



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0004791
(43) 공개일자 2015년01월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 38/21 (2006.01) A61K 38/17 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-7013355

(22) 출원일자(국제) 2012년10월22일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2014년05월19일

(86) 국제출원번호 PCT/US2012/061294

(87) 국제공개번호 WO 2013/059778

국제공개일자 2013년04월25일

(30) 우선권주장

61/549,681 2011년10월20일 미국(US)

61/594,304 2012년02월02일 미국(US)

(71) 출원인

캘리포니아 스템 셀, 인코포레이티드

미국 캘리포니아 알바인 슈트 150 캘리포니아 애브뉴 5251 (우:92617)

(72) 발명자

콘포쓰 앤드류

미국 92612 캘리포니아주 어빙 본 카르만 애비뉴 18301 스위트 130

딜만 로버트

미국 92612 캘리포니아주 어빙 본 카르만 애비뉴 18301 스위트 130

(74) 대리인

김성기, 김진희

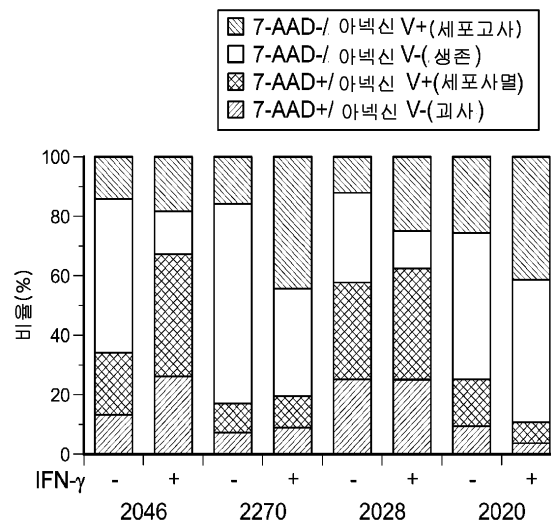
전체 청구항 수 : 총 34 항

(54) 발명의 명칭 감마 인터페론을 이용한 항원 제시 암 백신

(57) 요약

본 개시내용은 흑색종 치료를 위한 시약, 방법, 및 키트를 제공한다. 본 시약은 인터페론 감마(IFN 감마) 반응성인 흑색종 세포를 포함하고, 상기 세포는 자가포식성 및 비아포토시스성인 흑색종 세포이고, 세포는 MHC II형을 발현하는 것이다. 또 다른 측면에서, 시약은 IFN 감마 반응성, 비아포토시스성, MHC II형 발현 흑색종 세포가 적재된 수지상 세포를 포함하였다.

대표도 - 도2a



특허청구의 범위

청구항 1

흑색종을 앓는 피험체로부터 채취된 흑색종 세포로부터의 흑색종 특이 펩티드를 포함하는, 피험체로부터의 수지상 세포 집단으로서,

상기 흑색종 특이 펩티드는 시험관내에서 IFN 감마 또는 IFN 감마 모방체로 처리된 상기 흑색종 세포로부터 시험관내에서 수지상 세포에 의해 수득된 것이고;

시험관내에서 IFN 감마 또는 IFN 감마 모방체로 처리된 상기 흑색종 세포 중 60퍼센트(%) 초과는 자가포식성 및 비아پ토시스성이고,

수지상 세포 및 흑색종 세포는 동일한 피험체로부터의 것인, 수지상 세포 집단.

청구항 2

제1항에 있어서, 시험관내에서 IFN 감마 또는 IFN 감마 모방체로 처리된 상기 흑색종 세포 중 80% 초과가 자가포식성 및 비아پ토시스성인 수지상 세포 집단.

청구항 3

제1항의 포유동물 수지상 세포 집단을 포함하는, 제1항의 피험체를 위한 백신.

청구항 4

제1항에 있어서, 시험관내에서 수득된 흑색종 특이 펩티드 중 실질적으로 그들 모두가 세포 분열을 할 수 없는 흑색종 세포로부터의 것인 수지상 세포.

청구항 5

제1항에 있어서, 흑색종 특이 펩티드 중 실질적으로 그들 모두는, 흑색종 세포가 조사된(irradiated) 것이기 때문에 세포 분열을 할 수 없는 흑색종 세포로부터의 것인 수지상 세포.

청구항 6

제1항에 있어서, 흑색종 특이 펩티드 중 실질적으로 그들 모두는, 흑색종 세포의 염색체가 핵산 가교화제에 의해 가교되었기 때문에 세포 분열을 할 수 없는 흑색종 세포로부터의 것인 수지상 세포.

청구항 7

제1항에 있어서, IFN 감마 및 방사선(radiation)으로 처리된 흑색종 세포로부터의 것인 흑색종 특이 펩티드를 포함하는 수지상 세포.

청구항 8

제1항에 있어서, 흑색종 특이 펩티드를 포함하고, 상기 펩티드 모두가 IFN 감마 및 방사선으로 처리된 흑색종 세포로부터의 것인 수지상 세포.

청구항 9

제1항에 있어서, 자가포식성 및 비아پ토시스성인 흑색종 세포가 표면의 부착에 의해 수득되는 것인 수지상 세포 집단.

청구항 10

제1항에 있어서, 흑색종 특이 펩티드 중 실질적으로 그들 모두가 시험관내에서 세포 분열을 할 수 없도록 처리된 흑색종 세포로부터의 것인 수지상 세포.

청구항 11

제1항에 있어서, 피험체가 인간 피험체인 수지상 세포.

청구항 12

제1항에 있어서, 피험체가 인간이 아닌 포유동물인 수지상 세포.

청구항 13

흑색종을 앓는 피험체로부터의 1 이상의 성숙한 수지상 세포를 포함하는 흑색종 백신으로서,

1 이상의 성숙한 수지상 세포는 동일한 피험체로부터의 1 이상의 흑색종 종양 세포와의 접촉에 의해 제조되고,

1 이상의 성숙한 수지상 세포와 접촉되는 1 이상의 흑색종 종양 세포는 비분열성, 자가포식성, 및 비아포토시스성인 흑색종 백신.

청구항 14

제1항의 피험체에게 면역 자극량의, 제1항의 수지상 세포를 투여하는 단계, 또는 제13항의 피험체에게 면역 자극량의, 제13항의 백신을 투여하는 단계를 포함하는, 흑색종 특이 항원에 대한 면역 반응을 자극하는 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 자극받는 면역 반응이 $CD4^+$ T 세포 반응, $CD8^+$ T 세포 반응, 및 B 세포 반응 중 1 이상을 포함하는 것인 방법.

청구항 16

제17항에 있어서, $CD4^+$ T 세포 반응, $CD8^+$ T 세포 반응, 또는 B 세포 반응이 ELISPOT 검정법에 의해, 세포내 사이토카인 염색 검정법에 의해, 사량체 검정법에 의해, 또는 항원 특이 항체 생산을 검출함으로써 측정될 수 있는 것인 방법.

청구항 17

제14항에 있어서, 면역 반응이 2년 전체 생존(overall survival; OS)을 포함하는 생존기간을 포함하고, 2년 전체 생존이 60% 이상인 방법.

청구항 18

제14항에 있어서, 투여가 백신의 피하 주사를 포함하는 것인 방법.

청구항 19

제14항에 있어서, 투여가 3개월 동안 매주, 및 이후, 5개월 동안 매월 제공되는 백신 주사를 포함하는 것인 방법.

청구항 20

동일한 피험체로부터의 흑색종 세포 및 수지상 세포를 포함하는 수지상 세포 백신을 제조하는 방법으로서,

1 이상의 흑색종 세포를 세포 분열을 방지하는 제제(agent)로 처리하는 단계;

1 이상의 흑색종 세포를 시험관내에서 인터페론 감마(IFN 감마)로 또는 IFN 감마 모방체로 처리하는 단계;

자가포식성 및 비아포토시스성인 흑색종 세포를 선별하는 단계;

비자가포식성 및 아포토시스성인 흑색종 세포를 거부(reject)하는 단계;

자가포식성 및 비아포토시스성인 흑색종 세포를 1 이상의 자가 수지상 세포에 접촉시키는 단계; 및

1 이상의 흑색종 유래 펩티드가 1 이상의 자가 수지상 세포에 의해 흡수(uptake)되도록 하는 단계를 포함하는

방법.

청구항 21

제1 피험체로부터의, 인터페론 감마(IFN 감마) 처리된 흑색종 세포, 및 동일한 제1 피험체로부터의 항원 제시 세포(APC)를 포함하는 조성물로서, 흑색종 세포가

자가포식성; 및

비아포토시스성인 조성물.

청구항 22

제21항에 있어서, 흑색종 세포가 MHC II형 발현인 조성물.

청구항 23

제21항에 있어서, APC가 수지상 세포, 대식세포, 또는 B 세포인 조성물.

청구항 24

제21항에 있어서, 흑색종 세포가 흑색종 특이 펩티드를 포함하고, 흑색종 특이 펩티드는 APC 내에 함유되지 않은 것인 조성물.

청구항 25

제21항에 있어서, 흑색종 세포가 흑색종 특이 펩티드를 포함하고, 흑색종 특이 펩티드 중 1 이상은 APC에 의해 흡수되고 APC에 의해 포함되어 있는 것인 조성물.

청구항 26

제21항에 있어서, IFN 감마 처리된 흑색종 세포가 APC 내에 적재된 것인 조성물.

청구항 27

제21항에 있어서, IFN 감마 처리된 흑색종 세포가 APC 내에 적재되지 않은 것인 조성물.

청구항 28

제21항에 있어서, 흑색종 세포의 자가포식이 미세소관 결합 단백질 경쇄 3(LC3)을 검정하는 테스트에 의해 입증되는 것인 조성물.

청구항 29

제21항에 있어서, 흑색종 세포가 시제(reagent)인 7-아미노액티노마이신 D(7-ADD), 또는 시제인 아넥신 중 1 이상을 사용하여 비아포토시스성인 것으로 입증된 것인 조성물.

청구항 30

흑색종을 앓고 있고 흑색종 세포를 포함하는 피험체에서 면역 반응을 자극하는 방법으로서, 피험체가 제1 피험체와 동일한 피험체이고, 면역 유효량의, 제21항의 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 31

제1항의 백신 또는 제21항의 조성물을 제조하는 방법으로서, 1 이상의 자가포식성, 비아포토시스성 흑색종 종양 세포를 1 이상의 항원 제시 세포(APC)에 접촉시키는 단계를 포함하고, 1 이상의 자가포식성, 비아포토시스성 흑색종 종양 세포는 제1 인간 피험체로부터의 것이고, 1 이상의 APC는 동일한 제1 인간 피험체로부터의 것인 방법.

청구항 32

제1 피험체로부터 수득된 흑색종 세포를 세포 분열을 방지하는 제제로 처리하는 단계; 흑색종 세포를 IFN 감마

또는 IFN 감마 모방체로 처리하는 단계; 자가포식성 및 미아포토시스성인 흑색종 세포를 선별하는 단계; 및 선별된 흑색종 세포를 동일한 제1 피험체로부터의 자가 수지상 세포와 접촉시키는 단계를 포함하는, 수지상 세포 백신을 제조하는 방법.

청구항 33

제32항의 방법에 의해 제조된 바와 같은 수지상 세포 백신을 포함하는 조성물.

청구항 34

흑색종을 앓는 피험체에게 제33항의 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 흑색종 특이 항원에 대한 면역 반응을 자극하는 방법.

명세서

기술분야

[0001]

관련 출원

[0002]

본 출원은 2011년 10월 20일 출원된 미국 가출원 번호 제61/549,681호, 및 2012년 2월 2일 출원된 미국 가출원 번호 제61/594,304호의 전체 파리 조약 우선권 및 이점을 주장하며, 상기 출원들은 그 전문이 본원에 참고로 포함된다.

[0003]

기술분야

[0004]

본 개시내용은 흑색종 치료, 치료에 적합한 피험체에 대한 스크리닝, 물질 조성물, 방법 및 키트에 관한 것이다.

배경 기술

[0005]

암은 암에 대한 효과적인 면역 반응이 부족한 것으로 구별된다. 면역 반응 부족은 예를 들어, 많은 종양 항원은 "자가(self) 항원"이라는 사실로부터, 종양 세포에 의한 MHC 발현 부족과 그에 따른 종양 세포에 의한 종양 항원 제시 부족으로부터, 대식세포와 종양의 회합을 통해, 대식세포의, 면역 반응을 감소시키는 사이토카인의 발현으로부터, T 조절 세포(Tregs: T regulatory cells)의 면역억제성 활성화로부터 일어날 수 있다. 종양에 대한 면역 반응 부족은 또한 종양 세포가 선천 면역 반응을 자극하는 분자, 즉, 톨 유사 수용체(TLR: toll-like receptor) 또는 뉴클레오티드 결합 올리고머화 도메인(NOD: nucleotide binding oligomerization domain) 유사 수용체를 자극하는 분자를 발현하지 않는 경향이 있다는 사실로부터도 일어난다. 암은 고형 종양 뿐만 아니라, 혈액 암, 예컨대, 백혈병 및 골수형성이상 증후군을 포함한다.

[0006]

면역계는 세포 면역, 체액 면역, 및 보체 반응을 포함한다. 세포 면역은 수지상 세포, $CD8^+$ T 세포(세포독성 T 세포; 세포독성 림프구), 및 $CD4^+$ T 세포(헬퍼 T 세포)를 포함하는 세포 네트워크 및 이벤트를 포함한다. 수지상 세포(DC: dendritic cell)는 폴리펩티드 항원을 수득하는데, 여기서, 이들 항원은 DC의 외부로부터 수득될 수 있거나, 또는 감염 유기체에 의해 DC 내부에서 생합성될 수 있다. DC는 폴리펩티드를 프로세싱하여 길이가 약 10개의 아미노산 길이인 펩티드로 만들고, 이 펩티드를 MHC I형 또는 MHC II형으로 전달하여 복합체를 형성하고, 상기 복합체를 DC의 표면으로 왕복 수송시킨다. MHC I형/펩티드 복합체를 보유하는 DC가 $CD8^+$ T 세포와 접촉하게 되면, 그 결과로 $CD8^+$ T 세포는 활성화되고, 증식하게 된다. MHC II형의 역할과 관련하여, MHC II형/펩티드 복합체를 보유하는 DC가 $CD4^+$ T 세포와 접촉하게 되면, 그 결과로 $CD4^+$ T 세포는 활성화되고, 증식하게 된다(문헌 [Munz, et al., (2010) Curr. Opin. Immunol. 22:89-93]; [Monaco (1995) J. Leukocyte Biol. 57:543-547]; [Robinson, et al., (2002) Immunology 105:252-262]). 항원을 T 세포에 제시하는 수지상 세포가 상기 T 세포를 "활성화"시킬 수는 있지만, 활성화된 T 세포가 효과적인 면역 반응을 개시하지 못할 수도 있다. $CD8^+$ T 세포에 의한 효과적인 면역 반응은 다수의 상호작용 중 1 이상에 의한 DC의 사전 자극을 필요로 한다. 이러한 상호작용으로는 ($CD4^+$ T 세포의 CD40 리간드의 DC의 CD40 수용체와의 접촉에 의한) $CD4^+$ T 세포의 DC에의 직접적인 접촉, 또는 TLR 효능계의 수지상 세포의 톨 유사 수용체(TLR) 중 하나에의 직접적인 접촉을 포함한다.

[0007] 체액 면역은 B 세포 및 항체를 나타낸다. B 세포는 형질 세포로 전환되어, 형질 세포는 항체를 발현하고 분비한다. 나이브 B 세포는 마커 CD27을 발현하지 못하는 반면, 항원 특이 B 세포는 CD27을 발현한다는 점에서 구별된다(문헌 [Perez-Andres, et al., (2010) Cytometry Part B 78B (Suppl. 1) S47-S60]). 이어서, 분비된 항체는 종양 세포 표면 상에 존재하는 종양 항원에 결합할 수 있다. 그 결과, 감염된 세포 또는 종양 세포는 항체로 태깅된다. 항체가 감염된 세포 또는 종양 세포에 결합하게 되면, 결합된 항체는 NK 세포에 의해 이루어지는 감염된 세포 또는 종양 세포의 사멸을 매개한다. 비록 NK 세포는 특이 표적 항원을 인식하도록 형성된 것은 아니지만, T 세포가 표적 항원을 인식하도록 형성된 것인 방식으로 NK 세포가 항체의 불변 영역에 결합할 수 있는 능력을 통해서 NK 세포는 항체로 태깅된 세포를 특이적으로 사멸시킬 수 있다. 항체의 NK 세포 인식은 항체의 Fc 부위에 결합하는 (NK 세포의) Fc 수용체에 의해 매개된다. 이러한 유형의 사멸은 항체 의존성 세포 세포독성(ADCC: antibody-dependent cell cytotoxicity)으로 명명된다. NK 세포는 또한 ADCC의 기전과는 상관없이 세포를 사멸시킬 수 있는데, 이러한 사멸을 위해서는 표적 세포에서의 MHC I형의 발현은 상실되거나, 결핍되어야 한다(예컨대, 문헌 [Caligiuri (2008) Blood 112:461-469] 참조).

[0008] "지연형 과민성 반응(delayed type hypersensitivity)"이라는 기법을 사용하여 주로 세포 면역을 포함하는 면역 반응 또는 주로 체액 면역을 포함하는 면역 반응을 구별할 수 있다. 지연형 과민성 반응으로부터의 신호가 양성이라면, 이는 세포 반응을 나타내는 것이다(예컨대, 문헌 [Roychowdhury, et al., (2005) AAPS J. E834-E846] 참조).

[0009] 자가포식(Autophagy)이란 분해를 위해 세포질 성분 및 세포 소기관을 리소좀으로 전달하는 항상성 과정이다. 자가포식은 또한 CD4⁺ T 세포 인식을 위해 세포질 항원을 구조적 적합성 복합체(MHC: major histocompatibility complex) II형 분자 상에 적재(load)하는, 세포내 병원체와의 선천 및 적응 면역 반응과도 관련이 있다.

[0010] **설명**

[0011] 첨부된 특허청구범위를 포함하는 본원에서 사용되는 바, 예컨대, "하나"("a," "an") 및 "그"와 같은, 단수 형태의 단어는 문맥상 달리 명확하게 언급되지 않는 한, 그의 상응하는 복수의 지시 대상을 포함한다. 본원에서 인용된 모든 참고문헌은 마치 각 개별 공개 문헌, 특허, 공개된 특허 출원, 및 서열 목록 뿐만 아니라, 상기 공개 문헌 및 특허 문헌 중의 도 및 도면이 참조로 포함된다고 구체적으로 및 개별적으로 언급된 것과 같은 정도로 참조로 포함된다.

발명의 내용

[0012] **본 개시내용의 요약**

[0013] 본 개시내용은 제1 피험체로부터 수득된 흑색종 세포를 세포 분열을 방지하는 제제(agent)로 처리하는 단계, 흑색종 세포를 IFN 감마로, 또는 IFN 감마 모방체로 처리하는 단계, 자가포식성(autophagic) 및 비아포토시스성(non-apoptotic)인 흑색종 세포를 선별하는 단계; 및 선별된 흑색종 세포를 동일한 제1 피험체로부터의 자가 수지상 세포와 접촉시키는 단계를 포함하는, 수지상 세포 백신을 제조하는 방법을 개시한다. 상기 방법에 의해 제조된, 수지상 세포 백신을 포함하는 조성물 또한 제공한다. 흑색종을 앓는 피험체에게 상기 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 흑색종 특이 항원에 대한 면역 반응을 자극하는 방법 또한 본 개시내용에 의해 제공된다.

[0014] 흑색종을 앓고 있고 흑색종 세포를 포함하는 주어진 피험체로부터의 포유동물 수지상 세포 집단(population)을 포함하는 백신으로서, 여기서, 상기 피험체가 포함하는 흑색종 세포는 시험관내에서 IFN 감마 또는 IFN 감마 모방체로 처리되었을 때, 자가포식성 및 비아포토시스성인 흑색종 세포를 포함하고, 여기서, 수지상 세포는 흑색종 특이 펩티드 항원을 포함하고, 여기서, 상기 흑색종 특이 펩티드 항원은 상기 흑색종 세포로부터 시험관내에서 수지상 세포에 의해 수득된 것이고, 여기서, 수지상 세포가 포함하는 흑색종 특이 펩티드 중 60퍼센트(%) 초과는 자가포식성 및 비아포토시스성인 흑색종 세포로부터의 것이고, 여기서, 수지상 세포가 포함하는 흑색종 특이 펩티드 중 40퍼센트(%) 미만은 비자가포식성 및 아포토시스성인 흑색종 세포로부터의 것이고, 여기서, 수지상 세포 및 흑색종 세포는 동일한 피험체로부터의 것인, 백신이다. 자가포식성 및 비아포토시스성인 흑색종 세포가 표면의 부착에 의해 수득된 것인, 상기 수지상 세포 집단을 제공한다.

[0015] 일부 경우에, 흑색종 특이 펩티드 중 80% 초과는 자가포식성 및 비아포토시스성인 흑색종 세포로부터의 것이고, 여기서, 흑색종 특이 펩티드 중 20% 미만은 비자가포식성 및 아포토시스성인 흑색종 세포로부터의 것인, 백신을 개시한다.

[0016] 일부 경우에, 흑색종 특이 펩티드 중 90% 초과는 자가포식성 및 비아포토시스성인 흑색종 세포로부터의 것이고,

여기서, 흑색종 특이 펩티드 중 10% 미만은 비자가포식성 및 아포토시스성인 흑색종 세포로부터의 것인, 백신을 개시한다.

- [0017] 일부 경우에, 흑색종 특이 펩티드 중 실질적으로(본질적으로) 그들 모두가 세포 분열을 할 수 없는 흑색종 세포로부터의 것인, 백신을 개시한다.
- [0018] 일부 경우에, 흑색종 특이 펩티드 중 실질적으로 그들 모두는, 흑색종 세포가 조사(irradiated)되었기 때문에 세포 분열을 할 수 없는 흑색종 세포로부터의 것인, 백신을 개시한다.
- [0019] 일부 경우에, 흑색종 특이 펩티드 중 실질적으로 그들 모두는, 흑색종 세포의 염색체가 핵산 가교화제에 의해 가교되었기 때문에, 세포 분열을 할 수 없는 흑색종 세포로부터의 것인, 백신을 개시한다.
- [0020] 일부 경우에, 흑색종 특이 펩티드 모두 IFN 감마 처리된 또는 IFN 감마 모방체 처리된 흑색종 세포인 것인 흑색종 세포로부터의 것인, 백신을 개시한다.
- [0021] 일부 경우에, 흑색종 특이 펩티드 모두 IFN 감마 처리되지 않고, IFN 감마 모방체 처리되지 않은 흑색종 세포로부터의 것인, 백신을 개시한다.
- [0022] 일부 경우에, 자가포식성 및 비아포토시스성인 흑색종 세포로부터의 흑색종 특이 펩티드가 제1 개수(number)로 존재하고, 여기서, 비자가포식성 및 아포토시스성인 흑색종 세포로부터의 흑색종 특이 펩티드가 제2 개수로 존재하고, 여기서, 상기 제1 개수 및 제2 개수, 둘 모두 S-100, HMB-45, Mel-2, Melan-A, Mel-5, MAGE-1, MART-1, 또는 티로시나제 중 하나인 흑색종 특이 항원의 개수를 의미하고, 여기서, 상기 60퍼센트(%) 초과는 제1 개수의 것으로부터 유래된 것이고, 여기서, 상기 40퍼센트(%) 미만은 제2 개수의 것으로부터 유래된 것인, 백신을 개시한다.
- [0023] 일부 경우에, 자가포식성 및 비아포토시스성인 흑색종 세포로부터의 흑색종 특이 펩티드가 제1 개수로 존재하고,
- [0024] 여기서, 비자가포식성 및 아포토시스성인 흑색종 세포로부터의 흑색종 특이 펩티드가 제2 개수로 존재하고, 여기서, 상기 제1 개수 및 제2 개수, 둘 모두 S-100, HMB-45, Mel-2, Melan-A, Mel-5, MAGE-1, MART-1, 또는 티로시나제 중 2개인 흑색종 특이 항원의 개수를 의미하고, 여기서, 상기 60퍼센트(%) 초과는 제1 개수의 것으로부터 유래된 것이고, 여기서, 상기 40퍼센트(%) 미만은 제2 개수의 것으로부터 유래된 것인, 백신을 개시한다.
- [0025] 일부 경우에, 자가포식성 및 비아포토시스성인 흑색종 세포로부터의 흑색종 특이 펩티드가 제1 개수로 존재하고, 여기서, 비자가포식성 및 아포토시스성인 흑색종 세포로부터의 흑색종 특이 펩티드가 제2 개수로 존재하고, 여기서, 상기 제1 개수 및 제2 개수, 둘 모두 S-100, HMB-45, Mel-2, Melan-A, Mel-5, MAGE-1, MART-1, 또는 티로시나제 중 3개인 흑색종 특이 항원의 개수를 의미하고, 여기서, 상기 60퍼센트(%) 초과는 제1 개수의 것으로부터 유래된 것이고, 여기서, 상기 40퍼센트(%) 미만은 제2 개수의 것으로부터 유래된 것인, 백신을 개시한다. 다른 실시양태는 언급된 항원 중 4, 5, 6, 7 또는 8개를 이용한다. 전체적으로 상이한 흑색종 특이 항원의 사용 또한 포함한다.
- [0026] 일부 경우에, 흑색종 특이 펩티드 중 실질적으로 그들 모두는, IFN 감마 처리된 흑색종 세포인 흑색종 세포로부터의 것인, 백신을 개시한다.
- [0027] 일부 경우에, 흑색종 특이 펩티드 중 실질적으로 그들 모두는, 시험관내에서 세포 분열을 할 수 없도록 처리된 흑색종 세포로부터의 것인, 백신을 개시한다. 주어진 피험체가 인간 피험체인 상기 백신 또한 포함한다.
- [0028] 추가로, 본 개시내용은 주어진 피험체가 인간이 아닌 포유동물인 백신을 제공한다.
- [0029] 피험체에게 면역 자극량의 상기 백신을 투여하는 단계를 포함하는, 흑색종 특이 항원에 대한 면역 반응을 자극하는 방법을 개시한다.
- [0030] 자극받는 면역 반응이 $CD4^{+}$ T 세포 반응, $CD8^{+}$ T 세포 반응, 및 B 세포 반응 중 1 이상을 포함하는 것인 방법을 개시한다.
- [0031] $CD4^{+}$ T 세포 반응, $CD8^{+}$ T 세포 반응, 또는 B 세포 반응이 ELISPOT 검정법(assays)에 의해, 세포내 사이토카인 염색 검정법에 의해, 사량체(tetramer) 검정법에 의해, 또는 항원 특이 항체 생산을 검출함으로써 측정될 수 있는 것인 방법을 개시한다.

- [0032] 면역 반응이 2년 전체 생존(OS: overall survival)을 포함하는 생존기간을 포함하고, 여기서, 2년 전체 생존은 60% 이상인 방법을 개시한다.
- [0033] 추가로, 투여가 백신의 피하 주사를 포함하는 것인 상기 방법을 제공한다.
- [0034] 투여가 3개월 동안 매주, 이후, 5개월 동안 매월 제공되는 백신 주사를 포함하는 것인 방법을 개시한다.
- [0035] 수지상 세포 백신을 제조하는 방법을 개시한다.
- [0036] 1 이상의 흑색종 세포를 세포 분열을 방지하는 제제로 처리하는 단계로서, 여기서, 1 이상의 흑색종 세포를 인터페론 감마(IFN 감마)로, 또는 IFN 감마 모방체로 처리하는 것인 단계; 자가포식성 및 비아포토시스성인 흑색종 세포를 선별하는 단계로서, 여기서, 비자가포식성 및 아포토시스성인 흑색종 세포는 거부(reject)하는 단계를 포함하고, 여기서, 자가포식성 및 비아포토시스성인 흑색종 세포를 1 이상의 자가 수지상 세포에 제공하거나, 또는 자가포식성 및 비아포토시스성인 흑색종 세포로부터 유래된 펩티드를 1 이상의 자가 수지상 세포에 제공하는 것인, 동일한 피험체로부터의 흑색종 세포 및 수지상 세포를 포함하는 수지상 세포 백신을 제조하는 방법을 개시한다.
- [0037] 제1 피험체로부터의, 인터페론(IFN) 감마로 처리된 1 이상의 흑색종 세포, 및 동일한 제1 피험체로부터의 1 이상의 항원 제시 세포(APC)를 포함하는 조성물로서, 여기서, 흑색종 세포는 자가포식성; 비아포토시스성; 및 MHC II형 발현인 조성물을 개시한다. 또 다른 측면에서, IFN 감마 처리된 흑색종 세포가 APC 내에 적재되어 있는 것인 상기 조성물; 뿐만 아니라, IFN 감마 처리된 흑색종 세포가 APC 내에 적재되어 있지 않은 것인 상기 조성물을 포함한다. 또 다른 측면에서, 흑색종 세포가 병기 I, 병기 II, 병기 III, 또는 병기 IV인 흑색종을 앓는 피험체로부터의 것인 상기 조성물을 포함한다. 추가로, APC가 1 이상의 수지상 세포를 포함하는 것인, 상기 조성물, 관련된 키트, 및 관련된 방법을 고려한다.
- [0038] 한 측면에서, 본 개시내용의 제약 조성물, 시제(시약)(reagent), 및 관련된 방법은 IFN 감마 처리 후, 7-AAD 음성 및 아넥신 V 음성인 암 세포 제제를 사용한다. 상기 집단은 비제한적인 일례를 제공하기 위해, 예컨대, 약 99% 7-AAD 음성 및 약 99% 아넥신 V 음성이거나, 또는 95% 이상 7-AAD 음성 및 95% 이상 아넥신 V 음성이거나, 또는 90% 이상 7-AAD 음성 및 90% 이상 아넥신 V 음성인 것이다.
- [0039] 추가로, 자가포식이 미세소관 결합 단백질 경계 3(LC3)을 검정하는 테스트에 의해 입증되는 것인 상기 조성물; 및 세포가 시약인 7-아미노엑티노마이신 D(7-ADD), 또는 시약인 아넥신 중 1 이상을 사용하여 비아포토시스성인 것으로 입증된 것인 상기 조성물을 포함한다.
- [0040] 본 방법의 측면에서, 제1 피험체로부터 1 이상의 흑색종 세포를 제거하는 단계, 제1 피험체로부터 1 이상의 APC를 제거하는 단계, 및 흑색종 세포를 APC에 접촉시키는 단계를 포함하는, 상기 개시된 조성물을 제조하는 방법; 뿐만 아니라, 피험체에게 상기 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 피험체 또는 환자에서 흑색종에 대한 면역 반응을 자극하는 방법을 제공한다.
- [0041] 환자로부터의 흑색종 세포가 비아포토시스성 및 자가포식성이고, 여기서, 흑색종 세포가 MHC II형을 발현함으로써 첨가된 IFN 감마에 반응하는 것인 방법; 뿐만 아니라, 흑색종 세포가 항원 제시 세포 상에 적재되기 이전에 조사되는 것인 상기 방법을 개시한다.
- [0042] 흑색종 세포가 IFN 감마의 아포토시스 유발 효과에 비감수성인지 여부를 측정하는 단계, 및 피험체에게 상기 조성물 중 1 이상을 투여하는 단계를 포함하는, 흑색종 환자에서 흑색종을 치료하는 방법을 개시한다.
- [0043] 또 다른 측면에서, 흑색종 세포가 IFN 감마의 아포토시스 유발 효과에 비감수성인지 여부를 측정하는 단계, 및 피험체에게 상기 개시된 조성물 중 1 이상을 투여하는 단계를 포함하는, 흑색종 환자에서 흑색종에 대한 면역 반응을 자극하거나, 또는 증진시키는 방법을 제공한다. 면역 반응이 체액 면역 반응, 세포 면역 반응, 또는 선천 면역 반응 중 1 이상인 상기 방법 또한 공급한다.
- [0044] 키트의 측면에서, 본 개시내용은 피험체에서 중앙 항원에 대한 면역 반응을 테스트하기 위한 테스트용 키트로서, 여기서, 피험체는 상기 방법 중 1 이상에 의해 처리되고, 여기서, 키트는 체액 면역 반응, 세포 면역 반응, 또는 선천 면역 반응을 검출하는 시약을 포함하는 것인 키트를 제공한다.
- [0045] 정의
- [0046] 면역 자극량(immune-stimulatory amount)이란 제한 없이, ELISPOT 검정 결과를 측정 가능한 양만큼 증가시키거나, ICS 검정 결과를 측정 가능한 양만큼 증가시키거나, 사랑체 검정 결과를 측정 가능한 양만큼 증가시키거나,

항원 특이 CD4⁺ T 세포의 혈액 집단을 측정 가능한 양만큼 증가시키거나, 항원 특이 CD8⁺ T 세포의 혈액 집단을 측정 가능한 양만큼 증가시키거나, 또는 여기서, 적합한 대조군과 비교하였을 때, 증가가 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 1.5배, 2.0배, 3.0배 이상 등인 것인 양일 수 있다. 적합한 대조군은 수지상 세포에 흑색종 세포가 적재되지 않은 것이거나, 또는 흑색종 세포로부터 유래된 펩티드가 적재되지 않은 것인 대조군 백신일 수 있다.

[0047] "흑색종 특이 항원"이라는 용어는 빈번하게 흑색종과 관련하여 사용되는 항원으로서, 여기서, 항원은 다른 암과 관련이 있는 것이 아니라, 흑색종에 대해 독특한 것으로 간주되는 것인 항원을 포함하고, 추가로, "흑색종 특이 항원"이라는 용어는 빈번하게 흑색종과 관련된 항원으로서, 여기서, 항원은 다른 유형의 암, 예컨대, 유방암, 결장직장암 등과도 또한 관련이 있는 것인 항원을 포함한다.

[0048] 본 개시내용을 위해 흑색종 세포에 조사하는 것과 관련하여 "조사된(irradiated)"은 바람직하게는 감마 방사선에 의한 것이지만, 이는 또한 x선, 전자, 중성자, 양성자, 전자기 방사선, 가시광선, 자외선 등에 의한 조사도 포함한다. 한 측면에서, 방사선은 흑색종 세포의 세포 분열을 방지하는 작용을 한다. 또 다른 측면에서, 방사선은 세포 분열을 방지할 뿐만 아니라, 세포 단백질도 변형시킨다. 방사선에 대한 대안으로서, 본 개시내용은 물리적 파괴, 예컨대, 초음파 처리, 공동, 탈수, 이온 고갈에 의해, 또는 1 이상의 염의 노출로부터의 독성에 의해 흑색종 세포의 세포 분열을 방지한다.

[0049] 본 개시내용에서 인터페론 감마(IFN 감마)는 자가포식을 유도한다. 대안으로서, 또는 추가로, 자가포식 유도제, 예컨대, mTOR 억제제, 및 mTOR 비의존성 시약이 사용될 수 있다. 본 개시내용에 적합한 mTOR 억제제로는 예컨대, 라파마이신, 타목시펜, 토린 1, 템시로리무스, 에베롤리무스, IKK 자극, MAPK 키나제 억제제, MEK1/2 억제제, 탈수, 및 스트레스 활성화된 분자, 예컨대, 고갈에 의해 유도된 JNK1을 포함한다. mTOR 비의존성 시약으로는 리툰에 의해 유도된 저수준의 이노시톨-트리포스페이트(IP3), 카바마제핀, 및 발프로산, 또는 L형 칼슘 채널 길항제, 예컨대, 미녹시딜에의 노출에 의해 유발된 낮은 세포내 칼슘을 포함한다. 다른 mTOR 비의존성 시약으로는 칼페인(칼페스타틴)의 화학적 억제, 스펅고지질(S1P), 및 활성 산소, 예컨대, 과산화수소, 예컨대, 고갈 또는 저산소 조건에 의해 유발된 것을 포함한다. 이들 시약 중 1 이상이 IFN 감마 대신, 또는 IFN 감마 모방체 대신의 사용을 위해 제공된다. 예컨대, 문헌 [Ravikumar et al (2010) Phys. Revs. 90:1383-1435]를 참조할 수 있다.

[0050] "흑색종 특이 펩티드 중 60% 초과"에서와 같이 "퍼센트(%)"라는 용어는 항원적으로 별개인 상이한 펩티드의 개수가 아닌, 펩티드 분자의 개수를 의미하는 것이다. "흑색종 특이 펩티드 중 80% 초과"에서와 같이 퍼센트(%)라는 용어는 항원적으로 별개인 상이한 펩티드의 개수가 아닌, 펩티드 분자의 개수를 의미하는 것이다. "흑색종 특이 펩티드 중 40% 미만"에서와 같이 퍼센트(%)라는 용어는 항원적으로 별개인 상이한 펩티드의 개수가 아닌, 펩티드 분자의 개수를 의미하는 것이다. "흑색종 특이 펩티드 중 20% 미만"에서와 같이 퍼센트(%)라는 용어는 항원적으로 별개인 상이한 펩티드의 개수가 아닌, 펩티드 분자의 개수 등을 의미하는 것이다.

[0051] "흑색종 특이 펩티드 중 60% 초과"에서와 같이 "펩티드"라는 용어는 펩티드 분자, 올리고펩티드 분자, 및 폴리펩티드 분자 개수의 총합을 의미하는 것이다. "흑색종 특이 펩티드 중 80% 초과"에서와 같이 "펩티드"라는 용어는 펩티드 분자, 올리고펩티드 분자, 및 폴리펩티드 분자 개수의 총합을 의미하는 것이다. "흑색종 특이 펩티드 중 40% 미만"에서와 같이 "펩티드"라는 용어는 펩티드 분자, 올리고펩티드 분자, 및 폴리펩티드 분자 개수의 총합을 의미하는 것이다. "흑색종 특이 펩티드 중 20% 미만"에서와 같이 "펩티드"라는 용어는 펩티드 분자, 올리고펩티드 분자, 및 폴리펩티드 분자 개수의 총합 등을 의미하는 것이다.

[0052] "자가포식성 및 비아포토시스성인 것으로 편향된(biased)"이라는 용어는 시험관내에서 IFN 감마로 처리되었을 때, 암 세포, 예를 들어, 흑색종 세포가 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 98% 이상이 자가포식성 및 비아포토시스성인 것을 의미한다. 각종 흑색종 세포를 언급하는 데 사용되는 하기와 같은 용어상의 차이에 주의한다: 자가포식성 및 비아포토시스성인 세포는 비자가포식성 및 아포토시스성인 세포와 동일한 것이 아니다.

[0053] 1 이상의 암 세포로부터 유래된 펩티드와 관련하여 "~로부터 유래된"이라는 것은 하기를 포함한다. 암 세포를 예를 들어, 균질기에 의해, 또는 삼투성 파열에 의해 분해시킴으로써 조 추출물을 수득할 수 있다. 조 추출물의 펩티드, 올리고펩티드, 및 폴리펩티드를 수지상 세포에 노출시킨 후, 수지상 세포에 의해 펩티드를 프로세싱할 수 있다. ~로부터 유래된이라는 것은 또한 무순상 암 세포를 포함하는 수지상 세포를 제공하고, 여기서, 암 세포는 살아있는 것이거나, 또는 암 세포는 방사선으로 처리되었지만, 여전히 대사상으로 활성을 띠는 것이거나, 또는 암 세포는 핵산 가교화제로 처리되었지만, 여전히 대사상으로 활성을 띠는 것인 것을 포함한다. "~로부터

유래된"이라는 것은 수지상 세포에 의해 흡수(uptake)되고, 따라서, 암 세포로부터 유래된 것인 암 세포 잔해, 유리 암 세포 단백질, 및 조사된 암 세포의 혼합물을 포함한다.

[0054]

인간, 포유동물, 포유동물 피험체, 동물, 수의 피험체, 위약 피험체, 연구용 피험체, 실험용 피험체, 세포, 조직, 기관, 또는 생물학적 유체에 적용되는 바와 같이, "투여"란 제한 없이, 외인성 리간드, 시약, 위약, 소분자, 제약 제제, 치료제, 진단제, 또는 조성물을 피험체, 세포, 조직, 기관, 또는 생물학적 유체 등에 접촉시키는 것을 의미한다. "투여"는 예컨대, 치료, 약동학, 진단, 연구, 위약 및 실험 방법을 의미할 수 있다. 세포 처리는 시약을 세포에 접촉시키는 것 뿐만 아니라, 시약을, 세포와 접촉하고 있는 유체에 접촉시키는 것을 포함한다. "투여"는 또한 예컨대, 세포를 시약, 진단제, 결합 조성물에 의해, 또는 또 다른 세포에 의해 시험관 내에서 및 생체외에서 처리하는 것을 포함한다.

[0055]

리간드 및 수용체에 관한 것으로, "효능제(agonist)"는 수용체를 자극하는 분자, 분자 조합, 복합체, 또는 시약 조합을 포함한다. 예를 들어, 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자(GM-CSF: granulocyte-macrophage colony stimulating factor)의 효능제로는 GM-CSF, GM-CSF의 뮤테인 또는 유도체, GM-CSF의 펩티드 모방체, GM-CSF의 생물학적 기능을 모방하는 소분자, 또는 GM-CSF 수용체를 자극하는 항체를 포함한다. 리간드 및 수용체에 관한 것으로, "길항제(antagonist)"는 수용체를 억제, 상쇄, 하향조절, 및/또는 탈감작화시키는 분자, 분자의 조합, 또는 복합체를 포함한다. "길항제"는 수용체의 구성적 활성을 억제시키는 임의의 시약을 포함한다. 구성적 활성은 리간드/수용체 상호작용의 부재하에서 분명하게 나타나는 것이다. "길항제"는 또한 수용체의 자극받은(또는 조절된) 활성을 억제 또는 방해하는 임의의 시약을 포함한다. 일례로, GM-CSF 수용체의 길항제로는 어느 제한으로도 암시하지 않으면서, 리간드(GM-CSF)에 결합하여, 그가 수용체에 결합하지 못하도록 방해하는 항체, 또는 수용체에 결합하여 리간드가 수용체에 결합하지 못하도록 방해하는 항체, 또는 항체는 불활성 입체형태로 수용체를 로킹하는 것을 포함한다.

[0056]

달리 명확하게 언급되지 않거나, 또는 문맥상 달리 지시되지 않는 한, "발현"이라는 용어는 하기를 포함한다. 발현은 예컨대, 번역 후 변형에 의한 mRNA의 생합성, 폴리펩티드 생합성 폴리펩티드 활성화, 또는 준세포 위치 변화에 의한 또는 크로마틴으로의 동원에 의한 발현 활성화를 포함한다. 즉, "발현 증가"는 생합성 증가, 인산화에 의해 유발되는 활성 증가, 또는 세포질로부터 핵으로의 이동에 의해 유발되는 활성 증가를 포함한다.

[0057]

항원 제시 세포(APC)는 항원을 T 세포에 제시하는 데 사용되는 면역계의 세포이다. APC는 수지상 세포, 단핵구, 대식세포, 번역부 쿠퍼(Kupffer) 세포, 미세아교세포, 랑게르한스 세포, T 세포, 및 B 세포를 포함한다(예컨대, 문헌 [Rodriguez-Pinto and Moreno (2005) Eur. J. Immunol. 35:1097-1105] 참조). 수지상 세포는 2가지 이상의 계통에서 발생한다. 제1 계통으로는 프리 DC1, 골수성 DC1, 및 성숙한 DC1을 포함한다. 제2 계통으로는 $CD34^{++}CD45RA^{-}$ 초기 전구 다능성 세포, $CD34^{++}CD45RA^{+}$ 세포, $CD34^{++}CD45RA^{++}CD4^{+}IL-3R\alpha^{+}$ 프로 DC2 세포, $CD4^{+}CD11c^{-}$ 형질세포양 프리 DC2 세포, 림프양 인간 DC2 형질세포양 유래 DC2, 및 성숙한 DC2를 포함한다(예컨대, 문헌 [Gilliet and Liu (2002) J. Exp. Med. 195:695-704]; [Bauer, et al., (2001) J. Immunol. 166:5000-5007]; [Arpinati, et al., (2000) Blood 95:2484-2490]; [Kadowaki, et al., (2001) J. Exp. Med. 194:863-869]; [Liu (2002) Human Immunology 63:1067-1071]; [McKenna, et al., (2005) J. Virol. 79:17-27]; [O'Neill, et al., (2004) Blood 104:2235-2246]; [Rossi and Young (2005) J. Immunol. 175:1373-1381]; [Banchereau and Palucka (2005) Nat. Rev. Immunol. 5:296-306] 참조).

[0058]

"유효량"은 제한 없이, 의학적 상태 또는 장애의 증상 또는 징후를 호전, 역전, 경감, 예방, 또는 진단할 수 있는 양을 포함한다. 명확하게 또는 문맥상 달리 지시되지 않는 한, "유효량"은 병증을 호전시키는 데 충분한 최소량으로 제한되지 않는다. 어느 제한으로도 암시하지 않으면서, 바이오마커에 의해, 또는 임상 파라미터에 의해 질환 또는 장애의 중증도 뿐만 아니라, 질환 또는 장애를 예방, 치료 또는 경감시킬 수 있는 치료법의 능력도 측정될 수 있다.

[0059]

바이오마커로는 폴리펩티드, 폴리펩티드 위치(예컨대, 소포체, 세포내, 막 결합), 핵산, 혈구 계수, 혈청, 뇨, 또는 뇌척수액 중의 대사산물의 수준, 종양 세포 계수, 암 줄기 세포 계수, 종양 수준을 포함한다. 종양은 RECIST 기준에 의해 측정될 수 있다(문헌 [Eisenhauer, et al., (2009) Eur. J. Cancer. 45:228-247]). 발현 마커로는 mRNA 또는 유전자 증폭의 유전적 발현, 항원 발현, 및 폴리펩티드 발현을 포함한다. 임상 파라미터는 어느 제한으로도 암시하지 않으면서, 무진행 생존(PFS: progression-free survival), 6개월간의 PFS, 무질환 생존(DFS: disease-free survival), 질병 진행에 소요되는 시간(TTP: time to progression), 원격 전이까지 소요되는 시간(TDM: time to distant metastasis), 및 전체 생존기간을 포함한다.

[0060] "표지화된(labeled)" 조성물은 분광, 광화학, 생화학, 면역화학, 동위원소, 또는 화학 방법에 의해 직접적으로, 또는 간접적으로 검출가능하다. 예를 들어, 유용한 표지로는 ^{32}P , ^{33}P , ^{35}S , ^{14}C , ^3H , ^{125}I , 안정한 동위원소, 에피토프 태그, 형광성 염료, 전자 고밀도 시약, 예컨대, 효소 결합 면역검정법에서 사용되는 바와 같은, 기질, 또는 효소, 또는 플루오렛(fluorettes)을 포함한다(예컨대, 문헌 [Rozinov and Nolan (1998) Chem. Biol. 5:713-728] 참조).

[0061] **면역 반응을 평가하는 방법**

[0062] 본 개시내용은 또한 면역 반응의 특징을 규명하기 위한 ELISPOT 검정법, 세포내 사이토카인 염색(ICS: intracellular cytokine staining), 및 사랑체 검정법을 제공한다(예컨대, US 2007/0190029(Pardoll); 문헌 [Chattopadhyay (2008) Cytometry A. 2008 73:1001-1009]; [Vollers (2008) Immunology. 123:305-313]; [Lalvani, et al., (1997) J. Exp. Med. 186:859-865]; [Waldrop (1997) J. Clin. Invest. 99:1739-1750]; [Hudgens (2004) J. Immunol. Methods 288:19-34]; [Goulder (2001) J. Virol. 75:1339-1347]; [Goulder (2000) J. Exp. Med. 192:1819-1831]; [Anthony (2003) Methods 29:260-269]; [Badovinac and Harty (2000) J. Immunol. Methods 238:107-117] 참조). 환자에서의 면역 반응은 객관적 반응(RECIST 기준), 전체 생존기간, 무진행 생존(PFS), 무질환 생존, 원격 전이까지 소요되는 시간, 6개월간의 PFS, 12개월간의 PFS 등을 비롯한, 종양학 임상 시험에서 사용되는 종점에 의해 평가될 수 있다.

[0063] **백신**

[0064] 본 개시내용의 수지상 세포 백신은 진피내, 결절내, 점막, 또는 피하 경로, 또는 상피 경로의 임의 조합에 의해 투여될 수 있다. 각 용량은 약 10×10^3 개의 수지상 세포, 20×10^3 개의 세포, 50×10^3 개의 세포, 100×10^3 개의 세포, 200×10^3 개의 세포, 500×10^3 개의 세포, 1×10^6 개의 세포, 2×10^6 개의 세포, 20×10^6 개의 세포, 50×10^6 개의 세포, 100×10^6 개의 세포, 200×10^6 개, 500×10^6 개, 1×10^9 개의 세포, 2×10^9 개의 세포, 5×10^9 개의 세포, 10×10^9 개의 세포 등을 포함한다. 투여 빈도는 예컨대, 주 1회, 주 2회, 매 2주마다 1회, 매 3주마다 1회, 매 4주마다 1회, 매월 1회, 매 2개월마다 1회, 매 3개월마다 1회, 매 4개월마다 1회, 매 5개월마다 1회, 매 6개월마다 1회 등일 수 있다. 총 투여일수는 1일, 2일, 또는 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20일 등일 수 있다. 임의의 주여지는 투여는 동일 2회 이상의 주사를 포함할 수 있다는 것을 이해하여야 한다. 한 측면에서, 본 개시내용은 수지상 세포에 전체 종양 세포를 적재하는 것을 포함하며, 여기서, 수지상 세포 내로 적재되는 흑색종 세포 유래 단백질 중 10% 이상, 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 또는 99% 이상은 전체 종양 세포에 존재하는 것이다. 비제한적인 실시양태에서, 수지상 세포 백신은 플라스크, 바이알, 병, 시린지, 카테터, 캐놀러 등에 담겨져 있다. 투여를 위해, 투여되는 수지상 세포 중 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 99% 이상은 성숙한 수지상 세포이다.

[0065] **백신 동질성(homogeneity)**

[0066] 예시적인 실시에서, 본 개시내용은 시험관내 적재로부터 유래된 흑색종 펩티드를 포함하는 수지상 세포를 포함하는 백신으로서, 여기서, 백신은 5/95, 10/90, 20/80, 30/70, 40/60, 50/50, 60/40, 70/30, 80/20, 90/10, 95/5, 98/2, 99/1 이상 중인 수지상 세포/흑색종 세포의 비로 수지상 세포(흑색종 펩티드를 함유하는 DC와, 흑색종 펩티드를 함유하지 않는 DC의 총합)를 포함하는 것인 백신을 제공한다. 시험관내 적재로부터 유래된 흑색종 펩티드를 포함하는 수지상 세포를 포함하는 백신으로서, 여기서, 백신은 5/95, 10/90, 20/80, 30/70, 40/60, 50/50, 60/40, 70/30, 80/20, 90/10, 95/5, 98/2, 99/1 이상 중인 [수지상 세포]/[DC도 흑색종도 아닌 세포]의 비로 수지상 세포(흑색종 펩티드를 함유하는 DC와, 흑색종 펩티드를 함유하지 않는 DC의 총합)를 포함하는 것인 백신을 제공한다. 본 개시내용은 제1 구현은 흑색종 세포를 포함하고, 제2 구현은 수지상 세포를 포함하는, 구현화된 용기를 예시한다. 상기 두 구현은 흑색종 세포가 수지상 세포와 접촉하지 못하도록 하는 막, 필터, 밸브, 도관, 커플러에 의해 분리되어 있을 수 있으며, 수동식으로 이동키는 경우, 또는 막을 제거하거나, 밸브를 개방시키는 경우에 흑색종 세포는 수지상 세포와 접촉하게 되고, 이로써, 흑색종 세포, 흑색종 세포 단편, 및/또는 흑색종 펩티드는 수지상 세포 상에 적재될 수 있다.

[0067] **인터페론 감마 모방체(mimetics)**

[0068] 본 개시내용은 모방체, 예를 들어, 인터페론 감마 모방체, 예컨대, 모방체 펩티드 95-132를 포함한다(문헌

[Ahmed (2007) J. Immunol. 178:4576-4583]; [Fulcher (2008) FEBS Lett. 582:1569-1574]). 본 개시내용은 전반적인 목표는 자가포식성 및 비아포토시스성인 흑색종 세포가 강화된 흑색종 세포 집단을 획득하기 위한 것인 IFN 감마 모방체를 제공한다. IFN 모방체는 예컨대, 인터페론 감마와 동일한 효능제 활성을 가지는 항체를 포함한다.

[0069]

흑색종 세포 불활성화

[0070]

본 개시내용은 예를 들어, 방사선에 의해, 또는 핵산 가교제에 의해 암 세포를 불활성화시키는 조성물 및 방법을 제공한다. 예시적인 가교제는 DNA는 가교시키지만, 단백질을 비변형 상태 그대로 유지시킬 수 있는 능력을 가진다. 핵산 알킬화기는 베타-알라닌, N-(아크리딘-9-일), 2-[비스(2-클로로에틸)아미노]에틸 에스테르일 수 있다. 일부 실시양태에서, 핵산 표적화된 화합물은 UVA 방사선에 의해 활성화된 소랄렌 화합물이다. 예를 들어, 핵산 표적화 화합물은 (본원에서는 "S-59"로 지칭되는) 4'-(4-아미노-2-옥사)부틸-4,5',8-트리메틸소랄렌일 수 있다. 세포는 150 μ M의 소랄렌 S-59 및 3 J/cm² UVA 광(FX 1019 방사선 장치(박스터 펜월(Baxter Fenwal: 미국 일리노이주 라운드 레이크)))로 불활성화될 수 있다. S-59를 이용한 불활성화는 광화학 처리로 지칭되며, 이를 통해 세포는 완전하게 불활성화된다. 다양한 농도의 핵산 가교제는 세포를 불활성화시키는 데 있어서의 효능, 예를 들어, 세포 분열을 방지하는 데 있어서의 효능에 대해 테스트될 수 있다. S-59는 핵산을 가교화시킬 수는 있지만, 단백질을 무손상의 비변형 상태 그대로 유지시킬 수 있는 그의 능력으로 구별된다. 세포를 0, 1, 10, 100, 및 1,000 nM의 소랄렌 S-59를 함유하는 염수 5 mL를 현탁시킬 수 있다. 하기와 같이 각 시료에 조사할 수 있다. S-59를 100 nM 농도로 첨가할 수 있다. 대략 2 J/cm²(FX1019 방사선 장치(박스터 펜월: 미국 일리노이주 라운드 레이크)의 선량으로 시료에 UVA 조사할 수 있다. 이어서, 각 시료를 15 mL 튜브로 옮기고, 원심분리하고, 상청액을 제거한 후, 5 mL 염수로 세척하고, 원심분리하고, 상청액을 제거하고, 최종 펠릿을 0.5 mL의 염수에 현탁시킬 수 있다(미국 특허 번호 제7,833,775호(Dubensky) 및 제7,691,393호(Dubensky)).

[0071]

비아포토시스성인 흑색종 세포 강화(enriching)

[0072]

예를 들어, 비아포토시스성 및 자가포식성 세포를 비자가포식성 및 아포토시스성 세포로부터 분리시키는 기법으로서, 여기서, 분리는 자가포식성 및 비아포토시스성 세포를 표면에 부착시킴으로써 이루어지고, 여기서, 그 나머지 세포는 부유되는 것인 기법을 사용함으로써 비아포토시스성인 흑색종 세포를 흑색종 세포 집단에서 강화시킬 수 있다. 강화된 비아포토시스성인 흑색종 세포 집단은 또한 포스파티딜 세린에 특이적인 항체에 의해서 아포토시스성 세포를 제거함으로써 획득할 수 있다. 고정화된 항체에 의해 세포를 제거하는 기법은 이용가능하다(문헌 [Onodera (1998) Ther. Apher. 2:37-42]). 포스파티딜 세린에 특이적인 항체는 이용가능하다(예컨대, EMD 밀리포어(EMD Millipore: 미국 매사추세츠주 빌레리카)). 또한, 흑색종 세포의 벌크 집단은 형광성 항포스파티딜 세린 항체로 표지화될 수 있으며, 여기서, 태깅된 아포토시스성인 흑색종 세포는 유세포 분석법, 친화성 크로마토그래피, 면역자기 분리에 의해 제거된다(예컨대, 문헌 [Hoepfner (2012) Recent Results Cancer Res. 195:43-58]; [Dainiak (2007) Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 106:1-18] 참조).

[0073]

아포토시스 억제제

[0074]

아포토시스 억제제인 Z-VAD(Z-VAD-fmk)는 예컨대, 엔조 라이프 사이언시즈(Enzo Life Sciences: 영국 엑서터), R & D 시스템즈(R & D Systems: 미국 미네소타주 미니애폴리스), 토크리스 바이오사이언시즈(Tocris Biosciences: 영국 브리스틀), 바이오몰(BioMol: 미국 펜실베이니아주 플리머스 미팅), 및 EMD 케미칼즈(EMD Chemicals: 미국 뉴저지주 김스타운)로부터 입수할 수 있다. Z-VAD-fmk는 합성 펩티드, Z-Val-Ala-Asp(OMe)-CH₂F이다. 카스파제는 프로테아제 패밀리 중 시스테인-아스파르트산 특이 구성원이다. 카스파제는 예컨대, TRAIL, FAS와 같은 사멸 수용체 결합에 의해, DNA 손상, 스트레스, 혈청 고갈에 의해, 및 일부 세포 유형에서는 인터페론에 의해 활성화된다. 카스파제는 핵 단편화, 크로마틴 응축, 및 세포질 무결성 상실을 포함하는 고도로 조절된 아포토시스 과정에서 중요한 역할을 한다. 범용(pan) 카스파제 억제제인 z-VAD-fmk(카보벤즈옥시-발릴-알라닐-아스파틸-[O-메틸]-플루오로메틸케톤)는 카스파제 프로테아제의 촉매성 부위에 비가역적으로 결합하여, 아포토시스를 유도하는 그의 기능을 억제시킨다. IFN 감마에 대한 반응으로 아포토시스되는 세포의 능력을 억제시키는 것은 부유 아포토시스성 세포를 제거하기 위해 세척함으로써 선별하는 단계 없이 비아포토시스성이지만, 자가포식성이 세포를 생성할 수 있는 수단이 될 수 있다.

[0075]

본 발명의 한 실시양태에서, 종양 세포를 수지상 세포 상에, 또는 또 다른 유형의 항원 제시 세포(APC) 상에 적재하기 이전에, 종양 세포를 IFN 감마로 처리한다. 또 다른 실시양태에서, 종양 세포를 수지상 세포 상에, 또는 또 다른 유형의 항원 제시 세포(APC) 상에 적재하기 이전에, 종양 세포를 IFN 감마로 처리하지 않는다.

[0076]

본 개시내용은 수지상 세포, 항체, 또는 항원을 포함하는, 약물, 시약, 진단용 키트를 비롯한 키트를 제공한다. 1 이상의 수지상 세포 및 1 이상의 항원을 포함하는 조성물을 투여하는 방법, 항체 형성을 자극하는 방법, ADCC를 자극하는 방법, 보체 의존성 세포독성을 자극하는 방법, 및 환자 적합성 측정을 위한, 임상 시험 또는 일반 의학적 치료와 관련하여 환자 포함/배제 기준 측정을 위한, 및 제약 또는 시약에 대한 반응을 예측하기 위한 방법 및 키트 또한 제공한다. 보체 의존성 세포독성은 기술되어 있다(예컨대, 문헌 [Goodman, et al., (1990) J. Clin. Oncol. 8:1083-1092]; [Cheson (2010) J. Clin. Oncol. 28:3525-3530] 참조). 본 개시내용의 제약 조성물, 시약, 및 관련된 방법은 IFN 감마 처리된 암 세포를 적재함으로써 CD83이 유도된, CD83 양성 수지상 세포를 포함한다. 본 개시내용의 CD83 측면에서, CD83은 2% 이상, 3%, 4%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10% 이상만큼 등으로 유도된다. 또 다른 측면에서, 수지상 세포의 CD83이 IFN 감마 처리된 암 세포의 적재에 의해 검출가능하게 유도되지 않는 것인, DC 시약, 또는 DC 관련 방법을 배제한다.

도면의 간단한 설명

[0077]

도 1은 IFN 감마로 처리하기 전(좌측) 및 72시간 동안 IFN 감마로 처리한 이후(우측)의 배양된 종양 세포를 그래프로 나타낸 것이다. 처리 후, 배양된 종양 세포는 비자가포식성, 및 아포토시스성 부유 세포이거나, 또는 자가포식성, 및 비아포토시스성 및 부착성 세포였다. 부유 세포는 아포토시스성 마커인 포스파티딜 세린을 발현하는 것으로 나타났다. 부유 세포의 경우, MHC II형이 상대적으로 적게 발현된 것으로 나타난 반면, 부착성 세포의 경우에는 MHC II형이 과다발현된 것으로 나타났다.

도 2A-D는 수지상 세포에 적재하는 데 사용되는 IFN 감마 처리된 자가 종양 세포의 특징 규명을 보여주는 것이다. 자가 흑색종 종양 세포를 RPMI 중 15% FBS/ECS에서 72시간 동안 1,000 IU/mL IFN 감마로 처리하거나, 처리하지 않고, 수거하고, 100 Gy로 조사하고, 동결보존시켰다. 이어서, 세포를 AIMV 중에서 해동시키고, DC에의 항원 적재 이전에 면역블롯팅을 위한 세포 용해물 제조를 위해 및 유세포 분석을 위해 시료를 채취하였다. 4가지 별개의 자가 흑색종 세포주의 예가 제시되어 있다(도 2A, 도 2B 및 도 2C). 자가 종양 세포의 IFN 감마 처리에 의한 주조직 적합성 복합체 유도(도 2D). 72시간 동안 1,000 IU/mL IFN 감마로 처리한 후, 또는 처리하지 않고 종양 세포를 수거한 후, MHC I형 및 II형에 대해 검정하였다. 대조군 이소형 항체를 사용하여 양성 집단을 확인하였다. 검은색으로 표시된 데이터 점은 평균 형광 중앙값 $\pm$ 95% 신뢰 구간을 나타낸다. N = 65.

한 측면에서, 본 개시내용은 수지상 세포에 적재시키기 위해 비자가 종양 세포를 배제시키고, 수지상 세포에 적재시키기 위해 비자가 종양 세포를 사용하는 방법을 배제시킨다.

도 3A 및 3B는 인터페론 감마로 처리된 또는 처리되지 않은 자가 흑색종 세포주가 적재된 수지상 세포의 표현형을 도식한 것이다. 한 세트를 이루는 4가지 자가 흑색종 세포주를 72시간 1,000 IU/mL의 IFN 감마로 처리하거나, 처리하지 않고, 조사하고, 동결보존시켰다. 이어서, 세포를 AIMV 중에서 해동시키고, 수거하기 전 대략 24시간 동안 자가 수지상 세포와 조합하고, CD80, CD83, CD86 및 MHC II형 발현에 대하여 유세포 분석법에 의해 검정하였다(도 3A). 데이터는 도 3B에 요약되어 있다. 평균 $\pm$ SD가 제시되어 있다(n = 4).

도 4A 및 4B는 용량 제조를 위해 사용된 수지상 세포의 표현형을 보여주는 것이다. IFN 감마 처리되고, 조사된 자가 종양 세포를 적재하기 전의 DC 시료(ATC 적재 이전 DC, N = 53), 및 적재한 이후의 DC 시료(ATC 적재 이후 DC, N = 65)를 유세포 분석법에 의해 CD80, CD83, CD86 및 MHC II형의 발현에 대하여 평가하였다. FACS 캘리버(Caliber)® 비드를 사용하여 유세포 분석기 장치의 초기 환경을 설정한 후, 이 초기 환경을 데이터를 수집하는 동안 내내 일정하게 유지시켰다(도 4A). 도 4B에서 ATC 적재 이전 및 ATC 적재 이후에 대해 발현(%) 및 평균 형광 강도(MFI: mean fluorescence intensity) $\pm$ SD 값을 비교하였다. * p = 0.019 및 ** p = 0.0009.

도 5A 내지 5C는 인터페론 감마 처리된 흑색종 세포가 자가포식되는 것을 보여주는 것이다. 선택된 상업적으로 이용가능한 흑색종 세포주를 5% FBS/RMPI 중에서 72시간 동안 1,000 IU/mL IFN 감마와 함께 인큐베이션시켰다. 인큐베이션 기간 종료시 SK-5-Mel 세포 배양물의 위상차 현미경 사진을 촬영하였으며(도 5A), 자가포식소체를 연상시키는 액포가 있는 비대된 세포가 관찰되었다. IFN 감마로 처리하기 전, GFP-LC3B 구성물로 형질감염시킴으로써 자가포식소체가 형성된 것을 확인하였다(도 5B). LC3B에 대한 항체를 사용하는 웨스턴 블롯팅에 의해 IFN 감마 처리 이후의 자가포식 유도를 확인하였는데(도 5C), 여기서, 자가포식성 혈관 형성과 관련이 있는 것으로 밝혀진 LC3 형태는 더욱 빠르게 이동하는 것으로 확인되었다.

도 6A 및 6B는 인터페론 감마에 대한 반응으로 유도되는 아포토시스 및 자가포식을 보여주는 것이다. SK-5-Mel 세포를 72시간 동안 1,000 IU/mL의 IFN 감마와 함께 인큐베이션 시킨 후, 비부착성 및 부착성 집단을 수집하고, 7-AAD 및 아넥신-V를 사용하여 유세포 분석법에 의해 아포토시스 및 자가포식에 대해 검정하였다(도 6A). 엔조

사이토-ID 오토파지 디텍션 다이(Enzo Cyto-ID Autophagy Detection Dye)를 사용하여 제조사에 의해 제공되는 염료의 평균 감도 피크 시프트를 측정함으로써 유세포 분석법에 의해 자가포식을 측정하였다(도 6B). 5% FBS/RPMI와의 비교에서 피크 시프트의 배수 변화(fold change)는 도 6C에 제시되어 있으며, 여기서, 자가포식 유도에 대한 양성 대조군으로서 무혈청인 것을 사용하였다.

도 7에는 카스파제 활성을 차단시킨 이후의 자가포식 유도는 흑색종 세포에서 IFN 감마에 대한 반응으로 일어나는 자가포식의 유도에는 어떤 영향도 주지 못했다는 것이 도시되어 있다. SK-5-Me1 세포를 20 μ M의 범용 카스파제 억제제 z-VAD 또는 그의 대조군 화합물, z-FA의 존재하에서 72시간 동안 1,000 IU/mL의 IFN 감마로 처리하였다. 세포를 수거하고, 도 6C에서와 같이 유세포 분석법에 의해 자가포식에 대하여 검정하였다.

도 8은 72시간 동안 10 μ M의 자가포식 억제제 3-메틸아데닌(3-MA)의 존재하에서 1,000 IU/mL의 IFN 감마와 함께 인큐베이션된 SK-5-Me1 세포를 보여주는 것이다. 이어서, 세포를 수거하고, 유세포 분석법에 의해 아포토시스 및 MHC II형(HLA-DR) 발현에 대해 검정하였다.

도 9는 환자 종양 표본(N = 36)으로부터 생성된 종양 세포주로부터의 IFN 감마 처리된 세포를 MHC II형 또는 아포토시스의 변화에 대하여 검정하였다는 것을 보여주는 것이다. 제시된 데이터는 평균 형광 강도의 평균 $\pm$ SE이다.

도 10은 유세포 분석법에 의해 MHC II형 또는 아포토시스에 대하여 검정된, 환자 특이 백신 면역요법을 위해 수지상 세포에 적재시키는 데 사용하기 위한 시료로부터의 IFN 감마 처리된 세포를 보여주는 것이다(N = 54). MHC II형 평균 형광 강도 및 아포토시스성 세포(아넥신-V 양성)(%)의 배수 변화가 제시되어 있다.

도 11 및 도 12는 자가포식성, 비아포토시스성 인터페론 감마 처리된 종양 세포가 적재된 수지상 세포를 받은 환자에서의, MHC II형의 유도와 아포토시스 부재(인터페론 감마 내성) 사이의 상관관계는 보다 우수한 무진행 생존(도 11) 및 전체 생존기간(도 12)과 관련이 있음을 보여주는 것이다.

도 13은 3회의 시험으로부터 얻은 생존 곡선을 보여주는 것이다. 플롯(카플란-마이어(Kaplan-Meier) 플롯)은 임상 시험을 진행하는 동안 생존해 있는 연구 피험체의 비율을 보여주는 단계식 곡선이다. 각 군을 DC-54(솔리드형 동그라미 표시); TC-74(솔리드형 사각형 표시); TC-24(솔리드형 삼각형 표시); 및 DC-18(선)로 지명하였다. TC-24의 경우, 생존이 가장 열악하였다. 그 다음으로는 TC-74에서 생존이 가장 열악하였다. TC-24는 24명의 피험체를 포함하는 연구에서 종양 세포의 백신을 나타낸다. DC-54는 54명의 피험체가 치료받고, 여기서, 백신은 조사된 자가 종양 세포와 함께 공동 배양된 자가 수지상 세포(DC)를 포함한 것인, 수지상 세포 백신을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

추가 설명

자가(autologous) 수지상 세포 생성

각각 1,000 IU/mL씩의 IL-4(셀제닉스(CellGenix: 독일 프라이베르크)) 및 GM-CSF(베르렉스(Berlex: 미국 워싱턴주 시애틀))로 보충된 무항생제 AIM-V 배지(인비트로젠(Invitrogen: 미국 뉴욕주 그랜드아일랜드)(DC 배지) 중에서 피콜(ficoid) 성분채집술 생성물의 플라스틱 부착 방법에 의해 수지상 세포를 생성하였다(문헌 [Choi, et al., (1998) Clin. Cancer Res. 4:2709-2716]; [Luft, et al., (1998) Exp. Hematol. 26:489-500]; [Cornforth, et al., (2011) Cancer Immunol. Immunother. 60:123-131]). 이어서, IFN 감마 처리되고, 조사된 자가 종양 세포를 적재하기 전 6일 동안 플라스크를 배양하였다.

IFN 감마 자가 종양 세포주 생성 및 약물 조제

(Comforth) 등에 따라 (문헌 [Cornforth, et al., (2011) Cancer Immunol. Immunother. 60:123-131]; [Dillman, et al., (1993) J. Immunother. Emphasis Tumor Immunol. 14:65-69]; [Dillman, et al., (2000) Cancer Biother. Radiopharm. 15:161-168]) 순수한 종양 세포를 생성하였다. 이어서, 종양 세포를 72h 동안 1,000 U/mL의 인터페론 감마(인터문(InterMune: 미국 캘리포니아주 브리즈번))와 함께 인큐베이션시키고, 세습 공급원으로부터 100 Gy로 조사하고, 동결보존시켰다(문헌 [Selvan, et al.(2007) Int. J. Cancer 122:1374-1383]; [Selvan, et al., (2010) Melanoma Res. 20:280-292]). IFN 감마 처리되고, 조사된 종양 세포를 동결보존으로부터 회수하고, 포스페이트 완충처리된 염수(PBS: phosphate buffered saline)로 세척한 후, 배양된 수지상 세포(DC)에 첨가한 후, 약 24h 동안 인큐베이션시켰다. 고무 채집기를 이용하여 완만하게 스크래핑함으로써

항원 적재된 DC를 수거하고, 동결보존시켰다. 유세포 분석 평가 및 트립판 블루 배제 검정법을 위해 분취량의 IFN 감마 처리된 종양 세포, 또는 비처리된 종양 세포 및 적재된 DC를 수득하였다.

[0083] **피부 흑색종의 병기 분류**

[0084] 흑색종이 병기 I, 병기 II, 병기 III, 병기 IV로 진단되는 것인, 흑색종 환자에게 본 개시내용의 제약 또는 시약을 투여할 수 있다(문헌 [Mohr, et al (2009) Ann. Oncology (Suppl. 6) vi14-vi21]). 예를 들어, 병기 I은 국소 또는 원격 전이의 증거가 없는 원발성 흑색종 환자를 나타낸다. 병기 II는 림프 질환 또는 원격 전이의 증거가 없는 환자로서, 여기서, 환자는 추가로 예컨대, 피개 상피의 궤양화와 함께, 두께가 1 mm 초과 내지 2 mm 이하인 것을 특징으로 하거나, 또는 상피 궤양화와 함께, 두께가 2 mm 초과 내지 4 mm 이하인 것을 특징으로 하는 것인 환자를 포함한다. 병기 III 흑색종은 국소 림프절 또는 통과 또는 위성 전이를 포함한다고 문서상 기록으로 병리학적으로 입증된 병변을 포함하며, 여기서, 환자는 예컨대, 1, 2, 3, 또는 4개 또는 그 초과와 이화된 림프절을 가질 수 있다. 병기 IV 흑색종은 원격 전이가 존재하는 것으로 정의되는데, 여기서, 전이는 오직 원위부의 피부, 피하 조직, 또는 림프절에만 위치하고, 여기서, 전이는 폐 전이를 포함하거나, 또는 전이는 모든 다른 내장 부위를 포함한다.

[0085] 본 개시내용은 예방학적으로 투여하는 방법, 즉, 아직 흑색종 진단을 받지 않았거나, 그러한 진단을 받은 적이 없는 피험체에 사용하기 위한 투여 방법을 포함한다. 피험체가 이전에 흑색종 진단을 받은 경험이 있고, 흑색종을 성공적으로 치료하여 근절시킨 경험이 있는 환자이고(또는 자발적 완전 관해를 경험한 환자이고), 여기서, 근절 이후, 투여가 예방학적으로 사용되는 것인, 투여 방법을 포함한다.

[0086] **종양 항원**

[0087] 어느 제한으로도 암시하지 않으면서, 본 개시내용의 흑색종 세포는 Mage, Mart-1, Mel-5, HMB45, S100, 또는 티로시나제 중 1 이상을 발현한다(문헌 [Dillman, et al., (2011) Cancer Biotherapy Radiopharmaceuticals 26:407-415]). 한 측면에서, 종양 항원을 검출하는 것은 IFN 감마에 노출되지 않은 세포를 사용하는 반면, 또 다른 측면에서, 종양 항원을 검출하는 것은 IFN 감마로 처리된 세포에 대해 수행된다(예컨대, 문헌 [Cornforth, et al., (2011) Cancer Biotherapy Radiopharmaceuticals 26:345-351] 참조). US2007/0207171((Dubensky) 등)(상기 출원은 그 전문이 본원에서 참고로 포함된다)에 개시된 바와 같은, 1 이상의 흑색종 항원을 포함하는 흑색종 세포, 또는 1 이상의 단리된 흑색종 항원을 포함하는 조성물을 포함한다.

[0088] **아포토시스 측정**

[0089] 아포토시스는 다수의 시약, 예컨대, 형광 색소 표지화된 아넥신으로, 염료, 예컨대, 프로피디움 요오다이드 및 7-아미노엑티노마이신 D(7-AAD)를 이용함 염색에 의해, 미토콘드리아 내막 전위 상실을 측정함으로써, 카스파제의 활성화 또는 절단을 측정함으로써 검출 또는 측정될 수 있다. 예컨대, 문헌 [George, et al., (2004) Cytometry Part A. 59A:237-245]를 참조할 수 있다. 아포토시스에서의 초기 이벤트는 형질막의 외부 표면 상의 포스파티딜 세린의 노출이며, 이는 형광 색소 표지화된 아넥신에 의해 검출될 수 있다. 이용가능한 방법을 통해서 생존 세포, 괴사성 세포, 초기 아포토시스성 세포, 및 후기 아포토시스성 세포는 구별될 수 있다. 본 개시내용은 7-ADD 검정법에 의해 아포토시스성이 아닌, 아넥신 V 검정법에 의해 아포토시스성이 아닌, IFN 감마 처리 이후의 아포토시스에 대한 검정법에 의해 아포토시스성이 아닌(문헌 [Dillman, et al., (2011) Cancer Biotherapy Radiopharmaceuticals 26:407-415]), 또는 바이오마커 Bcl-2, 카스파제-3, P53, 또는 서비빈 중 1 이상에 의해 아포토시스성이 아닌(문헌 [Karam, et al., (2007) Lancet Oncol. 8:128-136]) 흑색종 세포를 사용한다. 본 개시내용의 제약 조성물, 시약, 및 관련된 방법은 아포토시스성인 IFN 감마 처리된 흑색종 세포를 배제시키는데, 여기서, 아포토시스는 예컨대, (Herlyn) 등에 의해 등록된 미국 특허 번호 제7,544,465호((Herlyn) 등); (Thorpe) 등에 의해 등록된 미국 특허 번호 제7,714,109호(상기 특허는 본원에 참고로 포함된다)에 따라 측정된다.

[0090] **자가포식 측정**

[0091] 자가포식은 많은 단백질과 일부 세포 소기관의 분해에 사용되는 천연적으로 발생하는 과정이다. 자가포식은 단백질 및 세포 소기관 전환, 고갈 반응, 세포 분화, 세포 사멸 등을 매개한다. 미세소관 관련 단백질 경계 3(LC3)은 자가포식을 모니터링하고자 하는 것이다. 한 접근법에서, 자가포식은 LC3-I에서 LC3-II로의 전환을 포함하는, LC3의 전환을 측정함으로써 검출될 수 있다. LC3-II의 양은 자가포식소체의 개수와 상관관계가 있다. 상세하게 설명하면, LC3은 세포질에 존재하고, 가용성인 반면, LC3-II는 막 상에 존재한다. LC3-II는 지질과 컨쥬게이트되어 있기 때문에, 그의 분자량은 더욱 크다. LC3 프로세싱은 예컨대, 웨스턴 블롯에 의해 측정될 수

있지만, 자가포식, 자가포식성 소체, 및 자가포식소체는 현미경법에 의해 측정될 수 있다. 자가포식은 예컨대, 프로세싱된 LC3-II를 검출함으로써, 초기 대 후기 자가포식성 구획 사이의 비에 의해, 또는 자가포식성 부피에 의해 정량화될 수 있다. 문헌 [Mizushima and Yoshimori (2007) Autophagy 3:542-546:634-641]; [Tanida, et al., (2008) Methods Mol. Biol. 445:77-88]; [Eng, et al., (2010) Autophagy 6:634-641]을 참조할 수 있다. 한 측면에서, 본 개시내용은 1 이상의 특정 병기에서의 자가포식 발생에 따라 세포가 선별될 수 있는, 적절한 자가포식성 암 세포를 선별하기 위한 스크리닝 도구로서 자가포식을 사용한다. 이러한 자가포식 단계는 (1) 자가포식소체에 의한 세포질 구획 격리, (2) 자가포식소체와 리소좀의 융합을 통한 자가리소좀 형성, 및 (3) 리소좀내 프로테아제에 의한 자가포식소체 내용물 분해를 포함한다. 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 주로 제1 단계를 보이는 세포, 주로 제2 단계를 보이는 세포, 주로 제3 단계를 보이는 세포, 주로 제1 및 제2 단계를 보이는 세포, 주로 제2 및 제3 단계를 보이는 세포, 또는 주로 3단계 모두를 보이는 세포를 포함한다. 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 제1 단계, 제2 단계, 제3 단계, 제1 및 제2, 제2 및 제3 단계를 보이는 세포, 또는 3단계 모두를 보이는 세포를 포함한다.

[0092]

인터페론 감마(IFN 감마) 신호전달

[0093]

IFN 감마(II형 인터페론) 신호전달은 다수의 유전자, 예컨대, IFN 감마 수용체, STAT1, STAT2, STAT1 동종이량체, STAT1/STAT2 이종이량체, IRF-1, GAS, 및 IRF-E의 발현에 의존한다. IFN 감마 신호전달은 IFN 감마 수용체 (IFNGR1 쇄; IFNGR2 쇄)에 의존한다는 것이 연구를 통해 밝혀졌다. 세포 표면 상의 IFNGR의 낮은 발현이 IFN 감마 신호전달의 일부 측면을 차단시킬 수 있다(문헌 [Schroder, et al., (2004) J. Leukocyte boil. 75:163-189]). 한 측면에서, 본 개시내용은 IFNGR의 표면 상의 낮은 발현을 보이는 암 세포를 사용하는 것은 배제한다. 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 STAT1 동종이량체를 발현하는 것에 대한 암 세포를 스크리닝하고, 이들 세포를 사용하고, STAT1 동종이량체를 발현하지 않는 세포는 실질적으로 배제한다. 추가의 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 STAT1 인산화(세린 727)를 포함하는 것에 대해 세포를 스크리닝하는 것을 고려한다. STAT1 유전자에 기능 상실 돌연변이를 가지는 환자로부터 암 세포를 배제하는 것 또한 고려한다(예컨대, 문헌 [Dupuis, et al., (2001) Science 293:300-303]; [Schroder, et al., (2004) J. Leukoc. Biol. 75:163-189] 참조). 하기는 IRF 유전자 패밀리에 관한 것이다. IRF-1, IRF-2, 및 IRF-9는 모두 IFN 감마 신호전달에 참여한다. 본 개시내용은 이들 IRF 유전자 패밀리 유전자 중 1 이상을 발현하는 암 세포를 사용하거나, 이들 유전자 중 1 이상을 발현하지 않는 암 세포를 배제하는 것을 포함한다.

[0094]

IFN 감마 반응성 유전자

[0095]

일부 예시적인 실시양태에서, 본 개시내용은 IFN 감마에 반응하는 흑색종 세포, 또는 종양전 흑색종 세포 사용을 필요로 하는 생물학적 물질, 조성물, 시약, 및 방법을 포함한다. 흑색종 세포는 1 이상의 IFN 감마 반응성 유전자의 발현에 대한 검정에 의해 확인, 구별, 및 선별될 수 있다. 다수의 IFN 감마 반응성 유전자가 확인되었다(예컨대, 문헌 [Halonen, et al., (2006) J. Neuroimmunol. 175:19-30]; [MacMicking (2004) 11:601-609]; [Boehm, et al., (1997) 15:749-795] 참조). 상기 검정은 환자로부터 1 이상의 흑색종 세포를 제거하는 것, 첨가된 IFN 감마의 존재 및 부재하에서 상기 세포를 배양하는 것, 및 IFN 감마에 대한 반응성을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 검정에서, IFN 감마로 유도된 유전자 발현은 전사 인자의 IFN 감마로 유도된 유전자의 프로모터에의 결합, IFN 감마로 유도된 유전자로부터의 mRNA의 발현, 발현된 폴리펩티드 등에 대해 감수성인 검정법에 의해 검출될 수 있다. IFN 감마 반응 유전자로는 예컨대, 전사 인자, 수송 단백질을 코딩하는, 면역 반응을 위해 사용되는 유전자, 아포토시스 유전자, 세포 성장 또는 유지를 위해 사용되는 유전자, 지질 대사를 위해 사용되는 유전자, 세포내이입 또는 세포외방출을 매개하는 유전자, 세포내 신호전달 유전자, 당 대사 유전자, 세포 부착 유전자 뿐만 아니라, 확립된 기능이 없는 유전자를 포함할 수 있다.

[0096]

한 측면에서, 본 개시내용은 IFN 감마 처리로 MHC II형의 발현 감소를 보이고, MHC II형 발현에 검출가능한 변화를 보이지 않고, 10% 이하의 MHC II형 발현 증가를 보이고, 15% 이하의 MHC II형 발현 증가를 보이고, 20% 이하, 25% 이하, 30% 이하, 40% 이하, 50% 이하의 MHC II형 발현 증가를 보이는 흑색종 세포 등을 배제한다. 한 측면에서, 백분율(%) 값은 생검 또는 생검의 일부에 존재하는, 주어진 피험체 또는 환자로부터의 흑색종 세포 집단에 대한 평균 발현 값을 나타낸다.

[0097]

IFN 감마 반응성 암 세포에 대해 스크리닝하는 데 사용하기 위한 IFN 감마 유도성 유전자의 비제한적인 목록

[0098]

ab000677, JAB/SOCS1; m63961, IFN 감마 유도성 단백질(mag-1); m35590, 대식세포 염증성 단백질 1-β; m19681, MCP-1(JE); y07711, 지크신; M34815, IFN 감마에 의해 유도된 모노카인(MIG: Monokine induced by IFN-gamma); m33266, 인터페론 유도성 단백질 10(IP-10); U44731, 퓨린 뉴클레오타이드 결합 단백질; U88328, 사

이토카인 신호전달의 억제인자-3(SOCS-3: Sup. of cytokine signalling-3); M21065, 인터페론 조절 인자 1; M63630, GTP 결합 단백질(IRC-47); U19119, G 단백질 유사 LRG-47; L27990, Ro 단백질; M31419, 204 인터페론 활성화가능한 단백질 ; af022371, 인터페론 유도성 단백질 203; U28404, MIP-1 알파 수용체; U43085, 글루코코르티코이드 약화된 반응 39; x56123, 탈린; m31419, 204 인터페론 활성화가능한 단백질; U53219, GTP아제 IGTP; I38444, T 세포 특이 단백질; M31418, 202 인터페론 활성화가능한 단백질; d38417, 아틸탄화수소 수용체; m26071, 조직 인자(mtf); D13759, Cot 원암유전자; M18194, 피브로넥틴; u59463, ICH-3; M13945, pim-1 원암유전자; L20450, DNA 결합 단백질(문헌 [Gil, et al., (2001) Proc. Natl. Acad. Sci 98:6680-6685] 참조). 본 개시내용은 IFN 감마로 유도된 유전자, CIITA 사용을 포함한다(예컨대, 문헌 [Chan, et al., (2010) J. Leukocyte Biol. 88:303-311]; [Kwon, et al (2007) Mol. Immunol. 44:2841-2849] 참조).

[0099]

본 개시내용은 제약 투여를 위해 환자의 적격성을 검정하거나, 선별하기 위한 스크리닝 방법으로서 하기의 IFN 감마 유도성 유전자 중 1 이상의 발현을 측정하는 것을 포함한다. 유전자로는 (유전자 1) FCGR1A, (유전자 2) IL6R, (유전자 3) CXCL9, (유전자 4) CLCSF14, (유전자 5) UBD, (유전자 6) C/EBP알파, 및 (유전자 7) MHC2TA(CIITA)를 포함한다(문헌 [Waddell, et al., (2010) PLoS ONE 5:e9753] 참조). 적격성 검정 방법에서 상기 유전자로 이루어진 특정의 클러스터, 예컨대, 유전자 1 및 2, 2 및 3, 3 및 4, 4 및 5, 5 및 6, 6 및 7, 1 및 3, 1 및 4, 1 및 5, 1 및 6, 1 및 7, 2 및 4, 2 및 5, 2 및 6, 2 및 7, 3 및 5, 3 및 6, 3 및 7, 4 및 6, 4 및 7, 5, 및 7 뿐만 아니라, 3가지 유전자의 조합, 예컨대, 1, 2, 3; 또는 3, 4, 5; 또는 4, 5, 6; 또는 5, 6, 7; 또는 1, 3, 4; 또는 1, 3, 5, 또는 1, 3, 6, 또는 1, 3, 7; 또는 1, 2, 4; 또는 1, 2, 5; 또는 1, 2, 6; 또는 1, 2, 7 등(이들 유전자 번호는 임의적인 것이다)의 용도 또한 포함한다.

[0100]

인터페론 감마 처리

[0101]

IFN 감마 처리에 노출된 흑색종 세포를 포함하는 시약, 및 관련된 방법은 하기에 제시된 바와 같다. IFN 감마 반응성 유전자의 유도는 20%(대조군 값의 1.2배) 이상, 30% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 100%(대조군 값의 2.0배) 이상, 2.5배 이상, 3.0배 이상, 4.0배 이상 중인 세포를 포함한다.

[0102]

IFN 감마 처리 후, 90% 미만이 자가포식성인, 80% 미만이 자가포식성인, 70% 미만이 자가포식성인, 60% 미만이 자가포식성인, 50% 미만이 자가포식성인, 40% 미만 등이 자가포식성인 흑색종 세포 집단은 배제시킨다.

[0103]

IFN 감마 처리 후, 90% 미만이 비아포토시스성인, 80% 미만이 비아포토시스성인, 70% 미만이 비아포토시스성인, 60% 미만이 비아포토시스성인, 50% 미만이 비아포토시스성인, 40% 미만 등이 비아포토시스성인 흑색종 세포 집단은 배제시킨다.

[0104]

IFN 감마 처리 후, 90% 미만이 비부착성인, 80% 미만이 비부착성인, 70% 미만이 비부착성인, 60% 미만이 비부착성인, 50% 미만이 비부착성인, 40% 미만 등이 비부착성인 흑색종 세포 집단은 배제시킨다.

[0105]

MHC II형 발현 측정

[0106]

예를 들어, MHC II형 유전자 생성물에 특이적인 항체 또는 핵산 프로브를 사용하여 MHC II형 발현을 측정할 수 있다. 이러한 MHC II형 유전자 생성물로는 HLA-DPA1, HLA-DPB1, HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-DRA, HLA-DRB1 뿐만 아니라, HLA-DM 및 HLA-DO를 포함한다(예컨대, 문헌 [Apostolopoulos, et al., (2008) Human Vaccines 4:400-409] 참조).

[0107]

예를 들어, 본 개시내용은 STAT1 및 STAT2를 발현하는, 활성 STAT1 신호전달 경로를 가지는, 활성 STAT2 신호전달 경로를 가지는, 또는 활성 STAT1 및 활성 STAT2 신호전달 경로를 가지는 흑색종 세포를 필요로 하는 시약, 치료 방법, 및 진단 방법을 포함한다.

[0108]

본 개시내용은 위험비(HR: hazard ratio)가 1.0 미만, HR이 0.9 미만, HR이 0.8 미만, HR이 0.7 미만, HR이 0.6 미만, HR이 0.5 미만, HR이 0.4 미만, HR이 0.3 미만 중인 생존 데이터를 초래하는, 제약 조성물 또는 제약 시약, 관련된 투여 방법, 및 치료 방법을 제공한다. 본 개시내용은 전체 생존 기간 데이터, 무진행 생존 데이터, 질병 진행에 소요되는 시간 데이터 등을 초래한다. 6개월간의 PFS가 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상 중인 것 또한 제공한다. 또한, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상 중인 것 또한 제공한다. 또한, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상 중인 1년(또는 2년)간의 PFS를 제공한다. 또한, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70%

이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상 등인 것 또한 제공한다. 또한, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상 등인 1년(또는 2년)간의 전체 생존 기간을 제공한다(예컨대, 문헌 [U.S. Dept. of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Guidance for Industry. Clinical trial endpoints for the approval of cancer drugs and biologics (April 2005)] 참조).

[0109] **IFN 감마 용도 및 자가포식 유도**

[0110] 구조적 적합성 II형 복합체 발현 증가로 측정되는 바와 같은, IFN 감마 처리 이후의 자가포식 유도는 전신 IFN 감마 처리에 대한 반응을 측정하는 방법이다. 생검된 흑색종 종양 세포의 측정가능한 집단이 배양물 중에서 IFN 감마에 노출되었을 때, 아포토시스가 아닌 자가포식된다면, 이는 상기 환자가 바람직하게 전신 IFN 감마 처리에 반응할 것이라는 것을 나타내는 것이다. 추가로, 성공적인 세포주가 생검으로부터 확립된다면, 상기 환자 또한 자가포식성이지만, 비아포토시스성 및 부착성인 집단으로부터의, IFN 감마 처리된 정제된 종양 세포주로부터 제조된 세포 요법 생성물로부터 이익을 얻게 될 것이다.

[0111] 본 개시내용은 인터페론 감마로 처리된 종양 세포주로부터 수집된 자가포식성, 비아포토시스성인 세포로부터 단리된 구조적 적합성 복합체를 단리시키고, 특징을 규명하는 것을 포함한다. 구조적 적합성 복합체는 CD4⁺ T 세포에 대해 특이적인 항원을 포함하고, 항체 매개 면역 반응과 관련되어 있다. 복합체는 자가포식성 세포에서 유도된 리소좀 매개 항원 프로세싱의 작용에 기인하여 비자가포식성 세포에 존재하지 않는 큰 항원 레퍼토리를 나타낼 것이다.

[0112] IFN 감마 처리된 세포주로부터 생성된 비아포토시스성, 자가포식성 종양 세포를 수지상 세포와 융합시켜 자가포식성 종양 세포의 표면 상의 고수준의 구조적 적합성 복합체에 기인하는 항원 제시를 증진시킬 수 있다. 이러한 과정을 통해 2가지 세포 유형의 융합으로부터 생성되는 신규한 세포 생성물을 수득하게 될 것이다.

[0113] IFN 감마에 대한 반응으로 자가포식이 유도되는 과정은 아포토시스를 일으키지 않는 방식으로 유도될 수 있다. 종양 세포를 카스파제 억제제 및 인터페론 감마로 처리하는 것을 조합함으로써 세포 사멸(및 궁극적으로 면역허용유발 아포토시스성 세포) 과정은 자가포식 유도를 억제시키지 않으면서, 또는 구조적 적합성 II형 복합체 증가 없이 차단될 수 있다.

[0114] **생존가능한 자가포식성 세포는 유지시키면서, 아포토시스성 세포는 제거하는 방법**

[0115] 흑색종에 관한 연구를 통해 아포토시스성 세포의 존재와 임상 시험에서의 열악한 생존 사이의 상관관계가 입증되었다(문헌 [Cornforth, et al., (2011) Cancer Immunol. Immunother. 60:123-131]; [Dillman, et al., (2011) Cancer Biother. Radiopharmaceuticals 26:407-415]). 하기 연구를 통해 시험관내 흑색종 종양 세포의 IFN 감마 처리 이후의 자가포식, 아포토시스 및 MHC II형 분자 유도를 조사하였다.

[0116] **여과**

[0117] 하기는 "여과" 방법을 제공한다. 본 개시내용은 세포 중 비아포토시스성인 흑색종 세포 집단을 강화시키기 위한 방법, 및 이들 방법에 의해 생성된 세포를 제공한다. 시험관내에서 IFN 감마 처리하기 전, 임의의 주어진 흑색종 세포 집단에서, 제1 비율의 세포는 아포토시스성인 것으로 편향되어 있을 수 있고, 제2 비율의 세포는 비아포토시스성인 것으로 편향되어 있을 수 있다. 이와 관련하여, 편향이란, 시험관내 IFN 감마 처리가 제1 비율의 세포(또는 세포의 제1 하위 집단)의 아포토시스는 자극하지만, 제2 비율의 세포(또는 세포의 제2 하위 집단)의 아포토시스는 자극하지 못하는 것을 의미한다. 실시양태에서, 시험관내 IFN 감마 처리는 아포토시스성인 것으로 편향된 흑색종 세포가 아포토시스되도록 가압함으로써 수지상 세포 백신 중에서 사용하기 위한 면역 자극성 흑색종 세포 집단을 강화시키는 데 사용될 수 있다. 아포토시스성인 것으로 편향된 흑색종 세포의 하위 집단이 일단 아포토시스되고 나면, 이들 세포는 제거되고, 폐기될 수 있다.

[0118] 연구 방법은 하기와 같았다. 자가포식, 아포토시스 및 MHC II형 발현에 대해 검증하기 전에 72시간 동안 자가 및 모델 흑색종 종양 세포주를 1,000 IU/mL의 IFN 감마와 함께 인큐베이션시켰다. LC3 II에 대한 항체를 이용한 면역블롯팅에 의해, 및 엔조 사이토ID® 오토파지 디텍션 키트(Enzo's CytoID® Autophagy Detection Kit)를 이용한 유세포 분석법에 의해 자가포식을 검출하였다. 아포토시스 및 MHC II형 유도는 각각 7-AAD 및 아넥신-V 염색을 이용한 유세포 분석법, 및 MHC II형에 대한 항체에 의해 검증하였다.

[0119] 본 연구로부터 얻은 결과를 통해 IFN 감마가 흑색종 세포주에서 자가포식성 및 아포토시스성 세포 집단, 둘 모두를 유도한다는 것이 입증되었다. 아포토시스성 집단은 주로 비부착성 집단에서 발견되는 반면, 자가포식성 세

포는 플라스크에 부착된 상태 그대로 남아있었다. 자가포식을 억제제 3-메틸아데닌(3-MA)으로 차단시키면, IFN 감마에 대한 반응으로 일어나는 MHC II형 양성 세포 유도는 억제된다(39.4% IFN 감마 대 10.0% IFN 감마 + 3-MA). 범용 카스파제 억제제 Z-VAD로 카스파제 활성을 억제시키면, IFN 감마 처리된 세포에서 아포토시스는 막을 수 있지만, 자가포식은 교란시키지 못한다(IFN 감마의 경우, 배수 변화 2.75 ± 0.15 대 IFN 감마 + Z-VAD의 경우, 배수 변화 3.04 ± 0.27). 결론적으로, 아포토시스 유도는 자가포식 및 MHC II형 유도 수준 감소와 관련이 있다. 본 개시내용은 생존가능한 자가포식성 세포를 유지시키면서, 아포토시스성 세포를 제거할 수 있는 방법 또는 절차를 제공하고, IFN 감마 처리는 이러한 유형의 세포 기반 면역요법의 효능을 증진시킬 수 있다.

[0120]

제1 연구로부터의 물질 및 방법

[0121]

자가 수지상 세포 생성

[0122]

앞서 문헌 [Choi (1998) Clin. Cancer Res. 4:2709-2716]; [Luft (1998) Exp. Hematol. 26:489-500]에 기술된 플라스틱 부착 방법에 의해 수지상 세포를 생성하였다. 간략하면, 자가 성분채집물 생성물에 대해 피콜-하이파크(ficoll-hypaque)(GE 헬스케어(GE Healthcare: 영국 버킹엄셔)) 밀도 구배 분리를 수행하였다. 세포 배양 플라스크(코닝-스타(Corning-Costar: 미국 뉴욕주 코닝)) 중 각각 1,000 IU/mL씩의 IL-4(셀레닉스: 독일 프라이베르크) 및 GM-CSF(베르렉스: 미국 워싱턴주 시애틀)로 보충된 무항생제 AIM-V 배지(인비트로젠: 미국 뉴욕주 그랜드아일랜드)(DC 배지)에 생성된 말초 혈액 단핵 세포를 15×10^6 개의 세포/mL 놓았다. 1시간 동안 인큐베이션시킨 후, 비부착성 집단은 버리고, 새 DC 배지를 플라스크에 첨가하였다. 다음날 아침, 비부착성 세포를 버리고, 주변 온도에서 플라스크를 PBS로 1회 세척하고, 새 DC 배지를 첨가하였다. 이어서, 플라스크를 6일 동안 배양하고, 이 기간에 유세포 분석 평가를 수행하여 상기 접근법으로 생성된 DC(적재 이전 DC)의 비율 및 표현형을 측정하였다.

[0123]

자가 종양 세포주 생성

[0124]

앞서 보고된 바와 같이 생성되고, 특징이 규명된 순수한 종양 세포를 200×10^6 개의 세포로까지 확장시킨 후, 앞서 기술된 바와 같이(문헌 [Choi (1998) Clin. Cancer Res. 4:2709-2716]; [Luft (1998) Exp. Hematol. 26:489-500; Dillman (1993) J. Immunother. Emphasis Tumor Immunol. 14:65-69]), RPMI(완전 배지) 중 15% FBS/ECS에서 72시간 동안 1,000 IU/mL의 IFN 감마(인터문, 미국 캘리포니아주 브리즈번)와 함께 인큐베이션시키고, 세습 공급원으로부터 100 Gy로 조사하고, 동결보존시켰다. IFN 감마 처리되고, 조사된 종양 세포를 동결보존으로부터 회수하고, PBS로 3회 세척한 후, 시험관내 배양된 DC에 첨가하고, ~24시간 동안 인큐베이션시켰다. 고무 채집기를 이용하여 완만하게 스크래핑함으로써 항원 적재된 DC를 수거하고, 동량의 9-11개의 분취량으로 동결보존시켰다. 적재 이후의 DC 세포를 나타내는 유세포 분석 평가를 위해 분취량의 세포를 수득하였다.

[0125]

유세포 분석법

[0126]

BD 파미노젠(BD Pharmingen: 미국 캘리포니아주 샌디에고)으로부터 입수한, 표면 마커에 대한 단일클론 항체: PerCp에 컨쥬게이트된 항MHC II형, APC에 컨쥬게이트된 항CD11c, PE에 컨쥬게이트된 항CD80, 항CD83, 항CD86을 사용하여 수지상 세포 집단의 표현형상의 특징 규명을 수행하였다. 이소형 대조군을 사용하여 양성 세포의 비율(%)을 측정하였다. BD 파미노젠으로부터 입수한, FITC, 아렉신-V-PE 및 7-아미노액티노마이신 D(7-AAD)에 컨쥬게이트된, MHC I형 및 II형에 대한 항체를 사용하여 종양 세포의 유세포 분석법을 수행하였다. 각 수행 이전에 캘리브라이트(CalibRITE) 유세포 분석법 보정(BD 파미노젠)을 사용하고, 유세포 분석 데이터를 수집하는 전체 기간 동안 동일한 장치 환경을 사용하였다.

[0127]

면역블롯 검정법

[0128]

프로테아제 억제제 칵테일(로슈(Roche: 미국 인디애나주 인디애나폴리스))과 함께 머메일리언 프로테인 엑스트랙션 리에이전트(Mammalian Protein Extraction Reagent)(써모 사이언티픽(Thermo Scientific: 미국 일리노이주 록퍼드))를 이용하여 얼음 상에서 10,000개의 세포/uL로 세포질 세포 용해물을 제조하였다. 대략 25 uL/라인의 세포 용해물을 12.5% 트리스 글리신 겔 상에서 분리하고, PVDF 막으로 옮기고, 하기에 대한 항체로 프로빙하였다: 칼레티쿨린(MBL, 미국 매사추세츠주 워번), Hsp-60, Hsp-70, Hsp-90(R&D 시스템즈: 미국 미네소타주 미니애폴리스), HMBG-1(셀 시그널링(Cell Signaling: 미국 매사추세츠주 덴버스), ICAM-1(산타 크루즈 바이오테크(Santa Cruz Biotech: 미국 캘리포니아주 산타 크루즈)), Mel-4, Mart-1(시그넷(Signet: 미국 캘리포니아주 에머리빌)), 티로시나제(업스테이트(Upstate: 미국 뉴욕주 레이크 플라시드)) 및 GAPDH(칼바이오크(Calbiochem: 독일 다름슈타트)).

[0129]

면역조직화학법

[0130]

면역세포화학적 방법을 사용하여 흑색종 세포주에 의한 패널 항원의 발현을 측정하였다. 1,000 IU/mL IFN 감마의 존재 또는 부재하에 세포를 8 챔버 배양용 슬라이드(써모 피셔(Thermo Fisher: 미국 뉴욕주 로체스터))에서 배양하였다. 72시간 후, 세포를 1X 포스페이트 완충처리된 염수(PBS)로 3회에 걸쳐 세척하고, 냉 아세톤 중에 고정시켰다. 내인성 퍼옥시다제를 차단시킨 후, 열거된 항원에 대하여 적절한 1차 항체와 함께 세포를 인큐베이션시켰다. 비오틴화된 항마우스 또는 항래빗 면역글로불린, 슈퍼 센스티브(Super Sensitive) 효소 컨쥬게이트된 스트렙타아비딘 표지화 및 홀스 래디쉬 퍼옥시다제 발색체, 및 기관 키트(바이오제넥스(Biogenex: 미국 캘리포니아주 샌 라몬))를 이용하여 면역조직화학법을 수행하였다. 하기 항인간 다중클론 또는 단일클론 항체의 반응성을 이소형 매칭된 대조군 항체를 이용하여 조사하였다: S-100 및 HMB-45(바이오제넥스: 미국 캘리포니아주 샌 라몬), Mel-2, Mel-5, Mart-1(시그네트(Signet: 미국 매사추세츠주 데덤), 티로시나제 및 Mage-1(써모 사이언티픽: 미국 캘리포니아주 프리몬트), Melan-A, HLA-I형 및 HLA-II형(덴마크 다크).

[0131]

통계학적 분석

[0132]

같은 변량의 두 시료에 대한 양측 스튜던츠 t 검정. 유의차는 p 값 ≤ 0.05 으로 측정하였다.

[0133]

제1 연구로부터의 결과

[0134]

세포 사멸은 완전 배지에서 72시간 동안의 IFN 감마와의 인큐베이션에 대한 반응으로 자가 흑색종 종양 세포주에서 차별적으로 유도되었다. IFN 감마로 처리된 세포, 또는 처리되지 않는 세포에 대해 트립판 블루 배제 검정법을 수행한 결과, IFN 감마 처리된 세포에서는 생존능이 감소하는 쪽으로 진행되는 유의적인 추세가 있는 것으로 밝혀졌다($89.1 \pm 6.8\%$ 대 $84.9 \pm 9.3\%$, $p = 0.014$, $N = 47$). 4가지 자가 흑색종 세포주 시료를 유세포 분석법에 의해서 아포토시스 유도에 대해 분석한 결과(도 1A), 흑색종 세포는 IFN 감마 유도성 아포토시스의 효과에 대하여 차별적인 감수성을 띠는 것으로 나타났고, 일부 세포는 보다 후기에 아포토시스를 나타내거나, 또는 "사멸(dead)" 집단으로 나타난 반면(7-AAD+/아넥신-V+), 다른 세포는 조기 아포토시스 또는 '세포 고사(dying)' 집단의 징후(7-AAD-/아넥신-V+)를 보였다. IFN 감마 처리 후, 그 결과로 생성된 아포토시스성 세포의 존재는 무진행 및 전체 생존 기간의 유의적인 감소와 관련이 있었다(문헌 [Cornforth (2010) Cancer Immunol. Immunother. Resistance to the proapoptotic effects of interferon-gamma on melanoma cells used in patient-specific dendritic cell immunotherapy is associated with improved overall survival]). 로그 순위 검정을 통해 흑색종 종양 세포의 IFN 감마 처리시 생존능 감소 및 연구 중에 있는 환자의 전체 생존 기간에는 유의적인 관련이 있는 것으로 밝혀졌다.

[0135]

IFN 감마의 존재 또는 부재하에서 인큐베이션된 세포로부터의 용해물을, 면역의 중요한 매개 인자일 수 있는 다양한 분자에 대하여 면역블롯하였다(도 1B). IFN 감마로 처리된 흑색종 세포 환경하에서, 열 쇼크 단백질은 차별적으로 조절되는 것으로 보인 반면, 대체로 세포 제제 중에 그대로 존재하는 것으로 나타났으며, 특히, hsp-70인 경우에 그러하였다. 일부 경우에, IFN $\square$ 처리시, 소포체 단백질, 칼레티쿨린, 및 고이동군 박스 1 단백질(HMGB-1: high-mobility group box-1 protein)은 상향 조절되는 것으로 나타났다(도 1B). 대조적으로, 일반 흑색종 항원(mel-4, Mart-1 및 티로시나제)은 일반적으로 IFN 감마에 의해 하향 조절되는 것으로 나타났고, 림프구 매개 세포독성에 대한 감수성과 관련된 림프구 부착 분자인 ICAM-1(문헌 [Hamai (2008) Cancer Res. 68:9854-9864])은 유의적으로 상향 조절되었다(도 1C). 실제로, IFN 감마 처리된 흑색종 종양 세포는 세포독성 T 림프구(CTL: cytotoxic T lymphocyte) 활성화에 대하여 감수성이 더 큰 것으로 나타났다. 추가로, 항원과 관련된 흑색종 패널에 관한 면역조직화학법을 통해 IFN 감마는 조사된 다수의 항원에서 항원 발현을 하향 조절시킨다고 밝혀졌다(하기 표 I).

[0136]

IFN 감마를 사용하면, 주조직 적합성 복합체, I형 및 II형은 상향 조절된다(문헌 [Bohn (1998) J. Immunol. 161:897-908]). 도 1D에 제시된 바와 같이, 자가 흑색종 세포를 IFN 감마로 처리한 결과, MHC I형은 거의 전반적으로 유의적이게 상향 조절되었고($p = 2.8 \times 10^{-8}$), 유도 배수 중앙값은 $2.91 \pm 1.13(95\% \text{ C.I.})$ 이었다. 추가로, MHC II형의 평균 형광 강도 또한 유의적으로 더 높기는 하였지만, 그 정도는 덜 하였고($p = 0.039$), 유도 중앙값은 $4.23 \pm 2.66(95\% \text{ C.I.})$ 이었다. 초기의 MHC II형 발현 수준이 낮기 때문에, 자가 흑색종 세포의 표면상의 MHC II형 분자의 수준은 일반적으로 MHC I형 분자의 수준보다 더 낮았지만, 사례 중 70%에서 IFN 감마 처리에 대한 반응으로 이루어지는 유도는 MHC II형 분자의 경우 2배를 초과하였다. 수치상 세포 상에 항원을 적재하는 동안 상기 분자가 종양 세포 상에 존재하는 것은 항원 제시 세포 상에 MHC 복합체를 "교차 드레싱"할 수 있는 기회를 제공할 수 있다(문헌 [Dolan (2006) J. Immunol. 277:6018-6024, Dolan (2006) J. Immunol.

176:1447-1455]).

[0137] 한 세트를 이루는 4가지 대표 자가 흑색종 세포주를 IFN 감마와 인큐베이션시키고, 동량으로 수지상 세포 상에 적재한 후, 유세포 분석법에 의해 CD80, CD83, CD86 및 MHC-II형 발현에 대하여 검정하였다. IFN 감마 처리된 흑색종 세포 적재시, CD83을 발현하는 수지상 세포의 양성 집단의 비율(%)이 작지만 감지할 수 있을 정도로 증가한 것이 관찰되었다는 결과를 얻었다(도 2). 추가로, CD86 도트 플롯(좌측 상단 사분면)에서 더 많은 프로세싱되지 않은 종양 세포가 관찰되었는데, 이를 통해 CD86 양성 집단(%)은 뚜렷이 감소되었고, 이는 IFN 감마 비처리된 종양 세포가 여전히 존재한다는 것을 나타내는 것이다. 앞서 보고된 바와 같이, 아포토시스성 세포는 수지상 세포에 의해 포식화될 가능성이 더 크기 때문에, 상기와 같은 효과는 IFN 감마에 의한 아포토시스 유도에 기인할 가능성이 가장 크다.

[0138] 도 3에 제시된 바와 같이, 적재 이전 DC 시료는 CD80($39.0 \pm 16.2\%$), CD83($7.1 \pm 6.9\%$), CD86($73.6 \pm 19.5\%$)을 발현하였고, MHC II형 양성이고, 생존능은 $96.2 \pm 5.0\%$ 인 것으로 나타났다. 적재된 DC는 유의적으로 더 높은 평균 형광 강도(172.9 ± 79.0 , $p = 0.0009$)와 함께, 유의적으로 더 높은 비율의 CD83($9.4 \pm 7.1\%$, $p = 0.019$)을 보였는데, 이는 조사되고, IFN 감마 처리된 종양 세포를 DC에 적재하는 것이 일부 수지상 세포에서 성숙화를 유도한다는 것을 나타낸다(도 3B).

[0139] 제1 연구로부터의 논의

[0140] 항종양 면역과 관련하여, 항원 적재, 성숙화, 및 투여에 대한 프로토콜, 및 수지상 세포(DC) 기반 면역 요법에 대한 가이드는 당업자에 의해 실시된다. 이러한 유형의 요법은 항원 공급원으로서 정제된 자가 종양 세포를 사용하는 것을 포함하고, 이는 환자 특이의, 종양 관련 항원 레퍼토리를 포함한다(문헌 [Selvan (2010) Melanoma Res. 20:280-292]; [Dillman (2007) Cancer Biother. Radiopharm. 22:309-321]). 일부 임상 시험에서는 비정제된 자가 벌크 종양을 사용한다. 상기의 항원 공급원은 오염성 섬유아세포 및 괴사성 조직을 가질 수 있다(문헌 [O'Rourke (2007) Melanoma Res. 17:316-322]). 종양 줄기 세포 관련 항원은 정제된 세포주에 존재할 수 있다(문헌 [Dillman (2006) New Engl. J. Med. 355:1179-1181]). IFN 감마 처리는 MHC II형 분자의 발현을 증가시킨다. MHC II형 분자는 수지상 세포 기반 요법에 대한 반응에 중요하다. 포식화된 물질에 존재하는 분자, 예컨대, 칼레티쿨린, HMGB-1, 및 열 쇼크 단백질은 성숙화 신호에 기여할 수 있으며, 여기서, 상기 기여는 사이토카인 콕테일에 의한 기여에 추가적인 것이 될 수 있다. 본 DC 제제는 성숙화되는 쪽으로 진행되는 추세를 보이는데, 이는 후기 아포토시스성 세포의 포식작용과 관련이 있을 수 있다(문헌 [Ip (2004) J. Immunol. 173:189-196]). 아포토시스성 세포 사용은 종양 세포 용해물 또는 괴사성 세포가 적재된 수지상 세포에 비하여 림프구 IFN 감마 분비를 자극하는 데 있어 더욱 큰 효과가 있는 수지상 세포를 생성하는 데 상관관계가 있으며, 이는 아포토시스성 세포가 적재된 수지상 세포가 생체내에서 더욱 큰 효력을 가질 수 있다는 것을 제안한다. IFN 감마의 아포토시스 유발 효과에 대한 내성은 보다 우수한 임상 결과와 관련이 있을 수 있다(문헌 [Comforth (2010) Cancer Immunol. Immunother. 60:123-131]). 성숙한 DC에 의한 인터루킨-12(IL-12) 분비가 강력한 세포 독성 림프구(CTL: cytotoxic lymphocyte; $CD8^+$ T 세포) 활성을 유도할 수 있다. 생체의 성숙화가 종양 면역을 지속시키는지 여부에 관한 문제가 제기되었다. 미성숙한 DC에 의한, 항원 특이 CTL을 억제시킬 수 있는 조절 T 세포 유도의 위험 또한 사이토카인으로 성숙화된 DC로도 발생할 수 있는 것으로 나타났다. DC 성숙화 프로토콜을 개선시키기 위해, 성숙화를 유도하는 신호전달 이벤트 순서의 재평가가 현재 조사 중에 있다. 따라서, 본원에서 제시된 증거는 DC가 성숙화 과정을 개시시켰다는 것을 시사하는 바, 생체의 사이토카인의 성숙화를 필요로 하지 않으면서, 본 연구에서 항원 공급원으로서 조사된 전체 종양 세포를 사용하는 것이 더욱 바람직한 DC 면역 요법 방법이 될 수 있다. 주사시, 이러한 "성숙화" DC는 라이센싱성, 항원 특이 $CD40L$ 을 발현하는 $CD4^+$ T 세포를 유인하는 케모카인을 분비함으로써 성숙화 과정을 완료할 수 있다. 혈청 케모카인, 예컨대, 애주버트 GM-CSF에 대한 반응으로 수지상 세포에 의해 생산된 CCL17/TARC는 보다 우수한 무진행 생존율과 관련이 있었다. 일부 맥락에서, 수지상 세포에 의한 림프구의 활성화는 공동 자극성 분자, 예컨대, CD80 및 CD86의 발현을 필요로 할 수 있다. 성숙화의 마커로서 CD83은 성숙한 수지상 세포 상에서 발현되고, 이는 보다 강력한 면역 반응을 유도할 수 있는 수지상 세포에 상응하는 것일 수 있다(문헌 [Prazma (2008) Immunol. Lett. 115:1-8]). 이는 제약 제제 중의 세포 모두의 분획을 나타낸다. 임의의 한 제약 요법에서 성숙한 DC만의 개수가 보다 우수한 환자 반응과 상관관계가 있을 수 있거나, 또는 그렇지 않을 수 있다.

[0141] 제1 연구로부터의 표

표 1

표 1: 흑색종 세포주가 사용된 환자 특이 세포 기반 수지상 세포 요법에서 인터페론 감마에 대한 반응으로 일어나는 일반 종양 관련 항원의 발현 수준의 변화

항원	기준 발현을 보이지 않는 것	기준 발현	IFN 감마 처리 이후의 변화	
			변화 없음	하향
S-100	74.1%	25.9%	42.9%	57.1%
HMB-45	18.5	81.5	54.5	45.5
Mel-2	3.7	96.3	46.2	53.8
Melan-A	11.1	88.9	29.2	70.8
Mel-5	18.5	81.5	72.7	27.3
MAGE-1	51.9	48.1	38.5	61.5
MART-1	11.1	88.9	14.8	85.2
티로시나제	25.9	74.1	40.0	60.0

시료 개수 N = 27개

제2 연구로부터의 물질 및 방법

흑색종 세포주

상업적으로 이용가능한 흑색종 세포주 A375, SK-Mel-5 및 SK-Mel-28을 아메리칸 타입 컬처 컬렉션(American Type Culture Collection)(카탈로그 번호: CRL-1619, HTB-70, 및 HTB-72)으로부터 구입하였다. A375, SK-Mel-5, 및 SK-Mel-28을 RPMI-1640 중 5% 우태아 혈청에서 유지시켰다(인비트로젠, 카탈로그 번호 11875-085). 범용 카스파제 억제제인 z-VAD-fmk 및 그의 대조군 화합물인 z-FA-fmk는 BD 파미노젠(카탈로그 번호: 550377 및 550411)으로부터 구입하였다. 제조사의 설명서에 따라(인비보젠(InvivoGen), 카탈로그 번호 psetz-gfplc3 및 lvec-12) GFP-LC3의 형질감염을 수행하고, DP72 디지털 카메라를 이용하여 올림푸스(Olympus) BX-51 현미경 상에서 현미경 사진을 촬영하였다. 검정하기 전 72시간 동안 1,000 U/mL의 IFN γ (인터론, 카탈로그 번호)와 함께 종양 세포를 인큐베이션시켰다. 외과 수술된 종양 시료의 효소적 분해, 1 mM 피루브산 나트륨 및 1 mM 글루타민 및 HEPES 완충제와 함께, 우태아 및 농축 우혈청(오메가 사이언티픽(Omega Scientific: 미국 캘리포니아주 샌디에고))으로 보충된 RPMI-1640 조직 배양 배지에서 배양함으로써 (문헌 [Hamai (2008) Cancer Res. 68:9854-9864]; [Tyring (1984) J. Natl. Cancer Inst. 73:1067-1073]에) 기술된 바와 같이, 환자 특이 세포주를 생성하였다. 니콘(Nikon) DS-L1 디지털 현미경 카메라를 이용하여 올림푸스 CK-2 현미경 상에서 위상차 현미경 사진을 촬영하였다.

자가 수지상 세포 생성

각각 1,000 IU/mL씩의 IL-4(셀제닉스, 카탈로그 번호) 및 GM-CSF(베르렉스: 미국 워싱턴주 시애틀)로 보충된 무항생제 AIM-V 배지(인비트로젠, 카탈로그 번호)(DC 배지) 중에서 피콜 성분채집술 생성물의 플라스틱 부착 방법에 의해 수지상 세포를 생성하였다(문헌 [Selvan (2007) Int. J. Cancer. 122:1374-1383]; [Cornforth (2010) Cancer Immunol. 60:123-131]). 이어서, IFN 감마 처리되고, 조사된 자가 종양 세포를 적재하기 이전에 6일 동안 플라스크를 배양하였다.

유세포 분석법

MHC II형에 대한 항체, 아넥신-V 및 아미노액티노마이신 D(7-AAD)를 사용하여 IFN 감마에 대한 반응으로 이루어지는 종양 세포 사멸 및 구조적 적합성 II형 발현의 변화에 관한 분석을 수행하고, 벡톤-딕슨 FACS 캘리버(Beckton-Dickenson Calibur)® 유세포 분석기에서 획득하였다.

웨스턴 블롯팅

[0151] 흑색종 종양 세포 용해물을 10-12.5% SDS-PAGE 상에서 분석하고, 니트로셀룰로스로 옮기고, 밤새도록 1차 항체로 프로빙한 후, 2차 항체로 컨쥬게이션시키고, 노벡스 AP 크로모제닉(Novex AP Chromogenic) 기질(인비트로젠: 미국 캘리포니아주 칼즈배드)에 의한 발색에 의해 밴드를 발색시켰다. LC3-B 항체(셀 시그널링 테크놀로지스(Cell Signaling Technologies: 미국 매사추세츠주 보스턴) 및 GADPH(EMD 바이오사이언시즈(EMD biosciences: 독일))에 대한 항체를 제조사의 권고에 따라 각각 1:100 및 1:10,000의 희석률로 사용하였다.

[0152] 제2 연구에 대한 설명

[0153] 시험관내에서 흑색종 종양 세포를 IFN 감마로 처리한 후, 자가포식, 아포토시스 및 MHC II형 분자 유도에 관해 조사하였다. 자가포식, 아포토시스 및 MHC II형 발현에 대해 검정하기 전에 72시간 동안 자가 및 모델 흑색종 종양 세포주를 1,000 IU/mL의 IFN 감마와 함께 인큐베이션시켰다. LC3 II에 대한 항체를 이용한 면역블롯팅에 의해, 및 엔조 사이토ID® 오토파지 디텍션 키트를 이용한 유세포 분석법에 의해 자가포식을 검출하였다. 아포토시스 및 MHC II형 유도는 각각 7-AAD 및 아넥신-V 염색을 이용한 유세포 분석법, 및 MHC II형에 대한 항체에 의해 검정하였다.

[0154] 제2 연구의 결과

[0155] 본 결과를 통해 IFN 감마가 흑색종 세포주에서 자가포식성 및 아포토시스성 세포 집단, 둘 모두를 유도한다는 것이 입증되었다. 아포토시스성 집단은 주로 비부착성 집단에서 발견되는 반면, 자가포식성 세포는 플라스크에 부착된 상태 그대로 남아있었다. 자가포식을 억제제 3-메틸아데닌(3-MA)으로 차단시키면, IFN 감마에 대한 반응으로 일어나는 MHC II형 양성 세포 유도는 억제된다(39.4% IFN 감마 대 10.0% IFN 감마 + 3-MA). 범용 카스파제 억제제 Z-VAD로 카스파제 활성을 억제시키면, IFN 감마 처리된 세포에서 아포토시스는 막을 수 있지만, 자가포식은 교란시키지 못한다(IFN 감마의 경우, 배수 변화 2.75 ± 0.15 대 IFN 감마 + Z-VAD의 경우, 배수 변화 3.04 ± 0.27). 아포토시스 유도는 자가포식 및 MHC II형 발현 수준 감소와 관련이 있다. 인터페론 감마 처리된 정제된 종양 세포주로부터 유래된 비아포토시스성 자가포식성 세포인, 자가 종양 세포가 적재된 수지상 세포를 받은 환자의 무진행 생존 및 전체 생존 기간은 개선되었다(p 0.003 및 p 0.002). IFN 감마 처리 후, 생존가능한 자가포식성 세포는 유지시키면서, 아포토시스성 세포를 제거하는 방법은 이러한 유형의 세포 기반 면역요법의 효능을 증진시킬 수 있다.

[0156] 연구에 관한 통합(pooled) 분석

[0157] 자가, 증식성, 자가 재생 종양 세포(추정 종양 줄기 세포 및/또는 조기 전구 세포)는 전이성 암의 새로운 대포를 확립하는 데 중요하고, 이는 백신에 대한 탁월한 항원 공급원이 될 수 있다. 본 연구는 상기 세포로부터의 항원을 이용한 면역화로부터의 생존에 대해 미치는 효과에 대해 다루었다.

[0158] 방법

[0159] 3회 연속 수행된 II상 시험으로부터 데이터를 통합하였는데, 상기 시험들은 모두 문서상 기록으로 입증된 전이성 흑색종을 앓는 환자로서, 자가 종양 세포의 세포 배양물로부터 얻은 항원을 사용한 프로토콜로 치료를 받은 환자를 포함하였다. S. C. 주사를 3주 동안 매주, 이어서, 5개월 동안 매월 제공하였다: 74명의 환자에는 조사된 종양 세포(TC)를 주사하고, 54명의 환자에는 조사된 자가 종양 세포(NCI-V01-1646)와 함께 공동 배양된 자가 수지상 세포(DC)를 주사하였고: 무작위화된 II상 시험에서 24명의 환자에게는 TC를, 18명에게는 DC를 주사하였다(NCT00436930).

[0160] 결과

[0161] 하기 표 2에는 각 시험에서의 전체 생존 기간(OS)이 요약되어 있다. 통합 분석에서, TC 처리 환자는 98명, 및 DC 처리 환자는 72명이었다. 연령(51세, 52세), 남성 성별(62%, 62%), 치료 시점에 질환에 대한 증거가 없는 비율(46%, 47%), 및 치료 시점에 M1c 내장 질환의 존재 비율(13%, 14%) 면에 있어서 특징은 유사하였다. OS는 DC로 처리된 환자에서 더욱 길었다(중앙값 63.1 대 20.2개월, 5년간의 OS 51% 대 26%, $p=0.0002$ 맨틀-콕스(Mantle-Cox) 로그 순위 검정). 무작위화된 시험에서 OS의 차이 또한 유의적이었다($p=0.007$).

[0162] 자가 증식성, 자가 재생 종양 세포로부터의 항원으로 프라이밍된 환자 특이 DC 백신은 장기간의 생존율을 촉진시키는 것과 관련이 있고, 전이성 흑색종 진단을 받은 환자 집단에서 환자 특이 TC 백신보다 우수하다.

표 2

표 2.					
백신	환자수	사망수	OS 중앙값	2yr 간의 OS	5yr 간의 OS
TC	74	60	20.3 mos	45%	28%
DC	54	31	58.4 mos	72%	50%
TC	24	16	15.9 mos	31%	***
DC	18	5	도달하지 못함	72%	***

환자 특이 백신에 대해 수행된 3회의 시험으로부터 얻은 생존 곡선은 도 13에 제시되어 있다. 자가 수지상 세포(DC)와 함께 조합하여, 또는 그러한 조합 없이, 자가 종양 세포를 이용하여 연속 I상 및 II상 임상 시험을 수행하였다. 피하 주사를 삼(3)주 동안, 이어서, 오(5)개월 동안 매월 제공하였는데, 74명의 환자에는 IFN 감마의 전처리 없이, 조사된 종양 세포를 주사하고: 54명의 환자에는 인터페론 감마로 전처리하고, 조사된 자가 종양 세포(TC)와 함께 공동 배양된 자가 수지상 세포를 주사하였다. 무작위화된 II상 시험에서 24명의 환자에게는 IFN 감마의 전처리 없이, 종양 세포(TC)를 주사하고, 18명에게는 IFN 감마로 전처리하고, 종양 세포(TC)와 함께 수지상 세포(DC)를 주사하였다.

IFN 감마 처리 특징

IFN 감마 처리는 아포토시스로 편향된 흑색종 세포가 실제로 아포토시스되도록 가압하여, 이로써 흡착/부유 기법에 의해 제거될 수 있도록 한다. IFN 감마 처리를 통해 자가포식성, 비아포토시스성 세포 집단은 증가하게 되고, 심지어, 흡착/부유 기법으로 선별하기 이전에도 그러한 결과를 얻을 수 있다. 심지어, 흡착/부유 기법으로 선별한 이후 측정되는 바와 같이, IFN 감마 처리를 통해 자가포식성, 비아포토시스성 세포 집단은 증가하게 된다. IFN 감마 처리를 통해 자가포식성, 비아포토시스성 세포 집단은 증가하게 되고, 여기서, 자가포식 증가는 항원 제시 세포에 대한 교차 프라이밍을 증가시킨다.

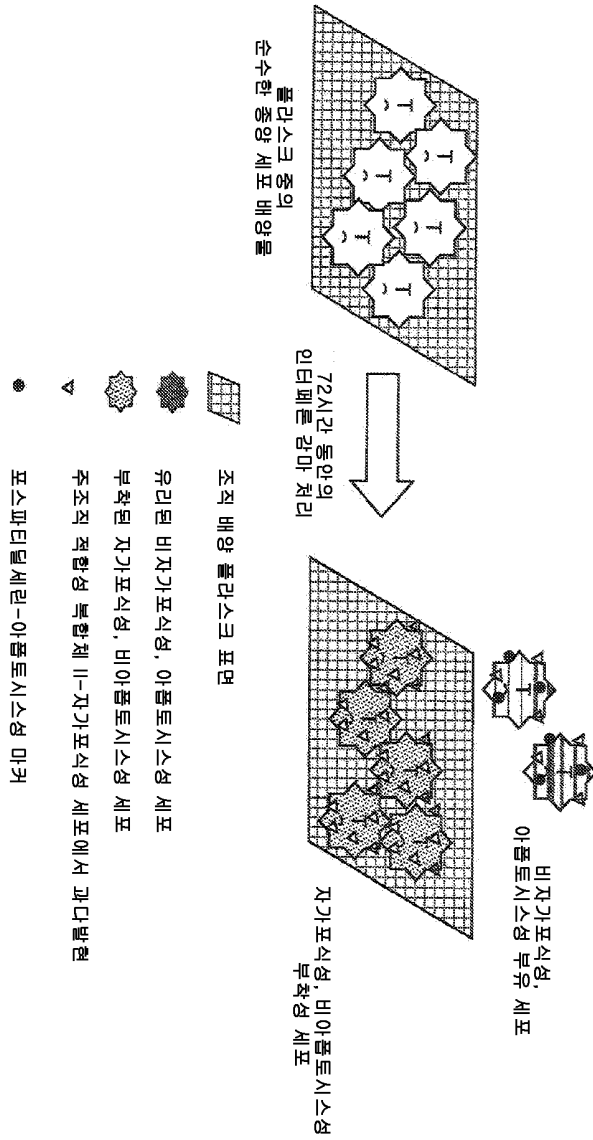
따라서, 본 개시내용의 근본적 특징은 그의 예시적인 실행 및/또는 측면에 적용되는 바와 같이, 제시되고, 기술되고, 언급되었지만, 그의 예시적 실행, 개시내용 및 측면의 형태 및 상세한 설명은 본 개시내용 및/또는 특허 청구범위의 정신으로부터 벗어남 없이, 당업자에 의해 다양하게 생략, 재구성 및 치환 및 변형될 수 있다는 것을 이해할 것이다. 예를 들어, 동일한 결과를 달성하기 위해 실질적으로 동일한 방식으로 실질적으로 동일한 기능을 수행하는 상기 요소 및/또는 방법 단계의 모든 조합은 본 개시내용의 범주 내에 포함되는 것으로 명확하게 의도된다. 또한, 개시된 임의의 형태 또는 실행과 관련하여 제시되고/거나, 기술된 구조 및/또는 요소 및/또는 방법 단계는 일반적으로 정선된 디자인으로서 개시되거나, 또는 기술되거나, 또는 제안된 임의의 다른 형태 또는 실행에 포함될 수 있다는 것을 이해하여야 한다. 그러므로, 본 개시내용의 범주는 제안하지 않는 것으로 한다. 모든 다른 변형은 이에 첨부된 특허청구범위의 범주 내에 포함시키고자 한다.

본 명세서에서 인용된 모든 공개 문헌, 특허, 특허 출원, 참고 문헌 및 서열 목록은 마치 본원에서 전체적으로 기술된 바와 같이, 본원에서 이러한 참조로 포함된다.

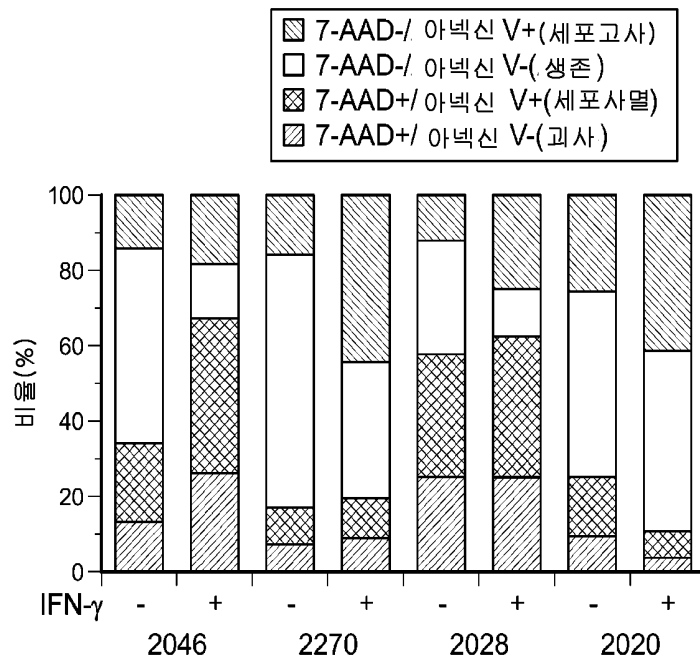
독자가 기술적 개시내용의 성질 및 요점을 빨리 이해할 수 있도록 하기 위해 37 CFR § 1.72(b)에 따라 요약서를 제공한다. 요약서는 본 특허청구범위의 범주 또는 의미를 해석하거나, 제한하는 데에는 사용되지 않는다는 이해 하에 제출된다.

도면

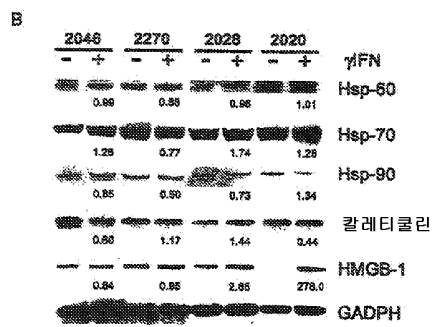
도면1



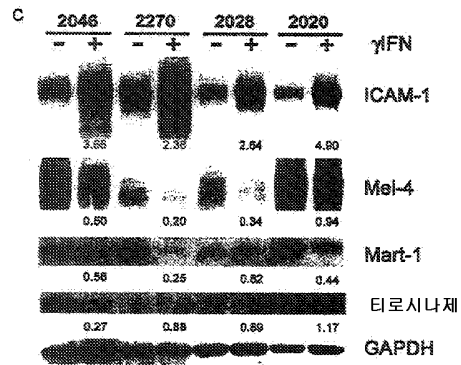
도면2a



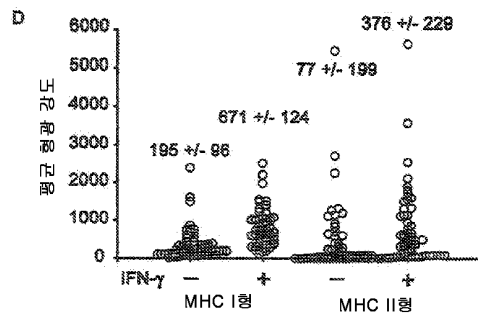
도면2b



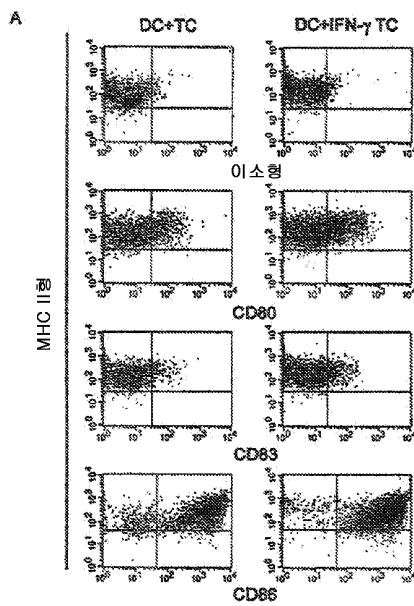
도면2c



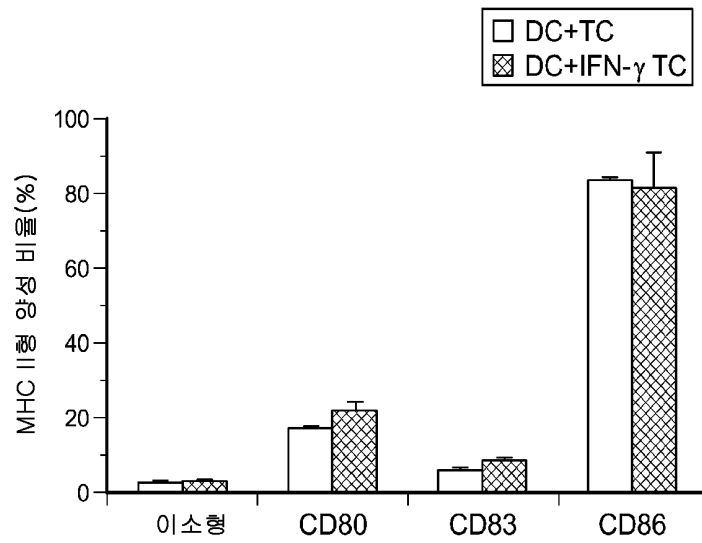
도면2d



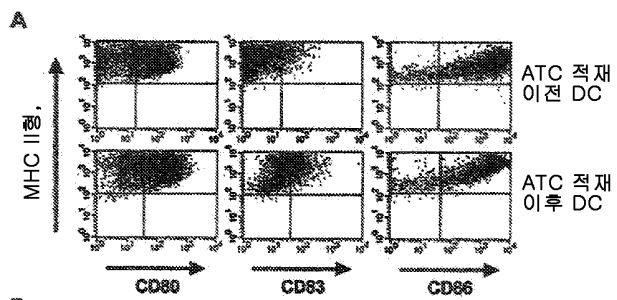
도면3a



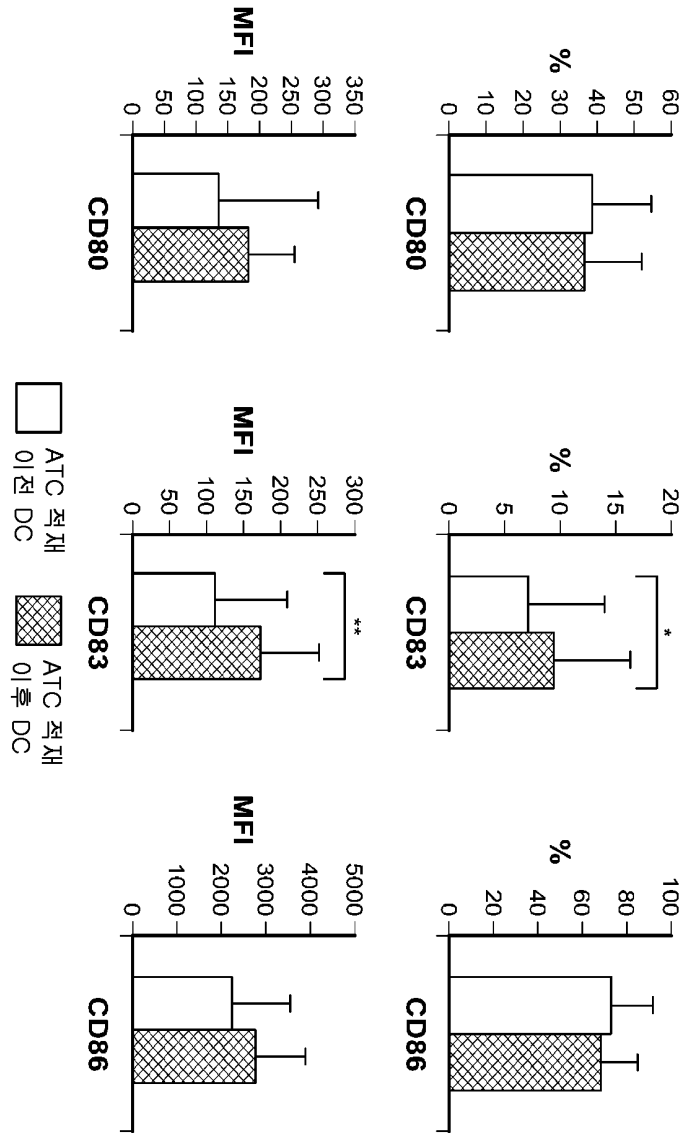
도면3b



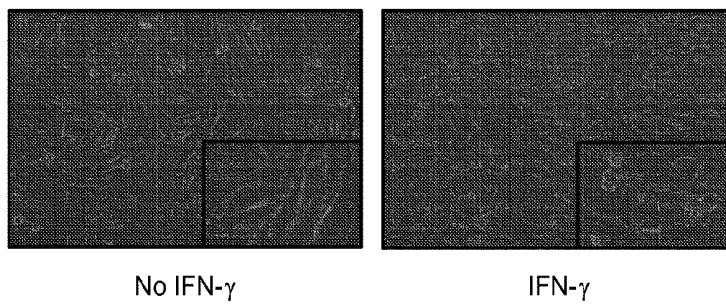
도면4a



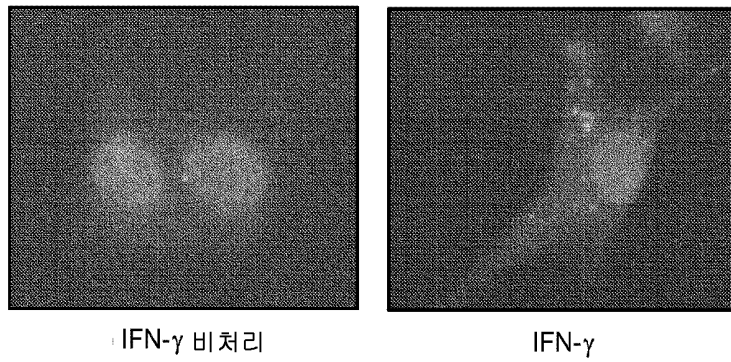
도면4b



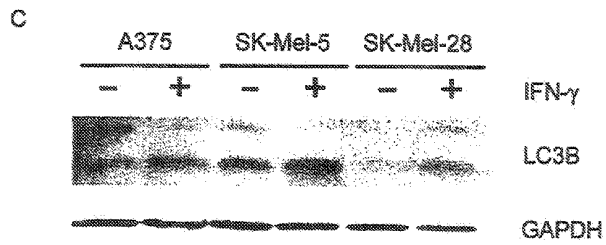
도면5a



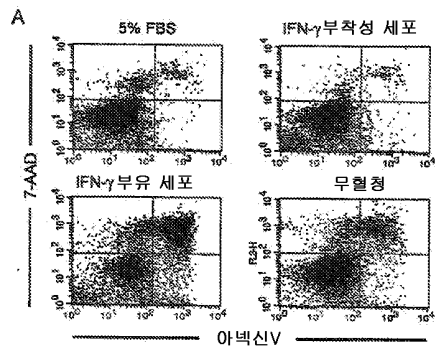
도면5b



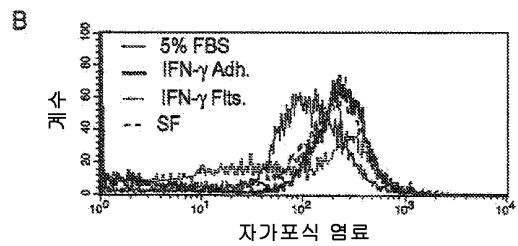
도면5c



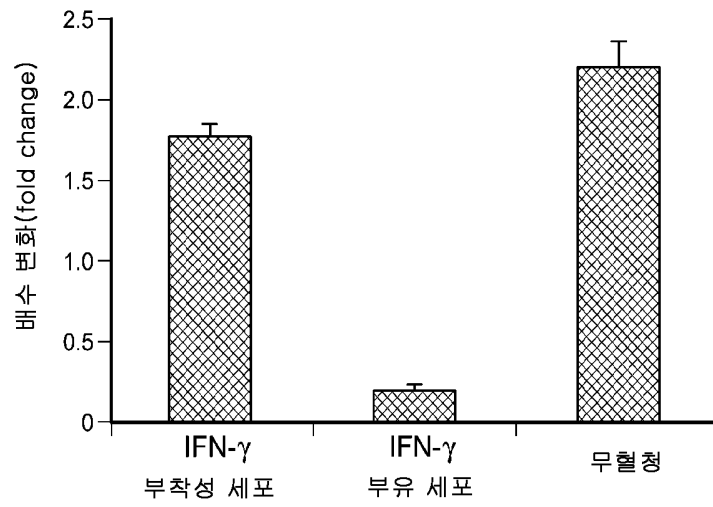
도면6a



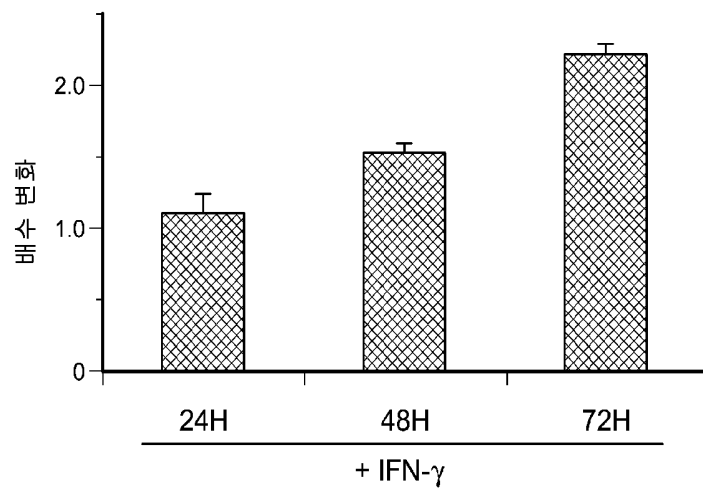
도면6b



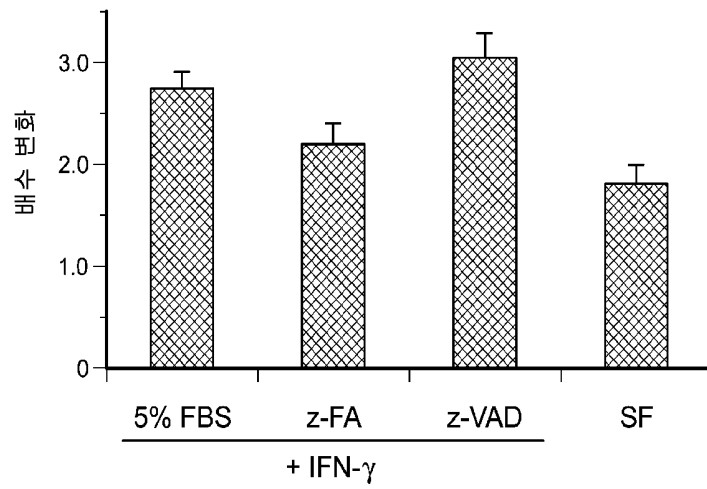
도면6c



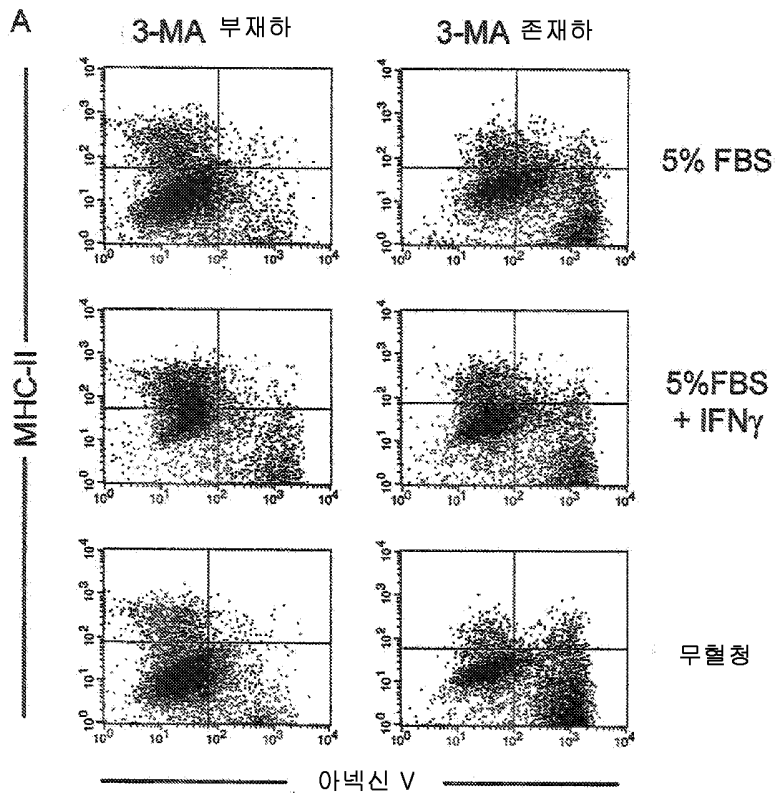
도면7a



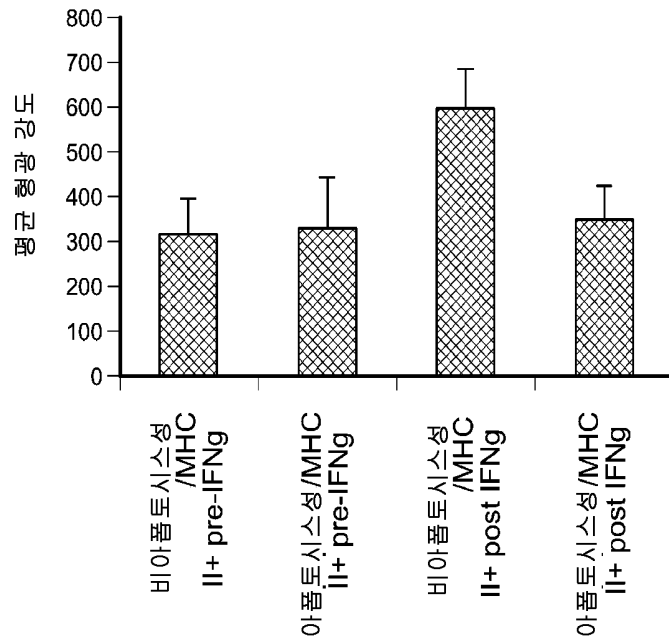
도면7b



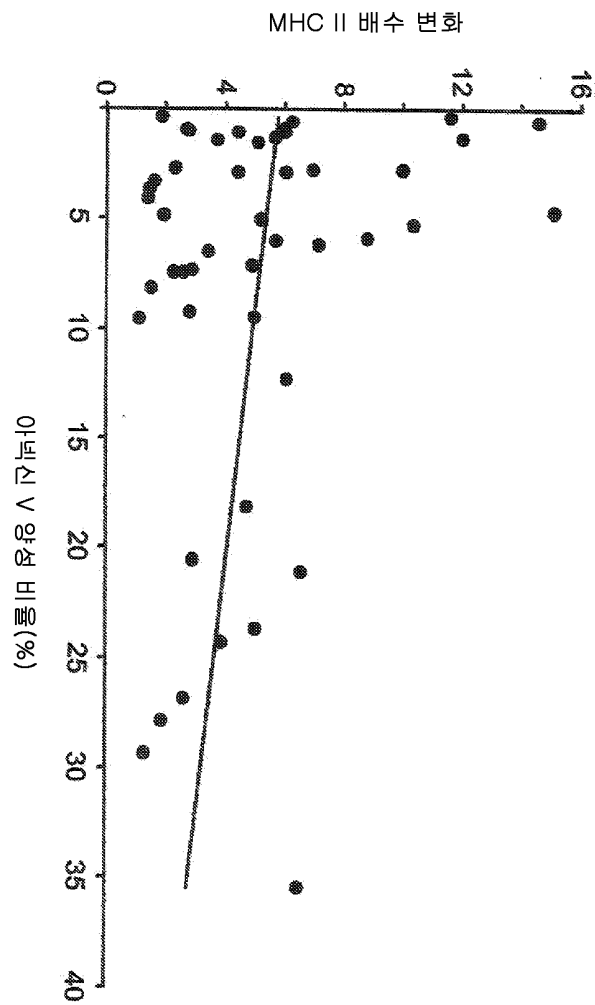
도면8



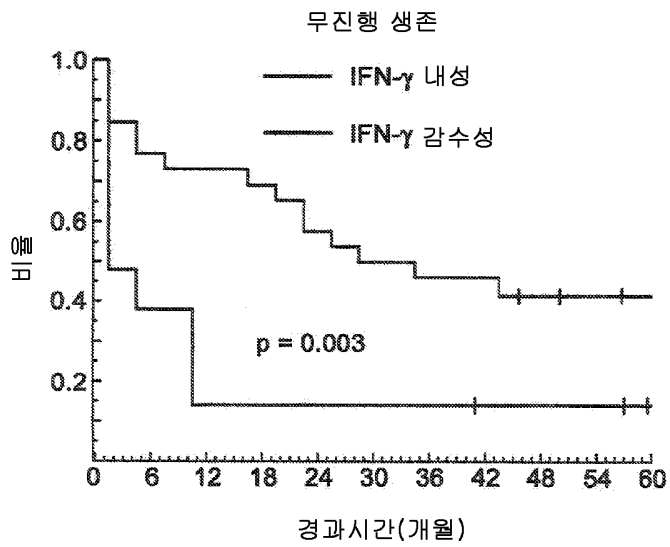
도면9



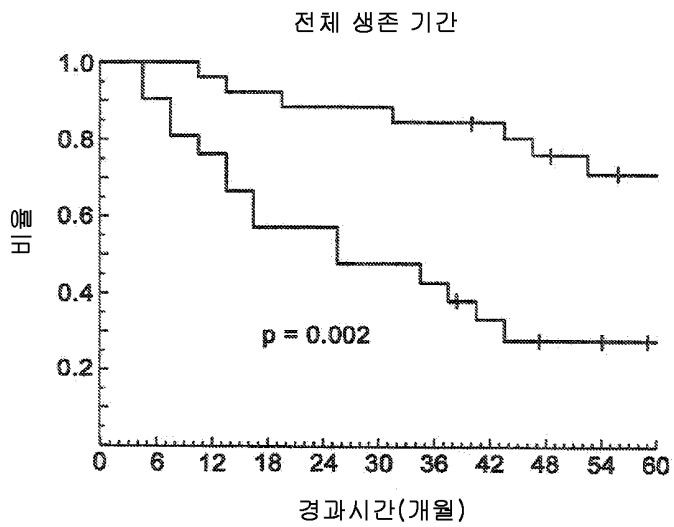
도면10



도면11



도면12



도면13

