



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0122902
(43) 공개일자 2013년11월11일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/17 (2006.01) A61K 38/16 (2006.01)
A61K 38/19 (2006.01) C07K 14/535 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2012-7031065
- (22) 출원일자(국제) 2011년04월27일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2012년11월27일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2011/034139
- (87) 국제공개번호 WO 2011/139769
국제공개일자 2011년11월10일
- (30) 우선권주장
61/328,471 2010년04월27일 미국(US)

- (71) 출원인
더 존스 홉킨스 유니버시티
미국 메릴랜드주 21218 볼티모어 찰스 스트리트
3400 엔.
- (72) 발명자
김영준
경기도 용인시 기흥구 용구대로2469번길 20, 428
호 (보정동, 자이아파트)
팔들, 드루, 엠.
미국 메릴랜드주 20833 브룩빌 제임스 크릭 코트
19400
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
한라특허법인

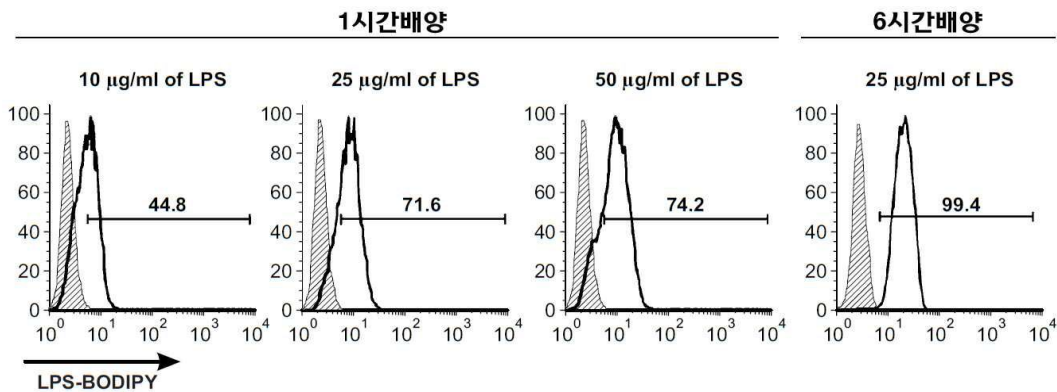
전체 청구항 수 : 총 43 항

(54) 발명의 명칭 **중양 치료용 면역원성 조성물 및 방법**

(57) 요약

본 발명은 하나 이상의 TLR 작용물질과 함께 제형화된 사이토킨(GM-CSF)을 발현하는 중양 세포를 포함하는 면역원성 조성물 및 면역 반응을 유도하거나 증대시키기 위한 상기 조성물의 사용 방법을 제공한다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

드레이크, 찰스, 조지

미국 메릴랜드주 21212 볼티모어 레지스터 에비뉴
323

데이비스, 메간

미국 메릴랜드주 21231 볼티모어 슈트 424 올리언
스 스트리트 1650

푸, 주안

미국 메릴랜드주 21231 볼티모어 슈트 424 올리언
스 스트리트 1650

특허청구의 범위

청구항 1

제조합 면역 자극 사이토킨(cytokine)을 발현하고 하나 이상의 toll형 수용체(toll-like receptor, TLR) 작용물질(agonist)을 포함하는 하나 이상의 증식-무능(proliferation-incompetent) 유전자 변형된 종양 세포(neoplastic cells)를 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,
사이토킨이 과립구-대식세포 콜로니-자극 인자(GM-CSF)인 면역원성 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서,
세포가 필적할만한 양의 하나 이상의 TLR 작용물질 및 GM-CSF를 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서,
TLR 작용물질이 TLR4, TLR5, TLR6, TLR7 또는 TLR8, TLR9 작용물질인 면역원성 조성물.

청구항 5

제 1 항에 있어서,
TLR4 작용물질 및 TLR7/8 작용물질을 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 6

제 5 항에 있어서,
TLR4 작용물질이 LPS, LPS 단편, 또는 합성 글리코피라노실(glycopyranosyl) 지질 A 유사체(analogue)이고, TLR7/8 동족체(analog)가 R848인 면역원성 조성물.

청구항 7

제 1 항에 있어서,
세포가 조사(irradiation)에 의해 증식 무능으로 되는 면역원성 조성물.

청구항 8

제 1 항에 있어서,
종양 세포가 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 전립선암, 두경부, 편평 세포 암종, 설암, 후두암, 편도선암, 하인두암, 비인두암, 유방암, 결장암, 폐암, 흑색종, 췌장암, 교모세포종 및 뇌암으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 면역원성 조성물.

청구항 9

제 1 항에 있어서,
적어도 약 1 ng의 TLR4 작용물질/ 1×10^5 세포 내지 10 ng의 TLR4 작용물질/ 1×10^5 세포를 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 10

제 1 항에 있어서,

적어도 약 3 내지 $5 \text{ ng}/5 \times 10^5$ 세포를 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 11

제 1 항에 있어서,

세포가 리포펙타민(lipofectamine) 또는 다른 리포솜 벡터(liposomal vector)와 함께 TLR 작용물질을 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 12

제 11 항에 있어서,

세포가 LPS/리포솜 미셀(micelle)을 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 13

제 1 항에 있어서,

하나 이상의 종양 항원을 발현하는 세포를 더욱 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 14

제 1 항 내지 제 13 항 중 어느 한 항에 있어서,

세포가 자기조직 또는 동종이계인 면역원성 조성물.

청구항 15

환자에게서 종양을 개선하기 위한 백신으로서, 약학적으로 허용 가능한 부형제 내에, 재조합 면역 자극 사이토 킨을 발현하고 유효량의 외부 틀형 수용체(TLR)를 포함하는 유효량의 증식-무능 종양 세포를 포함하는 백신.

청구항 16

제 15 항에 있어서,

세포가 GM-CSF를 발현하도록 유전자 변형된 백신.

청구항 17

제 15 항에 있어서,

조성물이 TLR4 작용물질 및 TLR7/8 작용물질을 포함하는 백신.

청구항 18

제 17 항에 있어서,

TLR4 작용물질이 LPS, LPS 단편, 또는 합성 글루코피라노실 지질 A 유사체이고, TLR7/8 동족체가 R848인 백신.

청구항 19

제 15 항에 있어서,

세포가 LPS/리포솜 미셀을 포함하는 백신.

청구항 20

제 12 항에 있어서,

하나 이상의 종양 항원을 발현하는 세포를 더욱 포함하는 백신.

청구항 21

제 12 항 내지 제 20 항 중 어느 한 항에 있어서,

세포가 자기조직 또는 동종이계인 백신.

청구항 22

종양이 있거나 또는 종양이 발병할 소인이 있는 환자에게서 종양 세포 항원-특이성 면역 반응을 유도하는 방법으로서, 상기 환자에게서 종양 세포 항원-특이성 면역 반응을 유도하기에 충분한 양으로, 상기 환자에게 유효량의, 재조합 면역 자극 사이토킨을 발현하고 외부 통형 수용체(TLR) 작용물질을 포함하는 하나 이상의 증식-무능 종양 세포를 포함하는 면역원성 조성물을 투여함을 포함하는 방법.

청구항 23

종양이 있거나 또는 종양이 발병할 소인이 있는 환자에게서 종양을 치료하거나 예방하는 방법으로서, 상기 환자에게서 종양 세포 항원-특이성 면역 반응을 유도하기에 충분한 양으로, 상기 환자에게 유효량의 제 1 항 내지 제 21 항 중 어느 한 항의 면역원성 조성물 또는 백신을 투여하여, 상기 환자를 치료함을 포함하는 방법.

청구항 24

종양이 있는 환자에게서 종양 진행 또는 전이를 치료하거나 예방하는 방법으로서, 상기 환자에게 유효량의 제 1 항 내지 제 21 항 중 어느 한 항의 면역원성 조성물 또는 백신을 투여하여, 상기 환자에게서 종양 진행 또는 전이를 치료하거나 예방함을 포함하는 방법.

청구항 25

환자에게서 확립된 종양(established tumor)을 치료하거나 또는 종양 형성을 예방하는 방법으로서, 상기 환자에게 유효량의 제 1 항 내지 제 21 항 중 어느 한 항의 면역원성 조성물 또는 백신을 투여하여, 상기 환자에게서 확립된 종양을 치료하거나 종양 형성을 예방함을 포함하는 방법.

청구항 26

미소 전이(micrometastasis) 또는 후유증이 있는 환자에게서 상기 미소 전이 또는 후유증을 치료하는 방법으로서, 상기 환자에게 유효량의 제 1 항 내지 제 21 항 중 어느 한 항의 면역원성 조성물 또는 백신을 투여하여, 상기 환자에게서 미소 전이 또는 후유증을 치료함을 포함하는 방법.

청구항 27

환자의 면역 방법으로서, 상기 환자에게 제 1 항 내지 제 21 항 중 어느 한 항의 면역원성 조성물 또는 백신을 투여함을 포함하는 방법.

청구항 28

제 14 항 내지 제 27 항 중 어느 한 항에 있어서,
종양 세포가 암 세포주로부터 유래하거나 또는 종양으로부터 유래하는 방법.

청구항 29

제 17 항에 있어서,
암 세포주 또는 종양이 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 전립선암, 두경부, 편평 세포 암종, 설암, 후두암, 편도선암, 하인두암, 비인두암, 유방암, 결장암, 폐암, 흑색종, 췌장암, 교모세포종 및 뇌암으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 방법.

청구항 30

제 14 항 내지 제 16 항 중 어느 한 항에 있어서,
면역원성 조성물을 전신으로 또는 국소로 투여하는 방법.

청구항 31

제 19 항에 있어서,

면역원성 조성물을 근육 내 주사, 정맥 내 주사, 종양 내 주사, 또는 종양 주변 주사에 의해 투여하는 방법.

청구항 32

제 8 항 또는 제 9 항에 있어서,

환자에게 유효량의 하나 이상의 화학요법제를 투여함을 또한 포함하는 방법.

청구항 33

제 12 항에 있어서,

하나 이상의 화학요법제가 아비라테론 아세테이트, 알트레타민, 무수빈블라스틴, 아우리스타틴, 벡사로텐, 바이칼루타미드, BMS184476, 2,3,4,5,6-펜타플루오로-N-(3-플루오로-4-메톡시페닐)벤젠 설펜아미드, 블레오마이신, N,N-다이메틸-L-발릴-L-발릴-N-메틸-L-발릴-L-프롤릴-L-프롤린-t-부틸아미드, 카키펀, 세마도틴, 클로람부실, 사이클로포스파미드, 3',4'-다이데하이드로-4'-데옥시-8'-노르빈-칼류코블라스틴, 도세탁셀, 도세탁셀, 사이클로포스파미드, 카보플라틴, 칼머스틴(BCNU), 시스플라틴, 크립토피신, 사이클로포스파미드, 시타라빈, 다카바진(DTIC), 닥티노마이신, 다우노루비신, 데시타빈 돌라스타틴, 독소루비신(아드리아마이신), 에토포시드, 5-플루오로유라실, 피나스테라이드, 플루타미드, 하이드록시유레아 및 하이드록시유레아탁산, 이포스파미드, 리아로졸, 로니다민, 로머스틴(CCNU), MDV3100, 메클로레타민(질소 머스타드), 멜팔란, 미보블린 이세티오네이트, 리족신, 세르테네프, 스트렙토조신, 미토마이신, 메토크렉세이트, 탁산, 닐루타미드, 오나프리스톤, 패클리탁셀, 프레드니머스틴, 프로카바진, RPR109881, 스트라머스틴 포스페이트, 타목시펜, 타소네르민, 탁솔, 트레티노인, 빈블라스틴, 빈크리스틴, 빈데신 설펜아미드, 및 빈플루닌으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 방법.

청구항 34

제 12 항 내지 제 31 항 중 어느 한 항에 있어서,

GVAX 단독 사용에 비해 수지상 세포의 활성화를 증대시키고/시키거나 AH1-특이성 세포독성 T-세포 또는 p15E-특이성 세포독성 T-세포의 수를 증가시키는 방법.

청구항 35

제 12 항 내지 제 31 항 중 어느 한 항에 있어서,

GVAX 단독 사용에 비해 종양 세포 증식, 종양 성장, 또는 환자 생존을 감소시키거나 안정화시키는 방법.

청구항 36

GM-CSF를 암호화하는 발현 벡터 및 하나 이상의 TLR 작용물질을 포함하는 증식-무능 종양 세포.

청구항 37

제 34 항에 있어서,

백혈병, 만성 골수성 백혈병, 전립선암, 두경부, 편평 세포 암종, 설암, 후두암, 편도선암, 하인두암, 비인두암, 유방암, 결장암, 폐암, 흑색종, 췌장암, 교모세포종 및 뇌암, 또는 이들의 세포주로부터 유래하는 종양 세포.

청구항 38

제 34 항에 있어서,

TLR4 및 TLR7/8 작용물질을 포함하는 종양 세포.

청구항 39

제 34 항에 있어서,

TLR 작용물질이 리포솜 벡터와 함께 존재하는 종양 세포.

청구항 40

유효량의 제 1 항 내지 제 21 항 중 어느 한 항의 면역원성 조성물 또는 백신 및 약학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는 종양 치료용 약학 조성물.

청구항 41

종양 치료용 키트로서, 유효량의 제 1 항 내지 제 21 항 중 어느 한 항의 면역원성 조성물 또는 백신 및 제 22 항 내지 제 33 항 중 어느 한 항의 방법에서 상기 키트를 사용하기 위한 설명서를 포함하는 키트.

청구항 42

환자에게서 경부 암을 치료하거나 예방하는 방법으로서, 상기 환자에게 유효량의 제 1 항 내지 제 21 항 중 어느 한 항의 면역원성 조성물 또는 백신을 투여하여, 상기 환자에게서 경부 암을 치료하거나 예방함을 포함하는 방법.

청구항 43

환자에게서 다형성 TLR 결핍증을 치료하는 방법으로서, 상기 환자에게 유효량의 제 1 항 내지 제 21 항 중 어느 한 항의 면역원성 조성물 또는 백신을 투여하여, 상기 환자에게서 상기 다형성 TLR 결핍증을 치료함을 포함하는 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 일반적으로 하나 이상의 TLR 작용물질과 함께 제형화된 사이토킨(GM-CSF)을 발현하는 종양 세포를 포함하는 면역원성 조성물 및 면역 반응을 유도하거나 증대시키기 위한 상기 조성물의 사용 방법을 제공한다.

배경기술

[0002] **관련 출원에 대한 상호참조**

[0003] 본 출원은 2010년 4월 27일자로 출원된 하기 미국 가 출원 제 61/328,471 호의 이점을 청구하며, 상기 출원의 내용 전체는 본 발명에 참고로 인용된다.

[0004] **연방 지원 연구 하에서 수행된 발명에 대한 권리의 진술**

[0005] 본 연구는 국립 보건원으로부터의 하기 허가(허가 번호: NIH K23-DE018464-02)에 의해 지원되었다. 정부는 본 발명에 대해 일정한 권리를 갖는다.

[0006] **발명의 배경**

[0007] GM-CSF(GVAX)를 분비하도록 조작된, 치명적으로 조사된 종양 세포 백신은 흑색종, 신장 세포, 전립선 및 비-소 세포 폐, 췌장뿐만 아니라 두경부 편평세포 암종의 다양한 모델들에서 유망한 효능을 나타내었으나, 다수의 면역학적 검사점 봉쇄로 인해, GVAX는 단독요법으로서, 진행된 질병에서는 임상적으로 유효하지 않은 듯하다. GVAX는 최근에, 진행된 호르몬 난치성 전립선암에 대한 III 기 시험에서 불명확한 효능을 갖는 것으로 밝혀졌다. 상기 종양에 의한 면역 탈출의 중대한 기전을 극복하지 못함은, 주로 종양-특이성 숙주 면역 반응을 자극하도록 고안된 과거의 면역요법적 전략의 큰 한계였다. 종양-억제 면역 반응을 감소시키기 위한 다수의 정의된 기전들 가운데, 조절 T-세포(Treg), 골수 유래 억제제 세포, 및 내성화 수지상 세포(DC)가 성공적인 면역요법을 막을 수 있는 음의 조절 인자로서 가정되었다. 이러한 면역 탈출 검사점 경로 중 일부로부터의 한 가지 하위 결과는 면역계의 유입 가지 중의 활성화된 항원 제공 세포(APC)의 제한된 수이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 상기 종양 세포에 의한 면역 탈출의 증대한 기전을 극복할 수 있는 개선된 종양 세포 백신이 필요하다.

과제의 해결 수단

[0009] 발명의 요약

[0010] 하기에 개시하는 바와 같이, 본 발명은 일반적으로 하나 이상의 TLR 작용물질과 함께 제형화된 사이토킨(GM-CSF)을 발현하는 종양 세포를 포함하는 면역원성 조성물 및 면역 반응을 유도하거나 증대시키기 위한 상기 조성물의 사용 방법을 특징으로 한다.

[0011] 하나의 태양에서, 본 발명은 일반적으로 재조합 면역 자극 사이토킨을 발현하는 하나 이상의 증식-무능(incompetent) 유전자 변형된 종양 세포 및 하나 이상의 toll형 수용체(TLR) 작용물질을 함유하는 면역원성 조성물을 특징으로 한다.

[0012] 또 다른 태양에서, 본 발명은 일반적으로 환자에게서 종양을 개선하기 위한 백신을 특징으로 하며, 상기 백신은 약학적으로 허용 가능한 부형제 중의 유효량의 재조합 면역 자극 사이토킨을 발현하는 증식-무능 종양 세포 및 유효량의 외부 toll형 수용체(TLR) 작용물질을 함유한다.

[0013] 더욱 또 다른 태양에서, 본 발명은 일반적으로 종양이 있거나 또는 종양이 발병할 소인이 있는 환자에게서 종양 세포 항원-특이성 면역 반응을 유도하는 방법을 특징으로 하며, 상기 방법은 상기 환자에게서 종양 세포 항원-특이성 면역 반응을 유도하기에 충분한 양으로, 상기 환자에게 유효량의, 재조합 면역 자극 사이토킨을 발현하고 외부 toll형 수용체(TLR) 작용물질을 포함하는 하나 이상의 증식-무능 종양 세포를 함유하는 면역원성 조성물을 투여함을 포함한다.

[0014] 추가의 태양에서, 본 발명은 일반적으로 GM-CSF를 암호화하는 발현 벡터 및 하나 이상의 TLR 작용물질을 포함하는 증식-무능 종양 세포를 특징으로 한다.

[0015] 더욱 또 다른 태양에서, 본 발명은 일반적으로 종양이 있거나 또는 종양이 발병할 소인이 있는 환자에게서 종양을 치료하거나 예방하는 방법을 특징으로 하며, 상기 방법은 상기 환자에게서 종양 세포 항원-특이성 면역 반응을 유도하기에 충분한 양으로, 상기 환자에게 유효량의 본 발명에 개시된 면역원성 조성물 또는 백신을 투여하여, 상기 환자를 치료함을 포함한다.

[0016] 더욱 또 다른 태양에서, 본 발명은 일반적으로 종양이 있는 환자에게서 종양 진행 또는 전이를 치료하거나 예방하는 방법을 특징으로 하며, 상기 방법은 상기 환자에게 유효량의 본 발명에 개시된 면역원성 조성물 또는 백신 중 어느 하나를 투여하여, 상기 환자에게서 종양 진행 또는 전이를 치료하거나 예방함을 포함한다.

[0017] 더욱 또 다른 태양에서, 본 발명은 일반적으로 환자에게서 확립된 종양을 치료하거나 또는 종양 형성을 예방하는 방법을 특징으로 하며, 상기 방법은 상기 환자에게 유효량의 본 발명에 개시된 면역원성 조성물 또는 백신 중 어느 하나를 투여하여, 상기 환자에게서 확립된 종양을 치료하거나 종양 형성을 예방함을 포함한다.

[0018] 더욱 또 다른 태양에서, 본 발명은 일반적으로 미소 전이 또는 후유증이 있는 환자에게서 상기 미소 전이 또는 후유증을 치료하는 방법을 특징으로 하며, 상기 방법은 상기 환자에게 유효량의 본 발명에 개시된 면역원성 조성물 또는 백신 중 어느 하나를 투여하여, 상기 환자에게서 미소 전이 또는 후유증을 치료함을 포함한다.

[0019] 더욱 또 다른 태양에서, 본 발명은 일반적으로 환자의 면역 방법을 특징으로 하며, 상기 방법은 상기 환자에게 본 발명에 개시된 면역원성 조성물 또는 백신 중 어느 하나를 투여함을 포함한다.

[0020] 더욱 또 다른 태양에서, 본 발명은 일반적으로 유효량의 본 발명에 개시된 면역원성 조성물 또는 백신 중 어느 하나 및 약학적으로 허용 가능한 부형제를 함유하는 종양 치료용 약학 조성물을 특징으로 한다.

[0021] 더욱 또 다른 태양에서, 본 발명은 일반적으로 종양 치료용 키트를 특징으로 하며, 상기 키트는 유효량의 본 발명에 개시된 면역원성 조성물 또는 백신 중 어느 하나, 및 본 발명에 개시된 방법들 중 어느 하나에서와 같이 상기 키트를 사용하기 위한 설명서를 함유한다.

[0022] 더욱 또 다른 태양에서, 본 발명은 일반적으로 환자에게서 경부 암을 치료하거나 예방하는 방법을 특징으로 하며, 상기 방법은 상기 환자에게 유효량의 본 발명에 개시된 면역원성 조성물 또는 백신 중 어느 하나를 투여하

여, 상기 환자에게서 경부 암을 치료하거나 예방함을 포함한다.

[0023] 더욱 또 다른 태양에서, 본 발명은 일반적으로 환자에게서 다형성 TLR 결핍증을 치료하는 방법을 특징으로 하며, 상기 방법은 상기 환자에게 유효량의 본 발명에 개시된 면역원성 조성물 또는 백신 중 어느 하나를 투여하여, 상기 환자에게서 상기 다형성 TLR 결핍증을 치료함을 포함한다.

[0024] 본 원에 묘사된 본 발명의 상기 태양들 중 어느 하나 또는 임의의 다른 태양의 다양한 실시태양들에서, 사이토킨은 과립구-대식세포 콜로니-자극 인자(GM-CSF)이다. 또 다른 실시태양에서, 상기 세포는 필적할만한 양의 하나 이상의 TLR 작용물질 및 GM-CSF를 함유한다. 추가의 실시태양에서, 상기 TLR 작용물질은 TLR4, TLR5, TLR6, TLR7 또는 TLR8, TLR9 작용물질이다. 더욱 또 다른 실시태양에서 상기 면역원성 조성물은 TLR4 작용물질 및 TLR7/8 작용물질을 함유한다. 또 다른 실시태양에서 상기 TLR4 작용물질은 LPS, LPS 단편, 또는 합성 글루코피라노실 지질 A 유사 화합물이고 TLR7/8 동족체는 R848이다. 다른 실시태양에서 상기 세포는 조사(irradiation)에 의해 증식 무능으로 된다. 몇몇 실시태양에서 상기 종양 세포를 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 전립선암, 두경부, 편평 세포 암종, 설암, 후두암, 편도선암, 하인두암, 비인두암, 유방암, 결장암, 폐암, 흑색종, 췌장암, 교모세포종 및 뇌암으로 이루어진 그룹 중에서 선택한다. 다른 실시태양에서 상기 조성물은 적어도 약 1 ng의 TLR4 작용물질/1 x 10⁵ 세포 내지 10 ng의 TLR4 작용물질/1 x 10⁵ 세포를 포함한다. 추가의 실시태양에서 상기 조성물은 적어도 약 3 내지 5 ng/5 x 10⁵ 세포를 함유한다. 또 다른 실시태양에서 상기 세포는 리포펙타민 또는 다른 리포솜 벡터와 함께 TLR 작용물질을 함유한다. 추가의 실시태양에서 상기 세포는 LPS/리포솜 미셀을 함유한다. 다른 실시태양에서 상기 면역원성 조성물은 하나 이상의 종양 항원을 발현하는 세포를 함유한다. 추가의 실시태양에서 상기 면역원성 조성물은 자기조직 또는 동종이계인 세포를 함유한다.

[0025] 본 원에 묘사된 본 발명의 상기 태양들 중 어느 하나 또는 임의의 다른 태양의 다양한 실시태양들에서, 상기 종양 세포는 암 세포주로부터 유래하거나 또는 종양으로부터 유래한다. 또 다른 실시태양에서 상기 암 세포주 또는 종양은 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 전립선암, 두경부, 편평 세포 암종, 설암, 후두암, 편도선암, 하인두암, 비인두암, 유방암, 결장암, 폐암, 흑색종, 췌장암, 교모세포종 및 뇌암으로 이루어진 그룹 중에서 선택된다. 또 다른 실시태양에서 상기 면역원성 조성물을 전신으로 또는 경구로 투여한다. 추가의 실시태양에서 상기 면역원성 조성물을 근육 내 주사, 정맥 내 주사, 종양 내 주사, 또는 종양 주변 주사에 의해 투여한다. 추가의 실시태양에서 상기 방법은 상기 환자에게 유효량의 하나 이상의 화학요법제를 투여함을 포함한다. 몇몇 실시태양에서 상기 하나 이상의 화학요법제는 아비라테론 아세테이트, 알트레타민, 무수빈블라스틴, 아우리스타틴, 백사로텐, 바이칼루타미드, BMS184476, 2,3,4,5,6-펜타플루오로-N-(3-플루오로-4-메톡시페닐)벤젠 설펜아미드, 블레오마이신, N,N-다이메틸-L-발릴-L-발릴-N-메틸-L-발릴-L-프롤릴-L-프롤린-t-부틸아미드, 카렉틴, 세마도틴, 클로람부실, 사이클로포스파미드, 3',4'-다이데하이드로-4'-테옥시-8'-노르빈-칼류코블라스틴, 도세탁셀, 도세탁셀, 사이클로포스파미드, 카보플라틴, 칼머스틴(BCNU), 시스플라틴, 크립토펜, 사이클로포스파미드, 시타라빈, 다카바진(DTIC), 닥티노마이신, 다우노루비신, 데시타빈 돌라스타틴, 독소루비신(아드리아마이신), 에토포시드, 5-플루오로유라실, 피나스테라이드, 플루타미드, 하이드록시유레아 및 하이드록시유레아탁산, 이포스파미드, 리아로졸, 로니다민, 로머스틴(CCNU), MDV3100, 메클로레타민(질소 머스타드), 멜팔란, 미보블린 이세티오네이트, 리족신, 세르테네프, 스트렙토조신, 미토마이신, 메토틱세이트, 탁산, 닐루타미드, 오나프리스톤, 페클리탁셀, 프레드니머스틴, 프로카바진, RPR109881, 스트라머스틴 포스페이트, 타목시펜, 타소네르민, 탁셀, 트레티노인, 빈블라스틴, 빈크리스틴, 빈데신 설펜아미드, 및 빈플루닌으로부터 선택된다. 추가의 실시태양에서 상기 방법들은 GVAX 단독 사용에 비해 수지상 세포의 활성화를 증대시키고/시키거나 AH1-특이성 세포독성 T-세포 또는 p15E-특이성 세포독성 T-세포의 수를 증가시킨다. 몇몇 실시태양에서 상기 방법은 GVAX 단독 사용에 비해 종양 세포 증식, 종양 성장, 또는 환자 생존을 감소시키거나 안정화시킨다. 추가의 실시태양에서 상기 세포는 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 전립선암, 두경부, 편평 세포 암종, 설암, 후두암, 편도선암, 하인두암, 비인두암, 유방암, 결장암, 폐암, 흑색종, 췌장암, 교모세포종 및 뇌암, 또는 이들의 세포주로부터 유래한다. 추가의 실시태양에서 상기 세포는 TLR4 및 TLR7/8 작용물질을 포함한다. 다른 실시태양에서 상기 TLR 작용물질은 리포솜 벡터와 함께 존재한다.

[0026] 정의

[0027] "사이토킨"은 국소적으로 작용하고 개인의 면역 반응을 조절하는 호르몬을 의미한다.

[0028] "유전자 변형된 종양 세포"는 트랜스유전자를 발현하도록 유전자 변형되고 암 치료의 일부로서 환자에게 투여되는 세포 또는 세포 집단을 의미한다. 본 발명의 면역원성 조성물 또는 백신은 치료 중인 환자에게 "자기조직" 또는 "동종이계"인 종양(예를 들어 신생물) 세포, 또는 상기 환자로부터 취한 종양 세포와 혼합된 "방관자

세포"를 포함한다. 일반적으로, 상기 유전자 변형된 종양 세포는 상기 환자를 괴롭히는 종양 세포와 동일한 일 반형을 갖는다. 예를 들어, 흑색종을 앓고 있는 환자는 전형적으로 흑색종으로부터 유래한 유전자 변형된 세포 를 투여받을 것이다. GM-CSF-발현 유전자 변형된 종양 세포 백신을 본 발명에서는 "GVAX"라 칭할 수 있다. 사 이토킨, 예를 들어 GM-CSF를 발현하도록 유전자 변형된 다음, 암 치료를 위해 환자에게 재투여되는 자기조직 및 동종이계 암 세포가 미국 특허 제 5,637,483, 5,904,920, 6,277,368 및 6,350,445 호뿐만 아니라 미국 특허 공 보 제 20100150946 호에 개시되어 있으며, 이들 특허는 본 발명에 참고로 명백히 인용되어 있다. 췌장암의 치 료를 위한 GM-CSF-발현 유전자 변형된 암 세포 또는 "사이토킨-발현 세포 백신"의 한 형태가 미국 특허 제 6,033,674 호 및 5,985,290 호에 개시되어 있으며, 이들 두 특허는 모두 본 발명에 참고로 명백히 인용되어 있 다. 보편적인 면역조절 사이토킨-발현 방관자 세포주가 본 발명에 참고로 명백히 인용된 미국 특허 제 6,464,973 호에 개시되어 있다.

[0029] "과립구-대식세포 콜로니 자극 인자(GM-CSF) 폴리펩타이드"는 면역조절 활성을 갖고 진뱅크(GenBank) 수납 번호 AAA52122.1과 약 85% 이상의 아미노산 서열 일치성을 갖는 사이토킨 또는 그의 단편을 의미한다.

[0030] 전형적인 GM-CSF 서열(NCBI AAA52122.1)을 하기에 제공한다:

[0031] 1 mwlqslilllg tvaccisapa rpspsstqpw ehvniqear rllnlsrdta aemnetvevi

[0032] 61 semfdlqept clqtrlelyk qglrgsltkl kgpltmash ykqhcptpe tscatqiitf

[0033] 121 esfkenlkdf llvipdcwe pvqe

[0034] GM-CSF는 과립구 및 대식세포 계통의 조혈 세포의 성장을 유도하는 것으로 입증되었다. 또한, 상기는 면역계의 주요 항원 제공 세포(APC)인 수지상 세포의 항원 처리 및 제공 기능을 또한 활성화한다. 하나의 실시태양에서, 면역원성 조성물은 상기 백신의 세포에서의 발현을 위해 조절 요소에 작동적으로 결합된 GM-CSF 암호화 서열을 포함한다.

[0035] "GM-CSF 핵산 분자"는 GM-CSF 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 의미한다.

[0036] GM-CSF 핵산 분자는 쥐 또는 인간 GM-CSF를 암호화할 수 있으며 게놈 DNA(본 발명에 내용 전체가 참고로 인용된 미국 특허 공보 제 2006/0057127 호를 참조하시오) 또는 cDNA(본 발명에 내용 전체가 참고로 인용된 미국 특허 공보 제 2006/0057127 호를 참조하시오)의 형태로 존재할 수 있다. 하나의 실시태양에서, 상기 GM-CSF 암호화 서열은 본 발명에 내용 전체가 참고로 인용된 미국 특허 공보 제 2006/0057127 호에 개시된 아미노산 서열을 암호화한다. GM-CSF 암호화 서열의 다른 예들이 진뱅크 수납 번호: AF373868, AC034228, AC034216, M 10663 및 NM000758에서 발견된다.

[0037] 예시적인 GM-CSF 암호화 서열(AF373868)을 하기에 제공한다:

[0038] 1 gcagtctgtt tectaccaga ctgggagcct caagggccaa atgtgagggc cagtggggagg

[0039] 61 gtcccgttta cctcccaga acaggtcctg gtgtggattg gaaagacttg ttgactgact

[0040] 121 gtctgagcta tgacaactca tttctaggag gaaagtgacc ttctctccca gatgggtcat

[0041] 181 acaggctctc tgctcctg gccatcagct gaaccactat ctatggctcc ctccctgccc

[0042] 241 ctccagcctc cagggtgcta tccaacacat gtgatctcta catgtagtat ccatgtcctc

[0043] 301 atctctcccc cgagagctcc ctggaaagag ctgagccaag gccttgcaaa aaaggtggag

[0044] 361 aaagggccag ggctggaca tttcatgttc ccaccaccag ctggccacta ggagtgttct

[0045] 421 acgcaggctc agatggatgg ggctggcctc acagtggggc ctggaggact aaggtttggt

[0046] 481 ttctctatgc aaggtcagaa aaactccac agtacaggga aactggccag ggctgcagac

[0047] 541 tcagaccaca gtgctaaagc catgaactcc acctgctctc tgaaggctcg ccaacctgag

[0048] 601 tccagcagaa tgttctcgct tgtgtccaac cccactggtt taggctgaat cagcctctag

[0049] 661 ggcccagagg cactgcacct ggagtgggga gcttctccag tatcagagtc accttcagag

[0050] 721 gcctggagcc ttccataaag caggtaaagag gactcaatag atgcatctgc atggaaaaca

[0051] 781 tcctccctc taccaggcac ctgtatgtac aaccaatcac agcagcacac atacaccag

[0052] 841 aaatgggcac gtgtgggccc acacccttt agctatgaaa cccaggcatg gggcagcttg

[0053] 901 agccagatac cttgtgcaaa cacaaactcg tgctgtcttc tctgaactcc attgtgaaaa

[0054] 961 tcaaactctt gtcagccct caagaccctt tagatttctt acttccacac ttccacagaa

[0055] 1021 aggcctctgg agttggggga tgctggggtt atgtaggaaa ttaagcctgg agggccttgc

[0056] 1081 tggggaagcc attgtccctg tacctgagat ggatgcagcc acagccctgg agccagcctg

[0057] 1141 aagctcctgg tgtctctcgg gggctacata taggagtgtg gtccgaacct cagaggggca

[0058] 1201 aacctgctct gcagagggaa tcaaggttca cataaccaga gaggggagtc actcaggaag

[0059] 1261 gtggctccag agccaagagt cagactctgg gtcccactt gaccagcca caccctct

[0060] 1321 gaagcttctt gagagtggct gcagctcgc tgctggatgt gcacatggtg gtcattcctt

[0061] 1381 ctgctcacag gggcaggggt ccccccttac tggactgagg ttgccccctg ctccaggtcc

[0062] 1441 tgggtgggag cccatgtgaa ctgtcagtgg ggcaggtctg tgagagctcc cctcacactc

[0063] 1501 aagtctctca cagtggccag agaagaggaa ggctggagtc agaatgagc accagggcgg

[0064] 1561 gcatagcctg cccaaagcc cctgggatta caggcaggat ggggagcctt atctaagtgt

[0065] 1621 ctcccagcc ccacccagc cattccagc caggaagtcc aactgtgcc cctcagaggg

[0066] 1681 agggggcagc ctcagggcca ttcagactgc ccagggaggg ctggagagcc ctcaggaagg

[0067] 1741 cgggtgggtg ggctgtcggg tcttggaaag gttcattaat gaaaacccc aagcctgacc

[0068] 1801 acctagggaa aaggctcacc gttccatgt gtggctgata agggccagga gattccacag

[0069] 1861 ttcaggtagt tccccctt cctggcatt ttgtggtcac cattaatcat ttctctgtg

[0070] 1921 tatttaagag ctcttttccc agtgagccca gtacacagag agaaaggcta aagttctctg

[0071] 1981 gaggatgtgg ctgcagagcc tgctgtcttt gggcactgtg gcctgcagca tctctgcacc

[0072] 2041 cgcccctcg cccagcccca gcacgcagcc ctgggagcat gtgaatgcca tccaggagcc

[0073] 2101 ccggcgtctc ctgaacctga gtagagacac tgctgtgag atggttaagt agagaatgtg

[0074] 2161 ggctgtgcc taggccacc agctggcccc tgactggcca cgctgtcag cttgataaca

[0075] 2221 tgacattttc ctttttaca gaatgaaaca gtagaagtea tctcagaaat gtttgacctc

[0076] 2281 caggtaaagt gcttctctct gacatagctt tccagaagcc cctgccctgg ggtggaggtg

[0077] 2341 gggactccat tttagatggc accacacagg gtgttccact ttctctccag tcagctggct

[0078] 2401 gcaggaggag ggggtagcaa ctgggtgctc aagaggctgc tggccgtgcc cctatggcag

[0079] 2461 tcacatgagc tcctttatca gctgagcggc catgggcaga cctagcattc aatggccagg

[0080] 2521 agtcaccagg ggacaggtgg taaagtgggg gtcacttcat gagacaggag ctgtgggttt

[0081] 2581 ggggcgctca ctgtgcccc agaccaagtc ctgttgagac agtgctgact acagagagcc

[0082] 2641 acagaggggt ttcaggaaca acccttgccc acccagcagg tccaggtgag gccccacccc

[0083] 2701 cctctcctg aatgatgggg tgagagtac ctcttccct aaggctgggc tcctctccag

[0084] 2761 gtgccctga ggggtggcctg ggccgggagc tgagaagggc aggttcgtgc ctgccaatgga

[0085] 2821 cagggcaggg tctatgactg gaccagcct gtgccctcc caagccctac tcctgggggc

[0086] 2881 tgggggcagc agcaaaaagg agtgggtggag agttcttgta cactgtggg cacttggcca
 [0087] 2941 ctgctcaccg acgaacgaca tttccacag gagccgacct gcctacagac ccgctggag
 [0088] 3001 ctgtacaagc agggcctgcg gggcagcctc accaagctca agggccccctt gaccatgatg
 [0089] 3061 gccagccact acaagcagca ctgcctcca accccggatga gtgcctacgg cagggcctcc
 [0090] 3121 agcaggaatg tcttaatcta gggggtgggg tcgacatggg gagagatcta tggctgtggc
 [0091] 3181 tgttcaggac cccaggggggt ttctgtgcca acagtatgt aatgattagc cctccagaga
 [0092] 3241 ggaggcagac agccatttc atccaagga gtcagagcca cagagcgctg aagcccacag
 [0093] 3301 tgctccccag caggagctgc tcctatcctg gtcattattg tcattatggt taatgaggtc
 [0094] 3361 agaggtgagg gcaaacccaa ggaaacttgg ggcctgcca aggccagag gaagtgccca
 [0095] 3421 ggcccaagtg ccacctctg gcaggacttt cctctggccc cacatgggggt gcttgaattg
 [0096] 3481 cagaggatca aggaaggag gctacttga atggacaagg acctcaggca ctcttctctg
 [0097] 3541 cgggaaggga gcaaaagttg tggccttgac tccactcctt ctgggtgccc agagacgacc
 [0098] 3601 tcagcccagc tgcctgctc tgcctggga ccaaaaaggc aggcgttga ctgcccagaa
 [0099] 3661 ggccaacctc aggtggcac ttaagttagg cccttgactc tggctgccac tggcagagct
 [0100] 3721 atgcactect tggggaacac gtgggtggca gcagcgtcac ctgaccagg tcagtgggtg
 [0101] 3781 tgtcctggag tggcctcct ggcctctgag ttctaagagg cagttagaaa acatgctggt
 [0102] 3841 gcttctctcc cccacgttac ccactgcct ggactcaagt gttttttatt tttcttttt
 [0103] 3901 taaaggaaac ttctgtgca acccagatta tcaccttga aagtttcaa gagaacctga
 [0104] 3961 aggactttct gcttgtcatc cccttgact gctgggagcc agtccaggag tgagaccggc
 [0105] 4021 cagatgaggc tggccaagcc ggggagctgc tctctcatga aacaagagct agaaaactcag
 [0106] 4081 gatggtcatc ttggagggac caaggggtgg gccacagcca tgggtgggagt ggcctggacc
 [0107] 4141 tgcctgggc cacactgacc ctgatacagg catggcagaa gaatgggaat atttatact
 [0108] 4201 gacagaaac agtaatattt atatatttat attttataaa tatttattta tttatttatt
 [0109] 4261 taagttcata ttccatattt attcaagatg tttaccgta ataattatta ttaaaaatat
 [0110] 4321 gcttctactt gtccagtgtt ctagtgtgtt tttaacatg agcaaatgcc agtgggtgct
 [0111] 4381 gccttcccat gaggcagggg agggaggaaa cggggagggtg gagagggggc gggggcctcc
 [0112] 4441 caggcgttgg gcactatcca agggccaaca ctgtcagagc agaggggagg tgagagccgg
 [0113] 4501 gcataggtgc ggaattctgc acacctggac gggcttcccg ggatgctcca gggtcccac
 [0114] 4561 cccagagaat ggctctcaag ttcacctgga agtccaagt accagcccag ggaactctta
 [0115] 4621 tcccagaaa gggcaccacc cttctgggg aggcctgggg gttggctggt cactggctga
 [0116] 4681 acagggccac tctggcatca ggcaaacac ctgcctgta gaggccttgg cccctgtgcc
 [0117] 4741 ccagccctg ccctcacac tctgagattt aaccattccg aaagtaaaca gcaaataga
 [0118] 4801 ctaactgttc aggggaaaag aaaccaaac acaggggtca cagtgcagcg tatttaccaa
 [0119] 4861 acttggccca aatgggtga tcttaatctc tgagagtcag aatgtaaggt cataatttgt
 [0120] 4921 tggtagatgg ctgtagtgcc gcatgtttct gaattgggtt ttatttttac atgaaatgtt
 [0121] 4981 gaatctaac aggcacttcc ccctaaaact catggcctgc aggcataaaa caaagtggc

[0122] 5041 ctctctcttc tccttacttt gacagctggg ctcaaggcct tgttcctgaa cctgttcct
 [0123] 5101 catctcctc caggactatg aggaagtgga tgtgcccaa gtcttagcg ggcagcagg
 [0124] 5161 ccagettctc cttgacaggt gggcctaagg aagctggctt gtggcagctt tagccctgc
 [0125] 5221 ctggcactgt ctgcagcat gcgccacca ccctcttgc ttctctact tcagttagca
 [0126] 5281 cctgcagaca gcgccaggcc tggccagaga cccactccat gctcatgcag aaagaccgtg
 [0127] 5341 acttcaggtg tgattacaaa taagaagtca ggtggaacgc tcaggatgaa gcctgagtgt
 [0128] 5401 cagcacaggc aagaatccat gaagtgtgct gtggttgttg aaaatgcatg aaaatcacat
 [0129] 5461 cttgccccagc gataaggtcc tctctgtctt ccgcgtaagc cagtgatgac tgataagagg
 [0130] 5521 tttagcattt ccttagcctc acatataatag gtaccctctt ccacagaaat gctgccaagc
 [0131] 5581 ccagggctcg gaccagcttg gactcacctt caagtaatac catgcacctg tacgtgctcc
 [0132] 5641 tggctcatgt gctctggggg tcagaaagcc attcttccca atgaaagtag ccacgatatc
 [0133] 5701 tccccacgaa aagtacacag cagtctgtgc tgacattcag aaagaactct cggtgacaa
 [0134] 5761 taacacacac aagataagtc tgggtctcca tcaaacgtta tttgtcttt agtgccctt
 [0135] 5821 tgtgtctctg accaatttct ctggcttccg gggctccttc aataggcccc agaaaaccag
 [0136] 5881 tgaggtaga aacagctgcc ccgggacctt tcataccaca tttgaacagg gagagagaga
 [0137] 5941 tctcaccagt cagtgccag ggaagagata acaacaagg atagtggagt ga

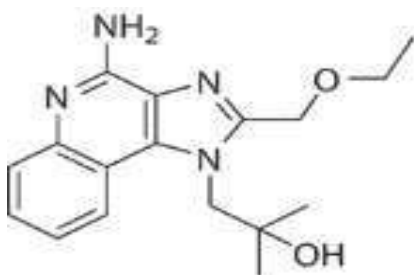
[0138] "톨형 수용체 작용물질"은 TLR 수용체 과의 구성원을 활성화하는 작용제를 의미한다.

[0139] "글루코피라노실 지질 A" 또는 "글리코피라노실 지질 A" 또는 "글리코피라노실 지질 보조제" 또는 "GLA"는 신규의, 임상 단계의, 인간 톨형 수용체-4(TLR-4) 작용물질(본 발명에 내용 전체가 참고로 인용된 미국 특허 출원 제 11/862,122 호 및 미국 특허 출원 공보 제 20080131466 호에 개시되어 있다)을 의미한다.

[0140] "IDC-1005"는 포스파티딜콜린을 함유하는 안정한 스쿠알렌 수증 유적형 유화액의 존재 하의 1 mg/ml GLA 및 0.2 mg/ml R848의 혼합물을 의미한다.

[0141] "리포솜 벡터"는 리포솜의 형성을 통해 작용제를 세포로 전달하는데 사용될 수 있는 임의의 조성물을 의미하며, 그의 비제한적인 예는 리포펙타민이다.

[0142] "R848"은 TLR7/TLR8 MyD88-의존성 신호전달 경로를 통해 면역 세포를 활성화하는 TLR 작용물질인, 분자량 314.17의 이미다조퀴놀린 화합물을 의미한다. R848은 하기의 화학식: C₁₇H₂₂N₄O₂ 및 구조를 갖는다:



[0143] "TRGVAX"는 TLR 작용물질과 추가로 제형화된 GVAX를 의미한다.

[0145] "톨형 수용체(TLR)"는 미생물 생성물을 의미하고/하거나 적합한 면역 반응을 개시하는 단백질 또는 그의 단편의 톨형 수용체 과의 구성원을 의미한다. 하나의 실시태양에서, TLR은 수지상 세포(DC)를 활성화한다.

[0146] "톨형 수용체 4(TLR4)"는 면역조절 활성을 갖는, NP₆₁₂₅₆₄와 85% 이상의 서열 일치성을 갖는 폴리펩타이드 또는 그의 단편을 의미한다. 인간 톨형 수용체 4 전구체 NP₆₁₂₅₆₄의 서열을 하기에 제공한다:

[0147] 1 mmsasrlagt lipamaflsc vrpeswepcv evvpnityqc melnfykipd nlpfstknld
 [0148] 61 lsfnpnlrhlg sysffsfpel qvldlsrcei qtiedgayqs lshlstlilt gnpiqslalg
 [0149] 121 afsglsslqk lvavetnlas lenfpihik tlkelnvahn liqsfklpey fsnltnlehl
 [0150] 181 dlssnkiqsi yctdlrvlhq mpllnslsdl slnpmfiqp gafkeirlhk ltlrnnfddl
 [0151] 241 nvmkctiqgl alevhrllvl gefrnegnle kfdksalegl cntieefrl ayldylddi
 [0152] 301 idlfncltnv ssslvsvti ervkdfsynf gwqhlelvnc kfgqfptlkl kslkrltfts
 [0153] 361 nkggnafsev dlpslefldl srnglsfkgc csqsdfgtts lkyldlsfng vitmssnflg
 [0154] 421 leqlhldf hsnlqmqmef svflslrnl yldishttr vafngifngl sslevlkmag
 [0155] 481 nsfqenflpd iftelrnlft ldlsqcqleq lsptafnsls slqvlnmshn nffsldtfpy
 [0156] 541 kclnslqvld yslnhimtsk kqelqhfps laflnltnqnd factcehqsf lqwkdqrql
 [0157] 601 lvevermecca tpsdkqgmpv lslnitqmm ktiigsvsl vlvsvvavl vykfyhlml
 [0158] 661 lagcikygrg eniydafviy ssqdedwvwrn elvknleegv ppfqclchyr dfipgvaiaa
 [0159] 721 niheghfks rkvivvvsqh fiqsrwcife yeiaqtwqfl ssragiifiv lqkvektllr
 [0160] 781 qqvelyrlls rntyleweds vlgrhifwrr lrkalldgks wnpegtvgtg cnwqeatsi

[0161] "개선하다"는 질병의 발병 또는 진행을 감소, 억제, 약화, 줄임, 저지, 또는 안정화시킴을 의미한다.

[0162] "동족체"는 동일하지는 않지만 유사한 작용 또는 구조적 특징을 갖는 분자를 의미한다. 예를 들어, 폴리펩타이드 동족체는 상응하는 천연 폴리펩타이드의 생물 활성을 유지하지만, 천연 폴리펩타이드에 비해 상기 동족체의 작용을 증대시키는 일부 생화학적 변형을 갖는다. 상기와 같은 생화학적 변형은 상기 동족체의 프로테아제 내성, 막 투과성, 또는 반감기를, 변경, 예를 들어 리간드 결합 없이 증가시킬 수 있다. 동족체는 비천연 아미노산을 포함할 수도 있다.

[0163] 본 명세서에서, "포함하다", "포함하는", "함유하는" 및 "갖는" 등은 미국 특허법에서 이들에게 속하는 것으로 생각되는 의미를 가질 수 있으며 "포함하다", "포함하는" 등의 의미를 가질 수 있고; "필수적으로 이루어지는" 또는 "필수적으로 이루어지다"는 마찬가지로 미국 특허법에 속하는 것으로 생각되는 의미를 가지며, 상기 용어는 제한이 없어, 인용된 것의 기본적인거나 신규의 특징들이 상기 인용된 것보다 많은 존재에 의해 변화되지 않고 종래 기술 실시태양을 배제하지 않는 한 상기 인용된 것보다 많은 존재를 허용한다.

[0164] "질병"은 세포, 조직 또는 기관의 통상적인 기능을 손상하거나 방해하는 임의의 상태 또는 장애를 의미한다.

[0165] "유효량"은 종양 세포에 대한 또는 종양 항원에 특이적인 면역 반응을 유도하거나 증대시키거나, 또는 종양 성장을 감소시키거나 안정화하거나, 환자 생존을 증대시키거나, 또는 치료되지 않은 환자에 비해 질병의 증상을 달리 개선시키기에 충분한 양을 의미한다. 질병의 치료학적 치료를 위해 본 발명을 실시하는데 사용되는 활성 화합물(들)의 유효량은 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 및 일반적인 건강에 따라 변한다. 궁극적으로, 주치의 또는 수의사가 적합한 양 및 투여량 섭생을 결정할 것이다. 상기와 같은 양을 "유효"량이라 지칭한다.

[0166] "단편"은 폴리펩타이드 또는 핵산 분자의 일부를 의미한다. 상기 부분은 바람직하게는 기준 핵산 분자 또는 폴리펩타이드의 전체 길이의 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90% 이상을 차지한다. 단편은 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, or 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 또는 1000 개의 뉴클레오타이드 또는 아미노산을 함유할 수 있다. 하나의 실시태양에서, TLR4 작용물질의 단편은 환자에게서 면역 반응을 증대시키기에 충분한 LPS 또는 또 다른 TLR4 작용물질의 약 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600 또는 700 개 이상의 아미노산을 포함한다.

[0167] "하이브리드화"는 상보성 뉴클레오타이드 염기들 간의 수소 결합을 의미하며, 이는 왓슨-크릭, 후그스틴 또는 역전된 후그스틴 수소 결합일 수 있다. 예를 들어, 아데닌 및 티미딘은 수소 결합의 형성을 통해 짝을 이루는 상보성 뉴클레오타이드 염기이다.

- [0168] "단리된"은 자연 상태에서 발견된 대로 통상적으로 동반되는 성분들이 다양한 정도로 없는 물질을 의미한다. "단리물"은 원래의 공급원 또는 환경으로부터의 분리 정도를 나타낸다.
- [0169] "단리된 폴리뉴클레오타이드"는 본 발명의 핵산 분자가 유래된 유기체의 천연 게놈 중에서 측면에 인접한 유전자가 없는 핵산(예를 들어 DNA)을 의미한다. 따라서 상기 용어는 예를 들어 벡터 내에; 자율적으로 복제하는 플라스미드 또는 바이러스 내에; 또는 원핵생물 또는 진핵생물의 게놈 DNA 내에 통합되거나; 또는 다른 서열들과 관계없이 별도의 분자(예를 들어 PCR 또는 제한 엔도뉴클레아제 절단에 의해 생성된 cDNA 또는 게놈 또는 cDNA 단편)로서 존재하는 재조합 DNA를 포함한다. 또한, 상기 용어는 DNA 분자뿐만 아니라 추가의 폴리펩타이드 서열을 암호화하는 하이브리드 유전자의 일부인 재조합 DNA로부터 전사되는 RNA 분자를 포함한다.
- [0170] "단리된 폴리펩타이드"는 자연에서 동반되는 성분들로부터 분리된 본 발명의 폴리펩타이드를 의미한다. 전형적으로, 상기 폴리펩타이드는 자연에서 회합된 단백질 및 천연 유기 분자 단백질이 없이 60 중량% 이상일 때 단리된다. 바람직하게는, 상기 제제는 본 발명의 폴리펩타이드가 75 중량% 이상, 보다 바람직하게는 90 중량% 이상, 및 가장 바람직하게는 99 중량% 이상이다. 본 발명의 단리된 폴리펩타이드를, 예를 들어 천연 공급원으로부터 추출에 의해, 상기와 같은 폴리펩타이드를 암호화하는 재조합 핵산의 발현에 의해; 또는 상기 단백질의 화학 합성에 의해 수득할 수 있다. 순도를 임의의 적합한 방법에 의해, 예를 들어 컬럼 크로마토그래피, 폴리아크릴아미드 겔 전기 영동에 의해, 또는 HPLC 분석에 의해 측정할 수 있다.
- [0171] "미소 전이"는 2차 종양이 임상적으로 검출하기에 너무 작은 전이의 형태를 의미한다.
- [0172] "최소 후유증"은 치료 도중 또는 치료 후 환자 중에 남아있는 소수의 종양 세포를 의미한다.
- [0173] "종양"은 세포 또는 조직의 병적인 증식 및 다른 조직 또는 기관으로의 그의 후속적인 이동 또는 침습을 특징으로 하는 질병을 의미한다. 종양 성장은 전형적으로는 조절되지 않고 진행성이며, 정상 세포의 휴지, 증식을 유도하지 않거나, 또는 야기하는 조건 하에서 발생한다. 종양은 다양한 세포 유형, 조직 또는 기관, 예를 들어 비제한적으로 방광, 뼈, 뇌, 유방, 연골, 식도, 나팔관, 쓸개, 심장, 장, 신장, 간, 폐, 림프절, 신경 조직, 난소, 췌장, 전립선, 골격근, 피부, 척수, 비장, 위, 고환, 흉선, 갑상선, 기관, 비뇨생식기, 요관, 요도, 자궁, 및 질, 또는 그의 조직 또는 세포 유형으로 이루어진 그룹 중에서 선택된 기관을 침범할 수 있다. 종양은 암, 예를 들어 육종, 암종, 또는 형질세포종(혈장 세포의 악성 종양)을 포함한다.
- [0174] 주변 조직을 침범하거나 혈류 또는 림프관에 들어가는 종양 세포는 원래 종양으로부터 떨어져서 2차 종양, 또는 전이를 형성한다. 전이된 종양은 치료하기가 더 어렵고 종종 더욱 불량한 예후를 갖는다. 상기 종양의 중증도(즉 종양 크기 및 침습도)에 따라, 단계 번호 I, II, III 또는 IV를 지정한다. I 기 종양은 최소로 진행되고 가장 예후가 좋다. II 기 종양은 전형적으로 더 큰 종양을 포함하고 다소 불량한 예후와 관련된다. III 및 IV 기 종양은 원래 부위를 벗어나 퍼져있고 예후가 가장 불량하다.
- [0175] 본 발명에 사용된 바와 같이, "작용제를 수득하는"에서와 같이 "수득하는"은 상기 작용제의 합성, 구입, 또는 달리 획득을 포함한다.
- [0176] 본 발명에 사용된 바와 같이, "재조합체"는 폴리펩타이드를 암호화하는 이중 폴리뉴클레오타이드를 발현하는 세포를 사용하여 생성시킨 폴리펩타이드에 대한 언급을 포함한다. 상기 세포는 적합한 단리된 핵산 서열의 도입에 의해 유전자 변경되었으므로 재조합 폴리펩타이드를 생산한다. 상기 용어는 또한 이중 핵산의 도입 또는 고유 핵산의, 상기 세포에 대해 고유하지 않은 형태로의 변경에 의해 변형되었거나, 또는 상기 세포가 상기와 같이 변형된 세포로부터 유래하는 세포, 또는 핵산, 또는 벡터에 대한 언급을 포함한다. 따라서, 예를 들어 재조합 세포는 상기 세포의 고유(비-재조합) 형태 내에서 발견되지 않는 유전자를 발현하거나, 상기 고유 형태 내에서 발견된 유전자들의 돌연변이체를 발현하거나, 또는 달리 비정상적으로 발현되거나, 저-발현되거나, 또는 전혀 발현되지 않는 고유 유전자를 발현한다.
- [0177] "감소하는"은 적어도 10%, 25%, 50%, 75% 또는 100%의 음의 변경을 의미한다.
- [0178] "기준"은 표준 또는 대조용 조건을 의미한다.
- [0179] "기준 서열"은 서열 비교를 위한 토대로서 사용되는 한정된 서열이다. 기준 서열은 명시된 서열의 부분집합 또는 전체일 수 있다; 예를 들어 완전 길이 cDNA 또는 유전자 서열, 또는 완전한 cDNA 또는 유전자 서열의 구획일 수 있다. 폴리펩타이드의 경우, 상기 기준 폴리펩타이드 서열의 길이는 일반적으로 약 16 개 이상의 아미노산, 바람직하게는 약 20 개 이상의 아미노산, 보다 바람직하게는 약 25 개 이상의 아미노산, 및 훨씬 더 바람직하게는 약 35 개 아미노산, 약 50 개 아미노산, 또는 약 100 개 아미노산일 것이다. 핵산의 경우, 상기 기준 핵산

서열의 길이는 일반적으로 약 50 개 이상의 뉴클레오타이드, 바람직하게는 약 60 개 이상의 뉴클레오타이드, 보다 바람직하게는 약 75 개 이상의 뉴클레오타이드, 및 훨씬 더 바람직하게는 약 100 개의 뉴클레오타이드, 또는 약 300 개의 뉴클레오타이드, 또는 그 부근 또는 그 사이의 임의의 정수일 것이다.

- [0180] "특이적으로 결합한다"는 본 발명의 폴리펩타이드를 인식하고 결합하지만, 샘플, 예를 들어 본 발명의 폴리펩타이드를 자연적으로 포함하는 생물학적 샘플 중의 다른 분자는 실질적으로 인식하지 않고 결합하지 않는 화합물 또는 항체를 의미한다.
- [0181] 본 발명의 방법에 유용한 핵산 분자는 본 발명의 폴리펩타이드 또는 그의 단편을 암호화하는 임의의 핵산 분자를 포함한다. 상기와 같은 핵산 분자는 내생적인 핵산 서열과 100% 일치할 필요가 없으나, 전형적으로는 실질적인 일치성을 나타낼 것이다. 내생적인 서열에 "실질적인 일치성"을 갖는 폴리뉴클레오타이드는 전형적으로는 이중 가닥 핵산 분자의 하나 이상의 가닥과 하이브리드화할 수 있다. 본 발명의 방법에 유용한 핵산 분자는 본 발명의 폴리펩타이드 또는 그의 단편을 암호화하는 임의의 핵산 분자를 포함한다. 상기와 같은 핵산 분자는 내생적인 핵산 서열과 100% 일치할 필요가 없으나, 전형적으로는 실질적인 일치성을 나타낼 것이다. 내생적인 서열에 "실질적인 일치성"을 갖는 폴리뉴클레오타이드는 전형적으로는 이중 가닥 핵산 분자의 하나 이상의 가닥과 하이브리드화할 수 있다. "하이브리드화한다"는 다양한 엄격성 조건 하에서 상보성 폴리뉴클레오타이드 서열들 간의 이중 가닥 분자(예를 들어 본 발명에 개시된 유전자) 또는 그의 일부를 형성하기 위해 짝을 지음을 의미한다(예를 들어 문헌[Wahl, G. M. and S. L. Berger (1987) *Methods Enzymol.* 152:399]; [Kimmel, A. R. (1987) *Methods Enzymol.* 152:507]을 참조하시오).
- [0182] "실질적으로 일치하는"은 기준 아미노산 서열(예를 들어 본 발명에 개시된 아미노산 서열들 중 어느 하나) 또는 핵산 서열(예를 들어 본 발명에 개시된 핵산 서열들 중 어느 하나)에 50% 이상의 일치성을 나타내는 폴리펩타이드 또는 핵산 분자를 의미한다. 바람직하게는, 상기와 같은 서열은 비교를 위해 사용된 서열에 대해 아미노산 수준 또는 핵산에서 60% 이상, 보다 바람직하게는 80% 또는 85%, 및 보다 바람직하게는 90%, 95% 또는 심지어 99% 일치한다.
- [0183] 서열 일치성을 전형적으로는 서열 분석 소프트웨어(예를 들어 위스콘신 대학 생물공학 센터, 유전학 컴퓨터 그룹의 서열 분석 소프트웨어 패키지, 위스콘신주 53705, 매디슨 유니버시티 애비뉴 1710 소재, BLAST, BESTFIT, GAP, 또는 PILEUP/PRETTYBOX 프로그램)를 사용하여 측정한다. 상기와 같은 소프트웨어는 상동성의 정도를 다양한 치환, 결실, 및/또는 다른 변형으로 지정함으로써 동일하거나 유사한 서열들에 맞는 것들을 찾아낸다. 보존 치환은 전형적으로는 하기 그룹 내의 치환들을 포함한다: 글리신, 알라닌; 발린, 아이소류신, 류신; 아스파르트산, 글루탐산, 아스파라진, 글루타민; 세린, 트레오닌; 리신, 아르기닌; 및 페닐알라닌, 타이로신. 일치성 정도를 측정하기 위한 전형적인 접근법에서, BLAST 프로그램을 사용할 수 있으며, 이때 e^{-3} 와 e^{-100} 사이의 확률 점수는 밀접하게 관련된 서열을 가리킨다.
- [0184] "환자"는 포유동물, 예를 들어 비제한적으로 인간 또는 비-인간 포유동물, 예를 들어 소, 말, 개, 양 또는 고양이 등을 의미한다.
- [0185] 본 발명에 사용된 바와 같은 "종양"은 악성이든 양성이든 간에 모든 종양 세포 성장 및 증식, 및 모든 전암성 및 암성 세포 및 조직을 지칭한다.
- [0186] 본 발명에 제공된 범위들은 상기 범위 내의 값 모두를 속기하는 것으로 이해된다. 예를 들어, 1 내지 50의 범위는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 및 50으로 이루어진 그룹으로부터의 임의의 수, 수들의 조합, 또는 하위-범위를 포함하는 것으로 이해된다.
- [0187] 본 발명에 사용된 바와 같이, "치료하다", "치료하는", "치료" 등의 용어는 질환 및/또는 상기와 관련된 증상을 감소시키거나 개선함을 지칭한다. 제외하는 것은 아니지만, 질환 또는 상태를 치료하는 것은 상기 질환, 상태 또는 이들과 관련된 증상들을 완전히 제거하는 것을 요구하는 것은 아님을 알 것이다.
- [0188] 구체적으로 진술되거나 또는 내용상 명백하지 않은 한, 본 발명에 사용된 바와 같은 "또는"이란 용어는 포함되는 것으로 이해된다. 구체적으로 진술되거나 또는 내용상 명백하지 않은 한, 본 발명에 사용된 바와 같은 "하나의" 및 "상기"란 용어는 단수 또는 복수인 것으로 이해된다.
- [0189] 구체적으로 진술되거나 또는 내용상 명백하지 않은 한, 본 발명에 사용된 바와 같은 "약"이란 용어는 당해 분야에서 통상적인 허용 범위 이내로서, 예를 들어 평균의 2 표준 편차 이내로서 이해된다. 약은 서술된 값의 10%,

9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, 0.1%, 0.05%, 또는 0.01% 이내로서 이해될 수 있다. 내용상 달리 명백하지 않은 한, 본 발명에 제공된 모든 수치들은 상기 용어 약에 의해 조절된다.

[0190] 본 발명에서 변수의 임의의 정의 내의 화학 그룹들의 목록 인용은 임의의 단일 그룹 또는 목록 그룹의 조합으로서 상기 변수의 정의를 포함한다. 본 발명에서 변수 또는 태양에 대한 실시태양의 인용은 임의의 단일 실시태양 또는 임의의 다른 실시태양 또는 그의 일부와의 조합으로서의 실시태양을 포함한다.

[0191] 본 발명에 제공된 임의의 조성물 또는 방법을 본 발명에 제공된 임의의 다른 조성물 및 방법들 중 하나 이상과 병용할 수 있다.

발명의 효과

[0192] 본 발명은 하나 이상의 TLR 작용물질과 함께 제형화된 사이토킨(GM-CSF)을 발현하는 종양 세포를 포함하는 면역원성 조성물 및 면역 반응을 유도하거나 증대시킨다.

도면의 간단한 설명

[0193] 도 1은 GVAX 내로의 TLR4 작용물질의 전달을 도시한다. 도 1은 GVAX 내로의 TLR4 작용물질의 전달을 도시하는 일련의 FACS 그래프이다. LPS의 GVAX 백신 세포 내로의 흡수 효율을 최적화하기 위해서, 리포펙타민 및 LPS-BODIPY 형광단 접합체의 농도를 지시된 대로 변화시켰다. 세포를 유식 세포측정 분석 전에 5 회 세척하였다. LPS는 LAL 분석을 사용하여 최종 세척 시 0.125 EU/ml 미만으로 검출할 수 없었다. 최적 흡수는 1×10^5 세포 당 40 µg/ml의 리포펙타민 및 25 µg/ml의 LPS와 함께 배양한 지 6 시간째에 있었다. 이러한 조건들을 세포 기준에 따라 LPS의 정량분석에 사용하였다.

도 2A, 2B 및 2C는 TEGVAX가 생체 내에서 종양 억제 반응을 유도할 수 있음을 도시한다. B16 접종된 C57BL/6 (도 2A), SCCFVII/SF 접종된 C3H(도 2B), 및 CT26 접종된 Balb/c(도 2C) 마우스를 전형적으로 종양 주사 후 3 내지 5일째에 종양 주변에 적합한 PBS, GVAX 또는 TEGVAX로 처리하였다. 연구된 모든 쥐 모델 중 TEGVAX 그룹에서 생체 내 종양 진행은 GVAX 그룹에서의 경우보다 통계학적으로 더 느렸다. B16 및 SCCFVII/SF 모델의 경우, GVAX 처리된 그룹과 PBS 처리된 그룹 간에 차이는 없었다. CT26 모델에서, TEGVAX 그룹의 마우스의 40 내지 60%가 18일까지 그들의 촉진 가능한 종양의 검출할 수 없는 수준으로의 회귀를 경험하였다. 293T 세포 내로 제형화된 동물의 LPS가 또한 대조용의 처리된 마우스에 비해 성장 속도의 차이를 보이지 않았다. 종양의 회귀를 나타낸 마우스를 CT26 종양(2×10^6)으로 재접종하였으며 종양 성장이 기록되지 않았다. 3 개의 쥐 모델 모두에서, 감소된 종양 성장 속도는 GVAX 그룹에서의 경우에 비해 TEGVAX 그룹에서 마우스의 증대된 생존과 상관성이 있었다.

도 3은 TEGVAX에 대해 기록된 개선된 생체 내 종양 억제 반응이 MyD88 의존성을 도시한다. B16 모델을 사용하여, 상기 생체 내 종양 성장 속도를 종양 접종 후 3 내지 5일째에 종양 내로 수행된 백신 처리와 함께 MyD88 빈 마우스로 수행하였다. TEGVAX 처리된 그룹에서 종양 억제 반응은 MyD88 빈 마우스에서 없어진다.

도 4A 및 4B는 TEGVAX 처리가 종양 미세환경 내로의 림프구 및 항원 제공 세포 침투를 증가시킴을 도시한다. 도 4A는 대조군, GVAX 또는 TEGVAX로 처리된 CT26 종양에서 CD4+, CD8+, CD86+ 및 CD45+ 세포의 면역조직화학 염색의 일련의 현미경 사진이다. 황색 세포는 첫 번째 2 개의 패널 중 CD4 또는 CD8과 CD45의 공-국소화된 염색을 나타낸다. 세 번째 패널은 단독의 CD86 접합체 염색을 나타낸다. 이들 세포를 40X 배율로 슬라이스당 10 개의 무작위로 선택된 시야에서 정식으로 정량분석하였다. 도 4B는 면역조직화학에 의해 획득된 정량분석된 데이터의 그래프 표현이다. GVAX 또는 TEGVAX로 처리된 종양 내에서, 상기 두 그룹 간에 각각의 정량분석된 CD4, CD8, CD86 및 CD45 세포에서 통계학적 차이가 존재하였다($P < 0.01$).

도 5는 TEGVAX 처리가 배액 림프절(DLN)에서 활성화된 수지상 세포(DC)를 증가시킴을 도시한다. CT26 종양 함유 Balb/c 마우스를 종양 주사 후 3일째에 PBS(도시 안 됨), GVAX 또는 TEGVAX로 종양 주변에 처리하였다. DC를 처리 후 5 내지 7일째에 상기 DLN으로부터 단리하였다. B220+CD11c+세포를 거르고 CD86, MHCCI 및 CD80 염색을 도시된 바와 같이 분석하였다. TEGVAX는 GVAX 처리된 그룹에 비해 DLN에서 CD80+MHCCI+CD뿐만 아니라 CD86+MHCCI+의 증가된 수를 가졌다.

도 6A 및 6B는 TEGVAX 처리가 종양 특이성 CD8+ T-세포의 수를 증가시킴을 도시한다. CT26 함유 Balb/c 마우스를 3일째에 PBS, GVAX, 또는 TEGVAX로 종양 주변에 처리하고, 5일 후에 CD8+ 세포를 비장 및 림프절로부터 분리 및 정제하였다. ELISPOT 분석을 APC로서 4T1 세포 및 AH1 펩타이드를 사용하여 수행하고 IFN- γ 수준을 측정하였다. 도 6A는 비장 및 배액 LN 모두에서 GVAX 그룹에 비해 TEGVAX 그룹에서 AH1 특이성 IFN- γ 생산 T-세포의 수가 통계학적으로 더 크다는 그래프이다(P<0.01). 도 6B는 AH1 특이성 CTL 살해의 그래프이다. 생체 내 CTL 분석을 사용하여 TEGVAX로 처리된 또는 상기 없이 처리된 CT26 종양 함유 마우스에서 AH1 특이성 CTL의 살해 퍼센트를 측정하였다. -gal CFSE 표지된 저 세포 및 AH1 CFSE 표지된 고 세포를 고유, 종양 함유 또는 TEGVAX 처리된 종양 함유 그룹들에 동시 주사하였다. 평균적인 평균 특이성 종양 용해는 처리되지 않은 그룹에 비해 TEGVAX 그룹에서 더 높았다(P<0.07).

도 7은 제형 없이 별도로 주사된 동 물의 PLS와 병용된 GVAX가 종양 억제 반응을 유도하지 않음을 도시한다. B16 함유 마우스를 GVAX, LPS, 또는 LPS와 GVAX의 혼합물로, 리포솜 제형 없이 종양 주변에 처리하였다. 도 2에 사용된 바와 같은 동 물 량의 LPS를 이들 실험에서 종양 주변에 주사하였다.

도 8은 TEGVAX가 전신적인 종양 억제 반응을 또한 유도할 수 있음을 도시한다. B16 종양 모델을 사용하여, 마우스를 TEGVAX로 종양 주변에 처리하거나 또는 TEGVAX를 종양 접종 부위로부터 대측성 사지 내로 주사하여 처리하였다. TEGVAX 그룹은 모두 유사한 생체 내 종양 성장 속도를 나타내었다.

도 9는 GVAX, R848 및 GLA의 조합이 흑색종 종양 세포 성장을 방지함을 도시하는 그래프이다. GVAX 및 다양한 TLR 작용물질과의 그의 제형을 B16 종양 접종 후 3일째에 주사하였다. 상기 종양은 백신 처리 시에 촉진할 수 없었다. 상기 종양의 상대적인 성장 속도를 각각의 그룹에 대해 추적하였다. GVAX, GLA 및 R848로 처리된 B16 종양의 경우, 상기 종양 성장은 처음에 다른 그룹들보다 적은 것으로 기록되었으며, 이들 마우스 중 일부에서 상기 종양은 회귀하였다.

도 10은 TLR 작용물질 증대된 GVAX가 확립된 B16 종양에 대해 종양 성장 속도를 감소시킴을 도시하는 그래프이다. B16 종양 세포를 발바닥에 주사하였으며, 일단 종양이 촉진되었으면, 상기 마우스를 도면에서 지시하는 바와 같이 백신 제형으로 처리하였다. 상기 백신을 대측성 사지에 주사하였다.

도 11은 GVAX/GLA/R848로 처리된 마우스가 가장 많은 수의 p15E-특이성 T-세포를 가지며 이러한 결과는 생체 내 종양 성장 속도와 상관이 있음을 도시하는 ELISPOT 분석 및 생체 내 CTL 분석의 결과를 도시하는 여러 개의 패널을 제공한다. 상기 백신 제형으로 처리된 마우스를 처리 후 1 내지 2주째에 수확하고, 그의 비장을 종양 특이성 T-세포에 대해 분석하였다. 이에 관하여 도 11A, 11B 및 11C로 제공한다.

도 12는 GVAX/GLA/R848로 처리된 마우스가 활성화된 수지상 세포를 현저하게 증대시켰음을 도시하는 2 개의 패널을 제공한다.

도 13은 GVAX/GLA/R848로 처리된 마우스가 I1-12를 발현하는 CD11c+ 세포의 수를 통계학적 유의수준으로 가짐을 도시하는 FACS 분석을 제공한다.

도 14는 확립된 B16 종양에 대한 GVAX/GLA/R848의 다양한 제형들의 효과를 도시하는 그래프이다. IDC-1005는 포스파티딜콜린을 함유하는 안정한 스쿠알렌 수중 유적형 유화액을 포함하는 비히클 존재 하의 GLA/R848이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0194] 본 발명은 하나 이상의 TLR 작용물질과 함께 제형화된 사이토킨(GM-CSF)을 발현하는 종양 세포를 포함하는 면역원성 조성물 및 면역 반응을 유도하거나 증대시키기 위한 상기 조성물의 사용 방법을 제공한다.

[0195] 본 발명은 적어도 부분적으로, 종양 세포-기재 백신에 대한 TLR 작용물질의 첨가가 상기 종양 조직 중에 존재하는 숙주 면역 반응 회피 기전을 극복함으로써 상기 백신의 효능을 증가시켰다는 발견을 기본으로 한다. 특히, 하기에 보다 상세히 보고되는 바와 같이, TLR4 작용물질을 갖는 공통 유전형의 GM-CSF 분비 완전 세포 종양 백신(GVAX)(TLR-증대된 GVAX의 경우 TEGVAX)이 생성되었다. 상기 백신의 효능을, 불량하게 면역원성인 B16 쥐 흑색종 모델을 포함하여, 3 가지 상이한 치료학적 쥐 모델에서 시험하였다. 면역조직화학, 유식 세포측정 분석, ELISPOT, 및 생체 내 CTL 분석을 사용하여 상기 종양 조직에 대한 고유의 및 적응된 면역 반응 모두를 평가하였다. TEGVAX의 종양 내 및 전신 투여는 GVAX 단독에 비해 생체 내에서 증가된 종양 억제 반응을 생성시켰다. TEGVAX의 개선된 종양 억제 효능은 TLR 신호전달 손상된 MyD88 -/- 마우스에서 제공되지 않았다. Balb/c 마우스의 CT26 쥐 모델에서, 상기 마우스의 40 내지 60%는 상기 이식된 종양의 회귀를 나타내었다. CT26 종양 세포로 재접종 시, 상기 마우스는 상기 종양에 대해 면역되었음을 입증하였다. TEGVAX 처리된 종양은 종양 조직에

서 증가된 수의 CD86+ 세포뿐만 아니라 증가된 침윤성 CD4 및 CD8 T-세포를 나타내었다. 상기 TEGVAX 처리된 마우스로부터의 배액 림프절은 GVAX 및 모의 처리된 그룹에 비해 증대된 수의 활성화된 CD86+MHCII+ 및 CD80+MHCII+수지상 세포를 가졌다. ELISPOT 분석뿐만 아니라 생체 내 CTL 분석은 TEGVAX로 처리된 마우스에서 AH1 종양 항원에 특이적인 증가된 수의 CTL을 입증하였다. 세포 기제 백신을 생체 내에서 개선된 종양 억제 반응과 함께 TLR 작용물질과 제형화할 수 있다.

[0196] **TLR 작용물질은 종양 억제 면역 반응을 증대시킨다**

[0197] 편향되지 않은 종양 항원의 공급원으로서 종양 세포 백신의 사용은 다수의 임상 시도들에서 안전한 것으로 입증되었다. 그러나, 이러한 접근법의 임상 효능은 T-세포 반응을 종양 억제 세포독성 반응을 향해 왜곡시킬 수 있는 활성화된 항원 제공 세포의 적당한 상향 조절에 의해 제한되었다. 감염과 관련하여, TLR 작용물질은 수지상 세포 활성화를 면역원성으로 만드는 것으로 입증된 반면, TLR4 신호전달의 결여는 내성을 도출할 수 있다(14). 블랜더와 메즈히토프(Blander and Medzhitov)는 식작용된 미생물 항원이 LPS의 존재 하에서 보다 효율적으로 제공될 수 있음을 입증하였다(17). 상기 항원-함유 포식리소솜에서 TLR4 신호전달 부재 하에, 펩타이드-MHC 부류 II 복합체는 DC 상의 세포 표면에 비효율적으로 제공된다. 이러한 연구로부터의 암시는 국소화된 TLR4 자극이 조합 백신의 일부로서 제공될 때 종양 억제 반응을 증대시킬 수 있다는 것이다.

[0198] 임의의 TLR 작용물질 사용에 대한 우리의 우려는, TLR4에 대한 생리학적 리간드가 패혈증의 원인인 거대분자 LPS이므로, 상기 물질의 독성이다. LPS의 TLR4 작용물질 활성화는 LPS의 지질 A 성분으로 단리되었으며, 다양한 형태의 무독성 지질 A 형태들이 암 환자에게 도입되었다(18). 다른 연구자들은 패혈증 및 과민증의 어떠한 증거도 없이 암 환자에게 대해 초발열성 용량의 LPS를 피부 내로 사용하였다(19). 또 다른 우려는 종양 세포 상에서 발현된 TLR4 수용체가 발암현상을 촉진할 수도 있다는 것이다(20).

[0199] 면역조절 사이토킨 GM-CSF를 발현하는 유전자 변형된 종양 세포를 포함하는 GVAX 백신은 현재 흑색종, 유방, 췌장 및 결장암에 대해 임상 시험 중이다. 본 발명에 보고된 바와 같이, TLR 자극을 GVAX와 함께 국소로 병용하는 것은 상기 GVAX 백신의 면역원성을 현저하게 증대시킬 수 있다. 전-발암성 TLR4 자극을 최소화하고 전신 TLR4 자극을 최소화하기 위해서, LPS 및 다른 TLR 작용물질을 GVAX 세포 내로 제형화하였으며, 이러한 신규 조합 백신은 여러 쥐 모델에서 종양 억제 효능을 나타내었다.

[0200] 따라서, 본 발명은 TLR 작용물질 함유 종양 세포-기제 백신을 포함하는 치료 조성물, 및 종양 세포(예를 들어 유방암 및 흑색종 세포)의 침습성을 예방, 감소 또는 제거하거나 또는 종양 또는 그의 증상을 달리 치료하기 위한 상기와 같은 세포-기제 백신의 사용 방법을 제공한다.

[0201] 하나의 특정한 실시태양에서, 본 발명은 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자(GM-CSF)를 분비하도록 유전자 변형되고 톨형 수용체 작용물질을 포함하도록 추가로 제형화된 환자-특이성 암 세포로 이루어진 자기조직 암 세포 백신을 제공한다. GM-CSF는 백혈구 생산의 자극에 대한 일부 특이성과 함께 다양한 조혈 전구세포의 증식 및 분화를 조절하고 치료-유발된 백혈구 감소증을 역전시킬 수 있다. 상기 작용제는 또한 항원 제공을 촉진하고, 항체-의존성 세포 세포독성(ADCC)을 상향 조절하며, 인터류킨-2-매개된 림포카인-활성화된 살해 세포 작용을 증가시키고 숙주 종양 억제 면역성을 증대시킬 수 있다. TLR 작용물질은 항원보강제로서 작용하며 상기 백신의 효능을 증가시킨다. TLR 작용물질과 제형화된 종양 세포-기제 백신은 활성화된 국소 수지상 세포의 수를 증가시킬 뿐만 아니라 종양 특이성 CTL 반응을 증가시켰다. 안전성을 위해서, 세포를 백신화 전에 조사한다.

[0202] **면역원성 조성물**

[0203] 암 백신을 포함하여, 본 발명의 면역원성 조성물은 특정 유형 암의 치료에 치료학적 및 예방학적으로 유용하다. 유리하게는, 상기 백신을, 환자의 종양 상에서 발현되는 특이적인 종양 항원을 표적화하는 백신을 생성시킴으로써, 특정 개인의 암을 치료하도록 맞출 수도 있다. 본 발명의 백신은 전형적으로는 불활성화된 종양 세포, 또는 GM-CSF를 발현하도록 유전자 변형된 종양 항원을 발현하는 세포를 함유하며, 상기 세포는 TLR4 작용물질 또는 그의 단편을 추가로 포함한다. 본 발명의 세포를 리포펙타민 또는 다른 리포솜 비히클, 예를 들어 오일/수 유화액 친지성 분자, 상기 친지성 분자를 용해하고, 무독성, 수동 흡수하는 어떤 것과 함께 TLR4 작용물질과 접촉시킴으로써 상기 TLR4 작용물질을 흡수하도록 유도한다. 이론에 얽매이고자 하는 것은 아니지만, 상기 TLR 작용물질 또는 그의 생물학적으로 활성인 단편을 TLR 작용물질-함유 미셀을 형성하기에 충분한 조건 하에서 리포솜과 접촉시킨다. 상기 미셀은 상기 GM-CSF 발현 종양 세포에 의해 비-특이적으로 흡수되며 상기 TLR 작용물질 제형화된 세포 백신을 사용하여 환자의 면역계를 자극할 수 있다. 다른 실시태양에서, TLR 작용물질은 비히클의 존재 하에서 세포 상으로 흡착된다. 적합한 비히클의 한 가지 비제한적인 예는 포스포티딜콜린을 함유하

는 안정한 스쿠알렌 수증 유적형 유화액(예를 들어 10 중량%의 수증 유적형 유화액)이다. 상기 면역계는 종양을 표적화하는 면역반응성 세포를 생성시킴으로써 상기 자극에 반응한다. 특정한 실시태양에서, 본 발명의 암 백신은 바람직하게는 검출할 수 없는 종양 세포, 예를 들어 미소 전이 또는 후유증을 표적화하며, 이에 의해 종양의 재발을 예방한다. 다른 질병들의 발생을 예방하는 상기 질병들에 대한 백신과 달리, 암 백신은 전형적으로는 환자가 종양이 있는 것으로서 확인된 후에 투여된다.

[0204] 종양 세포 백신을, 본 발명에 개시된 바와 같이 생성된 본 발명의 세포 조성물을 사용하여 제조한다. 상기 세포를 증식-무능으로 만들고 종양 개시 세포 항원이 면역 반응을 자극하는 환자에게 주사한다. 바람직하게는, 상기 면역계는, 치사량으로 조사된 세포 상에 나타난 하나 이상의 항원을 지니는 암 세포의 작은 집단을 표적화한다.

[0205] **재조합 폴리펩타이드 발현**

[0206] 본 발명은 재조합 GM-CSF 폴리펩타이드를 발현하도록 유전자 변형된 세포를 제공한다. 본 발명의 GM-CSF 폴리펩타이드를 실질적으로 과학 협회에 공지된 임의의 방법을 사용하여 생성시킨다. 전형적으로, 재조합 폴리펩타이드를, 적합한 발현 비히클 중의 GM-CSF 폴리펩타이드-암호화 핵산 분자 또는 그의 단편의 전부 또는 일부로 적합한 숙주 세포(예를 들어 종양 또는 신생물 세포주로부터 유래한 세포)를 형질전환시켜 생성시킨다. 상기과 같은 핵산 분자를 종양이 있는 환자로부터 유래한 세포 또는 시험관 내에서 종양 세포주로 전달할 수 있다. 상기 핵산 분자는 치료 유효 수준의 GM-CSF 단백질 또는 그의 단편이 생성될 수 있도록 흡수될 수 있는 형태로 환자의 세포에 전달되어야 한다.

[0207] 형질도입 바이러스(예를 들어 레트로바이러스, 아데노바이러스, 및 아데노-관련된 바이러스) 벡터를 특히 그의 높은 감염 효율 및 안정한 통합 및 발현 때문에 유전자 전달에 사용할 수 있다(예를 들어 문헌[Cayouette et al., Human Gene Therapy 8:423-430, 1997]; [Kido et al., Current Eye Research 15:833-844, 1996]; [Bloomer et al., Journal of Virology 71:6641-6649, 1997]; [Naldini et al., Science 272:263-267, 1996]; 및 [Miyoshi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94:10319, 1997]을 참조하시오). 예를 들어, GM-CSF 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 변체 또는 그의 단편을 레트로바이러스 벡터에 클로닝하고 그의 내생 프로모터로부터, 레트로바이러스 긴 말단 반복부로부터, 또는 관심 표적 세포 유형에 특이적인 프로모터로부터 발현을 구동할 수 있다. 사용될 수 있는 다른 바이러스 벡터는 예를 들어 우두 바이러스, 소 과필로마 바이러스, 또는 헤르페스 바이러스, 예를 들어 엡스타인-바 바이러스를 포함한다(또한 예를 들어 문헌[the vectors of Miller, Human Gene Therapy 15-14, 1990]; [Friedman, Science 244:1275-1281, 1989; Eglitis et al., BioTechniques 6:608-614, 1988]; [Tolstoshev et al., Current Opinion in Biotechnology 1:55-61, 1990; Sharp, The Lancet 337:1277-1278, 1991]; [Cornetta et al., Nucleic Acid Research and Molecular Biology 36:311-322, 1987]; [Anderson, Science 226:401-409, 1984]; [Moen, Blood Cells 17:407-416, 1991]; [Miller et al., Biotechnology 7:980-990, 1989]; [Le Gal La Salle et al., Science 259:988-990, 1993]; [Johnson, Chest 107:77S-83S, 1995]을 참조하시오). 레트로바이러스 벡터가 특히 잘 개발되었으며 임상 환경에 사용되었다(문헌[Rosenberg et al., N. Engl. J. Med 323:370, 1990]; 앤더슨 등(Anderson et al.)의 미국 특허 제 5,399,346 호). 가장 바람직하게는, 바이러스 벡터를 사용하여 GM-CSF 폴리뉴클레오타이드를 본 발명의 세포에, 상기 TLR4 작용물질을 상기 세포에 전달하기 전에, 상기 전달과 동시에, 또는 상기 전달에 이어서 투여한다.

[0208] 비-바이러스 접근법을 또한 종양이 있는 환자로부터 유래한 세포 또는 종양 세포주로부터 유래한 세포에 GM-CSF를 암호화하는 벡터를 도입하기 위해 사용할 수 있다. 예를 들어, GM-CSF를 암호화하는 핵산 분자를 리포펙타민의 존재 하에서 투여하거나(문헌[Feigner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84:7413, 1987]; [Ono et al., Neuroscience Letters 17:259, 1990]; [Brigham et al., Am. J. Med. Sci. 298:278, 1989]; [Staubinger et al., Methods in Enzymology 101:512, 1983]), 아시알로오로소점액상-폴리리신 접합체에 의해(문헌[Wu et al., Journal of Biological Chemistry 263:14621, 1988]; [Wu et al., Journal of Biological Chemistry 264:16985, 1989]), 또는 수술 조건 하에서 미세 주사에 의해(문헌[Wolff et al., Science 247:1465, 1990]) 세포에 도입시킬 수 있다. 바람직하게는 상기 핵산을 리포솜 및 프로타민과 함께 투여한다. 상기 세포를 상기 GM-CSF 암호화 벡터로 형질감염시키는 것과 동시에, 그 전에, 또는 상기에 이어서 TLR4 작용물질과 함께 리포펙타민으로 처리할 수 있다.

[0209] 시험관 내 형질감염을 수행하기 위한 방법은 칼슘 포스페이트, DEAE 텍스트란, 일렉트로포레이션, 및 원형질체 융합의 사용을 포함한다. 리포솜이 또한 세포 내로 DNA의 전달에 잠재적으로 유리할 수 있다.

[0210] 본 발명의 방법에 사용하기 위한 cDNA 발현은 임의의 적합한 프로모터(예를 들어 인간 거대세포 바이러스(CMV), 유인원 바이러스 40(SV40), 또는 메탈로티오네인 프로모터)로부터 지시되고 임의의 적합한 포유동물 조절 요소에 의해 조절될 수 있다. 예를 들어, 경우에 따라, 특정한 세포 유형에서 유전자 발현을 우선적으로 지시하는 것으로 공지된 인헨서를 사용하여 핵산의 발현을 지시할 수 있다. 상기 사용되는 인헨서는 비제한적으로 조직-또는 세포-특이성 인헨서로서 특성화된 것들을 포함할 수 있다. 한편으로, 게놈 클론을 치료 구조물로서 사용하는 경우, 상술한 프로모터 또는 조절 요소들 중 어느 하나를 포함하여, 동족 조절 서열에 의해서 또는 경우에 따라 이중 공급원으로부터 유래한 조절 서열에 의해서 조절을 매개할 수 있다.

[0211] 본 발명에 포함되는 또 다른 치료학적 접근법은 재조합 치료제, 예를 들어 재조합 GM-CSF 단백질, 변체 또는 그의 단편을 분비하는 세포를, 잠재적인 또는 실제의 병든 조직 부위에 직접(예를 들어 종양 내, 종양 주변에) 또는 전신적으로(예를 들어 임의의 통상적인 재조합 단백질 투여 기법에 의해) 투여함을 포함한다. GM-CSF 단백질을 발현하는 상기 투여되는 세포의 투여량은 개인 환자의 크기 및 건강을 포함한 다수의 인자에 따라 변한다. 임의의 특정 환자의 경우, 상기 특정한 투여량 섭생을 개인의 필요성 및 상기 조성물을 투여하거나 상기 투여를 관리하는 의사의 판단에 따라서 시간에 대해 조절해야 한다.

[0212] **자기조직 세포**

[0213] 사이토킨, 예를 들어 GM-CSF를 발현하고 TLR4 항원을 포함하는 자기조직 유전자 변형된 세포의 사용은 각 환자의 종양이 또 다른 환자로부터의 조직학적으로 유사한, MHC-합치된 종양 세포 상에서 발견되는 것들과 상이할 수 있는 종양 항원의 독특한 조합을 발현하므로 이점을 제공한다(예를 들어 문헌[Kawakami et al., J. Immunol., 148, 638-643 (1992)]; [Darrow et al., J. Immunol., 142, 3329-3335 (1989)]; 및 [Hom et al., J. Immunother., 10, 153-164 (1991)]을 참조하시오). 대조적으로, MHC-합치된 종양 세포는 상기 환자가 유전자 변형된 종양 세포 생산을 위해 그의 종양 샘플을 수득하기 위한 수술을 할 필요가 없다는 이점을 제공한다.

[0214] 하나의 실시태양에서, 종양이 있는 환자의 치료 방법은 상기 환자로부터 종양 세포를 수득하고; 상기 세포를 GM-CSF를 암호화하는 발현 벡터와 접촉시키고; 상기 세포를, 상기 세포에 식작용을 제공하거나 또는 달리 상기 세포가 TLR 작용물질을 흡수하는 조건 하에서 상기 TLR 작용물질과 접촉시키고; 상기 세포 증식을 무능으로 만들고(예를 들어 상기 세포를 조사함으로써); 상기 세포를 획득한 환자에게 상기 세포를 투여함을 포함한다. 바람직하게는, 상기 조성물을 포유동물 환자에게 피 내, 피하 또는 종양 내 투여한다.

[0215] 일부의 경우, 단일 자기조직 종양 세포는 GM-CSF를 단독으로 또는 GM-CSF를 하나 이상의 종양-관련된 항원과 함께 발현할 수 있다. 다른 경우에, GM-CSF 및 하나 이상의 종양-관련된 항원은 상이한 자기조직 종양 세포에 의해 발현될 수도 있다. 본 발명의 하나의 태양에서, 자기조직 종양 세포를, 발현에 필요한 프로모터 및 발현/조절 서열에 작동적으로 결합된, GM-CSF를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 벡터의 도입에 의해 변형시킨다. 또 다른 태양에서, 동일한 자기조직 종양 세포 또는 2차 자기조직 종양 세포를, 발현에 필요한 프로모터 및 발현/조절 서열에 작동적으로 결합된 하나 이상의 종양-관련된 항원을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 벡터의 도입에 의해 변형시킨다. 상기 하나 이상의 종양-관련된 항원을 암호화하는 핵산 서열을 동일하거나 상이한 벡터를 사용하여 동일하거나 상이한 자기조직 종양 세포에 도입시킬 수 있다. 상기 하나 이상의 종양-관련된 항원을 암호화하는 핵산 서열은 프로모터에 작동적으로 결합된 선택성 마커 서열을 추가로 포함하지 않을 수도 있다. 바람직하게는, 상기 자기조직 종양 세포는 높은 수준의 GM-CSF 및/또는 하나 이상의 전립선 종양-관련된 항원을 발현한다.

[0216] **동종이계 세포**

[0217] 하나의 실시태양에서, TLR4 작용물질을 함유하는(예를 들어 리포솜 비히클과 함께 TLR 작용물질을 포함하는) 유전자 변형된 동종이계 세포는 종양 면역원성을 증대시킬 수 있다. 본 발명에 사용된 바와 같이, "종양 세포주"는 처음에 종양 또는 다른 종양 세포로부터 유래한 세포를 포함한다. 상기와 같은 세포는 전형적으로는 배양 시 일정하지 않은 성장을 나타낸다. 하나의 태양에서, 환자로부터 면역 반응을 증대시키는 방법은 (a) 종양 세포주를 수득하고; (b) 상기 세포가 증가된 수준의 사이토킨, 예를 들어 GM-CSF를 생산할 수 있도록 만들기 위해 상기 세포주를 유전자 변형시키고; (c) 상기 세포가 TLR 작용물질을 흡수하도록 하는 조건 하에서 상기 세포를 상기 작용물질과 접촉시키고; (d) 상기 변형된 종양 세포주를 증식 무능으로 만들고; (e) 상기 종양 세포주가 수득된 것과 동일한 유형의 종양이 있거나 또는 상기 종양이 발병할 소인이 있는 환자에게 상기 종양 세포주를 투여함을 포함한다. 일부 실시태양에서, 상기 투여된 세포는 동종이계이며 환자와 MHC-합치되거나 합치되지 않는다. 상기와 같은 동종이계 주는 상기 주를 미리 제조하고, 특성화하고, 기지량의 TLR4 작용물질을 함유하고 필적할만한 양의 사이토킨을 생성시키는 바이알에 분액할 수 있다는 이점을 제공하며, 잘 특성화된 세포를

환자에게 투여하기 위해 이용할 수 있도록 보관(즉 동결)한다. 유전자 변형된 동종이계 세포의 제조 방법은 예를 들어 본 발명에 참고로 명백히 인용된 WO 00/72686에 개시되어 있다.

[0218] 임의의 적합한 투여 경로를 사용하여 동종이계 세포주 조성물을 환자에게 도입할 수 있으며, 바람직하게는 상기 조성물을 피 내, 피하 또는 종양 내 투여한다.

[0219] **TLR 작용물질**

[0220] 임의의 적합한 TLR 작용물질, 또는 작용물질들의 조합, 예를 들어 R848, GLA, 세균 리포펩타이드, 세균 리포단백질, 세균 리포테이코산, 마이코박테리아 리포글리칸, 효모 자이모산, 포린, 바이러스 이중 가닥 RNA, 리포폴리사카라이드, 지질 A, 모노포스포틸 지질 A(MPL(등록상표)), AGP, 플라젤린(Flagellin), 바이러스 단일 가닥 RNA, 이미다조퀴놀린, 세균 DNA, CpG DNA, 헤모조인, 요로병인성 세균, 및 원생동물 프로필린을 본 발명에 제공된 면역원성 조성물의 제조에 사용할 수 있다. 이들 TLR 작용물질은 당해 분야에 공지되어 있으며 예를 들어 문헌[Reed et al., Trends in Immunol. 30:23-32, 2008]에 개시되어 있고, 상기 문헌은 항원보조제 및 비히클에 대한 고찰을 추가로 제공한다. 상기 리드의 문헌은 내용 전체가 본 발명에 참고로 인용된다.

[0221] **투여**

[0222] 사이토킨(예를 들어 GM-CSF)을 발현하도록 유전자 변형되고 TLR 작용물질을 포함하는 종양 세포를 투여 전에 동결보존할 수도 있다. 바람직하게는, 상기와 같은 세포를 증식할 수 없도록("증식-무능") 처리한다. 가장 바람직하게는, 상기와 같은 세포를, 증식 무능을 허용하지만 최종적인 세포사 전에 여전히 GM-CSF의 생산을 허용하는 조사에 의해 증식-무능으로 만든다. 하나의 실시태양에서, 본 발명의 세포를 환자에게 투여하기 전에 약 50 내지 약 200 rad/분 또는 약 120 내지 약 140 rad/min의 용량으로 조사한다. 바람직하게는, 상기 세포를 상기 세포의 실질적으로 100%가 추가로 증식하는 것을 억제하기에 충분한 총 용량으로 조사한다. 바람직하게는 상기 세포를 약 10,000 내지 20,000 rad, 최적으로는 약 15,000 rad의 총 용량으로 조사한다.

[0223] 전형적으로는 치료 과정 동안 1 회 초과 투여의 TLR 작용물질 함유 사이토킨(예를 들어 GM-CSF)-발현 세포를 환자에게 전달한다. 특정한 치료 과정에 따라, 수 회의 주사를 단일 시점에서 제공할 수 있으며 이때 상기 치료를 다양한 시간 간격으로 반복할 수도 있다. 예를 들어, 초기 또는 "기폭(priming)" 치료에 이어서 1 회 이상의 "증폭(booster)" 치료를 수행할 수도 있다. 상기와 같은 "기폭" 및 "증폭" 치료를 전형적으로는 동일한 투여 경로에 의해서 및/또는 대략 동일한 부위에서 전달한다. 수회 용량을 투여하는 경우, 1차 면역화 용량은 후속 면역화 용량보다 더 많을 수도 있다. 예를 들어 $5 \times 10^{7-8}$ 기폭 용량에 이어서 수 회 증폭 용량의 10^{7-8} 내지 $3 \times 10^{7-9}$ GM-CSF 및 종양 항원 생산 세포를 투여할 수 있다.

[0224] TLR 작용물질을 포함하는 유전자 변형된 세포의 단일 주사는 전형적으로 적어도 약 10^5 내지 10^9 세포, 예를 들어 1×10^6 , 2×10^6 , 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , $x \times 10^8$, $x \times 10^9$ 세포이다. 사이토킨 및 종양 항원 생산 세포의 수를 예를 들어 주어진 세포 면역요법 조성물에 의해 생성된 사이토킨 및/또는 종양 항원의 수준에 따라 조절할 수도 있다. 바람직한 실시태양에서, 상기 변형된 세포를 근육 내 또는 정맥 내 주사한다.

[0225] 일부 실시태양에서, 세포 면역요법의 사이토킨-생산 세포를 24 시간당 세포 100만 개당 1, 5, 10, 25, 75, 100, 200, 300, 400, 500 ng 이상의 GM-CSF를 생산할 수 있는 용량으로 투여한다. 일부 실시태양에서, 본 발명의 면역원성 조성물을 24 시간당 세포 100만 개당 500 ng 이상의 특정 종양 항원을 생산할 수 있는 용량으로 투여한다. 최적의 세포 투여량 및 비의 측정은 통상적인 측정의 문제이며 본 발명에 제공된 명세에 비추어, 숙련자의 기술 내에 있다.

[0226] 본 발명의 세포를 상기 세포의 제조에 사용된 대부분의 추가적인 성분들을 제거하도록 처리한다. 특히, 배양 배지 중의 송아지 태아 혈청, 소 혈청 성분, 또는 다른 생물학적 보충물을 제거한다. 하나의 실시태양에서, 상기 세포를, 예를 들어 반복된 온화한 원심분리에 의해, 적합한 약물학적으로 상용성인 부형제 내로 세척한다. 상용성 부형제는 다양한 세포 배양 배지, 등장성 염수, 생리학적으로 상용성인 완충제, 예를 들어 포스페이트 또는 hepes 존재 또는 부재, 및 영양소, 예를 들어 텍스트로스, 생리학적으로 상용성인 이온, 또는 아미노산, 특히 다른 면역원성 성분이 없는 것들을 포함한다. 생체 내 투여용 조성물은 적합한 담체 또는 희석제를 포함할 수 있으며, 이들은 추가로 약학적으로 허용 가능할 수 있다. 예를 들어, 운반 시약, 예를 들어 알부민 및 혈장 분획 및 불활성 증점제를 사용할 수 있다. 상기와 같은 조성물의 제조 수단이 문헌에 개시되었다. 예를

들어 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences 19th edition, Genarro, A. Ed. (1995)]을 참조하시오.

[0227] 약학적 투여형에서, 본 발명에 개시된 면역원성 조성물을 단독으로 또는 당해 분야에 공지된 바와 같은 다른 약학적으로 활성인 화합물과 함께 및 공동으로 사용할 수 있다.

[0228] **약학적 치료제**

[0229] 본 발명은 종양의 치료에 유용한 종양 세포-기재 백신(예를 들어 GM-CSF를 발현하고 TLR4 작용물질 또는 그의 단편을 포함하는 증식-무능 종양 세포)을 포함한다. 하나의 특정한 실시태양에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 종양 또는 신생물 특이성 항원에 대한 면역 반응을 유도하거나 증대시키기에 유용하다. 본 발명에 사용된 바와 같은 "증대된 면역 반응"이란 어구는 특정한 면역 활성화의 검출 가능한 증가(예를 들어 B-세포 및/또는 T-세포 반응의 증가)가 검출될 수 있음을 의미한다. 증대된 면역 반응의 예는 본 발명의 사이토킨-발현 세포 백신의 투여 전보다 낮은 수준으로 검출되는 항원에 결합하는 항체의 양의 증가이다. 또 다른 예는 증가된 세포 면역 반응이다. 세포 면역 반응은 T 세포를 수반하며, 시험관 내(예를 들어 크로뎀 방출 분석에 의해 측정됨) 또는 생체 내에서 관찰될 수 있다. 증대된 면역 반응은 전형적으로는 특정한 면역 세포 개체수의 증가를 동반한다.

[0230] 또 다른 실시태양에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 종양 세포 성장의 억제에 유용하다. "종양 성장을 억제하는"이란 어구는 종양 질량, 종양 부피, 종양 세포의 양 또는 상기 종양의 성장 속도의 임의의 측정 가능한 감소를 지칭한다. 종양 질량의 측정 가능한 감소는 당해 분야의 숙련자들에게 공지된 다수의 방법들에 의해 탐지될 수 있다. 여기에는 접근할 수 있는 종양의 직접적인 측정, 종양 세포(예를 들어 혈액 중에 존재하는)의 카운팅, 종양 항원(예를 들어 전립선 특이성 항원(PSA), 알파태아단백질(AFP))의 측정 및 다양한 가시화 기법(예를 들어 MRI, CAT-스캔 및 X-선)이 포함된다. 상기 종양 성장 속도의 감소는 전형적으로는 암 환자의 경우보다 긴 생존 시간과 상관이 있다. 더욱 다른 실시태양에서, 본 발명의 세포-기재 백신은 종양 성장 및/또는 주변 조직을 침습하거나 또는 달리 전이하는 종양 세포의 성향을 방지하거나 감소시키기에 유용하다. 치료학적 용도의 경우, 본 발명에 개시된 백신을 전신으로, 예를 들어 약학적으로 허용 가능한 완충제, 예를 들어 생리 식염수 중에서 제형화하여, 또는 국소로 투여할 수 있다. 바람직한 투여 경로는 예를 들어 면역 반응을 유도하거나 증대시키기에 충분한 종양 내, 종양 주변, 피하, 정맥 내, 복강 내, 근육 내, 또는 피 내 주사를 포함한다. 인간 환자 또는 다른 동물의 치료를 생리학적으로 허용 가능한 담체 중의 치료 유효량의 본 발명에서 확인된 치료제를 사용하여 수행할 것이다. 적합한 담체 및 그의 제형이 예를 들어 문헌[E.W. Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences]에 개시되어 있다. 상기 투여되는 치료제의 양은 투여 방식, 환자의 연령 및 체중, 및 종양의 임상적 증상에 따라 다양하다. 일반적으로, 양은 종양과 관련된 다른 질병의 치료에 사용되는 다른 작용제에 대해 사용된 경우의 범위 내에 있을 것이지만, 몇몇 경우에 상기 화합물의 증가된 특이성으로 인해 보다 낮은 양이 필요할 것이다.

[0231] **약학 조성물의 제형**

[0232] 종양 치료용 세포-기재 백신의 투여는, 다른 성분들과 합하여, 종양의 개선, 감소 또는 안정화에 유효한 백신 농도를 생성시키는 임의의 적합한 수단에 의할 수 있다. 상기 백신은 임의의 적합한 담체 물질 중에 임의의 적합한 양으로 함유될 수 있고, 일반적으로는 상기 조성물의 전체 중량의 1 내지 95 중량%의 양으로 존재한다. 상기 세포-기재 백신을 비경구(예를 들어 피하, 정맥 내, 근육 내, 또는 복강 내) 투여 경로에 적합한 투여형으로 제공할 수 있다. 바람직한 투여 방법은 근육 내, 종양 내, 또는 정맥 내 주입이다. 상기 약학 조성물을 통상적인 약학적 실행에 따라 제형화할 수 있다(예를 들어 문헌[Remington: The Science and Practice of Pharmacy (20th ed.), ed. A. R. Gennaro, Lippincott Williams & Wilkins, 2000] 및 [Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, eds. J. Swarbrick and J. C. Boylan, 1988-1999, Marcel Dekker, New Yo]을 참조하시오).

[0233] **비경구 조성물**

[0234] 상기 세포-기재 백신을 포함하는 약학 조성물을, 통상적인 무독성의 약학적으로 허용 가능한 담체 및 보조제를 함유하는 투여형, 제형 중에서 또는 적합한 전달 장치 또는 이식물을 통해서 주사, 주입 또는 이식에 의해 비경구(피하, 정맥 내, 근육 내, 복강 내 등)로 투여할 수 있다. 상기와 같은 조성물의 제형 및 제제는 약학 제형 분야의 숙련자들에게 널리 공지되어 있다. 제형을 상기 문헌[Remington: The Science and Practice of Pharmacy]에서 찾을 수 있다.

[0235] 비경구용 조성물을 단위 투여형(예를 들어 단일 용량 앰플)으로, 또는 수회 용량을 함유하고 적합한 보존제가

첨가될 수도 있는(하기 참조) 바이알 중에서 제공할 수도 있다. 상기 조성물은 용액, 현탁액, 유화액, 주입 장치, 또는 이식용 전달 장치의 형태로 있거나, 또는 사용 전에 물 또는 또 다른 적합한 비히클로 재조성되는 건조 분말로서 제공될 수도 있다. 종양을 감소시키거나 개선하는 활성제와 별도로, 상기 조성물은 적합한 비경구적으로 허용 가능한 담체 및/또는 부형제를 포함할 수도 있다. 상기 활성 치료제(들)를 조절된 방출을 위해 미소구, 미세캡슐, 나노입자, 리포솜 등에 혼입할 수도 있다. 더욱 또한, 상기 조성물은 현탁액, 용해제, 안정제, pH-조절제, 긴장 조절제, 및/또는 분산제를 포함할 수도 있다.

[0236] 상기 가리킨 바와 같이, 본 발명에 따른 약학 조성물은 멸균 주사에 적합한 형태로 있을 수 있다. 상기와 같은 조성물을 제조하기 위해서, 적합한 치료제(들)를 비경구적으로 허용 가능한 액체 비히클 중에 용해하거나 현탁한다. 사용될 수 있는 허용 가능한 비히클 및 용매 중에는, 물, 적합한 양의 염산, 수산화 나트륨 또는 적합한 완충제의 첨가에 의해 적합한 pH로 조절된 물, 1,3-부탄다이올, 링거액, 및 등장성 염화 나트륨 용액 및 텍스트로스 용액이 있다. 수성 제형은 하나 이상의 보존제(예를 들어 메틸, 에틸, 또는 n-프로필 p-하이드록시벤조에이트)를 또한 함유할 수 있다. 상기 화합물들 중 하나가 물에 단지 드물게 또는 약간 용해성인 경우에, 용해 향상제 또는 용해제를 첨가하거나, 또는 용매가 10 내지 60% w/w의 프로필렌 글리콜 등을 포함할 수도 있다.

[0237] **복합 요법**

[0238] 임의로, 본 발명의 암 백신 기재 치료제를 임의의 다른 화학요법제와 함께 투여할 수 있으며; 상기와 같은 방법은 숙련자에게 공지되어 있고 문헌[E.W. Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences]에 개시되어 있다. 특히, 본 발명의 면역원성 조성물을 아비라테론 아세테이트, 알트레타민, 무수빈블라스틴, 아우리스타틴, 백사로텐, 바이칼류타미드, BMS184476, 2,3,4,5,6-펜타플루오로-N-(3-플루오로-4-메톡시페닐)벤젠 설펜아미드, 블레오마이신, N,N-다이메틸-L-발릴-L-발릴-N-메틸-L-발릴-L-프롤릴-L-프롤린-t-부틸아미드, 카켄틴, 세마도틴, 클로람부실, 사이클로포스파미드, 3',4'-다이테하이드로-4'-데옥시-8'-노르빈-칼류코블라스틴, 도세탁셀, 도세탁셀, 사이클로포스파미드, 카보플라틴, 칼머스틴(BCNU), 시스플라틴, 크립토포신, 사이클로포스파미드, 시타라빈, 다카바진(DTIC), 닥티노마이신, 다우노루비신, 데시타빈 둘라스타틴, 독소루비신(아드리아마이신), 에토포시드, 5-플루오로유라실, 피나스테라이드, 플루타미드, 하이드록시우레아 및 하이드록시우레아탁산, 이포스파미드, 리아로졸, 로니다민, 로머스틴(CCNU), MDV3100, 메클로레타민(질소 머스타드), 멜팔란, 미보블린 이세티오네이트, 리족신, 세르테네프, 스트렙토조신, 미토마이신, 메토크세이트, 탁산, 닐루타미드, 오나프리스톤, 패클리탁셀, 프레드니머스틴, 프로카바진, RPR109881, 스트라머스틴 포스페이트, 타목시펜, 타소네르민, 탁솔, 트레티노인, 빈블라스틴, 빈크리스틴, 빈데신 설펜아미드, 및 빈플루닌 중 하나 이상과 함께 투여할 수 있다.

[0239] 본 발명의 복합 요법에서, 상기 요법 성분들을 동시에, 또는 서로 1, 3, 5, 7, 14, 21 또는 28일 이내에, 종양의 성장을 억제하기에 충분한 양으로 투여한다. 암의 유형 및 그의 발병 단계에 따라, 상기 복합 요법을, 암을 치료하거나, 암의 확산을 늦추거나, 암의 성장을 늦추거나, 원래의 종양으로부터 신체의 다른 부분으로 확산될 수도 있는 암 세포를 살해 또는 저지하거나, 상기 암에 의해 유발된 증상을 완화하거나, 또는 우선 첫 번째로 암을 예방하기 위해 사용할 수 있다. 복합 요법은 또한 통증 또는 불편함을 야기하는 암세포를 제거함으로써 사람들이 보다 편안하게 살도록 도울 수 있다.

[0240] 본 발명 조합의 투여는 각 화합물의 보다 낮은 용량의 투여를 허용하여, 어느 한 화합물 단독의 투여에 비해 유사한 효능 및 더 낮은 독성을 제공한다. 한편으로, 상기와 같은 조합은 유사하거나 감소된 독성으로 종양을 치료하는데 개선된 효능을 생성시킨다.

[0241] **키트**

[0242] 본 발명은 종양 치료 또는 예방용 키트를 제공한다. 하나의 실시태양에서, 상기 키트는 단위 투여형의, 유효량의 종양 세포-기재 백신을 함유하는 치료 또는 예방학적 조성물을 포함한다. 일부 실시태양에서, 상기 키트는 치료 또는 예방학적 세포 조성물을 함유하는 멸균 용기를 포함하며; 상기와 같은 용기는 상자, 앰플, 병, 바이알, 튜브, 주머니, 파우치, 발포 팩, 또는 당해 분야에 공지된 다른 적합한 용기일 수 있다. 상기와 같은 용기는 플라스틱, 유리, 적층된 종이, 금속 호일, 또는 약제의 유지에 적합한 다른 물질로 제조될 수 있다.

[0243] 경우에 따라 본 발명의 종양 세포-기재 백신을 암(예를 들어 흑색종, 유방암)이 있거나 암이 발병할 위험이 있는 환자에게 투여하기 위한 설명서와 함께 제공한다. 상기 설명서는 일반적으로 종양의 치료 또는 예방을 위한 상기 조성물의 용도에 관한 정보를 포함할 것이다. 다른 실시태양에서, 상기 설명서는 하기 중 하나 이상을 포함한다: 치료제의 명세서; 허혈 또는 그의 증상의 치료 또는 예방을 위한 투여 스케줄 및 투여; 예방책; 경고; 적응증; 반대-적응증; 용량 초과 정보; 부작용; 동물 약물학; 임상 연구; 및/또는 참고문헌. 상기 설명서를 용

기(존재하는 경우)에 직접 인쇄하거나, 또는 표지로서 상기 용기에 적용하거나, 또는 별도의 시트, 팸플릿, 카드로서, 또는 상기 용기 내에 또는 상기 용기와 함께 공급된 끼우개로서 제공할 수 있다.

[0244] 본 발명의 실시는 달리 나타내지 않는 한, 분자 생물학(제조합 기법 포함), 미생물학, 세포 생물학, 생화학 및 면역학의 통상적인 기법을 사용하며, 이들은 숙련가의 이해 범위 내에 있다. 상기와 같은 기법들은 문헌, 예를 들어["Molecular Cloning: A Laboratory Manual", second edition (Sambrook, 1989)]; ["Oligonucleotide Synthesis"(Gait, 1984)]; ["Animal Cell Culture"(Freshney, 1987)]; ["Methods in Enzymology""Handbook of Experimental Immunology"(Weir, 1996)]; ["Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells"(Miller and Calos, 1987)]; ["Current Protocols in Molecular Biology"(Ausubel, 1987)]; ["PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis, 1994)]; ["Current Protocols in Immunology"(Coligan, 1991)]에 충분히 설명되어 있다. 상기 기법들을 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 및 폴리펩타이드의 생산에 적용할 수 있으며, 상기 기법들은 그 자체가 본 발명의 수행 및 실행에서 고려될 수 있다. 특정 실시태양들에 특히 유용한 기법들을 하기 섹션에서 논의할 것이다.

[0245] 하기의 실시예들을 당해 분야의 통상적인 숙련가들에게 본 발명의 분석, 선별, 및 치료 방법의 수행 및 사용 방법에 대한 완전한 개시 및 기술을 제공하기 위해 나타내며, 이들 실시예는 발명자들이 그들의 발명으로서 간주하는 범위를 제한하고자 하는 것은 아니다.

[0246] **실시에**

[0247] **실시예 1: TLR 작용물질 증대된 GVAX(TEGVAX)의 제형**

[0248] 국소적인 고유 면역세포 활성화를 증대시킬 뿐만 아니라 통형 수용체 4(TLR4) 자극의 전신 독성을 최소화하고 종양 세포에 대한 TLR4R 자극을 최소화하기 위해서, 리포폴리사카라이드(LPS)를 GVAX(TEGVAX-TLR4 증대된 GVAX) 내로 제형화하였다. 상업적으로 입수할 수 있는 리포솜 벡터-리포펙타민-를 사용하여 치사 조사 전 GVAX 세포 내로의 LPS의 흡수를 최적화하였다. 흡수 정도를 정량분석하기 위해서, LPS-DIPY로메텐 비오론 다이플루오라이드(BODIPY) 형광단을 사용하여 LPS-BODIPY로 제형화된 세포의 98%를 갖는 다양한 최적화 조건을 시험하였다(도 1). 세포당 흡수된 LPS의 총량을 정량분석하기 위해서 리플루스 아메보사이트(*Limulus Amebocyte*) 용해물(LAL) 분석(캠브렉스(Cambrex))을 사용하여, LPS 제형을 최적화한 리포펙타민 방법으로 4.73+/-0.2 ng의 LPS가 5 x 10⁵ 세포 내로 흡수됨을 입증하였다. 각각의 생체 내 쥐 종양 실험에 대해서, TEGVAX의 분액들을 LAL 분석뿐만 아니라 GM-CSF ELISA 분석을 사용하여 상기 TEGVAX 제형 중에 필적할만한 양의 LPS 및 GM-CSF가 확실한지를 시험하였다. 전형적인 GM-CSF가 50 내지 200 ng/ml/10⁶ 세포/일의 범위로 분비되었다.

[0249] **실시예 2: TEGVAX는 다수의 쥐 암 모델에서 생체 내 종양 억제 반응을 유도한다.**

[0250] TEGVAX의 효능을 처음에 B16 흑색종 쥐 모델에서 시험하였으며, 이때 TEGVAX를 치료 모델에서 종양 접종 후 3 내지 5일째에 종양 내 전달하였다. 종양 내 주사에 대한 근본적인 이유에 대한 부분은 상기 종양과 배액 림프 질 사이를 순환하는 국소 항원 제공 세포(APS)를 확실히 표적화한다는 것이었다. 상기 시점들은 면역성 결여 및 내성 종양 특이성 T-세포가 B16 주사 후 3일째 정도로 일찍 제공되기 때문에 선택되었다. 도 2에 도시된 바와 같이, TEGVAX는 GVAX 처리에 비해 B16 종양의 성장 속도를 감소시켰다. 성장 속도에 있어서 이러한 통계학적 유의수준 차이는 생존 곡선 차이로 번역되었다(도 2). 그러나, TEGVAX로 처리된 모든 C57B1/6 마우스는 결국 주사 부위에서 큰 종양을 나타내었다. 5 x 10⁵ GVAX 세포당 4.73 ng의 LPS가 측정되었으면, 대조용 실험을 수행하여 동 물 량의 LPS를 상기 TEGVAX 처리 그룹에서와 같이 종양 주변에 주사하였다. 상기 마우스는 GVAX 또는 PBS로 처리된 종양 함유 마우스와 성장 속도 또는 생존에 차이가 없었다(도 7). 리포솜 제형 없이 GVAX로 주사된 동 물의 LPS가 또한 PBS 대조군에 비해 종양 억제 반응을 입증하지 못했으며, 이는 LPS의 세포 내 제형이 그의 종양 억제 반응에 중요함을 암시한다(도 7). TEGVAX는 또한 전신적인 종양 억제 반응을 유도하였다(도 8). 상기 B16 흑색종 모델을 사용하는 경우, 마우스를 종양 접종 부위로부터 대측성 사지에 또는 종양 주변에 TEGVAX로 처리하였으며, 상기 두 처리 그룹은 모두 유사한 생체 내 종양 성장 속도를 나타내었다(도 8).

[0251] TEGVAX가 또한 다른 쥐 종양 모델에서 종양 억제 반응을 나타낼 수 있는지를 시험하기 위해서, SCCFVII/SF 세포를, 야생형 TLR4R을 갖는 동계 C3H/HeOJ 마우스의 옆구리에 피하 주사하였다. 일단 종양이 촉진되었으면, 상기 종양을 쥐 SCCFVII/SF 편평세포 암종 세포로부터 제조된 TEGVAX 또는 GVAX로 처리하였다. B16 모델을 사용한 상기 TEGVAX 실험에 필적하게, TEGVAX는 현저한 종양 억제 반응을 나타내었다. 다시 한번, TEGVAX로 처리된 모든 마우스는 결국 안락사를 요하는 부피가 커진 종양을 발생시켰다. SCCFVII/SF 마우스 모델에서 같은 자리

주사는 허 및 구강 저 종양의 측정에 내재하는 부정확성으로 인해 수행하지 않았다.

[0252] 마지막으로, TEGVAX를 또한 CT26 결장 암종 모델에서 시험하였으며, 상기 모델 또한 종양 억제 반응을 나타내었고 이때 상기 이식된 종양의 성장 속도는 GVAX 단독으로 처리한 CT26 종양보다 통계학적으로 더 느렸다(도 2). CT26의 경우, TEGVAX로 처리된 쥐의 40 내지 60%는 실제로 종양의 회귀가 있었다. CT26 세포를 생존한 마우스로부터 수확하고 종양을 재-이식하였으며, 어느 마우스도 어떠한 종양을 발생시키지 않았고, 이는 완전한 면역 요법 치유를 입증한다. 상기 CT26 모델의 경우, TEGVAX와 동 물 량으로, 치사량 조사된 HEK293 세포와 제형화된 LPS를 또한 시험하였다. 종양 항원 및 GMCSF의 동일한 조합 없이 세포 기재 백신 내로 제형화된 LPS는 상기 CT26 모델에서 종양 억제 반응을 유도하지 못했다.

[0253] **실시예 3: TEGVAX에 대한 종양 억제 반응은 MyD88 의존적이다.**

[0254] 상기 나타난 생체 내 종양 효과가 실제로 TLR4 신호전달의 도입에 기인하였는지를 확인하기 위해서, B16 종양을 MyD88 -/- 유전자형을 갖는 C57B1/6 마우스에 접종하였다. 이어서 상기 종양을 TEGVAX 또는 GVAX로 처리하였다. 도 3은 GVAX 세포 내로 제형화된 TLR4 작용물질의 첨가에 의해 증대된 종양 억제 반응이 사실상 TLR4 자극에 부차적임을 나타낸다. 상기 GVAX 그룹에서 초기에 나타난 가벼운 차이는 결국 상기 PBS 처리된 그룹의 성장 곡선과 중복되었다(도 7). MyD88은 TLR4 신호전달의 필수적인 세포 내 매개자이고, MyD88 빈 마우스에서 TLR4 신호전달의 부재는 야생형 C57B1/6 마우스에서 일관되게 기록된 증대된 생체 내 종양 억제 반응을 더 이상 나타내지 않았다.

[0255] **실시예 4: TEGVAX는 종양 미세환경에서 T-세포 침윤 및 APC의 증대를 유도한다.**

[0256] TEGVAX 처리로부터 생체 내 종양 억제 반응의 잠재적인 기전을 검사하기 위해서, 상기 종양 조직을 처리 후 수확하고 림프구 침윤물을 분석하였다. 도 4에 도시된 바와 같이, TEGVAX로 처리된 종양은 대조용 처리 및 GVAX 처리된 종양에 비해 정량적으로 증가된 CD4 및 CD8 침윤을 가졌다. 더욱이, TLR4 작용물질이 국소의 전문적인 APC가 성숙하도록 자극한다는 가설이 가정된 경우, CD86에 대한 항체에 대해 면역염색을 수행하였으며 TEGVAX로 처리된 종양 미세환경에서 CD86+ 세포의 정량적인 증대가 주목되었다. 대식세포가 종양 조직에서 증가하였는지의 여부를 또한 검사하였으나, 처리 그룹들 간에 F4+ 대식세포의 침윤에 있어서 유의수준 차이는 발견되지 않았다.

[0257] **실시예 5: 국소 배액 림프절에서 수지상 세포 활성화의 증대**

[0258] 도 4로부터의 면역염색 데이터는 TLR4 작용물질 제형화된 세포 백신이 활성화된 국소 수지상 세포의 수를 증가시킬 수 있다는 가설과 일치하였다. DC는 효과기 세포가 내성발생 또는 세포독성으로 되는지의 여부를 지시할 수 있는 중요한 1차 항원 처리 세포이다. 이론에 얽매이고자 하는 것은 아니지만, GVAX 내로 흡수된 LPS는 종양 항원과 함께 세포 찌꺼기 및 미셀로서 침윤성 DC 내로 포식되는 듯하다. 따라서, TEGVAX 처리로 증가된 수의 활성화된 국소 DC 집단이 있을 것처럼 보였다. 이러한 가설을 시험하기 위해서, 수지상 세포를 PBS, GVAX 또는 TEGVAX로 처리된 종양 함유 마우스로부터의 배액 림프절로부터 정제하고 B220 및 CD11c로 통상적인 DC 집단을 걸러내었다. 이들 걸러진 세포로부터의 DC 활성화 마커 CD86, CD80 및 MHCII의 다중항목 염색은 상기 TEGVAX 처리된 그룹으로부터의 수지상 세포가 상기 GVAX 처리된 그룹 또는 대조군 처리된 그룹에 비해 더 큰 활성화된 DC 개체수(도 5)를 가짐을 보인다.

[0259] **실시예 6: 종양 특이성 세포독성 T-세포가 TEGVAX로 처리된 마우스에서 확대된다.**

[0260] SCCFVII/SF 및 B16 모델과 함께 CT26 모델을 연구하는 하나의 근본적 이유는 AH1-특이성 세포독성 T-세포의 정량분석을 위한 시약들의 유효성이었다. 국소적인 수지상 세포를 활성화하는 TEGVAX에 대한 생체 내 종양 억제 반응이 종양 특이성 세포독성 효과기 세포의 하류 개체수를 증가시킬 수 있는지의 여부를 시험하기 위해서, ELISPOT 분석을 수행하였다. 면역원성 MHC 부류 I L^d 제한된 AH1 펩타이드를 사용하여, 상기 배액 림프절 및 비장으로부터 T-세포를 수확하고 IFN-생산 세포독성 T-세포를 AH1 펩타이드(상기 ELISPOT 분석에서 APC와 함께 적용된 CT26 세포에 대한 면역우세 펩타이드)의 존재 하에서 선별하였다. 최소의 AH1 특이성 T-세포가 TEGVAX 처리 후 5일째에 검출되었지만, 도 6A에 도시된 바와 같이, 제8일까지, 배액 림프절 및 비장 모두에서 TEGVAX 그룹 중에 통계학적으로 유의수준의 AH1 특이성 T-세포가 존재하였다. 생체 내 세포독성 T-림프구(CTL) 분석은 또한 처리되지 않은 그룹에 비해 TEGVAX 처리된 그룹에서 AH1 펩타이드를 접화하는 증대된 세포독성 T-세포를 입증하였다(도 6B). 상기 B16 모델로부터 p15E 특이성 T-세포를 사용한 생체 내 CTL 분석이 또한 상기 TEGVAX 그룹에서 증대된 p15E-특이성 T-세포를 입증하였다.

- [0261] 실시예 7: GVAX와 함께 TLR4 작용물질은 종양 세포 성장을 감소시키고 AH1-특이성 세포독성 T-세포의 수를 증가시켰다
- [0262] 상기 보고된 바와 같이, TEGVAX는 3 개의 별도의 쥐 모델에서 시험관 내 종양 반응을 개선시켰다. 상기 B16 흑색종 모델, CT26 결장 암종 모델뿐만 아니라 SCCVII 허 편평세포 모델에서, 확립된 종양 내로 종양 내 주사된 TEGVAX는 GVAX 단독에 비해 종양 성장을 감소시켰다. 종양 접종 후 TEGVAX를 사용한 전신 처리는 또한 생체 내에서 B16 성장 속도를 감소시켰다. 상기 종양 억제 반응을 유도하는 면역학적 기전을 검사하기 위해서, 상기 CT26 쥐 모델을 사용하여 종양 억제 세포독성 T-세포(CTL) 반응을 연구하였다. 잘 확립된 Elispot 분석 및 생체 내 CTL 분석을 사용한 경우, TEGVAX 처리된 마우스는 처리 후 8일까지 증가된 수의 AH1-특이성 세포독성 T-세포(CTL)를 나타내었다. 이러한 실험에서, 전임상 모델에서의 종양 성장 속도는 TLR4 작용물질과 GVAX와의 병용에 의해 감소되었다.
- [0263] 실시예 8: 합성 TLR4 작용물질 - 글루코피라노실 지질 A 유사 화합물(GLA) -은 GVAX 및 TLR7 및 TLR8 작용물질 (R848)과 함께 흑색종 세포의 성장을 현저하게 감소시켰다
- [0264] 종양 미세환경에서 한 가지 보다 많은 유형의 TLR 신호전달이 종양 억제 반응에 대해 TLR4 작용물질의 또 다른 형태를 개선할 수 있는지의 여부를 결정하기 위해서, 합성 글루코피라노실 지질 A 유사 화합물을 GVAX와 함께 사용하였다. GLA 제형화된 GVAX를 또한 R848, TLR7 및 TLR8 작용물질과 병용하였다. 생체 내 종양 처리 실험을 B16 흑색종 마우스를 사용하여 수행하였다. 상기 B16 흑색종 모델을 사용하는 경우, 상기 GVAX, GLA 및 R848의 조합은 야생형 마우스에서 공격적인 B16 종양의 성장을 방지하였다(도 9).
- [0265] 상기 백신 제형을 종양 접종 후 2 내지 4일째에 주사하였다. 전형적으로, GVAX는 단독으로 이들 불량한 면역원성 종양 세포에서 생체 내 B16의 성장을 방지하지 못한다. 이들 마우스에게 B16 흑색종 세포주를 재-주사한 경우, 상기 접종 종양 세포는 성장하지 않았다. 상기 ELISPOT 및 생체 내 CTL 분석을 모두 수행하여 p15E 특이성 CD8+ T-세포를 정량분석하였으며, GVAX, GLA, R848로 처리된 마우스는 GVAX 단독으로 처리된 마우스보다 현저하게 더 많은 p15E 특이성 CD8+ T-세포를 가졌다.
- [0266] 실시예 9: GVAX/GLA/R848의 조합은 수지상 세포 활성화를 증대시켰다
- [0267] 조직화된 종양 조직을 처리하기 위해서, 상기 GVAX/GLA/R848 제형을 사용하여 촉진 가능한 B16 종양을 처리하였다. 상기 백신 제형을 상기 촉진 가능한 종양 조직으로부터 먼 부위에 종양 접종 후 7 내지 10일째에 주사하였다. 다시 한번 상기 TLR 작용물질 증대된 GVAX는 상기 종양 성장 속도를 감소시켰다(도 10).
- [0268] ELISPOT 및 생체 내 CTL 분석을 각각의 상기 그룹들에서 수행하여 p15E 특이성 CTL의 수준을 정량분석하였으며, 결과는 GVAX/GLA/R848로 처리된 마우스가 생체 내 종양 성장 속도와 상관된 가장 많은 수의 p15E-특이성 T-세포를 가짐을 입증하였다(도 11).
- [0269] 상기 GVAX/GLA/R848 제형에 의해 상기 종양 억제 반응이 제공되었다면, 상기 TLR 작용물질 증대된 백신은 상기 수지상 세포를 자극하는 것으로 가정되었다. 따라서, 각각의 처리 그룹으로부터 배액 림프절 및 비장을 수확하고, 상기 수지상 세포의 활성화 상태를 검사하였다. CD11c+ 및 B220+ 세포에 대해 CD80 및 CD86 활성화 마커를 사용하는 경우, 상기 GVAX/GLA/R848 처리된 그룹은 현저하게 증대된 활성화된 수지상 세포를 나타내었다(도 12).
- [0270] 각각의 처리 그룹으로부터의 종양 조직을 면역조직화학을 사용하여 분석하였다. 보다 많은 수의 CD4+, CD8+ 및 CD86+ 세포가 GVAX/GLA/R848로 처리된 종양에서 발견되었다. 최종적으로, 사이토킨 환경을 각각의 처리 그룹들에서 검사하여 I1-12가 상기 TLR 작용물질로 처리된 마우스에서 상승되었는지의 여부를 측정하였다. CD11c 양성 세포를 배액 림프절과 비장 모두에서 수확하고, I1-12 사이토킨의 수준을, 상기 T-세포 레퍼토리가 종양 억제 Th1 반응을 향하게 하는 능력에 대해 검사하였다(도 13). GVAX/GLA/R848 처리된 마우스는 I1-12(상기는 T-세포 환경이 Th1 반응을 향하게 하는 1차 사이토킨이다)를 발현하는 통계학적 유의수준의 CD11c+ 세포 수를 가졌다. 이는 상기 배액 림프절 및 비장 모두에서 기록되었다.
- [0271] 요약하면, 상기 결과는 GVAX 플랫폼을 다중 TLR 작용물질과 함께 사용하는 조합적인 접근법이 고형 종양의 치료에서 증가된 효능을 가짐을 보였다. GVAX와 TLR4 및 TLR7/8 작용물질과의 조합은 생체 내에서 종양 억제 반응을 개선시킨다. 상기 개선된 종양 억제 반응은 증가된 수의 활성화된 수지상 세포, 증가된 수의 종양 특이성 CTL, 및 증가된 수의 CD11c+(배액 림프절 및 비장에서 I1-12를 분비할 수 있다)와 상관이 있다.
- [0272] 실시예 10: GVAX 세포 백신과의 TLR 작용물질의 특정한 제형화 시간은 종양 억제 활성의 생체 내 효능을 개선시

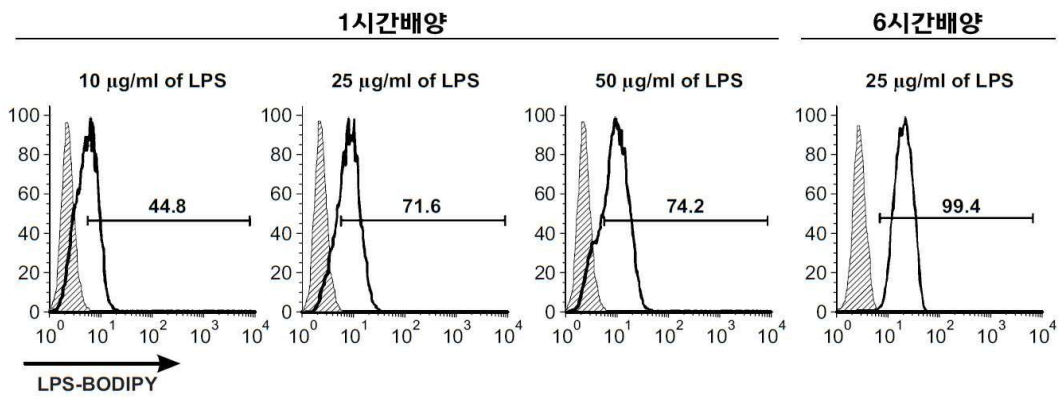
킨다

- [0273] 종양 억제 활성화에 대한, TEGVAX 제형 형성 중 GVAX와 TLR 작용물질의 배양 시간의 효과를 평가하였다. GLA/R848 및 GVAX를 함유하는 3 개의 TEGVAX 제형의 패널을, 상기 GLA/R848과 GVAX와의 배양 길이가 각 제형 중에서 변화도록(30 분, 1 시간 및 2 시간) 제조하였다. 상기 각각의 TEGVAX 제형을 확립된 B16 종양을 함유하는 마우스에게 투여하고 상기 B16 종양의 상대 부피를 24 시간에 걸쳐 측정하였다(도 14). 대조용으로서 GVAX 및 GLA/R848을 혼합 없이(도 14에서 "별도로") 투여하였다. 추가적인 대조군은 비히클 단독으로 이루어졌다. 비히클의 존재 하에서 GLA 및 R848을 조사 전 30 분 미만으로 GVAX와 혼합한 경우, 상기 제형은 종양 억제 활성화 없었다. 상기 종양 억제 활성화는 GVAX와 TLR 작용물질을 2 시간 넘게 배양하는 경우 또한 감소하였다. 최대의 종양 억제 활성화는 비히클의 존재 하에서 상기 GLA 및 R848을 1 시간 동안 GVAX와 혼합하는 경우 TEGVAX 제형에서 나타났다(도 14).
- [0274] 상술한 결과들을 하기의 방법 및 물질을 사용하여 획득하였다.
- [0275] 쥐 종양 세포주
- [0276] SCCFVII/SF 두경부 편평세포 암종, B16-F0 흑색종 및 GM-CSF를 분비하도록 형질도입된 B16-F0 세포주를 10% 열-불활성화된 송아지 태아 혈청, 페니실린(100 U/ml) 및 스트렙토마이신(100 U/ml)을 함유하는 RPMI 1640 배지에서 배양하였다. CT26 결장직장 암종 세포주를, MEM 불필수 아미노산(시그마(Sigma), 세인트 루이스 소재), 1 mM 나트륨 피루베이트 및 2 mM의 L-글루타민의 첨가와 함께 유사하게 배양하였다. GM-CSF와 함께 형질도입된 방관자 B78HI 세포를, CT26과 동일하지만, 스트렙토마이세스 하이그로스코피쿠스(1 g/L)(롯데 어플라이드 사이언스(Roche Applied Science), 미국 인디애나주 인디애나폴리스 소재)로부터의 하이그로마이신 B가 첨가된 배지에서 배양하였다. 모든 세포를 5% 가습된 CO2 중에서 37 °C에서 배양하였다. 상기 GVAX 백신 세포주를 백신화 모델에서 시험하였으며 이때 상기 백신을 종양 접종 전 10일째에 주사하였고, 3 개의 GVAX 주 모두에 대해 종양 성장이 나타나지 않았다.
- [0277] 마우스
- [0278] 다자란(>50일) 암컷 C57BL/6, Balb/C 및 C3H/HeOJ 마우스를 잭슨 레보라토리로 부터 구입하고 존스 홉킨스 동물 보호 및 사용 위원회에 따라 수용하였다. C57BL/6 MyD88 -/- 마우스를 프랭크 유소 박사(Dr. Frank Housseau)(존스 홉킨스 대학)로부터 얻었다.
- [0279] TEGVAX 제형
- [0280] 리포펙타민 시약(120 µg/ml) 및 에스케리키아 콜라이 026:B6으로부터의 LPS(10 내지 25 µg/ml)를 리포솜 복합체 내로 배합하였다. 리포폴리사카라이드(LPS) 제형에 대한 세포를 5 x 10⁵ 세포의 밀도로 시딩하고 24 시간 후에 이를 6 시간 동안 리포솜-LPS 복합체와 함께 배양하고, PBS로 5 회 세척하고, 이어서 마우스에게 주사하였다. 세포에 통합된 LPS를 정량분석하기 위해서 리플루스 아메보사이트 용해물(LAL) 분석(캠브렉스)을 제조자가 지시한 대로 수행하였다. 0 내지 3.0 EU/ml의 LPS(23 EU/ng)를 표준으로서 사용하였다. 치사 조사 전에, 상기 TEGVAX를 생육 가능한 세포 성장이 보장되도록 배양하였다. 아넥신 염색은 제형화 후 세포사멸의 증거가 없음을 입증하였다.
- [0281] TEGVAX 제형을 함유하는 GLA/R848에 대해서, 상기 GVAX 세포에 의해 TLR 작용물질을 흡착하기 위한 비히클은 포스파티딜콜린을 갖는 안정한 스쿠알렌 수중 유적형 유화액이었다. 상기 TLR 작용물질을 상기 비히클 중에서 1 mg/ml GLA 및 0.2 mg/ml R848의 농도로 제조하였다. 배양된 GVAX 세포를 트립신 처리하고 세척하였다. 세척 후에 상기 세포를 10,000 RAD로 치사량으로 조사하였다. 비히클의 존재 하에서 GLA 및 R848을 상기 조사된 GVAX 세포와 혼합하고 마우스에게 주사 전에 실온에서 1 시간 동안 배양하였다. 전형적으로, 20 µl의 GVAX 세포 및 20 µl의 GLA/R848/비히클을 주사 전에 혼합하였다.
- [0282] 생체 내 백신 처리 분석
- [0283] C57BL/6 마우스를 오른쪽 옆구리에 5 x 10⁴ B16-F0 세포로 피하 주사하였다. 접종 후 3 내지 5일째에 10⁶ 치사량 조사된(150 Gy) B16 GM-CSF(GVAX), 10⁶ 치사량 조사된(150 Gy) LPS 제형화된 GVAX(TEGVAX 제형) 또는 LPS 흡수된 293 세포를 종양 주변에 주사하였다. 일부의 경우에, 상기 백신을 상기 종양-접종된 사지로부터 대측성 사지에 주사하였다. C3H/HeOJ 마우스 및 Balb/c 마우스를 필적할만한 방법에 의해 각각 SCCFVII/SF 세포 및 CT26 세포와 함께 사용하였다.

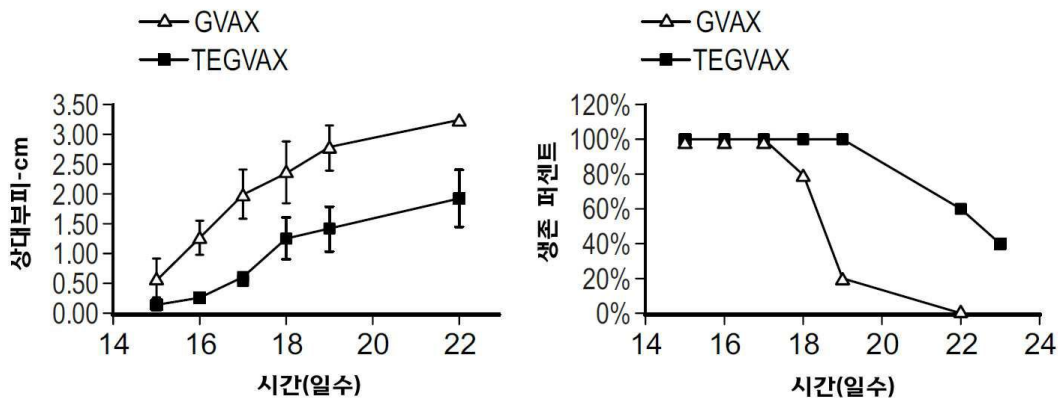
- [0284] 면역조직화학
- [0285] 마우스로부터의 동결된 CT26 종양을 10 μ m의 두께로 절단하고 실온에서 30 분 1% BSA로 차단하였다. 4 $^{\circ}$ C에서 1 시간 동안 배양된 항-마우스 CD45(이바이오사이언스(eBioscience)) 및 항-마우스 CD4-플루오레세인 아이소티오시아네이트(FITC), CD8-FITC, CD86-FITC 항체(BD 파밍겐(PharMingen))를 1차 항체로서 사용하였다. 항-CD45-Cy3(인비트로젠(Invitrogen))을 일부의 경우에 2차로서 사용하였다. DAPI를 10 분간 대비염색으로서 사용하였다. 40 배 배율의, 10 개의 무작위로 선택된 시야 중의 세포를 카운트하였다. 니콘 이클립스(Nikon Eclipse) F800은 현미경이고, 니콘 DS-Qi1mc는 카메라이며, NIS-요소 AR 3.0은 상기 실험에 사용된 소프트웨어였다. 종양 접종된 BL/6 마우스로부터의 비장 및 배액 림프절을 GVAX 및 TEGVAX 처리 후 5일째에 수확하였다. 얇게 저민 비장을 DNase I(룻슈) 및 조직 해리를 위한 상업적으로 입수할 수 있는 효소들의 블렌드(LIBERASE BLENDZYME 2)(20,000 MandI U/ml)(룻슈)를 함유하는 배지에서 효소적으로 절단시켰다. CD3+ 및 CD19+를 고갈 시킴으로써 DC-풍부한 집단을 수득하고, CD11c+ 및 B220+를 염색하였다. CD11c+B220+ 걸러진 DC를 BD 바이오사이언스로부터의 CD80, CD86, 및 MHCII 항체를 사용하여 다색 FACS 분석에 의해 평가하였다.
- [0286] ELISPOT 분석
- [0287] 효소-결합된 면역흡수 스폿(ELISPOT) 플레이트(멀티스크린(MultiScreen)_{HTS} 필터 플레이트, 밀리포어)를 24 시간 동안 마우스 인터페론(IFN)- γ 항체(Ab)(MabTech)로 코팅하고 4T1 유방암 세포를 10 μ g/ml의 AH1 펩타이드로 밤새 자극하였다. 다음날, 비장 및 림프절을 마우스로부터 수확하였다. 10⁶ CD8+a 세포를 3중으로 도말하여 10⁵의 자극되지 않은 4T1 세포와 함께 배양하거나, 10⁵의 자극된 4T1 세포와 함께 배양하거나, 또는 양성 대조군으로 1 μ M의 PMA 및 10 ng/ml의 이오노마이신으로 자극하였다. 제3일에, 상기 플레이트를 비오틴화된 항-마우스 IFN- γ Ab(MabTech)와 배양한 다음 ELISPOT을 위해 스트렙타아비딘-HRP(BD)와 함께 배양하였다. 상기 플레이트를 ELISPOT용 AEC 기질 시약 세트(BD)를 사용하여 전개시키고 ELISPOT 플레이트 판독기(임뮤노스팟(Immunospot))를 사용하여 분석하였다.
- [0288] 생체 내 CTL 분석
- [0289] 생체 내 추적용 셀트레이스(CellTrace; 상표) CFSE 세포 증식 키트(몰레큘라 프로브스(Molecular Probes))를 위한 상업적으로 입수할 수 있는 시약을 사용하여, TEGVAX의 존재 또는 부재 하에서 처리된 CT26 종양 접종된 마우스 중의 CTL의 살해 퍼센트를 시험하였다. 비장세포를 처리하고 β -갈락토시다제(β -gal) 또는 AH1 펩타이드로 90 분 동안 10 μ g/ml의 농도로 자극하였다. 상기 β -gal 집단을 낮게(0.5 μ M) CFSE 표지하고 상기 AH1 집단은 카복시플루오레세인 다이아세테이트 숙신이미딜 에스터(CFSE)로 표지하였다(5 μ M). 10 분 배양 후에, 상기 두 CFSE 표지된 세포를 3 개의 마우스 그룹에 10⁷ 세포/마우스로 주사하였다. 주사 후 24 시간째에 비장 세포를 수확하고 분석하였다.
- [0290] 통계학적 분석
- [0291] 대응표본 t-검정을 사용하여 양방 p 값을 계산하여 2 개의 처리 그룹 간의 차이에 대한 통계학적 유의수준을 평가하였다. 통계학적으로 유의수준인 p 값을 하기와 같이 표지하였다: **p<0.01 및 *p<0.05. 데이터를 엑셀 소프트웨어를 사용하여 분석하였다.
- [0292] 다른 실시태양
- [0293] 상기 명세서로부터, 본 원에 개시된 발명이 다양한 용도 및 조건에 채택되도록 상기 발명에 대해 변화 및 변경을 수행할 수 있음은 자명할 것이다. 상기와 같은 실시태양이 또한 하기 특허청구범위의 범위 내에 있다.
- [0294] 본 발명의 변수의 임의의 정의에서 요소들의 목록의 인용은 임의의 단일 요소 또는 나열된 요소들의 조합(또는 하위 조합)으로서의 상기 변수의 정의를 포함한다. 본 발명의 실시태양의 인용은 임의의 단일 실시태양 또는 임의의 다른 실시태양 또는 그의 일부와의 조합으로서 상기 실시태양을 포함한다.
- [0295] 본 명세서에서 언급된 모든 특허 및 공보들은, 각각의 독립적인 특허 및 공보가 구체적이고 개별적으로 참고로 인용됨을 가리키는 바와 같은 정도로 본 발명에 참고로 인용된다.

도면

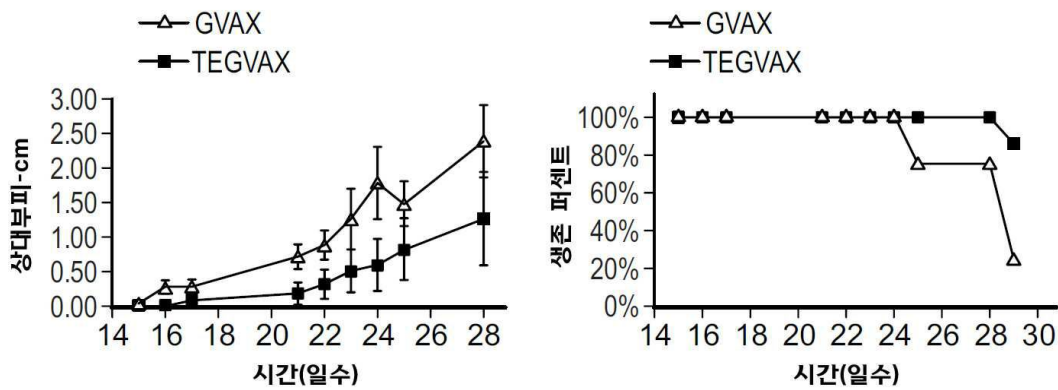
도면1



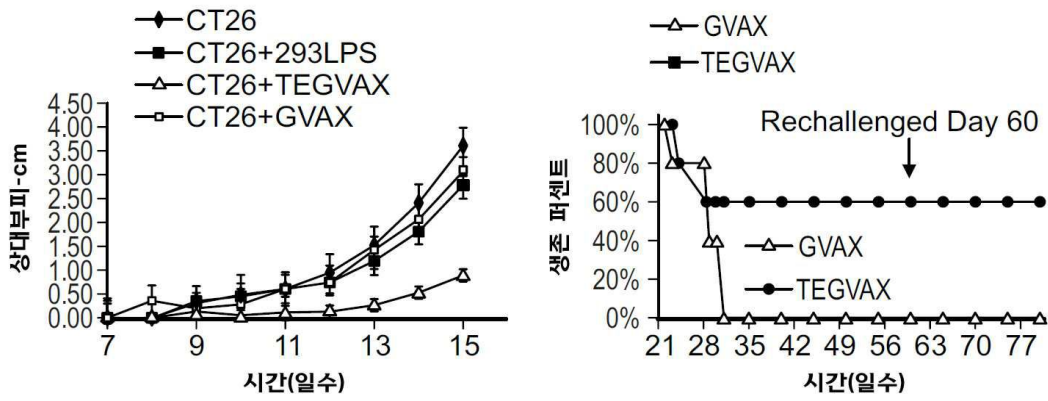
도면2a



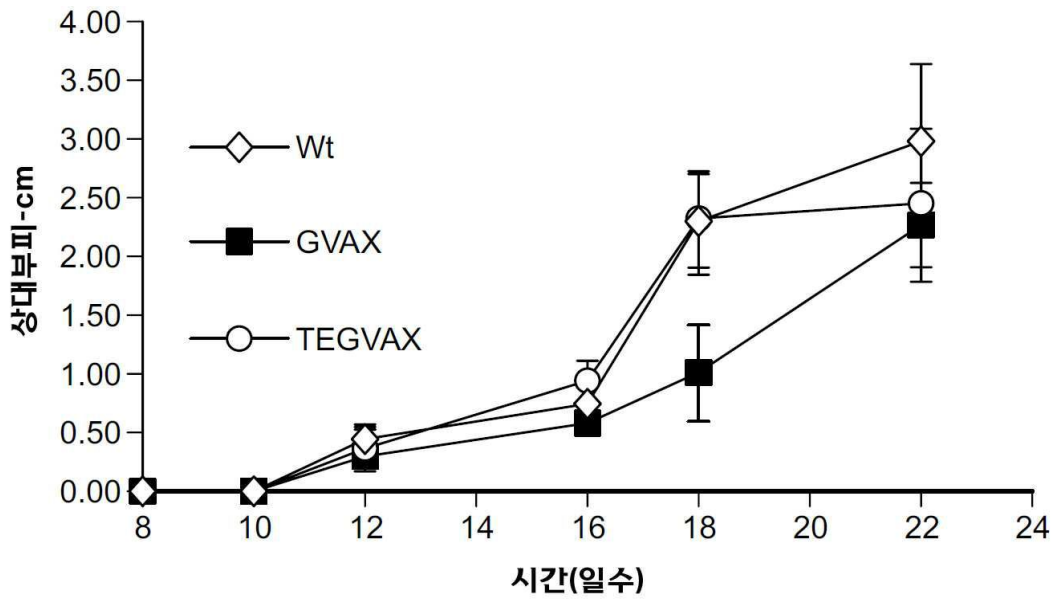
도면2b



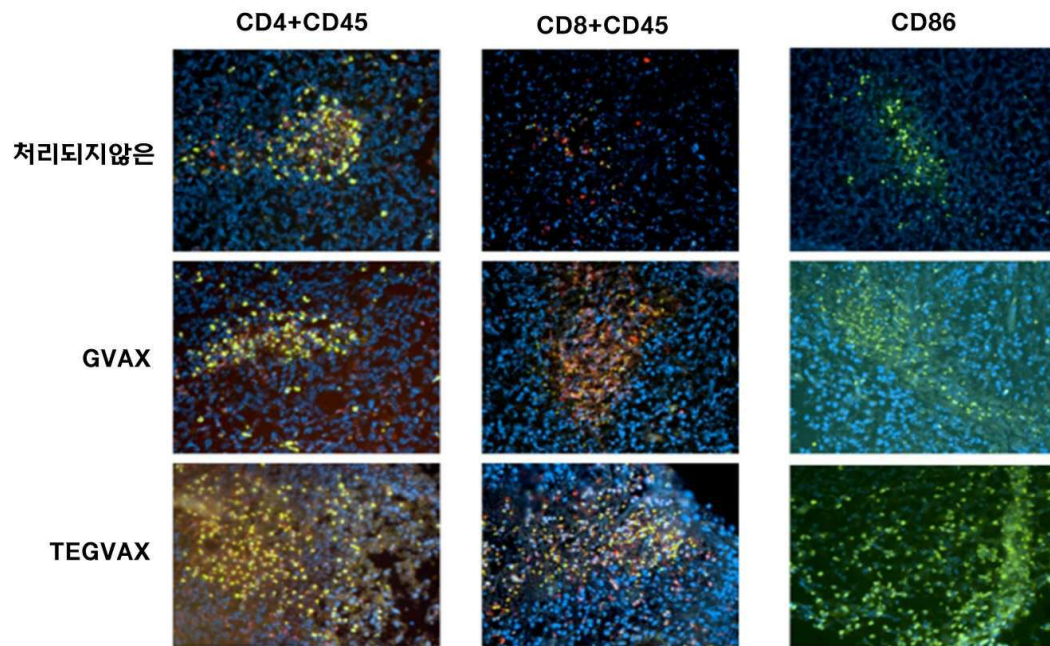
도면2c



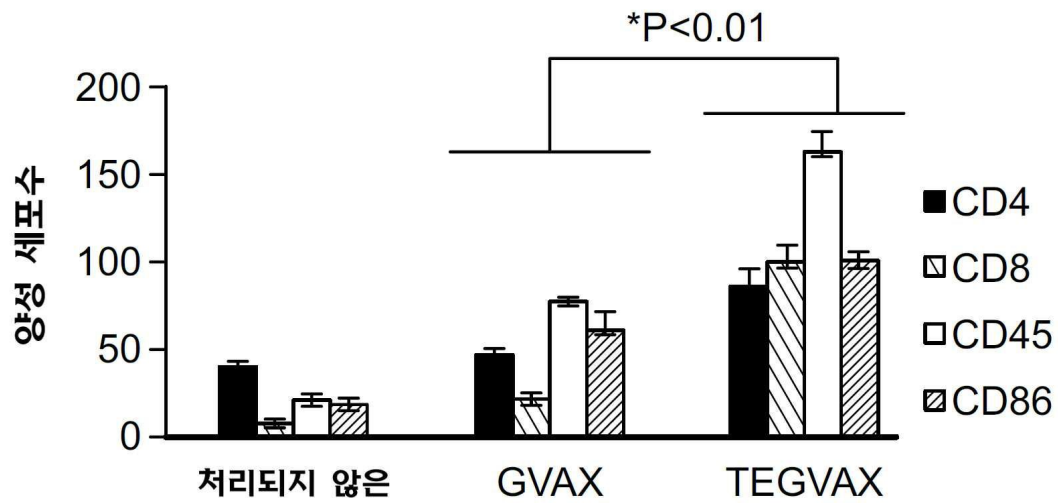
도면3



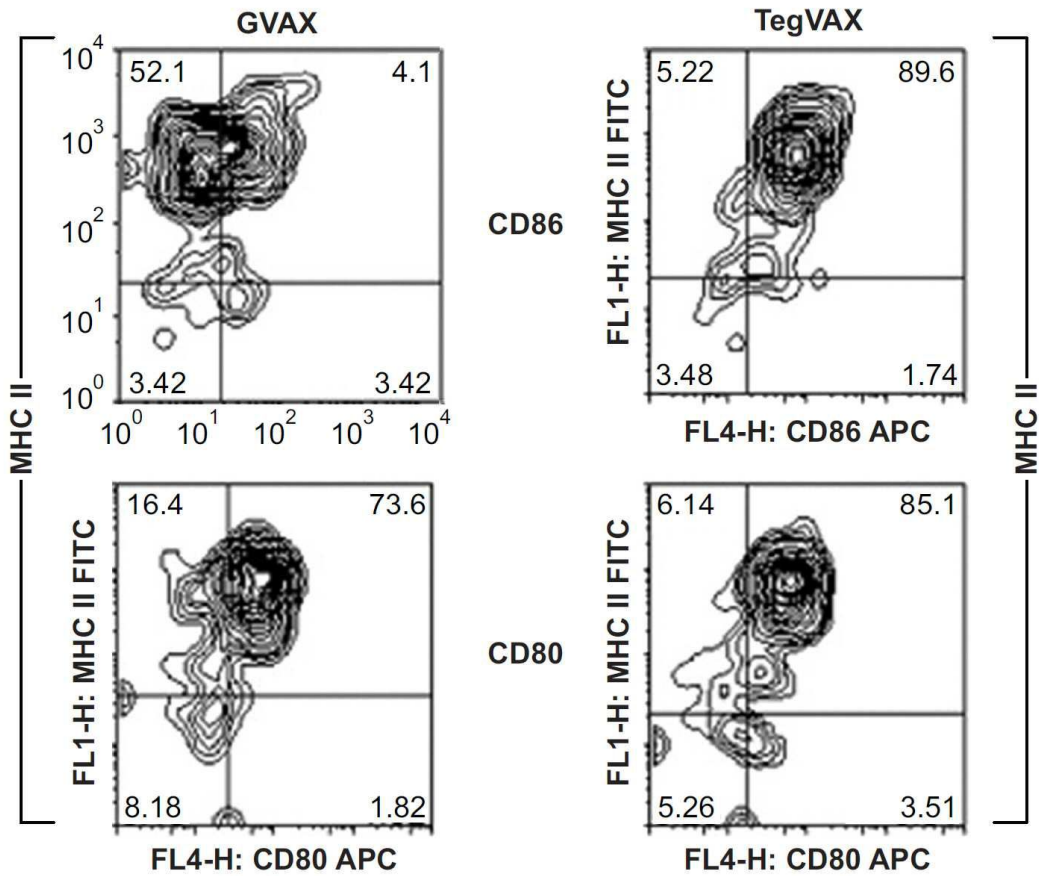
도면4a



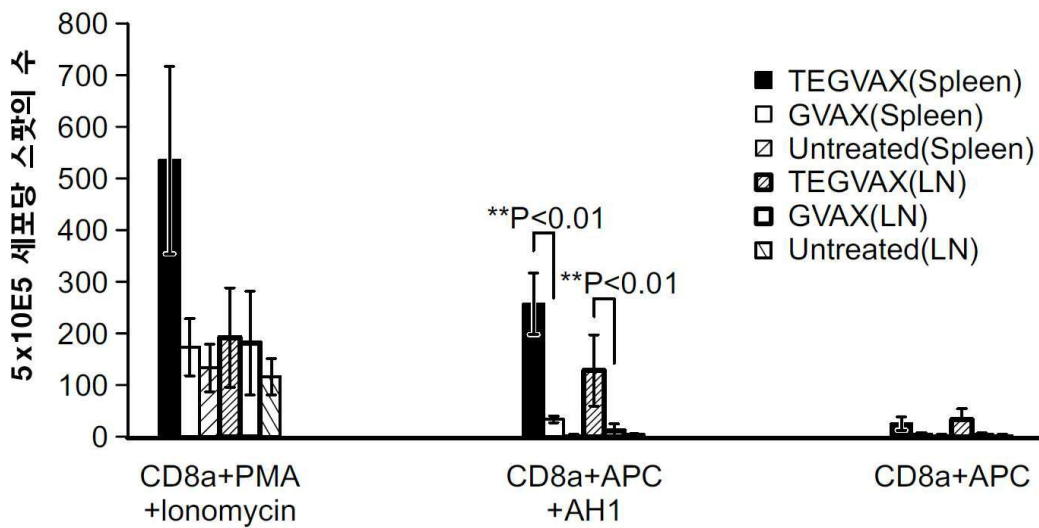
도면4b



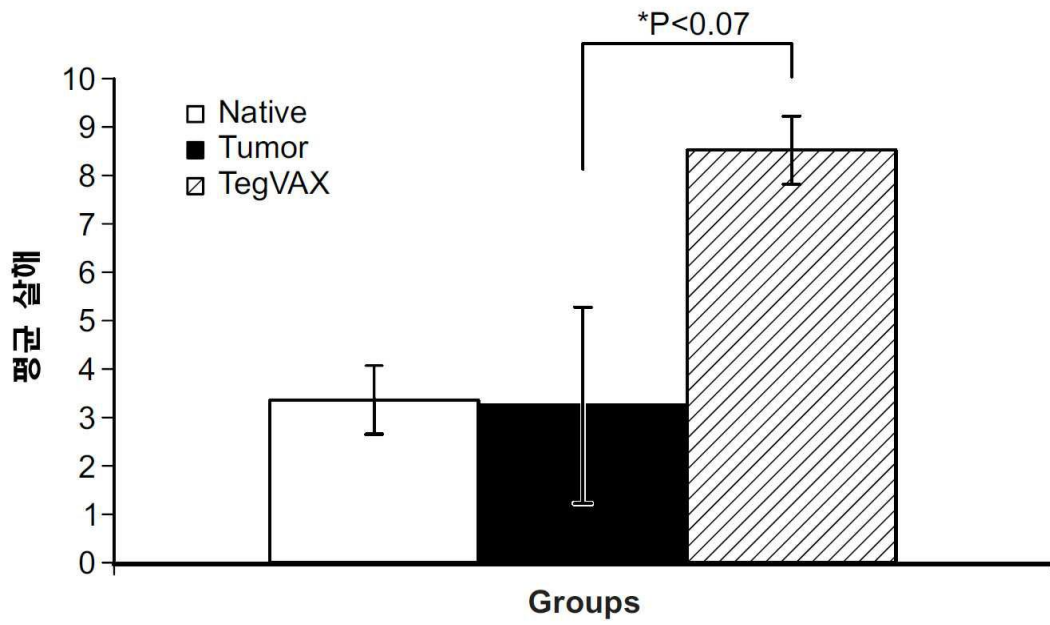
도면5



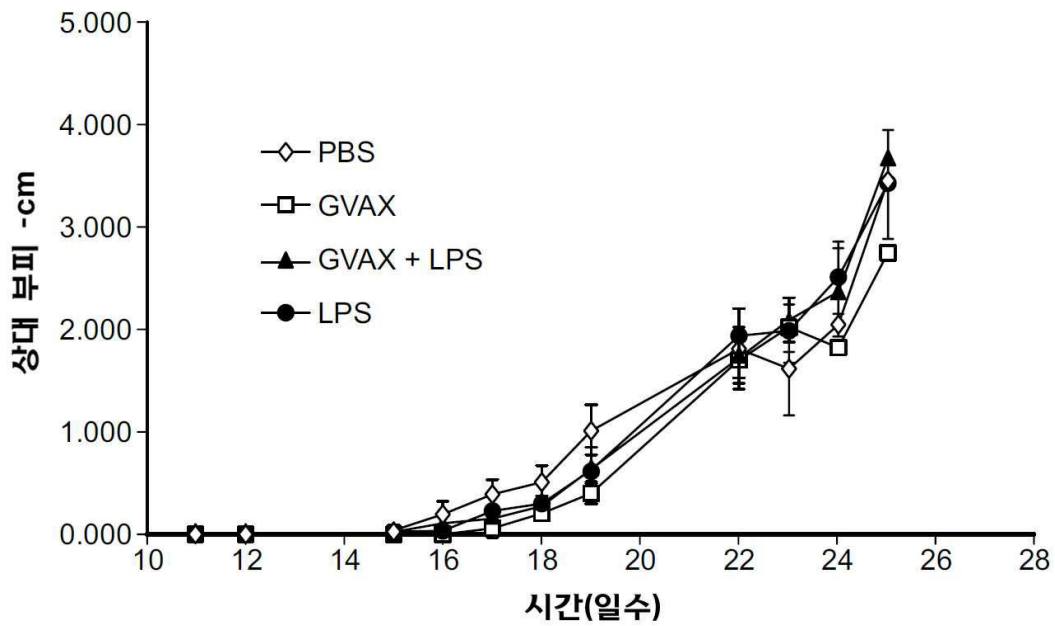
도면6a



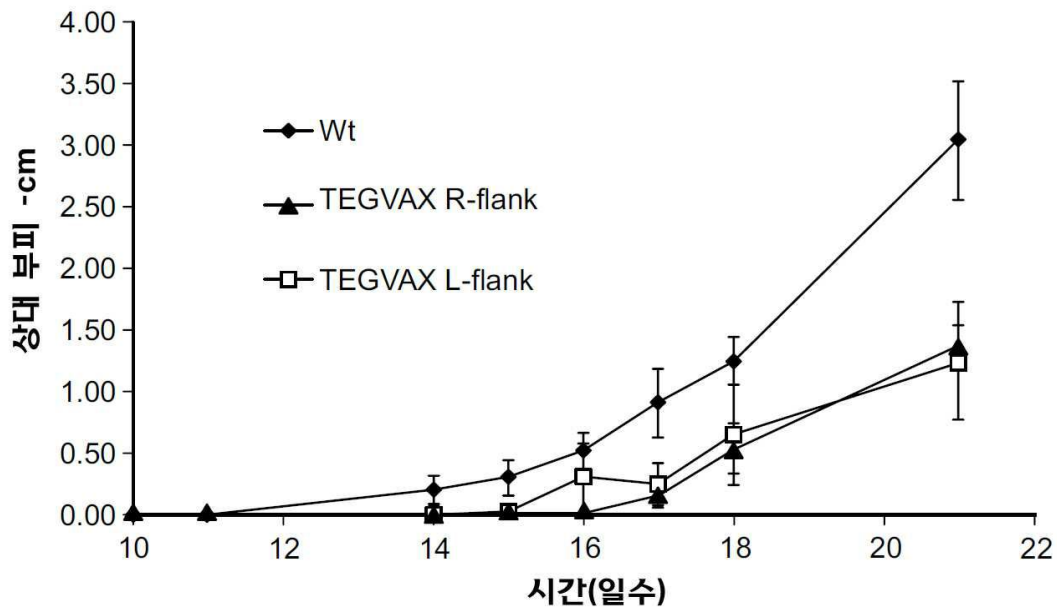
도면6b



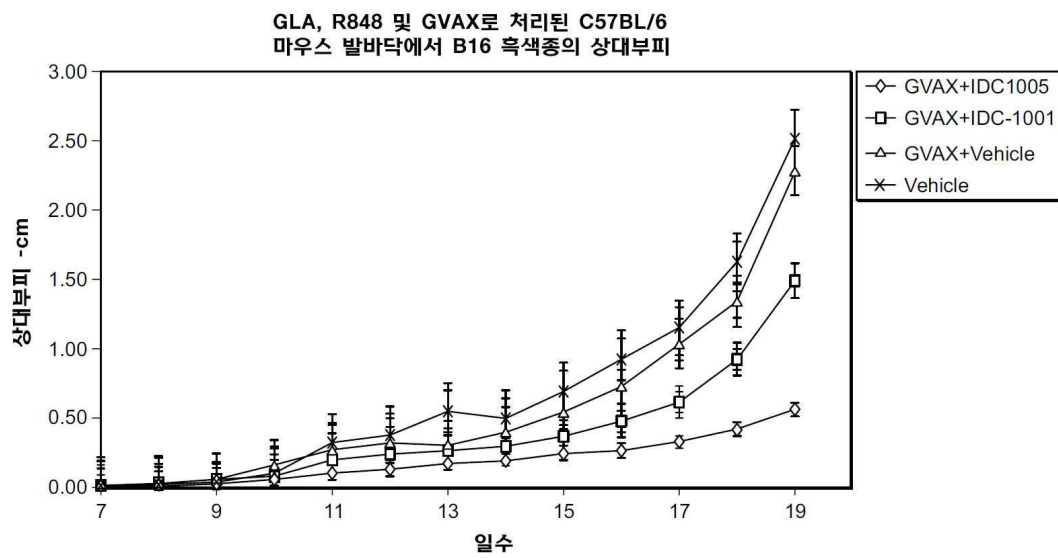
도면7



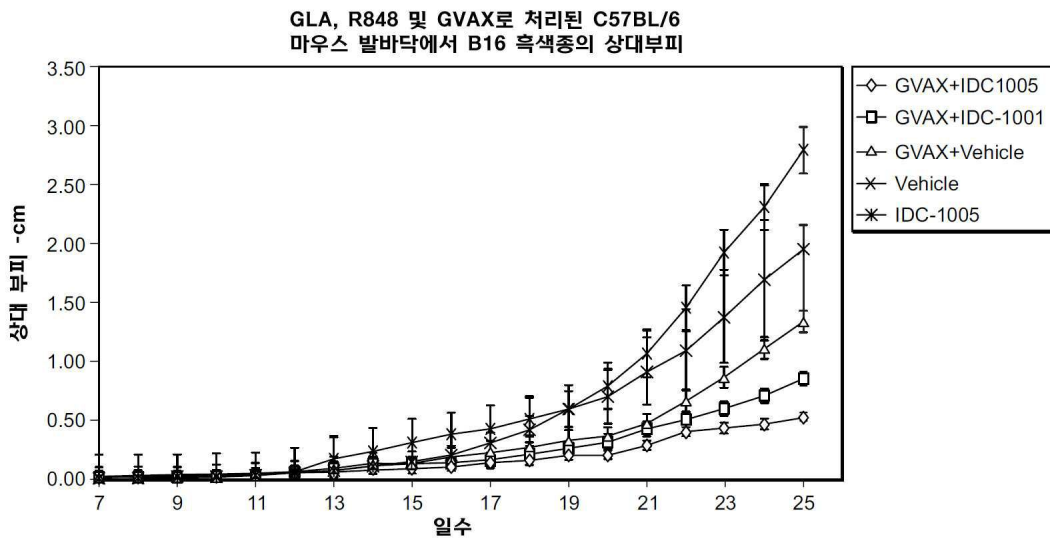
도면8



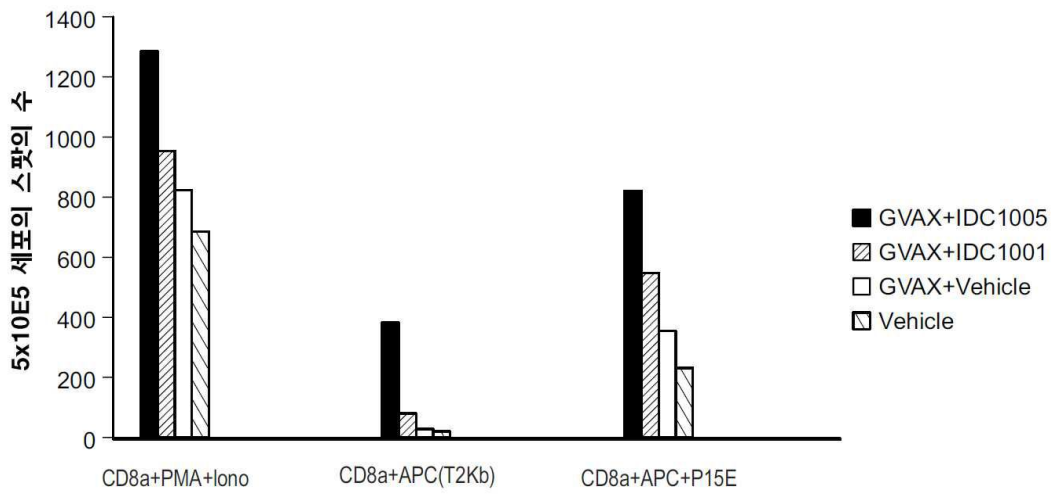
도면9



도면10



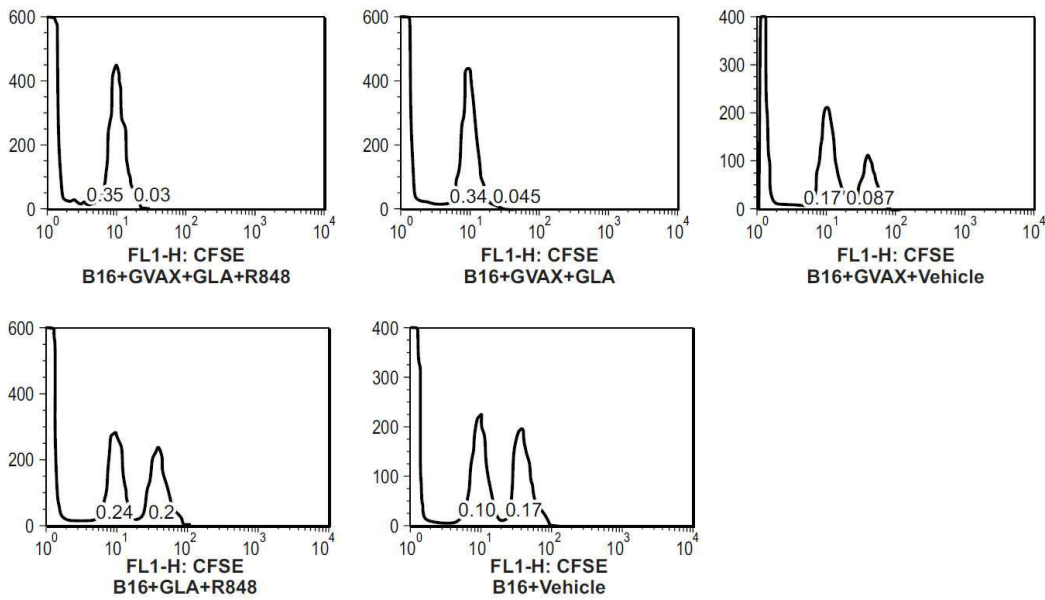
도면11a



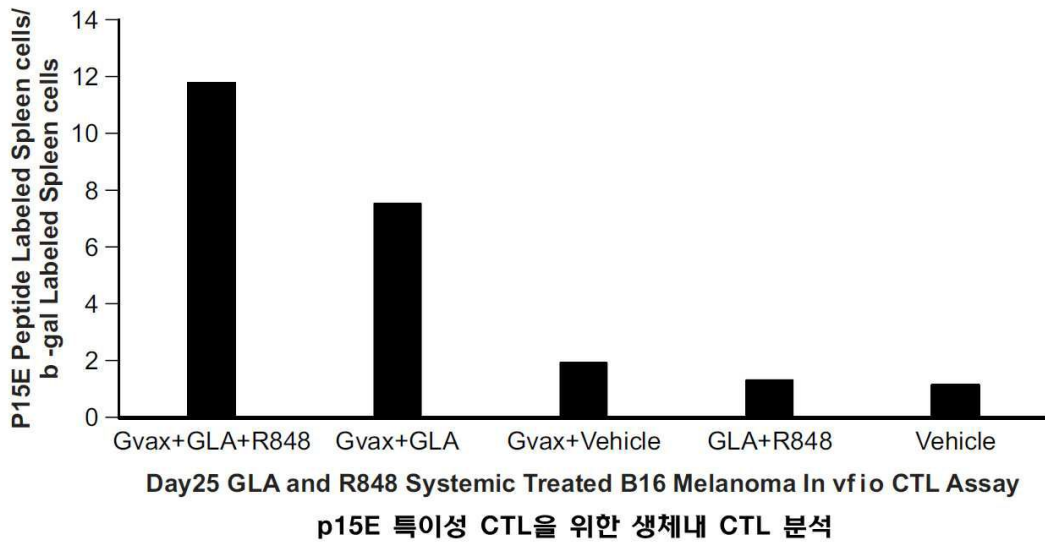
Day 12 injection B16 cells mice spleen CD8a+ IFN-γ ELISPOT assay

INF-g를 분비하는 p15E 특이성 T-세포에 대한 ELISPOT 분석

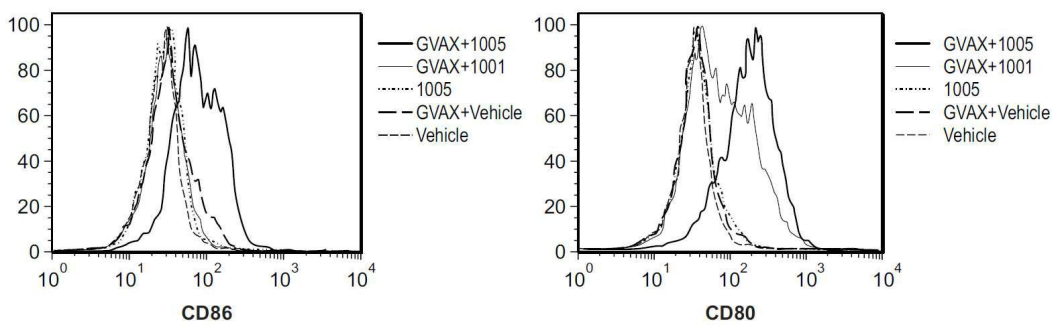
도면11b



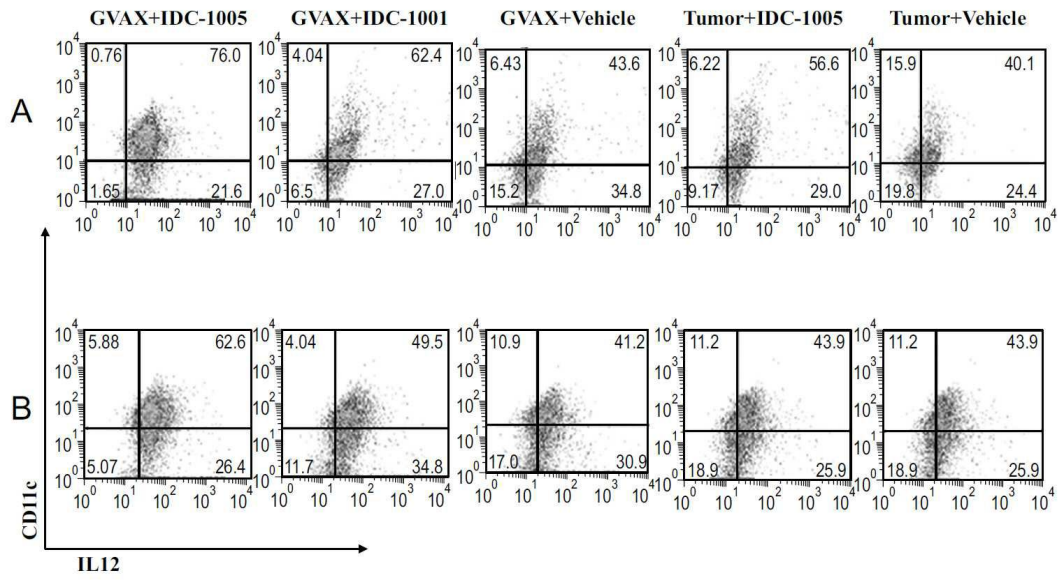
도면11c



도면12



도면13



도면14

