



- (51) 국제특허분류: 미분류
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2016/001932
- (22) 국제출원일: 2016년 2월 26일 (26.02.2016)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2015-0027415 2015년 2월 26일 (26.02.2015) KR
10-2015-0027416 2015년 2월 26일 (26.02.2015) KR
10-2015-0027417 2015년 2월 26일 (26.02.2015) KR
- (71) 출원인: 광주과학기술원 (GWANGJU INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) [KR/KR]; 61005 광주 북구 첨단과기로 123, Gwangju (KR).
- (72) 발명자: 박성규 (PARK, Sung Gyoo); 61005 광주 북구 첨단과기로 123 광주과학기술원 교수아파트 C동 1402호, Gwangju (KR). 이초룡 (LEE, Cho Rong); 61159 광주 북구 삼정로 50-1 두암 주공 3단지 아파트 305동 401호, Gwangju (KR).
- (74) 대리인: 양부현 (YANG, Boo Hyun); 08793 서울시 관악구 남부순환로 1922 청동빌딩 301호, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

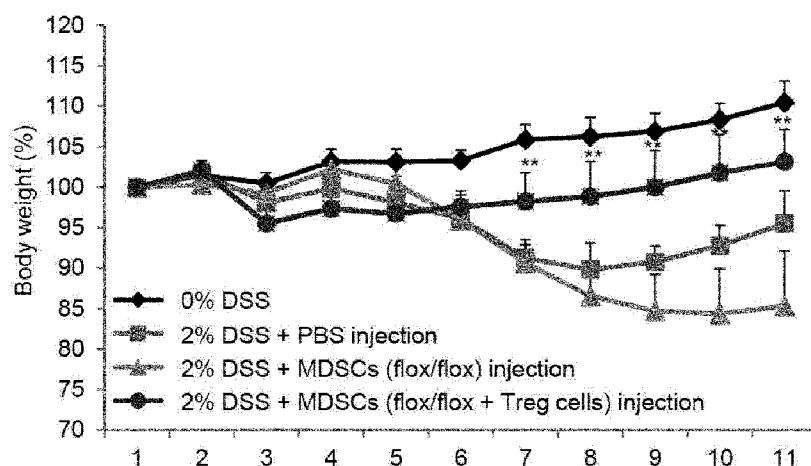
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))

(54) Title: COMPOSITION FOR ENHANCING IMMUNOSUPPRESSIVE ACTIVITY OF MYELOID-DERIVED SUPPRESSOR CELLS AND METHOD FOR ENHANCING IMMUNOSUPPRESSIVE ACTIVITY USING SAME

(54) 발명의 명칭: 골수 유래 억제 세포의 면역 억제 활성 증진용 조성물 및 이를 이용한 면역 억제 활성 증진 방법



(57) Abstract: The present invention relates to a composition for enhancing immunosuppressive activity of myeloid-derived suppressor cells (MDSCs), the composition containing immunoregulatory T cells (Treg cells) and/or transforming growth factor- β (TGF- β), to a method for enhancing immunosuppressive activity of myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) using the same, and to an immunosuppressive composition containing MDSCs differentiated into subpopulations by the treatment with immunoregulatory T cells and/or TGF- β . The use of the composition of the present invention can obtain MDSCs with enhanced immunosuppressive activity, and the use of the MDSCs can effectively prevent or treat immune-related diseases.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]



본 발명은 면역 조절 T 세포(Treg cell) 및/또는 TGF- β (transforming growth factor- β)를 포함하는 골수 유래 억제 세포(MDSC)의 면역 억제 활성 증진용 조성물, 이를 이용한 골수 유래 억제 세포(MDSC)의 면역 억제 활성 증진 방법, 및 면역 조절 T 세포 및/또는 TGF- β 의 처리에 의해 소집단(subpopulation) 분화된 MDSC를 포함하는 면역 억제용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 조성물을 사용함으로써 면역 억제 활성이 증진된 MDSC를 얻을 수 있고, 이를 이용하여 면역 관련 질환을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 골수 유래 억제 세포의 면역 억제 활성 증진용 조성물 및 이를 이용한 면역 억제 활성 증진 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 대한민국 보건복지부의 지원 하에서 과제번호 HI14C1466에 의해 이루어진 것으로서, 상기 과제의 연구관리전문기관은 한국보건산업진흥원, 연구사업명은 “첨단의료기술개발”, 연구과제명은 “자가면역질환 세포치료를 위한 조혈줄기세포 유래 기능강화 MDSC분화 기술개발”, 주관기관은 광주과학기술원, 연구기간은 2014. 10. 01 ~ 2016. 9. 30이다.
- [2] 본 특허출원은 2015년 2월 26일에 대한민국 특허청에 제출된 대한민국 특허출원 제 10-2015-0027415호, 2015년 2월 26일에 대한민국 특허청에 제출된 대한민국 특허출원 제10-2015-0027416호 및 2015년 2월 26일에 대한민국 특허청에 제출된 대한민국 특허출원 제10-2015-0027417호에 대하여 우선권을 주장하며, 상기 특허출원의 개시 사항은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.
- [3]
- [4] 본 발명은 면역 조절 T세포(Treg cell) 및/또는 TGF- β (transforming growth factor- β)를 포함하는 골수 유래 억제 세포(MDSC)의 면역 억제 활성 증진용 조성물, 이를 이용한 골수 유래 억제 세포(MDSC)의 면역 억제 활성 증진 방법, 및 면역 조절 T세포 및/또는 TGF- β 의 처리에 의해 소집단(subpopulation) 분화된 MDSC를 포함하는 면역 억제용 조성물에 관한 것이다.

[5]

배경기술

- [6] 골수 유래 억제 세포(Myeloid derived suppressor cell, MDSC)는 분화 초기 단계의 대식세포, 과립구, 수지상세포, 골수세포들의 전구체들로 구성되는 다양한 세포들의 혼합된 구성(population)이다. MDSC는 마우스에서 CD11b⁺Gr1⁺로 정의 되어진다. CD11b⁺Gr1⁺ 세포는 보통 건강한 마우스의 골수와 비장에서 적은 수로 존재하지만, 암이나 염증 질환에서는 비장, 혈액, 림프절에 축적된다. MDSC는 종양 진행, 염증, 박테리아나 기생충 감염 상태에서 면역 반응을 음성적으로 조절한다. MDSC의 형태학적 이질성은 Gr1 특이적 항체에 의해 인식되는 두 개의 항원 결정 부위(epitope), Ly6G와 Ly6C에 의해 구별되어진다. 이러한 항원 결정 부위에 의해 MDSC를 2개의 다른 부분집합 Granulocytic MDSC(Gr-MDSC; CD11b+Ly6G^{high}Ly6C^{low})와 Monocytic MDSC(Mo-MDSC; CD11b+Ly6G^{dim}Ly6C^{high})로 구분하며, 이들은 서로 다른 분포와 기능을 가진다.
- [7] MDSC의 Gr-MDSC와 Mo-MDSC는 T 세포 증식을 억제하는 서로 다른기작을 사용한다. Gr-MDSC는 높은 수준의 아르기네이즈1(ARG1)을 발현하고 활성산소(ROS)를 생성하는 반면, Mo-MDSC는 낮은 수준의 ARG1과 높은

수준의 산화질소(NO)로 특징지어진다. MDSC의 억제 능력은 원칙적으로 L-아르지닌의 세포 내부 물질대사와 관련이 있는데, L-아르지닌은 산화질소를 생성하는 inducible nitric oxide synthase(iNOS)와 L-아르지닌을 urea(요소)와 L-오르니틴으로 바꾸는 ARG1, 두 효소의 기질로서 작용한다. ARG1-의존적 면역 조절 기작은 T 세포의 CD3z 체인 발현의 감소와 G0-G1세포 주기의 T 세포 정지를 유도를 포함한다. 대조적으로 iNOS에 의해 MDSC에서 생성된 NO는 IL-2 수용체를 통한 T 세포 활성화 경로의 혼란을 포함한다. 게다가 두 효소에 의한 아르지닌 물질대사는 주로 초과산화물($O_2^{\cdot -}$)와 그 부산물인 과산화수소(H_2O_2)와 과산화아질산염 (ONOO)의 형태로 나타나는 활성산소의 생성과 관련이 있으며, 이러한 활성산소는 T 세포의 세포사멸을 유도할 수 있다.

[8]

[9] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

[10]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[11] 본 발명자들은 골수 유래 억제 세포(MDSC)의 면역 억제 활성 증진용 조성물 및 이에 의하여 면역 억제 활성이 증진된 골수 유래 억제 세포를 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과 면역 조절 T세포 및/또는 TGF- β 를 골수 유래 억제 세포에 처리하는 경우, 골수 유래 억제 세포의 면역 억제 활성을 효과적으로 증진시킬 수 있음을 규명함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[12] 따라서, 본 발명의 목적은 골수 유래 억제 세포의 면역 억제 활성 증진용 조성물을 제공하는데 있다.

[13] 본 발명의 다른 목적은 골수 유래 억제 세포의 면역 억제 활성 증진 방법을 제공하는데 있다.

[14] 본 발명의 또 다른 목적은 면역 억제 활성이 증진된 골수 유래 억제 세포의 제조 방법을 제공하는데 있다.

[15] 본 발명의 또 다른 목적은 면역 억제 활성이 증진된 골수 유래 억제 세포를 제공하는 데 있다.

[16] 본 발명의 다른 목적은 항염증용 조성물을 제공하는데 있다.

[17] 본 발명의 또 다른 목적은 염증성 장질환(IBD) 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는데 있다.

[18]

[19] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

[20]

과제 해결 수단

[21]

본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 면역 조절 T세포(Treg cell) 및 TGF- β (transforming growth factor- β) 중에서 선택되는 어느 하나 이상을 유효 성분으로 포함하는 골수 유래 억제 세포(MDSC)의 면역 억제 활성 증진용 조성물을 제공한다.

[22]

[23]

본 발명자들은 골수 유래 억제 세포(MDSC)의 면역 억제 활성 증진용 조성물을 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과 면역 조절 T세포 및 TGF- β 중에서 선택되는 어느 하나 이상을 골수 유래 억제 세포(MDSC)에 처리하는 경우, 골수 유래 억제 세포(MDSC)의 면역 억제 활성을 효과적으로 증진시킬 수 있음을 규명하였다.

[24]

본 명세서 상의 용어 “골수 유래 억제 세포(Myeloid derived suppressor cell, MDSC)”는 분화 초기 단계의 대식세포, 과립구, 수지상세포, 골수 세포들의 전구체 등 다양한 세포들이 혼합된 집단(population)을 의미한다. MDSC는 마우스에서는 CD11b+Gr1+로 정의된다. CD11b+Gr1+세포는 보통 건강한 마우스의 골수와 비장에서 적은 수로 존재하지만, 암이나 염증 질환에서는 비장, 혈액, 림프절에 축적된다.

[25]

본 발명의 골수 유래 억제 세포(MDSC)는 암이나 염증 상태에서 면역 반응의 조절에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 면역 조절 T세포(Treg cell)의 분화와 기능에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 그러나 종래 골수 유래 억제 세포(MDSC)의 분화와 기능에 있어서의 면역 조절 T세포의 역할은 보고된 바 없었다.

[26]

본 발명의 “TGF- β (transforming growth factor- β)”는 대부분의 세포들에서의 증식, 세포 분화 및 다른 기능들을 조절하는 단백질이다. 염증반응 동안에 면역 조절 T세포(Treg cell)가 면역 반응 조절을 위한 TGF- β , IL-10 과 같은 항염증성 사이토카인을 생산한다.

[27]

본 발명의 “면역 조절 T세포(Treg cell)”는 면역 시스템을 제어하는 T세포의 소집단(subpopulation)으로서 자기관용 유지와 자기 인식 세포(self-reactive cell)의 억제를 통한 자가면역으로부터의 보호에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 흉선에서 유래된 면역 조절 T세포(tTreg 세포; CD4+CD25+Foxp3+Nrp1+)와 말초에서 유래된 면역 조절 T세포(pTreg 세포; CD4+CD25+Foxp3+Nrp1-)의 두 주요 타입이 존재한다. tTreg 세포는 흉선에서 유래되며, pTreg 세포는 IL-2와 TGF- β 가 존재할 때 말초에 있는 CD4+CD25- T 세포에서 유래된다. 상기 면역 조절 T세포는 CD4와 CD25와 같은 표면 마커를 발현하며, 이와 함께 특이적 전사인자인 Foxp3를 발현한다.

[28]

본 발명자들은 면역 조절 T세포 또는 TGF- β 가 MDSC의 면역 억제 활성을

증진시킴을 *in vitro* 조건 및 *in vivo* 조건에서 확인하였다.

- [29] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 면역 억제 활성 증진은 골수 유래 억제 세포(MDSC)의 소집단(subpopulation) 분화 조절에 의한 것이다. MDSC의 형태학적 이질성은 Gr1 특이적 항체에 의해 인식되는 두 개의 항원 결정 부위(epitope), Ly6G와 Ly6C에 의해 구별되어진다. 이러한 항원 결정 부위에 의해 MDSC를 2개의 다른 소집단 Granulocytic MDSC(Gr-MDSC; CD11b+Ly6G^{high} Ly6C^{low})와 Monocytic MDSC(Mo-MDSC; CD11b+Ly6G^{dim}Ly6C^{high})로 구분하며, 이들은 서로 다른 분포와 기능을 가진다. 기본적으로 MDSC의 소집단인 Gr-MDSC와 Mo-MDSC는 서로 다른 기작을 사용하여 T세포 증식을 억제한다. Gr-MDSC는 높은 수준의 arginase 1(ARG1)을 발현하고 활성산소(ROS)를 생성하는 반면, Mo-MDSC는 낮은 수준의 ARG1과 높은 수준의 산화질소(NO)로 특징지어진다. 본 발명자들은 MDSC에 대한 면역 조절 T세포 또는 TGF- β 의 처리가 MDSC의 소집단인 Gr-MDSC와 Mo-MDSC로의 분화 양상을 조절하여 면역 억제 활성을 증진시킴을 규명하였다.
- [30] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 소집단 분화 조절은 Mo-MDSC(monocytic MDSC)의 증가 조절이다. 본 발명자들은 상술한 바와 같이 면역 조절 T세포 및 TGF- β 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 처리가 MDSC 집단(population)의 소집단 분화 양상에 영향을 끼친다는 사실을 규명하였고, 이를 통해 MDSC의 면역 억제 활성을 증진시킴을 규명하였다. 특히 본 발명자들은 MDSC가 증진된 면역 억제 활성을 갖기 위해서는 Mo-MDSC가 중요한 역할을 함을 규명하였고, 면역 조절 T세포, 더욱 구체적으로 면역 조절 T세포에서 유래한 TGF- β 가 전체 분화되는 MDSC에서 Mo-MDSC의 비율을 현저히 증가시킴을 밝혀내었다. 또한 TGF- β 는 Mo-MDSC가 생산하는 면역 억제에 관여하는 iNOS, TGF- β , IL-10과 같은 분자의 생산을 유의미하게 증가시킬 수 있음을 규명하였다.
- [31] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 조성물은 Mo-MDSC의 PD-L1 표면 발현을 증가시킨다. 본 발명자들은 상술한 바와 같이 TGF- β 가 iNOS, TGF- β , IL-10과 같은 분자의 생산을 유의미하게 증가시키는 외에도 Mo-MDSC에서의 PD-L1(programmed death-ligand 1)의 표면 발현을 증가시킴을 확인하였다. PD-L1은 임신, 자가면역 질환 및 감염과 같은 질병 상태에서 면역을 억제하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, MDSC가 매개하는 면역 조절에서 중요한 표면 분자로 알려져 있다.
- [32] 본 발명의 조성물은 종래 알려진 적절한 담체 및/또는 첨가물 등을 포함할 수 있다. 예를 들면, 멸균수, 생리식염수, 관용의 완충제(인산, 구연산, 그 밖의 유기산 등), 안정제, 염, 산화방지제, 계면활성제, 현탁제, 등장화제, 또는 보존제 등을 포함할 수 있다. 또한, 바이오 폴리머 등의 유기물, 히드록시아파타이트(hydroxyapatite) 등의 무기물, 구체적으로는 콜라겐 매트릭스, 폴리락트산 폴리머 또는 코폴리머, 폴리에틸렌글리콜 폴리머 또는

코폴리머 및 그 화학적 유도체, 그리고 이들의 혼합조성물을 이용할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 안정제로는 예를 들어, 텍스트란 40, 메틸셀룰로오스, 젤라틴, 아황산나트륨, 메타황산나트륨 등을 사용할 수 있다. 상기 산화방지제로는 예를 들어, 에리소르브산, 디부틸히드록시톨루엔, 부틸히드록시아니솔, α -토코페롤, 아세트산토코페롤, L-아스코르브산 및 그 염, L-아스코르브산팔미테이트, L-아스코르브산스테아레이트, 아황산수소나트륨, 아황산나트륨, 갈릭산트리아밀, 갈릭산프로필 또는 에틸렌디아민4아세트산나트륨 (EDTA), 피로인산나트륨, 메타인산나트륨 등의 킬레이트제를 사용할 수 있다. 상기 현탁제는 예를 들어, 메틸셀룰로오스, 폴리소르베이트 80, 히드록시에틸셀룰로오스, 아라비아고무, 트라칸트말, 카르복시메틸셀룰로오스나트륨, 폴리옥시에틸렌소르비탄모노라우레이트 등을 사용할 수 있다. 상기 등장화제로는 예를 들어, D-만니톨, 소르비톨 등을 사용할 수 있다. 상기 보존제로는 예를 들어, 파라옥시벤조산메틸, 파라옥시벤조산에틸, 소르브산, 페놀, 크레졸, 클로로크레졸 등을 사용할 수 있다.

[33]

[34] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 면역 조절 T세포(Treg cell) 및 TGF- β (transforming growth factor- β) 중에서 선택되는 어느 하나 이상을 골수 유래 억제 세포(MDSC)에 처리하는 단계를 포함하는, 골수 유래 억제 세포(MDSC)의 면역 억제 활성 증진 방법을 제공한다. 본 발명의 “처리”는 골수 유래 억제 세포(MDSC)로 분화 가능한 골수 세포가 MDSC로 분화하는 환경에서, 면역 조절 T세포 및 TGF- β 중에서 선택되는 어느 하나 이상을 추가하거나, 분화된 MDSC에 면역 조절 T세포 및 TGF- β 중에서 선택되는 어느 하나 이상을 접촉시키는 것에 의해 실시할 수 있고, 예를 들면, 골수 세포의 MDSC 분화 조건 배지, 골수 유래 억제 세포(MDSC)의 보관 및/또는 배양용 배지에 면역 조절 T세포 및 TGF- β 중에서 선택되는 어느 하나 이상을 추가로 넣어주어 실시할 수 있으며, 배지에 미리 면역 조절 T세포 및/또는 TGF- β 를 포함시키는 것도 가능하다. 면역 조절 T세포는 TGF- β 를 생성하고, MDSC의 소집단 분화 조절에 관여하며, TGF- β 에 의해 교육을 받은(TGF- β educated) Mo-MDSC를 생산하게 된다. 본 명세서 상에서 TGF- β 를 처리한 Mo-MDSC를 나타내기 위하여 사용한 용어 “교육을 받은(educated)”은 Mo-MDSC와 TGF- β 의 접촉에 의해 Mo-MDSC의 면역 억제 활성을 증진시키는 변화, 구체적으로 예를 들어 iNOS, TGF- β , IL-10과 같은 분자의 생산의 증가, Mo-MDSC에서의 PD-L1(programmed death-ligand 1)의 표면 발현 증가 등이 관찰되는 상태로의 전환을 의미한다. TGF- β 의 교육을 받은 Mo-MDSC는 본 명세서 상에서 “Mo-MDSC/TGF- β ”와 같이 간략하게 기재될 수 있다. Mo-MDSC/TGF- β 는 일반적인 Mo-MDSC에 비하여 유의하게 증가된 면역 억제 활성을 갖는다.

[35]

본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 골수 유래 억제 세포(MDSC)는 포유류 동물로부터 분리된 골수 세포를 *in vitro* 배양에 의해 분화시킨 세포이다.

골수 세포를 포유 동물로부터 분리하는 방법 및 *in vitro* 배양에 의해 분리된 골수 세포를 골수 유래 억제 세포(MDSC)로 분화 시키는 방법은 종래 공지된 방법을 제한없이 이용 가능하다.

- [36] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 처리는 *In vitro*에서 이루어진다. 구체적으로 예를 들면, 상술한 바와 같이, 골수 유래 억제 세포(MDSC)의 보관 및/또는 배양용 배지에 면역 조절 T세포 및 TGF- β 중에서 선택되는 어느 하나 이상을 추가로 넣어주어 실시할 수 있으며, 배지에 미리 면역 조절 T세포 및/또는 TGF- β 를 포함시키는 것도 가능하다.
- [37] 본 발명인 골수 유래 억제 세포(MDSC)의 면역 억제 활성 증진 방법은 상술한 골수 유래 억제 세포(MDSC)의 면역 억제 활성 증진용 조성물의 유효성분인 면역 조절 T세포 및/또는 TGF- β 를 이용하는 방법에 관한 것인바, 중복되는 내용에 대하여는 본 명세서 기재의 과도한 복잡성을 피하기 위해 생략하도록 한다.
- [38]
- [39] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 면역 조절 T세포 및 TGF- β 중 어느 하나 이상의 처리에 의해 소집단(subpopulation) 분화된 골수 유래 억제 세포(MDSC)를 유효 성분으로 포함하는 면역 억제용 조성물을 제공한다.
- [40] 본 발명의 소집단 분화는 본 발명의 다른 일 양태에서 상술한 바와 같이 Mo-MDSC(monocytic MDSC)가 증가된 분화이다. 본 발명의 조성물은 상술한 MDSC 면역 억제 활성 증진용 조성물을 처리하거나, 상술한 면역 억제 활성 증진 방법을 이용하여 제조된 소집단 분화된 MDSC를 유효 성분으로 포함하는 조성물에 관한 것이므로, 중복되는 내용에 대해서는 본 명세서 기재의 과도한 복잡성을 피하기 위해 생략하도록 한다.
- [41]
- [42] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 면역 조절 T세포 또는 TGF- β 의 교육을 받은(educated) Mo-MDSC를 유효 성분으로 포함하는 면역 억제용 조성물을 제공한다.
- [43] 본 명세서 상에서 면역 조절 T세포 또는 TGF- β 를 처리한 Mo-MDSC를 나타내기 위하여 사용한 용어 “교육을 받은(educated)”은 Mo-MDSC와 ‘면역 조절 T세포 또는 TGF- β ’의 접촉에 의해 Mo-MDSC의 면역 억제 활성을 증진시키는 변화, 구체적으로 예를 들어 iNOS, TGF- β , IL-10과 같은 분자의 생산의 증가, Mo-MDSC에서의 PD-L1(programmed death-ligand 1)의 표면 발현 증가 등이 관찰되는 상태로의 전환을 의미한다. 면역 조절 T세포의 교육을 받은 Mo-MDSC는 실질적으로 면역 조절 T세포로부터 유래한 TGF- β 의 교육을 받은 Mo-MDSC인 것으로 이해되며, 간단히 “TGF- β 의 교육을 받은 Mo-MDSC”라고 기재하는 경우에는 면역 조절 T세포를 처리하였거나 또는 TGF- β 를 직접 처리한 것 모두를 의미한다.
- [44] TGF- β 의 교육을 받은 Mo-MDSC는 본 명세서 상에서 “Mo-MDSC/TGF- β ”와

같이 간략하게 기재될 수 있다. Mo-MDSC/TGF- β 는 일반적인 Mo-MDSC에 비하여 유의하게 증가된 면역 억제 활성을 갖는다.

- [45] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 면역 조절 T세포 또는 TGF- β 의 교육을 받은 Mo-MDSC는 교육을 받지 않은 Mo-MDSC에 비하여 PD-L1 표면 발현이 증가된 것이다. 본 발명자들은 상술한 바와 같이 TGF- β 가 iNOS, TGF- β , IL-10과 같은 분자의 생산을 유의미하게 증가시키는 외에도 Mo-MDSC에서의 PD-L1(programmed death-ligand 1)의 표면 발현을 증가시킴을 확인하였다.
- [46] 본 발명인 면역 조절 T세포 또는 TGF- β 의 교육을 받은(educated) Mo-MDSC를 유효 성분으로 포함하는 면역 억제용 조성물은, 상술한 본 발명의 다른 양태인 면역 조절 T세포 및 TGF- β 중 어느 하나 이상의 처리에 의해 소집단(subpopulation) 분화된 골수 유래 억제 세포(MDSC)를 유효 성분으로 포함하는 면역 억제용 조성물에 있어서, MDSC의 소집단 중 특히 면역 조절 T세포 또는 TGF- β 의 교육을 받은 Mo-MDSC를 유효성분으로 포함하는 면역 억제용 조성물에 관한 것이고, 중복되는 내용에 대하여는 본 명세서 기재의 과도한 복잡성을 피하기 위해 생략하도록 한다.
- [47] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 면역 억제용 조성물을 유효성분으로 포함하는 항염증용 조성물을 제공한다. 본 발명인 항염증용 조성물이 적용될 수 있는 염증성 질환은 다발성 경화증, 천식, 습진, 건선, 알러지, 류마티스 관절염, 건선 관절염(psoriatic arthritis), 아토피성 피부염, 건선, 여드름, 아토피성 비염, 알레르기성 피부염, 만성 부비동염 및 지루성 피부염(seborrheic dermatitis)을 포함하는 염증성 피부질환, 골관절염, 위염, 통풍, 통풍 관절염, 궤양, 만성 기관지염, 급성 폐손상, 폐염증, 기도 과민반응, 크론병 및 궤양성 대장염을 포함하는 염증성 장질환, 강직성 척추염(ankylosing spondylitis), 폐혈증, 폐혈성 쇼크, 맥관염 및 활액낭염 같은 급성 또는 만성 염증 질환; 동맥경화증; 골다공증; 고형암을 포함하는 암; 알츠하이머병; 엡스타인-바 바이러스, 거대세포 바이러스, 헤르페스 바이러스(herpes simplex virus), HIV 및 인플루엔자 바이러스를 포함하는 바이러스 감염증; 모세혈관 확장성 운동실조증을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [48]
- [49] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 면역 억제용 조성물을 유효성분으로 포함하는 염증성 장질환(IBD), 다발성 경화증 및 관절염으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다. 염증성 장질환은 결장 및 원위 소장에서 발병하는 궤양성 질환을 의미한다. 장관에서의 다양한 증상을 유발하는 만성염증을 일으키는 원인이 되며, 염증이 장 뿐만 아니라 다른 기관에도 영향을 줄 수 있다. 증상이 나타났다가 사라지기를 반복하면서 평생 계속되는 질환으로 알려져 있다. 다발성 경화증은 만성 염증성 질환으로서, 뇌와 척수의 축삭 주변의 지방성 미엘린을 감싸는 부분이 손상을 입어서 탈수질환과 흉터형성으로 이어지는

염증질환이다. 한편, 본 발명의 면역 억제용 조성물에 의해 예방 또는 치료가 가능한 관절염은 염증성 관절염을 의미하고, 구체적으로 예를 들면 급성 또는 만성 염증 질환의 일종인 류마티스 관절염, 건선 관절염 및 통풍 관절염을 포함한다.

[50] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 염증성 장질환은 크론병 또는 궤양성 결장염이다. 크론병과 궤양성 결장염을 서로 관련된 질환이다. 본 발명에서의 크론병은 입에서부터 항문에 이르기까지 장관의 전 영역에서 발생할 수 있는 질병으로서, 특히 소장(회장)의 하부와 결장에서 가장 흔하게 발생한다. 본 발명에서의 궤양성 결장염은 대장(결장), 특히 대장 벽 안쪽의 얇은 층에 한정되어 발생한다. 염증은 결장의 가장 밑 부분(직장)에서 시작되어 위쪽으로 지속적으로 확대된다. 본 발명인 조성물을 이용하면, 상술한 염증성 장질환을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다.

[51] 상술한 항염증용 조성물 및 염증성 장질환(IBD) 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 첨가물 등을 포함할 수 있다. 예를 들면, 멸균수, 생리식염수, 관용의 완충제(인산, 구연산, 그 밖의 유기산 등), 안정제, 염, 산화방지제, 계면활성제, 현탁제, 등장화제, 또는 보존제 등을 포함할 수 있다. 또한, 바이오 폴리머 등의 유기물, 히드록시아파타이트(hydroxyapatite) 등의 무기물, 구체적으로는 콜라겐 매트릭스, 폴리락트산 폴리머 또는 코폴리머, 폴리에틸렌글리콜 폴리머 또는 코폴리머 및 그 화학적 유도체, 그리고 이들의 혼합조성물을 이용할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 안정제로는 예를 들어, 덱스트란 40, 메틸셀룰로오스, 젤라틴, 아황산나트륨, 메타황산나트륨 등을 사용할 수 있다. 상기 산화방지제로는 예를 들어, 에리소르브산, 디부틸히드록시톨루엔, 부틸히드록시아니솔, α -토코페롤, 아세트산토코페롤, L-아스코르브산 및 그 염, L-아스코르브산팔미테이트, L-아스코르브산스테아레이트, 아황산수소나트륨, 아황산나트륨, 갈릭산트리아밀, 갈릭산프로필 또는 에틸렌디아민4아세트산나트륨 (EDTA), 피로인산나트륨, 메타인산나트륨 등의 킬레이트제를 사용할 수 있다. 상기 현탁제는 예를 들어, 메틸셀룰로오스, 폴리소르베이트 80, 히드록시에틸셀룰로오스, 아라비아고무, 트라칸트말, 카르복시메틸셀룰로오스나트륨, 폴리옥시에틸렌소르비탄모노라우레이트 등을 사용할 수 있다. 상기 등장화제로는 예를 들어, D-만니톨, 소르비톨 등을 사용할 수 있다. 상기 보존제로는 예를 들어, 파라옥시벤조산메틸, 파라옥시벤조산에틸, 소르브산, 페놀, 크레졸, 클로로크레졸 등을 사용할 수 있다.

[52] 본 발명의 조성물은 비경구 투여, 구체적으로 예를 들어, 정맥 투여할 수 있다. 바람직하게 본 발명의 조성물은 정맥 주사에 적당한 제형으로 조제되어야 한다. 이를 위해서는 본 발명의 조성물은 약제학적으로 허용되는 수용액 중에 용해되어 있거나 또는 용액 상태에서 동결된 것이 바람직하다. 구체적으로 예를 들면, 증류수, 생리식염수 또는 PBS에 용해되어 있을 수 있으나 이에 한정되는 것은

아니다. 본 발명의 조성물은 안정화제나 흡착방지제를 함유할 수 있고, 주사시 통증을 감소시킬 수 있는 무통화제를 포함할 수 있으며, 필요에 따라 적당한 디바이스를 사용할 수 있다. 본 발명의 조성물을 이용한 세포치료제의 형태는 주사기나 디바이스에 담겨진 최종 주입 형태, 냉동이 가능한 크라이오바이알(cryovial)의 형태, 또는 액상의약품을 담을 수 있는 파이로젠이 없는 유리병과 고무전, 알루미늄 캡형태로 충전될 수 있다.

- [53] 디바이스의 형태로는 주사기, 멀티실린지 등이 사용될 수 있으며 세포를 포함하는 조성물을 정맥 주사하는데 적합한 크기의 바늘을 포함하는 디바이스를 적절히 선택하여 사용 가능하다.
- [54] 본 발명의 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 한편, 본 발명의 약제학적 조성물의 투여량은 바람직하게는 1일 당 0.0001-100 mg/kg(체중)이다.
- [55] 상술한 항염증용 조성물 및 염증성 장질환(IBD) 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 본 발명의 다른 양태인 면역 억제용 조성물을 유효성분으로 포함하며, 중복되는 내용에 대하여는 본 명세서 기재의 과도한 복잡성을 피하기 위해 생략하도록 한다.
- [56]
- [57] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 면역 조절 T세포 및 TGF- β 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 처리에 의해 소집단(subpopulation) 분화된 골수 유래 억제 세포(MDSC)를 유효 성분으로 포함하는 항염증용 조성물을 염증성 질환을 갖는 대상(subject)에 처리하는 단계를 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [58] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 소집단 분화는 Mo-MDSC(monocytic MDSC)가 증가된 분화이다.
- [59] 본 발명의 방법은 상술한 본 발명의 다른 일 양태인 항염증용 조성물을 이용하는 방법에 해당하므로, 중복되는 내용에 대하여는 본 명세서 기재의 과도한 복잡성을 피하기 위해 생략하도록 한다.
- [60]
- [61] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 면역 조절 T세포 또는 TGF- β 의 교육을 받은(educated) Mo-MDSC를 유효 성분으로 포함하는 항염증용 조성물을 염증성 질환을 갖는 대상(subject)에 처리하는 단계를 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [62] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 교육을 받은 Mo-MDSC는 교육을 받지 않은 Mo-MDSC에 비하여 PD-L1 표면 발현이 증가된 것이다.
- [63] 본 발명의 방법은 상술한 본 발명의 다른 일 양태인 항염증용 조성물을 이용하는 방법에 해당하므로, 중복되는 내용에 대하여는 본 명세서 기재의 과도한 복잡성을 피하기 위해 생략하도록 한다.

[64]

[65] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 면역 억제용 조성물을 유효 성분으로 포함하는 약학적 조성물을 염증성 장질환(IBD)을 갖는 대상(subject)에 투여하는 단계를 포함하는 염증성 장질환(IBD)의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[66] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 염증성 장질환은 크론병 또는 궤양성 결장염이다.

[67] 본 발명의 방법은 상술한 본 발명의 다른 일 양태인 염증성 장질환(IBD)의 예방 또는 치료용 조성물을 이용하는 방법에 해당하므로, 중복되는 내용에 대하여는 본 명세서 기재의 과도한 복잡성을 피하기 위해 생략하도록 한다.

발명의 효과

[68] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[69] (a) 본 발명은 골수 유래 억제 세포(MDSC)의 면역 억제 활성 증진용 조성물을 제공한다.

[70] (b) 본 발명은 골수 유래 억제 세포의 면역 억제 활성 증진 방법을 제공한다.

[71] (c) 본 발명은 면역 억제 활성이 증진된 MDSC를 포함하는 면역 억제용 조성물을 제공한다.

[72] (d) 본 발명은 항염증용 조성물 또는 염증성 장질환(IBD) 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[73] (e) 본 발명의 MDSC 면역 억제 활성 증진용 조성물 또는 면역 억제 활성 증진 방법을 이용하면 MDSC의 면역 억제 활성을 효과적으로 증진시킬 수 있다.

[74] (f) 본 발명의 면역 억제 활성이 증진된 MDSC를 포함하는 면역 억제용 조성물을 이용하면 효과적으로 면역 반응을 억제시킬 수 있다.

[75]

도면의 간단한 설명

[76] 도 1a는 장염을 보이는 *Pdk1* 유전자 녹아웃 마우스는 같은 우리에서 자란 야생형의 형제 마우스와 비교하였을 때, 직장 탈출의 빈도수가 증가하는 양상을 보이는 결과를 나타낸다.

[77] 도 1b는 10주령 이상의 *Pdk1* 유전자 녹아웃 마우스의 장에서 심각한 장의 염증 증세를 관찰한 사진을 나타낸다.

[78] 도 1c, 1d 및 1e는 CD11b+Gr1+ MDSC 집단(population)이 마우스가 나이가 들어감에 따라 장의 염증이 심화될 때, 점차 증가되는 결과를 나타낸다. 어린 나이의 마우스에서는(6령-8주령) *Pdk1* 유전자 녹아웃 마우스와 야생형의 형제 마우스의 비장과 림프절에서 유사한 비율의 MDSC population을 보였으나, 나이가 든 마우스에서는(10주령 이상의 마우스) *Pdk1* 유전자 녹아웃 마우스에서 야생형의 형제 마우스와 비교하였을 때, 비장과 림프절에서 MDSC population의 급격한 증가를 보였다.

- [79] 도 2a 및 2b는 야생형 Treg 세포의 입양 전달을 하거나 하지 않은 10주령의 *Pdk1*^{flox/flox}; *Cd4-Cre* 마우스(*flox/flox*) 및 한배 자손 대조군의 (a) 결장의 사진 및 (b) 조직학적 등급을 나타낸다.
- [80] 도 2c는 야생형 Treg 세포의 입양 전달을 하거나 하지않은 *Pdk1*^{flox/+}; *CD4-Cre* (*flox/+*) 및 *Pdk1*^{flox/flox}; *CD4-Cre*(*flox/flox*) 마우스에서의 MDSC 소집단의 유동 세포 분석을 나타낸다.
- [81] 도 2d는 DSS 주입 마우스(그룹당 마우스 개체수 n은 7-10)의 마지막 날의 MDSC의 입양 전달 후의 체중 변화(%)를 나타낸다.
- [82] 도 2e는 MDSC의 입양전달 후의 DSS 처리 마우스에서의 11일째에 측정된 결장 길이를 나타낸다.
- [83] 도 2f 및 도 2g는 표시한 MDSC의 전달 후에 DSS 유도의 실험적 결장염의 결장 사진(도 2f) 및 조직학적 등급(도 2g)을 나타낸다(그룹당 마우스 개체수 n은 5).
- [84] 도 2h는 DSS 처리 마우스로부터의 콜론 절편에서의 싸이토카인 수준의 측정을 나타낸다(그룹당 마우스 개체수 n은 3). 결과들은 평균 $\pm$ SD로 나타내었다. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ (스튜던트 *t* 검정).
- [85] 도 3a 및 3b는 항-CD3 및 항-CD28로 활성화한 후의 Treg 세포에서의 (a) TGF- β 및 (b) IL-10의 상대적인 mRNA 수준을 나타낸다.
- [86] 도 3c는 *Pdk1*^{flox/+}; *CD4-Cre*(*flox/+*) 및 *Pdk1*^{flox/flox}; *CD4-Cre*(*flox/flox*) 마우스의 비장으로부터의 Mo-MDSC 내 iNOS의 상대적인 mRNA 수준을 나타낸다.
- [87] 도 3d는 *Pdk1*^{flox/+}; *CD4-Cre*(*flox/+*) 및 *Pdk1*^{flox/flox}; *CD4-Cre*(*flox/flox*) 마우스의 비장으로부터의 Mo-MDSC 및 Gr-MDSC 내 ARG1의 상대적인 mRNA 수준을 나타낸다.
- [88] 도 3e는 *Pdk1*^{flox/+}; *CD4-Cre*(*flox/+*) 및 *Pdk1*^{flox/flox}; *CD4-Cre*(*flox/flox*) 마우스의 비장에서의 MDSC 소집단(subpopulation) 상의 PD-L1 발현의 유동 세포 분석을 나타낸다.
- [89] 도 3f는 *Pdk1*^{flox/+}; *CD4-Cre*(*flox/+*) 및 *Pdk1*^{flox/flox}; *CD4-Cre*(*flox/flox*) 마우스의 비장으로부터의 Mo-MDSC 및 Gr-MDSC를 갖는 항-CD3, 항-CD28, 및 TGF- β 로 자극한 후의 *in vitro*-유발 Treg 세포(iTreg)의 유동 세포 분석을 나타낸다. 결과들은 평균 $\pm$ SD로서 나타내었다. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ (스튜던트 *t* 검정).
- [90] 도 4a는 Treg 세포를 처리하거나 처리하지 않은 GM-CSF, IL-4 및 2-ME의 부재하에서 배양된 골수 세포의 유동 세포 분석을 나타낸다.
- [91] 도 4b는 Treg 세포 및 항-TGF- β 로 처리하거나 처리하지 않은 GM-CSF, IL-4 및 2-ME의 존재하에서의 분화된 골수 유래 억제세포(MDSC)의 유동 세포 분석을 나타낸다.
- [92] 도 4c는 Treg 세포 연관 싸이토카인 TGF- β 및 IL-10으로 처리하거나 처리하지 않은 골수 유래 억제세포(MDSC)의 유동 세포 분석을 나타낸다.
- [93] 도 4d는 Treg 세포 연관 싸이토카인 TGF- β 및 IL-10으로 처리하거나 처리하지 않은 골수 유래 억제세포(MDSC)의 수를 나타낸다.

- [94] 도 4e는 TGF- β 로 처리하지 않았거나 처리하여 분화된 골수 유래 억제세포(MDSC)의 각각의 소집단의 세포 수를 나타낸다.
- [95] 도 4f는 TGF- β 로 처리하지 않았거나 처리하여 분화된 CFSE-표지된 골수 유래 Mo-MDSC 또는 Gr-MDSC의 증식의 유동 세포 분석을 나타낸다.
- [96] 도 5a는 TGF- β 로 처리하지 않았거나 처리하여 분화된 골수 유래 억제세포(MDSC)상에서의 성숙한 골수 세포(myeloid) 마커의 유동 세포 분석을 나타낸다.
- [97] 도 5b는 TGF- β 로 처리하지 않았거나 처리하여 분화된 골수 유래 억제세포(MDSC)의 Wright-Giemsa 염색 결과를 나타낸다.
- [98] 도 5c, 5d 및 5e는 LPS 자극후에, TGF- β 로 처리하지 않았거나 처리하여 분화된 골수 유래 Mo-MDSC 내에서의 iNOS(도 5c), TGF- β (도 5d) 및 IL-10(도 5e)의 상대적인 mRNA 수준을 나타낸다.
- [99] 도 5f는 TGF- β 로 처리하지 않았거나 처리하여 분화된 골수 유래 Mo-MDSC 및 Gr-MDSC 내에서의 상대적인 ARG1의 mRNA 수준을 나타낸다.
- [100] 도 5g는 TGF- β 로 처리하지 않았거나 처리하여 분화된 골수 유래 Mo-MDSC 및 Gr-MDSC 내에서의 ARG1 활성도를 나타낸다.
- [101] 도 5h는 LPS, GM-CSF+IL-4 또는 GM-CSF+IL-4+LPS로 처리한 후에, TGF- β 로 처리하지 않았거나 처리하여 분화된 골수 유래 억제세포(MDSC) 소집단 상의 PD-L1 발현의 유동 세포 분석을 나타낸다. 결과들은 평균 $\pm$ SD로서 나타내었다. *, $P<0.05$; **, $P<0.01$ (스튜던트 t 검정).
- [102] 도 6a는 DSS 처리의 0일 및 6일째에 골수 유래 Mo-MDSC 또는 Mo-MDSC/TGF- β 의 입양 전달 후의 체중 변화(%)를 나타낸다(그룹당 마우스 개체수 $n=9-12$).
- [103] 도 6b는 Mo-MDSC 또는 Mo-MDSC/TGF- β 의 입양 전달 후의 DSS 처리 마우스의 11일째에 측정된 결장 길이를 나타낸다(그룹당 마우스 개체수 $n=3$).
- [104] 도 6c 및 6d는 골수 유래 Mo-MDSC 또는 Mo-MDSC/TGF- β 의 입양 전달 후 0일 및 6일째의 DSS-처리 마우스의 결장 사진 및 조직학적 등급을 나타낸다(그룹당 마우스 개체수 $n=4$).
- [105] 도 6e는 골수 유래 Mo-MDSC 또는 Mo-MDSC/TGF- β 의 입양 전달 후 DSS 처리 마우스로부터의 결장 절편의 싸이토카인 수준의 측정을 나타낸다(그룹당 마우스 개체수 $n=3$).
- [106] 도 6f는 골수 유래 Mo-MDSC 또는 Mo-MDSC/TGF- β 의 입양 전달 후 DSS 처리 마우스의 비장에서의 Treg 세포의 유동 세포 분석을 나타낸다.
- [107] 도 6g는 골수 유래 Mo-MDSC 또는 Mo-MDSC/TGF- β 의 존재 하에서의 항-CD3 및 항-CD28을 처리하여 자극한 후의 CFSE-표지된 tTreg 세포의 증식의 유동 세포 분석을 나타낸다. 결과들은 평균 $\pm$ SD로서 나타내었다. *, $P<0.05$; **, $P<0.01$ (스튜던트 t 검정).
- [108] 도 7은 $Pdk1^{flox/flox}$; $CD4$ -Cre 또는 야생형 Treg 세포로 주사한 $Pdk1^{flox/flox}$; $CD4$ -Cre

(flox/flox) 마우스의 비장으로부터 추출한 MDSC의 기능을 테스트하기 위한 DSS 유발 장염 모델을 나타낸다.

[109] 도 8은 *Pdk1*^{flox/flox}; *CD4-Cre* 또는 야생형 Treg 세포로 주사한 *Pdk1*^{flox/flox}; *CD4-Cre* (flox/flox) 마우스의 비장으로부터 추출한 MDSC의 기능을 테스트하기 위한 DSS 유발 장염 모델로부터의 결장의 사진을 나타낸다.

[110] 도 9는 골수 유래 Mo-MDSC 또는 골수 유래 Mo-MDSC/TGF- β 의 기능을 시험하기 위한 DSS 유발 장염 모델을 나타낸다.

[111] 도 10은 골수 유래 Mo-MDSC 또는 골수 유래 Mo-MDSC/TGF- β 의 기능을 시험하기 위한 DSS 유발 장염 모델로부터의 결장의 사진을 나타낸다.

[112] 도 11은 골수 유래 Mo-MDSC 또는 골수 유래 Mo-MDSC/TGF- β 의 기능을 시험하기 위한 DSS 유발 장염 모델로부터의 Treg 집단(population) 분석을 나타낸다. 비장 세포를 표시한 마우스로부터 추출하였고, Treg 세포(CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺), tTreg 세포(CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Nrp1⁺), 및 pTreg 세포(CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Nrp1⁻)를 유동세포 분석에 의해 분석하였다.

[113]

발명의 실시를 위한 형태

[114] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[115]

[116] 실시예

[117] 실시예 1: 마우스 및 MDSC 분리

[118] *Pdk1*^{flox/flox} 마우스를 *CD4-Cre* 트랜스제닉 마우스와 함께 사육하고, 후손은 *Pdk1*^{flox/flox}; *CD4-Cre* 및 *Pdk1*^{flox/+}; *CD4-Cre*를 얻기 위해 *Pdk1*^{flox/flox} 마우스와 함께 사육하였다. 모든 마우스는 광주 과학 기술원(GIST) 동물 관리 시설의 소정의 무균(pathogen-free) 조건에서 유지시켰다. MDSCs는 MDSC-특이적 표면 마커로 세포를 염색한 뒤 FACS Aria III 장비(BD Bioscience)로 분리하였다.

[119]

[120] 실시예 2: 골수 유래의 MDSCs의 *In vitro* 분화

[121] 골수 세포는 C57BL/6 마우스로부터 분리하였고, 10% 태아 소 혈청(FBS), 10 ng/ml GM-CSF, 10 ng/ml IL-4 및 50 μ M 2-ME 보충된 RPMI 1640 배지에서 배양하였다. 배양물을 37°C, 5% CO₂ 습도 환경에서 24-웰 플레이트에 보존시켰다. 세포를 3-5일째에 수집하였고, 유동 세포 계측(flow cytometry)으로 분석하였다.

[122]

[123] 실시예 3: Treg 세포 분리 및 *in vitro* Treg 세포 분화

- [124] *Pdk1^{flox/flox}; CD4-Cre* 또는 *Pdk1^{flox/+}; CD4-Cre* 마우스로부터의 CD4⁺CD25⁺ 림프절 세포를 플루오로크롬-킨주게이션된 항-마우스 CD4 및 항-마우스 CD25 항체로 염색한 후에 FACS AriaIII 장비(BD Bioscience) 상에서 분류하였다. *In vitro*에서, TGF- β (1 ng/ml)의 존재하에서 54 시간 동안 플레이트 부착 항-CD3 및 항-CD28로 자극함으로써 Tregs를 C57BL/6 마우스로부터의 CD4⁺CD25⁺ T-세포로부터 얻었다.
- [125]
- [126] **실시예 4: 조절 T-세포의 입양 전달(Adoptive transfer)**
- [127] 야생형(Wild-type) Treg 세포(CD4⁺CD25⁺)를 C57BL/6 마우스의 림프절로부터 FACS AriaIII 장비(BD Bioscience)로 분리하였다. *Pdk1^{flox/flox}; CD4-Cre* 또는 *Pdk1^{flox/+}; CD4-Cre* 마우스를 분리된 야생형 Treg 세포로 2-3회 정맥 주사하였다.
- [128]
- [129] **실시예 5: 유동 세포 계측**
- [130] 분리 또는 분화된 세포를 표지된 항체로 염색하였고, FACS CantoII 장비(BD Biosciences) 또는 Guava 장비(Millipore) 상에서 분석하였다. 살아있는 세포를 전면 및 측면 스캐터에 의해 입구를 형성시켰다. Foxp3에 대한 세포 내 염색을 위해, 세포를 고정시키고, Foxp3 염색 버퍼(eBioscience)를 투과시켰다. 데이터는 FlowJo 소프트웨어를 이용하여 분석하였다.
- [131]
- [132] **실시예 6: ARG1 효소 활성 분석**
- [133] ARG1 활성을 세포 용해물 상에서 측정하였다. 세포를 100 μ l의 0.1% Triton X-100으로 30분 동안 용해시켰다. 이어서 100 μ l의 25 mM Tris-HCl 및 10 μ l의 10 mM MnCl₂를 첨가하였고, 효소를 56°C에서 10 분간 가열함으로써 활성화시켰다. 용해물을 100 μ l의 0.5 M L-아르기닌(pH 9.7)을 이용하여 37°C에서 2시간 동안 배양함으로써 아르기닌 가수분해를 수행하였다. 900 μ l의 H₂SO₄(96%)/H₃PO₄(85%)/H₂O(1/3/7, v/v/v)을 이용하여 반응을 정지시켰다. 요소(urea) 농도를, 40 μ l의 α -이소나이트로소프로피오페논(100% 에탄올에 용해된)의 첨가 후에 95°C에서 30분간 가열시킨 후 540 nm에서 측정하였다.
- [134]
- [135] **실시예 7: 정량적 RT-PCR(reverse transcription-polymerase chain reaction)**
- [136] 총 RNA를 세포 펠릿으로부터 RNeasy Mini Kit(Qiagen)을 이용하여 분리하고, 첫 번째 가닥 cDNA를 RT Drymix(Enzinomics)를 이용하여 제조사의 지침에 따라 연속적으로 합성하였다. SYBR Premix(Takara)를 이용하여 real-time PCR(Agilent Technology)에 의해 각각의 mRNA의 총량을 측정하였다. 모든 실험들은 GAPDH(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)를 이용하여 정규화시켰다.
- [137]
- [138] **실시예 8: DSS-유발의 실험상 대장염(experimental colitis)**
- [139] C57BL/6 strain의 6-12주령의 마우스에 대하여 5일간 마시는 물의 2%(w/v)로

DSS[MP Biomedicals, MW=36,000-50,000 Da]의 경구 투여에 의해 대장염을 유도하였고, 정상의 마시는 물을 이어서 투여하였다. 마우스는 질병율(morbidity)에 대해 매일 확인하였고, 체중을 기록하였다. 마우스를 희생시키고, 결장(colon)을 적출하였으며, 결장 길이를 측정하였다.

[140]

[141] 실시예 9: Treg 세포 및 MDSC에 대한 증식 분석

[142] 세포들을 표면 마커 염색을 기초로 FACS Aria III 장비(BD Bioscience)를 통해 분리하였다. 분리된 세포를 5 μ M의 CFSE(eBioscience)로 5분간 염색하였고, 10% FBS 보충된 RPMI 1640 배지의 첨가에 의해 라벨링을 중단하였다. 몇 차례 세척 후, CFSE-표지된 세포를 48-72 시간 배양하였다.

[143]

[144] 실시예 10: 결장 조직 배양 및 사이토카인 측정

[145] 마우스를 희생시킨 후, 결장을 적출하고, 1 cm $\times$ 1 cm로 규격화된 결장 조직의 세그먼트를 페니실린 및 스트렙토마이신(Gibco) 보충된 cold PBS에서 세척하였다. 상기 세그먼트들을 페니실린 및 스트렙토마이신 보충된 혈청-프리 RPMI 1640 배지(HyClone) 내의 24-웰 플랫-바텀 배양 플레이트에서 배양하였다. 24시간 후, Cytometric Bead Array kits(BD Biosciences)를 이용하여 제조자의 지침에 따라 IFN- γ , IL-17A 및 IL-10의 생성을 측정하기 위해, 상청액을 수집하였다. 각각 동결건조된 재조합 무린 사이토카인을 이용하여 표준곡선(standard curve)을 얻었다.

[146]

[147] 실시예 11: 조직학 및 스코어링

[148] 표본들을 4% 중성-버퍼화 포르말린으로 고정시키고, 파라핀에 침지시켰다. 섹션들을 절단하고, 탈파라핀화시켰으며, 헤마톡실린 및 에오신으로 염색하였다. 염색된 장의 섹션들을 블라인드 채집에 의해 점수를 부여하였다. 조직학적 점수 부여는 관찰된 염증(0-4) 및 관찰된 상피 손상(0-4)을 기초로 하였다. 관찰된 염증의 임상 점수는 다음과 같이 정의하였다: 0, 염증 없음; 1, 고유판(lamina propria) 내의 가볍게 증가되는 염증을 갖는 낮은 수준의 염증; 2, 고유판 내에서 보통 수준으로 증가하는 염증[다중 병소(multiple foci)]; 3, 염증에 의해 벽이 두꺼워지는 증거를 보이는 높은 수준의 염증; 및 4, 경벽의(transmural) 백혈구(leukocyte) 침투 및/또는 구조적 왜곡(distortion)을 갖는 심각한 염증. 관찰된 상피 손상의 점수 부여는 다음과 같이 정의하였다: 0, 정상이거나 호중구(neutrophil)에 의한 침투 없음; 1, 드문 상피 병변(lesion)[병소적이고(focal) 표면적이거나 드문 선와염(cryptitis)]; 2, 드문 선와 종기(crypt abscess)를 포함하는 선와염의 병소(foci); 3, 다중 선와 종기 및/또는 병소 궤양화; 및 4, 광범위한 궤양.

[149]

[150] 실험결과

- [151] **1. MDSC는 T세포 특이적으로 *Pdk1* 유전자가 제거된 자연 발생적으로 장염이 유도된 마우스에서 증가한다.**
- [152] PDK1은 NF- κ B의 활성을 유도하는 CD28 공동 수용체 신호 전달을 통한 CD4 T세포 활성화에 필수적인 역할을 한다. 그러므로 *CD4-Cre*에 의한 T세포 특이적인 *Pdk1* 유전자 결핍은 CD4 T세포의 활성을 약화시키며, 면역 조절 T세포의 기능 또한 감소시킨다. 사실상 이러한 면역 조절 T세포의 기능 결핍은 *Pdk1* 유전자가 제거되지 않은 TCR $\gamma\delta$ +T세포의 활성을 조절 하지 못하기 때문에 *Pdk1* 유전자 녹아웃 마우스에서 자연발생적으로 장염을 유도시킨다. 장염을 보이는 *Pdk1* 유전자 녹아웃 마우스는 같은 우리에서 자란 야생형의 형제 마우스와 비교하였을 때, 직장 탈출의 빈도수가 증가하는 양상을 보였다(참조: 도 1a). 그리고 10주령 이상의 *Pdk1* 유전자 녹아웃 마우스의 장에서 심각한 장의 염증 증세를 관찰하였다(참조: 도 1b).
- [153] 흥미롭게도, CD11b+Gr1+ MDSC 집단(population)이 마우스가 나이가 들어감에 따라 장의 염증이 심화될 때, 점차 증가된다. 어린 나이의 마우스에서는(6령-8주령) *Pdk1* 유전자 녹아웃 마우스와 야생형의 형제 마우스의 비장과 림프절에서 유사한 비율의 MDSC population을 보였다(참조: 도 1c, 1d 및 1e). 그러나 나이가 든 마우스에서는(10주령 이상의 마우스) *Pdk1* 유전자 녹아웃 마우스에서 야생형의 형제 마우스와 비교하였을 때, 비장과 림프절에서 MDSC population의 급격한 증가를 보였다(참조: 도 1c, 1d 및 1e).
- [154]
- [155] **2. 야생형의 면역 조절 T세포의 선택적 이식(adoptive transfer)은 MDSC의 subpopulation에 영향을 끼치며, *Pdk1* 유전자 녹아웃 마우스에서 MDSC의 면역 조절성 기능을 개선한다.**
- [156] *Pdk1* 유전자 녹아웃 마우스에서, 면역 조절 T세포의 기능은 급격하게 감소되어 자연 발생적인 장염을 유도한다. 그러나 이러한 장염은 야생형의 면역 조절 T세포를 이에 선택적으로 이식하게 되면 유도되지 않는다(참조: 도 2a 및 2b). 장염을 가지는 *Pdk1* 유전자 녹아웃 마우스에서 MDSC population, 특히 Gr-MDSC population이 Mo-MDSC에 비해 많이 증가하였다(참조: 도 2c). 우리의 데이터에서 MDSC population의 전체 빈도수는 야생형의 면역 조절 T세포의 이식에 의해 5일내에 크게 변하지 않았다(참조: 도 2c). 그러나 면역 조절 T세포의 선택적 이식은 Gr-MDSCs(CD11b+Ly6G^{high}Ly6C^{low})와 Mo-MDSCs(CD11b+Ly6G^{dim}Ly6C^{hi})와 같은 MDSC의 subpopulation에 영향을 끼쳤다. 도 2c에서 보듯이, *Pdk1* 유전자 녹아웃 마우스와 야생형의 형제 마우스에서 야생형의 면역 조절 T세포에 의해 전체 MDSC 중에서 Mo-MDSC가 증가하였고, 반면에 Gr-MDSC는 감소하였다. 이러한 데이터를 통해, 면역 조절 T세포가 MDSC의 subpopulation의 영향을 끼칠 수 있음을 확인하였다. 이로써, 우선적으로 면역 조절 T세포가 MDSC의 기능에 영향을 주는지 여부를 확인해보았다(참조: 도 7). *In vivo*에서 MDSC의 기능을 확인하기 위하여, DSS(dextran sodium sulfate)로 유도된 장염 모델을 이용하였다.

DSS는 설치류의 염증성 장 질환 모델에서 화학적으로 급성 장 염증을 유도하는데 상용되는 물질이다. DSS로 유도된 장염은 체중 감소, 혈리, 상피세포 손상, 면역세포 침투 등으로 특정 지어 질 수 있다. 본 발명의 데이터에서 DSS로 유도된 장염에 의한 체중감소는 *Pdk1* 유전자 녹아웃 마우스로부터 분리한 MDSC의 선택적 이식에 의해 회복되어지지 않았다. 사실상 이러한 MDSC의 이식은 같은 용량의 PBS를 주사한 대조군 마우스보다 오히려 더 심한 체중 감소를 나타내었다(참조: 도 2d). 그러나 야생형의 면역 조절 T세포를 주사한 *Pdk1* 유전자 녹아웃 마우스의 MDSC 이식은 DSS로 유도된 장염 모델에서 장염에 의한 체중 감소를 급격히 개선하였다(참조: 도 2d). 대장 길이는 장염의 유용한 지표로 증명되어 사용된다. 그러므로 DSS를 먹인 마우스를 11일 후에 장의 길이를 측정하였다. DSS를 먹인 마우스에서 DSS를 먹이지 않은 대조군에 비해 장이 유의하게 줄어드는 것을 확인하였다(참조: 도 2e 및 8). 이러한 DSS로 유도된 장염의 마우스에서 장의 길이 축소는 *Pdk1* 유전자 녹아웃 마우스에서 분리한 MDSC의 선택적 이식에 의해 회복되어지지 않았다(참조: 도 2e). 그러나 위의 데이터에서와 같이 면역 조절 T세포를 주사한 *Pdk1* 유전자 녹아웃 마우스에서 MDSC의 선택적 이식은 장 길이 축소를 회복시켰다(참조: 도 2e). 그리고 DSS로 유도된 장염의 체중 변화 뿐만 아니라 장의 염증과 손상 역시 면역 조절 T세포를 주사한 *Pdk1* 유전자 녹아웃 마우스에서 분리한 MDSC에 의해 개선되었다. 그러나 *Pdk1* 유전자 녹아웃 마우스에서 분리한 MDSC의 선택적 이식은 장의 염증 및 손상을 회복시키지 못하였다(참조: 도 2f, 2g). 흥미롭게도, DSS로 유도한 장염의 마우스에 야생형의 면역 조절 T세포를 주사한 *Pdk1* 유전자 녹아웃 마우스의 MDSC 이식은 전체 면역 조절 T세포를 유의성 있게 증가시키며, 특히 tTreg 세포 (흉선에서 유래된 면역 조절 T세포)의 확장에 영향을 미쳤다.

[157]

[158] **3.** *Pdk1* 유전자 녹아웃 마우스에서 MDSC의 면역 조절 기능이 야생형의 형제 마우스의 MDSC에 비해 감소된다.

[159] 염증반응 동안에 면역 조절 T세포는 면역 반응 조절을 위한 TGF- β , IL-10 과 같은 항염증성 사이토카인을 생산한다. 이전 보고에 따르면 PDK1이 결핍된 면역 조절 T세포에서 항 염증성 사이토카인의 생산이 감소하는 것을 보았다. 본 발명의 데이터에서도 마찬가지로 PDK1 결핍이 면역 조절 T세포의 anti-CD3와 anti-CD28에 의해 매개되는 TGF- β (참조: 도 3a), IL-10(참조: 도 3b)의 생산을 급격히 감소시키는 것을 확인하였다. MDSC 역시 T세포 활성화 조절을 위한 iNOS, ARG1과 같은 효과기 분자(effector molecule)들을 생산한다. 흥미롭게도, *Pdk1* 유전자 녹아웃 마우스의 Mo-MDSC에서 iNOS 발현(참조: 도 3c)과 Mo-MDSC와 Gr-MDSC에서 ARG1 발현(참조: 도 3d) 역시 감소되는 것을 확인하였다. PD-L1은 억제성 공동 수용체(Programmed cell death 1)의 리간드로서 야생형의 형제 마우스와 비교해 볼 때, *Pdk1* 유전자 녹아웃 마우스의 Mo-MDSC와

Gr-MDSC에서 감소되는 것을 확인하였다(참조: 도 3e). PD-1(Programmed cell death 1)은 면역세포의 억제성 공동 수용체로서 자기 관용(self-tolerance)에 필수적이다. 그러므로 MDSC에서 PD-L1은 T세포의 활성화와 확장 및 사이토카인의 생산을 억제하는데 중요한 역할을 한다. 그리하여 본 발명의 데이터에서, *Pdk1* 유전자 녹아웃 마우스에서 MDSC는 야생형의 형제 마우스와 비교하여 면역 반응을 조절하는 활성이 감소되는 것을 확인하였다. MDSC의 이러한 면역 조절 분자들의 생산을 통한 직접적인 면역반응조절 뿐 만 아니라 MDSC는 면역 반응을 조절한다고 알려진 조절 면역 T세포의 분화에 관여함으로써 간접적으로도 면역 반응에 영향을 끼칠 수 있다. *In vitro* 조건에서 MDSC는 iTreg 세포(*in vitro*에서 유도된 면역 조절 T세포)를 증가시킬 수 있다. 우리의 데이터에서 *Pdk1* 유전자 녹아웃 마우스의 MDSC는 *in vitro*에서 야생형의 형제 마우스와 비교하였을 때, iTreg 세포를 분화시키는 능력이 감소되는 것을 확인하였다(참조: 도 3f).

[160]

[161] 4. 면역 조절 T세포에서 유래된 TGF- β 는 골수세포에서 유래된 MDSC의 분화에 영향을 준다.

[162]

In vitro 조건에서 골수세포를 GM-CSF, IL-4, 2-머캅토에탄올(2-ME)과 함께 3-5일간 배양하여 MDSC로 분화시킬 수 있다. *In vitro* 조건에서 생성되는 MDSC 역시 Mo-MDSC와 Gr-MDSC와 같은 2가지의 subpopulation을 갖는다. 면역 조절 T세포의 MDSC의 subpopulation 분화에 대한 효과를 확인하기 위해, 골수세포를 GM-CSF, IL-4, 2-ME가 있거나 없을 경우 면역 조절 T세포의 유무에 따라 MDSC로 분화시켜 확인해 보았다. 면역 조절 T세포를 추가하였더라도 사이토카인들이 없을 경우에는 CD11b+Gr1+ MDSC로 분화되어지지 않았다(참조: 도 4a). 그러나 면역 조절 T세포를 정상적으로 *in vitro*에서 MDSC로 분화시키는 조건에 추가할 경우, 정상 조건에 비해 Mo-MDSC로 편향되는 효과를 보였다(참조: 도 4b). 우리의 데이터에서 면역 조절 T세포는 *in vivo*에서도 MDSC의 subpopulation의 분화에 영향을 줄 수 있음을 확인하였다(참조: 도 2c). 그러므로 본 발명자들은 면역 조절 T세포가 MDSC의 subpopulation 분화에 영향을 미칠 수 있다고 결론 지었다. 면역 조절 T세포에서 생성되는 TGF- β 와 IL-10과 같은 사이토카인들은 면역 조절 T세포가 연관된 면역 조절에 중요한 역할을 한다. 위의 데이터에서 확인하였듯이, *Pdk1* 유전자 녹아웃 마우스에서 이들 사이토카인의 발현이 대조군에 비해 급격히 감소되어짐을 확인하였다(참조: 도 3a 및 3b). 그러므로 면역 조절 T세포에서 유래된 이들 사이토카인이 MDSC의 subpopulation에 아마 영향을 끼칠 것이라 예상하였다. 우리의 데이터에서 TGF- β 를 중화시키는 항체를 추가할 경우 골수 세포에서 유래한 MDSC subpopulation에 대한 면역 조절 T세포의 효과가 사라지는 것을 확인하였다(참조: 도 4b). 이로써, 면역 조절 T세포에서 유래된 TGF- β 가 MDSC의 subpopulation 분화를 조절하는 중요 매개자임을 확인할 수 있었다. 이러한

내용을 명확히 하기 위하여, *in vitro*에서 MDSC를 분화시키는 조건에서 TGF- β 를 직접 처리하여 보았다. 그 결과, TGF- β 가 MDSC의 subpopulation 분화에 영향을 끼치는 반면, IL-10은 영향을 주지 않는 것을 확인하였다(참조: 도 4c). 이러한 데이터에서 TGF- β 는 전체 분화되는 MDSC에서 Gr-MDSC의 비율을 감소시키고, Mo-MDSC의 비율을 증가시켰다. 그러나 Gr-MDSC의 전체 숫자(absolute number)는 전체 분화된 MDSC의 숫자가 증가하였기 때문에 크게 감소되지 않았다(참조: 도 4d 및 4e). 대신에 Mo-MDSC의 전체 숫자는 분화된 MDSC에서 크게 증가하는 것을 확인하였다(참조: 도 4e). 이러한 데이터들을 통해, TGF- β 가 Mo-MDSC의 확장에 관련이 있으며, 이러한 내용은 TGF- β 에 대한 각각의 population의 증식을 확인하여 증명하였다. *In vitro*에서 분화되는 골수 세포에서 유래한 중간 단계의 Mo-MDSC와 Gr-MDSC를 분리한 후 세포들의 분열 정도를 분석하기 위해 CFSE(carboxyl fluorescein succinimidyl ester)를 세포에 표지하였다. 그 결과, TGF- β 에 의해 Mo-MDSC의 세포 분열이 유의미하게 증가되는 반면, Gr-MDSC는 영향을 주지 않음을 확인하였다(참조: 도 4f).

[163]

[164] **5. TGF- β 는 MDSC의 면역 억제 기능을 증가시키는 데 중요한 역할을 한다.**

[165] 골수성 전구세포 (common myeloid progenitor, CMP)에서 유래되는 MDSC는 성숙한 대식세포와 수지상세포로 완전히 분화하지 않는다. *In vitro*에서 분화된 MDSC와 TGF- β 의 교육을 받은 MDSC(MDSCs/TGF- β)를 자세히 살펴보기 전에, 우선적으로 분화된 세포들이 미성숙한 단계를 유지하는지 여부를 대식세포 마커인 F4/80와 수지상 세포의 마커인 CD11c 염색을 통해 확인하였다. 그 결과, population의 거의 대부분이 TGF- β 처리와 상관없이 성숙한 골수 세포로 분화되지 않았다(참조: 도 5a). 추가적으로 이와 같이 분화된 소집단(subpopulation)이 MDSC의 각 소집단(subpopulation)과 일치하는지 여부를 확인하기 위해, 각각을 분리하여 Wright-Giemsa 염색을 한 후 이들의 형태를 현미경을 통해 관찰해 보았다. MDSC의 Wright-Giemsa 염색을 통해, Gr-MDSC에서는 다형핵의 백혈구 형태와 Mo-MDSC에서는 단핵 세포의 형태를 명확히 구분할 수 있었다(참조: 도 5b).

[166] 골수 세포에서 유래한 MDSC가 면역 억제 기능을 가지는지 여부를 확인하기 위하여 면역 억제 기능을 가지는 효과기 분자들의 생산을 확인해 보았다. 골수 세포에서 유래되는 Mo-MDSC는 면역 억제에 관여하는 iNOS, TGF- β , IL-10과 같은 분자들을 생산하였고, ARG1의 경우 Mo-MDSC와 Gr-MDSC 모두에서 발현되어졌다. 흥미롭게도 본 발명의 데이터에서 TGF- β 가 위에서 명시한 iNOS(참조: 도 5c), TGF- β (참조: 도 5d), IL-10(참조: 도 5e), ARG1(참조: 도 5f, 5g)을 포함한 효과기 분자들의 생산을 유의미하게 증가시킬 수 있음을 확인하였다. PD-L1 또한 MDSC가 매개하는 면역 조절에서 중요한 표면 분자로서, 골수 세포에서 유래된 MDSC, 특히 Gr-MDSC에서 역시 발현되는 것을 확인하였다(참조: 도 5h). 이러한 PD-L1의 표면 발현은 TGF- β 에 의해

Mo-MDSC에서 더욱 증가하는 반면, Gr-MDSC는 크게 영향 받지 않았다(참조: 도 5h). 아마도 *in vitro*에서 분화된 Gr-MDSC에서의 PD-L1 발현이 이미 높게 발현되고 있기 때문이라 추정되어진다.

[167]

[168] **6. TGF- β 의 교육을 받은 Mo-MDSC는 DSS로 유도된 장염모델에서 면역 억제 활성을 증대시킴.**

[169]

[170] *In vivo*에서, 골수세포에서 유래되는 MDSC의 기능을 조사하기 위해 DSS로 유도된 장염 모델을 사용하였다. 이러한 실험은 골수세포에서 유래된 Mo-MDSC와 TGF- β 의 교육을 받은 Mo-MDSC를 각각 분리하여, DSS를 처리하는 0일과 6일의 마우스에 정맥 주사하였다(참조: 도 9). 그리고 장염의 심각 정도를 확인하기 위해 체중감소를 매일 측정하였다. 그 결과, 체중감소를 보이는 DSS를 처리한 마우스와 비교하여, 골수세포에서 유래되는 Mo-MDSC와 TGF- β 의 교육을 받은 Mo-MDSC를 이식한 마우스에서 체중 감소가 완화되는 것을 확인하였다(참조: 도 6a). 그리고 체중의 회복이 Mo-MDSC와 비교하였을 때, TGF- β 의 교육을 받은 Mo-MDSC에 의해 훨씬 빨라지는 것 또한 확인 할 수 있었다(참조: 도 6a). 대조군의 마우스에서 장의 길이가 DSS에 의해 급격히 축소되는데, MDSC를 이식한 마우스에서는 장 길이 축소에 저항성을 보이며, 이는 TGF- β 의 교육을 받은 Mo-MDSC의 경우 더욱 효과적이다(참조: 도 6b, 도 10). 체중변화 뿐만 아니라 장의 염증과 손상정도 역시 DSS로 유도된 장염 모델에서 Mo-MDSC 보다는 TGF- β 의 교육을 받은 Mo-MDSC 이식에 의해 효과적으로 회복 되는 것을 확인할 수 있었으며(참조: 도 6c 및 6d), TGF- β 의 교육을 받은 Mo-MDSC의 이식은 Mo-MDSC의 이식보다 장 조직의 배양으로부터 얻어낸 상층액을 이용한 IL-10, IL-17A, IFN- γ 과 같은 사이토카인의 생산을 좀 더 효과적으로 억제할 수 있었다(참조: 도 6e).

[171]

장에서 염증반응 동안에 면역 조절 T세포는 염증반응 조절에 중요한 역할을 한다. 그리하여 본 발명자들은 면역 조절 T세포의 population을 DSS로 유도시킨 장염의 마우스 모델에서 확인하였다. 그 결과, DSS 처리 후에 CD4⁺Foxp3⁺면역 조절 T세포의 population이 감소되는 것을 확인하였으며, 골수세포에서 유래된 Mo-MDSC와 TGF- β 의 교육을 받은 Mo-MDSC를 이식할 경우 CD4⁺Foxp3⁺면역 조절 T세포의 population이 DSS를 처리한 대조군에 비해 증가되는 것을 확인할 수 있었다(참조: 도 6f 및 도 11). 특히, TGF- β 의 교육을 받은 Mo-MDSC를 이식할 경우 Mo-MDSC를 이식할 때보다 비장에서 전체 면역 조절 T세포의 비율이 유의미하게 증가하였다(참조: 도 6f 및 도 11). 면역 조절 T세포의 population 중에서 tTreg(CD4⁺Foxp3⁺ Nrp1⁺) 세포의 경우, DSS를 처리한 대조군에 비해 TGF- β 의 교육을 받은 Mo-MDSC를 이식할 경우 유의미하게 증가하는 반면, Mo-MDSC를 이식할 경우에는 비장에서 tTreg 세포가 유의미하게 증가하지는 않았다(참조: 도 6f 및 도 11). 그러므로 TGF- β 의 교육을 받은 Mo-MDSC가 면역

조절 T세포를 확장 시키는 능력이 더 뛰어났다. 이러한 내용은 *in vitro*에서 면역조절 T세포의 증식을 실험하여 재확인 하였다. 그 결과, 골수 세포에서 유래된 Mo-MDSC와 TGF- β 의 교육을 받은 Mo-MDSC가 *in vitro*에서 면역조절 T세포의 증식을 증가 시킬 수 있었다(참조: 도 6g). 특히, TGF- β 의 교육을 받은 Mo-MDSC가 *in vitro*에서 면역조절 T세포의 증식을 유의미하게 증가시켰으며, 이를 통해 *in vitro* 에서 골수세포에서 유래시킨 Mo-MDSC가 *in vivo*에서도 면역 억제기능을 가질 수 있음을 확인하였다. 또한, TGF- β 의 교육을 받은 Mo-MDSC가 *in vivo*에서 MDSC의 기능이 더 뛰어나다는 사실을 확인하였다.

[172]

[173] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[174]

[175] 참고문헌

[176] Abbas, A.K., Benoist, C., Bluestone, J.A., Campbell, D.J., Ghosh, S., Hori, S., Jiang, S., Kuchroo, V.K., Mathis, D., Roncarolo, M.G., *et al.* (2013). Regulatory T cells: recommendations to simplify the nomenclature. *Nature immunology* 14, 307-308.

[177] Araki, A., Kanai, T., Ishikura, T., Makita, S., Uraushihara, K., Iiyama, R., Totsuka, T., Takeda, K., Akira, S., and Watanabe, M. (2005). MyD88-deficient mice develop severe intestinal inflammation in dextran sodium sulfate colitis. *J Gastroenterol* 40, 16-23.

[178] Arihara, F., Mizukoshi, E., Kitahara, M., Takata, Y., Arai, K., Yamashita, T., Nakamoto, Y., and Kaneko, S. (2013). Increase in CD14+HLA-DR⁻/low myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients and its impact on prognosis. *Cancer Immunol Immunother* 62, 1421-1430.

[179] Baumgart, D.C., and Sandborn, W.J. (2007). Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet* 369, 1641-1657.

[180] Bommireddy, R., and Doetschman, T. (2007). TGFbeta1 and Treg cells: alliance for tolerance.

[181] *Trends in molecular medicine* 13, 492-501.

[182] Bronte, V. (2009). Myeloid-derived suppressor cells in inflammation: uncovering cell subsets with enhanced immunosuppressive functions. *European journal of immunology* 39, 2670-2672.

[183] Bronte, V., Serafini, P., De Santo, C., Marigo, I., Tosello, V., Mazzoni, A., Segal, D.M., Staib, C., Lowel, M., Sutter, G., *et al.* (2003). IL-4-induced arginase 1 suppresses alloreactive T cells in tumor20 bearing mice. *Journal of immunology* 170,

270-278.

- [184] Bronte, V., and Zanovello, P. (2005). Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nature reviews. Immunology* 5, 641-654.
- [185] Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K.J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., and Wahl, S.M. (2003). Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *The Journal of experimental medicine* 198, 1875-1886.
- [187] Delano, M.J., Scumpia, P.O., Weinstein, J.S., Coco, D., Nagaraj, S., Kelly-Scumpia, K.M., O'Malley, K.A., Wynn, J.L., Antonenko, S., Al-Quran, S.Z., et al. 1 (2007). MyD88-dependent expansion of an immature GR-1(+)CD11b(+) population induces T cell suppression and Th2 polarization in sepsis. *The Journal of experimental medicine* 204, 1463-1474.
- [188] Fontenot, J.D., Gavin, M.A., and Rudensky, A.Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nature immunology* 4, 330-336.
- [189] Gabitass, R.F., Annels, N.E., Stocken, D.D., Pandha, H.A., and Middleton, G.W. (2011). Elevated myeloid-derived suppressor cells in pancreatic, esophageal and gastric cancer are an independent prognostic factor and are associated with significant elevation of the Th2 cytokine interleukin-13. *Cancer Immunol Immunother* 60, 1419-1430.
- [190] Gabrilovich, D.I., and Nagaraj, S. (2009). Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* 9, 162-174.
- [191] Haile, L.A., Gamrekashvili, J., Manns, M.P., Korangy, F., and Greten, T.F. (2010). CD49d is a new marker for distinct myeloid-derived suppressor cell subpopulations in mice. *Journal of immunology* 185, 203-210.
- [192] Haile, L.A., von Waselewski, R., Gamrekashvili, J., Kruger, C., Bachmann, O., Westendorf, A.M., Buer, J., Liblau, R., Manns, M.P., Korangy, F., and Greten, T.F. (2008). Myeloid-derived suppressor cells in inflammatory bowel disease: a new immunoregulatory pathway. *Gastroenterology* 135, 871-881, 881 e871-875.
- [193] Hori, S., Nomura, T., and Sakaguchi, S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299, 1057-1061.
- [194] Huang, B., Pan, P.Y., Li, Q., Sato, A.I., Levy, D.E., Bromberg, J., Divino, C.M., and Chen, S.H. (2006).
- [195] Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer research* 66, 1123-1131.
- [196] Kang, J.A., Jeong, S.P., Park, D., Hayden, M.S., Ghosh, S., and Park, S.G. (2013).

- Transition from heterotypic to homotypic PDK1 homodimerization is essential for TCR-mediated NF-kappaB activation. *J Immunol* 190, 4508-4515.
- [197] Lindau, D., Gielen, P., Kroesen, M., Wesseling, I. P., and Adema, G.J. (2013). The immunosuppressive tumour network: myeloid-derived suppressor cells, regulatory T cells and natural killer T cells. *Immunology* 138, 105-115.
- [198] Lohr, J., Knoechel, B., and Abbas, A.K. (2006). Regulatory T cells in the periphery. *Immunological reviews* 212, 149-162.
- [199] Luan, Y., Mosheir, E., Menon, M.C., Wilson, D., Woytovich, C., Ochando, J., and Murphy, B. (2013).
- [200] Monocytic myeloid-derived suppressor cells accumulate in renal transplant patients and mediate CD4(+) Foxp3(+) Treg expansion. *Am J Transplant* 13, 3123-3131.
- [201] Maloy, K.J., and Kullberg, M.C. (2008). IL-23 and Th17 cytokines in intestinal homeostasis. *Mucosal immunology* 1, 339-349.
- [202] Marhaba, R., Vitacolonna, M., Hildebrand, D., Baniyash, M., Freyschmidt-Paul, P., and Zoller, M. (2007). The importance of myeloid-derived suppressor cells in the regulation of autoimmune effector cells by a chronic contact eczema. *Journal of immunology* 179, 5071-5081.
- [203] Marigo, I., Dolcetti, L., Serafini, P., Zanovello, P., and Bronte, V. (2008). Tumor-induced tolerance and immune suppression by myeloid derived suppressor cells. *Immunological reviews* 222, 162-179.
- [204] Mazzoni, A., Bronte, V., Visintin, A., Spitzer, J.H., Apolloni, E., Serafini, P., Zanovello, P., and Segal, D.M. (2002). Myeloid suppressor lines inhibit T cell responses by an NO-dependent mechanism. *Journal of immunology* 168, 689-695.
- [205] Nagaraj, S., and Gabrilovich, D.I. (2008). Tumor escape mechanism governed by myeloid-derived suppressor cells. *Cancer research* 68, 2561-2563.
- [206] Ochoa, A.C., Zea, A.H., Hernandez, C., and Rodriguez, P.C. (2007). Arginase, prostaglandins, and myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 13, 721s-726s.
- [207] Otsuji, M., Kimura, Y., Aoe, T., Okamoto, Y., and Saito, T. (1996). Oxidative stress by tumor26 derived macrophages suppresses the expression of CD3 zeta chain of T-cell receptor complex and antigen-specific T-cell responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 13119-13124.
- [208] Pan, P.Y., Ma, G., Weber, K.J., Ozao-Choy, J., Wang, G., Yin, B., Divino, C.M., and Chen, S.H. (2010).
- [209] Immune stimulatory receptor CD40 is required for T-cell suppression and T regulatory cell activation mediated by myeloid-derived suppressor cells in cancer. *Cancer Res* 70, 99-108.

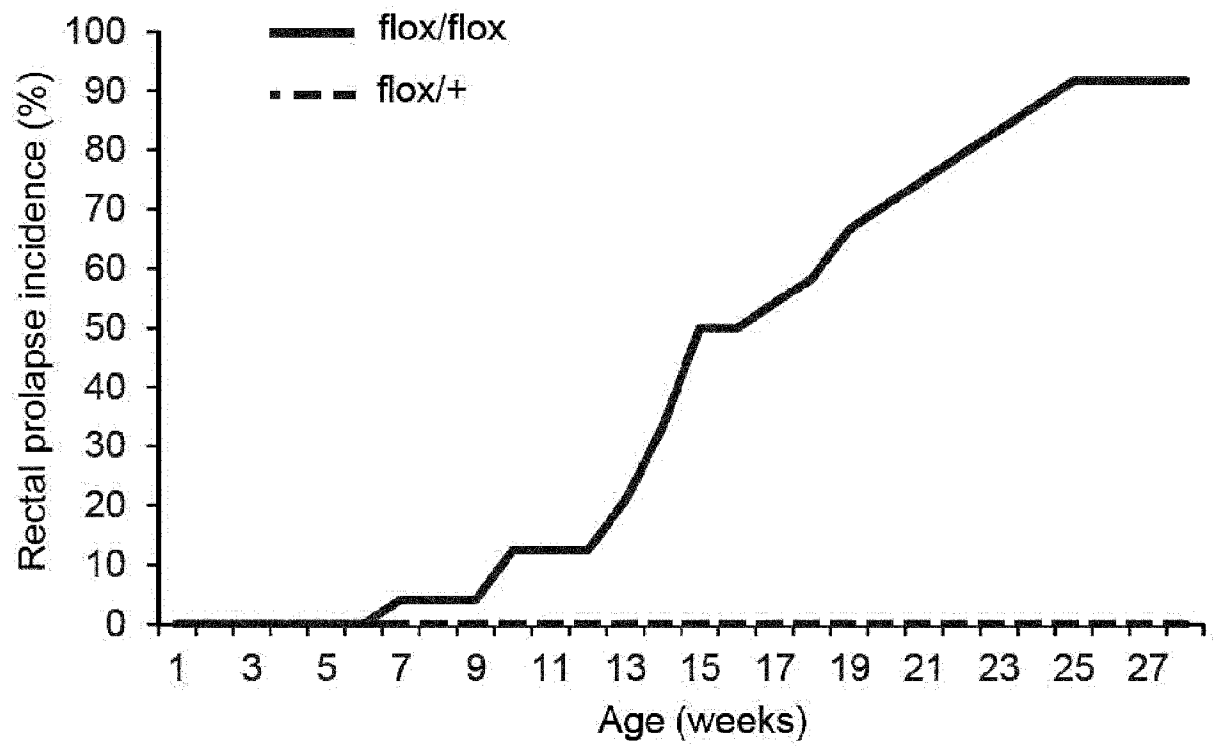
- [210] Park, S.G., Mathur, R., Long, M., Hosh, N., Hao, L., Hayden, M.S., and Ghosh, S. (2010). T regulatory cells maintain intestinal homeostasis by suppressing gammadelta T cells. *Immunity* 33, 791-803.
- [211] Park, S.G., Schulze-Luehrman, J., Hayden, M.S., Hashimoto, N., Ogawa, W., Kasuga, M., and Ghosh, S. (2009). The kinase PDK1 integrates T cell antigen receptor and CD28 coreceptor signaling to induce NF-kappaB and activate T cells. *Nat Immunol* 10, 158-166.
- [212] Rodriguez, P.C., Zea, A.H., Culotta, K.S., Zabaleta, J., Ochoa, J.B., and Ochoa, A.C. (2002). Regulation of T cell receptor CD3zeta chain expression by L-arginine. *The Journal of biological chemistry* 277, 21123-21129.
- [213] Rui, Y., Honjo, T., and Chikuma, S. (2013). Programmed cell death 1 inhibits inflammatory helper T-cell development through controlling the innate immune response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 16073-16078.
- [214] Sakaguchi, S., Ono, M., Setoguchi, R., Yagi, H., Hori, S., Fehervari, Z., Shimizu, J., Takahashi, T., and Nomura, T. (2006). Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunological reviews* 212, 8-27.
- [215] Saurer, L., and Mueller, C. (2009). T cell-mediated immunoregulation in the gastrointestinal tract. *Allergy* 64, 505-519.
- [216] Serafini, P., Borrello, I., and Bronte, V. (2006). Myeloid suppressor cells in cancer: recruitment, phenotype, properties, and mechanisms of immune suppression. *Seminars in cancer biology* 16, 53-65.
- [217] Serafini, P., Mgebroff, S., Noonan, K., and Borrello, I. (2008). Myeloid-derived suppressor cells promote cross-tolerance in B-cell lymphoma by expanding regulatory T cells. *Cancer Res* 68, 5439-5449.
- [218] Shevach, E.M. (2009). Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity* 30, 636-645.
- [219] Solito, S., Marigo, I., Pinton, L., Damuzzo, V., Mandruzzato, S., and Bronte, V. (2014). Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity in human cancers. *Ann N Y Acad Sci* 1319, 47-65.
- [220] Tazzari, M., Negri, T., Rini, F., Vergani, B., Huber, V., Villa, A., Dagrada, P., Colombo, C., Fiore, M., Gronchi, A., et al. (2014). Adaptive immune contexture at the tumour site and downmodulation of circulating myeloid-derived suppressor cells in the response of solitary fibrous tumour patients to anti-angiogenic therapy. *Br J Cancer* 111, 1350-1362.
- [221] Ugel, S., Delpozzi, F., Desantis, G., Papalini, F., Simonato, F., Sonda, N., Zilio, S., and Bronte, V. (2009). Therapeutic targeting of myeloid-derived suppressor cells.

- Current opinion in pharmacology 9, 470-481.
- [222] Vignali, D.A., Collison, L.W., and Workman, C.J. (2008). How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* 8, 523-532.
- [223] Wood, K.J., Bushell, A., and Hester, J. (2012). Regulatory immune cells in transplantation. *Nat Rev Immunol* 12, 417-430.
- [224] Wu, P., Wu, D., Ni, C., Ye, J., Chen, W., Hu, G., Wang, Z., Wang, C., Zhang, Z., Xia, W., et al. (2014).
- [225] gammadeltaT17 cells promote the accumulation and expansion of myeloid-derived suppressor cells in human colorectal cancer. *Immunity* 40, 785-800.
- [226] Youn, J.I., Nagaraj, S., Collazo, M., and Gabrilovich, D.I. (2008). Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *Journal of immunology* 181, 5791-5802.
- [227] Zhang, R., Ito, S., Nishio, N., Cheng, Z., Suzuki, H., and Isobe, K.I. (2011). Dextran sulphate sodium increases splenic Gr1(+)CD11b(+) cells which accelerate recovery from colitis following intravenous transplantation. *Clinical and experimental immunology* 164, 417-427.
- [228]

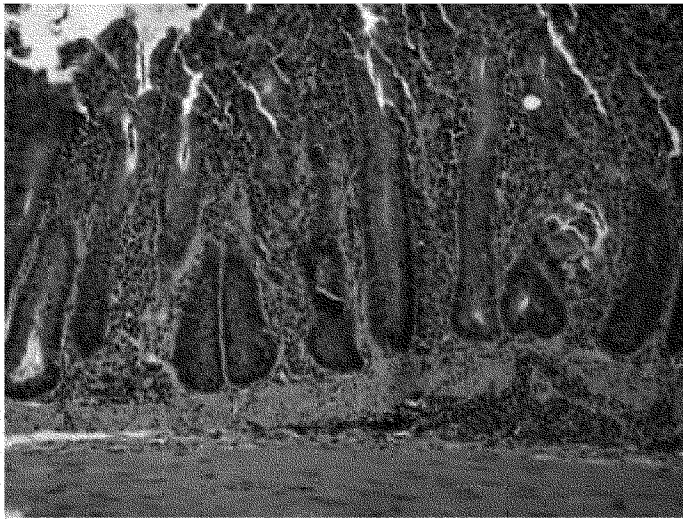
청구범위

- [청구항 1] 면역 조절 T세포(Treg cell) 및 TGF- β (transforming growth factor- β) 중에서 선택되는 어느 하나 이상을 유효 성분으로 포함하는 골수 유래 억제 세포(MDSC)의 면역 억제 활성 증진용 조성물.
- [청구항 2] 제 1 항에 있어서, 상기 면역 억제 활성 증진은 골수 유래 억제 세포(MDSC)의 소집단(subpopulation) 분화 조절에 의한 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 3] 제 2 항에 있어서, 상기 소집단 분화 조절은 Mo-MDSC(monocytic MDSC)의 증가 조절인 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 4] 제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 Mo-MDSC의 PD-L1 표면 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 5] 면역 조절 T세포(Treg cell) 및 TGF- β (transforming growth factor- β) 중에서 선택되는 어느 하나 이상을 골수 유래 억제 세포(MDSC)에 처리하는 단계를 포함하는, 골수 유래 억제 세포(MDSC)의 면역 억제 활성 증진 방법.
- [청구항 6] 제 5 항에 있어서, 상기 골수 유래 억제 세포(MDSC)는 포유류 동물로부터 분리된 골수 세포를 *in vitro* 배양에 의해 분화시킨 세포인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 7] 제 5 항에 있어서, 상기 처리는 *In vitro*에서 이루어지는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 8] 면역 조절 T세포 및 TGF- β 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 처리에 의해 소집단(subpopulation) 분화된 골수 유래 억제 세포(MDSC)를 유효 성분으로 포함하는 면역 억제용 조성물.
- [청구항 9] 제 8 항에 있어서, 상기 소집단 분화는 Mo-MDSC(monocytic MDSC)가 증가된 분화인 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 10] 면역 조절 T세포 또는 TGF- β 의 교육을 받은(educated) Mo-MDSC를 유효 성분으로 포함하는 면역 억제용 조성물.
- [청구항 11] 제 10 항에 있어서, 상기 교육을 받은 Mo-MDSC는 교육을 받지 않은 Mo-MDSC에 비하여 PD-L1 표면 발현이 증가된 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 12] 제 8 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항에 따른 면역 억제용 조성물을 유효성분으로 포함하는 항염증용 조성물.
- [청구항 13] 8 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항에 따른 면역 억제용 조성물을 유효 성분으로 포함하는 염증성 장질환(IBD)의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 14] 제 13 항에 있어서, 상기 염증성 장질환은 크론병 또는 궤양성 결장염인 것을 특징으로 하는 조성물.

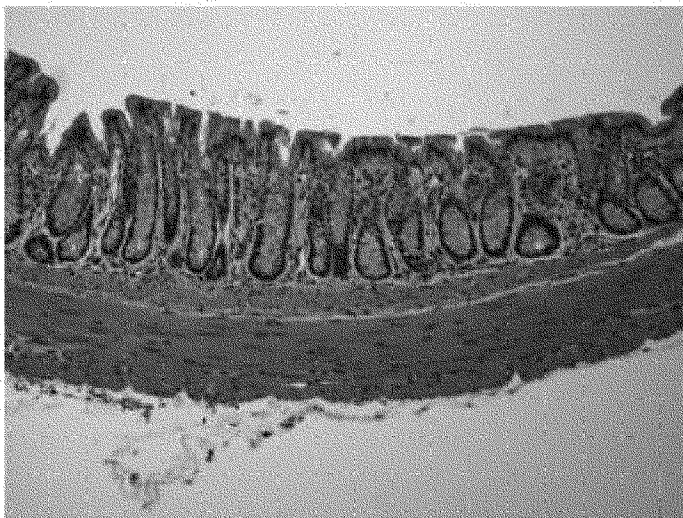
[도 1a]



[도 1b]

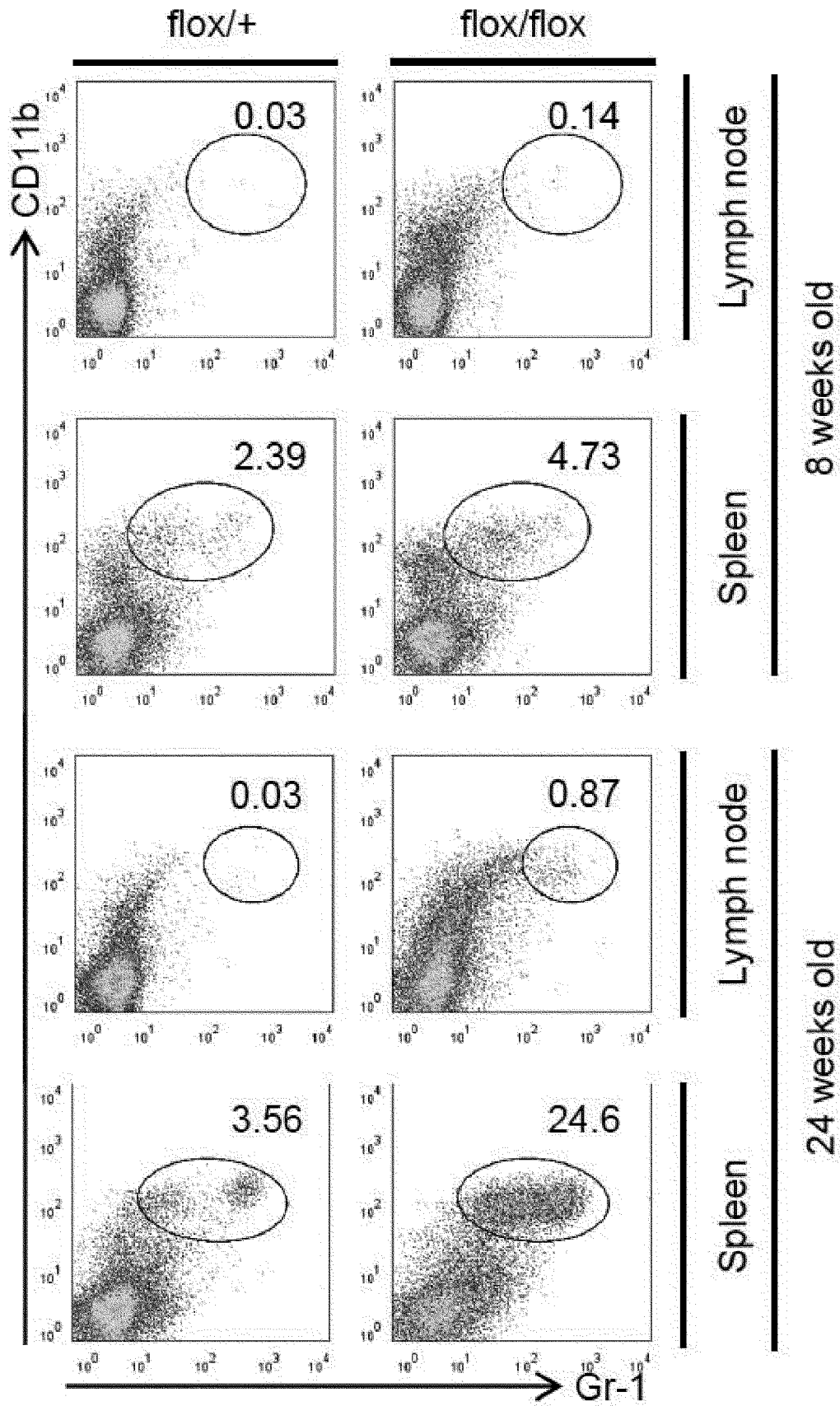


flox/flox

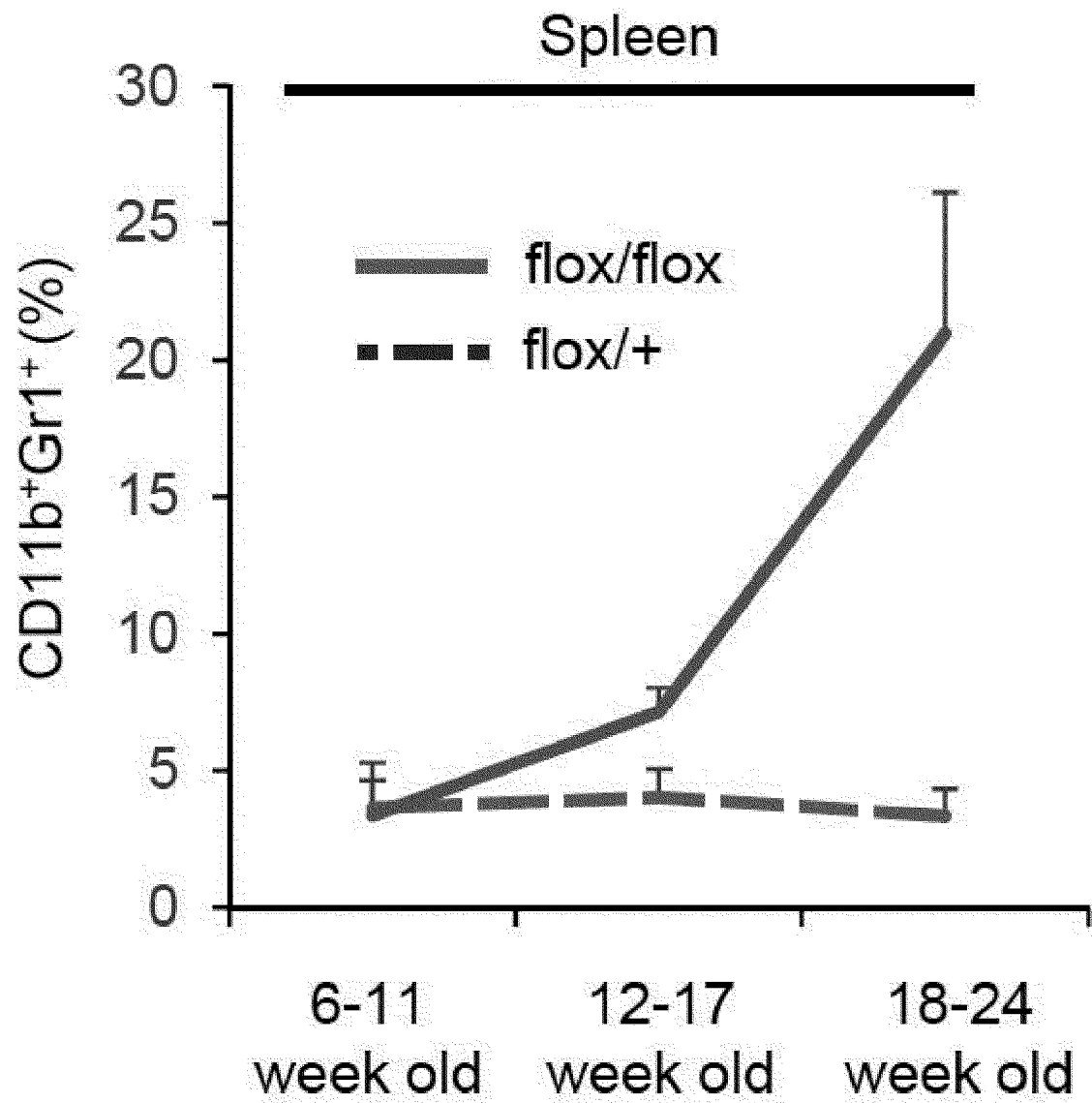


flox/+

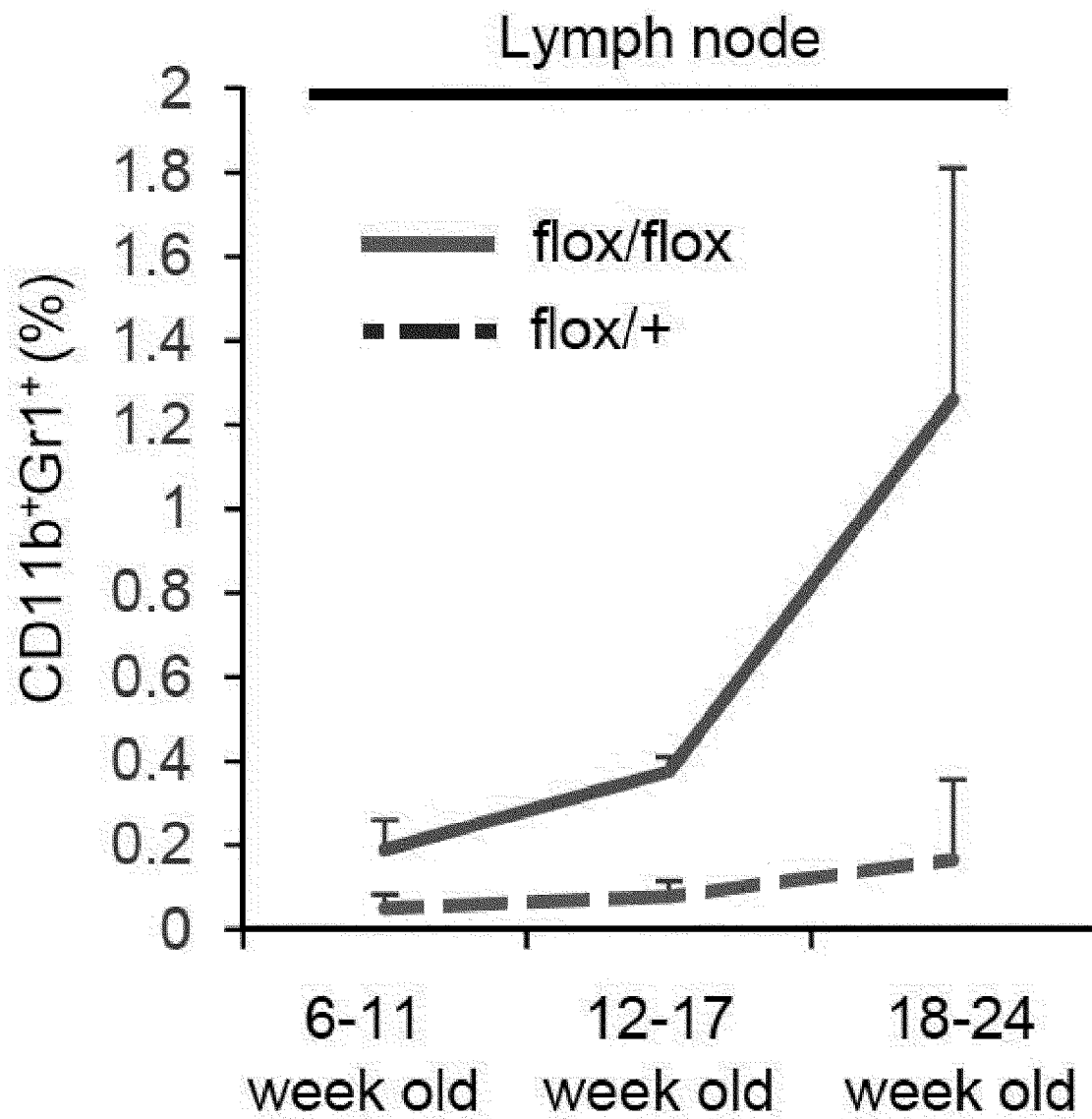
[도1c]



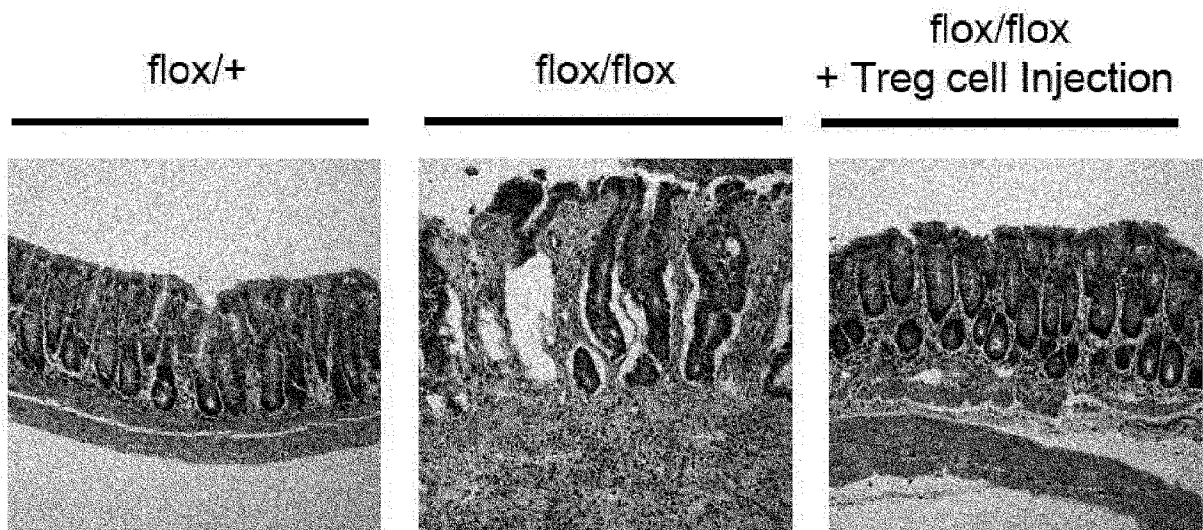
[도1d]



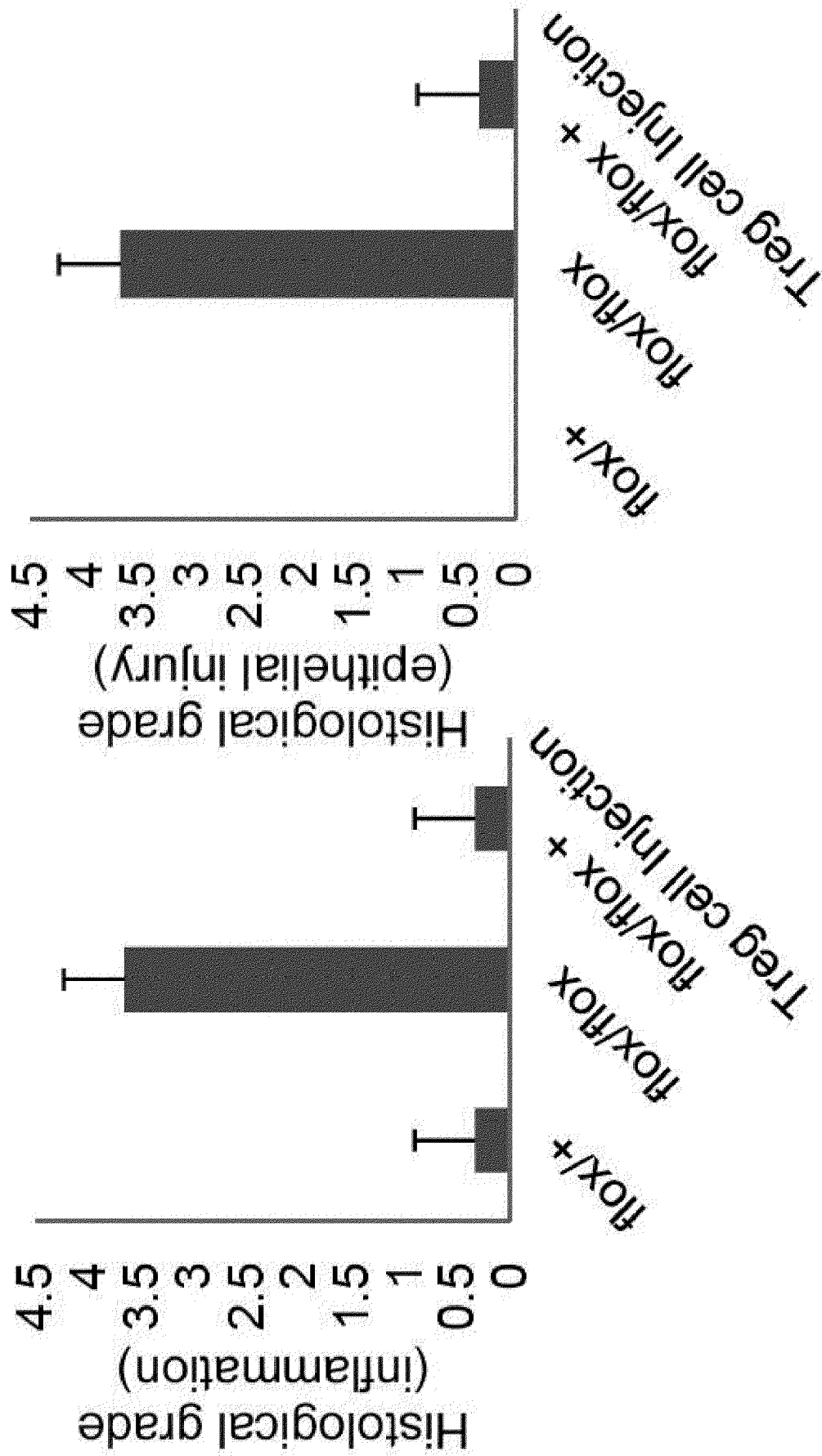
[도1e]



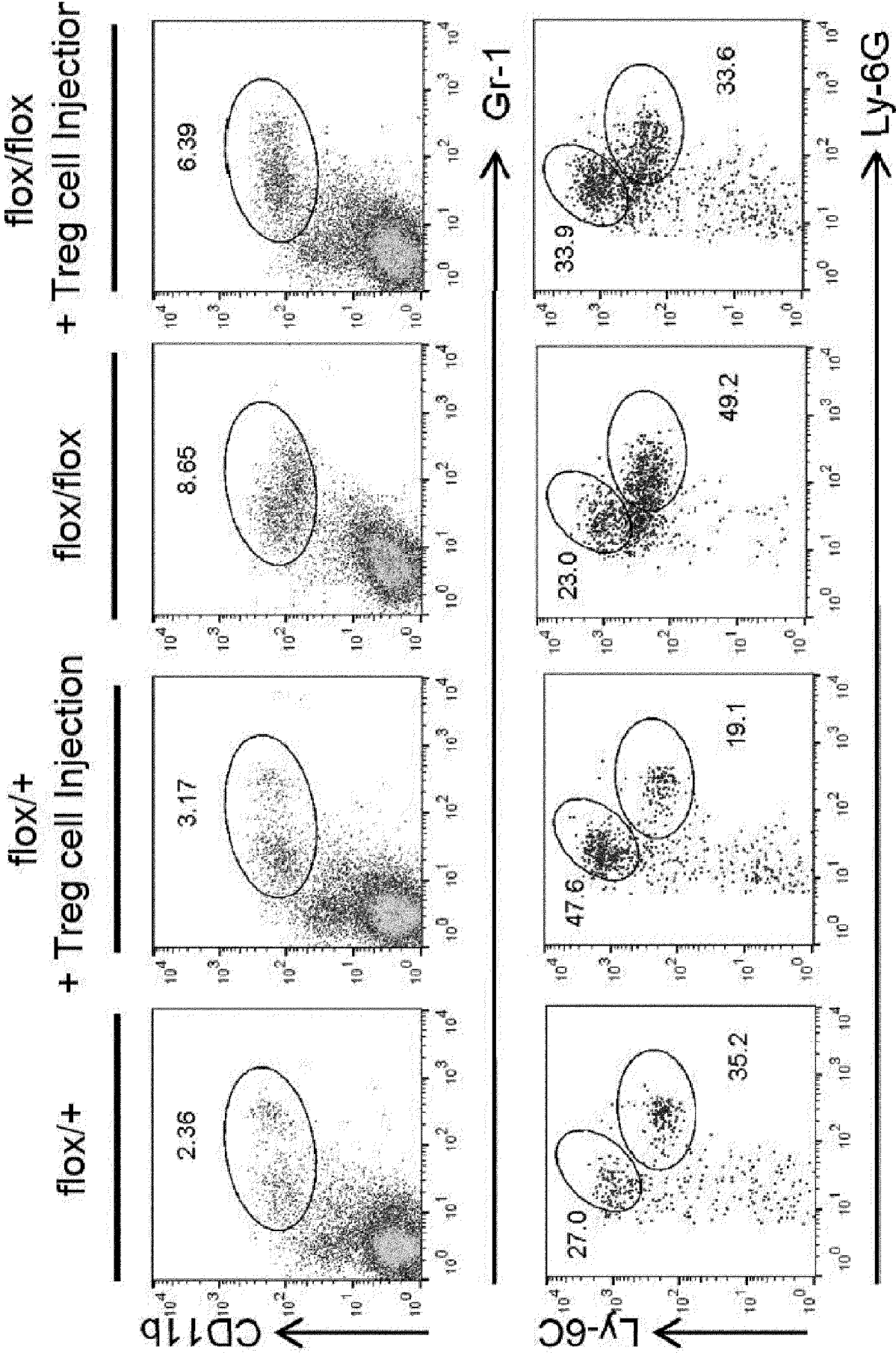
[도2a]



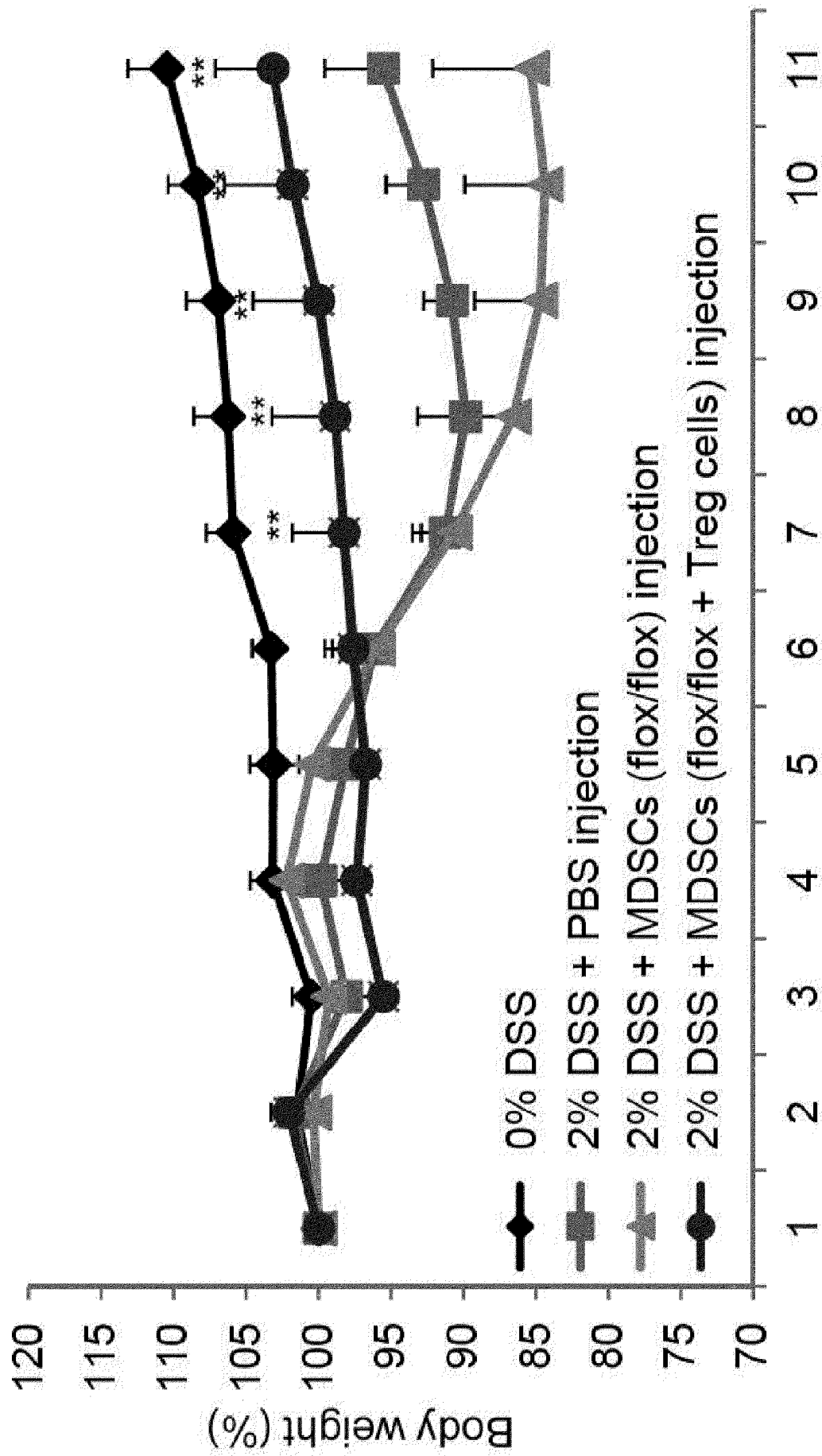
[도2b]



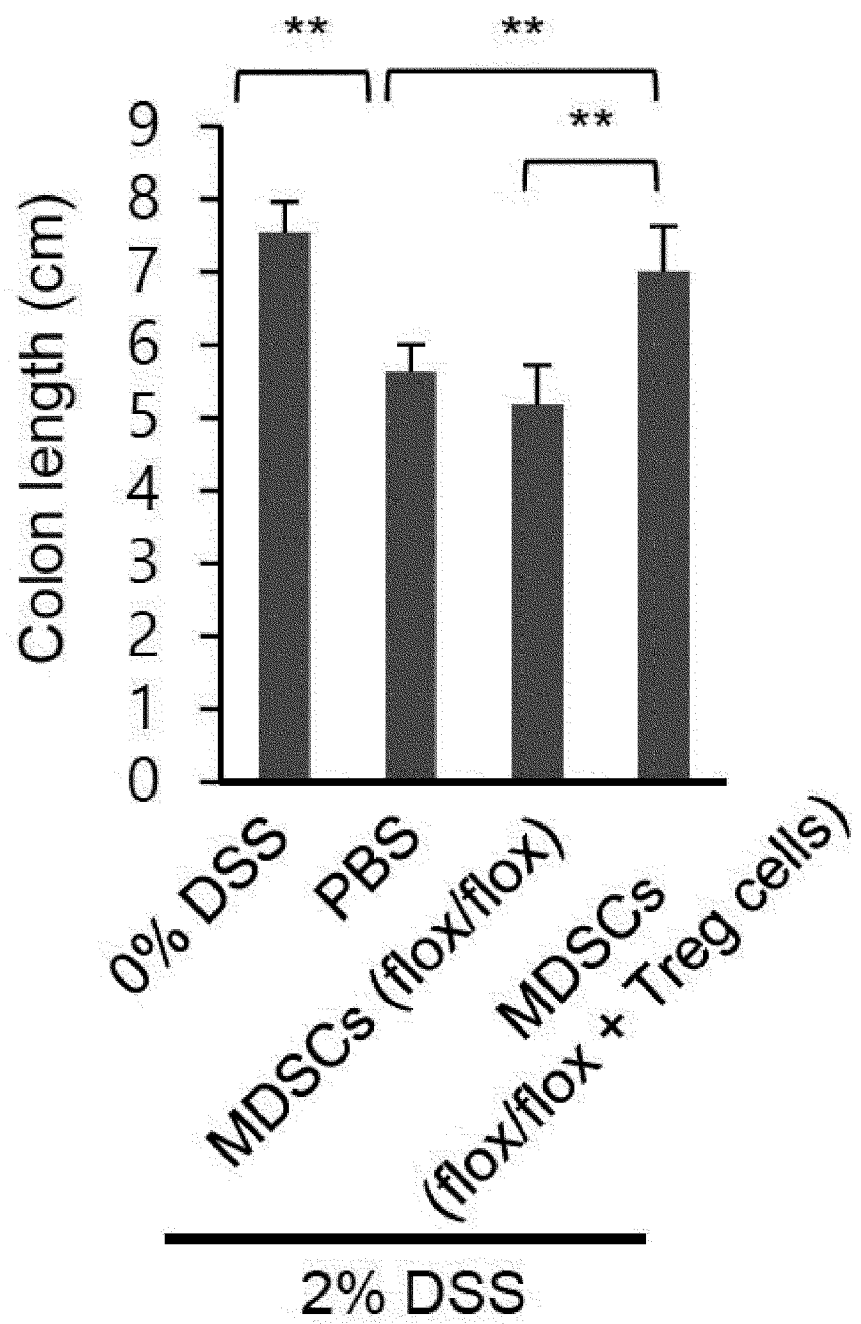
[도2c]



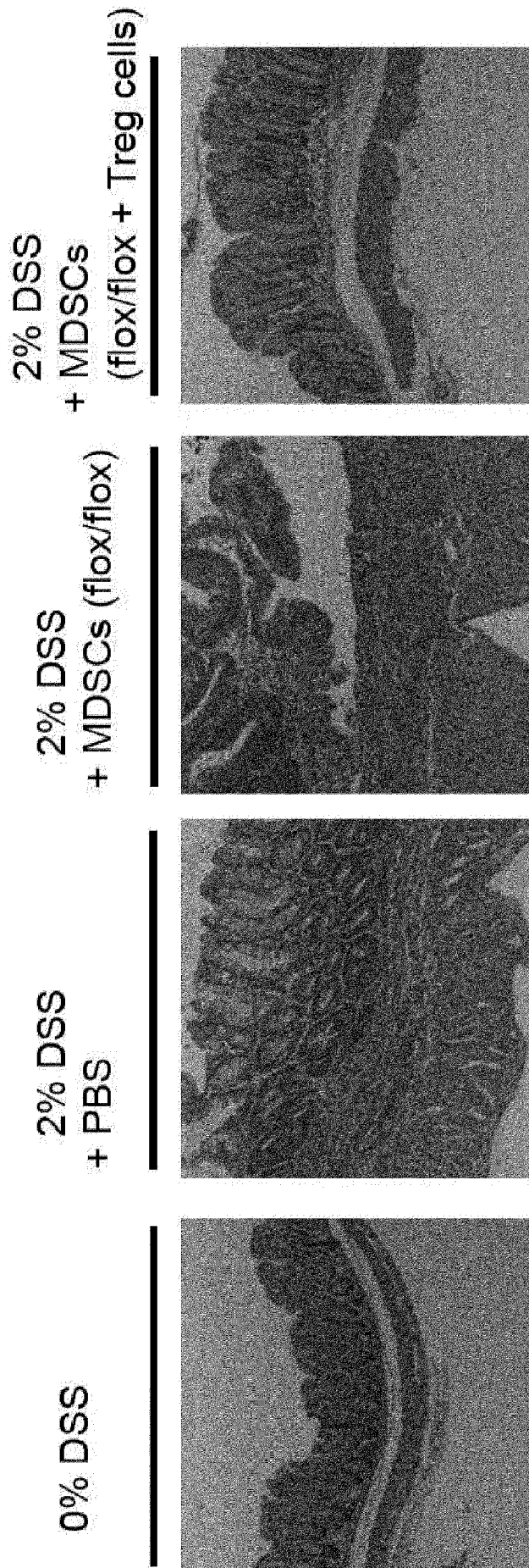
[도2d]



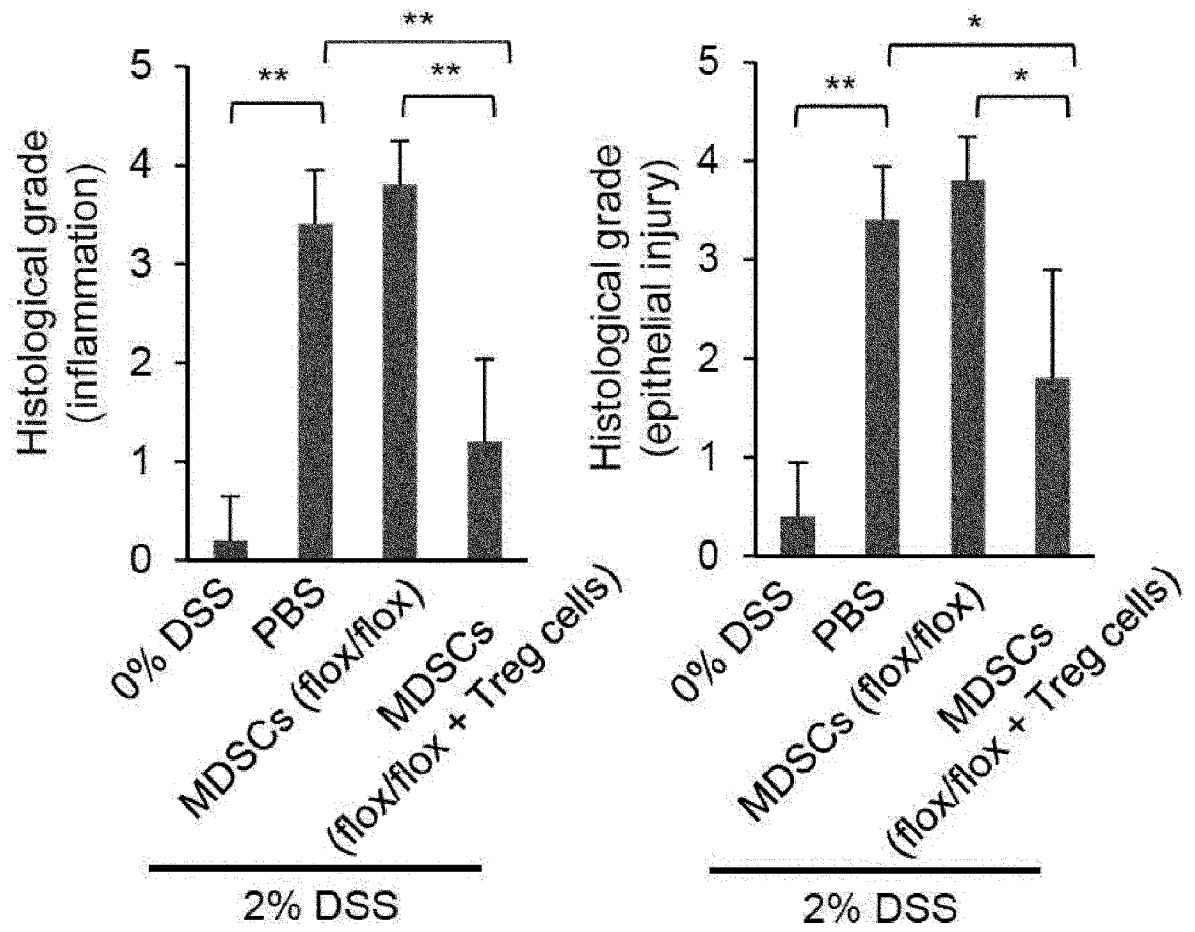
[도2e]



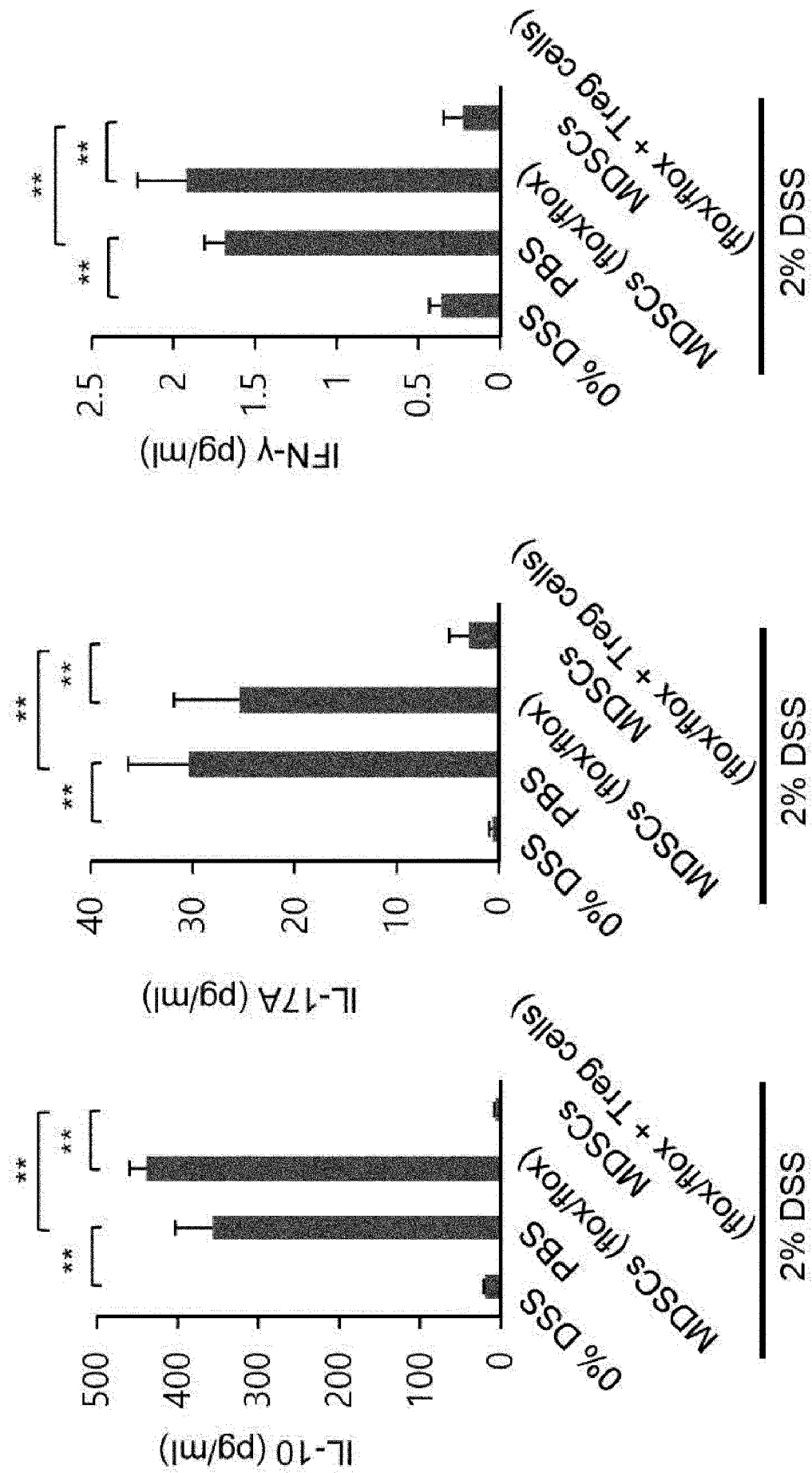
[도2f]



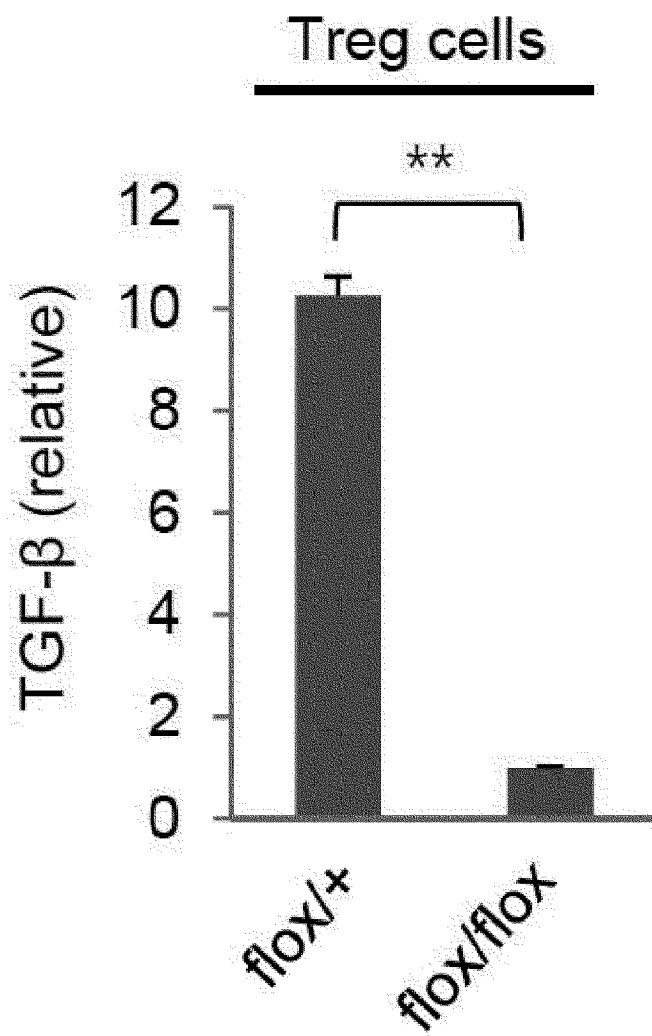
[도2g]



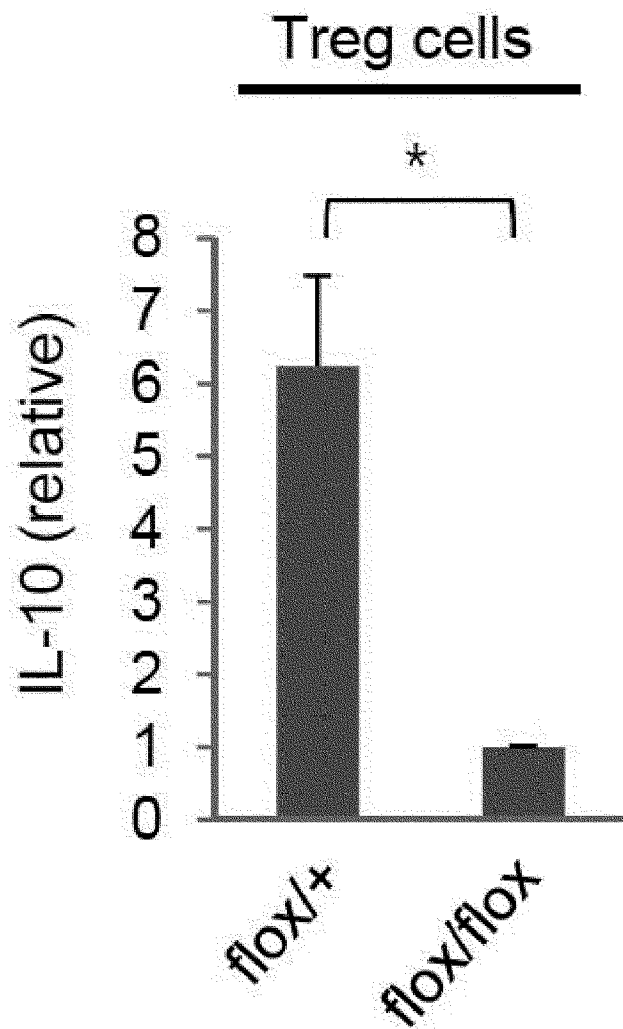
[도2h]



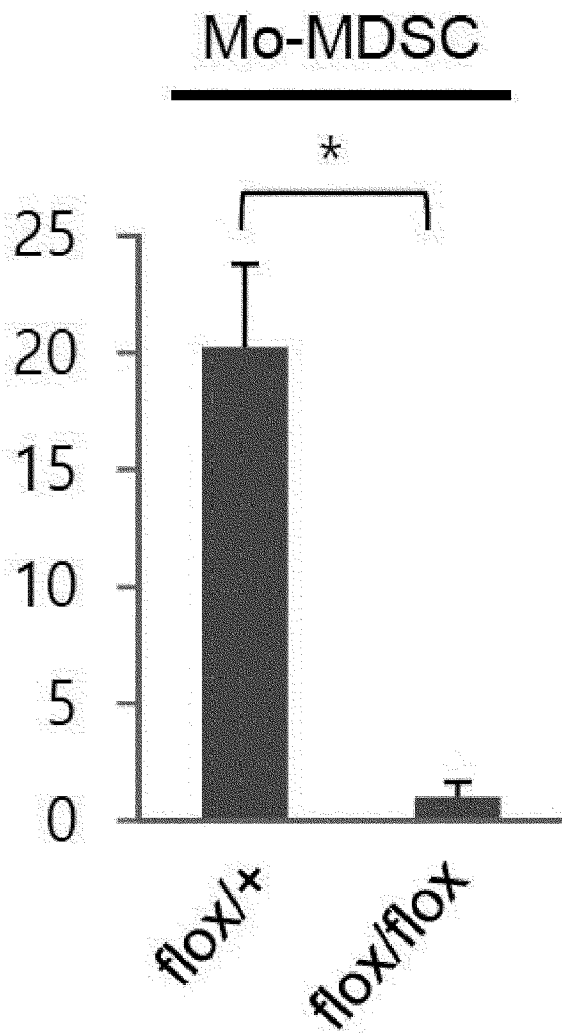
[도3a]



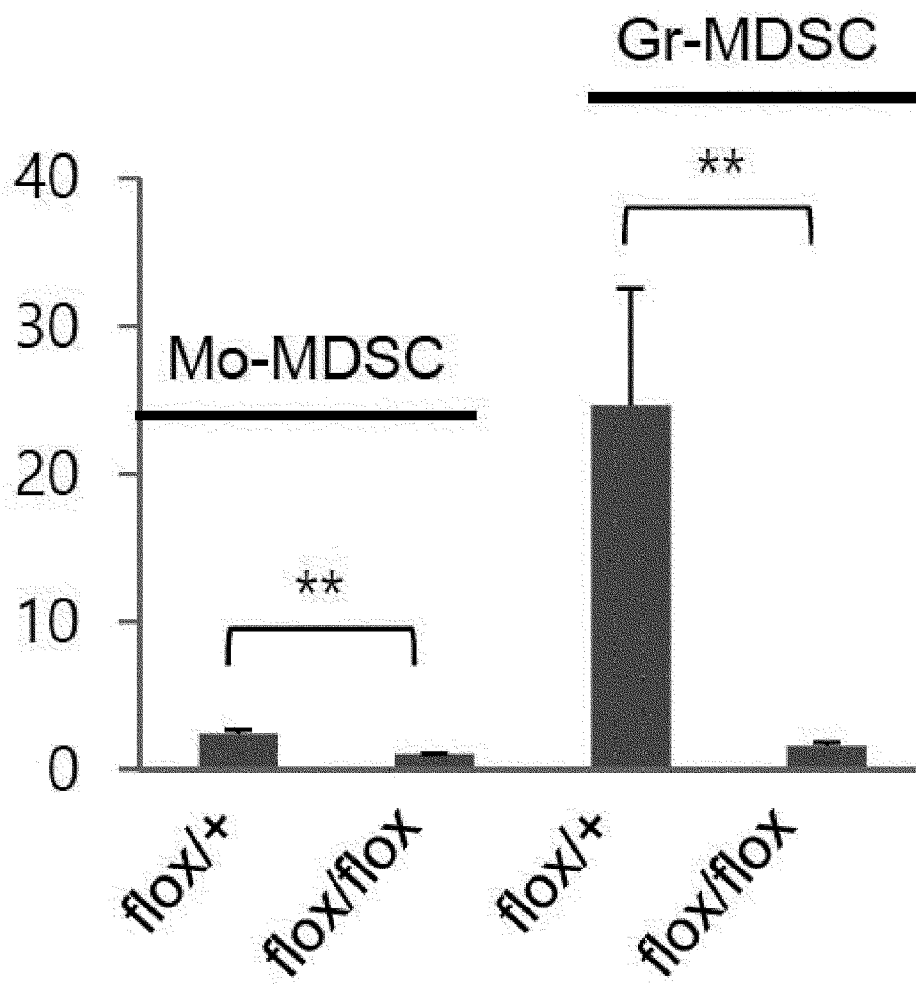
[도3b]



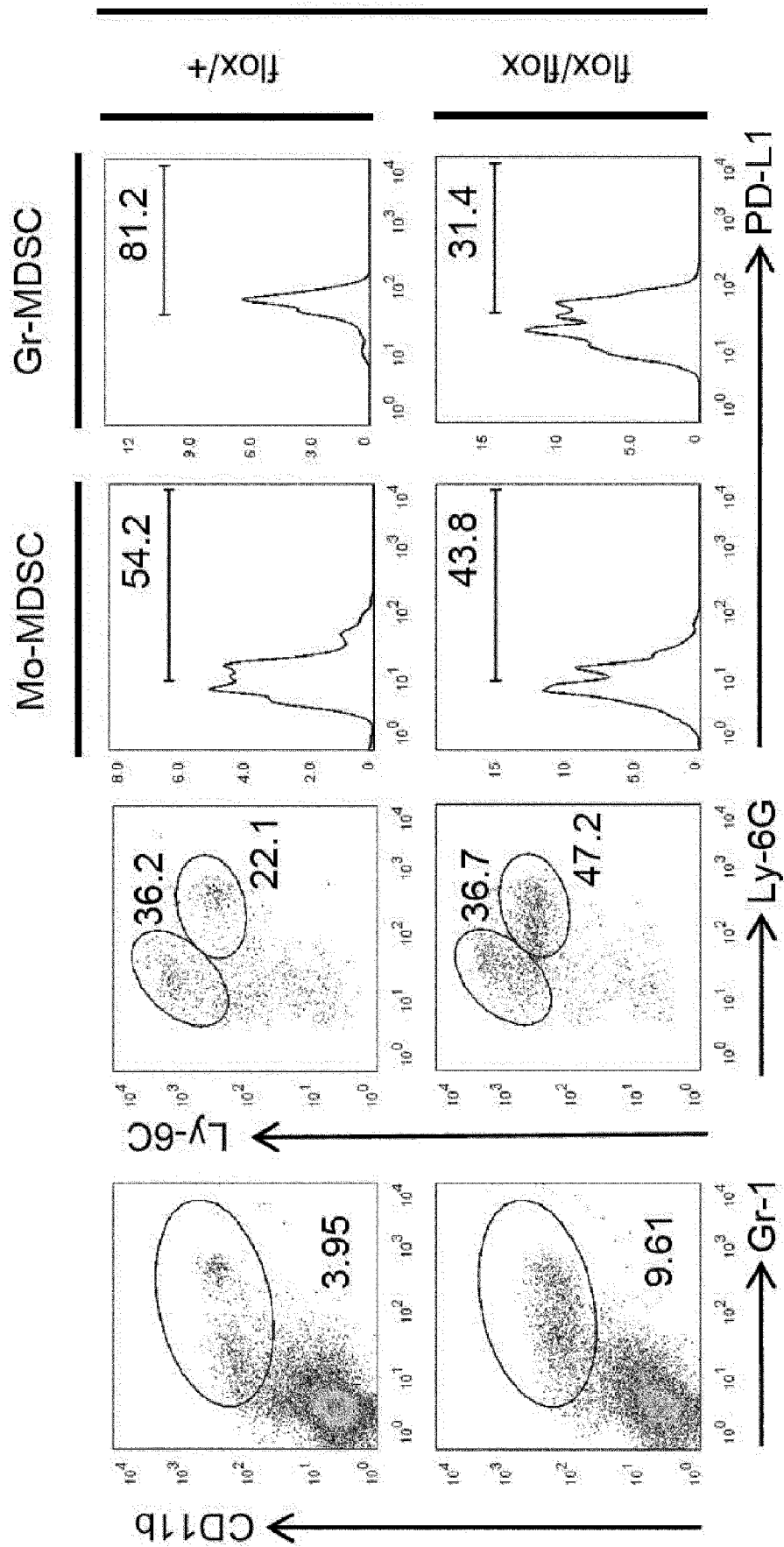
[도3c]



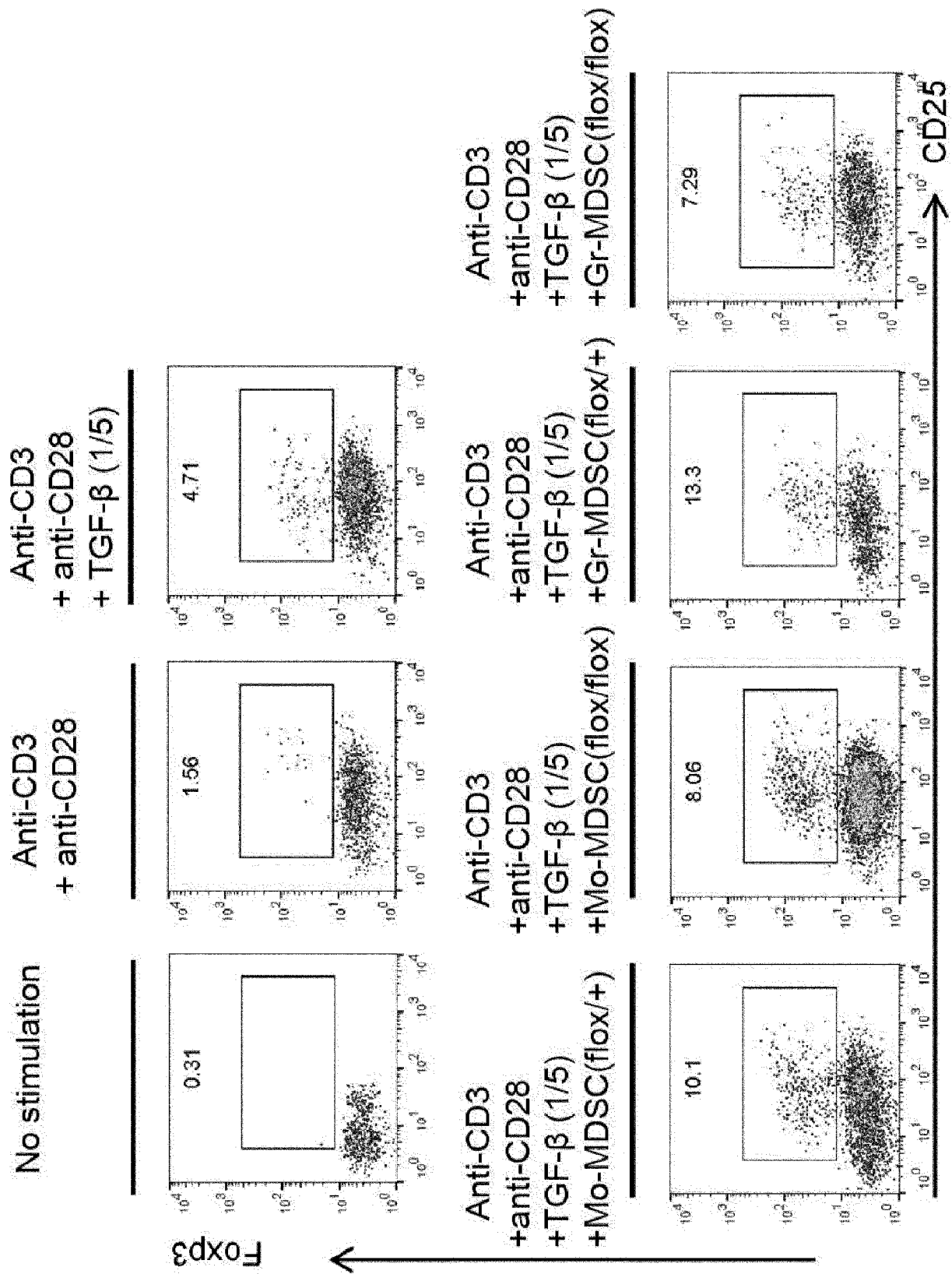
[도3d]



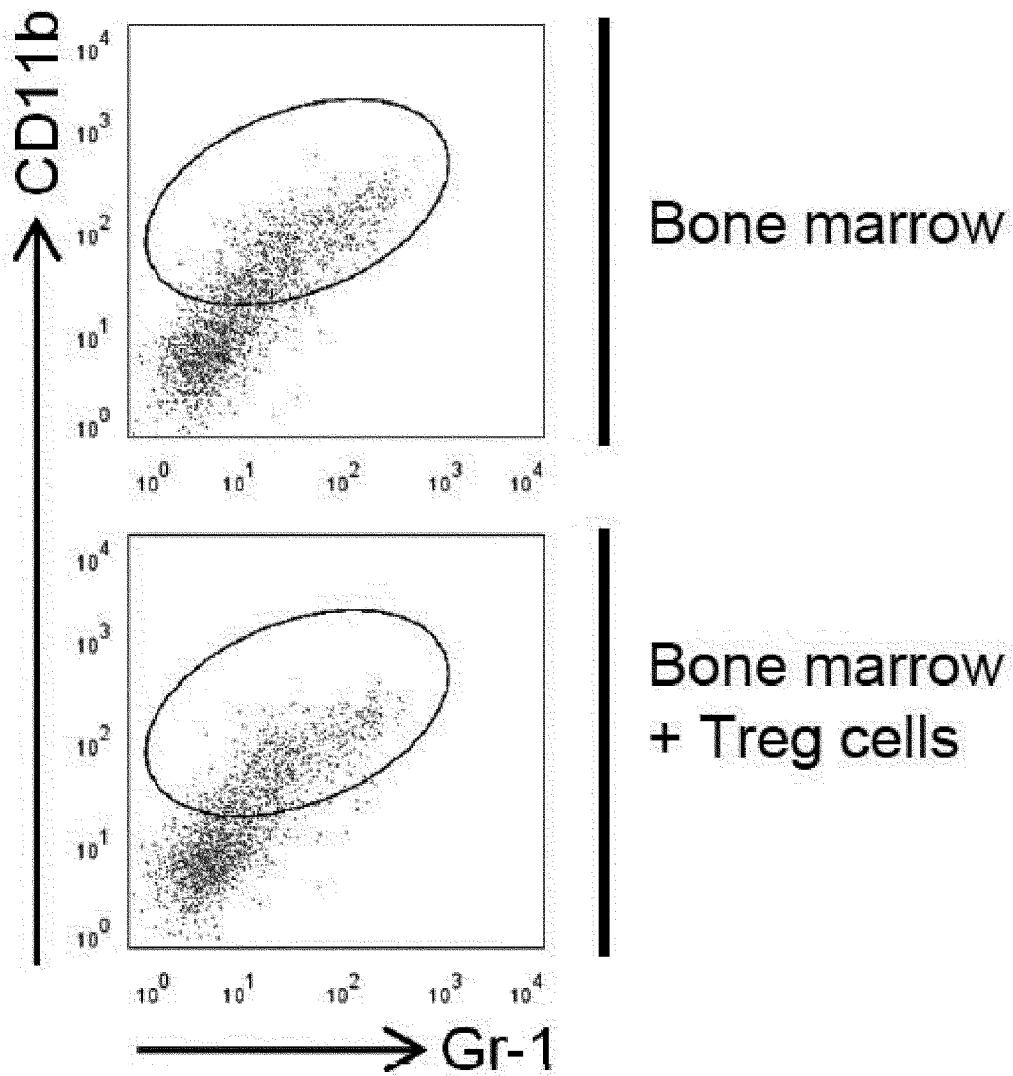
Spleen



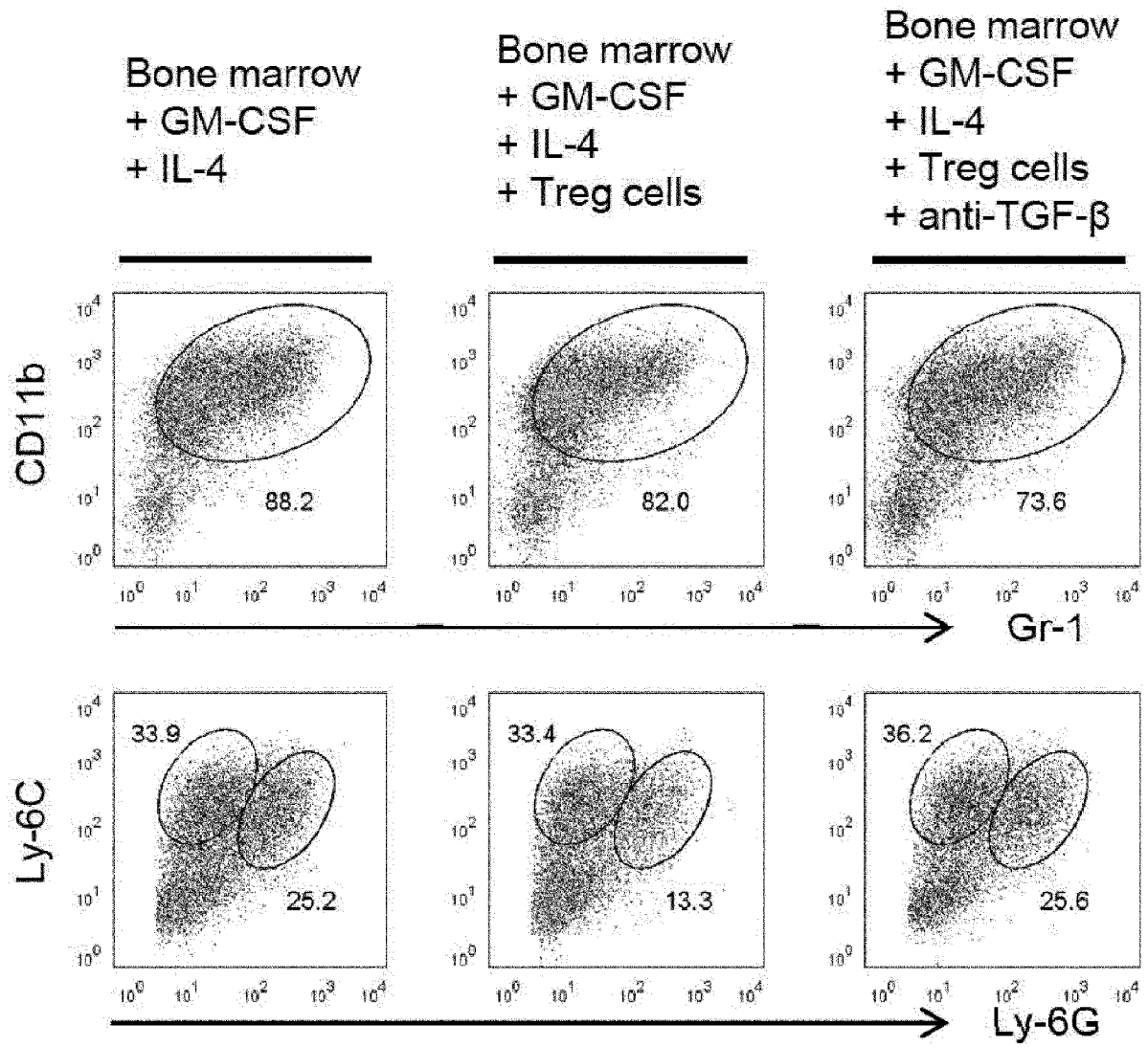
[도3f]



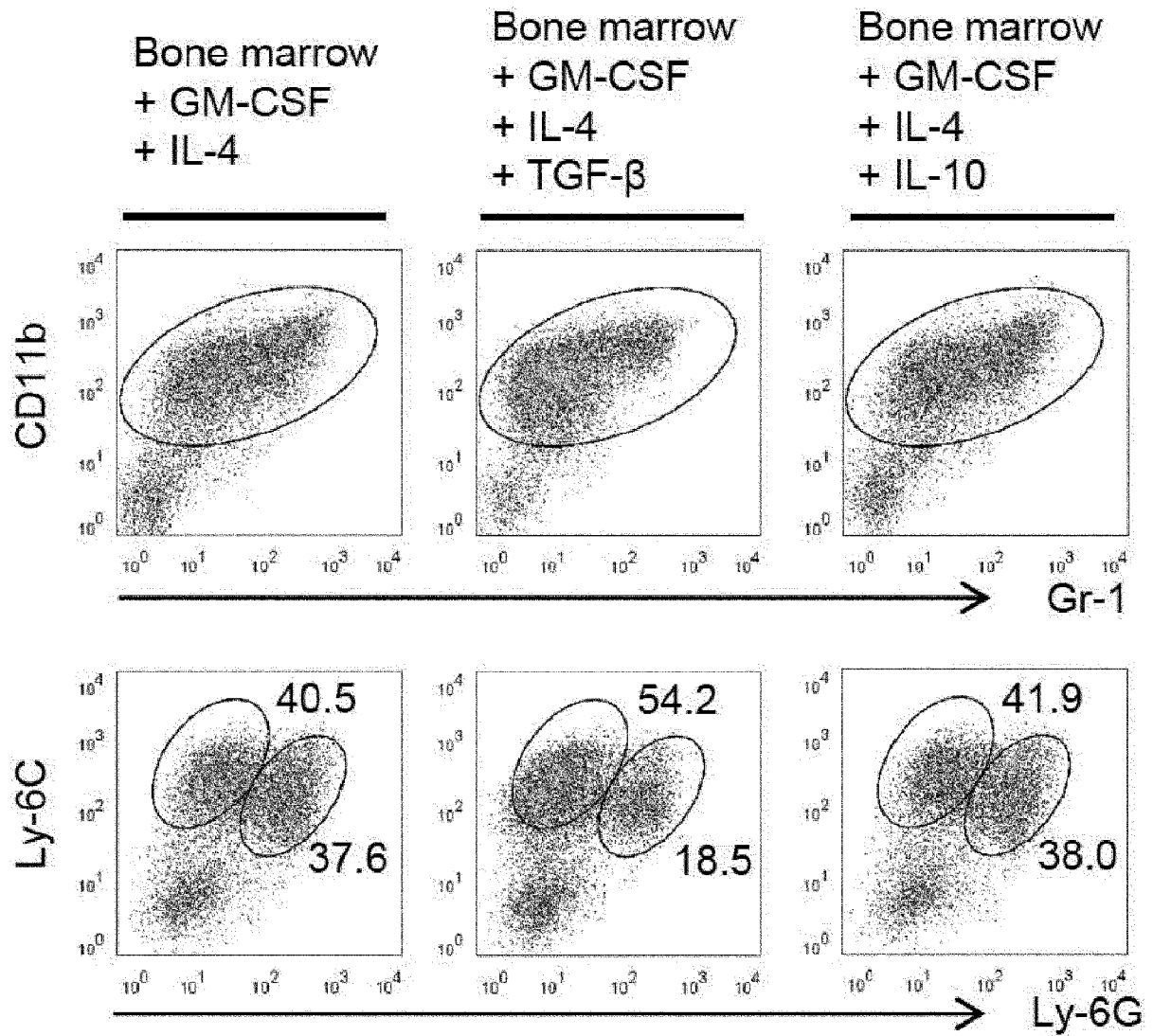
[도4a]



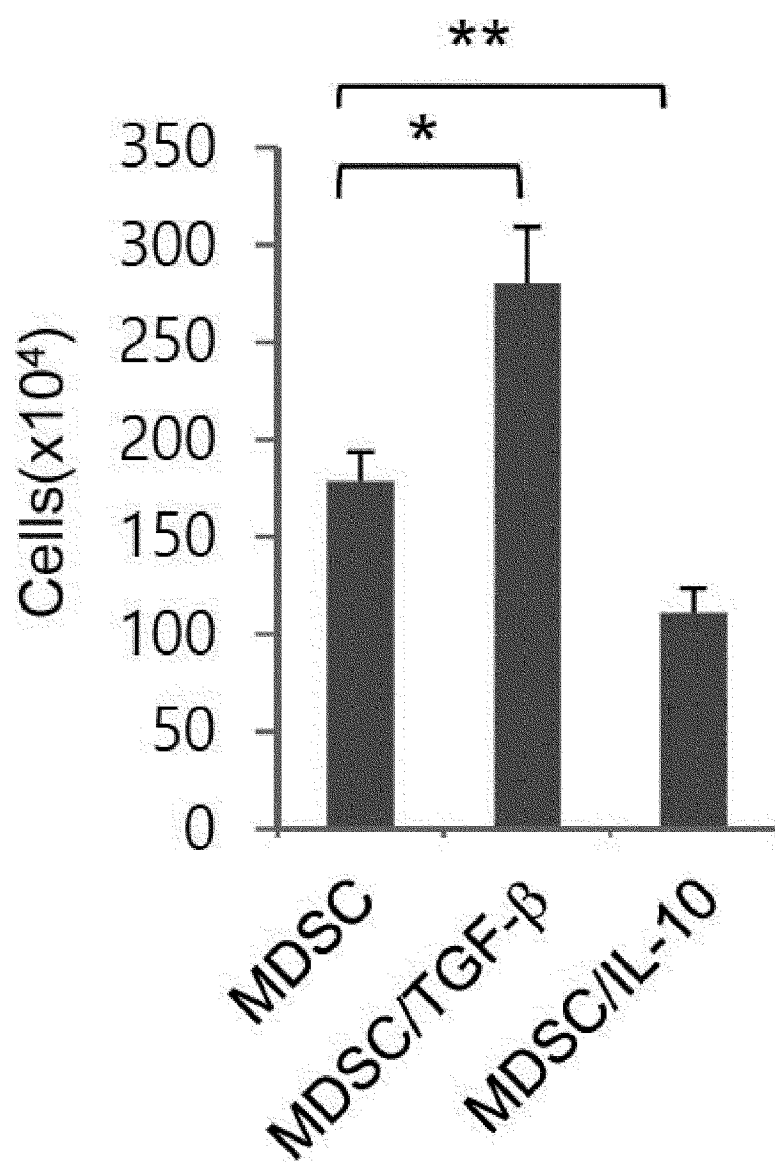
[도4b]



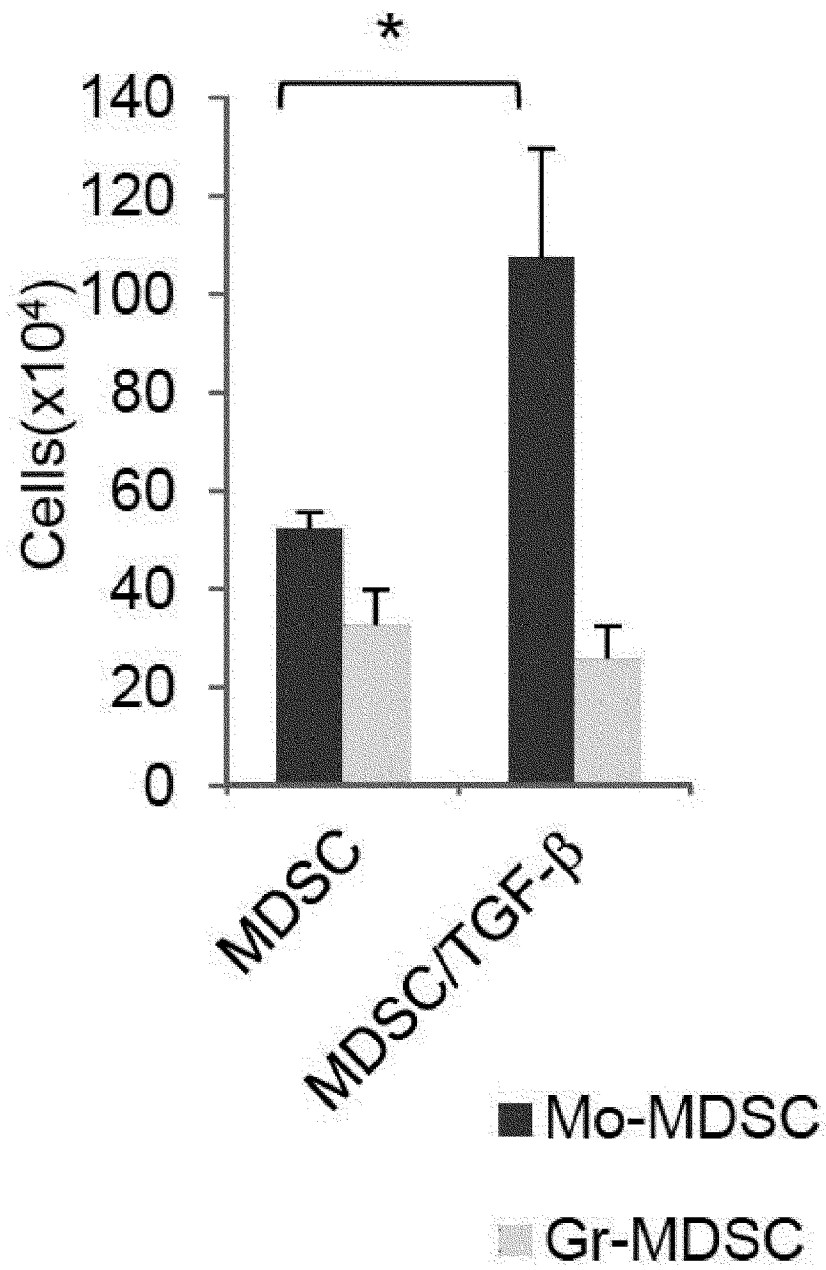
[도4c]



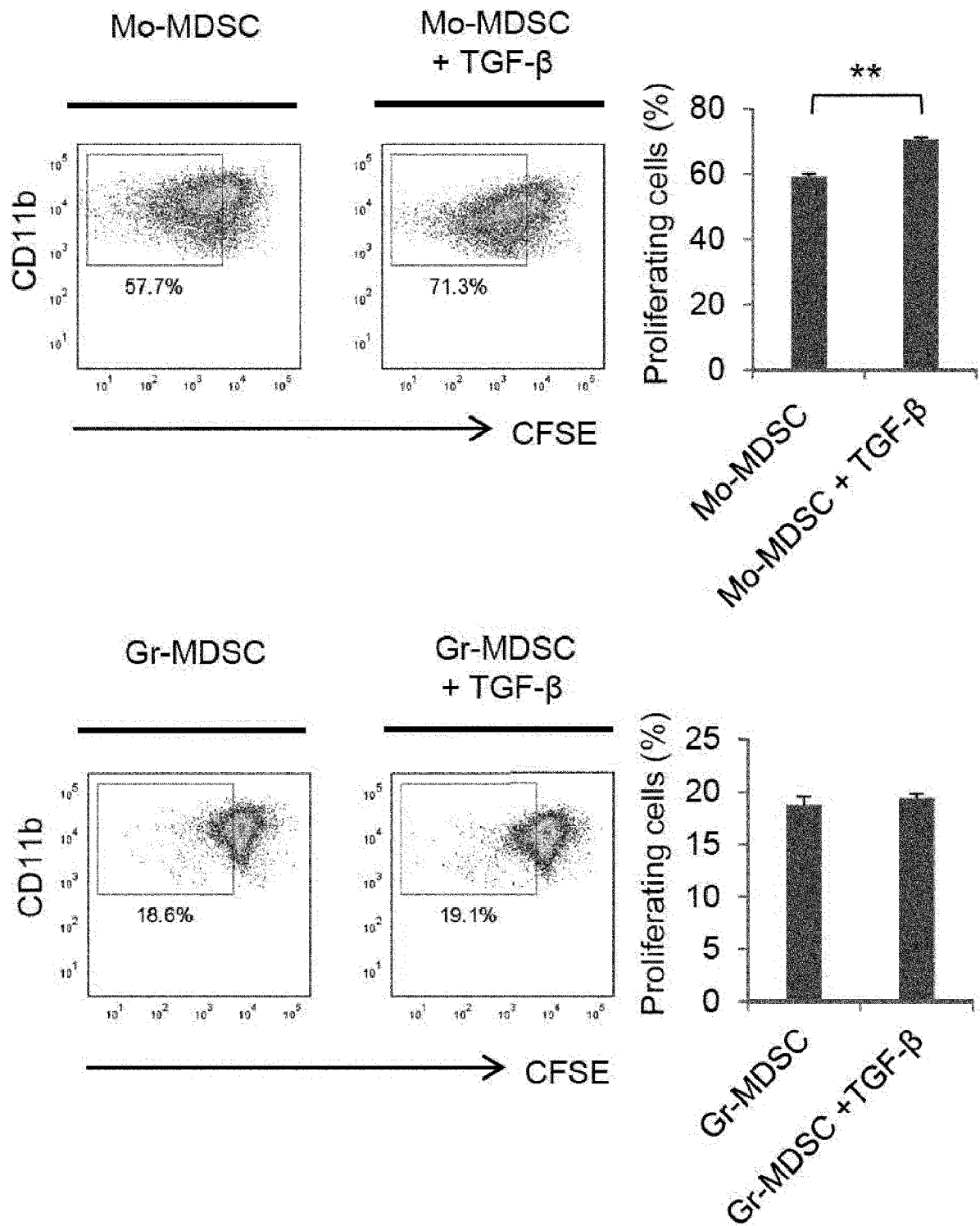
[도4d]



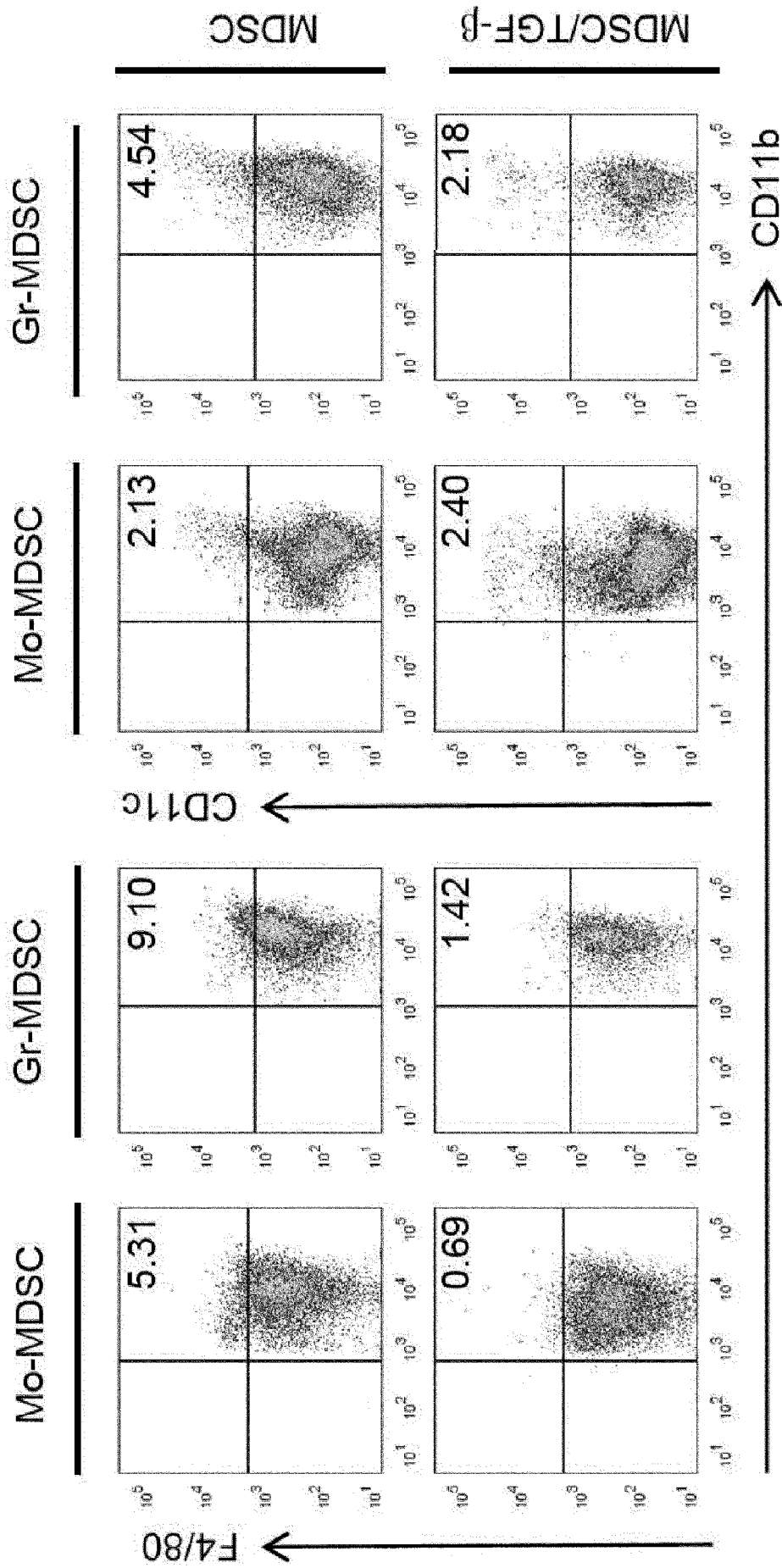
[도4e]



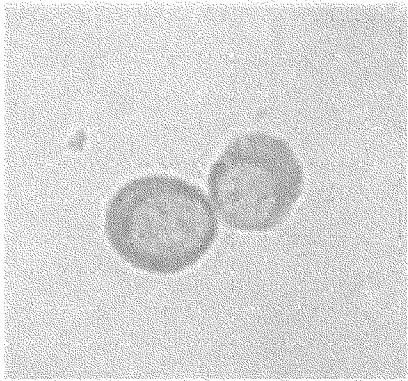
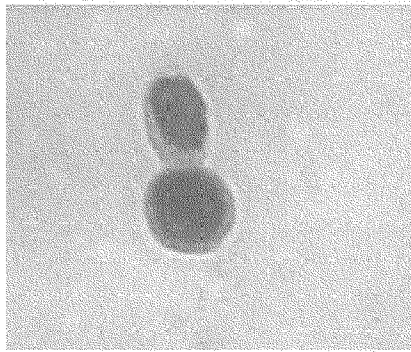
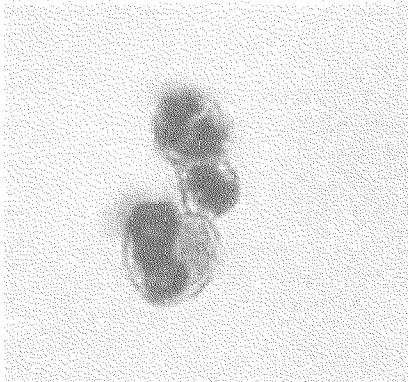
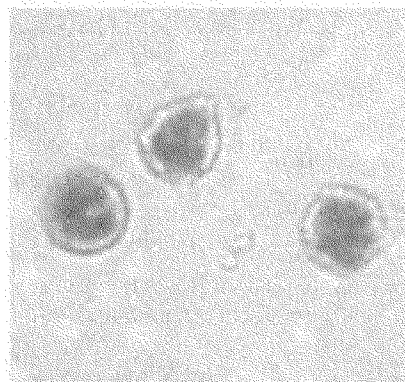
[도4f]



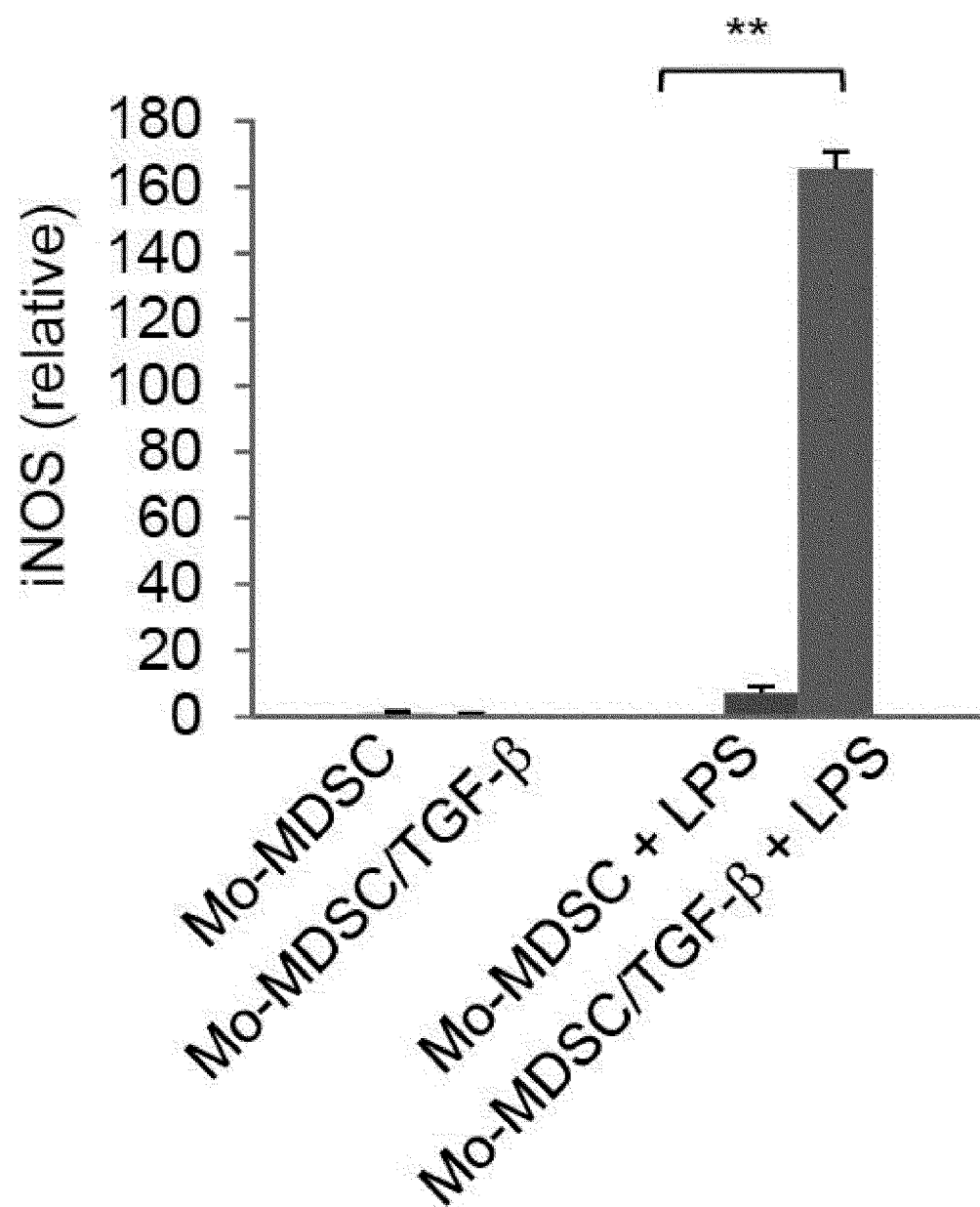
[도5a]



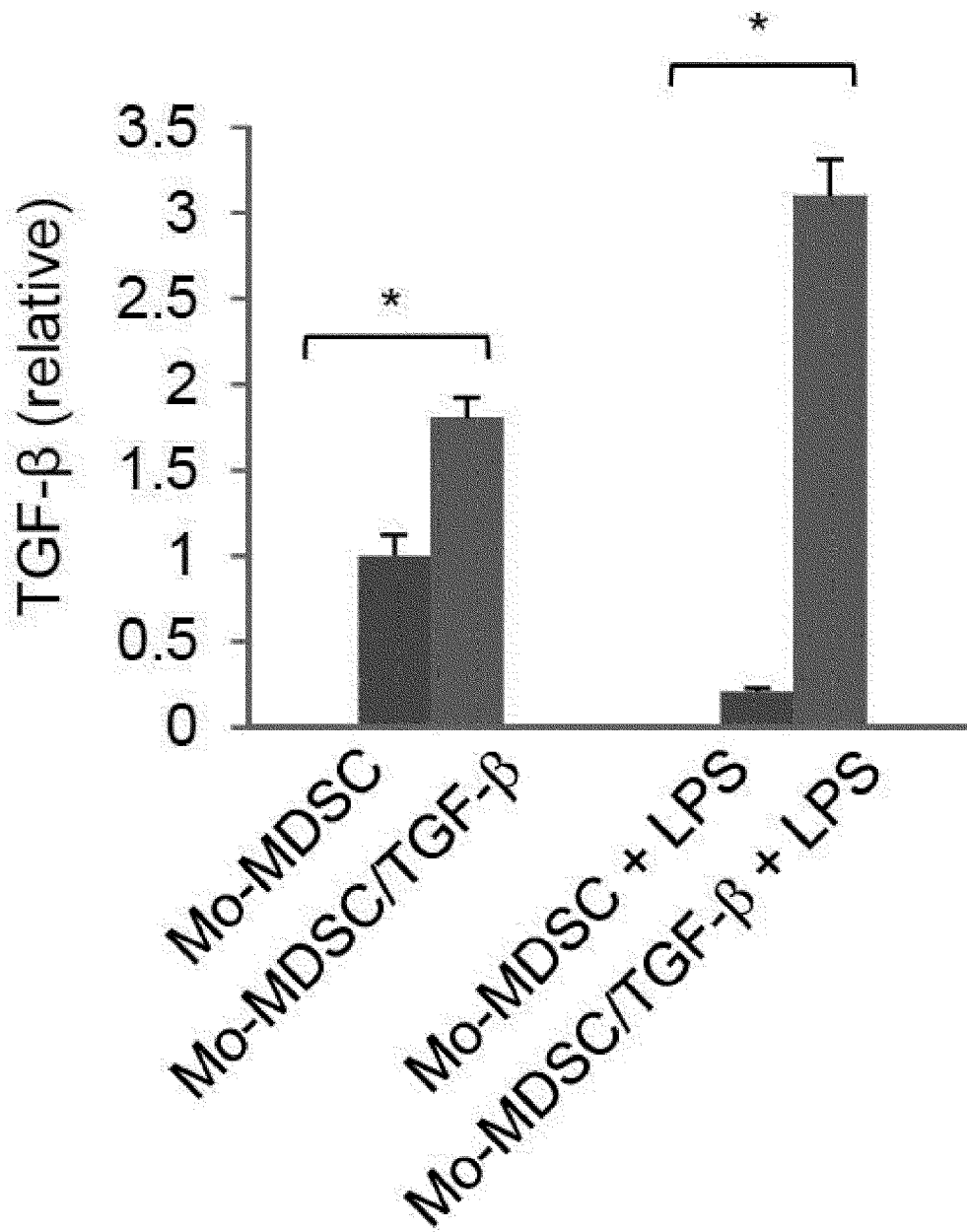
[도5b]

Mo-MDSC**Mo-MDSC/TGF- β** **Gr-MDSC****Gr-MDSC/TGF- β** 

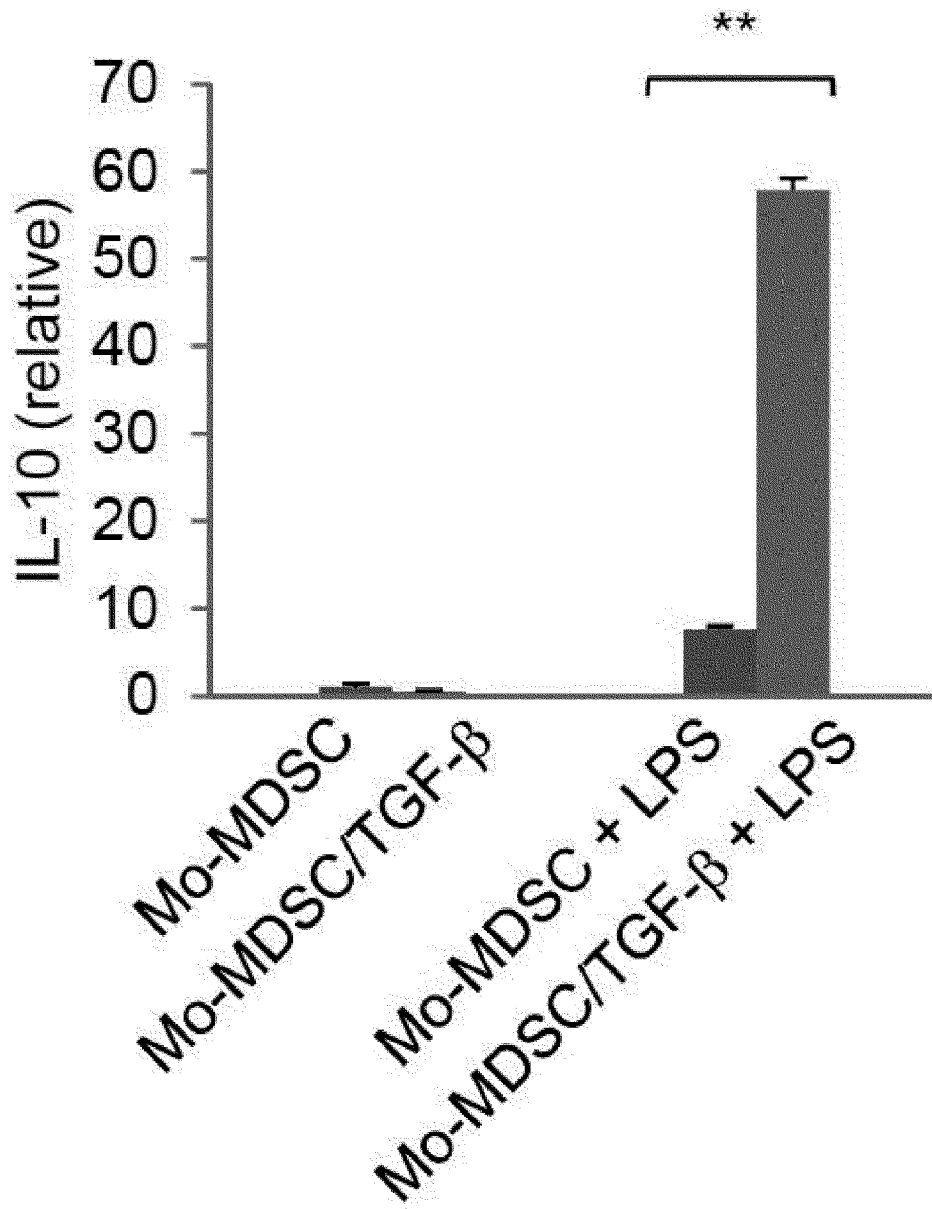
[도5c]



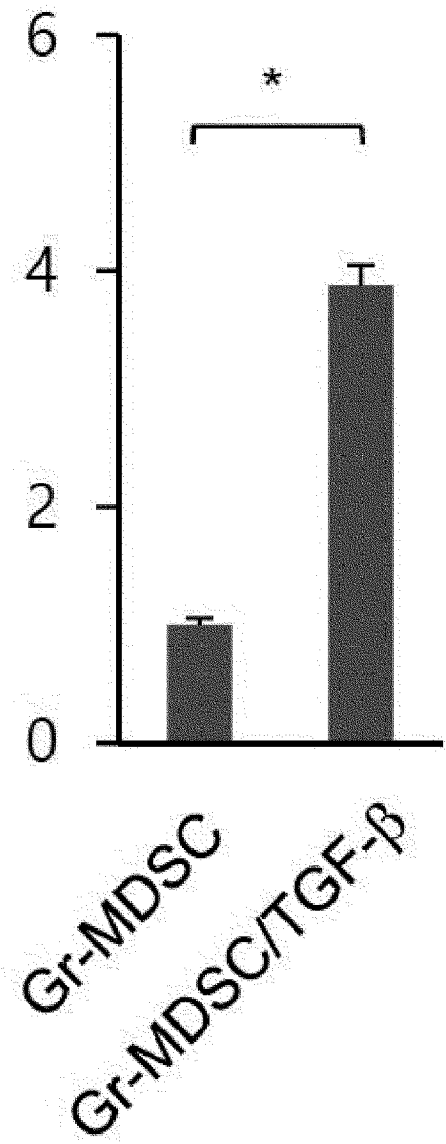
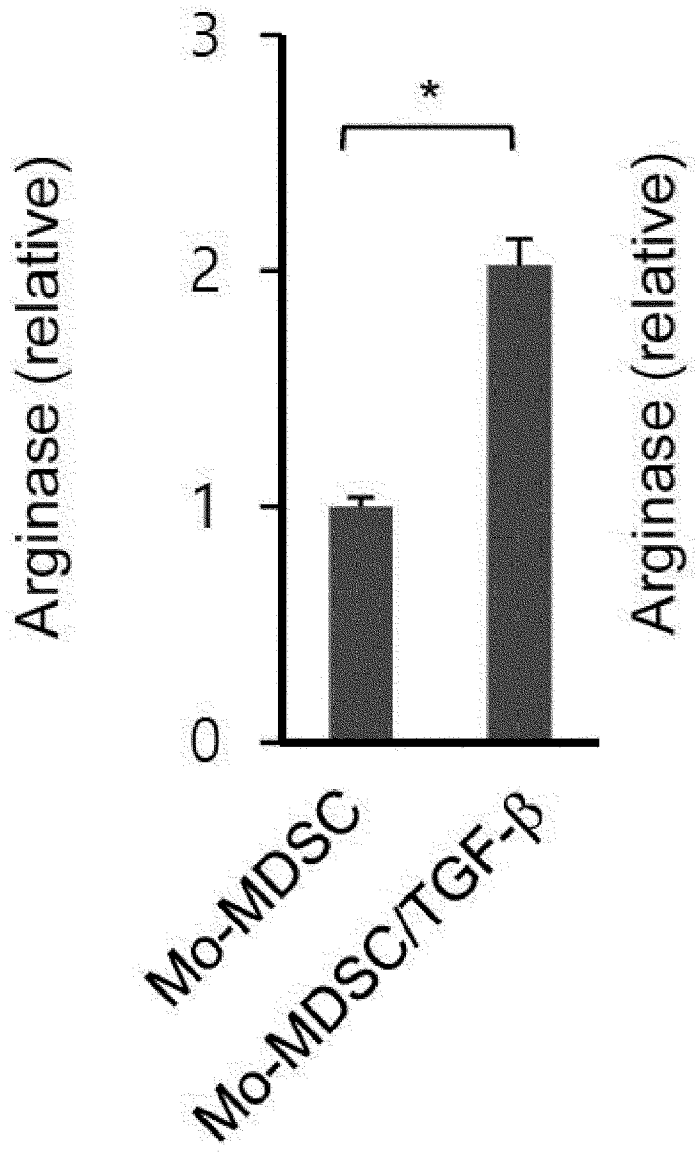
[도5d]



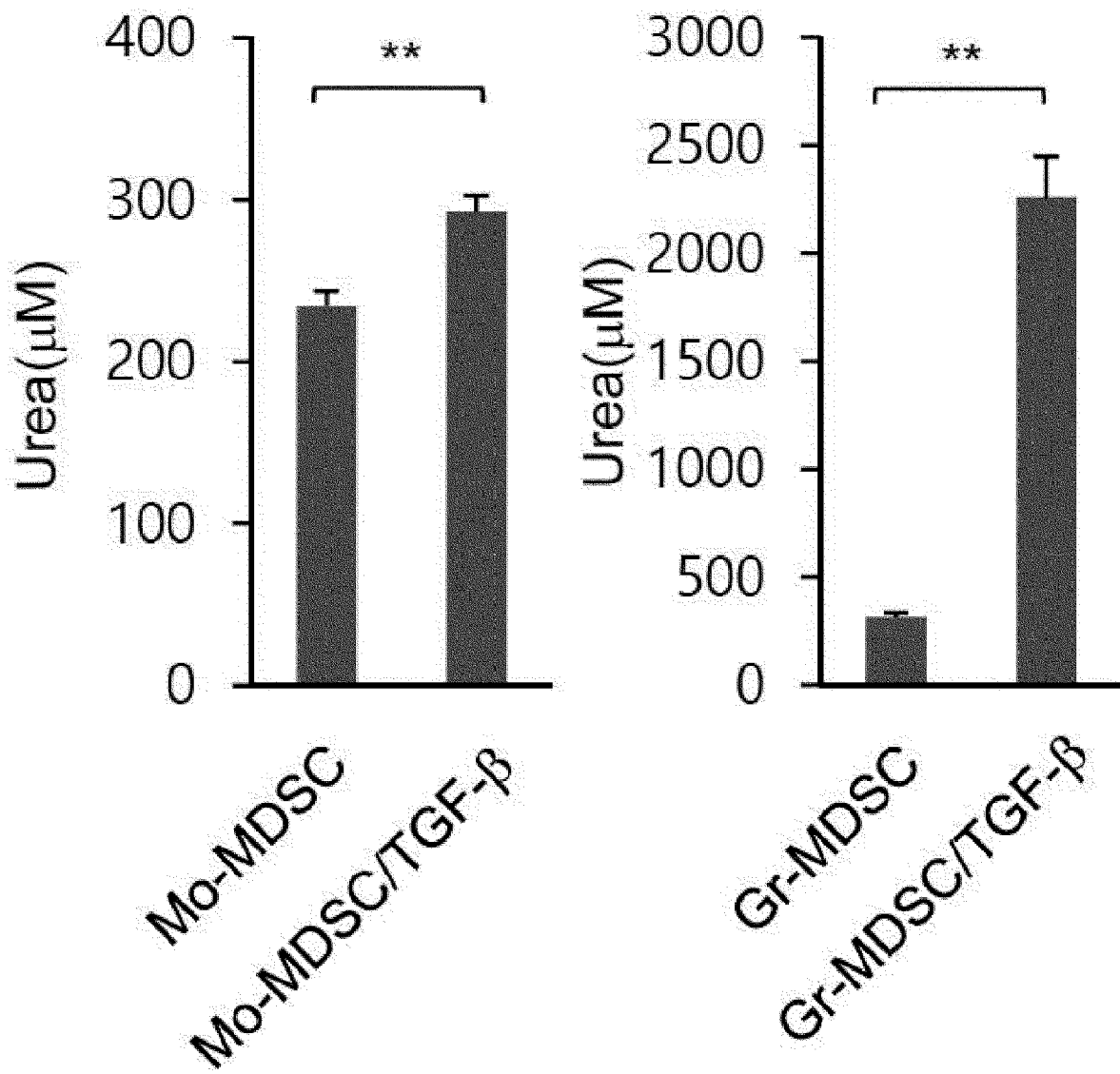
[도5e]



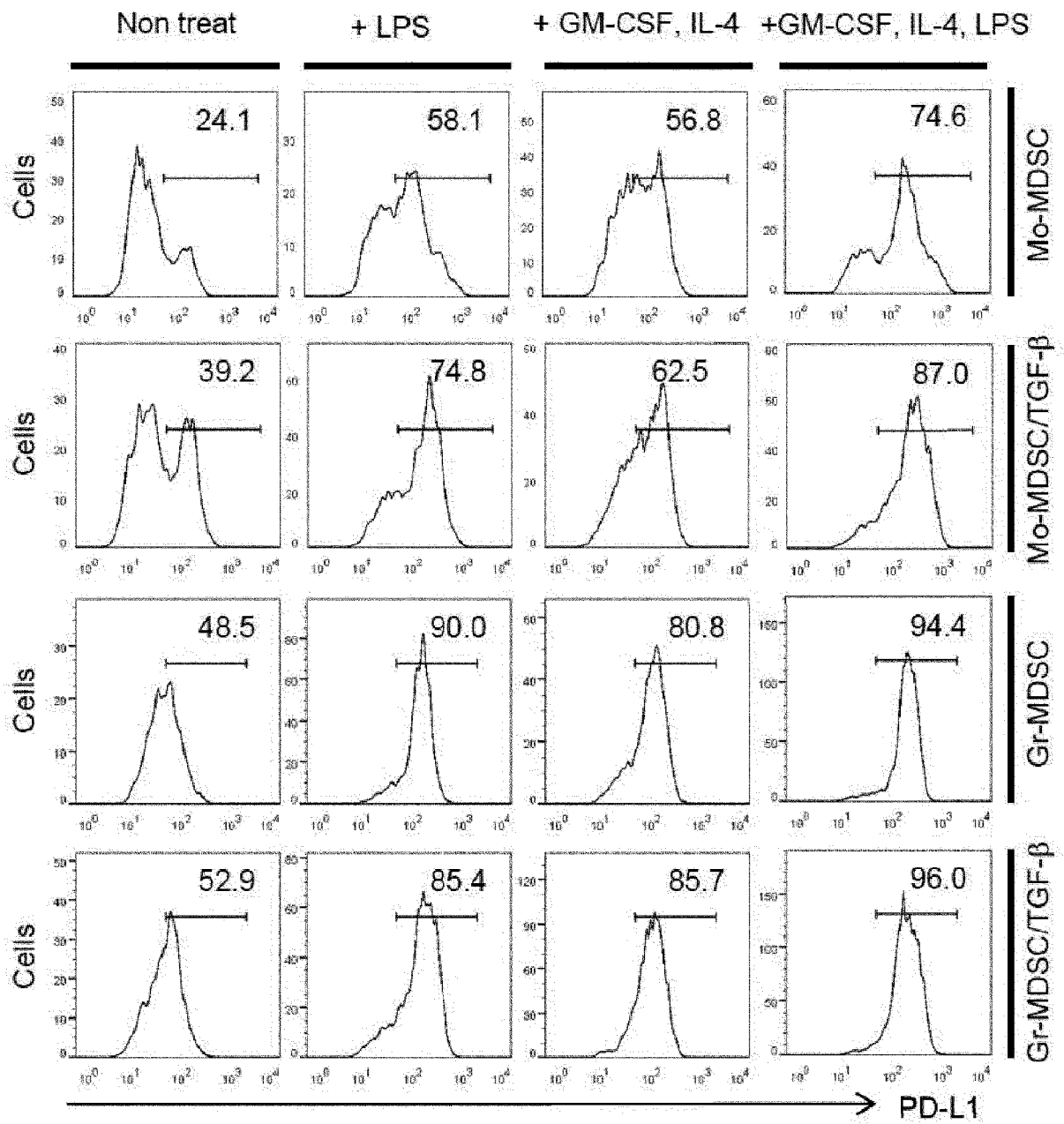
[도5f]



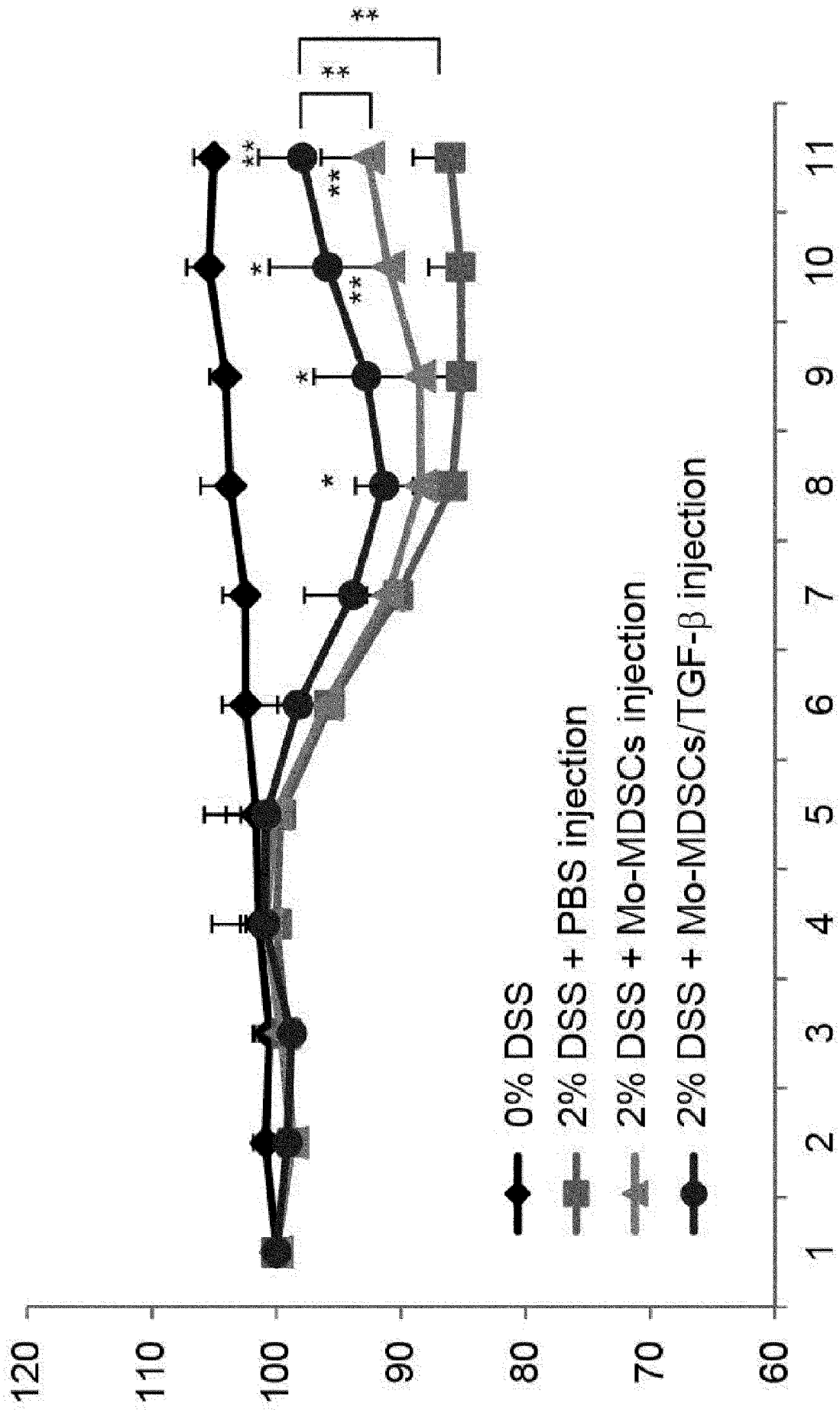
[도5g]



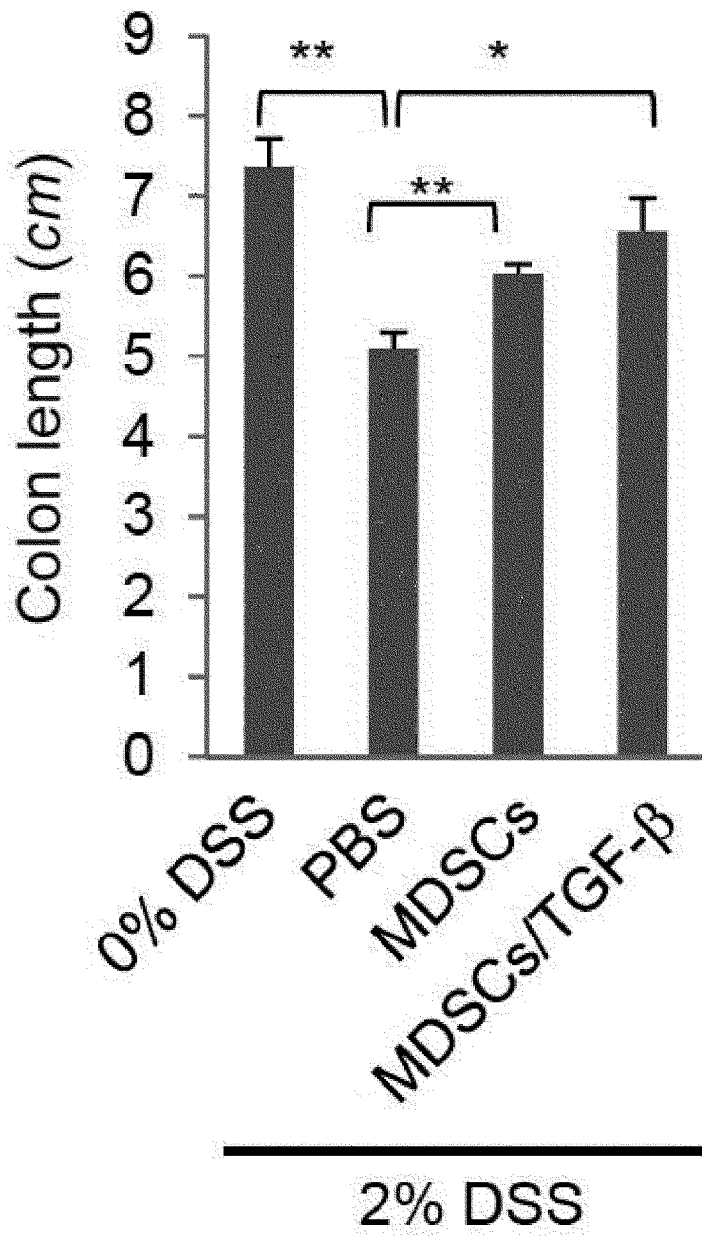
[5h]



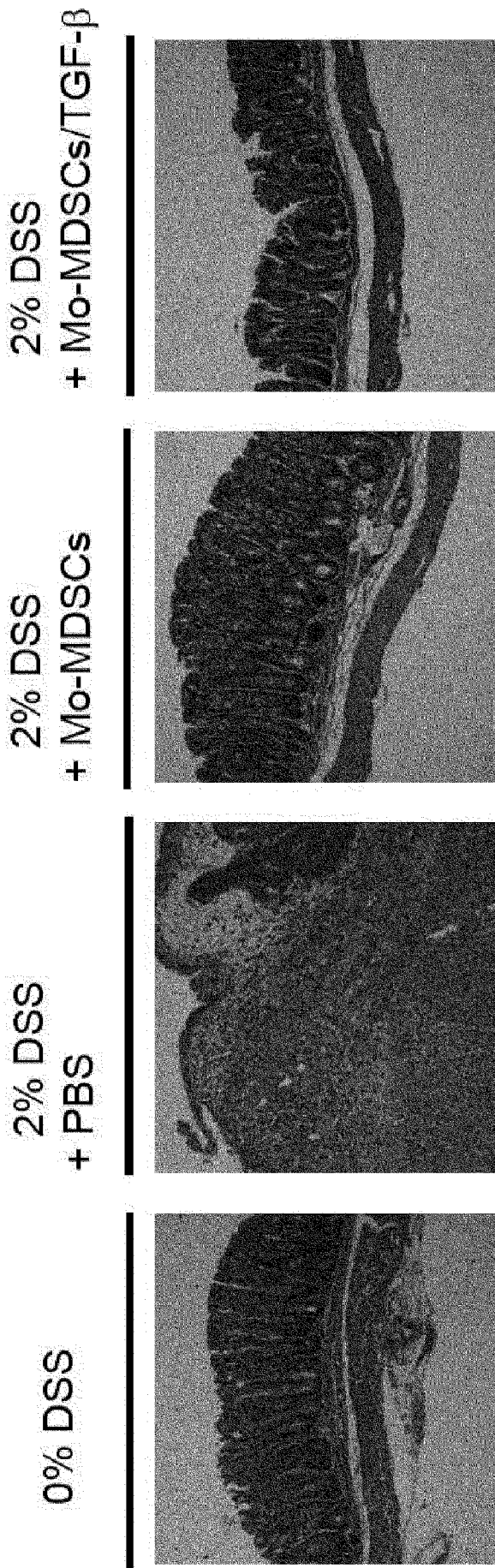
[도6a]



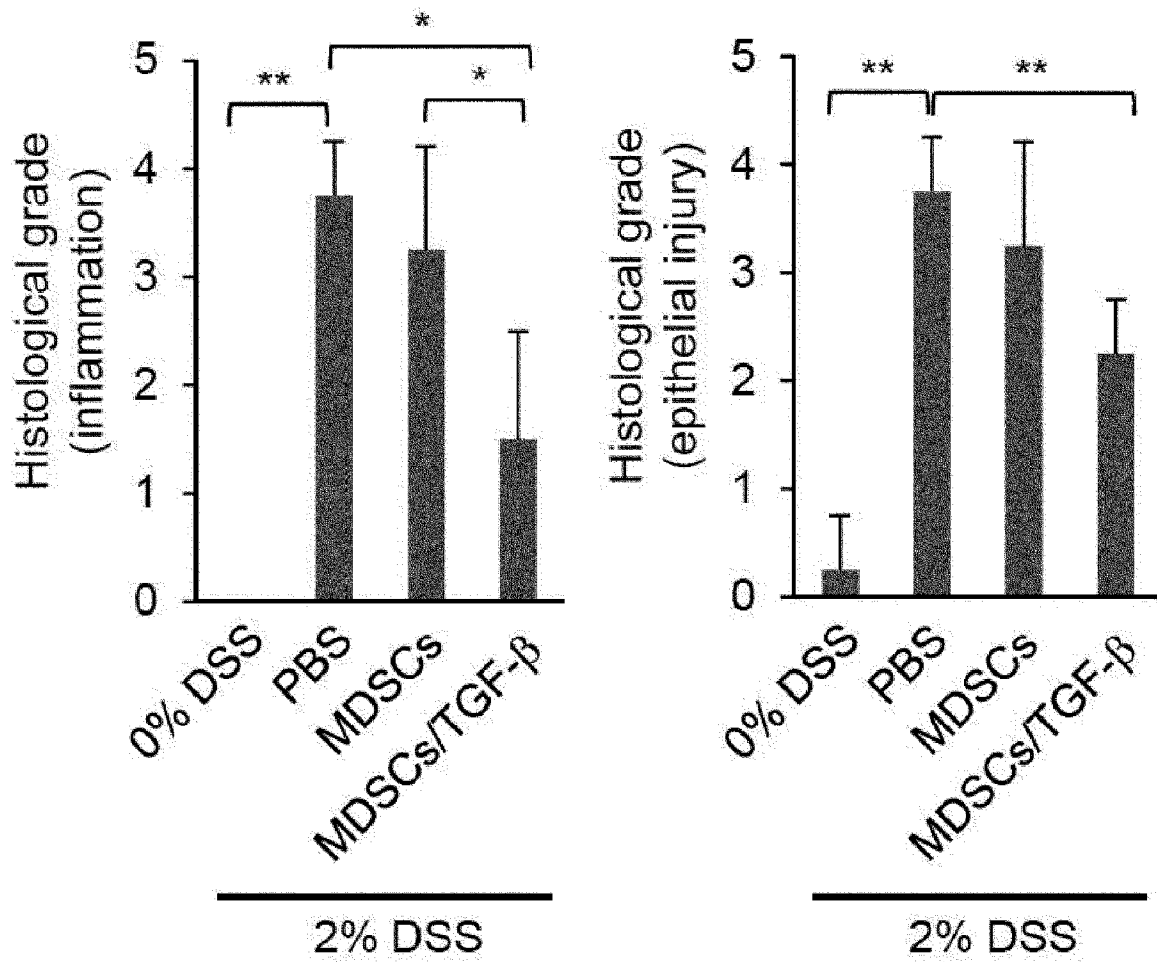
[도6b]



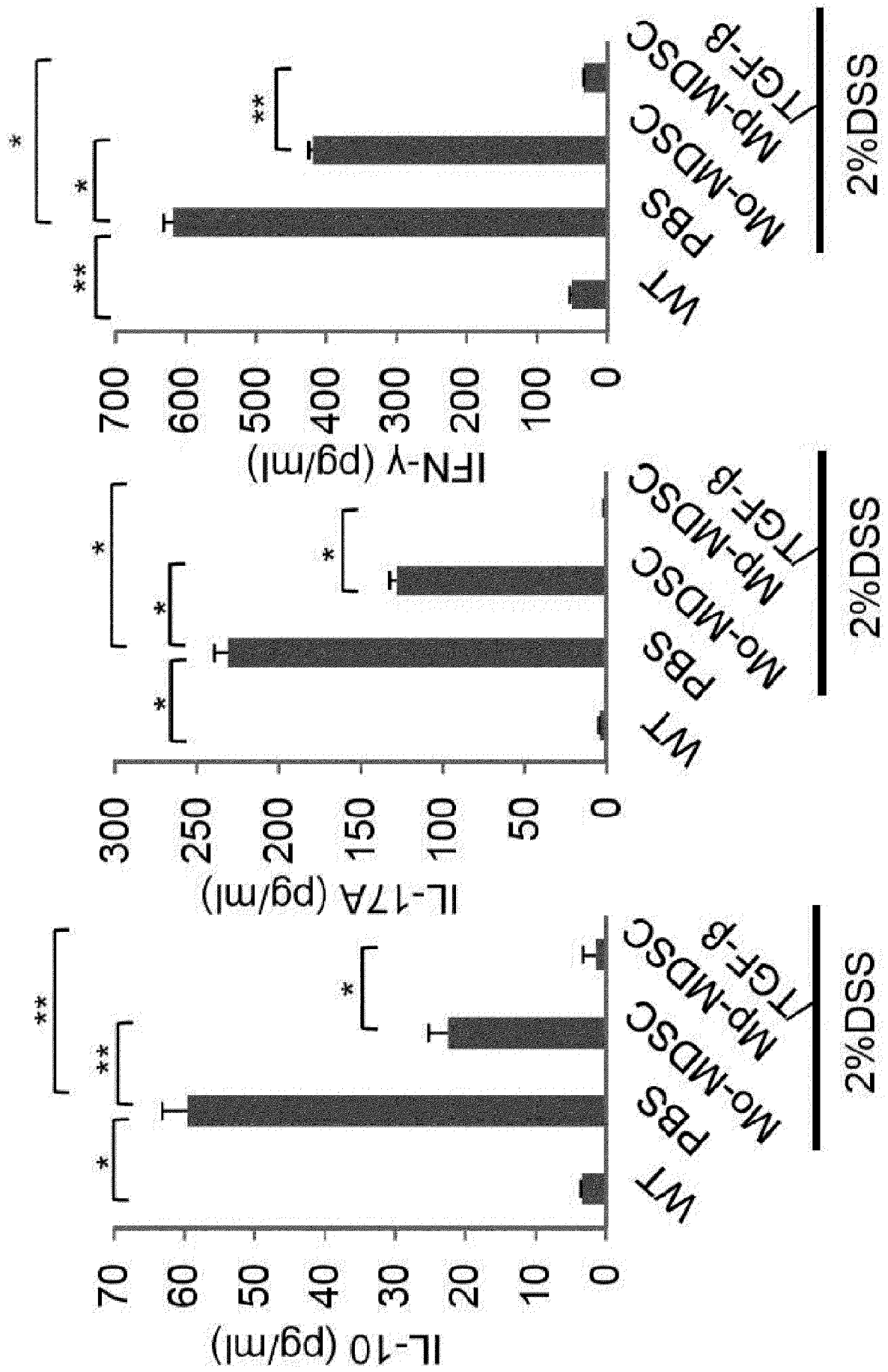
[도6c]



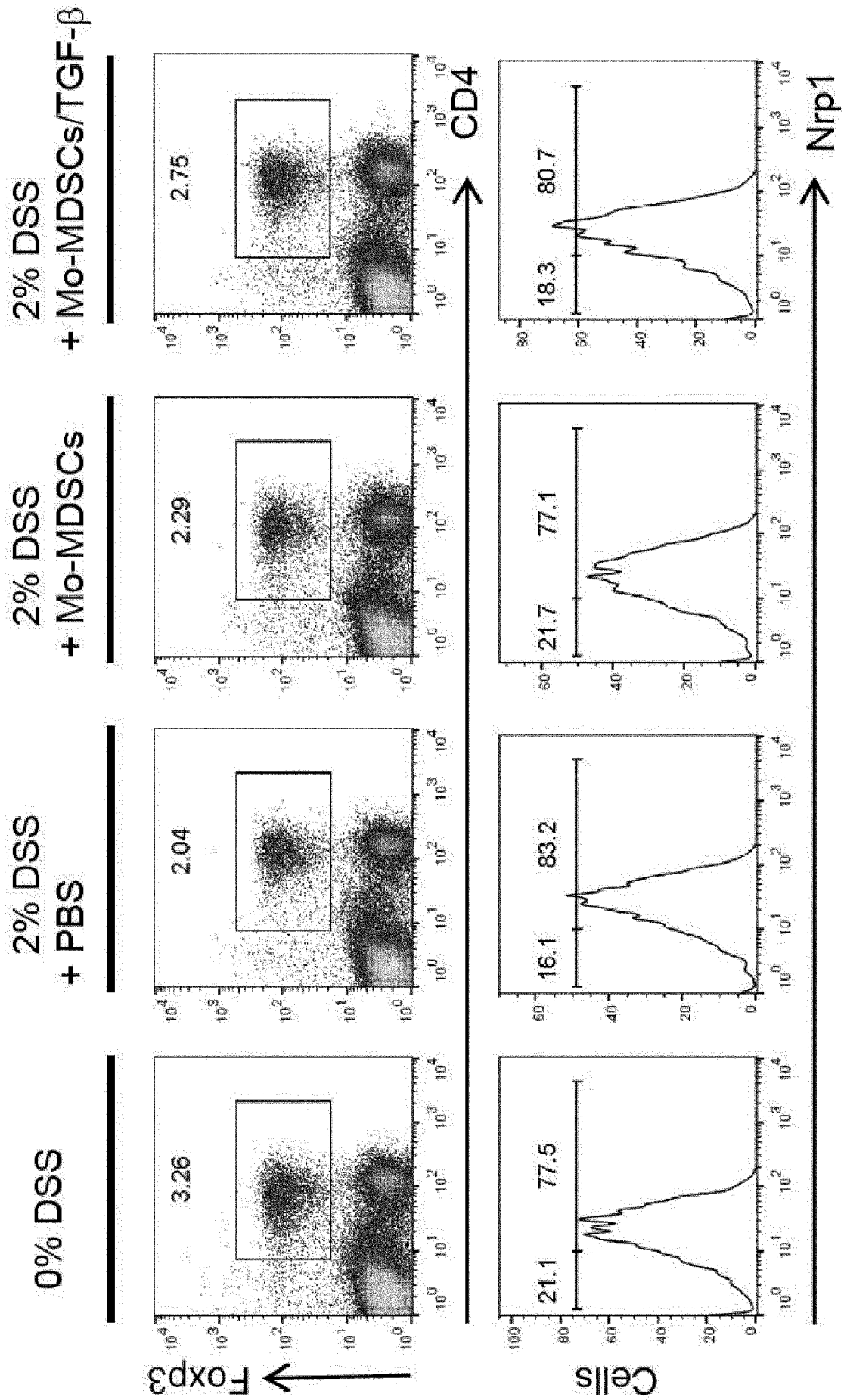
[도6d]



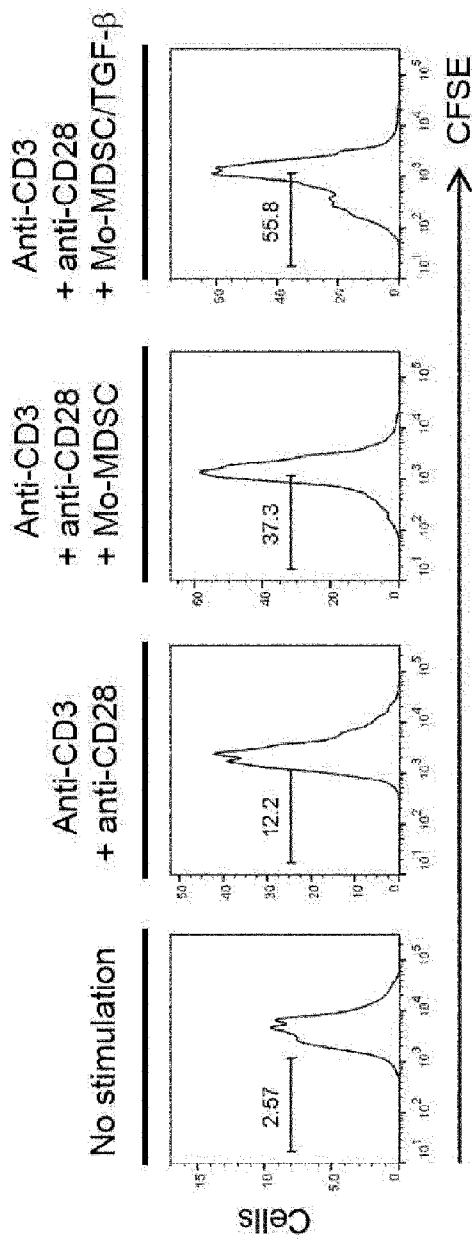
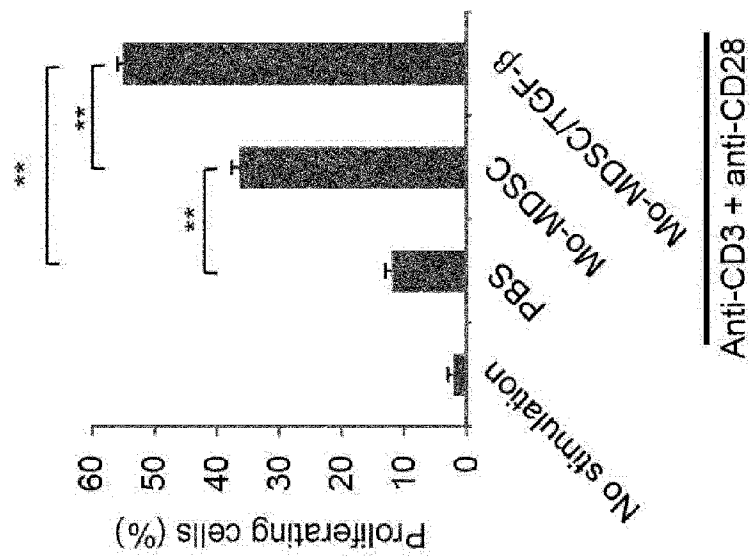
[도6e]



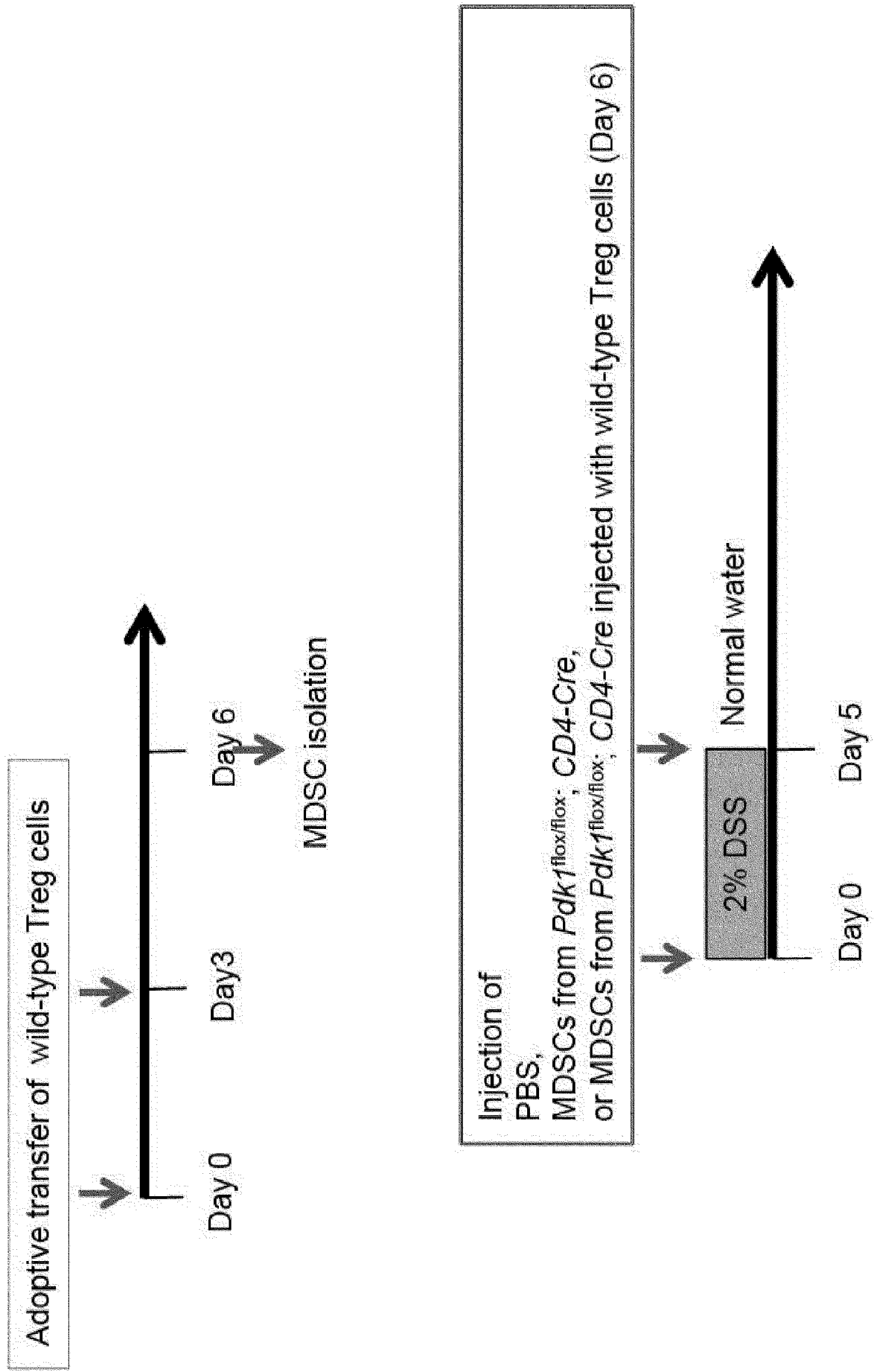
[56f]



[도6g]

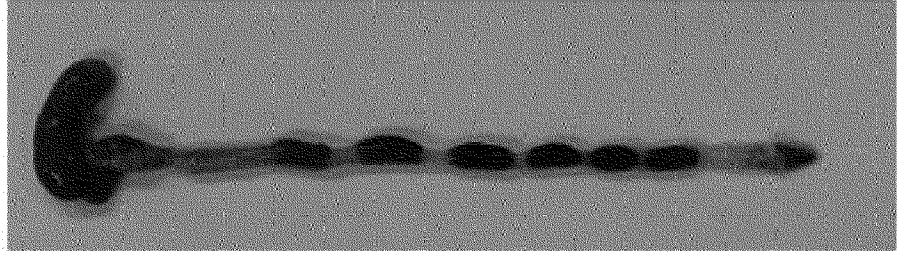


[도7]

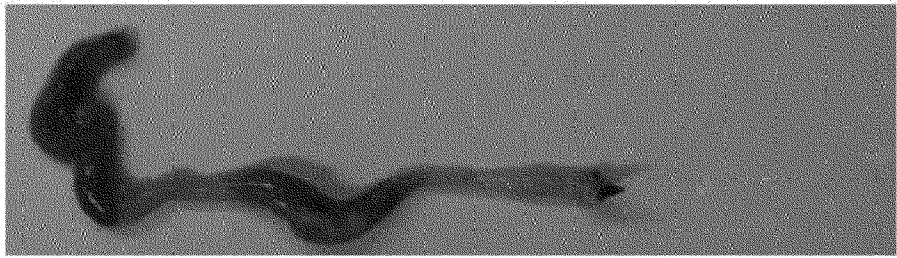


[도8]

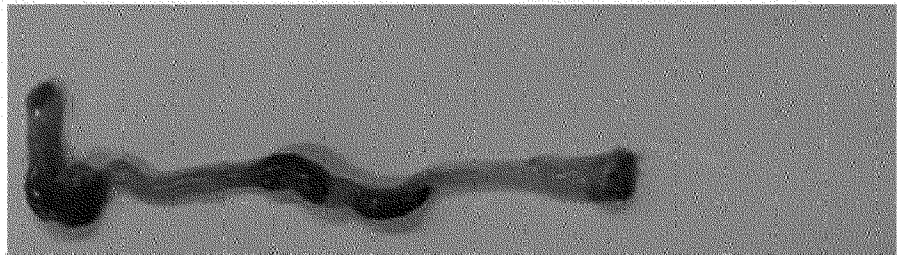
2% DSS
+ MDSCs
(flox/flox + Treg cells)



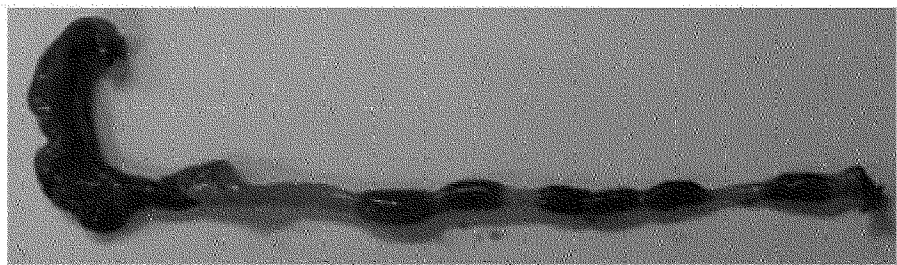
2% DSS
+ MDSCs (flox/flox)



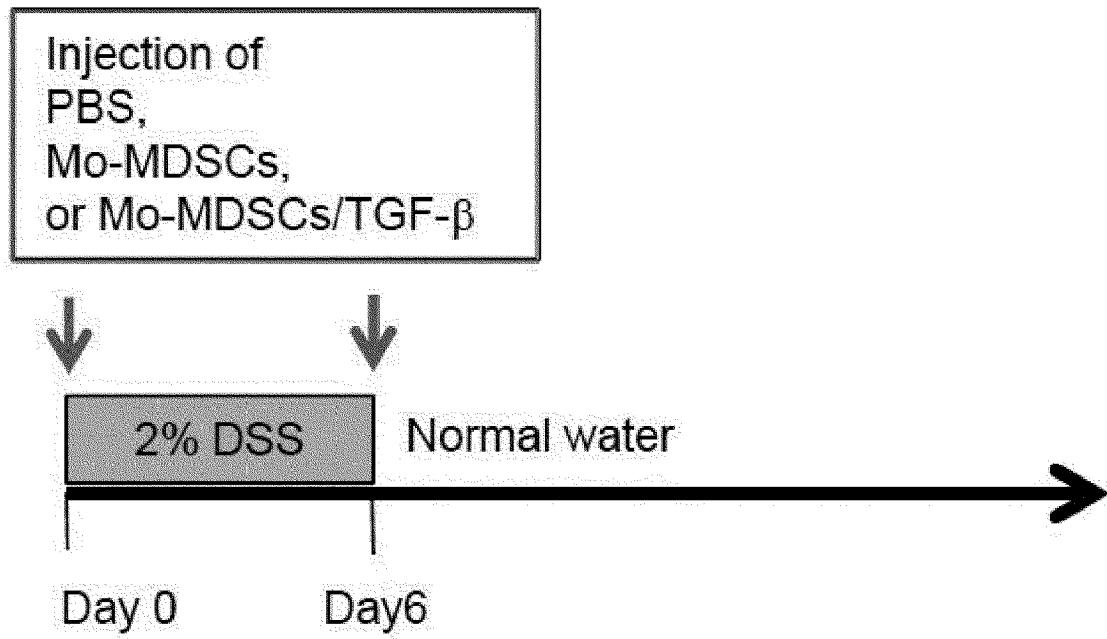
2% DSS
+ PBS



0% DSS

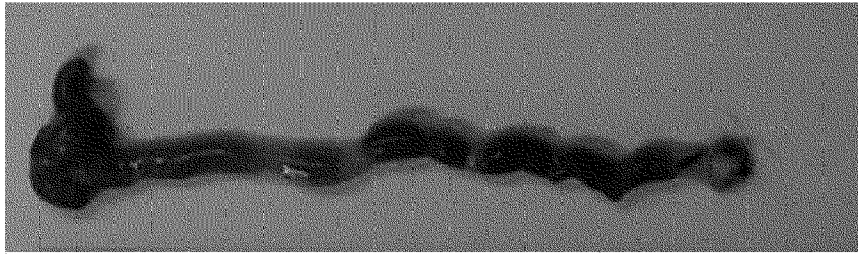


[도9]

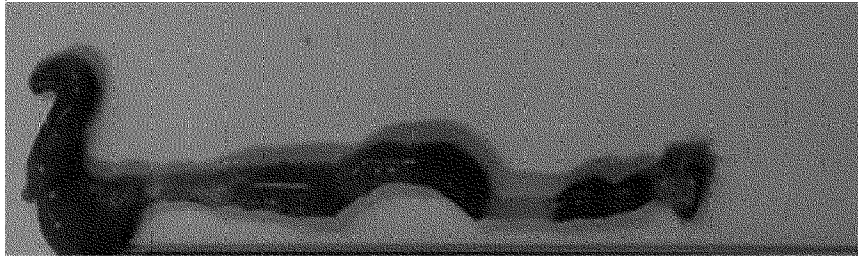


[도10]

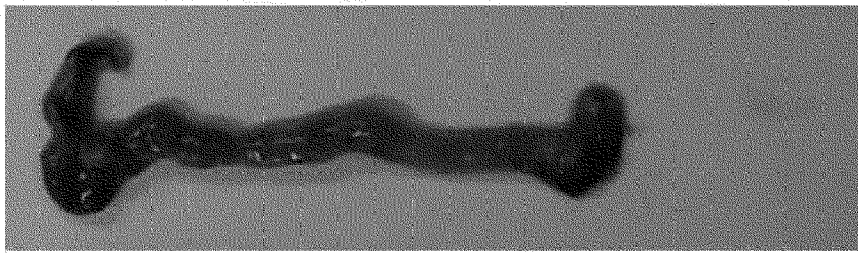
2% DSS
+ Mo-MDSCs/TGF- β



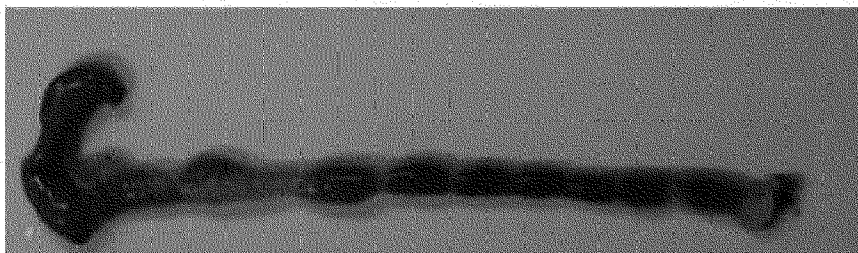
2% DSS
+ Mo-MDSCs



2% DSS
+ PBS



0% DSS



[115]

