



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0113543
(43) 공개일자 2022년08월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0784 (2010.01) A61K 39/00 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01) C12N 5/0783 (2010.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0639 (2013.01)
A61K 39/0011 (2021.08)
(21) 출원번호 10-2022-7026051(분할)
(22) 출원일자(국제) 2006년12월08일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2021-7002605
원출원일자(국제) 2006년12월08일
심사청구일자 2021년02월25일
(85) 번역문제출일자 2022년07월27일
(86) 국제출원번호 PCT/US2006/047083
(87) 국제공개번호 WO 2007/067782
국제공개일자 2007년06월14일
(30) 우선권주장
60/748,885 2005년12월08일 미국(US)

(71) 출원인
노쓰웨스트 바이오써라퓨틱스, 인크.
미국 메릴랜드주 20814 베테스다 스위트 800 몽고
메리 레인 4800
(72) 발명자
보인톤 알톤 엘.
미국 워싱턴주 98346-1863 킹스톤 피.오. 박스
1863
보쉬 말닉스 엘.
미국 워싱턴주 98039 메디나 노스이스트 14번 스
트리트 7814
(74) 대리인
장훈

전체 청구항 수 : 총 31 항

(54) 발명의 명칭 미성숙 단핵구성 수지상 세포의 활성화를 유도하기 위한 조성물 및 방법

(57) 요약

본 발명은 수지상 세포 성숙제의 이용 없이 미성숙 수지상 세포 (DC)의 성숙 유도 및 이들 세포의 활성화를 위한 방법에 관한 것이다. 활성화된 DC는 항원 특이적 T 세포 반응을 유도하기 위해 이용될 수 있다. 본 발명의 방법은 또한 수득된 반응에서 TH-1 및/또는 TH-2 편향 (bias)을 유도하기 위한 인터페론 γ 와 같은 지향성 성숙제의 첨가를 포함할 수 있다. 본 발명은 또한 항원 특이적 T 세포의 활성화 및 유도에 유용한 수지상 세포 집단에 관한 것이다. 유사하게, 활성화된 항원 특이적 T 세포 집단 및 이의 제조 방법에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

C07K 14/4748 (2013.01)

C12N 5/0636 (2013.01)

A61K 2039/5154 (2013.01)

C12N 2501/22 (2013.01)

C12N 2501/2304 (2013.01)

C12N 2501/2313 (2013.01)

C12N 2501/2315 (2013.01)

C12N 2501/24 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

미성숙 수지상 세포와 조직 배양 기질의 부착 및 수지상 세포의 시험관내 배양에 적합한 조건 하에서 활성화된 수지상 세포의 성숙을 위해 충분한 시간 동안, 미성숙 수지상 세포가 농후한 군집을 포함하는 세포 군집을 조직 배양 기질 및 수지상 세포 분화제를 갖는 배양 배지와 접촉시킴을 포함하는, 활성화된 수지상 세포의 군집이 농후한 군집을 포함하는 세포 군집을 생성시키는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 미리 결정된 항원을 조직 배양 기질과 접촉 전, 동시에 또는 후속적으로 세포 군집과 접촉시키는 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 미리 결정된 항원이 종양 특이적 항원, 종양 관련 항원, 바이러스 항원, 세균 항원, 종양 세포, 세균 세포, 항원을 발현하는 재조합 세포, 세포 용해물, 막 제제, 재조합으로 생산된 항원, 펩티드 또는 분리된 항원인 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 세포 용해물 또는 막 제제가 뇌 종양, 전립선 종양, 전립선 조직, 난소 종양, 유방 종양, 유방 조직, 백혈구 군집, 폐 종양, 흑색종, 방광 종양 또는 종양 세포주로부터 수득되는 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 뇌 종양이 다형성 신경교아세포종 또는 별아교세포종인 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 수지상 세포 분화제가 GM-CSF, IL-4, IL-13, IL-15 또는 이의 배합물인 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 미성숙 수지상 세포가, 단핵구성 수지상 세포 전구체가 농후한 세포 군집으로부터 유래되는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 단핵구성 수지상 세포 전구체가 농후한 세포 군집을 수지상 세포 분화 유도제와 접촉시키는 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 수지상 세포 분화 유도제가 GM-CSF, IL-4, IL-13 또는 IL-15 및 이의 배합물인 방법.

청구항 10

제7항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 단핵구성 수지상 세포 전구체가 환자 또는 HLA-일치 개체로부터 유래되는 방법.

청구항 11

제3항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 종양 세포 및 수지상 세포가 환자 유래인 방법.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 미성숙 수지상 세포를 지향적 (directional) 성숙제와 추가로 접촉시키는 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 지향적 성숙제가 인터페론 γ 인 방법.

청구항 14

미성숙 수지상 세포의 시험관내 배양에 적합한 조건 및 조직 배양 기질에 미성숙 수지상 세포의 부착에 적합한 조건하에서, 미성숙 수지상 세포를 조직 배양 기질 및 수지상 세포 분화 유도제와 접촉시킴을 포함하는, 미성숙 수지상 세포를 활성화시키는 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 미성숙 수지상 세포를, 미성숙 수지상 세포와 조직 배양 기질의 접촉 전, 동시에 또는 후속적으로 미리 결정된 항원과 접촉시킴을 추가로 포함하는 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 미리 결정된 항원이 종양 특이적 항원, 종양 관련 항원, 바이러스 항원, 세균 항원, 종양 세포, 세균 세포, 항원을 발현하는 재조합 세포, 세포 용해물, 막 제제, 재조합으로 생성된 항원, 펩티드 또는 분리된 항원인 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 세포 용해물 또는 막 제제가 종양 조직 또는 종양 세포주로부터 유래되는 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 종양 조직 또는 종양 세포주가 뇌 종양, 전립선 종양, 난소 종양, 유방 종양, 폐 종양, 흑색종, 방광 종양 또는 백혈구 군집으로부터 수득되는 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 뇌 종양이 다형성 신경교아세포종 또는 별아교세포종인 방법.

청구항 20

제14항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 수지상 세포 분화 유도제가 GM-CSF, IL-4, IL-13, IL-15 또는 이들의 배합물인 방법.

청구항 21

제14항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 미성숙 수지상 세포를 지향적 성숙제와 추가로 접촉시키는 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, 지향적 성숙제가 인터페론 γ 인 방법.

청구항 23

조직 배양 기질에 미성숙 수지상 세포의 부착을 유도하는 조건하에서, 조직 배양 기질 및 수지상 세포 분화 유도제와 접촉시켜 성숙된 수지상 세포 군집 및 미리 결정된 항원과 T 세포를 접촉시킴을 포함하는, T 세포를 활성화시키는 방법.

청구항 24

분리된 미성숙 수지상 세포를 미리 결정된 항원과 접촉시키고;

조직 배양 기질에 미성숙 수지상 세포의 부착을 유도하는 조건하에서, 분리된 미성숙 수지상 세포를 조직 배양

기질 및 수지상 세포 분화 유도제와 접촉시켜 미성숙 수지상 세포를 활성화시키고;

활성화된 수지상 세포를 비활성 T 세포와 접촉시켜 활성화된 항원 특이적 T 세포를 형성시킴을 포함하는, 활성화된 항원 특이적 T 세포를 생성시키는 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, 미리 결정된 항원이 종양 특이적 항원, 종양 관련 항원, 바이러스 항원, 세균 항원, 종양 세포, 세균 세포, 항원을 발현하는 재조합 세포, 세포 용해물, 막 제제, 재조합으로 생성된 항원, 펩티드 항원 또는 분리된 항원인 방법.

청구항 26

제25항에 있어서, 세포 용해물 또는 막 제제가 뇌 종양, 전립선 종양, 전립선 조직, 난소 종양, 백혈구 군집, 폐 종양, 유방 종양, 또는 방광 종양으로부터 획득되는 방법.

청구항 27

제26항에 있어서, 뇌 종양이 다형성 신경교아세포종 또는 별아교세포종인 방법.

청구항 28

제24항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 최초의 단계로서

분화 유도제의 존재하에서 단핵구성 수지상 세포 전구체를 배양하여 미성숙 수지상 세포를 형성시킴을 추가로 포함하는 방법.

청구항 29

제28항에 있어서, 분화 유도제가 GM-CSF, 인터류킨 4, GM-CSF 및 인터류킨 4의 배합물 또는 인터류킨 13인 방법.

청구항 30

제28항 또는 제29항에 있어서, 단핵구성 수지상 세포 전구체가 사람 피험체로부터 분리되는 방법.

청구항 31

제30항에 있어서, 미성숙 수지상 세포 및 T 세포가 서로 자가 유래인 방법.

발명의 설명

기술 분야

관련 출원

본 출원은 전체가 본원에 참조로서 인용된, 2005년 12월 8일에 제출된 미국 가출원 제60/748,885호에 대한 우선권을 주장한다.

배경 기술

항원 제시 세포 (APC)는 효과적인 면역 반응을 유도하는데 중요하다. 이들은 항원 특이적 T 세포 수용체를 갖는 T 세포에 항원을 제시할 뿐만 아니라, T 세포 활성화에 필요한 시그널을 제공한다. 이들 시그널은 완전하게 규명되어 있지 않지만, 다양한 세포 표면 분자 및 사이토킨 또는 성장 인자가 관여한다. 나이브 (naive) T 세포의 활성화 및 분극화 (polarization)를 위해 필요한 인자는 기억 T 세포의 재활성화를 위해 필요한 것들과 다를 수 있다. T 세포 활성화를 위해 항원을 제시하고 시그널을 전달하는 APC의 능력은 통상 부수적인 세포 기능으로 지칭한다. 단핵구 및 B 세포는 유효한 APC 임을 보였지만, 시험관내에서 이들의 항원 제시 능력은 이전에 감작된 T 세포의 재활성화에 제한되는 것으로 나타났다. 그러므로, 단핵구 및 B 세포는 기능적으로 나이브 T 세포 또는 미감작 T 세포 집단을 직접적으로 활성화시킬 수 없다. 이들은 또한 유도된 면역 반응 또는 유도된 그대로의 면역반응을 분극화할 수 있는 시그널을 전달할 수 없다.

- [0004] 수지상 세포 (DC)는 나이브 (naive) T 세포 및 기억 T 세포 모두를 활성화시킬 수 있는 것으로 생각되는 면역계의 전문적인 항원 제시 세포이다. 수지상 세포는 면역치료, 특히 암의 면역치료에서 이의 생체의 이용이 날로 증가하고 있다. 최적의 면역자극 성질을 갖는 수지상 세포의 생산은 생체의 배양을 위한 이들 세포의 생물학적 이해 및 개발을 필요로 한다. 이들 세포의 배양을 위한 다양한 프로토콜이 각 프로토콜에 대한 다양한 이점과 함께 기재되었다. 최근의 프로토콜은 무혈청 배지의 이용 및 배양된 세포에 바람직한 면역자극성 성질을 부여하는 성숙 조건의 이용을 포함한다.
- [0005] 수지상 세포의 활성화는 표현형적으로 피부 랑게르한스 (Langerhans) 세포와 유사한 미성숙 DC를, 림프절로 이동할 수 있는 성숙한 항원 제시 세포로 전환하는 과정을 개시한다. 당해 과정은 미성숙 수지상 세포의 특징인 강력한 항원 수용 능력을 점진적이고 연속적으로 감소시키고, 공-자극성 (co-stimulatory) 세포 표면 분자 및 다양한 사이토킨의 발현을 상향 조절 (up-regulation)한다. 다양한 자극은 DC의 성숙을 개시할 수 있다. 당해 과정은 복잡하고 시험관내에서 완료되기 위해 48시간 이상 소요된다. 성숙의 하나의 다른 결과는 세포의 생체내 이동 성질의 변화이다. 예를 들어, 성숙은 세포가 림프절로 연결되는 T 세포 영역으로 이동하도록 지시하는 CCR7을 포함하는 다수의 케모킨 (chemokine) 수용체를 유도하고, 림프절에서는 성숙한 DC가 I형 및 II형 MHC 분자에서 DC 표면에 제시된 항원에 대해 T-세포를 활성화시킨다. 용어 "활성화" 및 "성숙", 및 "활성화된" 및 "성숙한"은 미성숙 DC (부분적으로, 항원을 수용하는 능력에 의해 특성규명됨)로부터 성숙한 DC (부분적으로, 새로이 (de novo) T 세포 반응을 효과적으로 자극하는 능력에 의해 특성규명됨)로의 전이를 유도하고 완료하는 과정을 설명한다. 당해 용어는 통상적으로 당업계에서 상호교환적으로 이용된다.
- [0006] 공지된 성숙 프로토콜은 DC가 항원에 노출되는 동안 또는 노출된 후 접한다고 생각되는 생체내 환경에 근거한다. 당해 방법의 최상의 예는 세포 배양 배지로서 단핵구화 배지 (MCM)의 이용이다. MCM은 단핵구를 배양하여 시험관내에서 생성되고 성숙 인자의 공급원으로서 이용된다 (예, 본원에 참조로서 인용된 제US 2002/0160430호 참조). 성숙에 관여하는 MCM의 주요 성분은 염증(촉진성) 사이토킨 인터류킨 1 베타 (IL-1 β), 인터류킨 6 (IL-6) 및 종양 괴사 인자 알파 (TNF α)인 것으로 보고되었다.
- [0007] 그러므로, DC의 성숙은 다수의 시그널 전달 경로를 통해 작용하는 다수의 상이한 인자에 의해 유도될 수 있다. 결론적으로, 단일 성숙 경로 또는 과정은 없지만, 실제로 고유의 명백한 기능적 특성을 갖는 통상의 성숙한 DC 단계는 존재한다. 개념적으로, 이는 면역계가 반응해야 하는 신체에 대한 위협이 다양하여 상이한 공격 전략을 요구하기 때문에 이해될 수 있다. 예를 들어, 세균 감염은 특이적 항체가 부여된 활성화된 대식 세포에 의해 최상으로 제거되는 반면, 바이러스 감염은 바이러스-감염된 세포를 효과적으로 사멸시키는 세포독성 T 세포를 통해 최상으로 공격된다. 암 세포의 사멸에는 세포독성 T 세포, 천연 킬러 세포 (natural killer cell) 및 항체가 조합적으로 관여한다.
- [0008] 그러므로, 시험관내 DC의 성숙은 1종류의 면역 반응을 다른 것보다 선호하도록, 즉, 면역 반응을 분극화하도록 면역계를 유도하기 위해 고안될 수 있다. DC의 지향성 성숙은, 성숙 과정의 결과가 성숙한 DC의 처리로 인해 발생하는 특정 유형의 면역 반응을 지시한다는 개념을 나타낸다. 이의 가장 간단한 형태에서, 지향성 성숙은 Th1-형 또는 Th2-형 반응으로 분극화된 T 세포 반응을 지시하는 사이토킨을 생성하는 DC 집단을 생성시킨다. DC는 9개 이하의 상이한 톨 (Toll)-유사 수용체 (TLR 1 내지 TLR 9)를 발현하고, 이들 각각은 성숙을 유도하는데 이용될 수 있다. 놀랍지도 않게, 세균 생성물과 TLR2 및 TLR4의 상호작용은 DC의 지향성 성숙을 유도하여, 세균 감염을 처리하는데 가장 적절한 분극화된 반응을 유도한다. 역으로, TLR7 또는 TLR9를 통해 유도된 성숙은 항-바이러스 반응을 더 유도하는 것으로 나타난다. 추가적인 예로서, 대부분의 성숙 프로토콜에 인터페론 감마 (IFN- γ)의 첨가는 Th1-형 반응을 지시하는 성숙한 DC에 의해 인터류킨 12를 생성시킨다. 역으로, 프로스타글란딘 E2를 포함시키면 반대 효과를 나타낸다.
- [0009] 그러므로, 활성화된 DC의 지향성 성숙에서 이용될 수 있는 인자는, 예를 들어, 인터류킨 1 베타 (IL-1 β), 인터류킨 6 (IL-6) 및 종양 괴사 인자 알파 (TNF α)를 포함한다. 다른 성숙 인자는 프로스타글란딘 E2 (PGE2), 폴리-dIdC, 혈관작동성장관 펩티드 (vasointestinal peptide) (VIP), 세균 리포폴리사카라이드 (LPS) 및 마이코박테리아 또는 특정 세포벽 성분과 같은 마이코박테리아의 성분을 포함한다. 추가적인 성숙 인자는, 예를 들어, 이미다조퀴놀린 화합물, 예를 들어, 이미다조퀴놀린-4-아민 화합물 (예, 4-아미노-2-에톡시메틸- α , α -디메틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-에탄올 (R848로 명명) 또는 1-(2-메틸프로필)-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-4-아민) 및 이들의 유도체 (전체가 본원에 참조로서 인용된 제WO 00/47719호) 및 합성 이중 가닥 폴리리보뉴클레오타이드 (예, 폴리[I]:폴리[C(12)U]) 등, 톨-유사 수용체 (TLR)의 효능제 (예, TLR3, TLR4, TLR7 및/또는 TLR9) 및 DC의 성숙을 유도하는 것으로 공지된 비메틸화된 CpG 잔기를 함유하는 핵산의 서열 등을 포함한다. 또한,

상기 제제의 임의의 병용은 수지상 전구 세포의 성숙을 유도하는데 이용될 수 있다.

- [0010] 완전히 성숙한 수지상 세포는 미성숙 DC와 정성적으로 및 정량적으로 상이하다. 일단 완전히 성숙하면, DC는 높은 수준의 MHC I형 및 II형 항원 및 높은 수준의 T 세포 공자극 분자, 즉, CD80 및 CD86을 발현한다. 당해 변화는, 이들이 세포 표면 상의 항원 밀도를 증가시킬 뿐만 아니라, T 세포 상의 공자극 분자의 대응체, 예를 들어, CD28 등을 통해 T 세포 활성화 시그널을 증폭시키므로, T 세포를 활성화시키는 수지상 세포의 능력을 증가시킨다. 또한, 성숙한 DC는 T 세포 반응을 자극하고 분극화시키는 많은 양의 사이토킨을 생산한다.
- [0011] 생체의 DC 발생을 위한 통상의 방법은 환자로부터 DC 전구 세포가 풍부한 세포 집단을 수득한 후, DC 전구 세포를 시험관내에서 성숙한 DC로 분화시킨 후, 환자에게 다시 도입하는 것을 포함한다. 일부 연구자는 DC가 최종적으로 분화되어야하고, 그렇지 않으면 단핵구/대식세포로 다시 탈-분화되어 이들의 면역강화 능력의 대부분이 상실된다고 생각한다. 생체외에서 단핵구로부터 발생된 DC의 성숙은 상기한 방법 및 제제를 이용하여 성공적으로 성취되었다.
- [0012] 통상적으로, 미성숙 수지상 세포 (DC)를 제조하기 위해, 당업자는 처음에 다른 오염된 세포 유형으로부터 단핵구성 전구체를 정제하거나 농축되게 해야한다. 이는 단핵구가, 예를 들어, 말초 혈액에서 발견되는 림프구 및 천연 킬러 (NK) 세포와 같은 다른 세포보다 플라스틱에 접착하는 경향이 더 크므로, 플라스틱 (폴리스티렌) 표면에 단핵구성 전구체의 부착을 통해 통상적으로 수행된다. 강력한 세척으로 오염된 세포를 실질적으로 제거한 후, 단핵구는, 단핵구성 전구체를 미성숙 DC로 또는 직접적으로 성숙한 DC로 전환시키는 사이토킨과 배양된다. 단핵구성 전구 세포를 미성숙 DC로 분화시키는 방법은, 단핵구를 미성숙 DC로의 분화를 유도하기 위해 사이토킨 GM-CSF 및 IL-4를 이용하는 살루스토 (Sallusto) 및 란자베키아 (Lanzavecchia) (본원에 참조로서 인용된, *J. Exp. Med.*, 179:1109-1118, 1994)가 최초로 기술했다. 당해 사이토킨의 조합이 가장 통상적으로 이용되지만, 예를 들어, IL-4를 IL-13 또는 IL-15로 대체하는 것과 같은 다양한 다른 조합이 동일한 목표를 성취하기 위해 기술되었다. 당해 방법의 최종 결과는 T 세포 공자극 분자뿐만 아니라, 높은 수준의 주요 조직적합성 복합체 (MHC) 분자를 발현하지만, 수지상 세포 성숙 마커 (marker)인 CD83은 발현하지 않는 "감춰진 (veiled)" 세포이다. 당해 세포는 피부의 랑게르한스 세포와 유사하고, 이들의 주요 생리학적 역할은 침투한 미생물을 포획하는 것이다.
- [0013] 당해 방법의 변형은, 예를 들어, 접선 유동 여과 (TFF: Tangential Flow Filtration) 또는 비드 (bead)에 부착된 항체를 단핵구 상의 표면 분자와 결합시키는 것을 포함하는 단핵구의 상이한 정제 방법을 포함한다. 세포와 결합된 비드를 그 후, 컬럼 또는 자기 표면 상에서 농축시켜서 오염된 세포를 세척 제거한 후, 단핵구를 비드로부터 용출시켰다. 수지상 세포 전구체를 수득하기 위한 또 다른 방법에서, 혈액 (본원에 참조로서 인용된 미국 특허 출원 제5,994,126호) 또는 골수로부터의 줄기 세포 마커 CD34를 발현하는 세포를 정제한다. 당해 세포는 미성숙 DC로의 분화를 위해 필수 사이토킨 GM-CSF와 함께 배양될 수 있다. 당해 DC는 단핵구로부터 발생된 미성숙 DC와 매우 유사한 특성 및 기능적 성질을 명백히 갖는다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0014] 미성숙 DC는 항원을 수송하고 가공(processing)하는 높은 능력을 갖지만, 면역 반응을 개시하는 능력은 제한적이다. 면역 반응을 개시하는 능력은 미성숙 DC의 성숙에 의해 획득된다. 당해 성숙은 또한 DC를 활성화시킴 또는 DC의 활성화로 지칭된다. 성숙 과정은 상기한 성숙-유도 사이토킨, 세균 생성물 또는 바이러스 성분 등과의 접촉을 통해 개시된다.
- [0015] 당해 방법은 성숙한 DC를 생성할 수 있지만, DC 성숙을 위해 제조합 분자 및 세포 상청액을 이용하는데 있어 단점이 있다. 이들은 이들 시약 품목마다 불균일한 품질 및 수율, 및 가공을 위해 단핵구성 수지상 세포 전구체로의 수송을 위해 목적하는 항원과 경쟁할 수 있는 다량의 외부 단백질의 도입을 포함한다. 외부 단백질은 또한 독성일 수 있거나 환자에게 투여되었을 때 자가면역을 일으킬 수 있다. 이러한 시약은 또한 생산하기에 비싸서 면역치료의 비용을 과도하게 높일 수 있다.

과제의 해결 수단

- [0016] 발명의 요약
- [0017] 본원에 기술된 방법 및 조성물은 미성숙 수지상 세포 (DC)의 활성화의 유도 및 항원-특이적 면역 반응을 위한

당해 세포의 감작 (priming)을 위해 제공된다. 일 양태에서, 활성화된 수지상 세포가 풍부한 세포 집단을 형성하기에 충분한 시간 동안 수지상 세포와 조직 배양 기질의 부착 및 시험관내 미성숙 수지상 세포의 배양에 적합한 배양 조건하에서, 미성숙 수지상 세포를 조직 배양 기질 및 수지상 세포 분화 유도제를 함유하는 배양 배지와 접촉시켜 활성화된 수지상 세포가 풍부한 세포 집단을 생성하는 방법을 제공한다. 당해 방법에서, 수지상 세포 집단의 활성화를 유도하기 위해 수지상 세포 성숙제를 첨가할 필요는 없다. 미성숙 수지상 세포는 소정의 항원과 미성숙 수지상 세포와 조직 배양 표면의 접촉 전, 중 또는 후에 접촉할 수 있다. 소정의 항원은, 예를 들어, 종양 특이적 항원, 종양 관련 항원, 바이러스 항원, 세균 항원, 종양 세포, 세균 세포, 항원을 발현하는 재조합 세포, 세포 용해물 (lysate), 막 제제 (preparation), 재조합적으로 생성된 항원, 펩티드 항원 (예, 합성 펩티드 항원) 또는 분리된 항원일 수 있다. 또한, 항원은 용해성 항원 또는 입자성 항원일 수 있다. 특정 양태에서, 항원은 환자의 종양 또는 종양 세포주로부터의 세포 용해물 또는 막 제제일 수 있다.

[0018] 특정 양태에서, 당해 방법은 또한 단핵구성 수지상 세포 전구체가 풍부한 세포 집단을 수득하고; 단핵구성 수지상 세포 전구 세포의 분화를 유도하여 미성숙 수지상 세포 집단을 형성할 수 있는 시약의 존재하에서 전구체를 배양하는 것을 임의로 포함한다. 적합한 수지상 세포 분화제는, 예를 들어, GM-CSF, 인터류킨 4, GM-CSF 및 인터류킨 4의 배합물 또는 GM-CSF 및 인터류킨 13 또는 인터류킨 15의 배합물을 포함한다. 단핵구성 수지상 세포 전구체는 사람 대상체로부터 분리된 세포로서 수득될 수 있다.

[0019] 다른 양태에서는, 활성화된 수지상 세포가 풍부한 세포 집단을 생성하는 방법이 제공된다. 당해 방법은 통상적으로, 미성숙 수지상 세포가 풍부한 세포 집단을 제공하고; 수지상 세포와 조직 배양 기질의 부착 및 시험관내 미성숙 수지상 세포의 배양에 적합한 배양 조건 하에서, 미성숙 수지상 세포를 조직 배양 기질 및 세포 분화 유도제를 함유하는 배양 배지와 접촉시키는 것을 포함한다. 당해 세포는 활성화된 성숙한 수지상 세포가 풍부한 세포 집단을 형성하기에 충분한 시간 동안 배양된다. 생성된 활성화된 성숙한 수지상 세포 집단은, 포유류에 투여되었을 때, 당해 포유류에서 항원 특이적 면역 반응을 생성한다. 미성숙 수지상 세포 집단은 부착에 적합한 조건하에서 조직 배양 기질과 접촉 전, 중 또는 후에 소정의 항원과 접촉될 수 있다. 소정의 항원은, 예를 들어, 종양 특이적 항원, 종양 관련 항원, 바이러스 항원, 세균 항원, 종양 세포, 세균 세포, 항원을 발현하는 재조합 세포, 세포 용해물, 막 제제, 재조합으로 생산된 항원, 펩티드 항원 (즉, 합성 펩티드) 또는 분리된 항원일 수 있다. 항원은 용해성 항원 또는 입자성 항원일 수 있다. 특정 양태에서, 항원은 환자의 종양 또는 종양 세포주로부터 유래된 세포 용해물 또는 막 제제이다. Th1 및/또는 Th2 반응에 치우친 반응으로 DC의 성숙을 지시할 수 있는 제제, 예를 들어, 인터페론 감마 (IFN γ)가 또한 첨가될 수 있다.

[0020] 특정 양태에서, 당해 방법은 단핵구성 수지상 세포 전구체를 수득하고; 분화제의 존재하에서 시험관내에서 전구체를 미성숙 수지상 세포를 형성시키기 위해 배양하는 것을 임의로 추가로 포함할 수 있다. 적합한 분화제는, 예를 들어, GM-CSF, 인터류킨 4, 인터류킨 13, 인터류킨 15 또는 이의 배합물을 포함한다. 단핵구성 수지상 세포 전구체는 또한 치료를 필요로 하는 사람 대상체 또는 조직적합성이 일치하는 개체로부터 분리될 수 있다.

[0021] 또 다른 양태에서, T 세포를 활성화시키기 위한 조성물을 제공한다. 당해 조성물은 조직 배양 기질에 수지상 세포의 부착 및 활성화에 적합한 조건 하에서, 조직 배양 기질 및 수지상 세포 분화 유도제 및 소정의 항원과 접촉시켜 활성화되고 성숙한 수지상 세포 집단을 포함할 수 있다. 수지상 세포 집단은 상기 방법에 의해 생성된 성숙한 수지상 세포 집단에 의해 유도된 것과 유사한 항원 특이적 면역 반응을 생성할 수 있다. 수지상 세포 집단은 상기 배양 배지 및 첨가된 사이토킨으로부터 미성숙 수지상 세포를 분리하고, 수지상 세포 성숙제의 첨가없이 조직 배양 기질에 DC의 부착에 적합한 조건하에서, 분리된 미성숙 수지상 세포를 조직 배양 기질과 접촉시킴으로써 생성될 수 있다. 조직 배양 기질에 대한 수지상 세포 부착에 적합한 조건 하에서, 조직 배양 기질과 접촉시 수지상 세포는 활성화 및 성숙을 통해 활성 성숙한 수지상 세포로의 진행이 유도된다. 미성숙 수지상 세포와 동시에 첨가되거나 성숙 과정 동안에, 즉, 활성화 후, 그러나, 성숙의 완료 전에 조직 배양 기질에 첨가된 소정의 용해성 또는 입자성 항원은 수지상 세포에 의해 수용되고 가공되어, 항원 특이적 면역 반응을 유도하는 T 세포와 접촉시 유용한 적절한 세포 표면 수용체에 제시될 수 있다.

[0022] 다른 양태에서, 분리된, 활성화된 수지상 세포 집단이 제공된다. 세포 집단은 수지상 세포와 조직 배양 기질의 부착을 유도하는 조건하에서 조직 배양 기질 및 수지상 세포 분화 유도제와 이전에 접촉한 성숙한 활성화된 단핵구성 수지상 세포를 포함하고 이들로 농축된다. 생성된 활성화된 수지상 세포는 항원을 수용하고 가공할 수 있고, 시험관 내에서 연속 배양하면, 성숙한 수지상 세포의 세포 표면 표현형을 획득할 수 있다. 세포 집단은 소정의 항원 및/또는 분리된 T 세포, 예를 들어, 나이브 (naive) T 세포를 임의로 포함할 수 있다. 당해 T 세포는 분리된 림프구의 제제에 임의로 존재할 수 있다.

[0023] 활성화된 T 세포를 생성하는 방법이 또한 제공된다. 당해 방법은 통상적으로 분리된 미성숙 수지상 세포가 풍부한 세포 집단을 제공하고; 미성숙 수지상 세포와 소정의 항원을 접촉시키고, 조직 배양 기질에 미성숙 수지상 세포의 부착을 유도하는 조건하에서, 미성숙 수지상 세포와 조직 배양 기질 및 수지상 세포 분화 유도제를 접촉시키는 것을 포함한다. 당해 세포는 활성화된 수지상 세포를 형성하기 위해 미성숙 수지상 세포의 활성화를 유도하기 위해 충분한 시간 동안 배양된다. 활성화된 수지상 세포는 나이브 (naive) T 세포와 접촉하여 활성화된 항원 특이적 T 세포를 형성할 수 있다. 적합한 항원은, 예를 들어, 종양 특이적 항원, 종양 관련 항원, 바이러스 항원, 세균 항원, 종양 세포, 세균 세포, 항원을 발현하는 재조합 세포, 세포 용해물 (종양 세포 용해물 포함), 막 제제, 재조합으로 생성된 항원, 펩티드 항원 (예, 합성 펩티드 항원) 또는 분리된 항원을 포함할 수 있다. 소정의 항원은 용해성 항원 또는 입자성 항원일 수 있다. Th1 및/또는 Th2 반응에 치우친 반응으로 DC의 성숙을 지시할 수 있는 제제, 예를 들어, 인터페론 γ 가 또한 첨가될 수 있다.

[0024] 미성숙 수지상 세포가 풍부한 세포 집단은 소정의 항원, 조직 배양 기질 및 수지상 세포 분화 유도제와 동시에 접촉할 수 있거나, 당해 세포는 조직 배양 기질 및 수지상 세포 분화 유도제와 접촉 전, 중 또는 동시에 또는 후에 소정의 항원과 접촉할 수 있다. 특정 양태에서, 당해 방법은 단핵구성 수지상 세포 전구체가 풍부한 세포 집단을 수득하고; 수지상 세포 분화 유도제의 존재하에서 시험관내에서 전구체를 배양하여 미성숙 수지상 세포의 형성을 유도하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 분화 유도제는, 예를 들어, GM-CSF, 인터류킨 4, 인터류킨 13, 인터류킨 15 또는 이의 배합물을 포함한다. 단핵구성 수지상 세포 전구체는 사람 대상체로부터 임의로 수득될 수 있다. 특정 양태에서, 단핵구성 수지상 전구 세포, 미성숙 수지상 세포 및/또는 T 세포는 서로 자가 유래이다.

[0025] 활성화된 항원 특이적 T 세포는 항원 특이적 면역 반응의 자극을 필요로 하는 동물, 특히 포유류에게 투여될 수 있다. 적합한 항원은, 예를 들어, 종양 특이적 항원, 종양 관련 항원, 바이러스 항원, 세균 항원, 종양 세포, 세균 세포, 항원을 발현하는 재조합 세포, 세포 용해물, 막 제제, 재조합으로 생성된 항원, 펩티드 항원 (예, 합성 펩티드 항원) 또는 분리된 항원을 포함한다. 특정 양태에서, 세포 용해물 및/또는 막 제제는 환자의 종양 또는 종양 세포주로부터 유래된다. 미성숙 수지상 세포는 소정의 항원 및 조직 배양 기질, 수지상 세포 분화 유도제와 동시에 접촉할 수 있거나, 미성숙 수지상 세포는 신규한, 미사용의 오염되지 않은 조직 배양 기질과 접촉 전에 소정의 항원과 접촉할 수 있다.

[0026] 특정 양태에서, 당해 방법은 동물로부터 단핵구성 수지상 세포 전구체를 분리하고; 시험관내에서 분화제의 존재하에서 전구체를 배양하여 미성숙 수지상 세포를 형성시키는 것을 추가로 포함한다. 분화제는, 예를 들어, GM-CSF, 인터류킨 4, 인터류킨 13, 인터류킨 15 또는 이의 배합물일 수 있다.

[0027] 단핵구성 수지상 세포 전구 미성숙 수지상 세포 집단 및/또는 T 세포는 동물에게 자가 유래이거나 동물에게 동종 유래일 수 있다. 대안적으로, 당해 단핵구성 수지상 세포 전구체, 미성숙 수지상 세포 및/또는 T 세포는 당해 동물과 동일한 MHC 일배체형 (haplotype)을 갖거나, MHC 마커를 공유할 수 있다. 특정 양태에서, 당해 동물은 사람 또는 비-사람 동물일 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0028] 본 발명은 미성숙 수지상 세포 (DC) 집단의 활성화 및 성숙 유도 또는 유발 및 항원-특이적 면역 반응을 위한 당해 세포 집단의 감작을 위한 방법을 제공한다. 미성숙 수지상 세포 집단은 분리 배지 및 배양 배지 등을 포함하는 제제 배지로부터 수득될 수 있고, 미성숙 단핵구성 수지상 세포가 풍부한 세포 집단을 수지상 세포 성숙제의 첨가 없이 조직 배양 기질에 대한 DC의 부착에 적합한 조건하에서 조직 배양 기질 및 수지상 세포 분화 유도제와 접촉시킨다. 미성숙 수지상 세포를 DC에 의한 수용 가공 및 제시에 적합한 시험관내 세포 배양 조건하에서, 소정의 항원과 접촉시킬 수 있다. 목적하는 항원은 활성화의 개시 중, 전 또는 후속적으로 접촉시킬 수 있다. 대안적으로, 항원에 이미 노출된 (예, 생체내에서) 미성숙 단핵구성 수지상 세포가 수득될 수 있고, 유사하게 적합한 세포 배양 조건하에서 조직 배양 기질과 접촉시킬 수 있다. 생성된 활성화된 성숙한 수지상 세포는 목적하는 항원을 제시하고 항원 특이적 반응으로 T 세포를 활성화시킬 수 있다. 반응의 지향, 즉, Th-1 또는 Th-2 반응을 선호하는 반응의 치우침은 지향성 성숙제, 예를 들어, 인터페론 감마 (IFN γ) 등의 첨가에 의해 영향을 받을 수 있다.

[0029] 다른 양태에서, 단핵구성 수지상 세포 전구체가 풍부한 세포 집단은 대상체 또는 공여체로부터 수득될 수 있다. 세포 집단은 미성숙 수지상 세포를 수득하기 위해 수지상 세포 분화 유도제, 예를 들어, 하나 이상의 사이토킨 (예, 제한되지는 않지만, GM-CSF, 및 GM-CSF 및 IL-4, GM-CSF 및 IL-13, GM-CSF 및 IL-15의 배합물 등)과 접촉

시킬 수 있다. 이후, 미성숙 수지상 세포를 조직 배양 기질 및 수지상 세포 분화 유도제, 사이토킨 또는 다른 지향성 성숙제의 배합물과 함께 소정의 항원과 접촉시켜 수지상 세포를 활성화시키고/시키거나 부분적으로 성숙시킬 수 있다. 성숙한 수지상 세포는 대상체에서 항원 특이적 면역 반응을 유도하기 위해 직접적으로 이용될 수 있거나, 당해 세포는 T 세포에서 항원 특이성 면역 반응을 유도하기 위해 이용될 수 있다. 특정 양태에서, 소정의 항원을 제시하는 세포에 대한 CTL 반응을 유도하는데 유용한 MHC I-형 항원 가공이 자극된다. 유도된 반응의 지향은 인터페론 감마와 같은 지향성 성숙제의 첨가에 의해 영향을 받을 수 있다. 본원에서 이용된 바와 같이, 지향성 성숙제는 성숙한 DC의 최종 단계에 영향을 줄 수 있지만, 단독으로 이용될 때는 DC 성숙을 유도하지 않는 제제이다. 예를 들어, 지향성 성숙제는 Th-2 반응보다 Th-1 반응을 선호하도록, 또는 역으로, DC 집단의 성숙을 분극화시킬 수 있다.

[0030] 수지상 세포는 다양한 림프 및 비림프 조직에서 발견되는 항원 제시 세포의 다양한 집단이다 (Liu, *Cell* 106:259-262 (2001); Steinman, *Ann. Rev. Immunol.* 9:271-296 (1991) 참조). 수지상 세포는 췌장의 림프성 수지상 세포, 표피의 랑게르한스 세포 및 혈류 중의 감취진 세포를 포함한다. 종합적으로, 수지상 세포는 이들의 형태학, 높은 수준의 표면 MHC-II형 발현 및 T 세포, B 세포, 단핵구 및 천연 킬러 세포 상에 발현된 다른 특정한 표면 마커의 부재를 근거로 그룹으로 분류된다. 특히, 단핵구-유래 수지상 세포 (또한, 단핵구성 수지상 세포로서 지칭)는 CD11c, CD80, CD83, CD86를 통상적으로 발현하고 HLA-DR⁺이고, 항상은 아니지만 통상적으로 CD14⁻이다.

[0031] 대조적으로, 단핵구성 수지상 세포 전구체 (통상, 단핵구)는 통상 CD14⁺이고, HLA-DR, CD83 및 CD86을 거의 발현하지 않는다. 단핵구성 수지상 세포 전구체는 이들이 상주하는 임의의 조직, 특히, 림프 조직, 예를 들어, 췌장, 골수, 림프절 및 흉선으로부터 획득될 수 있다. 단핵구성 수지상 세포 전구체는 또한 순환계로부터 획득될 수 있다. 말초 혈액은 단핵구성 수지상 세포 전구체의 용이하게 접근할 수 있는 공급원이다. 제대혈은 단핵구성 수지상 세포 전구체의 다른 공급원이다. 단핵구성 수지상 세포 전구체는 면역 반응이 유도될 수 있는 다양한 유기체로부터 획득될 수 있다. 당해 유기체는, 예를 들어, 사람 및 비-사람 동물 (예, 영장류, 다른 포유류 (제한되지는 않지만, 개, 고양이, 마우스 및 래트를 포함), 새 (닭을 포함) 및 이의 형질전환 종을 포함하는 동물을 포함한다.

[0032] 다른 양태에서, 단핵구성 수지상 세포 전구체 및/또는 미성숙 수지상 세포가 풍부한 세포 집단은 건강한 대상체 또는, 대안적으로, 암 환자 (예, 뇌, 유방, 난소, 폐, 전립선 및 결장 등의 암)와 같이 면역 자극을 필요로 하는 대상체 또는 세포성 면역 자극이 유리하거나 요망되는 다른 대상체 (즉, 세균 또는 바이러스 감염 등을 갖는 대상체)로부터 획득될 수 있다. 수지상 세포 전구체 및/또는 미성숙 수지상 세포는 면역 자극을 필요로 하는 HLA-적합 대상체에 투여하기 위해 HLA-적합 건강한 개체로부터 또한 획득될 수 있다.

[0033] 수지상 세포 전구체 및 미성숙 수지상 세포

[0034] 혈액 및 골수를 포함하는 다양한 공급원으로부터의 수지상 세포 전구체 및 미성숙 수지상 세포가 풍부한 세포 집단을 분리하는 방법이 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 수지상 세포 전구체 및 미성숙 수지상 세포가 풍부한 세포 집단은 성분 채집술 또는 백혈구 성분 채집술에 의한 해파린 처리된 혈액 수집, 버피 코트 (buffy coat)의 제조, 로제팅 (rosetting), 원심분리, 밀도 구배 원심분리 (예, FICOLL (예, FICOLL-PAQUE[®]), 투석볼가 폴리비닐피롤리돈 (PVP)로 피복된 PERCOLL[®] (콜로이드성 실리카 입자 (15 내지 30mm 반경) 및 수크로스 등을 이용), 세포의 시차 용해 및 여과 등에 의해 획득될 수 있다. 특정 양태에서, 백혈구 집단은, 예를 들어, 대상체로부터 혈액을 수집하고, 혈소판을 제거하기 위해 탈피브린화시키고, 적혈구를 용해하여 제조될 수 있다. 수지상 세포 전구체 및 미성숙 수지상 세포는, 예를 들어, PERCOLL[®] 구배와 같은 밀도 구배 물질을 통해 원심분리에 의해 임의로 단핵구성 수지상 세포 전구체를 농축화 할 수 있다.

[0035] 수지상 세포 전구체 및 미성숙 수지상 세포가 풍부한 모든 집단은, 예를 들어, 밀폐된 무균계에서 임의로 제조될 수 있다. 본원에서 이용된 용어 "밀폐된 무균계" 또는 "밀폐계"는 비살균화된 주위 또는 순환 공기, 또는 다른 비살균화된 조건에 노출을 최소화하거나 제거한 시스템을 지칭한다. 수지상 세포 전구체 및 미성숙 수지상 세포를 획득하기 위한 밀폐계는 통상 뚜껑이 열린 튜브에서의 밀도 구배 원심분리, 외부 공기에서 세포의 전달 및 조직 배양 플레이트 또는 비밀봉 플라스크에서의 세포의 배양 등을 배제한다. 통상의 양태에서, 밀폐계는 수지상 세포 전구체 및 미성숙 수지상 세포를 초기 수집 용기로부터 밀봉가능한 조직 배양 용기로 무균 전달을 가능하게 한다.

- [0036] 특정 양태에서, 단핵구성 수지상 세포 전구체는 본원에 참조로서 인용된 제WO 03/010292호에서 기재된 바와 같이, 단핵구가 단핵구-결합 기질에 부착하여 수득된다. 예를 들어, 백혈구의 집단 (예, 백혈구 성분 채집술에 의한 분리)은 기질에 부착된 단핵구성 수지상 세포 전구체와 접촉시킬 수 있다. 백혈구 집단이 기질과 접촉할 때, 백혈구 집단 중의 단핵구성 수지상 세포 전구체는 기질에 우선적으로 부착한다. 다른 백혈구 (다른 유력한 수지상 세포 전구체)는 기질에 대해 감소된 결합 친화력을 나타내므로, 단핵구성 수지상 세포 전구체가 기질 표면에 우선적으로 농축되도록 한다.
- [0037] 적합한 기질은, 예를 들어, 용적에 대한 표면적 비율이 큰 것들을 포함한다. 당해 기질은, 예를 들어, 입자성 또는 섬유성 기질일 수 있다. 적합한 입자성 기질은, 예를 들어, 유리 입자, 플라스틱 입자, 유리-피복 플라스틱 입자, 유리-피복 폴리스티렌 입자 및 단백질 흡수에 적합한 다른 비드 (bead)를 포함한다. 적합한 섬유성 기질은 모세혈관성 튜브 및 미세용모막을 포함한다. 입자성 또는 섬유성 기질은 통상 부착된 단핵구성 수지상 세포 전구체가 부착된 세포의 생존력을 실질적으로 감소시키지 않고 용출되도록 한다. 입자성 또는 섬유성 기질은 실질적으로 비-다공성이므로 기질로부터 단핵구성 수지상 세포 전구체 또는 수지상 세포의 용출을 용이하게 한다. "실질적으로 비-다공성" 기질은 기질 내에서 세포가 포획되는 것을 최소화하기 위해 적어도 기질에 존재하는 주요 구멍이 세포보다 작은 기질이다.
- [0038] 단핵구성 수지상 세포 전구체의 기질로의 부착은 결합 배지를 첨가하여 임의로 증강시킬 수 있다. 적합한 결합 배지는, 예를 들어, 사이토킨 (예, 과립구/대식세포 콜로니 자극 인자 (GM-CSF), 인터류킨 4 (IL-4) 또는 인터류킨 13 (IL-13)), 혈장, 혈청 (예, 자가 혈청 또는 동종 혈청과 같은 사람 혈청), 혈청 알부민과 같은 정제된 단백질, 2가 양이온 (예, 칼슘 및/또는 마그네슘 이온) 및 기질에 단핵구성 수지상 세포 전구체의 특이적 부착을 돕거나 비단핵구성 수지상 세포 전구체의 기질 부착을 억제하는 다른 분자가 개별적으로 또는 임의의 배합으로 보충된 단핵구성 수지상 세포 전구체 배양 배지 (예, AIM-V[®] RPMI 1640, DMEM 및 X-VIVO 15[®] 등)를 포함한다. 특정 양태에서, 혈장 또는 혈청은 열-불활성화 될 수 있다. 열-불활성화된 혈장은 백혈구에 대해 자가 유래 또는 이중 유래이다.
- [0039] 단핵구성 수지상 세포 전구체의 기질 부착 후, 비-부착 백혈구는 단핵구성 수지상 세포 전구체/기질 복합체로부터 분리된다. 임의의 적합한 수단이 복합체로부터 비-부착 세포를 분리하는데 이용될 수 있다. 예를 들어, 비-부착 백혈구 및 복합체를 정지시킬 수 있고, 비-부착 백혈구 및 배지를 따라 버리거나 배출시킨다. 대안적으로, 혼합물을 원심분리하고, 비-부착 백혈구를 함유하는 상층액을 펠렛화된 복합체로부터 따라 버리거나 배출시켰다.
- [0040] 다른 방법에서, 단핵구성 수지상 세포 전구체가 풍부한 모든 집단은 준비된 백혈구가 풍부한 세포 집단으로부터 접선 유동 여과 기구를 이용하여 수득될 수 있다. 단핵구성 수지상 세포 전구체가 풍부한 세포 집단을 수득하는데 유용한 접선 유동 여과 기구는 교차-유동 챔버 (chamber)를 갖는 제거 유닛 (unit), 여과물 챔버 및 이들 사이의 위치한 필터를 포함한다 (전체가 본원에 참조로서 인용된 제 WO 2004-000444호 참조). 필터는 한쪽 면인 잔여물 표면은 교차-유동 챔버와, 다른 한쪽 면인 여과물 표면은 여과물 챔버와 유체 교환한다. 교차-유동 챔버는 백혈구를 포함하는 혈액 성분의 샘플을 교차-유동 챔버에 도입하기 위해 이용되고 필터의 여과물 표면에 평행하는 유입구를 갖는다. 유출구는 필터의 여과물 표면에 반대 방향인 챔버 부위 중앙에 위치한 교차-유동 챔버에 또한 제공된다. 접선 유동 여과 기구용으로 적합한 필터의 평균 구멍 크기는 약 1 내지 약 10 미크론의 범위이다. 필터의 평균 구멍 크기는 약 3 내지 약 7 미크론일 수 있다. 교차-유동 챔버 유입구로의 샘플의 소정의 유입 속도를 제공하기 위한 수단 및 필터를 통한 여과물 챔버로의 여과물의 여과 속도를 조절하기 위한 수단이 또한 포함될 수 있다. 여과 속도 조절 수단은 필터에 대해 저항없는 여과 속도 미만으로 여과 속도를 제한한다. 혈액 성분을 포함하는 샘플은 백혈구 성분 채집술 장치 또는 성분 채집술 장치로부터 수집된 샘플을 포함하는 용기와 같은 공급원 장치에 의해 제공될 수 있다.
- [0041] 수지상 세포 전구체는 분화, 성숙 및/또는 증식을 위해 시험관내 또는 생체외에서 배양될 수 있다. 본원에서 이용된 바와 같이, 분리된 미성숙 수지상 세포, 수지상 세포 전구체, T 세포 및 다른 세포는 인공적으로 이들의 천연 환경으로부터 격리되어 존재하여 천연의 생성물이 아닌 세포를 지칭한다. 분리된 세포는 정제된 형태, 반-정제된 형태 (예, 농축된 세포 집단) 또는 비-천연 환경에 존재할 수 있다. 간략히, 생체외 분화는 통상적으로 하나 이상의 세포 분화제의 존재하에서 수지상 세포 전구체 또는 수지상 세포 전구체를 갖는 세포 집단의 배양을 포함한다. 적합한 분화 유도제는, 예를 들어, 제한되지는 않지만, 세포 증식 인자 (예, GM-CSF, 인터류킨 4 (IL-4), 인터류킨 13 (IL-13), 인터류킨 15 (IL-15)과 같은 사이토킨 및/또는 이들의 배합물)일 수 있다. 특정 양태에서, 단핵구성 수지상 세포 전구체는 단핵구-유래의 미성숙 수지상 세포로부터 분화가 유도된다.

- [0042] 수지상 세포 전구체는 적합한 배양 조건하에서 배양되고 분화가 유도될 수 있다. 적합한 조직 배양 배지는, 예를 들어, AIM-V®, RPMI 1640, DMEM 및 X-VIVO 15® 등을 포함한다. 조직 배양 배지에, 당해 세포가 미성숙 수지상 세포로 분화되는 것을 촉진하기 위해 혈청, 아미노산, 비타민, GM-CSF 및/또는 IL-4, IL-13 또는 IL-15과 같은 사이토킨 및 2가 양이온 등이 보충될 수 있다. 특정 양태에서, 수지상 세포 전구체는 무혈청 배지에서 시험관내에서 배양될 수 있다. 당해 배양 조건은 임의의 동물-유래 생성물을 임의로 배제할 수 있다. 통상의 수지상 세포 배양 배지에서 일반적인 사이토킨 배합물은 각각 약 500 유닛/mL의 GM-CSF 및 IL-4를 포함한다. 분화되어 미성숙 수지상 세포를 형성하는 수지상 세포 전구체는 표현형적으로 피부의 랑게르한스 세포와 유사하다. 미성숙 수지상 세포는 통상적으로 CD14⁻ 및 CD11c⁺이고, 낮은 수준의 CD86 및 CD83을 발현하고, 특화된 내포작용 (endocytosis)을 통해 용해성 항원을 포획할 수 있다.
- [0043] 통상적으로, 상기 방법에서, 미성숙 수지상 세포는 시험관내 또는 생체외에서 성숙되어 환자에게 투여하기 전 또는 T 세포와 접촉하기 전에 성숙한 수지상 세포를 형성한다. 당해 방법에서, 수지상 세포 성숙제는 시험관내에서 소정의 항원과의 접촉 이전에 또는 함께 미성숙 수지상 세포를 포함하는 배양물에 첨가된다. 성숙되면, DC는 점차적으로 및 점진적으로 항원을 수용하는 능력을 상실하고 이들은 통상적으로 공자극성 세포 표면 분자 및 다양한 사이토킨의 상향-조절 발현을 나타낸다. 구체적으로, 성숙한 DC는 미성숙 수지상 세포보다 높은 수준의 MHC I형 및 II형 항원을 발현하고, 성숙한 수지상 세포는 통상적으로 CD80⁺, CD83⁺, CD86⁺ 및 CD14⁻로서 동정된다. 다량의 MHC 발현은 DC 표면 상의 항원 밀도의 증가를 유도하는 반면, 공자극 분자 CD80 및 CD86의 상향 조절은 T 세포 상의 CD28과 같은 공자극 분자의 대응체를 통해 T 세포 활성화 시그널을 강화한다.
- [0044] 상기 방법과 달리, 본 발명의 방법에서 미성숙 수지상 세포의 활성화는 조직 배양물 표면에 대한 수지상 세포의 부착에 적합한 조건 하에서, 분리된 미성숙 수지상 세포를 조직 배양 기질 및 수지상 세포 분화 유도제와 접촉 시킴으로써 개시되고 유도된다. 본 발명의 통상의 방법에서, 활성화는 성숙제의 첨가 없이 성취될 수 있다. 미성숙 수지상 세포는 이전의 배양 기질 또는 정제 배지로부터 제거되고 상기 배양 배지로부터 분리된다. 이어서, 분리된 미성숙 수지상 세포는 계수되고 잔여 과정을 위해 수지상 세포 성숙 인자의 첨가 없이 신선한 배양 배지와 배합하여 추후 이용을 위해 동결된다. 대안적인 방법에서, 지향성 성숙제는 수지상 세포로 치우친 활성화 동안에 첨가되어, 이들은 T 세포 반응을 Th-1 또는 Th-2 반응으로 분극화시킬 수 있다. 이용될 수 있는 제제를 제한하지 않는 예로서, 인터페론 γ 가 Th-1 반응으로 치우친 T 세포 반응을 위해 첨가될 수 있다. 단핵구 성 수지상 세포 전구체 또는 미성숙 DC에 첨가된 인터페론 γ 는 그 자체로는 DC 분화 및/또는 성숙을 유도하지 않는다.
- [0045] 본 발명의 방법에서 유용한 조직 배양 기질은 조직 배양 웰 (well), 플라스크, 병, 백 (bag), 또는 섬유, 비드 및 플레이트 등과 같은 생물반응기에서 이용되는 임의의 매트릭스 (matrix)를 포함할 수 있다. 통상적으로, 조직 배양 기질은 폴리스티렌 및 Teflon® (폴리테트라플루오로에틸렌, PTFE) 등의 플라스틱을 포함한다. 면역 치료를 위해 생체외에서 수지상 세포의 배양을 위해 가장 자주 이용된 이들 조직 배양 기질은 조직 배양 플라스크, -백 또는 다중으로 쌓인 플라스틱 층으로 이루어진 세포 분획 등을 포함한다.
- [0046] 분리된 미성숙 수지상 세포는 적합한 성숙 배양 조건에서 배양되고 성숙될 수 있다. 적합한 조직 배양 배지는 AIM-V®, RPMI 1640, DMEM 및 X-VIVO 15® 등을 포함한다. 조직 배양 배지에 당해 세포의 성숙을 촉진하기 위해 아미노산, 비타민, 사이토킨, 사람 혈청, 예를 들어, 약 1% 내지 10%의 사람 AB 혈청 및 2가 양이온 등이 보충될 수 있다.
- [0047] 수지상 세포의 성숙 및 활성화는 당업계에 공지된 방법에 의해 모니터링될 수 있다. 세포 표면 마커는 유동 세포 측정 및 면역조직화학법 등과 같은 당업계에 친숙한 검사법에서 검출될 수 있다. 당해 세포는 또한 사이토킨 생산에 대해 모니터링될 수 있다 (예, ELISA, FACS 또는 다른 면역 검사법). 본 발명에 따른 활성화된 DC 집단에서, 세포는 또한 통상의 세포 표면 마커 CD83, CD86 및 HLA-DR의 존재에 대해 검사될 수 있다. CD83과 같은 이들 항원의 일부는 성숙한 DC에서만 발현되는 반면, 다른 것들의 발현은 성숙 동안에 현저히 상향-조절된다. 성숙한 DC는 또한 당업자에게 친숙한 수용 검사에 의해 분석될 수 있는 음세포작용 (pinocytosis)에 의한 항원을 수용하는 능력을 상실한다. 항원으로 감각 또는 비감작된 수지상 세포 전구체, 미성숙 수지상 세포 및 성숙한 수지상 세포는 추후 이용을 위해 동결보존될 수 있다. 동결 보존 방법은 당업자에게 공지되어 있다 (예, 전체가 본원에 참조로 인용된 미국 특허 제5,788,963호 참조).
- [0048] 항원

- [0049] 본 발명에 따른 성숙한, 활성화된 수지상 세포는 T 세포에 항원을 제시할 수 있다. 성숙한, 활성화된 수지상 세포는 미성숙 수지상 세포를 활성화 동안 또는 후속적으로 소정의 항원과 접촉시켜 형성될 수 있다. 대안적으로, 항원과 이미 접촉한 (예, 분리전에 생체내에서) 미성숙 수지상 세포를 조직 배양 기질 및 수지상 세포 분화 유도제와 접촉시켜 세포독성 T 세포 반응을 유도하기 위해 활성화된 성숙한 수지상 세포를 생성할 수 있다.
- [0050] 적합한 소정의 항원은 T-세포 활성화가 요망되는 임의의 항원을 포함할 수 있다. 당해 항원은, 예를 들어, 세균 항원, 종양 특이적 또는 종양 관련 항원 (예, 온전한 세포, 종양 세포 용해물, 예를 들어, 교아세포종, 전립선 또는 난소, 유방, 결장, 뇌, 흑색종 또는 폐 종양 세포 등으로부터의 용해물), 종양으로부터 분리된 항원, 융합 단백질 및 리포솜 등, 바이러스 항원 및 임의의 다른 항원 또는 항원의 단편, 예를 들어, 펩티드 또는 폴리펩티드 항원을 포함할 수 있다. 특정 양태에서, 항원은, 예를 들어, 제한되지는 않지만, 전립선 특이적 막 항원 (PSMA), 전립선 산성 포스파타제 (PAP) 또는 전립선 특이적 항원 (PSA)일 수 있다 (예, 문헌 [Pepsidero *et al.*, *Cancer Res.* 40:2428-32 (1980); McCormack *et al.*, *Urology* 45:729-44 (1995)] 참조). 항원은 또한 세균 세포, 세균 용해물, 세포 용해물로부터의 막 단편 또는 당엽계에 공지된 임의의 다른 공급원일 수 있다. 당해 항원은 재조합으로 발현 또는 생성되거나 심지어 화학적으로 합성될 수 있다. 재조합 항원은 또한 숙주 세포 (예, 세균, 효모, 곤충, 척추동물 또는 포유류 세포)의 표면에 발현될 수 있고, 용해물에 존재할 수 있거나, 용해물로부터 정제될 수 있다. 항원은 용해성 항원 또는 입자성 항원일 수 있다.
- [0051] 항원은 또한 대상체의 샘플에 존재할 수 있다. 예를 들어, 대상체의 과증식 또는 다른 증상으로부터의 조직 샘플은 항원의 공급원으로서 이용될 수 있다. 당해 샘플은, 예를 들어, 생검 또는 외과 절제술에 의해 취득될 수 있다. 당해 항원은, 예를 들어, 용해물 또는 분리된 체제로서 이용될 수 있다. 대안적으로, 대상체 (예, 암 환자) 세포의 막 제제 또는 확립된 세포주는 또한 항원 또는 항원의 공급원으로서 이용될 수 있다.
- [0052] 예시적 양태에서, 외과적 표본으로부터 회수된 교아세포종 종양 세포 용해물이 항원의 공급원으로 이용될 수 있다. 예를 들어, 생검 또는 외과 절제술에서 취득된 암 환자 본인의 종양 샘플은 수지상 세포에 항원을 제시하기 위해 또는 항원 제시를 위한 세포 용해물을 제공하기 위해 직접적으로 이용될 수 있다. 대안적으로, 암 환자의 종양 세포의 막 제제가 이용될 수 있다. 종양 세포는 신경교아세포종, 전립선, 폐, 난소, 유방, 결장, 뇌, 흑색종 또는 다른 종류의 종양 세포일 수 있다. 용해물 및 막 제제는 당엽계에 공지된 방법에 의해 분리된 종양 세포로부터 제조될 수 있다.
- [0053] 일 양태에서, 단핵구성 수지상 세포 전구체는 기질에 대해 분리되고 기질로부터 용출되며, 생반응기 또는 조직 배양 백과 같은 다른 밀폐계로 옮겨진다. 적합한 조직 배양 백은, 예를 들어, STERICELL 배양 용기 (Nexell Therapeutics Inc.) 또는 TEFLON 배양 백 (American Fluoroseal Corp.) 등을 포함한다. 밀폐계는 당업자에게 이해될 수 있는 임의의 적합한 크기 또는 용적을 갖는다. 적합한 용적은, 예를 들어, 약 0.01L 내지 약 5L 또는 약 0.01L 내지 약 0.05L를 포함하고, 다소간의 용적이 가능하고 본 발명의 범위 내에 속한다.
- [0054] 단핵구성 수지상 세포 전구체는 또한 기질 상에서 배양될 수 있다. 예를 들어, 기질 상의 단핵구성 수지상 세포 전구체는 생반응기 (발효기 포함) 또는 조직 배양 플라스크, 백 또는 플레이트를 포함하는 조직 배양 용기에서 배양될 수 있다. 조직 배양 플라스크, -백 또는 플레이트는 당업자가 이해할 수 있는 임의의 적합한 크기 또는 용적을 가질 수 있다. 생반응기의 용적은 통상적으로 약 0.01 내지 약 5L 또는 약 0.01 내지 약 0.05L이고, 다소간의 용적이 가능하고 본 발명의 범위 내에 속한다. 통상적으로, 단핵구성 수지상 세포 전구체의 배양을 위해 이용된 생반응기의 용적은 약 0.01 내지 약 0.1L 일 수 있다. 생반응기는, 예를 들어, 1mL의 기질 당 약 10^5 세포 내지 약 5×10^6 세포와 같은 임의의 적합한 양의 단핵구성 수지상 세포 전구체로 접종될 수 있다. 기질 상의 단핵구성 수지상 세포 전구체는 또한 밀폐된 무균 시스템에서 배양될 수 있다.
- [0055] 단핵구성 수지상 세포 전구체는 미성숙 수지상 세포를 수득하기 위해 배양되고 분화될 수 있다. 적합한 조직 배양 배지는 AIM-V, RPMI 1640, DMEM 및 X-VIVO15 등을 포함한다. 조직 배양 배지에 아미노산, 비타민, 과립구/대식세포 콜로니 자극 인자 (GM-CSF) 및/또는 인터류킨 4 (IL-4), 인터류킨 7 (IL-7) 또는 인터류킨 13 (IL-13)과 같은 사이토킨 및 2가 양이온 등이 단핵구성 수지상 세포 전구체의 미성숙 수지상 세포로의 분화를 촉진하기 위해 보충될 수 있다. 통상의 사이토킨 배합물은 GM-CSF 및 IL-4 각각이 약 500 유니트/mL이다. 통상적으로, 단핵구성 수지상 세포 전구체가 기질 상에서 배양되면, 기질 표면으로부터 비부착 세포로서 회수된 다수의 성숙한 수지상 세포는 주로 성숙한 수지상 세포이다. 단핵구성 수지상 세포 전구체는 임의의 적합한 시간 동안 배양될 수 있다.
- [0056] 특정 양태에서, 미성숙 수지상 세포로의 전구체의 분화를 위해 적합한 시간은 약 4 내지 약 7일 일 수 있다.

전구체로부터의 미성숙 수지상 세포의 분화는 당업자에게 공지된 방법에 의해 모니터 될 수 있고, 예를 들어, 표지된 모노클로날 (monoclonal) 항체를 이용하여 세포 표면 마커 (예, CD14, CD11c, CD83, CD86, HLA-DR)의 존재 또는 부재가 모니터될 수 있다. 수지상 세포의 표현형은 또한 당업자에게 공지된 방법에 의해 유전자의 발현 패턴의 분석에 의해 측정될 수 있다. 미성숙 수지상 세포에 대한 통상의 세포 표면 표현형은 $CD14^{-}$, $CD11c^{+}$, $CD83^{-}$, $CD86^{-}$ 및 $HLA-DR^{+}$ 일 수 있다. 미성숙 수지상 세포는 세포 집단의 증식 및/또는 추가적인 분화 또는 항원 수용, 가공 및 제시를 위한 상태에서 미성숙 수지상 세포의 유지를 위해 적절한 조직 배양 배지에서 배양될 수 있다. 예를 들어, 미성숙 수지상 세포는 GM-CSF 및 IL-4의 존재하에서 유지 및/또는 증식될 수 있다.

[0057] 미성숙 수지상 세포는 신규 항원을 가공하는 능력을 보유하므로 일부 발명자에게 선호될 수 있다 (예, 문헌 [Koch *et al.*, *J. Immunol.* 155: 93-100 (1995)] 참조). 대조적으로, 적합한 성숙 조건하에서 항원에 노출되고 항원을 가공하는 성숙한 수지상 세포 (예, $CD14^{-}$, $CD11c^{+}$, $CD83^{+}$, $CD86^{+}$, $HLA-DR^{+}$)는 통상적으로 신규 항원을 효율적으로 가공하는 능력을 상실했다. 성숙한 수지상 세포는 세포 표면상의 제시를 위해 MHC I형 및/또는 MHC II형에 결합할 수 있는 펩티드와 접촉시킬 수 있다.

[0058] 배양 동안에, 미성숙 수지상 세포는 소정의 항원에 임의로 노출될 수 있다. 적합한 소정의 항원은 T-세포 활성화가 요망되는 상기한 바와 같은 임의의 항원을 포함할 수 있다. 일 양태에서, 미성숙 수지상 세포는 암 면역 치료 및/또는 종양 억제제를 위해, 예를 들어, 교아세포종, 전립선, 폐, 난소, 유방, 결장, 뇌, 흑색종 및 종양 세포 용해물 등과 같은 종양 세포 용해물의 존재하에서 배양된다. 다른 항원은, 예를 들어, 세균 및 바이러스 항원, 종양 세포, 정제된 종양 세포막, 종양 특이적 또는 종양 관련 항원 (예, 종양, 융합 단백질 및 리포솜 등으로부터 분리된 항원), 세균 세포, 세균 항원, 바이러스 입자, 바이러스 항원 및 임의의 항원을 포함할 수 있다. 또한, 항원은 항원을 발현하는 형질전환 또는 형질감염된 숙주 세포의 표면상에서 발현될 수 있거나, 정제된 막 또는 목적하는 항원을 발현하는 형질감염 또는 형질전환된 세포의 용해물 일 수 있다.

[0059] 종양 세포 용해물과 같은 항원과 접촉한 후, 당해 세포는 항원-특이적 수지상 세포 등의 집단을 증식시키기 위해 항원의 수용 및 가공을 허용하는 임의의 적합한 시간 동안 배양될 수 있다. 미성숙 수지상 세포는 또한 MHC I형 또는 MHC II형 분자의 환경에서 항원을 제시하는 활성화된 수지상 세포로 성숙될 수 있다. 당해 성숙은, 예를 들어, 조직 배양 기질 상에서 다른 공지된 성숙제의 부재하에서 조직 배양 기질에 수지상 세포의 부착을 유도하는 조건하에서 수지상 세포 분화 유도제와 함께 수행될 수 있다. 통상적으로 수지상 세포 분화 유도제는 GM-CSF 및 IL-14, IL-13 또는 IL-15 등이다.

[0060] 다른 양태에서 따라, 수지상 세포는 소정의 항원 및 지향성 성숙제에 노출될 수 있다. 지향성 성숙제는, 단독으로 이용되면, 단백질성 수지상 전구 세포의 분화 또는 미성숙 수지상 세포의 성숙을 유도하지 않지만, 통상적으로 활성화 과정과 병용되면, Th-1 또는 Th-2 반응을 유도할 수 있는 세포로 DC의 성숙을 지시한다. 인터페론 감마는 Th-1 반응으로 T 세포 반응을 유도할 수 있는 제제의 예이다.

[0061] 본 발명의 다른 양태에서, 소정의 항원에 노출된 미성숙 수지상 세포는 시험관내에서 항원에 대해 T 세포를 활성화시키는데 이용될 수 있다. 당해 수지상 세포는 항원에 노출된 직후 T 세포를 자극하기 위해 이용될 수 있다. 대안적으로, 수지상 세포는 항원 및 T 세포 노출 전 사이토킨 (예, GM-CSF 및 IL-4)의 배합물의 존재하에서 유지될 수 있거나, 당해 수지상 세포는 추후 이용을 위해 당업계에 공지된 방법에 의해 동결보존될 수 있다. 구체적인 양태에서, 사람 수지상 세포는 사람의 T 세포를 자극하기 위해 이용된다.

[0062] T 세포 또는 T 세포의 하위세트는 반응 세포 (responder cell)로서 이용하기 위해 다양한 림프 조직으로부터 수득될 수 있다. 당해 조직은, 제한되지는 않지만, 췌장, 림프절 및 말초혈관을 포함한다. 분리된 또는 정제된 T 세포는 혼합된 T 세포 집단 또는 정제된 T 세포 하위세트로서 소정의 항원에 노출될 수 있다.

[0063] 예를 들어, 정제된 $CD8^{+}$ T 세포는 항원-특이적 CTL 반응을 유도하기 위해 항원-노출된 수지상 세포와 공-배양될 수 있다. 또한, $CD4^{+}$ T 세포의 초기 제거는 $CD8^{+}$ 및 $CD4^{+}$ T 세포 모두의 혼합 배양에서 $CD4^{+}$ 세포의 과증식을 억제할 수 있다. T 세포 정제는, 제한되지는 않지만, CD2, CD3, CD4, CD6 및/또는 CD8에 대한 항체의 이용을 포함하는 양성 또는 음성 선별에 의해 성취될 수 있다.

[0064] 대안적으로, $CD4^{+}$ 및 $CD8^{+}$ T 세포의 혼합된 집단은 세포독성 및 T 헬퍼 (helper) 면역 반응을 포함하는 항원에 대해 특이적 반응을 유도하는 수지상 세포와 공-배양될 수 있다. 특정 양태에서, 활성화된 $CD8^{+}$ 또는 $CD4^{+}$ T 세

포는 본 발명의 방법에 따라 발생될 수 있다. 통상적으로, 항원-반응성, 분극화된 T 세포를 발생시키는데 이용된 성숙한, 감각된 수지상 세포는 이들이 투여될 대상체와 동형 (예, 대상체로부터 수득된)이다. 대안적으로, 의도된 수용체 대상체와 동일한 HLA 일배체형을 갖는 수지상 세포는 시험관내에서 HLA-적합 공여체의 비-암성 세포 (예, 정상 세포)를 이용하여 제조될 수 있다. 구체적인 양태에서, CTL 및 Th-1 헬퍼 세포를 포함하는 항원-반응성 T 세포는 면역자극을 위해 세포의 공급원으로서 시험관내에서 증식된다.

[0065] 세포 집단의 생체내 투여

[0066] 본 발명의 다른 양태에서, 면역 자극을 필요로 하는 대상체에게 성숙한, 감각된 수지상 세포 또는 활성화된, 예를 들어, 분극화된 T 세포 또는 당해 세포를 함유하는 세포 집단을 투여하는 방법이 제공된다. 당해 세포 집단은 성숙한, 활성화된 세포 집단 및/또는 활성화된, 예를 들어, 분극화된 T 세포 집단 모두를 포함할 수 있다. 특정 양태에서, 당해 방법은 수지상 세포 전구체 또는 미성숙 수지상 세포를 수득하고, 당해 세포를 조직 배양 기질, 수지상 세포 분화 유도제 및 소정의 항원과 접촉시킴으로써 분화시키고 성숙시켜 항원 특이적 T 세포 반응을 유도하기 위해 감각된, 성숙한 활성화된 수지상 세포 집단을 형성하여 수행한다. 미성숙 수지상 세포를 활성화 전, 중, 후에 항원과 접촉시킬 수 있다. 성숙한 또는 활성화된 수지상 세포는 면역 자극을 필요로 하는 대상체에게 직접적으로 투여될 수 있다.

[0067] 관련 양태에서, 활성화된 또는 성숙한 수지상 세포는 림프구 집단 내의 T 세포를 자극하기 위해 대상체로부터의 림프구와 접촉할 수 있다. 항원-반응성 $CD4^{+}$ 및/또는 $CD8^{+}$ T 세포의 세포 배양에서 클론성 증식이 임의로 뒤따르는 활성화된, 분극화된 림프구는 면역 자극을 필요로 하는 대상체에 투여될 수 있다. 특정 양태에서, 활성화된, 분극화된 T 세포는 대상체에 대해 자가 유래이다.

[0068] 다른 양태에서, 수지상 세포, T 세포 및 수용체 대상체는 동일한 MHC (HLA) 일배체형 갖는다. 대상체의 HLA 일배체형을 측정하는 방법이 당업계에 공지되어 있다. 관련 양태에서, 수지상 세포 및/또는 T 세포는 수용체 대상체에 대해 동종 유래이다. 예를 들어, 수지상 세포는 동일한 MHC (HLA) 일배체형을 갖는 T 세포 및 수용체에 대해 동종 유래일 수 있다. 동종 유래 세포는 통상적으로 하나 이상의 MHC 대립 유전자에 대해 일치한다 (예, 모두는 아니지만 하나 이상의 MHC 대립유전자를 공유한다). 덜 통상적인 양태에서, 수지상 세포, T 세포 및 수용체 대상체는 서로에 대해 모두 동종 유래이지만, 이들 모두는 통상적으로 하나 이상의 공통적인 MHC 대립 유전자를 갖는다.

[0069] 일 양태에 따라, T 세포는 미성숙 수지상 세포가 수득된 동일한 대상체로부터 수득된다. 시험관내에서 성숙 및 분극화 후, 자가 유래 T 세포는 존재하는 면역 반응을 자극하고/하거나 증대시키기 위해 대상체에 투여된다. 예를 들어, T 세포는 신체 표면적의 m^2 당 약 10^8 내지 약 10^9 세포의 용량으로 정맥내 주입에 의해 투여될 수 있다 (예, 본원에 참조로서 인용된 문헌[Ridell *et al.*, *Science* 257:238-241 (1992)]참조). 주입은 바람직한 간격, 예를 들어, 매달 반복될 수 있다. 수용체는 임의의 부작용을 발견하기 위해 T 세포 주입 동안 및 후에 모니터링될 수 있다.

[0070] 다른 양태에 따라, 본 발명에 따른 신규한, 사용하지 않은 깨끗한 조직 배양 기질과 접촉시켜 성숙된 수지상 세포는 종양 또는 표적 항원을 함유하는 다른 조직에 직접적으로 주사될 수 있다. 당해 부분적으로 성숙한 세포는 항원을 수용하여 생체내에서 T 세포에 당해 항원을 제시할 수 있다.

[0071] [실시예]

[0072] 다음의 실시예는 단지 본 발명의 다양한 양태를 설명하기 위해 제공되고 임의의 방식으로 본 발명을 제한하는 것으로 해석될 수 없다.

[0073] 실시예 1: 조직 배양 기질과의 접촉에 의한 단핵구성 수지상 세포 전구체의 성숙

[0074] 당해 실시예에서, 전구체가 풍부한 세포 집단의 단핵구성 수지상 세포 전구체는 GM-CSF 및 IL-4의 존재하에서 분화되어 미성숙 수지상 세포를 형성한다. 미성숙 수지상 세포는 조직 배양 시스템으로부터 수집되고, 세척되고 계수되고 신규한 깨끗한 조직 배양 용기에서 소정의 항원과 결합한다. 당해 세포는 소정의 용해성 또는 입자성 항원의 존재하에서 수지상 세포의 유지를 위한 통상의 조건하에, GM-CSF 및 IL-4가 보충된 통상의 수지상 세포 배양 배지에서 배양된다. 수지상 세포 성숙제는 당해 배지에 첨가되지 않는다. 수지상 세포는 성숙한 수지상 세포의 특성을 규명하는 세포 표면 마커의 존재를 측정하여, 수지상 세포 성숙제의 첨가 없이 성숙했는지 측정된다.

- [0075] 간략히, 미성숙 DC는 말초 혈액 단핵구를 1% 사람 혈장이 보충된 OptiMEM® 배지 (Gibco-BRL)의 존재하에서 플라스틱과 접촉시켜 제조한다. 미결합 단핵구를 세척에 의해 제거할 수 있다. 결합 단핵구를 mL 당 500 유닛의 GM-CSF 및 500 유닛의 IL-4의 존재하에서 X-VIVO 15® 배지에서 약 6 내지 7일 동안 배양할 수 있다.
- [0076] 미성숙 DC를 세정에 의해 수집하고 당해 세포를 배양 배지로 세척했다. 세포를 계수하고, 세척된 DC를, 예를 들어, 치료받을 환자로부터 외과적으로 제거된 교아세포종의 종양 세포 용해물과 배합했다. 상기한 바와 같은 GM-CSF 및 IL-4를 함유하는 배양 배지 중의 당해 DC 및 용해물을 신규한 깨끗하고 사용되지 않은 조직 배양 접시에 첨가하고 약 12 내지 약 20시간 동안 배양했다. 대안적인 양태에서, 인터페론 감마가 Th-1 증강 반응을 유도하기 위해 첨가될 수 있다.
- [0077] 활성화된 DC를 환자에게 투여하기 위해 수집하고, 세척하고 제조할 수 있다. 활성화된 DC의 샘플을 각각 CD14, CD83, CD86 및 HLA-DR에 특이적인 항체로 표지함으로써 세포의 표현형을 시험하는데 이용한다. 표지된 세포를 유동 세포 측정에 의해 분석하여 이들의 표현형을 결정했다. 활성화된 DC는 성숙한 수지상 세포에 대해 예상되는 바와 같이, CD14이 거의 없고, CD83에 대해 양성이고, 높은 수준의 CD86 및 HLA-DR이 발현됨을 증명했다.
- [0078] 활성화된 DC의 잔여 부분을 주사당 1×10^6 세포 내지 1×10^{10} 세포의 양으로 환자에게 투여한다. 항원 특이적 면역 반응의 유도는 MHC 4량체 분석 및/또는 ELISA에 의한 항원에 대한 항체 반응에 의해 T 세포 반응을 측정하여 평가했다.
- [0079] 실시예 2: 성숙제의 부재 하에서 활성화된 단핵구성 수지상 세포 전구체 세포의 세포 표면 표현형의 결정
- [0080] 당해 실시예에서, 단핵구를 플라스틱 조직 배양 용기에 부착을 통해 정제하고, 수집하고 세척하고, 추가적인 배양 기간 동안 신규 조직 배양 용기에서 재현탁했다. 성숙한 수지상 세포 마커 CD83의 당해 세포 표면 발현을 측정했다.
- [0081] 미성숙 DC를 발생시키기 위해, 단핵구를 플라스틱에 부착시켜 정제하고 GM-CSF, IL-4 및 약 1% 사람 AB 혈청을 함유한 수지상 세포 배양 배지에서 약 7일 동안 배양했다. 약 7일 후, 거의 모두 배지 중에 유리되어 부유하는 당해 세포를 회수하고, GM-CSF, IL-4 및 약 1% 사람 AB 혈청을 함유한 수지상 세포 배양 배지를 함유한 사용하지 않은, 깨끗한 폴리스티렌 조직 배양 플라스크에 재플레이팅 (replating)했다. 도립 (inverted) 현미경으로 재플레이팅한 세포의 시각적 관찰은 대부분의 세포가 조직 배양 표면에 부착되었음을 밝혔다. 재플레이팅 20시간 후, 세포는 DC 마커 CD 83의 유도를 나타냈다. 다음의 표는 분리된 단핵구의 다양한 샘플에서 CD83의 염색을 나타낸다.

표 1

샘플	% CD83 ⁺
A	56.7
B	47.6
C	41
D	21
E	15.4
F	24.1
G	40.5
H	19.6
I	20.5
J	19.4
K	17.9
L	11.6
M	12.5
N	23.6
O	17.1
P	13.8

- [0082]
- [0083] 실시예 3: 성숙제의 부재하에서 활성화된 수지상 세포의 임상적 이용당해 실시예에서, 수지상 세포 분화제의 부재하에서 활성화되고 환자로부터 제조된 종양 용해물과 접촉된 다형성 교아세포종 환자로부터 수득된 수지상 세포

포 조성물의 안전성 및 효능을 시험했다.

[0084] 종양 용해물을 외과적으로 절개된 종양 조직으로부터 제조했다. 분리된 종양 조직을 잘게 다져서 콜라게나제를 함유하는 완충 용액과 함께 용기에 넣어서 조직을 분해시켰다. 당해 혼합물을 실온에서 밤새 정치시켰다. 확보된 조직 분해물을 여과한 후, 유리된 종양 세포를 펠렛으로 원심분리했다. 당해 세포 펠렛을 적은 용적의 RPMI 1640에서 현탁시키고, 동결-해동 주기를 3회 실시했다. 동결-해동 후, 종양 용해물을 원심분리에 의해 청명하게 하고, 단백질 함유 상청액을 멸균을 위해 0.22 미크론 필터를 통해 여과시켰다.

[0085] 단핵구성 수지상 세포 전구체가 풍부한 세포 집단을 FICOLL 농도 구배 상에서 백혈구 성분 채집술 생성물의 정제에 의해 제조한 후, 플라스틱에 부착시켰다. 부착 세포는 10% AB 사람 혈청 및 각각 500U/mL의 hGM-CSF 및 hIL-4가 보충된 RPMI 1640에서 7일 동안 표준 수지상 세포 배양 조건하에서 배양된 단핵구성 수지상 세포 전구체이다.

[0086] 7일 후, 분화된 미성숙 수지상 세포를 수거하고, 세척하고 추후 이용을 위해 동결시키거나, 환자의 종양 용해물과 혼합하여 1% 내지 10%의 사람 AB 혈청 및 각각 500U/mL의 hGM-CSF 및 IL-4의 존재하에서 새로운 조직 배양 플라스크에 재플레이트했다. DC의 최종 농도는 0.5 내지 2×10^6 세포/mL (통상 1×10^6 세포/mL)이고, 종양 용해물의 최종 농도는 10 내지 1000 μ m/mL (통상 100 μ g/mL)이다.

[0087] 기재된 최초 시험에서, 환자는 자가 유래의 배양된 종양 세포로부터 유래된 종양 용해물과 접촉한 수지상 세포를 받았다. 당해 연구는 3명의 대상체가 1×10^6 DC를 받고, 3명의 대상체가 5×10^6 DC를 받고, 6명의 대상체가 10×10^6 DC를 받는 계단적용량증가 연구이다. 면역 반응을 지연형 과민반응 (DTH 반응) 및 세포독성 T 세포 반응 (CTL)을 측정하고, 질병 재발의 경우에 재-실행 동안에 침윤하는 림프구의 존재를 측정하여 평가했다. 각각의 검사는 상이한 양상의 유도된 면역 반응을 측정한다. DTH 반응은 통상적으로 헬퍼 T 세포 (Th) 활성의 증거이고, CTL 반응은 유도된 반응이 종양 세포를 사멸시킬 수 있는 능력을 갖는 T 세포를 유도하는지의 여부를 결정한다. 반응시 종양에서 검출된 침윤하는 T 세포는 활성화된 T 세포가 원위치 (in situ)에서 종양 세포를 사멸시키기 위해 종양 부위로 이동하는 능력을 갖는지를 결정한다.

표 2

면역 반응의 요약-제1기 시험				
환자 #	DC 용량 (# 세포/주사)	DTH 피부 실험 중	말초 CTL 활성 중	종양내 T 세포(재실험에서) ^a
1	1×10^6	양성	양성	+++
2	1×10^6	음성	음성	--
3	1×10^6	양성	양성	+++
4	5×10^6	음성	양성	++
5	5×10^6	양성	양성	n.a.
6	5×10^6	음성	양성	n.a.
7	10×10^6	음성	음성	--
8	10×10^6	음성	음성	++
9	10×10^6	양성	양성	+++
10	10×10^6	음성	음성	n.a.
11	10×10^6	음성	음성	n.a.
12	10×10^6	음성	음성	n.a.

[0088]

[0089] ^a 침윤하는 림프구 수의 반-주관적 평가에 의한 점수 n.a., 수술이 실행되지 않아서 적용할 수 없었음.

[0090] 2차 시험은 또한 4명의 대상체가 주사당 1×10^6 DC를 받고, 6명의 대상체가 주사당 5×10^6 DC를 받고, 6명의 대상체가 10×10^6 DC를 받는 계단적용량증가 연구이다. 당해 연구에서, 종양 용해물은 각각의 특정 환자로부터 절제된 종양으로부터 유래되었고, 용해물은 당해 환자로부터 유래된 DC와 접촉할 수 있다. 면역 반응을, 백신 접종 후, 항원 특이적 CD8+ T 세포에 대한 4량체 염색에 의해, 그리고 경우에 따라, 재수술시 침윤성 종양내 T 세포 존재에 의해 측정하여 평가했다. 통상적으로 재수술은 단지 질병의 재발 후에 수행된다. 13명의 환자는 새롭게 다형성 교아세포종 (GBM)으로 진단되었고, 2명은 재발한 GBM이고, 1명은 재발한 제III기 희돌기교세포

종이었다.

[0091] 항원-특이적 T 세포에 대한 4량체 염색에 의한 면역 반응의 평가는 특정 항원에 특이적인 T 세포 수용체를 발현하는 순환하는 T 세포의 존재의 결정 및 T 세포 수준의 정량을 허용한다. 당해 T 세포가, CD8을 또한 발현한다면, 당해 항원에 대한 CTL 대표 집단으로 추정된다. 당해 연구를 위해 선별된 항원은 조직학적 방법에 의해 본래 절제된 종양에 존재함이 밝혀진 공지된 종양 항원이다. 반응성을 표준 방법을 이용하여 Gp100 (흑색종-관련 종양 항원, GBM에서 또한 발견됨), Trp-2 (티로이나제-관련 단백질 2), Her-2 (표피 증식 인자 수용체-관련 수용체 티로닌 키나제) 및 CMV (사이토메갈로바이러스)를 포함하는 종양 관련 항원에 대해 시험했다.

[0092] 항원-특이적 $CD8^{+}$ T 세포에 대한 4량체 염색을 7명의 환자에서 시도하여, 양성 반응성을 5명에게서 검출했다. 5명의 반응성 환자 중, 2명을 1×10^6 DC로 면역화시켰고, 3명을 10×10^6 DC로 면역화시켰다. 당해 결과는 본 발명의 방법에 의해 측정된 DC가 대부분의 환자에서 면역 반응을 유도할 수 있음을 나타냈다. 대부분의 경우, 당해 반응은 항원 특이적 세포독성 T 세포 반응을 포함한다.

[0093] 상기 실시예는, 제한되지는 않지만, 청구된 발명의 범위를 설명하기 위해 제공된다. 본 발명의 다른 변형은 당업자에게 쉽게 명백해지고 첨부된 청구항에 의해 포함될 수 있다. 모든 공개, 특허, 특허 출원 및 기타 참조는 본원에서 인용되었고, 또한 전체가 본원에 참조로 포함될 수 있다.