



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년10월17일
 (11) 등록번호 10-1666692
 (24) 등록일자 2016년10월10일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0775 (2010.01) *C12N 15/53* (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2011-7012368
 (22) 출원일자(국제) 2009년11월06일
 심사청구일자 2014년10월30일
- (85) 번역문제출일자 2011년05월30일
 (65) 공개번호 10-2011-0123721
 (43) 공개일자 2011년11월15일
 (86) 국제출원번호 PCT/EP2009/064788
 (87) 국제공개번호 WO 2010/052313
 국제공개일자 2010년05월14일
- (30) 우선권주장
 0820397.8 2008년11월07일 영국(GB)
- (56) 선행기술조사문헌
 Stem Cells Dev. 17(4):681-693(2008.08.)*
 Biochem. Biophys. Res. Commun.
 168(1):1-8(1990.04.16.)*
 NCBI Accession, GenBank X17998.1*
 Curr. Opin. Pharmacol.
 6(4):435-441(2006.08.)*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
셀레릭스 에스에이
 스페인 마드리드, 이-28760 트레스 칸토스, 1,
 칼레 마르코니, 파르케 테크놀로히코 데 마드리드
- (72) 발명자
뷔세, 더크
 스페인 이-28760 마드리드, 트레스 칸토스, 파르
 케 테크놀로히코 데 마드리드, 칼레 마르코니 1,
 셀레릭스 에스.에이.
데 라 로사, 올라
 스페인 이-28760 마드리드, 트레스 칸토스, 파르
 케 테크놀로히코 데 마드리드, 칼레 마르코니 1,
 셀레릭스 에스.에이.
롬바르도, 엘레우테리오
 스페인 이-28760 마드리드, 트레스 칸토스, 파르
 케 테크놀로히코 데 마드리드, 칼레 마르코니 1,
 셀레릭스 에스.에이.
- (74) 대리인
손민

전체 청구항 수 : 총 11 항

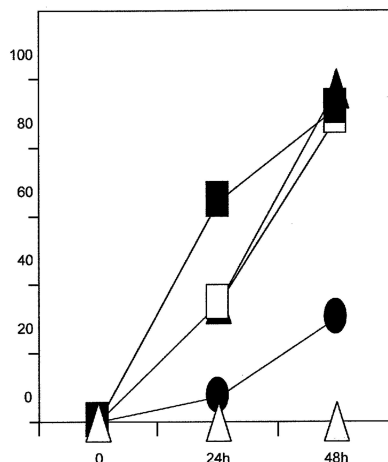
심사관 : 유성전

(54) 발명의 명칭 **세포, 핵산 작제물, 당해 작제물을 포함하는 세포 및 당해 세포를 질환 치료에 사용하는 방법**

(57) 요약

본 발명은 IDO를 발현할 수 있는 세포, IDO를 발현시키기 위한 핵산 작제물, 당해 작제물을 포함하는 세포, 및 당해 세포를 질환의 치료에 사용하는 방법에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 INF-감마에 대한 노출의 부재하에 IDO를 발현하는 세포, 및 항원에 특이적인 면역조절 세포의 제조 및/또는 생성에서의 이들의 용도에 관한 것이다.

대표도 - 도1



명세서

청구범위

청구항 1

인돌아민 2,3-디옥시게나제를 암호화하는 적어도 하나의 폴리뉴클레오티드 및 인돌아민 2,3-디옥시게나제를 암호화하는 적어도 하나의 폴리뉴클레오티드를 발현시키기 위한 구성적(constitutive) 프로모터를 포함하는 핵산 발현 작제물을 포함하는, 인돌아민 2,3-디옥시게나제를 구성적으로 발현하는 지방 유래 중간엽 줄기 세포.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드가 서열번호 1 또는 서열번호 6의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 세포.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 지방 유래 줄기세포가 지방 유래 조직, 피하 지방 유래 조직 또는 기관과 관련된 지방 조직으로부터 기원하는 세포.

청구항 4

제1항의 세포를 혈액 또는 이의 구성요소와 접촉시키는 단계를 포함하고, 여기서 상기 구성요소는 말초혈 단핵 세포 또는 말초혈 백혈구인,

면역조절 세포의 제조 및/또는 생성을 위한 엑스-비보(ex-vivo) 방법.

청구항 5

제1항의 세포를 항원의 존재하에서 혈액 또는 이의 구성요소와 접촉시키는 단계를 포함하고, 여기서 상기 구성요소는 말초혈 단핵 세포 또는 말초혈 백혈구인,

항원에 대하여 특이적인 면역조절 세포의 제조 및/또는 생성을 위한 엑스-비보(ex-vivo) 방법.

청구항 6

제4항에 있어서, 면역조절 세포가 조절 T 세포인 방법.

청구항 7

제5항에 있어서, 면역조절 세포가 조절 T 세포인 방법.

청구항 8

제4항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 면역조절 세포가 추가로 약학 조성물로 제제화되는 방법.

청구항 9

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 세포를 활성 성분으로 포함하는, 염증, 만성 염증 및 자가면역질환으로 이루어진 군으로부터 선택되는 질병의 치료용 약학 조성물.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 구성적(constitutive) 프로모터는 CMV 프로모터, HSV 프로모터, 바이러스 LTR, HIV 프로모터, 및 닭 액틴 프로모터로부터 선택되는, 세포.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 5의 아미노산 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 세포.

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 IDO를 발현할 수 있는 세포, IDO를 발현시키기 위한 핵산 작제물, 당해 작제물을 포함하는 세포 및 당해 세포를 질환 치료에 사용하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 고등 척추동물의 면역계는, 다양한 질환의 유발제인 박테리아, 진균 및 바이러스 등의 미생물을 포함하여, 척추동물 체내로 들어갈 수 있는 다양한 항원에 대한 일선의 방어수단이다. 더욱이, 면역계는 또한 자가면역 또는 면역병리학적 질환, 면역결핍 증후군, 아테롬성 동맥경화증 및 각종 신생물 질환을 포함하는 다양한 기타 질환 또는 질병과 관련된다. 이들 질환을 치료하는 방법들이 이용가능하지만, 현재의 대다수 요법들은 적절하지 못한 결과를 제공하고, 상당한 부작용의 위험을 지닌다. 새롭게 출현한 치료학적 전략 중에서, 세포 치료에 기반한 것들은 대다수의 질환을 치료하는 잠재적으로 유용한 도구를 구성하는 것처럼 보인다. 따라서, 상기 목적을 달성하기 위해 현재 연구자들에 의해 많은 노력이 이루어지고 있다.

- [0003] 자가면역 질환
- [0004] 자가면역 질환은, 박테리아, 바이러스 및 임의의 기타 외래 생성물에 대해 신체를 방어하는 것을 의미하는 신체 면역계가 정상 작동하지 않고 건강한 조직, 세포 및 기관에 대해 병리학적 반응을 생성할 때에 유발된다.
- [0005] T 세포 및 마크로파지는 유익한 보호를 제공하지만, 또한 유해하거나 치명적인 면역학적 반응을 생성한다. 자가면역 질환은 기관 특이적이거나 전신적일 수 있고, 상이한 병원성 메카니즘에 의해 유발된다. 전신 자가면역 질환은 폴리클로날 B 세포 활성화 및 면역 조절 T 세포, T 세포 수용체 및 MHC 유전자의 이상을 수반한다. 기관 특이적 자가면역 질환의 예는 당뇨병, 갑상선항진, 자가면역 부신 기능저하(autoimmune adrenal insufficiency), 순수 적혈구 빈혈, 다발성 경화증 및 류마티스성 심장염이다. 대표적인 전신 자가면역 질환은 전신 홍반성 루프스, 만성 염증, 소그렌 증후군, 다발성근염, 피부근염 및 피부경화증을 포함한다.
- [0006] 자가면역 질환에 대한 현재의 치료법은 코르티손, 아스피린 유도체, 하이드록시클로로퀸, 메토트렉세이트, 아자티오프린 및 사이클로포스파미드 또는 이들의 조합물과 같은 면역억제제를 투여하는 것을 수반한다. 그러나, 면역억제제를 투여할 때에 직면하는 딜레마는 자가면역 질환이 보다 효과적으로 치료될수록 환자가 감염물로부터의 공격에 더욱 무방비 상태로 남게 되고 또한 중앙 발달이 더욱 용이하다는 것이다. 따라서, 자가면역 질환을 치료하기 위한 새로운 요법이 매우 요구되고 있다.
- [0007] 염증 질병
- [0008] 염증은 신체의 백혈구 세포 및 분비된 인자가 박테리아 및 바이러스 등의 외래 물질에 의한 감염으로부터 신체를 보호하는 과정이고, 자가면역 질환의 통상적인 과정이다. 사이토킨 및 프로스타글란딘으로서 공지된 분비된 인자는 이러한 과정을 조절하고, 혈액 또는 발병된 조직으로 정렬된 및 자기-제한 캐스케이드로 방출된다. 일반적으로, 만성 염증 질환의 현재 치료법은 매우 제한된 효능을 갖고, 이들중 다수는 부작용 빈도가 높거나 질환의 진행을 완전히 차단할 수 없다. 지금까지 어떠한 치료법도 이상적이지 않고, 이들 종류의 병리에 대한 치료법이 없다. 따라서, 염증 질환의 치료를 위한 새로운 치료법이 매우 요구되고 있다.
- [0009] T-세포 반응의 억제
- [0010] 모든 면역 반응은 T 세포에 의해 조절된다. 자가면역 반응의 유도 가능성이 있는 자가 반응성 세포는 정상 T 세포 레파토리의 일부를 포함하지만, 건강한 상태에서는 이들의 활성화가 억제인자 세포에 의해 차단된다. T 억제인자 세포는 1970년대 이래 최초로 기재되어 있고, T 세포 아부류(subset)s의 특성화에 있어서 현저한 진보는 단지 최근해야 이루어졌으며, 이들은 조절 T 세포로 명명되어 있다.
- [0011] 조절 (억제인자) 활성을 갖는 상이한 CD4+, CD8+, 천연 킬러 세포 및, 감마 및 델타 T 세포 아부류가 존재한다. T-reg 세포의 2가지 주요 유형은 CD4+ 개체군, 즉 천연 흉선 생성 T-reg 세포, 및 말초 유도된 IL-10 또는 TGF-베타 분비 T-reg 세포(Tr1 세포)에서 특성화되어 왔다. CD4+CD25+, Foxp3-발현 천연 T-reg 세포는 흉선에서 생성되고, 이동하여 말초에서 유지된다.
- [0012] 세포 치료
- [0013] 중간엽 줄기세포(MSC)는 중간엽형 세포(지방세포, 골아세포 및 연골세포) 뿐만 아니라 근육세포, 뉴론, 내피세포, 성상세포 및 상피세포로 분화할 수 있는 다능성 성체 줄기세포이다. 정상 성체 골수종(BM-MSC)에서 최초로 보고되었으나, MSC는 또한 체대혈, 말초혈 및 지방 조직 등의 다른 공급원으로부터 수득될 수 있다. 분화 가능성 이외에, BM-MSC는 불량한 면역원성이고 면역 반응을 조절하는 독특한 특징을 갖는다. 따라서, BM-MSC는 HLA-I를 낮은 수준으로 발현하지만, BM-MSC를 면역 감시로부터 도망가게 하는 HLA-II, CD40, CD80 또는 CD86을 발현하지 않는다. 추가로, 생체의 증식된 BM-MSC는 T 세포, B 세포, NK 세포 및 항원 제시 세포를 포함하여 면역 세포의 활성화, 증식 및 기능을 억제하는 것으로 보고되어 있다. 최근의 충분한 연구에도 불구하고, BM-MSC의 면역조절 활성과 관련된 특정한 분자 및 세포 메카니즘은 논쟁 상태에 있다. BM-MSC는 T 세포 표현형을 조절하여 조절 활성을 갖는 세포를 생성할 수 있는 것으로 밝혀졌다. 대조적으로, 간세포 성장 인자(HGF), 프로스타글란딘 E2(PGE2), 형질전환 성장 인자(TGF)-1, 인돌아민 2,3-디옥시게나제(IDO), 산화질소 및 IL-10 등의

가용성 인자가 관련되어 있다. 추가로, 몇몇 보고는 또한 TNF α 및 IFN γ 등의 염증 사이토킨이 MSC에 의해 매개된 면역억제를 조절할 수 있는 것을 밝혔다.

- [0014] 지방 조직은 사람 지방 유도된 중간엽 줄기세포(hASC)로서 언급되는 MSC의 공급원이고, 이는 지방흡입된 지방 조직으로부터 분리되어 배지에서 장시간에 걸쳐 증식시킬 수 있다. hASC는 골수에서 이들의 대응물과 몇몇 특징, 예를 들면, 분화 가능성, 낮은 면역원성 및 면역 반응 억제능을 공유한다. 두 가지 세포형을 비교한 최근의 연구는 전사 및 프로테오믹 수준의 차이를 보고하였으며, 이는 hASC 및 BM-MSC가 유사성을 공유하면서 실제로 매우 상이하다는 것을 시사한다. hASC 매개된 면역억제의 기초를 이루는 특정한 메카니즘은 지금까지 거의 연구된 바가 없다. 최근 들어, hASC가 적어도 부분적으로는 PGE2의 방출을 필요로 하는 메카니즘에 의해 림프구 증식을 억제할 수 있는 것으로 보고되었다. 그러나, 이들 연구는 (i) 면역억제 메카니즘과 관련된 다른 세포 또는 가용성 인자, (ii) 분리된 T 세포 아부류에 대한 면역억제 효과 또는 (iii) 공동 배양시 hASC와 PBMC 둘 다의 표현형 변화에 관한 정보를 제공하지 않았다.
- [0015] 이들 생물학적 능력은 hASC를 포함한 MSC를 세포 치료 및 재생을 위한 흥미있는 도구로 되게 한다. 이는 BM-MSC가 동종이식 거부, 이식-대-숙주 질환, 실험실 자가면역 뇌척수염, 콜라겐 유도된 관절염 및 자가면역 심근염을 완화시킴을 나타내는 연구에 의해 추가로 뒷받침된다. 더욱이, 마우스 ASC(mASC)는 생체내 마우스 모델에서 동종이계 이식 후에 이식-대-숙주 질환을 보호하는데 매우 효율적인 것으로 최근에 보고되었다. 또한, MSC는 이들의 면역조절 능력에 초점을 맞춘 몇몇 임상 시험에서 사용되고 있다.
- [0016] IDO, 즉 트립토판 대사 효소의 발현은 T 세포 증식의 억제와 관련되는 것으로 공지되어 있다. 더욱이, IDO 발현은 염증 매개인자에 의해 조절되는 것으로 생각된다. 전문적 항원 제시 세포 및 BM-MSC에 의한 면역억제의 메카니즘에서 IDO의 관여는 최근에 입증되었다.

발명의 내용

과제의 해결 수단

- [0017] 본 발명은 IFN γ 의 부재하에 IDO를 발현시킬 수 있는 세포 및/또는 IDO를 구성적으로(constitutively) 발현시킬 수 있는 세포에 관한 것이다. 본 발명은 또한 효소 인돌아민 2,3-디옥시게나제를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열 또는 이의 단편을 포함하는 핵산 작제물, 및 당해 작제물을 포함하여 상기 효소의 구성적 발현을 생성하는 세포에 관한 것이다. 본 발명은 또한 면역조절 특성을 갖는 세포의 제조 및/또는 생성에 상기 세포를 사용하는 방법을 제공한다. 추가의 양태에서, 본 발명은 본 발명의 세포로 이루어진 약제 및 키트를 제공한다.
- [0018] 정의
- [0019] 본 명세서의 이해를 돕기 위해, 본 발명과 관련하여 몇몇 용어 및 표현의 의미가 하기에 설명될 것이다. 추가의 정의는 필요한 경우 기재사항과 함께 포함될 것이다.
- [0020] 용어 "IDO"는 인돌아민 2,3-디옥시게나제(INDO; EC 1.13.11.42)인 폴리펩티드 또는 실질적으로 유사한 활성을 갖는 폴리펩티드, 즉 필수 아미노산 L-트립토판의 N-포르밀키누레닌으로의 분해를 촉매할 수 있는 폴리펩티드를 의미한다.
- [0021] 본원에 사용된 용어 "동종이계"는 동일한 종의 상이한 개체로부터 기원하는 것을 의미하는 것으로 간주된다. 2개 이상의 개체는 하나 이상의 위치의 유전자가 동일하지 않은 서로 동종이계인 것으로 언급된다.
- [0022] 본원에 사용된 용어 "자가조직"은 동일한 개체로부터 기원하는 것을 의미하는 것으로 간주된다.
- [0023] 용어 "항원 제시 세포"(APC)는 MHC(주요 조직적합성 복합체)와 복합체화된 표면 외래 항원을 나타내는 세포 개체군을 의미한다. 신체 내의 거의 모든 세포가 T 세포에 대한 항원을 제시할 수 있지만, 본원에서 용어 "항원 제시 세포"(APC)는 표면 MHC II(HLA DP, DQ, DR) 및/또는 MHC I을 발현하는 분화된 세포로 한정되며, 당해 발현이 유도되는 것들(예를 들면, 이로써 한정되는 것은 아니지만, B 세포 및 CD4 PHA 아세포(blast)) 및 단핵구-마кро파지 계통으로부터 유도되는 것들(예를 들면, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 수지상 세포)을 포함한다.
- [0024] 용어 "자가면역 질환"은 자신의 세포, 조직 및/또는 기관에 대한 개체의 면역학적 반응에 의해 유발된 세포, 조직 및/또는 기관 손상을 특징으로 하는 개체의 상태를 의미한다. 본 발명의 면역조절 세포로 치료할 수 있는 자가면역 질환의 예시적인 비제한적 예는 원형탈모증, 강직성 척추염, 항인지질 증후군, 자가면역 에디슨 질환,

부신의 자가면역 질환, 자가면역 용혈성 빈혈, 자가면역 간염, 자가면역 난소염 및 고환염, 자가면역 혈소판감소, 베체트병, 수포성 천포창, 심근증, 복강 스포루-피부염, 만성 피로 면역 부전 증후군(CFIDS), 만성 염증성 탈수초성 신경병증, 척-스트라우스(Churg-Strauss) 증후군, 반흔성 유헤포창(cicatricial pemphigoid), 크레스트(CREST) 증후군, 한냉 응집소 질환, 홍반성 낭창, 필수 혼합 한랭 글로불린 혈증, 섬유근육통-섬유근염, 사구체신염, 그레이브스 질병, 길랭-바레(Guillain-Barre) 증후군, 하시모토 갑상선염, 특발성 폐 섬유증, 특발성 혈소판감소 자반병(ITP), IgA 신경병, 연소자 관절염, 편평태선, 메니에르(Meniere)씨 병, 혼합 결합 조직 질환, 다발성 경화증, 제1형 또는 면역-매개 당뇨병, 중증 근무력증, 심상성 천포창, 악성 빈혈, 결절성 다발성 동맥염, 다발성 연골염, 다선성 증후군, 류마티스성 다발성 근육통, 다발근염 및 피부근염, 원발성 무감마 글로불린 혈증, 원발성 담즙 간경변, 건선, 간경변 관절염, 레이놀트(Raynaud) 현상, 라이터(Reiter) 증후군, 유육종증, 경피증, 진행성 전신성 경화증, 소그렌(Sjogren) 증후군, 굿 파스테르(Good pasture) 증후군, 강직 인간 증후군, 전신 홍반성 낭창, 홍반 낭창, 타카야수(takayasu) 동맥염, 측두 동맥염/거대 세포 동맥염, 켈양성 대장염, 포도막염, 피부 포진상 맥관염 등의 맥관염, 베체너(Wegener) 육아종증, 항사구체 기저막 병, 항인지질 증후군, 신경계의 자가면역 질환, 가족성 지중해열, 램버트-이튼(Lambert-Eaton) 근무력 증후군, 교감성 안염, 다발성 내분비이상, 건선 등을 포함한다.

- [0025] 용어 "염증 질환"은 염증, 예를 들면, 만성 염증을 특징으로 하는 개체의 상태를 의미한다. 염증 질환의 예시적인 비제한적 예는, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 복강 질환, 류마티스성 관절염(RA), 염증성 장 질환(IBD), 천식, 뇌염, 만성 폐쇄성 폐 질환(COPD), 염증성 골연화증, 알레르기 질환, 패혈성 쇼크, 폐 섬유증(예: 특발성 폐 섬유증), 염증 혈관염(예: 결절성 다발 동맥염, 베그너(Wegner) 육아종증, 타카야수 관절염, 측두 동맥염 및 림프종 육아종증), 외상후 혈관 확장술(예: 혈관성형술 후 재협착증), 미분화 척추관절염, 미분화 관절 병증, 관절염, 염증성 골연화증, 만성 간염, 및 만성 바이러스 또는 박테리아 감염으로부터 유발되는 만성 염증을 포함한다.
- [0026] 세포 개체군에 적용된 용어 "분리된"은 사람 또는 동물 신체로부터 분리된 세포 개체군을 의미하고, 이는 생체 내 또는 시험관내에서 상기 세포 개체군과 관련되는 하나 이상의 세포 개체군을 실질적으로 포함하지 않는다.
- [0027] 용어 "MHC"(주요 조직적합성 복합체)는 세포 표면 항원 제시 단백질을 암호화하는 유전자의 아부류를 의미한다. 사람에서, 이들 유전자는 사람 백혈구 항원(HLA) 유전자를 지칭한다. 본원에서, 약어 MHC 또는 HLA는 상호 교대로 사용된다.
- [0028] 용어 "개체"는 동물, 바람직하게는 비-영장류(예: 소, 돼지, 말, 고양이, 개, 랫트 또는 마우스) 및 영장류(예: 원숭이 또는 사람)를 포함하는 포유동물을 의미한다. 바람직한 양태에서, 개체는 사람이다.
- [0029] 용어 "면역조절"은 면역계의 하나 이상의 생물학적 활성의 억제 또는 감소를 의미한다. 용어 "항원 특이적 면역조절"은 동종항원 또는 자가항원 둘 다를 포함하는 특이적 항원 또는 항원들과 관련된 면역계의 하나 이상의 생물학적 활성의 억제 또는 감소를 의미한다. 용어 "면역조절"은 "항원 특이적 면역조절"을 포함하는 것으로 간주된다.
- [0030] 본원에 사용된 용어 "면역조절제", "면역조절 세포 개체군", "면역조절 세포" 또는 "면역조절 세포들"은 하나 이상의 면역 세포(이로 한정되지는 않지만, 예를 들면, T 세포)의 하나 이상의 생물학적 활성(이로 한정되지는 않지만, 예를 들면, 사이토킨의 증식, 분화, 프라이밍, 작동인자 기능, 생성 또는 항원의 발현)을 억제 또는 감소시키는 제제, 이의 세포(들) 또는 개체군을 의미하는 것으로 간주된다.
- [0031] 용어 "T-세포"는 T 세포 수용체(TCR)를 발현하는 림프구의 아부류인 면역계의 세포를 의미한다. 용어 "조절 T-세포"(또한 본원에서 T-reg 세포로 지칭됨)는 면역계의 활성화를 활발히 억제하고 병리학적 자가 반응성, 즉 자가면역 질환을 차단하는 T 세포 아부류를 의미한다. 용어 "조절 T-세포" 또는 "T-reg 세포"는 FoxP3 분자를 발현하지 않는 천연 T-세포(또한 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T-reg 세포로서 공지됨) 및 적응성 T-세포(또한 Tr1 세포 또는 Th3 세포로서 공지됨) 둘 다를 포함하는 것으로 간주된다.
- [0032] 본 방법의 특히 바람직한 양태에서, 상기 면역조절제 또는 이의 개체군은 조절 T-세포이지만, 본 발명 방법의 대안적인 방법에서 이들은 조절 T-세포의 면역억제 기능을 수행할 수 있도록 변형된 다른 표현형의 세포일 수 있다. 예를 들면, 다른 표현형의 세포는 상기 변형 이전에 다음 능력: 혼합 림프구 반응의 억제; 세포독성 T 세포 반응의 억제; DC 성숙의 억제; 염증 사이토킨의 T 세포 생성의 억제 중의 하나 이상이 결여되어 있다.
- [0033] 본원에 사용된 바와 같이, 세포 표면 마커와 관련하여 사용된 "네가티브" 또는 "-"는 세포 개체군에서 세포의 20% 미만, 10% 미만, 바람직하게는 9% 미만, 8% 미만, 7% 미만, 6% 미만, 5% 미만, 4% 미만, 3% 미만, 2%

미만, 1% 미만이 상기 마커를 발현하거나 전혀 발현하지 않음을 의미하는 것으로 간주된다. 세포 표면 마커의 발현은, 예를 들면, 통상의 방법 및 장치(예를 들면, 상업적으로 입수가능한 항체 및 당해 기술분야에 공지된 표준 프로토콜과 함께 사용된 벡톤 디킨슨 FACS 칼리버 시스템(Becton Dickinson FACS Calibur system))를 사용하여 특이적 세포 표면 마커에 대한 유세포 분석기에 의해 측정할 수 있다.

- [0034] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 중간엽 줄기세포(또한 본원에서 "MSC"로서 지칭됨)은 중간엽으로부터 본래 유도된 다능 세포종을 의미하는 것으로 간주된다. 용어 "줄기세포"는 연속 분화에 의해 분화 세포로 성장할 수 있는 세포를 의미하는 것으로 간주된다. 다능성 줄기세포는 분화 세포의 다중 종으로 성장할 수 있다.
- [0035] 본원에 사용된 바와 같이, 표현 "현저한 발현" 또는 이와 동등한 용어 "포지티브" 및 "+"는, 세포 표면 마커와 관련하여 사용되는 경우, 세포 개체군에서 세포의 20% 이상, 바람직하게는 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상이 상기 마커를 발현하는 것을 의미하는 것으로 간주된다.
- [0036] 세포 표면 마커의 발현은, 예를 들면, 유세포 분석기에서, 통상의 방법 및 장치(예를 들면, 상업적으로 입수가능한 항체 및 당해 기술분야에 공지된 표준 프로토콜과 함께 사용된 벡톤 디킨슨 FACS 칼리버 시스템)을 사용한 배후 신호 이상으로 특이적 세포 표면 마커의 신호를 나타내는, 통상의 방법 및 장치(예를 들면, 상업적으로 입수가능한 항체 및 당해 기술분야에 공지된 표준 프로토콜과 함께 사용된 벡톤 디킨슨 FACS 칼리버 시스템)을 사용하여 특이적 세포 표면 마커에 대한 유세포 분석기에 의해 측정할 수 있다. 배후 신호는 통상의 FACS 분석에서 각 표면 마커를 검출하는데 사용된 특이적 항체와 동일한 이소형의 비특이적 항체에 의해 제공된 신호 강도로서 정의된다. 포지티브로 간주되는 마커의 경우, 관찰된 특이적 신호는, 통상의 방법 및 장치(예를 들면, 상업적으로 입수가능한 항체 및 당해 기술분야에 공지된 표준 프로토콜과 함께 사용된 벡톤 디킨슨 FACS 칼리버 시스템)을 사용한 배후 신호 강도보다 20%, 바람직하게는 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 500%, 1000%, 5000%, 10000% 이상 강력하다.
- [0037] 추가로, 세포 표면 및/또는 세포내 마커(예: 세포 수용체 및 막관통 단백질)에 대한 상업적으로 입수가능하고 공지된 단일 클론 항체를 사용하여 관련 세포를 동정할 수 있다.
- [0038] 용어 "결합 조직"은 중간엽으로부터 유도된 조직을 의미하고, 이들의 세포가 세포의 매트릭스에 포함됨을 특징으로 하는 몇몇 조직을 포함한다. 결합 조직의 예는, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 지방 및 연골 조직을 포함한다.
- [0039] 본원에 사용된 용어 "섬유아세포"는 섬유아세포 유사 활액 세포를 포함하는 것으로 간주된다.
- [0040] 용어 "글루텐"은 글리아딘 및 글루테닌 성분으로 이루어진 단백질을 의미하는 것으로 간주된다.
- [0041] 용어 "벡터" 및 "핵산 벡터"는 외래 DNA 단편을 숙주 또는 수용체 세포 내로 운반할 수 있는 체제(통상 DNA 분자)를 의미하는 것으로 간주된다.
- [0042] 용어 "클로닝 벡터"는 외래 DNA를 숙주 세포내로 운반하고, 당해 세포를 복제하고, 자체 및 외래 DNA의 다수 복제물을 생성하는 벡터를 의미하는 것으로 간주된다.
- [0043] 용어 "발현 벡터"는 외래 DNA 단편을 숙주 또는 수용체 세포에서 발현시킬 수 있는 벡터를 의미하는 것으로 간주된다.
- [0044] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "치료하다(treat)", "치료(treatment)" 및 "치료(treating)"는, 환자 또는 개체와 관련하여 직접 사용되는 경우, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 염증 질환, 자가면역 질환, 또는 이식된 기관 또는 조직의 거부를 포함한 면역학적으로 매개된 질환을 포함하는 질환과 관련된 하나 이상의 증상의 완화를 의미하는 것으로 간주되고, 여기서 완화는 상기 치료를 필요로 하는 개체에게 본 발명의 면역조절 세포 또는 이를 포함하는 약제학적 조성물의 투여로부터 발생한다.
- [0045] 발명의 상세한 설명
- [0046] 본 발명은 IDO를 IFN- γ 의 부재하에 발현시킬 수 있는 세포 및 IDO를 구성적으로 발현시킬 수 있는 세포에 관한 것이다. 이들 세포는 처음으로 IFN- γ 등의 유도인자의 부재하에 IDO를 발현시킨다. 이론에 국한시키고자 하는 것은 아니지만, 본 발명은, 염증 매개인자의 초기 관련 없이, 세포 요법의 면역억제에서 IDO의 사용을 가능하게 한다.

- [0047] 본 발명은 추가로 효소 인돌아민 2,3-디옥시게나제를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열 또는 이의 단편을 포함하는 핵산 작제물 및 상기 작제물을 포함하여 상기 효소의 구성적 발현을 생성하는 세포에 관한 것이다. 본 발명은 추가로 면역조절 특성을 갖는 세포의 제조 및/또는 생성에서 상기 세포를 사용하는 방법을 제공한다. 추가의 양태에서, 본 발명은 본 발명의 세포로 이루어진 약제 및 키트를 제공한다.
- [0048] 본 발명의 핵산 작제물
- [0049] 첫번째 양태에서, 본 발명은 i) 인돌아민 2,3-디옥시게나제를 암호화하는 적어도 하나의 폴리뉴클레오티드 또는 이의 작용성을 보유하는 단백질 단편을 포함하는 핵산 발현 작제물을 제공한다. 추가의 양태에서, 상기 폴리뉴클레오티드는 인돌아민 2,3-디옥시게나제를 암호화하는 복수의 절편 또는 이의 작용성을 보유하는 단백질 단편을 포함할 수 있고, 여기서, 상기 절편은 연속적으로 정렬되지만, 각각의 상기 절편은 하나 또는 복수의 뉴클레오티드에 의해 다음 절편으로부터 분리될 수 있다.
- [0050] 바람직하게는, 상기 폴리뉴클레오티드는 적어도 800개, 적어도 900개, 적어도 1000개, 적어도 1100개 또는 적어도 1200개 뉴클레오티드 길이이다.
- [0051] 한 가지 양태에서, 인돌아민 2,3-디옥시게나제 또는 이의 단편을 암호화하는 상기 핵산 폴리뉴클레오티드는 서열번호 5에 기재된 IDO 단백질 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 또는 이에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 상동성을 갖는 단백질을 포함한다. 서열번호 5는 인돌아민 2,3-디옥시게나제 아미노산 서열을 개시한다.
- [0052] 한 가지 양태에서, 인돌아민 2,3-디옥시게나제 또는 이의 단편을 암호화하는 핵산 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1 또는 서열번호 6의 적어도 800개, 적어도 900개, 적어도 1000개, 적어도 1100개 또는 적어도 1200개 뉴클레오티드로 구성된다. 유전자 코드의 중복성을 설명하기 위해, 이는 상기 핵산의 기능적 동등 단편, 변이체 및 유사체를 포함하는 것으로 간주된다. 따라서, 이는 서열번호 1 또는 서열번호 6과 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 상동성을 갖는 서열을 포함하는 것으로 간주된다. 서열번호 1 및 서열번호 6은 각각 작용성 인돌아민 2,3-디옥시게나제 아미노산 서열을 암호화하는 cDNA 서열을 개시한다.
- [0053] 추가의 양태에서, 핵산 발현 작제물은 상기 제1 폴리뉴클레오티드의 발현을 검출하기 위한 프로모터를 암호화하는 적어도 하나의 추가 폴리뉴클레오티드를 포함한다.
- [0054] 상기 프로모터는 구성적 프로모터인 것이 특히 바람직하다. 상기 프로모터는 바이러스 또는 진핵생물 프로모터인 것이 바람직하다. 진핵생물 프로모터가 특히 바람직하다. 추가의 양태에서, 상기 프로모터는 CMV 프로모터, HSV 프로모터, 바이러스 LTR, HIV 프로모터, 닭 액틴 프로모터로 이루어진 그룹으로부터 선택될 수 있다.
- [0055] 상기 핵산 발현 작제물은 이하 본 발명의 핵산 작제물로서 지칭될 것이다. 본 발명의 핵산 작제물을 제조하는 방법은 당해 기술분야에 공지되어 있다.
- [0056] 본 발명의 핵산 작제물은, 수용체 세포 내로 삽입하여 상기 수용체 세포가 상기 효소 또는 이의 기능적 동등 단편, 변이체 또는 유사체를 구성적으로 생성할 수 있게 하는, 효소 인돌아민 2,3-디옥시게나제의 제조에 사용하기에 적합하다. 따라서, 한 가지 양태에서, 본 발명은 본 발명의 외인성 핵산 작제물을 포함하는 세포를 제공한다. 본 발명의 핵산 작제물은 본 발명의 추가의 양태에서 적합한 핵산 벡터(이하 "벡터"로서 지칭된다) 내로 삽입되어 분리, 증폭 및/또는 숙주 또는 수용체 세포 또는 이의 계능 내로의 삽입을 가능하게 할 수 있다. 이러한 벡터는, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 발현 벡터 및 클로닝 벡터, 예를 들면, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 플라스미드, 하이브리드 플라스미드, 코스미드, 파지 벡터, 바이러스 벡터, 박테리아 합성 염색체 및 효모 합성 염색체를 포함한다. 당해 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 핵산 작제물의 크기 및 수용체 세포의 종류를 포함하는 인자와 관련하여 적절한 벡터를 선택할 수 있다.
- [0057] 따라서, 추가의 양태에서, 본 발명은 본 발명의 핵산 작제물을 포함하는 벡터를 제공한다. 상기 벡터는 플라스미드, 하이브리드 플라스미드, 코스미드, 파지 벡터, 바이러스 벡터, 박테리아 합성 염색체 및 효모 합성 염색체로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것이 바람직하다. 가장 바람직하게는, 상기 벡터는 플라스미드, 코스미드 또는 바이러스 벡터이다.
- [0058] 한 가지 양태에서, 벡터 내로 삽입된 본 발명의 재조합체 핵산 발현 작제물은 서열번호 2로 구성되거나 서열번호

호 2로 필수적으로 구성된다.

- [0059] 핵산을 포함하는 벡터는 숙주 또는 수용체 세포 내로의 본 발명의 핵산 작제물의 삽입에 사용될 수 있다. 벡터가 클로닝 벡터인 경우, 상기 숙주 또는 수용체 세포는 단세포 유기체(예를 들면, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 박테리아 또는 효모 세포), 또는 외래 DNA의 클로닝에서 사용하기에 적합한 다른 미생물인 것이 특히 바람직하다.
- [0060] 벡터가 발현 벡터인 경우, 상기 숙주 또는 수용체 세포는 동물 세포, 바람직하게는 포유동물 세포, 보다 바람직하게는 호모 사피엔스 세포인 것이 특히 바람직하다. 상기 수용체 세포는 중간엽 줄기세포, 섬유아세포, 또는 섬유아세포 유사 활액 세포인 것이 특히 바람직하다. 상기 수용체 세포는 출생 후 기원이고, 따라서 적합한 임의의 조직, 예를 들면, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 골수, 결합 조직, 지방, 제대, 제대혈 및 태반으로부터 분리될 수 있는 것이 추가로 바람직하다. 특히 바람직한 양태에서, 수용체 세포는 지방 조직으로부터 유도된 줄기세포인 것이 특히 바람직하다. 상기 지방은 임의의 적합한 기원일 수 있지만, 피하 지방 조직 또는 기관 관련 지방 조직(예를 들면, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 심장, 간, 신장 또는 췌장과 관련된 지방)인 것이 특히 바람직하다.
- [0061] 본 발명의 핵산 작제물을 포함하고 인돌아민 2,3-디옥시게나제를 구성적으로 발현하는 세포는 이를 필요로 하는 환자의 치료에 적합한 생체내 면역조절 능력을 갖는다. 따라서, 본 발명은 본 발명의 핵산 작제물로 형질감염되거나 형질전환된 세포를 제공한다. 본 발명은 또한 본 발명의 핵산 작제물을 포함하고IDO 또는 이의 기능적 동등 단편, 변이체 및 유사체를 구성적으로 발현하는 세포를 제공한다.
- [0062] 외인성 핵산 작제물은 안정하게 또는 불안정하게 게놈 내로 또는 수용체 세포의 다른 내인성 유전자 물질 내로 통합될 수 있거나, 세포 내에 함유될 수 있지만, 이의 내인성 유전자 물질로부터 분리될 수 있다.
- [0063] 본 발명의 핵산 작제물을 포함하는 세포를 이하 "본 발명의 IDO 세포"로 지칭한다. 본 발명의 IDO 세포는 IFN- γ 의 부재하에 IDO를 발현할 수 있고/있거나 IDO를 구성적으로 발현시킬 수 있다. 인돌아민 2,3-옥시게나제를 발현하는 본 발명의 IDO 세포가 바람직하다. 상기 세포는 키누레닌을 분비하는 것이 특히 바람직하다. 인돌아민 2,3-디옥시게나제를 발현하고 분비하는 세포로서 미분화 및/또는 다능 줄기세포인 본 발명의 IDO 세포가 추가로 바람직하다.
- [0064] 본 발명의 IDO 세포의 제조방법
- [0065] 한 가지 양태에서, 본 발명은 본 발명의 IDO 세포를 제조하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 본 발명의 핵산 작제물을 분리된 생존 수용체 세포 또는 세포들 내로 도입하는 것을 포함한다.
- [0066] 상기 수용체 세포는 동물 또는 사람 세포일 수 있지만, 포유동물 세포인 것이 바람직하고, 호모 사피엔스 세포인 것이 보다 바람직하다. 상기 수용체 세포는 중간엽 줄기세포(이하 MSC로서 지칭된다), 섬유아세포 또는 섬유아세포 유사 활액 세포인 것이 특히 바람직하다. 상기 수용체 세포는 출생 후 기원이고, 임의의 적합한 조직, 예를 들면, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 골수, 지방, 제대, 제대혈 및 태반으로부터 분리될 수 있는 것이 추가로 바람직하다. 본 발명의 방법에 사용된 수용체 MSC는 바람직하게는 결합 조직으로부터 유도된다. 대안적인 양태에서, 상기 수용체 MSC는 유리 연골의 연골세포로부터 취득된다. 추가의 양태에서, 수용체 MSC는 피부로부터 취득된다. 추가의 양태에서, 상기 수용체 MSC는 골수로부터 취득된다.
- [0067] 가장 바람직한 양태에서, 상기 수용체 MSC는 지방 조직으로부터 유도되고, 추가의 바람직한 양태에서, 지방 조직의 기질 분획으로부터 유도된다. 특히 바람직한 양태에서, 상기 수용체 세포는 지방 조직으로부터 유도된 줄기세포이다. 상기 지방은 임의의 적합한 기원의 것일 수 있지만, 피하 기원 또는 기관 관련 지방 조직(예를 들면, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 심장, 간, 신장 또는 췌장과 관련된 지방)인 것이 특히 바람직하다.
- [0068] 개체로부터 지방 조직을 획득하는 임의의 적합한 방법을 사용할 수 있고, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 지방 침착물의 외과적 제거(lipoaspiration), 지방흡입술 및 생검을 포함한다. 당해 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 지방 공급원으로부터 중간엽 줄기세포의 분리를 위한 방법에 익숙할 것이다. 이러한 방법은 당해 기술분야에 공지되어 있고, 이러한 분리를 위한 프로토콜은 용이하게 입수가능하다. 요약하면, 지방 물질을 먼저 세척(예를 들면, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 인산염 완충 염수)한 다음, 예를 들면, 콜라게나제를 사용하여 효소적으로 소화시켜 세포 현탁액을 취득한다. 이어서, 세포를, 예를 들면, 원심분리 및 적절한 완충제 또는 성장 배지에서의 재현탁에 의해 현탁액으로부터 분리한다. 분리된 세포 개체군을 간질성 혈관 분획으로 지칭하

고, 중간엽 줄기세포를 이들의 부착 특성에 기초하여 이로부터 분리할 수 있다.

- [0069] 수용체 세포가 중간엽 줄기세포(이하 MSC로 지칭한다)인 경우, 이들은 APC 표현형과 결합된 마커에 대해 네가티브인 것이 바람직하다. 따라서, 상기 수용체 MSC는 하기 마커: CD11b; CD11c; CD14; CD45; HLAII 중의 적어도 1개, 2개, 3개, 4개 또는 바람직하게는 모두에 대해 네가티브이다. 추가로, 수용체 MSC는 바람직하게는 하기 세포 표면 마커: CD31; CD34; CD133 중의 적어도 1개, 2개 또는 바람직하게는 모두에 대해 네가티브이다.
- [0070] 특정한 양태에서, 본 방법에 사용된 수용체 MSC는 바람직하게는 이들이 하기 세포 표면 마커 CD9, CD44, CD54, CD90 및 CD105 중의 적어도 1개, 2개, 3개, 4개 또는 바람직하게는 모두를 발현(즉 이들에 대해 포지티브)하는 것을 특징으로 한다. 바람직하게는, 수용체 MSC는 상기 세포 표면 마커(CD9, CD44, CD54, CD90 및 CD105) 중의 적어도 1개, 2개, 3개, 4개 또는 바람직하게는 모두의 현저한 발현 수준을 갖는 것을 특징으로 한다.
- [0071] 임의로, 수용체 MSC는 또한 세포 표면 마커 CD106(VCAM-1)에 대해 네가티브일 수 있다. 본 발명의 방법에서 사용하기에 적합한 수용체 MSC의 예는 당해 기술분야, 예를 들면, 이의 전체가 본원에서 참조로서 인용되는 국제 공개공보 제WO2007039150호에 기재되어 있다.
- [0072] 수용체 MSC
- [0073] 본 발명의 방법에서 사용하기에 적합한 수용체 MSC는 증식 능력을 나타낼 수 있고, 적어도 2개, 보다 바람직하게는 3개, 4개, 5개, 6개, 7개 또는 그 이상의 세포 계통으로 분화될 수 있다. 상기 수용체 MSC가 분화될 수 있는 세포 계통의 예시적인 비제한적 예는 골세포, 지방세포, 연골세포, 건세포(tenocytes), 근세포, 심근세포, 조혈-지지 기질 세포, 내피 세포, 뉴런, 성상세포 및 간세포를 포함한다. 수용체 MSC는 통상의 방법으로 증식시킬 수 있고 다른 계통의 세포로 분화시킬 수 있다. 이들의 미분화 대응물로부터 분화된 세포를 동정하고 후속적으로 분리하는 방법은 당해 기술분야에 공지된 방법으로 수행할 수 있다.
- [0074] 수용체 MSC는 또한 생체외에서 증식시킬 수 있다. 즉, 분리 후, 상기 MSC는 배양 배지에서 유지시키고 생체 외에서 증식시킬 수 있다. 이러한 배지는, 예를 들면, 항생제(예: 100단위/ml 페니실린 및 100[μg/ml 스트렙토마이신)의 존재 또는 부재하에 2mM 글루타민을 포함하고 2 내지 20% 태소 혈청(FBS)가 보충된 돌베코 변형된 이글 배지(DMEM)로 구성된다. 사용된 세포에 필요한 배지 및/또는 배지 보충물의 농도를 변형시키거나 조절하는 것은 당해 기술분야의 통상의 지식을 가진 자의 범위에 포함된다. 혈청은 종종 생존 및 증식에 요구되는 세포 및 비세포 인자 및 성분을 함유한다. 혈청의 예는 태소 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, 래빗 혈청, 랫트 혈청(RS) 등을 포함한다. 또한, 상기 수용체 MSC가 사람 기원인 경우, 세포 배양 배지에는 사람 혈청, 바람직하게는 자가조직 기원의 사람 혈청이 보충되어 있는 것도 본 발명의 범위에 포함된다. 혈청은, 보체 활성화경로 성분의 불활성화에 요구되는 경우, 55 내지 65°C에서 열 불활성화될 수 있는 것으로 이해된다. 혈청 농도의 조정, 배양 배지로부터 혈청의 회수를 사용하여 하나 이상의 목적하는 세포 유형의 생존을 촉진시킬 수도 있다. 바람직하게는, 상기 수용체 MSC는 약 2% 내지 약 25%의 FBS 농도에서 유리할 것이다. 또 다른 양태에서, 수용체 MSC는 규정 조성의 배양 배지에서 증식시킬 수 있고, 여기서 혈청은 혈청 알부민, 혈청 트랜스페린, 셀레늄 및, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 당해 기술분야에 공지된 인슐린, 혈소판 유도된 성장 인자(PDGF) 및 염기성 섬유아세포 성장 인자를 포함하는 재조합체 단백질로 치환된다. 다수의 세포 배양 배지는 이미 아미노산을 함유하지만, 일부는 세포의 배양 전에 보충을 필요로 한다. 이러한 아미노산은, 이로써 한정되는 것은 아니지만, L-알라닌, L-아르기닌, L-아스파르트산, L-아스파라긴, L-시스테인, L-글루탐산, L-글루타민, L-글리신 등을 포함한다. 항균제는 또한 세포 배양물에 통상 사용되어 박테리아, 마이코플라스마 및 진균 오염을 완화시킨다. 통상적으로, 사용된 항생제 또는 항진균제 화합물은 페니실린/스트렙토마이신의 혼합물이고, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 암포테리신(펄기존(Fungizone(R))), 암피실린, 젠타마이신, 블레오마이신, 하이그로마신, 카나마이신, 미토마이신 등도 포함할 수 있다. 호르몬도 또한 세포 배양물에서 유리하게 사용될 수 있고, 이로써 한정되는 것은 아니지만, D-알도스테론, 디에틸stil벤(DES), 텍사메타손, b-에스트라디올, 하이드로코르티손, 인슐린, 프로락틴, 프로게스테론, 소마토스타틴/사람 성장 인자(HGH) 등을 포함할 수 있다.
- [0075] 증식된 수용체 MSC
- [0076] 세포 증식은 일반적으로 복수의 세대에 걸쳐 수행되며, 여기서 각각의 세대는 세포 배양물의 희석, 목적하는 개체군 밀도까지 희석된 세포 배양물의 증식 및 이어서 후속적인 재희석을 포함한다. 한 가지 양태에서, 수용체

MSC는 본 발명의 방법에서 사용하기 전에 증식시킬 수 있다. 세포 증식 방법은 당해 기술분야에 공지되어 있다. 상기 세포는 핵산 작제물을 세포 내로 도입하기 전에 증식시키는 것이 바람직하다. 본 발명의 방법의 한 가지 양태에서, 상기 증식은 적어도 1회, 적어도 2회, 적어도 3회, 적어도 4회, 적어도 5회, 적어도 10회, 적어도 15회 또는 적어도 20회로 상기 개체군의 2배 또는 3배까지 수행된다. 추가의 양태에서 상기 증식은 적어도 1세대, 적어도 2세대, 적어도 3세대, 적어도 4세대, 적어도 5세대, 적어도 10세대, 적어도 15세대 또는 적어도 20세대에 걸쳐 수행된다.

[0077] 이어서, 핵산 작제물을 세포 내로 도입시킨다. 이는 당해 기술분야의 임의의 표준 수단에 의해 수행할 수 있다.

[0078] 외인성 핵산을 삽입하는 방법은 당해 기술분야에 공지되어 있다. 한 가지 양태에서, 핵산 작제물은 DNA 벡터, 예를 들면, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 플라스미드 또는 코스미드 벡터 내로 삽입시킬 수 있다. 당해 삽입은 일반적으로 적절한 효소적 수단에 의해 작제물 및 벡터 서열의 제한 및 연결에 의해 수행할 수 있다. 상기 효소 및 적합한 벡터는 당해 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에게 공지되어 있다. 본 발명의 한 가지 양태에서, 상기 벡터는 발현 벡터이고, 자체가 구성적 프로모터를 포함할 수 있으며, 여기서 핵산 작제물은 유전자 발현이 당해 프로모터에 의해 조절될 수 있도록 삽입된다. 당해 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는, 사용된 숙주 세포를 고려하여, 성공적으로 숙주 세포 내로 삽입되는 경우, 본 발명의 핵산 작제물이 전사 및 해독되어 당해 숙주 세포가 작용성 IDO 또는 이의 작용성 등가 단편, 변이체 및 유사체를 구성적으로 발현 및 분비하도록 하는 적절한 벡터를 선별할 수 있다.

[0079] 이어서, 생성된 재조합 벡터 작제물을 수용체 세포 내로 도입한다. 이는 형질전환 또는 형질도입을 포함하는 당해 기술분야의 표준 수단에 의해 수행할 수 있지만, 바람직하게는 동물 세포 내로의 벡터의 도입에 적합한 형질도입 또는 기타 수단에 의해 수행된다. 벡터 핵산의 형질감염 방법은 인산칼슘 처리, 바이러스 형질도입, 나노입자 충격, 열 쇼크, 마그네토펙션(magnetofection) 또는 상업적으로 입수가 가능한 키트 또는 시약의 사용을 포함한다.

[0080] 본 발명의 핵산 작제물의 수용체 세포 내로의 삽입은 바이러스 형질도입에 의해 수행하는 것이 바람직하다.

[0081] 본 발명의 면역조절 세포의 제조방법

[0082] 본 발명의 IDO 세포는 또한 이를 필요로 하는 환자의 생체내 치료에 적합한 면역조절 세포의 제조에 있어서 생체의 용도를 갖는다. 따라서, 한 가지 양태에서, 본 발명은 면역계의 활성화를 억제하고 병리학적 자기-반응성, 즉 자가면역 질환을 예방하는 면역조절 세포의 제조 및/또는 생성 방법을 제공한다. 한 가지 양태에서, 상기 면역조절 세포는 조절 T-세포이고, 특히 바람직한 양태에서 상기 면역조절 세포는 Foxp3+CD4+CD25+ T-reg 및/또는 IL-10/TGFb-생성 조절 Tr1 세포이다. 본 발명의 방법에 따라 제조되고/되거나 생성된 면역조절 세포는 본 발명의 추가의 양태를 구성한다.

[0083] 한 가지 양태에서, 상기 방법은 본 발명의 IDO 세포를 혈액 또는 이의 구성요소와 접촉시킴을 포함한다. 상기 구성요소는 가장 바람직하게는 말초혈 단핵 세포(PBMC) 또는 말초혈 백혈구(PBL)이다.

[0084] 본 발명의 IDO 세포 수 대 PBL 및/또는 PBMC의 비는 각각 1:1 내지 1:150인 것이 바람직하다. 본 발명의 IDO 세포 수 대 PBL 및/또는 PBMC의 비는 1:70 내지 1:5인 것이 추가로 바람직하다. 본 발명의 IDO 세포 수 대 PBL 및/또는 PBMC의 비는 1:60 내지 1:30인 것이 특히 바람직하다. 따라서, 한 가지 양태에서 이는 25개 말초혈 백혈구당 약 1개 IDO 세포 또는 10개 말초혈 단핵 세포당 1개 IDO 세포일 수 있다.

[0085] 당해 방법의 추가의 양태에서, 제제 IL-4 및 GM-CSF 둘 다가 본 발명의 방법에 사용된다. GM-CSF 농도 대 IL-4 농도의 비는 5:1 내지 1:1이고, 상기 각 제제의 농도는 1 내지 2000 IU/ml인 것이 바람직하며, 상기 농도는 500 내지 1000 IU/ml인 것이 추가로 바람직하다. 따라서, 한 가지 양태에서 이는 약 1000 IU/ml GM-CSF 대 약 500 IU/ml IL-4이다.

[0086] 본 발명의 면역조절 세포를 제조 및/또는 생성하는 상기 방법에서, MSC 및/또는 섬유아세포 개체군은 LPS, IL-2, IL-4 및 GM-CSF로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 제제의 존재하에 말초혈 백혈구와 함께 시험관내에서 배양된다. 배양 기간은 바람직하게는 1일 내지 15일이고, 보다 바람직하게는 7일 내지 10일이다. 추가의 양태에서, 상기 배양은 적어도 2일, 적어도 4일, 적어도 5일 또는 적어도 6일 또는 그 이상 동안 수행된다. 공동 배양은 개체의 치료에 사용될 수 있는 면역조절 세포를 생성한다.

- [0087] 면역조절 세포의 제조방법(들)은 바람직하게는 온도 및 이산화탄소 조절된 환경, 예를 들면, 인큐베이터에서 수행된다. 당해 방법은 바람직하게는 국부 변동을 고려하여 대략 포유동물 체온(예: 37°C)에서 수행된다. 또한, 본 발명의 방법은 이산화탄소 농도가 0 내지 10% 및 보다 바람직하게는 1 내지 5%인 환경에서 수행하는 것이 바람직하다.
- [0088] 본 발명의 방법으로 제조된 면역조절 세포의 의도된 수용체와 관련하여, 상기한 방법에 사용된 MSC 및/또는 섬유아세포는 동종이계(공여체) 또는 자가조직(개체) 기원일 수 있다. 당해 방법의 한 가지 양태에서, 상기 MSC 및/또는 섬유아세포는 동종이계 기원이다.
- [0089] PBL/PBMC의 제조
- [0090] 본 발명의 상기 방법으로 제조한 면역조절 세포의 의도된 수용체와 관련하여, 상기 방법에 사용된 말초혈 구성 요소는 자가조직 또는 동종이계 기원일 수 있다. 그러나, 이들은 자가조직 기원(즉, 이들은 면역조절 세포를 후속적으로 제공받거나 임의의 처리, 약제 또는 약제학적 조성물을 제공받은 개체로부터 수득됨)인 것이 바람직하다. 전혈로부터 PBL/PBMC의 분리 방법은 당해 기술분야에 공지되어 있고, 피콜-하이파크(Ficoll-Hypaque) 및/또는 적혈구 세포 용해 공정 또는 상업적으로 입수가능한 수단, 예를 들면, LeucoPREP™ 세포 분리 장치(Becton Dickinson & Co.) 및 HISTOPAQUE™(Sigma Diagnostics) 용액의 사용을 포함한다.
- [0091] 항원 특이적 면역조절 세포의 제조방법
- [0092] 본 발명은 또한 선택된 항원 또는 항원 그룹에 특이적인 면역조절 세포(이하 항원 특이적 면역조절 세포 또는 본 발명의 항원 특이적 면역조절 세포로 지칭함)의 제조 및/또는 생성 방법 및 항원 또는 항원 그룹과 관련되는 질환 또는 질병의 치료에서 이들의 용도를 제공한다. 이러한 항원의 예는 자가면역 질환, 예를 들면, 류마티스 성 관절염, 크론병, 과민성 반응 IV형, 낭창, 건선 및 당해 기술분야에 공지되고 본원의 다른 부분에서 기재된 기타 자가면역 질환에서 중요한 역할을 담당하는 것들이다. 한 가지 양태에서, 상기 항원 특이적 면역조절 세포는 조절 T-세포이고, 특히 바람직한 양태에서 상기 항원 특이적 면역조절 세포는 Foxp3+CD4+CD25+ T-reg 및/또는 IL-10/TGFb-생성 조절 Tr1 세포이다. 본 발명의 방법에 따라 제조한, 선택된 항원 또는 항원 그룹에 특이적인 항원 특이적 면역조절 세포는 본 발명의 추가의 양태를 구성한다.
- [0093] 상기 방법은 본 발명의 IDO 세포를 혈액 또는 이의 구성요소 및 선택된 항원 또는 항원 그룹과 접촉시킴을 포함한다. 상기 구성요소는 말초혈 단핵 세포 (PBMC) 또는 말초혈 백혈구(PBLS)이다.
- [0094] 한 가지 양태에서, 상기 방법은 MSC 및/또는 섬유아세포 개체군을 LPS, IL-2, IL-4 및 GM-CSF로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 제제의 존재하에 말초혈 백혈구 및 선택된 항원 또는 항원 그룹과 접촉시킴을 포함한다.
- [0095] 당해 방법의 한 가지 양태에서, 제제는 LPS(그램 양성 박테리아 내독소 지질다당류)이다. LPS 농도는 0.01 내지 100 µg/ml인 것이 바람직하고, 당해 농도는 1 내지 50 µg/ml, 예를 들면, 약 10 µg/ml인 것이 추가로 바람직하다.
- [0096] 상기 방법의 한 가지 양태에서, 제제는 IL-2이다. IL-2 농도는 약 0.01 내지 1000 IU/ml인 것이 바람직하고, 상기 농도는 약 500 IU/ml 이하, 약 600 IU/ml 이하, 약 700 IU/ml 이하, 약 800 IU/ml 이하 또는 약 900 IU/ml 이하인 것이 추가로 바람직하다.
- [0097] 대안적인 양태에서, 상기 제제는 GM-CSF 및 IL-4이다. GM-CSF 및 IL-4는 둘 다 사이토킨이다. 이의 농도는 1 내지 2000 IU/ml인 것이 바람직하고, 상기 농도는 500 내지 1000 IU/ml인 것이 추가로 바람직하다.
- [0098] 상기 방법의 추가의 양태에서, 제제 IL-4 및 GM-CSF가 본 발명의 방법에 사용된다. GM-CSF 농도 대 IL-4 농도의 비는 5:1 내지 1:1이고 각 제제의 농도는 1 내지 2000 IU/ml인 것이 바람직하고, 상기 농도는 500 내지 1000 IU/ml인 것이 추가로 바람직하다. 따라서, 한 가지 양태에서 이는 500 IU/ml IL-4당 약 1000 IU/ml GM-CSF일 수 있다.
- [0099] 항원 특이적 면역조절 세포를 제조 및/또는 생성하는 방법에서, 본 발명의 IDO 세포는 말초혈 백혈구 및 선택된 항원, 항원 그룹, 또는 상기 항원 또는 항원들을 발현 및/또는 제시하는 세포 유형과 함께 시험관내에서 배양된

다. 상기 접촉 또는 배양 기간은 바람직하게는 약 2시간 내지 약 25일이 바람직하고, 약 10 내지 약 18일이 보다 바람직하며, 약 14 내지 16일이 더욱 바람직하다. 추가의 양태에서, 배양 또는 접촉은 적어도 10일, 적어도 12일, 적어도 14일 또는 적어도 15일 또는 그 이상 동안 수행된다. 이러한 공동 배양은 개체의 치료에 사용될 수 있는 면역조절 세포를 생성한다.

- [0100] 본 발명의 방법(들)은 바람직하게는 온도 및 이산화탄소 조절된 환경, 예를 들면, 인큐베이터에서 수행된다. 당해 방법은 바람직하게는, 국부 변화를 고려하여, 대략 포유동물 체온(예: 37°C)에서 수행된다. 또한, 본 발명의 방법은 이산화탄소 농도가 0 내지 10% 및 보다 바람직하게는 1 내지 5%인 환경에서 수행된다.
- [0101] 대안적인 양태에서, 항원 특이적 면역조절 세포를 제조 및/또는 생성하는 방법은 (a) 말초혈 백혈구 및/또는 말초혈 단핵 세포를 선택된 항원 또는 항원 그룹과 접촉시키고, (b) 상기 세포 개체군을 MSC 및/또는 섬유아세포 개체군과 접촉시킴을 포함한다.
- [0102] 항원 특이적 면역조절 세포를 제조하는 상기 방법의 단계(a)에서, 말초혈 백혈구는 선택된 항원, 항원 그룹, 또는 상기 항원 또는 항원들을 발현 및/또는 제시하는 세포 유형의 존재하에 시험관 내에서 배양된다. 약 2, 4, 6, 12, 24, 48시간 또는 그 이상의 배양 기간, 바람직하게는 약 12 내지 약 24시간의 배양 기간 후, 본 발명의 세포 개체군은, 임의로 항원, 항원 그룹, 또는 상기 항원을 포함하는 세포의 제거 후, 본 발명의 IDO 세포와 함께 추가로 공동 배양된다. 상기 접촉 및 배양 기간은 바람직하게는 약 2시간 내지 약 25일이고, 보다 바람직하게는 약 10일 내지 약 18일, 보다 더 바람직하게는 약 14일 내지 16일이다. 추가의 양태에서, 상기 배양 또는 접촉은 적어도 10일, 적어도 12일, 적어도 14일 또는 적어도 15일 또는 그 이상 동안 수행된다. 이러한 공동 배양은 개체의 치료에 사용될 수 있는, 면역조절 세포를 생성시킨다. 이러한 공동 배양은 개체의 치료에 사용될 수 있는, 선택된 항원에 특이적인 면역조절 세포를 생성시킨다.
- [0103] 본 발명의 방법(들)은 바람직하게는 온도 및 이산화탄소 조절된 환경, 예를 들면, 인큐베이터에서 수행된다. 당해 방법은 바람직하게는, 국부 변화를 고려하여, 대략 포유동물 체온(예: 37°C)에서 수행된다. 또한, 본 발명의 방법은 이산화탄소 농도가 1 내지 5%인 환경에서 수행되는 것이 바람직하다.
- [0104] 항원(들)
- [0105] 항원 특이적 면역조절 세포를 제조 및/또는 생성하는 상기 방법에 사용되는 항원은 선택된 항원, 항원 그룹, 또는 상기 항원 또는 항원들을 발현 및/또는 제시하는 세포 유형일 수 있다. 한 가지 양태에서, 항원은 자가면역성을 갖는 환자로부터 수득한 자기항체의 혼합물, 펩티드 항원, 핵산, 변경된 펩티드 리간드, 재조합체 단백질 또는 이의 단편으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 한 가지 양태에서, 상기 항원은 관절염(예를 들면, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 콜라겐 항원)과 관련된다. 대안적인 양태에서, 상기 항원은 쉐리악 질환(또는 복강 질환, 복강 스프루, 비열대 스프루, 지방병 스프루, 글루텐 장병증 또는 콜라겐 과민성 장병증 및 글루텐 불내증으로 지칭됨)과 관련된다. 복강 질환과 관련된 항원은 몇몇 형태의 프롤아민(예를 들면, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 글리아딘, 호르테인 및/또는 세칼린)을 포함하는 글루텐 계열의 구성원이다. 추가의 양태에서, 상기 항원은 다발성 경화증(예를 들면, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 미엘린 항원)과 관련된다. 이러한 항원의 분리, 정제 및 제조 방법은 당해 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에게 공지되어 있다.
- [0106] 추가의 양태에서, 본 발명의 IDO 세포를 말초혈 백혈구(또는 이의 구성요소) 및 임의로 선택된 항원 또는 항원 그룹과 접촉시키는 것은 LPS, IL-2, IL-4 및 GM-CSF로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 제제의 존재하에 수행된다.
- [0107] 이러한 방법의 한 가지 양태에서, 당해 제제는 LPS(그람 음성 박테리아 내독소 지질다당류)이다. LPS 농도는 0.01 내지 100 µg/ml인 것이 바람직하고, 상기 농도는 1 내지 50 µg/ml, 예를 들면, 약 10 µg/ml인 것이 추가로 바람직하다.
- [0108] 이러한 방법의 한 가지 양태에서, 당해 제제는 IL-2이다. IL-2 농도는 약 0.01 내지 1000 IU/ml인 것이 바람직하고, 상기 농도는 약 500 IU/ml 이하, 약 600 IU/ml 이하, 약 700 IU/ml 이하, 약 800 IU/ml 이하 또는 약 900 IU/ml 이하인 것이 추가로 바람직하다.
- [0109] 대안적인 양태에서, 상기 제제는 GM-CSF 및 IL-4이다. GM-CSF 및 IL-4는 모두 사이토킨이다. 이의 농도는 1 내지 2000 UL/ml인 것이 바람직하고, 상기 농도는 500 내지 1000 IU/ml인 것이 추가로 바람직하다.
- [0110] 이러한 방법의 추가의 양태에서, 제제 IL-4 및 GM-CSF 둘 다 본 발명의 방법에 사용된다. GM-CSF 농도 대

IL-4 농도의 비는 5:1 내지 1:1이고 상기 제제 각각의 농도는 1 내지 2000 IU/ml인 것이 바람직하고, 상기 농도는 500 내지 1000 IU/ml인 것이 추가로 바람직하다. 따라서, 한 가지 양태에서 이는 약 1000 IU/ml GM-CSF 대 500 IU/ml IL-4일 수 있다.

- [0111] 본 발명의 세포
- [0112] "본 발명의 IDO 세포", "본 발명의 면역조절 세포" 및 "본 발명의 항원 특이적 면역조절 세포"는 총괄하여 "본 발명의 세포"로서 본원에서 지칭된다.
- [0113] 본 발명의 조성물
- [0114] 본 발명은 또한 본 발명의 세포로 이루어진 조성물을 제공한다. 본 발명의 세포로 필수적으로 이루어진 세포 조성물이 특히 바람직하다. 따라서, 한 가지 양태에서 본 발명은 상기 개체군 세포 중 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95% 또는 바람직하게는 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98% 또는 적어도 약 99%가 본 발명의 세포인 조성물 또는 세포 개체군을 제공한다. 한 가지 양태에서, 상기 세포 조성물은 세포 배양물이고, 따라서 적합한 매질, 완충제, 성장 인자, 영양소 및/또는 그러한 것을 추가로 포함한다. 상기 세포 배양물은 적합한 용기 내에 함유되어 일정하고 적합한 환경에 유지될 수 있다. 세포 배양 방법은 당해 기술분야에 공지되어 있다.
- [0115] 본 발명의 세포의 용도
- [0116] 본 발명의 세포는 질환 상태와 관련된 하나 이상의 증상, 특히 개체 면역계의 조절이 유리한 것들을 예방, 치료 또는 완화시키는데 사용될 수 있다. 여기에는, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 자가면역 질환, 염증 질환 및 면역학적으로 매개된 질환이 포함된다. 상기 용도는 본 발명의 추가의 양태를 구성한다.
- [0117] 따라서, 추가의 양태에서, 본 발명의 세포는 약제로서 사용된다. 특정한 양태에서, 본 발명의 세포를 포함하는 약제는 이식 내성을 유도하거나, 자가면역 또는 염증 질환 또는 이식된 기관 또는 조직의 거부를 유도하는 면역학적으로 매개된 질환의 증상을 상기 질환 또는 질병을 앓고 있는 개체에서 치료하고 완화시키는데 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명의 세포를 사용하여, 면역, 자가면역 또는 염증 질환의 증상을 상기 질환을 앓고 있는 개체에서 치료학적 또는 예방학적으로 치료 및 이에 의해 완화시키거나, 면역학적으로 매개된 질환의 증상을 상기 질환을 앓고 있는 개체에서 완화시킬 수 있다. 본 발명의 세포는 자가면역 질환, 염증 질환 또는 면역학적으로 매개된 질환의 치료에서의 용도를 갖는다. 치료될 수 있는 상기 질환 및 질병의 예시적인 비제한적 예는 상기 서두의 "정의"에 이미 수록된 것들이다. 특정한 양태에서, 상기 염증 질환은 만성 염증 질환, 예를 들면, 복강 질환, 다발성 경화증, 건선, IBD 또는 RA이다. 또 다른 양태에서, 본 발명은 개체 면역계의 조절이 유리한 질환, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 자가면역 질환, 염증 질환, 및 이식된 기관 및 조직의 거부를 포함하는 면역학적으로 매개된 질환과 관련된 하나 이상의 증상을 예방, 치료 또는 완화시키는 약제를 제조하기 위한 본 발명의 세포의 용도에 관한 것이다. 따라서, 본 발명은 추가로 면역 반응을 억제하거나 이식 내성을 유도하거나 자가면역 질환을 치료하거나 염증 질환을 치료하는 약제를 제조하기 위한 본 발명의 세포의 용도에 관한 것이다. 상기 자가면역 질환 및 염증 질환의 예는 앞에 언급되어 있다. 특정한 양태에서, 질환은 염증 질환, 예를 들면, 만성 염증 질환, 예를 들면, 복강 질환, 다발성 경화증, 건선, IBD 또는 RA이다.
- [0118] 항원 특이적 면역조절 세포의 용도
- [0119] 본 발명은 또한 본 발명의 방법에 따라 제조 및/또는 생성한 항원 특이적 면역조절 세포를 개체, 가장 바람직하게는 말초혈 백혈구가 수득되는 개체에게 투여함으로써 선택된 항원 또는 항원 그룹과 관련된 질환 또는 질병의 치료에 있어서의 상기 항원 특이적 면역조절 세포의 용도를 제공한다.
- [0120] 따라서, 추가의 양태에서, 상기 항원 특이적 면역조절 세포는 약제로서 사용된다. 특정한 양태에서, 본원에 기재된 항원 특이적 면역조절 세포로 이루어진 약제는 상기 선택된 항원 또는 항원 그룹과 관련된 질환 및 질병의 치료에 사용될 수 있다. 따라서, 항원 특이적 면역조절 세포를 사용하여, 자가면역 또는 염증 질환의 증상을

상기 질환을 앓고 있는 개체에서 치료학적 또는 예방학적으로 치료하고 완화시키거나 면역학적으로 매개된 질환의 증상을 상기 질환을 앓고 있는 개체에서 완화시킬 수 있다. 본 발명의 항원 특이적 면역조절 세포는 자가면역 질환, 염증 질환 또는 면역학적으로 매개된 질환의 치료에서의 용도를 갖는다. 치료될 수 있는 상기 질환 및 질병의 예시적인 비제한적 예는 서두의 "정의"하에 이미 기재한 것들이다. 특정한 양태에서, 상기 염증 질환은 만성 염증 질환, 예를 들면, 복강 질환, 다발성 경화증, 건선, IBD 또는 RA이다. 또 다른 양태에서, 본 발명은, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 자가면역 질환, 염증 질환, 및 이식된 기관 또는 조직의 거부를 포함하는 면역학적으로 매개된 질환을 포함하는, 개체 면역계의 조절이 유리한 질환과 관련된 하나 이상의 증상을 예방, 치료 또는 완화시키는 약제를제조하기 위한 본 발명의 항원 특이적 세포의 용도에 관한 것이다. 따라서, 본 발명은 추가로 상기 항원(들)과 관련된 면역 반응을 억제하는 약제를 제조하기 위한 본원에 기재된 항원 특이적 면역조절 세포의 용도에 관한 것이다. 상기 자가면역 질환 및 염증 질환의 예는 앞에 언급되어 있다. 특정한 양태에서, 질환은 염증 질환, 예를 들면, 만성 염증 질환, 예를 들면, 복강 질환, 다발성 경화증, 건선, IBD 또는 RA이다.

- [0121] 약제학적 조성물
- [0122] 본 발명은 개체 면역계의 조절이 유리한 질환과 관련된 하나 이상의 증상을 치료, 예방 및 완화시키기 위한 약제학적 조성물을 제공한다. 여기에는 자가면역 질환, 염증 질환, 이식된 기관 및 조직의 거부를 포함하는 면역학적으로 매개된 질환이 포함된다.
- [0123] 따라서, 또 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명의 세포 및 약제학적 담체를 포함하는 약제학적 조성물(이하 본 발명의 약제학적 조성물로서 지칭됨)에 관한 것이다. 상기 세포 유형의 2종 이상의 배합물도 본 발명에 의해 제공된 약제학적 조성물의 범위에 포함된다.
- [0124] 본 발명의 약제학적 조성물은 예방학적 또는 치료학적 유효량의 하나 이상의 예방제 또는 치료제(즉, 본 발명의 세포) 및 약제학적 담체를 포함한다. 적합한 약제학적 담체는 당해 기술분야에 공지되어 있고, 바람직하게는 미국 연방 또는 지방 정부의 규제 기관에 의해 승인되거나, 미국 또는 유럽 약전 또는 동물 및 보다 특히는 사람에서 사용하기 위한 일반적으로 인지되는 기타 약전에 수록된 것들이다. 용어 "담체"는 치료제에 함께 투여되는 희석제, 보조제(adjutant), 부형제 또는 비히클을 의미한다. 조성물은, 경우에 따라, 미량의 pH 완충제를 추가로 함유할 수 있다. 적합한 약제학적 담체의 예는 문헌[참조: "Remington's Pharmaceutical Sciences" by E W Martin]에 기재되어 있다. 이러한 조성물은 예방학적 또는 치료학적 유효량의 예방제 또는 치료제를 적합한 양의 담체와 함께 바람직하게는 정제된 형태로 함유하여, 개체에게 적절한 투여를 위한 형태를 제공한다. 제형은 투여 방식에 적합해야 한다. 바람직한 양태에서, 약제학적 조성물은 멸균성이고, 개체, 바람직하게는 동물 개체, 보다 바람직하게는 포유동물 개체 및 가장 바람직하게는 사람 개체에게 투여하기에 적합한 형태이다.
- [0125] 본 발명의 약제학적 조성물은 다양한 형태로 존재할 수 있다. 여기에는, 예를 들면, 고체, 반고체 및 액체 투약형, 예를 들면, 동결건조 제제, 액체 용액제 또는 현탁제, 주사가능한 및 주입가능한 액제 등이 포함된다. 바람직한 형태는 의도된 투여 방식 및 치료적 적용에 의존한다.
- [0126] 이를 필요로 하는 환자에 대한 본 발명의 세포 또는 이를 포함하는 약제학적 조성물의 투여는 통상의 수단으로 수행할 수 있다. 특정한 양태에서, 상기 세포 개체군은 세포를 목적하는 조직에 시험관내(예: 이식 또는 접목 전의 이식편으로서) 또는 생체내에서 개체 조직에 직접 전달함을 포함하는 방법으로 개체에게 투여된다. 당해 세포는 조직 유형에 따라 일반적으로 달라질 수 있는 적절한 방법에 의해 목적하는 조직에 전달될 수 있다. 예를 들면, 세포는 이식편을 세포 함유 배양 배지와 함께 세정(또는 이의 주입)하여 이식편에 전달될 수 있다. 또는, 세포는 개체군을 확립하기 위해 조직 내의 목적하는 부위 내로 접종할 수 있다. 세포는 또한 전신적으로, 예를 들면, 세포 현탁액의 주입에 의해 투여될 수 있다. 세포는 카테터, 투관침, 캐놀라, 스텐트(이는 세포로 접종될 수 있음) 등의 장치를 사용하여 생체내 부위로 전달될 수 있다.
- [0127] 본 발명의 세포 개체군 및 약제학적 조성물은 병용 치료에서 사용될 수 있다. 특정한 양태에서, 병용 치료는 하나 이상의 소염제에 내성이 있는 염증 질환 환자에게 투여된다. 또 다른 양태에서, 병용 치료는, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 비스테로이드성 소염 약물(NSAID), 스테로이드성 소염 약물, 베타-작용제, 콜린ergic제 및 메틸 크산틴을 포함하는 다른 유형의 소염제와 함께 사용된다. NSAID의 예에는, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 이부프로펜, 셀레콕시브, 디클로페낙, 에토돌락, 페노프로펜, 인돌메타신, 케토라락, 옥사프로진, 나부엔

톤, 순달, 톨멘틴, 로페콕시브, 나프록센, 케토프로펜, 나부메톤 등이 포함된다. 이러한 NSAID는 사이클로옥시게나제 효소(예: COX-I 및/또는 COX-2)를 억제시킴으로써 작용한다. 스테로이드성 소염 약물의 예에는, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 글루코코르티코이드, 텍사메타손, 코르티손, 하이드로코르티손, 프레드니손, 프레드니솔론, 트리암시놀론, 아줄프[이오타]딘 및 에이코사노이드(예: 트롬복산)이 포함된다. 인플릭시맵 등의 단일 클론 항체도 사용될 수 있다.

[0128] 상기 양태에 따라서, 본 발명의 병용 치료는 이러한 소염제의 투여 전에, 투여와 동시에 또는 투여 후에 사용될 수 있다. 추가로, 이러한 소염제는 림포이드 조직 유도인자 및/또는 면역조절제로서 본원에서 특성화된 제제를 포함하지 않는다.

[0129] 또 다른 양태에서, 본 발명은, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 자가면역 질환, 염증 질환, 및 이식된 기관 및 조직의 거부를 포함하는 면역학적으로 매개된 질환을 포함하는, 개체 면역계의 조절이 유리한 질환과 관련된 하나 이상의 증상을 예방, 치료 또는 완화시키는 약제학적 조성물 또는 약제를 조제 또는 제조하기 위한 본 발명의 세포의 용도에 관한 것이다. 따라서, 본 발명은 추가로 면역 반응을 억제하거나 이식 내성을 유도하거나 자가면역 질환을 치료하거나 염증 질환을 치료하는 약제학적 조성물 또는 약제를 조제 또는 제조하기 위한 본 발명의 세포의 용도에 관한 것이다. 상기 자가면역 질환 및 염증 질환의 예에는, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 복강 질환, 다발성 경화증, 건선, 염증성 장 질환(IBD) 및 류마티스성 관절염(RA)이 포함된다.

[0130] 키트

[0131] 본 발명은 또한 본 발명의 세포의 제조 및/또는 용도에 사용하기 위한 키트에 관한 것이다. 한 가지 양태에서, 상기 키트는 i) 본 발명의 IDO 세포 및 ii) LPS, IL-2, IL-4 및 GM-CSF로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 제제를 포함한다.

[0132] 한 가지 양태에서, 상기 제제는 LPS(그람 음성 박테리아 내독소 지질다당류)이다. LPS 농도는 0.01 내지 100 $\mu\text{g/ml}$ 인 것이 바람직하고, 상기 농도는 1 내지 50 $\mu\text{g/ml}$ (예: 약 10 $\mu\text{g/ml}$)인 것이 추가로 바람직하다.

[0133] 당해 방법의 한 가지 양태에서, 제제는 IL-2이다. IL-2 농도는 약 0.01 내지 1000 IU/ml인 것이 바람직하고, 상기 농도는 약 500 IU/ml 이하, 약 600 IU/ml 이하, 약 700 IU/ml 이하, 약 800 IU/ml 이하 또는 약 900 IU/ml 이하인 것이 더욱 바람직하다.

[0134] 대안적인 양태에서, 상기 제제는 GM-CSF 및 IL-4이다. 이의 농도는 1 내지 2000 $\mu\text{g/ml}$ 인 것이 바람직하고, 상기 농도는 500 내지 1000 $\mu\text{g/ml}$ 인 것이 더욱 바람직하다.

[0135] 추가의 양태에서, 제제 IL-4 및 GM-CSF 둘 다 혼합물로서 또는 별개의 용기에서 본 발명의 상기 키트에 제공된다. GM-CSF 농도 대 IL-4 농도의 비는 5:1 내지 1:1이고 각각의 상기 제제의 농도는 1 내지 2000 $\mu\text{g/ml}$ 인 것이 바람직하고, 상기 농도는 500 내지 1000 $\mu\text{g/ml}$ 인 것이 더욱 바람직하다. 따라서, 한 가지 양태에서, 이는 약 1000 $\mu\text{g/ml}$ GM-CSF 대 약 500 $\mu\text{g/ml}$ IL-4일 수 있다.

[0136] 추가의 양태에서, 상기 키트는 iii) 하나 이상의 항원, 또는 상기 하나 이상의 항원을 발현 및/또는 제시하는 세포 유형을 추가로 포함한다. 추가의 양태에서, 본 발명의 키트는 iv) 면역조절 세포의 제조 및/또는 생성에 사용하기 위한 지침을 포함할 수 있다.

[0137] 추가의 양태에서, 본 발명은 본 발명의 세포로 개체를 치료하기 위한 키트를 제공한다. 상기 키트는 i) 본 발명의 세포 및 ii) 상기 세포를 투여하는 장치를 포함한다. 상기 장치에는, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 시린지, 주사 장치, 카테터, 투관침, 캐놀라, 스텐트가 포함된다.

[0138] 추가의 양태에서, 본 발명의 모든 키트는 개체의 치료에 사용하기 위한 지침을 추가로 포함할 수 있다.

[0139] 용도

[0140] 핵산 작제물, 상기 작제물을 포함하는 세포, 상기 세포의 제조방법, 상기 세포를 사용하여 제조한 면역조절 세포 뿐만 아니라 본 발명의 세포로 이루어진 조성물 및 키트는 질환 상태, 특히 개체 면역계의 조절이 유리한 질환 상태와 관련된 하나 이상의 증상을 예방, 치료 또는 완화시키는데 사용될 수 있다. 여기에는, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 자가면역 질환, 염증 질환 및, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 복강 질환, 다발성

경화증, 건선, 염증성 장 질환(IBD) 및 류마티스성 관절염(RA) 등의 면역학적으로 매개된 질환이 포함된다. 상기 용도는 본 발명의 추가의 양태를 구성한다.

도면의 간단한 설명

- [0141] 도 1은 X축상의 시간(hr)에서 Y축상의 mM로 측정된 ASC의 키누레닌 생성(Y축)을 나타낸다. 빈 삼각형은 hASC-공(empty)을 의미하고, 흑색 삼각형은 IFN- γ 로 자극된 hASC-공을 의미한다. 빈 사각형은 hASC-IDO+를 의미하고, 흑색 사각형은 INF- γ 로 자극된 hASC-IDO+를 의미한다. 빈 원은 hASC-IDOsi를 의미하고, 흑색 사각형은 IFN- γ 로 자극된 hASC-IDOsi를 의미한다.
- 도 2는 2개의 막대 그래프를 제공한다. 각각은 hASC-공(좌측 막대) 및 hASC-IDO+(우측 막대)에 의한 PBMC 억제(Y축, %)를 나타낸다. 좌측의 막대 그래프는 1:50 hASC:PBMC의 비에서 PBMC 증식 양을 나타내고, 우측의 막대 그래프는 1:25 hASC:PBMC 비에서의 증식을 나타낸다.
- 도 3은 hASC-공(흑색 및 백색 좌측 막대) 및 hASC-IDO+(흑색 및 백색 우측 막대)에 의한 PBMC 억제(Y축, %)를 나타낸다. 흑색 막대는 무자극 세포를 나타내고, 백색 막대는 IFN- γ 로 미리 자극시킨 ASC를 나타낸다.
- 도 4는 다양한 지방 유도된 줄기세포 유형을 사용하여 생성한 CD4 세포의 개체군 중의 CD25 포지티브 세포의 비율(%)을 나타낸다. 좌측의 첫번째 세포 개체군은 ASC 부재하에 생성되었고, 좌측의 두번째 개체군은 hASC-공에 의해 생성되었으며, 중간 개체군은 hASC-IDOsi를 사용하여 생성되었고, 좌측의 네번째 개체군은 hASC-IDO+에 의해 생성되었으며, 우측의 가장 먼 개체군은 정상 ASC에 의해 생성되었다.
- 도 5는 실험 2의 두번째 부분에서 분석한 3개 조건 중의 대표적인 분포를 나타낸다. 좌측의 플롯은 구조 유전자를 갖는 ASC와 PBMC 공동 배양물의 FACS 분석(CD4/CD25/FOXP3)을 제공하고, 중앙 플롯은 ASC가 침묵 유전자를 제공하는 웰의 FACS 결과를 제공하며, 우측 플롯은 공 벡터를 갖는 대조군을 제공한다.
- 도 6은 공동 배양물 각각에서 조절 T-세포의 평균 비율을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

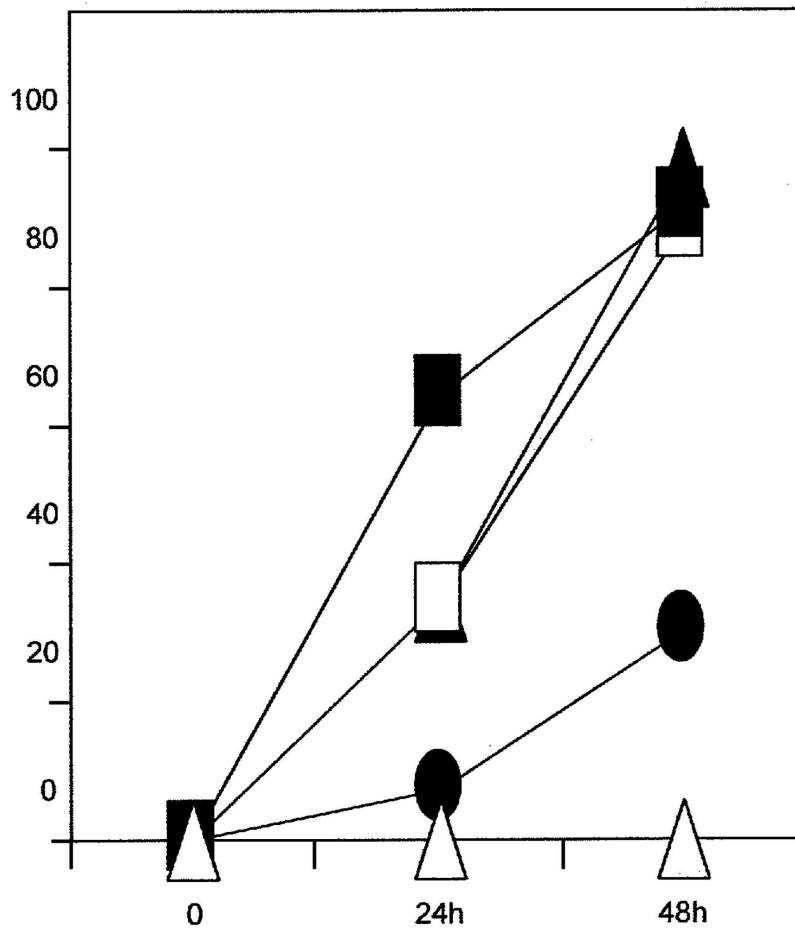
- [0142] 실시예
- [0143] 실시예 1: IDO 작제물의 제조
- [0144] IDO 단편을 클로닝하기 위해, IFN- γ 로 자극한 지방 유도된 줄기세포(이하 ASC로서 지칭됨)으로부터 수득한 mRNA로부터 cDNA의 역전사를 수행했다. IFN- γ 자극은 ASC 중에 IDO를 생성한다. 15,000 지방 유도된 줄기세포/sqcm를 75sqm 조직 배양 플레이트에 플레이팅하고, 48시간 동안 3 ng/ml IFN- γ 로 자극시켰다. RNA는 제조업자의 명세에 따라 인비트로젠 트리졸(Invitrogen TRIzol) 시약을 사용하여 수득했다. cDNA는 제조업자의 명세에 따라 인비트로젠 수퍼스크립트 II(Invitrogen Superscript II) 키트를 사용하여 전사시켰다.
- [0145] 수득된 cDNA를 다음 증폭 프라이머를 사용하여 PCR에 의해 증폭시켰다:
- [0146] 포워드 프라이머: AGGAGCAGACTACAAGAATGGCAC (서열번호 3)
- [0147] 리버스 프라이머: GTTGTGGCTCTGTACAATGGG (서열번호 4)
- [0148] PCR은 56.4°C의 어닐링 온도에서 수행했다. 인비트로젠™ 하이 피델리티(Invitrogen™ High Fidelity) 증식 키트를 PCR의 수행에 사용했다. 증폭된 핵산을 겔 전기영동에 의해 분리하고, 제조업자의 지시에 따라 인비트로젠 토포 II(Invitrogen™ TOPO II) 클로닝 키트를 사용하여 서브클로닝시켰다. 몇몇 클론을 서열분석하고, 정확한 CEL-P907GBp를 추가의 클로닝에 사용했다. 서열번호 1을 벡터(서열번호 2 참조)에 삽입했다. 요약하면, 서열분석된 IDO 유전자를 Not I 및 BamHI 등의 표준 제한 효소를 사용하여 소화시킨 다음, 국제공개공보 제W02005/061721호에 기재된 독점 벡터 pRV IRES neo로 클로닝시켰다. 5개의 형질감염 공정 및 레트로바이러스 상청액의 후속의 생성은 폴리에틸렌이민(1vol PEI : 2vol DNA)를 사용하여 수행했다. 이어서, 바이러스 상청액을 지방 유도된 줄기세포의 형질도입에 사용했다(추가의 상세한 설명은 국제공개공보 제W02005/061721호 참조).

- [0149] IDO 활성화
- [0150] IDO 벡터로 형질도입시킨 다음 IDO를 구성적으로 발현하는 ASC를 이하 hASC-IDO+ 세포로 지칭한다. 비교로서, IDO 유전자의 siRNA 침묵인자(silencer)를 포함하는 ASC 뿐만 아니라, 적절한 공 벡터(empty vector)로 형질전환된 15개 대조군 ASC(hASC-공)를 제조했다. 이들 클론의 IDO 활성화는 정지 조건 및 IFN- γ 자극(3 ng/ml) 후에 상이한 시점에서 HPLC로 평가했다. 예상한 바와 같이, hASC-공 세포는 유일하게, IFN- γ 로 자극한 경우, 키누레닌(Kyn) 생성을 유도했다. 중요하게는, hASC-IDO+ 세포는 Kyn을 배지 내로 구성적으로 축적시켰다. 이러한 활성화는 IFN- γ 처리에 의해 추가로 유도되었다. hASC-IDOsi 세포는 IFN- γ 로 자극 후에 Kyn 농도의 현저한 감소를 나타냈고, 이는 IDO의 침묵이 매우 효율적임을 가리킨다(도 1).
- [0151] 세포의 면역억제 효과
- [0152] IDO의 구성적 발현이 면역억제를 증강시킴을 추가로 확립하기 위해, PBMC를 hASC-공 또는 hASC-IDO+ 세포의 존재하에 차선 1:50 비에서 자극시키고, PBMC 증식을 측정했다. 도 2에 제시된 바와 같이, hASC-IDO+ 세포는 대조군 세포와 비교하여 억제를 현저히 증가시켰다. 이어서, hASC-매개된 면역억제에 대한 침묵 IDO 활성화의 효과를 분석했다. 따라서, PBMC를 hASC-공 또는 hASC-IDOsi 세포의 존재하에 비 1:25에서 자극시키고, PBMC 증식을 측정했다. 특히, hASC-IDOsi 세포는 PBMC 증식을 억제하는 능력이 현저히 감소됨을 나타냈다(도 2), 또한, IFN- γ 중화는, hASC-공에 의해 면역억제를 방지하면서, hASC-IDO+에 대해 어떠한 효과도 없었다(도 3). 이와 더불어, 이들 데이터는 IDO 활성화의 유도가 hASC에 의해 매개된 면역억제의 메카니즘에 필수적인 역할을 담당함을 나타낸다.
- [0153] 실시예 2: 조절 T-세포 생성
- [0154] 적합한 조건하에 말초혈 단핵 세포와 접촉된 ASC는 조절 T 세포를 생성한다. 이러한 방법은 국제공개공보 제 W02007/039150호에 기재되어 있다. hASC-IDO+가 조절 T 세포의 생성에 보다 우수함을 입증하기 위해, 생성된 조절 T 세포의 개체군을, 표준 수단(즉, IDO 약제물의 부재하에)을 사용하여 지방으로부터 유도된 줄기세포를 사용하여 생성한 것(이하 hASC로 지칭됨) 및 IDO 발현을 침묵시키기 위해 특이적 siRNA를 포함하는 ASC를 사용하여 생성한 것(hASC-IDOsi)과 비교했다. 대조군으로서, 적절한 공 벡터로 클론을 생성하고, 이를 사용하여 ASC(hASC-공)을 형질전환시킨다. hASCs, hASCs-IDO+, hASCs-IDOsi 및 hASCs-IDO-공을 24웰 플레이트에 플레이팅하고, 24시간 동안 배양했다. PBMC를 Pan T 세포 활성화 키트(항-CD3, 항-CD2 및 항-CD28이 적재된 마이크로비드)로 활성화시키고, 접촉 시스템에서 hASC(ASC:PBMC 비 1:25)의 존재 또는 부재하에 배양했다. 5일째에, FACS 분석을 위해 세포를 수거했다. 세포를 각각 PE, PerCP 및 APC로 표지된 CD25, CD4, CD3에 대한 항체로 오염시켜, 조절 T 세포(Treg)의 개체군을 검출했다(CD3+CD4+CD25+++로 기재됨). 세척 후, 세포를 고정시키고, FACS칼러버(BD Bioscience)를 사용하여 수득했다. 50×10^3 이벤트를 획득하고, 셀퀘스트-프로(CellQuest-pro) 소프트웨어를 획득 및 분석에 사용했다. 칼리브라이트(CALIBRITE) 비드(BD Bioscience)를 각 분석 전에 사용하여 세포계측기를 보정했다. 데이터는 관문 림프구에 대해 분석했다(전방 및 측면 산란 특성 기준).
- [0155] 도 4에 제시된 바와 같이, PBMC를 자극하고 ASC의 존재하에 배양하는 경우, 전체 CD4 세포 내의 Treg 개체군(CD3+CD4+CD25+++의 비율은 2.4%이었다. 그러나, hASC 및 ASC-IDO-공의 존재하에 도달된 비율은 대략 10 내지 15%이다. hASC-IDO+(IDO를 구성적으로 발현하는 hASC)와 함께 PBMC의 공동 배양은 CD4 전체 개체군에서 Treg 세포 50%의 생성을 유도한다. 당해 실험의 네가티브 대조군으로서, IDO 효소를 발현하지 않는 hASC-IDOsi를 사용했다. 이 클론은 CD4 세포 2% 미만의 아부류 내부에 2% 미만의 Treg 개체군을 유도했다. 따라서, hASC 중의 IDO의 구성적 발현은 조절 T-세포(CD3+CD4+CD25+++의 생성을 증가시키는 것으로 결론지을 수 있다.
- [0156] 이러한 관찰을 확인하기 위해, 실험을 IL-2 100 UI/ml의 첨가와 함께 기재된 바와 같이 반복하고, 7일에 걸쳐 배양한다. 배양한지 7일 후, 세포를 원심분리 및 펠렛하에 의해 수거하고, 유세포 분석기에 의해 분석했다. 개개 웰에 대한 FACS 분석의 결과는 도 3에 제공되어 있고, 이는, (SIL) 8.94% 및 (WT) 16.1%인 것과는 대조적으로, (IDO 클론)을 사용한 세포의 19.5%가 CD4+CD25bright임을 설명한다. 이는 각각의 그룹에서 모든 웰의 비교 수단을 나타내는 도 4에서 추가로 설명되어 있다. 이들 세포는 세포내 FOXP3에 의해 조절 T-세포인 것으로 확인되었다.

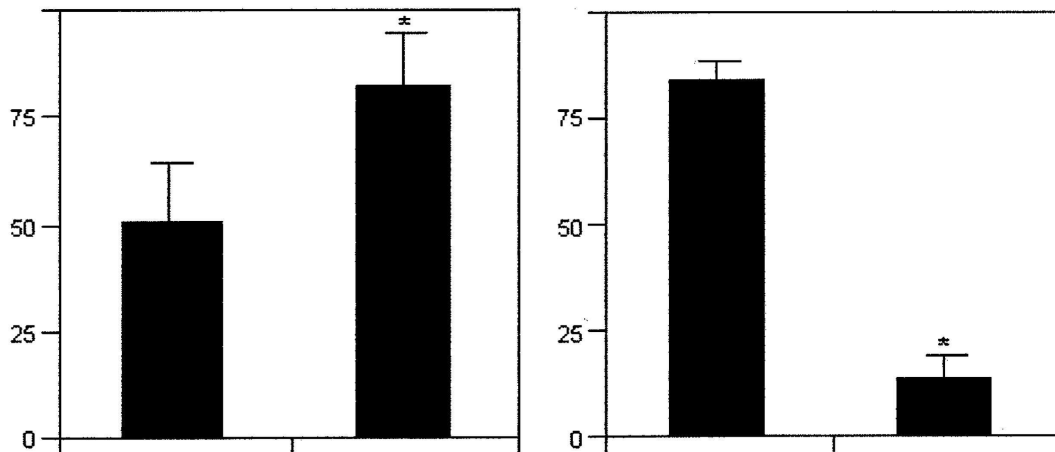
- [0157] 실험 결과는 ASC가 침묵 유전자를 나타내는 공동 배양물에서 발견된 Treg 비율이 IDO 활성이 존재할 때에 생성된 세포보다 더욱 낮음을 확인시켜 준다.
- [0158] 도 5는 실험 2의 두번째 부분에서 분석한 3개 조건 중의 대표적인 분포를 나타낸다. 좌측의 플롯은 구조 유전자를 갖는 ASC와 PBMC 공동 배양물의 FACS 분석(CD4/CD25/FOXP3)을 제공하고, 중앙 플롯은 ASC가 침묵 유전자를 제시하는 웰의 FACS 결과를 제공하며, 우측 플롯은 공 배터를 갖는 대조군을 제공한다.
- [0159] 도 6은 공동 배양물 각각에서 조절 T-세포의 평균 비율을 나타낸다. IDO는 IDO-공 및 IDO 침묵보다 더 많은 Treg를 유도함을 알 수 있다. 또한, ASC는 IDO-공과 대략 동일한 양의 Treg를 생성함을 알 수 있다.

도면

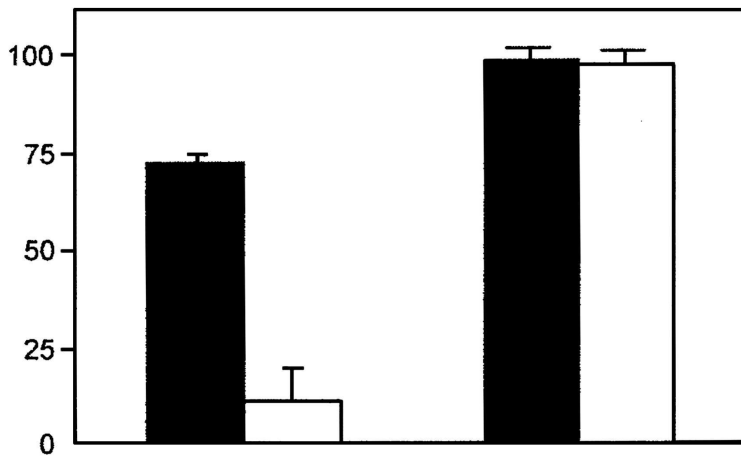
도면1



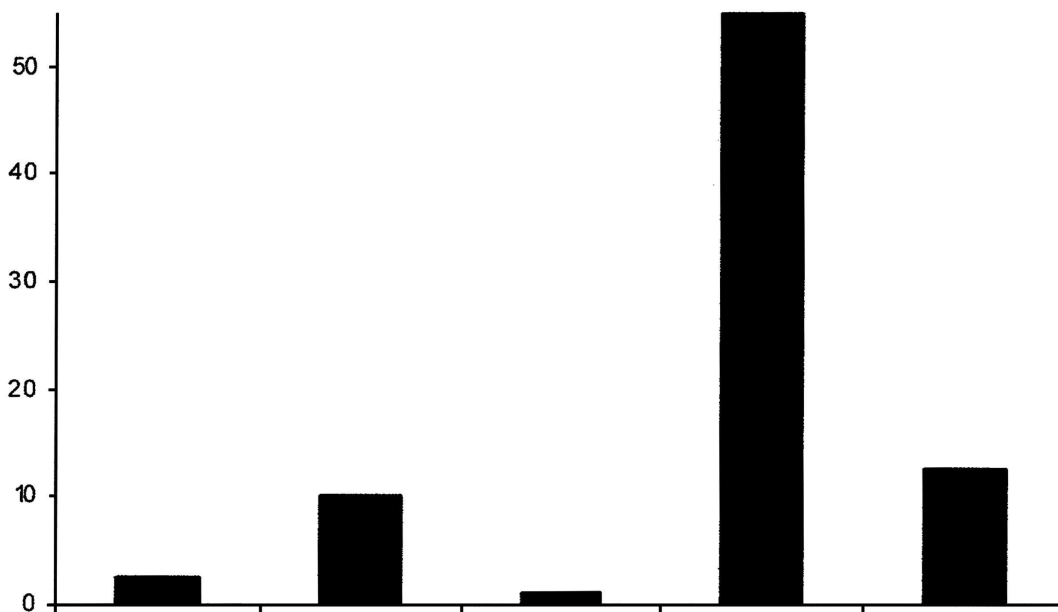
도면2



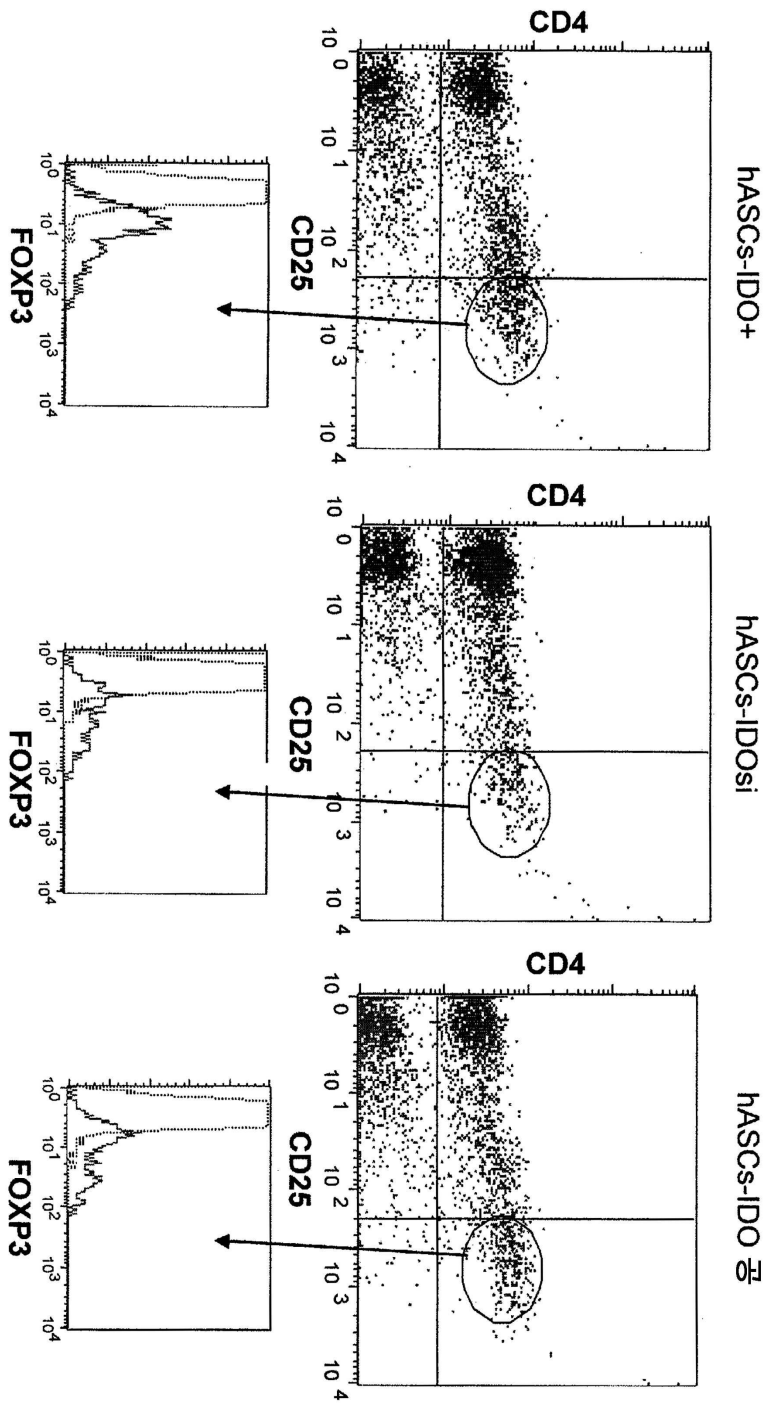
도면3



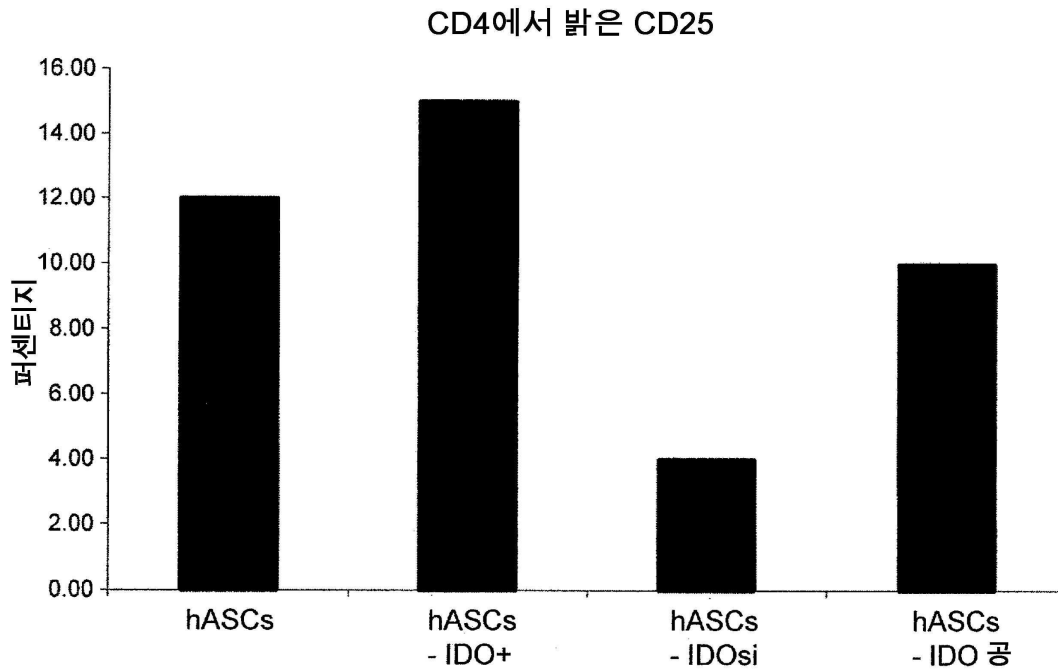
도면4



도면5



도면6



서열 목록

- <110> Cellerix S.A.
 - <120> Cells, nucleic acid constructs, cells comprising said constructs and methods utilizing said cells in the treatment of diseases
 - <130> IPA110331
 - <150> GB0820397.8
 - <151> 2008-11-07
 - <160> 6
 - <170> KopatentIn 1.71
 - <210> 1
 - <211> 1246
 - <212> DNA
 - <213> Homo sapiens
 - <400> 1
- ```

ggatcctaac tcgagatgcc accatggcac acgctatgga aaactcctgg acaatcagta 60
aagagtacca tattgatgaa gaagtgggct ttgctctgcc aaatccacag gaaaatctac 120

ctgattttta taatgactgg atgttcattg ctaaacatct gcctgatctc atagagtctg 180
gccagcttcg agaaagagtt gagaagttaa acatgctcag cattgatcat ctcacagacc 240
acaagtcaca ggccttgcga cgtctagttc tgggatgcat caccatggca tatgtgtggg 300
gcaaaggtea tggagatgtc cgtaaggctc tgccaagaaa tattgctgtt ccttactgcc 360

```

aactctccaa gaaactggaa ctgcctccta ttttggttta tgcagactgt gtcttgcaaa 420  
actggaagaa aaaggatcct aataagcccc tgacttatga gaacatggac gttttgttct 480  
catttcgtga tggagactgc agtaaaggat tcttcctggt ctctctattg gtggaaatag 540

cagctgcttc tgcaatcaaa gtaattccta ctgtattcaa ggcaatgcaa atgcaagaac 600  
gggacacttt gctaaggcg ctgttggaag tagcttcttg cttggagaaa gcccttcaag 660  
tgtttcacca aatccacgat catgtgaacc caaaagcatt tttcagtgtt cttcgcatat 720  
at ttgtctgg ctggaaaggc aacccccagc tatcagacgg tctgggtgat gaagggttct 780  
gggaagacce aaaggagttt gcagggggca gtgcaggcca aagcagcgtc tttcagtgtc 840  
ttgacgtcct gctgggcatc cagcagactg ctgggtggagg acatgctgct cagttctctc 900  
aggacatgag aagatatatg ccaccagctc acaggaactt cctgtgctca ttagagtcaa 960

atccctcagt ccgtgagttt gtcctttcaa aaggatgatgc tggcctgcgg gaagcttatg 1020  
acgcctgtgt gaaagctctg gtctccctga ggagctacca tctgcaaac gtgactaagt 1080  
acatcctgat tctgcaagc cagcagccaa aggagaataa gacctctgaa gacccttcaa 1140  
aactggaagc caaaggaact ggaggcactg atttaatgaa tttctgaaag actgtaagaa 1200  
gtacaactga gaaatccctt ttgaaggaag gttaattgaa tttcga 1246

<210> 2  
<211> 7054  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens  
<400> 2

ggccggccga agtggtttaa acgttgacat tgattattga ctagtatta atagtaatca 60

attacggggt cattagtcca tagcccatat atggagtcc gcgttacata acttacgta 120  
aatggcccgc ctggctgacc gcccaacgac ccccgcccat tgacgtcaat aatgacgtat 180  
gttcccatag taacccaat agggactttc cattgacgtc aatgggtgga gtatttacgg 240  
taaactgccc acttggcagt acatcaagtg tatcatatgc caagtacgcc ccctattgac 300  
gtcaatgacg gtaaatggcc cgcctggcat tatgcccagt acatgacctt atgggacttt 360  
cctacttggc agtacatcta cgtattagtc atcgtatta ccatggtgat gcggttttgg 420  
cagtacatca atgggcgtgg atageggttt gactcacggg gatttccaag tctccacccc 480

attgacgtca atgggagttt gttttggcac caaaatcaac gggactttcc aaaatgtcgt 540  
aacaactccg ccccatgac gcaaatgggc ggtaggcgtg tacggtggga ggtctatata 600  
agcagagctc aataaaagag cccacaacct ctactcggg gcgccagtcc tccgattgac 660

tgagtcgccc gggtagccgt gtatccaata aaccctcttg cagttgcatc cgacttgtgg 720  
 tctcgtgtt ccttgggagg gtctcctctg agtgattgac taccctcag cgggggtctt 780  
 tcatttgggg gctcgtccgg gatcgggaga cccctgcca gggaccaccg acccaccacc 840  
 gggaggtaa gctggccagca acttatctgt gtctgtccga ttgtctagt tctatgactg 900  
  
 attttatgcg cctgcgtcgg tactagttag ctaactagct ctgtatctgg cggaccctg 960  
 gtggaactga cgagttcga acaccggcc gcaacctgg gagacgtccc agggacttcg 1020  
 ggggccgttt ttgtggccc acctgagtcc aaaaatccc atcgttttgg actctttggt 1080  
 gcacccccct tagaggagg atatgtggt ctggtaggag acgagaacct aaaacagttc 1140  
 ccgctccgt ctgaatctt gcttccggt tgggaccgaa gccgcgccg gcgtcttctc 1200  
 tgctgcagca tcgttctgt ttgtctctgt ctgactgtgt ttctgtatt gtctgaaat 1260  
 atgggccgg gccagactgt taccactccc ttaagttga ccttaggtca ctggaagat 1320  
  
 gtcgagcga tcgctcaca ccagtcgta gatgtcaaga agagacgttg ggttacctc 1380  
 tgctctgcag aatggccaac cttaacgtc ggatggccg gagacggcac cttaaccga 1440  
 gacctcatca cccaggttaa gatcaagtc tttcacctg gcccgcatgg acaccagac 1500  
 caggtccct acatcgtgac ctgggaagc ttggctttg accccctcc ctgggtcaag 1560  
 cctttgtac accctaagc tccgctect ctctctccat ccgccccgc tctccccct 1620  
 gaacctctc gttagaccg ccctcgatc tcctttatc cagccctcac tcttcteta 1680  
 ggcgccccca tatggccata tgagatctt agttaactaa gcatgctagt cgaggctcga 1740  
  
 caaagtaag taatagtcc ctctctcaa gctcacttac aggcggatcc taactcgaga 1800  
 tgccaccatg gcacacgcta tggaaaact ctggacaatc agtaaagat accatattga 1860  
 tgaagaagt ggctttgct tgccaaatc acaggaat ctacctgatt ttataatga 1920  
 ctggatgtc attgctaac atctgcctga tctcatagag tctggccagc ttcgagaaag 1980  
 agttgagaag taaacatgc tcagattga tcctctaca gaccacaagt cacagcct 2040  
 tgcacgtcta gttctggat gcataccat ggcatatgt tggggcaaag gcatggaga 2100  
 tgtccgtaag gtcttgcaa gaaatattg tttctctac tgccaactct ccaagaaact 2160  
  
 ggaactgct cctatttgg tttatgcaga ctgtgtctt gcaactgga agaaaaagga 2220  
 tcctaataag cccctgact atgagaacat ggacgtttt ttctcattc gfgatggaga 2280  
 ctgcagtaa ggattcttc tggctctct attggtgaa atagcagct ctctgcaat 2340  
 caaagtaatt cctactgat tcaaggcaat gcaaatgca gaacgggaca ctttgctaaa 2400  
 ggcgtgttg gaaatagct ctgtcttga gaaagccct caagtgttc accaaatcca 2460  
 cgatcatgt aacccaaaag ctttttcag tttctctc atattttgt ctggctgaa 2520

aggcaacccc cagctatcag acggtctggt gtatgaaggg ttctgggaag acccaaagga 2580

gtttgcaggg ggcagtgcag gccaaagcag cgtctttcag tgctttgacg tctgtctggg 2640

catccagcag actgctggtg gaggacatgc tctcagttc ctccaggaca tgagaagata 2700

tatgccacca gctcacagga acttctctgtg ctattagag tcaaatccct cagtccgtga 2760

gtttgtcctt tcaaaagggtg atgctggcct gcgggaagct tatgacgct gtgtgaaagc 2820

tctggtctcc ctgaggagct accatctgca aatcgtgact aagtacatcc tgattctctgc 2880

aagccagcag ccaaaggaga ataagacctc tgaagacctc tcaaaactgg aagccaaagg 2940

aactggagge actgatttaa tgaatttctc gaagactgta agaagtacaa ctgagaaatc 3000

ccttttgaag gaaggttaat tgaattctga tttaaatctc cgcgggcccg ggatcgatcc 3060

gccccctccc ctccccccc cctaacttta ctggccgaag ccgcttgaa taaggccggt 3120

gtgctttgt ctatatgta ttttccacca tattgcccgc ttttggcaat gtgagggcc 3180

ggaaacctgg cctgtcttc ttgacgagca ttctagggg tctttcccct ctgcctaaag 3240

gaatgcaagg tctgttgaat gtcgtgaagg aagcagttcc tctggaagct tcttgaagac 3300

aaacaacgtc tgtagcgacc ctttgcaggc agcggaaacce cccacctggc gacaggtgcc 3360

tctgcggcca aaagccactg gtataagata cacctgcaaa ggcggcacia cccactgcc 3420

acgttgtgag ttggatagtt gtggaagag tcaaatggct ctctcaagc gtattcaaca 3480

aggggctgaa ggatgcccag aaggtaaccc attgtatggg atctgatctg gggcctcggt 3540

gcacatgctt tacatgtgtt tagtcgaggt taaaaaacg tctaggcccc ccgaaccacg 3600

gggacgtggt tttcctttga aaaacacgat gataaatatgg ccacaacat gattgaacaa 3660

gatggattgc acgcaggttc tccggccgct tgggtggaga ggctattcgg ctatgactgg 3720

gcacaacaga caatcggtc ctctgatgcc gccgtgttcc ggctgtcagc gcaggggcgc 3780

ccggttcttt ttgtcaagac cgacctgtcc ggtgccctga atgaactgca ggacgaggea 3840

gcgcggctat cgtggctggc cagcagggc gttccttgcg cagctgtgct cgactgtgc 3900

actgaagcgg gaagggactg gctgctattg ggcaagtgc cggggcagga tctctgtca 3960

tctcaccttg ctctgccga gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcg gcggctgcat 4020

acgtttgate cgctacctg cccattcgac caccaagcga aacatcgcat cgagcgagca 4080

cgtaactcga tggaaagcgg tcttctgat caggatgac tggacgaaga gcatcagggg 4140

ctcgcgccag ccgaactgtt cgccaggctc aaggcgcgca tgcccagcgg cgaggatctc 4200

gtcgtgacce atggcgaatgc ctgcttgccg aatcatatgg tggaaaatgg ccgcttttct 4260

ggattcatcg actgtggccg gctgggtgtg gcggaccgct atcaggacat agcgttggct 4320  
 acccgtgata ttgtgaaga gcttggcggc gaatgggctg accgcttctt cgtgttttac 4380  
 ggtatcgccg ctcccattc gcagcgcac cgccttctatc gccttcttga cgagtcttcc 4440  
 tgaagcggcc gccagcacag tggctgcacga taaaataaaa gattttatit agtctccaga 4500  
 aaaagggggg aatgaaagac cccacctgta ggtttggcaa gctagcttaa gtaacgcat 4560  
 ttgcaaggc atggaaaaat acataactga gaatagagaa gttcagatca aggtcaggaa 4620  
 cagatggaac agctgaatat gggccaaaca ggatatctgt ggtaagcagt tcttgccccg 4680  
  
 gctcagggcc aagaacagat ggaacagctg aatatgggcc aaacaggata tctgtggtaa 4740  
 gcagtctctg ccccggtca gggccaagaa cagatggtcc ccagatgagg tccagcctc 4800  
 agcagtttct agagaacct cagatgtttc caggggtccc caaggacctg aatgacctt 4860  
 gtgccttatt tgaactaac aatcagttcg ctctctgctt ctgttcgccc gcttctgctc 4920  
 cccgagctca ataaaagagc ccacaacccc tctctggggg cgccagctct cggattgact 4980  
 gagtcgccc ggtaccctg tatccaataa acctcttgc agttgcatcc gacttgtggt 5040  
 ctctctgttc ctggggaggg tctctctga gtgattgact acccgtcagc gggggctttt 5100  
  
 cattcacatg cagcatgat caaaattaat ttggtttttt ttcttaagta ttacattaa 5160  
 atggccatag ttgcattaat gaatcgcca acgcgccggg agaggcgggt tgcgtattgg 5220  
 cgctcttccg ctttaattaa gcatggagca aaaggccagc aaaaggccag gaacctaaa 5280  
 aaggccgctg tgctggcgtt tttccatagg ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaat 5340  
 cgacgtcaa gtcagagtg gcgaaacctg acaggactat aaagatacca ggcgtttccc 5400  
 cctggaagct ccctctgctg ctctctgtt ccgacctgc cgcttaccgg atacctgtcc 5460  
 gcctttctcc ctccgggaag cgtggcgtt tctcatagct cacgctgtag gtatctcagt 5520  
  
 tcggtgtagg tcgttctc caagetgggc tgtgtgcacg aacccccgt tcagcccgac 5580  
 cgctgcgct tatccggtaa ctatctctt gactccaacc cggtaagaca cgacttatcg 5640  
 cactggcag cagccactgg taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg cgggtctaca 5700  
 gagttcttga agtgggtggc taactacggc tacactagaa ggacagtatt tggtatctgc 5760  
 gctctgctga agccagttac cttcgaaaa agagtggta gctcttgatc cggcaaaaa 5820  
 accaccgctg gtagcgggtg tttttttgt tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaa 5880  
 ggatctcaag aagatcctt gatcttttct acggggtctg acgctcagt gaacgaaaac 5940  
  
 tcacgttaag ggattttgt catgagatta tcaaaaagga tcttcaccta gatcctttta 6000  
 aatataaat gaagttttaa atcaatctaa agtatatag agtaaacttg gtctgacagt 6060  
 taccaatgct taatcagta ggcacctatc tcagcagatc gtctatttcg ttcacata 6120

gttgctgac tccccgtcgt gtagataact acgatacggg agggcttacc atctggcccc 6180  
 agtgctgcaa tgataccgcg agaccacgc tcaccgctc cagatttacc agcaataaac 6240  
 cagccagccg gaagggccga ggcgagaagt ggtcctgcaa ctttatccgc ctccatccag 6300  
 tctattaatt gttgccggga agctagagta agtagttcgc cagttaatag tttgcgcaac 6360

gttgttgcca ttgctacagg catcgtgggtg tcacgctcgt cgtttgggat ggcttcattc 6420  
 agctccggtt cccaacgata aagcgcgagt acatgatccc ccatgtttgt caaaaaagcg 6480  
 gttagctcct tcggctcctc gatcgtttgc agaagtaagt tggccgcagt gttatcactc 6540  
 atggttatgg cagcactgca taattctctt actgtcatgc catccgtaag atgcttttct 6600  
 gtgactgggt agtactcaac caagtcattc tgagaatagt gtatgcggcg accgagttgc 6660  
 tcttgcccgg cgtcaatcag ggataatacc gcgccacata gcagaacttt aaaagtctc 6720  
 atcattggaa aacgtttctt ggggcgaaaa ctctcaagga tcttaccgct gttgagatcc 6780

agttcgatgt aaccactcgc tgcacccaac tgatcttcag catcttttac tttcaccagc 6840  
 gtttctgggt gagcaaaaac aggaaggcaa aatgccgcaa aaaagggat aaggcgaca 6900  
 cggaaatgtt gaatactcat actcttctt tttcaatatt attgaagcat ttatcagggt 6960  
 tattgtctca tgagcggata catattgaa tgtatttaga aaaataaaca aataggggtt 7020  
 ccgcgcacat ttccccgaaa agtgccacct acgt 7054

- <210> 3
- <211> 24
- <212> DNA
- <213> Homo sapiens
- <400> 3

aggagcagac tacaagaatg gcac 24

- <210> 4
- <211> 23
- <212> DNA
- <213> Homo sapiens
- <400> 4

gtttgtggct ctgttacaat ggg 23

- <210> 5
- <211> 403
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens

<400> 5

Met Ala His Ala Met Glu Asn Ser Trp Thr Ile Ser Lys Glu Tyr His  
 1 5 10 15

Ile Asp Glu Glu Val Gly Phe Ala Leu Pro Asn Pro Gln Glu Asn Leu  
 20 25 30

Pro Asp Phe Tyr Asn Asp Trp Met Phe Ile Ala Lys His Leu Pro Asp  
 35 40 45

Leu Ile Glu Ser Gly Gln Leu Arg Glu Arg Val Glu Lys Leu Asn Met  
 50 55 60

Leu Ser Ile Asp His Leu Thr Asp His Lys Ser Gln Arg Leu Ala Arg  
 65 70 75 80

Leu Val Leu Gly Cys Ile Thr Met Ala Tyr Val Trp Gly Lys Gly His  
 85 90 95

Gly Asp Val Arg Lys Val Leu Pro Arg Asn Ile Ala Val Pro Tyr Cys  
 100 105 110

Gln Leu Ser Lys Lys Leu Glu Leu Pro Pro Ile Leu Val Tyr Ala Asp  
 115 120 125

Cys Val Leu Ala Asn Trp Lys Lys Lys Asp Pro Asn Lys Tyr Val Asn  
 130 135 140

Thr Gly Asn Met Asp Val Leu Phe Ser Phe Arg Asp Gly Asp Cys Ser  
 145 150 155 160

Lys Gly Phe Phe Leu Val Ser Leu Leu Val Glu Ile Ala Ala Ala Ser  
 165 170 175

Ala Ile Lys Val Ile Pro Thr Val Phe Lys Ala Met Gln Met Gln Glu  
 180 185 190

Arg Asp Thr Leu Leu Lys Ala Leu Leu Glu Ile Ala Ser Cys Leu Glu  
 195 200 205

Lys Ala Leu Gln Val Phe His Gln Ile His Asp His Val Asn Pro Lys  
 210 215 220

Ala Phe Phe Ser Val Leu Arg Ile Tyr Leu Ser Gly Trp Lys Gly Asn  
 225 230 235 240

Pro Gln Leu Ser Asp Gly Leu Val Tyr Glu Gly Phe Trp Glu Asp Pro



|                                                                   |      |
|-------------------------------------------------------------------|------|
| aacatgctca gcattgatca tctcacagac cacaagtcac agcgccttgc acgtctagtt | 360  |
| ctgggatgca tcacatggc atatgtgtgg ggcaaaggtc atggagatgt ccgtaaggtc  | 420  |
| ttgccaagaa atattgetgt tccttactgc caactctcca agaaactgga actgcctcct | 480  |
| atthtggtht atgcagactg tgtcttggca aactggaaga aaaaggatcc taataagtat | 540  |
| gtaaacactg ggaacatgga cgthttgttc tcatttcgtg atggagactg cagtaaagga | 600  |
| ttcttcctgg tctctctatt ggtggaata gcagctgctt ctgcaatcaa agtaattcct  | 660  |
| actgtattca aggcaatgca aatgcaagaa cgggacactt tgctaaaggc gctgttggaa | 720  |
| atagcttctt gcttggagaa agcccttcaa gtgtttcacc aatccacga tcatgtgaac  | 780  |
| ccaaaagcat thttcagtgt tcttcgata tathttgtctg gctggaaagg caacccccag | 840  |
| ctatcagacg gtctggtgta tgaagggttc tgggaagacc caaaggagtt tgcagggggc | 900  |
| agtgcaggcc aaagcagcgt thttcagtgc thtgacgtcc tgcctggcat ccagcagact | 960  |
| gctggtggag gacatgtgc tcagttctc caggacatga gaagatata gccaccagct    | 1020 |
| cacaggaact tctgtgtgc attagagtca aatccctcag tccgtgagtt tgcctttca   | 1080 |
| aaagtgatg ctggcctgcg ggaagcttat gacgcctgtg tgaaagctct ggtctcctg   | 1140 |
| aggagctacc atctgcaat cgtgactaag tacatctga thctctgaag ccagcagcca   | 1200 |
| aaggagaata agacctctga agaccttca aaactggaag ccaaaggaac tggaggcact  | 1260 |
| gatttaatga thttcctgaa gactgtaaga agtacaactg agaaatccct thtgaaggaa | 1320 |
| ggttaatgta acccaacaag agcacattht atcatagcag agacatctgt atgcattcct | 1380 |
| gtcattacce attgtaacag agccacaaac taatactatg caatgttht ccaataatgc  | 1440 |
| aatacaaaag acctcaaat acctgtgcat thcttgtagg aaaacaaca aaggtaatth   | 1500 |
| tgtgtaatta tactagaagt thtgaatct gtatcttatc attggaataa aatgacattc  | 1560 |