

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2017년 1월 26일 (26.01.2017)



(10) 국제공개번호
WO 2017/014561 A1

- (51) 국제특허분류:
C12N 5/078 (2010.01) *A61K 35/15* (2014.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2016/007912
- (22) 국제출원일: 2016년 7월 20일 (20.07.2016)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2015-0102631 2015년 7월 20일 (20.07.2015) KR
- (71) 출원인: 가톨릭대학교 산학협력단 (THE CATHOLIC UNIVERSITY OF KOREA INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 06591 서울시 서초구 반포대로 222 가톨릭대학교 성의교정내, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 김태규 (KIM, Tai Gyu); 06002 서울시 강남구 압구정로 29길 71, 20동 305호 (압구정동, 현대아파트), Seoul (KR). 박미영 (PARK, Mi Young); 06591 서울시 서초구 반포대로 222 (반포동), Seoul (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 다나 (DANA PATENT LAW FIRM); 06242 서울시 강남구 역삼로 3길 11 광성빌딩 신관 5층, 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, 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.

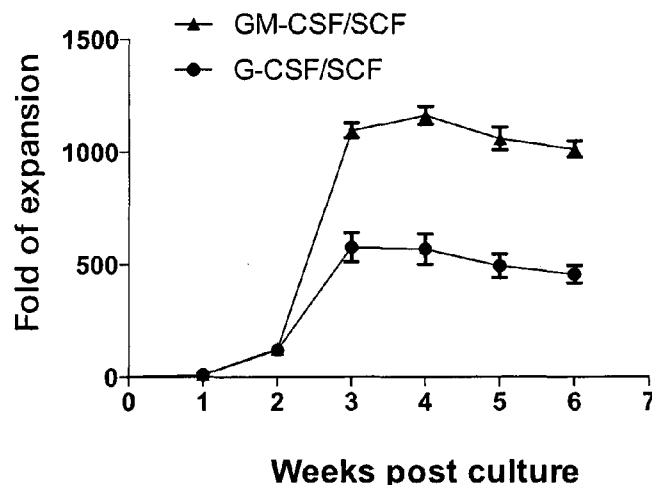
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS,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

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))

(54) Title: METHOD FOR INDUCING DIFFERENTIATION OF MYELOID-DERIVED SUPPRESSOR CELLS FROM CORD BLOOD CD34 POSITIVE CELLS AND PROLIFERATING SAME, AND USE OF MYELOID-DERIVED SUPPRESSOR CELLS

(54) 발명의 명칭 : 제대혈 C D 3 4 양성 세포에서 골수유래억제세포로의 분화 유도 및 증식 방법, 및 상기 골수유래억제세포의 용도



(57) Abstract: The present invention relates to a method for inducing differentiation myeloid-derived suppressor cells from cord blood CD34 positive cells and proliferating the same, and a use of the myeloid-derived suppressor cells. More specifically, myeloid-derived suppressor cells are induced to differentiate and proliferated by culturing cord blood CD34 positive cells in the presence of a cytokine cocktail of GM-CSF and SCF, such that myeloid-derived suppressor cells can be mass-produced *in vitro*, and the myeloid-derived suppressor cells can be used in preventing or treating immunorejection-related diseases such as graft-versus-host disease.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]

WO 2017/014561 A1



본 발명은 제대혈 CD34 양성 세포에서 골수유래억제세포로의 분화 유도 및 증식 방법, 및 상기 골수유래억제세포의 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 제대혈 CD34 양성세포를 GM-CSF 및 SCF의 사이토카인 콕테일 하에서 배양하여 골수유래억제세포를 분화 유도 및 증식함으로써 골수유래억제세포의 인 비트로 대량생산이 가능하고, 상기 골수유래억제세포를 면역거부반응 관련 질환, 예컨대 이식편대숙주병의 예방 또는 치료에 사용할 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 제대혈 C D 3 4 양성 세포에서 골수유래억제세포로의 분화 유도 및 증식 방법, 및 상기 골수유래억제세포의 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 사이토카인 조합을 이용한 제대혈 CD34 양성 세포에서 골수유래억제세포로의 분화 유도 및 증식 방법, 및 상기 골수유래억제세포의 용도에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 이식편대숙주병(Graft Versus Host Disease; GVHD)은 방사선 조사, 골수의 미세환경, 수혜자와 기증자의 나이 또는 성별, 줄기세포의 원천과 같은 다양한 요인에 의해 유도될 수 있다. 그러나, 대부분의 이식편대숙주병은 수혜자의 부적합 조직 항원과 이식된 T 세포의 반응에 의해서 야기된다(Hill GR et al. Blood, vol.90(8), pp.3204-13(1997); Goker H et al. Exp Hematol., vol.29(3), pp.259-77(2001)). 잇따른 다른 면역세포들의 증식 또는 활성화는 염증반응을 유도하는 사이토카인 방출에 의해 수혜자의 조직에 광범한 범위의 손상을 일으킨다(Iwasaki T, Clin Med Res. Vol.2(4), pp.243-52(2004)). 부신피질호르몬(Corticosteroids)은 일반적으로 급성 이식편대숙주병에 대한 일차적인 치료제로 사용되고 있고 싸이클로스포린(cyclosporine)과 메소트렉세이트(methotrexate)와 같은 면역억제제와 병용되면 더욱 효과적이다. 스테로이드의 일차치료는 피부, 간 또는 위장관의 병변을 완화하고, 생존률(1년 연장: 약 50%)을 증가시켰다(Ho VT et al., Best Pract Res Clin Haematol., vol.21(2), pp.223-37(2008); MacMillan ML et al., Biol Blood Marrow Transplant., vol.8(7), pp.387-94(2002)). 스테로이드에 내성을 가진 이식편대숙주병 환자는 항흉선 글로불린(antithymocyte globulin)과 같은 이차치료를 받게 된다. 그러나, 환자의 31% 만이 증상에서 초기 호전을 보였고, 단지 10% 만이 장기간 생존하였다(12-60개월). 그러므로, 생존률을 증진시키기 위한 새로운 치료법이 요구된다. 최근 시험관 내에서 증식된 제대혈 유래 조절 T 세포(Treg) 또는 중간엽 줄기세포(Mesenchymal stem cells(MSC))가 이식편대숙주병을 치료하기 위한 전략으로 평가되고 있으며 이러한 세포들의 입양전이는 마우스에서 생존률을 연장시켰다.
- [3] 골수유래억제세포(Myeloid-derived suppressor cells; MDSCs)는 면역세포들의 기능을 억제하는 골수 유래 미성숙 골수 세포(myeloid cell)의 집합으로서 고형암에서 면역반응을 억제하고 있는 것으로 처음으로 보고되었다(Murdoch C et al. Nat Rev Cancer., vol.8(8), pp.618-31(2008)). SCH, VEGF, GM-CSF, G-CSF, M-CSF와 같은 촉진인자, IFN- γ , IL-1b, IL-6, IL-12, IL-13과 같은 사이토카인,

칼슘 결합 단백질 S100A8, S100A9, complement component 3(C3), cyclooxygenase-2와 prostaglandin E2 등의 MDSC를 증식하고 활성화시키는 인자들이 종양모델에서 잘 연구됐다. 건강한 개체에서는 이들 세포가 없지만, 감염, 염증반응, 암, 자가면역 등의 병적인 상태에서 말초혈액, 림프기관, 비장, 암 조직 등에 축적된다. 골수유래억제세포는 마우스에서 CD11b⁺Gr1⁺ 세포로, 인간에서는 Lin-HLA-DR-CD11b⁺CD33⁺으로 정의된다. 이러한 세포는 매우 이질적인(여러 다른 종류들로 이뤄진) 골수성 세포 집단이고, 조혈 분화의 다양한 단계에서 대식구(macrophages), 수지상세포(dendritic cells), 과립구(granulocytes)를 발달시키는 조혈모세포 전구체 중 하나이다. 특히, 이 세포는 단핵구성(monocytic)과 과립구성(granulocytic)의 두 가지 그룹으로 분류된다. 이 두 아형은 인간에서는 CD14, 마우스에서는 Ly6C와 Ly6G의 발현 여부에 따라서 구별된다.

- [4] 최근 시험관 내에서 마우스의 배아줄기세포 또는 조혈모세포로 유도된 MDSC를 이용한 입양전이가 마우스 내에 이식 면역관용을 유도한 것이 보고되었다(Zhou Z et al., Stem Cells., vol.28(3), pp.620-32(2010); Highfill SL et al. Blood, vol.116(25), pp.5738-47(2010)). 그러나 이러한 방어 효능이 보고되었을지라도 MDSC의 증식이 임상에서의 치료를 위해서 더욱 중요하다. 다른 한편으로는 다른 면역조절세포들 또는 면역억제제와 MDSC의 병합 치료가 이식 환자들뿐만 아니라 알러지 반응, 자가면역질환 환자를 치료하기 위한 각광을 받는 요법이 되었다. 그러나 이식면역관용 유도에서 인간 유래 MDSC의 축적을 유도하는 인자들은 아직까지 검증되지 않았고 이러한 인간 유래 MDSC를 대량 생산하는 방법은 보고되지 않았다.

- [5] 이에, 본 발명자들은 제대혈 CD34⁺ 세포를 GM-CSF와 SCF를 이용하여 인간 유래 MDSC를 인 비트로에서 안정적으로 대량 생산하고, 면역부전동물에 인간 말초혈액단핵구(Peripheral Blood Mononuclear Cells; PBMC)를 이식하여 이종간(xenogeneic) 이식으로 인한 이식편대숙주병 모델에서 MDSC의 효능을 확립함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 본 발명의 목적은 제대혈 유래 CD34⁺ 세포로부터 골수유래억제세포를 분화 유도 및 증식하는 조성물 및 방법을 제공하는 것이다.
- [7] 본 발명의 다른 목적은 제대혈 유래 CD34⁺ 세포로부터 분화 및 증식된 상기 골수유래억제세포를 제공하는 것이다.
- [8] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 골수유래억제세포의 억제학적 용도를 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [9] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 GM-CSF 및 SCF를 포함하는, 제대혈

유래의 CD34⁺ 세포에서 골수유래억제세포(myeloid-derived suppressor cell; MDSC)로의 분화 유도 및 증식용 조성물을 제공한다.

[10] 본 발명은 또한 제대혈 유래의 CD34⁺ 세포를 GM-CSF 및 SCF 하에서 배양하여 골수유래억제세포로 분화 유도 및 증식하는 단계를 포함하는 제대혈 유래의 CD34⁺ 세포에서 골수유래억제세포로의 분화 유도 및 증식 방법을 제공한다.

[11] 본 발명은 또한 인간 제대혈 유래의 CD34⁺ 세포에서 분화 및 증식되고, Lin⁻, HLA-DR^{low} 및 CD11b⁺CD33⁺의 세포표현형을 발현하며, 세포표면 마커로 PDL-1, CCR2, CCR5, CD62L, CXCR4 및 ICAM-1의 발현을 포함하는 골수유래억제세포를 제공한다.

[12] 본 발명은 또한 상기 단핵구성 골수유래억제세포를 포함하는 면역억제용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[13] 본 발명은 제대혈 CD34⁺ 세포를 GM-CSF 및 SCF 하에서 일정시간 동안 배양하여 골수유래억제세포로 분화 유도 및 증식함으로써 인 비트로에서 골수유래억제세포를 대량생산할 수 있다.

[14] 상기 골수유래억제세포는 면역과민반응에 의해 야기되는 장기이식 거부반응, 조혈모세포 이식, 자가면역질환, 또는 알러지성 질환의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[15] 도 1은 제대혈에서 분리된 CD34⁺ 세포에서 GM-CSF와 SCF의 조합 하에서 안정적인 골수유래억제세포(MDSC)의 증폭 결과를 도시한 것이다.

[16] 도 2는 제대혈에서 분리된 CD34⁺ 세포를 GM-CSF 및 SCF의 조합 하에서 6주간 배양하고, 유세포 분석기를 통해 MDSC의 분화 여부를 분석한 결과이다.

[17] 도 3은 제대혈에서 분리된 CD34⁺ 세포를 GM-CSF 및 SCF의 조합 하에서 3주간 배양하고, CD11b⁺CD33⁺와 CD11b⁻CD33⁻의 표현형을 갖는 세포들을 분리한 다음 GM-CSF 및 SCF 하에서 1주간 배양하여 CD11b⁺CD33⁺와 CD11b⁻CD33⁻의 표현형을 갖는 세포들의 분화능을 분석한 결과이다.

[18] 도 4는 제대혈에서 분리된 CD34⁺ 세포를 6주간 배양하여 유도된 MDSC의 아형 분석 결과이다.

[19] 도 5는 제대혈 유래 CD34⁺ 세포에서 분화 유도된 MDSC의 세포표면 마커 분석 결과이다.

[20] 도 6a-b는 제대혈 유래 CD34⁺ 세포에서 분화 유도된 MDSC의 면역억제 단백질의 발현 여부를 측정된 결과이다.

[21] 도 7a-d는 제대혈 유래 CD34⁺ 세포에서 분화 유도된 MDSC의 인 비트로 면역억제능을 확인한 결과로, 도 7a는 제대혈 유래 CD34⁺ 세포에서 분화 유도된 MDSC의 인 비트로 동종 면역반응 억제능을 나타내고, 도 7b는 제대혈 유래 CD34⁺ 세포에서 분화 유도된 MDSC의 항원 특이 T 세포 반응에 대한 억제능을

나타내며, 도 7c는 제대혈 유래 CD34⁺ 세포에서 분화 유도된 MDSC의 사이토카인 분비능을 나타내며, 도 7d는 제대혈 유래 CD34⁺ 세포에서 분화 유도된 MDSC의 자극에 의한 FoxP3 발현 Treg 세포 수의 변화를 측정한 결과이다.

- [22] 도 8a-h 및 도 9 내지 도 11은 제대혈 유래 CD34⁺ 세포에서 분화 유도된 MDSC를 이종 마우스 모델(xenogeneic GVHD)에 투여한 후 이식편대숙주병(GVHD)에 대한 효능을 측정한 결과로, 도 8a는 제대혈 유래 CD34⁺ 세포에서 분화 유도된 MDSC의 투여 후 마우스의 움직임, 등이 굽은 정도, 털의 상태, 피부 통합성을 보여주는 결과이고, 도 8b는 마우스 무게 변화를 나타내며, 도 8c는 GVHD의 정도를 점수화한 결과, 도 8d는 마우스 생존율 변화, 도 8e-8h는 마우스 혈청 내 사이토카인 분비에 대한 ELISA 분석 결과, 도 9는 FoxP3 발현 Treg 세포 수의 변화, 도 10은 마우스 세포 내 염증 사이토카인의 분비 변화, 도 11은 마우스 혈청 내 항염증 단백질의 분비 변화를 나타낸다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [23] 이하, 본 발명의 구성을 구체적으로 설명한다.
- [24] 본 발명은 GM-CSF 및 SCF를 포함하는, 제대혈 유래의 CD34⁺ 세포에서 골수유래억제세포(myeloid-derived suppressor cell; MDSC)로의 분화 유도 및 증식용 조성물에 관한 것이다.
- [25] 또한, 본 발명은 제대혈 유래의 CD34⁺ 세포를 GM-CSF 및 SCF 하에서 배양하여 골수유래억제세포로 분화 유도 및 증식하는 단계를 포함하는 제대혈 유래의 CD34⁺ 세포에서 골수유래억제세포로의 분화 유도 및 증식 방법을 제공한다.
- [26] 본 발명의 제대혈 유래의 CD34⁺ 세포의 골수유래억제세포로의 분화 유도 및 증식은 GM-CSF 및 SCF의 사이토카인 조합을 포함하는 세포배양배지에서 CD34⁺ 세포를 일정 시간 동안 배양함으로써 인 비트로에서 단핵구성 골수유래억제세포를 대량생산하는 것을 특징으로 한다.
- [27] 본 발명의 골수유래억제세포로의 분화 유도에 사용되는 CD34⁺ 세포는 인간의 제대혈에서 분리한 것일 수 있다.
- [28] 상기 CD34⁺ 세포는 통상의 분리 방법을 통해 분리한 것일 수 있으며, 예를 들어, 인간 항-CD34 항체를 이용하여 분리한 것일 수 있다.
- [29] 본 발명의 골수유래억제세포는 상기 CD34⁺ 세포를 GM-CSF 및 SCF를 함유하는 세포배양배지에서 2주 내지 7주 동안, 더 구체적으로 3주 내지 6주 동안 배양하여 증폭 및 분화될 수 있다.
- [30] 상기 세포배양배지는 동물 세포 배양용 안전 배지일 수 있다. 예컨대, DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium), MEM(Minimal essential Medium), BME(Basal Medium Eagle), RPMI1640, F-10, F-12, α MEM(α Minimal essential Medium), GMEM(Glasgow's Minimal essential Medium), Iscove's Modified Dulbecco's Medium 등이 있으나, 이로 제한되지 않는다.

- [31] 상기 GM-CSF 및 SCF는 1 : 0.8 내지 0.3의 농도 비율로 세포배양배지에 첨가될 수 있다.
- [32] 바람직하게는, 상기 GM-CSF는 50 ng/mL 내지 200 ng/mL의 농도로 세포배양배지에 첨가될 수 있다. 상기 SCF는 10 ng/mL 내지 100 ng/mL의 농도로 세포배양배지에 첨가될 수 있다. 상기 범위 내일 경우 CD34⁺ 세포의 증식이 상대적으로 증가할 수 있다. 일 구체예에 따르면, CD34⁺ 세포를 G-CSF/SCF 하에서 3주 동안 배양하는 경우 600 배 정도 증식하나, GM-CSF/SCF 하에서는 1000 내지 3000배의 세포수로 증식될 수 있다.
- [33] 골수유래억제세포로의 분화 유도를 위한 상기 CD34⁺ 세포의 배양은 2주 내지 7주 동안, 더욱 바람직하게는 3주 내지 6주 동안 유지될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 일 구체예에 따르면, 3주 내지 6주 배양 시 30%로부터 95%의 CD11b⁺CD33⁺ 발현을 갖는 골수유래억제세포로 분화 유도될 수 있다.
- [34] 상기 CD34⁺ 세포의 골수유래억제세포로의 분화 조건은 조건은 CO₂ 배양기에서, 5 내지 15%의 이산화탄소의 통기량으로 35 내지 37 에서 수행할 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.
- [35] 상기 조건에서 분화 유도 및 증식된 골수유래억제세포는 배양 초기 CD34⁺ 세포의 수를 기준으로 1000 내지 3000배의 세포수로 증식될 수 있다.
- [36] 본 명세서에서, 용어 "골수유래억제세포(myeloid-derived suppressor cell; MDSC)"는 미성숙한 골수계 세포로 종양이나, 자가 면역 질환, 감염에서 과립구 등이 완전히 분화가 이루어지지 않아 미성숙한 상태로 존재하며, 암 환자뿐만 아니라 급성 염증 질환, 외상, 패혈증, 기생충·진균 감염에서도 증가한다고 알려져 있다. MDSC의 기능은 활성화된 T 세포를 효과적으로 억제하는 역할을 한다. MDSC가 T 세포를 조절하는 기전은 산화질소 합성효소(nitric oxide synthase)와 활성 산소종(reactive oxygen species; ROS) 및 아르기나제(arginase)라는 효소가 필수아미노산인 L-아르기닌(L-arginine)의 대사를 극대화함으로써 T 세포 활성을 억제한다고 알려져 있다.
- [37] 상기 제대혈에서 분리된 CD34⁺ 세포에서 분화 유도된 본 발명의 골수유래억제세포는 Lin⁻, HLA-DR^{low} 및 CD11b⁺CD33⁺의 세포표현형을 발현하는 단핵구성(monocytic) 골수유래억제세포일 수 있다.
- [38] 상기 골수유래억제세포는 세포표면 마커로 PDL-1, CCR2, CCR5, CD62L, CXCR4 및 ICAM-1의 발현을 포함할 수 있다. 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 제대혈에서 분리된 CD34⁺ 세포를 GM-CSF 및 SCF 하에서 6주간 배양하여 세포표면을 염색하면, HLA-ABC 70%, HLA-DR은 30% 이하, CD45는 90% 이상 발현되고, G-CSF/SCF 조합 하에서 분화 유도된 MDSC와 비교하여 본 발명의 GM-CSF/SCF 조합 하에서 분화 유도된 MDSC에서만 CD83과 CD80의 10% 발현이 관찰되었다. CD86은 GM-CSF/SCF 조합에 의한 MDSC에서 40% 정도 발현되어 공동자극분자들의 낮은 발현 양상을 보였다. 또한, CD40은 40%, 림프구 마커인 CD1d, CD3, B220은 5% 미만으로 발현되었다. T 세포의 증식이나

활성화를 억제하는 것으로 알려진 PDL-1은 GM-CSF/SCF 조합에 의해 배양된 세포에서만 30% 정도 발현되었다. CD13은 막통과 당단백질로서 골수 전구체에서 발현되며, 마이엘로페록시다제(MPO)는 골수 세포의 아주르친화 과립 안의 단백질로서 두 가지 모두 MDSC에서 발현되는 단백질이다.

GM-CSF/SCF의 조합으로 유도된 MDSC가 G-CSF/SCF 조합에 의해 유도된 MDSC보다 CD13의 발현이 유의하게 증가되었다. MPO는 두 가지 각기 다른 조합으로 유도된 MDSC에서 모두 90% 이상 발현되었다.

- [39] 또한, 상기 GM-CSF/SCF의 조합으로 유도된 MDSC는 G-CSF/SCF 조합에 의해 유도된 MDSC 및 인간 말초혈액 유래 수지상 세포 대비 아르기나아제 1, 인돌아민 2,3-디옥시게나아제(IDO) 및 유도성 산화질소 합성효소(iNOS)로 이루어진 군에서 선택되는 면역억제물질의 발현이 증가되어 있다.
- [40] 상기 GM-CSF/SCF의 조합으로 유도된 MDSC는 동종 CD4 T 세포의 증식을 유의하게 억제시켜, 항원 특이적인 T 세포 면역 반응에 의한 IFN- γ 의 분비를 강력하게 감소시킨다.
- [41] 상기 GM-CSF/SCF의 조합으로 유도된 MDSC는 CD40 항체로 자극을 받았을 때 IL-10의 분비가 유의하게 증가된 것을 관찰하였으며, VEGF 및 TGF- β 는 CD40 항체의 자극 여부에 영향을 받지 않고 높게 분비된다.
- [42] CD4 T 세포가 인 비트로에서 MDSC의 자극을 받으면 FoxP3를 발현하는 Treg 세포가 증가하는 것이 알려져 있고, GM-CSF/SCF의 조합으로 유도된 MDSC로 CD4 T 세포를 자극하는 경우, FoxP3 발현이 확인되나, 염증 사이토카인인 IL-17은 분비하지 않는다.
- [43] 또한, 상기 GM-CSF/SCF의 조합으로 유도된 MDSC는 이식편대숙주병 동물 모델에서 이식편대숙주병의 정도를 완화시키며, 생존율을 증가시키며, 혈청 내 항염증 사이토카인, IL-10 및 TGF- β 의 분비를 증가시키고, 항염증 단백질, CRP, MIP-3 β , MMP-9, RANTES(CCL5), SDF-1a의 분비를 증가시키며, 염증 사이토카인, IL-17 및 IFN- γ 를 감소시켜 염증 반응을 억제시킨다. 아울러 FoxP3를 발현하는 Treg 세포의 수를 증가시킨다.
- [44] 따라서, 본 발명은 인간 제대혈 유래의 CD34⁺ 세포에서 분화 및 증식되고, Lin⁻, HLA-DR^{low} 및 CD11b⁺CD33⁺의 세포표현형을 발현하며, 세포표면 마커로 PDL-1, CCR2, CCR5, CD62L, CXCR4 및 ICAM-1의 발현을 포함하는 골수유래억제세포를 제공한다.
- [45] 또한, 본 발명은 상기 단백질구성 골수유래억제세포를 포함하는 면역억제용 조성물을 제공한다.
- [46] 본 발명의 골수유래억제세포는 면역과민반응에 의해 야기되는 장기이식 거부반응; 조혈모세포 이식; 자가면역질환; 또는 알러지성 질환의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다. 예컨대, 이식편대숙주병의 완화에 사용될 수 있다.
- [47] 본 발명의 면역억제용 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체를 더 포함할 수 있다.

- [48] 상기 약제학적으로 허용 가능한 담체는 의약 분야에서 통상 사용되는 담체 및 비히클을 포함하며, 구체적으로 이온 교환 수지, 알루미늄, 알루미늄 스테아레이트, 레시틴, 혈청 단백질(예, 인간 혈청 알부민), 완충 물질(예, 각종 인산염, 글리신, 소르브산, 칼륨 소르베이트, 포화 식물성 지방산의 부분적인 글리세라이드 혼합물), 물, 염 또는 전해질(예, 프로타민 설페이트, 인산수소이나트륨, 인산수소칼륨, 염화나트륨 및 아연 염), 교질성 실리카, 마그네슘 트리실리케이트, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로즈계 기질, 폴리에틸렌 글리콜, 나트륨 카르복시메틸셀룰로즈, 폴리아릴레이트, 왁스, 폴리에틸렌 글리콜 또는 양모지 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다.
- [49] 또한, 본 발명의 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 유화제, 현탁제, 또는 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [50] 한 양태로서, 본 발명에 따른 조성물은 비경구 투여를 위한 수용성 용액으로 제조할 수 있으며, 바람직하게는 한스 용액(Hank's solution), 링거 용액(Ringer's solution) 또는 물리적으로 완충된 염수와 같은 완충 용액을 사용할 수 있다. 수용성 주입(injection) 현탁액은 소듐 카르복시메틸셀룰로즈, 솔비톨 또는 텍스트란과 같이 현탁액의 점도를 증가시킬 수 있는 기질을 첨가할 수 있다.
- [51] 본 발명의 조성물은 전신계 또는 국소적으로 투여될 수 있으며, 이러한 투여를 위해 공지의 기술로 적합한 제형으로 제제화 될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여 시에는 불활성 희석제 또는 식용 담체와 혼합하거나, 경질 또는 연질 젤라틴 캡슐에 밀봉되거나 또는 정제로 압형하여 투여 할 수 있다. 경구 투여용의 경우, 활성 화합물은 부형제와 혼합되어 섭취형 정제, 협측 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭시르, 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 사용될 수 있다.
- [52] 주사용, 비경구 투여용 등의 각종 제형은 당해 기술 분야 공지된 기법 또는 통용되는 기법에 따라 제조할 수 있다. 제형 투여는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등을 사용할 수 있다.
- [53] 본 발명의 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 예컨대, 본 발명의 조성물의 투여량은 성인에게 1일에 0.1 내지 1000 mg/kg의 양을, 바람직하게는 10 내지 100 mg/kg의 용량을, 일일 1회 내지 수회 투여할 수 있다.
- [54] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [55] <실시예 1> 제대혈 CD34⁺ 세포에서 GM-CSF와 SCF의 사이토카인 조합에 의한 안정적인 골수유래억제세포의 증폭 확립
- [56] 서로 다른 개체(인간)에서 유래된 제대혈로부터 human anti-CD34(Miltenyi Biotec, Germany)에 대한 항체를 이용하여 MACS 방법으로 CD34⁺ 세포를 분리하였다. 제대혈 유래 단핵세포들을 MACS buffer를 이용하여 수세하였다. FcR 차단 용액과 human CD34 microbead(CD34 항체가 결합된 microbead)는 각각 1×10^8 세포당 100 mL를 첨가 후 30분간 냉장 상태로 처리하였다. CD34 양성 세포와 음성 세포로 분리하기 위하여, 자성체에 mini-column을 설치한 후 3 mL의 MACS buffer(0.5% BSA, 2 mM EDTA in PBS pH 7.2)를 관류시켜 전세척(pre-washing)을 실시하였다. 전세척 후 각각의 항체가 처리된 시료를 1 mL의 MACS buffer에 재부유시켜 mini-column에 충전하고, 3 mL의 MACS buffer를 3회 동안 관류시켜 항체가 부착되지 않은 음성 세포를 분리하였다. 음성세포를 분리한 후 자성체에서 mini-column을 제거하고 5 mL의 MACS buffer를 1회에 걸쳐 관류시켜 양성 세포를 분리하였다. 분리한 양성 세포와 음성 세포를 농축하기 위해 MACS buffer를 이용하여 1회 원심분리 한 후 상층액을 제거하였다.
- [57] CD34 양성 수확 후에 GM-CSF(100 ng/mL), SCF(50 ng/mL)의 두 가지 사이토카인 조합으로 IMDM 배지를 이용하여 96-웰 플레이트에 1×10^5 으로 배양하기 시작하여 3일 후부터는 48-웰 플레이트에서 CD34⁺ 세포의 증폭을 유도하였다.
- [58] 도 1에 나타난 바와 같이, GM-CSF/SCF는 1주째에 10배 이상, 2주째에 100배 이상, 3주째에 1,000배 이상 증폭했지만 G-CSF/SCF 3주째에 600배로 증폭하였다. 따라서 GM-CSF(100 ng/mL)/SCF(50 ng/mL)의 조합이 더 효율적으로 CD34⁺ 세포를 증폭시키는 것을 알 수 있었다.
- [59] <실시예 2> 제대혈 유래 CD34⁺ 세포의 장기간 배양 후 분화 유도된 MDSC의 분석
- [60] 제대혈에서 CD34⁺ 세포를 분리한 후 GM-CSF(100 ng/mL)/SCF(50 ng/mL) 또는 G-CSF(100 ng/mL)/SCF(50 ng/mL)로 6주간 37, 5% CO₂ 배양 조건에서 배양하여 유세포 분석기를 통해 골수유래억제세포의 분화 여부를 분석하였다.
- [61] 도 2에 나타난 바와 같이, Lin⁻의 세포를 게이팅(gating)한 후에 CD11b⁺CD33⁺의 발현을 확인한 결과, GM-CSF/SCF는 3주에 CD11b⁺CD33⁺ 30% 이상, 6주 동안의 장기간 배양을 통해 90% 정도의 골수유래억제세포 군이 발현되는 것을 확인하였다. 반면 G-CSF/SCF는 3주에 15% 정도로 발현되었고 그 이후에는 점차 감소된 세포군이 관찰됨으로써 GM-CSF/SCF의 각테일이 고효율적으로 MDSC의 분화를 유도하는 것을 알 수 있었다.
- [62] <실시예 3> 제대혈 유래 CD34⁺ 세포의 3주 배양 후 유도된 CD11b⁺CD33⁺와

CD11b⁺CD33⁻ 세포의 분화능 분석

- [63] 제대혈에서 CD34⁺ 세포를 분리한 후에 GM-CSF(100 ng/mL), SCF(50ng/mL)로 3주간 배양하고, CD11b⁺CD33⁺와 CD11b⁺CD33⁻의 세포들을 FACS Aria를 이용하여 분리한 다음 각각의 분리된 세포를 일주일 동안 SCF(50 ng/mL), GM-CSF(100 ng/mL)로 배양하였다. 일주일 후에 유세포 분석기로 분석하였다.
- [64] 도 3에 나타난 바와 같이, CD11b⁺CD33⁺의 세포들은 98%의 CD11b⁺CD33⁺의 표현형을 유지하고 있었고, CD11b⁺CD33⁻의 세포들은 67%의 CD11b⁺CD33⁺의 표현형을 보임으로써, CD11b⁺CD33⁻의 세포들이 계속 CD11b⁺CD33⁺세포로 분화되고 있음을 관찰하였다.
- [65] <실시예 4> 제대혈 유래 CD34⁺ 세포의 장기간 배양 후 분화 유도된 G-MDSC와 M-MDSC의 분석
- [66] MDSC는 단핵구성 MDSC(M-MDSC)와 과립구성 MDSC(G-MDSC)로 나뉜다. 따라서, 제대혈 유래 CD34⁺ 세포에서 분화 유도된 MDSC의 아형의 종류를 분석하였다.
- [67] 도 4는 GM-CSF(100 ng/mL)와 SCF(50 ng/mL) 또 G-CSF(100 ng/mL)와 SCF(50 ng/mL)로 6주간 배양 후 CD11b⁺CD33⁺의 세포를 게이팅하고 나서 CD14(M-MDSC: CD11b⁺CD33⁺CD14⁺)와 CD15(G-MDSC:CD11b⁺CD33⁺CD15⁺)의 발현을 분석하였다.
- [68] 도 4에 나타난 바와 같이, 제대혈 유래 CD34⁺ 세포에서 GM-CSF(100 ng/mL)와 SCF(50 ng/mL)분화 유도된 MDSC는 83%의 발현을 보여 거의 M-MDSC였고 G-CSF(100 ng/mL)와 SCF(50 ng/mL)로 분화 유도된 MDSC는 M-MDSC와 G-MDSC가 1:1 비율임을 관찰하였다.
- [69] <실시예 5> 제대혈 유래 CD34⁺ 세포에서 분화 유도된 MDSC의 세포표면 마커 분석
- [70] 제대혈에서 CD34⁺ 세포를 분리하고, GM-CSF(100 ng/mL)와 SCF(50 ng/mL)로 6주간 배양한 후 세포표면 염색을 하여 유세포 분석기를 통해서 분석하였다. 이때, G-CSF(100 ng/mL)와 SCF(50 ng/mL)로 배양된 세포는 대조군으로 이용되었다.
- [71] 도 5에 나타난 바와 같이, HLA-ABC 70%, HLA-DR은 30% 이하, CD45는 90% 이상 발현하였다. CD83과 CD80은 GM-CSF/SCF로 배양된 세포에서만 각각 10~15%, 20% 발현되었고, CD86은 GM-CSF/SCF로 배양된 세포에서 40% 발현되었다(G-CSF/SCF로 배양된 세포보다 유의하게 높은 발현임). 따라서 공동자극분자(CD80, CD86)의 낮은 발현이 관찰되었다.
- [72] CD40은 40%, 림프구 마커인 CD1d, CD3, B220은 5% 미만으로 발현되었다.
- [73] T 세포의 증식이나 활성화를 억제하는 것으로 알려진 PDL-1은 GMCSF(100 ng/mL)와 SCF(50 ng/mL)로 배양된 세포에서만 30% 정도 발현되었다.
- [74] 다음으로, CD13은 막통과 당단백질(transmembrane glycoprotein)로서 골수 전구체에서 발현된다. 마이엘로페록시다제(Myeloperoxidase(MPO))는

골수세포의 아주르친화 과립(azurophilic granule) 안의 단백질로서 두 가지 모두 골수 유래 억제세포에서 발현되는 단백질이다.

[75] 유세포 분석기를 이용하여 분석한 결과, GM-CSF(100 ng/mL)/SCF(50 ng/mL)의 조합으로 유도된 골수유래억제세포 군이 G-CSF(100 ng/mL)/SCF(50 ng/mL)에 의해 유도된 골수유래억제세포 군보다 CD13의 발현이 유의하게 증가되었다. MPO는 두 가지 각기 다른 사이토카인의 조합으로 유도된 골수유래억제세포 군에서 모두 90% 이상 발현됨을 확인하였다.

[76] 또한, CD14는 88%, 골수(myeloid) 마커인 CD11c는 75%, CD11b는 85%가 발현됨으로써 제대혈 유래 CD34⁺ 세포에서 분화 유도된 세포에는 골수 세포가 높게 발현됨을 관찰하였다.

[77] <실시예 6> 제대혈 유래 CD34⁺ 세포에서 분화 유도된 MDSC에서 면역억제단백질의 발현 측정

[78] MDSC의 억제능을 알 수 있는 세포내 신호전달 인자에는 아르기나아제 1(Arginase 1), iNOS, 인돌아민 2,3-디옥시게나아제(Indoleamine 2,3-dioxygenase; IDO), COX-2, STAT1, STAT 3, STAT 6 등이 있어, 6주간 배양된 제대혈 유래 MDSC와 성인 PBMC 유래 수지상세포에서 이러한 세포내 신호전달인자를 비교 분석하였다.

[79] 도 6a-b에 나타난 바와 같이, 6주간 배양된 제대혈 유래 MDSC와 성인 PBMC 유래 수지상세포(adult DC)에서 NOS2, 아르기나아제 1, IDO의 발현을 비교한 결과, 제대혈 유래 MDSC는 이러한 세 가지 분자들이 의미 있게 높이 발현됨을 관찰하였고, adult DC에서는 아르기나아제 1, IDO가 미염색 상태(unstained) 보다 약간 증가함이 관찰되었다. 또한, iNOS2와 IDO는 G-CSF/SCF 조합보다 GM-CSF/SCF에서 유의하게 높게 발현되었다. Arginase 1 또한 G-CSF/SCF 조합보다 GM-CSF/SCF에서 높게 발현되었으나, 두 조합간 차이는 유의성을 보이지 않았다.

[80] <실시예 7> 제대혈 유래 CD34⁺ 세포에서 분화 유도된 MDSC의 인 비트로 면역억제능 평가

[81] 제대혈 유래의 MDSC의 인 비트로 동종 면역반응 억제능을 측정하기 위해, 각기 다른 인간으로부터 분리한 수지상세포(1×10^4)와 CD4 T 세포(1×10^5 , DC:T ratio=1:10)를 96-웰 플레이트에서 4일간 배양하였다. 배양 시 제대혈 유래 MDSC(GM-CSF/SCF 조합으로 6주간 배양 후 이용)를 첨가한 그룹과 첨가하지 않은 그룹으로 나누어 배양하였다. $1 \mu\text{Ci} (^3\text{H})$ 싸이미딘을 각각의 배양조에 첨가 후 18시간 후에 liquid scintillation counter로 측정하였다.

[82] 도 7a에 나타난 바와 같이, 수지상세포는 동종 CD4 T 세포를 효율적으로 증식시켰으나, 제대혈 유래 MDSC가 함께 배양된 그룹은 동종 CD4 T 세포의 증식을 아주 강력하게 억제하였다.

[83] 다음으로, 제대혈 유래 MDSC가 항원 특이 T 세포 반응을 억제하는지를 측정하기 위해, pp65 항원이 전이된 수지상세포 또는 단독의 수지상세포(1×10^4

-)와 다른 공여자의 CD4 T 세포(1×10^5 , DC:T ratio=1:10)를 제대혈 유래 MDSC 유무 조건에 따라 24시간 동안 96-웰 플레이트에서 반응시킨 후 IFN- γ 를 측정하였다.
- [84] 도 7b에 나타난 바와 같이, 제대혈 유래 MDSC(GM-CSF/SCF 조합으로 6주간 배양 후 이용)가 함께 배양된 그룹은 pp65 항원 특이적인 T세포 면역 반응에 의한 IFN- γ 의 분비를 아주 강력하게 감소시켰다.
- [85] 다음으로, 제대혈 유래 MDSC의 사이토카인의 분비 정도를 확인하였다.
- [86] 도 7c에 나타난 바와 같이, 제대혈 유래 MDSC(GM-CSF/SCF 조합으로 6주간 배양 후 이용)가 CD40 항체로 자극을 받았을 때 IL-10의 분비가 유의하게 증가되었다. VEGF와 TGF- β 는 CD40 항체의 자극 여부에 영향을 받지 않고 높게 분비되었다.
- [87] CD4 T 세포가 시험관 내에서 MDSC의 자극을 받으면 FoxP3를 발현하는 Treg 세포가 증가하는 것으로 알려져 있다. 따라서, 제대혈 유래 MDSC의 자극에 의한 FoxP3 발현 Treg 세포의 증가 여부를 확인하였다. 이를 위해, 1×10^5 의 CD4 T 세포와 GM-CSF/SCF 조합과 G-CSF/SCF 조합으로 유도된 각각의 MDSC 2×10^5 을 37°C, 5% CO₂에서 2일간 배양 후 CD3, CD4, CD25 항체를 이용하여 세포표면을 염색 후 FoxP3와 IL-17A 항체를 이용하여 세포내를 염색하였다.
- [88] 도 7d에 나타난 바와 같이, GM-CSF/SCF 조합으로 유도된 MDSC로 자극을 받은 CD4 T 세포는 62%, G-CSF/SCF 조합으로 유도된 MDSC로 자극을 받은 CD4 T 세포는 49%의 FoxP3를 발현하였다. 반면, 염증 사이토카인인 IL-17은 모두 분비되지 않았다.
- [89] <실시예 8> 제대혈 유래 MDSC의 이종 마우스 모델에서 효능 평가
- [90] 이종 GVHD 마우스 모델에서 제대혈 유래 MDSC의 효능을 확인하였다. 면역부전동물인 NSG 마우스는 이식 하루 전날에 200cGY로 방사선 조사되었고 하루 뒤에 마우스 개체당 인간 PBMC 1×10^6 을 이식받았다. 이식편대숙주병(GVHD)의 완화를 목적으로 18일과 24일에 1×10^6 , 2.5×10^6 , 5×10^6 의 제대혈 유래 GM-CSF/SCF로 유도된 MDSC가 투여되었다. 이식편대숙주병의 scoring을 위해서 이틀에 한 번 무게가 측정되었고, 마우스의 움직임, 등이 굽은 정도, 털의 상태, 피부 통합성이 관찰되었다.
- [91] 도 8a는 인간 말초혈액단핵구 이식 후 35일째의 마우스 사진을 보여준다. 방사선 조사와 인간 말초혈액을 이식받지 않은 건강한 NSG 마우스(대조군)는 평균 22~23g, MDSC (GM-CSF/SCF조합으로 6주간 배양 후 이용)가 투여된 마우스는 20~22g이었다. 반면, 인간 말초혈액단핵구만 투여된 마우스(PBMC only)는 15~17g이었고 등 또한 매우 굽어 있었으며 움직임이 전혀 없는 상태였다.
- [92] 다음으로, 제대혈 유래 MDSC의 투여 후 이종 마우스 모델에서 무게 감소 여부를 확인하였다. 2일 간격으로 무게를 측정하여 무게 감소를 그래프로 나타내었다.
- [93] 도 8b에 나타난 바와 같이, PBMC만 투여한 그룹은 점차 무게가 감소하여 6주

후부터는 -20% 정도의 무게 감소를 보인 반면 MDSC (GM-CSF/SCF 조합으로 6주간 배양 후 이용)로 치료된 그룹은 무게의 감소를 완화시켰다.

- [94] 다음으로, PBMC 이식 후 60일 후에 이식편대숙주병의 정도를 점수화하였다. 도 8c에 나타난 바와 같이, PBMC만 처리한 그룹은 무게의 감소뿐만 아니라 등이 30도 이상으로 굽고 털이 전체적으로 빠졌으며 움직임이 거의 없어 9점이고, 반면에 MDSC(GM-CSF/SCF 조합으로 6주간 배양 후 이용)로 치료를 받은 그룹들은 세포의 숫자가 많아질수록 점수가 낮아졌고, 특히 5×10^6 으로 치료를 받은 그룹은 0.5점이었다. 따라서, MDSC가 GVHD의 정도를 완화시킴을 관찰할 수 있었다.
- [95] 다음으로, 제대혈 유래 MDSC의 투여 후 이중 GVHD 마우스 모델에서 생존율을 측정하였다.
- [96] 도 8d에 나타난 바와 같이, PBMC만 투여한 그룹에 비교하여 MDSC(GM-CSF/SCF 조합으로 6주간 배양 후 이용)가 투여된 그룹들은 생존율이 유의하게 증가되었다. 그러나 세포의 숫자에 따른 생존율의 유의성은 없었다.
- [97] MDSC는 항-염증과 면역억제 사이토카인인 IL-10, 전-염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-1b, IL-6, 그리고 VEGF와 같은 단백질을 분비하는 것으로 알려져 있다. 따라서, PBMC 이식 후 35일 후에 마우스의 혈청을 분리하여 항염증 사이토카인을 ELISA로 측정하였다.
- [98] 도 8e-h에 나타난 바와 같이, PBMC만 투여한 그룹과 비교하여 MDSC (GM-CSF/SCF 조합으로 6주간 배양 후 이용)가 투여된 그룹에서 항염증 사이토카인 IL-10과 TGF- β 의 유의한 증가가 관찰되었다. 반면에 염증 사이토카인 IL-6와 TNF- α 는 PBMC만 투여한 그룹에서 유의하게 증가되었다.
- [99] CD4 T 세포가 인 비트로에서 MDSC의 자극을 받으면 FoxP3를 발현하는 Treg 세포가 증가하는 것으로 알려져 있다. 1×10^5 의 CD4 T 세포와 GM-CSF/SCF 또는 G-CSF/SCF로 유도된 각각의 MDSC 2×10^5 을 37°C, 5% CO₂에서 2일간 배양 후 CD3, CD4, CD25 항체를 이용하여 세포표면을 염색 후 FoxP3와 IL-17A 항체를 이용하여 세포 내부를 염색하였다.
- [100] 도 9에 나타난 바와 같이, GM-CSF/SCF로 유도된 MDSC로 자극을 받은 CD4 T 세포에서 세포의 수에 비례하여 FoxP3를 발현하는 Treg 세포가 증가되었다.
- [101] 다음으로, 제대혈 유래 MDSC의 투여 후 이중 GVHD 마우스 모델에서 세포내 염증 사이토카인의 분비를 확인하였다. 이를 위해, PBMC 이식 후 35일 후에 마우스의 비장에서 세포를 분리 후 CD3, CD4 항체를 이용하여 세포표면을 염색 후 IL-17, IL-4와 IFN- γ 항체를 이용하여 세포내를 염색하였다.
- [102] 도 10에 나타난 바와 같이, PBMC만 투여한 그룹에서 IL-17과 IFN- γ 의 발현이 유의하게 증가되었다. 따라서, MDSC(GM-CSF/SCF으로 6주간 배양 후 이용)를 투여하였을 때 염증반응이 억제됨을 확인하였다.
- [103] 마지막으로, 제대혈 유래 MDSC의 투여 후 이중 GVHD 마우스 모델의 혈청내 항염증 단백질 분비 여부를 확인하였다. 이를 위해, PBMC 이식 후 35일 후에

마우스의 혈청을 분리하여 사이토카인 어레이 키트(샘플 사이에 분비된 사이토카인의 차이를 동시에 측정할 수 있는 키트) 이용하여 측정하였다.

- [104] 도 11에 나타난 바와 같이, PBMC만 투여된 그룹의 혈청에서 염증 사이토카인 및 단백질이 혈청 내에 유의성 있게 분비되었고 반면에 MDSC (GM-CSF/SCF 조합으로 6주간 배양 후 이용) 투여된 그룹의 혈청에서는 염증 사이토카인 및 단백질이 감소된 것을 확인하였다.

산업상 이용가능성

- [105] 본 발명은 면역과민반응에 의해 야기되는 장기이식 거부반응, 조혈모세포 이식, 자가면역질환, 또는 알러지성 질환의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다.

청구범위

- [청구항 1] GM-CSF 및 SCF를 포함하는, 제대혈 유래의 CD34⁺ 세포에서 골수유래억제세포(myeloid-derived suppressor cell; MDSC)로의 분화 유도 및 증식용 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
CD34⁺ 세포는 인간의 제대혈에서 분리한 것인, 제대혈 유래의 CD34⁺ 세포에서 골수유래억제세포로의 분화 유도 및 증식용 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
골수유래억제세포는 Lin⁻, HLA-DR^{low} 및 CD11b⁺CD33⁺의 세포표현형을 발현하는 것인, 제대혈 유래의 CD34⁺ 세포에서 골수유래억제세포로의 분화 유도 및 증식용 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
골수유래억제세포는 세포표면 마커로 PDL-1, CCR2, CCR5, CD62L, CXCR4 및 ICAM-1의 발현을 포함하는 것인, 제대혈 유래의 CD34⁺ 세포에서 골수유래억제세포로의 분화 유도 및 증식용 조성물.
- [청구항 5] 제대혈 유래의 CD34⁺ 세포를 GM-CSF 및 SCF 하에서 배양하여 골수유래억제세포로 분화 유도 및 증식하는 단계를 포함하는 제대혈 유래의 CD34⁺ 세포에서 골수유래억제세포로의 분화 유도 및 증식 방법.
- [청구항 6] 제5항에 있어서,
CD34⁺ 세포는 인간의 제대혈에서 분리한 것인, 제대혈 유래의 CD34⁺ 세포에서 골수유래억제세포로의 분화 유도 및 증식 방법.
- [청구항 7] 제5항에 있어서,
GM-CSF 및 SCF는 1 : 0.8 내지 0.3의 농도 비율로 세포배양배지에 첨가되는, 제대혈 유래의 CD34⁺ 세포에서 골수유래억제세포로의 분화 유도 및 증식 방법.
- [청구항 8] 제5항에 있어서,
GM-CSF는 50 ng/mL 내지 200 ng/mL의 농도로 세포배양배지에 첨가되는, 제대혈 유래의 CD34⁺ 세포에서 골수유래억제세포로의 분화 유도 및 증식 방법.
- [청구항 9] 제5항에 있어서,
SCF는 10 ng/mL 내지 100 ng/mL의 농도로 세포배양배지에 첨가되는, 제대혈 유래의 CD34⁺ 세포에서 골수유래억제세포로의 분화 유도 및 증식 방법.
- [청구항 10] 제5항에 있어서,

골수유래억제세포의 분화 및 증식은 CD34⁺ 세포를 GM-CSF 및 SCF 하에서 2주 내지 7주 동안 배양하여 유도되는 것인, 제대혈 유래의 CD34⁺ 세포에서 골수유래억제세포로의 분화 유도 및 증식 방법.

[청구항 11] 제5항에 있어서,
골수유래억제세포는 배양 초기 CD34⁺ 세포의 수를 기준으로 1000 내지 3000배의 세포수로 증식되는 것인, 제대혈 유래의 CD34⁺ 세포에서 골수유래억제세포로의 분화 유도 및 증식 방법.

[청구항 12] 제5항에 있어서,
골수유래억제세포는 Lin⁻, HLA-DR^{low} 및 CD11b⁺CD33⁺의 세포표현형을 발현하는 것인, 제대혈 유래의 CD34⁺ 세포에서 골수유래억제세포로의 분화 유도 및 증식 방법.

[청구항 13] 제5항에 있어서,
골수유래억제세포는 세포표면 마커로 PDL-1, CCR2, CCR5, CD62L, CXCR4 및 ICAM-1의 발현을 포함하는 것인, 제대혈 유래의 CD34⁺ 세포에서 골수유래억제세포로의 분화 유도 및 증식 방법.

[청구항 14] 인간 제대혈 유래의 CD34⁺ 세포에서 분화 및 증식되고, Lin⁻, HLA-DR^{low} 및 CD11b⁺CD33⁺의 세포표현형을 발현하며, 세포표면 마커로 PDL-1, CCR2, CCR5, CD62L, CXCR4 및 ICAM-1의 발현을 포함하는 골수유래억제세포.

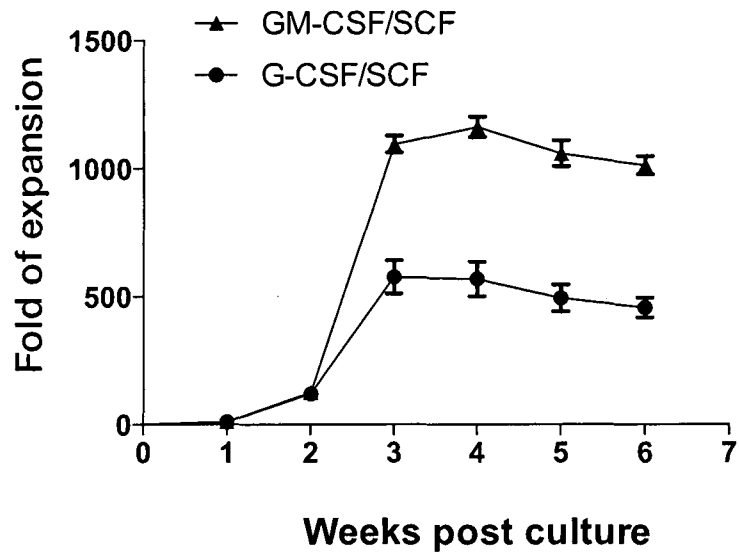
[청구항 15] 제14항에 있어서,
골수유래억제세포는 인간 말초혈액 유래 수지상 세포 및 G-CSF/SCF 조합에 의해 유도된 골수유래억제세포 대비 아르기나아제 1, 인돌아민 2,3-디옥시게나아제(IDO) 및 유도성 산화질소 합성효소(iNOS)로 이루어진 군에서 선택되는 면역억제물질의 발현이 증가된 것인, 골수유래억제세포.

[청구항 16] 제14항의 단핵구성 골수유래억제세포를 포함하는 면역억제용 조성물.

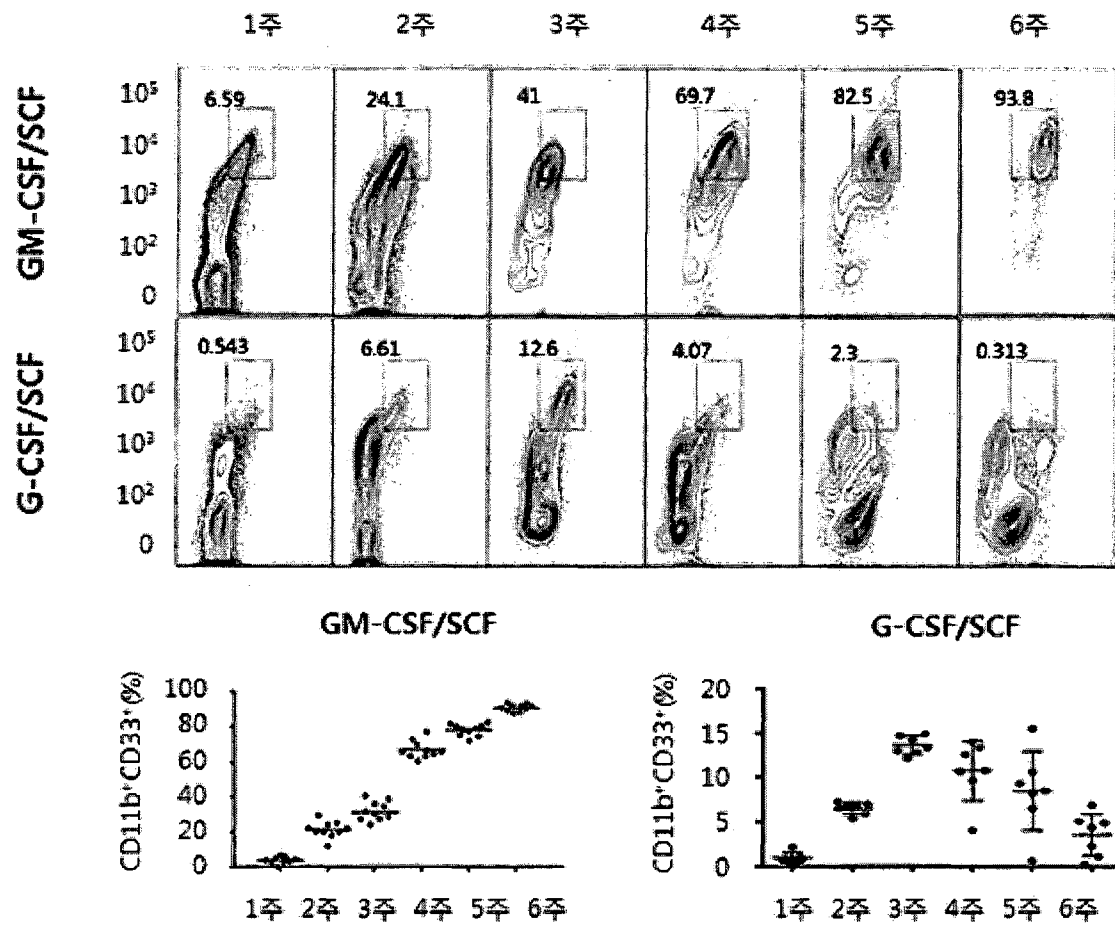
[청구항 17] 제16항에 있어서,
면역억제용 조성물은 면역과민반응에 의해 야기되는 장기이식 거부반응, 조혈모세포 이식, 자가면역질환, 또는 알러지성 질환의 예방 또는 치료에 사용되는 것인, 면역억제용 조성물.

[청구항 18] 제16항에 있어서,
면역억제용 조성물은 이식편대숙주병의 완화에 사용되는 것인, 면역억제용 조성물.

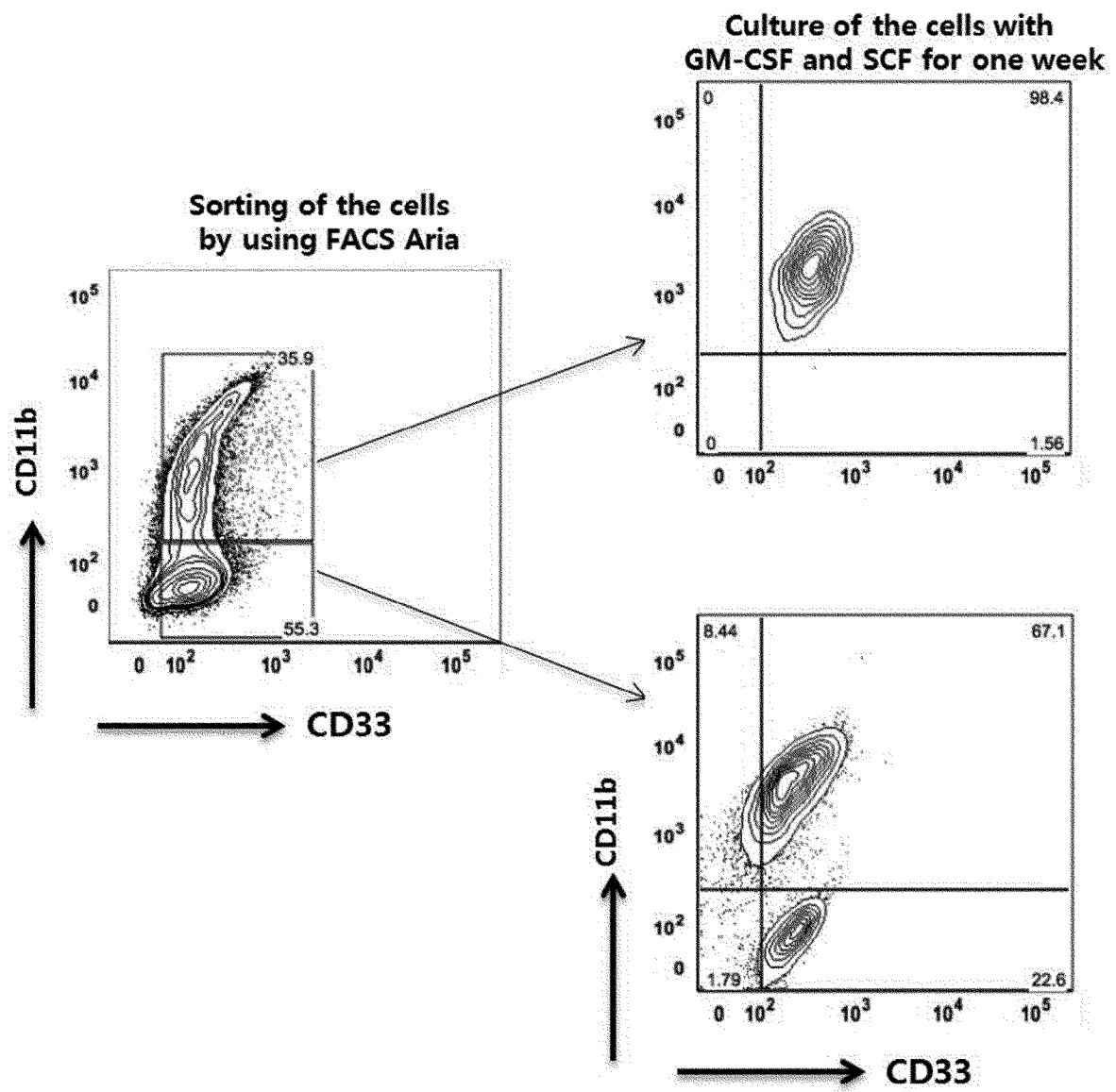
[Fig. 1]



[Fig. 2]

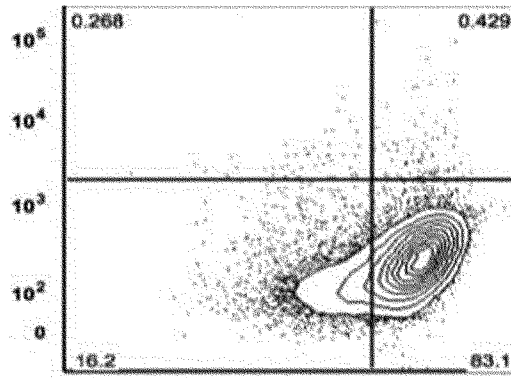


[Fig. 3]

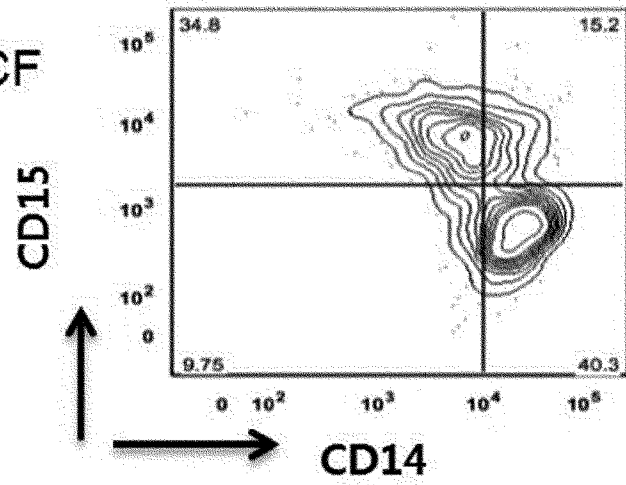


[Fig. 4]

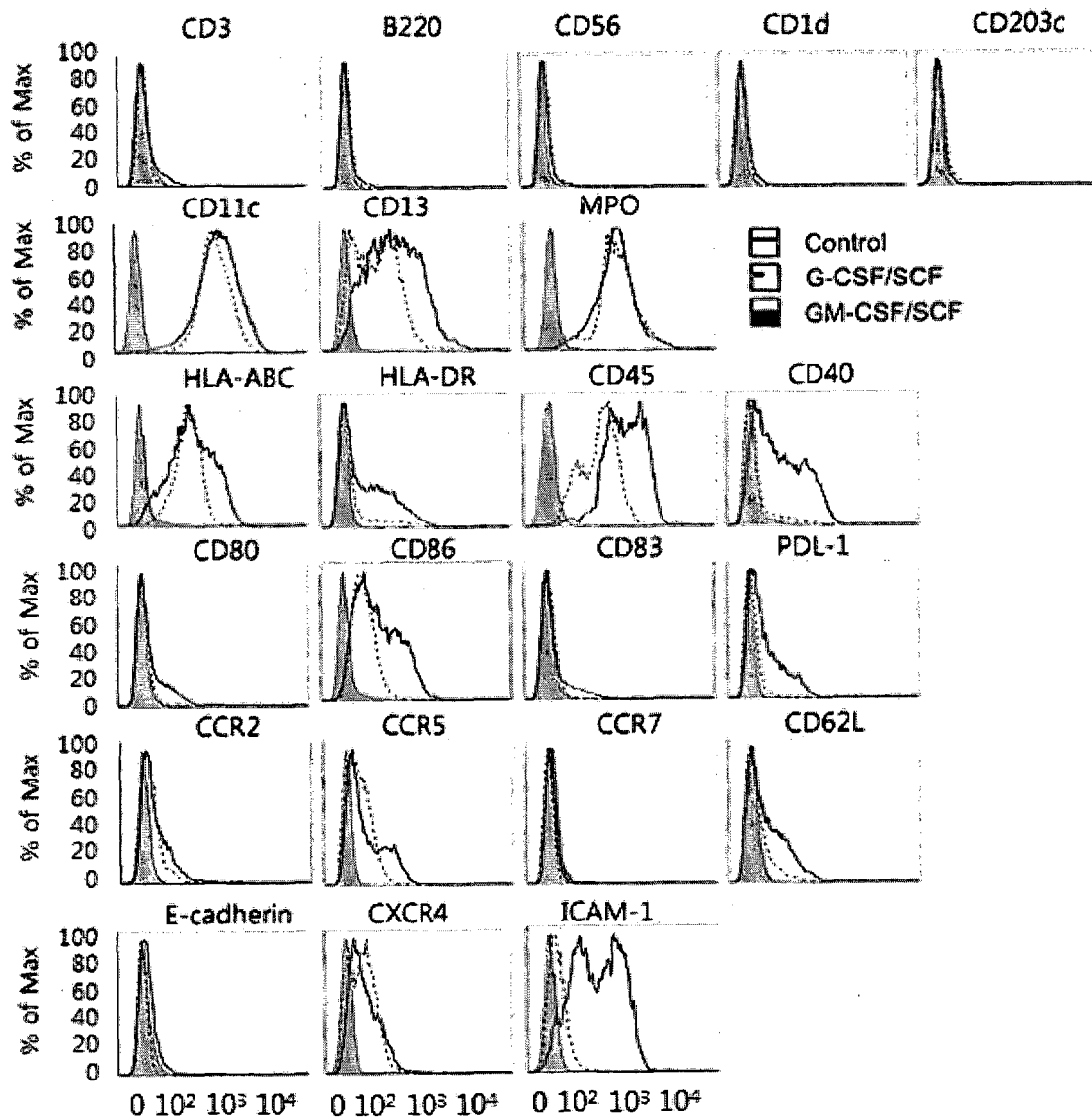
GM-CSF/SCF



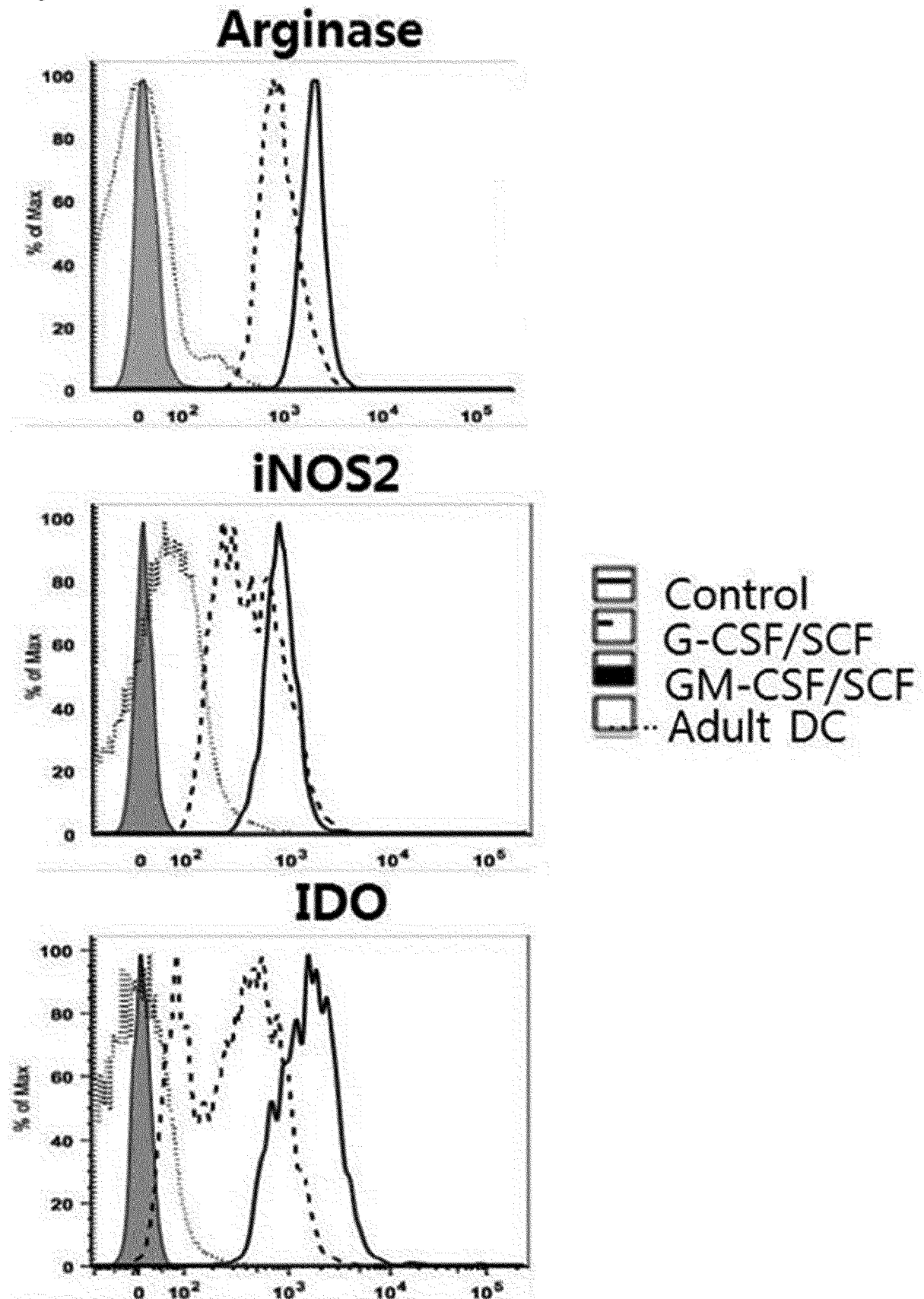
G-CSF/SCF



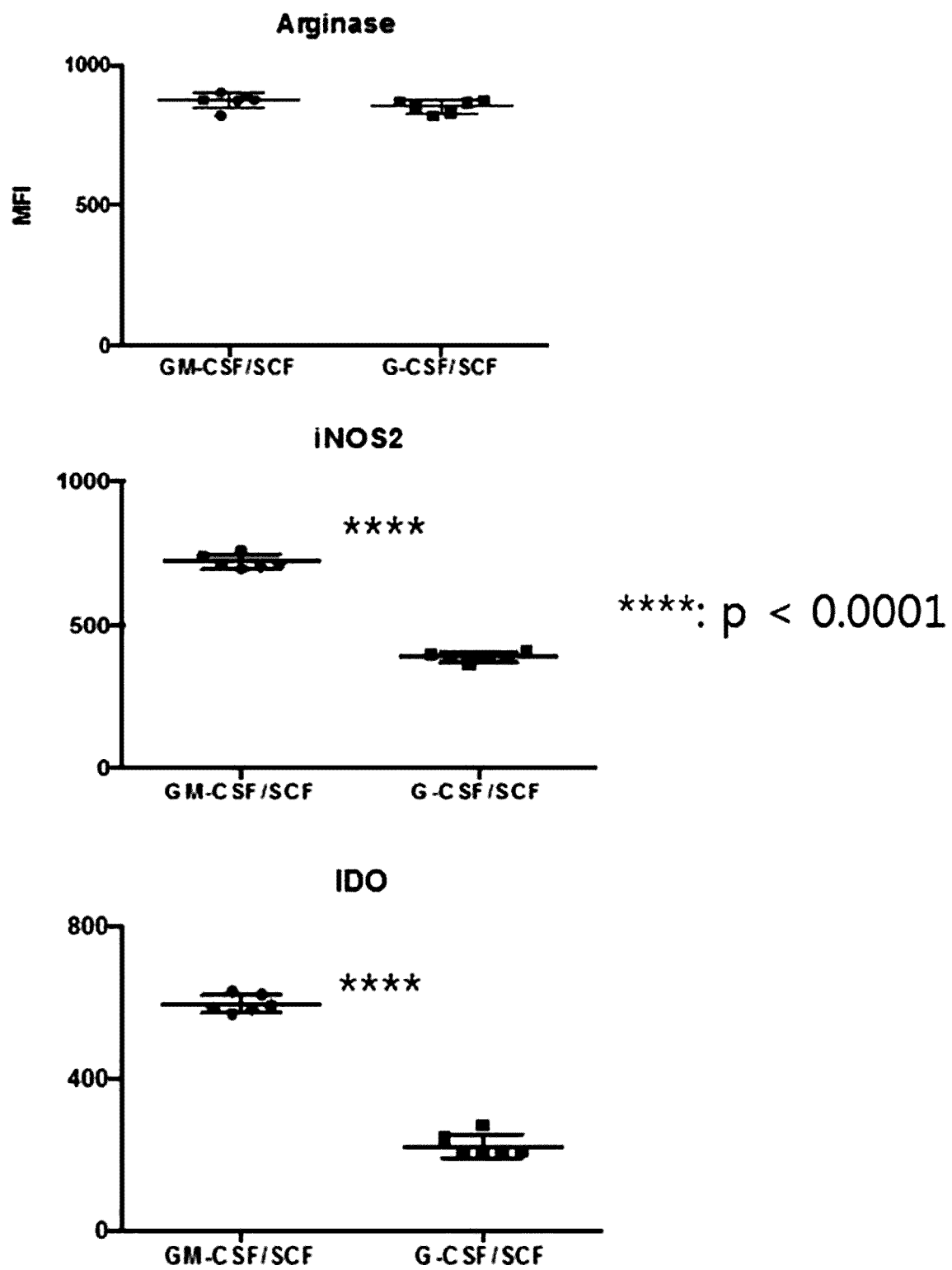
[Fig. 5]



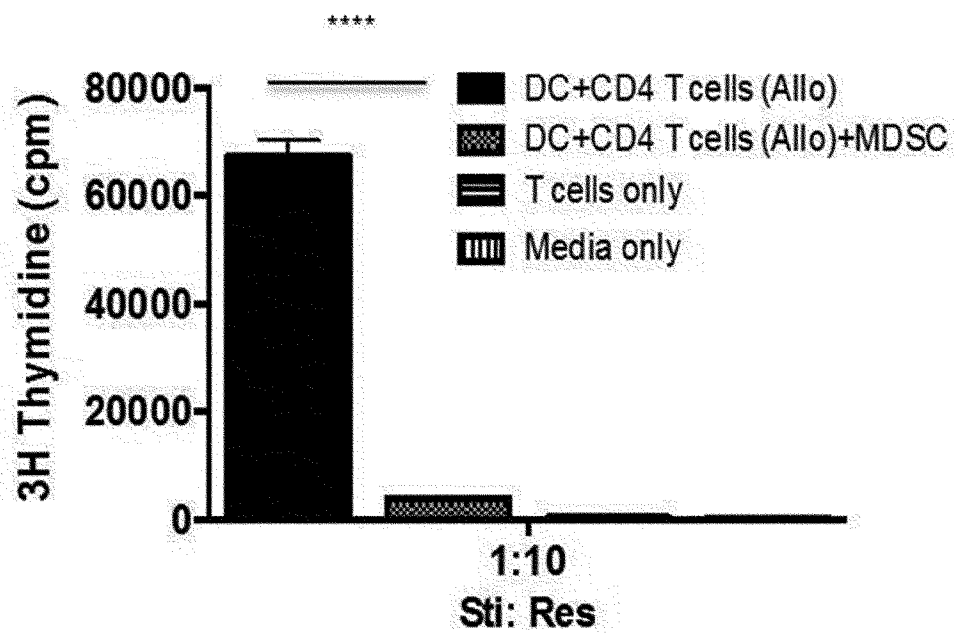
[Fig. 6a]



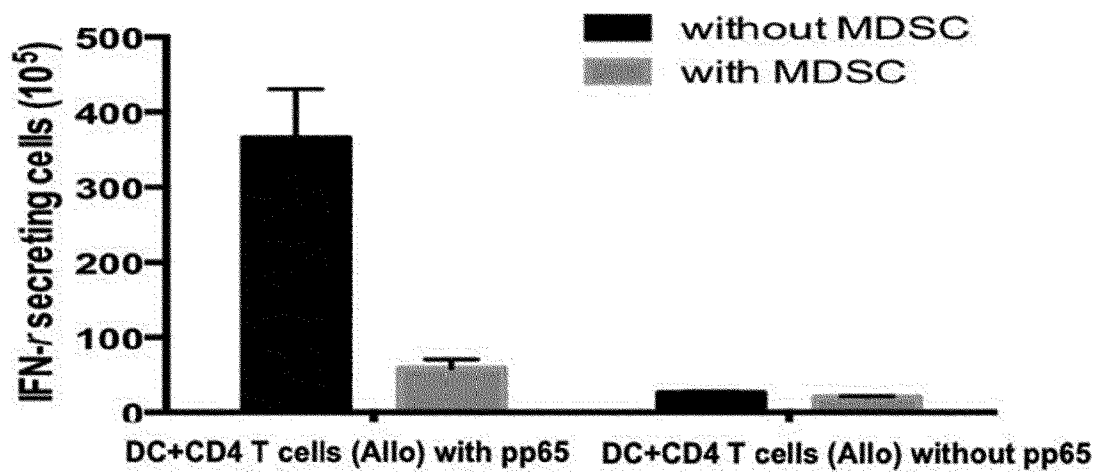
[Fig. 6b]



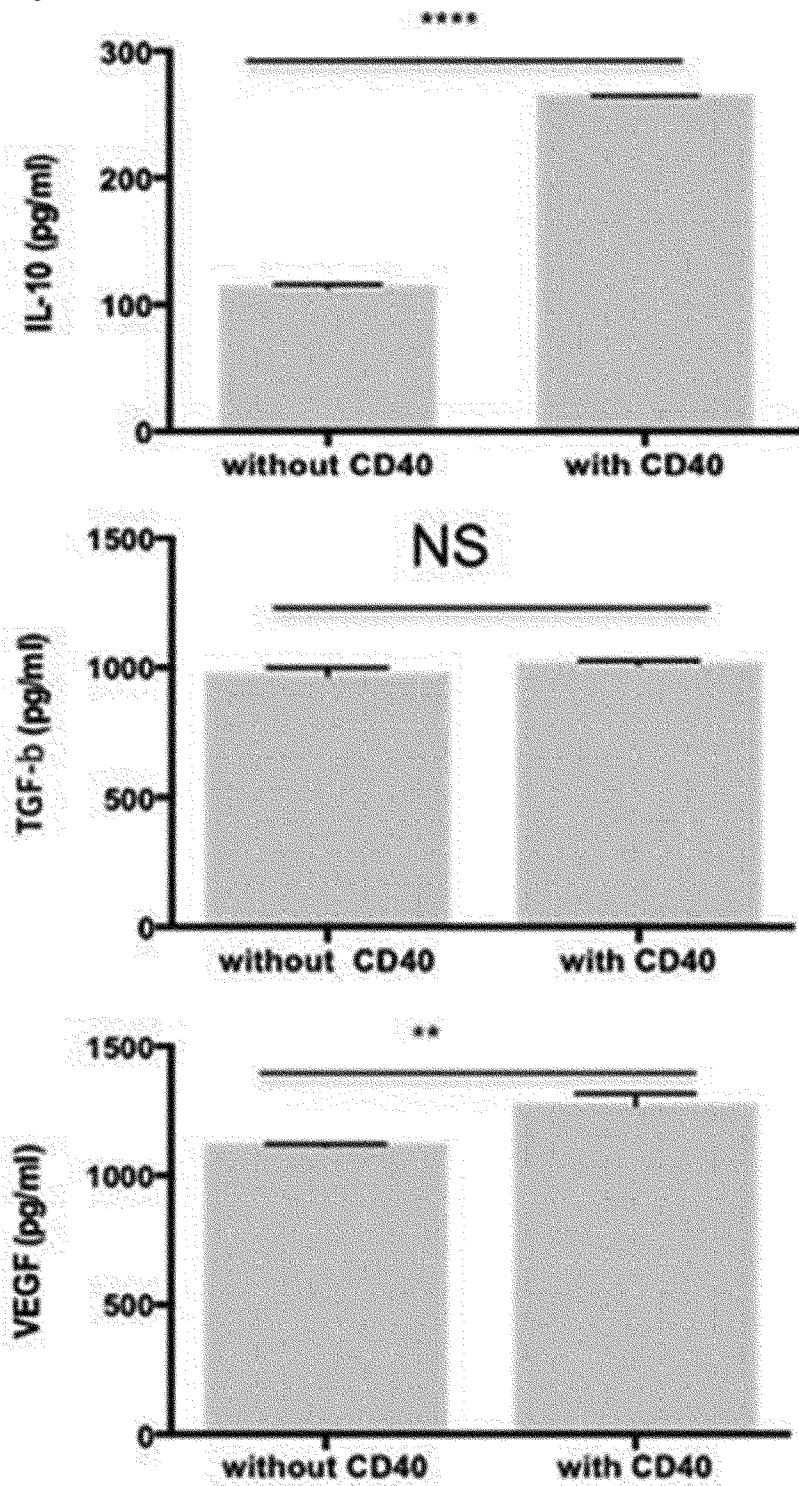
[Fig. 7a]



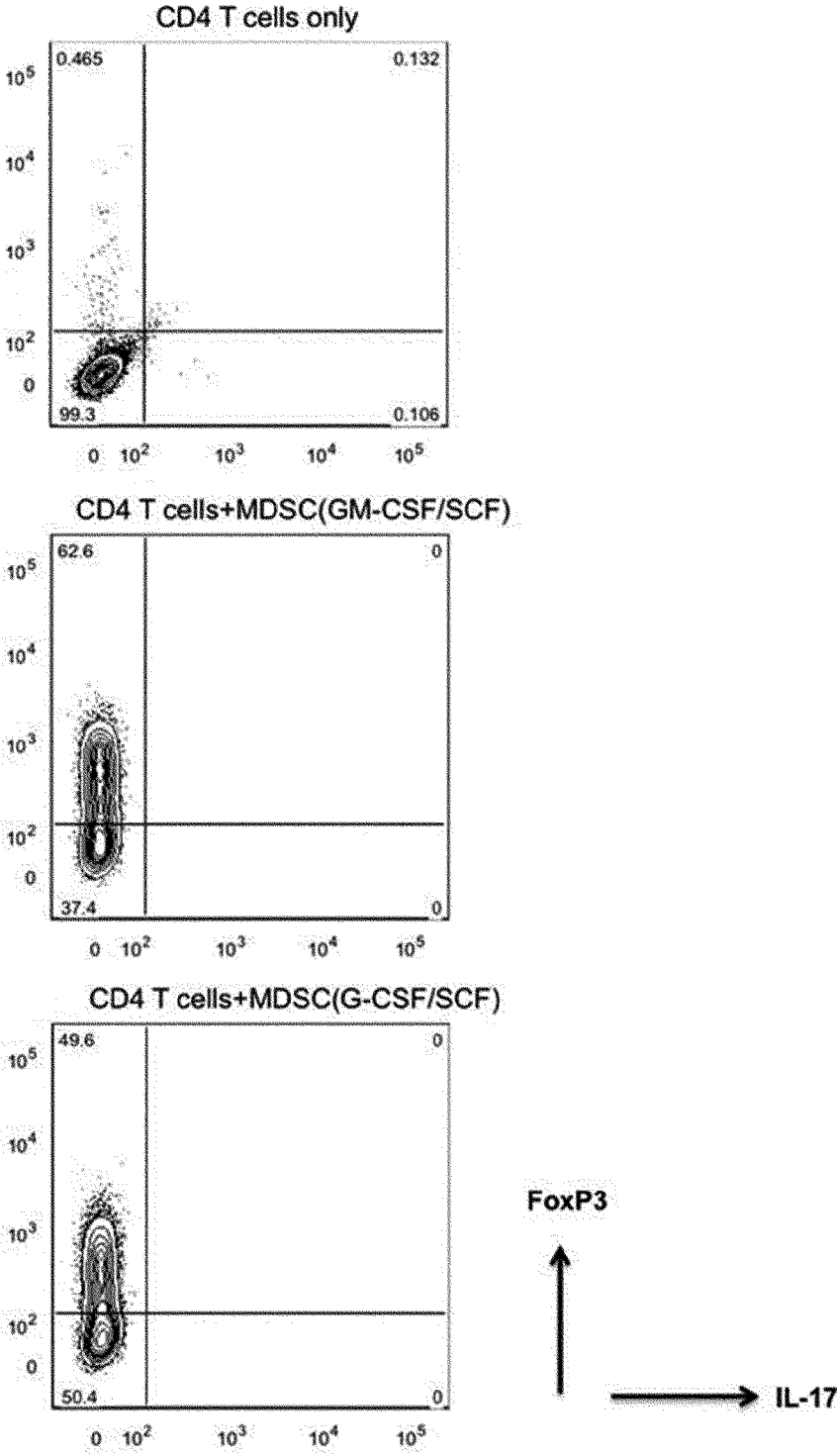
[Fig. 7b]



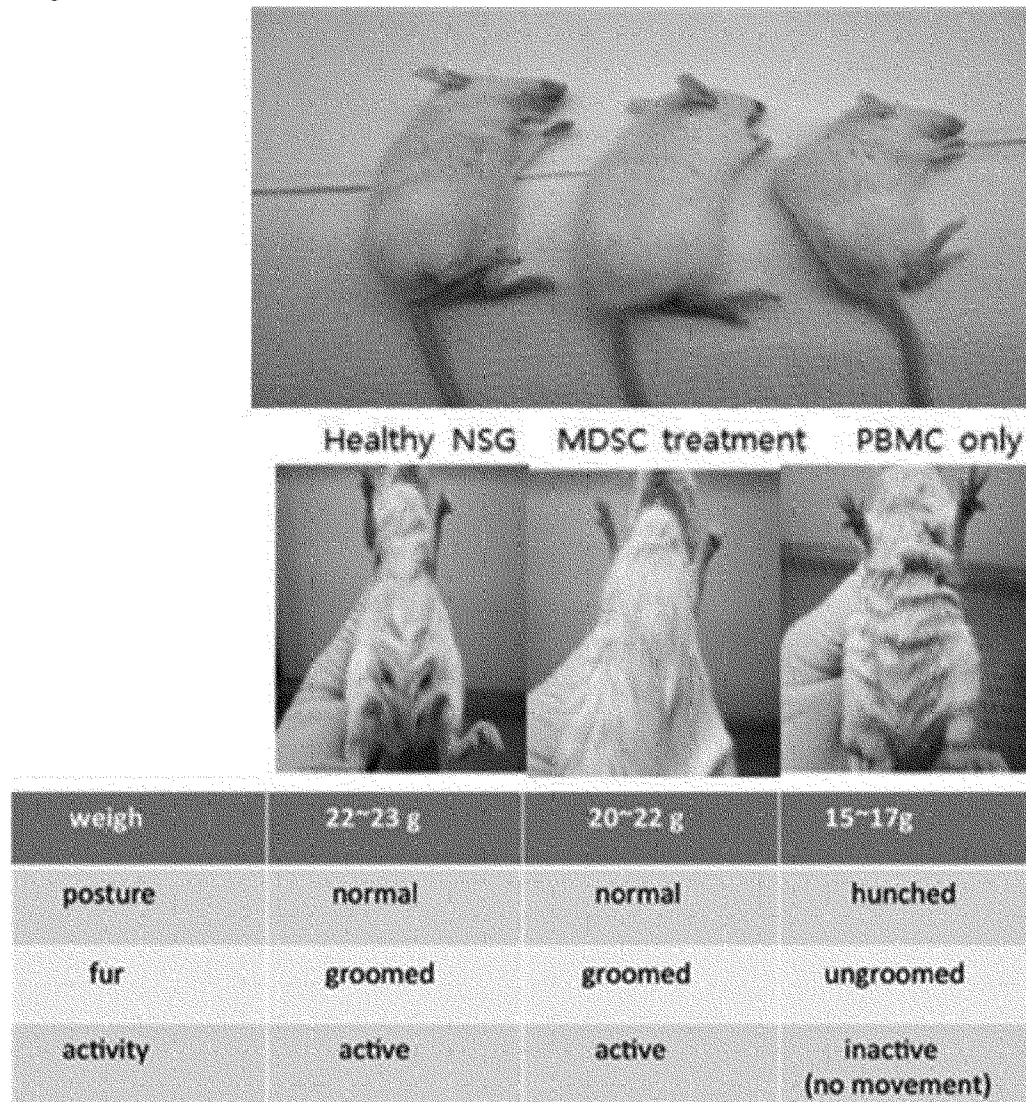
[Fig. 7c]



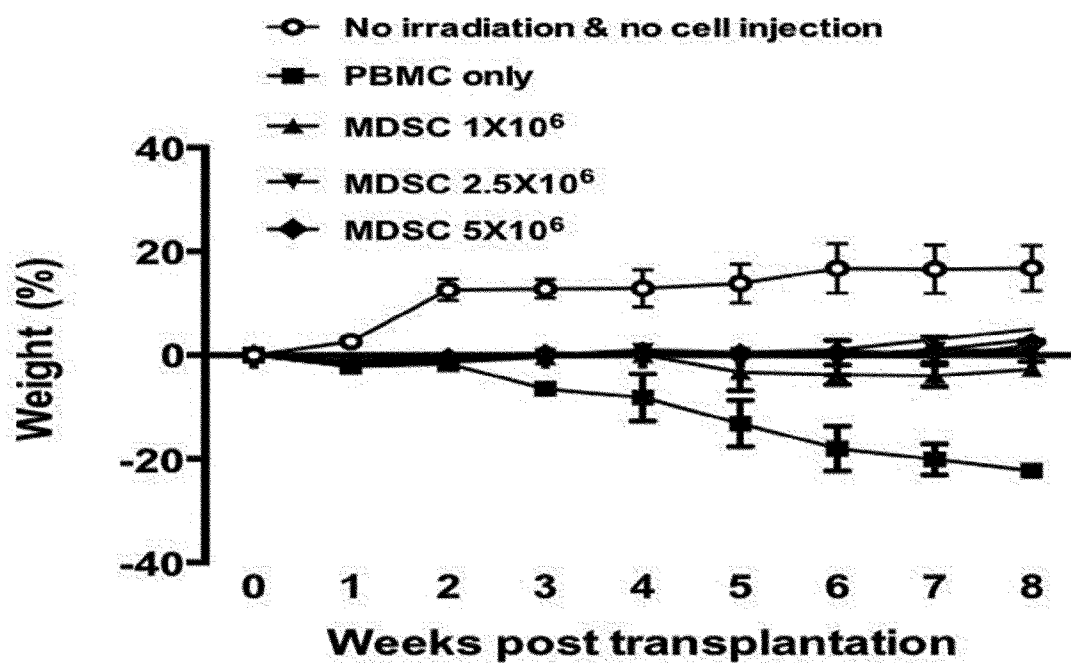
[Fig. 7d]



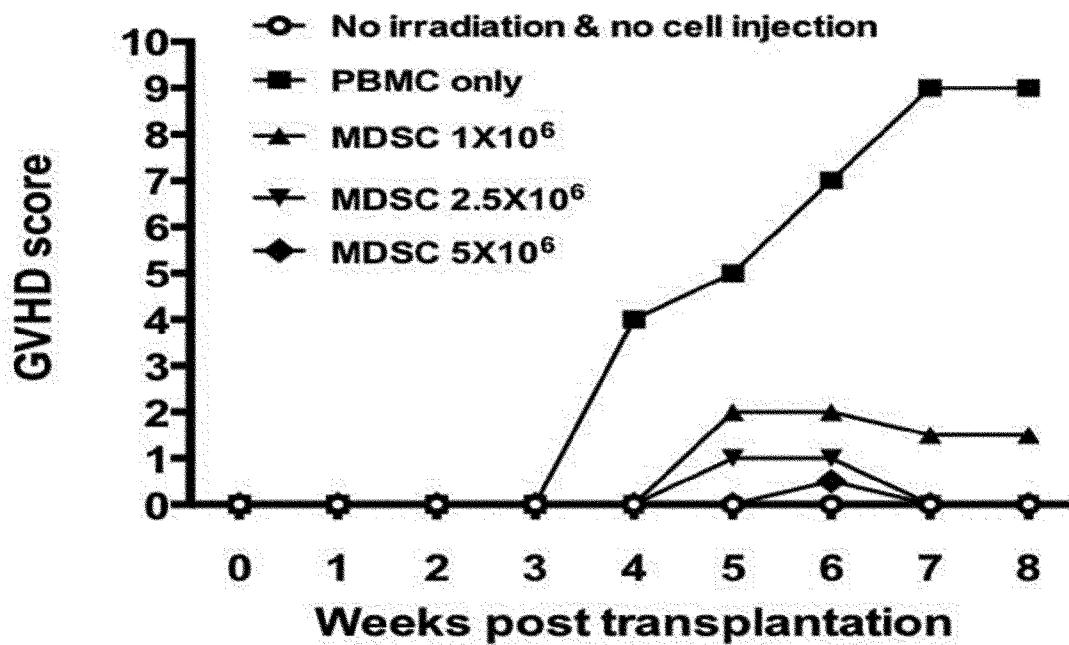
[Fig. 8a]



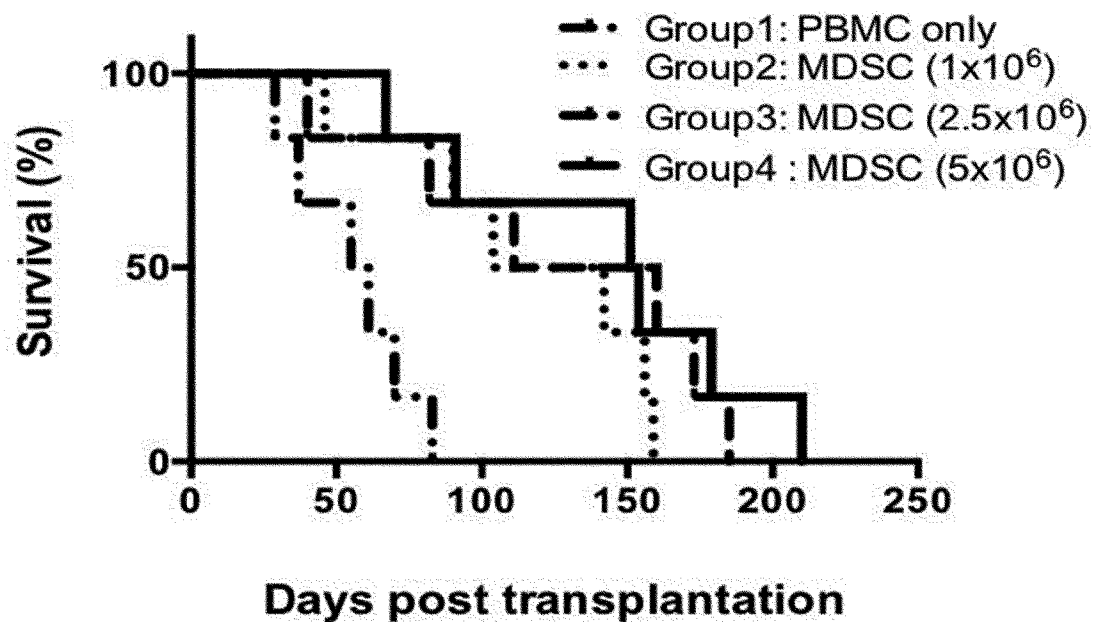
[Fig. 8b]



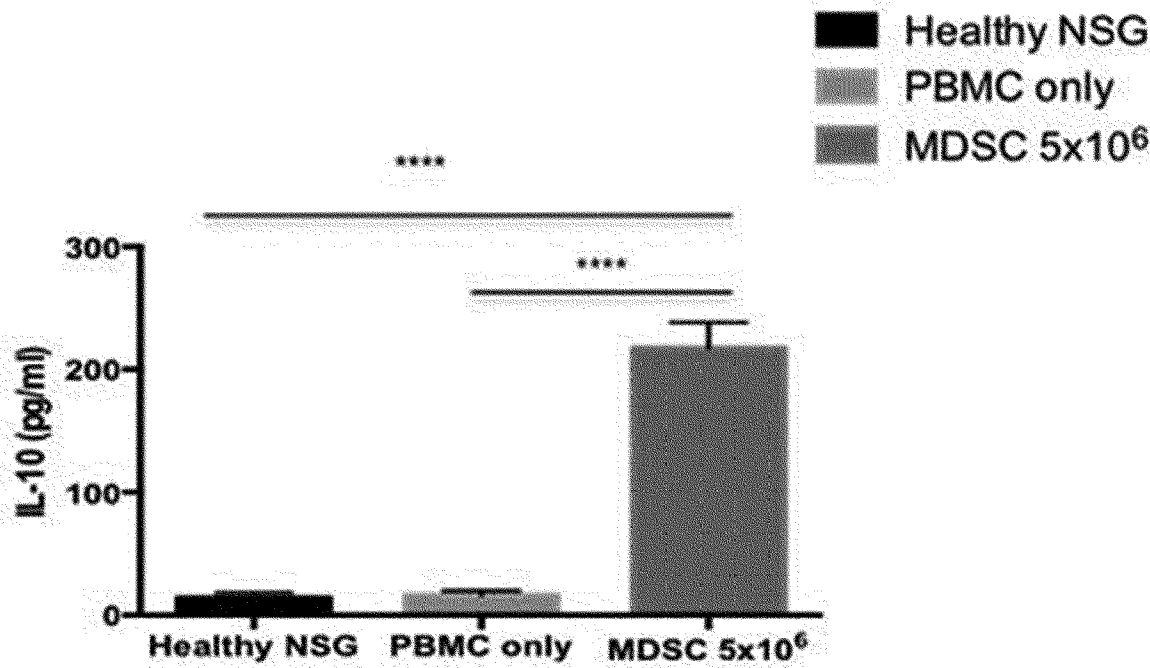
[Fig. 8c]



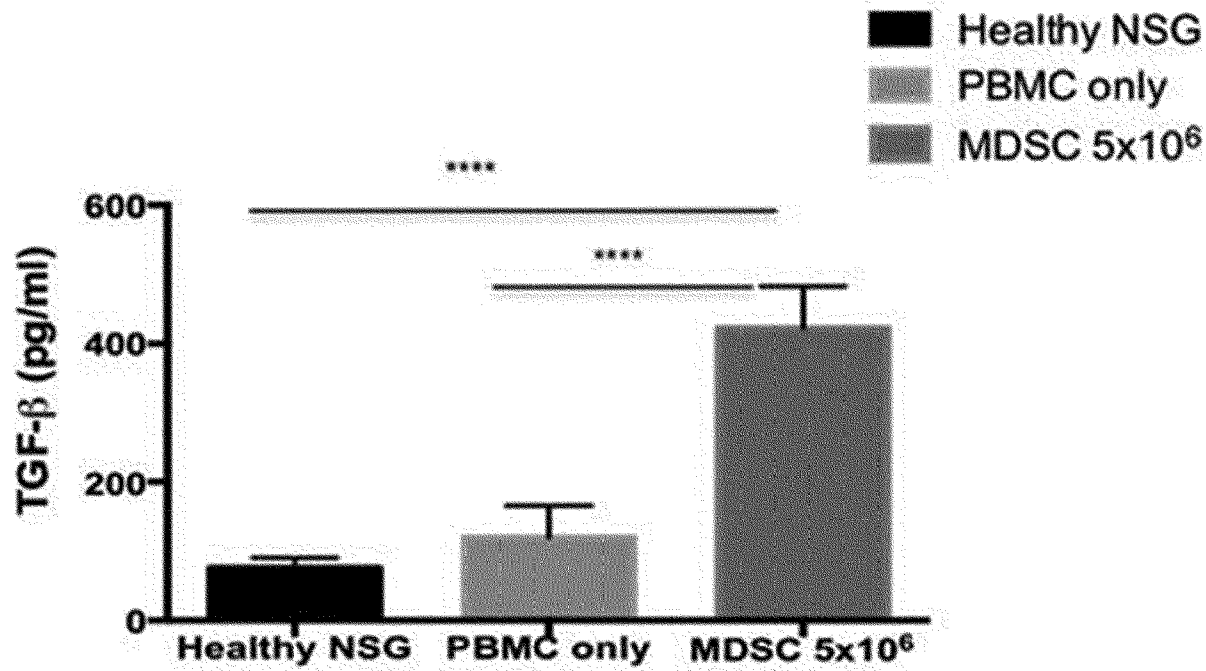
[Fig. 8d]



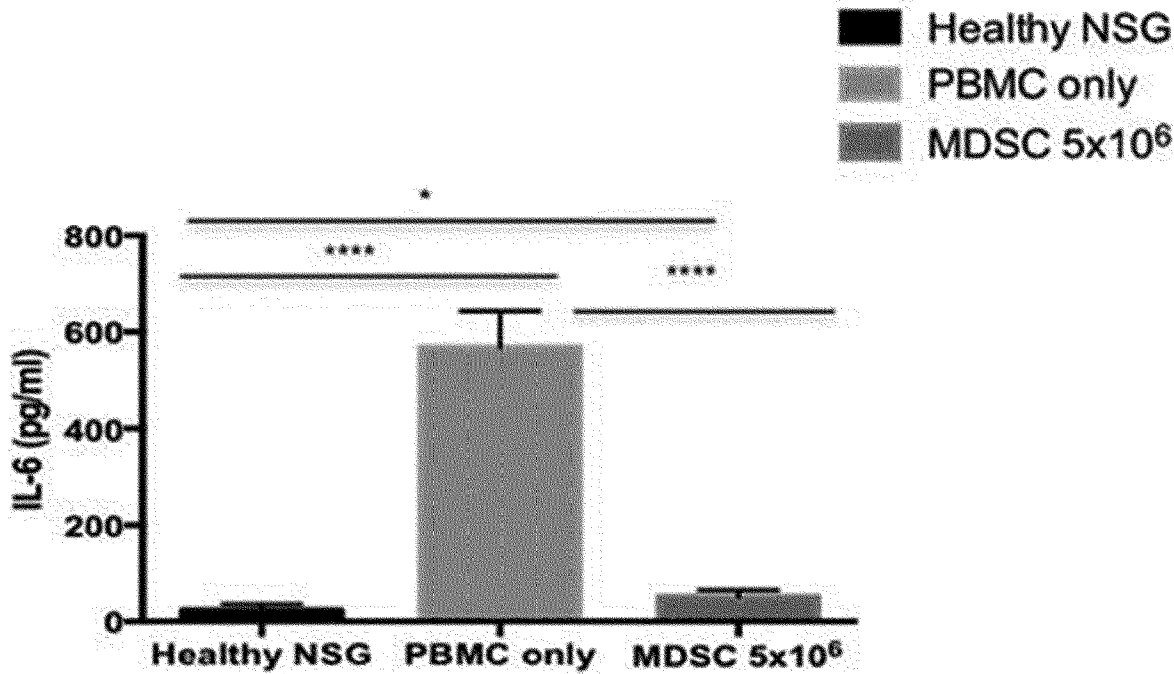
[Fig. 8e]



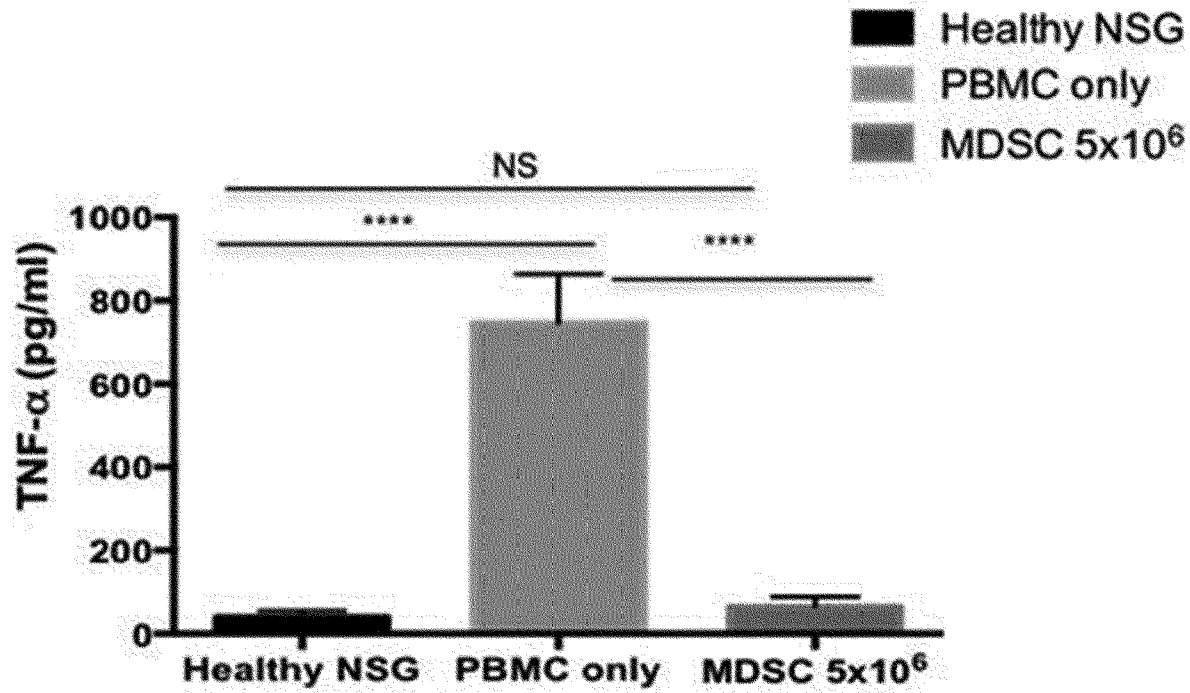
[Fig. 8f]



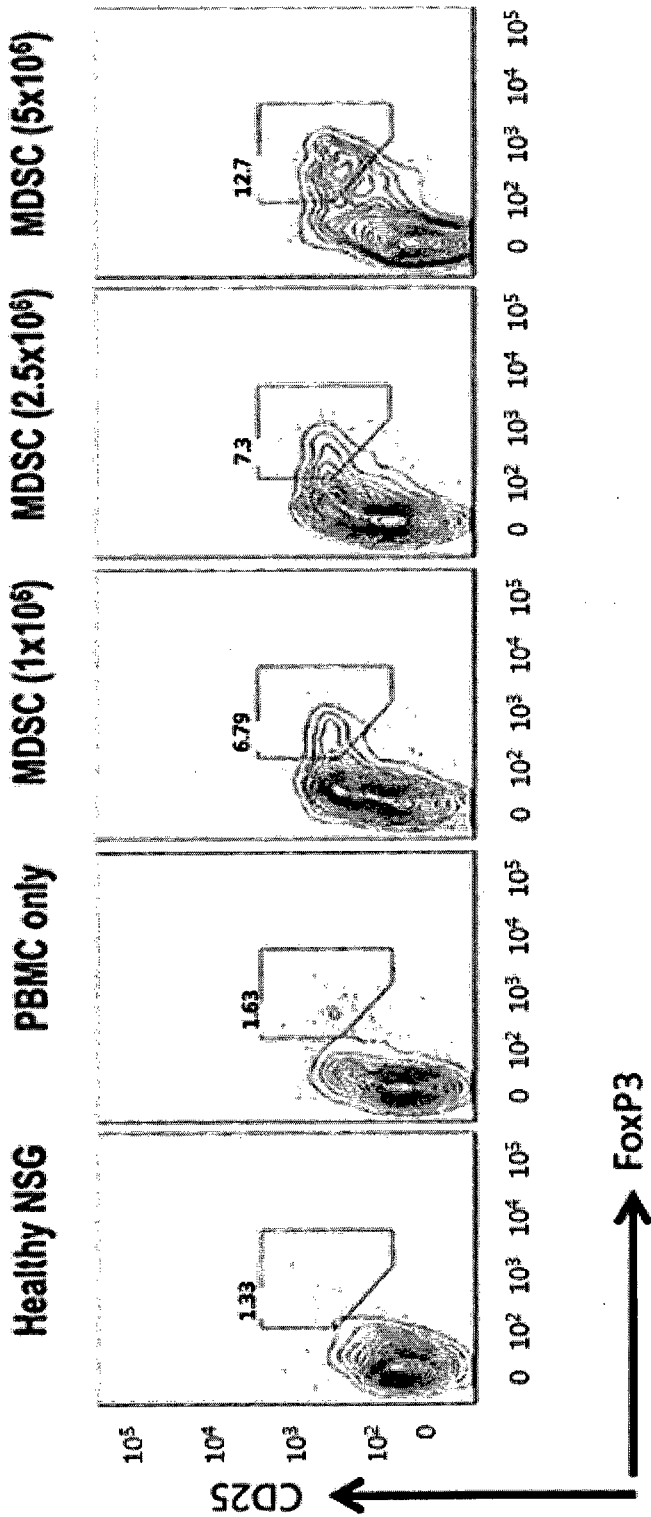
[Fig. 8g]



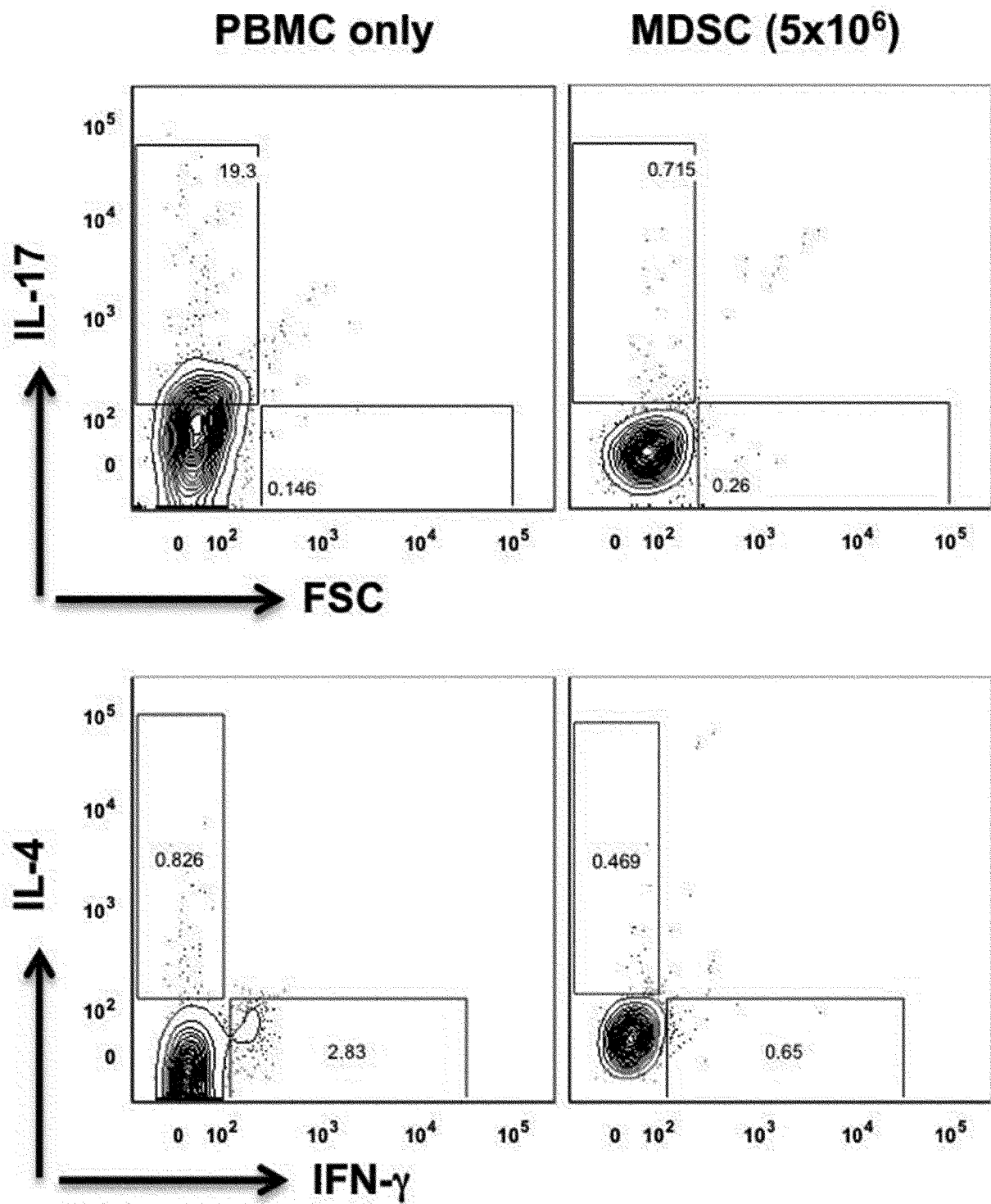
[Fig. 8h]



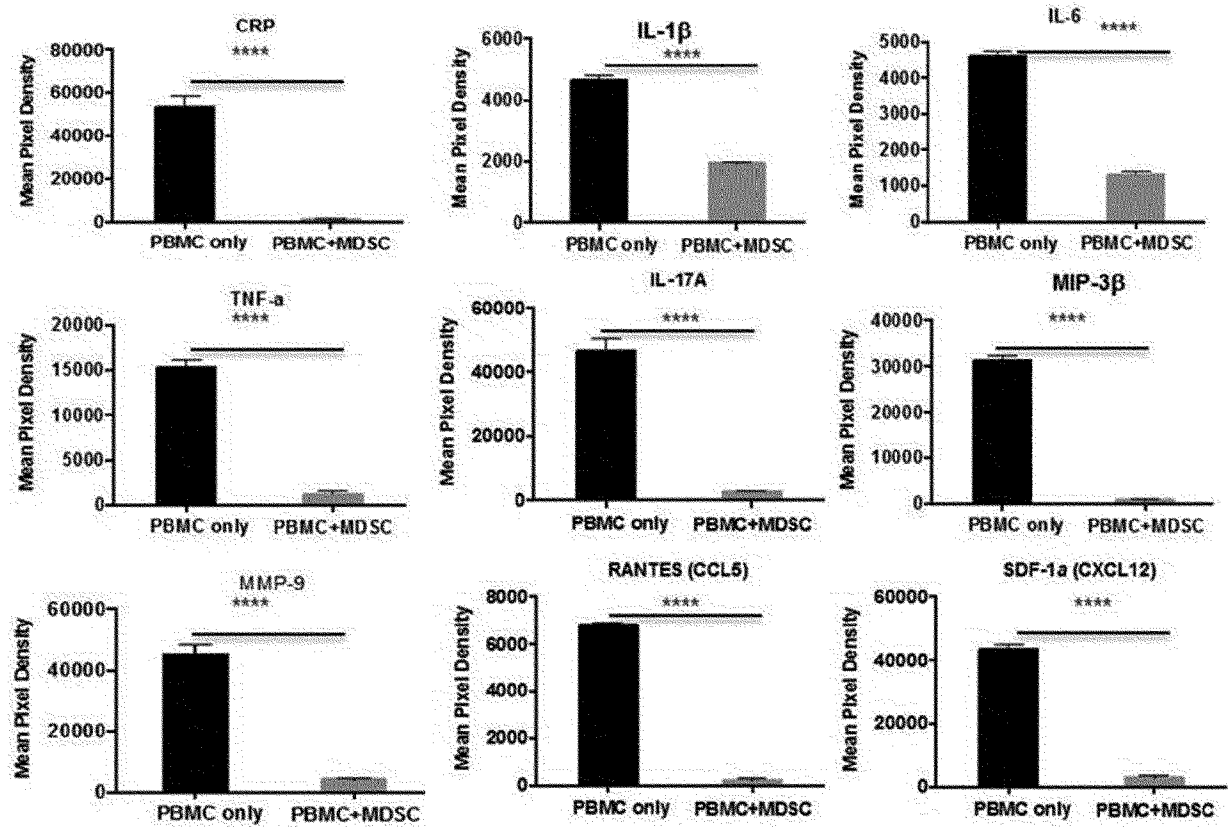
[Fig. 9]



[Fig. 10]



[Fig. 11]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/007912**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER****C12N 5/078(2010.01)i, A61K 35/15(2014.01)i**

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 5/078; C12N 5/06; C12N 5/02; A61K 35/20; A61K 31/565; C12Q 1/68; C12N 5/0789; A61K 35/15

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: GM-CSF, SCF, cord blood, CD34+, bone marrow-derived suppressor cell

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SRIVASTAVA, Minu K. et al., "Myeloid Suppressor Cells and Immune Modulation in Lung Cancer", Immunotherapy, March 2012, vol. 4, no. 3, pages 291-304 (inner pages 1-20) See abstract.	1-18
A	GABRILOVICH, Dmitry I. et al., "Myeloid-derived Suppressor Cells as Regulators of the Immune System", Nature Reviews Immunology, March 2009, vol. 9, no. 3, pages 162-174 (inner pages 1-26) See page 3.	1-18
A	KR 10-2005-0077746 A (LIFECORD INC.) 03 August 2005 See claim 1.	1-18
A	KR 10-2013-0054702 A (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION) 27 May 2013 See claim 1.	1-18
A	WO 2009-042201 A1 (CELGENE CELLULAR THERAPEUTICS) 02 April 2009 See claims 1 and 6-8.	1-18



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 NOVEMBER 2016 (29.11.2016)

Date of mailing of the international search report

29 NOVEMBER 2016 (29.11.2016)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2016/007912

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2005-0077746 A	03/08/2005	CN 1918287 A	21/02/2007
		EP 1711598 A1	18/10/2006
		KR 10-0677054 B1	02/02/2007
		US 2007-0122902 A1	31/05/2007
		US 7816137 B2	19/10/2010
		WO 2005-073366 A1	11/08/2005
KR 10-2013-0054702 A	27/05/2013	KR 10-1494275 B1	24/02/2015
		KR 10-2013-0103468 A	23/09/2013
WO 2009-042201 A1	02/04/2009	AU 2008-305516 A1	02/04/2009
		CA 2700613 A1	02/04/2009
		CN 101978045 A	16/02/2011
		EP 2205719 A1	14/07/2010
		JP 2010-540530 A	24/12/2010
		JP 2015-042648 A	05/03/2015
		JP 5703493 B2	22/04/2015
		JP 5985569 B2	06/09/2016
		KR 10-1644659 B1	01/08/2016
		KR 10-1645311 B1	03/08/2016
		KR 10-2010-0091160 A	18/08/2010
		KR 10-2015-0090276 A	05/08/2015
		KR 10-2016-0092062 A	03/08/2016
		MX 2010003217 A	30/07/2010
		RU 2010-116271 A	10/11/2011
		US 2009-0104164 A1	23/04/2009

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 5/078(2010.01)i, A61K 35/15(2014.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 5/078; C12N 5/06; C12N 5/02; A61K 35/20; A61K 31/565; C12Q 1/68; C12N 5/0789; A61K 35/15

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: GM-CSF, SCF, 제대혈, CD34+, 골수유래억제세포

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	SRIVASTAVA, MINU K. 등, 'Myeloid suppressor cells and immune modulation in lung cancer', Immunotherapy, 2012.03, 4권, 3호, 페이지 291-304 (내부 페이지 1-20) 초록 참조.	1-18
A	GABRILOVICH, DMITRY I. 등, 'Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system', Nature Reviews Immunology, 2009.03, 9권, 3호, 페이지 162-174 (내부 페이지 1-26) 페이지 3 참조.	1-18
A	KR 10-2005-0077746 A ((주)라이프코드) 2005.08.03 청구항 1 참조.	1-18
A	KR 10-2013-0054702 A (서울대학교산학협력단) 2013.05.27 청구항 1 참조.	1-18
A	WO 2009-042201 A1 (CELGENE CELLULAR THERAPEUTICS) 2009.04.02 청구항 1 및 6-8 참조.	1-18

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2016년 11월 29일 (29.11.2016)

국제조사보고서 발송일

2016년 11월 29일 (29.11.2016)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



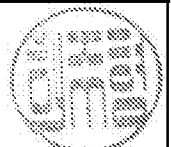
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-8150



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2005-0077746 A	2005/08/03	CN 1918287 A EP 1711598 A1 KR 10-0677054 B1 US 2007-0122902 A1 US 7816137 B2 WO 2005-073366 A1	2007/02/21 2006/10/18 2007/02/02 2007/05/31 2010/10/19 2005/08/11
KR 10-2013-0054702 A	2013/05/27	KR 10-1494275 B1 KR 10-2013-0103468 A	2015/02/24 2013/09/23
WO 2009-042201 A1	2009/04/02	AU 2008-305516 A1 CA 2700613 A1 CN 101978045 A EP 2205719 A1 JP 2010-540530 A JP 2015-042648 A JP 5703493 B2 JP 5985569 B2 KR 10-1644659 B1 KR 10-1645311 B1 KR 10-2010-0091160 A KR 10-2015-0090276 A KR 10-2016-0092062 A MX 2010003217 A RU 2010-116271 A US 2009-0104164 A1	2009/04/02 2009/04/02 2011/02/16 2010/07/14 2010/12/24 2015/03/05 2015/04/22 2016/09/06 2016/08/01 2016/08/03 2010/08/18 2015/08/05 2016/08/03 2010/07/30 2011/11/10 2009/04/23