



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0033375
(43) 공개일자 2009년04월02일

(51) Int. Cl.

A61K 35/12 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01) C12N 5/08 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-7002075

(22) 출원일자 2009년01월30일

심사청구일자 없음

번역문제출일자 2009년01월30일

(86) 국제출원번호 PCT/US2007/072525

국제출원일자 2007년06월29일

(87) 국제공개번호 WO 2008/005859

국제공개일자 2008년01월10일

(30) 우선권주장

60/817,916 2006년06월30일 미국(US)

(71) 출원인

베일러 리서치 인스티튜트

미국 텍사스주 75204 달라스 스위트 125 라이브
오크 스트리트 3434

(72) 발명자

팔루카 안나 캐롤리나

미국 텍사스주 75204 달라스 블랙번 스트리트
#2522 3000

방쉐로 자끄 에프.

미국 텍사스주 75230 달라스 노쓰헤이븐 6730

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

장훈

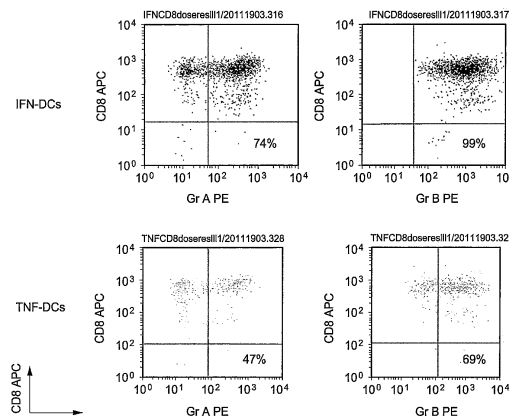
전체 청구항 수 : 총 36 항

(54) GM-CSF 및 인터페론 알파의 사용에 의해 생성되고 열처리 및 사멸된 암 세포가 로딩된 수지상 세포

(57) 요약

본 발명은 IFN α 에 노출됨으로써 성숙되고 열처리 후 사멸된 세포로부터의 암 항원이 로딩된 하나 이상의 수지상 세포의 약제학적 유효량을 포함하는 조성물 및 이를 제조하는 방법에 관한 것으로서, 하나 이상의 IFN α 수지상 세포는 하나 이상의 항원이 자가 MHC의 맥락에서 제시되는 조건하에 놓인다.

대표도



(72) 발명자

타키에 니콜라스

미국 텍사스주 75248 달라스 에코 블러프 6931

버크홀더 수잔

미국 텍사스주 76039 윌레스 시나몬 레인 104

특허청구의 범위

청구항 1

열 쇼크 후 사멸된 하나 이상의 암 세포의 존재하에 GM-CSF 및 IFN α 로 활성화된 하나 이상의 항원 제시 세포를 인큐베이션함으로써 하나 이상의 암 항원을 제시하고 T 세포 활성화를 유도하는 하나 이상의 항원 제시 세포를 활성화시키는 단계를 포함하는, 암을 치료하기 위한 조성물을 제조하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 항원 제시 세포를, T-세포 활성화를 유도하는 조건하에서 열 쇼크 후 사멸된 하나 이상의 암 세포의 잔재물을 포함하는 항원으로 펄스처리하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 열 쇼크 후 사멸된 암 세포로 펄스처리된 하나 이상의 항원 제시 세포를 극저온에서 저장하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 하나 이상의 항원 제시 세포가, 암 세포의 열 쇼크 및 사멸 후 수득된 하나 이상의 암 특이적 항원을 하나 이상의 CD8⁺ T 세포에 제시하는 항원 제시 수지상 세포를 포함하는, 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 항원 제시 세포가 수지상 세포, 단핵구, 자가 세포, 이종 세포 또는 이들의 배합물인, 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 하나 이상의 항원 제시 수지상 세포가 GM-CSF 및 IFN α -유도된 수지상 세포를 포함하는, 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 하나 이상의 항원 제시 세포가 GM-CSF 및 IFN α 와 함께 배양된 단핵구를 포함하는, 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 하나 이상의 암 세포가 환자 유래의 열-불활성화된 흑색종 세포로 추가로 정의되는, 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 하나 이상의 암 세포가 환자와 동일한 암 세포 유형인 열-불활성화된 흑색종 세포로 추가로 정의되는, 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 암 세포가 하나 이상의 Colo829 흑색종 세포를 포함하는, 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 암 세포가 확립된 암 세포주를 포함하는, 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 암 세포가 흑색종 세포인, 방법.

청구항 13

제1항에 있어서, 하나 이상의 암 세포가 하나 이상의 Mel-2 세포, 하나 이상의 Mel-3, 하나 이상의 Mel-4, 하나 이상의 Mel-6, 하나 이상의 Mel-9, 또는 이들의 배합물을 포함하는 흑색종 세포로서 추가로 정의되는, 방법.

청구항 14

제1항에 있어서, 암 세포를 약 38℃ 내지 약 46℃에서 약 4시간 동안 가열함으로써 처리하는, 방법.

청구항 15

제1항에 있어서, 암 세포를 약 0.5시간 동안 약 160Gy에서 γ -조사하여 사멸시키는, 방법.

청구항 16

제1항에 있어서, 암 세포를 열처리하여 사멸시키는, 방법.

청구항 17

제1항에 있어서, 제핵(enucleated) 수지상 세포를 포함하는 하나 이상의 펄스처리된 항원 제시 세포 및 T 세포 활성화를 유도할 수 있는 하나 이상의 열 처리된 암 세포를 첨가함을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 18

제1항에 있어서, 상기 암 세포가 섬유육종, 점액육종, 지방육종, 연골육종, 골육종, 척삭종, 혈관육종, 카포시 육종, 내피육종, 림프관육종, 림프관내피육종, 윤활막종, 중피종, 유방 종양, 평활근육종, 횡문근육종, 램도육종(rhabdosarcoma), 결장직장 암종, 췌장암, 유방암, 난소암, 전립선암, 편평세포 암종, 기저세포 암종, 샘암종, 한선 암종, 피지선 암종, 유두 암종, 유두 샘암종, 낭샘암종, 수질 암종, 기관지유래 암종, 신장세포 암종, 간암, 담관 암종, 융모막 암종, 고환종, 배아 암종, 율름 종양, 자궁경부암, 고환 종양, 폐 암종, 소세포 폐 암종, 방광 암종, 상피 암종, 신경아교종, 별아교세포종, 속질모세포종, 머리인두종, 뇌실막세포종, 송과체 종, 혈관모세포종, 청신경초종, 희소돌기아교세포종, 수막종, 신경모세포종, 망막모세포종, 골수종, 림프종, 및 백혈병으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 암으로부터의 세포인, 방법.

청구항 19

제17항에 있어서, 상기 암 세포가 섬유육종, 점액육종, 지방육종, 연골육종, 골육종, 척삭종, 혈관육종, 카포시 육종, 내피육종, 림프관육종, 림프관내피육종, 윤활막종, 중피종, 유방 종양, 평활근육종, 횡문근육종, 램도육종, 결장직장 암종, 췌장암, 유방암, 난소암, 전립선암, 편평세포 암종, 기저세포 암종, 샘암종, 한선 암종, 피지선 암종, 유두 암종, 유두 샘암종, 낭샘암종, 수질 암종, 기관지유래 암종, 신장세포 암종, 간암, 담관 암종, 융모막 암종, 고환종, 배아 암종, 율름 종양, 자궁경부암, 고환 종양, 폐 암종, 소세포폐 암종, 방광 암종, 상피 암종, 신경아교종, 별아교세포종, 속질모세포종, 머리인두종, 뇌실막세포종, 송과체종, 혈관모세포종, 청신경초종, 희소돌기아교세포종, 수막종, 신경모세포종, 망막모세포종, 골수종, 림프종, 및 백혈병으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 암으로부터의 세포인, 방법.

청구항 20

하나 이상의 단핵구를 하나 이상의 수지상 세포로 분화시키는 단계; 및

하나 이상의 수지상 세포에, 열 쇼크 후 사멸된 하나 이상의 암 세포를 포함하는 항원 제시 조성물을 로딩하고, 하나 이상의 수지상 세포가 항원 제시 조성물 중의 하나 이상의 항원을 제시하게 하는 조건하에서, 하나 이상의 수지상 세포를 GM-CSF 및 IFN α 와 함께 인큐베이션하는 단계를 포함하는, 암 항원을 제시하는 수지상 세포를 제조하는, 방법.

청구항 21

암을 앓는 것으로 의심되는 환자로부터 하나 이상의 단핵구를 분리시키는 단계,

단핵구를 세포 배양물 중의 GM-CSF 및 IFN α 에 노출시킴으로써 하나 이상의 단핵구를 하나 이상의 성숙된 수지상 세포로 성숙시키는 단계 및

하나 이상의 성숙된 수지상 세포에 열 쇼크 후 사멸된 하나 이상의 암 세포를 포함하는 항원 제시 조성물을 로딩하고, 로딩된 하나 이상의 성숙된 수지상 세포가, 하나 이상의 성숙된 수지상 세포를 항원 제시 조성물 중의 하나 이상의 항원을 제시하게 하는 조건하에서, T 세포 활성화를 유도할 수 있는 단계를 포함하는, 흑색종 항원을 제시하는 항원 제시 수지상 세포를 제조하는 방법.

청구항 22

항원을 제시하기 위해 GM-CSF 및 IFN α 로 활성화된 하나 이상의 수지상 세포의 약제학적 유효량을 포함하고, 수지상 세포가 열 쇼크후 사멸된 하나 이상의 암 세포를 포함하는 하나 이상의 항원을 제시하는, T 세포 활성화를 유도할 수 있는 암-특이적 백신.

청구항 23

제22항에 있어서, 암 세포가 사멸 시점에 아포토틱(apoptotic)이 아닌, 백신.

청구항 24

아포토틱이 아닌 열 쇼크되고 사멸된 흑색종 세포가 로딩되고 항원으로서 제시되는 하나 이상의 GM-CSF 및 IFN α -유도된 수지상 세포의 약제학적 유효량을 포함하고, 하나 이상의 IFN α 수지상 세포가 하나 이상의 흑색종의 제시를 증진시키는 조건하에서 인규베이션되는, T 세포 활성화를 유도할 수 있는 흑색종 특이적 백신.

청구항 25

제24항에 있어서, T-세포 활성화를 위한 펄스처리된 제제가 하나 이상의 펄스처리된 제핵 항원 제시 세포를 포함하는 것으로 추가로 정의되는, 백신.

청구항 26

제24항에 있어서, 백신이 극저온으로 보관되는, 백신.

청구항 27

제24항에 있어서, 하나 이상의 항원 제시 수지상 세포가 분화를 유발하기 위해 하나 이상의 CD8⁺ T 세포에 자가 암 항원을 제시하는, 백신.

청구항 28

제24항에 있어서, 항원 제시 세포가 수지상 세포, 단핵구, 자가 세포, 이종 세포 또는 이들의 배합물인, 백신.

청구항 29

제24항에 있어서, 하나 이상의 단핵구가 GM-CSF 및 IFN α 와 함께 배양되는, 백신.

청구항 30

제24항에 있어서, 하나 이상의 열-불활성화된 흑색종 세포가 환자로부터 유래하는, 백신.

청구항 31

제24항에 있어서, 암 세포를 약 38℃ 내지 약 46℃에서 약 4시간 동안 가열함으로써 처리하는, 백신.

청구항 32

제24항에 있어서, 암 세포를 약 0.5시간 동안 약 160Gy에서 γ -조사하여 사멸시키는, 백신.

청구항 33

제24항에 있어서, 상기 암 세포가 로 섬유육종, 점액육종, 지방육종, 연골육종, 골육종, 척삭종, 혈관육종, 카포시 육종, 내피육종, 림프관육종, 림프관내피육종, 윤활막종, 종피종, 유방 종양, 평활근육종, 횡문근육종, 램도육종, 결장직장 암종, 췌장암, 유방암, 난소암, 전립선암, 편평세포 암종, 기저세포 암종, 샘암종, 한선암종, 피지선 암종, 유두 암종, 유두 샘암종, 낭샘암종, 수질 암종, 기관지유래 암종, 신장세포 암종, 간암, 담관 암종, 융모막 암종, 고환종, 배아 암종, 율름 종양, 자궁경부암, 고환 종양, 폐 암종, 소세포폐 암종, 방광암종, 상피 암종, 신경아교종, 별아교세포종, 속질모세포종, 머리인두종, 뇌실막세포종, 송과체종, 혈관모세포종, 청신경초종, 희소돌기아교세포종, 수막종, 신경모세포종, 망막모세포종, 글수종, 림프종, 및 백혈병으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 암 세포인, 백신.

청구항 34

제25항에 있어서, 상기 암 세포가 섬유육종, 점액육종, 지방육종, 연골육종, 골육종, 척삭종, 혈관육종, 카포시 육종, 내피육종, 림프관육종, 림프관내피육종, 윤활막종, 중피종, 유방 종양, 평활근육종, 횡문근육종, 램도육종, 결장직장 암종, 췌장암, 유방암, 난소암, 전립선암, 편평세포 암종, 기저세포 암종, 샘암종, 한선 암종, 피지선 암종, 유두 암종, 유두 샘암종, 낭샘암종, 수질 암종, 기관지유래 암종, 신장세포 암종, 간암, 담관 암종, 용모막 암종, 고환종, 배아 암종, 율름 종양, 자궁경부암, 고환 종양, 폐 암종, 소세포폐 암종, 방광 암종, 상피 암종, 신경아교종, 별아교세포종, 속질모세포종, 머리인두종, 뇌실막세포종, 송과체종, 혈관모세포종, 청신경초종, 희소돌기아교세포종, 수막종, 신경모세포종, 망막모세포종, 골수종, 림프종, 및 백혈병으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 암 세포인, 백신.

청구항 35

열 쇼크 후 사멸된 암 세포를 포함하는 하나 이상의 암 항원을, 항원 제시 및 T-세포 활성화를 유도하는 조건하에서 GM-CSF 및 IFN α 로 활성화된 수지상 세포에 로딩하는 단계; 및

T 세포를 활성화할 하나 이상의 암 항원을 제시하는 하나 이상의 수지상 세포를 암 성장이 의심되어 이의 치료가 필요한 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 암 성장이 의심되는 환자를 치료하는 방법.

청구항 36

GM-CSF 및 IFN α 에 노출된 하나 이상의 단핵구를 분리 및 성숙시키는 단계,

T 세포 활성화를 유도할 수 있는 하나 이상의 수지상 세포에 열 쇼크 후 사멸된 하나 이상의 열처리된 암 세포를 포함하는 조성물을 로딩하여 하나 이상의 항원 제시 수지상 세포를 형성하는 단계 및

하나 이상의 항원 제시 수지상 세포를 암을 앓는 것으로 의심되어 이의 치료가 필요한 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 암을 앓는 것으로 의심되는 환자를 치료하는, 방법.

명세서

기술분야

- <1> 본 발명은 일반적으로 백신 분야, 특히 수지상 세포 활성화 인자를 사용하여 생성되며 열처리 및 사멸된 암 세포가 로딩된 수지상 세포의 조성물 및 이의 생성 방법에 관한 것이다.

배경기술

- <2> 본 발명의 배경은, 본 발명의 범위를 제한함이 없이, 암 세포 백신과 연관지어 기술된다.
- <3> 면역 반응물이 분리, 특성화 및 유도를 위한 다양한 방법이 개발되어 왔다. 예를 들면, 미국 특허 제6,821,778호(Engleman 등에게 허여됨)은 감마/델타-T 세포 수용체-포지티브 T 세포를 활성화시키기 위해 수지상 세포를 이용하는 특정 방법을 교시한다. 간단히 설명하면, 항원-특이적 T 세포-매개된 면역 반응을 유도하기 위해 항원을 제시하는데 사람 수지상 세포를 사용하는 방법이 교시된다. 특히, 상기 문헌의 교시는 사람 혈액으로부터 수지상 세포를 분리하고, 이 세포를 항원에 노출시키며, 항원-필스처리된 수지상 세포를, 항원-특이적 T 세포 증식 및 세포독성 활성의 자극을 위해 프라임되지 않거나 약하게 프라임된 개체로부터의 감마/델타-T 세포 수용체-포지티브-T 세포(감마/델타-TCR+ T 세포)와 공동-배양하는 것을 포함한다. 상기 문헌에서 기술되는 수지상 세포 항원 제시 시스템은, 다양한 적용, 예를 들면 감염성 질환 및 암에 대한 입양 세포 면역치료에 사용하기 위한 다수의 항원-특이적 주요 조직적합 컴플렉스-비제한된 T 세포의 활성화 및 확장을 갖는 것으로 알려져 있다.
- <4> 수지상 세포 조작에 대한 또 다른 예는 미국 특허 제6,652,848호(Gong 등에게 허여됨)에 교시되어 있으며, 이 특허는 수지상 세포 하이브리드를 교시한다. Gong은 수지상 세포와 비-수지상 세포 사이의 융합에 의한 융합 세포를 포함하는 면역자극 조성물, 이들 조성물을 이용하는 방법, 및 수지상 세포 하이브리드를 생성하는 방법을 교시한다.
- <5> 미국 특허 제6,602,709호(Albert 등에게 허여됨)는 T 세포의 유도 또는 관용유도(tolerization)를 위해 항원을 수지상 세포에 전달하는 아포토틱(apoptotic) 세포의 사용 방법을 포함한다. 당해 특허는 항원을 수지상 세포

에 전달함으로써 항원-특이적 세포독성 T 림프구 및 T 헬퍼 세포를 유도하는데 유용한 방법 및 조성물을 교시한다. 또한, 이 특허는 세포독성 T 림프구의 활성을 평가하기 위한 어세이에 대해 기술하고 있다. 간단히 설명하면, 항원은 아포토틱 세포에 의해 수지상 세포로 표적되며, 아포토틱 세포는 수지상 세포에 대한 제시를 위해 비-천연 항원을 발현하도록 변형될 수 있다. 아포토틱 세포에 의해 프라이밍되는 수지상 세포는 프로세싱된 항원을 제시할 수 있고 세포독성 T 세포 림프구 활성을 유도할 수 있거나 백신 치료에 사용될 수 있다고 기술하고 있다.

<6> 미국 특허 제6,475,483호(Steinman 등에게 허여됨)는 수지상 세포 전구체의 시험관 내 증식 방법 및 자가면역 질환을 치료하기 위한 면역원을 생성하기 위한 이용을 기술한다. 당해 특허는 수지상 세포 전구체의 증식 배양물을 생성하는 방법 및 증식성 수지상 세포 전구체로부터 성숙한 수지상 세포를 배양물 중에 제조하는 방법을 기술하고 있다. 성숙한 수지상 세포의 배양물은, 미립자를 포함한, 수지상 세포 변형된 항원 또는 항원으로 펄스처리된(pulsed) 수지상 세포(항원은 프로세싱되고 항원-활성화된 수지상 세포에서 발현된다)로 이루어진 신규한 T 세포 의존적 항원을 생성하는 효과적인 수단을 제공한다. 본 발명의 신규한 항원은 백신을 위한 면역원으로서 또는 질환을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 또한, 이들 항원은 소아 당뇨병 및 다발성 경화증과 같은 자가면역 질환을 치료하는데 사용될 수 있다.

<7> 발명의 요약

<8> 본 발명은 수지상 세포(DC)에 의해 협조되고(coordinated) 조절되는(regulated) 면역 반응을 유도하는 조성물 및 방법을 포함한다(참조문헌 1, 2). DC는 항원을 포획할 준비되어 있는 말초 조직에 존재한다. DC가 성숙하고 배액(drainage) 이차 림프 기관을 향해 이동함에 따라, 이들 항원은 작은 펩타이드로 프로세싱된다(참조문헌 3). DC는 미분화(naive) T 세포로 펩타이드를 제시하며, 이로써 T 헬퍼 1(Th1) 타입 $CD4^+$ T 세포 및 세포용해 $CD8^+$ T 세포를 수반하는 세포성 면역 반응을 유도한다. DC는 미분화(참조문헌 4) 및 메모리(참조문헌 5) B 세포를 활성화시키는 이의 능력을 통해 체액성 면역을 시작하는데 중요하다. 또한, DC는 천연 킬러(NK) 세포(참조문헌 6) 및 NKT 세포(참조문헌 7)을 활성화시킬 수 있다. DC는 많은 능력을 갖기 때문에 면역 오케스트라의 모든 요소를 관리할 수 있으며, 따라서 백신화를 위한 기본적인 표적물 및 도구를 나타낸다.

<9> 최근, 생체외-생성되고 항원-로딩된 DC가 면역을 증진시키기 위한 백신으로 사용되고 있다(참조문헌 8). 마우스에서의 많은 연구 결과, 종양 항원이 로딩된 DC는 치료학적 및 보호적 항-종양 면역을 유도할 수 있다는 것이 밝혀졌다(참조문헌 9). DC에 전달된 항원의 면역원성이 암(참조문헌 8) 및 만성 HIV 감염(참조문헌 10)을 앓는 환자에서 밝혀졌으며, 이는 DC 백신이 효과적일 수 있다는 "원리증명(proof-of-principle)"을 제공한다. 상이한 타입의 면역 반응을 유도하는 상이한 DC 서브세트의 확인 및 조절/억제 기능을 갖는 세포의 증대에서 DC의 역할은, 암을 앓는 환자에 대해 보다 나은 백신화 전략을 고안하는데 시험될 수 있는 새로운 변수를 제공한다.

<10> 본 발명은 항원 제시 세포에 의한 항원의 제시 및 활성화를 위한 조성물 및 방법을 포함한다. 보다 특히, 본 발명은 하나 이상의 암 항원을 제시하고 T 세포 활성화를 유도하는 하나 이상의 수지상 세포를 열 쇼크 후 사멸된 하나 이상의 암 세포와 함께 인큐베이션함으로써 상기 수지상 세포를 활성화시켜 암을 치료하는 방법 및 조성물을 포함한다. 또한, 본 발명의 방법은 T 세포 활성화를 유도하는 조건하에서 열 쇼크 후 사멸된 하나 이상의 암 세포의 잔재물(remains)을 포함하는 항원으로 항원 제시 세포를 펄스처리하는 단계를 포함한다. 또한, 본 발명의 방법은 열 쇼크 후 사멸된 암 세포로 펄스 처리된 하나 이상의 항원 제시 세포를 극저온으로(cryogenically) 저장하는 단계를 포함한다. 하나 이상의 항원 제시 세포는 암 세포의 열 쇼크 및 사멸 후 수득되는 하나 이상의 암 특이적 항원을 하나 이상의 $CD8^+$ 또는 $CD4^+$ T 세포에 제시하는 수지상 세포일 수 있다. 항원 제시 세포는 수지상 세포, 단핵구, 자가 세포, 이종 세포, 세포 단편 및/또는 이들의 배합물일 수 있다.

<11> 특정 실시에서, 하나 이상의 항원 제시 수지상 세포는 하나 이상의 수지상 세포, 예를 들면 $IFN\alpha$ 로 활성화된 단핵구를 포함한다. 항원 제시 세포는 GM-CSF(과립구 대식구-콜로니 자극 인자) 및 $IFN\alpha$ (인터페론 알파)와 함께 배양된 단핵구로부터 유도될 수 있다. 항원 제시 세포의 예는 하나 이상의 흑색종 세포-유도된 열 쇼크 단백질(예를 들면, 환자로 부터 유도된 열 불활성화된 흑색종 세포)을 발현하는 항원 제시 수지상 세포일 수 있다. 달리, 하나 이상의 열 불활성화된 흑색종 세포는 환자와 동일한 기초 세포 타입 또는 심지어는 암 세포 타입의 것일 수 있다. 특정 양태에서, 암 세포는 Colo829 흑색종 세포이다. 하나의 예에서, 암 세포는 확립된 세포주, 예를 들면 배양된 흑색종 세포, 예를 들면 Mel-2, Mel-3, Mel-4, Mel-6 및/또는 Mel-9 세포 또는 이의 배합물이다.

<12> 특정 양태에서, 암 세포는 약 38°C 내지 약 46°C에서 약 0.5 내지 4시간 동안 가열함으로써 처리된다. 암 세포

는 약 0.5시간 동안 약 160Gy에서 γ -조사하여 사멸되고/되거나 가열, 냉동-해동 사이클, 프렌치 프레스(French press), 전단, 직접 또는 간접적 압축, 냉동, 크래킹, 건조, 화학적 노출 및 (아포토시스와 다른) 세포 죽음을 유발하는 생물학적 제제 등에 의해 사멸될 수 있다. 또한, 본 발명은 하나 이상의 항원 제시 세포(제핵 수지상 세포를 포함할 수 있다) 및 T 세포 활성화를 유도할 수 있는 하나 이상의 열 처리된 암 세포(제시를 위해 사멸 및 프로세싱된 열-쇼크처리된 세포로 펄스처리됨)를 첨가하는 것을 포함한다. 특정 양태에서, 본 발명의 조성물은 앞 넓적다리 또는 상부 팔로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 하나 이상의 부위에서 피하 주사된다.

<13> 항원 제시를 위해 열처리 및 사멸되는 암 세포의 비-제한적 예는 섬유육종, 점액육종, 지방육종, 연골육종, 골육종, 척삭종, 혈관육종, 카포시 육종, 내피육종, 림프관육종, 림프관내피육종, 윤활막종, 종피종, 유방 종양, 평활근육종, 횡문근육종, 램도육종(rhabdomyosarcoma), 결장직장 암종, 췌장암, 유방암, 난소암, 전립선암, 편평세포 암종, 기저세포 암종, 샘암종, 한선 암종, 피지선 암종, 유두 암종, 유두 샘암종, 낭샘암종, 수질 암종, 기관지유래 암종, 신장세포 암종, 간암, 담관 암종, 용모막 암종, 고환종, 배아 암종, 율름 종양, 자궁경부암, 고환 종양, 폐 암종, 소세포폐 암종, 방광 암종, 상피 암종, 신경아교종, 별아교세포종, 속질모세포종, 머리인두종, 뇌실막세포종, 송과체종, 혈관모세포종, 청신경초종, 희소돌기아교세포종, 수막종, 신경모세포종, 망막모세포종, 골수종, 림프종, 및 백혈병으로부터 유도된 세포를 포함한다.

<14> 세포를 펄스처리하는데 사용될 수 있고/있거나 치료의 대상일 수 있는 암은 섬유육종, 점액육종, 지방육종, 연골육종, 골육종, 척삭종, 혈관육종, 카포시 육종, 내피육종, 림프관육종, 림프관내피육종, 윤활막종, 종피종, 유방 종양, 평활근육종, 횡문근육종, 램도육종, 결장직장 암종, 췌장암, 유방암, 난소암, 전립선암, 편평세포 암종, 기저세포 암종, 샘암종, 한선 암종, 피지선 암종, 유두 암종, 유두 샘암종, 낭샘암종, 수질 암종, 기관지유래 암종, 신장세포 암종, 간암, 담관 암종, 용모막 암종, 고환종, 배아 암종, 율름 종양, 자궁경부암, 고환 종양, 폐 암종, 소세포폐 암종, 방광 암종, 상피 암종, 신경아교종, 별아교세포종, 속질모세포종, 머리인두종, 뇌실막세포종, 송과체종, 혈관모세포종, 청신경초종, 희소돌기아교세포종, 수막종, 신경모세포종, 망막모세포종, 골수종, 림프종, 및 백혈병을 포함한다.

<15> 또 다른 양태는 하나 이상의 단핵구를 하나 이상의 수지상 세포로 분화시키는 단계; 및 하나 이상의 수지상 세포에 열 쇼크 후 사멸된 하나 이상의 암 세포를 포함하는 항원 제시 조성물을 로딩하고, 하나 이상의 수지상 세포가 조성물 중의 하나 이상의 항원을 제시하게 하는 조건하에서 놓이는 단계를 포함하는, 암 항원을 제시하는 수지상 세포를 제조하는 방법이다.

<16> 본 발명의 또 다른 방법은 암을 앓는 것으로 의심되는 환자로부터 하나 이상의 단핵구를 분리시키는 단계; 하나 이상의 단핵구를 하나 이상의 IFN α 수지상 세포로 성숙시키는 단계; 및 하나 이상의 IFN α 수지상 세포에 열 쇼크 후 사멸된 하나 이상의 암 세포를 포함하는 항원 제시 조성물을 로딩하고, 로딩된 하나 이상의 IFN α 수지상 세포가, 하나 이상의 IFN α 수지상 세포를 조성물 중의 하나 이상의 항원을 제시하게 하는 조건하에서, T 세포 활성화를 유도할 수 있는 단계를 포함하는, 흑색종 항원을 제시하는 IFN α 수지상 세포를 제조하는 방법이다.

<17> 또한, 본 발명은 항원을 제시하도록 활성화된 하나 이상의 수지상 세포의 약제학적 유효량을 포함하고, 수지상 세포가 열 쇼크 후 사멸된 하나 이상의 암 세포인 하나 이상의 항원을 제시하는, T 세포 활성화를 유도할 수 있는 암-특이적 백신을 포함한다. 하나의 양태에서, 암 세포는 열 쇼크 또는 처리되고 사멸(아포토시스에 의하지 않음)된 것이다. 본 발명의 또 다른 예는 IFN α 에 노출되고 열 쇼크 후 사멸된 흑색종 세포인 항원이 로딩되고 이를 제시하는 수지상 세포(IFN α 수지상 세포)로 성숙된 하나 이상의 단핵구의 약제학적 유효량을 포함하고, 하나 이상의 IFN α 수지상 세포가 하나 이상의 흑색종의 T 세포에의 제시를 증진시키는 조건하에서 인큐베이션되는, T 세포 활성화를 유도할 수 있는 흑색종 특이적 백신이다. 또한, 백신은 하나 이상의 펄스처리된 제핵의 항원 제시 세포를 포함하는 T-세포 활성화를 위한 펄스처리된 제제를 가하는 단계를 포함하는 방법에 의해 제조될 수 있다.

<18> 본 발명의 또 다른 방법은 열 쇼크 후 사멸된 암 세포를 포함하는 하나 이상의 암 항원을, 항원 제시 및 T-세포 활성화를 유도하는 조건하에서 활성화된 수지상 세포에 로딩하는 단계; 및 T 세포를 활성화할 하나 이상의 암 항원을 제시하는 하나 이상의 수지상 세포를 암 성장이 의심되어 이의 치료가 필요한 환자에게 투여하는 단계를 포함하여, 암 성장이 의심되는 환자를 치료하는 방법을 포함한다.

<19> 본 발명의 또 다른 방법은 GM-CSF 및 IFN α 를 사용하여 하나 이상의 단핵구를 이들 사이토키인으로 성숙된 수지상 세포로 분리 및 성숙시키는 단계; T 세포 활성화를 유도할 수 있는 하나 이상의 수지상 세포에 열 쇼크 후 사멸된 하나 이상의 열처리된 암 세포를 포함하는 조성물을 로딩하여 하나 이상의 항원 제시 수지상 세포를 형성하

는 단계; 및 하나 이상의 항원 제시 수지상 세포를 암을 앓는 것으로 의심되어 이의 치료가 필요한 환자에게 투여하는 단계를 포함하여, 암을 앓는 것으로 의심되는 환자를 치료하는 방법을 포함한다.

발명의 상세한 설명

- <40> 하기에서 본 발명의 다양한 양태의 제조 및 이용을 상세히 기술하고 있으나, 이는 본 발명이 많은 특별한 정황에서 구체화될 수 있는 많은 적용가능한 발명의 개념을 제공하기 위한 것임을 알 수 있다. 본원에서 기술되는 특정 양태는 단지 본 발명을 달성하고 이용하는 특정 방식에 대한 설명일 뿐 본 발명의 범위를 제한하지 않는다.
- <41> 본 발명의 이해를 돕기 위해서, 하기와 같은 많은 용어가 정의된다. 본원에서 정의되는 용어는 본 발명과 연관된 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 통상적으로 이해되는 의미를 갖는다. 용어 "하나(a 또는 an)" 또는 "상기(the)"는 단독의 실체를 언급하고자 하는 것이 아니며, 특정 예가 설명을 위해 사용될 수 있는 일반적인 부류를 포함한다. 본원에서의 전문용어는 본 발명의 구체적 양태를 기술하기 위해 사용된 것으로, 이의 사용은, 청구범위에서 정의되는 경우를제외하고는, 본 발명을 제한하지 않는다.
- <42> 약어. GM-CSF: 과립구 대식구-콜로니 자극 인자; IFN 알파: 인터페론 알파; LPS: 리포폴리사카라이드; TNF: 종양 괴사 인자; CR: 완전 반응; PR: 부분 반응; SD: 안정한 질환; PD: 진행적 질환; NPD: 비-진행적 질환; NED: 질병의 증거 없음; MDC: 단핵구 유도된 수지상 세포; CTL: 세포용해성 T 림프구; NK 세포: 천연 킬러 세포; NKT 세포: 천연 킬러 T 세포; ND: 수행하지 않음; NT: 시험하지 않음; TBD: 미결정됨.
- <43> 암 면역치료. 암에 대한 환자의 내성을 개선하기 위한 많은 전략이 있다. 이들 전략에는 1) 미생물 성분 또는 사이토킨을 사용한 면역계의 비-특이적 활성화; 2) 항체 및/또는 T 세포를 사용한 항원-특이적 입양 면역치료; 및 3) 항원-특이적 활성 면역 치료(백신요법)가 있다. 항체의 주요 제한은, 펩타이드가 MHC 분자와의 콤플렉스로서 세포 표면에 제시되는 세포내 단백질일 수 있는 T 세포에 대한 표적물과는 대조적으로, 표적 단백질이 세포 표면에 발현되어야 한다는 것이다(참조문헌 11). 사람에서 규정된 종양 항원의 확인(참조문헌 12, 13)은 입양 T-세포 치료의 개발을 촉진시켰다. 그러나, 치료적 T-세포 면역(종양-특이적 이펙터 T 세포) 및 보호적 T 세포 면역(종양 재발을 조절할 수 있는 종양-특이적 메모리 T 세포) 모두가 유도되는 것이 예상되기 때문에, 백신요법이 가장 주목되는 전략이다(참조문헌 14 내지 16).
- <44> 암을 앓는 사람에 대한 치료적 백신요법을 위한 많은 접근법이 개발되었으며, 자가 및 동종이형 종양 세포(종종 다양한 사이토킨을 발현하도록 변형된다), 펩타이드 및 단백질 및 DNA 백신을 포함한다(참조문헌 8, 16 내지 19). 모든 이들 접근법은 백신과 호스트 DC와의 우연한 마주침에 의존한다. 백신 항원이 DC와 마주치지 않은 경우, 면역 반응은 일어날 수 없다. 또한, 비-활성화된 DC 또는 "잘못된" 서브세트의 DC와의 부적절한 마주침은 면역 반응의 침묵을 이끌 수 있다(참조문헌 20). 이들 시나리오 모두가 통용되는 암 백신에서의 단점 중 일부를 설명할 수 있다. 또한, 적합한 면역 반응을 유도하기 위해 종양 항원이 어떻게 DC에 전달될 필요가 있는지도 알려져 있지 않다. 따라서, 암에 대한 최적 백신요법을 위한 변수를 확립할 수 있는 조절된 조건하에서 종양 항원이 로딩된 생체 외-생성된 자가 DC를 기초로 하는 연구가 필요하다. 백신으로서 DC를 사용하는 임상 연구가 생체 외에서 다수의 자가 DC를 생성하는 방법이 개발됨에 따라 용이해졌다(참조문헌 21 내지 23). 암에서 DC 백신요법의 효율을 증진시키기 위해 고려되어야 하는 변수는 다음을 포함한다: DC 관련된 요인; 호스트-관련된 요인; 및 DC 백신과 다른 치료와의 조합. 2개의 DC 관련된 변수, 즉 신규한 DC 서브세트 및 종양 항원을 로딩하기 위한 신규한 전략이 하기에서 간략하게 논의된다.
- <45> DC 백신의 변수. DC 서브세트: GM-CSF 및 IL-4가 단핵구를 미성숙 DC로 분화할 수 있다는 발견(참조문헌 22 내지 24)에 의해 DC 생물학 및 기능에 대한 이해에 있어 커다란 진척이 가능했다. Nestle 등(참조문헌 25)(종양-용해물-로딩된 DC를 사용) 및 Schuler와 그의 동료(참조문헌 26)(흑색종-펩타이드-로딩된 DC를 사용)에 의한 전이성 흑색종을 앓는 환자에서의 개척적 임상 연구에 이어, 수개의 기관이 백신으로서 IL-DC를 사용하였다(참조문헌 8). 그러나, 최근의 발견들은 DC를 생성하는 전통의 방식에 대한 새로운 대체법을 제시한다. 예를 들면, 시험관 내에서 항원-특이적 CTL 분화의 유도에 있어 흑색종-펩타이드-펄스처리된 IL15-DC가 IL4-DC 보다 더 효과적인 반면, CD4⁺ T 세포를 자극하는 능력은 견줄만하다(참조문헌 27). 또한, 3일-배양으로 생성된 IFN-알파-DC는 특이적 면역을 유도하는데 효과적인 것으로 밝혀졌다(참조문헌 28). 따라서, 이러한 상이한 DC 백신의 면역원성은 임상 연구에서 생체 내 시험을 보증한다.
- <46> 항원 로딩. DC 상의 MHC 부류 I 및 MHC 부류 II 분자에 규정된 항원으로부터 유도되는 펩타이드를 로딩하는 것이 DC 백신요법을 위한 가장 일반적으로 이용되는 전략이다(참조문헌 15, 29). 비록 이러한 기술이 "개념 증명

(proof of concept)" 연구에 중요하지만, 펩타이드의 이용은 추가의 백신 개발에 대해 제한을 갖는다: 지정된 HLA 타입으로의 한정; 잘 특성규명된 종양-관련 항원(TAA)의 제한된 수; 외인성 펩타이드-MHC 컴플렉스의 비교적 빠른 전환에 의해 주사 후 DC가 배액 림프절에 도착하는 시간에 비교적 낮은 항원 제시; 및 제한된 레파토리의 T-세포 클론의 유도로 종양 항원 변화를 조절할 면역계 능력의 제한. 많은 이들 펩타이드는 천연적으로 프로세싱되는 에피토프와 다를 수 있다. 따라서, 전체 항원 제제를 DC에 로딩하고 "천연" 프로세싱 및 에피토프 선별을 가능하게 하는 것이 효능을 개선하며 $CD4^+$ T 세포 및 CTL의 많은 클론을 수반하는 다양한 면역 반응을 발생시킬 것으로 예상된다. 모든 이러한 전략은 DC에 재조합 단백질, 엑소솜(exosome)(참조문헌 30), 바이러스 벡터(참조문헌 31), 플라스미드 DNA, RNA 트랜스팩션(참조문헌 32), 면역 컴플렉스(참조문헌 33) 및 DC 표면 분자에 대해 특이적인 항체(참조문헌 15, 34)를 DC에 로딩한다.

<47> 또 다른 기술은 포식된 죽은 종양 세포로부터의 펩타이드를 MHC 부류 I 분자(및 부류 II 분자)에 제시할 DC의 능력을 개발하는 것을 포함한다. 이는 크로스-프라이밍(cross-priming)으로 알려져 있다(참조문헌 35, 36). 실제로, 사멸된 동종이형 흑색종, 전립선 또는 유방암 세포주와 함께 배양된 DC는 시험관 내에서 종양 항원에 대한 미분화 $CD8^+$ T 세포를 프라이밍한다(참조문헌 36, 37). 전이성 흑색종을 앓는 20명의 환자를 사멸된 동종이형 흑색종 세포주(월 기준으로 8개의 백신)에 미리 노출된 동종이형 단핵구-유도된 DC로 현재까지 BIIR에서 백신처리하여 왔다. 백신요법은 안전한 것으로 판명되었으며(자가면역 또는 유해 사건이 없음), 흑색종-특이적 T 세포 면역을 유도하였다. 2명의 환자에서, 지속적인 종양 퇴화가 관측되었다. 이러한 결과는 백신 제제 방법의 효능을 증명하기 위한 보다 큰 규모의 임상 연구를 보증한다.

<48> GM-CSF 및 IFN 알파는 수지상 세포 백신을 유도하였다. IFN 생물학에서의 수개의 최근 발견은 이러한 부류의 분자에 대한 면역학자들의 관심을 재확장시켰다. 이러한 발견은 1) 형질세포성(plasmacytoid) 수지상 세포(pDC, 사람 및 뮌헨 DC의 서브세트)가 바이러스 시그날에 반응하여 다량의 타입 I IFN을 신속히 분비한다는 것을 입증하고(참조문헌 74); 2) 미성숙 골수양 DC를 활성화시키고(참조문헌 75) 단핵구의 DC로의 분화를 유도하는(참조문헌 28, 76) IFN 알파/베타의 능력; 3) 메모리 $CD8^+$ T 세포의 생성(참조문헌 77, 78) 및 항체 반응의 자극(참조문헌 5, 79, 80)에서 IFN 알파/베타의 활성; 4) 전신홍반성낭창의 발병에서 IFN 알파/베타의 중심적 역할(참조문헌 81, 82); 5) LPS 시그날링 및 폐혈속의 전개에서 IFN 알파/베타의 필수적 역할에 의해 설명되는 바와 같이, 면역계를 활성화시키기 위한 낮은 수준의 IFN 알파/베타의 분비(참조문헌 83)를 포함한다.

<49> 최근에 본원 발명자에 의해 IFN 알파가 인플루엔자 바이러스에 대해 특이적인 사람 체액성 반응을 시작하는데 필수적이라는 것이 인식되었다(참조문헌 5). 이는 IFN 알파가 CTL, 특히 종양 항원에 대해 지시되는 CTL의 생성을 향상시킬 수 있다는 가능성을 증가시켰다.

<50> IFN-DC는 세포용해성 $CD8^+$ T 세포를 효과적으로 활성화시킨다: 단핵구를 GM-CSF 및 IFN 알파와 배양함으로써 단핵구로부터 생성된 DC 백신(IFN-DC)의 생물학적 특성을 제조된 2개의 이전 생성물, 즉 단핵구를 GM-CSF 및 TNF(TNF-DC) 또는 IL-4(IL4-DC)와 배양함으로써 제조된 DC 백신들과 비교되었다. 동종이형 $CD8^+$ T 세포는 각각의 DC 서브세트와 5일 동안 배양 후 세포 분류에 의해 다시 정제되고 유동 세포계로 분석되었다. 놀랍게도, IFN-DC가 세포용해성 T 세포 분자, 예를 들면 GzA 및 B(도 1) 및 퍼포린(도시되지 않음)을 상당히 높은 양으로 발현시키면서 $CD8^+$ T 세포를 유도할 수 있다는 것으로 나타났다.

<51> IFN-DC는 성숙 자극에 대해 차등적으로 반응한다: 암 백신에서 IFN-DC의 역할을 보다 특성화하기 위해, 시험관 내에서 CD40 리간드, 이오노마이신(Ionomycin), 및 TLR 리간드, 예를 들면 LPS(TLR4), poly I:C(TLR3) 및 지모산(TLR2)을 포함한 다양한 활성화 시그날에 노출된 IFN-DC에서 사이토킨 생물사인(biosignature)을 분석하였다. 정제된 단핵구를 GM-CSF 및 재조합 사람 IFN 알파 2a와 함께 배양함으로써 생성된 IFN-DC를 다양한 자극에 노출시키고, 배양 상등액으로의 사이토킨/케모카인 분비를 멀티플렉스(Multiplex) 사이토킨 비드(Luminex)로 상이한 시점에서 측정하였다. 예비적 분석은, 분비된 사이토킨의 프로파일 노출 48시간에 걸쳐 유의하게 변화하지 않는다는 것을 입증한다(도시되지 않음). 도 2에 나타난 바와 같이, 주요 사이토킨 반응을 LPS, 이어서 poly I:C 및 이오노마이신에 의해 유발된다. CD40 리간드 또는 지모산에 노출시, 단지 경미한 사이토킨 분비가 유발되었다. 이러한 예비적 결과는 상이한 활성화 시그날이 IFN-DC에서 상이한 사이토킨 사인을 유발한다는 것을 입증한다.

<52> IFN-DC는 독특하게 T 세포 성장 인자인 IL-7을 분비한다: 시그날 사이토킨 분석 시, IFN-DC는 자연발생적으로 감지가능한 수준의 IL-7(도 3)을 분비하나 비-활성화된 IL4-DC는 그렇지 못한 것으로 관측되었다. 그러나,

IL4-DC을 타입 I 인터페론 경로를 활성화시키는 것으로 공지된 시그널로 활성화시키면(CD40 리간드 또는 지모산으로는 아님) IL-7 분비를 유도하였다(도 3). 이러한 결과는 T 세포 활성화에 대한 2가지의 중요한 결론을 도출한다: 1) IFN-DC에 의한 IL-7의 분비는 미분화 CD8⁺ T 세포를 프라이밍하는 이들의 뛰어난 능력에 대해 역할을 수행하고, 2) 타입 I 인터페론은 골수양 DC에 의한 IL-7 분비를 조절하는 것으로 보인다.

<53> IFN-DC는 종양-특이적 CTL을 효과적으로 크로스-프라이밍한다: IFN-DC가 CTL을 자극하는데 있어 실제로 보다 강력한지의 여부를 결정하기 위해, DC에 사멸된 흑색종 또는 유방암 세포를 로딩한 후 2개의 배양 사이클로 정제된 CD8⁺ T 세포를 프라이밍하는데 사용하였다. IFN-DC는 암 세포를 죽이는 능력을 갖는 CTL을 프라이밍하는데 있어 IL4-DC보다 효과적인 것으로 관측되었다(도 4). 미분화 CD8⁺ T 세포를 프라이밍하는 IFN-DC의 능력을 평가하기 위해, 본원 발명자는 앞서 확립시킨 종양 항원에 대한 시험관 내 크로스-프라이밍 시스템을 사용하였다. 당해 경우, DC에 사멸된 동종이형 종양 세포를 로딩하고 이러한 DC를 2주 배양에 걸쳐 자가의 미분화 CD8⁺ T 세포를 프라이밍하는데 사용하였다. 도 5에 나타난 바와 같이, 사멸된 동종이형 HLA-A*0201+Me290 흑색종 세포가 로딩된 IFN-DC는 면역화를 위해 사용되는 Me290 세포를 죽이는 능력을 갖는 CTL을 프라이밍하는데 현저하게 효과적이다. 흑색종-특이적 CD8⁺ T 세포의 존재는 테트라머 특이적 T 세포의 분석에 의해 더욱 확인되었다. 도 6에 나타난 바와 같이, 유도된 CD8⁺ T 세포는 서브군의 MART-1 특이적 T 세포를 포함한다.

<54> 따라서, IFN-DC는 종양 항원에 특이적인 CTL로 분화시키기 위해 미분화 CD8⁺ T 세포를 크로스-프라이밍하는데 고도로 효과적인 것으로 나타났다. 이러한 발견은 암 백신을 위한 잠재적으로 높은 치료적 의미를 갖는다. 따라서, IFN-DC는 종양 특이적 면역을 유도하는데 보다 효과적이며, 임상 세팅 환자에서의 생체 내 활성 시험을 더욱 보증한다.

<55> DC 백신 로딩을 위한 고도로 면역원성인 사멸된 종양 세포의 생성. 암 치료에서(단독으로 또는 방사선 치료를 위한 아주번트로서) 온열요법(hyperthermia)의 이용은 여러 해 동안 임상적 관심의 대상이었다(참조문헌 84). 온열요법은 방사선치료 및/또는 방사선-면역치료와 조합시 특히 효과적인 것으로 보인다(참조문헌 85, 86에서 검토됨). 온열요법이 방사선감작화를 이끄는 분자적 메카니즘은 불명확하나, 초기 반응 유전자의 활성화 및 열 쇼크 인자(HSF) 및 후속적으로 열 쇼크 단백질(HSP)이 이러한 발생에 역할을 하는 것으로 보인다(참조문헌 87). HSP는 분자량에 따라 조작상 명명되는 상이한 단백질, 예를 들면 hsp70의 슈퍼패밀리를 구성한다. 대부분의 HSP는 일정하게(constitutively) 발현되며, 온도 증가를 포함한 스트레스 조건하에서 더욱 유도된다. HSP는 세포질에서의 생성부터 ER에서의 MHC 부류 I에 대한 결합까지 펩타이드를 매개하는(chaperon) 분자적 릴레이 라인으로 간주된다(참조문헌 88, 89). 최근 HSP70, HSP60 및 GP96는 항원성 단백질 또는 펩타이드로의 크로스-프라이밍을 위한 면역 아주번트로서 확립되었다(참조문헌 90, 91). 이러한 과정에서, 재구성된 hsp70 또는 CD91(참조문헌 92), CD40(참조문헌 93), LOX-1(참조문헌 94) 또는 TLR2/4(참조문헌 95)을 통한 수용체-매개된 세포내이입을 통해 gp96-펩타이드 콤플렉스는 DC를 포함한 항원 제시 세포(APC)에 의해 내화된다. 따라서, 본원 발명자는 온열요법이 크로스-프라이밍을 향상시킴으로써 종양 퇴화를 향상시키는 백신의 제조에 기여할 수 있다는 것을 인식하였다.

<56> 열처리된 흑색종 세포. 현 연구의 목적은 고도로 면역원성이고 백신요법 목적으로 DC를 로딩하는데 사용될 수 있는 변형된 종양 세포 바디를 생성하는 것이다. 따라서, HSP70을 과발현하는 흑색종 세포주가 실제로 보다 면역원성이라는 전제가 확립되었으므로(도시되지 않음), 본 조사의 초점은 임상 등급의 조건에서 HSP 발현을 증가시키는 수단을 개발하는 것으로 이동되었다. 따라서, 흑색종 세포의 열처리가 로딩된 DC의 면역원성을 증가시킬 수 있는지의 여부가 측정되었다.

<57> 흑색종 세포의 열 처리는 HSP70을 증가시킨다: 흑색종 세포주를 42℃에서(열 쇼크) 4시간 동안 인큐베이션하였다. 예상되었던 바와 같이, HSP 발현을 ELISA(도시되지 않음) 또는 세포내 염색(도 7)에 의해 분석한 결과, HSP70의 상당한 상승 조절이 나타났다(참조문헌 85). 사멸된 흑색종 세포(흑색종 바디)는 베틀린산(BA)의 도입에 의해 비처리되거나 열-쇼크 처리된 세포로부터 생성되었다.

<58> 열처리된 흑색종 바디가 로딩된 DC는 흑색종 세포를 죽일 수 있는 CTL을 신속하게 생성한다: 로딩되지 않은 DC(CTL 1), 대조군 흑색종 바디가 로딩된 DC(CTL 2) 및 열-쇼크처리된 흑색종 바디가 로딩된 DC(CTL 3)을 정제된 미분화 CD8⁺ T 세포와 함께 2주 동안 배양하였다. T 세포 배양물을 1회(총 2회 자극) 재자극하고, 가용성 CD40 리간드 및 저용량 IL-7(10 U/ml, 모든 배양물) 및 IL-2를 두번째 주에(10 U/ml) 보충하였다. T 세포를 재

자극한 지 7일 후(총 14일의 배양) 분석하였다.

- <59> 열처리된 Me275 흑색종 바디(대조군 바디는 아님)가 로딩된 DC와 함께 배양된 T 세포가 Me275 세포를 죽일 수 있다는 것으로 나타났다(도 8). K562의 용해가 없었으므로, 상기 사멸은 T 세포에 대해 특이적이다. 또한, 2 번의 자극 후, T 세포는 또 다른 HLA-A*0201 흑색종 세포주(Me290)을 죽일 수 있었으며(도시되지 않음), 이는 공유된 항원에 대한 크로스-프라이밍이 발생할 수 있다는 것을 제시한다. HLA-A*0201 MCF7 유방암 세포의 용해가 없었으므로, 상기 사멸은 흑색종 세포에 대해 특이적이다. 마지막으로, 표적 세포를 MHC 부류 I 차단 mAb W6/32로 예비처리함으로써 상이한 E:T 비율에서 Me275 사멸이 60% 초과하게 억제되었으므로(도시되지 않음), 흑색종 세포의 사멸은 MHC 부류 I의 발현에 의해 적어도 부분적으로 제한되었다.
- <60> 열 쇼크처리된 흑색종 바디가 로딩된 DC는 흑색종-특이적 CTL을 신속히 생성한다: 열처리된 흑색종 바디로 프라이밍된 미분화 CD8⁺ T 세포는 4개의 흑색종 펩타이드(PSA 펩타이드는 아님)가 로딩된 T2 세포를 특이적 및 효과적으로 죽일 수 있다. 또한, 흑색종 세포주는 파괴되었으나, 유방암 세포주 MCF7 및 K562 세포는 영향을 받지 않았다(도 9). 열처리되고 사멸된 흑색종 세포가 로딩된 DC는 흑색종-특이적 세포독성 T 세포가 되도록 미분화된 CD8⁺ T 세포를 유도했다.
- <61> 테트라머 결합 분석으로 이러한 발견을 확인하였으며, 상기 분석은 0.4% 이하의 CD8⁺ T 세포가 MART-1에 특이적인 것으로 나타났다(도 10). 그러나, 다른 특이성은 거의 검출되지 않았다. 따라서, 2차 자극한지 7일 후 T 세포를 4개의 흑색종 펩타이드 각각으로 또는 대조군 PSA 펩타이드로 펄스처리된 자가 DC로 재자극하였다. 이들 배양물을 배양 7일 후에 분석하였다. 흑색종 펩타이드-펄스처리된 DC를 사용한 부스팅이 흑색종-특이적 CD8⁺ T 세포를 증대시키는 것으로 나타났으나(도 10), 대조군 펩타이드를 사용한 부스팅에서는 증대가 관측되지 않았다(도시되지 않음). 따라서, 흑색종 세포의 열 처리는 흑색종-특이적 반응을 향상시킨다.
- <62> 흑색종 세포의 열 처리가 종양 항원의 전사를 증진시킨다. 증진된 크로스-프라이밍이 열 쇼크 단백질(Heat Shock Protein)의 증대된 발현에 기인할 것이라는 초기 가설은, 입증되고 정제된 HSP70, HSP60 및 GP96가 항원성 단백질 또는 펩타이드로의 크로스-프라이밍을 위한 면역 아주버트로서 작용한다는 연구와 일치하는 것으로 밝혀졌다(참조문헌 90, 91). 그러나, 대조군 및 HSP70 전달된(transduced) Sk-Mel28 세포에 대한 마이크로어레이 분석 후, MAGE-A10을 포함한 수개의 종양 항원에 대한 증가된 전사(도시되지 않음)가 관측되었다. 따라서, 상이한 구성의 MAGE 종양 항원 패밀리를 코딩하는 12개의 유전자를 실시간 PCR 발현으로 측정하였다. 이들 항원은 MAGE-B3, MAGE-A8(도 11), MAGE-B4, 및 MAGE-A10(도시되지 않음)을 포함하였다. 액티노마이신 D에 대한 민감도 이외에도 MAGE-B3의 발현이 10000배까지 증가하였으며, 이는 적극적인 전사를 입증하는 것이다(도 11).
- <63> 따라서, 열처리된 바디가 로딩된 DC가 MAGE-A8 및 MAGE-A10에 대해 특이적인 CTL을 프라이밍할 수 있는지의 여부를 결정하기 위해 MAGE-A8 및 MAGE-A10로부터 유도되는 HLA-A*0201 제한된 펩타이드를 확인하여 분석하였다. 도 12에 나타나 있는 바와 같이, 열처리된(hot) HLA-A*0201⁺ Me290 또는 HLA-A*0201^{neg} Sk-Mel28 세포에 대해 프라이밍된 HLA-A*0201⁺ CTL은, 열처리되지 않은 흑색종 세포에 대해 프라이밍된 CTL 보다 높은 빈도의 MAGE-A10 테트라머 결합 CD8⁺ T 세포를 나타내었다.
- <64> 따라서, 종양 항원의 온열요법-증가된 전사가 크로스-프라이밍을 증진시키는데 기여할 수 있었다. 열처리 및 사멸된 흑색종 바디가 로딩된 DC는 자가 미분화 CD8⁺ 또는 CD4⁺ T 세포가 증가된 수준의 IFN 감마 및 감소된 수준의 IL-10을 생성하도록 유도한다. 조절/억제성 T 세포는 암에 대한 환자의 성공적 백신요법에 있어 주요 장애물 중의 하나인 것으로 간주된다. 도 13에 나타난 바와 같이, 열처리되지 않은 종양이 로딩된 DC로 제조된 배양물과 비교하여, 열처리되고 사멸된 흑색종 세포를 DC 백신에 로딩시킴으로써 IL-10의 분비가 감소되고 IFN 감마의 생성이 증가하였다. 이러한 결과는 임상 시도에서 생체 내에서의 DC 로딩에 대한 특이한 전략을 지지한다. 따라서, 열처리되고 사멸된 흑색종 세포의 DC 백신에의 로딩은 광범위한 흑색종-특이적 타입 1 CD8⁺ T 세포 면역을 유도한다.
- <65> 본 발명은 GM-CSF 및 IFN 알파를 사용하여 단핵구로부터 유도되고 동종이형 Colo829 흑색종 세포가 로딩된 자가 수지상 세포를 포함한다. 자가 수지상 세포는 성분채집(apheresis)에 의해 수득된 말초혈 단핵 세포로부터 제

핵하여 분리된 단핵구로부터 제조된다. 단핵구는 GM-CSF 및 IFN 알파의 존재하에 밀폐계에서 배양되며, 열처리되고 사멸된 동종이형 Colo829 종양 세포가 로딩되고, 냉동보관(cryopreserve)된다. 백신을 액체 질소(기상)에 저장한다.

<66> 수지상 세포는 Elutra 시스템(Gambro BCT)를 사용하여 단핵구를 단리시키도록 진행되는 성분채집 생성물로부터 제조된다. 단핵구를 유출(elutriation) 백으로부터 배양 백(각각 100ml 용적)으로 옮기고, 72시간 동안 1×10^6 개/ml 용적에서 배양하였다. 당해 예시에서, 배양 배지는 제조함 사람 GM-CSF(100ng/ml; Berlex) 및 인터페론 알파 2b(500IU/ml; Schering Plough)가 보충된 혈청-비함유 배지를 포함하였다. 그러나, 당업자라면 활성화를 최대화하기 위해 GM-CSF 및/또는 IFN 알파에 세포를 노출하는 양, 시점 및 길이를 알 수 있을 것이다. 배양한 지 처음 24시간 후, 백신에 사멸된 Colo829 세포를 로딩한다. 총 72시간의 배양 후, 수지상 세포를 수거하고, 배지 및 사이토킨을 생리식염수를 사용하여 제거한다. 세포를 10% DMSO 및 10% Plasmalyte를 포함하는 자가 혈청에 재현탁시키고, 30×10^6 개 세포/바이알로 냉동-바이알에 분배한다. 냉동바이알을 자동 속도 조절식 냉동기를 사용하여 냉동시키고, 액체 질소(기상)에서 저장한다.

표 1

제조 단계	
단계	기술
I	단리 - 자가 말초혈 단핵 세포를 COBE SPECTRA™를 사용하여 성분채집에 의해 수득한다. 이어서, 단핵구를 GAMBRO BCT ELUTRA™에서 말초혈 단핵 세포로부터 단리한다.
II	배양/로딩 - 단핵구를 3일 동안 GM-CSF 및 IFN 알파와 함께 배양함으로써 수지상 세포를 제조한다. 배양을 개시한지 24시간 후, 사멸된 동종이형 종양 세포(COLO 829)를 배양물에 가한다.
III	수거/냉동보관 - 수지상 세포 백신을 다수 용량을 위해 분취량으로 냉동보관할 것이다. 이어서, 바이알을 속도 조절식 냉동기를 사용하여 냉동시킬 것이다.

<68> PBMC 분리, 성분채집, 수집. 자가 말초혈 단핵 세포를 COBE SPECTRA™를 사용하는 성분채집으로 수득한다.

<69> 단핵구 유출 - 단리. 이어서, 단핵구를 GAMBRO BCT ELUTRA™에서 말초혈 단핵 세포로부터 단리한다. Elutra 시스템은, 세포의 크기 및 밀도를 기준으로 하여 세포를 다수 분획으로 분리시키기 위해 연속적 역유동 유출 기술을 이용하는, 반-자동의 밀폐계 원심분리기이다. Elutra 시스템의 의도된 적용은 단핵구를 농축시키는 것이다. 당해 시스템은 크기 및 밀도를 기준으로 하여 5개 분획의 세포를 수집한다. 분획 5는 수지상 세포 백신 제조를 위해 사용되는 농축된 단핵구 집단(약 90% 순도, n=7 건강한 지원자 성분채집)을 포함한다.

<70> 배양 - 분획 5를 포함하는 백을 원심분리시키고, 완충된 염수를 짜내어(express off) 버린다. 세포를 CellGenix DC 배양 배지에 재현탁시키고, 세포 계수, 생존성 및 표현형을 조사하기 위해 샘플을 분리시킨다. 단핵구의 수가 측정되면, 세포를 1×10^6 개 단핵구/ml의 농도로 희석시키고, AFC VueLife 배양 백에 무균 연결한다. 100ng/ml 농도의 GM-CSF(Leukine®)(Berlex Inc.) 및 500IU/ml 농도의 IFN alfa-2b(INTRON A)(Schering-Plough Corp.)를 가하고, 세포를 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 놓고 배양한다.

<71> 로딩 - 배양을 개시한 지 24시간 후, 제2 용량의 GM-CSF 및 IFN alfa-2b 뿐만 아니라 사멸된 종양 세포(COLO829)를 항원의 공급원으로서 첨가한다. 사멸된 Colo829는 감마선 조사를 이용하여 배지에서 제조되며, 삼중수소 처리된 티미딘의 삽입에 의해 측정되는 증식 불능(sterility 및 inability)에 대해 시험하고, 냉동 바이알에서 10% DMSO와 함께 50×10^6 개/ml의 농도로 냉동시키며, 기상 질소에 저장한다. DC에 1개의 사멸된 종양 세포/2개의 수지상 세포로 로딩되도록 적합한 수의 냉동바이알을 해동시킨다. 사멸된 Colo829를 배양 배지로 3회 세척하고 배양 백에 소용적으로 가한다.

<72> 수지상 세포 수거. 배양을 개시한 지 72 시간 후, 세포를 수거하고, 백신을 냉동보관한다. 배양 백을 원심분리시키고, 상등액을 버리며(express), 세포를 생리식염수로 3회 세척한다. 세척은 생리식염수의 백을 배양 백에 연결하고, 세포를 생리식염수에 재현탁시키며, 배양 백을 원심분리시키고, 생리식염수를 폐기물 수집 백으로 짜내는 것으로 이루어진다. 3번째 세척 후, 세포를 냉동 용액 희석제인 Plasmalyte에 재현탁시킨다.

<73> 속도 조절식 냉동 - 바이알을 속도 조절식 냉동기를 사용하여 냉동시킨다. 바이알을 냉동 챔버에 놓고, 액체 질소를 전자 솔레노이드 밸브를 통해 챔버에 도입한다. 기화는 거의 순간적이므로, 액체 질소가 챔버에 도입되는 속도의 조절이 열이 흡수되고 냉동 챔버 및 이의 내용물로부터 제거되는 속도를 직접적으로 조절한다.

<74> 냉동보관. 세포를 30×10^6 개 세포/ml의 농도로 냉동보관한다. 세포수가 측정되면, 세포를 자가 혈청으로 최종 농도의 2배로 희석한다. 세포 용적과 동일한 용적을 포함하는 냉동 용액의 백을 준비한다. 냉동 용액은 20% DMSO 및 20% Plasmalyte를 갖는 자가 혈청이다. 신속한 작업으로, 냉동 용액을 세포 백에 가하고, 세포를 표지된 냉동 바이알에 옮긴다. DMSO의 최종 농도는 10%이다. 냉동바이알을 1℃/min로 자동 속도 조절식 냉동기를 사용하여 냉동시키고, 기상 질소에 저장한다.

<75> 저장 - 냉동바이알을 오랜 기간 동안 저장하기 위해 속도 조절식 냉동기로부터 액체 질소 탱크로 옮긴다. 조절 목록이 GMP 훈련자에 의해 데이터베이스로 저장된다.

표 2

제조된 로트의 검증

로트 번호	제조 위치	제조일	제조 스케일	세포의 총 수율	로트의 이용
ND66	BIIR	05/25/04	새로운 분획 5의 1/3 2×10^8	1.60×10^8	공정 검증
ND68	BIIR	05/27/04	새로운 분획 5의 1/6 3×10^8	1.31×10^8	공정 검증
ND70	BIIR	06/01/04	새로운 분획 5의 1/3 4×10^8	2.14×10^8	공정 검증
ND71	BIIR	06/02/04	새로운 분획 5의 1/9 4×10^8	3.39×10^8	공정 검증
ND72	BIIR	06/03/04	새로운 분획 5의 1/4 4×10^8	1.43×10^8	공정 검증
ND73	BIIR	06/08/04	새로운 분획 5의 1/6 4×10^8	1.95×10^8	공정 검증
ND80	BIIR	10/21/04	해동된 분획 5 51×10^6	23×10^6	공정 검증
ND80	BIIR	10/28/04	해동된 분획 5 46×10^6	34×10^6	공정 검증
ND84	BIIR	11/22/04	해동된 분획 5의 10% 2.5×10^8	153×10^6	공정 검증
ND84	BIIR	12/06/04	해동된 분획 5 44×10^6	13×10^6	공정 검증
ND85	BIIR	12/09/04	해동된 분획 5의 5% 1.0×10^8	61×10^6	공정 검증
ND86-1	BIIR	12/19/04	해동된 분획 5의 5% 1.0×10^8	100×10^6	공정 검증
ND86-2	BIIR	12/20/04	새로운 분획 5의 1/3 0.5×10^8	39×10^6	공정 검증
ND86-1	BIIR	01/10/05	해동된 분획 5 25×10^6	2×10^6	공정 검증
ND89	BIIR	01/15/05	새로운 분획 5의 1/3 7×10^8	6.8×10^8	공정 검증
ND90	BIIR	02/04/05	새로운 분획 5의 1/3 3×10^8	2.6×10^8	공정 검증

<76>

<77> 활성 약제학적 성분의 최종 투여 형태의 안정성. 기술: 냉동보관된 세포 1ml를 포함하는 바이알을 37℃에서 신속히 해동시키고, 멸균된 생리식염수 9ml를 포함하는 주사기로 즉시 빨아들였다(세포가 주사 직전에 임상 위치에서 해동되는 조건). 생리식염수를 실온 또는 4℃(냉장)였다. 이어서, 세포를 6개 튜브에 고르게 분배하고, 실온 또는 냉장 온도로 유지시켰다. 이어서, 희석된 세포를 다양한 시점에서 검정하였다.

표 3

해동 후 시간의 함수로서의 생성물 생존성

생존율 (%)

	0 분	15 분	30 분	45 분	60 분	75 분
EXP 1	85	87	85	88	87	78
EXP 2	88	87	78	90	88	86
EXP 3	89	92	88	88	93	80
EXP 4	91	89	89	86	86	ND
EXP 5	87	87	82	86	86	ND
EXP 6	ND	ND	ND	ND	86	ND
EXP 7	ND	ND	ND	ND	86	ND
EXP 8	ND	ND	ND	ND	88	ND
EXP 9	ND	ND	ND	ND	94	ND
EXP 10	ND	ND	ND	ND	82	ND
EXP 11	ND	ND	ND	ND	72	ND
평균	88.0	88.4	84.4	87.6	86.2	81.3
표준편차	2.24	2.19	4.51	1.67	5.78	4.16

<78>

표 4

생성물 회수 : 해동 후 시간의 함수로서의 생존 세포
(냉동 전 바이알 1개당 세포 개수에 대한 것)

생존 세포의 회수율 (%)

	0 분	15 분	30 분	45 분	60 분	75 분
EXP 1	100	60	68.5	32	36	55
EXP 2	95	55	25	49.6	34	35
EXP 3	60	82	86.6	38	34	16.3
EXP 4	85	62.5	59	70	55	ND
EXP 5	55	46	43	55	45	ND
EXP 6	ND	ND	ND	ND	42	ND
EXP 7	ND	ND	ND	ND	36	ND
EXP 8	ND	ND	ND	ND	31	ND
EXP 9	ND	ND	ND	ND	86	ND
EXP 10	ND	ND	ND	ND	89	ND
EXP 11	ND	ND	ND	ND	98	ND
평균	79.0	61.1	56.4	48.9	53.3	35.4
표준편차	20.43	13.28	23.62	14.89	25.26	19.35

<79>

표 5

CD4⁺ T 세포를 사용하는 혼합된 림프구 반응에서의 생성물의 효능

MLR (cpm)

	5000 DC	2000 DC	500 DC
EXP 1	262,340	245,887	189,296
EXP 4	194,437	91,980	22,127
EXP 5	69,407	47,926	36,717
평균	175,395	128,598	82,713
표준편차	97,866	103,936	92,591

<80>

표 6

실온 및 4℃에서 해동되는 경우의 생성물 회수율 및 생존율

A	회수율 %					
	실온			4℃		
	평균	표준편차	범위	평균	표준편차	범위
0 분	79.0	20.43	55.0 - 100.0	49.5	14.84	35.0 - 65.0
15 분	61.1	13.28	46.0 - 82.0	38.0	22.03	7.3 - 63.5
30 분	56.4	23.62	25.0 - 86.6	40.5	25.76	15.0 - 80.0
45 분	48.9	14.89	32.0 - 70.0	52.9	39.57	9.6 - 115
60 분	40.8	9.15	34.0 - 55.0	49.5	47.40	7.3 - 126
B	생존율 %					
	실온			4℃		
	평균	표준편차	범위	평균	표준편차	범위
0 분	88.0	2.24	85 - 91	88.6	3.36	85 - 94
15 분	88.4	2.19	87 - 92	81.2	14.24	56 - 90
30 분	84.4	4.51	78 - 89	85.8	3.27	81 - 90
45 분	87.6	1.67	86 - 90	87.8	3.83	83 - 93
60 분	88.0	2.92	86 - 93	85.8	4.15	80 - 91

<81>

<82>

로트 방출에 대한 허용가능한 결과는, 실온에서 해동시킨 지 15분 후, 적어도 50%의 생존 세포 회수율 및 적어도 50%의 생존율이다. 방출 시험은 냉동 공정의 개시(1차), 중간(2차) 및 마지막(3차)에 수득된 3개의 바이알

에 대해 수행된다.

- <83> 냉동 백신의 특징분석. 냉동 백신을 더욱 특징분석하기 위해, 상술된 바와 같이 $CD4^{+}$ T 세포로 MLR을 자극하는 능력 및 생존율 이외에도, (1) 형태 및 표현형, (2) 사이토킨 분비 및/또는 (3) 자가 $CD8^{+}$ T 세포 분화를 유도하는 능력 중의 하나 이상을 분석할 수 있다.
- <84> 도 14는 본 발명의 전체 백신 제조 공정을 개요하는 흐름도이다. 단계 10에서, 백신 생성 공정에 포함시키기 위한 환자가 선별된다. 단계 12에서, 로딩을 위한 세포를 분리시키기 위해 환자의 혈액 성분채집이 수행되며, 단계 14에서 수집된다. 단계 10, 단계 12 및 단계 14는 1일에 수행될 수 있다. 이어지는 수일 동안, 세포를 배양하고(단계 16), 세포에 수득되는 항원-로딩된 수지상 세포에 의해 제시되는 항원(들) 및 단계 16의 배양물을 로딩한다(단계 18). 이어서, 단계 20에서 세포를 냉동시키고, 추가의 사용을 위해 저장하며/하거나 중국에는 해동시켜 방출시킨다(단계 22). 마지막으로, 세포 백신은 주사에 사용될 수 있다(단계 24). 하나의 양태에서, 전체 공정을 약 10일에 수행할 수 있다.
- <85> 도 15는 본 발명의 백신 제조를 위한 상세 단계 및 시각표를 나타내며, 여기서 세포는 유출 백(단계 26)에 제공되고, 하나 이상의 배양 백(단계 28)으로 옮겨진다. 단계 30에서, 예를 들면 3일의 배양 동안, 하나 이상의 사이토킨을 0시간에 제공한다. 세포를 사이토킨에 노출시킨 후, 세포를 사멸된 표적 세포, 예를 들면 Colo629 세포 및 임의로 추가의 사이토킨에 노출시킨다. 마지막으로, 약 72시간 후 세포를 수거하고/하거나 냉동, 시험, 멸균 등을 수행한다.
- <86> 로딩되지 않거나 사멸된 Colo829 세포가 로딩되고, 냉동되며, 1주, 2주 및 3주 동안 -80°C 에서 저장된 배양 백에서 IFN α -DC를 생성하였다. 냉동 세포를 1, 2 및 3주에 해동시키고, 이들의 형태를 검자(Giemsa) 염색으로 평가하였다. 도 16에 나타난 바와 같이, 로딩 및 로딩되지 않은 IFN-DC는 냉동/해동 후 DC 형태를 유지하였다.
- <87> 도 17은, 지시된 항체로의 표면 염색 및 유동 세포계에 의해 분석되는, 일례의 냉동/해동된 백신의 표현형을 나타낸다. DC는 CD1 분자(CD1a 및 CD1b/c)의 발현, 사이질(interstitial) DC인 INF-DC와 일치하는 CD14의 발현; 높은 수준의 HLA-DR 및 공동자극 CD80 및 CD86 분자를 포함하여 IFN-알파의 존재하에 이들의 생성과 일치하는 예상된 표현형을 보인다. 따라서, 냉동/해동된 백신은 IFN-DC의 형태 및 표현형을 보유한다.
- <88> DC는 T 세포와의 상호작용시 T 세포 분화를 조절하는 사이토킨을 분비한다. 따라서, 본 발명자는 T 세포 시그널을 대체하기 위해 가용성 CD40 리간드에 노출되는 경우(사멸된 Colo829 세포가 로딩되거나 로딩되지 않은) 냉동/해동된 IFN-DC에 의해 분비되는 사이토킨을 평가하였다. 멀티플렉스 사이토킨 분석(Luminex)을 이용하여 6시간 및 24시간 후 상등액을 평가하였다. 1ng/ml 를 초과하는 수준으로 분비되는 3개의 주요 사이토킨은 IL-8(약 10ng/ml), IL-6 및 MIP1 알파를 포함하였다. 예비-임상 연구로부터 예측되는 바와 같이, IFN-DC는 IL-7을 분비하였다(도 19). 또한, 낮은 수준의 IL-10이 검출될 수 있었다(100pg/ml 미만). 그러나, IL-10 분비는, 그 수준이 로딩되지 않거나 로딩된 DC의 배양물에서 유사하였으므로, 사멸된 Colo829 세포가 로딩되었기 때문이 아니었다(도 18). 결국, IL-10 분비는 제공자-관련되는 것으로 나타났다(자료 도시되지 않음).
- <89> DC 백신에 대한 긍정적인 변수는 자가 $CD8^{+}$ T 세포에 대해 종양 항원을 제시하고 이들의 분화를 유도하는 능력이다. 따라서, 냉동/해동된 HLA-A*0201+IFN-DC를 LPS(5 또는 10ng/ml)를 사용하여 24시간 동안 자극하고, MART-1 펩타이드로 마지막 10시간 동안 펄스처리한 후, 정제된 자가 $CD8^{+}$ T 세포에 대한 자극제로서 사용하였다. T 세포 배양물을 7일에 1회 부스팅하고, IL-7 및 IL-2를 보충한 후, T 세포 분화를 부스팅한 지 5일 후 테트라머 염색으로 평가하였다. 도 19에 나타난 바와 같이, 배양한 지 12일에 DC:T 세포 비율 1:10(즉, 10^5 개 DC/ 10^6 개 T 세포)에서, 약 2%의 $CD8^{+}$ T 세포가 MART-1 테트라머를 특이적으로 결합하였다. 또한, MART-1 특이적 $CD8^{+}$ T 세포의 분화는 1:33, 즉 3000개 DC/ 10^6 개 T 세포와 같이 낮은 DC:T 세포 비율에서조차도 관측될 수 있었다. 이들 결과는 냉동된 IFN-DC가 이들의 형태, 표현형 및 항원-특이적 $CD8^{+}$ T 세포를 증대시키는 능력을 보유한다는 것을 입증한다.
- <90> 전이성 흑색종을 앓는 환자에서 생성물 제조 및 방출의 실현가능성에 대한 예비 자료. 지금까지 본원 발명자는 단계 IV 흑색종을 앓는 7명의 환자에서 생성물 제조에 대한 자료를 수집하였다. 이들은 진행중인 임상 시도 과정에서 얻어진 예비 결과이다(IRB#005-065, IND#12339). 화학치료를 받았던 전이성 흑색종을 앓는 환자로부터의 세포를 사용하는 이러한 예비적 로트 제조 자료는 앞서 기술된 바와 같이 건강한 제공자로부터의 세포를 사

용하여 전개되었던 과정에 대한 실현가능성을 제시한다. 하기 표는 환자들의 물질을 사용하여 지금까지 제조된 로트를 요약한다.

표 7

단계 IV 흑색종을 앓는 환자 : Elutra 분획 5로부터의 단핵구 회수율

Pt	세포 농도 X 10 (6)	% CD14+
005-065-02-001*	58	87
005-065-02-002	2150	88
005-065-02-004	4150	53
005-065-02-005	2850	73
005-065-02-006	2000	77
005-065-02-007	1600	88
005-065-02-008	3650	80
평균	2351	78%
표준편차	1364	13%

* 당해 환자는, 성분채집 생성물의 품질이 불량하여 유출 후 모든 분획에서 단핵구를 나타냈다. 충분한 수의 백신을 확보하기 위해, 모든 분획을 풀링하여 배양하였다.

<91>

표 8

단계 IV 흑색종을 앓는 환자 : 지금까지 제조된 로트에서의 DC 회수율

Pt	백의 개수	배양된 세포 번호 X 10(6)	회수된 세포 번호 X 10(6)	회수율 (%)	냉동전 생존율 (%)	DC 번호 X 10(6)/ 냉동바이알	바이알 번호
005-065-02-001*	2	199	75	38	81	20	7
	3	F4&5 256	F4&5 67	26	69	10	1
005-065-02-002	10	1000	537	54	90	30	18
005-065-02-004	17	1700	788	46	91	32	21
005-065-02-005	12	1200	624	52	94	31	20
005-065-02-006	10	1000	564	56	94	27	19
005-065-02-007	16	1600	917	57	98	31	30
005-065-02-008	16	1600	928	58	85	35	28
평균		1350	726	54	92		
표준편차		321	175	4	5		

<92>

표 9

단계 IV 흑색종을 앓는 환자 : DMSO 세척 부재하에서의 해동 후의 DC 생존율

환자 번호	바이알 번호	제조일	해동 후의 생존율 (%)
005-065-02-001	8	09/30/05	66
005-065-02-003	18	10/02/05	65
005-065-02-003	1	10/02/05	63
005-065-02-004	1	10/09/05	79
005-065-02-004	10	10/09/05	76
005-065-02-004	21	10/09/05	77
005-065-02-005	1	10/20/05	63
005-065-02-005	10	10/20/05	65
005-065-02-005	20	10/20/05	70
005-065-02-006	1	10/27/05	50
005-065-02-006	9	10/27/05	56
005-065-02-006	19	10/27/05	47
005-065-02-007	1	11/20/05	90
005-065-02-007	18	11/20/05	91
005-065-02-007	30	11/20/05	88
005-065-02-008	1	12/21/05	67
005-065-02-008	14	12/21/05	72
평균			70
표준편차			13

<93>

표 10

단계 IV 흑색종을 앓는 환자 : DMSO 세척 부재하에서의 해당 후의 DC 회수율

환자	바이알	회수율 (%)
005-065-02-001	1	100
005-065-02-003	18	77
005-065-02-003	1	97
005-065-02-004	1	100
005-065-02-004	10	100
005-065-02-004	21	100
005-065-02-005	1	68
005-065-02-005	10	93
005-065-02-005	20	90
005-065-02-006	1	47
005-065-02-006	9	63
005-065-02-006	19	69
005-065-02-007	1	100
005-065-02-007	18	100
005-065-02-007	30	100
005-065-02-008	1	57
005-065-02-008	14	56
005-065-02-008	26	72
평균		83
표준편차		19

<94>

<95>

발명자의 참조문헌

Banchereau, J., Palucka, A.K., Dhodapkar, M., Burkeholder, S., Taquet, N., Alexandre, R., Taquet, S., Coquery, S., Wittkowski, K., Bhardwaj, N., Pinciro, L., Steinman, R., and Fay, J. (2001). Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34+ progenitor-derived dendritic cell vaccine. Cancer Research. 61:6451-6458.

Blanco, P., Palucka, A.K., Gill, M., Pascual, V., and Banchereau, J. (2001). Interferon alpha and dendritic cells in SLE. Science. 294:1540-1543.

Mohamadzadeh, M., Berard, F., Essert, G., Chalouni, C., Pulendran, B., Davoust, J., Bridges, G., Palucka, A.K., and Banchereau, J. (2001). Interleukin 15 skews monocyte differentiation into dendritic cells with features of Langerhans cells. J.Exp.Med. 194:1013-20.

Chomarat, P., Dantin, C., Bennett, L., Banchereau, J., and Palucka, A.K. (2003) TNF skews monocyte differentiation from macrophages to dendritic cells. J. Immunol. 171:2262-9

Palucka, A.K., Dhodapkar, M., Burkeholder, S., Wittkowski, K., Steinman, R., Fay, J., and Banchereau, J. (2003). CD34+ progenitor-derived dendritic cell vaccine permits rapid induction of T cell immunity in patients with metastatic melanoma J. Immunotherapy. 26(5):432-9.

<96>

Neihardt-Berard, E-M., Berard, F., Banchereau, J. and Palucka, A.K. (2004) Dendritic cells loaded with killed breast cancer cells induce differentiation of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes. *Breast Cancer Res* 2004, 6:R322-R328.

Paczesny, S., Banchereau, J., Fay, J., and Palucka, A.K. (2004) Expansion of melanoma-specific cytolytic CD8+ T cell precursors in patients with metastatic melanoma vaccinated with CD34+ progenitor-derived dendritic cells. *J Exp Med* 199(11):1503-11

Paczesny, S., Shi, H., Saito, H., Mannoni, P., Fay, J., Banchereau, J and Palucka, AK. (2005) Measuring Melanoma-specific CTLs Elicited by Dendritic Cell Vaccines with a Tumor Inhibition Assay in vitro. *J. Immunotherapy* 28(2):148-157

Palucka, AK., Dhodapkar, M., Paczesny, S., Ueno, H., Fay, J., and Banchereau, J. (2005) Boosting vaccinations with peptide-pulsed CD34+ progenitor derived dendritic cells can expand long-lived melanoma-specific CD8+ T cell immunity in patients with metastatic melanoma. *J. Immunotherapy* 28(2):158-168

Shi, H., Palucka, AK. Chapel, S., Bagnis, C., Mannoni, P., Davoust, J., and Banchereau, J. (2005) Enhanced cross-priming of melanoma-specific CTLs by dendritic cells loaded with killed allogeneic melanoma cells that were treated with hyperthermia. *J Immunol* (in revision)

Fay, J., Palucka, A.K., Paczesny, S., Ueno, H., Dhodapkar, M., Burkeholder, S., Steinman, R., and Banchereau, J. (2005) Long-term outcomes in patients with metastatic melanoma vaccinated with peptide-pulsed CD34-DCs. *Cancer Immunol Immunother*

Banchereau, J., Ueno, H., Dhodapkar, M., Connolly, J.E., Finholt-Perry, J., Klechevsky, E., Blanck, J-P., Johnston, DA., Steinman, R., Palucka, AK., Fay, J. (2005) Immune and clinical outcomes in patients with stage IV melanoma vaccinated with peptide-pulsed dendritic cells derived from CD34+ progenitors and activated with type I interferon. *J Immunother.*

Dubsky, P., Saito, H., Dantin, C., Connolly, J., Banchereau, J. and Palucka, AK. (2005) IL-15-induced human dendritic cells efficiently prime low frequency melanoma-specific naïve CD8+T cells to differentiate into cytotoxic T cells. Submitted

Saito, H., Dubsky, P., Dantin, C., Finn, OJ., Banchereau, J. and Palucka, AK. Cross-priming of Cyclin B1, MUC-1 and survivin peptide-specific CD8+T cells by dendritic cells loaded with killed allogeneic breast cancer cells. Submitted.

Ueno, H., Connolly, JE., Vence, L., Palucka, AK., and Banchereau, J. (2005) Global assessment of tumor-antigen specific human T cell repertoire. In preparation

<97>

Palucka, AK., Ueno, H., Connolly, J., Kerneis-Norvell, F., Blanck, J-P., Johnston, DA., Fay, J., and Banchereau, J. (2005) Immune and clinical responses in patients with stage IV melanoma vaccinated with dendritic cells loaded with killed allogeneic melanoma cells. In revision

<98>

<99>

기타 참조문헌

1. Steinman, R. M. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* **9**, 271-96 (1991).
2. Banchereau, J. et al. Immunobiology of dendritic cells. *Ann Rev Immunol* **18**, 767-811 (2000).
3. Mellman, I. & Steinman, R. M. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* **106**, 255-8 (2001).
4. Caux, C. et al. CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus tumor necrosis factor alpha: II. Functional analysis. *Blood* **90**, 1458-70 (1997).
5. Jego, G. et al. Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity* **19**, 225-34 (2003).
6. Fernandez, N. C. et al. Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. *Nat Med* **5**, 405-11 (1999).
7. Kadowaki, N. et al. Distinct cytokine profiles of neonatal natural killer T cells after expansion with subsets of dendritic cells. *J Exp Med* **193**, 1221-6 (2001).
8. Davis, I. D., Jefford, M., Parente, P. & Cebon, J. Rational approaches to human cancer immunotherapy. *J Leukoc Biol* **73**, 3-29 (2003).
9. Gilboa, E., Nair, S. K. & Lyster, H. K. Immunotherapy of cancer with dendritic-cell-based vaccines. *Cancer Immunol Immunother* **46**, 82-7 (1998).
10. Lu, W., Arraes, L. C., Ferreira, W. T. & Andrieu, J. M. Therapeutic dendritic-cell vaccine for chronic HIV-1 infection. *Nat Med* **10**, 1359-1365 (2004).
11. Townsend, A. R., Gotch, F. M. & Davey, J. Cytotoxic T cells recognize fragments of the influenza nucleoprotein. *Cell* **42**, 457-67 (1985).
12. Boon, T., Cerottini, J. C., Van den Eynde, B., van der Bruggen, P. & Van Pel, A. Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* **12**, 337-65 (1994).
13. Rosenberg, S. A. Cancer vaccines based on the identification of genes encoding cancer regression antigens. *Immunol Today* **18**, 175-82 (1997).
14. Pardoll, D. M. Cancer vaccines. *Nat Med* **4**, 525-31 (1998).
15. Gilboa, E. The makings of a tumor rejection antigen. *Immunity* **11**, 263-70 (1999).

<100>

16. Finn, O. J. Cancer vaccines: between the idea and the reality. *Nat Rev Immunol* **3**, 630-41 (2003).
17. Antonia, S., Mule, J. J. & Weber, J. S. Current developments of immunotherapy in the clinic. *Curr Opin Immunol* **16**, 130-6 (2004).
18. Hsueh, E. C. & Morton, D. L. Antigen-based immunotherapy of melanoma: Canvaxin therapeutic polyvalent cancer vaccine. *Semin Cancer Biol* **13**, 401-7 (2003).
19. Sondak, V. K. & Sosman, J. A. Results of clinical trials with an allogenic melanoma tumor cell lysate vaccine: Melacine. *Semin Cancer Biol* **13**, 409-15 (2003).
20. Steinman, R. M., Hawiger, D. & Nussenzweig, M. C. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* **21**, 685-711 (2003).
21. Caux, C., Dezutter-Dambuyant, C., Schmitt, D. & Banchereau, J. GM-CSF and TNF- α cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* **360**, 258-61 (1992).
22. Romani, N. et al. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med* **180**, 83-93 (1994).
23. Sallusto, F. & Lanzavecchia, A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor α . *J Exp Med* **179**, 1109-18 (1994).
24. Peters, J. H. et al. Signals required for differentiating dendritic cells from human monocytes in vitro. *Adv Exp Med Biol* **329**, 275-80 (1993).
25. Nestle, F. O. et al. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med* **4**, 328-32 (1998).
26. Thurner, B. et al. Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. *J Exp Med* **190**, 1669-78 (1999).
27. Mohamadzeadeh, M. et al. Interleukin 15 skews monocyte differentiation into dendritic cells with features of Langerhans cells. *J Exp Med* **194**, 1013-20 (2001).
28. Santini, S. M. et al. Type I interferon as a powerful adjuvant for monocyte-derived dendritic cell development and activity in vitro and in Hu-PBL-SCID mice. *J Exp Med* **191**, 1777-88. (2000).
29. Wang, R. F., Wang, X., Atwood, A. C., Topalian, S. L. & Rosenberg, S. A. Cloning genes encoding MHC class II-restricted antigens: mutated CDC27 as a tumor antigen. *Science* **284**, 1351-4 (1999).
30. Zitvogel, L. et al. Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nat Med* **4**, 594-600 (1998).

31. Ribas, A., Butterfield, L. H., Glaspy, J. A. & Economou, J. S. Cancer immunotherapy using gene-modified dendritic cells. *Curr Gene Ther* **2**, 57-78 (2002).
32. Boczkowski, D., Nair, S. K., Snyder, D. & Gilboa, E. Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells in vitro and in vivo. *J Exp Med* **184**, 465-72 (1996).
33. Regnault, A. et al. Fcγ receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *J Exp Med* **189**, 371-80 (1999).
34. Fong, L. & Engleman, E. G. Dendritic cells in cancer immunotherapy. *Annu Rev Immunol* **18**, 245-73 (2000).
35. Albert, M. L., Sauter, B. & Bhardwaj, N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* **392**, 86-9 (1998).
36. Berard, F. et al. Cross-Priming of Naive CD8 T Cells against Melanoma Antigens Using Dendritic Cells Loaded with Killed Allogeneic Melanoma Cells. *J Exp Med* **192**, 1535-1544 (2000).
37. Neidhardt-Berard, E. M., Berard, F., Banchereau, J. & Palucka, A. K. Dendritic cells loaded with killed breast cancer cells induce differentiation of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes. *Breast Cancer Res* **6**, R322-8 (2004).
38. Apostolou, I., Sarukhan, A., Klein, L. & von Boehmer, H. Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen. *Nat Immunol* **3**, 756-63 (2002).
39. Jordan, M. S. et al. Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol* **2**, 301-6 (2001).
40. Bensinger, S. J., Bandeira, A., Jordan, M. S., Caton, A. J. & Laufer, T. M. Major histocompatibility complex class II-positive cortical epithelium mediates the selection of CD4(+)25(+) immunoregulatory T cells. *J Exp Med* **194**, 427-38 (2001).
41. Fontenot, J. D., Gavin, M. A. & Rudensky, A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* **4**, 330-6 (2003).
42. Hori, S., Nomura, T. & Sakaguchi, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* **299**, 1057-61 (2003).
43. Steitz, J., Bruck, J., Lenz, J., Knop, J. & Tuting, T. Depletion of CD25(+) CD4(+) T cells and treatment with tyrosinase-related protein 2-transduced dendritic cells enhance the interferon alpha-induced, CD8(+) T-cell-dependent immune defense of B16 melanoma. *Cancer Res* **61**, 8643-6 (2001).
44. Suttmüller, R. P. et al. Synergism of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and depletion of CD25(+) regulatory T cells in antitumor therapy reveals alternative

- pathways for suppression of autoreactive cytotoxic T lymphocyte responses. *J Exp Med* **194**, 823-32 (2001).
45. Golgher, D., Jones, E., Powrie, F., Elliott, T. & Gallimore, A. Depletion of CD25+ regulatory cells uncovers immune responses to shared murine tumor rejection antigens. *Eur J Immunol* **32**, 3267-75 (2002).
46. Ghiringhelli, F. et al. CD4+CD25+ regulatory T cells suppress tumor immunity but are sensitive to cyclophosphamide which allows immunotherapy of established tumors to be curative. *Eur J Immunol* **34**, 336-44 (2004).
47. Somasundaram, R. et al. Inhibition of cytolytic T lymphocyte proliferation by autologous CD4+/CD25+ regulatory T cells in a colorectal carcinoma patient is mediated by transforming growth factor-beta. *Cancer Res* **62**, 5267-72 (2002).
48. Camara, N. O., Sebille, F. & Lechler, R. I. Human CD4+CD25+ regulatory cells have marked and sustained effects on CD8+ T cell activation. *Eur J Immunol* **33**, 3473-83 (2003).
49. Azuma, T., Takahashi, T., Kunisato, A., Kitamura, T. & Hirai, H. Human CD4+ CD25+ regulatory T cells suppress NKT cell functions. *Cancer Res* **63**, 4516-20 (2003).
50. Wolf, A. M. et al. Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. *Clin Cancer Res* **9**, 606-12 (2003).
51. Viguier, M. et al. Foxp3 expressing CD4+CD25(high) regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells. *J Immunol* **173**, 1444-53 (2004).
52. Woo, E. Y. et al. Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res* **61**, 4766-72 (2001).
53. Curiel, T. J. et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* **10**, 942-9 (2004).
54. Wang, H. Y. et al. Tumor-specific human CD4+ regulatory T cells and their ligands: implications for immunotherapy. *Immunity* **20**, 107-18 (2004).
55. Woo, E. Y. et al. Cutting edge: Regulatory T cells from lung cancer patients directly inhibit autologous T cell proliferation. *J Immunol* **168**, 4272-6 (2002).
56. Dieckmann, D., Bruett, C. H., Ploettner, H., Lutz, M. B. & Schuler, G. Human CD4(+)CD25(+) regulatory, contact-dependent T cells induce interleukin 10-producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells [corrected]. *J Exp Med* **196**, 247-53 (2002).
57. Jonuleit, H. et al. Infectious tolerance: human CD25(+) regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4(+) T helper cells. *J Exp Med* **196**, 255-60 (2002).

58. Roncarolo, M. G., Bacchetta, R., Bordignon, C., Narula, S. & Levings, M. K. Type 1 T regulatory cells. *Immunol Rev* **182**, 68-79 (2001).
59. Groux, H. et al. A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* **389**, 737-42 (1997).
60. Chen, Y., Kuchroo, V. K., Inobe, J., Hafler, D. A. & Weiner, H. L. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* **265**, 1237-40 (1994).
61. Jonuleit, H., Schmitt, E., Schuler, G., Knop, J. & Enk, A. H. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4⁺ T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med* **192**, 1213-22 (2000).
62. Wakkach, A. et al. Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. *Immunity* **18**, 605-17 (2003).
63. Monti, P. et al. Tumor-derived MUC1 mucins interact with differentiating monocytes and induce IL-10^{high}IL-12^{low} regulatory dendritic cell. *J Immunol* **172**, 7341-9 (2004).
64. Dhodapkar, M. V. & Steinman, R. M. Antigen-bearing immature dendritic cells induce peptide-specific CD8⁺ regulatory T cells in vivo in humans. *Blood* **100**, 174-7 (2002).
65. North, R. J. The murine antitumor immune response and its therapeutic manipulation. *Adv Immunol* **35**, 89-155 (1984).
66. Berd, D., Maguire, H. C., Jr. & Mastrangelo, M. J. Induction of cell-mediated immunity to autologous melanoma cells and regression of metastases after treatment with a melanoma cell vaccine preceded by cyclophosphamide. *Cancer Res* **46**, 2572-7 (1986).
67. Berd, D., Maguire, H. C., Jr., McCue, P. & Mastrangelo, M. J. Treatment of metastatic melanoma with an autologous tumor-cell vaccine: clinical and immunologic results in 64 patients. *J Clin Oncol* **8**, 1858-67 (1990).
68. Morton, D. L. et al. Polyvalent melanoma vaccine improves survival of patients with metastatic melanoma. *Ann NY Acad Sci* **690**, 120-34 (1993).
69. Mitchell, M. S. Perspective on allogeneic melanoma lysates in active specific immunotherapy. *Semin Oncol* **25**, 623-35 (1998).
70. Bystry, J. C. et al. Immunogenicity of a polyvalent melanoma antigen vaccine in humans. *Cancer* **61**, 1065-70 (1988).
71. Livingston, P. O. et al. Vaccines containing purified GM2 ganglioside elicit GM2 antibodies in melanoma patients. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**, 2911-5 (1987).

72. Hoon, D. S., Foshag, L. J., Nizze, A. S., Bohman, R. & Morton, D. L. Suppressor cell activity in a randomized trial of patients receiving active specific immunotherapy with melanoma cell vaccine and low dosages of cyclophosphamide. *Cancer Res* **50**, 5358-64 (1990).
73. Holtl, L. et al. Allogeneic dendritic cell vaccination against metastatic renal cell carcinoma with or without cyclophosphamide. *Cancer Immunol Immunother* **54**, 663-70 (2005).
74. Siegal, F. P. et al. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood [In Process Citation]. *Science* **284**, 1835-7 (1999).
75. Cella, M. et al. Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by double-stranded RNA. *J Exp Med* **189**, 821-9 (1999).
76. Montoya, M. et al. Type I interferons produced by dendritic cells promote their phenotypic and functional activation. *Blood* **99**, 3263-71 (2002).
77. Sprent, J., Tough, D. F. & Sun, S. Factors controlling the turnover of T memory cells. *Immunol Rev* **156**, 79-85 (1997).
78. Marrack, P., Kappler, J. & Mitchell, T. Type I interferons keep activated T cells alive. *J Exp Med* **189**, 521-30 (1999).
79. Le Bon, A. et al. Type I interferons potentially enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells in vivo. *Immunity* **14**, 461-70 (2001).
80. Proietti, E. et al. Type I IFN as a natural adjuvant for a protective immune response: lessons from the influenza vaccine model. *J Immunol* **169**, 375-83 (2002).
81. Blanco, P., Palucka, A. K., Gill, M., Pascual, V. & Banchereau, J. Induction of dendritic cell differentiation by IFN- α in systemic lupus erythematosus. *Science* **294**, 1540-3 (2001).
82. Bennett, L. et al. Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood. *J Exp Med* **197**, 711-23 (2003).
83. Karaghiosoff, M. et al. Central role for type I interferons and Tyk2 in lipopolysaccharide-induced endotoxin shock. *Nat Immunol* **4**, 471-7 (2003).
84. Woodhall, B., Pickrell, K. L., Georgiade, N. G., Mahaley, M. S. & Dukes, H. T. Effect of hyperthermia upon cancer chemotherapy; application to external cancers of head and face structures. *Ann Surg* **151**, 750-9 (1960).
85. Mattson, D. et al. Heat shock and the activation of AP-1 and inhibition of NF- κ B DNA-binding activity: possible role of intracellular redox status. *Int J Hyperthermia* **20**, 224-33 (2004).
86. Gius, D., Mattson, D., Bradbury, C. M., Smart, D. K. & Spitz, D. R. Thermal stress and the disruption of redox-sensitive signalling and transcription factor activation: possible role in radiosensitization. *Int J Hyperthermia* **20**, 213-23 (2004).
87. Berwin, B. & Nicchitta, C. V. To find the road traveled to tumor immunity: the trafficking itineraries of molecular chaperones in antigen-presenting cells. *Traffic* **2**, 690-7 (2001).
88. Basu, S. & Srivastava, P. K. Heat shock proteins: the fountainhead of innate and adaptive immune responses. *Cell Stress Chaperones* **5**, 443-51 (2000).
89. Frydman, J. Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones. *Annu Rev Biochem* **70**, 603-47 (2001).
90. Srivastava, P. K., Udono, H., Blachere, N. E. & Li, Z. Heat shock proteins transfer peptides during antigen processing and CTL priming. *Immunogenetics* **39**, 93-8 (1994).
91. Srivastava, P. Interaction of heat shock proteins with peptides and antigen presenting cells: Chaperoning of the Innate and Adaptive Immune Responses. *Annu Rev Immunol* **20**, 395-425 (2002).
92. Basu, S., Binder, R. J., Ramalingam, T. & Srivastava, P. K. CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. *Immunity* **14**, 303-13 (2001).
93. Becker, T., Hartl, F. U. & Wieland, F. CD40, an extracellular receptor for binding and uptake of Hsp70-peptide complexes. *J Cell Biol* **158**, 1277-85 (2002).
94. Delneste, Y. et al. Involvement of LOX-1 in dendritic cell-mediated antigen cross-presentation. *Immunity* **17**, 353-62 (2002).
95. Asea, A. et al. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J Biol Chem* **277**, 15028-34 (2002).

<105>

<106>

도면의 간단한 설명

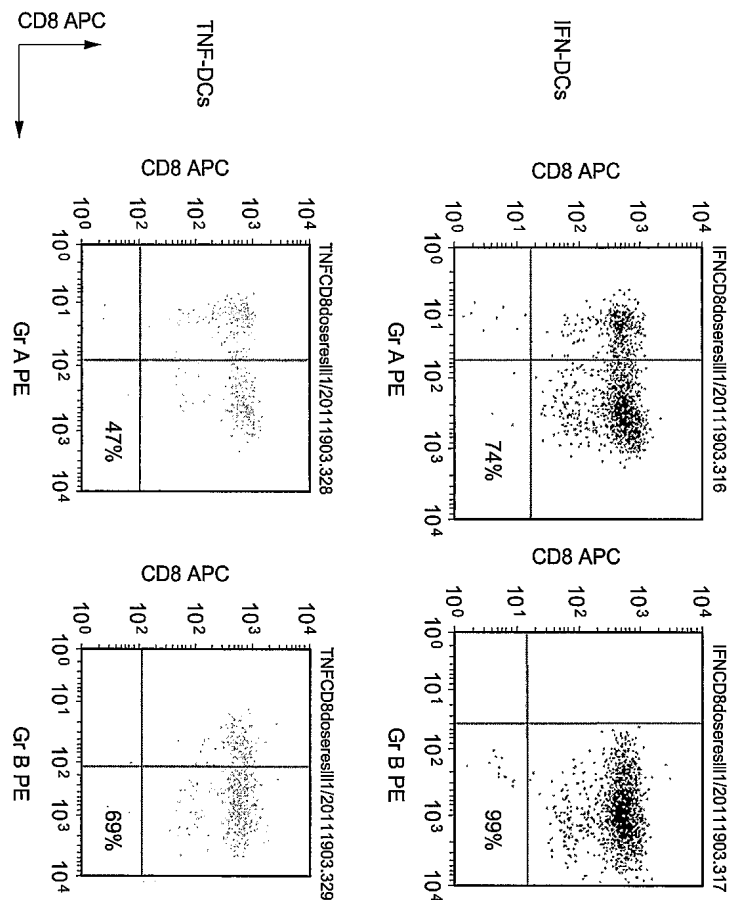
- <20> 본 발명의 특징 및 이점에 대한 보다 완전한 이해를 돕기 위해, 첨부된 도면과 함께 발명의 상세한 설명을 참조한다.
- <21> 도 1은 IFN-DC가 세포용해(cytolytic) $CD8^+$ T 세포를 효과적으로 활성화시킨다는 것을 나타낸다. 미분화 $CD8^+$ T 세포를 IFN-DC(상단) 또는 TNF-DC(하단)와 함께 5일 동안 배양하였다. T 세포를 안티- $CD8$ (종좌표) 및 안티-Granzyme A(좌측) 또는 안티-Granzyme B(우측)로 염색하였다. 이중 포지티브 $CD8^+$ T 세포에 대한 백분율을 나타내었다.
- <22> 도 2는 IFN-DC가 시험관 내에서 성숙 자극에 대해 차별적으로 반응한다는 것을 나타낸다. 지시된 자극에 대해 6시간 동안 노출된 IFN-DC의 상등액으로의 사이토킨 분비에 대한 표준화된 표시. 스케일 0(청색) - 20(적색). 지시된 사이토킨들에 대한 복합적인 사이토킨 비드 분석. Ctrl = 활성화제가 첨가되지 않음.
- <23> 도 3은 IFN-DC가 IL-7을 독특하게 분비한다는 것을 나타낸다. 상세 내역은 도 1에서와 같다. 6시간에서의 IL-7 분비(종좌표, pg/ml). 적색 막대(IFN-DC); 녹색 막대(IL-4 DC).
- <24> 도 4는 IFN-DC가 종양-특이적 CTL을 효과적으로 크로스-프라이밍(cross-prime)한다는 것을 나타낸다. 미분화 $CD8^+$ T 세포를, 사멸된 종양 세포가 로딩된 IL4-DC 및 IFN-DC에 노출시켰다. 2회의 자극 사이클 후에 CTL 기능(종좌표)을 측정하였다.
- <25> 도 5는 IFN-DC가 흑색종에 대한 CTL을 효과적으로 크로스-프라이밍한다는 것을 나타낸다. HLA-A*0201⁺ 미분화 $CD8^+$ T 세포를, 사멸된 Me290 흑색종 세포가 로딩된 IFN-DC와 함께 배양하였다. 배양물을 7일에 한번 부스팅하고, 5일 후 지시된 E:T 비율(횡좌표)에서 Me290 세포로부터의 크롬 방출 유발 능력 및 대조군 K562 세포(종좌표, 특이적 용해)로부터의 크롬 방출 유발 능력에 대해 수거된 T 세포를 평가한다.
- <26> 도 6은 IFN-DC가 흑색종-특이적 CTL을 효과적으로 크로스-프라이밍한다는 것을 나타낸다. 사멸된 흑색종 세포(Me290) 또는 멜라닌세포가 로딩된 IFN-DC를 사용한 배양에서 테트라머(tetramer) 특이적 $CD8^+$ T 세포의 빈도. HIV 테트라머는 네가티브 대조군으로 사용된다. 눈에 띄는 값은 $CD8^+$ T 세포 결합 테트라머의 백분율을 나타낸다.
- <27> 도 7은 흑색종 세포의 열 처리가 HSP를 증가시킨다는 것을 나타낸다. SK Mel28 흑색종 세포를 열처리하고 BA로 사멸시켰다. 세포를 폴리-리신 예비처리된 슬라이드에 올려놓고, 고정시킨 후, 투과시켰다. 일차 안티-HSP70 Ab 처리 후 Texas-Red 접합된 염소 안티-마우스 IgG로 처리하였다. Leica TCS-NT SP 공초점 현미경측정($\times 40$).
- <28> 도 8은 열처리된 흑색종 세포가 증가된 면역원성을 나타낸다는 것을 나타낸다: Me275 세포 및 대조군 K562의 사멸. 로딩되지 않은 DC(CTL 1), 대조군 흑색종 바디(body)가 로딩된 DC(CTL 2) 및 열-쇼크 흑색종 바디가 로딩된 DC(CTL 3). 14일의 프라이밍. ^{51}Cr 방출(종좌표).
- <29> 도 9는 열 처리된 흑색종 세포가 증가된 면역원성을 나타낸다는 것을 나타낸다: 4개의 흑색종 펩타이드(4P; MART-1, gp100, 타이로시나제 및 MAGE-3)의 혼합 또는 대조군 PSA 펩타이드로 펄스처리된 T2 세포의 사멸. 대조군 흑색종 바디가 로딩된 DC(CTL 1) 및 열-쇼크처리된 흑색종 바디가 로딩된 DC(CTL 2). ^{51}Cr 방출(종좌표).
- <30> 도 10은 열처리되고 사멸된 흑색종 세포가 로딩된 DC에 의한 흑색종-특이적 $CD8^+$ T 세포의 프라이밍을 나타낸다. a) 2주 배양 후 테트라머 염색, 및 b) 펩타이드 펄스처리된 DC로의 단독 부스팅 후 테트라머 염색. 도 7 및 본문을 참조한다.
- <31> 도 11은 흑색종 세포의 열 처리가 종양 항원의 전사를 증진시킨다는 것을 나타낸다. 실시간 PCR: 비열처리(cold: non), 열처리 및 열처리+액티노마이신 D 처리된 Me290 흑색종 세포. 표준화된 배수 표현(종좌표).
- <32> 도 12는 사멸된 종양 세포에서 열에 의해 상향-조절된 MAGE A10에 대한 크로스-프라이밍을 나타낸다. DC에 비열처리(cold) 또는 열처리(hot) 사멸된 흑색종 세포, HLA-A*0201⁺ Me290 또는 HLA-A*0201 네가티브 Skmel 28가

로딩된다. 2회의 자극 후, HLA-A*0201⁺ CD8⁺ T 세포를 펩타이드로 펄스처리된 DC로 부스팅한다. MAGE 10 테트라머로 유동 혈구측정 염색. CD3⁺ T 세포를 결합하는 테트라머의 백분율(%). 2개의 연구.

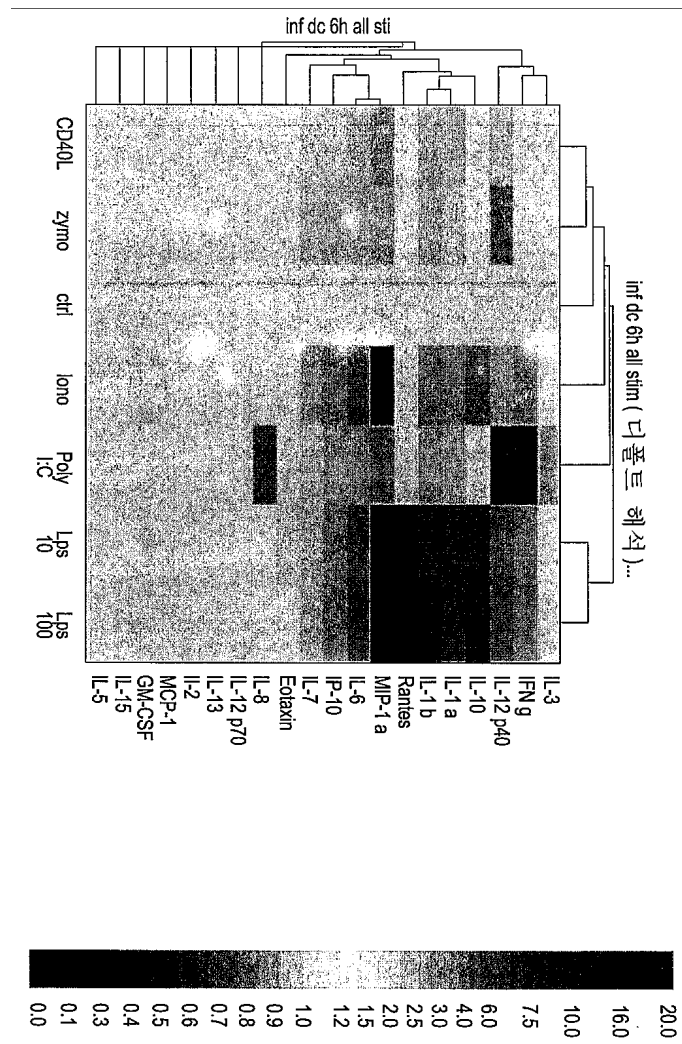
- <33> 도 13은 열처리된 흑색종 바디를 DC에 로딩함으로써 CD8⁺(상단) 및 CD4⁺ T 세포(하단) 모두에 의해 IL-10 분비가 감소하고 IFN 감마 분비가 증가한다는 것을 나타낸다. DC로의 1차 또는 2차 자극 후 지정된 시간에서 상등액의 루미넥스(Luminex) 분석. Ctrl은 비로딩된 DC이다.
- <34> 도 14는 본 발명의 전체적인 백신 제조 공정을 개요하는 흐름도이다.
- <35> 도 15는 본 발명의 백신을 제조하기 위한 상세 단계 및 스케줄을 나타낸다.
- <36> 도 16은 해동 후 냉동 백신의 형태를 나타낸다.
- <37> 도 17은 해동 후 냉동 IFN-DC 백신의 표현형을 나타낸다.
- <38> 도 18은 해동 후 냉동 백신에 의한 사이토킨 분비 프로필을 나타내는 그래프이다.
- <39> 도 19는 냉동 백신에 의한 자가 CD8⁺ T 세포 프라이밍을 나타낸다. MART-1 펩타이드 펄스처리된 냉동/해동 IFN-DC로의 2번의 자극 후 대조군 및 MART-1 특이적 테트라머를 결합하는 CD8⁺ T 세포의 백분율(%).

도면

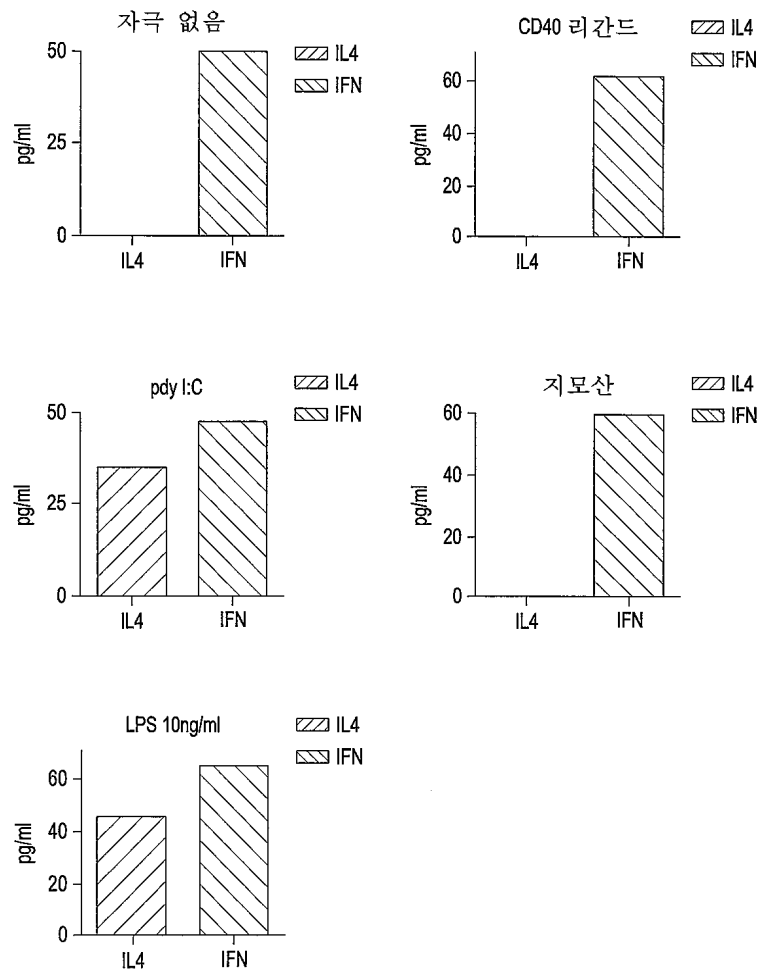
도면1



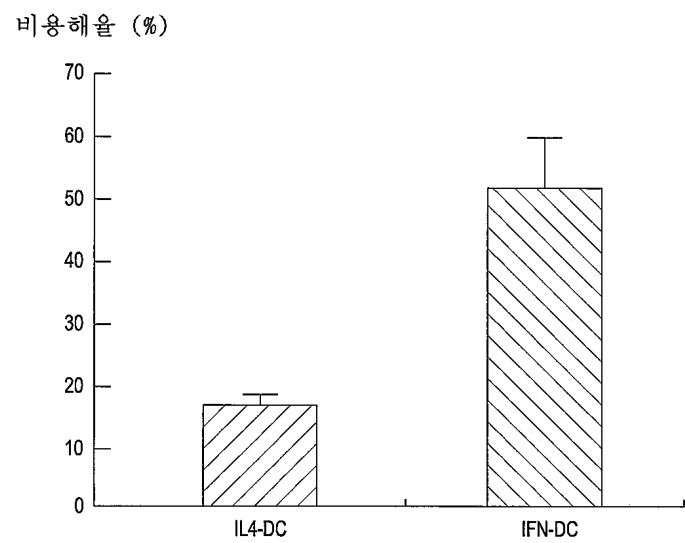
도면2



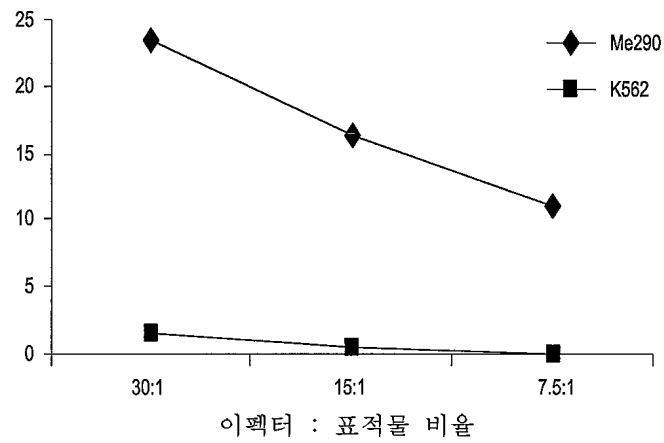
도면3



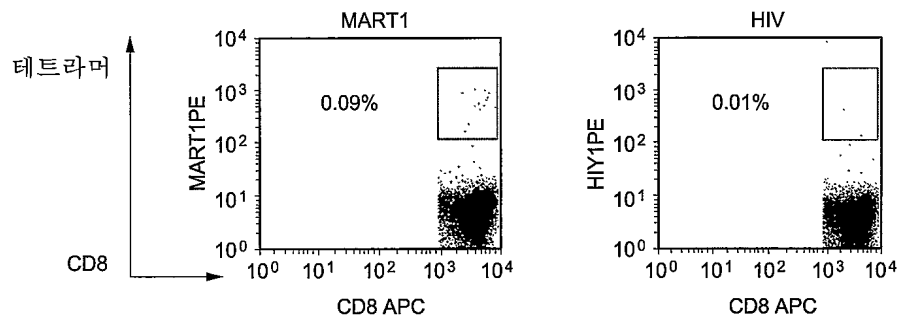
도면4



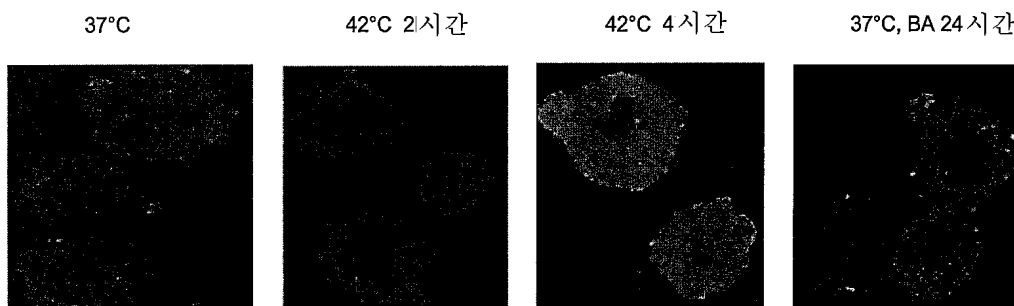
도면5



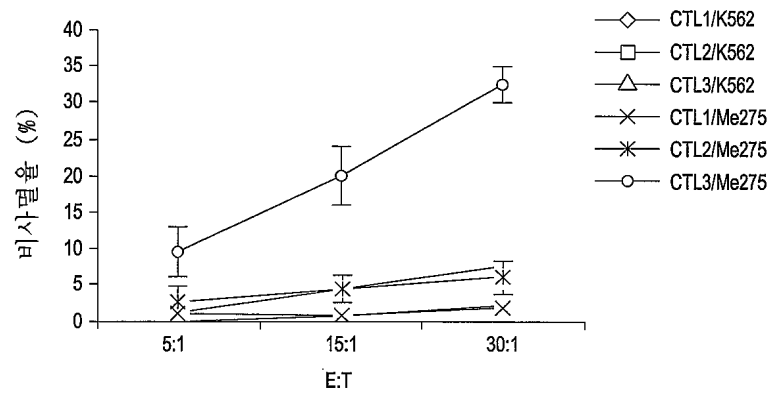
도면6



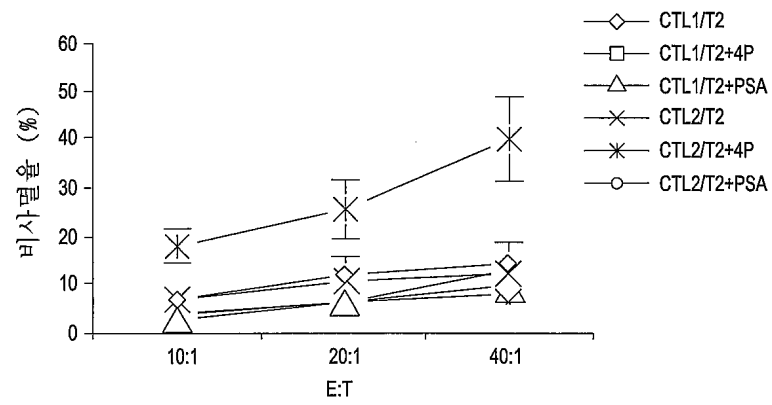
도면7



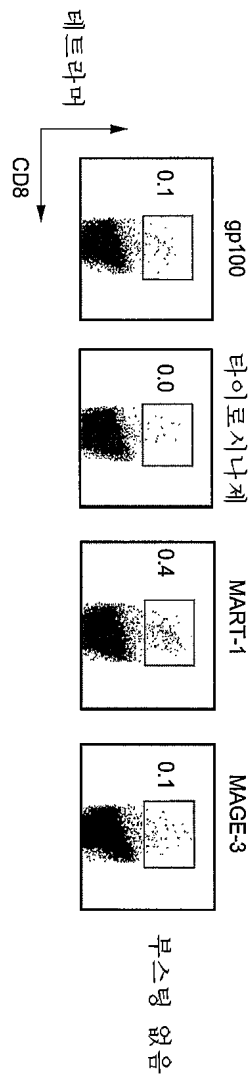
도면8



도면9



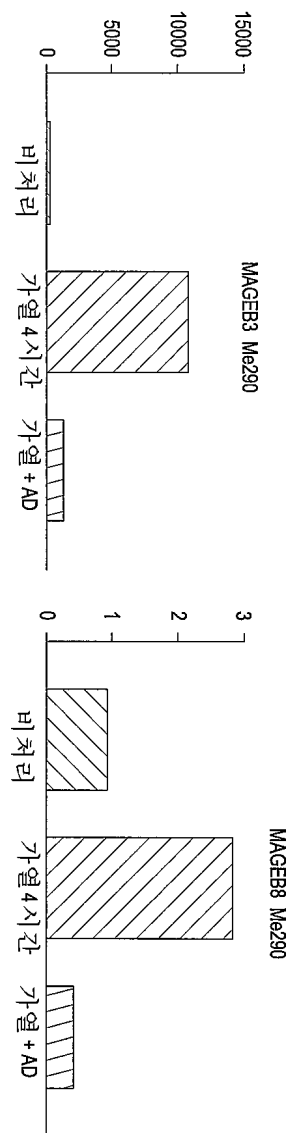
도면10a



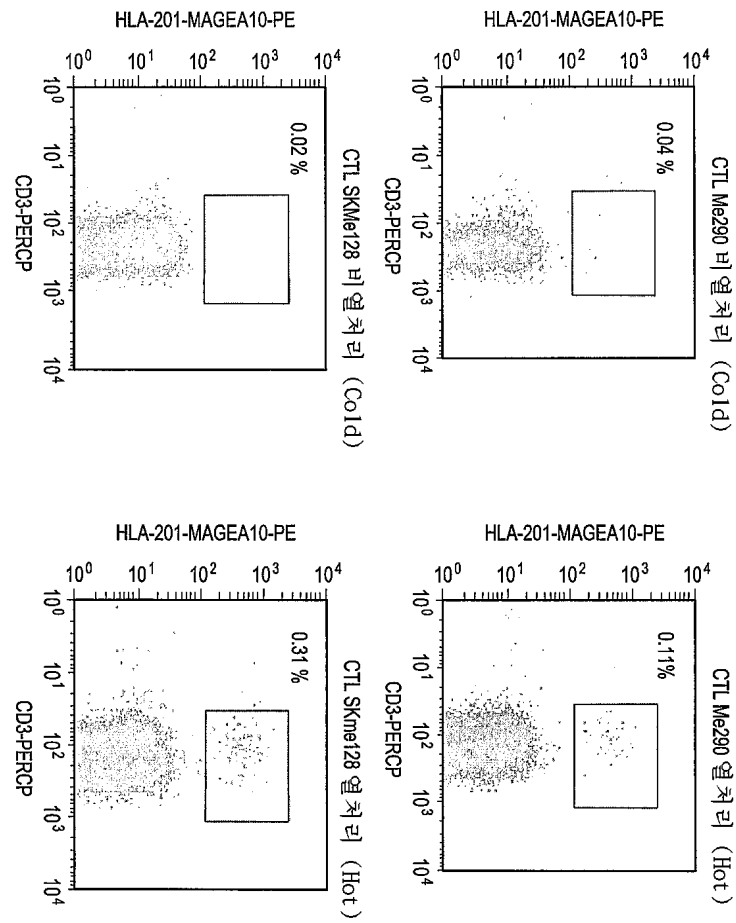
도면10b



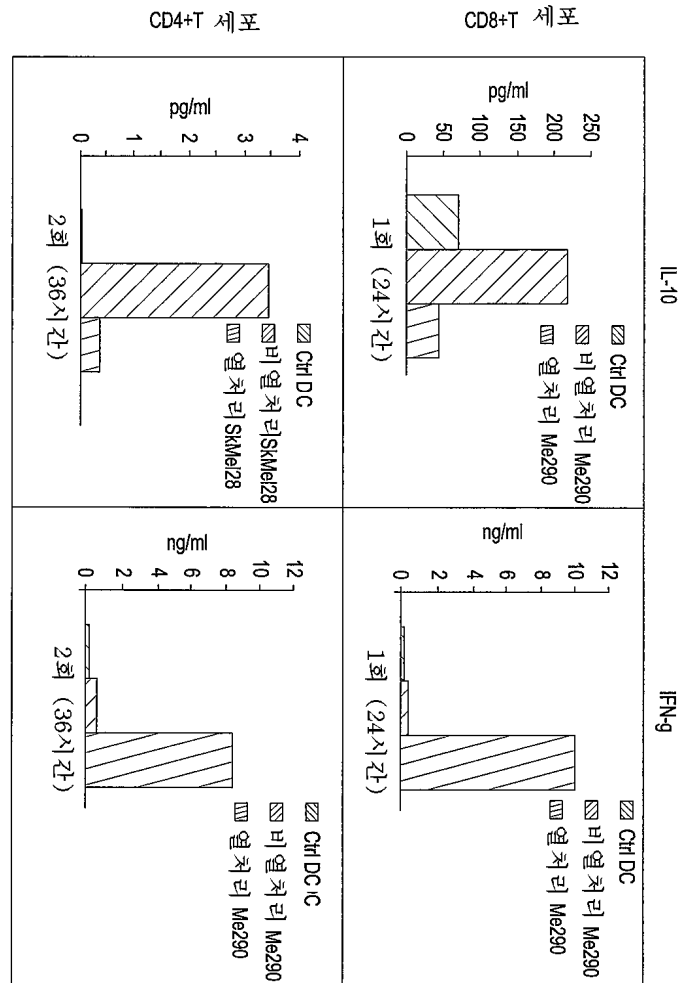
도면11



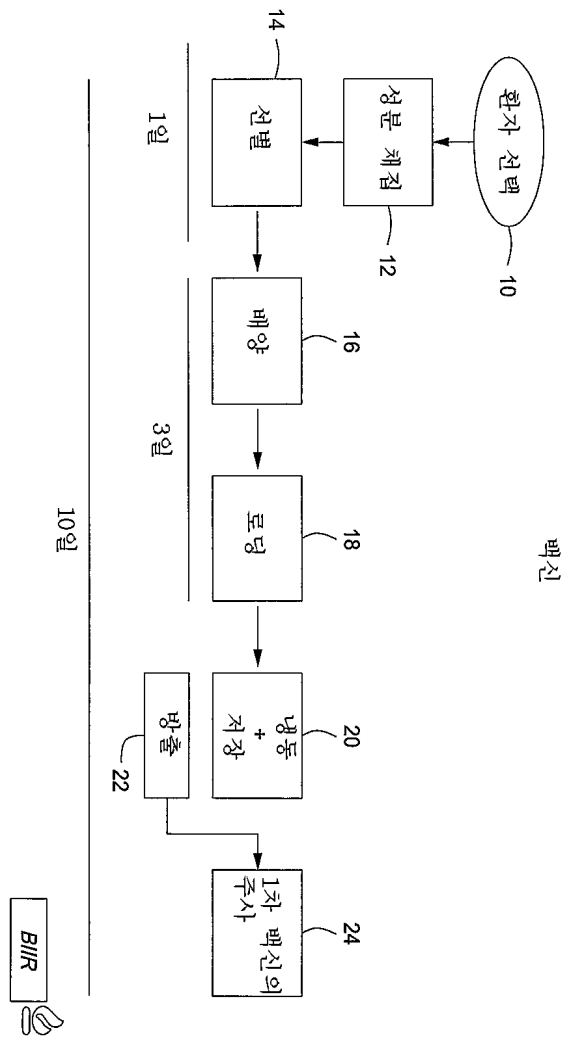
도면12



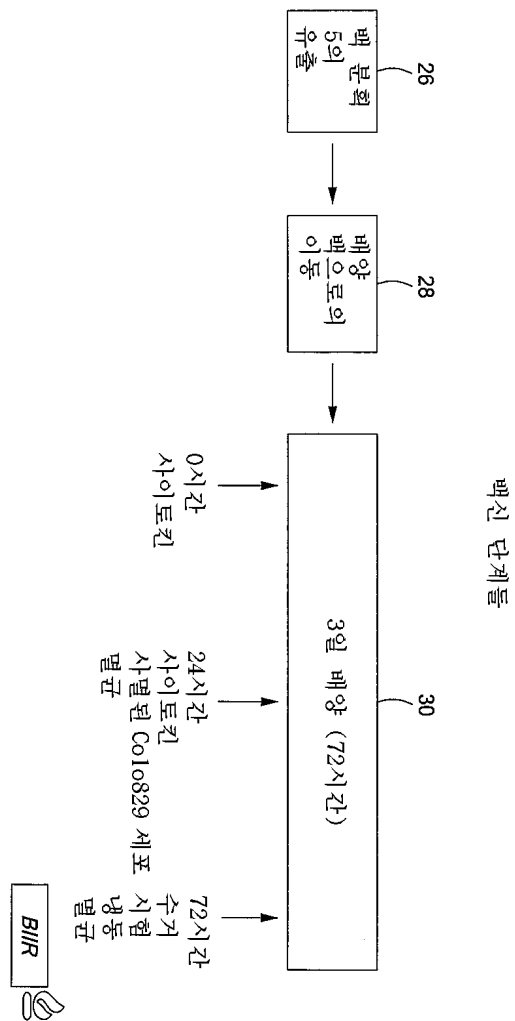
도면13



도면14



도면15



도면16

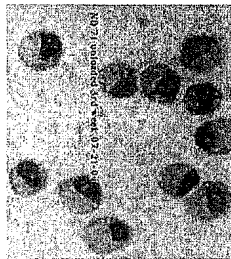
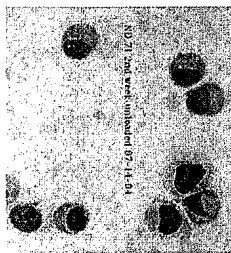
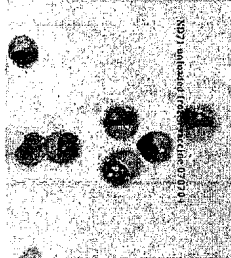
해동 후 냉동 백신의 형태

제1 주

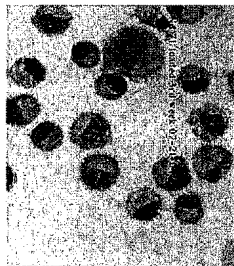
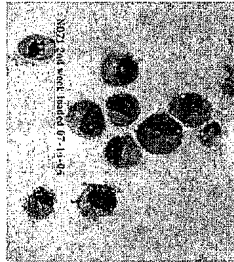
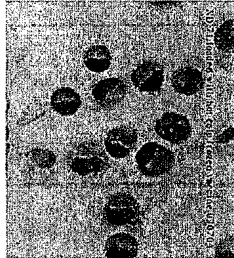
제2 주

제3 주

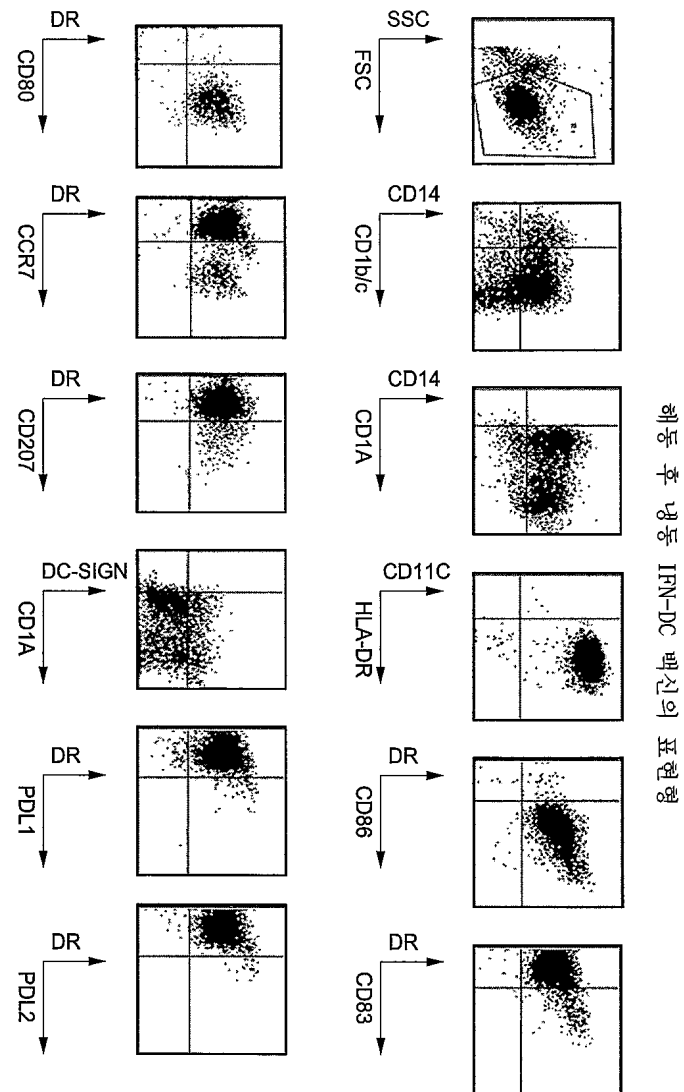
비로딩



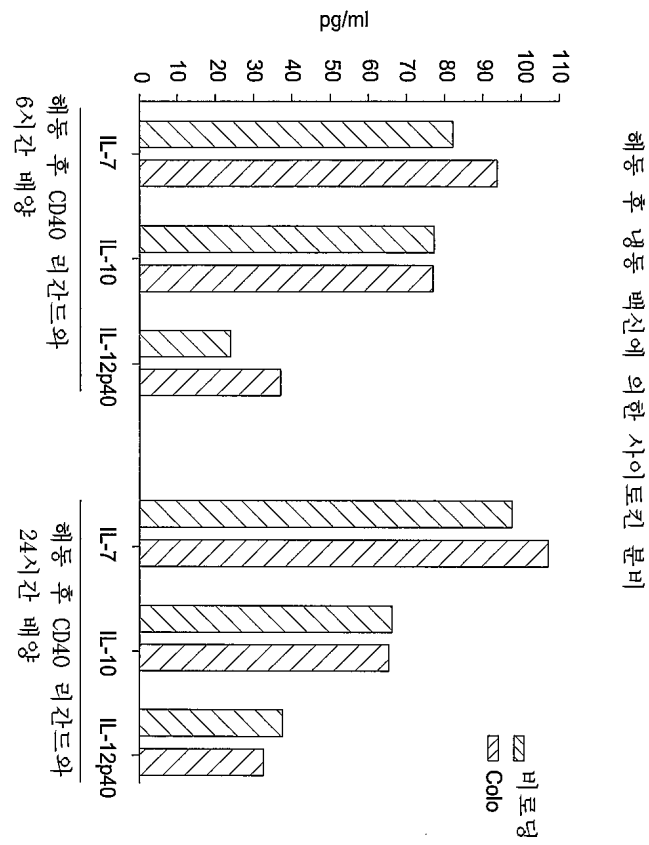
로딩 :
열처리된 Colo
(hot colo)



도면17



도면18



도면19

