



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0103492
(43) 공개일자 2013년09월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0784 (2010.01) C12N 5/0786 (2010.01)
C12N 5/02 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-7004865
(22) 출원일자(국제) 2011년08월11일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2013년02월26일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2011/063867
(87) 국제공개번호 WO 2012/020100
국제공개일자 2012년02월16일
(30) 우선권주장
1013443.5 2010년08월11일 영국(GB)

(71) 출원인
사이토바크 에이/에스
덴마크 디케이-2970 회르스홀름, 벤리그헤스바이
6, 사이언-디티유 폴스커파르
(72) 발명자
킬킨, 알렉세이
덴마크 디케이-2100 코펜하겐, 스트란드보올레바
든 61 2. 티브이.
덴도우개시엔, 카린
덴마크 디케이-2100 코펜하겐, 스트란드보올레바
든 61 2. 티브이.
젠센, 마틴 볼란드
덴마크 디케이-2940 홀테, 시스크라엔튼 6
(74) 대리인
배성호, 정태훈, 오용수

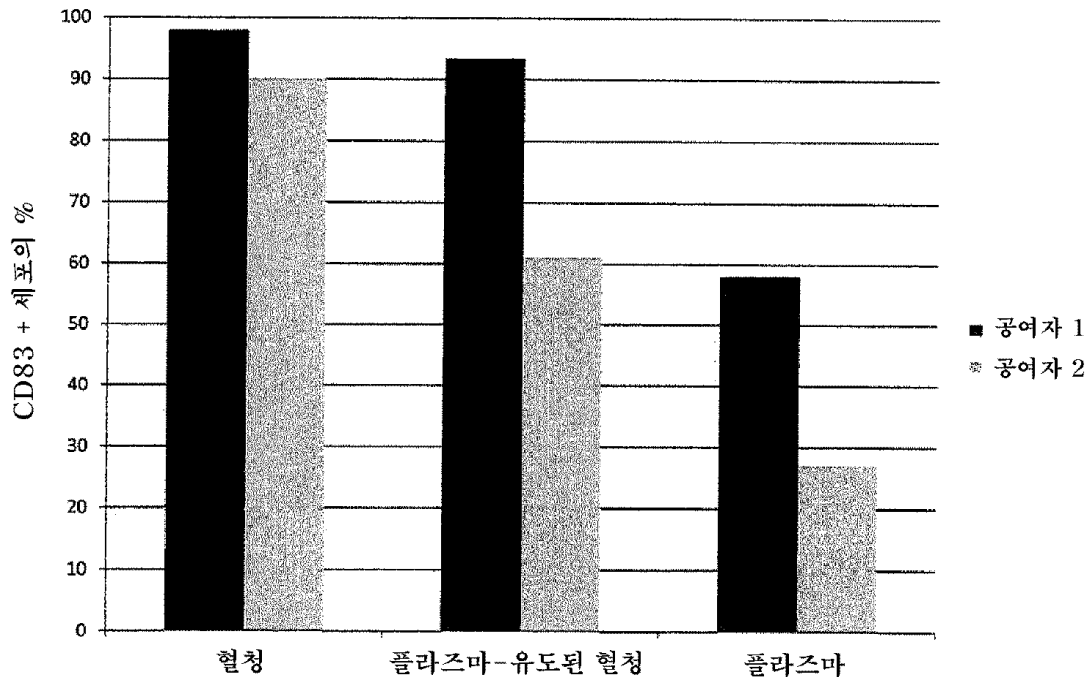
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 수지상 세포를 제조하기 위한 조성물 및 방법

(57) 요약

본 발명은 수지상 세포를 제조하기 위한 조성물 및 방법, 특히 면역 능력이 있는 미성숙한 수지상 세포를 제조하기 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다. 우리는 하기의 적어도 하나에 의해 특징지어지는 단핵 백혈구의 배양에 의하여 수지상 세포를 제조하는 방법을 기재한다: 실질적으로 플라즈마-프리 및 혈청-프리 예비-처리 매개, 헤파린을 포함하는 예비-처리 매개, 및 단백질 용액을 포함하는 예비-처리 매개의 적어도 하나에 의한 조직 배양 표면의 예비 처리; 실질적으로 플라즈마-프리 및 혈청-프리 흡착 매개의 적어도 하나를 사용하는 단핵 백혈구의 흡착; 실질적으로 플라즈마-프리 및 혈청-프리 배양 매개를 사용하는 단핵 백혈구의 배양. 우리는 또한 상기 수지상 세포들을 포함하는 조성물 및 상기 수지상 세포의 용도를 기재한다.

대표도



특허청구의 범위

청구항 1

하기의 적어도 하나에 의해 특징지어지는, 단핵 백혈구의 배양에 의하여 수지상 세포를 제조하는 방법:

실질적으로 플라스마-프리 및 혈청-프리 예비-처치 매개, 헤파린을 포함하는 예비-처치 매개, 및 단백질 용액을 포함하는 예비-처치 매개의 적어도 하나에 의한 조직 배양 표면의 예비 처치;

실질적으로 플라스마-프리 및 혈청-프리 흡착 매개의 적어도 하나를 사용하는 단핵 백혈구의 흡착;

실질적으로 플라스마-프리 및 혈청-프리 배양 매개를 사용하는 단핵 백혈구의 배양.

청구항 2

제1항에서,

상기 단백질 용액은 인간 혈청을 포함하는 것인 방법.

청구항 3

제2항에서,

상기 인간 혈청은 2 및 10 % 사이의 농도를 가지는 것인 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에서,

상기 예비-처치 매개는 10 및 200 U/ml 사이의 헤파린 농도를 가지는 것인 방법.

청구항 5

제4항에서,

상기 예비-처치 매개는 25 및 100 U/ml 사이의 헤파린 농도를 가지는 것인 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 방법에 따라 제조되는 수지상 세포를 포함하는 조성물.

청구항 7

제6항에서,

상기 조성물은 종양에 대하여 직접적으로 투여되는 것인 조성물.

청구항 8

면역 요법에 의해 암을 치료하기 위한 약제학적 조성물의 제조를 위한 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 방법에 따라 제조되는 미성숙한 수지상 세포의 용도.

청구항 9

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 방법에 따라 제조되는 미성숙한 수지상 세포를 포함하는 백신을 투약하는 것에 의하여 암을 치료하거나 또는 예방하는 방법.

청구항 10

제9항에서,

상기 백신은 종양에 대하여 직접적으로 투여되는 것인 방법.

청구항 11

면역 요법에 의한 암의 치료를 위한 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 방법에 따라 제조되는 미성숙한 수지상 세포를 포함하는 조성물.

청구항 12

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 방법에 따라 제조되는 미성숙한 수지상 세포로부터 제조되는 항원-공급의 조성물.

청구항 13

T 세포 림프구를 활성화하기 위하여 제12항에 따른 항원-공급의 조성물을 사용하고, 그에 따라 종양-특이적 CD8+ 세포 독성 T 림프구를 함유하는 세포 독성 조성물을 획득하는 것을 포함하는, 세포 독성 조성물을 제조하는 방법.

청구항 14

종양 항원에 대한 면역 반응을 자극하기 위하여 암 환자에 대하여 제12항에 따른 항원-공급의 조성물을 투약하는 것을 포함하는, 종양에 대한 면역 반응을 자극하는 것에 의하여 암을 치료하는 방법.

청구항 15

제13항의 방법에 따른 세포 독성 조성물을 제조하는 것, 및 상기 세포 독성 조성물을 암 환자에 대하여 투약하는 것을 포함하는, 입양성(adoptive) T 세포 요법에 의한 암을 치료하는 방법.

청구항 16

세포 독성 T 림프구의 활성화를 위한 항원 공급의 세포로서의 제6항에 따른 조성물의 용도.

청구항 17

입양성(adoptive) T 세포 면역 요법을 위한 약제학적 조성물의 제조를 위한 제13항의 방법에 의해 획득되는 종양-특이적 CD8+ 세포 독성 T 림프구의 용도.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 수지상 세포(dendritic cells)를 제조하기 위한 조성물 및 방법에 관한 것으로, 특히 면역 능력이 있는(immunocompetent) 미성숙 수지상 세포를 제조하기 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 종양 세포들은, 다수의 전염성(infectious) 제제들과 같이, 정상 세포들이 부재하는 특정한 단백질 항원들을 발현한다. 잠재적으로, 면역 체계는 이러한 종양 세포들을 이질적인 것으로 인식하고 또한 그들을 제거한다. 종양 세포의 인식 및 파괴를 매개할 능력이 있는 주요 반응기 세포 집단은 세포 독성 T 림프구(cytotoxic T lymphocytes(CTL))이다. CTL 반응을 유도하기 위하여, 항원-제공 세포(antigen-presenting cells(APC))에 의하여 항원들이 CTL 전구체들에 대해 제공되어야 한다. 최근 15 내지 20 년 동안, 면역 요법(immunotherapy) 연구는 가장 효과적인 항원-제공 세포들로서 수지상 세포들의 사용에 대하여 집중되어져 왔다(참고 문헌 1 및 2).

[0003] 수지상 세포들의 제조를 위한 가장 편리한 공급원은 혈액 단핵 백혈구(blood monocytes)이다. 피터(Peters)는 자발적으로(3) 및 두 개의 사이토카인(cytokines)(과립 대식 세포 집락-자극 인자 수용체(Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor(GM-CSF)) 및 인터루킨-4(Interleukin-4(IL-4))(4)의 존재하에서의 양자에서, 배양 내에서의 단핵 백혈구들(monocytes)의 수지상 세포-유사 세포들로 전환하는 능력을 기술하였다. 로마니 외(Romani et al.)(1994)(5) 및 살루스토(Sallusto) 및 란자베키아(Lanzavecchia)(1994)(6)에 의한 연구에 따라, GM-CSF 및 IL-4의 존재하에서 배양되는 단핵 백혈구들이 수지상 세포 제조를 위한 가장 널리 이용되는

공급원이었다. 단핵 백혈구들로부터의 수지상 세포의 제조는 전통적으로 우태아 혈청(fetal calf serum(FCS))의 존재하에서 수행되었다. FCS는 그 환자가 소혈청 알부민(bovine serum albumin(BSA))에 대해 타입 1 과민 반응(type 1 hypersensitivity)을 발현시킬 위험성이 있기 때문에 면역 요법을 위한 조성물 제조에 있어서의 사용을 위해서 현재로서 추천되어지지 않는다.

[0004] 두 가지 타입의 수지상 세포들-성숙 및 미성숙-이 존재한다. 성숙한 수지상 세포들은 CD83, 성숙한 수지상 세포들의 표지(marker)로 잘 알려져 있는(18), 의 존재에 의하여 특징화되어질 수 있다. 미성숙한 수지상 세포들은 CD1a 및 CD4, 미성숙한 수지상 세포들에 대한 특징적인 표지들인, 의 발현에 의하여 확인될 수 있다. 수지상 세포들의 미성숙한 상태는 기관에서의 그들의 자연적인 상태이다. 감염 또는 질병의 세포들의 출현 후에, 수지상 세포들은 영향받은 기관들 또는 조직들 내에 위치할 것이고 또한 그 감염된 제제들 및 병든 세포들을 식균할 것이다(phagocytize). 그들은 그런 다음 항원-특이적 T 림프구(antigen-specific T lymphocytes)에 대하여 처리된 항원들을 제공하기 위하여 국소 림프절(regional lymph nodes)로 이동할 것이다. 상기 이동의 과정 동안에, 또한 가능하게도 항원-특이적 T 세포들과의 최초의 상호 작용 동안에, 수지상 세포 성장이 개시되며, 증가되는 T-세포의 자극 활성화(stimulatory activity)를 유도할 것이다. 보편적인 개념은, 효과적인 항원-공급 세포가 되기 위하여, 수지상 세포들은, 성숙한 수지상 세포들(dendritic cells(DC))이 높은 수준의 CD80 및 CD86과 같은, 동시-자극의 분자들(co-stimulatory molecules)을 발현하고, 또한 미성숙한 DC보다 더욱 잘 이동할 수 있으므로, 성숙되어야 한다는 것이다.

[0005] 그러나 미성숙의 수지상 세포들에 의한 면역화(immunozation)가 임상적으로 효과를 가질 수 있다는 어떤 연구들이 존재한다. 흑색종 환자들(melanoma patients)의 치료에 대한 수지상 세포들의 유용에 관한 최근의 리뷰(11)는 미성숙의 수지상 세포들이 효과적으로 면역 반응을 이끌어내고, 그들의 잠재적인 면역 능력을 나타낸다는 실시에들은 보여준다. 사실적으로, 흑색종 환자들의 수지상 세포-기반의 면역 요법에 대한 최초의 연구들 중 하나에서 보여지는 임상적인 효과들은 미성숙의 수지상 세포들을 사용하여 얻어졌다(9).

[0006] 항원 제공 세포들(antigen-presenting cells)로서 미성숙한 DC의 사용은 성숙한 DC의 사용과 비교할 때 잠재적인 장점들을 갖는다. 성숙한 수지상 세포들은-가능하게는 완전하게 성숙한 DC에 의한 높은 수준의 동시-자극의 분자들(co-stimulatory molecules)의 결과로서의- 항원-비특이적 경로(예로서 W02008/081035를 참조)로 림프구들을 자극한다. 그것은 또한, 성숙한 수지상 세포들이 강력한 CTL 반응을 유도하는 반면, 미성숙한 수지상 세포들은 강력한 중앙 메모리 T 세포 반응(central memory T cell response)을 유도한다는 것(12), 즉, 미성숙한 DC가 우선적으로 메모리-타입의 면역 반응(memory-type immunine response)을 자극한다는 것을 나타내었다. 메모리-타입의 면역 반응은 메모리 세포들이 재-순환되고(D62L과 같은 부착 분자들의 존재로 인하여(13)), 종양 세포들과의 최초 접촉 후에 활성화되며, 또한 종양 세포들을 파괴한 후에 증식할 수 있는 능력을 가지고 있기 때문에(14, 15), 효과적인 항-종양 면역력을 유도하는데 있어서 중요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 생체 내에서 발견되는 미성숙 DC와 유사한 특성들을 보여주는, 면역 능력이 있는(immunocompetent) 미성숙 DC를 생산하는 방법을 제공하기 위한 것이다. 본 발명이 해결하고자 하는 특별한 문제는 미성숙한 DC의 제조 과정 동안에 이물질 반응들(foreign body reactions)을 감소시키거나 또는 제거하기 위한 것이다. 본 발명은 또한 임상적으로-유용한 및 약제학적으로-관련있는 미성숙의 DC를 제조하는 방법을 제공하는 것이다. 이러한 관점에서, 본 발명은 FCS를 사용하여 제조되는 DC와 동일한 특성들을 갖는 수지상 세포들, 그러나 그 제조의 과정에서는 FCS를 사용하지 않는, 을 제조하고자 한다.

[0008] 가장 넓은 관점에서, 본 발명은 미성숙한 수지상 세포들, 특히 면역 능력이 있는 미성숙한 수지상 세포들을 제조하는 방법을 제공하며, 이들은 메모리-타입의 항-종양 T세포 반응을 자극할 수 있다. 다른 관점에서, 본 발명은 IL-15를 발현하는 수지상 세포들을 제조하는 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명에 따르면, 실질적으로 플라즈마-프리의 예비-처리 매개, 헤파린을 포함하는 예비-처리 매개, 및 단백질 용액을 포함하는 예비-처리 매개 중 적어도 하나에 의한 조직 배양 표면(tissue culture surface)의 예비 처리; 실질적으로 플라즈마-프리의 흡착 매개, 및 실질적으로 혈청-프리의 흡착 매개 중 적어도 하나를 사용하는 단핵 백혈구들의 흡착; 및 실질적으로 플라즈마-프리의 배양 매개를 사용하는 단핵 백혈구들의 배양 중 적어도 하나

에 의하여 특징지어지는, 단핵 백혈구들의 배양에 의하여 수지상 세포들을 제조하는 방법이 제공된다.

- [0010] 바람직하게, 상기 단백질 용액은 인간 혈청을 포함한다. 적합하게는, 상기 인간 혈청은 2 및 10 % 사이의 농도를 갖는다.
- [0011] 일 실시예에서, 상기 예비-처리 매개는 10 및 200 U/ml 사이의 헤파린 농도를 갖는다. 이상적으로는, 상기 예비-처리 매개는 25 및 100 U/ml 사이의 헤파린 농도를 갖는다.
- [0012] 일 관점에서, 상기 기재된 방법들에 따라 제조된 수지상 세포들을 포함하는 조성물이 제공된다. 일 실시예에서, 상기 조성물은 종양에 대하여 직접적으로 투여된다.
- [0013] 또 다른 관점에서, 본 발명은 면역 요법에 의하여 암을 치료하기 위한 약제학적 조성물의 제조를 위한 상기 기재된 방법들에 따라 제조된 미성숙한 수지상 세포들의 용도를 제공한다.
- [0014] 상기 기재된 방법들에 따라 제조된 미성숙한 수지상 세포들을 포함하는 백신을 투약하는 것에 의하여 암을 치료하는 또는 예방하는 방법이 본 발명의 또 다른 관점을 이룬다. 일 실시예에서, 상기 방법은 종양 내로 백신을 직접적으로 투여하는 것을 포함한다.
- [0015] 본 발명의 일 관점은 면역 요법에 의한 암의 치료를 위한 상기 기재된 방법들에 따라 제조되는 미성숙한 수지상 세포들을 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0016] 추가적인 관점은 상기 기재된 방법들에 따라 제조되는 미성숙한 수지상 세포들로부터 제조되는 항원-제공의 조성물(antigen-presenting composition)을 제공한다.
- [0017] 본 발명의 추가적인 관점은 하기를 포함한다:
- [0018] T-세포 림프구들을 활성화하기 위하여 상기 기재된 바와 같은 항원-제공의 조성물을 사용하고, 그에 따라 종양-특이적 CD8+ 세포 독성 T 림프구들을 함유하는 세포 독성 조성물(cytotoxic composition)을 획득하는 것을 포함하는, 세포 독성 조성물을 제조하는 방법;
- [0019] 종양 항원들에 대한 면역 반응을 자극하기 위하여 암 환자에 대해 상기 기재된 바와 같은 항원-제공의 조성물을 투약하는 것을 포함하는, 종양에 대한 면역 반응을 자극하는 것에 의하여 암을 치료하는 방법;
- [0020] 상기 기재된 방법에 따르는 세포 독성 조성물을 제조하고, 또한 상기 세포 독성 조성물을 종양 환자에 대하여 투약하는 것을 포함하는, 입양성 T 세포 요법(adoptive T cell therapy)에 의하여 암을 치료하는 방법;
- [0021] 세포 독성 T 림프구들의 활성화를 위한 항원 제공 세포들로서의 상기 기재된 바와 같은 수지상 세포들의 용도; 및
- [0022] 입양성 T 세포 면역 요법(adoptive T cell immunotherapy)을 위한 약제학적 조성물의 제조를 위한 상기 기재된 방법에 의해 얻어지는 종양-특이적 CD8+ 세포 독성 T 림프구들의 용도.

발명의 효과

- [0023] 수지상 세포들을 제조하기 위한 본 발명의 과정은 단핵 백혈구들로부터 DC를 제조하는 잘 알려진 방법들에 대한 현저한 향상을 제공한다. 이러한 잘 알려진 방법은 말초의 혈액으로부터의 단핵 백혈구들의 분리를 포함하며, 5-7 일 동안 GM-CSF 및 IL-4의 존재 하에서 상기 분리된 단핵 백혈구들의 배양에 의해 후속된다. 본 발명의 향상된 점은 수지상 세포들 내에서의 유리한 특성들, 낮은 수준의 동시-자극의 분자들(co-stimulatory molecules) 및 높은 식균 작용의 활성(endocytic activity)과 같은, 을 제공한다. 본 발명의 제조 과정들에 따라 제조된 면역 능력이 있는 미성숙한 수지상 세포들의 특성들은 생체 내에서의 미성숙한 수지상 세포들의 특성들과 유사하다. 생체 내에서의 미성숙한 DC의 주요 특성들은 다음과 같다: 높은 식균 작용의 활성(endocytic activity), 인터루킨-15(Interleukin-15 (IL-15))를 생산할 수 있는 능력, 적합한 성숙의 제재(maturation agent)의 첨가에 의하여 완전히 성숙한 비-소모적인 수지상 세포들로 분화할 수 있는 능력, 및 생체 외에서 메모리-타입의 항원-특이적 CTL 반응(memory-type antigen-specific CTL response)을 유도할 수 있는 능력.

도면의 간단한 설명

- [0024] 본 발명의 상기 기재된 및 다른 관점들은, 단지 예시의 방법으로써, 수반되는 도면들 및 실시예들을 참조하여 이제부터 더욱 상세하게 기재될 것이다:

- 도 1은 제조되는 성숙한 수지상 세포들의 표현형(phenotype)에 대한 플라스틱 예비 처리 매개(plastic pre-treatment medium) 내 플라즈마 포함의 영향을 나타낸다;
- 도 2는 최종 수득물 내에서 림프구들의 비율에 대한 예비 처리 매개 내 헤파린 포함의 영향을 나타낸다;
- 도 3은 제조되는 성숙한 수지상 세포들의 표현형(phenotype)에 대한 예비 처리 매개 내 헤파린 포함의 영향을 나타낸다;
- 도 4는 제조되는 성숙한 수지상 세포들에 의한 IL-12p70의 제조에 대한 예비 처리 매개 내 헤파린 포함의 영향을 나타낸다;
- 도 5는 제조되는 성숙한 수지상 세포들의 표현형(phenotype)에 대한 흡착 매개 내 인간 혈청 포함의 영향을 나타낸다;
- 도 6은 제조되는 성숙한 수지상 세포들에 의한 IL-12p70의 제조에 대한 흡착 매개 내 인간 혈청 포함의 영향을 나타낸다;
- 도 7은 미성숙한 수지상 세포들의 표현형을 나타낸다;
- 도 8은 미성숙한 수지상 세포들 내에서의 IL-15의 발현을 나타낸다;
- 도 9는 미성숙한 및 성숙한 수지상 세포들의 용해물(lysates) 내 IL-15 단백질의 검출을 나타낸다;
- 도 10은 표지화된 용해물의 섭취를 나타낸다;
- 도 11은 유방암 세포 라인 MDA-MB-231의 용해물로 로딩된 수지상 세포들로 두 번 자극된 림프구들의 표현형을 나타낸다;
- 도 12는 HLA-A2-포지티브 종양 세포 라인 MCF-7 및 MDA-MB-231에 대한 HLA-A2-포지티브 공여자(donor)의 제조된 면역 림프구들의 세포 독성 활성을 나타낸다; 및
- 도 13은 HLA-A2-포지티브 종양 세포 라인 LNCaP 및 HLA-A2-네가티브 세포 라인 T47D에 대한 HLA-A2-포지티브 공여자(donor)의 제조된 면역 림프구들의 세포 독성 활성을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0025] 말초 혈액의 원심 분리에 의하여 얻어진 단핵 세포들(mononuclear cells)의 집단으로부터 단핵 백혈구를 분리하기 위하여, 단핵 백혈구들을 흡수하기 위하여 플라스틱 표면이 통상적으로 사용된다. 단핵 세포들은 단핵 백혈구들, 림프구들 및 다양한 비율의 혈소판들을 포함하며, 이들은 특히 말초 혈액의 원심 분리에 의해 제거하는 것이 곤란하다. 흡착에 의한 분리는 단핵 백혈구들의 높은 부착 특성에 기반된다. 단지 단핵 백혈구들만 상기 표면에 부착할 것이고, 반면 다른 세포성 성분들은 그렇지 않을 것이라는 것이 예상된다. 따라서 단핵 백혈구들은 비-흡착된 세포들을 제거하고 또한 흡착된 단핵 백혈구들의 단일층을 세척하는 것에 의하여 분리하는 것이 용이할 것이다. 실제로 있어서, 그러나 다른 세포 성분들의 상당 비율이 또한 상기 표면에 대하여 흡착할 것이다(참조 문헌 (22)의 도 1 참조).
- [0026] 단핵 백혈구들의 수지상 세포들로의 변형 동안에 다른 세포 성분들의 존재는 수지상 세포들의 특성을 위태롭게 할 수 있다. 몇 가지 이전 연구들은 생체 외에서 생산된 미성숙한 수지상 세포들이 면역 능력이 결여되어 있다는 것을 보고하여 왔다(7, 8). 생체 외에서 생산된 미성숙한 DC 및 생체 내에서 발견된 것들 사이의 차이는 생체 외에서 단핵 백혈구들의 DC로의 위태로운 분화로부터 발생될 수 있을 것이다. 분화는 단핵 세포들의 집단 내에 존재하는 단핵 백혈구들 및 다른 세포들이 플라스틱 조직 배양 표면(plastic tissue culture surfaces)에 접촉할 때에 발생하는 이물질 반응들의 결과로서 위태로워질 수 있다(16, 17). 이물질 반응들은 완전하게 능력있는 미성숙한 수지상 세포들로 분화하는 단핵 백혈구들의 능력을 저해하는 요인들의 생산을 유도하는 단핵 세포들의 활성화를 유발할 수 있다.
- [0027] 수지상 세포들의 생산은 전형적으로 플라스틱 예비-처리, 흡착 및 배양의 단계들을 포함한다. 본 발명의 방법에서, 단핵 백혈구들의 흡착의 과정은 단핵 백혈구들의 높은 부착은 유지하는 반면 비-단핵 백혈구성 단핵 세포 성분들의 부착을 감소시키는 것에 의하여 향상되어져 왔다.
- [0028] 수지상 세포들의 제조의 흡착 단계 동안의 림프구들의 비-특이적 흡착은 통상적인 문제점이다(22). 본 발명에서, 인간 혈청(2-10%)을 포함하는 매개로의 조직 배양 플라스틱의 예비-처리가 플라스틱 표면을 코팅하고

또한 림프구들의 비-특이적 흡착을 감소시키기 위하여 사용되었다. 인간 혈청의 이러한 효과는 피브로넥틴(fibronectin)의 존재와 관련된 것이며, 단핵 백혈구들이 피브로넥틴에 대한 수용체를 포함하며 또한 표면에-결합된 피브로넥틴에 대하여 부착할 수 있기 때문이다(28, 29). 또다른 공급원으로부터 유도된 피브로넥틴에 비하여 인간 혈청의 사용은 면역 요법 환자들에 대한 투약을 위한 조성물의 제조에 있어서 유리한 것이다.

[0029] 비-특이적 흡착 및 림프구 확장에 있어서의 추가적인 감소가 상기 플라스틱 예비-처리 매개 내 헤파린의 포함에 의하여 본 발명에서 달성된다. 헤파린은 다양한 타입의 체외에서 일어나는(extracorporeal) 혈액 처리의 과정 동안 인간 혈액 세포들의 흡착 및 활성화를 감소시키는데 있어서 종종 사용된다(26). 이러한 시스템들 내에서, 체외의 장비들에서 사용되는 모든 표면들에 대한 헤파린의 공유적 부착 및 혈액과 직접적으로 접촉하는 것이 사용된다. 수지상 세포들의 제조에 있어서, 헤파린은 높은 수준의 CD1a의 발현을 갖는 세포들을 제조하기 위하여 배양 매개에 대하여 부가적인 것으로서 사용되어져 왔다(27). 본 발명의 방법의 일 관점에서는, 그러나 헤파린은 상기 플라스틱 예비-처리 단계 동안에 사용되며, 특히 조직 배양 플라스틱 예비-처리 매개 내의 헤파린의 포함에 의한다.

[0030] 본 발명자들은 또한 혈소판들의 흡착 및 활성화가 만약 플라즈마가 플라스틱 예비-처리, 흡착 또는 배양 동안의 샘플 매개로부터 배제된다면 예방될 수 있다는 것을 발견하였다. 플라즈마의 상기 배양 매개에 대한 부가는 종종 수지상 세포들의 제조를 위하여 사용된다(22, 23). 플라즈마는 피브리노겐을 포함하며, 이는 혈소판들의 흡착 및 활성화를 매개할 수 있고(24), 이는 단핵 세포들의 제조에 있어서 종종 나타난다.

[0031] 본 발명의 일 관점에서, 단핵 백혈구의 비-특이적 활성화가 흡착 단계 동안에 감소된다. 단핵 백혈구의 비-특이적 활성화는 통상 수지상 세포로의 그들의 분화를 포함하는, 그들의 대식 세포(macrophages)로의 분화를 촉진한다. 본 발명에서, 단핵 백혈구의 비-특이적 활성화에서의 감소는 흡착 단계들로부터 성인 인간 혈청의 배제에 의해 달성된다.

[0032] 미성숙한 수지상 세포들의 생산을 위하여 여기 기재된 방법들은 수지상 세포 백신으로서의 사용을 위해 적합한 세포들을 생산한다. 예로서, 본 발명에 따라 제조된 미성숙한 수지상 세포들은 면역 요법 암 치료의 일부로서 종양으로 직접 투여될 수 있다. 본 발명의 방법들은 또한 강력한 항원-특이적 CTL 반응들을 유도할 수 있는 능력을 갖는 수지상 세포들을 생산한다. 이러한 미성숙한 수지상 세포들이 생체외 면역 실험(immunization experiments)에서 항원 제공 세포로서 사용될 때에, 일어나는 반응들은 메모리-타입의 반응들의 특성들, 예를들면, CD62L의 CTL에 의한발현, 타겟 세포들의 특이적 인식 및 킬링 및 타겟 세포들과의 최초 접촉 후에 강한 증식과 같은, 을 갖는다.

[0033] 실시예 1- 수지상 세포들의 제조

[0034] 수지상 세포들이 버피 코트(buffy coats)로부터 제조되었다. 60 ml의 버피 코트는 60 ml의 Ca/Mg-프리의 포스페이트 버퍼의 식염수(Ca/Mg-free phosphate buffered saline (DPBS))(캄브렉스(Cambrex))로 희석되었고, 또한 림포프랩(Lymphoprep)(네 개의 50 ml 튜브로 각각은 14 ml의 림포프랩이 구비됨)에 대하여 적용되었다. 말초 혈액 단핵 세포들(peripheral blood mononuclear cells (PBMCs))의 혈소판으로의 오염을 최소화하기 위하여, 림포프랩 원심 분리(200 g, 20℃)가 로마니 외(Romani et al.), 1996 (25)에 의하여 기재된 과정에 따라 20 분 후에 중단되었다. 상부 15-20 ml, 혈소판의 대부분을 포함하는, 이 50 ml의 튜브들 내로 이동되었고 또한 원심 분리가 재개되었다(460 g, 20 분, 20℃).

[0035] 플라스틱 조직 배양 플라스크의 코팅은 5 %의 인간 AB 혈청을 포함하는 RPMI 예비-처리 매개를 상기 플라스크(T25)에 대하여 첨가하는 것에 의하여 개시되었다. 상기 예비-처리 매개는 나중에 T25 플라스크로부터 제거되었고 또한 플라스크는 5 ml의 RPMI 1640으로 세정되었다.

[0036] 림포프랩 원심 분리의 종결 후에, 단핵 세포들은 그 인터페이스로부터 수확되었고, 차가운 EDTA-함유의 DPBS(캄브렉스(Cambrex))로 두 번 희석되었으며 또한 3 원심 분리, 그 첫번째는 250 g, 두번째는 200 g, 및 마지막은 150 g, 에 의하여 세척되었다. 원심 분리는 4℃에서 12 분 동안 수행되었다. 최초 원심 분리 후에, 세포들은 30 ml의 차가운 Ca/Mg 프리 DPBS 내에서 재-현탁되었고 또한 쿨터 카운터(Coulter Counter)를 사용하여 카운트되었다. 단핵 백혈구들의 양은 약 9 μ m의 평균 사이즈를 갖는 피크 내에서의 세포들의 수로서 측정되었다.

[0037] 수지상 세포들의 생산을 위하여, T25 폴리스티렌 플라스크 당 4-8 Mio의 단핵 백혈구들을 포함하는 세포 현탁물들이 원심 분리 튜브들 내로 이동되었고 또한 250 g에서 12 분 동안 4℃에서 원심 분리되었다. 4 ml의 AIM-V 흡착 매개(플라즈마 및/또는 혈청의 첨가를 포함하는 또는 포함하지 않는)가 그런 다음 각각의 플라스크에 대하

여 추가되었다. 추가적인 원심 분리 후에, 그 얻어진 펠렛은 $4-8 \times 10^6$ 단핵 백혈구/ml의 농도를 갖는 흡착 매개 내에서 재-현탁되었고, 또한 1 ml의 세포 현탁물이 각각의 T25 플라스크에 대하여 추가되었다. 37 °C에서의 흡착의 30 분 후에, 비-흡착된 세포들은 제거되었고, 흡착된 세포들은 따뜻한 RPMI 1640 매개로 두 번 세정되었고 또한 5 ml의 배양 매개(AIM-V 매개)가 각각의 플라스크에 대하여 첨가되었다. 상기 플라스크들은 37 °C에서 CO₂-인큐베이터내로 놓여졌다. 사이토카인(Cytokines)(GM-CSF, 최종 농도 100 ng/ml, 및 IL-4, 최종 농도 25 ng/ml)이 다음 날 및 3 일 후에 첨가되었다.

[0038] 4일 후에, 성숙할 수 있는 능력이 성숙 각테일(mauration cocktail): 10 ng/ml의 TNF-알파, 1000 U/ml의 IL-6, 10 ng/ml의 IL-1 및 0.1 µg/ml의 프로스타글란딘 E2(prostaglandin E2)을 포함하는, 을 추가하는 것에 의해 측정되었다. 6일 후에, 세포들이 수확되었고, 그들의 표현형이 FACS 분석기에 의해 결정되었으며, 또한 상청액 내에서의 IL-12p70의 생산물이 ELISA 분석기에 의해 결정되었다. 세포들은 CD83(피코에리쓰린(phycoerythrin (PE)) 및 CD86 (PE)에 대하여 직접적으로 컨주게이트되어 있는 항체들에 의해 염색되었으며, 모든 것은 파판젠, 벡톤 디킨슨, 브로엔드비, 덴마크(Pharmingen, Becton Dickinson, Broendby, Denmark)로부터의 것이다. 적합한 아이소타입 컨트롤들이 사용되었다. 샘플들은 FC500 플로우 사이토미터(FC500 Flow Cytometer) (벡크만 쿨터(Beckman Coulter))를 사용하여 분석되었다.

[0039] DC의 CD83 레벨이 완전한 성숙을 나타내기 위하여 사용되었다. 소모의 결여를 나타내기 위하여, 사이토카인 IL-12p70의 생산-이것은 면역 반응의 Th1 폴라리제이션(Th 1 polarization)을 위하여 중요한 것으로 인식되어 있다 (19)-이 측정되었다. IL-12p70 생산의 결여는 소모된 성숙한 수지상 세포들의 지표인 것으로 간주된다(20, 21).

[0040] 실시예 2- 흡착 매개 내에서의 플라즈마의 영향

[0041] 실시예 1에서 기재된 바와 같은 수지상 세포의 제조가 다음 중 어느 것을 포함하는 흡착 매개를 가지고 반복되었다: AIM-V 매개에 더하여, 혈청, 플라즈마-유도된 혈청 또는 플라즈마.

[0042] 두 개의 공여자(donors)로부터의 세포로의 실험들 중 하나의 결과들이 도 1에 보여진다. 플라즈마는 성숙의 정도에 대하여 네거티브적인 영향을 가지고 있었으며, 반면 플라즈마-유도된 혈청은 더 적은 저해 효과를 지닌다. 플라즈마-유도된 혈청의 네가티브적인 영향은 CaCl₂의 부가에 의해 유도되는 클로팅(clotting)의 과정 동안 플라즈마로부터 피브리노겐의 불충분한 제거와 연관되어 있을 수 있다. 요약하면, 플라즈마는 완전한 성숙에 이르기 위한 수지상 세포들의 능력에 대하여 네가티브적인 영향을 지니고 있었다.

[0043] 실시예 3- 플라스틱 예비-처리 매개 내에서의 헤파린의 영향

[0044] 수지상 세포들이 실시예 1에 기재된 바와 같이 준비되었다. 실시예 3의 실험에서, 헤파린이 플라스틱 예비-처리 매개에 대하여 더하여 졌으며 이에 따라 플라스틱 세포 배양 표면들이 상기 예비-처리 단계 동안에 헤파린에 의해 코팅되었다.

[0045] 그 최종 수득물에서의 림프구들의 비율에 대한 헤파린 코팅의 영향이 도 2에 보여진다. 공여자들(donors)의 대부분에 대하여, 림프구들의 비율이 상기 예비-처리 매개 내에서의 헤파린의 함유의 결과로서 2 배 감소하였고, 반면 수지상 세포들의 최종 수득물은 변함없거나, 또는 미세하게 감소되었다. 제조되는 수지상 세포들의 플로우 사이토메트리(flow cytometry)는 수지상 세포들의 성숙의 수준에서의 변화를 보여주지 않았다(도 3).

[0046] 이러한 수지상 세포들에 대하여 성숙의 과정 동안 IL-12p70의 수준이 또한 측정되었다. IL-12p70의 생산이, 캡처 Abs(capture Abs), 스탠다드 또는 샘플, 비오틴화된 검출 Abs(biotinylated detection Abs), 및 HRP-스트렙타비딘(HRP-streptavidin)을 포함하는 샌드위치 ELISA 에 의해 측정되었다. IL-12p70에 대하여 키트 "두오셋 엘리사 향상 시스템(DuoSet ELISA development System)"(R&G 시스템스)가 제작자의 추천에 따라 일정의 변형을 가지고 중요하게 사용되었다. 눈크 맥시소프 96-웰 플레이트(Nunc maxisorp 96-well plates)에 대한 캡처 항체들의 하룻밤 동안의 바인딩 및 세정 후에, 블로킹 단계가 적어도 3 시간 실온(r.t.)에서 연장되었다. 스탠다드 커브가 500 pg/ml에서 시작되는 스탠다드의 7 번 연속된 희석에 의하여 제조되었다. 스탠다드 및 샘플들이 실온에서 2 시간 동안 인큐베이트 되었고 4 °C에서 하룻 밤 동안의 인큐베이션에 의해 후속되었다. 후속되는 단계들은 제작자의 프로토콜에 따라 수행되었다. 하이드로젠 퍼옥사이드-테트라메틸벤지딘 혼합물(Hydrogen peroxide-tetramethylbenzidine mixture)이 HRP에 대한 기질 용액(substrate solution)으로서 사용되었고, 또한 효소 반

응을 종결시킨 후에, 광학적 밀도가 490 및 620 nm 에서의 판독 사이의 차이로서 파장 보정을 가지고 측정되었다.

[0047] 도 4에 도시된 바와 같이, 수지상 세포들을 성숙시키는 것에 의한 IL-12p70의 생산이 수 개의 것에서, 그러나 모든 배양들은 아닌, 증가되었다.

[0048] 요약하면, 플라스틱 예비-처리 매개 내에서의 헤파린의 포함은 최종 수지상 세포들의 림프구들로의 오염을 그 수지상 세포들의 특성들을 위태롭게 하지 않으면서 현저하게 감소시킨다.

[0049]

[0050] 실시예 4- 흡착 매개 내에서의 인간 혈청의 영향

[0051] 실시예 1에 기재된 바와 같은 방법이 그 흡착 매개 내에 인간 혈청의 사용을 포함 또는 포함시키지 않고 반복되었고 또한 결과적인 DC의 특성들이 조사되었다. 도 5 및 6는 두 개의 공여자로부터의 세포들로 얻어진 결과를 도시한다. 흡착 단계 동안에 인간 혈청의 존재는 스탠다드 성숙 콕테일(standard maturation cocktail)의 첨가에 따라 성숙하는 수지상 세포들의 능력을 감소시키며, 이것은 CD83+ 세포들의 비율 내에서의 감소(도 5) 및 IL-12p70 의 생산에서의 감소(도 6)에 의해 보여진다. 이러한 영향은 단핵 백혈구들의 활성화를 유도하는 혈청 내의 면역글로블린 존재의 결과일 것이다(16).

[0052] 실시예 5- 수지상 세포들의 최종 특성화

[0053] 미성숙한 수지상 세포들의 최종 특성화가 하기의 방법들을 사용하여 수행되었다: 생체 내에 존재하는 미성숙한 수지상 세포들에 대해 특징적인 표지들(CD1a 및 CD4)의 발현, IL-15의 발현, 및 레벨화된 용해물의 섭취에 대한 FACS 분석.

[0054] 미성숙한 수지상 세포들의 FACS 분석으로부터의 결과는 도 7에 도시되었다. 세포들은 CD1a 및 CD4 에 대해 포지티브였다. CD4는 림프구들에 의해 생산되는 IL-16 및 MHC 클래스 II에 대한 수용체이다. 리간드(MHC 클래스 II 또는 IL-16)를 갖는 수지상 세포들의 표면에서의 CD4의 상호 작용은 수지상 세포들의 활성화를 유도할 것이며 이것은 그들의 동시-자극적인 기능(co-stimulatory function)을 향상시킬 수 있다.

[0055] IL-15가 두 가지 방법에 의해 결정되었다: RT-PCR(통상적인 및 리얼 타임)에 의한 mRNA 발현, 및 샌드위치 ELISA에 의한 단백질 발현.

[0056] IL-15를 위한 mRNA의 발현

[0057] RNA가 샘플들로부터 분리되었고, RNA레이터(RNAlater)(암비온(Ambion))에서 보관되었고, DNase 처리되었고, 역전사되었으며, 또한 PCR 내에서 사용되었다. 역전사 과정 없는 제조물이 네가티브 컨트롤로서 사용되었고, 여기서 PCR 생산물의 결여는 계놈의 DNA를 오염시키는 것의 완벽한 결여를 나타내었다. 인간 IL-15에 대한 프라이머들이 참조로서 주어진다(30): TAAAACAGAAGCCAACTG (센스(sense)) 및 CAAGAAGTGTGATGAACAT (안티센스(antisense)). 95 °C에서 5 분 동안의 최초 변성(initial denaturation) 후에, 샘플들은 DNA 써모사이클러(thermocycler) 내에서 35-38 사이클 동안 증식되었고, 각각은 95 °C에서 60 초 동안의 변성(denaturing), 63 °C(사이클 1-3), 59 °C(사이클 4-6), 및 56 °C(사이클 7-38)에서 60 초 동안의 어닐링(annealing), 및 72 °C에서 45 초 동안의 신장(extension)을 포함하며, 72 °C에서 10 분 동안의 최종적인 신장(extension)에 의해 후속된다. PCR 수득물의 알리퀴트들이 다음으로 2 %의 아가로스 젤 상에서 전기 영동되고(electrophoresed) 또한 에티디움 브로마이드 스테이닝(ethidium bromide staining)에 의해 시각화되었다.

[0058] 리얼 타임 RT-PCR이 라이트사이클러 파스타트 DNA 마스터 플러스 SYBR 그린 I(Lightcycler Fastart DNA Master Plus SYBR green I) 및 라이트사이클러 2.0 인스트루먼트(Lightcycler 2.0 instrument)(로체 어플라이드 사이언스(Roche Applied Science))를 사용하여 수행되었고, 프라이머 및 조건은 참조(31)와 같았다: 센스(sense) - 5'-GCCCTGGATATCTGTCCAA-3', 안티센스(antisense) - 5'-GCTCGACACATTTCGTCTCA-3', 결과적으로 PCR 수득물 사이즈는 177 bp였다. 어닐링은 61 °C에서 수행되었다. β-액틴 및 GAPDH 을 인코딩하는 유전자들이 하우스-키팅 유전자 컨트롤로서 사용되었다.

- [0059] ELISA에 의한 IL-15의 결정
- [0060] IL-15 결정을 위하여, 0.35 ml의 각각의 수지상 세포 용해물이 수집되었고 또한 분석 때까지 동결(-20 °C) 상태로 유지되었다. IL-15의 농도는 ELIST 증식 시스템(퍼킨엘머 라스, 주식회사(PerkinElmer LAS, Inc.))과 결합된 "레디-셋-고(Ready-Set-Go)" ELISA 키트(이바이오사이언스, 샌디아고, 캘리포니아, 미국(eBioscience, San Diego, Ca, USA))를 사용하여 결정되었다. 상기 "레디-셋-고(Ready-Set-Go)" 키트는 캡처 Abs, 스탠다드, 비오티화된 검출 Abs(biotinylated detection Abs), 및 HRP-스트렙타비딘(HRP-streptavidin)을 포함했다. 상기 과정은 본질적으로 하기의 변형들을 포함하는 제작자의 추천에 따라 수행되었다: 1) 캡처 항체들의 눈크 맥시솅 96-웰 플레이트(Nunc Maxisorp 96-well plates)에 대한 하룻 밤 동안의 바인딩 및 상기 플레이트들의 세척 후에, 블로킹 단계가 적어도 3 시간 실온에서 연장되었다; 2) 스탠다드 커브가 500 pg/ml의 IL-15로 시작하는 스탠다드의 일곱 번의 연속된 희석에 의하여 제조되었고, 또한 세번 복사된(triplicated) 스탠다드 및 샘플들이 실온에서 2 시간 동안 인큐베이트되었으며 4 °C에서 하룻 밤 동안의 인큐베이션에 의해 후속되었다.
- [0061] HRP-스트렙타비딘(HRP-streptavidin)에 의해 후속되는 비오티화된 검출 Abs(biotinylated detection Abs)의 바인딩 후에, ELIST 에 의한 증식이 본질적으로 퍼킨엘머의 프로토콜(PerkinElmer's protocol)에 따라 수행되었다. 그런다음 HRP의 효소적 반응이 기질로서 테트라메틸벤지딘(tetramethylbenzidine (TMB))을 사용하여 측정되었다. 황산에 의해 반응을 종결한 후에, 광학적 밀도가 450 및 550 nm 판독 사이의 차이로서의 파장 보정을 가지고 측정되었다.
- [0062] IL-15의 결정의 결과가 도 8(RT-PCR 분석) 및 도 9(ELISA 분석)에 나타내어져 있다. 상기 결과들은 본 발명에 따라 생산된 미성숙한 수지상 세포들이 IL-15을 위한 mRNA를 발현하고 또한 세포들 내에서 단백질을 발현한다는 것을 보여준다. 일부 실험들에서 성숙에 따라 세포들 내에서의 IL-15의 양이 감소한다는 것에 흥미롭게 주목한다. 리얼-타임 PCR로부터의 데이터는 IL-15을 위한 mRNA의 발현을 확인시켜준다(미도시). IL-15가 발현하는 DC는 비-IL-15가 생산하는 세포들과 비교할 때 CTL 반응의 유도에서 우월하다는 것을 보여주었다(32, 33, 34). IL-15는 또한 메모리 CD8+ 세포들의 생산(generation) 및 유지(maintenance)를 유도할 수 있다(35, 36). 따라서, IL-15 발현은 메모리 타입 CTL 반응들을 유도하기 위한 본 발명의 방법에 의해 제조되는 수지상 세포들의 높은 능력을 반영할 것이다.
- [0063] 종양 세포들로부터의 용해물을 섭취하기 위해 제조되는 수지상 세포들의 능력을 보여주기 위해서, 실시예 6에 기재된 바와 같이 제조된 용해물이 하기의 과정을 사용하여 표지화되었다. 종양 세포 용해물(2-4 mg 단백질/ml)이 Ca/Mg를 함유하는 DPBS 내에 준비되었고, 1M NaOH 가 pH 9.0 까지로 올리기 위해 첨가되었다. 3 mg의 N-하이드록시숙신이미드-플루오레스스(N-Hydroxysuccinimide-Fluorescein (NHS-플루오레스, 피어스(NHS-Fluorescein, Pierce))가 50 µl 드라이 DMSO 내에 용해되었고, 또한 상기 용해물에 대하여 더하여졌다. 상기 혼합물은 37 °C에서 1.5 시간 동안 암흑 조건 하에서 인큐베이트되었다. 변형된 용해물은 투석물 내에서 UV 254 nm 하에서 어떠한 형광성이 검출되지 않을 때까지, 12 시간의 시간 경과로 다시 놓아지는, 1.51 DPBS(Ca/Mg 결여)로 투석되었다. 1.5 µl의 최종 용해물 및 NHS-플루오레스스 용액(NHS-Fluorescein solution)이 형광성 표지자(카이젤겔 60 F₂₅₄(Kieselgel 60 F₂₅₄), 머크(Merck))를 포함하는 TCL 플레이트 상에 스팟팅되었고 또한 크로마토그래피 시스템 아세토니트릴: H₂O/4:1 내에서 전개되었다. 상기 플레이트는 용해물 내의 모든 라벨이 단백질에 대해 공유적으로 부착되었는지 및 상기 용해물이 프리 라벨을 포함하지 않았는지를 확인하기 위하여 UV 254 nm 하에서 보여졌다.
- [0064] 도 10은 37 °C에서 표지화된 용해물로 60 분 동안 인큐베이트된 수지상 세포들의 현미경 사진을 나타낸 것이다(a- 광학 현미경; b- 형광 현미경). 모든 수지상 세포들이 표지화된 용해물의 강한 섭취를 나타낸다는 것이 선명하게 보여질 수 있었다.
- [0065] 요약하면, 상기 기재된 방법에 의해 생산된 수지상 세포들은 높은 균질성으로, 그들은 생체 내에 존재하는 수지상 세포들에 대해 특징적인 표면 분자들의 요구되는 세트를 발현하고, 그들은 IL-15를 발현하며, 또한 그들은 종양 세포들의 외인성으로(exogenously) 첨가된 용해물을 섭취할 수 있는 높은 능력을 가진다.
- [0066] 실시예 6- 종양 세포 라인으로부터의 용해물로 로딩된 미성숙한 수지상 세포들은 메모리-타입 반응의 특징을 갖는 생체 외 종양-특이적 CTL 반응의 생산을 자극한다.
- [0067] 본 발명의 방법에 의해 제조되고 또한 종양 항원들로 로딩된, 수지상 세포들의 항-종양 CTL 반응을 생산을 자극

하는 능력이 종양 항원의 공급원으로서 유방암 세포 라인 MDA-MB-231의 용해물을 사용하여 생체 외에서 테스트되었다. 이러한 세포 라인은 넓은 스펙트럼의 암/고환 항원(testis antigens)을 발현한다(WO 2008/081035 참조).

[0068] 종양 세포들은 L-글루타민 및 10 %의 우태아 혈청(fetal calf serum)으로 보충된 RPMI 1640 매개 내에서 배양되었다. 용해물의 준비를 위하여, 세포들은 트립신화(trypsinization)에 의해 수확되었고, 세척되었으며, 카운트되었고, 10^7 /ml의 농도에서의 RPMI 1640 매개 내에 현탁되었고 또한 5 사이클의 동결화(액상 질소) 및 소빙(thawing)(물 배쓰, 37 °C) 하에 놓여졌다. 결과물인 용해물은 원심 분리(3000 g, 60 분, 4 °C)에 의해 정화되었고 또한 -80 °C에서 알리퀴트들이 보관되었다.

[0069] 수지상 세포들은 실시예 1에 기재된 바와 같이 제조되었다. 4 또는 5 일째에, 종양 용해물로 수지상 세포들을 로딩하기 위하여 10 %의 종양 용해물이 상기 수지상 세포들의 배양에 대하여 첨가되었다.

[0070] 하룻 밤 동안의 인큐베이션 후에, 세포들은 수확되었고, 세척되었으며, 림프구 배양 매개 (5 %의 오토로고스 (autologous) 혈청이 첨가된 AIM-V) 내에서 재-현탁되었다. 종양-특이적 CTL 반응의 생체 외 생산을 위하여 상기 로딩된 수지상 세포들은 오토로고스 비-부착된 림프구들과 1:40의 비율로 혼합되었고 또한 각각의 웰 당 2 Mio 의 림프구, 24-웰 플레이트 내에 놓여졌다. 2, 5 및 8 일째에, 매개의 절반이 제거되었고 또한 50 U/ml의 IL-2를 포함하는 1 ml의 신선한 매개가 각각의 웰에 대하여 더하여 졌다. 10 또는 11일 째에, 세포들은 수확되었고, 또한 큰 활성화된 림프구들의 농도가 쿨터 카운터(Coulter Counter)를 사용하여 결정되었다. 상기 세포들은 다음으로 세척되었고, 소우된(thawed) 용해물-로딩된 수지상 세포들과 함께 1:10의 비율로 혼합되었으며 또한 2 ml의 림프구 배양 매개 내에서의, 24-웰 플레이트들(웰 당 0.5×10^6 림프구들)의 웰 내로 놓여졌다.

[0071] 2 및 5일 째에, 상기 매개의 절반이 제거되었고 또한 50 U/ml의 IL-2를 포함하는 1 ml의 신선한 매개가 각각의 웰에 대하여 더하여 졌다. 7일 째에, 세포들이 수확되었고, 카운트되었으며, 또한 FACS 분석을 위하여 또한 종양 세포 라인들의 패널에 대한 세포 독성을 위한 테스트를 위하여 사용되어졌다.

[0072] 몇 가지 실험들 중 하나에서 생산된 림프구들의 표현형 분석이 도 11에 보여진다. 보여지는 바와 같이, 세포들의 상당한 비율이 CD8+ T 림프구들이고 또한 그들의 대부분이 높은 수준의 CD62L을 발현한다.

[0073] 활성화된 림프구들의 세포 독성 활성이 종양 세포 라인들의 패널을 사용하여 HLA-A2-포지티브 공여자에 대하여 모폴로지적으로 결정되었다: 유방 암 세포 라인 MCF-7 (HLA-A2+), MDA-MB-231 (HLA-A2+) 및 T47D (HLA-A2-), 전립선 암 세포 라인 LNCaP (HLA-A2+). 5×10^4 종양 세포들이 10 %의 FCS이 첨가된 1 ml의 RPMI-1640 매개 내의 24-웰 플레이트들 내에서 시드되었으며 또한 테스트 이전에 2 일 동안 인큐베이트되었다. 1×10^6 세포들을 포함하는 1 ml의 분리된 림프구들의 현탁물이 상기 종양 세포들에 대하여 더하여 졌다.

[0074] 림프구들의 용해 활성은 24-48 시간의 인큐베이션 후에 모폴로지적으로 검출되었다. 그러한 실험들의 결과들이 도 12 및 13에 보여진다. 보여지는 바와 같이, 상당한 용해가 모든 HLA-A2-포지티브 종양 세포 라인들에 대해 보여졌고, 반면 HLA-A2-네거티브 T47D 종양 세포들은 용해에 대해 저항성이었다. 림프구들의 강한 증식이 HLA-A2-포지티브 종양 세포들을 포함하는 배양들에서 관찰되고, 반면 어떠한 증식도 저항성의 HLA-A2-네거티브 T47D 세포 라인을 포함하는 배양 내에서는 관찰되지 않는다.

[0075] 이러한 발견들-높은 수준의 CD62L의 발현, 단지 HLA-A2+ 종양 세포 라인의 용해, 및 접촉 후 림프구들의 강한 증식, 및 적합한 종양 항원들의 인식-은 본 발명의 시스템 내에서 특이적 메모리 타입 CTL 반응의 생산을 가리킨다.

[0076] 요약하면, DC를 제조하기 위한 본 발명의 발전된 방법은 특이적 메모리 타입 항종양 T 세포 반응을 자극할 수 있는 완전하게 면역 능력을 갖는 미성숙한 수지상 세포들을 도출한다.

[0077] 참조 문헌

[0078] 1. 반크로, J.(Banchereau, J.), F. 브리에(F. Briere), C. 콕스(C. Caux), J. 다보스트(J. Davoust), S. 레베크(S. Lebecque), Y. J. 리우(Y. J. Liu), B. 풀렌드란(B. Pulendran), 및 K. 폴카(K. Palucka). 2000. 수지상 세포들의 면역생물학(Immunobiology of dendritic cells). *Annu. Rev. Immunol.* 18:767.

[0079] 2. 반크로, J.(Banchereau, J.), 및 A. K. 폴카(A. K. Palucka). 2005. 종양에 대한 치료적 백신으로서의 수지상 세포(Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer). *Nat. Rev. Immunol.* 5:296.

- [0080] 3. 피터, J. H.(Peters, J. H.), S. 로홀(S. Ruhl), 및 D. 프레드리히(D. Friedrichs). 1987. 단핵 백혈구들로부터 연역되는 베일화된 부속 세포들(Veiled accessory cells deduced from monocytes). 면역생물학(*Immunobiology*) 176: 154.
- [0081] 4. 피터, J. H.(Peters, J. H.), H. 쑤(H. Xu), J. 러퍼트(J. Ruppert), D. 오스테르마이어(D. Ostermeier), D. 프레드리히(D. Friedrichs), 및 R. K. 가이젤러(R. K. Gieseler). 1993. 생체 외에서 인간 단핵 백혈구들로부터 수지상 세포를 분화하기 위해 요구되는 신호들(Signals required for differentiating dendritic cells from human monocytes in vitro). *Adv. Exp. Med. Biol.* 329:275.
- [0082] 5. 로마니, N.(Romani, N.), S. 그루너(S. Gruner), D. 브랑(D. Brang), E. 캄프젠(E. Kampgen), A. 렌츠(A. Lenz), B. 트로젠바커(B. Trockenbacher), G. 콘왈린카(G. Konwalinka), P. O. 프리취(P. O. Fritsch), R. M. 스타이만(R. M. Steinman), 및 G. 술러(G. Schuler). 1994. 인간 혈액 내에서 수지상 세포 조상들을 증식시킴(Proliferating dendritic cell progenitors in human blood). *J. Exp. Med.* 180:83.
- [0083] 6. 살루스토, F.(Sallusto, F.), 및 A. 란자베키아(A. Lanzavecchia). 1994. 배양된 인간 수지상 세포들에 의한 용해성 항원의 효과적인 출현은 과립구/대식세포 콜로니-인터루킨 4에 더하여 자극하는 요인에 의해 유지되며 또한 종양 괴사에 의해 다운 조절됨(Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumour necrosis factor). *J. Exp. Med.* 179: 1109.
- [0084] 7. 만케, K.(Mahnke, K.), E. 슈미트(E. Schmitt), L. 보니파즈(L. Bonifaz), A. H. 엔크(A. H. Enk), 및 H. 줄리트(H. Jonuleit). 2002. 미성숙의, 그러나 비활성은 아닌: 미성숙한 수지상 세포들의 관용적 기능(Immature, but not inactive: the tolerogenic function of immature dendritic cells). *Immunol. Cell Biol.* 80:477.
- [0085] 8. 스타인만, R. M.(Steinman, R. M.), 및 M. C. 누센즈바이그(M. C. Nussenzweig). 2002. 공포의 자가독성: 말초 T 세포 내성에서 수지상 세포의 중요성(Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99:351.
- [0086] 9. 네슬, F. O.(Nestle, F. O.), S. 알리자익(S. Alrijagic), M. 길리에트(M. Gilliet), Y. 선(Y. Sun), S. 그라브(S. Grabbe), R. 더머(R. Dummer), G. 버그(G. Burg), 및 D. 샤펜도르프(D. Schadendorf). 1998. 펩티드-또는 종양 용해물-펄스된 수지상 세포로의 악성 종양 환자의 백신화(Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumour lysate-pulsed dendritic cells). *네이처(Nature) (Med.)* 4:328.
- [0087] 10. 막켄센, A.(Mackensen, A.), R. 드라거(R. Drager), M. 술라이저(M. Schlesier), R. 메텔스만(R. Mertelsmann), 및 A. 린드만(A. Lindemann). 2000. 인간 펩티드-펄스된 수지상 세포로의 백신화 후 아나팔릭스를 발병하는 환자에서 보빈 혈청 알부민에 대한 IgE 항체들의 존재(Presence of IgE antibodies to bovine serum albumin in a patient developing anaphylaxis after vaccination with human peptide-pulsed dendritic cells). *암 면역학(Cancer Immunol). Immunother.* 49: 152.
- [0088] 11. 엔겔-노레가드, L.(Engell-Noerregaard, L.), T. H. 한센(T. H. Hansen), M. H. 안데르센(M. H. Andersen), S. P. 토르(S. P. Thor), 및 I. M. 스반(I. M. Svane). 2009. 악성 흑색종을 가진 환자들의 수지상 세포-기반의 백신화에 대한 임상적 연구의 리뷰: 임상적 반응 및 백신 변수들 간의 관련성의 측정(Review of clinical studies on dendritic cell-based vaccination of patients with malignant melanoma: assessment of correlation between clinical response and vaccine parameters). *암 면역학(Cancer Immunol). Immunother.* 58: 1.
- [0089] 12. 두모르타이어, H.(Dumortier, H.), G. J. 반 멀로(G. J. van Mierlo), D. 이간(D. Egan), W. 반 위크(W. van Ewijk), R. E. 토우스(R. E. Toes), R. 오프링가(R. Offringa), 및 C. J. 멜리프(C. J. Melief). 2005. 미성숙한 골수 수지상 세포 라인에 의한 항원 공급은 생체 내에서 CTL 제거를 유발하지 못하지만, 그러나 완전한 작용자 기능을 위해 구조될 수 있는 CD8+ 중앙 메모리-유사 T 세포들을 생산한다(Antigen presentation by an myeloid immature dendritic cell line does not cause CTL deletion in vivo, but generates CD8+ central memory-like T cells that can be rescued for full effector function). *J. Immunol.* 175:855.
- [0090] 13. 살루스토, F.(Sallusto, F.), J. 게기나트(J. Geginat), 및 A. 란자베키아(A. Lanzavecchia). 2004. 중앙 메모리 및 작용자 메모리 T 세포 서브세트: 기능, 생산, 및 유지(Central memory and effector memory T cell

subsets: function, generation, and maintenance). *Annu. Rev. Immunol.* 22:745.

- [0091] 14. 클레바노프, C. A.(Klebanoff, C. A.), L. 가티노니(L. Gattinoni), 및 N. P. 레스티포(N. P. Restifo). 2006. 중앙 면역한 및 면역요법에서의 CD 8 T-세포 메모리(CD 8 T-cell memory in tumour immunology and immunotherapy). *Immunol. Rev.* 211 :214.
- [0092] 15. 클레바노프, C. A.(Klebanoff, C. A.), L. 가티노니(L. Gattinoni), P. 토라비-파리지(P. Torabi-Parizi), K. 커스탄(K. Kerstann), A. R. 카르돈(A. R. Cardones), S. E. 핀켈스타인(S. E. Finkelstein), D. C. 팔머(D. C. Palmer), P. A. 안토니(P. A. Antony), S. T. 황(S. T. Hwang), S. A. 로젠버그(S. A. Rosenberg), T. A. 왈드만(T. A. Waldmann), 및 N.P. 레스티포(N. P. Restifo). 2005. 중앙 메모리 자가/중앙-반응성 CD8+ T 세포는 작용자 메모리 T 세포들과 비교할 때 우월한 항종양 면역성을 부여한다(Central memory self/tumour-reactive CD8+ T cells confer superior antitumour immunity compared with effector memory T cells). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102:9571.
- [0093] 16. 쉐, M.(Shen, M.), I. 가르시아(I. Garcia), R. V. 마이어(R. V. Maier), 및 T. A. 호베트(T. A. Horbett). 2004. 외부 신체 거대 세포 형성, 종양괴사 요인 알파 방출 및 단핵 백혈구의 응혈 활성화에 대한 흡착된 단백질 및 표면 화학의 작용(Effects of adsorbed proteins and surface chemistry on foreign body giant cell formation, tumour necrosis factor alpha release and procoagulant activity of monocytes). *J. Biomed. Mater. Res.* 70A:533.
- [0094] 17. 쉐, M.(Shen, M.), 및 T. A. 호베트(T. A. Horbett). 2001. 화학적으로 변형된 폴리스티렌 표면에 대한 단핵 백혈구/대식세포 흡착에 대한 표면 화학 및 흡착된 단백질의 작용(The effects of surface chemistry and adsorbed proteins on monocyte/macrophage adhesion to chemically modified polystyrene surfaces). *J. Biomed. Mater. Res.* 57:336.
- [0095] 18. 주, L. J.(Zhou, L. J.), 및 T. F. 테더(T. F. Tedder). 1995. 인간 혈액 수지상 세포들은 선택적으로 면역글로불린 슈퍼패밀리의 멤버, CD83을 발현한다(Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily). *J. Immunol.* 154:3821.
- [0096] 19. 호이플러, C(Heufler, C), F. 코흐(F. Koch), U. 스타즐(U. Stanzl), G. 토파(G. Topar), M. 와이소카(M. Wysocka), G. 트리키에리(G. Trinchieri), A. 엔크(A. Enk), R. M. 스타인만(R. M. Steinman), N. 로마니(N. Romani), 및 G. 쉐러(G. Schuler). 1996. 인터루킨-12는 수지상 세포들에 의해 제조되며 또한 T.헬퍼 1 세포에 의한 인터페론-감마 생산과 함께 T 헬퍼 1 유발을 매개한다(Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon-gamma production by T helper 1 cells). *Eur. J. Immunol.* 26:659.
- [0097] 20. 칼린스키, P.(Kalinski, P.), C. M. 힐켄스(C. M. Hilkens), A. 스니더(A. Snijders), F. G. 스니더윈트(F. G. Snijdewint), 및 M. L. 카젠버그(M. L. Kapsenberg). 1997. IL-12-결여된 수지상 세포, 프로스타글란딘 E2의 존재하에 생산된, 는 인간 나이브 T 헬퍼 세포를 성숙시키는데 있어서 타입 2 사이토카인 생산을 촉진한다(IL-12-deficient dendritic cells, generated in the presence of prostaglandin E2, promote type 2 cytokine production in maturing human naive T helper cells). *J. Immunol.* 159:28.
- [0098] 21. 마일라드, R. B.(Mailliard, R. B.), A. 완코웁-칼린스카(A. Wankowicz-Kalinska), Q. 카이(Q. Cai), A. 웨사(A. Wesa), C. M. 힐켄스(C. M. Hilkens), M.L. 카젠버그(M. L. Kapsenberg), J. M. 커크우드(J. M. Kirkwood), W. J. 스토르크스(W. J. Storkus), 및 P. 칼린스키(P. Kalinski). 2004. -타입-1 폴라라이즈된 수지상 세포들: 최적화된 CTL-유도 활성을 갖는 신규한 면역화 수단(type-1 polarized dendritic cells: A novel immunization tool with optimized CTL-inducing activity). *Cancer Res.* 64:5934.
- [0099] 22. 쉐너, B.(Thurner, B.), C. 로더(C. Roder), D. 디크만(D. Dieckmann), M. 호이어(M. Heuer), M. 크루제(M. Kruse), A. 글라서(A. Glaser), P. 카이카보우시(P. Keikavoussi), E. 캄프젠(E. Kampgen), A. 벤더(A. Bender), 및 G. 쉐러(G. Schuler). 1999. 임상적 적용을 위한 백혈구 증가증 수득물로부터의 다수의 완전하게 성숙된 및 안정된 수지상 세포들의 생산(Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical application). *J. Immunol. Methods* 223 : 1.
- [0100] 23. 줄리엣, H.(Jonuleit, H.), U. 쿤(U. Kuhn), G. 뮐러(G. Muller), K. 스타인브린크(K. Steinbrink), L. 파라그닉(L. Paragnik), E. 슈미트(E. Schmitt), J. 크넵(J. Knop), 및 A. H. 엔크(A. H. Enk). 1997. 염증유발 사이토카인 및 프로스타글란딘은 우태아 혈청-프리 조건 하에서 잠재적 면역자극성 수지상 세포들의 성숙을 유

도한다(Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions). *Eur. J. Immunol.* 27:3135.

- [0101] 24. 사이, W. B.(Tsai, W. B.), J. M. 그룬케마이어(J. M. Grunkemeier), C. D. 맥파랜드(C. D. McFarland), 및 T. A. 호베트(T. A. Horbett). 2002. 피브로겐, 피브로넥틴, 비트로넥틴 또는 본 와일브랜드 인자 내에서 선택적으로 결여된 플라즈마에 의해 미리 흡착된 폴리스티렌-기반의 표면에 대한 혈소판 흡착(Platelet adhesion to polystyrene-based surfaces preadsorbed with plasmas selectively depleted in fibrinogen, fibronectin, vitronectin, or von Willebrand's factor). *J. Biomed. Mater. Res.* 60:348.
- [0102] 25. 로마니, N.(Romani, N.), D. 라이더(D. Reider), M. 호이어(M. Heuer), S. 에브너(S. Ebner), E. 캄프젠(E. Kampgen), B. 에블(B. Eibl), D. 니더바이저(D. Niederwieser), 및 G. 슈러(G. Schuler). 1996. 인간 혈액 으로부터의 성숙한 수지상 세포들의 생산. 특별한 임상적 적용에 있어서 향상된 방법(Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability). *J. Immunol. Methods* 196: 137.
- [0103] 26. 웬델, H. P.(Wendel, H. P.), 및 G. 자이머(G. Ziemer). 1999. 체외에서 일어나는 순환을 위해 사용되는 인공적인 장비의 혈액 순응성을 향상시키기 위한 코팅-기술(Coating-techniques to improve the hemocompatibility of artificial devices used for extracorporeal circulation). *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 16:342.
- [0104] 27. 썬아, C. Q.(Xia, C. Q.), 및 K. J. 카오(K. J. Kao). 2002. 헤파린은 단핵 백혈구로부터 CD1a+ 수지상 세포의 분화를 유도한다: 표현형적인 및 기능적인 특징화(Heparin induces differentiation of CD1a+ dendritic cells from monocytes: phenotypic and functional characterization). *J. Immunol.* 168: 1131.
- [0105] 28. 베빌라쿠아, M. P.(Bevilacqua, M. P.), D. 아라니(D. Amrani), M. W. 모세손(M. W. Mosesson), 및 C. 비안코(C. Bianco). 1981. 인간 단핵 백혈구에 대한 차가운-비용해성 글로불린(플라즈마 피브로넥틴)을 위한 수용체(Receptors for cold-insoluble globulin (plasma fibronectin) on human monocytes). *J. Exp. Med.* 153 :42.
- [0106] 29. 오웬, C. A.(Owen, C. A.), E. J. 캄프벨(E. J. Campbell), 및 R. A. 스톡리(R. A. Stockley). 1992. 피브로넥틴에 대한 단핵 백혈구 흡착: CD11/CD18 인테그린의 역할 및 다른 단핵 백혈구 기능에 대한 관련성 (Monocyte adherence to fibronectin: role of CD11/CD18 integrins and relationship to other monocyte functions). *J. Leukoc. Biol.* 51 :400.
- [0107] 30. 틴호퍼, I.(Tinhofer, I.), I. 마르신츠(I. Marschitz), T. 헨(T. Henn), A. 이글(A. Egle), 및 R. 그레일(R. Greil). 2000. 인터루킨-15 수용체의 발현 및 다중 골수종에서의 종양 전이의 메카니즘으로서 인터루킨-15의 자기분비 생산(Expression of functional interleukin-15 receptor and autocrine production of interleukin-15 as mechanisms of tumour propagation in multiple myeloma). *Blood* 95:610.
- [0108] 31. 프란치, A.(Franchi, A.), J. 자렛(J. Zaret), X. 장(X. Zhang), S. 보카(S. Bocca), 및 S. 오나이거(S. Oehninger). 2008. 면역 조절 유전자, 인간 자궁 내막 내 이식의 윈도우 과정 중 그들의 단백질 생산물 및 특이적 리간드/수용체의 발현(Expression of immunomodulatory genes, their protein products and specific ligands/receptors during the window of implantation in the human endometrium). *Mol. Hum. Reprod.* 14:413.
- [0109] 32. 란징거, G.(Ratzinger, G.), J. 배거스(J. Baggers), M.A. 디 코스(M. A. De Cos), J. 유안(J. Yuan), T. 다오(T. Dao), J. L. 리간(J. L. Reagan), C. 문츠(C. Munz), G. 헬러(G. Heller), 및 J. W. 영(J. W. Young). 2004. CD34+ 조혈 조상으로부터 유도된 성숙한 인간 랑게르한스 세포는, 생활성의 IL-12p70의 부재에서, 단일 펩티드 존재 또는 교차-프라이밍에 의해, 피부-사이의 또는 단핵 백혈구-유도된 수지상 세포가 작용하는 것보다 더 큰 세포 독성의 T 림프구 활성을 자극한다(Mature human Langerhans cells derived from CD34+ hematopoietic progenitors stimulate greater cytolytic T lymphocyte activity in the absence of bioactive IL-12p70, by either single peptide presentation or cross-priming, than do dermal-interstitial or monocyte-derived dendritic cells). *J. Immunol.* 173 :2780.
- [0110] 33. 클레체브스키, E.(Klechevsky, E.), R. 모리타(R. Morita), M. 리우(M. Liu), Y. 카오(Y. Cao), S. 코쿼리(S. Coquery), L. 톰슨-스나이퍼(L. Thompson-Snipes), F. 브리에(F. Briere), D. 추샤벨(D. Chaussabel), G. 주라바스키(G. Zurawski), A. K. 폴카(A. K. Palucka), Y. 라이터(Y. Reiter), J. 반크로우(J. Banchereau),

및 H. 우에노(H. Ueno). 2008. 인간 상피 랑게르한스 세포 및 CD14+ 피부 수지상 세포들의 기능적 특성화 (Functional specializations of human epidermal langerhans cells and CD14+ dermal dendritic cells). *Immunity*. 29:497.

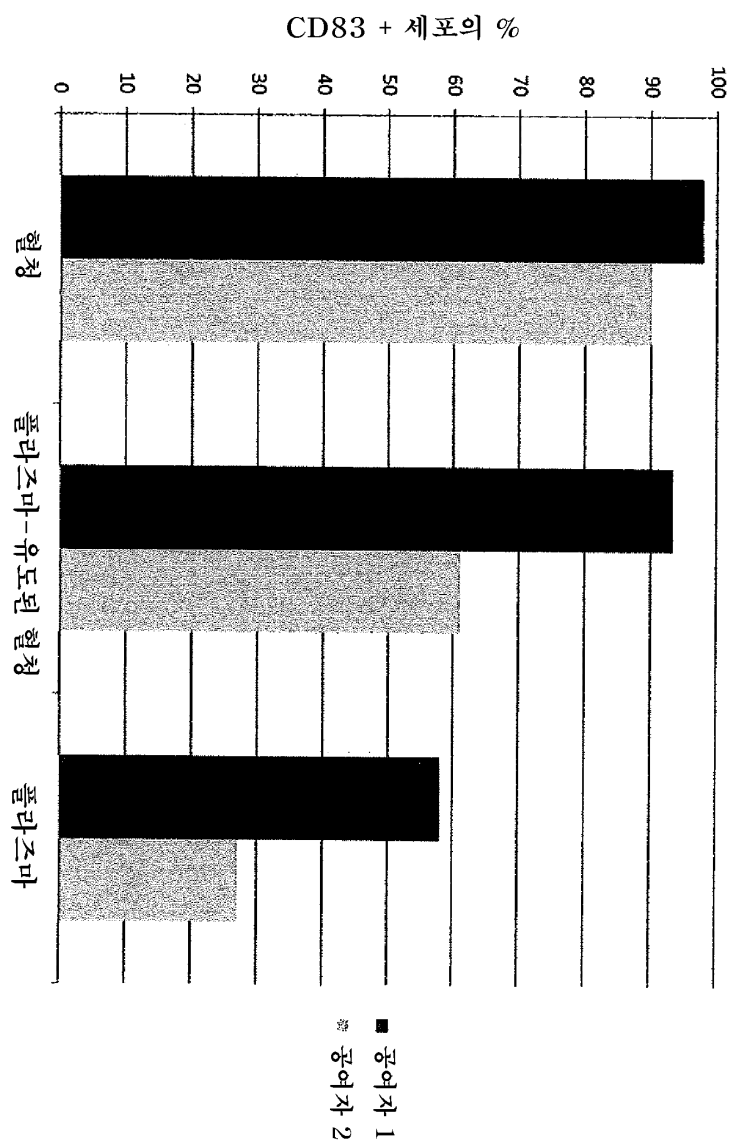
[0111] 34. 폴카, K.(Palucka, K.), H. 우에노(H. Ueno), G. 주라브스키(G. Zurawski), J. 페이(J. Fay), 및 J. 반크로우(J. Banchereau). 2010. 암 백신을 개발하기 위한 수지상 세포 서브세트에 대한 건조(Building on dendritic cell subsets to improve cancer vaccines). *Curr. Opin. Immunol.*

[0112] 35. 슐런스, K. S.(Schluns, K. S.), K. 윌리엄스(K. Williams), A. 마(A. Ma), X. X. 쟁(X. X. Zheng), 및 L. 레프란코이스(L. Lefrancois). 2002. 커팅 에지: 프라이머리 및 메모리 항원-특이적 CD8 T 세포들의 생산에 서의 IL-15에 대한 요구(Cutting edge: requirement for IL-15 in the generation of primary and memory antigen-specific CD8 T cells). *J. Immunol.* 168:4827.

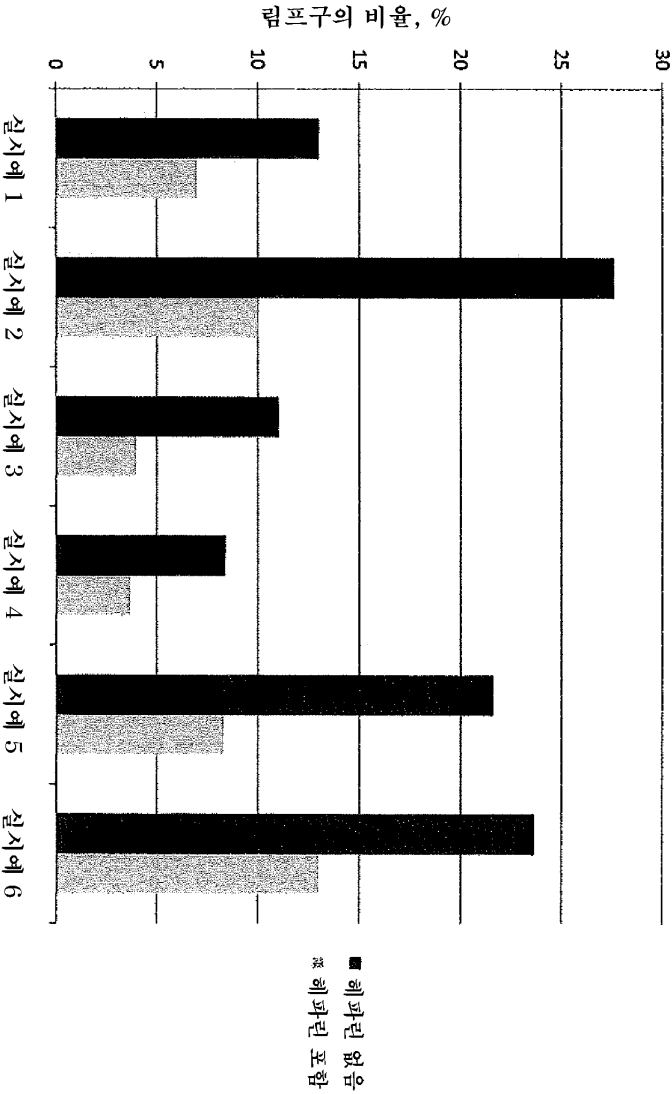
[0113] 36. 베커, T. C.(Becker, T. C), E. J. 웨리(E. J. Wherry), D. 분(D. Boone), K. 물라이-크리스나(K. Murali-Krishna), R. 안티아(R. Antia), A. 마(A. Ma), 및 R. 아메드(R. Ahmed). 2002. 인터루킨 15는 바이러스-특이적 메모리 CD 8 T 세포의 증식성 재생을 위해 요구된다(Interleukin 15 is required for proliferative renewal of virus- specific memory CD 8 T cells). *J. Exp. Med.* 195: 1541.

도면

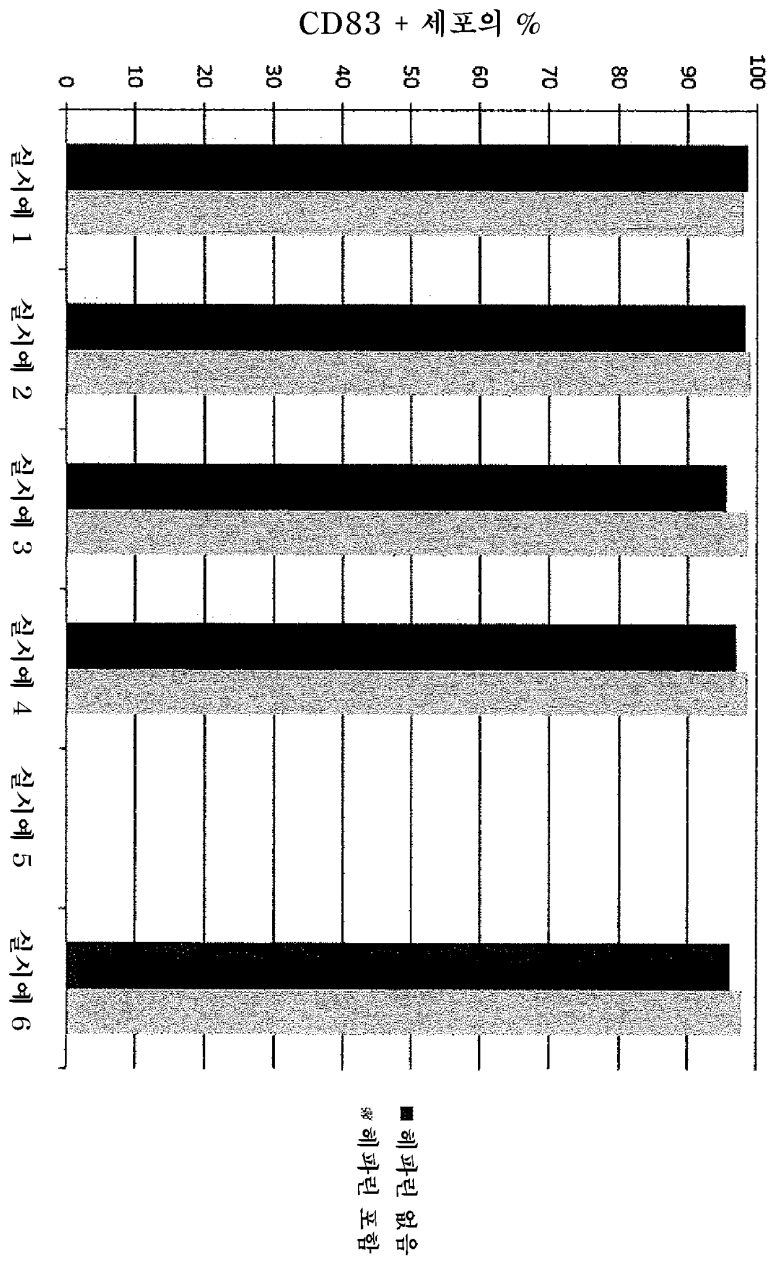
도면1



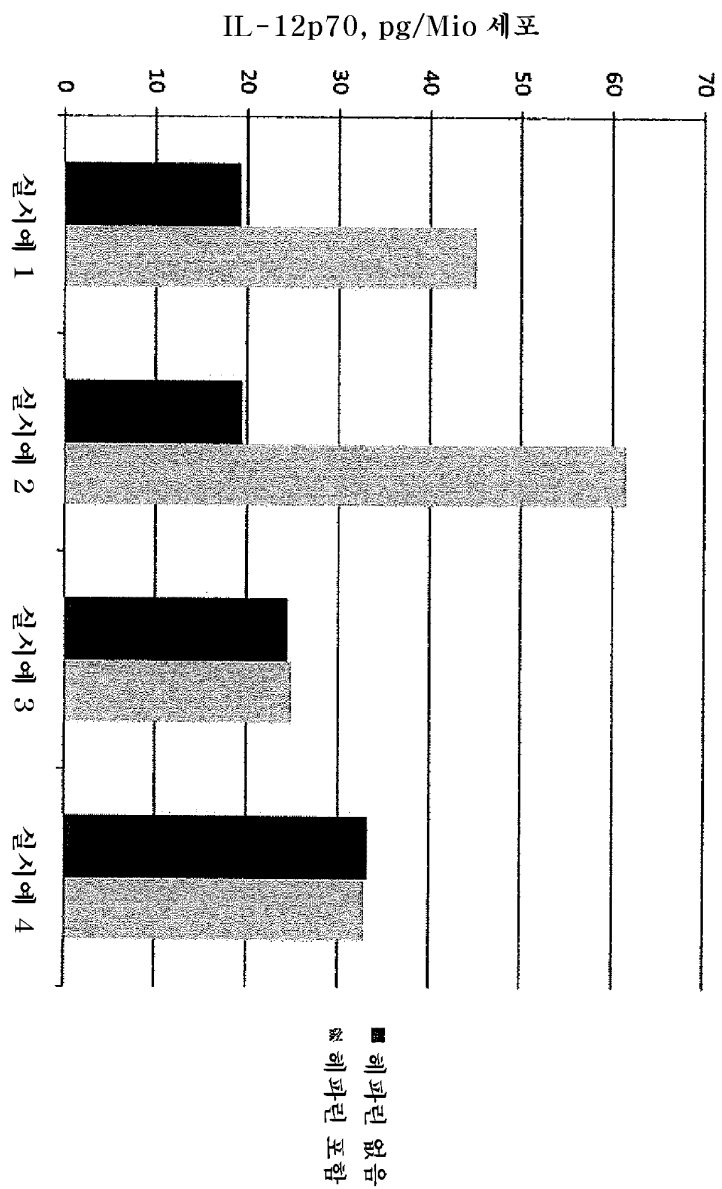
도면2



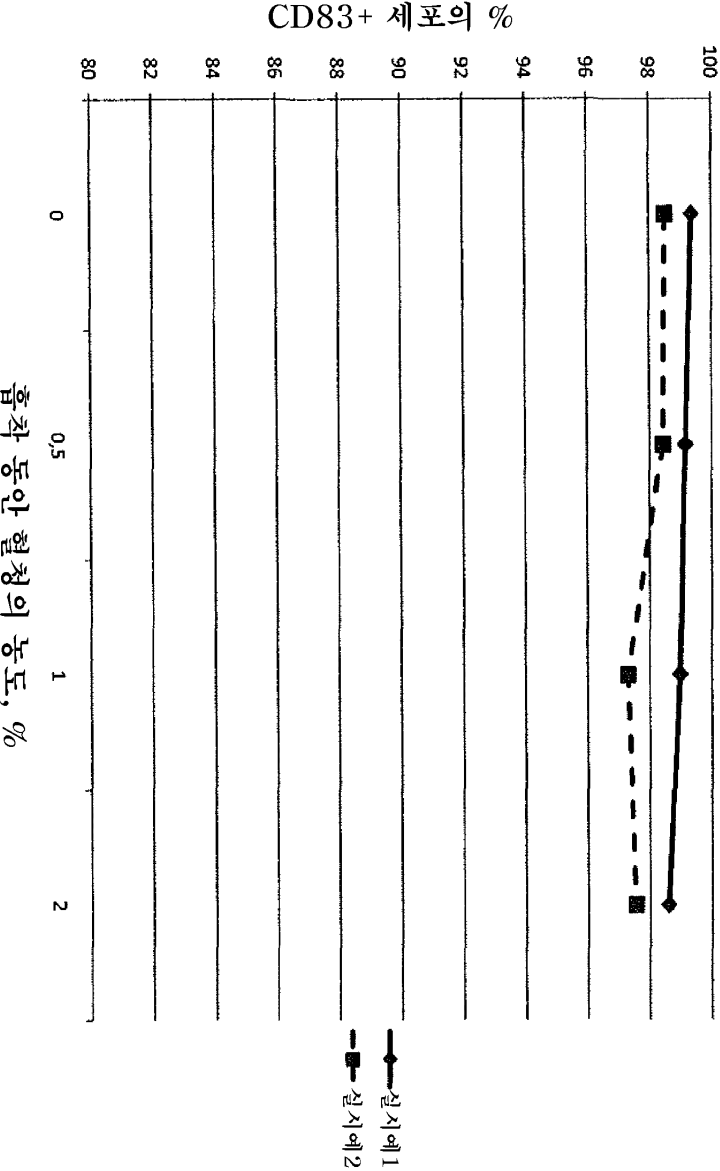
도면3



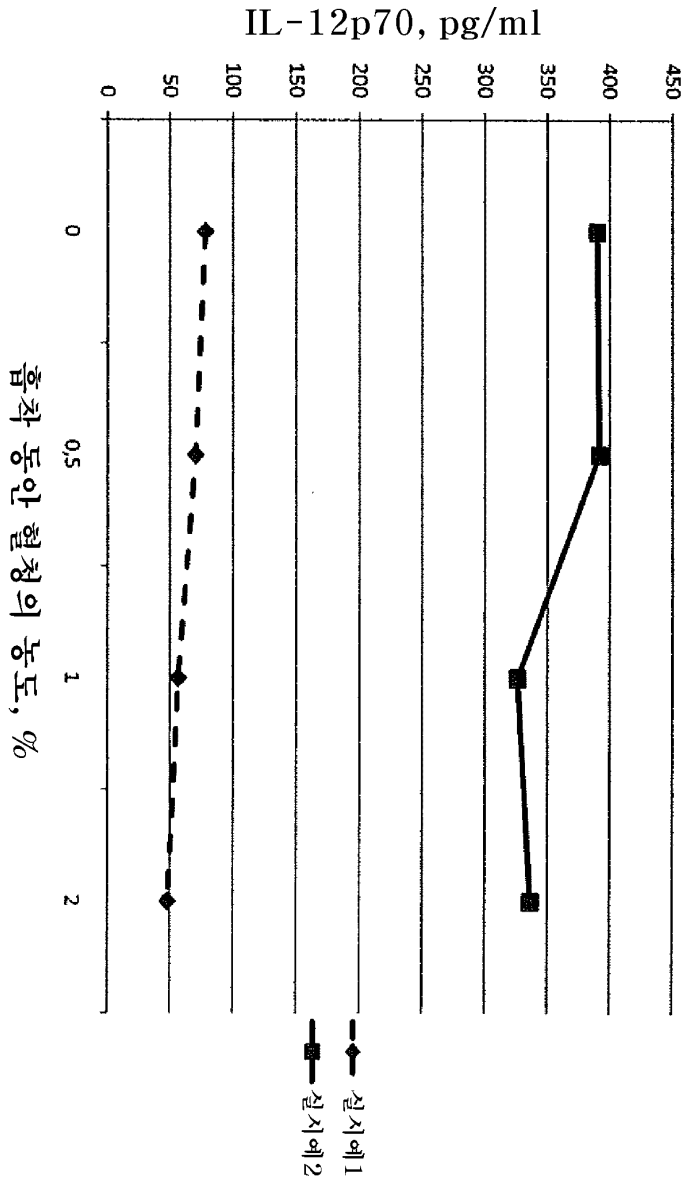
도면4



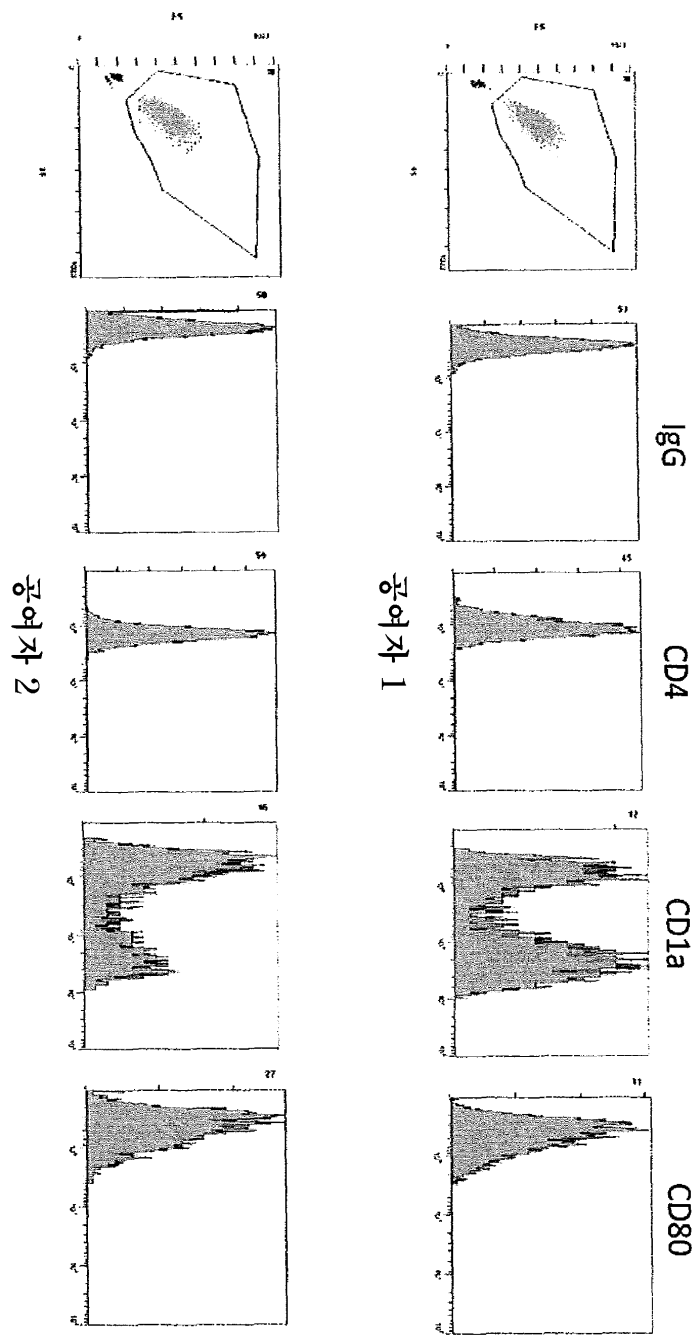
도면5

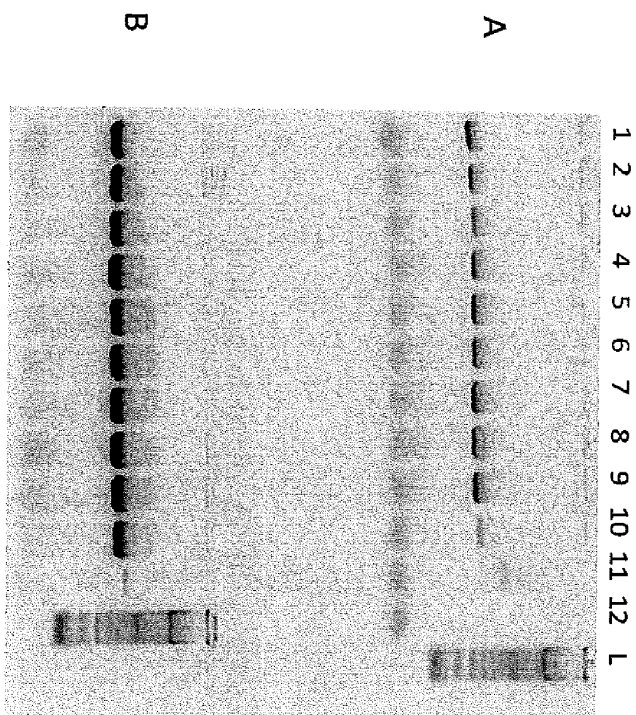


도면6



도면7

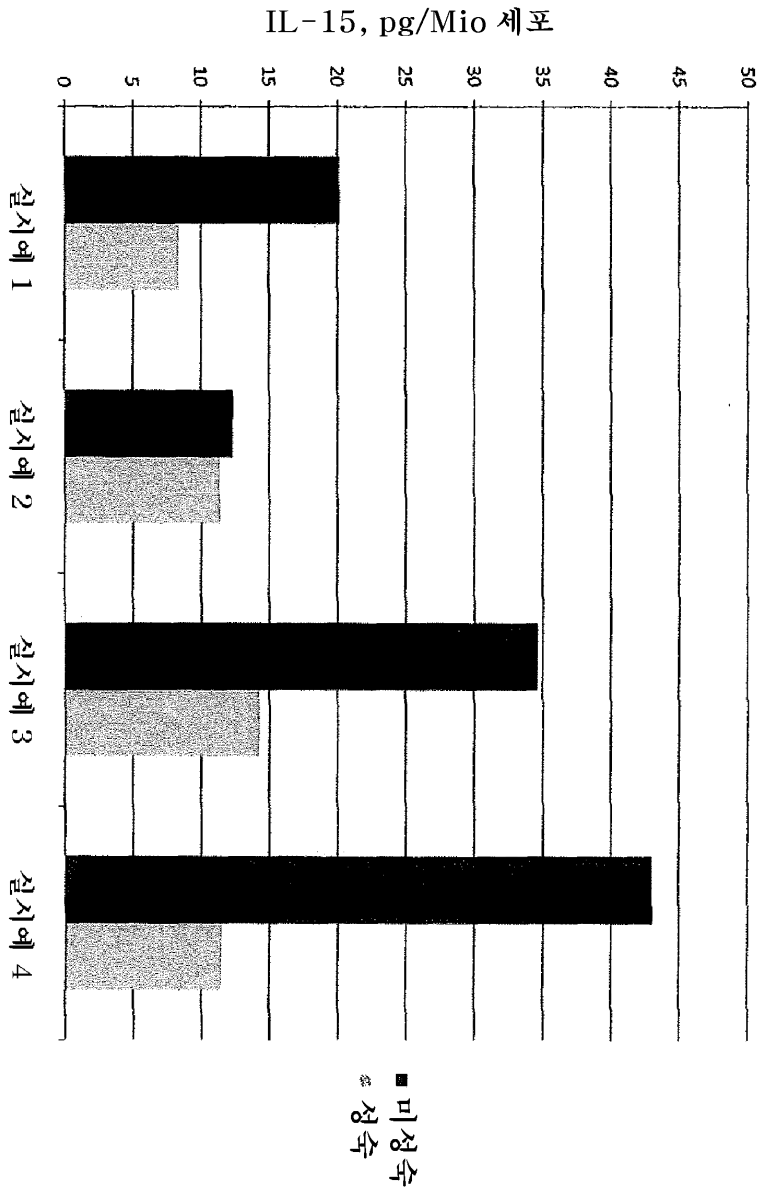




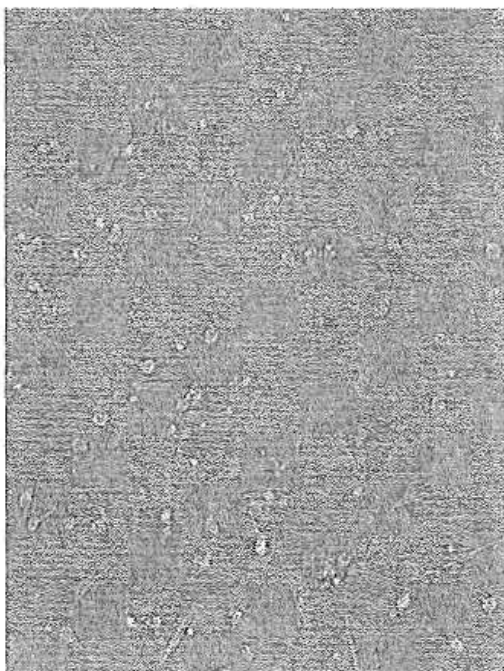
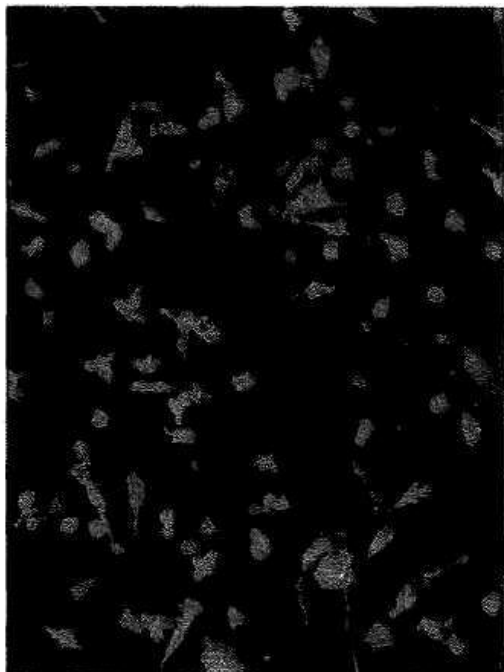
8면도

DC 내에서의 IL-15(A) 및 GAPDH(B) 발현의 RT-PCR 분석
 DC 용해물의 샘플(레인 1-10), RT를 포함하지 않는 컨트롤(레인 11),
 cDNA의 결여인 컨트롤(레인 12A).
 마커 락 레인-100bp 레더

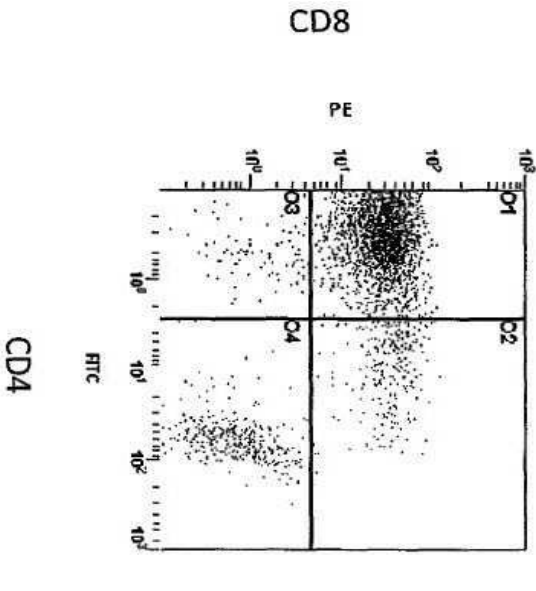
도면9



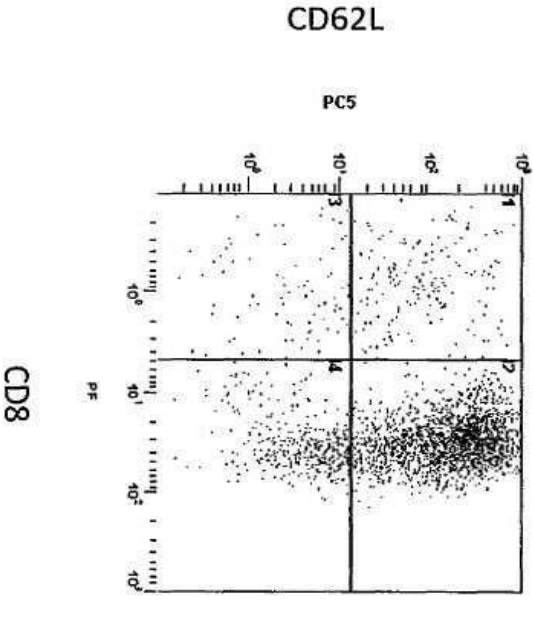
도면10



도면11



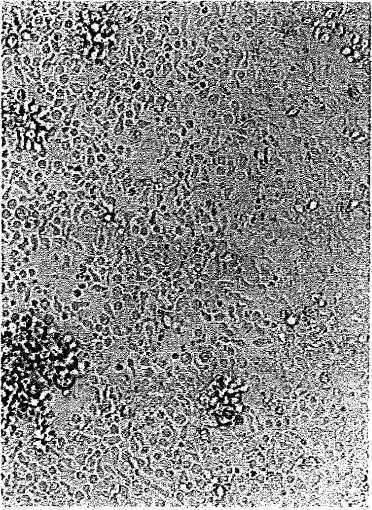
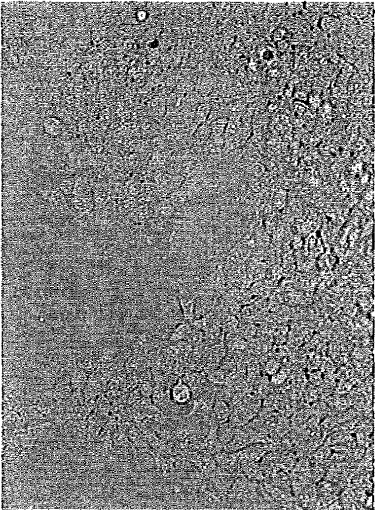
esj u2 MLUC: 2910 Undefined (UUUUS) 8 Z011US-14 00Z LNU : H.1 L0



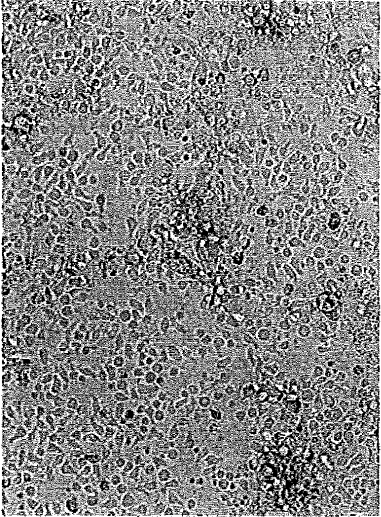
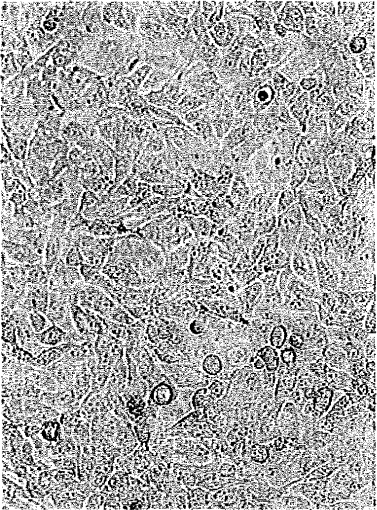
ooxess| u2 MLUC: 2910 Undefined (UUUUS) 8 Z011US-14 00Z LNU : -12 Log-H.14

도면12

MCF-7



MDA-MB-231



컨트롤 배양

림프구로 인큐베이트 후

도면13

