(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년03월13일
(11) 등록번호 10-1502518
(24) 등록일자 2015년03월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/07 (2010.01) *C12N 13/00* (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-7022846
(22) 출원일자(국제) 2008년04월11일
심사청구일자 2013년04월11일
(85) 번역문제출일자 2009년10월30일
(65) 공개번호 10-2009-0129501
(43) 공개일자 2009년12월16일
(86) 국제출원번호 PCT/IB2008/051385
(87) 국제공개번호 WO 2008/126039
국제공개일자 2008년10월23일
(30) 우선권주장
P20070101520 2007년04월11일 아르헨티나(AR)
(56) 선행기술조사문헌
US20060034811 A1

(73) 특허권자
콘세호 나시오날 데 인베스티가시오네스 시엔티피카스 이 테크니카스 (코니셋)
아르헨티나 쎄1033아아호 부에노스 아이레스 아베누에 리바다비아 1906 3 "에페"
푼다시온 살레스
아르헨티나 쎄1056아베에 부에노스 아이레스 비아몬테 2043 피소 6 아
이니스 바이오테크 엘엘씨
미국 델라웨어 19963 밀포드 켄트 카운티 밀포드 스위트 101 203 엔이 프론트
(72) 발명자
모르도 호세
아르헨티나 쎄1426에오에 부에노스 아이레스 9 피소 호세 에르난데스 1837
바리오 마리아 마르셀라
아르헨티나 1653 부에노스 아이레스 비야 바예스 테르 파사헤 쿡 55
보네우 에리카 마리아
아르헨티나 쎄1187아아베 부에노스 아이레스 아베누에 코르도바 2745 피소 12 뎁토 35
(74) 대리인
석혜선, 김용인

전체 청구항 수 : 총 23 항 심사관 : 이효진

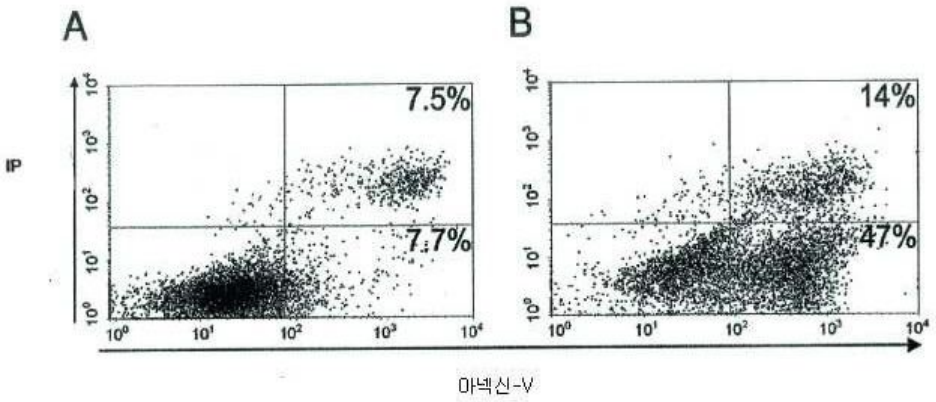
(54) 발명의 명칭 **세포주, 이를 포함하는 흑색종의 치료를 위한 조성물, 조성물 제조방법 및 치료방법**

(57) 요 약

본 발명은 세포주, 이를 포함하는 흑색종의 치료를 위한 조성물, 조성물 제조방법, 및 치료방법에 관한 것이다. 더욱 구체적으로는, 악성 질병의 치료를 위한 다양한 인간 흑색종 세포주에 관한 것이다. 세포주들은 (a) Mel-XY1 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2830으로 기탁됨, 기탁일자: 2007. 03. 23), (b)

(뒷면에 계속)

대 표 도



Mel-XY2 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2831로 기탁됨, 기탁일자: 2007. 03. 23), (c) Mel-XY3 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2832로 기탁됨, 기탁일자: 2007. 03. 23), (d) Mel-XX4 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2829로 기탁됨, 기탁일자: 2007. 03. 23), 또는 (e) 이들의 특정 군집(sub-population)이다. 세포주들은 방사선 조사될 수 있고, 그 결과 세포자멸성 표현형(apoptotic phenotype)의 군집, 및 이러한 세포주들의 괴사성 표현형의 군집이 얻어진다. 본 조성물은 보조제 및/또는 면역 조절제, 및/또는 자가 수지상 세포들을 포함할 수 있다.

특허청구의 범위

청구항 1

세포주 (a) Mel-XY1 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2830으로 기탁됨, 기탁일자: 2007. 03. 23), (b) Mel-XY2 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2831로 기탁됨, 기탁일자: 2007. 03. 23), (c) Mel-XY3 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2832로 기탁됨, 기탁일자: 2007. 03. 23), (d) Mel-XX4 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2829로 기탁됨, 기탁일자: 2007. 03. 23), 및 (e) 이들의 특정 군집(sub-population)을 포함하는 것을 특징으로 하는 흑색종 질병의 치료를 위한 인간 흑색종 세포주들의 조합.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 세포주 (a), (b), (c) 및 (d)는 방사선 조사되고, 증식능력이 없는 것을 특징으로 하는 세포주들의 조합.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 세포주 (a), (b), (c) 및 (d)는 자멸성(apoptotic) 표현형의 세포 군집을 포함하는 것을 특징으로 하는 세포주들의 조합.

청구항 4

제 3 항에 있어서,

상기 세포주 (a), (b), (c) 및 (d)는 각각 자멸성 표현형의 세포 군집을 35% 내지 60%의 양으로 포함하는 것을 특징으로 하는 세포주들의 조합.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 세포주 (a), (b), (c) 및 (d)는 괴사성(necrotic) 표현형의 세포 군집을 포함하는 것을 특징으로 하는 세포주들의 조합.

청구항 6

제 5 항에 있어서,

상기 세포주 (a), (b), (c) 및 (d)는 각각 괴사성 표현형의 세포 군집을 10% 내지 25%의 양으로 포함하는 것을 특징으로 하는 세포주들의 조합.

청구항 7

제 1 항에 있어서,

상기 특정 군집(sub-population)은 연한천(soft agar) 내에서 콜로니(colony)들을 형성할 수 있는 인간 흑색종 세포들을 포함하는 것을 특징으로 하는 세포주들의 조합.

청구항 8

동종의(allogenic) 흑색종 세포주 (a) Mel-XY1 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2830으로 기탁됨, 기탁일자: 2007. 03. 23), (b) Mel-XY2 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2831로 기탁됨, 기탁일자: 2007. 03. 23), (c) Mel-XY3 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2832로 기탁됨, 기탁일자: 2007. 03. 23), (d) Mel-XX4 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2829로 기탁됨, 기탁일자: 2007. 03. 23)의 조합을 포함하며, 상기 세포주들은 방사선 조사되고, 증

식능력이 없는 것을 특징으로 하는, 흑색종의 치료에 사용하기 위한 조성물.

청구항 9

성숙한 자가 수지상 세포; 이종의 인간 흑색종 세포주들의 조합으로 충전된 자가 수지상 세포, 상기 이종의 인간 흑색종 세포주들의 조합으로부터의 자멸성(apoptotic) 세포, 및 상기 이종의 인간 흑색종 세포주들의 조합으로부터의 괴사성(necrotic) 세포를 포함하며, 상기 이종의 인간 흑색종 세포주들의 조합은 (a) Mel-XY1 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2830으로 기탁됨, 기탁일자: 2007. 03. 23), (b) Mel-XY2 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2831로 기탁됨, 기탁일자: 2007. 03. 23), (c) Mel-XY3 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2832로 기탁됨, 기탁일자: 2007. 03. 23), (d) Mel-XX4 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2829로 기탁됨, 기탁일자: 2007. 03. 23), (e) 이들의 특정 군집(sub-population)으로 이루어지는 것을 특징으로 하는 인간 흑색종의 치료에 사용하기 위한 조성물.

청구항 10

제 9 항에 있어서,

상기 성숙한 자가 수지상 세포들이 $CD14^-$, $CD11c^+$, $CD1a^+$, 및 $CD83^+$ 의 표현형을 가지는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 11

a) 세포주 (a) Mel-XY1 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2830으로 기탁됨, 기탁일자: 2007. 03. 23), (b) Mel-XY2 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2831로 기탁됨, 기탁일자: 2007. 03. 23), (c) Mel-XY3 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2832로 기탁됨, 기탁일자: 2007. 03. 23) 및 (d) Mel-XX4 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2829로 기탁됨, 기탁일자: 2007. 03. 23)를 해동(thawing) 및 배양하는 단계;

b) 상기 세포주들을 방사선 조사하는 단계;

c) 보조제, 부형제, 면역 조절제, 또는 이들의 조합을 첨가하는 단계

를 특징으로 하는 제 8 항에 따른 조성물의 제조를 위한 방법.

청구항 12

제 11 항에 있어서,

상기 세포주 (a), (b), (c) 및 (d)의 세포들은 50 내지 100 Gy의 수치에서 방사선 조사되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제 11 항에 있어서,

상기 보조제는 BCG인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제 11 항에 있어서,

상기 면역 조절제는 GM-CSF, G-CSF, IFNα, 사이클로포스파마이드(cyclophosphamide), 및 이들의 혼합물을 포함하는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

a) 세포주 (a) Mel-XY1 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2830으로 기탁됨, 기탁일자: 2007. 03. 23), (b) Mel-XY2 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2831로 기탁됨, 기탁일자: 2007. 03. 23), (c) Mel-XY3 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2832로 기탁됨, 기탁일자: 2007. 03. 23) 및 (d) Mel-XX4 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM

ACC2829로 기탁됨, 기탁일자: 2007. 03. 23)를 해동 및 배양하는 단계;

b) 상기 세포주들을 방사선 조사하는 단계;

c) 자가 수지상 세포들을 획득하는 단계; 및

d) 단계 b)에서 방사선 조사된 세포들과 상기 자가 수지상 세포들을 특정 시간 동안 합동배양하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 제 9 항에 따른 조성물의 제조를 위한 방법.

청구항 16

제 15 항에 있어서,

상기 세포주 (a), (b), (c) 및 (d)의 세포들은 50 내지 100 Gy의 수치로 방사선 조사되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

제 15 항에 있어서,

상기 합동배양은 35 내지 39℃의 온도에서 6 내지 72시간의 기간 동안 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 18

제 15 항에 있어서,

단계 d)에서 자가 수지상 세포들과 세포주들 사이의 비율이 1:1 내지 3:1인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 19

제 15 항에 있어서,

단계 d)의 자가 수지상 세포들이 미성숙 자가 수지상 세포들을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 20

제 11 항 또는 제 15 항에 있어서,

상기 세포주 (a), (b), (c) 및 (d)를 혼합하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 21

제 1 항에 있어서,

흑색종을 가진 포유류들에서 항-종양 면역 반응을 유도하는 조성물을 제조하기 위한 인간 흑색종 세포주들의 조합.

청구항 22

제 1 항에 있어서,

흑색종을 가진 포유류들의 치료를 위한 조성물을 제조하기 위한 인간 흑색종 세포주들의 조합.

청구항 23

제 1 항에 있어서,

흑색종을 가진 포유류들의 항원보조 치료를 위한 조성물을 제조하기 위한 인간 흑색종 세포주들의 조합.

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 세포주, 이를 포함하는 흑색종의 치료를 위한 조성물, 조성물 제조방법, 및 치료방법에 관한 것이다. 더욱 구체적으로는, 악성 질병의 치료를 위한 다양한 인간 흑색종 세포주에 관한 것이다. 세포주들은 (a) Mel-XY1 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2830으로 기탁됨. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstraße 7 B 38124 Braunschweig, Germany., 기탁일자: 2007. 03. 23), (b) Mel-XY2 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2831로 기탁됨. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstrase 7 B 38124 Braunschweig, Germany. 기탁일자: 2007. 03. 23), (c) Mel-XY3 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2832로 기탁됨. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstrase 7 B 38124 Braunschweig, Germany. 기탁일자: 2007. 03. 23), (d) Mel-XX4 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2829로 기탁됨. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstrase 7 B 38124 Braunschweig, Germany. 기탁일자: 2007. 03. 23), 또는 (e) 이들의 특정 군집(sub-population)이다. 세포주들은 방사선 조사될 수 있고, 그 결과 세포자멸성 표현형(apoptotic phenotype)의 군집, 및 이러한 세포주들의 괴사성 표현형의 군집이 얻어진다. 본 조성물은 보조제 및/또는 면역 조절제, 및/또는 자가 수지상 세포들을 포함할 수 있다.

배 경 기 술

[0002] 최근, 암 면역치료법 분야에 많은 노력이 기울여지고 연구에 많은 자원들이 사용되어왔다. 현존하는 중요한 증거들은 암에 효과적인 면역반응에 있어서 T 림프세포들의 중추적 역할을 알려주고 있다(Oliver RT, Nouri AM. T; Cancer Surv 1992; 13:173-204). 이러한 목적을 위해, 동종세포 단독으로, 보조제와 함께, 또는 어떠한 사이토카인(cytokine)들과 조합한 치료법이 사용되어왔다.

[0003] 한편, 수지상 세포(DC)들은 순수한 T 림프세포들을 자극하는 특수한 기능에 의해 T 세포 반응을 개시할 수 있는 항원 존재 세포들이다(Schuler G, Steinman RM. Nature 1998; 392:245-52).

[0004] 몇몇 저자들이 생쥐 모델들, 및 인간에 있어서 DC가 자멸성 세포(apoptotic cell)들을 포함하고 있어서, 이로 인해 세포독성의 T 림프세포들의 유발을 허용하는 클래스 I HLA 복합체/펩타이드의 생성을 위한 항원이 존재한다는 것을 밝혀내었다(Albert ML, Pearce SF, Francisco LM, Sauter B, Roy P, Silverstein RL, Bhardwaj N. J Exp Med. 1998, 188: 1359-368; Chen Z, Moyana T, Saxena A, Warrington R, Jia Z, Xiang J. Int J Cancer. 2001, 93: 539-48 및 Shaif-Muthana M, McIntyre C, Sisley K, Rennie I, Murray A. Cancer Res. 2000, 60: 6441-447). 이러한 방법을 위해 자멸성 세포들이 수지상 세포(DC)의 성숙을 유발하는 것이 기본적이나, 많은 저자들이 인간의 자멸성 세포들이 DC를 성숙시키지 않거나, 또는 이러한 DC의 성숙의 손실을 유발하는 것으로 전하고 있다(Pietra G, Mortarini R, Parmiani G, Anichini A. Cancer Res 2001, 61: 8218-226; Labarriere N, Bretaudeau L, Gervois N, Bodinier M, Bougras G, Diez E, Lang F, Gregoire M, Jotereau F. Int J Cancer 2002, 101: 280-86 and Demaria S, Santori FR, Ng B, Liebes L, Formenti SC, Vukmanovic S. J Leukoc Biol. 2005, 77: 361-68).

[0005] Pardol 등에 의한 미국특허 6,187,306호는 흑색종의 치료방법 및 예방법에 대해 개시하고 있으며, 이는 면역 지배적인 흑색종 항원을 발현시키는 적어도 하나 또는 그 이상의 동종 세포주의 사용을 포함하고 있다. 여기서, 세포주는 사이토카인들을 발현시키도록 개질되었고, 이러한 변형된 세포주를 흑색종을 가지거나 또는 발명할 위험이 있는 환자에게 투여하였다. 면역 지배적인 항원의 대부분을 발현시키는 사용되어온 세포주 또는 세포주들의 중요성에도 불구하고, 그러한 항원들의 대부분을 발현시키는 새로운 세포주 또는 세포주들의 조합은 개시되어 있지 않다. 이 발명은 GM-CSF와 같은 사이토카인들을 발현시키는 변형된 세포주들을 기본적으로 포함한다.

[0006] 미국특허 5,882,654호 및 미국특허 5,840,317호는 동종의 백신으로 사용되는 방사선 조사된 흑색종 세포주들을 개시하고 있다. 개시된 치료법은 NED 환자들의 50% 아래(16/37)에 이르며, 효과적인 체액형 항-종양 활성을 보인다.

[0007] Wallack 등에 의한 미국특허 2006/0034811호는 세포질 및 세포막을 포함하는 용해된 또는 파열된 종양 세포들로 충전된 세포들이 존재하는 항원을 포함하는 백신에 대해 개시하고 있다. 종양 세포들은 환자로부터 얻은 세포들일 수도 있고, 또는 IL-2로 분류된 재조합 우두 바이러스로 감염된 세포주 또는 세포일 수 있다. Palucka 등에 의한 미국특허 2006/0140983호는 암 환자들 내의 면역을 유발하는 조성물에 대해 개시하고 있으며, 이는 하나 또는 그 이상의 열충격단백질과 배치하기 위해 준비된 항원 존재 세포들, 및 사멸한 종양 세포들의 분리 및 정제를 포함한다. 항원이 존재하는 세포는 수지상 세포이고, 종양세포들은 예를 들면 세포주들 같이 공통유전형(syngenic) 또는 동종(allogenic) 세포들이다. 상기 문헌은 종양세포의 가열을 통한 파열에 의해 열충격단백질의 통합의 필요성을 개시하고 있다. 개시된 분석법은 조성물이 흑색종 환자 내에서 면역-유발 활성을 가진다는 것을 필수적으로 개시하진 않는다.

[0008] Albert 등에 의한 미국특허 6,602,709호에는 T 세포 유발을 위해 수지상 세포들에 항원을 제공하기 위해 자멸성 세포들의 사용을 개시하고 있다. 이 방법은 항원 특이적인 세포독성의 T 림프세포 조세포들을 유발시키는데 유용하다. 수지상 세포들은 자멸성 세포들 또는 이들의 분절에 의해 준비되며, 세포독성의 T 림프세포의 활성을 유발하는데, 이는 치료용 백신으로서 사용될 수 있다.

발명의 상세한 설명

[0009] 본 발명의 한 양태에 따르면, 악성 질병들의 치료를 위한 몇가지 인간의 흑색종 세포주들이 제공되며, 여기서 세포주들은 (a) Mel-XY1 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2830으로 기탁됨, 기탁일자: 2007. 03. 23), (b) Mel-XY2 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2831로 기탁됨, 기탁일자: 2007. 03. 23), (c) Mel-XY3 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2832로 기탁됨, 기탁일자: 2007. 03. 23), (d) Mel-XX4 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2829로 기탁됨, 기탁일자: 2007. 03. 23), 또는 (e) 이들의 특정 군집(sub-population)이다. 세포주들은 자멸성 표현형의 모집단, 및 이러한 세포주들의 괴사성 표현형의 모집단을 얻기 위해 추가로 방사선 조사될 수 있다.

[0010] 본 발명의 또다른 양태에 따르면, 흑색종의 치료를 위한 조성물이 제공되며, 이러한 조성물은 적어도 하나의 동종 흑색종 세포주, 예를 들면 (a) Mel-XY1 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2830으로 기탁됨, 기탁일자: 2007. 03. 23), (b) Mel-XY2 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2831로 기탁됨, 기탁일자: 2007. 03. 23), (c) Mel-XY3 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2832로 기탁됨, 기탁일자: 2007. 03. 23), (d) Mel-XX4 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2829로 기탁됨, 기탁일자: 2007. 03. 23), 또는 이들의 조합을 포함하는데, 이러한 세포주들은 증식능력이 없다. 본 조성물은 또한 부형제, BCG와 같은 보조제, GM-CSF 또는 IFNα와 같은 면역 조절제를 포함할 수도 있다. 바람직한 실시예에서, 본 조성물은 (a) Mel-XY1 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2830으로 기탁됨, 기탁일자: 2007. 03. 23), (b) Mel-XY2 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2831로 기탁됨, 기탁일자: 2007. 03. 23), (c) Mel-XY3 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2832로 기탁됨, 기탁일자: 2007. 03. 23) 및 (d) Mel-XX4 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2829로 기탁됨, 기탁일자: 2007. 03. 23)의 네 가지 동종의(allogenic) 흑색종 세포주들을 포함하는데, 이러한 세포주들은 방사선 조사된 것이고 증식능력이 없다. 또다른 바람직한 실시예에서, 본 발명의 조성물은 (a) Mel-XY1 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2830으로 기탁됨, 기탁일자: 2007. 03. 23), (b) Mel-XY2 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2831로 기탁됨, 기탁일자: 2007. 03. 23) 및 (c) Mel-XY3 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2832로 기탁

됨, 기탁일자: 2007. 03. 23)의 세 가지 동종의 흑색종 세포주들의 조합을 포함하는데, 이러한 세포주들은 방사선 조사된 것이고 증식능력이 없다.

[0011] 본 발명의 또다른 실시예에 있어서, 흑색종의 항원보조 치료를 위한 조성물이 제공되는데, 상기 조성물은 적어도 하나의 동종의 흑색종 세포주, 예를 들면 (a) Mel-XY1 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2830으로 기탁됨, 기탁일자: 2007. 03. 23), (b) Mel-XY2 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2831로 기탁됨, 기탁일자: 2007. 03. 23), (c) Mel-XY3 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2832로 기탁됨, 기탁일자: 2007. 03. 23), (d) Mel-XX4 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2829로 기탁됨, 기탁일자: 2007. 03. 23) 및 이들의 조합을 포함하며, 이러한 세포주들은 방사선 조사되고, 증식능력이 없다. 본 조성물은 또한 부형제, BCG와 같은 보조제, 및 GM-CSF 및/또는 IFNα와 같은 면역 조절제를 포함할 수도 있다. 바람직한 실시예에 따르면, 본 발명의 조성물은 동종의(allogenic) 흑색종 세포주들 (a) Mel-XY1 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2830으로 기탁됨, 기탁일자: 2007. 03. 23), (b) Mel-XY2 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2831로 기탁됨, 기탁일자: 2007. 03. 23), (c) Mel-XY3 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2832로 기탁됨, 기탁일자: 2007. 03. 23), 또는 (d) Mel-XX4 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2829로 기탁됨, 기탁일자: 2007. 03. 23)의 조합을 포함하며, 이러한 세포주들은 방사선 조사된 것이고, 증식능력이 없다. 본 발명의 또다른 양태에 따르면, 본 발명의 조성물은 동종의(allogenic) 흑색종 세포주들 (a) Mel-XY1 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2830으로 기탁됨, 기탁일자: 2007. 03. 23), (b) Mel-XY2 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2831로 기탁됨, 기탁일자: 2007. 03. 23) 또는 (c) Mel-XY3 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2832로 기탁됨, 기탁일자: 2007. 03. 23)의 조합을 포함하며, 이러한 세포주들은 방사선 조사된 것이고, 증식능력이 없다.

[0012] 본 발명의 또다른 양태에 따르면, 본 조성물은 성숙한 자가 수지상 세포들, 적어도 동종의 인간 흑색종 세포주로 충전된 수지상 세포들, 적어도 하나의 이종의 인간 흑색종 세포주의 자멸성 세포들을 포함한다. 인간 흑색종 세포주는 다음 세포주들의 하나 이상이다: (a) Mel-XY1 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2830으로 기탁됨, 기탁일자: 2007. 03. 23), (b) Mel-XY2 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2831로 기탁됨, 기탁일자: 2007. 03. 23), (c) Mel-XY3 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2832로 기탁됨, 기탁일자: 2007. 03. 23), (d) Mel-XX4 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2829로 기탁됨, 기탁일자: 2007. 03. 23), 또는 (e) 이들의 특정 군집(sub-population).

[0013] 본 발명의 일 양태에 따르면, 인간 흑색종의 항원 보조 치료를 위한 조성물이 제공되며, 성숙한 수지상 세포들, 적어도 하나의 동종의 인간 흑색종 세포주로 충전된 수지상 세포들, 이종의 인간 흑색종 세포주 한가지의 자멸성 세포들 및 이종의 인간 흑색종 세포주 한가지의 괴사성 세포들을 포함한다. 흑색종 세포주는 다음 세포주들 가운데 하나 이상이다: (a) Mel-XY1 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2830으로 기탁됨, 기탁일자: 2007. 03. 23), (b) Mel-XY2 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2831로 기탁됨, 기탁일자: 2007. 03. 23), (c) Mel-XY3 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2832로 기탁됨, 기탁일자: 2007. 03. 23), (d) Mel-XX4 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2829로 기탁됨, 기탁일자: 2007. 03. 23), 또는 이들의 특정 군집(sub-population).

[0014] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명의 조성물을 제조하기 위한 방법이 제공되며, 이러한 방법은 다음 단계들에 의해 수행된다:

[0015] a) (a) Mel-XY1 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2830으로 기탁됨, 기탁일자: 2007. 03. 23), (b) Mel-XY2 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2831로 기탁됨, 기탁일자: 2007. 03. 23) 및 (c) Mel-XY3 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2832로 기탁됨, 기탁일자: 2007. 03. 23) 세포주들을 해동(thawing)시키는 단계 및 배양하는 단계;

[0016] b) 이러한 세가지 세포주들을 혼합하는 단계;

[0017] c) 이러한 세 가지 세포주들을 방사선 조사하는 단계;

[0018] d) 세포주 혼합물에 보조제 및 부형제를 첨가하는 단계.

[0019] 본 방법은 a) 단계에서 세포주 Mel-XX4 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2829로 기탁됨, 기탁일자: 2007. 03. 23)를 첨가하는 단계도 포함할 수 있다.

[0020] 본 발명의 또다른 양태에서는 본 조성물을 제조하는 방법이 제공되는데, 이는

[0021] a) (a) Mel-XY1 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2830으로 기탁됨, 기탁일자: 2007. 03. 23), (b) Mel-XY2 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2831로 기탁됨, 기탁일자: 2007. 03. 23), (c) Mel-XY3 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2832로 기탁됨, 기탁일자: 2007. 03. 23) 및 Mel-XX4 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2829로 기탁됨, 기탁일자: 2007. 03. 23) 세포주들을 해동시키는 단계 및 배양하는 단계;

[0022] b) 이러한 세가지 세포주들을 혼합하는 단계;

[0023] c) 이러한 세가지 세포주들을 방사선 조사하는 단계;

[0024] d) 자가 수지상 세포들을 획득하는 단계; 및

[0025] e) 단계 c)에서 방사선 조사된 세포주들로 자가 수지상 세포들을 약간의 시간 동안 합동배양하는 단계를 포함한다.

[0026] 본 발명의 또 다른 양태에서는, 흑색종을 가진 환자 내에서 항-종양 면역 반응을 유발시키는 방법을 제공하는데, 이는 필요로하는 환자에게 세포주들 (a) Mel-XY1 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2830으로 기탁됨, 기탁일자: 2007. 03. 23), (b) Mel-XY2 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2831로 기탁됨, 기탁일자: 2007. 03. 23), 및 (c) Mel-XY3 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2832로 기탁됨, 기탁일자: 2007. 03. 23)의 조합의 유효량을 투여하는 단계를 포함하며, 상기 세포주들은 증식능력이 없다. 투여는 보조제 및/또는 면역조절제와 함께 행해질 수 있다.

[0027] 본 발명의 또 다른 양태에서는, 흑색종을 가진 환자 내에서 항-종양 면역 반응을 유발시키는 방법을 제공하는데, 이는 필요로하는 환자에게 세포주들 (a) Mel-XY1 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2830으로 기탁됨, 기탁일자: 2007. 03. 23), (b) Mel-XY2 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2831로 기탁됨, 기탁일자: 2007. 03. 23), (c) Mel-XY3 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2832로 기탁됨, 기탁일자: 2007. 03. 23) 및 (d) Mel-XX4 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2829로 기탁됨, 기탁일자: 2007. 03. 23)의 조합의 유효량을 투여하는 단계를 포함하며, 상기 세포주들은 증식능력이 없다.

[0028] 본 발명의 또 다른 양태에서는, 흑색종을 가진 환자 내에서 항-종양 면역 반응을 유발시키는 방법을 제공하는데, 이는 필요로하는 환자에게 자가 수지상 세포들의 6 내지 72 시간 동안의 합동배양물, 및 세포주들 (a) Mel-XY1 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2830으로 기탁됨, 기탁일자: 2007. 03. 23), (b) Mel-XY2 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2831로 기탁됨, 기탁일자: 2007. 03. 23), (c) Mel-XY3 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2832로 기탁됨, 기탁일자: 2007. 03. 23) 및 (d) Mel-XX4 (독일 미생물 및 배양세포 은행 DSMZ에 접수번호 DSM ACC2829로 기탁됨, 기탁일자: 2007. 03. 23)의 조합의 유효량을 투여하는 단계를 포함하며, 상기 세포주들은 증식능력이 없다.

[0029] 본 명세서에 있어서, 용어 "조성물" 및 "혼합물"은 서로 교체가능하게 사용되었다.

[0030] 본 명세서에 있어서 포유동물의 면역체계를 조절하는 조성물들이 언급되는데, 이러한 조성물들은 해당 분야의 기술자들에게 백신 조성물, 세포기반 백신, 또는 단순히 백신으로 잘 알려진 것으로 이해될 것이다.

[0031] 4개의 세포주들이 부다페스트 조약에 따라 2007년 3월 27일에 독일의 DSMZ에 다음 기탁번호로 기탁되었다: Mel-XY1 DSM ACC2830 세포주, Mel-XY2 DSM ACC2831 세포주, Me3-XY1 DSM ACC2832 세포주, Mel-XX4 DSM ACC2829 세포주.

[0032] 세포주의 특성 분석의 결과는 다음 표에 나타내었다:

[0033] [표 1]: 본 발명의 인간 흑색종 종양세포 마커들

[0034]

마커	XY1	XY2	XY3	XX4
Gp100 (HMB45)	ND	ND	+	+
Gp100 (PCR)	+	+	+	+
티로시나아제 (PCR)	+	+	+	+
MART-1 (PCR)	+		+	

MAGE 1 (PCR)	ND		+	+
S100	+	+	+	+
비멘틴(Vimentin)	ND	+	+	+
CEA	ND	+	+	ND
GD2	+	+	+	+
GD3	+	+	+	+
P53	+	+	+	+
MIA	+	+	+	+
MCP-1		+	+	+
TRP-2	+	+	ND	+
MDR1		ND		
HLA class I	A02/23 B18/B37	A30/33 B18/B65	A02/A23 B18	A24(9)/A33(19) B18/B65 (14)
HLA class II	DR7/DR11 DR52/DR53	DR1/DR1	DR11 DR13 DR52	DR1/DR11
누드생쥐(nude mouse) 내에서의 종양유발성	+	+	+	+
소프트 아가 콜로니 내에서의 성장	++	++	++++	++

[0035] 대다수가 입방체 또는 연장된 형태인데 반해, Mel-XY1 세포주로부터 세포들이 크기 및 형태에 있어서 이질적인 멜라닌 결핍세포의 단일층으로 성장하며 연장이 없는 특성이 나타난다. 이들은 고밀도에서 약간 멜라닌성이다. Mel-XY1 세포들은 반-고체 아가 내에서 대량의 콜로니를 형성한다. Mel-XY1 세포들은 흉선 없는 (누드) 생쥐들에게 종양 유발적이며, 전이를 일으키지 않는다.

[0036] Mel-XY2 세포주로부터, 세포들이 크기에 있어서 이질적인 멜라닌 결핍세포의 단일층으로 성장하는 특성이 나타난다. 이들은 크기가 작고 숫자가 적으며, 다핵성이고 두드러진 핵소체(nucleoli)를 가진다. 흑색종에 있어서 특징적인 가지상 발현을 가지는 세포들 역시 관찰된다. 고농도 배양에 의해 이들은 적층되어 마이크로-종양을 발생시킬 수 있다. Mel-XY2 세포들은 흉선 없는 (누드) 생쥐들에게 종양 유발적이며, 전이를 일으키지 않는다.

[0037] Mel-XY3 세포주들로부터, 단일층으로의 세포성장이 특징이 나타난다. 세포들은 균일하고, 작으며, 부분적으로 둥글다. 고농도 배양에 의해 이들은 적층되어 마이크로-종양을 발생시킬 수 있다. Mel-XY3 세포들은 반-고형 아가 내에서 다량의 콜로니를 형성한다. Mel-XY3 세포들은 흉선 없는 (누드) 생쥐들에게 종양 유발적이며, 전이를 일으키지 않는다.

[0038] Mel-XX4 세포들로부터, 이러한 세포주는 고농도에서 축이 형성된 단일층으로 성장하는 특징이 나타난다. 저농도에서는 멜라닌 세포들과 유사하게 가지상의 돌출을 보인다. 세포들은 멜라닌성이며, 이들 일부는 두드러진 핵소체를 가진 다중 핵을 가진다. 군집 복제 시간은 172~173시간이며, 이들은 연한천(soft agar) 분석법에서 콜로니들을 형성한다.

[0039] 본 발명의 Mel-XX4 세포주가 (면역 감퇴된) 누드 생쥐에게 이식된 때, 종양 세포주들이 체외에서 생성되었다. 초기 종양으로부터 일련의 삽입은 처음 1개월 동안에 이식된 동물 100%에서 종양이 발생한다는 것을 증명하였다. 종양은 느리게 성장하였으며, 84일째에는 평균값 372±63㎟에 이르렀다. 본 발명의 세포주 Mel-XX4는 3×10^{6}만큼의 세포가 피하주사되었을 때 종양을 유발하였다.

[0040] 전형적인 염색체 수(modal chromosome number) 분석으로부터 다음이 밝혀졌다: 본 발명의 Mel-XY1 세포주는 염색체 수에 있어서 분산을 보였으며(105 내지 110 사이), 따라서 명확한 전형적인 염색체 수는 나타나지 않았다(수컷). 본 발명의 Mel-XY3 세포주는 전형적인 수를 보였다(수컷). 가장 빈번한 수 변형은 2 및 6쌍에서의 염색체 결실 및 20 및 22쌍에서의 염색체 과다였다. 본 발명의 Mel-XY4 세포주는 57-58의 전형적인 수를 보였다(암컷).

[0041] 본 발명의 세포주들에 있어서 세포자멸을 유도하는 감마선 조사가 연구되었다. 50Gy 조사의 적용은 본 발명의 각 세포주들에 대한 연한천에 있어서 클론원성 기능(clonogenic capacity)를 완전히 억제하기에 충분했다. 세포들이 70, 또는 100Gy로 조사되었을 때 세포자멸/괴사 유발도에 있어서 큰 변화가 관찰되지 않았다. 도 1 A는 비

-조사된 흑색종 세포들이 아넥신-V^+/IP^- 착색에 의해 특징지어지는 초기 자멸성 세포들을 6-9% 함유하는 것을 나타내었다(아래 우측 도표). 70Gy의 조사 및 72시간의 배양 후에, 초기 자멸성 세포의 45-53%가 얻어졌다(도 1 B 참조, 아래 우측 도표). 비조사된 세포 내에서 아넥신-V 및 IP 염색된 괴사성 세포들이 7.5%였던 것으로부터 조사된 세포에서는 약 15%로 증가하였다(상부 우측 도표). 그리하여, 본 명세서에 있어서 본발명의 조사된 흑색종 세포들은 Apo-Nec 세포로 명명되었으며, 어떠한 Apo-Nec 세포주들(Mel-XY1, Mel-XY2, Mel-XY3 및/또는 Mel-XX4) 중 하나 이상을 포함하는 조성물은 Apo-Nec 조성물로 명명된다.

[0042] 세포의 방사선 조사는 증식능력이 없는 세포를 얻게 하였으며, 본 발명의 Apo-Nec 조성물과 같은 조성물의 제조에 유용하다. 본 발명의 Apo-Nec 조성물이 본 발명의 세포주들 또는 이들의 다른 조합을 포함할 수 있다는 것은 해당 분야의 전문가에게 명백한 것이다. 바람직한 실시예에서, 본 발명의 Apo-Nec 조성물은 Mel-XY1, Mel-XY2 및 Mel-XY3 세포주들의 혼합물 또는 조합을 포함한다. 다른 바람직한 실시예에서는, 본 발명의 Apo-Nec 조성물은 Mel-XY1, Mel-XY2, Mel-XY3 및 Mel-XX4 세포주들의 혼합물 또는 조합을 포함한다. 본 발명의 바람직한 Apo-Nec 세포주들은 우수한 항-종양 면역반응을 유발하는 다중 항원의 조합을 제공한다.

[0043] 놀랍게도, 본 발명의 네 가지 Apo-Nec 세포주들의 혼합물에 의해 제공되는 종양 항원의 조합은 종양에 대해 특이적인 T 세포 면역 반응을 유발하며, 본 발명의 Apo-Nec 조성물로 치료될 경우, 80% 이상의 환자에서 질병이 치료되도록 하였다(도 8 참조).

[0044] 본 발명의 세포주들은 또한 DC/Apo-Nec로 알려진 조성물을 제조하는데 사용되며, 이는 본 발명의 세포주들 중 적어도 하나 및 자가 수지상 세포들을 포함한다.

[0045] 바람직한 실시예에서, 세포주들은 Mel-XY1, Mel-XY2, Mel-XY3 및 Mel-XX4 세포주들의 상이한 조합이다. 제한됨 없이 예를 들자면, 조합은 Mel-XY1 및 Mel-XY2 세포주들의 혼합물, 또는 Mel-XY1 및 Mel-XX4 세포주들의 혼합물을 포함할 수 있다. 바람직한 실시예에서, 조성물은 Mel-XY1, Mel-XY2, Mel-XY3 및 Mel-XX4 세포주들의 혼합물을 포함한다: 따라서, 네가지 세포들이 존재한다.

[0046] 바람직한 실시예에서, 본 발명의 DC/Apo-Nec 조성물은 방사선 조사된 세포주들 Mel-XY1, Mel-XY2, Mel-XY3, Mel-XX4, 및 자가 수지상 세포들의 조합을 포함한다.

[0047] 본 발명의 네 가지 세포주들의 특별한 조합은 수지상 세포들을 충전하기 위한 천연 항원의 독특한 자원을 제공하며, 추가로 클론원성 세포들의 항원을 제공한다. 본 발명의 네가지 세포주들의 조합이 천연 항원의 특별한 조합을 제공하는 것은 물론, 세포 군집의 특별한 조합도 포함하는 것이 반드시 고려되어야 한다. 세포 군집에는 자멸성 세포의 약 50%, 및 괴사성 세포의 약 15%가 존재한다. 상기 군집의 조합은 DC의 성숙을 유발한다.

[0048] 본 발명의 DC/Apo-Nec 조성물의 I단계 연구가 다음 표 2로 특징지어지는 16명의 흑색종 환자들에게서 수행되었다.

[0049] [표 2]: 환자 특징

[0050]

환자	성별	나이	임상 상태	Mts	PBMC ($\times 10^9$ 세포)	DC/Apo-Nec 투여량 ($\times 10^6$ 세포)	투여 횟수	임상평가 (30/3/07)	DTH 평가
1	F	42	IV	LN	3.5	5	4	P (8 m)	4
2	F	57	III	ND	3.6	5	4	NED (54 m+)	8
3	M	32	III	ND	3.3	5	4	NED (35 m+)	14.25
4	F	17	III	ND	4.4	5	4	NED (45 m+)	9.5
5	M	56	IV	L	5	10	4	P (4 m)	4
6	M	60	III	ND	1.5	3	4	NED (37 m+)	4.5
7	M	27	IV	SC	4.2	10	2	WP (1 m)	ND
8	M	26	III	ND	3.6	10	4	P (7 m)	10.5
9	F	42	III	ND	7.5	15	4	NED (71m+)	5.6
10	M	34	IV	LN	6.2	15	4	P (11 m)	5.5
11	M	44	IV	L	4.7	15	4	P (4 m)	10
12	M	56	III	ND	8	15	4	NED (25m+)	4.5
13	M	47	IIC	ND	9.3	20	4	NED (26 m+)	6.5
14	M	30	III	ND	7.5	20	4	NED (39 m+)	7.25
15	M	52	IV	LN	6	20	4	P (10 m)	3.75
16	F	57	IV	SC	8.2	20	4	P (6 m)	5.25

[0051] ND: 검출되지 않음

[0052] SC: 피하

[0053] L: 폐

[0054] LN: 림프절

[0055] 평균 나이는 42세(17세부터 60세까지 분포)였다. 5명의 여성과 11명의 남성이 치료되었다. 환자 중 한명은 IIC AJCC 흑색종 단계였고, 8명은 III 흑색종 단계였으며, 7명은 IV 흑색종 단계였다. #5 및 #11의 환자들은 폐 전이 수술을 받은 적이 있고; #16의 환자는 피하 전이를 가지고 있었으며; #1, #10 및 #15의 환자들은 림프절 피막 파괴로 인해 수술 후 겨드랑이 부위에 방사선 치료를 받은 적이 있었다. Apo-Nec 세포들(본 발명의 DC/Apo-Nec 조성물)과 합동 배양된 수지상 세포들(CDs) 5, 10, 15, 또는 20×10^6으로 네명의 환자무리를 처리 및 세척하였다. 모든 환자들은 각각 2주간 보조제 없이 DC/Apo-Nec 조성물(0.3ml)을 투여받았다. #7의 환자는 2차 접종 후 우측 허벅지에 외상을 입은 후 질병의 급속한 진전 및 비-조절된 감염 때문에 연구계획으로부터 제외되었다: 이 환자는 대체되지 않았다.

[0056] 미성숙 수지상 세포들(DCin)은 다음 양상을 보였다: 95.1±3.6%는 $CD14^-$/CD11c+였고, 70±6%는 $CD1a^+$였다. 순도는 약 60%로 판단되었다.

[0057] 무혈청 배지에 파종된 1×10^8의 PBMC로부터 약 3×10^6의 DC가 얻어졌다.

[0058] 환자들로부터 얻은 DCin 및 본 발명의 DC/Apo-Nec 조성물에 포함된 세포들이 분석된 경우, 환자들(n=15)로부터 얻어진 DCin 세포들의 42.3%±13.7이 본 발명의 Apo-Nec 세포들을 포식할 수 있다는 것이 발견되었다. Apo-Nec 세포들의 포식작용(phagocytosis)은, 전자 현미경으로 DC 내부의 공포(vacuole)에서 전체의 Apo-Nec 세포들 또는 이들 일부를 발견함으로써 평가되었다.

[0059] DC 세포들의 단핵세포 유도체의 성숙 과정에 영향을 미치는 본 발명의 Apo-Nec 세포들의 능력은 흐름세포측정(flow cytometry)에 의한 특이적 DC 세포 마커들의 측정을 통해 관찰되었다(FACS)(FACSCalibur, BD Biosciences, San Jose, CA). 본 발명의 Apo-Nec 세포의 포식작용은 LPS로 배양된 대조군에 비해 DC 세포 성숙 표현형을 유발시켰다. DC 세포 성숙도는 CD83, CD80, CD86, HLA 클래스 I 및 II, 및 CD40 발현의 증가에 의해 입증되었다. 포식작용 이후, DCin에 비해 FITC-Dx 세포내 이입의 75.2%±16의 감소가 발견되었다.

[0060] 케모카인 수용체(C-C 모티프) 수용체 7(CCR7)은 모든 환자 내에서 본 발명의 Apo-Nec 세포들의 포식작용 이후 DC 내에서의 발현을 증가시켰고, 이는 MIP-3β로의 CD 세포 체외 이주와 관련이 있다. DCin 세포들(9.6% CCR7+, MFI: 23.3)은 MIP-3β가 아니라 MIP-1α로 이주하였다; 대조적으로, DC/Apo-Nec 세포들(81.8% CCR7+, MFI: 41.2)은 MIP-1α가 아니라 MIP-3β로 명확하게 이주하였다.

[0061] 낮은 PBMC 수율을 보이고, 그 결과 10×10^6 DC/Apo-Nec 세포 투여량을 얻지 못하고 회당 3×10^6의 세포들만 투여받아야 했던 #6의 환자를 제외하고는, 나머지 모든 환자들은 본 발명의 DC/Apo-Nec 조성물의 예상 투여량을 투여받았다(무리 1: 5×10^6, 무리 2: 10×10^6, 무리 3: 15×10^6, 및 무리 4: 20×10^6). 본 발명의 DC/Apo-Nec 조성물은 매우 내성이 있으며, 발견되는 평균 독성 건수는 항상 1단계였다. 약한 국소반응 및 DTH가 접종 부위에서 발견되었으며, 홍반 및 구진을 동반하였다. 자가면역질환의 소견이 발견된 환자는 없었다(표 3).

[0062] [표 3]: 본 발명의 DC/Apo-Nec 조성물의 접종과 관계된 독성

[0063]

증상	조성물 5×10^6	조성물 10×10^6	조성물 15×10^6	조성물 20×10^6
피로	1/4	1/3	0/4	0/4
두통	1/4	0/3	0/4	0/4
오한	1/4	0/3	0/4	0/4
복부 경련	0/4	0/3	0/4	1/4
국소반응	4/4	3/3	4/4	4/4
무력증	0/4	1/3	0/4	0/4
메스꺼움	0/4	0/3	0/4	1/4

복통	0/4	0/3	0/4	1/4
구토	0/4	0/3	0/4	1/4
식욕부진	0/4	1/3	0/4	0/4
설사	0/4	0/3	0/4	1/4
근육통	1/4	0/3	1/4	0/4

[0064] 수술 이후 41.5개월(25 내지 71개월)의 평균 추적기간 후에도, IIC 단계의 환자들은 질병의 징후를 보이지 않았다(NED); III 단계 환자의 7/8(87.5%)가 NED 였으며, IV 단계 환자의 7/7이 질병의 진전을 보였다(도 2 참조).

[0065] 본 발명의 Apo-Nec의 이종 세포들에 대한 각 접종에 대해 DTH 반응이 평가되었고, 반응의 강도가 평가되었다. DTH 평가점수는 실시예에 기재된 바와 같다. 단지 환자들의 6/15 만이 본 발명의 Apo-Nec 세포들에 대하여 접종 전에 약한 DTH 반응을 보였다. DTH 분석은 Apo-Nec 세포의 접종이 모든 환자들에게서 특이적 반응성을 유발하는 것으로 나타났으며, 이는 제1차 접종 이후 관찰된 기초 반응에 비해 DC/Apo-Nec 조성물의 제2차 투여량의 접종 후 DTH 평가점수가 현저히 상승했기 때문이다(Mann Whithney 테스트 P=0.28, n=15). DTH 평가점수는 질병의 진전을 보였던 환자들 보다 NED 환자들에게서 더 높았다(P=0.28, Mann Wilcoxon Rank Sum 테스트).

[0066] 접종당 DC/Apo-Nec 세포들의 양의 증가는 DTH 평가점수를 현저히 상승시키지는 않았다.

[0067] 본 발명의 조성물에 포함된 살아있는 흑색종 세포들에 대한 체액 반응(humoral reaction)은 접종 전후에 나타나지 않았으며, 이는 FACS 분석법에 의해 평가된 것이다. Apo-Nec 세포에 대한 반응성 항체들의 존재 역시 혈청 내에서 접종 전후에 웨스턴-블롯(Western-blot) 기법에 의해 평가되었다. 네명의 환자(#3, #4, #, #16)에게서 흑색종 단백질의 엷은 띠(>200 kDa)만이 관찰되었으며, 사후-접종 혈청 내에서 검출되었고, 비-특이적 대조군으로 사용된 유방암 세포 추출물 내에서는 발견되지 않았다.

[0068] #1 환자를 위한 자가 흑색종 세포주가 확립되었고, 이에 따라 상기 환자 내에서 자신의 종양 세포에 대한 림프세포 증식 반응을 유발하는 DC/Apo-Nec 세포의 유사한 접종이 평가될 수 있었다. 림프세포 증식은 Apo-Nec #1세포(실시예들에 기재된 바 대로 #1 환자로부터 얻어진 방사선 조사된 종양 세포들)의 접종 전후에 5일간의 림프세포 배양 후에 평가되었다. 도 3은 DC/Apo-Nec #1 세포들에 대한 반응으로서 접종 후 림프세포의 증가가 접종 전 림프세포에 비해 높은 것으로 나타났는데, 이는 Apo-Nec 세포들에 의해 제공된 종양 항원들에 대한 특이적 면역화가 존재하는 것을 의미하며, 이는 DC/Apo-Nec 세포들의 접종 후 #1 환자 종양 내에도 존재한다.

[0069] 연구에 참여한 15명의 환자들 중 7명의 환자가 일배체형(haplotype) HLA-A*0201 클래스 I을 가지고 있었으며, 이는 그들의 PBMC 샘플들 내에서의 제한적인 HLA 종양-특이적 반응의 연구를 가능하게 하였다. 항-gp100 반응, 및 DC/Apo-Nec 조성물에 의해 유발된 특이적 Melan A/MART-1 CD8+ T 세포들이 HLA 테트라머/펩타이드의 특이적 결합, 및 ELISpot에 의해 측정된 IFN-γ 분비를 통해 말초혈액 샘플 내에서 직접 분석되었다.

[0070] I 환자의 5/7는 테트라머의 염색에 의해 gp100 및 Melan A/MART-1에 대해 활성인 특이적 CD8+ T 림프세포의 존재를 분석하기 위해 접종 전(1차 접종 7일 전) 및 후(4차 접종 15일 후)에 충분한 PBMC를 투여받았다. 결과는 표 4 A에 나타내었다. #2 및 #6 환자는 p100 및 Melan A/MART-1 특이적인 CD8+ T세포의 빈도가 접종 후 1% 넘게 현저히 증가하였고 여전히 NED였다(각각, 수술 후 53 및 36개월). 반면, #5, #8, 및 #16 환자는 테트라머 착색이 감소하였다. 이들 모두는 접종 후 질병이 진행되었다(도 3 A 참조). 한 실시예를 #2 환자의 결과로 표 4 B에 나타내었다. Melan A/MART-1 펩타이드를 인식하는 CD8+ T 세포의 백분율은 각각 0.17 및 0.26에서 1.15 및 1.16으로 증가하였다. 건강한 양성 HLA-A*0201 제공자들로 동일한 조건에서 수행된 실험에서는 반응성이 나타나지 않았다.

[0071] IFN-γ의 분비는 접종 전후 총 PBMC의 ELISpot에 대해 gp100 또는 Melan A/MART-1로 부가된 자가 수지상 세포들로 24시간 배양한 후 분석되었으며, 대조군으로서 인플루엔자 펩타이드들(flu_{58-66})을 사용하였다. 상기 분석법은 HLA-A*0201 환자 5/7에게서 평가되었다. 두명의 환자(#5 및 #16)에서 본 발명의 DC/Apo-Nec 조성물의 접종 후 IFN-γ가 유발되었으며, 이는 gp100 및 Melan A/MART-1 특이적인 CD8+ T 세포들에 의해 분비되었다. #5 및 #16 환자에 있어서, 빈도가 $7\text{-}3.5\times10^{-4}$이고 IFN-γ를 분비하는 CD8+ T 세포들이 유발되었다. #2 환자에게서는, 접종 전후에 gp100 및 Melan A/MART-1 특이적인 CD8+ T 세포가 다량 발견되었다. 이 환자는 수술 후 54개월인 현재 여전히 질병이 발병하지 않았다. #8 및 #15 환자들은 기준점(접종전)에서 소량을 나타냈으며, 본 발명의 DC/Apo-Nec 조성물의 4차의 접종 후에도 변화가 관찰되지 않았다.

[0072] 본 발명의 DC/Apo-Nec 조성물 내의 IL-12 및 IL-10 사이의 균형은 포식작용 후 다른 시간에 FACS에 의해 정량되

었고, 이후 사이토카인을 세포질 내에 축적하기 위해 브레펠딘(Brefeldin) A로 8시간 동안 처리하였다. 도 5에 나타낸 바와 같이, DCin의 6.1% 만이 32시간 후에야 IL-12를 생성하였다. 합동배양으로부터, DC/Apo-Nec 세포들의 30.8%가 IL-12를 생성하도록 유도되었다. 한편, DCin의 81.6%가 세포질 내에 사이토카인을 함유하였으며, 이들은 포식작용 후 변형되지 않았다. IL-10 및 IL-12를 생성하는 이중 양성인 세포들은 24시간일때 27.8% 였다(도 5 참조).

[0073] 본 발명의 DC/Apo-Nec 조성물은 안전하였고, 환자들에게 양호하게 내성이었다.

[0074] 본 발명의 DC/Apo-Nec 조성물은 환자 내에서의 세포 반응들을 유도하는데, 면역원으로서 Apo-Nec 세포를 사용하는 DTH 반응이 2차 접종 후에 기준값에 비해 모든 환자 내에서 증가하였기 때문이다.

[0075] 본 발명의 DC/Apo-Nec 조성물로 처리된 환자들의 85%(IIc 및 III 단계)는 수술 후 평균 41.5개월 동안의 추적 후에 질병이 발병하지 않았다(도 2 참조). 본 발명의 DC/Apo-Nec 조성물은 흑색종을 가진 환자들의 치료에 그 자체로 효과가 있으며, 또한 라디컬 치료 후 보조제로서도 유용한데, 이는 환자들의 면역반응을 촉진하고, 면역 시스템은 환자들에 있어서 가능한 재발을 방지하면서 모든 잔여 종양세포들을 제거하기 때문이다. 더욱 구체적으로는, 본 발명의 DC/Apo-Nec 조성물은 더 적은 양의 종양을 가진 단계 IIB, IIC 및 III 단계에 있는 환자들의 치료에 유용하며, 단계 IV의 환자들에 대한 라디컬 치료 후 보조제로서 유용하다.

[0076] 본 발명의 DC/Apo-Nec 조성물이 인간 흑색종의 치료에 사용될 수 있다는 것은 해당 업계의 기술자들에게 자명하다; 이것은 또한 다른 치료와 함께 보조제로서도 사용될 수 있으며, 예를 들면 환자의 상태 및 치료의 단계에 의존하면서 면역 시스템의 촉진제로도 사용될 수 있다.

[0077] 중요하게는, 본 발명의 Apo-Nec 세포들의 조합은 자가 DC 세포들의 숙성을 유도한다는 것이 주목되어야한다. 본 발명의 Apo-Nec 세포들의 혼합물 또는 조합은 수지상 세포들을 충전하기 위한 흑색종 항원의 우수한 근원이다. 수지상 세포들은 예를 들면 숙성 혼합물로 일반적으로 사용되는 인터류킨(Interleukine) 1, 종양괴사인자 α, CD40 리간드 또는 프로스타글란딘(Prostaglandin) E와 같은 여분의 촉진제의 추가 없이도 본 발명의 Apo-Nec 세포들과 접촉 및 포식작용에 의해 단지 숙성된다. 본 발명의 Apo-Nec 세포들을 포식하는 DC들은 케모카인-3β 및 IL-12의 세포내 생성에 반응하여 체외 이주를 증가시킨다. 본 발명의 DC/Apo-Nec 세포들은 특이적 CTL 항원들에 대해, 교차된 천연 종양 항원을 제공하는 기능이 있다.

[0078] 전술한 바와 같이, 각 환자들의 DCin에 의한 Apo-Nec 세포들의 포식작용은 이러한 DC의 성숙을 유발한다.

[0079] 한편, 본 발명의 세포주들은 그들의 클론원성(clonogenic) 기능에 대해 분석되었다. 연한천 내의 본 발명의 MEL-XY3 세포주 콜로니들은 세포간 낮은 접합성을 가지며 이종의 형태를 제공한다. 낮은 비율의 흑색종 콜로니들이 관찰되었다. 연한천 내의 본 발명의 MEL-XY1 세포주 콜로니들은 포함된 세포들 사이에 높은 접합성을 가지며 밀집된 형태를 제공하였다. 낮은 비율의 흑색종 콜로니들이 전혀 관찰되지 않았다.

[0080] 콜로니들을 특징짓는 방법으로서, 본 발명의 연한천 내의 세포주 내의 β-액틴의 발현에 대해 흑색종 항원의 발현도가 비교 및 정규화되었다. 클론 분류 결과는 표 4 및 도 6에 나타내었다.

[0081] [표 4]

[0082] 본 발명의 세포주들 및 본 발명의 클론원성주(clonogenic line) 사이의 항원 발현의 비교분석

[0083]

흑색종 분화 항원	세포주			
	MEL-XY3 세포주	MEL-XY3 콜로니	MEL-XY1 세포주	MEL-XY1 콜로니
MART1	+++	+	+	+
MAGE1	+	ND	+	ND
NYESO-1	++++	+	+	+
GP100	+	++	+	+
TYR	+	ND	+	ND
TRP2	+*	+*	+*	+*
B-ACTIN	+	+	+	+

[0084] ND: 검출되지 않음

[0085] *: 정규화되지 않은 자료

[0086] 관찰되는 바와 같이, 군집 및 본 발명의 각 세포주 내에, 클론원성 세포들의 특정 군집이 존재하며, 이러한 클론원성 세포들 역시 본 발명의 범위 내에 포함된다. 클론원성 세포들의 존재는 분화되지 않은 세포들 및 줄기세포에 대해서도 전형적인 항원을 환자들에게 제공할 수 있다.

[0087] 흑색종 종양은 이질성이 높으며, 따라서 면역 치료를 위해 세포주들 및 이들의 특정 행물형군의 혼합물 또는 조합에 의해 제공되는 복합 항원 혼합물을 사용하는 것이 기초적이다. 예로서, 도 7에는 멜라닌 세포 분화 항원의 발현에 대해 이러한 종양들의 이질성을 증명하는 기초 흑색종 생검을 나타내었다.

[0088] 환자들이 이후 실시예들에 기재된 계획에 따라 보조제로서 BCG 및 면역 조절제로서 GM-DSF와 함께 본 발명의 Apo-Nec 조성물로 치료될 때, 환자들의 75%(단계 IIC 및 III)가 최대 51개월의 추적 후에 질병이 발병하지 않았으며(도 8 참조), 독성이 단지 단계 1로 낮았다.

[0089] 한명의 선택된 계획적 환자로부터의 예시적 결과를 나타내었다. #200 환자는 67세 여성 코커시안으로, 2003년 11월에 참가하였다. 그녀는 2002년 6월에 증가된 등쪽 네뷤(nevume)으로 수술을 받은 적이 있었다. 조직학적으로는 클라크 레벨 IV, 브레슬로우(Breslow) 레벨 7의 피부 흑색종이 발견되었다. 2002년 8월, 약간의 위성증(satellitoses)이 관찰되었고, 이를 절제하였다. 환자는 Apo-Nec + BCG + GM-CSF를 투여 받았고, GM-CSF는 600 ㎍(조성물 당)이었으며, 치료가 끝난 후 약간의 독성을 보였다. 최종 임상 시험에서, 의심되는 결절이 등에서 발견되어 이를 절제하였으며, 현미경 사진은 도 9에 나타내었다. 살아있는 종양 영역이 남은 채로 강한 림프계 증식이 관찰되었을 뿐 아니라, 강한 종양 조직 괴사 및 멜라닌으로 충전된 마크로파지들의 존재도 관찰되었다.

[0090] 예로서, 본 발명의 Apo-Nec 조성물 + BCG + IFN-α로 치료된 환자의 결과도 나타내었다. #300 환자는 17세 남성으로, 좌측 서혜부 선병증(inguinal adenopathy)을 가지고 있었다. 2개월 후, 또다른 좌측 서혜부 절제가 행해졌고, 여기서 흑색종 전이를 가진 결절의 4/11가 얻어졌다. 그는 적은 양의 인터류킨-2로 치료받았다.

[0091] 2차 절제 14개월 후 좌측 서혜부 활(inguinal arch)에서 재발이 감지되었고, 다시 수술이 행해졌으며, 여기서 흑색종 전이를 가진 결절의 5/7가 분리되었다. 이 환자는 등통(back pain)이 있었다. 축방향 전산화단층촬영은 복막뒤 선병증을 밝혀내었고, 다트마우스(Dartmouth) 계획에 따른 화학요법이 행해졌다. 화학요법을 마친 후, 본 발명의 Apo-Nec 조성물 + BCG로 치료를 시작하였다. 본 발명의 조성물로 치료를 시작한지 14개월 후, 좌측 서혜부에서 결절이 감지되었다. 이 환자에게 수술을 행하였고, 거대 림프형질세포(lymphoplasmacyte) 침윤과 함께 흑색종 전이가 관찰되었다. 이 환자는 Apo-Nec 조성물 + IFN-α로 치료가 계속되었다. 도 10에 좌측 폐 결절의 완화를 나타내었다. 현재, 이 환자는 질병이 완치되었다.

[0092] 본 발명은 흑색종 세포주에 대해 기재하고 있고, 대부분의 흑색종 관련 항원들, 이러한 방사선 조사된 세포주를 포함하는 조성물, 및 흑색종 세포주의 자멸성/괴사성 세포들의 혼합물을 포식한 체외 생성된 자가 DC를 포함하는 조성물을 함께 기재하고 있다.

[0093] 본 발명은 다음의 실시예에 의해 더욱 잘 묘사될 것이며, 실시예들은 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 이해되어서는 안된다. 반면에, 기타 실시예, 변형, 및 균등한 것들이 참조될 수 있는 것이 명백하며, 이들은 본 명세서를 읽고 난 후, 본 발명의 개념 및/또는 첨부된 청구항의 범위를 벗어나지 않고 해당 분야 전문가에게 제안될 수 있을 것이다.

실 시 예

[0104] 실시예 1: 본 발명의 세포주들의 획득, 확립 및 유지

[0105] Mel-XY1: 코커시안 남성 환자의 등에서, 2차로부터 1차 흑색종으로의 허파 전이에서 세포주 Mel-XY1을 얻었다. 환자는 2년 후 뇌로의 전이로 사망하였다.

[0106] Mel-XY2: 세포주를 제공한 환자는 등에 궤양성 흑색종(클라크 레벨 III)이 있는 44세의 코커시안 남성이었다. 2년 후, 유사한 겨드랑이 선병증 및 폐 전이로 발전하였다. 겨드랑이 선병증은 절제 및 분리 되었고, 이러한 세포들이 세포주를 제공하였다.

[0107] Mel-XY3: 환자는 43세 코커시안 남성이었고, 팔에 1차 흑색종이 있었다. 2년 후, 겨드랑이 림프절 전이가 나타났다. 환자는 DTIC로 화학요법을 받았으며, 뚜렷한 임상적 반응은 없었다. 겨드랑이 전이는 절제되었고, 이로부터 세포주 Mel-XY3가 얻어졌다.

[0108] Mel-XX4: 33세 백인 여성의 서혜부 선병증 수술로부터 얻어졌으며, 이 선병증은 흑색종 전이로 진단된 것이다. 원발성 종양(primary tumor)은 밝혀지지 않았다. 15개월 후, 환자는 서혜부 림프절에서 재발하였다. 거대 흑색종 결절이 절제되었고, 작은 조각으로 분획되었으며, 지방 및 연결 조직을 제거하고, DMEM(Dulbecco modified by Eagle's Medium)에 현탁하였으며, 나일론 메쉬 상에서 압력에 의해 기계적으로 분리되었다. 세포 응집물은 37℃에서 밤새 효소처리되었다.

[0109] 세포들은 10%의 소 태아 혈청(FBS)(Natocor, Cordoba, Argentina)이 보충된 흑색종 배양 배지 내에서 재현탁되었고, 25㎠ 배양 플라스크에 파종되었으며, 습하고 5% CO_2 - 95% 대기 하에 37℃에서 배양되었다. 비접합된 세포들을 제거하기 위해 24시간 후 배양배지를 제거하였다.

[0110] 세포 현탁액은 항-섬유모세포 미세구 컬럼(Miltenyi Biotec, Germany)을 4회 통과시켰다. 얻어진 세포들은 Mel-XX4로 명명하였다.

[0111] 본 발명의 네가지 세포주들(Mel-XY1, Mel-XY2, Mel-XY3, 및 Mel-XX4)의 유지는 2mM의 글루타민, 20nM의 소듐셀레나이트, 100μM의 아스코르브산, 0.3mg/ml의 갈락토오스, 0.15mg/ml의 피루브산 나트륨, 및 5㎍/ml의 인슐린, 100IU/ml의 페니실린, 10㎍/ml의 스트렙토마이신이 보충된 흑색종 배지 DMEM:F12 영양 혼합물(1:1) 내에서 10%의 소 태아 혈청(FBS)(Natocor, Cordoba, Argentina)(GMP Laboratory of Centro de Investigaciones Oncologicas-FUCA)을 첨가하여 배양을 통해 행해졌다.

[0112] Melan A/MART-1(M27: AAGIGILTV) 및 gp100(G154: KTWGQYWQV) 항원들에 특이적인 CTL 클론들(제한된 HLA A*0201)이 10%의 비활성 인간 혈청, 항생제와 함께 30ng/ml의 항체 항-CD3(OKT-3, BD Biosciences) 및 일련의 300UI/ml IL-2(Chiron BV, Amsterdam, Netherlands)를 3일마다 이용하여 14일 순환으로 RPMI 배지 내에서 확장되었다.

[0113] 실시예 2: 세포주 특성화

[0114] 체외 성장 역학:

[0115] 10^4 세포들이 24웰 플레이트(코닝)의 웰에서 배양되었다. 매 2-3일 마다 세포들은 EDTA(0.02%)로 처리되었고, 수집하여 계수하였다. 군집 복제시간은 지수증식기(exponential phase) 동안 성장 곡선 기울기로부터 계산되었다.

[0116] 클론원성(clonogenicity)

[0117] 고정독립(anchoring independent) 세포 성장은 연한천법(Hamburger, 및 Slamon, Science 197: 461, 1977)에 의해 측정되었다. 3-100×10^3 세포들이 상부층에서 배양되었다. 플레이트는 21일간 배양되었고, 이후 매일 50㎕의 배양 배지를 추가하였다. 36세포 이상의 콜로니들을 현미경 아래에서 계수하였다.

[0118] 면역화학(ICC) 및 FACS에 의한 흑색종 항원의 특성화

[0119] ICC 분석을 위해, 지수적으로 성장하는 세포들을 EDTA로 처리하여 원심분리, 포름알데히드로 고정, 파라핀에 침적하고 미세한 분획으로 절단하였다. 환자의 정상조직 샘플을 대조군으로 사용하였다.

[0120] 조직 및 세포들은 케라틴, 비멘틴, 및 gp100/HMB 45(Biogenex), MART1/Melan-A(Dako)에 대한 단클론성 항체들(Mabs) 및 다클론성 항체들 항-S100 (Biogenex)과 함께 분석하였다.

[0121] 반응은 아비딘-비오틴 착물(Vectastain ABC)로 가시화되었다. 내인성 과산화물은 0.6% H_2O_2로 차단되었다.

[0122] EDTA 처리된 세포들을 재현탁함으로써 간접 면역형광 반응이 수행되었다. 10% 희석된 정상 염소 혈청으로 차단한 후에, 세포들을 1차 항체들로 배양, 세척, 2차 항체들로 배양(FITC 항-생쥐 염소 면역글로불린)(Dako), 세척, 1% 파라-포름알데히드 내에 고정하고, FACS(FACS Vantage SE, Becton-Dickinson, USA)로 분석하였다. 1차 항체들은 생쥐의 항-p53 Mabs (DO-7, BD Pharmingen), 3F8 항-GD2, R24 항-GD3였다. p53의 경우, 세포들이 투과되었다. 인간 류코사이트 항원(HLA) 클래스 I, 및 클래스 II가 PCR-SSP에 의해 특성화되었다.

[0123] RT-PCR에 의한 흑색종 연관 항원 측정:

[0124] 총 RNA가 트리졸(Trizol)(Invitrogen)로 추출되었다. cACN 합성을 개시하기 위해, 적절한 프라이머가 1-3㎍

RNA에 첨가되었고, 200 U MMLV-RT 효소(Promega), 20-40 U RNAsin(Promega), 및 250-500 μM dNTPs (Invitrogen)으로 70℃에서 5분간, 이후 40℃에서 60분간 배양되었다. cDNA부분(2-10㎕)이 Taq DNA 중합효소에 의해 특정 쌍 또는 프라이머를 사용하여 증폭되었다.

[0125] 구체적인 프라이머들은 아래에 나타낸 것이다:

[0126] Gp100

[0127] 5'-GCTTGGTGTCTCAAGGCAACT-3'(SEQ ID No.1)

[0128] 5'-CTCCAGGTAAGTATGAGTGAC-3'(SEQ ID No.2)

[0129] MART-1

[0130] 5'-CAAGATGCCAAGAGAAGATGCTCACT-3'(SEQ ID No.3)

[0131] 5'-GCTTGCATTTTTCCTACACCATTCCA-3'(SEQ ID No.4)

[0132] 티로시나아제

[0133] 5'-TTGGCAGATTGTCTGTAGCC-3'(SEQ ID No.5)

[0134] 5'-AGGCATTGTGCATGCTGCTT-3'(SEQ ID No.6)

[0135] 5'-GTCTTTATGCAATGGAACGC-3'(SEQ ID No.7)

[0136] 5'-GCTATCCCAGTAAGTGGACT-3'(SEQ ID No.8)

[0137] TRP-2

[0138] 5'-GAGTGGTCCCTACATCCTACG-3'(SEQ ID No.9)

[0139] 5'-GCGTCCTGGTCCTAATAATGT-3'(SEQ ID No.10)

[0140] MAGE-1

[0141] 5'-GAGTCCTCAGGGAGCCTCC-3'(SEQ ID No.11)

[0142] 5'-TTGCCGAAGATCTCAGGAAA-3'(SEQ ID No.12)

[0143] NY-ESO-1

[0144] 5'-AGCCGCCTGCTTGAGTTCTACCTC-3'(SEQ ID No.13)

[0145] 5'-AGGGAAAGCTGCTGGAGACAG-3'(SEQ ID No.14)

[0146] MDR-1

[0147] 5'-TCCAAGAAGCCCTGGACAAAG-3'(SEQ ID No.15)

[0148] 5'-TTGATGATGTCTCTCACTCTGTTCC-3'(SEQ ID No.16)

[0149] MIA

[0150] 5'-CATGCATGCGGTCCTATGCCCAAGCTG-3'(SEQ ID No.17)

[0151] 5'-GATAAGCTTTCACTGGCAGTAGAAATC-3'(SEQ ID No.18)

[0152] β-actin

[0153] 5'-ATGTTTGAGACCTTCAACACCCC-3'(SEQ ID No.19)

[0154] 5'-GCCATCTCTTGCTCGAAGTCCAG-3'(SEQ ID No.20)

[0155] 안티-센스 프라이머들은 아랫줄에 나타내었다.

[0156] 티로신 검출을 위해, 내부 프라이머화 함께 최초 PCR반응(Nested PCR)으로부터 1/100 부 역시 증폭되었다.

[0157] PCR 생성물은 아가로스 겔 내에서 분석되었고, 에티디움 브로마이드로 염색되었다: 분절의 크기는 100 bp DNA PM 마커(Promega)와 파종된 럼(rum)과 비교함으로써 계측되었다.

[0158] 세포유전학 및 분자세포학적 분석:

[0159] 본 발명의 4가지 세포주들에 상응하는 세포들이 세포유전학적 분석을 위해 8-16시간 동안 37℃에서 지수적 성장 콜키신(colchicine)(0.1㎍/ml) 내에서 배양되었고, 트립신-EDTA 용액으로 수집되어 표준 프로토콜에 따라 진행되었다. G-밴드 기법이 사용되었다. 인간 세포유전학적 명명법을 위한 국제 시스템에 따라 염색체 식별이 행해졌다(Mitelman, 1995 ISCN.: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature, (ed. S Karger, Basel)).

[0160] 실시예 3: 단핵세포로부터의 수지상 세포들(DC) 생성, 이들의 특성화, 및 Apo-Nec 세포들로 충전

[0161] 수지상 세포들은 건강한 제공자들의 백혈구 연층(buffy coat) 또는 혈구 성분채집(leukopheresis) 결과물로부터 얻어졌다. 말초 단핵세포들(PBMCs)은 Fycoll-Hypaque 밀도 기울기에 의해 정제되었다. PBMCs는 신선한 AIM-V™ 무혈청 배지(Invitrogen) 내에 현탁되었고, 배양 플라스크(TPP, Germany) 내에 부착되어 남겨졌다. 37℃에서 두 시간 후, 비접합된 세포들은 제거되었고, 접합된 단핵세포들은 800 U/ml rhuGM-CSF 및 50 ng/ml IL-4(Peprotech, Mexico)가 보충된 AIM-V 내에서 5일간 배양되었고, 그결과 CDin이 얻어졌다. 표현형의 변화는 광학현미경 및 FACS에 의해 분석되었다. DCin 조절 성숙을 유도하기 위해 2 mg/ml LPS(*E. coli* J5 지질다당질, Sigma, St. Louis, CA) 및 최종적으로 세포들이 48시간 동안 배양되었다.

[0162] 세포들이 비성숙단계(DCin)일 때, DC 세포 표현형의 특성화가 수행되었고, 이후 CD14, CD11c, CD1a, HLA 클래스 II, CD80, CD86, CD83, CD40, HLA 클래스 I, 및 CCR7 항원(BD Biosciences, San Jose, CA)에 대하여 플루오로크롬으로 표지된 항체들로 5×10^5 세포들을 염색함으로써, FACS 분석(Becton Dickinson, San Jose, CA)을 통해 자멸성/괴사성 세포들(Apo-Nec 세포들)의 포식작용 분석이 수행되었다. 적절한 iso-형태의 대조군은 쥐 IgG2a PE, 및 생쥐 IgG1 및 IgG2a 였다(BD Biosciences, San Jose, CA). 비표지된 단클론성 항체 항-CD83(IgG1), 및 대조군으로서 적절한 iso-형태를 채용하여, Apo-Nec 세포들을 포식하는 DCs 내에서의 CD83의 발현도 역시 분석되었다; 발달을 위해 항-생쥐 IgG1-PerCP(BD Biosciences, San Jose CA)가 사용되었다.

[0163] DC의 세포내 이입 능력은 1×10^6 DC를 FITC(Dx-FITC)(Sigma, St Louis, CA)로 1mg/ml의 결합된 덱스트란과 함께 37℃에서 30분간 배양함으로써 측정되었다. 배양 후, 세포들은 PBS로 세척되었고, FACS에 의해 분석되었다. 대조군은 세포내 이입 과정을 억제하기 위해 Dx-FITC로 4℃에서 30분간 배양된 DC를 포함하였다; 한편, 분석시간 0일 때를 기초 통합으로 정하였다. Dx-FITC 통합(세포내 이입)은 FACS에 의해 정량되었다.

[0164] DC세포 포식작용의 평가:

[0165] DCin 세포들은 신선한 AIM-V 배지 내에서 다른 시간에 Apo-Nec 세포들(앞서와 같이 제조)과 합동배양되었다. 일부 분석에서, DC들은 PKH26으로 붉게 염색되었고, Apo-Nec 세포들은 PKH67로 녹색으로 염색되었다(Sigma, St. Louis, CA). 합동배양 후 FACS에 의한 분석이 수행되었고, Apo-Nec 세포들을 포식하는 DCdml 백분율이 이중 양성 세포들의 백분율로서 정의되었다. 각 색에 대해 적절한 조절이 수행되었다. Apo-Nec 세포들과 DC의 비특이적 결합의 조절은 동일한 시간동안 세포들을 4℃에서 배양함으로써 수행되었다.

[0166] DC 체외 이주:

[0167] DC 체외 이주는 48-웰 화학주성 챔버(AP 48 Neuroprobe Inc., Gaithersburg, MD)를 이용하여 Apo-Nec 세포들과 합동배양 전후에 측정되었다. RPMI에 희석된 10ng/ml의 MIP-1α 또는 MIP-3β(Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA)을 바닥칸 내에 배치하였다. 기본 이주는 RPMI를 하부 챔버에 배치함으로써 측정하였다. DC들은 상부 챔버의 RPMI 내에 파종(3 x 10^4 CDs/well)되었다. 5㎛ 공극의 폴리-카보네이트 막이 상부 및 하부 챔버 사이에 배치되었다(Neuroprobe, Inc., Bethesda, MD). 37℃에서 90분 후, 막의 윗면의 세포들을 제거하고, 이주하여 막의 아랫면에 부착된 세포들은 10% 중성수에 희석된 김자(Giemsa)로 염색되었다. 막은 공기중 건조되었고, 캐나다 발삼(balsam)과 함께 슬라이드 상에 장착되었으며, 현미경을 이용하여 이주 횟수를 계수하였다. 40배의 배율로 웰당 5영역이 분석되었고, 3웰/조건이 분석되었다. 스튜던트 검정(Student's Test)에 의해 통계학적 분석이 수행되었다.

[0168] 전자현미경:

[0169] 전자현미경에 의해 포식작용 과정 역시 연구되었다. 합동 배양된 샘플들은 0.1M 포스페이트 버퍼 내에 2.5% 글루타알데하이드로 고정되었고, 1% 오스뮴 테트록사이드로 고정후 염색이 수행되었으며, 이들은 증류수로 2회 세척되었고, 2시간 동안 5% 우라닐 아세테이트로 교차-염색되었다. 세척 및 탈수 후에 샘플들은 수지(Durkupan) 내에 침적되었다. 초박 영역(70-90nm)이 얻어졌고, 구리 메쉬 상에 배치되었으며, 레이놀드 납 시트레이트로 교차염색되었다. 메쉬들은 Zeiss 109 투과전자현미경에서 분석되었다. 선택적으로는, 완벽한 세포들의 형상을 얻기 위해, 얇은 영역(0.5㎛)가 초-박절기(Reichert-Jung) 내에서 얻어지고, 0.1M 카보네이트 버퍼, 및 0.4% 톨루이딘 블루로 염색되고, Durkupan 상에 배치되었으며, 광학현미경(1000×)으로 관찰되었다. 소니 사이버샷 디지털 카메라(5메가픽셀)로 이미지를 찍었으며, 어도비 포토샵 6.0 프로그램으로 작업하였다.

[0170] 체내 교차 제공 분석, IFN-γ 분비:

[0171] 98% CD14+ 단핵세포들이 항-DC14 미세구(Miltenyi Biotec, Germany)를 이용하여 HLA A*0201 제공자로부터 정제되고 앞서와 같이 5일간 배양에 의해 DCin세포들로 분화되었다. DCin 세포들은 Apo-Nec 세포들과 함께 6, 12, 24 및 48시간 동안 배양되었고, 1ml AIVM 배지 내에서 특이적 CTL MelanA/MART-1 또는 gp100 클론에 대해 밤새 노출되었다. 상청액에 대한 IFN-γ분비는 ELISA 기법(OptEIA IFN-γ, Pharmingen BD Biosciences, San Diego, CA)에 의해 3중체 내에서 제조사의 제안에 따라 측정되었다. 각 실험에 대해 정규화 곡선이 작도되었고, 로그-로그 회귀 분석을 이용하여, Cembal 2.2 소프트웨어를 이용하여 샘플 농도가 계산되었다. 대조군은: DC + 20㎍/ml의 MART-1 또는 gp100 펩타이드, MART-1 및 gp100 항원들을 발현시키는 HLA A*0201$^+$ 흑색종 생세포주들(양성 대조군), 또는 비특이적 펩타이드들과 배양된 DC 세포들, 및 적절한 항원들을 발현시키지 않는 HLA A*0201$^+$ 흑색종 생세포주(음성 대조군)를 포함하였다.

[0172] 세포질내 사이토카인 IL-10 및 IL-12의 측정:

[0173] PKH26(빨강)으로 표지된 DC들이 다른 시간에 PKH67로 표지된 Apo-Nec 세포들과 합동배양되었다(6, 12, 24 및 48시간). 축적된 사이토카인 측정은 세포내 면역형광기법에 의해 이들의 생성물을 배양 후(Golgi Plug, BD Biosciences, San Jose CA) 브레펠딘 A로 차단(8시간)한 다음 행해졌다. 세포들은 0.05% 사포닌으로 투과되었고, 항-IL10 (쥐 동형 IgG2a)-APC, 및 항-IL12 서브유닛 p40-p70 (생쥐 동형 IgG1)-PerCp(BD Biosciences, San Jose, CA)로 염색되었다. 이중염색된 PKH26/PKH67 군집은 FACS에 의해 연구를 위해 선별되었고, 사이토카인들은 상기 군집들에 대해 4색 실험에서 분석되었다. 4℃에서의 합동 배양물이 대조군으로 사용되었다.

[0174] 실시예 4: 본 발명의 조성물의 제조, 및 접종 계획

[0175] Apo-Nec 조성물:

[0176] 세포주의 방사선 조사:

[0177] 본 발명의 4가지 세포주들(Mel-XY1, Mel-XY2, Mel-XY3, 및 Mel-XX4)은 70Gy에서 감마선으로 조사되었고, 이어서 세포들은 사용시까지 액체질소 내에서 동결되었다(50% DMEM, 40% 인간 알부민, 및 10% DMSO).

[0178] 세포 접종일, 이들을 해동하여 세척하고, 이들을 DMEM 배지 내에 재현탁하여 본 발명의 각각 분리된 세포주들의 5-10×10^6세포들, 또는 이들의 조합을 포함하는 조성물 투여량으로 제조하였다.

[0179] 300㎕를 피하주사하였다.

[0180] DC/Apo-Nec 조성물:

[0181] 자멸성/괴사성 종양 세포들의 제조:

[0182] 상기한 방법으로 방사선 조사 및 동결된 세포들(Mel-XY1, Mel-XY2, Mel-XY3, 및 Mel-XX4)을 해동하여 흑색종 배지 + 10% 소태아 혈청 내에 자멸 과정이 종료될 때까지 파종하였다. 72시간 배양 후, 세포들을 플라스크 바닥으로부터 분리하여 세척, 계수하고, 신선한 AIMV™ 무혈청 배지 내에 재현탁하였다(치료등급, GIBCO, Invitrogen Corporation, Grand Island, N.Y). 자멸 및 괴사는 Anexin-V FITC 링크 기법 및 프로피디움 요오드(IP)의 통합에 의해 분석되었고(Anexin-V 세포자멸 감지키트, BD Biosciences, San Jose, CA), FACS에 의해 분석되었다. 방사선 조사된 세포들 내에서의 증식능력을 분석하기 위해 연한천 내의 클론원성 분석이 6배체(1.5×10^4세포/웰) 내에서 수행되었고, 비-조사된 대조군 세포들과 비교되었다.

[0183] 각 환자의 복용량에 따라, 5, 10, 15 또는 20×10^6 DC들이 37℃에서 48시간 동안 AIMV 배지 내에서 Apo-Nec 세포들과 합동배양되었다. 접종일, 합동배양된 세포들은 1200rpm으로 5분간 원심분리된 후, DMEM 배지 내에 재현탁(300)되었고, 림프절의 완전한 배액과 함께 사지 중 한곳에 피하주사되었다.

[0184] 품질관리, 및 불임 측정이 모든 조성물에 대해 행해졌다.

[0185] 실시예 5: 환자 연구 계획, 및 선택 기준:

[0186] 치료에 대한 독성, 생활성, 및 면역반응을 평가하기 위한 환자 내 연구가 수행되었다. 연구는 Instituto Alexander Fleming의 재활 평가원(Institutional Revision Council) 및 윤리위원회(ethics commission)에 의해 승인되었다. 생활성 기준은 (a)IIB, IIC, III, 또는 IV 단계(AJCC)의 조직학에 의해 확인된 피부 흑색종; (b)전산화 축방향 단층촬영에 의해 평가된, 수술 후 최소 또는 미검출(ND)된 질병을 가지고, 락테이트 디하이드로게나아제(LDH) 효소수치를 가진 환자. 미지의 1차 흑색종을 가진 환자는 연구에서 배제될 수 있다; (c)15 내지 60세; (d)기대수명 > 6개월; (e)수율(ECOG) 0 또는 1; (f)질병의 진전, 독성, 또는 기타 임상적 원인으로 치료가 종료되거나 중단된, IFN-α로 정밀 치료된 단계 III의 환자, 또는 수술 이전 6개월 내에 IFN-α로 치료가 개시된 적이 없는 환자; (g)혈구성분 채집 과정을 위한 적절한 정맥 접근성; (h)실험 선정 기준: 헤모글로빈 > 10gr%; 백혈구수 > 4800/㎣, 혈소판 > 150,000/㎣; 총합 및 직접적인 빌리루빈(bilirrubin), 옥살아세틱 트랜스아미나아제(transaminase), 글루타믹-피루빅 트랜스아미나아제(transaminase) < 정상 최고수치의 1.5배; LDH < 450mU/ml; (i)크레아티닌 < 1.4mg%; (k)전월에 화학요법, 방사선 치료, 또는 생화학적 치료를 받지 않았을 것; 코르티코스테로이드 또는 비-스테로이드 항-염증성 의약(AINEs)의 투여가 없었을 것; (l)활발한 뇌 전이가 없을 것; (m) 정상적인 ECG; (n)모든 환자의 동의.

[0187] 환자 평가 및 치료계획:

[0188] 1차 접종 전 35일 이내에 환자 기본 평가가 행해졌다. 임상 평가는 완전한 임상 병력, 신체적 시험, 심전도(ECG), 전산화 축방향 단층촬영(흉부, 복부, 골반 및 두뇌), 종양 단계, 종양 크기의 측정, 및 질병부위 조사, 화학적 혈액 테스트, 및 혈액학을 포함하였다. 선택된 환자들은 PBMC를 얻고 DC를 생성하기 위해 혈구성분 채집을 받았다.

[0189] 환자들은 2주 간격으로 DC/Apo-Nec을 4회 접종받았다. 접종은 피하에 이루어졌고(300㎕), 보조제 없이 5 내지 20×10^6 사이의 DC/Apo-Nec 세포들을 아래팔에 주사한 채 각 복용량에 대해 DTH 테스트가 평가되었다. 생체 신호 및 DTH 피부 반응이 접종 후 2, 24 및 48시간에 분석되었다. 환자 상태는 70일째에 복부 초음파 및 흉부 X-선으로 조사하였으며, 계획은 75일째 임상 시험과 함께 종료되었다.

[0190] 본 발명의 Apo/Nec 세포들의 접종을 위해, 환자들은 온전한 림프절을 가진 사지 중 하나에 진피주사(id)되었다. 20명의 환자는 400 ㎍ rhGM-CSF 복용량(100 ㎍/일, 4일간)을 투여받았다. 접종일, 0.1ml hGM-CSF를 Apo-Nec(0.3ml 내에 16×10^6의 세포), 및 0.05ml의 BCG(1×10^6의 콜로니 형성 유닛)와 혼합하였다. 이후 3일 동안, 0.1ml의 hGM-CSF를 접종 부위에 진피내(id) 주사하였다. 각 환자는 각각 3주간 4회 접종 받았고, 이후 1년 동안

2개월마다 1 조성물, 이후 2년차에는 3개월 마다 1 조성물, 이후 6개월 마다 1 조성물의 투여를 계속하였다.

[0191] 통계학적 분석:

[0192] 모든 부작용은 국립 암 연구원(NCI)의 일반 독성 기준에 따라 분류되었다.

[0193] 모든 환자들이 4회의 접종을 받았을 때 평가 가능한 군집이 정의되었다. 대부분의 환자 자료들이 정상적으로 분포하지 않았기 때문에, 자료의 총 합은 윌콕슨 랭크 총합 테스트를 이용하여 분석되었다. 상이한 양의 DC/Apo-Nec를 투여받은 상이한 그룹들의 DTH 수치는 하나의 변수 ANOVA, 및 던넷(Dunnett) 다중 비교 테스트로 각 그룹간에 비교되었다. $P < 0.05$ 수치는 현저한 것으로 판단되었다.

[0194] 치료된 환자들의 면역반응 평가방법:

[0195] 환자의 면역반응을 평가하기 위해, 접종 7일 전(사전 혈청), 치료 종료 후 15일째(사후 혈청)에 혈청을 얻었고, 샘플들은 -80℃에서 보관되었다. PBMC 세포들은 혈구성분 채집(접종전)으로부터, 또는 최종 접종 후 15일째(접종후)에 얻은 혈액으로부터 Ficoll-Hypaque 기울기 및 연이은 원심분리에 의해 정제되었고, PBMC는 면역학적 분석에 사용되기까지 50% DMEM, 40% 인간 알부민, 및 10% DMSO 내에서 동결되었다. HLA-A*0201 HLA 정형화는 FITC(BD-Pharmingen, San Jose, CA)와 접합된 생쥐 항-HLA*A0201 단클론성 항체들과 환자 샘플을 배양한 후 결정되었다.

[0196] DTH 반응:

[0197] 각 접종일, 아래팔에서 2×10^6 Apo-Nec 세포들로 DTH 시험이 행해졌고, 반응은 접종 후 2, 24 및 48시간에 평가되었다. DTH 강도 수치는 다음과 같이 확립되었다: 0: 홍반 < 0.5cm; 1: 반점홍반 0.5-1.0cm; 2: 반점홍반 1.0-2.0cm; 3: 반점홍반 > 2.0cm, 또는 구진홍반 1.5cm; 4: 구진홍반 > 1.5cm. 비축된 DTH는 모든 각개 DTH 강도의 총합/4에 해당한다.

[0198] 증식 평가:

[0199] 사전- 및 사후-조성물 PBMC는 Ficoll-Hypaque 밀도 기울기에 의해 얻어졌고, 사용시까지 액체 질소 내에서 동결보관되었다. 세포들은 평가를 위해 해동되었고, AIM-V 배지(Gibco, Grand Island, NY) 내에서 1시간 동안 37℃로 배양되었다. 5×10^5 세포들이 식물-헤모아글루티닌(PHA)(5㎍/ml)(Gibco, Grand Island, NY)의 존재 또는 부재 하에 96-웰 플레이트에 파종되었고, 37℃로 72시간 동안 배양되었다. 마지막 16시간 동안, 세포들은 (^{3}H)dTHD(Amersham, 1 mCi/웰)로 부가되었으며, 세포 해동 이후 DNA 통합된 방사능(Cell Harvester, Nunc, Rochester, NY)이 액상 섬광계수기로 측정되었다.

[0200] 사이토카인의 측정:

[0201] 환자 혈청 IL-10 및 IL-12 농도가 접종 전(접종전 혈청), 및 4차 접종 2주 후(접종후 혈청)에 측정되었다. 혈청은 ELISA 분석(OptEIA IL-10 및 IL-12, BD Biosciences, San Diego, CA)이 행해질 때까지 -80℃에서 동결되었다. 적정 곡선이 각 분석에 대해 작도되었고, Cembal 2.2 소프트웨어를 이용하여 로그-로그 선형 회귀분석에 의해 계산되었다.

[0202] ELISpot 기법에 의한 IFN-γ 측정:

[0203] CD14+ 세포들은 항-CD14(Miltenyi Biotec, Paris, France)로 커버된 미세구를 이용하여 HLA-A2 양성 환자의 PBMC로부터 촉진제로서 정제되었고, 100 ng/ml GM-CSF 및 20 ng/ml IL-4와 함께 합성 SYH-H 배지(AbCys, Paris, France) 내에서 5일동안 배양되었고, 추가로 48시간 동안 10 mg/ml LPS와 함께 성숙되었다. 성숙 DC들은 37℃에서 1시간 동안 SYH-H 배지에 희석된 적절한 펩타이드 10㎍/ml와 함께 추진되었고, 세척후 총 10^5 CD8+ 림프세포/웰을 이용하여 10:1의 환자 관계 E/T에 도달할 때까지 PBMC와 혼합되었다.

[0204] 96-웰 플레이트는 pH 9.6의 카보네이트-바이카보네이트 버퍼 내에서 10㎍/ml의 인간 항-IFN-γ mAB와 함께 밤새 4℃에서 니트로셀룰로오스(MAIPS 450; Millipore, Bedford, MA)로 커버되었고, 세척후 IMDM 배지 + 10% AB 인간 혈청(Biowest, Nuaille, France)으로 37℃에서 시간 동안 차단되었다. 작동세포들은 100㎕ 배지에 파종되었고, 총 200㎕/웰에서 10:1의 E/T 관계에 도달할 때까지 목적세포들이 첨가되었다. 24시간 배양 후, 웰들은 PBS 내 0.1% Tween-20으로 5회 세척되었다. 플레이트들은 실온에서 PBS/HSA(0.4 g/L) 내의 인간 바이오틴화된 항-

IFN-γ 생쥐 mAB(Mabtech)와 함께 배양되었다. PBS 내 0.1% Tween-20으로 수차례 세척한 후, PBS/HSA 내의 1:1000 알칼라인 포스파타아제-스트렙타비딘(phosphatase-streptavidine)(Mabtech)이 첨가되었고, 실온에서 1시간 동안 배양되었다. 이후 플레이트들은 세척되었고, 5-브로민-4-클로린-3-인돌 포스페이트/니트로-테트라졸륨 블루 기질이 실온에서 30분 동안 첨가되었다(Mabtech). 건조 후, IFN-γ를 분비하는 CD8+ T 세포들이 계수되었고, ELISpot 자동 이미지 시스템 판독기(AID, Strassberg, Germany)를 이용하여 니트로-셀룰로오스 막 상의 착색점에 의해 가시화되었다.

[0205] HLA 테트라머/펩타이드로 착색:

[0206] HLA-A0201테트라머가 MART-1(AAGIGILTV), 또는 PE(phycoerithrine)에 접합된 gp100(KTWGQYWQV), 또는 APC(allo-phycocyanine) 각각에 특이적인 CD8+ T 림프세포의 클론들을 동정하기 위해 사용되었다. 염색과정은 37℃에서 15분간 행해졌고, 즉시 얼음에 담갔다. 이후, 샘플들은 항-CD8 FITC(Biosciences, San Jose CA)와 4℃에서 추가로 40분간 배양되었으며, FACS에 의해 분석되었다. 양성 대조군은 항-CD3 항체들(OKT-3, BD Biosciences) 30 ng/ml, 및 각 3일의 일련의 IL-2(Chiron BV) 300 UI/ml, + 10% 비활성화된 인간 AB 혈청, 및 항체들의 존재하에 RPMI 배지 내에서 14일-순환에서 확장된 MART-1(M27: AAGIGILTV) 및 gp100(G154: KTWGQYWQV) 항원들에 대해 특이적인 CTL 클론들로 행해졌다. 음성 대조군은 건강한 HLA-A0201 제공자들로부터의 PBMC 샘플들로 수행되었다.

[0207] 체액 반응의 측정:

[0208] Apo-Nec 세포들을 포함하는 생활성 세포들이 같은 비율로 혼합되었고, 10% 토끼 혈청으로 30분간 차단되었으며, 접종 전후 혈청과 함께 배양되었고, 4℃에서 1시간 동안 1/10로 희석되었다. 이후 이들은 세척되었고, 세포들은 토끼(DakoCytomation, Glostrup, DK)에서 얻어진 인간 항-면역글로불린 항체(IgG+A+M)와 함께 ℃에서 1시간 동안 배양되었다. 세포들은 세척되었고, 1% 파라-포름알데하이드에서 고정되었으며, FACS에 의해 분석되었다. 선택적으로는, 세포들은 우선 0.05% 사포닌(Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO)으로 투과화되고, 각 반응 단계 후 0.05% 사포닌/PBS가 첨가되었다. 첫 번째 항체 대조군으로 정상 혈청을 사용하였다.

[0209] 단백질 추출물은 본 발명의 Apo-Nec 세포들로부터 준비되었다. 세포 펠렛은 -80℃에서 동결되었고, 라이시스(lysis) 버퍼(50 mM Tris-ClH, pH 7.5, 1% NP_40, 150 mM의 NaCl, 5 mM의 EDTA, 및 1 mM PMSF)로 4℃에서 20분간 처리되었다. 현탁액은 폴리트론(Brinkmann Instruments, USA)으로 균질화되었고, 10,000g로 40분간 원심분리되었다. 상청액은 부분표본(aliquots)으로서 -20℃로 동결되어 보관되었다. 단백질 농축액은 로우리(Lawry)법에 따라 측정되었다. IIB-BR-G 인간 유방암종 세포주 단백질 추출물들이 이와 유사하게 준비되었다.

[0210] 단백질 추출물들(50㎍)은 SDS-PAGE 3%-12% 기울기가 행해졌고, 니트로-셀룰로오스 막(0.45㎛ 공극, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA)으로 이전되었다. 3% 소 탈지우유(Moliko, Argentina)로 차단한 후에, 이들은 환자 혈청의 1/10 희석액과 4℃에서 밤새 배양되었다. 수차례 세척 후, 막은 염소로부터 얻은 인간 항-IgG + A + M 항체들과 배양되었고, 당근 과산화물(HRP)(Zymed, San Francisco, CA)로 접합되었으며, 4-Cl-나프톨 + H_2O_2로 전개되었다.

[0211] 흑색종 전이체의 조직병리학적 분석:

[0212] 파라핀-침적 생검이 림프세포 및 DC 세포 침윤을 분석하기 위해 이용되었다. 3 내지 5 영역들이 헤마톡실린/에오신으로 염색되거나, 또는 항-CD4(1F6 클론), 항-CD8(C8E-144b 클론), 항-CD20(L26 클론), 항-CD1a(010 클론)(DakoCytomation, Glostrup, DK) 및 항-CD57(NK1 클론, Zymed, San Francisco, CA) 항체들로 면역-염색되었고, 기질(Vectastain, Vector, Burlingame, CA)로서 ABC 반응물질, 및 디아미노-벤지딘(DAB), 또는 노바레드(Novared)로 전개되었다. 반응은 기초 항체들을 생략함으로써 대조군으로 수행되었다. 영역들은 올림푸스 BX40 현미경으로 분석되었다.

산업상 이용 가능성

[0213] 본 명세서 내에 포함되어 있음.

도면의 간단한 설명

[0094] 도 1은 자멸유발 및 괴사(Apo-Nec cells)에 대해 본 발명의 세포주들의 혼합물의 감마선 조사 결과의 각각의 예

를 나타낸다. 도표 A는 비조사된 세포들을 나타내며, 도표 B는 70Gy의 감마선 조사 후, 아넥신(Anexine) V-FITC 및 IP(프로피디움 아이오다이드)로 염색된 세포들을 나타낸다. 조기의 자멸성 세포들은 아넥신 V-FITC^{+}/IP^{-}인 것에 반해, 괴사성 세포들은 모두 양성이었다.

[0095] 도 2는 본 발명의 DC/Apo-Nec 조성물로 처리된 환자의 카플란 마이어(Kaplan Meier) 그래프를 나타낸다.

[0096] 도 3은 DC가 제공된 자가 종양 세포들에 대한 e 림프세포들의 체외 증식을 나타낸다. 결과는 3중체(triplates)의 평균±표준편차 cpm(분당 횟수)로 나타내어진다. 7×10^{4} 이상 피토헤모아글루티닌(phytohemoaglutinin: PHA)을 포함하는 림프세포들은 양성 대조군으로서 배양되었다.

[0097] 도 4는 Melan A/MART-1, 및 GP-100 항원에 대한 테트라머 염색을 나타낸다. 도표 A는 실험에 참가한 HAL-A*0201 환자들로부터의 PBMN 샘플로 얻어진 결과를 나타낸다. *ND는 사후 도포 샘플들 내에서의 CD8^{+} T 세포량 부족으로 인해 검출되지 않음을 의미한다. 도표 B는 환자 #2로부터의 PBMC 내에서 CD8^{+} HLA T 림프세포/테트라머 펩타이드의 증가를 나타낸다. 양은 CD8^{+} HLA/테트라머 펩타이드의 백분율을 나타낸다. 건강한 기증자로부터의 HLA-A*0201 PBMC는 대조군과 같이 염색되었다.

[0098] 도 5는 본 발명의 Apo-Nec 세포들 내의 IL-10 및 IL-12의 세포질내 측정을 나타낸다. 도표 A는 DCin으로부터의 FACS 결과를 나타내며, 도표 B는 DC/Apo-Nec 세포들로부터의 FACS 결과를 나타낸다.

[0099] 도 6은 세포주 Mel-XY1 세포주 및 상기 세포주의 유도체 클론 내에서의 항원 HMB45 및 Mart-1의 발현을 나타낸다. 위쪽 세개의 도표는 세포주에 해당하며, 아래쪽 세개의 도표는 클론들에 해당된다. 1열은 세포주 및 대조군 클론들, 2열은 세포주 HMB45 발현 및 클론들 각각에 해당되며; 3열은 세포주 Mart-1 발현 및 클론들에 해당된다.

[0100] 도 7은 환자 #100으로부터의 흑색종 생검(biopsy)을 나타낸다. 도표 A는 저배율(25×) 이미지를 나타내며, Ag gp100 양성 및 음성 종양 세포들이 관찰된다; 도표 B는 gp100의 이질적인 발현을 나타내며, 고, 중, 및 무발현이 관찰된다(400×); 도표 C는 이종의 Ag MART-1 발현을 나타내며, 고발현의 세포 클론들이 음성 세포들로 둘러싸인 것이 관찰된다(400×).

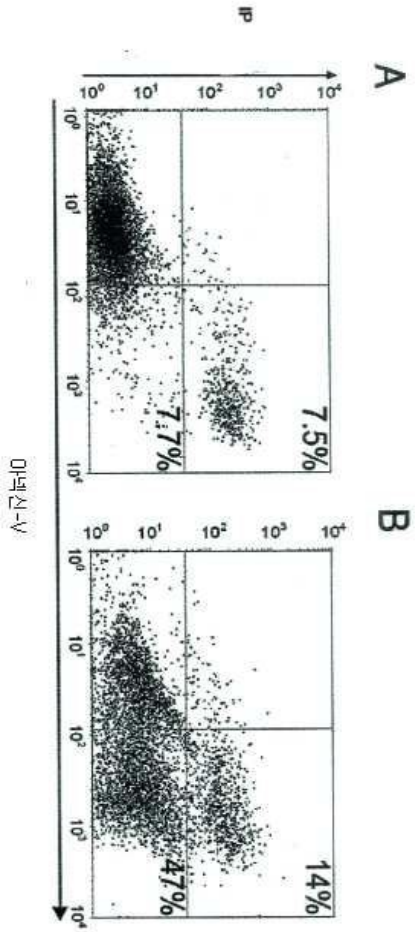
[0101] 도 8은 본 발명의 Apo-Nec 조성물로 처리된 환자들의 카플란-마이어 그래프를 나타낸다.

[0102] 도 9는 GM-CSF 및 BCG에 더하여 본 발명의 Apo-Nec 조성물로 처리된 환자 #200으로부터 절개된 피부 전이물(dermal metastases)을 나타낸다. 도표 A는 종양의 괴사 영역 내의 마크로파지들(1), 종양 세포와의 접촉에서 림프세포들로 침윤된 마크로파지들(2), 및 생존 종양영역 내의 마크로파지들(3)을 나타낸다. 도표 B는 강한 종양 침윤 영역의 100× 확대이며, 도표 C는 동일한 영역의 400× 확대이다. 여기서 침윤중인 림프세포들이 관찰된다. 도표 D는 동일한 전이물의 멜라닌으로 충전된 마크로파지들로 대부분이 괴사된 영역(1) 및 생존 영역(2)의 확대를 나타낸다(25×).

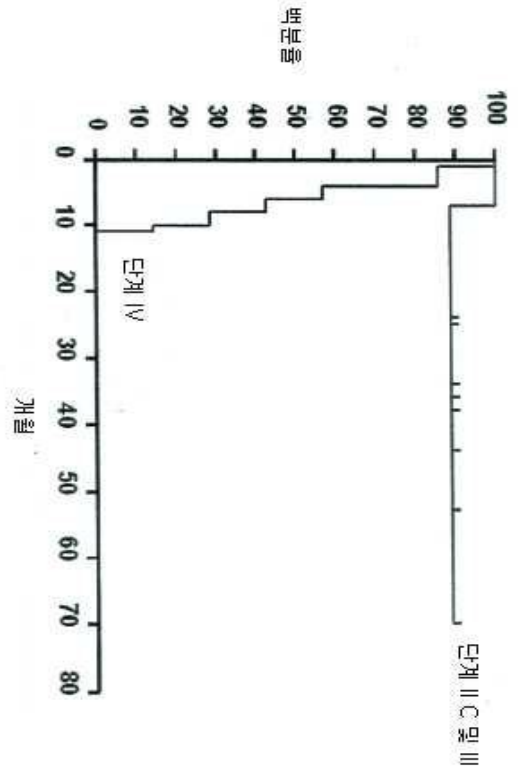
[0103] 도 10은 BCG에 더하여 본 발명의 Apo-Nec 조성물로 처리된 #300환자로부터의 컴퓨터화된 축방향 단층촬영 이미지를 나타낸다. 도표 A의 화살표는 폐 전이물의 위치를 나타내며, 도표 B는 5개월 후에 촬영된 축방향 단층촬영 이미지를 나타낸다.

도면

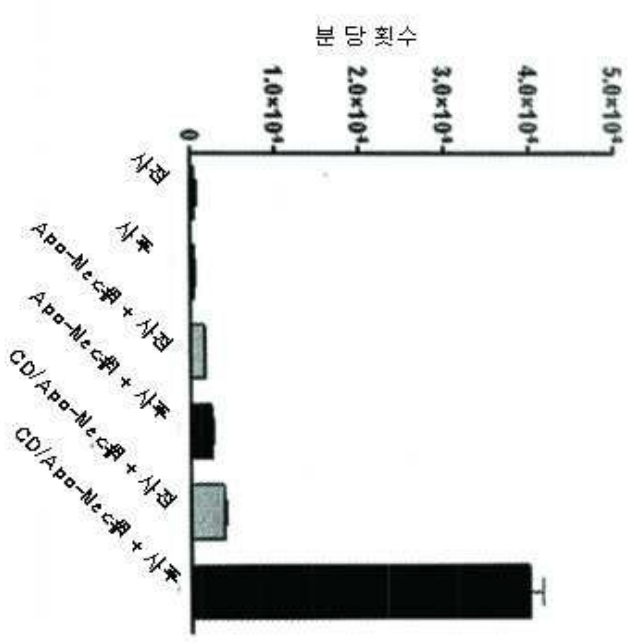
도면1



도면2


백분율
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
0
10
20
30
40
50
60
70
80
개월
단계 IV
단계 II C 및 III

도면3

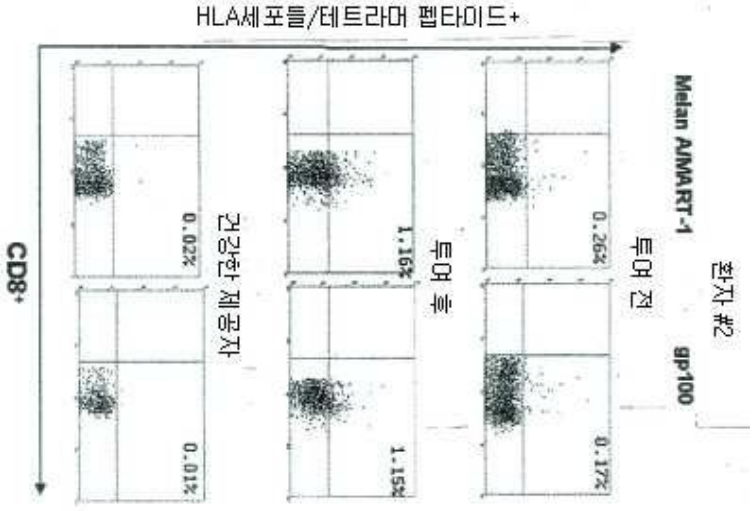

수혜 당 분
0
1.0×10⁴
2.0×10⁴
3.0×10⁴
4.0×10⁴
5.0×10⁴
사전
사후
Apo-Mec류 + 사전
Apo-Mec류 + 사후
CD/Apo-Mec류 + 사전
CD/Apo-Mec류 + 사후

도면4

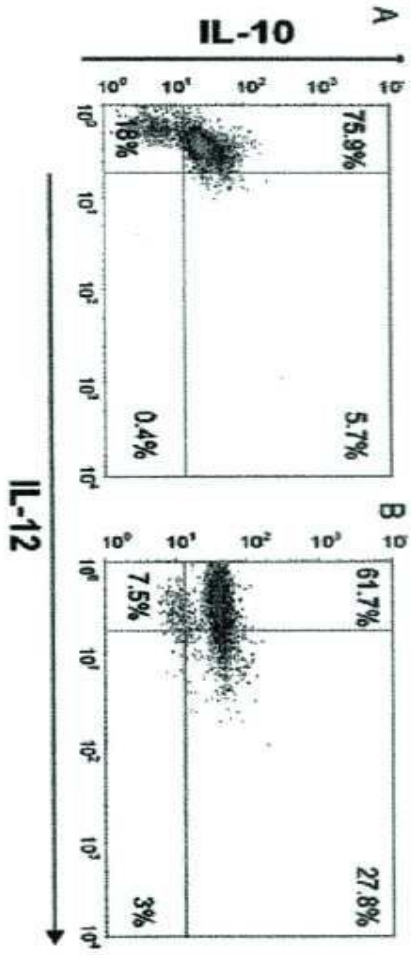
A

환자 HLA A*0201	% T 림프세포 CD8+ 테트라머+			
	gp100		Melan A/MART-1	
	PRE	POST	PRE	POST
pt# 2	0.17	1.15	0.26	1.14
pt# 5	1.12	0.64	0.58	0.1
pt# 6	0.39	1.26	0	1.77
pt# 8	0.98	0.93	0.93	0.25
pt# 10	0.26	ND*	0.13	ND
pt# 15	0.74	ND	1.52	ND
pt# 16	1.88	0.98	1.66	1.06

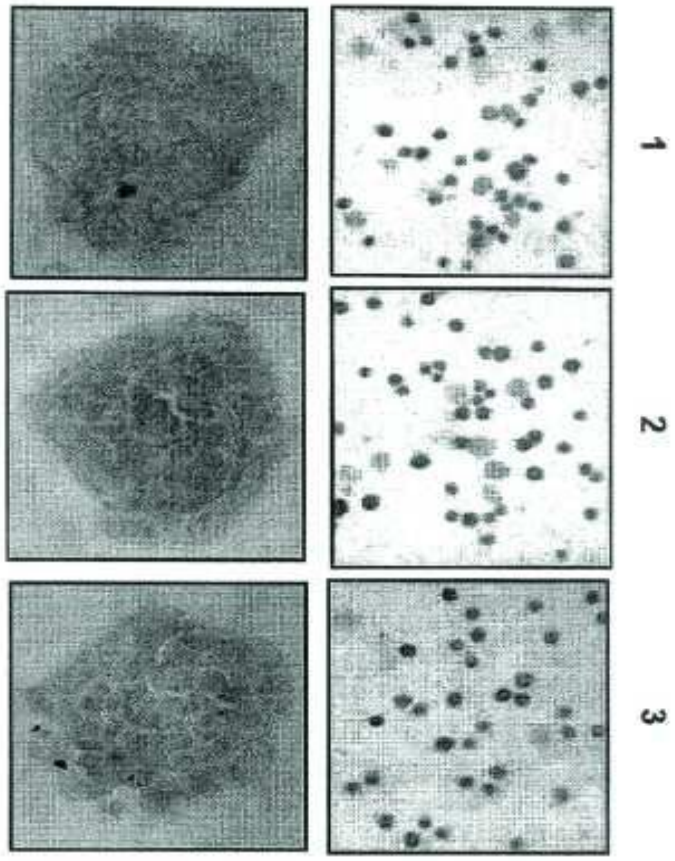
B



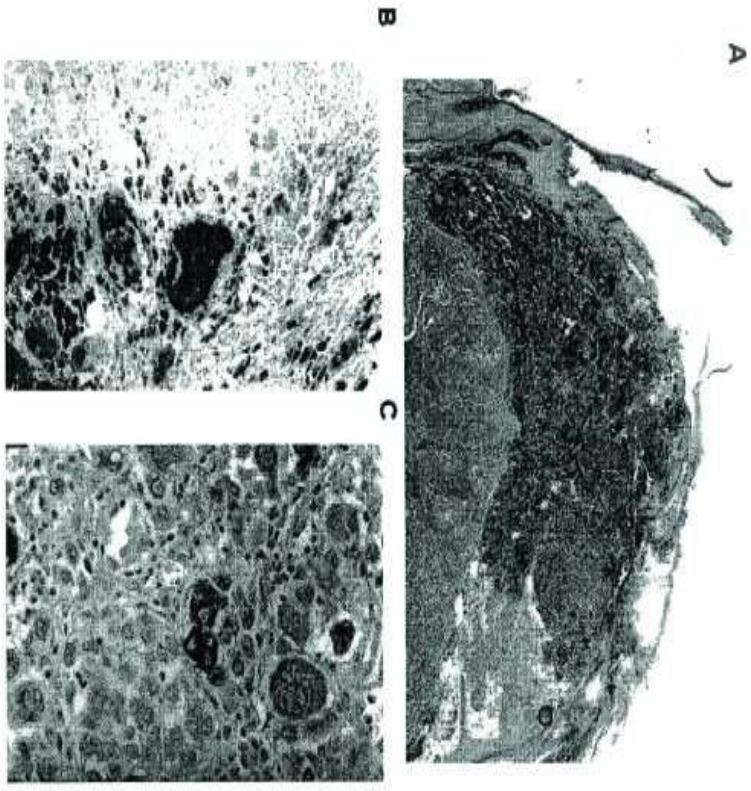
도면5



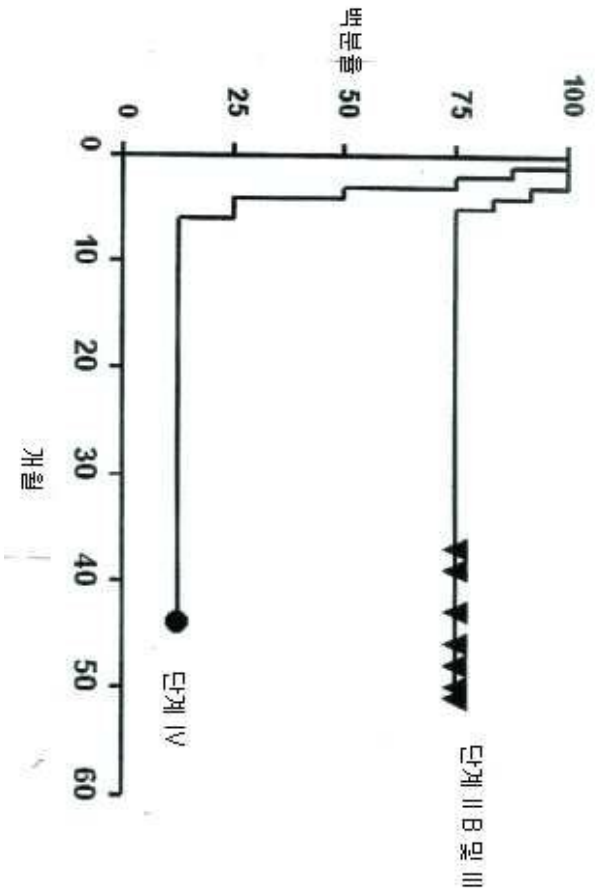
도면6



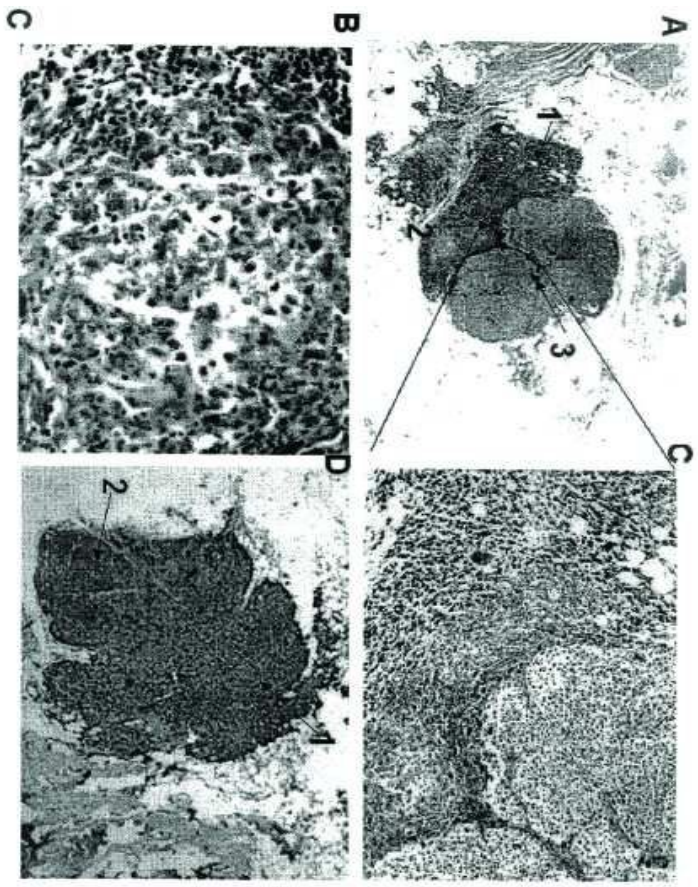
도면7



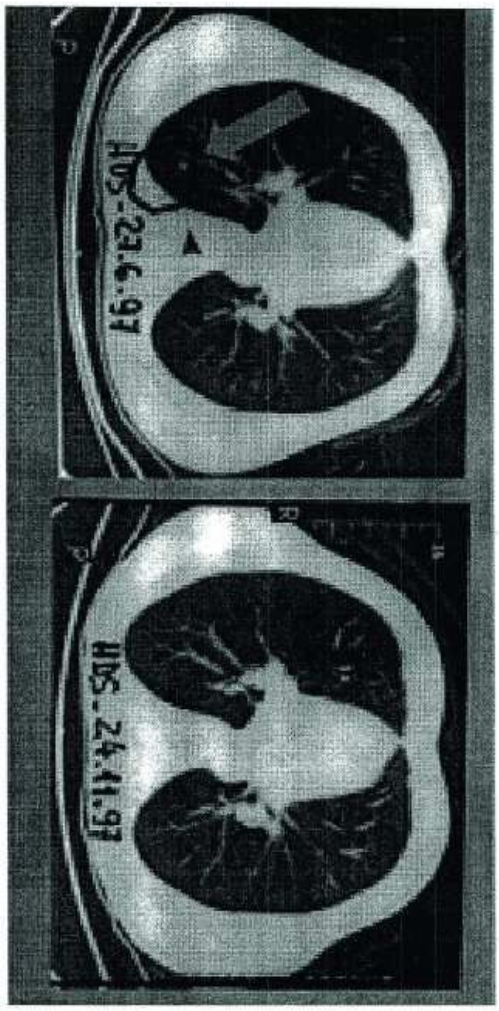
도면8



도면9



도면10



서 열 목 록

SEQUENCE LIST

<110> CONICET
Mordoh, Jose
<120> Cell lines, compositions comprising them for the treatment de melanomas, procedures to prepare the compositions, and treatment methods
<130> CONICET
<160> 20
<170> PatentIn version 3.2
<210> 1
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial
<220>

<223> GP100 5´-3´ PRIMER
<400> 1

gcttggtgtc tcaaggcaac t 21

<210> 2
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial
<220>

<223> anti-sense Gp100 primer
<400> 2
ctccaggtaa gtatgagtga c 21

<210> 3
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial
<220>

<223> MART-1 5´-3´ direction primer
<400> 3
caagatgcca agagaagatg ctcact 26

<210> 4
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial
<220>

<223> MART-1 anti-sense primer
<400> 4
gcttgcattt ttcctacacc attcca 26

<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial
<220>

<223> 5´-3´ sense tyrosinase primer
<400> 5
ttggcagatt gtctgtagcc 20

<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial
<220>

<223> anti-sense tyirosinase primer
<400> 6

aggcattgtg catgctgctt 20

<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial
<220>

<223> 5′-3′ sense internal tyrosinase primer (nested DNA)
<400> 7
gtctttatgc aatggaacgc 20

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial
<220>

<223> anti-sense internal tyrosinase primer (nested PCR)
<400> 8
gctatcccag taagtggact 20

<210> 9
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial
<220>

<223> 5'-3' sense TRP-2 primer
<400> 9
gagtggtccc tacatcctac g 21

<210> 10
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial
<220>

<223> antisense TRP-2 primer
<400> 10
gcgtcctggt cctaataatg t 21

<210> 11
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial
<220>

<223> 5'-3' sense MAGE-1 primer
<400> 11

gagtcctcag ggagcctcc 19

<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial
<220>

<223> anti-sense MAGE-1 primer
<400> 12
ttgccgaaga tctcaggaaa 20

<210> 13
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial
<220>

<223> 5´-3´ sense NY-ESO-1 primer
<400> 13
agccgcctgc ttgagttcta cctc 24

<210> 14
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial
<220>

<223> antisense NY-ESO-1 primer
<400> 14
agggaaagct gctggagaca g 21

<210> 15
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial
<220>

<223> 5´-3´ sense MDR-1 primer
<400> 15
tccaagaagc cctggacaaa g 21

<210> 16
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial
<220>

<223> antisense MDR-1 primer

<400> 16
ttgatgatgt ctctcactct gttcc 25

<210> 17
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial
<220>

<223> 5´-3´ sense MIA primer
<400> 17
catgcatgcg gtcctatgcc caagctg 27

<210> 18
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial
<220>

<223> anti-sense MIA primer
<400> 18
gataagcttt cactggcagt agaaatc 27

<210> 19
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial
<220>

<223> 5´-3´ sense beta-actin primer
<400> 19
atgtttgaga ccttcaacac ccc 23

<210> 20
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial
<220>

<223> anti-sense beta-actin primer
<400> 20
gccatctctt gctcgaagtc cag 23