



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년02월07일
(11) 등록번호 10-2763373
(24) 등록일자 2025년01월31일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0784 (2010.01) A61K 35/15 (2025.01)
A61K 39/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 5/064 (2025.01)
A61K 35/15 (2025.01)
- (21) 출원번호 10-2018-7002974
- (22) 출원일자(국제) 2016년06월29일
심사청구일자 2021년06월29일
- (85) 번역문제출일자 2018년01월30일
- (65) 공개번호 10-2018-0022949
- (43) 공개일자 2018년03월06일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2016/040134
- (87) 국제공개번호 WO 2017/004230
국제공개일자 2017년01월05일
- (30) 우선권주장
62/187,086 2015년06월30일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
US20130273654 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
노쓰웨스트 바이오써라퓨틱스, 인크.
미국 메릴랜드주 20814 베데스다 스위트 800 몽고
메리 레인 4800
- (72) 발명자
보쉬 마르닉스 엘.
미국 워싱턴주 98039 메디나 노쓰이스트 14쓰 스
트리트 7814
- (74) 대리인
장훈

전체 청구항 수 : 총 10 항

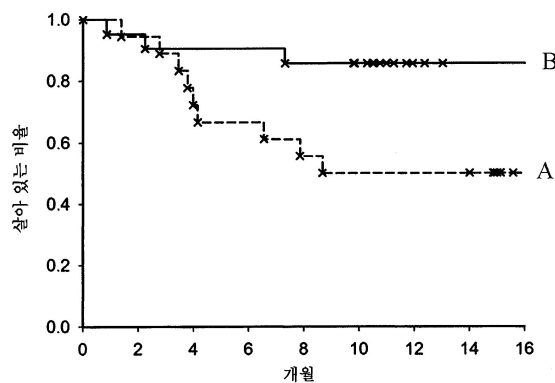
심사관 : 이현지

(54) 발명의 명칭 **항상되거나 증가된 항-종양 면역 반응을 유도하는 최적으로 활성화된 수지상 세포**

(57) 요약

본 개시는 암 및/또는 종양을 갖는 개체에게 투여하기 위해 사용될 수 있는 부분적으로 성숙하고 최적으로 활성화된 수지상 세포를 포함하는 세포의 집단을 제공한다. 부분적으로 성숙한 수지상 세포, 수지상 세포 성숙제와 약 10 내지 약 19시간 동안 접촉된 세포들은 투여시 종양 부위의 영역에서 종양 항원을 효율적으로 흡수하여 프로세싱하고, 성숙을 완료하고, 후속적으로 치료된 개체의 림프절로 이동시킬 수 있다. 일단 림프절로 이동되면, 완전히 성숙한 항원 제시 수지상 세포는 적절한 사이토카인(예를 들면, TNF α, IL-6, IL-8 및/또는 IL-12)을 분비하고, 실질적이고 최적인 임상학적 및/또는 항-종양 면역 반응을 유도하는 T 세포와 접촉한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 39/00 (2025.01)

C12N 2506/11 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

단리된 부분적으로 성숙하고 활성화된 사람 수지상 세포를 생산하는 방법으로서,

i) 사람 PBMC를 포함하는 세포 집단을 사람 단핵구 수지상 세포 전구체에 대해 풍부하게 하는(enriching) 단계로서, 상기 사람 PBMC를 포함하는 세포 집단은 사람 말초혈액에서 단리되는, 단계;

ii) 사람 단핵구 수지상 세포 전구체가 풍부한 상기 세포 집단을 유효량의 수지상 세포 분화제가 보충된 조직 배양 배지와 함께 상기 사람 단핵구 수지상 세포 전구체를 미성숙한 사람 수지상 세포로 분화시키기에 충분한 시간 동안 배양하는 단계;

iii) 미성숙한 사람 수지상 세포가 풍부한 상기 세포 집단을 유효량의 수지상 세포 성숙제와 배양하여 상기 미성숙한 사람 수지상 세포를 16시간 동안 활성화시키는 단계로서, 상기 수지상 세포 성숙제가 바실러스 칼메트-게랑(BCG: Bacillus Calmette-Guerin) 및 인터페론 γ (IFN γ)의 조합이고 상기 부분적으로 성숙한 수지상 세포가 항원을 흡수(uptake) 및 프로세싱하는, 단계; 및

iv) 상기 활성화된 사람 수지상 세포를 단리하고 세척하는 단계

를 포함하는, 단리된 부분적으로 성숙하고 활성화된 사람 수지상 세포를 생산하는 방법.

청구항 2

단리된 부분적으로 성숙하고 활성화된 사람 수지상 세포를 생산하는 방법으로서,

i) 사람 단핵구 수지상 세포 전구체가 풍부한 세포 집단을 유효량의 수지상 세포 분화제가 보충된 조직 배양 배지와 함께 상기 사람 단핵구 수지상 세포 전구체를 미성숙한 사람 수지상 세포로 분화시키기에 충분한 시간 동안 배양하는 단계로서, 상기 사람 단핵구 수지상 세포 전구체를 포함하는 세포 집단은 단리된 것인, 단계;

ii) 미성숙한 사람 수지상 세포가 풍부한 상기 세포 집단을 유효량의 수지상 세포 성숙제와 배양하여 상기 미성숙한 사람 수지상 세포를 16시간 동안 활성화시키는 단계로서, 상기 수지상 세포 성숙제가 BCG 및 인터페론 γ 를 포함하는, 단계; 및

iii) 상기 활성화된 사람 수지상 세포를 단리하고 세척하는 단계

를 포함하는, 단리된 부분적으로 성숙하고 활성화된 사람 수지상 세포를 생산하는 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 단핵구 수지상 세포 전구체가 피부, 비장, 골수, 흉선, 림프절, 제대혈, 또는 말초혈액으로부터 얻어지는, 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단핵구 수지상 세포 전구체 세포가 비-활성화된 단핵구 수지상 세포 전구체인, 방법.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단핵구 수지상 세포 전구체가 치료될 각각의 대상체로부터 얻어지는, 방법.

청구항 6

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단핵구 수지상 세포 전구체가 치료될 각각의 대상체에 대해 HLA-매칭된(mat ched) 건강한 각각의 대상체로부터 얻어지는, 방법.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 수지상 세포 분화제가 임의의 다른 사이토카인 부재 하의 GM-CSF, 또는 IL-4, IL-7, IL-13 또는 IL-15와 조합된 GM-CSF인, 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 BCG가 살아있는(live) 전체 BCG, BCG의 세포벽 성분, BCG-유도된 리포아라비도만난(lipoarabidomannan), 또는 BCG 구성성분을 포함하거나, 상기 BCG가 전체 BCG, BCG의 세포벽 성분, BCG-유도된 리포아라비도만난, 또는 BCG 구성성분을 포함하는 불활성화된 BCG를 포함하는, 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 불활성화된 BCG가 가열-불활성화된 BCG, 포르말린-처리된 BCG, 또는 가열-불활성화되고 포르말린 처리된 BCG인, 방법.

청구항 10

제1항 내지 제3항, 제8항 및 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 BCG의 유효량이 조직 배양 배지 밀리리터당 10^5 내지 10^7 cfu이고, IFN γ 의 유효량이 조직 배양 배지 밀리리터당 100 내지 1,000 유닛인, 방법.

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

발명의 설명

배경 기술

- [0001] 항원 제시 세포(APC: Antigen presenting cell)는 효과적인 면역 반응을 유발하는데 중요하다. 이들은 항원-특이적 T 세포 수용체를 갖는 T-세포에 대한 항원을 제시할 뿐만 아니라, T 세포 활성화에 필요한 신호를 제공하기도 한다. 항원을 제시하고 또한 T 세포 활성화에 대한 신호도 전달하는 APC의 능력은 보통 보조 세포 기능으로서 나타내어진다. 단핵구 및 B 세포는 컴피턴트(competent) APC인 것으로 밝혀졌지만, 시험관내에서의 이들의 항원 제시 능력은 이전에 감작화된(sensitized) T 세포의 재-활성화로 제한되는 것으로 나타난다. 따라서, 단핵구 및 B 세포는 기능적으로 나이브(naive)하거나 프라이밍되지 않은(unprimed) T 세포 집단을 직접적으로 활성화시킬 수 없다. 이들은 또한 유도된 면역 반응 또는 이들이 유도됨에 따른 면역 반응을 양극화시킬 수 있는 신호를 전달할 수 없다.
- [0002] 수지상 세포(DC)는 나이브 및 기억 T 세포 둘 다를 활성화시킬 수 있는 것으로 생각되는 면역계의 전문적인 항원 제시 세포이다. 수지상 세포는 면역 치료요법, 특히 암의 면역 치료요법에서 사용하기 위해 점차적으로 생체외에서 제조된다. 최적의 면역 자극 특성을 갖는 수지상 세포의 제조는 생체의 배양을 위한 이들 세포의 생물학의 이해 및 개발을 요구한다. 이들 세포의 배양을 위한 각종 프로토콜은 각각의 프로토콜에 따른 각종 이점과 함께 기술되어 있다.
- [0003] 수지상 세포의 활성화는, 피부 랑게르한스 세포와 표현형적으로 유사한 미성숙 DC를 림프절로 이동시킬 수 있는 성숙한 항원 제시 세포로 전환시키는 프로세스를 개시한다. 이러한 프로세스는 미성숙한 수지상 세포를 특징으로 하는 강력한 항원 흡수(uptake) 능력의 점진적이고 연속적인 손실을 초래하고, 공동-자극 세포 표면 분자 및 각종 사이토카인의 발현의 상황-조절을 초래한다. 각종 자극들은 DC의 성숙을 개시할 수 있다. 이러한 프로세스는 복잡하고, 적어도 단핵구 수지상 세포의 시험관내 완전한 성숙은 사용된 수지상 세포 성숙체에 따라 완료까지 최대 48시간이 걸릴 수 있다. 성숙의 하나의 다른 결과는 세포의 생체내 이동 특성의 변화이다. 예를 들면, 미성숙한 수지상 세포 성숙의 유도는, 상기 세포를 배수 림프절의 T 세포 영역에 보내는 CCR7을 포함하는 몇몇의 케모카인 수용체를 유도하고, 여기서, 성숙한 DC는 클래스 I 및 클래스 II MHC 분자와 관련하여 DC 표면 상에 제시된 항원에 대해 T 세포를 활성화시킨다. 용어 "활성화" 및 "성숙" 그리고 "활성화된" 및 "성숙한"은 미성숙한 DC(부분적으로는 항원을 흡수하는 능력에 의해 특성화된)로부터 성숙한 DC(부분적으로 새로운(de novo) T 세포 반응을 효율적으로 자극하는 능력에 의해 특성화된)로의 전이(transition)를 유도하고 완료하는 프로세스를 기술한다. 상기 용어들은 전형적으로 당해 분야에서 상호교환적으로 사용된다.
- [0004] 공지의 성숙 프로토콜은 Dc가 항원내의 동안에 또는 항원내의 노출 후에 접하는 생체내 환경에 기초한다. 이러한 접근법의 초기 예는 세포 배양 배지로서의 단핵구 조절 배지(MCM: monocyte conditioned media)의 사용이다. MCM은 단핵구를 배양함으로써 시험관내에서 생성되고 성숙 인자의 공급원으로서 사용된다. (예를 들면, 본원에 인용에 의해 포함된 US 2002/0160430을 참조한다.) 성숙에 관여하는 MCM의 주요 구성성분은 (프로)염증성 사이토카인인 인터류킨 1 베타(IL-1 β), 인터류킨 6(IL-6) 및 종양 괴사 인자 알파(TNF α)인 것으로 보고되어 있다.
- [0005] 따라서, DC의 성숙은 신호 전달 경로의 숙주를 통해 작용하는 호스트를 통해 작용하는 다수의 상이한 인자들에 의해 유발되거나 개시될 수 있다. 결과적으로, 단일 성숙 경로 또는 결과는 존재하지 않지만, 실제로 각각 이들 자체의 별개의 기능적 특성을 갖는 다수의 성숙한 DC 단계가 존재한다. 개념적으로 이는 면역계가 응답해야만 하는 신체에 대한 각종 위협이 많아 상이한 공격 전략을 필요로 하기 때문에 이해가 된다. 한 예로서, 세균 감염은 특정 항체가 보충된 활성화된 대식세포에 의해 가장 잘 소거되지만, 바이러스 감염은 바이러스-감염된 세포를 효율적으로 사멸시키는 세포독성 T 세포를 통해 가장 잘 공격된다. 암 세포의 사멸은 전형적으로 세포독성 T 세포, 자연 살해 세포 및 항체의 조합을 포함한다.
- [0006] 따라서, DC의 시험관내 성숙은 면역계가 한 유형의 면역 반응을 다른 면역 반응에 비해 선호하는 것, 즉, 면역 반응을 양극화시키는 것을 유도하도록 설계될 수 있다. DC의 방향성 성숙은 성숙 과정의 결과가 성숙된 DC를 이용한 치료로부터 초래되는 뒤이은 면역 반응의 유형을 지시한다는 개념을 설명한다. 이의 가장 간단한 형태에서, 방향성 성숙은 Th1-타입 또는 Th2-타입 면역 반응으로 양극화된 T 세포 반응을 지시하는 사이토카인을 생산하는 DC 집단을 초래한다. DC는 최대 9개의 상이한 To11-유사 수용체(TLR1 내지 TLR9)를 발현하고, 이의 각각은 성숙을 유발하는데 사용될 수 있다. 놀랄 것도 없이, TLR2 및 TLR4와 세균 생성물의 상호작용은 DC의 방향성 성숙을 초래하여 세균 감염을 취급하는데 가장 적절한 양극화된 반응을 초래한다. 반대로, TLR7 또는 TLR9를 통해 유발된 성숙은 항-바이러스 타입의 반응을 더 많이 초래하는 것으로 보인다. 추가의 예로서, 대부분의 성숙 프로토콜에의 인터페론 감마(IFN- γ)의 부가는 성숙한 DC에 의한 인터류킨 12의 생산을 초래하고, 이는 Th1-타입 면역 반응을 지시한다. 반대로, 프로스타글란딘 E2의 포함은 반대 효과를 갖는다.

- [0007] 완전히 성숙한 수지상 세포는 미성숙한 DC와 정성적으로 그리고 정량적으로 상이하다. 일단 완전하게 성숙하면, DC는 보다 높은 수준의 MHC 클래스 I 및 클래스 II 항원 및 보다 높은 수준의 T 세포 공동-자극 분자, 예를 들면, CD80 및 CD86을 발현한다. 이들 변화는 T 세포 상의 공동-자극 분자, 예를 들면, CD28의 대응물(counterpart)을 통한 T 세포 활성화 신호의 크기뿐만 아니라 세포 표면의 항원 밀도를 증가시키기 때문에 수지상 세포의 T 세포를 활성화시키는 능력을 증가시킨다. 또한, 성숙한 DC는 T 세포 반응을 자극하고 양극화시키는 다량의 사이토카인을 생산한다. 이들 사이토카인으로는 Th1-타입 면역 반응과 관련된 인터류킨 12 및 Th2-타입 면역 반응과 관련된 인터류킨-10 및 인터류킨-4가 포함된다.
- [0008] 일반적으로, 생체의 DC 생성을 위한 방법은 대상체로부터 DC 전구체 세포가 농축된 세포 집단을 얻고, 이어서 상기 대상체에게 다시 도입하기 전에 시험관내에서 DC 전구체 세포를 완전히 성숙한 DC로 분화시키는 것을 포함한다. 전형적으로, 이러한 프로세스 동안 성숙한 DC는 DC가 성숙됨에 따라 흡수 및 프로세스를 위해 항원과 접촉된다. 몇몇은 DC가 최종적으로 분화되어야만 하거나, 또는 단핵구/대식세포로 다시 탈-분화(de-differentiate)하여 이들의 면역-증강 능력을 많이 상실할 것이라고 생각한다. 단핵구로부터 생성된 DC의 생체 외 성숙은 당해 분야에 익히 공지되어 있는 방법 및 제제를 이용하여 성공적으로 달성되었다.
- [0009] 수지상 세포(DC)는 암의 활성 면역 치료요법에 대한 선택 수단으로서 인식된다. 동물 실험은 종양 형성으로부터 마우스를 보호하고 또한 확립된 종양을 제거하는데 있어서 DC 기반 면역 치료요법의 잠재성을 입증하였다. 이들 성공은 소규모 임상 시험에서의 사람에서 적어도 부분적으로 중복되었다. 작은 안전성 또는 개념 증명 시험으로부터 활성 또는 효능이 입증될 수 있는 보다 큰 시험으로의 전환은 상기 기술된 바와 같이 DC 제조의 번거롭고 성가신 특성에 의해 방해받아 왔다. 결과적으로 이러한 제품의 큰 잠재적 치료학적 가치에도 불구하고 DC-기반 암 백신 개발에 관심이 있는 회사는 거의 없었다.
- [0010] DC의 종양내(IT) 주사는 특별한 형태의 DC-기반 면역 치료요법이다. 주사시, DC는 예를 들면, 아포토시스성(apoptotic) 또는 죽어가는 종양 세포로부터 생체내 항원을 흡수하고, 림프절로의 이동 후 T 세포에 항원(들)을 제시한다. 실제로, 동물 모델에서의 이러한 치료의 효능은 종양에서의 아포토시스(apoptosis)의 정도와 상관관계가 있음이 발견되었고(Candido et al., Cancer Res., 61:228-236, 2001), 이는 이러한 접근법이 DC의 주사 전에 화학 치료학적 제제 또는 방사선을 이용하여 종양을 치료하는 것과 완전히 컴패터블(compatible)함을 시사한다. 또한, 몇몇의 그룹은 이러한 병용 치료요법이 확립된 종양에 대해 특히 효과적임을 입증하였다(Nikitina et al., Int. J. Cancer 94:825-833, 2001; Tanaka et al., Int. J. Cancer 101:265-269, 2002; Tong et al., Cancer Res. 61:7530-7535, 2001).
- [0011] 생체내 종양 세포가 항원의 공급원이기 때문에, IT 주사는 대부분의 시험관내 DC 기반 치료요법 접근법에서 현재 사용되고 있으므로 종양 항원의 선택 및 제조 둘 다에 대한 필요성을 피한다. 종양 항원의 선택은 종종 회사가 독점적 지위를 가질 필요성에 의해 주도되고, 유의한 임상학적 이점을 제공하는 것으로 증명된 현재까지 확인된 종양 항원의 거의 없다. 또한, 이러한 종양 항원의 사용은 종종, 종양 세포가 면역화(immunization)에 사용되는 항원의 발현을 하향 조절하는 경우에 이의 유효성을 잃을 수 있는 1가의 백신을 초래한다. 물론, Good Manufacturing Practices(GMP) 하에 요구되는 조건 하에서 종양 항원을 제조해야 할 필요성은 전형적인 DC-기반 면역화 방법에 추가의 비용을 부가한다.
- [0012] DC의 IT 주사는 수지상 세포를 면역억제성 종양 환경에 종속시킨다. 종양은 DC를 불활성화시키는 사이토카인 또는 T 세포 반응을 덜 효과적인 Th2-타입 면역 반응쪽으로 편향시키는 능력을 갖는 사이토카인을 생산하는 것으로 알려져 있다. 몇몇의 그룹은 특히 인터류킨 12(IL-12; Nishioka et al., Cancer Res. 59:4035-4041, 1999; Melero et al. Gene Therapy 6: 1779-1784, 1999)의 생산 또는 CD40 리간드의 발현(Kikuchi et al., Blood 96:91-99, 2000)을 통해 이들 억제 효과를 극복하는 것을 시도하기 위해 DC의 유전자 변형을 사용하였다. 이들 그룹에 의해 기술된 고무적인 결과는 치료학적 접근법으로서 DC의 IT 주사의 실행가능성(viability)을 추가로 입증한다.
- [0013] Triozzi 등(Cancer 89:2647-2654, 2000)은 전이성 흑색종 또는 유방암을 갖는 환자에서의 DC의 IT 주사를 기술한다. 그들은 흑색종을 갖는 4명의 환자에서 그리고 유방 암종을 갖는 2명의 환자에서 종양 퇴행을 얻었다. 퇴행성 병변의 생검은 침윤성 T 세포를 입증하였고, 이는 DC가 실제로 종양 세포에 대한 면역 반응을 활성화시켰음을 시사했다. 전반적으로, 이들 데이터는 DC의 IT 주사가 사람에서 가능하였음을 입증하였고, 유의한 임상학적 이점을 제공할 수 있었다. 그러나, 주사된 DC에 대한 MHC 클래스 II 항원의 그리고 B7-2 공동-자극 분자의 유의한 하향 조절이 관찰되었다. 이들 결정적인 분자의 하향 조절은 DC의 면역자극 잠재성을 감소시킬 것으로 기대될 수 있다.

[0014] 이러한 하향 조절을 극복하기 위한 한 방법은 WO 2004/053072(본원에 인용에 의해 포함됨)에 개시되어 있고, 여기서, 투여 전에 DC의 부분적 성숙을 통해 하향 조절이 회피될 수 있음이 밝혀졌다. 이러한 방법에서, 수지상 세포 전구체(적혈구 용해 후의 골수 세포 또는 단핵구 수지상 세포 전구체)는 미성숙 수지상 세포를 분화시키도록 시험관내에서 유도되었고, 상기 미성숙 수지상 세포는 상기 세포를 수지상 세포 성숙제, 예를 들면, BCG 및 IFN γ , 리포폴리사카라이드(LPS), 종양 괴사 인자 α (TNF α), 이미다조퀴놀린 화합물, 합성 이중 가닥의 폴리리보뉴클레오타이드, Toll-유사 수용체(TLR)의 효능제, DC의 성숙을 유도하는 것으로 공지되어 있는 비메틸화된 CpG 모티프를 함유하는 핵산의 서열, 또는 이들의 임의의 조합과 배양함으로써 하여 성숙을 시작하도록 유도되었다. 미성숙 수지상 세포를 미성숙 수지상 세포가 완전히 성숙되도록 하기 위해 이전에 측정된 것보다 더 적은 시간 동안 성숙을 지속하도록 허용하였다. 수지상 세포가 시험관내에서 완전히 성숙되도록 허용된 경우, 세포는 환자에게 투여한 후에 항원을 흡수하고 프로세싱할 수 없을 수 있다. 본 발명자들은 부분적으로 성숙한 수지상 세포의 단리 및 환자에게 투여하기 위한 제형화 전에 수지상 세포를 최적의 활성화를 위해 1 내지 약 10 시간 동안 숙성시켜야만 함을 개시하였다.

[0015] 예상치 못하게도, 수지상 세포 성숙제(예를 들면, BCG 및 IFN γ)와 약 10 내지 약 19시간 동안 접촉된 미성숙 수지상 세포가 생체내 항원의 흡수 및 프로세싱 및 대상체에서의 항-종양 반응의 후속적 유도를 위해 최적으로 활성화됨이 측정되었다.

발명의 내용

[0016] 요약

[0017] 본 개시는 단리된 활성화된 사람 수지상 세포를 생산하는 방법으로서, i) 말초혈 유래의 사람 PBMC를 포함하는 세포 집단을 단리하는 단계; ii) 사람 PBMC를 포함하는 세포 집단을 사람 단핵구 수지상 세포 전구체에 대해 농축시키는 단계; iii) 사람 단핵구 수지상 세포 전구체가 농축된 상기 세포 집단을 유효량의 수지상 세포 분화제가 보충된 조직 배양 배지와 함께 상기 사람 단핵구 수지상 세포 전구체를 미성숙한 사람 수지상 세포로 분화시키는 데 충분한 시간 동안 배양하는 단계; iv) 미성숙한 사람 수지상 세포가 농축된 상기 세포 집단을 유효량의 수지상 세포 성숙제와 배양하여 상기 미성숙한 사람 수지상 세포를 약 10 내지 약 19시간 동안 활성화시키는 단계; 및 v) 상기 활성화된 사람 수지상 세포를 단리하고 세척하는 단계를 포함하는, 단리된 활성화된 사람 수지상 세포를 생산하는 방법을 제공한다.

[0018] 추가의 실시형태에서, 단리된 활성화된 사람 수지상 세포를 생산하는 방법으로서, 상기 방법은 i) 사람 단핵구 수지상 세포 전구체를 포함하는 세포 집단을 단리하는 단계; ii) 사람 단핵구 수지상 세포 전구체가 농축된 상기 세포 집단을 유효량의 수지상 세포 분화제가 보충된 조직 배양 배지와 함께 상기 사람 단핵구 수지상 세포 전구체를 미성숙한 사람 수지상 세포로 분화시키는 데 충분한 시간 동안 배양하는 단계; iii) 미성숙한 사람 수지상 세포가 농축된 상기 세포 집단을 유효량의 수지상 세포 성숙제와 배양하여 상기 미성숙한 사람 수지상 세포를 약 10 내지 약 19시간 동안 활성화시키는 단계; 및 iv) 상기 활성화된 사람 수지상 세포를 단리하고 세척하는 단계를 포함하는, 단리된 활성화된 사람 수지상 세포를 생산하는 방법이 제공된다.

[0019] 상기 방법들은 피부, 비장, 골수, 흉선, 림프절, 제대혈, 또는 말초혈로부터 얻어지는 단핵구 수지상 세포 전구체를 사용할 수 있다. 또한, 상기 단핵구 수지상 세포 전구체는 치료될 각각의 대상체로부터 또는 치료될 상기 각각의 대상체에 대해 HLA-매칭된(matched) 건강한 각각의 대상체로부터 얻어진다.

[0020] 상기 방법들에서, 상기 수지상 세포 분화제는 다른 사이토카인의 부재 하의 GM-CSF 단독 또는 인터류킨 4(IL-4), 인터류킨 7(IL-7), 인터류킨-13(IL-13) 또는 인터류킨 15(IL-15) 등과 조합된 GM-CSF일 수 있다. 한 전형적인 실시형태에서, GM-CSF가 단독으로 사용되는 경우, 비-활성화된 단핵구 수지상 세포 전구체를 사용하고, 조직 배양 배지에 적어도 1%의 사람 또는 동물 단백질을 보충하여 조직 배양 기질의 상기 비-활성화된 단핵구 수지상 세포 전구체의 부착을 방지한다. 사람 또는 동물 단백질은 알부민, 혈청, 혈장, 젤라틴, 및 폴리-아미노산 등일 수 있다.

[0021] 상기 방법들에서, 상기 수지상 세포 성숙제는 불활성화된 바실러스 칼메트-게랑(BCG: Bacillus Calmette-Guerin), 인터페론 γ (IFN γ), 리포폴리사카라이드(LPS), 종양 괴사 인자 α (TNF α), 이미다조퀴놀린 화합물, 합성 이중 가닥의 폴리리보뉴클레오타이드, 예를 들면, 폴리[I]:폴리[C(12)U], Toll-유사 수용체(TLR)의 효능제 (agonist), 수지상 세포의 성숙을 유도하는 것으로 공지되어 있는 비메틸화된 CpG 모티프를 함유하는 핵산의 서열, 또는 이들의 임의의 조합일 수 있다. 상기 불활성화된 BCG는 전체 BCG, BCG의 세포벽 성분, BCG-유도된 리포아라비도만난, 또는 BCG 구성성분을 포함할 수 있고, 상기 불활성화된 BCG는 가열-불활성화되거나, 포르말린-

처리되거나, 가열-불활성화되고 포르말린 처리될 수 있다.

- [0022] 상기 방법들 중 하나에서 사용되는 경우, BCG의 유효량은 조직 배양 배지의 밀리리터당 약 10^5 내지 약 10^7 cfu 이고, IFN γ 의 유효량은 조직 배양 배지의 밀리리터당 약 100 내지 약 1,000 유닛이다. 상기 방법이 이미다조 퀴놀린 화합물을 사용하는 경우, 상기 화합물은 이미다조퀴놀린-4-아민 화합물, 예를 들면, 4-아미노-2-에톡시 메틸- α , α -디메틸-1H-이미다졸[4,5-c]퀴놀린-1-5 에탄올 또는 1-(2-메틸프로필)-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-4-아민, 또는 이들의 유도체일 수 있다.
- [0023] 상기 부분적으로 성숙하고 최적으로 활성화된 수지상 세포는 종양에 직접적으로 투여하거나; 종양의 제거 또는 절제 후의 종양상(tumor bed)에 투여하거나; 종양을 둘러싼 조직 영역에 투여하거나; 종양 영역을 직접적으로 배수(drainage)시키는 림프절에 투여하거나; 종양 또는 종양에 걸린 기관에 혈액 또는 림프를 전달하는 순환 혈관 또는 덕트(duct)에 직접적으로 투여하거나; 또는 종양 또는 종양에 걸린 기관에 상기 세포가 전달되도록 하는 순환계에 투여할 수 있다.
- [0024] 상기 방법들 중 어느 하나에 의해 생산된 부분적으로 성숙하고 최적 활성인 수지상 세포는 방사선 치료요법, 화학 치료요법 또는 이들의 조합에 대한 보강제로서 투여할 수 있다. 예를 들면, 부분적으로 성숙하고 최적으로 활성화된 수지상 세포는 방사선 치료요법, 화학 치료요법, 또는 이들의 조합의 전에, 이들과 동시에, 또는 이들에 후속하여 투여할 수 있다.
- [0025] 다른 실시형태에서, 약 10 내지 약 19시간 동안 사람 수지상 세포 성숙제를 이용하여 시험관내에서 부분적으로 성숙되고 최적으로 활성화된 사람 수지상 세포가 농축된 세포 집단 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 조성물을 투여함을 포함하는, 항-종양 면역 반응 및/또는 임상학적 반응을 생성시키는 방법으로서; 상기 조성물을 이러한 치료를 필요로 하는 개체에서 종양에 투여하거나, 종양상에 투여하거나, 또는 종양을 둘러싼 조직 영역에 투여하는, 항-종양 면역 반응 및/또는 임상학적 반응을 생성시키는 방법이 제공된다.
- [0026] 또 다른 실시형태에서, 약 10 내지 약 19시간 동안 사람 수지상 세포 성숙제와 배양함으로써 성숙해지도록 유도된 부분적으로 성숙되고 최적으로 활성화된 사람 수지상 세포를 포함하는 조성물로서, 상기 부분적으로 성숙되고 최적으로 활성화된 수지상 세포는 염증성 반응과 관련된 사이토카인을 생성시키는, 조성물이 제공된다. 예를 들면, 사이토카인은 종양 괴사 인자 α (TNF α), 인터류킨 6(IL-6) 및/또는 인터류킨 8(IL-8)을 유도할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0027] 본원에 기술된 방법 및 조성물의 선행하는 양상들 및 다수의 부수적 이점은, 첨부된 도면과 함께 고려하는 경우 동일한 것이 다음의 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용을 참조함으로써 더 잘 이해되므로 보다 쉽게 이해될 수 있고, 여기서:
 도 1은 각각의 치료 방법에 대한 생존 플롯을 도시한다. 데이터 점은 개월로 측정된 각종 시간에서 살아 남은 개체의 비율을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0028] 수지상 세포는 각종 림프성 및 비-림프성 조직에서 발견된 다양한 집단의 항원 제시 세포이다. (문헌[Liu, Cell 106:259-262 (2001); Steinman, Ann. Rev. Immunol. 9:271-296 (1991)]을 참조한다). 수지상 세포로는 비장의 림프성 수지상 세포, 표피의 랑게르한스 세포, 및 혈액 순환에서의 베일 세포(veiled cell)가 포함된다. 총체적으로, 수지상 세포는 이들의 형태, 높은 수준의 표면 MHC-클래스 II 발현, 및 T 세포, B 세포, 단핵구 및 자연 살해 세포 상에서 발현되는 소정의 다른 표면 마커의 부재에 기초한 한 그룹으로서 분류된다. 특히, 단핵구 유도된 수지상 세포(단핵구 수지상 세포로서도 나타냄)는 일반적으로 CD11c, CD80, CD86을 발현시키고, HLA-DR⁺이지만 CD14⁻이다.
- [0029] 대조적으로, 단핵구 수지상 세포 전구체(전형적으로 단핵구)는 일반적으로 CD14⁺이다. 단핵구 수지상 세포 전구체는 이들이 존재하는 임의의 조직, 특히 림프구 조직, 예를 들면, 비장, 골수, 림프절 및 흉선으로부터 수득될 수 있다. 단핵구 수지상 세포 전구체는 또한 순환계로부터 단리될 수 있다.
- [0030] 말초혈은 단핵구 수지상 세포 전구체의 쉽게 접근가능한 공급원이다. 제대혈은 단핵구 수지상 세포 전구체의 다른 공급원이다. 단핵구 수지상 세포 전구체는 면역 반응이 유발될 수 있는 각종 유기체로부터 단리될 수 있다

다. 이러한 유기체로는 예를 들면, 사람 및 비-사람 동물, 예를 들면, 영장류, 포유동물(개, 고양이, 마우스, 및 래트), 조류(닭 포함), 및 이들의 유전자전이 종(transgenic species)을 포함하는 동물이 포함된다.

[0031] 소정 실시형태들에서, 단핵구 수지상 세포 전구체 및/또는 미성숙한 수지상 세포는 건강한 대상체로부터 또는 면역자극을 필요로 하는 대상체, 예를 들면, 암환자 또는 세포성 면역자극이 이롭거나 요구될 수 있는 다른 대상체(즉, 세균 또는 바이러스 감염 또는 증식성(hyperplastic) 병태 등을 갖는 대상체)로부터 단리될 수 있다. 수지상 세포 전구체 및/또는 미성숙한 수지상 세포는 또한 부분적 활성화 및 면역자극을 필요로 하는 HLA-매칭된 대상체에의 투여를 위해 HLA-매칭된 건강한 개체로부터 수득될 수 있다.

[0032] 수지상 세포 전구체 및 미성숙한 수지상 세포

[0033] 수지상 세포 전구체, 예를 들면, 비-활성화된 수지상 세포 전구체, 및 혈액 및 골수를 포함하는 각종 공급원 유래의 미성숙한 수지상 세포가 농축된 세포 집단을 분리하는 방법이 당해 분야에 공지되어 있다. 예를 들면, 수지상 세포 전구체 및 미성숙한 수지상 세포는 헤파린화된(heparinized) 혈액을 채취함에 의해, 성분채집술(apheresis) 또는 백혈구 성분채집술(leukapheresis)에 의해, 버피 코트(buffy coat)의 제조, 총생(rosetting), 원심분리, 밀도 구배 원심분리(예를 들면, Ficoll[®](예를 들면, FICOLL-PAQUE[®]), PERCOLL[®](폴리비닐피롤리돈(PVP)으로 코팅된 콜로이드 실리카 입자(15 내지 30nm 직경), 및 슈크로스 등을 이용함), 세포의 차등 용해(differential lysis), 및 여과 등에 의해 단리될 수 있다. 소정 실시형태들에서, 백혈구 집단은 예를 들면, 대상체로부터 혈액을 수집하고, 혈소판을 제거하기 위해 섬유소를 제거(de-fibrinating)하고, 적혈구 세포를 용해시킴으로써 제조될 수 있다. 수지상 세포 전구체 및 미성숙 수지상 세포는 예를 들면, PERCOLL[®] gradient를 통한 원심분리, 및 항체 팬닝(panning) 등에 의해 단핵구 수지상 세포 전구체에 대해 임의로 농축될 수 있다. 본원에서 사용된 용어 "농축된"은 세포 집단 내의 단핵구 수지상 세포 전구체, 미성숙한 수지상 세포, 또는 부분적으로 성숙한 수지상 세포가 세포 집단 내의 세포의 총 수의 적어도 25%, 세포 집단 내의 세포의 총 수의 적어도 30%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80% 또는 적어도 심지어 90%를 포함함을 의미한다. 전형적으로, 농축된 세포는 집단 내의 세포의 총 수의 적어도 약 50%를 포함할 것이다. 소정 실시형태들에서, 농축된 세포는 세포 집단 내의 세포의 총 수의 적어도 약 90% 내지 최대 약 100%를 포함할 것이다.

[0034] 수지상 세포 전구체 및 미성숙한 수지상 세포는 선택적으로 폐쇄된 무균 시스템에서 제조될 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 "폐쇄된 무균 시스템" 또는 "폐쇄 시스템"은 비-멸균의 주위 또는 순환 공기 또는 다른 비-멸균 조건에 대한 노출이 최소화되거나 제거되는 시스템을 말한다. 수지상 세포 전구체 및 미성숙한 수지상 세포를 단리하기 위한 폐쇄된 시스템은 일반적으로 개방형 탑 튜브에서의 밀도 구배 원심분리, 세포의 개방된 공기 이동, 조직 배양 플레이트 또는 밀봉되지 않은 플라스크에서의 세포 배양 등을 배제한다. 한 전형적인 실시형태에서, 폐쇄된 시스템은 초기 수집 용기로부터 비-멸균 공기에 노출되지 않으면서 밀봉가능한 조직 배양 용기로 수지상 세포 전구체 및 미성숙한 수지상 세포의 무균 이동을 가능하게 한다.

[0035] 수지상 세포 전구체를 단리하기 위한 다른 보고된 방법은 부착성 단핵구 및 다른 "비-수지상 세포 전구체"를 선택적으로 제거하기 위해 상업적으로 처리된 플라스틱 기재(예를 들면, 비드 또는 자기 비드)를 사용하는 것이다. (예를 들면, U.S. 특허 제5,994,126호 및 제5,851,756호를 참조한다). 부착성 단핵구 및 비-수지상 세포 전구체는 폐기되지만, 비-부착성 세포는 생체의 배양 및 성숙을 위해 유지된다. 다른 방법에서, 성분채집 세포를 플라스틱 배양 백에서 배양하고, 여기에 플라스틱, 즉, 폴리스티렌 또는 스티렌, 마이크로 담체 비드를 추가하여 백의 표면적을 증가시켰다.

[0036] 소정 세포가 비드에 부착하기에 충분한 시간 동안 세포를 배양하였고, 비-부착성 세포를 백으로부터 세척하였다. (문헌[Maffei, et al., Transfusion 40:1419-1420 (2000)], WO 02/44338, 본원에 인용에 의해 포함됨). 소정의 다른 실시형태들에서, 단핵구 수지상 세포 전구체는 WO 03/010292에 개시된 바와 같은 단핵구-결합성 기질에 대한 느슨한 부착에 의해 단리된다. 예를 들면, 백혈구의 집단(예를 들면, 백혈구 성분 채집술에 의해 단리됨)은 단핵구 수지상 세포 전구체 부착성 기질과 접촉될 수 있다. 백혈구의 집단이 기질과 접촉하는 경우, 백혈구 집단의 단핵구 수지상 세포 전구체는 기질에 우선적으로 부착되지만, 분화 또는 성숙을 위해 활성화되지 않는다. 다른 백혈구(다른 잠재적 수지상 세포 전구체를 포함함)는 기질에 대한 감소된 결합 친화도를 나타내고, 이에 의해 단핵구 수지상 세포 전구체가 기질의 표면에서 우선적으로 농축되는 것을 가능케한다.

[0037] 적합한 기질로는 예를 들면, 큰 표면적 대 체적 비를 갖는 것들이 포함된다. 기질은 예를 들면, 미립자 또는 섬유성 기질일 수 있다. 적합한 미립자 기질로는 예를 들면, 유리 입자, 플라스틱 입자, 유리-코팅된 플라스틱

입자, 유리-코팅된 폴리스티렌 입자, 및 단백질 흡수에 적합한 기타 비드가 포함된다. 본 발명의 방법에 사용하기에 적합한 섬유성 기질로는 미세 모세관 및 미세 용모성 막 등이 포함된다. 미립자 또는 섬유질 기체는 전형적으로 부착된 세포의 생존력을 실질적으로 감소시키지 않으면서 부착된 단핵구 수지상 세포 전구체가 용출되는 것을 가능하게 한다. 미립자 또는 섬유질 기질은 기질로부터 단핵구 수지상 세포 전구체 또는 수지상 세포의 용출을 용이하게 하기 위해 실질적으로 비-다공성일 수 있다. "실질적으로 비-다공성" 기체는 기체에 존재하는 세공의 적어도 대부분이 상기 세포보다 더 작아서 기체에 세포를 포획하는 것을 최소화하는 기체이다.

[0038] 기질에의 단핵구 수지상 세포 전구체의 부착은 선택적으로 결합 배지의 첨가에 의해 향상될 수 있다. 적합한 결합 배지로는 예를 들면, 사이토카인(예를 들면, 과립구/대식세포 콜로니 자극 인자(GM-CSF), 또는 인터류킨 4(IL-4), 인터류킨 15(IL-15), 또는 인터류킨 13(IL-13)과 조합된 GM-CSF), 혈장, 혈청(예를 들면, 사람 혈청, 예를 들면, 자가 또는 동종이체 혈청), 정제된 단백질, 예를 들면, 혈청 알부민, 2가의 양이온(예를 들면, 칼슘 및/또는 마그네슘 이온) 및 기질에의 단핵구 수지상 세포 전구체의 특이적 부착을 보조하는 다른 분자, 또는 기질에 비-단핵구 수지상 세포 전구체의 부착을 방지하는 다른 분자가 보충되거나, 개별적으로 또는 임의의 조합으로의 단핵구 수지상 세포 전구체 배양 배지(예를 들면 AIM-V[®], RPMI 1640, DMEM, 및 XVIVO 15[®] 등), 및 기질에의 단핵구 수지상 세포 전구체의 특이적 부착을 보조하는 다른 분자 또는 기질에의 비-단핵구 수지상 세포 전구체의 예방을 방지하는 다른 분자가 포함된다. 소정 실시형태들에서, 혈장 또는 혈청은 가열-불활성화될 수 있다. 가열-불활성화된 혈장은 백혈구에 대해 자가 또는 이중성일 수 있다.

[0039] 기질에의 단핵구 수지상 세포 전구체의 부착 후, 비-부착성 백혈구가 단핵구 수지상 세포 전구체/기질 복합체로부터 분리된다. 임의의 적합한 수단이 상기 복합체로부터 비-부착성 세포를 분리하는데 사용될 수 있다. 예를 들면, 비-접착성 백혈구와 복합체의 혼합물은 침강될 수 있고, 비-부착성 백혈구 및 배지는 경사분리(decanting)되거나 배수된다. 대안으로, 상기 혼합물은 원심분리하고, 비-부착성 백혈구를 함유하는 상층액을 펠릿화(pelleted)된 복합체로부터 경사분리시키거나 배수시킬 수 있다. 기질에의 단핵구 수지상 세포 전구체의 부착은 단핵구 수지상 세포 전구체가 추가의 자극의 부재 하에 성숙한 수지상 세포 또는 대식세포를 활성화시키고 분화시키거나 또는 미성숙한 수지상 세포로의 성숙을 유도하지 않음에 유의해야 한다.

[0040] 다른 방법에서, 비-활성화된 단핵구 수지상 세포 전구체는 2003년 6월 19일에 출원된 국제 특허 출원 공보 제WO 2004/000444호, 현재 US 특허 제7,695,627호(둘 다 본원에 인용에 의해 포함됨)에 기술된 바와 같은 접선 유동 여과 장치(tangential flow filtration device)의 사용에 의해 제조된 백혈구가 농축된 세포 집단으로부터 단리될 수 있다. 단핵구 수지상 세포 전구가 농축된 세포 집단의 단리에 유용한 접선 유동 여과 장치는 교차-유동(cross-flow) 챔버, 여과물 챔버 및 이들 사이에 배치되는 필터를 갖는 제거기 유닛을 포함할 수 있다. 필터는 한면에 교차-유동 챔버를 갖는 잔류물(retentate) 표면, 및 다른 면에 여과물 챔버를 갖는 여과물 표면과 유동 연결(fluid communication)된다. 교차-유동 챔버는 백혈구를 포함하는 혈액 성분의 샘플을 교차-유동 챔버로 그리고 필터의 잔류물 표면에 평행하게 도입시키도록 조정된 유입구를 갖는다. 또한, 출구는 필터의 잔류물 표면의 맞은 편 챔버의 부분에 중심 배치된 교차-유동 챔버에 제공된다. 접선 유동 여과 장치에 사용하기에 적합한 필터는 전형적으로 약 1 내지 약 10 마이크로 범위의 평균 공극 크기를 갖는다. 필터는 약 3 내지 약 7 미크론의 평균 공극 크기를 가질 수 있다. 교차-유동 챔버의 유입구에 소정의 투입 속도의 샘플을 제공하기 위한 수단 및 필터를 통한 그리고 여과물 챔버로의 여과물의 여과 속도를 제어하기 위한 수단도 포함될 수 있다. 여과 속도 제어 수단은 여과 속도를 필터에 대한 무저항(unopposed) 여과 속도 미만으로 제한한다. 혈액 성분을 포함하는 샘플은 백혈구 성분 채집 장치 또는 백혈구 성분 채집 장치로부터 수집된 샘플을 포함하는 컨테이너와 같은 공급원 장치에 의해 제공될 수 있다.

[0041] 단핵구 수지상 세포 전구체 및 전구체가 농축된 세포 집단은 분화 및 부분적 성숙 및/또는 증식(expansion)을 위해 생체의 또는 시험관내에서 배양될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, "단리된 미성숙 수지상 세포", "수지상 세포 전구체" 및 다른 "세포"는 사람의 손에 의해 이들의 본래 환경과 별개로 존재하고, 따라서 자연의 산물이 아닌 세포를 말한다. 단리된 세포는 정제된 형태로, 반정제된 형태로 그리고/또는 비-천연 환경에 존재할 수 있다. 간략하게, 시험관내 및/또는 생체의 수지상 세포 분화는 전형적으로 단핵구 수지상 세포 전구체 또는 하나 이상의 수지상 세포 분화제의 존재 하에 수지상 세포 전구체를 갖는 세포의 집단을 배양하는 것을 포함한다. 적합한 분화제는 예를 들면, 세포 성장 인자(예를 들면, (GM-CSF)와 같은 사이토카인, 또는 GM-CSF 및 인터류킨 4(IL-4), 인터류킨 13(IL-13), 또는 인터류킨 15(IL-15), 또는 인터류킨 7(IL-7)의 조합)를 포함할 수 있다. 소정 실시형태들에서, 단핵구 수지상 세포 전구체가 분화되어 단핵구-유도된 미성숙한 수지상 세포를 형성한다.

- [0042] 수지상 세포 전구체는 시험관내 배양 조건에서 적합하게 배양 및 분화될 수 있다. 적합한 수지상 세포 조직 배양 배지로는 AIM-V[®], RPMI 1640, DMEM, 및 X-VIVO 15[®] 등이 포함되지만, 이들에 한정되는 것은 아니다. 조직 배양 배지에 혈청, 혈장, 아미노산, 비타민, 사이토카인, 예를 들면, GM-CSF 및/또는 IL-4, IL-7, IL-13, IL-15, 및 2가의 양이온 등을 보충하여 세포의 분화를 촉진시킬 수 있다. 소정 실시형태들에서, 수지상 세포 전구체는 선택적으로 임의의 동물-유도된 생성물을 배제할 수 있다. 수지상 세포 배양 배지와 함께 사용된 전형적인 사이토카인 조합은 각각 약 500 유닛/ml의 GM-CSF 및 IL-4, IL-7, IL-15 또는 IL-13을 포함한다. 비-활성화된 수지상 세포 전구체가 전형적인 수지상 세포인 전형적인 실시형태에서, 조직 배양 배지에는 소정 조건 하에서 임의의 다른 사이토카인의 부재 하에 GM-CSF를 보충할 수 있다. 예를 들면, GM-CSF가 단독으로 사용되는 경우에 상기 조직 배양 배지에는 또한 전형적으로 고농도의 사람 또는 동물 단백질을 보충하여 조직 배양 기질의 비-활성화된 단백질 수지상 세포 전구체의 부착을 방지하고, 이에 의해 수지상 세포 전구체의 성숙이 활성화된다. 전형적으로, 사람 또는 동물 단백질은 1% 초과와 농도로 부가되고, 전형적으로 10% 이하의 농도로 사용된다. 사람 또는 동물 단백질은 알부민, 예를 들면, 사람 혈청 알부민, 혈청, 혈장, 젤라틴, 및 폴리-아미노산 동일 수 있다.
- [0043] 수지상 세포 전구체는, 분화되어 미성숙한 수지상 세포를 형성하는 경우, 피부 랑게르한스 세포와 표현형적으로 유사하다. 미성숙한 수지상 세포는 전형적으로 CD14⁻ 및 CD11c⁺이고, 낮은 수준의 CD86 및 CD83을 발현하고, 전문화된 엔도사이토시스(endocytosis)를 통해 가용성 항원을 포획할 수 있다.
- [0044] 수지상 세포 성숙제로는 BCG, IFN γ , LPS, TNF α , 이미다조퀴놀린 화합물, 예를 들면, 이미다조퀴놀린-4-아민 화합물, 예를 들면, 4-아미노-2-에톡시메틸- α , α -디메틸-1H-이미다졸[4,5-c]퀴놀린-1-에탄올(R848로 명명됨) 또는 1-(2-메틸프로필)-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-4-아민, 및 이들의 유도체(예를 들면, WO2000/47719를 참조하고, 이는 그 전문이 본원에 인용에 의해 포함된다), 합성 이중 가닥의 폴리리보뉴클레오타이드, 예를 들면, poly[1]:poly[C(12)U] 등, Toll-유사 수용체(TLR)의 효능제, 예를 들면, TLR-3, TLR-4, TLR-7 및/또는 TLR-9, DC의 성숙을 유도하는 것으로 공지되어 있는 비메틸화된 CpG 모티프를 함유하는 핵산의 서열 등, 또는 이들의 임의의 조합이 포함될 수 있지만, 이들에 한정되는 것은 아니다. BCG의 유효량은 전형적으로 등가량 내지 불활성화(deactivation) 이전의 조직 배양 배지의 밀리리터당 약 10⁵ 내지 10⁷ cfu 범위이다. IFN γ 의 유효량은 전형적으로 조직 배양 배지의 밀리리터당 약 100 내지 약 1000U의 범위이다.
- [0045] 바실러스 칼메트-게랑(BCG)은 마이코박테리움 보비스(Mycobacterium bovis)의 무독성(avirulent) 균주이다. 본원에 사용된 바와 같이, BCG는 전체 BCG 뿐만 아니라 세포벽 성분, BCG-유도된 리포아라비도만난 및 다른 BCG 구성성분을 말한다. BCG는 가열-불활성화된 BCG, 포르말린-처리된 BCG 또는 열 및 다른 불활성화 방법의 조합 등에 의해 선택적으로 불활성화된다. 유효량의 이미다조퀴놀린 화합물, 예를 들면, 이미다조퀴놀린-4-아민 화합물, 예를 들면, 4-아미노-2-에톡시메틸- α , α -디메틸-1H-이미다졸[4,5-c]퀴놀린-1-에탄올(예를 들면, R848로 명명됨)은 약 1 내지 약 50 μ g/ml의 배양 배지일 수 있고, 보다 전형적으로는 5 내지 약 10 μ g/ml의 배양 배지가 사용된다. 이미다조퀴놀린 화합물은 단독으로 사용될 수 있거나, 예를 들면 BCG 및/또는 IFN과 병용될 수 있거나, 또는 추가의 TLR 효능제가 사용될 수 있다.
- [0046] 미성숙한 DC는 전형적으로 유효량의 수지상 세포 성숙제, 예를 들면, BCG 및 IFN γ 와 약 10시간 내지 약 19시간 동안 접촉시켜 성숙을 유도하고 최적으로 활성화시키지만, 수지상 세포를 완전히 성숙해지는 것은 아니다. 전형적으로, 수지상 세포를 성숙해지도록 하는데 BCG 및 IFN γ 를 사용하는 경우 완전한 성숙을 위해서는 적어도 24시간 인큐베이션(incubation) 시간이 요구되고, 사용되는 수지상 세포 성숙제에 따라 완전한 성숙을 위해서는 약 48 내지 약 72시간의 전형적인 인큐베이션 시간이 요구될 수 있다. 소정 실시형태들에서, 상기 시간은 약 10시간, 11시간, 12시간, 13시간, 14시간, 15시간, 16시간, 17시간, 18시간, 및 최대 약 19시간일 수 있다. 보다 전형적인 실시형태에서, 수지상 세포의 부분적 성숙 및 최적의 활성화를 위한 시간은 약 15 내지 약 18시간, 약 15 내지 약 17시간, 또는 특히 바람직한 실시형태에서는 약 16시간일 수 있다. 미성숙한 수지상 세포가 배양될 수 있고, 적합한 성숙 배양 조건에서 부분적으로 성숙되고 최적으로 활성화될 수 있다. 적합한 조직 배양 배지로는 AIM-V[®], RPMI 1640, DMEM, 및 X-VIVO 15[®] 등이 포함되지만, 이들에 한정되는 것은 아니다. 조직 배양 배지에는 아미노산; 비타민; 사이토카인, 예를 들면, GM-CSF 단독(예를 들면, 그 전문이 본원에 인용에 의해 포함된 US특허 제8,389,278호를 참조한다), 또는 IL-4, IL-7, IL-13 또는 IL-15와 조합된 GM-CSF; 및 2가의 양이온 등을 보충하여 세포의 성숙 유도를 촉진시킬 수 있다. 전형적인 사이토카인은 고농도의 사람 또는 동물 단백질을 갖는 GM-CSF 단독일 수 있거나 또는 병용하여 사용되는 경우의 GM-CSF는 약 500유닛/ml 내지 약 1000

유닛/ml의 GM-CSF의 농도로 사용되고, 100ng/ml의 IL-4, IL-3 또는 IL-15가 사용된다.

[0047] 미성숙한 수지상 세포의 부분적 성숙 및 최적의 활성화는 수지상 세포에 관해 당해 분야에 공지되어 있는 방법들에 의해 모니터링될 수 있다. 세포 표면 마커는 당해 분야에 친숙한 검정, 예를 들면, 유동 세포측정법, 및 면역조직화학 등으로 검출될 수 있다. 또한, 상기 세포는 사이토카인 생산에 대해 (예를 들면, ELISA, 다른 면역 검정에 의해 또는 올리고뉴클레오타이드 검정의 사용에 의해) 모니터링될 수 있다. 이들에 한정되는 것은 아니지만, 예를 들면, BCG 및 $INF\ \gamma$ 와 같은 수지상 세포 성숙제의 존재 하에 본 발명에 따라 배양되고 부분적으로 성숙되고 최적으로 활성화된 DC에서, 미성숙한 수지상 세포와 비교하여 증가된 수준의 인산화된 JAK2(마우스 활성화된 키나아제 2)는 당해 분야에 익히 공지되어 있는 방법에 의한 성숙의 개시를 나타내는 것으로 측정될 수 있다. 세포 표면 마커 및 사이토카인의 발현의 유도뿐만 아니라 신호전달 분자, 예를 들면, jak2의 인산화는, 또한 일단 수지상 세포가 개체에게 투여되면 수지상 세포는 생체내에서의 항원의 흡수 및 면역 반응의 유도를 위해 조정된다고 하는 지표로서도 알려져 있다.

[0048] 본 발명의 방법은 미성숙한 수지상 세포의 성숙을 개시하고 수지상 세포를 부분적으로 성숙해지도록 하고 최적으로 활성화하는데 필요한 기간 동안만 미성숙한 수지상 세포를 성숙 조건으로 처리하는 단계를 포함한다. 유효량의 BCG 및 유효량의 $IFN\ \gamma$ 와 함께 약 10 내지 19시간 인큐베이션하는 시간은 부분적으로 성숙하고, 대상체에게의 투여를 위한 약제학적으로 허용되는 담체와 병용하는 경우 조성물로서 사용하기 위해 선택적으로 수지상 세포를 최적으로 활성화시키는 것으로 밝혀졌다. 완전히 성숙한 DC는 항원을 흡수하고 공동-자극 세포 표면 분자 및 다양한 사이토카인의 상향-조절된 발현을 나타낼 수 있는 능력을 상실한다. 구체적으로, 성숙한 DC는 미성숙한 수지상 세포보다 높은 수준의 MHC 클래스 I 및 II 항원을 발현시키고, 성숙한 수지상 세포는 일반적으로 $CD80^+$, $CD83^+$, $CD86^+$ 및 $CD14^-$ 인 것으로 확인된다. MHC 발현이 더 클수록 DC 표면 상의 항원 밀도의 증가를 초래하고, 한편, 공동-자극 분자 $CD80$ 및 $CD86$ 의 상향 조절은 T 세포 상의 $CD28$ 과 같은 공동-자극 분자의 대응물을 통해 T 세포 활성화 신호를 강화시킨다. 본 개시에서 사용된 바와 같은 부분적으로 성숙되고 최적으로 활성화된 수지상 세포는 전형적으로, 일단 수지상 세포 성숙제에 노출되면 미성숙 수지상 세포와 비교하여 세포 표면 상의 공동-자극 분자의 발현의 상향 조절을 입증하는 이들 수지상 세포를 포함한다. 이들 공동-자극 분자로는 $CD80$, $CD86$ 및/또는 $CD54$ 가 포함되지만, 이들에 한정되는 것은 아니다. 상기 세포는 $CD83$ 을 발현할 수 있거나 또는 발현하지 않을 수 있지만, 상기 세포는 수지상 세포의 표면 상의 제시를 위해 항원을 흡수하고 프로세싱하는 능력을 유지한다. 본 출원의 방법의 한 실시형태에서, 부분적으로 성숙한 수지상 세포는 투여 후에 항원에 노출된다. 추가로, 부분적으로 성숙하고 최적으로 활성화된 수지상 세포는 미성숙한 수지상 세포에 의해 유의한 양으로 전형적으로 생산되지 않는 $TNF-\alpha$, IL-6, IL-8, IL-10 및/또는 IL-12 중 하나 이상을 생산할 수 있다. 한 특정 실시형태에서, 유효 농도의 BCG 및 $IFN\ \gamma$ 둘 다와 함께 약 16시간 동안 접촉된 부분적으로 성숙하고 최적으로 활성화된 수지상 세포는 24시간 내에 149ng/100만개 수지상 세포를 생산하였다. 동일한 농도의 BCG 및 $IFN\ \gamma$ 와 접촉된 미성숙한 수지상 세포는 24시간 내에 50ng/100만개의 세포를 생산하였다.

[0049] 완전히 성숙한 수지상 세포는 이들이 일단 완전히 성숙하면 세포는 더 이상 항원을 효율적으로 프로세싱하지 않기 때문에 본 발명의 방법 및 조성물에 바람직하지 못하다. 추가로, 성숙을 시작하도록 유도되지 않은 이전의 방법에서 사용된 미성숙한 수지상 세포는, 종양 내에서 또는 종양을 둘러싼 조직 내에서 전형적으로 발견되는 면역억제성 환경이 미성숙한 수지상 세포에 의한 항원의 프로세싱을 방지하는 것으로 알려져 있는 실질적 농도의 사이토카인을 포함하기 때문에 바람직하지 못하다. 본 개시에서, 미성숙한 수지상 세포의 부분적 성숙 및 최적의 활성화는 세포 표면 상의 사이토카인 수용체를 하향 조절하여 종양내 공간 또는 주위 조직에 존재하는 사이토카인의 임의의 면역억제 효과에 덜 민감하거나 덜 반응성있게 하고, 종양내 공간 또는 주위 조직 내에 존재하는 항원을 효율적으로 흡수하고 프로세싱할 수 있는 세포를 제공한다. 수지상 세포는 종양내 공간 내에서 또는 주위 조직에서 발견되는 아포토시스성 및 죽어가는 종양 세포로부터 상당량의 종양 항원을 흡수하고 프로세싱한다. 일단 투여된 부분적으로 성숙되고 최적으로 활성화된 수지상 세포가 예를 들면, 케모카인 수용체 CCR7의 발현에 의해 측정된 종양내 공간 내에서 효과적으로 성숙되면, 수지상 세포는 항원을 제시하는 수지상 세포가 T 세포, 특히 나이브 T 세포와 접촉할 것인 림프절로 이동하여 수지상 세포에 의해 제시된 임의의 종양 항원에 대한 면역 반응을 상향 조절할 것이다.

[0050] 본 발명의 또 다른 양상에 따르면, 본 개시의 각종 DC는 예를 들면, 동결보존(cryopreservation)에 의해 단핵구 수지상 세포 전구체, 성숙 전의 또는 약제학적으로 허용되는 담체와 함께 또는 이러한 담체의 부재 하의 부분적 성숙 후의 미성숙한 수지상 세포로서 보존될 수 있다. 사용될 수 있는 동결보존제로는 디메틸 설폭시드(DMSO), 글리세롤, 폴리비닐피롤리돈, 폴리에틸렌 글리콜, 알부민, 텍스트란, 슈크로스, 에틸렌 글리콜, i-에리트ρί톨, D-리비톨, D-만니톨, D-소르비톨, 이노시톨, D-락토스, 콜린 클로라이드, 아미노산, 메탄올, 아세트아미드, 글

리세롤 모노아세테이트 및 무기 염이 포함되지만, 이들에 한정되는 것은 아니다. 제어되는 느린 냉각 속도가 결정적일 수 있다. 상이한 동결보호제 및 상이한 세포 유형은 전형적으로 상이한 최적의 냉각 속도를 갖는다.

[0051] 물이 얼음으로 변하는 융합 페이스의 가열은 일반적으로 최소화되어야 한다. 냉각 절차는 예를 들면, 프로그래밍 가능한 냉동 장치 또는 배탄을 배스(bath) 절차를 사용하여 수행될 수 있다. 프로그래밍 가능한 냉동 장치는 최적의 냉각 속도 결정을 가능하게 하고 표준 재현가능한 냉각(standard reproducible cooling)을 용이하게 한다. Cryomed® 또는 Planar®와 같은 프로그래밍 가능한 제어된-속도 냉동기는 동결 용법을 원하는 냉각 속도 곡선으로 조정하는 것을 가능하게 한다.

[0052] 철저한 동결 후, 약제학적으로 허용되는 담체의 존재 또는 부재 하에 단핵구 전구체 세포, 미성숙한 DC 또는 부분적으로 성숙한 DC를 장기간의 저온 보관 용기에 신속하게 이동시킬 수 있다. 전형적인 실시형태에서, 샘플은 액체 질소(-196°C) 또는 이의 증기(-165°C)에서 극저온으로 보관될 수 있다. 조혈 줄기 세포, 특히 골수 또는 말초혈 유래의 조혈 줄기 세포의 조작, 동결보존 및 장기 보관에 관한 고려 및 절차는 본 발명의 세포에 대체로 적용가능하다. 이러한 논의는 예를 들면, 본원에 인용에 의해 포함된 하기 참조 문헌에서 찾을 수 있다: Taylor et al., *Cryobiology* 27:269-78 (1990); Gorin, *Clinics in Hematology* 15:19-48 (1986); Bone-Marrow Conservation, Culture and Transplantation, Proceedings of a Panel, Moscow, Jul. 2226, 1968, International Atomic Energy Agency, Vienna, pp. 107-186.

[0053] 동결된 세포는 바람직하게는 (예를 들면, 37°C 내지 41°C로 유지된 수조에서) 신속하게 해동하고, 해동 즉시 냉각시킨다. 해동시 세포 응집(clumping)을 방지하기 위해 세포를 처리하는 것이 바람직할 수 있다. 응집을 방지하기 위해, DNase(Spitzer et al., *Cancer* 45:3075-85 (1980)), 저분자량 텍스트란 및 시트레이트, 및 하이드록시에틸 전분(Stiff et al., *Cryobiology* 20: 17-24 (1983)) 등의 동결 전의 그리고/또는 후의 부가를 포함하지만 이들에 한정되지 않는 각종 절차들이 사용될 수 있다. 사람에서 독성인 경우 동결보호제는 해동된 부분적으로 성숙된 DC의 치료학적 사용 전에 제거되어야만 한다. 동결보호제를 제거하는 한 방법은 유의하지 않은 농도로의 회색에 의한 것이다. 일단 냉동된 단핵구 수지상 세포 전구체, 미성숙 수지상 세포 또는 부분적으로 성숙된 DC를 해동 및 회수하면, 이들은 이어서 제형화된 약제학적 생성물을 생산하는 추가의 방법에서 사용할 수 있다. 제형화된 부분적으로 성숙되고 최적으로 활성화된 수지상 세포는 비-냉동된 부분적으로 성숙되고 최적으로 활성화된 DC에 관하여 본원에 기술된 바와 같이 투여될 수 있다.

[0054] 부분적으로 성숙된 수지상 세포의 생체내 투여

[0055] 예를 들면, 암 또는 종양을 갖는 대상체에게 부분적으로 성숙되고 최적으로 활성화된 수지상 세포 또는 이러한 세포가 농축되어 함유된 세포 집단을 투여하기 위한 방법 및 조성물이 제공된다. 소정 실시형태들에서, 이러한 방법은 수지상 세포 전구체 또는 미성숙한 수지상 세포를 수득하고, 수지상 세포 성숙제, 예를 들면, BCG 및 IFN γ , 또는 상기 열거된 것들과 같은 임의의 다른 수지상 세포 성숙제의 존재 하에 이들 세포를 분화시키고 부분적으로 성숙시킨다. 부분적으로 성숙되고 최적으로 활성화된 수지상 세포는 당해 분야 숙련가에게 익히 공지되어 있는 방법 및 조성물을 이용하여 생리학적으로 허용되는 담체, 부형제, 완충제 및/또는 희석제와 함께 제형화될 수 있다. 부분적으로 성숙되고 최적으로 활성화된 수지상 세포는 면역자극을 필요로 하는 대상체에게 직접 투여될 수 있다. 전형적으로, 약 10^2 내지 약 10^{10} 개의 세포는 약제학적으로 허용가능한 담체 중에 현탁된다. 상기 세포는 종양에 직접적으로 또는 종양 또는 종양상에 가깝거나, 인접한 영역에 또는 순환 또는 림프 접촉으로 주사하여 세포가 암 또는 종양 항원과의 접근을 가짐을 확실히 한다.

[0056] 예를 들면, 이에 한정되는 것은 아니지만, 상기 세포는 종양에 직접적으로 투여하거나, 종양의 제거 또는 절제 후의 종양상에 투여하거나, 종양주위 공간에 투여하거나, 종양과의 직접적인 접촉으로 배수 림프절에 투여하거나, 종양 또는 종양에 걸린 기관을 유도하거나 공급하는 혈관 또는 림프관, 예를 들면, 문맥 또는 폐 정맥 또는 동맥 등에 투여할 수 있다. 본 개시의 부분적으로 성숙하고 최적으로 활성화된 수지상 세포의 투여는 화학 치료요법 또는 방사선 치료요법과 같은 종양에 대한 다른 치료와 동시에 또는 이러한 다른 치료에 후속으로 이루어질 수 있다. 추가로, 본 개시의 부분적으로 성숙한 수지상 세포는 다른 제제와 공동-투여될 수 있고, 이러한 제제는 수지상 세포의 성숙 및/또는 종양 내의 또는 종양에 가깝거나 인접한 영역 내의 항원의 프로세싱에 대한 보강제로서 작용한다. 또한, 수지상 세포는 종양 항원과의 접촉을 위해 세포가 천천히 종양 또는 종양상 내로 방출되도록 종양 또는 종양상 내의 또는 주위의 영역으로의 이식을 위한 서방형 매트릭스로 제형화되거나 배합될 수 있다.

[0057] 본 개시에서 사용된 종양은 고형 종양, 예를 들면, 육종; 궤양 종양; 결장직장 종양; 흑색종; 폐 종양; 유방 종양; 난소 종양; 두경부 종양; 위 종양; 전립선 종양; 식도 종양; 자궁경부 또는 질 종양; 및 뇌 종양, 예를 들

면, 교모세포종, 성상세포종, 수막종 또는 수모세포종 등이 포함되고, 이들에 한정되는 것은 아니다. 추가의 고형 종양은 또한 본원에 개시된 조성물 또는 방법을 사용한 치료에 대한 대상이다.

[0058] 본 개시의 부분적으로 성숙하고 최적으로 활성화된 수지상 세포는 제형화 및 투여 방식에 적절한 임의의 수단에 의해 투여될 수 있다. 예를 들면, 상기 세포를 약제학적으로 허용가능한 담체와 배합하여 주사기, 카테터, 및 캐놀러 등을 이용하여 투여할 수 있다. 상기와 같이, 상기 세포는 서방형 매트릭스로 제형화될 수 있다. 이러한 방식으로 투여되는 경우, 제형은 사용된 매트릭스에 적절한 수단에 의해 투여될 수 있다. 본 설명에 적용가능한 다른 투여 방법 및 투여 방식은 당해 분야 숙련자에게 익히 공지되어 있다.

[0059] 본 발명의 조성물은 개체의 치료시 이들 자체로 사용될 수 있다. 또한, 상기 조성물은 암 또는 종양을 치료하기 위한 임의의 다른 방법과 병용하여 사용될 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 방법은 종양의 외과적 절제, 화학 치료요법(세포독성 약물, 아포토시스성 제제, 및 항체 등), 방사선 치료요법, 냉동 치료요법, 근접 치료요법(brachytherapy), 및 면역 치료요법(항원 특이적 성숙한 활성화된 수지상 세포, NK 세포, 암 세포 또는 종양 항원에 대해 특이적인 항체의 투여) 등과 병용하여 사용될 수 있다. 이들 방법 중 어떠한 것도 임의의 병용에 사용될 수 있다. 병용 치료는 동시적 또는 순차적일 수 있고, 치료 의사에 의해 결정된 임의의 순서로 투여될 수 있다.

[0060] 다른 실시형태에서, 수지상 세포 및 수용 대상체는 동일한 MHC (HLA) 하플로타입(haplotype)을 갖는다. 대상체의 HLA 하플로타입을 측정하는 방법은 당해 분야에 공지되어 있다. 한 관련 실시형태에서, 부분적으로 성숙한 수지상 세포는 수용 대상체와 동종이계이다. 동종이계 세포는 전형적으로 적어도 하나의 MHC 대립형질(예를 들면, 적어도 하나의 MHC 대립형질을 공유하지만 모든 MHC 대립형질을 공유하는 것은 아님)에 대해 매칭된다. 덜 전형적인 실시형태에서, 수지상 세포 및 수용 대상체는 서로에 대해 전부 동종이계이지만, 보통 모두가 적어도 하나의 MHC 대립형질을 갖는다.

[0061] 항-종양 면역 반응은 임의의 하나 이상의 익히-공지되어 있는 방법에 의해 측정될 수 있다. 예를 들면, 항-종양 반응은 종양 크기의 감소, 종양 세포 사멸의 유도 또는 종양 세포 괴사, 종양 세포 증식의 감소에 의해, 또는 종양 항원 특이적 T 세포의 침윤(TIL) 등에 의해 측정될 수 있다.

[0062] 실시예

[0063] 하기 실시예는 단지 본 발명의 각종 양상의 실례로서 제공되는 것이고, 어떠한 방식으로든 본원에 개시된 방법 및 조성물을 한정하는 것으로 구성되지 않아야만 한다. 본 발명의 방법의 바람직한 실시형태 및/또는 본 발명의 방법은 설명 및 기술되어 있지만, 본 발명의 취지 및 범위를 벗어나지 않고 여기에서 각종 변화가 이루어질 수 있음이 이해될 것이다.

[0064] 본 실시예에서, 암, 이들에 한정되는 것은 아니지만 예를 들면, 고형 조직 종양인 종양, 예를 들면, 육종, 췌장 종양, 결장직장 종양, 흑색종, 유방 종양; 폐 종양; 및 난소 종양 등을 갖는 환자로부터 단리된 혈액 샘플로부터 미성숙한 수지상 세포를 수득하였고, 상기 미성숙한 수지상 세포를 GM-CSF 단독으로 보충된 수지상 세포 배양 배지에서 배양하였고, 환자에게 투여하기 위해 수집 및 조제하기 전에, 불활성화된 BCG 및 IFN γ 와 함께 16 시간 또는 20시간 동안 성숙되도록 유도하였다. 16시간 동안 부분적으로 성숙되고 활성화된 수지상 세포는 환자에서 약 20시간 동안 BCG 및 IFN γ 와 접촉된 수지상 세포보다 실질적으로 보다 우수한 임상학적 반응을 유도하였음이 발견되었다.

[0065] 환자는 백혈구 성분채집술을 받았고, 수집하는 동안 약 10리터 또는 2 혈량(blood volume)이 프로세싱되었다. 혈장 속도는 백혈구 성분채집 생성물에 대해 대략 2%의 표적 헤마토크리트(hematocrit)를 얻도록 조정되었다. 백혈구 성분채집 생성물은 접선 유동 여과(Tangential Flow Filtration(TFF))에 의해 단핵구의 단리 및 정제를 위해 프로세싱되었다. 백혈구 성분채집 샘플, 전형적으로는 혈액 백(bag)을 TFF 장치에 연결하여 샘플을 프로세싱하였고, 배양 배지(페놀 레드 불포함 RPMI-1640) 중에 현탁된 농축된 단핵구 수지상 세포 전구체 생성물을 조직 배양 백에서 수득하였다.

[0066] 제조합 사람 GM-CSF(500U/ml)가 보충된 배양 배지를 상기 농축된 비-활성화된 단핵구 수지상 세포 전구체 생성물에 부가하였고, 상기 세포를 5일 동안의 배양을 위해 인큐베이터에 두었다. 배양의 5일 동안, 단핵구 수지상 세포 전구체는 미성숙한 수지상 세포로 전환되었다. 이러한 인큐베이션 후, 가열-사멸된 BCG(1:300 희석 v/v 또는 살아 있는 수지상 세포당 대략 하나(1)의 BCG 입자) 및 인터페론 γ (500 내지 1,000U/ml)을 미성숙한 수지상 세포에 부가하였고, 상기 백을 수지상 세포의 활성화를 위해 추가의 16 내지 20시간 동안 인큐베이터에 되돌려 두었다. 이러한 시간은 미성숙한 수지상 세포를 성숙한 수지상 세포로 완전히 전환시키기에 충분하지 않았

다.

[0067] 수지상 세포 활성화 후, 조직 배양 백을 교반시켰고, 내용물을 250ml의 원추형 원심분리 튜브에 배수시켰다. 차가운 dPBS를 백에 추가하였고 임의의 나머지 부착성 세포를 백의 수동 마사지로 제거하였다. 이러한 세척액을 초기 세포 현탁액과 함께 모으고 상기 세포를 550 x g에서의 원심분리에 의해 펠렛화하였다. 활성화된 수지상 세포를 소량의 RPMI-1640, 40% 사람 혈청 알부민 및 10% DMSO에 재현탁시켰다. 활성화된 수지상 세포를 1.0ml/바이알 중의 3×10^6 , 8×10^6 , 17×10^6 개의 생존가능한 수지상 세포/바이알의 분취액(aliquot)으로 동결시켰다. 주사당 총 2, 6 또는 1,500만개의 생존가능한 수지상 세포를 전달하기 위해 필요에 따라 배치(batch)당 주사량을 조정하였다. 주사용 분취액을 조제하기 위해, 바이알을 기상 액체 질소 보관으로부터 제거하였고 20°C 내지 25°C에서 5 내지 10분 동안 두었다. 이는 내용물을 완전히 해동시키기에 충분한 시간이다. 바이알을 열고 1ml의 생성물을 주사기를 사용하여 무균적으로 제거하였다. 주사기에 공기를 주입하여 바늘이 비었는지 확인한 다음 바늘을 제거하였다. 적절한 주사 바늘을 주사기에 부착시켰다. 생성물을 주사 바늘로 밀어 넣었다. 실시간 초음파 또는 간헐적 안내(MRI 또는 CT) 또는 다중 모드 조합을 사용하여 종양에 접근하였다. 생성물 투여 동안, 하나의 바늘을 영상화(imaging) 하에 종양 주변부 내로 안내하였다. 일단 위치가 확인되면 4회의 주사가 사용되는 경우 종양 내에 각각의 주사당 소정량, 예를 들면, 0.2 ml의 첫번째 주사를 주사하였다.

[0068] 40명의 환자들이 본 연구에 등록되었다. 대부분의 환자는 실패한 다른 치료요법, 예를 들면, 활성 진행형 암으로 진행되었다. 환자들은 각각의 투여 후 2시간 동안 급성 독성에 대해 그리고 마지막 예방접종(immunization) 후 30일 동안 독성 및 자가 면역의 임상학적 및 실험적 징후에 대해 관찰되었다. 면역 반응을 평가하기 위해 시험관내 면역학적 평가를 수행하였다. 질환 진행은 신체 검사 측정, 방사선학적 수단 및 종양 생검에 의해 측정하여 종양 반응 및 재발을 평가하였다. 이와 같이, 종양 성장의 안정화는 긍정적인 결과인 것으로 간주되었다.

[0069] 제1차 예방접종은 백혈구 성분채집술 후 대략 3 내지 4주째에 제공되었다. 처음 3회의 주사는 1주 간격(즉, 1일째, 1주째, 2주째), 이어서, 8주째, 16주째 및 32주째에, 또는 생성물이 이용가능하고 동일한 부위에 주사가 가능한 종양 덩어리가 존재하는 한 제공되었다. 본래 주사 부위에 종양 덩어리가 불충분한 경우, 상이한 위치의 종양 덩어리를 사용하였다. 환자에게 16시간(방법 B) 동안 또는 20시간(방법 A) 활성화된 수지상 세포를 제공하였다. 각각의 방문시에 단일 종양이 주사되었고, 종양 성장, 생존, 종양 세포 사멸(괴사) 및 면역 세포의 침윤에 대해 환자를 모니터링하였다. 각 시점에서 살아있는 개체의 비율이 도면에 제공된다. 종양 성장은 표준 영상화 기술(CT 또는 MRI)을 사용하여 측정하였다.

표 1

종양 성장의 측정

	전체	방법 A	방법 B
SD ¹ 8 주	20	4	16

1) SD: 안정한 질환

[0070]

[0071] 손실 데이터로 인하여 환자의 수는 40명까지 합산되지 않는다.

[0072] 이 집단에서 질환 안정화는 양호한 결과이다.

표 2

생존의 측정

	전체	방법 A	방법 B
살아 있음	24	5	19

[0073]

[0074] 단계 4는 생명을 위협하는 병태이고, 생존은 중요한 종점이다.

표 3

종양 괴사를 입증하는 환자의 수

전체	방법 A	방법 B
16 명의 환자	4 명의 환자	12 명의 환자

[0075]

[0076]

표준 헤마톡실린/에오신 염색을 이용하여 종양 생검에 대해 종양 괴사를 평가하였다.

[0077]

방법 B(16시간 처리)에 의해 제조된 수지상 세포는 덜 최적인 방법으로 제조된 수지상 세포보다 더 많은 TNF α를 생산한다: 평균 149ng/1백만 DC/24시간 대 50ng/1백만 DC/24 시간. TNF α는 결국 더 우수한 생존에 대한 예측인자(상기 표 2 참조)인 8주제(상기 표 1 참조)에서의 안정한 질환(SD)과 관련되어 있다.

[0078]

데이터는 암 면역 치료요법에서 종양내 주입을 위한 부분적으로 성숙한 DC의 활성화에 대해 16 시간 처리(방법 B)가 최적임을 입증한다.

[0079]

독점적인 특성 또는 특권이 청구되는 본 발명의 실시형태들은 하기와 같이 정의된다:

도면

도면1

