

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.⁶
A61K 35/14

(11) 공개번호 특2000-0049096
(43) 공개일자 2000년07월25일

(21) 출원번호	10-1999-7003176	(87) 국제공개번호	WO 1998/16238
(22) 출원일자	1999년04월12일	(87) 국제공개일자	1998년04월23일
번역문제출일자	1999년04월12일		
(86) 국제출원번호	PCT/US1997/18718		
(86) 국제출원출원일자	1997년10월10일		
(81) 지정국	AP ARIP0특허 : 가나 케냐 레소토 말라위 수단 스와질랜드 우간다 짐바브웨 EA 유라시아특허 : 아르메니아 아제르바이잔 벨라루스 키르기즈 카자흐 스탄 몰도바 러시아 타지키스탄 투르크메니스탄 EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 독일 덴마크 스페인 핀란드 프랑스 영국 그리스 아일랜드 이탈리아 룩셈부르크 모나코 네덜란드 포르투갈 스웨덴 OA OAPI특허 : 부르키나파소 베냉 중앙아프리카 콩고 코트디부아르 카 메룬 가봉 기네 말리 모리타니 니제르 세네갈 차드 토고 국내특허 : 알바니아 아르메니아 오스트리아 오스트레일리아 아제르바이 잔 보스니아-헤르체고비나 바베이도스 불가리아 브라질 벨라루스 캐나 다 스위스 중국 쿠바 체코 독일 덴마크 에스토니아 스페인 핀란드 영국 그루지아 가나 헝가리 인도네시아 이스라엘 아이슬란드 일본 케냐 키르기즈 북한 대한민국 카자흐스탄 세인트루시아 스리랑카 라 이베리아 레소토 리투아니아 룩셈부르크 라트비아 몰도바 마다가스카 르 마케도니아 몽고 말라위 멕시코 노르웨이 뉴질랜드 폴란드 포르 투갈 루마니아 러시아 수단 스웨덴 싱가포르 슬로베니아 슬로바키아 타지키스탄 투르크메니스탄 터어키 트리니다드토바고 우크라이나 우간 다 미국 우즈베키스탄 베트남 유고슬라비아		
(30) 우선권주장	6/028,548 1996년10월11일 미국(US)		
(71) 출원인	더 리전트 오브 더 유니버시티 오브 캘리포니아 린다 에스. 스티븐슨 미국 94607-5200 캘리포니아주 오كل랜드 플랭크린 스트리트 1111 12층 히저로트존씨. 미국캘리포니아92648헌팅톤비치론해브드라이브6722 통슨제임즈에이. 미국캘리포니아92656알리소비에조플린스톤6 그랜저게일에이. 미국캘리포니아92714라구나비치산타로저31562		
(72) 발명자			
(74) 대리인	장용식		

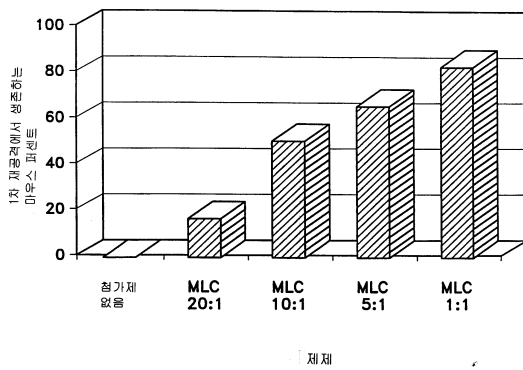
심사청구 : 없음

(54) 혼합 림프구와 조합된 종양세포를 사용하는 암 면역요법

요약

본 발명은 세포백신과, 특히 사람에서 암면역요법에 그것을 사용하는 방법으로 이루어진다. 백신은 종양 관련항원의 공급원과 함께 치료할 환자에 동종이계인 자극된 림프구로 이루어진다. 동종이계 림프구는 그것을 치료할 환자로부터 또는 또다른 제3의 공여자로부터 얻어진 백혈구와 조합하거나 공배양함으로써 자극될 수 있다. 종양항원은 환자로부터 제조된 1차종양세포, 종양세포계 또는 종양추출물의 형태로 제공될 수도 있다. 자극된 동종이계 림프구 및 종양항원은 전신성 세포 항종양면역반응을 준비하거나 부스터하기 위해 1차종양으로부터 떨어진 부위에서 조합 및 투여된다. 이 방법은 종양항원에 의한 자극에 대해 면역 시스템의 자연적인 불응성 성질을 극복하며, 숙주반응을 일으키고 잠재적으로 임상적 성과를 증진시킨다.

대표도



색인어

동종이계, 면역원성 조성물, 림프구, 백혈구, 암 면역요법

명세서

기술분야

본 출원은 1996년 10월 11일 출원되고, 계류중인, 본 명세서에 참고자료로서 전체가 포함되는 미국 가특허출원 60/028,548의 우선권 이익을 주장한다.

본 발명은 일반적으로 세포 면역학 및 암 요법 분야와 관련된다. 더 구체적으로는, 이것은 불활성화된 종양세포와 자극된 면역세포를 포함하는 세포 백신의 투여에 의한 혼합 림프구 배양에서 발생하는 것처럼 환자(특히 사람)에게서의 항 종양 면역반응의 발생과 관련된다.

배경기술

의학 연구에서 수많은 진보에도 불구하고, 암은 문명세계를 통하여 사망의 주요 원인으로 남아있다. 수술, 방사선요법 및 일반화된 화학요법등과 같은 암 치료에 대한 비 특이적인 접근은 순환하며 천천히 자라는 고형암의 선택적인 군의 치료에서 성공적이었다. 그러나, 많은 고형 종양은 이런 접근에 상당한 내성이 있고, 그 경우에 예후(豫後)는 매우 나쁘다.

한 예가 뇌 종양이다. 매년, 미국에서 대략 15,000 건의 고도 성세포종(星細胞腫)이 진단된다. 이 숫자는 소아 및 성인집단 양자에서 증가하고 있다. 표준 치료는 세포절제술후에 방사선 요법 또는 화학요법을 포함한다. 완치는 없고, 실질적으로 모든 환자들이 궁극적으로 재발성 또는 진행성 질환에 굴복하고 만다. 제 IV급의 성세포종(다형태 교아세포종: glioblastoma multiforme)에 대한 전체 생존율은 나빠서, 진단후 1 년이내 사망한 환자가 ~50%이다. 이들 종양은 공격적이고 표준 치료에 대해서 고도의 내성이 있기 때문에, 새로운 요법이 필요하다.

암치료에 있어서 부상하는 분야는 면역요법이다. 일반원리는 치료받는 환자에게 특히 악성세포에 대하여 실제로 거부반응인 것을 배치하는 능력을 부여하는 것이다. 1. 다양한 종류의 자극된 자가세포를 사용하는 입양 면역요법(adoptive immunotherapy); 2. 동종이계 림프구의 전신전달; 3. 면역학적으로 반응성인 세포의 종양내 이식; 4. 전신-종양특이적 면역반응을 발생시키는 먼 부위에서의 백신접종을 포함하는 수많은 면역학적 전략이 개발중이다.

상기 열거된 첫 번째 전략인 입양 면역요법은 환자에게 생체외에서 세포를 자극시키고, 이것을 환자에게 재투여함으로써 환자에게 증가된 수준의 면역을 제공함에 관한 것이다. 이 세포는 환자와 조직적합성이며, 일반적으로 이전의 자가 유래의 공여로부터 얻어진다.

한 접근은 생체외에서 자가 림프구를 종양-관련 항원으로 자극시켜 그들을 종양특이적으로 만드는 것이다. Zarling등((1978) Nature 274:269-71)은 생체외에서 자가 사람 백혈병 세포에 대한 세포독성 림프구를 발생시켰다. LEE등((1996) 초록, Gastroenterology)은 생체외에서 불활성화된 백혈병 아세포 및 자가 림프구와 함께 혼합된 림프구 배양을 행하였고, 자가 아세포상의 종양항원에 세포독성인 이펙터(effector) T세포를 발생시켰다. MHC D-로커스(locus) 부접합성은 림프구 배양에 적절한 도움을 제공하기 위하여 필요하다고 생각된다. Lesham등((1984) Cancer Immunol. Immunother. 17:117-23)은 생체외에서 동종감작에 의한 쥐의 흉선종 세포에 대한 세포독성 반응을 개발하였다.

Gately등((1982) J.Natl.Cancer Inst. 69:1245-54)은 9개의 사람 신경교종 세포계중 5개가 생체외 배양에서 동종이계 세포용해 림프구 반응을 유도하지 않는 것을 알아냈다. 그러나, 불활성화되면, 동종이계 림프구는 배양에서 자극인자 세포로서 제공되었고, 종양 특이적인 세포용해 T림프구 및 비특이적 비티펙터는 자극하지 않는 세포계중 4개로 발생되었다. 미국 특허 No.5,192,537에서, Osband 는 피토헤마글루티닌(phytohemagglutinin) 또는 IL-1 같은 비특이적 활성인자 및 종양 세포추출물의 존재하에서 생체외에서 종양환자의 단핵세포를 배양함으로써 이것들을 활성화시킨 다음 서프레서(suppressor)세포 활성을 소실시키기 위해 배양물을 처리하는 것을 제안한다.

이 실험적인 관찰에도 불구하고, 생체외에서 자극된 자가 종양-특이적 림프구의 전신투여는 표준 암 요

법의 일부가 되지는 못하고 있다.

자가 림프구 및 킬러 세포는 또한 비특이적으로 자극될 수 있다. 한 예를 들면, 항체-의존성 세포-매개 세포독성 반응을 매개할 수 있는 림프구를 발현하는 Fc 수용체는 IL-2와 IFN- γ 의 조합과 함께 배양함으로써 발생된다(미국 특허 No.5,308,626). 다른 예에서는, IL-2에서 배양된 말초 혈-유래 림프구는 정상 세포를 제외한 넓은 범위의 신생물 세포에 대하여 세포용해성인 림포킨-활성화 킬러 세포(LAK)를 형성한다. LAK는 CD3가 아닌 CD56항원을 발현하는 내추럴 킬러 세포로부터 주로 유래된다. 이런 세포는 IL-2에서 유도되는 플라스틱에 대한 유착성에 의하여 말초혈 림프구로부터 정제될 수 있다(A-LAK 세포; 미국 특허 No.5,057,423참조). IL-2의 고용량과 조합하여, LAK세포는 신장세포암과 전이성 사람 흑색종의 치료에 얼마간 성공하였다(Rosenberg(1987) New Engl.J.Med. 316: 889-897 참조). 이 전략은 노동-집약적이고, 비싸고, 모든 환자에게 적합하지 않다. Schwartz등((1989) Cancer Res.49:1441-1446)은 A-LAK세포는 실험 동물 모델에서 유방암의 폐나 간으로의 전이를 감소하는데 LAK 세포보다 우수하다는 것을 보였으나, 이것은 치료적이지 않으며, 장기 생존자가 없었다.

뇌종양의 치료에 있어 LAK를 이용하여 행해진 시도의 예에 대해서는, Merchant등의 (1988)Cancer.62:665-671 & (1990)J.Neuro-Oncol.8:173-198; Yoshida등의 (1988) Cancer Res.48:5011-5016; Barba등의(1989) J.Neurosurg.70:175-182; Hayes등의(1988) Lymphokine Res. 7:337-345; 및 Naganuma등의(1989) Acta Neurochir.(Wien)99:157-160을 참조. 다른 연구는 자가 미토겐-활성화되고 IL-2로 자극(MAK)된 킬러 림프구를 IL-2와 조합하여 사용하는 고등급의 재발성 교종에 대한 요법을 제안한다(Jeffes등의 (1991)Lymphokine Res. 10:89-94참조). 이런 시도중 어느것도 심각한 임상적 합병증과 관련된 것은 없었으나, 효과는 단지 일화(逸話)적이거나 일시적이었다. 이런 치료를 받는 환자들에게서 종양 특이적 면역의 유도는 보이지 않았다.

자가세포를 이용한 입양 요법의 다른 형태가 종양-침윤 림프구(TIL)관찰에 기초하여 제안되어 왔다. TIL은 종양으로 침윤한 림프구 집단을 수집하고, 그들을 생체외에서 IL-2와 함께 배양함으로써 얻어진다. Finke등((1990) Cancer Res. 50:2363-2370)은 사람 신장 세포 암종의 CD4+ 및 CD8+ TIL의 세포용해 활성을 특징짓는다. TIL은 LAK 세포보다 우수한 종양특이성과 활성을 갖고, 진전된 흑색종을 갖는 사람에게 실험적으로 투여되어 왔다(Rosenberg등(1990) New Engl.J.Med. 323:570-578참조). TIL내의 이펙터 집단은 숙주에서 종양특이적이라고 미리알려유전자 세포독성 T림프구일수도 있고, 용해성 과립이 없고, 배양에서 자극되었을 때는 세포독성 림프아세포로 형질전환된다(Berke등 (1988) J.Immunol. 129:303 ff. 참조). 불행히도, TILs는 단지 제한된 수의 종양형태에서 임상적으로 적절하기에 충분한 양으로 제조된다. 이 전략도 사람에 대한 요법에 있어서는 특히 실험적으로 남아있다.

위에 열거된 암 면역요법을 위한 2번째 전략은 동종이계 림프구의 인입면역전달(adoptive transfer)이다. 이 실험적 전략의 원리는 면역 자극의 일반적 수준을 만들어서, 이에 의하여 숙주 면역계가 종양을 거부하는 것을 막는 아네르기(anergy)를 극복하는 것이다. Strausser등((1981)J.Immunol.Vol.127, No.1)은 동종항원에 생체외에서 감작된 자가세포에 의한 사람 고형종양의 용해를 기술한다. Zarling등((1978) Nature 274:269-71)은 동종이계림프구로 감작에 따른 생체내 사람 항-림프종 반응을 증명한다. Kondo등((1984) Med Hypotheses 15:241-77)은 20-30%의 환자중 이 전략의 객관적 반응을 관찰하였고, 그 효과를 서프레스 T세포의 감소로 돌렸다. 이 연구는 산재성 또는 순환성 질환을 갖는 환자들에게 수행되었다. 이 초기 실험이 10년 전에 행해졌지만, 이 전략은 특히 고형 종양의 치료에 대해서는 일반적 승인을 얻지 못하고 있다.

위에 열거된 세 번째 면역전략은 종양내 이식이다. 이것은 이펙터 세포를 직접 작용부위로 송달하는 것에 관한 전략이다. 이식된 세포는 순환하지 않으므로, 그들은 숙주와 조직적합성일 필요가 없다. 동종이계세포의 종양내 이식은 종양과 반응하는 이식된 세포의 능력을 촉진시킬 수 있고, 강력한 이식편 대 종양 반응을 일으킬 수 있다.

Kruse등((1990) Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 87:9577-9581)은 Fischer 래트에서 자라는 뇌종양으로 동종이계 세포독성 T림프구(CTL)의 직접 종양내 이식이 동계 CTL, LAK 세포, 유착성LAK 세포 또는 IL-2 단독을 포함하는 다른 림프구 집단에 비해 현저한 생존률 이점이 있다는 것을 증명하였다. Redd등((1992) Cancer Immunol.Immunother. 34:349-354)은 래트에서 동종이계 뇌 종양에 대해 특이적인 세포독성 T 림프구를 개발하였다. 림프구는 오직 종양에 의해서만 발현되는 결정인자에 특이적이고, 생체내에서 치료목적으로 유용하다고 예견되었다. Kruse등 ((1994)J. Neurooncol. 19:161-168)은 4개의 MHC 비적합성 래트 종으로부터 CTL을 제조하였고, 그것들을 정작된 9L 뇌종양을 앓고 있는 Fischer 래트를 치료하기 위해 사용하였다. CTL은 2주마다 투여되었고, 다른 MHC 비적합성 CTL제제를 각각 투여하였다. 종양이 없는 동물은 최소한의 국소적 뇌 손상을 보였다. 종양을 갖는 것들은 : a)단핵 세포침윤, 치료후 2-4일에 시작한 대량 종양괴사, 및 15일만의 전 종양파괴 ; 또는 b)세포 침윤, 초기 종양 파괴, 및 동물의 죽음으로 진행되는 종양의 재성장을 보인다. 종양 퇴행 동물들은 생육가능한 종양세포를 두개골내로 재공격에 대하여 내성이 있었다(Kruse등의(1994)참조). 종양내 CTL 이식편은 시클로포스파미드를 사용하는 화학요법과 선택적으로 조합시킬 수 있다(Kruse 등(1993)J.Neurooncol. 15:97-112 참조).

종양내 이식 기술에 대한 기대에도 불구하고, 몇몇 단서는 남아있다. 한가지를 들면, 이식은 외과적 기술에 의해 빈번히 수행되는데, 이것은 이것을 루틴하게 유지하는 것은 너무나 침습성이다. 부가하여, 이 전략은 국소 반응을 발생시키는 것에 관한 것이지, 전이에 대한 방지에 일반적으로 필요한 전신반응을 발생시키는 것에 관련된 것이 아니다.

앞에서 열거된 4번째 면역요법전략은 숙주 공급원의 활성 전신종양-특이적 면역 반응의 발생이다. 이 반응은 종양으로부터 떨어진 부위에 백신 구성물을 투여함으로써 환자 자신의 면역계로부터 유도된다. 결과적으로 숙주에서 유도된 특이적 항체 또는 면역 세포는 희망하기는 종양으로 이동할 것이고, 암세포들이 신체 어디에 있는지 그들을 박멸할 것이다.

단리된 종양항원 백신 및 항 이디오타입 백신을 포함하는 다양한 종류의 백신이 제안되어 왔다. Mitchell등((1993) Ann.N.Y.Acad.Sci.690:153-166)은 DETOXTM 매추번트와 조합된 다수의 동종이계의 흑색종 세포계로부터의 기계적인 용해물로 암 환자들을 치료해 왔다. 이 접근은 관련 조직 형태의 종양은 모

두 종양-관련 항원을 공유한다는 전제를 기초로 한다. 악성 형질전환중에 항원의 발현을 획득하지 않거나, 항원을 표현하지 못하게 계속해서 분화하는 종양을 갖는 환자에게는 이 백신들은 성공적일수 없다.

항 종양백신에 대한 선택적인 접근은 치료받는 환자의 종양세포, 또는 이 세포의 유도체를 사용하는 것이다. 검토를 위해서는, Schirmacher 등 (1995) J.Cancer Res. Clin. Oncol 121:487-489 참조. 미국특허 No.5,484,596에서, Hanna Jr. 등은 외과적으로 종양을 제거하는 단계, 콜라게나제로 세포를 분산시키는 단계, 세포를 방사선 조사하는 단계, 약 10⁷ 세포의 적어도 연속적인 3회 투여량으로 백신접종하는 것을 포함하는, 재발 또는 전이를 막는 절제가능한 종양을 치료하기 위한 방법을 청구한다. 세포는 선택적으로 저온저장될수 있고, 면역계는 피부 시험에 의해 모니터될수 있다. 이 접근은 많은 종양 세포들은 자연적으로 면역원성이 아니라는 잘-확립된 견해를 해결할수 없다. 종양이 절제된 많은 환자들은 그들자신의 종양 항원, 심지어는 백신제에 포함되었을 때도 종양항원에 대해서도 반응하지 못하거나, 내성을 보인다.

강력하게 면역원성성을 향상시키는 자가 또는 동계 종양세포를 제조하는 몇가지 방법이 부상되었다. 종양세포는 바실루스 칼렛-구에린(BCG)의 추출물, 또는 A60 마이코박테리아 항원 복합체와 조합될수 있고, 백신이나 바이러스 또는 뉴캐슬 질한 바이러스(NDV)와 혼합될수도 있다. Guo 및 공동작업자들(W/0 95/16775)은 종양세포가 보다 강력한 면역원성성을 갖는 B세포같은 제2 세포의 막 성분과 융합되는 것을 제안하였다.

다른 접근에서는, 자가 또는 동계 종양 세포는 유전학적으로 변경되어 공동자극 분자가 된다. 공동자극 분자의 예는 B7-1공동자극 분자 또는 동종이계 조직적합성 항원같은 세포표면 수용체를 포함한다. 다른 예는 시토킨을 포함하는 분비된 활성인자들이다. 검토를 위해서, Pardoll 등(1992) Curr.Opin.Immunol. 4:619-23; Saito 등(1994) Cancer Res. 54:3516-3520; Vieweg 등(1994) Cancer Res. 54:1760-1765; Gastl 등 (1992) Cancer Res. 52:6229-6236; 및 W096/07433 참조. 종양 세포는 유전적으로 변경하여 TNF- α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, IFN- α , IFN- γ 및 GM-CSF를 생산하였다. 예를들면, Santin 등의 Gynecol.Oncol. 58:230-239, 1995b; Int.J.Gynecol.Cancer 5:401-410, 1995c; Am.J.Obst. Gynecol. 174:633-639, 1996 참조.

Golumbek(1989)은 IL-4에 대한 유전자가 삽입된 마우스 신장 암세포는 전신 T세포 면역에 대하여 강력한 면역원성성이고, 수식되지 않은 부모 종양세포로 후속의 치명적 공격에 대해서 마우스를 보호하는 것을 보고하였다. Cavallo 등 1991 & 1992. 항 종양면역은 GM-CSF 및 IL-4를 둘다 생산하는 암 백신에 의하여 강화된다(Wakimoto 등(1996) Cancer Res. 56:1828-33 참조). 시토킨 또는 시토킨 조합은 면역계의 세포를 자극시키거나 모집할 수 있고, 그럼으로써 면역에 대한 정상 장벽을 극복할수 있다. 어떤 사이토킨은 또한 주 조직적합성 복합체 분자 및 암 세포에 의한 세포간 유착성 분자의 발현에 영향을 주어 강력하게 면역원성성을 증가시킨다(Santin 등 1995a, Int. J. Cancer 65:688-694 ; Santin(1996) Am. J. Obst. Gynecol 참조).

시토킨을 분비하는 조직적합성 종양세포에 대한 실험은 유전학적으로 제한된 동물 모델에서 값싸게 행해졌고, 이 동물 모델은 이중의 사람 이용집단과 직접적으로 대등하지 않다(Colombo 등 (1995) Cancer Immunol.Immunother. 41:265-270 참조). 모든 종양 형태가 동일한 시토킨에 대하여 반응성인 것은 아니다. 특히 유전적 변경 후에 복제 가능한 종양세포를 환자에게 주사하는 것에 대한 문제가 있다. 부가해서, 보통은 백신에 사용을 위해서 치료할 환자의 충분한 세포를 유전적으로 변경시키고 생장시키기에 충분한 시간이 없다.

Blumbach(WO 96/05866)는 a)면역자극단백질에 대해 코드하는 유전자; b)시토킨; 및 c)티미딘 키나제 유전자로 형질도입시킨 살아있는 종양 세포의 백신을 제안했다. 조성물은 생체내에서 자라서 반응을 자극할 수 있고, 그후 선택적으로 티미딘 키나제에 의하여 죽는 생세포로서 제공된다. 일탈 돌연변이체의 가능성은 사람 요법에서 이 접근에 대한 법적 문제의 대상인 것 같다. Golumbek 등((1992)J.Immunother. 12:224-230)은 자멸 유전자를 갖는 증식하는 종양세포는 그들이 일시적으로 세포 주기를 일탈했거나, 약리학적으로 격리되었을 때 독소치료에도 생존할수 있다는 것을 보였다.

대안으로서, Cohen(WO 95/31107)은 신생물 질환은 하나이상의 시토킨을 발현하고, 또한 자가 게놈 종양 DNA에 의해 코드화된 종양-관련 항원을 발현하도록 유전적으로 변경된 동계이종세포를 포함하는 세포 면역원성으로 치료될수 있다는 것을 제안하였다. 이 접근에서는, 동종이계세포(마우스 LM세포로 예시됨)는 유전학적으로 변경되어 a)시토킨; b) 치료될 환자에 자가 유래인 종양-관련 항원을 발현한다. 따라서, 백신은 생종양세포를 포함할 필요가 없다.

그러나, 사람 환자에게 Cohen 발명의 적용은 각 환자에 대하여 특정한 종양에 의하여 발현되는 특정한 종양-관련 항원의 각 환자에 대한 사전지식이 필요할 것이다. 임상적 관심의 많은 사람 암들은 믿을만한 보편적으로 공유하는 표지를 갖지 않는다. 일단 적절한 표지가 특정한환자에 대하여 확인되면, 세포계는 따라서 가공되고, 치료에 앞서 요구되는 밀도로 배양된다. 이렇게, 각 환자들은 그들자신의 연구 개발 계획을 알게된다. 면역 반응이 단지 사용되는 종양-관련 항원에 초점이 맞춰지기 때문에 완전한 종양세포에 의해 발현된 항원의 스펙트럼에 대해서 지향된 것보다 효과가 적을수도 있다. 더 나아가, 이 백신은 살아있는 유전학적으로 변경된 세포계를 포함하여 앞에서 개요한 문제점을 제기한다. Cohen은 단지 동물 연구에서 생존율의 완화된 개선을 증명하였고, 그의 제제가 사람 암환자에서 효과적이라는 어떤 증거도 제공하지 못하였다.

사람 항 종양세포백신을 위한 적절한 전략은 다음 문제와 싸워야 한다: a)종양-관련 항원의 제시에서 종양(같은 형태의 종양이라 하더라도)간의 이질성; b)항원 및 시토킨 둘다와 관련된 개체간 면역반응의 이질성; c)사람에게 사용될수 있는 조성물에 대한 윤리적, 법적 문제; 및 d) 대부분의 임상적 세팅에서 개발시간이 부족하여 새로운 세포계를 가공하거나 각 환자에 대한 백신을 재단하는 능력이 제한된다.

발명의 개요

본 발명은 필요로 하는 사람환자에서 항종양 면역반응을 유도하는 조성물과 방법을 제공한다. 본 발명의 조성물은 생리학적으로 적합한 부형제중의 세포혼합물이고, 본 명세서에서 백신 또는 면역원성 조성물로 언급된다. 그들은 임상적으로 검출가능한 종양, 또는 예방 특히 상기 검출가능한 종양의 외과적 크기

축소(debulking), 화학요법 또는 방사선요법 후에 종양을 치료하거나 완화시키기 위하여 환자에게 투여될 수 있다. 이 조성물은 전형적으로 최초 종양 및 전이암에 대한 전신반응을 자극시키는 목적과 함께, 원종양과 떨어진 부위에 투여된다. 반응성은 전이된 부분(있는 경우), 원발생장소 또는 둘다에서 종양세포의 발달을 늦추거나 박멸한다.

최소한으로, 본 발명의 백신은 2가지 성분을 포함한다. 첫째는 종양항원의 공급원, 바람직하게는 다수의 항원인데 이것은 환자가 알고있는 종양과 관련되어 있다. 종양-관련 항원의 편리한 공급원은 외과적 절제 중에 환자로부터 미리 얻은 종양세포이다. 두 번째 성분은 항종양 반응을 생성하는 환자의 면역계의 자극에 참가할 수 있는 자극된 림프구 집단이다. 더 세부적으로는, 자극된 림프구 집단은 환자와 동종이계인 림프구를 포함한다. 그들은 바람직하게는 환자로부터 또는 반응인자 세포에 기여하는 공여자와 동종이계인 제2의 제3자 공여자로부터 얻은 백혈구와 같은 자극인자세포와 함께 생체외에서 공배양됨으로써 미리 활성화된다. 자극인자세포가 배양물에서 반응인자세포를 동종 활성화시킬 수 있는 다수의 자극인자 혹은 반응인자세포, 또는 둘다를 포함하는 조성물은 본 발명에 포함된다.

본 발명의 구체에는 암의 치료를 위한 조성물을 포함한다. 한 구체에는 약리학적으로 또는 생리학적으로 적합한 부형제 중의 다음 성분의 효과적인 조합을 포함하는, 사람 또는 기타 치료할 환자에게 투여를 위해 적절한 세포백신이다: a) 사람 또는 제3의 공여자로부터의 백혈구; b) 백혈구에 동종이계인 림프구, 바람직하게는 이 백혈구에 동종활성화된 것; c) 사람으로부터 얻어진 1차 종양세포, 그런 세포계 세포들의 자손, 또는 이들의 조합으로 이루어지는, 불활성화된 세포 집단. 첫째 성분은 동종이계인 림프구가 혼합물에 포함전에 달리 자극된 경우에 선택적이다. 이 불활성화된 종양세포는 종양세포 호모게네이트, 계면활성제 라이세이트, 또는 단기 단백질같은 그것들의 정제된 유도체등과 같은 종양-관련 항원의 선택적인 공급원에 의해 치환될 수 있다.

불활성화된 종양세포 집단은 바람직하게는 상기 사람으로부터 절제된 고형암으로부터 분산된 1차 종양세포로 이루어지고, 신경교종, 교아종 세포, 성세포종, 및 난소 암세포로 이루어지는 군으로부터 선택될 수도 있다. 다른 구체에에서는 한정되지 않게 백혈병 및 림프종을 포함하는 비-고형암이 사용될 수도 있다.

동종이계의 림프구는 전형적으로 적절한 공여자의 말초혈액으로부터 분리되고, 선택적으로 유전적으로 변경되어 높은 수준의 시토킨, 특히 IL-2, IL-4, GM-CSF, TNF- α 또는 M-CSF, 또는 이들의 조합을 발현한다. 바람직한 구체에에서, 백혈구 및 림프구는 상기 종양세포 집단과 조합되기 전에 림프구의 동종이계의 자극 또는 증식을 위한 충분한 조건하 및 기간동안 같이 배양된다.

본 발명은 또한 단위 용량형태 또는 키트형태로 백신 및 본 발명의 면역원성 조성물을 구체화한다. 또한 치료할 환자의 백혈구를 동종이계의 림프구와 함께 배양 및/또는 자극된 동종이계 림프구를 1차 종양세포, 자손 또는 환자의 종양항원과 조합시키는 것을 포함하는, 조성물의 다양한 성분을 혼합하거나 제조함으로써 본 발명의 조성물을 생산하는 방법을 구체화한다.

또한 항종양 면역반응, 특히 세포반응을 유도, 증가 또는 자극시키는 방법, 또는 본 발명의 백신이나 조성물의 어느 한가지를 투여하는 것을 포함하는 암같은 신생물 질환을 치료하는 방법을 구체화한다. 나아가, 구체에는 a) 생체외에서 종양-결합 항원 (특히 종양세포 집단)을 사람과 동종이계의 자극된 림프구를 포함하는 두 번째 세포집단과 혼합하는 단계와 b) 사람에게 세포혼합물의 면역원성 양을 투여하는 것의 단계를 포함하는, 치료가 필요한 사람에게서 신생물 질환을 치료하거나 항 종양 면역반응을 유도, 증가 또는 자극시키는 방법이다.

구체화된 방법 중의 하나로 자극된 면역 반응은 첫 번째 또는 두 번째 반응이 될 수 있고, 사람은 동종이계 림프구를 사람의 고형암에 또는 고형암이나 그 일부를 제거함으로 형성된 사람의 공동(空洞)에 투여함으로써 치료될 수 있다. 바람직하게는, 종양세포집단은 상기 사람으로부터 얻어진 1차 종양세포, 또는 상기 사람으로부터 얻은 1차 종양세포에서 유래된 세포계를 포함하고, 불활성화된다. 특별한 구체에에서는 2 번째 세포집단도 또한 상기 사람의 불활성화되고, 전형적으로 말초혈액으로부터 분리된 백혈구를 포함한다. 바람직하게는, 백혈구 및 림프구는 종양세포에 가하기 전에, 지속적으로 림프구의 동종이계 자극을 위한 충분한 조건하에서, 또는 림프구의 증식을 위해서, 상기 종양세포 집단과 조합전에 함께 배양된다. 특별한 구체에에서는, 기증자의 림프구는 양자택일로 또는 추가하여 증가된 수준의 시토킨을 발현하기 위해 유전적으로 변경되었다.

도면의 간단한 설명

도 1은 2, 4, 또는 6×10^9 개의 세포를 종양내로 이식한 후 여러 시간에서 9개의 다른 패턴 중 자기 공명 영상화(MRI)에 의해 측정된 상대적 종양크기를 보이는 3개의 패널 그래프이다. 이식물 세포는 자가 및 동종이계 백혈구의 혼합된 림프구 배양에서 얻었다. 아래로 기울어진 선은 이식의 결과로 국소적 면역반응에 부분적으로 기인하는 종양에 있어서 점진적인 감소의 표시이다.

도 2는 IL-4를 분비하는 종양 세포계에 대한 방사선 조사의 효과를 보이는 3개의 패널 그래프이다. 패널 A는 5,000(□) 또는 10,000(■) rad을 조사한 세포의 성장패턴이다. 패널 B와 C는 조사 후 여러 시간 후 전체 농도(패널 B) 또는 세포당(패널 C)으로 표시한 배양 배지에서 ELISA에 의하여 검출된 IL-4를 보였다.

도 3은 Balb/c 마우스의 J588L 림프종 세포로 2차 공격에 대하여 내성을 제공함에 대한 동종활성화된 림프구 제제의 영향을 보인 막대 그래프이다. 동계비장세포 또는 특정한 제3의 비장세포로 자극된 동종이계 세포는 모두 효과가 있었다.

도 4는 마우스 림프종 모델에서 생존시간에 대한 다른 세포배양 비율의 영향을 보인 막대 그래프이다.

도 5는 4개의 다른 분석방법으로 결정된, 다른 사람 동종활성화된 세포 제제에서 기능적 활성을 보인 막대 그래프이다.

도 6은 사람 동종활성화된 세포 제제에 의한 시토킨 IL-2 및 IFN- γ 의 분비의 수준을 보인 막대 그래프이다.

도 7은 다수의 다른 자극인자세포의 사용에 의한 사람 림프구의 동종활성화의 증가를 보인 막대그래프이다.

도 8은 반응인자:자극인자세포의 비율에 의존하는 다른 사람 동종활성화된 세포제제의 기능적 활성을 보인 막대 그래프이다.

도 9는 사람 세포; 반응인자 단독, 자극인자 단독 또는 10:1의 비율로 반응인자:자극인자인 혼합된 배양에 20 μ g/mL 히스티딘(어두운 그늘) 또는 시메티딘(밝은 그늘)의 포함의 영향을 보인 막대 그래프이다.

도 10은 4개의 주사부위에서 즉각 과민증 반응을 보이는, 혼합된 림프구 배양세포 및 자가 종양세포의 조합으로 백신접종된 사람 환자의 사진의 망판(網版) 복사물이다. 용량은: 100 $\times$ 10⁶ 세포 (우측 상부 4분면); 50 $\times$ 10⁶ 세포 (좌측 상부 4분면); 25 $\times$ 10⁶ 세포 (우측 하부 4분면); 10 $\times$ 10⁶ 세포(좌측 하부 4분면)이다.

도 11은 4개의 주사부위에 지연된 과민증 반응을 보이는, 이틀후의 동일한 사람환자를 찍은 사진의 망판 복사물이다. 이 반응은 환자가 백신 조성물의 성분들에 반응한다는 것을 확인한다.

발명의 상세한 설명

본 발명의 세포성 백신의 주요 특징은, 원하는 효과를 생성하기 위하여 숙주의 내부에서 한번에 일제히 작용하는 다중 성분의 이용이다. 달리 말하면, 이 전략은 단순한 인입 면역 전달 이상의 것이다. 이 백신의 한 성분은 종양 항원이며, 바람직하게는 치료하고자하는 환자의 종양에 의해 공유되는 다중 종양-관련 항원을 발현하는 암 세포의 형태로 제공되는 종양 항원이다. 이전에 확립된 종양 세포계는 이러한 목적을 위하여 이용될 수 있지만, 치료하고자하는 환자로부터 외과적 절제술, 생체검사법, 혈액 샘플링 또는 다른 적절한 기술에 의해 얻어진 세포를 사용하는 것이 특히 편리하다. 또다른 성분은 활성화되어 그 결과 숙주 내의 향상된 면역 반응을 자극하는 능력을 갖는 림프구를 포함하는 세포들의 혼합물이다. 어떤 바람직한 구체예에서는, 세포 혼합물은 치료하고자 하는 피검자로부터 얻어진 세포를 이용하여 자극된 동종이계 세포의 림프구 혼합 배양물이다.

이 전략은 사람에서 암 면역요법에 대한 이전의 접근법으로부터 상당히 거리가 있는 것이다. 자극된 림프구는 실험적인 사람 치료에 사용되어오고 있지만, 임상 요법(adoptive therapy)의 일부로서, 림프구는 원래 피검자 또는 밀접하게 일치되는 공여자로부터 얻어졌다. 본 발명에서는, 자극된 림프구는 피검자에 대하여 동종이계(allogeneic)이다. 자극된 림프구는 동시에 주사된 종양 관련 항원에 대한 반응을 나타내는 강력한 면역자극을 제공한다. 그 결과, 세포성 면역 반응은 종양에 대하여 특이적이고, 환자의 종양 세포 또는 그 유도체를 단순히 투여함으로써 얻어질 수 있는 것보다 훨씬 강력하다.

본 발명은 직접 종양층(tumor bed)에 이식된 혼합 림프구가 종양 성장을 제한하거나 또는 역으로 진행시킨다는 관찰과 연결되어 개발되었다. 이들 실험과 그로부터 얻어진 관찰은 하기 실시예 1에, 그리고 여기에서 참고문헌으로 합체되어 있는 같이 계류중인 U.S. 특허 출원 일련번호 08/616,880, CIP 출원 번호 08/406,388에 기술되어 있다. 종양 크기에 대한 결과는 적어도 부분적으로는 숙주기원의 활성 면역 반응에 기인하는 것으로 보여진다. 한 환자에게서는, 확장성 종양 괴사에 관한 조직학적 증거가 있음에도 불구하고, 잔여 동종이계 세포에 관한 어떠한 증거도 없었다. 게다가, 효과는 장기 지속을 나타낸다. 단일 이식물을 받은 어떤 환자는 수년동안 지속되는 그 질병에서 소산을 경험했다. 이식물 내의 동종이계 림프구에 의해 자극되는 이식 항원의 증가된 발현은 종양 부위에 가까운 림프성 세포의 광범위한 회복을 낳는다는 가설이 세워졌다. 지엽적인 이식편-대-종양, 이식편-대-숙주, 숙주-대-이식편, 또는 이러한 종류의 반응들의 조합들이 생겨날 수 있으며, 면역학적 창은 세포로 조절되는 항-종양 면역 반응을 개시하기 위한 다른 불충분한 면역성 종양 항원에 대해 개방되어 있다.

동물 모델은 이식 프로토콜과 상이한 유형의 암에 대하여 개발되었다. 전이성 암의 모델로는, MADB 10⁶L¹ 유방암종 세포계를 사용하여 Fisher 344 래트의 정중 간엽 내에 1차 종양을 서서히 주입하였다. 일단 종양이 잘 정착되면, 그것을 동계의 자극인자 림프구와 동종이계의 반응인자 림프구가 1:1의 비율로 예비 배양하면서 이식한다. 처리된 동물은 이식물이 아닌 생종양 세포가 주어지는 한 거의 2 주 동안 생존하였다. 장기 생존자는 어버이 유방암 세포의 일반적인 치사량으로 재공격받을 때 면역성을 가졌다. 혼합 림프구를 같이 예비배양하는 것은 완전한 효과를 얻는 데에 중요하다고 밝혀졌다(아래 실시예 3 참조).

계속되는 이들 연구의 결과는 다음의 결론을 시사한다: a) 혼합 림프구 이식물 전략은 적어도 두 개의 다른 암(신경교종, 그리고 전이성 유방암 모델)과 적어도 두 개의 다른 위치(뇌 및 간)에서의 생존력을 개선시키는 데 효과적이다; b) 생존자는 어버이 종양 세포로 재공격되는 것에 저항력을 갖는다; 그리고 c) 효과는 숙주 항-종양 면역의 면역 활성을 통하여 조절될 수 있다.

두가지의 연속적인 이식물로 처리된 특수한 교아세포종 환자는 적절하게 반응하지 않았고, 그 이식물은 외과적으로 제거하였다. 환자는 그리고 나서 외과적인 과정으로 회수되고 동종이계 및 자가 림프구의 또 다른 제조된 배양물과 혼합된 저온 저장된 종양 세포로 치료하였다. 혼합물은 종양층으로 투여한 것이 아니고, 종양으로부터 떨어진 경피 부위에 투여하였다(실시예 4 및 8). 이 실험 과정은 전신의 항-종양 반응을 생성하는 데에 놀라게 작용하였다. 이 환자는 종양 내 이식물을 가지고 있지 않음에도 불구하고, 가지고 있는 것처럼 반응하였다. 자가 종양 세포 더하기 혼합 림프구의 말초부위 투여는 효과적인 암 치료 방법이라는 결론에 이르며, 이는 아마도 종양의 면역성을 증가시키는 강력한 능력에 기인할 것이다.

본 발명의 세포성 백신의 품질 보증은, 그 효과가 종양 세포 단독으로 또는 앞서 사용된 부형제나 보조제와 혼합하여 사용하여 얻어지는 것보다 실질적으로 더 크다는 것이다. 백신의 자극된 림프구와 종양 세포 사이의 상호작용은 아마 복잡할 것이다. 어떤 한 이론에 의해 구속되기를 원하지는 않지만, 아마도 종양 세포(또는 종양-관련 항원)는 활성화된 림프구에 의해 자극된 숙주에서 생성되는 면역 반응에서 실제적인 방관자인 것으로 보인다. 활성화된 림프구는 다음 방법 중 한가지 이상에 참여할 수 있다. 첫째, 그들은 아마도 모집, 활성화, 또는 숙주 면역 세포들의 상호작용의 자극에 효과적인 시토킨을 제공할 것이다. 생성된 시토킨 혼합체는 부분적으로는 형질도입된 세포를 통하여 또는 단리된 형태로 제공되

는 시토킨보다 우수한데, 이는 그것이 인자들의 혼합물이기 때문이다. 혼합물 내의 개개의 시토킨들은, 일제히 작용할 수도 있고, 또는 서로 상승적으로도 작용할 수도 있는데, 이들은 단일의 시토킨에 의해서 가능한 방법으로 자극될 수 있는 것 이상의 다양한 활성을 자극한다. 둘째로, 활성화된 림프구는 또한 종양 항원 출현에 직접적인 역할을 또한 할 수 있다. 셋째로, 활성화된 림프구(특히 동종이계 림프구)는 숙주의 면역 세포를 자극하는 데 맞닿은 역할을 할 수 있고, 그러는 동안 종양 항원은 방관자로서 참여할 수 있다.

백신의 투여로부터 야기되는 면역 반응은 체액 및 세포질 성분 둘다를 포함할 수 있지만, 세포성 반응이 특히 바람직하다. 세포성 면역(세포독성 림프구, 또는 다른 작동체 메카니즘을 보충하는 보조-유도 세포)은 표적 신생물(종양) 세포에 대하여 특이적인 효과를 제공하는데 중요하다고 생각되어진다. 면역 반응의 존재는 표준의 면역학 기술에 의해 검출될 수 있다. 그러나, 사람 치료에서, 일차적인 목적은 환자의 임상 상태의 개선이다. 그러므로 임상적인 성과는 암 치료에 관한 것일 때, 본 발명의 조성물 및 방법의 효능에 대한 우수한 측정법이다.

본 발명은 이전에 사용되고 제안된 전략보다 우수하다. 본 발명의 백신 조성물의 이점은 다음을 포함한다:

-백신은 사람 암 환자의 임상 상태 또는 예후를 개선시킨다. 이것은 암 환자 내에 존재하는 종양 세포가 그 자신에 대해서 명백히 부족한 면역성을 갖는 경우에도 그러하다.

-반응이 즉시 종양-관련 항원에 의해 조절되더라도, 처치된 피검자의 종양에 대한 특정 항원의 존재를 확인할 필요는 없다. 환자 자신의 종양 세포의 이용은 관련 항원의 스펙트럼을 보증한다.

-환자의 세포를 유전자적으로 변경하거나 백신의 세포를 유전자적으로 변경하기 위하여 환자의 DNA를 이용할 필요는 없다. 사실, 유전자적으로 변경된 세포는 반응을 얻기위해 요구되지 않는다(하기한 바와 같이 그것들이 본 발명의 특정 구체예에 포함될 수도 있지만)

-이 전략은 전신 면역 반응을 생성하는 것을 도우며, 따라서 일차 종양에 대해서 뿐만 아니라 일차 종양과 종양 항원을 공유하는 전이성 세포에 대해서도 효과적일 수 있다.

-종양 세포의 초기 샘플링은 가능한 예외로 하고, 프로토콜은 최소한으로 침입적인 과정에 의해 수행될 수 있다. 백신 조성물은 종양으로부터 떨어진 부위에서 바람직하게 투여된다. 투여의 경피적인 경로가 바람직하다.

-효과는 오래 생존한다는 것인데 적어도 약 두달간 지속한다. 백신접종 과정이 숙주의 면역 시스템을 자극하도록 의도되기 때문에, 많아야 가끔의 보충만을 요구한다. 이것은 인입 면역 전달법보다 상당히 진보한 것이다.

본 발명의 백신 조성물을 제조하고 이용하기위한 바람직한 방법의 설명이 이하 부분에서 더 개시된다.

용어 정의

'백신', '면역원성', 또는 '면역원성성 조성물'은 여기에서 사람 또는 동물 피검자에게 투여할 때 어느 정도의 특이적인 면역성을 부여할 수 있는 적절한 화합물 또는 조성물을 언급하는 데 사용된다. 이 개시에서 사용되었듯이, '세포성 백신' 또는 '세포성 면역원성'은 적어도 하나의 세포 집단을 포함하는 조성물을 말하며, 이는 활성 성분으로서 선택적으로 불활성화된다. 본 발명의 백신, 면역원성, 그리고 면역원성성 조성물은 활성 백신인데, 이것은 숙주의 면역 시스템에 의해 적어도 부분적으로 조절되는 특이적 면역 반응(항-종양 항원 또는 항-암 세포 반응과 같은)을 자극할 수 있는 것을 의미한다. 면역 반응은 항체, 면역반응성 세포(보조인자/유도인자 또는 세포독성 세포와 같은), 또는 그들의 어떤 조합을 포함할 수 있으며, 또는 치료가 의도되고 있는 종양상에 존재하는 항원을 향해 바람직하게 의도된다. 반응은 단일의 또는 여러번의 투여로 투여됨으로써 피검자 내에서 유발되거나 재자극될 수 있다. 다르게 특정되지 않는다면, 조성물이 백신으로서 자극을 갖추기 위하여 조성물에 요구되는 것은 더 이상 없다.

화합물 또는 조성물은 만약 그것이 a) 순수한 개체 내에서 항원(종양 항원과 같은)에 대한 면역 반응을 생성할 수 있거나; 또는 b) 화합물 또는 조성물이 투여되지 않는다면 발생했을 것 이상으로 개체 내 면역 반응을 유지하거나 또는 증강시키거나 또는 재건할 수 있다면, 그 화합물 또는 조성물은 '면역원성성'이다. 조성물은, 만약 그것이 단일 또는 여러번의 투여로 투여될 때 이들 특징들 중 하나를 얻을 수 있다면 그 조성물은 면역원성성이다.

면역 또는 면역 반응을 '자극하는'이라는 말은, 그렇지 않으면 발생했을 것보다 더 높은 레벨로 종양 세포, 동종이계세포, 또는 외래 분자와 같은 표적 물질과 반응하는 숙주의 면역 시스템에 대한 능력을 개시, 증강, 또는 유지하는 화합물 또는 조성물의 투여를 말한다. 여기에서 '일차' 면역 반응을 자극한다는 것은, 예를 들어, 표적 항원에 대한 노출의 결핍, 표적에 대한 내성, 또는 면역 억제 등에 기인하여 이전의 반응성이 검출되지 않은 피검자 내에서의 특이적인 면역 반응성을 유발하는 것을 말한다. '이차' 반응을 자극한다는 말은, 예를 들어, 선택적인 면역성, 자발적인 면역화, 또는 하나 또는 몇몇 조성물 또는 과정을 이용한 치료에 기인하여 이전의 반응성이 검출되는 피검자 내에서의 반응성의 재개시, 증강(boosting) 또는 유지를 말한다.

'세포계' 또는 '세포 배양물'이란, 생체 외에서 성장되거나 보존된 고등 진핵 세포를 가리킨다. 이는 세포의 자손들이 어버이 세포와 완전히 동일(형태학적으로, 유전자형적으로, 또는 표현형적으로)하지 않을 수도 있다는 것으로 이해된다.

세포의 '불활성화'란 여기에서 자손을 형성하기 위해 세포 분열을 할 수 없게 된 세포를 가리킬 때 사용된다. 세포는 그럼에도 불구하고 시토킨과 같은 세포 생성물의 생합성 및/또는 분비를 할 수 있고, 또는 자극에 대한 반응을 할 수도 있다. 불활성화의 방법은 당업계에서 공지되어 있다. 불활성화의 바람직한 방법은, 미토마이신 C와 같은 독소로 처리하거나 또는 광조사하는 것이다. 고정되거나 또는 투과성이 되었거나, 분열 능력이 없는 세포들 또한 불활성화된 세포들의 예이다.

'혼합 림프구 반응', '림프구 혼합배양', 'MLR', 및 'MLC'는 상호교환적으로 사용되며, 동종이인자형으로 (allotypically) 상이한 최소한 두가지의 다른 세포 집단을 포함하는 혼합물을 말한다. 동종이인자형의 상이한 세포들 중 적어도 하나는 림프구이다. 그 세포들은 적절한 조건하에서, 그리고 일정 시간 동안 함께 배양되어서 림프구의 자극을 야기한다. MLC의 자주 등장하는 목적은 림프구의 증식을 개시할 수 있는 것과 같은 동종이제적 자극을 제공하는 것이다; 그러나 지시되지 않으면, 배양 동안의 증식은 요구되지 않는다. 적절한 문맥에 따라 이들 용어들은 그러한 배양으로부터 유래된 세포의 혼합물을 지칭하는 것으로 맥일적으로 사용된다. MLC로부터의 세포가 사람에게, 특히 종양 층에 거환으로 투여될 때, 이것은 '세포이식물'로 지칭된다.

'유전자적 변경'이란, 유전자적 요소가 유사분열 또는 감수분열 외의 방법으로 세포 내에 주입되는 과정을 말한다. 그 요소는 세포와 이종이거나 또는 세포에 이미 존재하는 요소의 추가 복제이거나 또는 개선된 개작일 수 있다. 유전자적 변경은 예를 들어, 일렉트로포레이션, 인산 칼슘 침전, 또는 폴리뉴클레오티드-리포좀 복합체와 접촉시키는 것과 같은 당업계에서 알려진 방법을 통하여 재조합 플라스미드 또는 다른 폴리뉴클레오티드로 세포를 형질도입시킴으로써 달성될 수 있다. 유전자적 변경은 또한 예를 들어, DNA 또는 RNA 바이러스 또는 바이러스 벡터로써 형질도입 또는 감염에 의해 달성될 수도 있다. 유전자적 변경은 세포의 자손에 의해 유전되지만, 이것이 본 발명을 실시하는 데 반드시 요구되는 것은 아니며, 특히 변경된 세포가 더 이상의 증식 없이 약제 조성물에 사용될 때 그러하다.

'종양 세포' 또는 '암 세포'라는 용어는 단수 또는 복수 형태로 사용되어서 숙주 생물체에 대한 병적요인을 만드는 악성 형질전환을 겪은 세포를 말한다. 일차 암 세포(즉, 악성 형질전환 부위 가까이로부터 얻어진 세포)는 잘 확립된 기술, 특히 조직 검사에 의해 비-암세포와 쉽게 구별될 수 있다. 여기에서 사용된 암 세포의 정의는 일차 암세포 뿐만이 아니라, 암 세포 조상으로부터 유래된 어떤 세포도 포함한다. 이는 전이된 암세포, 그리고 암세포로부터 유래하는 세포계 및 생생체의 배양물을 포함한다.

'종양-관련 항원' 또는 'TAA'라는 용어는 여기에서 같은 조직형의 비-종양세포에 의해서보다 종양세포에 의해서 더 높은 빈도와 밀도로써 발현되는 분자 또는 복합체를 말한다. 종양-관련 항원은 숙주에 의해 정상적으로 발현되지 않는 항원일 수 있거나; 그것은 돌연변이화되거나 끝이 잘려지거나, 잘못 겹쳐졌거나, 그렇지 않으면 숙주에 의해 정상적으로 발현되는 분자의 비정상적 징후일 수 있거나; 그것들은 정상적으로 발현되는 분자들과 동일할 수 있지만 비정상적으로 높은 레벨로 발현될 수 있거나; 또는 그것들은 비정상적인 상황이나 환경에서 발현될 수 있다. 종양-관련 항원은 예를 들어, 단백질 또는 단백질 단편, 복합 탄수화물, 핵산, 핵산, 또는 이들의 어떤 조합이나 다른 생물학적 분자들일 수 있다. 특정한 종양-관련 항원의 존재 또는 특성의 이해는 본 발명에 실시예에 필요하지 않다.

여기에서 사용된 '처치(치료)'라는 말은 처치되는 개체 또는 세포의 자연적인 진행을 변경시키려는 시도의 임상적인 개입을 말하며, 예방을 위하여 또는 임상적인 병의 진행 과정 동안 수행될 수 있다. 바람직한 효과는 질병의 발생 또는 재발의 예방, 증상의 완화, 질병의 직접 또는 간접적인 병리학적 결과의 최소화, 전이의 예방, 질병 진행 속도의 늦춤, 질병 상태의 개선 및 완화, 그리고 완화되거나 개선된 예후 등이 포함된다.

질병 상태와 관련한 '병리'란 병에 걸린 개체의 삶의 질과 정상적인 생리기능과, 안녕을 포함하는 어떤 것이다. 이는 병에 걸린 조직의 앞서 걸리지 않은 지역으로의 파괴적 침습, 정상적인 조직 기능에 의한 성장, 불규칙적이거나 억제된 생물학적 활성, 염증 또는 면역 반응의 악화 또는 억제, 다른 병원성 생물체 또는 약품에 대한 증가된 감수성, 그리고 통증, 발열, 구토, 피로, 기분 변화, 및 주치의에 의해 단정될 수 있는 그 밖의 특징들과 같이 바람직하지 못한 임상적 증상을 수반할 수 있다(그러나 이에 한정되는 것은 아님).

'유효량'이란 이로운 또는 바람직한 임상 결과, 특히 면역 반응의 생성, 또는 임상 상태의 눈에 띄는 개선을 가져오기에 충분한 양을 말한다. 면역원성 양은, 체액 반응, 세포성 반응, 또는 둘다를 포함할 수 있는 면역 반응을 도출하기에 충분한 처치되는 피검자 그룹(질환이 있든 없든)에서 충분한 양이다. 신생물(종양) 질환을 앓고 있는 피검자에 대한 임상 반응에 대하여, 유효량은 질병의 진행을 늦추거나 완화하거나 개선하거나 안정화시키거나 또는 역으로 진행시키거나, 그렇지 않으면 질병의 병적 귀결을 감소시키기에 충분한 양이다. 유효량은 단일의 투여로 또는 나누어서 투여될 수 있다. 유효량에 사용하기 위한 바람직한 양과 세포의 비율은 이 명세서의 다른 곳에서 주어지고 있다.

'개체' 또는 '피검자'는 척추 동물이며, 바람직하게는 포유 동물, 더 바람직하게는 인간이다. 인간이 아닌 포유 동물에는 사육 동물, 변종 동물, 그리고 애완 동물들이 포함되지만, 여기에 한정되지는 않는다.

일반적 기술

본 발명의 실시는, 다르게 지시되지 않는 한, 분자 생물학, 미생물학, 세포 생물학, 생화학, 및 면역학의 통상의 기술을 당업계의 기술범위 내에서 채용할 것이다. 그러한 기술은, 'Molecular Cloning: A Laboratory Manual', 2판(Sambrook 외, 1989); 'Oligonucleotide Synthesis'(M.J.Gait, ed., 1984); 'Animal Cell Culture'(R.I.Freshney, ed., 1987); 'Methods in Enzymology'(Academic Press, Inc.); 'Handbook of Experimental Immunology'(D.M.Weir & C.C.Blackwell, ed.); 'Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells'(J.M.Miller & M.P.Calos, eds., 1987); 'Current Protocols in Molecular Biology'(F.M.Ausubel 외, eds., 1987); 'PCR: The Polymerase Chain Reaction'(Mullis 외, eds., 1994); 'Current Protocols in Immunology'(J.E.Coligan 외, eds., 1991)와 같은 문헌에 모두 설명되어 있다. 또한 혼합된 림프구 배양에서의 기술의 실시예로서 (하기) Gately 외, Lee 외, 및 Zarling 외 참조.

약제 조성물의 제조 및 투여에 대한 일반적인 과정은 Remington's Pharmaceutical Sciences 18th Edition (1990), E.W.Martin ed., Mack Publishing Co., PA에 개설되어 있다.

본 발명의 조성물 및 방법을 시험하고 조절하는데 사용될 수 있는 암에 대한 동물 모델의 수는 많다. 어떤 모델은 확립된 동계 종양 세포계로 근친 동물을 주사하는 것을 포함한다. 종양은 치료가 개시되기 전에 정해진 강력한 치료 조성물과 함께 공동-주사되거나, 또는 어떤 때에는 순수한 동물의 백신 접종에 이어서 공격(challenge)으로서 투여될 수 있다. 예시는 실시예 부분에서 제공된다. 미국 특허 Nos.

5,663,481, 5,602,305 및 5,476,993; 유럽 특허 출원 379,554; 및 국제 출원 WO 91/01760에 기술된 키메라 동물 모델 또한 유용하다.

앞서 또는 나중에 여기에서 언급된 모든 특허, 특허 출원, 논문이나 출판물은 참고문헌으로서 여기에 함체된다.

세포성 백신의 제조

본 발명의 세포성 백신은 전형적으로, 각 셀 집단 또는 그와 동등한 것을 제조하고, 구성 성분들을 조합하고, 그리고 선택적으로는 피검자에게 투여하기 전에 세포 혼합물을 공배양하거나 또는 저장하는 것에 의해 모은다.

종양 관련 항원: 종양-관련 항원의 공급원은 가장 일반적으로는 환자를 처치하는 종양 세포에 근접하는 표현형을 갖는 종양 세포 또는 세포계이다. 같은 조직형으로부터 나온 유사한 조직적 특성을 갖는 종양은 종양-관련 항원을 공유하는 경향이 있다. 항원의 완전한 스펙트럼은 개개 종양들 사이에서 변할 수 있지만, 적어도 한가지는 공유될 것이라는 것은 실질적으로 가능하다. 바람직하게는, 종양 세포는 처치하고자하는 피검자와 조직적합성이다.

일반적으로, 환자로부터 종양세포를 얻는 것이 가능할 때, 이들 세포는 적절한 종양-관련 항원의 완전한 보존물을 함유할 가능성이 보다 크므로 바람직하다. 백혈병 및 림프종과 같은 혈중 종양은 말초 혈액으로부터 쉽게 샘플링될 수 있다. 한편, 종양세포는 일반적으로 생체검사를 포함하는(그러나 이에 한정되지는 않음) 외과적 절차에 의해, 또는 외과적 절제 또는 크기축소(debulking)에 의해 샘플링 된다. 종양 세포는 또한 전이 부위로부터 수집할 수도 있다. 고체 종양은 콜라게나아제 등과 같은 프로테아제로 효소처리하는 것과 선택적으로 결합되는 물리적 조작에 의해, 떨어진 세포들로 분리할 수 있다. 그 세포들은 그리고나서 신선한 생리적 배지로 옮긴다. 세포들은 예를 들어 액체 질소 내에서 냉동시켜 다음 사용 때까지 저장할 수 있다. 선택적으로, 그리고 특히 원래의 종양 덩어리가 작을 때에는, 적절한 공급을 보장하기 위하여 종양 세포 집단을 팽창시키는 것도 무방하다. 세포는 증식에 알맞는 생장 배지에서 배양하고, 선택적으로는 생장 인자를 보충한다. 바람직하게는, 종양 세포의 특징을 포함하는 안정한 세포 집단은, 더 이상의 형질전환없이 얻지만, 요구되는 경우에는 할 수도 있다. 세포 집단은 그 특성을 개량하거나 그 안정성을 향상시키기 위하여 선택적으로 클론될 수 있지만, 일반적으로는 필요하지 않다. 신뢰성있게 단기 배양을 정착시키고 다양한 종양 유형들로부터 적어도 10^8 세포를 얻기 위한 조건은, Dillman 외(1993) J. Immunother. 14:65-69에 의해 기술되어 있다. 가능하다면, 원래의 종양 세포 제제는 분열증식 없이 이용되는데, 이는 중요한 종양 항원이 분열증식 과정을 통하여 손실될 것이기 때문이다.

설명된 바와 같이 얻어진 암 세포 또는 세포계는 백신의 다른 성분들과 직접 결합할 수 있다. 그러나, 일단 피검자에게 투여되어서 더 이상의 증식을 예방하기 위해서는 암세포를 불활성화시키는 것이 바람직하다. 불활성화의 물리적, 화학적, 또는 생물학적 수단 어떠한 것도 이용될 수 있으며, 여기에는, 조사(바람직하게는 적어도 약 5,000cGy, 더 바람직하게는 적어도 약 10,000cGy, 더 바람직하게는 적어도 약 20,000cGy로써 행함); 또는 미토마이신-C로의 처리(바람직하게는 적어도 약 10 μ g/mL; 더 바람직하게는 적어도 약 50 μ g/mL)등이 포함되는데 이에 한정되는 것은 아니다.

종양 항원 공급원으로서 사용하기 위한 암 세포는, 맥일적으로는 글루타르알데히드, 파라포름알데히드 또는 포르말린과 같은 시약으로 고정될 수 있다. 그것들은 또한 데옥시글로레이트 또는 옥틸 글루코시드와 같은 이온성 또는 비-이온성 세제에서 용해화할 수 있고, 또는 예를 들어 우두 바이러스를 사용하여 용균할 수 있다. 원한다면, 용해화된 세포 현탁액은, 특정한 종양-관련 항원을 풍부하게 하거나 단리하기 위하여 많은 표준 생화학적 분리 과정 중 어느 하나를 거치게 하거나 맑게 만들 수 있다. 백신의 다른 성분들과 합치기 전에, 그 제제는 예를 들어 고정된 세포를 원심분리하거나 세척하여, 또는 용해화된 현탁액을 투석함으로써, 처리에 사용된 시약을 제제로부터 없애지게 한다. 그러한 종양세포 집단의 처리, 특히 불활성화의 범위를 넘어서는 특히 요구되지 않는 한 본 발명의 구체예의 실시 선택적이거나 필요 없을 수도 있다고 보여질 수 있다.

동종이계 세포: 본 발명의 세포성 백신은 또한 2차 세포 집단을 포함하는 데, 그 집단의 적어도 일부는 처치하고자 하는 피검자에 대하여 동종이계이면서 동종이계 자극에 대하여 특이적으로 반응할 수 있는 세포들이다. 이는 일반적으로 림프구 세포 또는 림프구 계열의 세포를 의미하며, 특히 T 세포를 의미한다. CD4 항원(CD4+ 세포)을 발현하는 림프구 및 CD8 항원(CD8+ 세포)을 발현하는 세포는 둘다 T 림프구의 정의에 포함되며, 둘다 또는 어느 하나는 백신에 포함될 수도 있다. 바람직하게는, 2차 세포 집단 내의 동종이계 세포는 적어도 10% CD4+ 세포 또는 10% 보조인자/유도인자 세포이고; 더 바람직하게는 그것은 적어도 약 20%의 CD4+ 또는 보조인자/유도인자 세포이고; 더더욱 바람직하게는 그 부분은 적어도 약 30%이고; 훨씬 더 바람직하게는 그 부분은 적어도 약 50%이다. CD4+ 세포는 형광으로 활성화되는 계수와 관련하여 OKT4와 같은 시판되는 특이적 항체로써 편리하게 정량할 수 있다.

세포는 만약 그것이 동종 반응을 자극하기에 족한 표현형 차이를 가지고 있다면, 일반적으로 동종이계라고 묘사된다. 이 개시의 본문에서, '동종이계'라는 용어는 주요 조직적합 복합체(MHC) 항원의 표현형에서의 차이로 제한되어서 사용된다. 같은 종의 세포들 간의 MHC 동종이인자형의 동일성에서의 어떤 차이는 그것들이 동종이계 세포라는 것을 의미한다. 사람 내에서, HLA-A, B, C, D, DP, DQ 및 DR 위치 중 어느 것에서의 차이는 본 발명에 대하여 관련있는 동종이인자형의 차이를 구성한다. HLA-A, B, C, D, DP, DQ 및 DR의 동일성은 보통 세포독성검사 또는 면역형광검사 기술로 동종이인자형-특이적 항체를 사용하여 결정된다. 본 발명의 목적을 위한 바람직한 동종이인자형적 차이는 HLA 등급 II 항원에 관련한다. 처치하고자 하는 피검자의 세포들과 추정 동종이계 세포들 사이에서 DP, DQ, 및 DR 위치의 등급 II 항원들을 비교하면, 바람직하게는 적어도 1, 더 바람직하게는 2, 3, 4, 5, 또는 6 위치가 동종이계 세포들 사이에서 차이가 난다. 등급 II 항원은 또한 형이 정해진 세포를 사용하는 혼합 림프구 반응에 의해 D 로커스에서 정해질 수도 있다. 동종이계 세포의 공여자는 일반적으로 처치되는 피검자와 무관하여, MHC 미스매치의 수를 최대화한다.

등급 II 영역 미스매치의 수는 하지만 동종이계성의 기능적 측정에 이차적으로 관련이 있다. 동종이계

세포는, 만약 그것들이, 처치하고자하는 피검자의 불활성화된 단핵 세포를 자극 세포로서 이용하여 일방(one-way) MLR 내의 강력한 분열증식 반응을 증명한다면, 본 발명에서의 사용에 특히 적절하다. 특히 피검자와 같은 유전자형의 자극 세포에 대하여 특히 강력한 반응을 일으키는 것으로 알려진 세포의 공여자가 특히 적절하다. 상이한 동종이계 세포의 한 패널을, 가장 강한 반응을 도출해내는 것을 결정하기 위하여 환자 세포에 대하여 테스트할 수 있다.

동종이계 세포 집단은 반드시 단일의 공여자로부터 얻어지는 것으로 한정되는 것은 아니다. 둘 또는 셋 또는 그 이상의 복수의 공여자들이 선택적으로 사용되어서 동종이계 세포의 수집을 용이하게 하거나, 동종이계 세포의 자극을 증가시키거나, 항-동종이인자형 반응의 도출을 최소화하거나, 또는 그렇지 않으면 세포성 백신의 효능을 증대시킨다.

동종이계 세포는 바람직하게는 피검자에게 투여되기 전에 활성화되거나 자극되고, 또는 일단 투여되면 활성화하거나 자극할 수 있다. 본문에서 '활성화'란 분열증식을 유도하는 것을 의미한다. 분열증식은 세포 계수에 의해서, 또는 마지막 ~18시간 배양하는 동안 표준 [³H]-티미딘 흡수 측정법에 의해 측정될 수 있다. PHA와 같은 미토겐으로 세포를 자극하면 최대의 분열 증식이 나타나고, 유도제 세포 없이 배양하면 가장 낮은 분열증식이 측정된다. 실질적으로 분열증식하는 세포는 사실상 최저 수준 이상의 흡수는 보일 것이다.

본문에서 '자극'이란 외부 작용제에 의해 유도되어 대사 변경을 겪거나, 특히 시토킨이나 다른 용해성 조절자와 같은 생물학적 관련 분자의 합성 및/또는 분비의 증가를 겪거나, 또는 정지된 림프구로부터 림프종으로 형태학적 변화를 겪거나, 또는 엔도사이토시스, 엑소사이토시스, 식균작용, 또는 세포내 물질수송의 증가를 포함하는(한정하는 것은 아님) 세포 내 생물학적 반응성의 증가 및 외부 환경으로부터 분자의 프로세싱을 겪는 것을 의미한다. 분열증식 및 세포독성 분석, 조직검사, 세포-표면 마커의 밀도 측정, 세포에 의해서 합성되고 그리고/또는 분비되는 조절자(특히 시토킨)의 측정, 또는 호중구, 호염기구, 비만세포, 단핵 백혈구, 대식구, 호산구, 및 다른 림프구와 같은 효과기세포를 모충하는 능력의 증가를 포함하여 다수의 생물학적 분석법이 활성화 및 자극의 측정에 관하여 관련이 있다. 유도의 부재 하에 관찰된 것을 초과하여 유도시에 특징 변화가 측정되는 것을 분석이 나타날 때 자극이 일어나는 것이다. 자극의 특히 관련 형태는 면역학적 반응시 그러한 특징을 지니는 세포의 참가 빈도 증가와 상호관련이 있는 것들이다. 그러한 특징들에는, 배발생, 특정 항원에 반응하는 분열증식 또는 세포독성, 그리고 조절자 IL-2, IL-4, IL-6, TNF- α , IFN- γ , G-CSF, M-CSF, 또는 GM-CSF의 증가된 분비등이 포함된다. 자극을 측정하기 위한 특정 분석법은 실시예 5에 제공되어 있다.

림프구는 본 발명에서 사용하기 위하여 어떠한 적절한 조직 공급원으로부터도 모을 수 있지만, 가장 편리하게는 동종이계 공여자의 혈액으로부터 얻는다. 공여자는, 충분한 백혈구 수를 갖는 것들을 확인하고, 신생물 질환이나 전염성 감염을 가진 것들을 배제하기 위하여 바람직하게는 미리 스크리닝한다. 수집은, 전체 혈액 기증 및 이어지는 혈액 세포 집단의 분리에 의해, 또는 더 편리하게는 백혈구 분리반출(leukapheresis)에 의하여 수행될 수 있다. 약 100-500mL, 바람직하게는 적어도 약 200mL의 백혈구 분리반출 현탁액을 얻기 위하여 충분한 혈액을 처리한다. 혈액은 구연산염이나 EDTA와 같은 항응고제 내에 모은다. 예를 들어, 백혈구 분리반출은 Cobe 2997(COBE SPECTRA[®], Lakewood CO); Fenwall CS 300(Fenwall, Deerfield IL); 또는 Haemonetics(Braintree MA) 혈액 세포 분리제를 사용하여 수행될 수 있다. 2-4 시간동안 ~40-50mL/분의 유속은 <1mL 적혈구 세포를 갖는 백혈구 분리반출 현탁액 ~200-250mL을 산출하는데, 이는 공여자 개인과 사용된 설비 사이에서 변화한다.

어떤 적절한 방법에 의해 제조된 림프구는 통상 세척하여서 혈소판을 제거하고, 그리고 2%의 불활성화된 우태아 혈청으로 보충된 AIM V와 같은 적절한 매질에서 재현탁시킨다. 원한다면, 세포는 림프구 특히 T 세포를 풍부하게 하기 위하여 하위 집단으로 더 분리할 수 있다. 양성 및 음성 선택법 둘다가 사용될 수 있다. 적절한 과정은, FICOLL[™] 또는 HISTOPAQUE[®]과 같은 적절한 매질에 대한 원심분리, 나일론-울 칼럼 위로의 통과, 패닝과 같은 친화 분리, 또는 적절한 세포-표면 마커에 대한 항체를 사용하여 형광 세포 분류기에서 분류하는 것을 포함한다. 편리함을 위하여, 조작단계의 수를 줄이는 것이 바람직할 수도 있다. 예를 들어, 보다 나은 루카페레시스 분리는 연속되는 FICOLL[™] 상의 분리에 대한 필요를 없앨 수 있다.

동종이계 세포는, 관련된 종양-관련 항원에 대한 면역 반응을 강화하는 어떠한 방식으로든 자극될 수 있다. LAK 세포와 TIL 세포는 자극된 동종이계 세포의 정의에 포함될 수 있다. LAK 및 TIL 세포는 당업계에서 공지된 기술에 따라서 생성되고 분리될 수 있다; 본 발명의 사용에 있어서 주요 차이점은 그것들이 의도하는 수용체에 대하여 동종이계라는 점이다. 본 발명은 동종이계 세포의 활성화 또는 자극의 어떠한 수단도 포함하는데, 이것에는 공여자 유래도 환자 유래도 아닌 세포와 미리 배양하는 것, 살아있는(불활성화되지 않은) 종양 세포와 미리 배양하는 것, 공여자 유래의 공급 세포와 미리 배양하는 것, 분리된 또는 재조합 시토킨 또는 그 혼합물과 미리 배양하는 것, ConA와 같은 미토겐과 미리 배양하는 것, 또는 상기 나열된 기술들의 어떠한 조합등이 포함되는데 이것에 한정되는 것은 아니다. 면역 세포를 자극하는 방법과 자극을 측정하는 분석법은 특히 미국 특허 No. 5,569,585에서 찾을 수 있다.

특히 바람직한 자극 방법은, 앞서 설명되었고 당업계에서 공지된 림프구혼합배양에 의한 방법이다.

자극인자 세포: 동종이계 림프구를 자극하기 위한 바람직한 방법은 그들을 적당한 자극을 제공할 수 있는 세포들과 결합하는 것이다. 그러한 세포들은 여기서 '자극인자' 세포라고 한다. 동종이계 림프구는 이 방식으로 자극되었을 때 '반응인자' 세포라고 한다.

본 발명의 일정한 구체예들에서, 자극인자 세포의 공급원은 치료받을 피험자와 유전적으로 유사한 개체이며, 더욱 바람직하게는 자극인자 세포는 MHC 항원에 관하여 피험자와 유사하거나 동일한 개체로부터 얻어지고, 더욱 바람직하게는 자극인자 세포는 피험자에 자가유래이다. 어떤 경우에서, 피험자는 종양 또는 선행 치료에 의한 자극으로 인하여 종양 관련 항원에 대해 이미 면역 반응을 가지고 있을 수 있다.

본 발명의 다른 구체예에서, 자극인자 세포는 치료받을 피험자로부터가 아니라 다른 공여자 또는 복수의 공여자들로부터 얻어진다. 피험자의 세포를 사용하는 이점은 반응인자가 투여후 피험자의 동종항원으로

부터의 자극을 계속 수용할 수 있다는 것이다. 그러나, 제 3자 자극인자의 사용은 그 자체의 이점들을 가진다. 예를 들면, 일단의 자극된 세포들이 몇몇 다른 환자에게 사용하기 위해 준비될 수 있다. 설명을 하자면, 치료받을 피험자 이외의 몇몇 다른 공여자로부터의 백혈구분리반출 세포는 포획되고 자극에 충분한 조건하에서 함께 배양된다. 그 다음 배양된 세포의 분액은 개개의 환자들 각각으로부터의 종양 세포로부터 결합되어 각각의 환자들의 종양 관련 항원에 맞춘 세포질 백신을 형성한다.

본 발명의 더 이상의 구체예에서 다른 개체들로부터의 복수의 자극인자 세포가 사용되며, 상기 개체는 치료받을 피험자를 포함할 수도, 안할 수도 있다.

자극인자 세포로서 사용하기에 적당한 세포 유형은 고밀도의 조직적합성 항원, 특히 클래스 II 항원을 가지는 것들이다. 림프절 세포가 적당하지만 더 통상적인 공급원은 말초혈이다. 백혈구는 백혈구분리반출법에 의하여 피험자의 순환계로부터 수집될 수 있으나, 필요한 자극인자 세포의 수가 반응인자 세포의 수보다 훨씬 적기 때문에 전 혈 수집이 더 통상적이며, 통상 더 편리하다. 정맥 천자에 의해 수집된 적당한 항응고제 중의 말초혈 200-400 mL는 전형적으로 백신을 제조하기에 충분한 세포를 제공한다.

상술된 분리 방법은 일반적으로 피험자의 전 혈 샘플로부터 자극인자 세포를 탈취하는데 사용될 수 있다. B 세포 및 단핵세포와 같은 개체군으로부터 클래스 II 조직적합성 항원을 발현시키는 세포를 풍부하게, 또는 적어도 고갈되지 않도록 하는 것이 바람직하다. 세포의 광대한 세부 분획은 보통 필요치 않으며, 간단한 말초혈 단핵 세포 개체군(PBMC)이 대부분의 목적에 적당하다.

혼합 림프구 배양: 공여자 동종이계 림프구 및 자극인자 세포는 사용시, 생체내에서 동종이계 자극이 일어날 것이라는 예상을 가지고 환자에 투여하기 직전에 조합될 수 있다. 그러나, 실시예 3에서 제공되는 데이터는 투여전 두가지 세포의 공배양이 조성물의 효과를 향상시킨다는 것을 나타낸다.

본 발명은 동종이계 세포를 자극하는 방식과 같이 이 방식(two-way) 혼합 림프구 배양물의 사용을 포함한다. 그러나, 자극인자 세포로서 종양 환자의 백혈구를 사용할 때는 일 방식 MLC가 바람직하다. 일 방식 MLC를 실행하기 위하여, 피험자의 자극인자 세포는 예를 들면, $\sim 10^7$ 세포/mL를 50 μ g/mL 미토마이신 C로 처리하고, 이어서 세척함으로써 불활성화된다.

동종이계 림프구는 일반적으로 우태아 혈청 또는 그것에 대한 대용물로 보충되고 선택적으로 다른 성장인자를 포함하는 적당한 배지에서 자극인자 세포와 결합된다. 반응인자:자극인자의 비율은 바람직하게는 약 100:1 내지 1:10, 보다 바람직하게는 50:1 내지 1:1, 더욱 바람직하게는 약 20:1 내지 5:1, 더욱 더 바람직하게는 약 10:1이다. 일 방식 MLC에서 복수의 자극인자 또는 반응인자 세포가 있는 경우, 반응인자:자극인자의 동일한 근사 비율이 유지된다. 따라서, 두 개의 불활성화 자극인자를 사용할 때, 그 비율은 대략 9:(1:1)이고, 세 개의 불활성화 자극인자를 사용할 때, 그 비율은 대략 8:(1:1:1)일 수 있다. 유사하게, 다중 반응인자를 사용할 때, 그 비율은 (5:5):1 또는 (3:3:3):1일 수 있다. 함께 배양한다면, 다중 반응인자 조성물은 다중 방식 MLC가 된다. 다중 반응인자의 일 방식 활성화는 10:1의 비율에서 각각의 반응인자 개체군에 대해 분리 배양을 실행한 다음, 사용 직전에 동종 활성화 세포를 결합함으로써 달성될 수 있다.

원하는 비율로 결합되면, 세포는 적당한 분위기(약 37°C에서, 95% O₂, 5% CO₂와 같은)하에 적당한 밀도로 배양된다. 배양 기간은 바람직하게는 적어도 약 12시간, 보다 바람직하게는 약 24시간 내지 72시간이다. 추가의 자극은 일반적으로는 바람직하지 않지만 시토킨 레벨이 배양의 첫 48 내지 72시간 동안에 보통 더 높기 때문에 3 내지 5일간 배양함으로써 얻어질 수 있다. 실행자는 상술된 바와 같이 또는 실시예 5에 기재된 바와 같이 이들 성질에 대해서 생분석을 실행하여 조건들이 반응인자 세포의 증식 또는 자극에 충분한 지를 결정할 수 있다. 다른 방법에서 TNF- α , LT 및/또는 IFN- γ 의 레벨을 배양 상정액에서 측정한다. 자극은 50-150 U/mL, 또는 500-3500 pg/mL에서의 TNF- α 또는 LT의 생물학적 활성 레벨로 나타낸다. 바람직한 배양물은 테트라졸륨 환원 분석(XTT) 또는 흘림 세포계산기(CD69 또는 세포내 에스테라제) 또는 양자에 의해 측정되는 바와 같이 배양의 첫 3일 내에 비자극 공여자 컨트롤치 보다 $\geq 10\%$ 활성 레벨을 나타내는 것들이다.

바람직한 세포원, 세포 비율, 배양 조건 및 다른 특징들의 본 명세서 내에서의 상세한 설명은 실행자를 도우려는 것이며 분명하게 요구되지 않는 한 본 발명의 범주를 한정하려는 것은 아니다. 여러 가지 다른 매개변수 조합이 원하는 기능 효과를 가진 세포 개체군을 생성할 수 있기 때문에 개개의 매개변수 어떠한 것에 대해서도 한정하는 의미는 없다.

혼합 림프구 배양은 일반적으로 종양 세포의 첨가 전에 동종이계 반응인자 세포 및 피험자의 자극인자 세포로 실행된다. 보통, 암 환자로부터 유도된다고 하더라도 자극인자 세포는 그 자체로 비 양성이다. 그러나, 종양 세포가 MLC 동안에 존재하는 것은 무방하다. 때로는 자극인자 세포와 종양 세포는 백혈병 치료에서와 같이 동일할 수 있다.

기능 효과의 최적화: 동물 모델 실험에서의 경험은 특히 상이한 제3자 공여자가 자극인자 세포로서 사용되었을 때, 모든 제3자 공여자가 동일한 정도의 동종활성화를 제공하지는 않는다는 것을 나타낸다.

변수가 공여자-세포 의존성인 정도로, 배양물에서 관측되는 동종활성화의 정도와 임상 결과의 관점에서 경험에 따라서 공여자가 선택될 수 있다. 테트라졸륨 환원 분석(XTT), 흘림 세포계산기 분석, 또는 ELISA에 의해 측정되는 일정한 림포카인의 분비 레벨과 같은 특정 레벨의 활성화를 나타내는 기능 기준은 임상 경험에 따라서 결과를 충분히 예상할 수 있다. 일단 성공적인 공여자가 확인되면, 그들은 면역원성 조성물을 제공하는 서비스 실험에 의하여 공급원이 되는 정규 공여자의 패널로 구성될 수 있다.

변수가 공여자와 환자간의 조화에 좌우되는 정도로, 몇가지 다른 선택 기준도 사용될 수 있다. 일정한 공여자-환자 조합의 효능이 조직적합성에 따라서 이동할 수 있기 때문에 공여자는 원한다면, 조직 조화를 기준으로 선택될 수 있다. 특정한 사람 조직적합성 유형의 공여자가 원한다면, 상술된 키메라 동물 모델 중 하나를 사용하여 특정 종양으로 효능에 대해 테스트될 수 있다.

시험관내 분석에서 환자로부터의 PBL과 잠재 공여자의 선택으로부터의 PBL을 사용하여 더욱 즉석의 공여

자 확인 테스트가 실행될 수 있다. 그러한 분석중 하나가 역기능 테스트이다. 이 분석에서, 환자 세포가 불활성화 자극인자로서 동중활성화 세포를 가진 잠재 공여자를 사용하여 반응인자로서 혼합 백혈구 배양물 내에서 설정될 수 있다.

반응이 동중활성화 세포에 의해 시토킨 분비를 수반한다고 생각되기 때문에 대안의 예상인자(predictor)가 이단계 배양물일 수 있다. 이 접근에서, 반응인자:자극인자 배양물이 제조 배양물에 사용하기 위해 테스트되는 동일한 반응인자 및 자극인자 세포를 사용하여 제조된다. 3일째에 배양물은 미토마이신 또는 치사량에 가까운 조사로 불활성화되어 세포가 여전히 시토킨을 생성하지만 복제물을 생성하지는 않게 한다. 그 다음, 환자로부터의 백혈구가 첨가되고 그 반응은 기능 분석, 시토킨 분비 또는 T세포 증식으로 이어진다. 이 접근의 변형에서, 불활성화 종양 세포는 또한 배양의 제2 단계에서 제공되고 ⁵¹Cr 표지된 종양 세포의 세포붕괴를 측정함으로써 제2 단계의 말기에서 그 정보가 결정된다.

이들 분석은 여러 가지 방법, 특히 고 반응인자가 풍부한 공여자 패널의 설정으로 본 발명의 조성물을 최적화하기를 바랄 수 있는 독자에게 유리하게 기술되었다. 본 발명이 이 섹션에서 약속되는 추가의 세심한 고안을 사용하지 않고 실행될 수 있다는 것을 강조한다.

동중활성화의 정도 또는 잠재적인 치료 결과는 다음 방법들, 즉 a) MLC에서 반응인자 또는 자극인자로서 복수의 공여자 세포를 사용하는 것; b) MLC에서 자극인자로서 치료받을 환자로부터의 세포를 사용하는 것; c) H2 수용체 안타고니스트를 MLC의 배양 배지에 첨가하는 것 중 하나 이상을 유용하고 적절하게 사용함으로써 향상될 수도 있다. 바람직한 H2 수용체 안타고니스트는 시메티딘이고 5μg/mL 내지 100μg/mL, 통상적으로는 20μg/mL로 배양 배지에 첨가된다. 시메티딘 또는 복수의 공여자 세포를 사용하는 이점은 실시예 6 및 7에 각각 설명된다.

유전적 변성 세포: 백신에 사용되는 동종이계 세포는 백신에 대한 면역 반응을 가능하게 하는 양식으로 유전적 변성될 수 있다. 상승된 레벨로 시토킨을 발현하도록 유전적 변성되는 동종이계 세포가 특히 바람직하다. 림프구, 특히 동종이계 혼합물 내의 것들은 이미 검출가능한 레벨의 일정한 시토킨을 생성할 수 있는 것으로 인식된다. 유전적 변성의 결과로서 일어나는 발현의 '상승된 레벨'은 동일 방식, 아니면 유사하게 유전적 변성되지 않은 세포에서 관찰되는 레벨을 초과한다. 어떠한 시토킨, 특히 림프구 또는 항원-제공 부류의 세포를 강화하거나 자극하는 능력을 갖거나, 아니면 면역 반응을 두드러지게 하는데 관여하는 것들이 이 목적에 사용될 수 있다. 바람직한 시토킨은 한정하는 것은 아니지만, 종양 괴사 인자, 예를 들면, TNF-α; 인터루킨, 예를 들면 IL-2, IL-4, IL-6, IL-7 및 IL-10; 인터페론, 예를 들면, IFN-α 및 IFN-γ; 조혈인자; 및 콜로니 자극인자, 예를 들면 GM-CSF 및 M-CSF를 포함한다.

본 발명에서 사용될 수 있는 가능한 시토킨 중에서 분화된 항원 제공 세포의 성숙과 기능에서의 그 중요한 역할 때문에 GM-CSF가 특히 바람직하다. 이것은 상피 공급원의 것들과 같은 많은 종양세포가 검출가능한 MHC 클래스 II 분자를 발현하지 않기 때문에 중요한 것으로 여겨진다. IL-4도 B 및 T림프구 뿐만 아니라 조혈세포에 대해 광범위한 범위의 자극 활성이 부여된 다기능 시토킨으로서 특히 바람직하다. 그 역할은 CD4+ 항원 제공 세포의 강화 및 활성화 뿐만아니라 세포독성 T림프구의 유도를 포함한다. TNF-α는 부분적으로 면역 및 염증성 반응에 대한 효과의 광범위한 범위 때문에 특히 바람직한 제 3의 시토킨이다.

사람 IL-4 및 TNF-α의 단백질과 DNA 암호화 서열은 알려져 있으며 암호화 서열들을 포함하는 벡터가 입수가능하다. IL-4 서열들과 벡터들에 대해서는 미국 특허 제 5,017,691호 및 유럽 특허 제 230107호를 참조하라. 유전적으로 변성된 CHO세포들은 미국특허 제 5,034,133호에 기재되어 있다. 고형 종양의 치료에 있어 IL-4 (단리된 재조합물로서 또는 유전적 변성 세포에서)의 사용은 미국특허 제 5,382,427호에 기재되어 있다. TNF 폴리펩티드, 암호화 서열, 벡터 및 유전적 변성 숙주 세포는 미국 특허 제 5,288,852호, 유럽 특허 제 155549호 및 미국 특허 제 4,879,266호에 기재되어 있다. 본 발명에서 사용될 수도 있는 TNF의 변이체는 미국 특허 제 4,677,063호에 기재되어 있다. TNF-α 및 인터페론을 포함하는 조성물들은 유럽 특허 제 131789호에 교시되어 있다. 암세포 성장의 억제에서 TNF 및 IL-4의 상승작용은 W092/05805에 기재되어 있다.

유전적 변성은 이 분야에서 공지된 어떠한 방법으로도 실행될 수 있다. 통상적으로 소정 시토킨에 대한 암호화 서열은 다른 조절 요소들과 단백질의 전사 및 번역에 필요한 폴리-A 서열과 함께 표적 세포에서 조직적이고 유도가능하게 활성인 이중 프로모터와 작동적으로 연결된다. 이와 같이 구성된 발현 카세트는 칼슘-인산염 침전, 양이온성 리포솜을 사용하거나 세포 자극성 바이러스성 벡터를 사용하는 삽입과 같은 이 분야에서 공지된 어떤 방법에 의해 세포로 도입된다. 유전적 변성 방법은 앞단락에서 인용한 특허 공보들에 기재되어 있다. 유전적 변성의 한가지 바람직한 방법은 실시예 2에 예시된 바와 같이 적당한 발현 카세트를 포함하는 LXSN 레트로바이러스 벡터의 사용이다. 다른 바람직한 방법은 아데노바이러스 벡터의 사용이다(N. Graf et al. abstract 1994). 간단히, 아데노바이러스 재조합 발현 벡터는 Microbix, Canada에 의해 공급되는 것들과 같은 시중구입 가능한 플라스미드의 유전공학에 의해 제조된다. 적당한 감염조건과 감염의 다양성(MOI)은 β-갈락토시다제와 같은 리포터 유전자를 사용하여 예비 실험에서 결정된 다음 시토킨 트랜스퍼에 사용될 수 있다(Kammersheid et al.). 바이러스 벡터를 사용하는 이점은 벡터가 먼저 복제된 다음 세포의 전체 개체군이 감염되고 변성될 수 있다는 것이다. 따라서 유전적 변성된 시토킨 분비 세포는 세포계로서 확립될 수 있으며, 또는 신선한 백혈구 분리반출제제는 본 발명의 백신에서 사용하기에 바로 앞서 다시 변성된다. 후자의 경우에서 백신의 제조는 관심있는 특정 시토킨에 대해 암호화 영역을 포함하는 바이러스 벡터를 가진 의도된 수혈자에 동종이계인 세포의 개체군을 감염시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 동종이계 림프구의 유전적 변성은 치료받을 피험자로부터의 백혈구와 공배양하는 것에 더하여, 또는 대안으로서 실행될 수 있다. 적당한 시토킨 또는 시토킨 혼합물을 생성할 수 있는 능력의 부여는 동종이계 림프구가 자기 자극되어 피험자 백혈구와 공배양하는 필수조건을 제거한다. 보다 빈번하게는, 두가지 효과가 상보적 또는 심지어 상승적일 수 있으며 바람직하게는 그 양자의 경우 모두일 수 있다. 예를 들면, 그 후 주요 시토킨을 생성하도록 변성된 림프구는 그 다음에 다른 시토킨의 생성을 더 적지만 중요한 양으로 활성화할 수 있는 피험자 백혈구와 공배양된다.

유사한 방법들이 백신 조성물에 사용하기 위해 1차 종양 세포 또는 종양 세포계를 유전적 변성하는데 사

용되어 그들이 시토킨을 생성하도록 할 수 있다. 그러한 변성된 종양 세포의 설명은 실시예 2에 제공된다. 일반적으로, 종양 세포보다는 동종이게 림프구를 유전적 변성시키는 것이 바람직한다; 부분적으로는 종양 세포가 피험자에게 투여되기 전에 통상적으로 조사되기 때문이다. 그럼에도 불구하고 변성하는 종양 세포는 일정한 이점을 줄 수 있다. 특히, 종양 세포는 안정한 세포계를 빠르게 형성한다. 그러한 세포계(특히 통상의 종양 관련 항원을 가진 것)는 다수의 피험자들을 치료하기 위한 백신용 표준 시토킨 분비 세포계를 생성하는데 사용될 수 있다. 실시예 2에 나타난 바와 같이, 종양 세포계는 증식을 중지시키는 방사량 후 소정 시간 동안 유전적 변성으로부터 시토킨의 생성을 계속하도록 생성될 수 있다. 본 발명의 사용을 위해, 이들 성질을 가진 세포계들이 개발되고, 백신으로 조합될 때까지 배양물 내에서 증식되거나 유지된다. 필요수의 종양 세포들은 정확한 양으로 조사되고 동종이게 림프구와 혼합되며; 한편 살아있는 변성 종양 세포의 보존은 부스터 주사를 위해 필요하다면 예비용으로 보존된다.

백신의 조합: 개체군 내 여러 가지 세포들의 생존성을 최대화하거나 그 의도하는 기능을 유지하기 위하여, 투여 시간에 근접하여 백신을 조합하는 것이 일반적으로 바람직하다. 여러 가지 세포 개체군은 미리 수집되고 백신 내 세포 유형 및 기능과 일치되는 정도로 배양 또는 냉동 저장될 수 있다. 새롭게 얻어진 세포가 바람직하다. 혼합 림프구 배양물로부터의 세포 또는 전체 백신도 혼합물로서 냉동 저장될 수 있다. 그러나, MLC를 실행한 다음 환자에게 투여하기 직전에 종양 세포를 첨가하는 것이 바람직하다.

동종이게 세포가 MLC에 의해 자극될 때, 통상적으로 백신 내에 세가지 세포 개체군, 즉 피험자 종양 세포, 자극인자 세포 및 동종이게 반응인자 세포가 있을 것이다. 자극인자 세포의 역할은 주로 시험관내 동종이게 세포를 자극하는 것이며, 최종 백신 조성물에 그들이 존재하게 할 필요는 없을 것이다. 따라서, 이들은 선택적으로 제거될 수 있으나, 이러한 제거가 통상적으로 필요하지는 않다.

세포의 제조, 특히 MLR에서 사용되는, 피험자에서 원치않는 효과를 가질 수 있는 어떤 추가의 성분들을 제거하는 것이 중요하다. 특히, 배양 배지 내의 우태아 혈청, 소 알부민, 또는 다른 생물학적 보충물들은 통상적으로 제거되어 그들에 대한 면역학적인 부작용을 피하도록 한다. 통상적으로 백신의 세포 성분들은 예를 들면, 반복된 완만한 원심분리에 의하여 적당한 약학적으로 적합성인 부형제로 세척된다. 적합성 부형제는 인산염 또는 헤페스와 같은 생리학적으로 적합성인 완충액과 덱스트로스, 생리학적으로 적합성 철, 또는 아미노산과 같은 영양제가 있거나 없는 등장 염수, 및 림프구 개체군, 특히 다른 면역원성 성분이 없는 것들과 함께 사용하기에 적당한 여러 가지 배양 배지들을 포함한다. 알부민 및 혈장 분획과 같은 담체 시약 및 불활성 농축제도 사용될 수 있다. 불활성 생물학적 성분은 그들이 약리학적 제제에 존재하는 정도로, 치료될 종과 동종으로부터 유도되는 것이 바람직하며, 피험자로부터 미리 얻어지는 것보다 더 바람직하다.

본 발명의 백신 조성물은 독립적으로, 또는 종양 관련 항원 및 활성화된 동종이게 세포와 동시에 작용하는 추가의 활성 성분을 선택적으로 포함할 수 있다. 그러한 선택적인 성분들은 한정하는 것은 아니지만 단리 또는 재조합 시토킨, 특히 본 명세서에서 명확하게 언급되는 것들, 보조제 및 다른 세포 종류를 포함한다.

본 발명의 백신 조성물은 합당하고 수용가능한 표준이 백신 그 자체가 수용자에 대한 추가의 주요 병변을 부여하지 않도록 취해진다. 사람에게 대한 투여에 '적당한' 것으로 인정된다. 국소 감염, 경화, 또는 통증, 또는 발열성 반응과 같은 부작용은 피할 수 없을 수도 있으며 일반적으로 그 치료가 상당한 비율의 환자들에게서 그 밖의 점에서 성공적이라면 수용가능하다. 그러나 그 조성물은 a) 특히 동종이게 림프구의 공여자로부터의 비관련된 병리학적 감염성 또는 화학 제제; b) 박테리아 또는 박테리아 독소, 마이코 박테리아, 및 바이러스와 같은, 조직 배양에서 생성되거나 증식될 수도 있는 바와 같은 원치않는 성장; c) 치료중인 피험자로부터 유래하지 않는 종양원성 제제 또는 공격적으로 성장하는 암 세포의 수용불가능한 레벨; 및 d) 원치않는 면역 반응, 특히 아나필락시성 쇼크를 개시하거나 실행하는 성분들이 합리적으 로 없어야 한다. 사용될 수 있는 특정 테스트들은 본 명세서의 실시예 부분에서 열거된다.

본 발명의 조성물들 및 그 부성분들은 단위 투여량 또는 키트 형태로 공급될 수 있다. 본 발명의 키트는 세포질 백신의 여러 가지 성분으로 이루어질 수 있거나 약학적 조성물이 별개의 용기에 구비된다. 용기들은 함께 혼합시 단위 투여량 또는 다중 투여량 형태로 본 발명의 백신을 구성하는 세포 또는 항원을 별도로 함유할 수 있다. 바람직한 키트는 별개의 용기 내에 상기 사람에게 동종이게인 자극된 림프구, 특히 동종이게 림프구 및 자가 백혈구의 공배양으로부터 얻어지는 세포들; 및 사람으로부터의 종양 관련 항원, 특히 사람 또는 그의 자손으로부터의 1차 종양 세포들로 이루어진다. 대안으로, 키트는 한 용기 내의 세포 혼합물과 다른 용기 내의 약학적 부형제로 이루어질 수 있다. 이 범주에서의 바람직한 키트는 제1 용기 내의 치료받을 피험자에 동종이게인 자극된 림프구, 특히 혼합 림프구 배양물로부터의 세포들; 및 제2 용기 내의 약학적 부형제로 이루어진다. 사용자는 피험자로부터의 그들 자신의 종양 세포를 제조하는데 부형제를 사용할 수 있으며, 그 다음 세포들은 피험자에게 투여하기 위하여 자극된 동종이게 림프구와 조합된다. 통상적으로 본 발명의 포장된 조성물과 키트는 조성물의 저장, 제조 및 투여를 위한 지시서를 포함한다.

암 치료에서 세포질 백신의 사용

본 발명의 조성물은 피험자, 특히, 한정하려는 것은 아니지만 사람 피험자에게 투여될 수 있다. 특히 그것은 종양 관련 항원에 대한 면역 반응을 알아내는데, 또는 암을 치료하는데 유용하다.

치료의 목적: 백신을 투여하는 한가지 목적은 면역 반응을 알아내는 것이다. 면역 반응은 체액 또는 세포질 성분, 또는 그 양자를 포함할 수 있다. 체액 면역성은 치료되는 개체로부터의 혈청 샘플 내 항체 레벨에 대한 표준 면역분석에 의해 결정될 수 있다.

세포질 면역성은 암의 면역 감시에서 중요한 역할을 하는 것으로 생각되기 때문에 세포질 면역 반응을 생성하는 것은 종종 치료의 특정 목적이 된다. 여기서 사용되는 바와 같이, '세포질 면역 반응'은 T세포를 수반하는 반응이며, 시험관내 또는 생체내에서 관찰될 수 있다.

일반적인 세포질 면역 반응은 백신 투여후 피험자로부터 채취된 세포내의 T세포 증식 활성(특히 PBL)으로서 측정될 수 있다. 바람직하게는 피험자로부터 유도된 불활성 종양 세포는 자극인자로서 사용된다.

PHA와 같은 비특이적인 미토겐은 양성 콘트롤로서 작용하고; 비관련 자극인자 세포와의 배양물은 음성 콘트롤로서 작용한다. 적당한 기간(통상적으로는 5일)동안 PBMC와 자극인자와의 배양후 [^3H] 티미딘 포함이 측정된다. 원한다면, T세포의 서브세트가 증식하고 있는 것의 측정은 흐름 세포계산기를 사용하여 실행될 수 있다. T세포 세포독성(CTL)도 측정될 수 있다. 이 테스트에서, 피험자로부터의 풍부한 T세포 개체군은 표준 ^{51}Cr 방출 분석에서 작동체(effector)로서 사용된다. 종양 세포는 60분 동안 37°C 에서 약 $200\ \mu\text{Ci}$ 의 $\text{Na}_2\ ^{51}\text{CrO}_4$ 로 표적으로서 방사표지되고 이어서 세척된다. 그 다음 T세포와 표적 세포($\sim 1 \times 10^4$ /웰)는 96-웰 U자형 바닥 플레이트에서 여러 가지 작동체 대 표적 비율로 조합된다. 플레이트는 $100 \times \text{g}$ 에서 5분 동안 원심분리되어 세포 접촉을 개시하고, 4-16시간 동안 37°C 에서 5% CO_2 로 배양된다. ^{51}Cr 의 방출은 상정액에서 측정되고 T세포의 부재하에 배양된 표적(음성 콘트롤) 또는 0.1% TRITONTM X-100(양성 콘트롤)과 비교된다.

백신을 투여하는 다른 목적은 신생물 질환, 특히 암의 치료를 위한 것이다. 일반적으로 백신의 이로온 효과는 적어도 부분적으로 면역에 의해 매개되나, 면역 반응이 달리 요구되지 않는 한 조성물 및 치료방법이 본 발명의 범주 내에 들도록 적절히 긍정적으로 설명될 필요는 없다.

적당한 피험자: 본 발명의 조성물은 사람과 비사람 척추동물에 투여하는데 사용될 수 있다. 이것들은 특히 잡종 개체군과 특히 자발적인 종양에서 이전에 이용가능한 조성물을 능가하는 이점을 가진다. 수의학적 응용은 본 발명의 범주 내에서 의도된다.

세포질 백신은 사람 피험자에서 테스트되었고, 특히 사람 치료에 적당하다. 백신은 숙련의의 결정에 따라서 어떠한 사람 피험자에게 제공될 수 있다. 통상적으로 피험자는 암을 갖거나 암 전개의 실질적인 위험에 있는 자일 것이다.

치료를 위한 통상적인 사람 피험자들은 임상 기준에 의해 구별될 수 있는 두가지 군으로 이루어진다. '진행된 질환' 또는 '고 종양 부담'이 있는 환자들은 임상적으로 측정가능한 종양을 가진 자들이다. 임상적으로 측정가능한 종양은 종양 질량에 기초하여 검출될 수 있는 것이다(예를 들면 촉진, MRI, CAT스캔, X-선 또는 라디오스티그라피에 의한; 그 자체에 대한 양성 생화학적 또는 조직병리학적 마커는 이 개체군을 동정하기에 불충분함).

본 발명에서 구현되는 백신 조성물은 환자의 상태를 완화시키려는 목적으로 진행된 질환을 가진 환자에게 투여된다. 이상적으로 종양 질량의 감소가 그 결과로서 일어나지만, 어떤 임상적인 개선이 이점을 구성한다. 임상적 개선은 진행의 감소된 위험 또는 비율 또는 종양의 병리학적 결과의 감소를 포함한다.

적당한 피험자의 제2 군은 '보조 군'으로서 이 분야에 알려져 있다. 이들은 암 병력이 있지만, 다른 방식의 치료에 반응을 보인 개체들이다. 선행 치료는 (한정하는 것은 아니지만) 외과적 절제, 방사선 치료, 통상적인 화학요법, 및 다른 방식의 면역요법을 포함할 수 있다. 그 결과, 이들 개체들은 상기 정의에 의한 임상적으로 측정가능한 종양을 갖지 않는다. 그러나 이들은 원래의 종양 부위 근처에, 또는 전이에 의한 이 질환의 재발 또는 진행에 대한 위험이 있는 것으로 추정된다. 보조 군은 고 위험 및 저 위험 개체들로 더 세분화될 수 있다. 세분화는 초기 치료 전후에 관찰되는 특징에 기초하여 이루어진다. 이들 특징은 임상 분야에 공지되어 있으며, 각기 다른 암에 대해 적절히 정의된다. 고 위험 서브군의 통상적인 특징은 종양이 이웃 조직을 침입하거나, 림프절의 개입을 나타내는 것이다.

본 발명에서 구현되는 백신 조성물은 주로 재발에 대한 예방 측정으로서 항암 반응을 밝혀내기 위하여 보조 군 내 환자들에게 투여된다. 이상적으로, 조성물은 암의 재발을 지연시키거나 더욱 바람직하게는 재발의 위험을 감소시킨다(즉, 치료율을 개선한다). 그러한 매개변수들은 다른 환자 개체군과 다른 방식의 치료와 비교하여 결정될 수 있다.

물론, 이들 두 환자 군간의 교차(crossover)가 일어나며, 본 발명의 백신 조성물은 적당한 어떠한 시간에서도 투여될 수 있다. 예를 들면, 치료는 고 종양 부담을 가진 환자의 통상적인 치료 전 또는 그 도중에 실행될 수 있으며 종양이 임상적으로 검출불가능하게 된 후에도 계속된다. 치료는 초기에 보조 군에 있지만 재발의 신호를 나타내고 있는 환자에게 계속될 수 있다.

본 발명의 조성물과 방법에 의해 치료될 수 있는 종양의 예는 체관 선암과 같은 체장 종양; 소형 및 대형 세포 선암, 편평상피암, 및 세기관지암과 같은 폐 종양; 상피선암 및 그것의 전이암과 같은 결장 종양; 및 간암 및 담관세포암과 같은 간 종양을 포함한다. 또한, 관 및 소엽 선암과 같은 유방 종양; 자궁경의 편평상피선암, 자궁 및 난소 상피 선암과 같은 부인 종양; 전립선암과 같은 전립선 종양; 천이성 편평세포암과 같은 방광 종양; 결절성 또는 확산성 B 또는 T세포 림프종, 형질세포종 및 만성 또는 급성 백혈병과 같은 RES계의 종양; 악성 흑색종과 같은 피부 종양; 및 연조직육종 및 평활근육종과 같은 연조직 종양을 포함한다. 특히 관심의 것은 성세포종, 회돌기교종, 뇌실상의세포종, 수아세포종, 및 원시 신경 외배엽 종양과 같은 뇌 종양이다. 이 항목에는 신경교종, 신경교아종, 및 신경교육종이 포함된다.

개체의 면역 상태는 다음 중 어느 것일 수 있다: 개체는 조성물 내에 존재하는 일정한 종양 관련 항원에 대하여 면역적으로 타고날 수 있으며, 이 경우 조성물들은 항종양 반응의 성숙을 개시하거나 촉진하는데 제공될 수 있다. 개체는 현재는 항종양 면역성을 발현하지 않을 수 있지만 면역학적 메모리, 특히 백신에 포함된 종양 관련 항원에 관한 T세포 메모리를 가질 수 있는데, 이 경우 조성물은 메모리 반응을 자극하기 위해 제공될 수 있다. 또한 개체는 백신에 포함된 종양 관련 항원에 대해 활성 면역성(체액성 또는 세포질 면역성, 또는 양자)을 가질 수 있으며, 이 경우 조성물들은 반응을 유지하거나 촉진하거나 성숙시키거나, 또는 면역계의 다른 부분을 보충하기 위해 제공될 수 있다. 환자는 적어도 부분적으로 면역적합성이어서 병리학적 범주의 이식물 대 숙주 반응을 최소화하도록 해야 한다. 그러나, 암 환자는 종종 어느 정도의 면역억제를 나타내며, 이것은 조성물이 안전하고 효과적으로 제공될 수 있는 한, 본 발명의 조성물의 사용을 반드시 방지하는 것은 아니라고 인정된다. 환자에게서의 면역적합성은 숙주 공급원일 수 있거나 동시 인입면역전달 치료 방법에 의해 제공될 수 있다.

투여 방식 및 투여량: 본 발명의 조성물은 어떠한 부위에서, 특히 1차 종양으로부터 '말단' 또는 '먼' 부위에서 피험자에게 투여될 수 있다.

약학적 조성물의 투여 경로는 비경구, 근육내, 피하, 내피, 복강내, 비강내, 정맥내(내재하는 카테테르를 경유하는 것을 포함함), 수입성 림프관 경유, 또는 치료중인 종양 및 환자의 상태의 관점에서 적당한 다른 경로에 의할 수 있다. 투여 후 수 일 동안에 일어날 수 있는 저 레벨 감염 또는 경화 때문에 비교적 비침입성의 방법이 바람직하며, 특히 피하 경로가 바람직하다.

제공되는 투여량은 면역 반응의 자극, 또는 본 명세서 내 다른 곳에 정의된 바와 같은 암 치료인, 원하는 치료 반응에 대해 가져오는 '효과적인' 양이다. 본 발명의 약학적 조성물에 대해서, 통상적으로 효과적인 양은 동종이계 림프구와, 존재한다면, 치료중인 피험자로부터의 종양 세포와 다른 세포들을 포함하여 약 10^5 내지 10^{11} 세포 범위 내에 있다. 바람직하게는 약 10^6 내지 10^{10} 세포 범위가 사용되며; 보다 바람직하게는 약 1×10^7 내지 2×10^9 세포 범위가 사용되며; 더욱 바람직하게는 약 5×10^7 내지 2×10^9 세포 범위가 사용되며; 더욱 더 바람직하게는 약 1×10^8 내지 1×10^9 세포 범위가 사용된다. 원하는 효과를 달성하기 위하여 조합하여 사용하는 경우 다중 투여량은 각기 효과량의 정의 내에 있다.

세포질 백신의 여러 가지 성분은 '효과적인 조합' 내에 존재하며, 이것은 효과적이기에 충분한 양의 백신에 대한 각각의 성분이 있는 것을 의미한다. 바람직하게는, 적어도 약 10^6 , 보다 바람직하게는 적어도 약 10^7 이고 10^{10} 동종이계 림프구 이하로 존재한다. 바람직하게는, 적어도 약 10^5 , 보다 바람직하게는 적어도 약 10^6 , 더욱 바람직하게는 약 10^7 이고 일반적으로는 10^8 미만, 통상적으로는 5×10^7 종양 세포, 종양 세포 자손, 또는 그것의 등가물이 존재한다. 자가 유래 또는 제 3자 백혈구가 존재한다면, 바람직하게는 약 10^5 내지 10^8 이다. 동종이계 림프구 대 자극인자 백혈구의 비율은 일반적으로 1:1 내지 100:1이고, 보통 약 5:1 내지 약 25:1, 통상적으로는 약 10:1이다. 그러나, 백신이 전체적으로서 효과적인 한 어떠한 수의 성분 세포 또는 다른 구성성분이 사용될 수 있다. 이것은 또한 동종이계 림프구 및 자가 유래 백혈구가 투여 전에 공배양되는지와 같은 백신을 제조하는데 사용되는 방법에 의존한다.

조성물의 효율성은 추정상 일단 피험자에게 투여되면 자극된 림프구와 종양 항원의 근접성에 관련있다. 투여 전에 성분들을 예비 혼합하는 것이 가장 편리한 한편, 피험자의 대략 동일한 주변에 분리 투여함으로써 유사한 효과 잠재적으로 달성될 수 있다는 것이 용이하게 인식되어진다. 따라서, 본 발명의 구체에는 성분들이 예비 혼합되는 조성물들 뿐만 아니라 수술 또는 치료에 의한 사람의 치료 방법, 특히 피험자의 종양을 치료하거나 항 종양 반응을 이끌어내기 위해 동시, 분리 또는 순차 사용을 위하여 자극된 림프구(예를 들면, 사람 환자에게 동종인 동종 활성화된 림프구) 및 종양 항원(예를 들면, 사람 환자 또는 그 자손으로부터의 1차 종양 세포)를 함유하는 조합된 제제를 포함한다.

본 발명의 약학적 조성물은 면역 반응을 발생하거나 피험자의 암 치료에 관련된 다른 요법 다음에, 또는 앞서서, 또는 그 대신에, 또는 조합하여 제공될 수 있다. 예를 들면, 피험자는 화학 요법, 방사 요법 및 면역 요법과 채용 트랜스퍼의 다른 형태에 의해 미리 또는 동시에 치료될 수 있다. 그러한 양태가 사용되는 경우, 바람직하게는 그것은 한 방식으로 또는 투약이 본 발명의 조성물의 면역원성을 방해하지 않는 시간에서 사용된다. 또한 환자는 면역 반응을 자극하기 위하여 다른 백신 또는 다른 조성물이 투여될 수 있다. 그러한 대안의 조성물들은 시토킨 발현 종양 세포계를 포함하여, 종양 항원 백신, 종양 항원을 암호화하는 핵산 백신, 항 이디오타이프 백신, 및 다른 유형의 세포질 백신을 포함할 수 있다.

본 발명의 일정한 구체에는 항 종양 면역 반응을 제공하도록 돕는 다른 방법과 연관하여 여기서 기술된 세포질 백신 조합의 투여로 이루어지는 조합 요법과 관련있다. 한가지 바람직한 조합 요법에서, 환자는 자극된 동종이계 림프구 및 자가 유래 종양 세포로 이루어지는 조성물로 종양으로부터 먼 부위에서 치료 전, 동안 또는 후에 자극된 동종이계 림프구의 종양내 이식이 제공된다. 다른 바람직한 조합 요법에서, 환자는 자극된 동종이계 림프구 및 자가 유래 종양 세포로 이루어진 조성물로의 치료 전, 동안, 또는 후에 다른 세포질 백신 조성물로 종양으로부터 먼 부위에서 치료된다. 이 목적을 위한 바람직한 다른 조성물은 유전적으로 변성되어 상승된 레벨로 시토킨을 발현하는 동종이계 세포(특히 종양 세포)로 혼합된 자가 유래 종양 세포로 이루어진다. 복수의 다른 조성물 또는 투여 방식이 치료의 과정에 걸쳐서 사용된 경우, 치료의 각 요소의 순서와 타이밍은 면역 자극 또는 항 종양 효과를 최적화 하도록 선택된다.

본 발명의 조성물의 투여 타이밍은 숙련의 판단 내에 있으며, 환자의 임상 상태, 치료 목적 및 또한 투여되는 동시 요법에 의존한다. 통상적으로, 환자 관리의 적당한 시간에서, 첫 번째 투약이 제공되며, 환자는 면역 또는 임상 반응, 종종 그 양자를 위해 모니터링된다. 면역 모니터링의 적당한 수단은 반응인자로서 환자의 PBL과 자극인자로서 1차 종양 세포를 사용하는 일 방식 MLR을 포함한다. 또한 면역 반응은 주사 부위에서 지연된 감염 반응에 의하여 명백하게 될 수 있다. 종양 모니터링의 적당한 수단은 종양 종류 및 특성에 따라서 선택되며, CT 스캔, 자기 공명 영상(MRI), 적당한 조영제로의 방사선 요법, 순환하는 종양 마커 항원의 모니터링, 및 피험자의 임상 반응을 포함할 수 있다. 원하는 효과가 달성될 때까지, 월, 또는 주 단위로 추가의 투약이 제공될 수 있다. 그 후, 특히 면역 또는 임상 이점이 가라앉는 것으로 나타날 때 추가의 부스터 또는 유지 투약이 필요에 따라서 제공될 수 있다.

세포질 백신의 다중 투약이 동일 환자에게 제공될 때, 백신 내 동종이계 림프구가 항 이인자형(anti-allotype) 반응을 발생할 수도 있는 가능성에 주의를 기울여야 한다. 복수의 공여자로부터의 동종이계 세포의 혼합물의 사용과 각 투약 내 상이한 동종이계 세포 개체군의 사용은 항 이인자형 반응의 출현을 최소화하도록 도울 수 있는 방법들이다.

치료 과정 중에, 환자는 주사 부위에서의 부작용, 또는 발열성 반응과 같은 일반적 부작용의 통상의 근거에 기초하여 평가된다. 부작용은 적당히 유지하는 임상 치료로 관리된다.

하기 실시예는 이 분야의 통상의 기술을 가진자에게 더 지침이 되도록 제공들에 반응한다는 것을 확인한다.

실시예

실시예1: 혼합 림프구의 이식물로의 암 치료

본 실시예에는 혼합 림프구 배양에서 자극된 동종이계 림프구를 진행된 뇌암의 종양층으로 이식하는 사람 연구를 기술한다. 그 결과 국소 환경은 자극된 림프구 및 어떤 잔류 자가 종양 세포로 이루어졌다. 이 치료는 치료된 피험자의 일부 중 암 진행을 제한하거나 보류하고 생존성을 개선하는데 있어서 효과적이었다. 동시적인 관찰은 본 발명, 즉 피험자 자신의 항 종양 반응의 명백한 활성 개선을 뒷받침한다.

임상 시험을 재발하는 고도의 성세포종을 가진 환자에게 실행하여 혼합 림프구 배양에 의한 환자 동종항원에 대해 활성인 동종이계 림프구의 직접 종양내 이식과 관련된 타당성, 내성 및 독성을 평가하였다. 결과는 재발하는 고도의 신경교종을 가진 환자에서 MLC 활성화 동종이계 림프구의 직접 종양내 이식이 타당하고 안전하며 임상 이점을 제공하는 것으로 나타난다고 가리킨다.

생검에 의해 고도의 성세포종(Daumas-Duport grade III 또는 IV)로 판명된 아홉 명의 환자를 표준 치료 후 이들의 성세포종의 재발 또는 진행 후 MLC 활성화 동종이계 림프구의 종양내 이식을 위해 무작위로 선발하였다. 시험은 The Institutional Review Board of the Hospital of The Good Samaritan, Los Angeles, CA가 승인하였다. 모든 환자들은 통지된 승인서에 서명하였다. 환자 연령은 24세에서 67세까지(평균 50세)였으며 4명의 남성과 5명의 여성이었다. 여덟 명의 환자는 등급IV 성세포종(신경교아종 다형, GBM)을 가졌고 한 환자는 등급III 성세포종(퇴행성 성세포종)을 가졌다. 모든 환자들은 선행 디벨킹 수술, 방사선 요법, 화학 요법 및 면역 요법(자가 LAK 세포 및 IL-2)을 실패하였으며, 점진적으로 성장하는 종양을 가졌다. 카르노프스키 퍼포먼스 스코어(Karnofsky performance score)는 면역 요법시에 60 내지 80점(평균 72.6)이었다. 환자 특성은 표1에 열거한다.

[표 1]

환자	연령	성별	Dx*	부위**	연구전 치료요법	KPS****
BTP-001	67	m	AA	LTL	RT,CT,GK(4mo)	80
BTP-002	53	f	GBM	LFL	RT,GK(0.5mo)	70
BTP-003	40	m	GBM	RTL	GK,RT,CT,GK,ITx,GK(0.5mo)	70
BTP-004	45	f	GBM	RTL	DBS,RT,CT,RT,GK(2mo)	60
BTP-005	61	m	GBM	LOL	DBS,RT,GK,GK(0.5mo)	70
BTP-006	24	f	GBM	ROL	CT,GK(7mo)	80
BTP-007	56	m	GBM	LTL	RT,DBS,CT,GK(1.5mo)	70
BTP-008	48	f	GBM	LOL	RT,CT,GK(0.5mo)	80
BTP-009	51	f	GBM	RPL	DBS,RT,CT,GK(0.5mo)	70

* GBM=다형 성세포종(성세포종, Daumas-Duport Grade IV); AA=퇴행성 성세포종(성세포종, Daumas-Duport Grade III).

** LFL=좌측 전두엽; RFL=우측 전두엽; RPL=우측 두정엽; LTL=좌측 측두엽; ROL=우측 후두엽; LOL=좌측후두엽.

*** DBS=디벨킹 수술; RT=외부 빔 방사 요법; CT=화학요법; ITx=면역요법전(LAK cells+IL-2); GK=감마 나이프 요법(동종 이식전 월)

**** KPS=카르노프스키 퍼포먼스 스코어(면역요법시)

제제 규모의 혼합 림프구 배양을 다음과 같이 실행하였다. 이식 3일 전에 유전적으로 비관련의 공여자를 동정하고 백혈구 분리 반출하여 원하는 수의 백혈구를 얻었다. 정해진 대로 대략 2.5시간 동안 백혈구 분리 반출하여 10×10^9 까지의 단핵 세포를 얻었다. 동시에 혈액 유닛을 환자로 부터 얻고 원심분리에 의하여 비피 코트를 얻었다. 그 다음 공여자 및 환자로 부터 단핵 세포를 FICOLL™-Hypaque 구배(밀도=1.077)에 걸쳐 원심분리하여 얻었다. 환자 단핵세포를 1시간동안 37°C에서 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 미토마이신-C(MC, Mutamycin)으로 처리하여 불활성화시키고 세척하여 과잉의 약제를 제거하였다. 그 다음 공여자 단핵 세포를 AIM V 배지(총 세포 밀도= 2×10^6 세포/ ml)에서 10:1 내지 20:1의 비율로 MC 처리된 환자 단핵 세포와 혼합하였다. 세포를 플라스틱 배양 백(Baxter)으로 분산시키고 37°C에서 가습한 5% CO_2 /95% 공기 인큐베이터에 넣었다. 3일 배양후 생육가능한 세포를 원심분리에 의해 제거하고, 계수하고, 4-5 ml 의 멸균 환자 혈장에 현탁하고 수술실로 옮겼다.

이식시에 글루콘산 칼슘을 초기 덩어리에 가하였다. 그 다음 덩어리를 멸균 금속 접시에서 세분화하였다. 종양층으로 둘러싸인 공동을 형성하는 것이 가능한 곳에서 종양을 절제하였다. 자극된 동종이계 림프구를 함유하는 잘게 썬 덩어리를 공동 내에, 그리고 종류에 관계없이 남아있는 종양 내에 또는 그 옆에 넣었다. MLC 활성화된 동종이계 림프구의 종양내 이식물과 관련된 임상 독성은 표 2에 나타난다. 각 투여량 레벨에서 어떤 환자는 1급 및 2급 독성을 경험하였다. 그러나 이들은 일시적인 효과였으며, 이들이 면역 요법 또는 수술 반응이었는지는 불명확하다. 각 투여량 레벨에서의 대뇌 부종의 정도는 수 개월까지 유지되는 덱사메타손의 중간 투여량(8 내지 24 $\text{mg}/\text{일}$)의 투여에 의하여 조절하였다.

[표 2]

환자 I.D.	세포 투여량	덱사메타손 투여량 (mg/일)			
		1주	1개월	3개월	6개월
BTP-001	2×10^9	24	20	6	16
BTP-002	2×10^9	16	24	96	--
BTP-003	2×10^9		15	48	96
BTP-004	4×10^9	16	2	4	16
BTP-005	4×10^9	16	24	--	--
BTP-006	4×10^9	8	6	8	8
BTP-007	6×10^9	16	14	24	--
BTP-008	6×10^9	24	14	14	8
BTP-009	6×10^9	9	16	24	10

독성은 6×10^9 세포까지의 세포이식물의 더 높은 투여량에서 증가하는 것으로 나타나지는 않았다. 공여자로부터 림프구를 얻을 때 물리적인 한계로 인하여 이식된 최대 투여량은 6×10^9 세포를 초과하지 않았다.

임상 반응은 세가지 항목: a) 최대 증강 직경의 삼축 측정과 함께 콘트라스트 증강을 사용하는 연속 MRI 스캔; b) 카르노프스키 퍼포먼스 스코어; 및 c) 생존률에 의해 평가하였다. 시험에 등록된 9명의 환자에 대한 연속 MRI 스캔으로부터의 종양 부피는 제 1도에 나타난다. 동종이식물에 대한 종양 반응의 MRI 증거(증강된 가돌리늄에 의해 평가된 바의, T1 증강 MRI 영상)는 9명의 환자 중 3명에게서 나타났다. 10 내지 130주의 관찰 기간에 걸쳐서 두 명의 환자에게서는 완전한 종양 퇴행이 있었으며 한 명의 환자에게는 부분적인 종양 퇴행(>50% 수축)이 있었다. 다섯 명의 환자에게서 연속 MRI 스캔은 8 내지 20주의 관찰 기간에 걸쳐서 필수적으로 종양 성장이 없는, 종양 크기의 안정화를 나타내었다.

단지 한 환자만이 동종이식후 진행성 종양 성장을 나타내었다. 면역 요법시부터 측정된 각 투여량 레벨에서 환자에 대한 전체 평균 생존률은 2×10^9 세포(18 내지 24주 범위)에서 24주, 4×10^9 세포(10 내지 135주 범위)에서 64주, 및 6×10^9 세포(20 내지 140주)에서 72주였다. 중요하게는 두 장기간 생존자가 있었는데 한명은 4×10^9 세포 투여량(BTP-006, >125주)에서였고, 다른 한 명은 6×10^9 세포 투여량(BTP-008, >135주)였다.

종양내 세포이식물과 관련된 임상 독성은 표 3에 나타낸다. 독성은 다음 기준에 따라서 등급하였다: 0등급=두통 없음, 열 없음, 발작 없음; 1등급=약한 두통; 2등급=두통, 약한 부종(MRI); 3등급=심한 두통, 보통의 부종(MRI); 4등급=심한 두통, 심한 부종(MRI), 신경 변화. 비가역성 3등급 또는 4등급 독성은 투약 한계였다.

[표 3]

환자 I.D.	세포 투여량	관측치 독성	생존률(주)*	반응**
BTP-001	2×10^9	1급	77	SD
BTP-002	2×10^9	2급	31	PR
BTP-003	2×10^9	1급	113	SD
BTP-004	4×10^9	2급	75	SD
BTP-005	4×10^9	1급	75	SD
BTP-006	4×10^9	2급	184+	CR
BTP-007	6×10^9	2급	130	SD

BTP-008	6×10^9	2급	160+	CR
BTP-009	6×10^9	2급	48	PD
* 초기진단시로부터의 생존률(주). +현재생존환자				
**면역요법에 대한 반응. CR=완전 반응;PR=부분 반응;SD=안정한 질환				
PD=진행성 질환				

각각의 이들 환자들을 80(예비이식) 내지 100의 카르노프스키 퍼포먼스 스코어로 업그레이드하였다. 환자 BTP-006의 MRI 스캔은 24개월에 걸쳐서 계속된 종양 퇴행을 나타내었다. 환자 BTP-008의 연속 MRI 스캔도 24개월 관찰 기간에 걸쳐서 종양 크기의 느린, 영구적인 감소를 나타내었다.

이식 부위의 조직학은 이식한지 60일후에 사망한 환자에게 실행된 부검후에 결정하였다. 면역조직화학은 10% 중성 완충 포르말린에 고정시킨 조직섹션에 대해서 실행하였다. 5 μ m 섹션을 실리콘화 유리슬라이드 상에 제조하고 색원체로서 DAB로 아비딘-비오틴 복합체 방법을 구성하는 TECHMATE™ 자가 면역염색시스템 (Biotech solutions, Inc., Santa Barbara, CA)을 사용하여 상이한 세포질 항원에 대한 1차 항체로 염색 하였다. 사용된 1차 항체는 anti-CD68(HAM 56, 매크로파지), L26 (CD20, B세포), UCHL-1(T세포) 및 GFAP (교세포)를 포함하였다. 면역염색후 조직 섹션을 헤마톡실린으로 대비염색하고 면역양성 세포에 대해 현 미경으로 실험하였다. 다른 감염세포 유형의 동정과 조직 과상의 정도를 표준 헤마톡실린/에오신 염색조직섹션을 사용하여 조직학적 기준에 의해 나란히 결정하였다.

동종이식물을 배치한 수술부위 근처에 낭포성 공동을 발견하고 단지 피브린과 조직화하는 혈액 덩어리로 채워넣었다. 현미경으로, 잔류 림프성 세포의 증거는 나타나지 않았다. 그러나 이식부위로부터 1.5cm 떨어진, 종양의 주변부로부터 채집한 섹션은 CD 68+ 매크로파지 및 산재된 림프구에 의한 종양 조직의 대량 침입과 확대된 종양 괴사의 증거를 나타내었다. 흥미롭게도, 수많은 CD68+ 매크로파지(소교세포)를 동정 하였는데, 정상 뇌 선세포 조직내 인접 혈관으로부터 사멸하는 종양조직의 영역으로 명백히 이동하였다.

이 연구는 MLC 활성화된 동종이식 림프구의 종양내 이식이 타당하고 환자가 잘 견디어낸다는 것을 나타낸다. 동종이식과 관련된 독성은 때때로 두통과, 저급열 및 글루코코르티코이드에 의해 조절되었던 대뇌 부종을 포함하였다. 장기간 생존환자는 이식후 여러달 동안 스테로이드가 남아있었지만 매우 낮은 유지 투약으로 궁극적으로 감소되었다. 방법은 연속 MRI 스캔에 대해 언급된 종양 반응에 의하여 결정된 바와 같은 상당수의 반응과, 가장 중요하게는, 연장된 환자 생존률과 관련되었다.

실시예 2: 시토킨을 발견하기 위한 세포의 유전적 변성

본 발명의 일정한 구체예에서, 한가지 세포 개체군 또는 다른 것은 상승 레벨로 시토킨을 발현하도록 유전적 변성된다. 본 실시예는 세포 개체군이 어떻게 시토킨을 발현하도록 유전적 변성되는지의 두가지 비 한정하는 예시를 제공한다. 대안으로 예시는 Maloney 쥐 백혈병 바이러스로부터 유도된 pLXSN 또는 LNCX 레트로바이러스 벡터를 사용한다. 유전적으로 변성된 세포는 세포분할 또는 조사후에도 안정한 양태로 원하는 생성물을 발현하도록 생성된다.

IL-4 분비 세포계: 사람 난소암 세포계를 IL-4 암호화 구조물로 이루어진 레트로바이러스 벡터를 사용하여 유전적으로 변성하여 IL-4를 분비시켰다. 세포계는 안정하였으며 불활성화량의 조사후에도 IL-4 생합성을 할 수 있었다. 세포계는 MHC 클래스 I과 Her-2/neu 항원을 발견하지만 MHC 클래스II 항원, ICAM-1, CA-125 또는 IL-4 리셉터는 발현하지 않는다.

그러한 세포계의 생성에 유용한 기술의 세부 사항은 어디엔가에 기술되어 있다(Santin et al. 1995b & c). 간단히, 사람 난소 세포계 UCI-107은 난소의 1차 단계III 장악성 유도상 선암을 가진 사전에 미치료된 환자로부터 확립하였다. UCI-101 및 UCI-107 세포계는 이미 Gamboa-Vujicic et al.에 의해 특징지어졌으며 친절하게도 Dr. Alberto Manetta (University of California, Irvine Medical Center)가 제공하였다. 세포는 RPMI 1640(Gibco Life Technologies), 10% 우태아 혈청(FBS, Gemini Bioproducts, Calabassas, CA) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신 술페이트(Irvine Scientific, Santa Ana, CA)를 함유하는 완전 배지(CM)내에 37°C, 5% CO₂에서 유지하였다.

레트로바이러스 벡터는 다음과 같이 구성하였다: pLXSN 플라스미드는 Dr. A. Dusty Miller(Fred Hutchinson Cancer Center, Seattle, WA)가 쾌히 제공하였다. Maloney 쥐 백혈병 바이러스(MMLV)로부터 유도된 이 플라스미드는 네오포스포트랜스페라제 유전자를 함유하며 그 구성 발현은 SV40 엔헨서/프로모터에 의해 수행되고, 집적된 벡터의 5' 레트로바이러스 LTR은 삽입된 유전자의 발현을 수행한다. 사람 IL-4 cDNA는 Okaïama 및 Berg pCD 클로닝 벡터내 ATCC로부터 얻었으며 BamHI 제한효소를 사용하여 절제하였다. 그 다음 pLXSN의 다중 클로닝 영역내 BamHI 제한 부위로 클로닝하였다. cDNA의 적당한 배향은 진단 엔도뉴클레아제 분해에 의하여 결정하였다. 일단 구성되면, 그후 DNA를 CsCl 구배 밀도 원심분리에 의하여 정제하였다.

정제된 레트로바이러스 플라스미드 DNA(LXSN/IL-4)를 사용하여 인산칼슘법에 의해 쥐 내사시 패키징 세포계 GP-E86을 형질도입하였다. 그후 이들 세포로부터의 48시간 상정액을 사용하여 쥐 양향성 패키징 세포계 PA317을 감염시켰다. PA-317-패키징 세포계를 ATCC로부터 얻었으며 CM에 유지시켰다. 형질도입된 PA317세포를 G418 내성에 의해 선별하였다. 단리된 클론을 확장하고, 분액하고 마스터 셀뱅크에서 액체 질소하에 동결시켰다. 감염성 비적합성 레트로바이러스를 함유하는 형질도입된 PA317 클론으로부터의 상정액을 사용하여 사람 암종 세포계를 감염시켰다. 간단히, 사람 난소암 세포계를 100mm 조직 배양 접시내에서 1×10^6 세포의 밀도로 10ml CM에서 접종하고 4시간동안 37°C, 5% CO₂에서 배양하여 고착시켰다. 배양 후 배지를 흡입하고 인산완충염수(PBS)중의 2% 폴리브렌 5ml (Aldrich Chemical Co. Inc, Milwaukee, W

1)로 대체하였다. 37℃, 5% CO₂에서 30분후, 10ml의 레트로바이러스 상장액을 가하고 레트로바이러스 중재 유전자 전사를 방출 배양에 의해 달성하였다. 그 다음 상장액을 흡입하고 CM으로 대체하였다. CM에서 37℃, 5% CO₂에서 추가로 48시간 배양한 후, 형질도입된 클론의 선택을 0.075% G418을 함유하는 CM내 배양에 의하여 달성하였다(geneticin, Gibco Life Technologies). 클론을 14일후 멸균 8×8 8mm 클로닝 실린더(Belco Glass, Inc., Vineland, NJ)를 사용하여 단리하고 3주동안 G418을 함유하는 CM에서 확장하였다. 부모 세포계를 G418내성에 대한 양성 컨트롤로서 사용하였다. G418내 클론 선택후 형질도입된 세포계를 확장 및 연구를 위해 CM으로 복귀시켰다.

세포를 CM내에 0.5×10^6 세포/10ml의 밀도로 100mm 조직배양접시에서 확립하였다. 세포 카운트를 매 12, 24, 48, 72 및 96시간 실행하고 생존가능한 세포의 수를 트리판 블루 배제를 사용하여 결정하였다. 실험을 실행하여 비충질도입된(부모) 종양세포계와 형질도입된 종양 세포계의 성장을 비교하고 시간내의 시토킨 생성의 레벨을 평가하였다. 상장액을 수집하고 -20℃에서 동결하고(시토킨 레벨의 차후 ELISA 평가를 위해) 배양접시를 트립신화하여 세포 카운트와 생존가능성을 결정하였다.

부모 IL-4 형질도입체 및 벡터 컨트롤 세포를 100mm 조직 배양 접시(Corning)에서 10ml CM중의 1×10^6 세포/ml 밀도로 접종하였다. 37℃, 5% CO₂에서 48시간 배양후, 상장액을 흡입하고 1,500rpm에서 10분동안 원심분리하여 세포가 없게 한 다음 -20℃에서 저장하였다. 그 다음 시중구입가능한 키트(Research & Diagnostic Systems, Minneapolis, Minnesota)를 사용하여 IL-4 농도를 ELISA에 의해 결정하였다. 표 4는 유전적으로 변성된 사람 장액성 유두상 난소암 세포의 개체 클론으로부터의 인터루킨-4의 분비 레벨을 나타낸다.

[표 4]

UCI-101 클론		UCI-107 클론	
명칭	IL-4 pg/mL	명칭	IL-4 pg/mL
A	140	A	32
B	(검출불가능)	B	83
C	49	C	90
D	40	D	35
E	87	E	1300
G	93	F	30
H	38	G	80
I	93	H	513
L	42	L	170
M	32	M	297
N	(검출불가능)	N	265
O	(검출불가능)	P	330
		Q	615
		X	79
		Y	68
평균	51.1	평균	265.8

예상되는 바와 같이, 각 부모 세포계 및 벡터 단독으로 형질도입된 세포계 및 벡터 단독으로 형질도입된 세포들은 검출가능한 레벨의 IL-4를 생성하지 않았다. UCI 107E IL-4 GS로 명명된 가장 좋은 IL-4 생성 클론을 확장하고 더 이상의 테스트와 광범위한 특징화를 위해 마스터 셀 배양을 형성하는데 사용하였다.

부모 세포계 UCI 107은 시험관내에서 성장한 난소 상피 세포의 특징적인 형태를 갖는다. LXSXN 벡터 단독 또는 IL-4 유전자를 함유하는 LXSXN으로 형질도입된 UCI 107세포의 형태는 부모 107세포의 것과 구별이 불가능하다. 부모, 벡터 컨트롤 및 UCI 107E IL-4 GS 세포의 2배수 시간은 각기 15.3, 15.7 및 18.6시간으로 결정되었다.

이들 세포의 성장 속도 변화는 35계대 및 6개월의 배양에 걸쳐서 시험관내에서 관찰되지 않았다. IL-4 생성 레벨은 일관되게 6개월의 계대 중에 900 내지 1300pg/ml/ 10^5 세포/48시간 범위였다. UCI 107E IL-4 GS 마스터 셀 배양(MCB)에 대해 실행된 광범위한 테스트는 이 세포계에 미코플라스마, 박테리아 및 전염성 바이러스가 존재하지 않는 것을 밝혀내었다.

Neo^R 유전자를 사용하여 서던 분석을 실행하여 UCI 107E IL-4 및 부모 UCI 107 세포계를 프로브하였다. 간단히, 조직 배양 세포의 농축 현탁액을 0.5% SDS를 함유하는 TNE 완충액(100mM Tris, 100mM NaCl, 1mM EDTA, pH 7.5)에 용해하고 37℃에서 방출도록 50μg/ml 프로테이나제 K로 처리한 다음 페놀과 클로로포름으로 추출하였다. DNA 용액을 100% 에탄올로 침전시키고 스포 아웃하고 10mM Tris, 0.1mM EDTA(pH 8)에 재현탁시켰다. 10μg의 고분자량 DNA를 Sst1(GIBCO/BRL, Grand Island, New York)로 분해하고 0.8% 아가로

스 겔 상에서 전기영동에 의해 분해하고 Gene Screen Plus(Dupont NEN, Boston, Massachusetts)로 옮겼다. 제조자의 지시서에 따라서 트랜스퍼, 하이브리드화 및 세척을 실행하였다. Tabor 및 Struhl의 방법(1988)(Current Protocols, Molecular Biology Vol. 1, pp. 2.2.1-2.2.3)에 의하여 랜덤 프라이머 IL-4 프로브를 제조하였다. 결과는 20세대후 UCI 107E IL-4가 여전히 벡터 DNA를 함유하는 것으로 확인되었다.

조사후 IL-4분비의 안정성을 다음과 같이 테스트하였다: 세포를 CM 내 15ml 원추형관내에서 200rad/분의 조사속도의 감마선(^{137}Cs)으로 실온에서 조사하였다. 조사직후, 세포를 페트리 접시 배양 플레이트에 10ml의 CM내에 1×10^6 세포의 밀도로 접종하였다. 1,000 내지 10,000의 테스트 조사량을 인가하였다. 조사된 세포를 37°C에서 5% CO_2 분위기에 배양하고 배지를 모든 접시에서 4일마다 완전히 바꾸었다. 48시간마다 배양 상정액을 시토킨 생성을 위해 접시로부터 수집하고 생존가능한 세포의 수를 광현미경에 의해 트립판 블루 배제에 의해 평가하였다.

이 실험의 결과는 도 2에 나타난다. 2,500 내지 10,000rad로 조사된 세포는 약 8일동안 생존가능한 것으로 남아있었지만 모든 세포들은 3주 이내에 사멸하였다. 1,000rad로 조사된 세포는 회복하여 증식을 계속하였다. 시토킨 생성의 레벨은 모든 조사량에서 8일동안 검출가능하였으며 생존가능한 세포의 수와 거의 평행하였다. 패널 B는 세가지 별도의 실험에서 5,000rad(□) 또는 10,000rad(■)에서의 조사후 IL-4 생성을 나타낸다. 패널 C는 두가지 별도의 실험에서 5,000 또는 10,000rad의 조사후 UCI 107E IL-4 GS세포에 의한 pg/ml/ 10^5 세포/48시간으로 표준화된 IL-4 생성을 나타낸다. 제2일(p=0.72), 제4일(p=0.14), 제6일(p=0.10) 및 제8일(p=0.3)에 2,500, 5,000 및 10,000rad로 조사된 세포중에서 생존률의 통계적으로 상당한 차이를 보이지 않았다.

집합적으로, 이들 결과는 UCI 107E IL-4 GS 세포가 안정한 IL-4 분비 세포계를 구성하는 것을 가리킨다. 세포는 효과적으로 복제를 중지하지만 1주까지의 동안에는 여전히 IL-4 생성을 유지하도록 조사될 수 있다.

TNF- α 분비세포계: 사람 TNF- α 암호화 서열을 사용하여 쥐 신경교아종 세포계를 유전적 변성시켰으며, 몇가지 상이한 신경교종 세포계에 대하여 보호를 제공하는 것으로 나타났다. Graf et al.(1994) Soc. Neuroscience(abstract).

간단히, TNF- α 암호화 서열을 LNCX 레트로바이러스 발현 벡터를 사용하여, 레트로바이러스 중재된 유전자 형질도입에 의하여 TNF 비감성 피셔 래트 T9 신경교아종 세포계로 삽입하였다. 2,000pg/106세포/48시간의 레벨로 생물학적 활성 TNF를 분비하는 T9/LNCT2로 나타낸 클론을 단리하였다. 그 형질도입된 세포, T9 부모세포 및 벡터단독(T9/LNCX로 표시)으로 형질도입된 세포들의 성장속도를 동정하였다. T9/LNCT2 세포계를 TNF 분비 능력의 손실없이 만 1년동안 유지시켰다.

부모 또는 벡터 컨트롤 T9 세포를 피셔 래트의 옆구리에 피하 주사한 경우 종양은 확고하게 성장하여 그 동물을 사망케했다. 대조적으로 피하주사된 T9/LNCT2 세포는 초기에 성장하였지만 3-4주내에 동물의 40-50%에서 퇴행되었다. TNF는 이 기간중에 피하 T9/LNCT2 세포에 의하여 분비되었다. 생존동물들은 총체적으로, 1년후에도 부모 T9로 두개내재공격에 내성이 있었다. 또한, 이들 동물은 상승작용 신경교종 9L의 공격에도 내성이 있었다.

실시에 3: 세포이식물로 치료후 재공격에 대한 내성

암 치료에 대한 래트 모델은 전이성 유방암 세포주 NADB 10^6 L^{-1} 를 Fisher 344 쥐 근교계의 간의 중엽으로 주사함으로써 개발하였다. 종양을 규칙적으로 측정하고 치료전 14일동안 정착하였다.

불활성화 Fisher 344 자극인자 림프구 및 Wistar-Furth(W/F) 동종이계 반응인자 림프구를 1:1 비율로 사용하여 혼합 림프구 배양물을 제조하였다. 배양의 초기 3일후, 80×10^6 세포를 정착된 진행성 성장 종양에 직접 주사하였다. 5마리 래트의 그룹들을 다음과 같이 처리하였다: 그룹 1에는 주사하지 않았고; 그룹 2는 미감성화 동종 W/F 림프구로 종양에 직접 주사하였고; 그룹 3은 혼합 림프구 반응으로부터 얻어진 세포로 유사하게주사하였다.

생존률에 대한 MLC 치료의 효과는 표 5에 나타낸다.

[표 5]

	그룹1 (미처리)	그룹2 (미감성화 림프구)	그룹3 (MLC)
중등치 생존률(일)	38	51	68*
범위(일)	17-62	32-63	55-300+
장기간 생존자	0%	0%	20%

*로그 등급 합계 시험 그룹 1 및 2: $p < 0.02$

MLC 치료 그룹은 장기간 생존자를 가진 유일한 그룹이었다. 생존자들은 부모 종양 세포로의 재공격에 내성이 있었다. 이것은 혼합 림프구 배양에 의해 자극된 동종이계 림프구의 직접 종양내 이식이 상당한 생존 이점을 제공한다고 결론지을 수 있다. 그 효과는 국소 종양 미세환경에서 활성 림프구 및 시토킨 생성에 응하는 숙주 항 종양 면역의 면역 활성화를 통하여 중재될 수 있다.

실시에 4: 종양으로부터 먼 부위에서의 세포질 백신 접종

본 실시예는 마우스 모델에서 상승작용 종양세포와 혼합된 자극된 동종이계 림프구로 이루어진 세포질 백

신의 사용을 확립하고, 면역반응을 발생하고 종양 내성을 부여하는데 효과적인 양을 확인한다.

일반적인 물질과 방법은 다음과 같다. 약 1×10^8 비장 세포를 통상적으로 단일 마우스 비장으로 부터 회수한다. 반응인자와 자극인자 비장 세포를 혼합하고 10% 우태아 혈청과 1mM BME로 보충된 1mL RPMI 배지에서 CO₂ 인큐베이터로 37°C에서 3일동안 배양한다. 배양 상정액을 IL-2, TNF, IFN- γ 및 IL-4에 대하여 ELISA로 분석한다. 배양된 세포내 세포 표면 CD 마커를 흐름 세포계산기 분석에 의해 결정한다. 또한 세포를 형태학적 기준에 의하여 모니터링하여 소림프구, 아세포 및 세포소멸체(apoptotic body)의 수를 측정한다. 혼합 림프구 배양물로부터의 필요불가결수의 세포들을 인산완충염수중에 약 100 μ L의 최종 주사 부피로 종양 세포와 결합한다. 조성물을 우측 옆구리로 피하 주사에 의해 투여한다. 주사 부위를 감염의 징후에 대해 실험하고 비장 세포를 면역학적 기준의 결정을 위하여 주기적으로 수집한다. 생검과 부검은 표준 형태학적 기준과 면역조직학에 의해 실행한다.

J588L은 Balb/c 마우스내 자발적인 종양으로부터 유도된 형질세포종 세포계이다. 10^6 생존가능한 J588L 세포의 피하주사는 약 12일 이내에 처리되고 세포질 과사에 의해 달성된 100%의 조직적합성 마우스내에 직경이 5mm보다 더 큰 촉진가능한 종양을 형성한다. 이 유형의 실험에서 마우스를 종양이 ~10mm 직경에 이른 후에 희생시킨다.

한 실험에서, Balb/c 마우스를 10^6 세포이식물 세포와 혼합된 10^6 J588L 형질세포종 세포로 피하주사하였다. 세포이식물을 위한 세포는 C57BL/6 비세포와 Balb/c 비세포를 10:1 비율로 3일동안 공배양함으로써 생성하였다. 주사 부위에서의 종양 성장을 세포 혼합물로 처리된 마우스에서 측정하고 콘트롤로서 10^6 C57BL/6 비세포 단독으로 혼합된 10^6 J588L 세포로 주사된 마우스의 것과 비교하였다. 콘트롤 그룹의 마우스 15마리 모두는 14일 이내에 적어도 1cm 직경의 종양을 가졌다. 그러나 먼저 그룹의 15마리 마우스중 11마리는 종양 성장이 없었으며; 다른 4마리는 콘트롤보다는 느리게 성장하는 종양을 가졌다. 이 그룹에서 생존하는 마우스를 반대쪽 옆구리에 J588L 세포의 추가의 덩어리로 계속 공격하여 종양에 대한 진행중인 전신 면역 반응이 있는지 판단하였다. 10마리의 마우스중 7마리는 재공격에 대해 내성이 있었으며, 종양 성장을 나타내지 않거나 제한된 성장에 이어서 퇴행을 나타내었다.

이식물의 세포들과 얻어진 반응간의 상호관계의 특징하는 표 6에 나타난 조합을 테스트함으로써 실행하였다.

[표 6]

혼합 림프구 배양물 (세포이식물 세포)			예측치 초기 효과
자극인자세포	반응인자세포	비율	
Balb/c (H2 ^d , 1A ^d) (동계)	C57BL/6 (H2 ^b) (동종이계)	1:1 1:10 1:20	이식편 대 숙주 이식편 대 종양 숙주 대 이식편 시토킨 분비
Balb/c (H2 ^d , 1A ^d) (동계)	C3H/He H2 ^k (동종이계)	1:1 1:10 1:20	이식편 대 숙주 이식편 대 종양 숙주 대 이식편 시토킨 분비
C57BL/6 (H2 ^b) (동종이계)	C3H/He H2 ^k (동종이계)	10:1 1:1 1:10	시토킨 분비
Balb/c (H2 ^d , 1A ^d) (동계)	DBA/2 H2 ^d 작은 조직적합성, 항원비적합성	1:1 1:10 1:20	이식편 대 숙주 이식편 대 종양 숙주 대 이식편 시토킨 분비
없음	C57BL/6 (H2 ^b) (동종이계)		동종자극

10^6 배양 세포를 10^6 J588L 세포와 혼합하고 Balb/c 마우스로 주사하고 앞서와 같이 그 반응을 모니터링한다. 생존하는 마우스를 10^6 J588L 세포 단독으로의 차후 공격에 의하여 진행중인 면역과 종양 내성에 대해 테스트한다.

실험의 두번째 세트는 백신 조성물내에 변조물질을 포함하는 이점을 결정하여 정해진다. T 헬퍼 세포를 기능적으로 두 서브세트로 분할할 수 있다. T_H1 세포를 IL-2, IFN 또는 IL-12의 존재하에 구성할 수 있으며 생체내 세포질 세포 독성에 조력하는 것으로 믿어진다. T_H2 세포는 IL-4, IL-5 또는 IL-10의 존재하에 구성할 수 있으며 B 세포 분비에 조력하는 것으로 믿어진다. T_H1 세포는 IL-2의 존재 때문에 통상적인 시험관내 림프구 배양중에 우세할 수 있다. T_H2 세포는 IgE의 생성과 호산구 중재 종양 세포용해의 개선을 통하여 강한 항종양 면역성의 역할을 할 수 있다.

백신 조성물의 자극된 동종이계 림프구를 제공하기 위하여 사용된 혼합 림프구 배양물이 관련된 변조물질, 특히 IL-2, IL-4 또는 프레드니손으로 보충되는 실험을 행하였다. 변조물질의 레벨은 먼저 Piccinni et al. (1995) J. Immunol. 155:128 ff. 및 Spits et al. (1988) J. Immunol. 141:29-36에 의해 사용된 범위에서 테스트하였다. C57BL/6 비세포와 Balb/c 비세포를 배양의 0일째에 시작하는 각 테스트 변조물질로 보충된 배지에서 10:1로 공배양하였다. 비보충된 배지와 비교하여 IL-2는 T_H1 세포의 비율을 증강시키는 것으로 예상되지만 IL-4 또는 프레드니손은 T_H2 세포의 비율을 증강시키는 것으로 예상된다. 각 배양물의 특징은 면역분석 또는 생분석에 의해 상정액내 시도킨 레벨을 측정함으로써 결정된다: 예를 들면 IL-2(T_H1 에 의한 분비), IL-4, IL-5(T_H2 에 의한 분비), IFN- γ 또는 TNF- α . 또한 각 배양물의 특징은 흐름 세포계산기에 의한 세포 표면 마커에 의해 결정한다: 예를 들면, CD45RB(T_H2 보다 T_H1 에 대해 높음); CD-69, 및 IL-2 수용체(활성화된 세포에 대해 상승됨)

보호 실험은 다음과 같이 실행한다: 10^6 배양 세포를 10^6 J588L 세포로 혼합하고 Balb/c 마우스에 주사하며, 그 반응은 앞서와 같이 모니터링한다. 생존하는 마우스를 10^6 J588L 세포 단독으로 차후 공격에 의한 진행중인 면역성과 종양 내성에 대해 테스트한다. 면역 반응의 특이성을 미관련 종양 세포계로 면역 마우스를 공격함으로써 테스트한다. T_H1 세포가 풍부한 배양물로부터 만들어진 백신의 효과를 T_H2 세포가 풍부한 배양물로부터 만들어진 백신과 비교한다. J588L 형질세포종 세포와 함께 양 종류의 배양물로부터 조합된 세포들로 이루어진 조성물로 동물을 처리하는 추가의 실험을 실행한다.

실시에 5: 동종활성화도의 측정

고품질의 효과적인 MLC 세포의 생성을 보장하기 위하여, 동종 활성화 세포의 효능을 측정하는 방법을 사용할 수 있다. 미자극된 콘트롤 세포 이상의 활성을 가진 세포 배양물만을 임상적으로 사용해야 한다. 이것은 미자극 콘트롤에 대한 활성을 비교하기에 유리한데, 왜냐하면 상이한 개체들로부터 단핵 세포의 배이스라인 활성이 광범위하게 변하기 때문이다.

몇가지 방법이 림프구 활성을 측정하는데 유용하다. 미자극 단핵세포와 비교하면 동종활성화 세포는 포르마잔 염료를 더 감소시키고 에스테라제 활성을 더 갖는다. XTT(포르마잔 염료)의 전환을 470nm(기준 650nm)에서 비색 분광광도계에 의하여 96-웰 플레이트내에서 용이하게 나타낼 수 있다. 통상적으로 활성화된 세포는 콘트롤보다 더 높은 흡광도를 나타낸다. 또한 림프구 활성화도 에스테라제 기질, 플루오레세인 디아세테이트(FDA)를 사용하여 에스테라제 활성의 흐름 세포계산기 측정에 의하여 설명될 수 있다. 고 에스테라제를 가진 T 세포는 FDA 및 파이코에리트린 표지된 CD3 항체를 사용하여 측정되지는 않는다. 에스테라제 활성은 더 높은 농도의 FDA와 96-웰 플레이트 포맷에서 494nm(기준 650nm)의 분광광도계에 의한 에스테라제 활성의 측정에 의하여 플레이트 분석에서 정확하게 측정될 수 있다. 혈청 함유 배지에 고유한 백그라운드 에스테라제 활성은 경쟁적 에스테라제 저해제(~ 10 nM), 아르기닌 메틸 에스테라제의 첨가에 의하여 저해된다. 대부분의 경우 이들 측정은 상호간 및 아체발생과 좋은 상호관계를 나타낸다.

I: MTT 포르마잔 환원 분석

이 분석은 배양 샘플에 대하여 MTT를 블루-그린 포르마잔 염료로 환원시킬 수 있는 능력에 의하여 살아있는 세포를 계수하는데 사용되며, 또한 불활성 세포로부터 활성화 세포를 구별하는데 도움이 된다. 이것은 실질적으로 어떠한 배지내에 실질적으로 어떠한 세포에 대해 사용될 수 있다. 유용한 세포 범위는 10^5 내지 5×10^6 /mL이다.

시약:

- 96 웰 플레이트, 편평 저부(ELISA 플레이트 아님)
- PBS(동결)중의 5mg/mL MTT (Sigma)
- 45% DMF, 0.2N HCl(37°C로 미리 데움)중의 20% SDS

과정:

이중조 또는 삼중조로 96 웰 플레이트에 세포와 함께 100 μ L의 배지를 넣는다. 100 μ L의 배지 단독을 콘트롤에 사용한다. 첫번째 칼럼을 블랭크로 남겨 놓는다.

10 μ L의 MTT를 각 웰에 가한다. 플레이트를 처서 혼합한다. 플레이트를 씻우고 37°C에서 4시간 배양한다.

50 μ L의 SDS 용액을 가하고, 거품은 피한다. 가볍게 처서 혼합한다. 거품이 존재한다면 표면을 분다. 플레이트를 570nm(기준 650nm)에서 카운트한다.

II: XTT 포르마잔 환원 분석

이 분석은 샘플에 대한 배양에 대하여 XTT를 레드-오렌지 포르마잔 염료로 환원시키는 능력에 의하여 살아있는 세포를 계수하는데 사용되며, 또한 불활성 세포로부터 활성화 세포를 구별하는데 도움이 된다. 이것은 실질적으로 어떠한 배지내에 실질적으로 어떠한 세포에 대하여 사용될 수 있다. 유용한 세포 범위는 10^5 내지 5×10^6 /mL이다.

시약:

- 96 웰 플레이트, 편평 저부(ELISA 플레이트 아님)
- PBS(세거)중의 1mg/mL MTT(2,3-비스(2-에톡시-4-니트로-5-술포-페닐-2H-테트라졸륨-5-카복사닐리드 염, Sigma)
- PBS(동결, 광보호됨)중의 1.53mg/mL PMS(페닐메탄술포닐 플루오라이드, Sigma)

과정:

이중조 또는 삼중조로 96 웰 플레이트에 세포와 함께 100 μ L의 배양 배지를 넣는다. 100 μ L의 배지 단독을 컨트롤에 대해 사용한다. 첫번째 칼럼을 블랭크로 남겨 놓는다.

사용 직전에 PMS를 XTT로 예비혼합한다(5 μ L/mL XTT). 50 μ L의 XTT를 각 웰에 첨가한다. 플레이트를 가볍게 쳐서 혼합한다.

플레이트를 씌우고 37°C에서 4시간 배양한다. 470nm(기준 650nm)에서 플레이트를 카운트한다.

III: CD3/CD69 또는 CD3/FDA에 대한 흘림 세포계산기

이것은 혼합 림프구 동종활성후 T 림프구 활성의 측정이다. CD69 발현 또는 에스테라제 활성과 같은 활성은 시토킨 분비와 상호 관련있으며 림프구 활성의 대용약 측정으로서 사용될 수 있다. 비자극된 림프구는 표면 CD69를 발현하지 않으며 단지 낮은 레벨의 비특이적인 에스테라제를 갖는다. 동종항원 또는 비특이적인 미토겐에 의해 활성화되면 CD69의 발현은 48시간(피크:24) 이내에 나타난다. 에스테라제 활성은 자극후 증가하며 수일간 계속된다. 모든 동종자극된 림프구 반응이 동일한 동력학으로 진행되는 것은 아니며 배양의 제 1, 2 및 3일째에 활성을 측정하는 것이 바람직하다.

샘플:

공여자 및 환자 세포의 테스트 샘플을 2% FCS-RPMI 중의 0.5×10^6 세포/mL로 소량의 배양물내에서 혼합하였다. 이들 배양물을 테스트할 때까지 37°C, 5% CO₂에서 유지시켰다.

시약:

- 모노클로날항체:
- CD3-PE(Coulter)
- CD69-FITC(Becton-Dickinson). 사용하지 않을 때는 냉장보존하고 광차단한다.
- Fluorescein Diacetate(Sigma): 원료용액을 10mg/ml DMSO에서 제조하고, 광차단하고 냉동된 로트시형된 알리켓에 보관한다. 작업액은 매주 DMSO중의 원료 비 1:100으로 희석하여 만들고, 작업액을 냉장보존하고 광차단한다.
- D-PBS, PBS중의 0.5% 파라포름알데히드-0.05% TRITON™ X-100

과정:

내부 컨트롤 비자극 및 활성화된 단핵세포샘플을 필요에 따라 제조한다. 큰 로트시형된 배치들은 10% DMSO 냉동배지에서 250 μ L 알리켓에서 냉동시키게 된다.

정상 공여자로부터의 단핵세포를 사용하여 활성화된 컨트롤 건본을 생성할 수 있다. 이들 세포를 0.5×10^6 세포/mL에서 2% FCS-RPMI에 100mL까지에 둔다. 세포를 2 μ g/mL PHA렉틴의 존재 또는 부재하에 37°C에서 2일간 배양하거나, 제2의 공여자집단과 10:1의 비유로 혼합한다. 세포를 350×g에서 5분간 원심분리에 의해 수집한다. 배지를 DMSO 냉동배지의 부피의 1/10을 제거 및 교체하고 냉동한다. 필요할때, 컨트롤 비자극 및 자극세포를 신속히 해동하고 PBS 9부피를 첨가함으로써 원래부피에 재현탁시킬 수 있다.

컨트롤 세포를 시험배지로부터 샘플과 함께 이하의 프로토콜에 따라 분석한다. 컨트롤 건본의 두벌사용은 추가의 품질보증방법이다. CD69 또는 에스테라제 포지티브 림프구의 백분율 5% 분산도 이내이어야 한다.

0.5mL PBS (샘플당)에 5 μ L의 CD3-PE항체(샘플당)를 희석시킨다. 10 μ L CD69(샘플당)나 아니면 1 μ L의 FDA 작업액(샘플당)을 첨가한다.

12×75mm 표지된 폴리스티렌 관에 0.5mL의 희석된 항체를 옮긴다. 각 관에 표준 컨트롤, 비자극 공여자세포 및 알로-활성화된 세포를 포함하는 100 μ L의 잘 혼합된 샘플을 가한다. 온화하게 흔들고 실온에서 30분 인큐베이션시킨다. 0.5mL의 0.5% 파라포름알데히드-0.05% TRITON™ X-100PBS를 가하고 혼합한다.

EPICS XL 쿨터 흘림 세포계산기와 같은 적당하게 장치된 세포계산기에서 계수를 행하였다. 어느 프로토콜이든 히스토그램 1(전방 스캐터 대 CD3)은 CD3+단핵세포계위에 풍부한 게이트를 가져야 한다. 히스토그램 2에서, 측 스캐터 대 CD3의 사용은 용해안된 RBS, RBC 고스트, 혈소판 집합체, 잔류 과립구 및 또는 다른 부스러기로부터 림프구(낮은 측 스캐터레벨)의 구별을 허용한다. 게이트는 림프구 주위로 당겨진다(예를 들면 히스토그램 2 참조). 이 제2의 게이트는 히스토그램 3으로 통과하고 여기서 CD3+CD69+세포 또는

는 CD3+FDA+세포가 디스플레이된다. 콘트롤 값을 먼저실행하여 게이트를 설정한다(비자극 콘트롤). CD69 또는 FDA 높은 값(Quad 2)이 2%이도록 히스토그램 3의 쿼드 스탯 커서를 놓는다. 자극된 샘플을 분석할때 이 게이트를 설정해둔다.

각 샘플에 대해 적어도 5,000게이트 세포를 계수하여 97% 신뢰도 간격을 얻는다.

IV: FDA 플레이트 분석

이 분석은 배양샘플이 에스테라제 기질인 플루오레세인 디아세테이트를 전환하는 능력에 의해 살아 있는 세포를 세기 위해 사용되고, 또한 불활성화된 세포로부터 활성화된 세포를 구별하기 위해서도 도움이 된다. 이 분석은 실제 어떤 배지에 대해서도 사용될 수 있다. 유용한 세포범위는 mL당 10^5 내지 5×10^6 이다.

시약:

- 96웰 플레이트, 편평 바닥(ELISA 플레이트 아님)
- DMSO중의 10mg/mL FDA(Sigma)(원료, 광차단)
- DMSO중의 10mg/mL 알기닌 메틸에스테르

과정:

96웰 플레이트에 세포를 가진 배지 100 μ L를 두벌 또는 세벌로 놓는다. 콘트롤로 100 μ L의 배지 단독을 사용한다.

PBSmL당 10 μ L의 원료 FDA와 mL당 50 μ L AME 원료를 첨가함으로써 신선한FDA 작업액을 만든다. 각 웰에 20 μ L의 FDA 작업액을 가한다. 플레이트를 가볍게 두드려 혼합한다.

플레이트를 덮고 37°C에서 1시간 인큐베이션시킨다. 494nm에서 플레이트를 계수한다(표준 650nm).

V: 산생성 분석

이 분석은 배지에서 상대적인 유기산 생성을 정량화하기 위해 사용된다. 이것은 세포의 활성화의 상태와 상관된다. 이 분석은 2% 이하의 혈청을 함유하는 배지의 사용을 요한다. 실제 세포범위는 24-48시간 배양된 $1-5 \times 10^6$ 세포/mL이다.

시약:

- 95웰 플레이트, 편평바닥(ELISA 플레이트 아님)
- 산분석 시약. 이것은 다량 만들어 4°C에서 보관한다. 증류수중의 0.1mg/mL 프로모페놀블루를 첨가한다. 적당한 적정점이 충족될때까지 충분한 농 HCl을 첨가한다. 96웰 플레이트의 웰에 100 μ L RPMI 2% FCS에 75 μ L의 시약을 첨가한 후 황록색이 얻어질때까지 적정을 수행한다.

과정:

96웰 플레이트에 세포를 가진 배지 100 μ L를 두벌 또는 세벌로 놓는다. 콘트롤로 100 μ L의 배지 단독을 사용한다.

각웰에 75 μ L의 시약을 가한다. 플레이트를 가볍게 두드려 혼합한다. 470nm에서 플레이트를 계수한다(표준 650nm).

VI 아세포 생성 정량화

이 분석은 7일후 배지에서 생성된 림프아세포의 절대수를 정량하기 위해 사용된다. 이 분석은 실제로 어떤 배지에서도 말초혈 단핵세포에 대해 사용될 수 있다. 유용한 세포범위는 mL당 1×10^5 내지 5×10^6 이다.

시약:

- Wright's Stain 또는 Diff-Quick Stain

과정:

Cytospin 챔버에 7일 배양액 1-2방울을 놓는다. Wright's Stain이나 Diff-Quick Stain으로 건조된 유리슬라이드를 염색한다. 오일 침지 100 $\times$ 렌즈의 현미경으로 림프아세포 및 기타 세포의 수를 계수한다. 300개 이상의 총세포를 계수한다.

실시에 6: 더이상의 동물 모델 실험

제3의 자극인자를 사용하여 제조된 동종활성화된 세포의 효율

비자극 동종이계 세포 단독, 동종활성화된 동계세포, 동계활성화된 동종이계세포(두 별개의 동종이계세포) 또는 모두 활성화된 동종이계세포(두 별개의 동종이계 공여자)로 구성된 세포조성물을 제조하였다. 마우스로부터의 비장세포를 사용하여 10:1 반응인자:자극세포의 비율로 배양함으로써 알로 활성화된 세포를 생산하였다. 비장세포조합물 3×10^6 /mL로 페니실린-스트렙토마이신으로 보충된 10%우태아 혈청(FCS)를 더한 RPMI에서 37°C에서 3일간 배양하였다.

1×10^6 의 살아있는 J588L 림프종세포를 10×10^6 배양된 마우스 비장세포와 혼합한 다음 Balb/c 마우스의 오른쪽 옆구리에 피하조직에 주사하였다. 처치된 마우스를 종양성장동안 3주간 관찰하였다.

종양없는 마우스를 왼쪽 옆구리 피하주사에 의해 1×10^6 살아있는 림프종세포 단독으로 1개월후 재공격하

고 종양성장을 관찰하였다.

도 3은 이들 실험의 결과를 나타낸다. 활성화된 동종이계세포의 존재를 후속 생체내 항종양 숙주반응과 상관한다. 처치된 동물에 동종이계인 두 공여자를 사용하여 제조된 세포집단을 동질유전 또는 자가세포의 대신에 사용되어 항종양반응을 유도할 수 있다. 그러나, 활성화된 동종이계 공여자: 공여자세포 집단의 모든 조합이 똑같이 효과적인 것은 아니었다.

효율에 대한 반응인자: 자극인자 세포의 비율의 영향.

반응인자로서 C57 비장세포와 자극인자로서 Balb/c 비장세포를 사용하여 가변적인 수의 동종이계 자극인자세포에 의해 활성화된 동종이계 세포로 구성된 세포집단을 제조하였다. 세포를 살아있는 림프종 세포 (J588L 세포)와 혼합하고 Balb/c 마우스의 옆구리에 주사하였다. 처치된 마우스를 종양성장체 대해 3주간 관찰하였다.

도 4는 1차 종양 공격후 종양없는 마우스의 백분율을 나타낸다(그룹당 6마리 마우스). 낮은 세포비율이 어떤 경우에 대해서는 마우스에서 항종양 반응을 유발시 더 양호할 수도 있다.

항종양 효과에 대한 종양을 지니는 마우스로부터의 비장세포를 사용하는 것의 영향.

비장세포를 천연 C57 또는 Balb/c 마우스로부터 또는 오른쪽 옆구리에 1cm 림프관을 지니는 마우스로부터 취하였다. 세포를 단독으로 아니면 RPMI-10 FCS에서 0.5×10^6 세포/mL 의 농도로 10:1비율로 Balb/c 세포와의 혼합물로 3일간 배양하였다. 림프구 활성화를 흘림 세포계산기에 의해 CD3+/Esterase 높은 집단의 백분율을 분석함으로써 판단하였다. 퍼센트 FDA 포지티브 세포는 건강한 Balb/c 공여자로부터의 자극인자를 사용하여 ~3.5%이었으나 종양을 지니는 공여자로부터의 자극인자를 사용하여 단지 ~2.5%이었다.

천연 Balb/c 마우스로부터나 아니면 J588L 종양을 지니는 마우스로부터의 자극인자로 알로-활성화된 세포 집단을 살아 있는 림프종세포(J588L 세포)와 혼합하고 천연 Balb/c 마우스의 옆구리에 주사하였다. 종양 없는 마우스를 다음에 왼쪽옆구리에서 1×10^6 살아있는 림프종 세포로 재공격하고 종양성장에 대해 관찰하였다. 2차 종양 공격후 종양없는 마우스 퍼센트는 두 그룹에서 30 내지 40%이었다.

알로 활성화된 림프구로 면역되고 조사된 종양세포를 후속 종양공격한 마우스의 저항성.

이 실험은 불활성화된 종양세포와 혼합된 알로-활성화된 림프구를 함유하는 세포백신의 면역학적 효과를 시험하였다.

C57/BL6 마우스(그룹당 3마리)를 10^6 조사된 B16 흑색종세포 단독으로 피하 주사하고 10^7 Balb/c×C57 알로-활성화된 림프구와 혼합하거나, 10^6 IL-4 분비 J588L 림프종 세포(C57에 동종이계)와 혼합하였다. 알로 활성화된 세포는 Balb/c 비장세포를 RPMI 10% FCS에서 3×10^6 /mL에서 10:1의 비율로 C57비장세포와 3일간 배양함으로써 제조하였다.

세포를 PBS에서 세척하고 천연 C57 마우스의 옆구리에 피하주사하였다. 3주후, 마우스를 반대 옆구리에 피하로 5×10^5 B16 살아있는 흑색종세포로 재공격하였다.

알로 활성화된 세포로 처치된 마우스는 다른 그룹보다 상당히 더 길게 상호하였다. 두마리의 가장 길게 생존하는 마우스는 최종적으로 원추형태의 종양을 발달시켰고, 둘다 궤양을 일으켰다. 다른 마우스들은 궤양을 발달시켰다. 궤양이 나타나난 2일후, 두 마우스는 숨을 거두었다. 이들 마우스의 시체해부로 대단히 괴저성 종양세포의 존재를 나타내었으며, 대량 DNA 퇴적의 형태의 최근의 종양세포 용해의 증거이다. 이 괴사는 림프구로 대부분 구성되는 염증성 침입물을 동반하였다. 신체 어디에도 다른 형태의 감염은 관찰되지 않았다. 폐전에도 보이지 않았다. 이것은 옆구리에 B16 흑색종 종양의 소론을 이룬 콘트롤 마우스에서의 다수의 폐전지와 반대이다. 두 마우스에서 좌우 신장은 광범위한 사구체신염을 나타내었고, 종양 용해증상으로부터 사멸을 제안한다. 다른 마우스들은 이들 변화를 증명하지 못하였다.

이들 결과는 후속공격에서 주어진 살아있는 암세포의 대량 용해를 일으킨 특이적 반응을 발달시키는 동종 활성화된 세포 백신으로 처치된 마우스와 일치된다.

다른 종양모델을 사용하는 또 다른 실험에서, C57/BL6 마우스(그룹당 3마리)를 10^6 Lewis 폐암 세포 단독으로 피하주사하고 10^7 Balb/c×C57 동종활성화된 림프구세포와 혼합하거나 또는 10^6 IL-4 분비 J588L 림프종세포(C57에 동종이계)와 혼합하였다. 동종활성화된 세포는 Balb/c 비장세포를 RPMI 10% FCS에서 3×10^6 /mL에서 10:1의 비율로 C57비장세포와 3일간 배양함으로써 제조하였다. 모든 세포를 PBS에서 세척하고 천연 C57 마우스의 옆구리에 피하주사하였다. 마우스를 종양형성에 대해 관찰하고, 종양이 직경 1cm에 달한후 희생시켰다. IL-4 분비세포로 처치된 마우스는 세 장기생존자중 둘로 다른 그룹 보다 상당히 더 길게 생존하였다. 동종 활성화된 세포 단독으로 처치된 군은 장기 생존자를 가졌다.

기능성 마커의 항종양 효과와의 상관관계

생체외 기증적 분석결과와 가능한 치료이점 간의 상관관계를 구하기 위해, 여러 활성화도를 나타내는 배양물을 마우스 림프종 처치모델에서 시험한다. 혼합된 림프구 배양물을 10:1 반응인자:자극인자 세포비율로 여러가지 동계교배 마우스종으로 부터의 비장세포를 사용하여 설치한다. 또 다르게는, 배양물을 특정의 반응인자:자극인자종 조합을 사용하고 다른 세포비율로 설치한다. 배양 3일후, XTT포마장 분석과 에스 테라제 분석에서 활성을 측정한다.

주사직전, 배양된 세포를 필요에 따라 추가의 비장세포로 보충하고 세포비율을 표준화하고 1×10^6 의 살아 있거나 조사된 J588L 림프종 세포와 혼합한다. 제제를 Balb/c 마우스에 주사하고 생존율에 대한 효과를 모니터한다. 마우스를 지속하는 면역반응에 대해 시험하기 위해 살아 있는 림프종 세포의 후속 투여량을

로 재공격할 수 있다. 그다음 생존 데이터를 배양기간동안 측정한 기능적 활성과 상관시킨다.

항종양 효과에 대한 동종활성화된 세포조성물의 효과

본 명세서에서 다른 곳에 기술된 바와 같이, 히스타민은 기능적 분석에서 측정된 바와 같이 림프구 배양 중에 동종활성화를 손상시킨다. H_2 수용체 안타고니스트인 시메티딘은 동종활성화를 촉진시킨다. 본 연구에서, 동종활성화 배양물은 $20\mu g/mL$ 히스타민 또는 시메티딘의 존재 또는 부재하에 제조되고, XTT 포마장 및 에스테라제 분석에서 시험한 다음 J588L 림프종 세포를 가진 마우스에 주사하여 효율과 상관시킨다.

또 다른 연구에서, 다수의 다른 자극인자 또는 반응인자세포를 갖는 것의 효과를 시험한다. C57: Balb/c 비장세포(10:1)를 함유하는 표준배양물을 마우스 림프종 모델에서의 효율에 대해 a) C57:Aj:Balb/c 비장세포(9:1:1 또는 5:5:1); b) C57:Aj:C3H 비장세포(9:1:1 또는 5:5:1); c) C57:Aj:C3H:Balb/c 비장세포(8:1:1:1 또는 3:3:3:1)을 함유하는 배양물과 비교한다.

실시에 7: 배양된 사람 세포로 실험

동종활성화된 세포의 기능성에 대한 평가기준

동종활성화도를 실시에 5에서 상세히 기술한 기능적 분석에 따라 측정할 수 있다. 이 실시예에는 분석에 의해 나타난 활성화도를 예시한다.

사람 말초혈 단세포를 많은 관련없는 사람 자원자들로 부터 취한 샘플로부터 분리하고 본 명세서에서 다른 곳에 기술된 것과 같은 10:1 반응인자: 자극인자 비율로 일방식(one-way) 혼합된 림프구 배양물에 설치하였다. 배양물에서 2-3일후 분석을 실행하였다. 결과를 도 5 및 도 6에 나타낸다. 개체 각각을 고유 글자로 표시하고 반응인자세포를 자극인자세포 전에 표시한다. 따라서, A×B 표시는 개체 A로부터의 세포가 개체 B로부터의 불활성화세포와 함께 배양되었다.

비자극된 단핵세포와 비교하여 동종활성화된 세포는 보다 큰 에스테라제 활성을 가지며 보다 크게 XTT(포마장염료)를 감소시킨다. 에스테라제 활성은 또한 에스테라제 기질인 플루오레세인 디아세테이트(FDA)를 사용하여 흘림세포계산기에 의해 측정될 수 있다. 높은 에스테라제 활성을 갖는 T세포는 FDA와 연관하여 피크에리트린-표지된 CD3 항체에 의해 확인될 수 있다. 이 방법은 아세포발생(1주간 배양후 결정됨), 또는 상정액에서 IL-2 또는 IFN- γ 의 수준과 잘 상관된다.

다수의 동종이계 자극인자세포를 사용하는 것의 영향

동종활성화된 사람림프구 배양물을 하나, 둘, 셋 또는 4개의 관련없는 공여자들로부터의 세포를 사용하여 제조하였다. 3×10^6 세포/mL를 $37^\circ C$ 에서 2일간 2% FCS-RPMI에서 배양하였다. 두 공여자 집단을, 반응인자세포를 자극인자세포와 10:1 비율로 혼합함으로써 제조하였다.

도 7은 흘림 세포계산기를 사용하여 측정된 세포의 특징을 나타낸다. 모든 값들은 쿨터 EPICS XL 세포계산기에서 4000개 세포를 계수한 후 밝게 형광인 세포의 백분율을 나타낸다.

결과는 일정한 조건에서 다수의 공여자로부터의 자극인자들로 제조된 배양물은 높은 수준의 활성화에 이르는 보인다.

반응인자: 자극인자세포의 비율을 변경하는 것의 영향

알로-활성화된 사람 말초혈 단핵세포로 구성된 혼합된 림프구 배양물을 10:1, 5:1 또는 1:1 비율의 같은 두 관련없는 공여자들로부터의 세포를 사용하여 제조하였다. 세포를 2% FCS-RPMI에서 0.5×10^6 세포/ml에서 3일간 배양하였다. 이들 배양물의 강도를 XTT 포마장 환원분석을 사용하여 측정하였다.

결과를 도 8에 나타낸다.

알로 활성화에 대한 히스타민 또는 시메티딘의 영향.

히스타민은 T 억제자세포의 활성을 유도하는 것으로 알려져 있다. T 억제자 세포는 MLR의 활성을 제어하는 데에 역할을 하기 때문에, 히스타민 및 효능있는 히스타민 타입 2(H_2) 리셉터 차단 약인 시메티딘의 효과를 세포배양물을 알로 반응하는 세포배양물에서 시험하였다. 동종활성화된 사람말초혈 단핵세포로 구성된 세포집단을 관련없는 공여자로부터의 세포를 사용하여 제조하였다. 모든 배양물은 반응인자: 자극인자 단핵세포의 10:1 비율을 0.5×10^6 세포/mL에서 함유한다. 일부 배양물에서는, $20\mu g/mL$ 히스타민 또는 $20\mu g/mL$ 시메티딘을 제0일에 첨가하였다.

도 9는 포마장 환원(XTT) 분석을 사용하여 측정한 결과를 나타낸다. 히스타민은 알로 활성화의 억제 및 감소된 강도를 유발하였다. 시메티딘은 억제의 발달을 차단함으로써 가능하게 활성을 향상시켰다.

실시에 8: 세포 백신의 임상적 용도

이 단원은 준비된 사람 수용자에서 면역학적 반응은 자극하는데에 성공적임을 나타내는 실시예를 제공한다.

암환자 JT는 암요법의 종래형태를 통해 진행된 공격성 다형태 교아세포종을 가졌다. 환자를 1995년 8월 및 9월에 실시에 1에 따라 종양내 이식물로 처리하였다.

그후 JT가 검출가능 종양특이적 면역을 발달시켰는지를 결정하기 위한 연구를 행하였다. 먼저, 안정한 세포계를 환자의 종양으로부터 확립하였다. 수술로 제거된 종양세포로부터의 생존 종양세포를 실험실에 옮기고 10% 우태아혈청(FCS)을 함유하는 RPMI-1640 배지에서 배양하였다. 세포계는 PGA-95로 지칭되었다. 생존 종양세포를 또한 후속제거된 후두엽으로부터 회수하고 PGA-96으로 지칭된 제2세포계를 발생시키기 위해 사용하였다. 두 세포계는 유사하나 동일하지 않은 특성을 갖는다

MLTC(혼합 림프구-종양세포배양물)를 다음 방법으로 수행하였다. 즉, 8월 세포이식때에 수집되고 저온보

존된 말초혈 림프구(PBL)는 RPMI-1640/10% FCS 중의 다양한 비율로 살아있는 성장하는 PGA-95세포와 8일 간까지 배양하였다. 항종양 활성은 검출되지 않았다. 그러나, 1996년 1월에 환자로부터 얻은 PBL을 동일한 방법으로 PGA-95 세포와 배양했을때, 강한 항종양 세포 활성이 주목되었다. 분석의 끝에 점착성종양세포의 크리스탈바이올렛 염색에 의해 결정된 바, 궁극적으로 100%의 종양 세포가 PBL: PGA-95비율 100:1에서 공배양 7-8일 동안 사멸하였다. 유사한 결과가 50:1 비율에서 얻어졌고 종양세포의 약 50% 사멸이 10:1에서 관찰되었다. 중요하게는 관련없는(제3자) PBL이 공배양에 대신 사용되었을때 PGA-95세포의 사멸이 일어나지 않았다.

MLTC의 처음 5일동안, 높은 수준의 IL-2(1000-1500pg/mL)이 생성되었고 그 다음 제8일에 훨씬 더 낮은 수준으로 떨어졌다. IL-4는 배양 8일동안에 검출되었다. TNF는 단지 6일후 상당한 수준으로 생성되었고 제8일에 400-500pg/mL로 증가를 계속하였다. 반응세포의 표현형은 흘림세포계계산분석에 의해 결정되었고, CD4+와 CD8+세포의 혼합물임이 발견되었다. CD4+세포는 배양중 초기에 증식되었고, 이어서 CD8+세포가 증식되었다. CD8+세포는 IL-2를 생산하지 않았다. 따라서, 배지를 200U/mL 재조합 IL-2(Hoffman-LaRoche)로 보충하고 약 1×10^9 CD8+ 세포독성 T림프구(CTL)가 약 30일내에 발생되었다.

발생된 CTL의 특이성은 표준 ^{51}Cr 방출분석에 의해 결정되었다. PGA-96 세포에 대해 발생된 CTL은 PGA-95와 PGA-96 세포(4-6시간 내에 30-50% 용해)를 둘다, 또는 앞서 배양되지않은 저온보존된 종양세포를 효율적으로 사멸시켰다. CTL은 자가면역 PBL 또는 자가면역 섬유아세포를 사멸하지 않았고, 관련없는 암세포계: 구체적으로, 교종세포(U373 또는 ACBT), 전립선 선암종 세포(LNCAP), 방광암세포(BLT-2), 난소암세포(UCI-107), 또는 백혈병세포(K562)를 사멸하지 않았다.

MLTC를 시간이 진행함에 따라 환자 JT에서 전신성 항종양 세포면역을 모니터 하기 위해 사용하였다. 1996년 1월에 시작하여 혈액샘플을 매 2-3주마다 수집하였다. MLTC 분석에서, 100%의 종양세포가 100:1 및 50:1의 PBL-PGA 비율에서 사멸되었고, 더 낮은 비율에서는 비례적으로 덜 사멸되었다. 4월에, 활성은 단지 25%의 종양세포가 100:1에서 사멸되는 지점까지 급격히 떨어졌고 50:1에서는 전혀 사멸되지 않았다. 환자가 재발을 일으키고 후두엽 절제술을 요한 것은 이 시기 직후이었다.

이어서, 환자에게 종양세포와 조합된 혼합 림프구로 구성되는 피부면역화를 제공함으로써 환자의 전신성 항종양활성을 부스터하는 것을 시도하기로 결정하였다. 원래의 종양으로부터의 저온 보존된 세포는 10,00cGy로 불활성화되었다. 세포이식물세포를 실시예 1에 따라 동종이계 공여자 반응인자 세포와 환자의 자극인자세포의 혼합된 림프구 배양물에 의해 제조하였다.

100, 50, 25 또는 10×10^6 세포이식물세포를 1×10^7 조사된 종양세포와 혼합함으로써 백신을 제조하였다. 투여량 범위를 실시예 5에 기술된 동물실험으로부터 외삽하였다. 등에 네군데 다른 부위에 조사를 놓았다. 피부반응이 모든 네부위에서 주목되었고 환자는 발열반응을 일으켰다.

[표 6a]

부위 및 투여량	특징	백신후 일수 (관련부위의 크기 cm×cm)					
		0	1	2	3	4	5
RUQ 100×10^6	홍반	2.5×2.2	1.5×1.3	1.4×1.2	0.4×0.3	없음	없음
	경화	없음	0.5×0.4	1.0×1.1	1.0×1.0	1.4×1.7	1.3×1.6
LUQ 50×10^6	홍반	2.3×2.4	1.5×1.1	1.1×0.9	0.3×0.3	없음	없음
	경화	없음	0.5×0.3	0.7×0.6	0.8×0.8	1.4×1.8	1.2×1.2
RLQ 25×10^6	홍반	1.3×1.3	1.1×1.0	0.4×0.3	0.4×0.4	없음	없음
	경화	없음	0.2×0.2	0.3×0.3	0.3×0.4	1.0×0.9	1.0×1.0
LL 10×10^6	홍반	0.7×0.7	0.3×0.3	없음	없음	없음	없음
	경화	없음	없음	0.1×0.1	0.3×0.4	0.8×0.7	1.0×1.0
임상적 특징:	열(°F)	없음	102	104	99-100.5	99-100.5	99-100.5
	내지	99					
	스테로이드 mg/day	6	0	10	10	10	10

도 10은 4회 주사 투여 직후 환자의 등을 찍은 사진을 복사한 것이다. 각 주사 부위에서 홍반이 명백하고, MLC에서 자극된 세포에 이미 존재하는 용해성 중재에 대한 반응인 것 같다. 도 11은 2일후 찍은 사진을 복사한 것이며 경화(induration)의 증거를 나타낸다. 표시는 관련부위의 측정된 크기를 나타낸다. 지연된 형태의 과민증의 이 증거는 특히 중요한데, 이것은 림프구 및/또는 항원제공세포가 자극된 동종이계세포에 의해 주사부위에 강화되었음을 제안하기 때문이다. 동종이계세포는 강화된 숙주세포를 자극

하는 것으로 예상되는데, 이것은 차례로 그 부위에 또한 존재하는 자가 종양세포에 대해 반응해야한다.
환자이력은 표 7에 나타낸다.

[표 7]

일	관찰
	7세의 오른손잡이 백인 여성
10/93	· 생검으로 입증된 재발 발작후의 다형태 교아세포종, 부분적인 절제를 수행함
11/93	· 종양이 진행됨. 부분적인 절제 수행함
11/93	· 종양이 진행됨. 전체적인 절제 수행함
11/93	· 화학요법: 시클로포스파미드의 2개 과정
2/94	· 외부 빔 방사 요법
6/94	· 고 투여량 화학요법: 시클로포스파미드+멜팔란, 이어서 자가 골수이식
8/95	· 종양재발 부분적인 절제 수행함; 심실 벽에서 잔류 종양
8/95	· 제 1 세포이식(CYTOIMPLANT) 수행함
9/95	· MRI에 의해 검출된 확장된 병소. 절제 수행함. 병적상태는 염증변화, 괴사, 및 소량의 잔류종양을 나타낸다
10/95	· 제2세포이식 수행함
12/95	· 감마나이프치치 2회 수행함
2/96	· 폴리 IC:LC로 처리
4/96	· 종양진행됨. 후두엽 절제술 수행함. 종양은 교차된 종양선을 갖는 것으로 주목되었다. 절제불가능
5/96	· 백신은 피하투여하였다 · 국소의 즉각적인 과민증과 지연된 과민증이 관찰됨. 환자는 발열반응을 나타낸다
6/96	· 환자안정 및 신경계 호전. 종양성장없음 부종 50% 감소. · 항종양 활성화에 대한 MLTC 분석이 양성이며 숙주 공급원의 항종양 면역반응과 일치됨

백신의 피부투여 12일후 수행한 MLTC 분석은 면역반응의 1월-3월에 앞서 주목된 수준으로의 극적인 회복을 나타내었다. MLTC 결과는 1996년 6월 14일에 수행된 결정을 통해 대략 이 수준에서 계속되었다. 환자는 대략 1996년 9월에 사망하였다.

백신 프로토콜의 변수를 입증하기 위한 더 이상의 시도를 행한다. 등급 III 또는 IV 성상세포종을 갖는 환자들을 실시예 1에서와 같이 적당한 Institutional Review Board의 후원하에 행한 연구로 모집하였다. 모든 환자를 내용을 알고 동의하에 등록하고 여러 처치군으로 무작위로 나누었다.

종양세포를 수술시 각 환자로부터 저온 보존하고, 필요하다면 생체외증식하여 예상된 치료과정에 충분한 세포를 얻었다. 해동 또는 배양된 종양 세포를 10,000rads의 감마선 조사를 받게 한다. 불활성화 환자 자 극인자세포와 공여자 백혈구를 사용하여 예비 스케일의 혼합된 림프구 배양물을 본질적으로 실시예 1에 기술된 바와 같이 행한다.

한번 시도에서, 환자는 2주 간격으로 두번 백신접종받는다. 각 세포 백신을 제조하기 위해 사용된 단핵세포는 두명의건강한 관련없는 공여자로부터 얻어진다. 공여자는 감염성 질환에 대한 위험성을 최소화하기 위해 사전 스크리닝하였고, 시험양성인 것들을 제거한다. 스크리닝은 HIV-1, HIV-2, HTLV-I, HTLV-II, 간염 C형, 또는 간염 B형 코어, HIV 항원 HBsAg, RPR, 또는 ALT와 같은 간 마커에 있어서 상승에 특이적인 항체에 대한 시험을 포함한다. HLA-A, -B, -C 및 -DR 유형화를 행하여 환자와와 서로에 동종이제인 공여자를 선별한다. 유전학적으로 이종의 공여자를 사용함으로써 제2투여의 과민(hyperacute)거부의 가능성이 감소된다. 게다가, 각 주사는 사전형성된 항체의 존재에 대해 주 교차매치(공여자세포 및 환자의 혈청)를 시험하는 것에 선행된다. 혈액형태의 매치는 Rh-플러스 공여자로부터 가임연령 이하의 Rh-마이너스 여성에 세포의 투여가 가능한 경우 회피되는 것을 제외하고는 일반적으로 요구되지 않는다.

혼합림프구 배양을 공여자와 불활성화된 환자 말초혈 단핵세포를 10:1의 비율로 혼합하고, 2% 우태아 혈청으로 보충된 AIMV내의 3×10^6 세포/mL에서 37℃에서 3일간 배양함으로써 행한다. 단일 접종물에 요구된 단핵세포의 총수는 1×10^9 이하이다. 자극된 세포를 수집하고 원심분리에 의해 세척한 다음 멸균 주사용 식염수에 현탁시킨다. 활성화된 세포의 생산의 품질관리는 세포수와 생존율을 모니터하고, 마이코플라스마

마와 엔도톡신에 대해 시험하고, 초기 활성화 마커를 사용하여 림프구 활성화에 대해 모니터링하는 것을 포함한다.

처치에 사용하기 전에, 알로 활성화된 세포제제를 또한 기능성 방출 평가기준에 따라 평가한다. 실시예 5에 기술된 테트라졸륨 환원 분석(XTT)을 세포 샘플에 대해 행한다. 흘림 세포계산을 행하여 형광항체를 사용하여 CD 69의 세포표면 발현을 측정하거나 또는 플루오레세인 디아세테이트를 사용하여 증가된 세포 내 에스테라제 활성을 행한다. 배양된 세포는 이들 분석법중 어느 하나(그러나 바람직하게는 둘다)에서 측정된 수준이 배양기간중 어떤날 (제1일, 제2일, 또는 제3일)에 대한 비자극 공여자 콘트롤 값보다 $\geq 10\%$ 위이다. 일단 배양물이 평가기준을 통과하면, 후속일수들에 대한 시험은 필요하지 않다. 세포를 제3일에 수확하고, 요구되는 수의 1차 또는 배양된 종양세포와 혼합하고 사람 투여를 위해 준비한다.

먼저 연구로 모집한 환자들은 세등급의 투여량중 한가지를 2주간격으로 2회 주사로 맞는다(10^8 MLC 세포: 10^8 종양세포): 그룹 1은 1×10^8 MLC 세포를 받고; 그룹 2는 5×10^8 MLC 세포를 받고; 그룹 3은 1×10^9 MLC 세포를 받는다. MLC 세포를 유용한 수에 따라 각 점종물에 대해 환자로부터 유도된 1×10^6 내지 1×10^7 종양세포와, 가능하면 1×10^7 쪽에 가깝게 하여 혼합된다. 점종은 20-21개이지 침을 사용하여 앞 중간 대퇴부에 양쪽에 서해부인대 10cm 아래에 피하투여한다. 최대 허용투여량(MTD)은 다음과 같이 결정한다: 주어진 세포 조합을 받는 세환자중 적어도 한 환자가 가역성 등급 3 또는 비가역성 등급 2독성을 나타내고 3명까지의 추가 환자들이 같은 투여량에 가담한다. 두번째 환자는 어느 정도의 독성 이상을 나타내고 세포 조합은 MTD로서 정의된다. 그렇지 않으면, 투여량은 최대수준에 이를때까지 증가시킨다.

임상적 반응을 주사부위에서 국소경화, 소양증 또는 괴사; 열, 권대감, 두통, 및 변경된 혈액작용 또는 신장변수를 포함하는 몇가지 평가기준; 그리고 MRI로서 이러한 평가기준에 의해 검출된 종양부피에 의해 모니터링된다. MRI로부터의 결과는 주의깊게 해석된다. 성장하는 종양 덩어리(진행성 질환의 특징) 또는 국소 백혈구 경화(성공적인 치료의 가능한 특징)은 둘다 MRI 상에 확대 부위로서 나타날수도 있다. 그러나, 부위의 감소는 종양 덩어리의 수축 및 성공적인 치료와 일치한다.

처치된 환자에서 세포 면역 반응의 존재는 몇가지 평가기준에 의해 모니터링된다. 각 점종 전과후에 얻어진 환자림프구를 공여자 공급원의 또는 제3의 조사된 동종이계세포(항알로타입반응에 대해서), 또는 조사된 환자종양세포 또는 제3의 종양세포(특이적 항종양 반응에 대해서)와 함께 배양한다. 배양물에서 환자 림프구의 반응은 MTT의 환원을 사용하여 증식을 측정함으로써 또는 세포분할을 위한 대리마커로서 다른 기능적 분석중 한가지에 의해 결정된다. CD69의 발현은 PE-표지된 항체를 사용하여 면역 플루오로 혈구계산법에 의해 결정된다.

선택적으로, 반응하는 T세포는 CD4, CD8, 또는 CD31에 대해 공염색하여 헬퍼 또는 억제자 서브세트를 동정하고 CD45RF에 대해 T_{H1} 을 T_{H2} 세포로부터 구별한다. 배지로 분비된 시토킨 IL-2, IL-4, IFN- γ 및 TNF- α 는 ELISA에 의해 정량화된다. IL-2 및 IFN- γ 는 T_{H1} 활성화와 상관하며, IL-4는 T_{H2} 활성화와 상관하고 TNF- α 는 양자의 활성화와 상관한다.

환자의 PBL도 또한 이 실시예에 초기에 기술한 바와 같이 자가면역 종양세포에 반응하는 능력에 대해 시험한다. PBL은 종양세포의 존재 또는 부재하에 배양한 다음 반응성의 정도에 대해 측정한다. 일반적인 T 세포 활성화는 실시예 5에 기술된 기능적 분석, [3H]티미딘 포함, 또는 배발생에 의해 측정될 수 있다. 세포독성 T세포활성은 ^{51}Cr 표지된 종양세포의 세포용해로서 측정될 수 있다. 처치된 환자에서 효과적인 지연된 형태의 과민증(DTH)항종양반응은 5×10^5 자가 종양세포, 볼거리, 트리코피틴, 또는 PPD 항원의 피부내투여의 48시간 반응을 처치전에 같은 시리즈에 대해 관찰된 것과 비교함으로써 측정된다.

후속시도에서, 백신요법은 이식요법과 조합된다. 외과적인 크기축소(debulking)시에, 자가 자극인자세포로 자극된 동종이계 림프구의 이식물을 실시예 1에 기술된 대로 종양 베드에 놓는다. 제거된 종양세포를 세포 백신의 제조를 위해 동결 및/또는 배양한다. 환자에 동종이계이고 바람직하게는 서로 및 이식물에 대한 세포공여자에 동종이계인 두 공여자를 선택한다. 각 공여자세포를 이 실시예에서 초기에 기술된 바와 같이 백신의 MLC성분을 제조하기 위해 사용한 다음 환자의 종양세포와 혼합한다. 한 백신을 이식후 4주때에 투여하고 두번째 백신을 6주때에 투여한다. 선택된 투여량은 앞의 시도에서 확립된 MTD이거나 또는 아래이다. 임상적 및 면역학적 평가기준을 전과 같이 모니터링한다.

조합요법을 받는 환자의 반응을 두개내 이식물만을 받은 환자와 비교하여 이전의 백신 접종이 이식물의 효과를 향상시키는 정도를 구한다.

또 다른 연구는 단계 IV(전이성) 결장암을 가진 환자에 대해 행한다. 환자를 세부사항을 알구 승인하에 연구에 가담시키고 표준 결장절제술을 받는다. 약 1주후(그들이 병원에서 나가는 시기쯤) 그들은 4회 백신주사과정을 시작한다.

백신조성물은 본질적으로 종양세포와 혼합된 알로 활성화된 세포집단으로 구성된다. 환자들은 세가지 다른 투여량 즉, 1×10^8 MLC 세포; 3×10^8 MLC 세포; 또는 1×10^9 MLC 중 한가지를 받고 유용성에 따라 1×10^7 까지의 불활성화된 종양세포와 혼합한다. 같은 투여량으로 매주스케줄로 4회 투여받는다.

초기 연구를 일차적으로 행하여 최대 허용 투여량(MTD)을 결정한다. 주사부위에서 바람직하지 못한 임상적 부작용은 허용되지 못하는 수준의 경화, 염증 또는 궤양화를 포함한다.

일단 MTD가 결정되면, 4주 백신접종 스케줄 단독과 종양 덩어리로 직접 이식에 의해 개시된 백신접종과정간의 비교를 한다. 초음파를 사용하여 결장절제술후 2일 내지 1주후 이식물군을 주사침을 간에서 전이성 종양 덩어리로 인도하도록 처치한다. 전이성 부위에 10×10^9 MLC 알로 활성화 세포제제를 단독으로 주사하고 최소부피의 식염수에 현탁시킨다. 1주후부터 시작하여 이 그룹의 환자는 또한 4주 과정의 MLC-종양세포 백신을 받는다.

환자를 치료후 적어도 3개월 동안 임상적 및 면역학적 반응의 정도에 대해 모니터한다. 면역학적 평가기준은 상기한 바를 따른다. 임상적 평가기준은 부분적으로 간에서 존재하는 종양 전이의 부피를 추적하는 것으로 이어진다. CT 스캔을 규칙적인 간격으로 행하고 각 전이성 부위의 부피를 계산하고 부피를 치료전에 얻은 측정치와 비교한다. 질병의 진행은 전이의 부피증가 또는 전이부위수의 증가로 나타난다. 성공적인 결과는 질환의 역전 또는 같은 등급의 결장암을 가진 환자의 전형적인 결과에 비해 더 느린 진행으로 나타난다.

실시에 9: 알로 활성화된 세포 조성물의 상업적 생산

이 프로토콜은 혼합된 림프구 배양물의 생산에 대한 전면적인 접근을 기술한다. 이 방법론의 설계는 Good Manufacturing(GMP) 및 Good Laboratory(GLP) Practices를 고려하고 U.S Federal Regulations의 Code 21의 요구조건에 따른다.

환자 말초혈 단핵세포, 적어도 2×10^9 세포를 처치받을 환자로부터 변형된 백혈구 분리반출(leukapheresis)에 의해 수집한다. 세포의 분리를 Stem Cell Collection Procedure를 사용하여 Baxter Fenwall 소실(apheresis)기계 또는 대등한 기계상에서 수행한다. 세포를 얼음위 박스터 타입 성분 백(4-10°C)에 넣는다. MONITOR-MARK™ 시간/온도 태그를 사용하여 변이온도를 모니터한다.

공여자 말초혈 단핵세포, 적어도 10×10^9 세포를 건강한 개인으로부터 변형된 백혈구 분리반출에 의해 수집한다. 세포의 분리를 Baxter Fenwall 소실기계 또는 대등한 기계상에서 Stem Cell Collection Procedure를 사용하여 수행한다. 공여자는 관련없는 익명의 무작위 개인이고 사전 스크리닝된 잠재적 공여자의 목록에서 뽑았다.

공여자의 사전 스크리닝은 HIV, 감염, 해면형태뇌염균, 또는 결핵에 대한 음성의 위험인자를 가리켜야 한다. 각 세포 성분은 HIV 1/2 Ab, HIV Ag, CMV Ab, HTLV 1/II Ab, HCV Ab, HBcAb, HBsAg 및 RPR에 대해 네거티브인 것으로 시험한다. 세포를 얼음위 박스터형 성분 백(4-10°C)에 넣는다.

수용시, 각 성분을 멸균, 적당한 세포수, 및 생존력에 대해 시험한다. 성분들을 사용시까지 4-10°C로 유지하고, 수집 72시간내에 사용하거나 냉동한다. 해동된 냉동재료는 2시간내에 사용하고 재냉동하지 않는다. 사전임상연구는 DMSO 함유 매질에서 냉동된 ACD 응집방지된 혈장 또는 재료에 4°C에서 보관된 성분들이 효과적인 세포조성물의 생산에 적합함을 가리킨다.

혈장을 원심분리에 의해 공여자와 환자성분들로부터 제거한다. 공여자 혈장을 수집하고 배지보충물로서 사용을 위해 열불활성화시킬 수도 있다. 성분세포들을 작은 부피의 PBS에 현탁시키고 적당한 부피의 각 현탁액을 혼합하여 3×10^6 단핵세포/ml를 AIMV 배지에 10:1 내지 20:1(공여자: 환자세포)의 비율로 함유하는 배양물을 제조한다. 열불활성화된 공여자 혈장을 2%의 최종농도로 첨가한다. 혼합된 세포를 Fenwall 용액펌프와 멸균기구의 사용을 통해 Fenwall 3리터 기계투과성 배양백에 펌핑한다. 성분세포의 샘플을 또한 림프구 활성화의 시험을 위해 작은 배양관에 설치할 수도 있다. 기능적 활성의 시험은 비자극 공여자 세포만을 함유하는 콘트를 배양물과 비교된다.

세포 혼합물을 5% 가습된 HEPA 여과된 CO₂와 함께 3일간 ISO-. 9000 Forma 37°C에서 배양하고 밀접하게 모니터한다. 세포를 원심분리에 의해 배양후 수확한다. 샘플을 품질보장분석을 위해 취한다. 각 제제를 최종 멸균, 적당한 세포수, 적당한 생존력 및 기능적 활성화에 대해 시험한다.

세포제제를 멸균한 25% 사람 알부민에 현탁시키고 운반을 위해 멸균한 주사용 바이알에 넣는다. 포장 30시간후 각 제제를 만기일 및 시간을 라벨붙이고 적당한 지시서, 방출내역결과, 및 MONITOR-MARK™ 시간/온도 태그를 첨부한다. 세포제제를 포장하고 방새 급송서비스를 통해 수송한다. 즉시 사용하지 않으면 4-10°C의 냉장고에 보관한다. 만기일 전에 이식되지 않는 제제는 모두 폐기한다.

제품 일관성을 측정하는 과정중 시험에는 다음을 포함한다.

- 사전 스크린 감염성 질환 시험;
- 과정중 및 최종제품 멸균도 시험;
- 최종제품 마이코플라스마 및 내독소;
- 과정중 및 최종제품세포수; 과정중 및 최종제품 생존력($\geq 85\%$)

세포는 또한 만족스러운 기능적 평가기준을 충족해야 한다. 이들 평가기준을 모두 충족하지 않는 제제는 환자치료에 사용되지 않는다.

[표 8]

공여자 및 환자 스크리닝(백혈구 분리방출 과정시)

시험	방법(병원혈액은행습 대로)	내역
위험인자에 대한 사전스크린	HIV	보고서만
	간염	
	해면형태 뇌염	
	결핵	

외래약제 스크리닝	HIV 1 및 2 Ab HIV Ag HBs-Ag HBcAb* HCV Ab HTLV 1 및 2 Ab CMV Ab* RPR	모두 네거티브*
-----------	---	----------

* 환자는 HBcAb 또는 CMV Ab에 대해 양성일 수도 있고, 성분들은 그대로 표지된다.
만일 CMV 네거티브 증여자 성분들이 입수되지 않으면, CMV 음성환자라도 CMV Ab 양성공여자 성분을 사용할수도 있다.

[표 9]

공여자 및 환자 단핵세포의 사전과정(환자 단핵세포의 조사에 앞서 편이시설에서 수용시)

시험	내역
평균도	평균
세포수	
환자:	$\geq 2 \times 10^9$ 세포
공여자:	$\geq 10 \times 10^9$ 세포

[표 10]

동종 활성화된 세포의 과정중 시험

시험	분석	내역
림프구 활성화의 생체활성 (배양 제1일, 제2일 및/또는 제3일에 한 시험)	테트라졸륨 환원 분석 (XTT)	시험 어느날에도 비자극 공여자 컨트롤 값의 $\geq 10\%$ 위이다
	흐림 혈구 계산법 (형광 항체에 의한 CD69의 세포표면 발현; 또는 플루오레세인 아세테이트에 의한 증가된 세포내 에스테라제활성)	시험 어느날에도 비자극 공여자 컨트롤 값의 $\geq 10\%$ 위이다

[표 11]

최종제품 시험

시험	내역
평균도	평균
세포수	9×10^9 세포 ($\pm 10\%$)
생존력	$\geq 85\%$ 생존세포
마이크플라스마	음성(이식후까지는 결과 모름)
내독소	$\leq 350\text{EU/전신체}$

전술한 발명은 명료성과 이해를 목적으로 예시 및 실시예에 의해 기술하였으나, 당업자에게는 어떤 변화 및 변경을 행할수 있음이 명백하다. 그러므로, 명세서 및 실시예는 첨부 청구범위에 의해 상술되는 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

a) 사람에 동종이계인 자극된 림프구와

b) 사람으로부터의 종양관련항원의 효과적인 조합으로 이루어지는 사람에게 투여를 위해 적합한 면역원성 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 종양관련항원은 상기 사람으로부터의 1차종양세포, 또는 종양세포를 생체외 배양함으로써 얻어진 이러한 종양세포의 자손에 포함되어 있는 것을 특징으로 하는 면역원성 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 종양관련항원은 상기 사람으로부터의 1차종양세포의 추출물, 상기 사람으로부터의 1차종양세포의 자손, 또는 이것들의 조합에 포함되어 있는 것을 특징으로 하는 면역원성 조성물.

청구항 4

제 1 항 내지 제 3 항중 어느 한 항에 있어서, 상기 자극된 림프구는 림프구에 동종이계인 백혈구와 배양함으로써 자극된 것을 특징으로 하는 면역원성 조성물.

청구항 5

제 1 항 내지 제 3 항중 어느 한 항에 있어서, 상기 자극된 림프구는 재조합 생산된 시토킨, 미토겐과 배양하거나, 또는 높은 수준으로 시토킨을 분비하도록 유전학적으로 변경된 세포와 배양함으로써 자극된 것을 특징으로 하는 면역원성 조성물.

청구항 6

a) 사람에 동종이계인 림프구;

b) 림프구에 동종이계인 백혈구;

c) 사람으로부터 얻어진 1차종양세포, 또는 이러한 세포의 자손으로 본질적으로 구성되는 불활성화된 종양세포집단의 효과적인 조합으로 이루어지는 사람에게 투여를 위해 적합한 면역원성 조성물.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 백혈구는 사람에 자가유래인 것을 특징으로 하는 면역원성 조성물.

청구항 8

제 6 항에 있어서, 백혈구는 사람에 동종이계인 것을 특징으로 하는 면역원성 조성물.

청구항 9

제 6 항에 있어서, 적어도 세 다른 사람 공여자로부터의 백혈구로 이루어지는 것을 특징으로 하는 면역원성 조성물.

청구항 10

제 6 항에 있어서, 불활성화된 종양세포집단은 흑색종, 체장암, 간암, 결장암, 전립선암, 및 유방암으로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 면역원성 조성물.

청구항 11

제 6 항에 있어서, 백혈구는 불활성화되어 있는 것을 특징으로 하는 면역원성 조성물.

청구항 12

제 6 항에 있어서, 상기 림프구는 높은 수준으로 시토킨을 발현하도록 유전학적으로 변경된 세포로 이루어지는 것을 특징으로 하는 면역원성 조성물.

청구항 13

제 6 항에 있어서, 상기 백혈구 및 상기 림프구는 상기 종양세포집단과 조합에 앞서 림프구의 동종이계자극에 충분한 지속기간 및 조건하에 공배양되는 것을 특징으로 하는 면역원성 조성물.

청구항 14

제 6 항에 있어서, 상기 공배양은 림프구에 의한 높은 시토킨분비를 자극하기에 충분한 지속기간 및 조건하에서 하는 것을 특징으로 하는 면역원성 조성물.

청구항 15

제 6 항 내지 제 14 항중 어느 한 항에 있어서, 투여량내의 백혈구에 동종이계인 상기 림프구의 수는 약 1×10^8 내지 2×10^9 인 것을 특징으로 하는 단위투여량의 면역원성 조성물.

청구항 16

제 6 항 내지 제 14 항중 어느 한 항에 있어서, 투여량내의 불활성화된 종양세포집단은 약 1×10^6 내지 5×10^7 세포로 구성되는 것을 특징으로 하는 단위투여량의 면역원성 조성물.

청구항 17

제 1 항의 면역원성 조성물의 제조방법에 있어서,

- a) 상기 사람에게 동종이계인 자극된 림프구를
- b) 사람으로부터의 종양관련항원과 혼합하는 것으로 이루어지는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 18

제 1 항의 면역원성 조성물의 제조방법에 있어서,

- a) 상기 사람에 동종이계인 림프구와 림프구에 동종이계인 백혈구의 공배양으로부터 얻은 세포와
- b) 사람으로부터의 1차종양세포, 또는 그것의 자손과 혼합하는 것으로 이루어지는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 19

제 1 항의 면역원성 조성물의 제조를 위한 키트에 있어서,

- a) 사람에 동종이계인 자극된 림프구와
- b) 사람으로부터의 종양관련항원을 별도의 용기에 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 20

제 1 항의 면역원성 조성물의 제조를 위한 키트에 있어서,

- a) 상기 사람에 동종이계인 림프구와 림프구에 동종이계인 백혈구의 공배양으로부터 얻은 세포와
- b) 사람으로부터의 1차종양세포, 또는 그것의 자손을 별도의 용기에 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 21

제 1 항 내지 제 5 항중 어느 한 항의 면역원성 조성물의 면역원성 양을 사람에게 투여하는 것으로 이루어지는 사람에서 항종양 면역반응을 유도하는 방법.

청구항 22

제 6 항 내지 제 14 항중 어느 한 항의 면역원성 조성물의 면역원성 양을 사람에게 투여하는 것으로 이루어지는 사람에서 항종양 면역반응을 유도하는 방법.

청구항 23

- a) 종양세포로 이루어지는 제1 세포집단과 림프구에 동종이계인 림프구로 이루어지는 제2 세포집단을 생체외 혼합하여 세포혼합물을 제조하는 단계와,
- b) 세포혼합물의 면역원성 양을 사람에게 투여하는 단계로 이루어지는 사람에서 항종양 면역반응을 자극하는 방법.

청구항 24

제 23 항에 있어서, 상기 종양세포는 흑색종, 체장암, 간암, 결장암, 전립선암, 및 유방암으로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 25

제 23 항에 있어서, 상기 제2 세포집단은 림프구에 동종이계인 백혈구를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 26

제 23 항에 있어서, 제2 세포집단은 적어도 세 다른 사람 공여자로부터의 백혈구를 함유하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 27

제 23 항에 있어서, 백혈구는 사람에 자가유래인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 28

제 23 항에 있어서, 백혈구는 사람에 동종이계인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 29

제 23 항에 있어서, 상기 면역반응은 1차반응인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 30

제 23 항에 있어서, 상기 면역반응은 2차반응인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 31

제 23 항에 있어서, 상기 사람은 사람의 고형종양으로 또는 고형종양 또는 그것의 일부가 제거된 부위 또는 그 주위에 동종활성화된 동종이계 림프구의 투여에 의해 사전에 처치된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 32

제 1 항 내지 제 14 항중 어느 한 항의 면역원성 조성물 유효량을 사람에게 투여하는 것으로 이루어지는 사람에서 신경형성질환을 치료하는 방법.

청구항 33

- a) 종양세포로 이루어지는 제1 세포집단과 림프구에 동종이계인 림프구로 이루어지는 제2 세포집단을 생체외 혼합하여 세포혼합물을 제조하는 단계와,
- b) 세포혼합물의 유효량을 사람에게 투여하는 단계로 이루어지는 사람에서 신경형성질환을 치료하는 방법.

청구항 34

제 33 항에 있어서, 상기 제2 세포집단은 림프구에 동종이계인 백혈구를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 35

수술 또는 치료에 의한 사람의 치료방법에 사용하기 위한

- a) 사람환자에 동종이계인 동종활성화된 림프구와,
- b) 사람환자로부터의 1차종양세포 또는 그것의 자손을 함유하는 세포집단.

청구항 36

제 35 항에 있어서, 림프구는 사람환자로부터의 백혈구에 대해 동종활성화된 것을 특징으로 하는 세포집단.

청구항 37

제 35 항에 있어서, 림프구는 사람환자에 동종이계인 백혈구에 대해 동종활성화된 것을 특징으로 하는 세포집단.

청구항 38

- a) 사람환자에 동종이계인 동종활성화된 림프구와,
- b) 사람환자로부터의 1차종양세포 또는 그것의 자손을 함유하는 세포집단의, 사람환자에서 종양을 치료하거나 항종양면역반응을 유발하기 위한 의학의 제조를 위한 사용.

청구항 39

제 38 항에 있어서, 림프구는 사람환자로부터의 백혈구에 대해 동종활성화된 것을 특징으로 하는 사용.

청구항 40

제 38 항에 있어서, 림프구는 사람환자에 동종이계인 백혈구에 대해 동종활성화된 것을 특징으로 하는 세포.

청구항 41

수술 또는 치료에 의한 사람의 치료방법에 동시, 별도 또는 연속사용을 위한

- a) 사람환자에 동종이계인 동종활성화된 림프구;
- b) 사람환자로부터의 1차종양세포 또는 그것의 자손을 함유하는 조합제제.

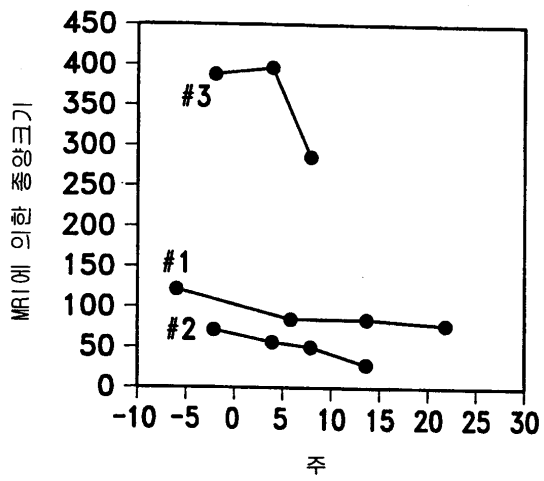
청구항 42

사람환자에서 종양을 치료하거나 항종양 면역반응을 유발하기 위한 동시, 별도 또는 연속사용을 위한

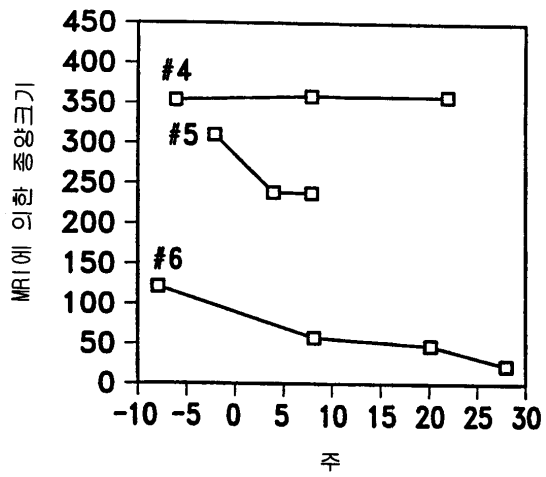
- a) 사람환자에 동종이계인 동종활성화된 림프구;
- b) 사람환자로부터의 1차종양세포 또는 그것의 자손을 함유하는 조합제제.

도면

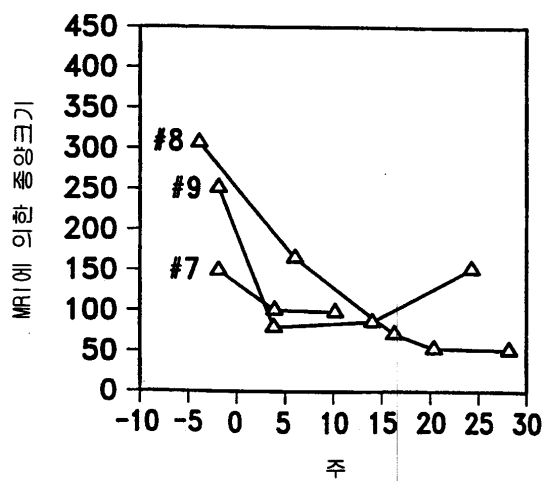
도면 1A



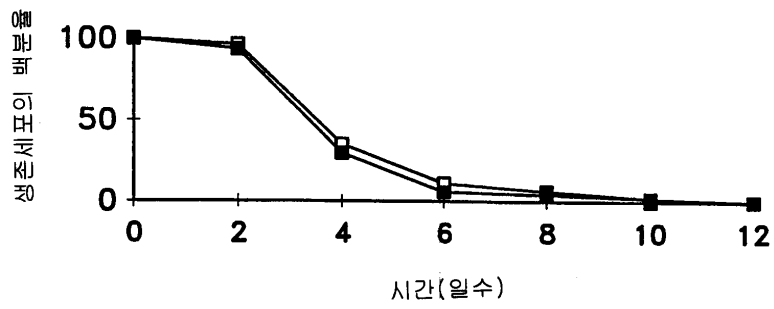
도면 1B



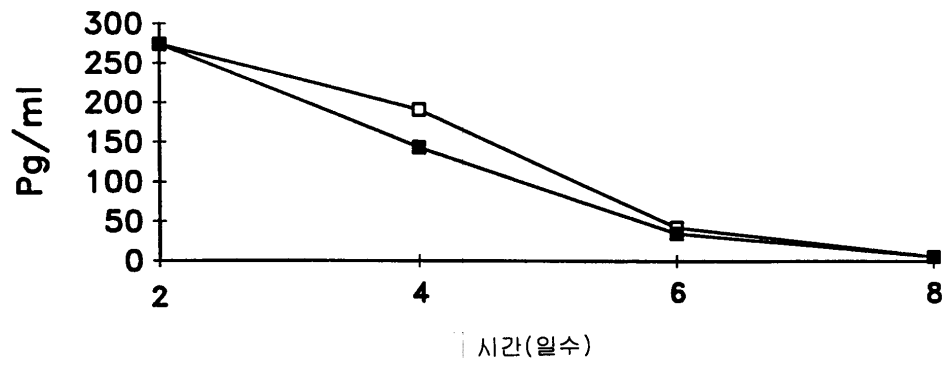
도면 1C



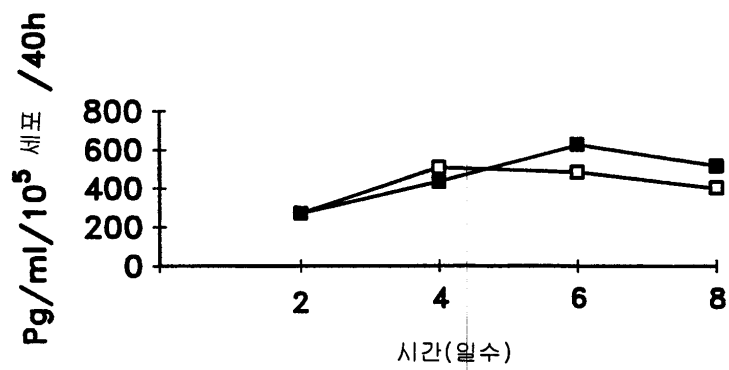
도면2A



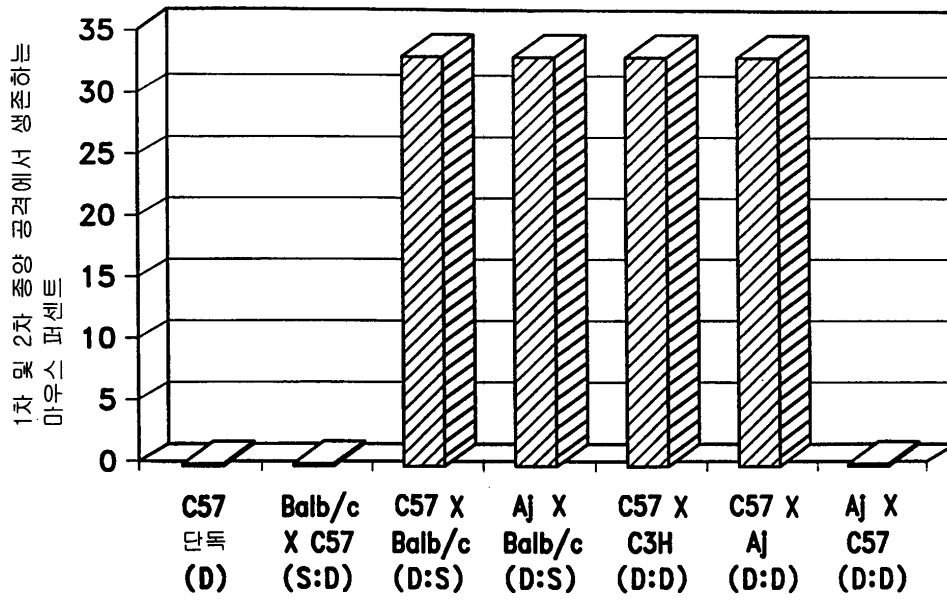
도면2B



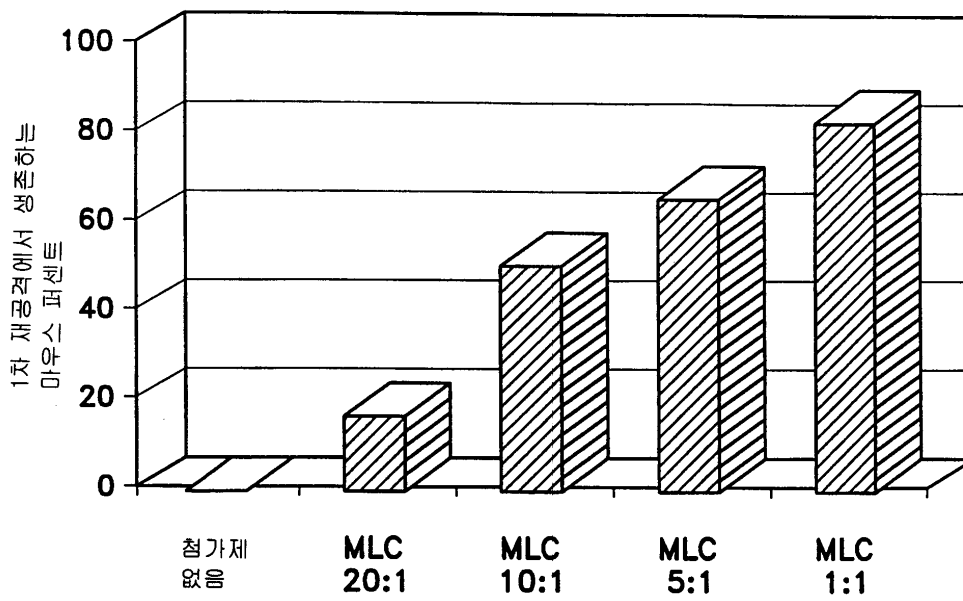
도면2C



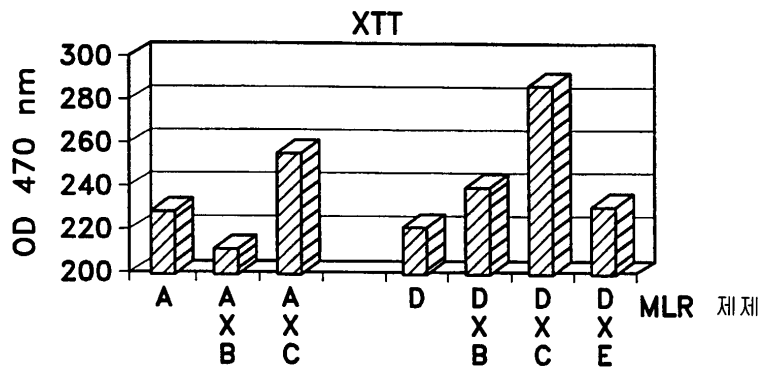
도면3



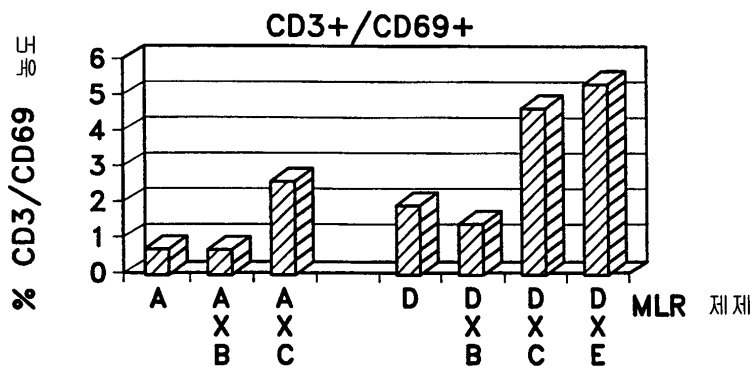
도면4



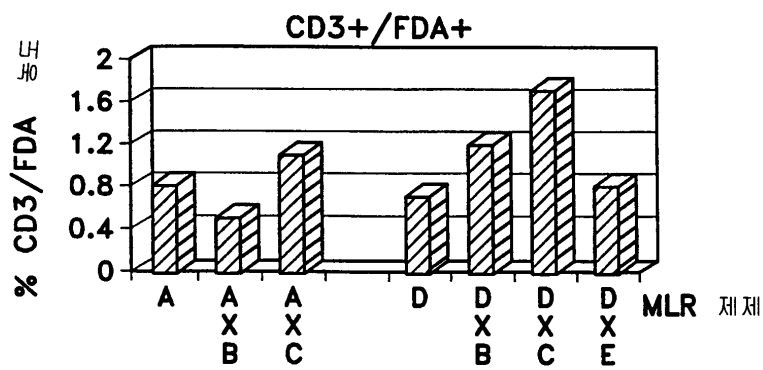
도면5A



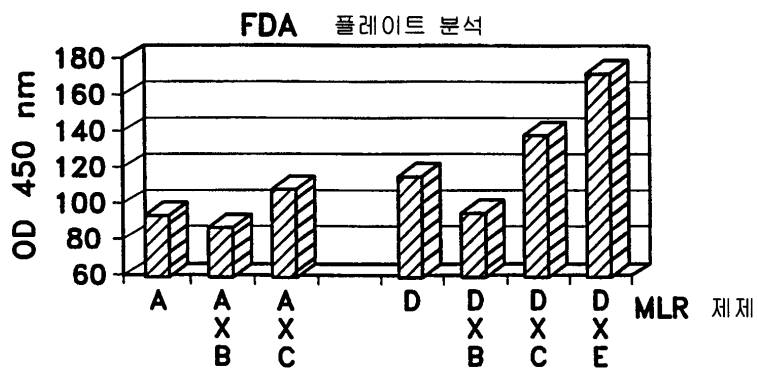
도면5B



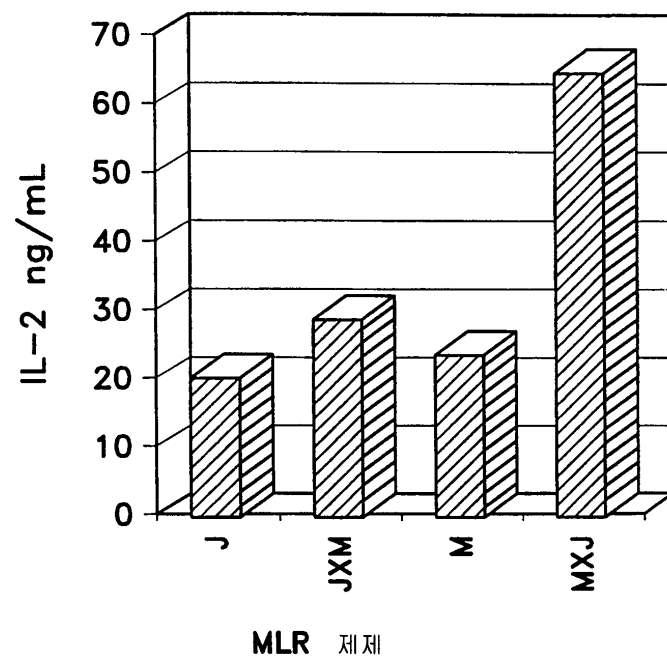
도면5C



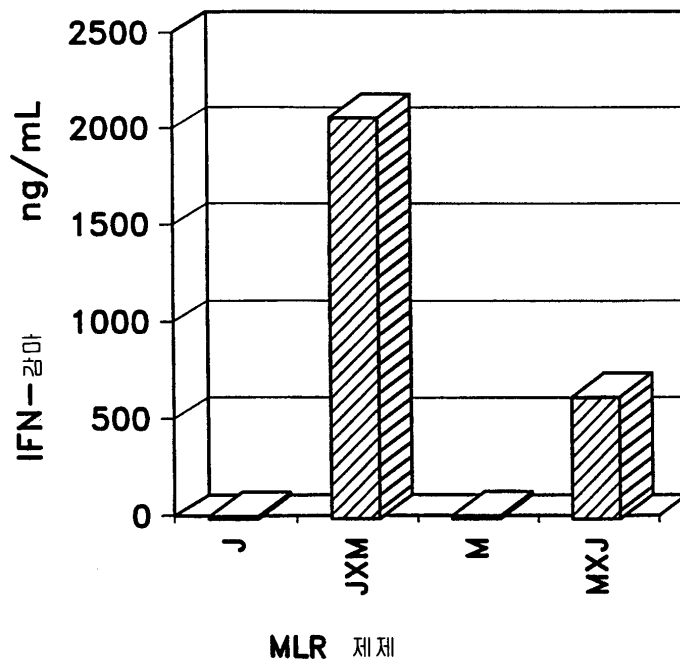
도면50



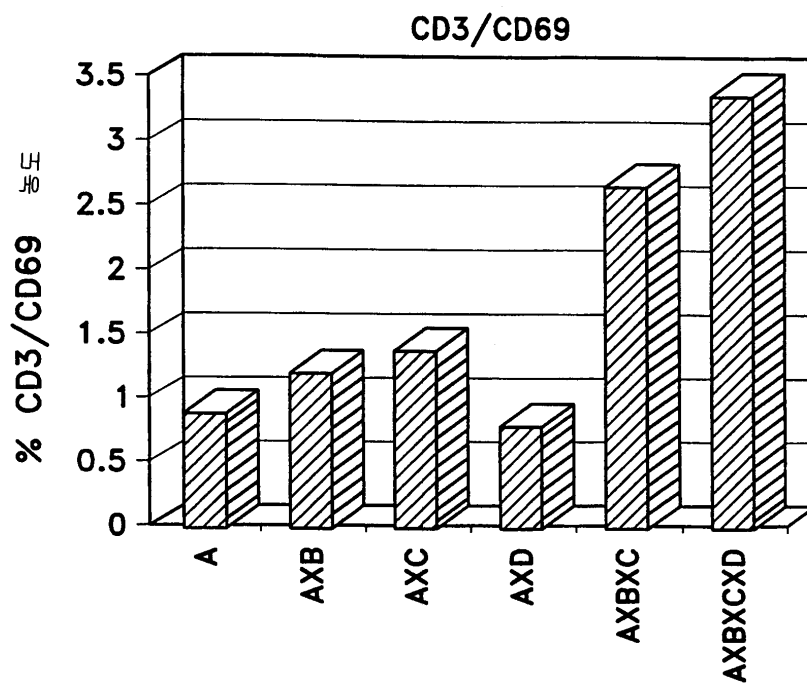
도면6A



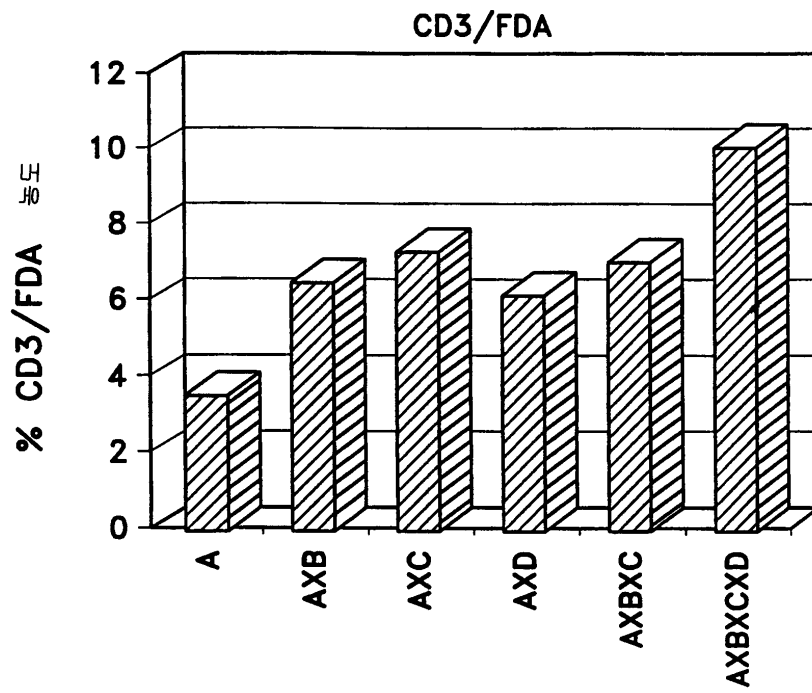
도면6B



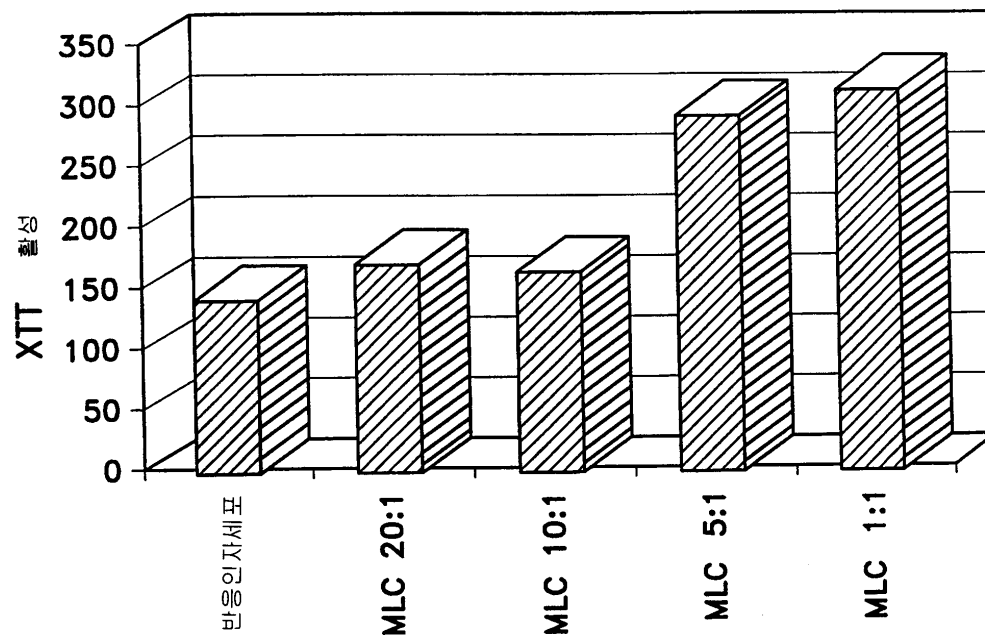
도면7A



도면7B



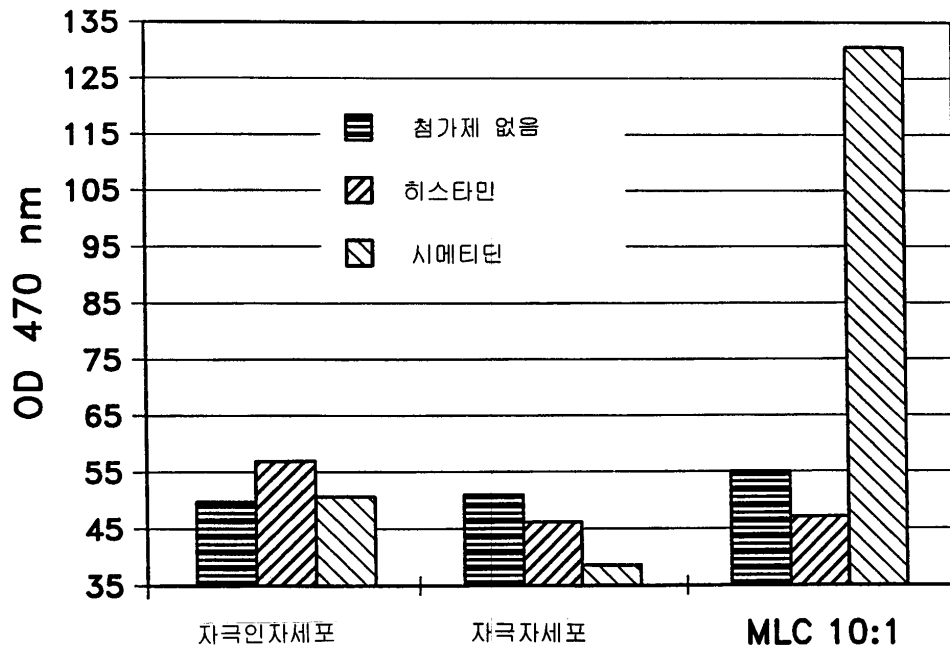
도면8



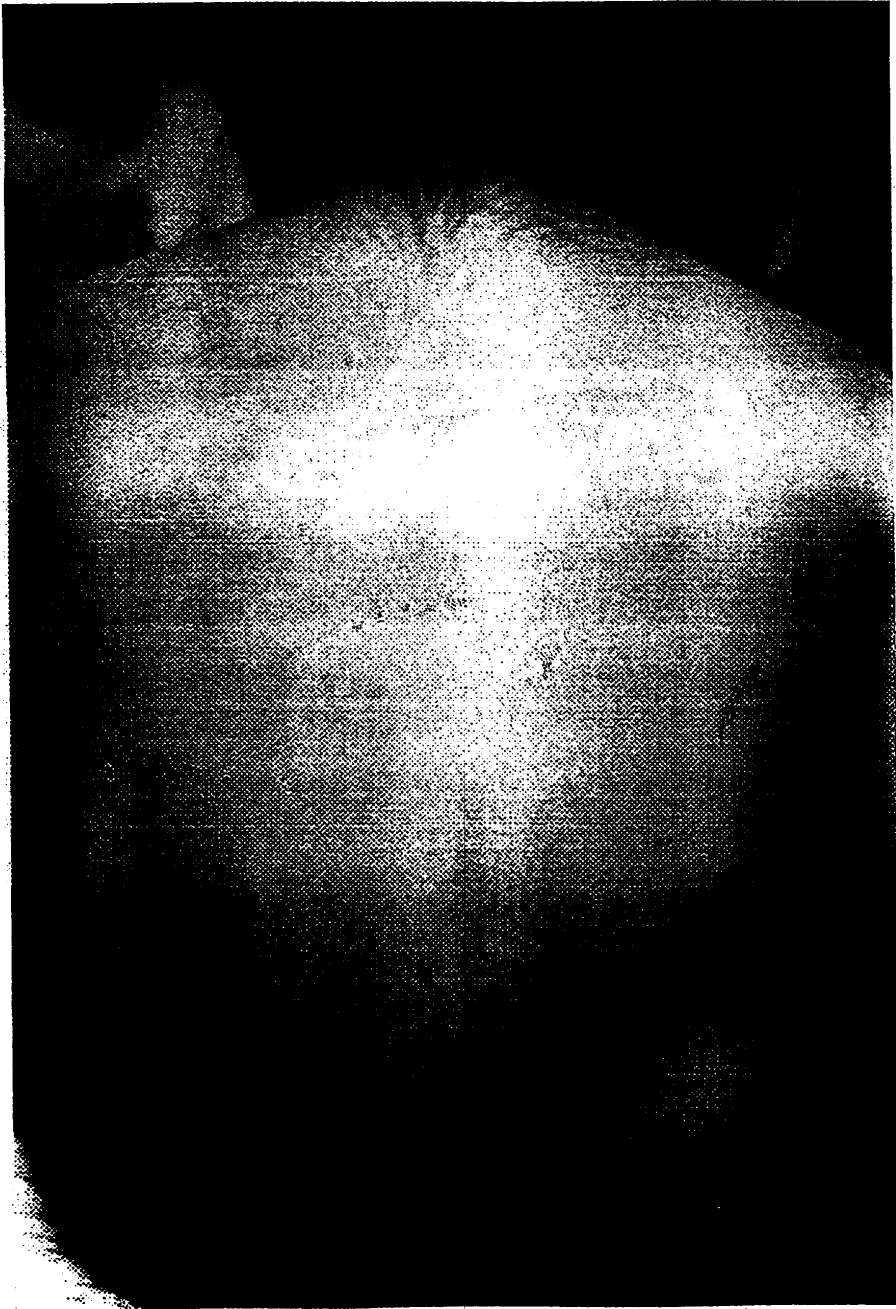
제제

도면9

XTT 포마장 감소



도면 10



도면11

