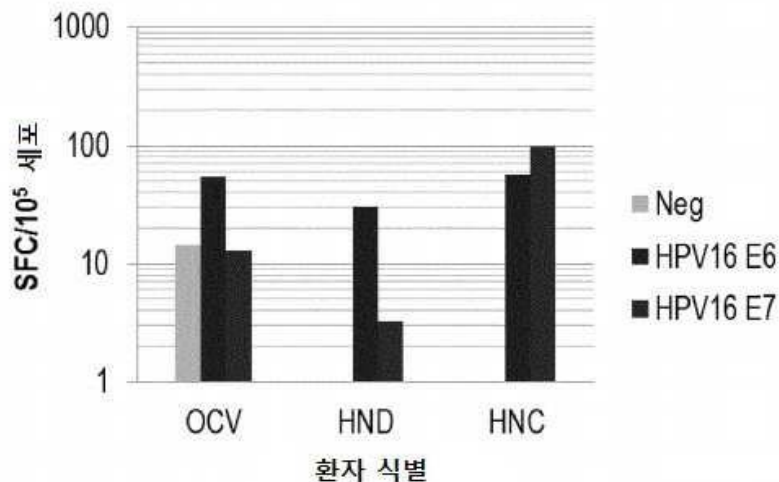
전체 청구항 수 : 총 42 항

(54) 발명의 명칭 HPV-특이적 T-세포의 생성

(57) 요약

본 개시의 구현예는 인간 파필로마바이러스 감염 및 이와 연관된 질병에 대한 면역요법을 위한 방법 및 조성물에 관한 것이다. 특정 구현예에서, 방법은 IL-6 및/또는 IL-12가 아닌, IL-7 및 IL-15를 사용하는 자극 단계를 포함하는, HPV16 및/또는 HPV18의 하나 이상의 항원을 표적하는 면역 세포의 생산에 관한 것이다. 다른 특정 구현예는 동시-자극 세포 및 특정 항원 제시 세포와 같은 특정 세포의 존재하에서의 자극을 이용한다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

A61P 31/20 (2018.01)

A61K 2039/5158 (2013.01)

A61K 2039/55527 (2013.01)

C12N 2501/2306 (2013.01)

C12N 2501/2307 (2013.01)

C12N 2501/2312 (2013.01)

C12N 2501/2315 (2013.01)

C12N 2502/1121 (2013.01)

C12N 2710/20034 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

T-세포를 자극하는 방법으로서, 인터류킨 (IL)-7 및 IL-15의 존재 및 IL-6 및/또는 IL-12의 부재하에서 T-세포를 항원 제시 세포(antigen presenting cell)로 자극하는 것을 포함하고, 상기 항원 제시 세포가 하나 이상의 펩티드에 이전에 노출되었고, 상기 펩티드가 인간 파필로마바이러스 (HPV)의 하나 이상의 단백질 서열의 적어도 일부에 상응하는 서열을 포함하는 것인, 방법.

청구항 2

HPV-연관 질병을 위한 치료적 T-세포를 생산하는 방법으로서,

IL-7 및 IL-15 중의 하나 이상의 존재 및 IL-6 및/또는 IL-12의 부재하에서 T-세포를 항원 제시 세포로 자극하는 단계로서, 상기 항원 제시 세포가 하나 이상의 펩티드에 이전에 노출되었고, 상기 펩티드가 HPV의 하나 이상의 단백질 서열의 적어도 일부에 상응하는 서열을 포함하는 것인, 단계를 포함하고,

상기 자극이 HPV-연관 질병에 대해 치료적인 T-세포를 생산하는 것인, 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, T-세포가 T-세포의 이전 자극으로부터, 선택적으로 PBMCs의 개체군 내부로부터 수득되는 것인, 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, T-세포의 이전 자극이 IL-7 및 IL-15의 존재, 및 IL-6 및/또는 IL-12의 존재하에서 T-세포를 항원 제시 세포로 자극하는 것을 포함하고, 상기 항원 제시 세포가 하나 이상의 펩티드에 이전에 노출되었고, 상기 펩티드가 HPV의 하나 이상의 단백질 서열의 적어도 일부에 상응하는 서열을 포함하는 것인, 방법.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 T-세포의 자극 전에, 방법이 말초 혈액 T-세포를 생산하기 위해, IL-7 및 IL-15의 존재, 및 IL-6 및/또는 IL-12의 존재하에서 T-세포를 항원 제시 세포로 자극하는 것을 추가로 포함하고, 상기 항원 제시 세포가 하나 이상의 펩티드에 이전에 노출되었고, 상기 펩티드가 HPV의 하나 이상의 단백질 서열의 적어도 일부에 상응하는 서열을 포함하는 것인, 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 제시 세포가 수지상 세포, B-블라스트 (B-blasts), 또는 PBMCs인 것인, 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, T-세포가 말초 혈액 단핵 세포 (PBMCs)의 개체군 내에 존재하거나 이로부터 수득 또는 분리되는 것인, 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 개체군 내 PBMCs가 비-부착성 PBMCs인 것인, 방법.

청구항 9

HPV 또는 HPV 항원에 특이적인 T-세포를 자극하는 방법으로서, IL-7 및 IL-15의 존재 및 동시-자극 세포의 존재하에서 HPV 또는 HPV 항원에 특이적인 T-세포를 항원 제시 세포로 자극하는 단계를 포함하고, 상기 항원 제시 세포가 하나 이상의 펩티드에 이전에 노출되었고, 상기 펩티드가 HPV의 하나 이상의 단백질 서열의 적어도 일부

에 상응하는 서열을 포함하는 것인, 방법.

청구항 10

HPV-연관 질병에 대한 치료적 T-세포를 생산하는 방법으로서, IL-7 및 IL-15중의 하나 이상의 존재 및 동시-자극 세포의 존재하에서 HPV 또는 HPV 항원에 특이적인 T-세포를 항원 제시 세포로 자극하는 단계를 포함하고, 상기 항원 제시 세포가 하나 이상의 펩티드에 이전에 노출되었고, 상기 펩티드가 HPV의 하나 이상의 단백질 서열의 적어도 일부에 상응하는 서열을 포함하고, 상기 자극이 HPV-연관 질병에 대해 치료적인 T-세포를 생산하는 것인, 방법.

청구항 11

제9항 또는 제10항에 있어서, 항원 제시 세포가 활성화 T 세포, 수지상 세포, B-블라스트, 또는 PBMCs인 것인, 방법.

청구항 12

제9항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 동시-자극 세포가 CD80+, CD86+, CD83+, 4-1BBL+, CD40+ 세포, OX40+ 세포, 또는 이들의 조합인 것인, 방법.

청구항 13

하기 단계를 포함하는, HPV-연관 질병에 대한 치료적 T-세포를 생산하는 방법:

(i) 말초 혈액 세포를 자극하는 단계로서, 상기 방법이 IL-7 및 IL-15의 존재 및 선택적으로 IL-6 및/또는 IL-12의 부재하에서 말초 혈액 T-세포를 항원 제시 세포로 자극하는 것을 포함하고, 상기 항원 제시 세포가 하나 이상의 펩티드에 이전에 노출되었고, 상기 펩티드가 HPV의 하나 이상의 단백질 서열의 적어도 일부에 상응하는 서열을 포함하는 것인, 단계; 및

(ii) IL-7 및 IL-15의 존재, 및 동시-자극 세포의 존재하에서 (i)로부터 수득된 T-세포를 항원 제시 세포로 자극하는 단계로서, 상기 항원 제시 세포가 하나 이상의 펩티드에 이전에 노출되었고, 상기 펩티드가 HPV의 하나 이상의 단백질 서열의 적어도 일부에 상응하는 서열을 포함하는 것인, 단계.

청구항 14

제13항에 있어서, 단계 (ii) 이전에 (i)로부터 수득된 T-세포가 동시-자극 세포의 존재하에서가 아닌 IL-7 및 IL-15의 존재하에서 재-자극될 수 있는 것인, 방법.

청구항 15

제13항 또는 제14항에 있어서, (i)에 사용된 항원 제시 세포가 수지상 세포 (DC), B-블라스트 (BB) 또는 PBMCs인 것인, 방법.

청구항 16

제13항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, (ii)에 사용된 항원 제시 세포가 활성화 T 세포, 수지상 세포 (DC) 또는 B-블라스트 (BB)인 것인, 방법.

청구항 17

제13항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 동시-자극 세포가 CD80+, CD86+, CD83+, 4-1BBL+, CD40+ 세포, OX40+ 세포, 또는 이들의 조합인 것인, 방법.

청구항 18

하기 단계를 포함하는, HPV-연관 질병에 대한 치료적 T-세포를 생산하는 방법:

(i) 말초 혈액 세포를 자극하는 단계로서, 상기 방법이 인터류킨 (IL)-7 및 IL-15의 존재 및 선택적으로 IL-6 및/또는 IL-12의 부재하에서 말초 혈액 T-세포를 항원 제시 세포로 자극하는 것을 포함하고, 상기 항원 제시 세포가 하나 이상의 펩티드에 이전에 노출되었고, 상기 펩티드가 HPV의 하나 이상의 단백질 서열의 적어도 일부에

상응하는 서열을 포함하는 것인, 단계;

(ii) 인터류킨 (IL)-7 및 IL-15의 존재 및 선택적으로 IL-6 및/또는 IL-12의 부재하에서 (i)로부터 수득된 T-세포를 항원 제시 세포로 자극하는 단계로서, 상기 항원 제시 세포가 하나 이상의 펩티드에 이전에 노출되었고, 상기 펩티드가 HPV의 하나 이상의 단백질 서열의 적어도 일부에 상응하는 서열을 포함하고, (ii)가 선택적으로 1회 이상 반복되는 것인, 단계; 및

(iii) 인터류킨 (IL)-7 및 IL-15의 존재, 및 동시-자극 세포의 존재하에서 (ii)로부터 수득된 T-세포를 항원 제시 세포로 자극하는 단계로서, 상기 항원 제시 세포가 하나 이상의 펩티드에 이전에 노출되었고, 상기 펩티드가 HPV의 하나 이상의 단백질 서열의 적어도 일부에 상응하는 서열을 포함하고, (iii)가 선택적으로 1회 이상 반복되는 것인, 단계.

청구항 19

제18항에 있어서, (i) 및 (ii)에 사용된 항원 제시 세포가 DC, BB, 또는 PBMCs인 것인, 방법.

청구항 20

제18항 또는 제19항에 있어서, (iii)에 사용된 항원 제시 세포가 활성화 T 세포, DC, BB, 또는 PBMCs인 것인, 방법.

청구항 21

제18항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 동시-자극 세포가 CD80+, CD86+, CD83+, 4-1BBL+, CD40+ 세포, OX40+ 세포 또는 이들의 조합인 것인, 방법.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, HPV가 HPV16 또는 HPV18인 것인, 방법.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 펩티드가 E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, L1, 및 L2 중 하나 이상에 상응하는 서열을 포함하는 것인, 방법.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, HPV-연관 질병이 암이고 펩티드가 E6 및 E7 중 하나 또는 둘 다에 상응하는 서열을 포함하는 것인, 방법.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 펩티드가 하기에 상응하는 서열을 포함하는 것인, 방법:

- a) HPV18 E6 단백질 및/또는 HPV18 E7 단백질, 및/또는
- b) HPV16 E6 단백질 및/또는 HPV16 E7 단백질.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 펩티드가 적어도 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개 이상의 아미노산 길이의 펩티드를 포함하는 것인, 방법.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 펩티드가 15개 아미노산 길이의 펩티드를 포함하는 것인, 방법.

청구항 28

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 펩티드가 라이브러리를 형성하고 상기 라이브러리 내 펩티드가 다른 펩티드와 11개 아미노산으로 순서대로 중첩하는 것인, 방법.

청구항 29

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법에 의해 생산된 치료학적 유효량의 T-세포가 HPV에 노출되었거나 HPV-연관 질병을 갖는 개체(individual)에게 제공되는 것인, 방법.

청구항 30

제29항에 있어서, HPV-연관 질병이 종양(neoplasm)을 포함하는 것인, 방법.

청구항 31

제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법에 의해 생산된 치료학적 유효량의 T-세포가 HPV16, HPV18 또는 둘 다에 노출되었거나, HPV16-연관 및/또는 HPV18-연관 질병을 갖는 개체에게 제공되는 것인, 방법.

청구항 32

제31항에 있어서, HPV16-연관 및/또는 HPV18-연관 질병이 종양을 포함하는 것인, 방법.

청구항 33

제31항 또는 제32항에 있어서, 종양이 암인 것인, 방법.

청구항 34

제33항에 있어서, 암이 자궁경부암, 항문암, 외음부암, 질암, 음경암, 구강인두암, 코인두암종, 후두 유두종증, 후두암, 두경부암, 또는 이들의 임의 부위의 이형성증인 것인, 방법.

청구항 35

제33항 또는 제34항에 있어서, 개체가 추가의 암 요법을 받았거나, 받고 있거나, 또는 받을 것인, 방법.

청구항 36

제35항에 있어서, 추가의 암 요법이 수술, 방사선, 호르몬 요법, 화학요법, 면역요법, 또는 이들의 조합인 것인, 방법.

청구항 37

제33항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 개체가 HPV-연관 암을 갖는 것으로 결정되는 것인, 방법.

청구항 38

제33항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 개체가 HPV16-연관 암을 갖는 것으로 결정되는 것인, 방법.

청구항 39

제33항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 개체가 HPV18-연관 암을 갖는 것으로 결정되는 것인, 방법.

청구항 40

적응성 세포 면역요법의 방법에 사용하기 위한 T-세포로서, T-세포가 제1항 내지 제39항 중 어느 한 항에 따른 말초 혈액 또는 T-세포를 자극하는 방법 또는 치료적 T-세포를 생산하는 방법에 의해 획득되거나, 이에 의해 획득 가능하거나, 또는 이의 산물이고, 적응성 세포 면역요법의 방법이 대상체에 T-세포를 투여하는 것을 포함하는 것인, T-세포.

청구항 41

대상체에 T-세포를 투여하는 것을 포함하는, 적응성 세포 면역요법의 방법에 사용하기 위한 의약품의 제조에 있어서 T-세포의 용도로서, T-세포가 제1항 내지 제39항 중 어느 한 항에 따른 말초 혈액 또는 T-세포를 자극하는 방법 또는 치료적 T-세포를 생산하는 방법에 의해 획득되거나, 이에 의해 획득 가능하거나, 또는 이의 산물인 것인, 용도.

청구항 42

약제학적 조성물, 의약품 또는 백신을 제조하는 방법으로서, 제1항 내지 제39항 중 어느 한 항에 따라 말초 혈액 또는 T-세포를 자극하거나 치료적 T-세포를 생산하고, 수득된 세포를 약제학적으로 허용가능한 담체, 보조제, 희석제 또는 부형제와 혼합하는 것을 포함하는, 방법.

발명의 설명**기술 분야**

[0001] 연방 후원 연구 또는 개발에 관한 진술

[0002] 본 발명은 국립암연구소 (National Cancer Institute)가 수여한 P50 CA097007 및 P01 CA94237에 따른 정부 지원으로 이루어졌다.

[0003] 기술 분야

[0004] 본 발명은 적어도 면역학, 세포 생물학, 분자 생물학, 및 암 치료제를 비롯한 의학 분야에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 인간 파필로마바이러스 (HPV)는 피부 또는 점막의 각질 세포에서 생산적인 감염을 확립하는 DNA 바이러스이다. 170개가 넘는 유형의 HPV가 있는데, HPV 유형의 아개체군은 발암성으로, 예를 들어, 자궁경부 상피내 종양 (CIN), 외음부 상피내 종양 (VIN), 음경 상피내 종양 (PIN), 및/또는 항문 상피내 종양 (AIN)을 비롯해, 생식기 종양 (neoplasia)으로 발전할 수 있는 고-위험성의 성적으로 전파되는 유형을 포함한다. HPV-유도성 암은 바이러스 서열이 숙주 세포의 세포 DNA 내로 통합될 때 발생한다. E6 및 E7과 같은 HPV "초기" 유전자 중 일부가 종양 성장 및 악성 형질전환을 촉진하는 종양유전자로 작용한다.

[0006] Ramos 등 (J Immunother 2013; 36: 66-76)은 HPV16 E6 및 E7에 특이적인 T-세포를 생성하기 위해 말초 혈액 단핵 세포를 자극하는 방법을 기술한다. 간략히 설명하면, 상기 방법은 세포가 사이토카인 IL-6, IL-7, IL-12 및 IL-15의 조합의 함유 또는 비함유 CTL 배지에서 배양되는 수지상 세포로 말초 혈액 단핵 세포의 자극, IL-2가 보충된 동시-배양액 중의 2차 자극, 및 IL-15의 존재하에서 펩믹스-로딩된 (pepmix-loaded) 부속 항원 제시 세포 (antigen presenting cell) (예컨대, B-블라스트)로의 매주 자극을 포함한다. 이 참고문헌은 사이토카인 IL-6, IL-7, IL-12 및 IL-15의 조합이 검출가능한 T-세포 반응을 위해서, 환자 시료로부터 HPV-특이적 T-세포의 증폭을 요구함을 교시한다.

[0007] 본 발명은, 예를 들어, 적어도 HPV16 및 HPV18과 연관된 질병을 포함하는, HPV-연관 질병을 치료하기 위해 당해 분야의 오래 지속된 필요성에 대한 경감을 제공한다.

발명의 내용**해결하려는 과제**

[0008] 본 발명은 특정 표적을 면역원성으로 인식하도록 변형된 면역계 세포에 관한 방법 및 조성물에 관한 것이다. 일부 구현예에서, 본 발명은 개체(individual)에서 면역 반응을 촉발하는 생물학적 모이어티를 표적하는 면역 세포 (세포독성 T-림프구 (CTL, 세포독성 T-세포로도 언급됨))의 발생에 관한 것이다. 특정 구현예에서, 본 발명은 HPV 질병-연관 항원을 포함하는 HPV 항원을 표적하는 세포독성 T-세포의 발생에 관한 것이다. 일부 경우에, 세포독성 T-세포의 혼합물이 생산되고, 상기 혼합물은, 일부 경우에, 하나보다 많은 HPV 유형의 하나보다 많은 항원을 포함하는, 하나보다 많은 HPV 항원을 표적한다.

[0009] 본 발명의 구현예는 HPV에 감염되거나, 예를 들어 암을 포함하는, HPV-연관 질병을 갖는 개체에게 치료법을 제공하기 위한 방법 및 조성물에 관한 것이다. "HPV-연관 질병"은 HPV 감염에 의해 유발되거나 악화되는 질병, HPV 감염이 위험 인자인 질병, 및/또는 HPV 감염이 질병 개시, 발달, 진행 또는 중증도와 연관되는 질병일 수 있다. HPV-연관 질병은 본 발명의 방법 및 조성물이 치료 효과 (예컨대, 질병의 발달/진행의 억제, 질병의 지연/예방된 개시, 질병 증상의 감소된 중증도, 질병 증상의 역전, 및/또는 증가된 생존률)를 제공하는 질병일 수 있다. 본 발명의 방법 및 조성물의 치료적 유용성이 본질적으로 HPV-감염 세포의 수의 감소로부터 이익을 얻을

수 있는 임의의 질환/병태로 확장됨은 당해 분야의 숙련자에게 자명할 것이다. 특정 구현예에서, 본 발명은 HPV-연관, 예컨대, HPV16-연관 및/또는 HPV18-연관된, 의학적 병태 (암 포함)를 표적할 수 있고 이에 대해 치료적인 적응성 세포 면역요법(adoptive cellular immunotherapy)을 위한 방법 및 조성물에 관한 것이다.

[0010] 특정 양태에서, 본 발명은 HPV, 예컨대, HPV16 및/또는 HPV18로부터의 항원을 표적하는 복수의 T-세포의 발생에 관한 것이다. 본 발명은 HPV, 예컨대, HPV16 및/또는 HPV18 항원에 대한 특이성을 갖는 T 세포주를 생성하기 위한 방법에 유의미하고 비-자명한 개선을 제공한다.

[0011] 본 발명의 일부 구현예에서, 개체는 본 발명의 방법 및/또는 조성물을 필요로 한다. 특정 구현예에서, 개체는 HPV, 예컨대, HPV16 및/또는 HPV18에 노출되었거나 (이들의 존재가 개체에게 알려지거나 알려지지 않을 수 있음), 개체는 HPV, 예컨대, HPV16 및/또는 HPV18에 노출된 것으로 의심되거나 그에 노출될 위험이 있다. 특정 구현예에서, 개체는 HPV-연관 질병, 예컨대, 암을 포함하는, HPV16-연관 및/또는 HPV18-연관 질병을 갖는 것으로 의심되거나 이를 가질 위험이 있다.

[0012] 방법의 일부의 특정 구현예에서, 특정 HPV, 예컨대, HPV16 및/또는 HPV18 항원(들)은 특정 항원(들)의 일부 또는 전부에 걸쳐 있는 하나 이상의 펩티드의 형태로 항원-제시 세포 (APCs)에 제시된다. 항원 펩티드는 펩믹스(pepmix)로 지칭될 수 있는, 펩티드 혼합물의 라이브러리에서 항원-제시 세포에 제공될 수 있다. 본 발명의 특정 양태에서, APCs에의 노출에 대한 다양한 펩믹스의 풀링(pooling)이 존재한다. 항원을 발현하는 APCs는 특정 HPV 항원(들)에 특이적인 T-세포의 자극을 초래하는 특정 조건하에서 말초 혈액 T-세포에 노출될 수 있다.

[0013] 본 발명의 일부 양태 및 구현예는 HPV-특이적 T-세포의 생성 및/또는 증폭에 관한 것이다.

[0014] 제1 양태에서, 본 발명은 말초 혈액 세포, 바람직하게는 말초 혈액 T-세포를 자극하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 인터류킨 (IL)-7 및 IL-15의 존재 및, 적어도 일부 경우에, IL-6 및/또는 IL-12의 부재하에서 말초 혈액 T-세포를 항원 제시 세포로 자극하는 것을 포함하고, 상기 항원 제시 세포는 하나 이상의 펩티드에 이전에 노출되었고, 상기 펩티드는 HPV의 하나 이상의 단백질 서열의 적어도 일부에 상응하는 서열을 포함한다. 본원에 기술된 다양한 양태에 따르면, 자극/배양이 소정의 사이토카인의 "존재"하에서 수행되는 경우, 관련 사이토카인 (예컨대, 제조함 및/또는 외인성 사이토카인)이 자극/배양에 첨가되었을 수 있다. 자극/배양이 소정의 사이토카인의 "부재"하에서 수행되는 경우, 관련 사이토카인 (예컨대, 제조함 및/또는 외인성 사이토카인)은 자극/배양에 첨가되지 않았을 것이다.

[0015] 일부 구현예에서, 인간 파필로마바이러스 (HPV)-연관 질병(들)에 대한 치료적 T-세포를 생산하는 방법이 제공되고, 상기 방법은 인터류킨 IL-7 및 IL-15의 하나 이상의 존재 및, 적어도 일부 경우에, IL-6 및/또는 IL-12의 부재하에서 말초 혈액 T-세포를 항원 제시 세포로 자극하는 단계를 포함하고, 상기 항원 제시 세포는 하나 이상의 펩티드에 이전에 노출되었고, 상기 펩티드는 HPV의 하나 이상의 단백질 서열의 적어도 일부에 상응하는 서열을 포함하고, 상기 자극은 HPV-연관 질병에 치료적인 T-세포를 생산한다.

[0016] 일부 구현예에서, 자극되는 말초 혈액 T-세포는 말초 혈액 세포의 이전 자극으로부터 수득된다. 이전 자극은 IL-7 및 IL-15의 존재, 및 적어도 일부 경우에 IL-6 및/또는 IL-12의 존재하에서 말초 혈액 세포를 항원 제시 세포로 자극하는 것을 포함하고, 상기 항원 제시 세포는 하나 이상의 펩티드에 이전에 노출되었고, 상기 펩티드는 HPV의 하나 이상의 단백질 서열의 적어도 일부에 상응하는 서열을 포함한다.

[0017] 이와 같이, 말초 혈액 T-세포를 자극하기 전에, 방법은 말초 혈액 T-세포를 생산하기 위해, IL-7 및 IL-15의 존재, 및 적어도 일부 경우에 IL-6 및/또는 IL-12의 존재하에서 말초 혈액 세포를 항원 제시 세포로 자극하는 것을 추가로 포함하고, 상기 항원 제시 세포는 하나 이상의 펩티드에 이전에 노출되었고, 상기 펩티드는 HPV의 하나 이상의 단백질 서열의 적어도 일부에 상응하는 서열을 포함한다.

[0018] 일부 구현예에서, 하나 이상의 펩티드는 HPV16의 하나 이상의 단백질; HPV18의 하나 이상의 단백질; 또는 HPV16의 하나 이상의 단백질 및 HPV18의 하나 이상의 단백질 둘 다의 적어도 일부 서열에 상응하는 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 펩티드는 단백질 E5, E6, E7, L1 및 L2 중 하나 이상에 상응하는 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 펩티드는 E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, L1, 및/또는 L2 펩티드를 포함하는, 펩티드의 라이브러리일 수 있다.

[0019] 일부 구현예에서, 방법은 HPV 또는 HPV 항원에 특이적인 면역 세포, 예컨대 T-세포를 생산할 수 있다. 일부 구현예에서, 방법은 HPV 또는 적어도 하나의 HPV 항원에 특이적인 말초 혈액 T-세포에 존재하는 T-세포의 개체군을 증폭시킬 수 있다. 본 발명의 방법에 의해 생산될 수 있는 T 세포 이외의 면역 세포는 NK 세포 및 NKT 세포

를 포함한다.

- [0020] 일부 구현예에서, 항원 제시 세포는, 예를 들어 활성화 T-세포, 수지상 세포 (DC), B-블라스트 (BB), 또는 PBMCs이다.
- [0021] 일부 구현예에서, IL-7 및 IL-15의 존재하에서 말초 혈액 T-세포의 자극은 적어도 IL-2의 부재하에서 발생한다. 일부 구현예에서, IL-7 및 IL-15의 존재하에서 말초 혈액 T-세포의 자극은 적어도 IL-4의 부재하에서 발생한다. 일부 구현예에서, IL-7 및 IL-15의 존재하에서 말초 혈액 T-세포의 자극은 적어도 IL-6의 부재하에서 발생한다. 일부 구현예에서, IL-7 및 IL-15의 존재하에서 말초 혈액 T-세포의 자극은 적어도 IL-12의 부재하에서 발생한다. 일부 구현예에서, IL-7 및 IL-15의 존재하에서 말초 혈액 T-세포의 자극은 적어도 IL-21의 부재하에서 발생한다. 일부 구현예에서, IL-7 및 IL-15의 존재하에서 말초 혈액 T-세포의 자극은 IL-6 및 IL-12의 부재하에서 발생한다.
- [0022] 일부 특정 구현예에서, 본 발명의 제1 양태의 방법에서 세포의 자극은 IL-6 및 IL-12의 부재하에서 발생한다.
- [0023] 일부 구현예에서, 말초 혈액 T-세포는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMCs)의 개체군 내에 존재할 수 있거나 이들로부터 수득되거나 단리된다. 개체군 내 PBMCs는 비-부착성 PBMCs일 수 있다. 항원 제시 세포는, 예를 들어 활성화 T-세포, 수지상 세포, B-블라스트, 또는 PBMCs일 수 있다.
- [0024] 제2 양태에서, 본 발명은 HPV 또는 HPV 항원에 특이적인 T-세포를 자극하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 IL-7 및 IL-15의 존재, 및 선택적으로 동시-자극 세포의 존재하에서 HPV 또는 HPV 항원에 특이적인 T-세포를 항원 제시 세포로 자극하는 것을 포함하고, 상기 항원 제시 세포는 하나 이상의 펩티드에 이전에 노출되었고, 상기 펩티드는 HPV의 하나 이상의 단백질 서열의 적어도 일부에 상응하는 서열을 포함한다.
- [0025] 일부 구현예에서, 인간 파필로마바이러스 (HPV)-연관 질병에 대한 치료적 T-세포를 생산하는 방법이 제공되고, 상기 방법은 인터루킨 IL-7 및 IL-15의 하나 이상의 존재, 및 선택적으로 동시-자극 세포의 존재하에서 HPV 또는 HPV 항원에 특이적인 T-세포를 항원 제시 세포로 자극하는 단계를 포함하고, 상기 항원 제시 세포는 하나 이상의 펩티드에 이전에 노출되었고, 상기 펩티드는 HPV의 하나 이상의 단백질 서열의 적어도 일부에 상응하는 서열을 포함하고, 상기 자극은 하나 이상의 HPV-연관 질병에 치료적인 T-세포를 생산한다.
- [0026] 일부 구현예에서, 항원 제시 세포는 활성화 T-세포, 수지상 세포 (DC), B-블라스트 (BB) 또는 PBMCs이다. 특정 구현예에서, 항원 제시 세포는 활성화 T-세포이다.
- [0027] 일부 구현예에서, 동시-자극 세포는 CD80+ 세포, CD86+ 세포, CD83+ 세포, 4-1BBL+ 세포, CD40+ 세포, OX40+ 세포, 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 세포 유형이다. 동시-자극 세포는 CD80+/CD86+/CD83+/4-1BBL+ 세포일 수 있다.
- [0028] 일부 구현예에서, HPV 또는 HPV 항원에 특이적인 T-세포의 자극은 제1 자극 단계가 아니다. 자극되는 세포인 T-세포는, 예컨대 본 발명의 제1 양태의 방법을 이용하는 이전 자극의 산물일 수 있다.
- [0029] 일부 구현예에서, 하나 이상의 펩티드는 HPV16의 하나 이상의 단백질; HPV18의 하나 이상의 단백질; 또는 HPV16의 하나 이상의 단백질 및 HPV18의 하나 이상의 단백질 둘 다의 적어도 일부 서열에 상응하는 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 펩티드는 단백질 E5, E6, E7, L1 및 L2 중 하나 이상에 상응하는 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 펩티드는 E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, L1, 및/또는 L2 펩티드를 포함하는, 펩티드의 라이브러리일 수 있다.
- [0030] 일부 구현예에서, 방법은 HPV 또는 HPV 항원에 특이적인 T-세포를 생산할 수 있다. 일부 구현예에서, 방법은 HPV 또는 HPV 항원에 특이적인 T-세포의 개체군을 증폭시킬 수 있다.
- [0031] 특정 구현예에서, HPV 또는 HPV 항원에 특이적인 T-세포의 자극은 IL-7, IL-15의 존재, 및 하나 이상의 유형의 동시-자극 세포의 존재하에서 HPV 또는 HPV 항원에 특이적인 T-세포를 항원 제시 세포로 자극하는 것을 포함한다.
- [0032] 일부 구현예에서, IL-7 및 IL-15의 존재하에서 T-세포의 자극은 IL-2의 부재하에서이다. 일부 구현예에서, IL-7 및 IL-15의 존재하에서 T-세포의 자극은 IL-4의 부재하에서이다. 일부 구현예에서, IL-7 및 IL-15의 존재하에서 T-세포의 자극은 IL-6의 부재하에서이다. 일부 구현예에서, IL-7 및 IL-15의 존재하에서 T-세포의 자극은 IL-12의 부재하에서이다. 일부 구현예에서, IL-7 및 IL-15의 존재하에서 T-세포의 자극은 IL-21의 부재하에서이다. 일부 구현예

서, 본 발명의 제1 양태의 방법에서 T-세포의 자극은 IL-6 및 IL-12의 부재하에서이다.

- [0033] 본 발명의 제1 및 제2 양태에 따른 방법은 HPV-연관 질병에 대한 치료적 T-세포를 생산하는 방법일 수 있다. 세포의 자극은 HPV-연관 질병에 치료적인 T-세포를 생산할 수 있다.
- [0034] 제3 양태에서, 제1 및 제2 양태의 방법은 HPV-연관 질병에 대한 치료적 T-세포를 생산하는 방법을 제공하도록 조합될 수 있고, 상기 방법은 하기 단계를 포함한다:
- [0035] (i) 말초 혈액 세포, 바람직하게는 말초 혈액 T-세포를 자극하는 단계로, 상기 방법은 인터류킨 (IL)-7 및 IL-15의 존재, 및 선택적으로 IL-6 및/또는 IL-12의 부재하에서 말초 혈액 T-세포를 항원 제시 세포로 자극하는 것을 포함하고, 상기 항원 제시 세포는 하나 이상의 펩티드에 이전에 노출되었고, 상기 펩티드는 HPV의 하나 이상의 단백질 서열의 적어도 일부에 상응하는 서열을 포함하는 것인, 단계;
- [0036] (ii) 인터류킨 (IL)-7 및 IL-15의 존재, 및 선택적으로 하나 이상의 유형의 동시-자극 세포의 존재하에서 (i)로부터 수득된 T-세포를 항원 제시 세포로 자극하는 단계로, 상기 항원 제시 세포는 하나 이상의 펩티드에 이전에 노출되었고, 상기 펩티드는 HPV의 하나 이상의 단백질 서열의 적어도 일부에 상응하는 서열을 포함하는 것인, 단계.
- [0037] 일부 구현예에서, 단계 (ii) 이전에, (i)로부터 수득된 T-세포는 동시-자극 세포의 존재가 아닌 IL-7 및 IL-15의 존재, 및 선택적으로 IL-6 및/또는 IL-12의 부재하에서 재-자극될 수 있다. 이러한 재-자극은 필요에 따라, 1회, 2회, 3회, 4회, 5회 또는 그 이상 수행될 수 있다.
- [0038] 일부 구현예에서, (i)에 사용된 항원 제시 세포는 수지상 세포 (DC), B-블라스트 (BB) 또는 PBMCs이다. 일부 구현예에서, (ii)에 사용된 항원 제시 세포는 활성화 T-세포, 수지상 세포 (DC), B-블라스트 (BB) 또는 PBMCs이다. 일부 구현예에서, (i)에 사용된 항원 제시 세포는 (ii)에 사용된 항원 제시 세포와 상이하지만, 이들은 특정 경우에 동일할 수 있다. 특정 구현예에서, (ii)에 사용된 항원 제시 세포는 활성화 T-세포이다.
- [0039] 일부 구현예에서, 동시-자극 세포는 CD80+ 세포, CD86+ 세포, CD83+ 세포, 4-1BBL+ 세포, CD40+ 세포, OX40+ 세포, 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 세포 유형이다. 동시-자극 세포는 CD80+/CD86+/CD83+/4-1BBL+ 세포일 수 있다.
- [0040] 일부 구현예에서, IL-7 및 IL-15의 존재하에서 세포의 자극은 IL-2의 부재하에서이다. 일부 구현예에서, IL-7 및 IL-15의 존재하에서 세포의 자극은 IL-4의 부재하에서이다. 일부 구현예에서, IL-7 및 IL-15의 존재하에서 세포의 자극은 IL-6의 부재하에서이다. 일부 구현예에서, IL-7 및 IL-15의 존재하에서 세포의 자극은 IL-12의 부재하에서이다. 일부 구현예에서, IL-7 및 IL-15의 존재하에서 세포의 자극은 IL-21의 부재하에서이다. 일부 구현예에서, IL-7 및 IL-15의 존재하에서 세포의 자극은 IL-6 및 IL-12의 부재하에서이다.
- [0041] 일부 바람직한 구현예에서, 단계 (i)에서 세포의 자극은 IL-6 및 IL-12의 부재하에서이다.
- [0042] 일부 구현예에서, 단계 (ii)에서 세포의 자극은 IL-6 및 IL-12의 부재하에서이다.
- [0043] 따라서, 일부 구현예에서, 하기 단계를 포함하는, HPV-연관 질병에 대한 치료적 T-세포를 생산하는 방법이 제공된다:
- [0044] (i) 말초 혈액 세포를 자극하는 단계로, 상기 방법은 인터류킨 (IL)-7 및 IL-15의 존재 및 선택적으로 IL-6 및/또는 IL-12의 부재하에서 말초 혈액 T-세포를 항원 제시 세포로 자극하는 것을 포함하고, 상기 항원 제시 세포는 하나 이상의 펩티드에 이전에 노출되었고, 상기 펩티드는 HPV의 하나 이상의 단백질 서열의 적어도 일부에 상응하는 서열을 포함하는 것인, 단계;
- [0045] (ii) 인터류킨 (IL)-7 및 IL-15의 존재 및 선택적으로 IL-6 및/또는 IL-12의 부재하에서 (i)로부터 수득된 T-세포를 항원 제시 세포로 자극하는 단계로, 상기 항원 제시 세포는 하나 이상의 펩티드에 이전에 노출되었고, 상기 펩티드는 HPV의 하나 이상의 단백질 서열의 적어도 일부에 상응하는 서열을 포함하고, (ii)가 선택적으로 1회 이상 반복되는 것인, 단계; 및
- [0046] (iii) IL-7 및 IL-15의 존재, 및 선택적으로 동시-자극 세포의 존재하에서 (ii)로부터 수득된 T-세포를 항원 제시 세포로 자극하는 단계로, 상기 항원 제시 세포는 하나 이상의 펩티드에 이전에 노출되었고, 상기 펩티드는 HPV의 하나 이상의 단백질 서열의 적어도 일부에 상응하는 서열을 포함하고, (iii)가 선택적으로 1회 이상 반복되는 것인, 단계.

- [0047] 일부 구현예에서, (i) 및 (ii)에 사용된 항원 제시 세포는 수지상 세포 (DC), B-블라스트 (BB) 또는 PBMCs이다. 일부 구현예에서, (iii)에 사용된 항원 제시 세포는 활성화 T-세포, 수지상 세포 (DC), B-블라스트 (BB) 또는 PBMCs이다. 일부 구현예에서, (iii)에 사용된 항원 제시 세포는 (i) 및/또는 (ii)에 사용된 수지상 세포와 상이하다. 바람직한 구현예에서, (iii)에 사용된 항원 제시 세포는 활성화 T-세포이다.
- [0048] 바람직한 구현예에서, (iii)에서의 자극은 동시-자극 세포의 존재하에서이다. 일부 구현예에서, 동시-자극 세포는 CD80+ 세포, CD86+ 세포, CD83+ 세포, 4-1BBL+ 세포, CD40+ 세포, OX40+ 세포, 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 세포 유형이다. 동시-자극 세포는 CD80+/CD86+/CD83+/4-1BBL+ 세포일 수 있다.
- [0049] 일부 구현예에서, IL-7 및 IL-15의 존재하에서 세포의 자극은 IL-2의 부재하에서이다. 일부 구현예에서, IL-7 및 IL-15의 존재하에서 세포의 자극은 IL-4의 부재하에서이다. 일부 구현예에서, IL-7 및 IL-15의 존재하에서 세포의 자극은 IL-6의 부재하에서이다. 일부 구현예에서, IL-7 및 IL-15의 존재하에서 세포의 자극은 IL-12의 부재하에서이다. 일부 구현예에서, IL-7 및 IL-15의 존재하에서 세포의 자극은 IL-21의 부재하에서이다. 일부 구현예에서, IL-7 및 IL-15의 존재하에서 세포의 자극은 IL-6 및 IL-12의 부재하에서이다.
- [0050] 일부 구현예에서, 단계 (i)에서 세포의 자극은 IL-6 및 IL-12의 부재하에서이다. 일부 다른 구현예에서, 단계 (i)에서 세포의 자극은 IL-6 및 IL-12의 존재하에서이다.
- [0051] 일부 특정 구현예에서, 단계 (ii)에서 세포의 자극은 IL-6 및 IL-12의 부재하에서이다. 일부 특정 구현예에서, 단계 (iii)에서 세포의 자극은 IL-6 및 IL-12의 부재하에서이다.
- [0052] 일부 특정 구현예에서, 본 발명의 방법은 HPV16 및/또는 HPV18에 특이적인 T-세포를 생산하기 위한 것이다. 일부 특정 구현예에서, 본 발명의 방법은 HPV16-연관 및/또는 HPV18-연관 질병에 특이적인 T-세포를 생산하기 위한 것이다.
- [0053] 일부 구현예에서, 말초 혈액 T-세포는 HPV; HPV16 또는 HPV18; 또는 HPV16 및 HPV18 둘 다에 감염된 것으로 알려지거나 이로의 감염이 의심되는 개체로부터 획득될 수 있다.
- [0054] 일부 구현예에서, 항원 제시 세포는 HPV; HPV16 또는 HPV18; 또는 HPV16 및 HPV18 둘 다에 감염된 것으로 알려지거나 이로의 감염이 의심되는 개체로부터 획득될 수 있다.
- [0055] 일부 구현예에서, 방법은 상기 방법에 의해 생산된 T-세포가 펩티드 라이브러리에 이전에 노출된 활성화 B 세포에의 노출이 없는 경우에 일어날 수 있다.
- [0056] 일부 구현예에서, 항원 제시 세포는 획득된 치료적 T-세포로 치료하고자 하는 개체에 대해 자가 또는 동종이형일 수 있다.
- [0057] 일부 구현예에서, 하나 이상의 펩티드는 HPV16의 하나 이상의 단백질; HPV18의 하나 이상의 단백질; 또는 HPV16의 하나 이상의 단백질 및 HPV18의 하나 이상의 단백질 서열의 적어도 일부에 상응하는 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 펩티드는 HPV16, HPV18, 또는 HPV16 및 HPV18로부터 유래하는 단백질 E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, L1, 및/또는 L2의 하나 이상에 상응하는 서열을 포함한다.
- [0058] 본 발명의 구현예에서, 펩티드는 HPV 단백질 E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, L1, 및/또는 L2의 하나 이상에 상응하는 서열을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 펩티드는, 예컨대 HPV 감염된 세포에서 프로바이러스 통합 (proviral integration) 후에 발현되는 하나 이상의 HPV 단백질 (예컨대, E1, E2, E3, E4, E5, E6 및/또는 E7)에 상응하는 서열을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 펩티드는 하나 이상의 형질전환 HPV 단백질 (예컨대, E6, 및/또는 E7)에 상응하는 서열을 포함할 수 있다. 펩티드는 상기 HPV 단백질 내부에 존재하는 연속적인 아미노산 서열에 상응할 수 있다. 펩티드는 적어도 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개 아미노산 길이 또는 그보다 길거나, 또는 15개 아미노산 길이를 가질 수 있다. 펩티드의 집합체는 라이브러리를 형성할 수 있고 라이브러리 내 펩티드는, 예를 들어 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 또는 14개 아미노산을 포함하는, 임의의 적합한 양으로 다른 펩티드와 순서대로 중첩할 수 있다. 펩티드는 다음에 상응하는 서열을 포함할 수 있다: a) HPV18 E6 단백질 및/또는 HPV18 E7 단백질, 및/또는 b) HPV16 E6 단백질 및/또는 HPV16 E7 단백질.
- [0059] 본 발명의 구현예에서, HPV는 HPV16 또는 HPV18, 또는 둘 다일 수 있다. HPV-연관 질병의 치료와 관련된 구현예에서, 상기 질병은 암일 수 있고 펩티드는 E6 및 E7의 하나 또는 둘 다에 상응하는 서열을 포함할 수 있다. HPV-연관 질병이 전-암성 병변인 경우, 펩티드는 E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, L1, 및 L2의 하나, 일부 또는

전부에 상응하는 서열을 포함할 수 있다.

- [0060] 본 발명의 방법에 의해 생산된 T-세포는 단리 및/또는 정제될 수 있고, 예컨대, 다른 세포로부터 단리/정제될 수 있다.
- [0061] 일부 구현예에서, 본 발명의 방법에 의해 생산된 치료학적 유효량의 T-세포는 HPV에 노출되었거나, HPV-연관 질병을 갖는 개체에게 제공된다. 관련 양태에서, 본 발명의 방법에 의해 생산된 T-세포는 HPV-연관 질병의 치료에 사용하기 위해 제공된다. 다른 관련 양태에서, 본 발명의 방법에 의해 생산된 T-세포의 사용은 HPV-연관 질병의 치료에 사용하기 위한 의약품의 제조에 있어서의 사용을 위해 제공된다.
- [0062] 본 발명의 일 양태에서, 적응성 세포 면역요법의 방법에 사용하기 위한 T-세포가 제공되고, 상기 T-세포는 본원에 기술된 말초 혈액 또는 T-세포를 자극하는 방법 또는 치료적 T-세포를 생산하는 방법에 의해 획득되거나, 그에 의해 획득 가능하거나, 또는 그의 산물이고, 적응성 세포 면역요법의 방법은 대상체에 상기 T-세포를 투여하는 것을 포함한다.
- [0063] 본 발명의 일 양태에서, 대상체에 T-세포를 투여하는 것을 포함하는 적응성 세포 면역요법의 방법에 사용하기 위한 의약품의 제조에 있어 T-세포의 용도가 제공되고, 상기 T-세포는 본원에 기술된 말초 혈액 또는 T-세포를 자극하는 방법 또는 치료적 T-세포를 생산하는 방법에 의해 획득되거나, 그에 의해 획득 가능하거나, 또는 그의 산물이다.
- [0064] 본 발명의 일 양태에서, 약제학적 조성물, 의약품 또는 백신을 제조하는 방법이 제공되고, 상기 방법은 본원에 기술된 방법에 따라 말초 혈액 또는 T-세포를 자극하거나, 또는 본원에 기술된 방법에 따라 치료적 T-세포를 생산하고, 획득된 세포를 약제학적으로 허용가능한 담체, 보조제, 희석제 또는 부형제와 혼합하는 것을 포함한다.
- [0065] 질병은 종양 (neoplasm)일 수 있다. 종양은 암일 수 있다. 암은 HPV-양성 암, 예컨대, HPV16-양성 암 및/또는 HPV18-양성 암일 수 있다.
- [0066] 치료되는 개체는 인간일 수 있다. 개체는 환자일 수 있다. 개체는 HPV, 예컨대 HPV16, HPV18, 또는 HPV16 및 HPV18 둘 다에 노출되었을 수 있거나, 또는 HPV-, HPV16- 및/또는 HPV18-연관 질병을 갖는다. HPV-, HPV16- 및/또는 HPV18-연관 질병은 종양일 수 있다. 종양은 암일 수 있다.
- [0067] 암은 임의의 종류일 수 있다. 일부 구현예에서, 암은 자궁경부암, 항문암, 외음부암, 질암, 음경암, 또는 구강 인두암이다. 일부 구현예에서, 암은 HPV-연관 암일 수 있다. "HPV-연관 암"은 HPV 감염에 의해 유발되거나 악화되는 암, HPV 감염이 위험 요인인 암, 및/또는 HPV 감염이 그의 개시, 발달, 진행, 중증도 또는 전이와 긍정적으로 연관되는 암일 수 있다. HPV-연관 암은 본 발명의 방법 및 조성물이 치료 효과 (예컨대, 암의 발달/진행의 억제, 지연/예방된 암의 개시, 감소/지연/예방된 전이, 암 증상의 감소된 중증도, 암세포 수의 감소, 종양 크기의 감소, 및/또는 증가된 생존률)를 제공하는 암일 수 있다. 일부 구현예에서, 암은 HPV-관련 암종, HPV-양성 구강인두암종, HPV-양성 자궁경부암종, HPV-양성 항문암종, HPV-양성 외음부암종, 코인두암종, HPV-양성 음경암종, 임의의 부위의 HPV-양성 이형성증, 또는 후두 유두종증이다.
- [0068] 개체 또는 대상체는 추가의 암 요법을 받았을 수 있거나, 받고 있을 수 있거나, 또는 받을 것이다. 추가의 암 요법은 수술, 방사선, 호르몬 요법, 화학요법, 면역요법, 또는 이들의 조합일 수 있다.
- [0069] 개체 또는 대상체는 HPV-연관 암 또는 HPV-양성 암을 갖는 것으로 결정될 수 있다. 개체는 HPV16-연관 암 또는 HPV16-양성 암을 갖는 것으로 결정될 수 있다. 개체는 HPV18-연관 암 또는 HPV18-양성 암을 갖는 것으로 결정될 수 있다. 개체 또는 대상체는 임의의 동물 또는 인간일 수 있다. 개체 또는 대상체는 바람직하게는 포유류, 더욱 바람직하게는 인간일 수 있다. 개체 또는 대상체는 비-인간 포유류일 수 있지만, 인간이 더 바람직하다. 개체 또는 대상체는 남성 또는 여성일 수 있다. 개체 또는 대상체는 환자일 수 있다.
- [0070] 세포 자극 단계를 포함하는 본 발명에 따른 방법은 시험관 내 또는 생체 외에서 수행될 수 있다. 용어 "시험관 내"는 실험실 조건이나 배양 중에 재료, 생물학적 물질, 세포 및/또는 조직을 이용한 연구를 포함하는 것으로 의도된다. "생체 외"는 유기체 외부에 존재하거나 외부에서 일어나는 것, 예컨대 유기체로부터 취해진 조직 (예컨대, 전체 기관) 또는 세포에 대해서일 수 있는, 인간 또는 동물 신체의 외부에서를 지칭한다.
- [0071] 일 구현예에서, 말초 혈액 세포를 자극하는 방법이 제공되고, 상기 방법은 인터류킨 (IL)-7 및 IL-15의 존재 및 IL-6 및/또는 IL-12의 부재하에서 말초 혈액 T-세포를 항원 제시 세포로 자극하는 것을 포함하고, 상기 항원 제시 세포는 하나 이상의 펩티드에 이전에 노출되었고, 상기 펩티드는 인간 파필로마바이러스 (HPV)의 하나 이상의 단백질 서열의 적어도 일부에 상응하는 서열을 포함한다. 말초 혈액 T-세포는 말초 혈액 세포의 이전 자극

으로부터 수득될 수 있고, 예컨대 말초 혈액 세포의 이전 자극은 IL-7 및 IL-15의 존재, 및 IL-6 및/또는 IL-12의 존재하에서 말초 혈액 세포를 항원 제시 세포로 자극하는 것을 포함하고, 상기 항원 제시 세포는 하나 이상의 펩티드에 이전에 노출되었고, 상기 펩티드는 HPV의 하나 이상의 단백질 서열의 적어도 일부에 상응하는 서열을 포함한다. 특정 경우에, 말초 혈액 T-세포를 자극하기 전에, 방법은 말초 혈액 T-세포를 생산하기 위해, IL-7 및 IL-15의 존재, 및 IL-6 및/또는 IL-12의 존재하에서 말초 혈액 세포를 항원 제시 세포로 자극하는 것을 추가로 포함하고, 상기 항원 제시 세포는 하나 이상의 펩티드에 이전에 노출되었고, 상기 펩티드는 HPV의 하나 이상의 단백질 서열의 적어도 일부에 상응하는 서열을 포함한다.

[0072] 구현예에서, HPV-연관 질병에 대한 치료적 T-세포를 생산하는 방법이 제공되고, 상기 방법은 다음 단계를 포함한다: IL-7 및 IL-15의 하나 이상의 존재 및 IL-6 및/또는 IL-12의 부재하에서 말초 혈액 T-세포를 항원 제시 세포로 자극하는 단계로, 상기 항원 제시 세포는 하나 이상의 펩티드에 이전에 노출되었고, 상기 펩티드는 HPV의 하나 이상의 단백질 서열의 적어도 일부에 상응하는 서열을 포함하고, 상기 자극은 HPV-연관 질병에 치료적인 T-세포를 생산한다. 말초 혈액 T-세포는 말초 혈액 세포의 이전 자극으로부터 수득될 수 있고, 예컨대 말초 혈액 세포의 이전 자극은 IL-7 및 IL-15의 존재, 및 IL-6 및/또는 IL-12의 존재하에서 말초 혈액 세포를 항원 제시 세포로 자극하는 것을 포함하고, 상기 항원 제시 세포는 하나 이상의 펩티드에 이전에 노출되었고, 상기 펩티드는 HPV의 하나 이상의 단백질 서열의 적어도 일부에 상응하는 서열을 포함한다. 특정 경우에, 말초 혈액 T-세포를 자극하기 전에, 방법은 말초 혈액 T-세포를 생산하기 위해, IL-7 및 IL-15의 존재, 및 IL-6 및/또는 IL-12의 존재하에서 말초 혈액 세포를 항원 제시 세포로 자극하는 것을 추가로 포함하고, 상기 항원 제시 세포는 하나 이상의 펩티드에 이전에 노출되었고, 상기 펩티드는 HPV의 하나 이상의 단백질 서열의 적어도 일부에 상응하는 서열을 포함한다.

[0073] 본 발명에 포함되는 방법의 구현예에서, 항원 제시 세포는 활성화 T-세포, 수지상 세포, B-플라스트, 또는 PBMCs이다. 말초 혈액 T-세포는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMCs)의 개체군 내에 존재할 수 있거나 이로부터 수득 또는 분리되고, 적어도 일부 경우에, 개체군 내 PBMCs는 비-부착성 PBMCs일 수 있다. 사용하는 경우, 동시-자극 세포는 CD80+, CD86+, CD83+, 4-1BBL+, CD40+ 세포, OX40+ 세포, 또는 이들의 조합일 수 있다.

[0074] 특정 구현예에서, HPV 또는 HPV 항원에 특이적인 T-세포를 자극하는 방법이 제공되고, 상기 방법은 IL-7 및 IL-15의 존재 및 동시-자극 세포의 존재하에서 HPV 또는 HPV 항원에 특이적인 T-세포를 항원 제시 세포로 자극하는 것을 포함하고, 상기 항원 제시 세포는 하나 이상의 펩티드에 이전에 노출되었고, 상기 펩티드는 HPV의 하나 이상의 단백질 서열의 적어도 일부에 상응하는 서열을 포함한다.

[0075] 특정 구현예에서, HPV-연관 질병에 대한 치료적 T-세포를 생산하는 방법이 제공되고, 상기 방법은 IL-7 및 IL-15의 하나 이상의 존재 및 동시-자극 세포의 존재하에서 HPV 또는 HPV 항원에 특이적인 T-세포를 항원 제시 세포로 자극하는 단계를 포함하고, 상기 항원 제시 세포는 하나 이상의 펩티드에 이전에 노출되었고, 상기 펩티드는 HPV의 하나 이상의 단백질 서열의 적어도 일부에 상응하는 서열을 포함하고, 상기 자극은 HPV-연관 질병에 치료적인 T-세포를 생산한다.

[0076] 일 구현예에서, HPV-연관 질병에 대한 치료적 T-세포를 생산하는 방법이 제공되고, 상기 방법은 다음을 포함한다: (i) 말초 혈액 세포를 자극하는 단계로, 상기 방법은 IL-7 및 IL-15의 존재 및 선택적으로 IL-6 및/또는 IL-12의 부재하에서 말초 혈액 T-세포를 항원 제시 세포로 자극하는 것을 포함하고, 상기 항원 제시 세포는 하나 이상의 펩티드에 이전에 노출되었고, 상기 펩티드는 HPV의 하나 이상의 단백질 서열의 적어도 일부에 상응하는 서열을 포함하는 것인, 단계; 및 (ii) IL-7 및 IL-15의 존재, 및 동시-자극 세포의 존재하에서 (i)로부터 수득된 T-세포를 항원 제시 세포로 자극하는 단계로, 상기 항원 제시 세포는 하나 이상의 펩티드에 이전에 노출되었고, 상기 펩티드는 HPV의 하나 이상의 단백질 서열의 적어도 일부에 상응하는 서열을 포함한다. 특정 구현예에서, 단계 (ii) 이전에, (i)로부터 수득된 T-세포는 동시-자극 세포의 존재가 아닌 IL-7 및 IL-15의 존재하에서 재-자극될 수 있다.

[0077] 구현예에서, HPV-연관 질병에 대한 치료적 T-세포를 생산하는 방법이 제공되고, 상기 방법은 다음을 포함한다: (i) 말초 혈액 세포를 자극하는 단계로, 상기 방법은 인터류킨 (IL)-7 및 IL-15의 존재 및 선택적으로 IL-6 및/또는 IL-12의 부재하에서 말초 혈액 T-세포를 항원 제시 세포로 자극하는 것을 포함하고, 상기 항원 제시 세포는 하나 이상의 펩티드에 이전에 노출되었고, 상기 펩티드는 HPV의 하나 이상의 단백질 서열의 적어도 일부에 상응하는 서열을 포함하는 것인, 단계; (ii) 인터류킨 (IL)-7 및 IL-15의 존재 및 선택적으로 IL-6 및/또는 IL-12의 부재하에서 (i)로부터 수득된 T-세포를 항원 제시 세포로 자극하는 단계로, 상기 항원 제시 세포는 하나 이상의 펩티드에 이전에 노출되었고, 상기 펩티드는 HPV의 하나 이상의 단백질 서열의 적어도 일부에 상응하는

서열을 포함하고, (ii)가 선택적으로 1회 이상 반복되는 것인, 단계; 및 (iii) 인터류킨 (IL)-7 및 IL-15의 존재, 및 동시-자극 세포의 존재하에서 (ii)로부터 수득된 T-세포를 항원 제시 세포로 자극하는 단계로, 상기 항원 제시 세포는 하나 이상의 펩티드에 이전에 노출되었고, 상기 펩티드는 HPV의 하나 이상의 단백질 서열의 적어도 일부에 상응하는 서열을 포함하고, (iii)가 선택적으로 1회 이상 반복되는 것인, 단계.

[0078] 본 발명의 임의의 방법에서, HPV는 HPV16 또는 HPV18일 수 있다. E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, L1, 및 L2의 하나 이상에 상응하는 서열을 포함하는 펩티드가 본 발명의 임의의 방법에서 사용될 수 있다. 펩티드는: a) HPV18 E6 단백질 및/또는 HPV18 E7 단백질, 및/또는 b) HPV16 E6 단백질 및/또는 HPV16 E7 단백질에 상응하는 서열을 포함할 수 있다. 일부 경우에, 본원에 기술된 바와 같은 세포의 유효량이 제공되는 개체는 HPV-연관 질병, 예컨대 암을 가지며, 펩티드는 E6 및 E7 중 하나 또는 둘 다에 상응하는 서열을 포함한다. 특정 양태에서, 하나 이상의 펩티드는 적어도 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개 아미노산 길이 또는 이보다 많은 펩티드를 포함하고, 특히 하나 이상의 펩티드는 15개 아미노산 길이의 펩티드를 포함한다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 펩티드는 라이브러리를 형성하고 라이브러리 내 펩티드는 11개 아미노산이 다른 펩티드와 순서대로 중첩한다.

[0079] 특정 구현예에서, 상기 방법에 의해 생산된 치료학적 유효량의 T-세포는 HPV에 노출되었거나 HPV-연관 질병을 갖는 개체에게 제공된다. 특정 구현예에서, HPV-연관 질병은 종양을 포함한다.

[0080] 본 발명의 방법에 의해 생산된 치료학적 유효량의 T-세포는 HPV16, HPV18, 또는 둘 다에 노출되었거나, 암과 같은 종양을 포함하는 HPV16-연관 및/또는 HPV18-연관 질병을 갖는 개체에게 제공될 수 있다.

[0081] 특정 구현예에서, 암은 자궁경부암, 항문암, 외음부암, 질암, 음경암, 구강인두암, 코인두암종, 후두 유두종증, 후두암, 두경부암, 또는 이들의 임의의 부위의 이형성증이다.

[0082] 일부 경우에, 본 발명의 세포를 받았고/받았거나 받을 개체는 또한 추가의 암 요법, 예컨대 수술, 방사선, 호르몬 요법, 화학요법, 면역요법, 또는 이들의 조합을 받았거나, 받고 있거나, 또는 받을 것이다.

[0083] 특정 양태에서, 본 발명의 세포를 받았고/받았거나 받을 개체는 HPV-연관 암, 예컨대 HPV16-연관 암 또는 HPV18-연관 암을 갖는 것으로 결정된다.

[0084] 다음 번호의 단락은 본원에 기술된 발명의 기술적 특징의 광범위한 조합의 진술을 포함한다:

[0085] 1. 말초 혈액 세포를 자극하는 방법으로서, 상기 방법이 인터류킨 (IL)-7 및 IL-15의 존재 및 IL-6 및/또는 IL-12의 부재하에서 말초 혈액 T-세포를 항원 제시 세포로 자극하는 것을 포함하고, 상기 항원 제시 세포가 하나 이상의 펩티드에 이전에 노출되었고, 상기 펩티드가 인간 파필로마바이러스 (HPV)의 하나 이상의 단백질 서열의 적어도 일부에 상응하는 서열을 포함하는 것인, 방법.

[0086] 2. HPV-연관 질병에 대한 치료적 T-세포를 생산하는 방법으로서, 상기 방법이:

[0087] IL-7 및 IL-15의 하나 이상의 존재 및 IL-6 및/또는 IL-12의 부재하에서 말초 혈액 T-세포를 항원 제시 세포로 자극하는 단계로, 상기 항원 제시 세포가 하나 이상의 펩티드에 이전에 노출되었고, 상기 펩티드가 HPV의 하나 이상의 단백질 서열의 적어도 일부에 상응하는 서열을 포함하는 것인, 단계를 포함하고,

[0088] 상기 자극이 HPV-연관 질병에 치료적인 T-세포를 생산하는 것인, 방법.

[0089] 3. 단락 1 또는 2에 있어서, 말초 혈액 T-세포가 말초 혈액 세포의 이전 자극으로부터 수득되는 것인, 방법.

[0090] 4. 단락 3에 있어서, 말초 혈액 세포의 이전 자극이 말초 혈액 세포를 IL-7 및 IL-15의 존재, 및 IL-6 및/또는 IL-12의 존재하에서 항원 제시 세포로 자극하는 것을 포함하고, 상기 항원 제시 세포가 하나 이상의 펩티드에 이전에 노출되었고, 상기 펩티드가 HPV의 하나 이상의 단백질 서열의 적어도 일부에 상응하는 서열을 포함하는 것인, 방법.

[0091] 5. 단락 1 또는 2에 있어서, 말초 혈액 T-세포를 자극하기 전에, 방법이 말초 혈액 T-세포를 생산하기 위해, IL-7 및 IL-15의 존재, 및 IL-6 및/또는 IL-12의 존재하에서 말초 혈액 세포를 항원 제시 세포로 자극하는 것을 추가로 포함하고, 상기 항원 제시 세포가 하나 이상의 펩티드에 이전에 노출되었고, 상기 펩티드가 HPV의 하나 이상의 단백질 서열의 적어도 일부에 상응하는 서열을 포함하는 것인, 방법.

[0092] 6. 단락 1 내지 7 중 어느 하나에 있어서, 항원 제시 세포가 수지상 세포, B-블라스트, 또는 PBMCs인 것인, 방법.

- [0093] 7. 단락 1 내지 6 중 어느 하나에 있어서, 말초 혈액 T-세포가 말초 혈액 단핵 세포 (PBMCs)의 개체군 내에 존재하거나 이들로부터 수득 또는 분리되는 것인, 방법.
- [0094] 8. 단락 7에 있어서, 개체군 내 PBMCs가 비-부착성 PBMCs인 것인, 방법.
- [0095] 9. HPV 또는 HPV 항원에 특이적인 T-세포를 자극하는 방법으로서, 상기 방법이 IL-7 및 IL-15의 존재 및 동시-자극 세포의 존재하에서 HPV 또는 HPV 항원에 특이적인 T-세포를 항원 제시 세포로 자극하는 것을 포함하고, 상기 항원 제시 세포가 하나 이상의 펩티드에 이전에 노출되었고, 상기 펩티드가 HPV의 하나 이상의 단백질 서열의 적어도 일부에 상응하는 서열을 포함하는 것인, 방법.
- [0096] 10. HPV-연관 질병에 대한 치료적 T-세포를 생산하는 방법으로서, 상기 방법이 IL-7 및 IL-15의 하나 이상의 존재 및 동시-자극 세포의 존재하에서 HPV 또는 HPV 항원에 특이적인 T-세포를 항원 제시 세포로 자극하는 단계를 포함하고, 상기 항원 제시 세포가 하나 이상의 펩티드에 이전에 노출되었고, 상기 펩티드가 HPV의 하나 이상의 단백질 서열의 적어도 일부에 상응하는 서열을 포함하고, 상기 자극이 HPV-연관 질병에 치료적인 T-세포를 생산하는 것인, 방법.
- [0097] 11. 단락 9 또는 10에 있어서, 항원 제시 세포가 활성화 T 세포, 수지상 세포, B-블라스트, 또는 PBMCs인 것인, 방법.
- [0098] 12. 단락 9 내지 11 중 하나에 있어서, 동시-자극 세포가 CD80+, CD86+, CD83+, 4-1BBL+, CD40+ 세포, OX40+ 세포, 또는 이들의 조합인 것인, 방법.
- [0099] 13. 하기 단계를 포함하는, HPV-연관 질병에 대한 치료적 T-세포를 생산하는 방법:
- [0100] (i) 말초 혈액 세포를 자극하는 단계로, 상기 방법이 IL-7 및 IL-15의 존재 및 선택적으로 IL-6 및/또는 IL-12의 부재하에서 말초 혈액 T-세포를 항원 제시 세포로 자극하는 것을 포함하고, 상기 항원 제시 세포가 하나 이상의 펩티드에 이전에 노출되었고, 상기 펩티드가 HPV의 하나 이상의 단백질 서열의 적어도 일부에 상응하는 서열을 포함하는 것인, 단계; 및
- [0101] (ii) IL-7 및 IL-15의 존재, 및 동시-자극 세포의 존재하에서 (i)로부터 수득된 T-세포를 항원 제시 세포로 자극하는 단계로, 상기 항원 제시 세포가 하나 이상의 펩티드에 이전에 노출되었고, 상기 펩티드가 HPV의 하나 이상의 단백질 서열의 적어도 일부에 상응하는 서열을 포함하는 것인, 단계.
- [0102] 14. 단락 13에 있어서, 단계 (ii) 이전에, (i)로부터 수득된 T-세포가 동시-자극 세포의 존재가 아닌 IL-7 및 IL-15의 존재하에서 재-자극될 수 있는 것인, 방법.
- [0103] 15. 단락 13 또는 14에 있어서, (i)에 사용된 항원 제시 세포가 수지상 세포 (DC), B-블라스트 (BB) 또는 PBMCs인 것인, 방법.
- [0104] 16. 단락 13 내지 15 중 어느 하나에 있어서, (ii)에 사용된 항원 제시 세포가 활성화 T 세포, 수지상 세포 (DC) 또는 B-블라스트 (BB)인 것인, 방법.
- [0105] 17. 단락 13 내지 16 중 어느 하나에 있어서, 동시-자극 세포가 CD80+, CD86+, CD83+, 4-1BBL+, CD40+ 세포, OX40+ 세포, 또는 이들의 조합인 것인, 방법.
- [0106] 18. 하기 단계를 포함하는, HPV-연관 질병에 대한 치료적 T-세포를 생산하는 방법:
- [0107] (i) 말초 혈액 세포를 자극하는 단계로, 상기 방법이 인터류킨 (IL)-7 및 IL-15의 존재 및 선택적으로 IL-6 및/또는 IL-12의 부재하에서 말초 혈액 T-세포를 항원 제시 세포로 자극하는 것을 포함하고, 상기 항원 제시 세포가 하나 이상의 펩티드에 이전에 노출되었고, 상기 펩티드가 HPV의 하나 이상의 단백질 서열의 적어도 일부에 상응하는 서열을 포함하는 것인, 단계;
- [0108] ii) 인터류킨 (IL)-7 및 IL-15의 존재 및 선택적으로 IL-6 및/또는 IL-12의 부재하에서 (i)로부터 수득된 T-세포를 항원 제시 세포로 자극하는 단계로, 상기 항원 제시 세포가 하나 이상의 펩티드에 이전에 노출되었고, 상기 펩티드가 HPV의 하나 이상의 단백질 서열의 적어도 일부에 상응하는 서열을 포함하고, (ii)가 선택적으로 1회 이상 반복되는 것인, 단계; 및
- [0109] (iii) 인터류킨 (IL)-7 및 IL-15의 존재, 및 동시-자극 세포의 존재하에서 (ii)로부터 수득된 T-세포를 항원 제시 세포로 자극하는 단계로, 상기 항원 제시 세포가 하나 이상의 펩티드에 이전에 노출되었고, 상기 펩티드가 HPV의 하나 이상의 단백질 서열의 적어도 일부에 상응하는 서열을 포함하고, (iii)가 선택적으로 1회 이상 반복

되는 것인, 단계.

- [0110] 19. 단락 18에 있어서, (i) 및 (ii)에 사용된 항원 제시 세포가 DC, BB, 또는 PBMCs인 것인, 방법.
- [0111] 20. 단락 18 또는 19에 있어서, (iii)에 사용된 항원 제시 세포가 활성화 T 세포, DC, BB, 또는 PBMCs인 것인, 방법.
- [0112] 21. 단락 18 내지 20 중 어느 하나에 있어서, 동시-자극 세포가 CD80+, CD86+, CD83+, 4-1BBL+, CD40+ 세포, OX40+ 세포 또는 이들의 조합인 것인, 방법.
- [0113] 22. 단락 1 내지 21 중 어느 하나에 있어서, HPV가 HPV16 또는 HPV18인 것인, 방법.
- [0114] 23. 단락 1 내지 22 중 어느 하나에 있어서, 펩티드가 E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, L1, 및 L2의 하나 이상에 상응하는 서열을 포함하는 것인, 방법.
- [0115] 24. 단락 1 내지 23 중 어느 하나에 있어서, HPV-연관 질병이 암이고 펩티드가 E6 및 E7 중 하나 또는 둘 다에 상응하는 서열을 포함하는 것인, 방법.
- [0116] 25. 단락 1 내지 25 중 어느 하나에 있어서, 펩티드가 다음에 상응하는 서열을 포함하는 것인, 방법:
- [0117] a) HPV18 E6 단백질 및/또는 HPV18 E7 단백질, 및/또는
- [0118] b) HPV16 E6 단백질 및/또는 HPV16 E7 단백질.
- [0119] 26. 단락 1 내지 25 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 펩티드가 적어도 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개 또는 이보다 긴 아미노산 길이의 펩티드를 포함하는 것인, 방법.
- [0120] 27. 단락 1 내지 26 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 펩티드가 15개 아미노산 길이의 펩티드를 포함하는 것인, 방법.
- [0121] 28. 단락 1 내지 27 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 펩티드가 라이브러리를 형성하고 라이브러리 내 펩티드가 다른 펩티드와 11개 아미노산이 순서대로 중첩하는 것인, 방법.
- [0122] 29. 단락 1 내지 28 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법에 의해 생산된 치료학적 T-세포의 유효량이 HPV에 노출되었거나 HPV-연관 질병을 갖는 개체에게 제공되는 것인, 방법.
- [0123] 30. 단락 29에 있어서, HPV-연관 질병이 종양을 포함하는 것인, 방법.
- [0124] 31. 단락 1 내지 30 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법에 의해 생산된 치료학적 유효량의 T-세포가 HPV16, HPV18 또는 둘 다에 노출되었거나, HPV16-연관 및/또는 HPV18-연관 질병을 갖는 개체에게 제공되는 것인, 방법.
- [0125] 32. 단락 31에 있어서, HPV16-연관 및/또는 HPV18-연관 질병이 종양을 포함하는 것인, 방법.
- [0126] 33. 단락 31 또는 32에 있어서, 종양이 암인 것인, 방법.
- [0127] 34. 단락 33에 있어서, 암이 자궁경부암, 항문암, 외음부암, 질암, 음경암, 구강인두암, 코인두암종, 후두 유두종증, 후두암, 두경부암, 또는 이들의 임의 부위의 이형성증인 것인, 방법.
- [0128] 35. 단락 33 또는 34에 있어서, 개체가 추가의 암 요법을 받았거나, 받고 있거나, 받을 것인, 방법.
- [0129] 36. 단락 35에 있어서, 추가의 암 요법이 수술, 방사선, 호르몬 요법, 화학요법, 면역요법, 또는 이들의 조합인 것인, 방법.
- [0130] 37. 단락 33 내지 36 중 어느 하나에 있어서, 개체가 HPV-연관 암을 갖는 것으로 결정되는 것인, 방법.
- [0131] 38. 단락 33 내지 37 중 어느 하나에 있어서, 개체가 HPV16-연관 암을 갖는 것으로 결정되는 것인, 방법.
- [0132] 39. 단락 33 내지 38 중 어느 하나에 있어서, 개체가 HPV18-연관 암을 갖는 것으로 결정되는 것인, 방법.
- [0133] 40. 적응성 세포 면역요법의 방법에 사용하기 위한 T-세포로서, 상기 T-세포가 단락 1 내지 39 중 어느 하나에 따른 말초 혈액 또는 T-세포를 자극하는 방법 또는 치료적 T-세포를 생산하는 방법에 의해 수득되거나, 그에 의해 수득 가능하거나, 또는 그의 산물이고, 적응성 세포 면역요법의 방법이 대상체에 T-세포를 투여하는 것을 포함하는 것인, T-세포.
- [0134] 41. 대상체에 T-세포를 투여하는 것을 포함하는 적응성 세포 면역요법의 방법에 사용하기 위한 의약품의 제조에

있어 T-세포의 용도로서, 상기 T-세포가 제1항 내지 제39항 중 어느 한 항에 따른 말초 혈액 또는 T-세포를 생산하는 방법에 의해 수득되거나, 그에 의해 수득 가능하거나, 또는 그의 산물인 것인, 용도.

- [0135] 42. 약제학적 조성물, 의약품 또는 백신을 제조하는 방법으로서, 제1항 내지 제39항 중 어느 한 항에 따라 말초 혈액 또는 T-세포를 자극하거나 치료적 T-세포를 생산하고, 수득된 세포를 약제학적으로 허용가능한 담체, 보조제, 희석제 또는 부형제와 혼합하는 것을 포함하는, 방법.
- [0136] 43. 다음 단계를 포함하는, 대상체에서 암을 치료하는 방법:
- [0137] (1) 대상체로부터 T 세포를 분리하는 단계;
- [0138] (2) 인터류킨 (IL)-7 및 IL-15의 존재 및 IL-6 및/또는 IL-12의 부재하에서 T-세포를 항원 제시 세포로 자극하는 단계로, 상기 항원 제시 세포가 하나 이상의 펩티드에 이전에 노출되었고, 상기 펩티드가 HPV의 하나 이상의 단백질 서열의 적어도 일부에 상응하는 서열을 포함하는 것인 단계를 포함하는, 방법에 의해 인간 파필로마바이러스 (HPV)에 특이적인 T 세포의 개체군을 생성 또는 증폭시키는 단계; 및
- [0139] (3) T 세포의 생성 또는 증폭된 개체군을 대상체에 투여하는 단계.
- [0140] 44. 단락 43에 있어서, (2)에서 자극된 T-세포가 말초 혈액 세포 또는 T-세포의 이전 자극으로부터 수득되는 것인, 방법.
- [0141] 45. 단락 43에 있어서, 상기 T-세포를 자극하기 전에, 방법이 IL-7 및 IL-15의 존재, 및 IL-6 및/또는 IL-12의 존재하에서 말초 혈액 세포 또는 T-세포를 항원 제시 세포로 자극하는 것을 포함하고, 상기 항원 제시 세포가 하나 이상의 펩티드에 이전에 노출되었고, 상기 펩티드가 HPV의 하나 이상의 단백질 서열의 적어도 일부에 상응하는 서열을 포함하는 것인, 단계.
- [0142] 46. 단락 43에 있어서, (2) 후 및 (3) 전에, 방법이 IL-7 및 IL-15의 존재, 및 동시-자극 세포의 존재하에서 (2)로부터 수득된 T-세포를 항원 제시 세포로 자극하는 것을 포함하고, 상기 항원 제시 세포가 하나 이상의 펩티드에 이전에 노출되었고, 상기 펩티드가 HPV의 하나 이상의 단백질 서열의 적어도 일부에 상응하는 서열을 포함하는 것인, 방법.
- [0143] 47. 단락 46에 있어서, 동시-자극 세포가 CD80+, CD86+, CD83+, 4-1BBL+, CD40+ 세포, OX40+ 세포, 또는 이들의 조합인 것인, 방법.
- [0144] 48. 단락 43에 있어서, (2) 후 및 (3) 전에, 방법이 (i) 동시-자극 세포의 존재가 아닌 IL-7 및 IL-15의 존재하에서 (2)로부터 수득된 T-세포를 재-자극하고, (ii) IL-7 및 IL-15의 존재, 및 동시-자극 세포의 존재하에서 (i) 후에 수득된 T-세포를 항원 제시 세포로 자극하는 것을 포함하고, 상기 항원 제시 세포가 하나 이상의 펩티드에 이전에 노출되었고, 상기 펩티드가 HPV의 하나 이상의 단백질 서열의 적어도 일부에 상응하는 서열을 포함하는 것인, 방법.
- [0145] 49. 단락 43에 있어서, 항원 제시 세포가 수지상 세포 (DC), B-블라스트 (BB), 또는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMCs)인 것인, 방법.
- [0146] 50. 단락 43에 있어서, (1)에서 T-세포가 말초 혈액 단핵 세포 (PBMCs)의 개체군으로부터 분리되는 것인, 방법.
- [0147] 51. 단락 43에 있어서, 암이 자궁경부암, 항문암, 외음부암, 질암, 음경암, 구강인두암, 코인두암종, 후두 유두종증, 후두암, 두경부암, 또는 이들의 임의의 부위의 이형성증인 것인, 방법.
- [0148] 52. 단락 43에 있어서, 암이 HPV-양성인 것인, 방법.
- [0149] 53. 단락 43에 있어서, 대상체가 HPV-연관 암을 갖는 것으로 결정되는 것인, 방법.
- [0150] 54. 다음 단계를 포함하는, 대상체에서 암을 치료하는 방법:
- [0151] (1) 대상체로부터 T 세포를 분리하는 단계;
- [0152] (2) 다음을 포함하는 방법에 의해 인간 파필로마바이러스 (HPV)에 특이적인 T 세포의 개체군을 생성 또는 증폭하는 단계:
- [0153] (i) 인터류킨 (IL)-7 및 IL-15의 존재하에서 T-세포를 항원 제시 세포로 자극하는 단계로, 상기 항원 제시 세포가 하나 이상의 펩티드에 이전에 노출되었고, 상기 펩티드가 HPV의 하나 이상의 단백질 서열의 적어도 일부에 상응하는 서열을 포함하는 것인, 단계;

- [0154] (ii) 인터류킨 (IL)-7 및 IL-15의 존재 및 IL-6 및/또는 IL-12의 부재하에서 (i)로부터 수득된 T-세포를 항원 제시 세포로 자극하는 단계로, 상기 항원 제시 세포가 하나 이상의 펩티드에 이전에 노출되었고, 상기 펩티드가 HPV의 하나 이상의 단백질 서열의 적어도 일부에 상응하는 서열을 포함하고, (ii)가 선택적으로 1회 이상 반복되는 것인, 단계; 및
- [0155] (iii) 인터류킨 (IL)-7 및 IL-15의 존재, 및 동시-자극 세포의 존재하에서 (ii)로부터 수득된 T-세포를 항원 제시 세포로 자극하는 단계로, 상기 항원 제시 세포가 하나 이상의 펩티드에 이전에 노출되었고, 상기 펩티드가 HPV의 하나 이상의 단백질 서열의 적어도 일부에 상응하는 서열을 포함하고, (iii)가 선택적으로 1회 이상 반복되는 것인, 단계;
- [0156] (3) T 세포의 생성 또는 증폭된 개체군을 대상체에 투여하는 단계.
- [0157] 55. 단락 54에 있어서, (i)에서 T-세포의 자극이 IL-6 및/또는 IL-12의 존재하에서인 것인, 방법.
- [0158] 56. 단락 54에 있어서, (i) 및 (ii)에 사용된 항원 제시 세포가 수지상 세포 (DC), B-블라스트 (BB), 또는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMCs)인 것인, 방법.
- [0159] 57. 단락 54에 있어서, (iii)에 사용된 항원 제시 세포가 활성화 T 세포, 수지상 세포 (DC), B-블라스트 (BB), 또는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMCs)인 것인, 방법.
- [0160] 58. 단락 54에 있어서, 동시-자극 세포가 CD80+, CD86+, CD83+, 4-1BBL+, CD40+ 세포, OX40+ 세포 또는 이들의 조합인 것인, 방법.
- [0161] 59. 다음 단계를 포함하는, 대상체에서 암을 치료하는 방법:
- [0162] (1) 대상체로부터 T 세포를 분리하는 단계;
- [0163] (2) IL-7 및 IL-15의 존재 및 동시-자극 세포의 존재하에서 HPV 또는 HPV 항원에 특이적인 T-세포를 항원 제시 세포로 자극하는 단계로, 상기 항원 제시 세포가 하나 이상의 펩티드에 이전에 노출되었고, 상기 펩티드가 HPV의 하나 이상의 단백질 서열의 적어도 일부에 상응하는 서열을 포함하는 것인, 단계를 포함하는 방법에 의해 인간 파필로마바이러스 (HPV)에 특이적인 T 세포의 개체군을 생성 또는 증폭하는 단계; 및
- [0164] (3) T 세포의 생성 또는 증폭된 개체군을 대상체에 투여하는 단계.
- [0165] 60. 단락 59에 있어서, 항원 제시 세포가 활성화 T 세포, 수지상 세포 (DC), B-블라스트 (BB), 또는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMCs)인 것인, 방법.
- [0166] 61. 단락 59에 있어서, 동시-자극 세포가 CD80+, CD86+, CD83+, 4-1BBL+, CD40+ 세포, OX40+ 세포, 또는 이들의 조합인 것인, 방법.
- [0167] 전술한 내용은 발명의 상세한 설명이 보다 잘 이해될 수 있도록 하기 위해 본 발명의 특징 및 기술적 이점을 다소 광범위하게 개략적으로 설명하였다. 본 발명의 청구범위의 대상을 형성하는 본 발명의 추가적인 특징 및 이점이 이하에 설명될 것이다. 기술된 개념 및 특정 구현예가 본 발명의 동일한 목적을 수행하기 위해 다른 구조를 변형 또는 고안하기 위한 기초로서 용이하게 이용될 수 있음이 당업자에 의해 인식되어야 한다. 또한, 이러한 균등한 구성이 첨부된 청구범위에 개시된 바와 같은 발명의 사상 및 범주를 벗어나지 않는 것으로 이해되어야 한다. 추가의 목적 및 이점과 함께, 그의 구성 및 작동 방법 모두에 대한 본 발명의 특징적인 것으로 생각되는 신규한 특징은 첨부된 도면과 관련하여 고려될 때 다음의 설명으로부터 더 잘 이해될 것이다. 그러나, 도면 각각이 단지 예시 및 설명의 목적으로만 제공되고 본 발명의 한계의 정의로서 의도되지 않음이 명백히 이해될 것이다.
- [0168] 본 발명은 이러한 조합이 명백히 허용되지 않거나 명시적으로 회피되는 경우를 제외하고 기술된 양태 및 바람직한 특징의 조합을 포함한다.
- [0169] 본원에 사용된 항목 제목은 단지 조직적인 목적을 위한 것으로 기술된 청구 대상을 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다.
- [0170] 본 발명의 양태 및 구현예는 첨부된 도면을 참조하여, 예로서, 설명될 것이다. 추가의 양태 및 구현예는 당업자에게 자명할 것이다. 이 텍스트에 언급된 모든 문서는 본원에 참조로서 포함된다.
- [0171] 후술하는 청구범위를 비롯해, 본 명세서 전반에 걸쳐서, 맥락이 달리 요구하지 않는 한, 단어 "포함하다" 및 "

포함한다" 및 "포함하는"과 같은 변형은 명시된 정수 또는 단계 또는 정수 또는 단계의 그룹을 포함하지만 임의의 다른 정수 또는 단계 또는 정수 또는 단계의 그룹을 배제하지 않는 것을 의미하는 것으로 이해될 것이다.

도면의 간단한 설명

[0172]

도 1A는 HPV16-특이적 T-세포의 생산을 위해 특정 조건을 이용하는 당해 분야의 방법을 설명한다. 도 1A는 펩믹스 비함유 (Neg), HPV16 E6 펩믹스 (HPV16 E6) 또는 HPV16 E7 펩믹스 (HPV16 E7)가 로딩된 자가 DCs로 3명의 HPV-연관 암 환자들 (OCV, HND 및 HNC로 식별됨)로부터의 PBMCs의 자극에 대한 스팟 형성 콜로니 (spot forming colony)의 생산을 보여주는 막대 차트이다. 환자 OCV의 경우, 좌측으로부터 우측으로 존재하는 3개의 막대가 Neg, HPV16 E6 및 HPV16 E7이다. HND 및 HNC 환자의 경우, 좌측으로부터 우측으로 존재하는 2개의 막대가 HPV16 E6 및 HPV16 E7이다.

도 1B는 특정한 신규 조건하에서, IL-7 및 IL-15의 존재 및 IL-6 및 IL-12의 부재하에서 T-세포의 자극에 의한 HPV16 또는 HPV18에 특이적인 T-세포 혼합물의 생산을 이용하는 본 발명의 방법을 설명한다. 도 1B는 3명의 HPV-연관 암 환자들 (OCV, PCV 및 HND로 식별됨)로부터의 PBMCs의 자극에 대한 스팟 형성 콜로니 (SFC)의 생산을 보여주는 막대 차트이다. 환자 OCV의 경우, 좌측으로부터 우측으로 존재하는 5개의 막대가 펩믹스 비함유 (Neg), HPV16 E6 펩믹스 (HPV16 E6), HPV16 E7 펩믹스 (HPV16 E7), HPV18 E6 펩믹스 (HPV18 E6), 및 HPV18 E7 펩믹스 (HPV18 E7)이다. 환자 PCD의 경우, 좌측으로부터 우측으로 존재하는 2개의 막대가 HPV16 E6 및 HPV16 E7이다. 환자 HND의 경우, 좌측으로부터 우측으로 존재하는 4개의 막대가 HPV16 E6, HPV16 E7, HPV18 E6 및 HPV18 E7이다.

도 2는 주입 후 시점에서 환자 #1에서 TGF-베타에 대한 음성 수용체 (DNRII)로 형질도입된 주입된 HPV 자극된 T-세포의 생체 내 증폭 및 지속을 보여주는 차트이다.

도 3은 주입 후 시점에서 환자 #2에서 TGF-베타에 대한 음성 수용체 (DNRII)로 형질도입된 주입된 HPV 자극된 T-세포의 생체 내 증폭 및 지속을 보여주는 차트이다.

도 4는 환자 #2에 대한 PET 스캔 (좌측 및 중앙) 및 신체검사의 사진 (우측)을 보여준다. 상부 행: 전-처리. 하부 행: 본 발명에 따라 생산된 HPV 자극된 T 세포로의 처리 후 6주째.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0173]

본 출원의 범위는 명세서에 기재된 공정, 기계, 제조, 물질의 조성, 수단, 방법, 및 단계의 특정 구현예로 한정되는 것으로 의도되지 않는다.

[0174]

오래 지속된 특허법 협약에 따라, 단어 "하나 (a)" 및 "한 (an)"은 이를 포함하는 단어와 함께 청구범위를 비롯한 본 명세서에 사용되는 경우, "하나 이상"을 나타낸다. 본 발명의 일부 구현예는 발명의 하나 이상의 요소, 방법 단계, 및/또는 방법으로 이루어지거나 이들로 필수적으로 이루어질 수 있다. 본원에 기술된 임의의 방법 또는 조성물이 본원에 기술된 임의의 다른 방법 또는 조성물에 대해 구현될 수 있음이 고려된다.

[0175]

본 발명은 HPV 감염 및 HPV-연관 의학적 상태를 치료하는 것을 비롯해, HPV-특이적 T-세포, 예컨대 HPV16- 및/또는 HPV18-특이적 T-세포를 필요로 하는 개체를 위한 치료적 T-세포의 생산 및 사용에 관한 것이다. 특정 구현예에서, 방법 및 조성물은 HPV 감염과 간접적으로 또는 직접적으로 관련된 종양을 치료하는데 유용하고, 이러한 종양은 양성 또는 악성일 수 있다. 13개 내지 18개 사이의 HPV 균주가 높은 발암성 위험을 부여하는 것으로 특정되었으며, 이들 중 12개 균주가 HPV 종 7 (HPV-18, -39, -45, -59, -68) 및 종 9 (HPV-16, -31, -33, -35, -52, -58, -67)에 속한다. HPV 타입 6 및 11은 후두 유두종을 일으킨다.

[0176]

I. HPV 항원(들) 및 펩믹스의 생성

[0177]

본 발명의 방법은 T-세포에 펩티드의 혼합물을 제시하는 항원-제시 세포를 이용한다. 이렇게 "로딩된 (loaded)" APCs는 말초 혈액 T-세포의 자극을 위해 말초 혈액 T-세포에의 노출 전에 생성되고, 로딩된 APCs의 생성은 말초 혈액 T-세포에 대한 자극 단계를 수행하는 개체 또는 실체에 의해 수행되거나 되지 않을 수 있다. 따라서, 일부 구현예에서, 펩티드 라이브러리의 유효량이 궁극적으로 치료적 CTLs를 생성하는 방법의 일부로서 APCs에 제공된다. 본 발명의 방법에서, 자극 단계 전에, APCs는 충분한 양의 펩티드 라이브러리에 노출된다. 특정 경우에, 이 라이브러리는 동일한 항원의 일부 또는 전체에 걸쳐 있는 펩티드의 혼합물 ("펩믹스")을 포함하지만, 일부 경우에, 라이브러리는 하나 이상의 항원의 일부 또는 전체에 걸쳐 있는 펩믹스를 포함하고, 하나 이상의 항원은 동일한 HPV 유래이거나 아닐 수 있다. 특정 구현예에서, APCs에 대한 펩티드는 비-천연이고, 이

들은 화학적으로 합성되거나 제조합적 수단에 의해 생산되거나 또는 되지 않을 수 있다.

- [0178] 하나 이상의 HPV 항원으로부터의 펩티드 혼합물의 라이브러리를 이용하는 경우, 다양한 펩티드는 소정의 단백질의 임의의 부분으로부터 유래할 수 있지만, 특정 경우에 펩티드는 단백질의 대부분 또는 전부의 길이에 집합적으로 걸쳐 있고, 상기 펩티드의 서열은 적어도 부분적으로 중첩되어 특정 항원(들)의 전체 원하는 영역의 적용을 용이하게 한다. 일부 경우에, 펩티드는 펩티드가 그에 상응하는 각각의 항원의 하나 이상의 공지된 에피토프 또는 도메인의 길이에 걸쳐 있다. 특정 영역은, 예를 들어 N-말단 도메인, C-말단 도메인, 세포외 도메인, 세포내 도메인과 같은 영역을 포함하는, 영역의 길이에 걸쳐 있는 펩티드에 의해 커버될 수 있다.
- [0179] 그로부터 펩티드가 유래하는 항원은 임의의 종류일 수 있는 HPV에 대한 항원일 수 있지만, 특정 구현예에서 항원은 세포독성 T-세포를 암을 비롯해 HPV 감염과 연관된 종양으로 지시하게 하는 그러한 것들이다. 특정 구현예에서, 펩티드는 HPV16 및/또는 HPV18을 포함하는 적어도 하나의 HPV 유형의 하나 이상의 항원의 적어도 일부로부터 유래하거나, 또는 이에 상응하는 서열을 갖는다. 예를 들어, 후기 자궁경부암에서, HPV 바이러스는 종양 세포 계층에 통합되어 E6 및 E7을 제외한 그의 다른 모든 유전자를 상실하고, 따라서 일부 경우에 이들 항원이 표적된다. 바이러스가 통합되기 전과 같은, 암의 초기 단계를 치료할 수 있는 구현예에서는, 예를 들어, E5 및 L1 및 L2를 포함하는, E6 및 E7 이외의, 항원으로부터의 펩티드를 이용할 수 있다. 그러나, 고 위험성 HPV 유형의 2개 주요 종양단백질이 E6 및 E7임을 감안하면, 특정 구현예에서, 펩티드의 서열은 임의의 HPV, 그러나 구체적으로 HPV16 및/또는 HPV18 유래의 E6 및/또는 E7로부터 수득된다. 항원 E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, L1, 및/또는 L2 중 어느 하나로부터의 펩티드가 본 발명의 방법에 이용될 수 있다.
- [0180] 일부 경우에, 펩믹스 라이브러리는 단일 유형의 HPV 바이러스로부터의 하나 이상의 항원에 상응하는 펩티드를 포함하고, 이들 펩티드는 당해의 전체 항원(들)에 걸치는 서열 적용범위를 제공하거나 하지 않을 수 있다. 다른 경우에, 펩믹스 라이브러리는 하나보다 많은 HPV 바이러스로부터의 하나 이상의 항원에 상응하는 펩티드를 포함하고, 이들 펩티드는 당해의 전체 항원(들)에 걸치는 서열 적용범위를 제공하거나 하지 않을 수 있다. 펩믹스는 하나 이상의 특정 항원의 하나 이상의 특정 영역에 상응하거나 하나 이상의 특정 항원의 전체에 상응하는 펩티드에 대해 농화되거나 (enriched) 되지 않을 수 있다.
- [0181] 본 발명에 사용되는 펩믹스는, 예를 들어 상업적으로 이용가능한 펩티드 라이브러리 유래일 수 있거나 합성적으로 생성될 수 있다. 이용가능한 라이브러리의 예시에는 JPT Technologies사 (Springfield, VA) 또는 Miltenyi Biotec사 (Auburn, CA)로부터의 것들이 포함된다. 당업자는, 예를 들어, HPV16 E6, HPV16 E7, HPV18 E6, 및 HPV18 E7의 공지된 서열을 토대로, 이들의 예시적인, 각각의 서열에 상응하는 펩티드를 생성할 수 있는 충분한 정보를 가질 것이다. HPV16 E6 단백질 서열의 예시는 National Center for Biotechnology Information의 GenBank® 데이터베이스에서 GenBank® 등재번호 AIQ82776.1 GI:688010703으로 이용가능하다. HPV16 E7 단백질 서열의 예시는 GenBank® 등재번호 AIQ82814.1 GI:688010789에 있다. HPV18 E6 단백질 서열의 예시는 GenBank® 등재번호 AGU90423.1 GI:537801975에 있다. HPV18 E7 단백질 서열의 예시는 GenBank® 등재번호 AGU90424.1 GI:537801976에 있다.
- [0182] 특정 구현예에서, 라이브러리는 이들 각각의 항원에 상응하는 특정 길이의 펩티드로 구성되지만, 일부 경우에 라이브러리는 2개 이상의 상이한 길이의 펩티드의 혼합물로 구성된다. 펩티드는 특정 길이(들)의 것일 수 있고, 이들은 특정 양이 순서대로 중첩할 수 있지만, 일부 라이브러리에서는 중첩 길이의 가변성이 있을 수 있다. 특정 구현예에서, 펩티드는, 예를 들어 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 또는 35개 이상의 아미노산 길이일 수 있다. 특정 구현예에서, 예를 들어, 적어도 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 또는 34개 아미노산 길이의 펩티드 사이에 중첩이 있다. 특정 구현예에서, 펩티드는 15개 아미노산 길이이고 11개 아미노산이 다른 펩티드와 중첩한다. 상이한 펩티드의 혼합물은 상이한 펩티드를 임의의 비율로 포함할 수 있지만, 일부 구현예에서, 각각의 특정 펩티드는 혼합물 내에 다른 특정 펩티드와 실질적으로 동일한 수로 존재한다. 펩티드에 대한 서열 상의 항원의 적용범위가 무작위적이고 항원의 소정의 영역에 걸쳐 실질적을 균일할 수 있지만, 일부 구현예에서, 라이브러리는, 예를 들어 에피토프 또는 그의 일부를 암호화하는 것으로 알려진 하나 이상의 펩티드와 같은 하나 이상의 특정 펩티드에 대해 농화될 수 있다.
- [0183] 특정 구현예에서, 특정 항원 단백질에 대한 펩믹스는, 예를 들어 8 내지 10개 아미노산 길이인 모든 가능한 HLA 클래스 I 에피토프를 포함한다. 특정 구현예에서, 더 긴 펩티드는 특정 펩티드에 대한 모든 클래스 II 에피토프를 커버하는데 이용된다. 특정 양태에서, 펩티드는 25개 아미노산이 중첩하는 최대 30개 아미노산 길이이다.

[0184] II. 치료적 T-세포를 생산하고 사용하는 방법

[0185] A. 치료적 T-세포의 생산

[0186] 특정 양태에서, 본 발명은 적어도 하나의 HPV 바이러스로부터의 하나 이상의 항원을 표적하는, 세포독성 T-세포와 같은 면역 세포의 발생에 관한 것이다.

[0187] 본원에 기술된 방법은 면역 세포의 자극 및/또는 증폭을 포함할 수 있다. 방법은 말초 혈액 세포, 예컨대 말초 혈액 단핵 세포의 자극 및/또는 증폭을 포함할 수 있다. 방법은 면역 세포의 개체군 (예컨대, PBMCs)의 내부로부터의 면역 세포 개체군 (예컨대 T-세포의 개체군)의 증폭을 포함할 수 있다. 예를 들어, T-세포의 개체군은 PBMCs의 개체군 내부의 T-세포의 자극에 의해 PBMCs의 개체군의 내부로부터 증폭될 수 있다. 따라서, 본원에 기술된 방법의 구현예에서, T 세포의 자극 및/또는 증폭은 PBMCs의 개체군의 자극을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, T-세포의 개체군은 종양-침윤 림프구의 개체군 내부로부터 T-세포의 자극에 의해 종양-침윤 림프구의 개체군 내부로부터 증폭될 수 있다. 따라서, 본원에 기술된 방법의 구현예에서, T 세포의 자극 및/또는 증폭은 종양-침윤 림프구 개체군의 자극을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, T-세포의 개체군은 T-세포의 개체군 (예컨대, 이중 특이성의 T-세포의 개체군) 내부로부터 증폭될 수 있고, 이는 혈액 시료, PBMCs의 개체군, 또는 종양-침윤 림프구의 개체군으로부터 획득될 수 있다. 자극/증폭은 HPV-특이적 면역 세포 (예컨대, HPV-특이적 CTLs과 같은 HPV-특이적 T 세포)의 수를 증가시킬 수 있고/있거나, 자극/증폭의 종료 시에 세포 개체군에서 이러한 세포의 증가된 비율을 초래할 수 있다. 방법은 T 세포의 자극 및/또는 증폭을 포함할 수 있다. 세포는 치료되는 환자 (즉, 자가 세포)로부터, 또는 다른 개체 (즉, 동종이형 세포)로부터 획득되었을 수 있다. 방법은 특정 구현예에서, 단리된 면역 세포의 자극 및/또는 증폭을 포함한다. 즉, 실질적으로 적혈구와 같은 비-면역 세포를 포함하지 않는 세포의 개체군에 대해 특정 방법이 수행될 수 있다. 일부 경우에, 면역 세포는 단리된 PBMCs, 또는 단리된 T 세포이다. 세포는 혈액 시료, 예컨대 환자 또는 개체로부터 획득된 혈액 시료로부터 획득되었을 수 있다. 세포는 조직 시료 또는 생검으로부터 획득되었을 수 있다. 세포는 종양 (예컨대, 종양-침윤 림프구)로부터 획득되었을 수 있다. 본원에 기술된 특정 방법은 환자로부터 획득된 시료로부터 PBMCs 및/또는 T 세포를 획득하는 단계를 포함한다. 방법의 특정 구현예는 환자 또는 개체로부터 혈액 또는 세포 시료를 획득하는 단계를 포함하지 않지만, 그 대신에 이전에 획득된 시료 또는 세포에 대해 수행된다. 방법은 PBMCs 및/또는 T 세포와 같은 면역 세포에 대해 시료를 농화하는 것과 같이, 시료를 가공하는 (processing) 것을 포함할 수 있다. 이러한 방법은 시료 내 적혈구, 혈소판, 혈청 및/또는 혈장의 양을 제거하거나 실질적으로 감소시키는 것을 포함할 수 있다. 이는 적혈구와 같은 다른 세포를 실질적으로 함유하지 않는 면역 세포의 개체군을 초래할 수 있다. 본원에 기술된 방법은 단리된 면역 세포, 또는 다른 세포 이외에 면역 세포를 함유하는 시료에 대해 수행될 수 있다.

[0188] T-세포를 생산하는 방법에서, 말초 혈액 T-세포는 적어도 하나의 HPV 항원의 일부 또는 전체에 걸쳐 있는 하나 이상의 펩티드에 노출되었던 APCs로 초기에 자극될 수 있다. 항원성 펩티드는 펩티드 혼합물의 라이브러리에서 APCs에 제공될 수 있고, 펩믹스의 다수의 라이브러리가 APCs의 동일한 집합체에 제공될 수 있다. 일부 구현예에서, 집합체는 면역우성 및 하위우성 (subdominant) 항원 둘 다를 포함한다.

[0189] 본 발명의 구현예에서, 치료적 T-세포가 생성되어 HPV 감염을 갖거나 HPV 감염으로부터 간접적으로 또는 직접적으로 초래되는 HPV-연관 의학적 상태를 가질 위험이 있는 개체에게 제공될 수 있다. 치료적 T-세포를 생산하는 방법에서는, 특정 조건하에서 말초 혈액 T-세포가, 예를 들어 E6 및/또는 E7을 비롯해 HPV16 및/또는 HPV18 항원의 전부 또는 일부를 포함하는 하나 이상의 항원의 일부 또는 전체에 걸쳐 있는 펩티드의 라이브러리가 로딩된 APCs와 혼합된다. 특정 구현예에서, 자극 단계를 위해, T-세포는 PBMCs의 개체군 내에 존재한다.

[0190] 일부 구현예에서, 특정 단계에서 사용된 APCs는 수지상 세포 (DCs)일 수 있다. DCs의 생성 방법은 당해 분야에 익히 공지되어 있고, 예컨대, Ramos *et al.* (상동)을 참조한다. 단핵구는 CD14 선택에 의해 PBMCs로부터 단리되어 DC 배지 및 2 mM 알라닌-글루타민 및 800 U/ml 과립구/대식세포 콜로니 자극 인자 (GM-CSF) 및 1000 U/ml 인터류킨 4 (IL-4) 중에서 5일간 배양될 수 있다. GM-CSF 및 IL-4는 3일째에 보충될 수 있다. 5일째에, DCs는 10 ng/ml 인터류킨-1 β (IL-1 β), 100 ng/ml 인터류킨 6 (IL-6), 10 ng/ml 프로스타글란딘 E2, 800 U/ml GM-CSF 및 1000 U/ml IL-4 함유 DC 배지에서 성숙된다. DC 성숙은 CD80, CD83, CD86 및 HLA-DR의 상향조절을 검출하기 위해 유세포 분석으로 평가될 수 있다.

[0191] 일부 구현예에서, 특정 단계에 사용된 APCs는 활성화 T-세포이다. 활성화 T-세포는 사혈된 (venesected) 혈액으로부터 단리된 자가 PBMC의 일부를 사용하여 생성된 다중클론 T-세포 (T-APCs)일 수 있다. 세포는 항-CD3 및 항-CD28 항체로 코팅된 세포 배양 플레이트에서의 배양에 의해 활성화될 수 있다. 그 후에 세포는 2주간 IL-

2의 존재하에서 증폭하도록 배양된다. 증폭된 T-APC는 나중에 사용하기 위해 동결-보존될 수 있다. 자극을 위해 (예컨대, 자극의 3차 주기 및 선택적으로 후속 자극을 위해) T-APC를 사용하기 2-3일 전에, 동결-보존된 세포를 해동시키고 항-CD3 및 항-CD28 항체-코팅된 세포 배양 플레이트에서 재-자극시킨다. 자극 당일에, T-APC 세포를 수확하고 HPV E6/E7 펩티드로 감작시킨 후, 1:1 비율로 HPV 자극된 T-세포의 진행 중인 배양물에 첨가한다.

[0192] 일부 구현예에서, 특정 단계 및/또는 방법에서 사용된 APCs는 B-블라스트 (BBs)일 수 있다. B-블라스트는, 예를 들어 환자의 자가 PBMC로부터 생성될 수 있다. PBMCs 내부의 B 림프구는 방사선 조사된 동종이형 CD40L-발현 MRC5 상피 세포주의 공-배양에 의해 활성화되고 100 U/ml IL-4 및 1 µg/ml 사이클로스포린 A 함유 배지에서 증폭된다.

[0193] 일부 구현예에서, HPV16 및 HPV18 중 하나 또는 둘 다로부터의 적어도 하나의 항원을 표적하는 T-세포를 생성하는 방법이 제공되고, 이는 일반적으로 다수의 PBMCs를 하나 이상의 특정 HPV16 및/또는 HPV18 바이러스 항원에 상응하는 펩티드 라이브러리로부터의 펩티드에 대해 로딩된 다수의 APCs와 접촉시킴으로써 발생한다. 특정 구현예에서, 세포의 두 개체군의 노출은 T-세포의 증폭을 허용한다. 특정 구현예에서, 자극 단계(들)은, 포유류 (예컨대, 쥐과, 인간) 또는 인간 사이토카인일 수 있는, 하나 이상의 특정 사이토카인의 존재하에서 일어난다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 사이토카인은 IL-7 및 IL-15이지만, 대안적인 구현예에서, 사이토카인(들)은 IL-15, IL-7, IL-21, IL-12, IL-6, IL-4, 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된다. 특정 구현예에서, 방법의 하나 이상의 단계는 IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-12, 및/또는 IL-21의 존재하에서 일어나지 않지만, 대안적으로 IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-12, 및/또는 IL-21이 이용될 수 있다. 사이토카인의 존재에 대한 언급은 외인성으로 첨가된 사이토카인의 존재, 즉 세포의 배양물 내부에 존재하거나 그에 의해 분비된 임의의 사이토카인을 배제하는 것이다. 일부 구현예에서, 펩티드는 HPV 항원의 일부 또는 전부에 걸치기 위해 서열상으로 중첩하는 펩티드로서 더욱 정의된다. 예를 들어, 특정 양태에서, 펩티드는 적어도 10개 아미노산, 특히 11개가 중첩하고, 일부 구현예에서, 펩티드는 적어도 12개 이상의 아미노산 길이, 특히 15개 아미노산 길이이다.

[0194] 세포 배양물에서의 포함을 위한 소정의 사이토카인의 적절한 양 또는 농도의 선택은 당업자 또는 통상의 기술자의 능력 내이다. 예시로서, 다음은 사용될 수 있는 특정 인터류킨의 목록 및 적합한 농도의 예이다:

[0195] 인터류킨 6 (IL-6): 50 내지 150 ng/ml, 약 50 ng/ml, 60 ng/ml, 70 ng/ml, 80 ng/ml, 90 ng/ml, 100 ng/ml, 110 ng/ml, 120 ng/ml, 130 ng/ml, 140 ng/ml 또는 150 ng/ml 중 하나;

[0196] 인터류킨 7 (IL-7): 5 내지 15 ng/ml, 약 5 ng/ml, 6 ng/ml, 7 ng/ml, 8 ng/ml, 9 ng/ml, 10 ng/ml, 11 ng/ml, 12 ng/ml, 13 ng/ml, 14 ng/ml 또는 15 ng/ml 중 하나;

[0197] 인터류킨 12 (IL-12): 5 내지 15 ng/ml, 약 5 ng/ml, 6 ng/ml, 7 ng/ml, 8 ng/ml, 9 ng/ml, 10 ng/ml, 11 ng/ml, 12 ng/ml, 13 ng/ml, 14 ng/ml 또는 15 ng/ml 중 하나;

[0198] 인터류킨 15 (IL-15): 5 내지 15 ng/ml, 약 5 ng/ml, 6 ng/ml, 7 ng/ml, 8 ng/ml, 9 ng/ml, 10 ng/ml, 11 ng/ml, 12 ng/ml, 13 ng/ml, 14 ng/ml 또는 15 ng/ml 중 하나.

[0199] 하기 표 1은 본 발명의 방법의 특정 구현예의 예시를 제공한다.

표 1

방법의 요소의 예시

구현예		구현예를 위한 예시
제1 자극	T-세포의 공급원	말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 비-부착성 PBMC
	항원-제시 세포 (APC)	수지상 세포 (DC), PBMCs 또는 B-블라스트
	사이토카인	IL-15 및 IL-7, 선택적으로 IL-6 및/또는 IL-12 및/또는 IL-21 및/또는 IL-4와의 조합
	항원	HPV용 바이러스 펩믹스
제2 자극	T-세포의 공급원	제1 자극의 산물
	APCs	DC PBMCs 자가 활성화 T-세포 (AATC)
	사이토카인	IL-15 및 IL-7, 바람직하게는 IL-6 또는 IL-12 부재 및 선택적으로 IL-15 및 IL-7이 유일한 인터류킨임
	항원	HPV용 바이러스 펩믹스
제3 자극 (및 필요한 경우 후속 자극)	T-세포의 공급원	제2 자극의 산물
	APCs	펩믹스-로딩된 AATCs + 동시-자극 세포
	사이토카인	IL-15 및 IL-7, 바람직하게는 IL-6 또는 IL-12 부재 및 선택적으로 IL-15 및 IL-7이 유일한 인터류킨임
	동시-자극 세포	CD86, 4-1BB, 및 CD83를 발현하는 세포, 예컨대 K562 세포

[0200]

[0201]

따라서, 특정 구현예에서, T-세포의 개체군 (개체군이 실질적으로 모두 T-세포를 포함할 수 있거나 T-세포의 개체군이 PBMCs 내와 같은 세포의 또 다른 개체군 내인 경우)은 APCs의 개체군에 노출되어, 적어도 다음의 구체적인 특징을 갖는 T 세포주를 생성한다: a) HPV16 E6 및/또는 E7 표적화에의 유효성 및/또는 HPV18 E6 및/또는 E7 표적화에의 유효성; b) 다클론성; c) TH1 편향 (bias); 또는 d) 이들의 조합. 생성된 T 세포주는 HPV 중 7 (HPV-18, -39, -45, -59, -68) 및 중 9 (HPV-16, -31, -33, -35, -52, -58, -67), 및 타입 6 및 11을 표적하는데 효과적일도록 생산될 수 있고, 이는 다음 항원의 임의의 하나 이상에 대해 지시된 펩믹스의 결과일 수 있다: E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, L1, 및/또는 L2.

[0202]

일부 경우에, T-세포는 1회 이상 자극되고, 상이한 자극 단계는 세포의 개체군을 동일한 조건에 노출시키거나 시키지 않을 수 있다. 특정 구현예에서, 제1 자극은 제2 자극 및/또는 제3 자극을 포함하는 후속 자극과는 다른 조건을 갖는다. 특정 구현예에서, 방법의 제1 자극 단계는 펩믹스-로딩된 DCs 또는 펩믹스-로딩된 PBMCs인 APCs를 이용하고 IL-7 및 IL-15를 이용한다. 이 자극 단계는 선택적으로 1회 이상 반복될 수 있다.

[0203]

방법의 특정 구현예에서, 말초 혈액 T-세포 (또는 PBMCs)의 펩믹스 또는 APCs에의 초기 노출 후 8일과 10일 사이에서, 8일, 9일, 또는 10일째에 PBMCs가 재-자극될 수 있지만, 그 이후는 아니고, 이어서 후속 재-자극이 15일, 16일, 또는 17일째에 발생할 수 있다.

[0204]

제1 자극 단계 (제1 자극 단계의 선택적인 반복을 포함함)에 후속하는 자극 단계에서, 제1 자극 후 수득된 결과의 T-세포 (이는 세포의 이중 개체군 내 일 수 있음)는 펩믹스-로딩된 DCs 또는 펩믹스-로딩된 PBMCs 및/또는 자가 활성화 T-세포에 노출된다. 제1 및 제2 자극 단계에 후속하는 자극에서, 제2 또는 이후 자극으로부터 수득된 T-세포 (이는 세포의 이중 개체군 내에 존재할 수 있음)는 펩믹스-자가 활성화 T-세포에 노출된다. 임의의 자극 단계에서 사용될 수 있는 동시-자극 세포는 적어도 CD86, 4-1BB, CD83, CD40, OX40, 및/또는 CD80을 발현하는 세포를 포함한다. 특정 경우에, 동시-자극 세포는 K562 세포이다.

[0205]

일부 구현예에서, 방법의 단계 도중에 배양 중인 세포는 변형된다. 특정 구현예에서, 세포는 특정 목적 또는 기능에 대해 세포를 효과적으로 또는 더욱 효과적으로 만드는 유전자 산물을 발현하는 폴리뉴클레오티드를 보유하도록 변형되고, 예컨대 특정 표적을 표적하는데 효과적이거나 더욱 효과적이고/이거나, T-세포 매개 세포독성

에 대한 기능이 강화되고/되거나, 종양 항원-특이적 세포 면역에 저항하도록 변형된다.

- [0206] 일부 구현예에서, 세포는 T-세포가 특정 항원을 발현하는 것과 같이, 원하는 표적 세포를 효과적으로 또는 더욱 효과적으로 표적하게 하는 특징의 비-천연 수용체를 발현하도록 변형된다. 세포는 키메라 항원 수용체 (CAR), $\alpha\beta$ T-세포 수용체 등을 발현하도록 변형될 수 있다. 세포는, 예를 들어 2일 내지 5일의 배양 사이에 도입되는 벡터와 같이, 특정 시점에서 방법 도중에 발현 벡터 (바이러스성 (레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스 등을 포함함) 또는 비-바이러스성일 수 있음)를 발현하도록 변형될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포는 각각의 자극 후 약 3일 이내에 발현 벡터에 노출되지만, 이러한 경우에 변형은 더 적은 장기 잠재성을 갖는 더 분화된 T-세포에서 발생한다 (이는 특정 상황에서 바람직함).
- [0207] 특정 구현예에서, 세포는, 예를 들어, 종양 항원, 예컨대 EphA2, HER2, GD2, 글리피칸-3, 5T4, 8H9, $\alpha_v\beta_6$ 인 테그린, B 세포 성숙 항원 (BCMA) B7-H3, B7-H6, CAIX, CA9, CD19, CD20, CD22, 카파 경쇄, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, ERBB3, ERBB4, ErbB3/4, FAP, FAR, FBP, 태아 AchR, 엽산 수용체 α , GD2, GD3, HLA-AI MAGE A1, HLA-A2, IL11Ra, IL13Ra2, KDR, 람다, 루이스-Y, MCSP, 메소텔린, Muc1, Muc16, NCAM, NKG2D 리간드, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSC1, PSMA, ROR1, Sp17, SURVIVIN, TAG72, TEM1, TEM8, VEGRR2, 암종배아 (carcinoembryonic) 항원, HMW-MAA, VEGF 수용체, 및/또는 종양의 세포의 기질에 존재하는 다른 예시적인 항원, 예컨대 피브로넥틴의 암태 아성 (oncofetal) 변형체, 테나신 (tenascin), 또는 종양의 괴사성 영역 및 다른 종양-연관 항원 또는 종양의 게놈 분석 및/또는 차등적 발현 연구를 통해 확인된 실행가능한 (actionable) 돌연변이를 표적하는 CAR을 발현하도록 변형된다.
- [0208] 일부 구현예에서, 세포는, 예를 들어, 형질전환 성장인자 베타 (TGF- β)에 의해 매개되는 것과 같은 종양 항원-특이적 세포 면역에 내성하도록 변형된다. 예를 들어, 세포는, 예컨대 문헌 [Foster et al., Antitumor activity of EBV-specific T lymphocytes transduced with a dominant negative TGF-beta receptor. *J Immunother.* 2008; 31: 500-505, 본원에 참조로서 포함됨]에 기술된 바와 같이, TGF-베타에 대한 우성의 음성 수용체 (DNRII)를 발현하도록 변형될 수 있다. 이는 면역원성 헤마글루티닌 태그의 제거에 의해 변형되는 우성의 음성 TGF- β 타입 II 수용체 (DNRII)를 암호화하는 레트로바이러스 발현 벡터로 세포를 형질감염시키는 것을 포함할 수 있다. 이렇게 변형된 T-세포는 TGF- β 분비 종양의 존재하에서 비변형된 T-세포에 비해, 증강된 항종양 활성을 포함하는 기능적 이점을 갖는 것으로 나타났다 (Foster et al., 상동).
- [0209] 본 발명에 따른 방법은 선행 기술 방법에 비해 바이러스-특이적 T-세포의 개체군에 대한 증폭 속도를 향상시킬 수 있다. T-세포 개체군에 대한 증폭 속도는 당업자에게 익히 공지된 방법에 의해 분석될 수 있다. 방법은 하나 이상의 시점에서 T-세포의 수를 측정하는 것을 포함한다. 예를 들어, T-세포의 수는 본 발명에 따른 방법을 수행한 후 결정되어 방법 개시 전의 T-세포의 수와 비교될 수 있고; 그 후에 T-세포 수의 배수 증폭이 계산될 수 있다.
- [0210] 증폭 속도는 또한 시간의 경과에 따른 T-세포에 의한 세포 분열을 분석함으로써 결정될 수 있다. 소정의 T-세포 개체군에 대한 세포 분열은, 예컨대 그 전체가 본원에 참조로서 포함되는 문헌 [Fulcher and Wong, *Immunol Cell Biol* (1999) 77(6): 559-564]에 기술된 바와 같이, 예를 들어 ^3H -티미딘 통합의 시험관 내 분석 또는 CFSE 희석 분석에 의해 분석될 수 있다.
- [0211] 본 발명에 따른 방법에 의해 달성되는 증폭 속도의 개선은 본 발명에 따른 방법을 수행하고, 그 방법에서 T-세포의 증폭을 비교가능한 대조군 방법, 예컨대 Ramos et al., (*J Immunother* 2013; 36: 66-76)의 방법 그대로와 비교함으로써 결정될 수 있다.
- [0212] 일부 구현예에서, 본 발명에 따른 방법에서 T-세포의 개체군에 대한 증폭 속도는 비교가능한 대조군 방법에서의 증폭 속도의 적어도 1.001배, 1.002배, 1.003배, 1.004배, 1.005배, 1.006배, 1.007배, 1.008배, 1.009배, 1.01배, 1.02배, 1.03배, 1.04배, 1.05배, 1.06배, 1.07배, 1.08배, 1.09배, 1.1배, 1.2배, 1.3배, 1.4배, 1.5배, 1.6배, 1.7배, 1.8배, 1.9배, 또는 2배 중 하나이다.
- [0213] 증폭 속도는 바이러스-특이적 T-세포 개체군, 또는 총 T-세포 개체군의 것일 수 있다.
- [0214] 본 발명의 방법에 따라 생성/증폭된 바이러스-특이적 T-세포는 적어도 선행 기술의 방법에 따라 생성/증폭된 바이러스-특이적 T-세포와 동일한 기능적 특성을 유지할 수 있다. 즉, 가속화된 증폭 속도는 증폭된 T-세포의 기능적 특성에 부정적인 영향을 미치지 않는다.

- [0215] 예를 들어, 방법이 바이러스-특이적 T-세포의 개체군을 생성/증폭하는 구현예에서, T-세포는 선행 기술의 방법에 따라 증폭된 바이러스-특이적 T-세포와 같이 이 바이러스의 펩티드로 감염되거나 이를 포함/발현하는 세포와 유사한 세포독성을 나타낸다.
- [0216] 증폭된 T-세포에 의한 세포독성은, 예컨대 T-세포가 상이한 효과기 (effector) (즉, T-세포) 대 표적 (즉, APC) 비율에서 그에 특이적인 바이러스의 펩티드를 제시하는 APCs와 증폭된 T-세포 개체군을 배양하고, APCs의 특이적 용해를 측정함으로써 분석될 수 있다. 예를 들어, HPV-특이적 CTL 개체군의 세포독성은 상이한 효과기 대 표적 비율에서 HPV-형질전환 LCL의 특이적 용해를 측정함으로써 분석될 수 있다.
- [0217] **B. 치료적 T-세포의 사용**
- [0218] 특정 구현예에서, 본 발명의 방법에 의해 사용된 세포는, 바이러스 감염에 의해 야기되는 것을 비롯한, 의학적 상태의 치료를 위해 이를 필요로 하는 개체에게, 또는 의학적 상태의 증상이 전혀 검출 가능하지 않거나 나타나지 않는 바이러스 감염을 표적하도록 제공된다. 본원에 사용된 바와 같이, "치료" 또는 "치료하는"은 질병 또는 병리학적 상태의 증상 또는 병리에 임의의 유익한 또는 바람직한 효과를 포함하며, 치료되는 질병 또는 상태, 예컨대 암의 하나 이상의 측정가능한 마커에서의 최소 감소조차 포함할 수 있다. 치료는 선택적으로 질병 또는 상태의 증상의 감소 또는 개선, 또는 질병 또는 상태의 진행의 지연을 포함할 수 있다. "치료"가 반드시 질병 또는 상태, 또는 이의 관련 증상의 완전한 박멸 또는 치유를 나타내는 것은 아니다.
- [0219] 본 발명에 의해 포함되는 방법에서, 치료적 T-세포는 단일의 비-HPV 바이러스에 의해 직접적 또는 간접적으로 야기되는 바이러스-연관 질병을 치료하는데 이용되거나 다르게는 단일 비-HPV 바이러스에 대해 혈청 양성인 (seropositive) 개체에게 제공된다. 다른 경우에, 치료적 T-세포는 하나보다 많은 바이러스에 의해 직접적 또는 간접적으로 야기되는 바이러스-연관 질병(들)을 치료하거나 다르게는 하나보다 많은 바이러스에 대해 혈청 양성인 개체에게 제공된다. 치료적 T-세포의 집합체에서, 각각의 T-세포 및 그의 자손은 하나의 바이러스로부터의 하나의 항원에서 단 하나의 펩티드에 대해 특이성을 가지며, 치료적 T-세포의 집합체의 생산 시, 예를 들어, 각각의 바이러스 항원에서 다중 에피토프와 같이, 다중-특이성을 갖는 T-세포 클론의 개체군을 증폭시킨다.
- [0220] 적어도 본 발명의 일부 방법에서, 그에 의해 생성된 CTLs의 치료학적 유효량은 개체, 예를 들어, HPV16 및/또는 HPV18-연관 질병을 갖거나 또는 가질 것으로 의심되거나 걸리기 쉬운 것으로 알려진 개체에 투여된다. 특정 구현예에서, 세포는, 예를 들어, 정맥내, 근육내, 피내, 복강내 주사 등과 같은 주사에 의해 투여된다. 일부 구현예에서, CTLs은 또한 다중클론 CD4+ 및 CD8+ CTLs로 정의된다. PBMCs는 개체에게 동종이형일 수 있거나 개체에게 자가일 수 있다.
- [0221] 특정 경우에, 예를 들어, 종양은 본 발명의 세포로 치료되고, 종양은 암을 초래할 수 있는 양성, 악성, 또는 전암성 병변일 수 있다. 따라서, 개체는 전암성 (pre-malignant) 병변 단계 및/또는 병변이 악성이 된 후에 본 발명의 방법에 의해 생산된 세포로 치료될 수 있다. 개체는 초기 또는 말기 암을 가질 수 있고, 당업자는 세포를 생산하는 방법이 초기 대 말기 암과 연관된 항원으로부터 유래한 APCs에 대한 펩티드를 이용하는 것과 같이, 이렇게 상이한 암의 단계에 대해 맞춤화될 수 있음을 인식할 것이다. 특정 구현예에서, 암은 원발성, 전이성, 재발성, 난치성 등일 수 있다.
- [0222] 특정 경우에, 자궁경부, 외음부, 질, 음경, 후두, 중인후 항문, 및 다른 상부 호흡소화관 영역의 전암성 병변과 같이, 암을 초래할 수 있는 전암성 병변은 본 발명의 방법에 의해 생산된 세포로 치료된다. 따라서, 개체는 전암성 병변 단계 및/또는 병변이 악성이 된 후에 본 발명의 방법에 의해 생산된 세포로 치료될 수 있다. 본 발명의 방법에 의해 생산된 세포로 치료될 수 있는 HPV-연관 의학적 상태에는 적어도 생식기 영역(들)의 이형성증, 자궁경부 상피내 종양, 외음부 상피내 종양, 음경 상피내 종양, 항문 상피내 종양, 자궁경부암, 항문암, 외음부암, 질암, 음경암, 생식기암, 구강인두암, 코인두암종, 경구 유두종 및 다른 상부 호흡소화관 병변이 포함된다.
- [0223] 일부 경우에, 세포의 투여 전에 암과 연관된 혈청형을 결정할 수 있지만, 일부 경우에 혈청형은 결정되지 않는다. 특정 구현예에서, HPV16-특이적 또는 HPV18-특이적 세포는 각각 HPV16 또는 HPV18-양성인 종양에 대해 활성을 갖지만, 일부 경우에는 상이한 HPV 혈청형과 교차-반응성이 있다. 교차-반응하는 능력은 공지되거나 되지 않을 수 있고, 특정 경우에, 예를 들어, HPV16 감염 또는 HPV16-연관 의학적 상태를 갖는 개체는 HPV18-특이적 T-세포가 투여되고, 그 반대이다. 이러한 경우에, 개체는 개체가 그 혈청형을 가졌는지 여부를 알 수 없는 혈청형에 대해 특이적인 세포로 처리될 수 있지만, 상기 세포는 여전히 교차-반응성으로 인해 치료적으로 효과적이다.

- [0224] 상기 방법의 자극 단계의 APCs가 HPV16 및 HPV18 펩믹스와 함께 로딩되는 경우, 이러한 APCs를 통해 증폭된 T-세포 자극의 결과는 개체가 당해 바이러스에 노출되었는지 여부에 의해 결정된다. 예를 들어, 개체가 HPV16가 아닌 HPV18에 감염된 경우, HPV18-특이적 T-세포만이 반응할 것이고, 이는 상기 감염이 초기에 HPV 18에 대한 T-세포 반응을 자극할 것이기 때문이다. 그러한 T-세포는 상기 개체에서 증폭할 것이고, 그 후에 기억 T-세포가 되어, 예를 들어, 활성화된 적이 없는 HPV16에 특이적인 T-세포보다 더 많은 수가 될 것이다.
- [0225] 치료되는 개체는 암을 갖거나, 암을 갖는 것으로 의심되거나, 암을 가질 위험에 처한 것으로 알려질 수 있다 (예컨대, 개체 또는 가족 병력; 성적으로 난잡함을 비롯한 성생활 활동; 및/또는 하나 이상의 특이적 마커를 포함하는, 유전적 소인을 가짐). 치료되는 개체는 HPV 바이러스의 존재를 가질 수 있지만, HPV-관련 의학적 상태의 어떠한 해로운 증상도 아직은 없다. 개체는 양성 또는 악성 종양을 가질 수 있다. 개체는 초기 또는 말기 암을 가질 수 있고, 당업자는 세포를 생산하는 방법이 초기 대 말기 암과 연관된 항원으로부터 유래한 APCs에 대한 펩티드를 이용하는 것과 같이, 이러한 상이한 단계의 암에 맞춤화될 수 있음을 인식한다. 특정 구현예에서, HPV-연관 질병은 구강이나 생식기 부위의 악성 암이다. 특정 구현예에서, 암은 원발성, 전이성, 재발성, 난치성 등일 수 있다. 개체는 임의의 종류의 성행위 또는 임의의 종류의 친밀한 신체 접촉의 결과로서 HPV16 및/또는 HPV18에 감염될 수 있다.
- [0226] HPV 감염의 임의의 단계가 본 발명에 의해 포함되는 세포로 치료될 수 있다. 본 발명의 방법으로 치료되는 확립된 HPV-연관 암을 갖는 개체는 전암 상태 (Carcinoma in Situ) (0기), I기, II기, III기, 또는 IV기 (MRI, CT 스캔, PET 스캔 등에 의해 결정될 수 있음)를 포함한다. 또한, 전-암 병변 (이형성증)을 갖는 개체가 또한 치료될 수 있다.
- [0227] 일부 구현예에서, 본 발명의 방법에 의해 생산된 세포의 1회 이상의 투여가 이를 필요로 하는 개체에게 제공된다. 상이한 투여 사이의 시간 길이는 1-7일, 1-4주, 1-12개월, 또는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10년 또는 그 이상의 순서를 포함하는, 임의의 적합한 지속시간일 수 있다. 일부 경우에, 약 1년 이내에 여러 번 주입이 이용될 수 있다. 세포의 1회 초과 투여가 개체에게 제공되는 경우, 세포가 그에 표적화되는 항원은 이전 투여(들)에서 이용된 세포로 표적화되었던 동일한 항원일 수도 있고 아닐 수도 있다. 예를 들어, 세포의 제1 투여 시, 세포는 HPV18 E6를 표적할 수 있는 반면, 세포의 또 다른 투여 시, 세포는 HPV18 E7을 표적하거나, 그 반대일 수 있다. 예를 들어, 추가의 투여(들)이 난치성이 되는 암에 요구될 수 있다. 추가의 자극은 하나 이상의 다른 유형의 암 치료법과 함께 이용될 수 있다.
- [0228] 일부 경우에, 개체는 당해 분야의 임의의 적합한 수단에 의해 선택적으로 HPV 감염을 갖는 것으로 결정된다. HPV는 세포 배양으로 배양될 수 없기 때문에, PCR, 서던 블롯 혼성화, 및/또는 인 시츄 (*in situ*) 혼성화를 이용하는 DNA 시험과 같은 HPV 감염 진단 방법을 이용할 수 있으며, 이들 방법은, 예를 들어, 질확대경검사 (colposcopy); 아세트산 시험; 생검; 신체검사; 및/또는 자궁경부세포검사 (Pap smear)와 함께 사용될 수 있거나 아닐 수 있다.
- [0229] 특정 구현예에서, 감염된 HPV를 표적하기 위해 본 발명의 방법에 의해 생산된 세포의 유효량이 남성 개체에게 제공되고, 이 경우에 개체는 그 후 성적 활동을 통해 여성 개체와 같은 다른 개체를 감염시킬 가능성을 감소시킨다. 남성 개체는 본 발명의 방법에 따른 세포에 노출되기 전에 HPV에 감염된 것으로 결정될 수 있거나 아닐 수 있다. 일부 경우에, 개체가 발암성 HPV에 감염된 것으로 나타난 경우, 그의 위험을 제거하기 위해 세포로 그를 치료할 가치가 있을 것이다. 세포가 효과적이었다면, 이들은 또한 자신의 파트너에게 바이러스를 전염시킬 가능성을 감소시킬 것이다.
- [0230] 특정 구현예에서, 개체는 면역약화된 (immunocompromised) 상태이다 (예를 들어, 면역계로 감염성 질병 또는 암과 싸우는 능력이 약화되거나 완전히 결핍된 개체로 정의될 수 있음). 특정 구현예에서, 면역약화된 개체는, 예를 들어, 줄기세포 이식 (조혈 줄기세포 이식 포함)을 받았거나, 장기 이식을 받았고/받았거나, 화학요법 또는 방사선을 비롯한 하나 이상의 암 치료법을 받았다. 일부 경우에, 개체는 면역 결핍 장애를 획득했거나 유전되었다. 일부 구현예에서, 이들의 질병 및/또는 그의 치료에 의해 면역약화된 개체에게 본 발명의 방법 및/또는 조성물이 제공된다.
- [0231] 의학적 치료 방법은, 방법의 단계가 암성 세포의 박멸 시 면역계를 보조하거나 증강시키는, 인간 대상체에서 악성 종양을 개선, 치료, 또는 예방하는 방법에 의해 암을 치료하는 것을 포함한다. 이러한 방법은 암성 세포를 파괴하기 위해 활성 면역반응을 일으키는 (또는 수동 면역반응을 획득하는) 본 발명에 따른 세포의 투여를 포함할 수 있다. 치료 방법은 화학요법, 방사선, 또는 수술과 같은 암 치료를 위한 통상적인 치료법과 함께 생물학적 보조제 (예컨대, 인터루킨, 사이토카인, 바실러스 코메트-구에린 (Bacillus Comette-Guerin), 모노포스포릴

지질 A, 등)의 동시-투여를 선택적으로 포함할 수 있다. 치료 방법은 암세포 성장을 방지 또는 파괴하도록 면역계를 활성화시킴으로써 작용하는 백신으로서 본 발명에 따른 조성물을 투여하는 것을 포함할 수 있다. 의학 적 치료 방법은 또한 자가 및/또는 이종 세포 또는 불멸화된 세포주를 사용하는 것들을 비롯해, 생체 내, 생체 외, 및 입양 면역요법을 포함할 수 있다.

[0232] I. 약제학적 조성물

[0233] 본 개시에 따르면, 용어 "약제학적 조성물"은 개체에의 투여를 위한 조성물에 관한 것이다. 특정 구현예에서, 약제학적 조성물은 비경구, 경피, 강내 (intraluminal), 동맥내, 경맥내 또는 정맥내 투여 또는 암과 같은 종양 내로의 직접 주사를 위해 치료적 면역 세포를 포함하는 조성물을 포함한다. 약제학적 조성물이 주입 또는 주사를 통해 개체에게 투여되는 것이 특히 고려된다. 적합한 조성물의 투여는 상이한 방식으로, 예컨대, 정맥내, 피하, 복강내, 근육내, 국소 또는 피내 투여에 의해 수행될 수 있다.

[0234] 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적 담체의 예시는 당해 분야에 익히 공지되어 있고 포스페이트 완충된 식염수, 물, 에멀전, 예컨대 수중유적형 (oil/water) 에멀전, 다양한 유형의 습윤제, 멸균수 등을 포함한다. 이러한 담체를 포함하는 조성물은 익히-공지된 통상적인 방법에 의해 제제화될 수 있다. 이들 약제학적 조성물은 적합한 투여량으로 대상체에 투여될 수 있다.

[0235] 투약 레지멘은 주치의와 임상 요인에 의해 결정될 것이다. 의학 분야에 익히 공지된 바와 같이, 임의의 한 환자에 대한 투여량은 환자의 크기, 신체 표면적, 연령, 투여되는 특정 화합물, 성별, 투여 시점 및 경로, 일반 건강, 및 동시에 투여되는 다른 약물을 포함하는, 다수의 요인에 좌우된다. 투여를 위한 특정 투여량은 신체 표면적의 m^2 당 2×10^7 세포 내지 m^2 당 1×10^{10} 세포일 수 있다. 장기적인 평가를 통해 진행을 모니터링할 수 있다.

[0236] 본 발명의 조성물은 국소적으로 또는 전신적으로 투여될 수 있다. 바람직한 구현예에서, 약제학적 조성물은 피하로 투여되고 더욱 더 바람직한 구현예에서는 정맥내로 투여된다. 비경구 투여용 제제는 수성 또는 비-수성 용액, 현탁액, 및 에멀전을 포함한다. 비-수성 용매의 예시는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브유와 같은 식물성 기름 및 에틸 올리에이트와 같은 주사가능 유기 에스테르이다. 수성 담체에는 식염수 및 완충된 매질을 포함하는, 물, 알코올/수성 용액, 에멀전 또는 현탁액이 포함된다. 비경구 비히클에는 염화나트륨 용액, 링거 텍스트로스, 텍스트로스 및 염화나트륨, 락테이트화 링거, 또는 고정유가 포함된다. 정맥내 비히클에는 유동액 및 영양 보충물, 전해질 보충물 (예컨대, 링거 텍스트로스에 기초한 것들) 등이 포함된다. 보존제 및 다른 첨가제, 예를 들어, 항미생물제, 항산화제, 킬레이트화제, 및 불활성 가스 등이 존재할 수 있다. 또한, 본 발명의 약제학적 조성물은 바람직하게는 인간 기원의 혈청 알부민 또는 면역글로불린과 같은 단백질성 담체를 포함할 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물은 본 명세서에 기술된 세포 외에, 약제학적 조성물의 의도된 용도에 따라 생물학적 활성제를 추가로 포함할 수 있는 것으로 고려된다.

[0237] II. 병용 요법

[0238] HPV 항원(들)에 대해 생성된 CTLs에 관한 본 발명의 특정 구현예에서, 임상적 양태에 대한 본 발명의 방법은 항암제와 같은 과증식성 질환의 치료에 효과적인 다른 제제와 조합된다. "항암제"는, 예를 들어, 암세포를 사멸하고, 암세포에서 아폽토시스를 유발하고, 암세포의 성장 속도를 감소시키고, 전이의 발생을 또는 수를 감소시키고, 종양 크기를 감소시키고, 종양 성장을 억제하고, 종양 또는 암세포로의 혈액 공급을 감소시키고, 암세포 또는 종양에 대한 면역 반응을 촉진하고, 암의 진행을 예방 또는 억제하거나, 또는 암을 갖는 대상체의 수명을 증가시킴으로써 대상체에서 암에 부정적으로 영향을 미칠 수 있다. 더 일반적으로, 이들 다른 조성물은 세포를 사멸하거나 이의 증식을 억제하는데 효과적인 조합된 양으로 제공될 수 있다. 이는 암세포를 두 제제 모두를 포함하는 단일 조성물 또는 약제학적 제제와 접촉시킴으로써, 또는 암세포를 2개의 개별적인 조성물 또는 제제와 동시에 접촉시킴으로써 달성될 수 있고, 이때 하나의 조성물은 발현 작제물을 포함하고 다른 하나는 제2 제제(들)을 포함한다. 다른 경우에, 세포 및 제2 조성물의 투여는 별개일 수 있으며 별도의 투여 경로 및/또는 담체를 가질 수 있다.

[0239] 화학요법 및 방사선요법 제제에 대한 종양 세포 내성은 임상 종양학의 주요 문제점을 나타낸다. 현재 암 연구의 하나의 목표는 화학요법 및/또는 방사선요법의 효능을 추가 요법과 병행함으로써 향상시키는 방법을 찾는 것이다. 본 발명의 맥락에서, 세포 요법이, 예를 들어, 화학요법, 방사선요법, 및/또는 면역요법 중제와 함께 유사하게 사용될 수 있는 것으로 고려된다.

- [0240] 대안적으로, 본 발명의 요법은 수분 내지 수주, 수개월, 또는 수년 범위의 간격으로 다른 제제 치료에 선행하거나 그에 후속될 수 있다. 다른 제제 및 본 발명이 개체에게 개별적으로 적용되는 구현예에서, 일반적으로 각 전달 시간 사이에 상당한 기간이 경과하지 않도록 하여 제제 및 본 발명의 요법이 여전히 세포에 유리하게 조합된 효과를 발휘할 수 있음을 보장할 것이다. 이러한 경우에, 서로 약 12-24시간 내에, 더욱 바람직하게는, 서로 약 6-12시간 내에 두 양상 모두로 세포와 접촉할 수 있음이 고려된다. 그러나, 일부 상황에서는, 각각의 투여 사이에 수일 (2, 3, 4, 5, 6 또는 7일) 내지 수주 (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8주)가 경과한 경우에는, 치료 기간을 상당히 연장하는 것이 바람직할 수 있다.
- [0241] 필요에 따라 치료 주기가 반복될 것으로 예상된다. 또한, 다양한 표준 요법뿐만 아니라 외과적 중재가 본 발명의 세포 요법과 함께 적용될 수 있는 것으로 고려된다.
- [0242] 본 발명의 방법으로부터 생산된 세포와 함께 사용될 수 있는 HPV-연관 암 치료의 예시에는 (예로서) 적어도 다음을 포함한다: 1) 수술 (종양 절제술, 경부 절제술, 자궁경부 원추절제술 (conization), 자궁절제술 등); 2) 아바스타틴® (베바시주맵); 블레녹산 (블레오마이신); 하이캄틴® (토포테칸 염산염); 또는 이들의 조합을 포함할 수 있는 약물 요법; 3) 방사선요법; 4) 본 발명의 것들 이외의 면역요법; 5) 호르몬 요법; 또는 6) 이들의 조합.
- [0243] **III. 본 발명의 키트**
- [0244] 본원에 기술된 임의의 조성물은 키트에 포함될 수 있다. 비-제한적인 예시로, 펩믹스의 라이브러리가 키트에 포함될 수 있고, 임의의 유형의 세포가 키트에 제공될 수 있고/있거나, 펩믹스 및/또는 세포의 조작을 위한 시약이 키트에 제공될 수 있다. 사이토카인(들) 또는 이를 생산하는 수단 (예컨대, 이를 암호화하는 벡터)이 키트에 포함될 수 있다. 세포 배양 시약 및/또는 장치(들)이 포함될 수 있다. 성분(들)이 적합한 용기 수단에 제공된다.
- [0245] 일 구현예에서, 키트는 대상체로의 투여를 위해, 바람직하게는 주입에 의해, 대상체로의 투여를 위해, 더욱 바람직하게는 자가 적응성 세포 면역요법 방법에서 주입에 의한 투여를 위해 (예컨대, 적합한 담체, 부형제, 희석제 또는 보조제와의 혼합에 의해) 제제화된 본 발명의 방법에 의해 수득되는 T-세포의 양을 포함하는 용기를 포함할 수 있다. 키트는 기결정된 온도, 예컨대 약 4°C 미만, 약 -2°C 미만 또는 약 -50°C 미만에서 유지될 수 있다. 키트는 키트의 보관 및/또는 운반 및/또는 T-세포의 투여를 위한 지침서를 더 포함할 수 있다.
- [0246] 키트는 본 발명의 적절하게 분액된 조성물을 포함할 수 있다. 키트의 구성성분은 수성 매질 또는 동결건조된 형태로 포장될 수 있다. 키트의 용기 수단은 일반적으로 적어도 하나의 바이알, 시험관, 플라스크, 병, 주사기 또는 다른 용기 수단을 포함할 것이며, 그 내로 구성성분이 배치, 바람직하게는 적절하게 분액될 수 있다. 키트에 하나보다 많은 성분이 있는 경우, 키트는 또한 일반적으로 추가의 구성성분이 개별적으로 배치될 수 있는 두 번째, 세 번째 또는 다른 추가적인 용기를 포함할 것이다. 그러나, 다양한 성분의 조합이 바이알 내에 포함될 수 있다. 본 발명의 키트는 또한 전형적으로 상업적 판매를 위해 밀폐된 상태로 성분을 함유하기 위한 수단을 포함한다. 이러한 용기는 그 안에 원하는 바이알이 보유되는 주입 또는 취입 성형된 (blow molded) 플라스틱 용기를 포함할 수 있다.
- [0247] 그러나, 키트의 구성성분은 건조 분말(들)로서 제공될 수 있다. 시약 및/또는 성분이 건조 분말로 제공되는 경우, 분말은 적합한 용매의 첨가에 의해 재구성될 수 있다. 용매가 또한 또 다른 용기 수단에 제공될 수 있는 것으로 고려된다.
- [0248] 일부 경우에, HPV 감염을 검출하기 위한 시약 및/또는 장치가 키트에 포함될 수 있다. 예시에는 면봉, 스페큘러, 사이토브러쉬 (cytobrushes), 슬라이드, 커버 슬립, 세포학 시료 수집 리셉터클(들) 등이 포함된다. 베바시주맵; 블레오마이신; 토포테칸 염산염; 또는 이들의 조합과 같은 HPV 감염 또는 암을 위한 추가적인 약물이 키트에 포함될 수 있다.
- [0249] **실시예**
- [0250] 하기 실시예는 본 발명의 바람직한 구현예를 충분히 예시하기 위해 제시된다. 그러나 이들은 어떠한 방식으로든 발명의 넓은 범위를 제한하는 것으로 해석어서는 안된다.
- [0251] **실시예 1**
- [0252] **치료적 T-세포의 생산**

- [0253] 본 발명의 일부 구현예에서, 치명적인 것으로 판명될 수 있는 하나 이상의 인간 파필로마바이러스로부터 유래한 다양한 항원에 대해 지속적으로 특이적인, 다중클론 (예를 들어, CD4+ 및 CD8+) CTLs을 포함하는, T-세포의 단일 제제를 신속하게 생성할 수 있는 메커니즘이 있다. 본 발명은 임상적 구현에 쉽게 적용될 수 있으며 "기성품 (off the shelf)" HPV 항바이러스 제제로 사용될 수 있다. 방법 및 조성물은 임상적 구현에 쉽게 적용될 수 있으며 개체를 위한 안전하고 효과적인 HPV 항바이러스제로서 유용하다.
- [0254] 특정 구현예에서, 말초 혈액 T-세포를 특정 보조 사이토카인의 존재 또는 부재하에서, E6/E7에 걸친 펩믹스 [11개 아미노산 (aa)이 중첩된 15-머의 펩티드 라이브러리]가 로딩된 단핵구-유래 수지상 세포로 자극시켰다. 결과의 T-세포주를 펩믹스-로딩된 활성화 B-세포 블라스트로 더욱 증폭시켰다. 16명 중 8명의 자궁경부암 환자 및 52명 중 33명의 구강인두암 환자로부터의 E6-특이적/E7-특이적 T-세포의 재활성화 및 증폭 (>1200-배)이 성공적으로 이루어졌다.
- [0255] 사이토카인 인터루킨 (IL)-6, IL-7, IL-12, 및 IL-15의 존재는 상기 방법, 방법의 특정 구현예에서 유용하다. 생산된 T-세포주는 다클론성, 다중 T-세포 아개체군 표현의 바람직한 특징 (기억 구획 포함) 및 TH1 편향을 보유하고, E6/E7 표적을 제거한다. 본 발명은 HPV16-연관 암을 갖는 환자로부터 HPV16 E6/E7-지시된 T-세포주를 확실하게 생성할 수 있음을 보여주었다. 이 기술은 확장가능하고 우수한-제조 절차-순응적이기 때문에, 이들 세포주는 HPV16 암을 갖는 환자의 적응성 세포 면역요법에 유용하고 HPV18 암에 또한 적용될 수 있다.
- [0256] HPV16에 대한 T-세포를 생산하는 공지의 방법이 도 1A에 설명되고, 이는 3명의 HPV-연관 암 환자에 대한 결과를 나타낸다 (HPV16-펩믹스만이 로딩된 DCs에 의한 PBMCs의 자극 후 수득된 세포주에서 수득된 γ IFN ELISpot 분석). 도 1B에서, 세번째 개체뿐만 아니라, 그의 결과가 또한 도 1A에서 입증된 2명의 환자에 대한 결과를 나타낸다. 도 1B는 HPV16-펩믹스 및 HPV18-펩믹스로 로딩된 DCs에 의한 PBMCs의 자극 후 수득된 세포주에 대한 γ IFN ELISpot 분석의 결과를 나타낸다. HPV16 및 HPV18 항원 둘 다에 대한 반응성이 검출될 수 있다 (모든 환자가 두 혈청형 모두에 대해 반응성을 갖지는 않을 것임).
- [0257] 본 발명의 특성을 살펴보면, 특정한 경우에 DCs는 HPV16-E6/E7 및 HPV18-E6/E7 펩믹스 라이브러리로 로딩된다. 이러한 경우에, 세포주는 (예를 들어, HPV16 항원 단독 대신에) HPV16 및 HPV18 E6 및 E7 항원 둘 다를 인식할 수 있다. 적어도 특정한 경우에, T-세포의 증폭은 IL-2가 아닌 IL-7 및 IL-15의 존재하에서 일어난다. 상기 방법의 조건에서 IL-7 및 IL-15의 존재는 자극 및 증폭의 각 단계에서 일 수도 있고 아닐 수도 있다. 일부 구현예에서, DCs로의 초기 생성/증폭 후 HPV-특이적 T-세포의 증폭은 IL-15의 존재하에서 펩믹스로 로딩된 자가 B-블라스트에서는 발생하지 않지만, 그 대신에, 동시-자극 세포 (CD80/CD86/CD83/4-1BBL), 및 IL-7과 IL-15의 존재하에서, 펩믹스로 로딩된 자가, 다중클론 활성화 T-세포를 이용한다. 이들 조건을 이용하여, T-세포 증폭이 공지된 방법에 의해 수득된 것보다 더 빠른 속도로, 적어도 10-배 빠르게 발생하고, 3회의 자극 후 특이성의 상실 없이 성공적으로 입증된다.
- [0258] 3명의 HPV-연관 암 환자에 대해 공지된 방법을 사용한 배수 세포 증폭의 요약이 표 2에 제공된다.

표 2

[0259] **표 2: 공지된 방법을 이용한 각 자극의 말기에서의 배수 증폭**

환자 ID	제1 자극 후 (DC 및 IL-2/15 존재)	제2 자극 후 (DC 및 IL-2/15 존재)	제3 자극 후 (B-블라스트 및 IL-2/15 존재)
OPA	3.38	2.63	4.96
OPE	1.59	4.60	1.60
OPY	2.20	2.50	0.38

- [0260] 3명의 HPV-연관 암 환자에 대해 본 발명의 신규한 방법을 사용한 배수 세포 증폭의 요약이 표 3에 제공된다. 3회의 자극 후 배수 증폭은 공지된 방법을 이용한 것보다 평균적으로 대략 50배 더 높다. 특이성은 유지된다 (#1에 예시됨).

표 3

[0261] **표 3: 본 발명의 방법을 이용한 각 자극의 말기에서 배수 증폭**

환자 ID	제1 자극 후 (DC 및 IL-7/15 존재)	제2 자극 후 (DC 및 IL-7/15 존재)	제3 자극 후 (활성화 T-세포, 동시-자극 세포 및 IL-7/15 존재)
-------	---------------------------	---------------------------	---

PDC	2.60	5.35	151.20
PGD	5.00	6.36	120.00
PJK	3.58	5.53	60.00

[0262] 실시예 2

[0263] HPV T-세포의 증폭을 위한 프로토콜

[0264] HPV 자극된 T-세포 (HPVST)를 10-20:1 PBMC:DC 비율로 HPV E6/E7 펩티드-감작된 자가 수지상 세포 (DCs)에 의해 먼저 활성화시키고, IL-6 (100 ng/ml), IL-7 (10 ng/ml), IL-12 (10 ng/ml), IL-15 (10 ng/ml)를 함유하는 배양 배지에서 8일간 배양한다 (예컨대, Ramos et al., (J Immunother 2013; 36: 66-76)에 의해 기술된 제1 자극 단계에 따름).

[0265] 9일째 제2 자극 단계를 IL-7 (10 ng/ml) 및 IL-15 (100 ng/ml)를 함유하는 배지에서 5-10:1 PBMC:DC 비율로 펩티드-감작된 DCs를 사용하여 수행한다.

[0266] 그 후에 동일한 수의 조사된 동종이형의 K562-cs 동시-자극 세포의 존재, 및 IL-7 (10 ng/ml) 및 IL-15 (100 ng/ml)를 함유하는 배지에서, 1:1 비율로 HPV E6/E7 펩티드-감작된 자가 T-APC를 사용하여 후속의 매주 자극/증폭 단계를 수행하여 원하는 수의 HPVSTs를 달성한다. 다중클론 T 세포 (T-APCs)를 사혈된 (venesected) 혈액으로부터 분리된 자가 PBMC의 일부를 사용하여 생성한다. 세포를 항-CD3 및 항-CD28 항체로 코팅된 세포 배양 플레이트에서 배양하여 활성화시킨다. 이어서 세포를 2주간 IL-2의 존재하에서 배양하여 증폭시킨다. 증폭된 T-APC를 나중에 사용하기 위해 동결-보존할 수 있다. HPVST 재-자극을 위해 T-APC를 사용하기 2-3일 전에 (HPVST 재-자극 및 이후의 3차 주기), 동결-보존된 세포를 해동시키고 항-CD3 및 항-CD28 항체-코팅된 세포 배양 플레이트에서 재-자극시킨다. HPVST의 재-자극 당일에, T-APC 세포를 수확하고 HPV E6/E7 펩티드로 감작한 후, 1:1 비율로 HPVST의 진행 중인 배양물에 첨가한다.

[0267] 실시예 3

[0268] 인간 환자에서 주입된 HPVST의 생체 내 증폭 및 지속

[0269] 실시예 2로부터 수득된 HPVSTs를 TGF-베타에 대한 우성 음성 수용체 (DNRII)로 형질도입하였다 [Foster et al., Antitumor activity of EBV-specific T lymphocytes transduced with a dominant negative TGF-beta receptor. J Immunother. 2008; 31: 500-505 참조].

[0270] HPVSTs를 2명의 인간 환자에게 투여하였고 생체 내 증폭 및 지속에 대해 시험하였다. 환자 #1은 광범위하게 전이된 구강인두암을 가지며 이전 치료가 중단되었다. 환자 #2는 목으로 전이된 구강인두암을 가지며 니볼루맵 (nivolumab) 단독에 대한 사전 반응 없이, 동반 니볼루맵 치료를 받고 있었다.

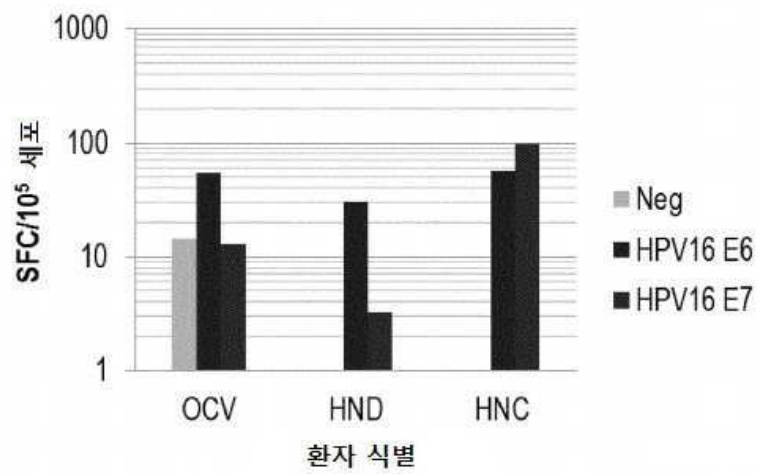
[0271] 주입된 HPVSTs의 생체 내 증폭 및 지속을 환자로부터의 말초 혈액으로부터 분리된 PBMCs에 대해 수행된 DNRII 유전자에 대한 qPCR로 평가하였다. 도 2 및 3의 데이터 시점은 HPVSTs의 주입 후 중요한 주입-후 간격을 나타낸다.

[0272] 환자 #1에서는 점진적인 증폭이 관찰되었다 (도 2). 환자 #2에서는 증폭이 제한적이었지만 (도 3), HPVSTs의 재-주입과 일치하는 6주에서의 피크와 함께, 환자는 부분적인 임상 반응을 보였다. HPVST 주입 6주 후 환자 #2는 치료 전 기준선에 비해 PET 스캔 및 신체검사로 측정된 질병 부담에서 감소를 나타내었다 (도 4).

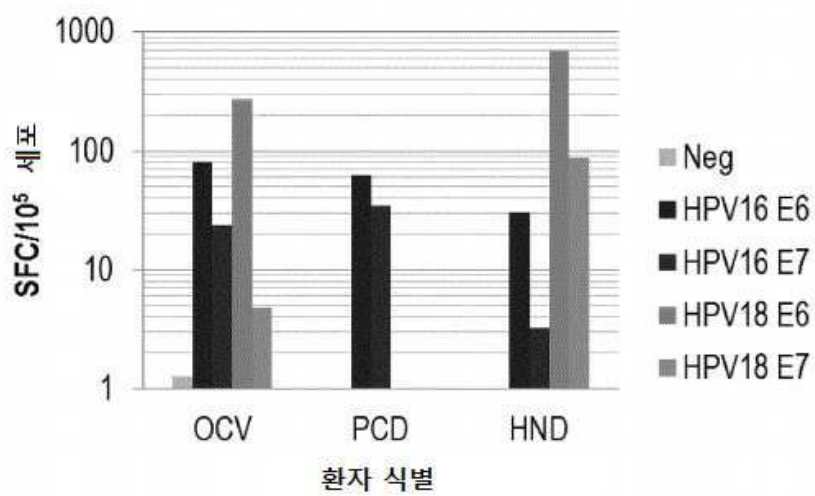
[0273] 본 발명 및 그의 이점이 상세히 설명되었지만, 첨부된 청구범위에 의해 정의된 바와 같은 사상 및 범위로부터 벗어나지 않으면서 다양한 변화, 대체 및 변경이 본원에서 이루어질 수 있음을 이해해야 한다. 또한, 본 출원의 범위는 명세서에 기술된 공정, 기계, 제조, 물질의 조성, 수단, 방법 및 단계의 특정 구현예로 제한되는 것으로 의도되지 않는다. 당업자가 본 발명의 개시로부터 용이하게 이해할 것인 바와 같이, 실질적으로 동일한 기능을 수행하거나 본원에 기술된 상응하는 구현예와 실질적으로 동일한 결과를 달성하는 공정, 기계, 제조, 물질의 조성, 수단, 방법 또는 단계가 본 발명에 따라 이용될 수 있다. 따라서, 첨부된 청구범위는 그들의 범위 내에 이러한 공정, 기계, 제조, 물질의 조성, 수단, 방법 또는 단계를 포함하는 것으로 의도된다.

도면

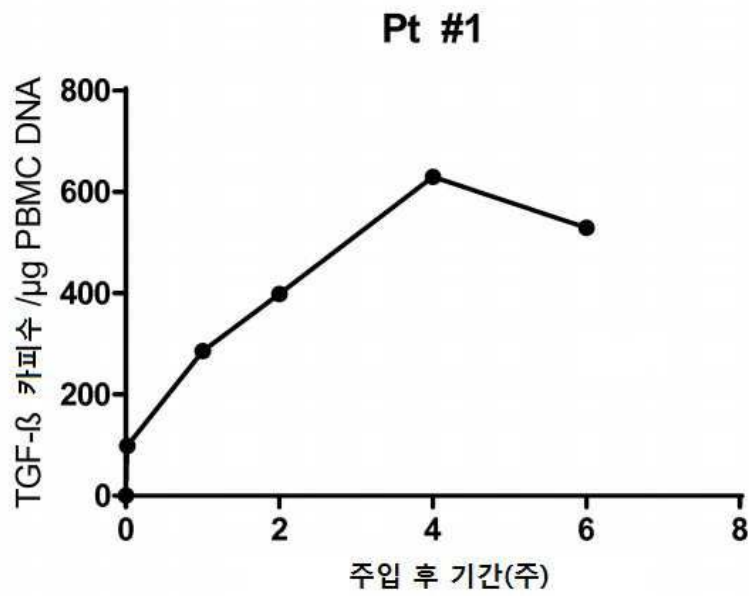
도면1a



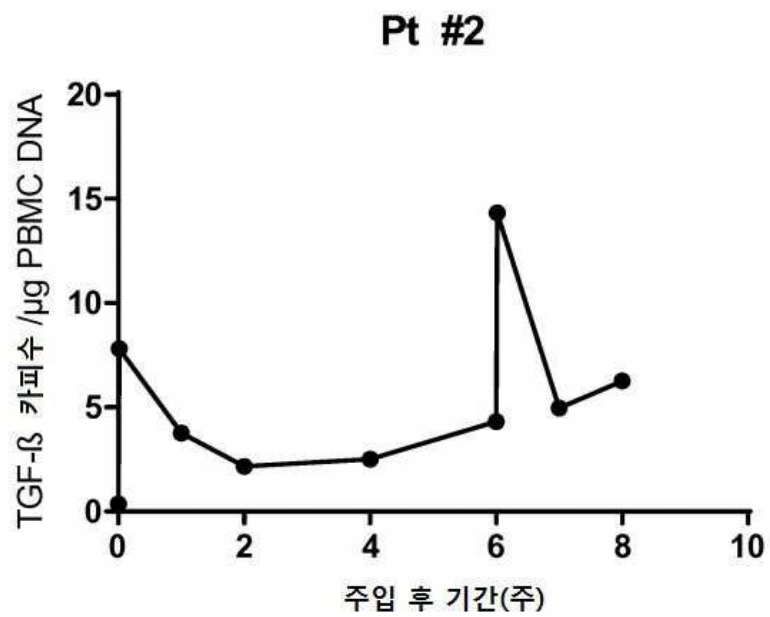
도면1b



도면2



도면3



도면4

