



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0017356
(43) 공개일자 2011년02월21일

(51) Int. Cl.

A61K 38/16 (2006.01) A61K 35/12 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-7023381

(22) 출원일자(국제출원일자) 2009년03월19일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2010년10월19일

(86) 국제출원번호 PCT/US2009/001727

(87) 국제공개번호 WO 2009/117116

국제공개일자 2009년09월24일

(30) 우선권주장

61/038,313 2008년03월20일 미국(US)

(71) 출원인

유니버시티 오브 마이애미

미국 33136 플로리다주 마이애미 스위트 2012 (엔. 더블유. 트웰프스 애비뉴 1475 오피스 오브 테크놀로지 트랜스퍼

(72) 발명자

포닥크, 엑하드, 알.

미국, 플로리다 33133, 코코넛 그로브, 1720 에스 파놀라 드라이브

로젠블랫, 조셉, 알.

미국, 플로리다 33312, 헐리우드, 3325 오크 힐 스트리트

(74) 대리인

허용록

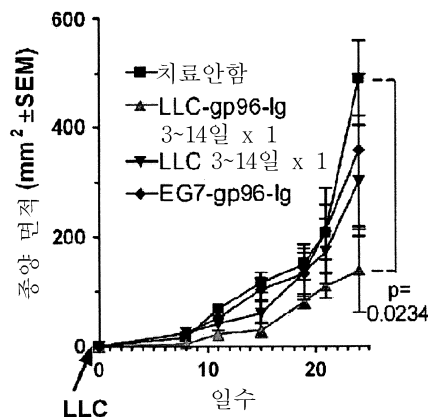
전체 청구항 수 : 총 24 항

(54) 열충격 단백질 G P 96 백신접종 및 이를 사용하는 방법

(57) 요약

본 발명은 열충격 단백질(hsp) gp96 폴리펩티드의 분비형을 암호화하는 핵산을 발현하도록 유전자 변형된 종양 세포를 제공한다. 본 발명은 또한 gp96 폴리펩티드의 분비형을 암호화하는 핵산을 발현하도록 유전자 변형된 종양 세포를 투여함으로써 종양에 대한 면역 반응을 자극시키는 방법을 제공한다.

대표도 - 도13



특허청구의 범위

청구항 1

gp96 폴리펩티드의 분비형을 암호화하는 핵산을 함유하는 진핵세포 발현 벡터로 트랜스펙션된 종양세포를 포함하는 약학 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 gp96 폴리펩티드의 분비형은 gp96 폴리펩티드와 면역글로불린 시그널 펩티드(IgSP)를 함유하는 융합 단백질인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제 2 항에 있어서,

상기 IgSP는 생쥐 IgSP, 집쥐 IgSP, 돼지 IgSP, 원숭이 IgSP, 인간 IgSP로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제 2 항에 있어서,

상기 IgSP는 생쥐 IgSP인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제 2 항에 있어서,

상기 IgSP는 인간 IgSP인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

적어도 하나의 B-세포 항원에 대한 항체를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제 6 항에 있어서,

상기 항체는 유인원 항체, 쥐 모노클론 항체, 키메라 항체, 인간화 항체 및 인간 항체로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

제 6 항에 있어서,

상기 항체는 쥐, 키메라 또는 인간화 항체인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 9

제 6 항에 있어서,

상기 B-세포 항원은 CD19, CD20, CD22, HLA-DR 및 CD74로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 10

gp96 폴리펩티드의 분비형을 암호화하는 핵산을 함유하는 진핵세포 발현 벡터로 트랜스펙션된 종양 세포 유효량

을 인간 대상에 투여하는 단계를 포함하는, 인간 대상에 보호적 면역 반응을 형성하는 방법.

청구항 11

제 10 항에 있어서,

상기 gp96 폴리펩티드의 분비형은 gp96 폴리펩티드와 면역글로불린 시그널 펩티드(IgSP)를 함유하는 융합 단백질인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제 11 항에 있어서,

상기 IgSP는 생쥐 IgSP, 집쥐 IgSP, 돼지 IgSP, 원숭이 IgSP, 인간 IgSP로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제 11 항에 있어서,

상기 IgSP는 생쥐 IgSP인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제 11 항에 있어서,

상기 IgSP는 인간 IgSP인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제 10 항에 있어서,

상기 gp96 면역화는 약 1주 ~ 약 6주의 기간동안 매일 2회 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

제 10 항에 있어서,

상기 gp96 면역화는 약 1주 ~ 약 6주의 기간동안 매일 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

제 10 항에 있어서,

약제학적으로 허용가능한 운반체와 적어도 하나의 B-세포 항원에 대한 항체를 함유하는 치료 조성물을 대상에 투여하는 단계를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 18

제 17 항에 있어서,

상기 치료 조성물은 1회 투여에 20 ~ 2000 mg의 양으로 비경구 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 19

제 17 항에 있어서,

상기 대상은 반복되는 경구 투여량으로 상기 항체를 수취하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 20

제 17 항에 있어서,

상기 항체는 유인원 항체, 쥐 모노클론 항체, 키메라 항체, 인간화 항체 및 인간 항체로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 21

제 17 항에 있어서,

상기 항체는 쥐, 키메라 또는 인간화 항체인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 22

제 17 항에 있어서,

상기 B-세포 항원은 CD19, CD20, CD22, HLA-DR 및 CD74로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 23

열충격 단백질(hsp) gp96 폴리펩티드의 분비형을 암호화하는 핵산을 함유하는 진핵세포 발현 벡터로 트랜스펙션된 종양 세포 유효량을 인간 대상에 투여하는 단계를 포함하는, 인간 대상에 보호적 면역 반응을 형성하는 방법.

청구항 24

열충격 단백질(hsp) gp96 폴리펩티드의 분비형을 암호화하는 핵산을 함유하는 진핵세포 발현 벡터로 트랜스펙션된 종양 세포를 암호화하는 핵산을 발현하도록 암 세포집단을 유전자 변형시키는 단계를 포함하는, 암 백신 제조 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 의학, 면역학 및 종양학의 분야에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 동물 대상의 종양에 대한 면역 반응을 유도하는 방법 및 그 조성물에 관한 것이다.

[0002] 관련출원

[0003] 본 출원은 2008년 3월 20일자 미국 특허 가출원 제 61/038,313 호의 우선권의 이익을 청구하며, 그 전체 내용은 참고사항으로 본 명세서에 포함된다.

[0004] 정부지원

[0005] 본 발명은 미국 ACGT로부터 국립보건원에 의해 지원되는 승인번호 CA109094, CA039201의 정부 지원으로 행해진 것이다. 미국 정부는 본 발명에 대한 특정 권리를 갖는다.

배경기술

[0006] 항종양 백신접종은 치료경험 없는 종양-비함유 생쥐에 투여하는 경우, 이후 챌린지시에 종양이 증식되는 것으로부터 보호하는데 매우 효과적이다. 보호는 일반적으로 장기간 지속되며 종양 특이적인 것으로, 이는 적응성 면역 반응이 관여된다는 것을 시사하는 것이다. 이 상황은 백신이 이미 진행된 종양의 치료 요법으로 사용시에 급격히 변화한다. 보호적 면역성을 효과적으로 확립할 수 있는 동일 양의 백신은 일반적으로 치료적 이익을 제공하지 못한다. 이렇게 치료적 백신접종의 효능이 떨어지는 이유는 종양-유도 억제 세포의 유도, 조절 세포의 생성, T-세포 무반응 또는 관용의 유도, 또는 이러한 메커니즘의 조합을 저지하기 때문인 것으로 추측된다. 종양-유도 면역 억제의 정확한 메커니즘이 무엇이든, 암치료를 위한 백신 요법의 성공은 이러한 종양-유도 억제 효과를 극복 또는 상쇄시킬 수 있느냐에 달려 있다.

[0007] 소포체(endoplasmic reticulum:ER)내에 위치하는 열충격 단백질(hsp) gp96은 MHC class I 및 II 분자에 대한 경로 상에서 펩티드의 샤페론(chaperon)으로서 역할을 하는 것으로 생각된다. gp96-샤페론화 펩티드는 세포 내에서 생성되어 ER로 이동되는 긴 단백질 단편 및 펩티드의 전체 스펙트럼을 함유한다. 종양 세포로부터 얻어지며 백신으로서 사용되는 gp 96은 특이적 종양 면역성을 유도하는데, 이는 아마도 종양-특이적 펩티드가 APC로 이동되기 때문인 것으로 추측된다. J Immunol. 1999 Nov 15; 163(10): 5178 ~ 82 참조.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 명세서에서 기술하는 본 발명은 항종양 조성물을 제공한다. 열충격 단백질인 당단백질(glycoprotein:gp)96-관련 펩티드는 수지상 세포에 의해 CD8에 교차제시(cross-presentation)된다. 항종양 치료에 적합한 백신접종 시스템이 개발되었다. J Immunother. 2008 May; 31(4): 394 ~ 401 및 거기에 인용된 참고문헌 참조. gp 96-면역글로불린(Ig) G1-Fc 융합 단백질을 종양 세포내로 트랜스펙션(transfection)시킴으로써, 사페론화 종양 펩티드와 결합된 gp 96- Ig가 분비된다. gp 96- Ig 분비 종양세포를 비경구 투여함으로써, 선천성 면역계의 활성화와 함께 원기왕성한, 항원-특이적 CD8 세포독성 T-임파구 확장(expansion)이 유발된다. 종양-분비 gp 96은 수지상 세포들(DCs) 및 자연 살해(NK) 세포를 gp 96의 분비 부위로 모집하게 하고, CD91과 톨 유사 수용체(Toll-like receptor)-2와 톨 유사 수용체-4와의 결합을 통해 DC 활성화를 매개한다. gp 96 및 그 사페론화 펩티드가 세포내 흡수되면, 주 조직적합성 복합체(MHC) class I를 통한 펩티드 교차 제시 및 CD4 세포에 독립적인 강한 선천성 CD8 활성화가 촉발된다. 이러한 모델 시스템에서, 입양 전이된 T-세포 수용체(TCR) 형질전환 녹색 형광 단백질(GFP)-마크 CD8 T 세포의 사용에 의해 백신접종 후 4일 내지 5일 이내에 CD8 CTL 확장을 정확하게 정량할 수 있다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명은 열충격 단백질(hsp) gp96 폴리펩티드의 분비형을 암호화하는 핵산을 발현하도록 유전자 변형된 종양 세포를 제공한다. 본 발명은 또한 gp96 폴리펩티드의 분비형을 암호화하는 핵산을 발현하도록 유전자변형된 종양 세포를 투여함으로써 암을 포함한 종양에 대한 면역 반응을 자극시키는 방법을 제공한다. 이 면역 반응은 보호적 면역 반응인 것이 바람직하다. 본 발명은 또한 예를 들어, gp96 폴리펩티드의 분비형을 발현하도록 유전자 변형된 종양 세포를 투여함으로써 암을 포함한 종양을 억제하는 방법을 제공한다. 이 종양 세포는 동종이계(allogeneic) 종양 세포인 것이 바람직하다. 또한, 본 발명은 열충격 단백질(hsp) gp96 폴리펩티드의 분비형을 암호화하는 핵산을 함유하는 진핵세포 발현 벡터로 트랜스펙션된 종양 세포를 암호화하는 핵산을 발현하도록 암 세포집단을 유전자 변형시키는 단계를 포함하는, 암 백신 제조 방법을 제공한다. 본 발명은 또한, 열충격 단백질(hsp) gp96 폴리펩티드의 분비형을 암호화하는 핵산을 함유하는 진핵세포 발현 벡터로 트랜스펙션된 종양 세포 유효량을 인간 대상에 투여하는 단계를 포함하는, 인간 대상에 보호적 면역 반응을 형성하는 방법을 제공한다.

[0010] 몇몇 바람직한 실시예에 따르면, gp96 폴리펩티드의 분비형은 gp 96 폴리펩티드와 면역글로불린 시그널 펩티드(IgSP)를 함유하는 융합 단백질이다. 임의로, IgSP는 생쥐 IgSP, 집쥐 IgSP, 돼지 IgSP, 원숭이 IgSP, 인간 IgSP로 구성되는 군 중에서 선택된다.

[0011] 몇몇 바람직한 실시예에 따르면, gp96 면역은 약 1일 ~ 약 6개월의 기간동안 빈번하게(예를 들어, 매일 또는 1일 2회) 투여된다. 다른 바람직한 실시예에 따르면, 본 치료 조성물은 1회당 20 ~ 2000mg의 양으로 비경구 투여된다.

[0012] 몇몇 바람직한 실시예에 따르면, gp96 면역화는 정상 및/또는 악성 B 임파구를 파괴하는 화합물이나 화합물들, 혹은 너무 많은 B 세포, 과활동 B 세포, 또는 기능장애성 B 세포에 의해 특성이 나타나는 질환을 치료하기 위해 사용되는 화합물이나 화합물들과 함께 투여된다. 이러한 질환에는 백혈병이나 림프종과 같은 종양 질환이 포함된다. B-세포 파괴 화합물은 항체인 것이 바람직하다. 특정 실시예에서, 항체는 유인원 항체, 쥐 모노클론 항체, 키메라 항체(chimeric antibody), 인간화 항체 및 인간 항체로부터 선택된다. 다른 실시예에서, 항체가 결합하는 B-세포 항원은 CD19, CD20, CD22, HLA-DR 및 CD74로부터 선택된다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1A ~ F에서, gp96-Ig-트랜스펙션된 EG7(A) 및 LLC(B)는 종양생성능 감소를 보여준다. ■:gp96-Ig-트랜스펙션된, ○:모의 트랜스펙션된, □:트랜스펙션되지 않은 세포를 의미한다. 접종된 세포의 투여에 6마리 생쥐 그룹을 이용하였다. 도 1C ~ F에서는, 분비성 gp96-Ig 백신접종으로 인해 종양-특이적인 기억이 형성된다. C57BL/6 생쥐에게 격주 간격으로 2회 백신접종을 하였는데, 10⁶ gp96-Ig-트랜스펙션된 EG7(■)으로 접종하거나 10⁶ 방사선처리된 EG7(□)으로 접종하거나, 또는 접종하지 않았다(·). 2주 후에, 생쥐는 그래프에 제시된 수의 종양세포로 킬링되었다(그룹당 6마리 생쥐). 3개월 동안 생쥐에서 종양이 발전되지 않는다는 것이 관찰되었으며, 그

리고 나서 종양이 없는 것으로 판단하였다.

도 2A ~ C에 있어서, 도 2A는 면역적격 세포의 고갈이 프라이밍 단계(priming phase)동안 10^6 EG7-gp96-Ig의 거부에 미치는 영향을 보여준다. 대조군은 PBS를 수취하였다. 각 생쥐의 종양 증식 곡선이 도시되어 있다. 고갈 일정은 상단에 도식적으로 나타나 있다. 면역적격 세포의 고갈은 10^6 EG7-gp96-Ig의 접종 2일 전에 항-CD8, 항-CD4 또는 카라기난(carrageenan)으로 실시하였다. 도 2B에서, CD4-결핍 생쥐는 EG7-gp96-Ig를 제거할 수 있다. 5마리의 CD4-결핍 생쥐는 방사선처리되지 않은 10^6 EG7-gp96-Ig으로 피하를 통해 켈린지되었다. 종양 증식을 기록하였으며, 평균 종양 직경이 보고되어 있다. 도 2C는 면역적격 세포의 고갈이 효과단계의 10^6 EG7-gp96-Ig의 거부에 미치는 영향을 보여준다. 면역화 및 고갈 일정은 상단에 도식적으로 나타나 있다. 면역화의 경우, 6마리의 생쥐 그룹에 방사선처리되지 않은 10^6 EG7-gp96-Ig를 피하를 통해 2회 접종하였다. 10^6 EG7으로 켈린지되기 3일 전에, 면역 세포를 상기와 같이 고갈시켰다. 대조군은 PBS를 수취하였다. 종양 증식을 기록하였으며, 평균 종양 직경으로서 보고되어 있다.

도 3A ~ B에서, CD8 T 세포의 gp 96-매개 교차-프라이밍은 CD4 세포의 부재하에서 증진되나, CD40L 세포의 부재에 의한 영향은 받지 않는다. 생쥐는 정맥내 투여를 통해 1 밀리온의 GFP-OT-1을 수취하였으며, 2일 후에 복강내 투여를 통해 4 밀리온의 EG7-gp96-Ig로 면역화되었다. 5일이 더 지난 후에 복강(peritoneal cavity:PC)으로부터 세포를 수확하여, FACS에 의해 CD8 게이트 내의 GFP-OT-1 빈도수에 대해 분석하였다. 수치는 PC 내의 GFP-OT-1의 절대 수로서 표시되어 있다. 도 3A는 야생형 생쥐와 CD4-결핍 생쥐를 비교한 것이다. 도 3B는 CD40L-결핍 생쥐를 비교한 것이다.

도 4A ~ C에서, CD8 T 세포의 gp 96-매개 교차-프라이밍은 CD80 및 CD86을 필요로 하며, NKT 세포에는 비의존적이다. 생쥐는 정맥내 투여를 통해 1 밀리온의 GFP-OT-1을 수취하였으며, 2일 후에 복강내 투여를 통해 4 밀리온의 EG7-gp96-Ig(A 및 C)로, 또는 2 밀리온의 3T3-OVA-gp96-Ig(B)로 면역화되었다. 5일이 더 지난 후에 비장(SP) 또는 PC로부터 세포를 수확하여, FACS에 의해 CD8 게이트 내의 GFP-OT-1 빈도수에 대해 분석하였다. 도 4A는 CD80 또는 CD86 단일 결핍을 도시한 것이고, 도 4B는 CD80/ CD86 이중 결핍을 도시한 것이며, C는 NKT 결핍($J_{\alpha 18} ko$)을 도시한 것이다.

도 5A ~ C는 림프절의 부재하에 gp 96에 의한 효율적인 교차 프라이밍을 보여준다. 도 5A는 FACS 데이터를 대표하는 LT α 결핍을 보여준다. 생쥐는 정맥내 투여를 통해 1 밀리온의 GFP-OT-1을 수취하였으며, 2일 후에 복강내 투여를 통해 2 밀리온의 3T3-OVA-gp96-Ig로 면역화되었다. 5일이 더 지난 후에 제시된 부위로부터 세포를 수확하여, FACS에 의해 CD8 게이트 내의 GFP-OT-1 빈도수에 대해 분석하였다. 도 5B에서는, 동일한 데이터를 막대 그래프로 나타내었다. 데이터는 2회의 독립적인 실험을 대표하는 것으로서, 각 막대는 2마리 생쥐의 평균 \pm SE를 나타낸다. 도 5C는 3T3-OVA-gp96-Ig에 의한 OT-1의 생체의 교차 프라이밍을 보여준다. 3일 전에 3T3-OVA-gp96-Ig, 3T3-gp96-Ig, 또는 3T3를 복강내 주입한 생쥐로부터 수확한 PEC를 CFSE-라벨을 붙인 OT-1을 사용하여 72시간 동안 OT-1:PEC의 비를 1:10, 1:100 및 1:1000 (a ~ f)으로 하여 배양하였다. 추가적인 대조군으로서, OT-1을 사용하여 3T3 형질전환체(transfectant)를 시험관 내에서 직접 배양하였다. 세포를 항-CD8-PE로 염색하고 CFSE 회색에 대해 분석하여 이를 b ~ h에 나타내었다.

도 6A ~ B에서, gp 96-OVA에 의한 CD8 T 세포의 gp 96-매개 교차-프라이밍은 EG7-K^{b-OVA}를 통한 항원 제시에 의한 직접적인 프라이밍보다 효과적이다. 생쥐는 정맥내 투여를 통해 1 밀리온의 GFP-OT-1을 수취하였으며, 2일 후에 복강내 투여를 통해 2 밀리온의 EG7-gp96-Ig로 면역화되었다. 도 6A에서, 면역화이전(면역전) 및 면역후 5일에 PC로부터 세포를 수확하여, FACS에 의해 CD8 게이트 내의 GFP-OT-1 빈도수에 대해 분석하였다. 도 6B는 EG7-gp96-Ig 및 EG7 면역화 후 PC 내에서의 GFP-OT-1 확장의 동력학을 보여준다. 제시된 부위에서 GFP-OT-1의 총 수가 그래프로 도시되어 있다.

도 7A ~ B는 gp 96에 의해 선천성 면역 세포의 PC내로의 모집 증가를 보여준다. 4 밀리온의 EG7 또는 EG7-gp96-Ig 세포를 복강내 주입하기 2일 전에 및 2일 후에 1 밀리온의 OT-1을 정맥내 투여를 통해 이입하였다. 지시된 날짜에 PC로부터 세포를 수확하여, 유세포분석기(flow cytometry)에 의해 표현형을 결정하였다. 도 7A는 EG7-gp96-Ig의 주입에 의해 CD11c⁺, NK1.1⁺, 및 F4/80^{dim} 세포의 모집을 보여준다. F4/80^{bright} 세포는 면역화 이전에 PC 내에 존재하며, 면역화 이후에 그 수가 변화되지 않는다. 도 7B는 EG7 또는 EG7-gp96-Ig에 의해 PC 내로 세포 모집을 비교한 것이다.

도 8A ~ C에 있어서, gp 96 분비는 DC 및 CD8 세포의 증식을 매개하며, PC 내에서 NK 세포를 활성화시킨다. 생쥐는 정맥내 투여를 통해 1 밀리온의 GFP-OT-1을 수취하였으며, 2일 후에 복강내 투여를 통해 4 밀리온의 EG7-gp96-Ig 또는 EG7로 면역화되었다. 도 8A에서, 4×10^6 EG7 또는 EG7-gp96-Ig로 면역화 후 2일 및 4일에 PC, 장간막 및 대동맥 주위 림프절(dLN) 및 비장(SP)에서 BrdU 염색에 의해 CD11c⁺ 세포의 증식을 측정하였다. CD11c⁺ 세포를 게이트로 제어하고 세포내 염색법에 의해 BrdU에 대해 분석하였다. 주목해야 할 점은 EG7-gp96-Ig 투여 후에만 PC에서 단지 2일 만에 CD11c⁺ 세포의 증식(적색 라인)이 이루어졌다는 것이다. 생쥐는 면역화한 날로부터 음용수 내의 BrdU를 수취하였다. 도 8B에서, BrdU 흡수에 의해 측정되는 CD8 증식은 gp 96 프라이밍 후에만 2일에(적색 라인) PC 내에서만 검출가능하다. EG7-gp96-Ig 면역화 후 4일에 PC 내에서; dLN, 배수 림프절(대동맥 주위, 장간막)에서; ndLN, 비배수 림프절(서혜부)에서 강력한 CD8 증식이 일어났다. 도 8C는 CD69 상향조절에 의해 측정되는 바와 같이 EG7-gp96-Ig 면역화에 의해 PC 내에서의 NK 1.1 세포의 활성화를 보여준다. 도 8A ~ C는 3개의 독립적인 실험을 대표한다.

도 9A ~ B는 OVA 단백질이 없는 경우와 비교했을 때 gp96-사페론화 OVA에 의한 CD8 T 세포 교차 제시의 증진을 보여준다. C57BL/6 생쥐는 정맥내 투여를 통해 1 밀리온의 GFP-OT-1을 수취하였으며, 2일 후에 복강내 투여를 통해 서로 다른 수의 동종동계(syngeneic) EG7-gp96-Ig 혹은 동종이계 3T3-OVA 또는 3T3-OVA-gp96-Ig로, 아니면 PBS 중의 OVA 단백질로 면역화되었다. 복강내 주입을 위한 세포의 수는 x-축에 제시된 바와 같이 24시간 동안 정량의 분비 gp96-Ig 또는 OVA를 생성할 수 있도록 조절되었다. OVA 및 gp96-Ig 분비는 각각 ELISA에 의해 시험관 내에서 측정되었다. 면역화 후 5일에 유세포분석기에 의해 PC 내에서 GFP-OT-1 확장이 결정되었다. 도 9A는 EG7-gp96-Ig 및 OVA 단백질에 대한 반응으로서 GFP-OT-1 확장을 보여준다. 도 9B는 3T3-OVA, 3T3-OVA-gp96-Ig 및 OVA 단백질에 대한 반응으로서 GFP-OT-1 확장을 보여준다.

도 10A ~ B에서 gp 96은 단백질 교차 프라이밍의 보조제(adjutant)로서 연속적으로 방출될 때 가장 효과적으로 작용한다. 도 10A에서, 생쥐는 정맥내 투여를 통해 1 밀리온의 GFP-OT-1을 수취하였으며, 2일 후에 제시된 바와 같이 복강내 투여를 통해 면역화되었다. 면역화 후 4일에 FACS에 의해 생체내 GFP-OT-1 확장이 측정되었다. 주입된 세포로부터의 분비 산물을 시험관 내에서 ELISA에 의해 정량화하였다. 제시된 분비 산물의 양은 주입된 수의 세포에 의해 24시간 내에 배양액 속에서 분비된 양을 의미한다. 주목해야 할 점은 3T3-OVA-gp96-Ig 세포로부터 분비된 200ng gp96과 함께 50μg의 OVA가 약 0.1% gp96-OVA를 함유하는 3T3-OVA-gp96-Ig로부터 분비된 200ng gp96-Ig보다 GFP-OT-1 확장을 덜 유발시킨다는 점이다. 도 10B에서, 생쥐는 정맥내 투여를 통해 1 밀리온의 GFP-OT-1을 수취하였으며, 2일 후에 3T3-OVA-gp96-Ig 배양 상청액으로부터 수득한 200ng 수용성 gp96-Ig로, 또는 연속으로 24시간 내에 200ng gp96-Ig를 분비하는 수의 3T3-OVA-gp96-Ig 세포로 복강내 투여를 통해 면역화되었다. 면역화 후 4일에 유세포분석기에 의해 PC 내의 GFP-OT-1 확장이 측정되었다.

도 11A ~ D는 원격 확립된 종양에 의해 OT-1 CTL 확장의 항원 비특이적 억제를 보여준다. 도 11A는 면역화되지 않은 생쥐; 종양이 없는, 면역화된 생쥐; 및 EG7 종양을 가지고 있는, 면역화된 생쥐에 있어서, 복강내 OT-1 CD8 CTL 빈도수의 비교를 보여준다. 1 밀리온의 EG7 종양세포를 오후구리에서 피하 이식한 후에 EG7-gp96-Ig로 면역화하기 전에 5일 동안 이 세포가 확립되도록 하였다. 면역화하기 전 2일에 1 밀리온의 OT-1 CD8 T 세포를 정맥내 입양 전이시켰다. 생쥐는 복강내 투여를 통해 2 밀리온의 EG7-gp96-Ig로 면역화되었다. 5일 후에 유세포분석기에 의해 복막 세포를 분석하였다. 도 11B에서, 확립된 종양에 의한 OT-1 확장의 억제는 항원 비특이적이다. EG7 대신, 난백알부민(ovalbumin)을 발현하지 않는 EL4 및 LLC가 5일 동안 확립되었다. 도 11A에서와 같이, OT-1 입양 전이 및 백신접종을 실시하였다. 도 11C는 확립된 종양의 존재하에 또는 부재하에(B에서와 같은 실험), 백신접종 부위인 복강내에 측정되는 OT-1의 절대 수를 보여준다. 도 11D에서, EG7-gp96-Ig 면역화에 의해 복강내로 모집되는 총 세포수는 확립된 종양의 존재하에 증가된다. 3회 또는 그 이상의 개별 실험을 대표하는 실험이 도시되어 있다. 각 그룹에서 N = 3 ~ 5마리의 생쥐이다. 도면에 표기된 유의 확률(p값)은 t 테스트에 의해 계산되었다. 음의 대조군은 면역화하지 않은(면역전) 생쥐이고, 양의 대조군은 오후구리에 말초 종양이 없는 생쥐이다. CTL은 세포독성 T 임파구를 의미하며, gp는 당단백질, Ig는 면역글로불린, LLC는 루이스 폐암종(Lewis lung carcinoma)을 의미한다.

도 12A ~ D에 있어서, 빈번한 gp96 면역화는 종양-유도 면역 억제를 극복할 수 있다. 도 12A에서, 1 밀리온의 EG7 종양세포를 오후구리에서 피하 이식하였다. 1 밀리온의 EG7-gp96-Ig 또는 방사선처리된 EG7의 복강내 투여에 의한 면역화는 종양 이식을 한 그 날에 혹은 그 후 2일 또는 4일에 시작하였다. 음의 대조군은 치료되지 않은 군으로서, n = 17이고, 방사선처리된 EG7 면역화는 n = 15이다. 다른 일정으로 실시되는 EG7-gp96-Ig 면역화는 n = 15이다. 도 12B에서, 복강내 투여가 3일 후에 시작되며, 14일까지(흑색 화살표) 매일 반복된다는 점을 제외

하고는 A와 동일하다. 1 밀리온의 EG7-gp96-Ig($n = 17$) 혹은 1 밀리온의 LLC-gp96-Ig($n = 5$) 또는 방사선처리된 EG7(음의 대조군, $n = 5$) 또는 치료되지 않은 군(음의 대조군, $n = 19$)이 있다. 도 12C에서, 5일 동안 세포가 확립되도록 한 다음, 5일에서 ~ 16일까지 매일 1회(흑색 화살표) 또는 2회(적색 화살표) 1 밀리온의 EG7-gp96-Ig로 복강내 면역화를 실시하였다. 각 그룹에서 $n = 5$ 이다. 도 12D에서, 7일 동안 세포가 확립되도록 한 다음, 7일에서 ~ 18일까지 매일 1회(흑색 화살표) 또는 2회(적색 화살표) 1 밀리온의 EG7-gp96-Ig로 복강내 면역화를 실시하였다. 각 그룹 당 $n = 5$ 이다. 종양 증식의 차이에 대한 유의 확률은 각 그래프에 표기되어 있다. 그래프에서, gp는 당단백질, Ig는 면역글로불린, LLC는 루이스 폐암종, ns는 유의성 없음을 의미한다.

도 13에서, 빈번한 면역화는 확립된 LLC의 종양 증식을 지연시킨다. LLC(105)를 옆구리에서 피하로 이식한 후에, 3일 동안 이 세포가 확립되도록 하였다. 3일에 1 밀리온의 LLC-gp96-Ig($n = 15$), EG7-gp96-Ig($n = 5$) 또는 방사선처리된 LLC($n = 5$)로 면역화, 또는 비치료($n = 19$)를 시작하였으며, 7일, 10일 및 14일에 반복하였다. 19마리의 비처리된 생쥐 및 15마리의 종양을 가지고 있는 면역화된 생쥐 사이의 차이의 유의성($p=0.00234$)이 나타나 있다. 그래프에서, gp는 당단백질, Ig는 면역글로불린, LLC는 루이스 폐암종을 의미한다.

도 14A ~ B에서, B 세포는 gp96 매개에 의해 NK 세포가 복강 내로 모집되고 그 속에서 DC가 보존되는 것을 방해한다. 도 14A는 EG7-gp96-Ig 면역화에 의해 B 세포, 그러나 별로 크지 않은 CD5+ B 세포만 복강내로 모집되는 것을 보여준다. 종양이 없는 생쥐는 복강내 투여를 통해 1 밀리온의 EG7-gp96-Ig를 수취하였다. 그 후에, 유세포분석기에 의해 CD5+ 및 CD5- B 세포의 축적을 매일 측정하였다. 3회 이상 실험을 대표한다. 도 14B에서, B 세포 결핍 생쥐(BCDM)에서 NK 세포의 모집 및 NK 세포와 DC의 보존이 증가되며, B 세포의 입양 전이에 의해 역전되는 현상을 보인다. WT 생쥐 및 BCDM를 2 밀리온의 EG7-gp96-Ig로 복강내 면역화시키고, 2일 및 4일 후에 복강으로부터 세포를 수확하여, 이를 유세포분석기에 의해 분석하였다. EG7-gp96-Ig로 면역화하기 2일 전에 10^7 WT B세포의 정맥내 입양 전이에 의해 B세포 재구성(B cell reconstitution)을 수행하였다. 3회 실험을 대표한다. 그래프에서, BCDM는 B 세포 결핍 생쥐를 나타내며, DC는 수지상 세포, gp는 당단백질, Ig는 면역글로불린, NK는 자연 살해세포, WT는 야생형을 의미한다.

도 15A ~ B에서, gp96이 매개하는 OT-1 CD8 CTL 확장은 B 세포의 부재하에 증가 및 지속된다. WT 생쥐 및 B 세포 결핍 생쥐는 1 밀리온의 GFP-OT-1을 수취하였고, B-세포 재구성 생쥐는 정맥내 입양 전이에 의해 10 밀리온의 WT B-세포를 추가로 수취하였다. 2일 후에 이 생쥐들을 4 밀리온의 EG7-gp96-Ig로 면역화한 후에, 복강(A), 그리고 장간막 및 대동맥 주위 림프절(dLN)(B)로부터 세포를 수확함으로써 제시된 날짜에 분석을 행하였다. 반복 측정 ANOVA에 의해 $*p=0.04$ 이다. 각 그룹에서 4마리 생쥐가 이용되었으며, 3회 실험을 대표한다. 그래프에서, ANOVA는 분산 분석을 의미하며, CTL은 세포독성 T 임파구, dLN은 배수 림프절, GFP는 녹색 형광 당단백질, gp는 당단백질, Ig는 면역글로불린, WT는 야생형을 의미한다.

도 16A ~ B에서, gp96이 매개하는 종양 거부는 BCDM에서 증가되며, B-세포 재구성에 의해 상실된다. 도 16A는 야생형 생쥐를 보여준다. 도 16B는 BCDM를 보여준다. 0.2mL PBS 중의 1 밀리온 LLC-난세포를 옆구리 내로 이식하였다. 5일 후에, 1 밀리온의 OT-1을 정맥내 입양 전이시켰다. 종양 이식 후 7일에, 생쥐들을 1 밀리온의 LCC-ova-gp96-Ig로 복강내 면역화하였다. 캘리퍼를 사용하여 2차원으로 종양 크기를 측정하였다. 각 그룹에서 $N = 5$ 이며, 3회 실험을 대표한다. 그래프에서, BCDM는 B 세포 결핍 생쥐를 나타내며, gp는 당단백질, Ig는 면역글로불린, LLC는 루이스 폐암종, PBS는 포스페이티브-완충 염을 의미한다.

도 17A ~ C에서, CTL 전구물질의 높은 빈도수 및 면역화는 BCDM에서 gp96 백신에 의한 종양 거부를 증진시킨다. 도 17A에서, BCDM는 LCC-ova-gp96-Ig로 백신접종을 생략한 것을 제외하고는 도 6에서와 같은 방식으로 처리되었다. 도 17B에서는, OT-1 전이를 생략한 것을 제외하고는 도 6과 같다. C에서는, 종양(LLC-난세포) 이식 이전에 10 밀리온의 B 세포로 BCDM 생쥐를 재구성하는 것을 제외하고는 도 16과 같다. 각 그룹에서 $N = 5$ 내지 6마리 생쥐이며, 2회 실험을 대표한다. 그래프에서, BCDM는 B 세포 결핍 생쥐를 나타내며, CTL은 세포독성 T 임파구, gp는 당단백질, Ig는 면역글로불린, LLC는 루이스 폐암종을 의미한다.

도 18에서, 작은 B 세포 집단은 LLC-난세포 종양 켈린지에 대한 면역 반응을 저해한다. LLC-난세포 이식 후 4일에(OT-1 주입 1일 전에), 인간 CD20 형질전환된 생쥐 각각은 1 mg의 Ritumixmab[®] 또는 PBS를 수취하였다. 처리 후 7일에, 유세포분석기에 의해 PBS내의 CD19+ 세포의 빈도수를 조사하였다. Ritumixmab[®] 주입 후에 PBL 내에 약 3%의 CD19+ 세포 집단이 잔류하였다. 각 막대 데이터는 3마리 생쥐의 평균 \pm S.E.를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0014] 몇몇 바람직한 실시예에 따르면, 본 발명은 열충격 단백질(hsp) gp96 폴리펩티드의 분비형을 암호화하는 핵산을 함유하는 진핵세포 발현 벡터로 트랜스펙션된 종양 세포 유효량을 인간 대상에 투여하는 단계를 포함하는, 인간 대상에 보호적 면역 반응을 형성하는 방법을 제공한다.
- [0015] 몇몇 바람직한 실시예에 따르면, 열충격 단백질(hsp) gp96 폴리펩티드의 분비형을 암호화하는 핵산을 함유하는 진핵세포 발현 벡터로 트랜스펙션된 종양 세포를 암호화하는 핵산을 발현하도록 암 세포 집단을 유전자 변형시키는 단계를 포함하는, 암 백신 제조 방법을 제공한다.
- [0016] 몇몇 바람직한 실시예에 따르면, 본 발명은 열충격 단백질(hsp) gp96 폴리펩티드의 분비형을 암호화하는 핵산을 함유하는 진핵세포 발현 벡터로 트랜스펙션된 종양 세포 유효량을 대상에 투여하는 단계를 포함하는, 종양에 대한 면역 반응을 자극시키는 방법을 제공한다.
- [0017] 바람직한 실시예에 따르면, 본 발명은 열충격 단백질(hsp) gp96 폴리펩티드의 분비형을 암호화하는 핵산을 함유하는 진핵세포 발현 벡터로 트랜스펙션된 종양 세포 유효량을 대상에 투여하는 단계를 포함하는, 종양 증식을 억제하는 방법을 제공한다.
- [0018] **gp96 폴리펩티드**
- [0019] gp96 폴리펩티드는 야생형 단백질 중의 하나이며, 야생형 인간 gp96 폴리펩티드인 것이 바람직하다. 또한 본 발명에 사용될 수 있는 gp96 폴리펩티드는 전술한 gp96 폴리펩티드와 동일성을 가지거나 실질적으로 유사성을 가지는 아미노산 배열을 갖는 gp96 폴리펩티드를 포함한다. 사용되는 gp96 폴리펩티드는 당해 분야에 공지되거나 본 명세서에 언급하는 gp96 폴리펩티드와 적어도 70%, 보다 바람직하게는 85%, 더욱 바람직하게는 90%, 특히 바람직하게는 95%의 동일성 또는 유사성을 가지는 것이 바람직하다. 사용되는 가장 바람직한 gp96 폴리펩티드는 야생형 인간 gp96 폴리펩티드와 적어도 99%의 유사성 또는 동일성을 가진다.
- [0020] 폴리펩티드 후보물질이 본 발명의 gp96 폴리펩티드와 상동관계를 공유하는 정도는 두 아미노산 배열 사이의 유사성 또는 동일성 정도에 따라 결정된다.
- [0021] 배열 동일성이 높은 수준이라는 것은 제 1 배열이 제 2 배열로부터 유도될 수 있는 가능성을 의미한다. 아미노산 배열 동일성은 두 정렬 배열 사이에 동일한 아미노산 배열이 동일해야 한다는 것이다. 따라서, 후보물질 배열이 기준 배열과 70%의 아미노산 동일성을 공유한다는 것은 후보물질 배열 중 70%의 아미노산이 기준 배열 중의 해당 아미노산과 동일해야 한다는 것을 의미한다. 동일성은 이에 국한되는 것은 아니나, ClustaIX 컴퓨터 서열 정렬 프로그램(THompson J D, Gibson T J, Plewniak F, Jeanmougin F, & Higgins D G: "The ClustaIX windows interface: 특성 분석 도구에 의해 도움받는 다중 배열 정렬에 대한 유연한 전략"; Nucleic Acid Res. 1997, 25(24): 4876-82), 및 거기서 제안되는 디폴트 파라미터(default parameter)와 같은 컴퓨터 분석에 의해 결정된다. 이 프로그램 사용시, 본 발명의 동종 DNA 배열에 의해 암호화되는 폴리펩티드의 성숙 부분이 gp96 폴리펩티드 배열의 아미노산 배열과 적어도 70%, 보다 바람직하게는 85%, 더욱 바람직하게는 90%, 특히 바람직하게는 95%, 가장 바람직하게는 99%의 동일성 정도를 가진다.
- [0022] 본 발명의 gp96 폴리펩티드는 변형 폴리펩티드를 포함한다. 본 명세서에서, "변형 폴리펩티드"라는 용어는 하나 이상의 아미노산 위치가 야생형 gp96 폴리펩티드와 다른 아미노산 배열을 가지는 폴리펩티드(또는 단백질)을 의미한다. 이러한 변형 폴리펩티드에는 전술한 유전자변형된 폴리펩티드 뿐만 아니라 보존적 치환체(conservative substitutions), 접합 변이체(splice variants), 이소폼(isoform), 다른 종으로부터의 동족체, 및 동질이상 등이 포함된다.
- [0023] 본 명세서에서, "보존적 치환체"라는 용어는 아미노산 잔기가 생물학적으로 유사한 다른 잔기로 치환된 물질을 의미한다. 일반적으로, 앞서 언급한 바와 같이, 생물학적 유사성은 야생형 배열에 보존적 아미노산이 치환된 치환체를 반영한다.
- [0024] 예를 들어, 보존적 아미노산 치환체가 폴리펩티드 또는 단백질 중 잔기의 총 수가 10% 미만을 나타내는 경우, 생물학적 활성에 영향을 전혀 또는 거의 미치지 않는 보존적 아미노산 치환체를 예상할 것이다. 보존적 아미노산 치환체는 폴리펩티드 또는 단백질의 5% 이하, 특히 폴리펩티드 또는 단백질의 2% 이하인 것이 바람직하다.
- [0025] 한 실시예에서, gp96 폴리펩티드는 15개 이하의 아미노산 치환체를 함유한다. 또 다른 한 실시예에서, gp96 폴리펩티드는 12개 이하의 아미노산 치환체를 함유한다. 또 다른 실시예에서, gp96 폴리펩티드는 10개 이하의 아미노산 치환체를 함유한다. 또 다른 실시예에서, gp96 폴리펩티드는 8개 이하의 아미노산 치환체를 함유한다. 또 다른 실시예에서, gp96 폴리펩티드는 5개 이하의 아미노산 치환체를 함유한다. 특히 바람직한 실시예에서,

성숙 배열에 단일 아미노산 치환체가 존재하는데, 여기서 두 치환 및 대체 아미노산을 비환형이다. 특정 보존적 치환체의 다른 예로는 하나의 소수성 잔기가 이소로이신, 말린, 로이신 또는 메티오닌과 같은 다른 잔기로 치환된 치환체, 혹은 하나의 극성 잔기가 다른 잔기로 치환된 치환체, 예를 들어, 아르기닌이 리신으로, 글루탐산이 아스파르트산으로, 글루타민이 아스파라긴으로 치환된 치환체가 포함된다.

[0026] 또한 보존적 치환이라는 용어는 치환된 폴리펩티드와 반응을 일으키는 항체가 그 비치환 폴리펩티드와도 면역 반응을 한다는 전제하에, 비치환 모 아미노산 잔기 대신 치환된 아미노산 잔기를 사용하는 것을 포함하는 의미이다.

[0027] 이러한 주 아미노산 배열 변형체는 변형되지 않은 상대방 폴리펩티드와 비교시 사실상 동일한 활성을 가지는 단백질이 될 수 있으며, 따라서 모 단백질의 기능적 유사체로서 고려될 수 있다. 이러한 변형체는 예를 들어 부위-지정 돌연변이 유발(site-directed mutagenesis)에 의한 것으로서 고려될 수 있거나 자발적으로 발생할 수 있으며, 이에겐 접합 변이체, 이소폼, 다른 종으로부터의 동족체, 및 동질이상 등이 포함된다. 이러한 기능적 유사체도 또한 본 발명에 따라 고려될 수 있다.

[0028] 시그널 펩티드

[0029] 시그널 펩티드는 염색체 DNA의 암호화 부분 내에 둘러싸여져 있으며, 리보솜에 의해 단백질의 일부로서 합성된다. 시그널 펩티드는 일반적으로 N-말단을 구성하며, 새로 합성된 폴리펩티드가 조면 소포체 내로 향하도록 유도한다. 여기에서, 시그널 펩티드가 폴리펩티드로부터 절단되고, 성숙 단백질이 그 주변으로 분비된다. 따라서 시그널 펩티드는 세포 내에 잔류한다.

[0030] 시그널 펩티드-진핵세포 시그널 펩티드. 진핵세포 시그널 펩티드는 분비되는 단백질 또는 막 구성성분으로 되는 단백질 상에 존재하는 펩티드이다. 이 시그널 펩티드는 일반적으로 단백질의 N-말단이다. 본 명세서에서, SignalP로 표시되는 모든 시그널 펩티드(2.0 버전 또는 바람직하게는 3.0 버전)는 시그널 펩티드를 의미하는 것이다.

[0031] 포유동물 시그널 펩티드는 소포체를 통해 분비되는 포유동물 단백질로부터 유도되는 시그널 펩티드이다.

[0032] 본 발명의 바람직한 실시예에 따르면, gp96 분자를 시그널 펩티드(SP)와 융합시킴으로써 gp96-SP 융합 단백질을 형성한다. 본 발명에 따르는 발현 벡터는 gp96 폴리펩티드에 작동가능하게 결합되어 있는 시그널 펩티드를 암호화하는 뉴클레오타이드 배열을 직접 발현할 수 있는 프로모터 배열을 가진 핵산을 함유한다.

[0033] 시그널 펩티드는 어떠한 작용성 시그널 펩티드도 가능하며, 예를 들어 면역글로불린 시그널 펩티드와 같은 이질성 시그널 펩티드도 포함한다. 시그널 펩티드는 인간, 생쥐, 집쥐, 원숭이, 돼지와 같은 어떠한 적합한 종으로부터도 유래될 수 있다.

[0034] 몇몇 실시예에서, 면역글로불린 시그널 펩티드(IgSP)는 대집단 포유동물로부터 알려져 있는 작은 19개 아미노산 펩티드이다. IgSP는 생쥐 또는 인간 유래인 것이 바람직하다. 그 이유는 생쥐 IgSP가 생쥐, 집쥐 및 인간에 대해 기능을 가지는 것으로 밝혀졌기 때문이다. 인간에게 사용하는 경우, IgSP는 교차 종에 따른 부작용의 위험을 줄이기 위해 인간 유래인 것이 바람직하다.

[0035] IgSP는 다음과 같은 종류 중에 하나 이상인 것이 바람직하다. 즉, 인간 IgSP(Met Asp Cys Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Thr Gly Thr His Ala); 히말라야 원숭이(원숭이) IgSP(Met Lys His Leu Trp Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp Val Leu Ser); 마모셋 원숭이(원숭이) IgSP(Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Phe Leu Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly Ala His Ser); 무스 무스쿨루스(생쥐) IgSP(Met Lys Cys Ser Trp Val Ile, Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly Val Asn Ser); 수스 스크로파(돼지) IgSP(Met Glu Phe Arg leu Asn Trp Val Val Leu Phe Ala Leu Leu Gln Gly Val Gln Gly); 및 만주집쥐(쥐) IgSP(Met Lys Cys Ser Trp Ile Ilu Leu Phe Leu Met Ala Leu Thr Thr Gly Val Asn Ser).

[0036] 시그널 펩티드의 절단: 발현 구성체로 혼입시키기 위한 특이적 gp96 형태에 관해 결정하기 전에, IgSP과 같은 시그널 펩티드의 절단 가능성을 아트 프레딕션 툴의 상태를 이용하여 체크할 수 있다. 바람직한 프레딕션 툴 중의 하나는 SignalP WWW 서버에서 입수가능한 SignalP 소프트웨어이며, 같은 서버로부터 입수할 수 있는 보다 새로운 3.0 버전이 바람직하다. 또한, 시그널 펩티드를 선택하기 위한 도구 및 기술에 대해 설명하고 있는 여러 참고문헌이 존재한다. 이러한 참고문헌은 다음과 같다. Henrik Nielsen, Jacob Engelbrecht, Sren Brunak and Gunnar von Heijne: "원핵세포 및 진핵세포 시그널 펩티드의 확인과 그 절단 부위의 예측", Protein Engineering, 10, 1-6(1997); SignalP-HMM 아웃풋 모델에 대해: Henrik Nielsen and Anders Krogh: "히든

Markov 모델에 의한 시그널 펩티드 및 시그널 앵커의 예측", In Proceedings of Sixth International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology(ISMB 6), AAAI Press, Menlo Park, Calif., pp.122-130(1998); 시그널 펩티드에 대한 개선된 예측 - SignalP 3.0, Jannick Dyrlov Bredtsen, Henrik Nielsen, Gunnar von Heijne and Sren Brunak. J M B(2004); "히든 Markov 모델에 의한 시그널 펩티드 및 시그널 앵커의 예측", Henrik Nielsen and Anders Krogh: Proceedings of Sixth International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology(ISMB 6), AAAI Press, Menlo Park, Calif., pp.122-130, 1998. 상기 참고문헌 각각은 그 전체가 본 명세서에서 참조 문헌으로 기재되어 있다.

[0037] **투여**

[0038] 몇몇 바람직한 실시예에 따르면, gp96 번역화는 약 1일 ~ 약 6개월의 기간동안 빈번하게(예를 들어, 매일, 1일 2회, 1일 3회 등) 투여된다. 몇몇 실시예에 따르면, 투여 기간은 약 1일 ~ 약 90일; 약 1일 ~ 약 60일; 약 1일 ~ 약 30일; 약 1일 ~ 약 20일; 약 1일 ~ 약 10일; 약 1일 ~ 약 7일이다. 몇몇 실시예에 따르면, 투여 기간은 약 1주 ~ 약 50주; 약 1주 ~ 약 40주; 약 1주 ~ 약 30주; 약 1주 ~ 약 24주; 약 1주 ~ 약 20주; 약 1주 ~ 약 16주; 약 1주 ~ 약 12주; 약 1주 ~ 약 8주; 약 1주 ~ 약 4주; 약 1주 ~ 약 3주; 약 1주 ~ 약 2주; 약 2주 ~ 약 3주; 약 2주 ~ 약 4주; 약 2주 ~ 약 6주; 약 2주 ~ 약 8주; 약 3주 ~ 약 8주; 약 3주 ~ 약 12주; 또는 약 4주 ~ 약 20주이다.

[0039] **병행 치료**

[0040] 몇몇 바람직한 실시예에 따르면, gp96 번역화는 정상 및/또는 악성 B 임파구를 파괴하는 화합물이나 화합물들, 혹은 너무 많은 B 세포, 과활동 B 세포, 또는 기능장애성 B 세포에 의해 특성이 나타나는 질환을 치료하기 위해 사용되는 화합물이나 화합물들과 함께 투여된다(예를 들어, Ritumixmab®). 이러한 질환에는 백혈병이나 림프종과 같은 종양 질환이 포함된다.

[0041] 너무 많은 B 세포, 과활동 B 세포, 또는 기능장애성 B 세포에 의해 특성이 나타나는 질환을 치료하기 위해 사용되는 화합물이나 화합물들은 B 세포를 표적화하는 항체인 것이 바람직하다. 예를 들어, 본 명세서에서 참고 문헌으로 소개되어 있는 미국 특허 출원 제 2003/0133930 호 참조. B 세포를 표적화하는 항체는 CD19, CD20, CD22, HLA-DR 및 CD74와 같은 항원에 대한 항체인 것이 바람직하다. 치료 조성물은 1회 사용에 20 ~ 2000mg의 양으로 비경구 투여되는 것이 바람직하다. 몇몇 실시예에 따르면, 대상은 비경구 투여에 의해 항체를 수취한다. 몇몇 실시예에 따르면, 대상은 반복적인 비경구 투여에 의해 항체를 수취한다. 몇몇 실시예에 따르면, 항체는 유인원 항체, 쥐 모노클론 항체, 키메라 항체, 인간화 항체 및 인간 항체 중의 하나이다. 몇몇 실시예에 따르면, 항체는 쥐 모노클론 항체, 키메라 항체, 또는 인간화 항체 중의 하나이다.

[0042] 몇몇 바람직한 실시예에 따르면, gp96 번역화는 1종 이상의 항암제와 함께 투여된다. 다양한 유형의 항암제가 본 발명의 방법에 사용될 수 있다. 이러한 종류의 항암제 및 그 바람직한 작용 메커니즘에 대해서 하기에 기술한다.

[0043] 1. 알킬화제: 알킬화제는 뉴클레오타이드에 알킬기를 공여하는 화합물이다. 알킬화 DNA는 자가 복제 능력이 없으므로, 세포 증식이 중지된다. 이러한 화합물의 예로는 부설판(busulfan), 배위결합 금속 착화물(예를 들어 카보플라틴, 옥살리플라틴 및 시스플라틴과 같은 백금 배위결합 화합물), 시클로포스파미드(시톡산), 다카르바진(dacarbazine), 이포스파미드, 메클로레타민(무스타르겐) 및 멜팔란 등이 있으나, 이에 국한되는 것은 아니다.

[0044] 2. 이작용성 알킬화제: 이작용성 알킬화제는 2개의 불안정한 메탄술포네이트 기가 4개 탄소 알킬 사슬의 반대쪽 말단에 결합되어 있는 화합물이다. 메탄술포네이트 기는 서로 상호작용하여, 암세포 내에서 DNA에 손상을 유발함으로써 복제를 저지한다. 이러한 화합물의 예로는 클로르암부실 및 멜팔란 등이 있으나, 이에 국한되는 것은 아니다.

[0045] 3. 비스테로이드계 아로마타제 억제제: 비스테로이드계 아로마타제 억제제는 에스트로겐 생성에 관여하는 효소인 아로마타제를 억제하는 화합물이다. 아로마타제를 차단함으로써 에스트로겐의 생성이 억제된다. 이러한 화합물의 예로는 아나스트로졸 및 엑세메스탄(exemestane)이 있다.

[0046] 4. 면역치료제: 면역치료제는 악성 종양과 연관되는 단백질을 생성하는 암세포를 표적화하는 항체 또는 항체 단편이다. 면역치료제의 예로는 유방암의 약 25 ~ 30%에서 다수로 발생하는 HER2 또는 HER2/neu를 표적화하는 허셉틴(Herceptin); 대장암에서 표피성장인자 수용체(EGFR)를 표적화하는 얼비투스(Erbitux); 대장암에 의해 발현되는 혈관 내피세포 성장인자(VEGF)를 표적화하는 아바스틴(Avastin); 및 B 세포 림프종에서 세포사멸을 촉발하

는 항-CD20 항체인 리툭산(Rituxan) 등이 있다. 추가적인 면역치료제로는 리신, 디프테리아 독신 및 슈도모나스 독신과 같은 독소 분자를 종양 특이적인 항원을 식별하는 항체와 결합시킨 면역독소가 있다. 결합은 생화학적으로 또는 제조합 DNA법에 의해 달성될 수 있다.

- [0047] 5. 니트로소우레아(nitrosurea) 화합물: 니트로소우레아 화합물은 NDA 복구에 필요한 효소를 억제한다. 이 화합물은 뇌에까지 이동할 수 있으므로 뇌종양을 치료하는데 사용될 뿐만 아니라, 비호지킨 림프종, 다발성 골수종 및 악성 흑색종에도 사용된다. 니트로소우레아의 예로는 카르무스틴 및 로무스틴이 있다.
- [0048] 6. 대사길항 물질: 대사길항 물질은 DNA 및 리보핵산(RNA) 합성을 방해하는 약제이다. 이 물질은 상 특이적이며 (S phase), 만성 백혈병 뿐만 아니라 유방, 난소 및 위장관의 종양의 치료에 사용된다. 대사길항 물질의 예로는 5-플루오로우라실, 메토틱세이트, 겐시타빈(gemcitabine; GEMZAR®), 시타라빈(Ara-C) 및 플루다라빈 등이 있다.
- [0049] 7. 항종양 항생제: 항종양 항생제는 항균 및 세포독성 활성을 갖는 화합물이다. 이러한 화합물은 또한 효소 및 유사분열을 화학적으로 방해하고 세포막을 변화시킴으로써 DNA를 방해할 수 있다. 이러한 화합물의 예로는 블레오미오신, 닥티노마이신, 다우노루비신, 독소루비신(Adriamycin), 이다루비신 및 마누마이신(예를 들어, 마누마이신 A, C, D, E 및 G 및 그 유도체; 예를 들어 미국 특허 제 5,444,087 호 참조) 등이 있으나, 이에 국한되는 것은 아니다.
- [0050] 8. 유사분열 억제제: 유사분열 억제제는 유사분열을 억제하거나, 세포의 재생산에 필요한 단백질 합성을 방해하는 효소를 억제하는 화합물(예를 들어, 투불린 결합 화합물)이다. 유사분열 억제제의 예로는 파클리탁셀 및 도세탁셀과 같은 타산계, 에포틸론, 에토포사이드, 빈블라스틴, 빈크리스틴 및 비노렐빈 등이 있다.
- [0051] 9. 방사선 요법: 방사선 요법은 광선과 같이 외부 공급원으로부터 방출되거나 작은 방사능원(radioactive source)의 이식에 의해 방출되는 X-선 또는 감마선을 포함하나, 이에 국한되는 것은 아니다.
- [0052] 10. 토포이소머라제 I 억제제: 토포이소머라제 I 억제제는 토포이소머라제 활성을 방해함으로써 DNA 복제를 방해하는 물질이다. 이러한 물질로는 CPT-11 및 토포테칸이 있으나, 이에 국한되는 것은 아니다.
- [0053] 11. 호르몬 요법제: 호르몬 요법은 타모시펜과 같은 항에스트로겐, 루프론과 같은 GNRH 작용제, 및 메게이스와 같은 프로게스테론 약제 등이 있으나, 이에 국한되는 것은 아니다.
- [0054] 다양한 매커니즘을 통해 항암 작용을 하는 다른 종류의 항암제도 당연히 본 발명의 gp96 면역화 및 방법에 적용될 수 있다. 이러한 추가적인 항암제의 예로는 로이코보린, 키나제 억제제(예를 들어, 이레사 및 플라보피리돌), 종래의 화학치료제 유사체(예를 들어, 타산 유사체 및 에포틸론 유사체), 혈관신생억제제(예를 들어, 매트릭스 메탈로프로테이나제 억제제), 및 다른 VEGF 억제제(예를 들어, ZD6474 및 SU6668) 등이 있다. 타그레틴(Targretin)과 같은 레티노이드도 또한 본 발명의 gp96 면역화 및 방법에 사용될 수 있다. 또한 파메실(famesyl) 트랜스퍼라제 활성을 방해하는 신호전달 억제제 및 화학요법제 내성을 가진 조절자(예를 들어, 발스포다(Valspodar))도 사용될 수 있다. C225와 같은 모노클론 항체 및 항-VEGF 항체도 또한 사용될 수 있다.
- [0055] **암의 종류**
- [0056] "종양"이라는 용어는 양성(예를 들어, 전이를 유발하지 않고 주변 정상 조직을 파괴하는 종양) 또는 악성/암(예를 들어, 주변 조직을 침입하고, 일반적으로 전이를 유발할 수 있으며, 제거 시술 후에도 재발될 수 있고, 적절한 치료가 이루어지지 않으면 숙주를 죽음에 이르게 하는 종양)일 수 있는 신생물적 증식(neoplastic growth)을 의미하는 것으로 사용된다.(Steadman's Medical Dictionary, 26th Ed, Williams & Wilkins, Baltimore, MD(1995) 참조). 본 명세서에서 사용되는 "종양", "종양 증식" 또는 "종양 조직"이라는 용어는 서로 바꿔 사용할 수 있으며, 제어할 수 없이 계속 진행되는 세포 분열에 의한 조직의 비정상적인 증식으로 생리적 기능을 전혀 할 수 없는 상태를 의미한다.
- [0057] 고형 종양은 악성(예를 들어, 전이하는 경향이 있으며 생명을 위협하는 종양) 또는 양성일 수 있다. 본 발명의 방법에 따라 치료 또는 예방될 수 있는 고형 종양의 예로는 육종 및 암종, 이에 국한되는 것은 아니지만, 예를 들어 섬유육종, 점액육종, 지방육종, 연골육종, 골육종, 척삭종(chordoma), 혈관육종, 내피세포종, 림프관종, 림프관내피세포종, 활막종, 중피종(mesothelioma), 유잉종양(Ewing tumor), 평활근육종, 횡문근육종, 대장선암, 대장암, 위암, 췌장암, 유방암, 난소암, 난관암, 원발성 복막 암종, 전립선암, 편평세포암종, 기저세포암, 선암, 땀샘선암종, 피지선암종, 유두상 암종, 유두상 선암, 췌장낭선암, 수질암종, 기관지암, 신세포암, 간암, 간 전이, 담관암, 용모상피암, 고환종, 배아암, 갑상선암, 역형성 갑상선암, 윌름스 종양(Wilms' tumor), 자궁

경부암, 정소암, 소세포 폐암 및 비소세포 폐암과 같은 폐암, 방광암, 상피세포암, 신경교종, 성상세포종, 수아 세포종, 두개인두종(craniopharyngioma), 뇌실막세포종, 송과체종, 혈관모세포종, 청신경초종, 뿔지교종(oligodendroglioma), 수막종, 흑색종, 신경모세포종 및 망막세포종 등이 있다.

[0058] 또한, 비정상적 증식 변화(예를 들어, 화생(metaplasias) 및 이형성증(dysplasias))를 포함하는 종양은 목(경부), 식도 및 폐와 같은 상피 조직에서 본 발명의 gp96 면역화 및 방법을 이용하여 치료 또는 예방될 수 있다. 따라서, 본 발명은 종양 또는 암으로 진행중인 것으로 의심되거나 밝혀진 상태, 특히 과다증식증(hyperplasia), 화생, 또는 특히 이형성증을 포함하는 비종양성 세포 증식이 발생하는 상태를 치료하는 방법을 제공한다(이러한 비정상적 증식 상태에 관해서는 Robbins and Angell, 1976, Basic Pathology, 2d Ed., W.B. Saunders Co., Philadelphia, pp.68-79 참조). 과다증식은 제어될 수 있는 세포 증식의 형태로서, 조직 또는 기관 내에서 세포수가 증가하는 것으로, 구조 또는 기능에 있어서 큰 변화는 생기지 않는다. 예를 들어, 자궁내막 증식증은 종종 자궁내막암으로 발전한다. 화생은 성인 또는 완전분화 세포의 한 형태가 성인 세포의 다른 형태로 치환되는, 제어될 수 있는 세포 증식의 형태이다. 화생은 상피 또는 결합 조직 세포에서 발생할 수 있다. 비정형 화생은 다소 무질서한 상피 화생을 포함한다. 이형성증은 흔히 암의 전조 상태로서, 주로 상피세포에서 나타난다. 이는 비종양성 세포 증식의 가장 무질서한 형태이며, 개체의 세포 균일성 및 세포의 조형 방향성의 손상을 포함한다. 이형성증 세포는 종종 비정상적으로 크고, 염색정도가 강한 핵을 가지며, 다형태성을 발휘한다. 이형성증은 만성 자극 또는 염증이 존재하는 부위에서 특징적으로 발생하며, 흔히 경부, 호흡기도, 구강, 및 담낭에서 발견된다. 이러한 이상증상에 관해서는 Fisherman et al., 1985, Medicine, 2d Ed., J.B.Lippincott Co., Philadelphia 참조.

[0059] 본 발명의 방법에 따라 치료 또는 예방될 수 있는 양성 종양의 다른 예를 들면, 특히 두개내 부위(intracranial site)의 동정맥(AV) 기형 및 글수종이 있다.

[0060] 몇몇 실시예에 따르면, 본 방법은 고형 종양 증식(예를 들어, 유방, 전립선, 흑색종, 신장, 대장, 경부 종양 증식) 및/또는 전이를 제어하기 위해 필요로 하는 대상에 본 발명의 화합물을 유효량으로 투여하는 단계를 포함한다. 몇몇 실시예에서, 대상은 포유동물이다. 몇몇 실시예에서, 포유동물은 인간이다.

[0061] 본 명세서에서 사용되는 "유효량"이라는 용어는 암으로 고통받는 동물, 바람직하게는 인간에게 바람직한 항암 효과 또는 항종양 효과를 제공하는데 충분한 양을 의미한다. 바람직한 항종양 효과는 종양 증식의 조절(예를 들어, 종양 증식 지연), 종양 크기 또는 전이 조절, 특정 항암제에 수반되는 부작용 및 독성의 감소, 암의 임상적 장애 또는 증상 완화 또는 최소화, 이러한 치료 부재시 예측되는 기간이상으로 대상의 수명 연장, 및 투여 전에 어떠한 종양 생성도 없는 동물의 종양 증식 예방(예를 들어, 예방적 투여) 등을 포함하나, 이에 국한되는 것은 아니다.

[0062] 본 명세서에서 사용되는 "조절한다", "조절하는", 또는 "조절"이라는 용어는 특정 과정이 발생하는 속도의 변화, 특정 과정의 억제, 특정 과정의 역전, 및/또는 특정 과정 개시의 억제를 의미한다. 따라서, 특정 과정이 종양 증식 또는 전이인 경우, "조절"이라는 용어는, 이에 국한되는 것은 아니지만, 종양 증식 및/또는 전이가 발생하는 속도의 감소; 종양 증식 및/또는 전이의 억제; 종양 증식 및/또는 전이의 전환(종양 수축 및/또는 제거); 및/또는 종양 증식 및/또는 전이의 억제를 포함하는 의미이다.

[0063] 본 명세서에서 사용되는 "상승 효과"라는 용어는 두 약물을 함께 사용함으로써 생기는 단순 더하기보다 큰 항암 효과로서, 약물을 각각 단독으로 투여시에 생기는 효과를 단순히 합한 것 그 이상의 효과를 의미한다. 두 약물 사이의 상승 효과의 측정법 중 하나는 Chou and Talalay의 조합 인덱스(CI)법(Chang et al., Cancer Res. 45:2434-2439, (1985) 참조)이며, 이는 중앙값 효과 원리를 기초로 한다. 이 방법은 세포독성 정도를 달리해서 두 약물 사이의 상승효과, 부가 또는 길항의 정도를 계산한다. CI 값이 1보다 작으면, 두 약물 사이에 상승효과가 있다. CI 값이 1이면, 더하기 효과는 있지만 상승효과는 없다. CI 값이 1보다 크면, 두 약물 사이에 길항효과가 있다. CI값이 작을수록, 상승효과는 증가한다. 또 다른 상승효과 측정법은 분할 저해 농도(FIC)이다. 이 분할 저해 농도 값은 병용시의 약물 작용의 IC₅₀을 단독 약물 작용의 IC₅₀의 합수로서 표시함으로써 결정된다. 상호작용하는 두 약물에 대하여, 각 약물의 FIC 값의 합이 상승작용의 척도를 나타낸다. FIC 값이 1보다 작으면, 두 약물 사이에 상승효과가 있다. FIC 값이 1이면, 더하기 효과가 있다는 것을 의미한다. FIC 값이 작을수록, 상승작용 효과는 증가한다.

[0064] 본 명세서에서 "항암제"라는 용어는 종양 증식 또는 전이를 조절할 수 있는 화학 화합물 또는 전자기적 방사선(특히, X-선)을 포함하는 의미이다. gp96 폴리펩티드의 분비형을 함유하는 항암제의 사용에 관한 언급에서, 이 용어는 gp96 폴리펩티드의 분비형과 다른 물질을 의미한다. 별도의 설명이 없는 한, 이 용어는 1종 또는 그 이

상의 항암제를 포함할 수 있다. 1종 이상의 항암제가 사용되는 경우, gp96 폴리펩티드의 분비형의 상대적인 투여 시간은 바람직하게 시간에 따라 효과적인 종양 농도로 1종 또는 그 이상의 항암제를 제공하도록 선택될 수 있다.

[0065] 본 명세서에서 사용되는 단수 형태는 별도의 설명이 없는 한, 복수 형태도 포함하는 의미이다. 본 명세서에서 "또는"이라는 말은 "이거나/또는"의 "배제"의 의미가 아니라, "및/또는"의 "포함"의 의미로 사용된다. 본 발명의 명세서 및 청구범위에서, 단수 형태는 별도로 설명하지 않는 한, 복수 대상을 포함한다.

[0066] 본 명세서에서 사용되는 "약"이라는 용어는 대략, 대충, 그 정도의 의미이다. "약"이라는 용어가 숫자 범위와 관련해서 사용되는 경우, 제시된 수치 이상과 이하로 그 경계를 확장시켜 범위가 조정된다. 일반적으로, "약"이라는 용어는 제시된 수치 이상 및 이하로 약 20%의 편차를 갖도록 수치를 조정하기 위해 사용된다. 본 명세서에 있어서, 전환 어구 또는 청구범위에서 사용되는 "함유한다" 또는 "함유하는"이라는 용어는 개방형 의미를 갖는 말로 해석된다. 즉, 이 용어는 "적어도 가진다" 또는 "적어도 포함한다"라는 어구와 동의어로 사용된다. 공정에 관해서 사용되는 경우, "함유하는"이라는 용어는 그 공정이 적어도 제시된 단계를 포함하며, 또한 추가적 단계를 포함할 수 있다는 것을 의미한다. 화합물 또는 조성물에 관해서 사용되는 경우, "함유하는"이라는 용어는 화합물 또는 조성물이 적어도 제시된 부분 또는 성분을 포함하며, 또한 추가적 부분 또는 성분을 함유할 수 있다는 것을 의미한다.

[0067] **다른 용어정의**

[0068] 본 발명의 조성물 및 방법은 종양에 대한 면역반응을 자극시키는데 유용하다. 이러한 면역반응은 종양과 관련한 징후 또는 증상을 치료 또는 완화하는데 효과적이다. 이러한 면역반응은 폐암과 관련한 징후 또는 증상을 치료 또는 완화하는데 효과적이다. 본 명세서에서 "치료"라는 용어는 본 발명에 따라 치료되지 않은 개체의 증상과 비교했을 때, 본 발명의 화합물을 투여한 개체의 증상을 감소, 예방 및/또는 역전시킨다는 의미로 사용된다. 개업 의사는 전문적 개업의사(내과의사 또는 수의사)가 본 명세서에 기술된 조성물 및 방법을 사용하면서 계속적인 임상 평가를 병행함으로써 후속 치료를 결정할 수 있다는 것을 인지할 것이다. 따라서, 개업 의사는 치료를 진행하면서, 표준 방법에 따른 폐암 치료에 있어서 개선사항을 평가할 것이다. 이러한 평가는 특정 치료의 사용량을 증가, 감소 또는 유지할 것인가 여부, 투여 방식 등을 결정하는데 도움 및 정보를 제공할 것이다.

[0069] 따라서, 본 발명의 방법은 예를 들어 암을 포함한 종양을 치료하는데 사용될 수 있다. 본 발명의 방법은 예를 들어 더 이상의 종양 증식을 방지하거나, 종양 증식을 지연시키거나 종양 퇴화를 유도함으로써 종양 증식을 억제하는데 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명의 방법은 예를 들어 폐암과 같은 암을 치료하는데 사용될 수 있다. 여기서 이해해야 할 점은 본 발명의 화합물의 투여 대상은 특정한 외상성 상태를 갖지 않아도 된다는 것이다. 실제로, 본 발명의 조성물은 어떠한 증상(예를 들어, 암이 진정되고 있는 환자)이 진행되기 전에 예방적 차원에서 투여될 수 있다. 본 명세서에서 "치료적" 및 "치료학적"이라는 용어 및 대체 용어는 치료적, 완화적 뿐만 아니라 예방적 용도를 포함하는 의미로 사용된다. 따라서, 본 명세서에서 "증상을 치료 또는 완화하는"이라는 용어는 본 발명의 투여를 받지 않은 대상의 증상과 비교할 때, 본 발명의 조성물을 치료학적 유효량으로 투여받은 대상의 증상을 감소, 예방 및/또는 역전시키는 것을 의미한다.

[0070] 본 명세서에서, "치료학적 유효량"이라는 용어는 원하는 치료 효과를 달성하는데 효과적인 사용량을 의미한다. 따라서, 당해 분야 숙련자는 1종 이상의 본 발명의 조성물을 미조정(fine tuning) 및/또는 투여하거나(예를 들어, 2종의 서로 다른 유전자변형 종양 세포의 동반 투여), 치료효과를 증진시키기 위해(예를 들어, 상승효과) 본 발명의 조성물을 다른 화합물과 함께 투여함으로써, 본 발명의 조성물의 치료학적 유효량을 낮추거나 증가시킬 수 있다는 것을 인지할 것이다. 그러므로, 본 발명은 소정의 포유동물에 특이적인 특정 위급 상태에 맞는 투여/치료 방법을 제공한다. 후술하는 실시예에서 설명하는 바와 같이, 치료학적 유효량은 예를 들어 경험적으로 처음에는 상대적으로 적은 양으로 시작해서 치료에 유익한 효과의 평가를 병행하면서 단계적으로 양을 증가시킴으로써 쉽게 결정될 수 있다. 따라서, 본 발명의 방법은 종양 환자의 치료를 위해, 단독으로 사용될 수도 있고, 다른 널리 알려진 종양 치료법과 병행해서 사용될 수도 있다. 당해 분야의 숙련자는 예를 들어 폐암 환자의 생존기간 연장 및/또는 폐암 환자의 생활의 질 향상에 본 발명의 방법이 유리하게 사용된다는 점을 쉽게 이해할 것이다.

[0071] 본 명세서에서 기술하는 백신접종 방법은 비면역원성 종양(nonimmunogenic tumor)을 가진 환자의 면역반응을 자극시키는데 효과적인 수단일 수 있다.

[0072] 본 명세서에서 사용되는 기술 용어 및 과학 용어는 별도로 정의되지 않는 한, 본 발명이 속한 분야에 숙련자가

통상적으로 이해할 수 있는 의미를 갖는다.

- [0073] 본 발명의 방법은 본 발명의 방법의 이점을 경험할 수 있는 모든 대상에 사용하기 위한 것이다. 따라서, 본 발명에 의하면, "대상", "환자" 뿐만 아니라 "개체"(바뀌 사용될 수 있음)는 인간 뿐만 아니라 비인간 대상, 특히 가축 동물을 포함한다.
- [0074] 본 명세서에서 사용되는 "동종이계 세포"는 이 세포가 투여되는 개체로부터 유도되지 않는, 즉 개체와 다른 유전적 구성을 가진 세포를 의미한다. 동종이계 세포는 일반적으로 이 세포가 투여되는 개체와 동일한 종으로부터 얻어진다. 예를 들어, 본 명세서에 기술한 바와 같이, 암 환자와 같은 인간 환자에 투여하는 경우, 동종이계 세포는 인간 세포일 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 "동종이계 종양 세포"는 동종이계 세포가 투여되는 개체로부터 유도되지 않는 종양 세포를 의미한다.
- [0075] 일반적으로, 동종이계 종양 세포는 이 세포가 투여되는 개체에서 종양에 대한 면역반응을 자극시킬 수 있는 1종 이상의 종양 항원을 발현한다. 본 명세서에서 사용되는 "동종이계 암세포" 예를 들어 폐암 세포는 동종이계 세포가 투여되는 개체로부터 유도되지 않는 암세포를 의미한다. 일반적으로, 동종이계 암세포는 이 세포가 투여되는 개체에서 암(예를 들어 폐암)에 대한 면역반응을 자극시킬 수 있는 1종 이상의 종양 항원을 발현한다.
- [0076] 본 명세서에서 사용되는 "유전자변형 세포"는 예를 들어 트랜스펙션 또는 형질도입(transduction)에 의해 외인성 핵산을 발현하도록 유전적으로 변형된 세포를 의미한다.
- [0077] 본 명세서에서 기술한 바와 같이, 전세포 백신은 현재까지 양호한 임상 결과를 가지기 때문에 동종이계 전세포 백신이 선택될 수 있다. 동종이계 세포를 기초로 하는 백신은 종양 항원이 서로 다른 환자의 종양 내에서 공유되며 환자의 항원 제시 세포에 의해 항원이 교차 제시될 수 있다는 가정하에, 자가조직 백신을 대신하는 우수한 대체물을 제공한다. Fong, et al., Annu. Rev. Immunol. 18: 245-273 (2000); Boon, et al., Annu. Rev. Immunol. 12: 337-365(1994).
- [0078] gp96 폴리펩티드의 분비형을 발현하도록 유전적으로 변형된 종양 세포를 함유하는 본 발명의 조성물은 면역화에 유용한 잘 알려진 성분을 함유함으로써 백신에 유용한 생리학적으로 허용가능한 운반체와 함께 조합하여 사용될 수 있다. 생리학적인 운반체의 성분은 백신 내에 투여되는 항원에 대한 면역반응을 촉진 또는 증진시키기 위한 물질이다. 본 조성물은 바람직한 pH 범위를 유지하기 위한 완충액, 염, 또는 항원에 대한 면역반응을 자극시키기 위한 조성물 내에서 대상에 항원을 제시하는 다른 성분을 함유할 수 있다. 생리학적으로 허용가능한 운반체는 또한 항원에 대한 면역반응을 증진시키는 1종 이상의 보조제를 함유할 수 있다. 본 조성물은 피하로, 근육내로, 피내로, 또는 면역화에 허용가능한 어떠한 방식으로든 투여될 수 있다.
- [0079] 보조제는 gp96 폴리펩티드의 분비형을 발현하도록 유전적으로 변형된 종양 세포와 같은 면역원성 물질(immunogenic agent)에 첨가되면, 그 혼합물에 노출시 수령자인 숙주 내에서 상기 면역원성 물질에 대한 면역반응을 비특이적으로 증진 또는 가능하게 하는 물질을 의미한다. 보조제는 예를 들어, 수중유형 에멀전(oil-in-water emulsion), 유중수형 에멀전, 알룸(알루미늄 염), 리포솜, 및 폴리스티렌, 전분, 폴리포스파젠 및 폴리락티드/폴리글리콜리드와 같은 미세입자를 포함할 수 있다.
- [0080] 또한 보조제는 예를 들어, 스쿠알렌 혼합체(SAF-I), 무라밀 펩티드, 사포닌 유도체, 마이코박테리아 세포벽 제제, 모노포스포릴 리피드 A, 마이콜산(mycolic acid) 유도체, 비이온 블록 공중합체 계면활성제, Quil A, 콜레라 독소 B 서브유닛, 폴리포스파젠 및 그 유도체, Takahashi et al., Nature 344: 873-875 (1990)에 의해 기술된 바와 같은 면역증강 복합체(ISCOMs) 등을 포함할 수 있다. 수의과 용도 및 동물에서의 항체 형성 용도의 경우, 프로인트 어쥬번트(Freund's adjuvant)(완전 및 불완전 둘다)의 미토겐 성분이 사용될 수 있다. 인간의 경우, 불완전 프로인트 어쥬번트(IFA)가 유용한 보조제이다. 다양한 적합한 보조제가 당해 분야에 널리 알려져 있다(예를 들어, Warren and Cheang CRC Critical Reviews in Immunology 8: 83 (1998); Allison and Byars, In Vaccines: New Approaches to Immunological Problems, Ellis, ed., Butterworth-Heinemann, Boston (1992) 참조). 추가적인 보조제는 예를 들어, 결핵 백신(Bacille Calmette-Guérin: BCG), DETOX(마이코박테리움 플레이(mycobacterium phlei)의 세포벽 골격성분(CWS)과 살모넬라 미네소타 유래의 모노포스포릴 리피드 A(MPL)를 함유) 등을 포함할 수 있다(예를 들어, Hoover et al., J.Clin.Oncol., 11: 390 (1993); Woodlock et al., J.Immunotherapy 22: 251-259 (1999) 참조).
- [0081] 본 명세서에 기술되는 본 발명의 조성물 및 방법은 종양 환자를 치료하는데 효과적이다. 특정 실시예는 폐암을 예로 들어 설명하지만, 적합한 동종이계 세포를 이용하여 암을 포함한 다른 종류의 종양에 유사한 방법을 사용할 수 있다는 점을 이해해할 것이다.

- [0082] 본 발명의 다양한 실시예의 기능에 실질적으로 영향을 주지 않는 변경을 가하는 것도 본 발명의 범위 내에 속한다는 점을 알아야 한다. 따라서, 다음의 실시예는 본 발명을 설명하기 위한 것으로, 본 발명을 제한하기 위한 것은 아니다. 본 발명은 특정 실시예를 통해 상세하게 기술되고 있으며, 본 발명의 취지 및 범위를 벗어나지 않는 한도 내에서 본 발명에 다양한 변경 및 수정을 가할 수 있다는 점이 당해 분야의 일반 숙련자에게는 명백할 것이다. 따라서, 예를 들어 당해 분야의 숙련자는 일상적인 수준이상의 실험을 수행하지 않고, 본 명세서에 기술된 특정 물질 및 절차와 동일한 다수의 동등물을 인식 또는 확인할 수 있을 것이다. 이러한 동등물은 본 발명의 범위 내에 속하는 것으로 간주되며, 특허청구 범위에 포함된다.
- [0083] **실시예 1: 종양 분비 열충격 융합 단백질은 거부를 위한 CD8 세포를 유도해 낸다.**
- [0084] 소포체에 존재하는 열충격 단백질 gp96은 MHC class I 분자에 의한 제시에 대한 경로에서 종양 항원으로부터 유도되는 것을 포함한 펩티드의 사파론으로 작용한다.
- [0085] gp96의 소포체 보유 시그널을 쥐 IgG1의 Fc 부분으로 대체함으로써 gp96의 분비형인 gp96-Ig를 생성하였다. gp96-Ig를 분비하는 종양 세포는 생체 내에서 종양생성능이 저하되고 면역원성이 증가하였으며, 초기 증식 후에 거부되었다. 종양거부는 프라이밍 단계 및 효과 단계에서 CD8 T세포를 필요로 한다. 두 단계 중 어느 쪽 단계에서의 거부에도 CD4 T세포는 필요하지 않았다. 생체 내에서 대식세포를 불활성화시키는 것으로 알려진 화합물인 카라기난은 CD8가 매개하는 종양 거부를 감소시키지 않았다. 따라서, gp96-Ig를 분비하는 종양 세포로 면역화하면, CD4를 필요로 하거나 대식세포의 도움없이, 효과적인 종양-거부 CD8 CTL이 생성된다. 이와 대조적으로, 정제된 종양-유도 gp96으로 또는 방사선처리된 종양세포로 면역화하는 데에는 두가지 요소가 다 필요하다.
- [0086] gp96의 분비형인 gp96-Ig를 발전시키고 종양 모델로 테스트하였다. gp96-Ig에 대한 cDNA를 갖는 종양 세포를 트랜스펙션함으로써 gp96-Ig 분비가 이루어졌다. 본 명세서에 도시된 바와 같이, gp96-Ig를 분비하는 종양 세포는 CD8 세포에 전적으로 의존하여 생체 내에서 강력한 면역화 및 종양 거부를 유발하였다.
- [0087] 세포계: 모든 세포계는 American Type Culture Collection(Manassas, VA)로부터 입수되었으며, 10% FCS를 함유하는 배양액 내에서 배양되었다. 인간 소세포 폐암(SCLC) 세포계(SCLC-2 및 SCLC-7)는 Savaraj et al., Am. J. Clin. Oncol. 20: 398에 기술된 바와 같이 확립되었다. 발현 벡터 내로 클론화된 닭 OVA인 apc-NEO-OVA는 Dr. M. Bevan(Seattle, WA)에 의해 적절하게 제공되며, 이것은 루이스 폐암종(LLC)을 트랜스펙션하는데 사용되었다.
- [0088] gp96-Ig의 구축: gp96-Ig 융합 단백질을 생성하기 위해, KDEL 배열을 삭제하고 쥐의 힌지 CH2 및 CH3 도메인으로 대체하였다. GeneAmp RNA PCR Kit(Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT)를 이용하여 주르카트 DNA(Jurkat DN A)로부터 이중가닥 cDNA를 제조하였으며 이를 PCR에 의해 증폭시켰다. PCR 프라이머는 5'-ATTACTCGAGGGCCGACGCCATGAGGG-3' 및 5'-GCCCGATCCTTCAGTCTAGATTCCTTGG-3'이었다. PCR 프라이머는 XhoI 부위(전방향 프라이머) 및 BamHI 부위(역방향 프라이머)를 함유하였다. gp96-Ig을 진핵세포 발현 벡터인 pBCMGSNeo 및 pBCMGHis의 XhoI 및 BamHI 부위 내로 삽입시키고, 이것을 SCLC-2, SCLC-7, B16F10, MC57, LLC NIH3T3, EL4, E.G7 및 P815 내에 트랜스펙션하였다. 1 mg/ml의 G418 또는 2.5 ~ 10mM의 L-히스티딘올(Sigma, St. Louis, MO)로 트랜스펙션된 세포를 선별하였다. J Immunol. 1999 Nov 15; 163(10):5178-82 및 거기서 인용된 참고문헌 참조.
- [0089] ELISA: 이 실험은 Ig 태그에 대한 항체를 이용하여 수행되었다. gp96-Ig-생성 세포를 10% FCS를 함유하는 AIMV 또는 IMDM 속에서 10^6 /ml의 양으로 플레이트시키고, 상이한 시점에서 배양 상청액을 수확하였다. gp96-Ig의 세포내 발현에 대한 분석을 위해, 세포를 3회 동결-해동 사이클에 의해 용해시키고, 60분간 $13,000 \times g$ 으로 원심분리하였다.
- [0090] gp96-Ig 융합 단백질의 정제: 표준 방법을 이용하여 단백질 A 컬럼 상에서 친화성 크로마토그래피(affinity chromatography)에 의해 gp96-Ig를 정제하였다(Bio-Rad, Hercules, CA). Micro BCA 단백질 시약 키트(Pierce, Rockford, IL)에 의해 gp96-Ig의 농도를 측정하였다. 표준 방법을 이용하여 SDS-PAGE 및 웨스턴 블로팅을 수행하였다.
- [0091] FACS 분석: gp96-Ig-트랜스펙션된 SCLC의 막 염색을 위해서, 대조용으로서 goat anti-mouse IgG-FITC 또는 goat anti-rabbit IgG-FITC로 4°C에서 15분간 세포를 염색한 다음, 이것을 Becton Dickinson FACScan 유세포분석기(San Diego, CA)에 의해 분석하였다. 세포내 염색을 위해, 세포를 4% 파라포름알데히드로 고정시키고, 1% 사포닌으로 투과시킨 다음, 4°C에서 15분간 goat anti-mouse IgG-FITC, goat anti-mouse IgG-PE, goat anti-rabbit IgG-FITC 또는 goat anti-syrian hamster IgG-FITC로 염색하고, 이것을 유세포분석기에 의해 분석하였

다.

- [0092] 종양 접종 및 백신접종: 생쥐의 옆구리 내로 200 μ l PBS 중의 생존 종양세포를 피하 주입함으로써 생체내의 종양 생성능을 측정하였다. 적어도 2개월 동안 매주 2회씩 종양의 크기를 2차원으로 측정하였다. 평균 종양 성장 크기가 직경 10mm를 초과했을 때, 생쥐는 사망하였다.
- [0093] 대조용으로서 10⁶ 생존 E.G7-gp96-Ig 또는 방사선처리된 E.G7(200 μ l PBS 중)을 생쥐의 우측 옆구리 내로 피하 주입함으로써 생쥐를 면역화시켰다. 2주 간격으로 2회 면역화하였다. 2주 후에, 제시된 수의 간 종양세포(200 μ l PBS 중의 EL4, E.G7, LLC 또는 LLC-OVA)를 생쥐의 좌측 옆구리에서 피하 주입함으로써 생쥐가 챌린지되도록 하였다.
- [0094] 생체 내에서 T 세포 또는 대식세포의 고갈: 200 μ l PBS 중의 GK1.5(항 CD4) 또는 2.43(항 CD8) 총 100 μ l을 복강 내 주사를 통해 투여하였다. FACS 분석에 의해 CD4 또는 CD8 세포의 고갈이 확인되었다. Ab 주입(데이터가 도시되어 있지 않음)후 2주 이상 동안 CD4 또는 CD8의 잔류량은 낮은 수준(>95% 제거)이었다. 대식세포의 기능 억제 위해, 200 μ l PBS 중의 1mg 카라기난(타입 II;Sigma)을 복강내 주입을 통해 투여하였다.
- [0095] 결과: 종양으로부터 정제된 ER에 상주하는 hsp gp96은 종양-특이적인 면역성을 제공할 수 있다. gp96의 C-말단 배열 KDEL은 ER 보유 시그널로서 역할을 한다. 이 배열을 제거함으로써 트랜스펙션된 종양 세포로부터 결합 펩티드와 함께 gp96의 분비가 이루어지고, 따라서 종양 세포가 더욱 면역성이 강해지므로 면역 시스템에 의해 종양 거부를 가능하게 한다.
- [0096] gp96의 KDEL 배열을 쥐의 IgG1(Fc 수용체 결합에 비효율적인 Ig 이소타입)의 힌지 CH2 및 CH3 도메인으로 대체하고 cDNA를 종양 세포 내로 트랜스펙션함으로써 배양 상청액 내로 gp96-Ig가 분비되었으며, 이는 ELISA에 의해 정량화되었다. SDS-PAGE 상의 단백질 A 정제 gp96-Ig는 융합 단백질의 예측 분자량 120kDa의 주 밴드 및 이미 비변형 gp96라고 보고되어 있는 2개의 고분자량의 부 밴드와 함께 마이그레이션시켰다. gp96에 특이적인 mAb를 이용한 웨스턴 블로팅에서 융합 단백질의 존재가 확인되었다. 주 밴드만이 염색되어 있다는 것은 부 밴드가 Ab에 의해 인식되지 않는 gp96의 글리코실화 변이체라는 것을 시사한다.
- [0097] gp96-Ig의 분비는 상청액 내에서 시간에 따라 직선형 축적으로 이루어졌다.세포내 gp96-Ig는 트랜스펙션된 세포의 용해물 내에서 소량으로 일정한 안정 상태의 수준으로 검출되었으며, 이는 gp96-Ig가 세포 내에서 축적되지 않는다는 것을 시사하는 것이다. 막은 손상되지 않은 트랜스펙션된 종양 세포의 FACS 분석 결과, 상술한 anti-mouse IgG로 염색되지 않았다. 이는 융합 단백질의 Ig 부분이 플라즈마 막의 외부 리플릿(leaflet)에 드러나지 않는다는 것을 시사한다. 이와 대조적으로, 막의 투과시에, gp96-Ig는 goat anti-mouse IgG Ab로 세포 내에서 검출된다. 그러나 대조용 goat anti-rabbit IgG에 의해서는 검출되지 않는다. gp96의 막통과 도메인(transmembrane domain)은 gp96-Ig의 분비를 방해하지 않으며 세포내 축적을 유도하지 않는다. 이 데이터는 막통과 도메인이 gp96의 막내의 정착에 사용되지 않으며, gp96가 통합 막 단백질이 아니라는 점을 제안하고 있는 종래의 보고와 일치한다. Altmeyer et al., 1996 Int. J. Cancer 69: 340
- [0098] gp96-Ig로 트랜스펙션된 모든 쥐 및 인간 세포계는 융합 단백질을 분비하였다. 모의 트랜스펙션된 세포는 gp96-Ig를 분비하지 않았다. E.G7은 동종동계 C57BL/6 생쥐에서 치명적 종양을 생성하는 EL4 림프종의 OVA 형질전환체이다. E.G7의 gp96-Ig 트랜스펙션은 E.G7-gp96-Ig이 E.G7(OVA 대리 항원-트랜스펙션된 종양) 이외에도 EL4 모종양에 대해 면역화시키는지 여부를 결정하게 한다.제 2 항원으로서는 gp96-Ig로 또는 OVA로 트랜스펙션된 LLC가 사용되는데, 그 이유는 E.G7와는 대조적으로, 낮은 면역성의 비조혈(nonhemopoietic) 종양이기 때문이다.
- [0099] 분비된 gp96-Ig는 종양생성능을 감소시키는 역할을 한다: gp96-Ig의 분비는 모의 트랜스펙션된 또는 트랜스펙션되지 않은 E.G7과 비교할 때, C57BL/6 생쥐의 E.G7의 종양생성능을 >100배까지 감소시킨다. 10 밀리온의 hsp-분비 종양 세포를 피하 주입하면, 접종된 생쥐의 단지 10%만이 종양을 유발한다(도 1A). 트랜스펙션된 EL4의 경우에도 gp96-Ig 분비에 의한 종양생성능의 감소가 유사한 수준으로 관측되었다(도시되지 않음). LLC에 의한 gp96-Ig 분비의 경우에는 종양생성능이 약 5배로, 더욱 감소되었다(도 1B).
- [0100] 면역원성 및 면역 기억 반응을 측정하기 위해서, 거부되는 양만큼의 방사선처리되지 않은 E.G7-gp96-Ig(10⁶)로 2주 간격에서 2회 C57BL/6 생쥐를 면역화하였다. 그 다음, 이 생쥐는 트랜스펙션되지 않거나 모의 트랜스펙션된 E.G7, 모 EL4, 트랜스펙션되지 않은 LLC 및 OVA-트랜스펙션된 LLC로 챌린지되었다(도 1C ~ F). 방사선처리된 E.G7으로 면역화된 생쥐 또는 백신접종하지 않은 생쥐를 대조군으로서 취하였다. E.G7-gp96-Ig로 면역화된 생쥐는 방사선처리된 세포로 백신접종된 생쥐 또는 면역화되지 않은 생쥐보다 E.G7에 의한 종양 챌린지에 10배 이상

더 건디어냈다(도 1C). 백신접종한 생쥐의 종양 증식은 매우 지연되었다. 면역화 효과는 EL4로 챌린지되었을 때 훨씬 더 명백하게 나타나는데, 이는 대조군과 비교했을 때 EL4 챌린지를 50배 정도 증가시킬 수 있다는 것을 보여준다(도 1D). 예상한 바와 같이, E.G7-gp96-Ig 면역화는 트랜스펙션되지 않은 또는 벡터-트랜스펙션된 LLC에 의한 챌린지로부터 보호하는 것은 아니다(도 1E). 그러나 OVA-트랜스펙션된 LLC가 챌린지로서 사용된 경우 보호가 약 3배 증가하는 것이 관측되었다(도 1F). E.G7-gp96-Ig로 면역화된 생쥐의 EL4 챌린지로부터의 강한 보호는 E.G7와 EL4이 공유하는 다수 종양 항원 때문일 수 있다. LLC-OVA에 의한 챌린지로부터의 약한 보호는 T 세포 인식용 OVA 대항원으로부터 유도되는 하나 또는 제한된 수의 에피토프(epitope)를 인식하는 T 세포에 의존한다.

[0101] 프라이밍 및 효과 단계에서 CD8 세포가 필요하다: EG7-gp96-Ig의 거부에 면역 메커니즘이 관여하는지에 대한 것은 생체 내에서 면역적격 세포의 제거/불활성에 의해 조사하였다. Meth A 종양-유도 gp96은 효과적인 면역화를 위해 CD4 세포, CD8 세포 및 대식세포를 필요로 하는 반면, 방사선처리된 Meth A 종양 세포로 면역화하는 경우, CD4 세포 및 CD8 세포는 필요로 하지만, 대식세포는 필요로 하지 않는다.

[0102] 프라이밍을 위해서, 1 밀리온의 방사선처리되지 않은 생존 E.G7-분비 gp96-Ig를 피하로 접종하였다. 이 양은 약 8mm의 평균직경이 될 때까지 성장한 후에 수축되고, 그 다음 거부되는 종양을 확립하기에 충분한 양이다. 종양 거부는 종양 접종2일 전에(도 2A), 또는 3일 후에(도시되지 않음) 항-CD8 Ab2.43으로 처리된 생쥐에서 차단된다. 항-CD4 Ab Gk1.5는 >14일 동안 CD4 세포를 완전히 제거했음에도 불구하고(도시되지 않음), 주입 시간에 상관없이 종양 거부에 영향을 주지 않았다(도 2A). CD4-결핍 생쥐는 E.G7-gp96-Ig를 거부할 수 있었다(도 2B). 이는 CD8 세포의 중요성을 입증하는 것이다. gp96-Ig를 분비하지 않는 E.G7은 처리되지 않은 생쥐 및 면역성이 없어진 생쥐에서 종양을 생성한다. 생체 내에서 대식세포를 불활성화시키는 것으로 알려진 카라기난은 종양 거부에 영향을 주지 못하였다.

[0103] 종양 거부의 효과 단계를 조사하기 위해서, 생존 E.G7-gp96-Ig로 14일 간격에서 2회 생쥐를 면역화하였다. 11일 후에(25일), 면역 세포를 제거하고, 3일 후에 생쥐는 트랜스펙션되지 않은 E.G7으로 챌린지되었다. 효과 단계에서는 CD8 세포만 필요하다. CD4 제거 또는 카라기난에 의한 대식세포 불활성화는 효과 단계에서 E.G7 거부에 영향을 주지 못하였다(도 2C).

[0104] gp96의 소포체 보유 시그널을 삭제하고 IgG1의 Fc 부분으로 대체하면 gp96-Ig가 분비되는데, 이는 IgG1 아워즈 사슬을 통해 이합체화(dimerization)되는 것으로 보인다. E.G7 분비 gp96은 특이적 면역성을 장기간 지속시킬 수 있으며, 이는 종양 펩티드의 샤페론으로서 작용한다는 것을 시사한다. 이와 대조적으로, 방사선처리된 또는 모의 트랜스펙션된 E.G7는 보호적 면역성을 제공하지 못한다. 코리네박테리움 파뮴(*corynebacterium parvum*)도 또한 E.G7 면역 보조제로서 역할을 하지 못하였다. 분비된 gp96-Ig는 대리 항원 OVA 및 다른 EL4항원 모두에 면역 특이성을 제공하지만, LLC-유도 종양 항원에 대해서는 교차면역화시키지 못한다.

[0105] 이 데이터는 분비되는 gp96-Ig와 관련있는 펩티드가 이동되어 MHC class I에 의해 제시되고 종양 거부를 유발하는 종양-특이적 CD8+ CTL 반응을 자극시킨다는 사실과 일치한다. CD8 반응은 CD4 도우미 비의존적인 것으로 생각되며 대식세포를 필요로 하지 않는다. 세포 요구물(cellular requirement)이 gp96-Ig 이합체화로 인한 것인지에 대해서는 알려지지 않았다.

[0106] 정제된 종양-유도 gp96-Ig와 종양-분비 gp96-Ig에 의한 면역 메커니즘을 비교해 보면 도움이 된다. Udon et al.(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 3077, 1994)은 면역화를 위해 Met A 종양 세포로부터 정제된 gp96을 이용하여, Met A 종양 세포의 종양 거부의 프라이밍 단계에서는 CD8 세포 및 대식세포의 필요성을, 효과 단계에서는 CD4 및 CD8 세포와 대식세포의 필요성을 보고하였다. 방사선처리된 Met A 종양으로 면역화하는 데에는 프라이밍 단계에서 CD4 세포가 필요하고, 효과 단계에서 CD4 및 CD8 세포가 필요하다. 방사선처리된 E.G7은 후속 챌린지에 대한 면역성을 형성하지 못한다. 종양-분비 gp96-Ig의 현저한 효과는 CD4 도우미없이 전적으로 CD8 세포에 의존한다. CD8 세포는 종양에 대한 CTL 반응의 프라이밍 단계 및 효과 단계에서 필요하다. 대식 세포는 필요하지 않은 것으로 추측된다. gp96-샤페론화 펩티드의 CD8으로의 제시에 있어서 수지상 세포 또는 다른 APC의 역할에 대해서는 알려져 있지 않으나, 가능성은 존재한다. 또한 gp96-Ig-분비 E.G7이 CD8 세포를 직접 자극시킨다는 것도 밝혀질 가능성이 있다.

[0107] **실시예 2: CD8 세포독성 T 임파구로의 항원 교차 제시를 증진시키기 위한 분자 및 세포 필요조건**

[0108] 본 실시예는 종양-분비 열충격 단백질 gp96-샤페론화 펩티드가 CD8 CTL의 항원 교차-프라이밍 효율성을 비샤페론화 단백질 단독의 교차-프라이밍 활성보다 수백만배까지 증진시킨다는 것을 입증한다. gp96은 비샤페론화 단백질에 의한 교차-프라이밍의 보조제로서 역할도 하지만, 이 작용에서 gp96은 펩티드 샤페론으로서보다는 1000

배 덜 활성화된 상태이다. 트랜스펙션된 종양 세포에 의한 gp96-Ig의 원위치에서의 분비는 수지상 세포 및 NK 세포를 gp96-Ig 방출 부위로 모집하여 활성화시키고 국소적으로 CD8 CTL 확장을 촉진시킨다. gp96이 매개하는 CD8 T 세포의 교차-프라이밍은 B7.1/7.2 공동자극을 필요로 하지만, 림프절-결핍 생쥐에서는 NKT 및 CD 세포의 부재하에 CD40L없이 방해받지 않고 진행된다. 림프절의 부재하에 gp96에 의한 CD8 CTL의 MHC I 교차-프라이밍은 gp96-Ig 방출 부위에서의 조직-기반으로 하는 국소적인 CTL 생성에 관한 신규한 메커니즘을 제공한다. 이 경로는 조직 손상 항원제에 대한 효과적인 방어를 위한 실질 조직에서 실효성이 있는 매우 중요하고 빠른 검출 및 신속한 반응 메커니즘을 구성할 수 있다.

[0109] 열충격 단백질은 APC에 의해 흡수되고 CD8 세포로 교차-제시될 수 있는 사페론 펩티드이다. 외인성 열충격 단백질(HSP)는 수지상 세포(DC)상의 CD91 및 LOX-1에 의해 활성적으로 잡혀있으며, CD8⁺ CTL에 교차-제시되어야 하는 MHC class I 경로로 사페론화 펩티드를 전달함으로써 펩티드에 특이적인 면역 반응을 유발한다. HSP-gp96에 의한 교차-프라이밍은 TLR2 및 TLR4 자극 및 CD8 CTL-편향된 반응을 유발하게 되는 DC 성숙과 관련이 있다.

[0110] gp96 분비 종양 세포로 면역화하면, CD4 세포에 비의존적으로 종양에 특이적이고 대리 항원에 특이적인 면역성이 생성된다. Oizumi et al., J Immunol. 2007 Aug 15; 179(4):2310-7. 본 실시예는 이러한 면역 방법을 이용하여 CD8 반응을 정량화함으로써, 림프절 및 CD4 세포에 비의존적으로 gp96 방출 부위에서 국소적으로 동종동계 CD8 교차-프라이밍을 이루는데 100조분의 1몰(femtomolar)의 gp96-사페론화 항원이면 충분하다는 것을 보여준다.

[0111] 생쥐: 야생형(wt) 및 B7.1, B7.2, B7.1/2, CD40L, 림포톡신 α (LTα), 및 CD4-결핍 생쥐(C57BL/6(B6) 백그라운드 내의)는 Jackson Laboratory로부터 입수하였다. B6.Jα281 생쥐(NKT 결핍, 새이름 Jα18 녹아웃(ko))은 Dr.Taniguchi(Chiba University, Chiba, Japan)의 승인하에 Dr.M. Lotze(University of Pittsburgh Medical Center, Pittsburgh, PA)에 의해 제공되었다. GFP-형질전환 생쥐는 제조자의 승인하에 입수하였다. C57BL/6 OT-1 생쥐는 Dr.M.Bevan(University of Washington School of Medicine, Seattle, WA)으로 입수하였다. 모든 생쥐는 항원과잉으로서 6 ~ 12주에서 사용되었다.

[0112] 세포계: Dr.M.Bevan에 의해 후하게 제공되는 OVA-트랜스펙션된 EL4 림프종 라인인 E.G7은 전술한 바와 같이 gp96-Ig를 함유하는 벡터 pCMG-His로 더 트랜스펙션하였다. NIH 3T3 세포는 pAC-neo-OVA(Dr.M.Bevan에 의해 후하게 제공됨) 중의 OVA로 및 gp96-Ig를 함유하는 pCMG-His로 트랜스펙션하였다.

[0113] 항체: 형광 항체는 BD Pharmingen 및 eBioscience로부터 구입하였다.

[0114] OT-1 세포의 정제 및 입양 전이: 자력분리기(magnetic separation)(>95% 순도; Miltenyi Biotec)를 이용하여 항-CD8에 의한 양성 선별법(positive selection)에 의해 GFP-마크 OT-1 세포를 정제하였다. 0.3ml PBS의 용량으로 C57BL/6 생쥐의 꼬리 정맥을 통해 1 밀리온의 GFP-OT-1 세포를 입양 전이시켰다.

[0115] 면역화: GFP-OT-1의 입양 전이 후 2일에, 0.5ml PBS의 용량으로 $2-4 \times 10^6$ 의 방사선처리되지 않은 EG7-gp96-Ig 세포 또는 대조용 EG7을 복강내로 주입하였다. 일부 실험에서, 생쥐는 PBS 내에 용해된 3T3-OVA-gp96-Ig, 3T3-OVA 또는 원래 OVA(Sigma-Aldrich)로 복강내 투여를 통해 면역화되었다.

[0116] OT-1의 생체외 Ag 교차-제시 및 교차-프라이밍: B6 야생형 생쥐 그룹을 2×10^6 의 3T3-OVA-gp96-Ig 또는 3T3-gp96-Ig로 복강내 투여를 통해 면역화시켰다. 3일 후에, 복막내 삼출물 세포(PEC)를 수집한 다음, 10^5 PEC를 200μl의 조직 배양액 속의 둥근바닥 96-well 미세적정 플레이트 내에서 48시간 및 72시간 동안 상이한 비율로 (5:1, 10:1, 100:1 및 1000:1) 정제된 미접촉 CFSE-라벨을 붙인 OT-1과 공배양시켰다. 또한, CFSE-라벨을 붙인 OT-1를 3T3, 3T3-OVA-gp96-Ig 및 3T3-gp96-Ig와 직접 공배양시켰다. 제시된 기간 후에, 세포를 수집하고, 항-CD8_{PE}로 염색하였다. LSR II 유세포분석기(BD Biosciences)에서 분석되는 바와 같이 CFSE 희석도에 의해 OT-1 확장을 측정하였다. 게이트 임과구 또는 총 CFSE+ 세포 중의 CFSE 희석도에 의해 세포 분열을 분석하였으며 이를 총 CFSE+ 세포에 대한 퍼센트로서 표현하였다.

[0117] BrdU 라벨링 및 분석: 면역화 수행에 있어서, 음용수 중의 BrdU(Sigma-Aldrich)(0.8mg/ml)를 생쥐에 투여하였다. 고정 및 투과 후에 BrdU(eBioscience) 염색에 의해 세포 샘플을 분석하였다.

[0118] CD4는 HSP gp96-펩티드에 의해 CD8 CTL에 Ag 교차 제시를 방해한다: gp96의 분비가능 형태인 gp96-Ig로 트랜스펙션된 종양 세포는 면역원성을 가지며 생쥐 내에서 종양 특이적인 면역을 유도한다. Yamazaki et al., J.Immunol. 163:5178-5182(1999). 종양 면역은 CD8 세포를 필요로 하지만, 면역 반응의 구심성 또는 원심성 팔

에서 CD4 세포에 비의존적이다.

- [0119] CD4 세포는 헬퍼 세포 및 조절 세포 활성을 발현시키기 때문에, 본 발명자는 이러한 상반되는 기능이 gp96에 의한 CD8 세포의 교차 프라이밍을 조절하였는지를 결정하는데 관심을 가졌다. 본 발명자는 EG7-gp96-Ig 또는 EG7 복강내 면역화에 대한 반응으로서의 CTL 확장을 정량화하기 위해서, 입양 전이된 K^{b-OVA} -특이적인 TCR-형질전환 CD8 세포를 사용하였다. E.G7는 OVA-트랜스펙션된 EL4 림프종이다. 이 시스템 내에서 OT-1 확장은 이미 gp96-사페론과 OVA 펩티드에 의존성을 보였으며, gp96-myc가 동일하게 활성화기 때문에 Ig-Fc-tag에 의해 영향을 받지 않았다. 중앙-분비 gp96-Ig 면역화 시스템은 또한 진성 중앙 항원에 대한 면역성을 생성한다. 그러나, OT-1 확장의 측정은 중앙 거부 측정보다 정확하고 신속한 정보를 제공한다.
- [0120] CD4 ko의 경우, 모든 CD4 기능(헬퍼 및 조절)이 제거되는 반면, CD40L ko의 경우, 주로 CD4 세포의 헬퍼 세포 기능이 손실된다. 그러므로, 본 발명자는 CD4 ko 및 CD40L ko 대 야생형 생쥐에서 EG7-gp96에 의해 분비되는 gp96-OVA에 대한 반응으로서 CT-I 확장을 비교하였다. 분석을 촉진하기 위해서, GFP-형질전환 생쥐로 OT-1 생쥐를 양육함으로써 OT-1 TCR-형질전환 세포를 또한 GFP-마킹하였다(GFP-OT-1). 야생형 생쥐와 비교했을 때, CD4 ko 생쥐의 CT-I 확장은 EG7-gp96-Ig에 대하여 100%까지 증가되었다. 이는 CD4 세포의 존재가 CD8 클론 확장을 방해한다는 것을 시사하는 것이다(도 3A). 이와 대조적으로, CD40L ko 생쥐에 있어서 CT-I 확장은 야생형 생쥐에서의 확장과 유사하다(도 3B). 이 데이터는 CD40L을 통해 매개되는 CD4 헬퍼 기능이 CD8 CTL에의 gp96-매개 항원 교차제시에 필요하지 않다는 것을 시사한다. 이와 대조적으로, CD4 ko에 존재하지 않는 $CD4^{+}$ T 조절 세포는 일반적으로 gp96-OVA에 의한 OT-1 교차-프라이밍을 하향-조절한다.
- [0121] gp96에 의한 CD8 교차-프라이밍은 B7.1 및 B7.2에 의존적이고 NKT 세포에 비의존적이다: 효과적인 T 세포 프라이밍은 DC 성숙 및 흔히 CD40 시그널을 통해 매개되는 공동자극 분자와 MHC의 상향-조절을 필요로 한다. 그러나, gp96에 의한 OT-1 프라이밍에는 명백하게 CD40L/CD40 축을 통한 CD4 도움이 필요하지 않다(도 3). gp96은 CD91, 그리고 TLR2 및 TLR4와 결합하며, 그림으로써 CD40에 비의존적으로 DC를 활성화시킬 수 있다. 본 발명자는 이러한 생체 내에서의 CD8 세포의 교차-프라이밍 메커니즘이 B7.1(CD80)와 B7.2(CD86) 공동자극에 의존적 인지를 결정하였다. B7.1 또는 B7.2 중 하나가 결핍된 생쥐(도 4A)는 야생형 생쥐의 약 50%의 효율성으로 gp96에 의한 OT-1의 교차-프라이밍을 공동자극시킬 수 있었다. 그러나, B7.1 및 B7.2 둘 다 완전히 없는 이중-결핍 생쥐(도 4B)에서는, gp96에 의한 OT-1의 교차-프라이밍이 완전히 파괴되었다.
- [0122] NKT 세포는 흔히 항종양 면역에 관여한다. $J_{\alpha 18}$ ko 생쥐는 CD1d-제한 불변성 NKT의 특징을 나타내는 불변성 TCR $v_{\alpha 14}$ 사슬을 생성시키지 못하기 때문에 NKT 세포가 부족하다. $J_{\alpha 18}$ ko 생쥐가 감소되지 않는 OT-1 확장을 유지하는 능력을 가진다(도 4C)는 것은 gp96에 의한 OT-1의 교차-프라이밍에 NKT 세포가 필수적이지 아니라는 것을 시사한다.
- [0123] gp96에 의한 Ag 교차제시는 림프절을 필요로 하지 않는다: 배수 림프절은 APC, CD4 헬퍼 세포, CD8 CTL 전구물질 및 NK 세포를 불러 모으며, 세포 상호작용을 촉진시키고 CTL 프라이밍 및 확장을 증진시킨다. gp96-매개로 하는 항원 교차-프라이밍은 CD4 헬퍼에 비의존적이기 때문에, 본 발명자는 OT-1 확장을 위한 배수 림프절의 필수요건에 의문을 제기하였다. LT_{α} -결핍 생쥐는 파이어소절(peyer's patch)을 포함하여 말초 및 장관막 림프절이 부족하며, 항바이러스 반응에서 손상된다. 그러나, gp96-OVA에 의한 OT-1 확장에 대해 분석하면, LT_{α} -결핍 생쥐는 야생형 생쥐와 비교했을 때 복강(PC) 내에서 거의 정상적인 OT-1 확장을 보여주었다(도 5A 및 B). 비장에서, GFP OT-1의 축적이 약 50%까지 감소되는데, 이는 림프절을 기반으로 하는 OT-1 클론 확장이 없다는 것을 반영하는 것이다. 이러한 조사 결과는 gp96에 의한 펩티드 교차-프라이밍에 림프절이 필요하지 않으며, gp96 방출 부위에서 국소적인 교차-프라이밍이 발생한다는 것을 시사한다.
- [0124] 림프절에 비의존적인 OT-1의 교차-프라이밍을 직접 테스트하기 위해, 본 발명자는 동종이계 3T3 세포, 3T3-OVA 세포, 또는 3T3-OVA-gp96-Ig 세포로 복강내 면역화한 후 3일에 B6 생쥐로부터 PEC를 분리하였다. 이 PEC를 다양한 비율로 CFSE-라벨을 붙인 OT-1과 혼합하고, 48시간 및 72시간 후에 CFSE 희석도를 측정하였다. 3T3-OVA-gp96-Ig를 주입한 생쥐로부터 분리된 PEC는 CFSE 희석에 의해 제시되는 바와 같이, 시험관 내에서 OT-1을 교차-프라이밍할 수 있다(도 5C, a ~ d). 이와 대조적으로, 3T3-gp96 또는 트랜스펙션되지 않은 3T3을 주입한 생쥐로부터 분리된 PEC는 OT-1 증식을 유발하지 못하였다(도 5 c, e, f). 이와 마찬가지로, 3T3-OVA-gp96-Ig 또는 3T3-gp96-Ig로 CFSE-라벨을 붙인 OT-1을 시험관 내에서 직접 배양한 경우 CFSE 희석을 유발하지 못하였다. 이 데이터는 복강 내의 림프절 부재하에 동종동계 CD8 세포에 gp96-OVA-유도 항원 교차제시의 모델을 제공한다.

- [0125] gp96은 그 방출 부위에 DC 및 NK 세포를 모집시키고 그 활성화를 촉진한다: 최소 수준의 교차-프라이밍은 APC 및 CD8 세포를 불러모으는 단계를 필요로 하는 반면, CD4 세포는 본 발명의 모델 시스템에 필요하지 않다. 본 발명자는 복강 내에서 gp96의 국소적 방출이 APC 및 OT-1의 국소 모집 및 활성화를 촉진하고, 그럼으로써 림프절의 필요성이 없게 되는지를 결정하였다.
- [0126] gp96-Ig 면역화에 의한 OT-1 확장은 4일 및 5일까지 최대이며, 복강 내에서 가장 잘 나타난다. 처음에 0에서부터 시작하여, 복강 내에서 4일 및 5일에 약 0.5밀리온의 OT-1이 축적되는데, 이는 모집된 CD8 세포의 60%까지를 의미한다. 강력한 OT-1 확장은 gp96-Ig 분비에 크게 의존하며(도 6), 다른 경우에서도 관측되는 바와 같이, E.G7에 대해서 최소 수준이다. 야생형 생쥐에서 gp96이 4일내에 CD8 세포를 교차-프라이밍할 수 있는 능력은 APC 및 다른 선천성 세포의 조기 활성화를 의미한다. gp96은 시험관 내에서 DC를 활성화 및 성숙시킬 수 있으며, gp96-사포론화 펩티드는 시험관 및 생체 내에서 DC 및 대식세포 상에 MHC I에 의해 교차 제시된다는 사실이 알려져 있다. Oizumi et al. J Immunol. 2007 Aug 15; 179(4):2310-7. 또한, gp96은 NK 세포를 활성화시킬 수 있다고 보고되어 있다. Oizumi et al. J Immunol. 2007 Aug 15; 179(4):2310-7. 비손상 OT-1 활성화가 LT_a ko 생쥐에서 이루어진다는 사실은 세포 모집 및 활성화가 gp96 방출 부위에서 국소적으로 이루어 진다는 것을 의미한다.
- [0127] EG7-gp96-Ig 또는 대조용으로서 EG7을 복강내 주입한 후에, 1 ~ 4일에 PEC를 수확하고 표현형 및 BrdU의 흡수에 의해 활성화에 대해 분석하였다. EG7-gp96-Ig에 의해 모집된 세포의 가장 큰 프랙션(약 80 ~ 90%)은 F4/80^{dim} 단핵세포/대식세포였다. 면역화 이전에 존재하는 복막내 대식세포는 F4/80^{bright}이며, EG7-gp96-Ig 주입 후에도 그 수가 변하지 않았다. CD11c⁺DC 및 NK1.1⁺NK 세포는 각각 처음 2일 이내에 PC로 모집된 세포의 약 5 ~ 10%를 차지하였다. B 세포 및 CD4 T 세포는 면역시작 3일에 복강내에서 숫자의 증가가 관찰되었으며, 4일 및 5일에 더 증가하였다(도시되지 않음). EG7와 비교했을 때, EG7-gp96-Ig의 복강내 주입은 처음 2일 이내에 PC내로 모집되는 총 세포수의 2배 수준이었다(도 7A). 이러한 효과는 ELISA에 의해 측정했을 때, 24시간 이내에 주입된 세포에 의해 적어도 60ng의 gp96-Ig가 분비되는 것을 필요로 하였다. Oizumi et al. J Immunol. 2007 Aug 15; 179(4):2310-7. 주입된 세포의 수에 의해 gp96-Ig이 보다 적은 양으로 분비된 경우에는, 세포 모집 및 CD8 교차-프라이밍 효과가 빠르게 점점 감소되었다. 이는 교차-프라이밍의 유발을 위한 민감성에 한계 농도가 존재한다는 것을 시사한다(데이터가 도시되지 않음). EG7에 의한 gp96-Ig 분비는 gp96-Ig를 분비하지 않는 EG7에 비해, 모집된 F4/80^{dim} 총 세포수의 2배 수준이었으며, 총 DC 및 NK 세포수의 3배 수준이었다(도 7B). 처음 2일 이내에 gp96에 의해 PC내로 모집되는 DC는 상당량의 BrdU를 포함하였는데, 이는 활성화되었다는 것을 시사한다. 이와 대조적으로, 배수 대동맥 주위 림프절, 장간막 림프절 및 비장로부터 분리된 DC는 BrdU에 음성을 나타내었다(도 8A). 이 조사 결과는 DC가 gp96-Ig 분비 부위에서 국소적으로 활성화 및 증식된다는 것을 강력하게 시사한다. 얼마 후에 림프절 및 비장에서, BrdU에 양성인 DC도 발견되었다. gp96을 분비하지 않는 EG7은 처음 2일 이내에 복강 내에서 DC에 의한 BrdU 흡수를 유발하지 않았다. 그러나, 흥미롭게도 4일에 EG7 모집 DC는 BrdU에 약한 양성을 나타내었는데(도 8A), 이는 EG7-gp96에 의해서는 초기 강한 활성화가 이루어지는 것과는 대조적으로, EG7에 의해서는 지연성 약한 활성화가 이루어진다는 것을 시사한다. 야생형 중앙 EG7에 의한 지연성 DC 활성화는 단지 최소의 CD8 확장에만 관련한다.
- [0128] EG7-gp96-Ig 그룹에서 2일까지 복강 내에 존재하는 CD8 세포는 상당한 BrdU 흡수를 보여주었으며, 이와 동시에 배수 림프절 및 비장 내의 CD8 세포는 BrdU에 음성을 나타내었다(도 8B). 이 조사 결과는 림프절 내에서 보다는 국소적인 복강내 CD8 증식과 일치한다. 4일까지, 복강내에서 CD8에 의해 gp96-의존성 BrdU 흡수가 강하게 나타났으며, 림프절 또는 비장내에서 보다 매우 높게 나타났다(도 8B).
- [0129] EG7 그룹이 아닌 gp96 그룹 내의 NK 세포는 CD69(도 8C) 및 2B4(도시되지 않음)에 의해 제시되는 바와 같이 4일까지 활성화되었다. NK 활성화는 CD69 상향-조절에 의해 측정했을 때, PEC에서만 나타났으며(도 8C), 국소적 활성화를 시사하는 림프절 또는 비장에서는 나타나지 않았다(데이터가 도시되지 않음).
- [0130] 이 데이터는 복강 내에서 gp96이 국소적 방출됨으로써 선천적 및 양자 면역 세포의 국소 모집 및 활성화를 유발하고 이로써 림프절 및 CD4 세포에 비의존적인 CD8 교차-프라이밍의 세포 메커니즘이 제공된다는 것을 입증한다. 이 교차-프라이밍 메커니즘은 복강의 특이적 해부학적 구조에 의존적이지 않다. 그 이유는 EG7-gp96-Ig 또는 3T3-OVA-gp96-Ig의 피하 투여가 OT-1 교차-프라이밍에 동일하게 효과적이기 때문이다(데이터가 도시되지 않음).

- [0131] gp96-샤페론 펩티드에 의한 매우 효과적인 CD8 CTL 교차-프라이밍: EG7과 EG7-gp96-Ig, 두 세포계는 거의 동일한 양의 OVA(약 80ng/24시간 $\times 10^6$ 세포)를 분비하지만, EG7과 비교했을 때, EG7-gp96-Ig에 의해 gp96-Ig를 분비하는 경우 OT-1 확장이 매우 증가된다. OT-1 확장이 동종이계 3T3-OVA 및 3T3-OVA-gp96-Ig에 대하여 비교될 때 OT-1 확장 차이가 유사한 것으로 보여진다. Oizumi et al. J Immunol. 2007 Aug 15; 179(4):2310-7. OVA-트랜스펙션된 세포로부터 분비된 gp96-Ig는 OVA 펩티드의 샤페론 역할을 하는 gp96(gp96-OVA)분자를 작은 프렉션(약 0.1% 또는 그 이하)으로 함유하며, OT-1 교차-프라이밍에 작용하는 것으로 생각된다. 그러나, 분비 gp96은 또한 DC의 모집 및 활성화를 위한 비특이적 보조제로서의 역할도 할 수 있으며, 이로써 OVA 단백질의 흡수 및 교차-프라이밍을 증진시킨다. 결국, gp96-Ig 및 OVA 단백질은 별개의 분자로서 분비되며 세포 외부에서 gp96-Ig-OVA 복합체를 형성하는 것이 가능하다. 이러한 가능성을 알아보기 위해서 다수의 실험을 행하였다.
- [0132] 우선, 본 발명자는 3T3-OVA, 3T3-OVA-gp96-Ig, 또는 EG7, EG7-gp96-Ig 및 순수 A 단백질의 복강내 주입 후에, 복강 및 비장에서의 OT-1 확장 효율성에 대한 사용량-의존적 특징을 비교하였다. OVA 및 gp96-Ig의 분비 속도는 각각 ELISA에 의해 시험관 내에서 측정되었으며, 24시간당 분비되는 나노그램으로서 표시되었다. 상이한 세포수로 주입하는데 있어서, 분비 OVA 및 gp96-Ig의 주입량 범위는 도 9에 도시된 바와 같이 수행되었다. 자극 후 4일에 OT-1 확장을 측정하였다. 24시간 동안 80 ~ 800ng의 OVA만을 분비하는 3T3-OVA 세포는 OT-1 확장을 유발하지 못하였다. 명백히, 이 양의 OVA는 동종이계 면역 시스템 활성화 하에서도 OT-1 교차-프라이밍을 유발하지 못한다. 이와 마찬가지로, OVA 만을 분비하는 동종이계 EG7 세포는 EG7 세포가 K^b-OVA를 발현시킨다 할지라도, 단지 최소로 OT-1 확장을 유발한다(도 6). 이는 OT-1의 직접적인 프라이밍이 매우 비효율적이라는 것을 시사한다. 이와 대조적으로, gp96-Ig이 OVA-함유 종양 세포로부터 분비되는 경우, 24시간 당 80 ~ 800ng의 gp96은 OT-1 교차-프라이밍을 효과적으로 유발하며, 따라서 OT-1 확장이 국소적으로 및 비장에서 이루어지게 한다. 이와 대조적으로 OVA-단백질에 의한 효과적인 교차-프라이밍은 3 ~ 10mg의 단백질을 필요로 한다. OVA-함유 세포로부터 분비되는 OVA 단백질 대 gp96의 경우 OT-1 확장의 민감성 차이는 중량 면에서 볼 때 약 10,000배이다(도 9). 분비 gp96 분자의 최대 0.1%가 OVA 펩티드와 관련있다는 사실과 분자량을 고려할 때, gp96-OVA 대 OVA 단백질에 의한 OT-1 교차-프라이밍 활성의 차이는 몰 면에서 볼 때 약 2백만배이다.
- [0133] 비샤페론화 단백질에 의한 CD8-CTL 교차-프라이밍을 위한 gp96의 보조제 활성: 도 9에 제시된 데이터는 gp96-OVA 복합체 보다는 별개의 분자로서 분비되는 gp96-Ig 및 OVA가 효과적인 OT-1 교차-프라이밍에 작용할 수 있다는 가능성을 열어두고 있다. 이러한 가능성을 알아보기 위해서, gp96 및 OVA가 별도의 분자로서 신중하게 투여되는 조건하에서 OT-1 확장을 조사하였다. OVA는 분비하지 않고 gp96 만을 분비하는 3T3-gp96 세포를 단독으로 또는 OVA 단백질과 함께 복강내 주입하였으며, 통상적으로 OT-1 확장을 정량화하였다. 도 10A에 도시된 바와 같이, 24시간당 200ng의 gp96-Ig를 분비하는 동종이계 3T3-gp96-Ig 세포는 비특이적 OT-1 확장을 유발하지 못하였다. 이와 마찬가지로, 단독으로 주입된 200ng 및 50 μ g OVA는 OT-1 확장을 매개하지 못하였다. 이와 대조적으로, 50 μ g OVA를 24시간당 200ng의 gp96-Ig를 분비하는 3T3-gp96-Ig 세포와 공주입시켰을 때, 적절한 OT-1 확장이 관찰되었다. 이는 gp96이 OT-1의 OVA 교차-프라이밍에 보조제로서 역할을 한다는 것을 시사한다. OVA와 함께 트랜스 형태로 활동하는 gp96-Ig의 작용은 OVA 단독에 비해 100 ~ 1000배까지 OT-1 교차-프라이밍을 증가시키는 반면, gp96 샤페론 OVA(시스-형태)은 1백만배 이상까지(OVA 단독에 비해) OT-1 교차-프라이밍을 증가시킨다. 음성 대조용으로서, OVA의 부재하에 3T3-gp96-Ig는 동종이계성을 가짐에도 불구하고, OT-1 확장에 영향을 주지 못하였다. 또한 공주입된 200ng OVA 단백질과 200ng gp96-Ig를 분비하는 3T3-gp96-Ig는 OT-1 교차-프라이밍을 유발하지 못하였다. 이는 gp96-Ig와 OVA의 복합체가 세포외에서 형성될 가능성을 배제하는 것이다.
- [0134] 이 데이터는 gp96의 보조제 효과가 DC의 활성화 및 음세포작용의 자극에 의해 유발되며, 이로써 OVA 단백질의 흡수 및 MHC I에 의한 OT-1로의 교차 제시를 증가시킨다는 것을 입증한다. gp96이 비샤페론 OVA의 교차-프라이밍에 대해 상당한 아쥬반트활성(adjuvant activity)을 보인다 할지라도, MHC class I 제시를 위한 gp96-샤페론 펩티드를 획득하고 그림으로써 교차-프라이밍 효율성을 증진시키는데 있어서 CD91 수용체를 통한 gp96-OVA 복합체의 내재화가 훨씬 효과적이다.
- [0135] gp96-Ig의 연속적인 분비는 입양 전이된 형질전환 및 내생 CD8 세포에 대한 최대의 CD8 교차-프라이밍 활성을 제공한다: 종양 세포로부터의 gp96-Ig 분비 모델시스템은 OT-1 교차-프라이밍에 미치는 영향에 있어서 gp96-Ig의 연속적인 분비와 gp96-Ig의 일시 주입(bolus injection)이 얼마나 차이가 있는지에 대한 의문을 제기하게 한다. 또한, OVA 및 OT-1는 인위적인 테스트 시스템이기 때문에, OT-1에서 도출되는 데이터가 비형질전환 내생 CD8 세포에 적용될 수 있는지를 확인하는 것이 중요하다. 중요한 것은, B6 생쥐의 EG7-gp96-Ig 면역화는 면역전 생쥐와 비교했을 때, 루이스 폐암종이 아니라 EL4 모세포에 의한 켈린지로부터 CD-의존성 보호를 50배 ~ 100배 증가

시킨다는 점이다. 이는 내재 종양 항원에 대항하는 gp96-의존성 교차-프라이밍을 시사하는 것이다. Yamazaki et al., 1999, J. Immunol. 163:5178-5182. 20,000개의 CD8 세포내에서 약 1의 빈도수(0.005%)를 보이는 비형질전환 내생 OVA-특이적 CD8 세포가 EG7-gp96-Ig 면역화로 CD8 게이트에서 1 ~ 3%의 빈도수로 확장한다. 이는 낮은 빈도수에서 시작하는(도시되어 있지 않음) OT-1에서와 같은 확장을 시사하는 것이다. 이와 함께, 이들 데이터는 gp96에 의한 교차-프라이밍이 TCR-형질전환 OT-1 세포에 국한되는 것이 아니며, 내생 종양-특이적 및 OVA-특이적 CD8 세포에 대해서도 작용한다는 것을 시사한다.

[0136] 3T3-OVA-gp96-Ig 배양액으로부터 수확된 200ng 혈청-비함유 gp96-Ig-OVA의 복강내 주입 효과와 생체 내에서 24 시간 이내에 200ng 분비하는 3T3-OVA-gp96-Ig 세포의 주입 효과를 비교했을 때, gp96-OVA가 지속적으로 분비되는 경우가 gp96-OVA의 일시 주입 경우에 비해 OT-1 확장의 급격한 증가현상이 관측되었다(도 10B). 이러한 관측은 예를 들어 감염에 의해 세포 사멸이 진행되는 결과로서 발생할 수 있는 gp96의 지속적인 방출이 CD4 도움없이 림프절의 필요성 없이 동종 CD8 교차-프라이밍을 위한 적절한 자극이 된다는 것을 시사한다.

[0137] 본 조사에서, gp96-사페론 펩티드에 의한 교차-프라이밍 활성화는 순수 단백질 단독의 경우와 비교해서 >1백만배까지 놀랄만한 증진이 이루어진다는 것이 밝혀졌다. 이 조사 결과는 사멸 중인 세포에 의해 방출되는 항원성 펩티드에 대한 CD8 CTL의 생성에 관해 고도로 민감한 메커니즘을 제공하기 때문에 유의성을 갖는다.

[0138] 항원 교차-제시의 효율성 분석에서, OT-1 확장은 gp96-OVA에 의해, gp96 플러스 OVA에 의해, 또는 단독 OVA에 의해 유발되는 항원 교차-제시를 위한 민감하고 정량적인 조사 결과로서 역할을 하였다. 관측된 OT-1 확장의 차이는 상이한 형태의 OVA의 교차-제시 활성화의 효율성에 의해서만 설명될 수 있다. 명백하게, gp96-사페론-OVA가 교차-제시에 가장 활성적이고, 그 다음은 보조제로서 OVA 플러스 gp96이며, 그 다음이 단독 OVA로서, 교차-프라이밍에 있어서 사페론화 OVA 보다 1백만배 이상 덜 활성적이다.

[0139] gp96이 매개하는 교차-프라이밍 메커니즘은 세포 사멸을 야기하는 감염인자로부터 유도되는 gp96-사페론 항원성 펩티드의 방출에 의해 수반될 수 있는 과정인 괴사 또는 감염으로 인해 세포가 사망하는 경우 생리학적으로 중요하다. 감염, 세포 사멸 및 gp96 방출 부위로의 DC 및 NK 세포의 모집 및 활성화는 항원성 gp96-사페론 펩티드의 CD8 세포로의 교차-제시에 효율적이고 림프절에 비의존적으로 원위치에서의 CTL 생성에 효율적인 경로를 제공한다. 그리하여, 이 CTL는 주변의 감염 세포를 제거시키며, 그럼으로써 감염 인자의 확산을 억제하는 역할을 한다.

[0140] 열충격 단백질에 의한 선천 면역 시스템의 자극을 기반으로 하는 방어 시스템은 양서류의 초기 척추동물 계통 내에서 이미 존재하고 있다. 양자 면역의 발전에 따라, gp96의 역할이 보조제 기능으로부터 효율적인 MHC class I 교차-제시 및 CD8 CTL의 교차-프라이밍을 위한 특이적 항원의 운반체 기능으로까지 확대되는 것으로 보인다.

[0141] 이러한 모델 및 가설을 뒷받침하기 위해, 본 발명자는 gp96의 원위치에서의 분비가 다수의 DC 및NK 세포의 국소적 모집 및 활성화를 유발하고 이로 인해 동종 CD8 세포를 국소적으로 활성화시킬 수 있다는 증거를 제시하였다. gp96에 대한 반응으로 DC는 다른 부위가 아닌 복강 내에서 증식한다. 이와 유사하게, NK 세포는 복강 내에서만 활성화된다. 동종 CD8 세포는 복강 내에서 가장 초기에 가장 활발한 증식을 보인다. 그러나 그 후에는, 비장을 포함한 다른 부위에서도 CD8 증식이 확산된다. 본 실험의 복강내 모델에서 기술한 바와 같이, gp96에 의한 CD8 세포의 국소적인 교차-프라이밍에 대한 설명은 교차-프라이밍 과정이 림프절의 부재하에 수행될 수 있어야 한다는 것을 전제로 하였다. 이는 LT α ko 생쥐에서 확인되었다. 중요한 점은 gp96에 의한 효과적인 CD8 교차-프라이밍이 복강에만 국한되지 않는다는 것이다. gp96-Ig-분비 종양 세포로 피하 면역화하였을 때에도, 동일하게 효과적인 CD8 교차-프라이밍 및 면역 시스템의 생성이 관측되었다. 분석을 위해서는, 다른 부위에서 발견되는 중첩 세포 집단이 없고 접근이 용이하기 때문에, 복강 부위를 선택하였다.

[0142] gp96-사페론화 펩티드에 의한 CD8 세포의 림프절-비의존적 교차-프라이밍은CD40L 및 CD4 도움에 비의존적으로 이루어진다. 대신에 DC 활성화는 이미 다른 경우에 의해 보여준 바와 같이, CD91 및 TLR2/4에 결합하는 gp96에 의해 유발되는 것으로 추측된다. 예비 실험에서, 본 발명자는 항-CD91 항체가 gp96에 의한 CD8 교차-프라이밍을 완전하게 차단한다는 것을 확인할 수 있었다. 그러나, CD80과 CD86에 의한 CD8 세포의 공자극이 gp96에 의한 CD8 교차-프라이밍에 절대적으로 필요하다.

[0143] 이 조사는 또한 gp96이 세포의 환경에서 존재하는 항원성 단백질의 교차-프라이밍을 증진시킴으로써 CTL 생성을 위한 보조제로서 역할을 할 수 있다는 것을 보여준다. 사망하는 세포로부터의 열충격 단백질 방출은 DC 활성화에 의한 선천성 면역반응, DC에 의한 세포의 단백질의 음세포작용의 자극 및 MHC I 교차-제시를 활성화시키는 "위험 시그널"로서 역할을 할 수 있다. 또한 gp96의 보조제 작용은 NK 세포를 활성화시키며, 그럼으로써 TH1

반응을 유발하고 세포의 감염인자의 제거를 증진시킨다.

[0144] gp96의 탁월한 교차-프라이밍 활성화에 대한 중요한 요소는 분비에 의한 연속적이고 지속적인 방출이다. 본 실험 모델 시스템에서, 동종이계 또는 동종동계 종양세포는 gp96을 분비하며, 그림으로써 생체내 시스템에서 단일 가변 gp96 분비 대 비분비의 분석을 가능하게 한다. 이 방법은 항원 또는 gp96의 정제 및 세포 분획(cell fractionation)을 필요로 하지 않으므로, 생화학적 정제 공정에 수반되는 잠재적 문제점을 피할 수 있다. 데이터는 소량의 gp96-펩티드 복합체(약 200ng/24시간)를 지속적으로(24시간) 방출(분비)하는 것이 동일한 양의 gp96-펩티드 복합체를 일시에 주입하는 경우보다 CD8 교차-프라이밍에 훨씬 효과적이라는 것을 보여준다. 명백히, 감염이 진행되는 중인 것으로 관찰될 수 있는 기간과 유사한 기간 동안 면역 시스템의 연속적 자극은 식세포(phagocytic cell)에 의해 신속하게 회식 또는 흡수되는 일시 주입 보다 훨씬 강한 면역 자극제이다. 예비 데이터는 gp96을 분비하는 생존의 동종이계 3T3 섬유아세포를 복강내 주입시 제거되기 이전 5 ~ 7일 동안 생존한다는 것을 확인해 준다. gp96-분비 종양 세포의 방사선처리 또는 미토마이신 c로 처리는 gp96 분비도, 생체내 교차-프라이밍 활성화도 억제시키지도 못한다(도시되지 않음). 이는 CD8 교차-프라이밍을 증진시키는데 세포 복제가 필요하지 않다는 것을 시사한다.

[0145] 본 조사는 잠재적으로 중요한 림프절 및 CD4에 비의존적인 면역 방어 메커니즘을 밝혀 줄 뿐만 아니라, 효과적인 세포 백신 전략 계획에 있어 기초를 제공한다.

[0146] 실시예 3: B세포의 부재하에 빈번한 백신 또는 면역화에 의해 종양-유도 면역 억제 극복

[0147] 본 실험은 종양-유도 면역 억제가 항원 비특이적이며, B세포의 부재에 의해 또는 빈번한 면역화에 의해 극복될 수 있다는 것을 입증한다. 확립된 종양은 생체 내에서 CD8 T 세포 클론 확장을 억제시킨다. 이러한 현상은 일반적으로 항원-특이적인 당단백질(gp) 96-사페론 백신접종시 종양이 없는 생쥐에서 관찰된다. 확립된 종양에 의한 CD8 T 세포 확장 억제는 CD8 T 세포 수용체에 의해 인식되는 항원의 종양 관련 발현과 무관하다. 종양을 가진 생쥐의 백신접종은 종양이 없는 생쥐와 비교할 때 백신 부위로의 세포 모집이 증가하는 것과 관련이 있다. 그러나, 확립된 억제성 종양의 거부는 빈번한(매일) gp96 백신접종을 필요로 한다. B세포는 T 헬퍼 세포-1 반응을 감소시키는 것으로 알려져 있다. 본 발명자는 B세포 결핍 생쥐에서, 1회 백신접종에 의해서 확립된 종양의 거부가 달성될 수 있다는 것을 알게 되었다. 따라서, 종양이 없는 B세포-결핍 생쥐에서, gp96-사페론 백신접종으로 동종 CD8 세포독성 T 임파구 클론 확장이 증진된다. 셀룰라 백신으로 빈번한 백신접종을 수행하고 이와 동시에 B 세포를 제거하면, 환자에 대한 항암 백신요법 효과를 상당히 증진시킬 수 있다.

[0148] 생쥐: C57BL/6J(B6) 생쥐는 Jackson Laboratory(Bar Harbor, ME) 또는 Charles River Laboratories(Frederick, MD)로부터 구입하였다. C57BL/6J 백그라운드를 가진 Ig-m-사슬 결핍 생쥐[B세포 결핍 생쥐(BCDM)]는 Jackson Laboratory로부터 구입하였다.

[0149] GFP 생쥐는 제조자의 관대한 승인하에 입수하였다. C57BL/6 옥시토신-I(OT-1) 생쥐(Dr.M.Bevan로부터 입수, University of Washington, Seattle, WA)는 H-2Kb-제한 닭 난백알부민유도 펩티드 257 ~ 264(SIINFEKL)에 특이적인 형질전환 TCR(Va2Vb 5.1.2)를 발현시켰다. 지시 설명서에 따라서, University of Miami의 동물 시설에서 GFP-OT-1 생쥐를 생산하기 위해 GFP 생쥐를 OT-1 생쥐와 교배시켰다. ova-TCR 유전자의 발현을 위해서 폴리머라제 사슬 반응에 의해, GFP를 위해서는 형광법에 의해 자손 생쥐를 선별하였다. 모든 생쥐는 항원과잉으로서 6 ~ 12주에서 사용되었다.

[0150] 세포계: EG7 세포계(Dr.M.Bevan으로부터 입수)는 전술한 바와 같이 gp96-Ig를 함유하는 벡터인 pCMG-His로 트랜스펙션하였다. 대조군 세포는 벡터 단독으로 트랜스펙션하였다. 루이스 폐암(LLC) 세포는 American Tissue Culture Collection으로부터 입수하였으며, pAC-neo-ova 중의 난백알부민으로 또는 알부민 벡터와 gp96-Ig를 함유하는 pCMG-His로 트랜스펙션하였다. 모든 세포는 10% 소태아 혈청 및 젠타마이신(GIBCO)을 포함하는 Iscove 수정 Dulbecco 배양액(GIBCO, Carlsbad, CA) 내에서 배양되었다. 트랜스펙션된 세포를 보존하기 위해서, 배양액에 선별용 항체(G418 또는 L-Histidinol, Sigma, St Louis, MO)를 첨가하였다.

[0151] 항체: 염색을 위하여 다음과 같은 항체를 사용하였다. 항-CD16/32(2.4G2), CyChrome-항-CD3e(145-2C11), CyChrome-항-CD5(UCHT2), CyChrome-항-CD8a(53-6.7), PE-CD19(4G7), PE 또는 FITC-항-NK1.1(PK136), 및 PE 또는 FITC-항-CD11c(HL3)를 BD PharMingen로부터 구입하였다.

[0152] GFP-OT-1 세포 및 CD19+ B 세포의 정제 및 입양 전이: GFP-OT-1 생쥐로부터 비장세포와 림프절 세포의 합동 단일 세포 현탁액을 얻었으며, 염화 암모늄 세포용해에 의해 적혈 세포를 제거하였다. 제조자의 지시설명서에 따라서, 항-CD8a 마그네틱 마이크로비드 및 MACS 컬럼(Miltenyi Biotec, Auburn, CA)를 이용하여 양성 컬럼 선별

법에 의해 GFP-OT-1 세포를 분류하였다. 분리된 OT-1 세포의 순도는 유세포분석에 의해 측정시 95%이상이었다. 정제된 세포상의 Va2 및 Vb5.1.2 발현은 유세포분석법에 의해 정량화하였다. B 세포의 정제를 위해, CD19+ 세포를 항-CD19 마이크로비드(Miltenyi Biotec, Auburn, CA)로 정제하였다. BCDM 생쥐 내에서 B 세포를 재구성하기 위해, 종양 세포의 이식 이전 2일에 꼬리 정맥을 통해 10^7 의 정제 세포를 입양 전이시켰다.

[0153] 생체내 CD8 CTL 확장의 분석: CD8+ CTL 확장을 측정하기 위해서, 10^6 의 GFP-OT-1로 생쥐를 입양 전이시키고, 2일 후에 $1 \times 10^6 \sim 4 \times 10^6$ 의 방사선처리되지 않은 EG7-gp96-Ig 세포를 복강내 주입을 통해 면역화시켰다. 면역화 후에 시간 간격을 두고, 지시된 시간에 복강, 장간막, 대동맥 주위 림프절[배수 림프절(dLN)]로부터, 그리고 말초혈액으로부터 세포를 수확하였다. 염화 암모늄 세포용해에 의해 샘플로부터 적혈 세포를 제거하였다. FcR 결합을 차단하기 위해서, 0.5% 소 혈청알부민(페닐 봉산)을 포함하는 포스페이트 완충염(PBS) 내에서 항-CD16/32 모노클론 항체로 4℃에서 10분 동안 1 밀리온의 세포를 배양하였다. 그런 후에, 30분 동안 제시된 항체로 세포를 배양하였다. 이 세포를 CELL Quest 소프트웨어(BD Bioscience)를 구비한 FACScan(Becton Dickinson)에서 분석하였다. 각 조직의 총 세포수 및 표적화된 세포 퍼센트로부터, 조직당 제시된 면역 세포의 총 수를 계산하였다.

[0154] 종양 접종 및 치료 프로토콜: 생쥐의 옆구리 내로 200 μ l PBS 중의 EG7, LLC 또는 LLC-ova 세포를 피하주입하였다. LLC-ova 세포의 접종 후 5일에(5일), 0.3mL의 PBS 중의 10^6 정제된 GFP-OT-1를 꼬리 정맥을 통해 주입하였다. 2일 후에, 그래프에 제시된 일정에 따라 0.5mL의 PBS 중의 10^6 방사선처리되지 않은 LLC-ova-gp96-Ig 또는 E.G7-gp96-Ig 세포를 복강내 주입함으로써 생쥐를 면역화하였다. 대조용 생쥐는 PBS로 또는 EG7이나 LLC-ova로 처리하였다. 옆구리의 종양 크기는 1주당 2회씩 적어도 20일 동안 2차원으로 측정되었다.

[0155] 통계학적 분석: 반복측정 분산분석 및 윌콕슨 부호순위 검정법(Wilcoxon signed rank test)에 의해 유의성을 평가하였다. $P < 0.05$ 의 값은 통계적 유의성을 갖는 것으로 간주되었다.

[0156] 확립된 종양은 TCR 특이성에 비의존적인 gp96에 의한 CD8 CTL 확장을 억제시킨다: 열충격 융합 단백질인 gp96-Ig을 종양 세포의 트랜스펙션시킴으로써 gp96-Ig와 함께 gp96-샤페론 펩티드가 분비되게 한다. gp96-Ig는 gp96의 소포체 보유 시그널(KDEL)을 IgG의 Fc 부분으로 대체함으로써 생성되는 융합 단백질이다. gp96-Ig-분비 종양 세포를 쥐에 주입시키면, 종양-특이적 면역성 및 기억이 유도되고, 이후 동일하나 트랜스펙션되지 않은 종양에 의한 후속 켈린지로부터 보호가 이루어지게 된다. 분비되는 gp96-Ig에 의해 생성되는 종양 면역성은 EL4-특이적 항원과 같은 종양 내생 항원으로부터 유도되는 펩티드를 포함하는 gp96-샤페론 펩티드에, 그리고 EL4(EG7) 또는 LLC(LLC-ova)내로 트랜스펙션되는 난백알부민과 같은 대리 항원에 특이적이다. 난백알부민 대리 항원은 난백알부민-특이적, OT-1 TCR 형질전환 CD8 세포의 입양 전이를 통해 생체 내에서의 CD8 CTL 확장을 정확하게 측정하는 방법을 제공한다.

[0157] 확립된 종양은 CTL 확장을 억제시킨다고 알려져 있다. 확립된 종양의 존재하에 또는 부재하에 CTL 반응을 측정하기 위해서, 본 발명자는 형질전환 CD8 CTL이 gp96-Ig-ova를 분비하는 난백알부민-트랜스펙션된 동종동계 또는 동종이계 종양에 대해 반응하는 TCR 형질전환 OT-1 시스템을 사용하였다. 본 발명자는 이식가능한 종양 모델로서, 난백알부민 트랜스펙션에 의해 EL4로부터 유도되는 EG7을 사용하였다. 이것은 면역원성 및 고도의 종양생성능을 갖는 것으로 분류된다. 또한 본 발명자는 그 외에도, 덜 면역원성이며 고도의 종양생성능을 갖는 것으로 간주되는 LLC 및 LLC-ova를 사용하였다. 두 세포계의 분열 속도는 배양액 내에서 더블링 타임이 8 ~ 12시간으로 매우 빠르다.

[0158] 24시간 내에 10^6 세포 당 60 ~ 80ng의 gp96-Ig를 분비하는 1 밀리온의 EG7-gp96-Ig 세포로 1회 복강내 면역화한 후에, 종양이 없는 생쥐에서 OT-1 CD8 T 세포는 CD8 게이트 중의 낮은 면역전 수준(B0.2%)에서 높은 빈도수(15% ~ 40%)로 확장된다(도 11). gp96-Ig를 분비하지 않는 방사선처리된 EG7의 투여는 현저한 OT-1 확장을 유발하지 못한다. 그러나, 옆구리에서 떨어진 부위의 피하에서 확립된 EG7 종양의 존재는 복강 내에서(도 11A ~ C) 및 계통적으로 비장 및 림프절에서(도시되지 않음) gp96-백신-유도된 OT-1 확장을 상당히 억제한다. EG7 종양은 난백알부민을 분비하며, Kb-ova를 발현시킨다. 그러므로, 종양 베드 또는 종양 dLN을 통한 재순환시에 입양 전이된 OT-1은 Kb-ova-특이적 TCR을 통한 시그널을 수신하는 반면, 공자극성 시그널을 수신하지 않기 때문에, 면역성이 결여된다는 가설이 가능하다. 이러한 가설을 검증하기 위해서, 난백알부민을 발현시키지 않는 동종동계 종양 EL4 및 LLC를 원격 부위의 피하에서 확립하였다. 그 다음, OT-1을 정맥내 투여를 통해 입양 전이하고, 전술한 바와 같이 EG7-gp96-Ig로 복강내 면역화하였다. 확립된 EL4 및 LLC는 확립된 EG7과 같이 분비 gp96-ova에 의한

OT-1 확장을 억제시키는데 효과적이다. 이는 억제가 종양 내에서 적절한 TCR 항원인 Kb-ova에 의존적이지 않다는 것을 시사하는 것이다(도 11B, C). 복강내 및 계통적 OT-1 확장은 원격 부위에서의 LLc 및 EL4 존재하에 억제되었지만, 놀랍게도 EG7-gp96-Ig 복강내 면역화하였을 때, 면역화 후 복강내로의 총 세포의 모집은 종양이 없는 생쥐와 비교시 실제로 증가되었다(도 11A).

- [0159] 이 데이터는 확립된 종양이 CTL 확장의 항원 비특이적 억제를 유도할 수 있다는 것을 시사한다. 이러한 억제 유도는 복강 내에서 백신 부위로의 세포 모집 증가와 관계가 있다. 이러한 세포 모집 증가가 CD8 T 세포의 억제에 역할을 하는지에 대해서는 연구 중에 있다.
- [0160] 항원 비특이적 면역 억제를 극복하기 위해서, 본 실험은 백신접종에 의해 CD8 CTL을 빈번하게 반복적으로 항원 특이적 자극시키면 종양을 가진 생쥐에서 발견되는 억제 활성을 방해할 수 있는지를 테스트한다.
- [0161] 확립된 종양의 거부는 빈번한 gp96-Ig 면역화를 필요로 한다: 분비 gp96-Ig를 포함한 많은 백신접종 전략이 생쥐에서 종양 및 종양 항원에 대해 보호적 면역성을 생성시킬 수 있으나, 이미 확립된 종양을 치료적 백신접종에 의해 거부하는 것은 보다 어려운 일이다. CD8 확장의 항원 비특이적 억제의 관찰을 통해서, 본 발명자는 상이한 백신접종 일정이 얼마나 종양 거부 및/또는 종양 성장에 영향을 미치는지에 대해 분석하였다.
- [0162] 본 발명자는 우선, 종양 이식 날짜와 같은 날에 백신접종을 시작함으로써 치료적 백신접종의 효과를 분석하였다. 1 밀리온의 EG7 종양 세포를 동종동계 생쥐의 옆구리에 피하로 이식하였다. 같은 날(0일)에, 백신으로서 gp96-Ig를 분비하는 1 밀리온의 gp96-Ig-분비 EG7 백신 세포(EG7-gp96-Ig)를 $60 \sim 80\text{ng}/10^6$ 세포 $\times 24$ 시간의 비율로 복강내 투여하였으며, 3, 7, 10 및 14일에 백신접종을 반복하였다. 치료를 받지 않은 생쥐에 비해, 종양 이식 날짜와 같은 날에 시작하여 4회 EG7-gp96-Ig 백신접종에 의해 세포 증식이 현저하게($P=0.0078$) 감소되었다(도 12A). 치료 효과는 gp96 및 항원에 의존적이다. EG7-gp96-Ig와 같은 비율의, gp96-Ig를 분비하지 않는 방사선처리된 EG7(도 12A) 또는 EG7 항원을 발현시키지 않는 LLC-gp96-Ig(도 12B)는 EG7-gp96-Ig와 같은 투여량 및 일정으로 백신으로서 복강내 투여되었을 때 종양 증식을 억제시키지 못하였다. EG7 접종 후 2일 또는 그 이후에 EG7-gp96-Ig 백신접종을 시작하면, 동일한 백신접종 일정을 사용했을 때 치료 효과가 실질적으로 감소된다(도 12A). 이 데이터는 2일 후에도, 바로 이식된 종양의 경우보다 백신접종에 의해 확립된 종양을 억제하기가 어렵다는 것을 보여준다.
- [0163] 3일 이상동안 확립된 종양이 더욱 빈번한 백신접종 일정에 의해 제어될 수 있는지에 대해서도 테스트하였다. 1 밀리몰의 EG7 종양세포를 옆구리에서 피하로 이식하고 3 ~ 7일 동안 확립되어 적어도 7 이상의 종양 세포 더블링이 되도록 하였다. 이 기간동안 종양 단괴(nodule)의 혈관신생이 발생하는데, 이는 시각적으로 검출될 수 있다. 그리고 나서, LLC-gp96-Ig 세포와 같은 투여량 및 일정으로, 1 밀리온의 EG7-gp96-Ig 세포를 매일 복강내 투여를 통해 생쥐에 백신접종하였으며, 특이성 대조군으로서 방사선처리된 EG7 세포를 사용하거나 백신접종을 하지 않았다. EG7-gp96-Ig 세포를 매일 백신접종한 경우, 3일 동안 확립된 EG7의 증식을 현저히($P=0.0078$) 효과적으로 억제시킨 반면(도 12B), 방사선처리된 EG7 또는 LLC-gp96-Ig를 매일 백신접종한 경우, 확립된 EG7의 증식에 영향을 주지 못하였다(조 12B). 추가적인 조사에서, 본 발명자는 이식된 EG7 종양이 EG7-gp96-Ig로 백신접종을 시작하기 전 5일 및 7일 동안 확립이 이루어지도록 하였다. 도 12C 및 12D에서, 종양 확립의 이후 단계에서 종양 증식을 배제시키기 위해서 매일 2회의 백신접종이 필요하였다. 이 데이터는 빈번한 면역화가 생쥐에서 24시간동안 종양 증식을 체크할 수 있다는 것을 보여준다. 장기간의 지속적인 백신접종 일정이 종양을 완전히 근절할 수 있는지에 대한 추가적인 조사가 필요할 것이다.
- [0164] 면역원성 EG7 림프종에서 얻어진 데이터를 입증하기 위해서, 덜 면역원성인 확립된 LLC로 실험을 반복하였다(도 13). 종양 이식후 3일째 되는 날에 시작한 LLC-gp96-Ig의 반복적인 복강내 면역화 경우, LLC의 종양 진행을 현저히($P=0.0234$) 지연시켰다. LLC의 대한 매일 면역화는 종양 지연에 보다 효과적이지 않다. 면역화 효과는 EG7-gp96-Ig 백신이 LLC 종양 증식을 억제시키지 못하였을 때처럼 종양 특이적이다. 방사선처리된 LLC의 경우에도 종양 증식을 억제시키지 못하였으나, 이 경우 gp96-Ig 분비에 의존적이었다.
- [0165] 이 데이터는 분비 gp96-Ig 및 그 샤페론화 펩티드에 의한 항원 교차 제시와 빈번한 DC 및 NK 세포 활성화가 함께 이루어지면, 확립된 종양에서 유도되는 항원 비특이적 면역 억제를 극복할 수 있다.
- [0166] gp96에 의한 DC 및 NK 세포 모집 및 CD8 CTL 확장은 BCDM에서 증진된다: T 헬퍼 세포-1 항종양 반응은 야생형(WT) 생쥐에 비해 BCDM에서 증진된다는 사실은 여러 그룹에 의해 보고되었다. 그러므로, 본 발명자는 gp96에 의한 CTL 확장 및 항종양 면역에 있어 B 세포의 역할을 조사하였다. 복강에는 CD5+CD19+B 세포 및 CD5+CD19+B1-B 세포가 거주하고 있는데, 후자 세포는 IgM 항체를 생산하며 활성화했을 때 이소타입 전환을 하지 않는다(도

14A). EG7-gp96-Ig로 복강내 면역화하면, CD5+CD19+ 집단이 면역화후 4일까지 약 5배 증가하는 반면, CD5+B1-B 세포는 단지 미미하게 증가한다(도 14A). gp96에 의한 OT-1 확장은 면역화 후 4일 및 5일에 최대가 된다. 백신 접종 부위인 복강 내로의 DC 및 NK 세포의 모집 및 활성화가 이루어진다. NK 세포는 이미 기술한 바와 같이 gp96-Ig에 의한 CD8 CTL 확장에 중요한 촉진자이다. BCDM에서, 복강 내로의 DC 모집은 백신접종 후 2일에 야생형 생쥐에서의 모집과 유사하였다. 그러나, 백신접종 후 4일까지 DC 수가 야생형 생쥐에서는 50%까지 감소하였지만, B세포 결핍 생쥐에서는 DC 수가 같은 높은 빈도수를 유지하였다(도 14B). BCDM에서 NK 세포 모집은 2일 및 4일에 증가되었다(도 14B). 이러한 차이는 의미있는 수준은 아니었으나, 3개의 별도 실험에서 재현될 수 있는 수준이었다. WT B세포를 BCDM에 입양 전이함으로써 DC 유지 및 NK 세포 모집의 증가를 배제시켰다. 이 조사 결과는 B 세포가 gp96에 의한 선천성 면역 세포 모집에 영향을 주며, 또한 B 세포가 CD8 CTL 확장을 제어 또는 억제하는데 관여할 수 있다는 것을 시사한다.

[0167] 그러므로, gp96 면역화로 BCDM에서 GFP-마크 OT-1 CD8 CTL 확장이 증가되었는지에 대해서도 테스트하였다. 도 15에 도시된 바와 같이, BCDM에 gp96 면역화 후 OT-1 확장은 야생형 생쥐에 비해 5일에 현저히 증가되었다. 중요한 점은 복강내 면역화 후 7일 및 12일에 OT-1이 현저히 높은 빈도수로 유지되었다($P=0.04$)(도 15A). 또한 dLN에서(도 15B), OT-1 확장 및 보유가 증가되었으나 유의성을 갖는 수준은 아니었다. 면역화 이전에 WT B세포를 BCDM에 입양 전이함으로써, OT-1 확장을 야생형 생쥐에서 관측되는 수준으로 또는 그 이하로 감소시켰다(도 15A, B). B 세포의 존재에 의한 OT-1 확장의 억제는 인터루킨(IL)-10 생성에 의해 유발되지 않는다. 그 이유는 IL-10 결핍 생쥐는 BCDM에서 관측되는 확장 증가보다는 야생형 생쥐의 경우와 유사한 수준의 OT-1 확장을 나타내기 때문이다.

[0168] 확립된 비면역원성 종양의 gp96에 의한 거부는 B 세포의 부재하에 증진된다: 전술한 바와 같이, 야생형 생쥐에서 EG7 종양의 증식 제어는 최소 매일 gp96 면역화를 필요로 한다. EG7 및 EL4 세포는 BCDM에서 거부되며 종양을 확립시키지 않는다. 그러나 LLC 및 LLC-ova는 야생형 생쥐에서 보다는 느린 속도로 성장하기는 하지만 BCDM에서 확립될 수 있다. LLC-ova를 BCDM 및 야생형 생쥐에서 5일 동안 옆구리의 피하에 확립하였다. OT-1를 정맥 내 투여를 통해 입양 전이시키고, 2일 후에 1회 투여량으로서 1밀리온의 LLC-ova-gp96-Ig를 복강내 투여한 다음, 옆구리에서의 종양 증식을 모니터링하였다. 야생형 생쥐에서, LLC-ova-gp96-Ig로 단일 면역화하면 옆구리의 종양 진행을 상당히 지연시킬 수 있으나 종양 거부에는 실패하였다(도 16A). 이와 대조적으로, BCDM에서, 단일 면역화는 7일 확립된 LLC-ova 종양을 완전히 제거하였으며(3마리 생쥐), 현저한 종양 수축을 나타내었다(2마리 생쥐)(도 16B). 처리를 하지 않은 경우, BCDM에서 LLC-ova는 비록 야생형 생쥐에서 보다는 느린 속도이긴 하지만, 증식이 진행된다(도 16A). BCDM의 B 세포 재구성(도 17C)은 야생형 생쥐에서 관측되는 수준과 유사한 백신접종 효과(즉, 증식지연 지연)를 제공한다(도 16A). 흥미로운 부분은 항체에 의한 완전한 또는 부분적인 B-세포 소모가 B-세포 결핍과 같은 효과를 가질 것인지에 대해 측정하는 것이다. 진행중인 예비 조사는 이러한 접근법을 뒷바침할 것이다.

[0169] 단일 면역화에 의해 이루어지는 BCDM에서의 확립된 LLC의 적절한 종양 제어는 충분한 다수의 종양-특이적 CTL 전구물질(OT-1) 및 항원-특이적 면역화(LLC-ova-gp96-Ig)에 의존적이다. BCDM에서, gp96 면역화없이 1 밀리온의 입양 전이된 OT-1의 존재하에서는 대부분의 생쥐에서 종양 거부가 일어나지 않는다(도 17). 마찬가지로, OT-1 전이가 없이 gp96 면역화 만으로는 두가지 조합의 경우보다 덜 효과적이다(도 17B).

[0170] 확립된 종양은 항종양 면역성을 억제시킨다는 점을 잘 인지할 것이다. 종양-특이적 T 세포는 확립된 종양의 존재하에서 무기력하게 된다. 본 조사에서 사용된 B 세포 임파구에 대한 무기력은 항원 특이적이고 MHC 제한적이며, 골수-유도 항원제시 세포와 결합된 MHC의 존재에 의존적이다. 다른 조사에서는, 항원 비특이적 골수-억제 세포 및 T 조절 세포가 항종양 면역성의 억제와 관련되어 있다. 본 조사는 생체 내에서의 CTL 반응 억제가 항원에 비의존적인 경로를 통해 확립된 종양에 의해 달성될 수 있다는 것을 보여준다. gp96-ova 백신접종으로 인한 OT-1 CD8 CTL 확장은 종양에 의한 난백알부민의 발현에 비의존적인 확립된 종양에 의해 억제된다. 이러한 유형의 억제는 T 조절 세포에 의해, 또는 골수-억제 세포나 M2 대식세포와 같은 다른 억제 세포에 의해 달성될 수 있다. 이러한 가설에 따르면, 예비 실험에서, 억제 활성화는 gp96 백신접종에 의해 종양을 가진 생쥐에서 유발되는 복강 세포의 전이에 의해 종양없는 생쥐에 전이가 가능하다.

[0171] gp96-ova 면역화에 대한 OT-1 반응은 확립된 종양의 존재하에 강하게 억제되기는 하지만, 완전히 차단되는 것은 아니다. 이는 확립된 종양에 의한 면역 억제와, 분비된 gp96-ova에 의해 자극되는 활성화 DC에 의한 항원 교차제시를 통한 백신-유도 CD8 CTL 활성화 사이에 밸런스가 존재한다는 것을 시사하는 것이다. 본 발명자는 종양에서 투약당하지 않은 생쥐 gp96-ova가 NK 세포 및 DC의 모집 및 활성화를 유발하고 그럼으로써 OT-1 확장을 달성한다는 것을 이미 기술하였다. LLC-gp96-Ig 백신접종에 의해 세포의 복강으로의 모집이 실질적으로 증진된다 할

지라도, 확립된 종양은 OT-1 확장을 억제시킨다. 이는 확립된 종양의 존재하에서 많은 모집된 세포가 억제 세로로 된다는 것을 시사한다. 이러한 가설은 gp96-ova로 빈번한 면역화를 수행하면, 반복되는 gp96에 의한 DC 및 NK 세포 자극을 통해 면역 활성화 억제로부터 증가로, 그림으로써 항원 교차제시 및 CTL 프라이밍 증가로 밸런스가 이동됨으로써 억제 활동을 극복할 수 있다는 점을 예측한다. 실제로, 빈번한 면역화는 종양 진행을 지연하는데 상당한 효과를 가진다. 확립된 EG7의 경우, 매일 1회 또는 2회 백신접종이 2일 또는 3일마다 백신접종하는 것보다 종양 진행을 중단시키는데 훨씬 효과적이었다. LLC의 경우, 3일 또는 수일마다 백신접종하는 것으로 충분하며, 매일 접종이 보다 효과적인 것은 아니었다. 이러한 종양-특이적 차이는 말초 종양의 존재에 의해서 억제 세포가 생성되는 비율과 관련이 있을 수 있다. 아니면, 종양이 억제 세포의 유도를 매개하는 매커니즘 또는 유도되는 억제 세포의 성질에 좌우될 수 있다.

[0172] 종양-분비 gp96-ova로 복강내 면역화에 대한 OT-1 반응을 연구하면서, 본 발명자는 다수의 B 세포가 백신 부위인 복강으로 모집되는 점에 주목하였다. B 세포는 항종양 면역에 대한 방해자로서 보고되어 있는데, gp96에 의해 유발되는 OT-1 확장에 있어서 B 세포의 역할에 대해 의문점이 증가한다. BCDM을 사용함으로써, gp96-ova 면역화 후 복강내에서 NK 세포 및 DC 모집 및 보유가 증가하고, 그리하여 OT-1 확장이 증가되었다는 것이 명백하다. B 세포가 재구성된 BCDM은 gp96-ova에 의한 OT-1 확장에 대해 야생형 생쥐처럼 반응하였는데, 이는 B 세포 결핍이 B 세포의 부재와 관계없는 방식으로 gp96-ova 면역화에 대한 BCDM의 반응성을 수정할 가능성을 배제하는 것이다. B 세포 결핍은 단일 gp96-Ig 면역화 후에 OT-1 확장을 증진시켜 줄 뿐만 아니라 7일 확립된 LLC-ova 종양의 거부를 매우 증진시켜 주었다. 이 데이터는 종양에 의한 억제 세포 유도가 B 세포 부재하에 매우 감소되며, B 세포가 "억제 세포"로서 역할을 한다는 것을 시사한다. B 세포가 억제 세포의 유도에 관여하는지 또는 B 세포 자신이 CTL 반응에 면역억제성이 있는지에 대해 추가적인 연구가 필요하다. 그러나, IL-10은 B 세포가 매개하는 종양 면역 억제에 관여하는 것 같지 않다. 현재 진행중인 연구에서, 본 발명자는 OX40-L이 결핍된 B 세포는 항종양 면역반응을 억제하는 능력을 감소시킨다는 것을 알게 되었다.

[0173] 이 연구는 항원 독립적인 면역 억제가 연구될 수 있고 더 나아가 정의될 수 있는 모델을 제공한다. 특히 이 과정에서 B 세포의 역할이 매우 흥미있는 연구대상이 될 것이다. 또한 이 연구는 항종양 백신이 보다 효과적으로 이루어질 수 있는 방식을 제시한다. 예를 들어 종양 분비 gp96 백신에 있어서, 항체로 B 세포를 제거하고 이후 빈번한 백신접종을 수행하면, 종래의 백신접종법에서 관측되는 것보다 효과적인 종양 증식 억제가 이루어질 수 있다.

[0174] **실시예 4: 열충격 단백질 gp96 백신접종에 의한 항종양 효과는 B 세포의 부재하에 증진된다**

[0175] B 세포 부재하에 gp96의 항종양 활성 증가: 면역학적 종양 거부는 일반적으로 Th1이 항종양 면역반응에 치우쳐 있는 동안 세포독성 CD8 세포의 생성에 의존한다. 종양 회피 전략은 흔히 Th2 사이토카인(cytokine)의 생성을 포함하여 체액성 반응으로 치우치는 Th2를 향한 면역 편위(immune deviation)를 포함한다. Th2 반응이 B 세포 활성화 및 TH1 극성화의 피드백 억제와 관련이 있기 때문에, 본 발명자는 gp96에 대한 항종양 면역반응이 B 세포의 부재에 의해 영향을 받는지에 대해 테스트하였다. 본 발명에서는 종양계로서 LLC-ova, 즉 대리 항원으로서 난백알부민으로 트랜스펙션된 자발적 이식가능한 폐암종을 사용하였다. LLC-ova는 비면역원성이며, 빠르게 증식하고(분열시간 16시간), 약 4주 이내에 죽는다. 24시간동안 1 밀리온의 세포가 되도록 Song의 비율로 LLC-ova를 gp96-Ig로 더 트랜스펙션함으로써, gp96-Ig를 분비하는 종양인 LLC-ova-gp96-Ig를 생성시켰다. LLC-gp96-Ig는 강한 동종 CD8-CTL 활성화를 매개하며 항종양 면역성을 생성시킨다. 이 면역화 모델은 B 세포의 부재가 항종양 반응에 미치는 영향을 평가하는데 사용되었다. LLC-ova를 야생형 생쥐 및 B세포 결핍(pMT) 생쥐의 옆구리에 피하 이식하고, 7일 동안 종양이 확립되도록 한 후에(0일), 1 밀리온의 생존 LLC-ova-gp96-Ig 세포를 복강내 주입하였다. ICb에 의해 제시되는 난백알부민 유도 펩티드 SIINFEKL를 검출하는 TCR 형질전환 OT-1 세포를 정맥내 주입한 후(10^6 세포) 2일에 LLC-gp96-Ig로 면역화하였다. 야생형 생쥐 내의 LLC-ova는 OT-1이 존재하는 경우에도, 면역화하지 않은 상태에서는 증식이 진행되었다(도 16). 1 밀리온의 LLC-ova-gp96-Ig 세포의 1회 복강내 주입은 종양 증식을 지연시키지만, 완전한 종양 거부를 유발하지 못한다. LLC-ova는 모든 생쥐내에서 진행성 종양을 형성하지만, B 세포 결핍 생쥐에서의 종양 진행은 야생형 생쥐에서 보다는 느리다. 7일간 확립된 종양을 가진 B 세포 결핍 생쥐에 gp96-분비 LLC-ova를 면역화하면, 완전한 종양 거부를 유발시킬 수 있다. 종양은 6주의 팔로우업 기간 동안 재발되지 않았다.

[0176] 이 모델 종양 시스템의 B 세포 결핍 생쥐는 증가된 수의 종양 특이적 전구물질 CTL(OT-1)의 존재하에 gp96-면역화에 대한 종양 거부 반응을 개시할 수 있다는 것이 명백하다. 종양 거부는 입양 전이된 OT-1의 부재하에는 LLC-ova-gp96-Ig에 대한 항종양 반응이 현저히 감소되기 때문에(도 17A), 이 두가지 성분에 따라 좌우되었다.

마찬가지로, OT-1 단독은 면역화없이 LLC-ova를 거부하지 못하였다(도 17A). 야생형 B 세포의 전이에 의해 B 세포 결핍 생쥐에서 B 세포의 재구성이 이루어지면, p96가 확립된 종양을 거부하는 능력을 상실하게 된다(도 17C). 정상 B 세포의 부재가 B 세포 결핍 생쥐에서 종양 거부 반응을 증진시키는 역할을 한다는 것이 명백하다.

[0177] B 세포 결핍 생쥐에서 CD8-CTL 클론 확장의 증진: B 세포 결핍 생쥐에서, gp96-기초 면역화로 인해 확립된 LLC-ova 종양을 거부하는 능력의 증가는 CD8-CTL 활성화의 증가를 시사한다. 본 발명자는 gfp-마크 OT-1 세포를 사용하여, B 세포 결핍 생쥐와 야생형 생쥐의 면역화 후 OT-1 세포의 클론 확장을 비교하였다. OT-1 세포를 정맥 내 투여를 통해 입양 전이시키고, 2일의 평형 기간 후에 생쥐에 LLC-ova-gp96-Ig를 주입하였다. 면역화 후 5일, 7일 및 12일에 복강내 및 배수 장간막 및 대동맥 주위 림프절 내에서 gfp-OT-1의 빈도수를 측정하였다. OT-1는 면역화 이전에는 복강내에 반드시 존재하는 것은 아니며, 배수 림프절 내에서의 빈도수는 CD8 게이트에서 0.5% 수준이다. 이미 보고된 바와 같이, 종양 분비 gp96은 야생형 생쥐에서 강한 CD8-CTL 확장(5일에 최대)을 유발한다. gp96-Ig를 분비하지 않는 LLC-ova는 OT-1를 확장시키지 못한다. 확장이 이루어지고, 이어서 다음번 주 동안 수축이 이루어진다. B 세포 결핍 생쥐에서, CD8-CTL 확장은 야생형 생쥐에서 관측되는 수의 약 2배까지 지속적으로 증가된다.

[0178] 야생형 B 세포로 B세포 결핍 생쥐에서 재구성이 이루어지면 CD8 반응을 유발하는데, 이는 야생형 생쥐와 표현형 면에서 구별되지 않는다. gp96-분비 종양 세포로 복강내 면역화하면, B 세포, 수지상 세포 및 NK 세포를 포함하는 다수의 면역 세포가 모집된다. 야생형 생쥐에서, B세포 축적은 CD8-CTL 확장과 동력학적으로 동시에 이루어지며, 3일 내지 5일 사이에 최대가 된다. DC 및 NK 세포는 gp96-Ig 면역화 후 처음 48시간 동안 복강 내로 모집된다. DC 및 NK 세포의 모집은 B 세포의 부재하에 증가되는 반면, 야생형 B 세포로 B세포 결핍 생쥐에서 재구성이 이루어지면 DC 및 NK 세포의 모집이 야생형 생쥐 수준으로 되돌려진다.

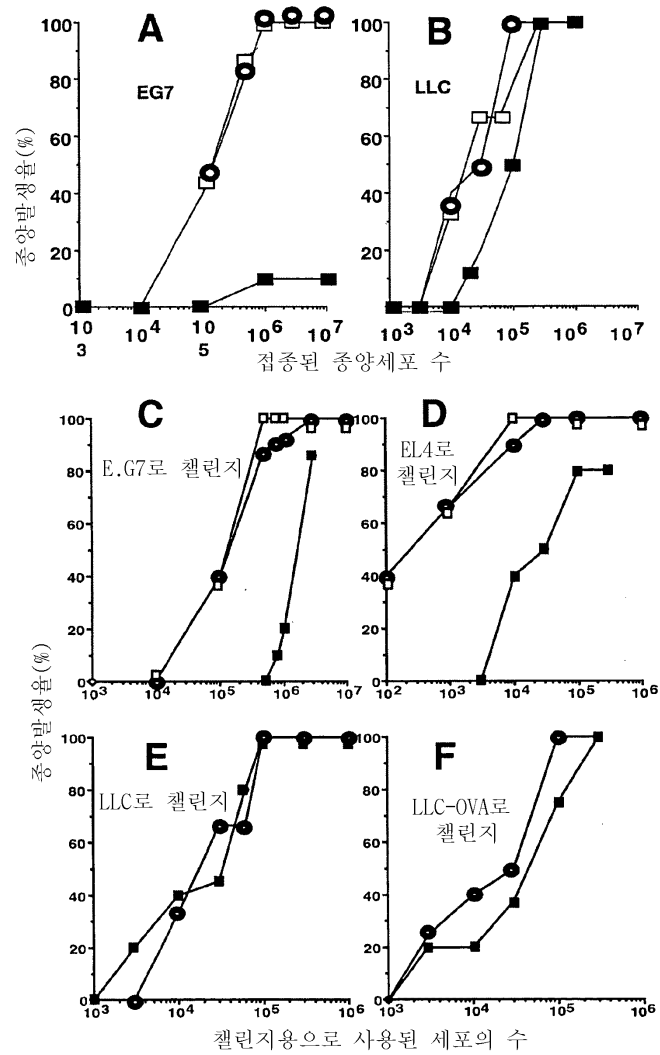
[0179] OT-1 세포 및 CD19+ B 세포의 정제 및 입양 전이: gfp-OT-1 생쥐로부터 비장세포와 림프절 세포의 합동 단일 세포 현탁액을 얻었으며, 염화 암모늄 세포용해에 의해 적혈 세포를 제거하였다. 제조자의 지시설명서에 따라서, 항-CD8a 마그네틱 마이크로비드 및 MACS(Miltenyi Biotec, Auburn, CA)를 이용하여 양성 컬럼 선별법에 의해 gfp-OT-1 세포를 분류하였다. 분리된 OT-1 세포의 순도는 유세포분석에 의해 측정시 CD8 양성 95% 이상이었다. 정제된 세포상의 Va2 및 Vb5.1.2 발현은 주입 이전에 유세포분석법에 의해 정량화하였다. B 세포의 정제를 위해, CD19+ 세포를 항-CD19 마이크로비드를 사용하여 동일한 절차에 따라 정제하였다. pMT 생쥐 내에서 B 세포를 재구성하기 위해, LLC-ova 세포의 접종 이전 2일에 꼬리 정맥을 통해 10^7 의 정제 세포를 입양 전이시켰다.

[0180] 종양 접종 및 치료 프로토콜: 생쥐의 옆구리 내로 200 μ l PBS 중의 방사선처리되지 않은 LLC 또는 LLC-ova 세포를 피하주입하였다. LLC-ova 세포의 접종 후 5일에(5일), 0.3ml의 PBS 중의 10^6 정제된 OT-1를 꼬리 정맥을 통해 주입하였다. 7일 후에, 0.5ml의 PBS 중의 방사선처리되지 않은 10^6 LLC-ova-gp96-Ig 세포를 복강내 주입함으로써 생쥐를 면역화하였다. 비치료 대조군으로서, 5일 및 7일에 PBS로 생쥐를 처리하였다. 종양 크기는 1주당 2회씩 적어도 20일 동안 2차원으로 측정되었다. OT-1 확장을 확인하기 위해, 10^6 gfp-OT-1로 입양 전이한 후에, 4×10^6 의 방사선처리되지 않은 EG7-gp96-Ig 세포를 복강내 주입함으로써 생쥐를 면역화하였다. RitumixmabR-처리된 인간 CD20 형질전환 생쥐의 종양 증식을 평가하기 위해, 4일에 0.5ml의 PBS 중의 1mg RitumixmabR 또는 PBS 단독을 복강내 주입함으로써 생쥐를 처리하였다. Ritumixmabn 처리를 제외하고는, 실험적 세부사항은 전술한 바와 동일한 프로토콜 하에서 수행되었다.

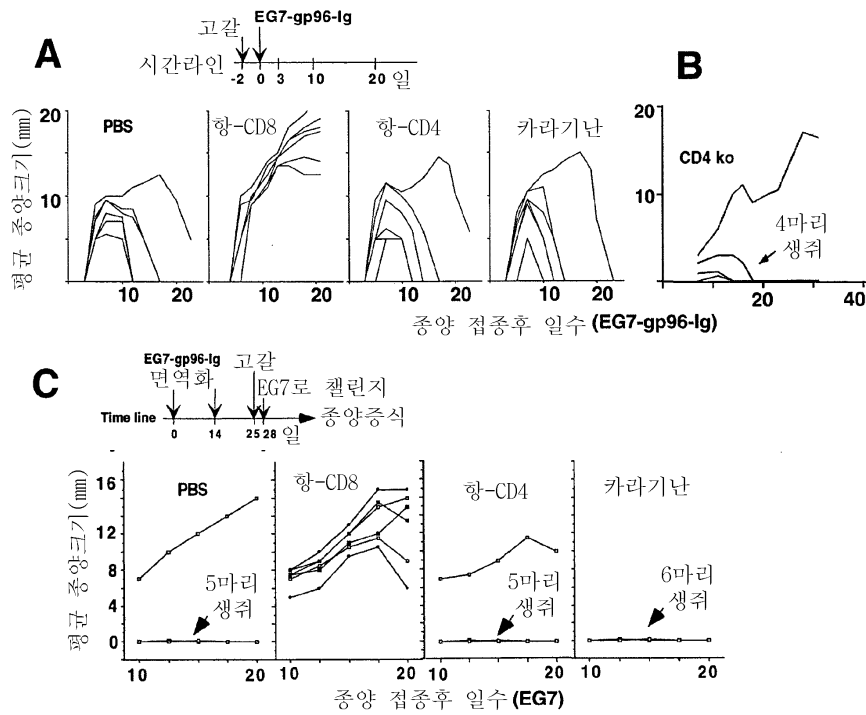
[0181] 유세포분석: 면역화 후에 시간 간격을 두고, 지시된 시간에 장간막 및 대동맥 주위 림프절(dLN)로부터, 그리고 복강으로부터 세포를 수확하였다. Ritumixmab[®] 처리후에 인간 CD20을 발현하는 B세포의 제거를 조사하기 위해서, 주입후 1주에 말초 혈액 세포를 얻었다. 염화 암모늄 세포용해에 의해 샘플로부터 적혈 세포를 제거하였다. 우선, FcR 결합을 차단하기 위해서, 0.5% BSA(PBA)를 포함하는 PBS 내에서 항-CD16132 mAb로 4°C에서 10분 동안 1 밀리온의 세포를 배양하였다. 그런 후에, 30분 동안 제시된 항체로 세포를 배양하였다. 이 세포를 CELL Quest 소프트웨어(BD Bioscience)를 구비한 FACScan(Becton Dickinson)에서 분석하였다. 각 조직의 총 세포수 및 표적화된 세포 퍼센트로부터, 각 조직당 제시된 면역 세포의 총 수를 계산하였다. 통계학적 분석에 있어서 종양 증식의 유의적 차이는 반복적인 ANOVA 테스트에 의해 평가되었다. $P < 0.05$ 의 값은 통계적 유의성을 갖는 것으로 간주되었다.

도면

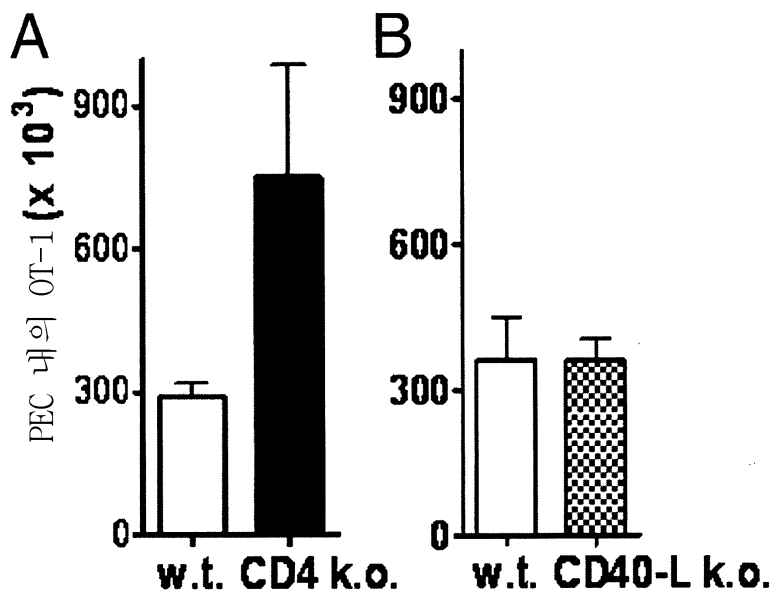
도면1



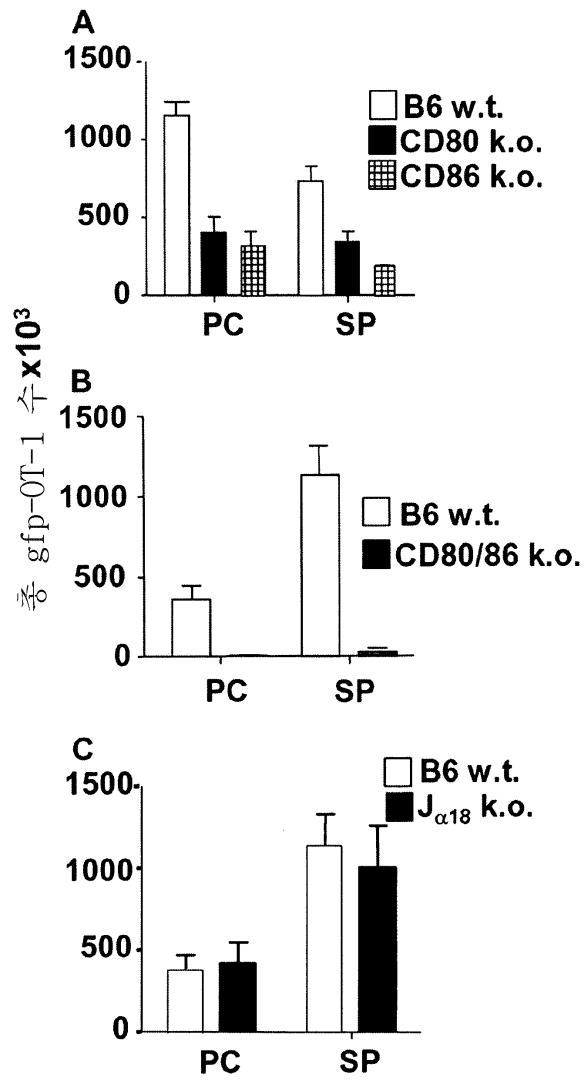
도면2



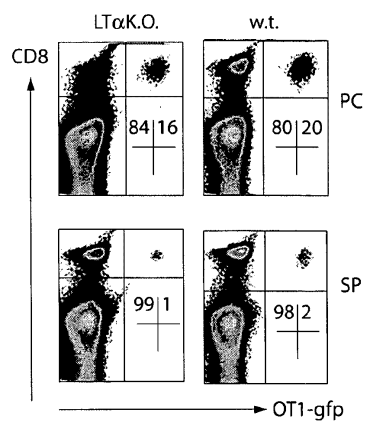
도면3



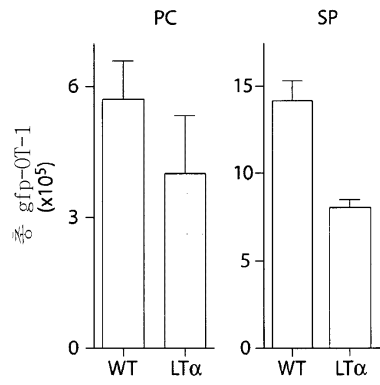
도면4



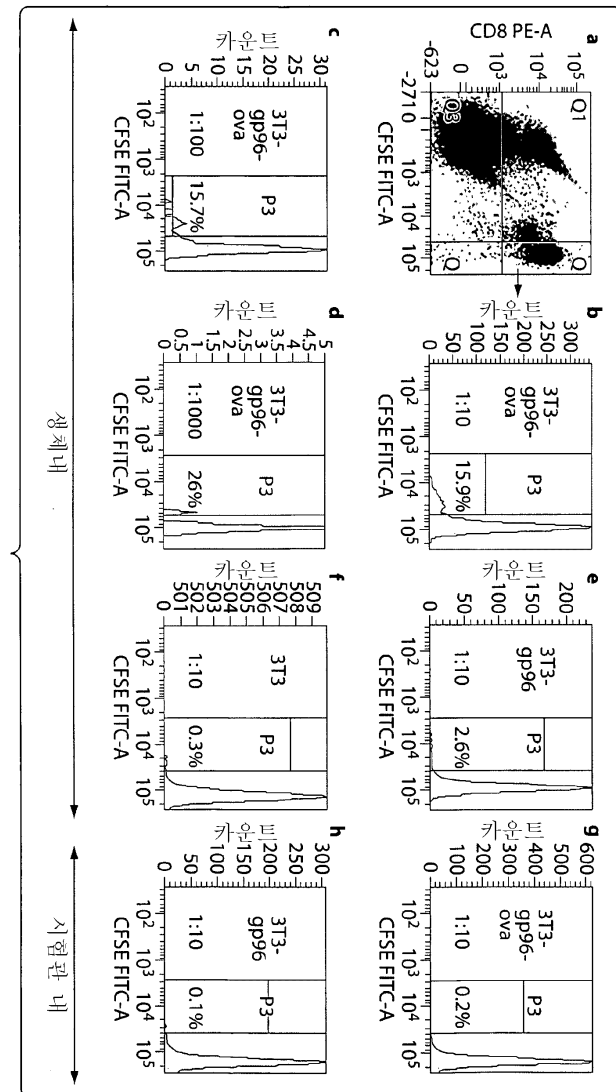
도면5a



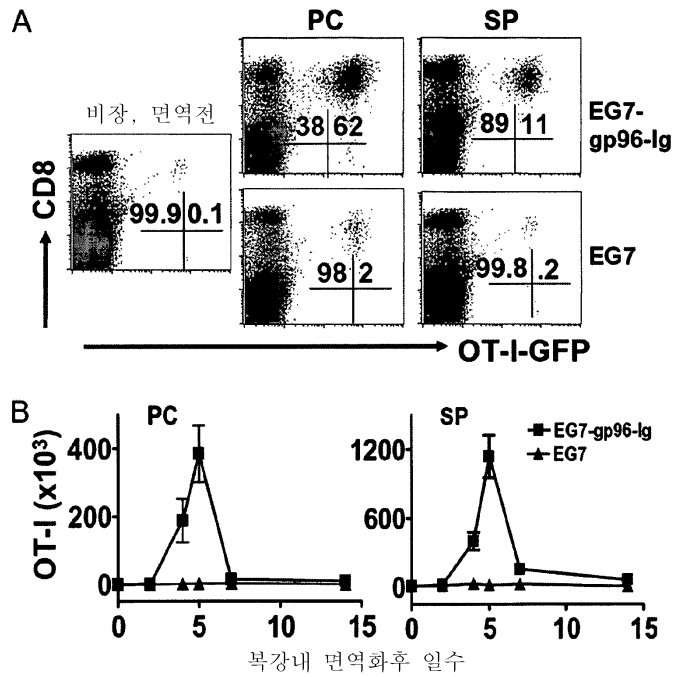
도면5b



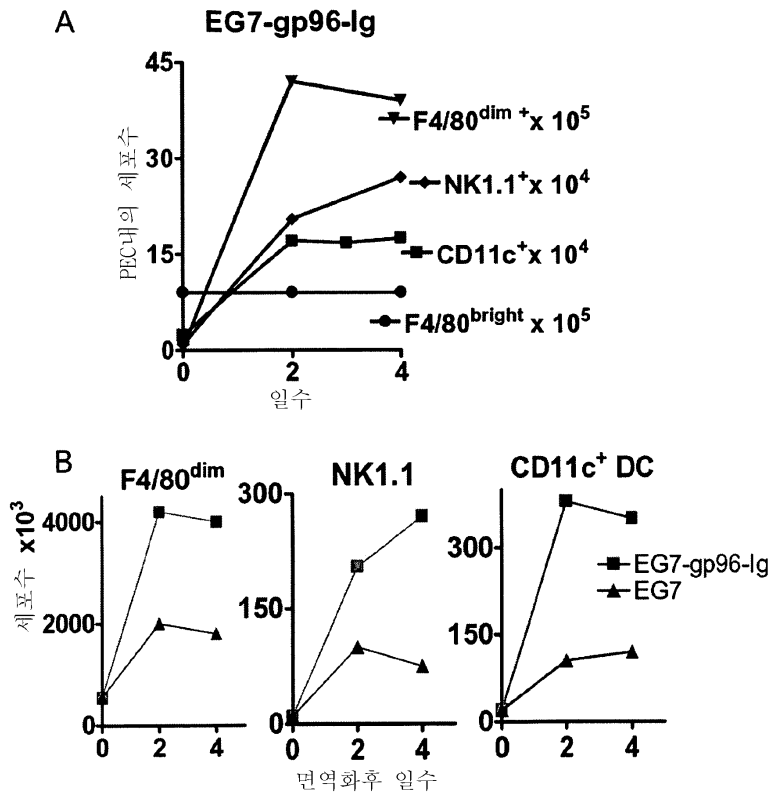
도면5c



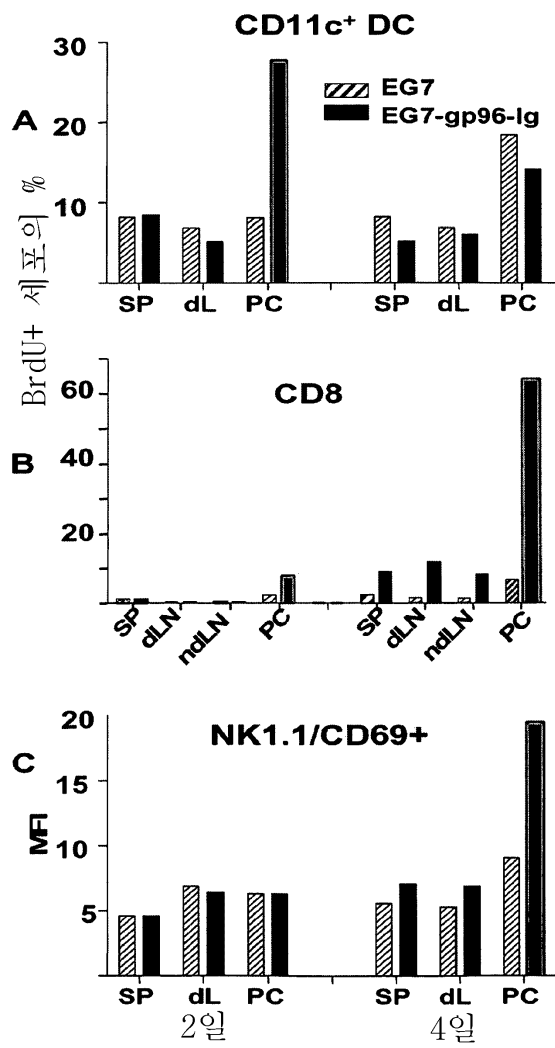
도면6



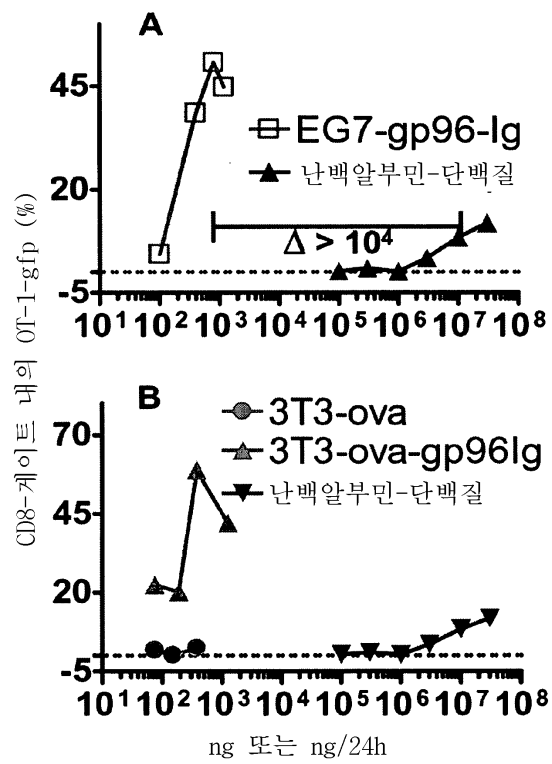
도면7



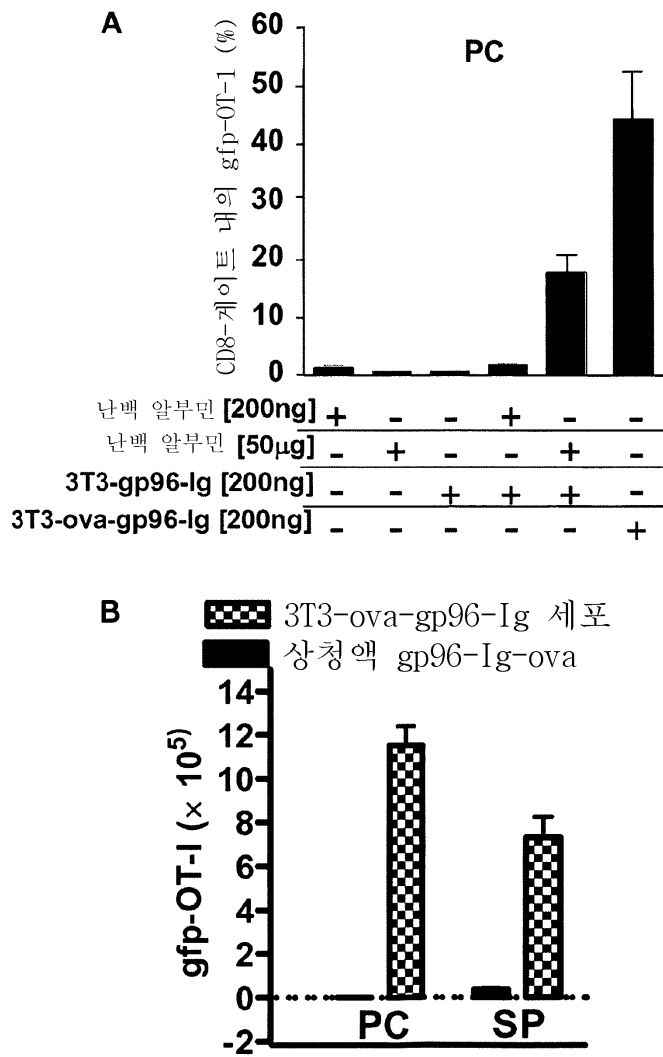
도면8



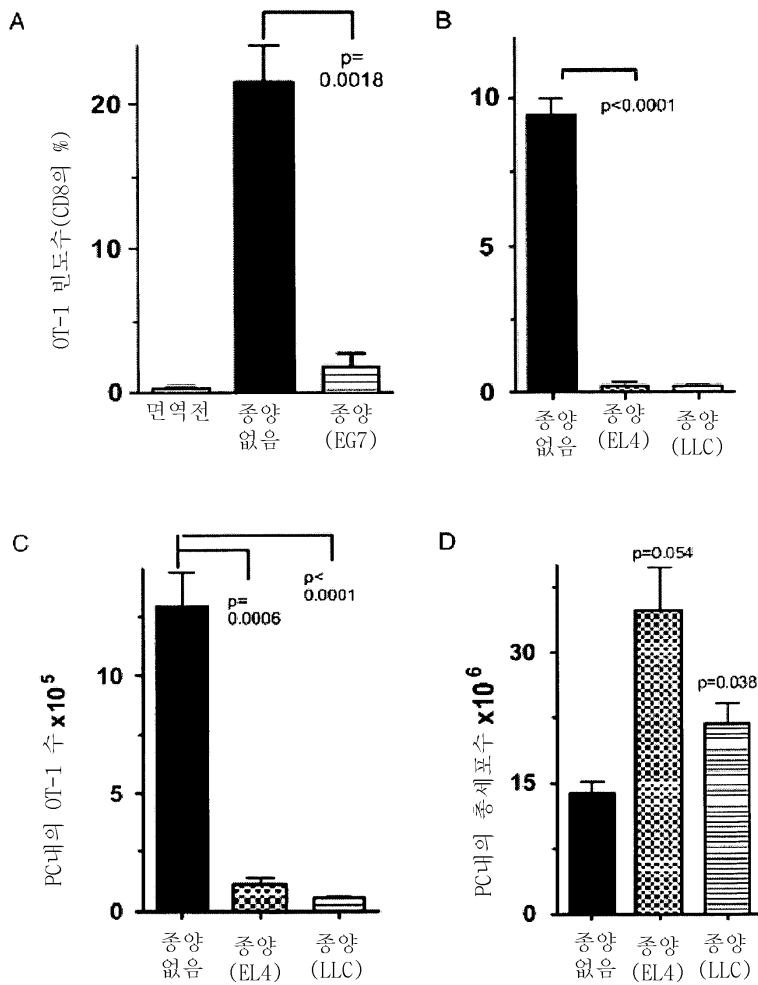
도면9



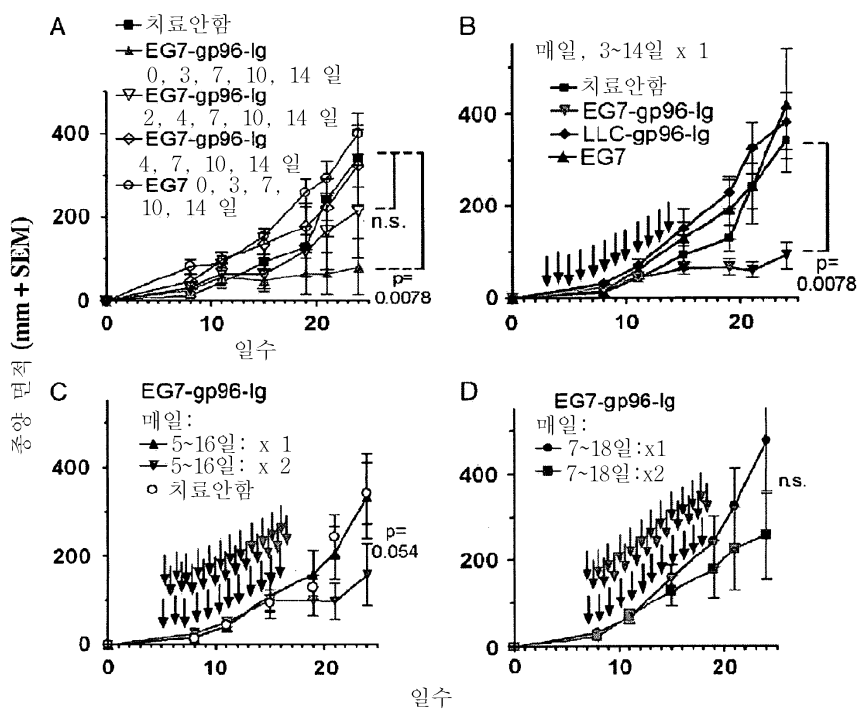
도면10



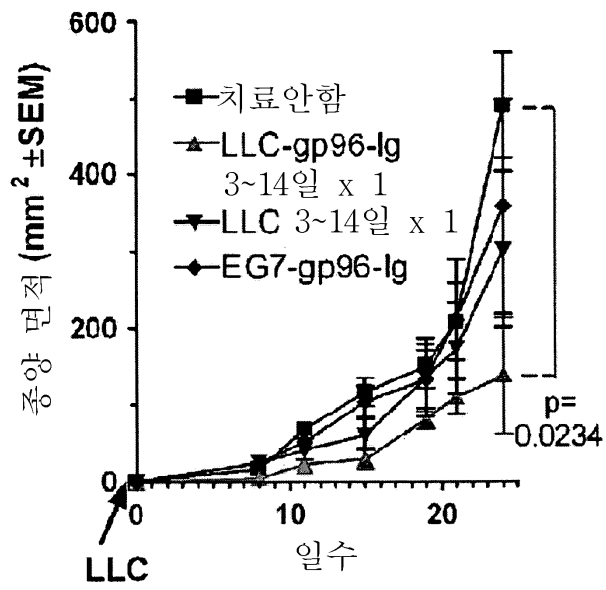
도면11



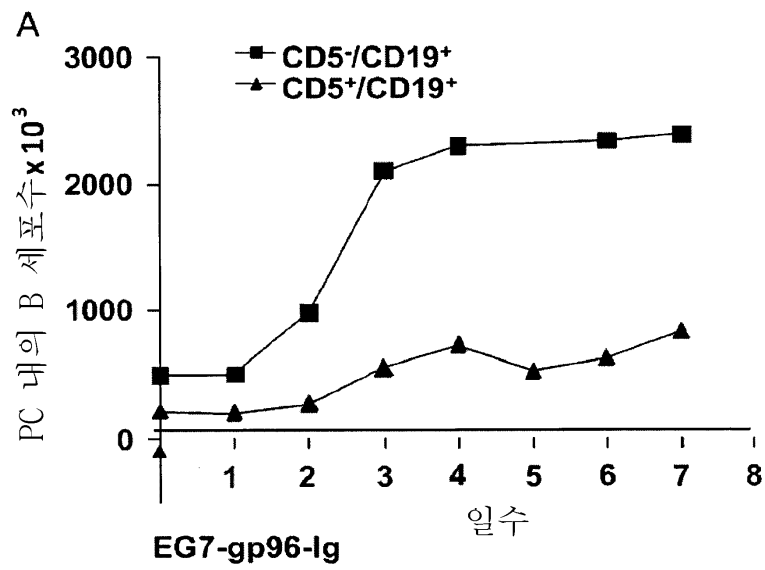
도면12



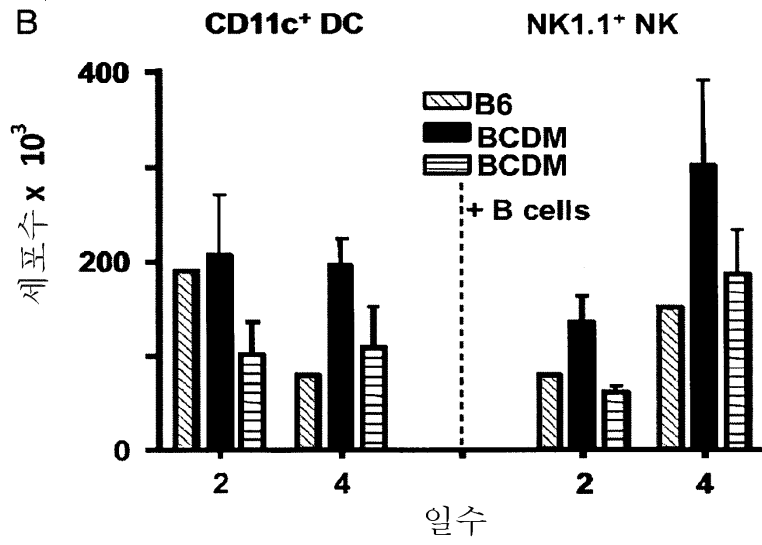
도면13



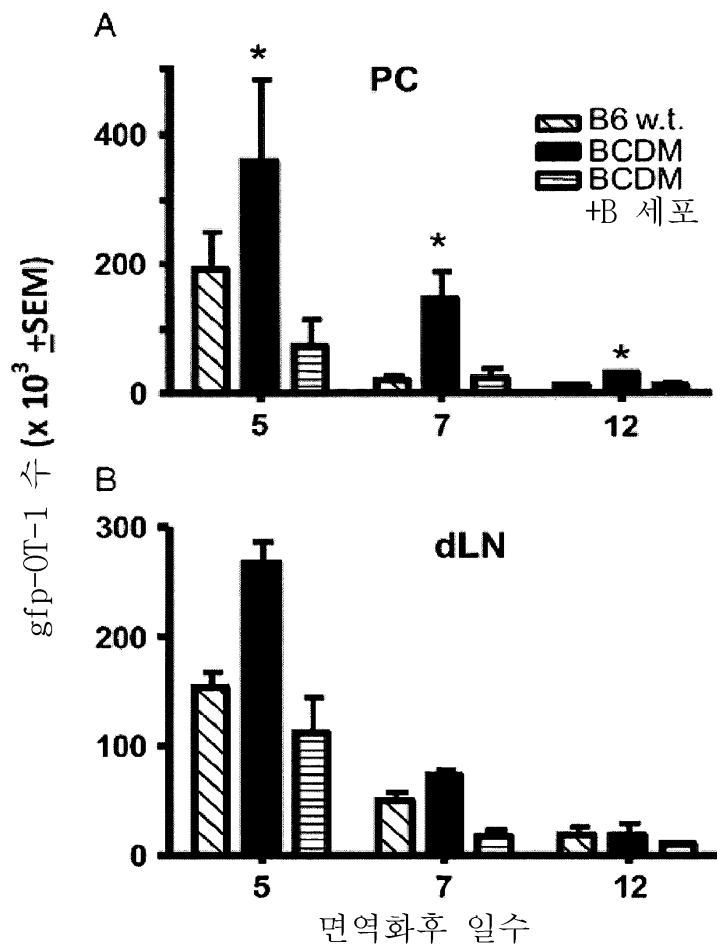
도면14a



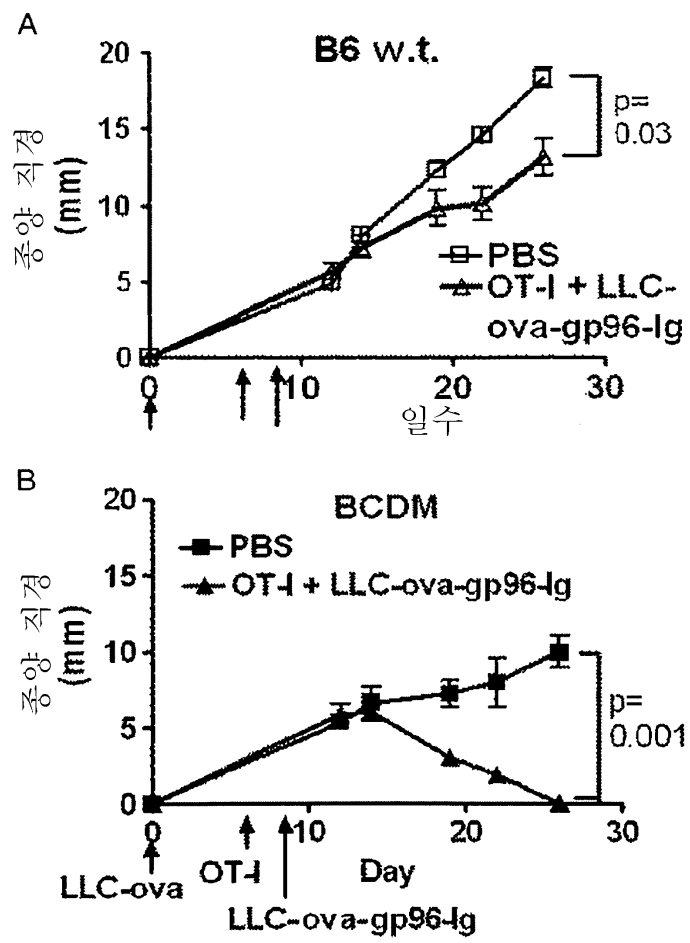
도면14b



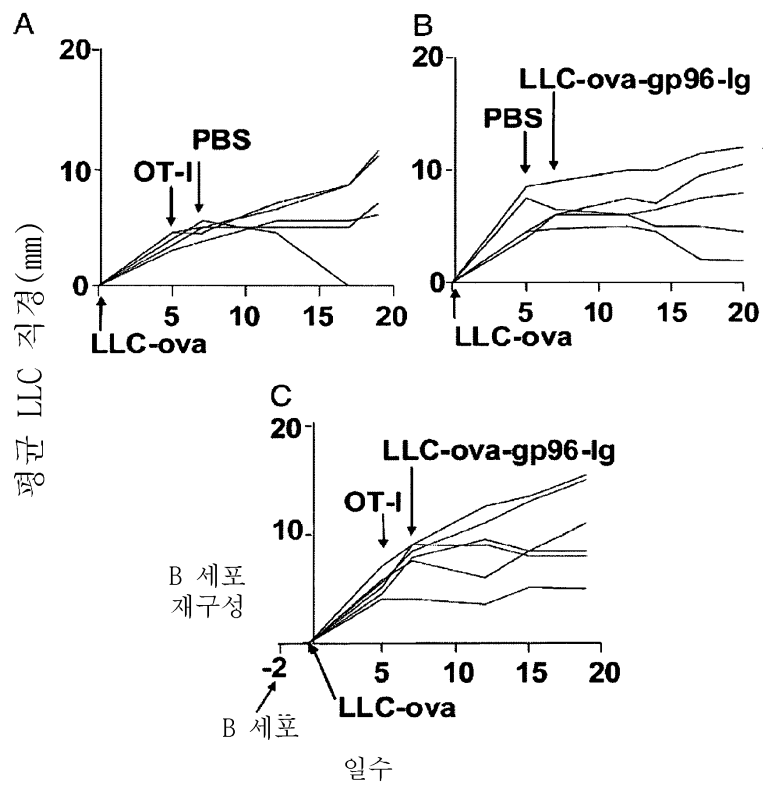
도면15



도면16



도면17



도면18

