



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0020904
(43) 공개일자 2020년02월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0783 (2010.01) A61K 35/17 (2014.01)
C07K 14/47 (2006.01) C12N 5/0784 (2010.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0636 (2013.01)
A61K 35/17 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-7002323
(22) 출원일자(국제) 2018년06월21일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2020년01월22일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2018/066690
(87) 국제공개번호 WO 2018/234516
국제공개일자 2018년12월27일
(30) 우선권주장
1710023.1 2017년06월22일 영국(GB)
1716978.0 2017년10월16일 영국(GB)

(71) 출원인
티셰르 아베
스웨덴 111 24 스톡홀름 베스트마나가탄 10 스톡
홀름 아베 어드바이스 퍼레탁사시스탄스 아이
(72) 발명자
그윈룬드, 한스
스웨덴, 18138 리딩외, 라스베르그스베건 55
(74) 대리인
이원희

전체 청구항 수 : 총 50 항

(54) 발명의 명칭 T-세포 증식 방법 및 용도

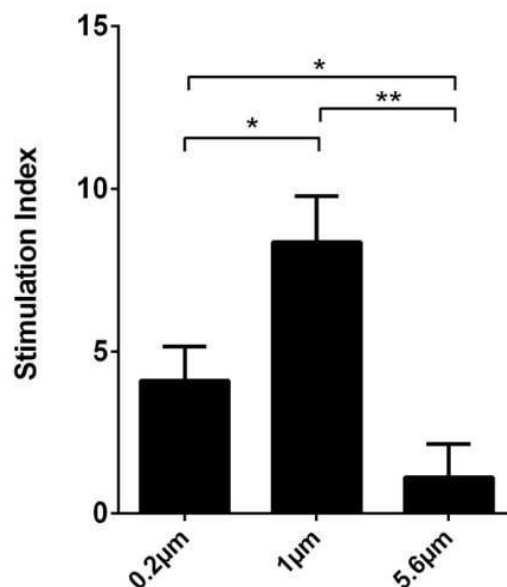
(57) 요약

본 발명은하기 단계를 포함하는 항 종양 T- 세포의 증식 방법을 제공한다:

a) 밀접하게 연관된 하나 이상의 종양 신생 항원 컨스트럭트를 갖는 포식 작용성 입자를 제공하는 단계이되, 여기서, 종양 신생 항원 컨스트럭트는 대상체에서 암과 관련되는 것으로 알려진 또는 의심되는 적어도 하나의 돌연

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1



변이 아미노산을 포함하는 아미노산 서열, 또는 대상체 암에서 발현되는 것으로 알려지거나 의심되는 돌연변이 또는 비돌연 아미노산 서열을 포함하고;

b) 생존 가능한 항원-제시 세포를 제공하는 단계;

c) 항원-제시 세포에 의한 입자의 포식 작용을 허용하는 조건 하에서 입자를 항원-제시 세포와 시험관 내 (invitro)에서 접촉시키는 단계;

d) 대상체로부터 생존 가능한 T- 세포를 포함하는 T- 세포 샘플을 제공하는 단계;

e) 항원 제시 세포에 의해 제시된 항원에 반응하여 항 종양 T 세포의 특이 적 활성화를 허용하는 조건 하에서 시험 관내에서 입자와 접촉 된 항원 제시 세포와 T 세포 샘플을 접촉시키는 단계.

본 발명은 또한 본 명세서에 정의된 종양 신생 항원 컨스트럭트를 제공한다.

(52) CPC특허분류

C07K 14/4748 (2013.01)

C12N 5/0638 (2013.01)

C12N 5/0639 (2013.01)

C12N 2501/998 (2013.01)

C12N 2531/00 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

하기 단계를 포함하는, 항 종양 T-세포의 증식 방법:

- a) 밀접하게 관련된 하나 이상의 종양 신생 항원 컨스트럭트를 갖는, 포식 세포성 입자를 제공하는 단계이되, 여기서, 종양 신생 항원 컨스트럭트는 대상체에서 암과 관련되거나 알려진 것으로 의심되는 적어도 하나의 돌연변이 아미노산, 또는 대상체에서 암 세포에서 발현되는 것으로 알려지거나 의심되는 돌연변이 또는 비돌연변이 아미노산 서열을 포함하는 아미노산 서열을 포함하고;
- b) 생존 가능한 항원-제시 세포를 제공하는 단계;
- c) 항원-제시 세포에 의한 입자의 포식 작용을 허용하는 조건 하에서 입자를 항원-제시 세포와 시험관 내(in vitro)에서 접촉시키는 단계;
- d) 대상체로부터 생존 가능한 T-세포를 포함하는 T-세포 샘플을 제공하는 단계;
- e) 항원-제시 세포에 의해 제시된 항원에 반응하여 항 종양 T-세포의 특이적 활성화를 허용하는 조건 하에서 시험관 내(in vitro)에서 입자와 접촉된 항원-제시 세포와 T-세포 샘플을 접촉시키는 단계.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 단계(a)의 관련 폴리펩티드 컨스트럭트를 갖는 입자는 살균 세척(sterilising wash)하여 관련 폴리펩티드 컨스트럭트를 갖는 무활성(aseptic) 입자, 바람직하게는 관련된 폴리펩티드를 갖는 멸균(sterile) 입자를 생성하는 것인, 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 방법은 다음을 더 포함하는 것인, 방법:

- (g) T-세포 샘플로부터 입자를 제거하는 단계; 및/또는
- (h) T-세포 샘플로부터 입자 및 항원-제시 세포를 제거하는 단계.

청구항 4

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, 입자가 상자성 특성, 바람직하게는 초상자성 특성을 갖는 것인 방법.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 상기 방법은 다음을 더포함하는 것인, 방법:

- (g) 자석 또는 자기장에 의해 T-세포 샘플로부터 입자를 제거하는 단계.

청구항 6

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서, 항원-제시 세포가 대상체로부터 유래 된 것인 방법.

청구항 7

제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 있어서, 종양 신생 항원 컨스트럭트가 하나 이상의 공유결합으로 연결된 펩티드를 포함하고, 여기서 하나 이상의 공유결합으로 연결된 펩티드는 대상체에서 암과 관련 있는 것으로 알려진 또는 의심되는 하나 이상의 돌연변이 아미노산을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 8

제 7 항에 있어서, 종양 신생 혈관 형성 컨스트럭트가 하나 이상의 공유결합으로 연결된 펩티드를 포함하고, 여기서 하나 이상의 공유결합으로 연결된 펩티드는 대상체 암에서 발현하는 것으로 알려진 또는 의심되는 돌연변이 아미노산 서열에 상응하는 아미노산 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 9

제 7 항 또는 제 8 항에 있어서, 종양 신생 항원 컨스트럭트가 3 개 이상의 공유결합으로 연결된 펩티드(예를 들어, 3, 4 또는 5 개의 공유결합으로 연결된 펩티드)를 포함하는 것인 방법.

청구항 10

제 7 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서, 종양 신생 항원 컨스트럭트의 각각의 펩티드가 10 내지 25 개의 아미노산을 포함하는 것인 방법.

청구항 11

제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 있어서, 2 종 이상의 종양 신생 항원 컨스트럭트가 입자와 밀접하게 관련되고, 각각의 종양 신생 항원 컨스트럭트는 동일한 폴리펩티드 서열을 갖거나 상이한 폴리펩티드 서열을 가질 수 있는 것인 방법.

청구항 12

제 1 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항에 있어서, 대상이 포유 동물, 특히 인간인 방법.

청구항 13

제 1 항 내지 제 12 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법에서 증식 된 항 종양 T-세포는 CD4 + 헬퍼 및/또는 CD8 + T-세포 인 방법.

청구항 14

제 1 항 내지 제 13 항 중 어느 한 항에 있어서, T-세포 샘플이 CD4 + 헬퍼 및/또는 CD8 + T-세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 15

제 1 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항에 있어서, T-세포 샘플이 종양, 바람직하게는 종양의 림프관으로부터 유래된 것인 방법.

청구항 16

제 1 항 내지 제 15 항 중 어느 한 항에 있어서, 항원-제시 세포가 식세포, 예를 들어 수지상 세포 인 방법.

청구항 17

제 1 항 내지 제 16 항 중 어느 한 항에 있어서, 암이 고형암, 예를 들어 유방암, 결장암, 간암, 폐암(비소 세포 및 소세포), 폐 카르시노이드 종양, 췌장암, 전립선 암, 난소 암 및 방광암으로부터 선택된 암인 방법.

청구항 18

제 1 항 내지 제 17 항 중 어느 한 항에 있어서, 입자가 5.6 μm 미만, 바람직하게는 4 μm 미만, 보다 바람직하게는 3 μm 미만, 더욱 더 바람직하게는 0.5 내지 2 μm , 또는 가장 바람직하게는 약 1 μm 인 최대 치수를 갖는 방법.

청구항 19

제 18 항에 있어서, 입자가 실질적으로 구형 인 방법.

청구항 20

제 2 항 내지 제 19 항 중 어느 한 항에 있어서, 살균(또는 멸균) 세척 또는 변성 세척은 관련된 폴리펩티드를 갖는 입자를 높은 pH, 예컨대 pH 13 이상, 보다 바람직하게는 pH 14 이상, 가장 바람직하게는 최소 pH 14.3에 처리하는 것을 포함하고; 또는 살균 세척은 관련 폴리펩티드를 갖는 입자를 낮은 pH, 예를 들어 pH 2 미만, 바람직하게는 pH 1 미만으로 처리하는 것을 포함한다.

청구항 21

제 2 항 내지 제 20 항 중 어느 한 항에 있어서, 멸균 세척 또는 변성 세척은 관련 폴리펩티드를 갖는 입자를 90 °C 이상, 보다 바람직하게는 92 °C 이상, 가장 바람직하게는 95 °C 이상과 같은, 고온에 노출시키는 단계를 포함하는 것인, 방법.

청구항 22

제 2 항 내지 제 21 항 중 어느 한 항에 있어서, 멸균 세척 또는 변성 세척은 관련된 폴리펩티드를 갖는 입자를 멸균/변성제, 예컨대 우레아 또는 구아니딘 히드로클로라이드를 5M, 6M, 7M 또는 8M 이상의 충분한 농도로 처리하는 것을 포함하는 방법.

청구항 23

제 2 항 내지 제 22 항 중 어느 한 항에 있어서, 살균 세척으로 입자가 무활성 상태, 보다 바람직하게는 입자가 멸균 상태인 방법.

청구항 24

제 3 항 내지 제 23 항 중 어느 한 항에 있어서, 입자가 중합체 입자, 바람직하게는 폴리스티렌 입자인 방법.

청구항 25

제 1 항 내지 제 24 항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 종양 신생 항원 컨스트럭트가 입자에 공유적 (covalently)으로 연결된 것인 방법.

청구항 26

제 1 항 내지 제 25 항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 종양 신생 항원 컨스트럭트가 금속 킬레이트를 통해 입자에 연결되는 것인 방법.

청구항 27

제 1 항 내지 제 26 항 중 어느 한 항에 있어서, 항원-제시 세포 및 T-세포 샘플이 동일한 대상체로부터 유래되고, 보다 바람직하게는 동일한 혈액 샘플로부터 유래 된 것인 방법.

청구항 28

제 1 항 내지 제 27 항 중 어느 한 항에 있어서, 항원-제시 세포 및 T-세포 샘플이 동일한 대상체로부터의 PBMC- 샘플로부터 유래 된 것인 방법.

청구항 29

제 1 항 내지 제 28 항 중 어느 한 항에 있어서, 세척 된 입자, 항원 제시 세포 및 T-세포 샘플이 동시에 접촉 되는 것인 방법.

청구항 30

제 1 항 내지 제 29 항 중 어느 한 항에 있어서,

하기 단계를 더 포함하는 것인, 방법:

(f) 예를 들어, 항 종양 T-세포 활성화 정도를 관련 기준과 비교함으로써, T-세포 샘플에서 항 종양 T-세포 활성화 정도를 결정하는 단계이되, 기준과 비교하여 샘플에서의 더 높은 정도의 항 종양 T-세포 활성화가 하나 이상의 종양 신생 항원 결정자가 샘플에서 항 종양 T-세포 활성화를 초래한다는 결론을 나타낸다.

청구항 31

제 30 항에 있어서, T-세포 샘플에서 항 종양 T-세포 활성화의 정도를 결정하는 단계는 샘플에서 활성화 된 T-세포의 분율을 결정하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 32

제 30 항 또는 제 31 항에 있어서, T-세포 샘플에서 항 종양 T-세포 활성화 정도를 결정하는 것은 ELISpot 또는

FluoroSpot- 기술을 사용하여 수행되는 것인 방법.

청구항 33

제 1 항 내지 제 32 항 중 어느 한 항의 방법에 의해 생성된 항 종양 T-세포를 포함하는 조성물.

청구항 34

제 33 항에 있어서, 항 종양 T-세포가 CD4 + 헬퍼 및/또는 CD8 + T-세포를 포함하는 조성물.

청구항 35

제 33 항 또는 제 34 항에 있어서, 대상체에서 암의 치료에 사용하기 위한 조성물.

청구항 36

제 1 항 내지 제 32 항 중 어느 한 항의 방법에 의해 생성된 항 종양 T-세포를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서의 암 치료 방법.

청구항 37

제 1 항 내지 제 32 항 중 어느 한 항의 방법에 의해 생성된 항-종양 T-세포의 환자에서 암 치료를 위한 용도.

청구항 38

대상체에서 암과 관련이 있는 것으로 알려져 있거나 의심되는 하나 이상의 돌연변이 아미노산, 및 선택적으로 대상체의 암에서 발현되는 것으로 알려지거나 또는 의심되는 돌연변이 또는 비돌연변이 아미노산 서열을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 종양 신생 항원 컨스트럭트:

여기서 바람직하게는 종양 신생 항원 컨스트럭트의 암과 관련되는 것으로 알려져 있거나 또는 의심되는 적어도 하나의 돌연변이 아미노산을 포함하는 각각의 아미노산 서열은 5 내지 50 개의 아미노산, 바람직하게는 10 내지 25 개의 아미노산을 포함하고; 바람직하게는 종양 신생 항원 컨스트럭트의 대상체에서 암 세포에서 발현되는 것으로 알려지거나 의심되는 각각의 선택적으로 존재하는 돌연변이 또는 비돌연변이 아미노산 서열은 5 내지 50 개의 아미노산, 바람직하게는 10 내지 25 개의 아미노산을 포함한다.

청구항 39

제 38 항에 있어서, 종양 신생 항원 컨스트럭트가 2 개 이상의 공유결합으로 연결된 펩티드(예를 들어, 3, 4, 5 또는 6 개의 공유결합으로 연결된 펩티드)를 포함하고, 각각의 펩티드는 대상체에서 암과 관련이 있는 것으로 알려져 있거나 의심되는 하나 이상의 돌연변이 아미노산, 또는 대상체의 암 세포에서 발현되는 것으로 알려지거나 의심되는 돌연변이 또는 비돌연변이 아미노산 서열(바람직하게는 각각의 펩티드는 대상체에서 암과 관련이 있는 것으로 알려지거나 의심되는 하나 이상의 돌연변이 아미노산을 포함하는 아미노산 서열을 포함하고), 여기서 펩티드는 직접 연결되거나 또는 스페이서 부분을 통해 연결되는 것인, 종양 신생 항원 컨스트럭트.

청구항 40

제 39 항에 있어서, 펩티드가 스페이서 부분을 통해 연결되고, 여기서 스페이서 부분은 1 내지 15 개 아미노산

(바람직하게는 1 내지 5 개 아미노산)의 짧은 서열이고, 바람직하게는 스페이스 모이어티는 모티프 VVR을 포함하거나(예를 들어, 스페이스 모이어티는 서열 VVR을 가짐), 또는 스페이스 모이어티는 모티프 GGS를 포함하는 것인(예를 들어, 스페이스 모이어티는 서열 GGS를 가짐), 중앙 신생 항원 컨스트럭트.

청구항 41

제 39 항 또는 제 40 항에 있어서, 중앙 신생 항원 컨스트럭트가 3 개의 공유적으로 연결된 펩티드를 포함하고, 바람직하게는 각각의 펩티드가 대상체의 암과 관련이있는 것으로 알려진 또는 의심되는 하나 이상의 돌연변이 아미노산을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는, 중앙 신생 항원 컨스트럭트.

청구항 42

제 38 항 내지 제 41 항 중 어느 한 항에 있어서, 중앙 신생 항원 컨스트럭트의 대상체에서 암과 관련되는 것으로 알려진 또는 의심되는 적어도 하나의 돌연변이 아미노산을 포함하는 아미노산 서열 각각이 비종양 세포에서의 서열과 비교하여 서열에서 단일의 치환 돌연변이 아미노산을 갖고, 돌연변이 아미노산의 C- 말단에 대한 플랜킹(flanking) 아미노산의 수는 8, 9, 10, 11 또는 12 개의 아미노산이고, 및 돌연변이 아미노산의 N- 말단에 대한 플랜킹(flanking) 아미노산의 수는 8, 9, 10, 11 또는 12 개의 아미노산인, 중앙 신생 항원 컨스트럭트.

청구항 43

하나 이상의 중앙 신생 항원 컨스트럭트가 밀접하게 관련된, 상자성 또는 초상자성 포식 작용성 입자:

상기 중앙 신생 항원 컨스트럭트는 대상체에서 암과 관련이있는 것으로 알려지거나 또는 의심되는 적어도 하나의 돌연변이 아미노산을 포함하는 아미노산 서열, 또는 대상체의 암에서 발현되는 것으로 알려지거나 또는 의심되는 돌연변이 또는 비돌연변이 아미노산 서열을 포함하고; 또는

상기 중앙 신생 항원 컨스트럭트는 제 38 항 내지 제 42 항 중 어느 한 항에 정의 된 중앙 신생 항원 컨스트럭트인 것인, 상자성 또는 초상자성 포식 작용성 입자.

청구항 44

제 43 항에 있어서, 입자의 최대 치수가 5.6 μm 미만, 바람직하게는 4 μm 미만,보다 바람직하게는 3 μm 미만, 더욱더 바람직하게는 0.5 내지 2 μm 인 상자성 또는 초상자성 포식 세포 성 입자 또는 가장 바람직하게는 약 1 μm ; 및/또는 입자는 실질적으로 구형인, 상자성 또는 초상자성 포식 작용성 입자.

청구항 45

제 43 항 또는 제 44 항에 있어서, 중앙 신생 항원 결정자(determinant)가 입자에 공유적으로 부착 된 상자성 또는 초상자성 포식 작용성 입자.

청구항 46

제 43 항 내지 제 45 항 중 어느 한 항에 따른 상자성 또는 초상자성 포식 작용성 입자 및 T-세포의 증식에 사용하기에 적합한 시약을 포함하는 키트.

청구항 47

상자성 또는 초상자성 포식 작용성 입자, 펩티드를 포식 작용성 입자에 커플 링하기 위한 커플링 시약, 및 T-세

포를 증식하는데 사용하기에 적합한 시약을 포함하는 키트.

청구항 48

제 47 항에 있어서, 다음을 더 포함하는 키트: 종양 신생 항원 컨스트럭트를 설계하기 위한 설명서; 및/또는 하나 이상의 종양 신생 항원 컨스트럭트; 및/또는 하나 이상의 신생 항원 에피토프; 및 선택적으로 종양 신생 항원 컨스트럭트를 생성하기 위한 시약, 예를 들어 상이한 클로닝 및 발현 조건에 맞게 조정된 즉시 사용 가능한 (ready-to-use) 벡터.

청구항 49

제 1 항 내지 제 32 항 중 어느 한 항에 있어서, 단계(e)이후(바람직하게 단계(e) 직후 또는 존재하는 경우 단계(f) 직후) 다음을 더 포함하는 방법:

a1) 밀접하게 연관된 하나 이상의 종양 신생 항원 컨스트럭트를 갖는 제 2 포식 작용성 입자를 제공하며, 여기서 종양 신생 항원 컨스트럭트는 대상체에서 암과 관련되거나 알려져있는 것으로 의심되는 적어도 하나의 돌연변이 아미노산을 포함하는 아미노산 서열, 또는 대상체에서 암 세포에서 발현되는 것으로 알려지거나 의심되는 돌연변이 또는 비 돌연변이 아미노산 서열을 포함하고;

b1) 제 2 생존 가능한 항원-제시 세포를 제공하는 단계;

c1) 항원-제시 세포에 의한 입자의 포식 작용을 허용하는 조건 하에서 시험관 내(in vitro)에서 제 2 입자를 제 2 항원-제시 세포와 접촉시키는 단계; 및

e1) 항원-제시 세포에 의해 제시된 항원에 반응하여 항 종양 T-세포의 특이적 활성화를 허용하는 조건 하에서 시험관 내(in vitro)에서 제 2 입자와 접촉된 제 2 항원-제시 세포와 T-세포 샘플을 접촉시키는 단계.

청구항 50

제 49 항에 있어서, 단계(a1)의 하나 이상의 종양 신생 항원 컨스트럭트를 갖는 제 2 포식 작용성 입자가 단계(a)의 하나 이상의 종양 신생 항원 컨스트럭트를 갖는 포식 작용성 입자와 동일하고; 및/또는 단계(b1)의 제 2 생존 가능한 항원-제시 세포는 단계(b)의 생존 가능한 항원-제시 세포와 동일한 것인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 항 종양 T-세포 증식 방법, 및 특히 암 치료에 있어서 본 발명의 방법에 따라 생성된 항 종양 T-세포의 조성물 및 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 적응 면역 시스템은보다 일반적인 방식으로 반응하는 선천 면역 시스템과는 달리, 유기체가 직면 한 다른 병원체 또는 세포 손상 문제에 특이적으로 적응하고 반응할 수 있는 면역 시스템의 한 부분을 구성한다. 적응 시스템은 체액 면역, 즉 B-세포에 의해 분비된 항체 및 T-세포-매개 면역 둘 다를 포함한다. 적응 면역 시스템의 특이성은 B- 및 T-세포에서 발현된 B- 및 T-세포 수용체에 있다. 유전자 분절의 복잡한 혼합 시스템을 통해 신체는 거의 무한한 다양한 B- 및 T-세포를 생성하며, 각각은 특정 단백질 또는 펩티드에 대한 특정 수용체를 발현한다.

[0003] T-세포는 적응성 면역계의 주요 부분을 형성하는 림프구이며, 여기서 세포-매개 면역에서 중심적인 역할을 한다. 정의된 T-세포 수용체(TCR)는 세포 표면에서 발현되고, 각각의 수용체는 MHC(주요 조직 적합성 복합체) 분자와 관련하여 제시된 항원 유래 펩티드를 인식한다. 여러 유형의 T-세포가 존재하며, 각각은 세포 성 면역

반응에서 뚜렷한 기능을 갖는다.

- [0004] 기능이 다른 두 가지 주요 유형의 T-세포가 있다. CD8-양성 세포 독성 T-세포는 MHC 클래스 I 수용체(인간, 인간 백혈구 항원(HLA)클래스 I로 지칭됨)상에 제시된 펩티드를 세포에서 결합 할 것이다. 모든 핵 형성 세포는 HLA 클래스 I을 발현한다. 제시된 펩티드가 외부의 것(바이러스성 감염의 가장 빈번한 징후)으로 간주되는 경우, 세포 독성 T-세포는 단백질 그랜자임(Granzyme)B 또는 perforin(Perforin)에 의해 세포를 사멸시킬 것이다. 표면 마커 CD4를 발현하는 헬퍼 T-세포(Th)는 세포 사이의 전 염증성 및 일부 억제성 신호를 증강시키는 단백질인 사이토카인의 분비에 의해 면역 반응을 조정한다. T-헬퍼 세포의 또 다른 중요한 기능은 예를 들어 B-세포의 클래스 스위칭을 유도하는 것이다. IgM-분비 B-세포를 IgG-분비 세포로 전환시켜 항원에 대한 체액성 면역 반응을 증가시킨다.
- [0005] T-헬퍼 세포는 그의 TCR을 통해 소위 항원 제시 세포(APC)또는 내피 세포 상에 특이적으로 발현되는 수용체인 MHC-II(인간에서 HLA 클래스 II로 지칭됨)상에 제시된 상응하는 펩티드에 결합할 것이다. T-세포 활성화는 Th-APC 상호 작용이 일어나는 미세 환경 및 APC상에서 발현되는 소위 공동-자극 분자의 유형에 의존한다. T-헬퍼 세포는 상이한 Th-서브 세트로 분화될 수 있고, 예를들어 전 염증성 Th1, Th2, Th17 세포 또는 조절성 T-세포(Treg)라 불리는 억제성 T-헬퍼 세포 유형으로 분화될 수 있다. 제한되지 않은 면역 시스템은 유해하고 조직 손상 및 자가 면역을 유발할 수 있기 때문에 후자의 서브 세트는 면역 반응을 제어하는데 매우 중요하다.
- [0006] 암 치료를 위한 면역학적 접근법이 알려져 있다. 예를 들어 흑색종, 폐암, 방광암 및 위장암의 치료에서 면역 활성화의 체크 포인트를 표적으로 하는 단일 클론 항체 사용에서 많은 성공이 있었다. 상이한 단일 클론 항체는 상이한 작용 메커니즘을 갖지만, 이들은 모두 항종양(또는 "종양 반응성")T-세포의 활성화 및 증식을 초래한다.
- [0007] T-세포가 종종 면역-매개 암 치료의 최종 이펙터이기 때문에, 항-종양 T-세포를 직접 사용하는 전략이 개발되었다. 하나의 접근법은 적응성 세포 전달(ACT)이며, 여기서 T-세포는 신체 외부에서 증식되고 다수의 암을 갖는 대상으로 재주입된다. 이 접근법은 예를 들어 Klebanoff et al., Nature Medicine, 2016, 22, 26-36에서 논의된다.
- [0008] 이 분야에서 몇몇 성공이 있었다. 예를 들어, 진행성 대장암 환자를 입양 면역요법 프로토콜을 사용하여 치료한 연구가 Karlsson et al., Ann Surg Oncol., 2010, 17(7): 1747-57에 보고되었다. 치료는 종양을 자연적으로 배출시키는 제 1 림프절(센티넬 노드)로부터 수술로 단리된 자가 종양-반응성 림프구의 분리 및 인비트로 증식에 기초하였다. 센티넬 노드 획득 림프구를 수집하고, 활성화시키고, 자가 종양 추출물에 대해 증식시키고, 수혈로 돌려 보냈다. 독성 부작용이나 다른 부작용은 관찰되지 않았다. 간 및 폐 전이를 가진 4 명의 환자에서 이 질환의 완전한 또는 현저한 퇴행이 발생했으며, 12 명의 환자가 부분 퇴행 또는 안정된 질병 상태를 나타냈다. 용량 의존적 반응 상관 관계가 있었고 IV 기 환자는 대조군 환자 0.8 년에 비해 2.6 년으로 생존율이 유의하게 증가한 것으로 나타났다. 새로 단리된 센티넬 노드 획득 림프구를 증식시키고 합병증 없이 환자에게 안전하게 다시 수혈할 수 있다 결론내렸다.
- [0009] 그러나, 현재의 방법을 사용하여 적응성 세포 전달에 사용하기에 충분한 항 종양 T-세포를 수득하는 것은 도전 과제이다: 증식될 종양-침윤 림프구를 얻기 위해서는 암의 외과적 제거가 필요하다. 이것은 침습적 절차이다. 또한, 수득된 세포는 적고, 종양으로부터의 면역 억제 메커니즘으로 인해 빈번하게 비 반응성(면역성 결여)이다. 이로 인해 충분한 증식을 얻기 위해 오랜 시간(수 개월)이 필요할 수 있다.
- [0010] 유전자 조작된 T-세포는 종양-침윤 림프구를 사용하여 적응성 세포 전달의 사용을 제한하는 실용성을 극복하기 위해 개발되었다. 유전자 조작된 T-세포는 항원 수용체의 도입에 의해 환자의 암으로 T-세포 특이성을 유전적으로 전환시키거나 "키메라 항원 수용체"라 불리는 합성 인식 구조를 T-세포에 도입함으로써 수득될 수 있다. 유전자 조작된 T-세포가 혈액 암 치료에 있어서 성공을 거두었지만, 고형 암을 치료하기 위한 유전자 조작된 T-세포의 안전성 및 선택성은 개선이 필요하다. WO 2016/053339(미국 보건 복지부 장관이 대표하는 USA의 국제출원)는 암 특이적 돌연변이에 의해 코딩된 돌연변이 아미노산 서열에 대해 항원 특이성을 갖는 T-세포를 분리하는 방법을 개시하고 있다. 상기 방법은 돌연변이 아미노산 서열을 코딩하는 암-특이적 돌연변이를 함유하는 환자의 암 세포의 핵산에서 하나 이상의 유전자를 확인하는 단계; 돌연변이 아미노산 서열을 제시하기 위해 환자의 자가 APC를 유도하는 단계; 돌연변이 아미노산 서열을 나타내는 자가 APC와 환자의 자가 T-세포를 공동 배양하는 단계; 및 자가 T-세포를 선택하는 단계를 포함한다. 선별 단계는 암-특이적 돌연변이에 의해 코딩된 돌연변이 아미노산 서열에 대해 항원 특이성을 갖는 단리된 T-세포를 채취하기 위해(a)돌연변이 아미노산 서열을 나타내는 자가 APC와 공동 배양되고(b)환자에 의해 발현된 주요 조직 적합성(MHC)의 맥락에서 제시된 돌연변이 아미노산 서열에 대한 항원 특이성을 갖는 자가 T-세포를 선별하는 단계를 필요로 한다. 일단 이들 세포가 선택

되면, 피더 PBMC(예를 들어, 조사된 알로제닉 PBMC), 인터루킨(IL)-2 및 OKT3 항체와 배양함으로써 세포가 증식되는 것으로 개시되어 있다.

[0011] 환자의 자가 APC가 돌연변이 아미노산 서열을 제시하도록 유도하기 위해, W02016/053339는 프리 펩티드 또는 뉴클레오타이드 컨스트럭트의 펄싱(pulsing)을 사용하여 신생 항원(또는 신생 항원 코딩 물질)을 세포 내로 도입하려는 것을 교시하고 있다. 유리 펩티드로 펄싱함으로써 신생 항원이 세포의 시토졸(세포내 액)로 도입된다.

[0012] 따라서, 암의 치료에 사용하기에 적합하고, 안전성 및 선택성이 양호하며, 임상 환경에서 실제로 사용될 수 있는 항 종양 T-세포를 제공하기 위한 개선된 방법이 여전히 요구되고 있다.

발명의 내용

[0013] 본 발명은 하기 단계를 포함하는 항 종양 T-세포의 증식 방법을 제공한다:

[0014] a)포식 작용 가능한(phagocytosable)입자를 제공하는 단계이되, 이 입자는 이와 밀접하게 관련된 하나 이상의 종양 신생항원 컨스트럭트(construct)를 갖고, 상기 종양 신생항원 컨스트럭트는 대상체에서 암과 관련 있는 것으로 알려진 또는 의심되는 적어도 하나의 돌연변이 아미노산, 또는 대상체의 암 세포에서 발견되는 것으로 알려진 또는 의심되는 돌연변이 또는 비-돌연변이 아미노산 서열을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 것인, 단계;

[0015] b)생존 가능한 항원-제시 세포를 제공하는 단계;

[0016] c)항원-제시 세포에 의한 입자의 포식 작용을 허용하는 조건 하에서 입자를 항원-제시 세포와 시험관 내(in vitro)(in vitro)에서 접촉시키는 단계;

[0017] d)대상체로부터 생존 가능한 T-세포를 포함하는 T-세포 샘플을 제공하는 단계;

[0018] e)항원-제시 세포에 의해 제시된 항원에 반응하여 항-종양 T-세포의 특이적 활성화를 허용하는 조건 하에서 시험관 내(in vitro)에서 입자와 접촉된 항원-제시 세포와 T-세포 샘플을 접촉시키는 단계.

[0019] 본 발명자들은 놀랍게도, 밀접하게 관련이 있는 종양 신생 항원 컨스트럭트를 갖는 포식 작용성 입자가 항원-제시 세포에 의해 내재화될 수 있고, 이어서 종양 신생 항원 컨스트럭트가 이들 세포의 표면 상에 제시 될 수 있고, 입자/APC 혼합물의 존재 하에 배양되어 T-세포의 증식을 야기한다는 것을 규명하였다. 포식 작용성 입자의 사용은 종양 신생 항원 컨스트럭트의 놀랍게도 높은 흡수 및 처리를 초래한다.

[0020] 밀접하게 관련된 하나 이상의 종양 신생 항원 컨스트럭트를 갖는, 포식 작용성 입자를 사용하고, 항원-제시 세포와 조합하여, 입자/항원-제시 세포를 암을 갖는 대상체로부터 T-세포 샘플에 노출시킴으로써, 항 종양 T-세포의 높은 수준의 증식이 달성될 수 있다. 일반적으로, 복수의 입자가 사용되고, 예를 들어 100 내지 1×10^7 개의 입자가 사용된다(아래에서 더 상세히 설명되는 바와 같이, 이들은 모두 모두 동일한 종이거나 상이 할 수 있음).

[0021] 상기 방법은 종양 신생 항원 컨스트럭트의 서열이 제어될 수 있고 또한 하나 이상의 종양 신생 항원 컨스트럭트가 입자 상에 포함될 수 있게 하므로 특히 효과적이다. 예를 들어, 하나 이상의 상이한 신생 항원 에피토프를 포함하는 상이한 종양 신생 항원 컨스트럭트가 입자에 부착될 수 있다. 입자의 이러한 다중화 능력은 다중 에피토프를 이용한 자극으로 T-세포 증식을 최대화 할 수 있다.

[0022] 포식 작용성 입자의 사용은 또한 다량의 종양 신생 항원 컨스트럭트가 세포로 들어가 세포 표면에 제공 될 수 있게 한다. 본 발명에 따른 단일 포식 작용성 입자는 전형적으로 이와 관련된 0.5 내지 백만개의 종양 신생 항원 컨스트럭트를 갖는다. 이는 포식 세포 입자를 내재화 한 APC에서 신생 항원의 높은 수준의 표면 발현으로 이어진다.

[0023] 포식 작용성 입자의 사용은 놀랍게도 종양 신생 항원 컨스트럭트가 항원-제시 세포에 고도로 멸균되고 순수한 형태로 제시 될 수 있게 한다. 예를 들어, 포식 작용성 입자는 발열 물질(pyrogens)과 같은 오염 물질을 제거할 수 있는 데 특히 효과적이다.

[0024] 임의의 특정 이론에 구속되기를 원치 않으면서, 밀접하게 관련된 종양 신생 항원 컨스트럭트를 갖는 포식 작용 가능한 입자는 포식 작용에 의해 항원-제시 세포에 의해 식포(phagosome)으로 내재화되기 때문에 특히 효과적이라고 여겨진다. 이어서, 종양 신생 항원 컨스트럭트는 식포에서 입자로부터 절단되고, 종양 신생 항원 컨스트럭트의 단편은 주요 조직 적합성(MHC)클래스 II 경로를 통해 항원-제시 세포의 표면에 제시되고 MHC 클래스 II 분

자에 의해 세포 표면에 제시된다. 이는 항원이 APC 상에 제시되는 독점적인 과정이 아니며, 종양 신생 항원 컨스트럭트의 일부 단편은 또한 주요 조직 적합성(MHC)클래스 I 경로를 통해 항원-제시 세포의 표면 상에 제시될 수 있고, 교차-제시로 알려진 과정에서, MHC 클래스 I 분자에 의해 세포 표면 상에 제시된다. 따라서, 종양 신생 항원 컨스트럭트의 단편이 주로 MHC 클래스 II 경로를 통해 APC 상에 제시될 것으로 예상되지만, 일부는 MHC 클래스 I 경로를 통해 제시될 것으로 예상되므로, 본 발명은 두 경로를 다양하게 활용한다.

[0025] 항원이 MHC 클래스 II 분자에 의해 제시될 때, 그들은 일반적으로 헬퍼 T-세포(CD4+ T-세포라고도 함)를 활성화시키고, 이들은 다른 세포 유형을 직접 죽이지 않고, 대신 사이토카인의 분비에 의해 면역 반응을 조정하여 B-세포의 클래스 전환을 유도하여 B-세포가 항체를 만들고 다른 T-세포 유형의 증식을 자극하도록 돕는다. 이는 본 발명의 방법에 따라 활성화된 T-세포 군이, 증식되고 환자에게 투여될 때, 다음과 같은, 면역 반응이 느리게 시작하여(따라서 부작용이 거의 없음)오래 지속되는 효과가 있음을 의미하고,(예를 들어, 종양 세포만 직접 공격할 수 있는 CD8-양성 세포독성 T-세포를 활성화시키기 보다는)전체 면역 체계를 이용하여 여러가지 방법으로 암을 표적할 수 있다. 이는 항원이 유리 펩티드 또는 펩티드를 발현하는 뉴클레오타이드 컨스트럭트로서 제공될 때 발생할 것으로 예상되는 것과 대조적이다. 이러한 항원은 APC의 시토졸에 흡수될 것으로 예상되며, 그 결과 신생 항원은 MHC 클래스 I 분자에 의해 MHC 클래스 I 경로를 통해서만 세포 표면에 제시된다. 이는 차례로 CD8-양성 세포 독성 T-세포의 활성화를 초래한다.

[0026] 본 발명의 치료 방법에서, 환자 자신의 면역계가 활용되고 자극된다. 이는 T-세포를 투여하기 전에 내인성 T-세포의 화학-유도된 고갈이 필요하지 않음을 의미한다. 따라서이 방법은 특정 비교 가능한 대안 방법보다 부작용이 적다.

[0027] 또한, 초기 표적화 후, T-헬퍼 세포로부터 유래된 기억 T-세포는 순환 상태를 유지하고, 이들은 신생 항원을 발현하는 암 세포가 체내에 남아 있거나 동일한 암이 재발하는 한 신속하고 효과적인 2 차 면역 반응을 일으킬 수 있다.

[0028] 따라서, 본 발명의 방법에 따라 증식된 T-세포 군은 증식되고 환자에게 투여될 때, 투여된 원래의 T-세포가 사망한 후에도, 원래의 활성화된 T-세포 유래된 기억 T-세포로 인해 계속하여 작용할 것이다.

[0029] 본 발명의 방법은 또한, 밀접하게 관련된 하나 이상의 종양 신생 항원 컨스트럭트를 갖는 포식 작용 가능한 입자가 멸균되고 순수한 형태로 신속하게 제조될 수 있고, 이어서 증식이 빠르게 시작되고 완료될 수 있는 바, 증식된 T-세포가 매우 빠르게 생성될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0030] 도 1. T-세포 활성화에 대한 입자 크기의 영향. 오발부민 감작 마우스로부터의 비장세포에 의한 증식 분석(티미딘 혼입). 5.6 μm , 1 μm 및 0.2 μm 의 직경을 가진 다른 크기의 입자에 결합된 오발부민의 비교. student T-테스트를 사용하여 결정된 p-값 및 $p < 0.05$ 가 발견될 때 기록. 스테이플은 SD를 나타낸다.

도 2. 신생 항원 펩티드 NA1-9로의 자극에 의한 T-세포의 증식. 도 2A는 시간 경과에 따른 배양물에서 세포의 수를 보여준다. 도 2B는 % CD4 +/총 T-세포를 보여준다. 도 2C는 CD4에서의 T-bet 발현을 보여준다. 도 2D는 CD8 + T-세포에서 그랜자임 B 및 perforin의 발현을 보여준다.

도 3. 신생-항원 컨스트럭트로의 자극에 의한 T-세포의 증식. CD4 + T-세포의 T-세포(작은 사각형)중 퍼센트 및 총 수(큰 사각형), 및 증식하는 CD4 + 세포(원)를 보여준다.

도 4. 신-항원 컨스트럭트로의 자극에 의한 T-세포의 증식. 도 4A는 시간 경과에 따른 배양물에서 세포의 수를 나타낸다(적색선: 식별된 펩티드; 분홍색 및 주황색 선: 동일한 단백질을 가지나 예측된 돌연변이(NA1, 3, 4 및 5)를 갖는 예측된 펩티드 대조 배양물). 도 4B는 % CD4 +/총 T-세포를 보여준다. 도 4C는 CD4 T-세포에 대한 BH-SNE(Barnes-Hut Stochastic Neighbor Embedding)알고리즘으로 수행된 분석을 시각화하며, 여기서 샘플의 모든 세포는 선택된 마커 세트(CD28, CD57, T-bet, GATA-3, perforin, 그랜자임 B(GZB), Ki-67 및 PD-1)따른 발현 강도에서 유사도에 따라 2D 맵 상에 나타났다.

도 5A. 항원 결합 입자로 37°C에서 18 시간 동안 배양한 후 3 가지 크기(4.5 μm , 2.8 μm 또는 1 μm)의 세포 내 포식된 항원 결합 입자로 PBMC의 공초점 현미경 이미지.

도 5B. 수동 계수에 의해 평가된 바와 같이, 37 °C에서 18 시간 동안 배양한 후 PBMC에서 2 가지 크기(4.5 μm 또는 2.8 μm)의 항원 결합 입자의 흡수를 나타내는 그래프.

도 5C. 부피 계산에 의해 평가 된 바와 같이 37℃에서 18 시간 동안 배양 한 후 PBMC에서 3 가지 크기(4.5 μm, 2.8 μm 또는 1 μm)의 항원 결합 입자의 흡수를 보여주는 그래프(* p <0,05 ** p <0,01 *** p <0,001, 스튜던트 T-테스트를 사용하여 계산).

도 6A. 실시예 3a(iv)의 FluoroSpot 분석에서 평가 된 바와 같이, 자극되지 않은 세포와 비교하여 3 가지 크기(4.5 μm, 2.8 μm 또는 1 μm)의 항원 결합 입자로 자극 된 CMV-민감성 건강한 공여자(n = 2)로부터 PBMC에서 IFN γ 생산 수준의 상대적 증가를 보여주는 그래프.

도 6B. 실시예 3a(iv)의 FluoroSpot 분석에서 평가 된 바와 같이, 자극되지 않은 세포와 비교하여 3 가지 크기(4.5 μm, 2.8 μm 또는 1 μm)의 항원 결합 입자로 자극 된 CMV-민감성 건강한 공여자(n = 1)로부터 PBMC에서의 IL22-생산 수준의 상대적 증가를 보여주는 그래프.

도 6C. 실시예 3a(iv)의 FluoroSpot 분석에서 평가 된 바와 같이, 자극되지 않은 세포와 비교하여 3 가지 크기(4.5 μm, 2.8 μm 또는 1 μm)의 항원 결합 입자로 자극 된 CMV-민감성 건강한 공여자(n = 1)로부터 PBMC에서 IL17-생산 수준의 상대적 증가를 보여주는 그래프.

도 6D. 실시예 3a(iv)의 FluoroSpot 분석에서 평가 된 바와 같이, 자극되지 않은 세포와 비교하여 3 가지 크기(4.5 μm, 2.8 μm 또는 1 μm)의 항원 결합 입자로 자극 된 CMV-민감성 건강한 공여자(n = 1)로부터 PBMC에서 IFN γ 및 IL17의 이중 사이토카인 생산의 상대적 증가를 보여주는 그래프.

도 6E. 실시예 3a(iv)의 FluoroSpot 분석에서 평가 된 바와 같이, 자극되지 않은 세포와 비교하여 3 가지 크기(4.5 μm, 2.8 μm 또는 1 μm)의 항원 결합 입자로 자극 된 CMV-민감성 건강한 공여자(n = 1)로부터 PBMC에서 IL22 및 IL17의 이중 사이토카인 생산의 상대적 증가를 보여주는 그래프.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0031] 정의

[0032] 엔도톡신, 예: 리포폴리사카라이드(LPS)는, 그람 음성 박테리아, 예컨대 에스케리키아 콜라이(Escherichia coli)의 외부 세포벽에서 발견되는 공유 결합 된 지질 및 폴리사카라이드 서브 유닛을 포함한다.

[0033] CD4 + T-세포(또는 T-헬퍼 세포 또는 CD4 + 헬퍼 T-세포)는 사이토카인 분비를 통해 면역 반응을 조정하는 세포이다. 이들은 B 세포의 항체 클래스 전환, 세포 독성 T 세포의 증식을 자극하거나 또는 식세포를 강화시키는 것과 같은, 다른 면역 세포를 억제 또는 강화시킬 수 있다. 이들은 APC상의 MHC 클래스 II를 통한 항원 제시에 의해 활성화되고, 특정 항원 내에서 대략 15 개 아미노산(소위 T-세포 에피토프)의 스트레치에 특이적인 T-세포 수용체(TCR)를 발현한다.

[0034] CD8 + T-세포(또는 세포 독성 T-세포)는 종양 세포, 감염된 세포 또는 달리 손상된 세포를 사멸시키는 세포이다. CD4 + T-세포와 달리 활성화를 위해 APC가 필요하지 않다. 이들의 T-세포 수용체는 모든 핵 세포에서 발현 된 단백질 인 MHC 클래스 I에 의해 제시된 항원 유래 펩타이드(약 7-10, 예를 들어 8, 아미노산 길이)를 인식한다.

[0035] 항원-특이적 T-세포 활성화는 TCR과 공동-자극된 MHC(HLA)분자 상에 제시된 특정 펩티드 사이의 상호 작용을 요구하는 공정이다.

[0036] 항원-제시 세포(APC)는 전형적으로 수지상 세포(DC), B-세포 또는 대식세포, 세포 외 유기체 또는 단백질, 즉 항원을 포식 또는 내재화하는 세포, 및 CD4 + T-세포에 대한 MHC 클래스 II에서 존재하는 항원-유래 펩티드를 가공한 후의 세포이다. 혈액에서 단핵구는 가장 풍부한 항원 제시 세포이다.

[0037] 포식 작용 가능한 입자는 면역계의 세포, 특히 단핵구에 의해 포식 될 수 있는 입자로 정의된다.

[0038] 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)는 전혈의 밀도 구배 원심 분리에 의해 제조 된 인간 혈액의 일부이다. PBMC 분획은 주로 림프구(70-90 %)와 단핵구(10-30 %)로 구성되며, 적혈구, 과립구 및 혈장은 제거되었다. 단핵구는 일부 경우에 PBMC 샘플에서 세포 수의 10 내지 20 %, 예를 들어 10 내지 15 %를 구성 할 수 있다.

[0039] 종양 신생 항원은 면역계에 의해 외부 물질로 인식 될 수 있는 펩티드 또는 단백질의 아미노산 서열에서의 종양 유도 변화를 말한다.

[0040] 돌연변이 아미노산을 포함하는 아미노산 서열은 대상체의 비종양 세포에서의 서열과 비교하여 변경되는 대상체의 종양 세포에서 펩티드 또는 단백질의 아미노산 서열이다. 돌연변이 아미노산은 점 돌연변이 일 수 있다 : 예

를 들어 아미노산의 삽입 또는 결실, 또는 단백질 또는 펩티드의 서열에서 다른 아미노산으로 단일 아미노산의 치환. 일부 상황에서, 둘 또는 그 이상의 돌연변이 아미노산이 일렬로 존재할 수 있다. 돌연변이는 프레임-시프트 돌연변이 일 수 있다.

[0041] **발명의 상세 설명**

[0042] 포식 작용 가능한 입자는 면역계의 세포, 특히 단핵구에 의해 포식 될 수 있는 입자로 정의된다.

[0043] 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)는 전혈의 밀도 구배 원심 분리에 의해 제조 된 인간 혈액의 일부이다. PBMC 분획은 주로 림프구(70-90 %)와 단핵구(10-30 %)로 구성되며, 적혈구, 과립구 및 혈장은 제거되었다. 단핵구는 일부 경우에 PBMC 샘플에서 세포 수의 10 내지 20 %, 예를 들어 10 내지 15 %를 구성 할 수 있다.

[0044] 종양 신생 항원은 면역계에 의해 외부 물질로 인식 될 수 있는 펩티드 또는 단백질의 아미노산 서열에서의 종양 유도 된 변화이다.

[0045] 돌연변이 아미노산을 포함하는 아미노산 서열은 대상체의 비종양 세포에서의 서열과 비교하여 변경되는 대상체의 종양 세포에서 펩티드 또는 단백질의 아미노산 서열이다. 돌연변이 아미노산은 점 돌연변이 일 수 있다: 예를 들어 아미노산의 삽입 또는 결실, 또는 단백질 또는 펩티드의 서열에서 상이한 아미노산에 대한 단일 아미노산의 치환. 일부 상황에서, 둘 이상의 돌연변이 아미노산이 일렬로 존재할 수 있다. 돌연변이는 프레임-시프트 돌연변이 일 수 있다.

[0046] 바람직하게는, 본 발명의 방법에 사용하기위한 입자는 최대 치수가 5.6 μm 미만, 바람직하게는 4 μm 미만, 더욱 바람직하게는 3 μm 미만, 예를 들어 2.5 μm 미만, 2 μm 미만 또는 2 미만일 수 있다. 1.5 μm . 바람직하게는, 본 발명의 방법에 사용하기위한 입자는 최대 치수가 0.001 μm 초과, 바람직하게는 0.005 μm 초과, 바람직하게는 0.01 μm 초과, 바람직하게는 0.05 μm 초과, 바람직하게는 0.1 μm 초과, 보다 바람직하게는 더 큰 치수를 가질 수 있다. 0.2 μm 초과, 더욱 바람직하게는 0.5 μm 초과이다. 바람직하게는 본 발명의 입자는 0.1 내지 5.6 μm , 바람직하게는 0.2 내지 5.6 μm , 바람직하게는 0.5 내지 5.6 μm , 바람직하게는 0.1 내지 4 μm , 바람직하게는 0.5 내지 4 μm ,보다 바람직하게는 0.1 내지 3 μm 간격에서 가장 큰 치수를 갖는다. 바람직하게는 0.5-3 μm , 더욱 더 바람직하게는 0.1-2.5 μm , 더욱 더 바람직하게는 0.5-2.5 μm , 더욱 더 바람직하게는 0.2-2 μm , 더욱 더 바람직하게는 0.5-2 μm ,보다 바람직하게는 1-2 μm , 또는 예를 들어 약 1 μm , 약 1.5 μm 또는 약 2 μm (바람직하게는 약 1 μm). 입자는 실질적으로 구형 일 수 있으며, 이 경우 치수는 직경을 지칭 할 것이다. 바람직하게는 입자는 실질적으로 구형이다.

[0047] 본 발명에 따른 바람직한 입자 크기는 식균 작용에 의해 세포에 들어갈 수 있을만큼 크지만, 하나 이상의 입자가 식균 작용에 의해 동일한 세포에 들어갈 수 있을 정도로 작은 크기이다. 하나 이상의 포식 작용 된 입자를 갖는 것은 APC 세포가 상이한 포식 소체 내의 여러 입자로부터 펩타이드를 동시에 취할 수 있고, 따라서 MHC 클래스 II 경로를 통해 세포 표면에서 신생 항원의 발현을 최대화 할 것임을 의미한다.

[0048] 일반적으로 박테리아의 크기와 비슷한 크기는 APC에 의한 완전한 식균 작용을 촉진한다. 완전한 식균 작용은 APC에 의한 우수한 항원 분해 및이어서 MHC 클래스 II를 통한 T-세포에 대한 우수한 제시로 이어진다. 최적의 크기는 현재 발명가들에 의해 조사되었다(실시예 3a 및 3b, 및 도 1, 5A-C 및 6A-E 참조).

[0049] 바람직한 특정 구체예에서, 입자는 상자성 특성, 또는 더욱 바람직하게는 초상자성 특성을 갖는다. 상자성 또는 초상자성 입자는 자석을 사용하여 T-세포로부터 완전히 분리 될 수 있다. 중요하게는, 내재화 된 입자를 함유하는 APC는 또한 자석을 사용하여 T-세포로부터 분리 될 수 있다. 이는 T-세포가 배양 혼합물로부터 신속하게 분리 될 수 있게 한다. T-세포는 모든 입자가 제거되었다는 지식으로 환자에게 투여 될 수 있다. 따라서 본 발명은 T-세포를 증식시키는 특히 안전한 방법을 제공한다.

[0050] 상자성 입자는 또한 이와 관련된 종양 신생 항원 컨스트럭트로 입자의 멸균 및/또는 변성을 촉진시킨다. 세척은 아래에서 더 상세히 논의된다. 세척 동안, 입자는 자석에 의해 수집 및/또는 고정 될 수 있다. 또한, 상자 내에 입자를 상자성으로 고정 시키거나 또는 상자성으로 고정 시키거나, 중력 또는 원심 분리에 의해 입자를 침강시키는 것과 같은 다른 수단에 의해 세척을 수행 할 수도 있다.

[0051] 초상자성 입자의 예는 Dynabeads TM(Invitrogen)이다. Dynabeads M-270 Carboxylic acid, Dynabeads M-270 Amine 및 Dynabeads MyOne Carboxylic acid와 같은 다양한 기능적 형태로 제공된다. Dynabeads MyOne Carboxylic Acid는 균일 한 단일 크기의 초상자성 입자로, 균일하게 분포 된 자성 물질과 고도로 가교 된 폴리 스티렌으로 구성된다. 입자는 글리시딜 에테르의 친수성 층으로 추가로 코팅되어, 그 안에 산화철을 내포한다.

이어서, 카르복실산 기가 입자의 표면에 도입된다.

[0052] 초상자성 입자의 다른 예는 캡슐화 된 카르복실화 된 에스타 포르 ® 슈퍼 파라 마그네틱 마이크로 스피어 (Merck Chimie S.A.S.) 및 Sera-Mag SpeedBeads(친수성)카르복실 레이트-개질 된 자성 입자(GE Healthcare UK Limited)를 포함한다. 캡슐화 된 카르복실화 된 Estapor® SuperParamagnetic 마이크로 스피어는 코어-셸 구조로 만들어졌다. 초상자성 산화철 재료(~ 40 %)는 폴리스티렌 필름으로 캡슐화되어 있으며 표면의 구성 요소를 방해하지 않는다. Sera-Mag SpeedBeads(친수성)Carboxylate-Modified Magnetic Particles는 균일 한 크기의 자성 입자이며 자철광의 두 번째 층(~ 60 %를 구성하는 총 두 층)을 특징으로한다. 결과적으로 Sera-Mag SpeedBeads는 자기장에 매우 빠르게 반응하여 서스펜션과 신속하고 완벽하게 분리된다. 그들은 콜리 플라워와 같은 표면을 가지고 있어 입자의 전체 표면적과 결합력을 증가시킨다.

[0053] 항원 폴리펩티드와 입자의 연관

[0054] 종양 신생 항원 컨스트럭트는 입자에서 종양 신생 항원 컨스트럭트를 분리하지 않으면서 하기 논의 된 바와 같이 살균 및 변성 세척을 수행 할 수 있는 방식으로 입자와 관련된다.

[0055] 폴리펩티드를 입자에 회합시키는 한 가지 방법이 실시예 1에 도시되어 있다. 그러나, 정확한 회합 방식은 본 발명의 방법에 중요하지 않다. 바람직하게는, 폴리펩티드는 입자에 공유 결합된다(예를 들어, 폴리펩티드의 아민기 또는 카르복실산 기와 입자 표면의 카르복실산 기 또는 아민 기 사이의 아미드 결합을 통해). 대안적으로, 후보 항원 폴리펩티드는 금속 킬레이트를 통해 입자에 연결될 수 있다. 예를 들어, 이미 노 디아 아세트산과 같은 금속 킬레이트 리간드와 연결된 입자는 Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} 또는 Fe^{3+} 와 같은 금속 이온에 결합할 수 있다. 이들 금속 킬레이트는 예를 들어 히스티딘 또는 시스테인을 함유하는 단백질 및 펩티드를 큰 강도로 결합할 수 있다. 따라서, 금속 킬레이트를 갖는 입자는 엄격한 세척이 결합 된 펩티드/단백질에서 LPS 및 다른 오염 성분의 양을 감소시킬 수 있는 방식으로 펩티드/단백질을 비공유적으로 흡착 할 수 있다.

[0056] 종양 신생 항원 컨스트럭트는 입자에서 종양 신생 항원 컨스트럭트를 분리하지 않으면서 하기 논의 된 바와 같이 살균 및 변성 세척을 수행 할 수 있는 방식으로 입자와 관련된다.

[0057] 폴리펩티드를 입자에 회합시키는 한 가지 방법이 실시예 1에 도시되어있다. 그러나, 정확한 회합 방식은 본 발명의 방법에 중요하지 않다. 바람직하게는, 폴리펩티드는 입자에 공유 결합된다(예를 들어, 폴리펩티드의 아민기 또는 카르복실산 기와 입자 표면의 카르복실산 기 또는 아민 기 사이의 아미드 결합을 통해). 대안적으로, 후보 항원 폴리펩티드는 금속 킬레이트를 통해 입자에 연결될 수 있다. 예를 들어, 이미 노 디아 아세트산과 같은 금속 킬레이트 리간드와 연결된 입자는 Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} 또는 Fe^{3+} 와 같은 금속 이온에 결합할 수 있다. 이들 금속 킬레이트는 예를 들어 히스티딘 또는 시스테인을 함유하는 단백질 및 펩티드를 큰 강도로 결합할 수 있다. 따라서, 금속 킬레이트를 갖는 입자는 엄격한 세척이 결합 된 펩티드/단백질에서 LPS 및 다른 오염 성분의 양을 감소시킬 수 있는 방식으로 펩티드/단백질을 비공유적으로 흡착 할 수 있다.

[0058] 종양 신생 항원 컨스트럭트

[0059] 종양 신생 항원 컨스트럭트는 대상체에서 암 세포에서 발현되는 것으로 공지되거나 의심되는 하나 이상의 종양 신생 항원 및/또는 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드이다. 바람직하게는, 종양 신생 항원 컨스트럭트는 대상체에서 암 세포에서 발현되는 것으로 알려져 있거나 의심되는 하나 이상의 종양 신생 항원 및/또는 돌연변이 아미노산 서열을 포함한다. 종양 신생 항원 컨스트럭트는 하나 이상의 공유결합으로 연결된 펩티드를 포함하며, 여기서 공유결합으로 연결된 펩티드 중 하나 이상은 바람직하게는 대상체에서 암과 관련이있는 것으로 알려져 있거나 의심되는 하나 이상의 돌연변이 아미노산을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 하나 이상의 공유결합으로 연결된 펩티드는 대상체에서 암 세포에서 발현되는 것으로 공지되거나 의심되는 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 대상체에서 암 세포에서 발현되는 것으로 공지 또는 의심되는 아미노산 서열은 종양이 존재하는 조직 또는 기관에 의해 발현되는 것으로 공지 또는 의심되는 아미노산 서열 일 수 있다. 아미노산 서열은 돌연변이되거나 비 돌연변이 될 수 있다. 바람직하게는 돌연변이된다. 대상체에서 암과 관련이있는 것으로 알려진 또는 의심되는 하나 이상의 돌연변이 아미노산을 포함하는 아미노산 서열(또는 암에서 발현되거나 알려진 것으로 의심되는 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 아미노산 서열)돌연변이가 있는 없든간에 대상체의 세포는 또한 '신생 항원 에피토프'로 지칭 될 수 있다.

[0060] 바람직하게는, 돌연변이 아미노산은 치환 된 아미노산이다(즉, 비종양 세포에서 단백질 또는 펩티드의 아미노산은 종양 세포에서 다른 아미노산으로 치환된다). 대안적으로, 돌연변이 아미노산은 서열로부터 결실 된 아미노

산 일 수 있다(즉, 비중양 세포와 비교하여 중양 세포에서 단백질/펩티드에서 결실 됨); 또는 돌연변이 아미노산은 서열에 삽입 된 아미노산 일 수 있다(즉, 새로운 아미노산이 비중양 세포와 비교하여 중양 세포에서 단백질/펩티드에 첨가됨).

[0061] 중양 신생 항원 컨스트럭트의 신생 항원 에피토프는 대상체에서 암과 관련이있는 것으로 알려져 있거나 의심되는 변이 된 단백질/펩티드(또는 변이 된 유전자)를 선택함으로써 설계 될 수 있으며; 단백질 또는 펩티드의 서열(또는 유전자의 발현에 기인 한 단백질/펩티드)에서 돌연변이 아미노산(들)을 위치시키는 단계; 및 돌연변이 아미노산(들), 및 돌연변이 아미노산(들)의 C- 말단 및 N- 말단에 다수의 측면 아미노산을 포함하는 단백질/펩타이드의 일부를 선택하는 단계를 포함한다. 특정 바람직한 구체예에서, 비-중양 세포의 단백질 또는 펩티드 서열과 비교하여 단백질 또는 펩티드의 서열에는 단일 돌연변이 아미노산이 존재한다. 더욱 바람직하게는, 비중양 세포에서의 단백질 또는 펩티드 서열과 비교하여 단백질 또는 펩티드의 서열에는 단일 치환 된 돌연변이 아미노산이 존재한다.

[0062] 바람직하게는 돌연변이 아미노산(들)의 C- 말단에 인접한 플 랭킹 아미노산의 수는 5 개 이상, 바람직하게는 8 개 이상, 예를 들어 8 개, 9 개, 10 개, 11 개 또는 12 개 아미노산이다. 바람직하게는 돌연변이 아미노산(들)의 N- 말단에 인접한 플 랭킹 아미노산의 수는 5 개 이상, 바람직하게는 8 개 이상, 예를 들어 8 개, 9 개, 10 개, 11 개 또는 12 개 아미노산이다. 변이 된 아미노산(들)의 플 랭킹 아미노산의 C- 말단 및 N- 말단에 대한 수는 동일 할 수 있고, 바람직하게는 동일하다.

[0063] 특정 실시 양태에서, 하나 이상의 공유결합으로 연결된 펩티드는 대상체에서 암 세포에서 발현되는 것으로 공지되거나 의심되는 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 대상체에서 암 세포에서 발현되는 것으로 공지 또는 의심되는 아미노산 서열은 종양이 존재하는 조직 또는 기관에 의해 발현되는 것으로 공지 또는 의심되는 아미노산 서열 일 수 있다. 아미노산 서열은 돌연변이되거나 비 돌연변이 될 수 있다. 바람직하게는 아미노산 서열이 돌연변이된다.

[0064] 중양 신생 항원 컨스트럭트가 2 개 이상의 공유결합으로 연결된 펩티드를 포함하는 실시 양태에서, 바람직하게는 각각의 공유결합으로 연결된 펩티드는 대상체에서 암과 관련되거나 알려져있는 것으로 의심되거나 의심되는 하나 이상의 돌연변이 아미노산을 포함하는 아미노산 서열(즉, 신생 항원 에피토프)을 포함한다. 대안적으로, 중양 신생 항원 컨스트럭트가 2 개 이상의 공유결합으로 연결된 펩티드를 포함하는 구체예에서, 바람직하게는 중양 신생 항원 컨스트럭트는 암과 관련되거나 알려져있는 것으로 의심되거나 의심되는 적어도 하나의 돌연변이 아미노산을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 적어도 하나의 펩티드를 포함한다. 대상체(즉, 신생 항원 에피토프), 및 대상체의 암 세포에서 발현되는 것으로 알려진 또는 의심되는 아미노산 서열을 포함하는 하나 이상의 펩타이드를 포함한다.

[0065] 중양 신생 항원 컨스트럭트가 2 개 이상의 공유결합으로 연결된 펩티드를 포함하는 구체예에서, 펩티드는 직접 적으로 연결되거나 스페이서 부분을 통해 연결될 수 있다. 스페이서 부분은 짧은 서열의 아미노산, 예를 들어 1 내지 15 개 아미노산, 바람직하게는 1 내지 10 개 아미노산, 더욱 바람직하게는 1 내지 5 개 아미노산(예를 들어, 1, 2, 3, 4 또는 5 개 아미노산)일 수 있다. 바람직하게는, 스페이서 모이어티는 모티프 VVR을 포함한다. 한 구체예에서 스페이서 모이어티는 서열 VVR을 갖는다. 대안적인 구체예에서, 스페이서 모이어티는 모티프 VVR을 포함하지 않으며, 예를 들어 스페이서 모이어티는 서열 VVR을 갖지 않는다. 다른 실시 형태에서, 스페이서 모이어티는 모티프 GGS를 포함하고, 예를 들어 스페이서 모이어티는 서열 GGS를 갖는다. 다른 구체예에서, 펩티드는 직접 연결된다(즉, 스페이서 모이어티가없고, 예를 들어 아미노산 스페이서 모이어티가 없다).

[0066] 바람직한 구체예에서, 중양 신생 항원 컨스트럭트는 2 개 이상의 공유결합으로 연결된 펩티드, 보다 바람직하게는 3 개 이상의 공유결합으로 연결된 펩티드, 예를 들어, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 개의 공유결합으로 연결된 펩티드, 바람직하게는 3, 4, 5 또는 6 개의 공유결합으로 연결된 펩티드, 보다 바람직하게는 3, 4 또는 5 개의 공유결합으로 연결된 펩티드를 포함한다. 바람직하게는, 연결된 펩티드는 각각 스페이서 부분을 통해 연결된다. 각각의 링커 모이어티는 동일하거나 상이 할 수 있다. 대상체에서 암과 관련이있는 것으로 알려져 있거나 의심되는 하나 이상의 돌연변이 아미노산을 포함하는 아미노산 서열을 각각 포함하는 3 개의 공유결합으로 연결된 펩티드가 특히 효과적인 것으로 밝혀졌다.

[0067] 2 개의 연결된 펩티드를 포함하는 중양 신생 항원 컨스트럭트의 구조는 다음과 같을 수 있다 :

[0068] - [에피토프 서열 1] - [링커 모이어티] - [에피토프 서열 2].

[0069] 3 개의 연결된 펩티드를 포함하는 중양 신생 항원 컨스트럭트의 구조는 다음과 같을 수 있다 :

- [0070] - [에피토프 서열 1] - [링커 모이어티] - [에피토프 서열 2] - [링커 모이어티] - [에피토프 서열 3].
- [0071] 4 개의 연결된 펩티드를 포함하는 종양 신생 항원 컨스트럭트의 구조는 다음과 같을 수 있다 :
- [0072] - [에피토프 서열 1] - [링커 모이어티] - [에피토프 서열 2] - [링커 모이어티] - [에피토프 서열 3] - [링커 모이어티] - [에피토프 서열 4].
- [0073] 5 개의 연결된 펩티드를 포함하는 종양 신생 항원 컨스트럭트의 구조는 다음과 같을 수 있다 :
- [0074] - [에피토프 서열 1] - [링커 모이어티] - [에피토프 서열 2] - [링커 모이어티] - [에피토프 서열 3] - [링커 모이어티] - [에피토프 서열 5].
- [0075] n 개의 연결된 펩티드를 포함하는 종양 신생 항원 컨스트럭트의 구조는 다음과 같을 수 있다 :
- [0076] - [에피토프 서열 1] - [링커 모이어티] - [에피토프 서열 2] - [링커 모이어티] - [에피토프 서열 3]... .. - [링커 모이어티] - [에피토프 서열 n].
- [0077] 바람직한 구체예에서, 종양 신생 항원 컨스트럭트의 각 펩티드는 5 내지 50 개의 아미노산,보다 바람직하게는 5 내지 30 개의 아미노산,보다 바람직하게는 8 내지 30 개의 아미노산, 가장 바람직하게는 10 내지 25 개의 아미노산, 예를 들어 10, 11을 포함하고, 또는 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 또는 25 개 아미노산을 포함한다. 하나의 특히 바람직한 구체예에서, 종양 신생 항원 컨스트럭트의 각각의 펩티드는 17 내지 25 개의 아미노산을 포함하고, 예를 들어 돌연변이 아미노산 + C- 말단 및 N- 돌연변이 아미노산의 말단에 8 내지 12 개의 아미노산(바람직하게는 10 개의 아미노산)을 포함한다.
- [0078] 입자가 둘 이상의 종양 신생 항원 컨스트럭트와 관련되는 구체예에서, 각각의 종양 신생 항원 컨스트럭트는 동일한 폴리펩티드 서열을 갖거나 상이한 폴리펩티드 서열을 가질 수 있다. 예를 들어, 제 1 종양 신생 항원 컨스트럭트는 하나 이상의 공유결합으로 연결된 펩티드(예를 들어, 하나 이상의 신생 항원 에피토프)를 포함 할 수 있고, 제 2 종양 신생 항원 컨스트럭트는 하나 이상의 상이한 공유결합으로 연결된 펩티드(예를 들어, 하나 이상의 상이한 제 1 종양 신생 항원 컨스트럭트의 신생 항원 에피토프에 대한 신생 항원 에피토프)를 포함 할 수 있다.
- [0079] 종양 신생 항원 컨스트럭트는 20 개 이상의 아미노산,보다 바람직하게는 30 개 이상의 아미노산,보다 바람직하게는 40 개 이상의 아미노산,보다 바람직하게는 50 개 이상의 아미노산, 더욱 더 바람직하게는 60 개의 아미노산을 포함 할 수 있다. 종양 신생 항원 컨스트럭트는 150 개 미만의 아미노산, 바람직하게는 130 개 미만의 아미노산,보다 바람직하게는 100 개 미만의 아미노산, 더욱 더 바람직하게는 85 개 미만의 아미노산, 및 더욱 더 바람직하게는 75 개 미만의 아미노산을 포함할 수 있다.
- [0080] 본 발명은 하나 이상의 종양 신생 항원 컨스트럭트가 입자와 관련 될 수 있게 한다. 종양 신생 항원 컨스트럭트는 하나 이상의 신생 항원 에피토프를 포함 할 수 있다. 입자에 여러 개의 신생 항원 에피토프를 사용하면 항암 T 세포가 증식 될 가능성이 높아집니다. APC에 의해 제시된 단편보다 더 큰 항원 폴리펩티드는 또한 각각의 항원의 다양한 에피토프가 제시 될 것을 보장한다.
- [0081] 본 발명은 단일 종양 신생 항원 컨스트럭트가 주어진 입자와 관련되거나, 또는 하나 이상의 상이한 신생 항원 컨스트럭트가 주어진 입자와 관련 될 수 있게 한다. 동일한 종양 신생 항원 컨스트럭트 또는 컨스트럭트와 관련된 입자는 동일한 입자 종으로 간주된다. 상이한 종양 신생 항원 컨스트럭트 또는 컨스트럭트와 관련된 입자는 상이한 입자 종인 것으로 간주된다.
- [0082] 일반적으로, 100 내지 1×10^9 , 예를 들어 100 내지 1×10^8 , 예를 들어 100 내지 1×10^7 입자가 소정의 증식 실행, 예를 들어 1000 내지 1×10^7 입자에 사용된다. 예를 들어, 입자 농도 대 APC 세포 농도의 비는 1000 : 1 내지 1:10의 범위이다. 입자의 크기에 따라 비율을 최적화 할 수 있다. 예를 들어, $1 \mu\text{m}$ 단면의 입자의 경우, 비는 50 : 1 내지 2 : 1, 예를 들어 25 : 1 내지 5 : 1, 예를 들어 15 : 1 내지 7 : 1, 예를 들어 10 : 1 일 수 있다.
- [0083] 입자는 균질 한 집단 일 수 있으며, 즉 모든 입자는 동일한 입자 종이다. 대안적으로, 입자는 이종 집단 일 수 있으며, 즉 입자 집단은 하나 이상의 입자 종을 포함한다. 예를 들어, 단계 a)는 추가로, 밀접하게 연관된 하나 이상의 종양 신생 항원 컨스트럭트를 갖는 제 2 종의 포식 작용성 입자를 제공하는 단계를 포함 할 수 있으며, 여기서 종양 신생 항원 컨스트럭트는 공지되거나 의심되는 하나 이상의 돌연변이 아미노산을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다 대상체에서 암, 또는 대상체에서 암 세포에서 발현되는 것으로 알려지거나 의심되는 돌연변이

또는 비 돌연변이 아미노산 서열과 관련되고, 종양 신생 항원 컨스트럭트의 서열은 제 2 입자는 제 1 입자와 관련된 종양 신생 항원 컨스트럭트(들)의 서열과 상이하다. 선택적으로 제 3, 및 선택적으로 제 4, 및 선택적으로 제 5, 및 선택적으로 제 6, 및 선택적으로 제 7, 및 선택적으로 제 8 및 선택적으로 제 8 및 선택적으로 n 번째 (여기서, n은 50 이하의 임의의 정수일 수 있음)종의 포식 작용성 입자 또는 n 번째 입자 종과 관련된 종양 신생 항원 컨스트럭트(들)의 서열은 다른 종의 입자가 제공 될 수 있으며, 이들 각각은 상기 종양 신생 항원 컨스트럭트는 대상체에서 암과 관련이 알려져 있거나 의심되는 하나 이상의 돌연변이 아미노산, 또는 변이 또는 비 돌연변이 아미노산을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 하나 이상의 종양 신생 항원 컨스트럭트 대상체에서 암 세포에서 발현되는 것으로 알려지거나 의심되는 서열을 포함한다.

[0084] 입자는 균질 한 집단 일 수 있으며, 즉 모든 입자는 동일한 입자 종이다. 대안적으로, 입자는 이종 집단 일 수 있으며, 즉 입자 집단은 하나 이상의 입자 종을 포함한다. 예를 들어, 단계 a)는 추가로, 밀접하게 연관된 하나 이상의 종양 신생 항원 컨스트럭트를 갖는 제 2 종의 포식 작용성 입자를 제공하는 단계를 포함 할 수 있으며, 여기서 종양 신생 항원 컨스트럭트는 공지되거나 의심되는 하나 이상의 돌연변이 아미노산을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다 대상체에서 암, 또는 대상체에서 암 세포에서 발현되는 것으로 알려지거나 의심되는 돌연변이 또는 비 돌연변이 아미노산 서열과 관련되고, 종양 신생 항원 컨스트럭트의 서열은 제 2 입자는 제 1 입자와 관련된 종양 신생 항원 컨스트럭트(들)의 서열과 상이하다. 선택적으로 제 3, 및 선택적으로 제 4, 및 선택적으로 제 5, 및 선택적으로 제 6, 및 선택적으로 제 7, 및 선택적으로 제 8 및 선택적으로 제 8 및 선택적으로 n 번째 (여기서, n은 50 이하의 임의의 정수일 수 있음)종의 포식 작용성 입자 또는 n 번째 입자 종과 관련된 종양 신생 항원 컨스트럭트(들)의 서열은 다른 종의 입자가 제공 될 수 있으며, 이들 각각은 상기 종양 신생 항원 컨스트럭트는 대상체에서 암과 관련이 알려져 있거나 의심되는 하나 이상의 돌연변이 아미노산, 또는 변이 또는 비 돌연변이 아미노산을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 하나 이상의 종양 신생 항원 컨스트럭트 대상체에서 암 세포에서 발현되는 것으로 알려지거나 의심되는 서열을 포함한다.

[0085] 추가 입자 유형, 예를 들어 3 종 이상의 입자(예를 들어, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 25, 30, 40 또는 50)가 사용될 수도 있다. 바람직하게는, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12 개의 입자 종이 사용될 수 있고, 보다 바람직하게는 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8 개의 입자 종이 사용될 수 있다 사용된다(예 : 4, 5 또는 6 입자 유형). 하나 이상의 입자 종이 사용되는 구체예에서, 각각의 입자 종은 다른 입자 종과 관련된 종양 신생 항원 컨스트럭트(들)과 상이한 서열을 갖는 그것과 관련된 종양 신생 항원 컨스트럭트(들)을 갖는다(예를 들어, 각각의 입자 종은 다른 입자 종과 관련된 종양 신생 항원 컨스트럭트(들)과 비교하여 하나 이상의 상이한 신생 항원 에피토프를 포함하는 종양 신생 항원 컨스트럭트(들); 바람직하게는 각각의 입자 종은 모든 상이한 신생 항원 에피토프를 갖는 이와 관련된 종양 신생 항원 컨스트럭트(들)(다른 입자 종과 관련된 종양 신생 항원 컨스트럭트(들)과 비교)을 갖는다. 하나 이상의 입자 종이 사용되는 구체예에서, 각각의 입자상의 종양 신생 항원 컨스트럭트는 상기 한 바와 같은 하나 이상의 신생 항원 에피토프를 포함하는 상기 한 바와 같은 컨스트럭트가다. 바람직하게는 각각의 입자 종과 관련된 종양 신생 항원 컨스트럭트는 2 개 이상의 공유결합으로 연결된 펩티드, 보다 바람직하게는 3 개 이상의 공유결합으로 연결된 펩티드(예를 들어, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 개의 공유결합으로 연결된 펩티드, 바람직하게는 3 개, 4 개, 5 개 또는 6 개의 공유결합으로 연결된 펩티드, 및 보다 바람직하게는 3 개, 4 개 또는 5 개의 공유결합으로 연결된 펩티드), 각각의 펩티드는 암과 관련이 있거나 알려진 것으로 의심되는 하나 이상의 돌연변이 아미노산을 포함하는 아미노산 서열을 포함 한다(보다 바람직하게는 각각 신생 항원 에피토프 임). 바람직하게는, 연결된 펩티드는 각각 스페이서 부분을 통해 연결된다. 각각의 링커 모이어티는 동일하거나 상이 할 수 있다.

[0086] 가장 바람직하게는, 각각의 입자 종과 관련된 종양 신생 항원 컨스트럭트는 3 개의 공유 적으로 연결된 펩티드를 가지며, 각각은 대상체에서 암과 관련이있는 것으로 알려져 있거나 의심되는 하나 이상의 돌연변이 아미노산을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다(보다 바람직하게는 각각 신생 항원 에피토프 임). 이러한 구체예에서, 바람직하게는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12 개의 입자 종이 사용되며,보다 바람직하게는 4, 5 또는 6, 더욱더 바람직하게는 5이다.

[0087] APC에 의한 항원의 분해는 균일 한 과정이 아니다. 이는 각각의 항원의 다양한 에피토프가 제시되도록 보장한다. 따라서, 종양 신생 항원 컨스트럭트가 APC에 의해 분해 될 때, 이는 제시 될 다양한 에피토프를 추가로 증가시킨다. APC의 포식 작용 경로를 이용하고, 하나 이상의 신생 항원 에피토프를 갖는 각각의 종양 신생 항원 컨스트럭트의 가능성 및 입자 상에 하나 이상의 종양 신생 항원 컨스트럭트를 사용할 수 있는 가능성과 조합하여, T-세포의 개선 된 증식이 달성된다. 더 많은 수의 항 종양 T-세포에 대한 에피토프를 제공 할 가능성이 증가하기 때문이다.

- [0088] 신생 항원 컨스트럭트의 대상체에서 암과 관련되거나 알려지거나 의심되는 적어도 하나의 돌연변이 아미노산을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 펩티드는 대상체의 종양에 존재하는 것으로 알려진 돌연변이 된 서열일 수 있다. 예를 들어, 돌연변이 데이터(전체 엑솜 및 핫스팟 분석 둘 다)또는 암 유형의 항원 프로파일이 알려져있을 수 있으며; 예를 들어 COSMIC 데이터베이스(<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>에서 액세스 가능)와 같은 특정 암의 돌연변이 데이터 프로파일이 데이터베이스에 포함되어 있다. 항원 프로파일에서 돌연변이 된 항원이 표적화 될 수 있으며, 즉 종양 신생 항원 컨스트럭트에서 하나 이상의 펩티드는 항원 프로파일에서 하나 이상의 돌연변이 아미노산 서열을 포함하는 아미노산 서열을 갖도록 설계 될 수 있다.
- [0089] 종양 신생 항원 컨스트럭트의 대상체에서 암과 관련되거나 알려지거나 의심되는 하나 이상의 돌연변이 아미노산을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 펩티드는 종양 또는 조직에 의해 발현되는 것으로 알려진 서열 일 수 있다. 종양이 존재한다. 이와 같이, 특정 암 또는 암이 위치한 특정 조직 또는 기관에 특이적인 항원이 선택 될 수 있다. 제한된 조직 또는 기관에서 발현되는 단백질/펩티드에 관한 정보를 제공하는 EBI 발현 아틀라스(<https://www.ebi.ac.uk/gxa/home>)와 같은 데이터베이스가 이용 가능하다. 특정 조직에서 발현 된 단백질에 고유 한 펩티드가 표적화 될 수 있다.
- [0090] 대안적으로(또는 추가로)암의 암 세포의 DNA 서열이 확립 될 수 있고, 따라서 암 세포의 돌연변이가 추론된다. 이어서, 돌연변이 된 서열이 표적화 될 수 있으며, 즉 종양 신생 항원 컨스트럭트에서 하나 이상의 펩티드는 암 세포에서 돌연변이 아미노산 서열을 포함하는 아미노산 서열을 갖도록 설계 될 수 있다.
- [0091] 바람직한 특정 실시 양태에서, T-세포 샘플은 치료를받는 대상체로부터 유래하고, 각각의 종양 신생 항원 컨스트럭트의 하나 이상의 펩티드의 서열은 대상체로부터 유래되고(특히, 종양 항원 프로파일 및/또는 DNA 서열로부터 유래 됨)대상의 암 세포). 바람직하게는 APC는 또한 대상체로부터 온 것이다. 다른 실시 형태에서, T-세포 샘플은 대상체로부터의 것일 수 있고, 대상체로부터의 APC 일 수 있고, 각각의 종양 신생 항원 컨스트럭트의 각각의 펩티드의 서열은 암에 대해 동일한 종에 대해 돌연변이 된 서열의 라이브러리로부터 유래 될 수 있다.
- [0092] 항원 제시 세포(APC)및 T 세포 샘플
- [0093] 본 발명의 맥락에서, APC는 단핵구/대 식세포 또는 수지상 세포와 같은 전문 항원 제시 세포이다. APC는 일차 세포 또는 불멸화 세포 일 수 있다. 바람직하게는 항원 제시 세포는 식세포이며, 더욱 바람직하게는 단핵구 또는 수지상 세포이다.
- [0094] APC는 T-세포가 반응할 수 있는 항원-특이적 맥락(MHC 제한)으로 T-세포에 항원을 제시 할 수 있도록 T-세포 샘플의 T-세포와 호환 가능해야한다. APC 및 T-세포 샘플은 바람직하게는 동일한 종으로부터 획득되고 MHC 수용체와 관련하여 공여체 매칭된다. 그러나, 다른 종으로부터의 유전자 조작 된 APC의 사용이 또한 예상된다. 보다 바람직하게는 APC 및 T-세포 샘플은 동일한 대상체로부터 획득된다. 항원-제시 세포 및 T-세포 샘플이 동일한 대상체로부터 유래 된 경우, APC와 T-세포 사이의 불일치 가능성이 회피된다.
- [0095] 항원-제시 세포 및 T-세포 샘플은 동일한 혈액 샘플로부터 유래 될 수 있으며, 이는 실제적인 관점에서 유리하다. 항원-제시 세포 및 T-세포 샘플은 동일한 대상체로부터의 PBMC- 샘플로부터 유래 될 수 있다. 말초 혈액 샘플에서 PBMC를 얻는 것은 일상적인 프로토콜이며 APC와 T-세포 모두에 대해 동일한 대상에서 편리한 소스를 제공한다.
- [0096] PBMC 샘플은 새로 사용되거나 동결 될 수 있다. 냉동 된 세포를 사용할 가능성은 물류 관점에서 실질적인 이점이 있다.
- [0097] T-세포 샘플은 종양, 바람직하게는 종양의 림프관으로부터 유래 될 수 있다. 훨씬 더 바람직하게는 T-세포 샘플은 센티넬 노드(즉, 종양 배출 림프절)로부터 유래 될 수 있다.
- [0098] T-세포 샘플은 CD4 + 및 CD8 + T-세포, 정제 된 T-세포 집단 또는(a)특정 T-세포 집단(들)이 고갈 된 PBMC를 포함하는 전체 PBMC를 포함 할 수 있다. 바람직하게는 T-세포 샘플은 CD4 + 및 CD8 + T-세포 둘 다를 포함한다.
- [0099] 바람직하게는, 본 발명의 방법에서 증식 된 항 종양 T-세포는 CD4 + 헬퍼 및/또는 CD8 + T-세포이다. 항 종양 CD4 + 헬퍼 T-세포는 항 종양 반응을 조정할 수 있다. CD8 + T-세포는 종양을 공격 할 수 있다. 따라서 혼합 된 T-세포 반응이 유리할 수 있다. 본원에 기재된 실시예에는 본 발명의 방법에서 증식 된 항-종양 T-세포의 대부분이 CD4 + 헬퍼 세포이다.
- [0100] 방법 단계의 세부 사항

- [0101] 본 발명은 항 종양 T-세포의 증식 방법을 제공한다. 본 발명의 방법은 시험관 내(in vitro)에서 수행된다. 바람직하게는 대상은 포유 동물, 보다 바람직하게는 인간이다. 단계(e)는 바람직하게는 1 일 내지 8 주, 바람직하게는 3 일 내지 8 주, 바람직하게는 1 주 내지 6 주, 더욱 바람직하게는 1 주 내지 4 주 지속된다. 본 발명의 방법은 단계(a)전에 단계(a'): 포식 작용 가능한 입자를 제공하고 하나 이상의 종양 신생 항원 컨스트럭트를 포식 작용 가능한 입자에 단단히 연관시키는 단계를 추가로 포함 할 수 있다.
- [0102] 본 발명의 방법의 한 실시 양태에서, 밀접하게 관련된 하나 이상의 종양 신생 항원 컨스트럭트를 갖는 입자, 항원 제시 세포 및 T-세포 샘플은 동일한 용기에서 동시에 접촉 될 수 있다. 다른 실시 형태에서, 하나 이상의 종양 신생 항원 컨스트럭트가 이와 밀접하게 연관되어 있고, 항원 제시 세포가 먼저 접촉 된 후 T-세포 샘플이 첨가된다. 다른 실시 형태에서, 항원 제시 세포 및 T-세포 샘플은 단일 샘플 내에 있고, 밀접하게 연관된 하나 이상의 종양 신생 항원 컨스트럭트를 갖는 입자가 T-세포/항원 제시 세포 샘플에 첨가된다.
- [0103] 본 발명의 방법의 한 실시 양태에서, T-세포 샘플을 입자와 접촉 된 항원-제시 세포와 접촉시키는 단계(g)는, 예를 들어 더 큰 용량의 IL-2를 T-세포 샘플에 첨가하는 것을 추가로 포함한다. 1.25 U/ml 초과(예를 들어 1.25 U/ml, 2.5 U/ml, 5 U/ml 또는 50 U/ml), 바람직하게는 2.5 U/ml, 5 U/ml 또는 50 U/ml 초과. 항원 특이적 T-세포 증식은 IL-2가 동시에 존재할 때 항원-제시 세포의 존재에서 발생한다. IL-2는 T-세포의 효과기 T-세포 및 기억 T-세포로의 분화를 촉진한다. 항원 특이적 T-세포의 증식 후, 항원-제시 세포는 예를 들어 자기 분리에 의해 증식 된 T-세포 집단으로부터 제거 될 수 있다.
- [0104] 본 발명의 방법의 다른 실시 양태에서, 입자와 접촉 된 항원-제시 세포와 T-세포 샘플을 접촉시키는 단계(g)는 IL-2 및/또는 IL-7 및/또는 IL-15는 T-세포 샘플에 대해, 예를 들어 1.25 U/ml보다 큰(예를 들어 1.25 U/ml, 2.5 U/ml, 5 U/ml), T-세포 샘플에 저용량의 IL-2를, 또는 IL-7 및/또는 IL-15의 선택적인 첨가와 함께 50 U/ml), 바람직하게는 2.5 U/ml 초과, 5 U/ml 또는 50 U/ml의 IL-2이 첨가와 함께 수행될 수 있다.
- [0105] 본 발명의 방법의 한 실시 양태에서, 각각의 단계(즉, 단계(a)내지(e)에서, 및 존재하는 경우 임의의 추가 단계에서)에는 항 -CD3 항체 및/또는 항 -CD28 항체가 없다 모든 단계에서 추가된다. 특히, 단계(d)또는(e)동안(또는 존재하는 경우 단계(e1), (f), (g)또는(h))동안 항 -CD3 항체 및/또는 항 -CD28 항체는 첨가되지 않는다. 본 발명의 방법의 한 실시 양태에서, 각각의 단계(즉, 단계(a)내지(e), 및 존재하는 경우 임의의 추가 단계)에서, 각 단계의 조건은 항 -CD3 항체 및/또는 항 -CD28 항체가 없다. 특히, 단계(d)및(e)에서, 존재하는 경우, 단계(e1), (f), (g)또는(h)에서 각각의 단계에서 T-세포 샘플은 항-CD3 항체 및/또는 항 -CD28 항체. 항 -CD3 항체 및 항 -CD28 항체는 T-세포를 무차별 적으로 자극하여 관심 항원에 특이적이 지 않은 T-세포 및 다른 T-세포의 증식을 유발할 수 있다.
- [0106] 본 발명의 바람직한 구체예에서, 상기 방법은 단계(e)동안 또는 후에(또는 단계(e1))동안 항원 특이적 T-세포를 분리 또는 분리하는 단계를 포함하지 않는다. 보다 구체적으로, 활성화되지 않은 T-세포 샘플의 T-세포로부터 T-세포 샘플의 항원-제시 세포에 의해 제시된 항원에 반응하여 활성화 된 T-세포를 분리 또는 분리하는 단계가 없다. 이는 본 발명의 방법이 제시된 항원에 특이적인 필요한 T-세포의 증식으로 이어지기 때문이다. 본 발명의 방법의 단계(e)에서 T-세포 샘플에서 항원-제시 세포에 의해 제시된 항원에 반응하여 활성화되지 않은 T-세포는 공정 동안 죽을 것이다. 따라서 분리 또는 분리 단계가 필요하지 않다.
- [0107] 세척
- [0108] 바람직하게는 T-세포 샘플을 관련된 펩티드를 갖는 입자와 접촉 된 항원-제시 세포와 접촉시키는 단계의 조건은 무균, 더욱 바람직하게는 무균이다. 입자의 사용은 관련된 펩티드를 갖는 입자의 멸균을 가능하게 하고, 보다 특히 거친 살균 조건의 사용을 허용하여, 입자와 관련된 신생 항원 컨스트럭트의 손실 또는 파괴없이 모든 병원체를 제거 할 수 있다.
- [0109] 이와 같이, 특정 바람직한 실시 양태에서, 본 발명의 방법은 단계(a)전(및 해당되는 경우 단계(a')후):(a') 입자와 밀접하게 관련된 종양 신생 항원 컨스트럭트를 처리하는 단계를 포함 할 수 있다. 피험자에게 해로운 물질을 제거하는 살균 세척. 살균 세척은 변성 세척 일 수도 있다.
- [0110] 특정 바람직한 구체예에서, 본 발명의 방법은 또한 단계(a)전(및 해당되는 경우 단계(a')후):(a') 입자와 밀접하게 관련된 종양 신생 항원 컨스트럭트를 변성 세척은 후속 단계(즉, 단계(a)내지(e)를 방해하지 않거나 존재하는 단계(a)내지(f);(a)내지(g)또는(a)를 방해하지 않을 정도로 낮은 내 독소 수준을 초래 함)(h))를 포함 할 수 있다.

- [0111] 단계(a'')및/또는 단계(a''')를 포함하는 이러한 구체예에서, 살균 세척 또는 변성 세척은 관련된 폴리펩티드 컨스트럭트(들)을 갖는 입자에 높은 pH, 예를 들어 적어도 pH를 적용하는 것을 포함 할 수 있다 12, 바람직하게는 pH 13 이상, 더욱 바람직하게는 pH 14 이상, 가장 바람직하게는 pH 14.3 이상이다. 대안적으로, 변성 세척은 관련된 폴리펩티드 컨스트럭트(들)을 갖는 입자를 낮은 pH, 예를 들어 pH 3 미만,보다 바람직하게는 pH 2 미만, 가장 바람직하게는 pH 1 미만으로 처리하는 것을 포함 할 수 있다.
- [0112] 단계(a'')및/또는 단계(a''')를 포함하는 이러한 구체예에서, 멸균 세척 또는 변성 세척은 추가로 또는 대안적으로 관련 폴리펩티드 컨스트럭트를 갖는 입자에 90 이상 이상의 고온을 가하는 것을 포함 할 수 있다. °C, 바람직하게는 92 °C 이상, 더욱 바람직하게는 95 °C 이상, 예를 들어 100 °C 이상 또는 110 °C 이상이다. 살균 세척 또는 변성 세척은 또한 부가 적으로 또는 대안적으로 관련 폴리펩티드 컨스트럭트를 갖는 입자를 변성제, 예컨대 우레아 또는 구아니딘 히드로 클로라이드에 충분한 농도, 예컨대 5M, 6M, 7M 또는 8M로 처리하는 것을 포함 할 수 있다.
- [0113] 살균 세척은 입자 및 관련 폴리펩티드 컨스트럭트를 알칼리, 바람직하게는 강 알칼리, 예를 들어 0.1M, 0.5M, 1M, 2M, 3M, 4M, 5M, 6M, 7M 또는 8M 알칼리에 노출시키는 것을 포함 할 수 있다. 특정 바람직한 구체예에서, 살균 세척은 입자 및 관련 폴리펩티드 컨스트럭트를 1M 이상의 수산화 나트륨(NaOH), 바람직하게는 2M 이상의 NaOH에 적용시키는 것을 포함 할 수 있다. 사용될 수 있는 다른 알칼리는 수산화 리튬(LiOH), 수산화 칼륨(KOH), 수산화 루비듐(RbOH), 수산화 세슘(CsOH), 수산화 마그네슘(Mg(OH)₂), 칼슘 수산화물(Ca(OH)₂), 수산화 스트론튬(Sr(OH)₂)및 수산화 바륨(Ba(OH)₂)을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다.
- [0114] 살균 세척은 입자 및 관련 폴리펩티드 컨스트럭트를 산, 바람직하게는 강산, 예를 들어 0.1M, 0.5M, 1M, 2M, 3M, 4M, 5M, 6M, 7M 또는 8M 산에 노출시키는 것을 포함 할 수 있다. 특정 바람직한 구체예에서, 살균 세척은 입자 및 관련 폴리펩티드 컨스트럭트를 1M 이상의 염산(HCl), 바람직하게는 2M 이상의 HCl에 노출시키는 것을 포함 할 수 있다. 사용될 수 있는 다른 산은 히드로 요오드 산(HI), 브롬화 수소산(HBr), 과염소산(HClO₄), 질산(HNO₃)및 황산(H₂SO₄)을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다.
- [0115] 바람직한 구체예에서, 살균 세척은 입자 및 관련 폴리펩티드 컨스트럭트가 무균 상태이고, 더욱 바람직하게는 입자 및 관련 폴리펩티드 컨스트럭트는 멸균 상태가된다. 본원에 정의 된 바와 같이 질병을 유발하는 박테리아 또는 다른 살아있는 미생물이없는 것으로 규정되어있다. 멸균은 본원에서 박테리아 또는 다른 살아있는 미생물이없는 것으로 정의된다.
- [0116] 바람직한 구체예에서, 변성 세척은 내 독소의 최종 농도에서 100 pg/ml 미만, 바람직하게는 50 pg/ml 미만,보다 바람직하게는 25 pg/ml 미만, 가장 바람직하게는 10 pg/ml 미만이 되도록 내 독소 양을 초래한다.
- [0117] 제제가 생존 미생물로 오염되면 세포 배양의 후속 단계가 손상 될 수 있다. 이와 같이, 본 발명의 바람직한 방법에서, 단계(a)의 관련 폴리펩티드 컨스트럭트를 갖는 입자는 멸균 세척을 거쳐 후속 단계를 방해하지 않을 정도로 미생물 및 내 독소 수준이 낮아진다.
- [0118] 살균 세척의 특정 방식은 본 발명의 맥락에서 중요하지 않다. 예를 들어, 살균 세척은 입자 및 관련 폴리펩티드 컨스트럭트를 높은 pH, 낮은 pH, 높은 온도, 멸균/변성제 또는 이들의 조합에 적용시키는 것을 포함 할 수 있다. 바람직하게는, 살균 세척은 입자 및 관련 폴리펩티드 컨스트럭트를 높은 pH 또는 8M 우레아 또는 6M 구아니딘 -HCl과 같은 강한 입체화/변성제에 노출시키는 것을 포함한다. 가장 바람직하게는, 살균 세척은 입자 및 관련 폴리펩티드 컨스트럭트를 13.0 이상,보다 바람직하게는 14.0 이상, 가장 바람직하게는 14.3 이상의 높은 pH에 노출시키는 것을 포함한다. 바람직하게는, 변성은 입자 및 관련 폴리펩티드 컨스트럭트를 1-5M, 바람직하게는 1-3M,보다 바람직하게는 1.5-2.5M, 가장 바람직하게는 2M 강한 알칼리, 예컨대 NaOH 또는 KOH, 바람직하게는 NaOH로 세척하는 것을 포함 할 수 있다.
- [0119] 살균 세척의 특별한 이점은 입자 및 관련 폴리펩티드 컨스트럭트를 갖는 제제가 단일 단계에서 멸균 및 변성되도록 조건이 선택 될 수 있다는 것이다. 특히, 높은 pH 세척(예 : pH> 14)은 제제를 편리하고 동시에 신속하게 살균하고 내 독소를 제거하는데 효과적인 변성 세척을 달성 할 수 있다.
- [0120] 살균 세척은 단일 세척 또는 여러 반복 세척, 예컨대 2, 3, 4 또는 5 세척을 포함 할 수 있다. 변성 세척은 단일 세척 또는 여러 반복 세척, 예컨대 2, 3, 4 또는 5 세척을 포함 할 수 있다.
- [0121] T-세포 활성화 정도 결정
- [0122] 단계(e)후에, 본 발명의 방법은 단계(f)를 추가로 포함 할 수 있다 : 예를 들어, 항-종양 T-세포 활성화 정도를

비교함으로써 T-세포 샘플에서 항-종양 T-세포 활성화 정도를 결정하는 단계 관련 기준을 참조하면, 기준과 비교하여 샘플에서 더 높은 정도의 항-종양 T-세포 활성화는 하나 이상의 종양 신생 항원 결정자가 샘플에서 항-종양 T-세포 활성화를 초래한다는 결론을 나타낸다. T-세포 샘플에서 항-종양 T-세포 활성화 정도를 결정하는 것은 샘플에서 활성화 된 T-세포의 분율을 결정하는 것을 포함 할 수 있다. T-세포 샘플에서 항-종양 T-세포 활성화의 정도를 결정하는 것은 ELISpot 또는 FluoroSpot 기술을 사용하여 수행 될 수 있다.

[0123] 상기 방법은 T-세포 활성화 정도를 관련 기준과 비교하는 단계를 포함 할 수 있으며, 이로써 기준과 비교하여 샘플에서 더 높은 정도의 T-세포 활성화는 후보 항원이 항원-특이적 T를 초래한다는 결론을 초래한다 샘플에서-세포 활성화. 기준은 "활성화"를 정의하는 데 중요하므로, 활성화 정도는 기준 샘플과 비교하여 바람직하게 정의된다. 기준 샘플은 예를 들어 종양 또는 종양 배출 림프절 샘플을 분석 할 때 정상 조직으로부터의 샘플 일 수 있다. 기준 샘플은 진단/예후 결론에 대한 임계 값을 설정하고 항원 특이적 양성, 즉 활성화 또는 음성, 즉 하향 조절을 결정하는데 사용된다.

[0124] T-세포 샘플에서 T-세포 활성화의 정도를 결정하는 것은 샘플에서 활성화 된 T-세포의 분율, 즉 샘플 내의 총 T-세포에 대한 활성화 된 T-세포의 수를 결정하는 것을 포함 할 수 있다. 기준 샘플에서 활성화 된 세포의 분율과 관련된 활성화 된 세포의 분율은 T-세포 활성화의 크기의 척도를 제공 할 것이다. 바람직하게는, 각각의 분석에서, 개별 샘플에서의 자발적 활성화 수준("백그라운드 활성화 수준")은 항원없이 배양 된 샘플, 즉 음성 대조군에서 결정된다. 백그라운드 활성화는 분석에서 보상 될 수 있다; 다시 말해서, 활성화 분율은 음성 대조군에 대한 활성화 분율을 뺀 순 값에 대해 계산 될 수 있다.

[0125] ELISpot, Fluorospot, 유세포 분석법을 사용한 사이토카인의 세포 내 염색, FASCIA, 증식 분석(예 : 티미 딘 혼입, CFSE 또는 BrdU 염색), MHC-I에 의한 특이적 TCR- 검출 또는 II 사량 체, 및 분비 된 사이토카인의 ELISA- 또는 루미 넥스 분석을 포함하여 항원-특이적 T-세포 활성화를 결정하는데 적합한 몇몇 방법이 존재한다.

[0126] ELISpot 기술을 사용하면, 자극에 대한 반응으로 세포에 의한 특정 사이토카인의 방출을 직접 검출한다. 세포를 막에 시딩하고 사이토카인 분비 세포의 수를 측정한다. 어떤 사이토카인이 측정되는지에 따라, 대 식세포 또는 T-세포 활성화와 같은 다른 변수가 측정 될 수 있다. FluoroSpot은 ELISpot 기술을 기반으로하며 여러 다른 분비 된 사이토카인을 동시에 읽을 수 있다. 이것은 세포 활성화의보다 정확하고 미묘한 추정을 가능하게한다. 이 두 가지 방법 모두 T 세포 활성화를 빠르고 쉽게 측정 할 수 있는 방법을 제공한다. 바람직하게는, T-세포 샘플에서 T-세포 활성화의 정도를 결정하는 것은 ELISpot/FluoroSpot 기술 또는 증식 분석(즉, 티미 딘 혼입)을 사용하여 수행 될 수 있다. T-세포 샘플에서 T-세포 활성화 정도를 결정하는 단계는 인터페론 감마(IFN- γ), 인터루킨 17(IL-17)의 분비에 의해 반응하는 항원-제시 세포와 접촉 된 T-세포의 분율을 결정하는 단계를 포함 할 수 있고, 인터루킨 22(IL-22)또는 이들의 조합, 예를 들어 ELISpot 또는 FluoroSpot 분석을 통해. 다른 관련 분석 물(사이토카인의 조합)을 사용하여 T-reg 사이토카인과 같은 특정 질병이나 상태를 분석 할 수 있다.

[0127] 선택적 추가 활성화 단계

[0128] 본 발명의 특정 실시 양태에서, 방법은 단계(e)후(예를 들어 단계(e)직후 또는 단계(f)직후 또는 단계(g)직후; 바람직하게는 단계(e)직후)를 추가로 포함한다. 또는 단계(f)직후):

[0129] e1)항원-제시 세포에 의해 제시된 항원에 반응하여 항 종양 T-세포의 특이적 활성화를 허용하는 조건 하에서 시험관 내(in vitro)에서 제 2 입자와 접촉 된 제 2 항원-제시 세포와 T-세포 샘플을 접촉시키는 단계.

[0130] 단계(e1)은 유리하게는 T-세포의 제 2 라운드의 활성화 및 자극("재 자극")으로서 작용한다. 따라서, 단계(e1)은 "재 자극"단계로 지칭 될 수 있다. 단계(e1)은 예를 들어 1 내지 4 주 지속될 수 있고,보다 바람직하게는 2 내지 3 주 지속될 수 있다.

[0131] 바람직하게는, 본 발명의 특정 구체예에서, 방법은 단계(e)후(예를 들어 단계(e)직후, 또는 단계(f)직후 또는 단계(g)직후); 바람직하게는 단계 직후(e)또는 단계(f)직후

[0132] a1)밀접하게 연관된 하나 이상의 종양 신생 항원 컨스트럭트를 갖는 제 2 포식 세포 성 입자를 제공하며, 여기서 종양 신생 항원 컨스트럭트는 대상체에서 암과 관련되거나 알려져있는 것으로 의심되는 적어도 하나의 돌연변이 아미노산을 포함하는 아미노산 서열을 포함하고, 또는 대상체에서 암 세포에서 발현되는 것으로 알려지거나 의심되는 돌연변이 또는 비 돌연변이 아미노산 서열;

[0133] b1)제 2 생존 가능한 항원-제시 세포를 제공하는 단계;

[0134] c1)항원-제시 세포에 의한 입자의 포식 작용을 허용하는 조건 하에서 시험관 내(in vitro)에서 제 2 입자를 제

2 항원-제시 세포와 접촉시키는 단계; 및

- [0135] e1)항원-제시 세포에 의해 제시된 항원에 반응하여 항 종양 T-세포의 특이적 활성화를 허용하는 조건 하에서 시험관 내(in vitro)에서 제 2 입자와 접촉된 제 2 항원-제시 세포와 T-세포 샘플을 접촉시키는 단계.
- [0136] 단계(e1)(또는 존재하는 경우 단계(a1)내지(e1))은 바람직하게는 T-세포 샘플의 증식 속도가 바뀔 때 단계(e)및/또는(f)및/또는(g)후에 수행된다. 바람직하게는 단계(e)는 2 내지 4 주 지속되며(단계(e)동안 T-세포 샘플의 증식 속도가 약해질 것으로 예상되는 경우), 및 단계(e1)(또는 존재하는 경우 단계(a1)내지(e1))은 단계(e)후에 수행된다.
- [0137] 단계(e1)이 단계(f)이후 인 실시 양태에서, 방법은(f1): 예를 들어 T-세포 샘플에서 항-종양 T-세포 활성화 정도를 결정하는 단계, 예를 들어 항- 관련 기준에 대한 종양 T-세포 활성화, 여기서 기준과 비교하여 샘플에서 더 높은 정도의 항-종양 T-세포 활성화는 하나 이상의 종양 신생 항원 결정 기가 항-종양 T-세포를 초래한다는 결론을 나타낸다 샘플에서 활성화.
- [0138] 단계(e1)이 단계(g)이후 인 실시 양태에서, 방법은(g1): 증식된 T-세포 샘플로부터 입자 및 항원-제시 세포를 제거하는 단계를 추가로 포함 할 수 있다.
- [0139] 이와 밀접하게 관련된 하나 이상의 종양 신생 항원 컨스트럭트를 갖는 제 2 식균 작용 입자는 단계(a)의 밀접하게 관련된 하나 이상의 종양 신생 항원 컨스트럭트를 갖는 식균 작용 입자와 동일 할 수 있거나, 상이 할 수 있다. 바람직하게는 동일하다.
- [0140] 제 2 생존 항원 제시 세포의 단계(b)의 생존 항원 제시 세포와 동일하거나 상이 할 수 있다. 바람직하게는 동일하다.
- [0141] 입자 제거
- [0142] 단계(e)후(및 적용 가능한 경우, 단계(f)및/또는(e1)후), 본 발명의 방법은 단계(g)T-세포 샘플로부터 입자를 제거하는 단계; 및/또는(h)T-세포 샘플로부터 입자 및 항원-제시 세포를 제거하는 단계.
- [0143] 입자가 상자성 또는 초상자성 입자 인 본 발명의 실시 양태에서, 유리하게는, 내재화 입자를 갖는 입자 및 임의의 항원-제시 세포는, 예를 들어 증식된 것을 확산시키기 전에 자석 또는 자기장을 사용하여 T-세포 샘플로부터 완전히 제거 될 수 있다 T-세포 샘플을 다시 대상으로. 이와 같이, 본 발명의 방법의 말미에있는 T-세포 샘플은 증식된 T-세포 및 포집 입자를 갖지 않는 임의의 항원-제시 세포만을 포함한다. 따라서, 본 발명의 특정 바람직한 구체예에서, 입자는 상자성 또는 초상자성이고, 단계(g)는 자석 또는 자기장에 의해 T-세포 샘플로부터 입자를 제거하는 단계를 포함한다. 단계(g)에서 입자의 제거는 또한 내재화 입자를 갖는 항원-제시 세포를 제거한다. 전형적으로, 내재화 된 입자를 갖는 항원-제시 세포는 입자(및 내재화 된 입자를 갖는 항원-제시 세포)가 단계(g)또는(h)에서 제거 될 때 사멸 될 것이다.
- [0144] 트리트먼트
- [0145] 본 발명의 방법은 항 종양 T-세포를 제공한다. 항 종양 T-세포는 대상체에서 암의 치료에 유용하다. 본 발명은 본 발명의 방법을 사용하여 수득된 T-세포가 대상체에게 투여되는 암의 치료 방법을 제공한다. T-세포는 단계(e)후(또는 해당되는 경우 단계(f)또는(g)후)수득된 세포이다. 증식된 T-세포는 정맥 내, 동맥 내, 척추 강내 또는 복강 내로 투여 될 수 있다.
- [0146] 암은 임의의 형태의 고형암 일 수 있다. 본 발명에 따른 고형 암은 장기에서 기원하는 비정상적인 조직 덩어리이다. 고형암은 일반적으로 낭종이나 액체 부위를 포함하지 않다. 고형암은 악성 일 수 있다. 다른 유형의 고형암은 그것들을 형성하는 세포의 유형으로 명명된다. 고형암의 유형에는 육종, 암종 및 림프종이 포함된다.
- [0147] 본 발명은 본 발명의 방법에 의해 생성된 항 종양 T-세포를 포함하는 조성물을 제공한다. 예를 들어, 조성물은 CD4 + 헬퍼 및/또는 CD8 + T-세포, 예를 들어 CD4 + 헬퍼 세포 및 CD8 + T-세포의 혼합물을 포함 할 수 있다. 예를 들어, 한 구체예에서, 혼합물은 주로 CD4 + 헬퍼 세포 및 또한 CD8 + T-세포를 포함 할 수 있다.
- [0148] 본 발명은 또한 대상체에서 암의 치료에 사용하기위한 본 발명의 방법에 의해 생성된 항 종양 T-세포를 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0149] 본 발명은 또한 본 발명의 방법에 의해 생성된 항 종양 T-세포를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서의 암 치료 방법을 제공한다.

- [0150] 본 발명은 또한 환자의 암 치료를 위한 본 발명의 방법에 의해 생성된 항 종양 T-세포의 용도를 제공한다.
- [0151] 고형암의 예로는 부신암, 항문암, 역형성 대세포 림프종, 혈관 면역 모세포 T 세포 림프종, B-세포 림프종, 담관암, 요로 방광암, 뇌/CNS 종양, 유방암, 자궁 경부암, 결장암, 자궁 내막암이 포함된다. 암, 식도암, 유방암, 안구암, 담낭암, 위장암, 위장관 간질 종양(장), 임신성 영양막 질환, 간질성 T 세포 림프종, 호지킨 림프종, 혈관 내 큰 B 세포 림프종, 신장암, 후두 및 인두암, 간암, 폐암(비소세포 및 소세포), 폐암 중 종양 림프종 육아종, 악성 중피종, 비강 및 부비동암, 비인두암, 신경모세포종, 결절 주변부 B 세포 림프종, 비호지킨 림프종, 구강 및 인두암, 골육종, 난소암, 췌장암, 음경암, 뇌하수체 종양, 프리마르 y 삼출성 림프종, 전립선암, 망막 모세포종, 횡문근육종, 타액선암, 육종, 피부암(기저 및 편평세포, 흑색종 및 메르켈 세포), 소장암, 위암, 고환암, 흉선암, 갑상선암, 자궁육종, 질암, 외음부암, 발덴스트롬 마크로 글로불린 혈증 및 윌름스 종양. 본 발명의 T-세포는 특히 고형암의 치료에 효과적이다. 이와 같이, 본 발명의 대상은 고형암을 가질 수 있다. 본 발명의 T-세포는 항문암, 방광암, 유방암, 자궁 경부암, 결장암, 간암, 폐암(비소세포 및 비암세포)으로 이루어진 군으로부터 선택된 고형암의 치료에 특히 효과적이다. 소세포), 폐암 중, 난소암, 췌장암, 음경암, 전립선암, 위암, 고환암, 자궁육종, 질암, 외음부암, 특히 유방암, 대장암, 간 치료용암, 폐암(비소세포 및 소세포), 폐 카르시노이드 종양, 췌장암, 전립선암, 난소암 및 방광암을 포함한다.
- [0152] 본 발명의 T-세포는 또한 전이성 고형암의 치료에 특히 효과적이다. 전이성암은 원발 부위에서 신체의 하나 이상의 다른 영역으로 퍼진 암이다.
- [0153] 암은 대안적으로 임의의 형태의 혈액 악성 종양일 수 있다. 본 발명에 따른 혈액 악성 종양은 골수 또는 림프계와 같은 혈액 형성 조직의 세포에서 시작되는 암의 형태이다. 많은 혈액 악성 종양에서, 정상적인 혈액 세포 발달 과정은 비정상적인 유형의 혈액 세포의 통제되지 않은 성장에 의해 중단된다. 혈액암의 예는 백혈병, 림프종, 골수종 및 골수이형성 증후군(림프종은 고형암 및 혈액 악성 종양으로 분류될 수 있음)을 포함한다.
- [0154] 혈액 악성 종양의 예에는 급성 호염기성 백혈병, 급성 호산구 백혈병, 급성 적혈구 백혈병, 급성 림프모구 백혈병, 급성 거핵모세포 백혈병, 급성 단핵구 백혈병, 성숙을 동반한 급성 골수아구성 백혈병, 성인성 급성 백혈병, 백혈병성 백혈병, 백혈병성 백혈병 T-세포 백혈병/림프종, 공격적인 NK-세포 백혈병, 역형성 큰 세포 림프종 및 형질 세포종, 혈관면모세포성 T-세포 림프종, B-세포 만성 림프구성 백혈병, B-세포 백혈병, B-세포 림프종, B-세포 전립선 백혈병, 만성 특발성 골수섬유증, 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 만성 호중구 백혈병, 골수외, 모발 세포 백혈병, 간비만 T-세포 림프종, 호지킨 림프종, 혈관 내 큰 B-세포 림프종 림프종, K-세포 림프종 백혈병, 다발성 골수종, 골수종, 결절성 B 세포 림프종, 비호지킨 림프종, 혈장 세포 백혈병, 원발성 삼출 림프종 및 발덴스트롬 마크로 글로불린 혈증을 포함한다.
- [0155] 본 발명의 T-세포는 또한 전이성 고형암의 치료에 특히 효과적이다. 전이성암은 원발 부위에서 신체의 하나 이상의 다른 영역으로 퍼진 암이다.
- [0156] 암은 대안적으로 임의의 형태의 혈액 악성 종양일 수 있다. 본 발명에 따른 혈액 악성 종양은 골수 또는 림프계와 같은 혈액 형성 조직의 세포에서 시작되는 암의 형태이다. 많은 혈액 악성 종양에서, 정상적인 혈액 세포 발달 과정은 비정상적인 유형의 혈액 세포의 통제되지 않은 성장에 의해 중단된다. 혈액암의 예는 백혈병, 림프종, 골수종 및 골수이형성 증후군(림프종은 고형암 및 혈액 악성 종양으로 분류될 수 있음)을 포함한다.
- [0157] 혈액 악성 종양의 예에는 급성 호염기성 백혈병, 급성 호산구 백혈병, 급성 적혈구 백혈병, 급성 림프모구 백혈병, 급성 거핵모세포 백혈병, 급성 단핵구 백혈병, 성숙을 동반한 급성 골수아구성 백혈병, 성인성 급성 백혈병, 백혈병성 백혈병, 백혈병성 백혈병 T-세포 백혈병/림프종, 공격적인 NK-세포 백혈병, 역형성 큰 세포 림프종 및 형질 세포종, 혈관면모세포성 T-세포 림프종, B-세포 만성 림프구성 백혈병, B-세포 백혈병, B-세포 림프종, B-세포 전립선 백혈병, 만성 특발성 골수섬유증, 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 만성 호중구 백혈병, 골수외, 모발 세포 백혈병, 간비만 T-세포 림프종, 호지킨 림프종, 혈관 내 큰 B-세포 림프종 림프종, K-세포 림프종 백혈병, 다발성 골수종, 골수종, 결절성 B 세포 림프종, 비호지킨 림프종, 혈장 세포 백혈병, 원발성 삼출 림프종 및 발덴스트롬 마크로 글로불린 혈증을 포함한다.
- [0158] 본 발명은 또한 대상체에서 암의 치료에 사용하기 위해 본 발명의 방법에 의해 생성된 항 종양 T-세포를 포함하는 조성물을 제공하며, 여기서 항 종양 T-세포를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여한 후, 대상체는 조성물

투여 후 X 일에 본 발명의 방법에 의해 생성된 항 종양 T-세포로부터 유래된 신생 항원 특이적 T-세포(예를 들어, 메모리 T-세포)의 존재에 대해 모니터링되며, 여기서 X는 약 7이다, 14, 21, 28, 30, 35, 42, 49, 56, 60, 90, 120, 150, 180, 300 및/또는 365 일; 선택적으로, 대상체에게 본 발명의 방법에 의해 생성된 추가의 항 종양 T-세포가 투여된다.

[0159] 본 발명은 또한 본 발명의 방법에 의해 생성된 항 종양 T-세포를 대상체에게 투여하는 것을 포함하고, 신생 항원 특이적 T-세포의 존재에 대한 모니터링(예를 들어 기억)을 추가로 포함하는, 대상체에서의 암 치료 방법을 제공한다. T-세포): 조성물 투여 후 X 일에 본 발명의 방법에 의해 생성된 항 종양 T-세포로부터 유도되며, 여기서 X는 약 7, 14, 21, 28, 30, 35, 42, 49, 56이다. , 60, 90, 120, 150, 180, 300 및/또는 365 일; 및 선택적으로 본 발명의 방법에 의해 생성된 추가의 항 종양 T-세포를 투여하는 단계를 포함한다.

[0160] 본 발명은 또한 이전에 따라 제조된 제 1 항 종양 T-세포 조성물로 이전에 치료된 대상체에서 재발 암의 치료에 사용하기 위해 본 발명의 방법에 의해 생성된 항 종양 T-세포를 포함하는 조성물을 제공한다 항-종양 T-세포를 포함하는 조성물은 본 발명의 방법에 의해 제조되며, 여기서 단계(a)에서 식 시트졸 입자와 밀접하게 관련된 종양 신생 항원 컨스트럭트는 본 발명에 따라 제조된 제 1 항 종양 T-세포 조성물을 제조하는 방법에 사용되는 포식 작용성 입자. 예를 들어, 단계(a)에서 식세포 작용 가능 입자와 밀접하게 관련된 종양 신생 항원 컨스트럭트는 제 1 항 종양 T를 만드는 방법에서 사용된 식세포 작용 입자와 밀접하게 연관된 종양 신생 항원 컨스트럭트와 비교하여 하나 이상의 상이한 신생 항원 에피토프를 포함한다 본 발명에 따라 제조된 세포 조성; 바람직하게는 단계(a)에서 식세포 작용 가능 입자와 밀접하게 관련된 종양 신생 항원 컨스트럭트는 제 1 항 종양 T-세포 조성물을 제조하는 방법에서 사용된 식세포 작용 입자와 밀접하게 연관된 종양 신생 항원 컨스트럭트와 비교하여 모든 상이한 신생 항원 에피토프를 포함한다 본 발명에 따라 제조된다.

[0161] 본 발명은 또한 본 발명에 따라 제조된 제 1 항 종양 T-세포 조성물로 이전에 치료된 대상체에서 재발 암의 치료 방법을 제공하며, 상기 방법은 생성된 항 종양 T-세포를 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 단계(a)에서 식세포 성 입자와 밀접하게 관련된 종양 신생 항원 컨스트럭트는 제 1 항 종양 T를 제조하는 방법에서 사용된 식세포 성 입자와 밀접하게 관련된 종양 신생 항원 컨스트럭트와 상이한 서열을 갖는 본 발명의 방법에 의해 본 발명에 따라 제조된 세포 조성물. 예를 들어, 단계(a)에서 포식 세포 형성 입자와 밀접하게 관련된 종양 신생 항원 컨스트럭트는 제 1 항 종양 T를 제조하는 방법에서 사용된 포식 세포 성 입자와 밀접하게 연관된 종양 신생 항원 컨스트럭트와 비교하여 하나 이상의 상이한 신생 항원 에피토프를 포함한다 본 발명에 따라 제조된 세포 조성; 바람직하게는 단계(a)에서 식세포 작용 가능 입자와 밀접하게 관련된 종양 신생 항원 컨스트럭트는 제 1 항 종양 T-세포 조성물을 제조하는 방법에서 사용된 식세포 작용 입자와 밀접하게 연관된 종양 신생 항원 컨스트럭트와 비교하여 모든 상이한 신생 항원 에피토프를 포함한다 본 발명에 따라 제조된다.

[0162] 본 발명의 입자 :

[0163] 본 발명은 또한 밀접하게 관련된 하나 이상의 종양 신생 항원 컨스트럭트를 갖는 상자성 또는 초상자성 포식 세포 성 입자를 제공하며, 여기서 종양 신생 항원 컨스트럭트는 암과 관련되거나 알려져 있거나 의심되는 적어도 하나의 돌연변이가 아미노산을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다.

[0164] 바람직하게는, 본 발명의 입자는 5.6 μ m 미만, 바람직하게는 4 μ m 미만,보다 바람직하게는 3 μ m 미만, 예를 들어 2.5 μ m 미만, 2 μ m 미만 또는 1.5 μ m 미만의 최대 치수를 가질 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 방법에 사용하기 위한 입자는 최대 치수가 0.001 μ m 초과, 바람직하게는 0.005 μ m 초과, 바람직하게는 0.01 μ m 초과, 바람직하게는 0.05 μ m 초과, 바람직하게는 0.1 μ m 초과,보다 바람직하게는 더 큰 치수를 가질 수 있다. 0.2 μ m 초과, 더욱 바람직하게는 0.5 μ m 초과이다. 바람직하게는, 바람직하게는 본 발명의 입자는 0.1 내지 5.6 μ m, 바람직하게는 0.2 내지 5.6 μ m, 바람직하게는 0.5 내지 5.6 μ m, 바람직하게는 0.1 내지 4 μ m, 바람직하게는 0.5 내지 4 μ m,보다 바람직하게는 0.1 내지 3 μ m의 간격에서 가장 큰 치수를 갖는다. 보다 바람직하게는 0.5 내지 3 μ m, 더욱 바람직하게는 0.1 내지 2.5 μ m, 더욱 더 바람직하게는 0.5 내지 2.5 μ m, 더욱 더 바람직하게는 0.2 내지 2 μ m, 더욱 더 바람직하게는 0.5 내지 2 μ m, 더욱 바람직하게는 1-2 μ m, 또는 예를 들어 약 1 μ m, 약 1.5 μ m 또는 약 2 μ m(바람직하게는 약 1 μ m). 바람직하게는, 입자는 실질적으로 구형이다.

[0165] 바람직하게는, 종양 신생 항원 컨스트럭트는 본 발명의 입자에 공유 적으로 부착된다. 예를 들어, 폴리펩티드는 폴리펩티드의 아민 기 또는 카르복실산 기와 입자 표면상의 카르복실산 기 또는 아민 기 사이의 아마이드 결합에 의해 부착될 수 있다.

[0166] 대안적으로, 후보 항원 폴리펩티드는 금속 킬레이트를 통해 입자에 연결될 수 있다.

- [0167] 예를 들어, 이미 노 디아 아세트산과 같은 금속 킬레이트 리간드와 연결된 입자는 Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} 또는 Fe^{3+} 와 같은 금속 이온에 결합 할 수 있다. 이들 금속 킬레이트는 예를 들어 히스티딘 또는 시스테인을 함유하는 단백질 및 펩티드를 큰 강도로 결합 할 수 있다. 따라서, 금속 킬레이트를 갖는 입자는 엄격한 세척이 결합 된 펩티드/단백질에서 LPS 및 다른 오염 성분의 양을 감소시킬 수 있는 방식으로 펩티드/단백질을 비공유 적으로 흡착 할 수 있다.
- [0168] 바람직하게는, 종양 신생 항원 컨스트럭트는 본 발명의 입자에 공유 적으로 부착된다. 예를 들어, 폴리펩티드는 폴리펩티드의 아민 기 또는 카르복실산 기와 입자 표면상의 카르복실산 기 또는 아민 기 사이의 아마이드 결합에 의해 부착 될 수 있다.
- [0169] 대안적으로, 후보 항원 폴리펩티드는 금속 킬레이트를 통해 입자에 연결될 수 있다.
- [0170] 예를 들어, 이미 노 디아 아세트산과 같은 금속 킬레이트 리간드와 연결된 입자는 Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} 또는 Fe^{3+} 와 같은 금속 이온에 결합 할 수 있다. 이들 금속 킬레이트는 예를 들어 히스티딘 또는 시스테인을 함유하는 단백질 및 펩티드를 큰 강도로 결합 할 수 있다. 따라서, 금속 킬레이트를 갖는 입자는 엄격한 세척이 결합 된 펩티드/단백질에서 LPS 및 다른 오염 성분의 양을 감소시킬 수 있는 방식으로 펩티드/단백질을 비공유 적으로 흡착 할 수 있다.
- [0171] **본 발명의 키트**
- [0172] 본 발명은 본 발명의 상자성 또는 초상자성 포식 세포 화 가능 입자(즉, 밀접하게 연관된 하나 이상의 종양 신생 항원 성 구조를 갖는 상자성 또는 초상자성 과 식세포 화 가능 입자를 포함하는 키트를 제공하며, 여기서 종양 신생 항원 구조는 적어도 대상체에서 암과 관련이있는 것으로 알려지거나 의심되는 하나의 돌연변이 아미노산) 및 T-세포 집단의 증식에 사용하기에 적합한 시약. 키트는 IL-2와 같은 T-세포 집단의 증식을 돕는 시약을 추가로 포함 할 수 있다. 그것은 또한 선택적으로 IL-7 및/또는 IL-15를 포함 할 수 있다. 키트는 본 발명의 입자를 멸균하기위한 시약을 추가로 포함 할 수 있다.
- [0173] 바람직하게는, 키트는 항 -CD3 항체 및/또는 항 -CD28 항체를 포함하지 않는다.
- [0174] 본 발명은 상자성 또는 초상자성 식세포 성 입자, 펩티드를 식세포 성 입자에 커플 링하기위한 커플 링 시약, 및 T-세포 집단을 증식 시키는데 사용하기에 적합한 시약을 포함하는 키트를 추가로 제공한다.
- [0175] 키트는 종양 신생 항원 컨스트럭트를 설계하기위한 설명서를 추가로 포함 할 수 있다. 키트는 종양 신생 항원 컨스트럭트, 예를 들어 상이한 클로닝 및 발현 조건에 대해 조정 된 즉시 사용 가능한 벡터를 생성하기위한 시약을 추가로 포함 할 수 있다. 키트는 또한 또는 대안적으로 하나 이상의 종양 신생 항원 컨스트럭트를 포함 할 수 있고, 예를 들어, 하나 이상의 특이적 암에 대한 종양 신생 항원 컨스트럭트의 라이브러리를 포함 할 수 있다. 키트는 하나 이상의 신생 항원 에피토프를 포함 할 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 특정 암에 대한 신생 항원 에피토프의 라이브러리를 포함 할 수 있다. 키트는 신생 항원 에피토프(및 선택적으로 하나 이상의 스페이스 모이어티)로부터 종양 신생 항원 컨스트럭트를 생성하기위한 설명서 및/또는 시약을 포함 할 수 있다.
- [0176] 키트는 IL-2와 같은 T-세포 집단의 증식을 돕는 시약을 추가로 포함 할 수 있다. 그것은 또한 선택적으로 IL-7 및/또는 IL-15를 포함 할 수 있다. 키트는 본 발명의 입자를 멸균하기위한 시약을 추가로 포함 할 수 있다.
- [0177] 바람직하게는, 키트는 항 -CD3 항체 및/또는 항 -CD28 항체를 포함하지 않는다. 바람직하게는, 키트는 키트가 사용될 때, 예를 들어 본 발명의 방법에 사용될 때 항 -CD3 항체 및/또는 항 -CD28 항체를 첨가하지 않는 설명서를 포함한다. 키트는 또한 T-세포를 증식시키기 전에 T-세포 샘플에서 활성화 된 T-세포를 분리하지 않도록 지시를 포함 할 수 있다.
- [0178] **실시예**
- [0179] **실시예 1 : 입자에 대한 폴리펩티드 커플 링**
- [0180] 폴리펩티드를 유리 카르복실산기를 함유하는 상자성 입자에 공유 결합시켰다. Dynabeads® MyOne™ 카르복시산 (ThermoFischer Scientific)을 입자로 사용했다(직경 1 μm 구체). 커플 링 절차는 제조자 프로토콜(NHS(N-히드록시 숙신이 미드) 및 EDC(에틸 카르 보디이 미드)를 사용한 2 단계 절차)에 따라 수행되었다 :
- [0181] 입자를 MES- 버퍼(25mM MES(2-(N- 모르 폴리 노)에탄 설푼산), pH 6)로 2 회 세척 하였다. 이어서, 카르복실산기를 MES- 완충제 중의 50 mg/ml NHS(N-히드록시 숙신이 미드) 및 50 mg/ml EDC(N-(3- 디메틸 아미노 프로필)-N- 에틸 카르 보디이 미드)를 입자에 첨가하여 활성화시키고, 30 분 동안 배양 하였다. 실온. 입자를 자석

으로 수집하고 상청액을 제거하고 입자를 MES- 버퍼로 2 회 세척 하였다. 단백질을 MES- 완충액에서 1 mg/ml, 총 100 ug의 농도로 희석하고 입자에 첨가하고 실온에서 1 시간 동안 배양 하였다. 입자를 자석으로 수집하고 상청액을 제거하고 단백질 농도 측정을 위해 저장 하였다. 미 반응 활성화 된 카르복실산기를 15 분 동안 50mM Tris pH 7.4로 캔칭 하였다. 이어서, 입자를 PBS pH 7.4로 세척 한 다음 -80℃에 저장 하였다.

[0182] 입자에 결합 된 단백질의 양을 측정하기 위해, BCA 단백질 분석 키트(Pierce BCA Protein Assay Kit, ThermoFisher Scientific)를 사용하여 커플 링 전 및 커플 링 후 상청액에서 단백질의 단백질 농도를 측정 하였다. BCA 분석은 제조업체의 프로토콜에 따라 사용되었다.

[0183] 비친 코니 닉산, BCA 단백질 분석을 사용하여 성공적인 커플 링을 보장하기 위해 커플 링 전후의 단백질 농도를 측정 하였다. 여러 폴리펩티드를 시험하고 1 mg 입자 당 평균 48.7 μ g(평균 : 48.7, SD : 20.5, N = 10)을 커플 링 하였다. 제조업체의 지침에 따르면, 1 mg 입자 당 50 μ g 폴리펩티드가 결합 될 수 있으며, 이는 예에서 수행 된 결합 효율이 높음을 나타냅니다.

[0184] 실시예 2: 세척

[0185] 대장균에서 생산 된 재조합 단백질과 입자를 결합시켰다. 입자를 RT의 멸균 수에서 3 개의 상이한 세척 완충제, 2M NaOH pH 14.3, 8M 우레아 또는 6M 구아니딘(구아니딘-HCl)중 하나로 세척하거나, 95 °C에서 PBS에서 배양 하였다. 입자를 완충액에 현탁시키고 4 분 동안 진탕시키고, 자석으로 수집하고 상청액을 제거 하였다. 이것을 3 회 반복했다. 열처리 된 입자를 PBS pH 7.4에 넣고 95 °C에서 5 분 동안 가열 블록에 넣은 후 자석으로 수집 하고 상청액을 제거 하였다. 이것을 3 회 반복했다. 이어서, 입자를 멸균 PBS로 3 회 세척하여 남아있는 세척 완충제를 제거 하였다.

[0186] (a)고 pH(2M NaOH pH 14.3), (b)열(95 ° C) 및 멸균/변성제((c)8M 우레아 및 (d)6M 구아니딘 히드로 클로라이드)의 4 가지 상이한 세척 조건을 시험 하였다. 세척 후, 입자와 관련된 폴리펩티드는 입자와 관련된 상태를 유지 하였다.

[0187] 실시예 3a: 식 균성 입자에 적합한 입자 크기의 확인

[0188] 티미 딘 혼입에 의한 증식 분석을 사용하여 항원-특이적 T-세포 활성화에 대한 입자 크기의 효과를 시험 하였다. 오발 부민(OVA)면역화 된 마우스로부터의 비장 세포를 상이한 크기의 OVA 결합 입자로 자극하여 항원 특이적 증식을 측정 하였다.

[0189] 표면에 카르복실산을 갖는 직경 5.6 μ m, 1 μ m 및 0.2 μ m의 상자성 입자를 실시예 1의 프로토콜에 따라 오발 부민 또는 소 혈청 알부민과 커플 링시켰다.

[0190] 항원 특이적 T-세포 활성화를 자극하는 입자의 효과를 시험하기 위해, 증식 분석(3H 티미 딘 혼입 포함)을 사용 하였다. 세포 농도와 관련한 입자 농도는 5.6 μ m 입자의 경우 1 : 1, 1 μ m 입자의 경우 10 : 1, 0.2 μ m 입자의 경우 500 : 1이다. 세포와의 배양 동안의 총 단백질 농도는 각각 5.6 μ m, 1 μ m 및 0.2 μ m에 대해 125ng/ml, 160ng/ml 및 160ng/ml로 계산되었다. 증식 분석은 다음과 같이 수행되었다 :

[0191] 오발 부민 감작 마우스로부터 비장 세포와 티미 딘 혼입에 의한 증식 분석. 자극으로서, 비드(Dynabeads® MyOne™ 카르복시산)에 결합 된 오발 부민(SigmaAldrich) 및 BSA(SigmaAldrich)를 사용 하였다. 수산화 알루미늄에 흡착 된 100 μ g의 오발 부민(Sigma)의 월간 주사를 통해 마우스를 오발 부민에 면역시켰다. 첫 주사 3 개 월 후 마우스를 죽이고 비장을 수확했다. 비장 세포는 Thunberg et al. 2009, 알레르기 64 : 919.

[0192] 세포를 5 일 동안 오발 부민 결합 비드 또는 BSA 결합 비드(세포 당 10 비드)와 함께 cRPMI에서 배양 하였다. 모든 세포를 37 °C에서 6 % CO₂의 가습 분위기에서 6 일 동안 배양 하였다. 하나의 3Ci/웰 [3H] 티미 딘을 최종 18 시간의 배양 동안 세포 배양에 첨가 하였다. 자극 된 3 중으로부터 수득 된 분당 평균 카운트(cpm)를 자극되지 않은 세포로부터의 평균 cpm 값으로 나누고 자극 지수(SI)로 표현 하였다. SI 값이 2.0 이상이면 일반적으로 양수로 간주된다.

[0193] 도 1에 도시 된 바와 같이, 직경 0.2 μ m의 OVA- 입자와 함께 배양 된 세포는 평균 SI가 4.1(95 % CI 2.4-5.8, P = 0.007)인 경우 증식이 증가한 것으로 나타났다. 직경이 1 μ m 인 OVA- 입자와 함께 배양 된 세포는 평균 SI가 8.4(95 % CI 6.1-10.6, P <0.005)인 경우 증식의 증가를 나타냈다. 직경이 5.6 μ m 인 OVA- 입자와 함께 배양 된 세포는 증식을 자극하는데 실패했으며, 평균 SI 1.1(95 % CI 0.4-2.7, P = 0.876).

[0194] 이러한 결과는 상이한 크기의 입자에 결합 된 항원이 세포 증식을 자극 할 수 있음을 보여준다. 직경이 약 1 μ

m 인 입자는 세포 자극과 관련하여 가장 효율적인 것으로 보이지만 0.2 μm 크기의 입자는 여전히 작동한다. 직경이 5.6 μm 에 가까워 질 때 입자가 세포를 완전히 자극하지는 않지만 1 μm 보다 큰 크기의 입자도 작동 할 것으로 예상하는 것이 합리적이다. 박테리아의 크기와 비슷하기 때문에 1 μm 이 최적 크기라고 가정하는 것이 합리적이다. 우리의 면역 체계는 식균 작용으로 진화 하여이 크기의 미생물/입자에 반응한다. 정상적인 항원 제시 세포는 10-15 μm 범위의 크기를 갖는다.

실시예 3b : 상이한 입자 크기의 항원 결합 된 입자의 비교 및 T-세포의 활성화 및 증식에있어서의 효과

(i)항원 결합 식세포 화 가능한 입자의 제조 :

크기가 다른 세 종류의 상자성 폴리스티렌 포식 세포가 사용되었다.

-직경 1 μm (Dynabeads MyOne Carboxylic Acid, ThermoFisher),

-직경 2.8 μm (Dynabeads M-270 카르복실산, ThermoFisher)및

-직경 4.5 μm (Dynabeads M-450 에폭시, ThermoFisher).

포식 작용성 입자를 제조자의 지시에 따라 항원(사이트 메갈로 바이러스 단백질 PP65)과 커플 링시켰다. 내 독소를 제거하기 위해, 모든 포식 작용 가능한 입자를 0.75M 수산화 나트륨 완충액으로 5 회 세척 한 다음 멸균 PBS에 재현 탁시켰다.

표 1

포식 작용 가능한 입자 크기	샘플의 PBMC 수	샘플의 PBMC 수	시료의 항원 결합 입자 수
1 μm	500 000	10:1	5 000 000
2.8 μm	500 000	1.4:1	700 000
4.5 μm	500 000	0.5:1	250 000

(iii)섭취 평가 :

배양 후, 공초점 현미경을 사용하여 포식 작용 된 항원 커플 링 된 입자의 수를 수동으로 계수 하였다. 평균 및 표준 편차 값을 얻기 위해 8 개의 세포를 계수 하였다. 도 5A에서, 세포 내 포식 작용 된 항원 결합 된 입자를 갖는 대표적인 세포의 공초점 현미경으로부터의 이미지가 도시되어있다. 검은 색 점선은 셀의 윤곽을 나타낸다. 흰색 선은 세포 내 항원 결합 입자의 총 크기를 나타낸다.

이 방법은 1 μm 항원 결합 입자가 너무 작아 정확하게 계산할 수 없으므로 적용 할 수 없다. 1 μm 항원 결합 입자의 양을 평가하기 위해, 모든 포식 작용 항원 결합 입자의 총 부피를 측정하고 60 %의 패킹 밀도를 가정하여 총 부피를 기준으로 개별 항원 결합 입자의 양을 역 계산 하였다. 이 방법은 2.8 μm 항원 결합 입자(수동으로 계산 된 9.1 항원 결합 입자/세포 대 추정 11.9 항원 결합 입자/세포)및 4.5 μm 항원 결합 입자(수동으로 계산 3.1 항원 결합 입자/세포 대 추정 2.4 항원 결합)에 대해 상당히 정확한 것으로 입증되었다. 입자/세포)와 마찬가지로 1 μm 항원 결합 입자의 양을 정확하게 추정하는 것으로 가정 할 수 있다.

도 5B 및 5C에 도시 된 항원 결합 입자의 흡수. 도 5B는 수동 계수(비드-타입 당 8 개의 세포 수)에 의해 평가 될 때 각 세포에 의해 흡수 된 항원 결합 입자의 수를 나타낸다. 수동 카운팅 방법을 사용하여, 4.5 μm 항원 결합 입자에 대한 세포 당 포식 작용 항원 결합 입자의 수는 $3.1(\pm 1.1)$ 인 것으로 밝혀졌다. 2.8 μm 항원 결합 입자의 경우 $9.1(\pm 2.2)$ 이었다. 이 방법으로는 1 μm 항원 결합 입자의 수를 세는 것이 불가능했다.

도 5C는 부피 계산(비드-타입 당 3 개의 세포 측정)(* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$, student T를 사용하여 계산 됨)에 의해 평가 된 바와 같이 각 세포에 의해 흡수 된 항원 결합 입자의 수를 나타낸다 -테스트). 부피 계산법을 사용하여, 4.5 μm 항원 결합 입자에 대한 세포 당 포식 작용 항원 결합 입자의 수는 $2.4(\pm 1.1)$ 인 것으로 밝혀졌다. 2.8 μm 항원 결합 입자의 경우 $11.9(\pm 3.2)$ 였다. 1 μm 항원 결합 입자의 경우 $203.7(\pm 21.9)$ 이었다.

부피 계산 방법에 의해 평가 된 바와 같이 각 세포에 의해 흡수 된 항원 결합 입자의 수에 기초하여, 총 포식 화 된 표면적 및 연장에 의해 총 항원의 양을 계산 하였다. 취한 표면적은 1 μm 항원 결합 입자의 경우 $639.6(\pm 68.9) \mu\text{m}^2$, 2.8 μm 항원 결합 입자의 경우 $293.1(\pm 79.3) \mu\text{m}^2$, 4.5 μm 항원 결합 입자의 경우 $150.7(\pm$

67.0) μm^2 로 계산되었다. 상기 데이터는 아래 표 2에 나와 있다.

표 2

포식 작용 가능한 입자 크기	세포 당 항원 결합 입자 흡수(카운팅)	세포 당 항원 결합 된 입자 흡수(부피로부터 계산)	셀당 차지하는 표면적
1 μm	-	203.7(± 21.9)	639.6(± 68.9) μm^2
2,8 μm	9.1(± 2.2)	11.9(± 3.2)	293.1(± 79.3) μm^2
4,5 μm	3.1(± 1.1)	2.4(± 1.1)	150.7(± 67.0) μm^2

(iv)T-세포 자극의 평가

항원 결합 된 입자의 T-세포를 자극하고 이에 따라 그들의 증식을 촉진하는 능력은 FluoroSpot 분석법(Mabtech, Sweden)을 사용하여 PBMC로부터 IFN γ , IL22 및 IL17A의 방출을 측정함으로써 평가되었다. CMV- 민감성 건강한 공여자(n = 2)로부터의 PBMC(250,000/웰)를 3 회 항원 결합 입자로 자극 하였다. 항원 결합 된 입자의 농도는 총 표면적 : 10 1 μm 항원 결합 된 입자/세포, 1.4 2.8 μm 항원 결합 된 입자/세포 및 0.5 4.5 μm 항원 결합 된 입자/세포를 기준으로 전술 한 바와 같다.

표 3

포식 작용 가능한 입자 크기	포식 작용 가능한 입자 크기	웰당 단핵구 수
1 μm	250,000	50,000
2,8 μm	250,000	50,000
4,5 μm	250,000	50,000

세포를 37 $^{\circ}\text{C}$, 5 % CO₂에서 44 시간 동안 배양 하였다. 플레이트는 제조업체의 지침에 따라 개발되었으며 자동 화 된 FluoroSpot 리더에서 읽다. FluoroSpot에 대해보고 된 데이터는 세포가 항원 결합 입자로 자극되지 않을 때 스폿 수 이상의 항원 결합 입자로 자극 될 때 스폿 수이다.

FluoroSpot 분석에서 평가 된 IFN γ 생산 수준은 그림 6A에 표시되어 있다. 항원 입자들 사이에는 거의 차이가 없음을 알 수 있다.

FluoroSpot 분석에서 평가 된 IL22 및 IL17 생산 수준은 그림 6B와 6C에 나와 있다. 1 μm 항원 결합 된 입자는 더 큰 항원 결합 된 입자보다 하나의 개체에서 현저히 더 높은 IL22 및 IL17 생성을 일으킨 것으로 나타났다, 다른 개체에게는 IL22와 유사한 경향이 관찰되었다.

FluoroSpot 분석에서 평가 된 이중 사이토카인 생산 수준은 그림 6D와 6E에 나와 있다. 1 μm 항원 결합 입자는 큰 항원 결합 입자보다 1 μm 항원 결합 입자로 자극 될 때 하나의 건강한 공여자에 대해 이중 사이토카인 방출 (IFN γ + IL17 및 IL22 γ + IL17)이 상당히 더 높은 것으로 나타났다.

이들 실험에서 사이토카인 방출은 T-세포 증식을위한 프록시로서 작용한다. 일반적으로, IFN γ 는 CD4 + T-세포 (Th1 서브 클래스)및 CD8 + T-세포에 의해 생성된다. IL17 및 IL22는 주로 전 염증성 Th17 CD4 + T-세포에 의해 생성된다. 이러한 염증성 세포는 종양 제거를 돕는 것으로 밝혀졌다. 데이터는 1 μm 비드가 다른 비드와 동일한 정도로 Th1 CD4 + T-세포 및 CD8 + T-세포의 활성화 및 증식을 야기하며, 추가의 전 염증성 Th17 CD4 + T-세포 및 덜 뚜렷하지만 여전히 전 염증성 이중 사이토카인 생산 T-세포.

실시예 4: 파일럿 연구

본 발명의 방법을 이용하는 파일럿 연구가 수행되었다 :

(i)방광암에서 신생 항원 표적의 확인

방광암은 높은 비율의 돌연변이를 나타내므로 면역계에 의해 비-자기 적으로 인식 될 수 있는 다수의 신-항원을 발현한다. 이와 같이, 본 발명자들은 면역 요법을 위해 T-세포를 증식 시키는데 사용될 수 있는 잠재적 인 신생

항원의 큰 저장소를 함유하는 돌연변이 데이터베이스를 마이닝함으로써 신항원 및 T-세포 표적으로서 적합한 종양 다형성을 조사 하였다.

[0222] COSMIC 데이터베이스 [27899578]에는 전체 엑솜 시퀀싱 및 핫스팟 분석 둘 다인 4754 개의 전이 세포 암종에 대한 돌연변이 데이터가 들어 있다. 본 발명자들은 요로 방광암(UBC)에 초점을 맞추고 가장 흔한 돌연변이 중 15 개를 선택하여 단일 아미노산 변화를 일으켜 신생 항원으로 인정 받았다. 본 발명자들은 또한 키나제, 성장 인자 수용체 및 세포주기 단백질과 같은 종양 병인과 관련된 것으로 공지된 유전자에서의 다형성에 초점을 맞추었다. 선택된 15 개의 돌연변이만으로도 COSMIC에서 발견된 방광암 돌연변이의 73 %를 커버한다. 네오 펩티드는 돌연변이 아미노산의 돌연변이 아미노산의 C- 말단 및 N- 말단에 10 개의 플랭킹 아미노산 + 10 개의 플랭킹 아미노산으로 설계되어, 21aa 펩티드가 생성되었다. 신생-항원 컨스트럭트를 설계하기 위해, 번역 후 인간 백혈구 항원 제시의 단계로서 VVR 모티프가 리소좀에서 카텝신 S에 의해 절단되기 때문에 3 개의 신생-항원 서열이 2 개의 VVR-스페이서로 라이닝되었다.

[0223] 대안으로, 추가 다형성 및 면역 요법에 대한 새로운 표적을 확인하기 위해 UBC 환자에서 종양의 전체 게놈 시퀀싱이 수행된다. RNA에서, 다형성을 보유하는 전 사체의 존재를 확인하기 위해 종양의 서열 분석이 수행될 수 있다. MRM(Multiple reaction monitoring)질량 분석 전이를 사용하여 단백질 수준에서 가장 일반적인 신생 항원의 발현을 환자에게 신속하게 스캔하여 개별 면역 요법에 사용되는 신생 항원을 조정할 수 있다.

[0224] (ii)제조합 신생 항원 생산

[0225] 제조합 단백질 생산을위한 매우 효율적인 프로토콜이 개발되었다. 합성 유전자는 상이한 클로닝 및 발현 조건에 따라 조정된 즉시 사용 가능한 벡터로 설계, 구매 및 서브 클로닝된다. 네오-항원은, 콜라 이로 발현되고, Ni-IMAC 크로마토 그래피에 의해 정제되고, 순도 및 내 독소 수준에 대한 시험 후 다이아 비드에 커를 링함으로써 효율적인 항원 제시를 위해 준비된다. 확립된 방법 론적 플랫폼으로, 제조합 단백질의 클로닝 및 발현은 몇 주 내에 실행될 수 있다.

[0226] (iii)신생 항원에 의한 T-세포 활성화 및 증식

[0227] 9 개의 신생-항원은 상기 한 바와 같이 생물 정보 학적으로 확인되었다. 설계된 신생-항원은 FGFR3 및 p53과 같은 방광암 관련 돌연변이를보고 한 유전자를 기초로한다. 3 개의 신생-항원을 포함하는 컨스트럭트를 사용한 파일릿 실험에서, 본 발명자들은 FluoroSpot에 의해 요로 방광암 환자의 혈액으로부터 IFN- γ 생산 T-세포를 동정하여 신생-항원 접근법의 타당성을 입증 할 수 있었다.

[0228] 방광암에 걸린 동일한 환자의 경우, 예측된 신생 항원 펩티드 NA1-9를 사용하여 T-세포의 활성화를 수행 하였다. NA 1, 3, 5, 7 및 8에 대한 반응으로 증식이 관찰되었다.도 2A는 시간 경과에 따른 배양에서 세포의 수를 나타낸다(PB = 말초 혈액). 도 2A의 화살표는 제 자극 시간(즉, T-세포 샘플이 항 종양 T-세포의 특이적 활성화를 허용하는 조건 하에서 포식 세포 성 입자와 접촉된 항원-제시 세포의 제 2 배치와 접촉된 시간을 나타낸다. 항원-제시 세포에 의해 제시된 항원에 대한 반응). 도 2B는 % CD4 +/총 T-세포를 보여준다. 도 2C는 CD4에서의 T- bet 발현을 나타내고,도 2D에서는 CD8 + T-세포에서의 그랜자임 B 및 perforin의 발현을 나타낸다.

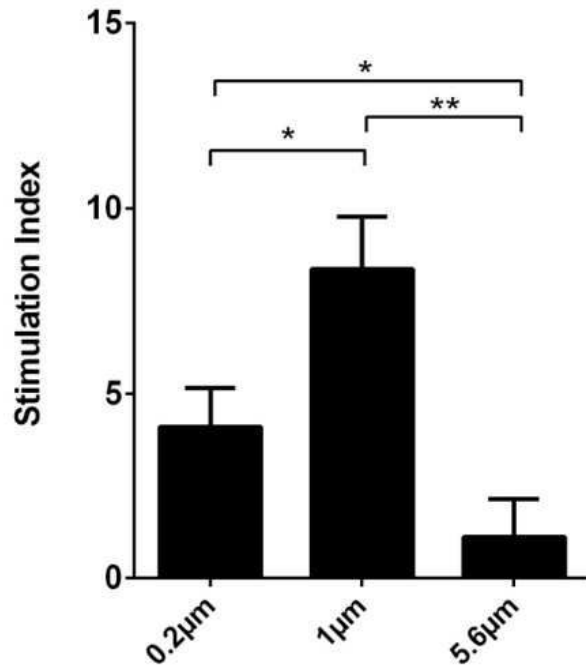
[0229] 증식된 T-세포는 전사 인자 Tbet 및 높은 수준의 이펙터 분자 perforin 및 그랜자임 B(GZB)를 발현한다.

[0230] 본 발명의 방법은 또한 서열화 된 종양 데이터가 이용 가능한 과증된 결장암 환자의 세포에서 사용되었다. 환자는 p53에서 두 가지 다형성, 즉 하나의 알려진 소설과 하나의 소설을 보여 주었다. 환자는 또한 PIK3CA에서 돌연변이를 나타냈다. 종양 신생 항원 컨스트럭트는 환자에 대한 종양 데이터의 특정 돌연변이에 기초하여 설계, 발현 및 정제되었다. 신생-항원 컨스트럭트는 세포를 증식시키기 위해 사용되어 신생-항원 특이적 반응을 일으켰다. 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 배양에 사용 하였다. 도 3은 증식 전 및 증식 동안 T- 샘플에서 CD4 + 세포(원)뿐만 아니라 CD4 + T-세포의 T-세포(작은 제곱)및 총 수(큰 제곱)중 백분율을 나타낸다. 도 4A는 시간 경과에 따른 배양 물에서의 세포 수를 나타낸다(빨간색 선은 개인화 된 펩티드를 나타내고, 분홍색 및 주황색 선은 대조군 단백질은 동일하지만 돌연변이는 예측된 펩티드(NA1, 3, 4 및 5)를 나타냄). 도 4B는 % CD4 +/총 T-세포를 보여준다. 도 4A 및 4B의 화살표는 제 자극 시간(즉, T-세포 샘플이 항-종양 T-의 특이적 활성화를 허용하는 조건 하에서 phagocytosable 입자와 접촉된 항원-제시 세포의 제 2 배치와 접촉된 시간을 나타낸다. 항원-제시 세포에 의해 제시된 항원에 반응하는 세포). 도 4C는 CD4 T-세포에 대한 BH-SNE(Barnes-Hut Stochastic Neighbor Embedding)알고리즘으로 수행된 분석을 시각화하며, 여기서 샘플의 모든 세포는 2 차원지도에 따라 선택된 마커 세트, 여기서 CD28, CD57, T- bet, GATA-3, perforin, 그랜자임 B(GZB), Ki-67 및 PD-1.

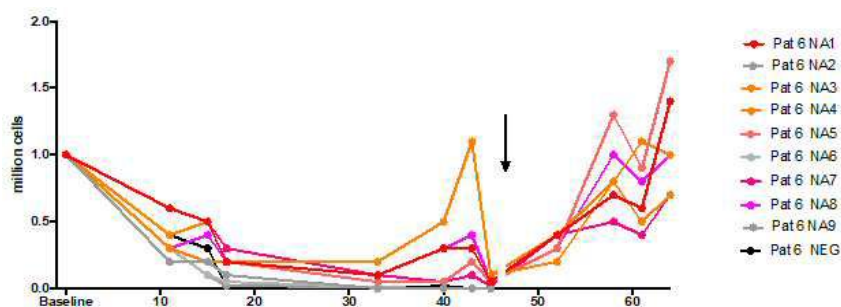
- [0231] 증식 마커 Ki67의 발현 및 T-세포의 수는 증식에서 증가하였고, 항-종양 활성에 대한 중요한 마커, 예컨대 Tbet, perforin 및 그랜자임 B의 발현은 14 개 이상의 CD4 + 및 CD8 + 세포에서 증가 하였다 문화 일. CD8 + T-세포의 백분율은 CD4 + T-세포의 약 10 %로 감소하였으나, CD8 + 세포의 총 수는 증가 하였다.
- [0232] 시퀀스 데이터 수신에서 증식 된 세포 분석에 이르는 전체 프로세스는 4-5 주 내에 완료 될 수 있다.
- [0233] 이러한 결과는 맞춤형 Th1 신-항원 반응이 있음을 보여준다. 따라서, 본 발명자들은 예측되고 서열 확인 된 신 생-항원이 T-세포 활성화 및 증식을 위해 설계되고 사용될 수 있음을 입증 하였다.

도면

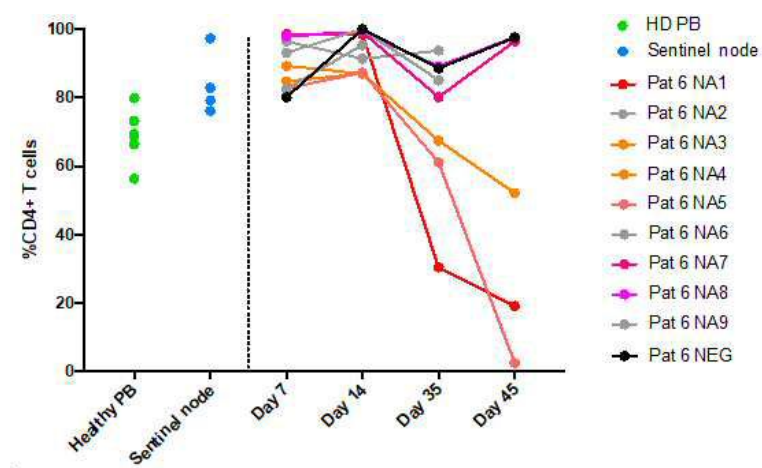
도면1



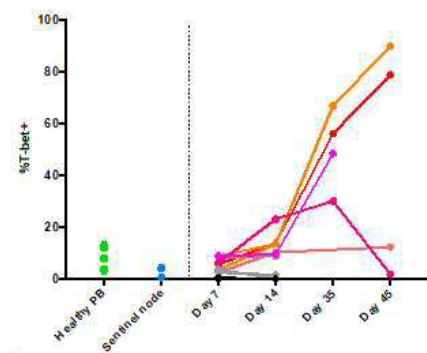
도면2a



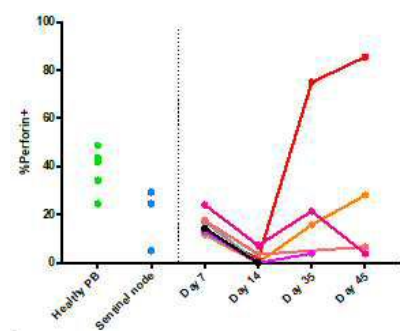
도면2b



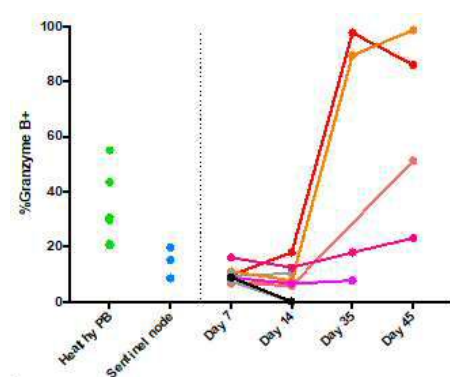
도면2c



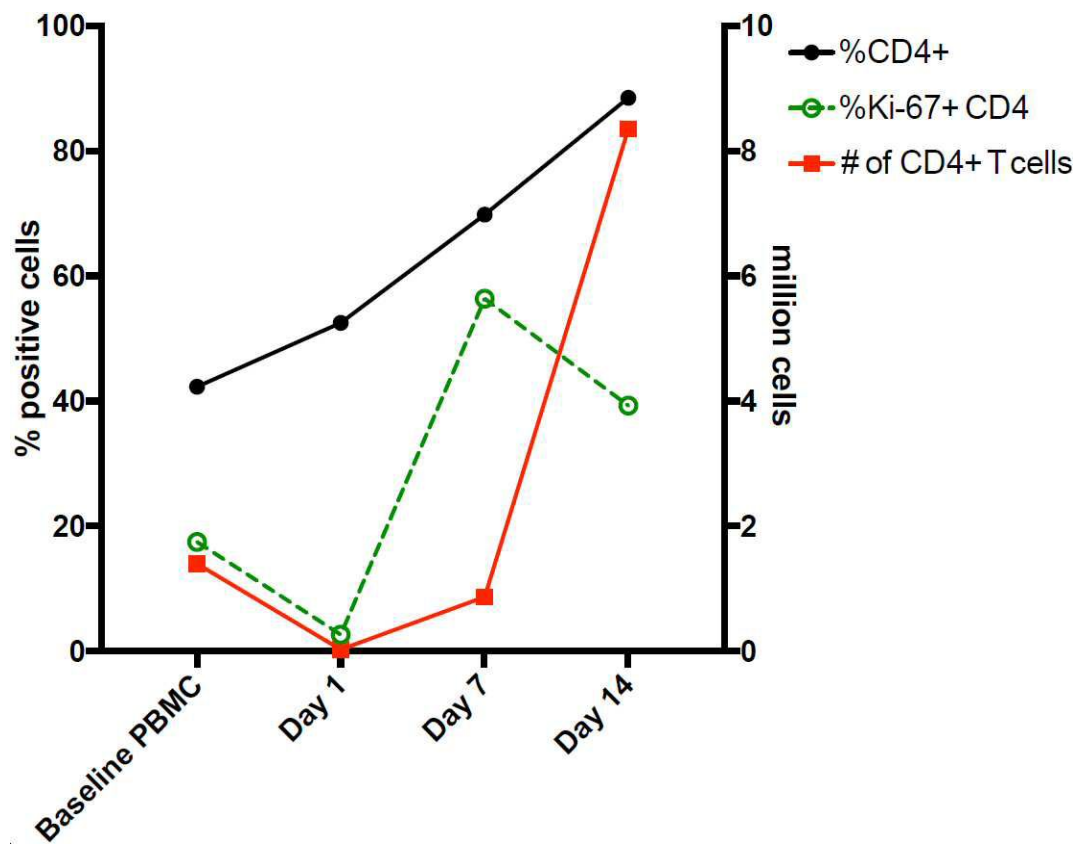
도면2d



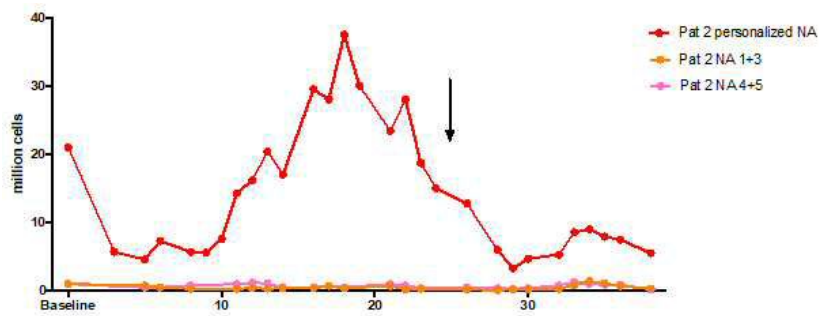
도면2e



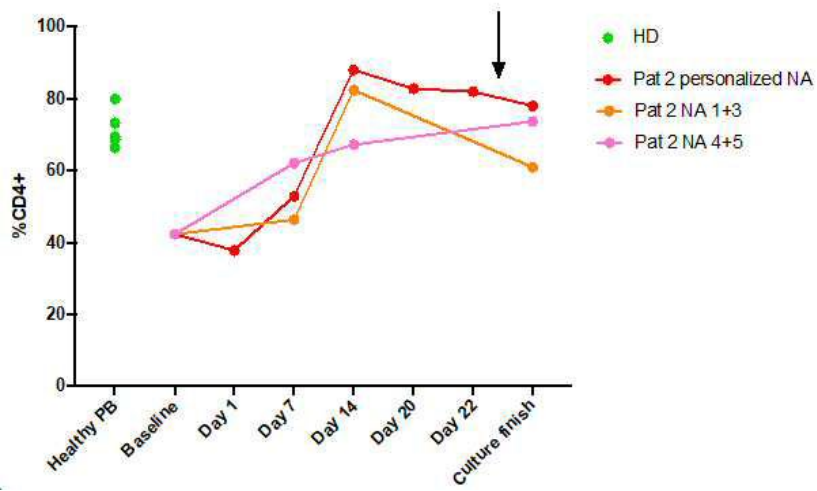
도면3



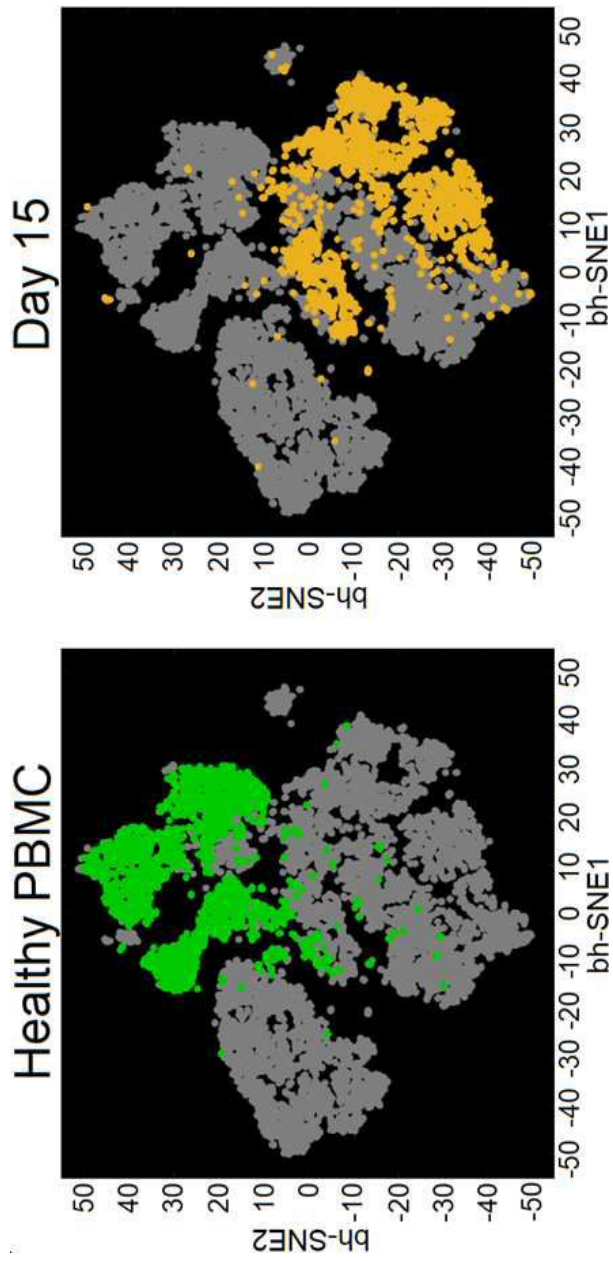
도면4a



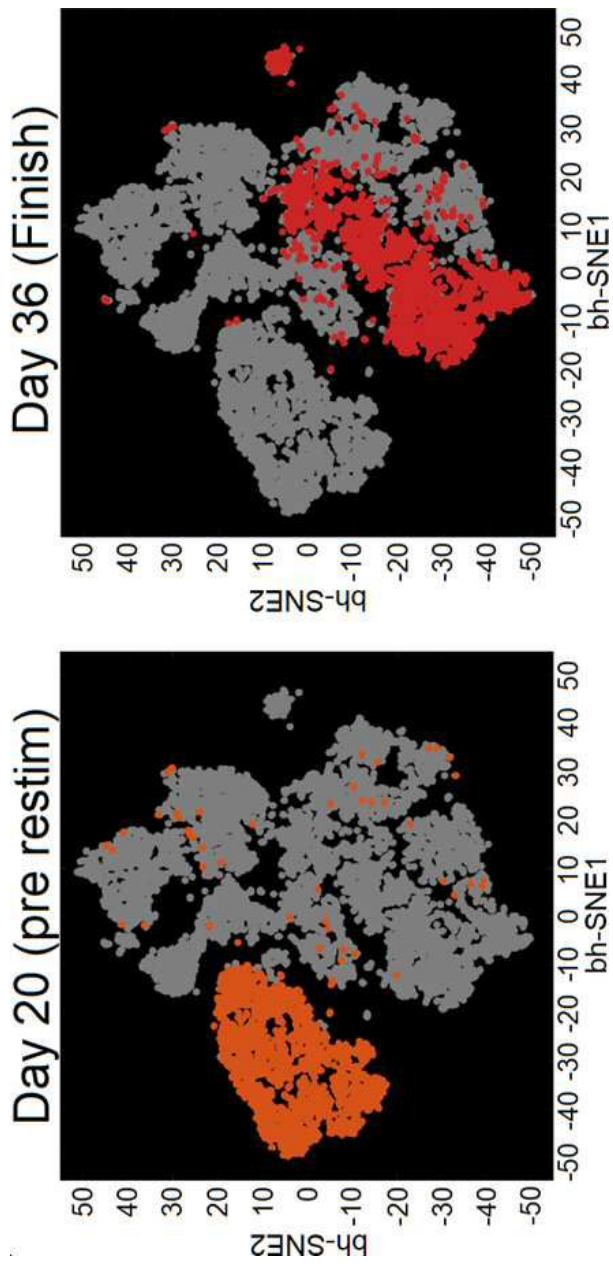
도면4b



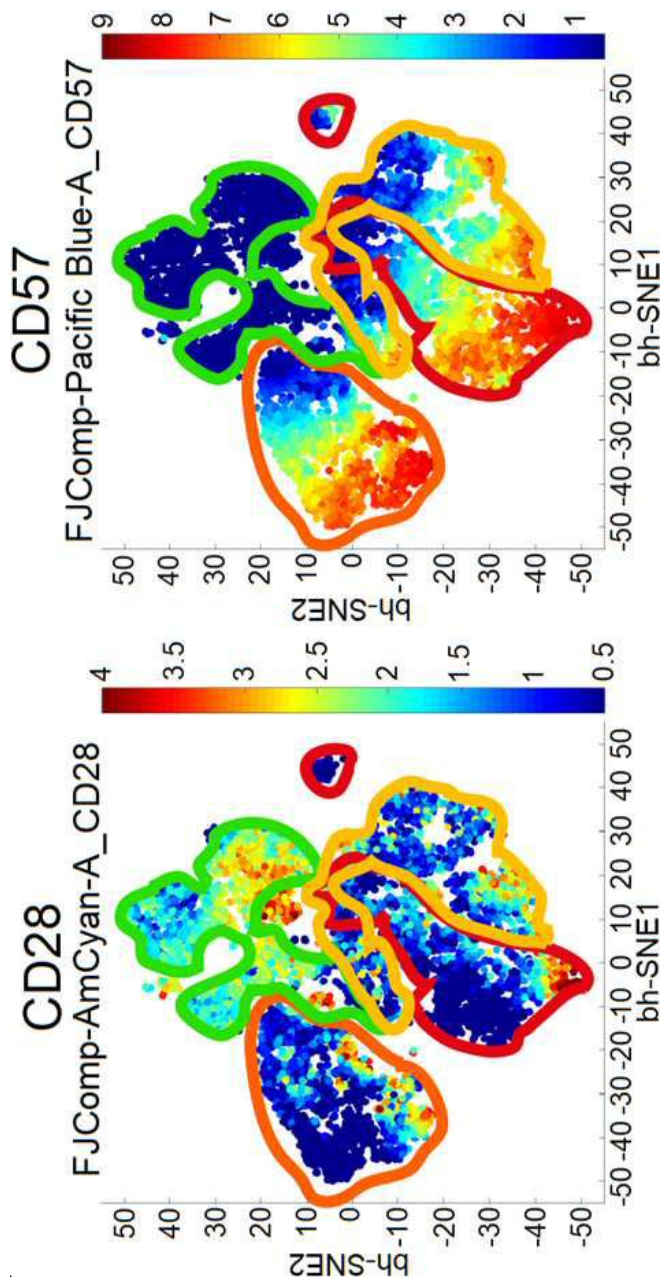
도면4c



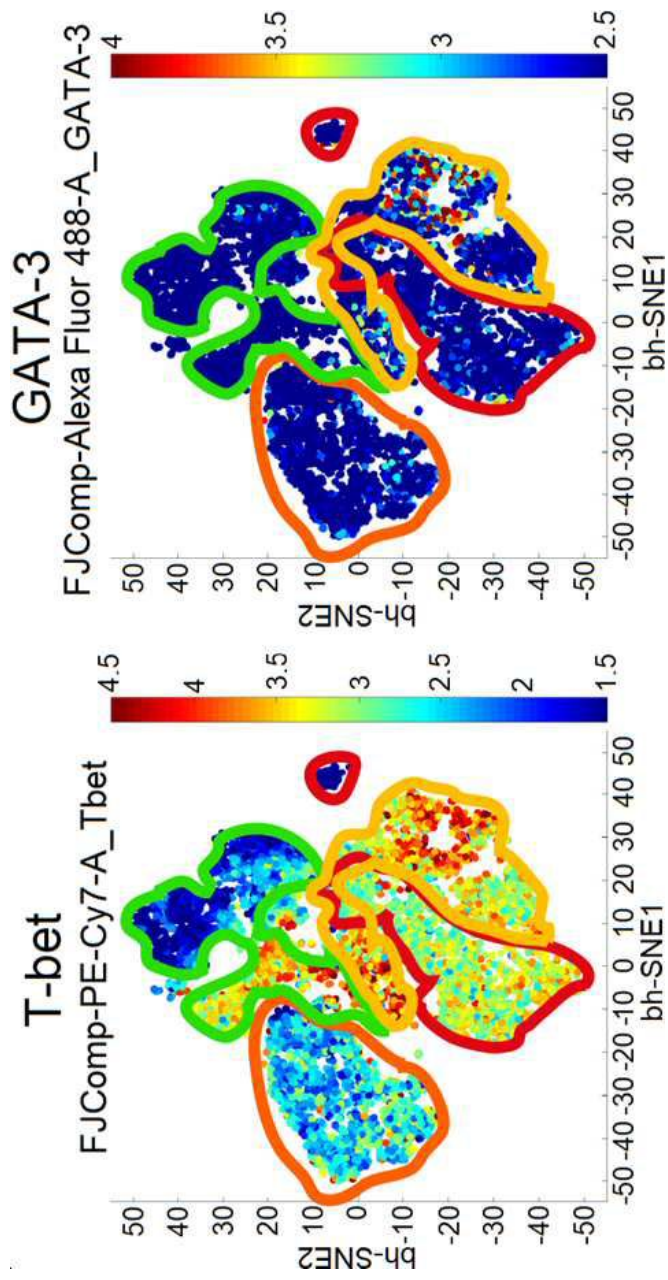
도면4d



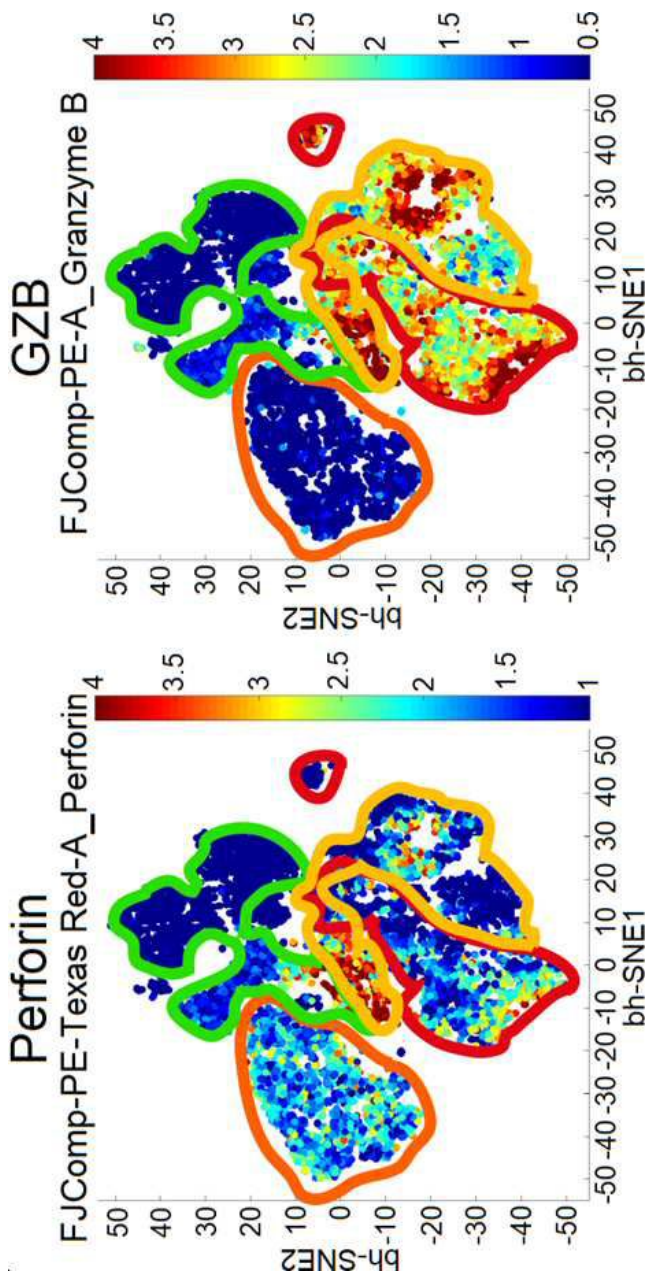
도면4e



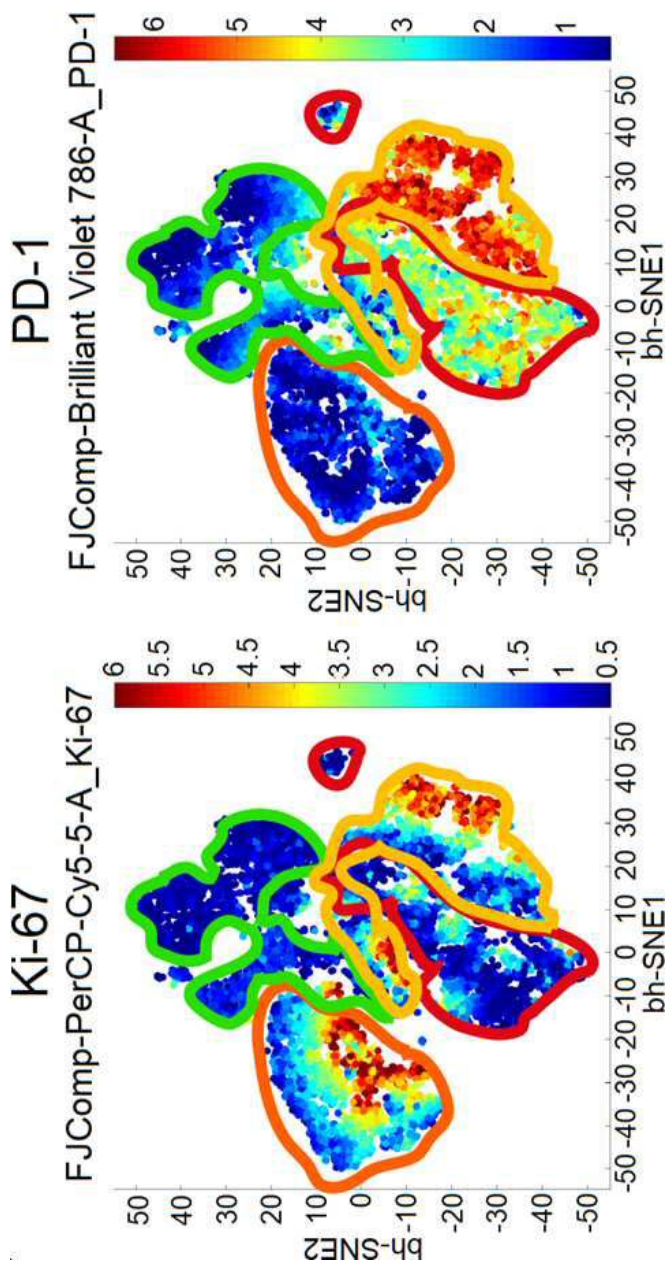
도면4f



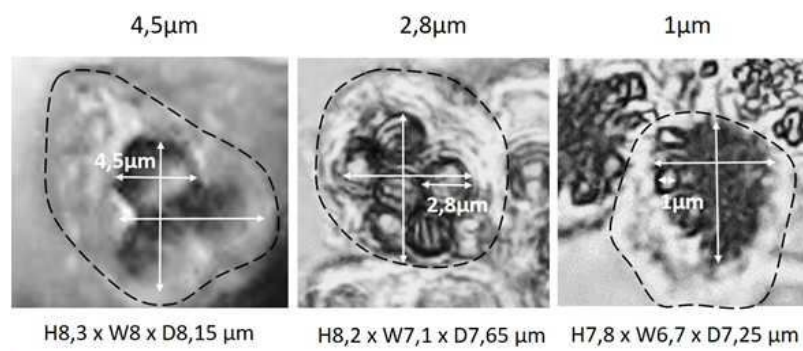
도면4g



도면4h



도면5a

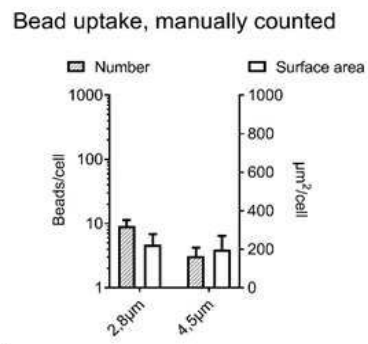


H8,3 x W8 x D8,15 μm

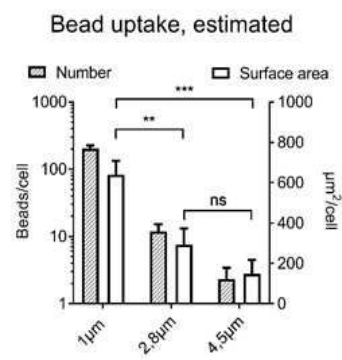
H8,2 x W7,1 x D7,65 μm

H7,8 x W6,7 x D7,25 μm

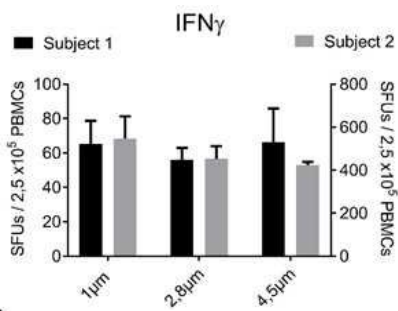
도면5b



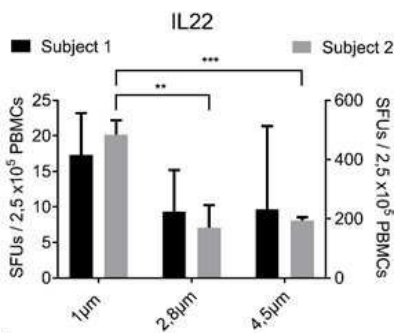
도면5c



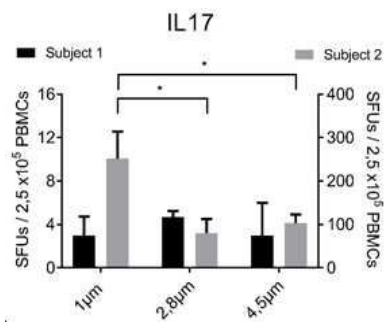
도면6a



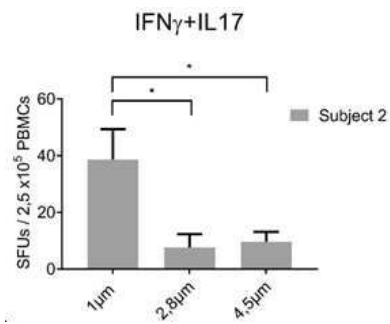
도면6b



도면6c



도면6d



도면6e

