(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0068810
(43) 공개일자 2014년06월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*A61K 39/12* (2006.01) *A61K 39/245* (2006.01)
*A61K 39/29* (2006.01) *A61P 37/00* (2006.01)
*A61P 29/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-7034616
(22) 출원일자(국제) 2012년05월25일
심사청구일자 2014년04월24일
(85) 번역문제출일자 2013년12월26일
(86) 국제출원번호 PCT/US2012/039605
(87) 국제공개번호 WO 2012/162620
국제공개일자 2012년11월29일
(30) 우선권주장
61/490,505 2011년05월26일 미국(US)

(71) 출원인
**지니우스 바이오테크놀로지 인베스트먼트, 엘엘씨**
미국, 매사추세츠 02025, 코하셋, 니콜스 로드 14
(72) 발명자
**슬라네츠, 앨프리드, 이.**
미국, 매사추세츠 02025, 코하셋, 니콜스 로드 14
(74) 대리인
**특허법인다나**

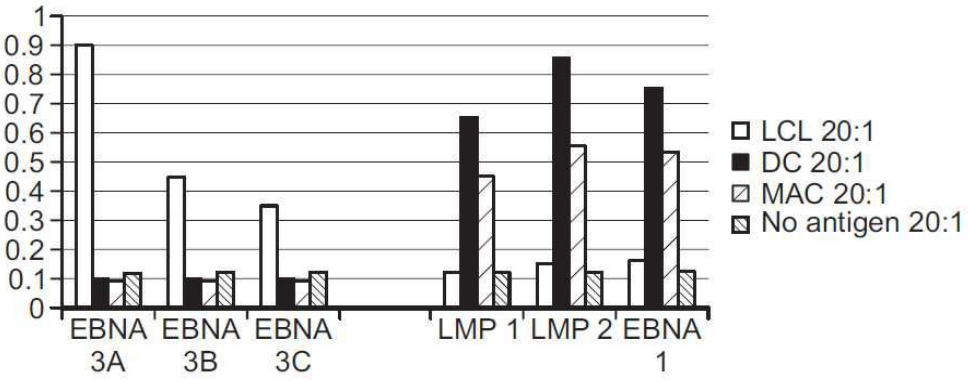
전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 발명의 명칭 **조절된 면역우세 요법**

## (57) 요 약

본 발명은 준우성 항원에 대한 T 세포 반응의 생성 및 세포의 항상성 및 면역 반응의 성질을 치료적으로 변화하기 위한 상기 세포의 용도에 관한 것이다. 바람직한 구체예에서, 환자의 면역 환경에의 영향을 피하도록 세포는 환자 외부에서 생성된다. 조직 배양에서, 환자로부터의 T 세포를 하나 또는 그 이상의 준우성 항원에 대하여 자극하고 성장시키고 그것을 환자에게 이식함에 의해서, 충분하게 세포가 확장되고 이식되는 경우, 면역 관용을 파괴 또는 유도하거나 또는 그 항원을 발현하는 세포 또는 기관에 대한 면역 반응을 수정하기 위하여, 이식된 세포는 반응에서 내인성 우성 T 세포를 압도한다. 기억 세포가 확립되었을 때, 그들은 그 후 이 새로운 면역우세 체계를 반영하여 목적한 치료적 효과를 오래 지속시킬 수 있다. 사실상, 이식 외인성으로 생성된, 준우성 항원에 대해 반응하는 T 세포는 세포 또는 기관에서 이전의 준우성 항원을 타겟으로 하도록 환자의 면역 반응을 준비시키고 재균형화하여 치료적 이점을 생성한다.

*대 표 도* - 도1a



## *특허청구의 범위*

**청구항 1**

환자의 면역우세 체계(immunodominance hierarchy)를 변경하는 방법에 사용하기 위한 환자 내에서 준우성 항원 또는 에피토프를 인지할 수 있는 T 세포.

**청구항 2**

제1항에 있어서, T 세포는 하기 단계에 의해 얻어지는 T 세포:

a. 환자로부터 얻은 샘플에서 적어도 하나의 준우성 항원 또는 에피토프의 동정, 및

b. 상기 준우성 항원 또는 에피토프를 인지할 수 있는 T 세포의 배양.

**청구항 3**

제1항 또는 제2항에 있어서, 면역우세 체계의 변경은 환자 내에서 감염, 암, 염증, 장기 이식 거부, 또는 이식편대숙주 질환을 치료/예방/완화하는 것인 T 세포.

**청구항 4**

환자의 면역우세 체계를 변경하기 위한 의약의 제조에 있어서의 환자 내에서 준우성 항원 또는 에피토프를 인지할 수 있는 T 세포의 용도.

**청구항 5**

제4항에 있어서, 상기 T 세포는 하기 단계에 의해 얻어지는 것인 T 세포의 용도:

a. 환자로부터 얻은 샘플에서 적어도 하나의 준우성 항원 또는 에피토프의 동정, 및

b. 상기 준우성 항원 또는 에피토프를 인지할 수 있는 T 세포의 배양.

**청구항 6**

제4항 또는 제5항에 있어서, 환자 내에서 감염, 암, 염증, 장기 이식 거부, 또는 이식편대숙주 질환을 치료/예방/완화하는 것인 T 세포의 용도.

**청구항 7**

환자로부터 얻은 샘플에서 적어도 하나의 준우성 항원 또는 에피토프의 동정 및 상기 준우성 항원 또는 에피토프를 인지할 수 있는 T 세포 집단의 배양에 의해 얻을 수 있고 환자의 면역우세 체계의 변경에 사용하기 위한 T 세포 집단(population).

**청구항 8**

제7항에 있어서, 치료에 사용하기 위한 것인 T 세포 집단.

**청구항 9**

하기 단계를 포함하는 방법:

a. 환자 샘플에서 우성 항원 또는 에피토프 및 준우성 항원 또는 에피토프의 동정;

b. 상기 준우성 항원 또는 에피토프를 인지할 수 있는 T 세포의 배양; 및

c. 환자의 면역우세 체계를 변경하기 위하여 유효수의 상기 T 세포를 환자에게 처치.

**청구항 10**

하기 단계를 포함하는 방법:

a. 환자 샘플에서 적어도 하나의 준우성 항원 또는 에피토프의 동정;

b. 상기 준우성 항원 또는 에피토프를 인지할 수 있는 T 세포의 배양; 및

c. 환자의 면역우세 체계를 변경하기 위하여 유효수의 상기 T 세포를 환자에게 처치.

**청구항 11**

제9항 또는 제10항에 있어서, 상기 준우성 항원 또는 에피토프는 세포성 또는 체액성 면역 반응에서는 검출되지 않거나 오직 낮은 수준으로만 검출 가능한 항원 또는 에피토프인 방법.

**청구항 12**

제9항 또는 제10항에 있어서, 상기 준우성 항원은 바이러스 항원, 다른 감염 물질 항원, 종양 항원, 또는 자가면역, 알러지, 염증, 장기 이식 거부, 또는 이식편대숙주 질환과 관련된 항원인 방법.

**청구항 13**

제9항 또는 제10항에 있어서, 단계 (b)는 우성 항원 또는 에피토프의 부재 하에서 T 세포를 배양하는 것을 추가로 포함하는 방법.

**청구항 14**

제9항 또는 제10항에 있어서, 단계 (b)는 억제성 T 세포 또는 반응성 T 세포를 강화하는 물질의 존재 하에서 또는 부존재 하에서 T 세포를 배양하는 것을 추가로 포함하는 방법.

**청구항 15**

제9항 또는 제10항에 있어서, 단계 (c)는 유효수의 T-세포를 피내 투여로 투여하는 것을 추가로 포함하는 방법.

**청구항 16**

제9항 또는 제10항에 있어서, 내인성 T 세포의 수를 감소하기 위하여 단계 (c) 이전에 상기 환자에게 조절제(conditioning agent)를 전처치하는 것을 추가로 포함하는 방법.

**청구항 17**

제9항 또는 제10항에 있어서, 상기 T 세포는 억제성 T 세포이고, 단계 (c)는 자가면역 질환, 알러지, 염증, 장기 이식 거부, 또는 이식편대숙주 질환을 치료 또는 예방하기 위하여 환자 내에서 내성을 유도하는 것을 추가로 포함하는 방법.

**청구항 18**

제9항 또는 제10항에 있어서,상기 T 세포는 반응성 T 세포이고, 단계 (c)는 감염 또는 암을 치료 또는 예방하기 위하여 세포독성 면역 반응을 유도하는 것을 추가로 포함하는 방법.

**청구항 19**

제9항 또는 제10항에 있어서, 요법이 환자의 면역 반응을 성공적으로 재균형(rebalance) 하였는지 확정하기 위하여 준우성 항원 또는 에피토프에 대한 내성 또는 체액성 또는 세포성 면역 반응을 프로파일링(프로파일링) 하는 것을 추가로 포함하는 방법.

## *명 세 서*

### *기 술 분 야*

[0001] 본 출원은 2011년 5월 26일에 제출된 미국 가출원 제61/490,505호와 연관되고, 그 내용은 전체가 참조로써 본원에 포함된다.

[0002] 본 발명은 세포 항상성의 치료적 조작에 따른 면역우세 체계 (immunodominance hierarch)의 수정에 기초한 암,

만성 감염, 자가면역 질환, 및 이식에 대한 신규 요법에 관한 것이다.

## 배 경 기 술

[0003] 암의 임상적 관리는 각 발생부위에 따라 특이적이고, 대부분의 경우, 질환의 진행 단계에 따라 달라진다(즉, 종양이 어느 범위까지 국소적으로 침투되었는지 또는 전이에 의해 다른 장기로 퍼졌는지). 화학요법과 함께 수술 및/또는 국소적 방사선 요법이 원발성 종양의 일반적인 치료법이고, 단일클론 항체 또는 사이토카인 요법 또는 전신 방사선요법이 전이성 질환에 대한 치료법이다. 최근에, 처음으로 수지상 세포 요법, 프로벤지(Provenge)가 4-개월 진행 이익(4-month progression benefit)을 가지고 전립성 암에 대하여 승인되었다. 진단은 현재까지 생검의 조직학적 분석에 기초한다. 분자 마커가 약물(예를 들어, 허셉틴)의 선택에 도움이 되는 경우, 때로 그들이 표준이 된다. 그러나, 일상적인 임상 기초에 있어서 아직까지 면역 반응의 프로파일의 창출은 이루어진 바 없다.

[0004] 1차 면역 반응 동안 T 세포가 항원을 보는 환경은 차후의 기억 반응의 성질을 결정한다. 최초의 인지 현상 및 1차 세포 주변의 미세환경이 다양한 결과를 일으킬 수 있다. 비전문적(nonprofessional) APC에 의해 항원이 제시되면, 처치되는 동안 에피토프의 아집단(subset)만이 방출된다. CD28 또는 TNF와 같은 공동자극 신호(costimulatory signal)를 놓치면, T 세포는 면역성 결여(anergized)된다. 미세환경에 따라, T 세포는 조절 T 세포, 보조 T 세포 분비성 Th1 사이토카인 ($CD8^+$ CTL 이펙터(effector)의 증식과 함께 더 많은 세포성 면역 반응을 추진) 또는 보조 T 세포 분비성 Th2 사이토카인 (B 세포의 증식과 성숙 및 항체 생산과 함께 더 많은 체액성 면역 반응을 추진)으로 분화될 수도 있다.

[0005] 또한, 밀리외(milieu) 내에서 항원의 특정 에피토프 또는 특정 항원들에 반응하는 T 세포는 밀리외(milieu) 내에서 다른 에피토프 또는 항원과 반응하는 집단 내의 T 세포들의 희생으로 성장하는 것과 같이 면역 반응은 진화할 것이다. 1차 면역 반응이 가라앉음에 따라, 세포가 기하급수적으로 증가하기 때문에, 이들 T 세포의 비율은 더욱 두드러지고 이차 자극시 기억되는 형태로 저장된다. 각 개인의 면역 반응은 가능한 에피토프의 적은 아집단에 집중된다. 작용 모델로서, 작동하는 다수의 메커니즘이 있는 반면, 성장하여 집단을 지배하는(dominant) T 세포는 면역 반응을 지배하게 되는 에피토프 또는 항원에 반응하는 것들이다. 1차 면역 반응에서, 그들은 준우성 에피토프에 반응하는 T 세포의 희생으로 성장하고, 기억에 의해, 차후의 면역 반응을 지배한다.

[0006] 개인의 면역 시스템이 처음으로 항원을 인지한 후 일정 날 동안, 우성 에피토프의 제한된 수에 반응하는 T 세포의 우성 집단이 생성되고 이들 T 세포는 그 후의 항원에 대한 반응의 성질을 확정한다. 관련된 세포의 다수 형태가 존재하지만, 본 발명과 관련된 작용 모델은, 우성 항원 상의 우성 에피토프에 반응하는 T 세포가 반응성 T 세포 (예를 들어, $CD4^+$ :TH1, TH2, Treg, 여포성 보조 T 세포, TH17, TH22, TH9; CD8+ CTL)로서 성장하면, 세포성 또는 체액성 면역 반응이 일어난다. 그러나, 우성 집단 내의 T 세포가 억제성 T 세포 (예를 들어, Treg, TH17, 아네르기된 T 세포)인 경우, 내성이 유도된다. 준우성 항원에 반응하는 T 세포는 우성 항원에 반응하는 T 세포의 클론 집단에 의해 압도된다.

[0007] 암, 만성 또는 잠복 감염, 국소 항원의 경우, 프로세싱/제시(processing/presenting) 및 공동자극 환경은 우성 항원에 대한 1차 면역 반응에 다음과 같은 영향을 미친다. 종양 또는 감염 물질 내에서 우성 항원에 대한 T 세포 반응은 강력한 이펙터 반응 보다 내성 또는 비효과적인 반응으로 균형이 맞춰진다. 항원 프로세싱 및 공동자극 (CD28 및 사이토카인)의 차이에 기인하여, 이는 수지상 세포 (DC)가 전우성(predominant) 항원 제시 세포인 체표면과 달리 수지상 세포 (DCs)가 일반적인 항원 제시 세포 (APCs)가 아닌 장기에서 두드러질 수 있다. 종양 및 감염 물질은 강한 1차 면역 반응을 위해 최적이 아닌 면역억제 환경을 만든다는 것 또한 잘 알려져 있다. 그 대신에, 우성 항원이 스스로 반응하는 세포가 되면, 내성이 파괴되고 자가면역이 뒤따른다. 이와 같은 내성은 반응 (심지어 만성적으로 약한 준우성 항원에 대한)을 이끄는 만성 또는 잠복 바이러스의 존재에 의해 파괴될 수 있다. 바이러스와 자가면역은 다중 연관이 있다. 바이러스 항원은, 자가면역의 원인이 되는, 장기에 대해 반응하는 T 세포에 도움을 제공하는 반면 염증 부위는 다른 항원의 방출을 이끈다. 1차 반응에서 우세 체계가 확립되고 기억에 의해 보강된 후, 환자의 면역계는 그 항원이 존재할 때마다 같은 반응을 효과적으로 반복할 것이다.

[0008] 우성 에피토프에 대한 면역 반응의 진행은 준우성 에피토프에 대한 반응을 약화시킬 수 있다(울퍼트(Wolpert) EZ 1998, 케들(Kedl) RM 2003). 우세/ 준우세 체계(dominance/subdominance hierarchy)는 다소 유동적일 수 있다. 예를 들어, 우성 에피토프에 대한 제거(deleting) 또는 침묵(silencing) T 세포 반응은 이전의 준우성 에피토프에 대한 감지할 수 없는 반응의 출현을 이끌 수 있다(반 데르 모스트 (Van der Most) RG 외. 1997, 안드레

안스키 (Andreansky) SS 외. 2005). 유사하게, 에피토프에서 우성 서열의 제거는 항원에 대한 반응을 제거하지 않는 반면, 이전의 준우성 에피토프에 대한 더욱 강한 숙주 반응을 이끈다(알란(Allan) JE 및 도허티(Doherty) PC 1985, 밀린(Mylin) LM 외. 2000).

## *발명의 내용*

### *과제의 해결 수단*

[0009] 본 발명은 세포 항상성의 치료적 조작에 의한 면역우세 체계(immunodominance hierarch)의 수정에 기초한 암, 만성 감염, 자가면역 질환, 및 이식의 신규 치료에 관한 것이다.

[0010] 항원에 대한 면역 반응을 재균형(rebalance)화하여, 특히, 암, 만성 및 잠복 감염, 자가면역 및 이식에 있어서 상당한 치료적 이점을 제공하는 신규 접근법을 개시한다. 조절된 미세환경에서 준우성 에피토프 및 준우성 항원에 대한 면역 반응을 생성함에 의해, 본 발명은 치료적 이점을 제공할 수 있는 것으로 질환에 대한 면역 반응의 성질을 근본적으로 변화시킨다. 항원에 대해 일어난 이전의 면역 반응 전 또는 후에, 또는 심지어 면역반응이 일어나고 있는 중에 면역 반응의 균형을 변화시킬 수 있다.

[0011] 본 발명은 환자 샘플에서 우성 항원 또는 에피토프 및 준우성 항원 또는 에피토프를 동정하고, 준우성 항원 또는 에피토프를 인지할 수 있는 T 세포를 배양하며, 환자의 면역우세 체계를 변경하기 위하여 환자에게 유효수의 T 세포를 처치하는 것을 포함하는 방법에 특징이 있다.

[0012] 본 발명은 또한 환자 샘플에서 적어도 하나의 준우성 항원 또는 에피토프를 동정하고, 준우성 항원 또는 에피토프를 인지할 수 있는 T 세포를 배양하며, 환자에게 유효수의 이러한 T 세포를 처치하여 치료적 이점을 제공하는 것을 포함하는 환자의 면역우세 체계를 변경하는 방법에 특징이 있다.

[0013] 한 관점에서, 본 발명은 우성 항원 또는 에피토프의 부재 하에서 T 세포를 배양하는 것을 추가로 포함한다. 다른 관점에서, 본 발명은 억제성 T 세포 또는 반응성 T 세포를 강화하는 물질의 존재 하에서 또는 부존재 하에서 T 세포를 배양하는 것을 추가로 포함한다. 이와 같은 물질은 성장 인자, 호르몬, 또는 다른 면역 세포를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0014] 한 관점에서, 본 발명은 유효수의 T 세포를 피내 투여로 투여하는 것을 추가로 포함한다.

[0015] 다른 관점에서, 본 발명은 환자에게 배양된 T 세포를 처치하기 전에 내인성 T 세포의 수를 감소하기 위하여 환자에게 조절제(conditioning agent)를 전-처치하는 것을 추가로 포함한다. 조절제는, 이에 제한되는 것은 아니나, 화학요법제를 포함할 수 있다.

[0016] 한 관점에서, T 세포는 환자로부터 엑스 비보(ex vivo)로 제공된다.

[0017] 준우성 항원 또는 준우성 에피토프는, 예를 들어, 세포성 또는 체액성 면역 반응에서는 검출되지 않거나 오직 낮은 수준으로만 검출 가능한 항원 또는 에피토프이다. 대안적으로, 준우성 항원 또는 준우성 에피토프는 우성 항원 또는 우성 에피토프보다 더 약한 내성 또는 면역 반응을 일으키는 항원 또는 에피토프이다. 준우성 항원은, 예를 들어, 바이러스 항원, 곰팡이(fungal) 항원, 박테리아 항원, 기생충 항원, 프리온(prion) 항원, 종양 항원, 또는 자가면역, 알러지, 염증, 장기 이식 거부, 또는 이식편대숙주 질환과 관련된 항원이다. 바이러스 항원은, 예를 들어, 만성 또는 잠복 바이러스 항원이다. 바이러스 항원은 EBV, HPV, HSV, VZV, B형 간염, C형 간염, HIV, HTLV, CMV, RSV, 또는 인플루엔자로부터 유래한다. 종양 항원은, 예를 들어, 종양-관련 항원, 종양 특이적 항원, 또는 암 줄기 세포 또는 전이와 관련된 항원이다.

[0018] 본 발명은 또한 환자 샘플에서 우성 항원 또는 에피토프 및/또는 준우성 항원 또는 에피토프를 동정하고, 준우성 항원 또는 에피토프를 인지할 수 있는 T 세포를 배양하며, 상기 T 세포는 억제성 T 세포이고, 환자에게 유효수의 상기 T 세포를 처치하여 환자의 면역우세 체계를 변경함으로써, 환자에서 내성을 유도하여 자가면역 질환, 알러지, 염증, 장기 이식 거부, 또는 이식편대숙주 질환을 치료 또는 예방하는 방법에 특징이 있다.

[0019] 본 발명은 또한 환자 샘플에서 우성 항원 또는 에피토프 및/또는 준우성 항원 또는 에피토프를 동정하고, 준우성 항원 또는 에피토프를 인지할 수 있는 T 세포를 배양하며, 상기 T 세포는 반응성 T 세포이고, 환자에게 유효수의 T 세포를 처치하여 환자의 면역우세 체계를 변경함으로써, 환자에서 세포독성 면역 반응을 유도하여 감염 또는 암을 치료 또는 예방하는 방법에 특징이 있다. 감염은, 예를 들어, 박테리아, 바이러스, 기생충, 또는 프

리온 감염이다.

[0020] 본 발명의 어느 방법에서, 질병, 감염, 암, 또는 의학적 상태(medical condition)의 치료 또는 예방은 질환, 감염, 암, 또는 의학적 상태의 적어도 하나의 증상을 완화(alleviating)하거나 또는 개선(ameliorating)하는 것을 포함한다. 치료적 이점은 질환, 감염, 암, 또는 의학적 상태의 적어도 하나의 증상의 어떠한 완화, 개선, 호전(improvement), 예방 또는 치료를 포함한다.

[0021] 한 관점에서, 환자의 샘플은 혈액 샘플(blood sample)이다.

[0022] 본 발명은 또한 요법이 면역 반응을 성공적으로 재균형화(rebalance)하였는지 확정하기 위하여, 준우성 항원 또는 에피토프에 대한 반응에서, 내성 또는 체액성 또는 세포성 면역 반응을 분석함에 의해서 환자를 재-프로파일링(re-profiling) 하는 것을 추가로 포함하는 방법에 특징이 있다.

[0023] 다른 정의가 없는 한, 여기에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속한 업계에서 통상의 기술자에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 여기에서 기술된 것과 유사하거나 동등한 방법 및 물질이 본 발명의 예로 사용될 수 있다고 하더라도, 적합한 방법 및 물질은 하기에서 기술된다. 여기에서 언급된 모든 간행물, 특허 출원, 특허, 및 다른 참고 문헌은 온전히 참조로써 명확히 포함된다. 상충되는 경우에는, 본 명세서는, 정의를 포함하여, 제한될 것이다. 또한, 여기에서 기술된 물질, 방법, 및 예들은 오직 실례일 뿐이고 이에 제한되는 것으로 의도되지 않는다.

[0024] 본 발명의 다른 특징 및 효과는 다음의 상세한 설명 및 청구항으로부터 분명해지고 이를 포함할 것이다.

## *도면의 간단한 설명*

[0025] 도 1a, 1b 및 1c는 $^{51}$Cr 방출 어세이의 결과를 보여준다.

도 2는 $^{51}$Cr 방출 어세이의 결과를 보여준다.

도 3a 및 3b는 $^{51}$Cr 방출 어세이의 결과를 보여준다. 도 3c는 살아있는(viable) APCs의 퍼센트를 보여준다.

도 4는 ELISpot에 의해 측정된 IFNɣ 생성 세포를 보여준다.

도 5, 6a, 6b, 7 및 8은 $^{51}$Cr 방출 어세이의 결과를 보여준다.

도 9는 만성 B형 간염의 마우스 모델을 보여준다.

도 10은 마우스 모델의 치료를 보여준다.

도 11은 HBs 및 HBc에 대한 T 세포 반응을 보여준다.

도 12 및 13은 투여 방법에 의한 반응을 보여준다.

도 14는 항원의 체계(hierarchy)를 보여준다.

도 15는 ICS에 의한 반응을 보여준다.

도 16은 항원의 체계를 보여준다.

도 17은 면역 반응 후의 급성 플레어(acute flair) 및 이에 따른 간염의 소실(clearance)을 보여준다.

도 18은 항원의 체계 후의 소실을 보여준다.

도 19는 T 세포가 환자의 간세포 암종(Hepatocellular carcinoma) (치료 전 - 왼쪽; 요법 8 주- 후- 오른쪽)을 완전히 분해하였음을 보여준다.

도 20은 환자의 종양에서 항원의 제시를 보여준다.

도 21은 NY-ESO-1 항원에 반응하는 세포를 보여준다.

도 22는 본 발명에 따른 요법 후의 항원 제시를 보여준다.

도 23은 면역우세 체계의 재균형을 보여준다.

도 24는 본 발명에 따른 T 세포 요법 전과 후의 CT 스캔이다.

도 25는 요법 후의 생존, 무 진행(progression free)을 보여준다.

도 26은 본 발명에 의한 요법 및 리툭산(Rituxan) + CHOP의 비교를 보여준다.

도 27은 동물에게 투여된 T 세포의 특성을 보여준다.

도 28은 시험 마우스에 대한 임상적 질환 스코어를 보여준다.

도 29는 시험 마우스에서 관절염의 발병률을 보여준다.

도 30a, 30b 및 30c는 정상 랫트, 인간 프로테오글리칸으로 면역화된 랫트 및 T 세포를 처치한 랫트의 병리 조직을 보여준다.

도 31은 본 발명의 요법과 함께 사용된 바이오리액터의 도식이다.

## *발명을 실시하기 위한 구체적인 내용*

[0026] A. 정의

[0027] 용어 "항체"는 목적한 생물학적 활성을 나타내는 한, 최광의 의미로 사용되고 구체적으로 인간, 비-인간 (예를 들어, 뮤린) 및 인간화된 단일클론 항체 (전체 길이의 단일클론 항체를 포함), 다클론 항체, 다중-특이성 항체 (예를 들어, 이중특이성(bispecific) 항체), 및 항체 단편을 포함한다.

[0028] 용어 "항원,"은 동물에서 항체의 생성 또는 T 세포 반응을 자극할 수 있는 화합물, 조성물, 또는 물질을 의미하고 동물에 주사(inject)되거나 흡수된 조성물을 포함한다. 항원은 이종의 면역원에 의해 유도된 것을 포함하는 특정 체액성 또는 세포성 면역의 생성물과 반응한다. 용어 "항원"은 모든 관련된 항원성 에피토프를 포함한다.

[0029] "항원 제시 세포(Antigen presenting cells)" 또는 "APCs"는 항원을 T 세포에 제시하기 위해 사용되는 면역계의 세포이다. APCs는 수지상 세포, 단핵세포, 대식세포, 변연부 쿠퍼 세포(marginal zone Kupffer cells), 미세아교세포(microglia), 랑게르한스 세포, T 세포, 및 B 세포 (예를 들어, 로드리구즈-핀토 및 모레노(Rodriguez-Pinto and Moreno) (2005) Eur. J. Immunol. 35: 1097-1105 참조)를 포함한다.

[0030] "자가면역," "자가면역 질환," "자가면역 상태" 또는 "자가면역 장애"는 나타난 자가면역 레퍼토리의 질적 및/또는 양적 결함에 의해 분명해진 지속된 장기-특이성 또는 전신성 임상 증상 및 변경된 면역 항상성과 관련된 신호의 세트이다. 자가면역 질환의 병인은 자가면역 반응에 의해 유도된 구조적 또는 기능적 손상의 결과로서 분명해진다. 자가면역 질환은 자기-항원 상의 에피토프에 대한 체액성 (예를 들어, 항체-매개), 세포성 (예를 들어, 세포독성 T 림프구-매개), 또는 양 면역 반응의 조합에 특징이 있다. 발병된 개체의 면역계는 그러한 특정 자기-항원이 제시된 세포 및 조직을 목표로 한 염증성 캐스케이드를 활성화한다. 공격당한 항원, 조직, 세포 타입 또는 장기의 파괴는 질환의 증상을 생기게 한다.

[0031] 용어 "암"은 조절되지 않는 세포 성장에 특징이 있는 질환 또는 장애를 의미한다. 암의 예는, 이에 제한되는 것은 아니나, 암종(carcinoma), 림프종, 모세포종(blastoma) 및 육종(sarcoma)를 포함한다. 구체적인 암의 예는, 이에 제한되는 것은 아니나, 폐암, 결장암(colon cancer), 유방암, 고환암(testicular cancer), 위암, 췌장암, 난소암, 간암, 방광암, 대장암(colorectal cancer), 및 전립선암을 포함한다. 업계에서 통상의 기술자에게 알려진 추가의 암 또한 고려된다.

[0032] "우성 항원" 또는 "우성 에피토프"는 강한 내성 또는 면역 반응을 일으키는 항원 또는 에피토프이고, 반응하는 T 세포의 총 수의 약 70% 초과의 양에서 항원 또는 에피토프에 대하여 T 세포 특이성이 나타나는 특징이 있다.

[0033] 용어 "에피토프"는 특정 면역글로불린에 의한 인지와 관련된 아미노산 잔기의 세트, 또는, T 세포의 맥락에서, T 세포 수용체 단백질 및/또는 주조직적합복합체 (Major Histocompatibility Complex; MHC) 수용체에 의한 인지에 필요한 잔기이다. 인 비트로(in vitro) 또는 인 비보(in vivo) 면역계 설정에서, 에피토프는, 면역글로불린, T 세포 수용체 또는 HLA 분자에 의해 인지되는 부위를 함께 형성하는, 1차, 2차 및 3차 펩타이드 구조, 및 전하와 같은 분자의 집합적 특성(collective features)이다.

[0034] "간염"은 간의 염증에 의해 정의되는 의학적 상태이다.

[0035] "인간 백혈구 항원 (Human Leukocyte Antigen)" 또는 "HLA"는 인간 클래스 I 또는 클래스 II 주조직적합복합체 (MHC) 단백질 (예를 들어, 스티테스(Stites), 외. 면역학(IMMUNOLOGY), 8TH ED., 랭 출판(Lange Publishing), 로스 알토스, 캘리포니아. (1994) 참조)이다.

[0036] "면역 반응"은, B 세포, T 세포, 또는 단핵세포와 같은, 면역계의 세포의 자극원에 대한 반응이다. 한 구체예에서, 반응은 특정 항원 ("항원-특이적 반응")에 대하여 특이적이다. 한 구체예에서, 면역 반응은, $CD4^+$ 반응 또는 $CD8^+$ 반응과 같은, T 세포 반응이다. 다른 구체예에서, 반응은 B 세포 반응이고 특정 항체의 생성을 일으킨다.

[0037] 면역우성은 항원에서 가능한 에피토프 (항원 단편)가 많이 있음에도 불구하고, 면역계가 제한된 수의 에피토프에 그의 반응을 집중하고, 재생할 수 있는 체계로서 정리될 수 있는 현상이다(세르카즈(Sercarz) 외. 1993). 면역우성은 인플루엔자 및 백시니아(vaccinia), 및 세포내 박테리아를 포함하는 인간 바이러스, 인공 항원에 대한 면역 반응을 위한 진리이다 (첸(Chen) WS 1994, 벨츠(Belze) GT 외. 2000, 첸(Chen) W 2000, 샤키(Tscharke) DC 2005). 면역우성의 최종 결과는 MHC 결합 친화성, 적당한 MHC 결합 펩타이드를 생성하기 위한 세포 프로세싱의 효율, MHC 결합 펩타이드 사이의 복합체를 인지하는 TCRs의 유효성 및 세포성 면역조절 메커니즘에 뒤이은 MHC를 포함하는 단계의 수에 의해 확정된다(유델(Yewdell) JW 2006, 세떼(Sette) A 외. 2009).

[0038] "림프구"는 생체의 면역 방어와 관련된 백혈구의 종류이다. 두 가지 주요 타입의 림프구가 있다: B 세포 및 T 세포.

[0039] "주조직적합복합체(Major histocompatibility complex)" 또는 "MHC"는 인간 백혈구 항원("HLA")을 포함하는 다른 종류의 조직적합성 항원 시스템을 포함하는 의미의 포괄 명칭이다.

[0040] "준우성 항원" 또는 "준우성 에피토프"는 우성 항원 또는 우성 에피토프에 비하여 약한 내성 또는 면역 반응을 생기게 하는 항원 또는 에피토프이다.

[0041] 용어 "처치"는 질환, 장애 또는 환자에 의해 분명해 지거나 환자 내에서 방지되는 생리적 상태에 대한 반응을 만드는 임상적 개입이다. 처치의 목표는 질환, 장애, 또는 상태의 진행을 느리게 하거나, 멈추거나, 역전하는 것 뿐 아니라 증상을 완화 및/또는 예방하는 것을 포함한다. "처치"는 치료적 처치 및 예방적 또는 방지적 수단이다. 처치를 필요로 하는 경우는 질환 또는 장애 또는 바람직하지 않은 생리적 상태에 의해 이미 영향을 받은 경우뿐 아니라, 질환 또는 장애 또는 바람직하지 않은 생리적 상태가 예방되어야 하는 경우를 포함한다.

[0042] "종양"은 악성 또는 양성, 및 모든 전-암성 및 암성 세포 및 조직을 포함하는 모든 신생물성(neoplastic) 세포 성장 및 증식이다 .

[0043] "__-머(mer)"는 타겟 항원에서 나타나는 __아미노산의 선형 서열(linear sequence)이다.

[0044] B. 우성 에피토프로부터 준우성 에피토프의 인지/구별 어세이

[0045] 먼저 환자의 종양 또는 감염을 종양 관련 패널(panel), 바이러스 또는 다른 항원의 존재에 대하여 분석한다. 혈액암(hematologic malignancies)의 경우 이는 일반적으로 종양 생검의 면역조직화학 또는 FACS에 의해 행해진다. 환자의 종양 또는 감염을 종양 관련 패널, 바이러스 또는 다른 항원의 존재에 대하여 분석한다. 혈액암의 경우 이는 일반적으로 종양 생검의 면역조직화학 또는 FACS에 의해 행해진다. 환자의 혈액을 뽑고 존재하는 항원에 대한 체액성 및 세포성 면역 반응을 시험한다. 인 비트로에서, 면역 반응에서 검출되지 않거나 낮은 수준으로 검출되는 항원은 T 세포를 성장하도록 주도적으로(proactively) 선택된다. 이 T 세포들이 성장한 후, 재-주입(re-infused)된 항원 반응에 대하여 그들을 시험하고, 환자의 혈액을 항원 반응에 대하여 분석할 수 있다. 이런 방식으로, 환자의 면역 반응은 효율적으로 재균형화되어 치료적 이점을 제공할 수 있다. 바람직한 구체예에서, 체액성 면역의 어세이는, 이에 제한되는 것은 아니나, ELISA 어세이를 포함한다. 바람직한 구체예에서, 세포성 면역 어세이는, 이에 제한되는 것은 아니나, 인터페론ɣ(IFNɣ) 및 종양 괴사 인자(TNFa)를 포함하는 사이토카인에 대한 세포내 사이토카인 염색(ICS)을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. T 세포 반응(예를 들어, CD8, CD4, Treg)의 아집단 또한 이 어세이로 분석할 수 있다. 대신하여, 세포성 면역의 어세이는, 이에 제한되는 것은 아니나, IFNɣ 또는 TNFα에 대한 ELISpot 어세이를 포함한다. 다른 구체예에서, IL-4, IL-12 (TH2 및 TH1), IL-10 (Treg) 또는 IL- 21 (여포성 보조 T 세포의 아집단)에 대하여 ELISpot 또는 ICS를 분석할 수 있다. 또 다른 구체예에서, 세포성 면역 프로파일링 어세이는 이들 또는 다른 사이토카인에 대한 세포내 염

색 (ICS)일 수 있다. 시험한 항원은 전체 항원(full antigen), 에피토프가 결실된 항원 또는 우성 또는 준우성 에피토프를 갖는 항원일 수 있다. 에피토프의 경우, 생물정보 소프트웨어를 사용하여 환자 MHC에 결합할 에피토프를 예측할 수 있고 그 후 이들 에피토프를 분석한다. 한 구체예에서, 이 소프트웨어는 어세이 부분에서 기술된 Net MHCpan 또는 공통(consensus) 에피토프 면역 정보 소프트웨어이다. 에피토프의 경우, 대체 어세이로서 테트라머 결합을 사용하여 알려진 HLA 타입을 제공하는 CTL을 정량할 수 있다. 펩타이드를 포함하는 테트라머는 각 테트라머를 인지하는 세포의 %를 확정하기 위해 사용되는 세포 및 세포 염색 및 FACS와 조합된다. 환자가 HLA A2와 같은 알려진 HLA 타입인 경우 유용하다. 그러나, 바람직한 방법은 체액성 반응에 대한 ELISA 및 세포성 반응에 대한 ICS 또는 Elispot이다. 바람직한 구체예에서, CTL은 말초 혈액으로부터 생성된다. 대신하여, CTL은 종양 침투성 림프구(TIL) 또는 주사 부위 주변의 DTH로부터 생성된다.

[0046] 10% FCS (CSL)를 처리한 RPMI 배지 1640에서 저민 피부로부터 4 mm 펀치(punch) 생검을 취하여 DTH 침투성 림프구를 제조할 수 있다. 단일 세포 현탁액은 1 g/ml 피토헤마글루티닌 (시그마;Sigma)로 자극되고 10 IU/ml IL-2 (세투스; Cetus) 및 10 ng/ ml IL-7 (페프로테크, 록키 힐, NJ; Peprotech, Rocky Hill, NJ)를 처리한 방사선 조사된 자기조직 유래의 PBMC와 함께 공동배양된다. 배지는 2-3일에 한 번씩 보충된다.

[0047] 체액성 면역 반응 프로파일링을 위하여, 환자로부터의 혈청은 1/100로부터 1/100000까지 연속적으로 1:4로 희석되고 정제된 재조합 종양 항원 (일반적으로 대장균(E. coli)에서 만들어진)과 함께 표준 ELISA에 사용된다. 2부터 10000+ 항원까지 분석될 수 있다. 각 정제된 단백질의 1 마이크로그램은 4 ℃에서 하룻밤 동안 마이크로웰 플레이트(눈크; Nunc)에 흡수된다. 플레이트는 PBS로 세척되고 2% FCS/PBS로 채워진다. 환자 혈청은 2% FCS/PBS에서 희석되고 두 시간 동안 가해진다. 플레이트는 세척되고 염소 항-인간 IgG-AP (서던 바이오테크놀러지 어소스; Southern Biotechnology Assoc)이 가해진다. 플레이트는 세척되고, 25분 동안 아토포즈 기질(Attophose substrate) (JBL 바이오사이언티픽)로 인큐베이트되고, 즉시 (사이토플루오르 2350; CytoFluor 2350, 밀리포어; Millipore)출련 된다. 출력물은 UV 흡광도이다.

[0048] 세포성 반응 프로파일링을 위한 두 가지 방법이 있다. 첫번째 방법은 IFNγ에 대한 효소-결합 면역흡수 스팟 (Enzyme-linked immunosorbent spot; "ELISPOT") 어세이와 관련된다. 하룻밤 동안, 4 ℃에서, 96 웰 폴리비닐리덴 디플루오라이드 백트 플레이트(polyvinylidene diflouride backed plate)(밀리포어, 베드포드; Millipore, Bedford, MA)는 5-15 ㎍/ml의 항-IFNγ 단일클론 항체 1-DIK (맵테크, 스톡홀름, 스웨덴; MABTECH, Stockholm, Sweden)로 코팅된다. 웰은 세척되고 5% 인간 AB 혈청 (발런트 팜;Valeant Pharm)으로 채워진다. 각 항원으로부터 각 2 μM의 펩타이드 혼합물과 함께 웰 마다 $5x10^6$ PBMCs (또는, 인 비트로 확장 후 어세이가 수행되는 경우에는 $5x10^5$의 CTL)가 가해진다. 37 ℃, 5% $CO_2$에서, 하룻밤 동안 (18 시간) 인큐베이트한다. 세포는 버려지고 웰은 0.05% 트윈 20을 함유하는 PBS로 세척된다. 2 시간 초과 동안 스트렙타비딘 컨쥬게이트 알칼라인 포스파타제 (맵 테크; MABTECH 또는 시그마 알드리치; Sigma Aldrich)에 뒤이어, 1 ㎍/ml 비오틴화된 항-IFNγ 단일클론 항체 7-B6-1 (맵테크; MABTECH)는 실온에서, 2- 4 시간 인큐베이트된다. 이는 알칼라인 포스파타제 (alk-phos) 기질 키트(Bio-Rad Richmond, CA)로 부터의 5-브로모-4-클로로-3-인돌일 포스페이트 및 니트로 블루 테트라졸리움으로 30분 반응한 후 수행된다. 스팟은 해부 현미경(dissection microscope; SZ CTV 올림푸스 현미경)을 사용하여 계수된다. 스팟은 또한 AIDELISPOT 리더 (자가면역 진단학(Autoimmun Diagnostika), 스트라스베르크, 독일)로 계수될 수 있다. 각 스팟은 스팟 형성 세포 (spot forming cell; SFC)/$10^5$ PBMCs로서 기록된 세포이다. 양성 대조군으로 10 ㎍/ml PHA가 사용될 수 있다; 음성 대조군으로 펩타이드 없는 단독 세포가 제공될 수 있다.

[0049] 두 번째 방법은 IFNγ 및 TNFcc에 대한 세포내 사이토카인 염색과 관련된다. $5x10^6$ PBMCs (또는 인 비트로 확장 후 어세이가 수행되는 경우에는 $5x10^5$의 CTL)가 연구되는 각 에피토프 또는 항원에 대한 펩타이드(최종 농도 $10^{-5}$ 내지 $10^{-9}$ M)와 함께 100 ㎕ PBS 1% FCS 96 웰 플레이트에 놓인다. IL-2 (150 U/Ml), 50 μM β 머캅토에탄올 및 브리펠딘 A (1 μg/ ml) 또는 골지 플러그(Golgi Plug; BD 바이오사시언티픽, 샌 디에고, CA) (뒤의 두 성분은 반응 세포에서IFNγ 또는 TNFcc의 축적을 증가시키기 위함)의 존재 하에서 6 시간 인큐베이션 후, 세포는 펠렛(pelleted)되고, 200 ml PBS 1% FCS에서 세척되며, 그 후 4 ℃ (얼음 상에서 30분)에서 30분 동안 표면 항원 (CD4 플루오레세인 이소티오시아네이트 및 CD8 알로피코시아닌 0.25 μg/ml (파밍겐, 벡턴, 디킨슨; Pharmingen, Becton Dickinson)에 대한 염색으로 표지된다. 세척 후, 얼음 상에서 20분 동안, 세포는 사이토픽스/사이토펌(Cytofix/Cytoperm)으로 투과되고 나서, 피코에리트린 컨쥬게이트 항-IFNγ (0.4 μg/ml) 또는 항-TNFcc (0.8 μg/ml) 항체 (파밍겐, 벡턴, 디킨슨; Pharmingen, Becton Dickinson)로 염색된다. 세포는 그 후,

세척, 고정 및 PBS 1% FCS에 재현탁되고 FACScan 유세포 분석기(flow cytometer)로 시험되며 세포 퀘스트 소프트웨어(cell Quest software)를 이용하여 분석된다. 대신에, FACS Canto (벡턴 디킨슨; Becton Dickinson)가 사용될 수 있다. 이에 제한되는 것은 아니나, IL-12 및 IL-4를 포함하는 다른 사이토카인이 TH1 또는 TH2 아집단을 측정하기 위하여 분석될 수 있다. T 세포의 폭넓게 분석할 수 있도록 하는 사이토카인 패널은 IL-12, IFNg, IL-4, IL-10 및 IL-17을 측정할 수 있다. $CD4^+$, $CXCR5^+$, $ICOS^+$ 세포로서, 여포성 보조 T 세포가 측정될 수 있다. $CD19^+$ 및 $B220^+$ 세포로서 B 세포가 측정될 수 있다. T 세포에서 IL-21은 B 세포 활성화 및 항체의 친화성 성숙과 관련되어야하므로, 이뿐만 아니라 연구에 사용될 수 있다. IFNγ, IL-4 (BD 바이오사이언스) IL-12, IL-10, IL-17 (R&D 시스템), 및 IL-21 항체 (R&D 시스템)의 프로파일링의 대체로서, ELISPOT 또한 사용될 수 있다. ICS는 실질적으로 다른 항원 또는 에피토프에 반응하는 CD8 또는 CD4 T 세포의 %를 프로파일한다. Treg를 포함하여 다른 세포 아집단이 분석될 수 있다. 대부분 Tregs의 표면 마커로서, 사이토크롬 표지된 CD25 단일클론 항체가 사용될 수 있다. 이에 대신하여, BD 바이오사이언스의 사이토크롬 표지된 인간 FoxP3 단일클론 항체 클론 259D/C7가 투과 후 세포를 염색하여 Treg 세포의 % 및 그들의 상태를 측정하기 위하여 사용된다. IL-10 또한 분석될 수 있다.

[0050] NetMHCpan은 HLA-A 및 -B에 결합하는 펩타이드의 정량적 예측을 위한 생물정보적 방법이다(닐센; Nielsen M 2007). 공통 에피토프 예측 접근법 또한 개발되어 왔다(모와치; Mouaftsi M 2006). 이 방법들은 항원에 대한 모든 잠재적 MHC I 에피토프를 분류하고 상위 1%의 펩타이드를 등급화하는데 사용되어 에피토프를 예측할 수 있다. 이 예측된 에피토프들은 그 후 9-10 머(mer) 펩타이드로서 합성되고 시험된다(예를 들어, 환자 PBMCs에 대하여 또는 관심있는 HLA 타입의 유전자가 도입된 마우스에서).

[0051] 특정 MHC (예를 들어, HLA A A2)를 갖는 테트라머가 8 머 펩타이드 에피토프 (MHC 클래스 I의 경우 및 MHC 클래스 II의 경우 15 머 펩타이드 에피토프)와 함께 합성된다. 배양된 T 세포는, 20 분 동안 실온에서 1/200 희석된 테트라머로 염색된다; 그 후 항 CD8 항체가 가해지고 추가로 30분 동안 염색된다. 그 후 세포는 세척되고, FACS 칼리버(Calibur)(BD 바이오사이언스) 상에서 100,000개가 얻어지며 플로우조 소프트웨어(Flowjo software)로 분석된다 (트리 스타; Tree Star).

[0052] 요법에 뒤이어, 요법이 면역 반응을 성공적으로 재균형화 하였는지 확정하기 위하여, 환자는, 준우성 항원 또는 에피토프에 대한 반응에서, 내성 또는 체액성 또는 세포성 면역 반응에 대한 분석에 의해, 재-프로파일링된다.

[0053] C. 면역 반응의 재균형화(rebalancing)

[0054] 본 발명의 한 구체예에서, 면역 반응은, 이 T 세포들을 환자에게 주입(주입) 또는 투여(administration)한 다음에, 엑스 비보에서, 준우성 항원 또는 항원 상의 준우성 에피토프에 대한 환자의 T 세포를 성장함에 의하여 재균형화될 수 있다. 준우성 항원 또는 에피토프에 대한 T 세포는, 조직 배양, 엑스 비보(ex vivo)에서(환자의 면역조절 환경으로부터 떠나서) 성장한다. 이전의 우성 세포를 압도할 만큼 세포가 충분히 성장한 후, 세포는 환자에게 재-주입(re-infused)되어 세포의 균형을 왜곡시키고 우세 체계를 치료적으로 전환한다. 더욱 바람직한 구체예에서, 요법으로서 새롭게(de novo) 도입된 T 세포의 수는 항원, 감염 물질, 종양 또는 장기에 반응하는 T 세포의 5%보다 많다. 비율은 내인성 T 세포의 수를 감소시키는 조절제(conditioning agents)로 환자를 전처치함에 의해서(즉, 화학요법) 주입된 세포를 선호하도록 추가로 왜곡될 수 있다.

[0055] 본 발명은 조직 배양에서, 준우성 항원에 대한 T 세포의 성장을 최적화하는 방법과 관련된다. 한 구체예에서, 세포는 우성 항원의 부재 하에서 성장한다. 이는 우성 항원에 노출된 적 없는 전문적(professional) 항원 제시 세포의 선택 및 우성 에피토프 또는 프로세스되는 항원의 능력을 제한하는 다른 성분을 제거하도록 하는 항원의 수정에 의해 달성될 수 있다.

[0056] 치료적 방법은 풍부하고, 준우성 항원/ 에피토프에 이상적으로 완전히 반응하는 T 세포를 필요로 하기 때문에, 이와 같은 T 세포의 성장을 위한 효율적인 방법이 중요하다. 우성 에피토프 및 항원에 대한 T 세포의 성장은 이 비율을 왜곡시켜 충분히 특이적인 세포를 생성하는데 필요한 배양 시간을 증가시킨다. 게다가, 재주입 뒤에, 우성 에피토프에 대하여 성장하는 세포들은 적절한 비율의 획득을 저지하도록 작용한다. 따라서, 특히 우성 항원 또는 에피토프의 도입을 제한하는 T 세포 배양 방법이 개발되어 왔다. 예를 들어, 모든 종양에 대하여, 상기 방법이 넓게 적용 가능한 반면, 상기 방법은 EBV 형질전환된 B 세포 (EBV 우성 항원/에피토프를 발현하는)를 사용

하지 않기 때문에, EBV 악성종양에 대하여 확실한 장점을 가진다. 그것은 또한 준우성 항원/에피토프에 반응하는 상당한 %의 CTL이 세포에 투여되는 경우 더욱 설득력 있다.

[0057] 인 비트로에서, 환자의 말초 혈액 단핵 세포 (PBMCs)로부터 단핵세포-유래 수지상 세포가 생성된다. 바람직한 구체예에서, 조직 배양 플라스크에서, 2 시간 동안의 PBMCs 플레이팅은 단핵세포의 부착을 가능하게 한다. 다른 구체예에서, $CD14^+$ 자성 비드를 사용하여 PBMC로부터 수지상 세포를 분리할 수 있다 (밀리텐야 바이오텍, 오번;Miltenyi Biotec, Auburn, CA). 이때, 부착하지 않은 세포는 제거되고 T 세포의 원천으로서 후에 제공될 때까지 -80으로 동결된다. 인터루킨 4 (IL-4) 및 과립-대식세포 콜로니 자극성 인자 (GM-CSF)로의 부착성 단핵세포의 처치는 약 일주일 안에 미성숙 수지상 세포(immature 수지상 세포; iDCs)로 분화를 유도한다. 이후의 2일 동안의 종양 괴사 인자(tumor necrosis factor; TNF) 또는 대식세포 컨디션드 배지(conditioned media)의 처치는 iDCs를 성숙 수지상 세포로 다시 분화시킨다. 이 세포들은 그리고 나서 준우성 항원을 함유하는 펩타이드 또는 플라스미드로 2시간 동안 펄스(pulse)된 후, PBMC가 해동되고 상기 펄스된 수지상 세포에 가해진다. 몇 시간 후에, IL-2 또는 IL-15 (IL-15가 바람직하다)를 함유하는 배지에서, 세포가 모이고 재현탁되어 항원을 인지하는 T 세포의 인 비트로 확장이 발생된다. 특정 프로토콜에서, IL-7 및 IL-15가 가하여 T 세포 생존을 증가시킨다. 다른 프로토콜에서, 배지 조건이 조정되어 T 세포의 특정 아집단의 성장이 최적화된다. 예를 들어, IL-12를 가하여 TH1 세포에 분극(polarize)을 줄 수 있다. 이에 대신하여, IL- 4를 가하여 TH2세포에 분극을 줄 수 있다. 특정 프로토콜에서, IL-6을 가하여 Treg의 성장을 막을 수 있다. 자가면역 또는 장기 이식 적용에 유용한 또 다른 변경에서, 낮은 수준의 $IL\text{-}2^+$ 라파마이신을 가하여 Treg의 성장을 두드러지게 할 수 있다. 더욱 상세한 프로토콜은 다양한 실시예 및 실시예 3, 도 3에 기술된, 특정 T 세포 아집단에 대하여 세포를 분극시키는 프로토콜로 생성된 세포의 인 비보 비교에서 요약된다. 조직 배양 플라스크에서 T 세포가 성장하게 되면, 배지는 14일 및 24일에 교체되어야 한다. 그러나, 바람직한 구체예에서, 예를 들어, 그렉스(Grex; 윌슨 울프(Wilson Wolf)) 또는 하이퍼스택(hyperstack; 코닝 (Corning))과 같은 가스 투과성 바이오리액터를 사용하여 이러한 필요를 줄일 수 있다. 전통적인 방법으로는 12-24 주가 소요되는 것과 달리, 일반적으로 환자에게 투여될 충분한 양의 세포가 2 내지 6 주 이내에 생성될 수 있다.

[0058] 본 발명의 다른 구체예에서, 본 발명자들은 항원에 대한 양자(adoptive) 이동을 위한 T 세포를 개발하였다. 상기 항원은 우성 에피토프가 제거되고 준우성 에피토프에 대한 더 많은 T 세포가 생성됨을 보여준다. 이와 같은 단백질 또는 상응하는 DNA 백신을 사용하여 준우성 에피토프에 대한 폭넓은 면역 반응을 갖는 T 세포를 생성할 수 있다. 이 접근법은, 이에 제한되는 것은 아니나, EBV, 암, HIV 또는 간염을 포함하는 질환의 넓은 범위를 폭넓게 적용 가능하여 준우성 에피토프를 향한 면역반응의 균형을 달성할 수 있어야 한다. 다른 구체예에서, 항원, 또는 플라스미드/ 그를 코딩하는 재조합 백신은 환자에게 접종하여 준우성 항원에 대한 면역 반응을 새롭게(de novo) 유도하는데 사용된다. 다른 구체예에서, 준우성 항원을 접종한 뒤에 준우성 반응성 T 세포를 투여하여 반응을 증가시킬 수 있다. 또 다른 구체예에서, 접근법은 치료적으로 또는 예방적으로 사용될 수 있으며, 환자의 면역 프로파일을 확정하여 질환의 리스크를 측정하고 상기 환자는 여기에서 기술된 어떤 접근법을 이용하여 적당한 준우성 항원으로 준비될 수 있다.

[0059] 다른 구체예에서, 성장한 T 세포는 내성을 유도하여 자가면역 질환, 알러지, 염증, 장기 이식 거부, 또는 이식편대숙주 질환을 예방 또는 치료한다. 목적한 T 세포의 타입에 따라, 이에 제한되는 것은 아니나, CD8, CD4, TH1, TH2, 또는 Treg을 포함하는 관련있는 아집단이, 바람직하게 성장하거나, 또는 풍부해지도록, 배양 조건을 수정할 수 있다. 예를 들어, T 세포는 특정 성장 인자, 사이토카인, 약물, 작은 분자, 또는 다른 면역 세포의 존재 또는 부존재 하에서 자랄 수 있다. 바람직한 구체예에서, 조직 배양에서, 준우성 항원 반응성 T 세포는, 자극된 전문적 항원 제시 세포 (예를 들어, 단핵세포 유래 수지상 세포, 대식세포 또는 EBV 불멸화(immortalized) B 세포)의 존재 하에서 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC's)로부터 생성된다.

[0060] 다른 구체예에서, 준우성 에피토프를 향하도록 항원 프로세싱을 수정하기 위하여 다양한 기술이 사용된다. 본 발명의 한 구체예에서, 이는 항원의 수정에 의해 달성된다. 상기 항원의 수정은 우성 에피토프, 항원 프로세싱을 억제하는 부위를 제거하거나 또는 항원 제시 세포에 한번에 제시되는 우성 또는 준우성 에피토프의 수를 제한한다. 이 수정들은 인지된 준우성 에피토프의 반응 및 다양성을 증가시킨다(실시예 1, 도 5). 다른 구체예에서, 수정된 LMP1, LMP 2 및 EBNA-1 서열은 아데노바이러스 또는 백시니아 바이러스와 같은 바이러스 벡터를 이용하여 APC로 이동될 수 있다. 다른 항원 (LMP1 및 EBNA-1)의 경우, 안좋은 항원 프로세싱을 이끄는 단백질의 부위의 제거는 그 항원상의 준우성 에피토프에 대한 면역반응을 매우 향상시킨다(실시예 1, 도 6). 수정된 LMP1, LMP2 및 EBNA-1 서열은 펩타이드, 단백질, 플라스미드 또는 아데노바이러스 또는 백시니아와 같은 바이러

스 벡터를 이용하여 APC로 이동될 수 있다.

[0061] 다른 구체예에서, CTL의 생성 동안 APC 및 항원에 프로테아좀 길항제가 가하여 인지된 준우성 에피토프의 수를 증가시키고 준우성 항원에 대한 반응을 강화할 수도 있다(실시예 2, 도 7). 다른 메커니즘을 갖는 많은 이용 가능한 프로테아좀 길항제가 있다(예를 들어, 보르테조밉, 클리오퀴놀, 락타시스틴, 에폭소미신(epoxomycin), MG-132, MLN9708, 카르필조밉(carfilzomib) (PR-171)).

[0062] 다른 구체예에서, 항원은 준우성 결정요인에 대한 반응에 관련된 다양한 이소타입을 갖는 항체와 복합체로 투여될 수도 있다(실시예 3, 도 13). 항원은 목적한 T 세포 에피토프 측면의(flanking) 항체 결합 결정요인과 함께 주사(injection)되어 전문적인(professional) 항원 제시 세포 및 에피토프 측면(flanking)에 대한 직접적인 항원 프로세싱(processing)을 타겟으로 한다.

[0063] 본 발명의 다른 구체예에서, 준우성 에피토프 또는 항원을 함유하는 플라스미드를 사용하여 T 세포를 생성한다. T 세포는, 투여되거나, IFNγ, IL-21 또는 다른 사이토카인과 조합하여 다양한 투여 경로에 의해 환자에게 직접적으로 투여되거나, 또는 수지상 세포 상에 펄스(pulse)되어 준우성 항원에 대한 반응을 유도한다. T 세포 자극 전에, IFN-감마 또는 다른 사이토카인이 유도되어 준우성 에피토프에 대한 T 세포 반응성(responsiveness)이 증가하고 면역우세 체계가 수정될 수도 있다.

[0064] 다른 구체예에서, 투여의 경로가 수정되어 면역우세 체계가 변경될 수도 있다. 백시니아 반응의 투여경로는 우성 결정요인의 우성 정도를 확정한다. 복강 내 투여되는 경우에는, 우성 결정요인이, 피내 투여의 경우에 있어서의 절반과는 달리 반응의 1/4만을 차지하는 것으로 알려졌다(샤키 DC 외. 2006, 샤키 DC 외 2005). 실시예 3, 도 11에서 보여주는 바와 같이,IP 또는 IV 경로보다, IM 경로에 의한 항원의 투여는 준우성 에피토프에 대한 강한 반응 및 더 넓은 반응을 발생시킨다. 따라서, 면역우세 체계를 수정하기 위하여 발명자가 청구하는 또 하나의 인 비보 메커니즘은 투여 경로의 수정이다. 바람직한 구체예에서, 배양된 T 세포는 피내 투여에 의해 전달된다. 다른 APCs (예를 들어, 대식세포, 수지상 세포)를 타겟으로 함에 따라, 투여 경로는 면역우세 체계를 변화시킨다(실시예 3, 도 12).

[0065] 바람직한 구체예에서, 항원은 그들 상에 준우성 에피토프를 가지는 바이러스 항원, 특히 잠복 바이러스 항원 또는 만성 바이러스 항원이다. 예를 들어, 바이러스 항원은 다음 군으로부터 선택되는 바이러스로부터 유래한다: EBV, HSV, VZV, B형 간염 및 C, HIV, 및 HTLV. 바이러스 항원은, 예를 들어, EBV LMP1, LMP2, EBNA-1, HPV E6, 또는 HPV E7이다. 예를 들어, 바이러스 항원은 EBV, HSV, VZV, B형 간염 및 C, HIV, 및 HTLV, CMV, RSV, 또는 인플루엔자와 관련된다. 다른 구체예에서, 항원은 다른 만성 및 잠복 감염 물질 상의 항원이다. 예를 들어, 감염 물질은, 박테리아, 곰팡이, 기생충, 또는 프리온과 관련된다. 또 다른 구체예에서, 항원은 종양 관련 항원, 종양 특이성 항원, 암 줄기 세포 또는 전이와 관련된 항원을 포함하는 종양항원이나 이에 제한되는 것은 아니다. 다른 구체예에서, 항원은 자가면역, 알러지, 염증 또는 장기 이식 거부 또는 이식편대숙주 질환과 관련된다.

[0066] 한 구체예에서, 환자의 면역우세 체계는, 환자 샘플에서의 우성 항원 또는 에피토프 및 준우성 항원 또는 에피토프의 동정, 준우성 항원 또는 에피토프를 인지할 수 있는 T 세포의 배양, 및 환자에게 유효수의 T 세포를 처치함에 의해서 변경된다.

[0067] 한 구체예에서, 환자의 면역우세 체계는, 환자 샘플에서의 적어도 하나의 준우성 항원 또는 에피토프의 동정, 준우성 항원 또는 에피토프를 인지할 수 있는 T 세포의 배양, 및 환자에게 유효수의 T 세포를 처치하여 치료적 이점을 제공함에 의하여 변경된다.

[0068] 다른 구체예에서, T 세포는 반응성 T 세포이다. 환자에게 유효수의 T 세포를 처치하여 환자의 면역우세 체계를 변경함으로써, 환자 내에서 세포독성 면역 반응을 유도하여 감염 또는 암의 치료 또는 예방한다. 감염은, 예를 들어, 박테리아, 바이러스, 기생충, 또는 프리온 감염이다.

[0069] 본 발명의 어떤 방법에 있어서, 질환, 감염, 암, 또는 의학적 상태의 치료 또는 예방은 상기 질환, 감염, 암, 또는 의학적 상태의 적어도 하나의 증상의 완화 또는 개선을 포함한다.

[0070] D. 치료적 방법

[0071] 1. 암

[0072] 우성 및 준우성 항원의 면역 프로파일링의 임상적 사용의 작용 흐름(work flow)

[0073] 단계 1: 종양 생검 (면역조직화학) 또는 혈액 (IHC, FACS 또는 Elisa) 항원 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10

[0074] 결과: 종양 상의 항원 1, 2 & 6, 패널에 없는 다른 것들

[0075] 단계 2: 면역 반응 프로파일링

[0076] 체액성 프로파일 세포성 프로파일

[0077] 혈청 상의 ELISA 각 항원으로 자극된 PBMCs 상의 Elispot 또는 ICS (적어도 IFNg에 대하여, 또한 T 세포 아집단을 분 석하기 위한 IL-10, IL-4 및 IL-12, IL-21에 대하 여)

[0078] 결과: 항원 1 강한 반응 (우성); 항원 2 & 6 반응 없음/ 약한(Modest) 반응 (준우성)

[0079] 단계 3: 인 비트로에서 준우성 항원에 대한 T 세포 성장 (CD8 및 CD4)

[0080] 결과: 항원 2 & 6에 반응하는 T 세포

[0081] 단계 4 (요법이 잘 확립되면 선택): 세포성 면역 프로파일링 (Elispot 또는 ICS)을 이용하여, T 세포의 >5%가 준우성 항원에 대한 반응으로 성장함을 확인

[0082] 결과: 항원 2 & 6에 대하여 T 세포의 25%가 반응

[0083] 준우성 항원에 대하여 적어도 T 세포의 5%가 반응을 제공, 단계 5로 진행

[0084] 단계 5: 사전 조절제(pior conditioning)(예를 들어, 사이클로포스파미드)유무에 따라, 환자에게 세포를 IV 주입(Infuse)

[0085] 단계 6 (요법이 잘 확립되면 선택될 수도 있다): 주입 2-3주 후 혈액으로부터 PBMC를 분리 및 면역 반응 프로파일

[0086] 결과: 세포 프로파일 항원 1 반응 없음/ 약한(Moderate) 반응; 항원 2 & 항원의 적어도 하나에 대한 강한 반응 (우성)

[0087] 단계 7: 임상적 반응 평가

[0088] RECIST (CR, PR); 생존 또는 무진행 생존(Progression Free Survival)

[0089] 결과: 향상된 반응 속도 및 생존

[0090] 실시예 4에서, 이 전신적 방법을 사용하여 흑색종을 치료한다. 실시예 5에서, 다중플라스미드 LMP2로 상기 방법을 적용하여, 림프종을 치료한다. 사실상, T 세포 요법은 림프종의 자연 경과(natural course)를 재발 완화형(relapsing remitting)으로부터 지속적인 관해(durable remission)로 변화시킨다. 이 항원뿐 아니라 제거된 LMP1 및 EBNA-1 또한 EBV 항원을 포함하는 다른 종양을 치료할 수 있다. 상기 종양은 다른 것들 중에서 비인두암종, 버키트 림프종, CLL, 호지킨스, 및 몇몇의 소화기 암(gatric cancer)을 포함한다. 실시예 3에서, 유사한 방법을 사용하여 간세포 암종을 치료한다. 이 실시예들은 본 발명에 참조로써 포함되고 준우성 항원으로의 면역 반응의 재균형화가 암의 모든 형태에 대하여 폭넓게 적용될 수 있음을 설명한다.

[0091] 2. 팬 종양(pan tumor) 타입 요법을 제작하기 위한 종양 상의 다수 준우성 항원의 일반적인 용도

[0092] 다른 구체예에서, 본 발명자들은 특정 타입의 종양에 대하여 충분한 준우성 항원이 동정될 수 있으면, 그 타입의 종양은, 환자를 테스트할 필요 없이, 다수의 준우성 항원에 대한 T 세포로 치료될 수 있음을 제안한다. 유사하게, 동일한 종양 상의 다수 항원의 타겟팅은, 예를 들어, 병용 화학요법과 같이, 저항성(resistance)을 감소시킨다. 예를 들어, 림프종의 40%에 있는 준우성 항원 EBV LMP2을 타겟으로 하고 생존하는 (림프종의 50%에 있는) 단일 T 세포 주를 개발하는 능력은 이 2가지 항원들에 대해 특이적인 T 세포 주로 림프종의 약 80%를 타겟하는 것을 허용할 것이다. 팬-림프종 생성물(Pan-lymphoma product)의 임상 시험은 실시예 5에서 기술된다. 3년까지, 팬 림프종 생성물을 처치한 환자의 무진행 생존은 요법 전에 시험된 항원 생성물과 비교할 만하다. 이는 병용 화학요법에서와 같이, 동일한 종양 상의 다수 항원에 대한 CTL의 반응이 탈출의 가능성을 감소시켰기 때문일 수 있다. 단일 T 세포 생성물로 모든 림프종을 치료하는 능력(단일 항원에 대해 양성인 아집단만을 처치할 필요가 없는 것) 은 새로운 생성물 컨셉이다. 본 발명의 다른 구체예에서, 본 발명자들은 또한, 사실상 모든 암을 위한, 유사 팬-암 생성물(Pan-cancer product)을 청구한다.

[0093] 3. 만성 감염

[0094] 간염 및 간세포 암종

[0095] 만성 간염 환자에서, HBs 항체는 생성되지 않지만, HBc 항체는 생성된다(가넴(Ganem) D 외 2004). 급성 간염 환자에서는, 두 가지 항원에 대한 항체가 생성된다. 성인은 그 당시 바이러스의 >90%가 급성이 분명한 반면에 신생아(neonates)의 >90% 및 1-5 세의 어린이의 30%는 만성 형태로 걸린다. 간세포 암종의 95%가 B형 간염 바이러스의 만성 감염과 관련된다. HBsAg는 때로 HCC의 세포 표면에 있다. 이들 현상을 고려하여, 본 발명자들은 간염 및 간세포 암종 환자에서, HBs가 준우성 인지 여부 및 T 세포의 성장이, 준우성 항원에 대한 면역 반응을 재균형화하고 치료할 수 있는 HBs 항원에 대한 CTLs을 생성할 수 있는지 연구하기로 결정했다.

[0096] 이 발견에 기초하여, 우리는, 간염 동물 모델에서, 궁극적으로 HBV 관련된 HCC 환자에서, HBs Ag에 대하여 성장한 CTL을 투여하여 만성 간염을 치료하였다. 동물 모델에서, HBVtgRAG 세포가 투여되었고 시험되었다. 대조 세포를 받은 동물에서, 만성 간염이 발병하였다. 또한, 동물이 간염에 걸리고 준우성 항원에 대한 CTL를 받았을 때, 동물은 급성 간염에 걸렸으나, 간염 바이러스는 깨끗했다(실시예 3, 도 9-11).

[0097] 고무적인 동물 실험 데이터를 고려할 때, T 세포 재균형 요법으로 간염 환자는 치료되었다.

[0098] 우성 및 준우성 항원의 면역 프로파일링의 임상적 사용의 작용 흐름(work flow)

[0099] 단계 1: 간염 표면 항원 및 간염 코어 항원 면역 반응 프로파일링

[0100] 체액성 프로파일 세포성 프로파일

[0101] 혈청 상의 ELISA 항원으로 자극된 PBMCs 상의 Elispot 또는 ICS (적어도 IFNg에 대하여, 또한 T 세포 아집단을 분석하기 위한 IL-10, IL-4 및 IL-12, IL-21에 대하여)

[0102] 결과: Hbc 강한 반응 (우성); Hbs 반응 없음/ 약한(Modest) 반응(준우성)

[0103] 단계 2: 인 비트로에서 준우성 항원에 대한 T 세포의 성장 (CD8 및 CD4)

[0104] 결과: HBs 항원에 대하여 반응하는 T 세포

[0105] 단계 3 (요법이 잘 확립되면 선택): 세포성 면역 프로파일링 (Elispot 또는 ICS)을 이용하여, >5%의 T 세포가 준우성 항원에 대한 반응으로 성장함을 확인

[0106] 결과: T 세포의 25%가 HBs 항원에 반응

[0107] 준우성 항원에 대하여 적어도 T 세포의 5% 가 반응을 제공, 단계 4로 진행

[0108] 단계 4: 사전 조절제(pior conditioning)(예를 들어, 사이클로포스파미드)유무에 따라, 환자에게 세포를 IV 주입(Infuse)

[0109] 단계 5 (요법이 잘 확립되면 선택될 수도 있다): 주입 2-3주 후 혈액으로부터PBMC를 분리 및 면역 반응 프로파일

[0110] 결과: 세포 프로파일 HBc 반응 없음/약한(Moderate) 반응; HBs 강한 반응 (우성)

[0111] 단계 6: 임상적 반응 평가

[0112] 결과: 감염의 소실

[0113] 5 환자들에서 HBV 및 HCC로 면역 프로파일링이 수행되었다. 예상된 대로, ELISA는 B형 간염 표면 항원(HBs Ag)이 아닌 B형 간염 코어 항원(HBc Ag)에 대한 항체의 높은 역가를 설명한다(실시예 3, 도 17). 그러나, PBMC가 수지상 세포로 유도되고, B형 간염 코어 항원 (HBc Ag) 및 B형 간염 표면 항원 (HBs Ag)으로 펄스되며 동일한 환자로부터의 PBMC로부터 CTL을 성장하기 위해 사용된 경우, 놀랄만한 결과가 관찰되었다. Elispot상의 IFN 생성 T 세포의 빈도(frequency)에 의해, 체계가 관찰되었다: 항원-없음 (10 sfc)<HBsAg(15 sfc)<HBcAg(45 sfc) (실시예 3, 도 14). 이는 간염 코어에 비하여 B형 간염 표면 항원이 실제로 준우성임을 의미한다. 또한, Elispot (실시예 3, 도 14) 및 ICS (실시예 3, 도 15)에 의하여, HBs의 하나의 에피토프 (FLL)가 우성으로 나

타났다. 이 에피토프를 함유하는 펩타이드는 환자로부터 세포를 성장하기 위해 사용되는 펩믹스(pepmix)로부터 제외되었다.

[0114] HCC 환자에서, 준우성 HBs (실시예 3, 도 16)에 대한 T 세포를 받은 환자의 3/5은 HBs 항원이 없었고 간 기능 검사(Liver Function Tests)에서(실시예 3, 도 17 & 19), 알라닌 전이효소(alanine transaminase; ALT)의 일시적 상승(transient elevation) 다음의 HCC에 대한 CR을 설명하였다. 투여 2 주 후, 그 환자들의 PBMC가 시험되었을 때, HBc 및 HBs의 이전의 준우성 에피토프에 비하여, HBs에 대하여 우성 반응이 나타났고 이는 환자의 면역우세 체계가 재균형화되었음을 의미한다(실시예 3, 도 18). 요법 및 면역우세 체계의 전환 결과는 치료적 이점을 제공하였다(실시예 3, 도 17 & 19).

[0115] 따라서, 준우성 항원에 대한 T 세포 양자 면역요법을 이용하여 만성 바이러스를 근절하고 존재하는 암을 치료할 수 있다. 또한, 준우성 항원 및 에피토프에 대한 T 세포의 직접적인 생성에 대한 면역 프로파일링은, 다수의 질환에서, 신규의 치료적 길을 열었다.

[0116] 사실상, 바이러스, 박테리아, 곰팡이, 프리온, 기생충 또는 다른 감염성 질환 모두는, 이에 제한되는 것은 아니나, C형 간염 바이러스 및 HIV 바이러스를 포함하여 치료될 수 있다. 다른 만성 감염성 질환 또한 재균형화를 이용하여 치료될 수 있다. 예를 들어, 많은 환자에서, 마이코박테리아 투베르쿨로시스는 만성 감염이지만, 면역계가 억제되었을 때는 재활성(reactivate)된다. 그의 휴면 상태(dormant state)에서, 보통 폐에서, 육아종에 의해 함유된다. 마이코박테리아 파고솜(phagosome)의 프로테옴에 대한 최근의 연구는 MTB는 대식세포에서 보다 수지상 세포에서 더 큰 정도로 항원 제시를 억제함을 가리킨다(리(Li) 외. 2011). 이 때문에, 본 발명자들은 준우성 에피토프에 반응하도록 면역계를 재균형화하는 것은 사실상 모든 암 또는 감염성 질환에 대한 폭넓은 치료적 접근법임을 제안한다.

[0117] 4. 자가면역

[0118] 역학 연구는 환자가 다발성 경화증에 걸릴 위험도는 EBV 항체 역가와 밀접한 연관성이 있음을 설명한다. 그들이 EBV로 감염되기 전에 수십만의 사람을 조사하고 최초 감염 후 몇 년 동안 그들을 추적조사함에 의해, 아세리오(Ascherio) 외는 MS에 걸린 305 환자를 연구할 수 있었다. 그들의 위험도는 EBV 감염 다음에 급속히 증가하였다(아세리오 A 외. 2010). EBV 보균자인 건강한 사람과 비교했을 때, 다른 EBV 항원과 비교하여 MS 환자에서 EBNA-1 400-641에 반응하는 기억 CTL이 증가하였다(루네만(Lunemann) JD 외. 2006). 자가-항원의 상호 인지에 의해 또는 바이스탠더 메커니즘(bystander mechanism)에 의해 자가면역을 유지할 수 있는 NA-1 특이성 Th1 세포가 나타났다. 또한, 트랜스제닉 마우스 연구는 B 세포 발현 LMP2a는 정상 내성 체크포인트를 우회하고 자가면역 질환의 발병을 증가시킴을 시사한다(스완슨-멍거슨(Swanson-Mungerson) M 2007). 이와 같이, 우리가 EBV 및 EBV 관련 암의 치료제로서 EBV 준우성 에피토프에 반응하는 T 세포를 연구하는 동안, EBV 준우성 에피토프에 반응하는 T 세포는 또한 자가면역에서 균형을 회복시키는데 유용할 수도 있다. 본 발명자들은 EBV 잠복 항원(EBNA-1, LMP1 및 LMP2)에 반응하는 T 세포를 성장 및 도입함에 의해, EBV 관련 자가면역 질환에서 면역 반응이 재균형화되고, 내성이 회복될 수 있음을 제안한다. 다른 바이러스와 관련되는 다른 자가면역 질환도 동일할 것이다. 예를 들어, 콕사키바이러스 B3와 같은 피코르나바이러스는 심근염/ 확장 심근병증, 제1형 당뇨, 뇌염, 근염, 고환염, 간염을 일으킨다.

[0119] 또 다른 구체예에서, 장기 특이적 자가면역이 생긴 장기와 관련된 항원에 대한 T 세포가 생성될 수 있다. 면역우세 현상은 언젠가 프로세싱된 모든 항원으로부터의 에피토프와 연관되기 때문에, 자가면역 반응 당시 반응을 일으키는 정확한 자가항원을 알 필요가 완전히 요구되지는 않는다. 예를 들어, 콜라겐의 준우성 에피토프에 반응하는 T 세포를 생성시키고 류마티스 관절염 환자의 염증 있는 관절로 도입하면, 진행중인 면역 반응이 재균형화되고 및 내성이 회복될 것이다. 활성 T 세포를 염증 부위로 도입하는 것이 유익할 것이라는 생각은 역발상이고 예측하지 못한 것이나, 우리의 작용 모델에 따르면, 그 부위에서 면역 반응의 재균형화는 비정상적인 면역 반응에 대한 적당한 조절을 회복시킬 것이다. 자가면역 질환의 치료는 본 발명의 다른 구체예이다.

[0120] 5. 인 비트로 Treg 확장

[0121] 면역 조절의 하나의 원리는 T 세포의 다른 아집단에 대한 Tregs의 균형이다. 본 발명의 다른 구체예는 Treg 세포를 향하도록 엑스 비보 T 세포 성장을 분극시킨다. 이 경우, 면역 반응을 재균형화하는 다른 방식으로서, 준우성 에피토프를 타겟으로하는 대신, 우성 에피토프에 대한 Treg가 생성된다. 한 구체예에서, 그렇게 생성된 Treg T 세포는 단독의 치료적 제품으로 사용된다. 다른 구체예에서, Treg 아집단은 준우성 에피토프 또는 준우성 항원에 대하여 성장한 다른 아집단으로부터의 T 세포와 조합하여 사용된다. 항-CD23 및 항- CD28 코팅된 비드로의 확장에 이어서, FACS 분류장치를 이용한 비 항원 특이적 방식으로 Tregs가 확장된 적은 있지만(퍼트넘(Putnam) 외. 2009), 현재까지 누구도 양자 면역요법을 위하여 항원 특이적 방식으로 Tregs를 확장한 적은 없었다. 여기에서 기술된 방법은, 자가면역 질환, 이식편대숙주 질환 또는 이식 거부에서 관찰되는 면역 반응에서, 다른 항원, 특히 우성인 항원에 대해 Tregs 특이성의 확립에 유용한 방법이다.

[0122] Tregs는 CD4-PerCP(SK3), CD127-PE (ML-7R-M21), CD25 APC (2A3), CD45RA-PE.Cy7 (L48) 및 CD45RO-PE.Cy5 (UCHLI)를 사용한 GMP 클린 룸에서 무균 조작을 이용하여 FACS 분류 장치 (BD FACS Aria II high speed 세포 sorter)에 의해, 자가면역 또는 이식 환자의 PBMC로부터 분리되었다. $CD4^{+}CD127^{lo/-}CD25^{+}$ 및 $CD4^{+}CD127^{lo/-}$ T 세포는 10% 인간 가열-비활성화되어 모아진 AB 혈청(밸리, 바이오메디컬, 윈체스터, VA)을 함유하는 3㎖ X-Vivo 15 배지 (론자, 워커스빌, MD)에서 분류 및 수집되었다. 이에 대신하여, Tregs는 동일한 항체로 코팅된 자성 비드(밀리텐야, 바이오텍, 오번, CA)를 이용하여 분리될 수 있다. 이 세포들은 24 웰 플레이트(코스타, 캠브리지, MA)에서 웰당 $2.5x10^{5}$ Tregs로 were 플레이트되었고, 수지상 세포를 함유하는 각 웰은 1:5의 Treg:APC 비율에서 우성항원으로 전-펄스(pre-pulsed)된 PBMC (상기의 T 세포 자극 부분에서 기술됨)로부터 제조되었다. 18 시간 인큐베이션 후, 세포는 배양 내(in 배양)에서, 1일부터 7일까지 라파마이신 (10Ong/ml; 와이어스, 매디슨, NJ)을 받았다. 2일에, 배양 볼륨이 2배로 되었고 300 유니트/ml IL-2가 가해졌다(카이런, 에머리빌, CA). 세포는 재현탁되고 2, 5, 7, 9 및 12일에 신선한 배지 및 IL-2가 가해졌다. 9일에, 세포는 수지상 세포가 펄스된 펩타이드로 재자극되었다. 이에 대신하여, 이 두 번째 자극을 위하여 항-CD23/항-CD28 코팅된 마이크로비드 (인비트로겐, 칼스배드, CA)가 사용될 수 있다. 또한, 밀폐된 시스템에서, 가스 투과성 바이오리액터 (그렉스;Grex와 같은)를 사용하여 더 적은 조작으로 이 세포 성장을 수행하고, 성장 속도(kinetics)를 향상시킬 수 있다. 다른 변형에서, 코팅된 비드로 자극할 때, IL-10이 가해져, Treg를 높은 수준의 IL-10을 분비하고 TH1 및 Th2 반응을 조절하는 Tregl로 추가로 분화시킨다.

[0123] 자가면역에서 우성 및 준우성 항원의 면역 프로파일링의 임상적 사용의 작용 흐름(work flow)

[0124] 단계 1 : 면역 반응 프로파일링

[0125] 체액성 프로파일 세포성 프로파일

[0126] 혈청 상의 ELISA 각 항원으로 자극된 PBMCs 상의 Elispot 또는 ICS(적어도 IFNγ에 대하여, 또한 T 세포 아집단을 분석하기 위한 IL-10, IL-4 및 IL-12, IL-21에 대하 여)

[0127] 결과: 항원 1 강한 반응 (우성); 항원 2 반응 없음/ 약한(Modest) 반응(준우성)

[0128] 단계 2: 인 비트로에서 준우성 항원에 대한 T 세포의 성장 (CD8 및 CD4); 인 비트로에서 우성 항원에 대한 Treg의 성장

[0129] 결과: 준우성 항원에 대하여 반응하는 T 세포; 우성 항원에 대하여 반응하는 Treg

[0130] 단계 3 (요법이 잘 확립되면 선택): 세포성 면역 프로파일링 (Elispot 또는 ICS)을 이용하여, >5%의 T 세포가

준우성 항원에 대한 반응으로 성장하고 Treg가 우성 항원에 대한 반응으로 성장함을 확인

[0131] 결과: T 세포의 25%가 항원에 반응

[0132] 준우성 항원에 대하여 적어도 T 세포의 5% 가 반응을 제공하고/하거나 우성 항원에 대하여 적어도 Treg 세포의 5% 가 반응을 제공, 단계 4로 진행

[0133] 단계 4: 사전 조절(pior conditioning)(예를 들어, 사이클로포스파미드)유무에 따라, 환자에게 세포를 IV 주입(Infuse)

[0134] 단계 5 (요법이 잘 확립되면 선택될 수도 있다): 주입 2-3주 후 혈액으로부터 PBMC를 분리 및 면역 반응 프로파일

[0135] 결과: 세포 프로파일 항원 1 반응 없음/약한(Moderate) 이펙터 반응; 항원 2 & 강한 Treg 반응 (우성)

[0136] 단계 6: 임상적 반응 평가

[0137] 자가면역에서 (MS-갑작스런 악화(flare ups) 감소, 류마티스성 관절염-관절의 부기 감소, 천식-공격 횟수 감소, 조기 1형 당뇨병(Early 타입 I diabetes), 췌장은 유지), 이식에서-장기 거부 속도 및 이식편대숙주 질환 감소

[0138] 결과: 임상적 결과가 호전됨

[0139] 6. 자가면역 또는 이식에서 우성 항원에 대한 Tregs의 투여

[0140] 또 다른 구체예에서, 우성 항원에 대한 Treg는 그 자체로 준우성 항원에 반응성이 있는 TH1, TH2 또는 CTL 아집단 상의 T 세포와 병용될 수 있다. 이와 같은 병용은 준우성 에피토프를 향하도록 반응의 균형을 더욱 완전하게 전환한다. 본 발명자들은 관절염에서 T 세포의 두 가지 타입 사이의 시너지를 설명한다(실시예 6).

[0141] 7. 이식(Transplant)

[0142] 다른 구체예에서, Treg는 다른 건강한 공여체로부터의 수지상 세포(또는 방사선 조사된 PBMC)를 이용한 건강한 공여체의 PBMC로부터 상기의 Treg 배양 조건을 이용하여 성장된다. 이 방식에서, 각 MHC에 대하여 동종반응성(alloreactive) Treg 주가 확립되고 저장된다. 위에서 언급한 바와 같이, 20 내지 50의 MHC 하플로타입에 대하여 생성된 Treg 주로 MHC의 80%가 커버될 수 있다. 이들 각 주는 -80 ℃에서, 일회량(single dose aliquots)으로 동결될 수 있다. 장기 또는 BMT에서 수행되는 경우, 맞지 않는 MHC에 반응하는 $5x10^7$ 세포 $/m^2$ Treg가 또한 환자에게 이식된다. 이 방식에서, 동종이형 거부(allogeneic rejection) 또는 이식편대숙주 질환이 감소될 수 있다.

[0143] 8. 자동 면역 프로파일링 어세이 및 밀폐된 시스템의 세포 배양 장치

[0144] 가스 투과성 멤브레인 장치가 배양 기술의 바람직한 구체예이다. 멤브레인이 가스 투과성이기 때문에, 멤브레인의 표면적 및 세포가 자라는데 요구되는 배지의 용량에 의해 배양의 규모가 확정된다. 이 가스 투과성 장치들의 예는 하이퍼스택(Hyperstack; 코닝) 또는 그렉스(Grex; 윌슨 울프)를 포함한다. 이 타입의 바이오리액터의 유용한 특성의 하나는 세포 배양 과정이 연속적으로 확장된다(linearly scaleable)는 것이다. 우리 접근법의 표준화의 일부로서, 우리는 제품 세트에서 사용하기 위한 표준 $CO_2$ 인큐베이터가 있는 바이오리액터의 버전을 디자인했다. 다른 구체예에서, 우리는 자동화된 제품 시설에서 웜 룸(warm room)을 위한 표준 스택(standard stack)에 적합한 바이오리액터를 디자인했다. 자동화를 목적으로 하는 바이오리액터가 두 사이즈로 만들어졌다: 하나는 각 환자를 위하여 자기조직 유래의 세포의 성장을 위한 것이고, 두 번째 더 큰 사이즈의 버전은 동종이형의 T 세포주의 상업적 제품을 위한 것이다. 개선된 방법에서, 세포 배양 장치는 직사각형 형태로의 자동화를 위하여 표준 $CO_2$ 인큐베이터 상의 슬롯에 끼워지도록 수정된다. 플라스크의 바닥 상에 가스 투과성 멤브레인이 있기 때문에, 플라스크를 셀프(shelf)에 놓으면 가스 투과성 멤브레인이 차단된다는 상당한 이점이 있다. 플라스크를 셀프에 놓으면, 멤브레인을 향하여 더 좋은 공기 흐름이 있다. 중요한 속성은 바이오리액터의 무게를 견디게 해주는 플라스크의 측면의 플랜지이다. 한 구체예에서, 바이오리액터는 셀프 지지부에 끼워지는 스테인리스 스틸 프레임으로 설정한다. 다른 구체예에서, 그들은 플라스틱의 한 부분으로 몰딩된다. 한 구체예에서, 그들은 전체 셀프의 풋프린트(footprint)를 가진다. 다른 구체예에서, 그들은 ½, ¼ 또는 1/3 또는 1/5의 셀프을 포함한다. 바람직한 구체예에서, 인큐베이터는 뉴 브런즈윅, 포르마, 더모일렉트론, ESCO(New Brunswick, Forma, ThermoElectron, Nuaire, ESCO)에서 만들었다. 바람직한 구체예에서, 인큐베이터는 공기 또는 물 재킷(jacketed)이 되거나 다른 디자인이 될 수 있다. 또 다른 구체예에서, 그들은 웜 룸에서 금속 프레임 셀프내에 또는 플랫 상에 잘 맞는다. 다른 바람직한 구체예에서, 플랫은 움직여지고 로봇으로 처리된다. 또 다른 구체예에서, 바이오리액터는 이에 제한되는 것은 아니나, 수확 전에 세포를 현탁액으로 되돌리는 락커를 포함하는 다양한 상업적 처리 설비에 적절하다.

[0145] 각 바이오리액터는 배지, 구성성분 및 세포를 도입하기 위한 접근 포트를 갖는 폐쇄 시스템이고, 그로부터 세포를 수확하여 동결하고 질을 제어한다. 바람직한 구체예에서, 이 접근 포트들은 바이오리액터의 안과 밖의 유체 및 세포를 이동시키는 튜브이고, 캡은 바이오리액터의 바닥까지 도달하는 고체 튜브로 통합된다. 다른 구체예에서, 접근 포트는 수공으로 또는 자동화된 로봇을 이용하여, 유체 세포 또는 다른 시약을 주사 또는 제거하기 위하여 니들 또는 다른 프로브가 바이오리액터로 삽입될 수 있는 고무의 살균 시트이다. 장치는 그들을 추적하여, 각 환자 및 각 세포주가 전용 바이오리액터를 갖도록 바코드를 붙인다. 바이오리액터는 사용된 후에 버리는 일회용일 수 있다. 바이오리액터는 또한 자동화된 세포 배양에서, 이에 제한되는 것은 아니나, 스택, 트랜스포터 및 움직이는 교반기(rocking agitators)을 포함하는 표준 로봇의 자동 설비에 맞도록 크기가 변경된다. 도 31은 이와 같은 바이오리액터의 예이다.

[0146] 바이오리액터와 유사하게, 상업적 멀티플렉스 면역 프로파일링 어세이 또한 디자인되어 항체의 역가 측정의 프로세싱 및 항원의 패널에 대한 T 세포 반응을 가능하게 한다. 이를 위해, 표준 96 well 플레이트 포맷으로 사용되는 ELISpot 어세이가 적용될 수 있다. 바람직한 구체예에서, AIDELISpot 리더 (오토이뮨, 다이아그노스티카, 스트라우스버그, 독일; Autoimmun Diagnostika, Strassberg, Germany) 를 사용하여 스팟이 계수된다. 이에 대신하여, ICS 어세이를 위하여, 96 웰 플레이트가 사용하여 세포를 FACS에 넣는다. 어느 경우에서나, 각 환자는 바코드가 부착된 그들 전용의 96 웰 플레이트를 갖고, 모든 플레이트는 일회용이다. 이 상업적 어세이들과 제조 공정은 본 발명의 구체예이다.

[0147] E. 실시예

[0148] 1. 실시예 1 : EBV 잠복 감염, 림프종 및 비인두 암종

[0149] 혈액에서 항체에 의한 측정 결과, 전 세계 인구의 90%가 EBV(단핵구증 원인 바이러스)에 노출되어 있다. EBV는 B 세포에 잠복하고 그의 단백질의 대다수를 차단하며, LMP1, LMP2 및 때때로 EBNA-1의 잠복 항원을 매우 낮은 수준으로 발현한다. 이 단백질들은 약한 면역성을 가지나, 심지어 잠복 상태에서 바이러스를 유지하는데 필요하다. 그들은 대부분 B 세포로부터 유래하기 때문에, EBV 잠복 항원에 대한 림프종 테스트의 40%가 양성이다. 따라서, 양자 세포 요법에서, 이 항원들은 CTL 반응의 생성을 위한 타겟으로 제공될 수 있다. 게다가, 다른 종양(예를 들어, 소화기 암의 10%)에서와 같이, 비인두 암종 또한 EBV 잠복 항원을 발현한다. CTL을 사용하여 EBV 림프종을 치료할 수 있지만, 반복된 자극으로 EBV로 형질전환된 B 세포를 이용하는 현재의 생산 방법은 시간 소모적이고(3-6 개월) 다루기 힘들다. 게다가, LMP2에 대하여 이 방식으로 만들어진 CTL은 T 세포 배치(batches)를 생성하고, 이의 절반만이 생성 후 LMP2에 대하여 검출가능한 반응을 보인다. 본 발명자들은 이 이유가 EBV 형질전환 LCL 세포에서 EBV 단백질로부터의 우성 에피토프의 존재에 기인한 것이라고 믿었다. EBV 형질전환 LCL 세포는 50%의 시간에서 LMP2에 대한 세포보다 너무 커진 CTL을 생성한다. 큰 종양을 갖는 환자에서, 종래의 공정에 의해 CTL로 처치된 환자의 52%가 완전한 반응을 보인다. 선행기술은 LMP2에 대한 반응의 존재 또는 부존재에 관계없이 모든 CTL이 동등하다고 여긴 반면에, 본 발명자들은 이것이 변동이 심함 임상반응의 하나의 이유일지 모른다고 느꼈다. 더욱이, 본 발명의 작용 모델은 이것이 사실임을 예측하였다. 따라서, LMP2에 대한 CTL 생성 효율의 증가는 임상적으로 중요할 수도 있다.

[0150] 본 발명에서, CTL 생산의 다른 방법 또한 구현되지만, 다음의 방법이 사용되어 다음의 실험 데이터가 창출된다: 진공채혈 튜브(Vacutainer tubes)에서, 환자로부터 40 ml 내지 100 ml의 말초 혈액이 수집되었다. 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC's)는 림포프렙(Lymphoprep) (니코메드, 오슬로, 노르웨이; Nycomed, Oslo, Norway)으로 원심분리하여 분리되었다. 또한, 10% 우태아 혈청(Fetal calf serum; FCS)(5x106 세포/ml)이 있는, 2mM L 글루타민, 100 IU/ml 페니실린, 100 μg 스트렙토마이신/ ml을 포함하는 RPMI 1640 (깁코, 그랜드 아일랜드; Gibco, Grand Island, NY)에서 재현탁되고 $10^7$ 세포/웰로 6 웰 플레이트 (코스타 코프, 캠브리지; Costar Corp, Cambridge, MA)에 심어졌다. 37 ℃ 에서, 2시간 후, 비부착성 세포는 제거되고 시험 튜브에 놓여진 10% 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)이 있는 FCS에서 재현탁되었다. 그 후 드라이 아이스 상에서 동결되고-80 냉동고에 보관되었다. 6 웰 플레이트에 남아있는 부착성 세포는 50 ng의 GM-CSF 및 mL 당 1000 U의 IL-4로 보충된 RPMI + 10% FCS에서 배양되었다. 2일 및 4일에 배지의 절반이 위에서 기술한 동일한 성장 인자를 포함하는 새로운 배지로 교체되었다. 6일에, 상기 배지는 기술된 배지에 성숙을 자극하기 위하여 25%의 용량을 대식세포 컨디션드 배지가 부가된 배지로 완전히 교체되었다.

[0151] 대식세포 컨디션드 배지는 RPMI 10% FCS에서, 37 ℃에서 24시간 동안, 면역글로불린 코팅된 플레이트 (하룻밤 동안 4 ℃에서 플레이팅 및 인큐베이트, PBS에서 면역글로불린에 의해 제조)에 부착된 PBMCs에 의해 생산되었다. 상청액은 수확되고, 0.2mm 기공 크기의 멤브레인 (아크로디스크, 겔만 사이언스; Acrodisc, Gelman Sciences)을 통하여 여과되었다. 사용하기 전에, 8주까지 -20 ℃에서 보관되었다. 비부착성 세포는 2일 후에 수확되고 수지상 세포의 원천으로서 사용되었다. CD54, CD80, CD83 및 CD86을 포함하는 표면 마커에 대한 단일클론 항체로 면역형광 염색이 수행되어 수지상 세포의 질이 보장되었다(세포 +의 >50%).

[0152] 3 μg/ml의 인간 β2 마이크로글로불린이 보충된 혈청 프리 RPMI 1640에서, DC 자극제는 μg/ml(펩타이드에 대하여 50)의 농도로, 37 ℃에서 2시간 동안 단백질에 전노출(preexpose)되었다. 그들은 그 후 세척되고, IL-7 5ng/ml로 보충된 RPMI 10% FCS에서 $10^5$ 세포/2 ml 웰로 심어졌다. 20: 1의 자극제에 대한 반응물(responder)의 비율을 위하여 각 웰에 2 x$10^6$ PBMC가 가해졌다. 14 및 21일에, 20 U/ml의 IL-2가 보충된 RPMI 10% FCS에서, 수지상 세포가 로딩된 자기조직 유래의 펩타이드로 배양이 재자극되었고(및 필요에 따라, 추가의 웰로 나누어졌다).

[0153] 환자에게 처치하기 위하여 CTL의 방출 시험이 이용되었다. 여기에는 >70%의 생존력, 7일 후 박테리아 및 곰팡이에 대한 배양 음성(negative culture), 5 EU/ ml 미만의 내독소 시험, 마이코플라즈마에 대한 음성 반응, Cr 방출 어세이에서 20: 1 비율에서, 수취 림프아구(lymphoblast)의 사멸이 20% 미만, $CD19^+$ B 세포의 2% 미만, $CD14^+$ 단핵세포의 2% 미만 및 HLA 상동성이 포함된다.

[0154] 다클론 T 세포 집단이 수확되었고, 5 hr 크로뮴 방출 어세이에서 이펙터로서 사용되었다. 크로뮴 방출 어세이를

위하여, CTL 공여체의 피부 생검으로부터 섬유아세포의 단층(monolayer) 배양을 확립하였고 재조합 백시니아 바이러스 (9 cm 페트리 디시 당 $2x10^6$ 세포)에 노출시켰다. 세포는 감염 18시간 후에 수확되었고 $^{51}CrO_4$로 1시간 동안 표지하였다. 세 번 세척되고, 5 시간 크로뮴 방출 어세이에서 타겟으로 사용되었다. γ 카운터로 카운팅하기 전에, 어세이로부터의 상청액을 1% 포름알데히드에 수확하였다.

[0155] a. 실험 1 : LCL 대신에 수지상 세포 또는 활성화된 대식세포가 항원 제시 세포로 사용된 경우, 준우성 에피토프에 반응하는 T 세포의 상대적 빈도가 향상된다.

[0156] 자극제로서 3 다른 항원 제시 세포를 이용하여, 10 환자로부터 T 세포 주가 제조되었다: EBV 형질전환 림프아구성(lymphoblastoid) 세포주(LCL) 제시 및 확장; 사이토카인 확장으로 수지상 세포 (DC) 제시; 사이토카인 확장으로 IFNγ 대식세포 (MAC) 제시. 3개 각각은, 항원제시 동안, EBNA-1 (aa 90 내지 325가 결실된 EBNA-1), LMP1 (aa 1-43 및 aa 260- 315가 결실된 LMP1) 및 LMP2 (LMP2A는 2 플라스미드에서, aa 1-399를 발현하는 하나 및 aa 400-497을 발현하는 두 번째 플라스미드)의 준우성 에피토프를 발현하는 3 플라스미드의 혼합물로 자극되었다. T 세포주 본 발명의 프로토콜을 이용하여 잘 생성되었고, $^{51}Cr$ 방출 어세이에서 연구되었다.

[0157] 도 1A 및 1B: 각각 20: 1 및 10: 1(CTL 주: HLA 매치된 섬유아세포)의, 두 가지 다른 이펙터: 타겟 (E/T) 비율에서 $^{51}Cr$ 방출. 지정된 항원으로부터의 펩타이드 혼합물로 전-펄스된 HLA 매치된 섬유아세포. CTL 주를 성장시키기 위하여 다르게 지정된 APC를 이용하여 대표적인 환자로부터 CTL 확장.

[0158]

[0159] 결론: 수지상 세포 (DC) 및 대식세포 (MAC)는 EBV 형질전환된 B 세포 (LCL) 보다 준우성 항원에 대한 CTL의 성장을 더욱 선택적으로 자극한다.

[0160] 도 1C: 세 가지 다른 이펙터: 타겟 (E/T) 비율 (CTL: HLA 매치된 섬유아세포)에서 $^{51}Cr$ 방출. 지정된 항원으로부터의 펩타이드 혼합물로 전-펄스된 HLA 매치된 섬유아세포. 혈액을 수확하자마자(배양 전) 동일한 환자의 PBMC로부터의 CTL.

[0161] 결론: T 세포를 배양한 후보다 상당히 높은 E/T 비율에서 환자는 EBV 우성 항원에 대하여 어느 정도 반응한다.

[0162] 도 2: 20: 1의 이펙터: 타겟 (E/T) 비율 (CTL 주: HLA 매치된 섬유아세포)에서의 $^{51}Cr$ 방출, HLA 특이성을 나타내는 펩타이드로 전-펄스된 HLA 매치된 섬유아세포, 상기에서와 같이 세 가지 다른 방법을 이용하여 동일한 환자로부터 만들어진 CTLs을 가진 LMP2로부터의 A2 제한된 준우성 에피토프:

[0163] 결론: 수지상 세포 및 대식세포 양자는 LCL에서 보다, 많은 수의 준우성 에피토프에 대한 반응 & 더 높은 수준의 CTL 활성을 일으키고 수지상 세포 및 대식세포 사이에서의 다른 에피토프에 대한 반응의 규모는 다르다.

[0164] 도 3A 및 3B: 20: 1 이펙터: 타겟 (E/T) 비율 (CTL 주: HLA 매치된 섬유아세포)에서의 $^{51}Cr$ 방출, 도 3A에서 LMP2: LCL 자극 및 도 3B에서 DC/MAC 자극으로부터의 펩타이드로 전-펄스된 HLA 매치된 섬유아세포.

[0165] 결론: 검출 가능한 LMP2 반응을 갖는 환자로부터, 수지상 세포 및 대식세포는 LCL이 CTL 주의 50%를 이끄는 것과는 달리, 환자의 90%에서 CTL 주를 이끈다. 따라서, 준우성 항원 및 에피토프에 대한 T 세포를 생성하기 위하

여, DC/MAC 프로세스가 더욱 탄탄하고(robust) 재생가능하다.

[0166] 도 3C: 항원 제시 세포로서 대식세포, 수지상 세포 또는 LCL 세포를 이용하여 성장한 CTL 주에서, $CD4^+$, $CD8^+$ 및 $CD25^+$인 생존 가능한 $CD3^+$ 세포의 %. 주는 CD3, CD4, CD8 및 CD25에 대한 항체로 염색되고 유세포 분석기에 의해 분석된다.

[0167] 결론: 모든 방법이 Tregs가 아닌 $CD8^+$ 세포를 확립한 반면, APC로서 수지상 세포 및 대식세포의 사용은, LCLs로 생성된 경우와 비교하여 $CD4^+$ 세포의 %를 증가시키는 것으로 나타난다.

[0168] ELISpot 어세이:

[0169] ELISpot 어세이를 수행하여 특정 항원에 대하여 생성된 T 세포의 수가 확정되었다. ELISpot γIFN 96 웰 폴리비닐리덴 디플루오라이드 백트 플레이트 (밀리포어, 베드포드, MA)는 15 g/ml의 항-IFNγ 단일클론 항체 1-DIK로 코팅되었다(맵테크, 스톡홀름, 스웨덴). 각 단백질로부터 각 2 μM의 펩타이드 혼합물과 함께 웰 마다 $5x10^6$ PBMCs가 가해지고 37 ℃, 5% $CO_2$에서, 하룻밤 동안 인큐베이트된다. 세포는 버려지고, 2 시간 초과 동안 스트렙타비딘 컨쥬게이트 알칼라인 포스파타제 (맵 테크)에 뒤이어, 1 ㎍/ml 비오틴화된 항-IFNγ 단일클론 항체 7-B6-1 (맵테크; MABTECH)는 실온에서, 2- 4 시간 인큐베이트된다. 알칼라인 포스파타제(alk-phos) 기질 키트(Bio-Rad Richmond, CA)로 부터의 5-브로모-4-클로로-3-인돌일 포스페이트 및 니트로 블루 테트라졸리움으로 30 분 반응한 후, 샘플의 수에 따라, 스팟은 해부 현미경(dissection microscope) 또는 AIDELISpot 리더 (자가면역 진단학, 스트라스베르크, 독일)를 사용하여 계수된다. 각 스팟은 스팟 형성 세포 (spot forming 세포; SFC)/105 PBMCs로서 기록된 세포이다. 이들 어세이에서, 양성 대조군은 세포 + 10 ㎍/ml PHA 이고 음성 대조군은 펩타이드 없는 단독 세포이다.

[0170] 도 4: ELISpot에 의해 측정된, 인 비트로 IFN 생성 세포 (SFC's) / 105 T 세포 성장

[0171] 결론: 수지상 세포 및 대식세포는 LCL보다 더욱 선택적으로 준우성 항원에 대한 T 세포를 확장시킨다.

[0172] 준우성 에피토프에 대한 반응을 확립하기 위한 항원의 최적화

[0173] EBNA-3과 비교하여 준우성 항원이기 때문에 최적화에 LMP2가 선택되었고, 인지된 EBV 준우성 에피토프의 다수가 공통 소프트웨어 및 PBMC 시험을 이용하여 동정된 이 단백질 상에 나타났다. 인지된 준우성 에피토프의 수를 증가하기 위한 노력에서, LMP2는 두 개 또는 이상의 플라스미드에 나누어졌다. CMV 프로모터 및 인공 ATG 및 폴리A의 조절하에서 p 셔틀 또는 pUC19 플라스미드에서 다음의 플라스미드가 구축되었다.

[0174] 플라스미드 1 LMP2B (aa 1-497)

[0175] 플라스미드 2 LMP2A $1^{st}$ 엑손 (aa 1-119)

[0176] 플라스미드 3 LMP2A $2^{nd}$ 엑손 (aa 120-497)

[0177] 플라스미드 4 LMP2A (aa 120-399)

[0178] 플라스미드 5 LMP2A (aa 400-497)

[0179] 플라스미드 6 LMP2A (aa 120-440)

[0180] 플라스미드 7 LMP2A (aa440-497)

[0181] 플라스미드 8 LMP2A (aa 1-399)

[0182] 플라스미드 9 LMP2A (aa400-497)

[0183] SCSI 10 박테리아 스트레인(스트레타진, 라 졸라; Stratagene, La Jolla, CA)에서 표준 절차를 이용하여 모든 플라스미드가 생성되었고 엔도 프리플라스미드 막시 키트(Endo free Plasmid Maxi kit; 퀴젠, 힐덴, 독일(Qiagen, Hilden, Germany))로 정제되었다. $10^6$ 세포 마다 2-20 μg 플라스미드 DNA 로, 아막사 DC 뉴클레오펙션 키트(Amaxa DC Nucleofection Kit; 아막사, 코엘른, 독일(Amaxa, Koeln, Germany))를 이용하여, 항원 제시 세포는 성숙 후 24시간 동안 감염되었다.

[0184] LMP2 상의 T 세포 면역 준우성 에피토프는 다음을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다:

[0185] LLW 329-337 LLWTLVVLL HLA A 2.01

[0186] CLG 426-434 CLGGLLTMV HLA A 2.01

[0187] IED 200-208 IEDPPFNSL HLA B 40.01

[0188] SSC 340-350 SSCSSCPLSKI HLA A11.01

[0189] TYG 419-427 TYGPVFMCL HLA A24.02

[0190] LLS 447-455 LLSAWILTA HLA A2

[0191] LTA 453 461 LTAGFLIFL HLA A2

[0192] FLY 356-364 FLYALALL HLA A2

[0193] 이 에피토프들에 대한 펩타이드가 합성되었고 PBMC 공여체의 피부로부터 분리된 HLA-A2 발현 섬유아세포 상의 $^{51}Cr$ 방출 어세이에서, CTL 반응을 시험하는데 사용되었다.

[0194] 도 5: 20: 1의 이펙터: 타겟 (E/T) 비율 (CTL Lines: HLA 매치된 섬유아세포)에서의 $^{51}Cr$ 방출, HLA 매치된 섬유아세포는 LMP2로부터의 펩타이드로 전-펄스: 1, 2, 3 또는 4 플라스미드 상에 나눠진 LMP2로 CTL 주(CTL line) 확립 (1 플라스미드 상에 1P: 497 aa LMP2B; 2P: LMP2A $1^{st}$ 엑손 (119 aa), 1 플라스미드 상에 LMP2A $2^{nd}$ 엑손 (378 aa); 3P LMP2A $1^{st}$ 엑손 (119 aa), 플라스미드 2 상에 LMP2A (120-399 aa) 및 $3^{rd}$ 플라스미드 상에 LMP2A (400-497 aa); 1 플라스미드 상에 4P: LMP2A $1^{st}$ 엑손 (119 aa), 플라스미드 2 상에 LMP2A (120-399 aa), $3^{rd}$ 플라스미드 상에 LMP2A (400-440 aa), $4^{th}$ 플라스미드 상에 LMP2A (440-497 aa); 2P 2: 플라스미드 1 (aa 120-440), 플라스미드 2 (aa 440- 497)

[0195] 결론: LMP2를, 하나는 aa 400 내지 497를 함유하고, 다른 하나는 399 이전의 잔기를 함유하는 적어도 두 개의 플라스미드에 나누면 더 많은 수의 준우성 에피토프에 대한 더 강한 반응이 나타난다.

[0196] CMV 프로모터의 조절 하에서, Gly Ala 반복 도메인에 해당하는 90 내지 325의 EBNA-1 아미노산은 EBNA- 1 서열로부터 제거되고 p 셔틀 플라스미드에 삽입되었다. 펩타이드 프로세싱을 억제하는 것으로 설명되었기 때문에 이

서열은 삭제하기로 선택되었다. 다음의 HLA-A2 제한된 펩타이드를 사용하여 반응을 평가하였다: VLK 574-582 HLA A2.

[0197] 또한, aa 1-43 결실 (응집/프로테아좀 프로세싱으로부터 보호를 막기 위해) 및 260-315 결실 (11 아미노산 일렬 반복(tandem repeats)의 5 카피)로 LMP1 서열이 제조되었다. 이 서열들은 CMV 프로모터의 조절 하에서, p 셔틀 플라스미드에서 구축되었고 야생형 LMP1과 비교되었다. 반응의 폭을 평가하기 위해, 다음의 LMP1의 HLA-A2 제한된 에피토프가 제조 및 시험되었다:

[0198] YLL 125-133 YLLEMLWRL HLA A2

[0199] YLQ 159-167 YLQQNWWTL HLA A2

[0200] TLL 166-174 TLLVDLLWLL HLA A2

[0201] LLV 167-175 LLVDLLWLL HLA A2

[0202] LLL 92-100 LLLIALWNL HLA A2

[0203] RLG 132-140 RLGATIWQL HLA A2

[0204] 도 6A 및 6B: 20: 1의 이펙터: 타겟 (E/T) 비율에서의 (CTL 주: HLA 매치된 섬유아세포) $^{51}$Cr 방출, HLA 매치된 섬유아세포는 EBNA-1 또는 LMP1로부터의 펩타이드로 전-펄스: 야생형 EBNA-1 대(vs.) EBNA-1 결실 및 야생형 LMP1 대 LMP1 결실과 확립된 CTL 주의 비교

[0205] 결론: 항원 프로세싱을 회피하는 단백질의 특정 부위의 결실은 더 많은 수의 준우성 에피토프에 대한 강한 반응을 이끌었다.

[0206] b. 실시예 2

[0207] 다음의 실험에서, 준우성 에피토프의 생성물과 반응하는 T 세포를 선호하도록 항원 프로세싱을 개선하기 위하여 다르게 디자인된 변화와 함께 상기 실시예 1에서 요약한 바와 같이, 동일한 방식으로 T 세포가 성장하였다.

[0208] 도 7: 20: 1의 이펙터: 타겟 (E/T) 비율 (CTL Lines: HLA 매치된 섬유아세포)에서의 ($^{51}$Cr 방출) Cr 방출, HLA 매치된 섬유아세포를 우성 항원 (EBNA-3A), 준우성 항원 (LMP2) 및 두 가지 다른 방법을 이용하여 동일한 환자로부터 만들어진 CTLs을 가진 LMP2로부터 특이적으로 HLA A2 제한된 준우성 에피토프를 나타내는 펩타이드로 전-펄스: 하나는 항원이 제시되는 동안 100nM 내지 300nM 보르테조밉을 가하고, 하나는 가하지 않았다.

[0209] 결론: CTL 항원이 제시되는 동안 프로테아좀 길항제 보르테조밉 의 부가는 항원 프로세싱을 수정하여 우성 에피토프에 대한 반응을 서서히 감소시키고 더 많은 수의 준우성 에피토프에 대한 CTL을 생성하였다.

[0210] 도 8: 20: 1의 이펙터: 타겟 (E/T) 비율 (CTL Lines: HLA 매치된 섬유아세포)에서의 ($^{51}$Cr 방출) Cr 방출, HLA 매치된 섬유아세포를 우성 항원 (EBNA-3A), 준우성 항원 (LMP2) 및 두 가지 다른 방법을 이용하여 동일한 환자로부터 만들어진 CTLs을 가진 LMP2로부터 특이적으로 HLA A2 제한된 준우성 에피토프를 나타내는 펩타이드로 전-펄스: 하나는 항원 제시 12 시간 전과 항원 제시 동안에 10 ng/ml 인터페론ɣ(IFNɣ)을 가하고, 하나는 가하지 않았다.

[0211] [0127] 결론: CTL 항원 제시 동안의 IFNγ 부가는 우성 에피토프에 대한 반응을 서서히 감소시키며, 항원 프로세싱을 수정하여 더 많은 수의 준우성 에피토프에 대한 CTL을 생성하였다. 수지상 세포보다 대식세포에서 효과는 더욱 두드러졌다.

[0212] c. 실시예 3: 간염 및 간세포 암종

[0213] B형 간염에서, 1차 및 2차 면역 반응의 연구가 가능한 만성 간염의 마우스 모델이 최근 개발되었다 (퍼블리코 J; Publicover J 외. 2011). 이 HBVtgRAG 마우스는 15 세대 동안 본질적으로 바이러스 복제 및 비리온의 방출을 허용한 이력이 있는 C57BL/6에서의 HBV-복제 트랜스제닉 마우스(HBVRpl); 및 T 및 B 세포를 생성할 수 없도록 만드는 RAG-1 결실 마우스 사이의 잡종이다. C57BL/6 마우스로부터 $10^8$ 스플리노사이트가 전사되었을 때, 면역계는 재구성되고 간염 감염에 대한 1차 면역 반응이 모델링되었다. 어린 (3-4 주령) 마우스에게 스플리노사이트를 투여하면, 동물 (B형 간염에 감염된 어린 아이와 유사한)은 만성 간염에 걸렸다. 인간에서와 마찬가지로, 동물의 혈청에서, HBc는 없었지만 HBs는 높은 수준으로 남아있었다(도 1). 만성 간염의 이 모델은 다음의 실험에 사용되었다.

[0214] 코바스 미라스 플러스 분석기(Cobas Miras Plus analyzer; 로슈 진단(Roche diagnostics))로, LT-L3K 키트(Diagnostic Chemicals Ltd)를 이용하여 알라닌 아미노전이효소가 측정되었다. ETI-MAX 2 PLUS(디아소린; Diasorin)를 이용하여 HBs Ag가 측정되었다. ETI-AB-AUK-PLUS 및 ABAU 표준 세트(andard set) (디아소린)를 이용하여 HBs 항체가 측정되었다. ETI-AB-COREK-PLUS (디아소린)를 이용하여 HBcAB가 측정되었다. 어세이는 ELx800 (바이오테크 인스투르먼트; Biotek Instruments) 파장 450nm 및 630 nm에서 출력되었다.

[0215] 도 9: 만성 B형 간염의 HBVtgRAG 마우스 모델.

[0216] 우리의 프로토콜을 이용하여, 엑스비보에서 T 세포를 HBs로 성장시키고 원래의 스플리노사이트를 전염(transfer)시킨 3-4주 후에 꼬리 정맥에 주사하였다. $1x10^5$ 내지 $1x10^8$ 세포로 적정이 수행되고 $1x10^6$ 세포에서 플래토(pateau)가 달성되었다. 아래에서 볼 수 있는 바와 같이, HBVtgRAG 모델에서 우리의 T 세포 재균형화 요법은 만성 간염을 치료한다.

[0217] 도 10: HBs Ag에 대해 반응하는 T 세포로 HBVtgRAG 모델을 처치하면 급성 염증이 유도되고 이전의 만성 감염이 소실된다.

[0218] 항원 제시 동안, IL-4 또는 IL-21이 보충제로서 배지에 사용되면, 플래토 효과를 얻기 위한 T 세포의 양은 각각 $5x10^5$ 및 $7x10^4$이었다. 이 세포의 수는 표준 IL-15 프로토콜에서 확장된 T 세포보다 낮은 로그보다 많고 이는 배양하는 동안의 여포성 보조 T 세포 및 TH2 세포를 향한 분극이 유리함을 가리킨다. 반면에, 플래토에 요구되는 세포의 수가 $1x10^7$로 증가된 IL-12로의 분극 및 IL-2 및 라파마이신으로의 Treg에 대한 분극은 요법에 대한 반응을 제거시킨다.

[0219] 다른 배양 조건은 HBVtgRAG 마우스에서 간염의 치료에 있어서, 다른 T 세포 아집단에 대한 분극 및 플래토에 도달하는 T 세포 수의 변화를 일으킨다.

[0220]

| 배양 조건 | 플래토에 도달하는 T 세포의 수 |
|---|---|
| IL-15 | $1X10^6$ |
| IL-15+IL-4 | $5X10^5$ |
| IL-15+IL-12 | $1X10^7$ |
| IL-15+IL-21 | $7X10^4$ |
| IL-2+라파마이신 | 반응 없음 |

[0221] [0135] 따라서, 다른 T 세포 아집단에 대한 T 세포의 분극은 중요한 치료적 효과를 가진다.

[0222] 다른 에피토프에 대한 T 세포의 빈도에 대한 T 세포 요법의 효과를 확정하기 위하여, ELISpot에 의하여 다른 에피토프에 대한 IFNγ 생성 에피토프의 %가 확정되었다. 이식 후 6 주에, HBs Ag에 대해 상승된 플래토 수준의 T 세포로 비처치 또는 처치된 HBVtgRAG 마우스로부터 스플리노사이트가 수집되었다. 간염 코어 항원 (HBc), 간염 표면 항원 (HBs) 또는 HBs의 두 개의 Kb 제한된 펩타이드: ILS 또는 WWL로 스플리노사이트가 펄스되었다.

[0223] HBs Ag 190-197 VWLSVIWM $K^b$

[0224] HBs Ag 208-215 ILSPFLPL $K^b$

[0225] 다음의 결과가 관찰되었다:

[0226] 도 11: HBs T 세포의 처치는 면역계를 새로운 우세 체계로 재균형화한다.

[0227] 볼 수 있는 바와 같이, 우리의 프로토콜을 이용하여 생성된 T 세포 주는 HBs에 대한 상당히 높은 T 세포 반응을 생성하고 HBc에 대한 약간 감소된 반응을 생성하였다. HBs 반응은 이전의 준우성 에피토프(WWL)에 대한 새로운 (de novo) 반응에 의하여 전우성적으로 추진되었다. 따라서, T 세포 재균형화 요법에 의해 HBs 이내의 우세 체계가 전환되었다. 이는 비처치 동물에서 존재하는 반응이(비록 약할지라도) 이전의 우성 HBc 항원보다 이전의 준우성 HBs 항원을 위한 HBV 반응의 총체적 균형을 전환하는 우성 에피토프 (ILS)에 불리하기 때문이다.

[0228] HBVtgRAG 마우스 모델을 사용하여 인 비보 방법 또한 면역우세 체계를 재균형화할 수 있는지 조사하였다. 한 접근법에서, 본 발명자들은 꼬리 정맥 주사(IV), 근육내(IM) 또는 복강내(IP) 에 의해, 프로인드 보강제(Freund's adjuvant)로 HBs 항원을 주사하였다. 이에 대신하여, 마우스 마다 100㎍ 플라스미드 DNA가 투여되었다(데이터 미도시).

[0229] 도 12: IM 투여 경로는 접종하는 동안 프로테아제 억제제의 투여량 처리로 준우성 항원에 대한 더 넓은 반응을 일으킨다.

[0230] 볼 수 있는 바와 같이, 다른 두 가지 경로보다 IM 투여에 의해 4 X 강한 반응이 생성되고 이는 준우성 에피토프에 대한 반응과 관련된다. 또한, 이 마우스는 프로테아좀 길항제 보르테조밉로 처치되었고, 항원은 IM 투여되었으며, 준우성 에피토프에 대한 반응이 더욱 두드러졌다.

[0231] 두 번째로, 반응 단독 및 다른 이소타입 (IgG1 대 IgG2a)의 두 개의 HBs 반응성 뮤린 항체와 복합 실험을 세팅했다 :

[0232] HBs Ag에 대한 단일클론 항체

[0233] 10-H05 뮤린 IgGl HBsAg (피츠제랄드, 콩코드(Fitzgerald, Concord), MA)

[0234] 10-H05A 뮤린 IgG2a HBsAg (피츠제랄드, 콩코드, MA)

[0235] 도 13: HBs Ag에 특이적인 IgGl 항체는 그렇지 않았으나 IgG2a 단일클론 항체는 다른 우세 체계 및 IV 경로에 의해 상당히 향상된 항원 제시를 야기했다.

[0236] 항원 항체 복합체가 정맥 내 및 IM으로 투여되는 경우, IgG2a 복합체는 준우성 에피토프에 대한 더 많은 반응을 생성하였다. 또한, 이 프로토콜은 IV 투여에 의하여 IM 투여에 의해 달성되는 수준과 거의 견줄만한 면역 반응을 발생시켰고 이는 인 비보IgG2a 면역 복합체의 IV 투여가 면역우세 체계를 ㅈ재균형화할 수도 있음을 의미한다.

[0237] 본 발명자들은 이 관찰에 대한 가능한 메커니즘은 IgG2a가 수지상 세포에서 우선적으로 발현되는 고 친화성 FcR에 결합하고 따라서 수지상 세포에 대한 HBs 항원을 타겟할 것이라는 가설을 세웠다. 부가적으로, HBs Ag $a$ 결정요인 첫 번째 루프(aa 124-147)가 항체를 중화함에 의한 인지를 위한 주요 에피토프이고 ILS 에피토프는 멀리 떨어져 있기 때문에, ILS에 대한 항원 프로세싱이 향상될 수 있다.

[0238] HBV 관련 간세포 암종에서 T 세포 재균형화 요법의 임상 시험

[0239] HLA-A *0201인 HBV 및 HCC를 가진 5 환자가 그들의 체액성 및 세포성 면역 반응에 대하여 면역 프로파일링 되었다. 전처치 임상 검사는 B형 간염 표면 항원 (HBs Ag)은 그렇지 않지만 B형 간염 코어 항원 (HBc Ag)에 대한 항체의 높은 역가를 설명한다(도 10).

[0240] PBMC가 수지상 세포로 유도되었고, B형 간염 코어 항원 (HBc Ag) 및 B형 간염 표면 항원 (HBs Ag)으로 펄스되었으며 PBMC로부터 CTL을 성장시키기 위하여 사용되었다. CTL의 성장은 IFNɣ에 대한 ELISpot에 의해 시험되었다.

[0241] 도 14: 환자 3으로부터의 105 PBMCs에서, 스팟 형성 세포의 수

[0242] ELISpot 상의 IFN ɣ 생성 T 세포의 빈도에 의해, 체계가 관찰되었다: 항원없음(10 sfc)<HBsAg(15 sfc)<HBcAg(45 sfc). 이는 간염 코어 항원에 비하여 B형 간염 표면 항원이 준우성임을 의미한다. 부가적으로, HBs (FLL, GLS 및 ILS)의 3 펩타이드가 연구되었다:

[0243] HBs Ag 20-28 FLLTRILTI HLA-A*201

[0244] HBs Ag 185-194 GLSPTVWLSV HLA-A*201

[0245] HBs Ag 208-216 ILSPFLPLL HLA-A*201

[0246] HBs에 대한 작은 반응에서 약간 우성으로 나타난 FLL 펩타이드가 검출되었으나, 약한 반응 때문에, ICS 어세이에 의하여 우세 체계가 확인되었다: 세포내 사이토카인 염색(Intracellular sytokine staining; ICS)

[0247] 펩타이드 (최종 농도 $10^{-5}$ 내지 $10^{-9}$ M)가 있는 100㎕의 1XPBS 1% FCS에서 $5x10^{5}$ CTL이 재현탁되고 한 시간 동안 인큐베이트되었다. 그리고 나서, 골지 플러그(Golgi Plug; BD 바이오사이언스, 샌 디에고, CA)가 가해졌다. 5

시간 동안, 37 ℃ 5% $CO_2$에서 세포가 인큐베이트, 펠렛되고, 200㎕ PBS 1%FCS에서 세척되었다. 4 ℃에서 30 분 동안, 표면 항원 CD4 플루오레세인 이소티오시아네이트 및 CD8 알로피코시아닌(Pharmingen, Becton Dickinson)에 대하여 염색되었다.

[0248] 고정화(fixation)에서 재현탁 및 투과화(permeabilization solution) 뒤에, 세포는 30 분 동안 얼음 상에서 항 인간 IFNγ 피코에리트린 (Pharmingen, BD) 1/20 희석액으로 염색되었다. 세포는 한번 세척되고 PBS 1% FCS에 재현탁되었으며 FACS Canto (벡턴 디킨슨) 상에서 분석되었다.

[0249] 도 15: HBs 에피토프에 대한 반응의 ICS 분석.

[0250] ICS에 의해 검출 가능한 반응이 강하지는 않았으나, FLL 에피토프는 다른 두 에피토프에 비하여 다시 우성으로 나타났다.

[0251] 각 환자로부터 $5x10^6$ PBMC가 분리되었고 펩타이드 15-30이 제거된 펩타이드(FLL을 제거하기 위해)와 함께 자극 항원으로서 HBs 15 머 펩타이드 혼합물을 사용하는 우리의 프로토콜에 따라 T 세포가 성장되었다. 확장되는 동안, IL-4 + IL-15가 사용되었다. $1x10^{10}$ T 세포가 얻어지고 ELISpot 시험을 위해 취해진 일회량으로 동결되었다.

[0252] 도 16: HBs 세포는 환자에게 투여된 T 세포의 다수이고 이들은 이전의 준우성 항원에 반응한다.

[0253] 볼 수 있는 바와 같이, 생성된 CTL 주는 이전의 준우성 HBs에 대하여 거의 독점적으로 반응하였고, 반응은 이전의 준우성 에피토프에 의해 주로 유도되었다. $5x10^7$ 내지 $1x10^8$ 세포 $/m^2$ 로,IV 주입에 의해 CTL이 투여되었고 환자가 모니터되었다.

[0254] 도 17: 환자는 급성 플레어가 있고 나서 간염이 치료된다.

[0255] 급성 간염이 생긴 후, 환자는 회복되었고 간염이 완전히 치료되었다. 14일에, PBMC는 다시 수집되었고 세포성 면역 반응의 프로파일은 재-확정되었다.

[0256] 도 18: 환자의 면역우세 체계는 그 항원 상의 이전의 준우성 항원 (HBs) 및 이전의 준우성 에피토프에 대하여 재균형화되었다.

[0257] 우리의 공정에 의해 성장한 T 세포에 의해 면역우세 체계가 성공적으로 재균형화되었다. 또한 만성 간염을 치료하기 위하여, 환자는 또한 간세포 암종에 대하여 완전환 반응을 나타내었다.

[0258] 도 19: T 세포는 환자의 간세포 암종을 완벽하게 해결했다.

[0259] d. 실시예 4: 암 치료를 위한 전신적 방법

[0260] 암의 임상적 진단 및 요법은 생검 및 암의 기원 조직, 분화 및 크기(extent of local) 및 전신적 전이를 확정하기 위한 종양 촬영을 수반한다. 종양유전자 또는 종양 억제 유전자의 유전적 결함에 대한 진단 및 화학요법제

또는 생물학적 제제에 대한 감수성을 확정하기 위한 어세이가 수행되는 동안, 구체적인 암의 종류 및 진행 단계에 따라, 일반적으로 환자는 수술, 화학요법 및 방사선 요법으로 병용 처치된다. 유사하게, 다른 기술을 이용하여, 다양한 환자에서 면역계가 연구되었지만, 환자의 임상적 관리에서, 이 정보가 쓰인 적이 없었다. 세포성 요법으로 면역계를 재균형화함과 함께, 본 발명자들은 암 환자의 관리에서 면역 프로파일링의 사용을 확립하였다. 본 발명자들은 환자에서 준우성 항원을 선택하고, 환자에게 재주입되어 종양에 대한 면역 반응을 재균형화할 수 있는 T 세포를 인 비트로에서 성장시킬 수 있는 표준화된 면역 프로파일링 방법론을 개발하였다. 요법에 뒤이어, 환자는 재프로파일되어 그 요법이 성공적으로 면역 반응을 재균형화 하였는지 확정할 수 있다. 이와 같은 치료적 방법은 신규한 것이고 임상적 반응을 이끌어내고 생존기간을 연장할 수 있다. 동일한 접근법이 감염성 질환 및 자가면역 및 장기 이식에 사용될 수 있다.

[0261] 첫 번째 단계는 환자의 종양 상에 어떤 종양 관련 항원이 존재하는지를 동정하기 위한 것이다. 이는 일반적으로 환자의 종양으로부터의 생검의 면역조직화학에 의해 이루어진다. 시험될 패널 항원은 종양의 타입에 따라 달라질 것이다. 예를 들어, 흑색종에서, 항원은 NY-ESO-1, SSX-2, 멜란 A, gp100, MAGE A4, MAGE A1, 티로시나제를 포함하고 새로운 종양 관련 항원으로 기술된 것으로 보충될 것이다. 패널에서, 모든 종양이 모든 항원을 발현하는 것은 아닐 것이다. 환자 종양이 가지고 있는 항원을 위하여, 위에서 기술된 체액성 및 세포성 면역 반응에 대한 전신적 프로파일링을 이용하여 다른 항원에 대한 면역 프로파일의 기준치가 확정된다. Elisa를 이용하여 혈청에서 각 항원에 대한 항체 역가가 확정되고 IFNγICS 또는 ELISpot에 의해 항원에 대해 반응하는 T 세포의 %가 확정된다. 이 방식으로, 프로파일의 기준치가 확정된다.

[0262] 도 20: 환자 1에서 종양 항원의 패널에 대한 IFNγICS

[0263] 환자 1에서, 환자의 종양은 NYESO-1, SSX-2, 멜란 A, 및 MAGE A4를 가졌다. ICS는 MAGE A4에 대하여 강한 반응을 보여주었으나, NYESO-1, SSX-2 및 멜란 A에 대하여는 약하거나/무반응이었다. NYESO-, SSX-2 및 멜란 A 항원은 따라서, 다음의 프로토콜을 이용한 인비트로 배양에서, CTL을 성장시키고 확장하기 위하여 선택되었다:

[0264] 혈액으로부터 $5x10^6$ PBMC가 분리된다. 인 비트로에서, 조직 배양 플라스크에서 2시간 동안 PBMCs를 플레이팅하여 단핵세포를 부착시킴으로서 환자의 말초혈액 단핵세포(PBMCs)로부터 단핵세포-유래된 수지상 세포가 생성된다. 이때, 비부착성 세포가 제거되고 추후에 T 세포의 원천으로 제공하기 위하여 -80에서 동결된다. 부착성 단핵세포를 인터루킨 4 (IL-4) 및 과립-대식세포 콜로니 자극 인자(Granulocyte-macrophage colony stimulating factor; GM-CSF)로 처치하면 약 일주일 내에 미성숙 수지상 세포(iDCs)로 분화된다. 차후에, 종양 괴사 인자(TNF)로 처리하면 iDCs가 다시 성숙 수지상 세포로 분화된다. 이 세포들은 그리고나서 45% 클릭(Click's) 배지(어바인 과학, 산타 아나; Irvine Scientific, Santa Ana, CA), 2mM 글루타맥스 1 및 5% 인간 혈청으로 보충된 RPMI 1640 배지에서, 3 분리 플라스크로 분리된다(또는 그러나 많은 항원은 T 세포를 성장시키고자 한다). 각 플라스크는 목적하는 항원을 코딩하는 서열을 함유하는 3 플라스미드 (또는 펩믹스)로 펄스된다(이 환자에서, SSX-2를 함유하는 NY-ESO-1,1을 함유하는 1 및 멜란 A를 함유하는 세 번째). 세포는 2 시간 동안 37 ℃에서 보관된다. 그동안, PBMC가 해동되고 1:20 내지 1: 100의 수지상 세포에 대한 PBMC 비율로, PBMC가 펄스된 수지상 세포에 가해지고 18시간 동안 37 ℃에서 인큐베이트된다. 세포의 세개의 플라스크는 그 후 IL-15 (5ng/ml)를 함유하는 동일한 배지에 담겨 재현탁되어, 항원을 인지한 T 세포의 인비트로 확장을 생성한다. 배지를 교환할 필요가 없고 기하급수적 성장 속도를 가능케 하는 그렉스(Grex) 가스 투과성 바이오리액터가 사용된다(윌슨 울프 제조 미니애폴리스; Wilson Wolf Manufacturing Minneapolis, MN). 일반적으로, 3 내지 6 주 이내에 환자에게 투여되기에 충분한 세포인 $3x10^8$ 내지 $1.5x10^{10}$의 세포가 얻어진다.

[0265] 가스 투과성 바이오리액터에서 T 세포가 성장한다

[0266] T 세포는 원활한 가스교환을 위해서, 또한 요구되는 농도로 성장하기에 충분한 배지의 용량을 갖는 가스 투과성 멤브레인 상에서 층(layer)으로 성장한다.

[0267] 인 비트로 배양의 끝에, T 세포는 동일한 항원으로, ICS 어세이에서 분석된다: NY-ESO-1, SSX-2, 멜란 A, gp100, MAGE A4, MAGE A1, 티로시나제.

[0268] 도 21: 환자 1 ICS 어세이

[0269] 어세이에 기초하여, NY-ESO-1, SSX-2 및 멜란 A의 경우에 있어서, 각 준우성 항원/ 에피토프에 반응하는 세포의 %가 확정된다. 이 % 및 배양에서 CTL의 수를 이용하여, 각 준우성 항원 또는 에피토프에 반응하는 세포의 총 수가 계산될 수 있다. 환자 1의 경우, 세포의 61.4%가 NY-ESO-1에 반응하였다 (도 21).

[0270] 이에 기초하여, 준우성 항원에 반응하는 CTLs의 알려진 용량이 환자에게 투여되었다. CTL은 $5x10^6$ 내지 $2x10^8$ 세포/m로 투여되었다

[0271] 환자로의 주입 후 2 -3 주에, PBMC는 다시 수집되었고 ICS에 의하여 세포성 면역 반응의 프로파일이 재-확정되었다:

[0272]

[0273] 도 22: 요법 후 ICS에 의한 세포성 면역 프로파일링 - 환자 1

[0274] 도 23: ELISA에 의한 체액성 면역 프로파일링 - 환자 1 (체액성 면역 반응의 상호 역가는 아래에 나타난다).

[0275] 면역 체계 어세이의 세포성 및 체액성 프로파일로부터 알 수 있는 바와 같이, 면역우세 체계는 이전의 준우성 항원을 선호하도록 재균형화 되었다.

[0276] 임상적 소견:

[0277] 임상적으로, 환자는 전이성 흑색종 4기로 진단받은 52세 남자였다. 그는 IL-2와 병용하는 다카르바진 (DTIC) 및 테모달 (테모졸로마이드) 화학요법제의 병용 처방에 반응을 보이지 않았다.

[0278] T 세포 요법 2년 후, 환자는 살아있고, 완전한 반응을 겪었다. 가슴 CT 스캔에서 볼 수 있는 바와 같이, 면역 재균형화 요법 6개월 이내에 폐에서의 전이가 완전히 회복되었고 안정한 상태가 유지되었다.

[0279] 도 24: T 세포 요법 전 후의 CT 스캔

[0280] e. 실시예 5: 림프종의 T 세포 요법

[0281] 재발된 공격성 비 호지킨스 림프종이 있는 150 성인 환자가 무작위로 3 그룹으로 나뉘어졌다: A: 리툭산 + CHOP; B: EBV LMP1 & LMP2 T 세포 재균형화에 이어 종양에서 EBV LMP1 & LMP2 항원에 대한 시험 및 C: 팬 림프종: 항원에 대한 어세이 없음; EBV LMP1, LMP2, 생존(surviving), MAGE A3에 반응하여 성장한 T 세포 요법. 림프종 생검 시험의 40%가 EBV LMP2에 대하여 양성, 시험의 50%가 생존(surviving)에 양성 및 시험의 15%가 MAGE A3에 양성. 표준의 Care R-CHOP regimen가 사용되었고 $m^2$ 당 $5x10^7$ 내지 $2x10^8$ T 세포가 투여되었다.

[0282]

[0283] 도 25: 무진행 생존율

[0284] 볼 수 있는 바와 같이, 종양에 반응하는 T 세포는 현재의 케어 표준에 대하여 우수한 반응 속도를 제공한다. 1년째는 실패가 나타난 반면, 다음 1년에서 CTL은 환자를 관해 상태로 유지시켰다. 이는 재균형화 후에, 적절하게 기능하는 면역계의 증거이다. 마침내, 최초로 EBV LMP T 세포가 더 나은 반응을 제공하는 동안, 3년까지 팬 림프종 생성물의 무진행 생존에 도달하였다. 또한, 림프종은 현재 일반적으로 18 개월 내지 2 년 이내에 환자에게 재발하는 재발 완화 질환이다. CTL 재균형화 요법은 이 과정을 변화시킨다: 환자의 면역계가 재균형화되면, 환자는 장기간 관해 상태를 유지하는 기억 반응을 발달시킨다. 따라서, 림프종의 다른 요법과는 달리, T 세포 요법은 오래가는 관해를 제공한다.

[0285] 도 26: T 세포 요법은 질환의 성질의 히스토리를 변화시킨다

[0286] f. 실시예 6: 자가면역 질환의 T 세포 요법

[0287] 콜라겐 유도된 관절염 모델 (CIA)은 DBA/ 1 마우스에서 이종의 콜라겐 II (CII)로 면역화하여 유도될 수 있는 류마티스 관절염 (RA)의 모델이다.

[0288] 잭슨 연구소(Jackson Laboratories; 바, 하버, ME)로부터 DBA/1 수컷 6-8 주령 마우스를 얻었다. 4 mg/ml의 결핵균(M tuberculosis; 콘드렉스)을 함유하는 CFA에서 유화한 100μg의 소의 CII (콘드렉스, 레드먼드(Chondrex, Redmond), WA)를 꼬리에 피하 주사하였다. 주사 5 주 후, 비처치 마우스의 80-100%가 완전히 질환에 걸렸음을 보여주었다.

[0289] T 세포의 인비트로 성장 부분에서 기술된 프로토콜을 이용하여 T 세포는 다음의 펩타이드로 성장한다.

[0290] 콜라겐 타입 II

[0291] Treg의 성장을 자극하기 위해 사용된 263-270 면역우성 펩타이드 (IL-2 + 라파마이신)

[0292] T 세포의 성장을 자극하기 위해 사용된 286-300 준우성 펩타이드 (IL-15)

[0293] 단독 또는 동등한 성분의 조합으로, 유도 후 20일에, 각 동물에 $5x10^6$ 세포가 투여되었다. 도 27 참조. CD25는 Treg 세포에 대한 마커이다. 대조군 동물은 PBS가 투여되었다. 도 28 참조.

[0294] 가능한 총 최고 스코어 12, 각 팔다리에 대하여 0-3 스코어를 이용하여, 일주일에 한번 씩 세 번, 임상적 질환에 대하여, 마우스에 점수가 기록되었다: 0-1 정상; 1 단일 손가락(발가락)에서 약한 발적 또는 부기; 2 홍반을 동반한 발목 또는 손목의 상당한 부기; 3 다중 관절에서 심각한 부기 및 홍반. 그룹에서 관절염 병변을 갖는 동물의 퍼센트는 관절염의 발생률을 나타낸다. 그룹에서 평균 임상적 스코어는 질환의 중증도를 반영한다. 도 28 및 도 29 참조.

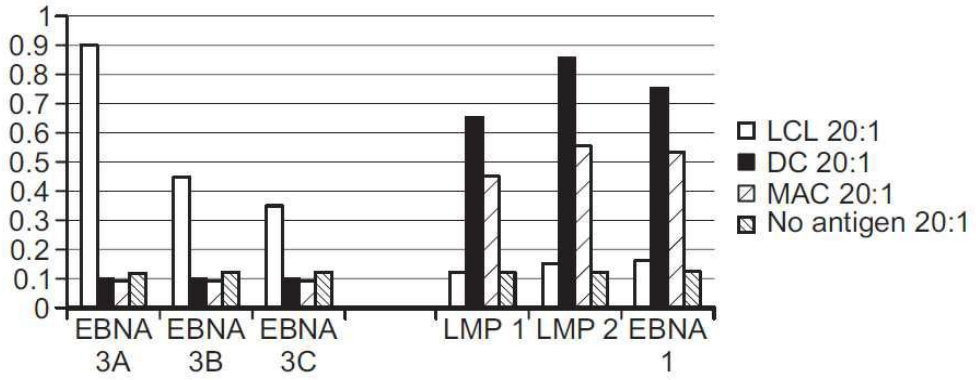
[0295] 관절의 조직병리

[0296] 도 30A는 정상 랫트를 보여준다. 도 30B는 인간 프로테오글리칸으로 면역화된 랫트를 보여준다. 도 30C는 T 세포로 처치된 랫트를 보여준다.

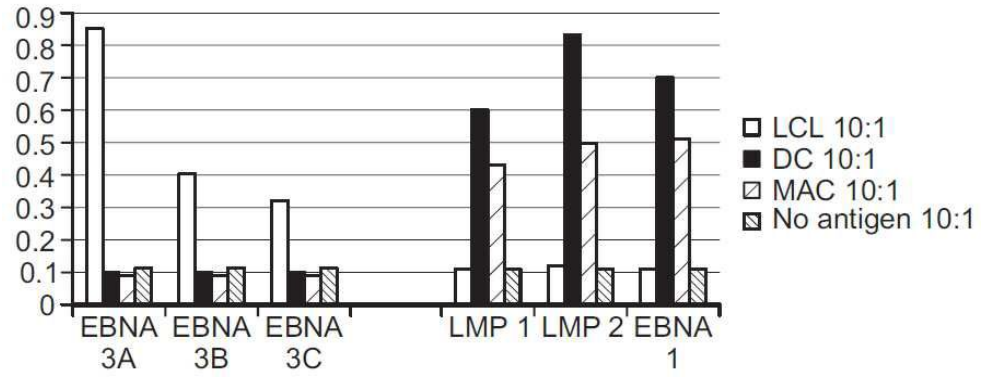
[0297] 볼 수 있는 바와 같이, T 세포 요법은 동물의 관절에서, 염증의 발생률, 심각성 및 양을 상당히 감소시킨다. 준우성 에피토프에 대해 자란 T 세포 및 우성 에피토프에 대해 성장한 Treg 사이의 면역 반응의 재균형화에서, 시너지 효과가 나타났다.

## 도면

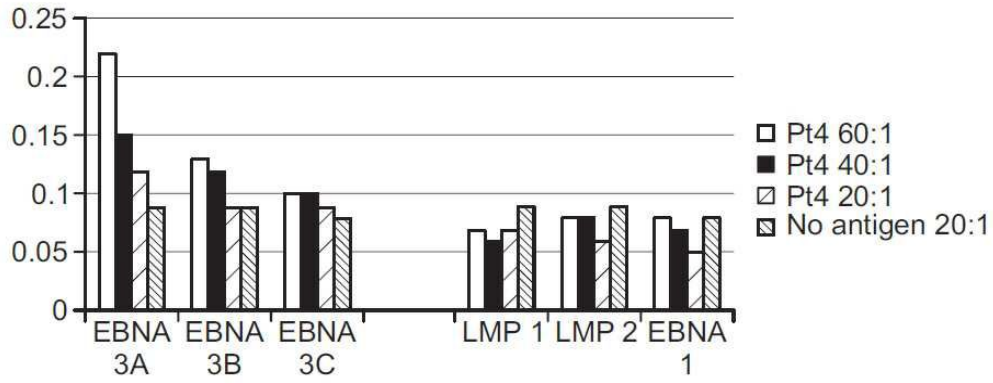
### 도면1a



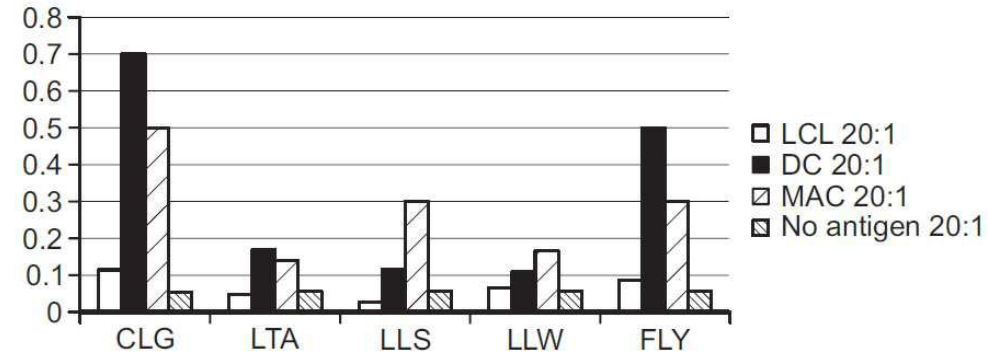

### 도면1b



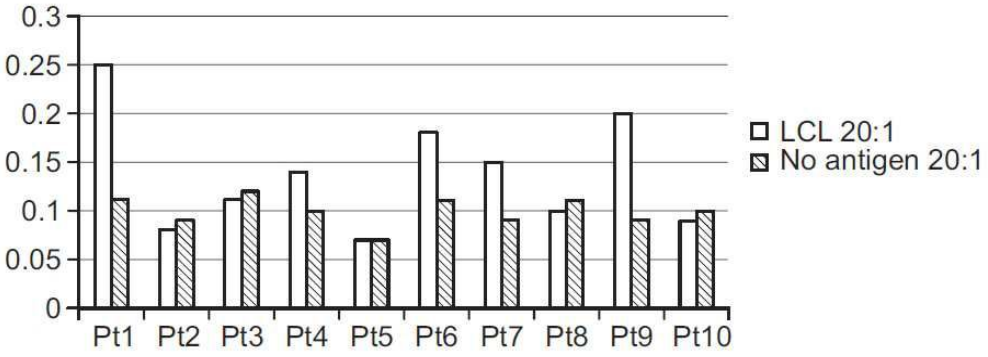
도면1c



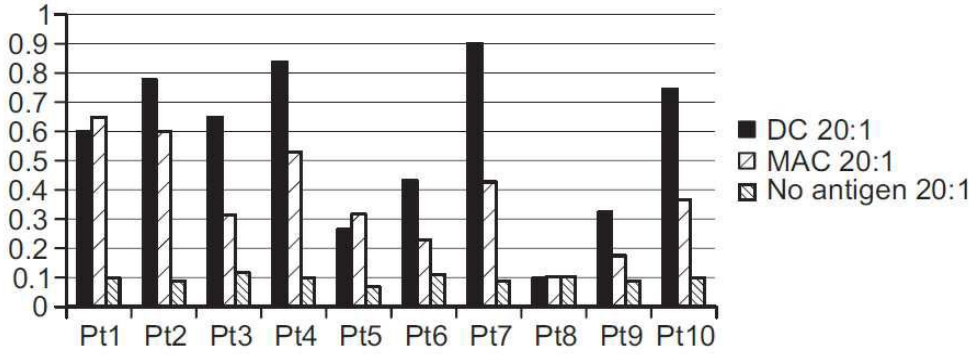

도면2



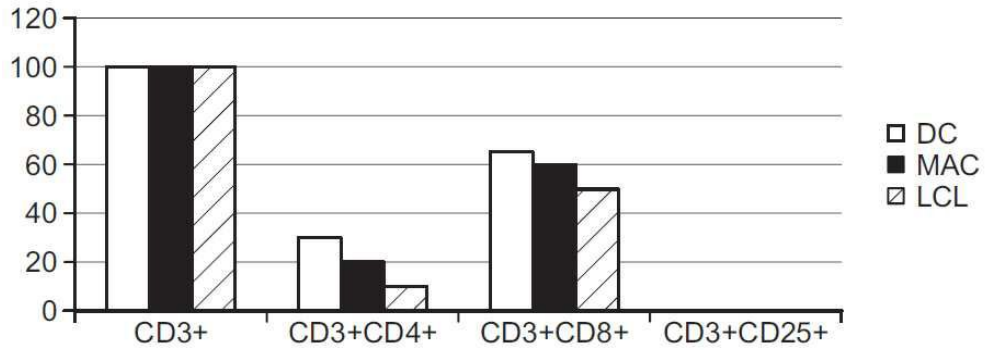

도면3a



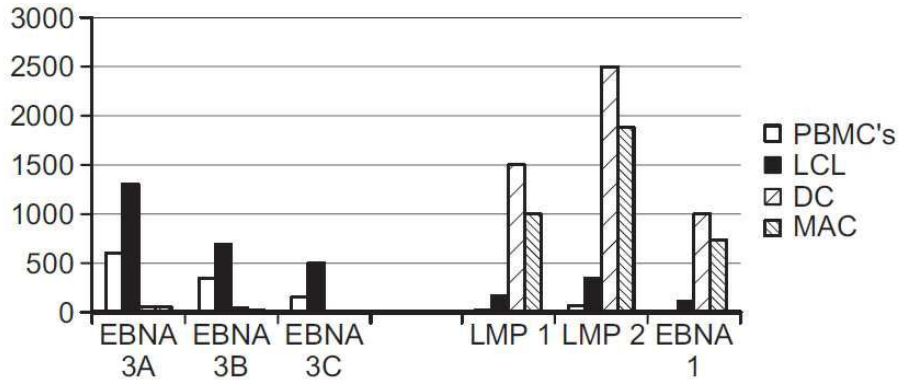
도면3b



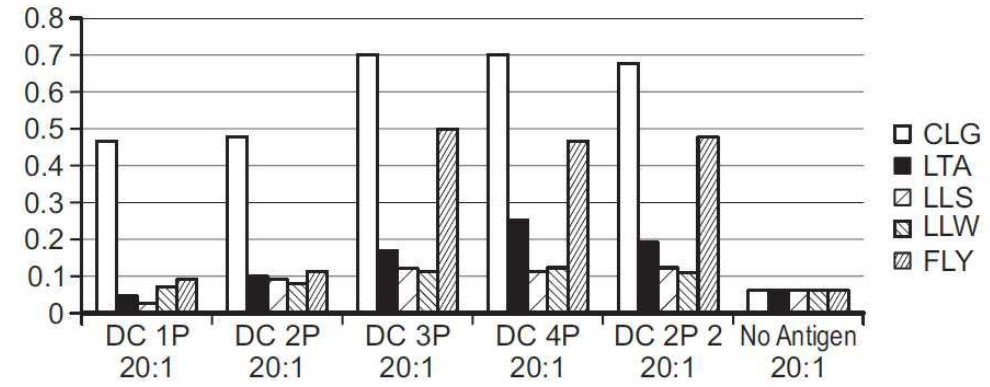

도면3c



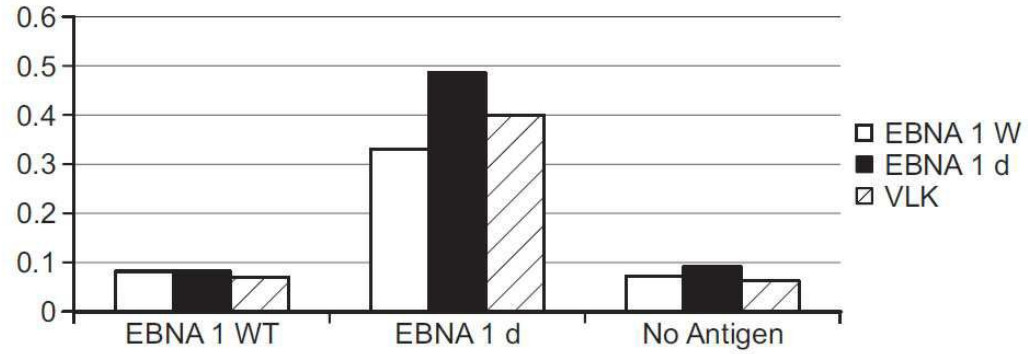

도면4



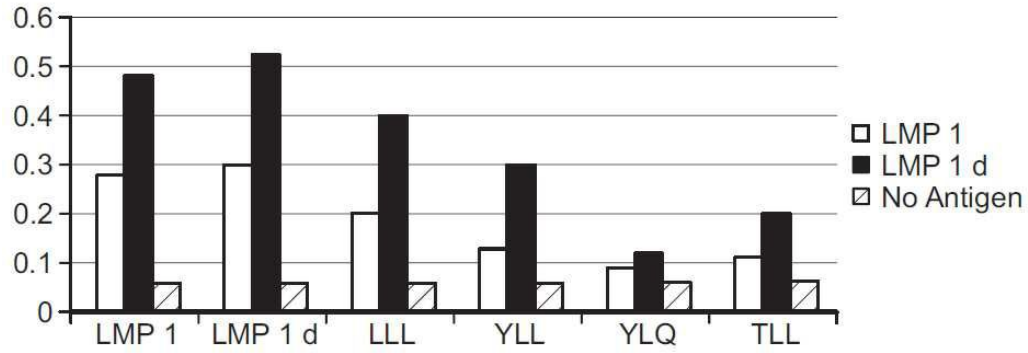
도면5



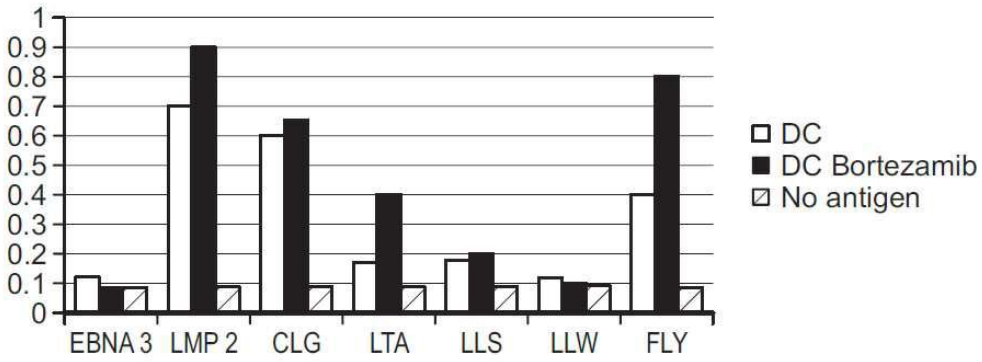

도면6a



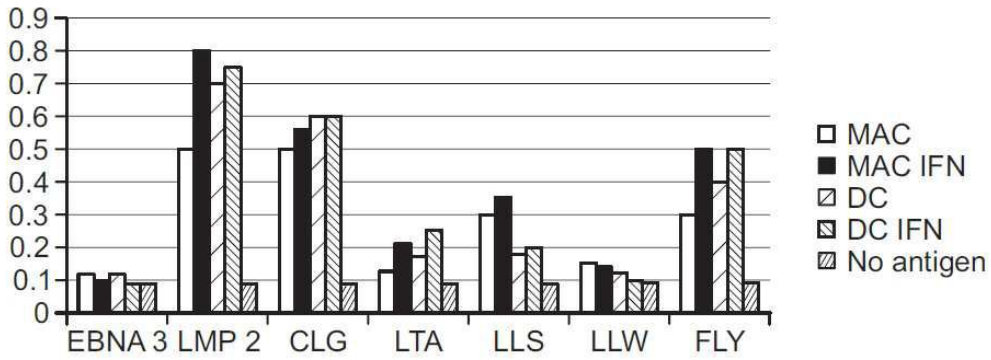

도면6b



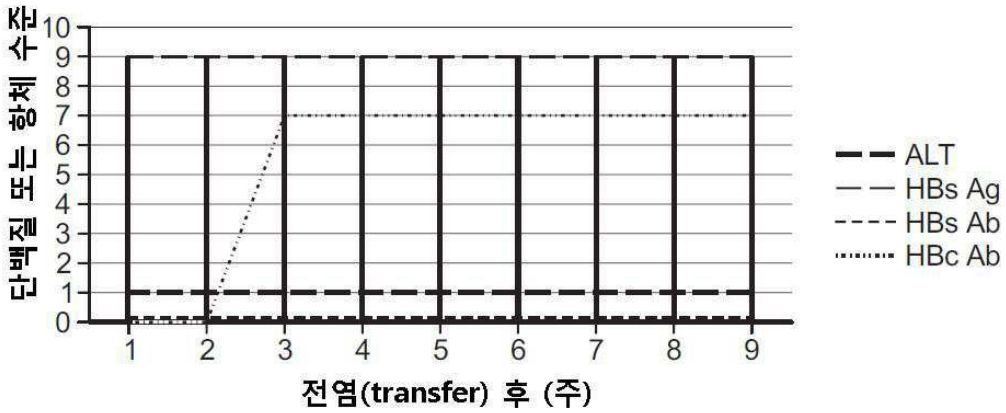
도면7


1
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
EBNA 3
LMP 2
CLG
LTA
LLS
LLW
FLY
DC
DC Bortezamib
No antigen

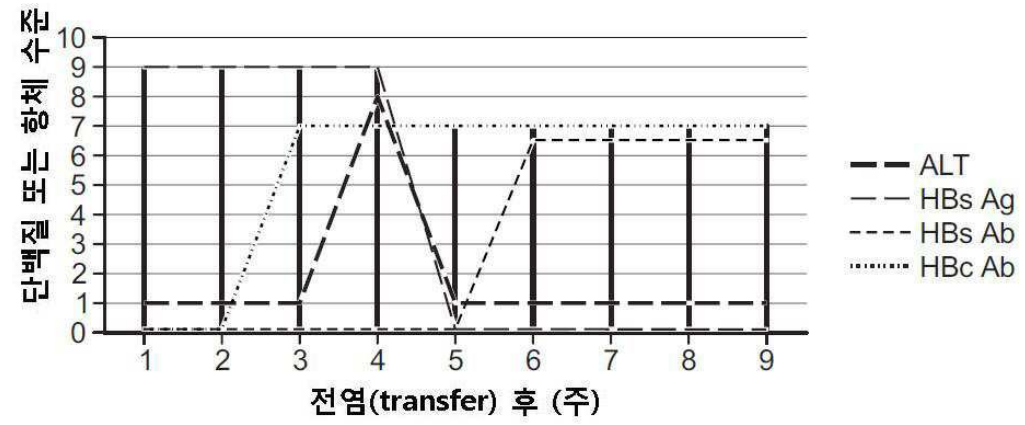
도면8


0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
EBNA 3
LMP 2
CLG
LTA
LLS
LLW
FLY
MAC
MAC IFN
DC
DC IFN
No antigen

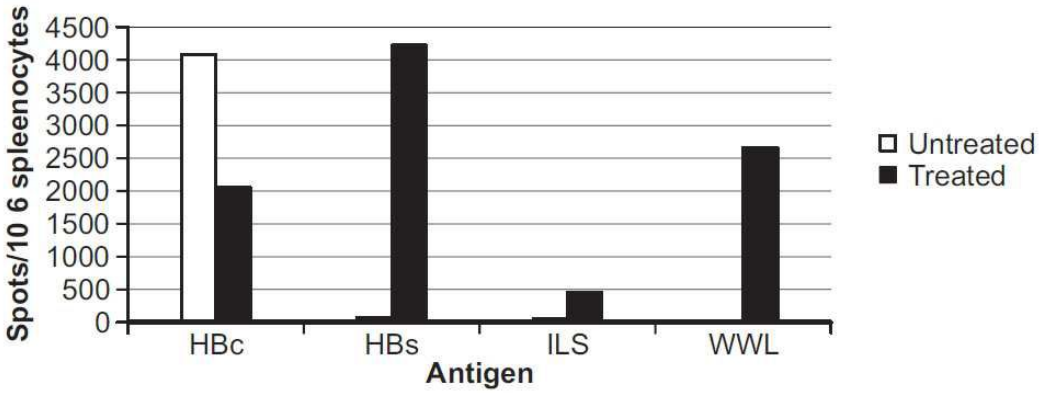
도면9


단백질 또는 항체 수준
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
전염(transfer) 후 (주)
ALT
HBs Ag
HBs Ab
HBc Ab

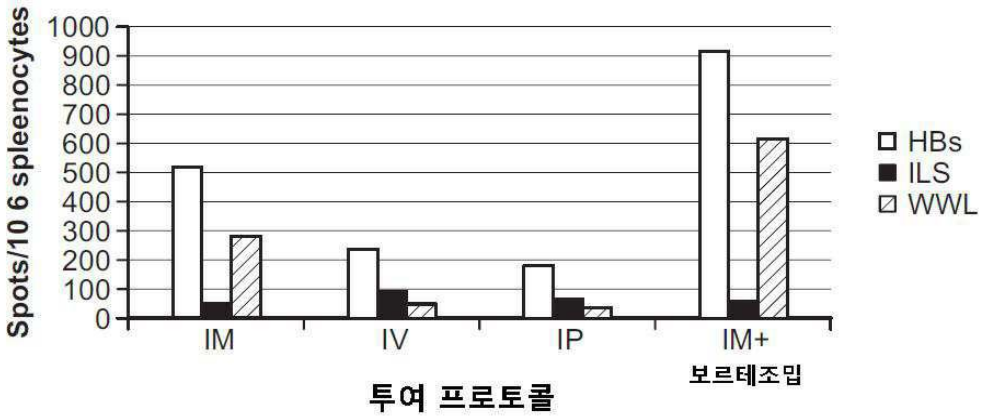
도면10



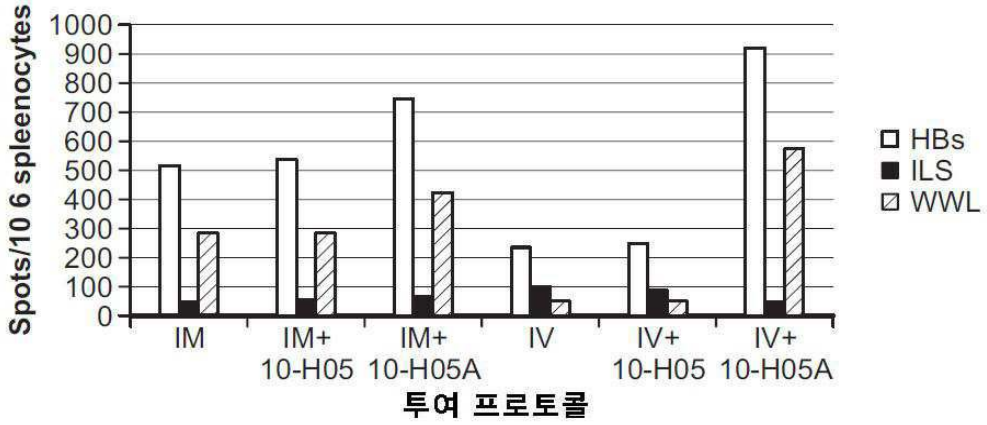

도면11



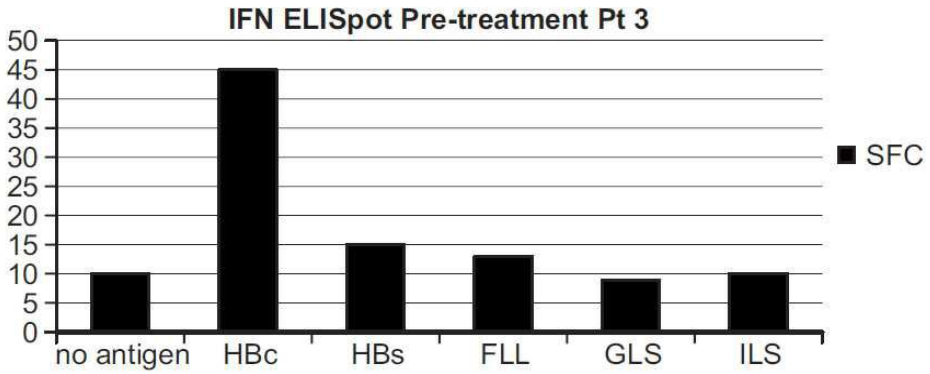

도면12



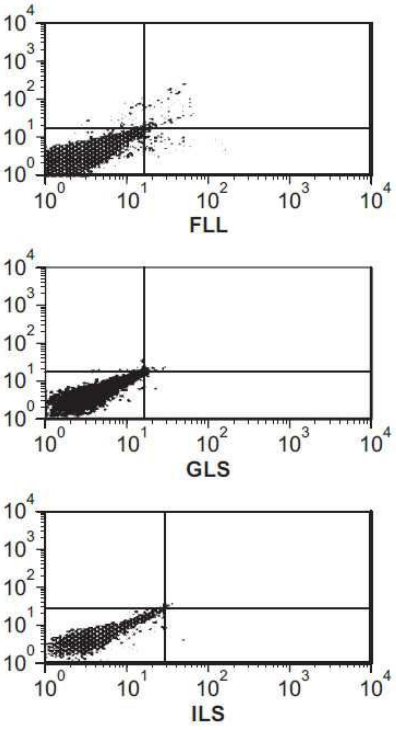
도면13



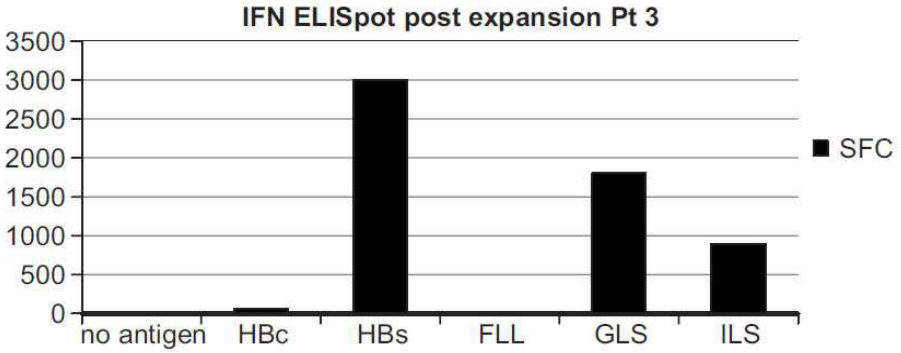

도면14



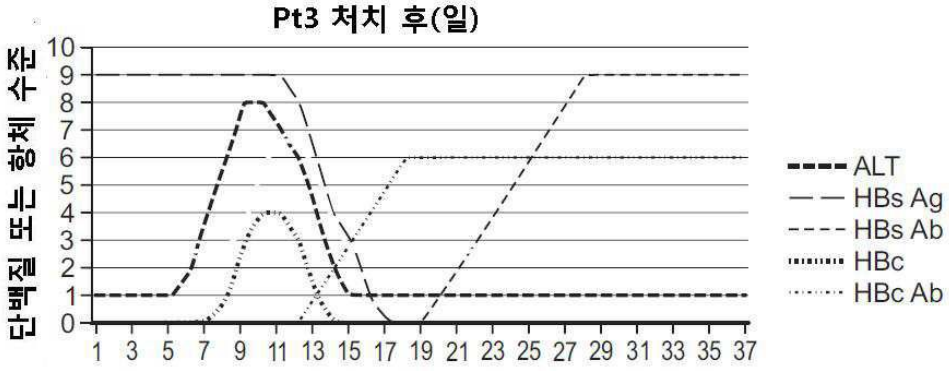

도면15



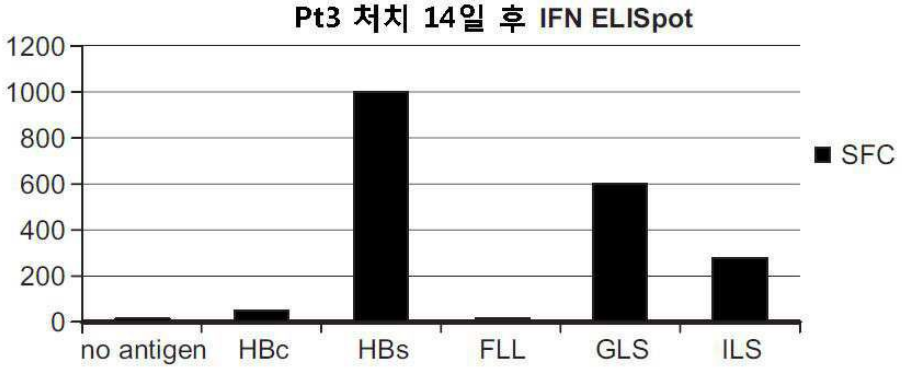
도면16



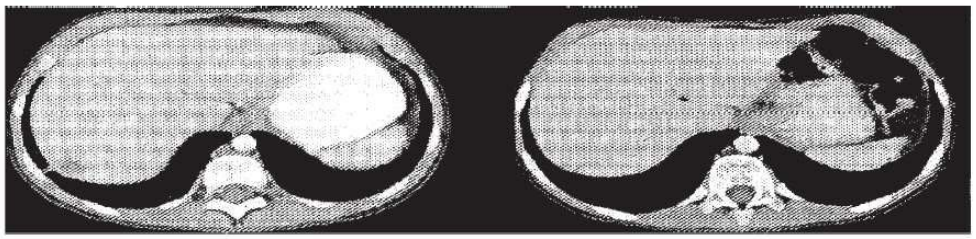

도면17



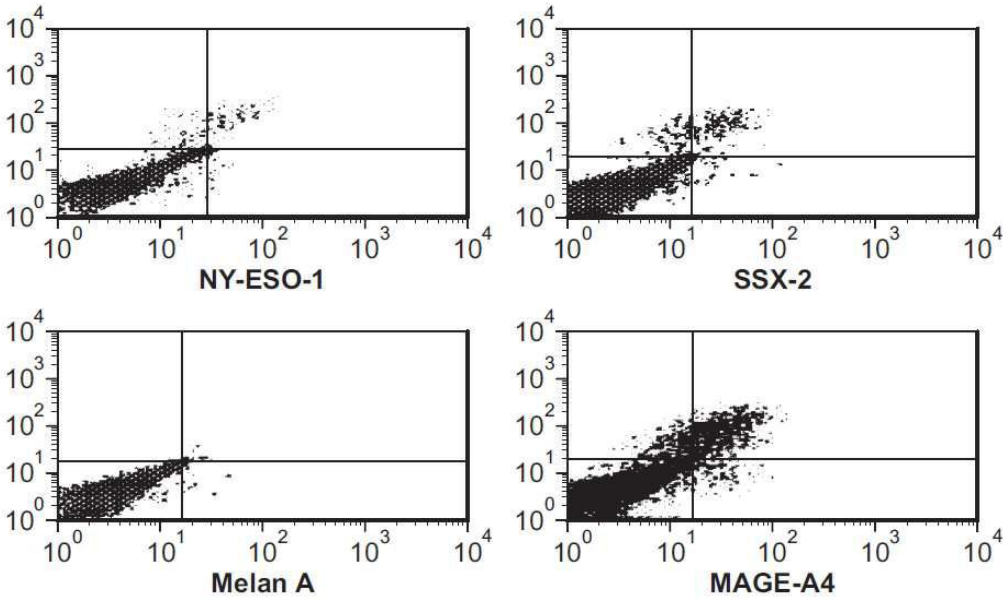

도면18



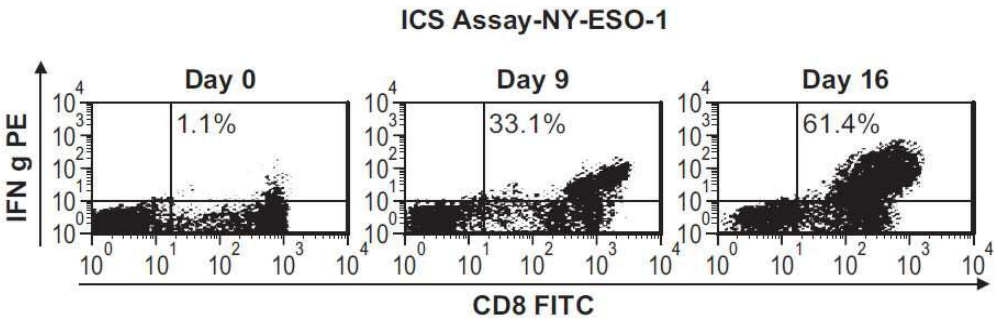

도면19



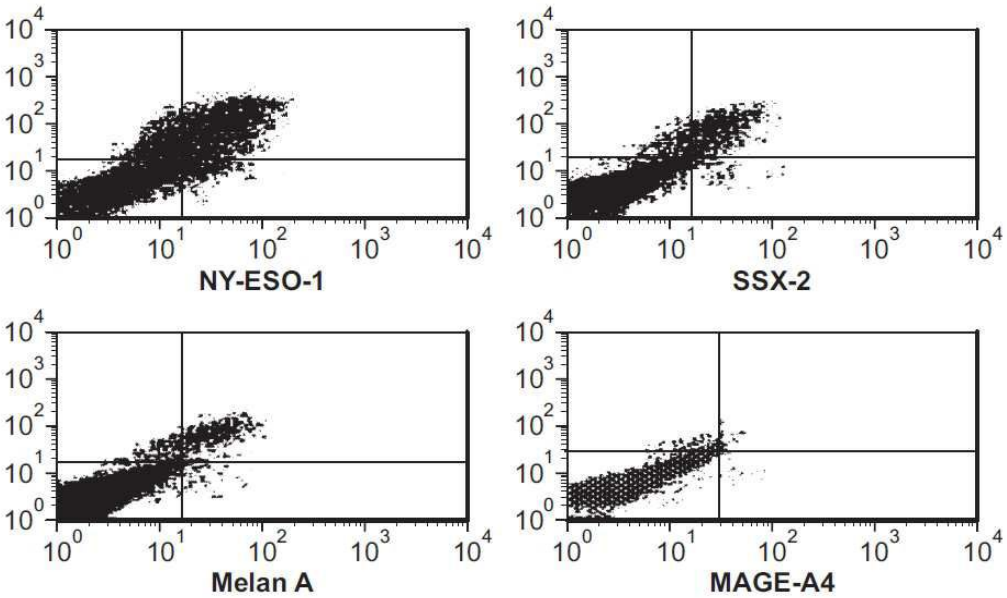
도면20



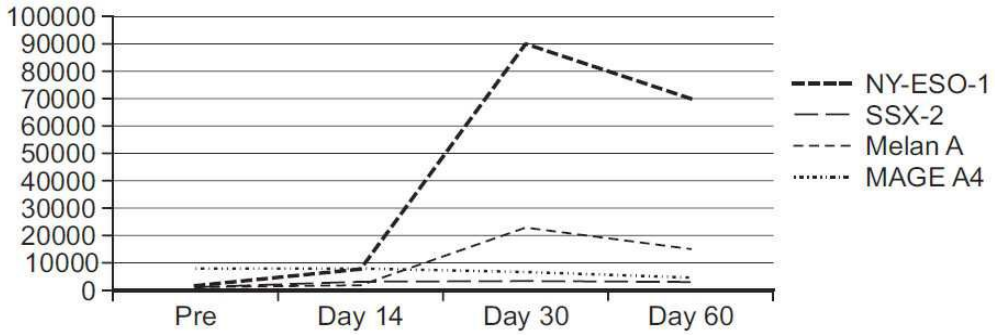

도면21



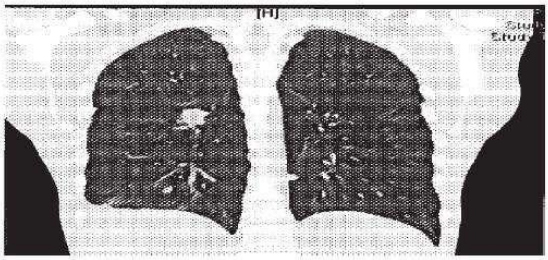

도면22



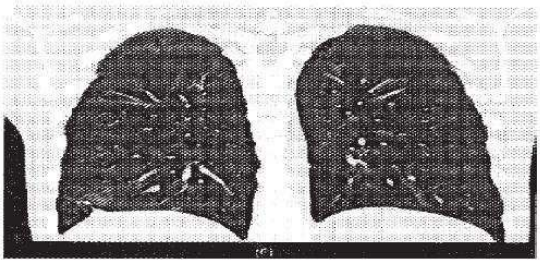
도면23




도면24

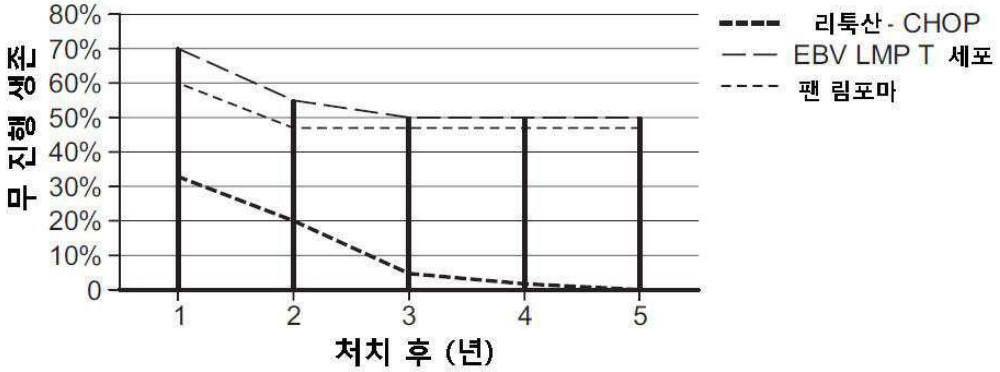


전

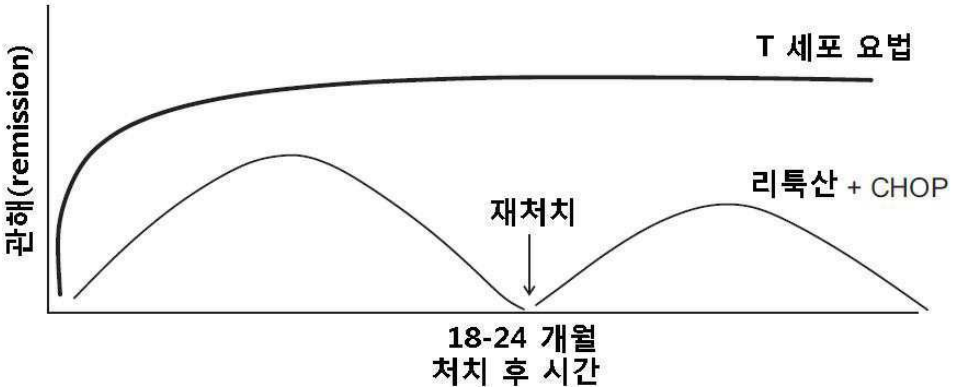


T 세포 요법 6개월 후

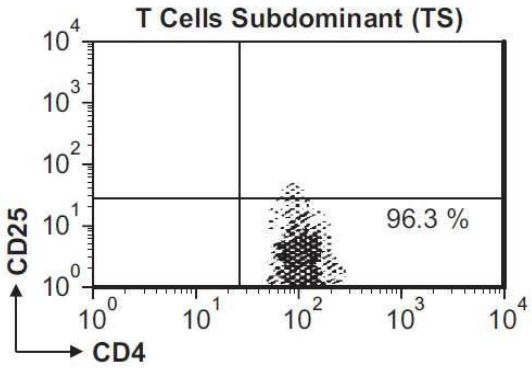
도면25

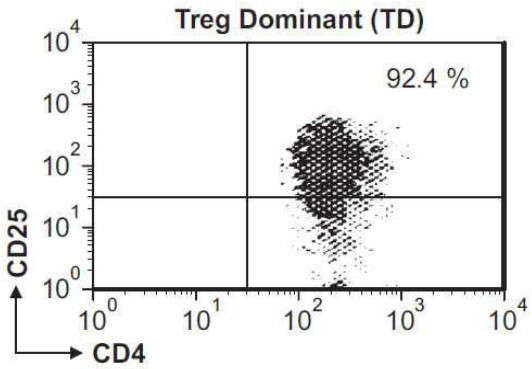


도면26

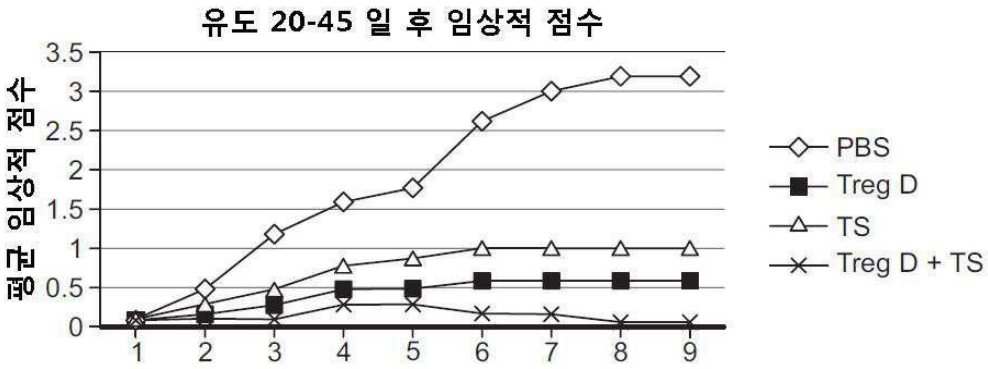

T 세포 요법
관해(remission)
리툭산 + CHOP
재처치
18-24 개월
처치 후 시간

도면27

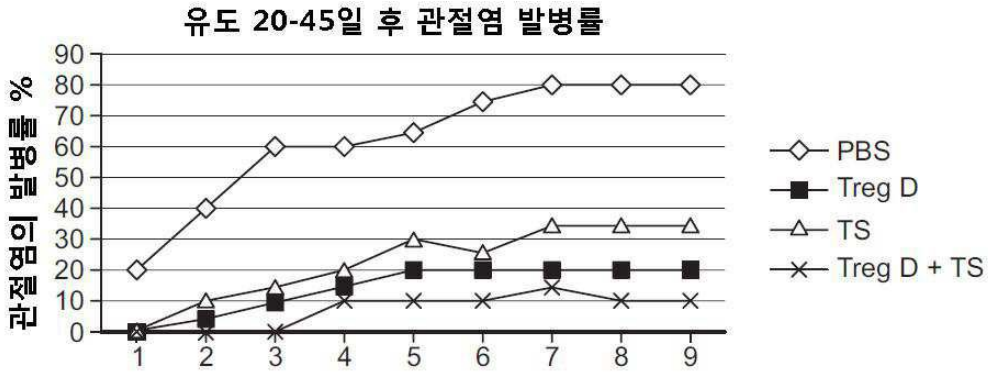

T Cells Subdominant (TS)
96.3 %
CD25
CD4


Treg Dominant (TD)
92.4 %
CD25
CD4

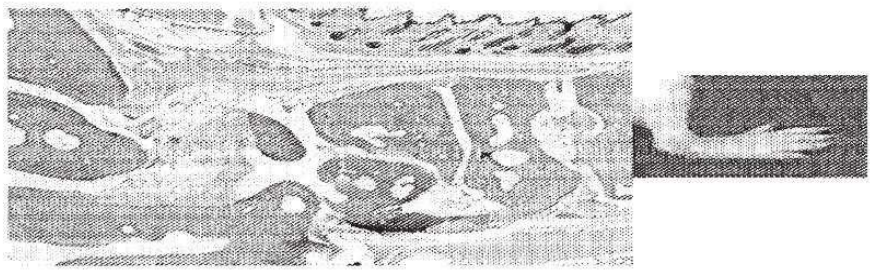
도면28




도면29

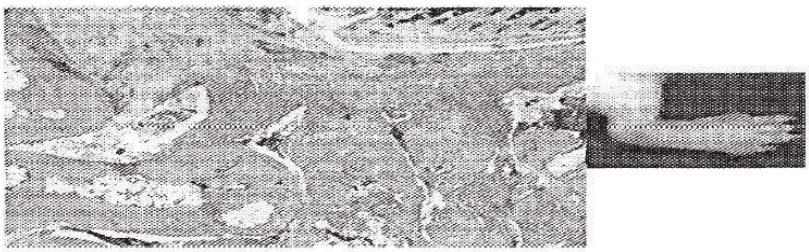



도면30a



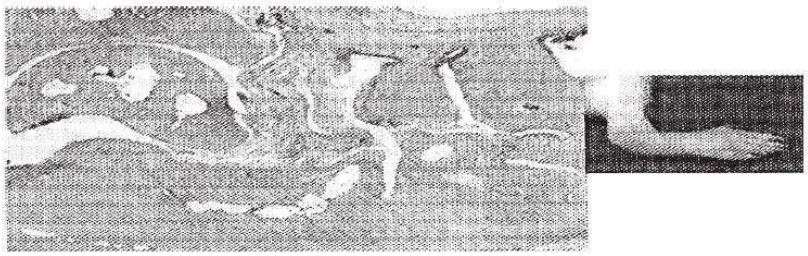
정상

도면30b



인간 프로테오글리칸으로 면역화

도면30c



T 세포 처치

도면31

