



등록특허 10-2678732



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년06월25일
(11) 등록번호 10-2678732
(24) 등록일자 2024년06월21일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 41/00 (2020.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61K 47/50 (2017.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 41/0042 (2013.01)
A61K 41/0057 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2017-7008280
- (22) 출원일자(국제) 2015년08월28일
심사청구일자 2020년08월28일
- (85) 번역문제출일자 2017년03월27일
- (65) 공개번호 10-2017-0047336
- (43) 공개일자 2017년05월04일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2015/069794
- (87) 국제공개번호 WO 2016/030529
국제공개일자 2016년03월03일

(30) 우선권주장
1415247.4 2014년08월28일 영국(GB)
1420773.2 2014년11월21일 영국(GB)

(56) 선행기술조사문현

WO2013189663 A1*

(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 45 항

심사관 : 허명숙

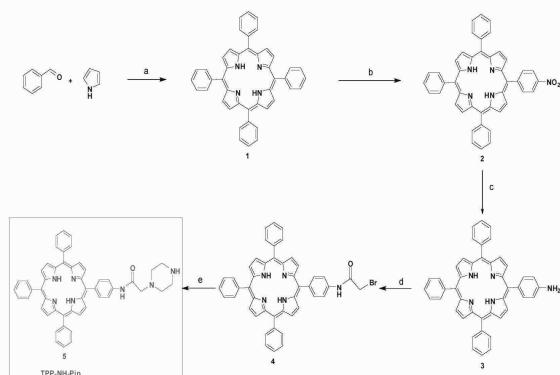
(54) 발명의 명칭 화합물 및 방법

(57) 요약

본 발명은, 사이토카인, 바람직하게는 GM-CSF가 상기 방법을 향상시키기 위해 사용되는 광화학 내재화 방법을 이용하여 세포의 표면 상에서 항원성 분자 또는 이의 일부의 발현 방법을 제공한다. 상기 방법은 면역 반응을 자극하기 위해 그리고 다양한 치료적 또는 예방적 방법을 위하여 사용될 수 있다. 상기 방법에서 사용을 위하여 성분을 포함한 약학적 조성물 또는 키트, 상기 방법에 의해 생산된 세포 및 치료 및 예방에서 그의 용도는 또한 본 발명의 측면을 형성한다.

대표 도 - 도1a

반응식 1



(52) CPC특허분류

A61K 47/549 (2017.08)
A61K 2039/5154 (2023.05)

(56) 선행기술조사문헌

Clinical Cancer Research. 2012. Vol.18, No.11,
pp.3122-3131.*

Journal of Controlled Release. 2014. Vol.174,
pp.413-150.*

JP2004520823 A

KR1020110036570 A

Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. 2007.
Vol.4, pp.100-105.*

Journal of Controlled Release. 2014. Vol.174,
pp.143-150.*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

명세서

청구범위

청구항 1

항원성 분자 또는 이의 일부를 세포의 표면 상에서 발현시키는 시험관내 또는 생체외 방법으로서,

상기 세포를 상기 항원성 분자, 감광제, 및 사이토카인과 접촉시키는 단계, 및

상기 감광제를 활성화하는 데 유효한 과장의 광으로 상기 세포를 조사시키는 단계,

를 포함하고,

상기 항원성 분자가 상기 세포 내로 흡수되며, 상기 항원성 분자가 조사된 세포의 사이토졸 속으로 방출되고, 상기 항원성 분자 또는 이의 일부가 그 뒤에 상기 조사된 세포의 표면 상에서 MHC 클래스 I 분자에 의해 제시되며,

상기 항원성 분자는 웹타이드이고,

상기 사이토카인은 GM-CSF이고, 및

상기 감광제는 설폰화된 알루미늄 프탈로시아닌, 설폰화된 테트라페닐포르핀, 설폰화된 테트라페닐클로린 또는 설폰화된 테트라페닐박테리오클로린인, 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 항원성 분자가 면역 반응을 자극시킬 수 있는 분자인, 방법.

청구항 3

제 2 항에 있어서,

상기 항원성 분자가 백신 항원 또는 백신 성분인, 방법.

청구항 4

제 2 항에 있어서,

상기 항원성 제시가 면역 반응의 상기 자극을 초래하는, 방법.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 감광제가 TPCS_{2a} , AlPcS_{2a} , TPPS_4 및 TPBS_{2a} 에서 선택되는, 방법.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 세포가 항원 제시 세포인, 방법.

청구항 7

제 6 항에 있어서,

상기 항원 제시 세포가 수지상 세포인, 방법.

청구항 8

제 1 항에 있어서,

상기 세포가 동시에, 별도로 또는 순차적으로 상기 항원성 분자, 감광제 및 사이토카인과 접촉되는, 방법.

청구항 9

인간을 제외한 대상체에서 면역 반응의 생성 방법으로서,

제 1 항, 제 2 항 또는 제 3 항에서 정의된 항원성 분자, 제 1 항 또는 제 5 항에 정의된 감광제, 및 제 1 항에 정의된 사이토카인을 상기 대상체에 투여하는 단계, 및

상기 감광제를 활성화하는 데 유효한 파장의 광으로 상기 대상체를 조사시키는 단계,

를 포함하고,

여기서 상기 항원성 분자가 상기 대상체에서 세포 내로 흡수되며, 상기 항원성 분자가 상기 대상체에서 조사된 세포의 사이토졸 속으로 방출되고, 상기 항원성 분자 또는 이의 일부가 그 뒤에 상기 조사된 세포의 표면 상에서 MHC 클래스 I 분자에 의해 제시되며,

면역 반응이 생성되는 것인, 방법.

청구항 10

제 9 항에 있어서,

상기 방법이 백신접종의 방법인, 방법.

청구항 11

제 9 항에 있어서,

질환, 장애 또는 감염의 치료 또는 방지를 위한, 방법.

청구항 12

제 11 항에 있어서,

암의 치료 또는 방지를 위한, 방법.

청구항 13

제 9 항에 있어서,

상기 대상체는 비-포유동물 동물, 또는 고양이, 개, 말, 당나귀, 양, 돼지, 염소, 소, 마우스, 랫트, 토끼 또는 기니아 피그에서 선택되는 포유동물인, 방법.

청구항 14

제 9 항에 있어서,

상기 항원성 분자, 감광제 및 사이토카인이 상기 대상체 동시에, 별도로 또는 순차적으로 투여되는, 방법.

청구항 15

대상체에서 면역 반응 자극에 사용을 위한 약학 조성물로서,

제 1 항, 제 2 항 또는 제 3 항 중 어느 한 항에 정의된 항원성 분자, 제 1 항 또는 제 5 항에 정의된 감광제, 및 제 1 항에 정의된 사이토카인 그리고 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 희석제, 담체 또는 부형제를 포함하는, 약학 조성물.

청구항 16

항원성 분자, 또는 이의 일부를 그의 표면 상에서 발현하는, 세포 또는 세포의 집단으로서,

상기 세포는 제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항에 정의된 방법으로 수득된 것인, 세포 또는 세포의 집단.

청구항 17

제 16 항에 있어서,
상기 세포는 수지상 세포인, 세포 또는 세포의 집단.

청구항 18

대상체에서 면역 반응 자극에 사용을 위한 약학 조성물로서,
제 16 항에 정의된 세포 또는 세포의 집단 및 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 희석제, 담체 또는 부형제를 포함한, 약학 조성물.

청구항 19

대상체에서 면역 반응을 자극하기 위한, 제 16 항에 정의된, 세포 또는 세포의 집단.

청구항 20

제 19 항에 있어서,
상기 대상체에서 질환, 장애 또는 감염의 치료 또는 방지를 위한, 세포 또는 세포의 집단.

청구항 21

제 20 항에 있어서,
백신접종을 위한 또는 암 치료 또는 방지를 위한, 세포 또는 세포의 집단.

청구항 22

삭제

청구항 23

제 15 항에 있어서,
상기 대상체에서 질환, 장애 또는 감염의 치료 또는 방지를 위한, 약학 조성물.

청구항 24

제 23 항에 있어서,
백신접종을 위한 또는 암 치료 또는 방지를 위한, 약학 조성물.

청구항 25

대상체에서 면역 반응 자극에 사용을 위한 약학 조합물로서,
제 1 항, 제 2 항 또는 제 3 항에 정의된 항원성 문자, 제 1 항 또는 제 5 항에 정의된 감광제, 및 제 1 항에 정의된 사이토카인의 약학 조합물이고,
상기 항원성 문자, 감광제 및 사이토카인은 동일하거나 별도의 제형일 수 있는, 약학 조합물.

청구항 26

제 25 항에 있어서,
상기 대상체에서 질환, 장애 또는 감염 치료 또는 방지를 위한, 약학 조합물.

청구항 27

제 26 항에 있어서,
백신접종을 위한 또는 암 치료 또는 방지를 위한, 약학 조합물.

청구항 28

제 25 항에 있어서,

상기 사용은

- a) 상기 대상체에서 세포를 상기 항원성 분자, 감광제, 및 사이토카인과 접촉시키는 단계, 및 상기 감광제를 활성화하는 데 유효한 파장의 광으로 상기 세포를 조사시키는 단계, 여기서 상기 항원성 분자가 상기 세포 내로 흡수되며, 상기 항원성 분자가 조사된 세포의 사이토졸 속으로 방출되고, 상기 항원성 분자 또는 이의 일부가 그 뒤에 상기 조사된 세포의 표면 상에서 MHC 클래스 I 분자에 의해 제시됨; 또는
 - b) 상기 항원성 분자, 감광제, 및 사이토카인을 상기 대상체에 투여하는 단계, 및 상기 감광제를 활성화하는 데 유효한 파장의 광으로 상기 대상체를 조사시키는 단계, 여기서 상기 항원성 분자가 상기 대상체에서 세포 내로 흡수되며, 상기 항원성 분자가 상기 대상체에서 조사된 세포의 사이토졸 속으로 방출되고, 상기 항원성 분자 또는 이의 일부가 그 뒤에 상기 조사된 세포의 표면 상에서 MHC 클래스 I 분자에 의해 제시되며, 면역 반응이 생성됨;
- 를 포함하는, 약학 조합물.

청구항 29

제 28 항에 있어서,

상기 대상체는 비-포유동물 동물, 또는 인간, 고양이, 개, 말, 당나귀, 양, 돼지, 염소, 소, 마우스, 랫트, 토끼 또는 기니아 피그에서 선택되는 포유동물인, 약학 조합물.

청구항 30

제 25 항에 있어서,

상기 사용은 세포의 집단을 제조하기 위한 방법을 포함하고,

상기 방법은 세포의 집단의 각 세포를 상기 항원성 분자, 감광제, 및 사이토카인과 접촉시키는 단계, 및 상기 감광제를 활성화하는 데 유효한 파장의 광으로 상기 세포를 조사시키는 단계를 포함하며,

여기서 상기 항원성 분자가 상기 세포 내로 흡수되며, 상기 항원성 분자가 조사된 세포의 사이토졸 속으로 방출되고, 상기 항원성 분자 또는 이의 일부가 그 뒤에 상기 조사된 세포의 표면 상에서 MHC 클래스 I 분자에 의해 제시되는, 약학 조합물.

청구항 31

제 30 항에 있어서,

세포의 상기 집단이 상기 대상체에 투여되는, 약학 조합물.

청구항 32

대상체에서 면역 반응 자극에 동시의, 별도의 또는 순차적 사용을 위한 약학 생성물로서,

제 1 항, 제 2 항 또는 제 3 항 중 어느 한 항에 정의된 항원성 분자, 제 1 항 또는 제 5 항에 정의된 감광제 및 제 1 항에 정의된 사이토카인을 조합된 제제로서 포함하고,

상기 항원성 분자, 감광제 및 사이토카인은 동일하거나 별도의 제형일 수 있는, 약학 생성물.

청구항 33

제 32 항에 있어서,

상기 대상체에서 질환, 장애 또는 감염의 치료 또는 방지를 위한, 약학 생성물.

청구항 34

제 33 항에 있어서,

백신접종을 위한 또는 암 치료 또는 방지를 위한, 약학 생성물.

청구항 35

제 32 항에 있어서,

상기 대상체는 비-포유동물 동물, 또는 인간, 고양이, 개, 말, 당나귀, 양, 돼지, 염소, 소, 마우스, 랙트, 토끼 또는 기니아 피그에서 선택되는 포유동물인, 약학 생성물.

청구항 36

대상체에서 면역 반응 자극에 사용을 위한, 또는 제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항에 따른 방법에서 세포의 상기 표면 상에 항원성 분자 또는 이의 일부 발현을 위한 키트로서, 상기 키트는:

제 1 항 또는 제 5 항에 정의된 감광체를 함유한 제1 컨테이너;

제 1 항, 제 2 항 또는 제 3 항 중 어느 한 항에 정의된 상기 항원성 분자를 함유한 제2 컨테이너;

및

제 1 항에 정의된 사이토카인을 함유한 제3 컨테이너;

를 포함하는, 키트.

청구항 37

제 36 항에 있어서,

상기 대상체에서 질환, 장애 또는 감염 치료 또는 방지를 위한, 키트.

청구항 38

제 37 항에 있어서,

백신접종을 위한 또는 암 치료 또는 방지를 위한, 키트.

청구항 39

제 36 항에 있어서,

상기 대상체는 비-포유동물 동물, 또는 인간, 고양이, 개, 말, 당나귀, 양, 돼지, 염소, 소, 마우스, 랙트, 토끼 또는 기니아 피그에서 선택되는 포유동물인, 키트.

청구항 40

인간을 제외한 대상체에서 면역 반응 생성 방법으로서,

제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항의 방법에 따라 세포의 집단을 제조하는 단계, 및 그 뒤에 상기 세포를 상기 대상체에 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 41

제 40 항에 있어서,

상기 대상체에서 질환, 장애 또는 감염을 치료 또는 방지하기 위한, 방법.

청구항 42

제 41 항에 있어서,

백신접종을 위한 또는 암 치료 또는 방지를 위한, 방법.

청구항 43

삭제

청구항 44

제 18 항에 있어서,

상기 대상체에서 질환, 장애 또는 감염의 치료 또는 방지를 위한, 약학 조성물.

청구항 45

제 44 항에 있어서,

백신접종을 위한 또는 암 치료 또는 방지를 위한, 약학 조성물.

청구항 46

제 15 항에 있어서,

상기 사용은

- a) 상기 대상체에서 세포를 상기 항원성 분자, 감광제, 및 사이토카인과 접촉시키는 단계, 및 상기 감광제를 활성화하는 데 유효한 파장의 광으로 상기 세포를 조사시키는 단계, 여기서 상기 항원성 분자가 상기 세포 내로 흡수되며, 상기 항원성 분자가 조사된 세포의 사이토졸 속으로 방출되고, 상기 항원성 분자 또는 이의 일부가 그 뒤에 상기 조사된 세포의 표면 상에서 MHC 클래스 I 분자에 의해 제시됨; 또는
- b) 상기 항원성 분자, 감광제, 및 사이토카인을 상기 대상체에 투여하는 단계, 및 상기 감광제를 활성화하는 데 유효한 파장의 광으로 상기 대상체를 조사시키는 단계, 여기서 상기 항원성 분자가 상기 대상체에서 세포 내로 흡수되며, 상기 항원성 분자가 상기 대상체에서 조사된 세포의 사이토졸 속으로 방출되고, 상기 항원성 분자 또는 이의 일부가 그 뒤에 상기 조사된 세포의 표면 상에서 MHC 클래스 I 분자에 의해 제시되며, 면역 반응이 생성됨;

를 포함하는, 약학 조성물.

청구항 47

제 46 항에 있어서,

상기 대상체는 비-포유동물 동물, 또는 인간, 고양이, 개, 말, 당나귀, 양, 돼지, 염소, 소, 마우스, 랙트, 토끼 또는 기니아 피그에서 선택되는 포유동물인, 약학 조성물.

발명의 설명**기술 분야**

[0001]

본 발명은 감광제, 항원성 분자, 예를 들어 백신 성분, 및 본원에서 정의된 바와 같이 사이토카인인 광화학 내재화 (PCI)-매개된 백신접종의 효과를 향상시키는 제제의 용도를 포함한 백신접종 또는 면역화, 및 감광제를 활성화하는데 유효한 파장의 광으로 조사의 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한, 그와 같은 방법에 유용한, 항원성, 예를 들어 백신 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 또한, 항원 제시를 달성하기 위해 세포 속으로, 항원성 분자, 예를 들어 백신 성분을 도입하기 위해 상기와 동일한 성분의 이용을 포함하는, 면역 반응을 생성하기 위해, 예를 들어 백신접종을 위하여 사용될 수 있는 항원 제시 세포의 생성 방법, 및 그와 같은 방법에 유용한 항원성 조성물을 제공한다. 본 발명은 또한 면역 반응을 유도하기 위해, 예를 들어 백신접종을 달성하기 위해 생체내 환자에 투여를 위하여 상기 방법에 의해 시험관내 생성된 세포의 용도를 제공한다. 세포 속으로 항원성 분자의 내재화 방법이 또한 제공된다.

배경 기술

[0002]

백신접종은 병원체에 적응성 면역력의 발생을 자극하기 위한 면역 시스템을 유발하기 위해 항원성 분자의 투여를 포함한다. 백신은 감염으로부터 이환율을 방지 또는 개선할 수 있다. 백신접종은 감염성 질환 방지의 가장 유효한 방법이고, 백신접종 때문에 광범위한 면역력이 천연두의 전세계적인 박멸 및 세계 대부분으로부터 질환 예컨대 소아마비, 홍역, 및 테타누스독소증의 제약을 크게 책임지고 있다.

[0003] 백신의 활성제는 원인이 되는 병원체, 또는 면역원성인 것으로 밝혀지는 병원체의 정제된 성분 (예를 들어, 바이러스의 외부 외피 단백질)의 온전한 그러나 불활성화된 (비-감염성) 또는 (감소된 감염성으로) 약화된 형태일 수 있다. 변성독소는 그의 독성 효과를 제거하지만 그의 면역원성 효과를 보유하기 위해 독소-기반 질환, 예컨대 테타누스독소증의 테타노스파스민 독소의 변성에 대한 면역화를 위하여 생산된다.

[0004] 대부분의 백신이 세포내이입을 통해 항원 제시 세포에 의해 시작되고 MHC 클래스-II 경로를 통해 항원 소화 및 제시용 리소좀에 엔도솜을 통해 수송되고, 백신접종은 주로 CD4 T-헬퍼 세포 및 B 세포를 활성화한다. 장애 또는 질환 예컨대 암, 뿐만 아니라 세포내 감염과 싸우기 위해, 세포독성 CD8 T-세포 반응의 자극은 중요하다. 그러나, 세포독성 CD8 T 세포의 유도는 보통 사이토졸에 항원 전달의 어려움 및 항원 제시의 MHC 클래스-I 경로 때문에 실패한다. 광화학 내재화 (PCI)는 사이토졸에 분자의 전달을 개선하고 PCI를 사용하는 백신접종의 방법은 공지되어 있다. PCI는, 그 제제를 활성화하기 위해 조사 단계와 조합으로, 감광제를 이용하는 기술이고, 세포의 사이토졸 속으로 세포에 공-투여된 분자의 방출을 달성한다고 알려져 있다. 상기 기술은 세포소기관, 예컨대 엔도솜 속으로 세포에 의해 용해된 분자가 조사 이후 사이토졸 속으로 이들 세포소기관으로부터 방출되도록 한다. PCI는 광범위한 세포 파괴 또는 세포 사멸을 초래하지 않는 방식으로 세포의 사이토졸 속으로 다르게는 막-불투과성 (또는 저조하게 투과성) 분자의 도입용 기전을 제공한다.

[0005] 광화학 내재화 (PCI)의 기초 방법은, 본원에서 참고로 편입되는, WO 96/07432 및 WO 00/54802에 기재된다. 상기 방법에서, (본 발명이 항원성 분자일) 내재화되는 분자, 및 감광제는 세포와 접촉된다. 내재화되는 감광제 및 분자는 세포 내에 세포성 막-결합 하위구획 속으로 용해되고, 즉 이들은 세포내 소포 (예를 들어 리소좀 또는 엔도솜) 속으로 세포내이입된다. 적절한 광에 세포의 노출시, 세포내 소포의 막을 파괴하는 반응성 종을 직접적으로 또는 간접적으로 생성하는 감광제가 활성화된다. 이는 내재화된 분자가 사이토졸 속으로 방출되도록 한다.

[0006] 그와 같은 방법에서 대다수의 세포의 기능성 또는 생존력이 유해하게 영향받지 않았다는 것을 알아내었다. 따라서, 그와 같은 방법의 유용성, 일명 "광화학 내재화"는, 사이토졸 속에 즉 세포의 내부에 치료제를 포함한, 다양한 상이한 분자의 수송을 위하여 제안되었다.

[0007] WO 00/54802는 세포 표면 상에 전달 분자를 제시 또는 발현하기 위해 그와 같은 일반적인 방법을 사용한다. 따라서, 세포 사이토졸 속으로 분자의 수송 및 방출 이후, 분자 (또는 그 분자의 일부)는 세포의 외부 즉 세포 표면 상에서 제시될 수 있는 세포의 표면에 수송될 수 있다. 그와 같은 방법은 백신접종의 분야에서 특정한 유용성을 갖고, 여기에서 백신 성분 즉 항원 또는 면역원은, 면역 반응을 유도하기 위해, 용이하게 하기 위해 또는 증대하기 위해, 그 세포의 표면 상에서 제시를 위하여 세포에 도입될 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 백신접종이 일부 주목할만한 성공을 달성하는 반면, 대안적 및 개선된 백신접종 방법에 대한 필요성이 여전하다. 본 발명은 상기 필요성을 다룬다.

[0009] 본 발명자들은, 유익하게는, 감광제, 항원성 분자, 예를 들어 백신 성분, 및 본원에서 정의된 바와 같이 사이토카인인 제제의 이용, 및 감광제를 활성화하는데 유효한 광으로 조사가 개선된 백신접종 또는 개선된 면역 반응을 초래한다는 것을 놀랍게도 알아내었다.

과제의 해결 수단

[0010] 아래 실시예에서 더 상세히 기재될 바와 같이 본 발명의 방법은 개선된 백신접종 또는 개선된 면역 반응, 예를 들어 항원-특이적 T 세포의 증가된 양의 생산을 제공한다. 상승작용 효과가 달성되는 것이 예상된다.

[0011] 이론에 의해 제한되기를 바라지 않는 반면, 본 발명의 방법이 증가된 CD8+ T 세포 반응을 이끄는 MHC 클래스 I 분자 상에서 증가된 항원 제시 및 따라서 개선된 백신접종 방법을 초래한다고 여겨진다. 실시예에서 개시된 바와 같이 OT-1 세포를 사용한 모델 시스템은 MHC 클래스 I 제시의 평가를 위하여 사용될 수 있다 (참고 예를 들어 Delamarre et al. J. Exp. Med. 198:111-122, 2003). 상기 모델 시스템에서 항원 에피토프 SIINFEKL의 MHC 클래스 I 제시는 OT-1 T-세포의 활성화를 이끌고, 활성화는 항원-특이적 T-세포의 증식 또는 IFN γ 또는 IL-2의 증가된 생산으로서 측정될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0012]

본 발명은 후술하는 하기 도면을 참조로 하기 비제한적인 실시예에서 더 상세히 이제 기재될 것이다:

도 1 은 반응식 1: 화합물 5의 합성을 위한 합성 경로를 보여준다. 시약 및 조건: (a) 프로피온산, 환류, 1h (20%); (b) NaNO₂ (1.8 eq), TFA, rt, 3min. 67%; (c) SnCl₂.2H₂O, 농축 HCl, 60°C, 1h (88%); (d) 브로모아세틸 브로마이드, Et₃N, CH₂Cl₂, rt, 1h (64%) (e) 피페라진, CH₂Cl₂, rt, 1h (94%).

반응식 2. N-변성된 키토산 유도체 (TPP-CS-TMA & TPP-CS-MP)의 합성. 여기에서 A-는 1st 배치 화합물을 나타내고 B-는 2nd 배치 화합물을 나타낸다. 시약 및 조건: (a) MeSO₃H/ H₂O, 10°C-rt, 1h, (90%); (b) TBDMSCl, 이미다졸, DMSO, rt, 24h (96 %); (c) 브로모아세틸 브로마이드, Et₃N, CH₂Cl₂, -20°C, 1h (92%); (d) 화합물 5 즉 TPP-NH-Pip (0.1 또는 0.25 eq), Et₃N, CHCl₃, rt, 2h (92-90 %) (e) NMe₃ 또는 1-메틸 피페라진, CHCl₃, rt, 24h (f) TBAF, NMP, 55°C, 24h 또는 농축 HCl/ MeOH, rt, 24h.

반응식 3 - 화합물 1, 3 20 및 21에 대한 합성 반응식. 반응 및 조건: ((a) 프로피온산, 환류, 1h, (20%); (b) NaNO₂ (1.8 eq.), TFA, rt, 3min.; (c) SnCl₂.2H₂O, 농축 HCl, 60°C, 1h, (54 %); (d₁) p-톨루엔설포닐하이드라자이드, K₂CO₃, 피리딘, 환류, 24h; (d₂) o-클로라닐, CH₂Cl₂, rt, (80%); (e) 클로로아세틸 클로라이드, Et₃N, CH₂Cl₂, rt, 2h, 원위치-(f) 피페라진, CH₂Cl₂, rt, 12h, (61 %). 화합물 20 및 21의 모든 유도체는 TPCa₁ 및 TPCa₂ 이성질체를 함유할 것이다. 그러나 단지 TPCa₁ 구조는 반응식 및 구조 도면에서 보여진다.

반응식 4 - 화합물 22-28에 대한 합성 반응식. 반응 및 조건: (a) 아세틸 클로라이드, MeOH, 환류, 24h, (87 %); (b) BF₃.Et₂O, CHCl₃, rt, p-클로라닐, 48h, (14%); (c) 2N KOH (MeOH내), THF:피리딘 (10:1), 환류, 24h (71 %); (d₁) p-톨루엔설포닐하이드라자이드, K₂CO₃, 피리딘, 환류, 24h; (d₂) o-클로라닐, CH₂Cl₂: MeOH (75:25), rt, (70 %); (e) EDCI.HCl, HOBT, Et₃N, N-Boc-피페라진 5, DMF, rt, 24h (54 %) (f) TFA, CH₂Cl₂, rt, 1h (89 %). 화합물 26-28의 모든 유도체는 TPCC₁ 및 TPCC₂ 이성질체를 함유할 것이다. 그러나, 단지 TPCC₁ 구조는 반응식 및 구조 도면에서 보여진다.

반응식 5A 및 5B. 시약 및 조건 (6A) : (a) 화합물 21 즉 TPC-NH-Pip (0.1 eq), Et₃N, CHCl₃, rt, 2h (78%) (b) NMe₃ 또는 1-메틸 피페라진, CHCl₃, rt, 24h. 시약 및 조건 (6b) : a) 화합물 28 즉 TPC-CO-Pip (0.1 eq), Et₃N, NMP, 75°C, 12h (89 %) (b) NMe₃ 또는 1-메틸 피페라진, CHCl₃, rt, 24h.

도 2는 아쥬반트 GM-CSF의 효과를 보여준다. 마우스는 10 μg OVA로, 10 μg OVA 및 10 μg GM-CSF로, 10 μg OVA 및 150 μg TPCS_{2a}로, 10 μg OVA, 10 μg GM-CSF, 및 150 μg TPCS_{2a}로 면역되었거나 또는 미치료된 채로 남겨졌다. TPCS_{2a}를 수용한 마우스는 조명되었다. 일 7에 마우스는 채혈되었고, OVA-특이적 CD8 T-세포의 빈도는 유세포측정으로 분석되었다. (A)는 유세포측정 분석으로부터 대표적인 점 도표를 보여준다. 세포는 CD8 발현 상에서 먼저 게이팅되었고, 그 다음 CD8⁺ 집단은 SIINFEKL 오량체 결합 (y-축) 및 CD44 발현 (x-축)에 대하여 분석되었다. 타원 내부의 집단은 따라서, 항원-특이적 (오량체 결합), 활성화된 (CD44 발현) CD8⁺ 세포를 나타내는, CD8⁺ 오량체⁺, CD44⁺ 세포를 나타낸다. (B)는 실험 그룹 (각 그룹에서 5 동물, 오차 막대: 평균의 표준 오차)에 대하여 평균 값 (% 항원-특이적, 총 CD8+세포의 CD44⁺ 세포)를 보여준다.

도 3은 HPV 16 E7 웨타이드 항원으로 마우스의 백신접종에 관한 GM-CSF의 효과를 보여준다. 마우스는, PCI와 또는 없이, HPV 단독으로 또는 GM-CSF와 HPV로 면역되었다. 도는 HPV 오량체를 발현한 총 CD8 세포의 %를 보여준다.

도 4는 선택적으로 HPV 16 E7 웨타이드 항원을 갖는 마우스의 백신접종에 관해 폴리(IC)를 이용한, GM-CSF의 효과를 보여준다. 마우스는, 도에서 지적된 바와 같이, PCI와 또는 없이 HPV, 폴리(IC) 및/또는 GM-CSF로 면역되었다. 2 면역하는 도에서 마지막 2개의 막대에서 보여준 결과에서 사용되었다. 도는 HPV 오량체를 발현한 총 CD8 세포의 %를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013]

따라서, 제1 측면에서 본 발명은, 상기 세포를 상기 항원성 분자, 감광제, 및 사이토카인인 제제와 접촉하는 단계, 및 감광제를 활성화하는데 유효한 과장의 광으로 세포를 조사하는 단계를 포함한, 세포의 표면 상에서 항원성 분자 또는 이의 일부의 발현 방법을 제공하고, 여기에서 상기 항원성 분자는 세포의 사이토졸 속으로 방출되고 항원성 분자 또는 이의 일부는 그 뒤에 세포의 표면 상에서 제시된다.

[0014]

바람직하게는 상기 방법 (및 그 뒤에 기재된 방법)은 상기 방법에서 상기에 기재된 3 활성 성분 (제제)만을 사용하고 제제는 상기 방법에서 적절한 수준 (예를 들어 아래 기재된 최소 수준)으로 존재하여 이로써 이들이 상기 방법의 효능에 영향을 미친다 (즉 PCI 백신접종/항원 제시/면역 반응 자극의 향상에서 활성 역할을 갖는다). 따라서 바람직하게는 제제는 다른 활성 성분 없이 벼파에 존재한다.

[0015]

상기 방법에서 상기 항원성 분자 및 상기 감광제, 및 선택적으로 본원에서 정의된 바와 같이 사이토카인인 상기 제제는 각각 세포내 소포 속으로 용해되고; 세포가 조사된 경우 세포내 소포의 막은 세포의 사이토졸 속으로 항원성 분자의 방출이 파괴된다.

[0016]

다양한 제제는 서로에 비해 동일한 또는 상이한 세포내 소포에 용해될 수 있다. 광감작제에 의해 생산된 활성 종이 이들이 함유되는 소포를 넘어서 확장할 수 있고/있거나 소포가 파괴된 소포와 유착으로 방출되도록 소포의 내용물을 합체할 수 있음을 알아내었다. 본원에서 참조된 바와 같이 "용해된"은 용해된 분자가 소포 내에 전체적으로 함유되는 것을 의미한다. 세포내 소포는 막에 의해 제한되고 세포내이입 이후 수득한 임의의 상기 소포, 예를 들어 엔도솜 또는 리소좀일 수 있다.

[0017]

본원에서 사용된 바와 같이, "파괴된" 구획은, 그 안에 함유된 항원성 분자의 방출을 허용하는데 충분한, 영구적으로 또는 일시적으로 구획의 막의 완전성 파괴를 지칭한다.

[0018]

본원에서 참조된 바와 같이 "감광제"는 제제가 활성화된 종을 생성하기 위해 적절한 과장 및 세기에서 조명으로 활성화된 경우 흡수된 광의 에너지를 화학 반응으로 전환할 수 있는 화합물이다. 이를 방법의 고 반응성 최종 생성물은 세포- 및 혈관 독성을 초래할 수 있다. 편리하게 그와 같은 감광제는 세포내 구획에 국지화하는 것, 특히 엔도솜 또는 리소좀일 수 있다.

[0019]

광감작제는 다양한 기전으로 그의 효과를 직접적으로 또는 간접적으로 발휘할 수 있다. 따라서 예를 들어, 특정 광감작제는 광에 의해 활성화된 경우 직접적으로 독성이 되고, 반면에 다른 것은, 세포성 물질 및 생체분자 예컨대 지질, 단백질 및 핵산에 극도로 파괴적인, 독성 종, 예를 들어 산화제 예컨대 단일항 산소 또는 다른 반응성 산소 종을 생성하는 작용을 한다.

[0020]

상기 감광제의 범위는 당해 기술에 공지되어 있고, 본원에서 참고로 편입되는, W096/07432를 포함한, 문헌에 기재되어 있고, 본 발명의 방법에서 사용될 수 있다. 포르피린, 프탈로시아닌, 퓨르퓨린스, 클로린, 벤조포르피린, 리소모트로핀 약염기, 나프탈로시아닌, 양이온성 염료 및 테트라사이클린 또는 그의 유도체를 포함하여, 많은 공지된 감광제가 있다 (Berg et al., (1997), J. Photochemistry and Photobiology, 65, 403-409). 다른 감광제는 텍사파이린, 페오포르마이드, 포르피센, 박테리오클로린, 케토클로린, 헤마토포르피린 유도체, 및 5-아미놀레별린산 및 그의 유도체에 의해 유도된 내인성 광감작제, 포토프린, 광감작제 사이의 이량체 또는 다른 콘주케이트를 포함한다.

[0021]

포르피린은 가장 광범위하게 연구된 감광제이다. 그의 분자 구조는 메틴 브릿지를 통해 함께 연결된 4개 피를 고리를 포함한다. 이들은 금속-복합체를 종종 형성할 수 있는 천연 화합물이다. 예를 들어 산소 운반 단백질 해모글로빈의 경우에서, 철 원자는 힘 B의 포르피린 코어 속으로 도입된다.

[0022]

클로린은, 코어에서, 4개 메틴 연결기를 통해 커플링된 3개 피를 및 1개 피롤린으로 이루어진 대형 해테로사이클릭 방향족 고리이다. 포르피린과 달리, 클로린은 따라서 크게 방향족이지만, 그러나 고리의 전체 둘레를 통해 방향족은 아니다.

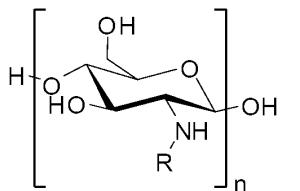
[0023]

숙련된 사람은 광감작제가 본 발명에서 사용에 적합하다는 것을 인식할 것이다. 세포의 엔도솜 또는 리소좀에 위치한 감광제가 특히 바람직하다. 따라서, 감광제는 바람직하게는 리소좀 또는 엔도솜의 내부 구획 속으로 용해되는 제제이다. 바람직하게는 감광제는 세포내이입에 의해 세포내 구획 속으로 용해된다. 바람직한 광감작제는 디- 및 테트라설폰화된 알루미늄 프탈로시아닌 (예를 들어 AlPcS_{2a}), 설폰화된 테트라페닐포르핀 (TPPS_n), 설폰화된 테트라페닐 박테리오클로린 (예를 들어 TPBS_{2a}), 나일 블루, 클로린 e₆ 유도체, 유로포르피린 I, 필로에

리트린, 헤마토포르피린 및 메틸렌 블루이다. 본 발명에서 사용을 위하여 추가로 적절한 광감작제는, 본원에서 참고로 또한 편입되는, WO03/020309에 기재된, 즉 설폰화된 메소-테트라페닐 클로린, 바람직하게는 TPCS_{2a}이다. 바람직한 감광제는 양친매성 광감작제 (예를 들어 디설폰화된 광감작제) 예컨대 양친매성 프탈로시아닌, 포르피린, 클로린 및/또는 박테리오클로린이고, 특히 TPPS_{2a} (테트라페닐포르핀 디설포네이트), AlPcS_{2a} (알루미늄 프탈로시아닌 디설포네이트), TPCS_{2a} (테트라페닐 클로린 디설포네이트) 및 TPBS_{2a} (테트라페닐 박테리오클로린 디설포네이트), 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함한다. 또한 바람직한 것은 친수성 감광제, 예를 들어 TPPS₄ (메소-테트라페닐포르핀 테트라설포네이트)이다. 특히 바람직한 감광제는 설폰화된 알루미늄 프탈로시아닌, 설폰화된 테트라페닐포르핀, 설폰화된 테트라페닐클로린 및 설폰화된 테트라페닐박테리오클로린, 바람직하게는 TPCS_{2a}, AlPcS_{2a}, TPPS₄ 및 TPBS_{2a}이다. 본 발명의 특히 바람직한 구현예에서 감광제는 클로린 TPCS_{2a} (디설폰화된 테트라페닐 클로린, 예를 들어 Amphinex®)이다.

[0024]

광감작제는 감광제를 제공하기 위해 담체에 연결될 수 있다. 따라서, 본 발명의 상기 구현예의 바람직한 측면에서 감광제는 광감작제와 식 (I)에서 정의된 바와 같은 키토산의 콘주게이트이다:



(I)

[0025]

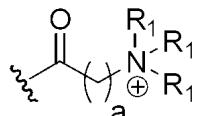
식 중,

n은 3 이상의 정수이고;

R은 상기 화합물에서 n회 나타나고, 그리고

[0029]

상기 총 Rn 기의 0.1%-99.9% (바람직하게는 0.5%-99.5%)에서, 각 R은 하기로부터 선택된 기 A이고:

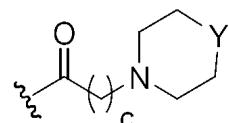


[0030]

식 중, 동일 또는 상이할 수 있는, 각 R₁은 H, CH₃ 및 -(CH₂)_b-CH₃으로부터 선택되고; a는 1, 2, 3, 4 또는 5이고; b는 0, 1, 2, 3, 4 또는 5이고 (여기에서 반대-이온은, 예를 들어, Cl⁻일 수 있다); 바람직하게는 R₁은 CH₃이고 b는 1이고,

[0032]

및



[0033]

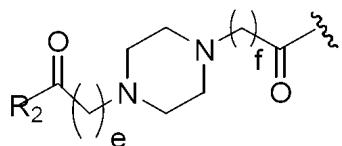
식 중, Y는 O; S; SO₂; -NCH₃; 또는 -N(CH₂)_dCH₃이고; c = 1, 2, 3, 4 또는 5; 및 d = 1, 2, 3, 4 또는 5, 바람직하게는 Y는 NCH₃이고 c는 1이고,

[0035]

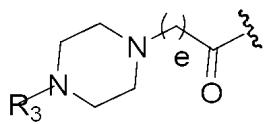
여기에서 각 R 기는 동일 또는 상이할 수 있고, 그리고

[0036]

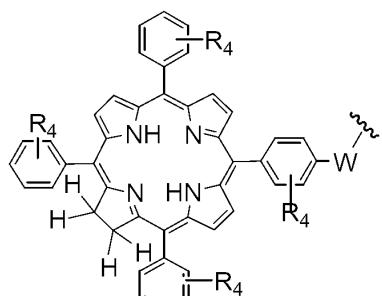
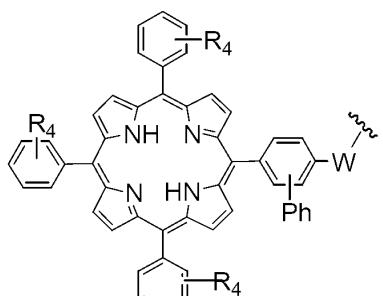
상기 총 Rn 기의 0.1%-99.9% (바람직하게는 0.5%-99.5%)에서, 각 R은 하기로부터 선택된 기 B이다:



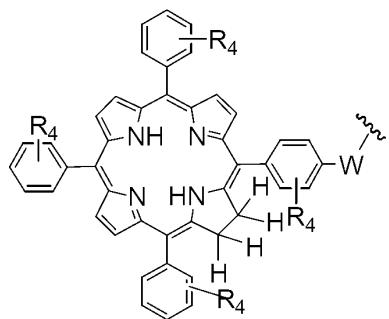
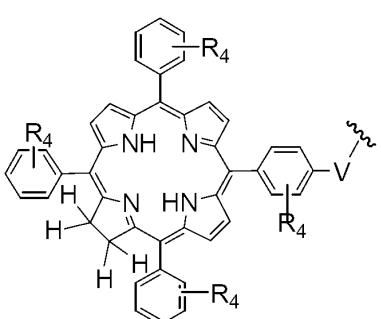
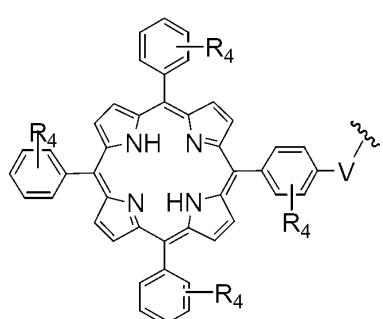
, 및



식 중, e는 0, 1, 2, 3, 4 또는 5이고; f는 1, 2, 3, 4 또는 5이고; 바람직하게는 e 및 f = 1,

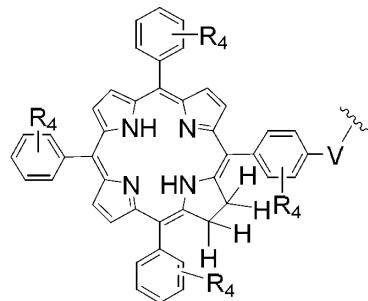
[0040] R_2 는 하기로부터 선택된 기이고:

및

W는 O, S, NH 또는 $N(CH_3)$ 으로부터 선택된 기; 바람직하게는 NH이고,[0043] R_3 은 하기로부터 선택된 기이고:

[0046]

및

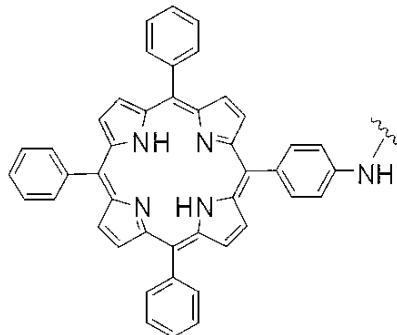


[0047]

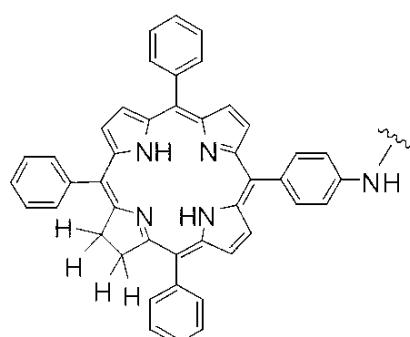
[0048] V는 CO, SO₂, PO, PO₂H 또는 CH₂로부터 선택된 기; 바람직하게는 CO이고,[0049] R₄는, 동일 또는 상이할 수 있는, H, -OH, -OCH₃, -CH₃, -COCH₃, C(CH₃)₄, -NH₂, -NHCH₃, -N(CH₃)₂ 및 -NCOCH₃으로부터 선택될 수 있는, (o, m 또는 p 위치에서 치환된) 기, 바람직하게는 H이고,

[0050] 여기에서 각 R 기는 동일 또는 상이할 수 있다.

[0051] 키토산 폴리머는 적어도 3 유니트 (n=3)를 갖는다. 그러나, 바람직하게는 n은 적어도 10, 20, 50, 100, 500, 1000 예를 들어 10 내지 100 또는 10 내지 50이다.

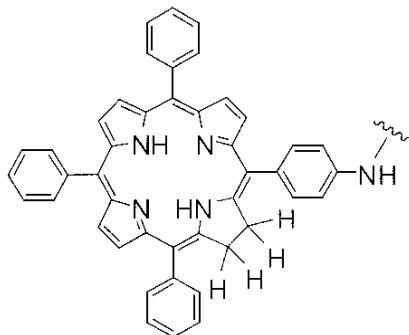
[0052] 바람직한 구현예에서 R₂는 하기로부터 선택된다:

TPPa

TPCa₁

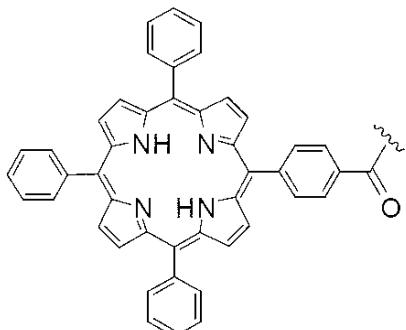
[0053]

[0054] 및

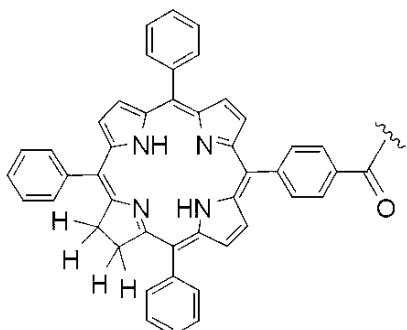


[0055]

[0056] 추가로 바람직한 구현예에서 R₃은 하기로부터 선택된다:

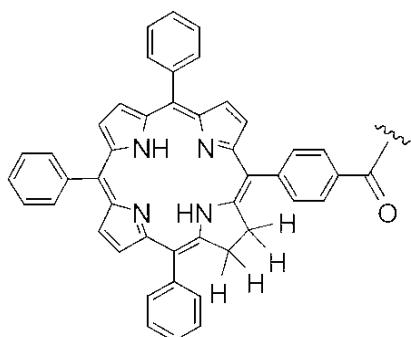


TPPc

TPC_{c1}

[0057]

및

TPC_{c2}

[0059]

바람직하게는 R₂ 또는 R₃은 TPP_a, TPC_{a1} 또는 TPC_{c1}이다.

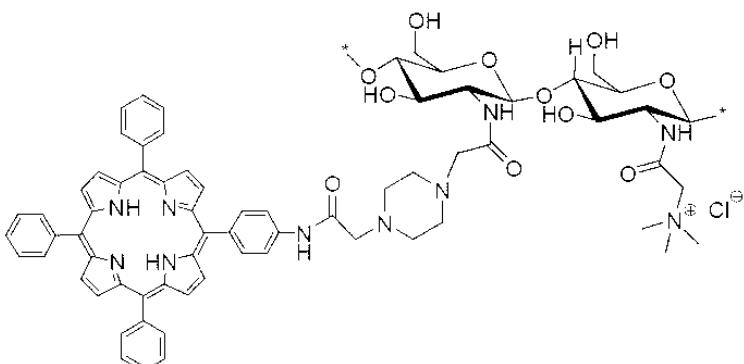
[0060] 기 A는 총 Rn 기의 70 내지 95%를 제공할 수 있고 기 B는 총 Rn 기의 5 내지 30%를 제공할 수 있다.

[0061]

[0062] 가장 바람직한 구현예에서 광감작제와 키토산의 콘주케이트는 하기로부터 선택된다 (참고 도 4의 반응식 1-5B에서 넘버링):

[0063]

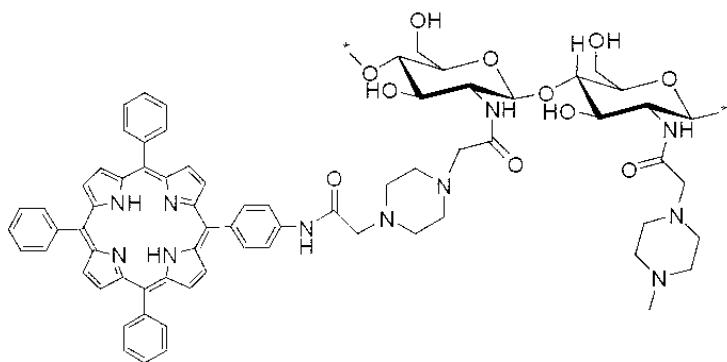
17: B:25%, A:75%



[0064]

[0065]

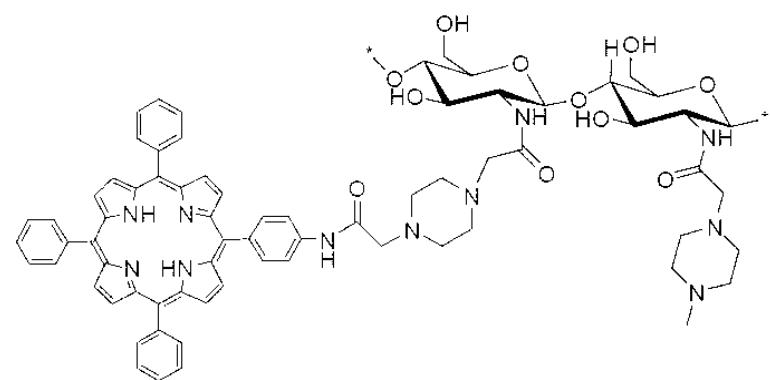
19: B:25%, A:75%



[0066]

[0067]

33: B:10%; A:90%

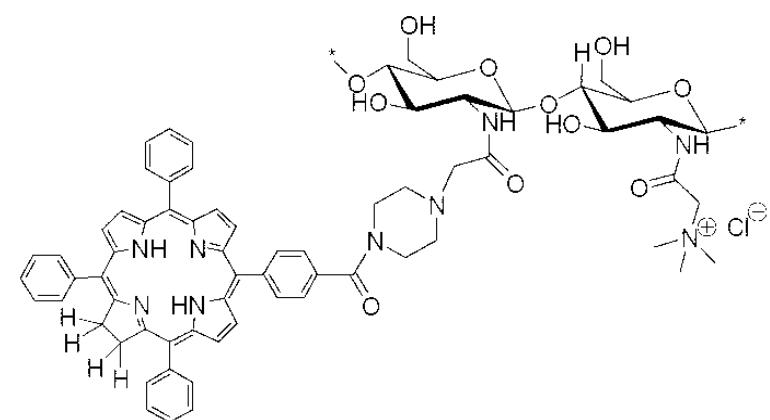


[0068]

, 및

[0069]

37: B:10%; A:90%



[0070]

[0071] 상기 구조에서, 제공된 A/B % 값은 기 A 또는 B인 Rn 기의 분율을 참조한다. 별표는 키토산 폴리머의 나머지를 표시한다.

[0072]

[0072] 이를 화합물은, 숙련된 사람에게 친숙할, 당해 기술에서 표준인 절차를 사용하는 합성 방법으로 제조될 수 있다. 예로써, 아래 논의된 바람직한 콘주게이트의 합성, 번호 17, 19, 33 및 37은 도 1의 반응 반응식 1-5B에서 보여진다 (및 참고 또한 도 1 범례).

[0073]

[0073] 본원에서 참조된 바와 같이 "항원성" 문자는, 적절한 방식으로 면역 시스템 또는 면역 세포에 제시된 경우, 자체, 또는 이의 일부가 면역 반응을 자극할 수 있는, 문자이다. 유익하게는, 따라서 항원성 문자는 백신 항원 또는 백신 성분, 예컨대 폴리펩타이드 함유 독립체일 것이다.

[0074]

[0074] 많은 상기 항원 또는 항원성 백신 성분은 당해 기술에 공지되어 있고 박테리아 또는 바이러스 항원 또는 원생동물 또는 고등 유기체를 포함한 임의의 병원성 종의 사실상 항원 또는 항원성 성분의 모든 방식을 포함한다. 전통적으로 백신의 항원성 성분이 (살아 있는, 죽은 또는 약화되든 아니든) 전체의 유기체 즉 전체의 세포 백신을

포함하는 반면, 또한 서브-유니트 백신, 즉 유기체의 특정한 항원성 성분 예를 들어 단백질 또는 웨타이드, 또는 심지어 탄수화물에 기반된 백신은 널리 조사되고 있고 문헌에 보고되고 있다. 임의의 상기 "서브-유니트"-기반 백신 성분은 본 발명의 항원성 분자로서 사용될 수 있다.

[0075] 그러나, 본 발명은 웨타이드 백신의 분야에서 특정한 유용성을 찾는다. 따라서, 본 발명에 따른 바람직한 항원성 분자는 (모든 더 짧은 및 더 긴 길이의 웨타이드 즉 웨타이드, 올리고웨타이드 또는 폴리웨타이드, 및 또한 단백질 분자 또는 이의 단편 예를 들어 5-500 예를 들어 10 내지 250 예컨대 15 내지 75, 또는 8 내지 25 아미노산의 웨타이드를 포함하도록 본원에서 정의되는) 웨타이드이다. 본 발명은, 예를 들어, 본 발명의 바람직한 측면을 형성하는 항원성 분자로서 난알부민을 이용하여 실증되고 있지만, 그러나 난알부민이 아닌 항원성 분자, 예컨대 실시예에서 사용된 것이 특히 바람직하다.

[0076] 다수의 웨타이드 백신 후보자는 문헌, 예를 들어 바이러스성 질환 및 감염 예컨대 AIDS/ HIV 감염 또는 인플루엔자, 갯과 파보바이러스, 소 백혈병 바이러스, 간염, 등의 치료에서 제안되고 있다 (참고 예를 들어 Phanuphak et al., Asian Pac. J. Allergy. Immunol. 1997, 15(1), 41-8; Naruse, Hokkaido Igaku Zasshi 1994, 69(4), 811-20; Casal et al., J. Virol., 1995, 69(11), 7274-7; Belyakov et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, 95(4), 1709-14; Naruse et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994 91(20), 9588-92; Kabeya et al., Vaccine 1996, 14(12), 1118-22; Itoh et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1986, 83(23) 9174-8. 사실상 다른 유기체 또는 종으로부터 유도된 웨타이드 항원일 수 있음에 따라, 유사하게 박테리아 웨타이드는 사용될 수 있다.

[0077] 병원성 유기체로부터 유도된 항원에 더하여, 웨타이드는 암 또는 다른 질환 예컨대 다발성 경화증에 대한 백신으로서 사용을 위하여 또한 제안되고 있다. 예를 들어, 돌연변이체 종양유전자 웨타이드는 세포독성 T-림프구의 자극에서 항원으로서 작용한 암 백신으로서 대단한 장래성을 유지한다. (Schirrmacher, Journal of Cancer Research and Clinical Oncology 1995, 121, 443-451; Curtis Cancer Chemotherapy and Biological Response Modifiers, 1997, 17, 316-327). 따라서 흑색종 항원은 본 발명의 항원성 분자로서 사용될 수 있다. 대안적인 구현예에서, 흑색종 항원이 아닌 항원성 분자는 사용될 수 있다. 본원에서 참조된 바와 같이 "흑색종 항원"은, 적절한 방식으로 면역 시스템 또는 면역 세포에 제시된 경우, 자체, 또는 이의 일부가 면역 반응을 자극할 수 있는, 흑색종 세포로부터 유도된 분자이다. 흑색종으로부터 "유도된" 분자는, 예를 들어 절단에 의해 흑색종에서 원상태 분자에 비해 변성되는 또는 흑색종 세포에서 나타날 수 있는 분자이고, 변성된 분자를 제공한 후-발현 변성 및/또는 서열 변성은 원상태 분자를 인식할 면역 반응을 생성하기 위해 변성된 분자를 허용하는 원상태 분자로부터 하나 이상의 에피토프를 유지한다. 흑색종 항원은 적절한 공급원 예를 들어 대상체의 흑색종으로부터 단리에 의해 수득될 수 있거나 또는 예를 들어 화학 합성 또는 웨타이드/단백질 발현에 의해 합성될 수 있다.

[0078] 합성 웨타이드 백신은 전이성 흑색종의 치료를 위하여 또한 평가되고 있다 (Rosenberg et al., Nat. Med. 1998, 4(3), 321-7). 다발성 경화증의 치료를 위한 T-세포 수용체 웨타이드 백신은 Wilson et al., J. Neuroimmunol. 1997, 76(1-2), 15-28에 기재된다. 사실상 문헌에서 웨타이드 백신으로서 기재된 또는 제안된 임의의 웨타이드 일 수 있음에 따라, 임의의 상기 웨타이드 백신 성분은 본 발명의 항원성 분자로서 사용될 수 있다. 웨타이드는 따라서 합성 또는 단리될 수 있거나 또는 다르게는 유기체로부터 유도될 수 있다. 바람직한 웨타이드는 실시예에서 사용된 것, 예를 들어 HPV 웨타이드 예컨대 서열 QAEPDRAHYNIVTFCCCKDSTLRLCVQSTHVDI를 갖는 HPV 롱 웨타이드를 포함한다.

[0079] 한 구현예에서 아쥬반트는 본 발명의 방법에서 또한 사용된다. 예를 들어, 아쥬반트는 톤-유사 수용체 (TLR) 리간드, 예컨대 TLR 3 리간드, 예를 들어 폴리(IC) (예를 들어 높은 (예를 들어 1.5-8kb의 평균 크기) 또는 낮은 (예를 들어 0.2-1kb의 평균 크기) MW 폴리(IC))로부터 선택될 수 있다. 폴리(IC)의 용량은, 다른 동물의 치료에 필요한 경우 적절하게 비례될 수 있는, 마우스에 대하여 5 μ g 내지 200 μ g, 예를 들어 10 μ g 및 100 μ g, 바람직하게는 10 μ g 또는 50 μ g일 수 있다. 본 발명의 생성물, 방법 또는 용도는 바람직하게는 폴리(IC)를 함유하거나 또는 이용한다.

[0080] 광화학 내재화 방법에 의해 세포 사이토졸에서 방출되면, 항원성 분자는 세포의 항원-조작 기계에 의해 가공될 수 있다. 따라서, 세포의 표면 상에서 발현된 또는 제시된 항원성 분자는 내재화되는 (세포내이입되는) 항원성 분자의 일부 또는 단편일 수 있다. 제시된 또는 발현된 항원성 분자의 "일부"는 바람직하게는 세포 내에 항원-조작 기계에 의해 생성되는 일부를 포함한다. 일부는, 그러나, 적절한 항원 설계 (예를 들어 pH 민감성 결합)를 통해 또는 다른 세포 조작 수단을 통해 달성될 수 있는 다른 수단에 의해 생성될 수 있다. 편리하게 상기 일부

는, 예를 들어 5 초파, 예를 들어 10 또는 20 초파 아미노산 크기의 웹타이드 경우에 면역 반응을 생성하기에 충분한 크기이다.

[0081] 본원에서 논의된 바와 같이, PCI-매개된 백신접종을 향상시키는 제제는 사이토카인이다. 용어 "사이토카인"은 다양한 발생학 기원의 세포에 의해 바디 전반에 걸쳐 생산된 조절물질의 큰 및 다양한 패밀리를 포함한다. 사이토카인은 단백질, 웹타이드, 또는 당단백질일 수 있는 작은 세포 신호전달 분자이다. 사이토카인은 면역조절체, 예컨대 인터류킨 (IL) 및 인터페론 (IFN) 및 또한 접락 자극 인자, 종양 괴사 인자 (TNF) 및 다른 조절 분자를 포함한다. 사이토카인은, 그의 기능, 분비의 세포, 또는 작용의 표적에 기반하여, 림포카인, 인터류킨, 및 케모카인으로서 분류되고 있다. 각 사이토카인은, 세포 기능을 변경하는 세포내 신호전달의 캐스케이드를 시작하는, 일치한 세포-표면 수용체를 갖는다. 사이토카인은 당해 기술에서 잘 알려지고 모든 상기 사이토카인은 본 발명에 따라 사용을 위하여 포함된다. 바람직한 패밀리는 본원에서 기재된 바와 같다.

[0082] 사이토카인은 구조 및/또는 기능에 따라 다양한 방식으로 분류되어 있고, 다양한 패밀리가 확인되어 있다. 사이토카인은 이들이 결합하는 수용체 덕분으로 분류될 수 있다. 수용체 (및 따라서 그의 리간드)는 유형 I 사이토카인 (조혈인자) 수용체, 유형 II 사이토카인 수용체, TNF 수용체, 면역글로불린 슈퍼패밀리 수용체 및 7 막통과 α -나선 수용체로 분류될 수 있다.

[0083] C-CSF, M-CSF, IL-3 및 IL-5와 함께, 과립구-대식세포 콜로니-자극 인자 (GM-CSF)는 상기 논의된 조혈 사이토카인 수용체용 리간드인 사이토카인의 패밀리에 속한다. 공통의 β 사슬을 갖는, GM-CSF 수용체 패밀리가 수용체의 상기 패밀리 이내이다. GM-CSF는 다양한 세포 유형에 의해 보존된 디-설파이드 결합으로 128 아미노산을 함유한 단일 사슬 당단백질로서 분비된다. GM-CSF의 기능은, GM-CSF-특이적 α 사슬 및, 인간 세포에서, IL-3 및 IL-5 수용체와 공유되는 β 사슬을 포함하는, GM-CSF 수용체에 의해 매개된다. α 사슬은 세포 표면 상에서 모노머로서 표현되고, 높은 친화도로 GM-CSF에 결합한다. 상기 결합 이후, β 사슬은 복합체에 동원되고 신호 전달 및 기능적 반응을 활성화한다. 또한, α 사슬은 (대안적 스플라이싱에 의해 생성된) 가용성 외부 분자로서 존재할 수 있다. 상기 수용체는 사이토카인에 대하여 그의 막-결합 대응물과 경쟁하지만 작용적 신호전달에 참여하지 않는다. GM-CSF는 백색 혈액 세포 성장 인자로서 기능한다. GM-CSF는 줄기 세포를 자극시켜 과립구 (중성구, 호산구, 및 호염기구) 및 단핵구를 생산한다. GM-CSF는 따라서 감염 싸움에서 중요하다.

[0084] IL-2 수용체 패밀리는 또한 유형 I 사이토카인 수용체 패밀리 내이다. 상기 패밀리의 구성원은 공통의 γ 사슬을 갖는다. 상기 패밀리에서 수용체는 IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 및 IL-21 수용체를 포함한다. 대다수의 인터류킨은 헬퍼 CD4 T 림프구에 의해, 뿐만 아니라 단핵구, 대식세포, 및 내피 세포를 통해 합성된다. 이들은 T, B, 및 조혈 세포의 발생 및 분화를 촉진시킨다.

[0085] IL-7은, 인터류킨-7 수용체 α 및 공통의 γ 사슬 수용체로 이루어진 이종이량체인, IL-7 수용체에 결합한다. IL-7은 모든 B 및 T 세포 발생에 중요하다. 상기 사이토카인 및 간세포 성장 인자 (HGF)는 프레-프로-B 세포 성장-자극 인자로서 기능하는 이종이량체를 형성한다. IL-7은 또한 초기 T 세포 발생 동안 T 세포 수용체 베타 (TCR β)의 V(D)J 재배열을 위한 보조인자이다. IL-7은 장 상피성 및 상피성 배상 세포에 의해 국소로 생산될 수 있지만, 그러나 림프구 자체에 의해 생산되지 않고 혈청 IL-7 수준은 림프구 카운트와 반대로 상관된다. 그의 수용체에 사이토카인의 결합은, 가슴샘 이내 및 주변내 생존 모두에서, T-세포 발생에 중요한 신호전달을 초래한다. IL-7은 (분화가 IL-3에 의해 자극되는 골수 전구 세포와 대조적으로) 림프 전구 세포로 다분화능 (전분화능) 조혈 줄기 세포의 분화를 자극한다. 림프 계통 (B 세포, T 세포 및 NK 세포)에서 모든 세포의 증식을 또한 자극한다. B-세포 성숙, T 및 NK 세포 생존, 발생 및 항상성의 특정 단계 동안 증식에 중요하다.

[0086] 상기에서 논의된 바와 같이, IL-2, IL-15 및 IL-21은, 이들이 사이토카인의 소위 감마(γ) 패밀리에 속한다는 점에서, IL-7에 관련된다. 즉 이들은 공통의 γ 사슬을 갖는 수용체에 결합한다. 이들 사이토카인은 모두 신호전달용 공통의 사이토카인 γ 사슬을 사용하고, T-세포 및 NK 세포에 강력한 효과를 갖는다.

[0087] IL-2는 주로 T-헬퍼 세포에 의해 생산되고 타고난 및 적응성 면역 시스템의 다양한 면역 세포 상에서 작용한다. IL-2는 반응성 T-세포의 증식을 유도하는 림포카인이다. 또한, 성장 인자로서 및 항체 생산 자극제로서, 수용체-특이적 결합을 통해, 일부 B-세포 상에서 작용한다. IL-2는 단일 당화된 폴리펩타이드로서 분비되고, 신호 서열의 절단은 그의 활성에 대하여 요구된다. 용액 NMR은, IL-2의 구조가 2개의 더 짧은 나선 및 몇 개의 저조하게-정의된 루프에 의해 측첩된, 4 나선 (일명 A-D)의 다발을 포함함을 제안한다. 나선 A에서, 그리고 나선 A 및 B 사이의 루프 영역에서 잔기는 수용체 결합에 중요하다. 2차 구조 분석은 IL-4 및 GM-CSF에 유사성을 제안하였다.

- [0088] IL-15는 다양한 세포 유형 및 조직에 의해 구성적으로 발현되지만, 그러나 주로 막-결합이다. IL-15 및 IL-2는 유사한 면역 효과를 나타내고 IL-2 수용체 서브유니트 IL-2R β 및 IL-2R γ (c)를 공유하지만, 그러나 각 사이토카인은 별도 α 수용체를 갖는다. IL-15는, 세포성 면역 반응의 자극 및 유지를 포함한, 다양한 생물학적 기능을 갖는다. IL-15는 T-림프구의 증식을 자극한다.
- [0089] IL-21은 IL-15에 상동성이지만, 그러나 수용체는 독특한 서브유니트 지정된 IL-21R α 및 IL-2R γ (c)로 구성된다. IL-21은 활성화된 CD4 $^+$ T 헬퍼 세포, 및 NK T 세포에 의해 생산된다. 모든 림프구 및 수지상 세포는 IL-21 수용체를 갖는다. 사이토카인 결합에 의한 수용체의 자극은 상호자극, CD8+ T 세포의 활성화 및 증식, NK 세포독성의 확대, CD40-유도된 B 세포 증식에서의 증가, 분화 및 아이소타입 스위칭, 및 Th17 세포의 촉진 및 분화를 초래할 수 있다.
- [0090] 인터페론 (IFNs)은 유형 II 사이토카인 수용체에 결합하는 사이토카인의 예이다. 인터페론은 병원체 예컨대 바이러스, 박테리아, 기생충 또는 종양 세포의 존재에 대한 반응에서 숙주 세포에 의해 제조된 및 방출된 단백질이다. 이들은 병원체 또는 종양을 박멸하는 면역 시스템의 보호성 방어를 유발하기 위해 세포 사이에서 정보전달을 허용한다. 인터페론은 면역 세포, 예컨대 자연 살해 세포 및 대식세포를 활성화시킬 수 있고 이들은 미감염된 호스트의 능력을 증가시켜 바이러스에 의한 신규 감염을 방해한다.
- [0091] 대략 10개의 상이한 IFNs는 포유동물 (인간 7명)에서 확인되고 있다. 이들이 신호하는 수용체의 유형에 기초하여 기술된, 3개의 IFN 클래스가 있다. 모든 유형 I IFNs는 IFNAR1 및 IFNAR2 사슬로 이루어진 IFN- α 수용체 (IFNAR)로서 공지된 특이적 세포 표면 수용체 복합체에 결합한다. 인간에 존재한 유형 I 인터페론은 IFN- α , IFN- β 및 IFN- ω 이다. 유형 II IFNs는, IFNGR1 및 IFNGR2 사슬로 이루어진, IFNGR에 결합한다. 인간에서 이는 IFN- γ 이다. 유형 III 인터페론은 IL10R2 및 IFNLR1로 이루어진 수용체 복합체를 통해 신호한다.
- [0092] IFN- α 단백질은 백혈구에 의해 생산되고, 바이러스성 감염에 대해 타고난 면역 반응으로 주로 관여된다. 13 하위유형이 있다: IFNA1, IFNA2, IFNA4, IFNA5, IFNA6, IFNA7, IFNA8, IFNA10, IFNA13, IFNA14, IFNA16, IFNA17 및 IFNA21. 이를 IFN- α 문자용 유전자는 염색체 9 상의 클러스터에서 함께 발견된다.
- [0093] 본 발명에 있어서, 제제는 임의의 사이토카인일 수 있다. 모든 공지된 형태의 상기-논의된 사이토카인은, 또한 기능적으로 등가인 이의 변이체, 유도체 및 단편을 포함하여, 본 발명에서 사용될 수 있다. 따라서, 상기 단편, 변이체 또는 유도체가 활성, 또는 "기능적"인 한, 즉 관련된 사이토카인의 적어도 하나의 기능 또는 활성 (예를 들어 생물학적 활성)을 보유하는 한, 용어 "사이토카인"은 본원에서 사용된 바와 같이 공지된 사이토카인 폴리펩타이드의 아미노산 서열 변이체, 및 사이토카인 폴리펩타이드의 단편, 또는 그의 유도체를 포함한다. 사이토카인은 재조합 폴리펩타이드, 합성 폴리펩타이드일 수 있거나 또는 천연 공급원으로부터 단리될 수 있다. 적합한 사이토카인은 상업적으로 이용가능하고 숙련된 사람에 공지될 것이고, 예를 들어 인간 사이토카인은 GenScript (Piscataway, NJ, USA)로부터 이용가능하다.
- [0094] 사이토카인은 임의의 종 (더 상세하게는 임의의 척추동물 종)일 수 있지만, 그러나 바람직하게는 포유동물, 및 더 바람직하게는 인간일 것이다.
- [0095] 사이토카인의 변이체는 이들이 자연에서 예를 들어 다른 종에서 나타남에 따라, 예를 들어, 상이한 대립유전자 변이체를 포함할 수 있거나 또는 지리학적 변화 등 때문에 기능적으로 등가 변이체는 또한 하나 이상의 아미노산 치환, 인트라시컨스 또는 공지된 서열에 대한 말단 결실 또는 부가를 편입하는 폴리펩타이드를 포함할 수 있다.
- [0096] 기능적으로 등가 유도체는, 예를 들어 화학적으로 치환된 또는 변성된 아미노산 잔기 또는 폐길화된 사이토카인의 봉입체를 포함한, 아미노산 서열의 화학 변성을 포함할 수 있다.
- [0097] 유도체는 또한 사이토카인 폴리펩타이드의 웨타이드모사인 분자일 수 있다. 환연하면, 폴리펩타이드와 기능적으로 등가인 또는 유사한 그리고 그의 폴리펩타이드 대응물에 유사한 3-D 구조를 채택할 수 있는, 그러나 웨타이드 결합에 의해 연결된 아미노산 단독으로 구성되지 않은 분자일 수 있다. 따라서, 웨타이드모사는 아미노산이 아니지만 구조적으로 및 기능적으로 아미노산에 유사한 서브-유니트로 구성될 수 있다. 서브유니트의 골격 모이어티는 표준 아미노산과 상이할 수 있고, 예를 들어 하나 이상의 탄소 원자 대신 하나 이상의 질소 원자를 포함할 수 있다. 웨타이드모사의 바람직한 클래스는 웨토이드, 즉 N-치환된 글리신이다. 웨토이드는 그의 웨타이드 대응물에 밀접하게 관련되지만 그의 측쇄가, 이들이 아미노산에 있음에 따라 α -탄소 보다는, 분자의 골격을 따라 질소 원자에 첨부된다는 점에서 화학적으로 상이하다.

- [0098] 모든 상기 변이체 및 유도체는 포함되고 다만 이들이 본 발명에 따라 관련된 사이토카인의 활성을 보유하고 광화학 내재화를 향상시키고, 예를 들어 실시예에서 기재된 방법론에 의해 평가된 바와 같이 PCI-매개된 백신접종을 향상시킨다.
- [0099] 활성을 보유하는 동안, 단백질 또는 웹타이드의 서열을 변성하는 것이 당해 기술에서 공지되고 이는 당해 기술 예를 들어 랜덤 또는 부위 지향된 돌연변이유발, 핵산의 절단 및 결찰, 화학 웹타이드 합성 등에서 표준인 기술을 이용하여 달성될 수 있다.
- [0100] 바람직하게는, 아미노산 변화는 작은 성질, 즉 단백질의 폴딩 및/또는 활성을 유의미하게 영향받지 않는 보존적 아미노산 치환; 전형적으로 1 내지 30 아미노산의 작은 결실; 작은 아미노- 또는 카복실-말단 확대; 최대 약 20-25 잔기의 작은 링커 웹타이드의 부가; 또는 순전하 또는 또 다른 기능, 예컨대 폴리-히스티딘 판, 항원성 에피토프 또는 결합 도메인을 변화시킴으로써 정제를 용이하게 하는 작은 확대. 그러므로, 단백질 또는 웹타이드에 대한 N 및/또는 C 확대는 정의에 포함된다. 각 확장된 유도체의 길이는 다양할 수 있고, 예를 들어, 유도체는 최대 50, 30, 20, 10 또는 5 아미노산에 의해 확장될 수 있다.
- [0101] 보존적 치환의 예는 염기성 아미노산 (예컨대 아르기닌, 라이신 및 히스티딘), 산성 아미노산 (예컨대 글루타민 및 아스파라гин), 소수성 아미노산 (예컨대 류신, 이소류신 및 발린), 방향족 아미노산 (예컨대 페닐알라닌, 트립토판 및 티로신) 및 작은 아미노산 (예컨대 글리신, 알라닌, 트레오닌 및 메티오닌)의 그룹 내이다. 사이토카인은 바람직하게는 본원에서 기재된 사이토카인의 공지된 아미노산 서열에 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성 또는 유사성을 갖는다. 예를 들어, 바람직한, 공지된 사이토카인의 아미노산 서열은 아래 표에서 보여진다:
- | 사이토카인 | NCBI 참조 서열 | UniProtKB/Swiss-Prot 참조 |
|----------------------------------|------------------------------|--------------------------------|
| 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자 전구체 (호모 사피엔스) | NP_000749.2
(144 아미노산) | P04141 (또한 CSF2로서 공지됨) |
| 인터류킨-2 전구체 (호모 사피엔스) | NP_000577.2
(153 아미노산) | P60568 |
| 인터류킨-7 동형 1 전구체 (호모 사피엔스) | NP_000871.1
(177 아미노산) | P13232 |
| 인터류킨-15 동형 1 프레프로단백질 (호모 사피엔스) | NP_000576.1
(162 아미노산) | P40933 |
| 인터류킨-21 동형 2 전구체 (호모 사피엔스) | NP_001193935.1
(153 아미노산) | Q9HBE4 |
| 인터페론 알파-1/13 전구체 (호모 사피엔스) | NP_076918.1
(189 아미노산) | P01562 (또한 IFNA1로서 공지됨) |
- [0102]
- [0103] 2개의 핵산과 2개의 아미노산 서열 사이 동일성의 정도는 당해 기술 예컨대 GCG 프로그램 패키지에서 제공된 캡에서 공지된 컴퓨터 프로그램으로 결정될 수 있다 (Needleman and Wunsch, 1970, Journal of Molecular Biology 48: 443-453). 2 아미노산 서열 사이 동일성의 정도 결정의 목적을 위하여, 캡은 하기 세팅으로 사용될 수 있다: 3.0의 캡 창출 패널티 및 0.1의 캡 확대 패널티. 아미노산 유사성은 위스콘신 대학교로부터 GCG 버전 10 소프트웨어 패키지의 최상의 적합 프로그램을 이용하여 측정될 수 있다. 상기 프로그램은 디폴트 값을 갖는 Smith and Waterman의 국부 상동성 알고리즘을 이용한다: 캡 창출 패널티 = 8, 캡 확대 패널티 = 2, 평균 매치 = 2.912, 평균 미스매치 = 2.03.
- [0104] 바람직하게는 본 발명에 따라 사용을 위하여 사이토카인은 유형 I 또는 유형 II 사이토카인 수용체를 위한 리간드인 사이토카인이다. 특히 바람직하게는, 사이토카인은 IL-2 수용체 패밀리 구성원 또는 GM-CSF 수용체 패밀리

구성원을 위한 리간드이거나 또는 사이토카인은 인터페론, 바람직하게는 유형 I IFN이다. 본 발명의 특히 바람직한 구현예에서 사이토카인은 GM-CSF, IL-7, IFN- α , IL-2, IL-15 또는 IL-21, 또는 그의 동족체 또는 유도체로부터 선택되고, 더욱더 바람직하게는 사이토카인은 GM-CSF, IL-7 또는 IFN- α 로부터 선택된다. 본 발명이 GM-CSF가 아닌 사이토카인의 용도를 확대하여도 가장 바람직하게는 사이토카인은 GM-CSF이다. 바람직하게는 사이토카인은 인간 공급원으로부터이다.

[0105] 본원에서 정의된 바와 같이, "리간드"는 수용체에 결합할 수 있는 및 그 수용체를 통해 신호전달을 개시하는, 또는 원상태 리간드에 의해 그 수용체를 통해 신호전달을 길항하는 또는 작용하는 문자이다.

[0106] 본원에서 사용된 바와 같이 "발현한" 또는 "제시한"은 상기 세포의 표면 상에서 항원성 분자 또는 이의 일부의 존재를 지칭하여 이로써 그 분자의 적어도 일부가 그 세포 주위의 환경에 노출되고 접근가능하고, 바람직하게는 이로써 면역 반응이 제시된 문자 또는 이의 일부로 생성될 수 있다. 발현되는 문자가 그 막에 존재할 수 있거나 또는 존재하도록 야기될 수 있는 성분 및/또는 세포 막과 접촉되는 "표면" 상에서 발현은 달성될 수 있다.

[0107] 용어 "세포"는 (곤충 세포 및 진균 세포를 포함하여) 모든 진핵 세포를 포함하기 위해 본원에서 사용된다. 대표적인 "세포"는 따라서 모든 유형의 포유동물 및 비-포유동물 동물 세포 (예컨대 어류 세포), 식물 세포, 곤충 세포, 진균 세포 및 원생동물을 포함한다. 바람직하게는, 그러나, 세포는 포유동물, 예를 들어 고양이, 개, 말, 당나귀, 양, 돼지, 염소, 소, 마우스, 랙트, 토끼, 기니아 피그로부터의 세포이지만, 가장 바람직하게는 인간으로부터이다. 본 발명의 방법, 용도 등 처리되는 세포는 그의 사이토졸 속으로 투여된 또는 수송된 문자를 그의 표면 상에서 발현, 또는 제시할 수 있는 임의의 세포일 수 있다.

[0108] 세포는 편리하게 면역 세포 즉 면역 반응에 관여된 세포이다. 그러나, 다른 세포는 또한 면역 시스템에 항원을 나타낼 수 있고 이들은 또한 본 발명의 범위 내에 해당한다. 본 발명에 따른 세포는 따라서 유익하게는 이하에서 기재된 바와 같이 항원-제시 세포이다. 항원-제시 세포는 본원에서 정의된 바와 같이 임의의 측면 또는 면역 반응의 "아암"에서 관여될 수 있다.

[0109] 세포독성 세포의 자극은 항원-제시 세포에 의한 특정한 방식, 예를 들어 MHC 클래스 I 제시로 자극되도록 세포에 항원을 제시되게 할 필요로 한다 (예를 들어 CD8⁺ 세포독성 T-세포의 활성화는 MHC-1 항원 제시를 필요로 한다). 항체-생산 세포는 또한 항원-제시 세포에 의한 항원의 제시로 자극될 수 있다.

[0110] 항원은 세포내이입으로 항원-제시 세포에 의해 용해될 수 있고 세포내이입성 소포에서 웨타이드로 분해될 수 있다. 이를 웨타이드는 엔도솜내 MHC 클래스 II 문자에 결합할 수 있고 웨타이드-MHC 클래스 II 복합체가 CD4+ T 혈포 세포에 의해 인식될 수 있는 세포 표면에 수송될 수 있고 면역 반응을 유도할 수 있다. 대안적으로, 사이토졸에서 단백질은, 웨타이드가 MHC 클래스 I 문자에 결합할 수 있고 세포 표면에 수송될 수 있는 TAP (항원 제시와 관련된 수송체)로, 예를 들어 프로테아솔에 의해 분해될 수 있고 내형질 망 속으로 수송될 수 있다 (Yewdell and Bennink, 1992, Adv. Immunol. 52: 1-123). 웨타이드가 외래 항원 기원이면, 웨타이드-MHC 클래스 I 복합체는 CD8+ 세포독성 T-세포 (CTLs)에 의해 인식될 것이다. CTLs는 웨타이드-MHC (HLA) 클래스 I 복합체에 결합할 것이고 그렇게 함으로써 활성화될 것이고, 증식하기 시작하고 CTLs의 클론을 형성한다. 세포 표면 상에서 동일한 웨타이드-MHC 클래스 I 복합체를 갖는 표적 세포 및 다른 표적 세포는 CTL 클론에 의해 사멸될 수 있다. 충분한 양의 항원이 사이토졸 속으로 도입될 수 있으면 외래 항원에 대한 면역력을 확립될 수 있다 (Yewdell and Bennink, 1992, supra; Rock, 1996, Immunology Today 17: 131-137). 이는 특히 암 백신의 개발을 위한 기초이다. 최대 실재적인 문제 중 하나는 사이토졸 속으로 충분한 양의 항원 (또는 항원의 일부)를 도입하는 것이다. 이는 본 발명에 따라 해결될 수 있다.

[0111] 이전에 언급된 바와 같이, 광화학 내재화 방법으로 세포 사이토졸에서 일단 방출되면, 항원성 분자는 세포의 항원-가공 기계로 가공될 수 있고 예를 들어 클래스 I MHC에 의해 적절한 방식으로 세포 표면 상에서 제시될 수 있다. 상기 가공은 항원의 분해, 예를 들어 단백질 또는 폴리웨타이드 항원의 웨타이드로의 분해를 포함할 수 있고, 상기 웨타이드는 그 다음 제시용 MHC의 문자와 복합된다. 따라서, 본 발명에 따라 세포의 표면 상에서 발현된 또는 제시된 항원성 분자는 내재화되는 (세포내이입되는) 항원성 문자의 일부 또는 단편일 수 있다.

[0112] 다양한 상이한 세포 유형은, 예를 들어, 림프구 (모든 T 및 B 세포), 수지상 세포, 대식세포 등을 포함하여, 그의 표면 상에서 항원을 제시할 수 있다. 다른 것은 예를 들어 암 세포 예를 들어 흑색종 세포를 포함한다. 이들 세포는 본원에서 "항원-제시 세포"로서 참조된다. 면역 시스템의 효과기 세포에 대한 항원의 제시에 주요하게 관여된 면역 시스템의 세포인 "전문 항원-제시 세포"는 당해 기술에 공지되어 있고 상기 문헌에 기재되고 B 림프구, 수지상 세포 및 대식세포를 포함한다. 바람직하게는 상기 세포는 전문 항원-제시 세포이다.

- [0113] 세포독성 T-세포 (CTL)로 항원-제시 세포에 의해 항원 제시를 위하여 항원성 분자는 항원-제시 세포의 사이토졸에 들어갈 필요가 있다 (Germain, Cell, 1994, 76, 287-299).
- [0114] 예를 들어 시험관내 또는 생체외 방법, 또는 대안적으로 생체내 방법을 포함한, 본 발명의 구현예에서, 세포는 수지상 세포이다. 수지상 세포는 포유동물 면역 시스템의 일부를 형성한 면역 세포이다. 그의 주요 기능은 항원성 물질을 가공하는 것 및 면역 시스템의 다른 세포에 그 표면 상에서 제시하는 것이다. 일단 활성화되면, 이들은 적응성 면역 반응을 개시하기 위해 이들이 T 세포 및 B 세포와 상호작용하는 림프절로 이주한다.
- [0115] 수지상 세포는 조혈 골수 전구 세포로부터 유도된다. 이들 전구 세포는 초기에 높은 세포내이입성 활성 및 낮은 T-세포 활성화 포텐셜을 특징으로 하는 미성숙한 수지상 세포로 변형한다. 일단 이들이 제시성 항원과 접촉하면, 이들은 성숙한 수지상 세포로 활성화되고 림프절로 이주하기 시작한다. 미성숙한 수지상 세포는 병원체를 식균하고 그 단백질을 작은 조각으로 분해하고 성숙시 MHC 분자를 이용하여 그의 세포 표면에서 상기 단편을 나타낸다.
- [0116] 수지상 세포는 수지상 세포의 임의의 적절한 공급원, 예컨대 피부, 코의 이너 라이닝, 폐, 위 및 창자 또는 혈액으로부터 유도될 수 있다. 본 발명의 특히 바람직한 구현예에서 수지상 세포는 골수로부터 유도된다.
- [0117] 수지상 세포는 본 발명의 시험관내 방법에서 사용을 위하여 천연 공급원으로부터 단리될 수 있거나 또는 시험관내 생성될 수 있다. 수지상 세포는 단핵구로부터 발생한다, 즉 바디에서 순환하는 및, 올바른 신호에 의존한, 백색 혈액 세포는 수지상 세포 또는 대식세포로 분화할 수 있다. 단핵구는 차례로 골수에서 줄기 세포로부터 형성된다. 단핵구-유도된 수지상 세포는 주변 혈액 단핵 세포 (PBMCs)로부터 시험관내 생성될 수 있다. 조직 배양 플라스크내 PBMCs의 플레이팅은 단핵구의 부착을 허용한다. 인터류킨 4 (IL-4) 및 과립구-대식세포 집락 자극 인자 (GM-CSF)를 이용한 이들 단핵구의 치료는 약 1 주 지나 미성숙한 수지상 세포 (iDCs)로 분화를 초래한다. 종양 괴사 인자 (TNF)를 이용한 후속의 치료는 추가로 성숙한 수지상 세포로 iDCs를 분화시킨다.
- [0118] 본원에서 사용된 바와 같이 "접촉"은 본원에서 정의된 바와 같이 세포 속으로 내재화에 적절한 조건 하에서, 예를 들어 바람직하게는 적절한 영양 배지내 37°C, 예를 들어 25-39°C에서 또는 생체내 체온, 즉 36-38°C에서 세포 및 감광제 및/또는 항원성 분자 및/또는 사이토카인 서로의 물리적 접촉을 지칭한다.
- [0119] 세포는 본원에서 정의된 바와 같이 순차적으로 또는 동시에 감광제 및 항원성 분자 및 사이토카인과 접촉될 수 있다. 바람직하게는, 및 편리하게 성분은 동시에 세포와 접촉된다. 감광제 및 항원성 분자 (및 선택적으로 사이토카인)는 동일 또는 상이한 세포내 구획 속으로 세포에 의해 용해될 수 있다 (예를 들어 이들은 공-전위될 수 있다).
- [0120] 세포는 그 다음 적합한 파장의 광에 노출되어 광감작화 화합물을 활성화시켜 차례로 세포내 구획 막의 파괴를 초래한다.
- [0121] (본원에서 참고로 편입되는) WO 02/44396은 방법내 단계의 순서가 배열될 수 있어 이로써 내재화되는 분자 (이 경우에 항원성 분자)가 세포와 접촉되기 전에 예를 들어 감광제가 세포와 접촉되고 조사에 의해 활성화되는 방법을 기재한다. 상기 방법은 내재화되는 분자가 조사시에 감광제로서 동일한 세포성 하위구획에 존재하는 것이 필요 없다는 사실을 이용한다.
- [0122] 따라서 한 구현예에서, 본원에서 정의된 바와 같이 상기 감광제 및/또는 상기 항원성 분자 및/또는 사이토카인은 함께, 또는 서로에 비해 별도로 세포에 적용된다. 적어도 항원성 분자 및 감광제가 동일한 세포내 구획에서 보이는 경우 조사는 그 다음 한번에 수행된다. 이는 소위 "라이트 애프터" 방법이다.
- [0123] 대안적 구현예에서, 상기 방법은 상기 세포를 감광제와 먼저 접촉시킴으로써, 그 다음 본원에서 정의된 바와 같이 항원성 분자 및/또는 사이토카인과 접촉으로 수행될 수 있고, 조사는 세포내 구획 속으로 감광제의 흡수 이후, 그러나 상기 감광제를 함유한 세포내 구획 속으로 항원성 분자 (및 선택적으로 사이토카인)의 세포성 흡수 이전 (예를 들어 광노출시에 상이한 세포내 구획에서 존재할 수 있다), 바람직하게는 임의의 세포내 구획 속으로 세포성 흡수 이전, 예를 들어 임의의 세포성 흡수 이전 수행된다. 따라서 예를 들어 감광제는 조사 및 그 다음 잔여 제제의 투여 이후 투여될 수 있다. 이는 소위 "라이트 비포" 방법이다.
- [0124] 본원에서 사용된 바와 같이 "내재화"는 분자의 세포내, 예를 들어 세포질, 전달을 지칭한다. 본 경우에 "내재화"는 세포내/막 결합된 구획으로부터 세포의 사이토졸 속으로 분자의 방출 단계를 포함할 수 있다.
- [0125] 본원에서 사용된 바와 같이, "세포성 흡수" 또는 "전좌"는 세포 막 외부의 분자가 세포에 넣어 이로써 이들이 예를 들어 세포내 막-제한된 구획, 예를 들어 내형질 망, 골지체, 리소좀, 엔도솜 등 속으로 또는 이와 관련된,

예를 들어 세포내이입 또는 다른 적절한 흡수 기전에 의해, 외부 배치 세포 막에 대해 내부에서 발견되는 내재화의 단계 중 하나를 지칭한다.

[0126] 다양한 제제와 세포의 접촉 단계는 임의의 편리한 또는 원하는 식으로 수행될 수 있다. 따라서, 접촉 단계가 시험관내 수행되면 세포는 수성 배지, 예컨대 예를 들어 적절한 세포 배양 배지에서 편리하게 유지될 수 있고, 적절한 시점에서 다양한 제제는 적절한 조건 하에서, 예를 들어 적절한 농도에서 및 적절한 시간의 길이 동안 배지에 단순히 부가될 수 있다. 예를 들어, 세포는 무혈청 배지의 존재하에 제제와, 또는 혈청-함유 배지와 접촉될 수 있다.

[0127] 아래 주석은 별도로 세포에 다양한 제제의 적용을 논의한다. 상기에서 논의된 바와 같이 그러나, 이들 제제들은 함께, 별도로, 동시에 또는 순차적으로 세포에 적용될 수 있다. 본원에서 참조된 바와 같이, 본 발명의 방법에서 사용된 다양한 제제의 적용은 시험관내 또는 생체내 세포일 수 있다. 후자의 경우에, 적용은 이하에 더 상세히 기재된 바와 같이 직접적인 (즉 국제화된) 또는 간접적인 (즉 전신 또는 비-국제화된) 투여를 통할 수 있다.

[0128] 감광제는 일상적인 기술을 이용하여 숙련된 사람에 의해 쉽게 결정될 수 있는 적절한 농도에서 및 적절한 시간의 길이 동안 세포와 접촉되고, 사용된 특정한 감광제로서 상기 인자 및 표적 세포 유형 및 위치에 의존할 것이다. 감광제의 농도는 편리하여 이로써 세포 속으로, 예를 들어 하나 이상의 그의 세포내 구획 속으로 또는 관련하여 용해되고 조사에 의해 활성화되면, 하나 이상의 세포 구조가 파괴되고 예를 들어 하나 이상의 세포내 구획이 용해 또는 파괴된다. 예를 들어 본원에서 기재된 바와 같이 감광제는 예를 들어 10 내지 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 사용될 수 있다. 시험관내 사용을 위하여 그 범위는 훨씬 더 넓을 수 있고, 예를 들어 0.0005-500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 일 수 있다. 생체내 인간 치료를 위하여 감광제는 전신으로 투여된 경우 0.05-20 mg/kg 체중 범위로 사용될 수 있다. 대안적으로, 0.005-20mg/kg 체중의 범위는 전신 투여에 사용될 수 있다. 국소로, 예를 들어 진피내, 피하 또는 종양내 투여로 투여되면, 용량은 1-5000 μg , 예를 들어 10-2500, 25-1000, 50-500, 10-300 또는 100-300 μg 의 영역일 수 있다. 바람직하게는 용량은 100 μg , 150 μg , 200 μg 및 250 μg 으로부터 선택된다. 바람직하게는 용량은 75-125 μg , 예를 들어 100 μg 이다. 제공된 용량은 평균 중량 (즉 70kg)의 인간용이다. 진피내 주사를 위하여 광감작제 용량은 100 $\mu\text{l}-1\text{ml}$ 에서 용해될 수 있고, 즉 농도는 1-50000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 범위일 수 있다. 더 작은 동물에서 농도 범위는 상이할 수 있고 따라서 국소로 투여된 경우를 통해 조정될 수 있고, 투약의 적은 변화가 상이한 동물에 필요하다.

[0129] 사용되는 항원의 농도는 사용되는 항원에 의존할 것이다. 편리하게 0.001-500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (예를 들어 20-500, 20-300, 20-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 20-50, 10-50, 5-50, 1-50, 0.01-50, 또는 0.001-50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 항원의 농도는 시험관내 사용될 수 있다. 펩타이드 항원을 위하여 예를 들어 0.001-500, 예를 들어 0.001-1, 5, 25, 50 또는 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 더 낮은 농도가 사용될 수 있다. 단백질 항원을 위하여 예를 들어 0.5-500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 더 높은 농도가 사용될 수 있다. 생체내 이용을 위하여 단백질 항원 용량은 0.5-500 μg , 예를 들어 10-100 μg 또는 10-200 μg 범위일 수 있다. 펩타이드 항원을 위하여 0.1-4000 μg , 예를 들어 0.1-2000 μg , 0.1-1000 μg 또는 0.1-500 μg , 예를 들어 0.1-100 μg 의 생체내 용량이 이용될 수 있다. 상기 용량은 국부 투여에 적절하다. 적절한 농도는 문제의 세포 속으로 문제의 제제 흡수의 효율 및 세포에서 달성하기 원하는 최종 농도에 의존하여 결정될 수 있다.

[0130] 본원에서 정의된 바와 같이 사이토카인의 농도는 또한 사용되는 특정한 분자에 의존할 것이다. 편리하게, 시험관내, 아래 표에서 보이는 바와 같이 농도는 사용될 수 있다. 예를 들어 5-500 μg , 예를 들어 50-250 μg 의 국부 투여용, 생체내 용량은 GM-CSF에 사용될 수 있고 500,000-50,000,000 IU는 IFN- α 에 사용될 수 있다. 500,000-10,000,000 IU/kg (또는 IU/ m^2)의 생체내 농도는 IL-2에 사용될 수 있고; 1-500 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 예를 들어 20-50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 은 IL-7에 사용될 수 있고, 1-100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 예를 들어 10-50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 은 IL-15 및 IL-21에 사용될 수 있다.

[0131]

적합한 사이토카인 용량을 보여주는 표

	시험관내	국부 (생체내)
GM-CSF	0.05-5 ng/ml	5-500 µg
IL-2	10-1000 IU/ml	500,000 - 10,000,000 IU 총 용량 또는 m ² 당
IL-7	0.5 - 100 ng/ml	1-500 µg
IL-15	0.5 - 100 ng/ml	1-100 µg
IL-21	0.5 - 500 ng/ml	1-100 µg
IFN-알파	0,005-10 단위 /ml	500,000-10,000,000 단위

[0132]

대개의 경우 본원에서 정의된 바와 같이 감광제, 항원성 분자 및 사이토카인은 함께 투여되지만, 이는 다양할 수 있다. 따라서 상이한 횟수 또는 방식 또는 투여 부위 (또는 세포와 접촉)는 각각의 상이한 성분에 고려되고 상기 방법은 본 발명의 범위내에 포함된다.

[0134]

한 구현예에서 본원에서 정의된 바와 같이 사이토카인은 예를 들어 경구 투여를 통해 예를 들어 별도 제형으로, 또는 전신으로 항원으로부터 별도로 투여된다. 따라서, 한 구현예에서 사이토카인은 항원 및/또는 광감작제의 투여 이전, 예를 들어 24 시간 이전에 투여될 수 있다.

[0135]

사이토카인은 예를 들어 조명 대략 2 시간 이전에 다른 제제에 비해 별도로 투여될 수 있다. 대안적 구현예에서 제제는 항원과 또는 항원으로서 동시에, 즉 일제히 투여될 수 있다.

[0136]

본원에서 정의된 바와 같이 세포와 감광제 및/또는 항원성 분자 및/또는 사이토카인 사이의 접촉은 편리하게 15 분 내지 24 시간, 예를 들어 30 분 내지 4 시간, 바람직하게는 1.5 내지 2.5 시간이다. 대안적으로, 시간의 범위는 약 1 시간 내지 약 48 시간, 예를 들어 약 2 시간 내지 약 40 시간, 또는 약 6 시간 내지 약 36 시간, 예를 들어 12 시간 내지 30 시간, 예를 들어 16 시간 내지 20 시간, 예를 들어 18 시간 또는 약 18 시간일 수 있다.

[0137]

바람직한 구현예에서 세포의 초기 인큐베이션은 감광제를 이용한다. 한 구현예에서 감광제와 항원성 분자 및/또는 사이토카인의 투여 사이의 시간은 시간의 문제이다. 예를 들어, 감광제는 조명 전에 16 내지 20 시간, 예를 들어 18 시간 적용될 수 있고, 항원성 분자 및/또는 사이토카인은 조명 전에 1 내지 3 시간, 예를 들어 2 시간 적용될 수 있다. 따라서, 감광제와 항원성 분자 및/또는 사이토카인의 투여 사이의 시간은 15 내지 23 시간의 범위일 수 있다.

[0138]

따라서, 세포는 그 다음 광감작제로 인큐베이션 이후 본원에서 정의된 바와 같이 항원 및/또는 사이토카인으로 인큐베이션된다. 편리하게 세포는 광감작제 및 항원성 분자 및 사이토카인으로 인큐베이션의 타이밍에 의존하여, 예를 들어 30 분 내지 4 시간, 예를 들어 1.5 내지 2.5 시간 동안, 광감작제/항원과 접촉 이후 및 조사 이전 광감작제/항원-유리 배지에 배치될 수 있다.

[0139]

다양한 제제가 표적 세포와 접촉되는 인큐베이션의 시간 및 생체내 적절한 방법은 인자 예컨대 사용되는 제제의 유형 및 투여 방식에 의존적일 것이다. 예를 들어, 제제가 치료되는/조사되는 종양, 조직 또는 장기에 주사되면, 주사 지점 근처의 세포는 접촉될 것이고 따라서, 더 나중의 시점 및 더 낮은 농도에서 제제와 접촉될 것 같은, 주사 지점으로부터 더 면 거리에서 위치한 세포 보다 더욱 빠르게 제제를 용해시키는 경향이 있을 것이다. 편리하게 6-24 시간의 시간이 사용될 수 있다.

[0140]

또한, 정맥내 주사 또는 경구로 투여된 제제는 표적 세포에 도달하는데 일부 시간이 걸릴 수 있고 따라서 제제의 충분한 또는 최적의 양이 표적 세포 또는 조직에서 축적하기 위해 더 긴 후-투여 예를 들어 며칠이 걸릴 수 있다. 생체내 개별적인 세포에 요구된 투여 시간은 따라서 이를 및 다른 파라미터에 의존하여 다양할 것 같다.

[0141]

그럼에도 불구하고, 생체내 상황이 시험관내 보다 더욱 복잡하여도, 본 발명의 기저 개념은 동일하고, 즉 분자가 표적 세포와 접촉하는 시간은 조사가 발생하기 전에 적절한 양의 감광제가 표적 세포에 의해 용해되고 있고 하기이다: (i) 조사 이전 또는 동안 항원성 분자 (및 선택적으로 사이토카인)가 용해되거나, 또는 표적 세포와, 세포 속으로, 예를 들어 감광제에 비해 동일 또는 상이 할 수 있는 세포내 구획 속으로 충분한 접촉 이후 용해될 것이거나 또는 (ii) 조사 이후 항원성 분자 (및 선택적으로 사이토카인)는 세포 속으로 그의 흡수를 허용하기 위해 충분한 시기 동안 세포와 접촉된다.

[0142]

본원에서 기재된 제제의 투여를 위하여 당해 기술에서 공통의 또는 표준의 생체내, 임의의 투여 방식, 예를 들

어 주사, 주입, 국소 투여, 경피 투여는 모두 내부 및 외부 바디 표면 등에 사용될 수 있다. 생체내 사용을 위하여, 본 발명은 내재화되는 감광제 함유 화합물 또는 분자가 체액 위치를 포함하여 국재화되는 세포를 함유하는 임의의 조직, 뿐만 아니라 고체 조직에 관련하여 사용될 수 있다. 모든 조직은 광감작제가 표적 세포에 의해 용해되는 한 치료될 수 있고, 광은 적절하게 전달될 수 있다. 바람직한 투여 방식은 진피내, 피하, 국소 또는 종양내 투여 또는 주사이다. 바람직하게는 투여는 진피내 주사이다.

[0143] 원하는 결과, 예를 들어 항원 제시, 면역 반응의 생성 또는 백신접종을 달성하기 위해, 방법 또는 그의 일부는 반복될 수 있고 예를 들어 "제-백신접종"이 발생할 수 있다. 따라서, 방법의 적절한 간격 또는 일부가 반복될 수 있는 이후 방법 그 자체가 여러 번 (예를 들어 2, 3 또는 그 이상 횟수), 예를 들어 본원에서 정의된 바와 같이 사이토카인의 추가 투여 또는 추가의 조사 단계가 수행될 수 있다. 예를 들어, 방법 또는 방법의 일부는 먼저 수행된 며칠, 예를 들어 5 내지 60 일 (예를 들어 7, 14, 15, 21, 22, 42 또는 51 일), 예를 들어 7 내지 20 일, 바람직하게는 14 일, 또는 주, 예를 들어 1 내지 5 주 (예를 들어, 1, 2, 3 또는 4 주) 이후 다시 수행될 수 있다. 방법의 모두 또는 일부는 시간의 적절한 간격, 예를 들어 2 주 또는 14 일에서 여러 번 반복될 수 있다. 바람직한 구현예에서 방법은 적어도 1회 반복된다. 또 다른 구현예에서 방법은 2회 반복된다.

[0144] 한 구현예에서, 상기 방법이 수행되는 제2 또는 후속의 시간으로 항원성 분자는 광감작제 및 조명과 조합으로 투여되고, 즉 사이토카인은 방법이 수행되는 제2 또는 후속의 시간으로 투여되지 않는다.

[0145] 아쥬반트가 방법 (예를 들어 폴리(I:C))에서 사용되는 구현예에서, 방법이 수행되는 제2 또는 후속의 시간으로 항원성 분자는 광감작제 및 조명과 조합으로 투여될 수 있고, 즉 아쥬반트는 방법이 수행되는 제2 또는 후속의 시간으로 투여되지 않는다. 이 경우에 사이토카인은 방법이 수행되는 제2 또는 후속의 시간으로 존재할 수 있거나 아닐 수 있다.

[0146] 대안적 구현예에서, 본 발명의 방법의 일부는 수행되는 본 발명의 방법에 앞서 수행될 수 있다. 예를 들어, 상기 방법은 본 발명의 방법이 수행되기 전에 사이토카인의 부재하에 하나 이상의 횟수, 예를 들어 2회 수행될 수 있다. 대안적으로, 상기 방법은 본 발명의 방법이 수행되기 전에 광감작제 및 조명의 부재하에 하나 이상의 횟수, 예를 들어 2회 수행될 수 있다. 상기 방법의 일부는 본 발명의 방법이 수행되기 전에 며칠, 예를 들어 7 또는 14 일, 또는 주, 예를 들어 1, 3 또는 4 주 수행될 수 있다. 상기 방법의 일부는 본 발명의 방법이 수행되기 전에 이들 시간 간격에서 하나 이상의 횟수 반복될 수 있다. 따라서, 바람직한 측면에서, 항원성 분자는 (예를 들어 상기 논의된 시간 간격으로) 2회 이상 (예를 들어 대상체에) 투여되고, 여기에서 적어도 상기 항원성 분자의 투여는 본 발명의 방법에 따라 수행된다.

[0147] 감광제를 활성화하기 위한 "조사"는 이하에서 기재된 바와 같이 직접적으로 또는 간접적으로 광의 투여를 지칭한다. 따라서 대상체 또는 세포는 예를 들어 직접적으로 (예를 들어 시험관내 단일 세포 상에서) 또는 간접적으로, 예를 들어 세포가 피부의 표면 아래인 경우 생체내 광원으로 조명될 수 있거나 또는 이들 모두가 직접적으로 조명되지 않는, 즉 다른 세포의 스크린 없이 세포의 층의 형태이다. 세포 또는 대상체의 조명은 본원에서 정의된 바와 같이 감광제, 항원성 분자 및 사이토카인의 투여 대략 18-24 시간 이후 발생할 수 있다.

[0148] 감광제를 활성화하기 위한 광 조사 단계는 당해 기술에서 잘 알려진 기술 및 절차에 따라 발생할 수 있다. 사용되는 광의 파장은 사용되는 감광제에 따라 선택된다. 적합한 인공 광원은 예를 들어 청색 (400-475nm) 또는 적색 (620-750nm) 파장 광을 이용하여 당해 기술에서 잘 알려진다. TPCS_{2a}에 대하여 예를 들어 400 내지 500nm, 더 바람직하게는 400 내지 450nm, 예를 들어 430-440nm, 및 더욱더 바람직하게는 대략 435nm, 또는 435nm의 파장이 사용될 수 있다. 적절한 경우 광감작제, 예를 들어 포르파린 또는 클로린은 녹색 광에 의해 활성화될 수 있고, 예를 들어 KillerRed (Evrogen, Moscow, Russia) 광감작제는 녹색 광에 의해 활성화될 수 있다.

[0149] 적합한 광원, 예를 들어 PCI Biotech AS의 LumiSource® 램프는 당해 기술에서 잘 알려진다. 대안적으로, 조정 가능한 출력 전력 최대 60mW 및 방출 스펙트럼 430-435nm를 갖는 LED-기반 조명 디바이스는 사용될 수 있다. 적색 광에 대하여, 임의의 적합한 적색 광원이 사용될 수 있기도, 조명의 적합한 공급원은 PCI Biotech AS 652nm 레이저 시스템 SN576003 다이오드 레이저이다.

[0150] 세포가 본 발명의 방법에서 광에 노출되는 시간은 다양할 수 있다. 사이토졸 속으로 분자의 내재화 효율은 세포 손상 및 따라서 세포 사멸이 증가하는 이상으로 최대까지 광에 증가된 노출과 함께 증가한다.

[0151] 조사 단계를 위한 바람직한 시간의 길이는 인자 예컨대 표적, 광감작제, 표적 세포 또는 조직에 축적된 광감작제의 양 및 광감작제의 흡수 스펙트럼과 광원의 방출 스펙트럼 사이의 중첩에 좌우된다. 일반적으로, 조사 단계를 위한 시간의 길이는 초 내지 분 또는 최대 몇 시간 (심지어 최대 12 시간)의 정도, 예를 들어 바람직하게는

최대 60 분 예를 들어 0.25 또는 1 내지 30 분, 예를 들어 0.5 내지 3 분 또는 1 내지 5 분 또는 1 내지 10 분 예를 들어 3 내지 7 분, 및 바람직하게는 대략 3 분, 예를 들어 2.5 내지 3.5 분이다. 더 짧은 조사 시간, 예를 들어 1 내지 60 초, 예를 들어 10-50, 20-40 또는 25-35 초가 또한 사용될 수 있다.

[0152] 적절한 광 용량은 당해 분야의 숙련가에 의해 선택될 수 있고 재차 사용된 광감작제 및 표적 세포 또는 조직에서 축적된 광감작제의 양에 좌우될 것이다. 광 용량은 가시적 스펙트럼의 (예를 들어, 사용된 광감작제에 의존하여, 청색 광이 사용되면 적색 영역, 또는 청색 영역에서) 더 높은 소멸 계수를 갖는 광감작제가 사용된 경우 보통 더 낫다. 조정가능한 출력 전력 최대 60mW 및 방출 스펙트럼 430-435nm를 갖는 LED-기반 조명 디바이스가 이용된 경우 예를 들어, $0.05\text{-}20 \text{ mW/cm}^2$, 예를 들어 2.0 mW/cm^2 의 플루엔스 범위에서 $0.24 - 7.2 \text{ J/cm}^2$ 의 범위로 광 용량은 사용될 수 있다. 대안적으로, 예를 들어 LumiSource® 램프가 이용되면 0.1-20 (예를 들어 LumiSource®에 의해 제공된 바와 같이 13 mW/cm^2 의 플루엔스 범위에서 $0.1\text{-}6 \text{ J/cm}^2$ 의 범위로 광 용량은 적절하다. 적색 광에 대하여, $0.5\text{-}5 \text{ mW/cm}^2$, 예를 들어 0.81 mW/cm^2 의 플루엔스 범위에서, $0.03\text{-}1 \text{ J/cm}^2$, 예를 들어 0.3 J/cm^2 의 광 용량이 사용될 수 있다.

[0153] 더욱이, 세포 생존력이 유지되면, 독성 종의 과도한 수준의 생성은 피해지게 되고 관련된 파라미터는 따라서 조정될 수 있다.

[0154] 본 발명의 방법은 필연적으로 광화학적 치료로 즉 감광제의 활성화에 관해 독성 종의 생성을 통해 광역학적 요법 효과에 의해 일부 세포 손상을 생기게 할 수 있다. 제안된 사용에 의존하여, 상기 세포 사멸은 중요하지 않을 수 있고 사실상 일부 적용 (예를 들어 암 치료)에 유리할 수 있다. 대부분의 구현예에서, 그러나, 세포 사멸은 제시 세포로부터 면역 반응의 생성을 허용하기 위해 피해진다. 본 발명의 방법은 변성될 수 있어서 이로써 생존한 세포의 분획 또는 분율은 감광제의 농도와 관련하여 광 용량을 선택함으로써 조절된다. 재차, 상기 기술은 당해 기술에 공지되어 있다.

[0155] 바람직하게는, 실질적으로 모든 세포, 또는 유의미한 다수 (예를 들어 세포의 적어도 75%, 더 바람직하게는 적어도 80, 85, 90 또는 95%)는 사멸되지 않는다. PCI 치료 이후 시험관내 세포 생존력은 당해 기술에 공지된 표준 기술 예컨대 MTS 시험에 의해 측정될 수 있다. 하나 이상의 세포 유형의 생체내 세포 사멸은 예를 들어 현미경검사에 의해 투여 지점의 1cm 반경 이내에 (또는 조직의 특정 깊이에서) 평가될 수 있다. 세포 사멸이 즉시 일어날 수 없음에 따라, % 세포 사멸은 조사의 몇 시간 이내 (예를 들어 조사 이후 최대 4 시간) 생존가능해지는 세포의 퍼센트를 지칭하지만 바람직하게는 조사 이후 4 이상 시간 % 생존가능 세포를 지칭한다.

[0156] 방법은 생체내, 시험관내 또는 생체외 수행될 수 있다. 바람직하게는 방법은 생체내 투여용 세포를 생성하기 위해 시험관내 또는 생체외 사용되거나 또는 방법은 생체내 사용된다. 따라서 바람직한 특성에서, 방법은 대상체에서 면역 반응을 생성하기 위해 사용될 수 있다.

[0157] 따라서, 추가 측면에서 본 발명은, 이전에 정의된 바와 같이 상기 대상체에 항원성 분자, 감광제, 및 사이토카인을 투여하는 단계, 및 상기 감광제를 활성화시키는데 유효한 파장의 광으로 상기 대상체를 조사하여, 여기에서 면역 반응이 생성되는 단계를 포함한, 대상체에서 면역 반응의 생성 방법을 제공한다.

[0158] 생성될 수 있는 "면역 반응"은, 그의 표면 상에서 "외래" 항원을 발현한 세포를 인식 및 파괴 (또는 다르게는 제거)할 수 있는, 체액성 및 세포-매개된 면역력, 예를 들어 항체 생산의 자극, 또는 세포독성 또는 킬러 세포의 자극일 수 있다. 용어 "면역 반응 자극"은 따라서 이들을 자극하기 위하여 모든 유형의 면역 반응 및 기전을 포함하고 본 발명의 바람직한 측면을 형성하는 CTLs 자극을 포함한다. 바람직하게는 자극되는 면역 반응은 세포 독성 CD8 T 세포이다. 면역 반응의 정도는 면역 반응의 마커, 예를 들어 분비된 분자 예컨대 IL-2 또는 IFN γ 또는 항원 특이적 T 세포의 생산에 의해 평가될 수 있다 (예를 들어 실시예에서 기재된 바와 같이 평가될 수 있다).

[0159] 세포독성 세포 또는 항체-생산 세포의 자극은 항원-제시 세포에 의한 특정한 방식, 예를 들어 MHC 클래스 I 제시에서 자극되도록 세포에 제시되는 항원을 필요로 한다 (예를 들어 $CD8^+$ 세포독성 T-세포의 활성화는 MHC-I 항원 제시를 필요로 한다). 바람직하게는 면역 반응은 MHC-I 제시를 통해 자극된다.

[0160] 바람직하게는 면역 반응은 질환, 장애 또는 감염, 예를 들어 암을 치료 또는 방지하기 위해 사용된다. 본원에서 기재된 방법 및 용도에서 암은 흑색종일 수 있다. 대안적인 구현예에서, 암은 흑색종이 아닌 암일 수 있다.

[0161] 바람직하게는 방법은 백신접종에 사용된다. 본원에서 참조된 바와 같이, "백신접종"은 질환, 장애 또는 감염의

발생 (또는 추가 발생)에 대해 예방적 또는 치료적인 면역 반응을 유도하기 위한 항원 (또는 항원을 함유한 문자)의 용도이고, 여기에서 그 질환, 장애 또는 감염은 그 항원의 비정상 발현 또는 존재와 관련된다. 바람직하게는 질환은 암이거나 (그리고 백신접종은 치료적이거나) 또는 면역 반응은 감염에 대해 생성된다 (그리고 백신접종은 예방적이다).

[0162] 본 발명의 바람직한 구현예에서, 방법, 예를 들어 백신접종의 대상체는 비-포유동물 동물 (예를 들어 어류) 또는 포유동물, 바람직하게는 고양이, 개, 말, 당나귀, 양, 돼지, 염소, 소, 마우스, 랫트, 토끼 또는 기니아 피그이지만, 가장 바람직하게는 대상체는 인간이다.

[0163] 바람직하게는 본원에서 기재된 방법은 시너지효과를 달성하고, 즉 생성된 세포 표면 제시 또는 면역 반응의 정도는 하기에 의해 관측된 조합된 향상 보다 더욱 향상된다: (i) 사이토카인의 부재하에 항원성 문자로 방법의 수행 및 (ii) 감광제 및 조사 단계의 부재하에 항원성 문자로 방법의 수행, 즉 방법 사이의 시너지효과는 관측된다. 세포 표면 제시 또는 면역 반응 생성의 수준은 적절한 수단, 예를 들어 항원-특이적 CD8+ 세포의 수 또는 면역 반응 활성화의 마커, 예를 들어 IFN γ 또는 IL-2의 수준에 의해 평가될 수 있다.

[0164] 본원에서 사용된 바와 같이 "시너지효과"는 단지 부가적 효과를 넘어 정량적 개선을 지칭한다.

[0165] 본 발명의 방법에서 사용된 다양한 제제는 대상체에 별도로, 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있다.

[0166] 본 발명의 세포의 표면 상에서 항원성 문자 또는 이의 일부의 발현 방법에 관련하여 상기 논의된 측면 및 특징은, 적절한 경우, 상기 면역 반응의 발생 방법에 또한 적용가능하다.

[0167] 본 발명은 또한, 본원에서 정의된 바와 같이 도입되는 항원성 문자, 감광제 및 사이토카인과 상기 세포를 접촉시키는 단계, 및 감광제를 활성화하는데 유효한 광으로 세포를 조사하는 단계를 포함한, 세포의 사이토졸 속으로 항원성 문자의 도입 방법을 제공한다. 일단 활성화되면, 상기 화합물을 함유한 상기 세포 내부의 세포내 구획은 이들 구획에 함유된 문자를 사이토졸 속으로 방출한다.

[0168] 상기 본 발명의 방법은 예를 들어 원위치 치료 또는 생체외 치료 그 다음 바디에 치료된 세포의 투여를 위하여 시험관내 또는 생체내 사용될 수 있다.

[0169] 본 발명은 추가로 항원성 문자, 또는 이의 일부를 그의 표면 상에서 발현한 세포, 또는 그의 집단을 제공하고, 여기에서 세포는 본원에서 정의된 바와 같이 임의의 방법으로 수득가능하다 (또는 수득된다). 이하에서 기재된 바와 같이, 예방, 또는 요법에서 사용을 위하여 세포 또는 세포 집단이 또한 제공된다.

[0170] 세포 집단은 게다가 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 희석제, 담체 또는 부형제를 포함한 약학적 조성물에서 제공될 수 있다.

[0171] 본 발명은 또한 본원에서 정의된 바와 같이 항원성 문자, 감광제, 및 사이토카인 및 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 희석제, 담체 또는 부형제를 포함한 약학적 조성물을 제공한다.

[0172] 이들 조성물 (및 본 발명의 생성물)은 약학적 기술에서 공지된 기술 및 절차에 따라 임의의 편리한 방식으로, 예를 들어 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 희석제, 담체 또는 부형제를 이용하여 제형화될 수 있다. 본원에서 참조된 바와 같이 "약학적으로 허용가능한"은 조성물 (또는 생성물)의 다른 성분과 양립가능한 뿐만 아니라 수령체에 생리학적으로 허용가능한 성분을 지칭한다. 조성물 및 담체 또는 부형제 물질, 복용량 등의 성질은 선택 및 원하는 투여 경로, 치료의 목적 등에 따라 일상적인 방식으로 선택될 수 있다. 복용량은 마찬가지로 일상적인 방식으로 결정될 수 있고 문자 (또는 조성물 또는 생성물의 성분), 치료의 목적, 환자의 연령, 투여 방식 등에 의존할 수 있다. 감광제와 관련하여, 조사에 관한 막을 파괴하기 위한 효력/능력은 또한 고려되어야 한다.

[0173] 세포, 예를 들어 항원 제시 세포는 시험관내 제조될 수 있다. 치료 방법에서, 이들 세포는 생체내 바디 또는 생체외 신체 조직에 투여될 수 있어서 이로써 상기 세포는 예를 들어 예방적 또는 치료적 목적을 위하여 면역 반응을 자극할 수 있다.

[0174] 따라서 본 발명은 추가로, 대상체에서, 예방 또는 치료에서 사용을 위하여 또는 면역 반응 자극에서 사용을 위하여, 예를 들어 백신접종 목적을 위하여, 예를 들어 CTLs 자극을 위하여, 바람직하게는 상기 대상체에서 질환, 장애 또는 감염의 치료 또는 방지를 위하여, 특히 암의 치료 또는 방지를 위하여, 본원에서 정의된 바와 같이 세포 집단 (또는 동일한 것을 함유한 조성물), 또는 본원에서 정의된 바와 같이 항원성 문자, 감광제, 및 사이토카인을 제공한다. 대안적으로 정의되면 본 발명은, 대상체에서 면역 반응 자극에 사용을 위하여 (예를 들어 CTLs 자극을 위하여), 바람직하게는 상기 대상체에서 질환, 장애 또는 감염의 치료 또는 방지를 위하여, 바람직

하게는 백신접종을 위하여 및/또는 암 치료 또는 방지를 위하여, (i) 세포 집단, (ii) 본원에서 정의된 바와 같이 조성물, 또는 (iii) 항원성 분자 및/또는 감광제 및/또는 사이토카인의 용도를 제공하고, 여기에서 바람직하게는 상기 면역 반응은 본원에서 정의된 바와 같이 방법에 의해 자극된다.

[0175] 상기 자극, 치료 또는 방지는 바람직하게는 상기 대상체에 상기 약제 투여를 포함한다.

[0176] 항원성 분자, 감광제 및 사이토카인은 조성물에서 조합 및 제시될 수 있다. 대안적으로 발현되면, 본 발명은 면역 반응 자극을 위하여 (예를 들어 대상체에서 CTLs 자극을 위하여), 바람직하게는 상기 대상체에서 질환, 장애 또는 감염을 치료 또는 방지하기 위해, 특히 백신접종 목적을 위하여 약제의 제조에서 본원에서 정의된 바와 같이 항원성 분자 및/또는 감광제 및/또는 사이토카인의 용도를 제공하고, 여기에서 상기 약제는 상기 대상체에 투여를 위하여 본원에서 정의된 바와 같이 방법에 의해 수득가능한 상기 세포의 표면 상에서 항원성 분자 또는 이의 일부를 발현한 세포의 집단을 포함한다. 바람직하게는 세포 집단은 상기 방법으로 수득된다. 집단은 대상체에 투여용이다.

[0177] 대안적 구현예에서 본 발명은 대상체에서 면역 반응을 자극하기 위해 (예를 들어 CTLs 자극을 위하여), 바람직하게는 상기 대상체에서 질환, 장애 또는 감염을 치료 또는 방지하기 위해 세포의 표면 상에서 상기 항원성 분자 또는 이의 일부의 발현에서 사용을 위하여 본원에서 정의된 바와 같이 항원성 분자, 감광제 및 사이토카인을 제공하고, 여기에서 상기 용도는 본원에서 정의된 바와 같이, 바람직하게는 세포, 예를 들어 수지상 세포의 집단을 제조하기 위한 방법을 포함한다. 이들 세포는 그 다음 대상체에 투여될 수 있다.

[0178] 본 발명은 추가로 본원에서 정의된 바와 같이 방법내 대상체에서 면역 반응 자극에 동시의, 별도의 또는 순차적인 사용을 위하여 (또는 세포의 표면 상에서 항원성 분자 또는 이의 일부의 발현을 위하여 또는 세포의 사이토졸 속으로 항원성 분자의 내재화를 위하여), 바람직하게는 대상체에서 질환, 장애 또는 감염을 치료 또는 방지하기 위해 조합된 제제로서 본원에서 정의된 바와 같이 항원성 분자, 감광제 및 사이토카인을 포함한 생성물을 제공한다.

[0179] 본 발명은 또한 본원에서 정의된 바와 같이 방법내 대상체에서 면역 반응 자극에 사용을 위하여, 바람직하게는 상기 대상체에서 질환, 장애 또는 감염의 치료 또는 방지를 위하여, 예를 들어 백신접종 또는 면역화에서 사용을 위하여, 또는 세포의 표면 상에서 항원성 분자 또는 이의 일부의 발현을 위하여 또는 세포의 사이토졸 속으로 항원성 분자의 내재화를 위하여 키트를 제공하고, 상기 키트는 하기를 포함한다:

[0180] 본원에서 정의된 바와 같이 감광제를 함유한 제1 컨테이너;

[0181] 본원에서 정의된 바와 같이 상기 항원성 분자를 함유한 제2 컨테이너;

[0182] 및

[0183] 본원에서 정의된 바와 같이 사이토카인을 함유한 제3 컨테이너.

[0184] 본 발명의 생성물 및 키트는 본원에서 정의된 바와 같이 세포 표면 제시 (또는 치료적 방법)을 달성하기 위해 사용될 수 있다.

[0185] 또 다른 추가 구현예에서 본 발명은, 본원에서 정의된 방법에 따른 세포의 집단을 제조하는 단계, 및 그 뒤에 상기 세포를 상기 대상체에 투여하는 단계를 포함한, 대상체에서 (예를 들어 CTLs 자극을 위하여), 바람직하게는 상기 대상체에서 질환, 장애 또는 감염의 치료 또는 방지를 위해 면역 반응의 발생 방법을 제공한다.

[0186] 치료된 세포가 생체내 투여된 경우 청구된 발명에 의해 달성된 항원성 제시는 유익하게는 면역 반응의 자극을 초래할 수 있다. 바람직하게는 상기 항원성 분자 또는 이의 일부를 포함한 또는 함유한 독립체에 의해 후속의 도전에 대해 보호를 제공하는 면역 반응은 생성되고, 결과적으로 본 발명은 백신접종의 방법으로서 특정한 유용성을 찾는다.

[0187] 질환, 장애 또는 감염은 면역 반응의 생성에 의해, 예를 들어 정상 세포에 비해 식별 (및 제거)를 허용하는 항원 (또는 그의 발현 수준)에 기초하여 확인될 수 있는 비정상 또는 외래 세포 제거에 의해 치료 또는 방지될 수 있는 임의의 질환, 장애 또는 감염이다. 사용된 항원성 분자의 선택은 치료받는 질환, 장애 또는 감염을 결정한다. 상기 논의된 항원성 분자에 기반하여, 본원에서 기재된 방법, 용도, 조성물, 생성물, 키트 등등은, 예를 들어, 감염 (예를 들어 위에서 언급된 바와 같이 바이러스 또는 박테리아), 암 또는 다발성 경화증에 대해 치료 또는 방지하기 위해 사용될 수 있다. 상기 질환, 장애 또는 감염의 방지는 백신접종에 해당할 수 있다.

[0188] 본원에서 정의된 바와 같이 "치료"는 치료에 앞서 증상에 비해 치료되고 있는 질환, 장애 또는 감염의 하나 이

상의 증상의 경감, 완화 또는 제거를 지칭한다. "방지" (또는 예방)는 질환, 장애 또는 감염의 증상의 개시 지연 또는 방지를 지칭한다. 방지는 절대적일 수 있거나 (이로써 질환이 발생하지 않는다) 또는 일부 개인에서만 또는 제한된 양의 시간 동안 유효할 수 있다.

[0189] 세포의 생체내 투여를 위하여, 당해 기술에서 공통의 또는 표준인 세포 집단의 임의의 투여 방식, 예를 들어 주사 또는 주입은 적절한 경로로 사용될 수 있다. 편리하게, 세포는 럼프내 주사로 투여된다. 바람직하게는 1×10^4 내지 1×10^8 세포는 대상체의 kg 당 (예를 들어 1.4×10^4 내지 2.8×10^6 / 인간 kg) 투여된다. 따라서, 예를 들어, 인간에서, $0.1\text{--}20 \times 10^7$ 세포의 용량은 용량으로, 즉 용량 당, 예를 들어 백신접종 용량으로서 투여될 수 있다. 용량은 필요하면 나중 시간에 반복될 수 있다.

[0190] 실시예

[0191] 실시예 1: OVA를 갖는 생체내 백신접종에 관한 사이토카인의 효과

[0192] 물질 및 방법

[0193] 마우스

[0194] C57BL/6 마우스는 Harlan (Horst, The Netherlands)으로부터 구매된다. 난알부민 (OVA)으로부터 MHC 클래스-I 제한된 에피토프 OVA₂₅₇₋₂₆₄를 인식하는 T-세포 수용체용 형질전환된 OT-I 마우스는 (본래 Taconic Europe (Ry, Denmark)으로부터 구매된) 취리히 대학교의 설비에서 사육된다. 모든 마우스는 특정 무병원체 (SPF) 조건하에서 유지되고, 수해된 절차는 스위스 수의과 당국에 의해 승인된다. OT-1 마우스에서, T-세포 수용체용 유전자는 이들 마우스내 (OT-1 세포로 칭해진) 거의 모든 CD8+ T-세포가 난알부민 (OVA) 항원으로부터 특이적 웹타이드 에피토프 (SIINFEKL)를 특이적으로 인식할 그와 같은 방식으로 조작되었다.

[0195] 면역화 프로토콜

[0196] 일 0에 암컷 C57BL/6 마우스는 꼬리 정맥에서 정맥내로 Rag2/OT-1 마우스로부터 1.5×10^6 비장세포로 주사된다. 이런 식으로 백신접종된 마우스는 만일, 및 단지 만일, 항원 제시 세포 상에서 MHC 클래스 I에 관해 적절하게 제시되면 OVA로부터 SIINFEKL-에피토프에 반응할 수 있는 CD8 T-세포의 "배경"을 갖는다. 따라서, OT-1 세포의 전이는 항원 특이적 CD8+ T-세포 및 IFN-γ 및 IL-2 생산의 평가에 의해 생체내 백신접종의 효과에 대하여 쉽게 검정하는 것을 가능하게 하는 백신접종된 마우스에서 검출 시스템을 "증폭시킨다".

[0197] 4 시간 후에 동물은 복부에서 진피내 주사로 백신접종된다 (아래 명시된 성분을 함유한 용액의 $2 \times 50 \mu\text{l}$). 4 동물의 14 그룹이 하기의 총 용량을 받는다:

[0198] 그룹 1: 250 μg TPCS_{2a} (Amphinex) + 10 μg 난알부민 (OVA, 등급 V, Sigma-Aldrich).

[0199] 그룹 2: 250 μg TPCS_{2a} + 10 μg 난알부민 + 10 μg GM-CSF.

[0200] 그룹 3: 250 μg TPCS_{2a} + 10 μg 난알부민 + 500,000 IU IL-2.

[0201] 그룹 4: 250 μg TPCS_{2a} + 10 μg 난알부민 + 10 μg IL-7.

[0202] 그룹 5: 250 μg TPCS_{2a} + 10 μg 난알부민 + 10 μg IL-15.

[0203] 그룹 6: 250 μg TPCS_{2a} + 10 μg 난알부민 + 10 μg IL-21.

[0204] 그룹 7: 250 μg TPCS_{2a} + 10 μg 난알부민 + 3,000,000IU IFN α.

[0205] 그룹 8: 10 μg 난알부민.

[0206] 그룹 9: 10 μg 난알부민 + 25 μg GM-CSF.

[0207] 그룹 10: 10 μg 난알부민 + 500,000IU IL-2.

[0208] 그룹 11: 10 μg 난알부민 + 10 μg IL-7.

[0209] 그룹 12: 10 μg 난알부민 + 10 μg IL-15.

[0210] 그룹 13: 10 µg 난알부민 + 10 µg IL-21.

[0211] 그룹 14: 10 µg 난알부민 + 3,000,000IU IFN α .

[0212] 일 1에 그룹 1-7의 동물은 마취되고 LumiSource 램프 (PCI Biotech AS)를 이용하여 청색 광으로 6 분 동안 조명된다. 동물은 항원 용액의 주사 약 18 h 후 조명되고, 조명의 플루엔스율은 약 13 mW/cm²이다. 일 7에 마우스는 꼬리 정맥으로부터 채혈되고 혈액 세포는 유세포측정 분석을 위하여 SIINFEKL 오량체 (ProImmune), 및 CD8 및 CD44 항체로 염색된다 (참고 아래 프로토콜). 일 14에 마우스는 안락사되고 비장이 수집된다. 1 분취량의 비장세포는 SIINFEKL 웹타이드 (EMC microcollections, Tuebingen, Germany)로 재자극되고, 세포내 IFN-γ 발현을 위하여 염색되고 유세포측정 분석에 의해 분석된다 (참고 아래). 또 다른 분취량의 비장세포는 세포 배양 배지에서 재현탁되고, 상기 기재된 바와 같이 SIINFEKL-오량체에 의해 염색된 재자극 없이 (순수하게 실제적인 이유로) 밤새 상기 배지에서 유지되고 유세포측정에 의해 분석된다 (참고 아래 프로토콜).

[0213] 비장 세포의 SIINFEKL-오량체-염색

[0214] 비장 세포에 관한 SIINFEKL-오량체 염색 및 유세포측정은 세포 배지에서 재현탁되는 세포 상에서 수행되고 재자극 없이 (순수하게 실제적인 이유로) 밤새 상기 배지에서 유지된다.

[0215] SIINFEKL-오량체 염색 및 유세포측정

[0216] 5-10 방울의 전체 꼬리 혈액은 수집되고 0.5 mL의 적색 세포 용해 용액 (Sigma)이 부가된다. 5-6 분 후, 세포는 스핀 다운되고 0.5 mL PBS로 2회 세정된다. 세포 펠렛은 FACS 버퍼 (0.01% Na-아자이드를 갖는 2% FCS/PBS)에서 재현탁되고, U-형성된 96 웰 플레이트로 이동되고 열음 상에서 10분 동안 FcR-차단 항체 (Pharmingen으로부터 1.0 µl 항-CD16/CD32), (1 µl + 49 µl FACS 버퍼)로 인큐베이션된다. 세정 없이, SIINFEKL-오량체-PE (ProImmune; 샘플 당 5 uL)는 부가되고, 혼합되고 37°C에서 15분 동안 인큐베이션된다. 세정 없이, 형광-표지된 CD8 또는 CD44는 1:100의 최종 농도로 부가되고, 25-45 min 동안 열음 상에서 인큐베이션된다. 세포는 100 µL FACS 버퍼에서 세정되고 100 µL FACS 버퍼에서 혼탁된다. 세포는 FACSCanto로 분석된다.

[0217] 생체외 비장세포 재자극

[0218] 비장세포는 단리되고 비장 크러싱 및 2% FCS/PBS에서 세포 분리에 의해, 1-2 분 동안 세포용해 버퍼 (Sigma)에서 진탕 및 2% FCS/PBS에서 세정에 의해 세포내 염색을 위하여 제조된다. 완전 배지에서 1 mL의 세포 혼탁액은 24-웰 플레이트의 웰 (500,000 세포/mL) 당 부가되고 5 µg/mL SIINFEKL은 각 웰에 부가되고 37°C에서 밤새 인큐베이션된다. 브레펠린 A (1-2 µg/mL)는 각 웰에 부가되고 37°C에서 4 시간 동안 인큐베이션된다. 세포는 U-형성된 96 웰 플레이트로 이동되고, 2% FCS/PBS에서 세정되고 FcR-차단 항체 (Pharmingen으로부터 1.0 µl 항-CD16/CD32)를 갖는 50 µL FACS 버퍼에서 재현탁되고, 10 분 동안 열음 상에서 인큐베이션된다. 세정 없이, 세포는 열음 (어둠) 상에서 20-45 min 동안 표면 항체 CD8 또는 CD44로 인큐베이션되고, FACS 버퍼에서 세정되고 열음 상에서 10-20 분 동안 100 uL 파라포름알데하이드 (PFA) (PBS내 1%)에서 재현탁에 의해 고정된다. 세포는 FACS 버퍼에서 세정되고, 100 µL NP40 (PBS내 1%)에서 재현탁되고 열음 상에서 3 분 동안 인큐베이션된다. FACS 버퍼에서 세정 이후, 형광-표지된 인터페론-감마 항체는 부가되고 어둠 속에 열음 상에서 35 min 동안 인큐베이션된다. FACS 버퍼에서 세정 및 혼탁 이후, 세포는 FlowJo 8.5.2 소프트웨어 (Tree Star, Inc., Ashland, OR)를 이용하여 FACSCanto로 분석된다.

[0219] 유세포측정

[0220] OVA-특이적 T-세포의 빈도는 유세포측정 (BD Biosciences로부터 FACSCanto, San Jose, USA)으로 결정된다. 유세포측정이 진행되기 전에 별도로 각 항체로 염색된 비드를 이용하여 보상이 수행된다. 항체 염색 전에, 적색 혈액 세포는 적색 세포 용해 용액 (Sigma)을 이용하여 용해된다. 10 000 CD8⁺ 사례는 각 샘플에 대하여 기록되고, SIINFEKL-오량체 양성 세포의 백분율은 Tree Star, Inc. (Ashland, OR)로부터 FlowJo 8.5.2 소프트웨어를 이용하여 계산된다 <http://www.flowjo.com/>.

[0221] ELISA

[0222] ELISA는 제조자의 설명에 따라 관련된 분자에 대하여 Ready-set Go! 키트 (**eBioscience**)를 이용하여 수행된다.

[0223] 마우스는 상기 기재된 면역화 프로토콜에 의해 생체내 백신접종된다. 혈액은 7 일 후 단리되고 비장은 14 일 후 단리된다. 혈액은 항원-특이적 CD8⁺ T 세포에 대하여 분석되고 비장 세포는 시험관내 재자극 이후 항원-특이적

CD8+ T-세포에 대하여 또는 IFN-γ 또는 IL-2 생산에 대하여 직접적으로 분석된다.

[0224] 혈액 및 비장에서 항원-특이적 T-세포의 수준

[0225] 항원-특이적 T-세포의 수준은 항원-특이적 T-세포에 특이적으로 결합하는 형광성으로 표지된 항원-특이적 "오량체"를 이용하여 유세포측정에 의해 측정된다. 동물내 총 CD8+ T-세포의 %로 항원 특이적 CD8+ T-세포의 수는 결정된다 (참고 SIINFEKL 염색의 면역화 프로토콜 및 세부사항에서 기재된 염색 및 유세포측정 분석).

[0226] 내인성 T-세포는 효과의 항원-특이성에 대하여 내부 대조군으로서 작용하는 것은, T-세포 상에서 일반적인 자극 효과가 또한 항원-특이적 세포의 %로 증가를 초래하지 않는 내인성 T-세포에 영향을 끼칠 것이다. 전형적으로 OT-1 세포의 %는 백신접종 전에 및 백신접종 이후 시점(들)에서 측정된다. 항원 단독 ("종래의 백신접종")의 효과는 항원+PCI의 효과와 비교된다.

[0227] 항원으로 생체외 자극 이후 비장 세포에서 IFN-γ 생산의 수준 (유세포측정)

[0228] 백신접종의 일 14에 제거된 비장은 상기 프로토콜에서 기재된 바와 같이 비장세포 단리 및 SIINFEKL 항원 펩타이드로 재자극 및 유세포측정에 의한 CD8+ T 세포의 분석용 IFN-γ 생산을 위한 세포내 염색 처리된다.

[0229] 항원으로 생체외 자극 이후 비장 세포에서 IFN-γ 및 IL-2 생산의 수준 (ELISA)

[0230] 백신접종의 일 14에 제거된 비장은 비장세포 단리 및 SIINFEKL 항원 펩타이드로 재자극 및 상기 프로토콜에서 기재된 바와 같이 ELISA에 의한 IFN-γ IL-2 생산 분석 처리된다.

[0231] 실시예 2: OVA로 생체내 백신접종에 관한 GM-CSF의 효과

[0232] 물질 및 방법

[0233] 동물

[0234] C57BL/6 마우스는 Harlan (Horst, The Netherlands)으로부터 구매되었다. CD8 T-세포 수용체 형질전환된 OT-I 마우스 (B6.129S6-Rag2tm1Fwa Tg(TcraTcrb)1100Mjb)는 Taconic Europe (Ry, Denmark)로부터 또는 Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine)로부터 구매되었다. OT-I CD8 T 세포는 난알부민 (OVA, aa257-264)으로부터 H-2K^b-제한된 애피토프 SIINFEKL을 인식한다. 모든 마우스는 SPF 조건하에서 유지되었고, 수행된 절차는 스위스 및 노르웨이에서 수의과 당국에 의해 승인되었다.

[0235] 물질 및 세포

[0236] 닦 OVA는 Sigma-Aldrich (Buchs, Switzerland)로부터 구매되었고, SIINFEKL 펩타이드는 EMC microcollections (Tuebingen, Germany)로부터, 및 GM-CSF는 Preprotech (Wien)로부터 구매되었다. 광감작제 테트라페닐 염소 디설포네이트 (TPCS_{2a})는 PCI Biotech (Lysaker, Norway)제이다. OVA, TPCS_{2a} 및, 관련된 경우, GM-CSF는 PBS에서 혼합되었고, 광 보호 유지되었고, 제조 60 분 이내에 마우스에 투여되었다. TPCS_{2a}는 LumiSource™ (PCI Biotech)으로 조명에 의해 활성화되었다.

[0237] 마우스의 진피내 광감작화 및 면역화

[0238] 면역화 1 일 전에, 비장 및 텁프절은 암컷 OT-1 마우스로부터 단리되었고, 적혈구는 균질화된 세포 혼탁액으로부터 용해 (Sigma-Aldrich로부터 RBC Lysis Buffer Hybri-Max)에 의해 제거되었다. 잔여 세포는 PBS에서 세정 되었고, 70 마이크론 나일론 스트레이너를 통해 여과되었고, 2×10^6 OT-1 세포는 수령체 암컷 C57BL/6 마우스 속으로 정맥내 주사에 의해 투여되었고; SIINFEKL-특이적 CD8 T 세포의 임양 전달은 유세포측정에 의한 면역 반응의 모니터링을 용이하게 한다. 1 일 또는 8 시간 후, 마우스는 꼬리 출혈로 채혈되고, 혈액은 OVA-특이적 CD8 T 세포의 기준선 빙도의 분석용 헤파린-함유 튜브에서 수집되었다.

[0239] 그 다음, 마우스는 복부 부분 상에서 면도되었고, OVA 또는 OVA, TPCS_{2a} 및 GM-CSF (10 μg)의 상이한 혼합물로 이루어진, 백신은 29G 니들을 가진 주사기를 이용하여 진피내로 주사되었다. 백신은 광 보호 유지되었고 제조의 60 분 이내에 사용되었다. 백신은 복부 중앙선의 좌측 및 우측 상에서 50 μl 각각의 2개 주사로 제공되었다. OVA는 10 또는 100 μg의 용량으로 사용되었고, TPCS_{2a} 용량은 150 μg이었다. 백신 주사 18 시간 이후, 마우스는 케타민 (25 mg/kg 체중) 및 자일라진 (4 mg/kg)의 혼합물의 복강내 주사로 마비되었고 (광감작제 TPCS_{2a}의 조명 및 활성화를 위하여) LumiSource 광원 상에서 배치되었다. 조명 시간은 6 분이었다.

- [0240] 일 7에 그 후 마우스는 꼬리 출혈에 의해 채혈되었고 적혈구는 유세포측정에 의한 항원-특이적 CD8 T 세포의 분석 전에 용해로 제거되었다. 실험의 마지막에서, 마우스는 안락사되었다.
- [0241] 면역 반응의 분석
- [0242] 혈액내 OVA-특이적 CD8 T-세포의 빈도는 유세포측정에 의한 분석을 위하여 항-CD8 항체 및 H-2K^b/SIINFEKL Pro5 오량체 (ProImmune, Oxford, UK)로 세포를 염색시킴으로써 모니터링되었다. 세포의 활성화 상태는 유세포측정에 의해 CD44의 발현을 시험함으로써 추가로 분석되었다. 세포는 FACSCanto (BD Biosciences, San Jose, USA)를 이용하여 분석되었고 FlowJo 8.5.2 소프트웨어 (Tree Star, Inc., Ashland, OR)를 이용하여 분석되었다.
- [0243] GM-CSF 실험.
- [0244] 백신접종이 기재된 바와 같이 유세포측정에 의해 분석된 후 일 7로부터 실험은 물질 및 방법, 및 마우스 혈액 샘플하에서 기재된 바와 같이 수행되었다. 모든 마우스는 기재된 바와 같이 OT-1 세포를 받았다.
- [0245] 하기 실험 그룹이 포함되었다:
- [0246] 1. 미처리됨: 마우스는 OT-1 세포를 받았지만, 백신접종되지 않았거나 조명되지 않았다.
 - [0247] 2. OVA: 마우스는 10 µg의 OVA로 백신접종되었다. 이들은 조명되지 않았다.
 - [0248] 3. OVA+GM-CSF: 마우스는 10 µg OVA + 10 µg GM-CSF의 혼합물로 백신접종되었다. 이들은 조명되지 않았다.
 - [0249] 4. OVA PCI: 마우스는 10 µg OVA + 150 µg TPCS_{2a}의 혼합물로 백신접종되었다. 기재된 바와 같이 조명되었다.
 - [0250] 5. OVA+gm-CSF PCI: 마우스는 10 µg OVA + 10 µg gm-CSF+150 µg TPCS_{2a}의 혼합물로 백신접종되었다. 기재된 바와 같이 조명되었다.
- [0251] 도2A는 유세포측정 분석으로부터 대표적인 점 도표를 보여준다. 타원 내부의 집단은 따라서 항원-특이적 (오량체 결합), 활성화된 (CD44 발현) CD8⁺ 세포를 나타내는, CD8⁺, 오량체⁺, CD44⁺ 세포를 나타낸다. 상기 집단에서 세포의 수가 OVA+GM-CSF 및 OVA PCI 그룹에서 (OVA 그룹과 비교된 경우) 증가되는 것, 및 효과가 OVA+GM-CSF PCI 그룹에서 추가로 유의미하게 증가되는 것이 보여질 수 있다.
- [0252] 도2B는 실험 그룹에 대하여 평균 값 (% 항원-특이적, 총 CD8⁺ 세포의 CD44⁺ 세포)을 보여주고, 제차 모든 다른 그룹에 대해 OVA+GM-CSF PCI 그룹에서 실질적인 증가를 보여준다.
- [0253] 실시예 3: HPV로 생체내 백신접종에 관한 GM-CSF의 효과
- [0254] 물질 및 방법
- [0255] 동물
- [0256] C57BL/6 마우스는 Harlan (Horst, The Netherlands)으로부터 구매되었다. 모든 마우스는 SPF 조건하에서 유지되었고, 수행된 절차는 노르웨이의 수의과 당국에 의해 승인되었다.
- [0257] 물질 및 세포
- [0258] HPV 16 E7 웨بت아이드 항원 (서열 QAEPD**RAHYNIVTF**CCCKCDSTLRLCVQSTHVDI, CD8 에피토프는 밑줄친다)은 United Peptides (Herndon, VA)로부터 수득되었다. 높은 MW 폴리(IC)는 InvivoGen (San Diego, USA)제이었다. GM-CSF (재조합 쥐과)는 PeproTech Inc., Rocky Hill, USA (카탈로그# 315-03)로부터 구매되었다. 광감작제 테트라페닐 클로린 디설포네이트 (TPCS_{2a})는 PCI Biotech (Lysaker, Norway)제이었고, HPV 오량체는 Proimmune (Oxford, UK), (Proimmune peptide codes 502H)제이었다.
- [0259] 마우스의 진피내 광감작화 및 면역화.
- [0260] 마우스는 복부 부분 상에서 면도되었고, 50 µg HPV 통 웨بت아이드 항원, 100 µg TPCS_{2a} 및 10 µg GM-CSF 및/또는 폴리(IC) (아래 명시된 바와 같이)로 이루어진 백신은 29G 니들을 갖는 주사기를 이용하여 진피내로 주사되었다. 백신은 광 보호 유지되었고 제조의 60 분 이내에 사용되었다. 백신은 복부 중앙선의 좌측 및 우측 상에서 50 µl 각각의 2개 주사로 제공되었다. 면역화 18 시간 이후, 마우스는 케타민 (25 mg/kg 체중) 및 자일라진 (4 mg/kg)의 혼합물의 복강내 주사로 마비되었고 하기 기재된 바와 같이 조명되었다.

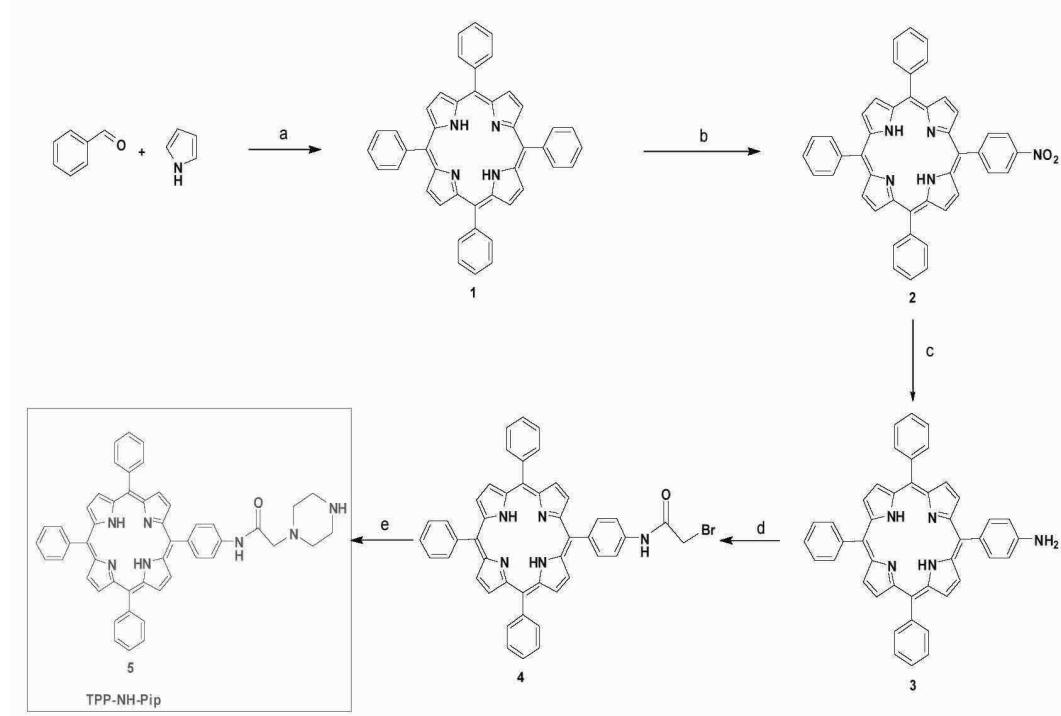
- [0261] 각 면역화 이후 일 7에 마우스는 꼬리 출혈에 의해 채혈되었고 적혈구는 유세포측정에 의한 항원-특이적 CD8 T 세포의 분석 전에 용해로 제거되었다.
- [0262] 면역된 마우스의 조명.
- [0263] TPCS_{2a}는 LumiSource™ (PCI Biotech)를 이용한 조명으로 활성화되었다. LumiSource를 이용한 조명은 면역화 18 시간 이후, 6 min 동안 수행되었다.
- [0264] 오량체 염색에 의한 면역 반응의 분석.
- [0265] 혈액에서 항원 특이적 CD8 T-세포의 빈도는 사용된 HPV 항원에 상응하는 항-CD8 및 항-CD44 항체 및 오량체로 세포의 염색 이후 유세포측정으로 모니터링되었다. 세포의 활성화 상태는 유세포측정으로 CD44의 발현 시험에 의해 분석되었다. 세포는 FACSCanto (BD Biosciences, San Jose, USA)를 이용하여 분석되었고 FlowJo 8.5.2 소프트웨어 (Tree Star, Inc., Ashland, OR)을 이용하여 분석되었다.
- [0266] 실시예 3a: HPV 롱 펫타이드 항원 및 GM-CSF를 이용한 PCI의 효과
- [0267] 실험은 물질 및 방법하에서 기재된 바와 같이 수행되었다. 동물은 아래 명시된 바와 같이 백신 혼합물로 일 0 및 일 14에 면역화되었다. 6 min 동안 조명은 면역화 18 시간 이후 LumiSource 조명 디바이스로 수행되었다. 각 면역화 이후 일 6으로부터 혈액 샘플은 HPV 오량체, CD8 및 CD44 항체로 염색되었고, 기재된 바와 같이 유세포 측정으로 분석되었다. 하기 실험 그룹이 포함되었다:
- [0268] 2 x HPV: 마우스는 50 μg HPV 롱 펫타이드로 2회 면역화되었다. 마우스는 조명되지 않았다.
- [0269] 2 x HPV + GM-CSF: 마우스는 50 μg HPV 롱 펫타이드 및 10 μg GM-CSF로 2회 면역화되었다. 마우스는 조명되지 않았다.
- [0270] 2 x HPV + GM-CSF + PCI: 마우스는 50 μg HPV 롱 펫타이드, 100 μg TPCS_{2a} 및 10 μg-GM-CSF로 2회 면역화되었다. 마우스는 모든 면역화에서 조명되었다.
- [0271] 결과
- [0272] 도 3에서 보여질 수 있는 바와 같이 항원 + GM-CSF를 이용한 2개의 면역화는 항원 단독으로 관측되었던 면역학적 CD8-세포 반응을 개선하지 않았다. 그러나, PCI와 GM-CSF 조합은 CD8-세포 반응을 실질적으로 증가시켰다.
- [0273] 실시예 3b: HPV 롱 펫타이드 항원, GM-CSF 및 폴리(IC)를 이용한 PCI의 효과
- [0274] 실험은 물질 및 방법하에서 기재된 바와 같이 수행되었다. 동물은 아래 명시된 바와 같이 백신 혼합물로 일 0 및 일 14에 면역화되었다. 6 min 동안 조명은 면역화 18 시간 이후 LumiSource 조명 디바이스로 수행되었다. 각 면역화 이후 일 6으로부터 혈액 샘플은 HPV 오량체, CD8 및 CD44 항체로 염색되었고, 기재된 바와 같이 유세포 측정으로 분석되었다. 하기 실험 그룹이 포함되었다:
- [0275] 2 x HPV: 마우스는 50 μg HPV 롱 펫타이드로 2회 면역화되었다. 마우스는 조명되지 않았다.
- [0276] 2 x HPV + 폴리(IC): 마우스는 50 μg HPV 롱 펫타이드 및 10 μg 폴리(IC)로 2회 면역화되었다. 마우스는 조명되지 않았다.
- [0277] 1st: HPV + p(IC) + PCI. 2nd: HPV + PCI: 마우스는 50 μg HPV 롱 펫타이드, 10 μg 폴리(IC) 및 100 μg TPCS_{2a} (1st 면역화)의 혼합물, 및 50 μg HPV 롱 펫타이드 및 100 μg TPCS_{2a} (2nd 면역화)으로 면역화되었다. 마우스는 모든 면역화에서 조명되었다.
- [0278] 1st: HPV + p(IC) + GM-CSF + PCI. 2nd: HPV + GM-CSF + PCI: 마우스는 50 μg HPV 롱 펫타이드, 10 μg 폴리(IC), 10 μg GM-CSF 및 100 μg TPCS_{2a} (1st 면역화)의 혼합물, 및 50 μg HPV 롱 펫타이드, 10 μg GM-CSF 및 100 μg TPCS_{2a} (2nd 면역화)로 면역화되었다. 마우스는 모든 면역화에서 조명되었다.
- [0279] 결과
- [0280] 상기 실험에서, 제1 면역화는 HPV 항원 단독으로, 항원 + 폴리(IC)으로 또는 항원 + 폴리(IC) + PCI, 또는 항원

+ 폴리(IC) + GM-CSF + PCI의 조합으로 수행되었다. 제2 면역화는 동일한 조합으로, 그러나, PCI로 처리된 샘플에 대해서는, 폴리(IC)가 없다. PCI + 폴리(IC) 단독을 이용한 치료 레지멘이 면역학적 반응에 긍정적인 효과를 갖는 반면, 동일한 치료 레지멘에 GM-CSF 부가는 반응을 실질적으로 향상시켰음을 도 4로부터 보여질 수 있다. 항원 + GM-CSF + PCI를 이용한 면역화는 항원 단독 (도 3)으로 관측된 면역학적 CD8-세포 반응을 유의미하게 개선하였지만, 반응의 규모는 GM-CSF 및 폴리(IC) 및 PCI의 조합 (도 4)에 대하여 관측된 것보다 실질적으로 더 작았다. PCI 없이 폴리(IC)의 사용이 항원 단독으로 달성된 면역학적 반응을 개선하지 않았던 관찰과 함께 합쳐져서, 실험은 PCI GM-CSF 및 폴리(IC)와 사용될 때 PCI가 상승작용으로 작용하여 펩타이드 항원에 대한 CD8 반응을 향상시킬 수 있음을 나타낸다.

도면

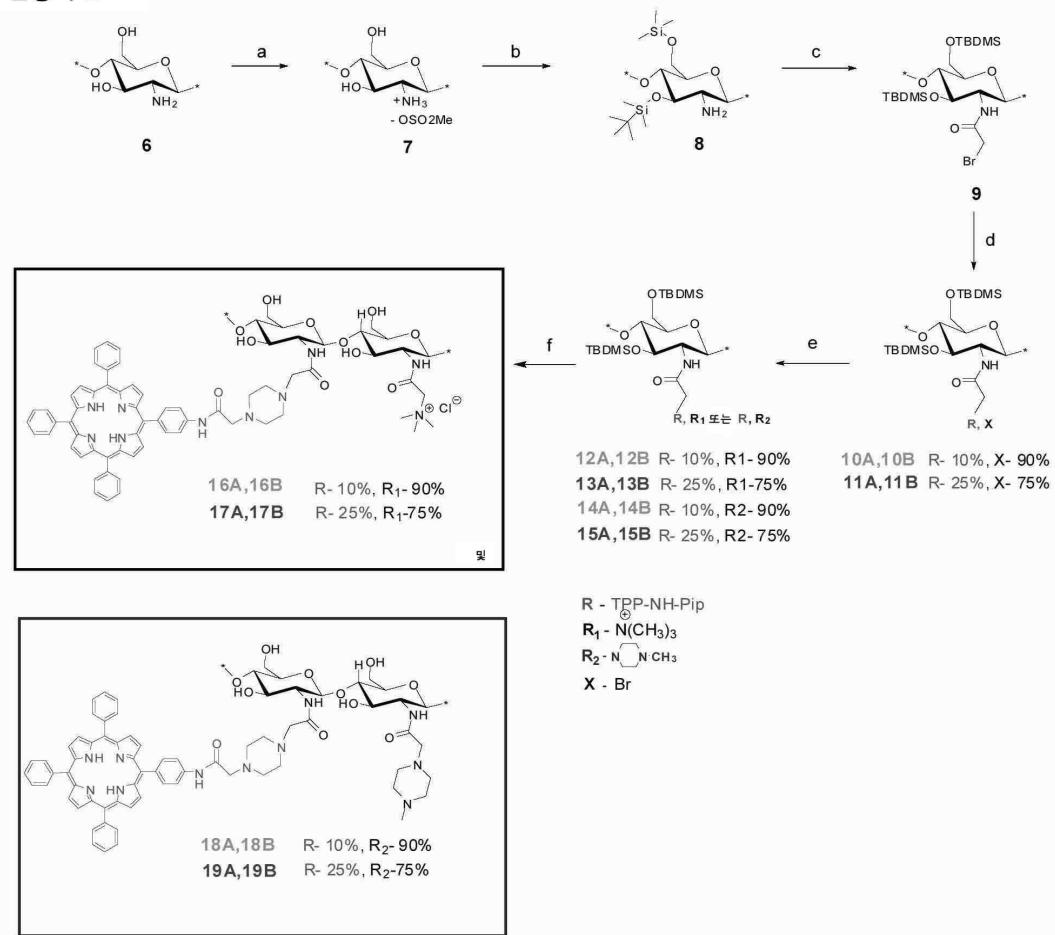
도면 1a

반응식 1



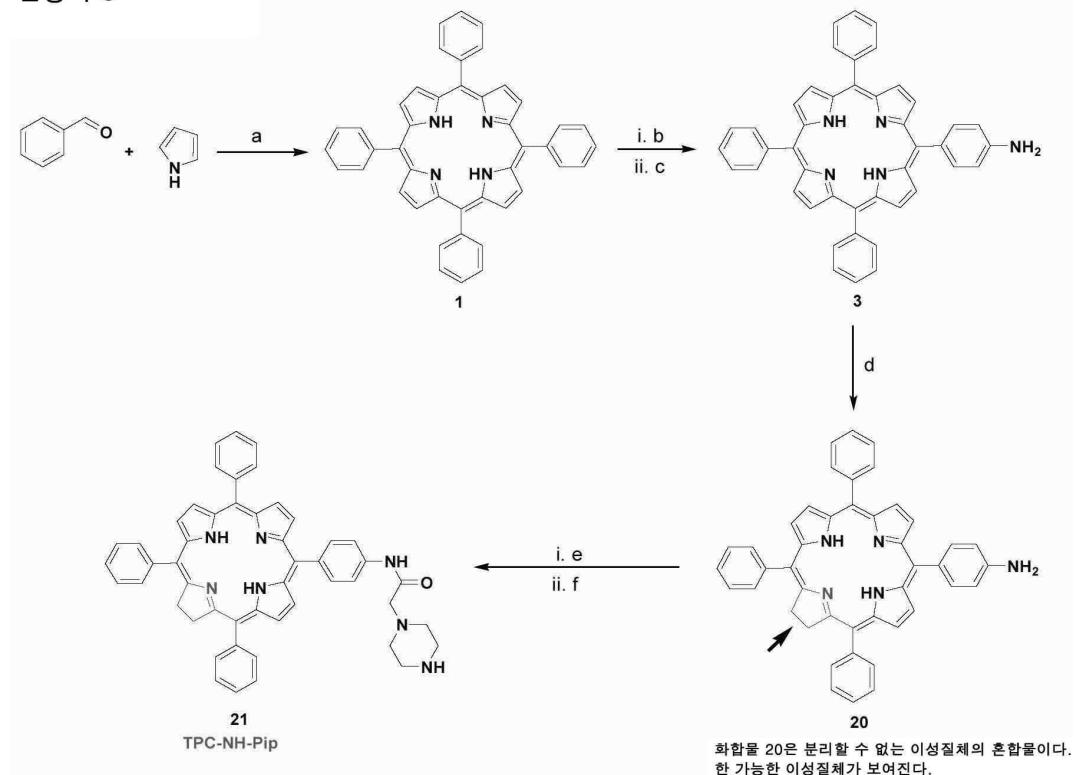
도면 1b

반응식 2



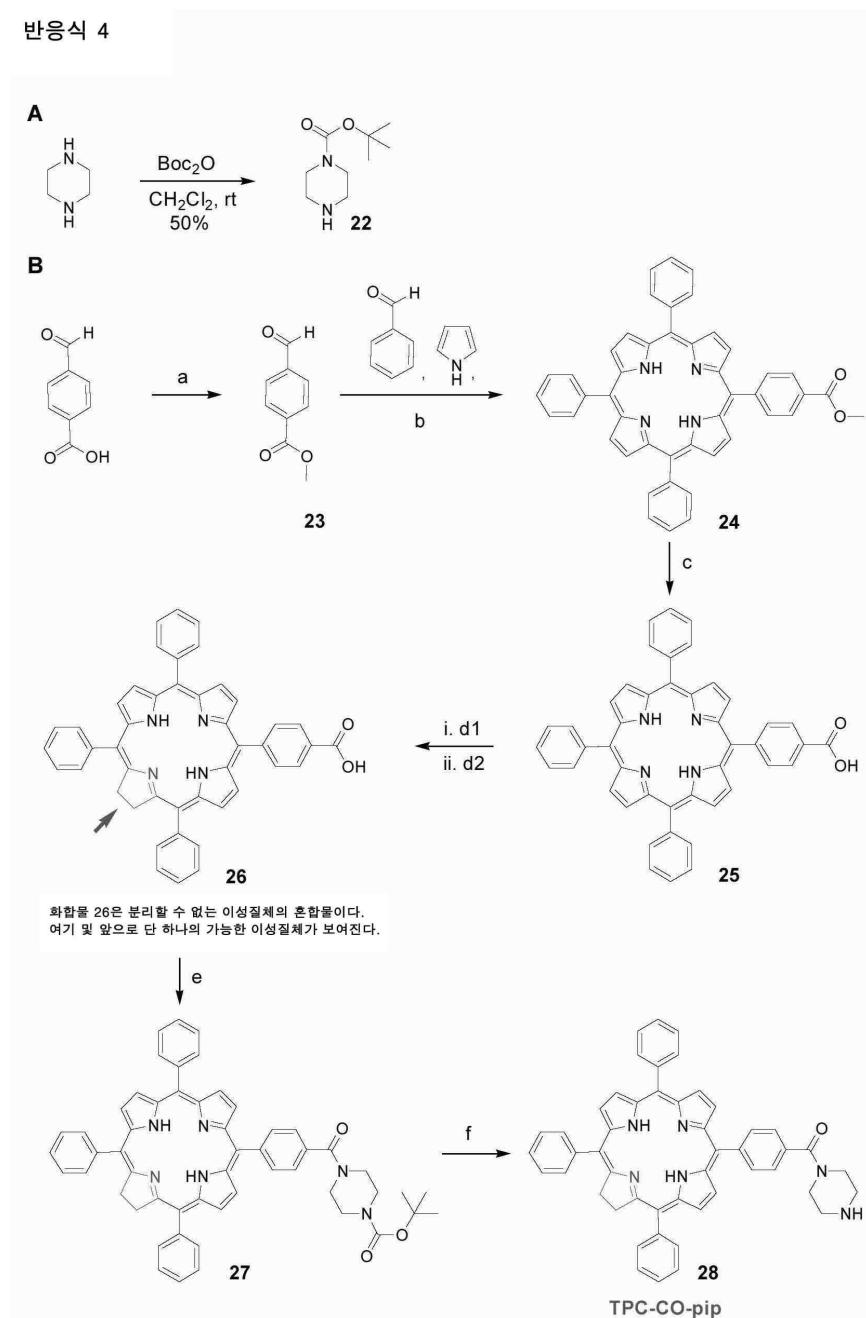
도면 1c

반응식 3



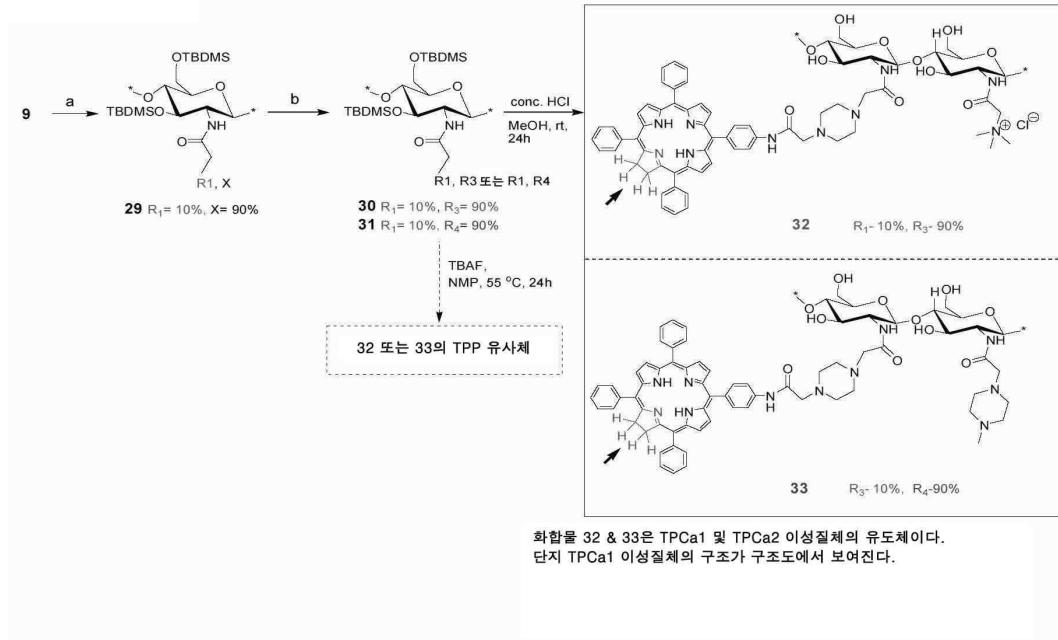
도면 1d

반응식 4

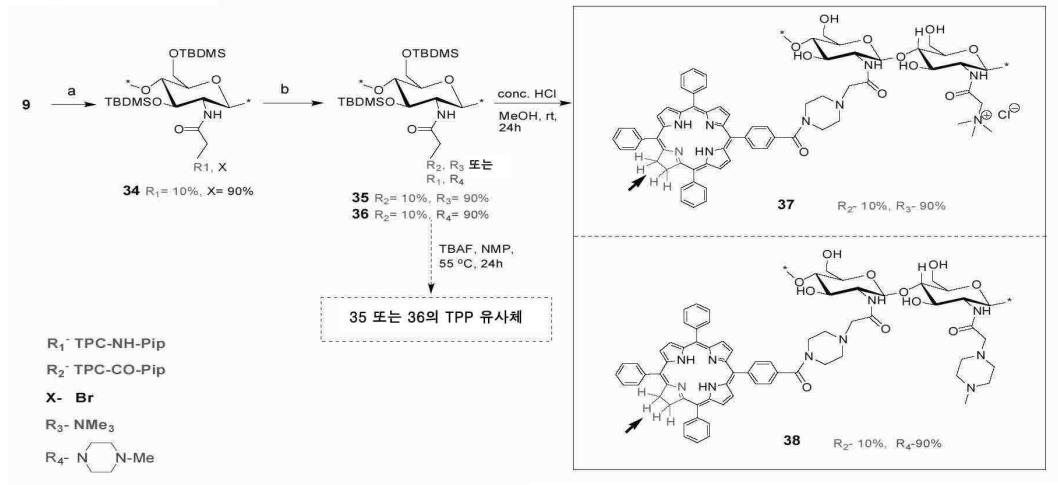


도면 1e

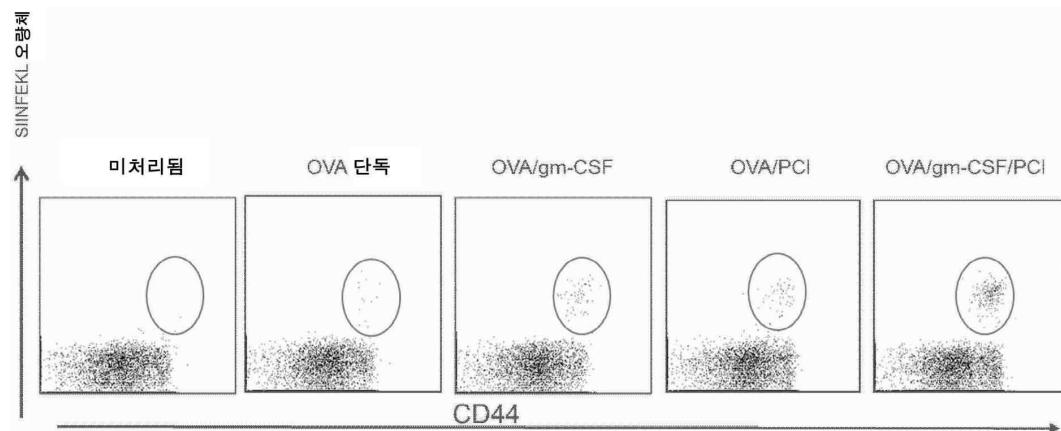
반응식 5A



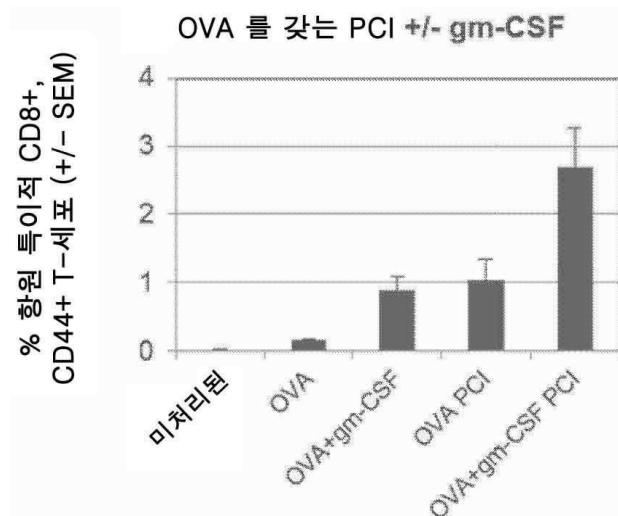
반응식 5B



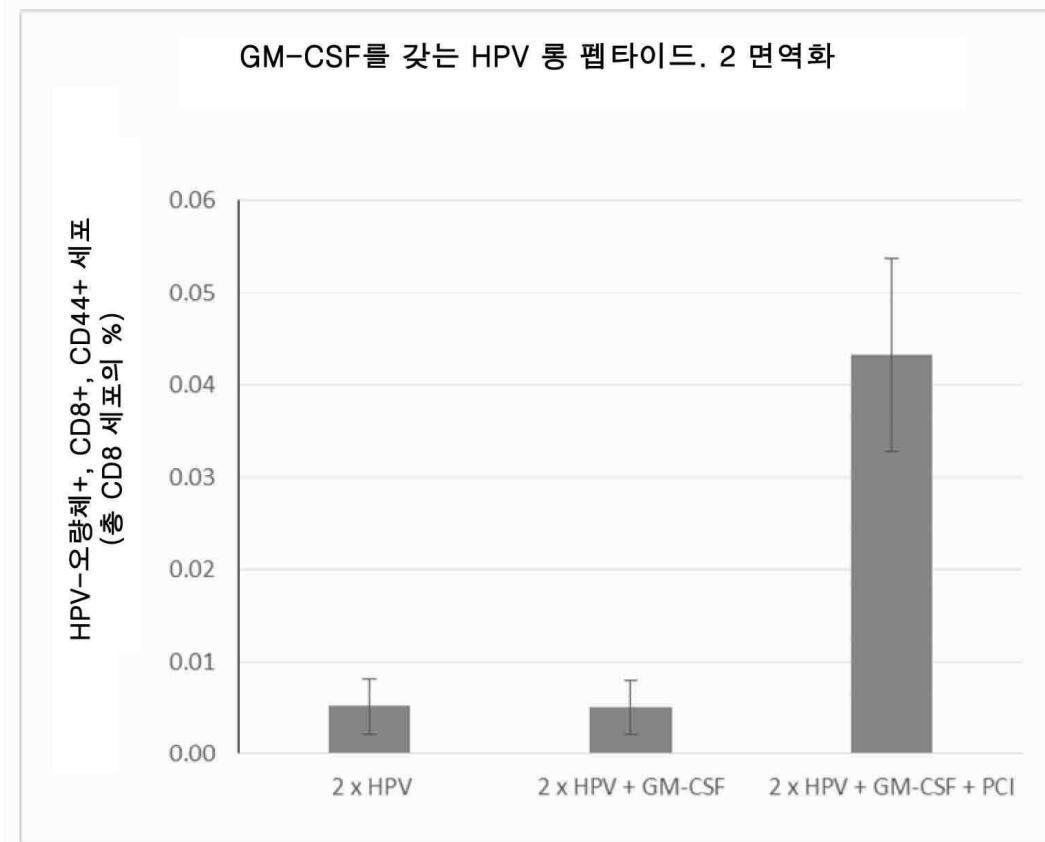
도면2a



도면2b



도면3



도면4

