



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년11월08일
(11) 등록번호 10-1900807
(24) 등록일자 2018년09월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0783 (2010.01) A61K 35/12 (2015.01)
(21) 출원번호 10-2013-7004186
(22) 출원일자(국제) 2011년08월22일
심사청구일자 2016년07월25일
(85) 번역문제출일자 2013년02월19일
(65) 공개번호 10-2013-0103485
(43) 공개일자 2013년09월23일
(86) 국제출원번호 PCT/US2011/048578
(87) 국제공개번호 WO 2012/024666
국제공개일자 2012년02월23일
(30) 우선권주장
61/401,881 2010년08월20일 미국(US)
61/495,055 2011년06월09일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
Leuk Res. 2008, 32:1903-1913.*
J Immunol. 2009, 182:6287-6297.*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
이뮤노베이티브 테라피스, 엘티디.
이스라엘 96951 예루살렘 퍼스트 플로어 빌딩 넘
버 1 말하 테크놀로지 파크
(72) 발명자
하-노이, 마이클
이스라엘 71700 모디인 에멕 스블론 22-1
(74) 대리인
윤의섭, 김수진

전체 청구항 수 : 총 11 항

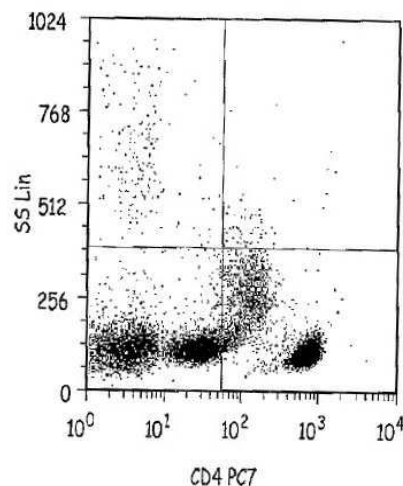
심사관 : 이현지

(54) 발명의 명칭 헬퍼 T1 특성들 및 세포용해 특성들을 발현하는 세포들

(57) 요약

헬퍼 T1 특성들 및 세포용해 활성 모드를 갖는 신규의 세포 형태가 발생되었다. 이러한 헬퍼 T1/살해 세포들은 말초 혈액으로부터 정제되고 세포용해성 T-세포들과 유사한 세포용해 활성과 함께 인터페론-감마와 같은 헬퍼 T1 특성들을 갖기 위하여 조작된 CD4+ 세포들이다. 세포용해성 T-세포 활성은 정상 세포들이 아닌, 질병 세포들을 표적으로 한다. 헬퍼 T1/살해 세포들의 세포용해 활성은 그랜자임 B-퍼포린 메커니즘에 의해 매개되고 질병 세포들의 아포토시스를 야기한다. 이러한 헬퍼 T1/살해 세포들을 생산하고 사용하는 방법들은 말초 혈액으로부터 CD4+ 세포들을 분리하는 단계, 헬퍼 T1/살해 세포들을 형성하기 위하여 CD4+ T-세포들을 활성화하는 단계 및 세포용해 활성을 갖는 이러한 헬퍼 T1/살해 세포들을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는데 헬퍼 T1/살해 세포들은 환자에 동종이다.

대표도 - 도1a



명세서

청구범위

청구항 1

종양 세포 라인에 대해 직접적인 세포 용해 활성을 가지는 활성화된 CD4+ 헬퍼 T1 세포들을 포함하는 항-종양 조성물에 있어서, 상기 활성화된 CD4+ 헬퍼 T1 세포들은, CD4+ 세포들을 외인성(exogenous) 사이토카인의 부가 없이 CD3 및 CD28 세포 표면 분자를 가교시켜 활성화시키고, 활성화된 세포를 동결시킨 다음, CD3 및 CD28 세포 표면 분자의 가교 결합에 의해 세포를 재활성화시키는 것에 의해 얻어지는 그랜자임 B 및 퍼포린을 발현하는 체외 활성화된 CD4+ 헬퍼 T1 세포들인 것을 특징으로 하는 항-종양 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 세포용해 활성은 자연 살해 특성들인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

삭제

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 상기 활성화된 CD4+ 헬퍼 T1 세포들은 인터페론-감마를 발현하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 활성화된 CD4+ 헬퍼 T1 세포들은 감소된 림포카인 인터루킨-4 발현을 갖거나 또는 림포카인 인터루킨-4를 발현하지 않는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

제 1항에 있어서, 상기 활성화된 CD4+ 헬퍼 T1 세포들은 정상적인 기증자 말초 혈액으로부터 유래하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 9

삭제

청구항 10

제 1항에 있어서, 상기 조성물은 적어도 1×10^7 세포들을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 11

제 1항에 있어서, 상기 조성물은 적어도 1×10^8 세포들을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 12

제 1항에 있어서, 상기 활성화된 CD4+ 헬퍼 T1 세포들의 상기 세포용해 활성은 암 세포들, 감염된 세포들 또는 그것들의 조합을 포함하는 질병 세포들을 불활성화시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

제 1항에 있어서, 상기 종양 세포 라인은 ARH77인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 19

삭제

청구항 20

체외에서 질병 세포들을 제1항, 제2항, 제4항, 제5항 및 제8항 중 어느 한 항의 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하며, 상기 질병 세포들의 상기 활성화된 CD4+ 헬퍼 T1 세포들과의 상호작용은 상기 질병 세포들의 파괴에 이르게 하는 것을 특징으로 하는 체외에서 질병 세포들을 파괴하기 위한 방법.

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

제 20항에 있어서, 상기 질병 세포들은 암 세포들, 감염된 세포들 또는 그것들의 조합을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 치료 암 백신 및 적응 면역 세포 치료 프로토콜(protocol)에의 사용을 위하여 임상적으로 적절한 수의 CD4+ 세포들을 생산하기 위한 방법을 개시한다.

배경 기술

[0002] 치료 암 백신(therapeutic cancer vaccination)은 면역요법(immunotherapy)의 한 종류이다. 면역요법은 암 치료를 위한 약물의 종류로서 화학요법, 방사선 및 수술과 결합하여 나타나는 새로운 치료 양상이다. 면역요법 방

법들은 질병들을 치료하기 위하여 면역 시스템의 힘을 활용한다. 치료 백신은 존재하는 종양, 바이러스와 박테리아 병원체에 대한 잠재적으로 치유력이 있는 치료요법인 면역요법의 한 형태이다. 치료 백신들은 일반적으로 표적(target) 질병으로부터 유래하는 항체 소스(source) 및 바람직한 면역 반응을 향상시키도록 디자인되는 보조제(adjuvant)로 구성된다. 일부 치료 백신 프로토콜에서, 숙주(host, 자가)로부터 유래하거나 또는 기증자(donor, 동종(allogeneic))로부터 유래하는, 살아있는 면역 세포들이 치료 백신들의 조성물이다. 수지상 세포(dendritic cell)들, 자연 살해 세포(natural killer cell)들 및 T-세포들과 같은, 자가 및 동종의 살아있는 면역 세포들이 또한 암의 치료를 위하여 면역요법 프로토콜에서 사용된다.

[0003] 림프구들은 척추동물 면역 시스템의 일부이며 큰 과립성 림프구(large granular lymphocyte)들 및 작은 림프구들을 포함한다. 큰 과립성 림프구들은 자연 살해 세포들을 포함한다. 작은 림프구들은 T-세포들 및 B 세포들로 구성된다. 자연 살해 세포들은 선천적 면역 시스템의 일부이며 종양들 및 바이러스로 감염된 세포들로부터 동물을 방어하는데 중요한 역할을 한다. 자연 살해 세포들은 다조직적합유전자 복합체(multihistocompatibility complex, MHC) 등급 I 표면 분자들을 통하여 감염된 세포들 및 종양 세포들을 감염되지 않은 세포들과 구별할 수 있다. 자연 살해 세포들은 사이토카인(cytokine)에 반응하여 활성화되고 활성 상태에서 감염된 세포들 또는 종양 세포들을 파괴하는 퍼포린(perforin) 및 그랜자임 B(granzyme B)와 같은 세포독성 입자들을 방출한다. 자연 살해 세포들은 세포 표면 마커(marker)들 CD16+ 및 CD56+을 특징으로 하나, CD4는 발현하지 않는다.

[0004] T-세포들 및 B-세포들은 적응 면역 반응(adaptive immune response)의 일부이며 비-자기 항원(non-self antigen)들을 인식한다. B-세포들은 항체 생산에 의해 비-자기 항원에 반응한다. 서로 다른 종류의 T-세포들은 서로 다른 방법으로 비-자기 항원들에 반응한다. 세포독성 T-세포들(Cytotoxic T-cells, CTL)은 마커들 CD3+, CD8+ 및 T 세포 수용체(T Cell Receptor, TCR, 이하 TCR로 표기) $\alpha\beta$ 를 특징으로 하나, CD4를 발현하지 않는다. 종양-특이 CD8+ 세포독성 T-세포들은 주로 종양 제거에 책임이 있다. 게다가, 세포독성 T-세포들은 특히 종양 세포들을 인식하며 동일한 조직의 정상 세포들은 공격하지 않는다. 세포독성 T-세포들은 질병 또는 암 세포들의 죽음을 유도하는 그랜자임 B 및 퍼포린을 포함하는 강력한 효소들을 포함하는 독성 입자들을 생산한다.

[0005] 헬퍼 T 세포(T helper cell)들은 세포 표면 마커들 CD3+, CD4+ 및 TCR $\alpha\beta$ 를 특징으로 한다. 헬퍼 T 세포들은 사이토카인 혹은 다른 세포들 또는 분자들을 통하여 면역 반응으로 향하는 다른 분자들을 생산한다. 헬퍼 T 세포들은 세포들의 살해를 직접적으로 매개하는 것으로 알려졌는데 따라서 정상적으로는 그랜자임 B 또는 퍼포린과 같은 세포독성 입자들을 포함하지 않는다. 헬퍼 T 세포들은 두 가지 형태의 서브카테고리로 나뉜다: 헬퍼 T 타입 1(Th1) 및 헬퍼 T 타입 2(Th2). 헬퍼 T1 세포들은 세포 면역을 매개하고 면역-매개 종양 막멸에 매우 중요하며, 반면에 헬퍼 T2 세포들은 체액성 또는 항체 면역을 매개한다. 헬퍼 T1 및 헬퍼 T2 세포들은 증가된 헬퍼 T1 세포들이 헬퍼 T2 세포들을 하향 조절하고(down regulate) 반대의 경우도 마찬가지인, 대응-조절적(counter-regulatory)이다.

[0006] 환자의 면역 반응을 향상시키거나 억제하기 위하여 다양한 면역요법 방법들이 개발되어 왔다. 세포 치료 방법들은 때때로 세포들의 증식, 분화 및/또는 활성화와 같은 체외 조작(ex-vivo manipulation)을 포함하며 치료로서 이러한 세포들을 환자로 전달한다.

[0007] 적응 면역요법은 환자로부터 림프구들의 제거, 체외에서 그것들의 항암 활성화의 촉진, 세포들의 임상적으로 적절한 큰 수로의 성장, 및 그리고 나서 세포들의 환자로의 복귀를 포함한다.

[0008] 적응 면역요법에서의 초기 실험들은 환자의 혈액으로부터 림프구들의 제거 및 림포카인 인터루킨(lymphokine interleukin, IL, 이하 IL로 표기)-2, 면역 자극기(immune stimulator)의 존재하에서 그것들이 성장을 포함한다. 세포들은 그리고 나서 환자에게 복귀된다. 이러한 림프구들은 림포카인 활성화 살해(lymphokine-activated killer, LAK) 세포들로 불린다.

[0009] 종양 자체로부터 분리된 림프구들을 사용하여 종양 세포들에 대한 강력한 반응이 획득되었다. 이러한 종양-침윤 림프구들(tumor-infiltrating lymphocytes, TILs)은 IL-2의 존재 하에서 성장되고 종양을 공격하기 위하여 체내로 복귀된다.

[0010] 적응 면역요법은 체외에서 처리된 세포들이 체내로 도입되는 면역요법의 한 형태이다. 임상진 연구들은 항종양 활성이 체외에서 활성화되고 증식된(expanded) 자가 림프구들과 함께 인터루킨-2를 사용함으로써 향상될 수 있다는 것을 제안하였다. 또한 대량 인터루킨-2 치료를 갖는 첫 번째 객관적 반응들이 림프구분만술(lymphopheresis)에 의해 수확되는(harvested) 자가 말초 혈액 림프구의 체외 활성을 통하여 제작되는 림포카인

활성화 살해 세포들과 함께 인터루킨-2를 받은 환자들에 알려졌으며, 초기에, 인터루킨-2/림포카인-활성화 살해 세포들의 조합이 인터루킨-2 단독에서보다 더 활성이 있는 것으로 나타났다. 인터루킨-2는 헬퍼 Th1 세포들에 의해 생산되는 사이토카인이다. 적응 면역요법의 사용에서의 관심은 IL-2와 함께 활성화된 림프구 활성화 살해 세포들 또는 종양-침윤 림프구들의 추가가 IL-2 보다 효과적이라는 것을 설명하는데 실패한 임상 연구들 후에 감소하였다.

[0011] CD4+ T(헬퍼 T) 세포들은 감염에 대한 숙주 방어의 대부분의 양상들의 활성화와 조절 및 세포독성 CD8+ 림프구(CTL)들의 적절한 기능에 매우 중요하다. 종양 면역에서의 많은 연구들은 대부분 CD8+ 세포들이고 흑색종(melanoma)과 일부 다른 종양들에서 분리될 수 있는 자연적으로 발생하는 자가 종양-특이 T 세포들에 초점을 맞추어 왔다. 이러한 세포들은 체외에서 증식되고 재주입될 수 있다. 이러한 형태의 적응 면역요법은 질환들이 다른 요법에 난치성인 일부 환자들에게 실제 종양 반응들 및 장기간 생존을 야기하였다. 적응 면역요법으로서 CD8+ 독성세포 T 세포들을 사용하는 광범위한 임상 실험들이 존재하나, 빈약한 임상 반응들은 환자의 더 높은 비율의 종양 제거를 달성하기 위하여 이러한 치료를 향상시키기 위한 필요성을 강조하고 있다.

[0012] CD8+ 림프구들은 CD4+ T 세포의 도움이 없기 때문에 체내에서의 기능성을 유지하는데 대부분 실패할 수 있다. 체외에서, CD8+ 세포들은 다조조직합유전자 복합체에 적합한 세포 라인들의 노출 상에서 많은 양의 인터페론-감마(IFN- γ)를 방출하고 자가 항원-양성 및 다조조직합유전자 복합체 등급 I-양상 종양들을 용해한다. 그러나 종양 세포들의 유전적 불안정성은 처리 능력에서의 손실에 이르게 하고 종양들을 CD8+ 세포용해성 T 세포들을 위하여 본질적으로 신뢰할 수 없는 표적들에 제공하는 내인성 항원(endogenous antigen)들이 나타난다. 게다가, 일부 CD4+ T 세포 서브셋(subset)들에 내재하는 것으로 보이는 CD8+ T 세포들은 광범위한 항종양 반응을 조정하는 고유의 능력이 부족한 것으로 나타난다.

[0013] 세포독성 CD8+ 림프구의 적응적 전달을 갖는 면역요법이 많은 동물 모델에서의 가능성을 설명하였으나, 이러한 결과들의 인간으로의 중계(translation)는 어렵고 달성하기 힘든 것으로 입증되었다. 특히 헬퍼 T1 서브타입의, CD4+ 세포들은 적응적으로 전달되는 CD8+ 살해 세포들에 자연적인 "도움"을 제공하기 위하여 이용가능한 모든 면역요법 설비(armamentarium)에 매력적인 첨가제가 될 수 있다. 그러나, 자연적으로 발생하는 종양-특이 CD4+ 세포들로 작업하는데 상당한 장벽들이 존재한다. 환자들의 어떤 주어진 개체군에서 CD4+ 헬퍼 세포들과 관련된 등급 II 인간 백혈구 항원(HLA)의 유전적 다양성은 CD8+ 세포용해 (살해) T-세포들에서 발견된 등급 I 인간 백혈구 항원의 경우보다 훨씬 더 복잡하며, 에피토프(epitope)들 및 T 세포 수용체의 식별에 더 문제가 많게 만든다. 게다가, CD4+ T 세포들은 CD8+ 세포들보다 체외에서 덜 증식되고 배양 조건들이 그것들의 특성에 중요하게 영향을 미친다. 마지막으로, 종양 특이 CD4+ 세포들을 기초로 하는 현실적인 동물 모델들의 부족이 존재한다. 이러한 요인들은 CD4+ T 세포들을 사용하는 제한된 중계 연구 및 그것들의 제한된 임상 사용을 갖는다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 본 발명은 치료 암 백신 및 적응 면역 세포 치료 프로토콜의 사용을 위하여 또한 세포용해성 입자들 그랜자임 B 및 퍼포린을 포함하고 헬퍼 T1 세포들로서 두 기능을 하며(인터페론-감마를 생산하나 IL-4는 생산하지 않는) 자연 살해-유사 활성화(정상 세포들이 아닌 종양 세포들만을 인식하고 살해하는)을 갖는 임상적으로 적절한 수의 CD4+ 세포들을 생산하기 위한 방법을 개시한다.

과제의 해결 수단

[0015] 세포 기반 치료 암 백신들(세포 면역요법)은 암의 치료를 위한 새로운 최소한의 독성 접근법으로서의 가능성을 유지한다. 이러한 접근법의 가능성은 동물 모델들에서 설명되어 왔으나, 이러한 가능성을 임상에 중계하기가 어려웠다(Bodey, Bodey 등, 2010). 첫 번째 세포 면역요법 약물인, 프로벤지(Provenge)[®](시풀류셀(sipuleucel)-T), 무증상(asymptomatic) 또는 최소 증상의 전이성 거세 저항성 전립선 암(metastatic castrate resistant prostate cancer)의 치료를 위한 자가 수지상 세포 면역요법(Kantoff, Higano 등)의 최근의 미국식품의약국(FDA) 승인은 임상 적용을 위하여 향상된 세포 치료 제품을 개발하기 위한 열정을 새롭게 하였다.

[0016] 동물들에서 개발된 세포 면역요법 전략들의 면역-매개 항-종양 메커니즘들을 성공적으로 중계하는 것이 어려운

것으로 입증되었기 때문에, 발명자들은 대신에 중요한 임상 항-종양 효과들을 유도하는 것으로 이미 알려진 항-종양 면역 메커니즘을 증계하는데 집중하였다. 거의 틀림없이, 인간들에서 설명된 가장 강력하고 가장 효과적인 면역-매개 항-종양 메커니즘은 비-골수소멸성 조절(non-myeloablative conditioning) 및 인간 백혈구 항원-일치(matched) 줄기 세포들의 이식 후에 발생하는 이식편 대 종양 효과(graft vs. cancer effect)이다(Barrett 및 Childs, 2000; Childs, 2000; Resnick, Shapira 등, 2005). 불행히도, 이러한 이식편 대 종양 효과들은 만성적인 이식편 대 숙주 질환(graft-versus-host-disease, GVHD) 독성을 동반한다. 만성 이식편 대 숙주 질환은 상당한 질병률(morbidity)과 관련되고 이식편 대 종양 메커니즘의 임상 적용을 심각하게 제한하는, 동종 조혈모세포 이식(hematopoietic stem cell transplantation, Lee, Klein 등, 2002) 후의 만기 사망률의 주된 원인이다.

[0017] 해로운 이식편 대 숙주 질환 효과들로부터 유익한 이식편 대 종양 효과들의 분리는 어려운데 그 이유는 이식편 대 숙주 질환을 억제하는 조작들이 또한 이식편 대 종양 효과를 감소시킨다는 점에서(Li, Giver 등, 2009), 효과들이 서로 관련되고 비례하기 때문이다. 상호 관련된 이식편 대 종양 및 이식편 대 숙주 질환 효과들의 알려진 면역-매개 메커니즘을 분석함으로써, 이식편 대 종양/이식편 대 숙주 질환 효과들의 분리 대신에 이식편 대 숙주로부터 숙주 대 이식편(host-to-graft)으로 효과들의 방향을 반전함(reversing)으로써 면역 메커니즘의 상호관계를 유지할 수 있는 동종 세포 면역요법을 개발하는 것이 가능할 수 있다고 제기하였다. 효과들의 방향의 성공적인 반전은 비-독성 숙주 대 이식편 거부(rejection) 효과에 결합되는 숙주 대 종양(host vs. tumor) 효과를 야기할 수 있다.

[0018] 고밀도 CD40L을 발현하고 많은 양의 인터페론-감마를 생산한 고의로 불일치되고, 활성화된, 동종 헬퍼 T1 세포들은 결합된 숙주 대 종양/숙주 대 이식편 효과들을 유도할 수 있을 것이라고 가정되었다. 이러한 가설은 화학요법-불응성의 B-세포 백혈병/림프종의 동물 모델에서 테스트되었다(Har-Noy, Zeira 등, 2008). 이러한 연구들은 헬퍼 T1 세포들이 활성화되고 항-CD3/항-CD28-코팅된 마이크로비드(microbead)에 부착되어 투여될 때에만 체외에서 분화된 동종 헬퍼 T1 세포들에 의해 상당한 숙주 대 종양/숙주 대 이식편 활성이 유도될 수 있다는 것을 설명하였다. 추가 연구들은 이러한 동종 CD3/CD28-교차결합된(cross-linked) 헬퍼 T1 세포들이 시스템상의 우세한(dominant) 헬퍼 T2 면역을 우세한 헬퍼 T1 면역으로 전환할 수 있는, 면역조절 효과들 및 헬퍼 T1-특이 면역의 발생과 종양 면역회피 메커니즘들의 조절장애(dysregulation)를 촉진하기 위한 보조 효과들 모두를 갖는다는 것을 보여주었다(Har-Noy, Zeira 등, 2009). 이러한 데이터를 고려하여, 이러한 실험적 접근법을 임상에 증계하는 가능성을 위한 헬퍼 T1 동종이식편(allograft)의 인간 버전(version)이 조사되었다.

발명의 효과

[0019] 인간 임상 연구를 위하여 이러한 세포들을 사용하기 위하여 극복되는데 필요한 동종 헬퍼 T1 세포들의 체외 분화 및 증식과 관련하여 상당한 조절 및 논리적 우려가 존재하였다. 그러한 한 가지 문제는 동종 헬퍼 T1 세포들의 마우스 버전이 마우스 헬퍼 T1 세포들의 체외 분화를 야기하기 위하여 IL-2, IL-12 및 항-IL-4 단일클론 항체(mAB)의 사용이 필요하였다는 것이다. 본 발명은 인간의 생물학적 약물로서의 분류를 위하여 일관된 배치(batch)간 동일성 및 기능적 특성들을 야기하는 외인성(exogenous) 사이토카인의 사용 없이 인간 동종 헬퍼 T1 세포들의 생산을 위하여 의약품 제조 품질 관리 기준(GMP)을 준수하는 공정의 성공적인 개발을 개시한다. 결과로서 생기는 동종이식편 세포들의 특성상에서, 인간 생산 공정은 예상 밖의 사실을 야기하였다. 여기에 설명된 방법들에 의해 발생하는 동종 헬퍼 T1 세포들은 헬퍼 T1 특성들이 발생하였을 뿐만 아니라 자연 살해-유사 특성들이 발생하였다. 헬퍼 T1 및 자연 살해-유사 활성의 조합을 갖는 동종이식편은 독특하며 정상 혈액 순환에서는 설명되지 않는다. 본 발명의 방법은 혼합된 기억(memory) 및 나이브(naive) 표현형(각각 CD45RA 및 CD45RO)과 함께 정제된, 휴면(CD25⁺), CD4⁺ T 세포들의 체외 배양을 포함한다. 세포들은 외인성 사이토카인 없이 고정화 항-CD3/항-CD28 단일클론 항체들로 여러 번 활성화된다. 세포들은 9일 후에 25-100 겹(fold)으로 증식하고 CD4⁺, CD45RO⁺, CD25⁺, CD62^{hi} 세포들로 분화한다. 이러한 중간 세포(intermediate cell)는 수년 동안 액체 질소 내에 저장될 수 있다. 환자 투여를 위하여 필요할 때, 전구체 세포들이 CD3/CD28 단일클론 항체들과 함께 4 시간 동안 배양된다. 이러한 최종 4시간의 배양 동안에, 전구체 세포들은 CD62L의 발현을 감소시키고 CD40L 및 CD25의 발현을 증가시키기 위하여 더 분화한다. 최종 CD4⁺, CD45RO⁺, CD40L^{hi}, CD62L^{lo}, CD25⁺ 세포들은 > 1000pg/10⁶ cells의 인터페론-감마 및 <50pg/10⁶ cells의 IL-4(헬퍼 T1 표현형)를 생산하고 그랜자임 B와 퍼포린의 세포용해성 입자들을 발현하며 종양세포들만을 용해하고 정상 세포들은 용해하지 않는 능력을 갖는 자연

살해-유사 활성을 나타낸다.

도면의 간단한 설명

- [0020] 도 1a 및 1b는 각각 CD4+ 선택 전 및 후의 세포 표현형을 나타내는 CD4 표면 항원의 면역염색으로부터의 유세포 분석기(flow cytometry) 플롯(plot)이다.
- 도 2a는 휴면으로서 CD4 나이트(CD4, CD45RA) 세포들을 갖는 소스 세포들의 표현형을 설명하는 일련의 유세포 분석기 플롯이다.
- 도 2b는 활성화된 CD4 기억 세포들(CD4, CD45RO 및 CD25)로의 배양 후에 표현형의 변화를 설명하는 일련의 유세포 분석기 플롯이다.
- 도 3은 활성화 전의 배양액 내에서 활성화된 세포들 및 활성화 후의 제형화 완충제(formulation buffer) 내의 세포들에서의 CD62L 발현의 시프트를 설명하는 유세포 분석기 플롯이다.
- 도 4a-4c는 각각 제형화 완충제 내의 세포들에서의 CD40L의 증가된 발현을 설명하는 CD4+ 세포들, 배양액 내에서 활성화된 세포들 및 제형화 완충제 내의 세포들에서의 CD40L 발현 패턴의 플롯들이다.
- 도 5는 직접 살해 분석법의 그래프이며 제형화 완충제 내의 세포들이 종양 세포 라인, ARH77로부터의 세포들을 살해할 수 있다는 것을 나타낸다.
- 도 6a는 배양액 내에서 활성화된 세포들에 의한 그랜자임 B의 발현의 플롯이다.
- 도 6b는 제형화 완충제 내의 세포들에 의한 그랜자임 B의 발현의 플롯이다.
- 도 6c는 제형화 완충제 내의 세포들에서의 퍼포린의 검출을 나타내는 웨스턴 블롯의 사진이다.
- 도 7은 에틸렌 글리콜 테트라아세트 산(ethylene glycol tetraacetic acid, EGTA)을 갖는 퍼포린-그랜자임 B 활성화 및 에틸렌 글리콜 테트라아세트 산을 갖지 않는 퍼포린-그랜자임 B 활성화의 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0021] 본 발명은 독특한 특성들을 갖는 세포들을 포함하는 조성물에 관한 것이다. 조성물은 헬퍼 T1 세포 특성들 및 세포용해성 입자들과 자연 살해 활성 모두를 갖는 세포 형태(cell type)의 세포들을 포함한다. 헬퍼 T1 특성들 및 자연 살해 특성들의 조합을 갖는 CD4+ T-세포들은 다양한 질병을 갖는 환자들을 위하여 실질적인 치료 능력을 제공할 수 있다. 헬퍼 T1 특성들은 예를 들면, IL-4의 생산 없이 인터페론-감마의 생산을 포함할 수 있다. 자연 살해 특성들은 그랜자임 B와 퍼포린의 발현을 이용하는 정상 세포들은 살해하지 않는 종양 세포들의 살해를 포함할 수 있다.
- [0022] 본 발명은 이러한 신규 세포 형태의 적응 면역요법을 위하여 임상적으로 적절한 수로의 분화 및 증식을 야기하는 방법들을 포함한다. 신규 세포들을 유래하기 위한 방법들은 T-세포들의 분리, 구체적으로 말초 혈액 또는 다른 소스들의 T-세포들로부터 CD4+ T-세포들의 분리를 포함할 수 있다. 이러한 CD4+ T-세포들은 여기서 설명되는 방법에 따라 임상적으로 적절한 수로 분화되고 증식될 수 있으며 면역요법을 위하여 사용될 수 있다. 놀랍게도, 이러한 방법들에 따라 제작되는 CD4+ T-세포들은 일반적으로 자연 살해/세포독성 CD8+ 림프구 세포들에서 알려진 세포용해 활성과 유사한 세포용해 활성을 나타낼 수 있으며 또한 헬퍼 T1 특성들 및 활성을 나타낸다.
- [0023] 일반적으로, 헬퍼 T-세포들은 세포용해 활성을 직접적으로 나타내지 않으나 질병 세포들을 불활성화시키거나 살해하기 위하여 자연 살해 세포들 및 세포독성 CD8+ 림프구들과 같은 다른 세포들을 유도하는 사이토카인들 및 다른 인자들을 생산한다. 존재하는 조성물 내의 CD4+ T-세포들은 직접적으로 질병 세포들을 살해할 수 있을 뿐만 아니라 그때 세포용해 활성을 수행하는 자연 살해 세포들과 같은 다른 세포들을 자극하기 위하여 사이토카인을 생산할 수 있다. 이러한 CD4+ T-세포들의 세포용해 활성은 종양 또는 감염된 세포들의 살해를 야기하는 그랜자임 B 및 퍼포린을 통하여 매개된다.
- [0024] 여기서 언급되는 것과 같은 세포용해 활성은 그것들이 표적 세포들과 상호작용할 때, 표적 종양 세포들 또는 세포 라인들의 주효 세포(effector cell)들에 의한 직접적인 살해에 관한 것이다. 직접적인 살해는 주효 세포 및 표적 세포들만 존재하고 다른 세포 형태들은 존재하지 않음으로써 발생할 수 있다.

- [0025] 본 발명에서 설명되는 신규 세포 형태는 여기서는 헬퍼 T1/살해 세포들로서 언급될 것이다. 헬퍼 T1/살해 세포들은 종양 세포들만 살해하고 정상 세포들을 살해하지 않는, 헬퍼 T1 특성들 및 그랜자임 B와 퍼포린 발현의 메커니즘을 통한 자연 살해 활성의 발현의 조합을 나타낼 수 있다.
- [0026] 여기서 언급되는 것과 같은 임상적으로 적절한 수는 직접적으로 또는 간접적으로 항-종양 효과를 유도하는 헬퍼 T1/살해 세포들의 충분한 수를 언급한다. 일반적으로 투여되는 헬퍼 T1/살해 세포들의 수는 단일 투여량으로서 적어도 1×10^6 cells, 바람직하게는 적어도 1×10^7 cells, 더 바람직하게는 적어도 1×10^8 cells이다. 더 많은 양의 투여량이 또한 본 발명의 범위 내에 존재한다. 바람직하게는 다수 환자들을 위한 충분한 투여량을 생산하기 위하여 단일 혈액 기증자로부터 충분한 양의 세포들이 생산된다. 임상적으로 적절한 수는 적어도 하나의 환자, 더 바람직하게는 10명의 환자들까지 그리고 더 바람직하게는 100명 이상의 환자들을 위한 충분한 세포들을 포함한다.
- [0027] 본 발명의 조성물은 다양한 질병 세포들을 갖는 환자에 투여될 수 있다. 환자는 동물, 인간 또는 다른 포유동물일 수 있다. 질병 세포들은 암 세포들 또는 감염된 조직으로부터의 세포들일 수 있다. 질병 세포들은 바이러스 및/또는 박테리아 병원체로 감염될 수 있다. 조성물은 유방암, 폐암, 대장암, 위암, 췌장암 등과 같은 고형 종양을 갖는 환자들에 투여될 수 있다. 조성물은 또한 혈액성 악성종양(hematological malignancy, 예를 들면, 만성 림프구성 백혈병(Chronic Lymphocytic Leukemia), 다발성 골수종(Multiple Myeloma), 및 비-호지킨 림프종(non-Hodgkin's lymphomas)) 또는 바이러스성 감염 질병들(예를 들면, B 또는 C형 간염, 대상포진, 인체 면역결핍 바이러스) 및 다른 질병들을 갖는 환자에 투여될 수 있다. 여기서 설명되는 조성물은 살아 있는 세포들이다. 살아 있는 세포들에 의해, >70%의 세포들은 적절한 조건 하에서 증식, 분화, 및/또는 활성화와 같은 체외 조작을 할 수 있는 것과 같이 트리판 블루 압출기(trypan blue extruder), ATP 레벨들의 MTT 또는 생물발광 검출과 같은 적절한 분석법 기술들 의해 결정되는 것과 같이 생존하는 것을 의미한다. 그러나, 조성물은 일부 불활성화 세포들, 방사성(radiated) 세포들 및/또는 비-생존 세포들 및 살아 있지 않은 조성물을 포함할 수 있다.
- [0028] 조성물은 일반적으로 예를 들면, 기증자의 혈액으로부터 처음 유래하는 CD4+ 세포들을 포함한다. 기증자는 질병이 없거나 또는 정상일 수 있다. CD4+ 세포들은 여기서 설명되는 것과 같은 방법으로 처리되고 그리고 나서 동일한 기증자 혹은 관련 또는 미관련 수용자(recipient) 내로의 융합을 위하여 제형화된다(formulated).
- [0029] CD4+ 소스 세포들은 바람직하게는 말초 혈액으로부터 정제된다. CD4 세포들은 다양한 방법으로 정제될 수 있다. 일반적으로, CD4+ 세포들은 양성 선택에 의한 말초 혈액의 연막(buffy coat)으로부터 정제된다. 연막으로부터의 CD4+의 양성 선택은 예를 들면, Miltenyi Biotec사(캐나다, 오번)로부터 획득되는 자성 비드들 및 칼럼(column)들을 사용함으로써 실행될 수 있다. 이는 약 90% 이상, 바람직하게는 약 95% 이상, 더 바람직하게는 약 98% 이상의 순수 CD4+ 세포들인 세포 조성물을 야기할 수 있다.
- [0030] 연막으로부터 분리되고 헬퍼 T1/살해 세포들의 생산을 위한 소스 물질로서 사용되는 CD4+ 세포들은 많은 수의 세포 표면 마커의 발현을 특징으로 한다. 말초 혈액의 연막으로부터 정제되는 CD4+ 세포들의 개체군은 CD45RA/CD45RO 마커들의 혼합된 개체군을 갖는다. CD4+ T-세포들은 일반적으로 대부분 CD25-이다. 바람직하게는 소스 CD4+ T-세포들은 대부분 나이브이다(CD45RA를 발현하고 CD45RO를 발현하지 않는). 소스 CD4+ T-세포들은 또한 CD62L 발현 및 CD40L 발현을 위하여 평가될 수 있다. 일반적으로, 소스 CD4+ T-세포들은 매우 낮은 양의 CD40L을 발현한다. CD62L의 발현은 바이모달(bimodal, 하이 및 로우) 평균 형광 강도(mean fluorescent intensity, MFI) 피크일 수 있다. 소스 CD4+ T-세포들은 바람직하게는 높은 CD62L 발현을 갖는다.
- [0031] 소스 CD4+ T-세포들은 다수의 활성화 단계들에 의해 헬퍼 T1/살해 세포들로 분화하도록 처리될 수 있다. 바람직하게는 소스 CD4+ T-세포들은 매 3일마다 9일 동안 활성화된다. 이러한 CD4+ 세포들은 바람직하게는 CD3 및 CD28 세포 표면 분자들의 교차결합을 통하여 활성화된다. CD3 및 CD28의 교차결합은 고정화 항-CD3 및 CD28 단일클론 항체들을 추가함으로써 달성될 수 있다. 일반적으로 헬퍼 T1/살해 세포들은 세포배양에서의 분화 및 증식에 의해 획득된다. 여러 번 활성화된 CD4+ 세포들은 세포 배양액으로부터 배양되고 액체 질소 내에 냉동 저장된다. 환자로의 투여 이전에, 세포들은 마지막으로 활성화된다. 세포들과 관련된 활성화 제제(activating agent)가 남는다. 부착된 활성화 제제를 갖는 세포들은 주입 또는 주사를 위하여 적합한, 주사기(syringe)와 같은, 장치 내에 제형화된다. 여기서 사용되는 "활성"은 단일클론 항체들과 같은 제제들에 의한 세포 표면 분자들의 결합 및 교차결합 제제들에 의한 이러한 제제들의 교차 결합 모두를 언급한다. 이러한 형태의 활성화는 예를 들면, 미국특허 제 7,425,592 및 미국특허 제 7,402,431에 설명되며, 이는 모두 여기에 참조로써 통합된다.
- [0032] CD4+ T-세포들은 T-세포 표면 분자들에 특이적인 고정화 단일클론 항체들의 사용을 포함하는 다양한 방법으로

활성화될 수 있다. 적절하게 활성화된 T-세포들은 예를 들면, 미국특허 제 7,435,592에서 설명된다. 세포들은 바람직하게는 단일클론 항체들 또는 그때 교차결합되는 다른 결합 제제들에 의해 결합되는 세포 표면 성분(moiety)들을 갖는다. 이러한 단일클론 항체들 및/또는 결합 제제들은 바람직하게는 예를 들면, T-세포들을 활성화하기 위하여 고정 표면에 고정되는, 제제에 의해 교차결합된다. 이들은 여기서 배양액 내에서 활성화된 세포들로 언급된다. 이러한 체외에서 제작된 배양액 내에서 활성화된 세포들은 미래의 사용 또는 주입을 위한 제형화를 위하여 냉동될 수 있다. 배양액 내에서 활성화된 세포들은 예를 들면, 액체 질소 탱크의 가스 상에서 분취되고(aliquoted) 냉동될 수 있다. 배양액 내에서 활성화된 세포들은 아래에 설명될 미리 정의된 동일성 및 기능적 배출 기준을 지속적으로 충족시킬 수 있다. 멸균 및 내독소가 없는 상태를 보장하기 위하여 공정 및 최종 품질 제어 테스트들이 수립된다.

[0033] 바람직한 일 실시 예에서, CD4⁺ T-세포들은 Invetrogen사로부터 구입한 CD3/CD28 ClinEx Vivo Dynal Beads의 존재 하에서 9일 동안 배양된다. 세포들은 Life Cell Flasks (Baxter Scientific사, 일리노이주 디어필드) 내에서 37°C 및 5% 이산화탄소에서 성장되고 배양 3일 및 6일째에 비드들로 재자극된다. 배양 9일 후에, 비드들이 제거되며 세포들은 배양액 내에서 활성화된 세포들로 언급될 수 있다. 활성을 위하여 세포를 배양하는 다른 방법들이 또한 본 발명이 범위 내에 존재한다.

[0034] 바람직한 실시 예들에서, 체외에서 제작된 배양액 내에서 활성화된 세포들은 환자 투여 또는 다른 사용이 필요할 때까지 냉동 저장된다. 환자로의 투여 이전에, 배양액 내에서 활성화된 세포들은 해동되고, 만일 필요하면, 예를 들면 미국특허 제 7,402,431에서 설명된 것과 같이 CD3 및 CD28과 같은 세포 표면 결합 성분들의 교차결합에 의해 영양 배지 내에서 세척되고 재활성화된다. 활성 및 교차결합 제제들과 함께, 배양액 내에서 활성화된 세포들은 그리고 나서 세척되고 제형화 완충제와 같은 비-영양성 완충제로 이동될 수 있다. 제형화 완충제 내에서 재활성화된 세포들은 여기서는 제형화 완충제 내의 세포들로 언급된다. 제형화 완충제 내의 세포들은 또한 여기서 헬퍼 T1/살해 세포들로 언급될 수 있다. 제형화 완충제 내의 세포들 및 헬퍼 T1/살해 세포들은 여기서 서로 호환하여 사용될 수 있다.

[0035] 헬퍼 T1/살해 세포들은 주사기 또는 다른 적절한 컨테이너 내에서 패키징되고(packed) 만일 필요하면 의료 사이트 지점으로 이동된다. 헬퍼 T1/살해 세포들은 그리고 나서 치료 목적을 위하여 환자에 투여될 수 있다. 헬퍼 T1/살해 세포들은 정맥내로, 복강내로, 피내로 또는 다른 적절한 방법들에 의해 투여될 수 있다. 일단 비-영양성 완충제로 이동되면, 헬퍼 T1/살해 세포들은 한정된 유통 기한을 갖는다. 세포들은 적어도 $\text{mL당 약 } 10^6 \text{ cells}$, 바람직하게는 $\text{mL당 약 } 10^7 \text{ cells}$ 또는 그 이상의 밀도에서 제형화될 수 있다. 일부 실시 예들에서, 세포들은 $\text{mL당 약 } 10^8 \text{ cells}$ 또는 그 이상의 밀도에서 제형화될 수 있다. 세포들의 특정 농도는 세포들의 특정 사용 및 치료 프로토콜에 의해 결정될 수 있다.

[0036] 조성물은 또한 헬퍼 T1/살해 세포들에 더하여 다수의 다른 조성물을 포함할 수 있다. 이러한 조성물은 예를 들면, 세포들을 원하는 활성 상태로 유지하는 제제들을 포함할 수 있다. 바람직한 일 실시 예에서, 조성물은 아래의 실시 예들에서 설명되는 Dynabeads ClinEX VivoTM과 같이 활성화된 상태에서 T-세포들을 유지하는 제제를 포함할 수 있다.

[0037] 일반적으로, 세포들은 환자로의 주입을 위하여 적합한 비-영양성 완충제로 이동된다. 세포들은 다양한 비-영양성 완충제들에서 존재할 수 있다. 여기서 언급되는 것과 같은, 비-영양성 완충제는 세포 증식 및/또는 증식을 제공하기에 적절한 조성물이 결핍된 모든 종류의 배지, 완충제 또는 다른 액체이다. 비-영양성 완충제들은 일반적으로 등장성의(isotonic), 미국약전(USP)에 따른 멸균의, 무발열성이고 살아있는 세포들을 온전하게 유지하기 위하여 적절한 조성물들 및/또는 완충 시스템을 포함하며 인간 비경구(perenteral) 사용을 위하여 승인되었다. 바람직한 일 실시 예에서, 비-영양성 완충제는 1% 인간 혈청 알부민(McKesson사, 캘리포니아주 샌프란시스코)을 갖는 플라스마라이트(Plasmalyte) A(Baxter Scientific사, 일리노이주 디어필드)인 제형화 완충제이다.

[0038] 헬퍼 T1/살해 세포들에 대한 실시 예들에서, 세포들이 비-영양성 완충제들로 이동될 때에도 세포들을 위한 활성 신호들은 유지된다. 예를 들면, 세포들이 세포 표면 결합 성분들을 교차결합함으로써 활성화되는 실시 예에서, 교차결합은 바람직하게는 비-영양성 완충제 내에서 유지된다. 저장 동안의 교차결합의 유지는 저장으로부터의 제거 후에 조성물의 기능적 특성들을 회복시키는데 매우 중요할 수 있다.

[0039] 조성물 내의 헬퍼 T1/살해 세포들은 기능적 특성들의 신규 조합을 나타낼 수 있다. 이러한 기능들은 헬퍼 T1 특성들 및 자연 살해 기능들과 유사한 세포용해 기능들을 포함한다. 헬퍼 T1/살해 세포들은 일반적으로 인터페론-

감마를 생산하고 실질적으로 감소된 IL-4 생산을 갖거나 또는 없는 IL-4 생산하지 않는다. 바람직하게는, IL-4 생산은 50pg/10⁶ cells 이하이고 인터페론-감마 생산은 1000pg/10⁶ cells 이상이다.

[0040] 부가적인 기능적 특성들은 예를 들면, CD40L, Fas 리간드(FasL), 퍼포린과 그랜자임 B과 같은 기능적 분자들, 동시자극(co-stimulatory) 분자들 4-1BBL, CD28, CTLA4, 및 종양성 괴사 인자(TNF) 관련 활성-유도 사이토카인(TRANCE), TWEAK, PD-1, B7 군, 인테그린(integrin), 캐드헤린(cadherin) 및 셀렉틴(selectin)과 같은 접합 분자(adhesion molecule)들 및 다양한 사이토카인들과 케모카인(chemokine)들의 분비 및 이러한 사이토카인들과 케모카인들을 위한 수용체들의 발현을 포함할 수 있다. 헬퍼 T1/살해 세포들은 많은 양의 사이토카인을 생산하고 분비할 수 있다. 생산된 사이토카인들은 예를 들면, 단지 휴면 IL-4 분비만을 갖는, 터페론-알파, 과립구대식세포콜로니자극인자(granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF) 및 종양괴사인자-알파일 수 있다.

[0041] 여기서 설명되는 헬퍼 T1/살해 세포들은 또한 세포용해 활성을 나타낼 수 있다. 세포용해 활성은 세포독성 CD8+ 림프구/자연 살해 세포들의 특성과 유사하다. 일반적으로, 헬퍼 T1/살해 세포들뿐만 아니라, 세포독성 CD8+ 림프구/자연 살해 세포들의 세포용해 활성은 종양 또는 질병 세포들에 특이적이거나 정상 세포들에는 특이적이지 않다. 바꾸어 말하면, 헬퍼 T1/살해 세포들은 종양 또는 질병 세포들을 살해할 수 있으나 정상 세포들은 살해하지 않는다. 세포용해 활성은 예를 들면, 다양한 메커니즘들을 통하여 발생할 수 있다. 세포용해 활성은 예를 들면, 그랜자임 B-퍼포린 메커니즘을 통하여 발생할 수 있다. 세포용해 활성은 세포용해 또는 아포토시스(apoptosis)에 의한 세포들의 파괴에 이르게 한다. 헬퍼 T1/살해 세포들의 세포용해 활성은 에틸렌 글리콜 테트라아세트 산(EGTA)에 의해 차단될 수 있다. 약 1mM에서의 에틸렌 글리콜 테트라아세트 산의 농도는 예를 들면, 활성화된 헬퍼 T1 세포들의 세포용해 활성을 감소시킬 수 있다.

[0042] 본 발명의 헬퍼 T1/살해 세포들은 분자들, 그랜자임 B 및 퍼포린을 발현할 수 있다. 그랜자임 B 및 퍼포린은 일반적으로 나이브 또는 분화, 활성 등에 의한 성숙 후에, CD4+ T-세포들에서 발현되지 않는다. 활성화된 헬퍼 T1 세포들 내의 그랜자임 B 및 퍼포린의 양은 다양할 수 있다. 일반적으로, 발현되는 그랜자임 B 및 퍼포린의 양은 질병 세포들을 파괴하기에 충분하다.

[0043] 바람직한 실시 예들에서, 본 발명은 헬퍼 T1/살해 세포들을 포함하는 조성물들을 포함한다. 이러한 헬퍼 T1/살해 세포들은 ARH77 세포들과 같은 골수종 종양 세포 라인들을 포함하는 다양한 종양 세포들을 불활성화시킬 수 있다. 질병 세포들의 불활성화는 에틸렌 글리콜 테트라아세트 산에 민감한 메커니즘을 통할 수 있다. 주효 세포(헬퍼 T1/살해 세포들) 대 표적 세포(질병 세포) 비율은 다양할 수 있다. 주효 세포 대 표적 세포 비율은 적어도 1:9, 바람직하게는 적어도 1:5 및 더 바람직하게는 적어도 1:1일 수 있다.

[0044] 본 발명은 질병 세포들을 파괴하기 위한 방법을 포함한다. 질병 세포들은 환자 내에 존재할 수 있다. 환자는 예를 들면, 암을 갖거나 또는 바이러스에 의한 감염에 기인하는 감염된 조직을 포함할 수 있다. 환자는 고형 암 또는 혈액성 악성 종양을 가질 수 있다. 방법은 환자에 여기서 설명되는 헬퍼 T1/살해 세포들을 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 헬퍼 T1/살해 세포들은 바람직하게는 환자에 동종이다. 동종 세포들은 하나의 정상적인 동종 기증자로부터 존재할 수 있다. 대안으로서, 동종 세포들은 다중 기증자로부터 유래하고 치료 조성물 내로 결합될 수 있다. 바람직하게는, 환자 및 동종 세포들 사이의 조직적합성 불일치(histocompatibility mismatch)가 최대화된다. 환자 및 동종 세포들 사이의 일부 조직적합성이 허용될 수 있으며 여전히 원하는 효과를 야기할 수 있다.

[0045] 헬퍼 T1/살해 세포들은 피내, 정맥내, 복강내 등을 포함하는 다양한 경로에 의해 환자에 투여될 수 있다. 환자는 1회 투여량 또는 다중 투여량으로 투여될 수 있다. 환자에 투여되는 세포들의 수는 다양할 수 있으며 특정 질병, 환자, 활성의 방법 및 다른 인자들에 의존한다. 일반적으로, 환자는 적어도 10⁷의 활성화된 헬퍼 T1 세포들, 바람직하게는 적어도 10⁸ 및 더 바람직하게는 적어도 약 10⁹ 세포들이 투여된다.

[0046] 본 발명은 또한 헬퍼 T1/살해 세포들을 포함하는 조성물을 투여함으로써 환자를 치료하는 방법을 포함한다. 환자는 헬퍼 T1/살해 세포들의 1회 또는 그 이상의 투여량을 받을 수 있다. 투여의 양 및 빈도는 다양할 수 있으며 특정 질환에 의존한다. 바람직한 실시 예들에서, 헬퍼 T1/살해 세포들은 환자에 동종이고 헬퍼 T1/살해 세포들의 환자로의 투여는 이식편 대 숙주 질환 없이 숙주 대 이식편 효과와 함께 숙주 대 종양 효과를 유도한다.

[0047] 실시 예들

- [0048] **재료들:** 캘리포니아주 브레아 소재의 Beckman Coulter사로부터 피코에리트린(phycoerythrin, PE, 이하 PE로 표기)-접합 CD40L을 구입하였다. 미시간주 안 아버 소재의 Cayman Chemical Co.사로부터 7-아미노(amino)-악티노마이신(actinomycin) D (7-AAD) (1000x)를 구입하였다. 일리노이주 디어필드 소재의 Baxter Scientific사로부터 플라스마라이트 A를 구입하였다. 캘리포니아주 샌프란시스코 소재의 McKesson사로부터 인간 혈청 알부민을 구입하였다. 캘리포니아주 샌디에이고 소재의 eBioscience사로부터 Fc 수용체 결합 차단제(FcR Binding Inhibitor)를 구입하였다. 캘리포니아주 칼즈배드 소재의 Invitrogen사로부터 DynaBeads ClinExVivo™를 구입하였다.
- [0049] **배양액 내에서 활성화된 세포들의 제작** - CD4⁺ T-세포들은 Invitron사로부터 구입한 CD3/CD28 ClinEx Vivo Dynal Beads의 존재 하에서 9일 동안 배양되었다. 세포들은 37℃ 및 5% 이산화탄소에서 Life Cell Flask들 (Baxter사) 내에서 성장되었으며 배양 3일 및 6일째에 비드들로 자극되었다. 배양 9일 후에, 비드들이 제거될 수 있으며 이러한 세포들이 배양액 내에서 활성화된 세포들로 언급된다.
- [0050] **제형화 완충제 내에서의 세포들의 제작** - 배양액 내에서 활성화된 세포들은 세척을 위하여 cRPMI 배지로 옮겨졌다. 제형화 프로토콜의 시작을 표시하기 위하여 시간이 기록되었다. cRPMI 배지 내의 세포들은 원심분리되었고, 상청액이 제거되었으며 세포들은 cRPMI 완충제 내에 부유되었다(suspended). 트리판 블루 분석법을 사용하여 세포 생존율이 결정되었다. 생존 세포들의 비율을 결정하기 위하여 살아 있는 세포들의 전체 세포 수 및 농도가 사용되었다. 만일 샘플이 80% 이상의 세포 생존율을 가졌으면, 그때 세포들의 재활성 및 제형화를 위하여 과정이 계속되었다.
- [0051] 배양액 내에서 활성화된 세포들은 1×10^7 cells/ml의 농도에서 재부유되었다. 1×10^7 cells/ml의 살아 있는 세포 농도에서 재활성이 수행되었다. 재활성은 볼륨에 따라 24 웰 플레이트(well plate), 6 웰 플레이트 또는 75 cm³ 플라스크에서 수행되었다. 세포들을 재활성시키기 위하여 Dynabeads ClinExVivo™ CD3/CD28이 첨가되었으며 36-38℃ 및 5% 이산화탄소에서 4시간 동안 배양되었다.
- [0052] 약 4시간 동안의 배양 후에, 세포들은 그리고 나서 제거되었고 최종 제형화 완충제를 갖는 50ml 튜브로 이동되었다. 최종 제형화 완충제는 1% 인간 혈청 알부민을 갖는 플라스마라이트 A이다. 재활성화된 세포들은 원심분리되었고, 상청액이 제거되었으며 최종 제형화 완충제 내에 부유되었다. 이들이 제형화 완충제 내의 세포들로 언급된다.
- [0053] 제형화 완충제 내의 세포들은 ml당 $\times 10^7$ 세포들의 농도에서 제형화 완충제 내에서 재부유되었다. 제형화 완충제 내의 세포들은 피내, 척수내 또는 정맥내 투여를 위하여 재부유되었다. 피내 제형으로서 1ml의 세포 부유물이 3 ml 주사기에 첨가되었다. 척수내 및 정맥내 제형은 각각 3 ml 및 5 ml이었다. 적절한 제형들을 갖는 주사기들이 약 4℃의 평균 온도로 냉동 저장되었다.
- [0054] **저장 후 샘플들의 수확** - 서로 다른 시점에서 세포들 및 상청액이 수집되었다. 시점들을 다음과 같다: 0(초기); 실온에서 2시간; 4℃에서 48시간; 및 4℃에서 48시간 뒤에 실온에서 2시간.
- [0055] 각각의 시점에서, 100μl 세포 부유물이 수집되었고 세포들은 4℃에서 5분 동안 400g에서 회전되었다. 상청액은 그리고 나서 나중에 효소 면역 측정법(ELISA)을 사용하는 인터페론-감마 검출을 위하여 또 다른 튜브로 이동되었다. 세포들은 유동세포 분석법을 위하여 150μl 염색(staining) 완충제에서 재부유되었다. 일부 실험들에서, 세포들은 100μl cRPMI 배지에서 재부유되었고 37℃에서 24시간 5% 이산화탄소로 배양기에서 배양되었다. 24시간 배양 후에 상청액을 취하여 효소 면역 측정법에 의해 인터페론-감마가 검출되었다.
- [0056] **유세포 분석(CD40L 및 7-AAD)** - 위(150μl)로부터 각각 미염색(unstained), CD40L 및 7-AAD로 라벨링된, 3개의 에펜도르프 튜브(ependorf tube) 내로 50μl 세포 부유물이 이동되었다. 미염색 튜브는 20분 동안 얼음에서 배양되었다. CD40L 튜브를 위하여, 세포들은 20분 동안 얼음에서 제조사의 설명에 따라 Fc 수용체 결합 차단제와 함께 전(pre)-배양되었다. 그리고 나서 40μl 염색 완충제(PBS+1%FBS) 및 10μl PE-CD40L 항체가 세포 부유물 내로 첨가되었고 암 조건에서 얼음에서 추가로 20분 동안 배양되었다.
- [0057] 7-AAD의 유세포 분석에 의해 세포 생존율이 테스트되었다. 7-AAD는 죽거나 손상된 세포들의 DNA 내로 삽입되며, 따라서 7-AAD 양성 세포들의 결정이 세포 생존율의 지표이다. 7-AAD 튜브를 위하여, 6℃에서 5분 동안 400g에서 원심분리되었다. 상청액을 제거한 후에, 세포 펠렛(cell pellet)들이 100μl 1x 7-AAD 용액 내에 재부유되었다. 튜브는 암 조건에서 15분 동안 얼음에서 배양되었다. 1ml의 염색 완충제가 CD40L 튜브에 첨가되었고 그리고 나

서 3개의 튜브가 함께 원심분리되었다. 상청액을 제거한 후에, 세포 펠렛들은 0.4ml의 염색 완충제 내에 재부유되었고 형광 유세포 분리기(fluorescence activated cell sorter, FACS)가 가동되었다.

[0058] 실시 예 1 - CD4⁺ 세포들의 정제 및 세포 표현형. 정상 기증자 말초 혈액을 획득하였고 연막으로부터 CD4⁺ 세포들이 Miltenyi Biotec사(캘리포니아주 오번)로부터 구입한 Miltenyi 자기 비드들 및 칼럼을 사용하여 정제되었다. 도 1은 측면 산란 검출기(side scatter) 대 CD4의 유세포 분석 플롯이다. 도 1은 CD4⁺ 세포들이 전체 개체군(N=22)의 약 46%라는 것을 나타낸다. CD4⁺ 세포들을 위한 양성 선택 후에, 결과는 98.69% 순수 CD4⁺ 세포들이다(N=22). 도 1b로부터 알 수 있는 것과 같이, 칼럼 후의 CD4⁺의 개체군은 림프구들 및 단핵구(monocyte)들 모두를 포함한다.

[0059] 서로 다른 기증자로부터 모든 배치가 생산되기 때문에, 생산의 시작과 끝에서 항원 마커들이 테스트되었다. CD4⁺ 세포들(도 2a) 대 배양액 내에서 활성화된 세포들(도 2b)의 세포 표현형이 테스트되었다. 결과들은 나이브 CD4⁺ 표현형(CD45RA⁺)으로부터 기억 표현형(CD45RO⁺)로의 매우 지속적인 시프트(shift)를 나타낸다. 도 2a는 각각 CD45RA, CD45RO 및 CD25를 위한 CD4⁺ 세포들의 표현형들을 도시한다. 도 2b는 배양 9일 후의 배양액 내에서 활성화된 세포들의 표현형 및 각각 CD45RA, CD45RO 및 CD25의 표면 발현을 위한 분석을 도시한다. 혼합된 CD45RA/CD45RO 개체군으로부터, CD45RA 음성 CD45RO 양성 개체군이 획득된다. CD25⁺ 세포들은 증식 과정이 시작에서 대략 10%이다. 9일째에, CD25⁺는 대략 85%이었다. 이는 세포들의 활성 상태에 따른다. 도 2a는 칼럼 후의 CD4⁺ 세포들이 CD45RA⁺ 세포들(평균=44.76% n=29), CD45RO⁺ (평균=53.44% n=29) 및 CD25⁺ (평균=10.83% n=29)의 나이브 표현형을 나타내는 것을 도시한다. 도 2b는 지속적인 자극과 함께 배양 9일 후에, 표현형이 헬퍼 T 메모리 유사 세포들로의 변화하는 것을 도시한다. CD45RA는 급격하게 내려가고(평균=4.22% n=29), CD45RO⁺는 평균 97.8%(n=29)까지 올라가며, CD25⁺도 또한 평균 90.03%까지 올라간다.

[0060] CD62L 발현 패턴 - 도 3은 0일째에, CD4⁺ 근원 세포(seed cell)들이 대략 10^3 에서의 최대 피크로 바이모달 CD62L 평균 형광 강도(MFI)를 발현하는(평균 산술 평균은 541 n=17) 것을 도시한다. 평균 형광 강도는 1541(배양액 내에서 활성화된 세포들)의 평균 산술 평균으로 증가하고 그리고 나서 최종 4시간의 활성(제형화 완충제 내의 세포들) 후에 상당히 내려간다(190.3의 평균 산술 평균).

[0061] CD40L 발현 패턴 - 배양액 내에서 활성화된 세포들 상에서의 CD40L 발현의 농도는 CD3/CD28 비드들로의 4시간 활성 후에 배양액 내에서 활성화된 세포들의 표면 상에서 지속적으로 증가하였다. 도 4는 0일째의 CD4⁺(도 4a), 최종 활성 전의 9일째에 수확된 배양액에서 활성화된 세포들(도 4b) 및 4시간 활성 이후의 제형화 완충제 내의 세포들(도 4c)을 비교하는 대표적인 배치의 CD40L 발현의 산술 평균 및 비율에서의 변화를 도시한다. 도시된 것과 같이, 활성화되지 않은 세포들 및 활성화된 세포들 사이의 차이는 CD40L⁺의 비율에서 크지 않고, 오히려 산술 평균에서 크다(배양액 내에서 활성화된 세포들에 대한 평균 산술 평균은 20(n=29)이고 반면에 제형화 완충제 내의 세포들에 대한 평균은 112(n=29)이다).

[0062] 최종 활성 동안의 사이토카인 분비 - 각각의 생산 배치로부터 9일째 수확된 배양액 내에서 활성화된 세포들의 샘플들이 4시간 동안 CD3/CD28 비드들로 활성화되었고 상청액들이 수집되었으며 효소 면역 측정법을 사용하여 사이토카인 생산(인터페론-감마, IL-4, IL-8, 종양괴사인자-알파 및 과립구 대식세포 군락 자극 인자(Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor, GM-CSF))를 위하여 테스트되었다. 테이블 1은 이러한 실험들의 결과를 나타낸다.

[0063] 테이블 1

배치 부호	인터페론-감마	림포카인 터루킨-4 (IL-4)	과립구 대식세포 군락 자극 인자(GM-CSF)	종양괴사인자-알파 (TNF α)
068C	2,178.3	0.00	647.9	1,338.3
069C	2,500.0	0.00	809.9	1,245.8
070C	5,469.1	0.00	1,595.9	1,994.9
071C	6,995.4	0.00	1,739.3	2,799.0
072C	806.6	0.00	251.1	117.7
073C	2,931.5	0.00	596.6	358.3
074C	462.9	0.00	0.0	105.3
075C	2,722.5	0.00	927.0	1,189.7
076C	4,118.0	0.30	752.0	576.7
078C	1,072.0	0.00	294.2	393.1
080C	3,846.7	0.90	1,878.4	1,828.4
081C	9,702.8	0.35	9,030.4	1,522.9
082C	6,662.4	0.76	3,984.9	869.0
083C	910.8	0.00	344.4	365.5
087C	2,257.6	0.00	764.6	736.8
088C	4,342.1	0.00	2,539.4	3,961.5
090C	1,021.4	1.00	402.0	810.5
094C	1,420.2	1.03	733.6	757.2
097C	703.2	1.16	327.7	989.4
평균 (n=15)	3,816.0	0.29	1,779.7	1,358.8

[0064]

[0065] 기능적 배출 기준을 위하여 인터페론 γ 및 IL-4만이 사용되었다. 19개의 연속적인 배치들이 테이블 1에 도시된다(값들은 pg/ 10^6 cells/4시간으로 표현). 기록된 평균은 통과된 배치들만을 포함한다.

[0066] 실시 예 2 - 활성화된 헬퍼 T1/살해 세포들의 직접적인 살해. 제형화 완충제 내의 세포들이 종양 세포들에 대한 직접적인 효과를 가질 수 있는지를 테스트하기 위하여, 세포들의 ARH77 세포 라인을 살해하는 능력이 테스트되었다. 이러한 세포 라인은 확립된 골수종 세포 라인이다. 제형화 완충제 내의 세포들로부터 이들을 분화시키기 위하여 ARH77 세포들이 카르복시 플루오레세인 석신이미딜 에스터(Carboxy Fluorescein Succinimidyl Ester, CFSE)로 염색되었다. 제형화 완충제 내의 세포들은 18시간 동안 표적(ARH77)에 대하여 서로 다른 주효 세포(제형화 완충제 내의 세포들)에서 염색된 ARH77 세포들과 혼합되었다. 그 이후, 7AAD가 첨가되었고 FC500MPL 유세포 분석기를 사용하여 세포들이 획득되었다. 본 실험은 서로 다른 배양액 내에서 활성화된 세포들 및 새로운 그리고 용해된 제형화 완충제 내의 세포들과 함께 반복되었다. 단독의 ARH77, DynaBeads와 함께, CD4+ 세포들 또는 배양액 내에서 활성화된 세포들과 함께는 상당한 사멸 데이터를 갖지 않는다(10% 미만). 도 5에 도시된 결과들은 배양액 내에서 활성화된 세포들, CD4+ 세포들 또는 비드들이 아닌, 제형화 완충제 내의 세포들이 ARH77 세포 라인에 직접적인 살해 효과를 갖는다는 것을 나타낸다.

[0067] 효과가 퍼포린-그랜자임 경로에 기인하는지를 알아보기 위하여 직접 살해 효과의 본질이 조사되었다. 퍼포린 및 그랜자임 B를 위한 염색을 위하여 내부 염색 및 웨스턴 블롯(western blot) 분석이 사용되었다. 도 6a는 배양액 내에서 활성화된 세포들이 도시된 것과 같이 매우 적게 발현하는 것을 나타낸다. 도 6b는 제형화 완충제 내의 세포들이 상당한 양의 그랜자임 B를 발현하는 것을 나타낸다. 도 6c는 웨스턴 블롯의 사용에 의해 퍼포린이 검출될 수 있다는 것을 나타낸다. 레인 1은 양성 대조군으로서, 활성화된 PBMCs의 추출물이다. 레인 2와 4는 서로 다른 배치들로부터의 배양액 내에서 활성화된 세포들이며, 레인 3과 5는 동일한 배치들로부터의 제형화 완충제

내의 세포들이다.

[0068] 직접 살해 메커니즘의 본질을 설명하기 위하여 억제 분석법이 또한 실행되었다. 제형화 완충제 내의 세포들은 위에서 설명된 것과 같이 ARH77 세포들과 혼합되었으며 아래의 테이블 2에 나타난 것과 같이 억제 제제들이 첨가되었다. CD40L 및/또는 FAS-리간드에 대한 항체들이 제형화 완충제 내의 세포들:ARH77 혼합물에 첨가되었다. 테이블 2는 가장 높은 농도도 살해 프로파일을 방지하지 않았음을 나타낸다.

[0069] 테이블 2

	항 CD40L	억제 없음	0.lig/ml	lig/ml	20ig/ml
항 Fas-리간드			35.48	35.92	35.5
억제 없음		33.85			
1ng/ml	36.55		34.55		
10ng/ml	38.86				
200ng/ml	38.97				30.0

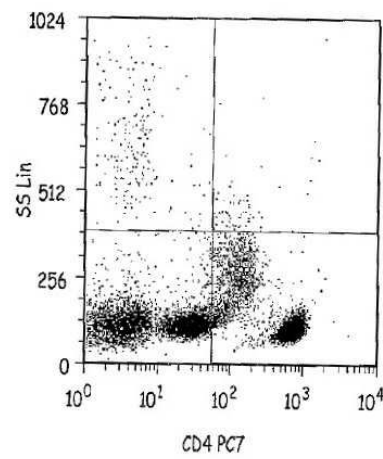
[0070]

[0071] 직접 살해 메커니즘 상의 에틸렌 글리콜 테트라아세트 산의 효과가 조사되었다. 에틸렌 글리콜 테트라아세트 산은 퍼포린의 중합반응을 차단하고 퍼포린/그랜자임 B 메커니즘의 억제제로서 작용한다. 도 7에 도시된 것과 같이, 1mM 에틸렌 글리콜 테트라아세트 산은 평균 50%(n=7)로 살해가 감소되었다. 짝 비교 검정(paired t test) P 값은 0.0002이다. 제형화 완충제 내의 세포들이 나타내는 직접 살해 효과는 퍼포린-그랜자임 경로로부터 비롯된다.

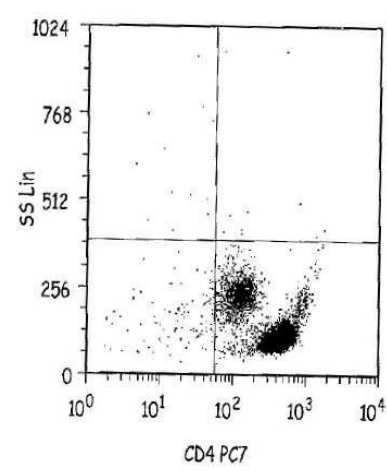
[0072] 비록 본 발명이 바람직한 실시 예들을 참조하여 설명되었으나, 통상의 지식을 가진 자들은 본 발명의 정신 및 범위를 벗어나지 않고 형태 및 세부내용의 변경들이 만들어질 수 있다는 것을 이해할 것이다.

도면

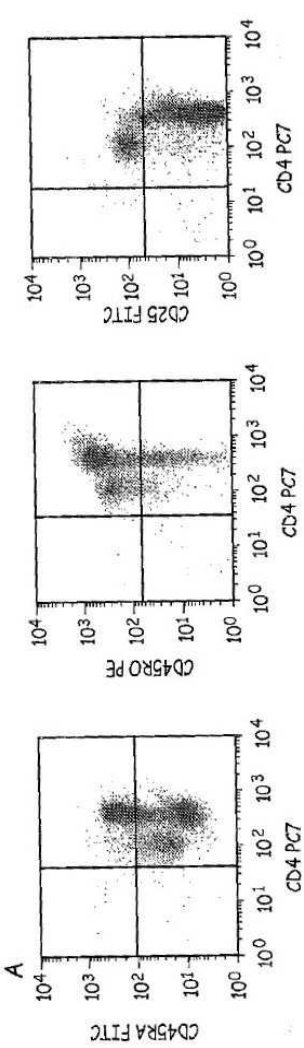
도면1a



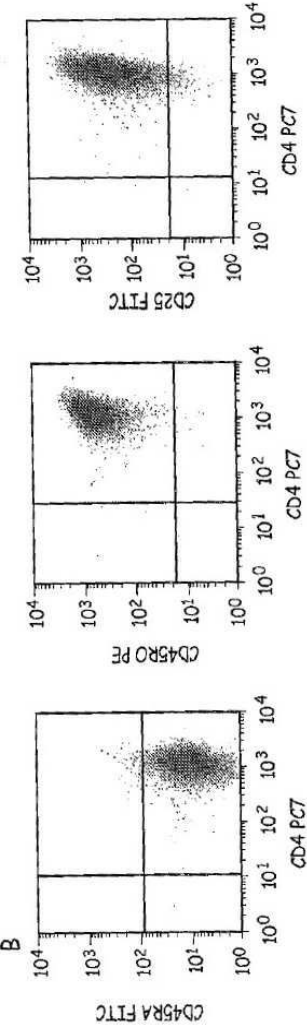
도면1b



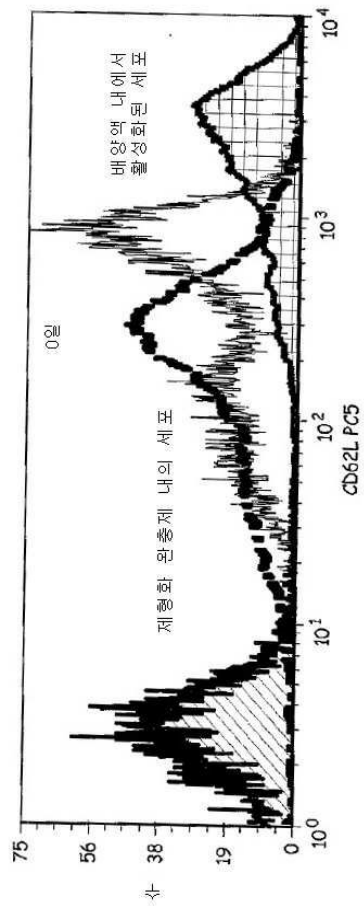
도면2a



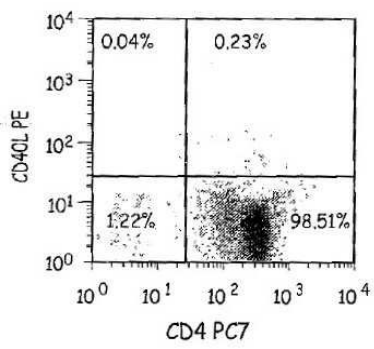
도면2b



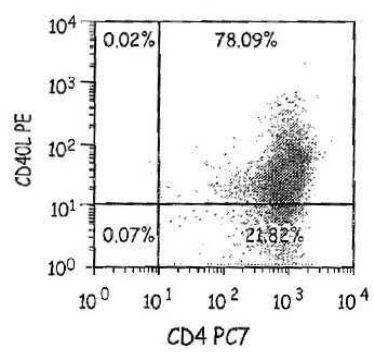
도면3



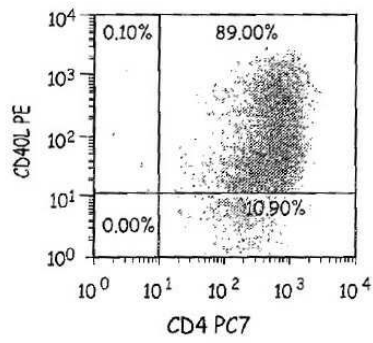
도면4a



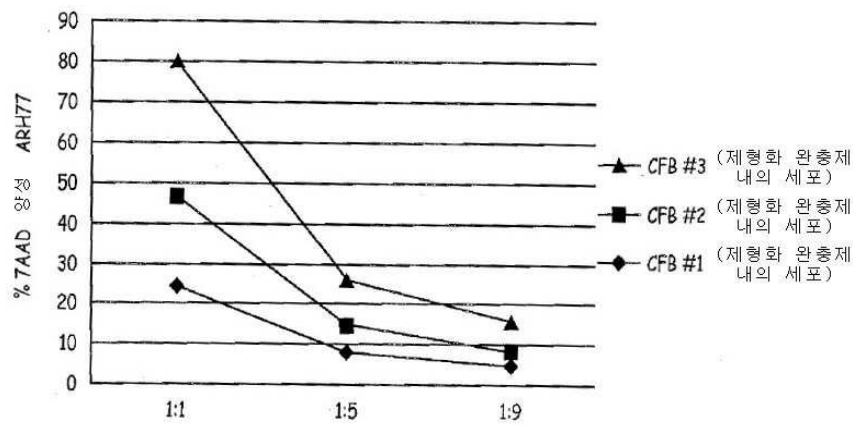
도면4b



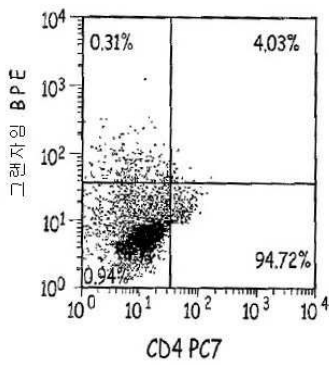
도면4c



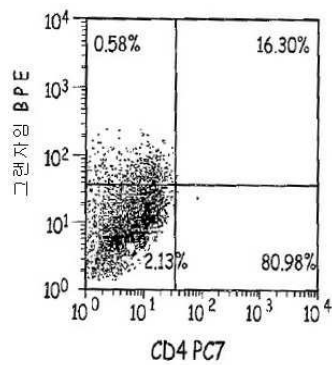
도면5



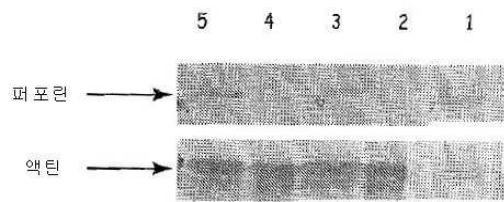
도면6a



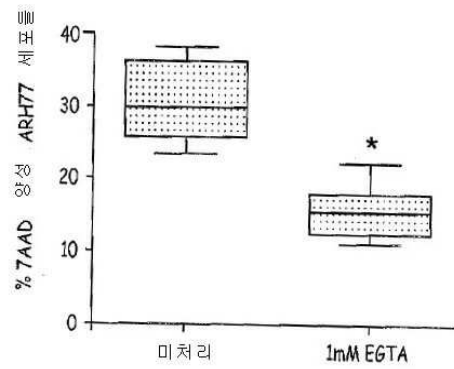
도면6b



도면6c



도면7



【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 20

【변경전】

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항

【변경후】

제1항, 제2항, 제4항, 제5항 및 제8항 중 어느 한 항