



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년06월24일

(11) 등록번호 10-2677451

(24) 등록일자 2024년06월18일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
**A61K 31/19** (2006.01) **A61K 31/706** (2006.01)  
**A61K 35/545** (2015.01) **A61K 39/00** (2006.01)  
**A61K 45/06** (2006.01) **A61P 35/00** (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
**A61K 31/19** (2013.01)  
**A61K 31/706** (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2022-7044304(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2017년05월24일  
 심사청구일자 2023년01월12일
- (85) 번역문제출일자 2022년12월16일
- (65) 공개번호 10-2023-0003387
- (43) 공개일자 2023년01월05일
- (62) 원출원 특허 10-2018-7037459  
 원출원일자(국제) 2017년05월24일  
 심사청구일자 2020년05월13일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2017/062604
- (87) 국제공개번호 WO 2017/202949  
 국제공개일자 2017년11월30일
- (30) 우선권주장  
 16305607.0 2016년05월25일  
 유럽특허청(EPO)(EP)
- (56) 선행기술조사문헌  
 Blood, 제122권, 제21호, 4492면(2013.11.15.)\*  
 Hindawi Publishing Corporation Stem Cells  
 International, 제2012권, 184154호, 1-10  
 면(2012)\*  
 INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE  
 31, 147~153, 2013\*  
 Molecular Therapy vol. 21 no. 4, 887~894 apr.  
 2013\*  
 \*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자  
 인제림 (앵스띠뽀 나씨오날 드 라 샹떼 에 드 라  
 호셰르슈 메디칼)  
 프랑스공화국, 에프-75013 빠리, 뤼 드 푀비악  
 101  
 유니베르시떼 파리스-쥘드  
 프랑스 오르세이 세텍스 뤼 조지스 클레망소 15  
 (우:91405)  
 (뒷면에 계속)
- (72) 발명자  
 그리셀리, 프랑크  
 프랑스공화국, 94805 빌뤼프, 캄뽀스 쉐엔에르에  
 스/밧 아 - 뤼 귀 모께 7 위935 - 앵스띠뽀 앙드  
 레 르워프  
 튀르양, 알리  
 프랑스공화국, 94805 빌뤼프, 캄뽀스 쉐엔에르에  
 스/밧 아 - 뤼 귀 모께 7 위935 - 앵스띠뽀 앙드  
 레 르워프  
 벤나쉴르-그리셀리, 안느리즈  
 프랑스공화국, 94805 빌뤼프, 캄뽀스 쉐엔에르에  
 스/밧 아 - 뤼 귀 모께 7 위935 - 앵스띠뽀 앙드  
 레 르워프
- (74) 대리인  
 특허법인오리진

전체 청구항 수 : 총 22 항

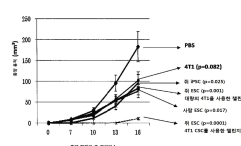
심사관 : 한정희

(54) 발명의 명칭 암 치료 방법 및 조성물

## (57) 요약

본 발명자들은 BALB/c 마우스내에서 전이성 4T1 유방 종양 모델을 개발하였다. 이들은 발프로산(VPA)과 함께 이  
 종 배아 줄기 세포를 사용한 백신접종이 유방 암에 대해 보다 높은 항-종양 반응을 생성하며 전이 발달을 억제함  
 을 밝혔다. 이들은 이러한 반응이 ESC 또는 iPSC 만을 사용하는 것과 비교하여 치료학적 요법에서 발프로산의 첨  
 (뒷면에 계속)

## 대표도



가만으로도 달성됨을 확립하였다. 따라서, 본 발명자들은 배아 항원을 발현하는 암을 치료하기 위한 신규 치료학적 전략을 제공한다. 따라서, 본 발명은 치료학적 유효량의 i) 다능성 세포의 집단 및 ii) MHC 발현을 활성화시키는 그룹으로부터 선택된 화합물을 조합 제제로서 암을 앓고 있는 대상체에게 동시에, 별도로 또는 연속적으로 투여하는 단계를 포함하는, 암을 앓고 있는 대상체를 치료하는 방법에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

*A61K 35/545* (2013.01)

*A61K 39/0011* (2023.05)

*A61K 45/06* (2013.01)

*A61P 35/00* (2018.01)

*A61K 2039/5156* (2023.05)

*A61K 2300/00* (2023.05)

(73) 특허권자

**아시스땅스 퍼블리끄-오페또 드 빠리**

프랑스 75012 파리 불바르 디드로 55

**유니베르시떼 파리 시테**

프랑스 75006 파리 생 제르맹 블러바드 85

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

대상체에서의 암의 치료적 또는 예방적 처치를 위한, (i) 히스톤 데아세틸라제 억제제 (HDACi) 및 (ii) 불활성화된 다능성 세포의 집단을 함유하는 백신 조성물,을 포함하는 조합 제제로,

상기 다능성 세포는 방사선 조사에 의해 불활성화되고, 상기 히스톤 데아세틸라제 억제제(HDACi)는 발프로산(VPA)이며, 상기 다능성 세포는 사람 배아 줄기 세포 또는 사람 유도된 다능성 줄기 세포인, 조합 제제.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 대상체가 사람인 것을 특징으로 하는, 조합 제제.

#### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 백신 조성물의 투여 후 적어도 15일 동안의 투여를 위한 발프로산(VPA)을 추가로 포함하는, 조합 제제.

#### 청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 다능성 세포의 집단이 하기에 의해 획득되는, 조합 제제:

- a) 확장 단계 동안 히스톤 데아세틸라제 억제제(HDACi) 또는 DNA 메틸트랜스퍼라제 억제제의 존재하에서, 세포의 다능성 능력을 유지하기 위한 조건의 존재하에서, 다능성 세포를 확장시키는 단계,
- b) 세포 엔벨로프 온전성을 유지하면서, 세포를 불활성화시킬 불활성화제에 확장된 세포를 노출시키는 단계로, 상기 세포가 치사 용량의 방사선에의 세포의 노출에 의해 불활성화되는, 단계,
- c) 확장된 불활성화된 세포를 회수하여 조건화시키는 단계.

#### 청구항 5

제4항에 있어서, 다능성 세포가 또한 확장 동안 돌연변이유발제에 노출되어 상기 집단의 세포에서 유전자의 돌연변이유발을 유도하는 것을 특징으로 하는, 조합 제제.

#### 청구항 6

제5항에 있어서, 돌연변이유발제는 알킬화제, 반응성 산소 종, 탈아민화제, 폴리사이클릭 방향족 탄화수소, 방향족 아민, 블레오마이신, 브롬, 벤젠, 염기 유사체, 인터칼레이팅제, 금속, 자외선 조사(ultraviolet radiation)와 조합된 소랄렌, 나트륨 아지드로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 화학적 돌연변이유발원인 것을 특징으로 하는, 조합 제제.

#### 청구항 7

제5항에 있어서, 돌연변이유발제가 알킬화제이고, 다능성 세포의 돌연변이유발제에 대한 상기 노출이 적어도 15일의 기간 동안 수행되는 것을 특징으로 하는 조합 제제.

#### 청구항 8

제6항에 있어서, 알킬화제가 에틸니트로소우레아(ENU)인 것을 특징으로 하는, 조합 제제.

#### 청구항 9

제4항에 있어서, 히스톤 데아세틸라제 억제제가 발프로산(VPA), 보리노스타트, 파노비노스타트, 기비노스타트, 벨리노스타트, 엔티노스타트, 모세티노스타트, 프락티노스타트, 치다미드, 퀴시노스타트 및 아백시노스타트로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조합 제제.

#### 청구항 10

제4항에 있어서, 상기 DNA 메틸트랜스퍼라제 억제제는 5-아자사이티딘인 것을 특징으로 하는 조합 제제.

#### 청구항 11

제1항 또는 제2항에 있어서, 암이 방광 암종, 유방 암종, 경부 암종, 담관암종, 결장직장 암종, 위 육종, 신경교종, 폐 암종, 림프종, 급성 및 만성 림프종 및 골수 백혈병, 흑색종, 다발 골수종, 골육종, 난소 육종, 췌장 암종, 전립선 암종, 위 암종, 신장 암종, 두경부 종양, 및 고형 암으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 조합 제제.

#### 청구항 12

제1항 또는 제2항에 있어서, 면역 체크포인트 억제제를 추가로 포함하는, 조합 제제.

#### 청구항 13

a. 방사선 조사에 의해 불활성화되는 불활성화된 다능성 세포의 집단으로, 다능성 세포가 사람 배아 줄기 세포 또는 사람 유도된 다능성 줄기 세포인, 불활성화된 다능성 세포의 집단, 및

b. 발프로산인 히스톤 데아세틸라제 억제제,

를 포함하는, 암 백신 조성물.

#### 청구항 14

제13항에 있어서, 다능성 세포가 확장 동안 돌연변이유발된 다능성 세포를 포함하는 것을 특징으로 하는, 암 백신 조성물.

#### 청구항 15

제13항 또는 제14항에 있어서, 대상체에서 암의 치료 또는 예방에의 사용을 위한, 암 백신 조성물.

#### 청구항 16

제15항에 있어서, 암이 방광 암종, 유방 암종, 경부 암종, 담관암종, 결장직장 암종, 위 육종, 신경교종, 폐 암종, 림프종, 급성 및 만성 림프종 및 골수 백혈병, 흑색종, 다발 골수종, 골육종, 난소 육종, 췌장 암종, 전립선 암종, 위 암종, 신장 암종, 두경부 종양, 및 고형 암으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 암 백신 조성물.

#### 청구항 17

제13항에 있어서, 발프로산은 백신 조성물의 투여 후 적어도 15일 동안 추가로 투여되는 것인, 암 백신 조성물.

#### 청구항 18

제13항 또는 제14항에 있어서, 다능성 세포가 항원의 MHC-I 제시를 증가시키기 위해 불활성화 전에 확장 동안 HDACi 또는 DNA 메틸 트랜스퍼라제에 의해 처리된 것을 특징으로 하는, 암 백신 조성물.

#### 청구항 19

제18항에 있어서, 다능성 세포가 확장 동안 돌연변이유발제에 노출되어 상기 집단의 세포에서 유전자의 돌연변이유발을 유도하는 것을 특징으로 하는, 암 백신 조성물.

#### 청구항 20

제19항에 있어서, 돌연변이유발제는 알킬화제, 반응성 산소 중, 탈아민화제, 폴리사이클릭 방향족 탄화수소, 방향족 아민, 블레오마이신, 브롬, 벤젠, 염기 유사체, 인터칼레이팅제, 금속, 자외선 조사(ultraviolet radiation)와 조합된 소랄렌, 나트륨 아지드로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 화학적 돌연변이유발원인 것을 특징으로 하는, 암 백신 조성물.

**청구항 21**

제20항에 있어서, 알킬화제가 에틸니트로소우레아(ENU)인 것을 특징으로 하는, 암 백신 조성물.

**청구항 22**

제15항에 있어서, 대상체가 사람인 것을 특징으로 하는, 암 백신 조성물.

**청구항 23**

삭제

**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

## 발명의 설명

## 기술 분야

[0001] 발명의 분야

[0002] 본 발명은 종양학 분야 내에 있으며, 보다 구체적으로, 본 발명은 항암 백신 조합된 치료요법에 관한 것이다.

[0003] 보다 특히, 본 발명은 암 세포 백신을 제조하는데 있어서 유용한 다수의 신생-항원(neo-antigen)을 제시하는 다능성 세포(pluripotent cell)를 포함하는 조성물을 제조하는 방법에 관한 것이다.

## 배경 기술

[0004] 발명의 배경

[0005] 암의 대부분은 발달 및 조직 유지 동안에 요구되는 정상 줄기 세포내에서 DNA 복제 동안에 발생하는 무작위 돌연변이로부터 생성된다. 암 줄기 세포(CSC)는 동적 상태에서 이중이며 후생유전학적으로 성형성(plastic)이다. CSC로부터 발생하는 종양 세포는 종양 진화의 클론 웨이브(clonal wave)를 유도하는 종양유전자(oncogene), 종양 억제 유전자 및 및 신호 전달 경로에 존재하는 돌연변이의 동시 축적에 의해 유도된다. '클론-전환 모델(clonal-evolution model)'에서 돌연변이 유형은 암이 발달함에 따라 변할 것이므로, 개개 암 세포는 점점 더 형질전환되어 공격적으로 된다. 초기 종양 발달시 획득한 돌연변이는 진전된 질환에서 유지된다.

[0006] 시간이 경과함에 따라 변화하여, 이러한 돌연변이는 점진적인 면역 편집(immune editing) 및 고갈(exhaustion)과 관련하여 올리고-클론성 종양 확장(oligo-clonal tumor expansion), 및 암 세포 내성을 초래한다. 암의 돌연변이적 특징(mutational signature)은 게놈 불안전성과 크게 관련되어 있다. 돌연변이는 면역원성 에피토프(epitope)를 지닌 신규한 비-자가 신생 항원(non-self neo-antigen)을 발생시킨다. 그러나, 종양 미세환경은 일반적으로 면역억제성이므로, 숙주 면역계는 일반적으로 이들 세포를 적절하게 파괴하여 이들 암과 싸울 수 없다. 면역 체크포인트 억제제(immune checkpoint inhibitor)와의 T 세포 반응에 의해 보고된 임상적 이점은 종양의 돌연변이 비율(mutation rate) 및 돌연변이 판도(mutation landscape)와 잘 관련되어 있다.

[0007] 암 줄기 세포(CSC)는 흔히 통상의 치료에 대해 내성이므로 종양 잔류성 및 재발에 기여하는 자가-재생하는 암 세포의 작은 개체를 나타낸다. 조혈 악성종양에서 초기에 발견된 CSC는 유방, 교모세포종, 전립선, 대장 두경부 편평 세포 암종, 난소 방광, 폐, 췌장암을 포함하는 다양한 기원으로부터의 고형 종양에서 기술되었다. CSC는 마우스에서 이중이식체 종양을 형성하는 특징 및 종양 개시능을 갖는다. 또한, 이들은 방사선- 및 화학-내성이며, 환자에서 치료학적 반응의 결여에 기여한다. 이로써, CSC 지속성(persistence)은 치료요법의 완료 후 종양 재발 및/또는 전이를 유발한다. 몇가지 공보가 종양 발생기전과 배아 줄기 세포(ESC) 상태 사이의 분자적 연관성을 입증하여 왔다. CSC는 사람 배아 줄기 세포(hESC) 및 사람 유도된 다능성 줄기 세포(hiPSC)에 의해 또한

발현된 다수의 배아 항원을 발현한다.

- [0008] 주로 OCT4, NANOG, 및 SOX2 전사 인자는 마스터 조절인자(master regulator)이며 고도로 통합된 네트워크(c-myc 및 폴리콤브 네트워크(polycomb network)와 관련됨)의 일부로서 함께 작동하여 히스톤 변형 및 DNA 메틸화를 통해 크로마틴을 리모델링하기 위한 후생적 기관(epigenetic machinery)을 사용함으로써 체세포로부터 CSC 또는 iPSC로의 변이를 구동시킨다. 이들 인자들은 정상 성체 줄기 세포 속에서는 부재한다. 배아 줄기 세포-유사 유전자 발현 및 사람 다능성 줄기 세포(ESC/iPSC) 실체를 정의하는 폴리콤브-조절된 유전자의 발현 저하(under-expression)는 암(유방, 췌장, 방광, 폐, 전립선, 수모세포종..)의 기원이 무엇이든지 간에 화학-방사선 치료요법 후 불량한 임상 결과 및 원거리 재발(distant recurrence)을 갖는 불량하게 분화된 사람 종양과 관련되어 있다. "줄기성(줄기ness)" 프로파일을 갖는 불량하게 분화된 종양은 상피-중간엽 "EMT" 마커를 지닌 암종 세포에 있어서 중간엽성 특성(mesenchymal trait), 낮은 수준의 MHC-I 발현, 전 종양 염증성 백혈구(pro-tumoral inflammatory leukocyte), 기질 세포 및 대식세포가 있는 면역억제성 종양 미세환경과 관련되어 있다. EMT를 겪는 종양 세포는 줄기성 특성을 획득하여 기관 전체에 매우 조기에 이주하여 장기간 동안 휴면기 상태로 잔류하는 능력을 지닌 CSC가 된다. CSC는 씨딩(seeding)하고 종양 구획을 보충하기 위한 저장기(reservoir)로서 작용한다. 이들은 또한 자가-재생, 상이한 조직으로의 전파, 전이 생성에 의해 확장한다. 이들 CSC는 다능성 배아 유전자 기호를 공유하며 항-암 약물 및 방사선치료요법에 대해 내성이다. 이들은 또한 상기 나타낸 이유로 (면역-저하 미세-환경: immune-depressive micro-environment) 면역 항-종양 방어를 탈출한다.
- [0009] 태아 조직을 사용하여 마우스를 면역화시킬 수 있으며 이것이 피부, 간, 및 위장관의 암을 포함하는, 이식된 종양의 거부를 유도할 수 있음이 보고되었다. 이러한 반응은 이들 종양 세포가 많은 수의 종양태아성 항원(oncofetal antigen)을 발현한다는 사실에 의해 설명되었다.
- [0010] 지금까지 암배아 항원(CEA), 알파 태아단백질 또는 암/고환 항원과 같은 배아 항원을 표적화하기 위해 수개의 사람 암 백신 시도가 수립되어왔다. 불행하게도, 하나의 항원만을 표적화하는 것은 1가 암 백신의 일반적인 무효력(inefficiency)을 야기하는 탈출 돌연변이체(escape mutant)의 신속한 출현으로 인하여 종양 거부를 매개하는 강력한 항종양 면역 반응을 생성하기에 충분하지 않은 것으로 밝혀졌다.
- [0011] 재생 의학에서 줄기 세포의 잠재능에 있어서의 최근의 관심은 광범위하게 이용가능한 잘-정의된 ESC 세포주뿐만 아니라 ESC와 표현형적으로 및 기능적을 유사한 iPSC에서도 이루어져 왔다.
- [0012] 암-관련 후생적 변이(epigenetic aberration)는 후생적 기구의 각각의 성분(DNA 메틸화, 히스톤 변형, 비-암호화 RNA, 구체적으로 마이크로RNA 발현)을 포함하는 암 줄기 세포의 특징적인 특성이다.
- [0013] 아자시티딘 또는 데시타빈과 같은 저메틸화 작용제(hypomethylating agent) 또는 보리노스타트 또는 로미테신과 같은 히스톤 데아세틸라제 억제제를 포함하는 종양-억제 활성을 지닌 몇가지 후생적 변형 약물이 현재 종양학에서 임상 사용 중에 있다.
- [0014] 이러한 약물을 사용하여, 암 세포를 재프로그래밍(reprogramming)하는 것이 가능하였다. 또한, 후생적 약물에 의한 종양 미세-환경의 후생적 재프로그래밍은 암 발달에 있어서 암-기질 상호작용의 명확한 증거가 존재하기 때문에 암 치료요법의 매력적인 조작 시도이다.
- [0015] 따라서, 줄기 세포 신호를 갖는 암을 예방하고/하거나 치료하기 위한 새로운 시도에 대한 필요성이 지속적으로 존재한다. 이들 암은 ESC/iPSC와 마찬가지로 배아 유전자(즉, 또한 신생-항원으로 불림)의 세트를 발현하며, 특히, 췌장 암, 유방 암, 난소 암, 대장 암, 폐 신장, 전립선 암종, 수모세포종, 담관암종, 간 암, 만성 및 급성 백혈병 및 골수종을 포함한다. 이러한 부류의 암은 대부분 암 환자의 생존을 증진시키고 삶의 질을 향상시키기 위해 CSC를 특이적으로 표적화하는 치료요법을 개발할 필요성이 있는 중간엽 유사-신호와 관련되어 있다. 특히 이러한 전략은 면역 항-CSC 반응과 조합된 복제를 허용하는(permissive) 항-종양 미세 환경의 회복(종양 미세-환경은 일반적으로 면역-억제성이므로 면역-감응성(immuno-competent)으로 재제조되어야 한다)으로 유도해야 한다. 이러한 및 다른 필요성은 본원에 개시된 주제에 의해 전체적으로 또는 부분적으로 언급된다.

## 발명의 내용

### [0016] 발명의 요약

- [0017] 본 발명은 본 발명자들에 의해, HDACi(히스톤 데아세틸라제 억제제)를 사용하여 목적인 항원을 함유하거나, 목적인 항원을 표적화하는 면역원성 조성물을 HDACi와 함께 환자에게 투여하고, 임의로 HDACi로 추가로 치료하는 경우, 상기 목적인 항원에 대해, 환자에서 면역 반응을 자극할 수 있다는 결정을 기반으로 한다. 면역원성 조성

물은 목적인 (하나의) 항원(들)에 대한 면역 반응이 개시되도록 하는 것으로 의도된다. 보조제로서 HDACi의 사용은 암의 치료, 특히 줄기 세포 특징을 갖는 암에 대해 특히 흥미롭다. 본 발명은 특히 청구범위에서 정의된다.

[0018] **발명의 상세한 설명**

[0019] 본 발명자들은 다능성 세포의 집단과 함께 HDACi의 사용이 종양 세포에 대한 면역 반응의 상승작용 및 효과적인 반응을 이끈다는 것을 밝혔다.

[0020] 더욱이, 본 발명자들은 hESC 또는 hiPSC와 같은 다능성 줄기 세포를 백신으로 사용하여 종양 세포에 의해 공유된 다양한 배아 항원에 대한 면역 반응을 생성할 수 있다고 추가로 가설을 세웠다. 이들은, 발프로산과 같은 MHC I을 유도할 수 있는 화합물과 함께 hESC 또는 hiPSC를 사용한 마우스의 백신화가 부작용 및 자가면역 질환의 증거없이 유방 암종에 대해 효과적인 면역 및 항-종양 반응을 유도할 수 있음을 발견하였다. 또한, 이들은 이러한 조합된 요법(regimen)이 폐 전이의 유의적인 억제와 관련되어 있음을 발견하였다. 놀랍게도, 이들은 이러한 반응이 ESC 또는 iPSC를 단독으로 사용하는 경우와 비교하여 치료학적 요법에서 HDACi, 및 특히 발프로산의 첨가에 의해 현저히 개선됨을 확립하였다.

[0021] 면역 반응을 증진시키기 위한 HDACi

[0022] 본 발명은 환자에게 백신 조성물과 함께 HDACi를 투여하는 단계를 포함하여, 환자에서 백신 조성물의 효능을 증가시키는 방법에 관한 것이다. 특히, HDACi가 백신 조성물에 첨가될 수 있다.

[0023] 증가된 효능은 백신 조성물의 면역원성을 증가시키거나, 백신 조성물에 대한 면역 반응을 증가시키거나, 백신 조성물에 의해 생성된 면역 반응을 증가시키는 것으로 이해될 수 있다. 이는 HDACi의 부재하에서 생성된 면역 반응과 비교될 수 있다.

[0024] 백신 조성물은 목적인 하나 이상의 항원(들)에 대한 면역 반응을 개발하는 환자를 만드는 것으로 의도된 면역원성 구성요소를 함유한다. 목적인 항원은 면역 반응이 요구되는 것에 대한 임의의 항원이며, 자체로부터의, 또는 세균, 바이러스, 또는 기생충 단백질과 같은 외인성의 임의의 펩타이드, 단백질(예컨대, 암 세포로부터의 항원), 핵산, 당, 지다당류 등과 같은 다른 종류의 항원을 포함한다.

[0025] 따라서, 본 발명은 보조제로서, 특히 백신 조성물에 대한 면역 반응을 증가시키기 위한 HDACi의 용도, 및 보조제로서 이의 용도를 위한, 또는 백신 조성물에 대한 면역 반응을 증가시키기 위한 HDACi에 관한 것이다. 본 발명은 또한 환자가 목적인 항원(들)에 대한 면역 반응을 개발하도록 의도된, 목적인 하나 이상의 항원(들)을 함유하는 백신 조성물의 제조를 위한 HDACi의 용도에 관한 것이다.

[0026] 본원에 개시된 방법 및 용도는 백신 조성물이 암 백신 조성물인 경우, 즉 암 세포에 의해 발현된 목적인 항원(들)을 함유하는 경우 특히 흥미롭다. 특히, 이러한 방법 및 용도는 고형 종양 암의 경우 잘 조정된다. 더욱이, 이러한 유형의 암에서, 면역 미세-환경은 특히 면역억제성이고(즉, 사이토킨 및 분자 시그널의 발현, 및 암 항원에 대한 면역 세포의 효능이 감소하는, 이러한 CD4 세포의 보충이 존재한다); 이러한 이론에 역메이지 않고도, HDACi의 존재가 미세-환경을 변형시키며 아마도 종양 속, 근처 또는 주변에 존재하는 세포 내에서 면역 억제 효과를 갖는 유전자의 발현을 변형시킴으로써, 면역 세포를 암 세포와 싸우도록 증강시킬 것으로 추정된다.

[0027] 본원에 기술된 방법은 또한 백신 조성물의 투여 후 수일 동안 HDACi를 투여하는 단계를 포함할 수 있다. HDACi의 이러한 연속 투여는 면역 세포가 종양을 "장악(take over)"할 수 있기에 충분한 시간 동안 미세환경 변형을 유지하는데 유용할 수 있다. 일반적으로, 이러한 HDACi의 추가의 연속된 투여는 백신 투여 후 적어도 3일 동안 1개월까지 HDACi의 적절한 용량의 매일 투여로 이루어질 것이다. 그러나, 추가의 HDACi 투여를 적어도 1주일 이상, 보다 바람직하게는 적어도 또는 약 2주 동안 수행하는 것이 바람직하다.

[0028] 백신 조성물은 환자가 목적인 하나 이상의 항원(들)에 대한 면역 반응을 발달시키도록 의도된 면역원성 구성요소(화합물)를 함유한다.

[0029] 이러한 면역원성 구성요소는 항원(또는 다중 항원)일 수 있다. 이러한 항원은 표적 세포(이는 숙주 세포, 및 또한 세균 세포, 기생충 병원체 또는 바이러스 입자를 포함하는 것으로 의도된다)에 따라, 상기에서 알 수 있는 바와 같이, 임의의 형태일 수 있다. 이는 또한 명반 또는 프로인트(Freund's) 완전 또는 불완전 보조제와 같이 당해 분야에 공지된 임의의 보조제(면역-자극인자)와 함께 제형화될 수 있다.



- [0030] 다른 구현예에서, 면역원성 화합물은 세포 조성물로부터의 추출물이며, 여기서 상기 조성물의 세포는 목적한 항원을 발현한다. 세포 추출물은 막 분획, 소포(vesicle), 및 핵과 같은 불용성 물질을 제거하기 위해 원심분리된 용해된 세포일 수 있으므로, 대부분의 시토플라زم으로 이루어진다. 다른 구현예에서, 추출물은 특정 성분을 고갈시키거나 농축시키는 특수한 기술(예를 들면, 초음파를 사용하여 큰 막 분획을 추출물 속에 잔류하는 작은 입자로 파괴할 수 있거나, 고속 원심분리를 사용하여 가장 작은 불용성 성분을 제거할 수 있다)을 사용하여 제조할 수 있다. 세포 추출물은 압력, 증류, 증발 등과 같은 임의의 화학적 또는 기계적 작용에 의해 수득된다.
- [0031] 다른 구현예에서 면역원성 구성성분은 세포 조성물이며, 여기서 상기 조성물의 세포는 목적한 항원을 발현한다. 이러한 구현예에서, 세포의 막을 보존(함으로써 항원의 제시가 MHC-I 경로를 통해 이루어지는 것이 바람직하다)하는 경우에 바람직하다. 세포가 하기 기술된 바와 같이, 불활성화되는 경우 바람직하다.
- [0032] 이러한 구현예에서, 세포는 하기 기술된 바와 같은 다능성 세포, 암 세포, 바이러스-감염된 세포 또는 세균 세포일 수 있다.
- [0033] 다른 구현예에서 면역원성 구성성분은 목적한 항원에 의해 시험관 내(*in vitro*)에서 프라이밍된(primed) 항원-제시-세포(APC)를 포함하는 세포 조성물이다. 이러한 조성물은 항원 및 항원-제시 세포(APC)로 제조된, 항원-제시 세포 백신이다. 항원-제시 세포는 이들의 표면에 주요 조직적합성 복합체(MHC)와 함께 복합체화된 항원을 나타내는 세포이다. 본 발명의 내용에서 바람직한, 수지 세포(DC)가 언급될 수 있는데, 이들이 헬퍼(helper) 및 세포독성 T 세포 둘 다, 대식 세포, 또는 B 세포에 대한 항원을 제시할 수 있기 때문이다. 이들 APC는 천연 세포, 또는 가공된 세포일 수 있다. 특히, 인공 항원-제시 세포를 개발하는데 있어서 발전을 고찰하는 Eggermont 등의 문헌(Trends in Biotechnology, 2014, 32, 9, 456-465)을 인용할 수 있다. APC를 사용하여 항-암 백신을 개발하는 방법은 당해 분야에서 광범위하게 제안되어 왔으며 당해 분야의 숙련가에게 공지되어 있다.
- [0034] 다른 구현예에서, 면역원성 구성성분은 실제로 항원을 함유하지 않으나 예를 들면, 목적한 항원을 제시하는 항원-제시 세포에 대한 노출에 의해, 목적한 항원에 대해 시험관 내에서 프라이밍된 T 세포 림프세포의 조성물로 이루어진다. 결과적으로, 이러한 조성물은 목적한 항원에 대해 생체 내(*in vivo*)에서 면역 반응을 개시할 수 있다. 이러한 전략은 "T 세포의 입양 전달(adoptive transfer)"로 불릴 수 있으며, 이러한 입양 전달된 T 세포는 시험관 내에서 장기간 동안 잔존하여 림프구 구획과 혈관 구획 사이에서 용이하게 이주하는 것으로 알려져 있다 (Bear *et al*, J Biomed Biotechnol. 2011;2011:417403; Melief *et al*, J Clin Invest. 2015;125(9):3401-3412).
- [0035] 모든 이러한 구현예에서, HDACi는 면역원성 구성성분을 함유하는 백신 조성물과 함께 투여된다. 이러한 투여는 면역원성 구성성분이 다능성 세포의 조성물인 구현예에 대해 하기 개시된 바와 같이, 동시, 별도 또는 연속적으로 이루어질 수 있다. 다능성 세포의 조성물에 대해 개시된 하기 모든 설명은 상기 개시된 어떠한 면역원성 구성성분도 포함하는 백신에 동등하게 적용될 수 있음을 주목하여야 한다.
- [0036] 본 명세서는 이러한 다능성 세포가, 앞서 상기한 바와 같이, 매우 침습성(aggressive)인 암에서 또한 발견되는 신생 항원을 발현하므로, 다능성 세포의 조성물과 함께, HDAC 억제제(특히 발프로산)를 강조한다. 결과적으로, 면역원성 구성성분이 무엇이든 간에, 목적한 항원이 상기 및 또한 하기 기술된 바와 같이, 암 세포에 의해 발현된 신생-항원인 경우 바람직하다.
- [0037] 특히, 면역원성 구성성분은 세포 조성물이며, 여기서 세포 조성물은 하기에 상세히 추가로 개시된 바와 같이, 다능성 세포의 확장 및 불활성화에 의해 수득된다.
- [0038] 조합 제제를 사용하여 암을 앓고 있는 대상체(subject)를 치료하는 방법
- [0039] 본 발명은 치료학적 양의 i) 다능성 세포의 집단 및 ii) 조합 제제로서, MHC 발현 및/또는 면역 반응을 활성화하는 그룹으로부터 선택된 화합물을 상기 대상체에, 동시에, 별도로 또는 연속적으로 투여하는 단계를 포함하여, 암을 앓고 있는 대상체를 치료하는 방법에 관한 것이다.
- [0040] 바람직한 환경에서, 세포는 배양되어 MHC I 경로를 통해 신생-항원을 제시하며, 특히, 집단의 일부 세포는 돌연변이된 것을 제시한다. 세포와 함께 사용된 화합물은 또한 세포의 다능성을 보존할 수 있다. 세포의 투여 후에 MHC 발현 및/또는 면역 반응(바람직하게는 함께 초기 투여된 것과 동일하지만, 잠재적으로 다른 반응)을 활성화시켜 면역 반응을 향상시키는 화합물을 투여하는 경우 매우 바람직하다.
- [0041] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "치료하는(treating)" 또는 "치료(treatment)"는 유전적인 가족성 암 증후군과 같은 암과 접촉할 고 위험 성향이 있거나 암이 수축된 것으로 의심되는 대상체 및 또한 병이 있거나 암 또는 의

학적 상태를 앓고 있는 것으로 진단된 대상체의 치료를 포함하는, 예방학적 또는 방지적 치료뿐만 아니라 치유적 또는 질환 변형 치료 둘 다를 지칭하며, 임상적 재발의 억제를 포함한다. 치료는 암을 가거나 궁극적으로 암을 획득할 수 있는 대상체에게 투여되어, 암 또는 재발하는 암의 하나 이상의 증상의 발생을 방지하거나, 치유하거나, 지연시키거나, 이의 중증도를 감소시키거나, 이의 하나 이상의 증상을 완화시키거나, 이러한 치료의 부재하에서 예측되는 것 이상의 대상체의 생존을 연장시킨다. "치료 요법(therapeutic regimen)"은 질병의 치료 양식, 예컨대, 치료요법 동안 사용된 용량의 양식을 의미한다. 치료 요법은 유도 요법 및 유지 요법을 포함할 수 있다. 어구 "유도 요법" 또는 "유도 기간"은 질환의 초기 치료에 사용된 치료 요법(또는 치료 요법의 일부)를 지칭한다. 유도 요법의 일반적인 목표는 치료 요법의 초기 기간 동안 대상체에게 높은 수준의 약물을 제공하는 것이다. 유도 요법은 "로딩 요법(loading regimen)"을 사용(부분적으로 또는 전체적으로)할 수 있으며, 이는 주치의가 유지 요법 동안 사용할 수 있는 것보다 더 많은 용량의 약물을 투여하는 것, 주치의가 유지 요법 동안에 투여할 수 있는 것보다 더 흔하게 약물을 투여하는 것, 또는 이들 둘 다를 포함할 수 있다. 어구 "유지 요법" 또는 "유지 기간"은 질병의 치료 동안 대상체의 유지를 위해 사용된 치료 요법(또는 치료 요법의 일부), 예컨대, 대상체를 장기간(수개월 또는 수년) 동안 차도가 있도록 유지시키는 것을 지칭한다. 유지 요법은 연속 치료요법(예컨대, 약물을 일정한 간격(예컨대, 매주, 매달, 매년 등) 또는 간헐적 치료요법(예컨대, 중단된 치료, 간헐적 치료, 재발시 치료, 또는 특수한 예정된 기준(예컨대, 통증, 질환 징후 등)의 달성 시 치료)을 사용할 수 있다.

[0042] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "동시 투여"는 동일한 경로 및 동일한 시간 또는 실질적으로 동일한 시간에 2개의 활성 성분의 투여를 지칭한다. 용어 "별도 투여"는 상이한 경로로 동시에 또는 실질적으로 동시에 2개의 활성 성분을 투여함을 지칭한다. 용어 "연속 투여"는 상이한 시간에 2개의 활성 성분을 투여함을 지칭하며, 이러한 투여 경로는 동일하거나 상이할 수 있다.

[0043] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "대상체"는 설치류, 고양이, 및 비-사람 및 사람 영장류와 같은 어떠한 포유동물도 지칭한다. 특히, 본 발명에서, 대상체는 다능성 배아-유사 줄기 세포 향원의 발현을 갖는 암으로 고생하거나 고생할 가능성이 있는 사람이다.

[0044] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "집단(population)"은 세포의 집단을 지칭하며, 여기서 세포의 총 수의 대부분(예컨대, 적어도 약 20%, 바람직하게는 적어도 약 50%, 보다 바람직하게는 적어도 약 70%, 및 심지어 보다 바람직하게는 적어도 약 80%, 및 심지어 보다 우선적으로 적어도 약 90%)은 목적한 세포의 구체적인 특성(예컨대, 적어도 96개의 마커를 포함하는 국제 줄기 세포 기관(international 줄기 cell initiative)(Adewumi et al, Nat Biotech 2007), 및 유전자-발현 기반 검정(PluriTest)(FJ Muller, Nature Methods 2011)에 의해 정의된 iPSC, ESC에 대한 다능성 마커)을 갖는다.

[0045] 특히, 용어 "다능성 세포의 집단"은 세포의 특징이 iPSC, 또는 ESC에 대한 다능성 마커의 발현인 세포의 집단을 지칭한다. 이들 세포는 바람직하게는 사람 배아 줄기 세포(hESC), 유도된 사람 다능성 줄기 세포(hiPSC), 동종 이계, 이종이계 또는 동계/자가 줄기 세포((syngeneic/autologous stem cell))로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0046] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "다능성"은 적절한 조건 하에서 특이한 세포 계통 특성을 지닌 3개의 배엽(내배엽, 중배엽, 및 외배엽)으로부터 기원한 모든 세포 유형으로 분화할 수 있는 자손을 생성하는 능력을 지닌 세포를 지칭한다. 용어 "다능성"은 정상 배아 줄기 세포(ESC), 또는 매우 작은 배아-유사 줄기 세포(VSEL) 또는 가공된 유도된 다능성 줄기 세포(iPSC), 성체 체세포(ASC)의 모든 공급원 및 세포 기원으로부터 재프로그래밍된(reprogrammed) 것을 포함한다.

[0047] 다능성 줄기 세포는 출생전, 출생후 또는 성체 기관의 조직에 기여한다. 표준 당해분야에 허용된 시험을 사용하여 8 내지 12주령의 SCID 마우스에서 기형종을 형성하는 능력, 및 다양한 다능성 줄기 세포 특성과 같은 세포 집단의 다능성을 확립한다. 보다 구체적으로, 사람 다능성 줄기 세포는 다음의 비-제한적인 목록으로부터의 마커 중 적어도 일부(적어도 3개, 보다 일반적으로 적어도 4개 또는 5개), 및 임의로 모두를 발현한다: SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81, TRA-2-49/6E, 알칼린 포스파타제(ALP), Sox2, E-카데린, UTF-1, Oct4, Lin28, Rex1, Nanog, TERC, TERT.

[0048] 다능성 줄기 세포는 전통적으로 배아 발달의 배반포 단계로부터 발생하며 아마도 태반을 제외하고는 모든 유형의 태아 및 성체 세포로 발달하는 능력을 갖는다. 배아 다능성 줄기 세포(ESC)는 일반적으로 50개-내지 150개-세포, 수정 후 4-내지 5-일된 배반포로부터 분리할 수 있다. ESC는 무한적 생체 외(ex vivo) 증식할 수 있지만, 이들은 배아발생 동안에만 일시적으로 생체 내에 존재한다. 예를 들면, NIH 승인된 세포주 WA09 사람

ESC와 같은 다양한 동물(사람 포함) ESC 세포주는 WiCell Research Institute(위스콘신 주 매디슨 소재)로부터 상업적으로 취득할 수 있다. Cecol-14와 같은 사람 ESC 세포주는 예를 들면, Cecolfes(콜롬비아주 보고타 소재)로부터 상업적으로 취득할 수 있다. 물론, 다른 배아 줄기 세포주도 경우에 따라 사용할 수 있다.

[0049] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "배아 줄기 세포"는 사람의 다능성 세포(즉, hESC)를 지칭한다. hESC는 배반포 전 단계 배아로부터 분리된다. 다른 구현예에서, hES 세포는 적어도 부분적으로 분화된 세포(예컨대, 다능성 세포)의 탈분화에 의해 제조되며 실제로 분화전능성(totipotent)이다. hESC를 제조하는 방법은 잘 공지되어 있으며, 예를 들면, 미국 특허 제5,843,780호, 제6,200,806호, 제7,029,913호, 제5,453,357호, 제5,690,926호, 제6,642,048호, 제6,800,480호, 제5,166,065호, 제6,090,622호, 제6,562,619호, 제6,921,632호, 및 제5,914,268호, 미국 공개된 특허문 제2005/0176707호, 국제 출원 제W02001085917호에 교시되어 있다. 본 발명의 맥락에서, 사람 배아 줄기 세포(hESC)는 Chung et al 2008에 기술된 바와 같은 기술에 따라 배아 파괴없이 생성된다.

[0050] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "유도된 다능성 줄기 세포"는 당해 분야에 공지되고 야마나카(Yamanaka)(특히 W02012/060473, PCT/JP2006/324881, PCT/JP02/05350, US 9,499,797, US 9,637,732, US 8,158,766, US 8,129,187, US 8,058,065, US 8,278,104)에 의해 초기에 개시된 방법을 사용하여, 재프로그래밍된 과정에 의해 비-다능성 세포로부터 인공적으로 유도된 다능성 줄기 세포를 지칭한다. 축약하면, 체세포는 Oct4, Sox2, Klf4 및 c-My, 또는 Oct4, Sox2, Lin28 및 Nanog와 같은 정의된 인자의 이소성 발현에 의해 유도된 다능성 줄기 세포(iPSC)로 재프로그래밍된다. 특수한 구현예에서, 유도된 다능성 줄기 세포는 포유동물, 특히(그러나 이에 한정되지 않는) 설치류, 돼지, 고양이, 개 및 비-사람 영장류, 및 사람으로부터 기원한다.

[0051] iPSC는 다양한 기원(섬유아세포, 혈액 세포, 각질 세포...)의 체세포로부터 및 다양한 기술(센다이 바이러스(sendai of virus), 에피솜 벡터, 합성 mRNA, 아데노바이러스, rAAV, 재조합 단백질...과 같은 온전성 렌티바이러스/레트로바이러스 및 비 온전성 벡터와 같음)을 사용함으로써 작은 화학적 화합물의 존재 또는 부재하에서 성공적으로 생성되었다.

[0052] 소 분자(small molecule)를 사용하여 후생적 변형체로서 작용함(즉, 일부유전자의 발현을 변형시킴)으로써 마우스 및 사람 iPSC의 유도 및 품질을 향상시킬 수 있다. 예시로서, BIX01294(BIX, G9a 히스톤 메틸트랜스퍼라제 억제제), 부티르산나트륨(NaB, 히스톤 데아세틸라제 HDAC 억제제) 또는 S-아데노-실호모시스테인(SAH, DNA 데메틸화제)를 언급할 수 있으며, 5-아자사이티딘(5-AZA, DNA 메틸트랜스퍼라제 억제제), 발프로산(VPA, 다른 히스톤 데아세틸라제 억제제)는 또한 정상 iPSC의 재프로그래밍 및 품질을 증진시킨다.

[0053] 완전히 재프로그래밍된 진짜(bona-fide) iPSC는 자가-재생능으로 배아 줄기 세포보다도 다능성 유전자를 유사하게 발현하며 제한되지 않은 줄기 세포(또는 줄기 세포 유사) 공급원을 나타낸다.

[0054] ESC 및 IPSC는 측정할 수 있는 줄기 세포 공급원을 허용하는 다수의 및 무한의 계대배양 동안 반복적으로 증폭될 수 있다. 다능성 잠재능은 다능성 유전자의 고 수준 발현을 보존함으로써 복제를 허용하는 배양 조건 하에서 활성적으로 유지된다. 이러한 방법은 당해 분야에 공지되어 있다.

[0055] 구체적인 배양 조건 및 방법은 안정한 계보를 복제하도록 하지만, 그럼에도 불구하고 일부 엑솜 돌연변이(exome mutation) 및 에피게놈적 변형(epigenomic modification)이 기술되어 왔다(Gore A and al. Nature 2011).

[0056] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "체 세포(somatic cell)"는 생식 세포(정자 및 난자)를 제외하고는 신체의 특정 세포를 지칭한다.

[0057] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "동종이계 세포"는 동일한 종이나 유전적으로 명백한 것으로부터의 세포를 지칭한다.

[0058] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "동계 또는 자가 세포"는 동일한 종 및 동일한 유전적 배경으로부터의 세포를 지칭한다.

[0059] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "이종 세포"는 상이한 종으로부터 및 유전적으로 명백한 세포를 지칭한다.

[0060] 특수한 구현예에서, 줄기 세포는 포유동물로부터 기원할 수 있으나 설치류, 돼지, 고양이, 개, 및 사람을 포함하는 영장류에 한정되지 않는다.

[0061] 다능성 세포의 집단을 제조하는 방법:

[0062] 제1 국면에서, 본 발명은:

- [0063] i) 확장 단계 동안에 다능성 세포의 집단 속에서 항원의 MHC-I 제시를 유도하는 제제의 존재하에서, 상기 세포의 다능성 능력을 유지하도록 하는 조건의 존재하에서, 다능성 세포를 확장하는 단계,
- [0064] ii) 확장된 세포를 다능성 세포를 불활성화시킬 불활성화제에 노출시키는 단계,
- [0065] iii) 확장되고 불활성화된 세포를 회수하고 조건화시키는 단계를 포함하여, 세포 조성물을 제조하는 방법에 관한 것이다.
- [0066] 구체적인 구현예에서, 세포 엔벨로프 온전성(cell envelope integrity)은 단계 ii)에서 유지된다.
- [0067] 다른 구현예에서, 세포는 불활성화되고 세포 추출물과 같은 세포 기원한 생성물이 수득된다.
- [0068] 상기 방법에 따라 제조된 세포 조성물은 본원에 개시된 방법에 따라, 암 치료에 사용할 수 있다.
- [0069] MHC I 항원 제사용 제제
- [0070] 다능성 세포는 MHC I 경로를 통해 항원의 제시를 증진시킬 제제의 존재하에서 확장된다. 이러한 증진된 확장은 이러한 제제의 존재 또는 부재하에서 세포의 표면에서 MHC I 분자의 수를 비교함으로써 점검할 수 있다.
- [0071] 이러한 제제는 당해 분야에 공지되어 있으며, 특히 히스톤 데아세틸라제 억제제(HDACi)를 인용할 수 있다. 이러한 활성을 가진 다수의 생성물은 당해 분야에 공지되어 있고, 이러한 HDACi들 중에서, 특히 발프로에이트(VPA 또는 발프로산, CAS 번호 99-66-1)을 인용할 수 있다. 사용될 수 있는 다른 HDACi(이들이 VPA보다도 동일한 작용 방식을 가지므로)는 특히, 보리노스타트, 로미덱신 키다미드, 파노비노스타트, 벨리노스타트, 파노비노스타트, 모세티노스타트, 아벡시노스타트, 엔티노스타트, SB939, 레스미노스타트, 기비노스타트 또는 퀴시노스타트이다. 이들 제제는 다능성 세포의 확장 동안 세포 배양(확장) 배지 속에 존재한다.
- [0072] 세포의 다능성의 유지
- [0073] 세포의 확장은 세포의 다능성 능력을 유지하도록 하는 조건(배지, 온도) 속에서 수행된다. 이들 배양 조건은 당해 분야에 공지되어 있다. 세포의 다능성 능력의 유지는 이러한 세포가 모든 배아 항원을 발현(및 따라서 제시)할 것을 보증하므로, MHC I 경로를 통해 이들의 표면에 이러한 항원을 제시하는 세포의 수용능을 증가시킨다.
- [0074] 다능성 세포 표면에서 제시된 배아 항원이 더 많아질수록, 이들 항원 중 적어도 하나가 또한 암 세포의 표면에서 제시될 가능성이 증가하며, 이는 이후 본 발명의 백신 조성물에 의해 프라이밍될 면역계에 의해 인식되어 표적화될 것이다.
- [0075] 따라서, 본원에 개시된 방법에 의해 수득된, 본 발명에 따른 조성물의 세포의 다능성의 유지는 광범위한 배아 항원의 제시를 가져오므로 본원에 개시된 치료 방법에서 본 발명의 백신 조성물의 편제된 효능을 가져온다.
- [0076] 다능성을 유지하는 것과 같은 조건에서 세포의 확장은 당해 분야에 공지되어 있다. 이는 특히 지금까지 기술된 모든 iPSC 확장 프로토콜(Shi Y and al, Nat Rev Drug Discovery 2017; Chen KG and al Cell 줄기 Cell. 2014)에 기술되어 있다. 다음의 조건을 사용하는 경우가 바람직하다:
- [0077] - 임의로 VPA 및/또는 돌연변이유발제(예를 들면, ENU, 하기 참고)로 보충된, E8 배지 또는 모든 임상 등급 ES/iPSC 배양 배지의 사용.
- [0078] - 저산소증 조건의 존재 또는 부재하에서 37°C의 온도
- [0079] - VPA(0.1 mM 내지 5 mM) 및/또는 ENU(0.1 µg/ml 내지 100 µg/ml) 및/또는 p53 억제제 및/또는 Y-27632 Rock 억제제와 같이 세포 생존을 향상시키는 화합물이 첨가된 동일한 배지를 사용한 매일 배지의 교환.
- [0080] 세포는 일반적으로 효소 탈착(콜라게나제, 트립신)을 사용하여 주당 1회 규칙적인 계대배양에 의해 유지된 90%의 최적 밀도로, 8주 동안 배양된다.
- [0081] 세포의 불활성화
- [0082] 바람직한 구현예에서, 본원에 기술된 치료 방법에 사용된 다능성 세포는 불활성화된다. 용어 "불활성화된", 및 이의 문법적 변형체는 살아있지만 증식할 수 없도록 된(즉, 유사분열적으로 불활성화된) 세포(예컨대, 다능성 세포)를 지칭하기 위해 본원에 사용된다. 당해 분야의 숙련가는 화학적 제제, 조사 및/또는 동결건조에 대한 노출을 포함하나, 이에 한정되지 않는 기술을 사용할 수 있다. 다능성 세포를 불활성화시켜 대상체에 투여시 다능성 세포가 분열할 수 없어서 대상체내에서 기형종을 형성할 수 없도록 할 수 있다. 다수의 세포의 문맥에서, 모



든 세포가 증식할 수 없도록 할 필요가 없음이 이해된다. 따라서, 본원에 사용된 바와 같은 어구 "대상체 내에서 기형종 형성을 방지하기 위해 충분한 정도로 불활성화된"은 대상체에게 투여 후, 조사된 다능성 줄기 세포가 시험관내 배양에 의해 확인되는 바와 같이 더 이상 분열하지 않았으므로 기형종을 형성하지 않도록 하는 집단 내에서 전체로서의 불활성화 정도를 지칭한다. 다능성 세포 내 하나 이상의 세포가 실제로 대상체 내에서 증식할 수 있는 경우에도, 숙주의 면역계는 기형종이 형성할 수 있기 전에 이들 세포를 파괴할 것임이 추정됨에 주목하여야 한다. 기형종 형성 및 증식의 이러한 불능은 기증성 및 비-기증성 면역계를 갖는 마우스에서의 시험에 의해 확인할 수 있다.

[0083] 일부 구현예에서, "불활성화된" 세포는 사멸된 세포이며, 일부 구현예에서, 불활성화된 세포는 전체 세포 분해물, 다능성 줄기 세포 기원한 엑소솜, 농축된 암 줄기 신생-항원, 전체 정제된 암 줄기 신생-항원, DNA RNA 및 단백질 추출물, 동결건조된 전체 세포 현탁액, 막 분획과 같은 세포 분해물의 분획, 세포질성 분획, 또는 이의 조합이다. 불활성화된 다능성 줄기 세포는 마우스의 백신 접종을 발프로산 또는 다른 HDACi와 함께 hESCs 또는 hiPSC를 사용하여 수행하는 경우 면역 반응을 자극할 수 있게 잔류한다. 이러한 백신 접종은 또한 부작용 및 자가면역 질환의 증거없이 4T1 유방 암종에 대해 효율적인 면역 및 항-종양 반응을 유도할 수 있다.

[0084] 전형적으로, 줄기 세포를 불활성화시키기 위하여, 이들을 치사 용량의 방사선(예컨대, 5 내지 100 Gy 단일 분획)에 노출시킬 수 있다. 세포에 전달된 정밀한 방사선 선량 및 용량 길이는 세포가 생존할 수 없는 한 중요하지 않다.

#### [0085] 세포의 회수 및 조건화

[0086] 방법의 회수 단계는 세포 배양물을 세척하고 X-Vivo/줄기flex 배지 또는 임의의 다른 임상 등급의 세포 배지와 같은 임의의 적절한 배지 속에서 세포를 재현탁시키는 하나(또는 다수의) 단계(들)을 포함한다.

[0087] 세포의 조건화는 사용 전 세포 조성물을 저장할 수 있도록 하기 위하여, 세포를 동결시키거나 동결건조시킴을 포함할 수 있다.

#### [0088] 다능성 세포의 돌연변이 및 신생-항원의 발현

[0089] 다능성 세포는 유전적으로 매우 안정한 세포임이 상기된다. 더욱이, 이들은 배아 발달의 과정에서 매우 일찍 존재하며 이들은 배아 발달을 위해서 증식하여야 하므로, 이들 세포가 너무나 돌연변이되는 경향이 아니어서 배아 내에서 동종성을 가지도록 하는 것이 중요하다.

[0090] 결과적으로 다능성 세포의 집단 속에 존재하는 세포는 일반적으로 이들의 유전 함량을 고려할 때(즉, 집단의 세포의 95% 이상이 동일한 유전적 배경으로 존재한다) 매우 균질하다.

[0091] iPSC를 제조하는 경우, 일부 세포의 선택적인 이점은 다수의 계대배양 동안 일어나며, 이는 늦은 계대배양에서 특수한 돌연변이를 나타내는 iPSC의 집단을 유도하지만, 세포 계능의 서열은 100%에 거의 근접한다.

[0092] 그러나, 수회의 계대배양 후, iPSC는 hESC과 같이 안정하다(Hussein SM and al, Nature 2011). 배양-유도된(적응성) 돌연변이는 장기간의 배양에서 매우 적은 유전적 변화로 획득될 것이다(Hussein SM and al, Bioessays, 2012).

[0093] 그러나, 침습성 암에서 발견된 처리된 세포 물질에서 태아/배아 신생-항원의 가변성을 증가시키기 위하여 세포 내에서 돌연변이를 유발할 수 있는 것이 유리하다. 이러한 방식으로 이는 면역 시스템이 이들 돌연변이된 세포에 대해 T 세포를 생성시킬 가능성을 증가시킬 것이며 암 세포 및 종양의 성장 동안 나중에 변화를 겪는 것과 싸울 수 있을 것이다.

[0094] 이는 암 줄기 세포의 증식 동안 DNA 복제 오류 및/또는 환경적 상해로부터 생성되는 유전적 변경의 축적으로부터 생성되는 암과 싸우는 것을 도울 수 있다. 이러한 변경은 발암 및 계능 불안정화 돌연변이를 개시하는 암 드라이버 돌연변이(cancer driver mutation)를 포함한다. 이러한 증가된 계능 불안정성은 약물 내성이 증가된 보다 침습적인 클론의 선택을 초래하는 클론 진화를 생성한다.

[0095] 결과적으로, 구체적인 구현예에서, 세포는 이러한 세포의 유전자 내에서 돌연변이를 유발할 조건 속에서 확장된다.

[0096] 따라서, 세포는 돌연변이유발제, 즉, 유기체의 유전 물질, 일반적으로 DNA를 변화시키는 물리적 또는 화학적 제제에 노출됨으로써 돌연변이의 빈도를 천연의 배경 수준 이상으로 증가시킬 수 있다.

- [0097] 돌연변이유발원은 물리적 돌연변이유발원 및 화학적 돌연변이유발원으로 이루어진 그룹으로부터 선택될 수 있다.
- [0098] 물리적 돌연변이유발원 중에서, 다음을 언급할 수 있다:
- [0099] - DNA 파괴 및 다른 손상을 유발할 수 있는 X-선, 감마 선 및 알파 입자와 같은 이온화 방사선. 특히 코발트-60 및 세슘-137로부터의 방사선을 언급할 수 있다. 조사 광선(irradiating ray)의 수준은 세포 불활성화에 사용된 것보다 훨씬 낮아야 하며 당해 분야의 기술자에 의해 설계될 수 있다.
- [0100] - 교정하지 않고 남겨둔 경우, 복제시 오류를 유발할 수 있는, 파장이 260 nm를 초과하는 자외선 조사.
- [0101] - 또는 DNA 속에서 14C와 같은 방사활성 붕괴.
- [0102] 화학적 돌연변이유발원 중에서 다음을 언급할 수 있다:
- [0103] - 슈퍼옥사이드, 하이드록실 라디칼, 과산화수소와 같은 반응성 산소 종(ROS).
- [0104] - 사이토신을 우라실로 전환함으로써 전이 돌연변이를 유발할 수 있는 질산과 같은 탈아민화제.
- [0105] - 디올-에폭사이드로 활성화되는 경우 DNA에 결합할 수 있는 폴리사이클릭 방향족 탄화수소(PAH).
- [0106] - 에틸니트로소우레아(ENU, CAS 번호 759-73-9), 머스타드 가스(mustard gas) 또는 비닐 클로라이드와 같은 알킬화제.
- [0107] - 2-아세틸아미노플루오렌과 같은 방향족 아민 및 아미드.
- [0108] - 빈카 종(Vinca species)으로부터의 것과 같은, 식물로부터의 알칼로이드.
- [0109] - 브롬 및 브롬을 함유하는 일부 화합물.
- [0110] - 나트륨 아지드.
- [0111] - 블레오마이신.
- [0112] - 자외선과 조합된 소랄렌(Psoralen).
- [0113] - 벤젠.
- [0114] - 복제 동안 DNA 염기에 대해 치환될 수 있고 전이 돌연변이를 유발할 수 있는 염기 유사체.
- [0115] - 에티디움 브로마이드, 프로플라빈, 다우노루비신과 같은 인터칼레이팅제(intercalating agent).
- [0116] - 비소, 카드뮴, 크롬, 니켈과 같은 금속 및 돌연변이유발원성일 수 있는 이들의 화합물.
- [0117] 이러한 구현예에서, 다능성 줄기 세포의 집단을 수득할 수 있으며, 여기서 세포는 특히 암 관련 신생-항원에 있어서 무작위 돌연변이(세포마다 일반적으로 상이함으로써 이중 집단으로 초래함)를 갖는다.
- [0118] 본 발명자들은 DNA 손상-의존성 세포자멸사(apoptosis)를 트리거(trigger)하지 않고 다능성 줄기 세포내에서 DNA 복제 오류를 유도할 수 있도록 하는 배양 조건을 설계하는 것이 가능함을 입증하였다.
- [0119] 이는 상기 나타난 바와 같이, 다능성 세포가 배아발생의 초기 단계 동안에 도입된 돌연변이가 가능한 한 적은 수이어야 하므로 천연적으로 매우 안정하다. 이로부터, DNA 복구 기구가 이들 세포에서 매우 효율적이어서, 대부분의 결함을 교정하고/하거나 이러한 결함을 교정할 수 없는 경우 세포자멸사를 유도하는 것이 생성된다.
- [0120] 일 구현예에서, 출발하는 집단의 다능성 세포(예를 들면, ESC 또는 iPSC)는 다능성 복제를 허용하는 배양 배지(당해 분야에 공지된 바와 같은) 속에서 확장되고 유지됨으로써 반복되는 계대배양 동안에 다능성 단계를 보존한다. 이러한 조건에서, 일반적으로 적은 양의 엑솜(exome) 돌연변이(엑솜당 5 내지 10개의 돌연변이)가 관찰될 수 있다.
- [0121] 다능성 세포는 이후에 돌연변이유발 화합물 방법을 사용하여 시험관 내에서 배양함으로써 상기 나열된 것과 같은 다능성 줄기 세포 내에서 게놈 불안정성을 유도하고 증가시킨다. DNA 손상은 이중 가닥 브레이크(Double-Strand Breaks: DSBs)용 마커로서  $\gamma$ H2AX의 포스포릴화에 의해 잘 확인된다.  $\gamma$ H2AX 양성 세포의 비율 및  $\gamma$ H2AX 병소(foci)의 빈도 둘 다는 ESC 또는 iPSC에서 증가되었을 뿐만 아니라 게놈 불안정성의 표시로서 보다 많은 수의 마이크로핵을 증가시켰다.

- [0122] 바람직한 제제는 블레오마이신, ENU, 알킬화제, 악티노마이신 D, ROS-조절제, UV, H2O2, 이온화 방사선(감마선, X 선)이며, 이들 모두는 배양 동안 축적된 다능성 줄기 세포 내에서 돌연변이의 유도 및 비율의 향상을 허용한다. 바람직한 구현예에서, N-에틸-N-니트로소우레아(ENU)는 <50  $\mu\text{g/ml}$ 의 선량에서 적어도 7 내지 60일의 긴 배양 기간 동안 처리된 다능성 줄기 세포내에서 신규 돌연변이를 생성하고 신생-항원의 수준을 향상시키는 것으로 밝혀졌다. 이러한 돌연변이는 암에서 보고된 것과 유사하다.
- [0123] 따라서, 특히 세포를 배지 속에서 HDACi와 함께 배양하는 경우, 세포의 다능성을 유지시키면서, 연장된 배양 시 선택적인 이점으로부터 높은 돌연변이 비율로 다능성 세포의 증식 동안 DNA 손상에 대한 반응에 있어서 돌연변이의 다양성을 축적시키는 것이 가능하다. 배양물 속에서 HDACi의 존재는 유도되는 DNA 손상에 대한 반응시 활성 히스톤(H3K4me3 및 H3K9ac) 및 다능성의 후생적 표시의 증가, 및 계대배양 동안 복제 및 증식 속도의 증가를 보존한다.
- [0124] 본원에 기술된 조성물 및 방법의 다른 구현예에서, 돌연변이는 고 수준의 게놈 불안정성을 촉진하는 유전자를 사용한 세포의 게놈 변형을 통해 다능성 세포내에서 유도된다. 특히, NER/BER/DSBR/MMR 억제제와 같은 적절한 억제제를 사용하여, DNA 복구 및 복제에 관여하는 유전자 또는 시그널링 경로(signaling pathway)의 활성을 결실시키거나 감소시킬 수 있다. 증가된 DNA 손상과 연결된 게놈 불안정성을 유도하는 이들 방법은 "백터"를 사용하거나 또는 DNA 폴리머라제 델타 복합체, 미스매치 복구(MMR), 염기 절개 복구(BER), 뉴클레오타이드 절개 복구(NER), 동종 재조합(HR), DSBR 또는 NEJH와 같은 DNA 복구 관련 유전자 또는 시그널링 경로를 불활성화시키거나 녹 다운(knock down)시키는 "유전적 변형"에 의해 수행할 수 있다. DNA 복구 유전자의 다른 예에는 DNAPkC, Ku70, Rad 51, Brcal 또는 Brca2가 있다.
- [0125] 다른 구현예에서, 다능성 세포는 변형시킴으로써 p53과 같은 세포자멸사-관련 유전자를 유전적 변형 또는 Pifithrin-mu, Nutlin-3과 같은 화학적 p53에 의해, 또는 p160-Rho-관련 코일된 키나제(ROCK)의 선택적 억제제인, Y-27632와 같은 세포 생존을 향상시키는 화합물의 사용에 의해 억제한다.
- [0126] 특수한 구현예에서, 다능성 세포의 집단은
- [0127] i) 예를 들면, 모세혈관확장성 운동실조증(Ataxia telangiectasia), 블룸 증후군(Bloom syndrome), 코케인 증후군(Cockayne's syndrome), 판코니 빈혈(Fanconi's anaemia), 베르너 증후군(Werner syndrome), 색소성 건피증(Xeroderma pigmentosum), 나이메헨 파속 증후군(Nijmegen breakage syndrome)을 포함하는 DNA 복구 질환;
- [0128] ii) 린치 증후군(Lynch syndrome)(MLH1, MSH2, MSH6, PMS1, 및 PMS2를 포함하는 MMR 유전자내에 돌연변이를 지닌 유전성 비-폴립증 결장직장암), TP53 유전자 또는 CHEK2 내에 돌연변이를 지닌 리-프라우메니(Li-Fraumeni), BRCA1/2 유전자내에 결실 또는 돌연변이를 지닌 유전성 유방 및 난소암(HBOC) 증후군, APC 유전자 내에 돌연변이를 지닌 가계성 대장 폴립증(familial adenomatous polyposis: FAP)과 같은, 게놈 불안정성을 지닌 유전성 가계 암 증후군;
- [0129] iii) 전좌(T9;22)를 지닌 CML에서와 같은 체세포 종양원성 유도된 게놈성 불안정성과 연결된 게놈 변형을 이미 함유한, 환자로부터 분리된 세포와 같은, 체세포로부터 생성된 유도된 다능성 줄기 세포(iPSC)로 이루어진다.
- [0130] 바람직한 구현예에서, 돌연변이된 다능성 세포의 집단은 유도된 다능성 줄기 세포로 제조되며 질환과 연결된 게놈 변형을 함유하는 체세포로부터 생성된다. 전형적으로, 게놈 변형은 전좌(T9;22), 결실(BRCA1/2) 또는 돌연변이(BRCA, RET)일 수 있다.
- [0131] 특수한 구현예에서, 다능성 줄기 세포의 집단은 암 세포주 또는 환자-특이적인 암 세포로부터 생성된 iPSC로 이루어진다.
- [0132] 다른 구현예에서, ESC 또는 IPSC의 집단은 유전적으로 변형되어 <<백터>>를 사용함에 의해 신생-항원 관련된 다수의 비-무작위 암 줄기를 과-발현한다. 특수한 구현예에서, ESC 또는 IPSC의 집단은 유전적으로 변형되어 "게놈 편집" 기술에 의해 다능성 줄기 세포 내에서 다수의 돌연변이 및 암 줄기 세포 특이적인 신생-항원(적어도 5개)을 발현한다. 본 발명은 RNA-안내된 멀티플렉스 게놈 편집, 변형, 발현의 억제 및 다른 RNA-기반 기술에 의해 이의 다수의 신생-항원을 도입함으로써 ESC 또는 IPSC를 제공하는 조성물 및 방법을 제공한다.
- [0133] 본원에 사용된 용어 "게놈 편집"은 cas9-매개된 게놈 편집을 위한 안내 RNA를 포함하는, RNA 매개된 유전적 조작을 지칭한다. 이러한 안내 RNA, (gRNA)는 엔도뉴클레아제 cas9를 따라 형질감염된다. 안내 RNA는 스캐폴드(scaffold) 및 표적에 대해 상보성인 스페이서 서열을 제공한다. 다른 구현예에서 유전적 조작 서열은 Crispr-Cas 9 시스템을 사용함으로써 당해 분야에서 표준 방법에 따라 유전자 사일런싱(gene silencing)을 위해 설계된

siRNA 또는 microRNA 서열일 수 있다. Crispr-Cas 시스템을 제조하고 사용하기 위한 조성물 및 방법은 당해 분야에 공지되어 있으며 특히, 미국 제8,697,359호에 기술되어 있다.

[0134] 특수한 구현예에서, 다능성 세포의 집단은 알킬화제로 처리된다. 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "알킬화제"는 하나의 분자로부터 다른 것으로 하나 이상의 알킬 그룹을 가하는 물질을 지칭한다. 이러한 처리는 신생-항원 내에 새로운 돌연변이를 생성하여 TIL 및 Th1/Th2 세포 면역성의 올리고 클론성 확장을 증가시킴으로써 우수한 면역 반응을 제공한다.

[0135] 본 발명에서, 알킬화제는 질소 머스타드, 니트로소우레아, 알킬 설포네이트, 트리아진, 에틸렌이민, 및 이의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 질소 머스타드의 비-제한적 예는 메클로르에타민(Lundbeck), 글로람부실(GlaxoSmithKline), 사이클로포스파미드(Mead Johnson Co.), 벤다무스틴(Astellas), 이소프파미드(Baxter International), 멜팔란(Ligand), 멜팔란 플루벤아미드(Oncopeptides), 및 약제학적으로 허용되는 이의 염을 포함한다. 니트로소우레아의 비-제한적 예는 스트렙토조신(Teva), 카르무스틴(Eisai), 로무스틴(Sanofi), 및 이의 약제학적으로 허용되는 이의 염을 포함한다. 알킬 설포네이트의 비-제한적 예는 부설판(Jazz Pharmaceuticals) 및 약제학적으로 허용되는 이의 염을 포함한다. 트리아진의 비-제한적 예는 다카르바진(Bayer), 테모졸로마이드(Cancer Research Technology), 및 약제학적으로 허용되는 이의 염을 포함한다. 에틸렌이민의 비-제한적 예는 티오테파(Bedford Laboratories), 알트레타민(MGI Pharma), 및 약제학적으로 허용되는 이의 염을 포함한다. 다른 알킬화제는 ProLindac (Access), Ac-225 BC-8 (Actinium Pharmaceuticals), ALF-2111 (Alfact Innovation), 트로포스파미드(Baxter International), MDX-1203(Bristol-Myers Squibb), 티오우레이도부티로니트릴(CellCeutix), 미토브로니톨(Chinoin), 미톨락톨(Chinoin), 니무스틴(Daiichi Sankyo), 글루포스파미드(Eleison Pharmaceuticals), HuMax-TAC 및 PBD ADC 조합(Genmab), BP-C1(Meabco), 트레오셀판(Medac), 니푸르티목스(Metronomx), 임프로셀판 토실레이트(Mitsubishi tanabe Pharma), 라니무스틴(Mitsubishi tanabe Pharma), ND-01(NanoCarrier), HH-1(Nordic Nano백터), 22P1G 세포 및 이포스파미드 조합(Nuvilex), 에스트라무스틴 포스페이트(Pfizer), 프레드니무스틴(Pfizer), 루르비넥테딘(PharmaMar), 트라벡테딘(PharmaMar), 알트레아타민(Sanofi), SGN-CD33A(Seattle Genetics), 포테무스틴(Servier), 네다플라틴(Shionogi), 헵타플라틴(Sk Holdings), 아파지쿠온(Spectrum Pharmaceuticals), SG-2000(Spirogen), TLK-58747(Telik), 라로무스틴(Vion Pharmaceuticals), 프로카르바진(Alkem Laboratories Ltd.), 및 약제학적으로 허용되는 이의 염을 포함한다. 다른 구현예에서, 알킬화제는 메클로르에타민(Lundbeck), 글로람부실(GlaxoSmithKline), 사이클로포스파미드(Mead Johnson Co.), 스트렙토조신(Teva), 다카르바진(Bayer), 티오테파(Bedford Laboratories), 알트레타민(MGI Pharma), 약제학적으로 허용되는 이의 염, 및 이의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 다른 구현예에서, 알킬화제는 ProLindac(Access), Ac-225 BC-8(Actinium Pharmaceuticals), ALF-2111(Alfact Innovation), 벤다무스틴(Astellas), 이포스파미드(Baxter International), 트로포스파미드(Baxter International), MDX-1203(Bristol-Myers Squibb), 테모졸로마이드(Cancer Research Technology), 티오우레이도부티로니트릴(CellCeutix), 미토부로니톨(Chinoin), 미톨락톨(Chinoin), 니무스틴(Daiichi Sankyo), 카르무스틴(Eisai), 글루포스파미드(Eleison Pharmaceuticals), HuMax-TAC 및 PBD ADC 조합(Genmab), 부설판(Jazz Pharmaceuticals), 멜팔란(Ligand), BP-C1(Meabco), 트레오셀판(Medac), 니푸르티목스(Metronomx), 임프로셀판 토실레이트(Mitsubishi tanabe Pharma), 라니무스틴(Mitsubishi tanabe Pharma), ND-01(NanoCarrier), HH-1(Nordic Nano백터), 22P1 G 세포 및 이포스파미드 조합(Nuvilex), 멜팔란 플루벤아미드(Oncopeptides), 에스트라무스틴 포스페이트(Pfizer), 프레드니무스틴(Pfizer), 루르비넥테딘(PharmaMar), 트라벡테딘(PharmaMar), 알트레아타민(Sanofi), 로무스틴(Sanofi), SGN-CD33A(Seattle Genetics), 포테무스틴(Servier), 네다플라틴(Shionogi), 헵타플라틴(Sk Holdings), 아파지쿠온(Spectrum Pharmaceuticals), SG-2000(Spirogen), TLK-58747(Telik), 라로무스틴(Vion Pharmaceuticals), 프로카르바진(Alkem Laboratories Ltd.), 약제학적으로 허용되는 이의 염, 및 이의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0136] 특수한 구현예에서, 다능성 세포의 집단은 N-에틸-N-니트로소우레아(ENU, CAS 번호 759-73-9)로 처리된다. ENU는 다음의 화학식  $C_3H_7N_3O_2$ 을 가지며, 에틸 그룹을 핵산 속의 핵염기에 이전시킴에 의한 매우 강력한 돌연변이유발원이다.

[0137] 상기 나타난 바와 같이, 돌연변이유발제의 목적은 확장(돌연변이의 도입은 세포의 복제 및 분열 동안 일어난다) 동안 다능성 세포의 유전자내에 무작위 돌연변이를 도입하기 위한 것이다. 다능성 줄기 세포의 집단은 성장 이점을 제공할 수 있으며 배양 적응을 증진시키기 위해 선택된다. ESC 또는 iPSC의 계대배양은 고 수준의 선택 압력을 겪으며, 확장시 다수의 클론성 돌연변이된 집단을 이를 위해 우선적으로 선택할 수 있다.



- [0138] 다능성 세포는 매우 안정하므로, 돌연변이유발원의 적용은 장기간 동안 수행되어야만 함에 주목하여야 한다. 설명의 문제로서, ENU를 사용하는 경우, 이는 적어도 7일 동안, 보다 바람직하게는 적어도 15일, 보다 바람직하게는 적어도 20일, 보다 바람직하게는 적어도 30일, 보다 바람직하게는 적어도 40일, 보다 바람직하게는 적어도 50일 또는 심지어 적어도 60일 동안 적용될 수 있다. 돌연변이유발원의 적용 후, 세포를 세척(돌연변이유발원이 화학적 제제인 경우)하고 MHC-I 발현, 특히 HDACi의 발현을 선호하는 제제의 존재하에서 추가로 확장시킬 수 있다. 이러한 제제는 바람직하게는 또한 돌연변이유발제의 적용 동안 존재한다.
- [0139] 따라서, 돌연변이유발원은 다능성 세포에 의해 발현되는 배아 유전자의 일부에서 돌연변이(즉, 비-유사(non-synonymous), 넌센스(nonsense), 프레임쉬프트(frameshift), StopGain, 스플라이스 변이체, CNV, SNV)를 유발할 것이므로 이들 항원의 다양성(전체 게놈내 새로운 신생-항원)을 증가시킬 것임을 관찰하고 점검할 수 있다. 따라서, 이는 향상된 면역원성으로 백신 조성물의 가능성을 증가시키며, 신속하고 빈번한 돌연변이가 존재하는 침습성 암에 대해 광범위한 면역 반응을 자극할 수 있을 것이다.
- [0140] 효과적인 면역 반응은 또한 암 세포의 클론성 확장이 종양 세포에 의해 발현된 항원내 돌연변이로 발생하는 일부 암의 경우 수득하기 어려울 수 있다. 따라서, 면역 반응은 암의 돌연변이 로드(mutational load)에 의존할 것이다. 따라서, 돌연변이유발원의 사용에 의한 다능성 세포 집단내 무작위 돌연변이의 생성은 돌연변이된 배아 항원의 발현을 초래하고 백신 접종시 면역계에 제시된 항원의 다양성을 증가시킬 수 있다.
- [0141] 결과적으로, 이러한 세포의 분열 동안 암 세포내에서 나타날 수 있는 돌연변이된 항원에 대한 프라이밍된 T-세포가 이미 존재할 수 있다.
- [0142] 다능성 세포의 변형
- [0143] 특수한 구현예에서, 다능성 줄기 세포의 집단은 유전적으로 변형되어 다능성 세포 게놈 내에서 유전자 통합을 사용함에 의해 면역 반응을 자극하는 화합물을 과-발현한다. 전형적으로, 제1 단계에서, 줄기 세포의 집단을 분리하고 확장시킨다. 제2 단계에서, 목적한 유전자를 레트로바이러스 또는 렌티바이러스와 같은 통합 바이러스 벡터내로 패키징한다. 제3 단계에서, 목적한 유전자를 함유하는 온전성 바이러스 벡터를 줄기 세포의 집단으로 이전시킨다.
- [0144] 특수한 구현예에서, 다능성 세포의 집단은 MHC 발현 및/또는 면역 반응을 모의시험(simulating)하는 단백질의 유전자로 변형된다. 이들 화합물은 인터페론 알파(IFN- $\alpha$ ), 인터페론 감마(IFN- $\gamma$ ), 인터루킨 2(IL-2), 인터루킨 4(IL-4), 인터루킨 6(IL-6), 인터루킨 12(IL-12), 종양 괴사 인자(TNF), 및 과립세포-대식세포 콜로니 자극 인자(GM-CSF), 이의 기능성 단편, 및 이의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0145] 본 발명에 의해 고려된 인터페론(IFN)은 일반적인 유형의 IFN, IFN-알파(IFN- $\alpha$ ), IFN-베타(IFN- $\beta$ ) 및 IFN-감마(IFN- $\gamma$ )를 포함한다. IFN은 예를 들면, 이들의 성장을 지연시키고/시키거나 하나 이상의 정상적인 거동을 지닌 세포내로 이들의 발달을 촉진하고/하거나 항원의 이들의 생산을 증가시킴으로써 면역계가 암 세포를 보다 용이하게 인식하여 파괴하도록 함에 의해 암 세포에서 직접 작용할 수 있다. IFN은 또한 예를 들면, 혈관형성을 지연시키고/시키거나, 면역계를 증강(boosting)시키고/시키거나 천연 킬러(NK) 세포, T 세포 및 대식 세포를 자극함으로써 암 세포에서 간접적으로 작용할 수 있다. 재조합체 IFN-알파는 Roferon(Roche Pharmaceuticals) 및 Intron A(Schering Corporation)로서 상업적으로 이용가능하다.
- [0146] 본 발명에 의해 고려된 인터루킨은 IL-2, IL-4, IL-11 및 IL-12를 포함한다. 상업적으로 이용가능한 재조합체 인터루킨의 예는 Proleukin®(IL-2; Chiron Corporation) 및 Neumega®(IL-12; Wyeth Pharmaceuticals)를 포함한다. Zymogenetics, Inc. (Seattle, Wash.)는 IL-21의 재조합체 형태를 현재 시험중이며, 이는 또한 본 발명의 조합에 사용하기 위해 고려되고 있다.
- [0147] 본 발명에 의해 고려되는 콜로니-자극 인자(CSF)는 과립세포 콜로니 자극 인자(G-CSF 또는 필그라스티미), 과립세포-대식세포 콜로니 자극 인자(GM-CSF 또는 사르그라모스티미) 및 에리트로포이에틴(에포에틴 알파, 다르베포이에틴)을 포함한다. 하나 이상의 성장 인자를 사용한 치료는 전통적인 화학치료요법을 받은 대상체에서 새로운 혈액 세포의 생성을 자극하는데 도움이 될 수 있다. 따라서, CSF를 사용한 치료는 화학치료요법과 관련된 부작용을 감소시키는데 도움이 될 수 있으며 사용될 화학치료제의 보다 많은 용량을 허용할 수 있다. 다양한 재조합체 콜로니 자극 인자, 예를 들면, Neupogen®(G-CSF; Amgen), 뉴라스타(Neulasta)(펠필그라스티미; Amgen), 류킨(Leukine)(GM-CSF; Berlex), 프로크릿(Procrit)(에리스로포이에틴; Ortho Biotech), 에포젠(에리스로포이에틴; Amgen), 아르네스프(Arnesp)(에리트로포이에틴)가 상업적으로 이용가능하다.

- [0148] 이의 광범위한 의미에서, "벡터"는 세포로 올리고뉴클레오타이드의 이전을 촉진할 수 있는 임의의 비히클이다. 바람직하게는, 벡터는 핵산을 벡터의 부재를 초래할 수 있는 분해 정도와 관련하여 감소된 분해를 지닌 세포로 운반한다. 일반적으로, 본 발명에 유용한 벡터는 네이키드 플라스미드(naked plasmid), 비-바이러스 전달 시스템(전기천공, 소노포레이션(sonoporation), 양이온성 형질감염제, 리포솜 등), 파아지미드, 바이러스, 핵산 서열의 삽입 또는 혼입에 의해 조작된 바이러스 또는 세균 원으로부터 기원한 다른 비히클을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 바이러스 벡터는 벡터의 바람직한 유형이며 다음의 바이러스로부터의 핵산 서열을 포함하나, 이에 한정되지 않는다: 레트로바이러스(예를 들면, 몰로니 쥐 백혈병 바이러스 및 렌티바이러스 기원한 벡터), 하비 쥐 육종 바이러스(harvey murine sarcoma virus), 쥐 유방 종양 바이러스, 및 로우스 육종 바이러스(rous sarcoma virus)와 같은 RNA 바이러스; 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스; SV40-형 바이러스; 폴리오마 바이러스; 엡슈타인-바르 바이러스(Epstein-Barr viruses); 파필로마 바이러스(papilloma virus); 헤르페스 바이러스(herpes virus); 박시니아 바이러스(vaccinia virus); 폴리오 바이러스(polio virus). 명명되지는 않았으나 당해 분야에 공지된 다른 벡터도 용이하게 사용할 수 있다.
- [0149] 전형적으로, 본 발명의 맥락에서, 바이러스 벡터는 아데노바이러스 및 아데노-관련(AAV) 바이러스를 포함하며, 이는 유전자 치료요법에서 사람 용도로 이미 입증된 DNA 바이러스이다. 실제로 12개의 상이한 AAV 혈청형(AAV1 내지 12)이 알려져 있으며, 각각은 상이한 조직 편향성(tropism)을 지닌다(Wu, Z Mol Ther 2006; 14:316-27). 재조합체 AAV는 의존성 파르보바이러스 AAV로부터 기원한다(Choi, VV J Virol 2005; 79:6801-07). 아데노-관련 바이러스 제1형 내지 제12형은 복제 결함성이 되도록 가공할 수 있으며 광범위한 세포 유형 및 종을 감염시킬 수 있다(Wu, Z Mol Ther 2006; 14:316-27). 이는 열 및 지질 용매 안정성; 조혈 세포를 포함한, 다양한 계통의 세포 내에서 높은 형질도입 빈도; 및 초감염 역제의 결여와 같은 이점을 가짐으로써 다중 시리즈의 형질도입을 허용한다. 또한, 야생형 아데노-관련 바이러스 감염은 선택적인 압력의 부재하에서 100회 이상의 계대배양을 위한 조직 배양에서 수반되며, 이는 아데노-관련 바이러스 계통성 통합이 비교적 안정한 현상임을 암시한다. 아데노-관련 바이러스는 또한 염색체의 양식으로 기능할 수 있다.
- [0150] 다른 벡터는 플라스미드 벡터를 포함한다. 플라스미드 벡터는 당해 분야에 집중적으로 기술되어 왔으며 당해 분야의 기술자에게 잘 알려져 있다. 예컨대, Sambrook et al., 1989. 지난 수년 동안, 플라스미드 벡터는 생체 내에서 항원-암호화 유전자를 세포로 전달하기 위한 DNA 백신으로서 사용되어 왔다. 이들은 많은 바이러스 벡터를 사용하는 경우와 동일한 안전성 문제를 가지지 않으므로 특히 유리하다. 그러나, 숙주 세포와 혼용성인 프로모터를 갖는 이러한 플라스미드는 플라스미드 내에서 작동적으로 암호화된 유전자로부터의 펩타이드를 발현할 수 있다. 일부 일반적으로 사용된 플라스미드는 pBR322, pUC18, pUC19, pRC/CMV, SV40, 및 pBlueScript를 포함한다. 다른 플라스미드는 당해 분야의 통상의 기술자에게 잘 알려져 있다. 또한, 플라스미드는 DNA의 특정 단편을 제거하거나 첨가하기 위한 제한 효소 및 연결 반응을 사용하여 통상적으로 설계될 수 있다. 플라스미드는 다양한 비경구, 점막 및 국소 경로에 의해 전달될 수 있다. 예를 들면, DNA 플라스미드는 근육내, 피내, 피하 또는 다른 경로로 주사될 수 있다. 이는 또한 비강내 분무 또는 점적, 직장 좌제 및 경구적으로 투여될 수 있다. 바람직하게는, 상기 DNA 플라스미드는 안구내 방식(유리체내, 망막하, 맥락막 위...)을 통해 주사된다. 이는 또한 유전자-총(gene-gun)을 사용하여 표피 또는 점막 표면내로 투여될 수 있다. 플라스미드는 수용액 속에 제공되어, 금 입자 위로 또는 리포솜, 덴드리머, 코클레이트 및 미세캡슐화를 포함하나, 이에 한정되지 않는 다른 DNA 전달 시스템과 함께 건조될 수 있다.
- [0151] 특수한 구현예에서, 줄기 세포의 집단은 siRNA와 같은 전이유전자를 동종 재조합체에 의해 염색체 19의 AAVS1 유전자자리내로 도입함으로써 변형된다.
- [0152] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "동종 재조합"은 염색체 또는 게놈 위에서 특정 유전자를 인공적으로 변형시키는 유전자 표적화 수단을 지칭한다. 염색체 상에서 표적 서열의 것과 동종인 부위를 갖는 게놈성 단편이 세포내로 도입되는 경우, 이러한 용어는 도입된 게놈성 단편과 염색체 상의 이에 상응하는 유전자자리 사이의 뉴클레오타이드 서열 상동성을 기반으로 일어나는 재조합을 지칭한다.
- [0153] 또한, 용어 "유전적 변형"은 염색체 상의 바람직한 유전자의 유전자자리(locus) 내에서 외인성 DNA의 삽입, 유전자의 일부 또는 전체의 외인성 DNA로의 치환, 또는 유전자의 결실을 지칭한다. 보다 구체적으로, 유전적 변형은 내인성 DNA 서열이 단편이 특정 유전자 자리에서 유전자의 발현과 함께 발현되거나 구성적으로 발현되는 방식으로 보유되는 외인성 DNA 단편의 삽입(즉, "녹-인(knock-in)"), 내인성 DNA 서열을 변형시키도록 하는 유전자의 일부 또는 전체 유전자 서열의 치환, 결실, 또는 파열(즉, "녹-아웃(knock-out)")을 지칭한다.
- [0154] 인공 염색체를 세포내로 도입시키기 위한 방법의 예는 인산칼슘 침전법(Graham et al., (1978) Virology 52:

456-457, Wigler et al., (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76 1373-1376 및 Current Protocols in Molecular Biology Vol.1, Wiley Inter-Science, Supplement 14, Unit 9.1.1-9.1.9 (1990)), 폴리에틸렌 글리콜을 사용하는 융합법(미국 특허 제4,684,611호), 지질감염과 같은 지질 담체를 사용하는 방법(Teifel et al., (1995) Biotechniques 19: 79-80, Albrecht et al., (1996) Ann. Hematol. 72: 73-79; Holmen et al., (1995) In Vitro Cell Dev. Biol. Anim. 31: 347-351, Remy et al., (1994) Bioconjug. Chem. 5: 647-654, Le Bolc'het al., (1995) Tetrahedron Lett. 36: 6681-6684, Loeffler et al., (1993) Meth. Enzymol. 217: 599-618 and Strauss (1996) Meth. Mol. Biol. 54: 307-327), 전기천공, 및 미세세포와의 융합 방법(미국 특허 제 5,240,840호, 제4,806,476호, 제5,298,429호, 및 제5,396,767호, Fournier (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78: 6349-6353 및 Lambert et al., (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88: 5907-59)를 포함한다.

[0155] 세포의 집단

[0156] 따라서, 상기 기술된 바와 같은 방법을 사용하여, 본 발명자들은 보다 효율적인 항종양 면역성을 트리거할 일부 또는 모든 배아 유전자 내 새로운 배아 에피토프를 발현하는 다능성 세포의 집단을 수득하였다. 보다 특히, 본 발명자들은 N-에틸-N-니트로로소우레아(ENU)로 처리한 다능성 세포의 집단이 ENU로 처리하지 않은 다능성 세포의 집단과 비교하여 무작위 돌연변이를 나타냄을 밝혀내었다. 따라서, 이러한 집단은 또한 본 발명의 주제이다.

[0157] 따라서, 본 발명은 다능성 세포를 포함하는 세포의 조성물에 관한 것이며, 여기서 상기 집단 속의 세포는 TP53, P2RY8, CRLF2, CRTC3, BLM, ASXL1, IDH2, NTRK3, MALAT1, EXT1, NCOA2, IKF1, PIK3R1, EP300, AKT2, PPP2R1A, CDK12, BRCA1, ERB2, , CDH1, TBX3, SMARCD1, HSP90AA1, EZH2, SUZ12, STAT5B 및 POU5F1로 이루어진 그룹으로부터 선택된, 적어도 3개의 유전자, 보다 바람직하게는 적어도 4개의 유전자, 보다 바람직하게는 적어도 5개의 유전자, 보다 바람직하게는 적어도 6개의 유전자, 보다 바람직하게는 적어도 7개의 유전자에서 적어도 0.1%, 바람직하게는 적어도 1%, 보다 바람직하게는 적어도 2%, 보다 바람직하게는 적어도 5%, 보다 바람직하게는 적어도 10%, 보다 바람직하게는 적어도 15%, 보다 바람직하게는 적어도 20%, 보다 바람직하게는 적어도 30%, 보다 바람직하게는 적어도 40%, 또는 심지어 적어도 50%의 돌연변이 비율을 나타낸다.

[0158] 이러한 유전자의 이러한 돌연변이 비율은 추가의 확장이 수행되는 경우, 이러한 추가의 확장 전 또는 후에, 돌연변이유발제에 대한 노출 후, 세포 집단에서 연구된다.

[0159] 다능성 세포가 유전적으로 매우 안정하다는 사실로 인하여, 상기 나열한 바와 같이 적어도 3개의 유전자 내에서 많은 양의 돌연변이의 존재는, 미리 존재하지 않았고 돌연변이유발 조건의 부재하에서 관찰되지 않을 수 있는 다능성 세포의 새로운 집단의 존재를 입증한다.

[0160] 돌연변이유발제에 대한 세포의 노출은 이러한 세포의 계능내에서 무작위 돌연변이의 출현을 트리거한다. 이러한 노출로부터 생성되는 집단은 따라서 장기간 확장 및 배양 동안 천연 돌연변이의 낮은 비율로 인하여, 필수적으로 동종인 다능성 세포의 집단과 비교하여 이종일 것이다. 본원의 수득된 집단은 따라서 특히 다음과 같이 특성화된다:

[0161] - 세포는 다능성이다(즉, 다능성의 마커를 지닌다)

[0162] - 상기 나타난 바와 같이, 집단내 세포의 계능에서 다수의 차이가 존재한다. 즉, 집단의 세포내에서, 상기 나열된 바와 같은 돌연변이된 유전자의 비율(상기 나타난 바와 같음)을 검출하는 것이 가능하다.

[0163] 설명의 문제로서, TP53 유전자의 5%의 돌연변이 비율은 세포 집단내 TP53 서열의 95%가 동일하고(TP53 참고 서열이라고 불린다), TP53 서열의 마지막 5%가 TP53 참고 서열과는 상이함을 의미한다.

[0164] 추가의 구현예에서, 본 발명은 따라서 다능성 세포를 포함하는 세포의 조성물에 관한 것이며, 여기서 상기 집단내 세포는 다음 특징 중 하나 이상을 포함하는 ESC 또는 iPSC의 집단내 돌연변이성 랜드스케이프(mutational landscape)를 나타낸다:

[0165] i) 적어도 > 3(또는 상기 나타난 바와 같이 이 이상)의 암 관련된 신생-항원 돌연변이가 계능 변형에 의해 ESC 또는 iPSC 내에 유전적으로 도입되었다.

[0166] ii) 돌연변이 유형의 조합은 돌연변이유발제에 의해 유도되고 배양된 배아 다능성 줄기 세포에서 선택적인 이점에 의해 농축되었다.

[0167] 돌연변이유발 공정은 수득되는 말기-계대배양 사람 iPS 세포주에서 신규한 계능 돌연변이 및 유전성 모자이크(genetic mosaicism)의 증가된 수준을 유발하고 있다.

- [0168] 유전자내의 돌연변이의 분석은 NGS(엑솜(Exome), RNAseq 또는 전체-게놈 서열분석), CGH 배열, SNP 정렬에 의해, 각각의 ESC 및 iPSC 집단내에서, 유도된 암 관련 "악성변이체(mutanome)" 특징의 대규모 게놈 분석에 의해 바람직하게 수행된다. 트랜스크립토크 프로파일링(transcriptome profiling)과 조합된 전체-엑솜 서열분석(whole-exome sequencing)은 발현된 단백질 암호화 악성 변이체를 설명할 수 있도록 한다.
- [0169] 게놈 변이(aberration)는 당해 분야에 공지된, 생물정보 분석을 위한 적어도 2개의 알고리즘을 사용하여 확인한다. 돌연변이유발제의 적용 후 전체 게놈내 총 돌연변이의 만연은 산출 ESC 또는 iPSC에서 보다 높은 돌연변이 및/또는 CNV 로드를 확인할 것이다.
- [0170] 정성적 및 정량적 기준은 기술된 바와 같이 ESC 또는 iPSC에서 유전적 모자이크현상 내에서 각각의 세포 집단을 정의하도록 할 것이다:
- [0171] 정성적 기준은:
- [0172] - 돌연변이유발 후 ESC 또는 IPS 게놈 내에서 이들의 존재 및 유사하게 배양된 계대배양내에서 돌연변이유발없이 ESC 또는 iPSC 내 이들의 부재에 관하여 정의된 획득된 신규 분자 체세포 변경(돌연변이, CNV 또는 SNV)의 확인.
- [0173] - 각각의 신규 돌연변이(즉, 비-유사, 넌센스, 스프라이스 변이체, DNV, SNV)의 분류 및 암 게놈내 및 다능성 유전자 및 배아 경로(다능성 유전자, 즉, 플루리넷 유전자(Plurinet gene)에 따라) 속에 존재하는 이들의 오버랩핑 검출(데이터 베이스로부터, 즉, TCGA, ICGC, COSMIC)에 의한 확인.
- [0174] 이러한 정량적 기준은 다음을 포함한다:
- [0175] - 전체 게놈 내에서 이들 신규한 체세포 돌연변이(가설 검정 신뢰값(false discovery rate confidence value)  $FDR \leq 0.05$  사용) 및 신규한 CNV/SNV( $FDR < 10\%$  사용)의 만연은 각각의 ESC 또는 IPS에 대해 정의된다.
- [0176] - 적어도 > 3의 상이한 유전자내에 유효 돌연변이의 존재
- [0177] - 적어도 > 0.1%로부터의 대립형질 빈도를 지닌 각각의 신규한 및 안정한 체세포 돌연변이의 돌연변이율, 또는 클론 선택 및 확장 후 또는 계대배양의 수(50X 깊이 내지 100X 깊이 및 80 내지 98%의 표적 엑솜 적용범위)와 관련하여 상기 알 수 있는 바와 같이 50% 이하의 다른 퍼센트.
- [0178] - 돌연변이유발 또는 유전적 변형 전에 투입 ESC 또는 iPSC와 비교하여 발현율이 적어도 > 90%인 다능성 마커의 발현 및 유전자-발현 기반 검정(PluriTest).
- [0179] - HDACi, 특히 VPA의 부재하에서 확장된 세포 집단과 비교하여, 적어도 50%, 및 일반적으로 90% 까지 증가된 세포 표면에서 MHC I 분자의 발현(예를 들면, FACS에 의해 측정된 것으로서).
- [0180] 본 발명은 상기 개시된 다능성 세포의 집단 및 면역 반응 및/또는 MHC I 발현을 자극하는 제제를 포함하는 백신 조성물에 관한 것이다.
- [0181] 특히, 이러한 다능성 세포는 바람직하게는 불활성화되고, 상기 개시된 바와 같이, 임의로 돌연변이된 ESC 또는 iPSC이다.
- [0182] 면역 반응을 자극하는 제제는 당해 분야에 공지된 보조제(adjuvant)(면역자극인자)이다. 이는 바람직하게는 HDACi(0.2mM 내지 4mM를 포함하는 용량 범위에서 사용됨)이다. 이러한 HDACi가 사용되는 경우, 다른 보조제 또한 사용될 수 있다.
- [0183] 본 발명은 또한 HDACi 화합물 및 세포 조성물의 동시 투여용으로 사용될 수 있는, 이러한 백신 조성물을 함유하는 장치(예를 들면, 주사기)에 관한 것이다.
- [0184] 이러한 백신 조성물은 환자의 치유를 위해, 또는 예방 백신으로서 줄기 세포 암(암, 신생항원을 발현하는 이의 세포)에 대한 치료학적 백신으로서 사용되어 특히 이러한 암에 민감한 환자내에서 이러한 암의 발병을 방지할 수 있다.
- [0185] 소질 유전자(predisposition gene)는 예를 들면(참고: 또한 Lindor et al, 2008 Journal of the National Cancer Institute Monographs, No. 38, Concise Handbook of Familial Cancer Susceptibility Syndromes, Second Edition):
- [0186] 유방/난소: BRCA1, BRCA2, PALB2, RAD51



- [0187] 린치 증후군(Lynch syndrome): MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, EPCAM
- [0188] 유전성 유상 신장 세포 암종: FH, MET
- [0189] 코우덴 병(Cowden disease): PTEN, PIK3CA
- [0190] 판코니 병(Fanconi disease): FANC
- [0191] 폰 히펠-린다우 병(Von Hippel-Lindau disease): VHL
- [0192] 악성 흑색종(malignant melanoma): CDKN2A, MITF, BAP1, CDK4
- [0193] 내분비샘 신생물(Endocrine Neoplasia): MEN1, RET, CDKN1B
- [0194] 신경섬유종증: NF1, NF2, LZTR1, SMARCB1, SPRED1
- [0195] 유전성 크롬친화성세포 부신경절종(hereditary pheochromocytoma paraganglioma): SDH, TMEM127, MAX, EPAS1
- [0196] 가족성 대장폴립증: APC, MUTYH
- [0197] 망막아종: RB1
- [0198] 버트-호그-두베 증후군(Birt-hogg-dubé syndrome): FLCN
- [0199] 블룸 증후군: BLM
- [0200] 카니 증후군(Carney syndrome): PRKAR1A
- [0201] 코를린 증후군(Gorlin syndrome): PTCH1
- [0202] 리-프라우메니 증후군(Li-Fraumeni syndrome): TP53, CHEK2
- [0203] 나이메겐 증후군(Nijmegen syndrome): NBN
- [0204] 포이츠-제거스 증후군(Peutz-Jeghers Syndrome): STK11
- [0205] 가족성 소아 폴립증(Familial Juvenile Polyposis): BMPR1A, SMAD4
- [0206] 색소성 건피증: XP
- [0207] 이러한 목록은 비 제한적이다.
- [0208] 특정의 구현예에서, 암 줄기 백신 생성물은 동결건조 후 세포 용해물의 혼합물, 농축된 다중-암 줄기 신생항원, 정제된 암 줄기 신생-항원, ESC 또는 IPSC로부터 기원한 엑소솜, DNA, RNA 단백질 또는 가공된 ESC 또는 IPSC로부터의 다중 펩타이드를 포함한다. 이들은 상기 개시된 바와 같은 면역원성 제제이며, 이는 HDACi의 부재하에 제형화된다.
- [0209] 다른 구현예에서, 암 줄기 세포 백신 생성물은 보조제 효과기로서 사용된 가공되어 조사된 ESC 또는 IPSC로부터의 상층액 GMP 배지와 혼합된다.
- [0210] 바람직한 구현예에서, 이러한 조성물 속의 세포는 불활성화된다(즉, 더 이상 분열할 수 없다).
- [0211] 본 발명의 세포의 조성물은 상기 개시된 방법 중 어느 것에 의해서도 수득하기 쉽다.
- [0212] 이러한 조성물 속의 세포는 천연적으로 이중이며, 돌연변이유발원이 사용되어서 당해 분야에 공지된 방법에 따라 배양된 다능성 세포 조성물로부터 상이한 경우, 이는 동종임에 주목하여야 한다.
- [0213] 배양 배지 속에서 다능성 유전자의 발현을 유지하고 MHC I 제시를 증가시키는 제제의 존재는 이들의 표면에 보다 많은 이러한 MHC I 분자를 갖는 세포를 초래할 것이므로, 돌연변이유발원의 부재하에서 배양된 경우, 세포의 집단은 당해 분야에 공지된 방법에 따라 배양된 세포의 집단과는 상이하다.
- [0214] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "MHC 발현 및/또는 면역 반응을 활성화시키는 그룹으로부터 선택된 화합물"은 면역원성을 자극할 수 있는 화합물을 지칭한다. 이러한 화합물은 MHC 발현 및/또는 면역 반응의 활성화제로 불린다. 용어 "MHC"는 항원으로 불리는 외부 분자를 인식하는 세포 표면 상에 존재하는 주요 조직적합성 복합체를 지칭한다. MHC는 항원에 결합하여 이들이 림프세포 T 및 B와 같은 면역 분자를 나타내도록 한다. 용어 "면역 반응"은 항원에 대한 면역계의 면역학적 반응을 지칭한다. 면역 반응을 활성화시킴으로서, FoxP3 소집단 및 골수

중-기원한 억제인자 세포(MDSC)의 집단은 감소하고, 역으로 NK 집단은 증가한다. 본 발명의 맥락에서, 종양에 대한 면역 반응은 종양의 세포 속 또는 세포 위에 존재하는 항원에 대한 세포독성 T 세포 반응을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포독성 T 세포 반응은 CD8+ T 세포에 의해 매개된다. 전형적으로, 본 발명의 맥락에서, MHC 발현 및/또는 면역 반응을 활성화시키는 항원은 상술한 바와 같이 다능성 세포의 집단에 존재하는 분자에 상응한다. MHC 발현 및/또는 면역계를 활성화시키는 화합물은 신생-항원이다. 용어 "신생-항원" 또는 "신생-항원성"은 계놈 암호화된 단백질의 아미노산 서열을 변경시키는 적어도 하나의 돌연변이로부터 발생하는 항원의 부류를 의미한다.

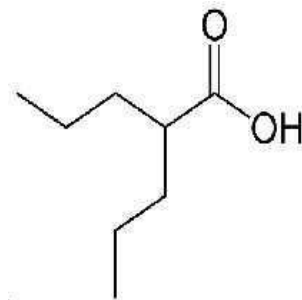
[0215] 본 발명의 맥락에서, 화합물은 사이토킨, 히스톤 데아세틸라제 억제제, DNA 메틸트랜스퍼라제 억제제, 및 히스톤-라이신 N-메틸트랜스퍼라제 효소 억제제로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0216] 특수한 구현예에서, MHC 발현 및/또는 면역 반응의 활성화제는 히스톤 데아세틸라제 억제제이다.

[0217] 본원에 사용된 바와 같은, HDACi로 또한 불리는 용어 "히스톤 데아세틸라제 억제제"는 히스톤 데아세틸라제의 기능으로 방해하는 화합물의 부류를 지칭한다. 히스톤 데아세틸라제(HDAC)는 암의 전사 조절 및 발병에 있어서 중요한 역할을 한다. 전형적으로, HDAC의 억제제는 전사를 조절하고 세포 성장 정지, 분화 및 세포자멸사를 유도한다. HDACi는 또한 방사선 및 화학치료학적 약물을 포함하는 암 치료에 사용된 치료학적 제제의 세포독성 효과를 향상시킨다.

[0218] 특수한 구현예에서, 히스톤 데아세틸라제 억제제는 발프로산(VPA)이다.

[0219] 용어 "발프로산"은 산-2-프로필펜타노성( $C_8H_{16}O_2$ )을 지칭하며, 이는 당해 분야에서 다음의 CAS 번호 및 식 99-66-1을 갖는다:



[0220]

[0221] 발프로산의 생물학적 활성은 다중이다(Chateauvieux et al, J. Biomed. Biotechnol, 2010, pii: 479364. doi: 10.1155 / 2010/479364). 발프로산은 억제 활성을 강화하는 신경전달물질 GABA(감마 아미노 부티레이트)에 영향을 미친다. 몇가지 작용 메커니즘이 제안되어 있다. 발프로산은 특히 GABA 물질대사이며: GABA 분해, GABA 트랜스아미노부티레이트(Transaminobutyrate)(LAMP), GABA 합성의 아크로이세먼트(acroissement)를 억제하고, 이의 회복을 변형시킨다. 또한, 발프로산은 특정의 이온 채널을 차단하고, N-메틸-D-아스파르테이트에 의해 매개된 흥분을 감소시키고, Na<sup>+</sup> 및 Ca<sup>2+</sup>(전압-의존성 L-형 CACNA1 C, D, N, 및 F형)를 포함하는 이온 채널의 활성을 차단한다.

[0222] 본 발명의 맥락에서, 발프로산은 사람 배아 줄기 세포(ESC) 또는 유도된 다능성 줄기 세포(IPSC)와 공유된 다능성 항원을 발현하는 암에 대한 면역 반응을 증강시키는 면역-자극인자로서 사용된다.

[0223] 보다 특히, VPA는 암 줄기 세포 구획에서 MHC-I의 발현을 자극하고 향상시켜, CSC 구획 내에서 신생-항원 함량을 증가시킨다. ESC 및 IPSC 내에서 및 CSC 내에서 MHC I의 보다 높은 발현은 APC/수지 세포에 대한 MHC I과 관련된 신생-항원의 제시를 향상시켜 TH1 면역 반응을 유도한다. 보다 높은 수준의 케모킨(CXCL9, CXCL10...)은 종양 내로 T 세포의 보충을 향상시킨다.

[0224] 본 발명은 크로마틴 리모델링을 통해 CSC 및 종양 세포내에서 배아 항원의 CSC 구획 발현시 신생-항원 함량, 및 또한 VPA 및/또는 5 아자사이티딘과 같은 HDACi의 존재하에서 다능성 세포를 확장시킴으로써 케모킨 발현(CXCL9, CXCL10...)을 증가시키는 방법에 관한 것이다.

[0225] 특히, 생체내에서 환자를 치료하는데 사용하는 경우, 본 발명의 조성물 및 백신은 종양 미세환경을 변형시키고 종양 내로의 T 세포의 보충을 촉진하여, 종양 용적의 장기간 지속된 감소를 획득하는 것을 가능하도록 한다.

[0226] 이는 암 프라임된 다능성 세포 백신 및 VPA 동시-투여의 상승 효과에 기인하는데, 즉 HDACi를 환자에게 추가

로 투여하는 경우, 백신 주사 후 장기간 동안(예를 들면, 적어도 15일) 추가로 증진시킨다.

- [0227] 실시예는 암 줄기 세포 백신 및 VPA 둘 다에 의한 조합된 치료가 Th1/Th2 세포 면역성을 지닌 TIL을 증가시키고, FoxP3 TReg 아집단을 감소시키며, NK 세포를 활성화시키고 MDSC의 억제 작용을 감소시키는 반면, 종양 면역 억제를 역전시키고 TReg를 감소시키고(종양 및 비장 내에서), T CD4+ 및 CD8+ 림프세포를 PD-1을 발현하는 적은 비율의 T CD4 및 CD8과 함께 종양내로 보충함으로써 우수한 항-종양 반응을 제공함을 나타낸다.
- [0228] VPA는 c-Myc 발현 수준을 하향 조절하며 암 세포 및 CSC의 세포자멸사 및 자기소모를 잠재적으로 유도한다. VPA는 자가포식소체 교차 제시를 통해 적응 면역 반응을 증강시킬 수 있다.
- [0229] VPA의 잘 공지된 다른 작용은 림프 결 속에서 IL6, IL8, TNFα 인터루킨(IL)-1베타, IL-17과 같은 염증성 사이토키ンを 감소시키는 것이다.
- [0230] 특수한 구현예에서, 히스톤 데아세틸라제 억제제는 수베로일아닐리드 하이드록삼산이며, 또한 보리노스타트(N-하이드록시-N' 0페닐옥탄디아미드)로 불리고 미국 식품 의약국(U.S. Food and Drug Administration: FDA)에 의해 2006년에 승인된 최초의 히스톤 데아세틸라제 억제제이다(Marchion DC et al 2004; Valente et al 2014).
- [0231] 특수한 구현예에서, 히스톤 데아세틸라제 억제제는 2015년에 FDA 승인을 받은 파노비노스타트(LBH-589)이며 Valente et al 2014에 기술된 바와 같은 구조를 갖는다.
- [0232] 특수한 구현예에서, 히스톤 데아세틸라제 억제제는 기비노스타트(ITF2357)이며 유럽 연합(European Union)에서 오르판 약물로 승인되었다(Leoni et al 2005; Valente et al 2014).
- [0233] 특수한 구현예에서, 히스톤 데아세틸라제 억제제는 또한 벨레오다크(PXD-101)로 불리는 벨리노스타트이며 2014년에 FDA 승인을 받았다(Ja et al 2003; Valente et al 2014).
- [0234] 특수한 구현예에서, 히스톤 데아세틸라제 억제제는 엔티노스타트(SNDX-275 또는 MS-275와 같음)이다. 이러한 분자는 다음의 화학식( $C_{21}H_{20}N_4O_3$ )을 가지며 Valente et al 2014에 기술된 구조를 갖는다.
- [0235] 특수한 구현예에서, 히스톤 데아세틸라제 억제제는 다음 화학식( $C_{23}H_{20}N_6O$ )을 갖는 모세티노스타트(MGCD01030)이다(Valente et al 2014).
- [0236] 특수한 구현예에서, 히스톤 데아세틸라제 억제제는 다음 화학식( $C_{20}H_{30}N_4O_2$ ) 및 Diermayr et al 2012에 기술된 바와 같은 구조를 갖는 프락티노스타트(SB939)이다.
- [0237] 특수한 구현예에서, 히스톤 데아세틸라제 억제제는 다음의 화학식 ( $C_{22}H_{19}FN_4O_2$ )을 갖는 치다미드(CS055/HBI-8000)이다.
- [0238] 특수한 구현예에서, 히스톤 데아세틸라제 억제제는 다음의 화학식( $C_{21}H_{26}N_6O_2$ )을 갖는 퀴시노스타트(JNJ-26481585)이다.
- [0239] 특수한 구현예에서, 히스톤 데아세틸라제 억제제는 다음의 화학식( $C_{21}H_{23}N_3O_5$ )을 갖는 아백시노스타트(PCI24781)이다(Valente et al 2014).
- [0240] 특수한 구현예에서, 히스톤 데아세틸라제 억제제는 다음의 화학식 ( $C_{20}H_{19}FN_6O_2$ )을 갖는 CHR-3996이다(Moffat D et al 2010; Banerji et al 2012).
- [0241] 특수한 구현예에서, 히스톤 데아세틸라제 억제제는 다음의 화학식( $C_{18}H_{20}N_2O_3$ )을 갖는 AR-42이다(Lin et al 2012).
- [0242] 특수한 구현예에서, MHC 발현의 활성화제는 DNA 메틸트랜스퍼라제 억제제이다.
- [0243] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "DNA 메틸트랜스퍼라제 억제제"는 DNA 메틸트랜스퍼라제(DNMT)와 상호작용할 수 있고 이들의 활성을 억제할 수 있는 화합물을 지칭한다. DNMT는 메틸 그룹의 DNA로의 이전을 촉매하는 효소이다. DNA 메틸화는 광범위한 생물학적 기능을 제공한다. 모든 공지된 DNA 메틸트랜스퍼라제는 메틸 공여체로서 S-아데노실 메티오닌(SAM)을 사용한다.
- [0244] 특수한 구현예에서, DNA 메틸트랜스퍼라제 억제제는 당해 분야에서 다음 화학식 ( $C_8H_{12}N_4O_5$ ) 및 구조를 갖는 5-아

자-2-데옥시사이티딘으로 알려진 아자사이티딘이다(Kaminskas et al 2004; Estey et al 2013).

- [0245] 특수한 구현예에서, DNA 메틸트랜스퍼라제 억제제는 다음 식 ( $C_8H_{12}N_4O_4$ )을 갖는 5-아자-2'-데옥시사이티딘으로 알려진 데시타빈이다(Kantarjian et al 2006).
- [0246] 특수한 구현예에서, MHC 발현 및/또는 면역 반응의 활성화제는 히스톤-라이신 N-메틸트랜스퍼라제 효소 억제제, 또는 DNA 메틸트랜스퍼라제 억제제이다. 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "히스톤-라이신 N-메틸트랜스퍼라제 효소 억제제"는 DNA 메틸화에 관여하는 제스트 동족체(zeste homolog) 1(EZH1) 및 2 (EZH2) 유전자의 인핸서 (enhancer)에 의해 암호화된 히스톤-라이신 N-메틸트랜스퍼라제 효소와 상호작용할 수 있는 화합물을 지칭한다. EZH2는 보조인자 S-아데노실-L-메티오닌을 사용함으로써 라이신 27에서 히스톤 H3에 대한 메틸 그룹의 첨가를 촉매한다.
- [0247] 특수한 구현예에서, 히스톤-라이신 N-메틸트랜스퍼라제 효소 억제제는 3-데아잔플라노신 A(DZNep, C-c3Ado)이다. DZNep, C-c3Ado는 다음의 화학식  $C_{12}H_{14}N_4O_3$ 을 가지며 당해 분야에서 CAS 번호 102052-95-9를 갖는다.
- [0248] 특수한 구현예에서, 히스톤-라이신 N-메틸트랜스퍼라제 효소 억제제는 UNC1999이고 불활성 유사체 화합물이다. UNC1999는 다음 화학식  $C_{33}H_{43}N_7O_2$ 을 가지며 당해 분야에서 CAS 번호 1431612-23-5이다.
- [0249] 특수한 구현예에서, 히스톤-라이신 N-메틸트랜스퍼라제 효소 억제제는 UNC2400이고 불활성 유사체 화합물이다. UNC2400은 다음 화학식  $C_{35}H_{47}N_7O_2$ 을 가지고 당해 분야에서 CAS 번호 1433200-49-7이다.
- [0250] 특수한 구현예에서, 히스톤-라이신 N-메틸트랜스퍼라제 효소 억제제는 타제메토스타트(EPZ6438, E7438)이다. 타제메토스타트는 다음 화학식  $C_{34}H_{44}N_4O_4$ 을 가지고 당해 분야에서 CAS 번호 1403254-99-8이다.
- [0251] 특수한 구현예에서, 히스톤-라이신 N-메틸트랜스퍼라제 효소 억제제는 트리플루오로아세테이트(EPZ011989)이다. 트리플루오로아세테이트는 다음 화학식  $CF_3COONa$ 을 가지고 당해 분야에서 CAS 번호 2923-18-4이다.
- [0252] 특수한 구현예에서, 히스톤-라이신 N-메틸트랜스퍼라제 효소 억제제는 EPZ005687이다. EPZ005687는 다음 화학식  $C_{32}H_{37}N_5O_3$ 을 가지고 당해 분야에서 CAS 번호 1396772-26-1이다.
- [0253] 특수한 구현예에서, 히스톤-라이신 N-메틸트랜스퍼라제 효소 억제제는 GSK343이다. GSK343은 다음 화학식  $C_{31}H_{39}N_7O_2$ 를 가지고 당해 분야에서 CAS 번호 1346704-33-3이다.
- [0254] 특수한 구현예에서, 히스톤-라이신 N-메틸트랜스퍼라제 효소 억제제는 GSK126이다. GSK126은 다음 화학식  $C_{31}H_{38}N_6O_2$ 을 가지고 당해 분야에서 CAS 번호 1346574-57-9이다.
- [0255] 특수한 구현예에서, 히스톤-라이신 N-메틸트랜스퍼라제 효소 억제제는 GSK2816126이다. GSK2816126는 다음 화학식  $C_{31}H_{38}N_6O_2$ 을 가지고 당해 분야에서 CAS 번호 1346574-57-9이다.
- [0256] 특수한 구현예에서, 히스톤-라이신 N-메틸트랜스퍼라제 효소 억제제는 ZLD1039이다. ZLD1039는 다음 화학식  $C_{36}H_{48}N_6O_3$ 을 가지고 당해 분야에서 CAS 번호 1826865-46-6이다.
- [0257] HDACi 및 DNA 메틸트랜스퍼라제 억제제 둘 다를 사용하는 것이 또한 고려되고 있다.
- [0258] 실제로, VPA 및 5-아자사이티딘(DNA 및 RNA로 혼입될 수 있는 뉴클레오사이드 사이티딘의 유사체)의 조합 사용이 신생 항-배아 항원의 재-발현에 대한 상승 효과를 가져옴이 밝혀졌다.
- [0259] HDACi는 치료학적 유효량으로 투여된다. VPA의 경우, 이는 10 내지 15 mg/kg/일 내지 60 mg/kg/일 이하일 수 있다. VPA의 혈장 수준은 바람직하게는 일반적으로 허용된 치료학적 범위(50 내지 100  $\mu$ g/mL) 내에 있다.
- [0260] 추가의 국면에서, 본 발명에 따른 방법은 사람 배아 줄기 세포(hESC) 또는 사람 유도된 다능성 줄기 세포(hiPSC)를 사용한 발현을 공유하는 다수의 배아 항원(예컨대, 배아 항원-3(SSEA3), SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81, Oct4, Sox2, Klf4, Nanog, Lin28...)을 발현하는 암을 치료하는데 적합하다.
- [0261] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "사람 줄기 세포를 발현하는 암"은 바람직하게는 본원에 개시된 방법, 백신 및 조성물에 의해 표적화된 암이며, 사람 배아 줄기 세포(hESC) 또는 유도된 다능성 줄기 세포(iPSC)와 발현을 공유하는 다수의 배아 항원을 발현하는 암 줄기 세포를 지칭한다. 전형적으로, 암은 방광 암종, 유방 암종, 경부



암종, 담관암종, 결장직장 암종, 위 육종, 신경교종, 폐 암종, 림프종, 급성 및 만성 림프종 및 골수 백혈병, 흑색종, 다발 골수종, 골육종, 난소 육종, 췌장 암종, 전립선 암종, 위 암종, 신장 암종, 두경부 종양, 및 고형 암으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

- [0262] 본원에 사용된 것으로서 용어 "투여하는" 또는 "투여"는 대상체에게 점막, 피내, 정맥내, 피하, 근육내 전달 및/또는 본원에 기술되거나 당해 분야에 공지된 물리적 전달의 어떠한 다른 방법에 의해, 신체 외부에 존재하는 물질(예컨대, 조합된 제제)을 대상체 내로 주사하거나 달리는 물리적으로 전달하는 작용을 지칭한다. 질환, 또는 이의 증상이 치료되는 경우, 물질의 투여는 전형적으로 질환 또는 이의 증상의 발병 후 일어난다. 질환 또는 이의 증상이 예방되는 경우, 물질의 투여는 전형적으로 질환 또는 이의 증상의 발생 전에 일어난다.
- [0263] 바람직한 구현예에서, 백신 조성물(다능성 세포 + MHC 제시를 자극하는 제제)는 피하 주사된다. 주사는 동일한 주사 지점에서 또는 상이한 주사 지점에서, 동일한 주사기로, 또는 별도의 주사기로, 동시에, 연속적으로, 별도로 이루어질 수 있다.
- [0264] 바람직한 구현예에서, 후 치료(MHC I 및/또는 HDACi와 같은 면역계를 자극하는 화합물, 특히 VPA의 투여)는 경구 경로로 투여된다.
- [0265] "치료학적 유효량"은 대상체에게 치료학적 이점을 부여하는데 필수적인 활성제의 최소량으로 의도된다. 예를 들면, 대상체에 대한 "치료학적 유효량"은 질환에 굴복하는 것과 관련된 병리학적 증상, 질환 진행 또는 생리학적 상태에 있어서의 개선 또는 이에 대한 내성을 유도하거나, 완화시키거나 또는 유발하는 양이다. 본 발명의 화합물의 총 1일 사용은 적절한 의학적 판단의 영역내에서 주치의에 의해 결정될 것이다. 어떠한 특수한 대상체에 대한 구체적인 치료학적 유효 용량 수준도 치료되는 장애 및 장애의 중증도; 사용된 구체적인 화합물의 활성; 사용된 구체적인 조성물, 대상체의 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별 및 식이; 투여 시간, 투여 경로, 및 사용된 구체적인 화합물의 배출 속도; 치료 기간; 사용된 구체적인 화합물과 함께 또는 동시에 사용된 약물; 및 의학 분야에 잘 공지된 유사 인자를 포함하는 다양한 인자에 의존할 것이다. 예를 들면, 바람직한 치료학적 효과를 달성하고 바람직한 효과가 달성될 때까지 투여량을 서서히 증가시키는데 요구되는 것보다 더 적은 수준에서 화합물의 용량으로 출발하여 바람직한 효과가 달성될 때까지 투여량을 점진적으로 증가시키는 것은 당해 분야의 기술 내에 있다. 그러나, 생성물의 1일 용량은 1일당 성인당 0.01 내지 1,000 mg의 넓은 범위에 걸쳐서 변할 수 있다. 전형적으로, 조성물은 치료될 대상체에 대한 투여량의 증상 조절을 위해 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 15.0, 25.0, 50.0, 100, 250 및 500 mg의 활성 성분을 함유한다. 의약은 전형적으로 약 0.01 mg 내지 약 500 mg의 활성 성분, 바람직하게는 1 mg 내지 약 100 mg의 활성 성분을 함유한다. 약물의 유효량은 통상적으로 1일당 0.0002 mg/kg 내지 약 20 mg/kg의 체중, 특히 약 0.001 mg/kg 내지 7 mg/kg의 체중의 투여량 수준에서 공급된다.
- [0266] 특수한 구현예에서, 본 발명에 따른 방법은 방사선 치료요법, 표적화된 치료요법, 면역치료요법, 또는 화학치료요법 중의 하나 이상을 추가로 포함한다. 전형적으로, 주치의는 대상체에게 i) 다능성 세포의 집단 및 ii) 방사선 치료요법, 표적화된 치료요법, 면역치료요법, 또는 화학치료요법과의 조합된 제제로서, MHC 발현 및/또는 면역 반응을 활성화시키는 그룹으로부터 선택된 화합물을 투여하기 위해 선택할 수 있다.
- [0267] 일부 구현예에서, 대상체에게 i) 다능성 세포의 집단 및 ii) 조합 제제 및 화학치료제로서 MHC 발현 및/또는 면역 반응을 활성화시키는 그룹으로부터 선택된 화합물을 투여한다.
- [0268] 용어 "화학치료제"는 종양 성장을 억제하는데 효과적인 화학적 화합물을 지칭한다. 화학치료제의 예는 티오테과 및 사이클로포스파미드와 같은 알킬화제; 부설판, 임프로설판 및 피포설판과 같은 알킬 설포네이트; 벤조도파, 카르보쿠온, 메투레도파, 및 우레도파와 같은 아지리딘; 알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포르아미드, 트리에틸렌티오포스포라리드 및 트리메틸올로멜라민을 포함하는 에틸렌이민 및 메틸아멜아민; 아세토게닌 (특히 블라타신 및 블라타시논); 카르프트데신(합성 유사체 토포데칸 포함); 브리오스타틴; 칼리스타틴; CC-1065(이의 아도젤레신, 카르젤레신 및 비젤레신 합성 유사체 포함); 크립토포신(특히 크립토포신 1 및 크립토포신 8); 둘라스타틴; 두오카르마이신(합성 유사체, KW-2189 및 CBI-TMI 포함); 엘레우테로빈; 판크라티스타틴; 사르코디타인; 스폰기스타틴; 클로람부실, 클로르나파진, 클로로포스파미드, 에스트라르누스틴, 이포스파미드, 메클로르에타민, 메클로르에타민 옥사이드 하이드로클로라이드, 멜팔란, 노벤비친, 펜에스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 우라실 머스타드와 같은 질소 머스타드; 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴, 라니무스틴과 같은 니트로소우레아; 에네딘 항생제(예컨대, 칼리체아미신, 특히 칼리체아미신 (11 및 칼리체아미신 211, 참고: 예컨대, Agnew Chem Intl. Ed. Engl. 33:183-186 (1994))); 다이네미신 A를 포함하는 다이네미신; 에스페라미신; 및 네오카르비노스타틴 클로모포르 및 관련된 크로모단백질 에네딘 항생제

클로모모포레스), 아클라시노마이신, 악티노마이신, 아우트라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 캅티노마이신, 카라비신, 칸니노마이신, 카르지노필린, 크로모마이신, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르루이신, 독소루비신(모르폴리노-독소루비신, 시아노모르폴리노-독소루비신, 2-피콜리노-독소루비신 및 테옥시독소루비신 포함), 에피루비신, 에소루비신, 이단르비신(idanrbicin), 마르셀로마이신, 미토마이신, 마이코페놀산, 노갈라르나인(nogalarnycin), 올리보마이신, 캅플로마이신, 포트피로마이신, 푸로마이신, 켈라마이신, 로도루비신, 스트렙토그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니멕스, 지노스타틴, 조루비신과 같은 항생제; 메토크세이트 및 5-플루오로우라실(5-FU)과 같은 항-대사물질; 데노프테린, 메토크세이트, 프테롭테린, 트리메토크세이트와 같은 염산 유사체; 플루다라빈, 6-머캅토프린, 티아미프린, 티오구아닌과 같은 푸린 유사체; 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카르모푸르, 사이타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플록수리딘, 5-FU와 같은 피리미딘 유사체; 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 테스톨락톤과 같은 안드로겐; 아미노글루테르이미드, 미토탄, 트릴로스탄과 같은 항-부신제; 프롤린산과 같은 염산 보충제; 아세글라톤; 알도포스파르니드 글리코시드; 아미놀레불린산; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트락세이트; 데포파민; 데메콜신; 디아지키온; 엘포르니틴; 엘립티늄 아세테이트; 에포틸론; 에토글루시드; 질산갈륨; 하이드록시우레아; 렌티난; 로니다민; 마이탄신 및 안사미토신과 같은 마이탄시노이드; 미토구아존; 미톡산트론; 모피다몰; 니트라크린; 펜토 스타틴; 페나메트; 피라루비신; 포도필린산; 2-에틸하이드라지드; 프로카르바진; PSK®; 라족산; 리족산; 시조피란; 시피로겐나늄; 테누아존산; 트리아지쿠온; 2,2',2"-트리클로로트리에틸아르닌; 트리콜테센스(특히 T-2 독소, 베라쿠린 A, 로리딘 A 및 안구이딘); 우레탄; 빈데신; 다카르바진; 난노무스틴; 미토브롬톨; 미톨락톨; 피포브로만; 가사이토신; 아라비노시드("Ara-C"); 사이클로포스파미드; 티오테파; 탁소이드, 예컨대, 파클리탁셀(TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) 및 독세탁셀(TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer, 프랑스 안토니 소재); 클로람부실; 겐시타빈; 6-티오구아닌; 머캅토프린; 메토크세이트; 시스플라틴 및 카르보플라틴과 같은 백금 유사체; 빈블라스틴; 백금; 에토포시드(VP-16); 이포스파미드; 미토마이신 C; 미톡산트론; 빈크리스틴; 비노렐빈; 나벨빈; 노반트론; 테니포시드; 다우노마이신; 아미노프테린; 크셀로다; 이반드로네이트; CPT-11; 토포이소머라제 억제제 RFS 2000; 디플루오로메틸오르니틴(DMFO); 레티노산; 카팩시타빈; 및 상기 중 어느 것의 약제학적으로 허용되는 염, 산 또는 유도체를 포함한다. 또한 상기 정의에는 예를 들면 타목시펜, 탈록시펜, 아로마타제 억제제 4(5)-이미다졸, 4-하이드록시타목시펜, 트리옥시펜, 케옥시펜, LY117018, 오나프리스톤, 및 토레미펜(파레스톤)을 포함하는 항-에스트로겐과 같이 종양에서 호르몬 작용을 조절하거나 억제하는데 작용하는 항호르몬제; 및 플루타미드, 닐루타미드, 비칼루타미드, 류프롤라이드, 및 고세렐린과 같은 항-안드로겐; 및 상기 중 어느 것의 약제학적으로 허용되는 염, 산 또는 유도체가 포함된다.

[0269] 일부 구현예에서, 대상체에게 i) 다능성 세포의 집단 및 ii) 조합 제제 및 표적화된 암 치료요법으로서 MHC 발현 및/또는 면역 반응을 활성화하는 그룹으로부터 선택된 화합물이 투여된다.

[0270] 표적화된 암 치료요법은 암의 성장, 진행, 및 확산에 관여하는 특정 분자(분자 표적)를 방해함으로써 암의 성장 및 확산을 차단하는 약물 또는 다른 물질이다. 표적화된 암 치료요법은 때때로 "분자적으로 표적화된 약물", "분자적으로 표적화된 치료요법", "정밀 의학", 또는 유사한 명칭으로 불린다. 일부 구현예에서, 표적화된 치료요법은 대상체에게 타이로신 키나제 억제제를 투여하는 것으로 이루어진다. 용어 "타이로신 키나제 억제제"는 수용체 및/또는 비-수용체 타이로신 키나제의 선택적인 또는 비-선택적인 억제제로서 작용하는 다양한 치료학적 제제 또는 약물 중 어느 것을 지칭한다. 타이로신 키나제 억제제 및 관련 화합물은 당해 분야에 잘 공지되어 있으며 미국 특허 공보 제2007/0254295호에 기술되어 있고, 이는 이의 전문이 본원에 참고로 포함된다. 타이로신 키나제 억제제와 관련된 화합물이 타이로신 키나제 억제제의 효과를 개괄할 것이라는 것, 예컨대, 관련된 화합물이 타이로신 키나제 시그널링 경로의 상이한 구성원에서 작용하여 이러한 타이로신 키나제의 타이로신 키나제 억제제와 동일한 효과를 생산할 것이라는 것은 당해 분야의 숙련가에 의해 인식될 것이다. 본 발명의 구현예의 방법에서 사용하기에 적합한 타이로신 키나제 억제제 및 관련 화합물의 예는 다사티닙(BMS-354825), PP2, BEZ235, 사라카티닙, 겐피티닙(이레싸(Iressa)), 수니티닙(수텐트; SU11248), 에를로티닙(타르세파; OSI-1774), 라파티닙(GW572016; GW2016), 카네르티닙(CI 1033), 세막시닙(SU5416), 바탈라닙(PTK787/ZK222584), 소라페닙(BAY 43-9006), 이마티닙(글리벡; STI571), 레플루노마이드(SU101), 반데타닙(작타마; ZD6474), 베바시주마브(아바스틴), MK-2206(8-[4-아미노사이클로부틸]페닐]-9-페닐-1,2,4-트리아졸로[3,4-f][1,6]나프티리딘-3(2H)-온 하이드로클로라이드)유도체), 이의 유도체, 이의 유사체, 및 이의 조합을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 본 발명에서 사용하기에 적합한 추가의 타이로신 키나제 억제제 및 관련 화합물은 예를 들면, 미국 특허 공보 제2007/0254295호, 미국 특허 제5,618,829호, 제5,639,757호, 제5,728,868호, 제5,804,396호, 제6,100,254호, 제6,127,374호, 제6,245,759호, 제6,306,874호, 제6,313,138호, 제6,316,444호, 제6,329,380호,

제6,344,459호, 제6,420,382호, 제6,479,512호, 제6,498,165호, 제6,544,988호, 제6,562,818호, 제6,586,423호, 제6,586,424호, 제6,740,665호, 제6,794,393호, 제6,875,767호, 제6,927,293호, 및 제6,958,340호에 기술되어 있으며, 이들 모두는 이의 전문이 본원에 참고로 포함된다. 특정의 구현예에서, 타이로신 키나제 억제제는 경구 투여되며 적어도 하나의 제I상 임상 시험, 보다 바람직하게는 적어도 하나의 제II상 임상, 심지어 보다 바람직하게는 적어도 하나의 제III상 임상 시험의 대상체에게 투여되며, 가장 바람직하게는 적어도 하나의 혈액학적 또는 종양학적 처방을 위해 FDA에 의해 승인된 작은 분자 키나제 억제제이다. 이러한 억제제의 예는 게피티닙, 에를로티닙, 라파티닙, 카네르티닙, BMS-599626(AC-480), 네라티닙, KRN-633, CEP-11981, 이마티닙, 닐로티닙, 다사티닙, AZM-475271, CP-724714, TAK-165, 소니티닙, 바탈라닙, CP-547632, 반데타닙, 보수티닙, 레스타우티닙, 탄두티닙, 미도스타우린, 엔자스타우린, AEE-788, 파조파닙, 악시티닙, 모타세닙, OSI-930, 세디라닙, KRN-951, 도티닙, 셀리시클립, SNS-032, PD-0332991, MKC-I(Ro-317453; R-440), 소라페닙, ABT-869, 브리바닙(BMS-582664), SU-14813, 텔라티닙, SU-6668, (TSU-68), L-21649, MLN-8054, AEW-541, 및 PD-0325901을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0271] 일부 구현예에서, 대상체에게 i) 다능성 세포의 집단 및 ii) 조합 제제 및 면역 체크포인트 억제제로서 MHC 발현 및/또는 면역 반응을 활성화시키는 그룹으로부터 선택된 화합물이 투여된다.

[0272] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "면역 체크포인트 억제제"는 하나 이상의 체크포인트 단백질을 전체적으로 또는 부분적으로 감소시키거나, 억제하거나, 방해하거나 조절하는 분자를 지칭한다. 체크포인트 단백질은 T-세포 활성화 또는 기능을 조절한다. CTLA-4 및 이의 리간드 CD80 및 CD86; 및 PD1과 이의 리간드 PDL1 및 PDL2(Pardoll, Nature Reviews Cancer 12: 252-264, 2012)과 같은 다수의 체크포인트 단백질이 알려져 있다. 이들 단백질은 T-세포 반응을 공-자극성으로 또는 억제성으로 상호작용하는데 관여한다. 면역 체크포인트 단백질은 생리학적 면역 반응의 자가-내성 및 지속성 및 진폭을 조절하고 유지한다. 면역 체크포인트 억제제는 항체를 포함하거나 항체로부터 기원한다. 일부 구현예에서, 면역 체크포인트 억제제는 항-CTLA4 항체(예컨대, 이필리무맙), 항-PD1 항체(예컨대, 니볼루맙, 펌브롤리주맙), 항-PDL1 항체, 항-TIM3 항체, 항-LAG3 항체, 항-B7H3 항체, 항-B7H4 항체, 항-BTLA 항체, 및 항-B7H6 항체로 이루어진 그룹으로부터 선택된 항체이다. 항-CTLA-4 항체의 예는 미국 특허 제5,811,097호; 제5,811,097호; 제5,855,887호; 제6,051,227호; 제6,207,157호; 제6,682,736호; 제6,984,720호; 및 제7,605,238호에 기술되어 있다. 하나의 항-CTLA-4 항체는 트레멜리무맙, (티실리무맙, CP-675,206)이다. 일부 구현예에서, 항-CTLA-4 항체는 CTLA-4에 결합하는 완전한 사람 모노클로날 IgG 항체인 이필리무맙(또한 10D1로서 공지됨, MDX-D010)이다. 다른 면역 체크포인트 단백질은 프로그램화된 세포 사멸 1(PD-1)이다. PD-1 및 PD-L1 차단제의 예는 미국 특허 제7,488,802호; 제7,943,743호; 제8,008,449호; 제8,168,757호; 제8,217,149호, 및 PCT 공개된 특허원 제WO03042402호, 제WO2008156712호, 제WO2010089411호, 제WO2010036959호, 제WO2011066342호, 제WO2011159877호, 제WO2011082400호, 및 제WO2011161699호에 기술되어 있다. 일부 구현예에서, PD-1 차단제는 항-PD-L1 항체를 포함한다. 특정의 다른 구현예에서, PD-1 차단제는 항-PD-1 항체 및 니볼루맙(MDX 1106, BMS 936558, ONO 4538), 이의 리간드 PD-L1 및 PD-L2에 의해 PD-1에 결합하여 이의 활성화를 차단하는 완전한 사람 IgG4 항체; 람브롤리주맙(MK-3475 또는 SCH 900475), PD-1에 대한 사람화된 모노클로날 IgG4 항체; PD-1에 결합하는 사람화된 항체인 CT-011; B7-DC의 융합 단백질인 AMP-224; 항체 Fc 부위; PD-L1(B7-H1) 차단을 위한 BMS-936559 (MDX- 1105-01)와 같은 유사한 결합 단백질을 포함한다. 다른 면역-체크포인트 억제제는 가용성 Ig 융합 단백질인, IMP321과 같은 림프세포 활성화 유전자-3(LAG-3) 억제제를 포함한다(Brignone et al., 2007, J. Immunol. 179:4202-4211). 다른 면역-체크포인트 억제제는 B7-H3 및 B7-H4 억제제와 같은 B7 억제제를 포함한다. 특히 항-B7-H3 항체 MGA271(Loo et al., 2012, Clin. Cancer Res. July 15 (18) 3834). 또한 TIM3(T-세포 면역글로불린 도메인 및 무친 도메인 3) 억제제(Fourcade et al., 2010, J. Exp. Med. 207:2175-86 and Sakuishi et al., 2010, J. Exp. Med. 207:2187-94)가 포함된다. 일부 구현예에서, 면역치료학적 치료는 Nicholas P. Restifo, Mark E. Dudley and Steven A. Rosenberg ("Adoptive immunotherapy for Cancer: harnessing the T cell response, Nature Reviews Immunology, Volume 12, April 2012)에 기술되어 있는 바와 같이, 적응 면역치료요법으로 이루어진다. 적응 면역치료요법에서, 환자의 순환하는 림프세포, 또는 종양-침윤된 림프세포는 시험관내에서 분리되어, IL-2와 같은 림포킨에 의해 활성화되어 재투여된다(Rosenberg et al., 1988; 1989). 활성화된 림프세포는 가장 바람직하게는 혈액 샘플로부터 일찍 분리되어 시험관내에서 활성화된(또는 "확장된") 환자의 자체 세포이다.

[0273] 일부 구현예에서, 대상체에게 i) 다능성 세포의 집단 및 ii) 조합 제제 및 방사선치료요법제로서, MHC 발현 및/또는 면역 반응을 활성화시키는 그룹으로부터 선택된 화합물을 투여한다.

[0274] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "방사선치료제"는 제한없이 암을 치료하거나 완화시키는데 효과적인 것으로 당



해 분야의 기술자에게 공지된 어떠한 방사선치료제도 지칭한다. 예를 들면, 방사선치료제는 근접치료요법 또는 방사선헤중 치료요법시 투여된 것들과 같은 제제일 수 있다. 이러한 방법은 임의로 화학치료요법 및/또는 다른 방사선치료요법과 같은, 그러나 이에 한정되지 않는 하나 이상의 추가의 암 치료요법의 투여를 추가로 포함할 수 있다.

[0275] 약제학적 및 백신 조성물

[0276] 상기한 바와 같이 MHC 발현 및/또는 면역 반응 및 다능성 세포의 집단을 활성화시키는 화합물을 약제학적으로 허용되는 부형제, 및 임의로 생분해성 중합체와 같은 서방출 매트릭스(sustained-release matrix)와 합하여 약제학적 조성물을 형성시킬 수 있다.

[0277] "약제학적으로" 또는 "약제학적으로 허용되는"은 적절하게는 포유동물, 특히 사람에게 투여되는 경우 불리한, 알레르기 또는 다른 부작용 반응을 생성하지 않는 분자 실체 및 조성물을 지칭한다. 약제학적으로 허용되는 담체 또는 부형제는 무-독성 고체, 반-고체 또는 액체 충전제, 희석제, 봉입 물질(encapsulating material) 및 어떠한 유형의 제형 보조제를 지칭한다. 단독으로 또는 다른 활성 성분과 함께, 활성 성분을 경구, 설하, 피하, 근육내, 정맥내, 경피, 국소 또는 직장 투여하기 위한 본 발명의 약제학적 조성물은 통상의 약제학적 지지체와의 혼합물로서 단위 투여형으로 동물 및 사람에게 투여될 수 있다. 적합한 단위 투여형은 정제, 겔 캡슐제, 산제, 과립제 및 경구 현탁제 또는 액제, 설하 및 볼내 투여형, 에어로졸, 임플란트, 피하, 경피, 국소, 복강내, 근육내, 정맥내, 피내, 경피, 척추강내 및 비강내 투여형과 같은 경구-경로형을 포함한다. 전형적으로, 약제학적 조성물은 주사될 수 있는 제형에 대해 약제학적으로 허용되는 비히클을 함유한다. 이들은 특히 등장성, 멸균성, 염수 용액(인산일나트륨, 인산이나트륨, 염화칼슘, 염화마그네슘 등 또는 이러한 염의 혼합물), 또는 경우에 따라서, 멸균수 또는 생리학적 염수의 첨가시 주사가가능한 용액을 구성하도록 하는 무수, 특히 동결-건조된 조성물일 수 있다. 주사가가능한 용도에 적합한 약제학적 형태는 멸균 수용액 또는 분산액; 참깨 오일, 땅콩 오일 또는 수성 프로필렌 글리콜을 포함하는 제형; 및 멸균 주사가가능한 용액 또는 분산액의 즉석 제조용 멸균 분말을 포함한다. 모든 경우에, 제형은 멸균되어야 하고 용이한 주사가가능성이 존재하는 정도로 유동성이어야만 한다. 이는 제조 및 저장 조건 하에서 안정하여야만 하고 세균 및 진균과 같은 미생물의 오염 작용에 대해 보존되어야 한다. 유리 염기 또는 약리학적으로 허용되는 염으로서 본 발명의 화합물을 포함하는 용액은 하이드록시프로필 셀룰로스와 같은 계면활성제와 적합하게 혼합된 물 속에서 제조될 수 있다. 분산제는 또한 글리세롤, 액체 폴리 에틸렌 글리콜, 및 이의 혼합물 및 오일 속에서 제조될 수 있다. 통상의 저장 및 사용 조건 하에서, 이들 제제는 미생물의 성장을 방지하기 위한 보존제를 함유한다. 폴리펩타이드(또는 이를 암호화하는 핵산)은 중성 또는 염 형태의 조성물로 제형화될 수 있다. 약제학적으로 허용되는 염은 산 부가염(단백질의 유리 아민 그룹과 함께 형성됨)을 포함하며 이는 예를 들면, 염산 또는 인산과 같은 무기산, 또는 아세트산, 옥살산, 타르타르산, 만델산 등과 같은 유기산과 함께 형성된다. 유리 카복실 산과 함께 형성된 염은 또한 예를 들면, 나트륨, 칼륨, 암모늄, 칼슘, 또는 철 수산화물과 같은 무기 염기, 및 이소프로필아민, 트리메틸아민, 히스티딘, 프로카인 등과 같은 유기 염기로부터 유도될 수 있다. 담체는 또한 예를 들면, 물, 에탄올, 폴리올(예를 들면, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 이의 적합한 혼합물, 및 식물성 오일을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 적절한 유동성은 예를 들면, 레시틴과 같은 코팅의 사용에 의해, 분산제의 경우에 필요한 입자 크기의 유지에 의해 및 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 미생물의 작용의 방지는 다양한 항세균제 및 항진균제, 예를 들면, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르브산, 티메로살 등에 의해 생성될 수 있다. 많은 경우에, 등장성 제제, 예를 들면, 당 또는 염화나트륨을 포함시키는 것이 바람직할 것이다. 주사가가능한 조성물의 연장된 흡수는 흡수를 지연시키는 제제, 예를 들면, 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴을 조성물 속에서 사용함으로써 생성될 수 있다. 멸균 주사가가능한 용액은 경우에 따라, 상기 나열한 수개의 다른 성분과 함께 적절한 용매 속에서 필요한 양의 활성 폴리펩타이드를 혼입시킨 다음 멸균 여과함으로써 제조한다. 일반적으로, 분산제는 다양한 멸균된 활성 성분을 염기성 분산 매질 및 상기 열거한 것들로부터 필요한 다른 성분을 함유하는 멸균 비히클내로 혼입시킴으로써 제조한다. 멸균 주사가가능한 용액의 제조를 위한 멸균 산제의 경우에, 바람직한 제조 방법은 활성 성분의 분말 및 이의 미리 멸균-여과한 용액으로부터의 어떠한 추가의 바람직한 성분을 수득하는 진공-건조 및 동결-건조 기술이다. 제형화시, 용액은 투여량 제형과 혼용성인 방식 및 치료학적으로 효과적인 양으로 투여될 것이다. 제형은 상기한 주사가가능한 용액의 유형과 같은 다양한 투여량 형으로 용이하게 투여되지만, 약물 방출 캡슐 등을 또한 사용할 수 있다. 수용액 속에서 비경구 투여를 위해, 예를 들면, 용액은 필요할 경우 적합하게 완충되어야 하며 액체 희석제는 우선 충분한 염수 또는 글루코스로 등장성이 되도록 하여야 한다. 이들 특수한 수용액은 특히 정맥내, 근육내, 피하 및 복강내 투여에 적합하다. 이와 관련하여, 사용될 수 있는 멸균 수성 매질은 본 개시내용의 측면에서 당해 분야의 숙련가에게 공지될 것이다. 예를 들면, 하나의 투여량은 1 ml의 등장성 NaCl 용액 속에 용해하고 1000 ml의 피하주입 유액에 가하거나 제안된 주입 부위에 주사

할 수 있다. 투여량에 있어서의 일부 변화가 치료하는 대상체의 상태에 따라 필수적으로 일어날 것이다. 투여에 관여하는 사람은 어떠한 상황에서도, 개개 대상체에 대해 적절한 용량을 결정할 것이다.

[0278] 보다 특히, 다능성 세포의 집단 및 MHC 발현 및/또는 면역 반응을 활성화시키는 화합물은 백신 조성물에서 제형화된다. 따라서, 본 발명은 i) 다능성 세포의 집단 및 ii) MHC 발현 및/또는 면역 반응을 활성화시키는 그룹으로부터 선택된 화합물을 포함하는 백신 조성물에 관한 것이다.

[0279] 특수한 구현예에서, 본 발명에 따른 백신 조성물은 i) 사람 배아 줄기 세포 및 ii) 발프로산을 포함한다.

[0280] 특수한 구현예에서, 본 발명에 따른 백신 조성물은 i) 특히 돌연변이유발제 또는 유전적 변형에 의해 향상된, 신생-항원을 발현하는 유도된 다능성 줄기 세포(iPSC) 및 ii) 발프로산을 포함한다.

[0281] 조성물은 또한 5 아자사이티딘을 포함할 수 있다.

[0282] 더욱이, 본 발명의 백신 조성물은 상술한 바와 같은 암을 앓고 있는 대상체에서 사용할 수 있다.

[0283] 본 발명에 따른 백신 조성물은 면역원성 조성물에서와 동일한 방식으로 상기 제시된 생리학적 부형제와 함께 제형화될 수 있다. 예를 들면, 약제학적으로 허용되는 비히클은 인산염 완충된 염수 용액, 증류수, 오일/물 유화액과 같은 유화액, 다양한 유형의 습윤제 멸균 용액 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. MDP와 같은 무라밀 펩타이드, IL-12, 인산알루미늄, 수산화알루미늄, 명반 및/또는 몬타나이드(R)과 같은 보조제를 백신 속에 사용할 수 있다.

[0284] 본 발명에 따른 백신 조성물은 피하(s.c), 피내(i.d.), 근육내(i.m.) 또는 정맥내(i.v.) 주사, 경구 투여 및 비강 투여 또는 흡입으로 투여될 수 있다. 백신의 투여는 일반적으로 단일 용량이다. 대안적으로, 본 발명의 백신의 투여는 첫번째(초기 백신접종)에 이어서, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100회 리콜(recall)(후속적인 투여)에 의해, 줄기 세포의 동일한 집단, 면역계를 자극하는 화합물 또는 이의 조합 및/또는 방사선 치료요법, 표적화된 치료요법, 면역치료요법, 또는 화학치료요법 중 추가로 하나 이상을 사용하여 이루어진다.

[0285] 백신 조성물은 또한 키트(kit)로 제공된다. 키트는 백신 조성물 및 면역화를 위한 지시사항을 제공하는 정보 리플렛(information leaflet)을 포함한다. 키트는 또한 생성물의 투여를 위한 모든 물질을 포함한다.

[0286] 본 발명은 다음의 도면 및 실시예에 의해 추가로 설명될 것이다. 그러나, 이들 실시예 및 도면이 어떠한 방식으로든 본 발명의 영역을 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다.

## 도면의 간단한 설명

[0287] 도면:

**도 1: 유방 종양 4T1 모델에서 mESCs, hESC, miPSC 및 4T1 세포를 사용한 백신접종 연구.** 연구 설계: 마우스(그룹당 n=5)에게 백신 7의 부스트(boost)를 제공하고 14일째에  $10^5$ 개의 조사된 세포; 쥐 배아 줄기 세포(mESC), 쥐 유도된 다능성 줄기 세포(miPSC), 사람 배아 줄기 세포(hESC) 또는 4T1 세포를 제공하였다. 14일 후에  $5 \times 10^4$ 개의 4T1 세포를 마우스의 유방 지방 패드(mammary fat pad)에 주사하였다. 5마리의 마우스에게 4T1-CSC를 주사하였다(맘모스피어(mammosphere)의 형태의 CSC를 생성하기 위한 TGF베타 및 TNF알파와 같은 추가의 사이토킨을 사용한 4T1 세포 성장).

**도 2: 백신 접종 후 면역 보호.** A; 유동 세포분석법에 의한 CD4 양성 종양 침윤 림프세포(TIL)의 정량화. B; CD4+ TIL 내에서 유동 세포분석법에 의한 CD25 양성 조절 T 세포의 정량화. C; 마우스의 그룹과 관련하여 CD8+ T 세포내에서 유동 세포분석법에 의한 PD1 조절성 T 세포의 정량화.

**도 3: 4T1 마우스 모델에서 VPA와 조합된 hESC를 사용한 백신접종 연구: 연구 설계:** 마우스(그룹당 n=5)에게 백신 7의 부스트 및 14일째에  $10^5$ 개의 조사된 세포 hESC를 VPA의 존재 또는 부재하에 제공하였다. 14일 후,  $5 \times 10^4$ 개의 4T1 세포를 마우스의 유방 지방 패드내에 주사하였다. A; 각각의 그룹당 종양 용적: 1/대조군(PBS), 2/hESC를 사용한 백신 접종 3/VPA와 조합된 hESC를 사용한 백신접종, 4/마우스에게 VPA 만을 제공. B: 44일째

종양 증량.

**도 4: hESC 백신 접종 및 VPA 후 면역 보호:** A; CD4 및 CD8 집단 내에서 비장 속의 PD1 세포의 감소. B, 종양 내에서 CD4+ 및 CD8+ T 세포의 증가. C: 비장 내에서 CD4+ 및 CD8+ T 세포의 증가

**도 5:** 4개의 그룹(대조군, hESC, hESC+VPA, VPA)의 각각의 동물에 대해 해부 후 폐 내에서 IVIS-스펙트럼 시스템에 의한 루시페라제 리포터 유전자의 정량화.

**도 6:** 4T1 세포 및 0.5 mM의 VPA로 5일 동안 치료한 4T1 CSC(맘모스피어(mammospheres))에서 실시간 PCR에 의한 다능성 유전자의 발현.

**도 7:** VPA 및 5Aza로 치료한 4T1에서 RT PCR 및 실시간 PCR에 의한 Oct4의 발현.

**도 8: 치료하지 않거나 ENU로 치료한 iPSC내에서 신생항원의 단백질 서열을 변경시키는 유전적 변형의 엑솜 서열분석에 의한 검출.** ENU-치료된 iPSC 및 비 치료된-iPSC 내에서 변이체의 정량화.(NS= 동일하지 않음, FS= 프레임쉬프트(frameshift), SG= 획득 정지).

**도 9:** 본 발명에 따른 공정의 개략도.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

**실시예:**

**실시예 1**

태아 조직을 사용하여 피부, 간, 및 위장관의 암을 포함하는 이식가능한 종양을 거부할 수 있는 마우스를 면역화할 수 있음이 보고되었다. 이러한 반응은 이러한 종양 세포가 많은 수의 종양태아 항원을 발현한다는 사실에 의해 설명된다. 암배아 항원(CEA)과 같은 배아 항원 및 알파 태아단백질 또는 암/전립선 항원을 표적화하기 위하여 지금까지 수개의 암 백신 시도가 확립되어 왔다. 불행히도, 하나의 항원 만을 표적화하는 것은 탈출 돌연변이(escape mutant)의 신속한 출현 및 일가 암 백신의 일반적인 비효율성으로 인하여 암 거부를 매개하기 위하여 강력한 항종양 면역 반응을 생성하는데 충분히 효율적이지 않음이 밝혀졌다. 재생 의학에서 줄기 세포의 잠재능에 있어서의 최근의 관심은 광범위하게 이용가능한 잘 정의된 분화되지 않은 ESC 세포주 및 또한 ESC와 표현형적으로 및 기능적으로 유사한 분화되지 않은 iPSC를 만들었다. 본 발명자들의 연구에서 본 발명자들은 분화되지 않은 줄기 세포가 다가 백신으로 사용되어 종양 세포 및 CSC에 의해 공유된 다양한 배아 항원에 대해 면역 반응을 생성할 수 있다고 가설을 세웠다. 본 발명자들은 최초로, ESC 또는 iPSC가 유방 암종에 대하여 면역 및 임상 반응을 유도할 수 있음을 발견하였다. 놀랍게도, 본 발명자들은 치료학적 요법에서 발프로산의 첨가가 ESC 또는 iPSC 단독과 비교하여 보다 높은 면역 및 항-종양 반응을 유도할 수 있음을 발견하였다.

### 물질 및 방법

본 발명자들은 BALB/c 마우스에서 전이성 4T1 유방 종양 모델을 개발하였다. 4T1 쥐 TNBC 유방암 세포주에서 배아 ES-유사 마커를 입증하기 위하여 메타-분석을 배아 세포 샘플(D3 줄기 세포 - 아피메트릭스 플랫폼(Affymetrix platform) GPL16570으로 주석이 달린 GSE51782) 및 상이한 데이터셋의 통합을 사용하여 수행하였다: 시험관내에서 배양된 TNBC 세포주 4T1(아피메트릭스 플랫폼 GPL6246으로 주석이 달린 GSE73296), 마우스 모델에서 이종기관이식된 TNBC 세포주 4T1(아피메트릭스 플랫폼 GPL6246으로 주석이 달린 GSE69006) 및 유선 샘플(플랫폼 GLP339으로 주석이 달린 GSE14202)(Padovani et al. 2009). 이러한 4T1 모델의 경우 balb/c 마우스에서 이식된 4T1이 다음을 포함하는 쥐 ESC와 함께 1304개이 상이한 유전자를 공유함이 미세-배열 분석에 의해 밝혀졌다: TRAP1A, TET1, TSLP, FAM169A, ETV5, MOXD1, PHLDA2, CRIP1, ADAMDEC1, NID1, EPCAM, H2-EA-PS, GPA33, IBSP, KANK3, MEST, MMP9, SPRY4, CLDN4, PRSS22, DDAH2, SPRY2, USP11, CTNNAL1, ZFP532, GRB10, CACNG7, ST14, CTH, RCN1, PECAM1, TMEFF1, PPP1R1A, GPR97, KIF2C, BRCA2, SLAIN1, CSRP2, DOCK6, HUNK, RAD51, ESYT3, SKP2, CCL24, SFRP1, HMGB2, ITM2A, ASPN, MSH2, SUGT1, ARHGAP8 등. 모든 이러한 유전자들은 따라서 정상의 쥐 유선과 비교하여, 4T1 및 mESC에서 일반적으로 상향조절됨이 밝혀졌다. 또한, 이종기관이식된 4T1은 시험관내에서 수거된 세포와 비교하여 CD44와 같은 CSC 마커를 고도로 발현함(CD44<sup>hi</sup>CD24<sup>lo</sup>의 39% 대 0.27%)이 밝혀졌다(나타내지 않음).

동일한 방식으로 전체-게놈 발현 프로파일 분석을 환자로부터의 삼중 음성 유방암(TNBC)에서 수행하였다. TNBC를 지닌 환자내에서 배아 ES-유사 마커를 입증하기 위하여 메타-분석을 배아 세포 샘플을 사용하여 수행하고 사람 유방 샘플을 상이한 데이터셋으로부터의 샘플 데이터를 병합하여 수행하였다: 84개의 유방 암 샘플을 포함하

고 아피메트릭스 플랫폼 GPL570으로 주석이 달린 데이터세트 GSE18864(Silver et al. 2010), 사람 정상 유방의 42개의 샘플을 포함하고 아피메트릭스 플랫폼 GPL96으로 주석이 달린 데이터세트 GSE20437(Graham et al. 2010), 사람 배아 줄기 세포의 42개 샘플을 포함하고 아피메트릭스 플랫폼 GPL570으로 주석이 달린 데이터세트 GSE23402(Guenther et al. 2010), 유방 암 세포주의 데이터세트(Maire et al. 2013) 및 TNBC 세포주의 세포 배양 샘플을 포함하고 아피메트릭스 플랫폼 GPL570으로 주석이 달린 데이터세트 GSE36953(Yotsumoto et al. 2013). 유방암의 3개 등급 그룹 사이에서 분석된 지도식 일원분산분석(supervised one-way ANOVA)은 다음을 포함하는 IPS 및 ES의 샘플을 사용하여 3개의 유방 암 TNBC 등급 III의 대부분을 분류하도록 하는 4288개의 유의적인 유전자를 확인하였다: CDC20, KRT81, NCAPG, MELK, DLGAP5, AURKA, ADAM8, CCNB1, RRM2, QPRT, SLAMF8, EZH2, CENPF, HN1, CENPA, SLC19A1, SLC39A4, CDK1, SEPHS1, GMD5, TUBB, SCRIB, DDX39A, YBX1, MKI67, TKT, WDR1, SKP2, ISG20, NRTN, SEC14L1, GAPDH, ILF2, PSMB2, DHTKD1, TPX2, CCNB2, IL27RA, NADK, H2AFX, MRPS18A, AURKA, MCM7, MCAM, NOP2, KIF23, JMJD4, YIPF3, CDH3, TALDO1, BID, C16orf59, HMMR, BIRC5, ZNF232, RANBP1, CDK1, SHMT2, KIF20A, EPHB4, SPAG5, PPARD, ORC6, TUBB4B, LYZ, TK1, PDXK, NAA10, BAG6, SF3B3, MARCKSL1, MCM3, PSRC1, NUSAP1 등. 따라서, 이들 유전자 모두는 정상 사람 유전과 비교하여 TNBC 중앙 및 hESC에서 일반적으로 상향 조절됨이 밝혀졌다.

[0294] **결과**

[0295] **결과 1 이중 배아 줄기 세포를 사용한 백신 접종은 유방 암에 대한 면역학적 및 항-종양 반응을 생성한다.**

[0296] 본 발명자들은 조사된 쥐 ESC(mESC), 쥐 유도된 다능성 줄기 세포(쥐 iPSCs), 사람 배아 줄기 세포(hESC) 또는 4T1 세포를 사용한 백신 접종이 동계(syngeneic) 4T1 마우스 모델에서 유방암에 대해 효과적인지를 우선 조사하였다. 이러한 백신접종에 이어서 마우스를 2개의 상이한 유형의 4T1 세포로 챌린지(challenge)하였다: SVF의 DMEM 10% 속에서 일반적으로 배양된 4T1 또는 mammosphere 형태로 성장하는 암 줄기 세포(CSC)를 생성하기 위하여 TGF $\beta$  및 TNF $\alpha$ 와 같은 추가의 사이토킨과 함께 성장시킨 4T1 세포. 본 발명자들은 백신접종하지 않은 마우스와는 대조적으로, hESCs, mESCs, 쥐 iPSCs 및 4T1으로 백신접종한 마우스가 유방 종양 용적의 유의적인 감소와 관련된 4T1 암종에 대해 일관된 세포 면역 반응을 생성하였음을 발견하였다( $p < 0.05$ )(도 1). 본 발명자들은 종양이 PBS-대조군 그룹에서 점진적으로 성장하였지만, 놀랍게도, mESC, miPS 또는 hESC를 사용하여 면역화한 마우스는 종양 성장의 지연을 초래하였고, PBS 그룹과 비교하여 각각의 그룹에서 평균 종양 크기에 있어 통계적으로 유의한 차이가 있음을 발견하였다(도 1). 본 발명자들은 마우스를 CSC 기원한 -4T1으로 챌린지하는 경우 정상 조건 하에서 성장한 4T1으로 챌린지한 마우스와 비교하여 종양 성장의 현저한 억제를 관찰하였으며 동계 mESC를 사용한 백신접종이 CSC를 우선적으로 표적화함을 나타낸다. 항종양 효과를 매개하는 세포 면역 메커니즘을 추가로 연구하기 위하여, 본 발명자들은 상이한 그룹으로부터 종양 침윤 림프세포의 표현형을 분석하고 CD4, CD8, CD25 및 PD1 소집단을 정량화하였다. 항-종양 효과는 1/ 종양 크기와 유의적으로( $p = 0.0039$ ) 관련된 CD4+ TIL의 증가(도 2a), 2/ 종양 크기와 역으로 관련된 CD25 양성 세포의 퍼센트의 감소(도 2b), 3/ 백신 요법(hECS, 4T1 또는 mESC를 사용한 백신접종)에 대해 보다 우수한 반응을 갖는 마우스내에서 더 나타난 PD1 양성 세포의 감소(도 2c)와 관련되었다.

[0297] **결과 2 발프로산(VPA)와 함께 이중 배아 줄기 세포를 사용한 백신접종은 유방 암에 대해 보다 높은 항-종양 반응을 생성하고 전이 발달을 억제한다.**

[0298] 4T1 유방 모델에서 전이 부위를 평가하기 위하여, 4T1 세포를 유전적으로 변형시켜 이들이 GFP 및 루시페라제 리포터 단백질(4T1Luc-GFP) 둘 다를 발현하도록 함으로써, 보다 깊은 기관(비장, 폐, 골, 간) 내에서 생물발광 영상(Ivis 스펙트럼)을 사용하여 생체내에서 이들의 추적을 가능하도록 하였다. 실험은 앞서 기술한 바와 같이 수행하였지만 백신으로서 조사된 hESC 만을 사용하였다; 그룹당 5마리의 마우스에게 백신 7의 2개의 부스트를 제공하고 14일째에 음료 수 속에 0.40mM의 용량으로 VPA가 들어있거나 들어있지 않은  $10^5$ 개의 조사된 hESC 세포를 제공하였다. 14일 후  $5 \times 10^4$ 개의 4T1Luc-GFP 세포를 마우스의 유방 지방 패드내에 주사하였다. 본 발명자들은 백신접종하지 않은 마우스와는 대조적으로, VPA와 함께 hESC로 백신접종한 마우스가 유방 종양 용적의 유의적인 감소( $p < 0.05$ )(도 3a) 및 종양 중량의 감소(도 3b)와 관련이 있는 4T1 암종에 대해 보다 높은 세포 면역 반응을 생성하였음을 발견하였다. 항-종양 반응은 hESC 및 VPA를 제공받은 마우스에서 CD4+T 세포 및 CD8+T 세포 둘 다에 있어서 PD-1발현의 현저한 감소와 관련되었다(도 4a). 또한, 항-종양 반응은 대조군 그룹(PBS)과 비교하여 조합 치료(hESC 및 VPA)를 제공받은 마우스의 경우 전적으로 종양 내에서(도 4b) 및 비장(도 4c)내에서 CD4+T 및 CD8+T 세포의 퍼센트의 유의적인 증가와 관련되었다. 본 발명자들은 또한 모든 마우스가 hESC 백신 및 VPA로 치료한 폐 전이 마우스를 유의적으로 감소시켰음을 발견하였다(도 5). 이와 함께, 이들 결과는 VPA와 이중 배아



줄기-기반 백신접종(hESC)이 hESC 및 VPA 단독의 사용과 비교하여 가장 강력한 효능을 가짐을 나타낸다. 이들 결과는 이중 배아 줄기-기반의 백신접종이 유방 암종에서 종양 재발을 감소시키는 효과적인 치료일 수 있음을 나타낸다.

[0299] 실시예 2 - 발프로산은 MHC 제1 부류의 발현 및 배아 유전자의 발현을 조절한다

[0300] 주요 조직적합성 복합체(MHC)는 후천적 면역계에 필수적으로 작용하는 외부 분자를 인식하기 위한 후천적 면역계에 대해 필수적인 세포 표면 단백질의 세트이다. MHC 분자의 주요 기능은 새로운 및 외부 항원에 결합하여 적절한 T-세포에 의한 인식을 위해 세포 표면에서 이들을 나타내는 것이다: 헬퍼 T 세포의 표면에서 CD4 분자와 상호작용함으로써, MHC 제II 부류는 후천적 면역성 또는 적응 면역성으로 불리는 특정 면역성의 확립을 매개한다. 세포독성 T 세포의 표면에서 CD8 분자와 상호작용함으로써, MHC 제I 부류는 감염되거나 악성인 숙주 세포의 파괴를 매개한다.

[0301] 면역 내성은 이에 의해 종양이 성장하는 중요한 수단이며, 이는 돌연변이된 단백질 및 변경된 항원 발현을 가지고, 숙주 면역계에 의한 제거를 방지한다. 종양 면역 내성은 세포 표면에서  $\beta 2-m$ 의 부재 및/또는 종양 세포 위에서 MHC 제I 부류의 부재에 의해 부분적으로 설명될 수 있다. VPA는 0.2 mM 내지 2 mM의 용량에서 4T1 세포 상에 MHC 제I 부류의 발현을 증가시킬 수 있는 것으로 밝혀졌다.

[0302] 4T1 및 4T1 mammosphere 상에서 MHC 제I 부류의 발현(TNFa 및 TGFb에 의한 처리에 의해 유도된 CSC)은 2 mM의 VPA로 24시간 내지 72 시간의 노출 후 2 내지 3배까지 증가시킨다.

[0303] 특히, VPA는 0.5mM의 용량에서 iPSC에서 HLA ABC MHC 제I 부류의 발현(63% 대 92%) 및 SSEA4 및 Tra1-60와 같은 다능성 마커의 발현(55% 대 72%)을 증가시킬 수 있음이 밝혀졌다.

[0304] 이러한 마커는 ENU 노출(60일의 치료) 후 감소되었으며, 세포를 0.5 mM의 VPA(28% 내지 92%의 HLA ABC 양성 iPSCs-ENU 및 iPSC 각각) 및 (48% 내지 69%의 SSEA4/Tra-1-60 양성 iPSCs-ENU 및 iPSC 각각)로 처리하는 경우 회복되었다.

[0305] VPA로서 HDAC 억제제는 부분적으로 크로마틴 리모델링에 의해 및 전사 인자내 단백질 구조에 있어서의 변화에 의해, 부분적으로, 유전자 전사를 선택적으로 변경시킬 수 있다. VPA가 유방 종양 세포내에서 다능성 유전자의 발현을 조절할 수 있는지를 연구하였다. 이러한 목적을 위해 본 발명자들은 4T1 및 4T1 mammosphere(TNFa 및 TGFb의 처리에 의해 유도된 CSC)를 1 mM 내지 2 mM의 VPA로 처리하였다. 모든 경우에, VPA는 Oct 4, Sox2 및 Nanog와 같이 iPSC 또는 ESC내에서 고도로 발현된 3개의 상이한 중요한 전사 인자의 발현을 2 내지 3배 증가시켰다(도 6). 중요하게도, 이러한 전사 인자 발현의 중요한 상승 효과는 DNA의 하이포메틸화를 유발하는, DNA 메틸트랜스퍼라제를 억제하는 용량에서 사용하는 경우 VPA 및 5-아자사이티딘(5aza)의 조합으로 종양 세포를 처리할 때 밝혀졌다. 특히, 4T1 세포를 VPA 및 5aza로 처리하는 경우 oct-4 전사체의 7배 증가가 나타났다(도 7a 및 b).

[0306] 실시예 3 - N-에틸-N-니트로소우레아(ENU)와 같은 돌연변이유발 약물에 노출된 iPSC내에서 게놈 불안정성에 의한 DNA 손상 및 DNA 복구 오류의 유도

[0307] 에틸-N-니트로소우레아(ENU)는 염기 전환을 생성하지만 또한 점 돌연변이 및 이중 가닥 DNA 파괴(DSB)를 생성하는 돌연변이유발원성 알킬화제이다.

[0308] ENU가 iPSC에서 DNA를 손상시키는지 확인할 수 있었다.

[0309] 세포 속에 존재하는 DSB의 부위에 대해 이끌어지는 포스포릴화된 감마-H2AX의 양을 평가하였다. 당해 실험에서, iPSC는 콜라게나제를 사용하여 기질 배양물로부터 탈착시키고 시험관내에서 ENU로 나타난 농도(50  $\mu$ g/ml) 및 시간에서 처리한 후, 항-포스포-감마 H2AX 항체를 사용하여 웨스턴 블롯 분석으로 처리하였다. 2분-10분과 같이 이른 시간에 나타난 바와 같은 감마-H2AX 수준의 증가가 관찰되었으며, 이후 기본 수준으로 돌아갔다.

[0310] 프로토콜을 설계하여 집중적인 증식 동안 DNA 복구 오류를 축적시키기 위하여 ENU로 iPSC의 연속 처리에 의해 iPSC내 게놈 불안정성을 유도하였다. 세포를 60일 동안 매일 10  $\mu$ g/ml 농도에서 ENU를 첨가하면서 매일 배지를 교환하면서 처리하였다. VPA를 배양 동안 가하였다.

[0311] + 61일째에, iPSC를 돌연변이유발 과정의 게놈 결과를 핵형(Karyotype), 및 RNA 서열분석, CGH 배열, 엑솜 서열 분석, WGS에 의해 평가한다. 배양된 iPSC 속에 축적된 게놈 변경은 ENU로 처리하지 않은 iPSC와 비교한다.

[0312] ENU 노출 후, 돌연변이된 iPSC를 유지하고 배양물 속에서 VPA로 확장시켰다. CGH 배열 및 엑솜 서열분석을 상이



한 계대배양에서 연속적으로 수행하여 이들의 확장 동안 ENU-iPSC 내 체세포 돌연변이 만연의 인자모사(genocopy)를 확인하였다. iPSC의 표현형은 전분화능 플루리테스트(pluripotency Pluritest) 및 Oct4, Sox2, Nanog, Tra-1 60, SSEA4의 발현을 평가함으로써 수행한다. 본 발명자들은 복제 비율 및 집단 더블링(population doubling)이 ENU 노출되지 않은 iPSC와 유사함을 발견하였다.

- [0313] iPSC를 10  $\mu$ g/ml의 ENU로 처리하고 돌연변이된 신생 항원의 검출을 위한 엑솜 서열분석을 수행하였다. ENU 처리된-iPSC에서 48개의 변형이 ENU가 부재한 iPSC에서 8개의 변형과 비교하여 밝혀졌다(도 8). 이들 유전자자리(loci)를 cBioPortal 프로그램(<http://www.cbioportal.org>)과 병합하여 상이한 암 연구로부터의 사람 종양 샘플로부터 암 게놈학 데이터 세트에 접근하도록 하였다. cBioPortal 프로그램을 사용하여 이들 변형의 10 내지 75% 이상이 암종(췌장, 폐 전립선)에서 또한 하향 조절되는 것으로 밝혀졌다. 모든 엑솜 서열분석의 경우 본 발명자들은 ENU-처리된 iPSC에서 검출될 수 있는 모든 돌연변이에 대해 30 내지 400개의 관독물의 적용 범위의 깊이를 측정한다.
- [0314] **실시예 4 - BRCA1에 대한 하플로인서피션시(Haploinsufficiency)는 배양 동안 iPSC 속에 CNV 축적과 함께 DNA 복구 변형 및 게놈 불안정성을 생성한다.**
- [0315] BRCA1/2의 변형은 유전성 유방 및 난소 암(HBOC) 증후군에 관여한다. 유방 암1(BRCA1)은 종양-억제제 유전자이며 동종 재조합, 이중 가닥 파괴 복구, S-상 및 G2/M, 스핀들 체크포인트(spindle checkpoint), 및 중심체 조절에 있어서 DNA 복구를 조절함으로써 게놈 안정성의 유지에 중추적 역할을 한다.
- [0316] BRCA1 속의 엑손 17이 결실된 섬유아세포 하보링(harboring)을 Oct3/4, Sox2, Klf4, 및 cMyc를 함유하는 센다이 바이러스(CytoTune®-iPS Sendai Reprogramming Kit, Life technologies)를 사용하여 재프로그래밍화하였다. 세포를 20% 녹아웃 혈청 교체인자(Knock Out Serum Replacer), 1 mM L-글루타민, 1% 페니실린/스트렙토마이신, 100  $\mu$ M 2-머캅토에탄올(Life technologies) 및 12.5 ng/ml 염기성 FGF(Miltenyi Biotech)이 보충된 DMEM/F12를 기반으로 하는 사람 다능성 줄기 세포 배지(hPSC 배지) 속에서 배양하였다. 26일째에, 완전히 재프로그래밍된 콜로니를 이들의 형태학 및 다능성 마커를 기반으로 FACS 분석, Nanog, Oct4 Sox2의 Q RT-PCR, NOD-SCID 마우스에서 테트라토마 형성 및 플루리테스트에 의해 수동으로 골랐다.
- [0317] 핵형은 정상이었다.
- [0318] 정상(WT) 및 BRCA1 +/- iPSC에 있어서 DNA 손상 반응(DDR)의 수준 및 활성을 비교하였다. 감마 H2AX 포커스를 조사 또는 ENU 노출 후 증식하는 iPSC 속에서 면역형광성에 의해 측정하였다. iPSC BRCA1+/-는 정상의 WT-iPSC와 비교하여 유의적으로 보다 높은 수준의 포스포릴화된 ATM/ATR 기질 및 또한 감마 H2AX 보충을 나타내었으며, 이는 증식하는 iPSC BRCA1+/-가 WT-iPSC와 비교하여 증가된 DNA 손상을 겪음을 나타낸다. iPSC BRCA1+/-는 초기 계대배양에서 증가된 수준의 DDR을 나타내므로, 이것이 교호하는 계대배양 및 증식 동안에 게놈 변형의 축적과 관련될 수 있는지를 시험하였다.
- [0319] 증식하는 다능성 줄기 세포에서 CGH 배열을 HDACi(VPA)가 보충된 배지 속에서 iPSC의 연장된 계대배양 후 분석하였다. 이러한 목적을 위해, Agilent CGHarray 실험을 iPSC 샘플로부터의 DNA 상에서 Roche-Nimbelgen aCGH 플랫폼을 사용하여 수행하였다. 신호 추출 및 게놈 간격을 Agilent cytogenomics 및 Nexus Roche-Nimbelgen 소프트웨어로 사람 게놈의 HG18 상에서 확인하였다. 유전자 유전자자리를 HG19 좌표(coordinate) 위에서 Roche-Nimbelgen 주석 파일(annotation files) (Genes\_July\_2010\_hg19, Roche-Nimbelgen 웹사이트)를 사용하여 전환시켰다. 유전 카피 수 변이(CNV) 다형성을 실험으로부터 scandb 데이터베이스를 사용하여 제거하였다(Gamazon et al. 2010). 배열 CGH CNV 비율은 열지도(heatmap)로서 MEV 버전 4.9.0 standalone 소프트웨어(적색: 획득, 녹색: 손실 및 암색: 제로)를 사용하여 그렸다(Saeed et al. 2003). 원래의 세포내에서 영향받은 것으로 밝혀진 유전자 유전자자리를 각각의 iPSC 샘플에서 영향받은 유전자 유전자자리로부터 감하였다. 각각의 iPSC의 특이적인 수득되는 여과된 CNV를 COSMIC 센서스 데이터베이스(census database)와 병합하였다(Futreal et al. 2004). HG19 상에서 게놈성 서코스플롯(Genomic Circosplot)을 여과 후 각각의 iPSC에서 영향받은 것으로 밝혀진 암 유전자를 사용하여 수행하였다. 이러한 게놈 그림을 OmicCircos R-package를 사용하여 R 환경 버전 3.0.2으로 수행하였다(Hu et al. 2014).
- [0320] iPSC BRCA1+/- (>100 일)의 배양은 마지막 계대배양에서 ENU 노출없이 증가된 게놈 불안정성과 동시에 게놈 비정상의 축적을 유도하는 것으로 밝혀졌다. 마지막 계대배양에서 핵형은 정상이다. Agilent aCGH 실험을 iPSC 세포로부터 및 원래의 각각의 세포로부터의 DNA 추출물에서 수행하였다. 이들 다능성 유도 동안에 영향받은 간격의 게놈 맵핑은 BRCA1+/- iPSC가 WT 하나와 비교하여 영향받은 유전자 유전자자리의 중요한 수에 의해 영향받았

음을 나타내었다. WT iPSC에서 CNV 유럽 다형성 여과(European polymorphism filtration) 후, 58개의 유전자 유전자자리만이 여전히 영향받은 것으로 밝혀졌으며(다형성은 영향받은 총 유전자자리의 1.69%를 나타낸다), 유사하게, BRCA1-/+에서 iPSC 5273 유전자 유전자자리에서는 다형성 여과 후 여전히 영향받은 것으로 밝혀졌다. BRCA1+/- iPSC에서 영향받은 대부분의 유전자 유전자자리는 DNA의 획득에 관한 것이었다.

[0321] 게놈 불안정성에 의해 영향받은 이들 유전자 중에서 이들 중 일부는 센서스 COSMIC 데이터베이스에서 암 유전자를 구동하는 것으로 알려져있다. WT iPSC는 aCGH (CDK4)에서 영향받은 유일한 하나의 암 유전자 유전자자리를 나타내었다. BRCA1-/+ iPSC는 131개 암 유전자 유전자자리에 관한 변경에 의해 영향받으며 이들 중 11개의 유전자가 유방 암에서 영향받는 것으로 알려져 있다: MSH2, SMARCD1, TBX3, CDH1, TP53, ERBB2, CDK12, BRCA1, PPP2R1A, AKT2, EP300. 이러한 변경은 BRCA1 유전자 유전자자리의 염색체인 작은 19 및 17번 염색체에서 특히 과-발현되는 것으로 밝혀졌다.

[0322] 모두 함께, 대부분의 iPSC BRCA1+/- 는 WT-IPSC와 비교하여 보다 높은 양의 삽입-결실(indel)(결실 또는 변형)을 나타내었다. 5273개 유전자에서 CNV중 8%의 비율이 확인되고 입증되었다. 생물정보 분석은 131개 유전자의 발현이 코스믹 데이터베이스 내에서 암 발달, 본질적으로 백혈병, 상피 종양 및 중간엽 종양 세포에 관여하는 것으로 확인되었다. 일부의 변경된 유전자가 유방 및 난소 암에서 유사하게 관찰된다.

[0323] 복제 비율, 다능성 유전자(플루리테스트, 세포 표면 마커) 및 MHC I은 VPA의 존재하에서 모든 배양 시간 동안 유지되고 안정하다.

[0324] 결론적으로, BRCA-1과 같은 DNA 복구 관련 유전자의 결실 또는 불활성화는 게놈 불안정성을 유도하도록 하여 다수의 CNV, 삽입-결실 및 MHC I과 관련된 돌연변이를 생성한다.

[0325] **실시예 5 - N-에틸-N-니트로소우레아(ENU)는 CML-iPSC에서 돌연변이된 신생 항원의 로드를 증가시킨다**

[0326] iPSC의 특성화를 필라델피아-양성 만성 골수성 백혈병(Philadelphia-positive chronic myeloid leukemia: CML)을 지닌 환자의 백혈구 혈액 세포로부터 생성하였다. iPSC는 전분화능 유전자 Oct4, c-Myc, Klf4 및 Sox2의 센다이-바이러스 매개된 전달의 사용으로 생성시켰다. 다능성 iPSC 형태학을 지닌 세포를 증폭시키고 세포 표면 전분화능 마커(Tra-1-60 및 SSEA4)를 사용하여 증폭시키고 또한 NSG 마우스 내로 근육내 주사 후 테트라토마를 생성시키는 이들의 능력으로 특성화하였다. 이들 iPSC는 CML의 필라델피아 염색체 특성을 지녔다. CML iPSc를 60일 동안 ENU에 노출시켰다. ENU로 처리한 DML-IPS로부터의 세포 유도체 배 콜로니(blast colony)를 ENU로 처리하지 않은 iPSC와 비교하였다.

[0327] CML iPSC의 DNA를 CGH 배열로 분석하였다. 수개의 게놈 변이가 CML IPSC 위에서 ENU에 의해 선택된 게놈 변이들 중에서의 이종(heterogeneity)의 손실의 검출과 함께 ENU-처리된 iPSC로부터 기원한 배-콜로니에서 관찰되었다 (CB32 이들은 332개 유전자 유전자자리를 포함한 카피 수 변이 DNV를 포함하였다). 유럽계 백인(European Caucasian) 게놈 다형성 데이터베이스에서 여과 후 255개의 게놈 유전자 유전자자리가 이들 게놈 변이에 여전히 존재하였다. 게놈 비정상성의 대부분은 이종의 손실(23%)과 함께 게놈 DNA의 손실(71%)을 포함하였다. 이들 게놈 변이는 전사 인자 데이터베이스의 일치하여, 암 유전자 데이터베이스 및 전분화능 유전자 데이터베이스가 이들 중요한 하향조절된 작용인자가 기본적으로 염색체 7, 8, 15, Y, 및 X에 주로 영향을 미친다는 것을 관찰하도록 하였다. 서코스플롯(Circosplot)은 또한 이들 비정상성의 대부분이 중배엽 세포 이주 및 IKZF1에 연루된 MESP와 같은 전사 인자와 연루됨을 측정하도록 하였다. 일부 전분화능 유전자, 및 Ph1-양성 백혈병에 관여하는 것으로 이미 기술된 IDH2, NCOA2, IKZF1, BLM과 같은 일부 암 유전자가 영향을 받았으며, 이는 비정상성의 관련성이 ENU-유도된 돌연변이유발에 의해 생성됨을 시사한다.

[0328] 이러한 분석은 확인된 비정상성의 획득 및 손실 및 일부와 같은 몇개의 유전자 변경이 코스믹 데이터베이스 (Cosmic database)에서 확인된 암 유전자임이 밝혀졌다.

[0329] ENU-iPSC에서 확인된 비정상성의 비교는 급성 백혈병 상(phase)에서 CML 환자에서 이미 확인된 침습성의 급성 백혈병 상 비정상성을 재생시킴을 확인하였으며, 이는 ENU-처리된 CML iPSC가 이러한 특수 암에서 이들 게놈 비정상성을 시험관내에서 재생시키는 유일한 도구임을 시사한다.

[0330] 본 명세서 전체에서, 다양한 참고문헌이 본 발명이 속한 분야의 상태를 기술하고 있다. 이들 참고문헌의 개시내용은 본원에 의해 본 개시내용에 참고로 포함된다.

[0331]      참고문헌:

Graham, K., A. de las Morenas, A. Tripathi, C. King, M. Kavanah, J. Mendez, M. Stone, et al. 2010. « Gene Expression in Histologically Normal Epithelium from Breast Cancer Patients and from Cancer-Free Prophylactic Mastectomy Patients Shares a Similar Profile ». *British Journal of Cancer* 102 (8): 1284-93. doi:10.1038/sj.bjc.6605576.

Guenther, Matthew G., Garrett M. Frampton, Frank Soldner, Dirk Hockemeyer, Maya Mitalipova, Rudolf Jaenisch, et Richard A. Young. 2010. « Chromatin Structure and Gene Expression Programs of Human Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cells », *Cell Stem Cell* 7 (2): 249-57. doi:10.1016/j.stem.2010.06.015.

Maire, Virginie, Fariba Némati, Marion Richardson, Anne Vincent-Salomon, Bruno Tesson, Guillem Rigaill, Eléonore Gravier, et al. 2013. « Polo-like Kinase 1: A Potential Therapeutic Option in Combination with Conventional Chemotherapy for the Management of Patients with Triple-Negative Breast Cancer ». *Cancer Research* 73 (2): 813 - 23. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-2633.

Padovani, Michela, Jackie A. Lavigne, Gadisetti V. R. Chandramouli, Susan N. Perkins, J. Carl Barrett, Stephen D. Hursting, L. Michelle Bennett, et David Berrigan. 2009. « Distinct Effects of Calorie Restriction and Exercise on Mammary Gland Gene Expression in C57BL/6 Mice ». *Cancer Prevention Research (Philadelphia, Pa.)* 2 (12): 1076 - 87. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-09-0034.

Silver, Daniel P., Andrea L. Richardson, Aron C. Eklund, Zhigang C. Wang, Zoltan Szallasi, Qiyuan Li, Nicolai Juul, et al. 2010. « Efficacy of Neoadjuvant Cisplatin in Triple-Negative Breast Cancer », *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 28 (7): 1145-53. doi:10.1200/JCO.2009.22.4725.

Yotsumoto, Fusanori, Eriko Tokunaga, Eiji Oki, Yoshihiko Maehara, Hiromi Yamada, Kyoko Nakajima, Sung Ouk Nam, et al. 2013. « Molecular Hierarchy of Heparin-Binding EGF-like Growth Factor-Regulated Angiogenesis in Triple-Negative Breast Cancer ». *Molecular Cancer Research: MCR* 11 (5): 506-17. doi:10.1158/1541-7786.MCR-12-0428.

Futreal, P. Andrew, Lachlan Coin, Mhairi Marshall, Thomas Down, Timothy Hubbard, Richard Wooster, Nazneen Rahman, et Michael R. Stratton. 2004. « A Census of Human Cancer Genes ». *Nature Reviews. Cancer* 4 (3): 177-83. doi:10.1038/nrc1299.

Gamazon, Eric R., Wei Zhang, Anuar Konkashbaev, Shiwei Duan, Emily O. Kistner, Dan L. Nicolae, M. Eileen Dolan, et Nancy J. Cox. 2010. « SCAN: SNP and Copy Number Annotation ». *Bioinformatics (Oxford, England)* 26 (2): 259 - 62. doi:10.1093/bioinformatics/btp644.

[0332]

Hu, Ying, Chunhua Yan, Chih-Hao Hsu, Qing-Rong Chen, Kelvin Niu, George A. Komatsoulis, et Daoud Meerzaman. 2014. « OmicCircos: A Simple-to-Use R Package for the Circular Visualization of Multidimensional Omics Data ». *Cancer Informatics* 13: 13-20. doi:10.4137/CIN.S13495.

Saeed, A. I., V. Sharov, J. White, J. Li, W. Liang, N. Bhagabati, J. Braisted, et al. 2003. « TM4: A Free, Open-Source System for Microarray Data Management and Analysis ». *BioTechniques* 34 (2): 374-78.

Loek J. Eggermont, Leonie E. Paulis, Jurjen Tel, Carl G. Figdor et al 2014 Trends in Biotechnology, 2014. Towards efficient cancer immunotherapy: advances in developing artificial antigen-presenting cells. Adham S. Bear, Conrad R. Cruz, and Aaron E. Foster *et al*, 2011. T Cells as Vehicles for Cancer Vaccination. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:417403

Cornelis J.M. Melief, Thorbald van Hall, Ramon Arens, Ferry Ossendorp, and Sjoerd H. van der Burg, Therapeutic cancer vaccines *J Clin Invest*. 2015;125(9):3401-3412

Oluseun Adewumi, Behrouz Aflatoonian, Lars Ahrlund-Richter, Michal Amit, Peter W Andrews, Gemma Beighton, Paul A Bello, Nissim Benvenisty, Lorraine S Berry, Simon Bevan, Barak Blum, Justin Brooking, Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative , *Nature Biotechnology* 25, 803 - 816 (2007)

Franz-Josef Müller, Bernhard M Schuldt, Roy Williams, Dylan Mason, Gulsah Altun, Eirini P Papapetrou, Sandra Danner, Johanna E Goldmann, Arne Herbst, Nils O Schmidt, Josef B Aldenhoff, Louise C Laurent & Jeanne F Loring A bioinformatic assay for pluripotency in human cells; *Nature Methods* 8, 315-317 (2011)

Shi Y and al, *Nat Rev Drug Discov*. 2017 Feb;16(2):115-130.

Chen KG and al Human pluripotent stem cell culture: considerations for maintenance, expansion, and therapeutics. *Cell Stem Cell*. 2014 Jan 2;14(1):13-26

Hussein SM and al, Copy number variation and selection during reprogramming to pluripotency. *Nature*. 2011 Mar 3;471(7336):58-62.

Hussein SM and al, Genome damage in induced pluripotent stem cells: assessing the mechanisms and their consequences. *Bioessays*. 2013 Mar;35(3):152-62.

Wu, Z et al, Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy. *Mol Ther* 2006; 14:316-27

Choi, VW et al, Effects of adeno-associated virus DNA hairpin structure on recombination. *J Virol* 2005; 79:6801-07

[0333]



Graham et al., A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA (1978) Virology 52: 456-457

Wigler et al., (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76 1373-1376 and Current Protocols in Molecular Biology Vol.1, Wiley Inter-Science, Supplement 14, Unit 9.1.1-9.1.9 (1990)

Lindor et al, 2008 Journal of the National Cancer Institute Monographs, No. 38, Concise Handbook of Familial Cancer Susceptibility Syndromes, Second Edition

Chateauvieux et al, J. Biomed. Biotechnol, 2010, pii: 479364. doi: 10.1155 / 2010/479364

Nicholas P. Restifo, Mark E. Dudley and Steven A. Rosenberg ("Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response, Nature Reviews Immunology, Volume 12, April 2012

Teifel et al., (1995) Biotechniques 19: 79-80,

Albrecht et al., (1996) Ann. Hematol. 72: 73-79

Holmen et al., (1995) In Vitro Cell Dev. Biol. Anim. 31: 347-351

Remy et al., (1994) Bioconjug. Chem. 5: 647-654

Le Bolc'h et al., (1995) Tetrahedron Lett. 36: 6681-6684

Loeffler et al., (1993) Meth. Enzymol, 217: 599-618

Strauss (1996) Meth. Mol. Biol. 54: 307-327

U.S. Pat. Nos. 5,240,840, 4,806,476, 5,298,429, and 5,396,767

Fournier (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78: 6349-6353

Lambert et al., (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88: 5907-59

Marchion DC et al J Cell Biochem. 2004 May 15;92(2):223-37.

Valente et al 2014 J Med Chem. 2014 Jul 24;57(14):6259-65 and

Valente et al 2014 Expert Opin Ther Pat. 2014 Apr;24(4):401-15.

Leoni et al Expert Opin Ther Pat. 2016;26(2):149-73

Ja et al 2003

Diermayr et al Blood Cancer J. 2012 May;2(5):e69

Moffat D et al J Med Chem. 2010 Dec 23;53(24):8663-78

Banerji et al Clin Cancer Res. 2012 May 1;18(9):2687-94

Lin et al 2012).

Kaminskas et al Org Biomol Chem. 2004 Sep 21;2(18):2578-84.

Estey et al Leukemia. 2013 Sep;27(9):1803-12..

Kantarjian et al Blood. 2007 Jan 1;109(1):52-7

[0334]

Agnew Chem Intl. Ed. Engl. 33:183-186 (1994)

Pardoll, Nature Reviews Cancer 12: 252-264, 2012

Brignone et al., 2007, J. Immunol. 179:4202-4211

Loo et al., 2012, Clin. Cancer Res. July 15 (18) 3834

Fourcade et al., 2010, J. Exp. Med. 207:2175-86

Sakuishi et al., 2010, J. Exp. Med. 207:2187-94

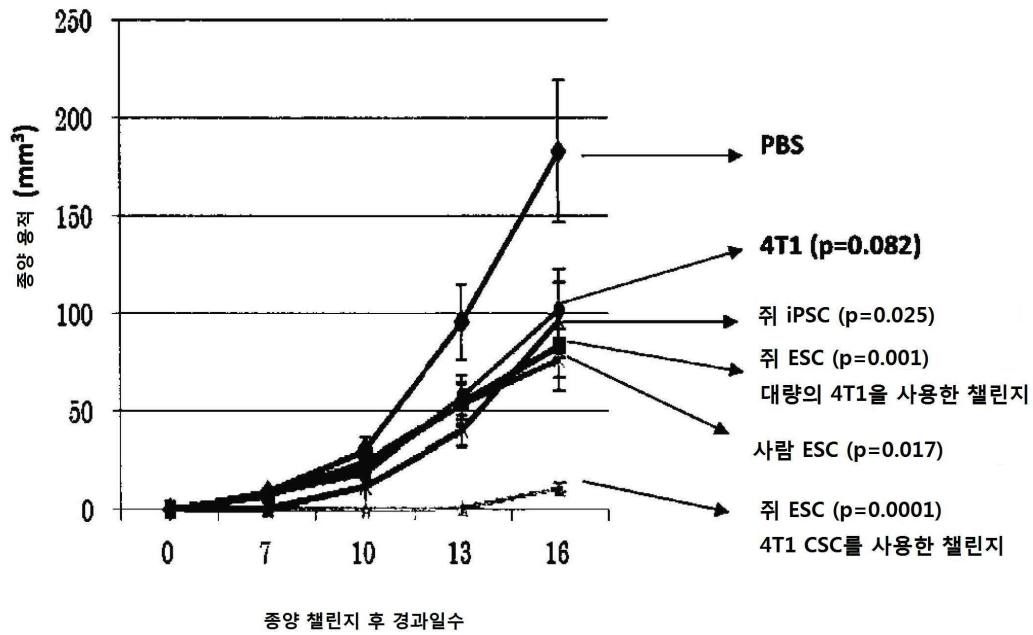
Rosenberg et al., N Engl J Med. 1988 Dec 22;319(25):1676-80.

Rosenberg Cancer Treat Rev. 1989 Jun;16 Suppl A:115-21.

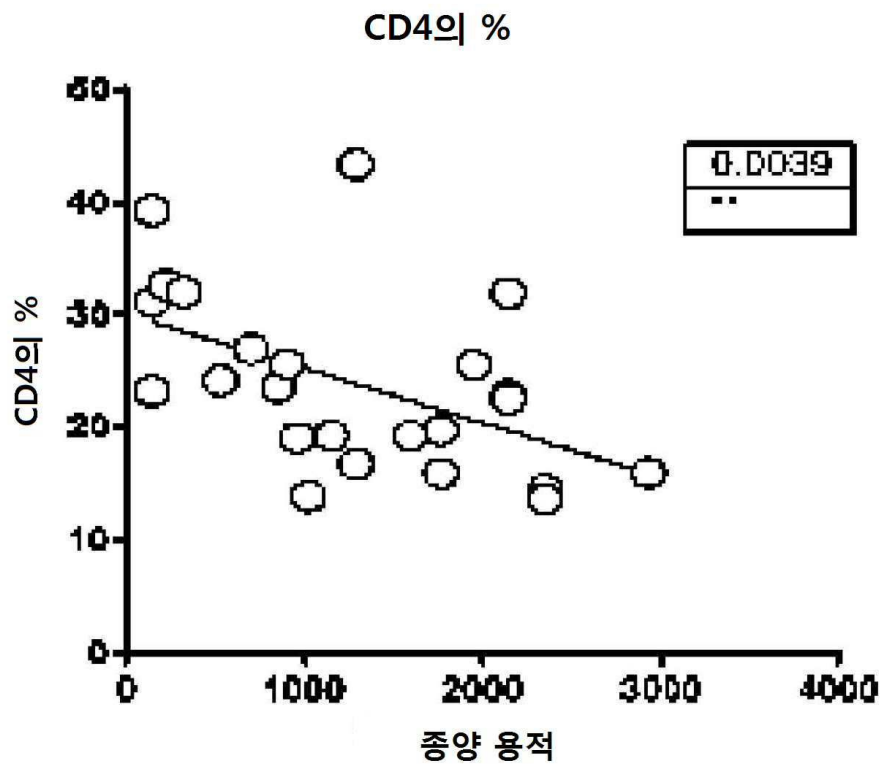
[0335]

도면

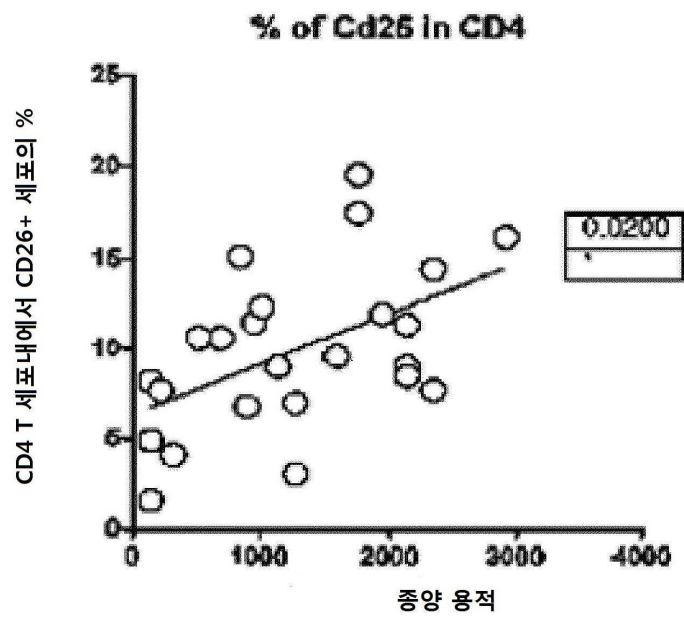
도면1



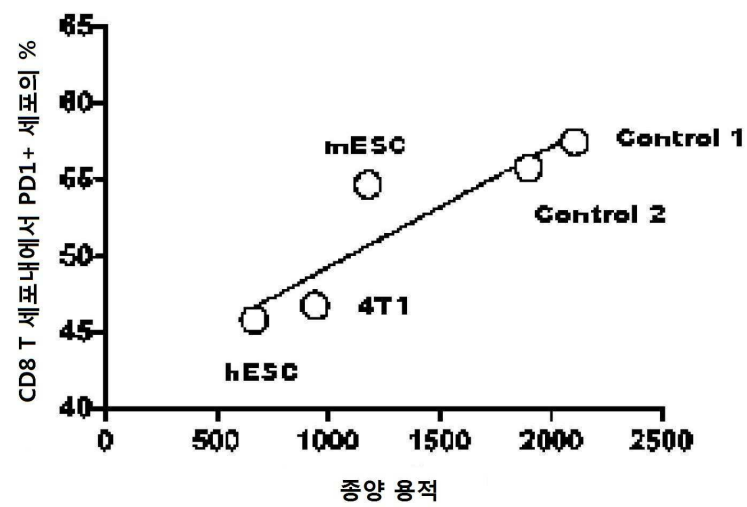
도면2a



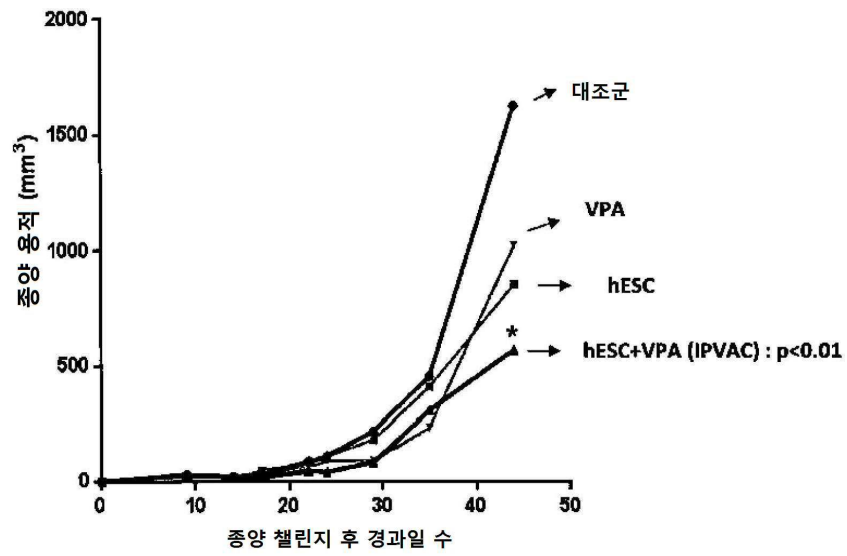
도면2b



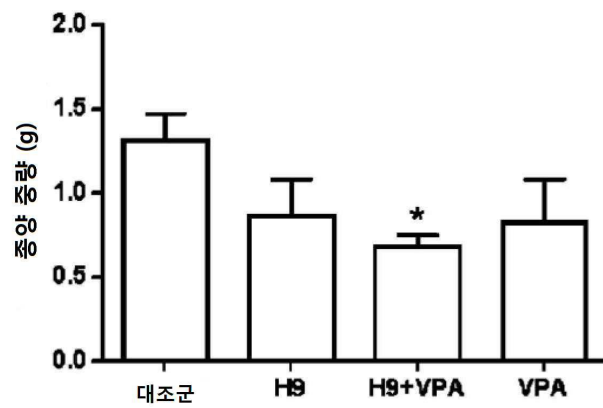
도면2c



도면3a

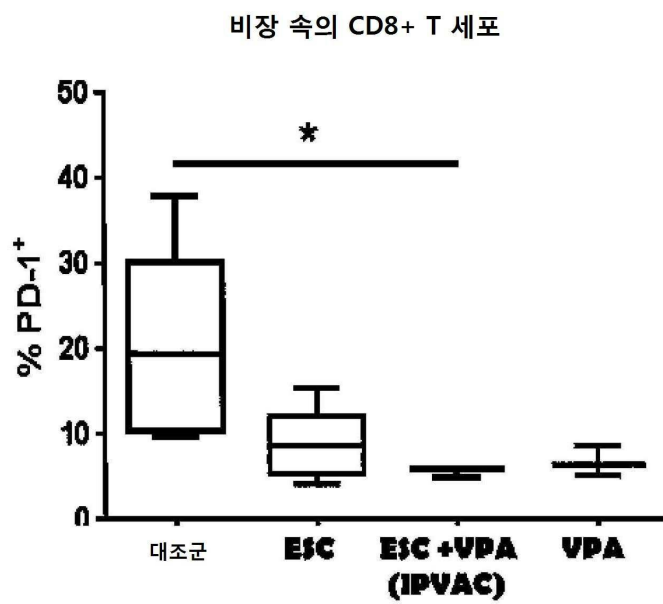
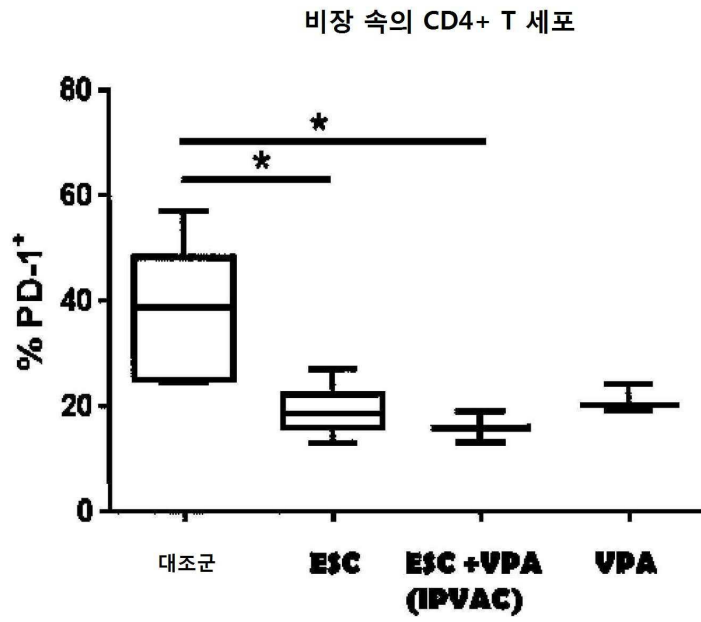


도면3b

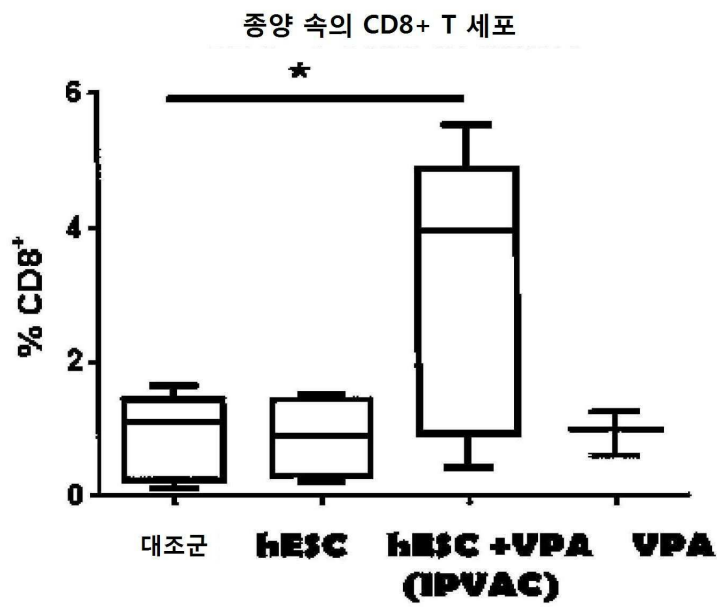
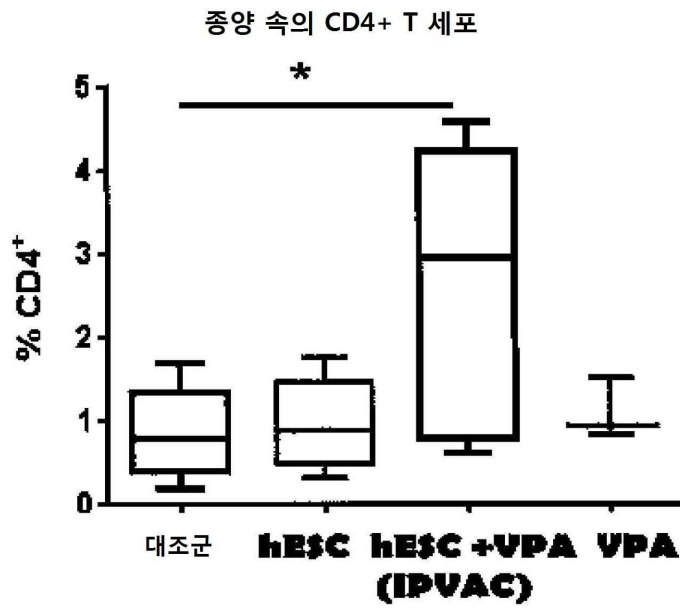




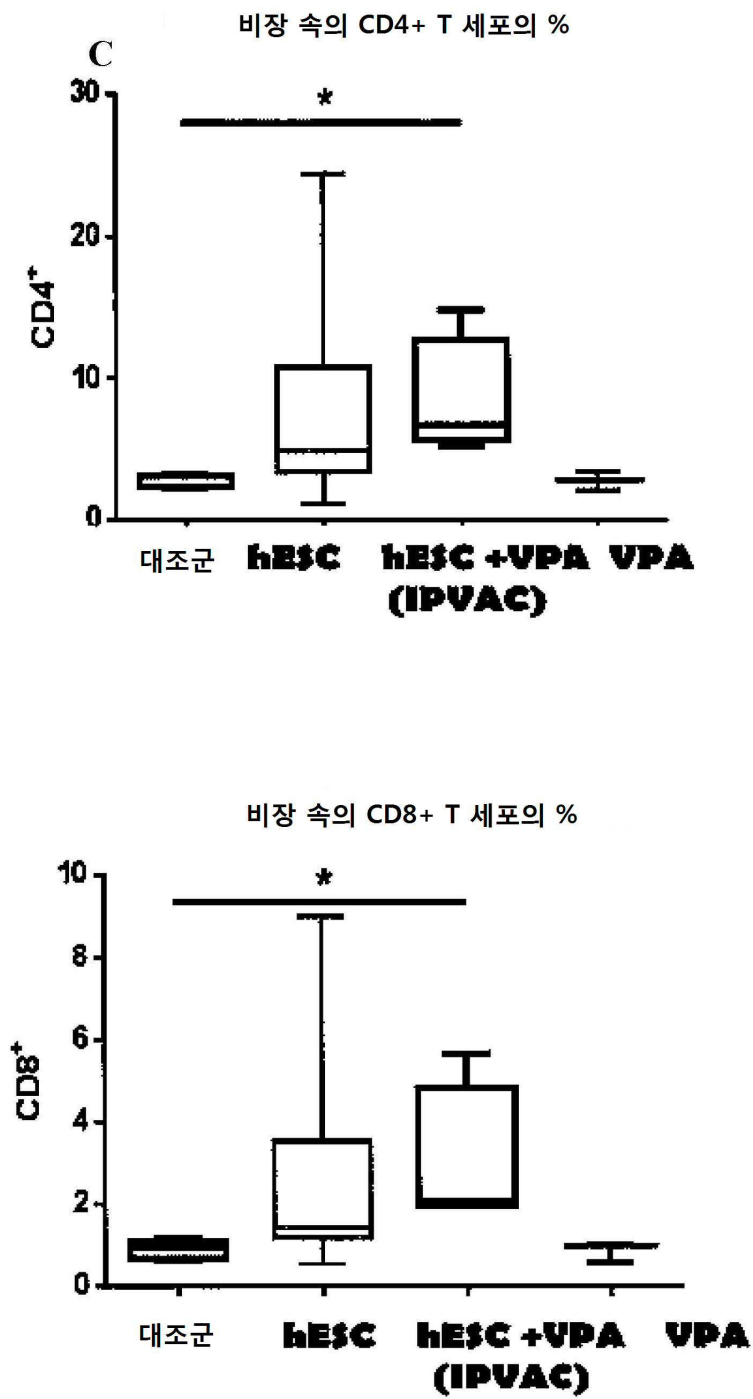
도면4a



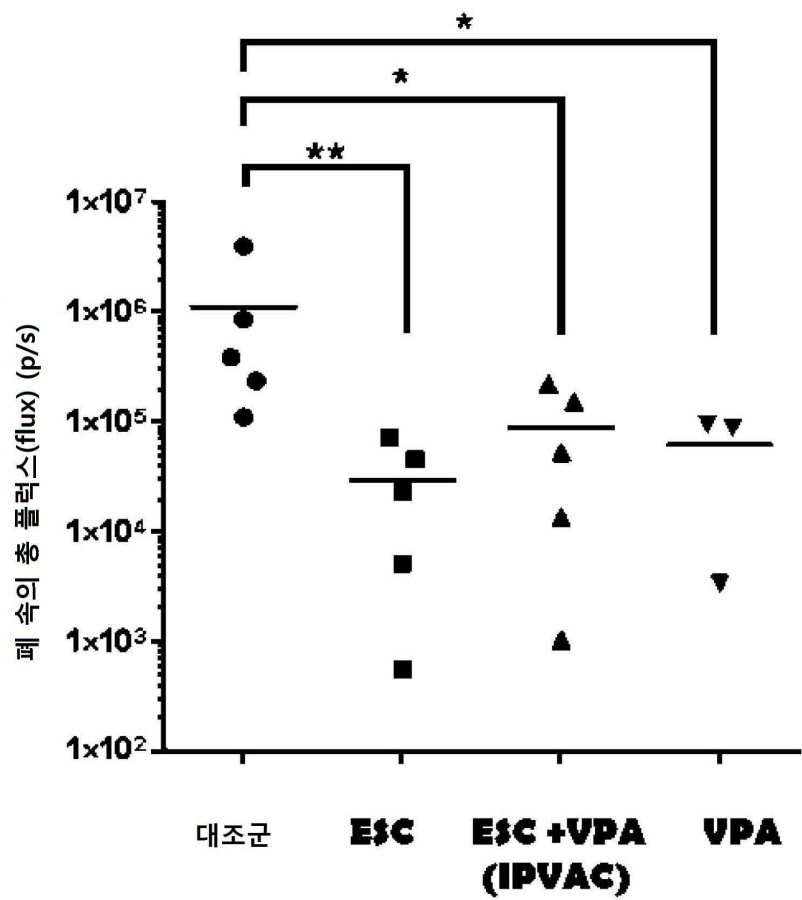
도면4b



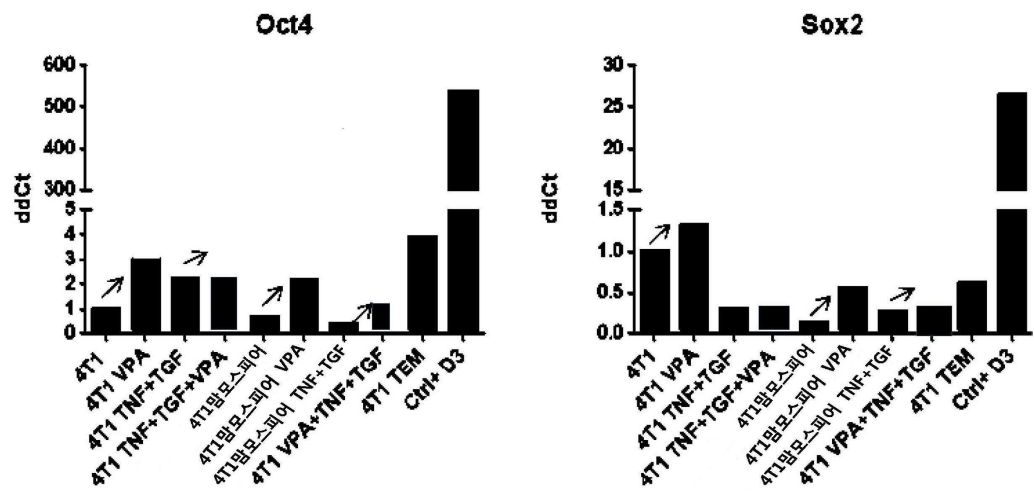
도면4c



도면5

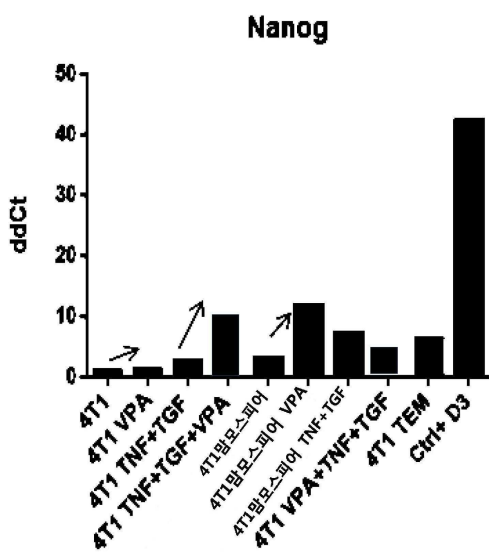


도면6a

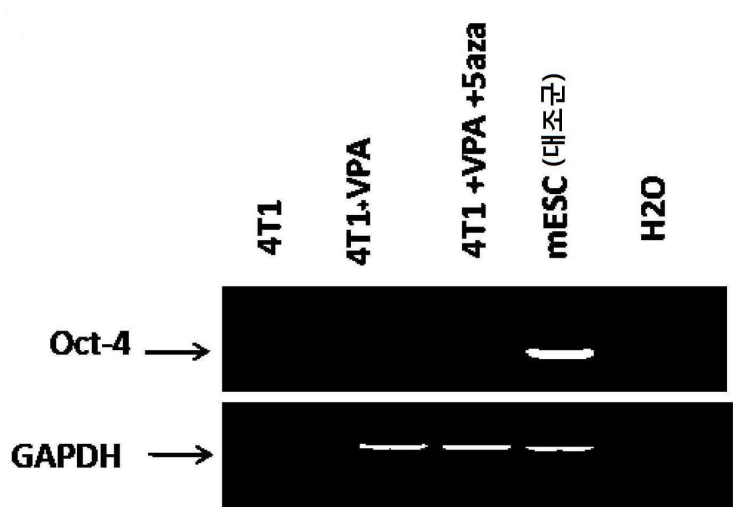




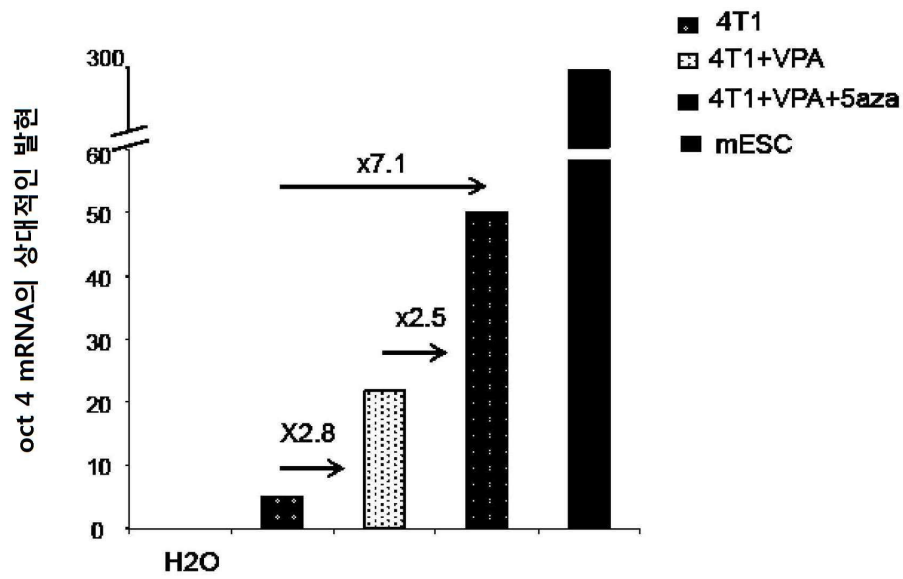
도면6b



도면7a

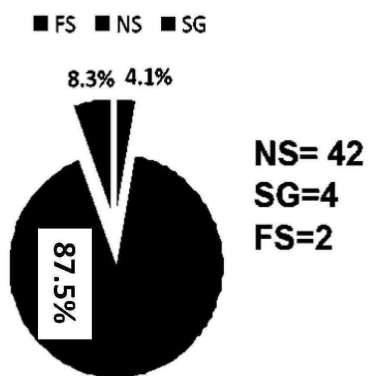


도면7b

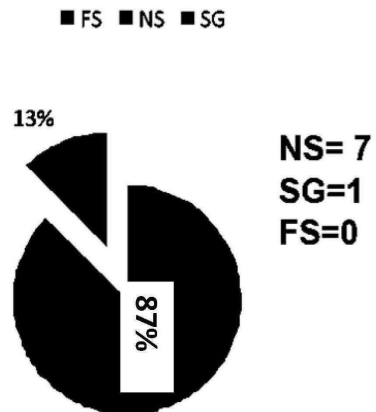


도면8

ENU의 존재하의 iPSC(48개의 변경)



ENU의 부재하의 iPSC(8개의 변경)



도면9

