(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0081341
(43) 공개일자 2011년07월13일

(51) Int. Cl.
G01N 33/53 (2006.01) *C07K 14/57* (2006.01)
C12N 5/0784 (2010.01) *C12N 5/071* (2010.01)
(21) 출원번호 10-2011-7012621(분할)
(22) 출원일자(국제출원일자) 2002년09월06일
심사청구일자 2011년06월30일
(62) 원출원 특허 10-2004-7003386
원출원일자(국제출원일자) 2002년09월06일
심사청구일자 2007년09월06일
(85) 번역문제출일자 2011년06월01일
(86) 국제출원번호 PCT/US2002/028620
(87) 국제공개번호 WO 2003/022215
국제공개일자 2003년03월20일
(30) 우선권주장
60/317,569 2001년09월06일 미국(US)

(71) 출원인
노쓰웨스트 바이오써라퓨틱스, 인크.
미국 메릴랜드주 20814 베데스다 스위트 750 위스콘신 애비뉴 7600
(72) 발명자
보쉬 마르닉스 엘
미국 워싱턴주 98039 메디나 14번 스트리트 7814 노스이스트
(74) 대리인
장훈, 이병호

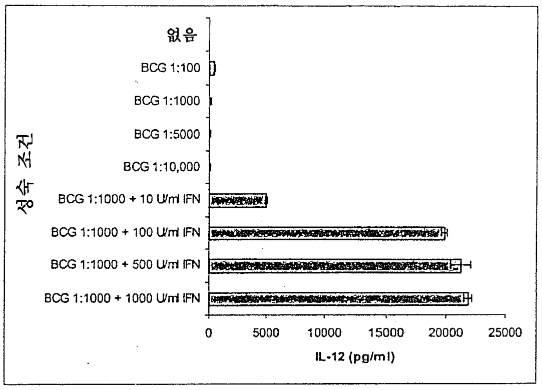
전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 증가된 인터페론 감마를 생산하는 활성화된 항원 특이적 T 세포를 포함하는 조성물

(57) 요 약

본 발명은 미성숙한 수지상 세포(DC)의 성숙화를 유도하고, 1형 면역 반응을 유도하기 위해 이들 세포를 프라이밍하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 또한, 본 발명은 1형 사이토킨 및/또는 1형 반응 생성쪽으로 분극화된 T 세포를 활성화하고 제조하는데 유용한 수지상 세포 집단을 제공한다. 유사하게는, 활성화되고 분극화된 T 세포 집단, 및 이를 제조하기 위한 방법이 제공된다.

대 표 도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

미성숙한 수지상 세포를 제공하는 단계;

미성숙한 수지상 세포의 성숙화에 적합한 배양 조건하에서 유효량의 BCG, 인터페론 γ(IFNγ) 및 예정된 항원을 미성숙한 수지상 세포와 접촉시키는 단계; 및

성숙한 수지상 세포를 예정된 항원에 대해 특이적인 T 세포와 접촉시켜 증가된 양의 인터페론 γ를 생산하는 활성화된 항원 특이적 T 세포를 형성하는 단계에 의해 생산된, 증가된 양의 인터페론 γ를 생산하는 활성화된 항원 특이적 T 세포를 포함하는 조성물.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 증가된 인터페론 감마를 생산하는 활성화된 항원 특이적 T 세포를 포함하는 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 항원-제공 세포(APC)는 효과적인 면역 반응을 유도하는 데 중요하다. 이들은 항원-특이적 T 세포 수용체를 가진 T 세포에 항원을 제공할 뿐 아니라, T 세포 활성화에 필요한 시그날을 제공한다. 이들 시그날은 아직 완전하게 규명되지 않았으나, 각종 세포 표면 분자 및 사이토킨 또는 성장 인자와 관련이 있다. 항원 노출되지 않은(naive: 나이브) 또는 분극화되지 않은 T 세포의 활성화에 필요한 인자들은 면역기억(memory) T 세포의 재-활성화에 요구되는 것들과 상이할 수 있다. 항원을 제공하고 T 세포 활성화를 위한 시그날을 전달하는 모든 APC의 능력은 통상적으로 부수적 세포 기능으로서 지칭된다. 비록 단핵구 및 B 세포가 수용적격(competent) APC인 것으로 밝혀졌지만, 이들의 시험관내 항원 제공 능력은 미리 감작된 T 세포의 재-활성화에 제한되는 것으로 보인다. 따라서, 이들은 기능상 나이브성이거나 프라이밍되지 않은 T 세포 집단을 직접 활성화시킬 수 없다.

[0003] 수지상 세포(DC)는, 나이브 T 세포 및 면역기억 T 세포 둘다를 활성화할 수 있는 것으로 간주되는, 면역계의 전문적인 항원 제공 세포이다. 수지상 세포는 면역요법, 특히 암의 면역요법에 사용하기 위하여 생체외에서 점차 제조되는 추세에 있다. 최적 면역자극 특성을 갖는 수지상 세포의 제조는 생체외 배양을 위한 이들 세포 생물학의 이해와 이용을 필요로 한다. 이들 세포 배양을 위한 각종 프로토콜이 기재되어 있고, 각 프로토콜은 다양한 장점을 갖고 있다. 최근의 프로토콜은 무혈청 배지의 사용, 및 배양된 세포에 목적하는 면역자극 특성을 부여하는 성숙한 조건의 사용을 포함한다.

[0004] 수지상 세포의 성숙화는 표현형이 피부 랑게르한스 세포와 유사한 미성숙 DC를 림프절로 이동할 수 있는 성숙한 항원 제공 세포로 전환시키는 과정이다. 이러한 과정에 의해, 미성숙한 수지상 세포를 특정짓는 강력한 항원 섭취 능력이 상실되고, 또한 공동-자극 세포 표면 분자 및 각종 사이토킨의 발현이 상향-조절된다. 공지된 성숙화 프로토콜은 DC가 항원에 노출되는 동안 또는 노출 후 조우되는 것으로 간주되는 생체내 환경을 기초로 한다. 이러한 접근법의 가장 좋은 예로는 세포 배양 배지로서 단핵구 조건 배지(MCM: Monocyte Conditioned Media)의 사용이 있다. MCM은 단핵구를 배양함으로써 시험관내에서 생성되며, 성숙화 인자의 공급원으로서 사용된다. MCM에서 성숙화에 관여하는 주요 성분은 (원)염증성 사이토킨 인터루킨 1 β(IL-1β), 인터루킨 6 β(IL-6) 및 종양 괴사 인자 α(TNFα)인 것으로 보고되었다. 기타 성숙화 인자로는 프로스타글란딘 E2(PGE2), 폴리-dIdC, 혈관작용성 소장 펩타이드(VIP), 세균성 지다당류(LPS) 뿐만 아니라 미코박테리아 또는 미코박테리아 성분, 예를 들면 특정 세포벽 성분이 포함된다.

[0005] 완전히 성숙한 수지상 세포는 미성숙한 DC와는 정성적 및 정량적으로 상이하다. 완전히 성숙한 DC는 고수준의 MHC I형 및 II형 항원, 및 고수준의 T 세포 공동자극성 분자, 즉 CD80 및 CD86을 발현시킨다. 이들 변화는 수지상 세포의 T 세포 활성화 능력을 증가시키는데, 이는 이들이 세포 표면 상의 항원 밀도를 증가시킬 뿐만 아니라, 예를 들어 CD28과 같은 T 세포상의 공동자극성 분자의 대응물을 통한 T 세포 활성화 시그날을 증폭시키기 때문이다. 추가로, 성숙한 DC는 다량의 사이토킨을 생성하며, 이 사이토킨은 T 세포 반응을 자극하고 유도한다. 이들 사이토킨중 2가지는 인터루킨 10(IL-10) 및 인터루킨 12(IL-12)이다. 이들 사이토킨은 유도된

T 세포 반응의 방향에 대해 정반대의 효과를 갖는다. IL-10이 생성되면 Th-2형 반응이 유도되는 반면, IL-12가 생성되면 Th-1형 반응이 유도된다. 후자의 반응이 세포 면역 반응이 요구되는 경우, 예를 들면 암 면역요법에서 특히 바람직하다. Th-1형 반응에 의해 세포 면역계의 작동인자 공격수단인 세포독성 T 림프구(CTL)가 유도되고 분화된다. 이러한 작동인자 공격수단은 종양 성장을 억제하는 데 가장 효과적이다. IL-12는 또한 천연 킬러(NK) 세포의 성장을 유도하고, 항-혈관형성 활성을 갖고, 이는 모두 효과적인 항-종양 공격수단이다. 따라서, IL-12를 생성하는 수지상 세포의 사용은 면역자극에 사용하는데 이론상 최적으로 적합하다.

[0006] 특정 수지상 세포 성숙화제, 예를 들면 세균성 지다당류, 세균성 CpG DNA, 이본쇄 RNA 및 CD40 리간드는 미성숙한 DC를 유도하여 IL-12를 생성하고, Th-1 반응을 위해 미성숙한 DC를 프라이밍하는 것으로 보고되었다. 대조적으로, 소염성 분자, 예를 들면 IL-10, TGF-β, PGE-2 및 코르티코스테로이드는 IL-12 생성을 억제하고, Th-2 반응을 위해 세포를 프라이밍할 수 있다.

[0007] 최근에, 인터페론 γ를 특정 수지상 세포 성숙화 인자, 예를 들면 세균성 지다당류(LPS) 및 CD40과 합함으로써, 수지상 세포에 의한 IL-12 생성이 증가된다고 보고되었다. 그러나, LPS 및 CD40은 둘다 성숙화 동안 소량의 IL-12를 유도한다는 공지된 능력을 갖는다. 따라서, 단지 IFNγ의 부가로 그 생성이 증가할 수 있다. 인터페론 γ 시그날링은 Jak2-Stat1 경로를 사용하며, 이 경로는 Stat1의 위치 701에서의 티로신 잔기의 인산화 후 이의 핵으로의 이동 및 이에 따른 인터페론 γ-반응성 유전자의 전사 증폭을 포함한다. 그러나, 사람 단핵구-유래된 수지상 세포에서의 시그날 전달 경로에 대하여는 거의 공지된 것이 없다. 이들 세포에서 인터페론 γ 작용 기작은 확립되지 않았다.

[0008] 현재 바실레 칼메테 구에린(bacille Calmette-Guerin: BCG)으로서 공지된, 미코박테리움 튜베르큘로시스(*Mycobacterium tuberculosis*)의 약독화된 소 균주(*Mycobacterium bovis*)가 암 면역요법에 사용되었다. 하나의 예로서, 살아있는 BCG의 방광내 투여는 방광 암 치료에 효과적인 것으로 입증되었으나, 이러한 치료 기작은 공지되지 않았다. BCG 투여의 효과는 예를 들면 암 세포를 공격하는 면역 반응의 유도에 의해 매개되는 것으로 추정된다. 이러한 반응에서의 BCG의 특이적 역할은 면역 반응성의 전신 유도인자의 역할을 할 뿐만 아니라 면역계에 종양 항원을 제공함에 있어서 아쥬반트 기능을 갖는 것으로 간주된다.

[0009] 또한, BCG는 성숙화 마커 CD83을 상향-조절하는 능력을 갖는, 수지상 세포의 강력한 성숙화제인 것으로 밝혀졌다. 또한, BCG는 MHC 분자 및 공동자극성 분자 CD80 및 CD86을 상향 조절할 수 있으며, 동시에 세포내이입 능력을 감소시킨다. 추가로, BCG 또는 BCG-유래된 리포아라비도만난(lipoarabidomannan)이 사이토킨 생성을 증가시킨다고 보고되었으나, 다른 DC 성숙화제를 사용하여 밝혀진 결과와는 달리, IL-12의 생성이 특이적으로 억제된다는 것이 밝혀졌다. 이러한 후자의 특성, 즉 IL-12 생성의 억제는 강한 세포-매개된, 세포독성 반응(Th-1 반응)이 요구되는 면역요법을 위한 수지상 세포의 성숙화에 BCG를 사용할 매력을 감소시킨다.

[0010] 따라서, 활성 면역요법에서의 BCG의 사용은 수지상 세포 성숙화를 유도하는 잠재력을 가진다. 그러나, 수지상 세포의 상기와 같은 성숙화를 유도하고, 동시에 광범위한 면역 자극을 제공하며, 강력한 세포독성 T 세포 반응을 갖는 1형(Th-1) 면역 반응으로 이들 수지상 세포를 프라이밍시키는 조성물 및 이러한 조성물을 사용하는 방법이 요구된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] <u>발명의 개요</u>

[0012] 본 발명은 광범위한 면역 자극을 동시에 제공하는 제제(즉, BCG)를 사용하여 미성숙한 수지상 세포(DC)의 성숙화를 유도하고, 또한 이들 세포를 프라이밍시켜 항원-특이적 세포독성 T 세포 반응을 일으키는 방법 및 조성물을 제공한다. 하나의 양태에서, 미성숙한 수지상 세포를 제공하는 단계; 당해 미성숙한 수지상 세포를 미성숙한 수지상 세포의 성숙화에 적합한 배양 조건하에서 유효 농도의 BCG 및 인터페론 γ(IFNγ)와 접촉시켜 성숙한 수지상 세포 집단을 형성시키는 단계를 포함하여, 성숙한 수지상 세포 집단을 생성시키는 방법이 제공된다. 성숙한 수지상 세포 집단은 성숙화 동안 BCG 및 IFNγ단독과 접촉되지 않은 미성숙한 수지상 세포 집단 보다도 인터루킨 10에 비해 증가된 비로 인터루킨 12를 생성시킨다. 미성숙한 수지상 세포는 BCG 및 IFNγ와의 접촉 전 또는 동안 예정된 항원과 접촉시킬 수 있다. 예정된 항원은 예를 들면 종양 특이적 항원, 종양 관련 항원, 바이러스 항원, 세균성 항원, 종양 세포, 세균성 세포, 항원 발현 재조합 세포, 세포 용해물, 막 제제, 재조합으

로 생성된 항원, 펩타이드 항원(예: 합성 펩타이드 항원), 또는 분리된 항원일 수 있다.

과제의 해결 수단

[0013] 특정 양태에서, 당해 방법은 임의로 단구성 수지상 세포 전구체를 분리하고; 당해 전구체를 분화제의 존재하에 배양하여 미성숙한 수지상 세포를 형성시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 적합한 분화제의 예로는 GM-CSF, 인터루킨 4, GM-CSF와 인터루킨 4의 배합물, 또는 인터루킨 13을 포함한다. 단구성 수지상 세포 전구체는 사람 피검체로부터 분리될 수 있다. 특정 양태에서, 성숙한 수지상 세포는 IL-10에 비해 1:1 이상의 비로 IL-12를 생성시킨다.

[0014] 또다른 양태로, 성숙한 수지상 세포 집단을 생성시키는 방법이 제공된다. 당해 방법은 일반적으로 미성숙한 수지상 세포를 제공하는 단계; 당해 미성숙한 수지상 세포를, 미성숙한 수지상 세포의 성숙화에 적합한 배양 조건하에서 유효량의 BCG 및 인터페론 γ(IFNγ)와 접촉시켜 성숙한 수지상 세포 집단을 형성시키는 단계를 포함한다. 수득한 성숙한 수지상 세포 집단은 1형 면역 반응을 일으킨다. 미성숙한 수지상 세포를 BCG 및 IFNγ와의 접촉 전 또는 동안 예정된 항원과 접촉시킬 수 있다. 예정된 항원은 예를 들면 종양 특이적 항원, 종양 관련 항원, 바이러스 항원, 세균성 항원, 종양 세포, 세균성 세포, 항원 발현 재조합 세포, 세포 용해물, 막 제제, 재조합에 의해 생성된 항원, 펩타이드 항원(예: 합성 펩타이드 항원), 또는 분리된 항원일 수 있다.

[0015] 특정 양태에서, 당해 방법은 임의로 단구성 수지상 세포 전구체를 분리하는 단계; 당해 전구체를 분화제의 존재하에 배양하여 미성숙한 수지상 세포를 생성시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 적합한 분화제는 예를 들면 GM-CSF, 인터루킨 4, GM-CSF와 인터루킨 4의 배합물, 또는 인터루킨 13을 포함한다. 단구성 수지상 세포 전구체는 사람 피검체로부터 분리될 수 있다. 특정 양태에서, 성숙한 수지상 세포는 IL-10에 비해 약 1:1 이상의 비로 IL-12를 생성시킨다.

[0016] 또다른 양태에서, T 세포를 활성화시키는 조성물이 제공된다. 당해 조성물은 성숙화에 적합한 조건하에 유효 농도의 BCG 및 IFNγ로 성숙화시킨 수지상 세포 집단; 및 예정된 항원을 포함할 수 있다. 당해 수지상 세포 집단은 성숙화 동안 IFNγ부재하에 BCG와 접촉시킨 성숙한 수지상 세포 집단 보다 인터루킨 10(IL-10)에 비해 증가된 비로 인터루킨 12(IL-12)를 생성시킬 수 있다. 특정 양태에서, 당해 수지상 세포 집단은 IL-10에 비해 IL-12를 약 10:1 이상의 비로 생성시킬 수 있다. 다른 양태에서, 당해 수지상 세포 집단은 성숙화 동안 IFNγ 없이 BCG의 존재하에 배양시킨 유사한 미성숙 수지상 세포 집단보다 IL-10에 비해 IL-12를 약 100:1 이상의 비로 생성시킬 수 있다.

[0017] 또다른 양태에서, 분리된, 미성숙한 수지상 세포 집단이 제공된다. 당해 세포 집단은 미성숙한 단구성 수지상 세포, 및 미성숙한 수지상 세포의 성숙화를 유도하는 유효 농도의 BCG 및 IFNγ를 포함한다. 수득한 성숙한 수지상 세포는 성숙화 동안 IFNγ없이 BCG의 존재하에 배양시킨 유사한 미성숙 수지상 세포 집단보다 인터루킨-10(IL-10)에 비해 더 많은 인터루킨-12(IL-12)를 생성시킨다. 세포 집단은 예정된 항원 및/또는 분리된 T 세포, 예를 들면 나이브 T 세포를 임의로 포함할 수 있다. T 세포는 임의로 분리된 림프구의 제제중에 존재할 수 있다.

[0018] 또한, 활성화된 T 세포를 생산하는 방법이 제공된다. 당해 방법은 일반적으로 미성숙한 수지상 세포를 제공하는 단계; 당해 미성숙한 수지상 세포를, 미성숙한 수지상 세포의 성숙화에 적합한 배양 조건하에 유효 농도의 BCG 및 인터페론 γ(IFNγ)와 접촉시켜 성숙한 수지상 세포를 형성하는 단계를 포함한다. 성숙한 수지상 세포를 나이브 T 세포와 접촉시켜 IFNγ를 생성하는 활성화된 T 세포를 형성시키고/거나 1형(Th-1) 반응을 위해 분극화시킬 수 있다. 적합한 항원은 예를 들면 종양 특이적 항원, 종양 관련 항원, 바이러스 항원, 세균성 항원, 종양 세포, 세균성 세포, 항원 발현 재조합 세포, 세포 용해물, 막 제제, 재조합에 의해 생성된 항원, 펩타이드 항원(예: 합성 펩타이드 항원), 또는 분리된 항원을 포함한다.

[0019] 미성숙한 수지상 세포를 예정된 항원, BCG 및 IFNγ와 동시에 접촉시키거나, 당해 세포를 BCG 및 IFNγ와 접촉시키기 전 예정된 항원과 접촉시킬 수 있다. 특정 양태에서, 당해 방법은 단구성 수지상 세포 전구체를 분리하는 단계; 당해 전구체를 분화제의 존재하에 배양하여 미성숙한 수지상 세포의 형성을 유도하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 적합한 분화제는 예를 들면 GM-CSF, 인터루킨 4, GM-CSF와 인터루킨 4의 배합물, 또는 인터루킨 13을 포함한다. 단구성 수지상 세포 전구체는 임의로 사람 피검체로부터 분리될 수 있다. 특정 양태에서, 미성숙한 수지상 세포 및 T 세포는 서로 자가성(autologous)이다.

[0020] 또한, 인터루킨 10(IL-10)에 비해 보다 많은 인터루킨 12(IL-12)를 생성하는 분리된 성숙한 수지상 세포가 제공된다. 성숙한 수지상 세포는 수지상 세포의 성숙화에 적합한 조건하에 유효 농도의 BCG 및 IFNγ를 포함하는 조성물을 사용하여 미성숙한 수지상 세포의 성숙화에 의해 제공될 수 있다. 예정된 항원은 임의로 분리된 성숙한 수지상 세포와 함께 포함될 수 있다. 예정된 항원으로 부하된 분리된 성숙한 수지상 세포가 또한 제공된다. 당해 수지상 세포는 성숙화 동안 IFNγ없이 BCG의 존재하 배양시킨 유사한 미성숙 수지상 세포 집단보다 인터루킨-12(IL-12)를 인터루킨-10(IL-10) 보다 많이, 예를 들면 IL-10보다 IL-12를 10배 이상 더 많이 생성시킨다.

[0021] 동물에서 1형(Th-1) 면역 반응을 일으키는 방법이 또한 제공된다. 당해 방법은 일반적으로 미성숙한 수지상 세포를 제공하는 단계; 미성숙한 수지상 세포를 미성숙한 수지상 세포의 성숙화에 적합한 배양 조건하에 유효량의 BCG 및 인터페론 γ(IFNγ)와 접촉시켜 성숙한 수지상 세포를 형성하는 단계를 포함한다. 성숙한 수지상 세포는 동물에게 투여되거나 나이브 T 세포와 접촉시켜 인터페론 γ(IFNγ) 및/또는 종양 괴사 인자 α(TNFα)의 생성을 특징으로 하는 활성화된 T 세포를 형성시킬 수 있다. 당해 활성화된 T 세포는 특이적 항원에 대한 세포독성 T 세포 반응의 자극을 필요로 하는 동물에게 투여될 수 있다. 적합한 항원은 예를 들면 종양 특이적 항원, 종양 관련 항원, 바이러스 항원, 세균성 항원, 종양 세포, 세균성 세포, 항원 발현 재조합 세포, 세포 용해물, 막 제제, 재조합에 의해 생성된 항원, 펩타이드 항원(예: 합성 펩타이드 항원), 또는 분리된 항원을 포함한다. 미성숙한 수지상 세포를 임의로 예정된 항원, BCG 및 IFNγ와 동시에 접촉시키거나, 당해 미성숙한 수지상 세포를 BCG 및 IFNγ와 접촉시키기 전 예정된 항원과 접촉시킬 수 있다.

[0022] 특정 양태에서, 당해 방법은 단구성 수지상 세포 전구체를 동물로부터 분리하는 단계; 당해 전구체를 분화제의 존재하에 배양하여 미성숙한 수지상 세포를 형성시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 분화제는 예를 들면 GM-CSF, 인터루킨 4, GM-CSF와 인터루킨 4의 배합물, 또는 인터루킨 13일 수 있다.

[0023] 미성숙한 수지상 세포 및 T 세포는 동물과 자가성이거나, 동물과 동종(allogenic)일 수 있다. 대안으로, 미성숙한 수지상 세포 및 T 세포는 동물과 동일한 MHC 일배체형(haplotype)이거나, MHC 마커를 공유할 수 있다. 특정 양태에서, 동물은 사람이거나, 비-사람 동물일 수 있다.

발명의 효과

[0024] 본 발명은, 미성숙한 수지상 세포(DC)의 성숙화를 유도하고, 이들 세포를 프라이밍시켜 항원-특이적 세포독성 T 세포 반응(Th-1 반응)을 일으키는 방법을 제공한다. 또한, 본 발명은 1형 사이토킨(예: IFNγ, TNFα 및/또는 IL-2)의 생성쪽으로 분극화된 T 세포 집단을 활성화시키고 제조하는데 유용한 수지상 세포 집단을 제공한다. 이러한 수지상 세포 집단은 적당한 성숙화 조건하에 BCG, IFNγ 및 예정된 항원과 접촉시킨 미성숙한 단구성 수지상 세포를 포함한다. 당해 미성숙한 수지상 세포를 성숙화 전 또는 동안 상기 항원과 접촉시킬 수 있다. 대안으로, 항원에 미리 노출(예: 생체내)시킨 미성숙한 단구성 수지상 세포를 적당한 성숙화 조건하에 BCG 및 IFNγ와 접촉시킬 수 있다. 수득한 성숙한 수지상 세포를 프라이밍시켜 T 세포를 1형 반응쪽으로 활성화 및 분극화시킨다. 1형 반응은 1형 사이토킨(예: IFNγ및/또는 IL-2)의 생성, IL-10보다 많은 IL-12의 생성, 세포독성 T 세포 반응, Th-1 세포의 생성, 및 특정 유형의 항체 생성을 포함한다. 종양 괴사 인자 α(TNFα)는 또한 상향조절될 수 있다. 대조적으로, 2형 반응은 IL-4, IL-5 및 IL-10의 생성, IL-12보다 많은 IL-10의 생성, Th2 세포의 생성, 및 CTL 반응 유도의 결여를 특징으로 한다.

[0025] 관련 양태에서, 미성숙한 수지상 세포, 예를 들면 단구성 수지상 세포 전구체를 프라이밍시켜 1형 반응을 일으킬 수 있는 성숙화제를 포함하는 조성물이 제공된다. 이러한 성숙한 프라이밍된 단구성 수지상 세포는 예정된 항원, 즉 예정된 외인성 항원의 주요 조직적합성 복합체(MHC) I형 제공을 증가시킬 수 있다. 항원의 MHC I형 제공은 세포독성 T 림프구(CTL)의 분화 및 항원-특이적 CTL-매개된 표적 세포 용해의 자극을 유도하는데 요구된다. 이러한 조성물은 BCG 및 IFNγ를 포함하고, 미성숙한 수지상 세포를 포함하는 세포 집단과 혼합될 수 있으며, 미성숙한 수지상 세포를 성숙화시키고, 미성숙한 수지상 세포와 BCG와의 접촉에 의해 유도된 IL-12의 억제를 전환시키거나 극복한다. 이러한 조성물과 접촉된 미성숙한 수지상 세포는 성숙화하고, BCG 단독과 접촉시킨 미성숙한 수지상 세포 집단과 비교하여, 전형적으로 IL-10보다 더 많은 양의 IL-12를 생성시킨다.

[0026] 또다른 양태에서, 피검체 또는 공여체로부터 수득된 단구성 수지상 세포 전구체는 사이토킨(예, GM-CSF 및 IL-4)과 접촉하여 미성숙한 수지상 세포를 수득할 수 있다. 이어서, 미성숙한 수지상 세포를 BCG 및 IFNγ단독으로 배합하거나 사이토킨과 배합하여 예정된 항원과 접촉시켜 수지상 세포를 성숙시키고, 상기 세포를 프라이밍시켜 T 세포에서 1형 면역 반응을 유도할 수 있다. 특정 양태에서, MHC I형 항원 과정이 자극되는데, 이는 예

정된 항원을 나타내는 세포에 대한 CTL 반응을 유도하는데 유용하다.

[0027] 수지상 세포는 다양한 림프계 및 비-림프계 조직에서 발견되는 항원 제공 세포의 다양한 집단이다[참고문헌: Liu, *Cell* 106: 259-62 (2001); Steinman, *Ann. Rev. Immunol*. 9: 271-96 (1991)]. 수지상 세포는 비장의 림프계 수지상 세포, 상피의 랑게르한스 세포 및 혈액 순환내 숨겨진 세포를 포함한다. 총괄적으로, 수지상 세포는 형태학, 고발현의 표면 MHC Ⅱ형 발현, 및 T 세포, B 세포, 단핵구 및 천연 킬러 세포상에 발현된 특정한 다른 표면 마커의 부재를 근거로 한 그룹으로서 분류된다. 특히, 단핵구-유래 수지상 세포(단구성 수지상 세포로서 또한 언급됨)는 통상적으로 CD11c, CD80 및 CD86을 발현하고, HLA-DR^{+}이지만 CD14^{-}이다.

[0028] 대조적으로, 단구성 수지상 세포 전구체(전형적으로 단핵구)는 통상적으로 CD14^{+}이다. 단구성 수지상 세포 전구체는 존재하는 임의의 조직, 특히 비장, 골수, 림프절 및 흉선과 같은 림프계 조직으로부터 수득할 수 있다. 단구성 수지상 세포 전구체는 또한 순환계로부터 분리할 수 있다. 말초 혈액은 단구성 수지상 세포 전구체를 용이하게 수득할 수 있는 공급원이다. 제대혈(umbilical cord blood)은 단구성 수지상 세포 전구체의 또다른 공급원이다. 단구성 수지상 세포 전구체는 면역 반응을 유도할 수 있는 다양한 유기체로부터 분리할 수 있다. 이런 유기체는 동물, 예를 들면 사람, 및 비-사람, 예를 들면 영장류, 포유동물(개, 고양이, 마우스 및 랫트 포함), 새(닭 포함) 뿐만 아니라 이의 형질전환 종을 포함한다.

[0029] 특정 양태에서, 단구성 수지상 세포 전구체 및/또는 미성숙한 수지상 세포는 건강한 피검체로부터 또는 면역자극을 필요로 하는 피검체, 예를 들면 전립선 암 환자 또는 세포 면역자극이 이롭거나 요망될 수 있는 다른 피검체(즉, 세균성 또는 바이러스성 감염의 피검체)로부터 분리될 수 있다. 또한 수지상 세포 전구체 및/또는 미성숙한 수지상 세포는 면역자극을 필요로 하는 HLA-적합 피검체에게 투여하기 위해 HLA-적합 건강한 개체로부터 수득될 수 있다.

[0030] <u>수지상 세포 전구체 및 미성숙한 수지상 세포</u>

[0031] 혈액 및 골수를 포함하는 다양한 공급원으로부터 수지상 세포 전구체 및 미성숙한 수지상 세포가 집적된 세포 집단을 분리하는 방법은 당해 기술분야에 공지되어 있다. 예를 들면, 수지상 세포 전구체 및 미성숙한 수지상 세포는 헤파린 처리된 혈액의 수거에 의해, 아페레시스(apheresis) 또는 백혈구 아페레시스에 의해, 백혈액 연층(buffy coat)의 제조, 로젯팅(rosetting), 원심분리, 밀도 구배 원심분리(예를 들면, Ficoll(예. FICOLL-PAQUE®), PERCOLL®(비-투석가능한 폴리비닐피롤리돈(PVP)로 피복된 콜로이드성 실리카 입자(직경 15-30 mm)), 슈크로스 등을 사용), 세포의 분별 용해 및 여과 등에 의해서 분리될 수 있다. 특정 양태에서, 백혈구 집단은, 예를 들어 피검체로부터 혈액 수거, 혈소판을 제거하기 위한 피브린 제거 및 적혈구 용해에 의해서 제조될 수 있다. 수지상 세포 전구체 및 미성숙한 수지상 세포는 임의로 예를 들어, PERCOLL® 구배를 통한 원심분리에 의해서 단구성 수지상 세포 전구체를 위해 집적될 수 있다.

[0032] 수지상 세포 전구체 및 미성숙한 수지상 세포는 임의로 폐쇄된, 무균계에서 제조될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "폐쇄된, 무균계" 또는 "폐쇄계"는 비-멸균화, 주위 또는 순환하는 공기에 노출 또는 다른 비-멸균 조건이 최소화되거나 제거된 계를 나타낸다. 수지상 세포 전구체 및 미성숙한 수지상 세포를 분리하기 위한 폐쇄계는 일반적으로 개방형 톱 튜브에서 밀도 구배 원심분리, 세포의 개방형 공기 전달, 조직 배양 플레이트 및 밀봉되지 않은 플라스크에서의 세포 배양 등을 배제한다. 전형적 양태에서, 밀폐계에서는 초기 수집 도관으로부터 밀봉가능한 조직 배양 도관까지 비-멸균된 공기에 노출되지 않고 수지상 세포 전구체 및 미성숙한 수지상 세포의 멸균된 이동이 가능하다.

[0033] 특정 양태에서, 단구성 수지상 세포 전구체는 본원에 참조로서 인용된. 2001년 7월 25일에 출원된, 미국 특허출원 제60/307,978호(소송사건 일람 제020093-002600US호)에 기재된 바와 같이, 단핵구-결합 물질에 부착하여 분리된다. 예를 들어, 백혈구 집단(예. 백혈구 아페레시스에 의해 분리됨)은 단구성 수지상 세포 전구체를 부착한 물질과 접촉될 수 있다. 백혈구 집단이 상기 물질과 접촉된 경우, 백혈구 집단에서 단구성 수지상 세포 전구체는 상기 물질에 우선적으로 부착한다. 다른 백혈구(다른 잠재적 수지상 세포 전구체를 포함)는 상기 물질에 감소된 결합 친화성을 나타내므로, 단구성 수지상 세포 전구체가 상기 물질의 표면상에 우선적으로 집적될 수 있도록 한다.

[0034] 예를 들어, 적합한 물질은 표면적 대 용적 비가 큰 것을 포함한다. 상기 물질은, 예를 들어 미립자 또는 섬유 물질일 수 있다. 적합한 미립자 물질은 예를 들어, 유리 입자, 플라스틱 입자, 유리-피복된 플라스틱 입자, 유

리-피복된 폴리스티렌 입자 및 단백질 흡수에 적합한 다른 비드(bead)를 포함한다. 적합한 섬유 기질은 미세 모세관 및 미세융모막을 포함한다. 미립자 또는 섬유 기질에서는 통상적으로 부착된 단구성 수지상 세포 전구체가 부착된 세포의 생존력을 실질적으로 감소시키지 않고 용출될 수 있도록 한다. 미립자 또는 섬유 기질은 실질적으로 비다공성이어서 단구성 수지상 세포 전구체 또는 수지상 세포가 상기 물질로부터의 용출이 용이하도록 할 수 있다. "실질적으로 비-다공성" 물질은 상기 기질에 존재하는 대다수의 공극이 적어도 세포보다 작아서 세포가 물질에 포획되는 것을 최소화하는 기질이다.

[0035] 단구성 수지상 세포 전구체가 기질에 부착하는 것을 임의로 결합 배지의 첨가에 의해서 증가시킬 수 있다. 적합한 결합 배지는 단구성 수지상 세포 전구체 배양 배지(예, AIM-V®, RPMI 1640, DMEM 및 X-VIVO 15® 등)를 포함하는데, 이에, 예를 들어, 사이토킨(예, 과립구/대식세포 콜로니-촉진 인자(granulocyte/macrophage colony-stimulating factor(GM-CSF)), 인터루킨 4(IL-4) 또는 인터루킨 13(IL-13)), 혈장, 혈청(예, 사람 혈청, 자가 조직 또는 동종 혈청), 혈청 알부민과 같은 정제된 단백질, 2가 양이온(예, 칼슘 이온 및/또는 마그네슘 이온) 및 기질에 단구성 수지상 세포 전구체가 특이적으로 부착되는 것을 보조하거나 기질에 비-단구성 수지상 세포 전구체가 부착되는 것을 방지하는 기타 분자가 임의로 배합되거나 개별적으로 보충된다. 특정 양태에서, 혈장 또는 혈청은 가열-불활성화된 상태일 수 있다. 열-불활성화된 혈장은 백혈구에 대해 자가 또는 이종 유래일 수 있다.

[0036] 상기 기질에 단구성 수지상 세포 전구체를 부착한 다음, 비-부착 백혈구는 단구성 수지상 세포 전구체/물질 복합체로부터 분리된다. 복합체로부터 비-부착 세포를 분리하는데 적합한 수단이 사용될 수 있다. 예를 들면, 비-부착 백혈구 및 복합체의 혼합물을 침강시키고, 비-부착 백혈구 및 배지를 옮겨 따르거나 배출시킬 수 있다. 또한, 혼합물을 원심분리하여 비-부착 백혈구를 함유한 상등액을 옮겨 따르거나, 펠렛화된 복합체로부터 배출시킬 수 있다.

[0037] 분리된 수지상 세포 전구체는 분화, 성숙화 및/또는 증대를 위해서 생체외에서 배양될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 분리된 미성숙한 수지상 세포, 수지상 세포 전구체, T 세포 및 다른 세포는 사람 손에 의해 천연 환경으로부터 분리되어 존재하는 세포를 나타내고, 따라서 천연 생성물이 아니다. 분리된 세포는 정제된 형태로, 반-정제된 형태로 또는 비-천연 환경에 존재할 수 있다. 간단하게는, 생체외 분화는 전형적으로 하나 이상의 분화제의 존재하에 수지상 세포 전구체 또는 수지상 세포 전구체를 갖는 세포 집단을 배양하는 것과 관련있다. 적합한 분화제는, 예를 들면 세포 성장 인자(예, GM-CSF, 인터루킨 4(IL-4), 인터루킨 13(IL-13) 및/또는 이의 배합물의 사이토킨)일 수 있다. 특정 양태에서, 단구성 수지상 세포 전구체는 분화되어 단핵구-유래된 미성숙한 수지상 세포를 형성한다.

[0038] 수지상 세포 전구체는 적합한 배양 조건에서 배양되고 분화될 수 있다. 적합한 조직 배양 배지는 AIM-V®, RPMI 1640, DMEM 및 X-VIVO 15® 등을 포함한다. 조직 배양 배지는 혈청, 아미노산, 비타민, GM-CSF 및/또는 IL-4와 같은 사이토킨 및 2가 양이온 등으로 보충되어 세포 분화를 촉진시킬 수 있다. 특정 양태에서, 수지상 세포 전구체는 무혈청 배지에서 배양할 수 있다. 상기 배양 조건은 임의로 동물-유래의 생성물을 배제할 수 있다. 전형적인 수지상 세포 배양 배지에서 전형적 사이토킨 배합물은 GM-CSF 및 IL-4 각각에 대해 약 500단위/㎖이다. 수지상 세포 전구체는, 분화되어 미성숙한 수지상 세포를 형성하는 경우, 표현형이 피부 랑게르한스 세포와 유사하다. 미성숙한 수지상 세포는 전형적으로 $CD14^-$ 및 $CD11c^+$이고, 저수준으로 CD86 및 CD83을 발현하고, 특수화된 세포내이입을 통해 가용성 항원을 포획할 수 있다.

[0039] 미성숙한 수지상 세포는 성숙되어 성숙한 수지상 세포를 형성한다. 성숙한 DC는 항원을 포획하고 동시 자극하는 세포 표면 분자 및 각종 사이토킨의 상향-조절된 발현을 나타내는 능력을 상실한다. 특히, 성숙한 DC는 MHC Ⅰ형 및 Ⅱ형 항원을 미성숙한 수지상 세포보다 더 높은 수준으로 발현시키고, 성숙한 수지상 세포는 일반적으로 $CD80^+$, $CD83^+$, $CD86^+$ 및 $CD14^-$인 것으로 확인된다. 더 많은 MHC 발현으로 DC 표면상에서 항원 밀도의 증가를 유도하는 반면, 동시-자극의 분자 CD80 및 CD86의 상향 조절로, T 세포상에 CD28과 같은 동시-자극 분자의 대응물을 통해서 T 세포 활성 시그날을 강화한다.

[0040] 본 발명의 성숙한 수지상 세포는 미성숙한 수지상 세포를 유효량 또는 유효 농도의 BCG 및 IFNɣ와 접촉시킴으로써 제조할 수 있다(즉, 성숙시킨다). 유효량의 BCG는 전형적으로 조직 배양 배지의 1㎖당 약 10^5 내지 10^7cfu의 범위이다. 유효량의 IFNɣ는 전형적으로 조직 배양 배지의 1㎖당 약 100 내지 1000U의 범위이다. 바실러스 칼메테-구에린(BCG)은 엠. 보비스(*M. bovis*)의 무독성 균주이다. 본원에서 사용된 바와 같이, BCG는 전체 BCG

및 세포벽 구성물, BCG-유래 리포아라비도만난, 및 2형 면역 반응의 유도와 관련된 다른 BCG 성분을 나타낸다. BCG는 열-불활성화된 BCG 및 포르말린-처리된 BCG 등과 같이 임의로 불활성화된다.

[0041] BCG는 IL-12 생성의 억제 및 세포내이입으로부터 항원의 배제를 수반하면서, 수지상 세포상에 표면 성숙 마커 CD83 및 CD86의 발현을 증가시킨다. 특정 이론에 제한되는 것을 의도하지 않으면서, BCG에 의한 수지상 세포의 성숙은 또한 종양 괴사 인자-α(TNFα)의 방출 및 상기 인자끼리의 응집체와 관계있는 것으로 특징지워졌다[참고문헌: 본원에 참고로서 인용된 Thurnher, *et al.*, *Int. J. Cancer* 70: 128-34 (1997)]. IFNγ 및 BCG로 미성숙한 수지상 세포를 성숙시킴으로써 IL-12의 DC 생성을 촉진시키고, IL-10의 생성을 감소시키거나 억제하면서, 1형 (Th-1) 반응을 위한 성숙한 수지상 세포를 프라이밍시켰다.

[0042] 미성숙한 DC를 전형적으로 약 1시간 내지 약 24시간 동안 유효량의 BCG 및 IFNγ와 접촉시킨다. 미성숙한 수지상 세포를 적합한 성숙 배양 조건하에 배양하고 성숙시킬 수 있다. 적합한 조직 배양 배지는 AIM-V®, RPMI 1640, DMEM 및 X-VIVO 15® 등을 포함한다. 조직 배양 배지는 아미노산, 비타민, GM-CSF 및/또는 IL-4와 같은 사이토킨 및 2가 양이온 등으로 보충되어 세포 성숙을 촉진시킬 수 있다. 전형적 사이토킨 배합물은 GM-CSF 및 IL-4 각각에 있어 약 500단위/㎖이다.

[0043] 수지상 세포의 성숙은 당해 기술분야에 공지된 방법으로 모니터할 수 있다. 세포 표면 마커를 유세포 분석기(flow cytometry) 및 면역조직화학법 등과 같은 당해 기술분야에 친숙한 검정으로 검출할 수 있다. 상기 세포를 또한 사이토킨 생성(예, ELISA, FACS 및 다른 면역 검정에 의해서)에 대하여 모니터할 수 있다. 본 발명에 따라 성숙된 DC 집단에서, IL-12 수준은 IL-10 수준보다 더 높아서 1형 (Th-1) 반응을 촉진시킨다. 예를 들면, DC는 IL-12/IL-10의 비가 1:1 이상, 약 10:1 또는 약 100:1까지 생성할 수 있다. 성숙한 DC는 또한 음세포작용(pinocytosis)에 의해 항원을 흡수하는 능력을 상실하고, 이는 당해 기술분야 숙련가에게 친숙한 흡수 검정으로 분석할 수 있다. 항원으로 프라이밍되거나 프라이밍되지 않은 수지상 세포 전구체, 미성숙한 수지상 세포 및 성숙한 수지상 세포는 후일 사용하기 위해서 냉동보존할 수 있다. 냉동보존 방법은 당해 기술분야에 익히 공지되어 있다. 예를 들면, 본원에 전문 참조로서 인용된 미국 특허 제 5,788,963호를 참조한다.

[0044] <u>항원</u>

[0045] 본 발명에 따라 성숙한, 프라이밍된 수지상 세포는 T 세포에 항원을 제공할 수 있다. 성숙한, 프라이밍된 수지상 세포는 미성숙한 수지상 세포를 성숙 전 또는 성숙 동안 예정된 항원과 접촉시킴으로써 형성될 수 있다. 대안으로, 항원과 이미 접촉하고 있는 미성숙한 수지상 세포(예, 분리 전의 생체내)는 BCG 및 IFNγ를 포함하는 조성물과 접촉하여 1형(Th-1) 반응을 위해 프라이밍된 성숙한 수지상 세포를 형성할 수 있다.

[0046] 적합한 예정된 항원은 T-세포 활성화가 바람직한 임의의 항원을 포함할 수 있다. 이러한 항원은 예를 들어, 세균성 항원, 종양 특이적 또는 종양 관련 항원(예, 전체 세포, 종양 세포 용해물, 종양에서 분리된 항원, 융합 단백질 및 리포솜 등), 바이러스 항원 및 다른 항원 또는 항원의 단편, 예를 들어, 펩타이드 또는 폴리펩타이드 항원을 포함할 수 있다. 특정 양태에서, 항원은 예를 들면, 전립선 특이적 막 항원(PSMA), 전립선 산 포스파타제(PAP) 또는 전립선 특이적 항원(PSA)일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다[참고문헌: 예를 들어 Pepsidero et al., *Cancer Res.* 40: 2428-32 (1980); McCormack et al., *Urlogy* 45: 729-44 (1995)]. 항원은 또한 세균성 세포, 세균성 용해물, 세포 용해물로부터의 막 단편 또는 당해 기술분야에 공지된 다른 임의의 공급원일 수 있다. 항원은 발현되거나 재조합으로 생성될 수 있고, 심지어 화학적으로 합성될 수 있다. 재조합 항원은 또한 숙주 세포(예, 세균, 효모, 곤충, 척추동물 또는 포유동물 세포)의 표면상에 발현될 수 있고, 용해물에서 존재하거나, 용해물로부터 정제될 수 있다.

[0047] 항원은 또한 피검체로부터의 샘플내 존재할 수 있다. 예를 들어, 피검체에서 과다증식되거나 다른 조건에서의 조직 샘플을 항원 공급원으로서 사용할 수 있다. 이러한 샘플을 예를 들어, 생검에 의하거나 외과 절제에 의하여 수득할 수 있다. 상기 항원을 용해물로서 또는 분리된 제제로서 사용할 수 있다. 대안으로, 피검체(예, 암 환자) 세포의 막 제제 또는 확립된 세포주를 또한 항원 또는 항원 공급원으로서 사용할 수 있다.

[0048] 예시적 양태에서, 외과 표본으로부터 회복된 전립선 종양 세포 용해물을 항원 공급원으로서 사용할 수 있다. 예를 들면, 생검이나 외과 절제에서 수득된, 암 환자의 자신의 종양 샘플을 직접 사용하여 수지상 세포에 항원을 제공하거나, 항원 제공을 위한 세포 용해물을 제공할 수 있다. 대안으로, 암 환자의 종양 세포의 막 제제가 사용될 수 있다. 종양 세포는 전립선암, 폐암, 난소암, 결장암, 뇌암, 흑색종 또는 다른 유형의 종양 세포일

수 있다. 용해물 및 막 제제를 당해 기술분야에 공지된 방법으로 분리된 종양 세포로부터 제조할 수 있다.

[0049] 또다른 예시적 양태에서, 모노클로날 항체 7E11-C.5와 특이적으로 반응하는, 정제되거나 반-정제된 전립선 특이적 막 항원(PSMA, PSM 항원으로서 또한 공지됨)을 항원으로서 사용할 수 있다[참고문헌: 본원에 참조로서 인용된 Horoszewicz et al., *Prog. Clin. Biol. Res.* 37:115-32 (1983); 미국 특허 제5,162,504호; 미국 특허 제5,788,963호; Feng et al., *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 32:(Abs. 1418) 238 (1991)]. 또다른 예시적 양태에서, PSMA의 아미노산 잔기 4 내지 12에 상응하는, 아미노산 잔기 서열 Leu Leu His Glu Thr Asp Ser Ala Val(서열번호 1)(PSM-P1으로 명칭됨)을 갖는 항원적 펩타이드를 항원으로 사용할 수 있다. 대안으로, PSMA의 아미노산 잔기 711 내지 719에 상응하는, 아미노산 잔기 서열 Ala Leu Phe Asp Ile Glu Ser Lys Val(서열번호 2)(PSM-P2로 명칭됨)을 갖는 항원적 펩타이드를 항원으로서 사용할 수 있다.

[0050] 특정 양태에서, 아미노산 잔기 서열 Xaa Leu(또는 Met) Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Val(또는 Leu)(PSM-PX로 명칭됨)(여기서, Xaa는 임의의 아미노산 잔기를 나타낸다)을 갖는 항원성 펩타이드를 항원으로서 사용할 수 있다. 이 펩타이드는 HLA-A2 환자에서 발견된 HLA-A0201 결합 모티프, 즉 류신 및 발린과 같은 "고정 잔기"를 갖는 9 내지 10개의 아미노산 잔기의 결합 모티프와 유사하다[참고문헌: Grey et al., *Cancer Surveys* 22: 37-49 (1995)]. 이 펩타이드를 HLA-A2^{+} 환자를 위해서 항원으로 사용할 수 있다[참고문헌: Central Data Analysis Committee " Allele Frequencies", Section 6.3, Tsuji, K. et al., (eds.), Tokyo University Press, pp. 1066-1077]. 유사하게는, 다른 HLA 결합 모티프와 유사한 펩타이드를 사용할 수 있다.

[0051] 전형적으로, 미성숙한 수지상 세포를 상기 기술된 바와 같이, 적합한 성숙 조건하에 BCG, IFNγ 및 예정된 항원의 존재하에 배양시킨다. 임의로, 미성숙한 수지상 세포를 GM-CSF 및 IL-4를 포함하지 않은 전형적 수지상 세포 배양 배지에서 예정된 항원 또는 성숙화제와 혼합할 수 있다. 항원이 함유된 배양물을 적어도 약 10분 내지 2일 후, 항원을 제거하고, BCG 및 IFNγ로 보충된 배양 배지를 부가할 수 있다. 사이토킨(예, GM-CSF 및 IL-4)을 또한 성숙 배지에 부가할 수 있다. 수지상 세포와 접촉시키는 방법은 일반적으로 당해 기술분야에 공지되어 있다[참조문헌: 본원에 참조로서 인용된 Steel lac Nutman, *J. Immunol.* 160: 351-60 (1998); Tao et al., *J. Immunol.* 158: 4237-44 (1997); Dozmorov and Miller, *Cell Immunol.* 178: 187-96 (1997); Inaba et al., *J Exp Med.* 166: 182-94 (1987); Macatonia et al., *J Exp Med.* 169: 1255-64 (1989); De Bruijn et al., *Eur. J. Immunol.* 22: 3013-20 (1992)].

[0052] 이어서 수득한 성숙한, 프라이밍된 수지상 세포를 나이브 T 세포와 같은 T 세포와 함께 동시-항온처리한다. T 세포 또는 T 세포의 서브세트를 반응자 세포로서 사용하기 위해 각종 림프계 조직으로부터 수득할 수 있다. 이러한 조직은 비장, 림프절 및/또는 말초 혈액을 포함하지만 이에 제한되는 것은 아니다. 세포를 혼합된 T 세포 집단 또는 정제된 T 세포 서브세트로서 성숙한, 프라이밍된 수지상 세포와 함께 동시-배양할 수 있다. T 세포를 CD2, CD3, CD4 및 CD8 등에 지시되는 항체의 용도를 포함하지만 이에 제한되는 것은 아닌, 양성 또는 음성 선택으로써 정제할 수 있다.

[0053] T 세포를 성숙한, 프라이밍된 수지상 세포와 접촉시킴으로써, 항체-반응성이거나, 활성화되고 분극화된 T 세포 또는 T 림프구가 제공된다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "분극화된"은 고수준의 IFNγ를 생성하거나, 그렇지 않으면 1형(Th-1) 반응을 유발하도록 프라이밍하는 T 세포를 나타낸다. 이러한 방법은 전형적으로 미성숙한 수지상 세포를 BCG 및 IFNγ와 접촉시켜 성숙한, 프라이밍된 수지상 세포를 제조하는 것을 포함한다. 미성숙한 수지상 세포를 성숙 전 또는 성숙 동안 예정된 항원과 접촉시킬 수 있다. 미성숙한 수지상 세포를 성숙 동안 T 세포(예, 나이브 T 세포)와 함께 동시-배양하거나, 성숙화 및 1형 반응을 유발하기 위해 수지상 세포를 프라이밍시킨 후 T 세포(예, 나이브 T 세포)를 동시-배양시킬 수 있다. 미성숙한 수지상 세포 또는 성숙한 수지상 세포를 성숙화 전 집적시킬 수 있다. 또한, T 세포를 수지상 세포와 접촉시키기 전 림프구 집단으로부터 집적시킬 수 있다. 특이적 양태에서, 집적되거나 정제된 CD4^{+} T 세포 집단을 수지상 세포와 접촉시킨다. 성숙한, 프라이밍된 수지상 세포를 T 세포와 동시-배양함으로써 항원-반응성 CD4^{+} T 세포 또는 항원-반응성 CD8^{+} T 세포로 성숙하는 특이적 T 세포의 자극을 유도한다.

[0054] 또다른 양태에서, 1형(Th-1) T 세포 반응을 유도하는 쪽으로 프라이밍된 성숙한 수지상 세포의 존재하에 상기 세포를 배양함으로써, 시험관내 T 세포의 재-자극 방법이 제공된다. 이러한 T 세포를 임의로 공급자(feeder) 세포상에서 배양할 수 있다. 성숙한, 프라이밍된 수지상 세포를 임의로 T 세포와 접촉시키기 전 방사선 조사할 수 있다. 적합한 배양 조건은 하나 이상의 사이토킨(예, 정제된 IL-2, 콘카나발린 A(Concanavalin A)-자극된 비장 세포 상등액 또는 인터루킨 15(IL-15))을 포함할 수 있다. 시험관내 미성숙한 수지상 세포, BCG, IFNγ

및 예정된 항원의 부가로 T 세포를 재-자극하여 T 세포 집단의 증대를 촉진시킬 수 있다.

[0055] 안정한 항원-특이적, 분극화된 T 세포 배양물 또는 T 세포주를 장기간 동안 정기적으로 재-자극함으로써 시험관내 유지시킬 수 있다. 따라서 T 세포 배양물 또는 T 세포주를 저장할 수 있고, 보존하는 경우(예, 냉동보존 및 결빙으로 제형화됨으로써), 장기간 사용을 위하여 목적하는 간격에 활성화되고 분극화된 T 세포를 재-공급하는데 사용할 수 있다.

[0056] 특정 양태에서, 활성화된 $CD8^+$ 또는 $CD4^+$ T 세포를 본 발명의 방법에 따라 생성시킬 수 있다. 전형적으로, 항원-반응성, 분극화된 T 세포를 생성하는데 사용되는 성숙한, 프라이밍된 수지상 세포는 투여될 피검체와 동일계이다(예, 피검체로부터 수득됨). 대안으로, 의도된 수혜 피검체로서 동일한 HLA 일배체형을 갖는 수지상 세포를 HLA-대항된 공여체로부터 비-암세포(예, 정상세포)를 사용하여 시험관내 제조할 수 있다. 특이적 양태에서, CTL 및 Th-1 세포를 포함하는, 항원-반응성 T 세포를 면역자극을 위한 세포 공급원으로서 시험관내 증식시킨다.

[0057] <u>세포 집단의 생체내 투여</u>

[0058] 본 발명의 또다른 양태에서, 면역자극을 필요로 하는 피검체에게 성숙한, 프라이밍된 수지상 세포 또는 활성화된, 분극화된 T 세포, 또는 이러한 세포를 함유하는 세포 집단의 투여 방법이 제공된다. 이러한 세포 집단은 성숙한, 프라이밍된 수지상 세포 집단 및/또는 활성화된, 분극화된 T 세포 집단 둘다를 포함할 수 있다. 특정 양태에서, 이러한 방법은 수지상 세포 전구체 또는 미성숙한 수지상 세포를 수득하고, BCG, IFNɣ 및 예정된 항원의 존재하에 이들 세포를 분화시키고 성숙시킴으로써 수행되어 Th-1 반응쪽으로 프라이밍된 성숙한 수지상 세포 집단을 형성할 수 있다. 미성숙한 수지상 세포는 성숙화 전 또는 성숙화 동안 항원과 접촉될 수 있다. 이러한 성숙한, 프라이밍된 수지상 세포는 면역자극을 필요로 하는 피검체에게 직접 투여될 수 있다.

[0059] 관련 양태에서, 성숙한, 프라이밍된 수지상 세포를 피검체로부터의 림프구와 접촉시켜 림프구 집단내 T 세포를 자극할 수 있다. 활성화된, 분극화된 림프구는, 임의로 항원-반응성 $CD4^+$ 및/또는 $CD8^+$ T 세포의 세포 배양물에서 클론의 증대후, 면역자극을 필요로 하는 피검체에게 직접 투여될 수 있다. 특정 양태에서, 활성화된, 분극화된 T 세포는 피검체와 자가성이다.

[0060] 또다른 양태에서, 수지상 세포, T 세포 및 수혜 피검체는 동일한 MHC(HLA) 일배체형을 갖는다. 피검체의 HLA 일배체형의 측정 방법은 당해 기술분야에 공지되어 있다. 관련 양태에서, 수지상 세포 및/또는 T 세포는 수혜 피검체와 동종이다. 예를 들면, 수지상 세포는 T 세포 및 수혜자와 동종일 수 있고, 이는 동일한 MHC(HLA) 일배체형을 갖는다. 동종 세포는 전형적으로는 하나 이상의 MHC 대립유전자(즉, 하나 이상이지만 모든 MHC 대립유전자를 함유하지는 않는다)를 위해 적합하다. 보다 덜 전형적인 양태에서, 수지상 세포, T 세포 및 수혜 피검체는 모두 서로에 대해서 동종이지만, 통상적으로 하나 이상의 공통의 MHC 대립유전자를 갖는다.

[0061] 하나의 양태에 따라서, 미성숙한 수지상 세포가 수득된 동일한 피검체로부터 T 세포가 수득된다. 시험관내 성숙화 및 분극화 후, 자가이식 T 세포를 피검체에게 투여하여 기존의 면역 반응을 유발하고/거나 증대시킨다. 예를 들면, T 세포는 예를 들어 약 10^8 내지 10^9세포/체표면적m^2의 용량으로 정맥내 주입에 의해 투여될 수 있다[참고문헌: 본원에 참조로서 인용된 Ridell et al., Science 257: 238-41 (1992)]. 목적하는 간격, 예를 들어 달마다 반복 주입할 수 있다. 수혜자는 T 세포 주입 동안 및 주입 후 역효과를 확인하기 위해 모니터될 수 있다.

[0062] 또다른 양태에 따라서, 본 발명에 따라 BCG 및 IFNɣ로 성숙된 수지상 세포는 종양, 또는 표적 항원을 함유하는 다른 조직내로 직접적으로 투여될 수 있다. 이러한 성숙한 세포는 항원을 흡수하여, 이 항원을 생체내 T 세포에 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0063] 도 1은 상이한 성숙 조건하에서 IL-12 생성을 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0064] 하기 실시예는 단지 본 발명의 각종 양태의 예시로서 제공되고, 어떠한 방법으로도 본 발명을 제한할 수는

없다.

[0065] <u>실시예 1: 상이한 성숙화 조건하의 IL-10 및 IL-12의 생성</u>

[0066] 이 실시예에서, 성숙화제 BCG 및/또는 IFNγ와 접촉시킨 미성숙한 수지상 세포의 집단으로부터의 사이토킨 생성을 측정하였다. 미성숙한 DC를 1% 사람 혈장으로 보충된 OptiMEM® 배지(Gibco-BRL)의 존재하에 말초 혈액 단핵구와 플라스틱을 접촉시킴으로써 제조하였다. 결합되지 않은 단핵구를 세척하여 제거하였다. 결합된 단핵구를 500U GM-CSF 및 500U IL-4/㎖의 존재하에 X-VIVO 15® 배지에서 6일 동안 배양하였다.

[0067] 첫번째 연구에서, 미성숙한 수지상 세포를 불활성화된 BCG의 부가로 성숙시켰다. 수득한 성숙한 수지상 세포의 사이토킨 생성을 측정하였다. 불활성화된 BCG를 다양한 농도로 X-VIVO 15®내 미성숙한 수지상 세포에 부가한 후, 37℃에서 24시간 동안 배양하였다. ㎖당 부가된 BCG 희석액을 4.1 $\times 10^8$cfu/모액㎖로부터 시작하여 표에 제시하고 있다. 검출할 사이토킨에 대한 항체를 사용하는 ELISA 검정에 의해 사이토킨 생성을 측정하였다. 간단하게는, 사이토킨에 특이적인 항체(예: IL-12 또는 IL-10)를 사용하여 고체 표면상의 사이토킨을 포획하였다. 이어서, 고체 표면을 2차로 처리하고, 사이토킨에 대한 항체를 표지화하여 포획된 사이토킨의 존재를 검출한다. 2차 항체는 전형적으로 효소로 표지화되어 열량측정 검정에 의한 검출이 용이하다. 대표적 실험 결과를 하기 표 1에 제시하고 있다. 사이토킨의 양, 또는 사이토킨 생성은 pg/㎖로서 제시된다.

표 1

BCG로 성숙된 DC에 의한 IL-10 및 IL-12 생성

[0068]

공여자	측정된 사이토킨	부가된 인자 없음	BCG 1:100	BCG 1:250	BCG 1:500	BCG 1:1000	TNFα + IL-1β
2	IL-12 p70	<5	393	239	335	<5	<5
	IL-12 p40	nd	nd	2852	nd	nd	nd
2	IL-10	76.5	1206	700	338	153	380
2	p70/IL-10	<0.06	0.33	0.34	1	<0.03	<0.01
3	IL-12 p70	249	318	260	74	<5	<5
	IL-12 p40	nd	nd	12257	nd	nd	nd
3	IL-10	305	426	162	124	<5	70
	p70/IL-10	0.82	0.75	1.60	0.60	nd	<0.07

[0069] "nd"는 검출되지 않음을 의미한다.

[0070] 표 1에 관해서, 상기 결과는 BCG 부가가 비록 사이토킨 생성의 절대수준 및 상대수준 모두가 공여체-의존적이라 해도, 사이토킨 IL-12, IL-10, 또는 이들의 아단위의 생성을 증가시킬 수 있음을 제시하고 있다. 가장 높은 수준의 증가는 IL-12 p40 및 IL-10에 있어서 나타났고, 이는 IL-12 p40의 수준과 상대적으로 관찰된 저-수준의 IL-12 p70(p35 및 p40 아단위로 구성됨)이 IL-12 p35 생성의 부족 때문인 것으로 보였다. BCG가 존재하는 하나를 제외한 모든 상태에서, IL-12 p70 대 IL-10의 수준 비는 1 이하이고, 이는 BCG 단독 존재하에 미성숙한 수지상 세포의 성숙화가 나이브(naive) T 세포를 Th-2 반응쪽으로 분극화시킴을 나타낸다.

[0071] 유사 조건하에서 IFNγ의 도입 효과를 또한 측정하였고, 하기 표 2에 제시하고 있다. 사이토킨 생성을 상기 기재된 바와 같이 측정하였다. 표 1 및 2를 비교하는 경우, 성숙화제(예. BCG)의 존재하에 IFNγ의 부가가 IL-12 p70의 생성을 증가시킴이 확실하다. 특히, 성숙화 동안 BCG와 IFNγ의 부가는 IL-12 p35 생성을 증가시키고, IL-10 생성을 감소시켰다. 결과로서, IL-10에 대한 IL-12 p70의 비는 BCG와 IFNγ의 부가시 늘 1보다 컸다. 몇몇 공여체에서 및 특정 조건하에서, IL-12 p70 대 IL-10의 생성 비는 BCG와 IFNγ의 부가에 의해 100:1보다 크게 증가할 수 있다. 따라서, 놀랍게도 이들 결과는 성숙화제 BCG와 IFNγ의 부가로 IL-12 p70 생성을 상당히 증가시킬 수 있음을 나타낸다.

표 2

BCG와 IFNγ로 성숙된 DC에 의한 IL-10 및 IL-12 생성

공여자	사이토킨	IFNγ 단독	BCG 1:100 + IFNγ	BCG 1:250 + IFNγ	BCG 1:500 + IFNγ	BCG 1:1000 + IFNγ	TNFα+IL-1β+. IFNγ
2	IL-12 p70	<5	1223	801	848	461	521
	IL-12 p40	<5	nd	23751	19362	8666	nd
2	IL-10	<5	470	510	394	179	95
	p70/IL-10		2.60	1.57	2.15	2.58	5.48
3	IL-12 p70	212	6858	5380	2934	949	231
	IL-12 p40	<5	nd	48351	nd	16164	25645
3	IL-10	141	254	241	157	<5	163
	p70/IL-10	1.50	27	22	18	>189	1.41

[0072]

[0073] "nd"는 검출되지 않음을 의미한다.

[0074] <u>실시예 2: IFNɣ에 의한 IL-10의 하향조절은 투여량-의존적이다:</u>

[0075] 이 실시예에서, BCG와 배합한 IFNɣ의 수지상 세포 집단내 IL-10 생성의 하향조절 능력이 예시되고 있다. 미성숙한 수지상 세포를 상기 기재된 바와 같이 제조하였다. 미성숙한 수지상 세포를 단독으로 배양하고, 2개 농도의 BCG(4.1 $\times 10^8$cfu/모액㎖의 1:1000 또는 1:250 희석액)중 하나의 존재하에 성숙시키거나, 0U 내지 1000U/㎖의 농도 범위에서 단독 IFNɣ에 노출시켰다. 수득한 수지상 세포에 의한 IL-10 생성을 시판중인 항체(예. R&D Systems, Minneapolis, MN)를 사용하는 ELISA(supra)에 의해 측정하였고, pg/㎖로 나타냈다. 대조구에서, 단독 배양(BCG 또는 IFNɣ의 부가 없이)된 미성숙한 DC는 어떠한 검출가능한 IL-10도 생성하지 않았다. 대조적으로, IFNɣ단독 존재하에 배양된 DC는 소량의 IL-10(약 20 내지 30pg/㎖)를 생성하였다. 생성된 IL-10의 양은 10U 내지 1000U IFNɣ/㎖의 범위에 걸쳐 투여량 의존성이 아니었다.

[0076] 대조적으로, BCG 단독의 존재하에 성숙화에 의해 생성된 DC는 상당량의 IL-10; 각각 BCG 모액의 1:1000 또는 1:250 배수 희석액의 존재하에 약 150pg/㎖ 또는 ＞250pg/㎖의 IL-10을 생성하였다. DC 성숙화 동안 BCG에 IFNɣ의 부가는 투여량-의존적 방식으로 IL-10 생성의 하향조절을 야기하였다. BCG의 1:1000 희석액의 존재하에 배양된 DC에 있어서, IL-10 생성은 약 150pg/㎖의 IL-10(IFNɣ없음)에서 약 20-30pg/㎖의 IL-10(1000U IFNɣ)로 감소하였다. BCG의 1:250 희석액의 존재하에 배양된 DC에 있어서, IL-10 생성은 약 270pg/㎖의 IL-10(IFNɣ없음)에서 약 50pg/㎖의 IL-10(1000U IFNɣ)로 감소하였다. 따라서, BCG 및 IFNɣ의 존재하에 미성숙한 DC의 성숙화는 IL-10 생성을 하향조절할 수 있고, BCG 단독에 의해 유도된 IL-10 생성의 명백한 자극을 극복할 수 있었다.

[0077] <u>실시예 3: IFNɣ에 의한 IL-12의 상향조절은 투여량 의존적이다:</u>

[0078] 이 실시예에서, IL-12 생성을 상향조절하는 IFNɣ의 능력이 예시되었다. 미성숙한 수지상 세포를 상기 기재된 바와 같이, GM-CSF 및 IL-4의 존재하에 증식된 6일째 단핵구 배양물로부터 유도하였다. 미성숙한 DC를 각종 농도의 BCG 단독, 또는 각종 농도의 IFNɣ와 배합한 BCG로 2일 더 처리하였다. 배양 상등액을 상기 기재된 바와 같이, ELISA 검정에 의해 IL-12 p70의 존재에 대하여 시험하였다.

[0079] 대표적 실험으로부터의 결과를 표 1에 제시하고 있다. 각각의 배양물에 있어서, 결과를 3회 측정하였다. BCG 단독의 양을 증가시킴에 따라서, 상대적으로 낮은(〈1000pg/㎖) 평균 농도의 IL-12 p70이 성숙한 DC에 의해 생성되었다. IL-12 생성량은 BCG 양이 증가됨에 따라 투여량 의존형으로 감소하였다. 대조적으로, BCG(모액의 1:1000 희석액)와 IFNɣ(10U/ml)의 부가시, IL-12의 양은 대략 5000pg/㎖로 급격히 증가하였다. BCG(모액의 1:1000 희석액)와 함께 100U/㎖의 IFNɣ부가시, IFNɣ양은 거의 20,000pg/㎖로 증가하였다. BCG(모액의 1:1000 희석액)와 함께 500U/㎖ 또는 1000U/㎖의 IFNɣ의 부가는 각각 대략 21,000pg/㎖ 및 22,000pg/㎖의 IL-12 수준을 야기하였다.

[0080] 요약하자면, BCG 단독이 IL-12 생성을 길항하는 것으로 보이지만, BCG 및 IFNɣ의 존재하에 미성숙한 DC의 성숙

화는 IL-12 생성을 상당히 증가시켰다.

[0081] 실시예 4: 항원 특이적 T-세포의 자극

[0082] 이 실시예에서, BCG 및 IFNɣ의 존재하에 성숙시킨 미성숙한 DC는 항원-특이적 T 세포에 의한 IFNɣ 생성을 자극하는 것으로 나타났다. 인플루엔자 A에 특이적인 T 세포주를 5% 사람 혈청으로 보충된 AIM-V® 배지에 5㎍/㎖의 인플루엔자 M1 펩타이드(GILGFVFTL; 서열번호 3)와 함께 2 $\times 10^6$세포/㎖로 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 접종함으로써 생성시켰다. 이들 배양 조건은 인플루엔자 M1 펩타이드에 있어서 특이적인 이들 T 세포의 선택적 증대를 야기한다. 배양 2일 후, 20U/㎖ 및 5ng/㎖의 IL-15를 배양물에 부가하였다. 배양 약 7 내지 14일 후, T 세포주를 사이토킨을 함유하지 않는 배지에서 밤새 정치시켰다.

[0083] 이어서, 항원-특이적 T 세포를 미성숙한 DC, BCG 단독으로 성숙시킨 DC, 또는 BCG와 IFNɣ로 성숙시킨 DC와 동시-배양하였다. 항원-특이적 T 세포 대 DC의 비는 1:1이었다. T 세포 및 DC를 37℃에서 24시간 동안 항온처리하였다. DC를 직접적으로 부하하거나, 인플루엔자 M1 펩타이드를 사용하여 삼투압으로 부하하였다. 간단하게는, 미성숙한 DC를 배양 플라스크로부터 수거하고, 원심분리로 농축시켰다. 삼투압 부하에 있어서, 세포를 소용적의 고삼투압 배지에서 재현탁시킨 후, PBS중의 동일 용적의 인플루엔자 M1 펩타이드를 부가하였다. 빙상 배양 10분 후, 세포를 광범위하게 세척하였다. 직접 부하에 있어서, 세포를 동일 용적의 X-VIVO 15® 배지 및 PBS중의 인플루엔자 M1 펩타이드로 재현탁시키고, 37℃에서 1시간 동안 항온처리하였다. 세포를 37℃에서 2시간 동안 항온처리하여 항원 프로세싱을 가능하게 했다.

[0084] T 세포와 DC 동시-배양 후, T 세포 반응을 100㎕의 배양 상등액 샘플로부터 IFNɣ의 ELISA 정량화로 측정하였다. 결과는 DC 부하 방법에 상관없이, BCG와 IFNɣ로 자극된 DC가 항원 특이적 T 세포의 보다 우수한 자극제라는 것을 나타내고 있다. 미성숙한 DC와 동시-배양된 T 세포는 상당히 적은 IFNɣ(〈2,000pg/㎖)을 생성하는 반면, BCG 단독으로 성숙시킨 DC와 동시-배양된 T 세포는 IFNɣ(〉5,000pg/㎖)의 중간 생산자였다. BCG와 IFNɣ를 사용하여 성숙시킨 DC와 동시-배양된 T 세포는 높은 수준의 IFNɣ를 생성시켰다(삼투압으로 부하된 DC에 있어서는 〉20,000pg/㎖ 또는 직접 부하된 DC에 있어서는 〉25,000pg/㎖).

[0085] 따라서, BCG와 IFNɣ로 성숙시킨 DC는 항원으로 DC를 부하시키는 방법에 상관없이, 항원-특이적 T 세포의 보다 나은 자극제였다.

[0086] 실시예 5: 시험관내 항원 특이적 T 세포 반응의 신규(De Novo) 생성

[0087] 키홀 림펫 헤모시아닌(KLM)에 특이적인 T 세포주를 BCG, 또는 BCG와 IFNɣ를 사용하여 성숙시킨 DC로 PBMC를 자극함으로써 생성시키고, KLH로 부하시키거나, 10:1의 T 세포 대 DC 비로 단백질을 조절하였다. T 세포 및 성숙시킨 DC를 3 내지 4일마다 신선 배지(5% 사람 AB 혈청, 20U/㎖ IL-2, 및 5ng/㎖ IL-15로 보충된 AIM-V® 배지)에 제공하였다. 세포를 필요에 따라 보다 큰 플라스크로 계대시켰다. 특정 항원에 대한 전반적인 전구체 빈도는 낮고, 미접촉 세포는 반응에 대한 강력한 자극을 필요로 하기 때문에, 자극을 10 내지 21일 간격으로 3 내지 4회 반복하였다. 세포를 재-자극 전 사이토킨이 함유되지 않은 배지에서 밤새 회수할 수 있었다.

[0088] 표준 3-일 티미딘 혼입 검정을 사용하여 KLH-특이적 세포 증식에 대한 자극된 T 세포주를 시험하였다. 자극시킨 T 세포를 DC 대 T 세포 비를 달리하면서 KLH-자극된 미성숙한 수지상 세포와 항온처리하였다. T 세포 증식을 분당 계수(CPM)로서 측정하였다. 자극에 반응한 세포 증식 또는 사이토킨의 생성을 항원-특이적 반응의 증거로 하였다. 항원 특이성에 대한 대조를 위해, 음성 대조 항원(인플루엔자 A 바이러스)을 또한 본 검정에 포함하였다.

[0089] BCG 단독으로 성숙시킨 DC를 T 세포를 자극하는데 사용하는 경우, T 세포 증식은 상당히 낮았다(〈5,000CPM). 이 저수준의 증식은 DC를 KLH 또는 인플루엔자 A 바이러스로 접촉시킨 것보다 낮았다. 또한, 저수준의 증식을 미성숙한 DC와의 항온처리에 대한 반응으로 관찰하였다. 50:1, 25:1 또는 12.5:1(T 세포 대 DC)의 자극제 비에 반응자로 사용된 3개 그룹의 DC 사이에서는 어떠한 유의차도 관찰되지 않았다. 대조적으로, BCG 및 IFNɣ로 성숙시킨 수지상 세포를 사용하여 T 세포를 자극하는 경우, KLH-자극된 DC는 미성숙한 DC 또는 인플루엔자 A로 자극된 성숙한 DC 보다 상당히 큰 T 세포 증식(대략 10,000-33,000 CPM)을 유도하였다. KLH 항원으로 자극된 성숙한 DC에 있어서, T 세포 증식은 자극제 비에 대한 반응자 증가와 비례하여 증가하였다.

[0090] 또한, T 세포 작동인자 기능을 사이토킨 분비에 의하여 모니터하였다. KLH-특이적 T 세포주(상기 기재된 바와 같이 생성됨)를 BCG 단독 또는 BCG와 IFNγ로 성숙시킨 DC를 사용하여 자극하였다. 자극시킨 T 세포주를 세포를 항-CD3 항체(50ng/㎖) 및 PMA(5ng/㎖)로 비-특이적으로 자극시킨 후, 세포내 사이토킨 염색에 의하여 사이토킨 생성에 대하여 시험하였다. 사이토킨 생성을 특정 사이토킨을 생성하는 세포의 %로서 측정하였다. 샘플링된 세포의 검출불가능한 상당히 낮은 %(《5%)로 IL-2, IL-4, IL-5 또는 IL-10을 생성하였다. IL-5 및 IL-10은 BCG와 IFNγ로 성숙시킨 DC에 의해 자극된 T 세포에서 검출되지 않았다. BCG 단독으로 성숙시킨 DC에 의해 자극된 T 세포는 저수준의 IFNγ(〈10%) 및 TNF-α(〈15%)를 생성하였다. 대조적으로, IFNγ와 BCG로 성숙시킨 DC로 자극된 상당한 정도의 T 세포는 IFNγ(대략 35%) 및 TNFγ(〉45%)를 생성하였다. 따라서, BCG와 IFNγ로 성숙시킨 DC로 T 세포를 자극시킴으로써, T 세포를 1형(Th-1) 반응쪽으로 분극화시킨다.

[0091] <u>실시예 6: Th-1 사이토킨 종양 괴사 인자 α(TNFα)의 유도</u>

[0092] 이 실시예에서, 1형 사이토킨 종양 괴사 인자 α(TNFα)를 상향조절하는 BCG와 TNFγ의 배합 능력이 예시되었다. 간단하게는, 미성숙한 수지상 세포를 상기 기재된 바와 같이 유도하였고, GM-CSF 및 IL-4의 존재하에 증식시켰다. 미성숙한 DC를 BCG 단독 또는 IFNγ와 배합하여 24시간 동안 배양하였다. 이어서, 단백질 수송 억제제(GolgiPlug™, PharMingen)를 부가하여 골지 복합체로부터 생성된 사이토킨의 수송을 차단하고, 세포를 밤새 항온처리하였다. 이어서, 세포를 수거하여 투과시키고, 당해 기술분야에 익히 공지된 방법을 사용하여 TNFα 또는 동형 대조군 항체에 특이적인 형광 표지 항체로 내부를 염색하였다. TNFα에 양성인 DC의 빈도 및 세포의 형광 강도를 FACS 분석으로 측정하였다(표 3). IFNγ의 존재하에 BCG를 사용한 DC의 성숙화는 Th-1 사이토킨 TNFα를 생성시키는 DC의 능력을 증가시키는 것으로 발견되었다.

표 3

[0093] IFNγ없는 BCG 또는 IFNγ와 BCG의 존재하에 성숙된 DC에 의한 TNFα 생성

성숙화 조건	양성 세포율 %	평균 형광 강도
BCG	3.9	99
BCG + IFNγ	31.5	192

[0094] <u>실시예 7: 세포-관련 항원에 대한 반응의 유도</u>

[0095] 이 실시예에서, BCG 단독으로 성숙시킨 DC와 비교하여, BCG와 IFNγ의 존재하에 DC를 성숙시킨 경우는 상당히 더 많은 종양-특이적 T 세포 방출 및 유사 수준의 항원-특이적 세포독성을 유도한다고 예시되었다. 미성숙한 수지상 세포를 상기 제시된 바와 같이 분리하고, GM-CSF 및 IL-4의 존재하에 배양하였다. 이어서, DC를 녹색 형광 단백질(GFP) 또는 인플루엔자 A 바이러스의 M1 단백질을 발현시키는 재조합 아데노바이러스로 이미 감염된 전체 종양 세포들(A549)중 하나에 부하하였다. DC를 BCG 또는 IFNγ와 배합한 BCG로 24시간 후에 성숙시켰다. 종양 부하된 DC 또는 GFP 또는 M-1-발현 종양 세포를 사용하여 자가 M1-특이적 T 세포주를 자극하였다. 24시간 후, 세포 배양물 상등액을 수거하고, 표준 IFNγ ELISA에 적용시켰다. M1-발현 종양 세포로 부하된 DC만이 IFNγ 방출을 자극할 수 있었고, BCG와 IFNγ으로 성숙시킨 DC는 미성숙한 또는 BCG 성숙시킨 DC보다 이 반응을 유도하는데 보다 현저히 강력하였다.

표 4

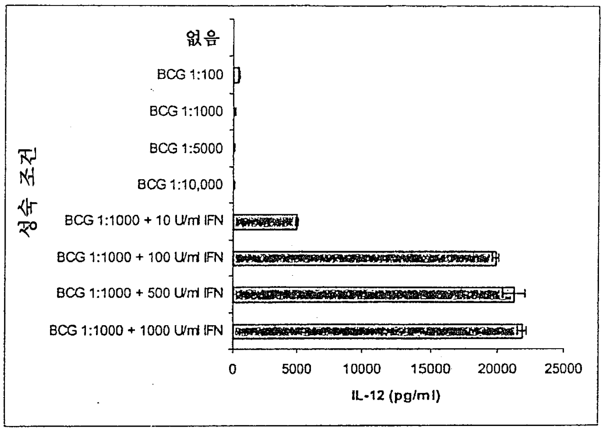
[0096] 세포-관련 항원에 대한 반응 유도

성숙화 조건	IFNγ방출
없음	10,379
BCG	15,114
BCG + IFNγ	75,546

[0097] 상기 실시예는 예시하고자 제공된 것이고, 청구된 발명의 범위를 제한하는 것이 아니다. 본 발명의 다른 변수는 당해 기술분야 숙련가에게 용이하게 명확하고, 관련 청구항에 포함될 것이다. 모든 명세서, 특허, 특허 출원서 및 다른 참조문헌은 본원에 인용되었고, 또한 전문 참조로서 혼입된다.

도면

도면1



서 열 목 록

<110> Northwest Biotherapeutics, Inc.

<120> COMPOSITIONS AND METHODS FOR PRIMING MONOCYTIC DENDRITIC CELLS AND T CELLS FOR TH-1 RESPONSE

<130> 20093-29-1PC

<150> US 60/317,569

<151> 2001-09-06

<160> 3

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Leu Leu His Gln Thr Asp Ser Ala Val

1 5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ala Leu Phe Asp Ile Glu Ser Lys Val

1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 3

Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu

1 5