



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0071277
(43) 공개일자 2014년06월11일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0783 (2010.01) *A61K 35/14* (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01) *A61P 37/00* (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2013-7030844
- (22) 출원일자(국제) 2012년05월18일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2013년11월20일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2012/059313
- (87) 국제공개번호 WO 2012/156522
국제공개일자 2012년11월22일
- (30) 우선권주장
11166808.3 2011년05월19일
유럽특허청(EPO)(EP)

- (71) 출원인
타이제닉스, 에스.에이.유.
스페인 마드리드 이-28760 트레스 칸토스, 1, 마르코니, 파르케 테크놀로하코 데 마드리드
- (72) 발명자
드 라 로사, 올가
스페인, 이-28760 트레스 칸토스, 칼레 드 마르코니 1, 타이제닉스 에스에이
- (74) 대리인
손민

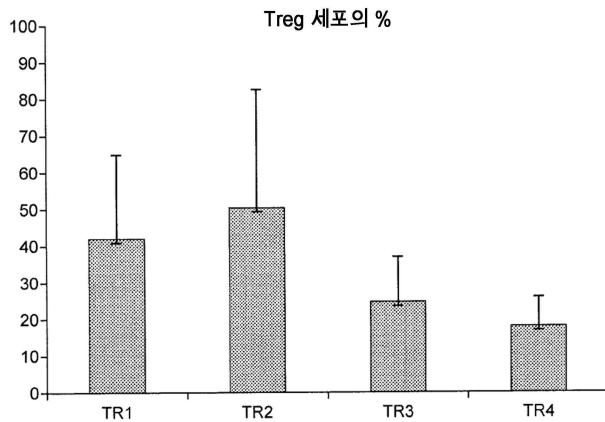
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 면역조절 활성을 갖는 세포 집단, 그의 제조 방법 및 용도

(57) 요 약

본 발명은 분리된 면역조절 세포, 그의 집단, 조성물 및 치료학적 용도를 제공한다. 본 발명의 면역조절 세포는 다발성 경화증의 면역조절에서 놀라운 효능을 갖는다. 한가지 구체예에서, 상기 면역조절 세포는 조절성 T-세포이며, 특히 바람직한 구체예에서 상기 면역조절 세포는 Foxp3+CD4+CD25+ T-reg 및/또는 IL-10/TGF-베타-생산 조절성 Tr1 세포이다. 본 발명의 면역조절 세포를 제조, 팽창 및/또는 생성시키는 방법은 MSC 및/또는 섬유아세포를 포함하는 세포 집단을 하나 이상의 다발성 경화증-연관된 항원의 존재 하에서 PBLs와 접촉시키는 것을 포함한다.

대 표 도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

본질적으로 CD62-L, FOXP3 및 CTLA4 중의 하나 또는 그 이상을 발현하는 다발성 경화증-연관된 항원-특이적 면역조절(immunomodulatory) 세포로 구성되는 분리된 세포 집단.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 세포가 CD62-L, FOXP3 및 CTLA4의 각각을 발현하는 세포 집단.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 세포가 CD127을 발현하지 않는 세포 집단.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중의 어느 하나에 있어서, 상기 세포가 조절성 T-세포인 세포 집단.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중의 어느 하나에 있어서, 상기 세포가 생체외(ex vivo) 생성되고, 상기 생체외 생성 중에 하나 이상의 항원에 대해 지시되거나 노출되는 세포 집단.

청구항 6

분리된 조절성 T 세포 또는 그의 세포 집단을 하나 이상의 다발성 경화증-연관된 항원의 존재 하에서 중간엽 줄기 세포 (MSC) 집단과 접촉시키는 것을 포함하여, 항원-특이적 면역조절 세포를 제조, 팽창 및/또는 생성시키는 방법.

청구항 7

- i) 분리된 세포 집단을 제공하고;
- ii) CD62-L, FOXP3 및 CTLA4로 구성된 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 마커의 발현을 측정하고;
- iii) 적어도 1, 2 또는 3 개의 상기 마커에 대해서 양성인 세포를 선택하는 것을 포함하여, 세포 집단을 선택하는 방법.

청구항 8

- i) PBL 집단을 제공하고;
- ii) 상기 PBLs를 하나 이상의 다발성 경화증-연관된 항원의 존재 하에서 MSC 및/또는 섬유아세포를 포함하는 세포 집단과 접촉시키고;
- iii) 면역조절 세포 집단을 분리시키고; 및
- iv) 상기 면역조절 세포 집단을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하여, 다발성 경화증이 있는 대상체를 치료하는 방법.

청구항 9

제6항 또는 제8항에 있어서, 상기 MSC 집단이 지방 조직으로부터 유래하는 방법.

청구항 10

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 세포 집단, 또는 제6항, 제8항 또는 제9항 중 어느 한 항에 따른 방법에 있어서, 상기의 다발성 경화증-연관된 항원이 마이엘린 염기성 단백질(myelin basic protein), 마이엘린 결합된 당단백질(myelin associated glycoprotein), 마이엘린 희돌기교세포 단백질(myelin oligodendrocyte protein), 단백지질 단백질(proteolipid protein), 희돌기교세포 마이엘린 올리고단백질(oligodendrocyte

myelin oligoprotein), 마이엘린 결합된 희돌기교세포 염기성 단백질(myelin associated oligodendrocyte basic protein), 희돌기교세포 특이적 단백질(oligodendrocyte specific protein), 열 쇼크 단백질, 희돌기교세포 특이적 단백질, NOGO A, 당단백질 Po, 말초 마이엘린 단백질 22, 및 2'3'-사이클릭 뉴클레오타이드 3'-포스포디에스테라제, 및 이들의 단편, 변이체 및 혼합물을 구성된 그룹으로부터 선택되는 세포 집단 또는 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 다발성 경화증-연관된 항원이 마이엘린 염기성 단백질 웨타이드, 마이엘린 희돌기교세포 당단백질 및 단백지질 단백질, 및 이들의 단편, 변이체 및 혼합물을 포함하는 그룹으로부터 선택되는 방법.

청구항 12

제1항 내지 제5항 중의 어느 한 항에 따르는 세포, 또는 제6항, 제9항, 제10항 또는 제11항 중의 어느 한 항의 방법에 따라 제조된 세포를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 13

다발성 경화증의 치료에 사용하기 위한 제1항 내지 제5항 중의 어느 한 항에 따르는 세포 집단, 제6항, 제9항, 제10항 또는 제11항 중의 어느 한 항의 방법에 따라 제조된 세포, 또는 제12항에 따르는 약제학적 조성물.

청구항 14

다발성 경화증의 치료를 위한 약제의 제조에 있어서의 제1항 내지 제5항 중의 어느 한 항에 따르는 세포 집단, 제6항, 제9항, 제10항 또는 제11항 중의 어느 한 항의 방법에 따라 제조된 세포, 또는 제12항에 따르는 약제학적 조성물의 용도.

청구항 15

제1항 내지 제5항 중의 어느 한 항에 따르는 세포 집단, 제6항, 제9항, 제10항 또는 제11항 중의 어느 한 항의 방법에 따라 제조된 세포, 또는 제12항에 따르는 약제학적 조성물을 필요한 대상체에게 투여하는 것을 포함하여, 다발성 경화증을 치료하는 방법.

명세서

기술분야

[0001]

본 발명은 면역조절 세포, 면역조절 세포를 제공하는 방법, 및 필요한 포유동물의 면역 변조를 위한 상기 세포의 치료학적 용도에 관한 것이다.

배경기술

[0002]

조절성 T-세포: 모든 면역반응은 T 세포에 의해서 조절된다. 자가면역반응을 유발하는 잠재력을 갖는 자체-반응성 세포는 정상적인 T 세포 레퍼토리 (cell repertoire)의 일부분을 포함하지만, 건강한 상태에서 이들의 활성화는 억제자 (suppressor) 세포에 의해서 방지된다. 비록 T 억제자 세포가 1970년대에 최초로 기술되었지만, T-세포 서브세트를 특정화하는데 있어서의 상당한 진행은 이들을 조절성 T 세포 (Treg 세포)로 재명명한 최근에야 이루어졌다.

[0003]

여기에는 조절 (억제자) 활성을 갖는 상이한 CD4+, CD8+, 자연 살해 세포, 및 감마 및 뱃타 T 세포 서브세트가 있다. Treg 세포의 두 가지 주된 타입은 CD4+ 집단으로 특정화되었으며, 즉 천연적으로-존재하는 흉선-생성 Treg 세포, 및 말초적으로-유도된 IL-10 또는 TGF-베타 분비 T-reg 세포 (TrI 세포)이다. 흉선에서 생성된 CD4+CD25+, Foxp3+발현성, 천연적으로-존재하는 T-reg 세포는 이동하여 말초에서 유지된다.

[0004]

(면역 및 염증성 장애의 치료에서의 그들의 사용을 위한) Treg 세포의 시험관내 제조방법은 본 기술분야에서 공지되어 있다. 예를 들어, 국제특허출원 WO2011/048222는 중간엽 줄기 세포를 말초혈액 백혈구와 접촉시킴으로써 Treg 세포를 제조하는 방법을 제공한다.

[0005]

Tregs의 지방-유래 줄기 세포 유도: 인간 지방-유래 중간엽 줄기 세포 (hASC)는 낮은 레벨의 HLA 클래스 I을 발현하지만, HLA 클래스 II, CD40, CD80 또는 CD86 분자를 결여하는 저조한 면역원성의 중간엽-타입 세포로 분화할 수 있는 다능성 (multipotent) 성체 줄기 세포의 공급원이다. 더구나, 팽창된 hASC는 세포 접촉-의존성

기전, 및 활성화된 면역 세포에 의해서 방출된 사이토킨에 대한 반응으로 분비된 가용성 인자 둘 다에 의해서 면역 세포의 활성화, 증식 및 기능을 억제하는 것으로 보고되었다. 류마티스성 관절염 (RA) 및 크론병에 대한 실험적 모델은 자가면역/염증성 질환의 모델, hASC 치료를 위한 잠재적 표적으로서 연구의 대상이다. 콜라겐 유도된 관절염 (CIA) 및 염증성 장 질환 (IBD) 마우스 둘 다에서 제공된 데이터는 hASCs의 주입이 두 가지 질환 모두의 발생률 및 중증도를 상당히 감소시켰음을 보고하였다. hASC 치료는 질병 피크의 후속 유도가 유발된 경우에 보호 효과를 갖는 것으로 입증되었다. 중증도의 이러한 임상적 감소는 Th1 반응의 하향조절에 의해서 매개된 국소 및 전신 항염증 효과를 수반하였다. 이들 데이터는, hASC가 짧은 기간 중에 림프양 기관으로 이동하여 더 소실될 수 있었다는 사실을 수반한다. 추가의 분석은 치료 후에 나타나는 자체-반응성 T 효과기 반응을 억제하는 능력을 갖는 항원-특이적 CD4+CD25+FoxP3+ 조절성 T 세포 (Treg)의 새로운 생성을 입증하였다. RA 환자에게서 수행된 생체외(ex vivo) 연구는 hASCs가 다양한 기전에 의해 콜라겐-반응성 T 세포 상에서 극심한 억제성 반응을 나타낸을 시사하였다. 이들 중의 하나는 자가반응성 T 세포의 증식을 억제하는 콜라겐 특이적 Treg 세포의 생성이었다. hASC는 용량 의존적 방식으로 자체-PBMCs에 대한 억제자 능력을 갖는 CD4+CD25brightFOXP3+ Tregs의 선택적 유도에 의해 그들의 면역억제 활성을 나타내는 것으로 보인다.

[0006]

다발성 경화증: 다발성 경화증 (MS)은 면역 시스템이 CNS의 만성 염증성 및 수초탈락 과정을 통해서 중추신경계 (CNS)를 공격하는 자가면역 상태이다. MS의 완화의 유도는 자가면역성의 방지에 중요한 역할을 하는 CD4+CD25+FOXP3+ Tregs의 자극과 연관되었다. 다수의 연구는 CNS의 염증성 및 수초탈락 장애를 포함한 다수의 인간 자가면역 질환에서 Treg의 수적 또는 기능적 결함을 보고하였다. MS 환자의 연구는 추가로, Treg 기능의 복구가 인간에게서 유망한 치료학적 접근방법이라는 가설을 뒷받침한다. 실제로, Tregs의 준최적 억제능은 재발-경감 MS가 있는 환자에게서 관찰되었다. 예를 들어, 임상적으로 사용된 면역 변조 약물인 글라티라머 (glatiramer) 아세테이트에 대해 반응하는 환자는 말초혈액 및 뇌척수액 내에서 증가된 레벨의 CD4+CD25+FoxP3+ Treg 세포를 갖는 것으로 보고되었다. MS에 대해 임상적으로 사용된 또 다른 약물인 인터페론 베타는 Tregs의 새로운 생성의 자극을 통해서 치료의 개시 후에 Tregs 활성의 재정상화 (renormalization)를 유도한다. MS의 동물 모델인 실험적 알레르기성 뇌척수염 (EAE)에서, 질병 진행은 Treg 고갈에 의해서 악화되며, EAE의 특정 모델에서 질병에 대한 자연적인 보호는 항원-특이적 Treg와 연관된다. 이들 데이터는 MS 환자에게서의 면역 기능 부전이 억제에 대한 효과기 T 세포 저항성의 결과라기 보다는 Tregs에 고유한 것일 수 있음을 시사한다.

발명의 내용

[0007]

발명의 요약

[0008]

한가지 관점에서, 본 발명은 수용주 대상체의 치료에 사용하는데 적합한 면역조절 세포의 제조, 팽창 및/또는 생성에 관한 것이다. 상기 면역조절 세포뿐만 아니라 이들을 포함하는 키트는 본 발명의 추가의 관점을 구성한다.

[0009]

또 다른 관점에서, 본 발명은 의약으로서뿐만 아니라 다발성 경화증을 치료하는 의약의 제조에 있어서의 상기 면역조절 세포의 용도에 관한 것이다. 본 발명은 또한, 병용 요법에서의 이러한 방법의 용도에 관한 것이며, 즉 본 발명의 면역조절 세포는 하나 또는 그 이상 작용제와, 즉 제2 또는 추가의 작용제와 동시에, 또는 별도로, 예를 들어, 순차적으로 공동-투여된다.

[0010]

또 다른 관점에서, 본 발명은 상기의 면역조절 세포 및 억제학적 담체를 포함하는 억제학적 조성물에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

[0011]

도 1 - 상이한 조건 하에서 생성된 Treg 세포의 백분율.

TR1은 PBLs 및 hASC와 MS 통합 (pooled) 웨타이드의 공동-배양물을 나타낸다. TR2는 웨타이드는 없이 hASC와의 공동-배양물을 나타낸다. TR3은 hASC의 부재 하, 및 통합 웨타이드의 존재 하에서 수행된 배양물을 나타낸다. TR4는 hASC 및 통합 웨타이드의 부재 하에서 수행된 배양물을 나타낸다. 그래프는 3 개의 독립적인 실험의 평균 및 표준 편차를 나타낸다.

도 2 - 상이한 조건 하에서 생성된 Treg 세포의 표현형.

TR1은 PBL 및 hASC와 MS 통합 웨타이드의 공동-배양물을 나타낸다. TR2는 웨타이드는 없이 hASC와 PBL의 공동-배양물을 나타낸다. TR3은 hASC의 부재 하, 및 통합 웨타이드의 존재 하에서 수행된 배양물을 나타낸다. TR4

는 hASC 및 통합 웨타이드의 부재 하에서 수행된 배양물을 나타낸다. 그레프는 게이트 집단 (gated population)에 대한 CD4+CD25bright (Treg) 집단의 CD103, CD127 및 세포내 염색된 FOXP-3의 발현의 백분율의 평균을 나타낸다. 3 개의 독립적인 실험이 각각의 그룹에 대해서 수행되었다.

도 3-8 - 폴리클로날 및 항원 유래 Treg 세포의 증식의 억제.

TR1 (도 3-5)은 hASC 및 MS 통합 웨타이드와의 공동-배양물을 나타낸다. TR2 (도 6-8)는 웨타이드가 없이 hASC 와의 공동-배양물을 나타낸다. 상부 열은 자극제로서 통합 웨타이드 또는 항 CD3/CD28 마이크로비드를 사용한 항원 유래 Treg 세포에 의한 증식의 백분율을 나타낸다. 하부 열은 자극제로서 통합 웨타이드 또는 폴리클로날 자극을 사용한 폴리클로날 Treg 세포에 의한 증식의 백분율을 나타낸다. 실험은 각각의 공여체로부터 분리된 세포의 수에 따라 1:1, 1:4 또는 1:20 비 (Treg: PBMC)로 수행되었다. 각각의 그룹 (TR1/TR2)에 대해서 3 개의 독립적인 실험이 수행되었다.

도 9 - 항원 특이적 및 비-특이적 유래 램프구에서 증식의 억제.

hASC 및 MS 통합 웨타이드와의 공동-배양을 나타낸다. 도달된 최대 증식은 흑색 오른쪽 막대에 나타낸 100%이다. 회색 막대는 부적절한 웨타이드 Flu HA의 존재 하에서 CD3 양성 T 세포의 다양한 비의 증식 (배양에서 도달된 최대 증식을 나타내는 증식의 백분율)을 나타낸다. 흑색 막대는 통합 MS 웨타이드의 존재 하에서 CD3 양성 T 세포의 다양한 비의 증식 (배양에서 도달된 최대 증식을 나타내는 증식의 백분율)을 나타낸다. 실험은 1:5, 1:11 또는 1:21 비 (Treg: PBMC)로 수행되었다. 3 회의 평균 및 표준 편차를 그레프에 나타낸다 (도달된 최대 증식은 흑색 오른쪽 막대에서 나타낸 100%이다).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012]

발명의 상세한 설명

[0013]

본 발명은 면역조절 특성을 갖는 면역조절 세포의 제조, 팽창 및/또는 생성을 위한 방법을 제공한다. 면역조절 세포 및 그의 용도는 본 발명의 추가의 관점을 구성한다.

[0014]

정의

[0015]

본 설명의 이해를 용이하게 하기 위해서, 본 발명과 관련한 일부의 용어 및 표현의 의미를 이하에 설명할 것이다. 추가의 정의는 필요에 따라 설명 전체에 포함될 것이다.

[0016]

본 명세서에서 사용된 것으로서, 용어 "동종이계 (allogeneic)"는 동일한 종의 상이한 개체로부터 유래하는 것을 의미하는 것으로 채택되어야 한다. 둘 또는 그 이상의 개체는, 하나 이상의 유전자좌에서의 유전자가 동일하지 않은 경우에 서로에 대해 동종이계라고 말한다.

[0017]

본 명세서에서 사용된 것으로서, 용어 "자가유래 (autologous)"는 동일한 개체로부터 유래하는 것을 의미하는 것으로 채택되어야 한다.

[0018]

용어 "항원 제시 세포 (antigen presenting cells)" (APC)는 주요 조직적합 컴플렉스 MHC와 컴플렉스를 형성한 표면 외래 항원을 나타내는 세포 집단을 나타낸다. 비록 신체 내의 거의 모든 세포가 T 세포에 대한 항원을 제시할 수 있지만, 용어 "항원 제시 세포" (APC)는 본 발명에서 표면 MHC II (HLA DP, DQ, DR)를 발현하는 전문화된 세포로 제한되며, 이 발현이 유도되는 이들 세포 (예를 들어, B-세포 및 CD4 PHA 아세포 (blasts), 단 이들로 제한되지는 않음) 및 또한, 단핵구-대식세포 계통으로부터 유래하는 이들 세포 (예를 들어, 수지상 세포, 단 이들로 제한되지는 않음) 둘 다를 포함한다.

[0019]

세포 집단에 적용된 용어 "분리된"은 인간 또는 동물 신체로부터 분리된 세포 집단을 나타내며, 이것은 생체내 또는 시험관내에서 상기 세포 집단과 결합된 하나 이상의 세포 집단을 실질적으로 갖지 않는다.

[0020]

용어 "MHC" (주요 조직적합 컴플렉스)는 세포-표면 항원-제시 단백질을 코드화한 유전자의 서브세트를 나타낸다. 인간에게서, 이들 유전자는 인간 백혈구 항원 (HLA) 유전자로 불린다. 여기에서, 약어 MHC 또는 HLA는 상호 교환하여 사용된다. 용어 "대상체 (subject)"는 동물, 바람직하게는 비-영장류 (예를 들어, 소, 돼지, 말, 고양이, 개, 렉트 또는 마우스) 및 영장류 (예를 들어, 원숭이 또는 인간)를 포함하는 포유동물을 나타낸다. 바람직한 구체예에서, 대상체는 인간이다.

[0021]

용어 "면역조절 (immunomodulatory)"은 면역 시스템의 하나 이상의 생물학적 활성의 억제 또는 감소를 나타내며, 이것은 면역 반응 및 염증성 상태의 하향조절뿐만 아니라 사이토킨 프로필, 세포독성 활성 및 항체

생산에 있어서의 변화를 포함하나, 이들로 제한되지는 않는다.

- [0022] 면역조절 세포와 관련하여 사용된 경우의 용어 "항원 특이적"은 동종항원 및 자가항원 둘 다를 포함하는 특이적 항원 또는 항원들과 연관되거나, 이들에 의해서 활성화된 면역 시스템의 하나 이상의 생물학적 활성 (예를 들어, T-세포 증식, 단 이것으로 제한되지는 않음)의 억제 또는 감소능을 갖는 세포를 나타낸다.
- [0023] 용어 "면역조절"은 "항원 특이적 면역조절"을 포함하는 것으로 채택되어야 한다.
- [0024] 본 명세서에서 사용된 것으로서, 용어 "면역조절제", "면역조절 세포 집단", "면역조절 세포" 또는 "면역조절 세포들"은 하나 이상의 면역 세포 (예를 들어, T 세포, 단 이들로 제한되지는 않음)의 하나 이상의 생물학적 활성 (예를 들어, 사이토킨의 증식, 분화, 프라이밍 (priming), 효과기 기능, 생산, 또는 항원의 발현)을 억제하거나 감소시키는 작용제, 세포(들) 또는 그의 집단을 의미하는 것으로 채택되어야 한다.
- [0025] 용어 "T-세포"는 T 세포 수용체 (TCR)를 발현하는 림프구의 서브세트인 면역 시스템의 세포를 나타낸다. 용어 "조절성 T-세포" (또한, 여기에서는 T-reg 세포로 불린다)는 면역 시스템의 활성화를 활성적으로 억제하며, 병리학적 자체-반응성, 즉 자가면역 질환을 방지하는 T 세포 서브세트를 나타낸다. 용어 "조절성 T-세포" 또는 "T-reg 세포"는 천연적으로 존재하는 T-세포 (또한, CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T-reg 세포로도 알려짐) 및 FoxP3 분자를 발현하지 않는 적응성 (adaptive) T-세포 (또한, Tr1 세포 또는 Th3 세포로도 알려짐) 둘 다를 포함하는 것으로 채택되어야 한다.
- [0026] 본 발명의 특히 바람직한 구체예에서, 상기의 면역조절제, 세포(들) 또는 그의 집단은 조절성 T-세포이지만, 방법의 대안적인 구체예에서 이들은 조절성 T-세포의 면역억제 기능을 수행할 수 있도록 변형된 다른 표현형의 세포일 수도 있다. 예를 들어, 다른 표현형의 세포는 상기의 변형 이전에 다음의 능력 중의 하나 또는 그 이상을 결여할 수 있다: 혼합 림프구 반응의 억제; 세포독성 T 세포 반응의 억제; DC 성숙화의 억제; 염증성 사이토킨의 T 세포 생산의 억제.
- [0027] 본 명세서에서 사용된 것으로서, 세포 표면 마커에 관해서 사용된 "음성 (negative)" 또는 "-"는 세포 집단에서 세포의 20%, 10% 미만, 바람직하게는 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 미만 또는 0%가 상기 마커를 발현하는 것을 의미하도록 채택되어야 한다. 세포 표면 마커의 발현은 예를 들어, 통상적인 방법 및 장치 (예를 들어, 상업적으로 이용할 수 있는 항체 및 본 기술분야에서 공지된 표준 프로토콜과 함께 사용된 Beckman Coulter Epics XL FACS 시스템)를 사용하여 특이적 세포 표면 마커에 대한 유동 세포분석에 의해서 결정될 수 있다.
- [0028] 본 명세서에서 사용된 것으로서, 용어 "중간엽 줄기 세포" (또한, 여기에서는 "MSC"로 칭함)는 원래 중간엽 조직으로부터 유래하는 다능성 세포 타입을 의미하는 것으로 채택되어야 한다.
- [0029] 본 명세서에서 사용된 것으로서, 세포 표면 마커에 관해 사용된 경우의 표현 "상당한 발현" 또는 그의 동등한 용어 "양성" 및 "+"는 세포 집단에서 세포의 20% 이상, 바람직하게는 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 이상 또는 전부가 상기 마커를 발현하는 것을 의미하는 것으로 채택되어야 한다.
- [0030] 세포 표면 마커의 발현은 예를 들어, 통상적인 방법 및 장치 (예를 들어, 상업적으로 이용할 수 있는 항체 및 본 기술분야에서 공지된 표준 프로토콜과 함께 사용된 Beckman Coulter Epics XL FACS 시스템)를 사용하여 배경 시그널 이상으로 유동 세포분석에서 특이적 세포 표면 마커에 대한 시그널을 나타내는 통상적인 방법 및 장치 (예를 들어, 상업적으로 이용할 수 있는 항체 및 본 기술분야에서 공지된 표준 프로토콜과 함께 사용된 Beckman Coulter Epics XL FACS 시스템)를 사용하여 특이적 세포 표면 마커에 대한 유동 세포분석에 의해서 결정될 수 있다. 배경 시그널은 통상적인 FACS 분석에서 각각의 표면 마커를 검출하기 위해서 사용된 특이적 항체와 동일한 이소타입의 비-특이적 항체에 의해서 제공되는 시그널 강도로 정의된다. 양성으로 간주되는 마커의 경우에, 관찰된 특이적 시그널은 통상적인 방법 및 장치 (예를 들어, 상업적으로 이용할 수 있는 항체 및 본 기술분야에서 공지된 표준 프로토콜과 함께 사용된 Beckman Coulter Epics XL FACS 시스템)를 사용하여 배경 시그널 강도 보다 20% 이상 더 강력하며, 바람직하게는 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 500%, 1000%, 5000%, 10000% 또는 그 이상 더 강력하다.
- [0031] 더 나아가, 상기 세포-표면 마커 (예를 들어, 세포 수용체 및 경막 단백질)에 대한 상업적으로 이용할 수 있으며 공지된 모노클로날 항체를 사용하여 적절한 세포를 확인할 수 있다.
- [0032] 용어 "결합 조직"은 중간엽 조직으로부터 유래하는 조직을 나타내며, 그들의 세포가 세포외 매트릭스 내에 포함되는 것을 특징으로 하는 몇 개의 조직을 포함한다. 결합 조직의 예로는 지방조직 및 연골조직이 포함되나, 이

들로 제한되지는 않는다.

[0033] 본 명세서에서 사용된 것으로서, 용어 "섬유아세포"는 활막 세포와 같은 섬유아세포를 포함하는 것으로 채택되어야 한다.

[0034] 본 명세서에서 사용된 것으로서, 환자 또는 대상체와 관련하여 직접적으로 사용되는 용어 "치료하다", "치료" 및 "치료하는"은 다발성 경화증과 관련한 하나 이상의 증상을 개선시키는 것을 의미하는 것으로 채택되어야 하며, 여기에서 상기의 개선은 본 발명의 면역조절 세포의 투여로 인한 결과이다.

[0035] 용어 "병용 요법"은 염증성 장애, 자가면역 질환, 또는 이식 기관 또는 조직의 거부반응을 포함한 면역학적으로 매개된 질환을 포함한 (단, 이들로 제한되지는 않음) 장애와 연관된 하나 이상의 증상의 개선을 위한 본 발명의 방식으로, 본 발명의 면역조절 세포 또는 이를 포함하는 약제학적 조성물을 다른 활성 작용제 또는 치료 양식과 함께 사용하는 것으로 나타낸다. 이를 다른 작용제 또는 치료에는 코르티코스테로이드 및 비-스테로이드성 항-염증성 화합물과 같이 (단, 이들로 제한되지는 않음) 이러한 장애의 치료에 공지된 약물 및 치료법이 포함될 수 있다.

[0036] 용어 "PBLs"는 말초혈액 백혈구, 림프구 또는 단핵구를 의미하는 것으로 채택되어야 한다.

[0037] 본 발명의 면역조절 세포, 또는 그의 약제학적 조성물은 또한, 코르티코스테로이드, 비-스테로이드성 항-염증성 화합물, 또는 염증을 치료하는데 유용한 그 밖의 다른 작용제와 조합될 수도 있다. 본 발명의 작용제와 이를 다른 치료법 또는 치료 양식의 병용은 동시에 발생할 수 있거나, 순차적으로 제공될 수 있으며, 즉 두 가지 치료는 상기 면역조절 세포 또는 이를 포함하는 약제학적 조성물이 다른 치료법 또는 치료 양식 전 또는 후에 제공될 수 있도록 분배될 수 있다. 담당 의사는 다른 작용제, 치료법 또는 치료 양식과 함께 면역조절 세포 또는 이를 포함하는 약제학적 조성물을 투여하는 적절한 순서를 결정할 수 있다.

상세한 설명

[0039] 한가지 관점에서, 본 발명은 분리된 면역조절 세포, 그의 집단 및 조성물을 제공한다. 본 발명의 면역조절 세포는 다발성 경화증의 면역조절에서 놀라운 효능을 갖는다.

[0040] 한가지 구체예에서, 상기의 면역조절 세포는 조절성 T-세포이며, 특히 바람직한 구체예에서, 상기의 면역조절 세포는 Foxp3+CD4+CD25+ T-reg 및/또는 IL-10/TGF β -생산 조절성 Tr1 세포이다. 본 발명의 분리된 면역조절 세포는 바람직하게는, 이들이 세포 표면 마커 CD62-L, CD127, FOXP3, CTLA4, CD104 및 GITR 중의 적어도 1, 2, 3, 4, 5 개, 및 바람직하게는 모두를 발현하는 (즉, 이들에 대해서 양성인) 것을 특징으로 한다. 바람직하게는, MSC는 이들이 상기 세포 표면 마커 (CD62-L, CD127, FOXP3, CTLA4, CD104 및 GITR) 중의 적어도 1, 2, 3, 4 개, 및 바람직하게는 이들 모두의 상당한 발현 수준을 갖는 것을 특징으로 한다.

[0041] 본 발명의 분리된 면역조절 세포는 더욱 바람직하게는, 이들이 세포 표면 마커 CD62-L, FOXP3 및 CTLA4 중의 적어도 1, 2 개, 또는 바람직하게는 이들 모두를 발현하는 (즉, 이들에 대해서 양성인) 것을 특징으로 한다. 바람직하게는, MSC는 이들이 상기의 세포 표면 마커 (CD62-L, FOXP3 및 CTLA4) 중의 적어도 1, 2 개, 또는 바람직하게는 이들 모두의 상당한 발현 수준을 갖는 것을 특징으로 한다. 이들은 CD127을 발현하지 않는 (즉, 이에 대해서 음성인) 것이 더 바람직하다.

[0042] 본 발명의 분리된 면역조절 세포는 생체외 제조, 팽창 또는 생성되는 것이 바람직하다. 본 발명의 면역조절 세포는 마이엘린 염기성 단백질(myelin basic protein), 마이엘린 결합된 당단백질(myelin associated glycoprotein), 마이엘린 희돌기교세포 단백질(myelin oligodendrocyte protein), 단백지질 단백질(myelin oligodendrocyte protein), 희돌기교세포 마이엘린 올리고단백질(myelin oligodendrocyte protein), 마이엘린 결합된 희돌기교세포 염기성 단백질(myelin associated oligodendrocyte basic protein), 희돌기교세포 특이적 단백질(oligodendrocyte specific protein), 열 쇼크 단백질, 희돌기교세포 특이적 단백질, NOGO A, 당단백질 Po, 말초 마이엘린 단백질 22, 2'3'-사이클릭 뉴클레오타이드 3'-포스포디에스테라제, 및 이들의 단편, 변이체 및 혼합물과 같은 (단, 이들로 제한되지는 않음) 하나 이상의 다발성 경화증-연관된 항원에 대해서 특이적인 항원인 것이 (또는 이들에 대해서 활성화된 면역 반응을 우선적으로 변조시키는 것이) 바람직하다. 본 발명의 면역조절 세포는 마이엘린 염기성 단백질 웨타이드, 마이엘린 희돌기교세포 당단백질 및 단백지질 단백질, 및 서열번호 1-7로 표시되는 것과 같은 (단, 이들로 제한되지는 않음) 이들의 단편, 변이체 및 혼합물과 같은 (단, 이들로 제한되지는 않음) 하나 이상의 다발성 경화증-연관된 항원에 대해서 특이적인 항원인 것이 (또는 이들에 대해서 활성화된 면역 반응을 우선적으로 변조시키는 것이) 바람직하다.

- [0043] 본 발명의 항원 특이적 면역조절 세포는 다발성 경화증의 시험관내 모델에서 면역 반응의 변조에 개선된 효능을 갖는 것으로 입증되었다. 본 발명의 한가지 구체예에서, 본 발명의 면역조절 세포는 마이엘린 염기성 단백질, 마이엘린 결합된 당단백질, 마이엘린 희돌기교세포 단백질, 단백지질 단백질, 희돌기교세포 마이엘린 올리고단백질, 마이엘린 결합된 희돌기교세포 염기성 단백질, 희돌기교세포 특이적 단백질, 열 쇼크 단백질, 희돌기교세포 특이적 단백질, NOGO A, 당단백질 Po, 말초 마이엘린 단백질 22, 2'3'-사이클릭 뉴클레오타이드 3'-포스포디에스테라제, 및 이들의 단편, 변이체 및 혼합물과 같은 (단, 이들로 제한되지는 않음) 하나 이상의 다발성 경화증-연관된 항원에 노출시킴으로써 생체외에서 생성된다. 본 발명의 면역조절 세포는 마이엘린 염기성 단백질 펩타이드, 마이엘린 희돌기교세포 당단백질 및 단백지질 단백질, 및 서열번호 1-7로 표시되는 것과 같은 (단, 이들로 제한되지는 않음) 이들의 단편, 변이체 및 혼합물과 같은 (단, 이들로 제한되지는 않음) 하나 이상의 다발성 경화증-연관된 항원에 노출시킴으로써 생체외에서 생성되는 것이 바람직하다.
- [0044] 본 발명은 추가로, 본질적으로 상기 면역조절 세포를 포함하거나, 대안적으로 상기 면역조절 세포의 세포수로 적어도 80%, 85%, 90%, 95%를 포함하는 본 발명의 면역조절 세포의 집단을 제공한다.
- [0045] 한가지 관점에서, 본 발명은 본 발명의 면역조절 세포의 제조, 팽창 및/또는 생성을 위한 방법에 관한 것이다. 한가지 구체예에서, 상기의 면역조절 세포는 조절성 T-세포이며, 특히 바람직한 구체예에서 상기의 면역조절 세포는 Foxp3+CD4+CD25+ T-reg 및/또는 IL-10/TGF β -생산 조절성 Tr1 세포이다. 상기의 방법은 MSC 및/또는 섬유아세포를 포함하는 세포 집단을 하나 이상의 다발성 경화증-연관된 항원의 존재 하에서 PBLs와 접촉시키는 것을 포함한다.
- [0046] 본 발명의 방법에 따라 제조, 팽창 및/또는 생성된 면역조절 세포는 본 발명의 추가의 관점을 구성한다.
- [0047] 상기 면역조절 세포는 세포 표면 마커 CD62-L, FOXP3 및 CTLA4를 발현하는 것이 특히 바람직하다. 더 나아가, 이들은 CD127을 발현하지 않는 것, 즉 CD127에 대해서 음성인 것이 바람직하다.
- [0048] 따라서, 대안적인 구체예에서 본 발명은
- [0049] i) PBL 집단을 제공하고;
- [0050] ii) 상기 PBLs를 하나 이상의 다발성 경화증-연관된 항원의 존재 하에서 MSC 및/또는 섬유아세포를 포함하는 세포 집단과 접촉시키고;
- [0051] iii) 면역조절 세포 집단을 분리시키고;
- [0052] iv) 면역조절 세포 집단을 다발성 경화증을 갖는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하여, 다발성 경화증이 있는 대상체를 치료하는 방법을 제공한다.
- [0053] 용어 "MSC" 및/또는 "섬유아세포 세포 집단"은 다음 중의 임의의 것을 의미하기 위해서 사용되어야 한다: 본질적으로 중간엽 줄기 세포를 포함하는 다수의 세포; 본질적으로 섬유아세포를 포함하는 다수의 세포; 본질적으로 간엽 줄기 세포 및 섬유아세포를 포함하는 다수의 세포. 분리된 조절성 T-세포에 대한 상기 MSC 및/또는 섬유아세포 세포 집단 내의 세포의 수의 비는 각각 1:1 내지 1:150 사이인 것이 바람직하다. 더 나아가, PBLs에 대한 상기 MSC 및/또는 섬유아세포 내의 세포의 수의 비는 1:30 내지 1:5 사이인 것이 바람직하다. 따라서, 한가지 구체예에서 이것은 대략 매 25 PBLs당 1 MSC, 매 25 PBLs당 1 MSC 및 1 섬유아세포, 또는 매 10 PBLs당 1 MSC일 수 있다.
- [0054] 본 발명의 면역조절 세포를 제조, 팽창 및/또는 생성시키는 상기의 방법에서, MSC (예를 들어, MSC 및/또는 섬유아세포 세포 집단이나, 이들로 제한되지는 않음)는 시험관내에서 PBLs와 배양한다. 배양 기간은 바람직하게는 2 시간 내지 21일 사이이며, 더욱 바람직하게는 5일 내지 17일 사이이다. 추가의 구체예에서, 상기의 배양은 적어도 2, 4, 5, 또는 6일 또는 그 이상 동안 수행된다. 배양 기간이 약 15일인 것이 특히 바람직하다. 이러한 공동-배양은 면역조절 세포의 생산을 야기하여 대상체의 치료에 사용될 수 있는 상기 PBLs의 팽창된 집단을 제공할 것이다.
- [0055] 본 발명의 방법(들)은 바람직하게는, 온도 및 이산화탄소 조절된 환경에서, 예를 들어, 인큐베이터 내에서 수행된다. 상기 방법은 바람직하게는, 지역적 변이를 고려하여, 대략 포유동물 체온, 예를 들어, 37°C에서 수행된다. 또한, 본 발명의 방법은 이산화탄소 농도가 0% 내지 10%, 더욱 바람직하게는 1% 내지 5% 사이인 환경에서 수행하는 것이 바람직하다.
- [0056] PBLs의 제조.

- [0057] 본 발명의 상술한 방법에 의해서 제조된 면역조절 세포의 의도된 수용주에 관하여, 상기 방법에서 사용된 PBLs는 자가유래 또는 동종이계 기원일 수 있다. 그러나, 이들은 자가유래 기원인 것이 (즉, 이들이 추후에 면역조절 세포 또는 이들의 어떤 치료, 의약 또는 약제학적 조성물을 수용할 대상체로부터 유도된 것이) 바람직하다. 전혈로부터 말초혈액 백혈구를 분리시키는 방법은 본 기술분야에서 공지되어 있으며, 피콜-파크 (Ficoll-Hypaque) 및/또는 적혈구 용해 절차, 또는 LeucoPREP™ 세포 분리 기구 (Becton Dickinson & Co.) 및 HISTOPAQUE™ (Sigma Diagnostics) 용액과 같은 상업적으로 이용할 수 있는 수단의 사용을 포함한다.
- [0058] **섬유아세포.**
- [0059] 본 발명의 방법에서 사용된 것으로서 섬유아세포는 세포외 매트릭스의 합성 및 유지와 연관된 중간엽 유래 결합 조직이며, 활막 세포와 같은 섬유아세포를 포함하는 것으로 채택되어야 한다. 섬유아세포는 어떤 적합한 동물로부터라도, 가장 바람직하게는 인간으로부터 수득될 수 있다.
- [0060] **MSC.**
- [0061] 본 발명의 방법에서 사용된 MSC는 바람직하게는 결합 조직으로부터 유래한다. 바람직한 구체예에서, 상기 MSC는 지방 조직으로부터, 추가의 바람직한 구체예에서는 지방 조직의 기질 분획으로부터 유래한다. 대안적인 구체예에서, 상기 MSC는 히알린 연골의 연골 세포로부터 수득된다. 추가의 구체예에서, 상기 MSC는 피부로부터 수득된다. 또 다른 구체예에서, 상기 MSC는 골수로부터 수득된다.
- [0062] MSC는 어떤 적합한 동물, 가장 바람직하게는 인간으로부터의 결합 조직의 어떤 적합한 공급원으로부터라도 수득될 수 있다. 상기 세포는 바람직하게는 출생-후의, 비-병원성 포유동물 공급원 (예를 들어, 설치류; 영장류)으로부터 수득되는 것이 바람직하다. 바람직한 구체예에서, MSC는 지방 조직의 기질 분획, 히알린 연골, 골수 또는 피부와 같은 (단, 이들로 제한되지는 않음) 결합 조직의 공급원으로부터 수득된다. 가장 바람직하게는, 상기 방법의 MSC는 비-병원성의 출산-후 인간 기질성 지방 조직으로부터 수득된다.
- [0063] 본 발명의 방법에 의해서 제조된 것으로서 면역조절 세포의 의도된 수용주에 관하여, 상술한 방법에서 사용된 MSC 및/또는 섬유아세포는 동종이계 (공여체) 또는 자가유래 (대상체) 기원의 것일 수 있다. 상기 방법의 한가지 구체예에서, 상기 MSC 및/또는 섬유아세포는 동종이계 기원의 것이다.
- [0064] 본 발명의 방법에서 사용된 MSC 및/또는 섬유아세포는 바람직하게는, (i) 이들이 APCs에 대해서 특이적인 마커를 발현하지 않고, (ii) 이들이 구성적으로 IDO를 발현하지 않으며, (iii) 이들이 IFN-감마에 의한 자극에 대해서 IDO를 발현하고, MSC의 경우에는 (iv) 이들이 적어도 2 개의 세포 계통으로 분화되는 능력을 나타낸다는 것을 특징으로 한다.
- [0065] **MSC 표현형 마커.**
- [0066] 본 발명의 방법에서 사용된 MSC는 바람직하게는, APC 표현형과 연관된 마커에 대해서 음성이다. 따라서, 상기의 MSC는 다음의 마커 CD 11b; CD 11c; CD1 14; CD45; HLAII 중의 적어도 1, 2, 3, 4 개, 또는 바람직하게는 이를 모두에 대해서 음성인 것이 바람직하다. 더욱이, MSC는 바람직하게는 다음의 세포 표면 마커 CD31; CD34; CD 133 중의 적어도 1, 2 개, 또는 바람직하게는 이를 모두에 대해서 음성이다.
- [0067] 특별한 구체예에서, 본 발명의 방법에서 사용된 MSC는 바람직하게는, 이들이 다음의 세포 표면 마커 CD9, CD44, CD54, CD90 및 CD 105 중의 적어도 1, 2, 3, 4 개, 또는 바람직하게는 이를 모두를 발현하는 (즉, 이들에 대해서 양성인) 것을 특징으로 한다. 바람직하게는, MSC는 이들이 상기 세포 표면 마커 (CD9, CD44, CD54, CD90 및 CD 105) 중의 적어도 1, 2, 3, 4 개, 및 바람직하게는 이를 모두의 상당한 발현 레벨을 갖는 것을 특징으로 한다.
- [0068] 임의로, MSC는 또한 세포 표면 마커 CD 106 (VCAM-1)에 대해서 음성일 수도 있다. 본 발명의 방법에서 사용하는데 적용한 MSC의 예는 본 기술분야에서, 예를 들어, 이에 의해서 온전히 참고로 포함된 국제특허출원 WO2007/039150에 기술되어 있다.
- [0069] **분화.**
- [0070] 본 발명의 방법에서 사용하는데 적합한 MSC는 증식하고, 적어도 2 개, 더욱 바람직하게는 3, 4, 5, 6, 7 개 또는 그 이상의 세포 계통으로 분화되는 능력을 나타낼 수 있다. 상기 MSC가 분화될 수 있는 세포 계통의 예시적인 비-제한적 예로는 골세포, 지방 세포, 연골 세포, 건세포 (tenocytes), 근세포, 심근 세포, 조혈-지지 기질 세포 (hematopoietic-supporting stromal cells), 내피 세포, 뉴론, 성상세포 및 간세포가 포함된다. MSC는

통상적인 방법에 의해서 증식하고, 다른 계통의 세포로 분화할 수 있다. 분화된 세포를 그들의 미분화 대응물로부터 확인하고, 이어서 분리시키는 방법은 또한, 본 기술분야에서 잘 알려진 방법에 의해서 수행될 수 있다.

[0071] MSC 세포 배양.

상기의 MSC는 또한, 생체외에서 팽창될 수도 있다. 즉, 분리시킨 후에 상기 MSC는 배양 배지 내에서 생체외 증식하도록 유지 및 허용될 수 있다. 이러한 배지는 예를 들어, 항생제 (예를 들어, 100 유니트/ml 페니실린 및 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 스트렙토마이신)가 있거나 없는 둘베코의 변형된 이글 배지 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium; DMEM), 및 2 mM 글루타민으로 구성되고, 2-20% 태아 소 혈청 (FBS)으로 보충된다. 배지 및/또는 배지 보충물의 농도를 사용된 세포에 대한 필요에 따라 변형시키거나 변조시키는 것은 본 기술분야에서 숙련된 전문가의 기술의 범위 내에 있다. 혈청은 종종, 생존 및 팽창에 필요한 세포성 및 비-세포성 인자 및 성분들을 함유한다. 혈청의 예로는 태아 소 혈청 (FBS), 소 혈청 (BS), 송아지 혈청 (CS), 태아 송아지 혈청 (FCS), 신생 송아지 혈청 (NCS), 염소 혈청 (GS), 말 혈청 (HS), 돼지 혈청, 양 혈청, 토끼 혈청, 랙트 혈청 (RS) 등이 포함된다. 또한, 상기 MSC가 인간 기원의 것이라면 세포 배양 배지를 인간 혈청, 바람직하게는 자가유래 기원의 것으로 보충하는 것도 본 발명의 범위 내의 것이다. 보체 캐스케이드 (cascade)의 성분을 불활성화시키는 것이 필요하다고 생각된다면, 혈청을 55-65°C에서 열-불활성화시킬 수 있는 것으로 이해된다. 혈청 농도의 변조, 배양 배지로부터 혈청의 회수를 또한 사용하여 하나 이상의 바람직한 세포 타입의 생존을 촉진시킬 수도 있다. 바람직하게는, 상기 MSC는 약 2% 내지 약 25%의 PBS 농도로부터 이득을 얻을 것이다. 또 다른 구체예에서, MSC는 일정한 조성의 배양 배지 내에서 팽창될 수 있으며, 여기에서 혈청은 혈청 알부민, 혈청 트랜스페린, 셀레늄, 및 본 기술분야에서 공지된 것으로 인슐린, 혈소판-유래 성장 인자 (PDGF), 및 염기성 섬유아세포 성장 인자 (bFGF)를 포함한 (단, 이들로 제한되지는 않음) 재조합 단백질의 조합으로 대체된다.

[0073] 다수의 세포 배양 배지는 이미 아미노산을 함유하지만, 일부는 세포의 배양 전에 보충을 필요로 한다. 이러한 아미노산에는 L-알라닌, L-아르기닌, L-아스파르트산, L-아스파라긴, L-시스테인, L-시스틴, L-글루탐산, L-글루타민, L-글리신 등이 포함되나, 이들로 제한되지는 않는다.

[0074] 또한, 항미생물제가 박테리아, 마이코플라즈마 및 진균 오염을 경감시키기 위해서 전형적으로 세포 배양에 사용된다. 전형적으로, 사용된 항생제 또는 항진균성 화합물은 페니실린/스트렙토마이신의 혼합물이지만, 또한 암포테리신 (Fungizone®), 암피실린, 젠타마이신, 블레오마이신, 하이그로마이신, 카나마이신, 미토마이신 등을 포함할 수도 있으며, 이들로 제한되지는 않는다.

[0075] 호르몬이 또한 유리하게 세포 배양에 사용될 수도 있으며, D-알도스테론, 디에틸스틸베스트롤 (DES), 텍사메타손, b-에스트라디올, 하이드로코르티손, 인슐린, 프로락틴, 프로게스테론, 소마토스타틴/인간 성장 호르몬 (HGH) 등을 포함하나, 이들로 제한되지는 않는다.

[0076] 팽창된 세포.

[0077] 한가지 구체예에서, MSC 및/또는 섬유아세포는 본 발명의 방법에서 사용하기 전에 팽창되어야 할 수 있다. 세포 팽창을 위한 방법은 본 기술분야에서 공지되어 있다.

[0078] 방사선 조사된 세포.

[0079] 한가지 구체예에서, MSC 및/또는 섬유아세포는 본 발명의 방법에서의 그들의 사용 전에 방사선 조사되어야 한다. 세포의 방사선 조사는 그들의 증식능 및 생존 시간을 감소시킨다.

[0080] 방사선 조사는 감마 방사선 조사장치와 같은 이온화 방사선의 적합한 제어 공급원을 사용하여 수행될 수 있다. 방사선 조사 조건은 MSC 및/또는 섬유아세포의 장기간 성장 정지를 야기하는 방사선 용량을 부여하는데 필요한 노출 시간을 결정하기 위해 본 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해 실험적으로 조정되어야 한다. 한가지 구체 예에서, 상기의 방사선 용량은 1-100 Gy; 5-85 Gy, 10-70 Gy, 12-60 Gy로 구성된 그룹으로부터 선택 범위 이내 이지만, 상기의 방사선 용량은 15-45 Gy의 범위 내인 것이 특히 바람직하다.

[0081] IFN-감마 자극된 세포.

[0082] 한가지 구체예에서, MSC 및/또는 섬유아세포는 본 발명의 방법에서 사용하기 전에 인터페론 감마에 의해서 자극될 수 있다. MSC 자극을 위한 MSC의 IFN-감마 처리는 본 기술분야에서 공지되어 있으며, 본 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 수행될 수 있다.

[0083] 미토마이신 C 처리된 MSC.

- [0084] 한가지 구체예에서, MSC 및/또는 섬유아세포는 본 발명의 방법에서 사용하기 전에 미토마이신 C로 처리될 수 있다. MSC의 미토마이신 C 처리는 본 기술분야에서 공지되어 있으며, 본 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 수행될 수 있다.
- [0085] 더욱이, 필요한 경우에 MSC 및/또는 섬유아세포는 본 발명의 방법에서 사용하기 전에 방사선 조사, IFN-감마 및 미토마이신 C로 구성된 그룹으로부터 선택된 다수의 처리에 적용될 수 있다.
- [0086] 상기 MSC의 유지 조건은 또한, 세포를 미분화된 형태로 유지시키도록 허용하는 세포성 인자를 함유할 수 있다. 분화시키기 전에 세포 분화를 억제하는 보충물을 배양 배지로부터 제거하여야 한다는 것은 본 기술분야에서 숙련된 전문가에게 명백하다. 또한, 모든 세포가 이들 인자를 필요로 하지는 않는다는 것도 명백하다. 실제로, 이들 인자는 세포 타입에 따라서 원치 않는 효과를 유발할 수 있다.
- [0087] 항원 특이적 면역조절 세포의 제조를 위한 방법:
- [0088] 항원(들).
- [0089] 면역조절 세포의 제조 및/또는 생성을 위한 상기의 방법에서 사용된 다발성 경화증-연관된 항원은 단일 항원, 다수의 항원, 또는 상기의 항원 또는 항원들을 발현하고/하거나 제시하는 세포 타입일 수 있다. 한가지 구체예에서, 항원은 자가면역을 앓고 있는 환자로부터 유래하는 자가항원의 혼합물, 펩타이드 항원, 핵산, 변화된 펩타이드 리간드, 재조합 단백질 또는 이들의 단편을 포함하는 그룹으로부터 선택된다.
- [0090] 한가지 구체예에서, 상기 항원은 관절염과 연관된다 (예를 들어, 콜라겐 항원이나 이들로 제한되지는 않음).
- [0091] 한가지 구체예에서, 상기의 다발성 경화증-연관된 항원은 마이엘린 염기성 단백질, 마이엘린 결합된 당단백질, 마이엘린 희돌기교세포 단백질, 단백지질 단백질, 희돌기교세포 마이엘린 올리고단백질, 마이엘린 결합된 희돌기교세포 염기성 단백질, 희돌기교세포 특이적 단백질, 열 쇼크 단백질, 희돌기교세포 특이적 단백질, NOGO A, 당단백질 Po, 말초 마이엘린 단백질 22, 2'3'-사이클릭 뉴클레오타이드 3'-포스포디에스테라제, 및 이들의 단편, 변이체 및 혼합물을 포함하는 그룹으로부터 선택된다.
- [0092] 추가의 구체예에서, 상기의 다발성 경화증-연관된 항원은 마이엘린 염기성 단백질 펩타이드, 마이엘린 희돌기교세포 당단백질 및 단백지질 단백질, 및 이들의 단편, 변이체 및 혼합물을 포함하는 그룹으로부터 선택된다.
- [0093] 추가의 구체예에서, 상기의 다발성 경화증-연관된 항원은 마이엘린 염기성 단백질 (MBP13-32, MBP 83-99, MBP 111-119, MBP 146-170), 마이엘린 희돌기교세포 당단백질 (MOG 1-20, MOG 35-55) 및 단백지질 단백질 (PLP 139-154) 및 이들의 단편, 변이체 및 혼합물을 포함하는 그룹으로부터 선택된다.
- [0094] 이러한 항원의 선택, 분리, 정제 및 제조를 위한 방법은 본 기술분야에서 숙련된 전문가에게 공지되어 있다.
- [0095] 이하에서, 용어 "본 발명의 면역조절 세포"는 면역조절 세포 및 항원 특이적 면역조절 세포 둘 다를 포함한, 본 명세서에 기술된 본 발명의 방법에 의해서 제조, 팽창 및/또는 생성된 모든 면역조절 세포를 의미하는 것으로 채택된다. 한가지 구체예에서, 상기의 면역조절 세포는 조절성 T-세포이며, 특히 바람직한 구체예에서 상기의 면역조절 세포는 Foxp3+CD4+CD25+ T-reg 및/또는 IL-10/TGFb-생산 조절성 Tr1 세포이다.
- [0096] 추가의 작용제.
- [0097] 본 발명의 바람직한 구체예에서, 면역조절 세포의 제조, 팽창 또는 생성을 위한 방법은 본 발명의 면역조절 세포의 수율을 증가시키는데 적합한 하나 이상의 작용제의 존재 하에서 수행된다. 바람직하게는, MSC 및/또는 섬유아세포를 PBLs와 접촉시키는 단계를 상기의 작용제의 존재 하에서 수행한다. 이러한 작용제는 바람직하게는, 소분자, 사이토킨 및/또는 성장 인자와 같은 (단, 이들로 제한되지는 않음) MSC 자극성 인자이다. 적합한 작용제에는 IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, IL-30, LPS, G-CSF, M-CSF, GMC-SF, 키트-L, VEGF, Flt-3 리간드, PDGF, FGF-2, TPO, IL-11, IGF-1, MGDF, NGF, TGF-b, HMG, 탈리도마이드, 5-아자사이티딘, 트리코스타틴-A, 밸프로산, 성장 호르몬, 인간 융모성 고나도트로핀, 뇌하수체 아데닐레이트 사이클라제 활성화 폴리펩타이드 (PACAP), 세로토닌, 글 형성 단백질 (BMP), 표피 성장 인자 (EGF), 변형 성장 인자 알파 (TGF.알파.), 섬유아세포 성장 인자 (FGF)로 구성된 그룹으로부터 선택된 것이 포함되나, 이들로 제한되지는 않는다.
- [0098] 상기 방법의 한가지 구체예에서, 작용제는 LPS (그램 음성 박테리아 내독소 리포폴리사카라이드)이다. LPS 농도는 0.01 내지 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 사이인 것이 바람직하며, 더 나아가 상기의 농도는 1 내지 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 사이, 예를

들어, 약 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 인 것이 바람직하다.

[0099] 대안적인 구체예에서, 상기의 작용제는 GM-CSF 및 IL-4이다. GM-CSF 및 IL-4는 둘 다 사이토킨이다. 그의 농도는 1 내지 2000 IU/mL 사이인 것이 바람직하며, 더 나아가 상기의 농도는 500 내지 1000 IU/mL 사이인 것이 바람직하다.

[0100] 상기 방법의 추가의 구체예에서, 작용제 IL-4 및 GM-CSF는 둘 다 본 발명의 방법에서 사용된다. IL-4의 농도에 대한 GM-CSF의 농도의 비는 5:1 또는 1:1 사이이고, 상기 작용제 각각의 농도는 1 내지 2000 IU/mL 사이인 것이 바람직하며, 더 나아가 상기의 농도는 500 내지 1000 IU/mL 사이인 것이 바람직하다. 따라서, 한가지 구체예에서 이것은 500 IU/mL IL-4에 대해서 약 1000 IU/mL GM-CSF일 수 있다.

면역조절 세포 선택.

[0102] 특정의 관점에서, 본 발명은 수용주 대상체에게 투여하는데 적합한 면역조절 세포를 제공한다. 따라서, 상기의 면역조절 세포는 상대적 표현형적 균질성을 갖는 것이 바람직하다. 따라서, 본 발명의 방법의 임의의 단계에서 본 발명의 면역조절 세포는 불균질 세포 배양물로부터 선택된다. 본 발명의 면역조절 세포 및 항원 특이적 면역조절 세포는 본 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 공지된 통상적인 수단에 의해서 선택 및 분리될 수 있다. 이러한 기술의 예로는 FACS 및 면역자기성 세포 분류 (immunomagnetic cell sorting)가 포함된다.

[0103] 한가지 구체예에서, 본 발명은 본 발명의 세포의 확인을 위한 방법 또는 시험을 제공한다. 상기의 방법은

i) 분리된 세포 집단을 제공하고;

ii) CD62-L, FOXP3 및 CTLA4로 구성된 그룹으로부터 선택된 1, 2 개 또는 모든 마커의 발현을 결정하고;

iii) 상기 마커 중의 적어도 1, 2 또는 3 개에 대해서 양성인 세포를 선택하는 단계를 포함한다.

[0107] i)의 분리된 세포 집단은 바람직하게는 본 발명의 방법에 따라 생성된 세포 집단이다. ii) 및 iii)에 따라 세포를 검출 및 선택하는 방법은 예를 들어, 이전에 기술된 바와 같이 본 기술분야에서 잘 알려져 있다. 추가의 구체예에서, 단계 ii)에서는 마커 CD127의 발현이 또한 결정되며, 단계 iii)에서는 상기 마커의 발현에 대해서 음성인 세포가 선택된다.

세포 팽창.

[0109] 상기 방법의 한가지 구체예에서, 본 발명의 면역조절 세포는 이어서 본 기술분야에서 공지된 배양 기술, 또는 본 발명에 기술된 방법을 사용하여 생체외에서 수가 팽창될 수 있다. 대체 치료 방법으로서, 본 발명의 면역조절 세포는 생체내에서 직접 투여될 수도 있다.

세포 저장.

[0111] 상기 세포는 밀폐된 용기 내에서 실온에서 저장, 또는 냉동보존을 포함하는 (단, 이들로 제한되지는 않음) 본 기술분야에서 공지된 어떤 방법에 의해서라도 보존될 수 있다.

항원 특이적 면역조절 세포 또는 그의 집단의 용도.

[0113] 본 발명은 또한, 다발성 경화증, 가장 바람직하게는 PBLs가 수득된 대상체의 치료에 있어서의 본 발명의 방법에 따라 제조, 팽창 및/또는 생성된 면역조절 세포의 용도를 제공한다.

[0114] 따라서, 또 다른 관점에서 상기의 면역조절 세포가 의약으로 사용된다.

[0115] 이하에서, 용어 "본 발명의 면역조절 세포"는 팽창 및 비-팽창된 면역조절 세포 및 항원 특이적 면역조절 세포 둘 다를 포함하는, 본 명세서에 기술된 본 발명의 방법에 의해서 제조, 팽창 및/또는 생성된 모든 면역조절 세포를 의미하는 것으로 채택되어야 한다.

약제학적 조성물.

[0117] 본 발명은 다발성 경화증과 연관된 하나 이상의 증상의 치료, 예방 및 개선을 위한 약제학적 조성물을 제공한다.

[0118] 따라서, 또 다른 관점에서 본 발명은 본 발명의 면역조절 세포 및 약제학적 담체를 포함하는 약제학적 조성물 (이하에서는, 본 발명의 약제학적 조성물로 칭한다)에 관한 것이다. 세포의 상기 타입의 2 개 또는 그 이상의 조합이 본 발명에 의해서 제공된 약제학적 조성물의 범주 내에 포함된다.

[0119]

본 발명의 약제학적 조성물은 하나 이상의 예방적 또는 치료학적 작용제 (즉, 본 발명의 면역조절 세포)의 예방적 또는 치료학적 유효량, 및 약제학적 담체를 포함한다. 적합한 약제학적 담체는 본 기술분야에서 공지되어 있으며, 바람직하게는 US 연방 또는 주정부의 관리기관에 의해서 승인되거나, 동물, 더욱 특히는 인간에게서 사용을 위해 미국 약전 또는 유럽 약전, 또는 다른 일반적으로 인정되는 약전에서 열거된 것이다. 용어 "담체"는 치료학적 작용제와 함께 투여되는 희석제, 보조제, 부형제 또는 비허클을 나타낸다. 조성물은 필요한 경우에, 또한 미량의 pH 완충제를 함유할 수 있다. 적합한 약제학적 담체의 예는 문헌 ["Remington's Pharmaceutical Sciences" by E W Martin]에 기술되어 있다. 이러한 조성물은 대상체에 대한 적절한 투여를 위한 형태를 제공하도록 적합한 양의 담체와 함께, 바람직하게는 정제된 형태의 예방적 또는 치료학적 작용제의 예방적 또는 치료학적 유효량을 함유할 것이다. 제제는 투여의 모드에 적합하여야 한다. 바람직한 구체예에서, 약제학적 조성물은 무균성이며, 대상체, 바람직하게는 동물 대상체, 더욱 바람직하게는 포유동물 대상체, 가장 바람직하게는 인간 대상체에게 투여하는데 적합한 형태이다.

[0120]

본 발명의 약제학적 조성물은 다양한 형태일 수 있다. 이들에는 예를 들어, 동결건조된 제제, 액체 용액 또는 혼탁액, 주사용 및 주입용 용액 등과 같은 고체, 반-고체, 및 액체 투약형이 포함된다. 바람직한 형태는 의도된 투여 모드 및 치료학적 적용에 따라 좌우된다.

[0121]

치료법에서의 세포의 용도.

[0122]

필요한 대상체에 대한 본 발명의 면역조절 세포 집단, 또는 이를 함유하는 약제학적 조성물의 투여는 통상적인 수단에 의해서 수행될 수 있다. 한가지 구체예에서, 본 발명의 조성물은 전신 투여용으로 (예를 들어, 직장, 비내, 볼점막 (buccally), 질내, 이식된 저장소를 통해서, 또는 흡입에 의해서) 제조될 수 있다. 또 다른 구체 예에서, 본 발명의 조성물은 국소 투여용으로 제조될 수 있다. 본 발명의 조성물은 비경구 경로로 투여될 수도 있다. 조성물은 피하, 피내, 정맥내, 근육내, 관절내, 활막내, 흉골내, 초내, 병소내, 림프내 및 두개내 경로에 의해서 투여될 수 있다.

[0123]

추가의 구체예에서, 상기 세포 집단은 시험관내 (예를 들어, 이식 또는 접목 (engrafting) 시키기 전의 이식편 (graft)으로서) 또는 생체내에서 동물 조직에 직접적으로 세포를 원하는 조직에 전이시키는 것을 포함하는 방법에 의해서 대상체에게 국소적으로 투여된다. 세포는 일반적으로 조직 타입에 따라 달라질 수 있는 적절한 방법에 의해서 원하는 조직에 전이시킬 수 있다. 예를 들어, 세포는 세포를 함유하는 배양 배지에 이식편을 입욕시킴으로써 (또는 이것을 주입함으로써) 이식편에 전이시킬 수 있다. 대안적으로, 세포는 조직 내의 원하는 부위 상에 접종하여 집단을 정착시킬 수 있다. 세포는 카테터 (catheters), 투관침 (trocars), 카눌라 (cannulae), 스텐트 (stents) (이것은 세포로 접종될 수 있다) 등과 같은 장치를 사용하여 생체내의 부위에 전위시킬 수 있다.

[0124]

본 발명의 세포 집단 및 약제학적 조성물은 병용 요법으로 사용될 수 있다. 특정의 구체예에서, 병용 요법은 하나 이상의 항염증제에 대해서 불응성인 염증성 장애가 있는 대상체에게 투여된다. 또 다른 구체예에서, 병용 요법은 비스테로이드성 항염증성 약물 (NSAIDs), 스테로이드성 항염증성 약물, 베타-작용제, 항콜린제, 및 메틸 크산틴을 포함하는 (단, 이들로 제한되지는 않음) 다른 타입의 항염증제와 함께 사용된다. NSAIDs의 예로는 이부프로펜, 셀레톡시브, 디클로페낙, 데토돌락, 페노프로펜, 인도메타신, 케토랄락, 옥사프로진, 나부멘تون, 선탁, 틀멘틴, 로페록시브, 나프록센, 케토프로펜, 나부메톤 등이 포함되나, 이들로 제한되지는 않는다. 이러한 NSAIDs는 사이클로옥시게나제 효소 (예를 들어, COX-1 및/또는 COX-2)를 억제함으로써 작용한다. 스테로이드성 항염증성 약물의 예로는 글루코코르티코이드, 텍사메타손, 코르티손, 하이드로코르티손, 프레드니손, 프레드니솔론, 트리암시놀론, 아줄프[이오타]딘, 및 트롬복산 및 류코트리엔과 같은 아이코사노이드가 포함되나, 이들로 제한되지는 않는다. 인플릭시마브 (Infliximab)와 같은 모노클로날 항체가 사용될 수도 있다.

[0125]

상기 구체예에 따라서, 본 발명의 병용 요법은 이러한 항염증제의 투여 전에, 동시에 또는 후에 사용될 수 있다. 더 나아가, 이러한 항염증제는 여기에서 림프양 조직 유도제 및/또는 면역조절 세포로 특정화된 작용제는 포함하지 않는다.

[0126]

키트.

[0127]

추가의 구체예에서, 본 발명은 본 발명의 면역조절 세포로 대상체를 치료하는데 사용하는 키트를 제공한다. 상기 키트는 i) 본 발명의 방법에 따라 제조, 팽창 및/또는 생성된 면역조절 세포 집단, 또는 그의 약제 또는 약제학적 조성물, 및 ii) 시린지, 주사 장치, 카테터, 투관침, 카눌라 및 스텐트와 같은 (단, 이들로 제한되지는 않음) 상기 세포를 투여하기 위한 장치를 포함한다. 추가의 구체예에서, 본 발명의 상기 키트는 iii) 대상체의

치료에 사용하기 위한 설명서를 포함할 수 있다.

[0128] 본 발명의 다양한 구체예는 본 명세서에 기술된 발명을 설명하나 제한하지는 않는 이하의 실시예에 의해서 설명될 것이다.

[0129] 실시예

[0130] 본 실험의 목적은 다발성 경화증의 치료를 위해 동종이계 지방조직 유래 줄기 세포의 존재 하에서 중추신경계와 관련된 단백질로부터 유도된 웨타이드를 사용하여 항원 특이적 Treg 세포를 "시험관내에서" 생성시키고, 더 나아가 이를 억제자 활성을 폴리클로날 Tregs와 또는 유도된 웨타이드의 존재 하에서 생성된 항원 특이적-Tregs와 비교함으로써 특이성을 입증하기 위한 것이었다.

[0131] 재료 및 방법

[0132] 건강한 공여체 샘플: 지질흡인물 (lipoaspirates)은 건강한 성인 공여체로부터의 인간 지방 조직으로부터 수득하였으며, 문헌 [DelaRosa *et al.* "Requirement of IFN-gamma mediated Indoleamine 2,3 dioxygenase expression in the modulation of lymphocyte proliferation by human adipose-derived stem cells." *Tissue Eng Part A.* 2009]에 기술된 바와 같이 처리하였다. hASC는 4-12 계대에서 사용되었다. 연막은 National Transfusion Centre of the Comunidad Autonoma of Madrid에 의해서 제공되었다. 말초혈액 램프구는 피콜 파크 플러스 (Ficoll Paque Plus; GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala)를 사용한 밀도 원심분리 구배에 의해서 연막으로부터 분리되었다.

[0133] 웨타이드 선택:

[0134] 웨타이드는 MHC II와 관련하여 제시되는 그들의 능력 및 그들의 면역원성을 기초로 하여 선택되었다. 이를 필요조건을 기초로 하여, 7 개의 웨타이드가 선택되었으며, 공여체당 하나의 웨타이드를 사용하는 대신에 7 개의 웨타이드의 풀 (pool)을 Treg 유도를 위한 저친화성 조건 (0.1 마이크로몰의 낮은 농도를 의미함) 하에서 사용하였다.

[0135] 마이엘린 염기성 단백질 웨타이드 (MBP13-32, MBP 83-99, MBP 111- 119, MBP 146-170), 마이엘린 희돌기교세포 당단백질 (MOG 1-20, MOG 35-55) 및 단백지질 단백질 (PLP 139-154)을 동일한 농도로 통합하여 DMSO 중의 1 mM의 최종 저장 농도로 만들었다. 통합 웨타이드는 0.1 마이크로몰로 배양에서 사용되었다.

[0136] 사용된 웨타이드는 표 1에 나타내었다.

[0137] [표 1]

마이엘린 염기성 단백질 MBP		
MBP (13-32)	KYLATASTMDHARHGFLPRH	서열번호 1
MBP (83-99)	ENPVVHFKNIVTPRTP	서열번호 2
MBP (111-119)	LSRFSWGAEGQRPGPGYGG	서열번호 3
MBP (146-170)	AQGTLSKIFKLGGRDSRGSPMARR	서열번호 4
마이엘린 희돌기교세포 당단백질		
MOG (1-20)	GQFRVIGPRHPIRALVGDEV	서열번호 5
MOG (35-55)	MEVGWYRPPFSRVVHLRYRNGK	서열번호 6
단백지질 단백질		
PLP (139-154)	HCLGKWLGHPDKFVGI	서열번호 7
인플루엔자 헤마글루터닌		
FLUHA (306-318)	PKYVKQNTLKLAT	서열번호 8

[0138]

[0139] 실시예 1: ASC 매개된 Treg 생성 및 특징화

[0140] 일단 특이적-Tregs의 생성을 위해서 사용된 반응성 웨타이드의 풀을 선택하여, hASC-매개된 MS-특이적 Treg 팽창을 수행하였다.

[0141] PBMCs를 MS 통합 웨타이드의 존재 및 부재 하에서, 완전 배지 및 IL-2 (100 UI/ml)에 의해서 hASCs와 함께 공동

-배양하였다. 실험을 시작하기 48 시간 전에 ASCs를 FBS가 보충된 DMEM 배지를 사용하여 웰당 40,000 세포로 플레이팅하였다. 실험을 시작하기 24 시간 전에 PBMCs를 해동시키고, 완전 RPMI와 함께 비-부착성 웰 플레이트(단핵구의 부착을 피하기 위함) 상에서 휴식 조건 하에 두었다. 0일에 ASCs로부터의 배지를 수확하고, PBMCs를 RPMI와 함께 mL당 100만으로 ASC 웰 플레이트에 첨가하였다. 각각의 웰은 2 mL의 용적을 가졌다. ASC와 PBMC의 비는 200만 PBMCs당 40,000 (1:50)이었다. 공동-배양은 0.1 마이크로몰의 MS 통합 웹타이드의 존재 및 부재 하에, 37°C 및 5% CO₂의 배양기 내에서 완전 배지 및 IL-2 (100 UI/mL)와 hASCs를 사용하여 수행하였다. 배지는 매 3일마다 새로이 공급하였다. 공동-배양의 15일 후에 세포를 수확하고, 표현형 및 기능적 특정화를 위해서 사용하였다.

[0142] 공동-배양의 15일 후에, 세포를 수확하였다. 세포의 일부를 사용하여 Treg 표현형을 결정하기 위한 표현형 특정화를 수행하였다. 세포의 나머지를 사용하여 CFSE 염색된 자가유래 PMCS에 대한 증식시험을 수행하였다. hASC 및 MS 통합 웹타이드와의 공동-배양으로부터 분리된 Treg 세포를 TR1으로 칭하였다. 웹타이드가 없이 hASC와의 공동-배양으로부터 분리된 Treg 세포를 TR2로 칭하였다. hASC의 부재 하 및 통합 웹타이드의 존재 하에서 분리된 Treg 세포는 TR3으로 칭하였다. hASC 및 통합 웹타이드의 부재 하에서 분리된 Treg 세포는 TR4로 칭하였다.

[0143] 두 개의 상이한 특정화 실험이 수행되었다.

[0144] 제1 실험은 4 개의 상이한 공동-배양에 대해서 수행되었다:

[0145] 1. PBMC + hASCs + IL-2 (TR2)

[0146] 2. PBMC + hASCs + 웹타이드 풀 + IL-2 (TR1)

[0147] 3. PBMC + 웹타이드 풀 + IL-2 (TR3)

[0148] 4. PBMC + IL-2 (TR4)

[0149] 배양물은 15일 동안 유지시켰다. 그 후에, 4 개의 공동-배양물로부터의 세포를 표면 마커 (CD25, CD4, CD103, GITR, CD127, 세포내 FOXP-3,...)에 대해 멀티파라메터 면역형광법에 의해서 특정화하였으며, CD4+CD25bright 서브세트는 TR1 및 TR2 공동-배양 세포 상에서 면역자기성 분리에 의해서 분리시켰으며, 이것은 이하의 기능적 실험에서 더 분석하였다.

[0150] 제2 실험은 TR1 분리된 Tregs 상에서 수행되었다.

[0151] 1. PBMC + hASCs + 웹타이드 풀 + IL-2: 분리된 Tregs (TR1)

[0152] 배양물은 15일 동안 유지시켰다. 그 후에, 세포를 표면 마커 (CD25, CD4, 및 세포내 FOXP-3)에 대해 멀티파라메터 면역형광법에 의해서 특정화하였으며, CD4+CD25bright 서브세트는 면역자기성 분리를 사용하여 분리시켰다.

실시예 2: ASC-매개된 마이엘린-특이적 Treg의 기능적 평가

[0153] CFSE 염색: 3 명의 공여체로부터의 PBMCs를 30 μM CFSE (Sigma Aldrich)로 염색하고, 37°C에서 15 분 동안 배양하였다. 비결합된 CFSE를 동량의 FCS (Invitrogen)를 사용하여 훈청하고, 이어서 세포를 PBS로 2 회 세척하였다. CFSE-표지된 자가유래 PBMCs 2exp10⁵ 세포/웰을 1:1, 1:4, 1:20 및 1:50의 억제자 (S) 비로 편평-바닥 96-웰 플레이트의 웰에서 배양하였다. TR1 및 TR2 집단은, 이들이 공동-배양 시험에서 PBMCs의 증식을 상당히 억제한 경우에, 억제를 매개하는 것으로 생각되었다. 모든 CFSE 데이터는 Cell QuestTM 소프트웨어를 사용하여 분석하였다.

[0154] 마이엘린 특이적-Treg 세포의 억제능은 자가유래 PBMCs의 CFSE 증식시험에 의해서 시험하였다.

[0155] 억제의 백분율은 100% 증식 또는 0% 억제의 대조 배양물을 참고로 하여 1 세대 이상 분열한 세포의 백분율을 사용함으로써 계산되었다.

기능적 시험 1

[0156] PBMC 세포를 웰당 200,000 세포의 최종 수에 도달하는 증가하는 농도의 분리된 Treg 세포 (TR1 및 TR2)와 함께 96-웰 플레이트 내에서 배양하였다. 공동-배양물은 6일 동안 정치시켰다.

[0157] 자가유래 림프구의 증식을 유도하기 위해서, TR1 및 TR2 세포 집단 각각을 두 가지의 상이한 자극, 즉 폴리클로

날 자극 (팬(pan) T 세포 활성화/팽창 키트) 및 항원 특이적 자극 (MS 특이적 Treg의 생성에 사용된 통합 웨타이드를 사용)으로 처리하였다. 마지막으로, 세포를 수확하고, CFSE 변화를 FACS에 의해서 분석하였다.

[0160] 기능적 시험 2

100,000 개의 자가유래 PBMCs를 증가하는 수의 MS-특이적-Tregs (TR1)의 존재 하에, ml당 50 UI의 IL-2와 함께 통합 MS 웨타이드 또는 부적절한 웨타이드 (FLU-HA) 하에서 6일에 걸쳐 배양하여 자가유래 PBMCs의 증식을 유도하였다. 그 후, 세포를 수확하여 CD3에 대해서 염색하였다. CFSE 변화는 FACS에 의해서 분석하였다.

[0162] 결과

[0163] Treg 수 및 표현형에 대한 웨타이드 특이성의 효과

hASC 및 MS 통합 웨타이드와의 공동-배양으로부터 분리된 Treg 세포는 TR1로 칭하였다. 웨타이드가 없이 hASC 와의 공동-배양으로부터 분리된 Treg 세포는 TR2로 칭하였다. hASC의 부재 하, 및 통합 웨타이드의 존재 하에서 분리된 Treg 세포는 TR3으로 칭하였다. hASC 및 통합 웨타이드의 부재 하에서 분리된 Treg 세포는 TR4로 칭하였다.

도 1에 나타낸 바와 같이, TR1 및 TR2 공동-배양물은 hASC의 부재 하에서 유도된 PBMCs (TR3, TR4)보다 Treg 세포의 상당히 더 큰 백분율을 나타내었다. 이들 데이터는 항원 유래 PBMC 배양물이 비-유래 배양물과 유사한 Treg 백분율을 유도하였음을 나타내었으며, 이것은 웨타이드가 조절성 T 세포를 생성시키는 ACS의 능력에 영향을 미치지 않았음을 의미한다.

[0166] 항원 유래 Treg (TR1)가 폴리클로날 Treg (TR2)와 동일한 집단에 속한다는 것을 입증하기 위해서, 본 발명자들은 Treg 세포의 특징적인 3 개의 마커, 즉CD103, CD127 및 foxp3을 표현형적으로 분석하였다. 도 2에 나타낸 바와 같이, 유사한 표현형이 TR1 및 TR2 세포에 대해서 발견되었으며, 반면에 비-ASC 유도된 Treg (TR3 및 TR4)는 FOXP3 및 CD103의 더 낮은 백분율을 가졌다. CD127의 발현은, 모든 조절성 T 세포 타입에 대해서 기술된 바와 같이 모든 경우에 음성이었다.

[0167] MS 특이적 유도된 Tregs:

[0168] 본 발명자들은 분리된 Treg 세포의 기능성을 입증하는 것을 목적으로 하였다. 이러한 목적을 위해서, TR1 및 TR2 조건으로부터 CD4+CD25+ 조절성 T 세포를 분리시켰다.

[0169] 기능적 시험 1

[0170] 시험 1을 위해서, 자가유래 PBMCs 2×10^5 세포/웰을 1:1, 1:4, 1:20 및 1:50의 억제기 (S) 비로 편평-바닥 96-웰 플레이트에서 배양하였다. TR1 및 TR2 집단은 이들이 공동-배양 시험에서 PBMCs의 증식을 상당히 억제시킨 경우에 억제를 매개하는 것으로 간주되었다. 증가하는 수의 Treg 세포의 존재 하에서 PBMC 증식의 백분율은 PBMC 단독인 경우에 발견되는 100% 증식에 대한 상대적 백분율로서 표현되었다. 3 개의 개별적인 실험의 결과는 도 3-8에 나타내었으며, 이것은 TR1 세포는 MS 통합 웨타이드가 사용된 경우에, 자가유래 PBMCs의 증식을 억제 할 수 있었음을 시사한다. 항 CD3/CD28과 같은 증식의 강력한 유도제와 비교하여, MS 웨타이드를 사용한 억제는 더 낮았지만, 폴리클로날 자극에 대해서 도달된 증식 및 활성화의 수준은 웨타이드에 의한 경우보다 더 높았다.

[0171] 예상된 바와 같이 TR2 폴리클로날 Treg는 통합 웨타이드를 자극제로서 사용한 경우에 증식을 상당한 감소를 유도하지 않았다.

[0172] 이를 결과는 TR1 세포가 효과적으로, 더 큰 백분율의 MS 특이적 T 세포를 함유하는 것을 시사한다.

[0173] 기능적 시험 2

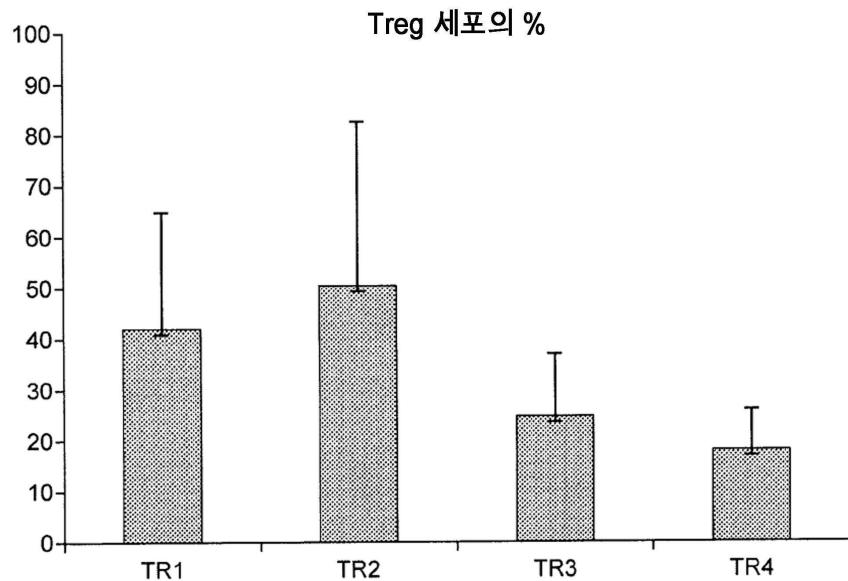
[0174] 시험 2를 위해서, PBMCs 1×10^5 세포/웰을 1:5, 1:11 및 1:21의 억제기 (S) 비로 편평-바닥 96-웰 플레이트에서 배양하였다. 단지 TR1 세포만이 사용되었다. TR1은 이들이 공동-배양 시험에서 PBMCs의 증식을 상당히 억제한 경우에 억제를 매개하는 것으로 간주되었다. MS-특이적 Treg가 단지 특이적 웨타이드의 존재 하에서만 자가유래 T 세포의 증식을 억제할 수 있었는지 여부를 연구하기 위해서, 본 발명자들은 부적절한 웨타이드의 존재 하에서 공동-배양을 수행하였다. MS 유도된 자가유래 림프구에서 MS 특이적 Treg의 억제기 능력을 플루 (flu) 유도된 자가유래 림프구에서의 MS 특이적 Tregs와 비교하였다. 도 9는 도달된 최대 증식으로 불리는 MS 및 플루 웨타이드의 존재 하에서의 증식의 백분율을 나타낸다.

- [0175] 결과는 PBMCS에 첨가된 통합 MS 펩타이드 내의 MS 특이적 Tregs의 존재가 자가유래 T 세포 구획의 증식을 억제하는 것을 시사한다. 이러한 억제는 부적절한 펩타이드가 사용된 경우에 상당히 더 낮았다.
- [0176] 이들 결과는, 분리된 MS-특이적 Tregs가 MS 통합 펩타이드의 존재 하에서 유도된 자가유래 T 세포 증식을 우선적으로 억제함을 나타낸다.
- [0177] **고찰**
- [0178] 종합적으로 보면, 이들 결과는 Treg 생성을 위한 방법이 항원 특이적 Treg를 포함하지만, 비-특이적 면역억제능을 현저하게 더 낮은 정도로 유지시키는 Treg 세포 집단을 생성시킬 수 있었음을 나타낸다. 일반적으로, 본 발명자들은 또한, hASC/PBMC 공동-배양물로부터 분리된 폴리클로날 Treg가 자가유래 PBMCs의 증식을 억제할 수 있는 것으로 결론을 내릴 수 있다. 그러나, MS 특이적 Tregs의 생성은 MS 펩타이드에 대해서는 반응하지만 다른 펩타이드 (예를 들어, 부적절한 펩타이드 FLU-HA)에 대해서는 그렇지 않은 자가유래 T 세포를 우선적으로 억제한다.
- [0179] **요약**
- [0180] 중추신경계의 단백질로부터 유래하는 통합 MS 펩타이드 [마이엘린 염기성 단백질 펩타이드 (MBP13-32, MBP 83-99, MBP 111-119, MBP 146-170), 마이엘린 희돌기교세포 당단백질 (MOG 1-20, MOG 35-55) 및 단백지질 단백질 (PLP 139-154)]을 Treg 유도 시스템에 첨가하였으며, MS 특이적 Treg는 폴리클로날 Tregs와 유사한 백분율로 생성되었다. MS 특이적 Treg (여기에서는 TR1로 칭함)는 폴리클로날 Treg 세포와 같이 CD4+CD25highFOXP3lowCD127negCD103low/neg인 것으로 표현형적으로 특정화되었다. MS 특이적 Treg는 펩타이드 풀 및 낮은 IL-2 농도에 의해서 유도된 자가유래 PBMCs의 증식을 억제할 수 있었다. PBMCs는 또한, 항 CD3/CD28 마이크로비드로 자극되는 경우에 MS 특이적 조절성 T 세포에 의한 억제를 받을 수 있었다.
- [0181] 흥미롭게도, 비-특이적 펩타이드가 사용된 경우에, MS 특이적 Treg의 억제능은 감소되었으며, 따라서 비록 본 발명의 세포 집단은 이들이 MS 펩타이드 T 세포 증식의 변조에 더 큰 효능을 나타낸다는 점에서 "항원-특이적" 이지만, 이들은 여전히 비-MS 연관된 T 세포 반응의 변조에 대한 (감소된) 능력을 보유하는 것으로 결론을 내릴 수 있다.
- [0182] **추가의 특징.**
- [0183] 언급될 수 있는 본 발명의 추가의 특징은 다음과 같다:
- [0184] a) 본질적으로 CD62-L, CD127, FOXP3, CTLA4, CD104 및 GITR을 발현하는 세포로 구성되는 분리된 면역조절 세포 집단.
- [0185] b) 본질적으로 다발성 경화증-연관된 항원에 대해 지시된 세포 또는 생체외 생성 중에 하나 이상의 다발성 경화증-연관된 항원에 노출된 세포로 구성되는 생체외 생성된 분리된 면역조절 세포 집단.
- [0186] c) 상기 세포가 CD62-L, CD127, FOXP3, CTLA4, CD104 및 GITR을 발현하는 것을 특징으로 하는 상기 b)의 세포 집단.
- [0187] d) 분리된 조절성 T 세포 또는 그의 세포 집단을 하나 이상의 다발성 경화증-연관된 항원의 존재 하에서 중간엽 줄기 세포 집단과 접촉시키는 것을 포함하여, 면역조절 세포를 제조, 팽창 및/또는 생성시키는 방법.
- [0188] e) 상기 다발성 경화증-연관된 항원이 마이엘린 염기성 단백질, 마이엘린 결합된 당단백질, 마이엘린 희돌기교세포 단백질, 단백지질 단백질, 희돌기교세포 마이엘린 올리고단백질, 마이엘린 결합된 희돌기교세포 염기성 단백질, 희돌기교세포 특이적 단백질, 열 쇼크 단백질, 희돌기교세포 특이적 단백질, NOGO A, 당단백질 Po, 말초 마이엘린 단백질 22, 2'3'-사이클릭 뉴클레오타이드 3'-포스포디에스테라제, 및 이들의 단편, 변이체 및 혼합물을 포함하는 그룹으로부터 선택되는 상기 d)의 방법.
- [0189] f) 상기 다발성 경화증-연관된 항원이 마이엘린 염기성 단백질 펩타이드, 마이엘린 희돌기교세포 당단백질 및 단백지질 단백질, 및 이들의 단편, 변이체 및 혼합물을 포함하는 그룹으로부터 선택되는 상기 e)의 방법.
- [0190] g) 상기 항원이 서열번호 1-7 및 이들의 단편, 변이체 및 혼합물로 구성된 그룹으로부터 선택되는 상기 f)의 방법.
- [0191] h) a) 내지 c)의 세포 또는 d) 내지 g)의 방법에 제조된 세포를 포함하는 약제학적 조성물.

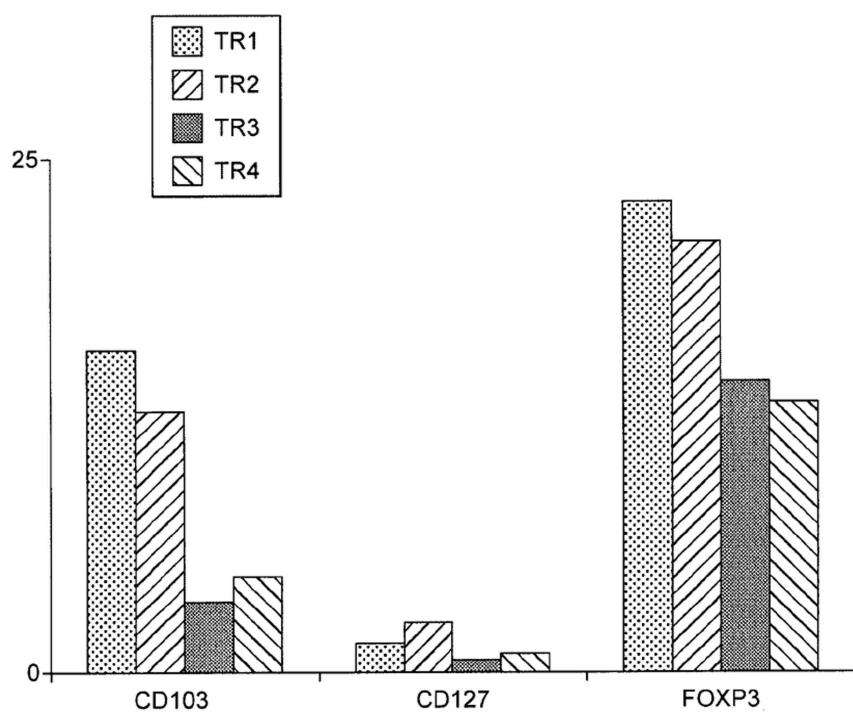
- [0192] i) 다발성 경화증의 치료에 있어서의 a) 내지 c)의 세포 집단, d) 내지 g)의 방법에 따라 제조된 세포 또는 h)의 약제학적 조성물의 용도.
- [0193] j) 다발성 경화증의 치료를 위한 조성물의 제조에 있어서의 a) 내지 c)의 세포 집단, d) 내지 g)의 방법에 따라 제조된 세포 또는 h)의 약제학적 조성물의 용도.

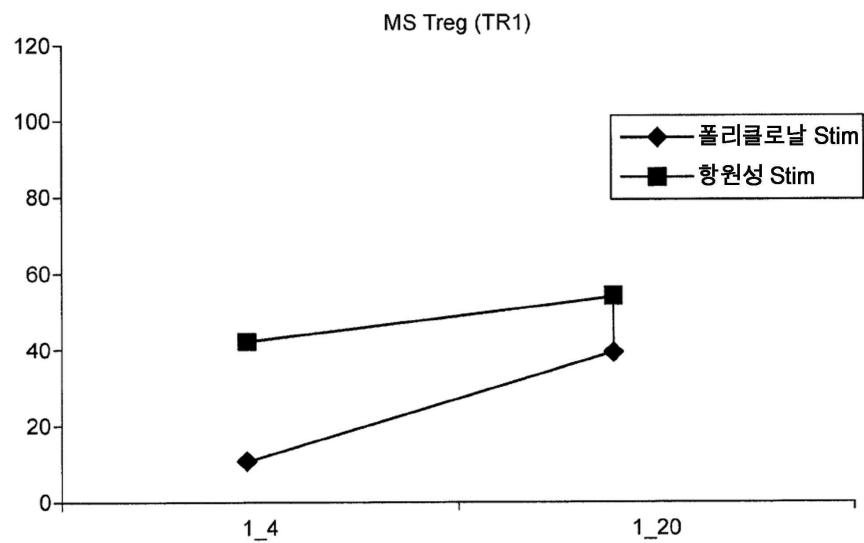
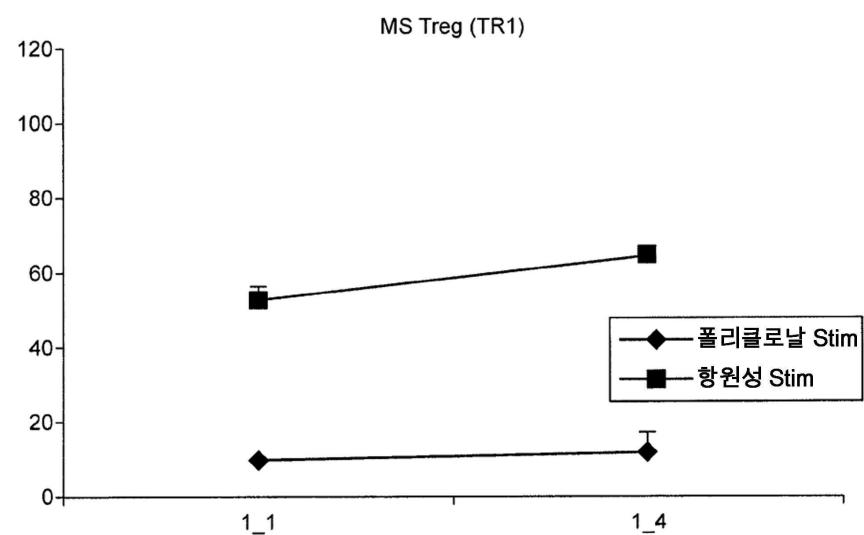
도면

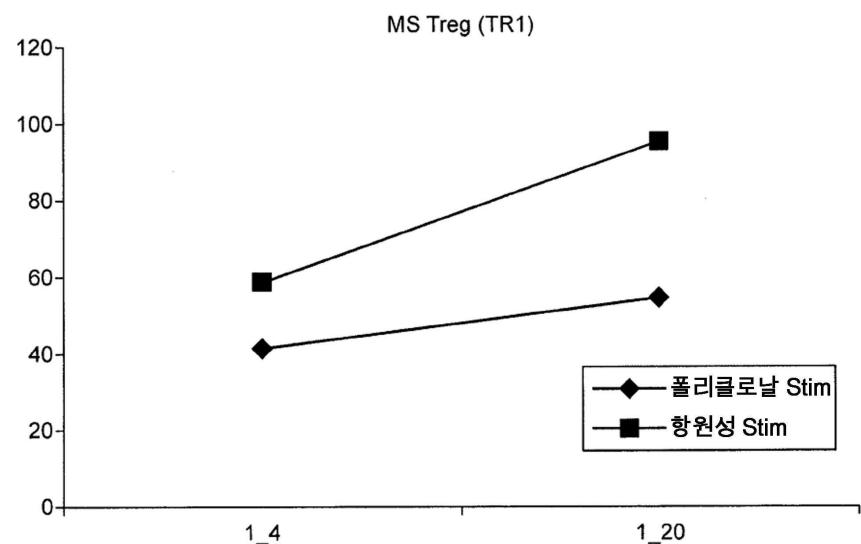
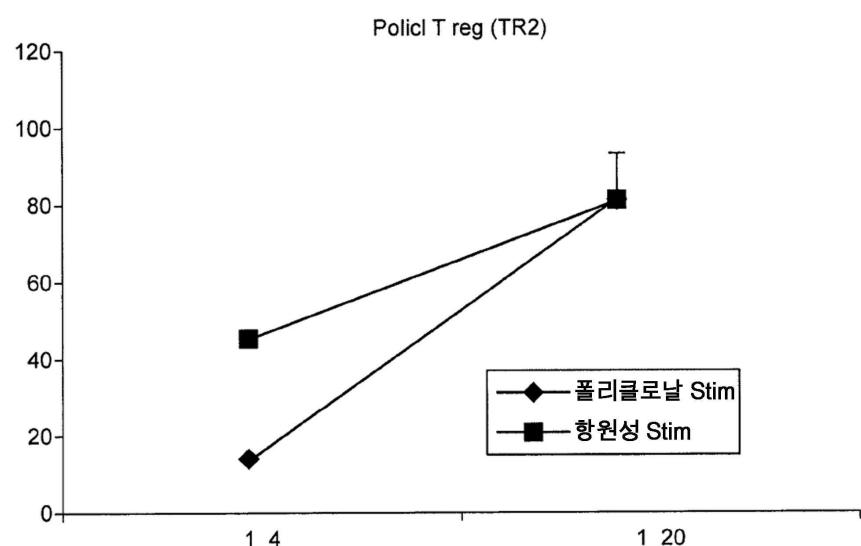
도면1



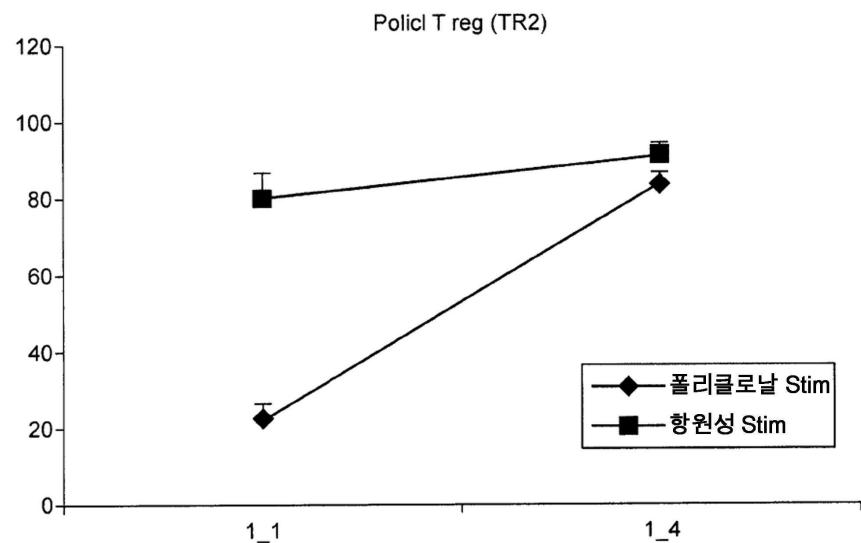
도면2



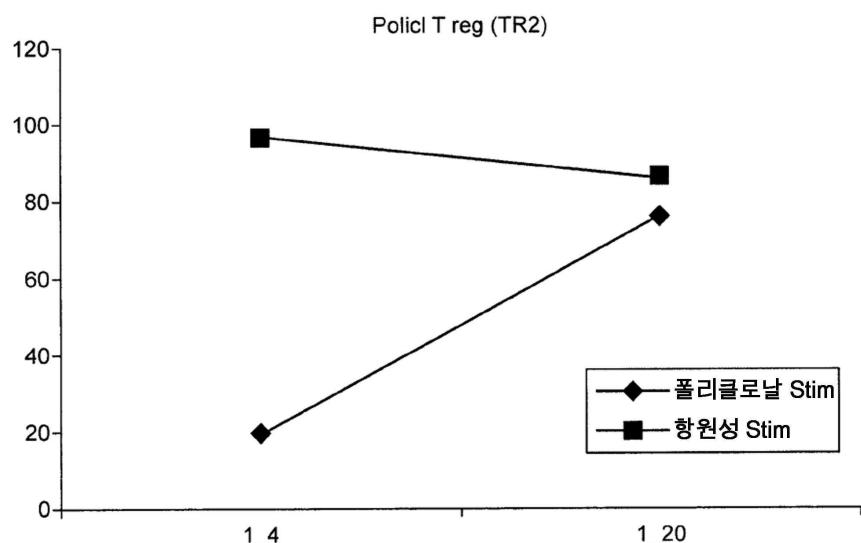
도면3**도면4**

도면5**도면6**

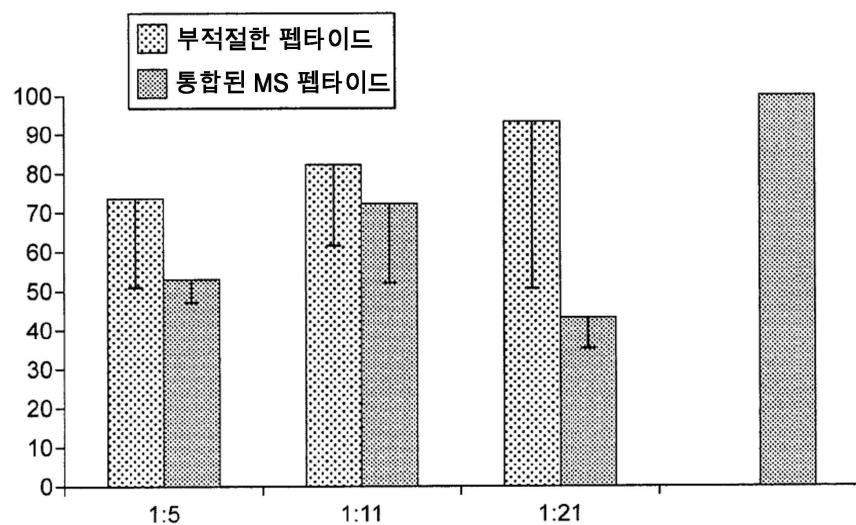
도면7



도면8



도면9



서 열 목 록

<110> TIGENIX S.A.U.

<120> CELL POPULATIONS HAVING IMMUNOREGULATORY ACTIVITY, METHODS FOR THE PREPARATION AND USES THEREOF

<130> IPA131087

<150> EP 11166808.3

<151> 2011-05-19

<160> 8

<170> Kopatent In 2.0

<210> 1

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Lys Tyr Leu Ala Thr Ala Ser Thr Met Asp His Ala Arg His Gly Phe

1

5

10

15

Leu Pro Arg His

20

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Glu Asn Pro Val Val His Phe Phe Lys Asn Ile Val Thr Pro Arg Thr

1	5	10	15
---	---	----	----

Pro

<210> 3

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Leu Ser Arg Phe Ser Trp Gly Ala Glu Gly Gln Arg Pro Gly Phe Gly

1	5	10	15
---	---	----	----

Tyr Gly Gly

<210> 4

<211> 25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Ala Gln Gly Thr Leu Ser Lys Ile Phe Lys Leu Gly Gly Arg Asp Ser

1	5	10	15
---	---	----	----

Arg Ser Gly Ser Pro Met Ala Arg Arg

20	25
----	----

<210> 5

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Gly Gln Phe Arg Val Ile Gly Pro Arg His Pro Ile Arg Ala Leu Val

1	5	10	15
---	---	----	----

Gly Asp Glu Val

20

<210> 6

<211> 21

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Glu Val Gly Trp Tyr Arg Pro Pro Phe Ser Arg Val Val His Leu

1 5 10 15

Tyr Arg Asn Gly Lys

20

<210> 7

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

His Cys Leu Gly Lys Trp Leu Gly His Pro Asp Lys Phe Val Gly Ile

1 5 10 15

<210> 8

<211> 13

<212> PRT

<213> Influenza virus

<400> 8

Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr

1 5 10