



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년10월29일
(11) 등록번호 10-1912982
(24) 등록일자 2018년10월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0789 (2010.01) A61K 35/28 (2015.01)
B01D 15/00 (2006.01) C12M 1/34 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-7027817
(22) 출원일자(국제) 2013년03월05일
심사청구일자 2018년02월28일
(85) 번역문제출일자 2014년10월02일
(65) 공개번호 10-2015-0011796
(43) 공개일자 2015년02월02일
(86) 국제출원번호 PCT/IL2013/000026
(87) 국제공개번호 WO 2013/132477
국제공개일자 2013년09월12일
(30) 우선권주장
61/607,033 2012년03월06일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
Molecular Therapy 13(1) May 2006 Abstract
#1041 page S399

(73) 특허권자
셀렉트 바이오테라퓨틱스 리미티드
이스라엘 가버사바 4442510 3층 하타스 스트리트
23
(72) 발명자
야르코니, 샤이
이스라엘, 4439529, 크파르 사바, 33 레임드 헤이
스트리트
아스케나시, 나디르
이스라엘, 6209307, 텔 아비브, 14 헤이 베이아르
스트리트
(74) 대리인
허용록

전체 청구항 수 : 총 16 항

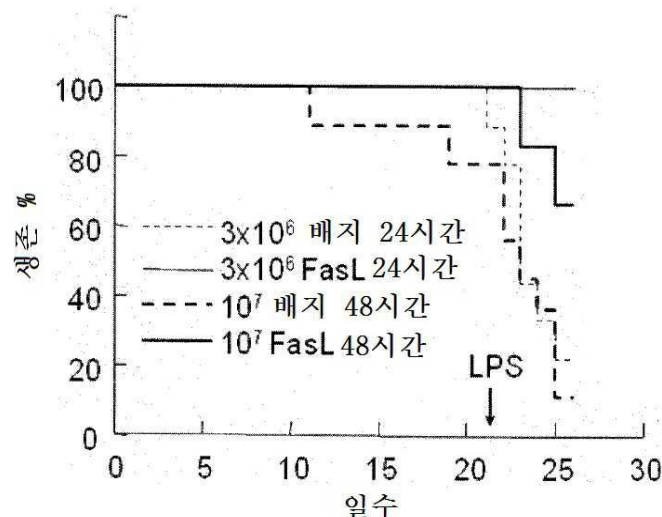
심사관 : 이효진

(54) 발명의 명칭 세포자멸사-신호전달 내성 세포를 선택하기 위한 디바이스 및 방법, 그리고 그의 용도

(57) 요약

본 발명은 리셉터-매개 세포자멸사에 내성이 있는 세포의 선택을 위하여 적응된 디바이스 및 키트, 그리고 이 디바이스 및 키트를 이용하는 방법을 개시한다. 디바이스는 해당 디바이스 내로 도입되는 이중 세포 집단으로부터 이식편 대 숙주 질환(GvHD)을 유도하는 성숙한 면역 세포의 음성 선택을 가능하게 한다. 디바이스는 기성품 산물 - 현재 존재하지 않는 용액에 의해 간단하면서도 보다 저렴한 세팅으로 효과적인 세포 선택을 가능하게 한다. 본 발명은 또한 디바이스에 대한 용도를 개시한다.

대표도 - 도11d



명세서

청구범위

청구항 1

디바이스로서, 생체적합성 물질(biocompatible material) 및 표면에 고정된 생물학적으로 활성인 세포자멸사-유도 리간드(biologically active apoptosis-inducing ligand)로 이루어진 용기를 포함하되, 상기 디바이스는 세포자멸사-신호전달 내성 세포 및 세포자멸사-신호전달 민감성 세포를 포함하는 이종 세포 집단으로부터 세포자멸사-민감성 세포의 세포자멸에 의한 세포자멸사-신호전달 내성 세포의 세포 선택을 위하여 적합한 것이고, 상기 세포자멸사-유도 리간드는 종양 괴사 인자 α (TNF- α), Fas 리간드(FasL), Trail 또는 Tweak 로 이루어진 군으로부터 선택된 단일 제제인 것인 디바이스.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 표면은 상기 용기의 내부 표면인 것인 디바이스.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 용기는 백(bag), 칼럼(column), 튜브, 병(bottle), 바이알(vial) 및 플라스크를 포함하는 군으로부터 선택된 것인 디바이스.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 생체적합성 물질은 폴리프로필렌, 폴리스타이렌, 실리콘, 폴리염화비닐 또는 이들의 조합물을 포함하는 군으로부터 선택된 것인 디바이스.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 고정된 세포자멸사-유도 리간드는 Fas 리간드(FasL)인 것인 디바이스.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 표면은 상기 용기 내에 존재하는 비즈(beads)의 표면인 것인 디바이스.

청구항 7

(a) 제1항의 디바이스; 및 (b) 상기 디바이스 내에 있는 세포자멸사-유도 리간드의 건실성(integrity) 및 활성을 유지하기 위한 용액을 포함하고, 세포자멸사-신호전달 내성 세포 및 세포자멸사-신호전달 민감성 세포를 포함하는 이종 세포 집단으로부터 세포자멸사-민감성 세포의 세포자멸에 의한 세포자멸사-신호전달 내성 세포의 세포 선택을 위한, 세포 선택 키트.

청구항 8

제7항에 있어서, 제2 세포자멸사-유도 리간드를 더 포함하는 세포 선택 키트.

청구항 9

세포 집단으로부터 세포자멸사-신호전달 내성 세포를 선택하는 방법으로서, 상기 세포 집단은 세포자멸사-신호전달 내성 세포(apoptosis-signaling resistant cell) 및 세포자멸사-신호전달 민감성 세포(apoptosis-signaling sensitive cell)를 포함하며, 상기 방법은,

(a) 제1항의 디바이스 내에 세포 집단을 포함하는 샘플을 도입하는 단계; 및

(b) 상기 디바이스 내에서 상기 세포들을 배양하는 단계로 이루어짐으로써;

이로써 세포 집단으로부터 세포자멸사-신호전달 민감성 세포를 제거하기 위해서 세포자멸사-신호전달 민감성 세포에서 세포 사멸을 유도함으로써 세포 집단에서 세포자멸사-신호전달 내성 세포의 풍부화(농축)를 통해서 세포

자멸사-신호전달 내성 세포를 선택하는 것인, 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 세포자멸사-신호전달 내성 세포는 줄기 세포, 활성화-유도 세포사(activation-induced cell death: AICD)에 불감성(insensitive)인 면역 세포, 전구 세포(progenitor cell), 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 것인 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 줄기 세포는 골수 줄기 세포인 것인 방법.

청구항 12

제10항에 있어서, 상기 활성화-유도 세포사에 불감성인 면역 세포는 T 세포인 것인 방법.

청구항 13

제9항에 있어서, 상기 세포 집단은 골수, 전구 세포 이동된 말초 혈액 또는 제대혈(umbilical cord blood: UC B)로부터 유래된 것인 방법.

청구항 14

제1항에 있어서,

조혈모 줄기 세포 및 전구 세포(hematopoietic stem and progenitor cells: HSPC) 이식의 임상적 성과를 향상시키는 방법에 사용하기 위한 디바이스로서,

상기 방법은

- (a) 조혈모 줄기 세포 및 전구 세포를 포함하는 세포 집단을 포함하는 샘플을 제공하는 단계;
 - (b) 상기 세포 집단을 상기 디바이스에서 생물학적으로 활성인 세포자멸사-유도 리간드인 1 내지 24시간의 기간 동안 Fas 리간드(FasL) 또는 24 내지 48시간의 기간 동안 종양 괴사 인자 α (TNF- α)와 접촉시키는 단계;
 - (c) 단계 (b)의 세포들을 회수하는 단계; 및
 - (d) 단계 (c)의 세포들을 이식하는 단계;를 포함하되,
- 이로써 조혈모 줄기 세포 및 전구 세포(HSPC) 이식의 임상적 성과를 향상시키는 것인 디바이스.

청구항 15

전구-세포 이식물을 포함하는 조성물에서 악성 세포를 제거하기 위한 방법으로서,

- (a) 전구-세포 이식물을 포함하는 조성물을 제공하는 단계; 및
- (b) 1항의 디바이스에서 24시간의 기간 동안 상기 조성물을 세포자멸사-유도 리간드와 접촉시키는 단계를 포함하되;

이로써, 전구-세포 이식물을 포함하는 조성물에서 악성 세포를 제거하기 위한 것인 방법.

청구항 16

제1항에 있어서,

이식편 대 종양활성(GvT)을 유지하면서 이식편 대 숙주질환(GvHD)을 예방하기 위한 방법에 사용하기 위한 디바이스로서,

상기 방법은

- (a) HSPC 및 면역 세포를 포함하는 세포 집단을 포함하는 샘플을 제공하는 단계;
- (b) 상기 디바이스에서 2 내지 16시간 동안 상기 세포 집단을 세포자멸사-유도 리간드와 접촉시키는 단계;

(c) 단계 (b)의 세포들을 회수하는 단계; 및

(d) 단계 (c)의 세포들을 이식하는 단계,를 포함하되,

이로써 이식편 대 종양(GvT) 활성을 유지하면서 이식편 대 숙주 질환(GvHD)을 예방하는 것인 디바이스.

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 의료용 디바이스의 분야에 관한 것으로, 더욱 구체적으로는, 세포자멸사 신호전달에 내성이 있는 세포를 선택하는 것을 목적으로 하는 디바이스, 해당 디바이스를 사용하는 방법, 그리고 그의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 줄기 세포는 다양한 특수화된 세포 유형으로 분할될 뿐만 아니라 분화되며 또한 자가-증식되어 더 많은 줄기 세포를 생산할 수 있는 세포이다. 포유류에서, 줄기 세포는 배반포의 내부 세포괴(inner cell mass)로부터 분리된 배아 줄기 세포, 또는 각종 조직에서 발견되는 성체 줄기 세포로서 발견된다. 성체 유기체에서, 줄기 세포 및 전구 세포(progenitor cell)는 신체의 복구 시스템으로서 작용하여, 성체 조직을 보충한다.

[0003] 생리학적 활성을 조절하는 수술적 개입 혹은 약물에 의존하는 현재의 모든 치료와 달리, 줄기 세포는 기능장애 또는 변성 조직에 대한 대체물을 제공한다. 따라서, 대체 요법에서의 줄기 세포의 사용은, 많은 현재 치료 불가능한 질환의 예후를 극적으로 변화시키고, 손상된 장기의 기능을 복원시키며, 선천적인 대사 장애 및 결함을 고칠 수 있었다. 성체 및/또는 배아 유래 둘 모두의 줄기 세포의 확장과 연관된 기술의 중요성은 광범위한 질환의 치료에서 이들 세포의 많은 전임상(preclinical) 및 임상 용도에 의해 설명된다.

[0004] 더욱 최근의 발전은, 조혈모 줄기 세포 및 전구 세포(hematopoietic stem and progenitor cells: HSPC) 및 중간엽 줄기세포(mesenchymal stromal cell: MSC)를 포함하는, 조혈 구획 내의 수개의 줄기 세포가 면역-조혈계 밖에서 세포 유형으로 분화되어, 광범위 퇴행성 장애, 말단 기관 고장 및 기능장애에서의 조직 복구 및 재생을 위하여 이들 세포 유형을 사용할 기회를 만들어, 세포 요법에 의해 기관 이식을 가능하게 교체하는 능력을 가지는 것으로 판명되었다.

[0005] 줄기 세포의 주된 임상 용도들 중 하나는 조혈 줄기 세포 이식(hematopoietic stem cell transplant: HSCT)을 통하는 것이다. 이 과정에서 도너로부터의 많은 세포가 수용체의 면역 및 조혈계를 재구성할 목적으로 수용체로 이송된다. 이들 이식을 행하는 동안, 면역 재구성은 사실상 백혈병, 림프종, 다발성 골수종 및 다수의 고형 종양 등과 같은 다수의 화학요법-내성 암에 대한 최상의 요법이라는 것이 실현되어 있었다. 종양학에서의 그의 용도를 넘어서, HSCT는 자가면역 질환(예컨대, 당뇨병 T1, SLE 및 크론병), 대사 및 효소 결핍의 선천적 이상, 이

상혈색소증 또는 선천적 및 후천적 면역결핍 등과 같은 비악성(non-malignant) 장애를 치유하는 잠재성을 품고 있다. HSCT는 비암 징후에 대해서 이용되어 왔고, 이는 유의한 양성 결과를 나타내고 있다. 그럼에도 불구하고, 이 절차는 이식편 대 숙주 질환(Graft versus host disease: GvHD)이 가장 중요한 그의 중증의 독성 효과 때문에 생명을 위협하는 병태에 현재 이용되고 있다.

[0006] 암의 치료를 위하여 이 접근법을 이용할 경우, 이식편 거부를 방지하기 위하여 공격적인 방사선-화학요법을 통한 면역-조혈계의 근절에 의해 골수억제성 전처치(myeloablative preconditioning) 후에 가장 빈번하게 수행되었다. 숙주의 면역-조혈계가 이식 전에 근절될 필요가 없는 최근의 실현은 상당한 진보를 이루었고, 따라서 골수억제성 전처치를 비골수억제성 전처치(non-myeloablative preconditioning) 및 저감된 강도 처치(reduced intensity conditioning: RIC)로 대체하고 있다. 비골수억제성 전처치의 이용은 필수 장기 기능부전, 생착(engraftment)의 실패 및 난치성 감염에 의해 초래되는 생명을 위협하는 상황을 상당히, 그러나 아직 충분하지 않게 향상시키고 있다. 숙주의 조혈계는 RIC에 의해 근절되지 않으므로, 도너 세포가 생착에 실패할 경우에 회복될 수 있다. 시간이 흐름에 따라서, 도너 이식편이 이식편 대 종양(Graft versus tumor: GvT) 및 이식편 대 자가면역(graft versus autoimmunity: GvA) 반응의 발생을 용이하게 하는 과정을 대체하지만, 환자가 위독한 이환을 및 사망물에 이르는 GvHD에 더욱 노출되게 된다.

[0007] 제1형 막관통 단백질/유착 분자인 조혈 줄기 세포의 마커로서의 사이알로뮤신 CD34의 동정은 이식 목적을 위하여 조혈 줄기 세포를 모으는 수단으로서 CD34+ 세포 선택을 이용하는 능력을 가져왔다. CD34 마커는 몇몇 줄기 세포에는 존재하지 않고, 또한 각종 하위유형의 혈액 전구체에서 발견된다. 이러한 긍정적인 선택을 이용할 경우 유의한 줄기 세포의 일부의 소실을 초래하게 된다. 게다가, 몇몇 후속의 전구체 세포와 함께 줄기 및 전기 세포의 혼합된 세포 집단이 얻어지게 된다. 이러한 혼합 세포 집단의 이식은 이식 성공을 감소시킨다[Askenasy N. et al., Current Stem Cell Research and Therapy 2006; 1:85-94]. 따라서, 세포에 일어나는 역효과를 없애면서 조혈 재구성에 요구되는 세포들 모두를 유지하는 선택 방법에 대한 필요가 있었다.

[0008] 체세포와 달리, 조혈모 줄기 세포 및 전구 세포(HSPC), 중간엽 줄기세포, 및 신경 전구체(neural progenitor: NP)는 방사선-화학요법에 의해 그리고 상주하는 조혈 세포의 대량 사멸의 결과로서 골수강 내로 방출되는 2차적인 인자들의 둘 모두에 의해 가해지는 것들과 같은 손상 인자들에게 불감성(Insensitive)으로 되는 것이 보고되어 있다. HSPC는, 대부분의 원시 전구체에서 성장 신호를 전달하기 위하여 대신 이용되는 종양 괴사 인자(tumor necrosis factor: TNF) 계열 리셉터에 의해 도입되는 세포자멸사 신호에 대해 특히 내성이 있다. 쥐과 모델에서, 조혈 전구체는 손상 및 스트레스 조건 하에 수개의 TNF 계열 리셉터를 몹시 상향조절하는 것으로 판명되었다. 이식 세팅에 있어서, 이 생리학적 기전은 세포자멸사-민감성 도너 세포에 비해서 생착을 위하여 더욱 원시 전구체를 우선시한다. 따라서, FasL, Trail, Tweak 또는 TNF- α 등과 같은 TNF 계열 세포자멸사-유도 리간드에 이식 집단을 노출시키는 것은, TNF-계열 리간드 유도 세포자멸사에 대해서 민감한 세포 집단이 세포자멸사를 받고 이식물로부터 제거되므로, 줄기 세포 집단을 음성적으로 선택하는 결과를 초래한다. 쥐과 모델에서의 이러한 방법의 이용은 특허 출원 제WO 2007/138597호에 개시되어 있다.

[0009] 도너 이식편의 조성물은 줄기 세포 이식의 중요한 파라미터이다. 임계 개수의 전구체가 생착을 확보하기 위하여 요구되는 것으로 판명되어 있다. 또한, 몇몇 비-줄기 세포 서브세트의 존재는 생착의 가능성을 실질적으로 향상시키므로, 세포들의 이중 혼합물의 이식이 정제된 전구체의 이식보다 더 효과적이다. 도너 이식편 내의 최상위 서브세트들은 (CD4⁺ 및 CD8⁺) T 세포들인데, 그 이유는 이들이 골수 미세환경에서 거부에 대응하여 조혈 전구체 생착을 지원하는 것으로 입증되어 있기 때문이다. 그러나, 동종이계 T 세포의 부분적으로 면역억제된 수용체 내로의 이식은 영속성 있는 생착을 지원하는데, 이는 잠재적으로 치명적인 이식편 대 숙주 반응(graft versus host reaction: GvH) 또는 이식편 대 숙주 질환(GvHD)을 매개한다. 성숙한 도너 T 세포들은 이 반응을 매개하는 한편, 이식 후 새롭게 발달된 도너 T 세포들은 숙주에 대해서 견딘다. GvH를 매개하고 생착을 지원하는 T 세포 서브세트들 간의 분리에 있어서 광범위한 노력을 쏟고 있지만; 실험적 입증은 아직까지 결론에 이르지 못하고 있다.

[0010] 이식편 대 숙주 질환(GvHD)은 통상 이식후 처음 100일 내의 급성기 반응과, 더욱 더딘 진행이지만 동등하게 해로운 결과를 지니는 만성 반응을 포함한다. 중요하게는, 이들 두 반응은 이식으로부터의 일수 내에 성숙한 도너 T 세포에 의해 매개된 초기 염증에 의해 촉발된다. 급성 GvHD는 통상 면역억제 요법에 의해 치료되는데, 이 요법은 조혈 재구성에 대한 음성적 효과를 지니는 반면, 만성 반응에 대한 현재 효과적인 요법은 없다. GvHD의 예방에 대한 전통적인 접근법은, CD3, CD4, CD8 등과 같은 세포 표면 마커를 이용해서, 가끔 B 림프구에 의해 수반되는, 도너 접종원으로부터의 성숙한 T 세포의 고갈(depletion)로 이루어진다. 각종 세포 표면 마커를 이용해

서 더욱 선택적인 T 세포 고갈(T cell depletion: TCD)을 달성하는 집중적인 연구는 실패하였다.

[0011] 가장 특이적인 고갈은 숙주 항원에 대한 생체의 감작 후의 세포자멸사 신호를 이용해서 반응성 T 세포 서브세트의 제거에 의해 적절한 결과를 달성하였다. 감작화된 T 세포는 활성화-관련 분자의 레퍼토리를 발현하고, 활성화-유도 세포사(activation-induced cell death: AICD)에 민감해지며, 특정 고갈에 이용되는 특징을 신속한 속도로 증식시킨다. 그러나, 선택적 제거에 대한 이 접근법에는 수개의 주된 장애물이 있다. 첫 번째로, T 세포의 감작은 항원에 대한 반복된 노출 과정이며, 이는 3 내지 7일의 생체의 인큐베이션을 필요로 한다. 따라서, T 세포 활성화는 이식 전 적어도 3일에 수행되어야 한다. 두 번째로, AICD에 걸리기 쉬운 신속-순환 T 세포를 부여하는 감작 및 활성화는, 또한 효과기/기억 T 세포의 발달과 확장을 유도하며, 그의 지속적인 동종이게 반응성은 GvHD를 개시시키고 전파시킬 수 있다. 효과기/기억 T 세포는, 부분적으로는 고유한 낮은 수준의 카스파제-3으로 인해 Fas 가교결합에 대해서 비교적 내성이 있어, 생체의 배양된 T 세포의 주입 후에 환자에게 급성 및 만성 GvHD에 잘 걸리게 하는 세포자멸사-내성 표현형을 초래한다. 세 번째로, 가장 효과적인 생체의 감작은 주 조직 적합 복합체(major histocompatibility complex: MHC)의 성분에 대한 것이며, 그 차이는 이식 세팅에서 우세한 동종이게 반응(alloresponse)을 유발한다. 그러나, GvHD 반응은 주로 부 조직적합 복합체 항원(miHA)에 의해 자극되고, 주로 조직-특이적 항원(TSA)을 표적화한다. 정상 및 비정상 조직 에피토프는 염증에 의해 그리고 이식 전 처치에 의해 가해지는 손상에 의해 노출된다. GvT 및 이식 생착을 뒷받침하는 세포의 서브세트를 유지하면서, GvHD를 유도하는 T 세포의 선택적 고갈을 위한 효과적인 방법은 아직 찾아야 한다.

발명의 내용

- [0012] 본 발명은 리셉터-매개 세포자멸사에 내성이 있는 세포의 선택을 위하여 적응된 디바이스 및 키트, 그리고 이 디바이스 및 키트를 이용하는 방법을 개시한다. 디바이스는 해당 디바이스 내로 도입되는 이종 세포 집단으로부터 이식편 대 숙주 질환(GvHD)을 유도하는 성숙한 면역 세포의 음성 선택(negative selection)을 가능하게 한다. 디바이스는 기성품 산물(off the shelf product) - 현재 존재하지 않는 용액에 의해 간단하면서도 보다 저렴한 세팅으로 효과적인 세포 선택을 가능하게 한다. 본 발명은 또한 디바이스에 대한 용도를 개시한다.
- [0013] 일 양상에 따르면, 본 발명은 생체적합성 물질(biocompatible material) 및 표면에 고정된 생물학적으로 활성인 세포자멸사-유도 리간드(biologically active apoptosis-inducing ligand)로 이루어진 용기를 포함하는 디바이스를 개시하되, 여기서 상기 디바이스는 세포 선택을 위하여 적응되어 있다.
- [0014] 일 실시형태에 따르면, 생물학적으로 활성인 세포자멸사-유도 리간드가 고정되는 표면은 용기의 내부 표면이다.
- [0015] 다른 실시형태에 따르면, 생물학적으로 활성인 세포자멸사-유도 리간드가 고정되는 표면은 용기 내에 존재하는 비즈(beads)의 표면이다.
- [0016] 다른 실시형태에 따르면, 용기는 백(bag), 칼럼(column), 튜브, 병(bottle), 바이알(vial) 및 플라스크를 포함하는 군으로부터 선택된다.
- [0017] 또 다른 실시형태에 따르면, 디바이스를 구성하는 생체적합성 물질은 폴리프로필렌, 폴리스타이렌, 실리콘, 폴리염화비닐 또는 이들의 조합물을 포함하는 군으로부터 선택된다.
- [0018] 또 다른 실시형태에 따르면, 고정된 세포자멸사-유도 리간드는 종양 괴사 인자 α (TNF- α), Fas 리간드(FasL), Trail, Tweak, 또는 이들의 임의의 조합물을 포함하는 군으로부터 선택된다.
- [0019] 다른 양상에 따르면, 본 발명은 이종 세포 집단으로부터 세포자멸사-신호전달 내성 세포를 선택하는 방법을 개시하되; 상기 세포 집단은 세포자멸사-신호전달 내성 세포(apoptosis-signaling resistant cell) 및 세포자멸사-신호전달 민감성 세포(apoptosis-signaling sensitive cell)를 포함한다. 상기 방법은 본 발명의 디바이스 내에 이종 세포 집단을 포함하는 샘플을 도입하는 단계 및 디바이스 내에서 세포들을 배양하는 단계로 이루어지고, 이로써 세포 집단으로부터 세포자멸사-신호전달 내성 세포를 선택한다.
- [0020] 다른 실시형태에 따르면, 선택된 세포자멸사-내성 세포는 체대혈 줄기 세포, 이동된 말초 혈액 줄기 세포, 골수 줄기 세포, 암 줄기 세포 및 신경 줄기 세포를 포함하는 군으로부터 선택된 줄기 세포이다.
- [0021] 다른 실시형태에 따르면, 선택된 세포자멸사-내성 세포는 활성화-유도 세포사(AICD)에 둔감한 면역 세포이다. 또 다른 실시형태에 있어서, 활성화-유도 세포사(AICD)에 불감성인 면역 세포는 T 세포이다.
- [0022] 다른 실시형태에 따르면, 선택된 세포자멸사-내성 세포는 전구 세포이다.
- [0023] 또 다른 실시형태에 따르면, 상기 방법에서 이용되는 세포 집단은 골수, 전구 세포 이동된 말초 혈액 또는 체대

혈(umbilical cord blood: UCB)로부터 유래된다

- [0024] 또 다른 실시형태에 따르면, 디바이스 내에서의 인큐베이션 시간은 2시간 내지 72시간이다.
- [0025] 또 다른 양상에 따르면, 본 발명은 본 발명의 디바이스 및 디바이스 내에 있는 세포자멸사-유도 리간드의 건실성(integrity) 및 활성을 유지하기 위한 용액을 포함하는 세포 선택 키트를 개시한다. 몇몇 실시형태에 있어서, 키트는 중앙 피사 인자 α (TNF- α), Fas 리간드(FasL), Trail, Tweak, 또는 이들의 임의의 조합의 군으로부터 선택된 세포자멸사 유도 리간드를 더 포함한다.
- [0026] 다른 실시형태에 따르면, 세포자멸사-유도 리간드의 건실성 및 활성을 유지하기 위한 용액은 완충액 또는 배지(media)이다.
- [0027] 또 다른 양상에 따르면, 본 발명은 상기 디바이스 및 방법을 이용하는 방법을 개시한다. 상기 방법은 조혈모 줄기 세포 및 전구 세포(HSPC) 이식의 임상적 성과를 향상시키는 방법이다. 이 방법에 있어서, 세포 집단을 포함하는 샘플이 제공되며; 세포 집단은 줄기 세포 및 전구 세포를 포함한다. 상기 집단은 세포자멸사-유도 리간드와 접촉되고, 나머지 세포는 회수되어 이식을 위하여 이용된다. 추가의 실시형태에 따르면, 접촉은 본 발명의 디바이스 내에서 일어난다.
- [0028] 다른 실시형태에 따르면, 상기 방법에서의 세포 집단은 골수, 전구 세포 이동된 말초 혈액 또는 제대혈(UCB)로부터 유래된다.
- [0029] 다른 실시형태에 따르면, 상기 방법을 이용해서 선택된 줄기 세포는 제대혈 줄기 세포, 이동된 말초 혈액 줄기 세포, 골수 줄기 세포, 암 줄기 세포 및 신경 줄기 세포를 포함하는 군으로부터 선택된다.
- [0030] 다른 실시형태에 따르면, 세포의 집단은 21 내지 24시간의 기간 동안 Fas 리간드(FasL)를 이용해서 그리고 24 내지 48시간의 기간 동안 중앙 피사 인자 α (TNF- α)를 이용해서 인큐베이션된다.
- [0031] 다른 실시형태에 따르면, 상기 방법으로부터 회수된 세포들은 자가 이식, 동종이계 이식 또는 반일치(haploidentical) 이식을 위하여 이용된다.
- [0032] 다른 실시형태에 따르면, 상기 방법에서 회수된 세포들은 활성화-유도 세포사(AICD)에 불감성인 면역 세포를 더 포함한다. 또 다른 실시형태에 있어서, 활성화-유도 세포사(AICD)에 불감성인 면역 세포는 T 세포이다.
- [0033] 또 다른 양상에 따르면, 본 발명은 상기 디바이스 및 방법을 위한 또 다른 이용 방법을 개시한다. 이 방법은 전구-세포 이식물을 포함하는 조성물에서 악성 세포를 제거하기 위한 방법이다. 이 방법에서, 전구-세포 이식물을 포함하는 조성물이 제공되고 나서, 세포자멸사-유도 리간드와 접촉된다. 추가의 실시형태에 따르면, 접촉은 본 발명의 디바이스 내에서 일어난다.
- [0034] 다른 실시형태에 따르면, 조성물은 약 24시간의 기간 동안 세포자멸사-유도 리간드인 Fas 리간드(FasL)와 접촉된다.
- [0035] 다른 실시형태에 따르면, 전구-세포 이식물은 자가 이식물로서 이용된다.
- [0036] 다른 양상에 따르면, 본 발명은 상기 디바이스 및 방법을 위한 또 다른 이용 방법을 개시한다. 이 방법은 이식편 대 숙주 질환(GvHD)을 예방하면서 이식편 대 종양(GvT) 활성을 유지하는 방법이다. 이 방법에서, 세포 집단을 포함하는 샘플이 제공되고, 세포 집단은 HSPC 및 면역 세포를 포함한다. 집단은 세포자멸사-유도 리간드와 접촉되고, 나머지 세포는 회수되어 이식에 이용된다. 추가의 실시형태에 따르면, 접촉은 본 발명의 디바이스 내에서 일어난다.
- [0037] 다른 실시형태에 따르면, 조성물은 2 내지 16시간의 기간 동안 세포자멸사-유도 리간드 Fas 리간드(FasL)와 접촉된다.
- [0038] 본 발명의 추가의 실시형태, 특징, 이점 및 적용 가능한 전체 범주는 이하에 제공되는 도면 및 상세한 설명으로부터 명백해질 것이다. 그러나, 본 발명의 정신과 범위 내에서의 각종 변화와 변경이 이 상세한 설명으로부터 당업자에게 명백해질 것이므로, 본 발명의 바람직한 실시형태를 나타내는 상세한 설명은 단지 예로써 부여될 뿐임에 유의해야 한다.

도면의 간단한 설명

- [0039] 도 1. 시험관내에서 리셉터-매개 세포자멸사에 대한 UCB 세포의 민감도(sensitivity)를 도시한 한 세트의 그래

프이다. (a) UCB 세포의 신선한 샘플을 다양한 시간 기간 동안 케모카인 보충 없이 배지에서 배양하고(n=35), 50 ng/ml의 FasL 올리고머(n=21) 및 20 ng/ml의 TNF-알파(n=18)에 노출시켰다. 세포자멸사는 단핵 세포(mononuclear cell: MNC) 및 게이트된 CD34⁺ 전구체에서 아넥신(Annexin)-V 흡수로부터 구하였다. (b) 신선한 UCB 단핵 세포, 게이트된 CD34⁺ 전구체 및 단리된 계통-음성(lineage-negative: lin⁻) 전구체에서의 Fas 및 TNF 리셉터의 발현. (c) 세포자멸사는 동족 리간드의 영향 하에 Fas 및 TNF 리셉터를 발현하는 게이트된 CD34⁺ 전구체에서 시간 함수로서 측정하였다(n= 15-21). (d) 동족 리간드를 이용해서 인큐베이팅한 Fas 및 TNF 리셉터를 발현하는 MNC 및 게이트된 CD34⁺ 전구체의 증식 속도(n=6). 증식은 ModFit 소프트웨어를 이용해서 CFSE 희석액으로부터 측정하였다. (e) 신선한 UCB 샘플에서의 T 세포(CD3⁺), B 림프구(CD19⁺) 및 골수 세포(CD33⁺)에서의 Fas 및 TNF 리셉터의 발현(n=8-13). (f) FasL 및 TNF- α 에 48시간 동안 노출된, 단핵구/대식세포(CD14⁺)를 포함하는 계통-양성(lineage-positive) UCB 서브세트에서 아넥신-V 흡수로부터 구한 바와 같은 세포자멸사(n=6-14).

도 2. 도 2a는, UCB 전구체가 리셉터-매개 세포자멸사에 내성이 있는 것을 나타낸, 개략도이고, 그리고 도 2b 내지 도 2g는 그의 그래프이다. (a) NOD.CID 마우스들은 2회 용량의 25 μ g/g 부설판으로 처리하고, 상이한 조건 하에서 인큐베이팅된 동등한 수의 UCB 세포를 2일 후에 이식하였다. 인간 키메라 현상은 선택적 인간 및 쥐과 항-CD45 항체들을 이용해서 12주 후에 골수 내에서 측정하였다. (b) 동일한 UCB 단위로부터 신선한 UCB 세포, 그리고 배지 중, 50 ng/ml FasL 및 20 ng/ml TNF- α 를 이용한 24시간 인큐베이션 후의 생착. 데이터는 7가지 상이한 UCB 샘플을 나타낸다. (c) 동일한 UCB 단위로부터의 배지 중, FasL 및 TNF α 를 이용한 48시간 인큐베이션 후의 생착(6개 UCB 샘플을 나타냄). (d) 동일한 UCB 단위로부터의 배지 중, FasL 및 TNF α 를 이용한 72시간 동안의 인큐베이션은 생착을 감소시킨다(5개 UCB 샘플을 나타냄). (e) 배지 중, FasL 및 TNF- α 를 이용한 48시간의 인큐베이션 후의 단핵 세포(MNC), 게이트된 CD34⁺ 전구체 및 단리된 계통-음성(lin⁻) 전구체의 증식 속도(n=4-7). (f) 프로피듐 아이오다이드의 핵 혼입으로부터 결정된 바와 같은 G0/G1 세포 주기 상에 위치한 유사분열적-휴지 UCB 서브세트의 분획(n=5-8). (g) 5주 동안 중간엽 줄기세포층 위에 10³개의 UCB 세포를 평판 배양 후 측정하고 나서 반고형 메틸셀룰로스 배양액으로 이송하여 측정된 장기 배양 개시 세포(long-term culture initiating cell: LTC-IC) 빈도. FasL(50 ng/ml) 및 TNF- α (20 ng/ml)가 전체 배양 기간을 통하여 존재하였고, 배지의 절반의 교환에 의해 주 간격에서 리프레싱되었다(n=8-13). 데이터는 하나의 UCB 단위의 비교 배양 조건을 나타낸다.

도 3. 도 3b는, 사멸 리간드에 대한 UCB 세포의 노출이 시험관내 전구체의 빈도 및 생체내 골수 분화를 증대시키는 것을 나타낸, 개략도이고, 그리고 도 3a 내지 도 3c는 그의 그래프이다. (a) 신선한 UCB 세포들: 전구체(CD34), T 세포(CD3), B 림프구(CD19) 및 골수 세포(CD33)에서의 계통 마커(lineage marker)의 발현. 생세포(viable cell)의 조성물은 50 ng/ml FasL 및 20 ng/ml TNF- α 에 대한 노출과 함께 24 및 48시간 동안 인큐베이션 후에 변화하여, 전구체의 분획을 증가시킨다(n=17-31). (b) 가변 시간 기간 동안 인큐베이션 후, 죽은 세포가 피콜 구배(ficoll gradient)에 걸쳐서 원심 분리에 의해 제거되었고, 동등한 수의 생세포가 줄기 세포 인자(SCF), 인터류킨-3(IL-3) 및 과립구-대식세포 집락 자극인자(granulocyte-macrophage colony stimulating factor: GM-CSF)로 촉진된 반고체 메틸셀룰로스 배양액 중에서 평판배양되었다. 집락 형성 세포(colony forming cell: CFU, 10³개의 생세포당으로 표현됨)의 빈도는 14일 후에 결정되었다. (c) 신선한 UCB 샘플(대조군) 및 배지 중, FasL 및 TNF- α 를 이용한 인큐베이션 후의 상대적 CFU 빈도(n=12-27).

도 4. 도 4a는 UCB 세포 상의 사멸 리간드의 조합된 효과를 나타낸, 개략도이고, 그리고 도 4b 내지 도 4d는 그의 그래프이다. (a) Fas의 발현은 24시간 동안 20 ng/ml TNF- α 를 이용한 인큐베이션에 의해 촉진되었고, 이어서 세포는 50 ng/ml FasL을 이용한 채 그리고 이용하지 않은 채 추가로 24시간 동안 인큐베이팅되었다. (b) 각종 인큐베이션 조건 하에서 단핵 세포(MNC) 및 게이트된 CD34⁺ 전구체에서의 Fas 발현(n=6-9). (c) TNF- α 를 이용하고, 또한 FasL의 보충을 이용한 채 그리고 이용하지 않은 채 48시간의 인큐베이션 동안 Fas-양성 MNC, 게이트된 CD34⁺ 전구체 및 단리된 계통-음성(lin⁻) 전구체의 세포자멸사(n=5-12). (d) 각종 인큐베이션 후의 별크 세포 현탁액 중의 CFU 빈도는 피콜 상에서의 원심분리에 의해 죽은 세포를 제거한 후에 증가한다(n=7-15).

도 5. 도 5c는, 사멸 리간드가 UCB 세포의 생체의 확장 동안 전구체 빈도를 증가시키는 것을 나타낸, 개략도이고, 그리고 도 5a, 도 5b 및 도 5d는 그의 그래프이다. (a) CD34⁺ 전구체는 액체 배양액 중에서 3주 동안 임상적으로 승인된 프로토콜 하에 면역자기적으로 단리되고 확장되었다. CD34⁺ 전구체의 분획은 신선한 UCB 샘플과 비교해서 확장 동안 증가되었고, 제3 및 최종 주의 배양 동안 50 ng/ml FasL의 보충 시 더욱 증가되었다(n=4).

(b) 10^3 개의 총 세포에 대해 정규화된 3주 확장($n=4$) 후의 배양액 중의 $CD34^+$ 세포의 절대 개수. (c) 동등한 수의 신선한 및 확장된 UCB 세포(동일 샘플로부터)는 2회 용량의 25 $\mu\text{g/g}$ 부설판으로 처리된 NOD.SCID 마우스들($H2K^b$) 내로 이식되었다. (d) 인간 조혈 키메라 현상은 12주 후에 골수 및 비장 내에서 결정되었다. 데이터는 최종의 제3주 배양 동안 신선한 세포, 그리고 FasL을 이용한 것과 이용하지 않은 확장된 전구체와 비교해서 6개의 독립된 UCB 단위를 나타낸다.

도 6. 도 6a 내지 도 6f는 짧은 배양 동안 mPB 세포의 세포자멸사에 대한 민감도 및 사멸 리셉터의 발현을 도시한 그래프이다. 2 내지 7년 동안 저온 보존된 mPB 샘플을 해동시키고, 과잉량의 DMSO를 제거하고 나서, 세포를 50 ng/ml FasL 및 29 ng/ml $\text{TNF-}\alpha$ 를 이용한 채 그리고 이용하지 않은 채 4 및 16시간 동안 인큐베이팅하였다.

(a) 단핵(MNC) mPB 세포 및 게이트된 $CD34^+$ 전구체 내에서의 Fas 및 TNF 리셉터의 발현 ($n=7-11$). (b) 계통-양성 T 세포($CD3$), B 림프구($CD19$) 및 골수 세포($CD33$) 내에서의 Fas 및 TNF 리셉터 발현의 비교 분석($n=7-11$). (c) Fas 발현은 모든 서브세트에서 16시간의 배양 동안 실질적으로 감소한다($n=5-9$). (d) B 림프구($CD19$) 및 골수 세포($CD33$)에서 가장 우세한 배양 동안의 TNF-R2 의 상향 조절($n=7-11$). (e) 해동된 mPB 샘플을 FasL 및 $\text{TNF-}\alpha$ 를 이용한 채 그리고 이용하지 않은 채 4 및 16시간 동안 인큐베이팅하였다($n=5-11$). 세포자멸사는 아넥신-V 혼입으로부터 결정되었다. (f) 사멸 리간드를 이용한 채 그리고 이용하지 않은 채 4 및 16시간 동안 해동된 mPB의 인큐베이션 후 게이트된 $CD34^+$ 전구체 및 $CD3^+$ T 세포의 세포자멸사의 비교 속도.

도 7. 도 7a 내지 도 7d는 사멸 리간드가 저온 보존된 이동된 말초 혈액(mPB)의 이식에서 GvHD를 예방하는 것을 나타낸 그래프이다. (a) 2회 용량의 25 $\mu\text{g/g}$ 로 처리되고, 4시간 동안 배지 중, 50 ng/ml FasL 및 20 ng/ml $\text{TNF}\alpha$ 를 이용해서 배양된 1.5×10^7 개의 mPB 세포로 2일 후에 이식된 NOD.SCID 마우스들의 생존(각 군에서 $n=10$). (b) 인간 제노키메라 현상은 FasL을 이용한 사전 인큐베이션과 함께($n=10$) 혹은 사전 인큐베이션 없이($n=7$) 동일 mPB로부터 세포의 12주 이식 후의 골수에서 측정하였다. (c) 해동된 세포의 수용체에서의 3주 이식후($n=18$) 그리고 배지($n=12$) 중, FasL($n=9$) 및 $\text{TNF}\alpha$ ($n=10$)를 이용한 채 그리고 이용하지 않은 채 4시간 동안 인큐베이션 후의 체중. 12주의 실험 시점에서, 배지 중 그리고 FasL을 이용해서 인큐베이션된 세포를 이식한 마우스들은 다음에 대해서 평가되었다: (d) 정상(0) 및 비정상 (1) 파라미터에 따른 임상적 점수: 1. 피부 질환 및 탈모, 2. 쇠약, 3. 발바닥 과다각화증 및 4. 설사, 그리고 (e) 0-침윤 없음, 1-거의 침윤 없음, 2-패취 침윤, 3-확산 침윤, 4-조직 기반구조의 열화에 따라서 점수매긴 간 조직학.

도 8. 도 8b는, 사멸 리간드에 대한 노출이 항원 자극 및 이식편 대 종양 반응성을 훼손하지 않는 것을 나타낸, 개략도이고, 그리고 도 8a, 도 8c, 도 8d 및 도 8e는 그의 그래프이다. (a) 저온 보존된 mPB를 해동시키고, 50 ng/g FasL 및 20 ng/g $\text{TNF-}\alpha$ 를 이용해서 4 혹은 16시간 동안 인큐베이팅시켰다. 생세포 분획 내의 $CD34^+$ 전구체, T 세포($CD3^+$), B 림프구($CD19^+$) 및 골수 세포($CD33^+$)의 상대 분포는 세포자멸사에 대한 이들 서브세트의 가변적인 민감도를 나타낸다. (b) mPB 샘플은 사멸 리간드로 4 또는 16시간 동안 인큐베이팅시키고, 죽은 세포는 피클 상에서의 원심분리에 의해 제거하였으며, 동등한 수의 생세포는 반고형 메틸셀룰로스 배양액 중에서 평판 배양하였다. (c) 클론원성 활성(clonogenic activity)은 배지 중 그리고 50 ng/ml FasL 또는 20 ng/ml $\text{TNF-}\alpha$ 를 이용한 인큐베이션 후의 mPB 세포의 집락 형성 세포(CFU) 빈도로서 표현되었다(각 군에서 $n=7-11$). (d) 50 ng/g FasL로 4시간 동안 인큐베이팅된 mPB는 혼합 림프구 반응(MLR) 검정에서의 조사된 동종이계 mPB 자극제(stimulator)로 공동-인큐베이팅시켰다. 반응체(responder)의 증식은 CFSE 희석액으로부터 구하여, ModFit 소프트웨어를 이용해서 정량화하였다. (e) NOD.SCID 마우스들에게는 인간 결장암종 HT29를 피하 접종하고, 배지 중, 그리고 FasL을 이용해서 4시간 동안 사전 인큐베이팅된 3×10^7 개의 mPB 세포를 정맥 주입시켰다. (mm^3 = 길이 x 폭² x 0.4)에 따라 캘리포로 측정된 바와 같은 종양 성장 속도는, FasL에 대한 노출과 무관하게 mPB 세포의 주입에 의해 감소되었다.

도 9. 도 9a 및 도 9e는, 세포자멸사-민감성 세포의 이식전 고갈이 GvHD를 예방하는 것을 나타낸, 개략도이고, 그리고 도 9b 내지 도 9d 및 도 9f 내지 도 9h는 그의 그래프이다. (a 내지 d) 사전 감작된 GvHD 효과기의 FasL-매개 제거. (a) $H2K^b$ 마우스들은 3일 간격으로 10^7 개의 $H2K^d$ 비장세포로 2회 면역화시켰다. 두 번째 면역화 후 3일째에 비장세포(im $H2K^b$)는 24시간 동안 배지 중 그리고 50 ng/ml FasL을 이용해서 24시간 동안 인큐베이팅하였다. (b) $H2K^d$ -면역화된 $H2K^b$ 마우스로부터 수거된 비장세포는 배지 중($n=6$) 그리고 50 ng/ml FasL($n=5$)을

이용해서 24시간 동안 인큐베이팅하였다. 세포자멸사 및 사멸은 게이트된 $CD4^{+}$ 및 $CD8^{+}$ T 세포 서브세트에서 각각 아넥신-V 및 7-AAD 흡수로부터 측정되었다. (c) 면역화된 마우스로부터의 비장세포는 제3자 자극체($H2K^k$)에 비해서 조사된($3000rad$) 동종이계 자극체($H2K^d$)에 대한 증가된 반응을 보인다. 동종이계 반응은 24시간 동안 FasL을 이용한 인큐베이션에 의해 상당히 억제되는 한편, 제3자 자극에 대한 반응성을 유지한다. 증식 지수는 CFSE 희석액으로부터 결정되었다($n=5$ 개별적인 인큐베이션). (d) 면역화된 도너로부터의 생존 비장세포(1.5×10^6)는 배지 중 그리고 FasL을 이용한 생체의 인큐베이션 후 거의 치사량에 가깝게 조사된($650rad$) F1 수용체로 입양 전달되었다($H2K^b \rightarrow H2K^{b/d}$). 생존의 차이는 +7일째에 $10\mu g$ 리포다당류(LPS)의 투여에 의해 분극화되었다(각 군에서 $n=8$). (e 내지 h) 비자극 도너 비장세포의 FasL-매개 고갈. (e) 거의 치사량에 가깝게-조사된($650rad$) F1 수용체($H2K^{b/d}$)에는 배지 중 그리고 FasL을 이용해서 24시간 동안 사전 인큐베이팅한 반동종이계 비장세포($H2K^b$)를 주입하였다. (f) 게이트된 $CD4^{+}$ 및 $CD8^{+}$ T 세포 서브세트 내의 세포자멸사의 측정을 위하여, 비자극 비장세포를 배지 중($n=7$) 그리고 $50 ng/ml$ FasL을 이용해서($n=9$) 24시간 동안 인큐베이팅하였다. (g) FasL을 이용한 채 그리고 이용하지 않은 채 24시간 동안 인큐베이팅된 비자극 비장세포($H2K^b$)는 조사된 동종이계 자극체($H2K^d$)에 반응한다. (h) 비자극 도너로부터의 생존가능한 비장세포(1.5×10^6)는 배지 중($n=10$) 그리고 FasL을 이용한($n=10$) 생체의 인큐베이션 후에 거의 치사량에 가깝게 조사된($650rad$) F1 수용체 내로 입양 전달된다($H2K^b \rightarrow H2K^{b/d}$). 마우스들은 +7일에 $10\mu g$ LPS(정맥내)로 시험되었다.

도 10. 도 10a 내지 도 10e는 비자극 비장세포의 Fas-매개 고갈이 반일치 및 동종이계 면역 세포의 GvHD 활성을 감소시키는 것을 나타낸 그래프이다. 거의 치사량에 가깝게-조사된($650rad$) F1 수용체($H2K^{b/d}$)에 배지 중 그리고 FasL을 이용해서 24시간 동안 사전 인큐베이팅된 각종 수(1.5 내지 4.5×10^6)의 반동종이계 비장세포를 주입하였다. (a) FasL을 이용한 채 그리고 이용하지 않은 채 인큐베이팅한 비장세포의 수용체는 정상(0) 및 비정상(1) 파라미터: 1. 피부 질환 및 탈모, 2. 쇠약, 3. 발바닥 과다각화증 및 4. 설사에 따라서 임상적으로 점수 매겨졌다. (b) FasL을 이용한 채 그리고 이용하지 않은 채 인큐베이팅한 각종 수의 도너 비장세포의 수용체의 중량 감소(각 군에서 $n=5$ 내지 10). (C 내지 D) 3×10^6 개의 비장세포의 반일치 이식물은 FasL을 이용한 채 그리고 이용하지 않은 채 24시간 동안 인큐베이션 후의 동종이계 이식물($H2K^b \rightarrow H2K^d$)과 비교되었다(각 군에서 $n=6-10$). 임상적 점수(c) 및 중량 감소(d)는 1주 후에 측정되었다. (e) T 및 B 림프구의 비장 내용물은 조사 후에 제1주 동안 점차로 감소된다(각 군에서 $n=5$). 리포다당류(LPS) 시험의 생존 동물들은 이들 서브세트(LPS 주입 후 2일)의 현저한 자극을 나타내며, 이것은 FasL을 이용한 비자극 비장세포의 전처리에 의해 둔감해진다($n=7$).

도 11. 도 11c는, Fas 가교결합이 NOD.SCID 마우스들에서의 GvHD를 개선하는 것을 나타낸, 개략도이고, 그리고 도 11a, 도 11b 및 도 11d 내지 도 11f는 그의 그래프이다. (a) 배지 중 및 $50 ng/ml$ FasL을 이용해서 인큐베이팅한 비장세포는 가변적인 수준의 자발적(밝은 색 막대) 및 Fas-매개 세포자멸사(흑색 막대)를 나타낸다. 세포자멸사는 24 및 48시간의 인큐베이션 후의 게이트된 $CD4^{+}$ 및 $CD8^{+}$ T 세포 서브세트에 대한 아넥신-V 흡수에 의해 측정되었다($n=7-9$). (b) 배지 중 그리고 FasL을 이용한 48시간의 인큐베이션 전후에 생존 $CD4^{+}$ 및 $CD8^{+}$ T 세포, $CD4^{+}CD25^{+}$ 조절 T 세포 및 B 림프구($B220^{+}$)의 분획 분포. (c) 배지 중 그리고 $50 ng/ml$ FasL을 이용해서 인큐베이팅된 C57BL/6 도너로부터의 비장세포는 동종이계 NOD.SCID 마우스들($H2K^b \rightarrow H2K^{k7}$)에게 주입하였고: 3×10^6 및 10^7 개의 나이브(naive) 비장세포는 각각 24 및 48시간 동안 사전 인큐베이팅하였다. (d) 대조군 배지($n=9$) 중 그리고 $50 ng/ml$ FasL($n=10$)을 이용해서 사전 인큐베이팅된 비장세포가 주입된 NOD.SCID 마우스들의 생존율. 치명적인 GvHD는 $10\mu g$ LPS의 정맥내 주입에 의해 촉발되었다. 마우스들은 항문 출혈(gastrointestinal involvement: GI)(e) 및 중량 감소(f)의 발생에 따른 임상적 점수에 대해서 3주 후에 평가되었다.

도 12. 도 12a는, 반일치 골수 이식물에서 Fas-민감성 나이브 면역 세포의 제거를 나타낸, 개략도, 도 12b 및 도 12c는 그의 그래프, 그리고 도 12d는 그의 사진 및 그래프이다. (a) $850rad$ 에서 조사된 F1 수용체($H2K^{b/d}$)에는 5×10^6 개의 BMC($H2K^b$, $CD45.1$) 및 각종 수의 도너 비장세포($H2K^b$, $CD45.2$, GFP)를 이식하였다. 배지 중 그리고 FasL을 이용해서 48시간 동안 인큐베이팅된 비장세포의 수용체는(각 군에서 $n=8$) 이식후 3주에 항문 출혈(GI)의 발생에 따른 임상적 점수(b) 및 중량 감소(c)에 대해서 평가되었다. (d) 3주 이식후, 마우스들은 배지 중 그리고

고 FasL을 이용해서 인큐베이팅된 3×10^6 개의 비장세포의 수용체에서 피부 및 간의 조직학적 평가를 위하여 희생시켰다($n=5$): 0-침윤 없음, 1-거의 침윤 없음, 2-폐쇄 침윤, 3-확산 침윤, 4-조직 기반구조의 열화.

도 13. 도 13a는, 반일치 골수 이식에서 Fas-민감성 나이브 면역 세포의 선택적 고갈 후의 면역 재구성을 나타낸, 그래프 및 FACS 스캔, 도 13b 및 도 13d는 그의 FACS 스캔, 그리고 도 13c는 그의 그래프이다. (a) 850rad에서 조사된 F1 수용체($H2K^{b/d}$)에는 5×10^6 개의 BMC($H2K^b$, CD45.1) 및 각종 수의 도너 비장세포($H2K^b$, CD45.2, GFP)를 이식하였다. 도너($H2K^b$) 및 숙주($H2K^{b/d}$) 키메라 현상은 이식 후 3주에 말초 혈액에서 결정되었다($n=5$). 마우스들은 이하를 결정하기 위하여 이식 후 3주에 희생시켰다: (b) 비장 재구성에 대한 주된 기여는 이 시점에서 존재하고 있는 주입된 소수의 비장세포(CD45.2, GFP^+)를 지니는 골수(CD45.1, GFP^-)로부터 기인된다. 데이터는 5개의 독립적인 측정치를 나타낸다. (c) MLR 검정에서의 제3자($H2K^k$) 조사된 자극체에 대한 반응(1:3 반응체:자극체 비에서). 증식은 배지 중 그리고 FasL을 이용하여 인큐베이팅된 비자극 비장세포의 수용체에서 CFSE 희석액으로부터 결정하였다($n=4$). (d) 거의 치사량에 가깝게 조사된(650rad) 야생형 수용체 내로 이식 후 24시간째에 장간막 림프절 내의 GFP^+ 도너 비장세포. 데이터는 4개의 독립적인 측정치를 나타낸다.

도 14. 도 14a, 도 14c 및 도 14e는, 비자극 림프구의 FasL-매개 고갈이 조혈 세포 생착을 지지하는 것을 나타낸, 개략도, 그리고 도 14b, 도 14d 및 도 14f는 그의 그래프. (a) 전체 골수 세포(wBMC)는 50 ng/ml FasL을 이용한 채 그리고 이용하지 않은 채 24시간 동안 인큐베이팅하고, 2×10^6 개의 세포를 거의 치사량에 가깝게 조사된(800rad) 동종이계 숙주에 이식하였다($H2K^d \rightarrow H2K^b$). (b) 3주에서의 말초 혈액 키메라 현상은 FasL($n=6$)을 이용한 사전 인큐베이션에 의해 영향받지 않았다. (c) 10^6 개의 계통-음성 BMC($n=7$)의 조사된(800rad) 동종이계 숙주 내로의 이식은($H2K^d \rightarrow H2K^b$) 배지 중($n=5$) 그리고 FasL($n=6$)을 이용해서 24시간 동안 사전 인큐베이션 후 GVHD 활성이 없는 F1 도너($H2K^{b/d}$)로부터의 10^6 개의 비장세포로 보충되었다. (d) 비장세포의 첨가는 FasL에 대한 노출에 관계 없이 조혈 세포 생착을 향상시켰다. (e) 혼합된 키메라 현상은 750rad에서 조사된 동종이계 수용체 내로 5×10^5 개의 lin^- BMC의 이식($H2K^d \rightarrow H2K^b$)에 의해 유발되었다(대조군, $n=6$). 10일 후, 마우스들에게는 동종이계($H2K^d$) 10^6 개의 림프구를 주입하였다(DLI). (f) 도너 키메라 현상의 수준은, 림프구 주입을 실시하지 않은 마우스들(대조군)과 비교해서, 배지 중 그리고 FasL을 이용해서 24시간 동안 DLI를 사전 인큐베이팅한 후 3주에 증가하였다($n=6$).

도 15. 도 15A, 도 15C, 도 15E 및 도 15G는, FasL-고갈된 비자극 림프구의 이식이 이식된 대 숙주 활성을 유지하는 것을 나타낸, 개략도이고, 그리고 도 15B, 도 15D, 도 15F 및 도 15H는 그의 그래프이다. (A) 피하 동종이계($H2K^d$) CT26 결장암종 종양을 보유하는 NOD.SCID 마우스들($H2K^{g7}$)에게는 5주령의 숙주-정합된 NOD 도너($H2K^{g7}$)로부터 1.5×10^7 개의 비장세포를 (종양 이식 후 1일에) 주입하였다. (B) 림프구의 주입은, 배지 중 그리고 FasL($n=8$)을 이용한 24시간 동안의 사전 인큐베이션에 관계 없이 OD.SCID 마우스들($n=10$)에서의 종양 성장을 억제하였다. (C) MHC-정합된 피하 신경모세포종(Neuro-2a, $H2K^a$) 종양을 보유하는 $H2K^a$ 마우스들에게 거의 치사량에 가깝게 조사하고(750rad), 동종이계 도너($H2K^b$)로부터 2×10^6 개의 계통-음성 골수 세포를 이식하였다. (D) GVHD 활성이 없는 F1 도너($H2K^{b/d}$)로부터의 림프구의 주입은, 종양 성장에 유의한 영향을 미치지 않았다($n=17$). 배지 중에서 24시간 동안 인큐베이팅된 동종이계 비장세포($H2K^b$)의 주입은 종양 성장 속도를 감소시켰지만($n=10$), 중증의 GVHD 때문에 3주 내에 마우스들의 80%가 죽었다. FasL로 사전 인큐베이팅된 비장세포의 주입은 종양 성장을 동등하게 저감시켰지만 모든 마우스들이 살아 있었다($n=11$). (E) 거의 치사량에 가깝게 조사된(750rad) BALB/c 마우스들에게 5×10^6 개의 동계(syngeneic)($H2K^d$) 골수 세포와 2×10^5 개의 A20 림프모구종 세포($H2K^d$)의 혼합물을 주입하였다. 세포 혼합물을 배지 중 그리고 FasL을 이용해서 24시간 동안 사전 인큐베이팅하였다. (F) 배지 중에서 인큐베이팅된 골수 및 A20 세포의 수용체는 치명적인 결과를 지니는 파종성 종양을 전개시킨 반면($n=10$), FasL로 사전 인큐베이팅한 세포의 수용체는 생존하였다($n=10$). (G) 650rad에서 조사된 면역손상된(immunocompromized) NOD.SCID 마우스들($H2K^{g7}$)에게, 배지 중 그리고 50 ng/ml FasL 단백질을 이용한 48시간의 인큐베이션 후에 동계 NOD 도너($H2K^{g7}$)로부터 5×10^7 개의 골수 세포를 입양 전달하였다. 고혈당증은 200 mg/ μ l를 초과하는 절식 혈당 수준의 두 측정 후에 고려되었다. (H) 배지 중 그리고 FasL 단백질을 이용해서 사전 인큐베

이팅된 전체 골수 세포의 입양 전달(adoptive transfer) 후의 고혈당증의 전개(n=10).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0040] 일 실시형태에 있어서, 본 발명은 세포자멸사-신호전달 내성 세포를 선택하기 위한 디바이스를 개시한다. 다른 실시형태에 있어서, 세포자멸사-신호전달 내성 세포는 줄기-세포, 전구 세포 및 면역 세포를 포함하는 군으로부터 선택된다. 다른 실시형태에 있어서, 본 발명의 면역 세포는 T-세포의 서브세트이다. 다른 실시형태에 있어서, 본 발명의 세포는 조혈 세포이다. 다른 실시형태에 있어서, 본 발명의 세포는 표면 표현형, 예컨대 CD34+에 기초하여 동정된다. 다른 실시형태에 있어서, 세포자멸사-신호전달 내성 세포는 본 발명의 세포이다.
- [0041] 다른 실시형태에 있어서, 세포자멸사-신호전달 내성 세포는 TNF-알파에 대해 내성이 있다. 다른 실시형태에 있어서, 세포자멸사-신호전달 내성 세포는 Fas 리간드에 대해 내성이 있다. 다른 실시형태에 있어서, 세포자멸사-신호전달 내성 세포는 TRAIL에 대해 내성이 있다. 다른 실시형태에 있어서, 세포자멸사-신호전달 내성 세포는 Tweak에 대해 내성이 있다. 다른 실시형태에 있어서, 세포자멸사-신호전달 내성 세포는 TNF-알파, Fas 리간드, TRAIL, Tweak, 또는 이들의 임의의 조합에 대해 내성이 있다.
- [0042] 다른 실시형태에 있어서, 본 발명은 줄기 세포 또는 "줄기세포능"(stemness)의 동정을 위한 세포 염색 방법과 연관된 장애품 및 부정확성을 극복하는 방법 및 디바이스를 제공한다. 다른 실시형태에 있어서, 종래 기술은 전형적으로 줄기 세포의 동정을 위한 방법을 제공하되, 여기서 본 발명은 배양물로부터 줄기 세포를 선택하는 수단을 제공하며, 이때 배양물은 비-줄기 세포들을 포함하는 각종 세포 유형을 포함한다. 다른 실시형태에 있어서, 선택은 1단계로 수행된다.
- [0043] 본 발명의 적어도 일 실시형태를 상세하게 설명하기 전에, 본 발명은 이하의 설명에 기재되거나 실시예에 의해 예시된 상세에 대한 그의 적용에 있어서 제한되는 것이 아님을 이해해야 한다. 본 발명은 다른 실시형태일 수 있거나, 또는 각종 방식으로 실행되거나 수행될 수 있다. 또한, 본 명세서에서 이용되는 어법 및 용어는 설명의 목적을 위한 것이며 제한으로서 간주되어서는 안됨을 이해해야 한다.
- [0044] 다른 실시형태에 있어서, 본 발명의 디바이스는 용기를 포함하되, 이 용기의 내부 표면에는 세포자멸사-유도 리간드가 고정되어 있다. 다른 실시형태에 있어서, 본 발명의 디바이스는 용기를 포함하되, 이 용기 내에 도입된 비즈의 표면에 세포자멸사-유도 리간드가 고정되어 있다. 다른 실시형태에 있어서, 본 발명의 디바이스는 용기를 포함하되, 이 디바이스 내에 수용된 비즈의 표면에는 세포자멸사-유도 리간드가 고정되어 있다. 다른 실시형태에 있어서, 본 발명의 디바이스는 단일 단계를 이용해서 줄기-세포를 선택하는데 이용된다. 다른 실시형태에 있어서, 단일 단계는 용기 내에 있는 이종 세포 집단의 인큐베이션을 포함한다. 다른 실시형태에 있어서, 인큐베이션은 본 명세서에서 제공된 바와 같은 세포자멸적 리간드에 세포 집단을 노출시킨다. 다른 실시형태에 있어서, 인큐베이션은 줄기-세포 등과 같은 세포자멸사-내성 세포의 생존과, 세포자멸사-민감성 세포 유형의 세포자멸적 사멸을 초래한다.
- [0045] 다른 실시형태에 있어서, 세포자멸사-내성 세포(줄기 세포 등)의 선택된 집단은 암, 면역 질환, 화학요법-내성 암, 또는 선천적 혹은 후천적 면역결핍 등(단 이들로 제한되지 않음)과 같은 질환을 치료하는 과정에서 이식을 위하여 이용된다. 다른 실시형태에 있어서, 당업자라면 본 발명의 세포자멸사 내성 세포의 사용을 용이하게 결정할 수 있다.
- [0046] 다른 실시형태에 있어서, 용기는 적어도 1종의 생체적합성 물질로 구성되어 있다. 다른 실시형태에 있어서, 생체적합성 물질은 폴리프로필렌, 폴리스타이렌, 실리콘, 폴리염화비닐 또는 이들의 조합물을 포함하지만 이들로 제한되는 것은 아니다. 다른 실시형태에 있어서, 생체적합성 물질은 그의 내부 표면 상에 세포자멸사-유도 리간드의 고정화를 용이하게 하는 능력 혹은 내구성 또는 투명성 등(단, 이들로 제한되지 않음)과 같은 파라미터에 따라서 선택된다. 다른 실시형태에 있어서, 생체적합성 물질은 그 요법의 수혜자 혹은 수용체에서 임의의 바람직하지 않은 국소 혹은 전신 효과를 유도해내지만, 그 특이적 상황에서 가장 적절한 유익한 세포 혹은 조직 반응을 일으키고, 그 요법의 임상적으로 관련된 성능을 최적화하는 것에 관하여 비활성이다(생체적합성 물질은 미국 특허 제5,998,024호, 미국 특허 제6,526,984호 및 미국 특허 제4,979,959호에 예시되어 있다). 다른 실시형태에 있어서, 생체적합성 물질은 본 발명의 세포자멸사 내성 세포의 생존을 촉진하는 적어도 1층으로 코팅된 소수성 중합체를 포함한다.
- [0047] 다른 실시형태에 있어서, 용기는 백이다. 다른 실시형태에 있어서, 용기는 칼럼이다. 다른 실시형태에 있어서, 용기는 튜브이다. 다른 실시형태에 있어서, 용기는 병이다. 다른 실시형태에 있어서, 용기는 바이알이다. 다른 실시형태에 있어서, 용기는 플라스크이다. 다른 실시형태에 있어서, 용기는 당업계에 공지되고 디바이스의 특수

한 의도된 용도에 적합한 임의의 기타 저장소(receptacle)이다.

- [0048] 일 실시형태에 따르면, 디바이스는, 세포-집단이 내부에 도입되는 단일 용기로 구성된다. 다른 실시형태에 있어서, 용기는 세포 지스리기 및 단백질로부터 전체 세포를 분리하는데 적합한 필터 장치에 의해 분리된 2개의 연동 챔버(interlocking chamber)를 포함한다. 다른 실시형태에 있어서, 세포-집단은 하나의 챔버 내로 도입되고, 그 챔버 내에서 인큐베이션되고, 인큐베이션 후에, 그 용액 중의 선택된 세포를 세포 지스리기 및 단백질로부터 분리시키기 위하여 필터가 이용될 수 있다.
- [0049] 다른 실시형태에 따르면, 용기는 세포-집단이 내부에 도입되는 칼럼의 형태이며, 이는 전체 세포, 또는 구체적으로는 줄기 세포의 해당 칼럼에의 부착을 허용한다. 다른 실시형태에 있어서, 인큐베이션 후에, 나머지 세포 지스리기와 단백질은 폐기되고, 선택된 세포는 칼럼으로부터 분리된다. 이러한 칼럼의 이용은, 미국 특허 제 5,098,842호 및 특허 출원 제US 2011/0256581호에 예시되어 있다.
- [0050] 다른 실시형태에 있어서, 종양 괴사 인자(TNF) 계열의 구성원은 세포자멸사 내성 세포를 선택하기 위한 세포자멸사 유도제로서 이용된다. 다른 실시형태에 있어서, 본 발명에 따라 이용되는 TNF-계열 세포자멸사-유도 리간드는 TNF- α , FasL, Trail(Apo2 리간드) 또는 Tweak(Apo3 리간드)이다. 다른 실시형태에 있어서, 세포자멸사촉진제(pro-apoptotic agent)는 재조합 단백질이다.
- [0051] 다른 실시형태에 있어서, 생물학적으로 활성인 세포자멸사 유도 리간드는 용기의 내부 표면에 고정되면서 그의 세포자멸사 유도 활성이 활성 상태인 리간드이다. 다른 실시형태에 있어서, 생물학적으로 활성인 세포자멸사 유도 리간드는 각각의 리셉터를 결합하면서 세포자멸사를 그의 고정 형태로 유지할 수 있는 활성 부분을 적어도 포함하는 TNF- α , FasL, Trail 및 Tweak 중 어느 하나이다.
- [0052] 다른 실시형태에 있어서, 세포자멸사 유도 리간드는 포유류 공급원으로부터 유래된다. 다른 실시형태에 있어서, 세포자멸사 유도 리간드는 인간 세포자멸사 유도 리간드이다. 다른 실시형태에 있어서, 세포자멸사 유도 리간드는 설치류 세포자멸사 유도 리간드이다.
- [0053] 다른 실시형태에 따르면, 생물학적으로 활성인 세포자멸사-유도 리간드는 용기의 내부 표면에 고정된다. 다른 실시형태에 있어서, 생물학적으로 활성인 세포자멸사-유도 리간드는 용기 내의 비즈에 고정된다. 다른 실시형태에 있어서, 생물학적으로 활성인 세포자멸사-유도 리간드는 용기 내에 수용된 세포와 리간드의 자유 상호작용을 허용하는 방식으로 고정된다.
- [0054] 단백질을 표면에 고정시키는 많은 방법이 당해 기술분야에서 공지되어 있다. 대부분의 고정 방법은 단백질의 결합을 위하여 표면 특성을 변화시키거나 작용기를 제공하도록 표면을 적절한 물질로 변성(혹은 수식)시키거나 코팅하는 것을 포함한다. 한편, 어떠한 변성도 없는 맨 표면 상에 단백질의 고정화는 특정 표면에 특이적인 친화도 펩타이드를 이용하는 것을 필요로 한다. 다른 실시형태에 있어서, 고정화는 본 발명의 세포자멸사 유도 리간드와 화합가능한 킬레이터를 이용함으로써 달성된다. 다른 실시형태에 있어서, 당업자라면 적절한 킬레이터를 용이하게 동정할 수 있다. 다른 실시형태에 있어서, 킬레이터는 본 발명의 세포자멸사 유도 리간드와 화합가능하고 또한 그의 생물학적 활성을 유지한다. 다른 실시형태에 있어서, 킬레이터는 본 발명의 세포자멸사 유도 리간드와 화합가능하고 또한 그의 생물학적 활성을 촉진시킨다.
- [0055] 다른 실시형태에 있어서, 세포자멸사-유도 리간드의 고정화는 물리적 흡착, His-6과 Ni^{+} 이온 간의 상호작용, 이형이량체 류 지퍼 쌍(heterodimeric Leu zipper pair)의 이중나선 결합(coiled coil association), SH-기의 화학흡착, 알데하이드기와 아미노기 간의 슈프 염기 결합, TGase의 아실 전이 반응, 스트랩타비딘-바이오틴 간의 친화도, FLAG와 항-FLAG 항체 간의 친화도, 글루타타온과 GST 간의 친화도 또는 PS-친화도 펩타이드에 융합된 단백질의 친수성 폴리스타이렌에의 결합에 의해 달성된다(고정화를 위한 각종 방법은 미국 특허 제6,040,182호, 미국 특허 제4,885,234호, 특허 출원 제US 2010/0209945호 및 특허 출원 제US 2006/0009623호에 예시되어 있다).
- [0056] 다른 실시형태에 있어서, 세포자멸사 유도 리간드는 전체 단백질의 유도체 혹은 유사체이다. 다른 실시형태에 있어서, 세포자멸사 유도 리간드는 작은 유기 분자이다. 다른 실시형태에 있어서, 세포자멸사 유도 리간드는 전체 단백질의 변이체, 유도체, 변형체 혹은 절두체이다. 다른 실시형태에 있어서, FasL은 서열번호 1에 기재된 바와 같은 인간 FasL이다. 다른 실시형태에 있어서, 본 발명의 인간 TNF- α 는 서열번호 2를 포함한다. 다른 실시형태에 있어서, 본 발명의 인간 Trail은 서열번호 3을 포함한다. 다른 실시형태에 있어서, 본 발명의 인간 Tweak은 서열번호 4를 포함한다.

- [0057] 본 명세서에 개시된 단백질은 재조합 혹은 화학적 합성법에 의해 생산될 수 있다.
- [0058] 다른 실시형태에 있어서, 본 명세서에서는 이중 세포 집단으로부터 세포자멸사-내성 세포를 선택하는 방법이 제공되되, 여기서 이중 집단은 세포자멸사-신호전달 내성 세포와 세포자멸사-신호전달 민감성 세포를 포함한다. 다른 실시형태에 있어서, 상기 방법은 디바이스 내로 이중 세포 집단을 도입하는 단계 및 그 안에서 인큐베이션시키는 단계로 이루어진다. 다른 실시형태에 있어서, 상기 방법은 디바이스 내로 이중 세포 집단을 도입하는 단계 및 그 안에서 인큐베이션시키는 단계를 포함한다.
- [0059] 다른 실시형태에 있어서, 본 명세서에서 이용되는 바와 같은 "선택하는"이란 용어는 이중 세포 집단 중에서 선택된 세포만이 살아있는 방법을 지칭한다. 다른 실시형태에 있어서, 살아있는 세포는 세포자멸사-신호전달 내성 세포이다.
- [0060] 다른 실시형태에 있어서, 세포자멸사-신호전달 내성 세포는 줄기 세포이다. 다른 실시형태에 있어서, 세포자멸사-신호전달 내성 세포는 활성화-유도 세포사(AICD)에 불감성인 면역 세포이다. 다른 실시형태에 있어서, 세포자멸사-신호전달 내성 세포는 전구 세포이다. 다른 실시형태에 있어서, 세포자멸사-신호전달 내성 세포는 줄기 세포, 활성화-유도 세포사(AICD)에 불감성인 면역 세포, 전구 세포 또는 이들의 임의의 조합이다.
- [0061] 다른 실시형태에 있어서, 줄기 세포는 제대혈 줄기 세포이다. 다른 실시형태에 있어서, 줄기 세포는 이동된 말초 혈액 줄기 세포이다. 다른 실시형태에 있어서, 줄기 세포는 골수 줄기 세포이다. 다른 실시형태에 있어서, 줄기 세포는 암 줄기 세포이다. 다른 실시형태에 있어서, 줄기 세포는 신경 줄기 세포이다. 다른 실시형태에 있어서, 줄기 세포는 제대혈 줄기 세포, 이동된 말초 혈액 줄기 세포, 골수 줄기 세포, 암 줄기 세포, 신경 줄기 세포 또는 이들의 조합이다.
- [0062] 다른 실시형태에 있어서, 본 명세서에서 이용되는 바와 같은 "활성화-유도 세포사(AICD)에 불감성인 면역 세포"는 활성화 시 세포자멸사를 받지 않는 면역계의 세포를 지칭한다. 다른 실시형태에 있어서, 활성화-유도 세포사(AICD)에 불감성인 면역 세포는 비활성화된 T 세포이다.
- [0063] 치료 목적을 위하여 줄기-세포를 수거하는 것은, 자가 또는 donor로부터의 줄기-세포를 포함하는 조직의 추출에 이어서, 줄기-세포와 함께 공동-이식될 경우 유해한 효과를 지닐 수도 있는 다른 세포 집단으로부터 줄기-세포를 분리시키는 것을 필요로 한다.
- [0064] 다른 실시형태에 있어서, "세포자멸사 내성"이란 어구는 "리셉터-매개 세포자멸사 내성"이다. 다른 실시형태에 있어서, 본 발명의 세포-선택 방법은 리셉터-매개 세포자멸사에 내성이 있는 세포 유형에 대한 단일-단계 음성 선택 방법이다. 다른 실시형태에 있어서, 본 발명의 방법은, 이하에 예시된 바와 같이, 디바이스의 단일 이용을 통해서, 이식의 임상적 성과를 뒷받침하는 면역-세포와 줄기 세포 둘 모두의 병행 단리를 가능하게 한다.
- [0065] 다른 실시형태에 따르면, 본 발명의 방법에서 이용될 수 있는 세포 집단은, 골수, 제대혈(UCB) 및 전구 세포 이동된 말초 혈액(mPB)(단, 이들로 제한되지 않음)으로부터 유래된다. 그러나, 세포 집단이 세포자멸사-내성 세포를 포함하는 기타 성체 조직으로부터도 유래될 수 있다는 것은 당업자에게 명백하다. 다른 실시형태에 있어서, 세포 집단은 배아 조직으로부터 유래된다.
- [0066] 다른 실시형태에 있어서, 이중 세포 집단은 장기 혹은 조직으로부터 유래된다. 다른 실시형태에 있어서, 이중 세포 집단은 배아로부터 유래된다. 다른 실시형태에 있어서, 이중 세포 집단은 배아 세포, 줄기 세포, 면역 세포, 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 조직으로부터 유래된다. 다른 실시형태에 있어서, 이중 세포 집단은 골수로부터 유래된다. 다른 실시형태에 있어서, 이중 세포 집단은 골수 간질로부터의 기계적 제거에 의해, 흡인에 의해, 또는 분자 앵커(molecular anchor)의 활성화 및 파괴를 통한 말초 혈액(mPB) 내로의 이동 후의 성분채집술에 의해 유래된다. 다른 실시형태에 있어서, 이중 세포 집단은 말초-혈액으로부터 유래된다.
- [0067] 다른 실시형태에 있어서, 줄기 세포는 세포의 이중 집단으로부터 선택된다. 다른 실시형태에 있어서, 본 명세서에서 이용되는 바와 같은 "세포의 이중 집단"이란 어구는 위에서 정의된 바와 같은 줄기 세포와 적어도 1개의 세포자멸사-민감성 세포의 혼합물을 지칭한다. 다른 실시형태에 있어서, 세포의 이중 집단은 임의의 유기체로부터 유래된다. 다른 실시형태에 있어서, 세포의 이중 집단은 포유류 공급원으로부터 유래된다. 다른 실시형태에 있어서, 세포의 이중 집단은 인간 공급원으로부터 유래된다.
- [0068] 다른 실시형태에 있어서, 세포의 이중 집단은 계통 양성 세포와 줄기 세포의 혼합물을 포함한다. 다른 실시형태에 있어서, 본 명세서에서 이용되는 바와 같은 "계열 양성 세포"란 성숙한 세포 계통 마커를 발현하는 세포를 지칭한다. 다른 실시형태에 있어서, 성숙한 세포 계통 마커는 분화 무리(Cluster of Differentiation: CD) 단백질

질이다.

- [0069] 다른 실시형태에 있어서, 본 발명의 상기 방법은 계통 고갈을 수행하는데 이용된다.
- [0070] 다른 실시형태에 있어서, 세포의 이중 집단은 조직 혹은 그의 부분이다. 다른 실시형태에 있어서, 세포의 이중 집단은 세포 집괴(cell aggregate)이다. 다른 실시형태에 있어서, 세포의 이중 집단은 단일 세포 현탁액이다. 다른 실시형태에 있어서, 세포의 이중 집단은 일차 배양물이다. 다른 실시형태에 있어서, 세포의 이중 집단은 세포 샘플이다. 다른 실시형태에 있어서, 세포의 이중 집단은 본 발명의 세포자멸사 촉진제에 접근가능한 개미 집단이다.
- [0071] 다른 실시형태에 따르면, 디바이스 내에서의 인큐베이션은 2시간 내지 72시간 지속된다. 다른 실시형태에 있어서, 디바이스 내에서의 인큐베이션은 2시간 내지 4시간 지속된다. 다른 실시형태에 있어서, 디바이스 내에서의 인큐베이션은 4시간 내지 10시간 지속된다. 다른 실시형태에 있어서, 디바이스 내에서의 인큐베이션은 10시간 내지 24시간 지속된다. 다른 실시형태에 있어서, 디바이스 내에서의 인큐베이션은 12시간 내지 36시간 지속된다. 다른 실시형태에 있어서, 디바이스 내에서의 인큐베이션은 24시간 내지 48시간 지속된다. 다른 실시형태에 있어서, 디바이스 내에서의 인큐베이션은 36시간 내지 72시간 지속된다. 다른 실시형태에 있어서, 디바이스 내에서의 인큐베이션은 48시간 내지 72시간 지속된다.
- [0072] 예기치 않게, 본 발명자들은 세포자멸사-유도 리간드들의 상이한 조합에 의한 상이한 인큐베이션 시간이 기능적으로 특유한 임상적 성과를 가져올 수 있는 것을 발견하였다. 따라서, 인큐베이션 시간은, 이하에 예시된 바와 같이, 구체적인 용도에 따른다.
- [0073] 다른 실시형태에 따르면, 본 발명은 세포 선택 키트를 개시한다. 다른 실시형태에 있어서, 키트는 세포자멸사-유도 리간드의 건실성 및 활성을 유지하기 위한 용액을 더 포함하는 본 발명의 디바이스를 포함한다. 다른 실시형태에 있어서, 키트는 본 발명의 방법에 따라서 세포 선택을 수행하기 위한 설명서를 구비한 삽입물을 더 포함한다. 다른 실시형태에 있어서, 세포자멸사-유도 리간드의 건실성 및 활성을 유지하는 용액은 용액이다. 다른 실시형태에 있어서, 이 용액은 세포자멸사-유도 리간드의 활성을 가능하게 하면서 그들의 건실성과 구조를 유지하는 완충액 또는 배지이다. 다른 실시형태에 있어서, 이 용액의 구성성분은 이용된 세포자멸사-유도 리간드에 따라 달라진다. 다른 실시형태에 있어서, 이 용액은 프로테아제 저해제를 포함한다. 다른 실시형태에 있어서, 프로테아제 저해제는 페닐메틸설포닐 플루오라이드, 벤즈아미디느, 펩스타틴 A, 류펩틴, 아프로티닌, 안티페인(Antipain), EDTA, EGTA 또는 이들의 임의의 조합(단, 이들로 제한되지 않음)으로부터 선택된다. 다른 실시형태에 있어서, 용액은 트리스(TRIS) 완충액 또는 글라이신-NaOH(단, 이들로 제한되지 않음)로부터 선택된 완충액 시스템을 포함한다(단백질의 안정성 및 활성을 위한 완충액 선택에 영향을 미치는 상이한 조건은 문헌[Uguw S.O. and Apte S.P., *Pharmaceutical Technology*:2004;March: 86-113]에 예시되어 있다).
- [0074] 다른 실시형태에 있어서, 상기 용액은 세포 생존, 세포 성장, 세포 증식, 또는 이들의 임의의 조합을 가능하게 하고/하거나 촉진시키는 요소들을 포함한다. 다른 실시형태에 있어서, 세포 생존, 세포 성장, 세포 증식, 또는 이들의 임의의 조합을 가능하게 하고/하거나 촉진시키는 요소들은 성장 배지, 혈청 또는 항박테리아제를 포함한다. 이 실시형태에 따르면, 상기 용액은 키트의 디바이스 내에서 세포의 생존성을 유지시키는 것이 가능하다.
- [0075] 다른 실시형태에 있어서, 상기 용액은 줄기-세포 증식을 가능하게 하는 인자들을 포함한다. 다른 실시형태에 있어서, 줄기-세포 증식을 가능하게 하는 인자들은 성장 인자, 호르몬, 효소 또는 화학약품(단, 이들로 제한되지 않음)으로부터 선택된다.
- [0076] 다른 실시형태에 있어서, 키트는 디바이스에 또는 용액에 첨가되는 추가적인 세포자멸사-유도 리간드를 더 포함하므로, 이 용액에 본 발명의 세포자멸사 내성 세포를 향한 선택성을 부여한다.
- [0077] 다른 실시형태에 있어서, 본 발명의 키트는 세포의 집단에 첨가되는 세포자멸사-유도 리간드의 동질성 혹은 농도에 유연성을 제공한다. 이 실시형태에 따르면, 키트는 추가의 용기들을 포함하되, 각 용기는 상이한 세포자멸사 유도 리간드를 수용한다. 키트의 사용자는, 본 명세서에서 이하에 예시된 바와 같은, 목적으로 하는 용도에 따라서 세포자멸사-유도 리간드의 바람직한 조합을 선택하고, 리간드를 디바이스에 도입하여 리간드를 이용한 인큐베이션을 가능하게 한다.
- [0078] 다른 실시형태에 있어서, 본 발명의 키트는 세포자멸사-유도 리간드의 첨가에 일시적인 유연성을 제공한다. 본 명세서에서 이하에 예시된 바와 같이, 세포자멸사-유도 리간드들의 상이한 조합, 순차적인 투여 혹은 인큐베이션 시간은 임상적으로 특유의 성과를 가져온다. 키트의 사용자는 세포자멸사-유도 리간드의 목적으로 하는 첨가 순서, 및 디바이스 내의 각 리간드를 이용한 인큐베이션 기간을 선택할 수 있으므로, 선택의 임상적 성과를 달

성할 수 있다.

- [0079] 다른 실시형태에 따르면, 본 발명은 또한 조혈모 줄기 세포 및 전구 세포(HSPC) 이식의 임상적 성과를 향상시키는 방법을 개시한다. 다른 실시형태에 있어서는, HSPC를 포함하는 세포 집단이 제공된다. 다른 실시형태에 있어서, 세포 집단은 본 발명의 디바이스 내에서 세포자멸사-유도 리간드와 접촉하고, 해당 디바이스 내에서 인큐베이션된다. 다른 실시형태에 있어서, 살아 있는 세포가 회수된다. 다른 실시형태에 있어서, 회수된 세포는 대상체에 이식된다.
- [0080] 다른 실시형태에 있어서, 동종이계 제대혈은 본 발명의 키트의 디바이스 내로 도입된다. 이 실시형태에 따르면, FasL은 용기의 내부 표면 상에 고정된다. 혈액은 24시간 미만 동안 디바이스 내에서 인큐베이션된다. 인큐베이션이 끝나면, TNF- α 는 디바이스 내로 도입되고, 인큐베이션은 24 내지 48시간 동안 계속된다. 제2의 인큐베이션 후에, 세포는 디바이스로부터 추출되고, 환자에게 이식된다. 다른 실시형태에 있어서, 단리 단계는, 용액 중 세포 지스러기와 단백질로부터 살아 있는 세포를 단리시키기 위하여, 인큐베이션의 종료와 이식 사이에 이용된다.
- [0081] 다른 실시형태에 있어서, 상기 방법의 세포 집단은 자기 이식으로부터 유래된다. 다른 실시형태에 있어서, 상기 방법의 세포 집단은 동종이계 이식으로부터 유래된다.
- [0082] 다른 실시형태에 따르면, 본 발명은 또한 조성물 중의 악성 세포를 제거하는 방법을 개시한다. 이 방법에서, 조성물은 세포자멸사-유도 리간드와 접촉하여 인큐베이션된다. 다른 실시형태에 있어서, 조성물은 전구-세포 이식물을 포함한다.
- [0083] 다른 실시형태에 있어서, 세포자멸사-유도 리간드는 FasL이다. 다른 실시형태에 있어서, 인큐베이션은 약 24시간 동안이다. 본 발명자들은, 예기치 않게, 악성 세포를 포함하는 이식물에 약 24시간 동안 FasL의 첨가가 악성 혼입물을 제거하고, 생존율을 향상시키는 것을 생체내에서 밝혀냈다(도 15E 내지 도 15F).
- [0084] 다른 실시형태에 따르면, 이 제거 기술은 준임상적인 악성 질환에 시달하는 걸보기에 건강한 도너로부터 이식편 내의 악성 세포의 부재를 확실하게 할 가능성을 지닌다.
- [0085] 다른 실시형태에 따르면, 이식물은 암환자의 골수로부터 추출되어 본 발명의 디바이스 내에 도입된다. 이 실시형태에 따르면, 이식물은 약 24시간 동안 고정된 FasL을 이용해서 인큐베이션된다. 인큐베이션 완료 후, 선택된 세포는 암환자에게 도로 이식된다. 다른 실시형태에 있어서, 단리 단계는, 세포 지스러기와 단백질로부터 선택된 세포를 단리시키기 위하여, 이식에 앞서 행해진다.
- [0086] 다른 실시형태에 따르면, 본 발명은 또한 이식편 대 종양(GvT) 활성을 유지하면서 이식편 대 숙주 질환(GvHD)을 방지하는 방법을 개시한다. 이 방법에 따르면, 샘플이 제공된다. 일 실시형태에 있어서, 샘플은 세포 집단을 포함한다. 다른 실시형태에 있어서, 세포 집단은 HSPC를 포함한다. 다른 실시형태에 있어서, 세포 집단은 면역 세포를 포함한다. 다른 실시형태에 있어서, 세포 집단은 HSPC, 면역 세포 또는 이들의 조합을 포함한다. 일 실시형태에 따르면, 세포 집단은 세포자멸사-유도 리간드와 접촉된다. 다른 실시형태에 있어서, 살아있는 세포는 디바이스로부터 회수된다. 다른 실시형태에 있어서, 회수된 세포는 대상체에게 이식된다.
- [0087] 다른 실시형태에 따르면, 본 발명의 방법은 GvHD를 유발하지 않는 T 세포 서브세트의 선택만을 초래한다. 본 발명자들은, 예기치 않게, 동시에 발생하는 T 세포 감각 없이, 2 내지 16시간의 FasL을 이용한 짧은 인큐베이션이 GvHD 효과기의 효과적인 제거를 초래하는 것을 발견하였다(도 9). 이 실시형태에 따르면, 조혈 전구체 생착을 지지하는 T 세포 서브세트의 생존은, FasL을 이용한 이식된 세포의 치료가 생착을 손상시키지 않았으므로, 달성된다(도 14).
- [0088] 다른 실시형태에 있어서, 도너 접종원으로부터의 세포자멸사-민감성 T 세포의 선택적 제거는 강력한 이식편 대 종양(GvT) 반응의 발생을 손상시키지 않는다.
- [0089] 다른 실시형태에 따르면, 본 발명의 방법은 높은 정도의 GvHD를 앓고 있는 당업계에 공지된 동종이계 이동된 말초 혈액 이식물 상에 이용될 수 있다. 이 실시형태에 있어서, 동종이계 이동된 말초 혈액 이식물은 본 발명의 디바이스 내에 도입된다. 이식물은 이어서 2 내지 16시간의 짧은 기간 동안 고정된 FasL을 이용해서 인큐베이션된다. 인큐베이션 후, 나머지 세포가 회수되어, 환자에게 이식된다. 다른 실시형태에 따르면, 단리 단계는, 선택된 세포를 세포 지스러기 및 단백질로부터 단리시키기 위하여, 이식보다 선행될 수 있다.
- [0090] 다른 실시형태에 따르면, 본 발명의 상기 방법은 도너 림프구 주입(donor lymphocyte infusion: DLI) 전에 비자

극 T 세포의 선택적 고갈을 위하여 이용될 수 있다.

[0091] 몇몇 실시형태에 따른 재조합 발현

[0092] 다른 실시형태에 있어서, 본 발명의 단백질은, 숙주 세포, 예를 들어, 핵산 분자로 형질전환된 미생물 세포 내 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 분자를 발현시킴으로써 합성될 수 있다.

[0093] 단백질을 암호화하는 DNA 서열들은, 당업계에 잘 알려진 각종 방법을 이용해서, 이들을 생산하는 임의의 세포로부터 단리될 수 있다(예를 들어, 문헌[Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition, Cold Spring Harbor, N.Y., (2001)] 참조). 예를 들어, 야생형 단백질을 암호화하는 DNA는, 공지된 서열의 뉴클레오타이드 서열에 기초하여 구축된, 특정 프라이머를 이용한 중합효소 연쇄반응(PCR)에 의해 적절한 미생물의 게놈 DNA, 플라스미드 또는 코스미드로부터 증폭될 수 있다. 적절한 기술은, 당업계에 잘 알려져 있고, 예를 들어, 미국 특허 제4,683,195호; 제4,683,202호; 제4,800,159호; 및 제4,965,188호에 기재되어 있다.

[0094] DNA는 당업계에 공지된 각종 방법(예를 들어, 문헌[Marek P. M et al., "Cloning and expression in Escherichia coli of Clostridium thermocellum DNA encoding p-glucosidase activity", Enzyme and Microbial Technology Volume 9, Issue 8, August 1987, Pages 474-478] 참조)을 이용해서 증폭 전에 세포로부터 추출될 수 있다.

[0095] 단백질을 암호화하는 단리된 폴리뉴클레오타이드는, pET28a 플라스미드 등과 같은, 벡터로 클로닝될 수 있다.

[0096] 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 단리 및 클로닝 시에, 돌연변이(들)는, 당업계에 공지된 방법들, 예를 들어, 부위-특이적 돌연변이유발(예를 들어, 문헌들[Kunkel Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1985, 82:488-492; Weiner et al., Gene 1994, 151:119-123; Ishii et al., Methods Enzymol. 1998, 293:53-71] 참조); 카세트 돌연변이유발(예를 들어, 문헌[Kegler-Ebo et al., Nucleic Acids Res. 1994 May 11; 22(9): 1593-1599] 참조); 재귀적 양상불 돌연변이유발(예를 들어, 문헌[Delagrave et al., Protein Engineering 1993, 6(3): 327-331] 참조), 및 유전자 자리 포화 돌연변이유발(예를 들어, 미국 특허 출원 공개 제2009/0130718호 참조)을 이용해서 하나 이상의 염기쌍에서 변형에 의해 도입될 수 있다.

[0097] 폴리뉴클레오타이드 내로 다수의 돌연변이를 도입하는 방법도 잘 알려져 있다(예를 들어, 문헌들[Michaelian et al., Nucleic Acids Res. 1992, 20:376; Dwivedi et al., Anal. Biochem. 1994, 221:425-428; Bhat Methods Mol. Biol. 1996, 57:269-277; Meetei et al., Anal. Biochem. 1998, 264:288-291; Kim et al., Biotechniques 2000, 28:196-198; 그리고 국제 특허 출원 공개 제WO 03/002761A1호 및 제WO 99/25871호] 참조).

[0098] 목적으로 하는 서열을 가진 폴리뉴클레오타이드를 제조하는 대안적인 방법은 합성 유전자의 사용이다. 본 발명의 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는, 예를 들어, 포스포로아미다이트 방법을 이용해서 합성적으로 제조될 수 있다(문헌들[Beaucage et al., Curr Protoc Nucleic Acid Chem. 2001 May; Chapter 3:Unit 3.3; Caruthers et al., Methods Enzymol.1987, 154:287-313]) 참조).

[0099] 합성 유전자의 사용은 목적으로 하는 종(예를 들어, 이 콜라이(E. coli))에서 발현될 뉴클레오타이드의 최적화된 서열을 포함하는 인공 유전자의 생산을 허용한다. 유전자를 재설계하는 것은 많은 경우에 유전자 발현을 향상시키는 수단을 제공한다. 개방 판독 프레임(open reading frame)을 재기입하는 것은 유전 암호의 중복화(redundancy) 때문에 가능하다. 이와 같이 해서, 개방 판독 프레임에서 뉴클레오타이드의 약 삼분의 일까지 변화시키고 또한 동일 단백질을 생산하는 것이 가능하다. 예를 들어, 300개의 아미노산의 전형적인 단백질 서열에 대해서, 동일한 단백질을 암호화하게 되는 10150개 이상의 코돈 조합이 있다. 드물게 이용되는 코돈을 더욱 흔한 코돈으로 교체하는 등과 같은 최적화 방법을 이용함으로써, 표적 유전자에 의해 암호화되는 단백질의 발현 수준에 극적인 효과를 가져올 수 있다. RNA 2차 구조를 제거하는 등과 같은 추가의 최적화가 또한 포함될 수 있다. 이들 및 기타 동시 최적화를 수행하기 위하여 컴퓨터 프로그램은 입수가 가능하다. 원래의 DNA 서열로 이루어진 다수의 뉴클레오타이드 변화 때문에, 새롭게 설계된 유전자를 작성하는 유일한 실제적인 방식은 유전자 합성을 이용하는 것이다.

[0100] 이와 같이 해서 생산된 폴리뉴클레오타이드는 이어서 정제, 어닐링, 결찰, 증폭, 제한 효소(restriction endonuclease)에 의한 소화 및 적절한 벡터 내로의 클로닝 중의 하나 이상을 포함하는 추가의 조작이 실시될 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 특정 숙주 세포 유형에서 그의 발현을 위하여 적합한 발현 벡터 내로 직접, 또는

클로닝 벡터 내로 초기에 결합될 수 있다.

- [0101] 당업자에게 용이하게 명백한 바와 같이, 야생형 효소를 암호화하는 서열에 원래 존재하는 아미노산을 치환하는 특정 아미노산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드에 사용되는 코돈은, 폴리뉴클레오타이드를 발현시키기 위하여 선택된 숙주 세포의 공지된 그리고 선호되는 코돈 용법에 따라서 선택되어야 한다.
- [0102] 당업자라면 핵산 서열과 단백질 서열 간, 특히, 유전 암호와 이 코드의 축중배열(degeneracy) 간의 관계를 알고 있으며, 어려움 없이 본 발명의 단백질을 암호화하는 핵산을 구축하는 것이 가능할 것이다. 예를 들어, 당업자라면, 단백질 서열 내의 각 아미노산 치환에 대해서, 치환체 아미노산을 암호화하는 하나 이상의 코돈이 있을 수 있다는 것을 알 것이다. 따라서, 그 특정 아미노산 잔기에 관하여 유전 암호의 축중배열에 따라서, 하나 이상의 핵산 서열이 소정의 변종 단백질 서열에 대응하여 발생될 수 있는 것은 명백할 것이다.
- [0103] 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는, 예를 들어, 비-암호화 5' 및 3' 서열, 예컨대, 전사된, 비번역된 서열, 종결 신호, 리보솜 결합 부위, mRNA를 안정화시키는 서열, 인트론 및 폴리아데닐화 신호를 포함하는 비암호화 서열을 포함할 수 있다. 또한, 융합 단백질의 형태로 단백질의 정제를 용이하게 하는, 변이 단백질과 비상동성인 추가적인 아미노산에 대한 암호화 서열, 특히 마커 서열, 예컨대, 폴리-His tag를 포함하는 폴리뉴클레오타이드가 포함된다.
- [0104] 본 발명의 단백질은, 예를 들어, 추출 및 정제의 도움으로, 태그부착 단백질로서 생산될 수 있다. 태그 작제물의 비제한적인 예는 His-Tag(6개 연속 히스티딘 잔기)인데, 이것은 종래의 방법에 의해 단리되고 정제될 수 있다. 이것은 또한, 트롬빈 분할 부위 등과 같이, 태그의 제거를 허용하기 위하여 태그 부분과 관심대상 단백질 서열 간의 단백질분해적 분할 부위를 포함하도록 하는 것이 편리할 수 있다.
- [0105] 본 발명의 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 광범위한 발현 벡터 내로 혼입될 수 있고, 이것은 광범위한 숙주 세포로 형질전환될 수 있다. 숙주 세포는 원핵 혹은 진핵 세포일 수 있다.
- [0106] 숙주 세포 내로의 폴리뉴클레오타이드의 도입은 화학적 전환(예컨대 염화칼슘 처리), 전기영동, 권주게이션, 전달, 인산칼슘 형질주입, DEAE-덱스트란 매개 형질주입, 트랜스펙션(transfection), 미량주입법, 양이온성 지질-매개 형질주입, 스크레이프 로딩(scrape loading), 볼리스틱 도입(ballistic introduction) 및 감염 등과 같은 잘 알려진 방법에 의해 수행될 수 있다.
- [0107] 몇몇 실시형태에 있어서, 세포는 원핵 세포이다. 적절한 원핵 숙주의 대표적인 비제한적인 예는 박테리아 세포, 예컨대, 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) 및 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)를 포함한다. 다른 실시형태에 있어서, 세포는 진핵 세포이다. 몇몇 예시적인 실시형태에 있어서, 세포는 진균 세포, 예컨대, 효모이다. 적절한 효모 세포의 대표적인 비제한적인 예는 사카로마이세스 세레비시애(*Saccharomyces cerevisiae*) 및 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*)를 포함한다. 추가의 예시적인 실시형태에 있어서, 세포는 식물 세포이다.
- [0108] 단백질은 발현을 위하여 적절한 임의의 벡터로 표현될 수 있다. 적절한 벡터는 선택된 숙주 세포에 따라서 결정된다. 대장균(*E. coli*) 내에서 단백질을 발현시키기 위한 벡터는, 예를 들어, pET, pK233, pT7 및 람다 pSKF를 포함하지만 이들로 제한되는 것은 아니다. 기타 발현 벡터 시스템은 베타-갈락토시다제(pEX); 말토스 결합 단백질(pMAL); 및 글루타티온 S-트랜스퍼라제(pGST)에 기초한다.
- [0109] 목적으로 하는 벡터로 형질전환된 숙주 세포의 선택은 비-형질전환된 세포에 대해 독성인 선택 배지에서의 성장과 연루된 표준 선택 프로토콜을 이용해서 달성될 수 있다. 예를 들어, 이 콜라이는 항생물질 선택제를 함유하는 배지에서 성장될 수 있고; 항생물질 내성 유전자를 더욱 제공하는 발현 벡터로 형질전환된 세포는, 선택 배지에서 성장할 것이다.
- [0110] 적절한 숙주 세포의 형질전환, 그리고 단백질 발현을 위하여 적합한 조건 하에서의 전과 시, 목적으로 하는 단백질은 형질전환된 세포의 세포 추출물에서 동정될 수 있다. 관심 대상 단백질을 발현하는 형질전환된 숙주는 SDS-PAGE를 이용해서 숙주에 의해 발현되는 단백질을 분석하고, 이 겔을, 동일 벡터로 형질전환되었지만 관심 대상 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 함유하지 않는 숙주로부터 얻어진 SDS-PAGE 결과 비교함으로써 동정될 수 있다.
- [0111] 관심 대상 단백질은 또한 적절한 항체를 이용한 면역블롯 분석, 총 세포 추출물의 도트 블로팅, 제한된 단백질 분해, 질량 분광 분석 및 이들의 조합 등과 같은 기타 공지된 방법에 의해 동정될 수 있다.
- [0112] 관심 대상 단백질은, 황산암모늄 혹은 에탄올 침전, 산 추출, 염 분별화, 이온 교환 크로마토그래피, 소수성 상

호작용 크로마토그래피, 겔 침투 크로마토그래피, 친화도 크로마토그래피 및 이들의 조합을 포함하는 종래의 방법에 의해 분리 및 정제될 수 있다.

[0113] 관심 대상 분리된 단백질은, 당업계에서 공지된 방법들(이들의 일부는 이하에 기재되어 있음)을 이용해서, 그들의 각종 특성, 예를 들어, 특정 활성 및 열 안정성에 대해서 분석될 수 있다.

[0114] 상기 절차를 수행하는 조건뿐만 아니라 기타 유용한 방법은 당업자에 의해 용이하게 결정된다(예를 들어, 문헌[Current Protocols in Protein Science, 1995 John Wiley & Sons] 참조).

[0115] 특정 실시형태에 있어서, 본 발명의 단백질들은, 재조합 단백질의 생산 및 정제를 촉진시키기 위하여 그들의 시작 코돈(메티오닌 또는 발린) 없이 및/또는 그들의 선도(leader) (신호) 펩타이드 없이 생산 및/또는 이용될 수 있다. 선도 펩타이드를 암호화하는 서열이 없는 클로닝 유전자가 숙주 세포의 세포질에 대해서 해당 단백질을 제한할 것이고 또한 그들의 회복을 용이하게 할 것이라는 것은 알려져 있다(예를 들어, 문헌[Glick, B. R. and Pasternak, J. J. (1998), "Molecular biotechnology: Principles and applications of recombinant DNA", 2nd edition, ASM Press, Washington D.C., p. 109-143] 참조).

[0116] 몇몇 실시형태에 따른 합성 제조

[0117] 본 발명의 단백질은 단백질 합성 분야에서의 숙련된 자에게 공지된 임의의 수법에 의해 합성될 수 있다. 고상 단백질 합성에 대해서는, 많은 수법의 요약은, 문헌들[Stewart, J. M. and Young, J. D. (1963), "Solid Phase Peptide Synthesis," W. H. Freeman Co. (San Francisco); 및 Meienhofer, J (1973). "Hormonal Proteins and Peptides," vol. 2, p. 46, Academic Press (New York)]에서 발견할 수 있다. 고전적인 용액 합성의 검토에 대해서는, 문헌[Schroder, G. and Lupke, K. (1965). The Peptides, vol. 1, Academic Press (New York)]을 참조하면 된다.

[0118] 일반적으로, 펩타이드 합성법은 성장 중인 펩타이드 사슬에 하나 이상의 아미노산 혹은 적절하게 보호된 아미노산의 순차적인 첨가를 포함한다. 통상적으로 제1 아미노산의 아미노 혹은 카복실기는 적절한 보호기에 의해 보호된다. 보호된 혹은 유도체 아미노산은, 이어서 아마이드 결합을 형성하는데 적합한 조건 하에서, 적절하게 보호된 상보적 (아미노 혹은 카복실)기를 지니는 서열에서 다음 아미노산을 부가함으로써 용액 중에서 이용되거나 비활성 고체 담지체에 부착될 수 있다. 그 후, 보호기는 이 새롭게 부가된 아미노산 잔기로부터 제거되고, 그 다음 아미노산(적절하게 보호됨)이 부가되는 등등이며; 전통적으로, 이 과정은 세척 단계도 또한 수반한다. 목적으로 하는 아미노산의 전체가 적합한 서열에 연결된 후에, 임의의 남아 있는 보호기(및 임의의 고체 담지체)는 순차로 혹은 동시에 제거되어 최종 펩타이드 화합물을 제공한다. 이 일반적인 절차의 간단한 변형에 의해, 보호된 트라이펩타이드를 적절하게 보호된 다이펩타이드에 (카이랄 중심을 라세미화하지 않는 조건 하에서) 커플링시킴으로써, 성장 중인 사슬에 한번에 하나보다 많은 아미노산을 부가하고, 탈보호 후에, 펜타펩타이드를 형성하는 등등이 가능해진다.

[0119] 펩타이드 합성의 추가의 설명은 미국 특허 제6,472,505호에 개시되어 있다.

[0120] 본 발명의 추가의 목적, 이점 및 신규한 특징들은 이하의 실시예의 검토 시 당업자에게 명백해질 것이며, 이러한 실시예는 제한으로서 의도된 것은 아니다. 또한, 위에서 묘사된 바와 같은 그리고 이하의 특허청구범위에 청구된 바와 같은 본 발명의 각종 실시형태 및 양상의 각각은 이하의 실시예에서 실험적인 뒷받침이 발견된다.

[0121] 서열

서열번호	동정	서열
1	인간 FasL	MQQPFNYPYPQIYWVDSSASSPWAPPGTVLPCPTSVPRRPGQ RRPPPPPPPPPLPPPPPPPLPLPLPP LKKRGNHSTGLCLLMFFMVLVALVGLGLGMFQLFHLQKE LAELRESTSQMHTASSLEKQIGHPSPPPEK

[0122]

		KELRKVAHLTGKSNRSRSMPLWEDTYGIVLLSGVKYKKGGL VINETGLYFVYSKVYFRGQSCNNLPLSHK VYMRNSKYPQDLVMMEGKMMSYCTTGQMWARSSYLGA VFNLTSAHLYVNVSESLVNFEESQTFGLYK
2	인간 TNF- α	MSTESMIRDVELAEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFLIVAG ATTFLCCLHFGVIGPQREEFPRDLSLI SPLAQAVRSSSRTPSDKPVAVHVANPQAEGQLQWLNRRANA LLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLF KGQGPCSTHVLLTHTISRIAVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPE GAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSA EINRPDYLDFAESGQVYFGIIL
3	인간 Trail	MAMMEVQGGPSLGQTCVLIVIFTVLLQSLCVAVTYVYFTNE LKQMQDKYSKSGIACFLKEDDSYWDPNDE ESMNPCWQVKWQLRQLVRKMILRTSEETISTVQEKQQNISP LVRERGPQRVAAHITGTRGRSNTLSSPN SKNEKALGRKINSWESSRSGHSFLSNLHLRNGELVIHEKGFY YIYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQMVQYI YKYTSYPDPILLMKSARNSCWSKDAEYGLYSIYQGGIFELKE NDRIFVSVTNEHLIDMDHEASFFGAFLV
4	인간 Tweak	MAARRSQRRRGRRGEPGTALLVPLALGLGLALACLGLLLAV VSLGSRASLSAQEPAQEELVAEEDQDPSE LNPQTEESQDPAPFLNRLVRPRRSAPKGRKTRARRAIAAHYE VHPRPGQDGAQAGVDGTVSGWEEARINS SSPLRYNRQIGEFIVTRAGLYYLYCQVHFDEGKAVYLKLDLL VDGVLALRCLEEFSAATAASSLGPQLRLC QVSGLLALRPGSSLRIRTLPPWAHLKAAPFLTYFGLFQVH

[0123]

[0124] 실시예 1

[0125] 사멸 리간드에 대한 제대혈 세포의 생체의 노출

[0126] 시험관내 사멸 리셉터 활성화의 세포자멸적 활성

[0127] TNF 수퍼패밀리의 주된 활성화는 세포자멸사 신호의 전달이다. 사전 동의에 따라 만기 분만으로부터 얻어진 신선한 제대혈(UCB)을, 성장 인자의 보충 없이 액체 배양액 중에 각종 시간 기간 동안 FasL 및 TNF- α 에 노출시켰다. 벌크 UCB 배양물 내의 게이트된 CD34⁺ 전구체는 저감된 속도의 세포자멸사와 시간 함수로서의 감수성(susceptibility) 증가를 보였지만(도 1a), 세포자멸적 세포사는 TNF 계열의 사멸 리간드에 대한 노출에 의해 증대되지 않는다. 세포자멸사 신호전달에 대한 불감성은 조혈 전구체 내의 리셉터의 저수준 발현에 의해 초래되는 것으로 앞서 제안되어 있었다. 이 분석은 벌크 UCB 집단에서보다 게이트된 CD34⁺ 및 단리된 lin⁻ 전구체에서 Fas 및 TNF 리셉터의 낮은 발현을 나타내었다(도 1b). 리셉터를 발현하는 세포의 서브세트의 더욱 집중된 평가는, CD34⁺ 전구체의 세포자멸사에 대한 과도한 감수성을 나타내었지만, 세포자멸사는 하나의 예외를 지니는 동족 리셉터에 의해 유도되지 않았다(도 1c). TNF- α 에 대한 단기 노출(24시간 미만)은 TNF-R1 및 TNF-R2 둘 모두를

발현하는 $CD34^{+}$ 세포의 검출가능한 리셉터-매개 세포자멸사의 경우뿐이었다. 이들 데이터는, 사멸 리셉터의 발현이 액체 배양액 중 자발적 세포자멸사에 특히 민감한 세포의 특징이라는 것을 시사한다. 세포자멸사의 변동은 차별적인 증식 속도로부터 기원될 수 있지만, 리셉터-양성 $CD34^{+}$ 전구체의 세포자멸사에 대한 증가된 감수성은 동족 리간드의 존재에 의해서 영향도 받지 않았던 저감된 증식 속도와 연관되었다(도 1d).

[0128] UCB 세포의 서브세트가 세포자멸사에 민감하다는 것을 정의하기 위하여, 골수 및 림프 계통이 더욱 평가되었다. $CD3^{+}$ T 세포가 높은 수준의 Fas를 발현하는 한편, TNF 리셉터는 $CD33^{+}$ 골수 세포에서 우세하다(도 1e). TNF-R1은 일반적으로 계통-양성 서브세트 모두에서 TNF-R2보다 높은 수준에서 발현된다. 48시간 동안 사멸 리간드를 이용한 세포자멸적 도전시험에의 노출은, 리간드의 존재에 의해 크게 영향받지 않는, lin^{-} 전구체에 비해서 모든 계통-양성 서브세트의 과도한 속도의 자발적 세포자멸사를 나타내었다(도 1f). 다음의 두 현저한 예외사항이 관찰되었다: a) 높은 수준의 TNF 리셉터를 발현하는, UCB 호중구에 대응하는, $CD14^{-}CD33^{+}$ 골수 세포에서의 Fas-매개 세포자멸사; 및 b) $CD3^{+}$ T 세포에서의 TNF-유도 세포자멸사. 액체 배양액 중의 세포자멸사에 대한 UCB-유래 T 세포의 내성은, AICD-형 음성 조절을 감작시키기 위하여 자극을 필요로 하는, 이 항원-무경험 서브세트의 자연적인 속성에 의해 설명된다. 따라서, 배양물에서의 비자극 UCB 세포의 세포자멸사는 $CD19^{+}$ B 림프구 및 골수 세포($CD14^{+}$, $CD33^{+}$)의 사멸에 의해 지배되며, TNF 계열 리셉터의 선택적인 세포자멸적 기능은 상이한 서브세트에 있다.

[0129] SCID 재증식 세포(repopulating cell) 및 장기 배양 개시 세포는 리셉터-매개 세포자멸사에 대해 내성이 있다

[0130] SCID 재증식 세포(SRC), 장기 개시 세포(long-term initiating cell: LTC-IC) 및 단기 클론원성 검정을 비롯하여, 점진적으로 투입되는 전구체의 기능을 평가하기 위하여 수개의 대리 검정법이 이용되었다. SRC 활성화는 인간 재구성 세포와 부분적으로 양립되어, 샘플 내의 가장 원시적인 전구체에 대한 대리 기능 검정으로서 역할한다. 이식 전에 FasL 및 TNF- α 를 이용한 채 그리고 이용하지 않은 채 인큐베이팅된 동등한 초기 개수의 세포들이 이용되었는데, 그 이유는 제노키메라 현상의 수준의 광범위한 변동성이 증대된 생착의 정확한 평가를 방해하기 때문이다(도 2a). SRC 기능은 이식 전 24 내지 48시간 동안 FasL 및 TNF- α 에 노출 후에 보존되었는데(도 2b 내지 도 2d), 이는 가장 원시적인 조혈 전구체가 액체 배양액 중에서의 자발적 및 리셉터-매개 세포자멸사에 불감성인 것을 나타낸다. 확장된 생체의 인큐베이션은, FasL 및 TNF- α 의 존재에 관계 없이, 인간 조혈 전구체의 생착 능력의 소실과 연관된다(도 2e). 케모카인 및 성장 인자로 보충된 액체 배지 중에서의 UCB 세포의 연장된 생체 외 인큐베이션은 표현형의 극적인 변화와 연관되고, 또한 면역손상된 마우스들에서의 세포 호밍(homing) 및 생착을 저감시키는 것이 알려져 있다. 그러나, 부족한 SRC 생착을 사멸 리간드에 의한 리셉터-매개 세포자멸사에 기인하는 것으로 간주했던 종래의 연구와 달리, 확장된 배양물의 유해한 영향은 세포막 사멸 리셉터의 활성화와는 크게 독립적이다.

[0131] 연장된 기간의 생체의 배양 후의 부족한 인간 세포 생착은 G0/G1 세포 주기상으로부터의 증식 및 배출과 연관된다. UCB 세포, $CD34^{+}$ 및 lin^{-} 전구체의 증식 속도(도 2e)와 세포 주기상(도 2f)은 양쪽 모두 48시간의 인큐베이션 후에 FasL 및 TNF- α 의 존재에 의해 영향받지 않았다. 사멸 리간드의 존재에 있어서 높은 분획의 유사분열적-휴지 전구체의 보존은 동등한 수준의 SRC 생착을 설명하는데, 이는 G0/G1에 위치된 세포에 대해서 제한된다.

[0132] 조혈 전구체 활성화에 대한 대리 생체의 검정은 중간엽 줄기세포에 대한 장기 배양(LTC-IC)을 포함하며, 이는 반고형 메틸셀룰로스 배양물 내에 투입된 전구체에 의해 형성된 집락보다 더욱 원시적인 서브세트를 나타낸다. 전체 5주 기간의 장기 배양 동안 체세포에 대해 독성인 농도에서의 FasL 및 TNF- α 에 대한 노출은, Fas 및 TNF 리셉터-매개 세포자멸사 신호전달에 대한 $CD34^{+}$ 및 lin^{-} 전구체의 전체적인 내성과 일관되게, LTC-IC 활성화에 영향을 미치지 않았다(도 2g). 이와 같이 해서, 세포자멸사에 각종 UCB 서브세트의 차별적인 고유 감수성에 의해 초래된 사멸 리간드에의 노출 동안 생존 서브세트의 조성물의 현저한 조절에도 불구하고, 가장 원시적인 전구체의 SRC 및 LTC-IC 활성화는 보존되는데, 이는 리셉터-매개 세포자멸사에 대한 내성을 반영한다.

[0133] 죽은 세포의 제거에 의한 골수 전구체의 풍부화

[0134] UCB 세포의 각종 서브세트의 자발적 및 리셉터-유도 세포자멸사에 대한 고유한 감수성은 생체의 인큐베이션 후에 생세포의 조성물의 현저한 변동을 초래한다. 예를 들어, 독성 용량의 FasL을 이용한 48시간의 인큐베이션 후, 현저하게 풍부한 생존 계통-음성 세포가 있는 반면, TNF- α 를 이용한 인큐베이션은 상대적으로 풍부한 생존

골수 세포를 초래한다(도 3a). 그 때문에, 사멸 리간드에의 노출 후의 전구체의 풍부함은 반고형 배양물의 클론 원성 활성을 증가시키는 것이다. 집락 형성 단위(colony forming unit: CFU) 빈도의 변동은 피콜 상에서의 침강에 의해 죽은 세포의 제거 후에 줄기 세포 인자(SCF), 인터류킨-3(IL-3) 및 과립구-대식세포 집락 자극인자(GM-CSF)로 촉진된 반고형 메틸셀룰로스 배양물(도 3b)에 동등한 수의 생존 UCB 세포를 평판배양하여 평가할 수 있다. 성숙한 UCB 세포의 우세한 세포자멸사와 일관되게, CFU-GM 빈도는 FasL 및 TNF- α 에의 48시간 노출 후 각각 대조군 배양물 중에 1:143에서 각각 1:37 및 1:31로 증가하였다(도 3c). 최대 풍부화는 48시간의 인큐베이션 후에 관찰되는 한편, 이 기간을 넘어 확장된 생체의 배양물은 투입된 골수 전구체의 기능에 유해한 결과를 지녔다. 이 검정은 UCB 샘플 내 비-전구 세포의 선택적 리셉터-매개 제거를 커버하지 못하며, 그럼에도 불구하고 세포자멸사의 유사한 전체 속도는 CFU-GM 빈도의 4 내지 5배 증가를 초래한다.

[0135] TNF 계열 리셉터들 간의 크로스토크(cross-talk)는 세포자멸사에 대해 민감하지 않다

[0136] TNF 계열 리셉터/리간드 상호작용은 리셉터 활성화의 현저한 특이성, 그러나 부분적 상동성을 특징으로 한다. 대부분의 리간드는 수개의 동족 리셉터를 결합하지만, 수개의 리간드에 의한 리셉터의 교차-활성화는 알려져 있지 않다. 이 계열에서의 크로스토크는 따라서 다른 TNF 계열 리셉터의 활성화에 응답하여 리셉터의 유도된 상향 조절에 의해 매개된다. 크로스 토크의 가장 잘 알려진 예는 CD34⁺ 전구체의 TNF 리셉터 활성화 시 Fas의 유도된 발현이다. TNF-유도 Fas 발현이 세포자멸사에 대해 UCB 세포를 감작시키는지 결정하기 위하여, 세포를 먼저 TNF- α 에 노출시키고 나서 FasL에 노출시키므로(도 4a), Fas 리셉터의 현저한 상향조절을 초래한다(도 4b). Fas⁺ 세포가 두 번째 날의 배양 동안 FasL에의 노출에 의해 세포자멸사로 유도되는 한편, UCB 세포, 게이트된 CD34⁺ 및 단리된 lin⁻ 전구체는 TNF- α 의 존재에 의해 상대적으로 보호되며(도 4c), 이는 Fas 발현의 상향조절이 세포자멸사에 대한 민감도와는 관련이 없었음을 나타낸다. 세포자멸사-민감성 세포의 리간드-매개 제거에 의한 전구체 풍부화의 기능 검정은 FasL 및 TNF- α 에의 합동 노출이 CFU-GM 빈도를 증가시키고(도 4d), 일관성 있게, 두 리간드에의 UCB 세포의 합동 노출은 생체내 SRC 활성을 손상시키지 않았던 것을 나타내었다(도시 생략). 이들 데이터는, 두 독립적인 경로, 그들의 합동 활성화 및 TNF 계열 리셉터들 간의 크로스토크에 의해 세포자멸사 신호 전달에 대한 조절 전구체의 내성을 기술한다.

[0137] UCB 세포의 생체의 확장 동안 분화 세포의 고갈

[0138] 제대혈은 공격적인 방사선화학요법 후의 면역-조혈계의 재구성을 위한 조혈 전구체의 좋은 공급원이지만, 적은 수의 세포와 느린 생착이라고 하는 두 가지 주된 단점을 지닌다. 이들 제한을 극복하기 위하여, 이식 전 UCB 세포의 생체의 확장에 대한 많은 접근법이 개발되어 있다. 세포들은 숫자상으로 확대되고, 전구체는 활성화되며, 이는 조혈 재구성의 품질을 향상시킨다. 이 때문에, TNF-계열 리간드에 대한 세포 배양물의 노출은 분화된 세포의 클론성 확장의 제한에 의해 더욱 원시적인 전구체에 대한 상대적인 이점을 부여할 것이고, 이는 생착의 효율에 유의하게 영향을 미치지 않는다. CD34⁺ 전구체의 분획(도 5a) 및 절대 개수(도 5b)를 증가시키는 표준 확장 프로토콜을 이용해서, 생체의 배양의 제3 및 최종 주 동안의 보충 FasL은 CD34⁺ 서브세트의 더 한층 유의한 확장을 초래한다. 인간 조혈 전구체에 대한 가장 원시적인 검정인 SRC의 빈도 및 기능을 결정하기 위하여, 동일한 UCB 단위로부터의 동등한 수의 UCB 세포를 부설판-처리된 면역손상된 NOD.SCID 마우스들에게 이식하였다(도 5c). 3주 배양 동안 FasL에의 노출은 등등 및/또는 보다 높은 수준의 인간 조혈 제노키메라 현상을 초래하였는 바(도 5d), 이는 전구체의 기능이 향상되었음을 강조하는 것이다. 개별 마우스에서의 생착의 광범위한 변동성은 확장된 CD34⁺ 전구체의 증가된 수의 우수한 기능성의 더욱 정확한 결정을 방해한다. 이와 같이 해서, 세포자멸사-민감성 세포의 선택적 고갈은 이식을 위한 생체의 확장된 UCB 전구체의 분획 및 개수를 증가시키는 효과적인 방식이다.

[0139] **실시예 2**

[0140] **사멸 리간드에 대한 이동된 말초 혈액 세포의 생체의 노출**

[0141] 시험관내 사멸 리셉터 활성화의 세포자멸적 활성

[0142] 이식을 위한 조혈 전구체의 만연된 공급원은 과립구 집락 자극 인자(granulocyte colony stimulating factor: G-CSF) 또는 c-키트 및 CXCR4의 길항제에 의한 이동 후의 말초 혈액액이다. 이동된 단핵 세포는, 이어서 성분채집술(apheresis)에 의해, 상당한 수의 CD34⁺ 전구체를 함유하는 말초 혈액액으로부터 수집된다. 말초 혈액액으로부터 수거한 세포는 일반적으로 활성화되어 있고, 따라서, 선택적 고갈을 위한 사멸 리간드에의 노출 기간은 상당히

더 짧아진다. UCB 세포에 대해 제시된 데이터로부터의 추가적인 차이는 저온 보존된 mPB 샘플의 사용이며, 이 샘플의 해동은 해당 세포의 15 내지 25%의 세포자멸사 사멸과 연관된다. Fas는 $CD34^{+}$ 전구체의 대략 25%(도 6a) 및 상당한 분획의 B 림프구 및 골수 세포(50 내지 65%, 도 6b)로 표현된다. TNF 리셉터는 TNF-R1의 우세한 발현과 함께 계통-양성 mPB 세포에서 주로 발현된다. 짧은 배양 후, Fas 발현은 감소되는 한편(도 6c), 모든 서브세트는 TNF-R2의 현저한 상향 조절을 나타낸다(도 6c). 이들 데이터는 해동된 mPB 세포에서의 사멸 리셉터 발현의 동적 변동을 개시하며, 이는 한편으로는 Fas^{+} 세포의 사멸에 의해, 다른 한편으로는 TNF-R2의 상향조절에 의해 영향받는다.

[0143] 계통-양성 세포의 25 내지 45%가 4시간의 생체외 인큐베이션 내에 세포자멸사적인 반면, 이들 세포의 60 내지 90%는 16시간의 인큐베이션 내에 세포자멸사로 유도된다(도 6e). FasL 및 TNF- α 의 존재는 배지 중에서 관찰되는 계통-양성 세포의 높은 비율의 세포 자멸사를 유의하게 감소시키지 못한다. UCB 세포로부터의 가장 현저한 변동은 이동된 말초 혈액(mPB) 내에서의 활성화된 $CD3^{+}$ T 세포 서브세트이며, 이는 짧은 시간 기간 내에 리간드에 의해 세포자멸사로 유도된다. 리셉터-매개 세포자멸사에 대한 이들 상대적인 민감도는 생세포의 조성물의 유의한 변화를 초래하는 바, 4시간의 인큐베이션 후의 T 세포와 16시간의 인큐베이션의 B 림프구 및 골수 세포의 현저한 저감을 가져온다. 두 시점에서, $CD3^{+}$ T 세포는 선택적으로 고갈되어, $CD34^{+}$ 전구체를 지니는 생존 분획을 풍부하게 한다(도 6f). 따라서, 사멸 리간드를 이용한 이동된 말초 혈액의 짧은 인큐베이션은 저온 보존된 mPB 샘플 내에서 성숙한 세포의 서브 세트를 고갈시키고 전구체를 풍부하게 한다.

[0144] Fas 가교결합에 민감한 mPB-유래 T 세포의 고갈은 이식편 대 숙주 질환을 개선시킨다

[0145] mPB 세포 이식물 중의 이환율의 가장 중요한 원인은 말초 혈액 중 T 세포의 활성화의 본질적 상태의 결과인 GvHD이다. 이종발생성 GvHD에 대한 FasL의 영향을 평가하기 위하여, NOD.SCID 마우스들에게는 리간드에 노출한 채로 그리고 노출 없이 동일 단위로부터 1.5×10^7 개의 생존 mPB를 이식하였다. 4시간 동안 FasL을 이용한 사전 인큐베이션은 모든 마우스의 생존을 가져온 반면, 배지 중의 인큐베이션은 수용체의 1/3의 사멸을 초래하였다(도 7a). 생존 동물들은 유사한 수준의 인간 조혈 키메라 현상을 나타내었는 바(도 7b), 이는 mPB 내의 SRC가 Fas-매개 세포자멸사에 내성이 있었던 것을 재차 입증한다. 중증의 GvHD는, 심각한 중량 감소(도 7c), 임상적 점수(도 7d) 및 간 조직학(도 7e)에 의해 결정되는 바와 같이, 배지 중에서 인큐베이션된 mPB를 접종한 마우스들의 사망률의 원인이었다. 이종발생성 GvHD의 생존 및 이들 특징의 모두는 mPB 세포의 FasL에의 짧은 노출에 의해 완화되었다. 또한, 명백하게 유사한 속도의 전체 세포자멸사에도 불구하고, 리간드의 존재는 별개의 서브 세트의 계통-양성 mPB 세포에 영향을 미치는 것은 기능 검정으로부터 명백하다.

[0146] 사멸 리간드에의 노출은 골수 전구체 빈도를 증가시킨다

[0147] 짧은 인큐베이션 후의 mPB 배양물 내의 생존 서브세트의 조성물은 Fas 및 TNF 리셉터에 의해 매개된 세포자멸사에 대한 mPB-유래 면역 세포의 차별적인 민감도를 반영한다. 세포의 상대적 분포는 4시간의 인큐베이션 동안 세포자멸사에 대한 $CD3^{+}$ T 세포의 높은 민감도, 그리고 보다 긴 인큐베이션 기간 동안 $CD19^{+}$ B 림프구 및 $CD33^{+}$ 골수 세포의 후속의 사멸과 일치한다(도 8a). 이들 변동은 mPB 샘플에서 전구체의 빈도가 사멸 리간드를 이용한 짧은 인큐베이션 및 죽은 세포의 제거에 의해 증가될 수 있는 것을 시사하였다(도 8b). FasL 및 TNF- α 에의 노출은 골수 전구체의 4배 풍부를 가져오며, 이는 배지 중의 인큐베이션 후에 관찰되는 풍부화의 두배이다(도 8c). UCB 세포와 마찬가지로, 사멸 리간드에의 노출은 증가된 CFU 빈도를 초래하지만, UCB 세포들로부터의 변동에서 사멸 리간드에 대한 mPB 노출의 기간은 훨씬 짧다. 이들 데이터는 GvHD 효과기의 제단된 기능적 제거의 효율과 안전성을 보완하며, 이는 세포자멸사-불감성 전구체가 현저하게 풍부하다는 것을 나타낸다.

[0148] FasL에 대한 이식전 노출은 면역 및 이식편 대 종양 반응성을 손상시키지 않는다

[0149] GvHD 중증도를 예방하고 저감시키기 위하여 선택적 T 세포 고갈을 이용하는 실험에서의 결정적 의문은 이식편이 강력한 이식편 대 종양 반응을 유발하는 능력을 보유하는지의 여부이다. 조성물 내의 이들 변화에도 불구하고, 배지 중 그리고 FasL을 이용해서 인큐베이션된 mPB는 조사된 동종이계 인간 mPB 자극체에 대한 반응성을 보존한다(도 8d). 일관성 있게, FasL에 노출된 채로 그리고 노출 없이 mPB의 접종은 피하 HT29 인간 결장암종 종양을 보유하는 면역손상된 마우스들에서의 종양 성장 억제에 대해서 유사한 효과를 지닌다(도 8e). 따라서, FasL에 노출된 비자극 저온 보존된 mPB 세포는 치명적인 GvHD를 억제하고, 생착을 촉진시키며, 또한 GvT 반응성을 유지시킨다.

[0150] 실시예 3

[0151] T 세포의 이식전 고갈은 치명적인 GvHD를 예방한다

[0152] 숙주-감작화된 T 세포의 생체의 선택적 고갈에 의한 치명적인 GvHD의 예방

[0153] 숙주-반응성 T 세포의 FasL-매개 제거와 도너 접종원으로부터의 T 세포의 물리적 고갈은 양쪽 모두 GVHD를 확실하게 예방한다. 반일치 췌과 이식물(부모 대 어린이)은 높은 수준의 사망률을 특징으로 하는 GvHD의 극도의 위험을 나타낸다. 제1 단계에서, 실험은 숙주 항원에 대한 감작 후 세포자멸사 신호에 의해 T 세포의 고갈을 이용해서 반복되었다. 2 내지 3일 동안의 시험관내 항원-특이적 감작은 Fas 및 그의 동족 리간드를 부수적으로 상호 조절하는 반응성 T 세포의 T 세포 리셉터(TCR)-매개 자극을 일으켜, 방어적인 항세포자멸사 기전의 하향조절과 병행하여 세포자멸사 캐스케이드의 실행을 초래한다. 이 절차를 연장된 인큐베이션 없이 생체외에서 세포자멸사 리간드에 대한 짧은 노출을 이용하는 테스트 접근법과 비교하기 위하여, 도너는 생체내에서 숙주 항원에 대해서 사전 면역화되었다(도 9a). 예상되는 바와 같이, FasL에 대한 감작화 비장 세포의 노출이 $CD4^+$ 세포와 $CD8^+$ T 세포 둘 모두에서 유의한 세포자멸사를 유도하였다(도 9b). 감작의 효능은, 제3자($H2K^k$) 항원과 비교해서, 자극 중인 $H2K^d$ 동종이계 항원(alloantigen)에 대항하여 BALB/c 림프구($H2K^d$)로 면역화된 B6 마우스들($H2K^b$)로부터 수거된 림프구의 보다 강한 증식성 반응으로부터 명백하였다(도 9c). 이들 반응은 대조군 배지에서서의 반응체의 짧은(24시간) 인큐베이션 후에 지속되었지만, FasL의 첨가는 $H2K^d$ 자극체에 대한 사전 감작된 비장세포의 반응성을 저감시켰다. 제3자 $H2K^k$ 항원에 대한 반응은 보존되었다.

[0154] GvHD를 유발하는 감작된 림프구의 능력에 대한 FasL 노출의 효과를 평가하기 위하여, $H2K^d$ -면역된 $H2K^b$ 부모 도너로부터의 생세포는 거의 치사량에 가깝게 조사된 반일치 F1 수용체 내로 입양 전달시켰다($H2K^b \rightarrow H2K^{b/d}$). 대조군 배지에서 인큐베이팅된 사전 감작된 비장세포의 주입은 중증의 GvHD를 초래하였으며, 이는 리포다당류(LPS) 시험 후 균일하게 치명적으로 되어, 모든 마우스의 사망을 초래하였다(도 9d). LPS 시험은 강력한 면역 활성화와, 염증성 사이토카인의 방출을 초래하였으며, 이는 최대 진행중 GvHD 반응을 악화시켜 사망을 촉발시킨다. 이와 대조적으로, 주입 전에 FasL을 이용해서 사전 감작된 도너로부터의 비장세포의 생체의 인큐베이션은 LPS의 투여 후에도 50%의 마우스가 생존하였다. 이 생체내 모델은, 연구 전에, 동종이계 항원 기동된 림프구 자극이 세포자멸사촉진제를 이용해서 특이적으로 제거될 수 있는 효과기 세포의 GVHD-유발 집단의 정교화(elaboration)를 가져오는 것을 나타내는 것을 확인해준다.

[0155] 비자극 T 세포의 생체의 선택적 고갈에 의한 치명적인 GvHD의 예방

[0156] 본 발명자들은, 도너 림프구의 숙주 항원에 대한 이식전 노출이 T 세포 자극을 증대시킬 수 있고 이들 동종이계 반응이 Fas-매개 세포자멸사에 대해서 배양액 중에서 생성된 일부 효과기/기억 림프구 서브세트의 제한된 민감도로 인해 또는 모든 동종이계 반응성 T 세포를 완전히 제거하는 Fas 가교결합의 불능성으로 인해 지속될 수 있는 것을 추론하였다. 또한, 인간 도너:숙주쌍에 대한 이 사전 감작 접근법의 임상적 적응성은 상당한 도전일지도 모른다. 동종이계 반응성 T 세포의 FasL 선택의 더욱 간단하고도 더욱 신뢰성 있는 모델에 대한 탐색에 있어서, 인큐베이션 기술은 수용체 동종이계 항원에 사전에 노출되지 않았던 나이브 도너 세포를 이용하도록 변형될 수 있다(도 9e). 이 새로운 접근법에 있어서, 나이브 비장세포는 숙주 항원에 대한 사전 혹은 동시 노출의 부재 시 그리고 증식성 자극의 부재 시 FasL-함유 배지에 대한 노출에 의해 생체외에서 고갈되었다. FasL은 나이브 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포의 세포자멸사를 증가시켰지만(도 9f), 동종이계 반응은 후속으로 시험관내에서 자극된 생세포에서 보존되었다(도 9g). 따라서, 비자극 비장세포의 FasL에 대한 노출은 동종이계 항원에 대해서 반응하는 세포자멸사-불감성 세포의 능력을 보존한다.

[0157] 비자극 림프구의 생체의 제거의 효과를 평가하기 위하여, 생존 비장세포는 거의 치사량에 가깝게 조사된 반일치 F1 수용체 내로 주입하였다($H2K^b$ -GFP $\rightarrow H2K^{b/d}$). 배지 중에서 인큐베이팅된 비감작된 림프구는 치명적인 GvHD의 덜 강력한 매개체였고, 따라서 LPS는 사이토카인 스톰(cytokine storm)을 유도하여 도너 림프구의 활성을 분극화시키는데 이용되었다. LPS 시험 후의 FasL-전처리된 비자극 비장세포의 수용체의 70%의 생존은 생체의 고갈된 숙주-자극된 비장세포의 수용체의 생존에 비해서 우수하였던 반면에, 치명적인 GvHD가 대조군 배지에서 인큐베이팅된 비장세포의 모든 수용체에서 촉발되었다(도 9h). 이와 같이 해서, FasL을 이용한 도너 림프구의 처리는 숙주 항원에 대한 사전 노출의 부재 시 F1 잡종 급성 GVHD 모델에 대해서 고위험 부모의 치명적인 GvHD(LPS 시

험을 포함함)를 예방하였다.

[0158] GvHD 예방의 양적 및 질적 측면

[0159] 대조군 배지에서 인큐베이션 후의 생존 비장세포의 입양 전달은 거의 치사량에 가깝게 조사된 반일치 F1 수용체에서 유의한 GvHD를 일으켰고, 이는 FasL을 이용한 도너 세포 사전 인큐베이션에 의해 둔해졌다(도 10a). 체중의 용량-의존적 감소는 배지 중에서 인큐베이팅된 반일치 비장세포의 수용체에서의 점진적인 GVHD 중증도의 증거이다(도 10b). 이와 대조적으로, 중량 감소는, GvHD 중증도의 개선과 일관되게, FasL을 이용해서 사전 인큐베이팅된 나이브 부모 비장세포로 주입된 F1 잡종 마우스들에서 유의하게 저감되었다. 반일치 이식물($H2K^b \rightarrow H2K^{b/d}$)에서의 임상적 GvHD 점수(도 10c) 및 중량 감소(도 10d)는 동종이계 마우스 조합($H2K^b \rightarrow H2K^d$)에서 관측된 것을 초과하였으며, 일관성 있게, FasL을 이용한 사전 인큐베이션의 보호 효과는 동종이계 이식물에서 GvHD 예방에 있어서 더욱 효과적이었다. 현저하게는, 마우스들에서의 1.5 내지 5×10^6 개의 T 세포의 입양 전달은 인간에서 60 내지 200×10^6 개의 T-세포/kg의 용량과 등가인 반면, 표현형 T 세포 고갈에 의한 GvHD의 예방에 대한 임계 안전성은 반일치 이식물에서 0.02×10^6 개의 T-세포/kg이다.

[0160] 상이한 실험군에서의 생존 동물의 면역 프로파일의 차이를 평가하기 위하여, 비장의 조성물은 LPS 시험 전 및 시험 후 2일째에 평가되었다(도 10e). 모든 T 및 B 세포 서브세트는, 비장세포의 입양 전달과 무관하게, 치사량에 가까운 조사 후 제1주 동안 감소되었다. 대조군 배지에서 인큐베이팅된 림프구의 수용체는 비장의 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포와 B 림프구에서 서지(surge)에 의해 LPS에 반응하였으며($p < 0.001$), 이는 FasL-전처리된 비장세포의 수용체에서는 유의하게 감소되었다($p < 0.001$). 분별화되지 않은 비장세포와는 반대로 정제된 T 세포를 이용한 이들 실험의 반복은 유사한 결과를 보였다(데이터 제시 생략).

[0161] 생체외에서 사멸 리간드에의 노출 시간을 결정하기 위한 NOD.SCID 마우스들의 GvHD의 시뮬레이션

[0162] 비자극 도너 T 세포의 선택적 고갈에 의한 GvHD의 예방은 두 가능한 기전의 관여를 제기한다. 첫 번째로, 거의 치사량에 가까운 조사에 의해 유도된 부분적인 면역 및 골수 고갈은 잔류 숙주 면역 요소들이 FasL-고갈된 도너 T 세포에 대하여 성공적으로 작동하여, GvHD 억제를 가져오는 것을 시사한다. 두 번째로, 전신 조사를 이용한 처치는 GvHD의 구심암(afferent arm)에서 중요한 역할을 하는 조직 손상을 유도한다. 이들 두 기전을 평가하기 위하여, 질환은 이식전 처치하지 않은 림프구-결핍 NOD.SCID 마우스들에서 유도되었다. 24 및 48시간 동안 비자극 비장세포의 FasL에 대한 노출은, 유의한 세포자멸사(도 11a)와 함께, $CD4^+$ 및 $CD8^+$ 생존 T 세포의 분획의 이에 상당하는 감소(도 11b)를 유발하였다.

[0163] 일련의 교정 실험 후에, NOD.SCID 마우스들에게는 FasL-함유 배지에서 각각 24 또는 48시간의 생체외 인큐베이션 후에 3×10^6 또는 10^7 개의 나이브 동종이계 비장세포를 주입하였다($H2K^b \rightarrow H2K^{E7}$)(도 11c). 배지에서 인큐베이팅된 비장세포의 주입은, 보다 높은 용량에서 대략 20% 사망률을 유발하였고, LPS 시험 투여 후에 심한 사망률이 기록되었다(도 11d). 도너 림프구-매개 치명적인 GvHD에 대한 FasL 인큐베이션의 보호 효과는 LPS 주사 후의 마우스들의 우수한 생존에 의해 재차 강조되었다(도 11d). 이 보호 효과는 임상적 점수(도 11e) 및 중량 감소(도 11f)의 현저한 향상을 수반하였다. 컴피턴트(competent) 잔류 숙주 면역성의 부재 그리고 조절-유도 조직 손상 등과 같은 소인적 숙주 인자 없이 NOD.SCID 마우스들의 GvHD의 예방은, GvHD가 주로 비자극 림프구의 FasL에의 노출에 의해 도너 T 세포 집종원의 조절 결과인 것을 강조한다.

[0164] **실시예 4**

[0165] **조혈 세포 생착에 대한 비자극 림프구의 생체외 선택적 고갈의 영향**

[0166] Fas-민감성 나이브 비장세포의 고갈은 골수 이식에서의 GVHD를 완화시킨다

[0167] 이식 세팅에 대한 GvH-유사 모델의 발견을 확장시키기 위하여, 숙주-나이브 세포의 Fas-매개 고갈의 효과는 도너 림프구 주입과 함께 반일치 BMT를 받은 마우스들에서 평가되었다(도 12a). 대조군 배지($H2K^b \rightarrow H2K^{b/d}$)에서 사전 인큐베이팅된 150만, 300만 및 450만개의 비장세포와 함께 5×10^6 개의 반일치 BMC를 받은 조사된 F1 수용체는 중증의 GvHD(도 12b) 및 유의한 10 내지 15% 중량 감소(도 12c)를 나타낸다. GvHD의 임상적 점수는 귀 피부 및 간 시편의 조직학적 분석에 의해 입증되었다(도 12d). FasL을 이용해서 24시간 동안 주입된 나이브 비장세포의 사전 인큐베이션은 임상 GvHD 점수를 저감시켰고($p < 0.005$), 중량 감소를 무디게 하였으며($p < 0.005$), 병든 표적

장기에서 림프구 침윤물을 저감시켰다($p < 0.005$). 그러나, 잔류 저등급 GvHD 활성은 3 내지 4.5×10^6 개의 FasL-전처리된 반일치 비장세포의 주입 후에 지속되었다. 이 용량의 T 세포가 4 내지 6×10^7 개의 T 세포/정합된 관계 없는 도너로부터의 미조작된 동종이계 전 골수 이식으로 종종 투여된 T-세포의 Kg의 용량에 상당하는 것은 괄목할 만하다.

[0168] 반일치 BMT 및 세포자멸사-민감성 세포의 선택적 고갈 후의 면역-조절 재구성

[0169] GvHD는 이식편 기능을 감소시키고, 수용체 면역 반응을 극심하게 저지시킨다. Fas-민감성 도너 비장세포의 고갈이 이식 후 면역-조절 재구성에 어떻게 영향을 미치는지를 결정하기 위하여, 숙주는 이식된 도너 림프구의 생존, 키메라 현상 및 관계 없는 항원에 대한 면역 반응성에 대해서 평가되었다. 대조군 배지에서 사전 인큐베이션된 최고 용량(4.5×10^6)의 미조작된 도너 비장세포의 수용체는, FasL 전처리된 비장세포의 수용체에 비해서, 3주 및 6주 이식후에 감소된 수준의 키메라 현상을 나타내었는 바(도 13a), 이것은 도너 림프구의 전처리가 미처리 세포의 이식편 억제 효과를 저지하는 것을 입증한다.

[0170] 이식 시 주입된 성숙한 림프구가 말초 항상성 확장을 위한 골수 이식편에 의해 생성된 림프구와 경쟁하여 알파 림프구 개수에 영향을 미치기 때문에, 림프 재구성에 대한 FasL 처리된 림프구 주입의 영향이 조사되었다. 미소한 CD45 항원 차이(CD45.1 대 CD45.2)는 이식 후의 몇 주 동안 수용체 내의 BMC 이식편-유래 T 세포와 주입된 비장세포 간을 분화시키는데 이용되었다. F1 수용체가 부모의 면역 세포를 거부하지 않는다는 사실에도 불구하고, 소수의 주입된 비장세포($H2K^b$, CD45.2⁺GFP⁺)는, 이들이 FasL을 이용해서 인큐베이션되었던 혹은 대조군 배지에서 인큐베이션되었던지 간에, 이식 후 3주에 수용체의 말초 림프 장기에서 검출되었다(도 13b). 질적으로, 대조군 및 FasL-전처리된 비장세포의 수용체는 키메라 마우스들에 대해서 예상되는 바와 같이 도너와 숙주 항원의 둘 모두에 대해서 무반응(unresponsiveness)을 나타내었고, 제3자($H2K^k$) 항원에 대해서 동등하게 잘 반응하였다(도 13c). 따라서, FasL을 이용한 림프구의 생체외 처리는 이식 후 정량적 혹은 기능적 면역 재구성에 하등 영향을 미치지 않지만, GvHD의 예방이 도너 세포 생착을 향상시키는 것으로 여겨진다.

[0171] 본 발명자들은 FasL을 이용한 비자극 림프구의 사전 인큐베이션에 의한 GvHD의 예방이 세포의 손상된 네비게이션 능력에 의해 초래되는지에 의문을 가졌다. 이 가능성은 거의 치사량에 가깝게 조사된 F1 수용체 내로의 생존 비장세포의 주입($H2K^b$ -GFP $\rightarrow$ $H2K^{b/d}$)에 의해 평가되었고, 이는, 세포들이 FasL에 사전 노출되었는지 또는 대조 배지에 사전 노출되었는지, 주입 후 24시간째에 림프구가 수용체 비장 및 장간막 림프절로 돌아간 것을 입증하였다(도 13d). 이들 데이터는 림프구의 사전 노출이 그의 네비게이션 능력을 손상시키는 일 없이 잠재적인 GvHD 효과기를 고갈시키는 것을 입증한다.

[0172] 조절 세포의 사멸 리간드에 대한 노출은 생착을 향상시킨다

[0173] 조절 이식편으로부터의 모든 T 세포의 고갈은 생착-촉진 세포를 제거하여, 대용량의 줄기 세포의 보상적 주입을 요구한다. 24시간 동안 FasL을 이용한 이식편의 사전 인큐베이션(도 14a)은 2×10^6 개의 동종이계($H2K^d \rightarrow H2K^b$) 전체 BMC의 조사된 숙주 내로의 이식에 의해 유도된 도너 키메라 현상의 수준에 영향을 미치지 않았다(도 14b). 따라서, 생착은 이중 전체 BMC 집단이 이식 전에 사멸 리간드에 노출된 경우 소실되지 않는다.

[0174] T 세포는 이하의 두 기전을 통한 조절 전구체 생착을 지지한다: a) 도너 T 세포는 잔류 도너 면역에 의해 이식편 거부에 대응할 수 있고, 그리고 b) T 세포는 골수 내의 파종 부위에서 전구체와 공존하며 확인되지 않은 비면역원성 기전을 통한 생착을 지지한다. 거부를 예방하기 위한 세포자멸사-민감성 T 세포의 고갈이 또한 생착-촉진 세포를 제거하는지를 결정하기 위하여, 조사된 $H2K^b$ 마우스들에게 10^6 개의 살아 있는 미조작된 $H2K^d$ lin⁻ 전구체를 이식하였다. 이 모델에서, GvHD 활성이 없는 F1 도너로부터의 비장세포($H2K^{b/d}$)가 이용되었다. 대조군 배지 또는 FasL을 이용한 인큐베이션 후의 10^6 개의 살아있는 F1 비장세포의 주입은 도너 키메라 현상의 수준을 증가시켰는 바(도 14c), 이는 Fas-민감성 비장세포의 고갈이 HSPC 생착을 용이하게 하는 세포를 제거하지 못하는 것을 입증하고 있다.

[0175] 도너 림프구의 사멸 리간드에 대한 사전 노출은 지연된 도너 림프구 주입의 생착-지지 활성을 보존시킨다

[0176] 이식후 도너 림프구의 주입(DLI)은 도너 키메라 현상을 향상시키고, 감염에 대한 반응성을 증대시키며, 이식편 대 종양 반응을 촉진하는 효과적인 접근법이다. 지연된 DLI가 더욱 잘 용인되어, 조절 이식 시 처리된 수용체에

서 림프구의 주입보다 덜 GvHD를 일으킨다고 해도, 림프구는 GvHD의 중증도를 증가시키는 능력을 지닌다. 혼합 키메라 현상의 모델(도 14e)에서 지연된 도너 림프구 주입은 FasL에 대한 림프구의 이식전 노출에 무관하게 도너 키메라 현상의 수준을 증가시키는데 효과적이었다(도 14f). 따라서, Fas-민감성 비자극 림프구의 고갈은 이식후 DLI의 효능을 손상시키지 않는다.

[0177] FasL은 GVT를 손상시키는 일 없이 GVHD를 완화시킨다

[0178] 악성 질환의 치료를 위하여 수행된 줄기 세포 이식의 전반적인 성공은 이식편 대 종양(GvT) 효과에 의존할 수 있다. (생체의 또는 강력한 생체내 면역 억제에 의한) T 세포의 벌크 고갈은 각종 임상 상황에서 GvT 효과를 무디게 하고 이식후 재발률을 증가시킬 수 있다. FasL 인큐베이션이 두 실험 모델에서 GvHD에 대한 그의 유익한 효과에 병행해서 GvT 효과를 저지시키는지의 여부를 조사하였다. 첫 번째 모델에서, 동종이계 종양에 대한 FasL-매개 고갈 후의 숙주-정합된 림프구의 GvT 반응성의 보존을 평가하였다. CT26 결장암종 세포(H2K^d)는 NOD (면역적격) 도너(H2K^{g7}, 도 15A)로부터의 1.5×10^7 개의 비장세포가 입양 전달된 NOD.SCID 마우스들(H2K^{g7})에게 이식하였다. 24시간 동안 FasL을 이용해서 사전 인큐베이팅된 비장세포는 대조군 배지에서 인큐베이팅된 비장세포와 비교해서 유사한 정도로 종양 이식물의 성장을 억제시켰으며(도 15B), 이것은 FasL을 이용한 인큐베이션이 림프구-매개 GvT 반응성을 보존하는 것을 확인해준다. 두 번째 모델에서, MHC-정합된 신경모세포종(Neuro-2a, H2K^a) 종양을 보유하는 H2K^a 마우스들에게는 거의 치사량에 가깝게 조사하고, 동종이계 도너로부터의 2×10^6 개의 lin^- 전구체를 이식하였다(H2K^b, 도 15C). 종양을 자체로서 인식하는 F1 도너(H2K^{b/d})로부터의 림프구의 주입은, 종양 성장에 유의한 영향을 미치지 못하였다(도 15D). 이에 상충하여, 동종이계 비장세포(H2K^b)의 주입은 종양 성장 속도를 저감시켰지만, 마우스들의 80%는 중증의 GvHD 때문에 3주 내에 죽었다. 비자극 도너 비장세포(H2K^b)의 생체외 Fas-매개 고갈은 치명적인 GvHD를 완화시키면서 동등한 종양-억제 효과를 보였으며, 모든 마우스는 실험 종료 시점까지 생존하였다. 이들 데이터는 GVHD가 GvT 효과에 대한 전제조건이 아님을 확인해주고, 따라서 GvHD의 예방은 선택적으로-고갈된 림프구의 항종양 활성을 손상시키지 않는다.

[0179] 악성 세포의 FasL-매개 퍼징(purging)

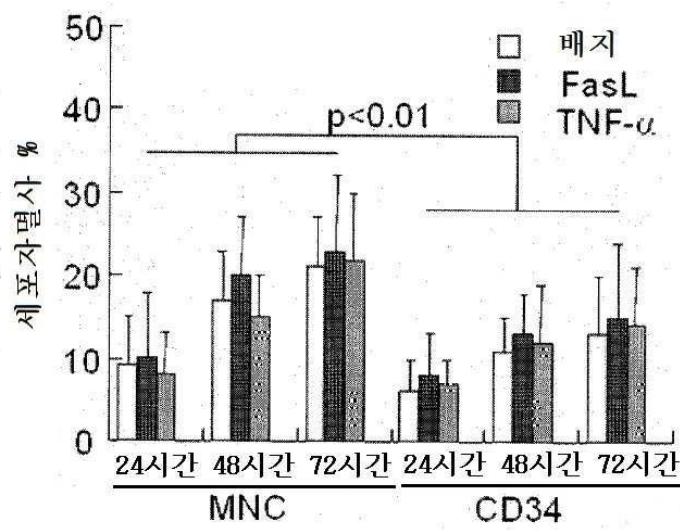
[0180] 공격적인 방사선화학요법 후의 자가 이식물의 상당한 이점과 안전성에 불구하고, 이식편의 잔류 악성 세포에 의한 혼입은 질환 재발의 위험 인자이다. 이 가능성을 평가하기 위하여, 마우스들에게, 골수 세포와 A20 B 세포 림프종의 혼합물을, 동계 BALB/c 마우스들에서의 치명적인 용량으로 주입하였다(도 15E). 배지에서 인큐베이팅된 세포 혼합물의 주입은 4주 내에 수용체의 80%의 사멸을 초래하였지만, FasL에 노출된 이식편을 주입한 모든 마우스는 이 기간 동안 살아있었다(도 15F). 이들 데이터는 조혈 이식편으로부터 세포자멸사-민감성 악성 세포의 고갈에 대하여 사멸 리간드에 의한 짧은 인큐베이션의 효능을 보고한다.

[0181] Fas-민감성 세포의 고갈은 자가 이식에서의 자가면역성의 입양 전달을 방지한다

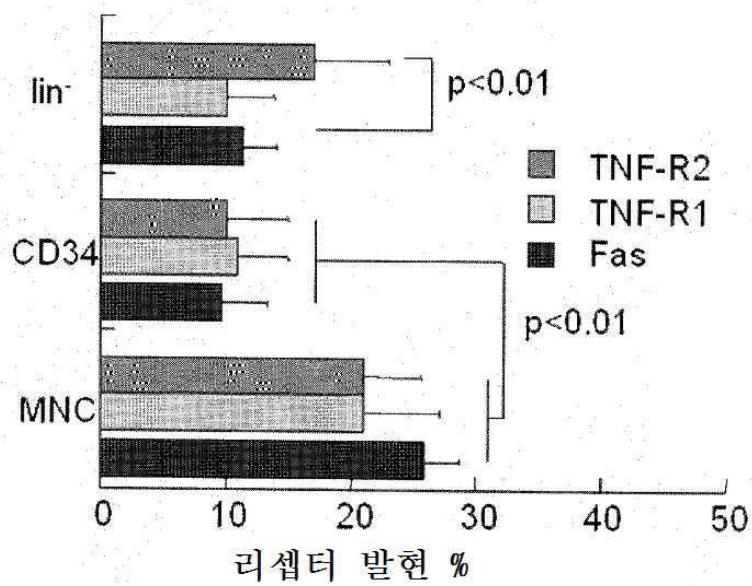
[0182] 제1형 당뇨병은 췌장의 랑게르한스섬에서 인슐린-생산 β -세포를 파괴하는 자가면역 반응이다. 이 장애는 일반적으로 비비만 당뇨병 마우스(NOD)에서 모델화되되, 그 발병률은 30주령의 암컷에서 80%를 상회한다. 자가면역 당뇨병은 T 세포에 의해 입양 전달되지만, 전체 골수 세포의 이식에 의해 그만큼 효율적이지는 않다. 예비 실험은 5×10^7 개의 골수 세포가 거의 치사량에 가깝게-조사된 NOD.SCID 마우스들의 대략 50%에게 질환을 전달하는 것을 결정하였으며(도 15G), 두 군주는 동일한 단상형(H2K^{g7})을 보유한다. 또한, NOD.SCID 마우스들은 이들이 컴퍼턴트 T 및 B 림프구를 결여하므로 도너 세포를 거부하지 않는다. 48시간 동안 배지에서 인큐베이팅된 BMC의 입양 전달이 질환을 효율적으로 옮기는 반면, FasL에 노출된 BMC의 수용체의 어느 것도 고혈당증을 보이지 않았다(도 15H). 따라서, 생체외에서 조혈 세포의 사멸 리간드에의 노출은 자가면역 반응성을 지닌 세포를 제거한다.

도면

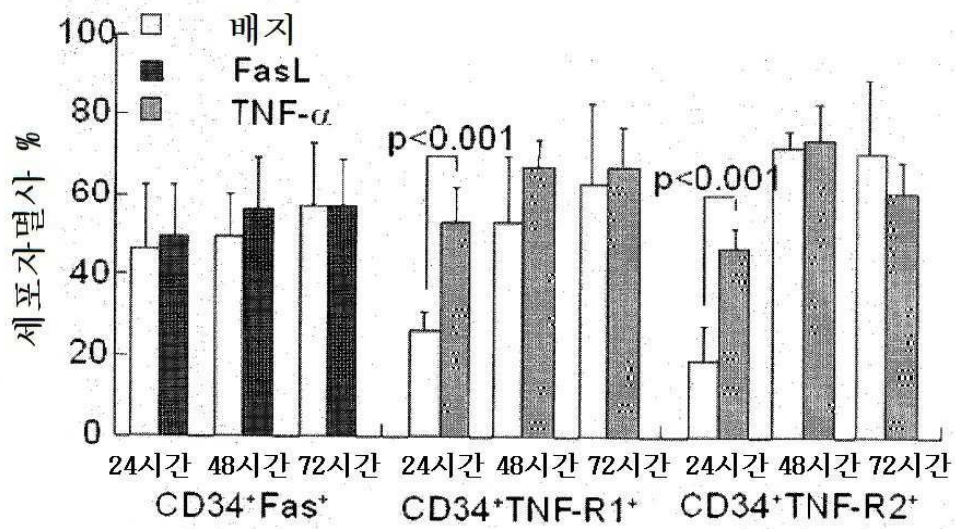
도면1a



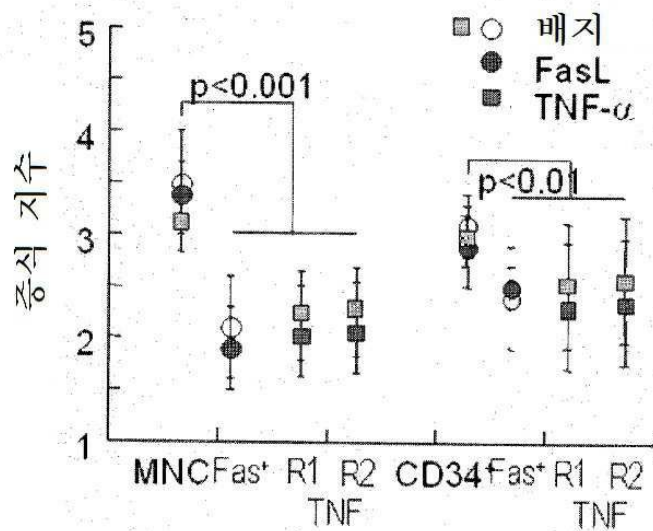
도면1b



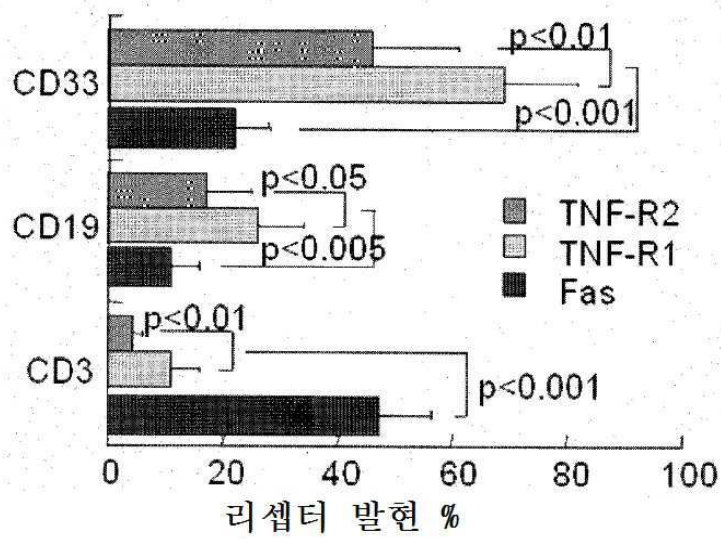
도면1c



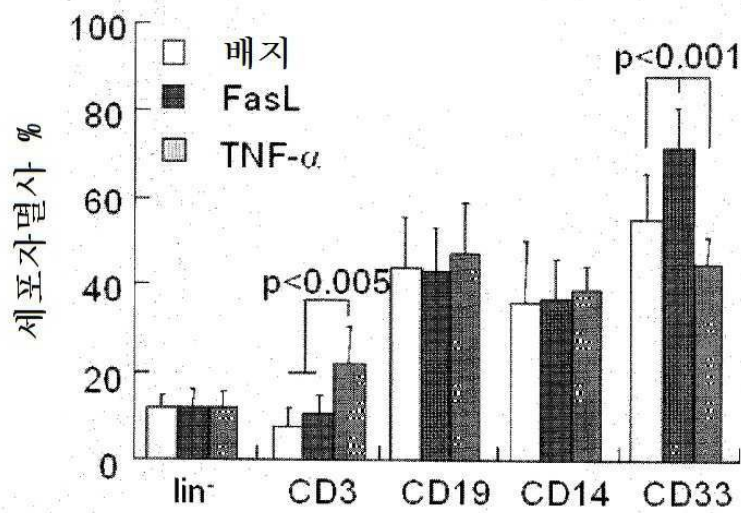
도면1d



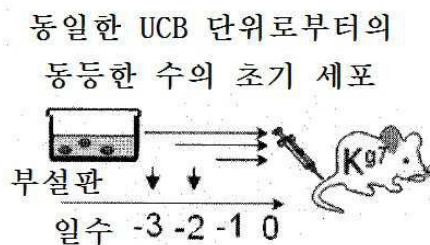
도면1e



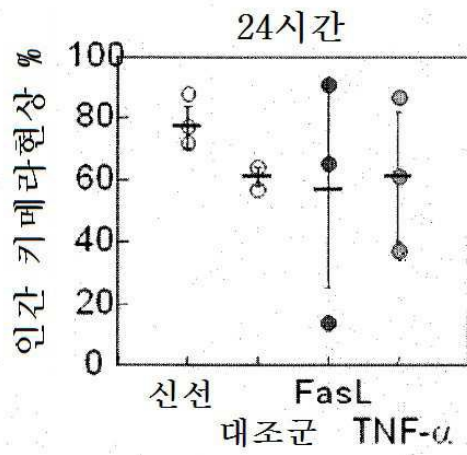
도면1f



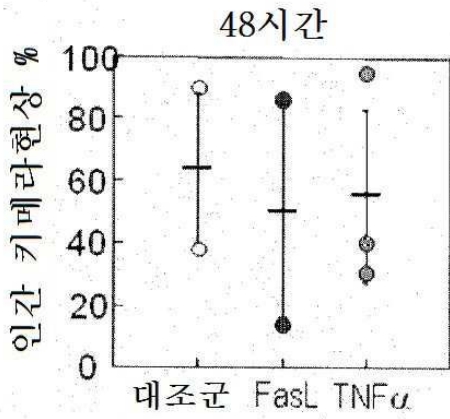
도면2a



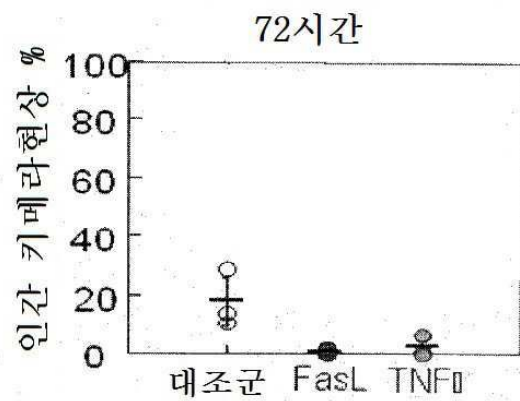
도면2b



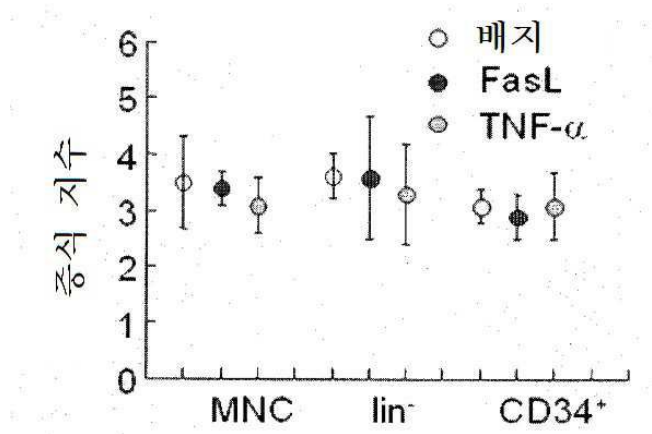
도면2c



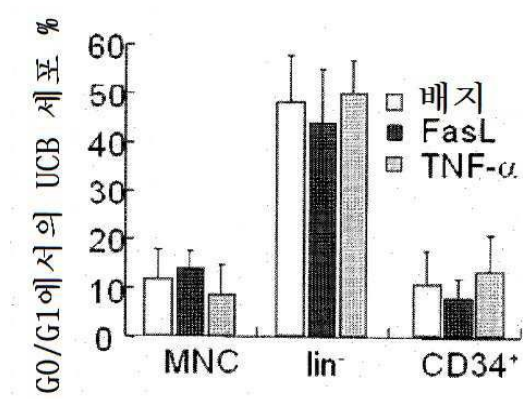
도면2d



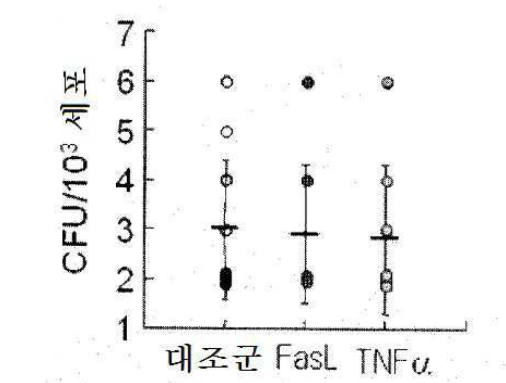
도면2e



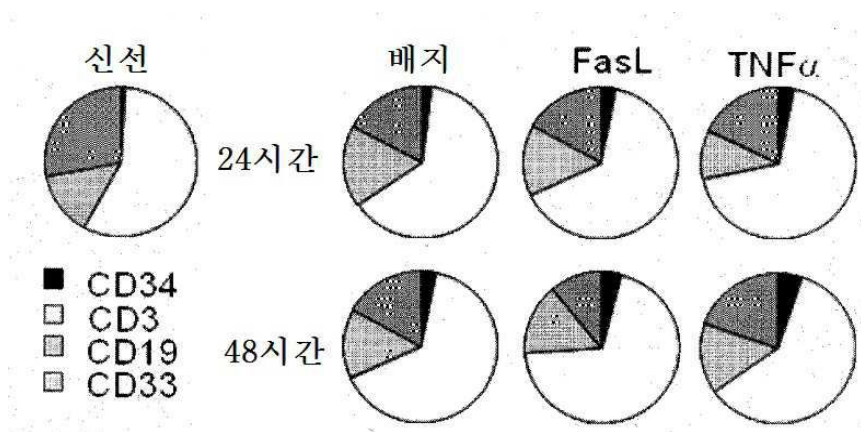
도면2f



도면2g



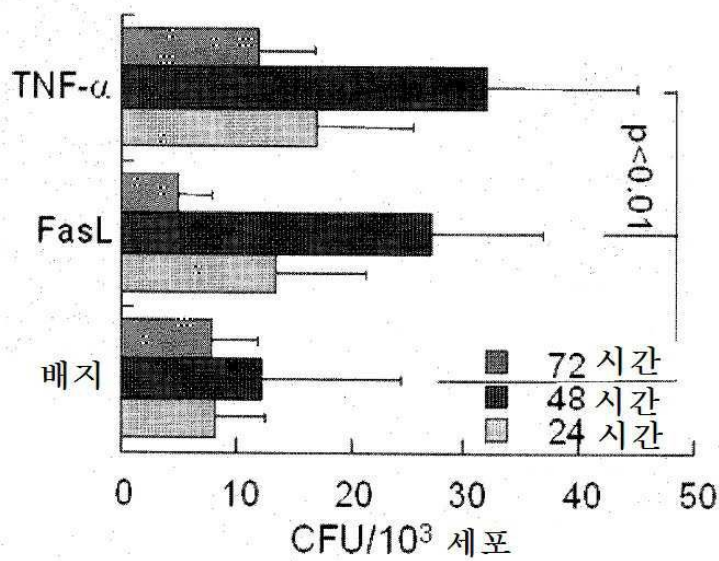
도면3a



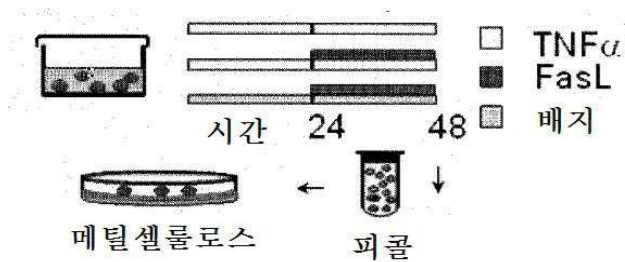
도면3b



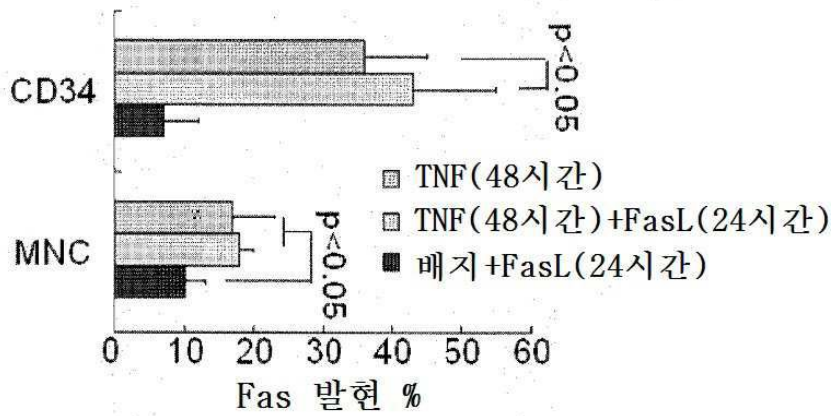
도면3c



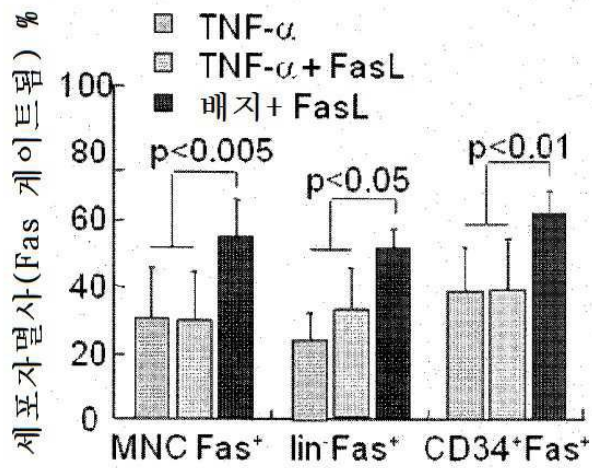
도면4a



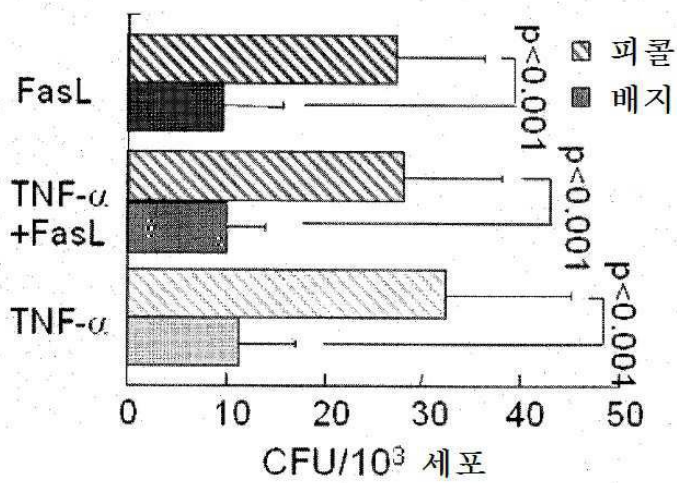
도면4b



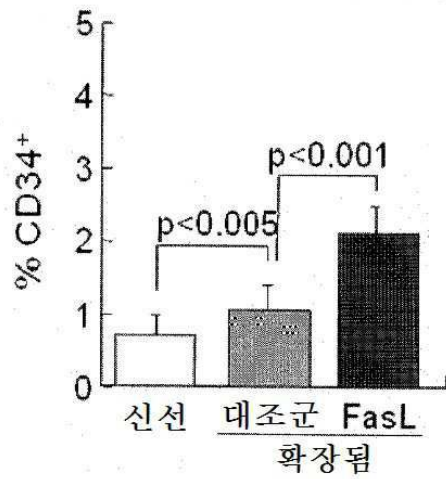
도면4c



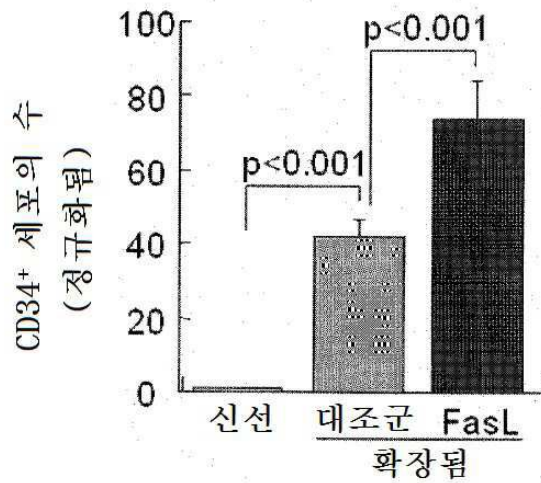
도면4d



도면5a



도면5b

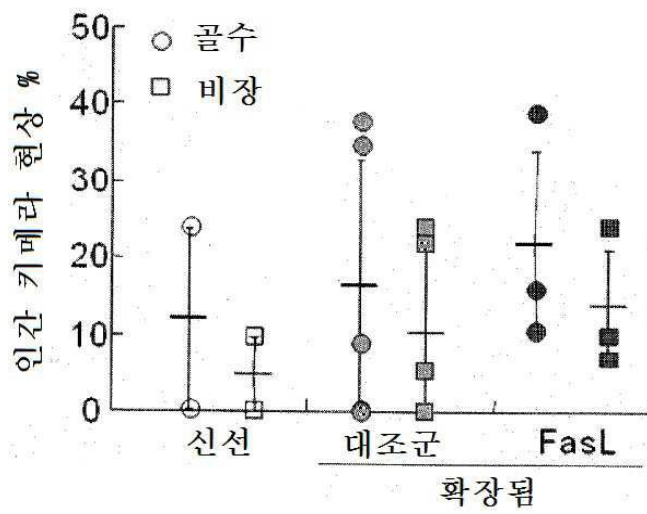


도면5c

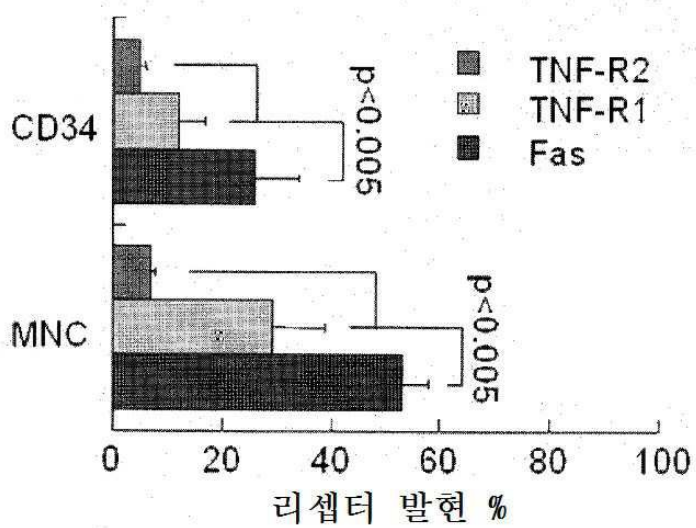
동일한 UCB 단위로부터의 동등한 수의 초기 세포



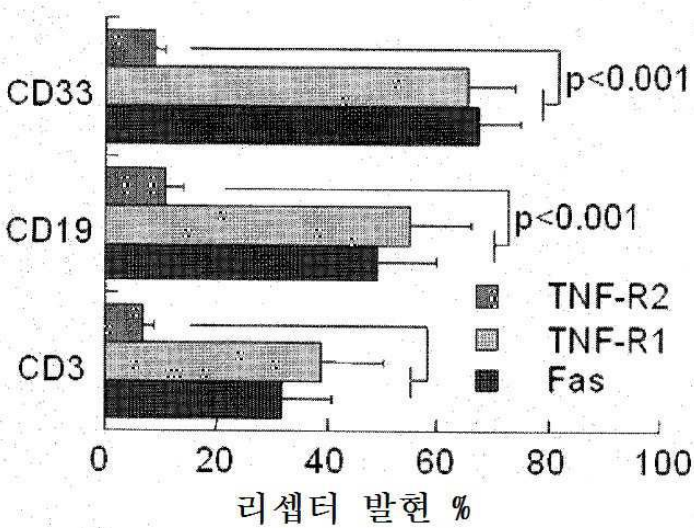
도면5d



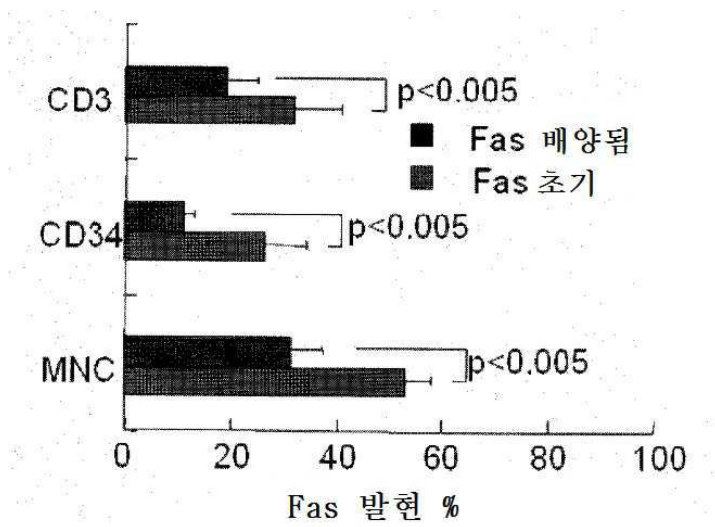
도면6a



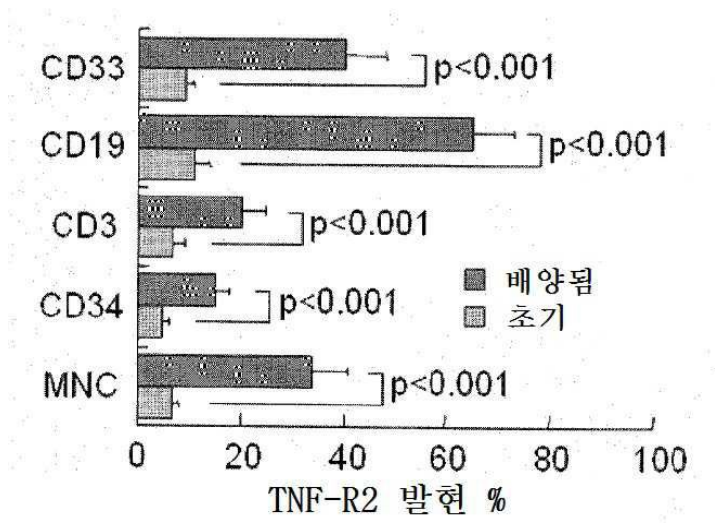
도면6b



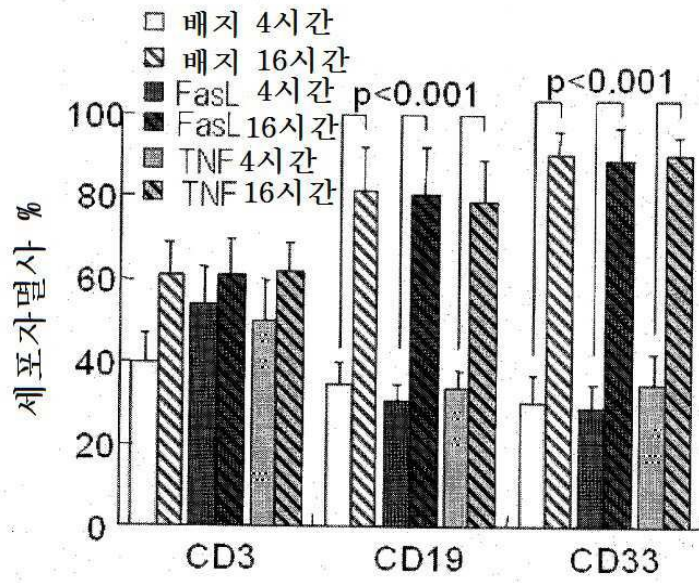
도면6c



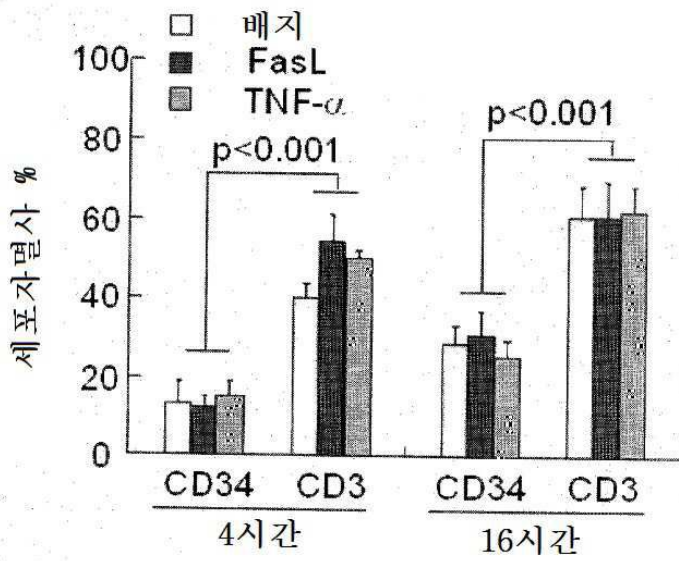
도면6d



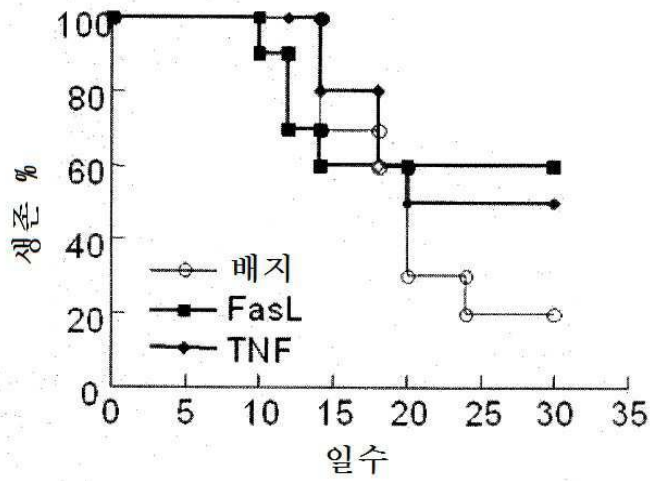
도면6e



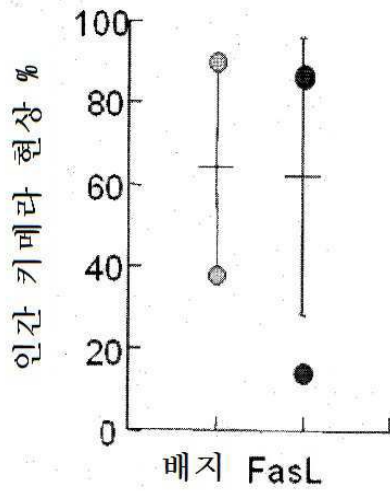
도면6f



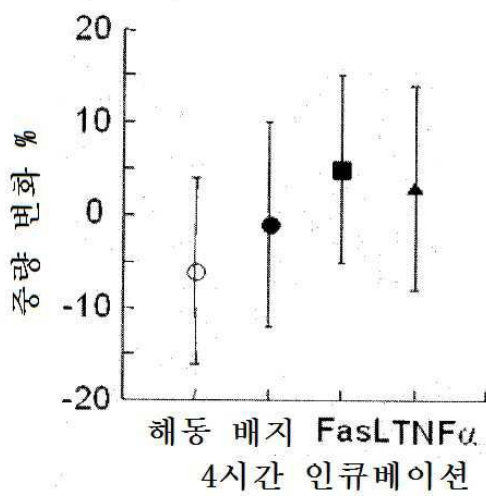
도면7a



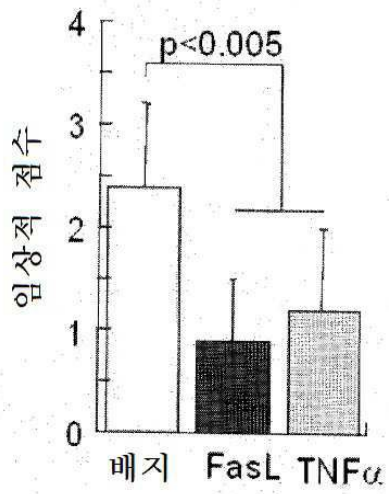
도면7b



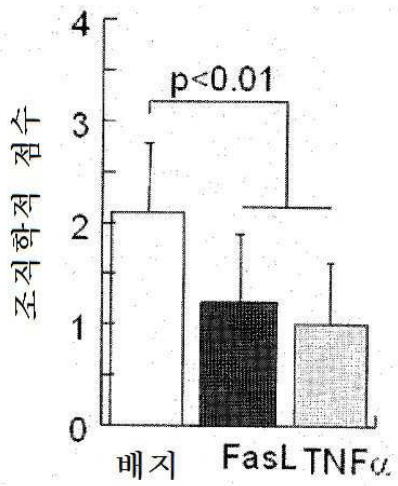
도면7c



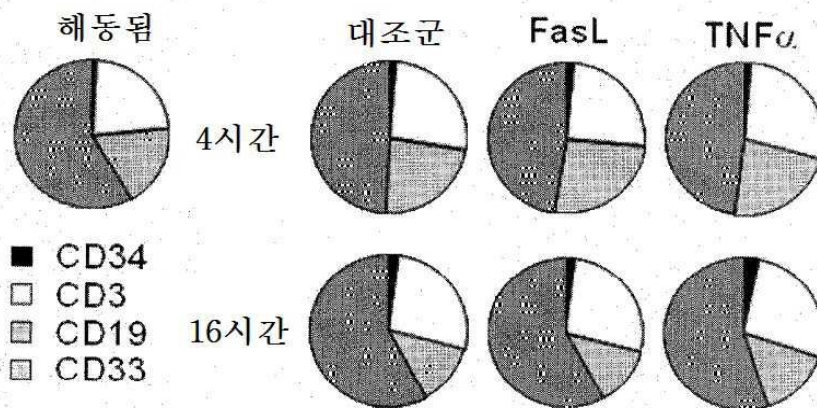
도면7d



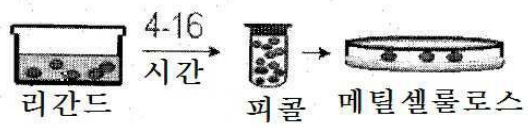
도면7e



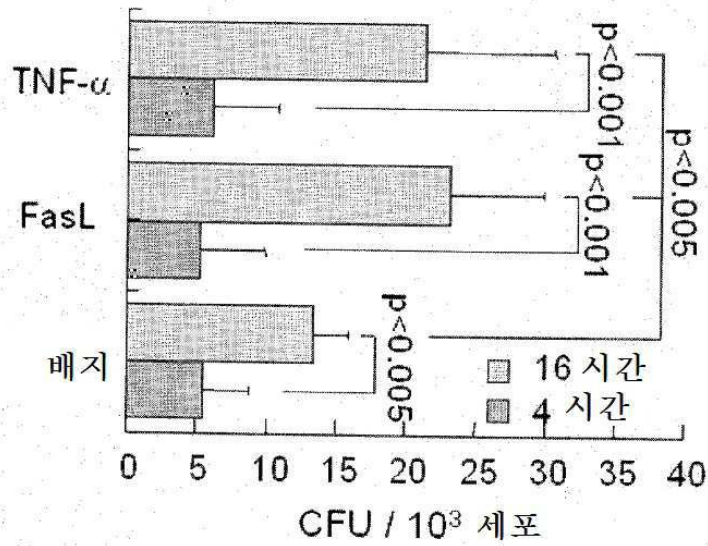
도면8a



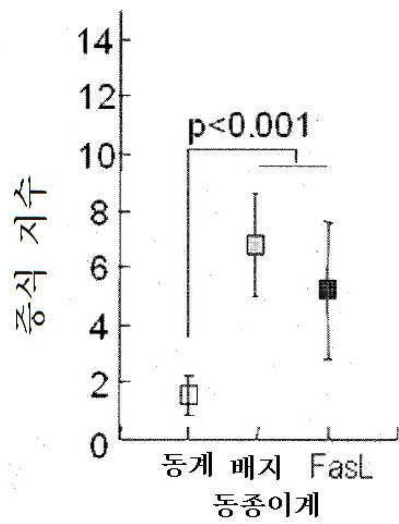
도면8b



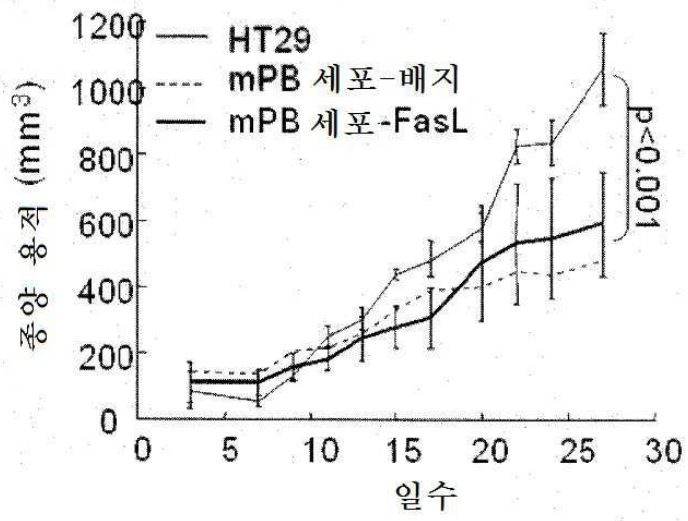
도면8c



도면8d



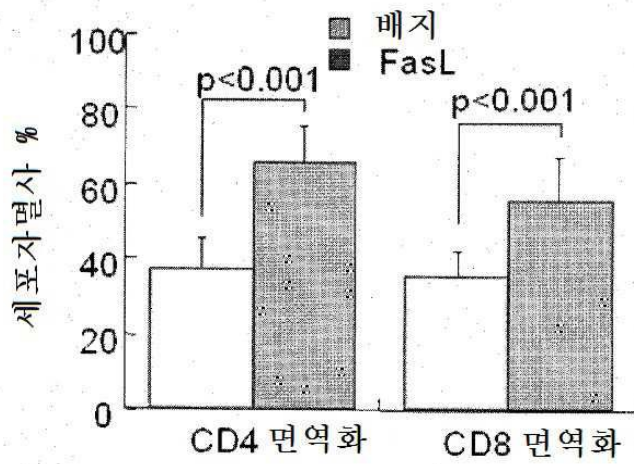
도면8e



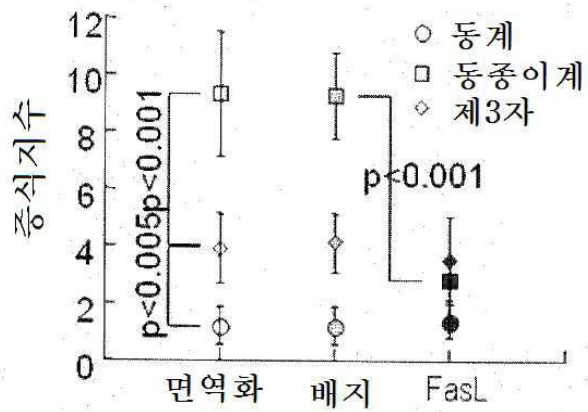
도면9a



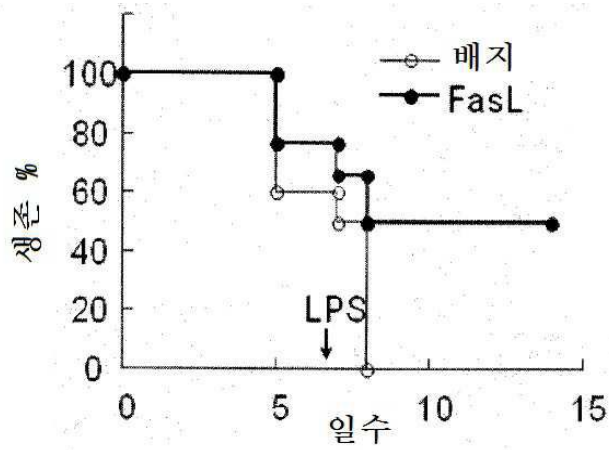
도면9b



도면9c



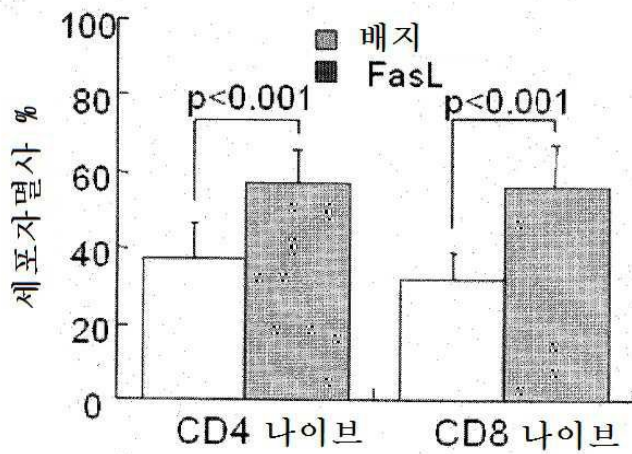
도면9d



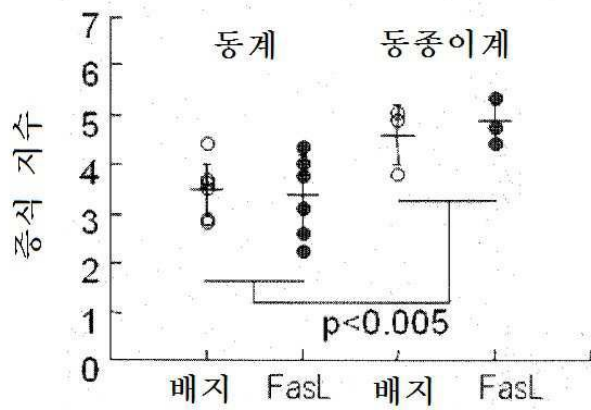
도면9e



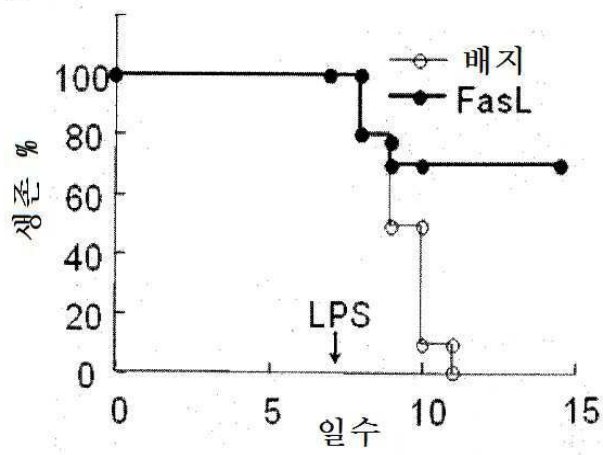
도면9f



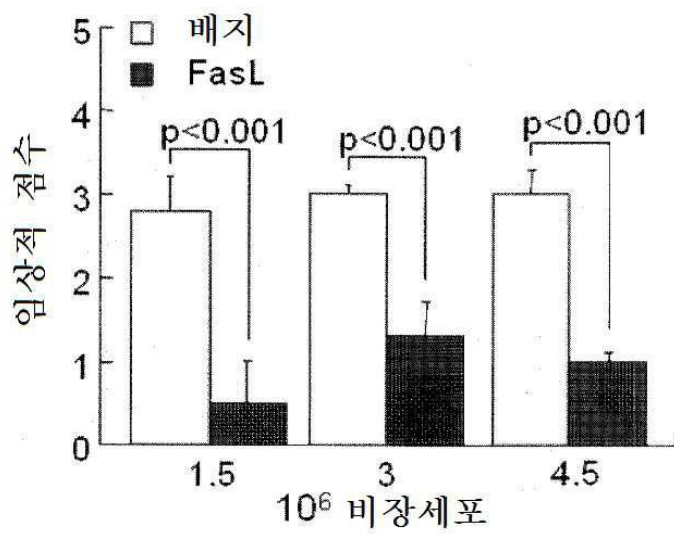
도면9g



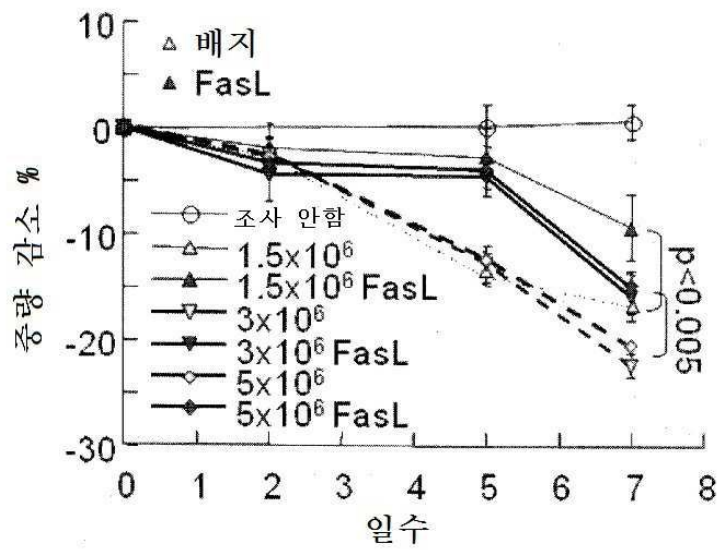
도면9h



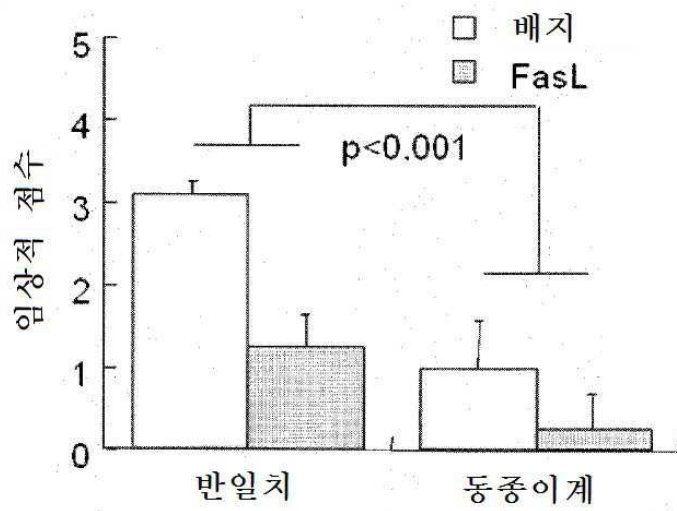
도면10a



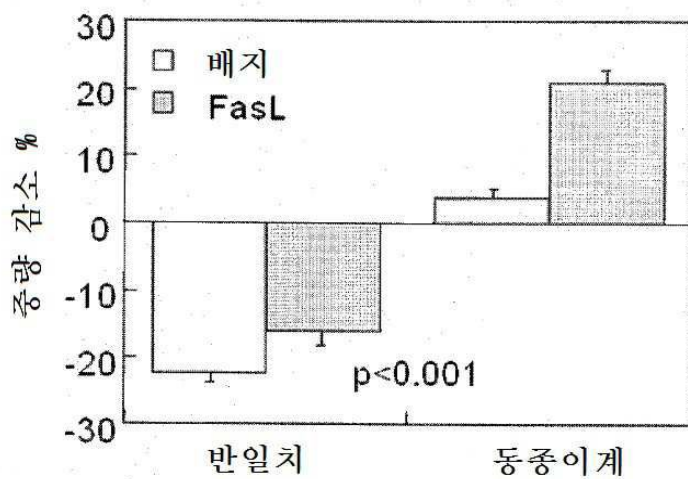
도면10b



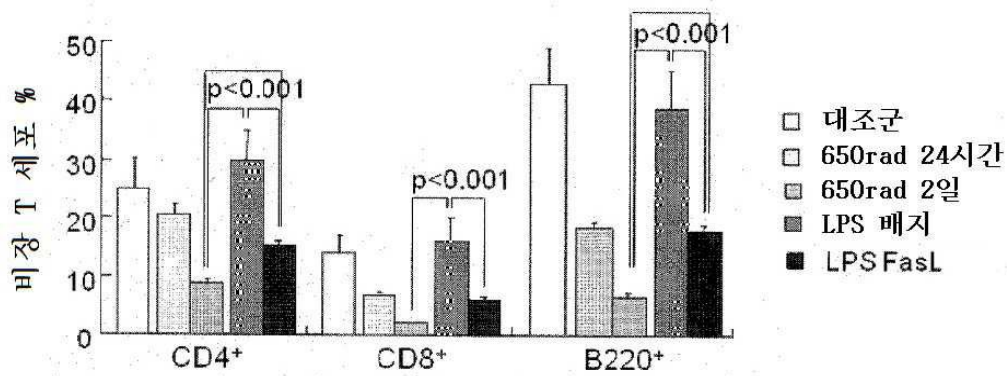
도면10c



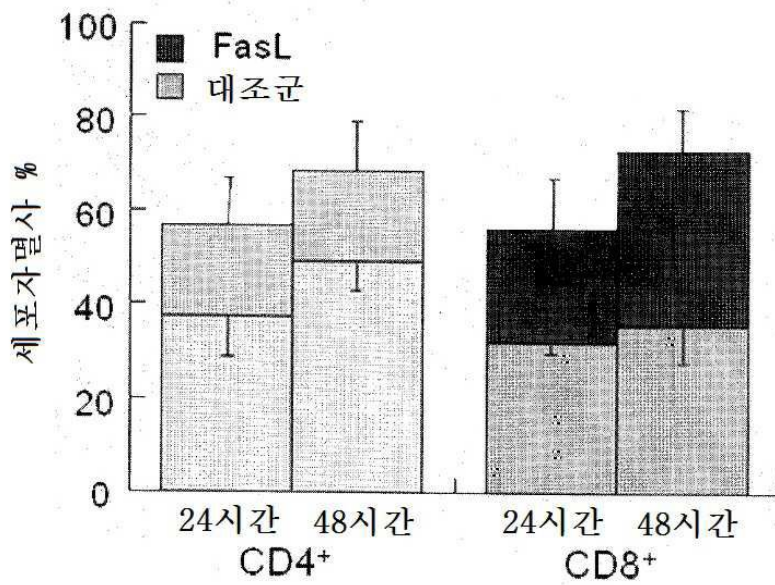
도면10d



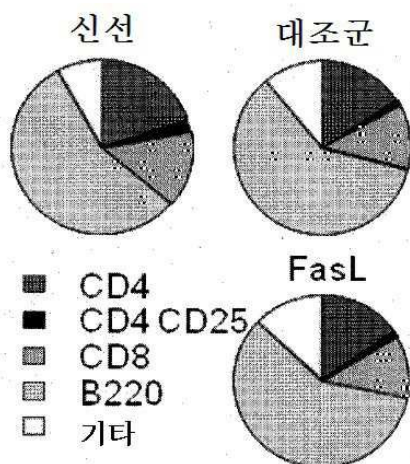
도면10e



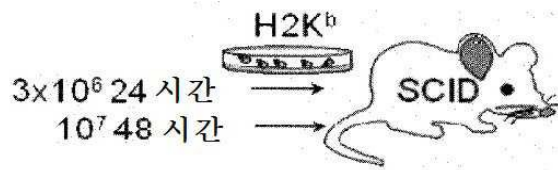
도면11a



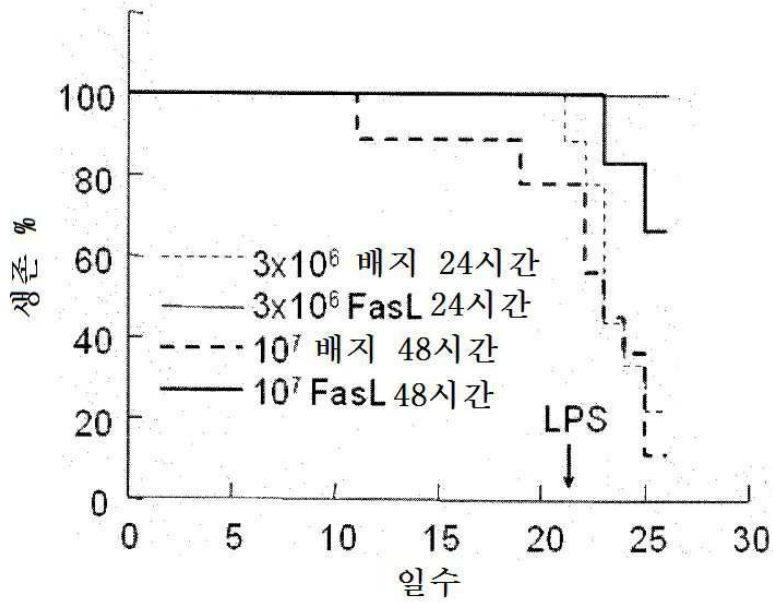
도면11b



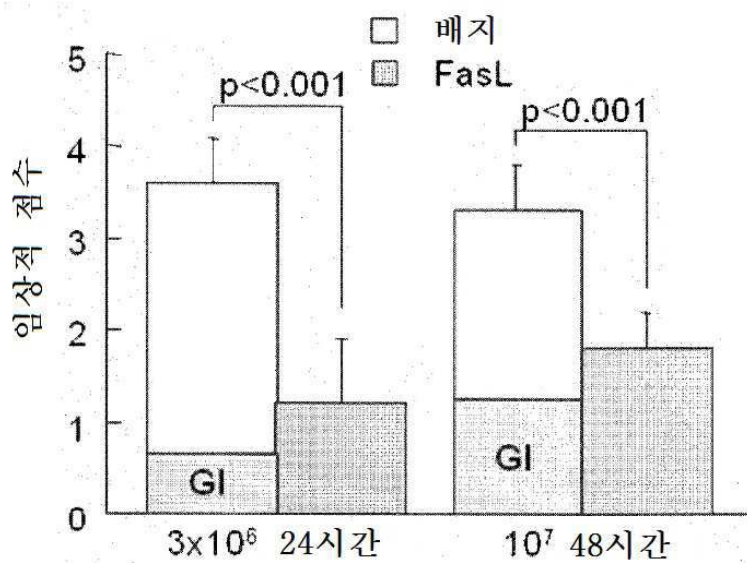
도면11c



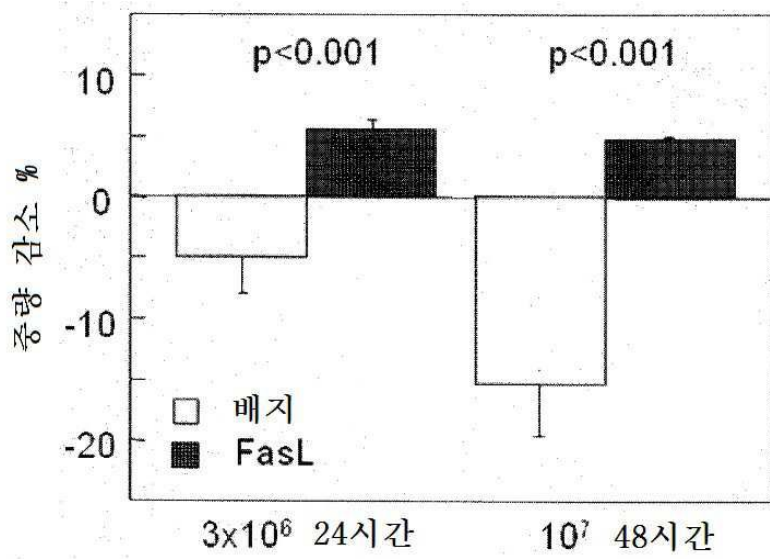
도면11d



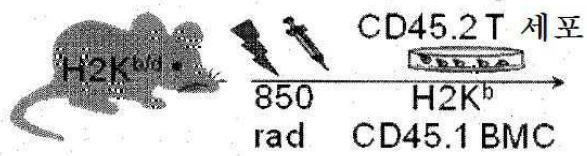
도면11e



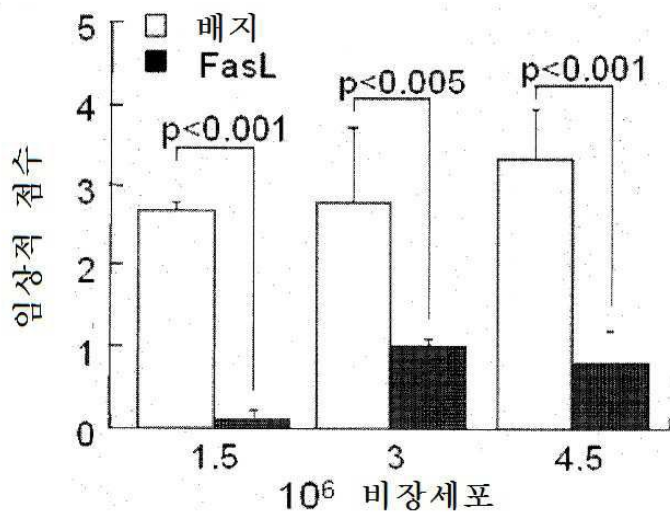
도면11f



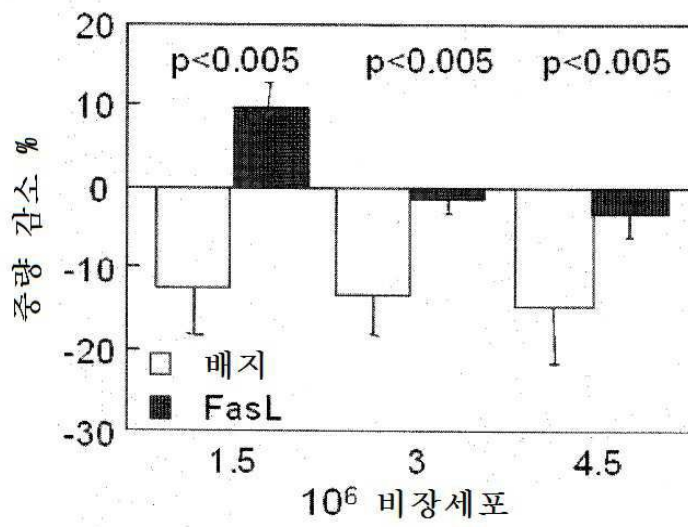
도면12a



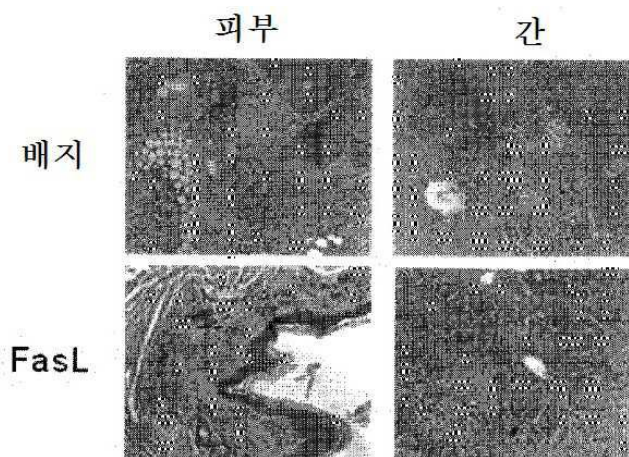
도면12b



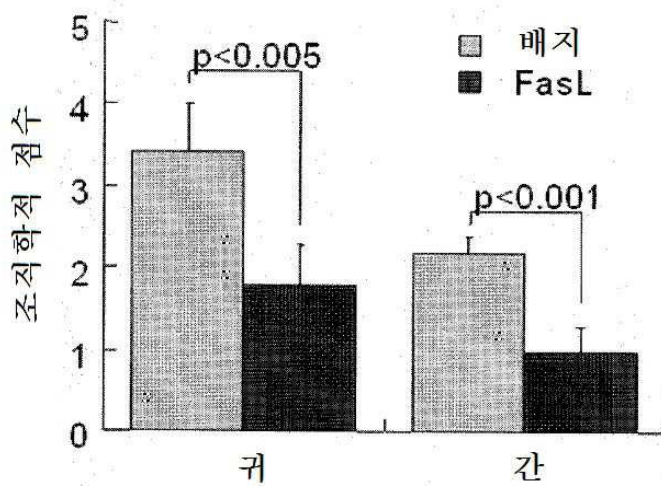
도면12c



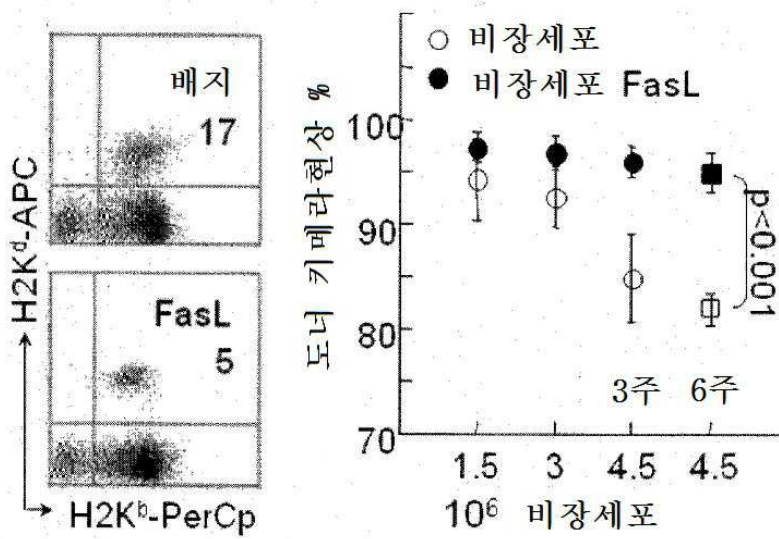
도면12d



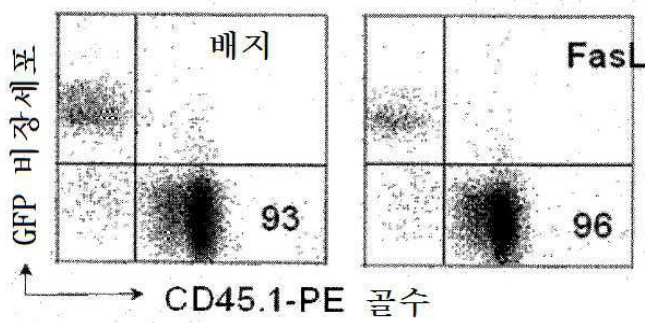
도면12e



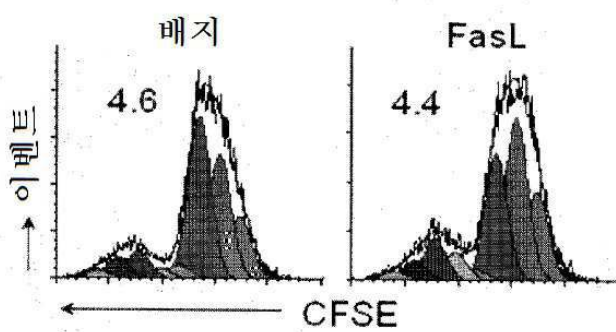
도면13a



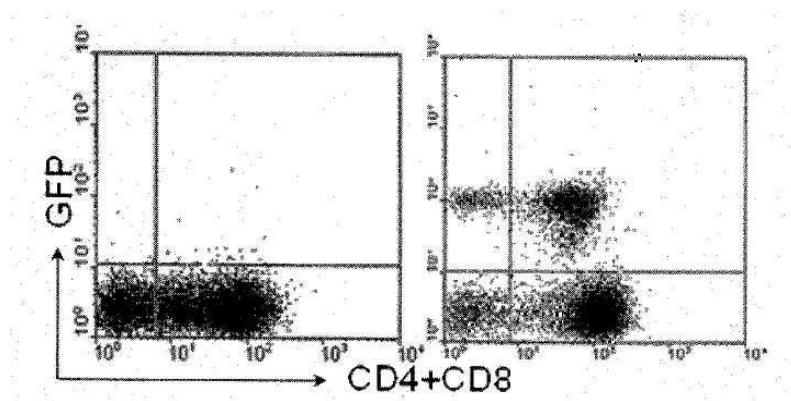
도면13b



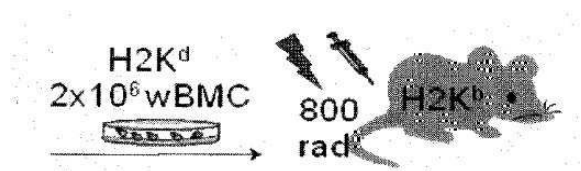
도면13c



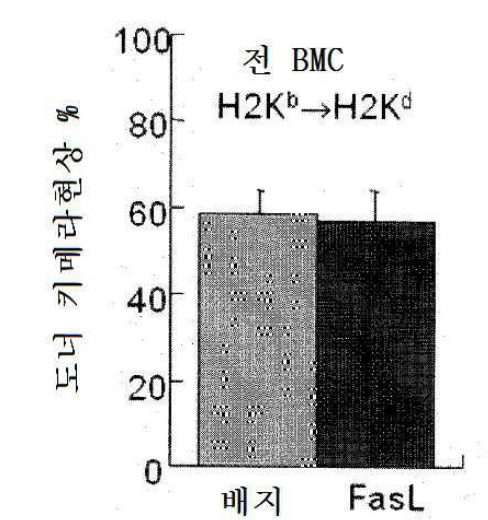
도면13d



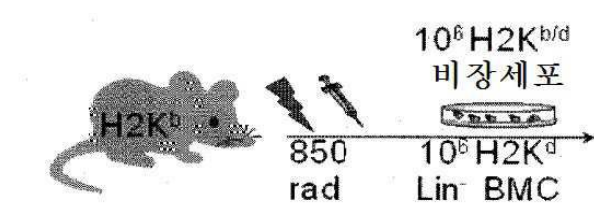
도면14a



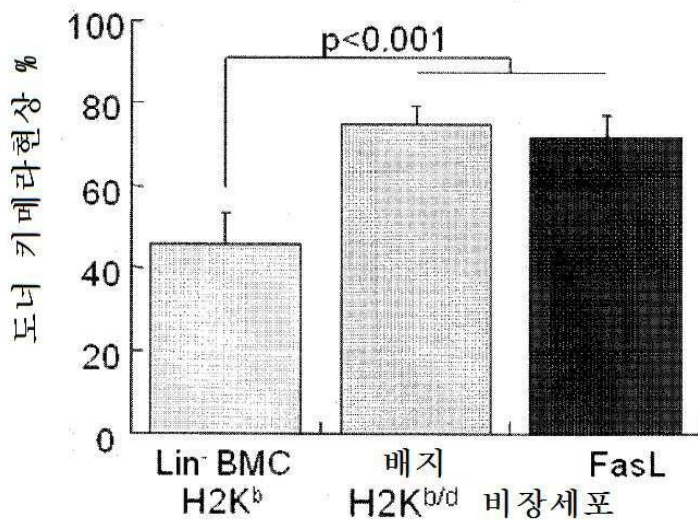
도면14b



도면14c



도면14d



도면14e



도면14f

