

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl. ⁶ C12N 5/08		(45) 공고일자 1999년 10월 15일	
		(11) 등록번호 10-0223395	
		(24) 등록일자 1999년 07월 09일	
(21) 출원번호	10-1994-0703412	(65) 공개번호	특 1995-0700989
(22) 출원일자	1994년 09월 30일	(43) 공개일자	1995년 02월 20일
번역문제출일자	1994년 09월 30일		
(86) 국제출원번호	PCT/US 93/02639	(87) 국제공개번호	WO 93/20186
(86) 국제출원일자	1993년 03월 29일	(87) 국제공개일자	1993년 10월 14일
(81) 지정국	AP ARIPO특허 : 말라위 수단 EA EURASIAN특허 : 러시아 EP 유럽특허 : 핀란드 OA OAPI특허 : 부르키나파소 베냉 중앙아프리카 콩고 코트디부아르 카메룬 가봉 기네 말리 모리타니 니제르 세네갈 차드 토고 국내특허 : 오스트레일리아 바베이도스 불가리아 브라질 캐나다 체코 헝가리 일본 대한민국 스리랑카 마다가스카르 몽고 노르웨이 뉴질랜드 폴란드 루마니아 슬로바키아 우크라이나 미국 베트남		
(30) 우선권주장	92400879.0 1992년 03월 30일 EPO(EP)		
(73) 특허권자	쉐링 코포레이션 둘락 노먼 씨. 미국 뉴저지주 07033 케플워어스시 개롭핑 힐 로드 2000		
(72) 발명자	자끄방슈로 프랑스공화국에프-69130에펠리아브뉴폴-상띠25 크리스토프코 프랑스공화국에프-69005리용뤼드사브와1		
(74) 대리인	이병호		

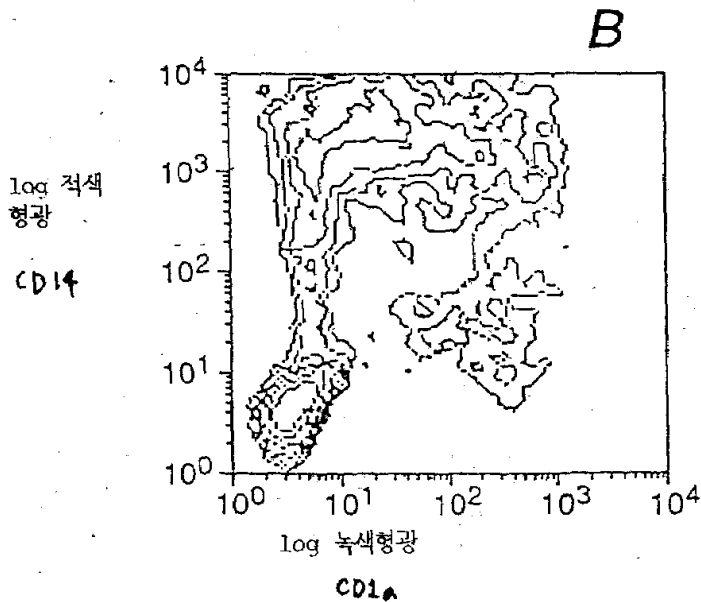
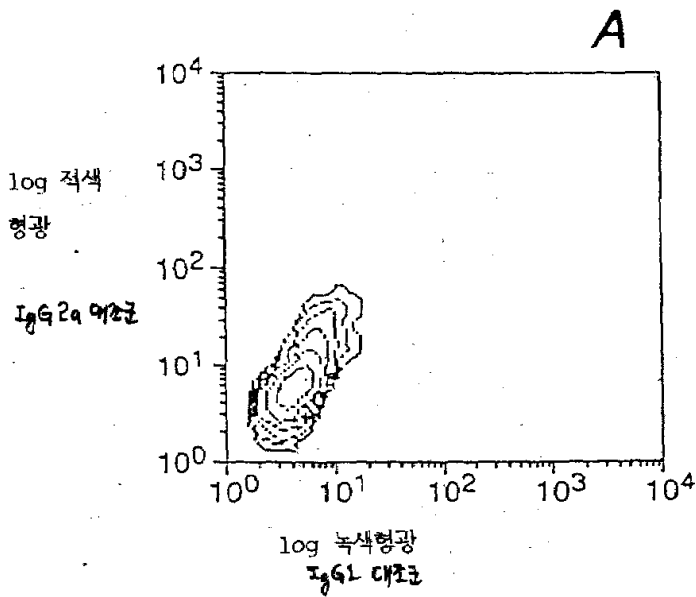
심사관 : **최규환**

(54) 사람수지상세포의시험관내생성방법및이의용도

요약

본 발명은 CD34⁺ 세포를 종양괴사인자- α 와 인터루킨-3으로 처리하거나 GM-CSF로 처리하여 시험관내에서 사람 수지상 세포를 생성하는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 상기 방법에 의해 제조된 수지상 세포의 세포성 조성물을 포함한다. 본 발명의 수지상 세포는 조직 거부 검정을 위한 개선된 혼합 임파구 반응, 양의 수동 면역 치료, HIV 및 기타 바이러스 감염의 수동 면역 치료 및 사람 항체 생성을 위한 SCID-hu 마우스를 포함한, 많은 진단 및 치료 시스템에서의 구성 요소로서 널리 사용될 수 있다.

대표도



명세서

[발명의 명칭]

사람 수지상 세포의 시험관내 생성방법 및 이의 용도

[기술분야]

본 발명은 일반적으로 사람 수지상(dendritic) 세포를 시험관내에서 생성하는 방법, 및 보다 특히, 이로써 생성된 세포의 치료 용도 및 진단 용도에 관한 것이다.

수지상 세포는 MHC-억제된 T세포의 감작화, 기관 이식조직의 거부, 및 T 세포-의존적 항체의 형성과 같은 몇몇 면역 반응을 개시하도록 작용하는 항원-제시세포 시스템이다. 수지상 세포는 많은 비-임파계 조직에서 발견되나, 구심성 림프 또는 혈류를 통해 임파계 기관의 T 세포-의존적 영역내로 이동될 수 있다. 이들이 피부에서 발견되는 경우 이들은 랑게르한스 세포(Langerhans cell)라 불리며, 또한 점막에도 존재한다. 이들은 말초 조직(이들이 항원을 얻을 수 있는 조직)내에서 면역 시스템의 파수군이다. 이들 세포는 CD4를 발현하고 HIV에 의해 시험관내에서 감염될 수 있으므로, 이들이 생체내에서 HIV 바이러스의 유입구를 제공하는 것 같다[참조 : Knight et al., pp. 145 in Racz, et. al., editors. Accessory Cells in HIV and Other Retroviral Infections (Karger, Basel, 1991); Ramsauer et al., pp. 155 in Racz, et al., editors (상기 참조)]. 말초혈로부터 사람 수지상 세포의 분리가 최근들어서야 성공하였으며, 단지 소수의 세포만이 생성될 수 있다(참조: Freudenthal et al., Proc. Natl. Acad. Sci., Vol. 87, pp. 7698(1990)). 다수의 사람 수지상 세포를 시험관내에서 생성하면, 시험관내에서 사람의 순수한 CD4 및 CD8 T세포를 프라이밍(priming)하고, HIV 감염을 방해할 수 있는 제제를 스크리닝하며, 사람 T 및 B 세포

로 재구성된 SCID-hu 마우스에서 사람 B 세포의 1차 및 2차 생체내 반응을 발생시키고, 보다 민감한 혼합-임파구 반응 검정법을 구성하는데 중요한 잇점을 나타낸다.

동종 조직 및 기관의 이식에 대한 주요한 방해는 이식조직체 수용자에 의한 조직이식 거부이다. 공급자 조직에 대한 수용자 또는 숙주의 세포-중재된 면역 반응은 거부 과정에서 중요한 역할을 한다. 세포-중재된 면역 반응은 두가지 중요한 양상을 지닌다: (1) 주요 조직적합성 복합체(MHC)의 맥락에서 숙주 세포가 공급자 세포를 외래물질로서 인지하는 경우의 인지 양상; 및 (ii) 숙주 세포가 외래 세포를 공격하여 반응하는 경우의 파괴 양상. 공격 과정의 일부로서, 많은 반응 세포가 증식하며, 세포 독성, 즉 적절한 항원을 나타내는 공급자 세포를 죽이는 능력을 획득하게 된다. 따라서, 세포-중재된 면역성은 2가지 측정가능한 작용, 즉 증식과 세포독성의 측면에서 기술될 수 있다[참조: Dubey et al., chapter 131 in Rose et al., Editors. Manual of Clinical Laboratory Immunology. 3rd edition (American Society of Microbiology, Washington, D.C., 1986)].

세포 배양 기술의 개발로 인해, 생체내 면역 과정을 모방한 시험관내 방법을 확립하게 됨으로써, 시험관내에서 세포-중재된 면역성을 평가하는 측정법이 제공되었다. 특히, 이식과 관련한 유용성은 혼합 임파구 반응(MLR), 또는 혼합 임파구 배양이다. MLR은 비교적 간단한 검정법이지만, 여기에는 많은 변형이 있다. 전형적으로, 이 검정법은 적합한 배양 시스템에서 반응 임파구를 증식 및/또는 전자 기구가 예를 들어 조사에 의해 무력화된 자극 임파구와 혼합하는 것으로 이루어져 있다. 세포를 수일 동안 배양한 후, 자극 세포에 대한 반응 세포의 반응성, 예를 들어 삼중수소처리된 티미딘의 흡수, 아세포수, 분열 세포수, 사이토킨 생성 등을 정량하기 위한 다수의 상이한 측정을 수행할 수 있다. 이 검정법에서 기타 변수는 반응 세포 및 자극 세포의 공급원, 예를 들어 말초혈, 비장, 램프질; 반응 세포가 자극 세포에 대해 동계(syngenic), 동종(allogenic) 또는 이종(xenogenic)인가의 여부; 자극 세포를 무력화시키는 방법, 예를 들어 조사 또는 DNA 합성 억제제(예: 미토마이신 C)로의 처리 등을 포함한다.

세포-중재된 면역 반응성에 대한 통상의 검정법으로서 MLR의 결점은 감작성이다. 때때로, 특정한 판독 방법을 이용하는 경우에도 MLR에서 강력한 효과를 얻기가 힘들다. 자극 모집단중의 항원-제시 세포는 반응 세포를 자극하는데 관여하는 것으로 믿어진다: 그러나, 대부분의 조직에서 세포와 같은 공급원은 수가 적으며/적거나 비효율적으로 자극하는 유형이다. MLR 검정법의 감작성, 및 이에 따른 유용성은 보다 강력한 자극 세포 모집단을 이용함으로써 상당히 향상될 수 있다. 수지상 세포가 강력한 항원-제시 세포로서 널리 공지되어 있으므로, 상기 세포를 이러한 작용에 이용할 수 있다[참조: Steinman, Ann. Rev. Immunol. Vol. 9, pgs. 271-296(1991)]. 불행하게도, 통상의 MLR에 사용하기 위한 충분한 양으로 수지상 세포를 수득하기가 현재 매우 곤란하다.[참조: Steinman, et al., chapter 49 in Herzenberg et al., Editors. Cellular Immunology Vol. 2 (Blackwell Scientific Publications. Oxford. 1986)].

[발명의 요약]

본 발명은 사람 수지상 세포의 시험관내 생성 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 본 발명의 방법에 의해 생성된 사람 수지상 세포의 분리된 모집단, 및 자극 세포로서 수지상 세포의 순수한 모집단을 사용하는 개선된 MLR 검정법을 포함한 분리된 세포의 용도를 포함한다. 본 발명의 방법은 종양괴사인자- α (TNF- α) 및 인터루킨-3(IL-3)의 존재하에 또는 과립구-대식구 콜로니 자극인자(GM-CSF)의 존재하에 CD34⁺ 조혈원(hematopoietic progenitor) 세포를 배양하여 본 발명의 CD1a⁺ 수지상 세포를 형성하는 단계를 포함한다.

따라서, 본 발명은 CD34⁺ 조혈 세포를 TNF- α 와 IL-3로 처리하거나 GM-CSF로 처리하는 단계; 및

CD1a 항원을 발현하는, 상기와 같이 처리된 CD34⁺ 조혈 세포를 분리하는 단계를 포함하여, 사람 수지상 세포를 포함하는 세포성 조성물을 제조하는 방법을 제공한다.

바람직하게는, CD34⁺ 세포는 GM-CSF뿐만 아니라 TNF- α 로 처리한다.

본 발명은 또한 시험관내 배양에 의해 CD1a 항원을 발현하는 CD34⁺ 조혈 세포, 및 상기 정의된 방법에 의해 생성된 사람 수지상 세포를 포함하는 세포성 조성물을 제공한다.

수지상 세포는 면역학적 반응을 개시한다. 본 발명에 따른 수지상 세포에 대해 본원에 보고된 시험관내 자료는, 이들 세포가 실험실 도구로서 유용하며 암 및 바이러스 감염을 포함하는 다양한 질환의 양자(수동) 면역 치료에 의한 생체내 치료에 유용성을 가질 수 있다는 것을 나타낸다.

본 발명은 또한 수지상 세포주를 제조하거나 수지상 세포를 유도하기 위한 TNF- α 와 IL-3 또는 GM-CSF의 용도; CD34⁺ 헬퍼 T 세포를 생성하기 위한 수지상 세포의 용도; 수동 면역 치료에 있어서의 CD34⁺ 헬퍼 T 세포의 용도; 사람 항체 생성을 위한 SCID-hu 마우스의 용도; 및 암-특이적 및 바이러스-특이적 CD8⁺ 세포독성 T 세포를 생성하기 위한 수지상 세포의 용도, 특히 AIDS 바이러스에 대해 특이적인 CD8⁺ 세포독성 T 세포를 생성하기 위한 수지상 세포의 용도에 관한 것이다.

본 발명의 또다른 양상은 반응 세포의 샘플을 제공하는 단계; 자극 세포가 반응 세포에 대해 동종이며, 자극 세포가 (a) CD34⁺ 조혈 세포를 TNF- α 와 IL-3로 처리하거나 GM-CSF로 처리하는 단계와 (b) CD1a 항원을 발현하는, 상기와 같이 처리된 CD34⁺ 조혈 세포를 분리하는 단계를 포함하는 방법에 의해 생성된 수지상 세포로 이루어지도록 불활성화된 자극 세포의 샘플을 제공하는 단계;

반응 세포와 상기와 같이 불활성화된 자극 세포를 함께 배양하는 단계; 및

반응 세포의 반응성을 측정하는 단계를 포함하는 혼합 임파구 반응법을 포함한다.

[도면의 간단한 설명]

제1도는 CD1a⁺ 세포에 의한 CD14의 부분적 공동-발현을 나타내는 유동 혈구 측정 자료이다.

제2도는 다양한 배지 조건하에서 CD1a⁺ 세포의 성장 역학에 관한 자료이다.

제3도는 본 발명의 수지상 세포에 의한 자극후의 CD4⁺ 세포 증식에 관한 자료이다.

제4도는 동종 CD4⁺ T 세포 증식의 자극시 CD1a⁺ 세포의 효과를 나타내는 자료이다.

제5도는 본 발명의 수지상 세포에 의한 자극후의 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포 증식에 관한 자료이다.

[발명의 상세한 설명]

본 발명의 중요한 양상은 CD34⁺ 조혈 세포로부터 수지상 세포의 생성이다.

CD34⁺ 조혈원 세포는 다양한 조직원, 예를 들어 골수로부터 수득되나, 바람직하게는 다음과 같이 제대 혈액 샘플로부터 수득된다: 샘플로부터 정밀도 단핵구를 피콜-하이파큐(Ficoll-Hypaque) 구배 분리($d=1.077\text{g/ml}$)로 분리하고, 예를 들어 1% w/v 조직-배양 등급의 소 혈청 알부민으로 보충된 RPMI 1640 배지에서 37°C로 밤새 배양하여 유착 세포를 제거시킨다. 바람직하게는, CD34 항원을 포함하는 세포를 항-CD34 모노클로날 항체, 예를 들어 Immunotech(Marseille, France)로부터 입수가 가능한 Imu-133.3, Becton Dickinson(Mountain View, California)으로부터 입수가 가능한 항-My 10등을 사용하는 간접적 면역 패닝(panning)에 의한 포지티브 선별을 통해 비-유착 단핵구 분획으로부터 분리시킨다. 패닝 플라스크는 다음과 같이 제조한다: 트리스 완충액(0.05mol/l, pH 9.4)중의 25 µg/ml 농도의 양(sheep) Fab 항마우스 IgG를 75-cm² 조직 배양 플라스크에 분배시켜(10ml) 4°C에서 밤새 코팅시킨다. 별도로, 경-밀도 단핵구(상술한 바와 같이 유착 세포를 제거시킨)를 2% 열-불활성화시킨 푸울링된 사람 AB 혈청(HABS)로 보충된 RPMI 1640중에서 10⁷개 세포/ml로 5 µg/ml의 항-CD34 항체와 함께 4°C에서 1시간 동안 배양한다. 이어서, 세포를 2% HABS를 포함하는 찬 배지내에서 세척하고, 약 5 × 10⁷개 세포를 포함하는 10ml을, 상술한 바와 같이 양의 항마우스 IgG로 미리 피복시킨 플라스크에 분배시킨다. 4°C에서 2시간 배양후, 현탁액중의 비-유착 세포(즉, CD34-제거된 분획)를 가만히 피펫팅하고 배지로 수회 세정함으로써 수거한다. 이어서, 유착 분리된(panned) 세포(즉, CD34-풍부 분획)를 격렬한 피펫팅으로 회수한다.

수지상 세포를 GM-CSF 또는 TNF-α와 IL-3을 포함하는 배지에서 배양함으로써 CD34⁺ 세포로부터 수득한다. 바람직하게는, 수지상 세포를 TNF-α 뿐만 아니라 GM-CSF를 포함하는 배지에서 배양함으로써 CD34⁺ 세포로부터 수득한다. 본 발명에 사용하기에 적합한 TNF-α, GM-CSF 및 IL-3은, 예를 들어 Genzyme Corp.(Cambridge, MA)사에서 상업상 입수하거나, 예를 들어 문헌[참조: Clark 등의 미합중국 특허 제 4,959,455호(IL-3); Clark 등의 PCT 특허원 제EP 85/00326호(국제공개공보 제WO86/00639호)(GM-CSF): 및 Mark 등의 미합중국 특허 제4,677, 063호(TNF-α)]에 교시되어 있는 바와 같이 재조합 발현 시스템으로 제조할 수 있다. 바람직하게는, IL-3 및 GM-CSF는 포화 농도로 사용된다: 즉, CD34⁺ 세포상의 모든 IL-3 및 GM-CSF 수용체가 생물학적 활성의 IL-3 및 GM-CSF 분자에 의해 점유되는 농도로 사용된다. 물론, 실제 농도는 사용되는 IL-3 및 GM-CSF의 성질에 따라 달라질 수 있다. 바람직하게는, 특히 활성이 5 × 10⁶ U/mg 이상인 사람 IL-3이 사용되며, 여기에서 활성 단위는, 액체 배양물중의 사람 골수 세포에 의한 ³H-티미딘 흡수로 측정된 반최대치의 증식 활성에 상응한다. 후술되는 배양 시스템에서, 포화 농도는 10ng/ml (또는 50U/ml)이다. 바람직하게는, 특히 활성이 2 × 10⁶ U/mg 이상인 사람 GM-CSF가 사용되며, 여기에서 활성 단위는 상기 IL-3에 대해 정의한 바와 같다. 후술되는 배양 시스템에서, 포화 농도는 100ng/ml(또는 200U/ml)이다. 바람직하게는, TNF-α는 2 내지 3ng/ml 또는 40 내지 60U/ml. 가장 바람직하게는 약 2.5ng/ml 또는 50U/ml 범위의 농도로 사용된다. TNF-α의 단위는 문헌[참조: Carswell et al., Proc. Natl. Acad. Sci., Vol. 72, pg. 3666(1975). and by Aggarwal et al., J. Biol. Chem., Vol. 260, pg. 2345(1985)]에서 정의된다. 세포는 표준 첨가제를 포함하는 표준 조직 배양 배지, 예를 들어 10%(v/v) 열 불활성화된 태내 소 혈청, 10mM 헤페스(Hepes), 2mM L-글루타민, 5 × 10⁻⁵M 2-머캅토에탄올, 페니실린(100U/ml) 및 스트렙토마이신(100mg/ml)으로 보충된 RPMI 1640중에서 공동-배양할 수 있다. 바람직하게는, CD34⁺ 세포는 8 내지 12일동안 사이토킨의 존재하에 배양된다.

배양물중에 형성되는 수지상 세포는 상술한 바와 같이 패닝시켜 분리시키며, 단 항-CD1a 및/또는 항-CD14 항체가 사용된다는 것을 예외로 한다(두 항체는 예를 들어 Becton-Dickinson에서 상업상 입수가 가능하다).

본 발명의 MLR 방법은 다음 단계들을 포함한다: (1) 반응 세포의 샘플을 제공하는 단계; (2) 자극 세포가 반응 세포에 대해 동종이고, 자극 세포가 (a) CD34⁺ 조혈 세포를 TNF-α와 IL-3로 처리하거나 GM-CSF로 처리하는 단계와 (b) CD1a 항원을 발현하는, 상기와 같이 처리된 CD34⁺ 조혈 세포를 분리하는 단계를 포함하는 방법에 의해 생성된 수지상 세포로 이루어지도록 불활성화시킨 자극 세포의 샘플을 제공하는 단계; (3) 반응 세포와 상기와 같이 불활성화시킨 자극 세포를 공동-배양하는 단계; 및 (4) 반응 세포의 반응성을 측정하는 단계.

바람직하게는, 반응 세포의 샘플은 이식조직을 수령할 환자의 말초혈로부터의 CD4⁺ T 세포로 이루어진다. T 세포 모집단을 수득하는 데 사용되는 기술은 당 분야에 널리 공지되어 있으며, 문헌[참조: DiSabato et al., eds., in Meth. in Enzymol., Vol. 108(1984)]에 충분히 기술되어 있다. 예를 들어, CD4⁺ T 세포는 하기와 같이 분리될 수 있다: 먼저 단핵구를 말초혈로부터 분리시키고 유착 세포를 제거시킨다. 이어서 CD4⁺ T 세포를, 예를 들어 시판되는 모노클로날 항체, 예를 들어 항-CD14, 항-CD16, 항-CD20, 항-CD8, 항-CD40(Becton-Dickinson 및/또는 Ortho Diagnostic Systems, New Jersey 시판)의 각테일을 사용하여 면역

자기 제거[예를 들어 Dynabeads(Dynal. Oslo, Norway)사용]등에 의해 다른 세포 유형을 제거시켜 정제한다. 면역자기 제거를 2회 수행한 후 순도가 95%보다 높은 CD4⁺ 모집단을 전형적으로 수득한다.

본 발명의 자극 세포는 반응 세포를 취한 사람이 아닌 다른 사람으로부터 취한 CD34⁺ 조혈원 세포로부터 유도되는 수지상 세포이다. 즉, 자극 세포는 반응 세포에 대해 동종이다. 이들 세포는 상술한 바와 같이 수득한다.

본 발명의 자극 세포는, 그들의 자극 작용은 여전히 포함하되 반응 세포로부터 측정되는 반응은 감출 수 있는 다른 작용은 억제되도록 불활성화된다. 따라서, 불활성화의 성질은 다소 검정의 판독(read-out)에 따라 달라진다. 바람직하게는, 반응 세포에서 측정되는 반응, 또는 판독은 세포 증식이다. 기타의 판독은 또한 사이토킨 생성, 세포분해능 등과 같은 현상을 포함한다. 바람직하게는, 자극 세포는, 복제될 수 없으나 이들의 항원-프로세싱 기구가 여전히 작용성하도록 처리된다. 이는, 통상적으로, 반응 세포와 혼합하기 전에, 예를 들어 약 1,500내지 5,000R(감마 또는 X-방사선), 바람직하게는 3,000 내지 4,000R로 세포를 조사하여 수행한다.

바람직하게는, 반응 세포의 증식은 표준 프로토콜에 따라 삼중수소처리된 티미딘의 흡수에 의해 측정한다. 예를 들어, 자극 세포 10 내지 2.5×10^4 개를 96-웰판저 조직 배양 플레이트중의 동종 CD4⁺ T 세포 2.4×10^4 개에 가하고, 상술한 배지에서 4일 동안 배양한다. 배양후, 세포를 6시간 동안 삼중수소처리된 티미딘 $1 \mu\text{Ci}$ 로 펄스를 발생시킨 다음, 이들을 수거하여 예를 들어 섬광계수법으로 삼중수소처리된 티미딘의 흡수를 측정한다.

[실험]

하기 실시예는 본 발명을 설명하기 위한 것이다. 세포주, 시약 및 이들의 농도, 온도, 및 기타 변수들은 단지 본 발명의 적용을 예시하고자 함이며, 이로써 본 발명이 한정되지는 않는다.

[실시예]

[실시예 1]

사람 수지상 세포의 생성

GM-CSF 및 TNF- α 중에서 12일 동안 배양한 후, CD34⁺ 코드(cord) 혈 조혈 전구체 세포로부터 생성된 세포를 2-색 형광 측정하기 위해 가공한다. 간단히 언급하면, 세포를 연속적으로, 접합되지 않은 모노클로날 항체, 피코에리트린-접합된(PE-접합된) 항-마우스 면역글로불린, 정상 마우스 혈청, 및 모노클로날 항체 OKT6(항-CD1a; Ortho) 또는 Leu-M3(항-CD14; Becton-Dickinson)와 함께 배양한다(이때, 모노클로날 항체는 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC)로 직접 표지된다). 제1도에 나타난 바와 같이, GM-CSF 및 TNF- α 의 존재하에서 12일 동안 CD34⁺ 세포를 배양하여 CD1a 항원을 공동-발현하는 CD14⁺ 단구를 출현시킨다. 또한, 총 CD1a 모집단이 30 내지 90%인(5회 실험으로부터의 범위) CD14⁻ CD1a⁺ 세포의 모집단이 일관되게 관측된다. 단구계(monocytic lineage)내에서, CD1a 항원의 발현은 랑게르한스 세포에 한정된다. 제1a도는 IgG₁-FITC 이소타입 대조군 대 IgG_{2a}-PE 이소타입 대조군으로부터의 2-색 형광 강도를 나타낸다. 제1b도는 OKT6-FITC(CD1a 발현에 비례) 대 Leu-M3-PE(CD14 발현에 비례)로부터의 2-색 형광 강도를 나타낸다. 제2도에 나타난 바와 같이, CD1a⁺ 세포는 배양 개시시에는 검출되지 않고, CD1a 항원은 TNF- α 의 존재하에 배양 4일후 처음으로 관측되며, 20일까지 발현이 증가되었다. CD1a⁺ 세포 5% 미만이 IL-3의 존재하에 관측되는 반면에, CD1a⁺ 세포 5 내지 15%가 GM-CSF의 존재하에 검출되었다. 많은 비율의 CD1a⁺ 세포가 IL-3와 TNF- α (10 내지 25%) 및 주로 GM-CSF와 TNF- α (20 내지 60%) (배양 12일후의 5회 시험으로부터의 범위)에서 검출되었다. 성장 효율 측면에서, IL-3+TNF- α 는 IL-3 단독보다 2 내지 3배 더 강력하고, GM-CSF+TNF- α 는 GM-CSF 단독보다 3 내지 4배 더 강력하였다(제2도). 따라서, CD34⁺ 세포 10^5 개로부터 개시하여, 배양 12일후, GM-CSF에서는 CD1a⁺ 세포 1 내지 3×10^6 개가 생성되는 반면, IL-3+TNF- α 및 GM-CSF+TNF- α 에서는 2 내지 3×10^6 개 세포가 회수되었다. GM-CSF+TNF- α 가 CD1a⁺ 세포 생성에 대해 가장 강력한 조합 요소로 보이므로, 이들 세포의 특성화를 위한 모든 배양물은 GM-CSF+TNF- α 를 포함한다: 제2도의 (i) IL-3(▲), (ii) IL-3와 TNF- α (△), (iii) GM-CSF(■), 및 (iv) GM-CSF와 TNF- α (□)의 존재하에서 CD34⁺ 세포 10^5 개의 증대를 보인다. -는 3회 실험에서의 총 세포수이고, ---는 CD1a 항원의 발현을 나타낸다. 제2a도 및 제2b도는 2개의 별도의 실험 세트로부터의 자료를 나타낸다.

본 발명의 방법에 의해 생성된 CD1a⁺ 세포의 형태를 광학현미경 및 전자 현미경으로 조사한다. GM-CSF 단독에서 관측된 유착 세포는 일정 모양의 대식구에 대한 일반적 양상을 나타내는 반면, GM-CSF+TNF- α 의 존재하에서 수득된 세포들은 고분지 수지상돌기, 소엽 핵, 및 수지상 돌출을 갖는 용모상 표면이 있는 수지상 세포의 전형적 양상을 갖는다. CD1a⁺ 세포중 일부(5개중 약 1개)는 버백(Birbeck) 과립의 구조를 생각나게 하는, 이중막을 연결시키는 소기관을 갖는다.

GM-CSF와 TNF- α 의 존재하에서 배양 12일후 생성된 CD1a⁺ 세포의 표현형은 2-색 형광 분석으로 결정한다. 실험에 따라서, CD14를 공동-발현하는 CD1a⁺ 세포의 백분율(%)은 10 내지 70%로 다양하다. 하기 표1에 나타난 결과는, CD1a⁺ 세포 15%미만이 CD14를 공동-발현하는 실험으로부터 수득된 것이다: 이로써, CD1a⁺ 세포와 CD1a⁻ CD14⁺ 세포 모두가 특정분석되었다. CD1a⁺ 세포는 CD1c, CD4, 및 CD40을 공동-발현하였으나 CD1b를 발현하지 않았다. 이와는 대조적으로, CD1a⁻ CD14⁺ 세포는 CD1c를 발현하지 않고 단지 CD4 및 CD40만을 약간 발현하였다. CD1a⁺와 CD14⁺ 세포 모두가 Fc γ RII(CD32), Fc γ RIII(CD16), 및 CR3(CD11b)를

포함하는 반면, 단지 CD1a⁻CD14⁺ 세포만이 Fcγ R1(CD64) 및 CR1(CD35)를 발현하는 것으로 밝혀졌다. CD1a⁺ 및 CD1a⁻CD14⁺ 세포는 LFA1α(CD11a)와 LFA1β(CD18) 모두를 발현하였으나, CD1a⁺ 세포는 CD1a⁺CD14⁺ 세포보다 ICAM1(CD54)를 보다 높은 수준으로 발현하였다. CD1a⁺ 세포는 HLA-DR을 매우 높은 수준으로(CD14⁺ 세포의 5 내지 10배 이상) 발현하였다. 이와는 대조적으로, CD1a⁻CD14⁺ 세포는 HLA-DQ⁺를 높은 수준으로 발현하였다.

표 1

본 발명의 수지상 세포의 표현형

항원	항체	CD1a 세포와의 반응성	CD14 세포와의 반응성	항체 공급원(*)
CD1a	OKT6, IOT6a, T6, DMC1, L544	++	-	Ort. Hy8, Imu. Cou.
CD1b	IOT6b	-	-	Imu
CD1c	IOT6c	+	-	Imu
CD14	Leu-M3	+/-	+++	BD
CD4	IOT4	++	+/-	Imu
CD40	Mab89	++	+/-	EP
CD16	Leu11b	+	+	BD
CD32	2E1	+/-	+/-	Imu
CD64	197	-	+	Med
CD21	CR2	-	-	BD
CD11b	IOM1	++	++	Imu
CD35	IOT17	-	++	Imu
CD54	84H10	+++	+	Imu
CD11a	SPVL7	++	++	Hy2
CD18	BL5	++	++	Imu
HLA-DR	L243	++++	++	BD
HLA-DQ	SPVL3	+++	+	Imu

* 항체 공급원은 다음과 같다: Ort=Ortho Diagnostic Systems; Imu=Immunotech; Cou=Coulter(Hialeah, FL); BD=Becton-Dickinson; Med=Medarex Inc.(Lebanon, NH); Hy2=Hybridoma, Vol. 2. pg. 423(1983); Hy8=Hybridoma, Vol. 8. pg. 199(1989); EP=Eur. Pat. Appl. 89 403 491.7

[실시예 2]

수지상 세포에 의한 자극후 CD4⁺ T 세포의 증식

CD34⁺ 세포를 본 발명에 따라 12시간 동안 배양한 후, 4,000Rad로 조사시켜 실험용 자극 세포를 만든다. 10 내지 (2.4×10^4)개 자극 세포를, 후술하는 바와 같이 10% 사람 AB⁺ 혈청으로 보충된 배지중의 환자 미세시형 조직 배양 플레이트의 2.5×10^4 개 휴지 CD4⁺ T 세포 또는 기타 반응 세포에 대해 시이딩시킨다.

본 발명의 수지상 세포를, (반응 세포로서의) 휴지 동종 CD4⁺ T 세포의 증식을 유도하는 능력에 대해 검정한다. 제3a도에 나타낸 바와 같이, IL-3 단독의 존재하에서 배양된 세포(▲)는 최저의 동종 CD4⁺ T 세포 증식을 유도하였다. 이와는 대조적으로, GM-CSF 단독(■), IL-3+TNF-α(△), 및 GM-CSF+TNF-α(□)의 존재하에서 배양된 세포는 동종 CD4⁺ T 세포의 증식을 강력히 유도하였다. CD34⁺ 원(progenitor) 세포의 배양 조건에 따라, CD4⁺ T 세포의 최적 증식이 상이한 비[(자극 세포)/(동종 CD34⁺ T 세포)]의 값에 대해 관측되었다. 대조값(자극 세포가 없는 CD34⁺ T 세포)과 비교하여, CD4⁺ T 세포에 의한 삼중수소처리된 티미딘 흡수의 50배 향상은 각각 GM-CSF 단독, IL-3+TNF-α, 및 GM-CSF+TNF-α의 존재하에서 배양된 세포에 대해 1:3.8(범위 1:3 내지 1:25), 1:12.5(범위 1:10 내지 1:35), 및 1:360(범위 1:100 내지 1:400)의 비로 관측되었다(5회 실험으로부터의 범위).

제3b도에 나타난 실험에서, CD34⁺ 세포는 모든 실험에 대해 GM-CSF 및 TNF-α의 존재하에서 배양하며, 반응 세포는 성인 말초혈(□), 코드혈(△ 및 ▲), 및 동계 코드혈 CD4⁺ T 세포(■)이다. 제3b도는, 코드혈 또는 성인 말초혈로부터 유도된 동종 CD4⁺ T 세포가 동일하게 자극되었으며, 동계 CD4⁺ T 세포가 매우 낮은 정도(동종 세포보다 20배 약한 반응)로 자극되었다는 것을 나타낸다.

GM-CSF 및 TNF-α의 존재하에서 12일 배양한 후, CD1a⁺ 세포를 면역자기 제거에 의해 제거시키는 경우(제4도). 유도능의 강력한 상실이 관측되었다. CD4⁺ T 세포 증식의 50배 향상은 각각 CD1a⁺ 세포의 제거 전후

에 1:200(1:200 내지 1:400의 3회 실험 범위) 및 1:8(1:8 내지 1:40의 3회 실험 범위)의 비[(자극세포)/(동종 CD4⁺ T 세포)]에 대해 관측되었다. 조사후, 자극 세포로서 다음이 사용되었다: 총모집단(■), CD1a⁺ 세포를 제거시켜 포함시키지 않은 모집단(□), 및 항-IgG, 이소타입 항체로 제거시킨 대조군 모집단(△).

[실시예 3]

수동 면역 치료용의 암-특이적 CD8 세포독성 T 세포의 생성

CD34⁺ 세포를 상술한 바와 같이 암 환자의 말초혈로부터 분리시키고, GM-CSF 와 TNF- α 의 존재하에 성장시킨다. 말초혈 CD8 세포를 냉동보관한다. 수지상 세포를 생성시킨후, CD8 T 세포를 해동시킨 다음, 이를 환자의 암 세포와 혼합한다. 감각화시킨후, CD8 T 세포를, 예를 들어 문헌[참조: Rosenberg의 미합중국 특허 제4,690,915호]에 기술되어 있는 바와 같이 IL-2의 존재하에 증식시킨다. 총 세포를, 이들이 종양-특이적 세포독성 활성을 나타내는 경우 환자에게 재주입시킨다. 종양 세포를 특이 종양 항원으로 대체시킨다[참조: van der Bruggen et al.. Science. Vol. 254, pp. 1643(1991)].

GM-CSF 및 TNF- α 의 존재하에서 생성된 수지상 세포는 휴지 동종 CD8⁺ T 세포 증식의 강력한 자극제이다.

CD34⁺ 코드혈원으로부터 생성된 수지상 세포를 12일 동안 배양하여 조사(4,000Rad)시키고, 이어서 휴지 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포에 대한 자극 세포로서 사용한다. 10 내지 2.5×10^5 개 자극 세포를 10% 사람 AB⁺ 혈청으로 보충된 배지(20U/ml IL-2의 존재 또는 부재)중의 환자 미세시험 조직 배양 플레이트내의 2×10^4 개 휴지 T 세포에 대해 시이딩시킨다. 5일간 배양후, 세포를 8시간 동안 ³H-티미딘 1 μ Ci로 펄스를 발생시키고, 수거하여 계수한다. 시험을 삼중으로 수행하고, 그 결과를 평균 수/분으로 나타낸다.

CD4⁺ 및 CD8⁺ T세포가 배양되는 배지에 IL-2를 가한 결과, ³H-티미딘 흡수에 의해 나타나는 바와 같이, CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포의 증식을 실제로 자극시켰다. 제5도에 나타난 바와 같이, 배지 단독(□)의 존재하에서 배양된 CD8⁺ 세포는 매우 적은 증식을 나타낸 반면, IL-2(■)의 존재하에서 배양된 CD8⁺ 세포는 보다 큰 증식을 나타냈다; 더우기, 배지 단독(○)의 존재하에서 배양된 CD4⁺ 세포는 증식을 거의 나타내지 않은 반면, IL-2(●)의 존재하에서 배양된 CD4⁺ 세포는 상당히 큰 증식을 나타내었다.

[실시예 4]

SCID-hu 마우스에서 제1 및 제2 항체 반응의 발생

SCID-hu 마우스는 제2 반응이 항원을 상기시키되 제1 반응은 확립시키지 않도록 한다(참조: Moller, The SCID-hu Mouse, Vol. 124(Munksgaard, Copenhagen, 1991); Duchosal et al.. Nature, Vol. 355, pp. 258(1992); and Mosier et al.. Curr. Top. Microbiol. Immunol.. Vol. 152, pp. 195(1989)). 이는 수지상 세포 푸울의 재구성이 부족하기 때문인 것으로 믿어진다. 항원-펄스 발생시킨 수지상 세포는 생체내에서 항체 반응을 효과적으로 유도할 수 있기 때문에[참조: Sornasse et al.. J. Exp. Med.. Vol. 175, pp. 15(1992)]. SCID-hu 마우스를 사람 세포 공여자의 CD34 세포 또는 적합한 MHC를 갖는 또다른 공여자 세포로부터 시험관내에서 발생된 수지상 세포로 재구성시킨다. 수지상 세포를 주입하기 전에 적합한 항원으로 펄스를 발생시킨다. 일단 마우스가 항원에 대한 항체를 나타내는 경우, B 세포를 혈액 및 기타 재구성된 기관으로부터 분리하고, 예를 들어 문헌[참조: Banchereau et al.. Science. Vol. 251, pp. 70(1991)]에 교시되어 있는 바와 같이 앵스타인-바르 바이러스의 존재하에 CD40 시스템에서 배양함으로써 죽지 않도록 하였다.

[실시예 5]

시험관내에서 생성된 수지상 세포를 사용한 수동 면역 치료에 의한 AIDS 치료

수지상 세포를 시험관내에서 HIV에 의해 감염시키면, HIV를 포함하는 배양물에서 3 내지 5일후 세포 표면으로부터 HIV가 발아하는 것으로 밝혀졌다[참조: Patterson, J. Gen. Virol.. Vol. 68, pgs. 1177-1181(1987)]; Macatonia et al.. Immunology, Vol. 71, pgs. 38-45(1989); and Knight et al.. Immunol. Lett.. Vol. 19, pgs. 177-182(1988)]. HIV에 의한 수지상 세포의 생체내 감염에 대한 증거가 피부의 랑게르한스 세포에 대한 감염의 기술 및 피부 세포내 MHC 제11형 분자의 양 감소로부터 나타난다[참조: Tschachler et al.. J. Invest. Dermatol.. Vol. 88, pgs. 233-237(1987); and Belsito et al.. N. Engl. J. Med.. Vol. 310, pgs. 1279-1282(1984)]. 더우기, HIV 환자로부터 혈액 수지상 세포 3 내지 21%가 다른 세포 유형에서 관찰되는 것보다 2차수 큰 감염 수준으로 HIV를 함유한다[참조: Macatonia et al.. Immunology, Vol. 71, pgs. 38-45(1990)]. 바이러스에 의해 수지상 세포가 감염되면 T 세포에 대한 항원 표현능이 차단되며, 이로써 성공적인 면역 반응에 필요한 T 세포의 보충/증식이 억제된다.

HIV 환자의 CD34⁺ 세포를 사용하여 본 발명에 따라 수지상 세포를 생성한다. 이어서, 수지상 세포를 선택된 항원과 배양하여 HIV 환자에 재주입시킨다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

사람 CD34⁺ 조혈세포를 GM-CSF, TNF- α 와 IL-3 또는 GM-CSF와 TNF- α 로 처리함으로써 상기 CD34⁺ 조혈세포로부터 사람 수지상(dendritic) 세포의 생성으로 유도하는 단계; 및 이러한 사람 수지상 세포를 회수하는 단계를 포함하여, 사람 수지상 세포를 포함하는 세포성 조성물을 제조하는 방법.

청구항 2

암 또는 바이러스 항원으로 펄스 발생시킨 수지상 세포를 시험관내에서 생성시키고, $CD8^+$ 세포독성 T 세포를 감작화시켜 이의 증식을 유도하기에 충분한 양의 상기 시험관내에서 생성된 수지상 세포로 사람 $CD8^+$ T 세포를 처리하는 단계; 및 암-특이적 또는 바이러스-특이적 사람 $CD8^+$ 세포독성 T 세포를 회수하는 단계를 포함하여, 암-특이적 또는 바이러스-특이적 사람 $CD8^+$ 세포독성 T 세포를 생성하는 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, $CD8^+$ T 세포가 암 항원으로 감작화되어 암 특이적 $CD8^+$ 세포독성 T 세포가 생성되는 방법.

청구항 4

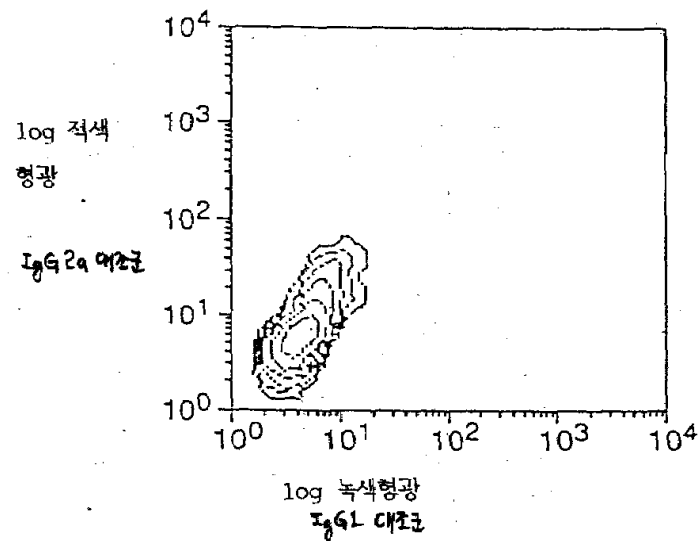
제2항에 있어서, $CD8^+$ T 세포가 바이러스 항원으로 감작화되어 바이러스 특이적 $CD8^+$ 세포독성 T 세포가 생성되는 방법.

청구항 5

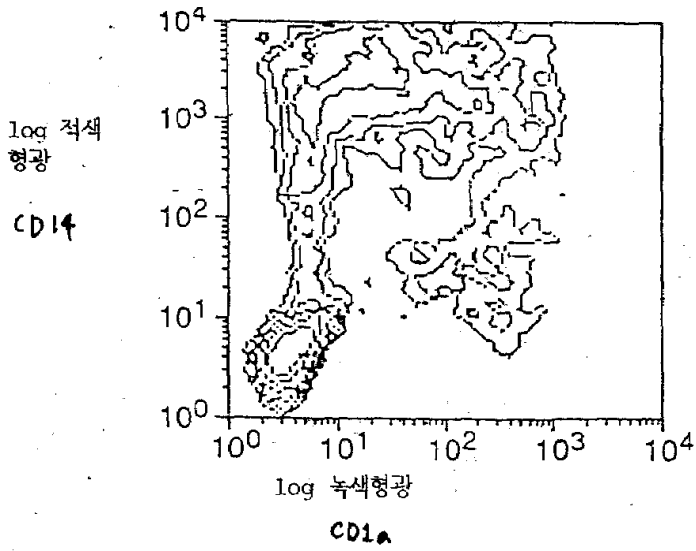
제4항에 있어서, $CD8^+$ T 세포가 AIDS 바이러스의 바이러스 항원으로 감작화되고, 생성된 $CD8^+$ 세포독성 T 세포가 HIV 바이러스에 대해 특이적인 방법.

청구항 6

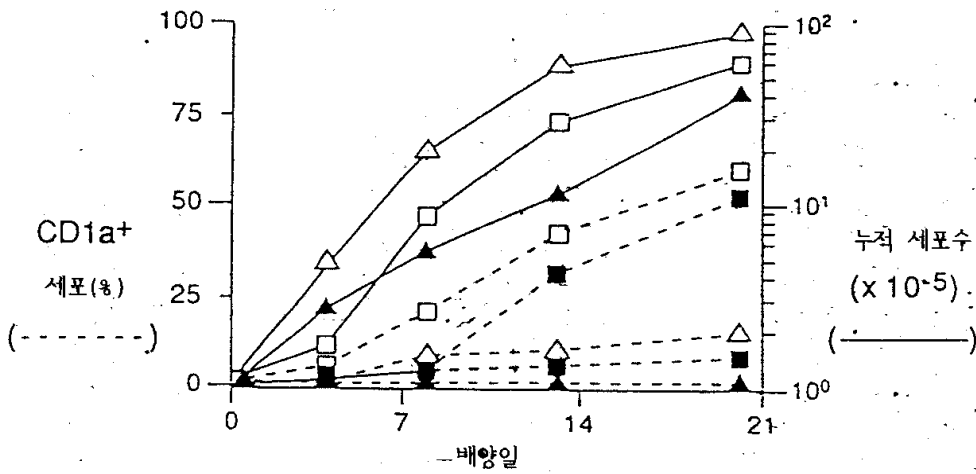
항원으로 펄스 발생시킨 수지상 세포를 시험관내에서 생성시키고, 항원-특이적 $CD4^+$ 헬퍼 T 세포를 감작화시켜 이의 증식을 유도하기에 충분한 양의 상기 시험관내에서 생성된 수지상 세포로 사람 $CD4^+$ T 세포를 처리하는 단계; 및 항원 특이적 사람 $CD4^+$ 헬퍼 T 세포를 회수하는 단계를 포함하여, 항원 특이적 사람 $CD4^+$ 헬퍼 T 세포를 생성하는 방법.

도면**도면 1a**

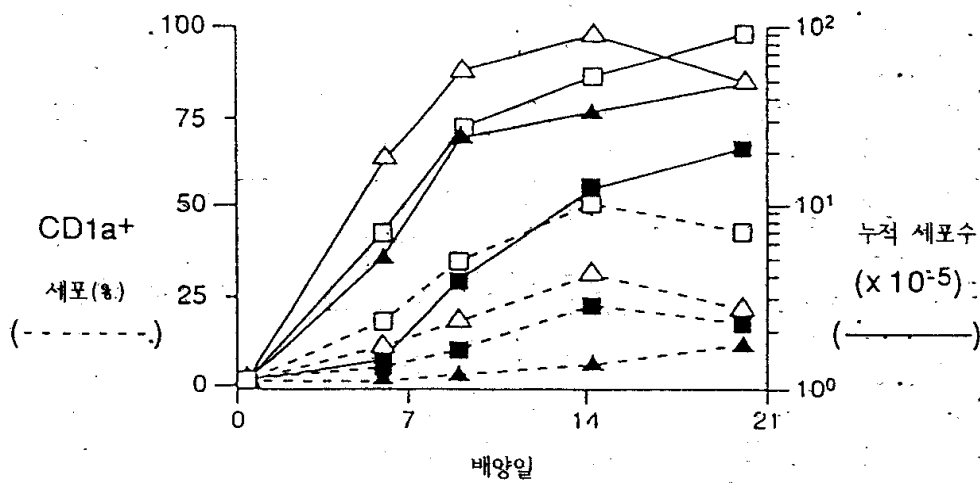
도면 1b



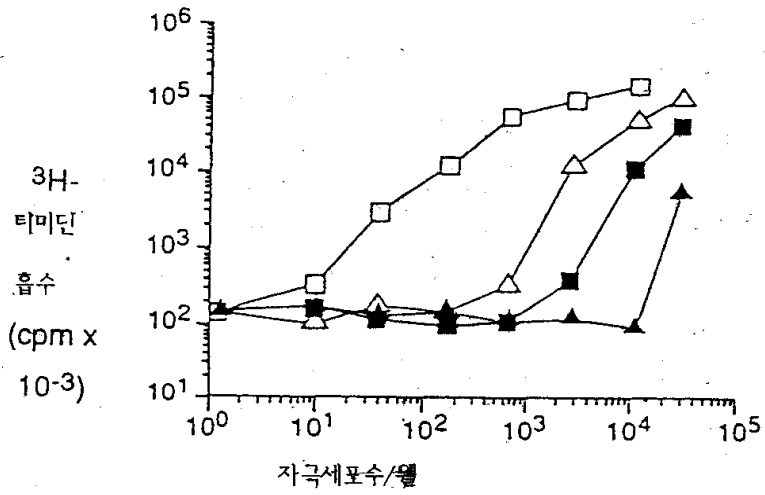
도면 2a



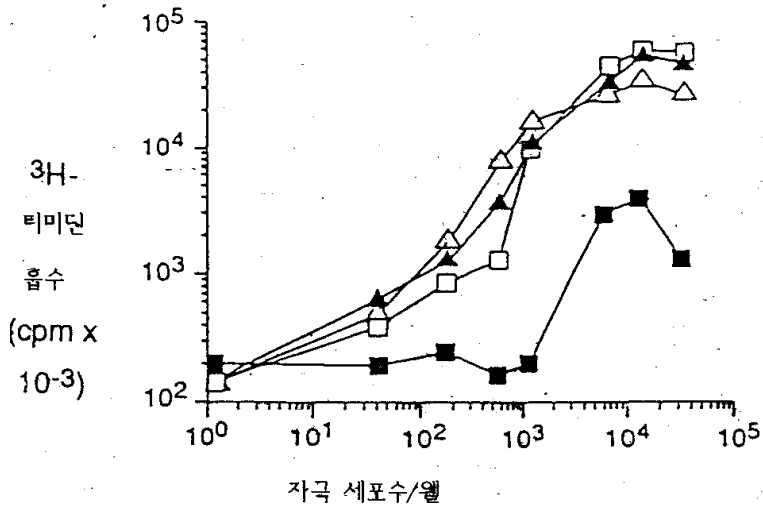
도면 2b



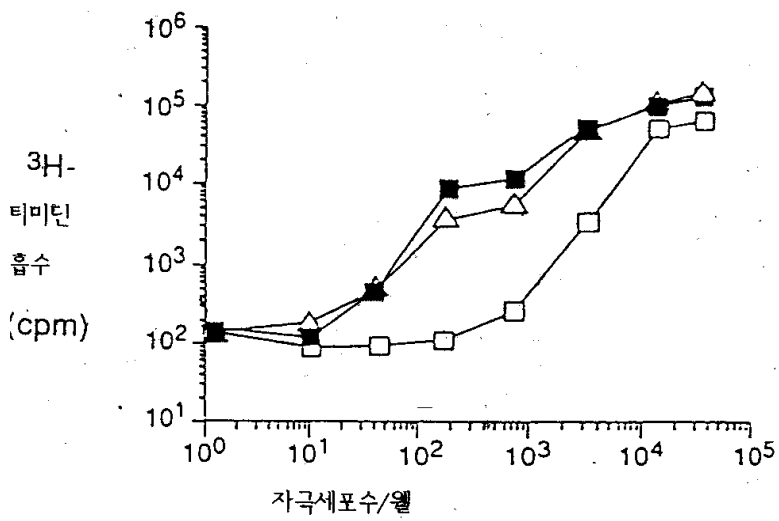
도면3a



도면3b



도면4



도면5

