(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0024048
(43) 공개일자 2021년03월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/17 (2014.01) *A61P 37/06* (2006.01)
A61P 37/08 (2006.01) *C07K 16/18* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01) *C12Q 1/6804* (2018.01)
C12Q 1/686 (2018.01) *G01N 33/569* (2017.01)
(52) CPC특허분류
A61K 35/17 (2013.01)
A61P 37/06 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2021-7001916
(22) 출원일자(국제) 2019년06월21일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2021년01월20일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2019/024753
(87) 국제공개번호 WO 2019/245038
국제공개일자 2019년12월26일
(30) 우선권주장
JP-P-2018-119001 2018년06월22일 일본(JP)

(71) 출원인
가부시키가이샤 준텐 바이오
일본 1030027 도쿄도 츄오쿠 니혼바시 2쵸메 1반 3고
(72) 발명자
우치다 고이치로
일본국 도쿄도 분쿄쿠 혼고 2-1-1 준텐도다이가쿠나이
다케다 가즈요시
일본국 도쿄도 분쿄쿠 혼고 2-1-1 준텐도다이가쿠나이
오쿠무라 고
일본국 도쿄도 분쿄쿠 혼고 2-1-1 준텐도다이가쿠나이
(74) 대리인
리앤목특허법인

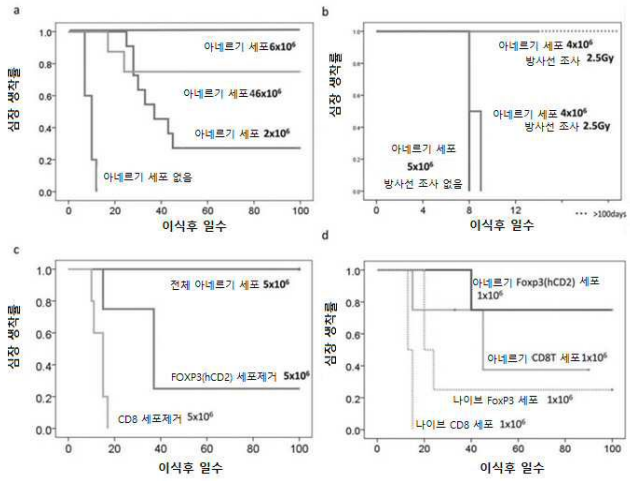
전체 청구항 수 : 총 57 항

(54) 발명의 명칭 **복합 상태를 갖는 세포 혼합물을 이용한, 면역 관용을 유도하는 항체 및 유도된 림프구, 또한 유도된 림프구를 이용하는 세포 치료제 및 치료법**

(57) 요 약

본 개시는 항원 특이적인 면역 관용 또는 면역 억제를 위한 의약 조성물을 제공한다. 본 개시는 CD4 양성 아네르기 T세포와 CD8 양성 아네르기 T세포를 포함하는 의약 조성물을 제공한다. 어느 하나의 실시형태에서 아네르기 T세포는 CD80 및/또는 CD86과 CD28의 상호작용을 저해할 수 있는 항체에 의해 유도된다. 특정의 실시형태에서 의약 조성물은 제어성 T세포(예를 들어 FOXP3 양성 CD4 양성 CD25 양성 T세포)를 더 포함해도 된다.

대 표 도 - 도3



(52) CPC특허분류
A61P 37/08 (2018.01)
C07K 16/18 (2013.01)
C07K 16/2812 (2013.01)
C07K 16/2815 (2013.01)
C12Q 1/6804 (2018.05)
C12Q 1/686 (2018.05)
G01N 33/56966 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

CD4 양성 아네르기 T세포와,

CD8 양성 아네르기 T세포를 포함하는 의약 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 아네르기 T세포는 CD80 및/또는 CD86과 CD28의 상호작용을 저해할 수 있는 저해 인자에 의해 유도되는 의약 조성물.

청구항 3

청구항 2에 있어서,

상기 저해 인자가 저분자, 단백질, 핵산, 지질, 당 및 이들의 조합으로 이루어지는 군에서 선택되는 의약 조성물.

청구항 4

청구항 3에 있어서,

상기 단백질이 항체 혹은 그 개변체, 또는 세포 표면 분자 혹은 그 개변체인 의약 조성물.

청구항 5

청구항 4에 있어서,

상기 항체의 개변체가 항원 결합 단편인 의약 조성물.

청구항 6

청구항 4에 있어서,

상기 세포 표면 분자의 개변체가 융합 단백질인 의약 조성물.

청구항 7

청구항 3 내지 청구항 6 중 어느 한 항에 있어서,

상기 저해 인자는 항CD80 항체, 항CD86 항체, CD80 및 CD86에 대한 이중 특이성 항체, 항CD28 항체 혹은 이들의 항원 결합 단편, CTLA4-Ig 융합 단백질, CD28-Ig 융합 단백질로 이루어지는 군에서 선택되는 의약 조성물.

청구항 8

청구항 7에 있어서,

상기 CTLA4-Ig 융합 단백질은 아바타셉트 또는 벨라타셉트인 의약 조성물.

청구항 9

청구항 1 내지 청구항 8 중 어느 한 항에 있어서,

제어성 T세포를 더 포함하는 의약 조성물.

청구항 10

청구항 1 내지 청구항 9 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제어성 T세포는 FOXP3 양성 CD4 양성 CD25 양성인 의약 조성물.

청구항 11

CD80 및/또는 CD86과 CD28의 상호작용을 저해할 수 있는 저해 인자에 의해 아네르기가 유도된 세포를 포함하는 의약 조성물로서, 이 조성물은 CD8 양성 세포를 포함하고, 이 조성물은 FOXP3 양성 세포 및 CD4 양성 세포 중 적어도 1종 이상을 더 포함하는 의약 조성물.

청구항 12

청구항 5에 있어서,

FOXP3 양성 세포, CD4 양성 세포 및 CD8 양성 세포 전부를 포함하는 의약 조성물.

청구항 13

청구항 11 또는 청구항 12에 있어서,

상기 CD8 양성 세포는 CD44 양성인 의약 조성물.

청구항 14

청구항 11 또는 청구항 12에 있어서,

상기 CD8 양성 세포는 CD45RA 음성 또한 CD45RO 양성인 의약 조성물.

청구항 15

청구항 11 내지 청구항 14 중 어느 한 항에 있어서,

상기 FOXP3 양성 세포는 CD4 양성인 의약 조성물.

청구항 16

청구항 11 내지 청구항 15 중 어느 한 항에 있어서,

상기 FOXP3 양성 세포는 CD25 양성인 의약 조성물.

청구항 17

청구항 1 내지 청구항 16 중 어느 한 항에 있어서,

상기 의약 조성물은 항원 특이적인 면역 관용 또는 면역 억제를 위한 것인 의약 조성물.

청구항 18

청구항 3에 있어서,

상기 항체는 항CD80 항체, 항CD86 항체, CD80 및 CD86에 대한 이중 특이성 항체, 항CD28 항체 또는 이들의 조합을 포함하는 의약 조성물.

청구항 19

청구항 2 내지 청구항 18 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포는 상기 저해 인자와, 피험체 유래의 세포와, 이 피험체 유래의 항원 혹은 이 피험체에서 유래하지 않는 항원 또는 이 항원의 함유물을 혼합하는 단계에 의해 유도된 세포인 의약 조성물.

청구항 20

청구항 1 내지 청구항 19 중 어느 한 항에 기재된 조성물을 포함하는, 피험체 유래의 항원 또는 이 피험체에서 유래하지 않는 항원에 의해 발생하는 이 피험체에서의 질환, 장해 또는 상태를 처치 또는 예방하기 위한 의약

조성물.

청구항 21

청구항 20에 있어서,

상기 질환, 장해 또는 상태는 이식 면역 거부 반응, 알레르기, 자기면역 질환, 이식편대숙주병, iPS 세포 또는 ES 세포 및 이들 세포에서 유래하는 세포, 조직 또는 장기의 이식에 의해 일어나는 면역 거부 반응으로 이루어지는 군에서 선택되는 의약 조성물.

청구항 22

청구항 21에 있어서,

상기 이식 면역 거부 반응은 신장, 간장, 심장, 피부, 폐, 췌장, 식도, 위, 소장, 대장, 신경, 혈액, 면역계 세포를 포함하는 혈구 세포, 뼈, 연골, 혈관, 각막, 안구 또는 골수가 이식됨으로써 발생하는 것을 특징으로 하는 의약 조성물.

청구항 23

청구항 20 내지 청구항 22 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항원의 함유물은 세포인 의약 조성물.

청구항 24

세포를 포함하는 의약을 제조하는 방법으로서, 이 방법은

(A) CD80 및/또는 CD86과 CD28의 상호작용을 저해할 수 있는 저해 인자와, 피험체 유래의 세포와, 이 피험체 유래의 항원 혹은 이 피험체에서 유래하지 않는 항원 또는 이 항원의 함유물을 혼합하는 공정과,

(B) 이 혼합에 의해 얻어지는 세포 생성물이 CD8 양성 세포를 포함하는 것을 확인하는 공정과,

(C) 이 세포 생성물이 FOXP3 양성 및 CD4 양성 중 적어도 1종의 세포를 포함하는 것을 확인하는 공정을 포함하는 방법.

청구항 25

청구항 24에 있어서,

상기 저해 인자가 저분자, 단백질, 핵산, 지질, 당 및 이들의 조합으로 이루어지는 군에서 선택되는 방법.

청구항 26

청구항 25에 있어서,

상기 단백질이 항체 혹은 그 개변체, 또는 세포 표면 분자 혹은 그 개변체인 방법.

청구항 27

청구항 26에 있어서,

상기 항체의 개변체가 항원 결합 단편인 방법.

청구항 28

청구항 26에 있어서,

상기 세포 표면 분자의 개변체가 융합 단백질인 방법.

청구항 29

청구항 25 내지 청구항 28 중 어느 한 항에 있어서,

상기 저해 인자는 항CD80 항체, 항CD86 항체, CD80 및 CD86에 대한 이중 특이성 항체, 항CD28 항체 혹은 이들의

항원 결합 단편, CTLA4-Ig 융합 단백질, CD28-Ig 융합 단백질로 이루어지는 군에서 선택되는 방법.

청구항 30

청구항 29에 있어서,

상기 CTLA4-Ig 융합 단백질은 아바타셉트 또는 벨라타셉트인 방법.

청구항 31

청구항 17에 있어서,

상기 세포 생성물에서의 CD8 양성 세포의 존재, 및 FOXP3 양성 세포 및 CD4 양성 세포 중 적어도 1종의 세포의 존재가 상기 세포 생성물이 의약으로서 사용될 수 있음을 나타내는 방법.

청구항 32

청구항 24 내지 청구항 31 중 어느 한 항에 있어서,

상기 의약은 상기 피험체 유래의 항원 또는 상기 피험체에서 유래하지 않는 항원에 의해 발생하는 이 피험체에서의 질환, 장해 또는 상태를 처치 또는 예방하기 위한 것인 방법.

청구항 33

청구항 24 내지 청구항 32 중 어느 한 항에 있어서,

상기 공정(B)이 항CD8 항체에 의해 CD8을 검출하는 것을 포함하고, 상기 공정(C)이 항FOXP3 항체 및 항CD4 항체 중 적어도 1종의 항체에 의해 FOXP3 및 CD4 중 적어도 1종을 검출하는 것을 포함하는 방법.

청구항 34

청구항 33에 있어서,

상기 검출이 FACS에 의해 실시되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 35

피험체 유래의 세포에서 발현하는 항원 또는 이 피험체에서 유래하지 않는 항원에 의해 발생하는 이 피험체에서의 질환, 장해 또는 상태를 처치 또는 예방하기 위한 세포를 포함하는 의약의 품질을 관리하는 방법으로서, 이 방법은

(A) 이 세포가 CD8 양성 세포를 포함하는 것을 확인하는 공정 및

(B) 이 세포가 FOXP3 양성 세포 및 CD4 양성 세포 중 적어도 1종의 세포를 포함하는 것을 확인하는 공정을 포함하는 방법.

청구항 36

청구항 35에 있어서,

상기 공정(A)이 항CD8 항체에 의해 CD8을 검출하는 것을 포함하고, 상기 공정(B)이 항FOXP3 항체 및 항CD4 항체 중 적어도 1종의 항체에 의해 FOXP3 및 CD4 중 적어도 1종을 검출하는 것을 포함하는 방법.

청구항 37

청구항 36에 있어서,

상기 검출이 FACS, 웨스턴 블롯 또는 PCR에 의해 실시되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 38

청구항 1 내지 청구항 23 중 어느 한 항에 기재된 의약 조성물을 제조하기 위한, 저해 인자를 포함하는 조성물로서, 이 저해 인자가 CD80 및/또는 CD86과 CD28의 상호작용을 저해할 수 있는 저해 인자인 조성물.

청구항 39

청구항 38에 있어서,

상기 저해 인자가 저분자, 단백질, 핵산, 지질, 당 및 이들의 조합으로 이루어지는 군에서 선택되는 조성물.

청구항 40

청구항 39에 있어서,

상기 단백질이 항체 혹은 그 개변체, 또는 세포 표면 분자 혹은 그 개변체인 조성물.

청구항 41

청구항 40에 있어서,

상기 항체의 개변체가 항원 결합 단편인 조성물.

청구항 42

청구항 40에 있어서,

상기 세포 표면 분자의 개변체가 융합 단백질인 조성물.

청구항 43

청구항 39 내지 청구항 42 중 어느 한 항에 있어서,

상기 저해 인자는 항CD80 항체, 항CD86 항체, CD80 및 CD86에 대한 이중 특이성 항체, 항CD28 항체 혹은 이들의 항원 결합 단편, CTLA4-Ig 융합 단백질, CD28-Ig 융합 단백질로 이루어지는 군에서 선택되는 조성물.

청구항 44

청구항 43에 있어서,

상기 CTLA4-Ig 융합 단백질은 아바타셉트 또는 벨라타셉트인 조성물.

청구항 45

세포의 혼합물을 포함하는 의약을 제조하기 위한 키트로서, 이 키트는

(A) CD80 및/또는 CD86과 CD28의 상호작용을 저해할 수 있는 저해 인자와,

(B) CD8을 검출하기 위한 수단과,

(C) FOXP3 및 CD4 중 적어도 하나를 검출하기 위한 수단을 포함하는 키트.

청구항 46

청구항 45에 있어서,

상기 저해 인자가 저분자, 단백질, 핵산, 지질, 당 및 이들의 조합으로 이루어지는 군에서 선택되는 키트.

청구항 47

청구항 46에 있어서,

상기 단백질이 항체 혹은 그 개변체, 또는 세포 표면 분자 혹은 그 개변체인 키트.

청구항 48

청구항 47에 있어서,

상기 항체의 개변체가 항원 결합 단편인 방법.

청구항 49

청구항 47에 있어서,

상기 세포 표면 분자의 개변체가 융합 단백질인 방법.

청구항 50

청구항 46 내지 청구항 49 중 어느 한 항에 있어서,

상기 저해 인자는 항CD80 항체, 항CD86 항체, CD80 및 CD86에 대한 이중 특이성 항체, 항CD28 항체 혹은 이들의 항원 결합 단편, CTLA4-Ig 융합 단백질, CD28-Ig 융합 단백질로 이루어지는 군에서 선택되는 키트 또는 방법.

청구항 51

-

청구항 52

청구항 51에 있어서,

상기 CTLA4-Ig 융합 단백질은 아바타셉트 또는 벨라타셉트인 키트 또는 방법.

청구항 53

청구항 45 내지 청구항 52 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포의 혼합물에서의 CD8 양성 세포의 존재, 및 FOXP3 양성 세포 및 CD4 양성 세포 중 적어도 1종의 세포의 존재가 상기 세포의 혼합물이 의약으로서 사용될 수 있음을 나타내는 키트.

청구항 54

청구항 45 내지 청구항 53 중 어느 한 항에 있어서,

상기 의약은 상기 피험체 유래의 항원 또는 상기 피험체에서 유래하지 않는 항원에 의해 발생하는 이 피험체에서의 질환, 장해 또는 상태를 처치 또는 예방하기 위한 것인 키트.

청구항 55

피험체 유래의 세포에서 발현하는 항원 또는 이 피험체에서 유래하지 않는 항원에 의해 발생하는 이 피험체에서의 질환, 장해 또는 상태를 처치 또는 예방하기 위한 세포를 포함하는 의약의 품질을 관리하기 위한 키트로서, 이 키트는

(A) CD8을 검출하기 위한 수단과,

(B) FOXP3 및 CD4 중 적어도 1종을 검출하기 위한 수단을 포함하는 키트.

청구항 56

청구항 45 내지 청구항 55 중 어느 한 항에 있어서,

상기 CD8을 검출하기 위한 수단이 항CD8 항체를 포함하고, FOXP3 및 CD4 중 적어도 1종을 검출하기 위한 수단이 항FOXP3 항체 및 항CD4 항체 중 적어도 1종의 항체를 포함하는 키트.

청구항 57

청구항 56에 있어서,

상기 검출은 FACS, 웨스턴 블롯 또는 PCR에 의해 행해지는 것을 특징으로 하는 키트.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 개시는 면역 관용에 관한 신규 기술에 관한 것이다. 보다 특정하면 본 개시는 아네르기 T세포를 포함하는 의약 조성물, 이 의약 조성물의 제조 및 이 의약 조성물의 품질 관리에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 간장 이식은 말기 간부전 환자에 대한 최종적인 처치로서 널리 사용되어 왔다. 매년 일본 외에서는 20,000 이상의 증례가 있고, 일본에서는 500을 넘는 증례가 있다.

[0003] 이식은 말기의 신장, 심장, 간장, 췌장의 장기부전에 대해 선택되는 주요 처치 중 하나로서, 최근에 이식 거부(graft rejection) 반응의 처치의 현저한 진보에도 불구하고 면역 억제 양생법(immunosuppressive regimen) 없이는 이식의 대부분은 최종적으로 거부된다. 연속적인 약물 요법에 의존하는 현재의 면역 억제 양생법은 약물로는 이식에 대해 명확하게 한정된 반응뿐만 아니라 모든 면역 반응을 억제하기 때문에 장기 이식 환자에 감염증이나 암에 대한 감수성의 증가를 일으키기 쉽게 한다.

[0004] 재생 의료도 주목받지만 유도성 다능성 줄기세포(iPS 세포) 등을 이용해도 최종적으로는 자기 유래의 세포가 아닌 한은 면역 거부 반응이 일어날 수 있기 때문에 면역 관용의 기술은 주목받고 있다.

[0005] 이 면역 관용을 유도하는 기술로서 T세포의 항원 특이적인 면역 불응답(아네르기)의 유도가 있다. 구체적으로는 항원 제시 세포 상의 CD80/CD86과 미활성화(나이브) T세포 상의 CD28의 상호작용을 저해하는 항체를 장기 이식 환자에 직접 투여하여 생체 내에서 공여자(donor) 항원 특이적 아네르기를 유도하는 기술(특허문헌 1)이나 동일한 항체의 존재하에서 수혜자(recipient) 세포와 방사선 조사한 공여자 세포를 공배양에 의해 체외로 공여자 항원 특이적 아네르기 세포를 유도하여 수혜자에게 되돌리는 기술이 보고되어 있다(특허문헌 2, 특허문헌 3 및 비특허문헌 1~3).

[0006] 비특허문헌 1은 체외에서 공여자 항원 특이적 아네르기 세포를 유도하여 수혜자에게 되돌리는 기술에서 CD8 양성 세포를 제거해도 면역 억제에 거의 영향이 없는 것을 보고하고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 특허문헌 1: 일본공표특허 2002-504120호 공보

(특허문헌 0002) 특허문헌 2: 일본공표특허 2007-131598호 공보

(특허문헌 0003) 특허문헌 3: 일본공표특허 2016-520081호 공보

비특허문헌

[0008] (비특허문헌 0001) 비특허문헌 1: Satoru Todo et al. Hepatorogy, 64(vol.2), 632-643 (2016)

(비특허문헌 0002) 비특허문헌 2: Teraoka S, Koyama I, Bashuda H, Uchida K, Tonsho M, et al. (2017) J Transplant Res 2(1) p1-8

(비특허문헌 0003) 비특허문헌 3: Bashuda H et al., J. Clin. Invest. 115: 1896-1902 (2005).

발명의 내용

해결하려는 과제

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명자들은 CD80/CD86과 CD28의 상호작용을 저해하는 항체 등의 저해 인자를 이용하여 T세포의 아네르기를 유도해도 아네르기가 유도된 T세포의 혼합물 중에 CD8 양성 세포가 존재하지 않는 경우, CD8 양성 세포가 존재하는 경우에 비해 면역 관용을 유도하는 능력이 의미 있게 저하되는 것을 처음으로 발견하였다. 본 발명자들은 면역 관용을 유도하기 위해서는 CD8 양성 세포가 중요한 기능을 하는 것을 발견하였다.

[0010] 따라서, 본 개시는 이하를 제공한다.

[0011] (1) CD4 양성 아네르기 T세포와, CD8 양성 아네르기 T세포를 포함하는 의약 조성물.

[0012] (2) 상기 아네르기 T세포는 CD80 및/또는 CD86과 CD28의 상호작용을 저해할 수 있는 저해 인자에 의해 유도되는, 상기 항목에 기재된 의약 조성물.

[0013] (3) 상기 저해 인자가 저분자, 단백질, 핵산, 지질, 당 및 이들의 조합으로 이루어지는 군에서 선택되는, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 의약 조성물.

[0014] (4) 상기 단백질이 항체 혹은 그 개변체, 또는 세포 표면 분자 혹은 그 개변체인, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 의약 조성물.

[0015] (5) 상기 항체의 개변체가 항원 결합 단편인, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 의약 조성물.

[0016] (6) 상기 세포 표면 분자의 개변체가 융합 단백질인, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 의약 조성물.

[0017] (7) 상기 저해 인자는 항CD80 항체, 항CD86 항체, CD80 및 CD86에 대한 이중 특이성 항체, 항CD28 항체 혹은 이들의 항원 결합 단편, CTLA4-Ig 융합 단백질, CD28-Ig 융합 단백질로 이루어지는 군에서 선택되는, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 의약 조성물.

[0018] (8) 상기 CTLA4-Ig 융합 단백질은 아바타셉트(abatacept) 또는 벨라타셉트(belatacept)인, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 의약 조성물.

[0019] (9) 제어성 T세포를 더 포함하는, 항목 1~8 중 어느 한 항에 기재된 의약 조성물.

[0020] (10) 상기 제어성 T세포는 FOXP3 양성 CD4 양성 CD25 양성인, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 의약 조성물.

[0021] (11) CD80 및/또는 CD86과 CD28의 상호작용을 저해할 수 있는 저해 인자에 의해 아네르기가 유도된 세포를 포함하는 의약 조성물로서, 이 조성물은 CD8 양성 세포를 포함하고, 이 조성물은 FOXP3 양성 세포 및 CD4 양성 세포 중 적어도 1종 이상을 더 포함하는 의약 조성물.

[0022] (12) FOXP3 양성 세포, CD4 양성 세포 및 CD8 양성 세포 전부를 포함하는, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 의약 조성물.

[0023] (13) 상기 CD8 양성 세포는 CD44 양성인, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 의약 조성물.

[0024] (14) 상기 CD8 양성 세포는 CD45RA 음성 또한 CD45RO 양성인, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 의약 조성물.

[0025] (15) 상기 FOXP3 양성 세포는 CD4 양성인, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 의약 조성물.

[0026] (16) 상기 FOXP3 양성 세포는 CD25 양성인, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 의약 조성물.

[0027] (17) 상기 의약 조성물은 항원 특이적인 면역 관용 또는 면역 억제를 위한 것인, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 의약 조성물.

[0028] (18) 상기 항체는 항CD80 항체, 항CD86 항체, CD80 및 CD86에 대한 이중 특이성 항체, 항CD28 항체 또는 이들의 조합을 포함하는, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 의약 조성물.

[0029] (19) 상기 세포는 상기 저해 인자와, 피험체 유래의 세포와, 이 피험체 유래의 항원 혹은 이 피험체에서 유래하지 않는 항원 또는 이 항원의 함유물을 혼합하는 단계에 의해 유도된 세포인, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 의약 조성물.

[0030] (20) 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 조성물을 포함하는, 피험체 유래의 항원 또는 이 피험체에서 유래하지 않는 항원에 의해 발생하는 이 피험체에서의 질환, 장해 또는 상태를 처치 또는 예방하기 위한 의약 조성물.

[0031] (21) 상기 질환, 장해 또는 상태는 이식 면역 거부 반응, 알레르기, 자기면역 질환, 이식편대숙주병, iPS 세포 또는 ES 세포 및 이들 세포에서 유래하는 세포, 조직 또는 장기의 이식에 의해 일어나는 면역 거부 반응으로 이루어지는 군에서 선택되는, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 의약 조성물.

[0032] (22) 상기 이식 면역 거부 반응은 신장, 간장, 심장, 피부, 폐, 췌장, 식도, 위, 소장, 대장, 신경, 혈액, 면역계 세포를 포함하는 혈구 세포, 뼈, 연골, 혈관, 각막, 안구 또는 골수가 이식됨으로써 발생하는 것을 특징으로 하는, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 의약 조성물.

[0033] (23) 상기 항원의 함유물은 세포인, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 의약 조성물.

[0034] (24) 세포를 포함하는 의약을 제조하는 방법으로서, 이 방법은

[0035] (A) CD80 및/또는 CD86과 CD28의 상호작용을 저해할 수 있는 저해 인자와, 피험체 유래의 세포와, 이 피험체 유래의 항원 혹은 이 피험체에서 유래하지 않는 항원 또는 이 항원의 함유물을 혼합하는 공정과,

[0036] (B) 이 혼합에 의해 얻어지는 세포 생성물이 CD8 양성 세포를 포함하는 것을 확인하는 공정과,

[0037] (C) 이 세포 생성물이 FOXP3 양성 및 CD4 양성 중 적어도 1종의 세포를 포함하는 것을 확인하는 공정을 포함하는 방법.

[0038] (25) 상기 저해 인자가 저분자, 단백질, 핵산, 지질, 당 및 이들의 조합으로 이루어지는 군에서 선택되는, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 방법.

[0039] (26) 상기 단백질이 항체 혹은 그 개변체, 또는 세포 표면 분자 혹은 그 개변체인, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 방법.

[0040] (27) 상기 항체의 개변체가 항원 결합 단편인, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 방법.

[0041] (28) 상기 세포 표면 분자의 개변체가 융합 단백질인, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 방법.

[0042] (29) 상기 저해 인자는 항CD80 항체, 항CD86 항체, CD80 및 CD86에 대한 이중 특이성 항체, 항CD28 항체 혹은 이들의 항원 결합 단편, CTLA4-Ig 융합 단백질, CD28-Ig 융합 단백질로 이루어지는 군에서 선택되는, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 방법.

[0043] (30) 상기 CTLA4-Ig 융합 단백질은 아바타셉트 또는 벨라타셉트인, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 방법.

[0044] (31) 상기 세포 생성물에서의 CD8 양성 세포의 존재, 및 FOXP3 양성 세포 및 CD4 양성 세포 중 적어도 1종의 세포의 존재가 상기 세포 생성물이 의약으로서 사용될 수 있음을 나타내는, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 방법.

[0045] (32) 상기 의약은 상기 피험체 유래의 항원 또는 상기 피험체에서 유래하지 않는 항원에 의해 발생하는 이 피험체에서의 질환, 장해 또는 상태를 처치 또는 예방하기 위한 것인, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 방법.

[0046] (33) 상기 공정(B)이 항CD8 항체에 의해 CD8을 검출하는 것을 포함하고, 상기 공정(C)이 항FOXP3 항체 및 항CD4 항체 중 적어도 1종의 항체에 의해 FOXP3 및 CD4 중 적어도 1종을 검출하는 것을 포함하는, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 방법.

[0047] (34) 상기 검출이 FACS에 의해 실시되는 것을 특징으로 하는, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 방법.

[0048] (35) 피험체 유래의 세포에서 발현하는 항원 또는 이 피험체에서 유래하지 않는 항원에 의해 발생하는 이 피험체에서의 질환, 장해 또는 상태를 처치 또는 예방하기 위한 세포를 포함하는 의약의 품질을 관리하는 방법으로서, 이 방법은 (A) 이 세포가 CD8 양성 세포를 포함하는 것을 확인하는 공정 및 (B) 이 세포가 FOXP3 양성 세포 및 CD4 양성 세포 중 적어도 1종의 세포를 포함하는 것을 확인하는 공정을 포함하는 방법.

[0049] (36) 상기 공정(A)이 항CD8 항체에 의해 CD8을 검출하는 것을 포함하고, 상기 공정(B)이 항FOXP3 항체 및 항CD4 항체 중 적어도 1종의 항체에 의해 FOXP3 및 CD4 중 적어도 1종을 검출하는 것을 포함하는, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 방법.

[0050] (37) 상기 검출이 FACS, 웨스턴 블롯 또는 PCR에 의해 실시되는 것을 특징으로 하는, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 방법.

[0051] (38) 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 의약 조성물을 제조하기 위한, 저해 인자를 포함하는 조성물로서, 이 저해 인자가 CD80 및/또는 CD86과 CD28의 상호작용을 저해할 수 있는 저해 인자인 조성물.

[0052] (39) 상기 저해 인자가 저분자, 단백질, 핵산, 지질, 당 및 이들의 조합으로 이루어지는 군에서 선택되는, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 조성물.

[0053] (40) 상기 단백질이 항체 혹은 그 개변체, 또는 세포 표면 분자 혹은 그 개변체인, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 조성물.

[0054] (41) 상기 항체의 개변체가 항원 결합 단편인, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 조성물.

[0055] (42) 상기 세포 표면 분자의 개변체가 융합 단백질인, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 조성물.

[0056] (43) 상기 저해 인자는 항CD80 항체, 항CD86 항체, CD80 및 CD86에 대한 이중 특이성 항체, 항CD28 항체 혹은 이들의 항원 결합 단편, CTLA4-Ig 융합 단백질, CD28-Ig 융합 단백질로 이루어지는 군에서 선택되는, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 조성물.

[0057] (44) 상기 CTLA4-Ig 융합 단백질은 아바타셉트 또는 벨라타셉트인, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 조성물.

[0058] (45) 세포의 혼합물을 포함하는 의약을 제조하기 위한 키트로서, 이 키트는 (A) CD80 및/또는 CD86과 CD28의 상호작용을 저해할 수 있는 저해 인자와, (B) CD8을 검출하기 위한 수단과, (C) FOXP3 및 CD4 중 적어도 하나를 검출하기 위한 수단을 포함하는 키트.

[0059] (46) 상기 저해 인자가 저분자, 단백질, 핵산, 지질, 당 및 이들의 조합으로 이루어지는 군에서 선택되는, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 키트.

[0060] (47) 상기 단백질이 항체 혹은 그 개변체, 또는 세포 표면 분자 혹은 그 개변체인, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 키트.

[0061] (48) 상기 항체의 개변체가 항원 결합 단편인, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 방법.

[0062] (49) 상기 세포 표면 분자의 개변체가 융합 단백질인, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 방법.

[0063] (50) 상기 저해 인자는 항CD80 항체, 항CD86 항체, CD80 및 CD86에 대한 이중 특이성 항체, 항CD28 항체 혹은 이들의 항원 결합 단편, CTLA4-Ig 융합 단백질, CD28-Ig 융합 단백질로 이루어지는 군에서 선택되는, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 키트 또는 방법.

[0064] (52) 상기 CTLA4-Ig 융합 단백질은 아바타셉트 또는 벨라타셉트인, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 키트 또는 방법.

[0065] (53) 상기 세포의 혼합물에서의 CD8 양성 세포의 존재, 및 FOXP3 양성 세포 및 CD4 양성 세포 중 적어도 1종의 세포의 존재가 상기 세포의 혼합물이 의약으로서 사용될 수 있음을 나타내는, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 키트.

[0066] (54) 상기 의약은 상기 피험체 유래의 항원 또는 상기 피험체에서 유래하지 않는 항원에 의해 발생하는 이 피험체에서의 질환, 장해 또는 상태를 처치 또는 예방하기 위한 것인, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 키트.

[0067] (55) 피험체 유래의 세포에서 발현하는 항원 또는 이 피험체에서 유래하지 않는 항원에 의해 발생하는 이 피험체에서의 질환, 장해 또는 상태를 처치 또는 예방하기 위한 세포를 포함하는 의약의 품질을 관리하기 위한 키트로서, 이 키트는 (A) CD8을 검출하기 위한 수단과, (B) FOXP3 및 CD4 중 적어도 1종을 검출하기 위한 수단을 포함하는 키트.

[0068] (56) 상기 CD8을 검출하기 위한 수단이 항CD8 항체를 포함하고, FOXP3 및 CD4 중 적어도 1종을 검출하기 위한 수단이 항FOXP3 항체 및 항CD4 항체 중 적어도 1종의 항체를 포함하는, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 키트.

[0069] (57) 상기 검출은 FACS, 웨스턴 블롯 또는 PCR에 의해 행해지는 것을 특징으로 하는, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 키트.

[0070] (B1)

[0071] CD8 양성 아네르기 T세포를 포함하는, CD4 양성 아네르기 세포와 함께 이용하여 면역 관용을 야기하기 위한 의약 조성물.

[0072] (B2)

[0073] 상기 항목 1~57 또는 다른 항목 중 어느 하나에 나타내는 하나 또는 복수의 특징을 더 포함하는, 항목 B1에 기재된 의약 조성물.

[0074] (C1)

[0075] CD4 양성 아네르기 T세포를 포함하는, CD8 양성 아네르기 세포와 함께 이용하여 면역 관용을 야기하기 위한 의약 조성물.

[0076] (C2)

[0077] 상기 항목 1~57 또는 다른 항목 중 어느 하나에 나타내는 하나 또는 복수의 특징을 더 포함하는, 항목 B1에 기

재된 의약 조성물.

[0078] (D1)

[0079] 피험체 유래의 항원 또는 이 피험체에서 유래하지 않는 항원에 의해 발생하는 이 피험체에서의 질환, 장해 또는 상태를 처치 또는 예방하는 방법으로서, CD4 양성 아네르기 T세포와 CD8 양성 아네르기 T세포를 유효량으로 이 피험체에 투여하는 공정을 포함하는 방법.

[0080] (D2)

[0081] 상기 아네르기 T세포는 CD80 및/또는 CD86과 CD28의 상호작용을 저해할 수 있는 항체에 의해 유도되는, 상기 항목에 기재된 방법.

[0082] (D3) 상기 저해 인자가 저분자, 단백질, 핵산, 지질, 당 및 이들의 조합으로 이루어지는 군에서 선택되는, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 방법.

[0083] (D4) 상기 단백질이 항체 혹은 그 개변체, 또는 세포 표면 분자 혹은 그 개변체인, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 방법.

[0084] (D5) 상기 항체의 개변체가 항원 결합 단편인, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 방법.

[0085] (D6) 상기 세포 표면 분자의 개변체가 융합 단백질인, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 방법.

[0086] (D7) 상기 저해 인자는 항CD80 항체, 항CD86 항체, CD80 및 CD86에 대한 이중 특이성 항체, 항CD28 항체 혹은 이들의 항원 결합 단편, CTLA4-Ig 융합 단백질, CD28-Ig 융합 단백질로 이루어지는 군에서 선택되는, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 방법.

[0087] (D8) 상기 CTLA4-Ig 융합 단백질은 아바타셉트 또는 벨라타셉트인, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 방법.

[0088] (D9) 제어성 T세포를 투여하는 공정을 더 포함하는, 항목 1~8 중 어느 하나에 기재된 의약 조성물.

[0089] (D10) 상기 제어성 T세포는 FOXP3 양성 CD4 양성 CD25 양성인, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 방법.

[0090] (D11) 피험체 유래의 항원 또는 이 피험체에서 유래하지 않는 항원에 의해 발생하는 이 피험체에서의 질환, 장해 또는 상태를 처치 또는 예방하는 방법으로서, 이 방법은 CD80 및/또는 CD86과 CD28의 상호작용을 저해할 수 있는 저해 인자에 의해 아네르기가 유도된 세포를 유효량으로 이 피험체에 투여하는 공정을 포함하고, 이 아네르기가 유도된 세포는 CD8 양성 세포를 포함하며, 이 아네르기가 유도된 세포는 FOXP3 양성 세포 및 CD4 양성 세포 중 적어도 1종 이상을 더 포함하는 방법.

[0091] (D12) FOXP3 양성 세포, CD4 양성 세포 및 CD8 양성 세포 전부를 포함하는, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 방법.

[0092] (D13) 상기 CD8 양성 세포는 CD44 양성인, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 방법.

[0093] (D14) 상기 CD8 양성 세포는 CD45RA 음성 또한 CD45RO 양성인, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 방법.

[0094] (D15) 상기 FOXP3 양성 세포는 CD4 양성인, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 방법.

[0095] (D16) 상기 FOXP3 양성 세포는 CD25 양성인, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 방법.

[0096] (D17) 상기 아네르기가 유도된 세포는 항원 특이적인 면역 관용 또는 면역 억제를 야기하는, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 방법.

[0097] (D18) 상기 항체는 항CD80 항체, 항CD86 항체, CD80 및 CD86에 대한 이중 특이성 항체, 항CD28 항체 또는 이들의 조합을 포함하는, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 방법.

[0098] (D19) 상기 세포는 상기 저해 인자와, 피험체 유래의 세포와, 이 피험체 유래의 항원 혹은 이 피험체에서 유래하지 않는 항원 또는 이 항원의 함유물을 혼합하는 단계에 의해 유도된 세포인, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 방법.

[0099] (D20) 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 조성물을 포함하는, 피험체 유래의 항원 또는 이 피험체에서 유래하지 않는 항원에 의해 발생하는 이 피험체에서의 질환, 장해 또는 상태를 처치 또는 예방하기 위한 방법.

[0100] (D21) 상기 질환, 장해 또는 상태는 이식 면역 거부 반응, 알레르기, 자기면역 질환, 이식편대숙주병, iPS 세포

또는 ES 세포 및 이들 세포에서 유래하는 세포, 조직 또는 장기의 이식에 의해 일어나는 면역 거부 반응으로 이루어지는 군에서 선택되는, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 방법.

[0101] (D22) 상기 이식 면역 거부 반응은 신장, 간장, 심장, 피부, 폐, 췌장, 식도, 위, 소장, 대장, 신경, 혈액, 면역계 세포를 포함하는 혈구 세포, 뼈, 연골, 혈관, 각막, 안구 또는 골수가 이식됨으로써 발생하는 것을 특징으로 하는, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 방법.

[0102] (D23) 상기 항원의 함유물은 세포인, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 방법.

[0103] (E1) 피험체 유래의 항원 또는 이 피험체에서 유래하지 않는 항원에 의해 발생하는 이 피험체에서의 질환, 장해 또는 상태를 처치 또는 예방하기 위한 의약을 제조하기 위한, CD4 양성 아네르기 T세포 및 CD8 양성 아네르기 T세포의 사용.

[0104] (E2) 상기 아네르기 T세포는 CD80 및/또는 CD86과 CD28의 상호작용을 저해할 수 있는 항체에 의해 유도되는, 상기 항목에 기재된 사용.

[0105] (E3) 상기 저해 인자가 저분자, 단백질, 핵산, 지질, 당 및 이들의 조합으로 이루어지는 군에서 선택되는, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 사용.

[0106] (E4) 상기 단백질이 항체 혹은 그 개변체, 또는 세포 표면 분자 혹은 그 개변체인, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 사용.

[0107] (E5) 상기 항체의 개변체가 항원 결합 단편인, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 사용.

[0108] (E6) 상기 세포 표면 분자의 개변체가 융합 단백질인, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 사용.

[0109] (E7) 상기 저해 인자는 항CD80 항체, 항CD86 항체, CD80 및 CD86에 대한 이중 특이성 항체, 항CD28 항체 혹은 이들의 항원 결합 단편, CTLA4-Ig 융합 단백질, CD28-Ig 융합 단백질로 이루어지는 군에서 선택되는, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 사용.

[0110] (E8) 상기 CTLA4-Ig 융합 단백질은 아바타셉트 또는 벨라타셉트인, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 사용.

[0111] (E9) 상기 CD4 양성 아네르기 T세포 및 CD8 양성 아네르기 T세포는 제어성 T세포를 더 포함하는, 항목 1~8 중 어느 하나에 기재된 사용.

[0112] (E10) 상기 제어성 T세포는 FOXP3 양성 CD4 양성 CD25 양성인, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 사용.

[0113] (E11) 피험체 유래의 항원 또는 이 피험체에서 유래하지 않는 항원에 의해 발생하는 이 피험체에서의 질환, 장해 또는 상태를 처치 또는 예방하는 의약을 제조하기 위한, CD80 및/또는 CD86과 CD28의 상호작용을 저해할 수 있는 저해 인자에 의해 아네르기가 유도된 세포의 사용으로서, 이 아네르기가 유도된 세포는 CD8 양성 세포를 포함하고, 이 아네르기가 유도된 세포는 FOXP3 양성 세포 및 CD4 양성 세포 중 적어도 1종 이상을 포함하는 사용.

[0114] (E12) 상기 아네르기가 유도된 세포는 FOXP3 양성 세포, CD4 양성 세포 및 CD8 양성 세포 전부를 포함하는, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 사용.

[0115] (E13) 상기 CD8 양성 세포는 CD44 양성인, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 사용.

[0116] (E14) 상기 CD8 양성 세포는 CD45RA 음성 또한 CD45RO 양성인, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 사용.

[0117] (E15) 상기 FOXP3 양성 세포는 CD4 양성인, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 사용.

[0118] (E16) 상기 FOXP3 양성 세포는 CD25 양성인, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 사용.

[0119] (E17) 상기 아네르기가 유도된 세포는 항원 특이적인 면역 관용 또는 면역 억제를 야기하는, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 사용.

[0120] (E18) 상기 항체는 항CD80 항체, 항CD86 항체, CD80 및 CD86에 대한 이중 특이성 항체, 항CD28 항체 또는 이들의 조합을 포함하는, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 사용.

[0121] (E19) 상기 아네르기가 유도된 세포는 상기 저해 인자와, 피험체 유래의 세포와, 이 피험체 유래의 항원 혹은 이 피험체에서 유래하지 않는 항원 또는 이 항원의 함유물을 혼합하는 단계에 의해 유도된 세포인, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 사용.

[0122] (E20) 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 조성물을 포함하는, 피험체 유래의 항원 또는 이 피험체에서 유래하지 않는 항원에 의해 발생하는 이 피험체에서의 질환, 장해 또는 상태를 처치 또는 예방하기 위한 사용.

[0123] (E21) 상기 질환, 장해 또는 상태는 이식 면역 거부 반응, 알레르기, 자기면역 질환, 이식편대숙주병, iPS 세포 또는 ES 세포 및 이들 세포에서 유래하는 세포, 조직 또는 장기의 이식에 의해 일어나는 면역 거부 반응으로 이루어지는 군에서 선택되는, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 사용.

[0124] (E22) 상기 이식 면역 거부 반응은 신장, 간장, 심장, 피부, 폐, 췌장, 식도, 위, 소장, 대장, 신경, 혈액, 면역계 세포를 포함하는 혈구 세포, 뼈, 연골, 혈관, 각막, 안구 또는 골수가 이식됨으로써 발생하는 것을 특징으로 하는, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 사용.

[0125] (E23) 상기 항원의 함유물은 세포인, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 사용.

[0126] (F1) 피험체 유래의 항원 또는 이 피험체에서 유래하지 않는 항원에 의해 발생하는 이 피험체에서의 질환, 장해 또는 상태를 처치 또는 예방하기 위한, CD4 양성 아네르기 T세포 및 CD8 양성 아네르기 T세포의 세포 혼합물.

[0127] (F2) 상기 아네르기 T세포는 CD80 및/또는 CD86과 CD28의 상호작용을 저해할 수 있는 항체에 의해 유도되는, 상기 항목에 기재된 세포 혼합물.

[0128] (F3) 상기 저해 인자가 저분자, 단백질, 핵산, 지질, 당 및 이들의 조합으로 이루어지는 군에서 선택되는, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 세포 혼합물.

[0129] (F4) 상기 단백질이 항체 혹은 그 개변체, 또는 세포 표면 분자 혹은 그 개변체인, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 세포 혼합물.

[0130] (F5) 상기 항체의 개변체가 항원 결합 단편인, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 세포 혼합물.

[0131] (F6) 상기 세포 표면 분자의 개변체가 융합 단백질인, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 세포 혼합물.

[0132] (F7) 상기 저해 인자는 항CD80 항체, 항CD86 항체, CD80 및 CD86에 대한 이중 특이성 항체, 항CD28 항체 혹은 이들의 항원 결합 단편, CTLA4-Ig 융합 단백질, CD28-Ig 융합 단백질로 이루어지는 군에서 선택되는, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 세포 혼합물.

[0133] (F8) 상기 CTLA4-Ig 융합 단백질은 아바타셉트 또는 벨라타셉트인, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 세포 혼합물.

[0134] (F9) 제어성 T세포를 더 포함하는, 항목 1~8 중 어느 하나에 기재된 세포 혼합물.

[0135] (F10) 상기 제어성 T세포는 FOXP3 양성 CD4 양성 CD25 양성인, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 세포 혼합물.

[0136] (F11) 피험체 유래의 항원 또는 이 피험체에서 유래하지 않는 항원에 의해 발생하는 이 피험체에서의 질환, 장해 또는 상태를 처치 또는 예방하기 위한, CD80 및/또는 CD86과 CD28의 상호작용을 저해할 수 있는 저해 인자에 의해 아네르기가 유도된 세포로서, 이 아네르기가 유도된 세포는 CD8 양성 세포를 포함하고, 이 아네르기가 유도된 세포는 FOXP3 양성 세포 및 CD4 양성 세포 중 적어도 1종 이상을 포함하는, 아네르기가 유도된 세포.

[0137] (F12) FOXP3 양성 세포, CD4 양성 세포 및 CD8 양성 세포 전부를 포함하는, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 아네르기가 유도된 세포.

[0138] (F13) 상기 CD8 양성 세포는 CD44 양성인, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 아네르기가 유도된 세포.

[0139] (F14) 상기 CD8 양성 세포는 CD45RA 음성 또한 CD45RO 양성인, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 아네르기가 유도된 세포.

[0140] (F15) 상기 FOXP3 양성 세포는 CD4 양성인, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 아네르기가 유도된 세포.

[0141] (F16) 상기 FOXP3 양성 세포는 CD25 양성인, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 사용.

[0142] (F17) 항원 특이적인 면역 관용 또는 면역 억제를 야기하는, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 아네르기가 유도된 세포.

[0143] (F18) 상기 항체는 항CD80 항체, 항CD86 항체, CD80 및 CD86에 대한 이중 특이성 항체, 항CD28 항체 또는 이들의 조합을 포함하는, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 아네르기가 유도된 세포.

[0144] (F19) 상기 아네르기가 유도된 세포는 상기 저해 인자와, 피험체 유래의 세포와, 이 피험체 유래의 항원 혹은 이 피험체에서 유래하지 않는 항원 또는 이 항원의 함유물을 혼합하는 단계에 의해 유도된 세포인, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 아네르기가 유도된 세포.

[0145] (F20) 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 조성물을 포함하는, 피험체 유래의 항원 또는 이 피험체에서 유래하지 않는 항원에 의해 발생하는 이 피험체에서의 질환, 장해 또는 상태를 처치 또는 예방하기 위한 아네르기가 유도된 세포.

[0146] (F21) 상기 질환, 장해 또는 상태는 이식 면역 거부 반응, 알레르기, 자기면역 질환, 이식편대숙주병, iPS 세포 또는 ES 세포 및 이들 세포에서 유래하는 세포, 조직 또는 장기의 이식에 의해 일어나는 면역 거부 반응으로 이루어지는 군에서 선택되는, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 아네르기가 유도된 세포.

[0147] (F22) 상기 이식 면역 거부 반응은 신장, 간장, 심장, 피부, 폐, 췌장, 식도, 위, 소장, 대장, 신경, 혈액, 면역계 세포를 포함하는 혈구 세포, 뼈, 연골, 혈관, 각막, 안구 또는 골수가 이식됨으로써 발생하는 것을 특징으로 하는, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 아네르기가 유도된 세포.

[0148] (F23) 상기 항원의 함유물은 세포인, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 아네르기가 유도된 세포.

[0149] 본 개시는 이하도 제공한다.

[0150] (G1) CD4 양성 아네르기 T세포와,

[0151] CD8 양성 아네르기 T세포를 포함하는 의약 조성물.

[0152] (G2) 상기 아네르기 T세포는 CD80 및/또는 CD86과 CD28의 상호작용을 저해할 수 있는 항체에 의해 유도되는, 상기 항목에 기재된 조성물.

[0153] (G3) 제어성 T세포를 더 포함하는, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 의약 조성물.

[0154] (G4) 상기 제어성 T세포는 FOXP3 양성 CD4 양성 CD25 양성인, 상기 항목 중 어느 한 항에 기재된 조성물.

[0155] (G5) CD80 및/또는 CD86과 CD28의 상호작용을 저해할 수 있는 항체에 의해 아네르기가 유도된 세포를 포함하는 의약 조성물로서, 이 조성물은 CD8 양성 세포를 포함하고, 이 조성물은 FOXP3 양성 세포 및 CD4 양성 세포 중 적어도 1종 이상을 더 포함하는 조성물.

[0156] (G6) FOXP3 양성 세포, CD4 양성 세포 및 CD8 양성 세포 전부를 포함하는, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 조성물.

[0157] (G7) 상기 CD8 양성 세포는 CD44 양성인, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 조성물.

[0158] (G8) 상기 FOXP3 양성 세포는 CD4 양성인, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 조성물.

[0159] (G9) 상기 FOXP3 양성 세포는 CD25 양성인, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 조성물.

[0160] (G10) 상기 의약 조성물은 항원 특이적인 면역 관용 또는 면역 억제를 위한 것인, 상기 항목 중 어느 한 항에 기재된 조성물.

[0161] (G11) 상기 항체는 항CD80 항체, 항CD86 항체, CD80 및 CD86에 대한 이중 특이성 항체, 항CD28 항체 또는 이들의 조합을 포함하는, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 조성물.

[0162] (G12) 상기 세포는 상기 항체와, 피험체 유래의 세포와, 이 피험체 유래의 항원 혹은 이 피험체에서 유래하지 않는 항원 또는 이 항원의 함유물을 혼합하는 단계에 의해 유도된 세포인, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 조성물.

[0163] (G13) 항목 G1~G12 중 어느 하나에 기재된 조성물을 포함하는, 피험체 유래의 항원 또는 이 피험체에서 유래하지 않는 항원에 의해 발생하는 이 피험체에서의 질환, 장해 또는 상태를 처치 또는 예방하기 위한 의약 조성물.

[0164] (G14) 상기 질환, 장해 또는 상태는 이식 면역 거부 반응, 알레르기, 자기면역 질환, 이식편대숙주병, iPS 세포 또는 ES 세포 및 이들 세포에서 유래하는 세포, 조직 또는 장기의 이식에 의해 일어나는 면역 거부 반응으로 이루어지는 군에서 선택되는, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 조성물.

[0165] (G15) 상기 이식 면역 거부 반응은 신장, 간장, 심장, 피부, 폐, 췌장, 식도, 위, 소장, 대장, 신경, 혈액, 면역계 세포를 포함하는 혈구 세포, 뼈, 연골, 혈관, 각막, 안구 또는 골수가 이식됨으로써 발생하는 것을 특징으

로 하는, 항목 G14에 기재된 조성물.

[0166] (G16) 상기 항원의 함유물은 세포인, 상기 항목 중 어느 한 항에 기재된 조성물.

[0167] (G17) 세포를 포함하는 의약을 제조하는 방법으로서, 이 방법은

[0168] (A) CD80 및/또는 CD86과 CD28의 상호작용을 저해할 수 있는 항체와, 피험체 유래의 세포와, 이 피험체 유래의 항원 혹은 이 피험체에서 유래하지 않는 항원 또는 이 항원의 함유물을 혼합하는 공정과,

[0169] (B) 이 혼합에 의해 얻어지는 세포 생성물이 CD8 양성 세포를 포함하는 것을 확인하는 공정과,

[0170] (C) 이 세포 생성물이 FOXP3 양성 및 CD4 양성 중 적어도 1종의 세포를 포함하는 것을 확인하는 공정을 포함하는 방법.

[0171] (G18) 상기 세포 생성물에서의 CD8 양성 세포의 존재, 및 FOXP3 양성 세포 및 CD4 양성 세포 중 적어도 1종의 세포의 존재가 상기 세포 생성물이 의약으로서 사용될 수 있음을 나타내는, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 방법.

[0172] (G19) 상기 의약은 상기 피험체 유래의 항원 또는 상기 피험체에서 유래하지 않는 항원에 의해 발생하는 이 피험체에서의 질환, 장해 또는 상태를 처치 또는 예방하기 위한 것인, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 방법.

[0173] (G20) 상기 공정(B)이 항CD8 항체에 의해 CD8을 검출하는 것을 포함하고, 상기 공정(C)이 항FOXP3 항체 및 항CD4 항체 중 적어도 1종의 항체에 의해 FOXP3 및 CD4 중 적어도 1종을 검출하는 것을 포함하는, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 방법.

[0174] (G21) 상기 검출이 FACS에 의해 실시되는 것을 특징으로 하는, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 방법.

[0175] (G22) 피험체 유래의 세포에서 발현하는 항원 또는 이 피험체에서 유래하지 않는 항원에 의해 발생하는 이 피험체에서의 질환, 장해 또는 상태를 처치 또는 예방하기 위한 세포를 포함하는 의약의 품질을 관리하는 방법으로서, 이 방법은

[0176] (A) 이 세포가 CD8 양성 세포를 포함하는 것을 확인하는 공정 및

[0177] (B) 이 세포가 FOXP3 양성 세포 및 CD4 양성 세포 중 적어도 1종의 세포를 포함하는 것을 확인하는 공정을 포함하는 방법.

[0178] (G23) 상기 공정(A)이 항CD8 항체에 의해 CD8을 검출하는 것을 포함하고, 상기 공정(B)이 항FOXP3 항체 및 항CD4 항체 중 적어도 1종의 항체에 의해 FOXP3 및 CD4 중 적어도 1종을 검출하는 것을 포함하는, 항목 G22에 기재된 방법.

[0179] (G24) 상기 검출이 FACS, 웨스턴 블롯 또는 PCR에 의해 실시되는 것을 특징으로 하는, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 방법.

[0180] (G25) 세포의 혼합물을 포함하는 의약을 제조하기 위한 키트로서, 이 키트는

[0181] (A) CD80 및/또는 CD86과 CD28의 상호작용을 저해할 수 있는 항체와,

[0182] (B) CD8을 검출하기 위한 수단과,

[0183] (C) FOXP3 및 CD4 중 적어도 하나를 검출하기 위한 수단을 포함하는 키트.

[0184] (G25A) 세포의 혼합물을 포함하는 의약의 품질을 관리하기 위한 키트로서, 이 키트는

[0185] (A) CD8을 검출하기 위한 수단과,

[0186] (B) FOXP3 및 CD4 중 적어도 하나를 검출하기 위한 수단을 포함하는 키트.

[0187] (G26) 상기 세포의 혼합물에서의 CD8 양성 세포의 존재, 및 FOXP3 양성 세포 및 CD4 양성 세포 중 적어도 1종의 세포의 존재가 상기 세포의 혼합물이 의약으로서 사용될 수 있음을 나타내는, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 키트.

[0188] (G27) 상기 의약은 상기 피험체 유래의 항원 또는 상기 피험체에서 유래하지 않는 항원에 의해 발생하는 이 피험체에서의 질환, 장해 또는 상태를 처치 또는 예방하기 위한 것인, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 키트.

[0189] (항목 G27A) 상기 의약은 면역 관용을 이용하여 처치 또는 예방하기 위한 것인, 상기 항목 중 어느 하나에 기재

된 키트.

[0190] (G28) 피험체 유래의 세포에서 발현하는 항원 또는 이 피험체에서 유래하지 않는 항원에 의해 발생하는 이 피험체에서의 질환, 장해 또는 상태를 처치 또는 예방하기 위한 세포를 포함하는 의약의 품질을 관리하기 위한 키트로서, 이 키트는

[0191] (A) CD8을 검출하기 위한 수단과,

[0192] (B) FOXP3 및 CD4 중 적어도 1종을 검출하기 위한 수단을 포함하는 키트.

[0193] (G29) 상기 CD8을 검출하기 위한 수단이 항CD8 항체를 포함하고, FOXP3 및 CD4 중 적어도 1종을 검출하기 위한 수단이 항FOXP3 항체 및 항CD4 항체 중 적어도 1종의 항체를 포함하는, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 키트.

[0194] (G30) 상기 검출은 FACS, 웨스턴 블롯 또는 PCR에 의해 행해지는 것을 특징으로 하는, 상기 항목 중 어느 하나에 기재된 키트.

[0195] 본 개시에서 상기 하나 또는 복수의 특징은 명시된 조합에 더하여 추가로 조합하여 제공될 수 있는 것이 의도된다. 본 개시의 추가적인 실시형태 및 이점은 필요에 따라 이하의 상세한 설명을 읽고 이해하면 당업자에게 인식된다.

발명의 효과

[0196] 본 개시의 조성물은 CD4 양성 아네르기 T세포 및 CD8 양성 아네르기 T세포를 포함하고, CD8 양성 아네르기 T세포를 포함하지 않는 것보다 높은 면역 관용의 유도능을 가진다. 또한, 면역 관용을 유도하기 위한 의약의 제조에 있어서 CD8 양성 세포를 지표로 하여 의약의 품질을 관리할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0197] [도 1] 도 1은 면역 관용을 야기하기 위해 필요한 성분을 특정하는 기능 상실 어세이의 결과를 나타낸다. (i) 아네르기 세포의 생성: C57BL6(이하, B6이라고 약기) 마우스 및 BALB/c 마우스로부터 비장을 적출하여 비장 세포(림프구)를 얻었다. 그 후, 스티뮬레이터가 되는 BALB/c 비장 세포에 방사선(γ선) 30Gy를 조사한 후 B6 유래 비장 세포와 1:1로 혼합하여 항CD80 항체와 항CD86 항체를 각 최종 농도가 10μg/mL이 되도록 첨가하고 적절한 부피의 배양액에서 37℃, 5% CO_2 인큐베이터 중에서 배양을 개시하였다. 배양 개시로부터 7일째에 원심에 의해 배양액을 제거한 후에 새로 BALB/c 유래의 방사선 조사 비장 세포와 항CD80 항체/항CD86 항체를 포함하는 배양액을 배양 개시시와 같은 조건으로 첨가하였다. 배양 14일째에 세포를 회수하여 아네르기 세포를 얻었다. (ii) 각 세포 표현형의 선별: 얻어진 아네르기 세포에 PE 형광 표지 항CD8 항체를 반응시킨 후, 항PE 자기 비즈를 이용한 자동 자기 세포 분리 장치(auto-MACS)에 의해 세포를 CD8 양성과 CD8 음성으로 선별하였다. 또한, PE 형광 표지 CD19 항체를 이용하여 동일한 조작을 행하여 세포를 CD19 양성과 CD19 음성으로 선별하였다. 나아가 FOXP3 발현 제어성 T세포(reg T세포)를 세포 표면 항원의 발현으로 식별할 수 있도록, 리스폰더 세포가 FoxP3과 인간 CD2를 동시에 발현하도록 유전자 개변을 행한 B6 유래 마우스를 사용하여 PE 형광 표지 항인간 CD2 항체와 항PE 자기 비즈를 이용한 auto-MACS에 의해 인간 CD2 양성 세포(FoxP3 발현 reg T세포)와 인간 CD2 음성 세포로 선별하여 면역 반응 억제능 시험에 사용하였다. (iii) 면역 반응 억제능 시험: 새로 채취한 B6 마우스 유래의 비장 세포를 리스폰더로서, 또한 새로 채취한 BALB/c 마우스의 비장 세포를 스티뮬레이터로서 이용하여 각각의 세포를 1:1의 비율로 포함하는 혼합 배양물을 96웰 플레이트의 각 웰 중 200μL의 부피로 제작하였다(1웰당 각 세포수는 1×10^5개). 이 혼합 배양물에 대해 리스폰더 B6 비장 세포의 세포수와의 비율이 1, 1/2, 1/4, 1/8 또는 1/16이 되도록 어떠한 선별도 행하지 않은 전체 아네르기 세포(도 1a), 아네르기 CD8 양성 세포만의 세포 집단 혹은 아네르기 CD8 양성 세포를 제외한 나머지 세포 집단(도 1b), reg T세포만의 세포 집단 혹은 reg T세포를 제외한 나머지 세포 집단(도 1c), 또는 CD19 양성 세포(B세포)만의 세포 집단 혹은 B세포를 제외한 나머지 세포 집단(도 1d)을 첨가하고 37℃, 5% CO_2 인큐베이터 중에서 배양하였다. 배양 개시 4일째에 ^{3}H-티미딘을 첨가하고, 배양 개시 5일째(^{3}H-티미딘 첨가의 16~20시간 후)에 배양 세포를 회수하여 신틸레이션 카운터에 의해 ^{3}H-티미딘 도입량을 측정하였다. 각 도면 중, 「naive」는 리스폰더만의 웰, 「allo」는 리스폰더와 스티뮬레이터만의 웰이며, 「naive」의 ^{3}H-티미딘 도입량의 평균값을 1로 하여 그래프를 작성하였다.

[도 2] 도 2는 CD80/86 블로킹에 의한 억제 기능 획득 어세이의 결과를 나타낸다. 실시예 1과 같은 수법으로 야

생형 B6 마우스 및 FoxP3과 인간 CD2를 동시에 발현하도록 유전자 개변을 행한 B6 유래 마우스로부터 각각 얻은 비장 세포에 대해 BALB/c 유래의 방사선 조사 비장 세포와 항CD80 항체/항CD86 항체에 의한 처리를 행하여 아네르기 세포를 얻었다. 이 아네르기 세포와 함께 야생형 B6 마우스 및 FoxP3과 인간 CD2를 동시에 발현하도록 유전자 개변을 행한 B6 유래 마우스로부터 얻은 무자극의 나이브 비장 세포를 각각 PE 형광 표지 항마우스 CD8 항체 또는 PE 형광 표지 항인간 CD2 항체와 반응시켰다. 그 후, 항PE 자기 비즈를 이용한 auto-MACS에 의해 세포를 CD8 양성과 CD8 음성으로 또는 인간 CD2 양성과 인간 CD2 음성으로 선별하였다. 선별한 각 세포를 실시예 1에 기재되는 96웰 플레이트 상의 혼합 배양계에 첨가하고 그 면역 억제능을 조사하였다. 각 도면 중, 「naive」(i는 보다 정확하게는 트레마(위의 점이 2개)를 나타냄. 본 명세서 중 동일함)는 리스폰더만의 웰, 「allo」는 리스폰더와 스티뮬레이터만의 웰이며, 「naive」의 ^{3}H-티미딘 도입량의 평균값을 1로 하여 그래프를 작성하였다.

[도 3] 도 3은 아네르기 유도 후의 순화 세포가 이식 후에 관용 유도 능력을 갖는지 어떤지를 마우스를 이용한 실험으로 확인한 결과를 나타낸다. 실시예 1과 같은 수법으로 야생형 B6 마우스 및 FoxP3과 인간 CD2를 동시에 발현하도록 유전자 개변을 행한 B6 유래 마우스의 비장 세포에 대해 BALB/c 유래의 방사선 조사 비장 세포와 항CD80 항체/항CD86 항체에 의한 처리를 행하여 아네르기 세포를 얻었다. 얻어진 아네르기 세포(전체 아네르기 세포)로부터 실시예 1과 같은 수법으로 CD8 양성 세포, CD4 양성 세포 또는 인간 CD2 양성 세포를 선별하였다. 야생형 B6 마우스에 2Gy의 방사선(γ선)을 조사한 3일 후에 BALB/c 마우스의 심장을 이식하고, 직후(또는 심장 이식과 같은 날 중)에 나이브 B6 비장 세포 또는 얻어진 아네르기 세포를 꼬리정맥(caudal vein)으로부터 투여하여 심장의 거부를 관찰하였다. 각 군 5마리 이상으로 실험을 행하였다. 도 3a는 아네르기 세포를 이식하지 않은 경우 혹은 전체 아네르기 세포를 2×10^{6}개, 4×10^{6}개 또는 6×10^{6}개 투여한 경우의 심장 이식 마우스의 누적 생존을 나타낸다. 도 3b는 수혜자 마우스에 대한 방사선 조사의 효과를 나타낸다. 각각 수혜자 마우스에 대한 방사선 조사 없음+전체 아네르기 세포 5×10^{6}개, 수혜자 마우스에 대한 2.5Gy 방사선 조사+나이브 B6 비장 세포 4×10^{6}개, 또는 수혜자 마우스에 대한 2.5Gy 방사선 조사+전체 아네르기 세포 4×10^{6}개의 처치를 부여하고 그 후의 마우스의 생존을 추적하였다. 도 3c 및 도 3d는 다양한 순화 세포 집단을 투여한 경우의 심장 이식 마우스의 생존을 나타낸다.

[도 4] 도 4는 인간 PBMC에서 유래하는 아네르기 세포의 능력을 나타낸다. (i) 아네르기 세포의 생성: 4명의 지원자(2명을 스티뮬레이터, 2명을 리스폰더로 함)의 인간 말초혈로부터 단핵 세포(PBMC)를 분리하고, 스티뮬레이터 PBMC에는 방사선(γ선) 30Gy를 조사하여 리스폰더 PBMC와 1:1로 혼합하였다. 혼합한 PBMC에 항인간 CD80 항체와 항인간 CD86 항체를 각각 최종 농도가 10μg/mL이 되도록 첨가하고 적절한 부피의 배양액에서 37℃, 5% CO_2 인큐베이터 중에서 배양을 개시하였다. 배양 개시로부터 7일째에 원심에 의해 배양액을 제거한 후에 방사선 조사 스티뮬레이터 PBMC와 항CD80 항체/항CD86 항체를 포함하는 배양액을 배양 개시시와 같은 조건으로 첨가하였다. 배양 14일째에 세포를 회수하고 원심에 의해 배양액을 워시아웃하여 아네르기 세포를 얻었다. (ii) 각 세포 표현형의 선별: 얻어진 아네르기 세포를 PE 형광 표지 마우스 항인간 CD25 항체, FITC 형광 표지 마우스 항인간 CD4 항체, APC 형광 표지 마우스 항인간 CD8 항체에 의해 염색한 후 JSAN 셀 소터(베이 바이오사이언스사)를 이용하여 각 세포를 순화하였다. (iii) 면역 반응 억제능 시험: 새로 채취한 동일한 지원자의 PBMC를 리스폰더, 스티뮬레이터로서 이용하여 각각의 세포를 1:1의 비율로 포함하는 혼합 배양물을 96웰 플레이트의 각 웰 중 200μL의 부피로 제작하였다(1웰당 각 세포수는 2×10^{5}개). 이 혼합 배양물에 대해 리스폰더 PBMC의 세포수와의 비율이 1/2, 1/4, 1/8 또는 1/16이 되도록 전체 아네르기 세포를 첨가하고 37℃, 5% CO_2 인큐베이터 중에서 배양하였다(도 4a). 도 4b에서는 상기 혼합 배양물에 대해 CD25 양성 세포를 순화한 세포 집단(CD25+), CD4 양성 CD25 양성 reg T세포를 순화한 세포 집단(CD4+CD25+), 또는 순화한 CD4 양성 CD25 양성 reg T세포 및 순화한 CD8 양성 세포를 더한 세포 집단(CD25+/CD8+)을 리스폰더 PBMC의 세포수와의 비율이 각각 1/2이 되도록 첨가하였다. 도 4c에서는 상기 혼합 배양물에 대해 리스폰더 PBMC의 세포수와의 비율이 1/2, 1/4, 1/8 또는 1/16이 되도록 CD4 양성 세포를 순화한 세포 집단, CD4 음성 세포를 순화한 세포 집단 또는 전체 아네르기 세포를 첨가하고 면역 억제능을 비교한 것이다. 각 도면 중, 「naive」는 리스폰더만의 웰, 「allo」는 리스폰더와 스티뮬레이터만의 웰이며, 「naive」의 ^{3}H-티미딘 도입량의 평균값을 1로 하여 그래프를 작성하였다.

[도 5] 도 5는 아네르기 세포에 의한 면역 억제는 항원에 특이적임을 나타내는 도면이다. 이 도면은 항CD80/86 항체 존재하에서 Balb/c 마우스 비장 세포로 자극된 B6 마우스 유래의 아네르기 세포의 B6 마우스에의 이입 후의 심장의 생착률을 나타낸다. 이식된 BALB/c 마우스의 심장의 거부를 100% 저해하며 100일 후에도 심장이 생착되어 있지만, 이에 반해 타자(heterologous(3rd party))인 CBA 마우스의 심장은 이식 후에 신속하게 거부 반응

을 일으키며 약 50일에 100% 거부되는 것이 나타났다.

[도 6] 도 6은 아네르기 세포가 나이브 세포보다 신속하게 공여자(스티뮬레이터) 세포에 결합함으로써 나이브 세포의 반응 및 증식을 저해하고 있음을 나타낸다. 실시예 1과 같은 수법으로 B6 마우스로부터 얻은 비장 세포에 대해 BALB/c 유래의 방사선 조사 비장 세포와 항CD80 항체/항CD86 항체에 의한 처리를 행하여 아네르기 세포를 얻었다. 이 실험에서는 형광 색소 GFP를 항상적으로 발현하도록 유전자 개변한 B6 마우스로부터 새로 얻은 비장 세포를 리스폰더로서 이용하였다. 12웰 플레이트 내에서 상술한 리스폰더 B6 비장 세포 및 스티뮬레이터(공여자) BALB/c 비장 세포를 각각 1×10^{6}개/ml 포함하는 4mL의 혼합 배양계에 상기 아네르기 세포를 리스폰더 B6 비장 세포와의 비율이 1/2이 되도록 첨가하고 37℃, 5% CO_2 인큐베이터 중에서 배양하였다. 배양 개시로부터 1일 후부터 3일 후까지 경시적으로 플레이트를 관찰하여 사진을 찍었다.

[도 7] 도 7은 아네르기 세포 중에서 면역 억제능(아네르기 유도능)을 발휘하는 세포는 CD44 양성임을 나타낸다. 실시예 1과 같은 수법으로 B6 마우스로부터 얻은 비장 세포에 대해 BALB/c 유래의 방사선 조사 비장 세포와 항CD80 항체/항CD86 항체에 의한 처리를 행하여 아네르기 세포를 얻었다. 이 아네르기 세포를 PE 형광 표지 항마우스 CD8 항체, PE 형광 표지 항마우스 CD4 항체 및 APC 형광 표지 항마우스 CD44 항체로 염색 후 JSAN 셀 소터를 이용하여 CD8 양성 CD44 음성 세포 또는 CD4 양성 CD44 음성 세포를 제거한 세포 집단을 제작하고, 이 세포 집단 또는 전체 아네르기 세포를 리스폰더 B6 비장 세포와의 비율이 1/2, 1/4, 1/8 또는 1/16이 되도록 혼합 배양계에 첨가하였다(도 7a). 나아가 JSAN 셀 소터를 이용하여 CD8 양성 CD44 양성 세포 또는 CD4 양성 CD44 양성 세포를 순화한 세포 집단을 제작하여 리스폰더 B6 비장 세포와의 비율이 1/2, 1/4 또는 1/8이 되도록 혼합 배양계에 첨가하였다(도 7b). 도 7c는 아네르기 세포의 표현형을 FACS에 의해 조사한 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0198] 이하, 본 개시를 최적의 형태를 나타내면서 설명한다. 본 명세서의 전체에 걸쳐 단수형의 표현은 특별히 언급하지 않는 한 그 복수형의 개념도 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 따라서, 단수형의 관사(예를 들어 영어의 경우는 「a」, 「an」, 「the」 등)는 특별히 언급하지 않는 한 그 복수형의 개념도 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어는 특별히 언급하지 않는 한 해당 분야에서 통상 이용되는 의미로 이용되는 것으로 이해되어야 한다. 따라서, 그 밖에 정의되지 않는 한 본 명세서 중에서 사용되는 모든 전문 용어 및 과학 기술 용어는 본 개시가 속한 분야의 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 모순되는 경우 본 명세서(정의를 포함하여)가 우선된다.

[0199] (용어의 정의)

[0200] 본 명세서에서 「약」이란 본 명세서에서 사용되는 경우 뒤에 이어지는 수치의 ±10%를 의미한다.

[0201] 본 명세서에서 「면역 관용」이란 특정의 항원에 대한 특이적 면역 반응을 나타내지 않거나 특이적 면역 반응이 억제된 상태이다. 면역 관용은 면역 세포(특히 T세포)가 특정의 항원에 대한 특이적 면역 반응을 나타내지 않거나 특이적 면역 반응이 억제된 상태와, 인간이 특정의 항원에 대한 특이적 면역 반응을 나타내지 않거나 특이적 면역 반응이 억제된 상태 둘 다 또는 어느 한쪽을 의미해도 된다. 면역 관용이 야기됨으로써 면역 거부 반응에 대한 처치가 가능해지거나 알레르기에 대한 치료가 가능해지기 때문에 주목받고 있다. 본 명세서에서 「아네르기」란 항원 제시 세포로부터 항원이 제시될 때에 공자극이 입력되지 않음으로써 그 다음번에 공자극이 있는 조건으로 자극되어도 반응할 수 없게 된 상태를 의미한다. 따라서, 본 명세서에서는 「아네르기 세포」란 면역 관용이 발생한(면역 불응답의) 세포를 말하고, 「아네르기 T세포」는 면역 관용이 발생한(면역 불응답의) T세포로서, 활성화되지 않은 것 외에 다시 동일한 항원이었을 때에 무반응인 T세포도 포함된다. 또, 본 명세서에서 「면역 관용이 유도된 PBMC(또는 T세포)」와 「아네르기 PBMC(또는 T세포)」는 같은 의의이다. 아네르기 세포인지 어떤지는 예를 들어 CD44 양성을 확인함으로써 확인할 수 있지만 이에 한정되지 않는다.

[0202] 본 명세서에서 「피험체」란 사육 동물(예를 들어 소, 양, 고양이, 개, 말), 영장류(예를 들어 인간 및 원숭이 등의 비인간 영장류), 토끼 및 설치류(예를 들어 마우스 및 래트)를 포함한다. 특정의 실시형태에서는 피험체는 인간이다.

[0203] 본 명세서에서 「약제」, 「제」 또는 「인자」(모두 영어로는 agent에 상당함)는 넓은 뜻으로는 교환 가능하게 사용되며, 의도하는 목적을 달성할 수 있는 한 어떠한 물질 또는 다른 요소(예를 들어 광, 방사능, 열, 전기 등의 에너지)이어도 된다. 이러한 물질로서는 예를 들어 단백질, 폴리펩티드, 올리고펩티드, 펩티드, 폴리뉴클레

오티드, 올리고뉴클레오티드, 뉴클레오티드, 핵산(예를 들어 cDNA, 게놈 DNA와 같은 DNA, mRNA와 같은 RNA를 포함함), 폴리사카리드, 올리고사카리드, 지질, 유기 저분자(예를 들어 호르몬, 리간드, 정보 전달 물질, 그 밖의 유기 저분자 화합물, 조합 화학(combinatorial chemistry)으로 합성된 분자, 의약품으로서 이용될 수 있는 저분자(예를 들어 저분자 리간드 등) 등), 이들의 복합 분자를 들 수 있지만 이들에 한정되지 않는다.

[0204] 본 명세서에서 「저해 인자」는 소정의 작용(예를 들어 상호작용, 시그널 전달 등)을 저해할 수 있는 모든 종류의 저분자, 단백질, 핵산, 지질, 당 등을 말한다. 특정의 이론에 속박되는 것은 바라지 않지만, 본 개시에서 세포 표면의 CD80 및/또는 CD86과 CD28의 상호작용을 블록하여 CD28 공자극 시그널을 저해함으로써 T세포에 아네르기를 유도한다. 본 개시에서는 CD80 및/또는 CD86과 CD28의 상호작용을 블록하는 데에 사용되는 저해 인자는 저분자, 단백질, 핵산, 지질, 당 및 이들의 조합으로 이루어지는 군에서 선택된다. 일 국면에서는 상기 단백질은 항체 혹은 그 개변체, 또는 세포 표면 분자 혹은 그 개변체이다. 다른 국면에서는 상기 항체의 개변체는 항원 결합 단편이다. 다른 국면에서는 상기 세포 표면 분자의 개변체는 융합 단백질이다. 다른 국면에서는 상기 저해 인자는 항CD80 항체, 항CD86 항체, CD80 및 CD86에 대한 이중 특이성 항체, 항CD28 항체 혹은 이들의 항원 결합 단편, CTLA4-Ig 융합 단백질, CD28-Ig 융합 단백질로 이루어지는 군에서 선택된다. 다른 국면에서는 상기 CTLA4-Ig 융합 단백질은 아바타셉트 또는 벨라타셉트이다. 또한, 상기 상호작용을 간접적으로 저해하는 인자(예를 들어 시그널 전달의 상류 또는 하류의 시그널의 저해 인자)도 조합하여 사용하는 것도 상정된다.

[0205] 본 명세서에서 넓은 뜻의 「항체」는 항원 상의 특정 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있는 분자 또는 그 집단을 말한다. 본 명세서에서 넓은 뜻의 「항체」는 전체길이 항체(즉, Fc 부분을 갖는 항체)이어도 되고, Fc 부분이 결여되어 있는 항체이어도 된다. Fc 부분이 결여되어 있는 항체는 목적의 항원에 결합할 수 있으면 되고, 이러한 항체로서는 예를 들어 Fab 항체, $F(ab')_2$ 항체, Fab' 항체, Fv 항체, scFv 항체 등을 들 수 있지만 이들에 한정되지 않는다. 항체는 어떠한 타입의 항체이어도 되고, 즉 해당 분야에서 공지의 면역글로불린이어도 된다. 예시적인 실시형태에서 항체는 아이소타입 IgA, IgD, IgE, IgG 또는 IgM의 클래스의 항체이다. 예시적인 실시형태에서 본 명세서에 기재되는 항체는 하나 또는 복수의 알파, 델타, 엡실론, 감마 및/또는 뮤 중쇄를 포함한다. 예시적인 실시형태에서 본 명세서에 기재되는 항체는 하나 또는 복수의 카파 또는 경쇄를 포함한다. 예시적인 형태에서 항체는 IgG 항체이며, 4개의 인간 서브 클래스: IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4 중 하나이다. 또한, 본 개시에서의 사용이 예상되는 항체로서는 낙타과 동물 유래의 항체(예를 들어 VHH 항체), 상어 유래의 항체(예를 들어 1본쇄 항체), 펩티보디(peptibody), 나노보디(nanobody, 단일 도메인 항체), 미니보디(minibody), 다중특이성 항체(예를 들어 이중 특이성 항체, 다이아보디(diabody), 트리아보디(triabody), 테트라보디(tetrabody), 탠덤 디-scFV, 탠덤 트리-scFv) 등을 들 수 있고, 이들은 해당 분야에서 공지이다. 예를 들어 Kortt 등 Biomol Eng. 2001 18권: 95~108페이지 (2001년) 및 Todorovska 등 J Immunol Methods. 248권: 47~66페이지 (2001년) 등을 참조하기 바란다. 또한, 항체는 항체 수식물 또는 항체 비수식물을 포함한다. 항체 수식물은 항체와 예를 들어 폴리에틸렌글리콜 등의 각종 분자가 결합되어 있어도 된다. 항체 수식물은 항체에 공지의 수법을 이용하여 화학적인 수식을 실시함으로써 얻을 수 있다. 인공적으로 작출된 항체 및 항체의 여러 가지의 수식/개변 방법에 대해서는 생화학(2016) 제88권 제3호 380~385페이지도 참조할 것.

[0206] 본 명세서에서 좁은 뜻의 「항체」는 항원 상의 특정 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있는 면역글로불린 또는 그 집단을 말하고, 그 개변체를 「항체의 개변체」라고 한다. 본 명세서에서 좁은 뜻의 「항체」는 전체길이 항체(즉, Fc 부분을 갖는 항체)일 수 있고, 본 명세서에서 「항체의 개변체」는 상기 항체의 Fc 부분이 결여되어 있는 개변체일 수 있다. 따라서, 본 명세서에서 좁은 뜻의 항체는 전체길이 항체라고도 불릴 수 있고, 항체의 개변체는 전체길이 항체의 개변체라고도 불릴 수 있다. Fc 부분이 결여되어 있는 개변체는 목적의 항원에 결합할 수 있으면 되고, 이러한 개변체로서는 예를 들어 Fab 항체, $F(ab')_2$ 항체, Fab' 항체, Fv 항체, scFv 항체 등을 들 수 있지만 이들에 한정되지 않는다. 또한, 항체의 개변체는 항체 수식물 또는 항체 비수식물을 포함한다. 항체 수식물은 항체와 예를 들어 폴리에틸렌글리콜 등의 각종 분자가 결합되어 있어도 된다. 항체 수식물은 항체에 공지의 수법을 이용하여 화학적인 수식을 실시함으로써 얻을 수 있다.

[0207] 본 개시의 일 실시형태에서 「다클론 항체(polyclonal antibody)」는 예를 들어 항원에 특이적인 다클론 항체의 생산을 유도하기 위해 포유류(예를 들어 래트, 마우스, 토끼, 소, 원숭이 등), 조류 등에 목적의 항원을 포함하는 면역원을 투여함으로써 생성하는 것이 가능하다. 면역원의 투여는 하나 이상의 면역제 및 원하는 경우에는 아쥬반트의 주입을 해도 된다. 아쥬반트는 면역 응답을 증가시키기 위해 사용되는 경우도 있고, 프로인드 아쥬반트(완전 또는 불완전), 미네랄 겔(수산화 알루미늄 등) 또는 계면 활성 물질(리졸레시틴 등) 등을 포함하고 있어도 된다. 면역 프로토콜은 해당 기술 분야에서 공지이며, 선택하는 숙주 생물에 맞추어 면역 응답을 유발하

는 임의의 방법에 따라 실시되는 경우가 있다(단백질 실험 핸드북, 요도샤(2003): 86-91.).

[0208] 본 개시의 일 실시형태에서 「단클론 항체(monoclonal antibody)」는 집단을 구성하는 개개의 항체가 소량 자연스럽게 발생하는 것이 가능한 돌연변이를 갖는 항체를 제외하고 실질적으로 단일 에피토프에 대응하는 동일한 항체인 경우를 포함한다. 또는 집단을 구성하는 개개의 항체가 소량 자연스럽게 발생하는 것이 가능한 돌연변이를 갖는 항체를 제외하고 실질적으로 동일한 항체이어도 된다. 단클론 항체는 고도로 특이적이며, 다른 에피토프에 대응하는 다른 항체를 전형적으로 포함하는 및/또는 동일한 에피토프에 대응하는 다른 항체를 전형적으로 포함하는 것과 같은 통상의 다클론 항체와는 다르다. 그 특이성에 더하여 단클론 항체는 다른 면역글로불린에 의해 오염되지 않은 하이브리도마 배양으로부터 합성할 수 있는 점에서 유용하다. 「단클론」이라는 형용은 실질적으로 균일한 항체 집단으로부터 얻어진다는 특징을 나타내고 있어도 되지만 항체를 무엇인가 특정의 방법으로 생산해야 하는 것을 의미하는 것은 아니다. 예를 들어 단클론 항체는 "Kohler G, Milstein C., Nature. 1975 Aug 7; 256(5517): 495-497."에 게재되어 있는 바와 같은 하이브리도마법과 동일한 방법에 의해 제작해도 된다. 혹은 단클론 항체는 미국특허 제4816567호에 기재되어 있는 바와 같은 재조합법과 동일한 방법에 의해 제작해도 된다. 또는 단클론 항체는 "Clackson et al., Nature. 1991 Aug 15; 352(6336): 624-628." 또는 "Marks et al., J Mol Biol. 1991 Dec 5; 222(3): 581-597."에 기재되어 있는 바와 같은 기술과 동일한 방법을 이용하여 파지 항체 라이브러리로부터 단리해도 된다. 또는 "단백질 실험 핸드북, 요도샤(2003): 92-96."에 게재되어 있는 방법에 의해 제작해도 된다.

[0209] 본 개시의 일 실시형태에서 「키메라 항체」는 예를 들어 이종 생물 사이에서 항체의 가변 영역과 항체의 정상 영역을 연결한 것으로, 유전자 재조합 기술에 의해 구축할 수 있다. 마우스-인간 키메라 항체는 예를 들어 "Roguska et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Feb 1; 91(3): 969-973."에 기재된 방법으로 제작할 수 있다. 마우스-인간 키메라 항체를 제작하기 위한 기본적인 방법은 예를 들어 클론화된 cDNA에 존재하는 마우스 리더 서열 및 가변 영역 서열을 포유류 세포의 발현 벡터 중에 이미 존재하는 인간 항체 정상 영역을 코드하는 서열에 연결한다. 또는 클론화된 cDNA에 존재하는 마우스 리더 서열 및 가변 영역 서열을 인간 항체 정상 영역을 코드하는 서열에 연결한 후 포유류 세포 발현 벡터에 연결해도 된다. 인간 항체 정상 영역의 단편은 임의의 인간 항체의 H쇄 정상 영역 및 인간 항체의 L쇄 정상 영역의 것으로 할 수 있고, 예를 들어 인간 H쇄의 것에 대해서는 Cγ1, Cγ2, Cγ3 또는 Cγ4를, L쇄의 것에 대해서는 Cλ 또는 Cκ를 각각 들 수 있다.

[0210] 본 개시의 일 실시형태에서 「인간화 항체」는 예를 들어 비인간종 유래의 하나 이상의 CDR 및 인간 면역글로불린 유래의 프레임 워크 영역(FR), 추가로 인간 면역글로불린 유래의 정상 영역을 가지며, 원하는 항원에 결합하는 항체이다. 항체의 인간화는 해당 기술분야에서 이미 알려진 여러 가지의 수법을 사용하여 실시 가능하다(Almagro et al., Front Biosci. 2008 Jan 1; 13: 1619-1633.). 예를 들어 CDR 그래프팅(Ozaki et al., Blood. 1999 Jun 1; 93(11): 3922-3930.), Re-surfacing(Roguska et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Feb 1; 91(3): 969-973.) 또는 FR 셔플(Damschroder et al., Mol Immunol. 2007 Apr; 44(11): 3049-3060. Epub 2007 Jan 22.) 등을 들 수 있다. 항원 결합을 개변하기 위해(바람직하게는 개선하기 위해) 인간 FR 영역의 아미노산 잔기는 CDR 공여자 항체로부터의 대응하는 잔기와 치환해도 된다. 이 FR 치환은 해당 기술분야에서 주지의 방법에 의해 실시 가능하다(Riechmann et al., Nature. 1988 Mar 24; 332(6162): 323-327.). 예를 들어 CDR과 FR 잔기의 상호작용의 모델링에 의해 항원 결합에 중요한 FR 잔기를 동정(同定)해도 된다. 또는 서열 비교에 의해 특정의 위치에서 이상한 FR 잔기를 동정해도 된다.

[0211] 본 개시의 일 실시형태에서 「인간 항체」는 예를 들어 항체를 구성하는 중쇄의 가변 영역 및 정상 영역, 경쇄의 가변 영역 및 정상 영역을 포함하는 영역이 인간 면역글로불린을 코드하는 유전자에서 유래하는 항체이다. 주요 제작 방법으로서는 인간 항체 제작용 형질전환(transgenic) 마우스법, 파지 디스플레이법 등이 있다. 인간 항체 제작용 형질전환 마우스법에서는 내인성 Ig를 녹아웃한 마우스에 기능적인 인간의 Ig 유전자를 도입하면 마우스 항체 대신에 다양한 항원 결합능을 갖는 인간 항체가 생산된다. 나아가 이 마우스를 면역하면 인간 단클론 항체를 종래의 하이브리도마법으로 얻는 것이 가능하다. 예를 들어 "Lonberg et al., Int Rev Immunol. 1995; 13(1): 65-93."에 기재된 방법으로 제작할 수 있다. 파지 디스플레이법은 전형적으로는 대장균 바이러스의 하나인 M13이나 T7 등의 섬유상 파지의 코트 단백질(g3p, g10p 등)의 N말단측에 파지의 감염성을 잃지 않도록 외래 유전자를 융합 단백질로서 발현시키는 시스템이다. 예를 들어 "Vaughan et al., Nat Biotechnol. 1996 Mar; 14(3): 309-314."에 기재된 방법으로 제작할 수 있다.

[0212] 본 명세서에서 「피험체 유래의 세포」란 본 개시의 조성물이 투여되는 피험체로부터 얻은 세포 또는 이 피험체로부터 얻은 세포에서 유래하는 세포를 말한다. 본 명세서에서 「피험체 유래의 항원」이란 면역 응답을 발생시키는 피험체 자신이 생성하는 항원, 예를 들어 자기면역 질환을 갖는 피험체에서의 자기면역 질환의 원인이 되

는 피험체 자신이 생성하는 항원을 말한다. 본 명세서에서 「피험체에서 유래하지 않는 항원」이란 면역 응답을 발생시킬 수 있는 외래의 항원을 말한다. 본 명세서에서 「피험체에서 유래하지 않는」 「항원의 함유물(antigen-containing material)」은 피험체에서 유래하지 않는 항원을 함유하는 임의의 물질 또는 물질의 집합물을 말하고, 예를 들어 피험체에서 유래하지 않는 항원을 발현하고 있는 세포, 세포 집단, 조직 등을 들 수 있다.

[0213] 본 명세서에서 「이식 면역 거부 반응」이란 장기, 조직 또는 세포의 이식을 받은 피험체에 있어서 피험체의 면역계가 이식된 장기, 조직 또는 세포에 대해 공격하여 손상 또는 파괴하는 것을 말한다.

[0214] 본 명세서에서 「알레르기」란 피험체에서 유래하지 않는 항원에 대해 면역 응답이 과잉으로 일어나는 상태를 말한다. 알레르기를 일으키는 피험체에서 유래하지 않는 항원은 알레르겐이라고도 불리며, 예를 들어 진드기 항원, 난백 항원, 우유 항원, 소맥 항원, 땅콩 항원, 대두 항원, 메밀 항원, 참깨 항원, 쌀 항원, 갑각류 항원, 키위 항원, 사과 항원, 바나나 항원, 복숭아 항원, 토마토 항원, 참치 항원, 연어 항원, 고등어 항원, 소고기 항원, 닭고기 항원, 돼지고기 항원, 고양이 인설(dander) 항원, 곤충 항원, 꽃가루 항원, 개 인설 항원, 진균 항원, 세균 항원, 라텍스, 합텐 및 금속 등을 들 수 있지만 이들에 한정되지 않는다.

[0215] 본 명세서에서 「자기면역 질환」이란 면역계가 자신의 세포, 조직 또는 장기에 대해 바람직하지 않은 면역 응답을 행하는 임의의 질환을 말한다. 자기면역 질환으로서는 예를 들어 류마티스 관절염, 다발성 경화증, 1형 당뇨병, 염증성 장질환(예를 들어 크론병 또는 궤양성 대장염), 전신성 홍반성낭창(lupus erythematosus), 건선, 강피증, 자기면역성 갑상선 질환, 원형 탈모증, 그레이브스병, 길랭-바레 증후군, 셀리악병, 쇼그렌 증후군, 류마티스열, 위염, 자기면역성 위축성 위염, 자기면역성 간염, 췌도염, 난소염, 정소염, 포도막염, 수정체 기인성 포도막염, 중증근무력증, 원발성 점액수종, 악성 빈혈, 자기면역성 용혈성 빈혈, 애디슨병, 강피증, 굿파스처 증후군, 신장염(예를 들어 사구체신염), 건선, 심상성 천포창, 유천포창, 교감성 안염, 특발성 혈소판 감소성 자반병, 특발성 백혈구 감소증, 베게너 육아종 및 다발성/피부근염을 들 수 있지만 이들에 한정되지 않는다.

[0216] 본 명세서에서 「이식편대숙주병」이란 이식된 장기, 조직 또는 세포가 면역 응답에 의해 이식을 받은 피험체의 세포, 조직 또는 장기를 공격하여 손상 또는 파괴하는 것을 말한다.

[0217] 본 명세서에서 「iPS 세포 혹은 ES 세포 또는 이들 세포에서 유래하는 세포, 조직 혹은 장기의 이식에 의해 일어나는 면역 거부 반응」이란 iPS 세포 혹은 ES 세포가 갖는 항원, 또는 iPS 세포 혹은 ES 세포에서 유래하는 세포, 조직 혹은 장기가 갖는 항원에 의해 발생하는 면역 거부 반응을 말한다.

[0218] (바람직한 실시형태)

[0219] 이하에 바람직한 실시형태의 설명을 기재하지만 이 실시형태는 본 개시의 예시이며 본 개시의 범위는 이러한 바람직한 실시형태에 한정되지 않는 것으로 이해되어야 한다. 또한, 당업자는 이하와 같은 바람직한 실시예를 참고하여 본 개시의 범위 내에 있는 개변, 변경 등을 용이하게 행할 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 이들 실시형태에 대해 당업자는 적절히 본 명세서 중의 기재를 참작하여 임의의 실시형태를 조합할 수 있다. 또한, 본 개시의 이하의 실시형태는 단독으로도 사용되고 혹은 이들을 조합하여 사용할 수 있는 것으로 이해된다.

[0220] (의약과 치료 및 예방)

[0221] 본 발명자들은 CD80/CD86과 CD28의 상호작용을 저해하는 저해 인자를 이용하여 T세포의 아네르기를 유도해도 아네르기가 유도된 T세포를 포함하는 혼합물 중에 CD8 양성 세포가 존재하지 않는 경우, 면역 관용을 유도하는 능력이 저하되는 것을 밝혔다. 이는 CD8 양성 세포를 제거해도 면역 억제에 거의 영향이 없을 가능성을 보고하는 비특허문헌 4와는 대조적이며 예상 밖이었다.

[0222] 일 태양에서 본 개시는 CD4 양성 아네르기 T세포와 CD8 양성 아네르기 T세포를 포함하는 의약 조성물을 제공한다. 이러한 의약 조성물은 항원 특이적인 면역 관용 또는 면역 억제를 위해 사용될 수 있다. 이 아네르기 T세포는 CD80 및/또는 CD86과 CD28의 상호작용을 저해할 수 있는 저해 인자에 의해 유도될 수 있다. 이러한 저해 인자는 저분자, 단백질, 핵산, 지질, 당 및 이들의 조합으로 이루어지는 군에서 선택된다. 일 국면에서는 상기 단백질은 항체 혹은 그 개변체, 또는 세포 표면 분자 혹은 그 개변체이다. 다른 국면에서는 상기 항체의 개변체는 항원 결합 단편이다. 다른 국면에서는 상기 세포 표면 분자의 개변체는 융합 단백질이다. 다른 국면에서는 상기 저해 인자는 항CD80 항체, 항CD86 항체, CD80 및 CD86에 대한 이중 특이성 항체, 항CD28 항체 혹은 이들의 항원 결합 단편, CTLA4-Ig 융합 단백질, CD28-Ig 융합 단백질로 이루어지는 군에서 선택된다. 다른 국면에서는 상기 CTLA4-Ig 융합 단백질은 아바타셉트 또는 벨라타셉트이다.

[0223] 어느 하나의 실시형태에서 CD80 및/또는 CD86는 항원 제시 세포에 의해 발현되고, CD28은 T세포에 의해 발현된다.

[0224] 어느 하나의 실시형태에서 본 개시의 의약 조성물은 제어성 T세포, 예를 들어 FOXP3 양성 CD4 양성 CD25 양성 T세포를 더 포함할 수 있다. 이러한 제어성 T세포는 특정의 항원에 대한 특이적 면역 반응을 나타내지 않는 「면역 관용」에 직접 관여하는 것이 아니며 필수 성분은 아니지만, 면역 응답을 억제할 수 있기 때문에 바람직한 실시형태에서는 본 개시의 조성물은 제어성 T세포를 더 포함해도 된다.

[0225] 본 개시의 다른 국면에서 본 개시는 CD80 및/또는 CD86과 CD28의 상호작용을 저해할 수 있는 저해 인자에 의해 아네르기가 유도된 세포를 포함하는 의약 조성물로서, 이 조성물은 CD8 양성 세포를 포함하고, 이 조성물은 FOXP3 양성 세포 및 CD4 양성 세포 중 적어도 1종 이상을 더 포함하는 조성물을 제공한다. 이러한 의약 조성물은 항원 특이적인 면역 관용 또는 면역 억제를 위해 사용될 수 있다. 특정의 실시형태에서 본 개시의 조성물은 FOXP3 양성 세포, CD4 양성 세포 및 CD8 양성 세포 전부를 포함해도 된다.

[0226] 본 발명자는 아네르기가 유도된 CD8 양성 세포 및 CD4 양성 세포(CD8 양성 아네르기 세포 및 CD4 양성 아네르기 세포라고도 부름)에는 CD44 양성의 세포를 많이 포함하는 것을 밝혔다. 따라서, 어느 하나의 실시형태에서는 CD8 양성 세포 및/또는 CD4 양성 세포는 CD44 양성일 수 있다. 또한, 아네르기 세포의 생성의 확인에는 CD44 외에 CD45RA/CD45RO도 사용할 수 있다. 예를 들어 일 국면에서 CD8 양성 세포 및/또는 CD4 양성 세포는 CD45RA 음성 또한 CD45RO 양성이다.

[0227] 어느 하나의 실시형태에서는 FOXP3 양성 세포는 CD4 양성 및/또는 CD25 양성일 수 있다. 본 개시의 조성물은 제어성 T세포를 더 포함하는 것이 바람직하고, 제어성 T세포는 FOXP3 양성이며, 나아가 CD4 양성 및/또는 CD25 양성일 수 있다.

[0228] 어느 하나의 실시형태에서 CD80 및/또는 CD86과 CD28의 상호작용을 저해할 수 있는 저해 인자는 저분자, 단백질, 핵산, 지질, 당 및 이들의 조합으로 이루어지는 군에서 선택된다. 일 국면에서는 상기 단백질은 항체 혹은 그 개변체, 또는 세포 표면 분자 혹은 그 개변체이다. 다른 국면에서는 상기 항체의 개변체는 항원 결합 단편이다. 다른 국면에서는 상기 세포 표면 분자의 개변체는 융합 단백질이다. 다른 국면에서는 상기 저해 인자는 항CD80 항체, 항CD86 항체, CD80 및 CD86에 대한 이중 특이성 항체, 항CD28 항체 혹은 이들의 항원 결합 단편, CTLA4-Ig 융합 단백질, CD28-Ig 융합 단백질로 이루어지는 군에서 선택된다. 다른 국면에서는 상기 CTLA4-Ig 융합 단백질은 아바타셉트 또는 벨라타셉트이다. 어느 하나의 실시형태에서 CD80 및/또는 CD86은 항원 제시 세포에 의해 발현되고, CD28은 T세포에 의해 발현된다. 특정의 실시형태에서 CD80 및/또는 CD86과 CD28의 상호작용을 저해할 수 있는 저해 인자는 항CD80 항체 및/또는 항CD86 항체 혹은 CTLA4-Ig 융합 단백질일 수 있다. 본 개시에서의 사용이 상정되는 저해 인자로서는 상술되는 바와 같이 CTLA4-Ig 융합 단백질을 들 수 있다. CTLA4-Ig 융합 단백질은 항원 제시 세포 상에서의 CD80/CD86에의 결합에 대해 T세포 상의 공자극 수용체인 CD28과 경합하여 그 결과 T세포의 활성화를 저해하도록 기능한다. 본 개시에서는 상기 CTLA4-Ig 융합 단백질로서 아바타셉트(Orencia(등록상표)), 벨라타셉트 또는 Maxy-4가 예상된다. 벨라타셉트는 CD80 및 CD86에 대한 결합 아비디티를 현저하게 증대시키는 2개의 아미노산 치환(L104E 및 A29Y)을 함유한다(Davies JK 등 Cell Transplant. (2012); 21(9): 2047~61, Adams AB 등 J Immunol. (2016) 197(6): 2045~50을 참조할 것). 또한, CTLA4-Ig 융합 단백질과 동일한 효과가 기대되는 저해 인자로서 CD28-Ig 융합 단백질(Peach RJ 등 J Exp Med. (1994) 180(6): 2049~2058)도 들 수 있다. 본 개시의 저해 인자는 핵산의 형태로도 사용될 수 있다. 일례를 들면 CTLA4-Ig 융합 단백질을 코드하는 핵산을 아데노바이러스 벡터 등을 통해 세포에 도입하여 발현시키는 것도 예상된다. 예를 들어 Jin YZ 등 Transplant Proc. (2003); 35(8): 3156~9를 참조할 것.

[0229] 어느 하나의 실시형태에서 아네르기 세포는 항체 등의 저해 인자와, 피험체 유래의 세포와, 이 피험체 유래의 항원 혹은 이 피험체에서 유래하지 않는 항원 또는 이 항원의 함유물을 혼합하는 단계에 의해 유도된 세포일 수 있다. 항원의 함유물은 세포일 수 있고, 이 세포의 증식 및 활성화를 방지하기 위해 방사선 조사될 수 있다.

[0230] 특정의 실시형태에서는 본 개시의 조성물을 포함하는, 피험체 유래의 항원 또는 이 피험체에서 유래하지 않는 항원에 의해 발생하는 이 피험체에서의 질환, 장해 또는 상태를 처치 또는 예방하기 위한 의약 조성물이 제공될 수 있다. 피험체 유래의 항원 또는 이 피험체에서 유래하지 않는 항원에 의해 발생하는 이 피험체에서의 질환, 장해 또는 상태로서는 예를 들어 이식 면역 거부 반응, 알레르기, 자기면역 질환, 이식편대숙주병, iPS 세포 또는 ES 세포 및 이들 세포에서 유래하는 세포, 조직 또는 장기의 이식에 의해 일어나는 면역 거부 반응 등의 면역 관용을 필요로 하는 질환, 장해 또는 상태를 들 수 있지만 이들에 한정되지 않는다.

[0231] 어느 하나의 실시형태에서 이식 면역 거부 반응은 신장, 간장, 심장, 피부, 폐, 췌장, 식도, 위, 소장, 대장, 신경, 혈액, 면역계 세포를 포함하는 혈구 세포, 뼈, 연골, 혈관, 각막, 안구 또는 골수가 이식됨으로써 발생하는 것을 특징으로 한다.

[0232] 본 개시가 대상으로 하는 질환 등이 이식 면역 거부 반응인 실시형태에 있어서, 아네르기 세포는 항체 등의 저해 인자와 수혜자 유래의 세포(PBMC 또는 비장 세포)와 공여자 유래의 항원 또는 공여자 유래의 항원의 함유물을 혼합함으로써 유도될 수 있다. 공여자 유래의 항원의 함유물은 PBMC, 비장 세포 또는 이식되는 장기 유래의 세포 등일 수 있다.

[0233] 본 개시가 대상으로 하는 질환 등이 알레르기인 실시형태에 있어서, 아네르기 세포는 항체 등의 저해 인자와 피험체 유래의 세포(PBMC 또는 비장 세포)와 알레르기를 일으키는 피험체에서 유래하지 않는 항원을 혼합함으로써 유도될 수 있다.

[0234] 본 개시가 대상으로 하는 질환 등이 자기면역 질환인 실시형태에 있어서, 아네르기 세포는 항체 등의 저해 인자와 피험체 유래의 세포(PBMC 또는 비장 세포)와 자기면역 질환의 원인이 되는 피험체 유래의 항원을 혼합함으로써 유도될 수 있다.

[0235] 본 개시가 대상으로 하는 질환 등이 이식편대숙주병인 실시형태에 있어서, 아네르기 세포는 항체 등의 저해 인자와 이식편을 제공하는 공여자의 PBMC 또는 비장 세포와 수혜자 유래의 항원 또는 이 항원의 함유물을 혼합함으로써 유도될 수 있다. 수혜자 유래의 항원의 함유물은 PBMC, 비장 세포 또는 장기가 이식되는 부위의 주변 세포 혹은 이에서 유래하는 세포 등일 수 있다.

[0236] 본 개시가 대상으로 하는 질환 등이 iPS 세포 또는 ES 세포 및 이들 세포에서 유래하는 세포, 조직 또는 장기의 이식에 의해 일어나는 면역 거부 반응인 실시형태에 있어서, 아네르기 세포는 항체 등의 저해 인자와 피험체 유래의 세포(PBMC 또는 비장 세포)와 iPS 세포 또는 ES 세포로부터 분화시킨 이식에 이용하는 세포를 혼합함으로써 유도될 수 있다.

[0237] 이하에 본 개시에 의한 질환 등의 치료예를 나타내지만 이하에 한정되는 것은 아니다.

[0238] (알레르기 및 자기면역 질환)

[0239] 알레르기 및 자기면역 질환에 관해서는 환자의 말초혈로부터 얻은 대식세포(macrophage)를 관례적인 방법에 의해 항원 제시능이 높은 수상세포(대식세포 유래 수상세포)로 분화시켜 방사선(γ선) 조사 후의 이 세포에 알레르기나 자기면역 질환에서의 과잉 반응의 원인이 되는 항원을 제시시키고, 동일한 환자 말초혈로부터 얻은 T세포군과 항CD80 항체 및/또는 항CD86 항체 혹은 CTLA4-Ig 융합 단백질 등의 적절한 저해 인자의 존재하에서 1~2주간 공배양하여 알레르기나 자기면역 질환의 원인이 되는 항원에 특이적인 아네르기 세포를 얻는다. 이 아네르기 세포를 환자에 투여함으로써 알레르기나 자기면역 질환의 원인이 되는 항원에 특이적인 면역 관용을 유도하여 알레르기 및 자기면역 질환의 예방 및 치료에 이용한다. 예방적 요법인지 치료인지 나아가 증상의 강약 등의 여러 가지 조건에 의해 투여 횟수는 복수회가 되기도 한다.

[0240] (이식편대숙주병)

[0241] 이식편대숙주병에서는 이식 면역 거부 반응에 대한 치료와는 대조적으로 이식편을 제공하는 공여자의 PBMC 또는 T세포 등의 이식편대숙주병의 원인이 될 수 있는 세포를 방사선(γ선) 조사한 숙주 유래의 PBMC 또는 그 이외의 세포와 항CD80 항체 및/또는 항CD86 항체 혹은 CTLA4-Ig 융합 단백질 등의 적절한 저해 인자의 존재하에서 1~2주간 공배양하여 숙주에 특이적인 아네르기 세포를 얻는다. 이 아네르기 세포를 숙주에 투여함으로써 이식편대숙주병의 원인이 되는 이식편에 의한 숙주에의 반응을 억제하여(면역 관용을 유도하여) 이식편대숙주병을 예방 및 치료한다. 예방적 요법인지 치료인지 나아가 이식하는 조직이나 그 크기, 증상의 강약 등의 여러 가지 조건에 의해 투여 횟수는 복수회가 되기도 한다.

[0242] (iPS 세포 또는 ES 세포 및 이들 세포에서 유래하는 세포, 조직 또는 장기의 이식에 의해 일어나는 면역 거부 반응)

[0243] iPS 세포 또는 ES 세포를 이용한 치료에의 응용에서는 iPS 세포 또는 ES 세포로부터 분화시킨 이식에 이용하는 세포 또는 수상세포에 방사선(γ선)을 조사하고, 이 세포와 이식을 받는 환자의 PBMC 또는 T세포군을 항CD80 항체 및/또는 항CD86 항체 혹은 CTLA4-Ig 융합 단백질 등의 적절한 저해 인자의 존재하에서 1~2주간 공배양하여 iPS 세포 또는 ES 세포로부터 분화시킨 세포에 특이적인 아네르기 세포를 얻는다. 이 아네르기 세포를 숙주에 투여함으로써 iPS 세포 또는 ES 세포에서 유래하는 이식한 세포, 조직 및 장기에 특이적인 면역 관용을 유도하

여 이들에의 거부 반응을 예방 및 치료한다. 예방적 요법인지 치료인지 나아가 이식하는 조직이나 그 크기, 증상의 강약의 여러 가지 조건에 의해 투여 횟수는 복수회가 되기도 한다.

[0244] (의약의 제조 방법)

[0245] 본 개시의 다른 국면에서 본 개시는 세포를 포함하는 의약을 제조하는 방법으로서, 이 방법은 (A) CD80 및/또는 CD86과 CD28의 상호작용을 저해할 수 있는 항체 등의 저해 인자와, 피험체 유래의 세포와, 이 피험체 유래의 항원 혹은 이 피험체에서 유래하지 않는 항원 또는 이 항원의 함유물을 혼합하는 공정과, (B) 이 혼합에 의해 얻어지는 세포 생성물이 CD8 양성 세포를 포함하는 것을 확인하는 공정과, (C) 이 세포 생성물이 FOXP3 양성 및 CD4 양성 중 적어도 1종의 세포를 포함하는 것을 확인하는 공정을 포함하는 방법을 제공한다. 본 발명자들은 충분한 면역 억제능을 발휘하기 위해서는 아네르기가 유도된 T세포의 혼합물 중에 CD8 양성 세포가 포함되어 있는 것이 중요함을 발견하였다. 따라서, 아네르기가 유도된 T세포를 포함하는 의약의 제조에 있어서 CD8 양성 세포가 포함되어 있는 것을 담보하는 것이 중요하다. 이와 같이 제조된 의약은 피험체 유래의 항원 또는 피험체에서 유래하지 않는 항원에 의해 발생하는 피험체에서의 질환, 장해 또는 상태를 처치 또는 예방하기 위해 사용될 수 있다. CD8 양성 세포를 생성하는 것과 같은 저해 인자이면 어떠한 저해 인자를 이용해도 된다.

[0246] 어느 하나의 실시형태에서 세포 생성물에서의 CD8 양성 세포의 존재, 및 FOXP3 양성 세포 및 CD4 양성 세포 중 적어도 1종의 세포의 존재가 세포 생성물이 의약으로서 사용될 수 있음을 나타낸다.

[0247] 상기 공정(B)에서 CD8 양성 세포를 포함하는 것을 확인하기 위해 항CD8 항체를 사용하여 CD8이 검출될 수 있다. 상기 공정(C)에서 FOXP3 양성 및 CD4 양성 중 적어도 1종의 세포를 포함하는 것을 확인하기 위해 항FOXP3 항체 및 항CD4 항체 중 적어도 1종의 항체를 사용하여 FOXP3 및 CD4 중 적어도 1종이 검출될 수 있다. 검출하기 위한 구체적인 수법으로서는 플로우 사이토메트리(FACS), 웨스턴 블롯, RNA의 검출 등을 들 수 있지만 이들에 한정되지 않는다. 바람직하게는 검출하기 위한 구체적인 수법은 FACS이다. RNA의 검출은 PCR 등의 해당 분야에서 공지의 방법에 의해 행해진다. FOXP3은 세포 내에서 발현되는 것이지만 세포를 고정 후에 투과 처리하여 세포 내를 염색하는 것이 가능하고, 마찬가지로 FACS 등의 수법에 의해 검출하는 것이 가능하다. 이 방법에서 사용하기 위해 적절한 시판의 제품으로서는 eBioscience™ Human Regulatory T Cell Staining Kit #3(cat#88-8995-40), eBioscience™ Mouse Regulatory T Cell Staining Kit #1(cat#88-8111-40), eBioscience™ Human/Non-Human Primate Regulatory T Cell Staining Kit #1(cat#88-4999-40) 및 eBioscience™ Human Regulatory T Cell Whole Blood Staining Kit(cat#88-8996-40) 등을 들 수 있다.

[0248] (품질 관리 방법)

[0249] 다른 국면에서 본 개시는 세포 제제(세포 함유 의약)의 품질 관리 방법을 제공한다. 보다 상세하게는 본 개시는 피험체 유래의 세포에서 발현하는 항원 또는 이 피험체에서 유래하지 않는 항원에 의해 발생하는 이 피험체에서의 질환, 장해 또는 상태를 처치 또는 예방하기 위한 세포를 포함하는 의약의 품질을 관리하는 방법으로서, 이 방법은 (A) 이 세포가 CD8 양성 세포를 포함하는 것을 확인하는 공정 및 (B) 이 세포가 FOXP3 양성 세포 및 CD4 양성 세포 중 적어도 1종의 세포를 포함하는 것을 확인하는 공정을 포함하는 방법을 제공한다. 피험체 유래의 세포에서 발현하는 항원 또는 이 피험체에서 유래하지 않는 항원에 의해 발생하는 이 피험체에서의 질환, 장해 또는 상태를 처치 또는 예방하기 위한 세포를 포함하는 의약에 있어서, 일정한 품질(충분한 면역 관용)을 유지하기 위해 이러한 세포를 포함하는 의약 중에 CD8 양성 세포가 포함되어 있는지 어떤지를 관리하는 것이 중요한 점 중 하나이다.

[0250] 상기 공정(A)에서 CD8 양성 세포를 포함하는 것을 확인하기 위해 항CD8 항체를 사용하여 CD8이 검출될 수 있다. 상기 공정(B)에서 FOXP3 양성 및 CD4 양성 중 적어도 1종의 세포를 포함하는 것을 확인하기 위해 항FOXP3 항체 및 항CD4 항체 중 적어도 1종의 항체를 사용하여 FOXP3 및 CD4 중 적어도 1종이 검출될 수 있다. 검출하기 위한 구체적인 수단으로서는 FACS, 웨스턴 블롯 및 PCR 등을 들 수 있지만 이들에 한정되지 않는다. FOXP3는 세포 내에서 발현되는 것이지만 세포를 고정 후에 투과 처리하여 세포 내를 염색하는 것이 가능하고, 마찬가지로 FACS 등의 수법에 의해 검출하는 것이 가능하다.

[0251] 이하에 전형적인 본 개시의 세포 제제의 제조 및 품질 관리의 방법의 일례를 나타낸다.

[0252] (아네르기 T세포를 포함하는 세포 제제의 제조 및 품질 관리)

[0253] 1. 생물 유래 원료 및 그 대응 상황

[0254] 일 실시형태에서는 아네르기 T세포의 제조 공정에서 표 1에 기재된 생물 유래 원료 기준에 적합한 생물 유래 원

료를 사용한다.

[0255] 아네르기 T세포의 투여는 수혜자에 대해 공여자로부터의 장기 이식(예를 들어 간장 이식)이 실시된 후에 행해진다. 공여자 장기(예를 들어 간장) 중에는 자기유래 아네르기 T세포의 재료인 공여자 유래 단핵구도 바이러스 제거되지 않은 상태로 포함되어 있고, 공여자 유래 단핵구를 포함한 채로 공여자 장기(예를 들어 간장)는 수혜자에게 이식된다. 그 때문에 자기유래 아네르기 T세포의 재료로서 사용하는 공여자 유래 단핵구는 생물 유래 원료에 해당하지 않는다고 생각한다.

표 1

표 1 생물유래원료 일람표

명칭	함유하는 생물유래원료		생물유래원료 기준 대응상황
	성분명	동물종	
항CD80 항체	세포유래성분	차이니즈 햄스터(이종)	ICH-Q5A와 ICH-Q5D에 따라 품질과 안전성을 검증한 공정에서 제조한 항체를 선택예정
항CD86 항체	세포유래성분	차이니즈 햄스터(이종)	ICH-Q5A와 ICH-Q5D에 따라 품질과 안전성을 검증한 공정에서 제조한 항체를 선택예정
ALyS505N-0	인간혈청알부민	인간(동종)	의약품(혈장분획제제)을 선택
AIM-V	인간혈청알부민	인간(동종)	생물유래원료 기준에 적합한 재료를 선택 ※상세는 원약 등 등록원부에 기재
인간혈청알부민	인간혈청알부민	인간(동종)	의약품(혈장분획제제)을 선택

[0256]

[0257] 벨라타셉트(예를 들어 Bristol-Myers Squibb, New York, NY로부터 입수 가능)

[0258] 2. 세포 제제의 제법

[0259] 일 실시형태에서는 세포 제제는 이하와 같이 제조할 수 있다. 이하에 예시하는 각종 수치 등은 대표예이며, 당업자는 적절히 변경하여 세포 제제의 제조를 행할 수 있다.

[0260] 1) 투여 19일 전쯤에 의료 기관에서 공여자에게 성분채집술(apheresis)을 실시하여 공여자 성분채집술 산물을 30Gy의 방사선을 조사하여 세포 증식능을 없앤 후에 세포 가공을 실시하는 세포 배양 가공 시설로 발송한다.

[0261] 2) 공여자 성분채집술 산물 수령 후, 세포 배양 가공 시설에서 공여자 단핵구를 밀도 구배 원심법에 의해 분리, 회수 후 2개로 나누어 동결하여 -80±10℃에서 보관한다.

[0262] 3) 투여 14일 전쯤에 의료 기관에서 수혜자에게 성분채집술을 실시하여 수혜자 성분채집술 산물을 세포 가공을 실시하는 세포 배양 가공 시설로 발송한다.

[0263] 4) 수혜자 성분채집술 산물 수령 후, 세포 배양 가공 시설에서 수혜자 단핵구를 밀도 구배 원심법에 의해 분리, 회수하여 해동한 공여자 단핵구 및 항CD80 항체 및 항CD86 항체 또는 CTLA4-Ig 융합 단백질 등의 저해 인자와 공배양한다.

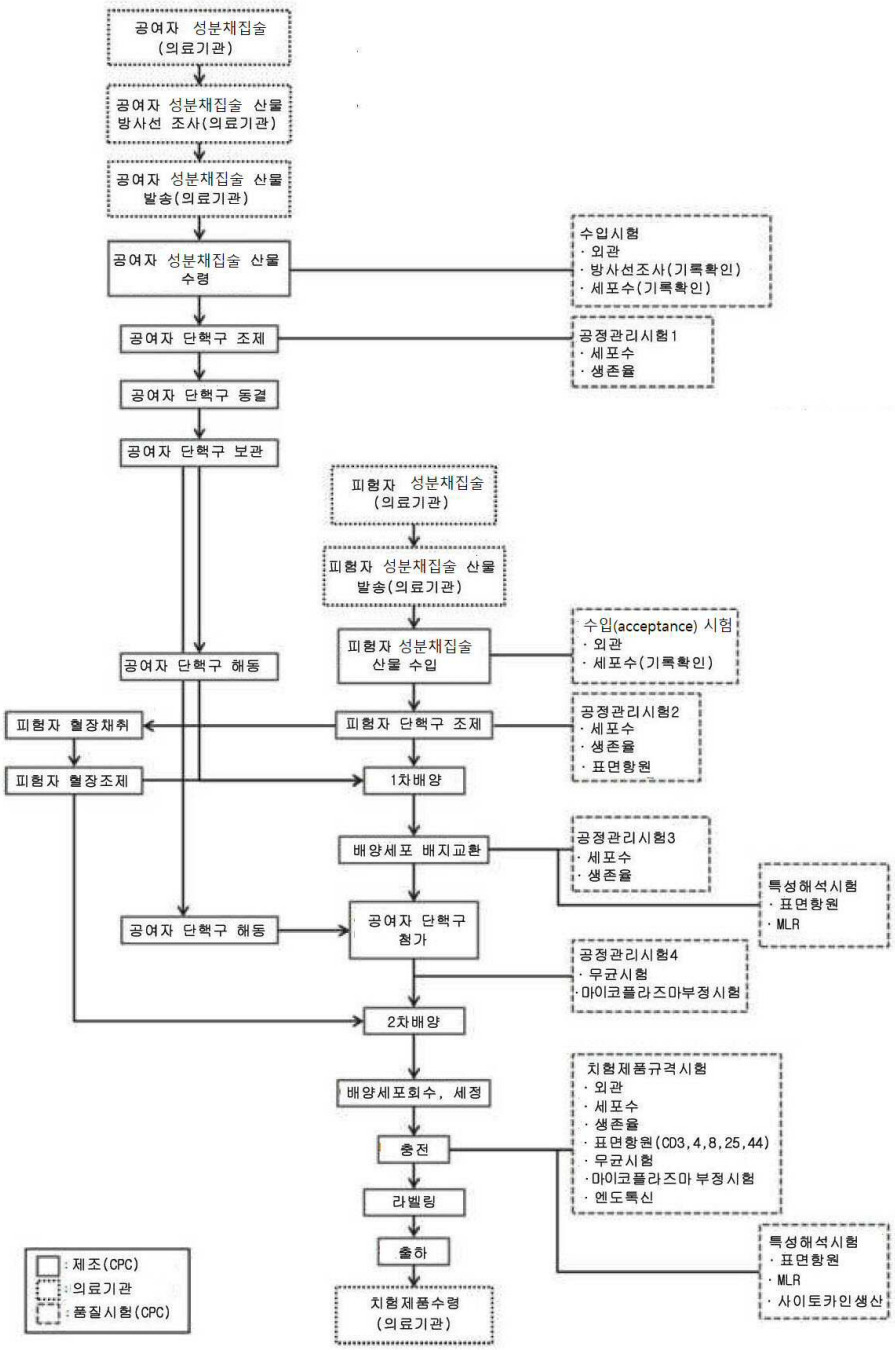
[0264] 5) 투여 7일 전쯤에 배지 교환을 행한다. 7일간 배양한 중간 제품을 회수하여 해동한 공여자 단핵구 및 항CD80 항체 및 항CD86 항체 또는 CTLA4-Ig 융합 단백질 등의 저해 인자와 공배양한다.

[0265] 6) 투여 당일에 세포 가공물을 밀도 구배 원심법에 의해 회수 후에 세정하여 생리식염액에 충전한다.

[0266] 7) 의료 기관에 발송하여 의료 기관에서 수혜자에게 투여한다.

[0267] (제조 및 품질 시험 흐름의 대표예)

화학식 1



[0268]

[0269] 3. 공정 내 관리 시험

[0270] 일 실시형태에서는 제조 공정 내에서 표 2에 기재한 공정 내 관리 시험을 실시할 수 있다. 이하에 예시하는 각종 수치 등이나 순서는 대표예이며, 당업자는 적절히 변경하여 공정 내 관리 시험을 실시할 수 있다.

표 2

표 2 공정내 관리시험 일람표

시험종류	시험항목	타이밍
공정내 관리시험	세포수	공정내 관리시험 1,2,3
	생세포율	공정내 관리시험 1,2,3
	무균시험	공정내 관리시험 1,2,4
	마이코플라즈마 시험	공정내 관리시험 4

[0271]

[0272] 4. 규격 시험, 특성 해석 시험

[0273] 일 실시형태에서는 최종 제품을 이용하여 표 3에 기재한 규격 시험을 행할 수 있다. 표 3에 예시하는 순서는 대표예이며, 당업자는 적절히 변경하여 규격 시험, 특성 해석 시험을 실시할 수 있다. 예를 들어 그 개변예로서는 실시예 8에 예시한 규격을 들 수 있다. 유도성 억제성 T세포 투여시에는 결과가 판명되지 않은 경우 공정 내 관리 시험의 결과를 참고로 치험(clinical trial) 제품의 출하를 판단할 수 있다.

[0274] 또한, 제조 공정 내의 세포, 최종 제품을 이용하여 표 3에 기재한 특성 해석 시험을 행할 수 있다.

표 3

표 3 최종제품규격시험 일람표

항목	시험항목	규격값
외관	외관시험	미황백색~담황색의 세포현탁액
세포표면마커	$CD3^+$세포비율	≥50%
	$CD3^+$세포중의 $CD8^+CD44^+$ 세포비율	≥10%
	$CD3^+$세포중의 $CD4^+CD25^+$세포비율	≥5%
안전성	무균시험	미생물의 발육을 인정하지 않음
	엔도톡신	<0.25EU/mL
	마이코플라즈마부정시험	음성
함량	세포수	$\geq 1 \times 10^9$개
	생세포율	≥70%

[0275]

[0276] 상기 치험 제품 규격 시험, 특성 해석 시험은 본 명세서에 기재되는 바와 같고, 치험 제품 규격 시험은 외관, 세포수, 생세포율, 세포 표면 마커(CD3, CD4, CD8, CD25, CD44, CD45RA/CD45RO), 제조 공정 유래 불순물(공여자 유래 세포, 배지 성분, 항CD80 항체, 항CD86 항체, 세포 동해 보호액 성분, 비중 분리액 성분), 바이러스 부정 시험, 무균 시험, 마이코플라즈마 부정 시험 및 엔도톡신을 포함할 수 있다. 효능 시험으로서 배양 세포를 이용한 림프구 혼합 시험(MLR)에 의한 사이토카인 생산 혹은 트리튬 도입 시험을 포함할 수 있다. 세포 표현형의 기준값에 대해서는 예를 들어 CD3 양성 세포 비율은 대표적으로는 표 중의 50% 이상을 기준값으로 할 수 있고, 혹은 예를 들어 30% 이상, 35% 이상, 40% 이상, 45% 이상, 50% 이상, 55% 이상, 60% 이상, 65% 이상, 70% 이상 혹은 이들 사이의 수치(1%, 0.5%씩 등으로 설정할 수 있음)이어도 된다. CD3 양성 세포 중의 CD8 양성 CD44 양성 세포 비율은 대표적으로는 표 중의 10% 이상을 기준값으로 할 수 있고, 혹은 예를 들어 1% 이상, 2% 이상, 3% 이상, 4% 이상, 5% 이상, 6% 이상, 7% 이상, 8% 이상, 9% 이상, 10% 이상, 11% 이상, 12% 이상, 13% 이상, 14% 이상, 15% 이상 등이어도 된다. CD3 양성 세포 중의 CD4 양성 CD44 양성 세포 비율은 설정하지 않아도 되고, 혹은 예를 들어 1% 이상, 2% 이상, 3% 이상, 4% 이상, 5% 이상, 6% 이상, 7% 이상, 8% 이상, 9% 이상, 10% 이상, 11% 이상, 12% 이상, 13% 이상, 14% 이상, 15% 이상 등을 기준값으로서 설정해도 된다. CD3

양성 세포 중의 CD8 양성 CD45RA 음성 세포 비율은 설정하지 않아도 되고, 혹은 예를 들어 1% 이상, 2% 이상, 3% 이상, 4% 이상, 5% 이상, 6% 이상, 7% 이상, 8% 이상, 9% 이상, 10% 이상, 11% 이상, 12% 이상, 13% 이상, 14% 이상, 15% 이상, 20% 이상, 25% 이상, 30% 이상, 35% 이상, 40% 이상 등을 기준값으로서 설정해도 된다. CD3 양성 세포 중의 CD8 양성 CD45RA 음성 CD45RO 양성 세포 비율은 설정하지 않아도 되고, 혹은 예를 들어 1% 이상, 2% 이상, 3% 이상, 4% 이상, 5% 이상, 6% 이상, 7% 이상, 8% 이상, 9% 이상, 10% 이상, 11% 이상, 12% 이상, 13% 이상, 14% 이상, 15% 이상 등을 기준값으로서 설정해도 된다. CD3 양성 세포 중의 CD4 양성 CD45RA 음성 CD45RO 양성 세포 비율은 설정하지 않아도 되고, 혹은 예를 들어 1% 이상, 2% 이상, 3% 이상, 4% 이상, 5% 이상, 6% 이상, 7% 이상, 8% 이상, 9% 이상, 10% 이상, 11% 이상, 12% 이상, 13% 이상, 14% 이상, 15% 이상 등을 기준값으로서 설정해도 된다. CD3 양성 세포 중의 CD4 양성 CD25 세포 비율은 대표적으로는 표 중의 5% 이상을 기준값으로 할 수 있고, 혹은 예를 들어 1% 이상, 2% 이상, 3% 이상, 4% 이상, 5% 이상, 6% 이상, 7% 이상, 8% 이상, 9% 이상, 10% 이상, 11% 이상, 12% 이상, 13% 이상, 14% 이상, 15% 이상 등이어도 된다. 세포수는 1×10^{9}개 이상을 대표적으로 기준으로서 채용할 수 있지만, 혹은 예를 들어 1×10^{8}개 이상, 5×10^{8}개 이상, 1×10^{9}개 이상, 2×10^{9}개 이상, 3×10^{9}개 이상 등이어도 된다. 생세포율은 70% 이상을 대표적으로 기준으로서 채용할 수 있지만, 혹은 50% 이상, 55% 이상, 60% 이상, 65% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상 등을 기준으로서 채용할 수도 있다.

[0277] (최종 제품의 조성)

[0278] 최종 제품은 일례를 들면 하기 표에 기재된 구성물로 구성된다. 이들 규격도 또한 당업자는 적절히 변경하여 조성을 변경하여 재생 의료 등 제품을 구성할 수 있다.

표 4

표 조성 일람

구성물	조성
자기유래 아네르기세포	1×10^{9}개 이상
생리식염액	100mL
인간혈청알부민	1%

[0279]

[0280] 당업자는 규격 시험, 특성 해석 시험에 대해 본 명세서에 기재되는 기술적 사항을 적절히 참작하여 필요에 따라 변경을 행하여 구체적으로 실시할 수 있다.

[0281] 5. 재생 의료 등 제품의 투여 방법

[0282] 일 실시형태에서 장기 이식 후 14일 후에 1회 투여한다. 당업자는 투여 방법이나 그 기간 등에 대해 본 명세서에 기재되는 기술적 사항을 적절히 참작하여 필요에 따라 변경을 행하여 구체적으로 실시할 수 있다.

[0283] (키트)

[0284] 다른 국면에서 본 개시는 세포 제제를 제조하기 위한 키트를 제공한다. 또 다른 국면에서 본 개시는 세포 제제의 품질 관리를 위한 키트를 제공한다. 상세하게는 본 개시는 세포의 혼합물을 포함하는 의약을 제조하기 위한 키트로서, 이 키트는 (A) CD80 및/또는 CD86과 CD28의 상호작용을 저해할 수 있는 항체 등의 저해 인자와, (B) CD8을 검출하기 위한 수단과, (C) FOXP3 및 CD4 중 적어도 하나를 검출하기 위한 수단을 포함하는 키트를 제공한다.

[0285] 어느 하나의 실시형태에서 세포의 혼합물에서의 CD8 양성 세포의 존재, 및 FOXP3 양성 세포 및 CD4 양성 세포 중 적어도 1종의 세포의 존재가 세포의 혼합물이 의약으로서 사용될 수 있음을 나타낸다.

[0286] 본 개시의 키트로 제조된 세포의 혼합물을 포함하는 의약은 아네르기가 유도된 CD8 양성 T세포와 FOXP3 양성 세포 및 CD4 양성 세포 중 적어도 1종의 세포를 포함하고 있고, 피험체 유래의 항원 또는 피험체에서 유래하지 않는 항원에 의해 발생하는 피험체에서의 질환, 장해 또는 상태를 처치 또는 예방하기 위해 사용될 수 있다.

[0287] 다른 국면에서 피험체 유래의 세포에서 발현하는 항원 또는 이 피험체에서 유래하지 않는 항원에 의해 발생하는

이 피험체에서의 질환, 장해 또는 상태를 치치 또는 예방하기 위한 세포를 포함하는 의약의 품질을 관리하기 위한 키트로서, 이 키트는 (A) CD8을 검출하기 위한 수단과, (B) FOXP3 및 CD4 중 적어도 1종을 검출하기 위한 수단을 포함하는 키트를 제공한다. 어느 하나의 실시형태에서 CD8을 검출하기 위한 수단이 항CD8 항체를 포함하고, FOXP3 및 CD4 중 적어도 1종을 검출하기 위한 수단이 항FOXP3 항체 및 항CD4 항체 중 적어도 1종의 항체를 포함한다. 검출은 예를 들어 FACS, 웨스턴 블롯, PCR 등에 의해 행해질 수 있다.

[0288] (자기유래 제어성 T세포 제조 순서)

[0289] 이하에 자기유래 제어성 T세포의 전형적인 제조 방법을 설명한다.

[0290] 사전 확인

[0291] 일 실시형태에서는 사전 확인은 이하와 같이 행할 수 있다. 이하에 예시하는 각종 수치, 시약, 순서 등은 대표예이며, 당업자는 적절히 변경하여 사전 확인의 제조를 행할 수 있다.

[0292] 공여자 및 환자의 감염증 스크리닝 검사를 실시하여 공여자에 대해서는 HBs 항원, HCV 항체, HIV-1/2, HTLV-1 항체가 전부 음성임을 확인한다.

[0293] 1. 공여자 림프구의 분리(무균하에서 행함) 대표예

[0294] 일 실시형태에서는 공여자 림프구의 분리는 이하와 같이 제조할 수 있다. 이하에 예시하는 각종 수치, 시약이나 순서 등은 대표예이며, 당업자는 적절히 변경하여 공여자 림프구의 분리를 행할 수 있다.

[0295] · 성분채집술로 공여자 림프구를 회수 백에 채취하고 그 회수 백을 방사선 조사한다.

[0296] · 전술한 방사선 조사 완료된 말초혈 단핵구를 적량의 Ficoll-Paque PREMIUM(GE Healthcare #17-5442-02) 또는 Lymphocyte separation Solution(나칼라이 테스크 #20828) 등(예를 들어 20mL)이 들어간 원심관에 넣고 860G로 20분간 22℃에서 원심분리(원심분리기의 액셀을 slow, 브레이크를 slow로 설정함)한다.

[0297] · 상청을 버리고 림프구층을 포함하는 세포 부유액을 다른 원심관(예를 들어 50mL 원심관 2개)으로 옮긴다.

[0298] · 세포 부유액이 들어간 원심관에 생리식염액을 추가하고(예를 들어 전액량이 50mL가 될 때까지 적량), 시린지(예를 들어 18G 주사침을 부착한 50mL 시린지) 또는 피펫으로 흡인 배출을 반복하여 잘 혼화시킨다.

[0299] · 500G로 10분간 22℃에서 원심분리(원심분리기의 액셀을 fast, 브레이크를 fast로 설정해도 됨)한다.

[0300] · 상청을 버리고 다시 생리식염액을 추가하여(예를 들어 전액량이 50mL가 될 때까지 적량) 세포 펠렛을 피펫으로 흡인 배출을 반복하여 잘 혼화시킨다.

[0301] · 500G로 5분간 22℃에서 원심분리(원심분리기의 액셀을 fast, 브레이크를 fast로 설정해도 됨)한다.

[0302] · 상청을 버린다.

[0303] · 미리 공여자로부터 채취한 혈장을 포함하는 ALyS505N-0 배양액(세포 과학 연구소(CSTI) 1020P10))을 세포 펠렛에 더하고(예를 들어 전액량이 31mL가 될 때까지 적량) 피펫으로 흡인 배출을 반복하여 잘 혼화시킨다.

[0304] · 시린지(예를 들어 18G 주사침을 부착한 1mL 시린지) 또는 피펫으로 적량(예를 들어 0.3mL) 발취하여 세포수 및 생세포수를 확인한다.

[0305] 2. 공여자 림프구의 동결 보존(무균하에서 행함)

[0306] 일 실시형태에서는 공여자 림프구의 동결 보존은 이하와 같이 행할 수 있다. 이하에 예시하는 각종 수치, 시약이나 순서 등은 대표예이며, 당업자는 적절히 변경하여 공여자 림프구의 동결 보존을 행할 수 있다.

[0307] · 동결 백(예를 들어 프로즈 백 F-050 25mL 동결 백 (주)니프로 89-101)을 무균하에서 개봉하고 라벨에 필요 사항(날짜, 제조 번호, 공여자명)을 기입한다.

[0308] · 시린지(예를 들어 18G 주사침을 부착한 30mL 시린지)로 세포 부유액을 취하여 동결 백에 넣는다.

[0309] · ACD액((주)테루모 TP-A05ACD, 예를 들어 세포 부유액 15mL에 대해 2mL)을 세포 부유액이 들어간 동결 백에 더하고 4℃로 냉각한 보냉제에 끼워 10분간 정도 냉각시킨다.

[0310] · 시린지(예를 들어 18G 주사침을 부착한 20mL 시린지)를 이용하여 4℃로 냉각한 CP-1(교쿠토 제약 공업(주) 551-27202-4 세포 동해 보호액 CP-1, 예를 들어 8.5mL)을 동결 백에 1분 반 정도의 시간에 걸쳐 더한다. 이때

동결 백을 천천히 교반한다.

[0311] · 시린지를 이용하여 동결 백 및 그 포트 내의 공기를 전부 발취한다.

[0312] · 튜브 실러를 사용하여 동결 백을 밀봉하고, 우선 4℃에서 약 5~10분 냉각하고 그 후 -80℃의 냉동고에서 보관한다.

[0313] 3. 공여자 림프구의 해동(무균하에서 행함)

[0314] 일 실시형태에서는 공여자 림프구의 해동은 이하와 같이 행할 수 있다. 이하에 예시하는 각종 수치, 시약이나 순서 등은 대표예이며, 당업자는 적절히 변경하여 공여자 림프구의 해동을 행할 수 있다.

[0315] · 보존된 공여자 세포의 동결 백을 예를 들어 37℃ 항온조에서 해동한다. 이후의 조작은 바람직하게는 무균하에서 행한다.

[0316] · 시린지(예를 들어 18G 주사침을 부착한 50mL 시린지)를 이용하여 해동된 동결 백으로부터 세포 부유액을 발취하여 원심관(예를 들어 50mL 원심관 2개에 12.5mL씩)으로 옮긴다.

[0317] · 세포 부유액이 들어간 원심관에 예를 들어 5% 알부민액(니혼 제약(주) 123146364 헌혈 알부민 5% 정맥주사 12.5g/250mL)(예를 들어 세포 부유액 12.5mL에 대해 37.5mL)을 추가하고 잘 혼화시킨다. 그 후, 약 5분간 정치(靜置)한다.

[0318] · 예를 들어 600G로 10분간 22℃에서 원심분리(예를 들어 바람직하게는 원심분리기의 액셀을 fast, 브레이크를 slow로 설정함)한다.

[0319] · 상청을 조용히 버리고 세포 펠렛에 세정용의 알부민이 추가된 생리식염액(예를 들어 5% 알부민액 25mL와 생리식염액 19mL로 제작함) 등의 적절한 액을 더하여 현탁한다.

[0320] · 예를 들어 600G로 10분간 22℃에서 원심분리(예를 들어 바람직하게는 원심분리기의 액셀을 fast, 브레이크를 slow로 설정함)한다.

[0321] · 상청을 조용히 버리고 세포 펠렛에 ALyS505N 배양액(예를 들어 50mL 원심관에 대해 10mL)을 더하여 현탁한다.

[0322] · ALyS505N-0 배양액 또는 이와 동등한 액이 들어간 배양 백(예를 들어 (주)니프로 87598 니프로 미디움 ALyS505NB10)에 항인간 CD80 항체(예를 들어 m2D10.4; Cat.No.16-0809-85, eBioscience사)와 항인간 CD86 항체(예를 들어 IT2.2; Cat.No.16-0869-85, eBioscience사)를 각각 예를 들어 최종 농도 10μg/mL로 더하고(또는 CTLA4-Ig 융합 단백질(예를 들어 벨라타셉트) 등의 동등한 저해 인자를 더하고), 이 배양 백에 상기 세포 부유액을 시린지(예를 들어 18G 주사침을 부착한 20mL 시린지)로 주입하여 더한다. 일례에서는 배양 백 중의 총액량은 약 840mL이다.

[0323] 4. 환자 림프구의 분리~1차 배양 개시(무균하에서 행함)

[0324] 일 실시형태에서는 환자 림프구의 분리는 이하와 같이 행할 수 있다. 이하에 예시하는 각종 수치, 시약이나 순서 등은 대표예이며, 당업자는 적절히 변경하여 환자 림프구의 분리를 행할 수 있다.

[0325] · 환자로부터 채취한 혈장은 항온조 중에서 예를 들어 56℃에서 30분간 가온하여 비동화해 둔다. 바로 사용하지 않는 것은 동결 보존한다.

[0326] · 환자로부터 채취한 말초혈을 적량의 적절한 매체, 예를 들어 Ficoll-Paque(예를 들어 20mL)가 들어간 원심관에 넣고, 예를 들어 860G로 20분간 22℃에서 원심분리(예를 들어 바람직하게는 원심분리기의 액셀을 slow, 브레이크를 slow로 설정함)한다.

[0327] · 상청을 버리고 림프구층을 포함하는 세포 부유액을 다른 원심관(예를 들어 50mL 원심관 2개)으로 옮긴다.

[0328] · 세포 부유액이 들어간 원심관에 생리식염액을 추가하고(예를 들어 전액량이 50mL가 될 때까지 적량), 피펫으로 흡인 배출을 반복하여 잘 혼화시킨다.

[0329] · 예를 들어 500G로 10분간 22℃에서 원심분리(원심분리기의 액셀을 fast, 브레이크를 fast로 설정해도 됨)한다.

[0330] · 상청을 버리고 다시 생리식염액을 추가하여(예를 들어 전액량이 50mL가 될 때까지 적량) 세포 펠렛을 피펫으로 흡인 배출을 반복하여 잘 혼화시킨다.

[0331] · 예를 들어 500G로 5분간 22℃에서 원심분리(원심분리기의 액셀을 fast, 브레이크를 fast로 설정해도 됨)한다.

[0332] · 상청을 버리고 세포 펠렛에 예를 들어 ALyS505N-0 배양액(예를 들어 10mL)을 더하여 현탁하여 세포 부유액을 제작한다(예를 들어 합계 20mL가 될 때까지 ALyS505N-0 배양액을 추가한다). 여기서, 0.5mL 정도의 세포 부유액을 발취하여 세포수, 생세포수 및 표면 항원의 발현을 확인한다.

[0333] · 「3. 공여자 림프구의 해동」에서 제작한 ALyS505N-0 배양액 중 공여자 세포 및 항체 등의 저해 인자가 들어간 배양 백에 환자 유래의 비동화 혈장을 추가한다.

[0334] · 이 배양 백에 상기 환자 유래 세포 부유액을 시린지(예를 들어 18G 주사침을 부착한 20mL 시린지)로 주입하여 더하고, 튜브 실러를 사용하여 배양 백을 밀봉한다. 일례에서는 배양 백 중의 총액량은 약 1000mL이다.

[0335] · 37℃ 인큐베이터 내에서 예를 들어 1주간 배양한다.

[0336] 5-1. 배지 교환(예를 들어 1주간째, 바람직하게는 무균하에서 행함)

[0337] 일 실시형태에서는 배지 교환은 이하와 같이 행할 수 있다. 이하에 예시하는 각종 수치, 시약이나 순서 등은 대표예이며, 당업자는 적절히 변경하여 배지 교환을 행할 수 있다.

[0338] · 인큐베이터로부터 배양 백을 취출하고 내용물을 원심관(예를 들어 225mL 원심관 4개)에 나누어 주입한다.

[0339] · 예를 들어 600G로 10분간 22℃에서 원심분리(예를 들어 바람직하게는 원심분리기의 액셀을 fast, 브레이크를 fast로 설정해도 됨)한다.

[0340] · 상청을 조용히 버리고 세포 펠렛에 예를 들어 ALyS505N-0 배양액을 더하여 현탁하여 세포 부유액을 제작한다(예를 들어 합계 20mL가 될 때까지 ALyS505N-0 배양액을 추가한다). 여기서, 0.3mL 정도의 세포 부유액을 발취하여 세포수 및 생세포수를 확인한다.

[0341] · 예를 들어 ALyS505N-0 배양액이 들어간 배양 백에 세포 부유액을 시린지(예를 들어 18G 주사침을 부착한 20mL 시린지)로 주입하여 더한다.

[0342] · 항인간 CD80 항체(예를 들어 2D10.4) 희석액과 항인간 CD86 항체(예를 들어 IT2.2) 희석액을 각각 예를 들어 최종 농도 10μg/mL이 되도록(또는 CTLA4-Ig 융합 단백질(예를 들어 벨라타셉트) 등의 저해 인자를 이용해도 됨) 배양 백에 시린지(예를 들어 18G 주사침을 부착한 20mL 시린지)로 주입하여 더한다.

[0343] 5-2. 공여자 림프구의 해동·항원 재자극~2차 배양 개시(예를 들어 1주간째, 무균하에서 행함)

[0344] 일 실시형태에서는 공여자 림프구의 해동·항원 재자극~2차 배양 개시는 이하와 같이 행할 수 있다. 이하에 예시하는 각종 수치, 시약이나 순서 등은 대표예이며, 당업자는 적절히 변경하여 공여자 림프구의 해동·항원 재자극~2차 배양 개시를 행할 수 있다.

[0345] · 보존된 공여자 세포의 동결 백과 환자 유래의 비동화 혈장을 예를 들어 37℃ 항온조에서 해동한다. 이후의 조작은 바람직하게는 무균하에서 행한다.

[0346] · 시린지(예를 들어 18G 주사침을 부착한 50mL 시린지)를 이용하여 해동된 동결 백으로부터 공여자 세포 부유액을 발취하여 원심관(예를 들어 50mL 원심관 2개)으로 옮긴다.

[0347] · 공여자 세포 부유액이 들어간 원심관에 5% 알부민액(예를 들어 50mL 원심관 2개에 대해 합계로 약 50mL)을 추가하여 잘 혼화시킨다. 그 후, 약 5분간 정치한다.

[0348] · 예를 들어 600G로 10분간 22℃에서 원심분리(원심분리기의 액셀을 fast, 브레이크를 slow로 설정함)한다.

[0349] · 상청을 조용히 버리고 세포 펠렛에 세정용의 알부민이 추가된 생리식염액(예를 들어 5% 알부민액 25mL와 생리식염액 19mL로 제작함)을 더하여 현탁한다.

[0350] · 예를 들어 600G로 10분간 22℃에서 원심분리(원심분리기의 액셀을 fast, 브레이크를 slow로 설정함)한다.

[0351] · 상청을 조용히 버리고 세포 펠렛에 예를 들어 ALyS505N-0 배양액(예를 들어 50mL 원심관에 대해 10mL)을 더하여 현탁한다.

[0352] · 「3. 공여자 림프구의 해동」에서 제작한 ALyS505N 배양액 중 환자 세포 및 항체 등의 저해 인자가 들어간 배양 백에 해동한 환자 유래의 비동화 혈장(예를 들어 10mL)을 시린지(예를 들어 18G 주사침을 부착한 20mL 시린지)로 주입하여 더하고, 추가로 이 배양 백에 상기 세포 부유액을 시린지(예를 들어 18G 주사침을 부착한 20mL

시린지)로 주입하여 더한다. 일례에서는 배양 백 중의 총액량은 약 1000mL이다.

[0353] · 튜브 실러를 사용하여 배양 백을 밀봉한다.

[0354] · 37℃ 인큐베이터 내에서 예를 들어 1주간 배양한다.

[0355] 6. 2차 배양 중의 검사(배양 세포 발취 시험)

[0356] 일 실시형태에서는 2차 배양 중의 검사는 이하와 같이 행할 수 있다. 이하에 예시하는 각종 수치, 시약이나 순서 등은 대표예이며, 당업자는 적절히 변경하여 2차 배양 중의 검사를 행할 수 있다.

[0357] · 대표적으로 2차 배양 개시로부터 3일째(배양 통산 10일째)에 소량의 배양액을 배양 백으로부터 발취하여 마이코플라즈마 오염 등에 대해 검사한다.

[0358] 7. 배양 림프구의 회수 · 충전(무균하에서 행함)

[0359] 일 실시형태에서는 배양 림프구의 회수 · 충전은 이하와 같이 행할 수 있다. 이하에 예시하는 각종 수치, 시약이나 순서 등은 대표예이며, 당업자는 적절히 변경하여 배양 림프구의 회수 · 충전을 행할 수 있다.

[0360] · 예를 들어 2차 배양 개시로부터 7일째(배양 통산 14일째)에 인큐베이터로부터 배양 백을 취출하고 내용물을 원심관(예를 들어 225mL 원심관 4개)에 나누어 주입한다.

[0361] · 예를 들어 600G로 10분간 22℃에서 원심분리(원심분리기의 액셀을 fast, 브레이크를 fast로 설정해도 됨)한다.

[0362] · 상청을 조용히 버리고 세포 펠렛에 생리식염액을 더하여 현탁한다.

[0363] · 예를 들어 600G로 10분간 22℃에서 원심분리(예를 들어 바람직하게는 원심분리기의 액셀을 fast, 브레이크를 fast로 설정해도 됨)한다.

[0364] · 상청을 조용히 버리고 세포 펠렛에 생리식염액(예를 들어 10mL)을 더하여 현탁하여 세포 부유액을 제작한다.

[0365] · 세포 부유액을 적량의 Ficoll-Paque(예를 들어 20mL)가 들어간 원심관(예를 들어 50mL 원심관)에 조용히 넣어 중층(重層)시킨다.

[0366] · 예를 들어 860G로 20분간 22℃에서 원심분리(원심분리기의 액셀을 slow, 브레이크를 slow로 설정함)한다.

[0367] · 상청을 버리고 림프구층을 포함하는 세포 부유액을 다른 원심관(예를 들어 50mL 원심관)으로 옮긴다.

[0368] · 세포 부유액이 들어간 원심관에 생리식염액을 추가하고(예를 들어 전액량이 50mL가 될 때까지 적량), 시린지(예를 들어 18G 주사침을 부착한 50mL 시린지)로 흡인 배출을 반복하여 잘 혼화시킨다.

[0369] · 예를 들어 500G로 10분간 22℃에서 원심분리(원심분리기의 액셀을 fast, 브레이크를 fast로 설정해도 됨)한다.

[0370] · 상청을 5mL 정도 남기고 나머지는 버리고 피펫으로 흡인 배출을 반복하여 잘 혼화시킨다.

[0371] · 생리식염액을 추가하고(예를 들어 전액량이 50mL가 될 때까지 적량), 시린지(예를 들어 18G 주사침을 부착한 50mL 시린지)로 흡인 배출을 반복하여 잘 혼화시킨다(a).

[0372] · 예를 들어 500G로 5분간 22℃에서 원심분리(원심분리기의 액셀을 fast, 브레이크를 fast로 설정해도 됨)한다(b).

[0373] · 상청을 5mL 정도 남기고 나머지는 버리고 피펫으로 흡인 배출을 반복하여 잘 혼화시킨다(c).

[0374] · 상기 (a), (b) 및 (c)를 추가로 2회 반복한다.

[0375] · 마지막 원심분리 후의 상청을 적량(예를 들어 4mL)을 발취하여 무균 검사 및 마이코플라즈마 검사에 제공한다.

[0376] · 다시 생리식염액을 더하여 현탁하여 세포 부유액을 최종적인 용기(예를 들어 100mL 생리식염액의 병)로 옮긴다. 적량(예를 들어 4mL)을 발취하여 최종적인 생성물의 세포수, 생세포수, 표면 항원의 발현 및 엔도톡신의 함유량을 확인한다.

[0377] 8. 2차 포장

[0378] 일 실시형태에서는 2차 포장은 이하와 같이 행할 수 있다. 이하에 예시하는 각종 수치, 시약이나 순서 등은 대표예이며, 당업자는 적절히 변경하여 2차 포장을 행할 수 있다.

[0379] · 대표적으로는 적절한 기준(대표적으로는 NUHCPC-M-12-ATREG)에 기초하여 라벨에 피험자 ID, 제조 번호, 사용기한을 입력하여 인쇄하고 용기에 라벨을 첩부한다.

[0380] · 적절한 기준(대표적으로는 NUHCPC-PMF-ATREG14)에 기초하여 「용법 · 용량 · 효능 또는 효과 및 사용상 주의 또는 취급상 주의」를 발행한다.

[0381] · 지퍼가 달린 비닐봉투에 시험물 및 「용법 · 용량 · 효능 또는 효과 및 사용상 주의 또는 취급상 주의」를 수납한다.

[0382] · 출하할 때까지 이송 용기에 넣어 모니터링 유닛 내에 보관한다.

[0383] (주기)

[0384] 본 명세서에서 「또는」은 문장 중에 열거되어 있는 사항의 「적어도 하나 이상」을 채용할 수 있을 때에 사용된다. 「혹은」도 마찬가지이다. 본 명세서에서 「2개의 값의 범위 내」라고 명기한 경우 그 범위에는 2개의 값 자체도 포함한다.

[0385] 본 명세서에서 인용된 과학 문헌, 특허, 특허출원 등의 참고 문헌은 그 전체가 각각 구체적으로 기재된 것과 동일한 정도로 본 명세서에서 참고로서 원용된다.

[0386] 이상 본 개시를 이해의 용이를 위해 바람직한 실시형태를 나타내어 설명하였다. 이하에 실시예에 기초하여 본 개시를 설명하지만 상술한 설명 및 이하의 실시예는 예시의 목적으로만 제공되며 본 개시를 한정하는 목적으로 제공한 것은 아니다. 따라서, 본 개시의 범위는 본 명세서에 구체적으로 기재된 실시형태에도 실시예에도 한정되지 않고 청구범위에 의해서만 한정된다.

[0387] 실시예

[0388] 이하, 실시예에 기초하여 본 개시를 보다 구체적으로 설명한다. 단, 본 개시는 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다. 또, 본 명세서 전체를 통해 인용되는 모든 문헌은 참조에 의해 그대로 본원에 도입된다.

[0389] (실시예 1: 기능 상실 어세이)

[0390] 본 실시예에서는 면역 관용을 야기하기 위해 필요한 성분의 특정을 행하기 위해 기능 상실 어세이를 행하였다. 이하에 설명한다.

[0391] (재료 및 방법)

[0392] (아네르기 세포의 생성)

[0393] 이미 문헌에 기재된 방법에 따라 실험을 행하였다(1-3). 요약하면 C57BL6(이하 B6) 마우스 및 BALB/c 마우스(니혼 클레아, 니혼 찰스-리버 등)로부터 비장을 적출하여 적혈구를 용혈하여 비장 세포(림프구)를 얻은 후 4×10^6 세포/ml가 되도록 10% 비동화 소 태아 혈청(FCS)(SIGMA # 172012-500ML Lot 11 D257 또는 biosera #FB-1380/500 Lot.015BS482)을 포함하는 RPMI1640 배지(Sigma; R8758-500MK)에서 조정하였다. 스티뮬레이터가 되는 BALB/c 비장 세포에 방사선(γ선) 30Gy를 조사한 후 B6 비장 세포와 1:1로 혼합하여 eBioscience사 제품 햄스터 항마우스 CD80 항체(16-10A1)(Cat.No.16-0801-82)와 래트 항마우스 CD86 항체(GL1)(Cat.No.14-0862-82)를 각 최종 농도가 10μg/mL이 되도록 첨가하고, 12웰 플레이트(Corning, #3513)(1~2.5mL), 6웰 플레이트(Corning, Cat.No.3516)(3~6mL), 6cm 샬레(Greiner CELLSTAR(등록상표) dish, Cat.No.628160)(3~6mL) 또는 10cm 샬레(Corning, Cat.No.430167)(10~15mL)에서 37℃, 5% CO_2 인큐베이터 중에서 14일간 배양하였다. 배양 개시로부터 7일째에 원심에 의해 배양액을 제거한 후에 새로 BALB/c 유래의 방사선 조사 비장 세포와 항CD80 항체/항CD86 항체를 포함하는 배양액을 배양 개시시와 같은 조건으로 첨가하였다. 14일 후에 세포를 회수하여 아네르기 세포를 얻었다.

[0394] 일부의 실험에서는 PE 형광 표지 항마우스 CD8 항체(53-6.7; eBioscience, #12-0081-85)를 아네르기 세포에 반응시킨 후 항PE 자기 비즈(밀테니 바이오테크 #1300-10-639)를 이용한 auto-MACS(밀테니 바이오테크)에 의해 세포를 CD8 양성과 CD8 음성으로 선별하였다. 또한, PE 형광 표지 CD19 항체(1D3; eBioscience, #12-0193-85)를 이용하여 동일한 조작을 행하여 세포를 CD19 양성과 CD19 음성으로 선별하였다. 이들 세포를 면역 반응 억제능

시험에 사용하였다. 나아가 일부의 실험에서는 FOXP3 발현 제어성 T세포(reg T세포)를 세포 표면 항원의 발현으로 식별할 수 있도록, 리스폰더 세포가 FoxP3과 인간 CD2를 동시에 발현하도록 유전자 개변을 행한 B6 유래 마우스(4)를 사용하여 PE 형광 표지 항인간 CD2 항체(RPA-2.10; eBioscience, #12-0029-42)와 항PE 자기 비즈를 이용한 auto-MACS에 의해 인간 CD2 양성 세포(FoxP3 발현 reg T세포)와 인간 CD2 음성 세포로 선별하여 면역 반응 억제능 시험에 사용하였다.

[0395] (면역 반응 억제능 평가)

[0396] 이미 문헌에 기재된 방법에 따라 실험을 행하였다(3). 요약하면 아네르기 세포를 리스폰더 B6 비장 세포와의 비율이 1/2로부터 1/16이 되도록 조정한 후에 96웰 플레이트(Corning사 제품, Cat.No.3799) 상에서의 새로 채취한 B6 마우스 및 BALB/c 마우스의 비장 세포를 이용한 1×10^6 세포/mL에서의 1:1 혼합 배양물(최종적으로 200μL/웰로 4웰씩)에 첨가하고 37℃, 5% CO_2 인큐베이터 중에서 배양하였다(1웰당 B6 마우스 및 BALB/c 마우스의 비장 세포는 각각 1×10^5 세포, 아네르기 세포는 1×10^5 세포의 1/2~1/16의 세포수). 배양 개시 4일째에 ^{3}H-티미딘(10μL)을 첨가하고, 배양 개시 5일째(^{3}H-티미딘 첨가의 16~20시간 후)에 Cell Harvester(Molecular Devices)에 의해 배양 세포를 회수하여 신틸레이션 카운터에 의해 ^{3}H-티미딘 도입량을 측정하였다. 나이브의 B6 림프구 세포의 무자극에서의 ^{3}H-티미딘 도입량을 1로 하여 그래프를 작성하고 비교 검토하였다.

[0397] (결과)

[0398] 결과를 도 1에 나타낸다. 값은 무자극 상태(나이브)의 ^{3}H-티미딘 도입량의 평균값을 1로 하여 산출한 값을 나타낸다. 도 1a에 도시된 바와 같이 어떤 선별도 행하지 않은 전체 B6 비장 배양 세포는 항CD80/86 항체 존재하에서 스티뮬레이터 BALB/c 비장 세포와 함께 배양한(이후, 「항체-스티뮬레이터 처리」라고 함) 후, 신선한(나이브) B6 비장 세포의 BALB/c 비장 세포에의 반응을 억제하는 효과가 있는 것이 확인되었다. 이 아네르기가 유도된 전체 배양 세포(세포 혼합물)는 아네르기 CD8 양성 세포, 아네르기 CD4 양성 세포, 제어성 T세포(reg T세포)에 더하여 다른 세포(CD19 양성 B세포)도 포함하는 것이 예상된다.

[0399] 이 항체-스티뮬레이터 처리 후의 세포 혼합물로부터 CD8 양성 세포(대부분이 CD44 양성의 아네르기 CD8 양성 세포)를 순화한 시료를 이용하여 실험한 바, 아네르기 CD8 양성 세포만의 세포 집단에서도 억제 효과가 있는 것을 알 수 있고(흑색), 아네르기 CD8 양성 세포를 제외한 나머지 세포 집단에는 억제 효과가 없는(회색) 것이 나타났다(도 1b).

[0400] 나아가 도 1c에 도시된 바와 같이 항체-스티뮬레이터 처리 후의 세포 혼합물로부터 인간 CD2 양성 세포=reg T세포를 순화한 바, reg T세포만의 세포 집단에서도 억제 효과가 있고(흑색), 또한 reg T세포를 제외한 나머지 세포 집단에도 동일한 억제 효과가 있는(회색) 것이 나타났다.

[0401] 한편, 도 1d에 도시된 바와 같이 항체-스티뮬레이터 처리 후의 세포 혼합물로부터 CD19 양성 세포(B세포)를 순화한 경우, B세포만의 세포 집단에서는 억제 효과가 없지만(흑색), B세포를 제외한 나머지 세포 집단에는 억제 효과가 있는(회색) 것이 나타났다.

[0402] 이와 같이 CD8 양성 세포를 결락시키면 면역 반응의 억제=면역 관용의 유도가 현저하게 저하되고 CD8 양성 세포 단독으로도 강한 면역 관용 유도가 나타났기 때문에 CD8 양성 세포는 유효한 면역 관용의 유도에는 필수 세포인 것으로 이해된다. 따라서, 면역 관용 유도 세포 제품을 제조할 때에는 CD8 양성 세포의 유무 확인은 품질 관리상 중요한 것으로 이해된다.

[0403] 순화한 FOXP3 양성 세포 집단에서도 FOXP3 양성 세포를 결락시킨 세포 집단에서도 동일한 억제 작용이 관찰되며, 이는 CD8 양성 세포가 면역 관용을 유도하는 능력을 갖는 것과 모순되지 않는다. 또한, 제어성 T세포로서 널리 알려지는 FOXP3 양성 세포에 면역 억제능을 갖는 것과도 합치한다. 따라서, 항체-스티뮬레이터 처리 후의 전체 아네르기 세포 중에서 면역 관용을 유도하는 데에 유효한 세포는 아네르기 CD8 양성 세포와 함께 FOXP3 양성 세포이며, 이 혼합물이 가장 유효하게 면역 관용을 유도한다고 생각된다.

[0404] CD19에 대해 선별한 실험으로부터 CD19 양성 세포(B세포)에는 억제 효과가 없는 것을 알 수 있고, CD19 양성 세포는 불필요한 것으로 이해된다.

[0405] (실시예 2: CD80/86 블로킹에 의한 억제 기능 획득 어세이)

[0406] 본 실시예에서는 CD8 양성 T세포의 면역 관용 유도 능력(면역 거부 억제 능력)이 항체-스티뮬레이터 처리에 의한 아네르기 유도에 의한 것임을 확인함과 아울러 동일한 실험을 FOXP3 양성 T세포에서도 행하였다.

[0407] (재료 및 방법)

[0408] 실시예 1과 같은 수법으로 야생형 B6 마우스 및 FoxP3과 인간 CD2를 동시에 발현하도록 유전자 개변을 행한 B6 유래 마우스로부터 각각 얻은 비장 세포에 대해 항체-스티뮬레이터 처리를 행하여 아네르기 세포를 얻었다. 이 아네르기 세포와 함께 야생형 B6 마우스 및 FoxP3과 인간 CD2를 동시에 발현하도록 유전자 개변을 행한 B6 유래 마우스로부터 얻은 무자극의 나이브 비장 세포를 각각 PE 형광 표지 항마우스 CD8 항체 또는 PE 형광 표지 항인간 CD2 항체와 반응시켰다. 그 후, 항PE 자기 비즈를 이용한 auto-MACS에 의해 세포를 CD8 양성과 CD8 음성으로 또는 인간 CD2 양성과 인간 CD2 음성으로 선별하였다. 선별한 각 세포를 96웰 플레이트 상의 혼합 배양계에 첨가하고 그 면역 억제능을 조사하였다.

[0409] (결과)

[0410] 결과는 도 2에 나타낸다.

[0411] 도 2a(값은 무자극 상태(나이브)의 ^{3}H-티미딘 도입량의 평균값을 1로 하여 산출한 값을 나타냄)에 도시된 바와 같이 아네르기 CD8 양성 세포에는 억제 효과가 있는 것(흑색) 및 무자극의 나이브 비장 세포로부터 분리한 CD8 양성 세포에는 억제 효과가 없는 것(회색)이 나타났다. 나아가 도 2b에 도시된 바와 같이 항체-스티뮬레이터 처리 후의 reg T세포(흑색)도 면역 억제능을 발휘하고, 그 억제능은 무자극의 나이브 reg T세포(회색)에 비해 강한 것이 나타났다.

[0412] 이로부터 CD8 양성 세포가 면역 관용을 야기하려면(면역 반응의 억제) 항CD80/86 항체 존재하에서의 스티뮬레이터 BALB/c 비장 세포를 이용한 자극에 의한 아네르기 유도가 필요하고, 동일한 것은 reg T세포가 보다 강력한 면역 억제 기능을 발휘할 때에도 적용되는 것을 알 수 있었다. 즉, 항체-스티뮬레이터 처리에 의해 유도되는 아네르기 CD8 양성 세포와 reg T세포에는 강력한 면역 관용 유도능이 있는 것이 나타났다.

[0413] (실시예 3: 순화 아네르기 세포의 이식 후의 관용 유도 능력)

[0414] 본 실시예에서는 아네르기 유도 후의 순화 세포가 이식 후에 관용 유도 능력을 갖는지 어떤지를 확인하였다.

[0415] (재료 및 방법)

[0416] 실시예 1과 같은 수법으로 야생형 B6 마우스 및 FoxP3과 인간 CD2를 동시에 발현하도록 유전자 개변을 행한 B6 유래 마우스의 비장 세포로부터 항CD80/86 항체 존재하에서의 스티뮬레이터 BALB/c 비장 세포와의 공배양으로 아네르기 세포를 얻었다. 나아가 일부의 실험에서는 얻어진 아네르기 세포(전체 아네르기 세포)로부터 실시예 1과 같은 수법으로 CD8 양성 세포, CD4 양성 세포 또는 인간 CD2 양성 세포를 선별하였다. 야생형 B6 마우스에 2Gy의 방사선(γ선)을 조사한 3일 후에 BALB/c 마우스의 심장을 이식하고, 직후(또는 심장 이식과 같은 날 중)에 나이브 B6 비장 세포 또는 얻어진 아네르기 세포를 꼬리정맥으로부터 투여하여 심장의 거부을 관찰하였다. 각 군 5마리 이상으로 실험을 행하였다.

[0417] (결과)

[0418] 도 3에 그 결과를 나타낸다. 도 3a에 도시된 바와 같이 아네르기 세포를 이식하지 않은 경우 이식한 심장은 약 2주간까지 모든 예가 거부된다. 이에 반해 전체 아네르기 세포 투여군에서는 투여한 세포수에 의존하여 심장의 생착률이 개선되며, 6×10^{6}개의 전체 아네르기 세포의 이입에서는 이식한 심장에의 관용이 유도되었다고 판정되는 100일 이후에서도 모든 마우스에서 이식한 심장이 생착되어 있었다. 도 3b에 도시된 바와 같이 이 관용 유도는 수혜자 마우스에 방사선 조사한 후에 아네르기 세포를 이입한 경우에만 관찰되고, 방사선 조사 없이 아네르기 세포를 투여한 경우나 방사선 조사 마우스에 나이브 세포를 이입한 경우에는 전혀 관찰되지 않았다. 아네르기 세포로부터 인간 CD2 양성 세포(FoxP3 발현 reg T세포) 또는 아네르기 CD8 양성 세포를 제거한 세포 집단을 방사선 조사 마우스에 투여한 경우는 전체 아네르기 세포 이입과 같은 100일 후에서의 이식한 심장의 100%의 생착은 보이지 않고 명백하게 관용 유도능이 저하되어 있으며, 전체 아네르기 세포(아네르기 세포 혼합물)의 투여의 우위성이 명백하였다(도 3c). 또한, 순화한 나이브 CD8 양성 T세포의 투여에서는 모든 마우스에서 이식한 심장은 거부된 것에 반해, 아네르기 CD8 양성 T세포를 이입한 경우에는 투여한 마우스 중 40%에서 관용이 유도되었다(도 3d). 나아가 나이브 인간 CD2 양성 세포(FoxP3 발현 reg T세포)를 이입한 경우에서도 관용이 유도되는 마우스는 있지만, 아네르기 인간 CD2 양성 세포(FoxP3 발현 reg T세포)를 투여한 경우가 보다 효과적으로 관용

을 유도하였다(도 3d). 따라서, 아네르기 CD8, CD4, FoXP3 양성 세포 각각의 단독 투여보다 아네르기 세포 혼합물의 투여는 이식된 심장에 대한 거부 반응을 보다 효과적으로 억제하고, 나아가 수혜자에 방사선 조사 등에 의한 골수 억제를 일으킴으로써 보다 효과적으로 관용을 유도하는 것이 나타났다.

[0419] 이 결과는 실시예 1과 모순되는 것은 아니며, 순화된 아네르기 CD8, CD4, FoxP3 양성 세포나 나이브 FoxP3 양성 세포를 단독으로 투여한 경우이어도 그 세포수가 많으면 아네르기 세포 혼합물의 이입과 동등한 이식한 심장에 대한 거부 반응의 억제(관용 유도=100일 이상의 이식한 심장의 생착)를 나타낼 가능성을 부정하는 것은 아니다. 또한, 이 실험에서는 유전자 개변된 마우스를 이용하였기 때문에 세포 표면의 인간 CD2의 발현에 의해 세포를 살린 채로 Foxp3 발현 세포=억제성 T세포를 순화할 수 있었지만, 일반적으로는 세포 내에서의 Foxp3의 발현을 살아 있는 세포에서 검출할 수는 없다. 대용으로서 CD25 양성 CD4 양성 T세포를 이용한 경우, 활성화한 CD4 양성 T세포가 억제성 T세포보다 많이 포함되고 그 면역 억제 기능은 약한 것이 알려져 있다. 또한, Foxp3 양성 억제성 T세포는 적기 때문에 아네르기 Foxp3 발현 억제성 세포의 순화는 매우 어렵다. 실제로 도 3d에 도시된 1×10^6개의 인간 CD2 발현 세포=FoxP3 발현 세포를 얻으려면 1×10^7개 이상의 전체 아네르기 세포를 필요로 하였다. 따라서, 여기에 나타난 결과는 혼합물이 보다 실용적이고 효과적임을 명백하게 나타내고 있다.

[0420] (실시예 4: 인간 PBMC에서 유래하는 아네르기 세포의 능력)

[0421] 다음으로 본 실시예에서는 인간 PBMC에서 유래하는 아네르기 세포의 능력에 대해 평가하였다.

[0422] (재료 및 방법)

[0423] (아네르기 세포의 생성)

[0424] 이미 문헌에 기재된 방법에 따라 실험을 행하였다(5-8). Promo cell사 제품 Lymphocyte separation Media(Cat.No.C-44010) 또는 Ficoll-Paque PREMIUM(GE Healthcare #17-5442-02) 또는 Lymphocyte separation Solution(나칼라이 테스크 #20828) 등을 이용하여 4명의 지원자(2명을 스티뮬레이터, 2명을 리스폰더로 함)의 인간 말초혈로부터 단핵세포(PBMC)를 분리하고, 4×10^6 세포/ml가 되도록 2% 인간 AB형 혈청(pool) 첨가 Biowest사 제품 ALyS505N-0 배지(세포 과학 연구소(CSTI) 1020P10)에서 조정하였다. 스티뮬레이터 PBMC에는 방사선(γ선) 30Gy를 조사하고 리스폰더 PBMC와 1:1로 혼합하였다. 상기에서 혼합한 PBMC에 eBioscience사 제품 마우스 항인간 CD80 항체(2D10.4)(Cat.No.16-0809-85)와 마우스 항인간 CD86 항체(IT2.2)(Cat.No.16-0869-85)를 각각 최종 농도가 10μg/mL이 되도록 첨가하고, 12웰 플레이트(Corning, #3513), 6웰 플레이트(Corning, Cat.No.3516), 6cm 샬레(Greiner CELLSTAR(등록상표) dish, Cat.No.628160) 또는 10cm 샬레(Corning, Cat.No.430167)에서 37℃, 5% CO_2 인큐베이터 중에서 배양을 개시하였다. 배양 개시로부터 7일째에 원심에 의해 배양액을 제거한 후에 방사선 조사 스티뮬레이터 PBMC와 항CD80 항체/항CD86 항체를 포함하는 배양액을 배양 개시시와 같은 조건으로 첨가하였다. 배양 14일째에 세포를 회수하고 원심에 의해 배양액을 워시아웃하여 아네르기 세포를 얻었다. 일부의 실험에서는 PE 형광 표지 마우스 항인간 CD25 항체(BC96; eBioscience #12-0259-42), FITC 형광 표지 마우스 항인간 CD4 항체(RPA-T4; eBioscience #11-0049-42), APC 형광 표지 마우스 항인간 CD8 항체(RPA-T8; eBioscience #17-0088-42)를 이용하여 아네르기 세포를 염색 후, JSAN 셀 소터(베이 바이오사이언스사)를 이용하여 각 세포를 순화하여 혼합 배양계에 첨가하였다.

[0425] (면역 반응 억제능 평가)

[0426] 얻어진 아네르기 세포를 리스폰더 PBMC와의 비율이 1/2로부터 1/16이 되도록 조정한 후에 새로 채취한 동일한 지원자의 PBMC를 이용한 96웰 플레이트(Corning사 제품, Cat.No.3799) 상에서의 각 2×10^5개/200μL/웰로의 4웰씩의 혼합 배양계에 첨가하고 37℃, 5% CO_2 인큐베이터 중에서 배양하였다. 배양 개시 4일째에 ^{3}H-티미딘(10μL)을 첨가하고, 배양 개시 5일째(^{3}H-티미딘 첨가의 16~20시간 후)에 Cell Harvester(Molecular Devices)에 의해 배양 세포를 회수하여 신틸레이션 카운터에 의해 ^{3}H-티미딘 도입량을 측정하였다. 나이브의 리스폰더 PBMC의 무자극에서의 ^{3}H-티미딘 도입량을 1로 하여 그래프를 작성하고 비교 검토하였다.

[0427] (결과)

[0428] 결과를 도 4에 나타낸다.

[0429] 도 4a는 「항체-스티뮬레이터 처리 후의 전체 아네르기 세포」의 용량 의존적인 면역 반응 억제능을 나타낸다.

항체-스티뮬레이터 처리 후의 전체 아네르기 세포의 비율이 높을수록 억제 효과가 높은 것이 명백하다.

[0430] 도 4b는 항체-스티뮬레이터 처리 후의 전체 아네르기 세포를 소팅에 의해 좌측 3번째의 막대로부터 우측으로 차례대로 CD8 양성 CD44 양성 아네르기 세포와 reg T세포를 포함하는 CD25 양성 세포를 순화한 세포 집단(회색), CD4 양성 CD25 양성 reg T세포를 순화한 세포 집단(세로무늬), 나아가 순화한 CD4 양성 CD25 양성 reg T세포에 순화한 CD8 양성 세포를 더한 세포 집단(흑색)을 이용하여 면역 억제능을 비교한 것이다. 여기에 나타나는 결과로부터 reg T세포는 단독으로는 면역 억제능은 없고 CD8 양성 T세포와 공존함으로써 면역 억제능을 발휘하는 것이 명백하다.

[0431] 도 4c는 항체-스티뮬레이터 처리 후의 전체 아네르기 세포를 CD4 양성 세포(회색)와 CD4 음성 세포(사선)로 선별하여 그 전체 아네르기 세포(흑색)와 면역 억제능을 비교한 것이다. 값은 무자극 상태(나이브)의 ^{3}H-티미딘 도입량의 평균값을 1로 하여 산출한 값을 나타낸다. CD4 양성 세포에는 reg T세포가 포함되고, CD4 음성 세포에는 CD8 양성 세포가 포함된다. CD4 양성 세포에서도 CD4 음성 세포에서도 면역 억제가 나타나 있다.

[0432] 도 4b에서 reg T세포 단독으로는 면역 억제능을 발휘할 수 없었던 것과 CD8 양성 세포와의 공존재하에서 reg T세포의 면역 억제능이 발휘되어 있기 때문에 reg T세포의 충분한 면역 억제능의 발휘에는 CD8 양성 세포 혹은 reg T세포 이외의 CD4 양성 세포의 존재가 필요한 것이 시사되었다. CD4 음성 세포의 면역 억제능은 이 중에 포함되는 아네르기 CD8 양성 T세포에서 유래하는 것으로 생각된다.

[0433] (실시예 5: 항원 특이적 억제를 나타내는 실험)

[0434] 본 실험에서는 항체-스티뮬레이터 처리 후의 전체 아네르기 세포의 공여자 특이적 관용 유도를 확인하였다.

[0435] (재료 및 방법)

[0436] 실시예 1과 같은 수법으로 야생형 B6 마우스(H-2^{b})로부터 얻은 비장 세포를 항CD80/86 항체 존재하에서 BALB/c 마우스(H-2^{b}) 유래의 비장 세포로 자극하여 배양하여 아네르기 세포를 얻었다. 이 아네르기 세포를 2Gy의 방사선 조사 3일 후에 BALB/c 마우스 또는 CBA 마우스(H-2^{k})의 심장을 이식한 야생형 B6 마우스에 5×10^{6}개 꼬리정맥으로부터 투여하여 심장의 거부를 관찰하였다.

[0437] (결과)

[0438] 도 5에 도시된 바와 같이 항CD80/86 항체 존재하에서 Balb/c 마우스 비장 세포로 자극된 B6 마우스 유래의 아네르기 세포의 B6 마우스에의 이입은 이식된 BALB/c 마우스의 심장의 거부를 100% 저해하고 100일 후에도 심장이 생착되어 있는, 즉 관용이 유도되어 있다. 이에 반해 3rd party인 CBA 마우스의 심장은 이식 후에 신속하게 거부 반응이 일어나고 약 50일에 100% 거부된다.

[0439] 이상으로부터 항CD80/86 항체 존재하에서 항원에 반응된 호스트 유래의 림프구는 그 항원 특이적인 면역 반응의 억제능을 갖는 것이 나타났다.

[0440] (실시예 6: 아네르기 세포의 선택적인 조기 접착에 의한 나이브 세포의 면역 반응 억제)

[0441] 본 실험에서는 아네르기 세포가 나이브 세포보다 신속하게 공여자(스티뮬레이터) 세포에 결합함으로써 나이브 세포의 반응 및 증식을 저해하고 있음을 확인하였다.

[0442] (재료 및 방법)

[0443] 실시예 1과 같은 수법으로 B6 마우스로부터 얻은 비장 세포를 항CD80/86 항체 존재하에서 BALB/c 마우스 유래의 비장 세포로 자극하여 아네르기 세포를 얻었다. 이 실험에서는 형광 색소 GFP를 항상적으로 발현하도록 유전자 개변한 B6 마우스로부터 새로 얻은 비장 세포를 리스폰더로서 이용하였다. 12웰 플레이트(Corning사 제품, Cat.No.3799) 내에서 상술한 리스폰더 B6 비장 세포 및 스티뮬레이터(공여자) BALB/c 비장 세포를 각각 1×10^{6}개/ml 포함하는 4ml의 혼합 배양계에 상기 아네르기 세포를 리스폰더 B6 비장 세포와의 비율이 1/2이 되도록 첨가하고 37℃, 5% CO_2 인큐베이터 중에서 배양하였다. 1일 후부터 3일 후까지 경시적으로 플레이트를 관찰하여 사진을 찍었다.

[0444] (결과)

[0445] 도 6에 사진의 대표적인 상을 나타낸다. 최하단의 아네르기 세포를 더한 배양계에서만 배양 1일 후부터 세포 덩

어리(클러스터)가 형성되고, 이는 나이브 세포와 공여자 세포만(위로부터 2단째)의 계에서는 관찰되지 않는다. 따라서, 아네르기 세포가 아마도 BALB/c 유래의 세포를 중심으로 하는 세포 덩어리를 형성하고 있는 것으로 추측된다. 배양 2일 후 이후가 되면 나이브 B6 비장 세포도 세포 덩어리를 형성하기 시작하고, 동시에 그 부위에서 형광이 강해진다. 이는 BALB/c 비장 세포에 접착하여 반응한, 형광을 발하는 나이브 세포의 증가에 의한다고 생각되며, 이러한 형광의 증강은 나이브 세포 단독 배양의 상단과 아네르기 세포를 첨가한 배양계에서는 관찰되지 않는다. 따라서, 나이브 세포의 증식 반응은 아네르기 세포의 첨가로 억제되어 있는 것이 시사된다. 이 결과로부터 아네르기 세포는 나이브 세포보다 신속하게 공여자 세포에 접착하여 나이브 세포에 의한 공여자 세포의 인식(접착)을 저해함으로써 나이브 세포의 반응=증식을 저해하고 있는 것이 시사된다.

[0446] (실시예 7: 면역 억제능(아네르기 유도능)을 발휘하는 세포의 속성)

[0447] 본 실험에서는 아네르기 세포 중에서 면역 억제능(아네르기 유도능)을 발휘하는 세포는 CD44 양성인 것의 확인 실험을 행하였다.

[0448] (재료 및 방법)

[0449] 실시예 1과 같은 수법으로 야생형 B6 마우스로부터 얻은 비장 세포를 항CD80/86 항체 존재하에서 BALB/c 세포로 자극하여 아네르기 세포를 얻었다. 이 아네르기 세포를 APC 형광 표지 항마우스 CD8 항체(53-6.7; eBioscience #17-0081-82 또는 BioLegend; #100730), PerCP/Cy5.5 형광 표지 항마우스 CD4 항체(RM4-5; eBioscience #45-0042-82 또는 GK1.5; BioLegend; #100434) 및 APC/Cy7 형광 표지 항마우스 CD44 항체(BioLegend; #1003028)로 염색 후, JSAN 셀 소터(베이 바이오사이언스사)를 이용하여 CD8 양성 CD44 음성 세포 또는 CD4 양성 CD44 음성 세포를 제거한 후 혼합 배양계에 첨가하였다. 나아가 JSAN 셀 소터를 이용하여 CD8 양성 CD44 양성 세포 또는 CD4 양성 CD44 양성 세포를 순화하여 혼합 배양계에 첨가하는 실험도 행하였다.

[0450] (결과)

[0451] 도 7a에 도시된 바와 같이 아네르기 세포로부터 CD8 양성 CD44 음성 세포 또는 CD4 양성 CD44 음성 세포를 제거해도 전체 아네르기 세포의 첨가와 마찬가지로 새로운 혼합 배양계에서의 리스폰더 세포인 나이브 B6 비장 세포의 증식을 억제하는 것이 관찰되었다. 이로부터 CD44 음성 세포에는 면역 억제 작용 즉 아네르기 유도능은 없는 것으로 나타났다. 나아가 도 7b에 도시된 바와 같이 순화한 CD8 양성 CD44 양성 세포 또는 CD4 양성 CD44 양성 세포에는 단독으로도 면역 억제능이 있는 것이 나타나고, 지금까지의 실시예에서 나타난 아네르기 CD8 양성 세포 또는 아네르기 CD4 양성 세포에 의한 면역 억제는 CD44 양성 세포에 의해 발휘되어 있는 것이 확인되었다.

[0452] 또한, 동시에 아네르기 세포의 표현형을 FACS에 의해 조사한 바, 도 7c에 도시된 바와 같이 아네르기 CD8 양성 T세포 중에서 강한 면역 억제 기능을 갖는 아네르기 CD44 양성 세포는 16.61%, 아네르기 CD4 양성 T세포 중의 강한 면역 억제 기능을 갖는 아네르기 CD44 양성 세포는 31.01%이었다.

[0453] (실시예 8: 다양한 저해 인자를 이용한 면역 관용의 야기)

[0454] 본 실시예에서는 다양한 저해 인자를 이용해도 면역 관용을 야기할 수 있음을 나타낸다.

[0455] (아네르기 세포의 생성)

[0456] 기본적으로는 실시예 1에 기재된 방법 및 이미 문헌에 기재된 방법에 따라 실험을 행한다(1~3). 수혜자 PBMC 및 공여자 PBMC에는 각각 인간 말초혈로부터 신선하게 분리한 것을 사용하거나 또는 -80℃로 동결 보존한 것을 급속 해동하여 사용하며, 이들 세포는 함께 자기 혈장 또는 10% 비동화 소 태아 혈청(FCS)(SIGMA # 172012-500ML Lot 11D257 또는 biosera #FB-1380/500 Lot.015BS482)을 포함하는 RPMI1640 배지(Sigma; R8758-500MK)에서 4×10^6 세포/mL로 조정한다. 공여자 PBMC에는 20Gy 방사선을 조사해 둔다. 이들 수혜자 PBMC와 공여자 PBMC를 1:1로 혼합하고, 이 혼합물에 저해 인자(예를 들어 항CD80 항체/항CD86 항체에서는 각각 최종 농도 10μg/ml, 벨라타셉트(또는 아바타셉트)에서는 최종 농도 10μg/ml~40μg/ml)를 첨가한다. 배양은 6cm 샬레(Greiner CELLSTAR(등록상표) dish, Cat.No.628160)(배양 부피 3~6mL) 또는 10cm 샬레(Corning, Cat.No.430167)(배양 부피 10~15mL)에서 37℃, 5% CO_2 인큐베이터 중에서 7일간 행한다(배양 개시시의 세포 밀도는 4×10^6 세포/mL).

[0457] 배양 개시로부터 7일째에 원심에 의해 배양한 수혜자 PBMC를 회수하여 상기 배지에서 4×10^6 세포/mL로 조정한다. 이 배양한 수혜자 PBMC에 새로 조제한 조사 완료된 공여자 PBMC를 세포수비 2:1이 되도록 첨가하고, 추가로 저해 인자(예를 들어 항CD80 항체/항CD86 항체에서는 각각 최종 농도 5μg/ml~10μg/ml, 벨라타셉트(또는 아바

타셉트)에서는 최종 농도 10μg/ml~40μg/ml)도 첨가한다. 배양은 상기와 같은 조건으로 7일간 행한다(세포 밀도: 4×10^6 세포/mL).

[0458] (면역 반응 억제능 평가)

[0459] 배양 개시로부터 통산하여 14일째에 원심에 의해 유도 세포를 회수하여 기본적으로는 이미 문헌에 기재된 방법에 따라 림프구 혼합 시험을 행하였다(3). 세포 현탁물을 37℃, 5% CO_2 인큐베이터에서 공배양한다. 공배양 개시 4일째에 ^{3}H-티미딘(10μl)을 첨가하고, 공배양 개시 5일째(^{3}H-티미딘 첨가의 16~20시간 후)에 배양액 중의 ^{3}H-티미딘을 제거하여 ^{3}H-티미딘 도입량을 측정하여 면역 반응 억제능을 확인할 수 있다.

[0460] (실시예 9: 세포 제제의 품질 관리)

[0461] 세포 제제의 제법에 대해서는 상술한 실시예 1~7에서의 기재를 참조할 것. 실시예에 준하여 제조된 세포 제제에 대해 이하와 같이 품질 관리를 행한다.

[0462] 만족해야 할 품질 규격의 대표예는 이하와 같다.

표 5

최종제품의 품질규격

		치험실시시의 출하		
항목		시험항목	시험법	잠정규격값
확인시험	외관	외관시험	육안	미황백색~담황색 세포의 현탁액
	세포표현형	CD3양성세포비율	FCM	≥50%
		CD3양성세포중의 CD8양성CD44양성 세포비율	FCM	≥5%
		CD3양성세포중의 CD4양성CD44양성 세포비율	FCM	≥5%
		CD3양성세포중의 CD4양성CD25양성 세포비율	FCM	≥5%
순도시험		CD45양성세포비율	FCM	≥95%
안전성		무균시험	일본약국방법	미생물의 발육을 인정하지 않음
		엔도톡신	일본약국방법	<0.25EU/ml
		마이코플라즈마	일본약국방법	음성
세포수		세포수	혈구계산반	1×10^8~30×10^8 개
생세포율		생세포율	트리판블루법	≥70%

[0463]

[0464] (세포 제제의 품질 관리 시험)

[0465] 본 명세서에 기재된 방법에 의해 예를 들어 실시예 1~7의 기재에 준하여 생성된 아네르기 세포가 최종 제품의 품질 규격에 합치하는지 여부를 조사하기 위해 이하의 시험을 실시한다.

[0466] · 외관

[0467] 생리식염액 중에 현탁시킨 아네르기 세포를 외관에 대해 육안으로 조사한다. 품질 규격에 합치하는 현탁액은 미황백색~담황색의 세포로 이루어질 것이다.

[0468] · 세포 표현형 및 아네르기 세포의 순도

[0469] 아네르기 세포를 각 표현형에 대해 플로우 사이토메트리로 조사하기 위해 예를 들어 이하의 항체를 사용하여 다중 염색에 의해 해석한다:

[0470] CD3: FITC 형광 표지 항인간 CD3 항체(UCHT1; eBioscience #11-0038-42) 또는 Pacific Blue 형광 표지 항인간 CD3 항체(UCHT1; Invitrogen #CD0328)

[0471] CD4: PE 형광 표지 항인간 CD4 항체(RPA-T4; eBioscience #25-0049-42)

[0472] CD8: APC 형광 표지 항인간 CD8 항체(RPA-T8; eBioscience #17-0088-42)

[0473] CD25: PerCP 형광 표지 항인간 CD25 항체(MEM-181; eBioscience #A15802)

[0474] CD44: PE-Cy7 형광 표지 항인간 CD44 항체(IM7; eBioscience #25-0441-82)

[0475] CD45: Brilliant Violet 형광 표지 항인간 CD45 항체(HI30; BioLegend #304032)

[0476] CD45RA: FITC 형광 표지 항CD45RA 항체(ALB11; Beckman Coulter A07786) 또는 PE 형광 표지 항CD45RA 항체(ALB11; Beckman Coulter IM1834U)

[0477] CD45RO: ECD 형광 표지 항CD45RO 항체(UCHL1; Beckman Coulter IM2712U) 또는 PE 형광 표지 항CD45RO 항체(UCHL1; Beckman Coulter A07787) 또는 APC 형광 표지 항CD45RO 항체(UCHL1; Bay biosciences 20-0457)

[0478] 순서

[0479] CD3 양성 세포 비율, 생세포 중의 CD45 양성 세포 비율, CD3 양성 세포 중의 CD8 양성 CD44 양성 세포 비율, CD3 양성 세포 중의 CD4 양성 CD44 양성 세포 비율, CD3 양성 세포 중의 CD8 양성 CD45RA 음성 세포 비율, CD3 양성 세포 중의 CD8 양성 CD45RA 음성 CD45RO 양성 세포 비율, CD3 양성 세포 중의 CD4 양성 CD45RA 음성 CD45RO 양성 세포 비율 및 CD3 양성 세포 중의 CD4 양성 CD25 양성 세포 비율

[0480] 생리식염액 중에 현탁시킨 아네르기 세포를 상기 항체에 반응시킨 후에 Zombie NIR Fixable Viability Kit(BioLgened #423106)를 이용하여 죽은 세포를 염색한다. 이 다중 형광 염색된 세포를 FACS Verse(BD Bioscience사)에서 전체 생세포 중의 CD3 양성 세포의 비율을 결정한다.

[0481] 품질 규격에 합치하는 아네르기 세포는 50% 이상의 세포가 CD3 양성이 될 것이다. 동시에 형광에 기초하여 생세포 중의 CD45 양성 세포의 비율, 살아 있는 전체 CD3 양성 세포 중의 CD8 양성 CD44 양성 세포의 비율, CD4 양성 CD44 양성 세포의 비율, CD8 양성 CD45RA 음성 세포의 비율, CD8 양성 CD45RA 음성 CD45RO 양성 세포의 비율, CD4 양성 CD45RA 음성 CD45RO 양성 세포의 비율, CD4 양성 CD25 양성 세포의 비율을 결정한다.

[0482] 품질 규격에 합치하는 아네르기 세포는 생세포의 95% 이상의 세포가 CD45 양성이 될 것이며, 적혈구나 혈소판 등의 불순물을 현저한 양으로는 포함하지 않는다. 나아가 품질 규격에 합치하는 아네르기 세포는 CD3 양성 세포 집단 중 5% 이상이 CD8 양성 CD44 양성, 5% 이상이 CD4 양성 CD44 양성, 5% 이상이 CD8 양성 CD45RA 음성, 5% 이상이 CD8 양성 CD45RA 음성 CD45RO 양성, 5% 이상이 CD4 양성 CD45RA 음성 CD45RO 양성, 그리고 5% 이상이 CD4 양성 CD25 양성의 세포이다.

[0483] · 안전성

[0484] 기본적으로는 일본약국방 또는 해당하는 각국의 약국방의 기재에 준거하여 시험을 행한다. 이하에 예시적인 실시형태를 서술한다.

[0485] 무균 시험법

[0486] 아네르기 세포 부유액을 가볍게 원심분리하고 그 상청을 무균 시험에 제공한다. 일본약국방에서의 대표적인 무균 시험 중 하나인 직접법에서는 상청을 소이빈·카세인·다이제스트 배지 또는 액상 티오글리콜산 배지에 접종

하고 각각 30~35℃ 또는 20~25℃에서 14일간 이상 배양한다. 그 후, 배양물을 배양 기간 중에 수회 관찰한다. 다른 대표적인 무균 시험인 멤브레인 필터법에서는 상청을 무균 희석액(예를 들어 1g/L의 육제 또는 카세인제 펩톤 용액(pH 7.1±0.2))으로 희석하고, 희석한 상청을 멤브레인 필터 상으로 옮겨 여과한다. 그 후 그 멤브레인 필터를 상술한 2종류의 배지에 각각 넣고 14일간 이상 배양한다. 품질 규격에 합치하는 제품에서는 배양 기간 중 및 최종일에 배지에 육안적인 미생물의 증식은 존재하지 않는다.

[0487] 엔도톡신 시험법

[0488] 아네르기 세포 부유액을 적절히 생리식염액으로 희석하여 pH 6.0~8.0으로 조제한다. 그 후, 라이세이트 시약과 혼합하여 라이세이트 시액의 겔 형성을 지표로 하여(겔화법) 또는 라이세이트 시액의 겔화 과정에서의 탁도 변화를 지표로 하여(비탁법) 혹은 합성 기질의 가수분해에 의한 발색을 지표로 하여(비색법) 시료 중의 엔도톡신 농도를 정량적으로 구한다. 필요에 따라 라이세이트 시약의 표시 감도를 확인하는 예비 시험을 행한다. 품질 규격에 합치하는 제품에서는 엔도톡신 농도는 0.25EU/mL 미만이 되어야 하다.

[0489] 마이코플라즈마 부정 시험

[0490] 배양액 또는 아네르기 세포 부유액을 가볍게 원심분리하고 그 상청을 마이코플라즈마 부정 시험에 제공한다. 일본약국방에서의 대표적인 마이코플라즈마 부정 시험 중 하나인 배양법에서는 시료를 한천 평판 배지에 접종하고 5~10%의 탄산가스를 포함하는 질소가스 중에서 적절한 습도하에 35~37℃에서 14일간 이상 배양하거나 혹은 시료를 액체 배지를 넣은 용기에 접종하고 35~37℃에서 배양하여 액체 배지의 색조 변화를 관찰하였을 때나 또는 배양 개시로부터 일정 기간마다 액체 배양물로부터 앨리퀴트를 취하여 새로운 한천 평판 배지에 뿌리고 배양을 계속한다. 그 후, 모든 한천 평판 배지를 대상으로 7일째와 14일째에 배율 100배 이상의 현미경으로 마이코플라즈마의 집락의 유무를 조사한다. 다른 대표적인 마이코플라즈마 부정 시험인 지표 세포를 이용한 DNA 염색법에서는 전형적으로는 지표 세포인 Vero 세포와 지정의 마이코플라즈마 균주를 이용한다. 이 방법에서는 커버글라스를 가라앉힌 배양 접시 등에 지표 세포를 접종하고 5% 탄산가스를 포함하는 공기 중에서 35~38℃에서 하루 증식시킨다. 그 후 시료(배양액 또는 상청)를 첨가하여 동일한 조건으로 3~6일간 배양을 계속한다. 커버글라스 상의 배양 세포를 고정 후 비스벤즈이미드 등의 염색제에 의해 DNA 형광 염색하고 형광 현미경(배율 400~600배 또는 그 이상의 배율)으로 검사하여 음성(비접종) 대조 및 마이코플라즈마 양성 대조와 비교하면서 세포핵을 둘러싸도록 미소한 핵외 형광 반점을 갖는 세포가 0.5% 이상 존재한 경우에는 마이코플라즈마 양성으로 판단한다. 품질 규격에 합치하는 제품에서는 마이코플라즈마 음성이어야 한다.

[0491] · 세포수

[0492] 생리식염액 중에 현탁시킨 아네르기 세포를 혈구 계산반을 이용하여 현미경 하에서 또는 자동 셀 카운터에 의해 세포수를 측정한다. 품질 규격에 합치하는, 투여에 적절한 아네르기 세포의 수는 1×10^{8}~30×10^{8}개(예를 들어 100mL 생리식염액 중)이며, 이 범위를 밑도는 경우에는 적절히 세포를 추가해야 한다.

[0493] · 생세포율

[0494] 생리식염액 중에 현탁시킨 아네르기 세포를 0.3~0.5% 트리판 블루 염색액(예를 들어 카탈로그 #35525-02, 나칼라이 테스크)과 혼합하여 혈구 계산반을 이용하여 현미경 하에서 또는 자동 셀 카운터에 의해 생세포수를 측정한다. 품질 규격에 합치하는 제품에서는 70% 이상의 세포가 생세포이어야 한다.

[0495] (고찰)

[0496] 이상의 결과로부터 본 개시의 조성물은

[0497] 1) CD44 양성 CD8 양성 T세포와 CD44 양성 CD4 양성 T세포를 중심으로 하는 면역 억제 세포의 집단으로, 혼합물임으로써 그 성능은 강하게 발휘된다.

[0498] 2) 이 세포 집단은 동시에 FoxP3 양성의 reg T세포를 함유한다고 시사되지만, 이 reg T세포의 억제능도 항CD80/86 항체 존재하에서의 항원 자극이라는 아네르기를 유도하는 배양계에서 증강되고, 또한 CD44 양성 CD8 양성 세포, CD44 양성 CD4 양성 세포의 존재하에서 그 억제능은 보다 강하게 발휘된다.

[0499] 3) 항CD80/86 존재하에서 한 번 항원에 반응하여 선택되어 항원 특이적이 된 아네르기 CD8 양성 세포 및 아네르기 CD4 양성 세포가 나이브 세포보다 빨리 항원을 인식하여 커버하는 것이 면역 억제의 메커니즘 중 하나임이 증명되었다. 이들은 종래의 면역 거부 억제 실험에서는 판명되지 않았던 것으로 매우 중요한 지견이다.

[0500] 이들 지견은 면역 거부 억제를 위한 세포 제제의 품질 관리에 있어서 중요한 체크포인트가 될 수 있다.

[0501] 표 5에 나타낸 최종 제품의 규격은 대표예이며, 세포 표현형 등의 기준값은 적절히 변경할 수 있고, 그 개변예로서는 표 3에 기재되는 예를 들 수 있다.

[0502] 참고문헌

[0503] 이하의 참고문헌은 실시예 등에서 기본 기술로서 참조한 것이며, 이들 문헌이 본 개시에 대해 선행기술을 구성하는 것을 인정하는 것은 아니다. 이들 내용은 참고로서 원용된다.

[0504] 1. Bashuda H, Kimikawa M, Seino K, Kato Y, Ono F, Shimizu A, et al. Renal allograft rejection is prevented by adoptive transfer of anergic T cells in nonhuman primates. The Journal of clinical investigation. 2005; 115(7): 1896-902.

[0505] 2. Bashuda H, Shimizu A, Uchiyama M, Okumura K. Prolongation of renal allograft survival by anergic cells: advantages and limitations. Clin Transplant. 2010; 24 Suppl 22: 6-10.

[0506] 3. Luo Z, Gotoh M, Grochowiecki T, Tanaka T, Kimura F, Kawashima H, et al. Anergic T cells generated in vitro suppress rejection response to islet allografts. Transplantation. 2000; 69(10): 2144-8.

[0507] 4. Miyao T, Floess S, Setoguchi R, Luche H, Fehling HJ, Waldmann H, et al. Plasticity of Foxp3(+) T cells reflects promiscuous Foxp3 expression in conventional T cells but not reprogramming of regulatory T cells. Immunity. 2012; 36(2): 262-75.

[0508] 5. Davies JK, Barbon CM, Voskertchian A, Nadler LM, Guinan EC. Ex vivo alloanergization with belatacept: a strategy to selectively modulate alloresponses after transplantation. Cell transplantation. 2012; 21(9): 2047-61.

[0509] 6. Davies JK, Gribben JG, Brennan LL, Yuk D, Nadler LM, Guinan EC. Outcome of alloanergized haploidentical bone marrow transplantation after ex vivo costimulatory blockade: results of 2 phase 1 studies. Blood. 2008; 112(6): 2232-41.

[0510] 7. Davies JK, Nadler LM, Guinan EC. Expansion of allospecific regulatory T cells after anergized, mismatched bone marrow transplantation. Science translational medicine. 2009; 1(1): 1ra3.

[0511] 8. Davies JK, Yuk D, Nadler LM, Guinan EC. Induction of alloanergy in human donor T cells without loss of pathogen or tumor immunity. Transplantation. 2008; 86(6): 854-64.

[0512] (주기)

[0513] 이상과 같이 본 개시의 바람직한 실시형태를 이용하여 본 개시를 예시하였지만, 본 개시는 청구범위에 의해서만 그 범위가 해석되어야 하는 것으로 이해된다. 본 명세서에서 인용한 특허, 특허출원 및 다른 문헌은 그 내용 자체가 구체적으로 본 명세서에 기재되어 있는 것과 마찬가지로 그 내용이 본 명세서에 대한 참고로서 원용되어야 하는 것으로 이해된다. 본 출원은 일본특허출원 2018-119001(2018년 6월 22일 출원)에 대해 우선권 주장의 이익을 주장하는 것으로, 이 출원의 내용은 본원에서 그 내용이(전부일 수 있음) 참고로서 원용되는 것으로 이해된다. 또한, 일본특허출원 2018-118996 및 일본특허출원 2018-119003(모두 2018년 6월 22일 출원)과 이들에 대해 우선권 주장하는 국제출원의 내용은 그 일부 또는 전문이 본 명세서에서 참고로서 원용된다.

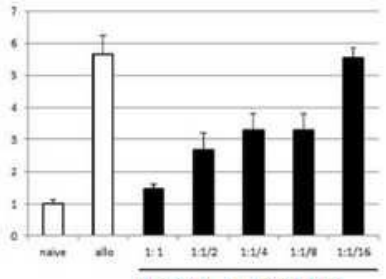
산업상 이용가능성

[0514] 본 개시는 특정의 항원에 특이적인 면역 관용이 유도된 세포를 포함하는 의약 조성물을 제공한다. 이러한 기술에 기초한 제제 등에 관련되는 산업(제약)에 있어서 이용 가능한 기술이 제공된다.

도면

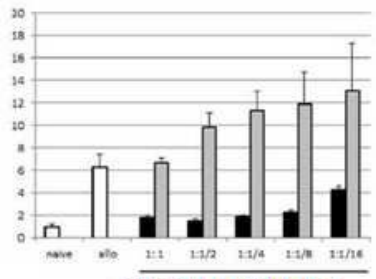
도면1

도1a



■ 전체 아네르기 세포를 혼합 배양계에 첨가

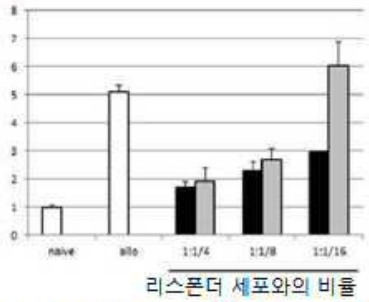
도 1b



■ 아네르기 CD8 양성세포를 순화한 세포집단을 혼합배양계에 첨가

□ 아네르기 CD8 양성세포를 제외한 나머지 세포집단을 혼합배양계에 첨가

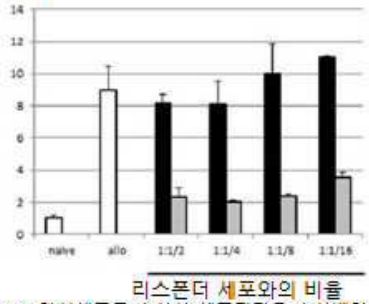
도 1c



■ reg T(FoxP3양성)세포를 순화한 세포집단을 혼합배양계에 첨가

□ reg T세포를 제외한 나머지 세포집단을 혼합배양계에 첨가

도 1d

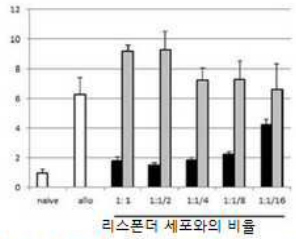


■ CD19 양성세포를 순화한 세포집단을 혼합배양계에 첨가

□ CD19양성세포를 제외한 나머지세포집단을 혼합배양계에 첨가

도면2

도 2a

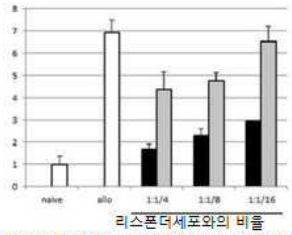


■ 아네르기 CD8 양성세포를 순화한 세포집단을 혼합배양계에 첨가

□ 나이브 CD8 양성세포를 순화한 세포집단을 혼합배양계에 첨가

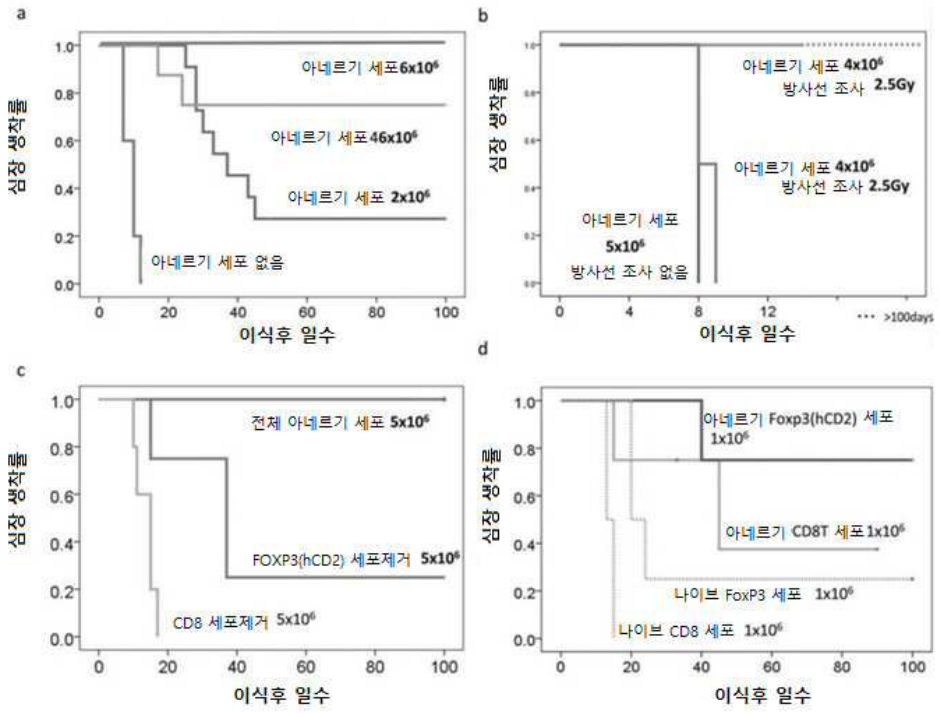
도 2b

□ 나이브 hCD2 양성(FoxP3양성)세포를 순화한 세포집단을 혼합배양계에 첨가



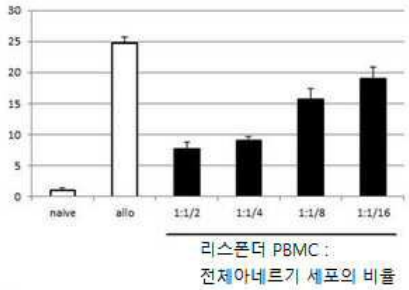
■ 아네르기hCD2양성(FoxP3양성)세포를 순화한 세포집단을 혼합배양계에 첨가

도면3

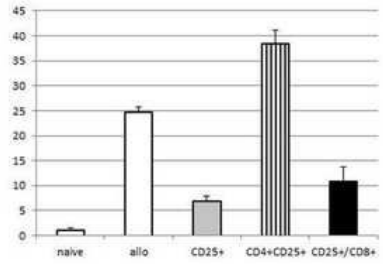

a
심장 생착률
아네르기 세포6x10⁶
아네르기 세포46x10⁶
아네르기 세포 2x10⁶
아네르기 세포 없음
이식후 일수
b
심장 생착률
아네르기 세포 4x10⁶
방사선 조사 2.5Gy
아네르기 세포 4x10⁶
방사선 조사 2.5Gy
아네르기 세포
5x10⁶
방사선 조사 없음
>100days
이식후 일수
c
심장 생착률
전체 아네르기 세포 5x10⁶
FOXP3(hCD2) 세포제거 5x10⁶
CD8 세포제거 5x10⁶
이식후 일수
d
심장 생착률
아네르기 Foxp3(hCD2) 세포
1x10⁶
아네르기 CD8T 세포 1x10⁶
나이브 FoxP3 세포 1x10⁶
나이브 CD8 세포 1x10⁶
이식후 일수

도면4

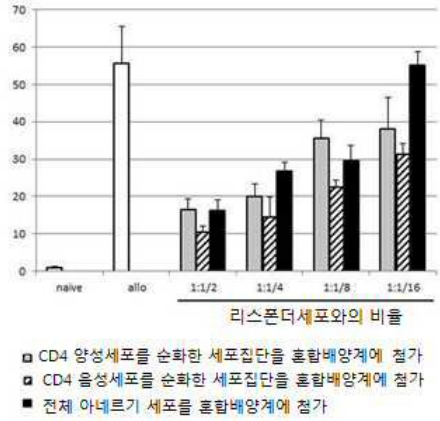
도4a



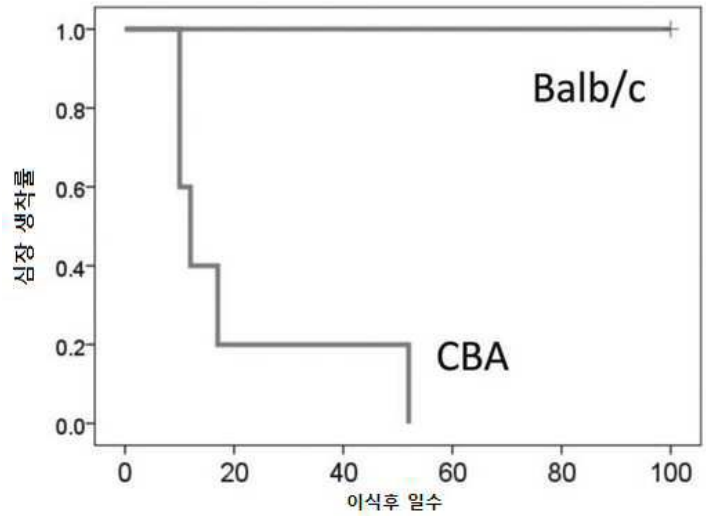
도 4b



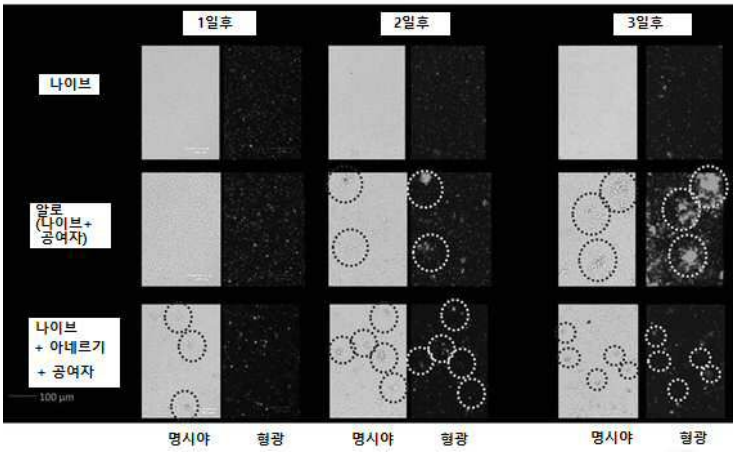
도 4c



도면5

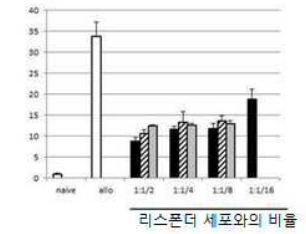

1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
심장 생착률
Balb/c
CBA
0
20
40
60
80
100
이식후 일수

도면6


1일후
2일후
3일후
나이브
알로
(나이브+
공여자)
나이브
+ 아네르기
+ 공여자
100 μm
명시야
형광
명시야
형광
명시야
형광

도면7

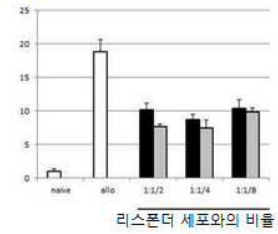
도 7a



리스폰더 세포와의 비율

■ 전체 아네르기 세포를 혼합배양계에 첨가
▫ CD8양성 CD44음성 세포를 제거한 세포집단을 혼합배양계에 첨가
▫ CD4양성 CD44음성 세포를 제거한 세포집단을 혼합배양계에 첨가

도 7b



리스폰더 세포와의 비율

■ CD8양성 CD44양성 세포를 순화한 세포집단을 혼합배양계에 첨가
▫ CD4양성 CD44양성 세포를 순화한 세포집단을 혼합배양계에 첨가

도 7c

