



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0104646  
(43) 공개일자 2018년09월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 47/61 (2017.01) A61K 38/18 (2006.01)  
A61K 47/36 (2017.01) A61K 9/00 (2006.01)  
A61K 9/06 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
A61K 47/61 (2017.08)  
A61K 38/1841 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2018-7022661  
(22) 출원일자(국제) 2017년01월05일  
심사청구일자 없음  
(85) 번역문제출일자 2018년08월06일  
(86) 국제출원번호 PCT/IL2017/050013  
(87) 국제공개번호 WO 2017/118979  
국제공개일자 2017년07월13일  
(30) 우선권주장  
62/275,827 2016년01월07일 미국(US)

(71) 출원인  
비.지. 네게브 테크놀로지스 앤드 애플리케이션스  
리미티드, 옛 벤-구리온 유니버시티  
이스라엘 비어-쉐바 84105 피.오. 박스 653  
(72) 발명자  
코헨 스마다르  
이스라엘 8486619 비어 쉘바 벤트위치 스트리트 6  
몬소네고 아론  
이스라엘 7952500 모샤브 니르-바님 하버레드 스트리트 415  
(74) 대리인  
유미특허법인

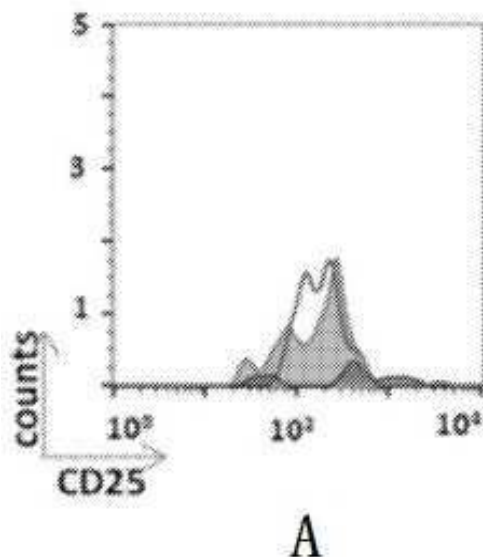
전체 청구항 수 : 총 32 항

(54) 발명의 명칭 면역관용 반응을 구축하기 위한 조성물 및 방법

(57) 요약

본 발명은 일반적으로 개체에서 면역관용 반응을 구축하기 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 본 발명은 황산화 다당류와 생활성 폴리펩타이드를 포함하는 면역관용 반응을 구축하기 위한 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도17a



(52) CPC특허분류

*A61K 38/1858* (2013.01)  
*A61K 38/1866* (2013.01)  
*A61K 47/36* (2013.01)  
*A61K 9/0014* (2013.01)  
*A61K 9/06* (2013.01)  
*A61P 37/02* (2018.01)  
*A61P 37/06* (2018.01)  
*A61K 2300/00* (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

개체에서 면역관용 반응 (immunotolerant response)을 유도하는 방법으로서,  
 상기 개체에게 황산화 다당류 (sulfated polysaccharide)와 생활성 폴리펩타이드를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하며,  
 상기 생활성 폴리펩타이드가 TGF- $\beta$ 1 (transforming growth factor  $\beta$ 1)이고,  
 상기 TGF- $\beta$ 1이 상기 황산화 다당류의 설페이트 기에 비-공유적으로 결합된, 방법.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,  
 상기 면역관용 반응이 동종이식 성공의 개선을 포함하는, 방법.

#### 청구항 3

제2항에 있어서,  
 상기 면역관용 반응이 동종세포 이식 (allogeneic transplantation)에 대한 면역 반응의 억제를 포함하는, 방법.

#### 청구항 4

제2항에 있어서,  
 상기 면역관용 반응이 동종세포의 세포자살 억제를 포함하는, 방법.

#### 청구항 5

제2항에 있어서,  
 상기 면역관용 반응이 동종세포 생존 증가를 포함하는, 방법.

#### 청구항 6

제2항에 있어서,  
 상기 면역관용 반응이 동종세포 이식체의 혈관형성 자극을 포함하는, 방법.

#### 청구항 7

제1항에 있어서,  
 상기 면역관용 반응이 자가면역 장애의 억제를 포함하는, 방법.

#### 청구항 8

제7항에 있어서,  
 상기 자가면역 장애가 다발성 경화증, 건선 및 1형 당뇨병을 포함하는, 방법.

#### 청구항 9

제1항에 있어서,  
 상기 면역관용 반응이 상기 조성물의 투여 부위로 국소화되는, 방법.

#### 청구항 10

제1항에 있어서,

상기 면역관용 반응이 상기 생활성 폴리펩타이드의 연장된 제시 (prolonged presentation)를 포함하는, 방법.

#### 청구항 11

제1항에 있어서,

상기 면역관용 반응이 염증성 신호전달의 억제를 포함하는, 방법.

#### 청구항 12

제1항에 있어서,

상기 면역관용 반응이 수지상 세포의 성숙화 억제를 포함하는, 방법.

#### 청구항 13

제1항에 있어서,

상기 면역관용 반응이 CD8+ T 세포의 세포독성 반응의 억제를 포함하는, 방법.

#### 청구항 14

제1항에 있어서,

상기 면역관용 반응이 조절성 T 세포 분화의 자극을 포함하는, 방법.

#### 청구항 15

개체에서 동종이식 거부 반응 (allograft rejection)을 완화 또는 예방하는 방법으로서,

상기 개체에게 황산화 다당류 및 생활성 폴리펩타이드를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하고,

상기 생활성 폴리펩타이드가 TGF- $\beta$ 1 (transforming growth factor  $\beta$ 1)이고,

상기 TGF- $\beta$ 1이 상기 황산화 다당류의 설페이트 기에 비-공유적으로 결합된, 방법.

#### 청구항 16

개체에서 자가면역 질환 또는 장애를 치료하는 방법으로서,

상기 개체에게 황산화 다당류 및 생활성 폴리펩타이드를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하고,

상기 생활성 폴리펩타이드가 TGF- $\beta$ 1 (transforming growth factor  $\beta$ 1)이고,

상기 TGF- $\beta$ 1이 상기 황산화 다당류의 설페이트 기에 비-공유적으로 결합된, 방법.

#### 청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물이 하나 이상의 부가적인 생활성 폴리펩타이드를 포함하며,

상기 하나 이상의 부가적인 생활성 폴리펩타이드가 상기 황산화 다당류의 설페이트 기에 비-공유적으로 결합된, 방법.

#### 청구항 18

제17항에 있어서,

상기 하나 이상의 부가적인 생활성 폴리펩타이드가 양으로 하전된 폴리펩타이드 또는 헤파린-결합성 폴리펩타이드 또는 이들 둘 모두인, 방법.

#### 청구항 19

제18항에 있어서,

상기 하나 이상의 부가적인 생활성 폴리펩타이드가 헤파린-결합성 폴리펩타이드인, 방법.

#### 청구항 20

제19항에 있어서,

상기 하나 이상의 부가적인 생활성 폴리펩타이드가 항-트롬빈 III (AT III), 트롬보포이에틴 (TPO), 세린 프로테아제 저해제 (SLP1), C1 에스테라제 저해제 (C1 INH), 백시니아 바이러스 컴플리먼트 컨트롤 단백질 (vaccinia virus complement control protein, VCP), 섬유모세포 성장인자 (FGF), FGF 수용체, 혈관 내피 성장인자 (VEGF), 간세포 성장인자 (HGF), 인슐린-유사 성장인자 (IGF), 혈소판-유래 성장인자 (PDGF), 골 형태형성 단백질 (BMP), 상피 성장 인자 (EGF), CXCL 케모카인 리간드 4 (CXCL4), 기질 세포 유래 인자-1 (SDF-1), 인터루킨-6 (IL-6), 인터루킨-8 (IL-8), RANTES (Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted), 단핵세포 화학주성인자 단백질-1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1), 대식세포 염증성 펩타이드-1 (MIP-1), 림포타킨, 프렉탈카인 (fractalkine), 아넥신 (annexin), 아포지단백질 E (ApoE), 면역결핍 바이러스 타입-1 (HIV-1) 외피 단백질 gp120, 시클로필린 A (CypA), Tat 단백질, 헤르페스 심플렉스 바이러스 (HSV)의 바이러스 외피 당단백질 gC, gB 또는 gD, 땀기열바이러스의 외막 단백질, 플라즈모듐 파시파룸 (Plasmodium falciparum)의 포자소체 (circumsporozoite, CS) 단백질, 박테리아 표면 부착 단백질 OpaA, 1-셀렉틴, P-셀렉틴, 헤파린-결합성 증식-관련 분자 (heparin-binding growth-associated molecule, HB-GAM), 트롬보스폰딘 타입 I 리피트 (thrombospondin type I repeat, TSR), 펩타이드 마이엘린 희소돌기신경교 당단백질 (peptide myelin oligodendrocyte glycoprotein, MOG) 및 아밀로이드 P (AP)로 이루어진 군으로부터 선택되는 헤파린-결합성 폴리펩타이드인, 방법.

#### 청구항 21

제19항에 있어서,

상기 하나 이상의 부가적인 생활성 폴리펩타이드가 PDGF-BB, PDGF-AA, bFGF, aFGF, VEGF, IL-6, TPO, SDF-1, HGF, EGF, MOG, BMP-2, BMP-4, BMP-7 및 IGF로 이루어진 군으로부터 선택되는 헤파린-결합성 폴리펩타이드인, 방법.

#### 청구항 22

제19항에 있어서,

상기 하나 이상의 부가적인 생활성 폴리펩타이드가 혈관신생 활성을 나타내는 헤파린-결합성 폴리펩타이드인, 방법.

#### 청구항 23

제22항에 있어서,

상기 혈관신생 활성을 나타내는 폴리펩타이드가 VEGF, bFGF, aFGF, PDGF- $\beta\beta$ , IGF, HGF, BMP 또는 이들의 조합인, 방법.

#### 청구항 24

제17항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 하나 이상의 부가적인 생활성 폴리펩타이드가 VEGF 및 PDGF- $\beta\beta$ 인, 방법.

#### 청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물이 지지 매트릭스를 더 포함하는, 방법.

#### 청구항 26

제25항에 있어서,

상기 지지 매트릭스가 다당류, 단백질, 세포외 기질 성분, 합성 폴리머 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 폴리머인, 방법.

#### 청구항 27

제25항에 있어서,

상기 지지 매트릭스가 알기네이트 및 황산화 알기네이트의 조합으로부터 만들어진, 방법.

#### 청구항 28

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 황산화 다당류가 우론산 잔기를 포함하는, 방법.

#### 청구항 29

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 황산화 다당류가 알기네이트 설페이트인, 방법.

#### 청구항 30

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 황산화 다당류가 히알루로난 설페이트인, 방법.

#### 청구항 31

개체에서 동종이식 거부 반응을 완화 또는 예방하는 방법으로서,

상기 개체에게, PDGF- $\beta$   $\beta$ -알기네이트 설페이트, VEGF-알기네이트 설페이트, 및 TGF  $\beta$  1-알기네이트 설페이트를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하며,

상기 조성물이 지지 매트릭스를 더 포함하며,

상기 지지 매트릭스가 다당류, 단백질, 세포외 기질 성분, 합성 폴리머 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 폴리머인, 방법.

#### 청구항 32

개체에서 자가면역 질환 또는 장애를 치료하는 방법으로서,

상기 개체에게, 황산화 다당류, 제1 생활성 폴리펩타이드 및 제2 생활성 폴리펩타이드를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하며,

상기 제1 생활성 폴리펩타이드 및 상기 제2 생활성 폴리펩타이드가 각각 상기 황산화 다당류의 설페이트 기에 비-공유적으로 결합되며,

상기 조성물이 지지 매트릭스를 더 포함하며,

상기 지지 매트릭스가 다당류, 단백질, 세포외 기질 성분, 합성 폴리머 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 폴리머이고,

상기 제1 생활성 폴리펩타이드가 TGF- $\beta$  1인, 방법.

### 발명의 설명

### 기술 분야

본 발명은 일반적으로 개체에서 면역관용 반응 (immunotolerant response)을 구축하기 위한 조성물 및 방법에

[0001]

관한 것이다. 보다 상세하게는, 본 발명은 황산화 다당류와 생활성 폴리펩타이드를 포함하는, 면역관용 반응을 구축하기 위한 조성물에 관한 것이다.

## 배경 기술

- [0002] 세포의 동종이식 거부 반응에 대한 예방은 현재 세포 치료 전략들에서 주된 해결 과제이다. 이러한 거부 반응은 동종이식-반응성 작동자 CD4 및 CD8 T 세포에 의해 매개된다. 면역억제제의 평생 투여가 동종반응 및 이식편 거부 반응을 약화시킬 수 있지만, 감염 및 악성 종양의 위험성 증가와도 연관되어 있다. 최근 수년간, 영양분과 노폐물을 통과시킬 수 있는 막 캡슐 내 세포 캡슐화를 기초로 하는, 몇가지 생체물질-기반한 전략들이 동종이계 세포 이식편의 면역 거부 반응을 예방하기 위해 개발되었지만; 캡슐이 세포 유입 및 혈관형성도 저해하기 때문에, 디바이스의 크기는 산소 확산 거리 200  $\mu\text{m}$ 로 제한된다.
- [0003] 이상적인 세포 이식 디바이스는 이식된 세포의 생존성을 유지하기 위해 디바이스의 전역에서 혈관형성이 달성될 수 있도록 해야 하며, 숙주 내 이식편 생착을 촉진하여야 한다. 그러나, 디바이스의 혈관형성은 종종 혈액 순환을 통한 대규모 백혈구 침윤으로 인한 동종이식 거부 반응의 위험성 증가와 연관되어 있다.
- [0004] TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ )는 면역조절 사이토카인으로서, 자가면역 질환 및 암에서 명백한 염증성 과정과 같은, 염증성 과정을 억제하는 작용을 하기 때문에 면역관용 미세환경 구축을 강화할 수 있다. TGF- $\beta$ -풍부 환경에서, 항원을 흡수한 수지상 세포 (DC)는 관용성으로 되고, 작동성 CD4+ T 세포의 생성 뿐만 아니라 세포독성 CD8+ T 세포의 활성화 및 증식을 억제하는 항-염증성 조절 T 세포로의 CD4+ T 세포의 분화를 매개한다.
- [0005] 따라서, 국소 면역관용 미세환경을 구축하면서도 바람직하지 않은 전신 효과는 회피하는 개선된 조성물 및 방법에 대한 요구가 존재하고 있다.

## 발명의 내용

- [0006] 본 발명은, 일 측면에서, 개체에 황산화 다당류와 생활성 폴리펩타이드를 포함하되 생활성 폴리펩타이드가 황산화 다당류의 설페이트 기에 비-공유적으로 결합된 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 개체에서 면역관용 반응을 유도하는 방법에 관한 것이다. 일 구현예에서, 생활성 폴리펩타이드는 TGF- $\beta$ 1 (transforming growth factor  $\beta$ 1)이다.
- [0007] 또 다른 측면에서, 본 발명은, 개체에 황산화 다당류와 생활성 폴리펩타이드를 포함하되 생활성 폴리펩타이드가 황산화 다당류의 설페이트 기에 비-공유적으로 결합된 조성물을 투여하여, 개체에서 동종이식 거부 반응을 완화 또는 예방하는 단계를 포함하는, 개체에서 동종이식 거부 반응을 완화 또는 예방하는 방법에 것이다. 일 구현예에서, 생활성 폴리펩타이드는 TGF- $\beta$ 1 (transforming growth factor  $\beta$ 1)이다.
- [0008] 본 발명은, 또한, 개체에, 황산화 다당류, 제1 생활성 폴리펩타이드 및 제2 생활성 폴리펩타이드를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하며, 상기 제1 생활성 폴리펩타이드 및 상기 제2 생활성 폴리펩타이드가 각각 상기 황산화 다당류의 설페이트 기에 비-공유적으로 결합되고, 상기 조성물이 지지 매트릭스를 더 포함하며, 상기 지지 매트릭스가 다당류, 단백질, 세포의 기질 성분, 합성 폴리머 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 폴리머인, 개체에서 자가면역 질환 또는 장애를 치료하는 방법에 관한 것이다. 일 구현예에서, 제1 생활성 폴리펩타이드는 TGF- $\beta$ 1이다. 일 구현예에서, 제2 생활성 폴리펩타이드는 마이엘린 희소돌기신경교 당단백질 (myelin oligodendrocyte glycoprotein, MOG)이다.

## 도면의 간단한 설명

- [0009] **도 1A**는 알기네이트-설페이트/알기네이트 스캐폴드의 제작 과정을 도시한 것이다. 90% 알기네이트와 10% 알기네이트-설페이트 혼합물을 칼슘 이온을 사용해 가교하였다. 그런 후, 혼합물을 96웰 플레이트에 분배하고 냉동 건조하여 마이크로포러스 지지체를 제조하였다. TGF- $\beta$  및 혈관신생 인자를 스캐폴드 내 알기네이트-설페이트에 친화성으로 결합시켰다.
- 도 1B**는 알기네이트-설페이트/알기네이트 스캐폴드에 친화성으로 결합된 경우와 프리스틴 스캐폴드에 흡수시킨 경우, TGF- $\beta$ 의 보유 %를 측정한 그래프를 도시한 것이다. 이 %는 ELISA에 의해 검출된, 7일간 TGF- $\beta$  총 투입량으로부터 계산한다.
- 도 1C**는 0.5 ng/ml TGF- $\beta$ 에 노출시킨 후 40분 배양한 NIH-3T3 섬유모세포 세포주의 세포용해물을 이용한, p-

SMAD2 및 p-SMAD3의 웨스턴 블롯 결과를 도시한 것이다.

**도 1D**는 P-SMAD2/액틴의 웨스턴 블롯을 분석한 그래프이다. 레인은 다음과 같다: 1: 배지, TGF- $\beta$  비-처리; 2: 배지 + TGF- $\beta$ ; 3: 시간 경과에 따라 스캐폴드로부터 방출된 TGF- $\beta$ ; 4: 산성 pH를 이용한 Alg/AlgS 스캐폴드의 용해 후 afTGF- $\beta$ ; 및 5: EDTA를 이용한 알기네이트-설페이트/알기네이트 스캐폴드의 용해 후 afTGF- $\beta$ . 데이터는 3세트 실험의 평균 값 및 SD로 나타낸다.

**도 2A**는 시험관내 실험의 타임라인을 도시한 것이다: OTII 비장 세포를 afTGF- $\beta$  (50 ng/스캐폴드)이 첨가 또는 비-첨가된 스캐폴드에 접종하였다. 접종한 지 1시간 후, 배지에 OVA 펩타이드 (20  $\mu$ g/ml)를 첨가하여 비장 세포를 활성화시키고, 이후 사이토카인을 측정하였다.

**도 2B**는 사이토카인 분비에 있어 -TGF-OVA 대조군 대비 IL-17 (72h) 배수 변화를 측정하여 나타낸 그래프이다.

**도 2C**는 사이토카인 분비에 있어 -TGF-OVA 대조군 대비 IL-10 (48h) 배수 변화를 측정하여 나타낸 그래프이다.

**도 2D**는 사이토카인 분비에 있어 -TGF-OVA 대조군 대비 IL-2 (24h) 배수 변화를 측정하여 나타낸 그래프이다.

**도 2E**는 사이토카인 분비에 있어 -TGF-OVA 대조군 대비 IFN- $\gamma$  (48h) 배수 변화를 측정하여 나타낸 그래프이다.

**도 3**은 활성화 3일 후, 림프구 및 CD4 T 세포 게이팅을 나타낸 FACS 플롯이다.

**도 4A**는 활성화 3일 후, CD25 및 Foxp3를 발현하는 CD4+ T 세포의 대표적인 FACS 플롯을 도시한 것이다.

**도 4B**는 TGF- $\beta$ -결핍 구조체의 대표적인 FACS 히스토그램 대비 afTGF- $\beta$  구조체 내 Tregs의 빈도 증가를 보여주는 FACS 히스토그램이다.

**도 4C**는 -TGF-OVA 대조군 대비, afTGF- $\beta$  처리 및 비-처리된 경우의 전체 CD4+ T 세포에서의 Tregs %를 나타낸 그래프이다. 적색: afTGF- $\beta$ ; 청색: TGF- $\beta$ -결핍; 흑색: 대조군. 데이터는 3세트 실험의 평균 값과 3번의 개별 시험의 SEM으로 나타낸다. 결과는 unpaired t-검정으로 비교하였다, \*\* p<0.01.

**도 5A**는 접종한 지 3일 후, CD25 및 Foxp3를 발현하는 CD4+ T 세포의 대표적인 FACS 플롯을 도시한 것이다. 비장 세포를 afTGF- $\beta$  구조체 및 TGF- $\beta$ -결핍 구조체에서 배양하고, anti-IL-10 (1 ng/ml)의 존재 하에 OVA로 자극하였다. 적색: afTGF- $\beta$ ; 청색: TGF- $\beta$ -결핍; 흑색: 대조군.

**도 5B**는 afTGF- $\beta$  구조체와 TGF- $\beta$ -결핍 구조체 간에 Tregs 빈도 (frequency) 차이가 없음을 보여주는 대표적인 FACS 히스토그램이다. 적색: afTGF- $\beta$ ; 청색: TGF- $\beta$ -결핍; 흑색: 대조군.

**도 5C**는 -TGF-OVA 대조군 대비, afTGF- $\beta$  처리 및 비-처리된 경우의 전체 CD4+ T 세포에서의 Tregs %를 나타낸 것이다.

**도 5D**는 -TGF-OVA 대조군 대비, afTGF- $\beta$  처리 및 비-처리된 경우의 IL-2 분비의 배수 변화를 도시한 것이다.

**도 5E**는 -TGF-OVA 대조군 대비, afTGF- $\beta$  처리 및 비-처리된 경우의 IFN- $\gamma$  분비의 배수 변화를 도시한 것이다.

**도 5F**는 -TGF-OVA 대조군 대비, afTGF- $\beta$  처리 및 비-처리된 경우의 IL-17 분비의 배수 변화를 도시한 것이다.

**도 5G**는 공-배양 3일 후, CD25 및 Foxp3를 발현하는 CD4+ T 세포에 대한 대표적인 FACS 플롯을 도시한 것이다. OVA T 세포를 CD11c<sup>dnr</sup> Tg 마우스로부터 유래된 비장 세포와 함께 afTGF- $\beta$  구조체 및 TGF- $\beta$ -결핍 구조체에서 공-배양하였다. 적색: afTGF- $\beta$ ; 청색: TGF- $\beta$ -결핍; 흑색: 대조군.

**도 5H**는 afTGF- $\beta$  구조체 및 TGF- $\beta$ -결핍 구조체에서 Treg 개체군에 차이가 없음을 보여주는 대표적인 FACS 히스토그램을 도시한 것이다. 적색: afTGF- $\beta$ ; 청색: TGF- $\beta$ -결핍; 흑색: 대조군.

**도 6A**는 -TGF-OVA 대조군 대비, afTGF- $\beta$  처리 또는 비-처리된 경우의 전체 CD4+ T 세포에서의 Tregs %를 나타낸 그래프이다.

**도 6B**는 -TGF-OVA 대조군 대비, afTGF- $\beta$  처리 또는 비-처리된 경우의 IL-2 분비의 배수 변화를 도시한 그래프이다.

**도 6C**는 -TGF-OVA 대조군 대비, afTGF- $\beta$  처리 또는 비-처리된 경우의 IFN- $\gamma$  분비의 배수 변화를 도시한 그래프이다.

**도 6D**는 -TGF-OVA 대조군 대비, afTGF- $\beta$  처리 또는 비-처리된 경우의 IL-17 분비의 배수 변화를 도시한 그래프



이다.

도 6E는 -TGF-OVA 대조군 대비, afTGF- $\beta$  처리 또는 비-처리된 경우의 IL-10 분비의 배수 변화를 도시한 그래프이다.

도 7A는 이식 10일차 섬유모세포를 함유한 회수 디바이스의 PECAM (CD31) 염색 냉동-조직 단편으로서, 스캐폴드의 숙주 내피 세포의 침투가 확인된다.

도 7B는 이식 15일차 동종 섬유모세포 (녹색)를 함유한 TGF- $\beta$ -결핍 구조체 내에 형성된 혈관 (적색)에 대한 공초점 사진을 도시한 것이다.

도 7C는 이식 15일차 동종 섬유모세포 (녹색)를 함유한 TGF- $\beta$  구조체 내에 형성된 혈관 (적색)에 대한 공초점 사진을 도시한 것이다.

도 8은 PECAM 염색된 면적을 단편 전체 면적으로 나눈 %로서 계산된 혈관 밀도 그래프를 도시한 것이다. 데이터는 PECAM 면역염색한 횡-단면 슬라이드에서 랜덤으로 선택한 15개의 서로 다른 필드에서 수집하였다. n=5; 결과를 unpaired t-검정으로 비교하였다, p<0.05.

도 9A는 CD11c+ 세포 게이팅을 보여주는 대표적인 FACS 플롯으로서, afTGF- $\beta$  비-처리된 구조체 내 세포 침투를 보여준다.

도 9B는 afTGF- $\beta$  구조체 대비, TGF- $\beta$ -결핍 구조체에서의 성숙한 CD11c+CD86+ DC의 수준 증가를 보여주는 FACS 플롯을 도시한 것이다.

도 9C는 총 CD11c+ 세포 유래의 CD11c+CD86+ 집단의 %가 TGF- $\beta$ -결핍 구조체에서 현저하게 높다는 것을 보여주는 그래프이다.

도 9D는 TGF- $\beta$ -결핍 구조체를 침투하는 CD4 T 세포의 게이팅을 도시한 FACS 플롯이다.

도 9E는 afTGF- $\beta$  구조체 및 TGF- $\beta$ -결핍 구조체에서 게이팅된 전체 침투성 CD4+ T 세포에서의 Treg %를 나타낸 FACS 플롯이다.

도 9F는 이식한 지 10일 후, afTGF- $\beta$  구조체에서 디바이스내 전체 침투성 CD4+ T 세포로부터 Treg 집단이 현저하게 증가됨을 입증해주는 그래프이다.

도 9G는 TGF- $\beta$ -결핍 구조체에서 침투성 림프구에 대한 게이팅을 나타낸 FACS 플롯이다.

도 9H는 afTGF- $\beta$  처리된 및 비-처리된 구조체에서의 CD8+ 침투성 T 세포를 나타낸 FACS 플롯이다.

도 9I는 afTGF- $\beta$  구조체 및 TGF- $\beta$ -결핍 구조체에서 전체 침투성 림프구들 중 침투성 CD8+ 집단의 %를 나타낸 그래프이다.

도 9J는 TGF- $\beta$ -결핍 구조체에서 침투성 CD8+ T 세포의 게이팅을 나타낸 FACS 플롯이다.

도 9K는 afTGF- $\beta$  처리된 및 비-처리된 구조체에서 활성 CD8+CD69+ 침투성 T 세포를 나타낸 FACS 플롯이다.

도 9L은 TGF- $\beta$ -결핍 구조체와 비교해, afTGF- $\beta$  구조체에서 전체 CD8+ 침투성 T 세포들 중 활성 CD8+CD69+ T 세포의 %가 낮음을 보여주는 그래프이다.

도 10A는 이식한 지 15일 후, afTGF- $\beta$  구조체에서 GFP+ 섬유모세포 집단의 게이팅을 나타낸 FACS 플롯이다.

도 10B는 이식한 지 3일 후 남아있는 섬유모세포들 중 GFP+ 섬유모세포의 %를 나타낸 그래프이다.

도 10C는 구조체 내부에 존재하는 아넥신 V 및 PI 염색된 GFP+ 세포를 측정하여 나타낸 FACS 플롯이다.

도 10D는 살아있는 섬유모세포의 % (GFP+annexinV-PI-)가 afTGF- $\beta$  처리 디바이스에서 현저하게 높음을 보여주는 그래프이다.

도 10E는 세포자살 섬유모세포 (GFP+annexinV+PI-)의 %가 TGF- $\beta$ -결핍 구조체에서 유의하게 높음을 보여주는 그래프이다.

도 10F는 사멸 섬유모세포 (GFP+annexinV+PI+)의 %가 TGF- $\beta$ -결핍 구조체에서 유의하게 높음을 보여주는 그래프이다. n=12, 결과는 unpaired t-검정에 의해 각 시간대에 비교하였다 \* p<0.05.

도 11A는 동종 섬유모세포의 세포용해물을 이용해 배양 및 활성화한, 이식한 지 15일 및 30일된 마우스에서 분

리된 비장 세포에 의한 IL-17 (72시간) 분비를 야생형 (WT) 마우스 대조군과 비교하여 측정된 배수 변화를 나타낸 그래프이다.

**도 11B**는 동종 섬유모세포 세포용해물을 이용해 배양 및 활성화한, 이식한 지 15일 및 30일된 마우스에서 분리된 비장 세포에 의한 IL-2 (24시간) 분비를 야생형 (WT) 마우스 대조군과 비교하여 측정된 배수 변화를 나타낸 그래프이다.

**도 11C**는 동종 섬유모세포 세포용해물을 이용해 배양 및 활성화한, 이식한 지 15일 및 30일된 마우스에서 분리된 비장 세포에 의한 IFN- $\gamma$  (48시간) 분비를 야생형 (WT) 마우스 대조군과 비교하여 측정된 배수 변화를 나타낸 그래프이다.

**도 11D**는 동종 섬유모세포 세포용해물을 이용해 배양 및 활성화한, 이식한 지 15일 및 30일된 마우스에서 분리된 비장 세포에 의한 IL-10 (48시간) 분비를 야생형 (WT) 마우스 대조군과 비교하여 측정된 배수 변화를 나타낸 그래프이다.

**도 11E**는 세포독성 분석 중에 포획된 동종 섬유모세포와 시험관내 시냅스 형성한 세포독성 CD8 (Granzyme B 염색된 CD8+, 청색) T 세포의 대표적인 공초점 사진을 도시한 것으로, CD8+ T 세포는 afTGF- $\beta$ 를 처리 또는 비-처리하여 이식한 숙주 및 WT 마우스의 전체 비장 세포에서 이식 15일 후 및 30일 후 자기적으로 분리한 다음 동종 섬유모세포와 1:4의 비율로 공-배양하였다.

**도 11F**는 세포독성 분석에서 섬유모세포와 공-배양한 CD8+CD107+ 세포의 대표적인 FACS 플롯을 도시한 것이다.

**도 12A**는 afTGF- $\beta$  구조체 및 WT 마우스와 비교해, TGF- $\beta$ -결핍 구조체로 이식된 숙주에서 생산시, 전체 CD8+ 세포들 중 세포독성 CD8+CD107+ T 세포의 %가 유의하게 높음을 보여주는 그래프이다.

**도 12B**는 afTGF- $\beta$  구조체 및 WT 마우스와 비교해, TGF- $\beta$ -결핍 구조체로 이식된 숙주에서 생산시, 전체 CD8+ 세포들 중 세포독성 CD8+CD107+ T 세포의 %가 유의하게 높음을 보여주는 FACS 플롯이다.

**도 12C**는 세포독성 분석 후 공-배양한 총 섬유모세포에서 세포자살 GFP+annexinV+PI- 섬유모세포의 %를 나타낸 그래프이다. 결과는 3세트 실험의 평균 값과 2번의 독립적인 실험들의 SEM으로 표시하며, 투-웨이 ANOVA로 비교하였다. 터키의 사후 검정을 수행해 처리 군간 차이를 구하였다. \*  $p < 0.05$ .

**도 13A**는 OTII 마우스의 비장에서 분리하여, OVA 펩타이드 (최종 펩타이드 농도: 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )가 처리 또는 비-처리된 알기네이트 스캐폴드에 접종한 비장 세포의, 활성화 72시간 이후의, 공초점 사진이다.

**도 13B**는 접종 당일 및 활성화 후 3일차 림프구의 대표적인 FACS 플롯을 도시한 것이다.

**도 14**는, OVA 활성화가 배양시 CD4+ T 세포를 유지하는데 효과적임을 보여주는, 활성화하거나 또는 활성화하지 않은, 접종 전 및 접종 3일차에 확인된 CD4+ T 세포 집단의 FACS 플롯을 상단 열에 도시한다. 하단 열은 OVA 펩타이드에 의한 CD4+ 활성화를 뒷받침해주는, OVA 활성화하거나 또는 활성화하지 않은, 접종 전 및 접종 3일차 확인된 CD4+CD25+Foxp3+ Treg 집단의 FACS 플롯이다.

**도 15A**는 afTGF- $\beta$  (50ng/스캐폴드) 처리 또는 비-처리된 알기네이트 스캐폴드에서, 골수 DC와 함께 알기네이트 스캐폴드에서 공-배양한 (총 세포  $0.5 \times 10^6$ /배양) CD4+ T 세포 (OTII 마우스에서 자기적으로 분리됨)에서의 IL-2 분비 수준을 측정하여 나타낸 그래프로서, T 세포가 OVA 펩타이드에 의해 활성화됨이 확인된다.

**도 15B**는 afTGF- $\beta$  (50ng/스캐폴드) 처리 또는 비-처리된 알기네이트 스캐폴드에서 골수 DC와 함께 알기네이트 스캐폴드에서 공-배양한 (총 세포  $0.5 \times 10^6$ /배양) CD4+ T 세포 (OTII 마우스에서 자기적으로 분리됨)에서의 IFN- $\gamma$  분비 수준을 측정하여 나타낸 그래프로서, T 세포가 OVA 펩타이드에 의해 활성화됨이 확인된다.

**도 15C**는 afTGF- $\beta$  (50ng/스캐폴드) 처리 또는 비-처리된 알기네이트 스캐폴드에서 골수 DC와 함께 알기네이트 스캐폴드에서 공-배양한 (총 세포  $0.5 \times 10^6$ /배양) CD4+ T 세포 (OTII 마우스에서 자기적으로 분리됨)에서의 IL-17 분비 수준을 측정하여 나타낸 그래프로서, T 세포가 OVA 펩타이드에 의해 활성화됨이 확인된다. afTGF- $\beta$ 의 존재 시 IFN- $\gamma$  수준과 IL-17 수준의 유의한 감소는 afTGF- $\beta$ 의 면역조절을 의미한다.

**도 15D**는 afTGF- $\beta$  (50ng/스캐폴드) 처리 또는 비-처리된 알기네이트 스캐폴드에서 골수 DC와 함께 알기네이트 스캐폴드에서 공-배양한 (총 세포  $0.5 \times 10^6$ /배양) CD4+ T 세포 (OTII 마우스에서 자기적으로 분리됨)에서의 IL-10 분비 수준을 측정하여 나타낸 그래프로서, T 세포가 OVA 펩타이드에 의해 활성화됨이 확인된다.

도 15E는 afTGF- $\beta$  처리된 배양물에서 Tregs 수준의 명백한 증가 추세를 보여주는 CD4+CD25+Foxp3+ Tregs 수준을 측정한 그래프이다. 결과는 3세트 실험의 평균 값 및 SD로 나타내며, 투웨이 ANOVA로 비교하였으며, 터키의 사후 검정을 이용해 처리 군 간의 차이를 구하였다. \*p<0.05.

도 16A는 배양물에 최종 농도 100 ng/ml (배지 0.5 ml 중의 afTGF- $\beta$  농도 50 ng/스캐폴드에 해당됨)로 첨가하고 2D 페트리 디쉬에서 OVA 펩타이드 (최종 농도: 20  $\mu$ g/ml)로 활성화한, 용해성 TGF- $\beta$ 의 존재 하에 배양된 OTII 마우스로부터 분리된 전체 비장 세포에 의한 IL-2 분비의 배수 변화를, TGF- $\beta$  및 OVA가 비치리된 대조군과 비교하여, 도시한 것으로, 비장 세포가 OVA 펩타이드의 결과로서 활성화됨을 보여준다.

도 16B는 배양물에 최종 농도 100 ng/ml (배지 0.5 ml 중의 afTGF- $\beta$  농도 50 ng/스캐폴드에 해당됨)로 첨가하고 2D 페트리 디쉬에서 OVA 펩타이드 (최종 농도: 20  $\mu$ g/ml)로 활성화한, 용해성 TGF- $\beta$ 의 존재 하에 배양된 OTII 마우스로부터 분리된 전체 비장 세포에 의한 IFN- $\gamma$  분비의 배수 변화를, TGF- $\beta$  및 OVA가 비치리된 대조군과 비교하여, 도시한 것으로, TGF- $\beta$ 의 면역조절 효과를 보여준다. IL-10 분비 변화 (d)는 TGF- $\beta$  처리 또는 비-처리한 경우의 배양물 간에 차이가 없었으며, CD4+CD25+Foxp3+ Treg 집단에서 차이가 없는 것과 일치한다.

도 16C는 배양물에 최종 농도 100 ng/ml (배지 0.5 ml 중의 afTGF- $\beta$  농도 50 ng/스캐폴드에 해당됨)로 첨가하고 2D 페트리 디쉬에서 OVA 펩타이드 (최종 농도: 20  $\mu$ g/ml)로 활성화한, 용해성 TGF- $\beta$ 의 존재 하에 배양된 OTII 마우스로부터 분리된 전체 비장 세포에 의한 IL-17 분비의 배수 변화를, TGF- $\beta$  및 OVA가 비치리된 대조군과 비교하여, 도시한 것으로, TGF- $\beta$ 의 면역조절 효과를 보여준다. IL-10 분비 변화 (d)는 TGF- $\beta$  처리 또는 비-처리한 경우의 배양물 간에 차이가 없었으며, CD4+CD25+Foxp3+ Treg 집단에서 차이가 없는 것과 일치한다.

도 16D는 배양물에 최종 농도 100 ng/ml (배지 0.5 ml 중의 afTGF- $\beta$  농도 50 ng/스캐폴드에 해당됨)로 첨가하고 2D 페트리 디쉬에서 OVA 펩타이드 (최종 농도: 20  $\mu$ g/ml)로 활성화한, 용해성 TGF- $\beta$ 의 존재 하에 배양된 OTII 마우스로부터 분리된 전체 비장 세포에 의한 IL-10 분비의 배수 변화를, TGF- $\beta$  및 OVA가 비치리된 대조군과 비교하여, 도시한 것으로, TGF- $\beta$ 의 면역조절 효과를 보여준다. IL-10 분비 변화 (d)는 TGF- $\beta$  처리 또는 비-처리한 경우의 배양물 간에 차이가 없었으며, CD4+CD25+Foxp3+ Treg 집단에서 차이가 없는 것과 일치한다.

도 16E는 2D 배양물에 접종한 후 3일차 CD4+ T 세포의 CD25 및 Foxp3 발현을 보여주는 대표적인 FACS 플롯이다.

도 17A는 용해성 TGF- $\beta$ 의 존재 하에 Tregs가 증가되지 않음을 보여주는, 대표적인 FACS 히스토그램을 도시한 것이다. 적색: TGF- $\beta$ , 청색: TGF- $\beta$ -free, 흑색: 대조군 (Tregs가 검출되지 않음).

도 17B는 TGF- $\beta$  및 OVA가 비-처리된 대조군 대비, afTGF- $\beta$  처리 또는 비-처리된, 전체 CD4+ T 세포의 CD4+CD25+Foxp3+ % 변화를 나타낸 그래프이다. 막대는 3세트 실험의 평균 값과 3번의 독립적인 실험들의 SEM을 나타내며, unpaired t-검정으로 비교한다. \*p<0.05.

도 17C는 afTGF- $\beta$  (100 ng/스캐폴드) 처리 또는 비-처리되고, GFP+ 동종 섬유모세포 ( $0.5 \times 10^6$  세포/스캐폴드)가 접종된, VEGF 및 PDGF- $\beta$ 가 (각각 200 ng/스캐폴드) 친화성으로 결합된 스캐폴드로부터 분리된 GFP+ 세포의 FACS 플롯이다. 구조체는 마우스의 신피막 하에 이식하였으며, 이식 3일 후 회수하였다.

도 17D는 이식 3일 후, afTGF- $\beta$  구조체와 TGF- $\beta$ -결핍 구조체 간에 전체 접종된 세포의 GFP+ 세포 %에 유의한 차이가 없음을 보여주는 그래프이다. n=5, 결과는 unpaired t-검정으로 비교하였다.

도 17E는 afTGF- $\beta$  구조체 또는 TGF- $\beta$ -결핍 구조체가 이식된 숙주의 비장 세포에서 자기적으로 분리하여 CD8+ 세포독성 분석을 위해 동종 섬유모세포와 공-배양한, CD8+ 세포의 FACS 플롯이다. 자기 분리에서 CD8을 발현하는 세포의 순도는 93% 보다 높았다.

도 18은 afTGF- $\beta$  구조체 또는 TGF- $\beta$ -결핍 구조체가 이식된 숙주 마우스의 비장으로부터 분리된 CD8+ T 세포를 섬유모세포와 섬유모세포 : CD8+ T 세포 1:4의 비율로 공-배양함으로써 수행한 CD8+ 세포독성 분석의 라이브 이미지이다. 대조군은 이식하지 않은 야생형 마우스에서 분리한 CD8+ T 세포였다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0010]

아래 상세한 설명에서, 구체적인 여러 설명들이 본 발명에 대한 충분한 이해를 제공하기 위해 기술된다. 그러나, 당해 기술 분야의 당업자라면, 본 발명이 이러한 구체적인 설명없이도 실시될 수 있음을 이해할 것이다. 또 다른 경우, 충분히 공지된 방법, 공정 및 구성 요소들은 본 발명을 모호하게 하지 않기 위해 구체적으로 기술하진 않는다.

- [0011] 본 발명은, 일 측면에서, 개체에게 황산화 다당류와 생활성 폴리펩타이드를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하며, 생활성 폴리펩타이드가 황산화 다당류의 설페이트 기에 비-공유적으로 결합된, 개체에서 면역관용 반응을 구축하는 방법에 관한 것이다. 일 구현예에서, 생활성 폴리펩타이드는 TGF- $\beta$ 1 (transforming growth factor  $\beta$ 1)이다.
- [0012] 본 발명은, 일 측면에서, 개체에 황산화 다당류와 TGF- $\beta$ 1 (transforming growth factor  $\beta$ 1)을 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 개체에서 면역관용 반응을 구축하는 방법에 관한 것이다. 상기 조성물의 포유류, 일 구현예에서, 인간에 투여는 TGF- $\beta$ 1의 국소 방출에 유용하며, 따라서 자가면역 반응 등의 면역 반응에 대해 상당한 국소적인 억제를 달성한다. 다른 측면에서, 면역억제는 수지상 세포 (DC)의 성숙화 저해, Tregs의 빈도 증가, IL-10-의존적인 방식으로 CD4 및 CD8 세포독성 T 세포의 작동자 기능 저하 및 전-염증성 사이토카인의 농도 감소 등의, 여러가지 TGF- $\beta$ 1 매개 효과를 통해 달성된다. 부가적인 측면에서, afTGF- $\beta$ 의 국소 면역조절 효과는 비장에 국소적으로 발휘되어, 동종 섬유모세포-특이적인 CD4 및 CD8 T 세포의 작동자 기능을 현저하게 감소시킨다. 다른 측면에서, 투여되는 조성물은 추가적인 상당한 국소 효과를 발휘할 수 있는 부가적인 생활성 폴리펩타이드를 포함한다. 이러한 방식은 전통적인 경로를 통한 전신 투여로 인해 유발될 수 있는 대규모의 부작용을 방지하는 이점을 가진다.
- [0013] 또 다른 측면에서, 본 발명은, 황산화 다당류와 생활성 폴리펩타이드를 포함하는 조성물을 개체에게 투여하여 개체에서 동종이식의 성공을 향상시키는 단계를 포함하며, 상기 생활성 폴리펩타이드가 황산화 다당류의 설페이트 기에 비-공유적으로 결합된, 개체에서 동종이식 성공을 향상시키는 방법에 관한 것이다. 일 구현예에서, 생활성 폴리펩타이드는 TGF- $\beta$ 1 (transforming growth factor  $\beta$ 1)이다.
- [0014] 본 발명은 또한 동종세포 이식에 대한 숙주 면역 반응의 국소 억제를 통해, 동종 이식 거부 반응을 저하 또는 예방하거나 또는 동종이식 성공을 개선시키는 방법에 관한 것이다. 면역 반응은, 또한 숙주와의 드래프트 병합 (draft integration)에 필수적인, 이식체의 혈관형성의 결과이다. 아래 실시예들은, 면역조절 사이토카인인 TGF  $\beta$ 1의 국소 방출이, 그렇지 않을 경우 궁극적으로 항-동종이식 세포독성을 유발하게 될, 염증성 신호전달 (예, IL-17A)을 국소적으로 억제하는 면역조절성 미세환경을 형성함을 입증해준다.
- [0015] 본 발명은 부가적으로 동종 이식 성공을 개선시키거나, 동종 세포의 세포자살 억제를 통한 동종 이식 거부 반응을 저하 또는 예방하고, 동종 세포 생존을 증가시키는 방법을 개시한다. 후술한 바와 같이, TGF  $\beta$ 1-스캐폴드는, 심지어 연장된 이식 (prolonged implantation) 후에도, 놀랍게, 예상치 못하게도, 세포자살성 동종 세포의 비율이 낮고, 동종 세포의 생존 비율이 더 높다.
- [0016] 일 구현예에서, 본 발명은, 개체에게 황산화 다당류와 생활성 폴리펩타이드를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하며, 생활성 폴리펩타이드가 TGF- $\beta$ 1 (transforming growth factor  $\beta$ 1)이고, TGF- $\beta$ 1이 황산화 다당류의 설페이트 기에 비-공유적으로 결합된, 개체에서 동종이식 거부 반응을 저하 또는 예방하는 방법을 제공한다.
- [0017] 다른 구현예에서, 본 발명은, 개체에 PDGF- $\beta$  -알기네이트 설페이트, VEGF-알기네이트 설페이트 및 TGF  $\beta$ 1-알기네이트 설페이트를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하며, 조성물이 지지 매트릭스를 더 포함하며, 지지 매트릭스가 다당류, 단백질, 세포의 기질 성분, 합성 폴리머 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 폴리머인, 개체에서 동종이식 거부 반응을 저하 또는 예방하는 방법을 제공한다.
- [0018] 다른 구현예에서, 본 발명은 동종세포 이식체의 혈관형성의 자극을 통해 동종이식체의 숙주 통합을, 숙주에 의한 동시적인 항-동종이식 면역 반응 없이, 촉진하는 방법에 관한 것이다. 따라서, 본 발명은 TGF  $\beta$ -1과 동시적으로 혈관신생 인자의 국소 방출을 통해 동종이식체 내 혈관신생을 자극하는 방법을 제공한다. 예를 들어, TGF  $\beta$  및 혈관신생 인자 VEGF 및 PDGF- $\beta$ 의 조합물과 황산화 알기네이트를 포함하는 바이오접합체의 동물 투여는, 인자들의 지속 방출 (sustained release)을 촉진하여, 혈관형성 및 성숙한 혈관 형성을 유도한다.
- [0019] 또한, 본 발명은 수지상 세포의 성숙화를 억제함으로써 면역관용 반응을 구축하는 방법에 관한 것이다. 일부 구현예에서, 후술한 바와 같이, TGF  $\beta$ 1의 방출은, 스캐폴드에 침투하는 수지상 세포들의 상당 비율이 미성숙인 상태로 있게 하여, Tregs의 빈도 증가와 세포독성 CD8 T 세포의 활성화 억제가 달성된다.
- [0020] 본 발명은, 비-배타적인 예로, TGF  $\beta$ 1 등의 생활성 폴리펩타이드의 연장된 제시 (prolonged presentation)를 추가로 제공한다. 하기에 보다 상세히 기술된 바와 같이, 본 발명의 조성물은 양으로 하전된 폴리펩타이드 및/또는 헤파린-결합성 폴리펩타이드, 예를 들어, TGF  $\beta$ 1과 가역적이고, 특이적으로 상호 작용할 수 있다. 이러한 가역적인 결합은 폴리펩타이드의 점진적인 방출을 야기하여, 장기간 지속시킬 수 있다. 본 발명은 투여 후 약 10

일 동안 유지되는 폴리펩타이드의 지속 방출을 포함한다. 다른 구현예, 지속 방출 기간은 약 15일이다. 또 다른 구현예에서, 지속 방출 기간은 약 30일이다. 다른 구현예에서, 지속 방출 기간은 약 60일이다. 또 다른 구현예에서, 지속 방출 기간은 60일 보다 장기간이다. 다른 구현예에서, 지속 방출 기간은 약 10일 내지 약 15일, 10일 내지 15일, 또는 약 15일 내지 약 30일, 또는 15일 내지 30일 또는 약 30일 내지 약 60일, 또는 30일 내지 60일, 또는 투여 후 10, 15, 30, 60일간의 범위이거나, 또는 이들 범위 내 임의의 일수이다. 본 발명은, 또한, 10일을 초과하지 않는 폴리펩타이드의 지속 방출을 포함한다. 다른 구현예에서, 지속 방출 기간은 15일을 초과하지 않는다. 또 다른 구현예에서, 지속 방출 기간은 30일을 초과하지 않는다. 다른 구현예에서, 지속 방출 기간은 60일을 초과하지 않는다. 또 다른 구현예에서, 지속 방출 기간은 90일을 초과하지 않는다. 다른 구현예에서, 지속 방출 기간은 120일을 초과하지 않는다. 일 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 폴리펩타이드의 전신 방출 (예, 개체의 혈류로의 방출)을 촉진한다. 다른 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 폴리펩타이드의 국소 방출을 촉진한다.

- [0021] 일 구현예에서, 본 발명은 개체에게 황산화 다당류와 생활성 폴리펩타이드를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하며, 생활성 폴리펩타이드가 TGF- $\beta$ 1 (transforming growth factor  $\beta$ 1)이고, TGF- $\beta$ 1이 황산화 다당류의 설페이트 기에 비-공유적으로 결합된, 개체에서 자가면역 질환 또는 장애를 치료하는 방법을 제공한다.
- [0022] 본 발명은, 또한, 개체에 황산화 다당류, 제1 생활성 폴리펩타이드 및 제2 생활성 폴리펩타이드를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하며, 제1 및 제2 생활성 폴리펩타이드는 각각 황산화 다당류의 설페이트 기에 비-공유적으로 결합되며, 조성물이 지지 매트릭스를 더 포함하고, 지지 매트릭스가 다당류, 단백질, 세포외 기질 성분, 합성 폴리머 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 폴리머인, 개체에서 자가면역 질환 또는 장애를 치료하는 방법에 관한 것이다. 일 구현예에서, 제1 생활성 폴리펩타이드는 TGF- $\beta$ 1이다. 일 구현예에서, 제2 생활성 폴리펩타이드는 마이엘린 회소돌기신경교 당단백질 (MOG)이다.
- [0023] 본 발명은, 또한, 전신 면역억제 부작용을 회피하면서도 개체에서 자가면역 질환 또는 장애를 억제 또는 치료하는 방법에 관한 것이다. 따라서, 본 발명은, 비-배타적인 예로, 자가면역 신호전달을 간섭하여 국소 억제를 유발하는 TGF $\beta$ -1 등의, 생활성 폴리펩타이드의 국소 방출을 제공한다. 본 발명에서 고려되는 자가면역 질환 및 장애로는 다발성 경화증, 1형 당뇨병 및 건선 등이 있으나, 이로 한정되는 것은 아니다.
- [0024] 다른 측면에서, 본 발명은 다발성 경화증, 건선 및 1형 당뇨병으로 이루어진 군으로부터 선택되는 자가면역 장애의 억제에 관한 것이다.
- [0025] 이에, 본 발명은, 일 측면에서, 비-배타적인 예로, 마이엘린 염기성 단백질 (MBP), 프로테오리피드 단백질 (PLP) 및 마이엘린 회소돌기신경교 당단백질 (MOG) 등의, 다발성 경화증 (MS) 자가항원 (autoantigen)에 특이적인 CD4+ T 세포에 면역관용을 유도하는 방법을 제공한다. 일 구현예에서, 본 발명은 황산화 다당류, TGF $\beta$ 1 및 MOG, 또는 이의 자생적 단편 (autogenic fragment)을 포함하는 바이오접합체를 투여함으로써, MOG 또는 이의 자생적 단편에 특이적인 CD4+ T 세포에 면역관용 효과를 유도하는 방법을 제공한다. 자가면역원성 MOG 단편들 수 종이 당해 기술 분야에 공지되어 있으며, 이러한 것으로는 마우스 MOG 아미노산 1-22, 35-55 및 64-96에 해당되는 펩타이드가 있다 (예, 미국 특허 공개번호 2009/0053249, 이의 전체 내용이 원용에 의해 본 명세서에 포함됨). 일 구현예에서, MOG 자가면역원성 단편은 펩타이드 MEVGWYRSPFSRV-VHLYRNGK (마우스 MOG35-55; 서열 번호 1)이다.
- [0026] 부가적인 측면에서, 본 발명은, 췌장  $\beta$  세포에 특이적인 CD4+ T 세포에 면역관용을 유도함으로써, (일 구현예에서, 1형 당뇨병의 기저가 되는) 췌장  $\beta$  세포의 자가면역 파괴를 예방하는 방법을 제공한다. 일 구현예에서, 본 발명은 황산화 다당류, TGF $\beta$ 1 및 동종이계 또는 동계  $\beta$  세포를 포함하는 바이오접합체를 투여함으로써 췌장  $\beta$  세포에 특이적인 CD4+ T 세포에 면역관용을 유도하는 방법을 제공한다.
- [0027] 부가적인 다른 측면에서, 본 발명은 진피 CD4+ T 세포에서 면역관용을 유도함으로써 (건선의 기저가 되는) 비정상적인 각질 형성 세포의 증식과 관련된 자가면역 염증성 신호전달을 억제하는 방법을 제공한다. 일 구현예에서, 본 발명은, 황산화 다당류, TGF $\beta$ 1 및 피부 바이옴시로부터 수득한 물질 등의 조직인 세포성 또는 분자 체제를 포함하는 바이오접합체를 진피 투여함으로써, 진피 CD4+ T 세포에서 면역관용 효과를 유도하는 방법을 제공한다.
- [0028] 용어 "생활성 폴리펩타이드"는, 본원에서, 생체내에서 다양한 약리학적 활성을 나타내는 폴리펩타이드를 지칭하며, 그러한 것으로는 성장인자, 사이토카인, 케모카인, 혈관신생 인자, 면역조절제, 호르몬 등이 있으나, 이로 한정되는 것은 아니다. 본원에서, 용어 "폴리펩타이드" 및 "단백질"은 본원에서 상호 호환적으로 사용된다. 하



나 이상의 생활성 폴리펩타이드는 양으로 하전된 폴리펩타이드 및/또는 헤파린-결합성 폴리펩타이드일 수 있다.

- [0029] 일 구현예에서, 생활성 폴리펩타이드는 TGF $\beta$ 이다. 본 발명은 TGF의 공지된 모든 이소형 (TGF $\beta$  1 - TGF $\beta$  5; TGF $\beta$  1-3는 포유류, TGF $\beta$  4는 닭에서 발견된 것이며; TGF $\beta$  5는 개구리에서 발견된 것임), 뿐만 아니라 이의 단편, 돌연변이, 상동체, 유사체 및 대립유전자 변이체를 포괄한다. 일 구현예에서, TGF $\beta$ 는 포유류 TGF $\beta$ 이다. 일 구현예에서, TGF $\beta$ 는 TGF $\beta$  1이다. 다른 구현예에서, TGF $\beta$ 는 TGF $\beta$  2이다. 다른 구현예에서, TGF $\beta$ 는 TGF $\beta$  3이다. 다른 구현예에서, TGF $\beta$ 는 인간 TGF $\beta$  1 (Genbank Accession No X02812) 또는 마우스 TGF $\beta$  1 (Genbank Accession No AJ00986)이다.
- [0030] 일 구현예에서, 용어 "양으로 하전된 폴리펩타이드"는 약 pH = 7.5의 생리 pH에서 양의 순 전하 (positive net charge)를 가지는 폴리펩타이드/단백질을 의미한다. 양으로 하전된 단백질의 예로는 인슐린, 글라티라머 (glatiramer) 아세테이트 (코폴리머 1 또는 Cop 1이라고도 함), 항-트롬빈 III, 인터페론 (IFN)- $\gamma$  (헤파린-결합 단백질이라고도 함), IGF, 소마스타틴, 에리트로포이에틴, 황체형성 호르몬-방출 호르몬 (LH-RH) 및 인터루킨, 예 IL-2 및 IL-6 등이 있으나, 이로 한정되는 것은 아니다.
- [0031] 일 구현예에서, 용어 "헤파린-결합 단백질 또는 폴리펩타이드"는 양으로 하전된 염기성 아미노산 클러스터를 가지며, 헤파린 체인 상의 구체적으로 한정된 음으로 하전된 설프 또는 카르복시기와 이온 쌍을 형성하는, 단백질을 지칭한다 (Capila and Linhardt, 2002). 헤파린-결합 단백질의 예로는 트롬보포이에틴 (TPO); 프로테아제/에스테라제, 예 항-트롬빈 III (AT III), 세린 프로테아제 저해제 (SLP1), C1 에스테라제 저해제 (C1 INH) 및 백시니아 바이러스 컴플리먼트 컨트롤 단백질 (VCP); 성장인자, 예로 섬유모세포 성장인자 (FGF, aFGF, bFGF), FGF 수용체, 혈관 내피 성장인자 (VEGF), 인슐린-유사 성장인자 (IGF), 간세포 성장인자 (HGF), TGF- $\beta$  1 (transforming growth factor  $\beta$  1), 혈소판-유래 성장인자 (PDGF, PDGF- $\alpha$  및 PDGF- $\beta$ ), 상피 성장 인자 (EGF) 및 골 형태형성 단백질 (BMP) - 예로, BMP-2, 4 및 7; 케모카인, 예로, 혈소판 인자 4 (PF-4, CXC 케모카인 리간드 4 또는 CXCL4로 지칭됨), 기질 세포 유래 인자-1 (SDF-I), IL-6, IL-8, RANTES (Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted), 단핵세포 화학주성인자 단백질-1 (MCP-I), 대식세포 염증성 펩타이드-1 (MIP-I), 림포타틴 및 프렉탈카인; 지질 또는 막-결합 단백질, 예로 아넥신 (annexin), 아포지단백질 E (ApoE); 병원성 단백질, 예로 인간 면역결핍 바이러스 타입-1 (HIV-I) 외피 단백질, 예로, HIV-I gp120, 시클로필린 A (CypA), Tat 단백질, 헤르페스 심플렉스 바이러스 (HSV)의 바이러스 외피 당단백질 gC, gB 또는 gD, 뎅기열바이러스의 외막 단백질, 플라즈모듐 파시파룸 (Plasmodium falciparum)의 포자소체 (circumsporozoite, CS) 단백질, 박테리아 표면 부착 단백질 OpaA; 및 부착 단백질, 예로 1- 및 P-셀렉틴, 헤파린-결합성 증식-관련 분자 (HB-GAM), 트롬보스폰딘 타입 I 리피드 (TSR), 펩타이드 마이엘린 희소돌기신경교 당단백질 (MOG) 및 아밀로이드 P (AP) 등이 있으나, 이로 한정되는 것은 아니다.
- [0032] 이에, 일 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법의 임의의 생활성 폴리펩타이드는, 제1 생활성 폴리펩타이드 또는 부가적인 생활성 폴리펩타이드 또는 제2 또는 제3 생활성 폴리펩타이드이든, AT III, TPO, SLP1, C1 INH, VCP, FGF, a FGF 수용체, VEGF, HGF, IGF, PDGF, BMP, EGF, CXCL4, SDF-1, IL-6, IL-8, RANTES, MCP-1, MIP-1, 림포타틴, 프렉탈카인, 아넥신 (annexin), ApoE, HIV-1 외피 단백질 gp120, CypA, Tat 단백질, 헤르페스 심플렉스 바이러스 HSV의 바이러스 외피 당단백질 gC, gB 또는 gD, 뎅기열바이러스의 외막 단백질, 플라즈모듐 파시파룸의 CS 단백질, 박테리아 표면 부착 단백질 OpaA, 1-셀렉틴, P-셀렉틴, HB-GAM, TSR, MOG 또는 AP, 또는 이들의 조합이다.
- [0033] 다른 구현예에서, 생활성 폴리펩타이드는 PDGF-BB, PDGF-AA, bFGF, aFGF, VEGF, IL-6, TPO, SDF-1, HGF, EGF, MOG, BMP-2, BMP-4, BMP-7, IGF 또는 이들의 조합이다. 다른 구현예에서, 본 발명의 방법에 사용하기 위한 조성물은 TGF-beta, VEGF 및 PDGF- $\beta$ 를 생활성 폴리펩타이드로서 포함한다.
- [0034] 본 발명의 일부 구현예에서, 하나 이상의 헤파린-결합성 폴리펩타이드는 PDGF- $\beta$ , PDGF- $\alpha$ , bFGF, aFGF, VEGF, TGF $\beta$  1, IL-6, TPO, SDF-I, HGF, EGF, BMP 또는 IGF로부터 선택된다. 본 발명의 다른 구현예들에서, 하나 이상의 생활성 폴리펩타이드는 혈관신생 인자 또는 혈관신생 활성을 나타내는 성장인자, 예를 들어, TGF- $\beta$  1, VEGF, bFGF, aFGF, PDGF- $\beta$ , IGF 및 이들의 조합이다.
- [0035] 본 발명의 일 구현예에서, 하나 이상의 혈관신생 인자는 VEGF, PDGF- $\beta$ , 또는 VEGF, PDGF-BB 및 TGF- $\beta$  1의 조합이다.
- [0036] 일 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법에서 생활성 폴리펩타이드는 사이토카인이다. 일 구현예에서, 생활성 폴리펩타이드는 TGF-beta이다. 다른 구현예에서, 생활성 폴리펩타이드는 인터루킨 (IL)-10이다. 다른 구현예에

서, 생활성 폴리펩타이드는 IL-4이다. 다른 구현예에서, 생활성 폴리펩타이드는 IL-5이다. 다른 구현예에서, 생활성 폴리펩타이드는 IL-13이다. 다른 구현예에서, 생활성 폴리펩타이드는 케모카인이다. 일 구현예에서, 케모카인은 (C-X-C 모티프) 리간드 (CXCL) 12이다. 다른 구현예에서, 케모카인은 CXCL11이다.

[0037] 본 발명에서, 바이오접합체를 구성하는 황산화 다당류는 여러가지 반복적인 단당류 유닛들로 구성될 수 있으며, 여러가지 길이일 수 있으며, 유닛을 연결하는 여러가지 타입의 결합을 가질 수 있다. 황산화 다당류는, 예를 들어, 황산화 셀룰로스와 같이 선형일 수 있거나, 예를 들어, 황산화 글리코젠과 같이 분지형일 수 있으며, 다양한 길이일 수 있으며; 예를 들어, 황산화 테트라- 또는 트리-사카라이드로 작을 수 있다. 적절한 황산화 다당류는, 비-배타적인 예로, 전분, 글리코젠, 셀룰로스, 키토산 또는 키틴 등의 동질다당류 (homopolysaccharide), 또는 비-배타적인 예로, 알긴산 (알기네이트) 염 및 히알루론산 등의 이질다당류 (heteropolysaccharide)일 수 있다.

[0038] 본 발명에서, 일 구현예에서, 황산화 다당류는 D-글루쿠론산, D-갈락투론산, D-만누론산, L-이두론산 및 글루론산과 같은 우론산 잔기를 포함한다. 우론산 잔기를 포함하는 다당류의 예로는, 비-배타적으로, 알긴산 염, 일 구현예에서, 식물 기원의 소듐 알기네이트, 펙틴, 검 (gum) 및 점질물 (mucilage); 및 동물 기원의 글리코사미노글리칸 (GAG), 예로, 히알루론산 (히알루로난) 등이 있다. 우론산을 포함하는 황산화 다당류는 화학적으로 황산화될 수 있거나 또는 천연적인 황산화 다당류일 수 있다.

[0039] 일 구현예에서, 황산화 다당류는 알기네이트 설페이트이다. 다른 구현예에서, 황산화 다당류는 히알루로난 설페이트이다.

[0040] 알긴산은 갈조류와 해초에서 수득되는 선형 다당류로서,  $\beta$ -1,4-연결된 글루쿠론산 및 만누론산 유닛들로 구성된다. 본원에서, 용어 "알기네이트"는 해조류 (예, 라미나리아 하이퍼보리아 (*Laminaria hyperborea*), 라미나리아 디기타타 (*L. digitata*), 에클로니아 막시마 (*Eclonia maxima*), 마크로시스티스 피리페라 (*Macrocystis pyrifera*), 레소니아 니그레스센스 (*Lessonia nigrescens*), 아스코필룸 코도숨 (*Ascomyllum codosum*), 라미나리아 자포니카 (*L. japonica*), 두르빌레아 안타르크티카 (*Durvillaea antarctica*) 및 두르빌레아 포타토룸 (*D. potatorum*))에서 유래되며,  $\beta$ -D-만누론산 (M) 및  $\alpha$ -L-글루론산 (G) 잔기를 다양한 비율로 포함하는, 다가음이온성 다당류 코폴리머 (polyanionic polysaccharide copolymer)를 지칭한다.

[0041] 본 발명에 사용하기 적합한 알기네이트는,  $\alpha$ -L-글루론산 및  $\beta$ -D-만누론산을, 일 구현예에서 1:1 내지 3:1 범위로, 일 구현예에서, 1.5:1 내지 2.5: 1, 일 구현예에서, 약 2의 범위로 포함하며, 일 구현예에서, 1 내지 300 kDa, 일 구현예에서, 5 내지 200 kDa, 일 구현예에서, 10 내지 100 kDa, 일 구현예에서, 20 내지 50 kDa 범위의 분자량을 가진다.

[0042] 알기네이트는  $\text{Ca}^{2+}$  및  $\text{Ba}^{2+}$  등의 2가 양이온의 존재 시 젤화된다. 약학/의학 분야에서, 이 물질은 대부분의 세포 (박테리아, 식물 및 포유류 세포)에 대한 캡슐 물질로서 성공적으로 사용되고 있다. 분자의 경우, 이는 훨씬 덜 효율적이며, 심지어 250 kDa 크기의 거대 분자는 알기네이트 하이드로겔 시스템에서 빠르게 분리된다. 특히, 5 내지 100 kDa 범위의 크기를 가진, 사이토카인, 증식 인자와 같은 대상 생물학적 분자는 빠르게 분리된다.

[0043] 히알루론산은 글루쿠론산 및 N-아세틸 글루코사민으로 된 반복적인 이당류 유닛들로 구성되며, 세포외 기질에서 발견되는 코어 컴플렉스 프로테오글리칸 응집체를 형성한다.

[0044] 다당류의 황산화는, 다양한 사이토카인 및 성장인자와 같은 중요한 신호 단백질의 결합 및 제어 방출을 허용하는 특성을 부여하는 것으로, 기존에 공지되어 있다. 알기네이트 설페이트 및 히알루로난 설페이트 둘다 바이오접합체 형성시 헤파란 설페이트 및 헤파린의 생물학적 특이성을 모방하는 것으로 확인되었다 (예, WO 2007/043050, 이의 전체 내용이 원용에 의해 본 명세서에 포함됨).

[0045] 당해 기술 분야의 당업자가 이해하는 바와 같이, 생활성 폴리펩타이드와 황산화 다당류 간의 결합은 이온 결합, 정전기적 상호작용, 소수성 상호작용, 수소 결합 또는 반 데르 발스 힘을 포함하는 가역적인 비-공유 결합으로부터 선택된다.

[0046] 생활성 폴리펩타이드는, 양 전하를 가짐으로써, 황 기로 인해 음 전하를 띠는, 황산화 다당류에 가역적이고 비-공유적으로 결합될 수 있는 것으로, 이해되어야 한다.

[0047] 이에, 본 발명은 하나 이상의 생활성 폴리펩타이드의 국소화된 지속 방출 방법을 제공한다.

[0048] 본 발명의 방법에 따르면, 바이오접합체는 인체의 임의 부위에 주입 또는 이식될 수 있으며, 생활성 폴리펩타이드

드(들)의 전달 시스템으로서 이용된다. 일 구현예에서, 본 발명의 바이오접합체는 유동성 젤의 형태일 수 있다. 다른 구현예에서, 바이오접합체는 단단한 이식가능한 스캐폴드로서 사전성형 (preformulate)될 수 있다. 추가적인 구현예에서, 이식가능한 스캐폴드는 지지 매트릭스를 추가로 포함할 수 있다.

- [0049] 매트릭스는 바이오접합체의 지지체 또는 캐리어로서 이용할 수 있으며, 입자 또는 다공성 물질로 구성될 수 있다. 매트릭스 물질은 유연하며, 제자리에 고정될 수 있어, 의도하지 않은 위치로의 이동이 방지된다. 폴리머 매트릭스 물질은 천연 또는 합성 물질일 수 있으며, 비-배타적으로, 폴리에틸렌 글리콜 (폴리에틸렌 옥사이드), 폴리비닐 알코올), 폴리락트산, 폴리글리콜산 및 폴리하이드록시부티레이트 등의 합성 폴리머, 또는 콜라겐, 피브린 및 젤라틴과 같은 천연 폴리머, 또는 키토산 및 알기네이트와 같은 다당류 등이 있다.
- [0050] 매트릭스는, 예를 들어, 하이드로겔, 비드, 미소구 (마이크로비드), 하이드로겔 마이크로캡슐, 스폰지, 스캐폴드, 폼 (foam), 콜로이드형 분산물, 나노입자, 현탁물 등의, 전달 방식에 적절한 임의의 형태일 수 있다. 따라서, 황산화 다당류 및 생활성 펩타이드로 된 바이오접합체에 기초한 지속 방출 투약 형태는 액체, 메쉬, 스폰지, 파이버 및 하이드로겔로서 제조될 수 있다.
- [0051] 본원에서, 용어 "하이드로겔"은 물을 함유할 수 있는 천연 또는 합성 친수성 폴리머 체인으로 된 네트워크를 지칭한다. 이러한 네트워크를 형성할 수 있는 화합물의 예로는 알기네이트, 부분적으로 칼슘 가교된 알기네이트 용액, 키토산 및 점성 히알루로난이 있다.
- [0052] 본원에서, 용어 "바이오접합체"는 생활성 폴리펩타이드에 공유적으로 또는 비-공유적으로 결합된 황산화 다당류를 의미한다. 비-공유적 결합의 예로는 이온 결합, 정전기 상호작용, 소수성 상호작용, 수소 결합 또는 반 데르 발스 힘을 포함하는 결합이다.
- [0053] 본원에서, 용어 "스캐폴드"는 공동 (void)을 포함하는 임의의 합성 또는 유기 구조를 지칭한다. 이러한 스캐폴드의 비-배타적인 예는 몰드 (mold), 캐스트 (cast) 및 포유류의 손상된 조직내 공동이다.
- [0054] 본 발명의 조성물은 임의의 적절한 방법에 의해, 예를 들어, 간내, 진피내, 경피 (예, 서방형 제형), 근육내, 복막내, 정맥내, 관상동맥내, 피하, 경구, 경막외, 국소 및 비강내 경로에 의해 투여될 수 있다. 또한, 투여는 개체에 임플란트 (또는 이의 단편)를 외과적으로 투여, 이식, 삽입 또는 주입하는 것을 포함한다. 임플란트 (또는 단편)는 피하, 근육내 위치되거나, 또는 의도한 기능을 임플란트가 수행하도록 허용할 수 있는 다른 신체 위치에 위치될 수 있다. 일반적으로, 임플란트 (또는 단편)는, 비-배타적인 예로, 개체의 상완, 등 또는 복부 등의, 부위에 피하 이식에 의해 투여된다. 투여하기에 적합한 또 다른 부위는 의학 전문가에 의해 쉽게 결정될 수 있다. 복수의 임플란트 또는 단편은 원하는 치료 용량을 달성하도록 투여될 수 있다. 임의의 또 다른 치료학적으로 유용한 투여 경로가 사용될 수 있다. 투여는 또한 본원에 기술된 조성물의 개체로의 전신 투여 또는 국소 투여를 포함한다.
- [0055] 용어 "개체"는 인간을 포함하나, 이로 한정되진 않는다. 다른 구현예에서, 개체는 쥐과 동물이며, 일 구현예에서, 마우스이고, 다른 구현예에서, 랫이다. 다른 구현예에서, 개체는 개, 고양이, 소, 양 또는 돼지이다. 다른 구현예에서, 개체는 포유류이다.
- [0056] 황산화 다당류 바이오접합체를 제조하는 방법들은 잘 알려져 있으며 (예, 미국 특허 공개번호 Pub. 2015/0051148, 이의 전체 내용이 원용에 의해 본 명세서에 포함됨), 아래에서 추가로 기술된다.
- [0057] 본 발명은 황산화 및 비-황산화 다당류, 예를 들어 알기네이트 및 알기네이트 설페이트의 혼합물을 포함한다. 본 발명에서, 황산화 다당류의 비율은 다당류 총 중량에 대해 약 1% 내지 약 40% 범위일 수 있으며, 일 구현예에서, 다당류의 총 중량에 대해 약 3% 내지 약 30% 범위, 일 구현예에서, 다당류의 총 중량에 대해 약 4% 내지 약 20% 범위, 일 구현예에서, 다당류의 총 중량에 대해 약 5% 내지 약 10% 범위일 수 있다. 다른 예로, 상기한 비율은 중량%이다. 다른 구현예에서, 결합 및 바이오접합체로부터의 방출은 다당류 황산화 수준에 의해, 그리고 전달 시스템의 황산화 다당류 설페이트 병합 수준에 의해 조절할 수 있다.
- [0058] 본 발명은 또한 황산화 다당류-생활성 폴리펩타이드 바이오접합체에 약제학적으로 허용가능한 담체의 첨가를 고려한다. 용어 "약제학적으로 허용가능한 담체"는 의도한 타겟에 활성 성분을 전달하고, 인간 또는 다른 수여 유기체에 유해하지 않은, 비히클을 지칭한다. 본원에서, "약제학"은 인간 및 수의학 약제학 둘다를 망라하는 것으로 이해될 것이다. 사용가능한 담체로는, 예를 들어, 물, 아세톤, 에탄올, 에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜, 부탄- 1,3-다이올, 이소프로필 미리스테이트, 이소프로필 팔미테이트, 미네랄 오일 및 화학물질로 구성된 폴리머, 예, 폴리글리콜산 또는 폴리하이드록시부티레이트 또는 콜라겐, 피브린과 같은 천연 폴리머, 키토산 및 알기네이트와 같은 다당류 등이 있다. 담체는 전달 방식에 적절한 임의의 형태, 예를 들어, 용액, 콜로이드형 분산



물, 에멀전 (수중유 또는 유중수), 현탁물, 크림, 로션, 젤, 폼, 무스, 스프레이 등일 수 있다. 약학적 조성물의 제형화 방법 및 구성 성분들은 잘 알려져 있으며, 예를 들어, Remington's *Pharmaceutical Sciences, Eighteenth Edition*, A. R. Gennaro, Ed., Mack Publishing Co. Easton Pa., 1990에서 찾아볼 수 있다. 본 발명의 일 구현예에서, 담체는 수성 완충제이다. 다른 구현예에서, 담체는 다당류이고, 일 구현예에서, 알기네이트 하이드로겔이고, 또는 다른 구현예에서, 히알루론산이다.

[0059] 면역관용 반응의 예로는 동종이식 성공, 동종이식 거부 반응 결핍, 자가면역 장애의 억제, 동종 세포 이식에 대한 면역 반응의 억제, 동종 세포의 세포자살 억제, 동종 세포의 생존성 증가, 동종 세포 이식체의 혈관형성 자극, 생활성 폴리펩타이드의 연장된 제시, 염증성 신호전달의 억제, 수지상 세포의 성숙화 억제, CD8+ T 세포의 세포독성 반응 억제, 및 조절성 T 세포의 분화 자극 등이 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다.

[0060] 본 발명의 조성물에 의해 치료되는 질환 또는 장애의 예로는, 동종이식 거부 반응, 다발성 경화증, 건선, 1형 당뇨병, 류마티스 관절염, 전신성 홍반성 낭창, 중증 근무력증, 하시모토 갑상선염, 원발성 담즙성 간경변, 황성 만성 간염, 부신염/애디슨 질환, 다발성 근염, 피부근염, 자가면역 용혈성 빈혈, 심근염, 심근심낭염, 경피증, 포도막염 (파코 포도막염 (phacouveitis) 및 교감성 안염) 심상성 천포창, 유천포창, 악성 빈혈, 자가면역 위축성 위염, 크론질환, 및 궤양성 대장염 등이 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다.

[0061] 본원에 인용된 모든 특허, 특허 출원 및 과학 간행물들은 그 전체 내용이 원용에 의해 본 명세서에 포함된다.

[0062] 이제 본 발명은 일부 비-제한적인 실시예를 들어 설명될 것이다.

## [0063] 실시예

### [0064] 재료 및 방법

### [0065] 화학제

[0066] 소듐 알기네이트 (>65% 글루론산 모노머 함량; VLVG의 M.W. 30 kDa 및 LVG 100 kDa)는 NovaMatrix, FMC BioPolymer (노르웨이 드람멘)에서 구입하였다. 세포 배양 배지는, 10% 소 태아 혈청 (FBS, HyClone™), 2mm L-글루타민, 100 U/mL 페니실린, 1 µg/mL 스트렙토마이신 (Pen/Strep), 2.5 U/mL Nystatin (모두 Biological Industries 사에서 구입, 이스라엘 Kibbutz Beth HaEmek) 및 50 µM β-머캅토에탄올 (Sigma-Aldrich, 이스라엘 Rehovot)이 첨가된, Gibco (미국 CA)에서 구입한, IMDM (Iscove's Modeified Dulbecoo's Medium) (골수 유래 수지상 세포 (bmDC) 배지) 또는 DMEM (Dulbecoo's Modified Eagle Medium) (클론 배지)이다. HBSS (Hank's balanced salt solution) 및 PBS (phosphate buffer saline) 역시 Biological Industries 사에서 구입하였다. ACK (Ammonium-Chloride-Potassium) 세포용해 완충액은 BioWhittaker (Walkersville, MD, USA) 사에서 구입하였다. 이소플루란은 Minrad (NY, USA) 사에서 구입하였다. CD4+ 및 CD8+ T-세포 정제 키트는 STEMCELL™ Technologies (Vancouver, Canada)에서 구입하였다. ELISA, FACS, 웨스턴 블롯팅 및 IHC를 위한 항체는, 달리 언급되지 않은 한, BioLegend (CA, USA)에서 구입하였다. 혈관 내피 성장인자 (VEGF), 혈소판-유래 성장인자 (PDGF-β) 및 형질변환 성장인자 β1 (TGF-β)은 PeproTech (NJ, USA)에서 구입하였다. 웨스턴 블롯팅에 사용되는 포스포타제 저해제 및 니트로셀룰로스 막은 Santa Cruz Biotech (TX, USA)에서 구입하였다. Tissue-Tek O.C.T. 화합물은 Sakura (CA, USA)에서 구입하였다. 달리 언급되지 않은 한, 그외 화합물들은 모두 Sigma-Aldrich에서 구입하였다. 오발부민 (OVA) 펩타이드는 GenScript (NJ, USA)에서 구입하였다.

### [0067] 동물 및 세포주

[0068] C57/B16 마우스 및 CD11cdnR 형질전환 마우스는 Jackson Laboratory (Maine, USA)에서 구입하였다. OVA-특이적 인, MHC 클래스 II-제한된 alpha beta T 세포 수용체 (OTII) 형질전환 마우스는 이스라엘 네게브의 벤 구리온 대학의 엘리 루이스 박사로부터 친절하게 선물로 제공받았다. 마우스 모두 벤-구리온 대학의 의학 센터 (이스라엘 브엘 세바)의 동물 시설에서 사육 및 교배하였으며, 자동멸균된 잠자리, 사료 및 물이 구비된 자동멸균된 케이지에서 유지시켰다.

[0069] NIH/3T3 섬유모세포 세포주 (ATCC® CRL1658™)는 네게브의 벤 구리온 대학의 엘리 루이스 박사로부터 친절하게 선물로 제공받았다.

### [0070] 알기네이트 매트릭스의 제조

[0071] 부착 펩타이드 G4RGDY 및 해파린-결합성 펩타이드 G4SPRRARVTY (RGD/HBP)가 공유 결합된 알기네이트를 기존에 공지된 바와 같이 합성하였으며, Freeman et al. 2009 (*Biomaterials*, 2009;30(2122-31)) 및 Freeman et al.

2008 (*Biomaterials*. 2008;29(3260-8))에 따라 알기네이트-설페이트를 합성하였다. 마크로포러스 스캐폴드를 동결-건조 기법에 의해 제조하였다. 간략하게는, 균질한 칼슘 이온 분포를 달성하기 위해 용액을 균질화함으로써, 1.2% (w/v) 소듐 알기네이트 용액을 1.32% (w/v) D-글루콘산/헤미칼슘 염과 가교하였다. 가교된 용액 내 최종 성분의 농도는, 알기네이트 및 가교제 각각이 1.0% 및 0.22% (w/v)였다. 가교된 알기네이트 용액 50  $\mu$ l를 96웰 플레이트의 각 웰에 넣어, 4°C로 냉각한 다음 24시간 동안 냉동 (-20°C)하여 0.08 bar 및 (-57°C)에서 48시간 동안 동결건조하였다. 스캐폴드의 멸균 처리는 생물학적 후드에서 1시간 동안 자외선 (UV)에 노출시켜 달성하였다.

**[0072] 시험관내 방출 실험 및 TGF- $\beta$  생활성 평가**

**[0073]** afTGF- $\beta$ 의 방출 실험은 2개의 스캐폴드 그룹에서 검사하였다: 프리스틴 알기네이트 스캐폴드 및 알기네이트/알기네이트-설페이트 (Alg/AlgS) 스캐폴드 (즉, 90% 프리스틴 알기네이트 + 10% 알기네이트 설페이트). TGF- $\beta$ 가 탑재된 스캐폴드는 회전식 교반기 위의 48웰 플레이트에서 배지 (글루코스 고 함유 DMEM + 100 U/mL 페니실린, 0.1 mg/mL 스트렙토마이신, 0.1 mg/mL 네오마이신 및 0.1% 소 혈청 알부민 (BSA) (w/v)) 500  $\mu$ l 중에 7일간 37°C에서 무균 조건 하에 인큐베이션하였다. TGF- $\beta$ 를 스캐폴드에 탑재한 후 0일, 1일, 3일 및 7일째에 배지 샘플을 수집하여, 항-인간 재조합 TGF- $\beta$  ELISA 키트를 제조사의 지침에 따라 사용하여 방출된 TGF- $\beta$ 를 분석하였다. 상기 지정된 시점에 남아있는 afTGF- $\beta$ 를 정량하기 위해, 스캐폴드 샘플을 취하여 에틸렌다이아민 테트라아세트산 (EDTA)에 용해하였다. 알기네이트 체인에서 afTGF- $\beta$ 를 용해시키기 위해 용액의 pH를 3으로 만들고, 원심분리하여 상 분리를 달성하였다. ELISA 수행 전에, 용액의 pH를 다시 pH=7로 조정하였다. 각 시점에 afTGF- $\beta$ 의 %를 (TGF- $\beta$ 의 양/초기 TGF- $\beta$  투입량) x 100으로 계산하였다.

**[0074] 전체 비장 세포의 분리 및 배양**

**[0075]** 동물을 안락사시키고, 비장을 취하여 균질화한 다음 70  $\mu$ m 메쉬로 여과하여 단일 세포 현탁액을 수득하였다. 적혈구를 ACK 완충제 300  $\mu$ l로 세포용해시키고, 남아있는 세포를 계수하였다. 세포는 클론 배지 (DMEM + 10% 소 태아 혈청, 10 mM HEPES, 1 mM 소듐 피루베이트, 10 mM 비-필수 아미노산, 1% Pen/Strep 및 50  $\mu$ M  $\beta$ -머캅토에탄올)에서 배양하였다.

**[0076] CD4+ 및 CD8+ T 세포의 자기에 의한 분리**

**[0077]** 전체 비장 세포의 단일 세포 현탁액을 수득한 후, CD4+ T 세포 또는 CD8+ T 세포를 EasySep™ Magnet (STEMCELL Technologies, Vancouver, Canada)를 제조사의 지침에 따라 사용하여 자기 비드 네거티브 선별 키트로 분리하였다. 정제된 T 세포를 이후 유세포 측정을 위해 CD4 또는 CD8로 염색하였으며, 유세포 측정으로 분석하여 정제를 평가하였다.

**[0078] 골수-유래 수지상 세포의 정제 및 배양**

**[0079]** 골수-유래 전구체를 과립구-대식세포 콜로니-자극 인자 (GM-CSF)와 함께, 기존 실험에서 몇가지 수정을 가한 방법에 따라 배양하여, 수지상 세포 (DC)를 구축하였다. 0일에, 4-12주령 C57/B16 마우스에서 대퇴골 및 경골을 취하여, 거즈 패드를 사용해 주변 조직을 제거하였다. 그 후, 뼈를 차가운 PBS에 넣고, 팁을 가위로 제거하였으며, 27 G 바늘을 사용해 차가운 PBS로 골수를 플러싱하였다. 수득되는 현탁액을 70  $\mu$ m 메쉬로 여과하고, 적혈구를 100  $\mu$ l ACK 완충제로 1분간 세포용해하였다. 세포 현탁액을 HBSS로 2번 행구고, 150 g에서 6분간 6°C에서 원심분리한 다음 DC 배지에 재현탁하였다 [IMDM + 10% FBS, 2 mM L-글루타민, 페니실린 (100 U/ml), 스트렙토마이신 (1  $\mu$ g/ml), 니스타틴 (2.5 U/ml), 50  $\mu$ M  $\beta$ -머캅토에탄올 및 J554 세포 유래의 20% GM-CSF 상층액 (하기 참조)]. 세포를 배지 10 ml에서  $5 \times 10^6$  세포/디쉬의 밀도로 세균용 90 mm 페트리 디쉬에 접종하여, 8일간 배양하였다. 세포를 습식 챔버에서 37°C 및 5% CO<sub>2</sub>에서 배양하였다. DC 배지 및 GM-CSF를 3일 및 5일에 교체하고, 8일에 추가적인 실험을 위해 준비되었다.

**[0080] GM-CSF를 함유한 상층액의 준비**

**[0081]** 뮤라인 GM-CSF 구조체로 형질전환된 J558 세포는 엔젤 포르가도 (이스라엘 네게브의 벤 구리온 대학) 교수로부터 선물로 제공받았다. 형질전환된 세포는 2주간 1 mg/ml G-418의 존재 하에 배양하여 선별하였으며, 이를 조직 배양 플라스크에  $\sim 2 \times 10^5$  세포/ml 밀도로 접종하였다. 그런 후, 3주간 2-3일마다 세포를 배양 배지에 1:5로 희석하였다. 상층액을 0.2  $\mu$ m 필터로 여과하고, (-80°C)에서 보관하였다.

**[0082] 매트릭스에 세포 접종 및 활성화: 시험관내 배양**

- [0083] 트라이 알기네이트/알기네이트-설페이트 매트릭스에, TGF- $\beta$ 와 함께 또는 TGF- $\beta$  첨가없이, 세포 현탁액 14  $\mu$ l를 점적하여, 세포를 접종하였다 ( $0.5 \times 10^6$  총 세포/매트릭스). 세포 구조체를 30초간 500 rpm에서 원심분리하고, 10분간 37°C 및 5% CO<sub>2</sub>에서 배양하여 매트릭스에 세포가 분포되게 하였다. 그런 후, 배양 배지 200  $\mu$ l를 점진적으로 첨가하였으며, 세포 디바이스를 2시간 동안 배양하였다.
- [0084] 세포 활성화를 위해, 세포 구조체를 48웰 플레이트로 이동시켜, 배양 배지 1 ml을 단독으로 또는 OVA 펩타이드 (최종 펩타이드 농도: 20 mg/ml)와 함께 첨가하였다. 습식 인큐베이터에서 37°C 및 5% CO<sub>2</sub> 하에 배양하였다.
- [0085] **IL-10 저해**
- [0086] 정제된 항-마우스 IL-10 (Biolegend; Cat 505012)을 IL-10 저해제로서 최종 농도 1 ng/ml (배양물내 IL-10의 최대 농도 보다 높은 수준)로 첨가하였다. 샌드위치 ELISA에서 배양물 내 미량의 IL-10은 확인되지 않았다.
- [0087] **NIH 3T3 섬유모세포의 레트로바이러스 감염**
- [0088] PLAT-E 세포를, 10% FBS 및 0.5% 페니실린, 스트렙토마이신, 블라스티시딘 및 푸로마이신이 함유된 DMEM에서 유지시켰다. PLAT-E 패키징 세포를 100 mm 디쉬 당  $8 \times 10^6$  세포로 접종하여, 밤새 배양하였다. 다음날, PolyJet 시험관내 형질감염 시약 (SignaGen, MD, USA)을 사용해 pMX-IRES-GFP 벡터로 세포를 형질감염시켰다. 형질감염 24 시간 후, 배지를 새로운 배지로 교체하고, 형질감염 후 24시간 및 48시간에 배지를 수집하였다.
- [0089] 형질감염 하루 전, 3T3/NIH 섬유모세포를 12웰 플레이트 당  $10^5$  세포로 접종하였다. 바이러스-함유 상층액 (24 시간 후 수집)에 2  $\mu$ g/ml 프로타민 설페이트를 첨가하여 섬유모세포 디쉬로 이동시킨 다음 밤새 배양하였다. 형질감염 24시간 후, 바이러스-함유 배지를 48시간 상층액으로 교체하였다. 섬유모세포는 형질감염 사이클 3번 수행하였다.
- [0090] **매트릭스 내 NIH/3T3 섬유모세포 접종: 생체내**
- [0091] 세포 현탁액 (즉, 200 ng TGF- $\beta$ 이 첨가 또는 TGF- $\beta$  비-첨가된 DMEM 중의 세포) 30  $\mu$ l을 건조된 공유-결합된 RGD/HBP 알기네이트/알기네이트-설페이트 매트릭스에 점적하여, (상기 기술된 바와 같이) GFP를 발현하도록 감염된 NIH/3T3 섬유모세포를 접종하였다 ( $0.5 \times 10^6$  전체 세포/매트릭스). 세포 현탁액 30  $\mu$ l는 액세스 액체 남김 없이 스캐폴드 전체를 젖시기에 적절한 부피인 것으로 확인되어, 성장인자들 모두 스캐폴드에 최고 수준으로 결합되게 보장한다. 매트릭스를 5분간 37°C 및 5% CO<sub>2</sub>에서 인큐베이션하여, 구조체를 이식하기 전에 스캐폴드 내에 세포가 분포되게 하였다.
- [0092] **디바이스 이식**
- [0093] 세포를 매트릭스에 접종한 직후, 세포 이식 디바이스를 이소플루란을 이용한 마취 장치로 마취시킨 C57/B16 야생형 마우스의 좌측 신피막 하에 이식하였다. 이식 후 여러 시기 (10일, 15일 또는 30일)에, 세포 이식 디바이스를 둘러싼 섬유 조직과 함께 외과적으로 분리하였다. 이의 혈관형성을 면역조직화학으로 분석하고, 침투성 림프구 집단과 섬유모세포의 생존성을 유세포 측정으로 분석하였다. 이식 후 15일 및 30일에, 전체-림프구 배양 및 CD8+ 세포독성 분석을 위해 비장을 분리하였다.
- [0094] **섬유모세포 세포용해물**
- [0095] NIH/3T3 섬유모세포 (세포  $10^7$ )를 냉동 및 해동 사이클을 5회 수행하고, 원심분리한 다음 이의 총 단백질 농도를 Bio-Rad 단백질 분석 (Bio-Rad, Israel)으로 측정하였다.
- [0096] **섬유모세포 세포용해물을 이용한 전체 비장 세포의 활성화**
- [0097] 이식 후 15일 및 30일째에, 전체 비장 세포를 96웰 U형 플레이트 ( $2 \times 10^4$  세포/웰)에서 배양하였으며, 섬유모세포 세포용해물 (최종 단백질 농도: 10 mg/ml)로 활성화하였다.
- [0098] **CD8+ 세포독성 분석**
- [0099] CD8+ T 세포는 전술한 바와 같이 이식 후 15일 및 30일에 전체 비장 세포에서 자기에 의해 분리하였다. CD8+ T 세포 및 NIH 3T3 섬유모세포를 4:1의 비율로 공-배양하였다. 공-배양한 지 2시간 및 12시간에, CD8+ T 세포의 세포독성과 섬유모세포의 생존성을 FACS로 분석하였다.

[0100] 웨스턴 블롯팅

[0101] NIH/3T3 섬유모세포에 5 ng/ml TGF- $\beta$ 를 40분간 처리하고, 프로테아제 저해제 칵테일과 포스파타제 저해제가 첨가된 방사면역침강 분석 (RIPA) 완충제 [150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 50 mM Tris-HCl (pH=7.5), 1% NP-40]를 사용해 세포 용해물을 획득하였다. 세포를 얼음 위에서 30분간 RIPA와 함께 인큐베이션한 다음 13,000 rpm에서 원심 분리하였다. 상층액을 수집하여, Bio-Rad 단백질 분석으로 단백질 농도를 측정하였으며, 단백질 30  $\mu$ g/웰로 사용하여 SDS-PAGE를 수행한 다음 이를 니트로셀룰로스 막으로 이동시켰다. 막을 실온에서 1시간 동안 Tris-완충화된 염수 + 0.5% 폴리소르베이트 20 (TWEEN 20) (TBST) 중의 5% BSA (MP Biochemicals, Santa Ana, Ca) 또는 5% milk로 차단한 다음, 일차 항체와 함께 4℃에서 밤새 인큐베이션하였다. 다음과 같은 일차 항체를 사용해 단백질을 검출하였다: 토끼 항-포스포-SMAD2, 토끼 항-SMAD2/3 (둘다 Cell Signaling에서 구입, Danvers, MA), 및 마우스 항-액틴 (MP Biochemicals, Santa Ana, Ca). 이차 호스래디시 퍼옥시다제 (HRP)-접합 항체는 염소 항-마우스 IgG (Jackson labs, Sacramento, CA) 및 당나귀 항-토끼 IgG (Amersham, GE healthcare, UK)였다. Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate kit (Thermo Scientific, Waltham, MA)를 사용해 화학발광을 유도하였으며, ImageQuant LAS 4000 소프트웨어 (GE Healthcare Life Sciences, UK)로 검출하였다. 밴드의 밀도를 ImageJ 소프트웨어로 정량하였다.

[0102] 유세포 측정 분석

[0103] 시험관내 실험 후 매트릭스 분석을 위해, 매트릭스를 먼저 용해한 다음 원심분리하여 세포를 획득하고, HBSS로 헹구고 다시 원심분리하여 FACS 완충제 (2% FBS/PBS)에 현탁하였다. 생체내 이식 후 세포 이식 디바이스를 분석하기 위해, 매트릭스와 주변 섬유 조직을 균질화하여 70  $\mu$ m 메쉬로 여과하여 단일 세포 현탁액을 획득하였으며, 세포를 원심분리하여 FACS 완충제 (2% FBS/PBS)에 현탁하였다.

[0104] 단일 세포 현탁액을 획득한 후, Fc-차단제를 5분간 첨가하여 비-특이적인 항원 결합을 방지하였다. 그 후, 형광 항체를 제조사의 지침에 따라 첨가하고, 플레이트를 15분간 얼음 위에서 인큐베이션하였다. 그런 후, 샘플을 FACS 완충제로 헹구고, 3분간 6℃에서 420 g로 2번 원심분리하였다.

[0105] 세포내 FACS 염색 (Foxp3)을 위해, 세포를 먼저 형광 항체로 염색한 다음 고정 완충액에서 20분간 인큐베이션한 후 2번 헹구고 15분간 투과화 완충액에서 인큐베이션하였다. 그 후, 세포를 FACS 완충액으로 헹구고, 30분간 세포내 항체와 인큐베이션한 다음 원심분리하여 FACS 완충액에 현탁하였다. Gallios™ Flow Cytometer (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA)를 FlowJo 소프트웨어를 사용해 이용하여 유세포 측정 분석을 수행하였다.

[0106] 실험에 사용되는 모든 항체는 fluor-접합 항체였으며, APC-Cy7-접합된 항-CD4 (Biolegend; cat 100414), PerCP-접합된 항-CD8 (Biolegend; cat 100732), PE-접합된 항-CD25 (Biolegend; cat 101904), PE-Cy7-접합된 항-CD69 (Biolegend; cat 104512), APC-접합된 항-CD107a (Biolegend; cat 121614), FITC-접합된 항-FoxP3 (Biolegend; cat 137214), PE/Dazzle-접합된 항-CD11c (Biolegend; cat 117348), 항-CD86 Brilliant Violet (Biolegend; cat 305431), APC-접합된 아넥신 V (Biolegend; cat 640920) 및 PI (Biolegend; cat 421301)를 포함하였다.

[0107] ELISA에 의한 사이토카인 분비 분석

[0108] OVA 펩타이드 또는 섬유모세포 세포용해물을 이용하여 활성화 후 시험관내 및 생체의 실험에서 세포-프리 (cell-free) 상층액을 획득하였다. IL-2를 측정하기 위해, 상층액을 세포 활성화 후 24시간에 수집하였다. IFN- $\gamma$  측정 및 IL-10과 IL-17A를 측정하기 위해, 세포 활성화 후 각각 48시간 및 72시간에 상층액을 수집하였다. 상층액에서 사이토카인 농도를 측정하기 위해 샌드위치 ELISA를 제조사의 지침에 따라 수행하였다.

[0109] 면역조직화학 및 공초점 이미징 분석

[0110] 생체내 혈관형성 분석을 위해, 세포 이식 디바이스 및 이를 둘러싼 섬유 조직을 동물에서 적출하여, 4% 파라포름알데하이드 (PFA)에 24시간 고정한 다음 슈크로스 용액 (30%)에 48시간 고정하였다. 그런 후, 디바이스를 OCT (Optimal Cutting Temperature compound)로 임베딩하여 (-80)℃에 보관하였다. 수평 조직 단편 (20  $\mu$ m 두께)을 크라이오스태트 (Lecia CM3050 S)로 절단하여, 사용시까지 (-80)℃에 보관하였다. 조직 단편을 PBS/TWEEN (0.05% v/v) 중에 헹구었다. 염색하기 전에, 1차 항체 희석 완충액을 사용해 비-특이적인 결합을 차단하였다. 그런 후, 조직 단편을 1차 단일클론 항-마우스 CD31 항체 (Biolegend; cat 910003)와 인큐베이션하고, Alexa Fluor 633-접합된 항-rat IgG (Biolegend; cat 405416)로 염색하였다.

[0111] 조직 단편의 공초점 영상 촬영을 Nikon C1si 레이저 스캐닝 공초점 현미경으로 수행하였다. 혈관 밀도를 전체



이미지 영역에서 혈소판 내피 세포 유착 분자 (PECAM) CD31-점유된 영역의 %로서 계산하였으며, Imaris 소프트웨어 (Bitplane scientific solutions, South Windsor, CT)을 이용해, PECAM-면역염색 조직 단편 슬라이드들에서 랜덤으로 선택한 15개의 필드에서 구하였다.

[0112] CD8+ 세포독성 영상 촬영을 위해, CD8+ T 세포를 SNARF1 (Invitrogen, CA, USA)으로 제조사의 지침에 따라 염색한 후, NIH/3T3 섬유모세포와 공-배양하였다. 공-배양한 지 12시간 후, 웰내 세포를 4% PFA로 고정하였다. Granzyme B에 대한 염색 전에, 1차 항체 희석 완충액을 사용해 비-특이적인 결합을 차단한 다음 세포의 투과화를 수행하였다. 그런 후, 세포를 fluor-접합된 1차 단일클론 항-마우스 Granzyme B (Biolegend; cat 515405)와 밤새 인큐베이션하였다. 조직 단편 및 CD8+ 세포독성 분석을 수행한 웰에 대한 공초점 영상 촬영을 Nikon C1si 레이저 스캐닝 공초점 현미경으로 수행하였다.

[0113] 활성화 영상 촬영 후 72시간에 스캐폴드에서 시험관내 비장 세포 배양을 위해, 스캐폴드를 수집하여, DMEM 완충액 중의 4% PFA에서 20분간 고정한 다음 슈크로스 용액에서 24시간 인큐베이션하였다. 고정 후, 디바이스를 O.C.T 중에 임베딩하여, (-80)℃에 보관하였다. 수평 조직 단편 (30  $\mu$ m 두께)을 크라이오스테트 (Lecia CM3050 S)로 절단하여, 사용시까지 (-80)℃에 보관하였다. 조직 단편을 DMEM 완충제 중에 행구었다. 염색하기 전에, DMEM 완충제 중의 2% BSA를 사용해 비-특이적인 결합을 차단하였다. 그런 후, 조직 단편을 1차 단일클론 항-마우스 CD11c 항체 (Biolegend; cat 117302) 및 1차 단일클론 항-마우스 CD4 항체 (Biolegend; cat 100402)와 인큐베이션하고, Alexa Flour 488-접합된 항-랫 IgG (Biolegend; cat 405418) 및 Alexa Flour 546 항-아르메니아 햄스터 IgG (Biolegend; cat 405423)로 염색하였다.

#### [0114] 통계 분석

[0115] 모든 통계 분석들은 윈도우용 GraphPad Prism version 5.02 (GraphPad Software, San Diego, CA)로 수행하였다. 모든 변수는 평균  $\pm$  SEM으로 나타낸다. 시험관내 실험을 two-tailed unpaired t-검정으로 비교하였다 ( $p < 0.05$ ). 모든 생체의 실험은 터키의 사후 검정을 이용한 일원배치분산분석으로 비교하였다 ( $p < 0.05$ ).

#### [0116] 실험 허가

[0117] 모든 외과적 시술과 실험 절차들은 이스라엘 베게브의 벤 쿠리온 대학의 동물 윤리 위원회 (IACUC)로부터 검토 및 허가받았다.

#### [0118] 실시예 1

##### [0119] 세포-이식 디바이스 제조 및 면역조절 특성

[0120] 세포-이식 디바이스는, 마크로포러스 구조로 인해 이식 후 효과적으로 혈관형성을 달성하는 것으로 기존에 검증된, 알기네이트 스캐폴드 (평균 포어 크기 = 80  $\mu$ m)였다. 혈관형성을 강화하기 위해, 알기네이트 스캐폴드에 친화성-결합된 (VEGF) 및 혈소판-유래 성장인자 (PDGF- $\beta$ )를 첨가하였다. 알기네이트 매트릭스에 성장인자의 친화성 결합은, 스캐폴드의 건조 중량의 10%를 차지하는, 알기네이트-설페이트의 상호작용에 의해 매개된다. 본 발명자들은, 헤파린-결합 단백질 패밀리의 성장인자, 예를 들어, VEGF, PDGF- $\beta$  및 TGF- $\beta$ 가 헤파린/헤파린-설페이트와의 천연적인 상호작용과 비슷한 방식으로 알기네이트-설페이트와 상호작용한다는 것은, 기존에 입증되었다 (도 1A). 이에, 본 발명자들은, 알기네이트 스캐폴드에 성장인자의 친화성 결합이 이의 생물학적 기능을 향상시킬 것으로 예상하였다.

[0121] 이러한 예상에 기초하여, 알기네이트-설페이트/알기네이트 스캐폴드에 TGF- $\beta$ 의 친화성 결합에 의해 면역관용 미세환경을 구축하였다 (도 1A, 상세 설명은 재료 및 방법 참조). 이 과정은, TGF- $\beta$ 가 프리스틴 알기네이트 스캐폴드에 비-특이적으로 흡착된 경우와 비교해, TGF- $\beta$ 의 제시를 연장시켰다. TGF- $\beta$ 의 ELISA에서, 알기네이트-설페이트-함유 스캐폴드의 경우, 7일 후, 처음에 탑재된 afTGF- $\beta$ 의 30.2%  $\pm$  0.8%가 매트릭스에 여전히 존재하는 반면, 프리스틴 스캐폴드의 경우에는 불과 5.2%  $\pm$  0.3%만 존재하는 것으로, 드러났다 (도 1B). 중요한 사실은, 배지에서 확인된 방출된 TGF- $\beta$  및 알기네이트/황산화 알기네이트 매트릭스 (afTGF- $\beta$ )에 친화성으로 결합된 TGF- $\beta$ 가 섬유모세포 단일층에서 SMAD2 인산화를 유사하게 활성화한다는 것이다 (도 1C, D). 특히, afTGF- $\beta$ 는, 매트릭스에 여전히 친화성 결합된 경우와 스캐폴드에서 해리된 경우에도 비슷한 활성을 나타내었으며, 이는 세포가 친화성 결합된 형태 및 분리된 상태 둘다의 TGF- $\beta$ 와 상호작용할 수 있다는 것을 의미한다.

[0122] 다음으로, 알기네이트-설페이트/알기네이트 스캐폴드 (afTGF- $\beta$  구조체)에 afTGF- $\beta$ 의 공간적인 제시 (spatial presentation)가 면역조절 미세환경을 구축하는 지를 조사하였다. 전체 비장 백혈구를 스캐폴드에서 배양할 수 있는지, 생존 상태로 유지시킬 수 있는지, 항원-특이적인 T 세포 반응을 발휘할 수 있는 지를 조사하기 위한 예

비 실험을 수행하였다. 이를 위해, 적혈구-고갈된 비장 백혈구를 OTII OVA-TCR Tg 마우스 (림프구가 OVA-특이적 임)에서 분리하여 스캐폴드에 T 세포 활성화 펩타이드로서 OVA의 부재 또는 존재 하에 접종하였다 (도 2A). 도 13A는 세포 접종 후 3일차, 대표적인 구조체를 도시한 것으로, 백혈구가 스캐폴드 전체에 분포되어 있으며, DC 및 CD4 T 세포는 인접하여 존재하여 세포-세포 상호작용이 가능하였다. OVA-유발성 T 세포 증식이 검증되었으며, T 세포의 32% 및 6%가 각각 OVA 활성화시 및 활성화 부재시 생존하는 것으로 나타났다 (도 13B). OVA 활성화된 구조체내 생존 림프구의 대략 20%가 CD4+CD25+이었다 (도 14A, B).

[0123] afTGF- $\beta$ 의 면역조절 효과는, 사이토카인 프로파일과, 비장 세포 (도 2B-E) 및 afTGF- $\beta$  구조체에 접종된 정제된 DC (도 15A-E)에서의 CD4+CD25+Foxp3+ 조절성 T 세포 (Treg)의 출현으로 드러났다. 도 15B-E에 도시된 바와 같이, afTGF- $\beta$ 는 전-염증성 사이토카인 IL-17A의 분비를 효과적으로 억제하고, 조절성 사이토카인 IL-10을 현저하게 증가시키며, 분비된 IL-2 또는 IFN- $\gamma$ 의 수준에 영향을 미치지 않았다. 중요한 사실은, 디바이스 내 afTGF- $\beta$ 의 존재가 전체 CD4+ T-세포 집단들 중 CD4+CD25+Foxp3+ T 세포의 빈도를 2.8배 증가시킨다는 것이다 (OVA 존재 및 비-존재시, 전체 T 세포 집단의 각각 30.6%  $\pm$  3.4% 및 11.8%  $\pm$  3.1%;  $p=0.008$ , 도 3, 도 4A-C). 요컨대, 이러한 사실은, afTGF- $\beta$ 가 세포 이식 디바이스 내 항-염증 환경을 조성함을 입증해준다. 특히, afTGF- $\beta$ 에서 관찰된 Treg 빈도 증가 및 분비된 IL-17 수준 감소는, 항-IL-10의 존재시 (도 5A-F) 또는 CD11c 프로모터 하에 인간 TGF- $\beta$  수용체 II 유전자를 우성 네거티브 형태로 발현하는 CD11c<sup>dnr</sup> Tg 마우스로부터 유래된 비장세포를 이용한 경우에는, 관찰되지 않았다 (도 5G-H, 도 6A-6E).

[0124] 요컨대, 본 실험의 결과는, DC에서 afTGF- $\beta$  신호전달이 IL-10 상향조절을 유도하고, 이것이 CD4 T 세포의 작동자 기능을 약화시키고 Treg 분화에 우호적이라는, 기전을 시사한다. 이 기전은, 2D 세포 단일층에 용해성 TGF- $\beta$ 가 첨가된 경우에 비해, 이식 디바이스의 3차원 (3D) 미세환경에서 유의하게 더 강력한 것으로 보인다 (도 16A-E, 도 17A-B).

## [0125] 실시예 2

### [0126] 디바이스의 생체내 혈관신생

[0127] 이식 후, 세포 이식 디바이스의 혈관형성은 특히 고 밀도로 접종된 세포 디바이스에 이식된 동종 세포의 생존 및 기능을 유지시키는데 중요하다. 혈관형성을 강화하기 위해, 디바이스에 VEGF와 PDGF- $\beta$ 를 첨가하였다. (TGF- $\beta$ 가 결핍된 구조체와 비교해) afTGF- $\beta$  구조체에서 세포 거동 및 생존성 차이가 혈관형성의 차이에 근거할 가능성을 파악하기 위해, afTGF- $\beta$  구조체내 혈관형성 수준을 TGF- $\beta$ -결핍 구조체와 비교하였으며; 이들 2가지 타입의 구조체에 GFP를 발현하도록 감염시킨 Swiss murine 오리진으로부터 유래된 동종이계 NIH/3T3 섬유모세포 세포주를 접종하였다 (세포 5x10<sup>5</sup>개/스캐폴드).

[0128] 도 7A는, 신피막 하에 이식 후 10일 이내에, 세포-접종한 이들 2종의 디바이스에서 PECAM+ (CD31) 내피 세포가 군집을 형성하여, GFP-섬유모세포들에 분산된 혈관 모세관을 형성하였음을, 보여준다. 15일까지, 이식된 구조체 내에서 명확한 모세관이 관찰되었으며 (도 7B, C), 이는 afTGF- $\beta$ 가 처리 및 비-처리된 세포 디바이스의 3-4%에 해당되었다 (도 8).

## [0129] 실시예 3

### [0130] 생체내 국소 면역조절 및 동종섬유모세포 그래프트 생존

[0131] 다음 실험 세트는, afTGF- $\beta$  스캐폴드 내 국소 면역조절 미세환경의 확립을 생체내에서 검증하였다. 또한, 디바이스 내 광범위한 혈관형성을 감안하여, 이식된 동종섬유모세포의 생존성과 기능을 유지하는 이러한 잠재적인 이식 장치의 효과를 조사하였다.

[0132] 이식한 지 10일 및 15일에 회수한 구조체에 대한 FACS 분석에서, TGF- $\beta$ -결핍 구조체와 비교하여, 현저하게 낮은 비율의 공동-자극성 분자 CD86 (도 9A-C)와 현저하게 높은 비율의 CD4+CD25+Foxp3+ Treg (도 9D-F,  $p<0.05$ )가 afTGF- $\beta$  구조체에서 확인되었다. Treg 증가는 이식한 지 불과 10일 후에 명확해졌다. 즉, 이식 10일 후, afTGF- $\beta$  구조체에서 현저하게 낮은 비율의 CD8+ T 세포가, TGF- $\beta$  결핍 구조체와 비교해, 드러났다 (각각 2.1%  $\pm$  0.4% 대 5.5%  $\pm$  0.9%) (도 9G-I). 아울러, 활성화 마커 CD69를 발현하는 CD8 T 세포 분획의 현저한 감소가, afTGF- $\beta$  구조체에서, TGF- $\beta$  결핍 구조체와 비교하여, 이식 10일 후 (각각 13.4%  $\pm$  3.5% 대 22.9%  $\pm$  9.3%,  $p=0.015$ ) 및 이식 15일 후 (4%  $\pm$  0.8% 대 12.0%  $\pm$  2.5%,  $p=0.0001$ ) 관찰되었다 (도 9J-L).

[0133] 면역관용 환경이 동종 섬유모세포의 생존에 영향을 미치는 지를 확인하기 위해, 살아있는 동종 섬유모세포의 개

수와 세포자살로 이행되는 세포의 빈도를 측정하였다. 디바이스에서 회수한 GFP+ 세포를 이식 3일째 디바이스에 존재하는 전체 GFP+ 세포에 대한 GFP+ 세포의 %로서 계산하였다 (도 17 C, D). 이 베이스라인은 T 세포-매개 세포독성과 관련없는 세포 사멸을 제외시키기 위해 선택하였다. 이식 15일째 회수된 동종 섬유모세포의 %는 afTGF-β 구조체 및 TGF-β-결핍 구조체에서 각각 50.4% ± 2% 및 44.6% ± 0.7%이었으며 (p<0.05, 도 10A, B), 이식 30일 후 afTGF-β 디바이스에서 유래된 회수된 동종 섬유모세포의 %는 증가 추세를 관찰되었다. 살아있는 동종 섬유모세포의 생존성을 아넥신 V 및 PI로 표지한 GFP 세포의 FACS 분석으로 추가로 검증하였다 (도 10C). 이식 15일차, 살아있는 동종 섬유모세포 (GFP+annexin-PI-)의 %는 afTGF-β 구조체가 TGF-β-결핍 구조체 보다 유의하게 높았다 (각각 38.5% ± 3.5% 및 23.2% ± 5.0%, p=0.038, 도 10D). 즉, 이식한 지 15일 및 30일차에, GFP+ 동종 섬유모세포의 총 수에 대한 GFP+annexinV+PI-세포자살 세포의 %와 GFP+annexinV+PI+ 세포의 %는, afTGF-β 구조체가 TGF-β-결핍 구조체 보다 유의하게 낮았다 (도 10E, F). 이러한 데이터는, 구조체 내 afTGF-β의 국소 제시가 침윤성 DC를 미성숙한 상태로 유지시키며, 따라서 Treg 빈도를 증가시키고, 세포독성 CD8 T 세포의 활성을 억제함을, 보여준다.

[0134]

#### 실시예 4

[0135]

**친화성-결합된 TGF-β는 동종세포 특이적인 말초 T 세포의 활성화를 억제한다.**

[0136]

세포 또는 조직 이식에서 주요 문제는, 면역억제제가 항원 특이적이지 않아, 숙주 방어 기전을 손상시킨다는 것이다. 또한, 약물 섭취 중단이 종종 면역 반응을 반등시켜, 궁극적으로 이식 거부 반응을 유발한다. 숙주 면역성을 손상시키지 않으면서 이식체에 대한 장기간 생존 제공은 동종이식-특이적인 T 세포 반응을 유도함으로써 달성할 수 있다. 혈관형성된 afTGF-β 구조체가 동종 섬유모세포-특이적인 말초 반응을 유도하는지를 확인하기 위해, 이식 15일 및 30일차에 마우스에서 비장 세포를 분리하여, 동종 섬유모세포-특이적인 T 헬퍼 및 T 세포 독성 반응을 조사하였다. TGF-β-결핍 구조체의 이식과 비교하여, afTGF-β 구조체가 이식된 마우스에서 적출한 비장세포에서는, 이식 15일차에, 동종 섬유모세포-특이적인 Th17 작동자 기능이 현저하게 감소되었다 (도 11A; TGF-β-결핍 구조체가 이식된 마우스에서 적출한 비장 세포 대비, 방출된 IL-17는 55.5%임, p<0.05). 놀랍게도, 이식 30일차에는 이들 비장 세포에서 Th1 및/또는 CD8 T 세포 작동자 기능이 감소되었다 (도 11B-C; TGF-β-결핍 구조체가 이식된 마우스에서 적출한 비장 세포와 비교해, IL-2와 IFN-γ의 방출 수준이 각각 45.2% 및 20.9%임, p<0.05). IL-10 방출 수준은 그룹들 간에 유의한 차이가 없었다 (도 11D).

[0137]

다음으로, 동종 세포-특이적인 CD8 T 세포의 세포독성 반응 역시 afTGF-β 구조체가 이식된 마우스에서 억제되는지를 조사하였다. 이식 마우스 및 야생형 마우스에서 비장세포를 분리한 다음 CD8 T 세포를 (방법 및 도 17E에 기술된 바와 같이) 분리하여 동종 섬유모세포와 각각 1:4의 세포 비율로 공-배양하였다. 공조점 이미징에서, TGF-β-결핍 구조체 이식 마우스에서 분리된 CD8+ T 세포가 동종 섬유모세포와 면역 시냅스를 형성하며, 세포독성을 발휘하는 것으로 드러났다 (도 11E 및 도 18).

[0138]

CD8 T 세포와 동종 섬유모세포를 공-배양한 후, 2시간 및 12시간 후, CD107을 발현하는 세포독성 CD8 T 세포의 빈도를 FACS로 평가한 결과, 이들 2 시점에, 세포독성 CD8+CD107+ T 세포의 비율은 TGF-β-결핍 구조체가 이식된 마우스의 비장세포에 비해 afTGF-β 구조체가 이식된 마우스의 비장세포에서 현저하게 낮았다 (도 11F, 12A). 또한, TGF-β-결핍 구조체가 이식된 마우스와 비교해, afTGF-β 구조체가 이식된 마우스에서 분리한 비장-유래 CD8 T 세포와의 공-배양시, 현저하게 더 적은 수의 동종 섬유모세포가 세포자살로 진행되었다 (각각 35.5% ± 5.1% vs. 17.2% ± 0.9%, 15일; 도 12B, C). 특히, afTGF-β 구조체가 이식된 마우스에서 수득한 활성화된 CD8 T 세포의 세포독성 활성 및 빈도는 야생형 마우스와 비슷하였으며, 이는 TGF-β 구조체를 이용한 동종 섬유모세포의 이식이 매우 약한 세포독성 반응을 나타낸다는 것을 의미한다.

[0139]

세포 이식 디바이스에서 매트릭스에 친화성-결합된 TGF-β의 국소 제시가 면역조절 미세환경을 조성하여, 세포 동종이식체를 거부 반응으로부터 보호한다는 가설을 검증하였다. afTGF-β는, DC를 미성숙 표현형으로 유지시키고, Treg의 빈도를 증가시키고, CD4 및 CD8 세포독성 T 세포의 작동자 기능은 IL-10 의존적인 방식으로 감소시킴으로써, 조절 기능을 발휘함을, 확인하였다. 중요한 사실은, afTGF-β의 국소 면역조절 효과가 비장에 작용하여, 동종 섬유모세포-특이적인 CD4 및 CD8 T 세포의 작동자 기능이 현저하게 감소됨을, 확인하였다는 것이다.

[0140]

TGF-β는, 주변 사이토카인 환경에 따라, 항-염증 반응 및 전-염증 반응을 모두 유도할 수 있는, 중요한 면역조절성 사이토카인이다. 알기네이트 스캐폴드에 친화성으로 결합될 경우 제시된 TGF-β가 활성화된 작동자 T 세포를 조절할 수 있는지는 명확하지 않다. 본 시험관내 결과에 따르면, afTGF-β는, DC 또는 상당 수준으로, 전체 비장세포를 항원 제시 세포 (APC)로 사용하는 경우 CD4 T 세포의 활성화를 억제하며, 분비되는 IL-10 수준과 Treg 빈도를 증가시킨다. 항-IL-10 또는 CD11c-DNR 비장세포를 이용하여 시험관내에서 수행한 차단 실험에서,

afTGF- $\beta$ 는 2가지 경로의 조절 기능을 가지는 것으로 시사되었다: (1) DC에 대한 IL-10 신호전달 강화 및 이의 미성숙 표현형 유지. 즉, 이전 실험에서 관찰된 바와 같이, 미성숙 DC는 T 세포의 작동자 기능을 저하시키고, CD4+CD25+Foxp3+ Treg의 빈도를 증가시키며; (2) 작동자 T 세포에 직접 신호를 전달하고 이의 작동자 기능을 약화시킨다.

[0141] 특히, afTGF- $\beta$ 는 2D 배양시 용해성 TGF- $\beta$  보다 더 효과적이다. 이러한 현상은 매트릭스에 결합된 친화성으로 인한 세포에의 TGF- $\beta$ 의 국소 제제가 원인일 수 있으며, 그래서 신호 전달을 강화할 수 있다. 아울러, TGF- $\beta$ 의 친화성-결합으로, 프리스틴 스캐폴드에 흡착되었을 때 신속하게 방출되는 것과 비교해, 활성 사이토카인의 연장된 지속적인 방출이 이루어졌다. 이러한 기전이 면역조절 환경을 성공적으로 구축하는데 기여하는 것이다. TGF- $\beta$ -방출 제어 시스템은 Treg의 집단을 시험관내 및 생체내에서 유도 및 확장시키기 위해 기존에 사용된 바 있다. 그러나, 이 시스템은 사이토카인의 친화성-결합을 이용하지도 또는 동종 세포 이식 디바이스로서 이의 사용을 촉진시키는 3D 면역조절 환경을 구축하는데 이러한 전략 이용을 시도한 바도 없다.

[0142] 이식 디바이스로서, 알기네이트 스캐폴드에 스캐폴드의 혈관형성을 광범위하게 강화하는 혈관신생 인자 VEGF 및 PDGF- $\beta$ 를 첨가하였다. 이러한 세포 이식 디바이스의 가능성있는 효과는, 혈관형성이 이식된 세포에게로 그리고 이식된 세포로부터 효율적인 매스 수송을 실행할 수 있도록 촉진하면서도, 강화된 백혈구 침윤이 동종 이식 거부 반응을 촉진할 수 있다는 것이다. 본 실험의 데이터에서는, afTGF- $\beta$ 가 시험관내 및 생체내에서 관찰된 바와 같이 유사한 조절 효과를 발휘하는 것으로, 나타났다. TGF- $\beta$ -결핍 구조체와 비교해, 이식 후 10일 및 15일차에 회수된 afTGF- $\beta$  첨가된 구조체는 성숙형 DC 빈도의 현저한 감소, Treg 빈도 증가 및 세포독성 T 세포의 빈도 감소를 나타내었다. 또한, afTGF- $\beta$  구조체가 이식된 마우스 역시, 비장세포-유래 동종 섬유모세포 반응성 CD4 및 CD8 T 세포가 전-염증성 사이토카인 수준의 현저한 감소 및 거의 완전하게 없어진 세포독성 활성을 발휘하기 때문에, 말초 관용을 야기하였다. 따라서, 이식된 디바이스의 혈관형성은, TGF- $\beta$ 의 스캐폴드 내 국소적인 존재를 제공하면서도, 이식체의 생존성을 증가시킬 뿐만 아니라 이식된 세포에 반응하여 유발되는 말초 면역 반응을 약화시킨다.

[0143] 본 발명자들은 TGF- $\beta$  결핍 구조체와 비교해 afTGF- $\beta$  구조체의 고유한 특성들을 해명하기 위해 2-단계 모델을 제안한다. 1 단계에서, afTGF- $\beta$ 는 침윤성 APC에 신호를 전달하여, 이를 이식된 세포를 식균하면서도 미성숙 상태로 유지시킨다. 이식 후 수일 내 모세관이 형성되며, 이를 통해 APC가 배액 림프절 (draining lymph node)로 이동한 다음 나이브 동종 섬유모세포-반응성 CD4 및 CD8 T 세포의 아네르기 또는 약간의 활성화를 촉진한다. 2 단계에서, 스캐폴드-침윤성 T 세포에 대한 afTGF- $\beta$  신호전달이, 미성숙 DC의 존재와 더불어, DC 활성화를 추가로 약화시키고, Treg 분화 및/또는 확장을 촉진한다. 이러한 과정이, 전체적으로, afTGF- $\beta$  구조체 이식 후 15일 및 30일차에 관찰된, 동종 섬유모세포의 세포독성의 현저한 감소를 유발한다.

[0144] 알기네이트 스캐폴드가 숙주 체내에서 분해됨에 따라, TGF- $\beta$  풍부 환경이 국소 항원-특이적인 면역조절을 전신 및 항원-특이적인 면역관용으로까지 확장시킨다는 것이 특히 중요하다. 1형 당뇨병의 경우, 예를 들어, 이식된  $\beta$  세포에 반응하여 구축된 이러한 말초 관용이 췌장에서 면역 공격을 차단할 수 있으며, 아마도 섬 재생 (islet regeneration)을 방지할 수 있다. 비슷한 전략을 사용해 다른 조직-특이적인 자가면역 질환을 치료할 수 있으며, 동시에 면역억제제의 경우에서와 같이 병원체에 대한 숙주 방어 손상은 회피한다.

[0145] 실시예 5

[0146] 다발성 경화증 (MS)을 치료하기 위한 알기네이트/황산화 알기네이트 매트릭스 (afTGF- $\beta$ )에 TGF- $\beta$ 의 친화성 결합

[0147] 실험적인 자가면역 뇌척수염 (EAE)은 MS 모델로 사용된다. C57BL/6 마우스를 마이엘린 희소돌기신경교 당단백질 (MOG) 잔기 35-55로 면역화한다. 7-10일 후, 임상 점수로 진행되는 마우스에서 꼬리 및 사지 마비가 발생한다. 질환은 척수내 백혈구 침윤 증상으로 나타나며, 이는 전형적인 MS 상해 특징이다. 질환은 재발 관해 양상으로 종종 나타난다. TGF- $\beta$  및 MOG35-55 펩타이드가 결합되거나 또는 탑재된 알기네이트/황산화 알기네이트 스캐폴드를 면역화 전 또는 면역화 이후에 여러 시점에 이식하고 (예, 질병 개시 5일전, 임상 점수 최고점인 15일 또는 관해 시기인 20일), EAE 임상 점수 (Miller *et al.*, "Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in the Mouse." *Curr Protoc Immunol.* 2007 May; CHAPTER: Unit-15.1, 원용에 의해 본 명세서에 포함됨)를 MOG-특이적인 CD4 T 세포 (사이토카인 프로파일 및 활성화 마커)의 표현형 및 척수 조직병리학적 특성, 즉, 침윤성 백혈구 및 탈수초화와 함께 조사한다.

[0148] 결과에 따르면, MOG-특이적인 T 세포가 허용되고, 그래서 TGF- $\beta$  및 MOG35-55가 탑재된 스캐폴드를 이식받은



동물에서 EAE 임상 스코어 완화, 림프구 침윤 및 MS 병변의 수적 감소 등의 급성 및 만성 질환 프로세스가 예방 또는 완화된다.

[0149] 임상 실험에서, TGF $\beta$  스캐폴드는 MS 개체의 특이적인 HLA 대립 유전자에 따라 수종의 면역우성 에피토프를 운반한다.

[0150] **실시예 6**

[0151] **1형 당뇨병을 치료하기 위한 afTGF- $\beta$**

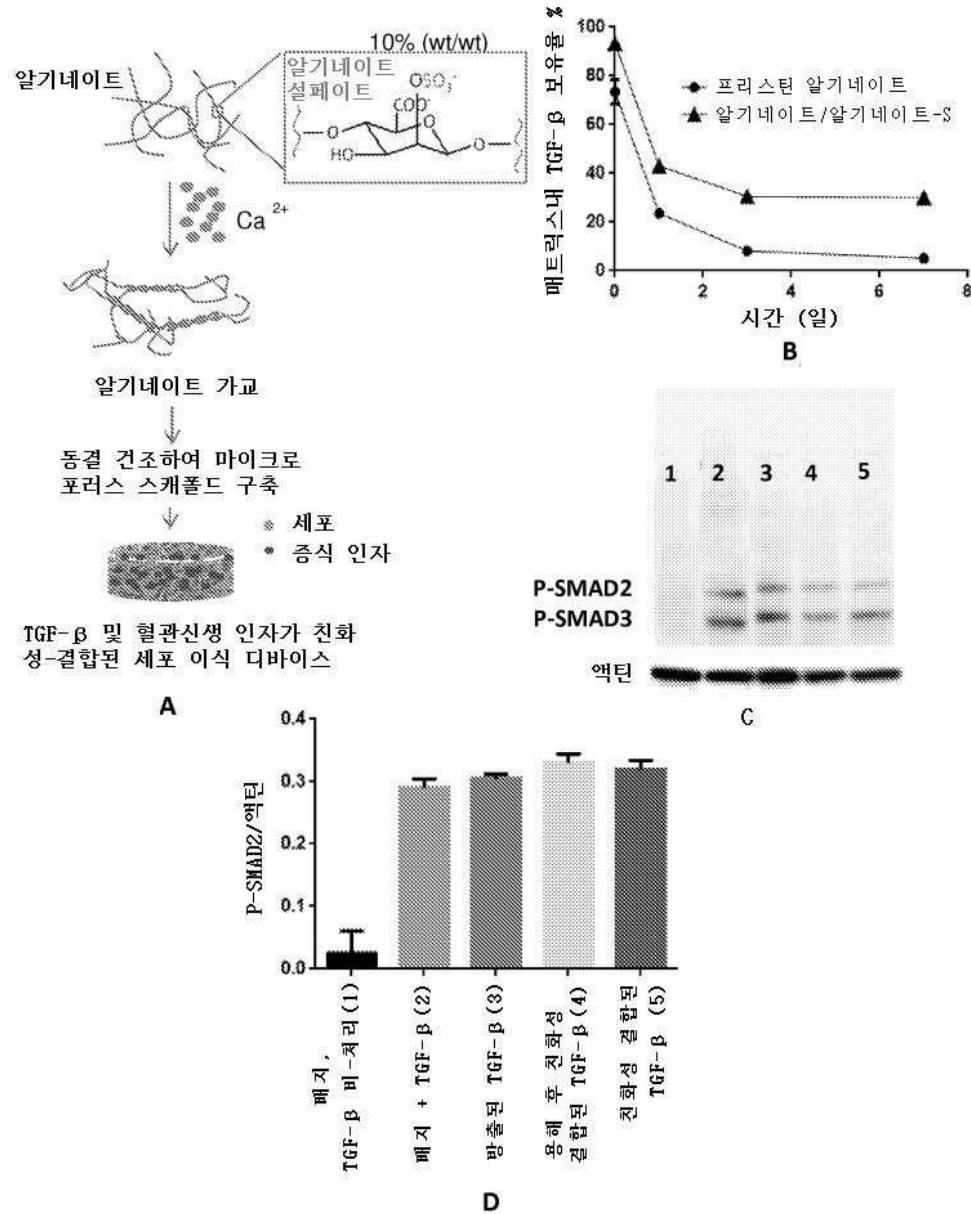
[0152] 백혈구가 췌장의  $\beta$  세포를 파괴하는 1형 당뇨병 마우스 모델 (예, NOD 마우스)에서, TGF $\beta$ 를 발현하는 동종이계 또는 동계 췌장  $\beta$  세포를 질환 발병 전 또는 발병 후 이식하고 (약 10주), 마우스에서 인슐린 수준과 글루코스 수준을, 췌장 및 스캐폴드에서 면역 침윤, 병리생리학적 특성 및  $\beta$  세포 생존성과 더불어 조사한다.

[0153] 그 결과,  $\beta$  세포-특이적인 림프구가 허용되고, 그래서 TGF- $\beta$ 를 발현하는 췌장  $\beta$  세포가 이식된 동물에서  $\beta$  세포의 사멸 저하, 인슐린 수준 증가 및 혈당 수준 저하 등의 급성 및 만성 질환 프로세스가 예방 또는 완화된다.

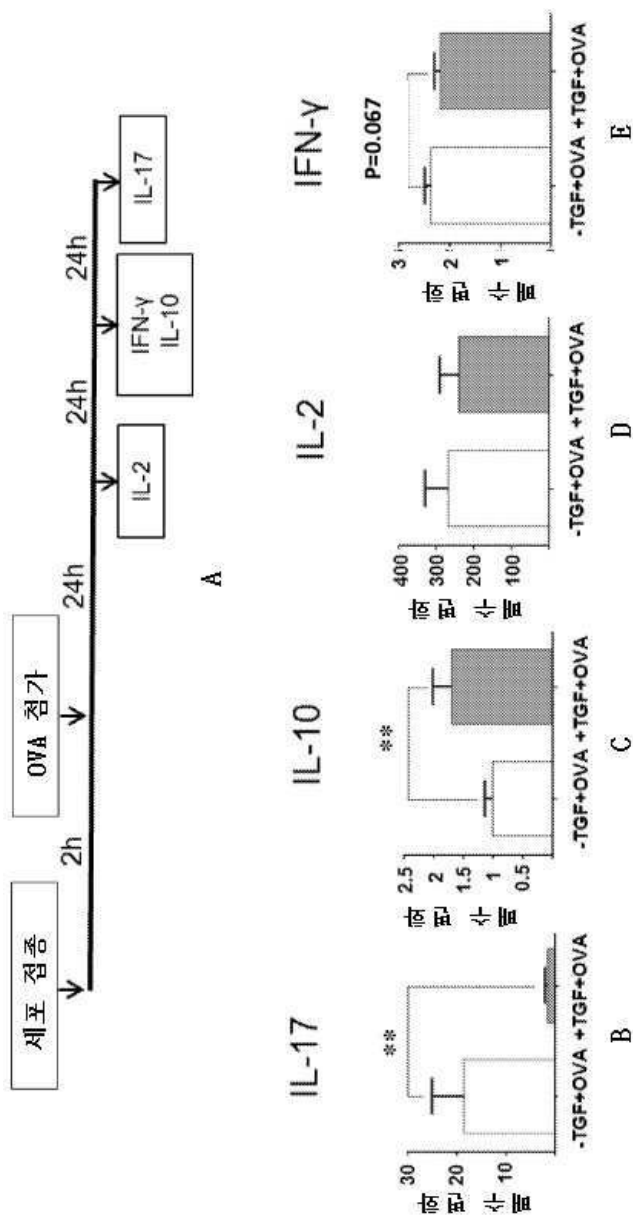
[0154] 본 발명의 일부 특징들이 본원에 예시 및 기술되었지만, 당해 기술 분야의 당업자라면 다수의 수정, 치환, 변경 및 등가를 생각할 수 있을 것이다. 따라서, 첨부된 청구항은 본 발명의 진정한 사상에 포함되는 상기한 모든 수정 및 변경을 포괄하는 의도로 이해된다.

도면

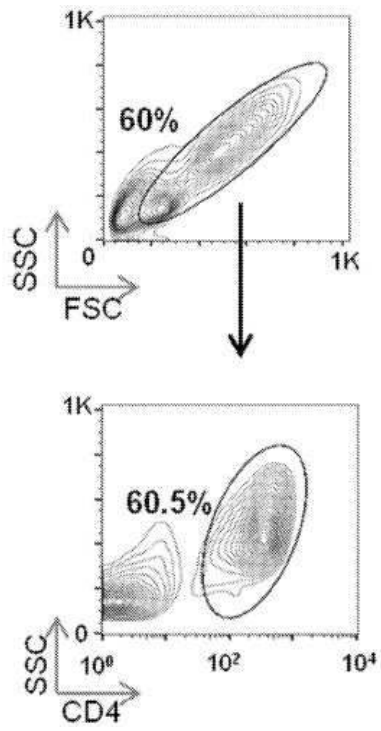
도면1



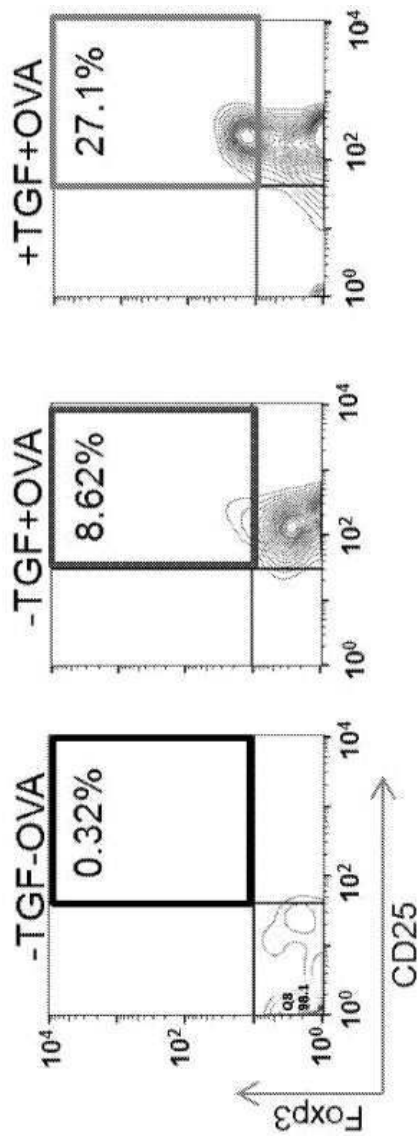
도면2



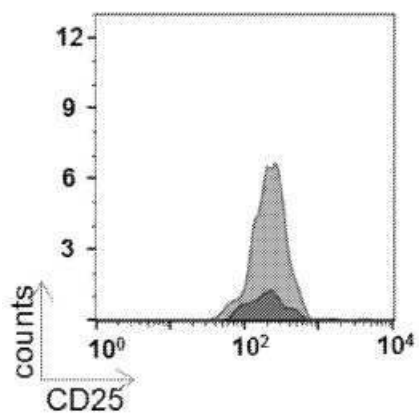
도면3



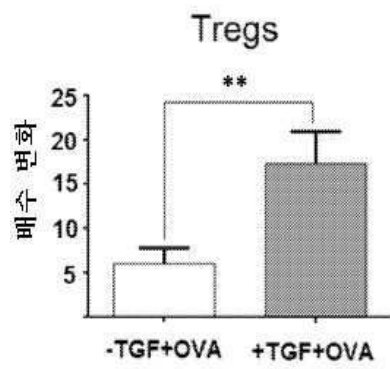
도면4a



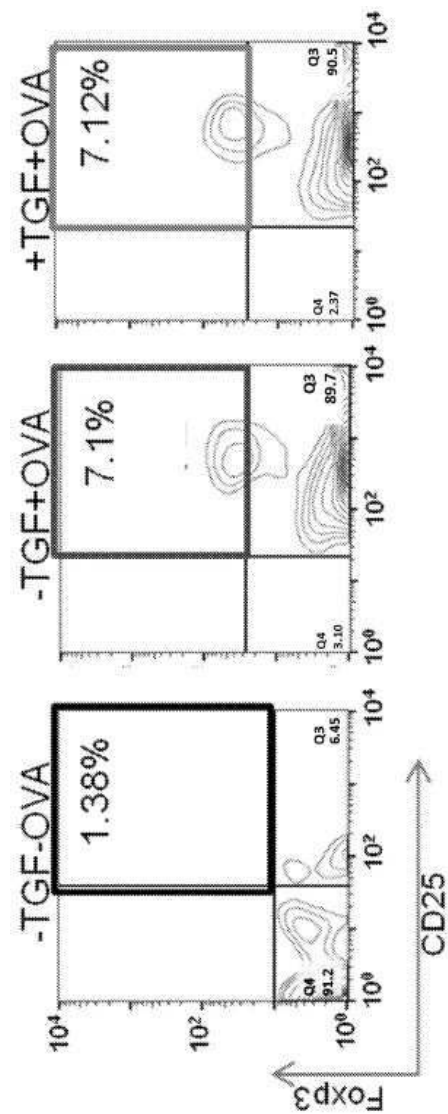
도면4b



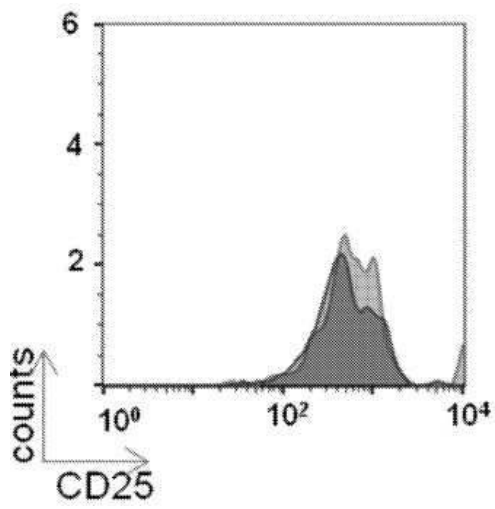
도면4c



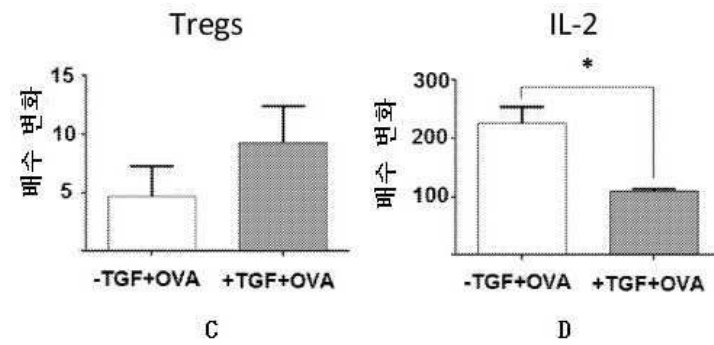
도면5a



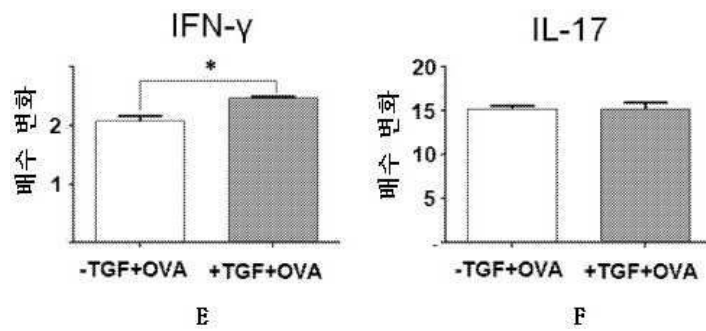
도면5b



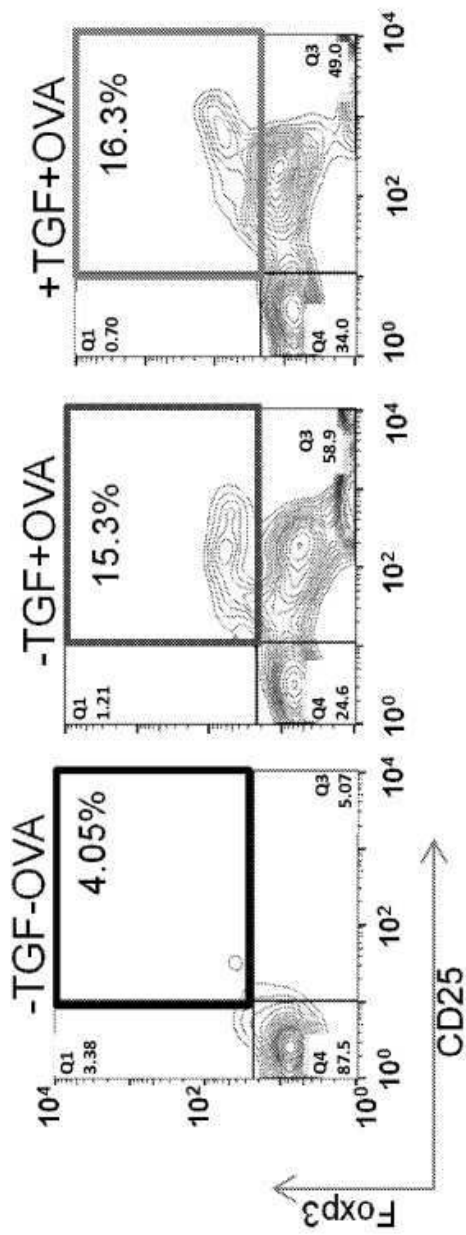
도면5cd



도면5ef

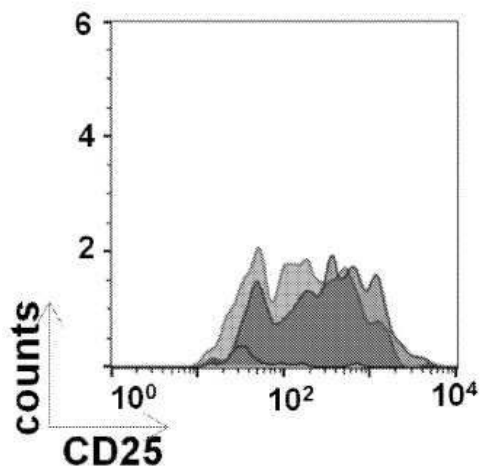


도면5g

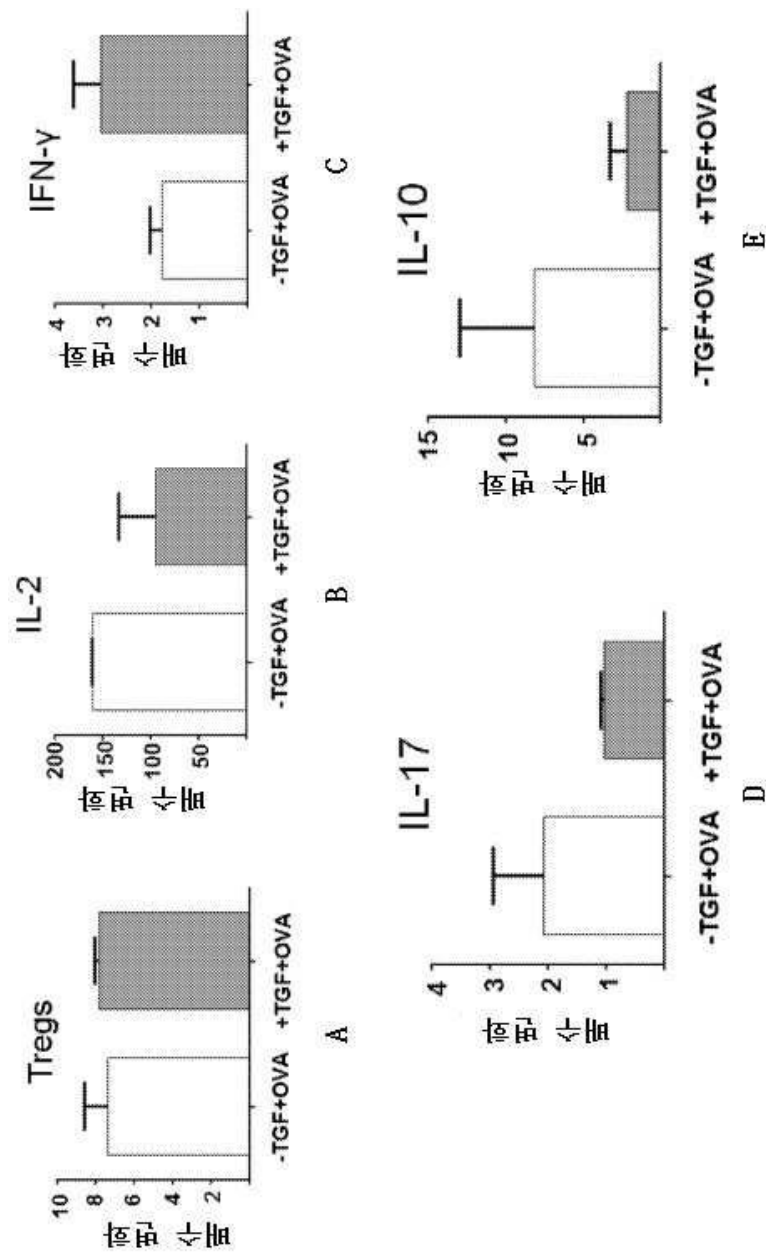




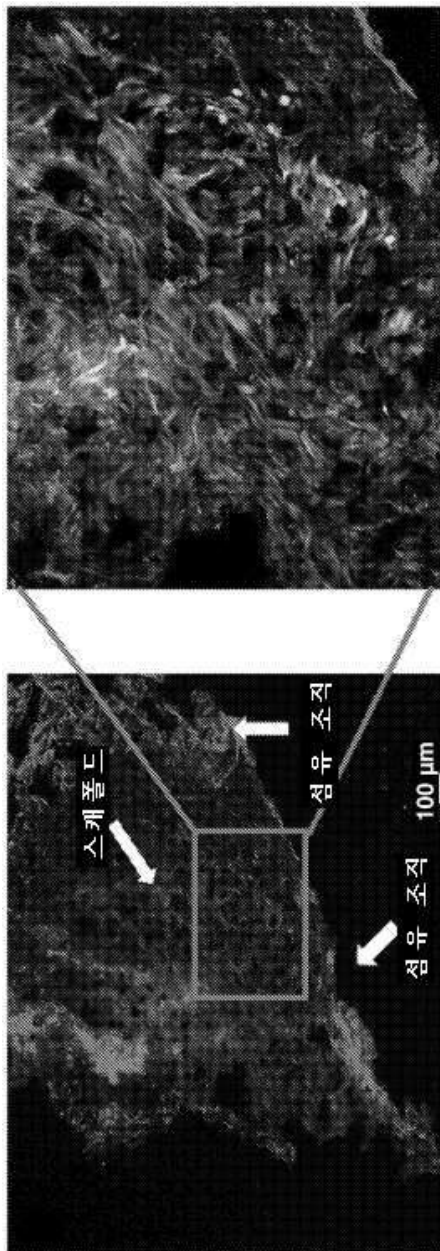
도면5h



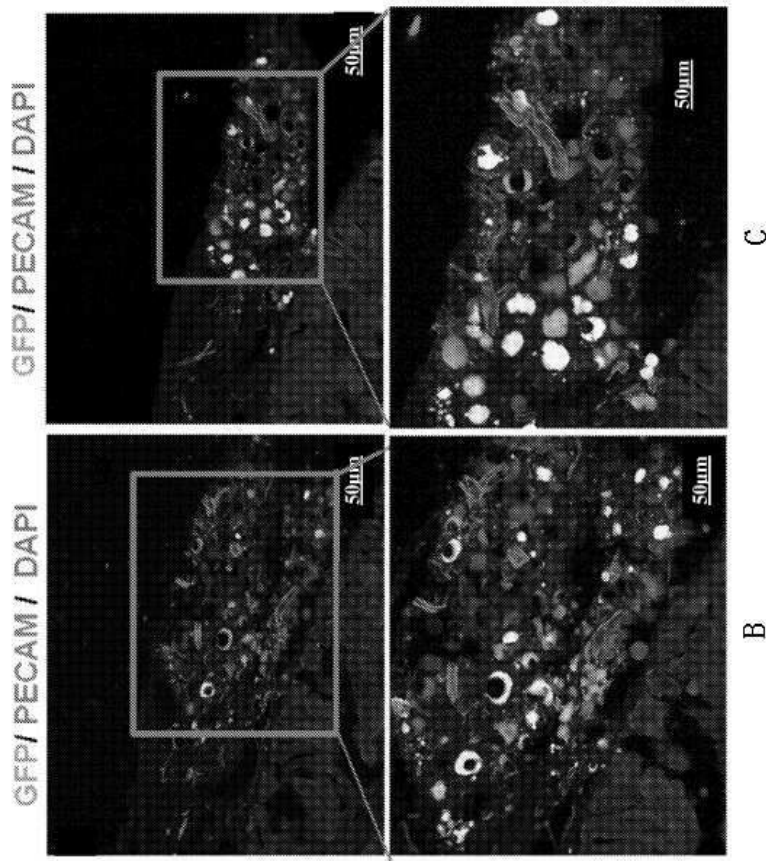
도면6



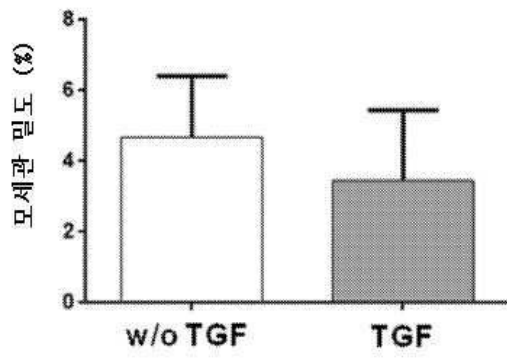
도면7a



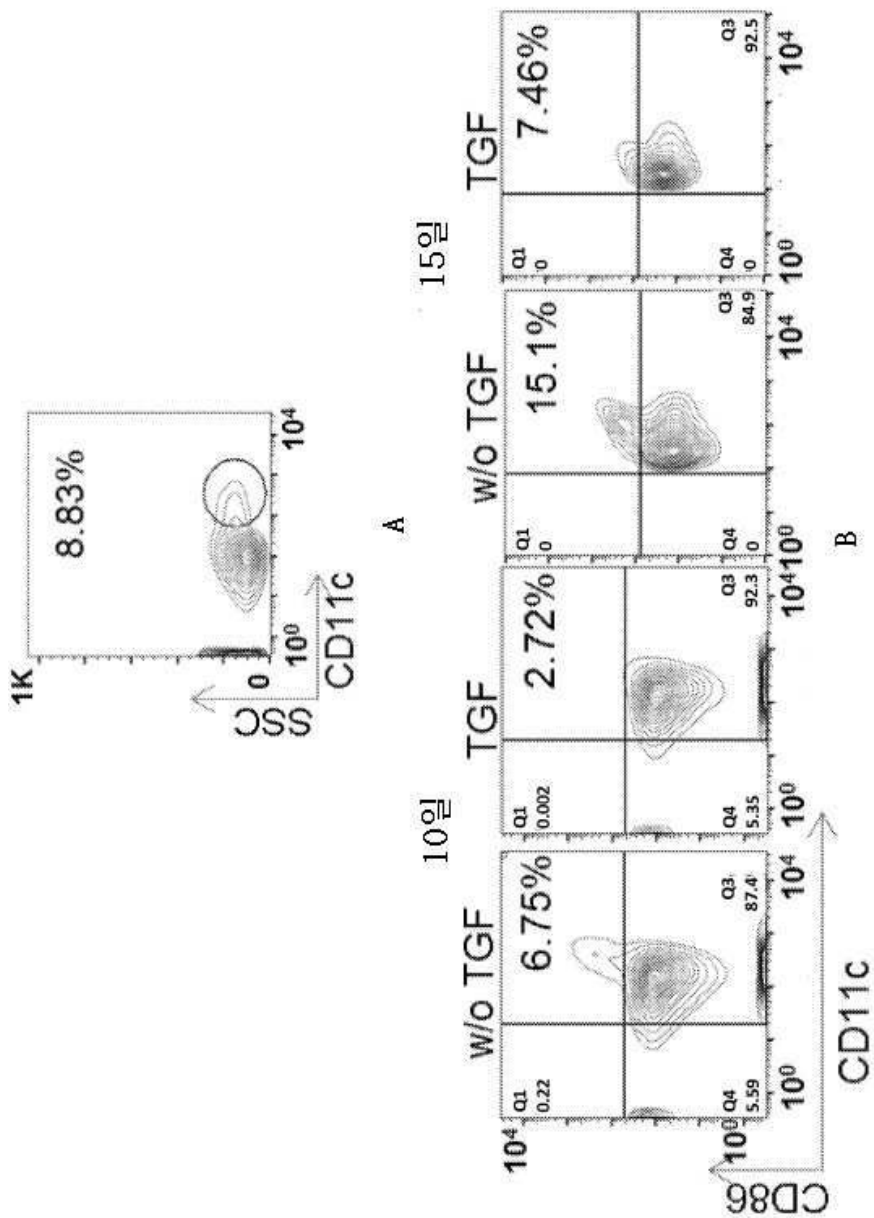
도면7bc



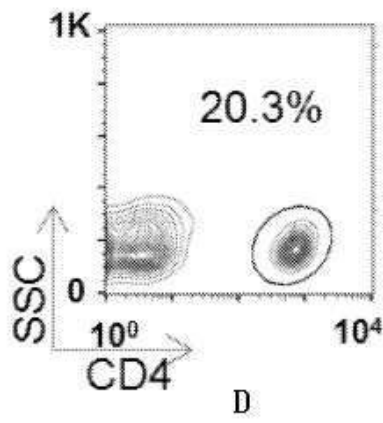
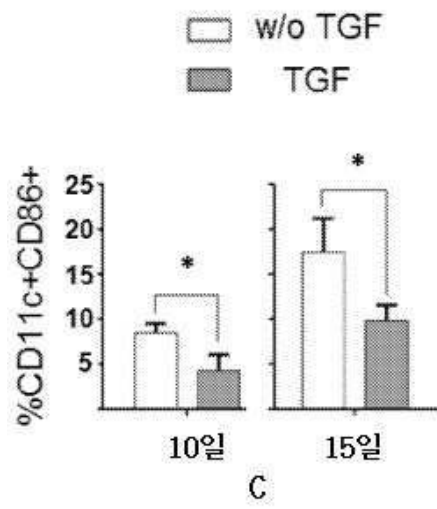
도면8



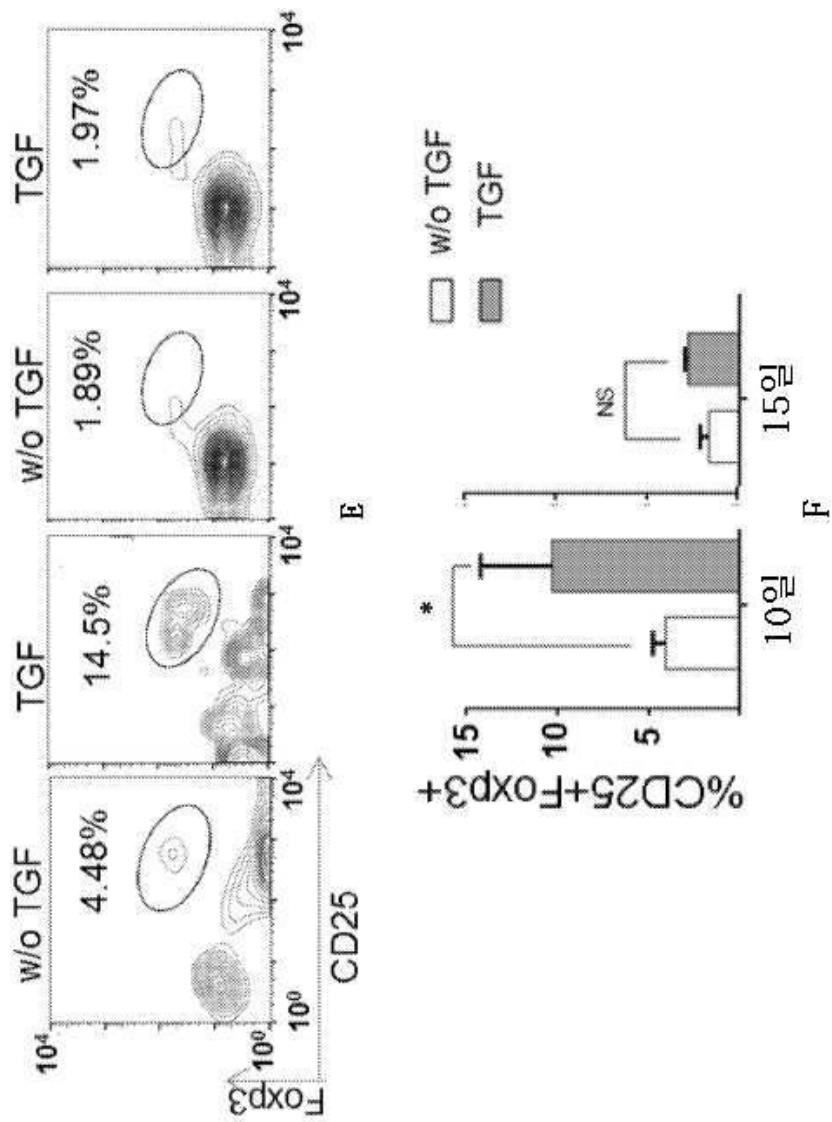
도면9ab



도면9cd

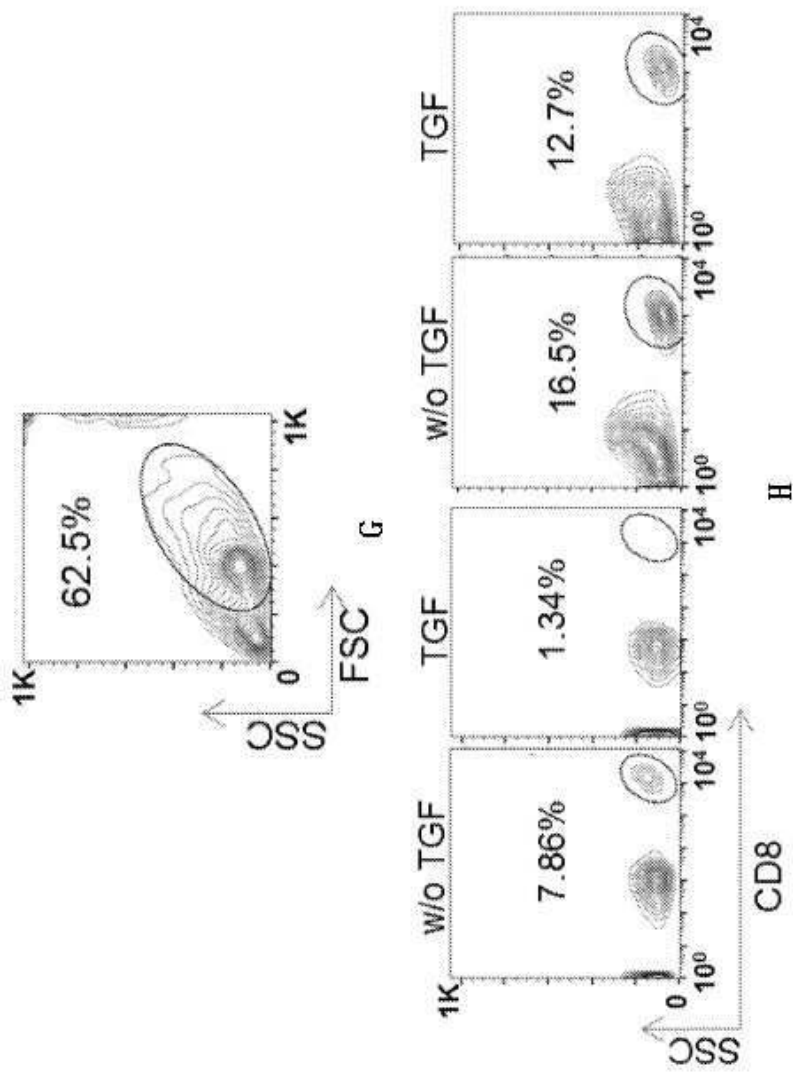


도면9ef



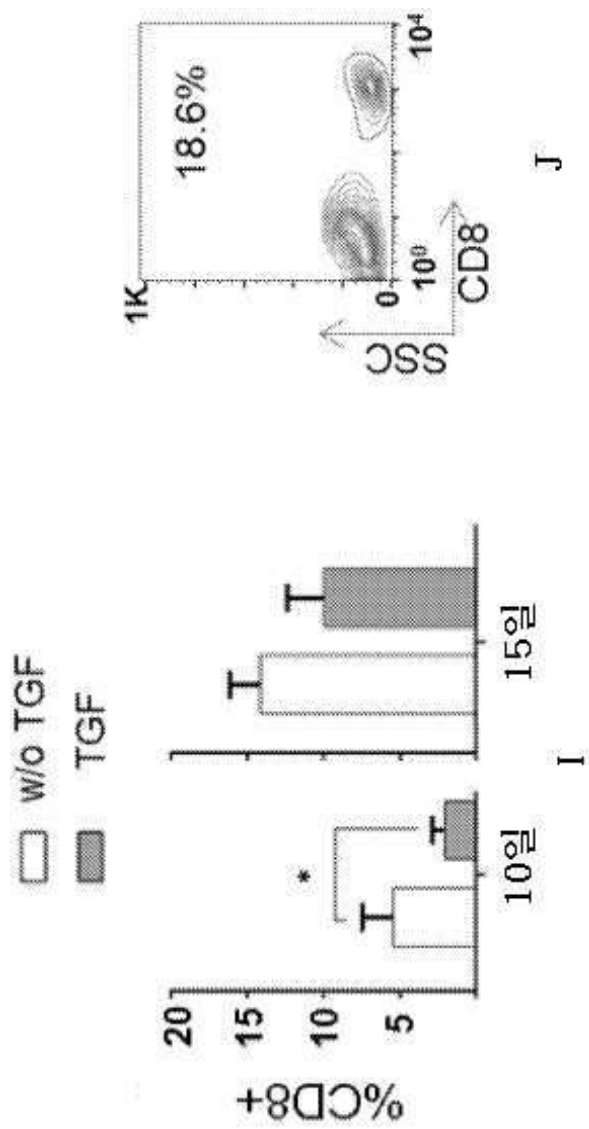


도면9gh

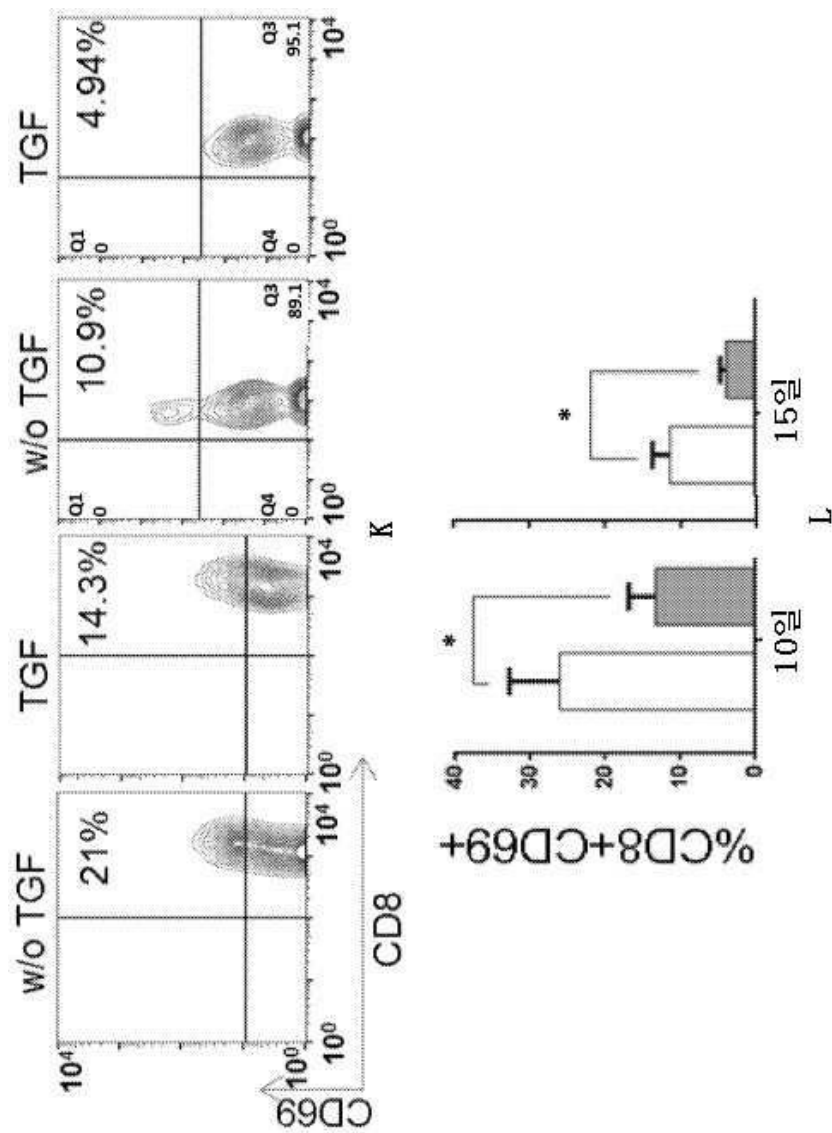




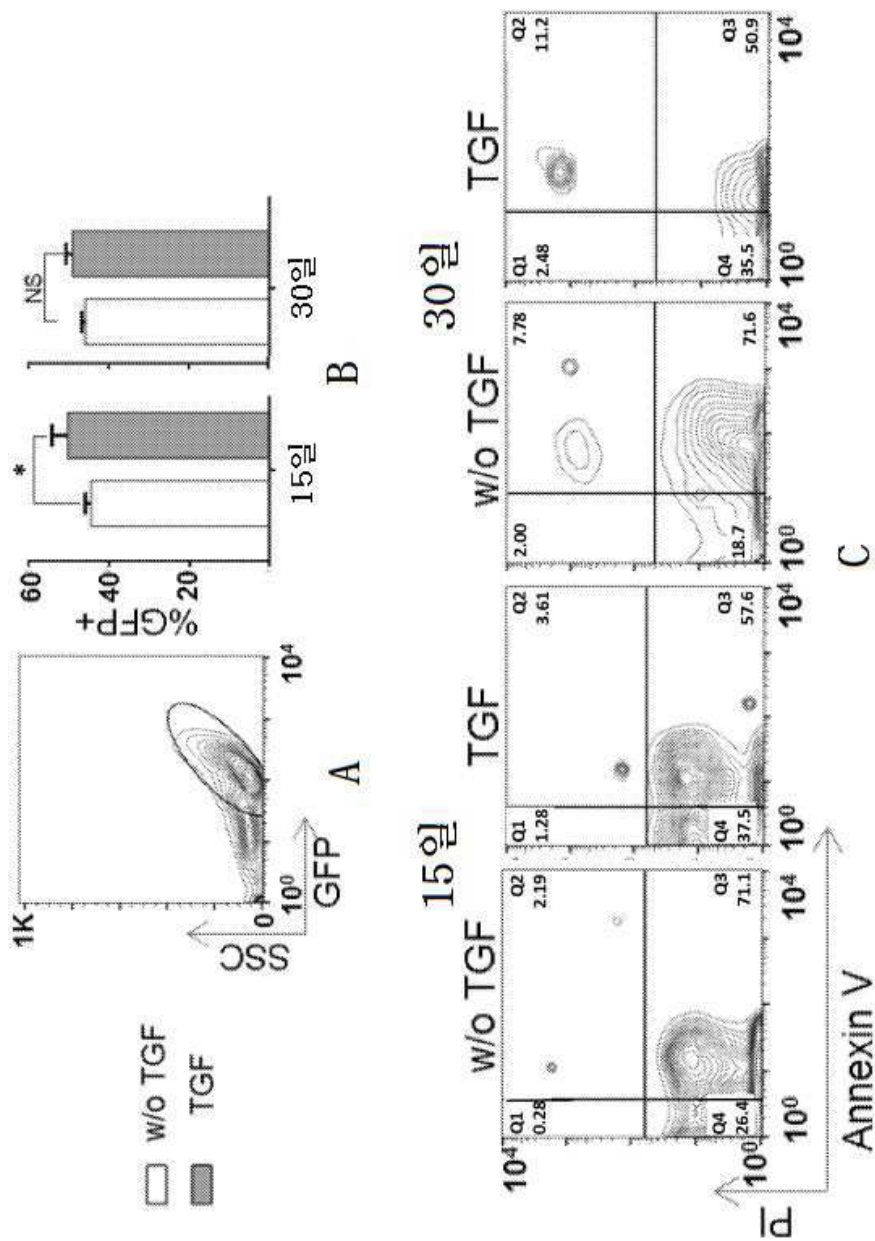
도면9ij



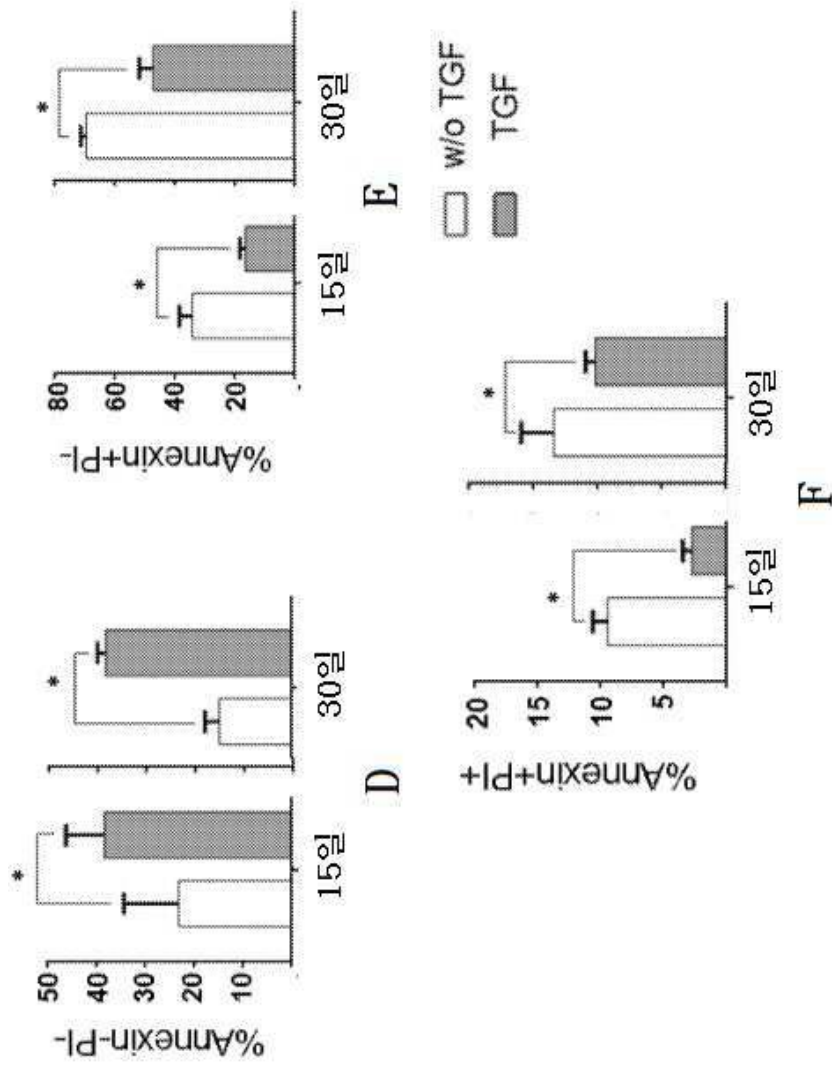
도면9k1



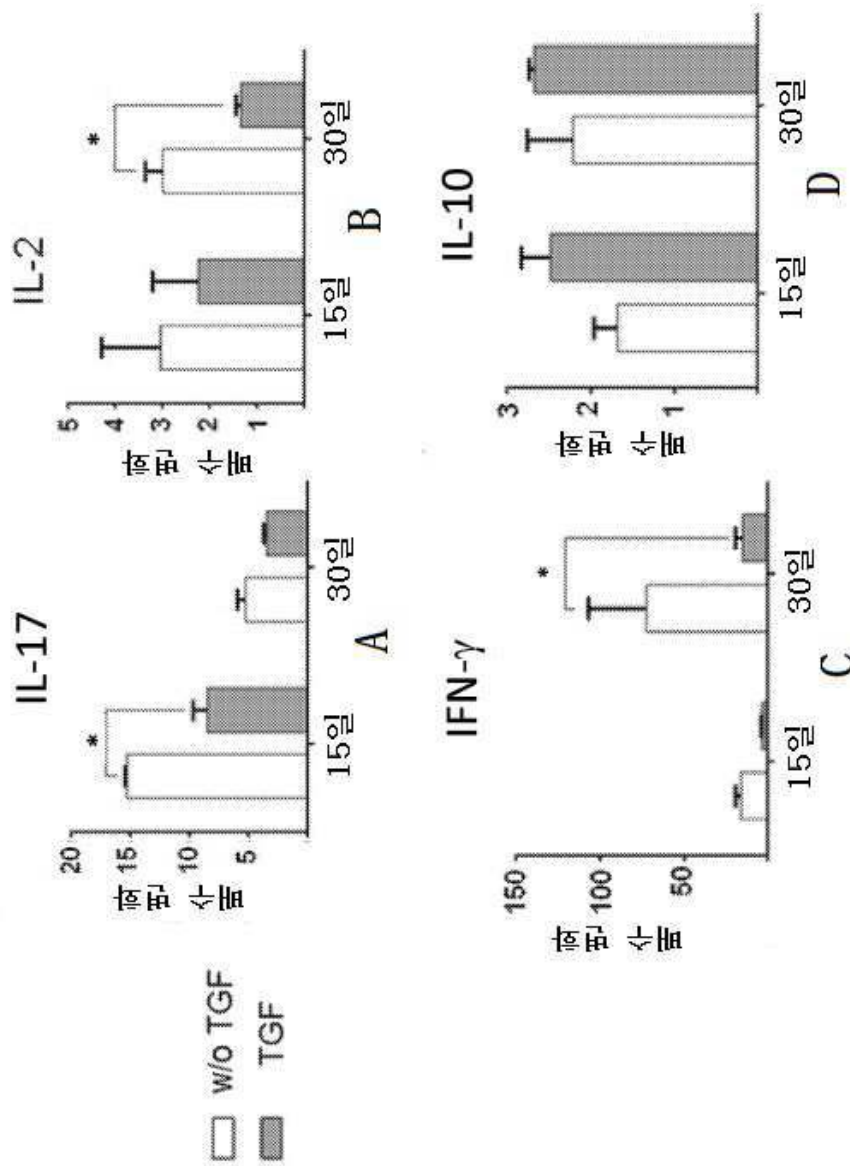
도면10abc



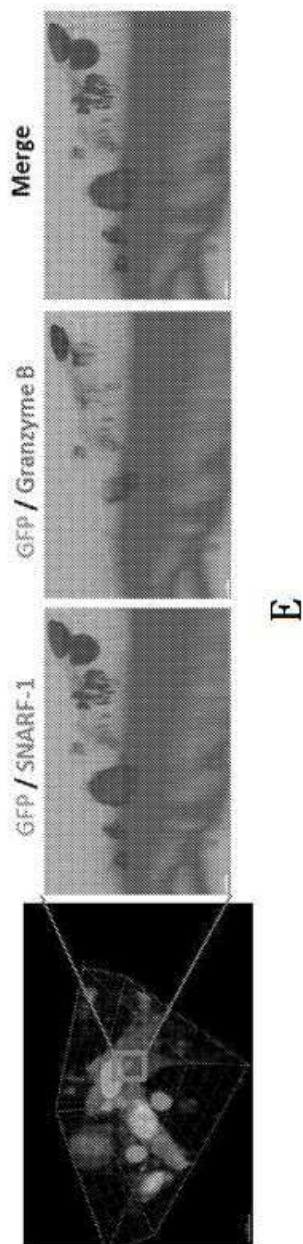
도면10def



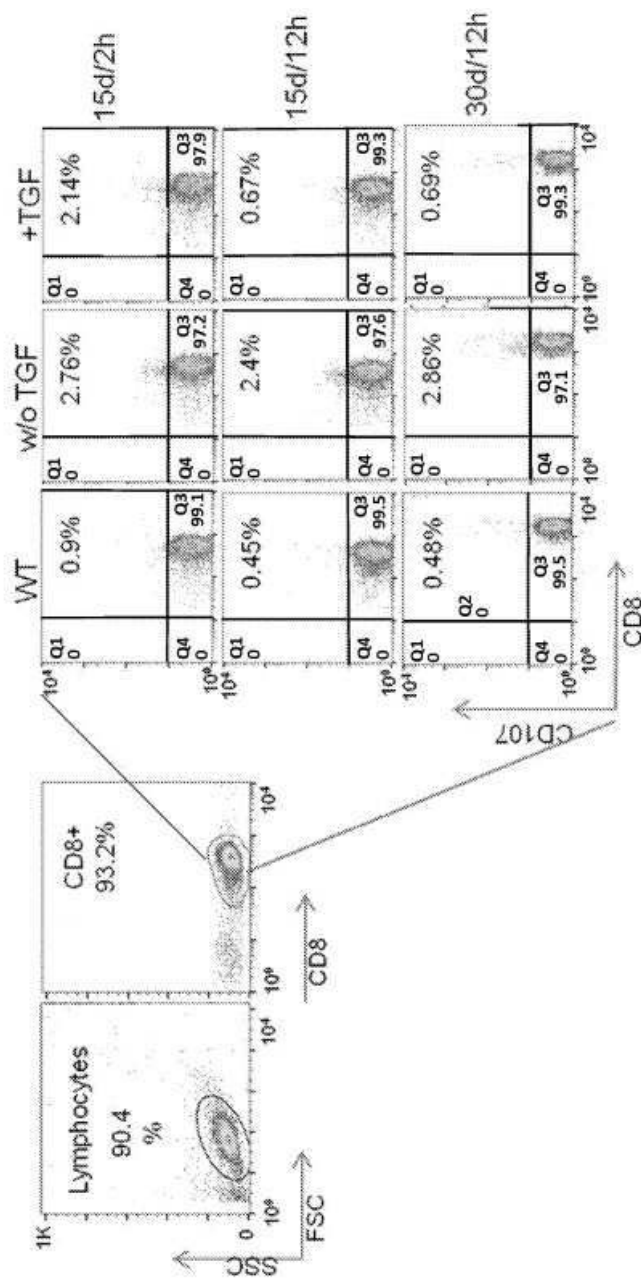
도면11ad



도면11e

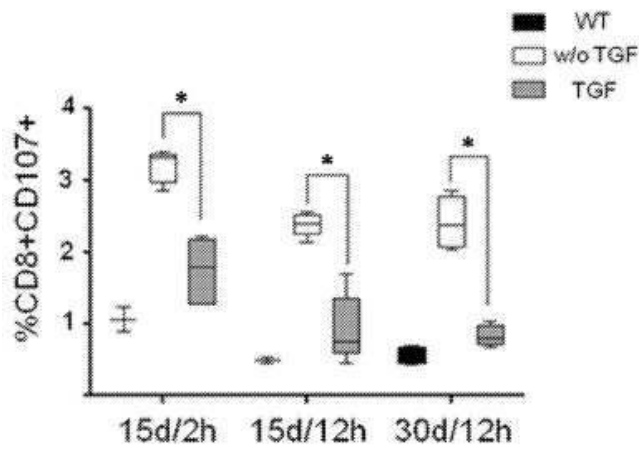


도면11f

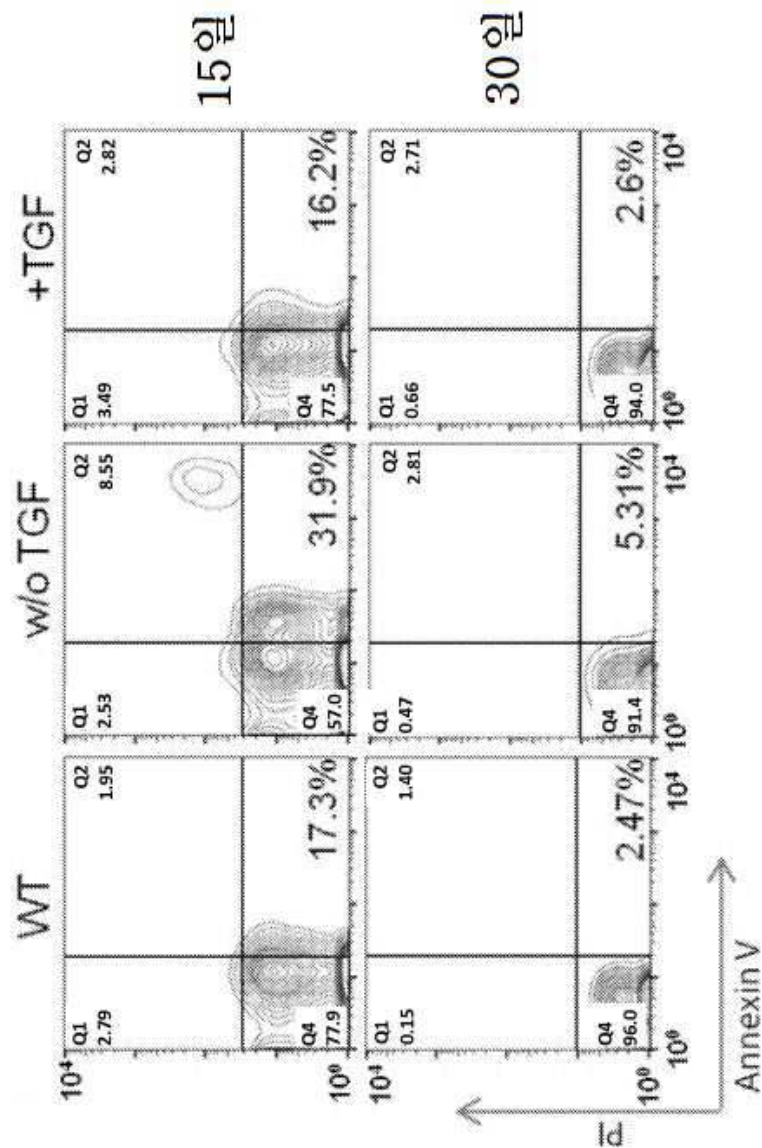




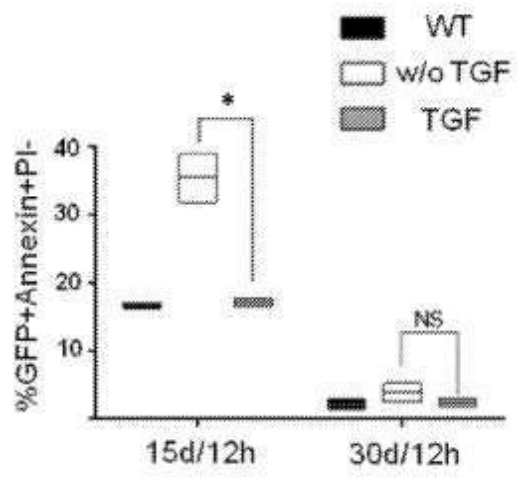
도면12a



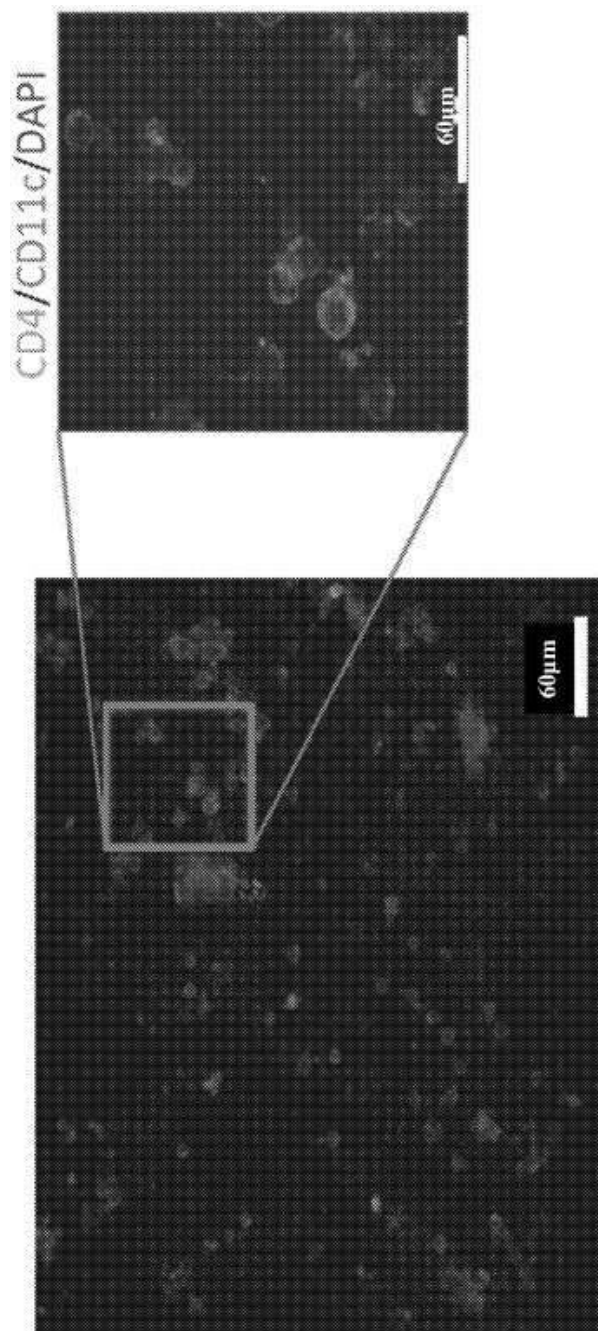
도면12b



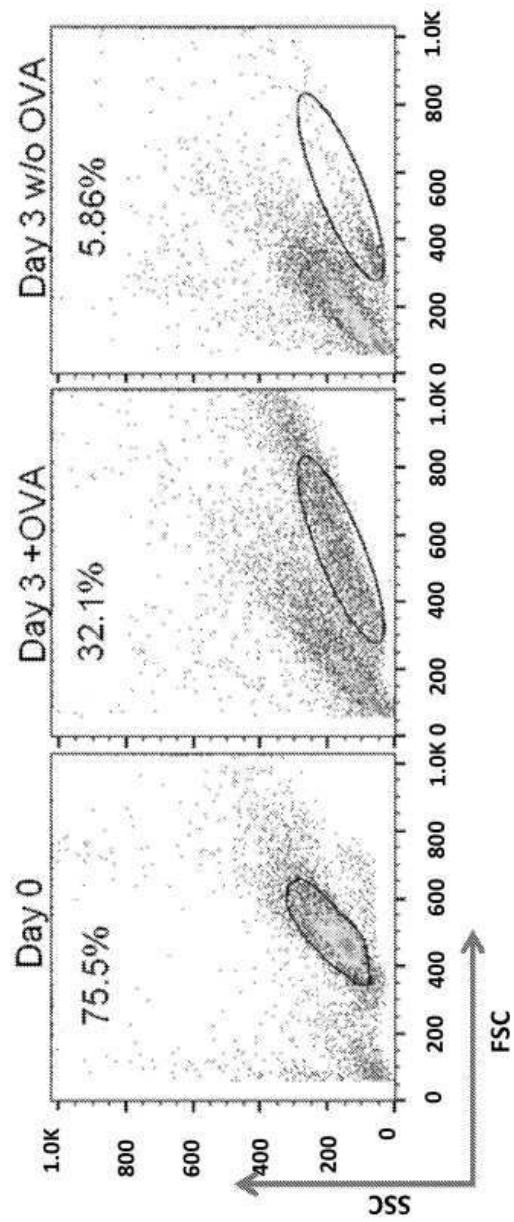
도면12c



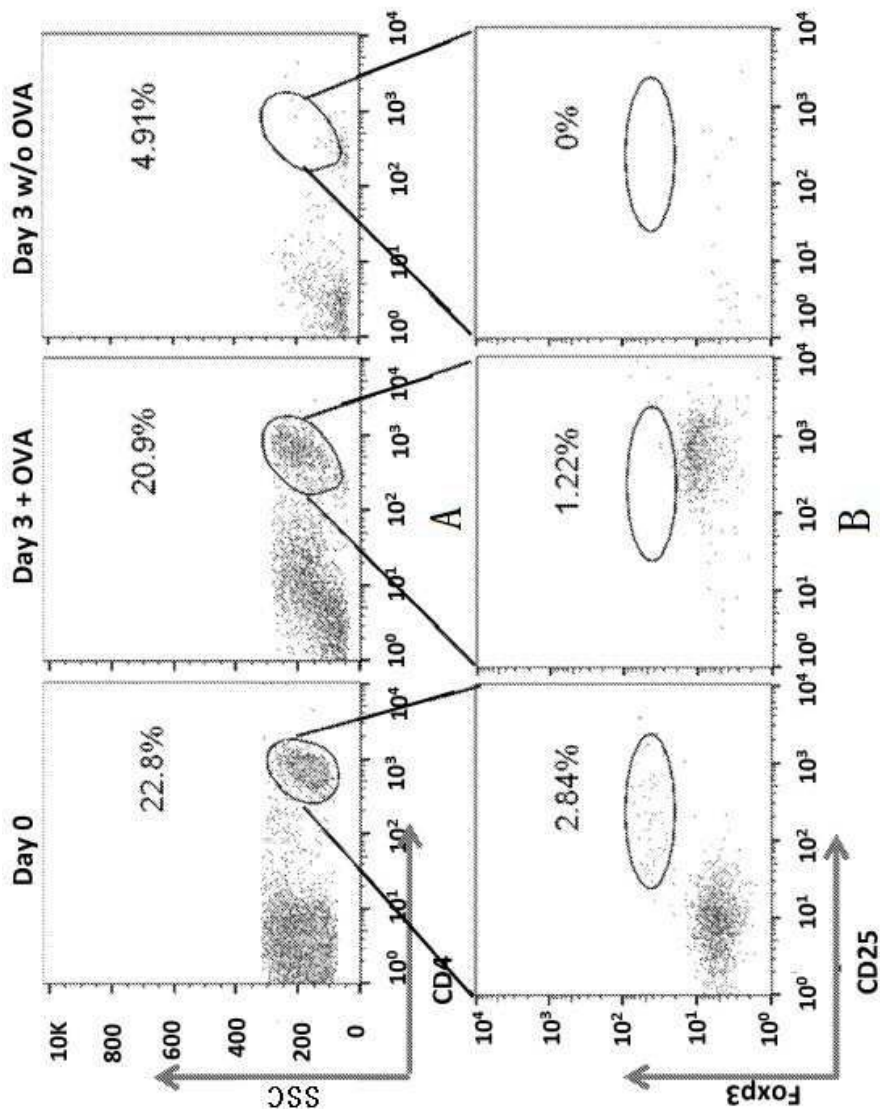
도면13a



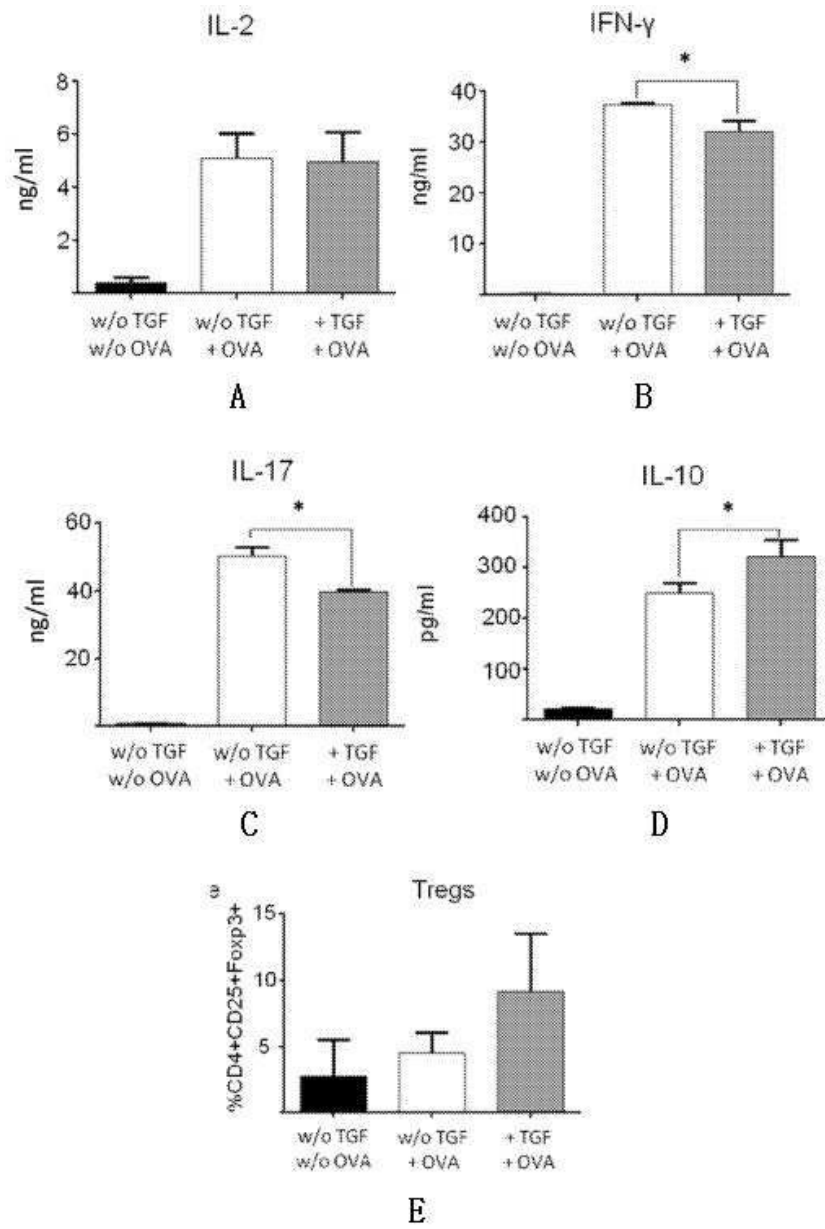
도면13b



도면14

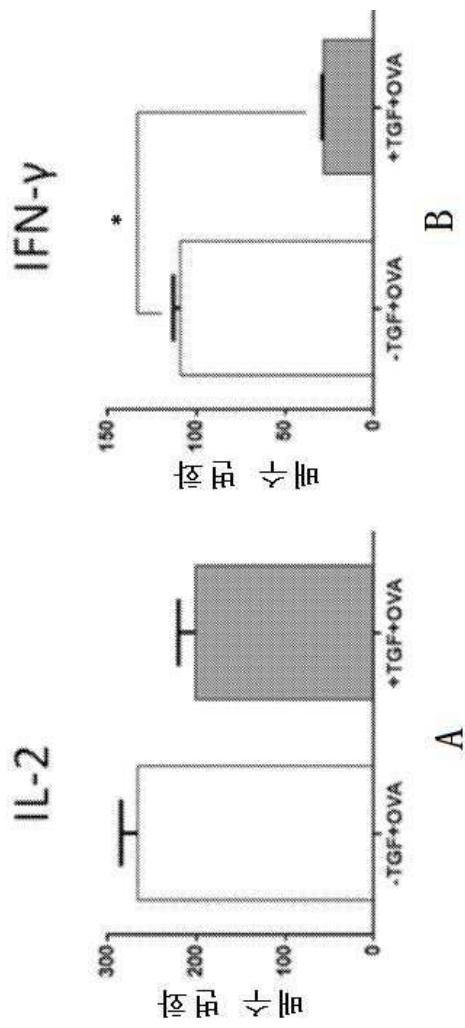


도면15

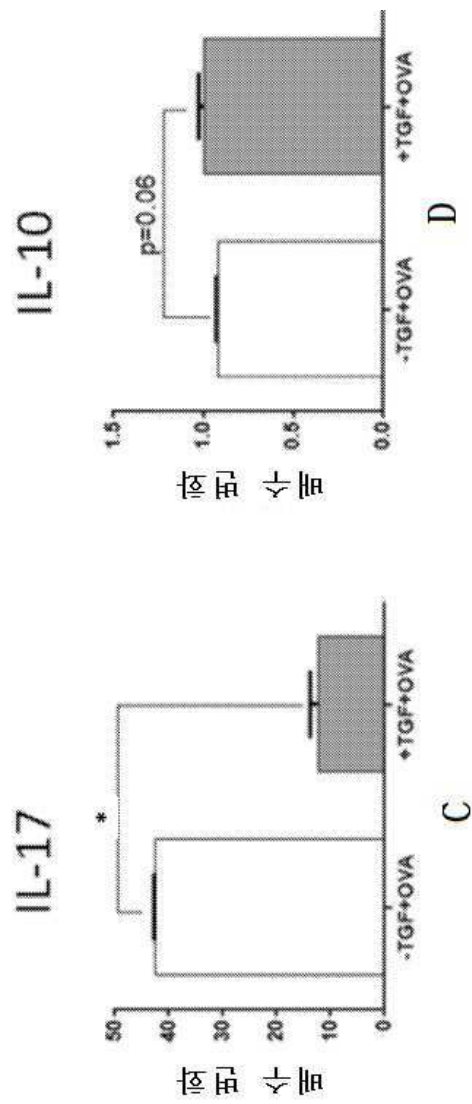




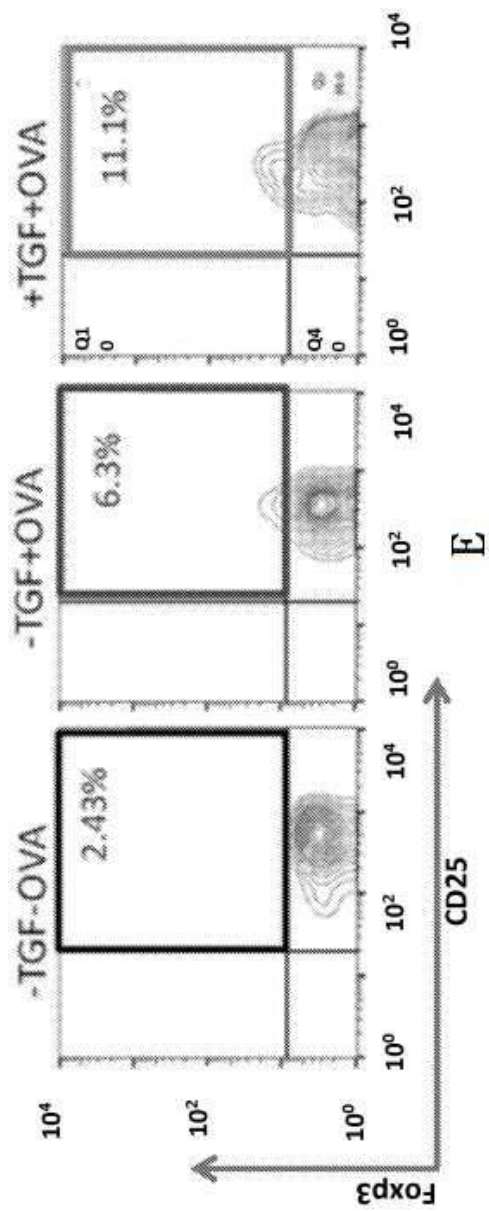
도면16ab



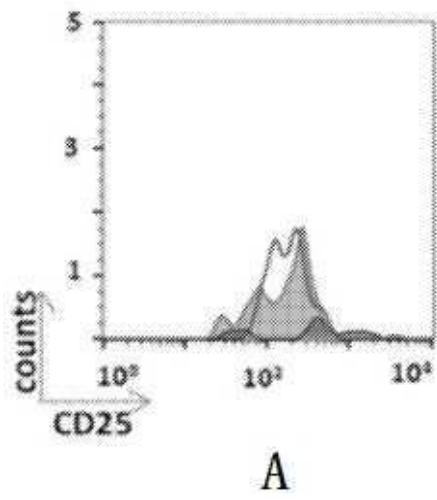
도면16cd



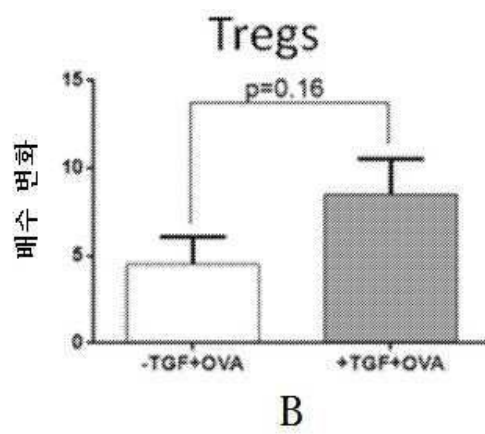
도면16e



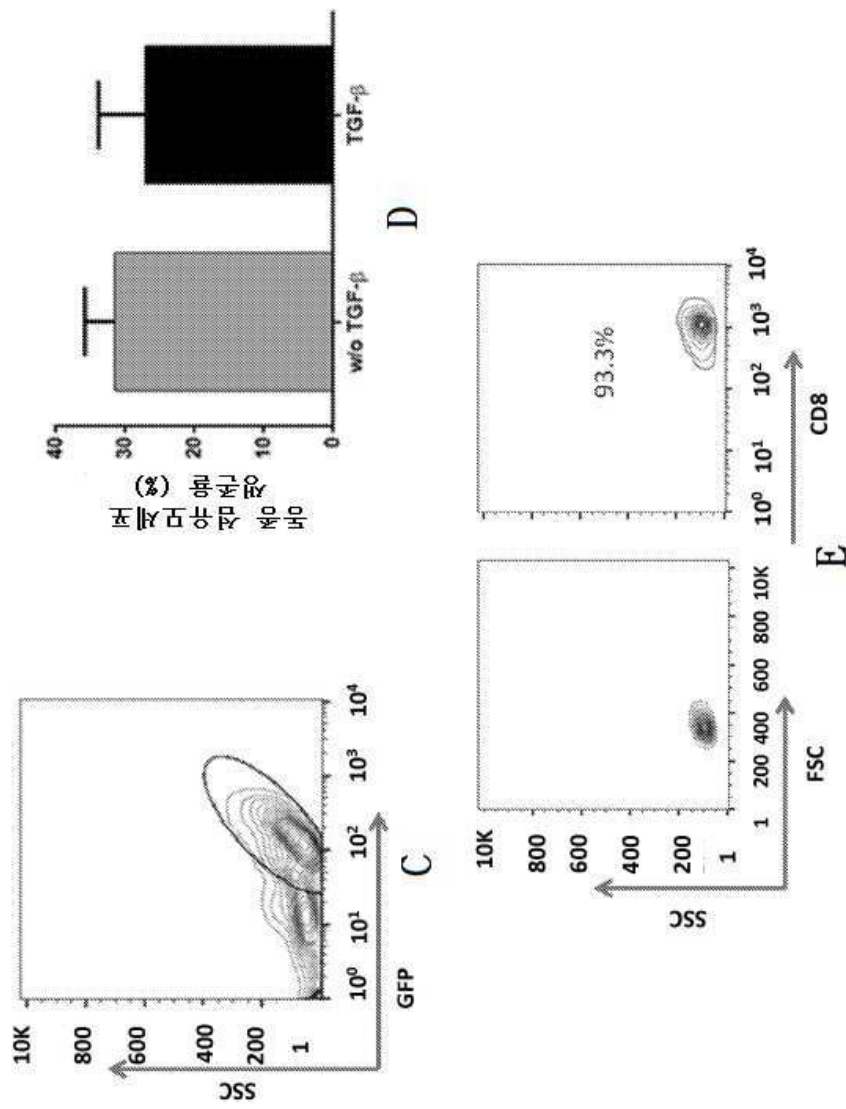
도면17a



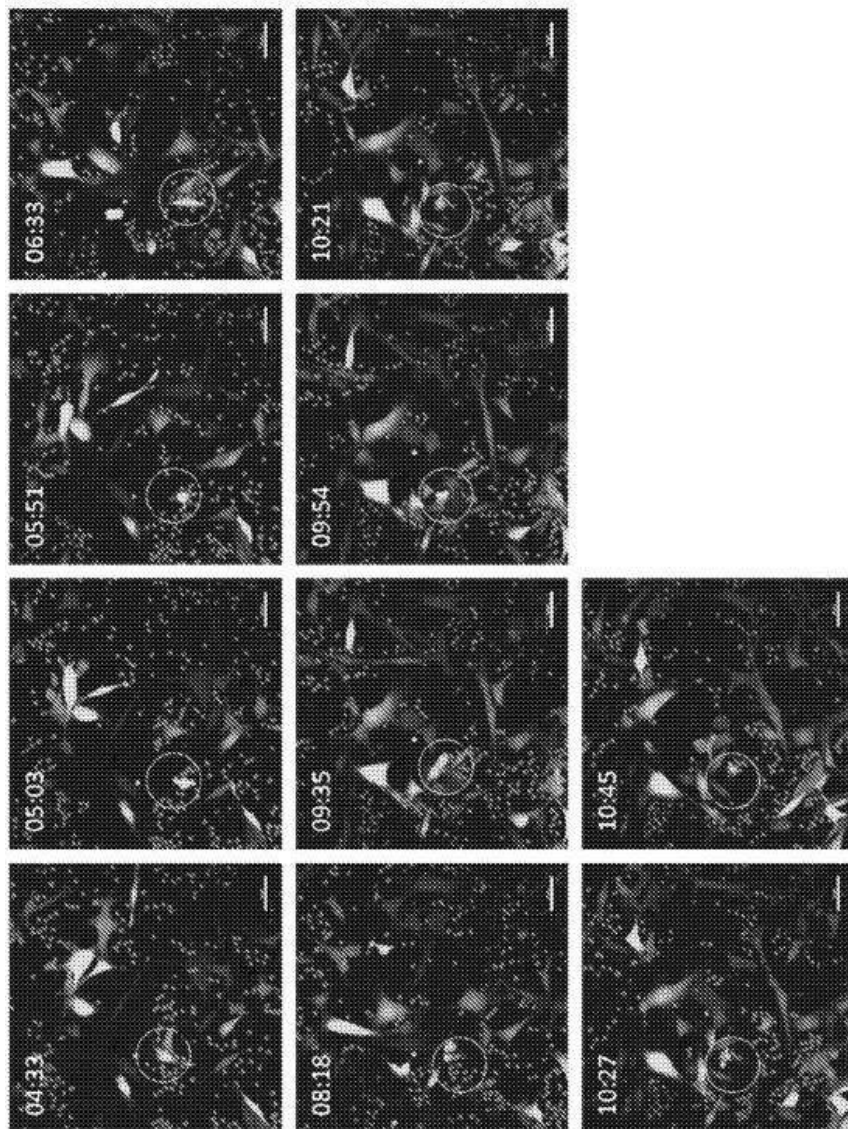
도면17b



도면17cde



도면18



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> B. G. Negev Technologies and Applications Ltd., at  
Ben-Gurion University  
COHEN, Smadar  
MONSONEGO, Alon

<120> COMPOSITIONS AND METHODS FOR GENERATING IMMUNOTOLERANT RESPONSES

<130> P-79598-PC

<150> 62/275,827

<151> 2016-01-07

<160> 1



<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

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

1                      5                      10                      15

Tyr Arg Asn Gly Lys

20