



(19)대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.

A61K 39/00 (2006.01)  
A61K 38/16 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2007-0086663  
(43) 공개일자 2007년08월27일

(21) 출원번호 10-2007-7014527

(22) 출원일자 2007년06월26일

심사청구일자 없음

번역문 제출일자 2007년06월26일

(86) 국제출원번호 PCT/US2005/043985

(87) 국제공개번호 WO 2006/062917

국제출원일자 2005년12월06일

국제공개일자 2006년06월15일

(30) 우선권주장 60/633,175 2004년12월06일 미국(US)

(71) 출원인 사이클론 파아머슈티컬 인코퍼레이티드  
미합중국 캘리포니아 산마테오 마리너스 아일랜드 블러바드 901

(72) 발명자 모비글리아, 거스타보, 안토니오  
아르헨티나, 에이비엔 부에노스 아이레스 1211, 파라과이 2452-1스트  
플로어  
루돌프, 알프레드, 알.  
미국, 캘리포니아 94022, 로스 알토스 힐스, 리디코트 드라이브14142

(74) 대리인 박경재

전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 암 백신 보조제로서 알파 티모신 펩티드류

(57) 요약

본 발명은 피검자에서 면역 시스템 응답을 끌어낼 수 있는 면역 응답-시동 암 백신 및 피검자에서 면역 시스템 응답을 증진시키는 알파 티모신 펩티드의 백신 효과-증진량을 이용하고, 여기서 암 백신 및 알파 티모신 펩티드는 개별적으로 또는 함께 투여될 수 있는 것인 피검자에서 암 백신 효과를 증진시키는 제약학적 조성물 및 그 방법에 관한 것이다.

특허청구의 범위

청구항 1.

a) 피검자에서 면역 시스템 응답을 이끌어낼 수 있는 면역-반응 시동 암 백신; 및

b) 상기 피검자에서 상기 면역 시스템 응답을 증진시키는 백신 효과-증진량의 알파 티모신 펩티드를 포함하고;

c) 여기서 상기 암 백신 및 상기 알파 티모신 펩티드는 개별적으로 또는 함께 투여될 수 있는 것인 피검자에서 암 백신 효과를 증진시키기 위해 피검자에서 암을 치료하기 위한 제약학적 조성물.

## 청구항 2.

제1항에 있어서, 상기 피검자는 인간이고, 상기 백신은 수지상 세포 백신인 제약학적 조성물.

## 청구항 3.

제1항에 있어서, 상기 백신은 약  $1 \times 10^{-9}$ g 내지 약  $1 \times 10^{-3}$ g의 양이고, 상기 알파 티모신 펩티드는 약 0.1-20 mg의 양인 제약학적 조성물.

## 청구항 4.

제1항에 있어서, 상기 백신은 약  $1 \times 10^{-8}$ g 내지 약  $1 \times 10^{-4}$ g의 양이고, 상기 알파 티모신 펩티드는 약 0.5-10 mg의 양인 제약학적 조성물.

## 청구항 5.

제4항에 있어서, 상기 알파 티모신 펩티드는 TA1이고, 상기 TA1의 양은 약 1.6-3.2 mg인 제약학적 조성물.

## 청구항 6.

제1항에 있어서, 상기 암은 유방암인 제약학적 조성물.

## 청구항 7.

제1항에 있어서, 상기 암은 1차 흑색종, 전이성 흑색종, 선암, 편평 상피 세포암, 아데노 편평 상피 세포암, 흉선종, 림프종, 육종, 폐암, 간암, 비호지킨성 림프종, 호지킨 림프종, 백혈병, 자궁암, 전립선암, 난소암, 췌장암, 대장암, 다발성 골수종, 신경아세포종, NPC, 방광암, 자궁 경부암, 신장암, 뇌종양, 골암, 자궁암, 위암 및 직장암으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 제약학적 조성물.

## 청구항 8.

a) 피검자에서 면역 시스템 응답을 이끌어낼 수 있는 면역-반응 시동 암 백신; 및

b) 상기 피검자에서 상기 면역 시스템 응답을 증진시키는 백신 효과-증진량의 알파 티모신 펩티드를 포함하고;

c) 여기서 상기 암 백신 및 상기 알파 티모신 펩티드는 개별적으로 또는 함께 투여될 수 있는 것인 피검자에서 암 백신 효과를 증진시키기 위해 제1항의 제약학적 조성물을 피검자에서 투여하는 단계를 포함하는 것으로,

피검자에게 알파 티모신 펩티드를 투여하는 것과 관련하여 상기 면역 반응 시동-암 백신을 피검자에게 투여하는 단계를 포함하고, 여기서 상기 백신 및 알파 티모신 펩티드는 개별적으로 또는 함께 상기 피검자에게 투여되는 것인, 암 치료 방법.

**청구항 9.**

제8항에 있어서, 상기 피검자는 인간이고, 상기 백신은 수지상 세포 백신인 방법.

**청구항 10.**

제8항에 있어서, 상기 백신은 약  $1 \times 10^{-9}$ g 내지 약  $1 \times 10^{-3}$ g의 양이고, 상기 알파 티모신 펩티드는 약 0.1-20 mg의 양으로 투여되는 것인 방법.

**청구항 11.**

제8항에 있어서, 상기 백신은 약  $1 \times 10^{-8}$ g 내지 약  $1 \times 10^{-4}$ g의 양이고, 상기 알파 티모신 펩티드는 약 0.5-10 mg의 양으로 투여되는 것인 방법.

**청구항 12.**

제11항에 있어서, 상기 알파 티모신 펩티드는 TA1이고, 상기 TA1의 양은 약 1.6-3.2 mg인 방법.

**청구항 13.**

제12항에 있어서, 상기 TA1은 상기 백신의 투여와 실질적으로 동시에 투여되는 것인 방법.

**청구항 14.**

제12항에 있어서, 상기 백신 및 상기 TA1은 주사에 의해 투여되는 것인 방법.

**청구항 15.**

제8항에 있어서, 상기 조성물은 다중 횟수로 상기 피검자에게 투여되는 것인 방법.

**청구항 16.**

제15항에 있어서, 상기 백신은 투여 기간 동안 상기 피검자에게 4-10회 투여되는 것인 방법.

**청구항 17.**

제16항에 있어서, 상기 백신은 투여 기간 동안 3주마다 상기 환자에게 투여되는 것인 방법.

**청구항 18.**

제17항에 있어서, 상기 알파 티모신 펩티드는 TA1이고, 상기 TA1은 투여 기간 동안 주 2회 투여되는 것인 방법.

## 청구항 19.

제18항에 있어서, 상기 투여 기간은 약 6개월인 방법.

### 명세서

#### 기술분야

본원 발명은 2004년 12월 6일자로 출원된 미합중국 지방 출원 제60/633,175호의 우선권을 주장한다.

본 발명은 암 치료 분야에 관한 것이다.

#### 배경기술

암은 전 세계적으로 사망의 주된 원인이다. 수술, 화학요법 및 방사선요법과 같은 암 치료에 대한 어떠한 특이적 접근법들도 환자들의 선택적인 그룹들에서 성공적이지 못하다. 면역요법은 암 치료를 위한 새로운 분야를 구성한다. 일반적인 원리는 종양 세포들에 반하여 면역학 활성을 증가시키는 능력을 치료 중인 피검자에게 제공하는 것이다. 최근 수년간 출현되고 현재 개발 중인 수많은 방법들이 있다. 이들 방법들은 알로겐성 림프구들의 전이, 면역 응답 세포들의 종양내 이식, 종양 특이적 면역 응답을 발생시키기 위한 전신 백신화 등을 포함한다.

당업계에는 개선된 항암 치료법 및 그 조성물들에 대한 필요성이 남아있다.

### 발명의 상세한 설명

본 발명에 따라, 피검자에서 면역 시스템 응답을 끌어낼 수 있는 면역 응답-시동 암 백신 및 피검자에서 면역 시스템 응답을 증진시키는 알파 티모신 펩티드의 백신 효과-증진량을 이용하고, 여기서 암 백신 및 알파 티모신 펩티드는 개별적으로 또는 함께 투여될 수 있는 것인 피검자에서 암 백신 효과를 증진시키는 제약학적 조성물 및 그 방법이 제공된다.

#### 실시예

본 발명은 피검자, 바람직하게는 포유동물 피검자, 가장 바람직하게는 인간 피검자에서 종양 및 암의 치료에 관한 것이다.

진행된 암은 통상의 암 치료 방법들에 대한 내성이 있다. 일부 암 백신들은 종양 응답과 연관되거나 또는 연관 없이 질병의 진행을 저지시키거나 또는 정지시키고, 생존률을 증가시키는데 있어서 약간의 활성을 보였다. 싸이멀패신(티모신 알파-1) 등의 알파 티모신 펩티드의 투여는 암 환자들의 백신 치료에 대한 긍정적인 보조제 효과를 갖고, 종양 크기를 감소시키고 암 백신 단독에 응답하지 않는 환자들을 포함하여 진행된 암 환자들에 대한 생존률을 증가시킨다(예, 수지상 세포 면역학).

본 발명은 암 및 종양의 치료에 관련된다. 일 실시예에서, 본 발명은 유방암을 포함하지만, 이것으로만 제한되지 않는 암 등의 신생물 질병을 갖고, 종양학 백신으로 치료받은 환자들의 치료에서 면역 조절제 기질 싸이멀패신 등의 알파 티모신 펩티드의 면역 자극 활성에 관한 것이다. 이는 수지상 세포 백신과 같은 암 백신들로 치료받은 환자들에서 알파 티모신 펩티드의 부가로 인한 치료 응답의 개선을 포함하지만, 이러한 종류의 암 백신에 대해 배타적이지 않다.

본 발명은 유방암 치료로 예시된다. 그러나, 본 발명을 사용하여 치료할 수 있는 암들은 1차 흑색종, 전이성 흑색종, 선암, 편평 상피 세포암, 아테노 편평 상피 세포암, 흉선종, 림프종, 육종, 폐암, 간암, 비호지킨성 림프종, 호지킨 림프종, 백혈병, 자궁암, 전립선암, 난소암, 췌장암, 대장암, 다발성 골수종, 신경아세포종, NPC, 방광암, 자궁 경부암, 신장암, 뇌종양, 골암, 자궁암, 위암, 직장암 등을 포함하지만, 이들로만 제한되지 않는다.

알파 티모신 펩티드는 천연 발생 TA1 뿐만 아니라 합성 TA1 및 천연 발생 TA1의 아미노산 서열, 그와 실질적으로 유사한 아미노산 서열, 또는 치환되거나, 결핍되거나, 삭제되거나, 신장되거나, 대체되거나, 또는 그의 축약된 서열 형태 및 TA1

의 그것과 실질적으로 유사한 생물 활성을 갖는 변형된 서열들을 갖는 재조합 TA1, 예를 들면 TA1과 실질적으로 동일한 활성을 갖는 실질적으로 동일한 방식으로 기능하도록 TA1과 충분한 아미노산 상동성을 갖는 TA1 유도된 펩티드를 포함하는 티모신 알파 1(TA1) 펩티드류를 포함한다. 알파 티모신 펩티드의 적절한 용량은 약 0.001-10 mg/kg/1일 범위일 수 있다.

"티모신 알파 1" 및 "TA1"이라는 용어는 미합중국 특허 제4,079,137호에 개시된 아미노산 서열을 갖는 펩티드를 의미하고, 그의 개시 내용을 본원에 참고 문헌으로 혼입한다.

알파 티모신 펩티드의 효과량은 약 0.1-20 mg의 TA1, 바람직하게는 0.5-10 mg의 TA1에 대응하는 범위 내의 용량 단위일 수 있는 암 백신-증진량이다. 더욱 바람직하게는, 용량 유닛은 약 1.4 mg의 TA1을 포함한다. 가장 바람직하게는, 용량 유닛은 약 1.6-3.2 mg을 포함한다.

티모신 분획 5(TF5)로부터 초기에 단리된 티모신 알파 1(TA1)는 서열화되고, 화학적으로 합성된다. TA1은 3108의 분자량을 갖는 28개의 아미노산 펩티드이다.

본 발명의 바람직한 실시예들에 따라 사용하기 위한 암 백신들은 수지상 세포 백신들이다.

암 백신들은 임의의 결합있는 복용량으로 본 발명에 따라 피검자에게 투여될 수 있다. 그러한 복용량은 약  $1 \times 10^{-9}$ g 내지 약  $1 \times 10^{-3}$ g 범위에 속할 수 있다. 다른 실시예들에서, 적절한 효과적인 암 백신 복용량은 약  $1 \times 10^{-8}$ g 내지 약  $1 \times 10^{-4}$ g 범위일 수 있다. 암 백신은 임의의 효과적인 횟수의 용량, 예를 들면 1-20 이상의 용량으로 피검자에게 투여될 수 있다. 바람직하게는, 암 백신은 복수개의 용량, 예를 들면 약 2 내지 약 15회 용량, 더욱 바람직하게는 약 4-10회 용량, 가장 바람직하게는 약 6회 용량으로 투여된다. 특히 바람직한 실시예들에서, 백신은 투여 기간 동안 약 3주에 한번 피검자의 건강한 림프절에 투여된다.

바람직한 실시예들에서, 면역 응답-시동 암 백신은 피검자에게 알파 티모신 펩티드를 투여하는 것과 관련하여 피검자에게 투여되고, 여기서 백신 및 알파 티모신 펩티드는 피검자에게 개별적으로 및(또는) 함께 투여된다. 일 실시예에서, 알파 티모신 펩티드는 적어도 백신을 1회 투여하는 동안 백신의 투여와 실질적으로 동시에 투여된다. 바람직한 실시예들에서, 백신 및 알파 티모신 펩티드 모두는 주사에 의해 투여된다. 바람직하게는, 백신 및 알파 티모신 펩티드 모두는 여러번 피검자에게 투여된다. 바람직한 실시예들에서, 알파 티모신 펩티드는 투여 기간 동안 1주 2회 투여된다. 투여 기간은 약 6개월로 지속되는 것이 특히 바람직하다. 일 실시예에서, 본 발명은 암 백신 치료 단독에 대한 응답자들이 아닌 피검자들에서 암의 치료에 적용될 수 있다.

특히 바람직한 실시예들에서, 알파 티모신 펩티드는 암 백신을 피검자에게 투여하는 것과 관련하여 약 1-4 mg(예, 약 1.6-3.2 mg) 범위 내의 제약학적 복용량 단위로 1주 2회 피하 주사에 의해 투여된다. 그러나, 알파 티모신 펩티드 및(또는) 암 백신을 함유하는 제약학적 복용량 단위들이 임의의 적절한 경로로 투여에 적합한 임의의 방식으로 제형될 수 있다.

본 발명의 이 실시예의 일 국면에 따라, 알파 티모신 펩티드를 함유하는 복용량 단위가 루틴한 방식으로 피검자에게 투여된다. 예를 들면, 복용량 단위는 1일 1회 이상, 1일 1회, 1주 1회, 1달 1회 등으로 투여될 수 있다. 복용량 단위는 2회-1주 기준으로, 즉 1주 2회, 예를 들면 3일마다 투여될 수 있다. 알파 티모신 펩티드의 복용량 단위는 또한 1주 3회 기준, 즉 1주 당 3회로 투여될 수 있다.

알파 티모신 펩티드 및 백신의 투여는 주사, 흡입 또는 경구 등의 임의의 적절한 수단에 의해 발생할 수 있다. 특히 바람직한 실시예에서, 투여는 주사에 의한 것이다.

백신 및 알파 티모신 펩티드가 동시에 투여될 때 이들은 백신 및 알파 티모신 펩티드를 포함하는 단일 조성물로서 제공될 수 있다.

백신 및(또는) 알파 티모신 펩티드를 포함하는 조성물들은 또한 1개 이상의 제약학적으로 허용되는 캐리어 및 임의로 기타 치료 성분들을 포함할 수 있다. 주사 또는 주입에 적절한 제형들은 임의로 항산화제, 완충액, 세균 발육 억제제 및 제형들이 의도된 수령인의 혈액과 등장성이 되게 하는 용질들 및 현탁액제들 및 증점제들을 포함할 수 있는 수성 및 비수성 멸균 현탁액들을 포함한다. 이 제형들은 단위-용량 또는 다중-용량 용기들 중에, 예를 들면 밀봉된 앰플들 및 바이알들 중에 제공될 수 있고, 사용 직전에 멸균 액체 캐리어 예를 들면 주사용 물의 부가만을 요하는 냉동-건조된(동결 건조된) 상태로 저장될 수 있다.

진행된 암은 통상의 암 치료 방법들에 대한 내성이 있다. 일부 암 백신들은 질병 진행을 감소 또는 정지시키고, 생존률을 증가시키기 위한 활성을 보였다. 싸이멀페신 (티모신 알파-1) 등의 알파 티모신 펩티드의 투여는 암 백신 단독(수지상 세포 면역화 등)에 반응하지 않는 진행된 암 환자들을 포함하여, 생존률의 증가 및 종양 크기의 감소와 같은 백신 치료에 대한 긍정적인 효과를 갖는다.

인간의 신체에서 항상성을 유지할 책임이 있는 3가지 시스템: 면역, 내분비 및 신경계가 있다. 면역 시스템은 세포 및 조직 회복 및 분화를 도울 뿐만 아니라 이들의 내부 및 외부 환경들을 유지함으로써 이들의 신원을 보존할 책임이 있다. 따라서, 면역 시스템의 2가지 주요 기능은 조절 기능 및 작동체 기능이다. 이들 기능 모두는 유기체의 필요에 따라 동적으로 응답하는 동일한 세포 개체군에 의해 수행된다.

면역 시스템은 암 치료에서 능동적인 역할을 하고, 장기 이상 및 신생물 출현을 방지할 수 있다.

치료 관점으로부터, 암의 면역 요법은 본질적으로 백신들, T 세포 주입들 또는 사이토킨들 등의 각종 시약들을 통한 면역 시스템의 자극을 의미한다. 이들 시약들은 다음:

- 1) 항-종양 응답을 자극함으로써;
- 2) 억제제 메카니즘들을 감소시킴으로써;
- 3) 종양 세포들이 이들의 면역원성을 증가시키고 이들을 면역학적 방어에 더욱 민감하게 되도록 변경시킴으로써;
- 4) 세포 독성 약물들 또는 방사선 요법에 대한 내성을 개선시킴으로써 여러 작용 메카니즘들을 통해 작용할 수 있다.

암은 세포 성장에 연루된 단백질들에 대해 인코딩하는 유전자들에서 발생하는 각종 유전자 결함들에 의해 유발된다. 면역 시스템의 성분들인 항체들 및 T 세포들은 결함있는 유전자들을 인식하거나 또는 그에 반응하는데 효과적이지 못하지만, 이들은 암-유발 유전자들이 인코딩하는 기형 단백질들을 인식하고 그에 응답한다. 면역 시스템은 B 및 T 림프구들을 통해 암을 공격할 수 있다.

항체들은 이물질에 대한 반응으로 B 세포들이 생산한 단백질들이다. 각각의 항체는 특이적 항원에 결합한다. 항체들의 주요 보호 효과들은 약 20개의 상이한 단백질들의 수집물인 "상보(complement)" 시스템의 증식 작용을 통해 발생한다. 항체가 항원과 결합할 때, 항체 상의 특이적 반응 부위가 활성화된다. 이러한 부위는 상보 시스템의 분자와 결합하고, 반응의 캐스케이드를 설정한다. 옵소니제이션 및 식균 작용은 더욱 중요한 상보 효과들이다. 이들은 호중구 및 매크로파지들에 의해 식균 작용을 강하게 활성화시킨다. 이러한 유형의 항체-매개된 효과는 항체-의존형 세포 매개된 세포 독성(ADCC)으로 공지되어 있다. 소화된 이물 세포 단백질들이 펩티드들로서 항원-표시 세포(APC)의 주요 조직 적합성 착물(MHC) 분자들에 제공됨에 따라, ADCC는 T-세포 활성을 촉매하는 장점을 갖는다. 항체들은 또한 특히 암 세포들에서 성장 메카니즘을 봉쇄함으로써 세포들을 치사하는 것으로 보인다.

세포독성 T 세포들(CD8+)-세포들은 클래스 I MHC 분자들에 특이적이고, 일단 이들이 단백질 또는 펩티드 단편들로서 제공되면 세포의 표면 상에 발현된 펩티드 항원들에 반응하고, MHC에 디스플레이된다. 펩티드 및 MHC는 함께 T 세포들을 공격 활성화시킨다. 이러한 T 세포는 효소들로 그의 멤브레인을 천공하거나 또는 아포토시스 또는 자체-파괴 경로를 시동함으로써 캐리어 세포를 파괴하고, 이들 침입 세포들을 파괴한다.

헬퍼 T 세포들(CD4+)은 면역 시스템 활성의 조절자들이다. CD4+ T 세포들은 또한 클래스 II MHC를 인식한다. CD4+ T 세포들은 세포 독성 T 세포 응답(T-헬퍼 1) 또는 항체 응답(T-헬퍼 2)를 자극하는 사이토킨(유사 인터류킨-2 (IL-2))를 분비함으로써 면역 반응을 증가시킨다. 이들 사이토킨들은 B 세포들을 자극하여 항체들을 생산하고, CD8+ T 세포 생산을 증진시킨다. CD4+ T 세포들은 면역 시스템의 다른 세포들 상에서 작용하는 사이토킨이라 칭하는 일련의 단백질 매개 인자들을 형성하고, 전체 면역 시스템의 응답 작용을 증진시킨다.

암 세포들(온코사이트들)의 유전자 변형은 변경되지 않은 성인 세포의 그것과 상이한 분자들의 출현을 유발한다. 종양 항원 도는 종양 관련 항원들이라 칭하는 이러한 상이한 분자들은 작동체 반응의 표적이다.

동시에, 온코사이트는 그 자신의 DNA 복제 및 그 자신의 분화 과정을 유도하는 사이토킨을 발생시키고, 예를 들면 바이러스에 의해 감염된 세포들에 의해 분비된 인터페론 β는 이웃하는 세포들에 대한 바이러스 복제를 종료시켰다.

IL6 및 변환된 성장 인자  $\beta$ (TGF $\beta$ ) 등의 다른 사이토킨들은 유전자 손상의 수선을 성공적으로 구하지 못하고, 이들이 세포 분화를 유도하더라도, 이들은 Th1 작동체 면역 시스템의 작용을 억제한다.

세포 변환 과정을 시작하는 독성 효과는 유전자 돌연변이 및 면역 억제를 포함하는 면역 보호 능력(면역 감시)을 손상시킬 수 있다. 더욱이, 그의 변경된 DNA를 성공적으로 회복하려는 시도하지 못한 신규한 온코사이트는 TGF $\beta$ 의 생산 및(또는) 그에 대한 면역 내성을 유도하는 관련 사이토킨의 생산을 증가시킴으로써 일반적으로 변경된 세포들은 신생물을 발원한다.

최종 연구에서 종양들은 면역원성이고, 이들은 장기간의 면역학적 메모리를 생산할 수 있는 것으로 밝혀졌다. 다른 중요한 점은 암 환자들의 장기간 생존을 변경시키는 종양의 재발이다. 일부 환자들은 화학요법, 수술 또는 방사선요법과 같은 통상의 치료에 초기에 반응할 수 있지만, 종양은 재발할 수 있다. 신장 이식을 겪은 환자들은 일반적인 개체군보다 장기간 추적에서 전체적으로 3 내지 5배 더 높은 암 발생률을 갖고, 이들의 장기간 면역 억제에 부분적으로 기인할 수 있음은 공지되어 있다.

항원들은 면역 시스템의 세포들에 의해 이들의 파괴를 위해 인식된 이물질들이다. 세포들이 발암성이 될 때, 이들은 신규하고, 친숙하지 않은 항원들을 생산한다. 면역 시스템은 이들 항원들을 이물질로 인식할 수 있고, 암 세포들을 함유하거나 또는 심지어 파괴한다. 바이러스성 단백질 - B형 간염 바이러스(HBV), 엡스타인-바르 바이러스(EBV) 및 인간 유두종 바이러스(HPV)는 각각 간세포암, 림프종 및 자궁경부암의 발달에 중요하다. 종양원성 단백질들, 글리코실화된 단백질들 및 탄수화물들은 종양 항원들이다. 이들 단백질들의 다수는 다수의 종양 유형들을 공유하고, 500개 이상의 종양 항원들이 정의되었다.

항체의 면역 응답은 암인 환자들에서 충분히 활발해지는 것으로 보이지 않는다. 암으로 발현된 단백질들은 면역 응답을 이끌어낼 수 있다.

#### 백신화

왜 불충분한 면역 응답이 존재하는지에 대한 많은 이유들이 있다. 사이토킨 환경은 CD4+ T 세포들의 증식을 허용하지 않는다. 종양들이 성장함에 따라, 이들은 면역 수용체 분자들에 결합하고, 이들이 바이러스에 의해 감염되지 않은 세포의 표면 상에 노출되는 것을 방지하는 바이러스성 분자들 등의 면역 응답을 직접적으로 조절하거나; 또는 심지어 면역 시스템 활성화를 하향 조절하는 종양 자체에 의해 분비된 인자들에 의해 면역 억제 인자들을 분비할 수 있다.

면역 내성은 종양이 면역 침입을 탈출하는 주요 메커니즘이다. 면역 치료 방책의 디자인은 암 세포들을 근절시키는데 효과적일 수 있다. 이들은 면역 시스템 활성 물질을 사용하고, 항원-표시 세포들을 공급하거나, 또는 이들 종양 항원 단백질들의 일부를 면역원성 펩티드들 내로 실질적으로 예비 소화시킴으로써 더욱 "자체" 면역원성이 되게 하는데 초점을 맞춘다.

임상적으로 유용한 종양 백신은 다수의 단백질들에 반하여 면역화되어야 하고, 악성 변형에 연루된 중요 단백질들을 표적화한다. 이러한 방식으로, 면역 조절제라 칭하는 약물 또는 기질들을 사용하는 것은 백신화 작용의 조직학적 및 임상학적 결과들을 개선시키는 자연 면역 반응을 증가 또는 개질시킬 수 있다. 성공적인 면역 요법은 암 세포들을 파괴하고, 그의 재발을 방지하기 위해 면역 시스템의 조절 활성을 취급하는데 초점을 맞추어야 한다.

바람직한 실시예에서, 본 발명은 상기 면역 활성들 모두에 초점을 맞춘다. 생존하는 개질된 제 위치 종양 세포들은 제 위치의 고유 수지상 세포(DC)를 부추기기 위해 사용된다. 두 유형의 세포들의 동시-배양물은 특정 조직 배양물 배지에서 발달되어 고유의 DC를 작동체 반응 유발물 DC로 분화시킨다. 이들 DC는 건강한 림프절에 주입되어 환자의 종양 세포들에 반하여 T 세포 작동체 반응을 시동한다.

이러한 접근법은 안전하고, 환자에 대한 작은 독성 뿐만 아니라 진행되고 잘-정착된 종양들에 반하는 중요하고 지속적인 항종양 활성을 생성한다.

다음은 먼저 면역 감시 뿐만 아니라 상대 종양 탈출 형태에 연루된 종양 항원들 및 세포들을 개시한다.

다음으로, 현재 사용되는 주요 면역 요법 방책들이 개시된다. 이어서, 진보적인 치료 접근법, 그의 원리, 가능한 작용 메커니즘들, 및 이들의 장점들이 다른 접근법들과 비교하여 개시된다.

종양 항원들(TA): 관련 종양 항원들은 2개의 주요 범주로 분할될 수 있다. 제1 범주는 종양 세포들에서 배타적으로 발견되고, 면역 공격에 대한 이상적인 표적을 제공하는 특이적 종양 항원들(STA)을 포함한다. 제2 범주는 종양 세포들에서 뿐만 아니라 이들의 분자들의 정량적 및 정성적 발현이 종양 세포들을 정상 세포들로부터 구별되도록 사용하게 하는 일부 정상 세포들에서 밝혀진 종양 연관 항원들(TAA)을 포함한다.

종양 면역 요법의 목적은 STA 및 TAA에 반하는 면역 응답의 제어 및 증진을 통해 암을 효율적으로 치료하는 것이다. 일부 악성 흑색종들 및 신장 세포암에서 관찰되는 자발적인 소강 상태는 이러한 목표 달성의 증거이다.

종양 특이적 항원들(TSA): 이들 항원들은 단지 온코사이트들에서 검출될 수 있다. 이들 항원들은 실험 동물들의 종양에서 뿐만 아니라, 바이러스 기원 인간 단백질들, 악성 표현형에 관련된 돌연변이된 종양 유전자들 및 단백질, 악성 세포들의 특징인 게놈 안정성에 의해 유발된 자발적 돌연변이들에서 식별되었다.

T 세포들에 대한 주요 조직 적합성 착물(MHC)를 통해 항원 표시를 위한 경로들의 근절은 변경된 세포 멤브레인 단백질들이 항원들로서 검출될 뿐만 아니라 내부 또는 내면화된 단백질들이 특이적 종양 항원들이 될 수 있다는 것을 설명한다. T 세포들은 사이토졸성 단백질의 세포 저하로부터 유도되고, MHC 분자의 펩티드 틸에 삽입된 작은 펩티드들을 인식한다. 이들 펩티드들은 MHC 분자와 함께 이후에 세포 표면으로 수송된다. 따라서, 임의의 기형 세포 단백질은 잠재적인 면역 시약이고, 멤브레인에서 검출되는 유일한 단백질은 아니다. 다음으로, p53에서와 같이 돌연변이되는 대립 형질을 생산하는 종양 세포 내의 어떠한 기능성 단백질도 잠재적으로 특이적인 종양 항원이 될 수 없다.

종양 관련 항원들(TAA): TAA는 특정 분화 단계에서 일부 정상 세포에 의해 발현될 수 있는 종양 세포 분자들이다. 다른 세포주 또는 분화 마커들 또는 이들의 조합과 관련하여 그의 정량적 또는 조합된 발현들은 변환된 세포들의 식별에 유용할 수 있다. 최상의 특성화된 TAA는 종양 치사 항원들이고, 이는 배 발생 중에 발현되지만, 정상적인 성인 조직에서 존재하지 않거나 또는 거의 검출되지 않는다. 원형 TAA는 암배 항원(CEA)이다.  $\alpha$ -페토단백질 및 MAGEE 단백질 부류가 이러한 종류의 항원들에 포함된다.

#### 면역 감시

일반적으로 변형된 세포는 정상 세포들의 단백질들로부터 이들의 질 또는 양이 상이한 항원성 단백질들(각각 STA 및 TAA)를 제공한다. 본래 및 적응형 면역 응답 모두에서 작용하는 세포들 및 체액 성분들은 일단 그것이 구성하는 변형된 세포 및 종양의 파괴 응답에서 일 역할을 한다.

면역 감시 과정에 포함된 세포들은 다음과 같다:

천연 킬러 세포(NK): 이들은 MHC 유도된 세포들을 인식하고 파괴한다. 이들 세포들은 표적 세포의 멤브레인 내로 공격들의 형성을 통해 이들의 기능을 수행한다. 공격들은 혈장 멤브레인에서 퍼포린 분자들의 자체-어셈블리로 구성된다. 이들 세포들의 구조는 상보적 C9와 다소 상동성이고, 그의 병치는 그랜자임 유형의 세포 분해 효소들이 용이하게 통과할 수 있는 공격을 발생시킨다. 종양 세포 표면 상의 수용체 Fas 및 TNF  $\alpha$ 의 활성화는 제2 메카니즘을 구성한다. 이들 현상 모두는 아포토시스를 활성화시킨다. MHC 분자들의 부재에 의해 유발된 이들 세포 분해 활성화는 고유의 면역 응답에 대응하는 활성화들이다. 다른 한편, 천연 킬러 세포들은 또한 종양에 반하여 지향된 항체들의 활성화에서 협력 작용한다. 이들 세포들은 이들의 Fc 수용체들을 통해 종양 세포 표면에 접착되고, 상기 분해 현상(퍼포린, Fas 활성화, TNF  $\alpha$  공격)을 유발한다. 이러한 활성화는 종양들에 대한 적응형 면역 응답의 일부로 고려된다.

이들 기능들로 인해, 천연 킬러 세포들은 바이러스에 의해 유도된 종양 세포들 및 이들의 발병 중의 작은 종양들의 파괴의 주된 책임 원인이 되고, 이들은 인터페론 및 인터류킨 2의 작용에 의해 활성화된다. 이들 류킨은 NK 세포들의 분해 활성화들을 촉진시킨다. NK 세포들은 활성화되어야 한다고 한다(LAK, 류킨 활성화된 킬러들).

고유의 NK 응답으로서 종양 세포 파괴는 MHC1 멤브레인 단백질들의 인지할 수조차 없는 존재에 의해 억제된다. 그러나, 이러한 존재는 이것이 종양 지향된 항체들의 분해 활성화로 인한 것일 때 NK 반응을 억제하지 못한다.

식세포: 식균 활성을 갖는 세포들은 치료 목적으로 사용될 수 있는 특이적 항종양 작용 메카니즘들을 갖는다. T 림프구들에 의해 활성화되었을 때, 이들 세포들은 종양 세포로 전이되고: 리소자임, 초산화물 라디칼들, 산화 질소 및 TNF는 상이한 메카니즘들을 통해 종양 세포들을 파괴한다. 그러나, 이들의 중요한 항종양 활성화는 이들의 항원 제공 용량을 통해, 주로 이들의 CD4 림프구 제공 용량에 의해 발휘된다. 종양들은 그들의 표면 상에 MHC2 분자들을 갖지 않고, 따라서, 이들은

헬퍼 세포들에 대해 이들의 특징적인 종양 항원들을 보일 수 없는 것으로 공지되어 있다. 활성화된 마크로파지는 이러한 항원 표시를 수행할 수 있고, 조절기 및 작동체 CD4+ 림프구들 모두의 활성화를 유도한다. 이들은 또한 CD8+ 및 B 세포들에 대한 항원들을 제공한다.

이들의 식세포 제공 특징들에 관하여 면역 시스템의 가장 기술적인 세포들은 수지상 세포들이다. 독특한 수지상 세포는 1000개의 고유의 CD4 림프구들과 접촉할 수 있고, 이 때문에, 수지상 세포들은 유기체에서 가장 강력한 것으로 고려된다. 이로 인해, 이들은 치료 목적으로 사용된다. 이들은 현재 인공적으로 제어되는 배지 중의 이들의 자극이 종양에 반하는 면역의 면역 시스템의 자극을 유도하기 때문에 최상의 보조제인 것으로 고려된다. 이들 세포들은 또한 종양 세포 억제 분비의 표적이다. 종양의 프로스타글란딘, TGFβ 및 IL10 분비는 거부 반응의 특징적인 억제(및 조절) 림프액 함유 개체군의 발생을 유도함으로써 마크로파지들 상으로 부정적인 효과를 갖는다.

림프구들: 가장 강력한 항종양 역할은 작동체 그룹 CD4 및 CD8의 T 림프구들에 의해 이루어진다. 이들의 억제제 T 세포 개체군들의 출현 및 발달은 불행하게도 종양 성장 및 그의 전이를 전신으로 전파시키게 한다. 이들 억제제 림프구들은 그들의 세포 멤브레인 내에 CD25 포지티브 마커를 갖는 CD4 림프구들의 소집단으로서 특성화된다. T 세포들의 작동체 반응은 종양 세포들을 직접적으로 치사하고, 면역 시스템 성분들의 나머지를 활성화시킨다. CD4 및 CD8 개체군들에 반하여 저항된 항종양 면역성은 항원 특이적이다. 이들 림프구들은 환자의 말초 혈액에서 뿐만 아니라, 종양 침윤 세포들에서 역시 검출되었다. 이미 개시된 바와 같이, CD4 세포 활성화는 항종양 반응의 양 및 품질에 관하여 가장 중요하다. 그러나, 종양들은 MHC II 분자들을 발현시키지 않기 때문에, 그의 작용은 대응하는 특수화된 세포에 의해 수행된 항원 표시에 의존한다. 반대로, 세포독성 T 세포들은 MHC I에서 세포 항원들을 인식할 수 있다. 그러나, 규칙적인 상황에서 이들의 동시-자극 분자들의 결핍으로 인해, 종양 세포들은 종양들에 반하여 특이적인 CD8 세포들의 면역력 저하 상태(anergy)를 유도한다. 반대로, 활성화된 CD8 림프구들은 종양 분해를 위해 이들 동시-자극 신호들을 필요로 하지 않는다. 이들이 사용하는 분해 메커니즘들은 NK 세포들에 의해 사용된 것들: 아포토시스 및 혈장 멤브레인 내의 공극 형성과 유사하다.

B 세포들: 종양 면역성에 대한 수렁인의 반응의 잠재적 기능은 환자의 혈청에서 반응성 항종양 항체들의 가끔의 검출에 의해 제안되는 것으로 사용된다. 기본적인 작용 메커니즘은 항체들을 통한 세포 분해이다(ADCC). 상보물에 의해 조절되는 항균성 파괴 메커니즘은 항종양 경쟁에서 더 적은 역할을 하는 것으로 보인다. 마지막으로, 여러 실험들은 종양에 대한 특이적 항체 공격이 면역 반응 촉진 항원의 소멸을 유도하고; 따라서 이러한 분해 메커니즘에 저항하는 개체군들을 (부정적인 선택에 의해) 발생시킨다. 항체들이 세포 멤브레인 내의 MHC I 착물들의 소멸을 발생시키는 경우 NK 세포들에 의한 이들의 파괴에 민감해진다. 종양 유전자 HER2-NEU의 단백질에 반하는 헤르셉틴(herceptin) 등의 여러 모노클로날 항체들은 그의 치료 용도 및 상업적 용도에 대해 개발되었다. 이 분자는 난소 및 유방 전이의 25%에서 발견되고, FDA는 이러한 증상으로 고통받는 환자들의 치료를 위한 그의 치료 용도를 승인하였다. 이들 항체들의 제2의 것은 rituximad되고, 이는 CD20 세포 결정자에 반하여 저항되고, 이러한 이유로 B 임파종의 치료에 성공적으로 사용되고 있다. 다른 항체들은 현재 임상 개발중에 있다.

종양 세포 면역학: 종양 세포들은 염증 항종양 반응의 표적이 될 수 있는 여러 분자들을 제공한다. 그러나, 이들 항원들을 인식할 수 있는 림프구들이 종양에 인접한 혈액 중에서 단리되더라도, 이들은 신생물에 반하여 효율적인 작동체 기능을 발생시킬 수 없다. 종양 세포들의 세포학적 특징들은 이러한 현상을 설명하거나 또는 설명하려 시도하고: 종양 세포들은 이들의 표면 상에 MHCII 착물들을 갖지 않고 그것은 이들이 CD4 림프구들에 이들의 ATP를 제공할 수 없고, 이들은 불량한 MHC1 착물 발현을 소유하는 이유이다.

이들 특성들은 NK 세포 활성화의 억제, 및 CD8 세포들에서 불량한 활성화 응답을 생산한다. 이러한 최종 현상은 대부분의 종양 세포들이 이들의 표면 상에 동시-자극 분자들을 제공하지 않음으로써 악화된다. 동시-자극 분자들에 대한 수용체들의 이러한 결핍은 면역력 저하된 CD8 림프구들의 개발의 원인이 된다.

종양 세포들은 항-염증 기질들을 고도로 분비한다. 이들 기질들의 일부는 아직 확인되지 않았다. 프로스타글란딘 생산은 마크로파지들의 활성화를 방해함으로써 작용한다. 이러한 기질은 인도메타신 또는 COX2억제제들의 부수적인 투여에 의해 억제될 수 있다. 종양 세포들은 또한 많은 양의 TGFβ 및 IL10을 생산할 수 있다. 이들 사이토킨들은 세포 분화를 조절하는 분자들이다. 종양 세포들은 적절한 세포 분화가 결여되어 있기 때문에, 이들은 또한 이러한 기질의 합성 반응의 생산을 제어하도록 네거티브 조절 신호들이 결핍되어 있다. 췌장 종양, 유방암, 신경교종, SCLC 등의 전이 가능성들 사이의 병치; 및 이들 사이토킨들의 합성 반응을 보이는 연구들이 있다. 이들의 가장 중요한 작용은 항원 제공 세포들의 조건을 조절함으로써, 이들이 종양 항원들에 반하여 특이적인 억제제 림프구들의 출현을 유도한다.

면역 시스템과 종양 사이의 동적인 관계: 종양 및 종양 세포들의 혼합 배양물에 대한 기술들은 흑색종 펩티드들에 반하여 작용하는 세포 독성 T 세포들의 항원성 조성물의 상세한 연구를 가능하게 한다. 이들은 아미노산 서열을 통해 특이적 종양

항원들을 특성화하기 위해 클론화되어 사용된다. 이들 연구에서 3가지 중요한 발견이 이루어졌다. 제1의 발견은 흑색종이 세포독성 T 세포들로서 인식될 수 있는 적어도 5개의 상이한 항원들을 갖는다는 것이다. 제2의 발견은 흑색종 항원들에 반하여 작용하는 세포독성 T 림프구들이 생체 내로 확장하지 않는다는 것이다. 이는 상기 항원들이 생체 내에 있을 때 면역원성이 아니라는 것을 제안한다. 제3의 발견은 특이적 세포 독성 T 세포들의 존재로 인해 이들 항원들의 발현의 시험관 내 및 가능하게는 또한 생체 내의 부정적 선택 가능성이다. 이들 발견들은 종양 면역요법에 대한 희망을 제공한다. 동시에, 이 발견들은 이들 항원들이 자연적인 형태로 고도로 면역원성이 아니고, 이들은 세포 독성 T 세포들에 의해 인식될 수 없고 제거될 수 없는 생체 내 종양 세포들을 선택할 가능성에 관하여 경고함을 드러낸다.

성장할 수 있기 위해서, 종양은 일련의 동적인 탈출 메카니즘들을 발생시켜야 한다. 임의의 항종양 방책과 직면한 경우, 종양은 새로운 탈출 형태의 발달을 통해 그 자신의 적응에 반응한다.

기형적인 분자들의 검출은 특이적 항체들의 출현 및 ADCC에 의한 그의 후속 파괴를 통해 주요 체액 면역성 반응을 발생시킨다. NK 및 다형핵 세포들은 이러한 현상에서 활성 부분을 취한다. 이는 적절한 표면 항원들의 낮은 또는 심지어 존재하지 않는 발현을 갖는 세포들의 개체군의 선택을 유도한다. 동시에, 파괴된 세포들의 식균 작용은 클래스 I MHC 분자들에 존재할 수 있는 세포내 항원들에 반하여 연장된 세포 면역성 반응을 유도한다. 상이한 항원들을 생성하는 세포들 및(또는) 동시-자극 분자들이 없는 세포들의 새로운 선택이 수행된다. 마지막으로, 더욱 큰 미분화 레벨을 갖는 세포들의 선택은 종양에 의해 생산된 인터류킨 10 및 TGFβ 등의 억제 인자들의 증가에 직접적으로 관련된다. 이들 기질들은 이들이 특이적 억제제 세포들의 촉진자들이 되도록 하는 수지상 세포들을 유도한다. 이러한 현상은 종양에 대한 내성의 발전을 가능케 하고, 이는 절대적으로 자유롭게 성장하고 전파될 가능성을 갖는다. 세포 개체군들의 동력학들을 무시하는 면역 시스템 촉진에 기초한 치료 접근법들은 실패할 것이고, 그 이유는 특이적 기술의 사용에 의한 단일 작용 경로가 상기 선택 현상을 유도하고, 장기간 동안의 결과들에서 그의 후속 실패를 유도하기 때문이다. 단일 면역 요법 접근 작용에 반응하는 종양의 백분율은 이러한 접근법의 효과 및 에너지와 무관하게 20% 미만이다. 따라서, 상기 동력학을 예상하는 기술들의 조합은 적절한 시간의 목적 효과를 이끌어내도록 사용되어야 한다.

#### 면역 요법

숙주의 면역 시스템은 종종 종양 성장을 제어하는데 부적절하지만, 종양 근절을 다루기 위해 면역 시스템의 가능한 촉진 및 개선의 여러 가지 지지자들이 존재한다. 이들중 일부는 대부분의 종양 세포들에서 식별 가능한 종양 항원들의 존재, 효과적이지 못한 숙주 반응들을 통해 검출될 수 있는 식별; 및 종양 세포들이 면역 반응을 거부하는 메카니즘들의 양호한 이해이다. 최근 기술의 비약적 발전은 종양 항원 면역 요법을 위한 신규한 가능성을 발생시킨다. 이들 중에서 우리는 다음: 림프구 소집단의 단리 기술, 종양 항원들의 식별 및 정제, 항원 선택된 T 세포들의 발전, 사이토킨들에 의한 면역 반응들의 증가 및 종양 항원의 표면을 표적으로 하는 항체들의 생산을 발견한다.

배타적으로 사용되거나 또는 독소들에 결합된 종양 항원들에 반하는 모노클로날 항체들(MAB)는 종양 성장을 제어할 수 있다.

모노클로날 항체들의 출현은 종양들을 시동하고 파괴할 가능성을 제안하였다. 적절한 아이소타입의 특이적 종양 항체들은 NK 세포들에 의한 종양 세포 분해로 지향될 수 있고 이들의 Fc 수용체들을 통해 NK 세포들을 활성화시킨다. 이를 행하기 위해, 세포 멤브레인의 분자인 특이적 종양 항원이 발견되어야 한다. 이 때문에, 생쥐는 선택된 항원에 의해 면역화된다. 다음으로, 생쥐의 비장이 제거되고, 그의 조직은 림프구 세포 현탁액을 얻기 위해 용해된다. 이어서, 림프구들은 IgG를 생산하는 골수종으로부터 세포들과 융합된다. 얻어진 하이브리드 세포 현탁액은 하이브리도마라 칭한다. 이는 96-웰 배양 플레이트 상에서 그의 희석액에 의해 배양된다. 융합된 세포들은 각각의 격벽 내에 그들중 몇몇을 허용하는 방식으로 적층된다. 다음으로, 이들은 성장하도록 방치되고, 각각의 격벽의 상청액은 어떤 세포 클론들이 항체들을 발생하였는지 결정하기 위해 분석된다. 다음으로, IgG 분비 클론들이 확장되고, 생산된 항체는 동일한 세포 유형이지만 상이한 환자들로부터 상이한 종양들을 인식하는데 있어서 그의 특수성 및 효과를 결정하기 위해 분석된다. 이후, 선택된 클론들이 확장된다. 사용되어야 하는 항체들은 이들 클론들의 상청액으로부터 추출된다. 분자 조작을 사용함으로써, 항체의 Fc 부분이 인간 기원의 유사한 것으로 대체되는 경우, 이러한 분자의 항원성은 감소될 것이다. 이들은 "인간화된" 항체들이라 칭한다.

FDA는 최근에 유방암의 치료를 위한 헤르셉틴으로서 공지된 인간화된 모노클로날 항체의 사용을 승인하였다. 이러한 항체는 성장 인자 HER-2/neu의 수용체에 반응한다. 이러한 수용체는 유방암으로 고통받는 환자들의 거의 사분의 일에서 과다 발현된다. 이러한 과다 발현은 HER-2/neu가 잘못된 예후에 관련되더라도 T 세포들에 의한 항종양 반응을 유도한 HER-2/neu에 대한 책임이 있다. 헤르셉틴은 수용체와 그의 천연 리간드의 상호 작용을 봉쇄하고 수용체의 발현 레벨을 감소시킴으로써 작용하는 것으로 믿어진다. 이러한 항체의 효과들은 종래의 화학요법과 조합될 때 증가할 수 있다.

CD20의 인식을 통해 작용하는 Rituximab로서 공지된 제2의 FDA 승인된 항체가 존재한다. 이는 B 세포 비호지킨성 림프종의 치료를 위해 사용된다. CD20의 유니온 및 그룹화는 림프구 아포토시스를 유도하는 신호를 공유한다.

방사선 동위 원소 방출과 연관된 모노클로날 항체들은 종양 확장을 감시하고, 진단을 제공하기 위해 종양들을 가시화하는데 사용되고 있다.

모노클로날 항체들에 의한 제1의 공지된 성공적인 종양 치료에서, 항 유전형 항체들은 그의 대응하는 이뮤노글로불린이 대응하는 유전형을 발현시키는 B 세포들을 표적화하기 위해 사용되었다. 치료의 제1 부분은 일반적으로 소강 상태를 유도하지만; 종양은 초기 치료에 사용된 항체에 결합하지 않는 돌연 변이 형태로 재출현한다. 이러한 경우는 종양에 의한 치료 회피를 허용하는, 유전적 불안정성의 분명한 예를 나타낸다.

종양 특이적 또는 종양 선택적 모노클로날 항체들의 치료 용도에 의해 제공되는 다른 문제점들은 모노클로날 항체 결합후 세포들의 불충분한 치사 및 종양 덩어리에서 항체의 불충분한 침투이다. 제1의 문제점은 항체에 독소를 결합시킴으로써 빈번히 피할 수 있다. 이러한 절차는 면역 독소라 칭하는 시약을 발생시킨다. 이러한 절차에 대해 바람직하게 지시된 2개의 독소들은 리신 사슬 A 및 슈도모나스 독소이다. 이들 시도 모두는 식균 작용 격벽 내의 항체 분자로부터 독소 분자의 분리를 허용하도록 항체의 내면화를 요구하고; 따라서, 독소 사슬의 침투 및 세포의 후속 치사를 가능케 한다.

콘주게이트된 모노클로날 항체들을 사용하는 2개의 다른 분석법은 아드리아미신(adriamycin) 등의 화학 요법 약물들과 항체 분자들의 결합 또는 이러한 분자 및 방사선 동위 원소들의 결합을 내포한다.

제1의 경우에, 종양 세포 표면으로부터 항원을 통한 모노클로날 항체 특수성은 그의 위치에 약물을 집중시킨다. 내면화 후, 약물은 엔도솜들 내로 방출되어 그의 세포 증식 억제 또는 세포 독성 효과를 발휘한다. 방사선 동위 원소들에 결합한 모노클로날 항체들은 종양 위치에 방사선 활성 초점을 집중시킨다. 이들 시도 모두는 이들이 이웃하는 종양 세포들을 치사하므로 유리하고, 일단 약물 또는 방사선 활성 배출물이 방출되기 때문에, 이들은 항체에 결합한 것들에 인접한 세포들에 영향을 미칠 수 있다.

암배 항원인 CEA는 모노클로날 항체들의 종양 항원 타겟의 예이다. 재발한 결장 직장암은 CEA에 반하여 방사선 활성으로 마크된 모노클로날 항체를 통해 검출될 수 있다. 이러한 절차는 현재 이러한 신생물의 진단 및 치료를 위한 시험 단계에 있다.

#### 수지상 세포들

DC는 이물질 항원들을 처리하고 전달하도록 자연적으로 기능하는 "모체 자연의(Mother Nature's)" 항원-표시 세포들 및 T 세포들에 대한 제시 및 보호성 면역 응답의 발생을 위한 림프절들에 대한 "위헌" 신호인 것으로 보인다. DC가 활성화되고 "성숙될" 때, LD들은 T-세포 자극의 과정에 보다 잠재적인 것으로 보인다. DC는 보편적으로 피부 및 기타 내장 장기에 체류하고, 여기서 이들은 병원균들 및 기타 항원들에 직면하고; 이들이 항체들에 의해 촉진된 후 이들의 피부내 주사는 초기 시도에서 흑색종 및 결장 직장암의 후퇴를 유도하는 것으로 보였다.

DC는 골수로부터 유래한다. IL3, SCF, Flt3L, TNF 및 BMCSF는 그의 초기 분화에 영향을 미친다. 이러한 최종 사이토킨은 예비 분화된 형태들의 증식을 촉진시키고, 이들 세포들의 혈류로의 방출에 조력한다. 뿐만 아니라, DC는 고유의 T 세포들로부터 면역 응답들의 발생을 위해 공지된 가장 잠재적인 비히클리고, 암 항원-특이적 백신들의 처리 및 전달에 사용된다.

종양 항원들에 의해 부하된 수지상 세포들(DC)에 기초한 치료용 암 백신들은 면역성에서 DC의 중심적 역할 때문에 특별한 관심을 끌고 있다. DC는 전신에서, 특히 감염성 미생물들이 출입할 입구가 될 수 있는 영역에서 발견되었다. 동물 모델들의 수많은 연구로 종양 항원들이 부하된 DC는 종양 도전에 반하여 보호될 수 있고, DC-기초 면역화가 이미 이식된 종양들의 진행을 서행시킬 수 있는 것으로 나타났다. 예를 들면, B16 흑색종 세포주로부터 유도된 항원들에 의해 부하된 수지상 세포들에 의해 면역화된 생쥐들은 이식된 종양들의 진행을 방지할 수 있다.

지역적 림프절들로 DC의 생리적 이동을 흉내내기 위해, DC는 상이한 투여 경로들: 정맥내로(IV), 피하로(SC), 경피로, 결절내로, 림프관 내로 및 종양내로 사용되었다. DC와 함께 사이토킨들의 투여는 면역화에 의해 유도된 면역 응답을 증가시킬 수 있다. 본 발명에서, 면역 자극물로서 사용된 싸이멀페신은 비응답자 환자들에서 DC 백신화에 대한 임상적 응답을 개선했다.

일반적으로, 대부분의 DC 백신-기초 연구들은 이러한 대략적인 계획안에 따랐다. 환자들은 DC를 발생시키기 위해 류카프레시스를 겪고, 이들 DC의 분획은 제1 면역화를 위해 신선하게 사용되는 한편, 나머지는 이후의 사용을 위해 냉동 보존된다. DC는 항원에 의해 부하되고, 면역화 전의 부하 방법은 일부 연구들에서 이 부하가 동결 보존 전에 수행됨으로써 DC 백신이 해동 후 사용될 준비가 되어 있다. 면역화를 위한 이상적인 간격 또는 기간은 공지되어 있지 않지만, 일반적으로, 1주 내지 33주마다 주어진다. 관련 없는 항체들로 로드된 DC는 면역화에 대한 포지티브 및 네거티브 대조군으로서 포함된다. 다음으로, 말초 혈액은 면역 응답들의 유도를 감시하도록 유인되지만; 최종 생성물에 대한 광범위한 면역 분석들을 수행하고, 반복적인 류카페레시스가 수행될 수 있다. 각종 분석은 현재 임상 시도들에 사용되고 있다. 생체내 활성의 척도 외에, 면역화되는 항원에 대한 응답으로 T 세포들의 사이토킨 생산, 증식 또는 세포 분해 활성을 결정함으로써 시험관내 T-세포 반응을 특성화할 수 있다.

진행중인 시도가 일반적이므로, DC 백신들은 최소 독성으로 잘 견디고 있다. 다른 잠재적인 종양학 백신들 (세포 백신들, 멜라닌 백신들, 알로게닉스 세포 백신 단독 또는 BCG와 함께, 우두 종양 분해물, 세포 없는 상청액 백신들, 유전성 백신들, 바이러스성 벡터 백신들)에 의한 진행중인 시험들이 있다.

종양학 백신화의 면역원성을 증가시키기 위한 많은 시도들이 이루어졌고, 이들은 키폴 샷갓 조개로서 공지된 캘리포니아 및 멕시코 해안을 따라 발견되는 조개류에 의해 제조된 단백질인 키폴 림팻 헤모시아닌(KLH)를 포함한다. KLH는 면역 응답을 유발하고 암 세포 항원들에 대한 캐리어로서 작용하는 큰 단백질이다. 암 항원들은 종종 면역 시스템에 대해 가시화될 수 없는 비교적 작은 단백질들이다. KLH는 T-헬퍼-세포들로서 공지된 면역 세포들에 대한 추가의 인식 사이트들이고, 세포 독성 T-림프구들(CTLs)로서 공지된 다른 면역 세포들의 활성화를 증가시킬 수 있다.

바실러스 칼미트 구에린(BCG): TB에 반하여 백신화하기 위해 수십년 동안 통상적으로 사용된 결핵 세균의 불활성화된 형태이다. BCG는 그것이 백신 항원에 대한 면역 응답을 부추길 것이라는 희망으로 일부 암 백신들에 부가된다. BCG가 왜 면역 반응을 이끌어내는데 특별히 효과적일 수 있는지가 잘 이해되지 않는다. 그러나, BCG는 결핵에 대한 백신을 포함하여 다른 백신들에 의해 수년 동안 사용되어 왔다.

인터류킨-2 (IL-2): 천연 킬러 세포들이라 칭하는 특정한 특수화된 면역 시스템 세포들의 암-치사 능력을 부추길 수 있는 신체의 면역 시스템에 의해 생산된 단백질이다. 그것이 면역 시스템을 활성화시킬 수 있더라도, 많은 연구원들은 IL-2 단독으로는 암 재발을 방지하기에 충분하지 않다고 믿는다. 여러 가지 암 백신들은 특이적 암 항원들에 대한 면역 응답들을 부추기기 위해 IL-2를 사용한다.

과립구 단핵구-콜로니 자극 인자(GM-CSF): 항원-표시 세포들의 증식을 자극하는 단백질이다.

QS21: 일부 백신들에 부가되었을 때 면역 반응을 개선시킬 수 있는 식물 추출물이다.

이들은 암 백신들에 대한 생물학적 응답을 증진시키려 의도한다. 암 백신들과 조합된 면역 자극물로서 광범위한 면역 자극 약물인 티모신 알파 1(싸이멀페신)의 사용을 어느 누구도 개시하지 않았다. 우리는 이러한 시약이 수지상 세포의 백신화(종양학 백신들)에 대한 생물학적 응답을 개선시키거나 증가시키는 것을 알았다. 우리는 매우 양호한 반응을 갖는 수지상 세포 백신에 대한 선행되는 반응을 제공하지 않은 유방암 환자들에게 이러한 면역 자극 약물을 사용한다.

싸이멀페신 알파 1 또는 Ta1은 만성 B 및 C형 간염, 후천성 면역 결핍증(AIDS), 1차 면역 길핍 질병, 백신화에 대한 우울증 및 암을 포함하는 여러 질병들에서 관련된 치료 잠재성 및 그의 면역 조절 작용을 위해 사용된 펩티드이다. 이러한 증상들에서 그의 효과에 대한 기초는 주로 면역학적 응답의 조절을 통한 것이다. 이러한 약물은 수많은 면역 시스템 파라미터들에 대한 유리한 효과를 갖고, T-세포 분화 및 성숙을 증가시키는 것으로 밝혀졌다.

싸이멀페신 알파 1은 흉선 조직으로부터 천연 기질로서 원시 단리되었다. 그것은 28개의 아미노산으로 된 순수한 합성 아미노-말단 아실화된 펩티드(분자량 3108)이다. 현재, TA1은 고체상 펩티드 합성에 의해 생산된다.

내인성 싸이멀페신은 혈청 중에서 검출될 수 있고, 여기서 면역 분석에 의해 건강한 성인들에서 측정된 레벨들은 0.1 내지 1 ng/mL의 범위에 있다. 소스 및 방출 메카니즘 및 순환하는 싸이멀페신의 조절은 알려져 있지 않다. 싸이멀페신은 그것이 유기 용매들 중에서 구조화된 나선들로 접혀질 수 있고, 따라서 보조되지 않은 멤브레인을 교차할 수 있음에 따라 세포내 수용체들을 갖는 것이 가능하다.

싸이멀페신은 증가된 수의 성숙한 T 세포들을 생산하기 위해 줄기 세포들을 자극한다. 배양액 중의 인간의 CD34 줄기 세포들에 싸이멀페신을 부가함으로써 싸이모포이에시스를 증가시키고, 전체 CD3 T 세포들의 수의 증가 및 싸이모사이트들의 성숙을 위해 중요한 사이토킨인 인터류킨-7(IL-7)의 합성을 증가시킨다. 증가된 우세한 소집단은 헬퍼 T 세포들(CD4)이었다.

만성 B24형 간염 및 암인 환자들에서 CD3, CD4 및 CD8 세포들의 증진된 생산은 다수의 동물 모델, 정상적인 인간 피검자 및 HIV-감염된 환자들에서 NK-세포 활성을 증가시켰다.

싸이멀페신은 IFN $\gamma$ , IL-2, IL-3 및 미토겐들 또는 항원들에 의한 활성화 후에 IL-2 수용체의 발현을 증가시킬 수 있다. 증진된 사이토킨 생산의 이러한 패턴, 즉, IFN $\gamma$  및 IL-2는 싸이멀페신이 면역 응답의 Th1 유형을 촉진시키고, IL-2의 생산의 현저한 증가 뿐만 아니라 Th2 사이토킨들 IL-4 및 IL-10의 감소를 유도하는 것을 나타낸다.

싸이멀페신은 용량-의존 형식으로 시험관내 싸이모사이트들로 텍사메타손-유도된 아폽토시스를 길항 작용한다. 그 효과는 포지티브 미숙 T 세포들에 이중인 CD4CD8에 대해 대부분 결정된다. 종양-생성 생쥐들로부터 혈청에 의해 자극된 싸이모사이트들의 아폽토시스는 티모신에 의한 처리에 의해 감소되기도 한다.

싸이멀페신은 백신 증진제로서 감염성 질병들(B형 간염, C형 간염, 후천성 면역 결핍증)의 치료 및 여러가지 암들을 위해 인간에서 연구되었지만, 암 백신들과 함께 면역 조절제로서 그것을 사용한 사람은 없었다.

이 약물은 여러 동물 암 모델들에서 효능을 보였고, 면역 기능을 개선시키는 것으로 보였다. 많은 암 환자들은 세포 면역성을 억제하였고, 일부 암들의 진행은 면역 시스템에 의한 종양들의 손상된 억제에 관련되는 것으로 보인다.

싸이멀페신이 어떻게 임상 반응을 개선시킬지를 설명할 수 있는 작용의 정확한 메카니즘은 완전히 이해되지 않는다. 이러한 작용은 이 약물이 나타내고(내거나) 오늘날까지 공지되지 않은 다른 약물들에 의한 많은 메카니즘들과 관련될 수 있다. 그것은 관찰된 Th1 및 C1 반응에 대한 사이토킨 편향과 연관될 수 있고, 이는 다시 DC가 억제제 면역 활성화 이외의 작동체를 시동하게 하는 환경을 발전시킨다.

싸이멀페신은 안전항 약물이고, 그의 잠재적인 부작용들은 현저히 낮다.

본원에 개시된 바와 같이, DC-TBH는 활성화된 제 위치 B 세포들(TBH)에 의해 융합된 제위치 종양 세포들과 동시-배양된 제위치 수지상 세포들(DC)에 의해 환자들을 주기적으로 면역화시키는 것을 포함하는 활성화 면역 요법 치료이다.

TBH는 종양 항원들의 소스로서 사용되고, DC는 항원 표시 세포들로서 사용된다.

바람직한 실시예들에서, 본 발명은 진행된 신생물 질병들로 고통받는 환자들에서 양호한 치료 결과를 얻는데 유리한 여러가지 특징들을 제공한다.

수술 조각에 의해 다루어지는 경우와 같이 많은 세포들을 얻는 것이 권장되고, 미세한 바늘 생검을 통해 얻어진 종양 세포들의 수는 TBH의 동화를 위해 충분하다. 이러한 방식으로, 환자는 임의의 불필요한 수술 위험으로 진행되는 것이 방지된다. 다른 한편, 아래 언급되는 바와 같이, 전이 항원성은 모든 상이한 장기들에서 상이한 것으로 보인다. 따라서, 환자의 실질적인 모든 전이로부터 종양 세포들을 얻기 위해 비침입성 방법을 이용하는 것이 바람직하다.

B 림프구들은 일단 활성화되면 이들의 효능으로 인해 면역 시스템에서 제2의 가장 강력한 유형의 항원 표시 세포들로 되는 세포들이다. 다른 한편, B 세포 배양물들이 IL6에 의해 자극되는 경우, 이들은 적어도 6개월 동안 계속 성장한다. 이러한 IL6 민감성은 세포 융합 후 TBH 개체군으로 전파된다.

따라서, TBH는 몇몇 종양 세포들로부터 발생되어 그의 잠재성 및 항원성 다양성을 상실하지 않고 수개월 동안 시험관 내에서 유지 및 확장될 수 있다.

일단 DC가 이러한 하이브리드에 노출되면, 이들은 상이한 신생물 세포 개체군들의 자연 상태로 존재하는 가능한 모든 종양 항원들을 실질적으로 포획한다. 이들 항원들은 활성화된 B 세포들의 특징인 동시-자극하는 접착성 분자들의 그룹과 함께 TBH 표면 상에 제공되고, 이는 낮은 농도 레벨에서조차 DC에 의한 이들의 최대한의 효율적인 포착 및 동화를 허용한다.

DC 관련 요법들의 치료 작용의 효능은 이들 세포들이 얻어지는 소스들과 직접적으로 관련되는 것으로 보인다.

서지적인 요소에 따라, 골수로부터 어리고 성숙한 형태물 이동을 통해 얻은 DC로 처리한 환자들의 대략 68%는 50% 이상의 중앙 덩어리의 감소를 제공하는 한편; CD34+ 또는 순환하는 단핵구들의 분화에 의해 시험관 내에서 발생된 DC로 처리된 환자들의 경우에 20% 이하의 감소를 제공하였다.

본원에 개시된 전형적인 프로토콜에 사용된 DC는 5일 동안 낮은 용량으로 GMCSF에 의해 자극된 환자들의 연층(Buffy Coat)로부터 얻었다. 이는 성숙 및 미성숙한 형태들의 수집 및 CD34+ 의 낮은 흐름을 가능케 하였다. 다른 한편, 단지 3일 동안 GMCSF 및 TNF에 의한 시험관내 배양물 및 IL4의 부재는 작동체 DC의 분화를 허용하고, CD34+, CD14+ 또는 단핵구들 등의 다른 가능한 존재하는 세포 형태들의 분화를 방지한다.

면역화를 위해 사용된 DC가 CD34+ 및 CD14+ 를 배제한 항체 각테일을 사용하는 네거티브 선택에 의해 또는 침강을 통해 얻어졌을 때 면역 반응과 환자 생존률 사이에 어떠한 현저한 통계학적 차이도 관찰되지 않았다.

#### 예시 프로토콜

DC는 골수로부터 유래한다. IL3, SCF, Fit3L, TNF 및 GMCSF는 그의 초기 분화에 영향을 미친다. 이러한 최종 사이토킨은 예비 분화된 형태들의 증식을 촉진하고, 이들 세포들의 혈류로의 방출을 돕는다.

GMCSF의 피하 투여는 혈액으로의 DC의 중요한 통로를 이끌어낸다.

그 후, 어프레스스 및 다음의 네거티브 선택에 의해 얻어진 혈액 시료 중에서 치료학적으로 유용한 수로 이들을 단리시킬 수 있고, 그러한 목적으로 캐나다 밴쿠버 소재 스템 셀 테크놀로지사에 의해 제공되는 DC용 StemSep™ 키트를 사용한다. 우리가 사용한 GMCSF는 아르헨티나 캐사라 러버러토리에서 생산된 대장균 중의 인간 재조합물이다. 우리가 선택한 용량은 150 µg으로, 5일 동안 연속하여 저녁에 (대략 오후 7시) 매일 투여된다. 이러한 용량 및 투여 스케줄에 따라, 그 효과는 과립구들의 낮은 증가에 의해 얻어진 DC의 수와 관련하여 높고, 부작용을 보인다. 그 순간에, 혈류로 통과하는 골수로부터 기원하는 DC는 다음:

- (1) 모세관 벽들을 통해 통과하는 능력 (이들을 또한 불량한 이동성을 갖는다),
- (2) 불량한 항원 표시 용량이지만, 큰 식균 능력,
- (3) 이들이 작동체 또는 내성 반응을 유도하는지 여부에 관하여 정의되지 않는 특성을 갖는다.

이들은 민감하게 머무르는 조직 내로 마이크로 환경의 사이토킨 작용에 의해서 뿐만 아니라 식균 작용에 의해 진행되고, 이들은 다른 특성들:

- (1) 이들의 멤브레인 수용체들은 돌연변이되고, 이들은 조직들로부터 림프성 모세관들로 이동하여 그들을 통과하는 능력을 획득한다. 이들은 큰 이동성을 갖지만, 모세관을 통과하는 능력은 상실한다.
- (2) 이들은 그들의 식균 능력을 상실하지만, 항원 표시 능력을 증가시킨다.
- (3) 이들은 자신을 조절자 또는 작동체 면역 반응의 유도물로 정의하는 특성을 을 획득하는 성체 형태들로 분화된다.

#### 치료법 설명

시료들은 환자들의 상이한 전이로부터 얻어졌다. 어프레스스 및 장차의 정제 공정이 실험실에서 수행되더라도, 환자의 B 세포들은 부가되는 IL4 및 IL6을 통해 48시간 동안 시험관 내에서 정제되고, 활성화되었다. 마지막으로, 환자들은 환자들의 수지상 세포들과 동시 배양된 활성화된 B 세포 하이브리드 자체, 또는 B 세포 하이브리드에 의해 면역화되었다. 이러한 면역화는 3주에 한번 건강한 림프절 내로 적용되었다. 동시에, 환자들은 면역화 기간 동안 3일마다 저녁에 (7:00 pm 내지 9:00 pm) 싸이멀패신 1.6 mg을 피하로 섭취하고, 이는 다음 6개월 동안 백신화 프로토콜 후 예상된다. 이러한 백신화 계획은 예를 들면 4 내지 10회 용량을 포함할 수 있지만, 이들 숫자는 배타적이지 않다.

B 세포들은 헤마프레스스를 통해 환자의 말초 혈액의 연층으로부터 얻어진다. 다음으로, 어프레스스로 얻은 생성물은 피콜-하이파크 구배로 파종된다. 수퍼리어 인터페이스에서 얻은 EKSGORR세포 고리는 B 세포들의 소스이고, 이는 캐나다 밴쿠버 소재 스템 셀 테크놀로지사가 공급한 상용 키트를 사용하는 네거티브 선택에 의해 단리된다. B 세포들은 IL4 및 IL6이 풍부한 혈청 없는 배지 중에서 배양된다.

종양 시료는 수술 또는 바늘 생검을 통해 얻어진다. 추출된 물질의 세포학적 동시 확인은 두 경우로 수행된다. 종양 시료는 기계적으로 분해된다. 얻어진 단일 세포 현탁액은 인간 알부민, 인슐린, 및 상피 성장 인자가 풍부한 혈청 없는 배지 중에서 배양된다.

이어서, 활성화된 림프구들 및 단리된 종양 세포들은 폴리에틸렌글리콜 용액의 사용에 의해 융합된다. TBH 세포들의 형성은 종양 세포 소스에 따라 B 세포 마커로서 항 CD20 및 항 사이토케라틴 또는 항 비멘타인에 의한 면역 이중 염색을 통해 조절된다. 이어서, 하이브리드들은 인슐린, 상피 성장 인자 및 IL6가 풍부한 혈청 없는 배지에서 배양된다.

제 위치의 DC는 골수로부터 기동된 후 헤마프레스스를 통해 얻어진다. 기동은 5일 동안 GMCSF로 환자를 자극함으로써 수행된다. 2개의 혈액들의 프로세스에 대응하는 연층은 6일째에 어프레스스를 통해 수집된다.

미숙한 분화물 DC의 혼합 개체군은 환자의 연층으로부터 농축된다. 이러한 농축 및 정제 단계는 상이한 접착 기술이나 네거티브 선택에 의해 수행될 수 있다. 전자에서, 단핵 세포들은 조직 배양 플라스크 상에 적층되고, 4시간 후 상층액이 완만하게 처리된다. 이어서, 접착성 세포들은 아래 기재된 적절한 조직 배양 배지 중에서 배양된다. 네거티브 선택 방법에서, 단핵 세포들은 다음: CD3, CD14, CD16, CD19, CD34, CD56, CD66b 및 글리코포린 A에 반하여 8개의 모노클로날 항체들(MAB)의 혼합물에 의해 인큐베이션된다. 각각의 모노클로날 항체는 면역 자기 비드에 의해 콘주게이트된다. 마크된 세포 현탁액은 자기장을 통해 통과시킴으로써 정제된다. 마크된 세포는 유지되고, 마크되지 않은 세포들은 멸균관에 수집된다. 얻어진 마크되지 않은 세포 현탁액은 50%(40%-60%) 미숙 및 성숙한 DC 현탁액으로 구성된다.

제 위치의 풍부한 DC 현탁액은 인간 알부민, GMCSFrh 및 TNFrh가 풍부한 혈청 없는 배지 중에서 3일 동안 제 위치의 TBH와 동시-배양된다.

DC는 72시간 동안 배양후 세척되고, 농축되고, 환자의 건강한 림프절들 중의 하나에 주사되고, 대응하는 안전성, 순수성 및 효능 시험이 이어진다.

이러한 공정은 진행된 신생물 질병들로 고통받는 환자들에서 양호한 치료 결과들을 얻는 가능성에 대해 유리한 여러 특징들을 제공한다.

수술 조각으로 다루는 경우와 같이 많은 수의 세포들을 얻는 것이 유리하지만, 미세한 바늘 생검을 통해 얻어진 종양 세포들의 수는 TBH의 동화에 충분하다. 전이 항원성은 모든 상이한 장기에서 상이한 것으로 보인다. 따라서, 환자의 모든 전이 부위로부터 종양 세포들을 얻는 비침입적 방법으로 계수하는 것은 매우 중요하다.

B 림프구들은 일단 활성화되면 면역 시스템에서 제2의 가장 강력한 유형의 항원 표시 세포들로 되는 세포들이다. 다른 한편, B 세포 배양물들이 IL6에 의해 자극되는 경우, 이들은 적어도 6개월 동안 계속 성장한다. 이러한 IL6 민감성은 세포 융합 후 TBH 개체군으로 전파된다.

따라서, TBH는 몇몇 종양 세포들로부터 발생되어 그의 잠재성 및 항원 다양성을 상실하지 않고 수개월 동안 시험관 내에서 유지 및 확장될 수 있다.

일단 DC가 이러한 하이브리드에 노출되면, 이들은 상이한 신생물 세포 개체군들의 자연 상태로 존재하는 가능한 모든 종양 항원들을 실질적으로 포획한다. 이들 항원들은 활성화된 B 세포들의 특징인 동시-자극하는 접착성 분자들의 그룹과 함께 TBH 표면 상에 제공되고, 이는 낮은 농도 레벨에서조차 DC에 의한 이들의 최대한의 효율적인 포착 및 동화를 허용한다.

TBH는 시험관내 성숙기 및 활성화 프로세스들의 시작과 함께 DC에서 존재하기 때문에, 이는 DC가 이러한 프로세스를 수행할 수 있는 단기간 동안 종양 항원들의 삽입을 허용한다. 곧, 종양 항원들이 엔도사이토티트된 후, DC는 항원들을 처리하고 제공하는 이들의 능력에서 최대 레벨의 효능에 도달한다. 이들은 또한 혈관으로부터 조직으로 이동하는 능력을 발전시킨다.

따라서, 림프절 내 주사는 DC 백신의 혈액 트랜스관류보다 더욱 효율적인 것으로 보인다.

그러나, 골수로부터 기동을 통해 얻어진 DC는 단일 공정에서 얻어지는 적은 수의 세포들을 초래한다. 이들 DC가 수술 조각으로부터 용해된 종양들 등의 전체 종양을 나타내는 항원들의 사용에 의해 또는 종양 세포들 및 DC에서 벗어난 하이브리드에 의해 자극될 때, 이 시료들은 시간이 경과함에 따른 효능을 달성하기 위해 상이한 부분들로 분리될 수 있다.

임상적 진화 관점에서, 일부 환자들만이 종양학 백신 단독에 의한 자발적인 양호한 진화를 겪는다. 화학요법, 방사선요법 및 호르몬 요법에 내성이 있는 진행된 유방암 환자들에서 낮은 생존률을 갖는 것은 공지되어 있다.

제 1차 수치상 세포 백신(DCV)의 프로토콜은 환자 성과들을 개선시킬 수 있는 것으로 개발되었다.

짜이멀패신(ZADAXIN®)은 Th1 반응을 증진시키는 것으로 보였으며, 이는 종양 퇴화와 관련된다. 다음 연구는 수치상 세포 면역화 및 짜이멀패신이 백신 요법 단독에 반응하지 않는 진행된 유방암 환자들의 결과에 긍정적인 효과를 미치는지 여부를 평가하기 위해 수행되었다.

본 발명은 제한되도록 의도되지 않는 다음 실시예에 의해 예시된다.

#### 실시예

화학요법, 방사선요법 및 호르몬요법에 내성이 있는 진행된 유방암인 18명의 환자들이 치료받았다.

AHEMS 환자들은 유방암 4기(전이에 의해)인 여성들이었다.

연령 범위는 39 내지 71세였다.

환자들은 수치상 세포 백신으로 치료받았다 (프로토콜: Annals of Oncology 2004-15권, Supp. 3 Abs: iii40- Dendritic Cell Vaccine for Metastases Breast Cancer에 따름)

제2 백신화 과정 후, 세포 면역화가 측정되었고, 이는  $\geq$  백신화가 계속된 20 ULPI (Linfocytic 증식 지수).

응답이  $<$  20 UPLI인 경우, 환자들은 5 및 7명의 환자 그룹으로 (랜덤화된) 2개의 그룹으로 분할되었다. 5명의 환자 그룹은 수치상 세포 백신 + 짜이멀패신을 수용하였다 (6개월 동안 1.6 mg/tw). 다른 7명의 환자 그룹은 면역 자극을 수용하지 않고, 프로그램된 수치상 백신화 과정을 수용하였다.

이러한 면역요법 레지멘의 성공을 위해 중요한 점은 제2 DC 백신 후에 환자가 가진 초기 면역 응답이다.

환자 면역 응답은 림프구 증식 분석이라는 명칭의 잘 공지된 시험관내 시험을 사용하여 측정하였다. 간단히, 환자로부터 단핵 세포들이 정제되고, 10:1의 비율로 환자 종양 세포들의 현탁액과 혼합되었다 (3000 림프-단구 대 300 종양 세포들). 혼합 세포 현탁액은 다중 웰 플레이트에 파종되고, 37°C에서 인큐베이션된다. 96시간 후 세포들은 수확되었고, 자동 헤모사이토미터에 의해 계수되었다.

계수된 단핵 세포들의 수가 20000 세포 이상인 경우(림프구 증식 지수 - 20 U의 LPI), 환자들은 효과적인 종양 응답 및 장기간 생존하는 양호한 결과를 가졌다. 반대로 이러한 혼합 세포 배양 후, 단핵 세포들이 이러한 수에 도달하지 못하는 경우, 환자는 불량한 응답을 갖고, 생존 기간은 면역 응답자 환자들보다 현저히 단축되었다.

짜이멀패신 치료는 종양 거부에 연루된 것인 Th1 응답의 중요한 면역 증진제이다.

제2 DC 면역화가 20 U 이하의 LPI를 가진 후 39세 내지 71세 범위의 연령인 5명의 진행된 유방암 환자들은 짜이멀패신 (6개월 동안 1.6 mg/1주 2회) + 4개의 추가의 수치상 세포 백신 과정으로 치료받았다. 짜이멀패신은 LPI를 개선시킬 수 있고, 치료받은 환자들의 대부분은 효과적인 종양 응답을 보였다.

전체 18명의 전이된 유방암 환자들에서 기원하는 임상 응답 및 생존률 데이터가 수집되었으며, 일련의 통계학적 분석을 수행하기 위해, 우리는 전체 개체군을 3개의 상이한 그룹들로 분할하였다.

그룹 1(n=7)에서, 환자들은 6회의 수지상 세포 면역화를 수용하고(3주마다 1회) 제2 백신 후 림프구 증식 지수(LPI)>20 U(면역 응답)였다.

그룹 2(n=6)에서, 환자들은 6회의 수지상 세포 면역화를 수용하고 제2 백신 후 LPI>20 U(비면역 응답)였다.

그룹 3(n=5)에서, 환자들은 6회의 수지상 세포 면역화를 수용하고 제2 백신 후 LPI>20 U(비면역 응답)이고, 이들은 싸이 멀패신(1.6 mg/1주 2회)을 수용하였다.

면역 응답은 림프구 증식 분석에 의해 측정되었다. 관찰된 결과들은 6개월째에, 그룹 1 (응답자들)의 환자들 100% 중에서 >50%, 그룹 2(비응답자들)에서 50%, 및 그룹 3(싸이 멀패신으로 치료한 비응답자들)에서 80%의 종양 감소가 있었다.

12개월 동안 생존한 환자는 그룹 1에서 57%, 그룹 2에서 1.0% 및 그룹 3에서 80%였다.

우리는 제2 백신화 후 DCV 요법에 대한 면역 응답(LPI>20 U)이 종양 크기의 감소 및 환자 생존 기간을 연장시키는 것과 관련되는 것을 알 수 이Te다 싸이 멀패신에 의한 치료는 수지상 세포 면역화에 응답하지 않은 진행된 유방암 환자들에 대한 긍정적인 효과를 가졌다. 환자 생존률은 싸이 멀패신을 수용하지 않은 면역 응답자들 및 비면역 응답자들에 비교하여 싸이 멀패신-치료된 그룹에서 높았다(표 1 참조).

표 1은 6개월 째의 임상 응답 및 12개월째의 환자 생존률을 보여준다.

표 1

6개월 째의 임상 응답 및 12개월 째의 환자 생존률			
치료군	n	>50% 종양 감소된 환자	환자 생존률
그룹 1 (응답자들)	7	100%	57%
그룹 2 (비응답자들)	6	50%	0%
그룹 3 (싸이 멀패신으로 치료한 비응답자들)	5	80%	80%

전이된 유방암인 18명의 환자들의 소급적인 관찰이 수행되었다.

그룹 1(n=7), 환자들은 6회의 수지상 세포 면역화를 수용하고(3주마다 1회) 제2 백신 후 림프구 증식 지수(LPI)>20 U(면역 응답)였다.

그룹 2(n=6), 환자들은 6회의 수지상 세포 면역화를 수용하고 제2 백신 후 LPI>20 U(비면역 응답)였다.

그룹 3(n=5), 환자들은 6회의 수지상 세포 면역화를 수용하고 제2 백신 후 LPI>20 U(비면역 응답)이고, 이들은 싸이 멀패신(1.6 mg/1주 2회)을 수용하였다.

결과: 6개월 째에, 그룹 1 (응답자들)의 환자들 100% 중에서 >50%, 그룹 2(비응답자들)에서 50%, 및 그룹 3(싸이 멀패신으로 치료한 비응답자들)에서 80%의 종양 감소가 있었다. 12개월 째에 생존한 환자는 그룹 1에서 57%, 그룹 2에서 1.0% 및 그룹 3에서 80%였다.

이러한 면역 자극 약물의 사용은 수지상 세포 백신들로 치료한 유방암 환자들에 대해 제한적이지 않고; 대신에 그것은 다른 유형의 암인 환자들에서 수지상 세포 백신들의 진화 및 임상 결과들을 개선시킬 수 있다. 싸이 멀패신은 또한 다른 종류의 면역학 백신들에 의한 임상 결과를 개선시킬 수 있다.