



등록특허 10-2768442



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년02월17일
(11) 등록번호 10-2768442
(24) 등록일자 2025년02월11일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0783 (2010.01) *A61K 35/17* (2025.01)
A61P 37/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 5/0637 (2025.01)
A61K 35/17 (2025.01)
- (21) 출원번호 10-2018-7009677
- (22) 출원일자(국제) 2016년09월06일
심사청구일자 2021년09월03일
- (85) 번역문제출일자 2018년04월05일
- (65) 공개번호 10-2018-0054663
- (43) 공개일자 2018년05월24일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2016/070991
- (87) 국제공개번호 WO 2017/042170
국제공개일자 2017년03월16일
- (30) 우선권주장
15306366.4 2015년09월07일
유럽특허청(EPO)(EP)
- (56) 선행기술조사문헌
X.L. Li. et al. The Journal of Immunology (2010) 185(2):823-833
Carole Guillonneau et al., The Journal of Clinical Investigation (2007) pp.1096-1106
WO2015150492 A1
WO2016009041 A1

(73) 특허권자
인스티튜트 내셔널 드 라 쌘테 에 드 라 리세르셰
메디칼르
프랑스, 75654 파리 세덱스 13, 101 뤼 드 툴비아
크
남트 유니베르시티
프랑스 애프-44000 낭뜨 께 드 뚜르빌 1
쌍트르 하스피탈리에 유니베르시떼 드 낭뜨
프랑스, 44000 낭뜨, 5 알레 드 일레 글로리에테

(72) 발명자
구일론뉴 캐롤
프랑스, 44093 낭뜨, 30 블러바드 장 모네,
유1064/인썸- 유니버시티 드 낭뜨
아네콘 이그나시오
프랑스, 44093 낭뜨, 30 블러바드 장 모네, 인썸
유엠알 1064
베지어 세브린
프랑스, 44093 낭뜨, 30 블러바드 장 모네, 인썸
유엠알 1064

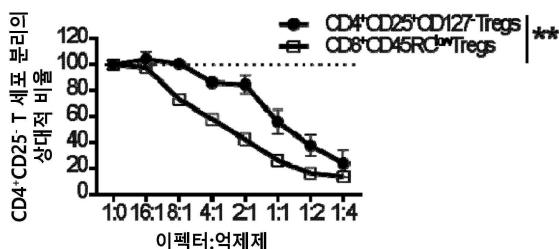
(74) 대리인
특허법인한얼

전체 청구항 수 : 총 15 항

심사관 : 이효진

(54) 발명의 명칭 CD8+CD45RC^{low} TREGS의 신규한 아집단 및 이들의 용도**(57) 요약**

본 발명은 CD8⁺CD45RC^{low} Tregs의 신규 아집단, 즉 CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포의 IFN⁺IL-10⁺IL-34⁺ 분비 집단, 이들의 분리 및 확장 방법, 및 약물로서, 보다 특히 면역 치료법을 위한 약물로서 및 바이오마커로서의 그들의 용도에 관한 것이다.

대 표 도

(52) CPC특허분류

A61P 37/00 (2018.01)
C12N 2501/2302 (2013.01)
C12N 2501/2315 (2013.01)
C12N 2501/51 (2013.01)
C12N 2501/515 (2013.01)
C12N 2501/727 (2013.01)
C12N 2501/999 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

IFN γ ⁺ IL-10⁺ IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺CD45RC^{low} T 조절(Treg) 세포의 분리된 집단.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 Treg 세포가 GITR⁺ 및/또는 Foxp3⁺인, 분리된 집단.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 Treg 세포가 키메라 항원 수용체(chimeric antigen receptor: CAR) 또는 키메라 자가항체 수용체(CAAR)를 포함하는 유전적으로 변형된 Treg 세포인, 분리된 집단.

청구항 4

인간 말초혈액 단핵세포(peripheral blood mononuclear cell: PBMC) 또는 림프구를 함유하는 생물학적 샘플로부터 IFN γ ⁺ IL-10⁺ IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포를 검출 및/또는 분리하는 방법으로서,

(a) 상기 인간 PBMC 또는 림프구의 집단을, 인간 CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포의 집단을 분리하는 데 유용한 수단과 접촉시키는 단계; 및

(b) (a) 단계에서 수득되는 인간 CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포의 분리된 집단을 IFN γ ⁺ IL-10⁺ IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포를 분리하는 데 유용한 수단과 접촉시키는 단계를 포함하고,

상기 인간 CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포의 집단을 분리하는 데 유용한 수단이 단클론성 항-인간 CD3 항체, 단클론성 항-인간 CD8 항체 및 단클론성 항-인간 CD45RC 항체로 이루어진 적어도 3개의 항체의 조합이고,

상기 IFN γ ⁺ IL-10⁺ IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포를 분리하는 데 유용한 수단이 IFN γ 와 CD3, CD8 및 CD45RC로부터 선택된 T 세포에 특이적인 세포 표면 분자에 결합하는 이중특이성 항체, IL-10과 CD3, CD8 및 CD45RC로부터 선택된 T 세포에 특이적인 세포 표면 분자에 결합하는 이중특이성 항체, 및 IL-34와 CD3, CD8 및 CD45RC로부터 선택된 T 세포에 특이적인 세포 표면 분자에 결합하는 이중특이성 항체로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 2개의 이중특이성 항체의 조합인, 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 Treg 세포가 GITR⁺ 및/또는 Foxp3⁺이고, GITR⁺ 및/또는 Foxp3⁺ CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포의 집단을 분리하는 데 유용한 수단이 항-인간 GITR 항체를 포함하는, 방법.

청구항 6

IFN γ ⁺ IL-10⁺ IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포를 확장시키는 방법으로서, IFN γ ⁺ IL-10⁺ IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포의 분리된 집단을 Treg 세포를 확장시키기에 적합한 배양 배지와 접촉시키는 단계를 포함하고, 상기 Treg 세포를 확장시키기에 적합한 배양 배지가 적어도 하나의 항원-특이적 자극제 및/또는 적어도 하나의 사이토카인을 포함하는, 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 Treg 세포가 GITR⁺ 및/또는 Foxp3⁺인, 방법.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 $\text{IFN}\gamma^+ \text{IL}-10^+ \text{IL}-34^+$ 분비 인간 $\text{CD8}^+ \text{CD45RC}^{\text{low}}$ Treg 세포의 분리된 집단이 동결되고, 이후 Treg 세포를 확장시키기에 적합한 배양 배지와 접촉되기 전에 해동되는, 방법.

청구항 9

제6항에 있어서, 상기 적어도 하나의 항원-특이적 자극제가 항원, 세포, MHC 폴리머 및 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 10

제6항에 있어서, 상기 배양 배지가 소정량의 인터류킨-2(IL-2) 및/또는 소정량의 인터류킨-15(IL-15)를 포함하는, 방법.

청구항 11

확장된 $\text{IFN}\gamma^+ \text{IL}-10^+ \text{IL}-34^+$ 분비 인간 $\text{CD8}^+ \text{CD45RC}^{\text{low}}$ Treg 세포의 분리된 집단.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 Treg 세포가 GITR^+ 및/또는 Foxp3^+ 인, 분리된 집단.

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 Treg 세포가 항원-특이적이고/이거나, CAR 또는 CAAR을 포함하는 유전적으로 변형된 Treg 세포인, 분리된 집단.

청구항 14

제1항에 따른 $\text{IFN}\gamma^+ \text{IL}-10^+ \text{IL}-34^+$ 분비 인간 $\text{CD8}^+ \text{CD45RC}^{\text{low}}$ Treg 세포의 분리된 집단 또는 제11항에 따른 확장된 $\text{IFN}\gamma^+ \text{IL}-10^+ \text{IL}-34^+$ 분비 인간 $\text{CD8}^+ \text{CD45RC}^{\text{low}}$ Treg 세포의 분리된 집단을 포함하는, 이식 거부반응, GVHD, 만성 염증성 질환, 자가면역 질환, 치료적 단백질에 대한 원하지 않은 면역 반응 또는 알러지의 예방 또는 치료가 필요한 환자에서 이를 예방 또는 치료하는 방법에 사용하기 위한 약학적 조성물.

청구항 15

환자가 이식 거부반응, GVHD, 만성 염증성 질환, 자가면역 질환, 치료적 단백질에 대한 원하지 않은 면역 반응 또는 알러지의 위험이 있는지를 측정하기 위한 시험관 내(*in vitro*) 방법으로서, 제4항에 따른 방법에 의해 상기 환자로부터 수득된 생물학적 샘플에서 $\text{IFN}\gamma^+ \text{IL}-10^+ \text{IL}-34^+$ 분비 인간 $\text{CD8}^+ \text{CD45RC}^{\text{low}}$ Treg 세포의 존재를 측정하는 단계를 포함하고, 여기에서 $\text{IFN}\gamma^+ \text{IL}-10^+ \text{IL}-34^+$ 분비 인간 $\text{CD8}^+ \text{CD45RC}^{\text{low}}$ Treg 세포의 존재가 이식 거부반응, GVHD, 만성 염증성 질환, 자가면역 질환, 치료적 단백질에 대한 원하지 않은 면역 반응 또는 알러지의 감소된 위험을 나타내는 것인, 방법.

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 인간 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Tregs의 고도의 억제성 아집단의 동정을 통한 세포 치료법 분야에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 면역억제성 양생법(regimen)은 이식체의 장기 생존 및 이식 받은 환자의 건강에 대한 중요한 장애물로 남아 있으며, 주로 이차효과 및 비-특이적 면역억제로 인해 지난 몇 년간 동종 이식 생존율의 향상이 정체되어 있다(Feng 2008). 인간에서 공여자 항체에 대한 우수한 억제 능력 및 특이성을 가진 조절 집단의 동정은 인간 이식 및 조절 T 세포(Treg)/이펙터 T 세포(Teff) 조절 장애를 가진 많은 질환에 있어 큰 관심의 대상이 된다.

[0003] 사실, Tregs가 다른 면역 세포의 활성을 급속히 억제한다는 점에서 $Foxp3^+$ Treg 세포 및 $CD45RC^{low}$ Tregs를 포함하는 조절 T 세포 또는 "Tregs"는 다양한 면역 반응을 조절하는데 있어 기본적인 것이다. 특히, Tregs는 자기 및 비-자기 항원에 대한 원하지 않은 면역 반응을 하향 조절함으로써 관용을 유지하는데 중요하다. 예를 들어, Treg 장애는 다발성 경화증(MS), 유형 I 당뇨병(TID), 건선, 중증 근무력증(MG) 및 다른 자가면역 질환을 가진 환자에서 발견되어 왔다. 또한, 아토피 및 알러지 질환에 대하여 유사한 관련성이 존재할 수 있다. 이러한 모든 질환에 대한 보고는 환자의 Treg 세포의 감소된 시험판 내 면역 억제를 나타내고 있다. 이는 자가면역 질환, 알러지, 항-치료학적 단백질 면역 반응(즉, 제8인자(factor VIII)) 및 이식-관련된 합병증의 치료 또는 예방을 위한 면역 치료에서 Tregs 사용의 가능성에 대한 관심을 증가시켰다.

[0004] 따라서, Treg 세포의 분리 집단을 수득하기 위해, $CD4^+$ 및 $CD8^+$ 이펙터 T 세포가 실질적으로 없는 고도의 억제 특성을 가진 Tregs 세포의 아집단에 대한 특별한 요구가 있다. 사실, 고도의 억제성 분리된 Tregs는 확장될 수 있고, 효과적으로 항원-특이적인 면역 관용을 유도하기 위해 관심이 있거나 유전적으로 변형된(예를 들어, 주어진 키메라 항체 수용체(또한, CAR로 불림)를 발현하기 위함 또는 키메라 T 세포 수용체(TCR)를 발현하기 위함) 항원으로 또는 다른 유형의 키메라 항원 수용체로 펄스(pulse)될 수 있다. 이러한 Treg 세포의 확장된 집단은 면역 시스템에 의한 자기 또는 치료학적 문자/조직의 분해를 회피하기 위해, 만성 염증, 자가면역, 알러지, 이식, 치료학적 단백질에 의한 치료 및 유전자 치료의 분야에서 특히 관심이 있다.

발명의 내용

발명의 요약

[0006] 첫번째 측면에서, 본 발명은 $IFN\gamma^+ IL-10^+ IL-34^+$ 분비 인간 $CD8^+ CD45RC^{low}$ T 조절(Treg) 세포의 분리 집단에 관한 것이다.

[0007] 두번째 측면에서, 본 발명은 인간 말초혈액 단핵세포(PBMCs) 또는 림프구를 함유하는 생물학적 샘플로부터 $IFN\gamma^+ IL-10^+ IL-34^+$ 분비 인간 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포를 검출 및/또는 분리하는 방법에 관한 것이고, 다음의 단계를 포함한다: (a) 상기 인간 PBMCs 또는 림프구의 집단을 인간 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포의 집단을 분리하는데 유용한 수단과 접촉시키는 단계; (b) (a) 단계에서 수득되는 인간 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포의 분리 집단을 $IFN\gamma^+ IL-10^+ IL-34^+$ 분비 인간 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포를 분리하는데 유용한 수단과 접촉시키는 단계.

[0008] 세번째 측면에서, 본 발명은 $IFN\gamma^+ IL-10^+ IL-34^+$ 분비 인간 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포의 분리 집단을 Treg 세포를

확장하기에 적합한 배양 배지와 접촉시키는 단계를 포함하는, IFN γ^+ IL-10 $^+$ IL-34 $^+$ 분비 인간 CD8 $^+$ CD45RC low Treg 세포를 확장하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 (i) 인간 말초혈액 단핵세포(PBMC) 또는 림프구를 함유하는 생물학적 샘플로부터 CD8 $^+$ GITR $^+$ Treg 세포를 분리하고, 선택적으로 인간 말초혈액 단핵 세포(PBMC) 또는 림프 구를 함유하는 생물학적 샘플로부터 CD8 $^+$ CD45RC low GITR $^+$ Treg 세포를 분리하는 단계, (ii) 선택적으로 동결하고, 이후에 분리된 Treg 세포를 해동하는 단계 및 (iii) 배지에서 상기 세포를 확장하는 단계를 포함하는, IFN γ^+ IL-10 $^+$ IL-34 $^+$ 분비 인간 CD8 $^+$ CD45RC low Treg 세포의 집단을 생성하는 방법에 관한 것이다.

[0009] 네번째 측면에서, 본 발명은 확장된 IFN γ^+ IL-10 $^+$ IL-34 $^+$ 분비 인간 CD8 $^+$ CD45RC low Treg 세포의 분리 집단에 관한 것이다.

[0010] 다섯번째 측면에서, 본 발명은 본 발명에 따른 IFN γ^+ IL-10 $^+$ IL-34 $^+$ 분비 인간 CD8 $^+$ CD45RC low Treg 세포(확장되거나 확장되지 않음)의 분리 집단을 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0011] 여섯번째 측면에서, 본 발명은 의약으로 사용하기 위한, 본 발명에 따른 IFN γ^+ IL-10 $^+$ IL-34 $^+$ 분비 인간 CD8 $^+$ CD45RC low Treg 세포의 분리 집단에 관한 것이다.

[0012] 일곱번째 측면에서, 본 발명은 이식 거부반응, GVHD(이식 편대 숙주 반응, graft versus host disease), 만성 염증성 질환, 자가면역 질환, 치료적 단백질에 대한 원하지 않은 면역 반응 또는 알러지의 예방 또는 치료가 필요한 개체에서 이를 예방 또는 치료하는 방법에서 사용하기 위한 본 발명에 따른 IFN γ^+ IL-10 $^+$ IL-34 $^+$ 분비 인간 CD8 $^+$ CD45RC low Treg 세포(확장되거나 확장되지 않음)의 분리 집단에 관한 것이다.

[0013] 마지막 측면에서, 본 발명은 환자가 이식 거부반응, GVHD, 만성 염증성 질환, 자가면역 질환, 치료적 단백질에 대한 원하지 않은 면역 반응 또는 알러지의 위험이 있는지 측정하기 위한 시험관 내(*in vitro*) 방법에 관한 것이고, 본 발명에 따른 방법에 의해 상기 환자로부터 수득된 생물학적 샘플에서 IFN γ^+ IL-10 $^+$ IL-34 $^+$ 분비 인간 CD8 $^+$ CD45RC low Treg 세포의 존재를 측정하는 단계를 포함하고, 여기에서 IFN γ^+ IL-10 $^+$ IL-34 $^+$ 분비 인간 CD8 $^+$ CD45RC low Treg 세포의 존재는 이식 거부반응, GVHD, 만성 염증성 질환, 자가면역 질환, 치료적 단백질에 대한 원하지 않은 면역 반응 또는 알러지의 위험의 감소를 나타내는 것이다.

발명의 상세한 설명

[0014] 본 발명은 CD8 $^+$ Tregs의 고도의 억제성 아집단의 동정으로부터 유래한다. 특히, 본 발명자는 CD8 $^+$ CD45RC low Tregs의 IFN γ^+ IL-10 $^+$ IL-34 $^+$ 분비하는 아집단의 고도의 억제성 아집단을 동정하였다. 본 발명자는 항-공여체 CD4 $^+$ CD25 $^-$ 이펙터 T 세포 반응에 대한 통상적인 CD4 $^+$ CD25 high CD127 low Tregs와 비교하여 이들의 우수한 잠재력 및 이들의 억제 활성에 있어 IFN γ , IL-10 및 IL-34의 역할을 입증하였다. 또한, 본 발명자는 IFN γ^+ IL-10 $^+$ IL-34 $^+$ 분비 CD8 $^+$ CD45RC low Tregs의 특이적인 확장 및 이식에서 인간화 마우스를 사용하여 인간 피부 이식 거부 반응 및 GVHD를 억제하기 위한 세포-기반의 치료법으로서 이들의 잠재력에 대하여 기재하였다.

본 발명의 Treg 세포 집단

[0015] 첫번째 측면에서, 본 발명은 CD8 $^+$ Tregs의 분리 집단, 특히 IFN γ^+ IL-10 $^+$ IL-34 $^+$ 분비 인간 CD8 $^+$ CD45RC low T 조절 (Treg) 세포의 분리 집단에 관한 것이다. 본 발명은 또한 IFN γ^+ IL-10 $^+$ IL-34 $^+$ 분비 인간 CD8 $^+$ CD45RC low T 조절 (Treg) 세포의 분리 집단에 관한 것이고, 여기에서 상기 Treg 세포는 GITR $^+$ 및/또는 Foxp3 $^+$ 이다.

[0016] 하나의 구현예에서, 본 발명은 CD8 $^+$ CD45RC low Tregs의 분리 집단에 관한 것이다. 하나의 구현예에서, 본 발명은 CD8 $^+$ GITR $^+$ Tregs의 분리 집단에 관한 것이다. 하나의 구현예에서, 본 발명은 CD8 $^+$ Foxp3 $^+$ Tregs의 분리 집단에 관한 것이다. 하나의 구현예에서, 본 발명은 CD8 $^+$ CD45RC low GITR $^+$ Tregs의 분리 집단에 관한 것이다. 하나의 구현예에서, 본 발명은 CD8 $^+$ CD45RC low Foxp3 $^+$ Tregs의 분리 집단에 관한 것이다. 하나의 구현예에서, 본 발명은

CD8⁺ GITR⁺ Foxp3⁺ Tregs의 분리 집단에 관한 것이다. 하나의 구현예에서, 본 발명은 CD8⁺ CD45RC^{low} GITR⁺ Foxp3⁺ Tregs의 분리 집단에 관한 것이다.

[0019] 하나의 구현예에서, 본 발명에 따른 CD8⁺ Tregs의 분리 집단은 IFN γ, IL-10 및 IL-34 중에서 적어도 하나의 사이토카인을 분비한다. 따라서, 하나의 구현예에서, 본 발명에 따른 CD8⁺ Tregs의 분리 집단은 IFN γ 또는 IL-10 또는 IL-34를 분비한다.

[0020] 또 다른 구현예에서, 본 발명에 따른 CD8⁺ Tregs의 분리 집단은 IFN γ, IL-10 및 IL-34 중에서 적어도 2개의 사이토카인을 분비한다. 따라서, 하나의 구현예에서, 본 발명에 따른 CD8⁺ Tregs의 분리 집단은 IFN γ 및 IL-10, 또는 IFN γ 및 IL-34, 또는 IL-10 및 IL-34를 분비한다.

[0021] 또 다른 구현예에서, 본 발명에 따른 CD8⁺ Tregs의 분리 집단은 IFN γ, IL-10 및 IL-34를 분비한다.

[0022] 하나의 구현예에서, 상기에 기재된 CD8⁺ Tregs의 분리 집단은 IL-2 및/또는 TGF β-1를 추가로 분비한다.

[0023] 특히, 인간 CD8⁺ CD45RC^{low} T 조절 세포 중에서, 본 발명자는 IFN γ 및 IL-10 및 IL-34를 분비하는 CD8⁺ CD45RC^{low} T 조절 세포의 아집단을 동정하였다. 따라서, 하나의 구현예에서, 본 발명의 인간 CD8⁺ CD45RC^{low} Tregs는 IFN γ, IL-10 및 IL-34를 분비한다.

[0024] 하나의 구현예에서, 본 발명의 인간 CD8⁺ CD45RC^{low} Tregs는 IFN γ, IL-10 및 IL-34를 분비하고, GITR을 발현한다. 하나의 구현예에서, 본 발명의 인간 CD8⁺ CD45RC^{low} Tregs는 IFN γ, IL-10, 및 IL-34를 분비하고, Foxp3을 발현한다. 하나의 구현예에서, 본 발명의 인간 CD8⁺ CD45RC^{low} Tregs는 IFN γ, IL-10, IL-34 및 TGF β-1을 분비한다.

[0025] 또 다른 구현예에서, 본 발명의 인간 CD8⁺ CD45RC^{low} Tregs는 IFN γ, IL-10 및 IL-34를 분비하고, Foxp3 및 GITR을 발현한다. 하나의 구현예에서, 본 발명의 인간 CD8⁺ CD45RC^{low} Tregs는 IFN γ, IL-10, IL-34 및 TGF β-1을 분비하고, Foxp3을 발현한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 인간 CD8⁺ CD45RC^{low} Tregs는 IFN γ, IL-10, IL-34 및 TGF β-1을 분비하고, GITR을 발현한다.

[0026] 또 다른 구현예에서, 본 발명의 인간 CD8⁺ CD45RC^{low} Tregs는 IFN γ, IL-10, IL-34 및 TGF β-1을 분비하고, Foxp3 및 GITR을 발현한다.

[0027] 하나의 구현예에서, 상기에 기재된 인간 IFN γ⁺ IL-10⁺ IL-34⁺ 분비 CD8⁺ CD45RC^{low} Tregs는 IL-2를 분비한다.

[0028] 본 발명의 하나의 구현예에서, 상기에 기재된 CD8⁺ Tregs의 분리 집단은 저장되기 위해 동결될 수 있다. 본 발명의 특정 구현예에서, 상기에 기재된 IFN γ⁺ IL-10⁺ IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺ CD45RC^{low} Tregs의 분리 집단은 저장되기 위해 동결될 수 있다. 하나의 구현예에서, 상기에 기재된 인간 CD8⁺ Tregs의 분리 집단은 동결되었고 해동되었다. 특정 구현예에서, 상기에 기재된 IFN γ⁺ IL-10⁺ IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺ CD45RC^{low} Tregs의 분리 집단은 동결되었고 해동되었다.

[0029] 본 발명에서 사용된 용어, 이전에 억제 T 세포로 알려진, "조절 T 세포" 또는 "Tregs"는 면역 시스템을 조절하고, 자기-항원에 대한 관용을 유지하고, 자가면역 질환을 차단하는 T 세포의 아집단을 지칭한다. 이러한 세포들은 통상적으로 이펙터 T 세포의 유도 및 증식을 억제하거나 하향 조절한다.

[0030] 본 발명에서 사용된 용어 "집단"은 세포의 집단을 지칭하고, 여기에서 세포 전체 수의 과반수(예를 들어, 적어도 약 50%, 바람직하게 적어도 약 60%, 더 바람직하게 적어도 약 70% 및 보다 더 바람직하게 적어도 약 80%)는 관심 있는 세포의 명시된 특성을 가지고, 관심 있는 마커를 발현한다(예를 들어, 인간 CD8⁺ CD45RC^{low} Treg 세포의 집단은, 고도의 억제 기능을 가지고 IFN γ, IL-10, IL-34, Foxp3, GITR 또는 TGF β-1⁺와 같은 관심 있는 특정 마커를 발현하는, 적어도 약 50%, 바람직하게 적어도 약 60%, 더 바람직하게 적어도 약 70%, 보다 더 바람직

하게 적어도 약 80%의 세포를 포함한다). 본 발명에서 사용된, 용어 수치에서 선행하는 용어 "약"은 상기 수치 값의 플러스 또는 마이너스 10%를 의미한다.

[0031] 본 발명에서 사용된 용어 "분리(isolated)"는 자연적인 환경(예를 들어, 말초혈액)으로부터 격리되어, 분리되고 (isolated), 정제되고 또는 구분되는(separated) 세포 또는 세포 집단을 지칭하고, 자연적으로 존재하지만 분리된 세포를 기반으로 한 세포 표면 마커가 부족한 다른 세포들이 적어도 약 75% 없는(free), 80% 없는, 85% 없는 및 바람직하게 약 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 없는 세포 또는 세포 집단을 지칭한다.

[0032] 본 발명에서 사용된 용어 "마커"는 단백질, 당단백질 또는 세포의 표면 또는 세포 내에 발현되거나 세포에 의해 분비되는 임의의 다른 문자를 지칭하며, 이는 세포를 동정하는데 사용되어 도움을 줄 수 있다. 마커는 통상적으로 일반적인 방법에 의해 검출될 수 있다. 세포 표면 마커의 검출을 위해 사용될 수 있는 방법의 특정한, 비-제한적 예시는 면역세포화학, 형광 활성 세포 선별(FACS) 및 효소 분석법뿐만 아니라, 단백질의 mRNA를 검출하는 RT-PCR 및 문자 생물학적인 방법이다.

[0033] 본 발명에서 사용된 용어, 당업계에서 잘 알려진 "CD8"(분화클러스터 8)은 T 세포 수용체(TCR)를 위한 공동-수용체의 역할을 하는 막관통 당단백질을 지칭한다. 가능하기 위해, CD8은 CD8 체인의 쌍으로 구성되는 이량체를 형성한다. CD8의 가장 흔한 형태는 CD8- α 및 CD8- β 체인으로 구성된다. 자연적으로 발생하는 인간 CD8- α 단백질은 수탁번호(accession number) P01732 하에 UniProt 데이터베이스에서 제공된 아미노산 서열을 갖는다. 자연적으로 발생하는 CD8- β 단백질은 수탁번호 P10966 하에 UniProt 데이터베이스에서 제공된 아미노산 서열을 갖는다.

[0034] 본 발명에서 사용된 용어 "CD45"(LCA 또는 PTPRC로도 알려짐)는 이전 [Streuli *et al.*, 1996]에 기재된 상이한 아이소폼으로 존재하는 막관통 당단백질을 지칭한다. CD45의 개별적인 아이소폼은 CD45 세포외 영역의 부분을 코딩하는 3개의 가변성 엑손의 선택적인 스플라이싱으로부터 발생한 이들의 세포외 도메인 구조에 있어 상이하다. CD45의 다양한 아이소폼은 상이한 세포외 도메인을 갖지만, 약 300개 아미노산 잔기의 2개의 동종, 고도의 보존된 포스파타아제 도메인을 가진 동일한 막관통 및 세포질 부분을 갖는다. 자연적으로 발생하는 인간 CD45 단백질은 수탁번호 P08575 하에 UniProt 데이터베이스에서 제공된 아미노산 서열을 갖는다. 본 발명에서 사용된 용어 "CD45RC"는 티로신 포스파타아제 CD45의 엑손 6 스플라이싱 변이체(엑손 C)를 지칭한다. CD45RC 아이소폼은 B 세포 상에서, CD4 $^+$ 및 CD8 $^+$ T 세포의 서브 세트 상에서 발현된다.

[0035] 본 발명에서 사용된 용어 "인터페론 감마" 또는 "IFN γ " 또는 "IFNg" 또는 "유형 II 인터페론"은 당업계에 잘 알려져 있고, 선천성 및 후천성 면역에서 중요한 사이토카인을 지칭한다. 자연적으로 발생하는 인간 IFN γ 단백질은 수탁번호 P01579 하에 UniProt 데이터베이스에서 제공된 146개 아미노산의 아미노산 서열을 갖는다.

[0036] 본 발명에 따라, 본 발명의 IFN γ 분비 CD8 $^+$ Tregs는 적어도 약 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, 11000, 12000, 13000, 14000, 15000, 16000, 17000, 18000, 19000 또는 20000 pg/ml IFN γ 를 분비한다.

[0037] 본 발명에서 사용된 용어 "인터류킨-10" 또는 "IL-10"은 당업계에 잘 알려져 있고, 항-염증성 사이토카인을 지칭한다. 자연적으로 발생하는 인간 IL-10 단백질은 수탁번호 P22301 하에 UniProt 데이터베이스에서 제공된 178개 아미노산의 아미노산 서열을 갖는다.

[0038] 본 발명에 따라, 본 발명의 IL-10 분비 CD8 $^+$ Tregs는 적어도 약 0.1, 0.5, 1, 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900 또는 2000 pg/ml IL-10을 분비한다.

[0039] 본 발명에서 사용된 용어 "인터류킨-34" 또는 "IL-34"는 당업계에 잘 알려져 있고, 단핵구 및 대식세포의 증식, 생존 및 분화를 촉진하는 사이토카인을 지칭한다. 자연적으로 발생하는 인간 IL-34 단백질은 수탁번호 Q6ZMJ4 하에 UniProt 데이터베이스에서 제공된 242개 아미노산의 아미노산 서열을 갖는다.

[0040] 본 발명에 따라, 본 발명의 IL-34 분비 CD8 $^+$ Tregs는 적어도 약 0.1, 0.5, 1, 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900 또는 2000 pg/ml IL-34를 분비한다.

[0041] 본 발명에서 사용된 용어 "글루코코르티코이드-유도된 TNFR-관련 단백질" 또는 "GITR" 또는 "종양 괴사 인자 수용체 슈퍼페밀리 멤버 18" 또는 "TNFRSF18"은 당업계에 잘 알려져 있고, TNF 수용체 슈퍼페밀리의 표면 수용체

분자를 지칭한다. 자연적으로 발생하는 인간 GITR은 수탁번호 Q9Y5U5 하에 UniProt 데이터베이스에서 제공된 241개 아미노산의 아미노산 서열을 갖는다.

[0042] 본 발명에서 사용된 용어 "포크헤드 박스 P3" 또는 "Foxp3"는 당업계에 잘 알려져 있고, T 조절 세포의 전사 인자, 마커의 역할을 있다고 여겨지는 핵 단백질을 지칭한다. 자연적으로 발생하는 인간 Foxp3은 수탁번호 Q9BZS1 하에 UniProt 데이터베이스에서 제공된 431개 아미노산의 아미노산 서열을 갖는다.

[0043] 본 발명에서 사용된 용어 "형질전환 생장 인자 베타 1" 또는 "TGF β -1" 또는 "TGFb1"은 당업계에 잘 알려져 있고, 면역 시스템을 조절하는데 있어 중요한 역할을 하는 사이토카인을 지칭한다. 자연적으로 발생하는 인간 TGF β -1은 수탁번호 P01137 하에 UniProt 데이터베이스에서 제공된 390개 아미노산의 아미노산 서열을 갖는다.

[0044] 본 발명에 따라, 본 발명의 TGF β -1 분비 CD8 $^{+}$ Tregs는 적어도 약 0.1, 0.5, 1, 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900 또는 2000 pg/ml TGF β -1을 분비한다.

[0045] 본 발명에서 사용된 용어 "인터류킨-2" 또는 "IL-2"는 당업계에 잘 알려져 있고, 면역 활성화 및 항상성을 조절하는데 있어 중요한 역할을 하는 사이토카인을 지칭한다. 자연적으로 발생하는 인간 IL-2는 수탁번호 P60568 하에 UniProt 데이터베이스에서 제공된 153개 아미노산의 아미노산 서열을 갖는다.

[0046] 본 발명에 따라, 상기에 기재된 IL-2 분비 CD8 $^{+}$ Tregs는 적어도 약 0.1, 0.5, 1, 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 또는 2000 pg/ml IL-2를 분비한다.

[0047] 본 발명에 따라, 사이토카인 분비는 통상적으로 적어도 하나의 자극제로 활성화한 후의 세포 배양에서 측정된다. 자극제의 예시는 항원, 세포, MHC 폴리머, 항체 및 렉틴을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 하나의 구현예에서, 상기 적어도 하나의 자극제는 동종이형 항원 제시 세포, 항-CD3 항체 및/또는 항-CD8 항체, IL-2, PMA + 이오노마이신을 포함하는 군으로부터 선택된다.

[0048] 하나의 구현예에서, 사이토카인 분비는 통상적으로 배양의 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 또는 21일 후, 바람직하게 배양의 12, 13, 14, 15, 16 또는 17일 후, 더 바람직하게 배양의 14일 후에 측정된다. 또 다른 구현예에서, 사이토카인 분비는 통상적으로 약 2×10^5 , 3×10^5 또는 4×10^5 cells/ml로, 바람직하게 약 2.5×10^5 , 3×10^5 또는 3.5×10^5 cells/ml, 더 바람직하게 약 3×10^5 cells/ml로 시작된 배양에서 측정된다. 하나의 구현예에서, 사이토카인 분비는 약 3.5×10^5 cells/ml로 시작된 배양에서 배양의 14일 후에 측정된다.

[0049] 본 발명의 하나의 구현예에서, 본 발명의 CD8 $^{+}$ 인간 Tregs, 특히 상기에 기재된 IFN γ $^{+}$ IL-10 $^{+}$ IL-34 $^{+}$ 분비 인간 CD8 $^{+}$ CD45RC $^{\text{low}}$ T 조절(Treg) 세포는 하기에 추가로 기재되는 바와 같이, 바람직한 발현 산물을 코딩하기 위해 유전적으로 변형될 수 있다.

[0050] 용어 "유전적으로 변형된"은 세포가 비-변형된 본 발명의 CD8 $^{+}$ 인간 Tregs, 특히 IFN γ $^{+}$ IL-10 $^{+}$ IL-34 $^{+}$ 분비 인간 CD8 $^{+}$ CD45RC $^{\text{low}}$ Treg 세포에 자연적으로 존재하지 않는 핵산 분자, 또는 상기 본 발명의 CD8 $^{+}$ 인간 Tregs, 특히 IFN γ $^{+}$ IL-10 $^{+}$ IL-34 $^{+}$ 분비 인간 CD8 $^{+}$ CD45RC $^{\text{low}}$ Treg 세포에서 비-자연적인 상태(예를 들어, 증폭됨)로 존재하는 핵산 분자를 포함하는 것을 가리킨다. 핵산 분자는 상기 세포 또는 이의 원종(ancestor) 내로 도입되었을 수 있다.

[0051] 본 발명의 CD8 $^{+}$ 인간 Tregs, 특히 IFN γ $^{+}$ IL-10 $^{+}$ IL-34 $^{+}$ 분비 인간 CD8 $^{+}$ CD45RC $^{\text{low}}$ Treg 세포를 유전적으로 변형하기 위하여, 바이러스-매개된 유전자 전달, 비-바이러스-매개된 유전자 전달, 네이키드(naked) DNA, 물리적 처리 등과 같은 많은 접근이 사용될 수 있다. 이 목적을 위해, 핵산은 주로 재조합 바이러스, 플라스미드, 파지, 에피솜, 인공 염색체 등과 같은 벡터 내로 통합되었다. 유전자를 운반하는 핵산을 세포 내로 도입할 수 있는 수단의 예시는 DEAE-덱스트란, 리포펙션, 칼슘 포스페이트 또는 당업자에게 공지된 다른 방법을 사용한 미세주입법, 전기천공법, 형질도입 또는 형질주입을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0052] 본 발명의 특정 구현예에서, 본 발명의 CD8 $^{+}$ 인간 Tregs, 특히 IFN γ $^{+}$ IL-10 $^{+}$ IL-34 $^{+}$ 분비 인간 CD8 $^{+}$ CD45RC $^{\text{low}}$ Treg

세포는 바이러스 벡터(또는 제조합 바이러스) 또는 바이러스-유사 입자(VLP)와 같은 벡터 입자를 사용하여 유전적으로 변형된다. 이 구현예에서, 이종 핵산은 예를 들어, 이후에 본 발명의 CD8⁺ 인간 Tregs, 특히 IFN γ⁺ IL-10⁺ IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺ CD45RC^{low} Treg 세포를 감염시키는데 사용되는 재조합 바이러스 내로 도입된다. 재조합 바이러스의 상이한 유형, 특히 재조합 레트로바이러스가 사용될 수 있다. 레트로바이러스 감염은 세포의 게놈 내로 안정적인 통합을 가능하게 하므로, 레트로바이러스는 바람직한 벡터이다. 시험관 내뿐만 아니라 생체 내에서도 개체 내로 주입 후에, 램프구 확장은 전이유전자가 각 세포 분열에서 전달되기 위해 분리 동안 안정적으로 유지되는 것을 요구하기 때문에, 이는 중요한 성질이다. 사용될 수 있는 레트로바이러스 유형의 예시는 온코바이러스, 렌티바이러스 또는 스푸마바이러스 계열의 레트로바이러스이다. 온코바이러스 계열의 특정 예시는 슬로우 온코바이러스(slow oncovirus), MoMLV, ALV, BLV 또는 MMTV와 같은 비 발암유전자 캐리어(oncogene carriers) 및 RSV와 같은 패스트 온코바이러스(fast oncoviruses)이다. 렌티바이러스 계열의 예시는 HIV, SIV, FIV 또는 CAEV이다.

[0053] 결손 재조합 레트로바이러스를 제조하기 위한 기술은 문헌[WO 89/07150, WO 90/02806, 및 WO 94/19478]에 널리 기재되어 있었다. 이러한 기술들은 통상적으로 전이유전자를 포함한 레트로바이러스 벡터의 적절한 패키징 세포 주 내로의 도입, 이어서 생산된 바이러스의 회수를 포함하고, 상기 바이러스는 이들의 게놈에 전이유전자를 포함한다. 본 발명의 CD8⁺ 인간 Tregs, 특히 IFN γ⁺ IL-10⁺ IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺ CD45RC^{low} Treg 세포는 바이러스 상충액, 정제된 바이러스와 함께 배양, 상기 Treg 세포와 바이러스 패키징 세포의 공동-배양, 트랜스웰 기술 등에 의한 것과 같은 다양한 프로토콜을 사용하여 재조합 바이러스에 의해 감염될 수 있다.

[0054] 본 발명에서 사용된 용어 "바이러스-유사 입자"(VLP)는 바이러스 입자와 비슷한 구조를 지칭한다. 본 발명에 따른 바이러스-유사 입자는 바이러스 게놈의 전체 또는 부분, 통상적이고 바람직하게 바이러스 게놈의 복제적이고 감염되는 성분의 전체 또는 부분이 부족하기 때문에 비-복제적이다. 여기에서 사용된 용어 "비-복제적"은 VLP에서 포함되거나 포함되지 않은 게놈을 복제할 수 없는 것을 지칭한다. VLP는 당업계에 공지된, 예를 들어, 국제 특허 공개 WO 02/34893호에 개시된 기술에 따라 제조될 수 있다.

[0055] 본 발명의 CD8⁺ 인간 Tregs, 특히 IFN γ⁺ IL-10⁺ IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺ CD45RC^{low} Treg 세포를 유전적으로 변형하는데 사용되는 핵산은 폴리펩타이드(예를 들어, 단백질, 펩타이드 등), RNA 등을 포함하는 다양한 생물학적으로 활성인 산물을 코딩할 수 있다. 특정 구현예에서, 핵산은 면역-억제 활성을 가지는 폴리펩타이드를 코딩한다. 또 다른 구현예에서, 핵산은 세포에 독성이거나 조건부로 독성인 폴리펩타이드를 코딩한다. 바람직한 실시예는 HSV-1 TK, 사이토신 데아미나아제 등과 같은 티미딘 키나아제(뉴클레오시드 유사체 존재 하에 독성을 지님)를 포함한다.

[0056] 핵산의 또 다른 바람직한 카테고리는 관심 있는 항원에 특이적인 키메라 항원 수용체(CAR) 또는 자가-항원을 포함하는 키메라 자가항체 수용체(CAAR)와 같은 T 세포 수용체 또는 이들의 서브유닛 또는 기능적 등가물을 코딩하는 것이다. 예를 들어, 항원에 특이적인 재조합 TCRs 또는 CARs의 발현은, 면역 반응을 억제하기 위해 이를 필요로 하는 환자에서 이팩터 T 세포에 더 특이적이고 효과적으로 작용할 수 있는, 본 발명의 CD8⁺ 인간 Tregs, 특히 IFN γ⁺ IL-10⁺ IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺ CD45RC^{low} Treg 세포를 생산한다. 키메라 항원 수용체(CAR) 설계의 기본 원리는 광범위하게 기재되어 있었다(예를 들어, Sadelain *et al.*, 2013).

[0057] CARs는 스페이서/힌지(spacer/hinge) 및 막판통 도메인을 통해 세포내 신호전달 도메인에 통상적으로 연결되는 세포외 항원-인식 모이어티를 포함한다. "1세대" CARs의 세포내 신호전달 도메인은 T-세포 활성 모이어티만을 포함한다. "2세대" CARs의 세포내 도메인은 활성 모이어티와 동시에 공동-자극 모이어티, 예를 들어, CD3 ζ를 포함한다. 공동-자극 도메인의 예시는 ICOS, OX40 (CD134), CD28, 4-1BB (CD137), CD27 및 DAP10을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. "3세대" CARs의 세포내 도메인은 활성 모이어티와 동시에, CD28 및 OX40 또는 4-1BB와 같은 종양 괴사 인자 수용체(TNFr) 및 CD3 ζ의 조합과 같은 2개의 공동-자극 도메인을 포함한다.

[0058] CARs는 통상적으로 생존 및 증식 신호를 지원하기 위해 세포외 항원-결합 도메인을 공동자극 내부-도메인과 동시에 T-세포 수용체의 CD3-ζ 체인으로부터 유래된 세포내 신호전달 도메인과 융합시킴으로써 수득된다. CAR-변형된 T 세포는 환자의 MHC와 별개로 기능하고 임상적 용도를 위해 쉽게 생성될 수 있기 때문에, CAR 기반-접근과 함께 하기에 기재된 병원성 항원의 표적화는 유용하다.

[0059] CAARs는 자가면역 질환에 관여하고, 세포내 신호전달 도메인에 융합되는 자가 항원과 같은 세포외 자가 항원을 포함한다. CAAR의 세포내 신호전달 도메인의 예시는 CD137CD3 ζ 신호전달 도메인과 같은 T 또는 NK 수용체 신호

전달 도메인을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0060] 하나의 구현예에서, 본 발명의 CD8⁺ Tregs는 유전적으로 변형되고, 세포내 신호전달 분자와 연결된 적어도 하나의 CAR, 하나의 CAAR 및/또는 하나의 고유의 수용체를 발현한다. CAR의 예시는 1세대 CARs, 2세대 CARs, 3세대 CARs, 3개 이상의 신호전달 도메인(공동-자극 도메인 및 활성 도메인)을 포함하는 CARs, 및 억제성 CARs(iCARs)를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0061] 이에 따라, 하나의 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 CD8⁺ 인간 Tregs의 분리 집단, 특히 IFN γ ⁺ IL-10⁺ IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺ CD45RC^{low} Treg 세포의 분리 집단에 관한 것이고, 여기에서 상기 Treg 세포는 키메라 항원 수용체를 포함하도록 유전적으로 변형된 Treg 세포이다.

[0062] 본 발명에 따르면, 관심 있는 항원을 인식하는 CAR의 세포외 도메인은 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 같은, 상기 항원에 결합하는 수용체 또는 수용체의 단편을 포함할 수 있다. 본 발명에 따르면, CAR의 세포외 도메인은 인간 항체 또는 임의의 다른 종으로부터 기원된 항체를 포함할 수 있다.

[0063] 본 발명에서 사용된 용어, "항체 단편"은 항원의 에피토프와 특이적으로 상호작용할 수 있는 능력을 가진 항체의 적어도 하나의 부분을 지칭한다. 항체 단편의 예시는 Fab, Fab', F(ab')2, Fv 단편, scFv 항체 단편, 다이설 파이드-연결된 Fvs(sdFv), VH 및 CHI 도메인으로 구성되는 Fd 단편, 선형 항체, sdAb와 같은 단일 도메인 항체 (VL 또는 VH), 카멜리드(camelid) VHH 도메인, 경첩부(hinge region)에서 다이설파이드 브릿지(disulfide bridge)에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편과 같은 항체 단편으로부터 형성된 다중-특이성 항체, 및 항체의 분리된 CDR 또는 다른 에피토프 결합 단편을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0064] 또 다른 구현예에서, 본 발명의 CD8⁺ Tregs는 유전적으로 변형되고 기능적 T 세포 수용체(TCR) 및/또는 인간 백혈구 항원(HLA), 예를 들어 HLA 클라스 I 및/또는 HLA 클라스 II의 발현이 부족하다. 하나의 구현예에서, 기능적 TCR 및/또는 HLA가 부족한 본 발명의 유전적으로 변형된 CD8⁺ Tregs는 동종이형 Tregs이다.

본 발명의 Treg 세포를 포획하는 수단:

[0066] 상기에 기재된 바와 같은 본 발명의 CD8⁺ 인간 Tregs의 아집단, 특히 CD8⁺ CD45RC^{low} Treg 세포의 아집단은 그들의 세포 표면 마커 및 그들의 IFN γ , IL-10 및 IL-34를 생산하는 능력에 의해 작용적으로 특징 지어질 수 있다.

[0067] 두번째 측면에서, 본 발명은 인간 말초혈액 단핵세포(PBMCs) 또는 림프구를 함유하는 생물학적 샘플로부터 상기에 기재된 바와 같은 CD8⁺ 인간 Tregs의 아집단, 특히 IFN γ ⁺ IL-10⁺ IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺ CD45RC^{low} Treg 세포의 아집단을 검출 및/또는 분리하는 방법에 관한 것이고, 다음의 단계를 포함한다: (a) 상기 인간 PBMC 또는 림프구의 집단을 인간 CD8⁺ CD45RC^{low} Treg 세포의 집단을 분리하는데 유용한 수단, 선택적으로 GITR⁺ 및/또는 Foxp3⁺ CD8⁺ CD45RC^{low} Treg 세포의 집단을 분리하는데 유용한 수단과 접촉시키는 단계; (b) (a) 단계에서 수득되는 인간 CD8⁺ CD45RC^{low} Treg 세포의 분리 집단을 IFN γ ⁺ IL-10⁺ IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺ CD45RC^{low} Treg 세포를 분리하는데 유용한 수단과 접촉시키는 단계.

[0068] 본 발명은 또한 인간 말초혈액 단핵세포(PBMCs) 또는 림프구를 함유하는 생물학적 샘플로부터 IFN γ ⁺ IL-10⁺ IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺ CD45RC^{low} Treg 세포를 검출 및/또는 분리하는 방법에 관한 것이며, 상기 Treg 세포는 선택적으로 GITR⁺ 및/또는 Foxp3⁺이고, 다음의 단계를 포함한다: (a) 상기 인간 PBMCs 또는 림프구의 집단을 인간 CD8⁺ CD45RC^{low} Treg 세포의 집단을 분리하는데 유용한 수단, 선택적으로 GITR⁺ 및/또는 Foxp3⁺ CD8⁺ CD45RC^{low} Treg 세포의 집단을 분리하는데 유용한 수단과 접촉시키는 단계; (b) (a) 단계에서 수득되는 인간 CD8⁺ CD45RC^{low} Treg 세포의 분리 집단을 IFN γ ⁺ IL-10⁺ IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺ CD45RC^{low} Treg 세포를 분리하는데 유용한 수단과 접촉시키는 단계.

[0069] 하나의 구현예에서, 본 발명의 방법의 (b) 단계는 (a) 단계에서 수득되는 인간 CD8⁺ CD45RC^{low} Treg 세포의 분리 집단을 GITR, Foxp3 및 TGF β -1 중 적어도 하나를 또한 발현하는 IFN γ ⁺ IL-10⁺ IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺ CD45RC^{low} Treg 세포를 분리하는데 유용한 수단과 접촉시키는 단계를 포함한다.

- [0070] 또 다른 구현예에서, 본 발명의 방법의 (b) 단계는 (a) 단계에서 수득되는 인간 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포의 분리 집단을 Foxp3 및 GITR, 또는 Foxp3 및 TGF β -1, 또는 GITR 및 TGF β -1을 또한 발현하는 IFN $\gamma^+ IL-10^+ IL-34^+$ 분비 인간 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포를 분리하는데 유용한 수단과 접촉시키는 단계를 포함한다.
- [0071] 또 다른 구현예에서, 본 발명의 방법의 (b) 단계는 (a) 단계에서 수득되는 인간 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포의 분리 집단을 GITR 및 Foxp3 및 TGF β -1을 또한 발현하는 IFN $\gamma^+ IL-10^+ IL-34^+$ 분비 인간 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포를 분리하는데 유용한 수단과 접촉시키는 단계를 포함한다.
- [0072] 하나의 구현예에 따르면, 본 발명의 방법의 (a) 단계에서 인간 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포의 집단의 분리는 본 발명의 $CD8^+ Treg$ 세포의 활성화를 필요로 하지 않는다. 하나의 구현예에 따르면, 본 발명의 방법의 (b) 단계에서 본 발명의 IFN $\gamma^+ IL-10^+ IL-34^+$ 분비 인간 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포의 분리는 (a) 단계에서 수득되는 인간 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포의 분리 집단을 적어도 하나의 자극제로 자극한 후, 수행된다. 자극제의 예시는 상기에 기재되어 있다.
- [0073] 본 발명에서 사용된 바와 같이, 용어 "생물학적 샘플"은 말초혈액 단핵세포 "PBMCs" 또는 림프구를 함유하는 임의의 체액 또는 조직을 지칭한다. 본 발명의 맥락 내에서, "PBMC 또는 림프구 함유 유체(fluid)"는 혈액(전혈(whole blood) 샘플, 혈청 샘플 또는 플라스마 샘플) 및 활액(synovial fluid)을 포함한다. "림프구 함유 조직"은 비장, 흉선, 림프절, 골수, 페이어 패치(Peyer's patches) 및 편도를 포함한다.
- [0074] 하나의 구현예에서, 본 발명의 방법은 유도만능 줄기세포(induced pluripotent stem cells, iPSC) 또는 iPSC 유도된 $CD34^+$ 세포의 배양물로부터 상기에 기재된 바와 같은 IFN $\gamma^+ IL-10^+ IL-34^+$ 분비 인간 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포를 수득 및/또는 분리하기 위한 것이다. 본 발명의 맥락 내에서, iPSC 또는 iPSC 유도된 $CD34^+$ 세포의 배양물은 예를 들어, 인간 말초혈액 단핵세포(PBMCs)를 함유하는 생물학적 샘플로부터 수득될 수 있다.
- [0075] (a) 및 (b) 단계에서, 관심 있는 인간 세포의 집단의 분리는, 유세포 분석법, 마그네틱 비드, 생분해성 비드, 비-생분해성 비드로 표지된 항체로의 친화도 방법(affinity method), 및 이러한 방법의 조합을 사용한 고효율 세포 분류(high-throughput cell sorting)와 같은 면역선택 기술을 포함하는, 당업자에게 이용가능한 특정 면역 세포 집단을 검출하기 위한 다양한 방법에 의해 수행될 수 있다.
- [0076] 본 발명에서 사용되는 바와 같이, 용어 "유세포 분석법"은 유체의 흐름에 관심 있는 세포들을 혼탁시키고, 이들을 전자 검출 장치에 통과시킴으로써, 이들의 수를 계산하기 위한 기술을 지칭한다. 유세포 분석법은 형광 파라미터와 같은, 초당 수천개 입자의 물리적 및/또는 화학적 파라미터의 동시 다중 파라미터 분석(multiparametric analysis)을 가능하게 한다. 현대의 유세포 분석기는 일반적으로 다수의 레이저 및 형광 검출기를 가지고 있다. 유세포 분석 기술의 일반적인 변이는, 관심 있는 집단을 정제하거나 검출하기 위해, "형광-활성화된 세포 분류(fluorescence-activated cell sorting)"를 사용하여, 입자들의 특성에 기초하여 이들을 물리적으로 분류하기 위한 것이다.
- [0077] 본 발명에서 사용된 바와 같이, "형광-활성화된 세포 분류"(FACS)는 생물학적 샘플로부터 세포의 이종 혼합물을, 각 세포의 특이적인 빛 산란 및 형광 특성에 기초하여, 2개 이상의 용기 내로, 한번에 하나의 세포를 분류하기 위한 유세포 분석법을 지칭한다. FACS는 개별적인 세포로부터의 형광 신호의 빠르고 객관적이고 정량적인 기록뿐만 아니라 특히 관심 있는 세포의 물리적인 분리를 제공한다. 그에 따라, 예를 들어 인간 $CD8^+ Treg$ 세포를 분리하기 위해, FACS는 본 발명에 기재된 방법과 함께 사용될 수 있다.
- [0078] 대안적으로, 본 발명의 인간 $CD8^+$ 인간 Tregs, 특히 본 발명에 따른 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포의 분리는 마그네틱 비드와 같은, 비드 기반 분류 방법을 사용하여 수행될 수 있다.
- [0079] 이러한 방법을 사용하여, 세포는 특정한 세포-표면 마커에 대하여 양성적으로 또는 음성적으로 구분되고 분리될 수 있다. 본 발명에서 정의한 바와 같이, "양성 선택"은 특이적인 세포-표면 마커를 발현하는 세포를 분리하고 검출시키는 기술을 지칭하고, 반면에 "음성 선택"은 특이적인 세포-표면 마커를 발현하지 않는 세포를 분리하고 검출하는 기술을 지칭한다. 몇몇의 구현예에서, 비드는 시판중인 비드 접합 키트와 같은 당 업계에 알려진 표준 기술을 사용하여 당업자에 의해 항체로 코팅될 수 있다. 몇몇의 구현예에서, 음성 선택 단계는 하나 이상의 계

통(lineage) 마커를 발현하는 세포를 제거하기 위해 수행되고, 이어서 관심 있는 인간 Treg 세포(즉, 상기에 기재된 바와 같은 IFN γ ⁺ IL-10⁺ IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺CD45RC^{low} Tregs)를 양성적으로 선택하기 위해 형광-활성화된 세포 분류한다.

[0080] 따라서, 하나의 구현예에서, 본 발명의 방법은 다음을 포함한다: (a) 인간 PBMCs 또는 램프구의 집단을 비-CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포를 고갈시키기에 유용한 수단과 접촉시키는 단계; (b) (a) 단계에서 수득되는 인간 CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포의 분리 집단을 IFN γ ⁺IL-10⁺IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포를 분리하는데 유용한 수단과 접촉시키는 단계.

[0081] 일반적으로, 인간 CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포의 집단과 같은 세포의 집단을 분리하는데 유용한 수단은 적합한 세포 표면 분자 또는 마커에 대한 결합 파트너(항체와 같은 것)이다.

[0082] 특이적인 결합 파트너는 포획 모이어티(capture moiety) 및 라벨 모이어티(label moiety)를 포함한다. 포획 모이어티는 직접적으로 또는 간접적으로 세포 및 산물 모두에 부착하는 것이다. 라벨 모이어티는 산물에 부착하는 것이고, 직접적으로 또는 간접적으로 표지될 수 있다. 특이적인 결합 파트너는, 산물 및 이의 결합 파트너 간의 비교적 높은 친화도 및 특이성이 있고, 표지(labelling) 또는 세포 분리 기술 동안 산물:파트너 복합체가 검출되기 위한 산물:파트너 복합체의 해리가 비교적 느린, 임의의 모이어티를 포함한다.

[0083] 포획 모이어티는 선택적으로 연결 모이어티(linking moiety)를 통해 고정 수단("앵커 모이어티"(anchor moiety))에 결합될 수 있고, 또한 이용 가능한 포획 모이어티의 수를 증가시키고, 그에 따라 예를 들어 변형된 텍스트란 분자, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 폴리바이닐 알코올 및 폴리바이닐피롤리돈을 포함하는 분자 중합체와 같은 산물의 포획의 가능성을 증가시키는 연결 모이어티를 포함할 수 있다.

[0084] 항체와 같은 포획 모이어티에 접합될 수 있는 라벨 모이어티는 당업자에게 잘 알려져 있다. 예를 들어, 32 P, 35 S 또는 3 H와 같은 방사선 동위 원소; 플루오레세인(FITC), 로다민, 텍사스 레드, 피코에리트린(PE), 알로피코시아닌, 페리니딘-엽록소-단백질 복합체(PerCP), 6-카르복시플루오레세인(6-FAM), 2', 7'-디메톡시-4', 5'-디클로로-6-카르복시플루오레세인(JOE), 6-카르복시-X-로다민(6-ROX), 6-카르복실-2', 4', 7', 4, 7-헥사클로로플루오레세인(HEX), 5-카르복시플루오레세인(5-FAM) 또는 N, N, N', N'-테트라메틸-6-카르복시로다민(TAMRA)와 같은 형광 또는 발광 마커; F(ab)2 단편과 같은 항체 또는 항체 단편; 바이오틴, 아비딘, 아가로스, 뼈 형성 단백질(BMP), 매트릭스 바운드(matrix bound), 합텐과 같은 친화도 라벨(affinity label); 및 알칼린 포스파타제(AP) 및 홀스래디쉬 퍼옥시다제(HRP)와 같은 효소 또는 효소 기질.

[0085] 적합한 세포 분자는 CD3(T 세포(활성화)), CD8 및 CD45RC와 같은 인간 CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포의 세포 표면 마커뿐만 아니라, CD8⁺ T 세포들에 대하여 특이적인 다른 CD 마커 또는 세포 부착 분자를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0086] 본 발명의 하나의 구현예에서, (a) 단계에서 인간 CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포의 집단을 분리하는데 유용한 수단은 인간 CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포의 집단을 분리하는데 유용한 항체들이다.

[0087] 본 발명의 하나의 구현예에서, (a) 단계에서 인간 CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포의 집단을 분리하는데 유용한 수단은 단일클론 항-인간 CD3 항체, 단일클론 항-인간 CD8 항체 및 단일클론 항-인간 CD45RC 항체로 구성되고, 선택적으로 항-인간 GITR 항체(바람직하게는 단일클론 항-인간 GITR 항체)를 추가로 포함하는, 적어도 세개의 항체의 조합이다.

[0088] 본 발명의 하나의 구현예에서, (a) 단계에서 인간 CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포의 집단을 분리하는데 유용한 수단은 단일클론 항-인간 CD3 항체, 단일클론 항-인간 CD8 항체 및 단일클론 항-인간 CD45RC 항체로 구성되고, 선택적으로 항-인간 GITR 항체(바람직하게는 단일클론 항-인간 GITR 항체) 및/또는 항-인간 Foxp3 항체(바람직하게는 단일클론 항-인간 Foxp3 항체)를 추가로 포함하는, 적어도 세개의 항체의 조합이다.

[0089] 본 발명에서 사용된 바와 같이, 용어 "항체"는 면역글로불린 분자 및 면역글로불린 분자의 면역적으로 활성인 부분 즉, 면역-특이적으로 항원에 결합하는 항원 결합 부위를 포함하는 분자를 지칭한다. 본 발명에 따른 "항-X 항체" 또는 "X 항체"는 X에 특이적으로 결합할 수 있는 항체이다.

- [0090] 본 발명의 특정 구현예에서, 인간 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포의 집단을 분리하는데 유용한 항체는 항-인간 CD3 항체, 항-인간 CD8 항체 및 항-인간 CD45RC 항체, 바람직하게는 단일클론 항-인간 CD3 항체, 단일클론 항-인간 CD8 항체 및 단일클론 항-인간 CD45RC 항체이다. 본 발명에서 고려되는 인간 CD3 항원에 결합하는 항체의 예시는 단일클론 항체 OKT3, UCHT1, HIT3a, S4.1 및 SK7를 포함한다. 본 발명에 의해 고려되는 인간 CD8 항원에 결합하는 항체의 예시는 단일클론 항체 C8/144B, SK1, 3B5, OKT8, BW135/80 및 RPA-T8을 포함한다. 본 발명에 의해 고려되는 인간 CD45RC 항원에 결합하는 항체의 예시는 단일클론 항체 MT2 및 RP1/12를 포함한다.
- [0091] 본 발명의 하나의 구현예에서, (b) 단계에서 $IFN\gamma^+ IL-10^+ IL-34^+$ 분비 인간 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포의 집단을 분리하는데 유용한 수단은 $IFN\gamma^+ IL-10^+ IL-34^+$ 분비 인간 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포의 집단을 분리하는데 유용한 항체이다.
- [0092] 보다 특히, 인간 $IFN\gamma^+ IL-10^+ IL-34^+$ 분비 인간 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포의 집단을 분리하는데 유용한 항체는 본 발명의 인간 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포에 의해 분비되는 사이토카인(즉, $IFN\gamma$, IL-10 및 IL-34) 중 하나와 결합하고, T 세포, 바람직하게는 $CD8^+ T$ 세포에 대하여 특이적인 세포 표면 분자(예를 들어, CD3, CD8, CD45)와 결합하는 이중특이성 항체이다. 본 발명에 의해 고려되는 이중특이성 항체의 예시는 인간 $IFN\gamma$ 및 인간 CD45에 결합하는 이중특이성 항체, 인간 $IFN\gamma$ 및 인간 CD3에 결합하는 이중특이성 항체, 인간 $IFN\gamma$ 및 인간 CD8에 결합하는 이중특이성 항체, 인간 IL-10 및 인간 CD45에 결합하는 이중특이성 항체, 인간 IL-10 및 인간 CD3에 결합하는 이중특이성 항체, 인간 IL-10 및 인간 CD8에 결합하는 이중특이성 항체, 인간 IL-34 및 인간 CD45에 결합하는 이중특이성 항체, 인간 IL-34 및 인간 CD3에 결합하는 이중특이성 항체, 인간 IL-34 및 인간 CD8에 결합하는 이중특이성 항체를 포함한다. 예를 들어 $IFN\gamma$ 또는 IL-10 분비 분석-검출 키트는 상업적으로 이용가능하다(Miltenyi biotec).
- [0093] 하나의 구현예에서, 상기에 기재된 바와 같은 인간 $IFN\gamma^+ IL-10^+ IL-34^+$ 분비 인간 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포의 집단을 분리하기 위해서, 본 발명의 방법의 (b) 단계는 $IFN\gamma$ 및 T 세포, 바람직하게는 $CD8^+ T$ 세포에 대하여 특이적인 세포 표면 분자(예를 들어, CD3, CD8, CD45)에 결합하는 이중특이성 항체, IL-10 및 T 세포, 바람직하게는 $CD8^+ T$ 세포에 대하여 특이적인 세포 표면 분자(예를 들어, CD3, CD8, CD45)에 결합하는 이중특이성 항체, 및 IL-34 및 T 세포, 바람직하게는 $CD8^+ T$ 세포에 대하여 특이적인 세포 표면 분자(예를 들어, CD3, CD8, CD45)에 결합하는 이중특이성 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 2개의 이중특이성 항체의 조합을 포함한다.
- [0094] $IFN\gamma^+$ 분비 인간 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포 중에서, 10 또는 20%만이 IL-10⁺이다. 본 출원인에 의해 얻어진 결과에 따르면, IL-10 및 IL-34는 일반적으로 인간 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포에 의해 공동-발현된다. 그에 따라, 하나의 구현예에서, (a) 단계에서 분리된 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Tregs로부터 $IFN\gamma^+ IL-10^+ IL-34^+$ 분비 인간 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Tregs를 분리하기 위한 이중특이성 항체의 조합은 $IFN\gamma$ 및 T 세포에 특이적인 세포 표면 분자에 결합하는 적어도 하나의 이중특이성 항체, 및 IL-10 및 T 세포에 특이적인 세포 표면 분자에 결합하는 이중특이성 항체나 IL-34 및 T 세포에 특이적인 세포 표면 분자에 결합하는 이중특이성 항체 둘 중 하나를 포함한다.
- [0095] 특정한 구현예에서, $IFN\gamma$ 및 T 세포에 특이적인 세포 표면 분자에 결합하는 이중특이성 항체, IL-10 및 T 세포에 특이적인 세포 표면 분자에 결합하는 이중특이성 항체 및 IL-34 및 T 세포에 특이적인 세포 표면 분자에 결합하는 이중특이성 항체는 관심 있는 집단을 분리하기 위해 사용된다.
- [0096] 이중기능성(bifunctional) 항체로도 알려진, 이중특이성 항체는 첫번째 항원에 대한 적어도 하나의 항원 인식 부위 및 두번째 항원에 대한 적어도 하나의 항원 인식 부위를 가진다. 이러한 항체는 재조합 DNA 방법에 의해 또는 당업계에 알려진 방법에 의해 화학적으로 생산될 수 있다. 화학적으로 만들어진 이중특이성 항체는 이들의 특성을 유지하기 위해 감소되었거나 개량되었던 항체 및 각 항원에 대한 적어도 두개의 항원 인식 부위를 갖기 위해 화학적으로 결합되었던 항체를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 이중특이성 항체는 모든 항체 또는 항체의 컨쥬게이트, 또는 두개의 다른 항원을 인식할 수 있는 항체들의 중합체 형태를 포함한다. 항체는 폴리머 또는 입자 상에서 고정될 수 있다.
- [0097] 이러한 이중특이성 항체를 수득하는 기술은 국제 특허 출원 WO 94/09117에 광범위하게 기재되어 있다.

- [0098] 하나의 구현예에서, 상기에 기재된 바와 같은 인간 IFN γ ⁺IL-10⁺IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포의 집단을 분리하기 위해, 본 발명의 방법의 (b) 단계는 IFN γ , IL-10 및 T 세포에 특이적인 세포 표면 분자에 결합하는 삼중특이성 항체의 사용을 포함한다.
- [0099] 3개의 항원이 공동-관여하는 삼중특이성 항체는 WO2016105450에 기재되어 있다.
- [0100] 본 발명의 하나의 구현예에서, (b) 단계에서 IFN γ ⁺IL-10⁺IL-34⁺ 분비 인간 GITR⁺CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포의 집단을 분리하는데 유용한 수단은 상기에 기재된 바와 같은 IFN γ ⁺IL-10⁺IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포의 집단을 분리하는데 유용한 항체 및 GITR 및/또는 Foxp3 및/또는 TGF β -1를 검출하는데 유용한 항체이다.
- [0101] 보다 특히, GITR을 검출하는데 유용한 항체는 인간 항-GITR 항체이다. 인간 GITR 항원에 결합하는 항체의 예시는 단일클론 항체 MAB689-100, 621, eBioAITR, 110416를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0102] 보다 특히, Foxp3를 검출하는데 유용한 항체는 인간 항- Foxp3 항체이다. 인간 Foxp3 항원에 결합하는 항체의 예시는 단일클론 항체 PCH101, 259D, 206D 및 236A/E7를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0103] 보다 특히, TGF β -1를 검출하는데 유용한 항체는 인간 항- TGF β -1 항체이다. 인간 TGF β -1 항원에 결합하는 항체의 예시는 단일클론 항체 MAB2463, TW4-6H10, 19D8, 및 eBio16TFB를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0104] 본 발명의 하나의 구현예에서, (b) 단계에서 IFN γ ⁺IL-10⁺IL-34⁺ 분비 인간 GITR⁺CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포의 집단을 분리하는데 유용한 수단은 상기 기재된 바와 같은 IFN γ ⁺IL-10⁺IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포의 집단을 분리하는데 유용한 항체 및 IL-2를 검출하는데 유용한 항체이다.
- [0105] 보다 특히, IL-2를 검출하는데 유용한 항체는 인간 항-IL-2 항체이다. 인간 IL-2 항원에 결합하는 항체의 예시는 단일클론 항체 MQ1-17H12 및 5344.111를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0106] 하나의 구현예에서, 본 발명의 방법의 (a) 단계 및 (b) 단계는 수반되어 수행된다. 즉, 하나의 구현예에서, 본 발명의 상기에 기재된 바와 같은 IFN γ ⁺IL-10⁺IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포를 인간 말초혈액 단핵세포(PBMCs) 또는 림프구를 함유하는 생물학적 샘플로부터 검출 및/또는 분리하는 방법은 상기 인간 PBMC 또는 림프구의 집단을 인간 IFN γ ⁺IL-10⁺IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포의 집단을 분리하는데 유용한 수단과 접촉시키는 단계를 포함한다. 적절한 수단의 예시는 상기에 기재되어 있다.
- [0107] 본 발명은 또한, MHC 클라스 II 분자로부터 유래된 분리된 웨타이드 또는 이의 기능적 단편을 포함하는 배양 배지와 함께, 수지상 세포, 바람직하게는 형질세포양 수지상세포(pDCs: plasmacytoid dendritic cells)의 존재 하에서, CD8⁺ T 세포의 집단을 배양하는 단계를 포함하는, 본 발명에 따른 CD8⁺CD45RC^{low} Tregs의 집단을 생성하는 시험관 내 또는 생체 외 방법에 관한 것이다.
- [0108] 하나의 구현예에서, MHC 클라스 II 분자로부터 유래된 분리된 웨타이드는 5 내지 40개의 아미노산 범위의 길이를 가지고, 아미노산 서열: REEYARFDSDVGEYR(서열번호 1)로부터 인접한 적어도 5개의 아미노산 또는 이의 기능-보존적인 변이체를 포함한다. 바람직하게는, MHC 클라스 II 분자로부터 유래된 분리된 웨타이드는 15 내지 40개의 아미노산 범위의 길이를 가지고, 아미노산 서열: REEYARFDSDVGEYR(서열번호 1) 또는 이의 기능-보존적인 변이체를 포함한다.
- [0109] 또 다른 구현예에서, MHC 클라스 II 분자로부터 유래된 분리된 웨타이드는 11 내지 16개의 아미노산 범위의 길이를 가지고, 아미노산 서열: SDVGEYR(서열번호 18) 또는 이의 기능-보존적인 변이체를 포함한다.
- [0110] 본 발명에 따르면, 용어 "기능-보존적인 변이체"는 기준 웨타이드(예를 들어, 서열번호 1 또는 서열번호 18)와 적어도 약 70%, 보다 더 바람직하게는 적어도 약 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5% 또는 99.9% 동일성을 포함하고, 여전히 기능을 가진, 즉, 기준 웨타이드(예를 들어, 서열번호 1 또는 서열번호 12)와 실질적으로 동일한 방법으로 CD8⁺CD45RC^{low} Tregs의 집단의 생성을 여전히 유도할 수 있는, 웨타이드를 지칭한다.
- [0111] 바람직하게는, MHC 클라스 II 분자로부터 유래된 상기 웨타이드는 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된다:

- [0112] REEYARFDSDVGEYR(서열번호 1);
- [0113] NREEYARFDSDVGEYR(서열번호 2);
- [0114] REEYARFDSDVGEFR(서열번호 3);
- [0115] REEYVRFDSDVGEYR(서열번호 4);
- [0116] QEEYARFD SD VGEYR(서열번호 5);
- [0117] REEYARFDSDVGVYR(서열번호 6);
- [0118] NREEYARFDSDVGEFR(서열번호 7);
- [0119] NREEYVRFDSDVGEYR(서열번호 8);
- [0120] NQEEYARFDSDVGEYR(서열번호 9);
- [0121] NREEYARFDSDVGVYR(서열번호 10);
- [0122] RLLARLIYNREEYARFDSDVGEYRAVTELGRPSAEYRNKQ(서열번호 11);
- [0123] YLRYDSDVGEYRAVTE(서열번호 12);
- [0124] DSDVGEYRAVTELGRP(서열번호 13);
- [0125] YLRYDSDVGEYR(서열번호 14);
- [0126] YLRYDSDVGEYRAV(서열번호 15);
- [0127] SDVGEYRAVTELGR(서열번호 16);
- [0128] LRYDSDVGEYRAVTE(서열번호 17).
- [0129] 하나의 구현예에서, 상기 방법은 상기에 기재된 바와 같은 MHC 클래스 II 분자로부터 유래된 펩타이드를 포함하는 MHC/펩타이드 다양체를 포함하는 배양 배지와 함께 CD8⁺ T의 집단을 배양하는 단계를 포함한다.
- [0130] 본 발명에 따르면, 용어 "MHC/펩타이드 다양체"는 상기에 기재된 바와 같은 MHC 클래스 II 분자로부터 유래된 펩타이드가 로드된(loaded) 주요 조직 적합성 복합체(MHC) 단백질 서브유닛들로 구성되는 안정적인 다양체 복합체를 지칭한다. 상기 MHC/펩타이드 다양체(본 발명에서 MHC/펩타이드 복합체로도 불림)는 MHC/펩타이드 이량체, 삼량체, 사량체 또는 오량체를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 바람직하게는 상기 MHC/펩타이드 다양체는 사량체이다.
- [0131] 기재된 MHC 클래스 II 분자로부터 유래된 펩타이드 및 MHC/펩타이드 다양체는 WO2015150491 및 WO2015150492에 기재되어 있으며, 이는 본 발명에서 참고로 인용된다.
- [0132] 농축시키는 방법/고갈시키는 방법/삭제
- [0133] 본 발명은 또한 상기 기재된 바와 같은 IFN γ⁺ IL-10⁺ IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포에서 세포 집단을 농축시키는 방법에 관한 것이고, 다음을 포함한다:
- 상기 기재된 바와 같은 인간 말초혈액 단핵세포(PBMCs) 또는 림프구를 함유하는 생물학적 샘플에서 IFN γ⁺ IL-10⁺ IL-34⁺를 분비하는 CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포를 검출하는 단계;
 - 상기 세포를 선택하고,
- [0136] 이로써 IFN γ⁺ IL-10⁺ IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포에서 농축된 세포 집단을 수득하는 단계.
- [0137] 따라서, 하나의 구현예에서, 상기 기재된 바와 같은 IFN γ⁺ IL-10⁺ IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포에서 집단을 농축시키는 방법은 다음을 포함한다:
- 인간 말초혈액 단핵세포(PBMCs) 또는 림프구를 함유하는 생물학적 샘플을 인간 CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포의 집단을 분리하는데 유용한 수단과 접촉시키는 단계,

[0139] - CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포로부터 IFN γ⁺IL-10⁺IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포를 검출 및 선택하고,

[0140] 이로써 IFN γ⁺IL-10⁺IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포에서 세포 집단을 수득하는 단계.

[0141] IFN γ⁺IL-10⁺IL-34⁺를 분비하는 CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포를 검출 및/또는 선택하는 방법은 상기에 기재되어 있다. 예를 들어, 세포를 선별하고, 분리하고 또는 선택하는 방법은 항체-코팅된 마그네틱 비드를 사용한 자력 선별 (Schwartz, et al., U.S. Pat. No. 5,759,793) 및 고체 매트릭스(예를 들어, 플레이트)에 붙어 있는 항체를 사용한 친화성 크로마토 그래피 또는 "페닝(panning)"을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 정확한 선별을 제공하는 추가적인 기술은 다중 색상 채널, 낮은 각도 및 둔감한 빛 산란 검출 채널 또는 임피던스 채널과 같은, 다양한 수준의 정교함을 가질 수 있는 형광-활성화 세포 분류기(FACS)를 포함한다. 사멸한 세포와 관련된 염료(예를 들어, 프로페디움 아이오다이드, LDS)에 의한 선택에 의해 제거될 수 있다. 적혈구 세포는 예를 들어, 세정(elutriation), 용혈 또는 피콜-파퀴에 구배(Ficol-Paque gradient)에 의해 제거될 수 있다. 선택된 세포의 생존능에 지나치게 해가 되지 않는, 당업계에 잘 알려진 임의의 기술은 적용될 수 있다.

[0142] 본 발명에 따르면, IFN γ⁺IL-10⁺IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포에서 집단을 농축시키는 방법은 다음을 포함할 수 있다:

[0143] - 비-CD8⁺ 세포의 마커에 결합하는 적어도 하나의 반응물에 인간 말초혈액 단핵세포(PBMCs) 또는 림프구를 함유하는 생물학적 샘플을 접촉시키고, 이로써 비-CD8⁺ 세포를 고갈시키는 단계,

[0144] - 상기에 기재된 바와 같은 IFN γ⁺IL-10⁺IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포에서 검출하여, 이들을 선택하고,

[0145] 이로써 IFN γ⁺IL-10⁺IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포에서 농축된 세포 집단을 수득하는 단계.

[0146] 하나의 구현예에서, IFN γ⁺IL-10⁺IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포에서 집단을 농축시키는 방법은 다음을 포함한다:

[0147] - 비-CD8⁺ 세포의 마커에 결합하는 적어도 하나의 반응물에 인간 말초혈액 단핵세포(PBMCs) 또는 림프구를 함유하는 생물학적 샘플을 접촉시키고, 이로써 비-CD8⁺ 세포를 고갈시키는 단계,

[0148] - 상기에 기재된 바와 같은 CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포를 검출하고 분리하는 단계, 및

[0149] - CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포로부터 상기 기재된 바와 같은 IFN γ⁺IL-10⁺IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포를 검출 및 선택하고,

[0150] 이로써 IFN γ⁺IL-10⁺IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포에서 농축된 세포 집단을 수득하는 단계.

[0151] 비-CD8⁺ 세포에 결합하는 마커의 예시는 CD4, CD14, CD16, CD19를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0152] 상기 마커에 결합하는 바람직한 반응물은 항체이다. 하나의 구현예에서, 항체는 형광색소 또는 자분(magnetic particle)에 컨쥬제이트된다. 또 다른 구현예에서, 세포 선택은 유세포 분석, 형광 활성 세포 분류, 자력 선별, 친화성 크로마토그래피 또는 페닝 또는 이들의 조합에 의해 수행된다.

[0153] 또 다른 측면에서, 본 발명은 IFN γ⁺IL-10⁺IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포의 농축 집단에 관한 것이다. 상기 IFN γ⁺IL-10⁺IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포의 농축 집단은 상기에 기재된 바와 같은 IFN γ⁺IL-10⁺IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포에서 집단을 농축시키는 방법에 의해 수득될 수 있다.

[0154] 본 발명에서 사용된 바와 같이, IFN γ⁺IL-10⁺IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포의 농축 집단은 최초에 수득된 세포의 집단에서의 IFN γ⁺IL-10⁺IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포의 백분율 보다 IFN γ⁺IL-10⁺IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포의 백분율이 더 높은 것이다. 비록 가능하더라도, IFN γ⁺IL-10⁺IL-34⁺ 분

비 인간 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포의 농축 집단은 $IFN\gamma^+ IL-10^+ IL-34^+$ 분비 인간 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포의 동종 집단을 함유할 필요가 없다. 특정한 구현예에서, 구성물의 상기 세포의 적어도 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 98% 또는 약 99%는 $IFN\gamma^+ IL-10^+ IL-34^+$ 분비 인간 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포이다. 또 다른 구현예에서, 농축 집단에서의 $IFN\gamma^+ IL-10^+ IL-34^+$ 분비 인간 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포의 백분율은 농축 전의 $IFN\gamma^+ IL-10^+ IL-34^+$ 분비 인간 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포의 백분율의 적어도 2배, 5배, 10배, 20배, 30배, 40배, 50배, 60배, 70배, 80배, 90배, 100배이다.

[0155] 농축 방법은 농축 과정의 각 단계와 관련된 농축 정도에 기초하여 다양하다. $IFN\gamma^+ IL-10^+ IL-34^+$ 분비 인간 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포의 농축 정도 및 정제 백분율은 공여체, 세포/조직 공급원 및 공여체의 질병 상태를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아닌, 많은 요인에 의해 결정될 것이다. 특정한 구현예에서, $IFN\gamma^+ IL-10^+ IL-34^+$ 분비 인간 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포는 적어도 약 2배, 약 5배, 약 10배, 약 15배, 약 20배, 약 25배, 약 30배, 약 35배, 약 40배, 약 50배, 약 55배, 약 60배, 약 65배, 약 70배, 약 75배, 약 80배, 약 85배, 약 90배, 약 95배, 약 100배, 약 105배, 약 110배, 약 115배, 약 120배, 약 130배, 약 140배, 약 150배 또는 약 200배로 농축된다.

[0156] 본 발명은 또한 $IFN\gamma^+ IL-10^+ IL-34^+$ 분비 인간 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포에서 세포 집단을 고갈시키는 방법에 관한 것이고, 다음을 포함한다:

[0157] - 상기에 기재된 바와 같은 인간 말초혈액 단핵세포 또는 림프구를 함유하는 생물학적 샘플에서 $IFN\gamma^+ IL-10^+ IL-34^+$ 을 분비하는 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포를 검출하는 단계,

[0158] - 상기 세포를 고갈시키는 단계,

[0159] - 이로써 $IFN\gamma^+ IL-10^+ IL-34^+$ 분비 인간 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포에서 고갈된 세포 집단을 수득하는 단계.

[0160] $IFN\gamma^+ IL-10^+ IL-34^+$ 을 분비하는 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포를 검출 및/또는 선택하는 방법은 상기에 기재되어 있다.

[0161] 또 다른 측면에서, 본 발명은 $IFN\gamma^+ IL-10^+ IL-34^+$ 분비 인간 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포-고갈된 집단에 관한 것이다. 상기 $IFN\gamma^+ IL-10^+ IL-34^+$ 분비 인간 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포-고갈된 집단은 상기에 기재된 바와 같은 $IFN\gamma^+ IL-10^+ IL-34^+$ 분비 인간 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포에서 세포 집단을 고갈시키는 방법에 따라 수득 가능할 수 있다.

[0162] 본 발명에서 사용된 바와 같이, $IFN\gamma^+ IL-10^+ IL-34^+$ 분비 인간 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포-고갈된 집단은 최초에 수득된 세포의 집단에서의 $IFN\gamma^+ IL-10^+ IL-34^+$ 분비 인간 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포의 백분율 보다 $IFN\gamma^+ IL-10^+ IL-34^+$ 분비 인간 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포의 백분율이 더 낮은 것이다.

[0163] 하나의 구현예에서, 고갈된 집단에서 $IFN\gamma^+ IL-10^+ IL-34^+$ 분비 인간 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포의 백분율은 고갈 전의 $IFN\gamma^+ IL-10^+ IL-34^+$ 분비 인간 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포의 백분율의 최대 0.5배, 0.4배, 0.3배, 0.25배, 0.2배, 0.15배, 0.1배이다.

[0164] 조절 T 세포의 고갈은 암 환자에서 백신-매개된 면역이 증가되는 것을 보여주었다(Dannull et al., 2005, 115(12):3623-3633). 그에 따라, 본 발명의 또 다른 구현예에서, 본 발명의 $IFN\gamma^+ IL-10^+ IL-34^+$ 분비 인간 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포의 고갈이 암 또는 전염성 질환을 치료하기 위한 세포 치료법에서 사용될 수 있음이 제안되고, 여기에서 상기 Treg 세포는 치료를 위해 유독하거나 해로울 수 있다. 예를 들어, 암 치료에서, $IFN\gamma^+ IL-10^+ IL-34^+$ 분비 인간 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포의 일시적인 고갈은 백신 접종/면역치료법 프로토콜 전에 흥미로울 수 있었고, 상기 일시적인 고갈은 본 발명의 고갈시키는 방법에 따라 기기를 통해 환자의 혈액의 체외로의 고갈시키고, 즉시 환자에게 재-주입하여 얻어진다. 그에 따라, 상기 구현예에서, 환자의 혈액으로부터 $IFN\gamma^+$

$^+ IL-10^+ IL-34^+$ 분비 인간 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포의 고갈은 기기를 통해 체외에서 수행된다.

[0165] 본 발명은 또한 $IFN\gamma^+ IL-10^+ IL-34^+$ 분비 인간 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포 집단을 동정 또는 분리하기 위한 키트, 또는 $IFN\gamma^+ IL-10^+ IL-34^+$ 분비 인간 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포에서 세포 집단을 농축 또는 고갈시키기 위한 키트에 관한 것이고, 상기 키트는 CD3, CD8, CD45RC의 세포 표면 발현을 검출하기 위한 반응물 및 $IFN\gamma$ 및 $IL-10$ 및/또는 $IL-34$ 의 분비를 검출하기 위한 수단을 포함한다.

[0166] 바람직하게는, 상기 반응물은 항체이다. 보다 바람직하게는, 이러한 항체는 형광 색소 또는 자분에 컨쥬게이트된다.

[0167] 하나의 특정한 구현예에서, 상기 반응물은 항-미세소관제, 알킬화제 및 DNA 마이너 그루브 결합제와 같은 세포 독성 약물에 컨쥬게이트된 항체이다. 세포독성 약물의 예시는 미토마이신(mitomycin), 아우리스타틴(auristatins) 및 메이탄신(maytansine) 유도체를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0168] 또 다른 구현예에서, 상기 반응물은 항생제에 컨쥬게이트된 항체이다. 항생제의 예시는 클로람페니콜, 에리트로마이신, 린코마이신, 푸시딘산, 스트렙토마이신, 아미노글리코시드계 항생제, 테트라사이클린, 플리믹신, 포스포마이신, 반코마이신, 리스토세틴, 바시트라신, 그라미시딘, 페니실린 및 세팔로스포린을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0169] 하나의 구현예에서, 상기 키트는 $Foxp3$ 발현 및/또는 GITR 발현 및/또는 $TGF\beta-1$ 발현 및/또는 $IL-2$ 발현을 검출하기 위한 반응물을 추가로 포함한다. 바람직하게는 상기 반응물은 항체이다. 보다 바람직하게는, 상기 항체는 형광 색소에 컨쥬게이트된다.

본 발명의 Treg 세포를 확장하는 수단:

[0171] 세번째 측면에서, 본 발명은 상기 기재된 바와 같은 $IFN\gamma^+ IL-10^+ IL-34^+$ 분비 인간 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포를 확장하는 방법에 관한 것이고, $IFN\gamma^+ IL-10^+ IL-34^+$ 분비 인간 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포의 분리 집단을 배양하는 단계, 바람직하게는 $IFN\gamma^+ IL-10^+ IL-34^+$ 분비 인간 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포의 분리 집단을 Treg 세포를 확장하기에 적합한 배양 배지에 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0172] 하나의 구현예에서, 본 발명은 $IFN\gamma^+ IL-10^+ IL-34^+$ 분비 인간 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포를 확장하는 방법에 관한 것이고, 상기 Treg 세포는 선택적으로 $GITR^+$ 및/또는 $Foxp3^+$ 이고, $IFN\gamma^+ IL-10^+ IL-34^+$ 분비 인간 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포의 분리 집단을 Treg 세포를 확장하기에 적합한 배양 배지에 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0173] 하나의 구현예에서, 본 발명은 $GITR$, $Foxp3$ 및 $TGF\beta-1$ 중 적어도 하나를 발현하는 $IFN\gamma^+ IL-10^+ IL-34^+$ 분비 인간 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포를 확장하는 방법에 관한 것이고, $IFN\gamma^+ IL-10^+ IL-34^+$ 분비 인간 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포의 분리 집단을 Treg 세포를 확장하기에 적합한 배양 배지에 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0174] 하나의 구현예에서, 본 발명의 $IFN\gamma^+ IL-10^+ IL-34^+$ 분비 인간 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포의 분리 집단은 동결되고, 그 후에 Treg 세포를 확장하기에 적합한 배양 배지에 접촉되기 전에 해동된다. 본 발명자는 본 발명의 $IFN\gamma^+ IL-10^+ IL-34^+$ 분비 인간 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Tregs는 효과적으로 확장될 수 있고, 더욱이 해동 후에도 확장될 수 있음을 입증하였다. 사실, 본 발명자는 본 발명의 $IFN\gamma^+ IL-10^+ IL-34^+$ 분비 인간 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Tregs가 갓 분류되었을 때보다 해동되었을 때 더 효과적으로 증식하였음을 관찰하였다.

[0175] 본 발명에서 사용된 바와 같이, 용어 "확장"은 주어진 세포의 집단(예를 들어, T 세포와 같은 면역 세포)을 전환 및/또는 증폭하는 과정을 지칭한다. T 세포의 확장은 바람직하게는 항원, 세포(동종 이식 내에서 공여체의 세포와 같은), MHC 폴리머, 항체(항-CD3 항체 및/또는 항-CD28 항체와 같은), 렉チン(PHA와 같은) 등과 같은 항원-특이적인 자극제의 존재 하에 T 세포를 포함하는 세포 집단을 배양함으로써 수행된다. 확장은 또한 사이토카인($IL-15$, $IL-12$, $IL-4$, $IL-7$, $IL-2$, $IFN\gamma$, $IL-34$ 와 같은) 및 전염증성(pro-inflammatory) 사이토카인(예를 들어, $IL-1$ (특히, $IL-1\beta$), $IL-6$ 및 $TNF\alpha$ 와 같은))의 존재 하에서 T 세포의 배양을 필요로 할 수 있다.

[0176] 본 발명에서 사용된 바와 같이, 용어 "배양 배지"는 세포 생존능을 유지하고 증식을 지원해주는 영양소를 함유하는 세포 집단의 유지 또는 세포 집단의 배양을 위한 배지를 지칭한다. 배양 배지는 적절한 조합으로 다음 중

어느 하나를 포함할 수 있다: 염(들), 완충액(들), 아미노산, 글루코스 또는 다른 당류(들), 항생제, 혈청 또는 혈청 대체물, 및 성장인자, 사이토카인 등과 같은 다른 성분. 특정한 세포 유형을 위해 일반적으로 사용되는 배양 배지는 당업계의 기술자에게 잘 알려져 있다. 본 발명의 배양 배지는 Invitrogen의 RPMI 1640과 같은 상업적으로 입수 가능한 배지를 기초로 할 수 있다.

[0177] 하나의 구현예에서, 본 발명의 인간 CD8⁺CD45RC^{low} Tregs를 확장하는데 적합한 배지는 적어도 하나의 자극제를 포함한다. 하나의 구현예에서, 상기 적어도 하나의 자극제는 항원, 세포, MHC 폴리머, 항체 및 렉틴으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 하나의 구현예에서, 상기 적어도 하나의 자극제는 항원-특이적이고, 항원, 세포, MHC 폴리머 및 항체로 이루어진 군으로부터 선택된다. 하나의 구현예에서, 상기 적어도 하나의 자극제는 동종이계 항원 제시 세포, 항-CD3 항체 및/또는 항-CD8 항체, PMA + 이오노마이신을 포함하는 군으로부터 선택된다.

[0178] 하나의 구현예에서, 본 발명의 인간 CD8⁺CD45RC^{low} Tregs를 확장하는데 적합한 배지는 상당한 양의 적어도 하나의 사이토카인을 포함한다. Treg을 확장하는데 적합한 배지에서 존재할 수 있는 사이토카인의 예시는 IL-12, IL-4, IL-7, IL-2, IFN γ , IL-34 및 전염증성 사이토카인(예를 들어, IL-1(특히, IL-1 β), IL-6 및 TNF α 와 같은)을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0179] 하나의 구현예에서, Treg 세포를 확장하는데 적합한 배양 배지는 상당한 양의 인터류킨-2(IL-2) 및/또는 인터류킨-15(IL-15)을 포함한다.

[0180] 특정한 구현예에서, IL-2는 인간 인터류킨-2(hIL-2), 바람직하게는 재조합 인간 인터류킨-2(rhIL-2)이다. rhIL-2는 약학적 용도를 위해 상업적으로 입수 가능하다는 점을 추가적으로 유의해야 한다. 적절한 상업적 형태는 예를 들어, Proleukin®, 재조합 인간 IL-2 조성물을 포함한다.

[0181]

[0182] 특정한 구현예에서, IL-15는 인간 인터류킨-15(hIL-15)이고, 바람직하게는 재조합 인간 인터류킨-15(rhIL-15)이다.

[0183] 일반적으로, IL-2는 100 내지 10000 U/ml, 바람직하게는 500 내지 5000 U/ml, 보다 바람직하게는 1000 U/ml 범위의 농도로 본 발명의 배양 배지에 첨가된다.

[0184] 일반적으로, IL-15는 1 내지 100 ng/ml, 바람직하게는 2.5 내지 50 ng/ml 범위의 농도, 보다 바람직하게는 10 ng/ml 농도로 본 발명의 배양 배지에 첨가된다.

[0185] 일반적으로, IL-12는 0.01 내지 500 ng/ml, 바람직하게는 1 내지 50 ng/ml 범위의 농도, 보다 바람직하게는 5 ng/ml 농도로 본 발명의 배양 배지에 첨가된다.

[0186] 일반적으로, IL-4는 0.01 내지 500 ng/ml, 바람직하게는 1 내지 20 ng/ml 범위의 농도, 보다 바람직하게는 5 ng/ml 농도로 본 발명의 배양 배지에 첨가된다.

[0187] 일반적으로, IL-7은 0.01 내지 500 ng/ml, 바람직하게는 2.5 내지 50 ng/ml 범위의 농도, 보다 바람직하게는 10 ng/ml 농도로 본 발명의 배양 배지에 첨가된다.

[0188] 일반적으로, IFN γ 는 0.01 내지 500 ng/ml, 바람직하게는 5 내지 100 ng/ml 범위의 농도, 보다 바람직하게는 20 ng/ml 농도로 본 발명의 배양 배지에 첨가된다.

[0189] 일반적으로, IL-34는 0.01 내지 500 ng/ml, 바람직하게는 10 내지 100 ng/ml 범위의 농도, 보다 바람직하게는 50 ng/ml 농도로 본 발명의 배양 배지에 첨가된다.

[0190] 일반적으로, IL-1은 0.01 내지 500 ng/ml, 바람직하게는 2.5 내지 50 ng/ml 범위의 농도, 보다 바람직하게는 10 ng/ml 농도로 본 발명의 배양 배지에 첨가된다.

[0191] 일반적으로, IL-6은 0.01 내지 500 ng/ml, 바람직하게는 5 내지 100 ng/ml 범위의 농도, 보다 바람직하게는 20 ng/ml 농도로 본 발명의 배양 배지에 첨가된다.

[0192] 일반적으로, TNF는 0.01 내지 500 ng/ml, 바람직하게는 5 내지 100 ng/ml 범위의 농도, 보다 바람직하게는 20 ng/ml 농도로 본 발명의 배양 배지에 첨가된다.

[0193] 일반적으로, TNFbeta는 0.01 내지 500 ng/ml, 바람직하게는 0.1 내지 10 ng/ml 범위의 농도, 보다 바람직하게는 1 ng/ml 농도로 본 발명의 배양 배지에 첨가된다.

- [0194] 일반적으로, 관심 있는 배양 배지와 함께 본 발명의 인간 CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포의 배양은 적어도 6일, 예를 들어, 적어도 6일에서 15일 이하, 또는 적어도 6일에서 20일 이하, 또는 적어도 6일에서 6주 내지 8주 이하, 바람직하게는 14일 동안 수행될 수 있다. 하나의 구현예에서, 관심 있는 배양 배지와 함께 본 발명의 인간 CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포의 배양은 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 또는 31일 동안 수행된다. 하나의 구현예에서, 관심 있는 배양 배지와 함께 본 발명의 인간 CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포의 배양은 1주, 2주, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10주 또는 그 이상 동안 수행된다.
- [0195] 하나의 구현예에서, 사이토카인, 바람직하게는 IL-2 및/또는 IL-15는 본 발명의 인간 CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포의 배양의 0일차에 배양 배지에 첨가된다. 또 다른 구현예에서, 사이토카인, 바람직하게는 IL-2 및/또는 IL-15는 배양 배지에 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 및/또는 20일에 1번, 2번 또는 3번 또는 4번 또는 그 이상 추가로 첨가된다. 하나의 구현예에서, 사이토카인, 바람직하게는 IL-2 및/또는 IL-15는 본 발명의 인간 CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포의 배양의 0일 및 5, 6, 7, 8 또는 9일차, 바람직하게는 0일 및 7일차에 배양 배지에 첨가된다. 또 다른 구현예에서, 사이토카인, 바람직하게는 IL-2 및/또는 IL-15는 3번, 바람직하게는 0일차 및 2번 추가로 배양 배지에 첨가된다. 또 다른 구현예에서, 사이토카인, 바람직하게는 IL-2 및/또는 IL-15는 4번, 바람직하게는 0일차 및 3번 추가로 배양 배지에 첨가된다. 또 다른 구현예에서, 사이토카인, 바람직하게는 IL-2 및/또는 IL-15는 5번, 바람직하게는 0일차 및 4번 추가로, 예를 들어, 0, 6, 13, 16 및 18일차에 배양 배지에 첨가된다. 하나의 구현예에서, 사이토카인, 바람직하게는 IL-2 및/또는 IL-15는 0일차 및, 배양의 종료까지 2, 3, 또는 4일 마다 첨가된다.
- [0196] 하나의 구현예에서, Treg 세포를 확장하는데 적합한 배양 배지는 상당한 양의 적어도 하나의 관심 있는 항원을 포함한다. 일반적으로, 주어진 항원은 1 μ g/ml 농도로 본 발명의 배양 배지에 첨가된다.
- [0197] 특정한 구현예에서, 확장은 다클론성 확장이다. 다클론성 확장은 항-CD3 Ab 및 항-CD28 Ab 및/또는 동종이계 항원-제시 세포(APCs)를 사용하여 얻어질 수 있다.
- [0198] 하나의 구현예에서, 0.1 내지 10 μ g/ml, 바람직하게는 0.25 내지 4 μ g/ml, 보다 바람직하게는 1 μ g/ml의 항-CD3 항체 및/또는 0.1 내지 10 μ g/ml, 바람직하게는 0.25 내지 4 μ g/ml, 보다 바람직하게는 1 μ g/ml의 항-CD28 항체는 배양 배지에 첨가된다.
- [0199] 하나의 구현예에서, 1:1 내지 1:10, 바람직하게는 1:2 내지 1:6 범위, 및 보다 바람직하게는 1:4 의 Tregs:APCs 비율로 동종이계 항원-제시 세포(APCs)는 배양 배지에 첨가된다.
- [0200] 본 발명의 내용 내에서, 상기에 기재된 바와 같은, 확장되거나 확장되지 않은, IFN γ ⁺IL-10⁺IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포의 분리 집단은 항원-특이적인 IFN γ ⁺IL-10⁺IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포의 집단을 얻기 위해 관심 있는 항원으로 감작될 수 있고, 상기 항원은 본 발명의 IFN γ ⁺IL-10⁺IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포의 분리 집단을 준비시키고, 상기 항원에 대하여 특이적인 IFN γ ⁺IL-10⁺IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포의 집단을 얻기 위한 효과적인 양으로 제공된다. 사실상, 이러한 확장된 항원-특이적인 IFN γ ⁺IL-10⁺IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포는 자가면역 질환, 치료학적 단백질에 대한 면역 반응 및/또는 알러지와 같은, 원하지 않는 면역 반응의 예방 또는 치료에 있어 유용하다.
- [0201] 그에 따라, 치료되는 질환과 관련된 항원(병원성 항원)에 대하여 특이적인 IFN γ ⁺IL-10⁺IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포의 집단이 수득되어야 한다. 따라서, 관심 있는 항원은 자가-항원, 동종-항원, 일반적인 인간 식이로부터의 식품 항원, 염증성 항원 및 알레르겐으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0202] 용어 "자가-항원"은 개인의 단백질로부터 유래된 면역성 펩타이드를 지칭한다. 예로써, 다음은 자가-항원의 다음의 비-제한적인 목록이다: 아세틸콜린 수용체, 액틴, 아데닌 뉴클레오타이드 수송체(adenine nucleotide translocator), 아드레날린수용체, 방향족 L-아미노산 탈탄산효소, 아시알로당단백질 수용체, 살균성/투과성 항진 단백질(Bpi: bactericidal/permeability increasing protein), 칼슘 감지 수용체, 콜레스테롤 결사슬 철단효소, 콜라겐 유형 IV-사슬, 사이토크롬 P450 2D6, 데스민, 데스모글레인-1, 데스모글레인-3, F-액틴, GM-강글리오시드, 글루탐산 탈탄산효소, 글루탐산 수용체, H/K ATP아제, 17- α 수산화효소, 21-수산화효소, IA-2(ICAS12), 인슐린, 인슐린 수용체, 내인성 인자 유형 1, 류코사이트 기능 항원 1(leucocyte function antigen

1), 미엘린 결합 당단백질, 미엘린 염기성 단백질(myelin basic protein), 미엘린 올리고덴드로사이트 단백질(myelin oligodendrocyte protein), 미오신, P80-콜린, 피루브산 탈수소효소 복합체 E2(PDC-E2), 나트륨 요오드 공수송체, SOX-10, 갑상선 및 눈 근육 공유 단백질, 티로글로불린, 갑상선 과산화효소, 갑상선 자극 호르몬 수용체, 조직 트랜스글루탐산효소, 전사 공활성화 인자 p75, 트립토판 가수분해효소, 티로시나아제, 티로신 수산화효소, ACTH, 아미노아실-tRNA-히스티딜 합성효소, 카르디올리핀, 탄산무수화효소 II, 동원체 연관 단백질, DNA-의존적 뉴클레오솜-자극 ATP아제, 피브릴라닌, 피브로넥틴, 글루코스 6 포스페이트 아이소머라제, 베타 2-당단백질 I, 골진(golgin, 95, 97, 160, 180), 열 충격 단백질, 반부착 단백질 180(hemidesmosomal protein 180), 히스톤 H2A, H2B, 케라틴, IgE 수용체, Ku-DNA 단백질 키나아제, Ku-핵단백질, La 인단백질, 미엘린 연관 올리고덴드로사이트 염기성 단백질(MOBP), 단백지방 단백질, 올리고덴드로사이트 특이적 단백질(OSP/클라우딘 11), 2',3'-고리형 뉴클레오타이드 3-포스포디에스테라아제(CNPase), BP 항원 1(BPAG1-e), 트랜스알돌라아제(TAL), 인간 미토콘드리아의 자가 항원 PDC-E2(노보 1 및 2), OGDC-E2(노보 3) 및 BOCOADC-E2(노보 4), 수포성류 천포창(BP) 180, 라미닌 5(LN5), DEAD-박스 단백질 48(DDX48) 또는 인슐린종-연관 항원-2.

[0203]

용어 "일반적인 인간 식이로부터 식품 항원"은 인간에게 다음의 비-제한적 목록의 식품 항원과 같은, 일반적인 식품으로부터 유래된 면역성 웹타이드를 지칭한다: 리포칼린과 같은 소과의 항원(bovine antigens), Ca-결합 S100, 알파-락토알부민, 베타-락토글로불린과 같은 락토글로불린, 소과의 혈청 알부민, 카제인. 식품-항원은 또한 파리알부민과 같은 대서양 연어 항원, 오보무코이드, 오브알부민, Ag22, 콘알부민, 라이소자임 또는 닭 혈청 알부민과 같은 닭 항원, 트로포마이오신과 같은 땅콩, 새우 항원, 아글루티닌 또는 글리아딘과 같은 밀 항원, 셀러리 프로필린과 같은 셀러리 항원, 당근 프로필린과 같은 당근 항원, 타우마틴, 사과 지질 운반 단백질, 사과 프로필린과 같은 사과 항원, 배 프로필린, 이소플라본 환원효소와 같은 배 항원, 엔도키나아제와 같은 아보카도 항원, 살구 지질 운반 단백질과 같은 살구 항원, 복숭아 지질 운반 단백질 또는 복숭아 프로필린과 같은 복숭아 항원, HPS, 대두 프로필린 또는 (SAM22)PR-10 prot와 같은 대두 항원.

[0204]

용어 "염증성 항원"은 미엘린 염기성 단백질(MBP), 미엘린 연관 당단백질(MAG), 미엘린 올리고덴드로사이트 당단백질(MOG), 단백지방 단백질(PLP), 올리고덴드로사이트 미엘린 올리고단백질(OMGP), 미엘린 연관 올리고덴드로사이트 염기성 단백질(MOBP), 올리고덴드로사이트 특이적 단백질(OSP/클라우딘 1), 열 충격 단백질, 올리고덴드로사이트 특이적 단백질(OSP), NOGO A, 당단백질 Po, 말초 미엘린 단백질 22(PMP 22), 2',3'-고리형 뉴클레오타이드 3- 포스포디에스테라아제(CNPase), 시트룰린-치환된 고리형 및 선형 필라그린 웹타이드, 유형 II 콜라겐 웹타이드, 인간 연골 당단백질 39(HCgp39) 웹타이드, HSP, 이종 핵 리보핵단백질(hnRNP) A2 웹타이드, hnRNP B1, hnRNP D, Ro60/52, HSP60, 65, 70 및 90, BiP, 케라틴, 비멘틴, 피브리노겐, 콜라겐 유형 I, III, IV 및 V 웹타이드, 아넥신 V, 글루코스 6 포스페이트 아이소머라제(GPI), 아세틸-칼페스타틴, 피루브산 탈수소효소(PDH), 알돌라아제, 토포아이소머라제 I, snRNP, PARP, Sc1-70, Sc1-100, 음이온성 카르디올리핀 및 포스파티딜세린, 중성 전하의 포스파티딜에탄올아민 및 포스파티딜콜린을 포함하는 인지질 항원, 금속 단백분해효소, 피브릴린, 아그렉칸(aggreccan)을 지칭한다.

[0205]

용어 "알레르겐"은 흡입된 알레르겐, 섭취된 알레르겐 또는 접촉 알레르겐을 지칭한다. 알레르겐의 예시는 꽃가루(Cup, Jun), 집 먼지 진드기(Der, Gly, Tyr, Lep), 개, 고양이 및 설치류(Can, Fel, Mus, Rat)로부터 유래된 흡입된 알레르겐을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 접촉 알레르겐의 예시는 중금속(니켈, 크롬, 금과 같은), 라텍스, 할로탄과 같은 핫텐, 하이드랄라진을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0206]

따라서, 하나의 구현예에서, 자가면역 질환이 다발성 경화증일 때, 자가 항원은 미엘린-관련 항원(예를 들어, 미엘린 염기성 단백질(MBP) (예를 들어, MBP83-102 웹타이드), 미엘린 올리고덴드로사이트 당단백질(MOG) (예를 들어, MOG35-55) 및 단백지방 단백질(PLP) (예를 들어, PLP139-151 웹타이드)로 이루어진 군으로부터 선택된다. 자가면역 질환이 유형 I 당뇨병(T1D)일 때, 자가 항원은 인슐린, 인슐린 전구체 프로인슐린(ProIns), 글루탐산 디카복실라아제 65(GAD65), 신경교섬유질 산성 단백질(GFAP), 섬-특이적 글루코스-6-포스페이트 촉매 소단위-관련 단백질(IGRP: islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein), 인슐린종-관련 항원-2(IA-2) 및 아연 수송체 8(ZnT8)으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 자가면역 질환이 류마티스 관절염일 때, 자가 항원은 유형 II 콜라겐(CTII)이다.

[0207]

동종항원은 치료학적 단백질뿐만 아니라 동종 이식에 의해 발현되는 항원, 유전자 치료법의 과정에서 발현되는 단백질(또한, 사용된 바이러스 벡터로부터 발생한 바이러스 항원)을 포함하지만, 이에 제한되지 않는 것으로 또한 의도된다. 자가 항원은 HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F, HLA-G, HLA-DM, HLA-DO, HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR, 부항원(minor antigens), 예를 들어, HA-1, HA-2, HA-3, HA-8, HB-1 UGT2B17, BCL2A1, HY B7, HY A2,

HY A1, HY B60, HY B8, HY DQ5, HY DRB3와 같은 것, 및 혈액형 항원 A 및 B로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0208] 이와 같은 "동종이식"은 두개의 유전적으로 다른 MHC 단상형뿐만 아니라, 부조직적합 항원 및 혈액형을 가지는 동종의 두 개체간의 이식이다. 이에 따라, 동종이식 거부반응을 예방 또는 치료하기 위해, IFN γ $^+ IL-10^+ IL-34^+$ 분비 인간 CD8 $^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포가 일반적으로 환자(또는 수용자)로부터 분리되고, 공여자로부터의 세포를 사용하여 확장된다. 그 대신에, IFN γ $^+ IL-10^+ IL-34^+$ 분비 인간 CD8 $^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포는 공여자로부터 얻은 항원의 조합을 사용하여 확장될 수 있다.

[0209] 용어 "치료학적 단백질"은 단백질 또는 웨타이드 및 그들의 임의의 주어진 조건 또는 질병의 치료에서의 투여를 지칭한다. 치료학적 단백질은 환자에게 투여되는 치료학적 항체, 사이토카인, 효소 또는 임의의 다른 단백질과 같은, 임의의 단백질 또는 웨타이드에 관한 것이다. 단백질 치료의 예시는 플라스마-유래된 또는 재조합 응고 인자 응축물(예를 들어, 인자 VIII 및 인자 IX)의 투여를 통한 혈우병의 치료, 단클론성 항체를 사용한 암 또는 심혈관 질환의 치료 또는 효소 보충 요법에 의한 대사성 또는 리소좀 질환의 치료에 관한 것이다.

[0210] 특정한 구현예에서, Treg 세포를 확장하는데 적합한 배양 배지는 상당한 양의 인터류킨-2(IL-2) 및/또는 인터류킨-15(IL-15) 및 적어도 하나의 관심 있는 항원을 포함한다.

[0211] 또 다른 측면에서, 본 발명은 확장된 IFN γ $^+ IL-10^+ IL-34^+$ 분비 인간 CD8 $^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포의 분리 집단에 관한 것이다. 하나의 구현예에서, 본 발명은 확장된 IFN γ $^+ IL-10^+ IL-34^+$ 분비 인간 GITR $^+ CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포의 분리 집단에 관한 것이다. 하나의 구현예에서, 본 발명은 확장된 IFN γ $^+ IL-10^+ IL-34^+$ 분비 인간 Foxp3 $^+ CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포의 분리 집단에 관한 것이다. 하나의 구현예에서, 본 발명은 확장된 TGF $\beta-1^+ IFN \gamma ^+ IL-10^+ IL-34^+$ 분비 인간 CD8 $^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포의 분리 집단에 관한 것이다. 또 다른 구현예에서, 본 발명은 확장된 IFN γ $^+ IL-10^+ IL-34^+$ 분비 인간 CD8 $^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포의 분리 집단에 관한 것이고, 여기에서 상기 Treg 세포는 GITR $^+$ 및/또는 Foxp3 $^+$ 이다. 또 다른 구현예에서, 본 발명은 확장된 IFN γ $^+ IL-10^+ IL-34^+$ 분비 인간 Foxp3 $^+ GITR^+ CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포의 분리 집단에 관한 것이다. 또 다른 구현예에서, 본 발명은 확장된 TGF $\beta-1^+ IFN \gamma ^+ IL-10^+ IL-34^+$ 분비 인간 Foxp3 $^+ CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포의 분리 집단에 관한 것이다. 또 다른 구현예에서, 본 발명은 확장된 TGF $\beta-1^+ IFN \gamma ^+ IL-10^+ IL-34^+$ 분비 인간 GITR $^+ CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포의 분리 집단에 관한 것이다. 그에 더하여 또 다른 구현예에서, 본 발명은 확장된 TGF $\beta-1^+ IFN \gamma ^+ IL-10^+ IL-34^+$ 분비 인간 Foxp3 $^+ GITR^+ CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포의 분리 집단에 관한 것이다.

[0212] 상기에 기재된 바와 같은 확장된 IFN γ $^+ IL-10^+ IL-34^+$ 분비 인간 CD8 $^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포의 상기 분리 집단은 상기에 기재된 바와 같은 본 발명의 Treg 세포를 확장하기 위한 방법에 의해 수득 가능할 수 있다. 특정한 구현예에서, IFN γ $^+ IL-10^+ IL-34^+$ 분비 인간 CD8 $^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포는 항원-특이적이다.

[0213] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 CD8 $^+ Tregs$ 의 집단을 생산하는 방법에 관한 것이고, 다음을 포함한다:

[0214] - 인간 말초혈액 단핵세포(PBMCs) 또는 림프구를 함유하는 생물학적 샘플로부터 CD8 $^+ GITR^+$ Treg 세포를 분리하고, 선택적으로 인간 말초혈액 단핵 세포(PBMCs) 또는 림프구를 함유하는 생물학적 샘플로부터 CD8 $^+ CD45RC^{low} GITR^+$ Treg 세포를 분리하는 단계,

[0215] - 선택적으로 동결하고, 이후에 분리된 Treg 세포를 해동하는 단계, 및

[0216] - 배지에서 상기 세포를 확장하는 단계.

[0217] 하나의 구현예에서, 상기 방법은 다음을 포함한다:

[0218] - 인간 말초혈액 단핵세포(PBMCs) 또는 림프구를 함유하는 생물학적 샘플로부터 CD8 $^+ GITR^+$ Treg 세포를 분리하는 단계, 여기에서 분리된 CD8 $^+ GITR^+$ Treg 세포는 IFN γ $^+ IL-10^+ IL-34^+$ 분비 인간 CD8 $^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포임,

- [0219] - 선택적으로 동결하고, 이후에 분리된 Treg 세포를 해동하는 단계, 및
- [0220] - 배지에서 상기 세포를 확장하는 단계.
- [0221] 사실상, 본 발명자는 GITR⁺CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포의 아집단은 높은 억제성 활성을 가짐을 입증하였다.
- [0222] 하나의 구현예에서, 본 발명은 IFN γ⁺IL-10⁺IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포의 집단을 생산하는 방법에 관한 것이고, 다음을 포함한다:
- 인간 말초혈액 단핵세포(PBMCs) 또는 림프구를 함유하는 생물학적 샘플로부터 CD8⁺GITR⁺ Treg 세포를 분리하고, 선택적으로 인간 말초혈액 단핵 세포(PBMCs) 또는 림프구를 함유하는 생물학적 샘플로부터 CD8⁺CD45RC^{low} GITR⁺ Treg 세포를 분리하는 단계,
- [0224] - 선택적으로 동결하고, 이후에 분리된 Treg 세포를 해동하는 단계, 및
- [0225] - 배지에서 상기 세포를 확장하는 단계.
- [0226] 하나의 구현예에서, 상기 방법은 다음을 포함한다:
- 인간 말초혈액 단핵세포(PBMCs) 또는 림프구를 함유하는 생물학적 샘플로부터 CD8⁺GITR⁺ Treg 세포를 분리하는 단계,
- [0228] 선택적으로 동결하고, 이후에 분리된 Treg 세포를 해동하는 단계, 및
- [0229] - 배지에서 상기 세포를 확장하는 단계.
- [0230] 또 다른 구현예에서, 상기 방법은 다음을 포함한다:
- 인간 말초혈액 단핵세포(PBMCs) 또는 림프구를 함유하는 생물학적 샘플로부터 CD8⁺CD45RC^{low} GITR⁺ Treg 세포를 분리하는 단계,
- [0232] - 선택적으로 동결하고, 이후에 분리된 Treg 세포를 해동하는 단계, 및
- [0233] - 배지에서 상기 세포를 확장하는 단계.
- [0234] 인간 CD8⁺ Tregs 세포를 분리 및 Treg 세포를 확장하기 위한 방법은 상기에 기재되어 있다.
- [0235] 하나의 구현예에서, CD8⁺GITR⁺ Treg 세포는 GITR을 검출하는데 유용한 항체로 분리될 수 있다. 인간 GITR 항원에 결합하는 항체의 예시는 단클론성 항체 MAB689-100, 621, eBioAITR, 110416를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0236] 또 다른 구현예에서, CD8⁺CD45RC^{low} GITR⁺ Treg 세포는 GITR을 검출하는데 유용한 항체 및 CD45RC를 검출하는데 유용한 항체로 분리될 수 있다. 인간 GITR에 결합하는 항체의 예시는 단클론성 항체 MAB689-100, 621, eBioAITR, 110416를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 인간 CD45RC 항원에 결합하는 항체의 예시는 단클론성 항체 MT2 및 RP1/12를 포함한다.
- [0237] 하나의 구현예에서, CD8⁺GITR⁺ Treg 세포 또는 CD8⁺CD45RC^{low} GITR⁺ Treg 세포는 적어도 하나의 자극제로 PBMCs 또는 림프구의 활성화 후에 본 발명의 방법에 따라 분리된다. 자극제의 예시는 상기에 기재되어 있다.
- [0238] 하나의 구현예에서, 상기에 기재된 바와 같은 IFN γ⁺IL-10⁺IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포는 유도 만능 줄기세포(iPSC) 또는 iPSC 유래된 CD34⁺ 세포의 배양으로부터 유래되고 분리된다. 본 발명의 내용에서, iPSC 또는 iPSC 유래된 CD34⁺ 세포의 배양은 예를 들어, 인간 말초혈액 단핵세포(PBMCs)를 함유하는 생물학적 샘플로부터 수득될 수 있다.
- [0239] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 CD8⁺ Tregs의 집단을 고갈시키는 방법에 관한 것이고, 다음을 포함한다:
- 인간 말초혈액 단핵세포(PBMCs) 또는 림프구를 함유하는 생물학적 샘플에서 CD8⁺GITR⁺ Treg 세포를 검출하는

단계, 선택적으로 인간 말초혈액 단핵세포(PBMCs) 또는 럼프구를 함유하는 생물학적 샘플에서 $CD8^+ CD45RC^{low} GITR^+$ Treg 세포를 검출하는 단계, 및

[0241] - 상기 세포를 고갈시키는 단계,

[0242] - 이로써 $IFN\gamma^+ IL-10^+ IL-34^+$ 분비 인간 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포에서 고갈된 세포 집단을 수득하는 단계.

[0243]

[0244] 본 발명의 약학적 조성물

[0245] 본 발명은 또한 본 발명의 $CD8^+$ 인간 Tregs, 특히 본 발명에 따른 $IFN\gamma^+ IL-10^+ IL-34^+$ 분비 인간 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포의 집단, 바람직하게는 본 발명의 $CD8^+$ 인간 Tregs, 특히 $IFN\gamma^+ IL-10^+ IL-34^+$ 분비 인간 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포의 분리 집단을 포함하는 조성을 제공한다. 하나의 구현예에서, 본 발명에 따른 조성을 본 발명의 $CD8^+$ 인간 Tregs, 특히 $IFN\gamma^+ IL-10^+ IL-34^+$ 분비 인간 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포의 농축 집단을 포함한다. 하나의 구현예에서, 본 발명에 따른 조성을 본 발명의 $CD8^+$ 인간에서 고갈된 세포 집단, 특히 $IFN\gamma^+ IL-10^+ IL-34^+$ 분비 인간 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포-고갈 집단을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명에 따른 조성을 본 발명의 유전적으로 변형된 $CD8^+$ 인간 Tregs의 집단, 특히 유전적으로 변형된 $IFN\gamma^+ IL-10^+ IL-34^+$ 분비 인간 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포의 집단을 포함한다.

[0246] 또 다른 구현예에서, 본 발명에 따른 조성을 본 발명의 $CD8^+$ 인간 Treg, 특히 $IFN\gamma^+ IL-10^+ IL-34^+$ 분비 인간 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포의 확장 집단을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명에 따른 조성을 본 발명의 항원-특이적인 $CD8^+$ 인간 Tregs의 확장 집단, 특히 항원-특이적인 $IFN\gamma^+ IL-10^+ IL-34^+$ 분비 인간 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포의 확장 집단을 포함한다.

[0247] 본 발명은 또한 본 발명의 $CD8^+$ 인간 Tregs, 특히 본 발명에 따른 $IFN\gamma^+ IL-10^+ IL-34^+$ 분비 인간 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포의 집단을 포함하는 약학적 조성을 제공한다.

[0248] 하나의 구현예에서, 약학적 조성을 본 발명의 $CD8^+$ 인간 Tregs, 특히 상기 기재된 바와 같은 $IFN\gamma^+ IL-10^+ IL-34^+$ 분비 인간 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포의 집단 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함한다. 하나의 구현예에서, 약학적 조성을 본 발명의 $CD8^+$ 인간 Tregs, 특히 상기 기재된 바와 같은 $IFN\gamma^+ IL-10^+ IL-34^+$ 분비 인간 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포의 분리 집단 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함한다. 하나의 구현예에서, 약학적 조성을 본 발명의 $CD8^+$ 인간 Tregs, 특히 상기 기재된 바와 같은 $IFN\gamma^+ IL-10^+ IL-34^+$ 분비 인간 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포의 농축 집단 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함한다. 하나의 구현예에서, 약학적 조성을 본 발명의 유전적으로 변형된 $CD8^+$ 인간 Tregs, 상기 기재된 바와 같은 유전적으로 변형된 $IFN\gamma^+ IL-10^+ IL-34^+$ 분비 인간 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포의 집단 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함한다.

[0249] 또 다른 구현예에서, 약학적 조성을 본 발명의 확장된 $CD8^+$ 인간 Tregs, 특히 상기 기재된 바와 같은 확장된 $IFN\gamma^+ IL-10^+ IL-34^+$ 분비 인간 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포의 집단 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함한다. 특정한 구현예에서, 약학적 조성을 본 발명의 확장된 항원-특이적인 $CD8^+$ 인간 Tregs, 특히 상기 기재된 바와 같은 확장된 항원-특이적인 $IFN\gamma^+ IL-10^+ IL-34^+$ 분비 인간 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 세포의 집단 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함한다.

[0250] 약학적 조성을 일반적으로 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 및/또는 승인된 침가제, 항생제, 보존제, 항원보조제, 희석제 및/또는 안정화제를 포함한다. 이러한 보조 물질은 물, 식염수, 글리세롤, 에탄올, 습윤제 또는 유화제, pH 완충 물질 또는 이와 유사한 것일 수 있다. 적절한 담체는 단백질, 다당류, 폴리락트산, 폴리글리콜산, 종합 아미노산(polymeric amino acid), 아미노산 공중합체, 지질 응집체 또는 이와 유사한 것과 같은, 일반적으로 크고, 느리게 대사되는 분자이다. 이 약학적 조성을 만니톨, 텍스트란, 당, 글라이신, 락토스 또는 폴

리비닐피롤리돈과 같은 추가적인 첨가제 또는 항산화제 또는 불활성화 가스와 같은 다른 첨가제, 안정화제 또는 체내 투여에 적합한 재조합 단백질(예를 들어, 인간 혈청 알부민)을 함유할 수 있다.

[0251] 본 발명에서 사용된 바와 같이, 용어 "약학적으로 허용가능한"은 포유류, 특히 인간에 적절한 경우에 투여되었을 때, 불리한, 알레르기성 또는 다른 부적당한 반응을 일으키지 않는 분자 엔터티(molecular entity) 및 조성물을 지칭한다. 약학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제는 비-독성 고체, 반-고체 또는 액체 필러, 희석제, 캡슐화 물질 또는 임의의 유형의 제형 보조제를 지칭한다.

[0252] 본 발명은 또한 본 발명의 CD8⁺ 인간 Tregs, 특히 본 발명에 따른 IFN γ⁺ IL-10⁺ IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺ CD45RC^{low} Treg 세포의 집단을 포함하는 의약을 제공한다. 하나의 구현예에서, 본 발명의 의약은 본 발명의 CD8⁺ 인간 Tregs, 특히 본 발명에 따른 IFN γ⁺ IL-10⁺ IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺ CD45RC^{low} Treg 세포의 분리 집단을 포함한다. 하나의 구현예에서, 본 발명의 의약은 본 발명의 CD8⁺ 인간 Tregs, 특히 본 발명에 따른 IFN γ⁺ IL-10⁺ IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺ CD45RC^{low} Treg 세포의 농축 집단을 포함한다. 하나의 구현예에서, 본 발명의 의약은 본 발명의 유전적으로 변형된 CD8⁺ 인간 Tregs, 특히 본 발명에 따른 유전적으로 변형된 IFN γ⁺ IL-10⁺ IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺ CD45RC^{low} Treg 세포의 집단을 포함한다.

[0253] 하나의 구현예에서, 본 발명의 의약은 본 발명의 CD8⁺ 인간 Tregs, 특히 본 발명에 따른 IFN γ⁺ IL-10⁺ IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺ CD45RC^{low} Treg 세포의 확장 집단을 포함한다. 하나의 구현예에서, 본 발명의 의약은 본 발명의 항원-특이적인 CD8⁺ 인간 Tregs, 특히 본 발명에 따른 항원-특이적인 IFN γ⁺ IL-10⁺ IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺ CD45RC^{low} Treg 세포의 확장 집단을 포함한다.

[0254]

본 발명의 Treg 세포의 치료학적 방법 및 용도

[0256] 상기에 언급된 바와 같이, 본 발명의 CD8⁺ 인간 Tregs, 특히 본 발명의 IFN γ⁺ IL-10⁺ IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺ CD45RC^{low} Treg 세포의 분리 집단은 면역 시스템에 의한 자기-조직 또는 치료학적 단백질의 분해를 막기 위한, 자가면역, 만성 염증, 알레르기, 이식(이식 거부 반응 또는 GVHD를 예방 또는 치료하기 위한), 유전자 치료법 및 치료학적 단백질으로의 치료 분야에 관심이 있다. 본 발명에 따른 인간 CD8⁺ CD45RC^{low} Treg 세포의 분리 집단은 실제로 면역 관용을 유도하는 능력 및/또는 면역 반응, 바람직하게는 치료되는 질환과 관련된 항원에 대한 직접적인 항원-특이적인 면역 반응(들) 및/또는 CD4⁺ T 세포, CD8⁺ T 세포, 바람직하게는 면역 T-세포 관용 또는 감소된 T-세포 활성화에 의해 매개된 원하지 않는 후천성 면역 반응을 억제 및/또는 방해하는 능력을 보였다. 바람직하게는, 본 발명의 CD8⁺ 인간 Tregs, 특히 본 발명의 IFN γ⁺ IL-10⁺ IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺ CD45RC^{low} Treg 세포의 분리 집단은 치료되는 환자로부터 분리된다(그리고 체외 확장 후에 환자에게 재-투여될 것이다).

[0257] 이에 따라, 본 발명의 하나의 측면은 의약으로 사용되기 위한 본 발명의 CD8⁺ 인간 Tregs, 특히 본 발명의 IFN γ⁺ IL-10⁺ IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺ CD45RC^{low} Treg 세포의 분리 집단에 관한 것이다. 본 발명의 또 다른 측면은 의약으로 사용되기 위한 본 발명의 확장된 CD8⁺ 인간 Tregs, 특히 확장된 IFN γ⁺ IL-10⁺ IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺ CD45RC^{low} Treg 세포의, 바람직하게는 항원-특이적인 분리 집단에 관한 것이다.

[0258] 본 발명의 CD8⁺ 인간 Tregs, 특히 본 발명에 따른 IFN γ⁺ IL-10⁺ IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺ CD45RC^{low} Treg 세포의 분리 집단(바람직하게는 확장된 항원-특이적인 집단)은 많은 접근 방법들에 의해 환자에게 재도입될 수 있다. 바람직하게는, 이들은 정맥 내로 주입된다. 하나의 구현예에서, 약 1X10⁴ 내지 약 1X10⁸ 세포가 환자에게 재도입된다. 또 다른 구현예에서, 약 1X10⁶ 내지 약 10X10⁶ 세포/환자 체중의 kg이 환자에게 재도입된다.

[0259] 용어 "예방하다" "예방하는" 및 "예방"은 여기에서 본 발명의 CD8⁺ 인간 Tregs, 특히 본 발명의 따른 IFN γ⁺ IL-10⁺ IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺ CD45RC^{low} Treg 세포를 투여한 개체에서의 장애의 발달 또는 발생의 억제 또는 장애의

하나 이상의 증상의 재발, 발생 또는 발달의 예방을 지칭한다.

[0260] 본 발명에서 사용된 바와 같이, 용어 "치료"는 치료 처리 및 예방 조치 및 예방책을 지칭하고, 여기에서 목적은 표적이 되는 병리적 장애 또는 상태를 예방 또는 감속(완화, 감소)하는 것이다. 치료가 필요한 이들은 장애를 가지기 쉬운 이들뿐만 아니라 장애를 이미 가지고 있는 이들을 포함한다. 환자는 원하지 않는 면역 반응에 대하여 성공적으로 "치료되고", 만약 본 발명의 CD8⁺ 인간 Tregs, 특히 본 발명의 따른 IFN γ⁺ IL-10⁺ IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺ CD45RC^{low} Treg 세포의 치료학적인 양을 수여받은 후에는, 환자는 다음의 하나 이상의 주목할 만한 및/또는 측정 가능한 감소 또는 부재를 보인다: 병원성 세포 수의 감소; 병원성인 전체 세포의 비율에서의 감소; 및/또는 특이적인 질환 도는 상태와 관련된 하나 이상의 증상의 다소 완화; 감소된 사망률 및 사망, 및 생활 질의 향상. 질환에서의 성공적인 치료 및 개선을 평가하기 위한 상기 파라미터는 의사에게 친숙한 일반적인 과정에 의해 쉽게 측정할 수 있다.

[0261] 본 발명에서 사용된 바와 같이, 용어 "환자"는 의료적 케어를 기다리는 수여자인, 또는 수여받는, 또는 의료적 과정의 개체이었고/이고/일, 또는 질병의 발달 또는 진행에 대하여 모니터링되는 인간을 지칭한다. 하나의 구현 예에서, 인간은 성인이다(예를 들어, 18세 이상의 환자). 또 다른 구현예에서, 환자는 어린이다(예를 들어, 18세 이하의 환자). 하나의 구현예에서, 환자는 남성이다. 또 다른 구현예에서 환자는 여성이다.

[0262] 본 발명에서 사용된 바와 같이, 용어 "치료학적으로 효과적인 양"은 본 발명의 CD8⁺ 인간 Tregs, 특히 IFN γ⁺ IL-10⁺ IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺ CD45RC^{low} Treg 세포의, (1) 원하지 않는 면역 반응의 발생의 자연 또는 예방; (2) 원하지 않는 면역 반응의 하나 이상의 증상의 진행, 심화 또는 악화의 감속 또는 중단; (3) 원하지 않는 면역 반응의 증상의 개선을 불러일으킴; (4) 원하지 않는 면역 반응의 심각성 또는 발생률의 감소; 또는 (5) 원하지 않는 면역 반응의 치료를 목표로 하는, 표적에 부정적이거나 불리한 부작용을 일으키지 않는 수를 지칭한다. 치료학적으로 효과적인 양은 예방법 및 예방적 작용을 위해, 원하지 않는 면역 반응의 발생 전에 투여될 수 있다. 그 대신에, 또는 추가적으로, 치료학적으로 효과적인 양은 치료적 작용을 위해 원하지 않는 면역 반응의 개시 후에 투여될 수 있다. 효과적인 양은 환자의 나이, 성별, 인종, 일반적인 상태 등 치료될 상태의 심각성, 치료의 기간, 임의의 병행치료(concurrent treatment)의 특성, 사용되는 약학적으로 허용되는 담체 및 당업자의 지식 및 전문성 내의 유사한 인자들에 따라 다양할 수 있다. 적절한 경우에, 임의의 개별적인 케이스에서의 "효과적인 양"은 관련 텍스트 및 문헌을 참조하여 및/또는 일반적인 실험을 사용하여 당업자에 의해 결정될 수 있다(예를 들어, Gennaro et al., Eds. Remington's The Science and Practice of Pharmacy, 20th edition, (2000), Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore MD; Braunwald et al., Eds. Harrison's Principles of Internal Medicine, 15th edition, (2001), McGraw Hill, NY; Berkow et al., Eds. The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, (1992), Merck Research Laboratories, Rahway NJ 참조).

[0263] 하나의 구현예에서, 본 발명은 자가면역 질환을 예방 또는 치료하기 위한 방법에서 사용하기 위한 본 발명의 CD8⁺ 인간 Tregs, 특히 본 발명의 IFN γ⁺ IL-10⁺ IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺ CD45RC^{low} Treg 세포의 분리 집단에 관한 것이다.

[0264] 하나의 구현예에서, 본 발명은 자가면역 질환을 예방 또는 치료하기 위한 방법에서 사용하기 위한 본 발명의 확장된 CD8⁺ 인간 Tregs, 특히 본 발명의 확장된 IFN γ⁺ IL-10⁺ IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺ CD45RC^{low} Treg 세포의 분리 집단에 관한 것이다.

[0265] 본 발명은 또한 자가면역 질환을 예방 또는 치료하기 위한 방법에 관한 것이고, 이를 필요로 하는 환자에게 본 발명의 CD8⁺ 인간 Tregs, 특히 본 발명의 IFN γ⁺ IL-10⁺ IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺ CD45RC^{low} Treg 세포의 집단의 약학적으로 효과적인 양을 투여하는 단계를 포함한다.

[0266] 본 발명에서 사용되는 바와 같이, 용어 "자가면역 질환"은 면역 시스템이 정상 숙주의 일부인 항원(자가-항원)에 대하여 면역 반응(예를 들어, B-세포 또는 T-세포 반응)을 생성하는, 결과적으로 조직에 손상을 주는 질환을 지칭한다. 자가면역 질환에서, 숙주의 면역 시스템은 "자기"로서 특정 항원을 인식하는데 실패하고 면역 반응은 항원을 발현하는 숙주의 조직에 대하여 고정된다.

[0267] 인간에게 영향을 주는 전형적인 자가면역 질환은 류마티스 관절염, 청소년의 소수관절염(juvenile oligoarthritis), 콜라겐-유도된 관절염, 항원보조제-유도된 관절염, 포도막염, 쇼그렌 증후군, 다발성 경화증, 실험적 자가면역 뇌수막염, 염증성 장 질환(예를 들어, 크론병 및 궤양성 대장염), 자가면역 위점막 위축

(autoimmune gastric atrophy), 심상성 천포창, 건선, 백반증, 유형 I 당뇨병, 비-비만 당뇨병, 중증 근무력증, 그레이브스 병, 하시모토 갑상선염, 경화성 담관염, 경화성 침샘염, 전신성 홍반성 루푸스, 자가면역 혈소판감소성 자반, 구스파스트어 증후군, 에디슨병, 전신 경화증, 다발성근염, 피부근염, 후천적 혈우병, 혈전성 혈소판감소성 자반 및 이와 유사한 것을 포함한다.

[0268] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 만성 염증성 질환을 예방 또는 치료하기 위한 방법에서 사용하기 위한 본 발명의 CD8⁺ 인간 Tregs, 특히 본 발명의 IFN γ ⁺IL-10⁺IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포의 분리 집단에 관한 것이다.

[0269] 하나의 구현예에서, 본 발명은 만성 염증성 질환을 예방 또는 치료하기 위한 방법에서 사용하기 위한 본 발명의 확장된 CD8⁺ 인간 Tregs, 특히 본 발명의 확장된 IFN γ ⁺IL-10⁺IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포의 분리 집단에 관한 것이다.

[0270] 인간에게 영향을 주는 만성 염증성 질환의 예시는 비-자가면역 염증성 장 질환, 수술-후 유착, 관상동맥 질환, 간섬유화, 급성 호흡곤란 증후군, 급성 염증성 췌장염(acute inflammatory pancreatitis), 내시경 역행 췌담관 조영술-유도된 췌장염(endoscopic retrograde cholangiopancreatography-induced pancreatitis), 화상, 관상동맥, 대뇌 동맥 및 말초 동맥의 죽종형성(atherogenesis), 충수염, 담낭염, 계실염, 내장 섬유증 장애(visceral fibrotic disorder), 상처 치유, 피부 흉터 장애(skin scarring disorder, 퀘로이드, 화농성 한섬염), 육아종성 장애(유육종증, 원발성 담즙성 간경화증), 천식, 과저성 농피증, 스위트 증후군, 베체트병, 원발 경화성 담관염 및 농양을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0271] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 이식 거부반응을 예방 또는 치료하기 위한(또는 이식 관용을 유도하기 위한) 또는 GVHD 예방 또는 치료하기 위한 방법에서 사용하기 위한 본 발명의 CD8⁺ 인간 Tregs, 특히 본 발명의 IFN γ ⁺IL-10⁺IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포의 분리 집단에 관한 것이다.

[0272] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 이식 거부반응을 예방 또는 치료하기 위한(또는 이식 관용(transplant tolerance)을 유도하기 위한) 또는 GVHD 예방 또는 치료하기 위한 방법에서 사용하기 위한 본 발명의 확장된 CD8⁺ 인간 Tregs, 특히 본 발명의 확장된 IFN γ ⁺IL-10⁺IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포의 분리 집단에 관한 것이다.

[0273] 본 발명은 또한 이식편대숙주 질환(GVHD: graft versus host disease) 또는 이식 거부 반응을 예방 또는 치료하는(또는 이식 관용을 유도하는) 방법에 관한 것이고, 이를 필요로 하는 환자에게 본 발명의 CD8⁺ 인간 Tregs, 특히 본 발명의 IFN γ ⁺IL-10⁺IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포의 집단의 약학적으로 효과적인 양을 투여하는 단계를 포함한다.

[0274] 본 발명에서 사용된 바와 같이, 용어 "이식 거부반응"은 급성 및 만성 이식 거부반응 모두를 포함한다. "급성 거부반응"은 이식되는 조직이 면역학적으로 외래일 때, 이식 수여자 조직의 면역 시스템에 의한 거부반응이다. 급성 거부반응은 수여자의 면역 세포들의 효과기 기능을 수행하고 이식 조직을 파괴하는 이들에 의한 이식 조직의 침투의 특징을 나타낸다. 급성 거부반응의 발생은 급격하고 일반적으로 이식 수술 후 몇주 내로 인간에서 발생한다. 일반적으로, 급성 거부반응은 라파마이신, 사이클로포린, 항-CD40L 단클론성 항체 및 이와 유사한 것과 같은 면역억제제로 방해되거나 억제될 수 있다. "만성 이식 거부반응"은 일반적으로 이식 후 몇 달 내지 몇 년 내에, 심지어는 급성 거부반응의 성공적인 면역억제의 존재 하에서 인간에서 발생한다. 섬유증은 장기 이식의 모든 유형의 만성 거부반응에서의 일반적인 요인이다.

[0275] 용어 "이식(transplantation)" 및 이의 변이는 이식이 동질유전자이거나(공여자와 수여자가 유전적으로 동일한), 동종이계이거나(공여자와 수여자가 동일한 종이지만 유전적 기원이 다른), 이종개체인(공여자와 수여자가 상이한 종인) 수여자 내로의 이식체(transplant)(또는 이식편(graft)으로 불림)의 삽입을 지칭한다. 따라서, 전형적인 시나리오에서, 숙주는 인간이고 이식편은 상동한 또는 상이한 유전적 기원의 인간으로부터 유래된 동종 이식편이다. 또 다른 시나리오에서, 이식편은 예를 들어 인간 숙주 내로 이식되는 개코원숭이 심장과 같이, 계통학적으로 광범위하게 분리된 종으로부터의 동물을 포함하여, 이식되는 종으로부터 상이한 종으로부터 유래된다.

[0276] 하나의 구현예에서, 이식체의 공여자는 인간이다. 이식체의 공여자는 살아있는 공여자 또는 죽은 공여자, 즉 시

체 공여자일 수 있다.

[0277] 하나의 구현예에서, 이식체는 장기, 조직 또는 세포이다.

[0278] 본 발명에서 사용된 바와 같이, 용어 "장기"는 유기체 내에서 특정 기능 또는 기능 군을 수행하는 고체 혈관화된 기관을 지칭한다. 용어 장기는 심장, 폐, 신장, 간, 이자, 피부, 자궁, 뼈, 연골, 소장 또는 대장, 방광, 뇌, 가슴, 혈관, 식도, 나팔관, 쓸개, 난소, 이자, 전립선, 태반, 척수, 팔 다리, 지라, 위, 고환, 흉선, 갑상선, 기도, 요관, 요도를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명에서 사용된 바와 같이, 용어 "조직"은 인간 또는 동물에서의 조직의 임의의 유형을 지칭하고, 유관속 조직, 피부 조직, 간 조직, 체장 조직, 신경 조직, 비뇨생식기 조직, 위장 조직, 뼈 및 연골을 포함하는 골격 조직, 지방 조직, 힘줄 및 인대를 포함하는 결합 조직, 양막 조직(amniotic tissue), 만성 조직(chorionic tissue), 경막(dura), 심막(pericardia), 근육 조직, 선상 조직, 얼굴 조직, 눈 조직을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0279] 본 발명에서 사용된 바와 같이, 용어 "세포"는 관심 있는 세포가 농축된 조성물, 바람직하게는 상기 세포의 적어도 약 20%, 약 30%, 약 40%, 바람직하게는 적어도 약 50%, 약 60%, 보다 더 바람직하게는 적어도 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%를 포함하는 조성물을 지칭한다.

[0280] 특정한 구현예에서 세포는 골수, 말초혈액 또는 제대혈로부터 유래된 다분화능(multipotent) 조혈모세포; 또는 다능성(pluripotent, 예를 들어, 배아 줄기세포(ES) 또는 유도만능 줄기세포(iPS)) 또는 심장 근육 세포(cardiomyocyte), 베타 체장 세포, 간세포, 뉴런 등과 같은 상이한 세포 계통의 다분화능 줄기세포-유래된 분화된 세포로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0281] 하나의 구현예에서, 세포 조성물은 동종이계 조혈 줄기세포 이식(HSCT)을 위해 사용되고, 이에 따라 일반적으로 골수, 말초혈액 또는 제대혈로부터 유래된 다분화능 조혈 줄기세포를 포함한다.

[0282] HSCT는 백혈병 및 림프종을 가진 환자를 치료할 수 있다. 그러나, 동종이계 HCT의 중요한 한계는 이러한 치료법을 받은 환자의 약 30-50%에서 심각한 형태로 일어나는 이식편대숙주 질환(GVHD)의 발달이다.

[0283]

[0284] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 치료학적 단백질에 대한 원하지 않는 면역 반응을 예방 또는 치료하기 위한 방법에서 사용하기 위한 본 발명의 CD8⁺ 인간 Tregs, 특히 본 발명의 IFN γ ⁺ IL-10⁺ IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포의 분리 집단에 관한 것이다.

[0285]

또 다른 구현예에서, 본 발명은 치료학적 단백질에 대한 원하지 않는 면역 반응을 예방 또는 치료하기 위한 방법에서 사용하기 위한 본 발명의 확장된 CD8⁺ 인간 Tregs, 특히 본 발명의 확장된 IFN γ ⁺ IL-10⁺ IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포의 분리 집단에 관한 것이다.

[0286]

본 발명은 또한 치료학적 단백질에 대한 임의의 원하지 않는 면역 반응을 예방 또는 치료하기 위한 방법에 관한 것이고, 이를 필요로 하는 환자에게 본 발명의 CD8⁺ 인간 Tregs의 집단, 특히 본 발명의 IFN γ ⁺ IL-10⁺ IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포의 집단의 약학적으로 효과적인 양을 투여하는 단계를 포함한다.

[0287]

본 발명에서 사용된 바와 같이, 용어 "치료학적 단백질에 대한 원하지 않는 면역 반응"은 유전자 치료법의 과정에서 발현되는 단백질 및/또는 인자 VIII(혈우병 A) 및 다른 응고 인자와 같은 치료학적 단백질, 효소보충요법, 단클론성 항체(예를 들어, 나탈리주맙(natalizumab), 리툭시맙(rituximab), 인플릭시맙(infliximab)), 다중클론성 항체, 효소 또는 사이토카인(예를 들어, IFN β)에 의한 임의의 원하지 않는 면역 반응을 지칭한다.

[0288]

또 다른 구현예에서, 본 발명은 알러지의 예방 또는 치료에서 사용하기 위한 본 발명의 CD8⁺ 인간 Tregs, 특히 본 발명의 IFN γ ⁺ IL-10⁺ IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포의 분리 집단에 관한 것이다.

[0289]

또 다른 구현예에서, 본 발명은 알러지의 예방 또는 치료에서 사용하기 위한 본 발명의 확장된 CD8⁺ 인간 Tregs, 특히 본 발명의 확장된 IFN γ ⁺ IL-10⁺ IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포의 분리 집단에 관한 것이다.

[0290]

본 발명은 또한 알러지 예방 또는 치료하기 위한 방법에 관한 것이고, 이를 필요로 하는 환자에게 본 발명의

CD8⁺ 인간 Tregs의 집단, 특히 본 발명의 IFN γ⁺IL-10⁺IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포의 집단의 약학적으로 효과적인 양을 투여하는 단계를 포함한다.

[0291] 본 발명에서 사용된 바와 같이, 용어 "알러지" 또는 "알레르기"는 면역 시스템의 장애(또는 부적절한 반응)을 지칭한다. 알러지 반응은 알레르겐으로 알려진 일반적으로 무해한 환경적인 물질에 대하여 일어난다; 이들 반응은 학습되고, 예측할 수 있고, 빠르다. 정확하게, 알러지는 과민증의 4가지 형태 중 하나이고, 유형 I(또는 즉시형) 과민증으로 불린다. 이는 IgE로 알려진 항체의 하나의 유형에 의해 비만 세포 및 호염구라고 불리는 특정 백혈구의 과도한 발현, 결과적으로 과도한 염증성 반응을 일으키는 것으로 특징지어 진다. 일반적인 알러지 반응은 습진, 두드러기, 고초열, 천식, 식품 알레르기 및 말벌 및 벌과 같은 쏘는 곤충의 독에 대한 반응을 포함한다.

[0292] 하나의 구현예에서, 개체는 환자이다.

[0293] 하나의 구현예에서, 개체는 만성 염증성 질환에 걸린, 바람직하게는 만성 염증성 질환으로 진단된 것이다.

[0294] 하나의 구현예에서, 개체는 자가면역 질환에 걸린, 바람직하게는 자가면역 질환으로 진단된 것이다.

[0295] 하나의 구현예에서, 개체는 이전에 이식되었거나, 또는 이식될 것이다.

[0296] 하나의 구현예에서, 개체는 이전에 치료학적 단백질을 수여받았거나, 또는 치료학적 단백질을 수여받을 것이다.

[0297] 하나의 구현예에서, 개체는 알러지에 걸린, 바람직하게는 알러지로 진단된 것이다.

[0298] 하나의 구현예에서, 개체는 예를 들어, 라파마이신, 사이클로스포린 A, 미코페놀레이트 모페틸, 메틸프레드니솔론, 타크로리무스 또는 이들의 조합과 같은 면역억제제로 치료받는다. 또 다른 구현예에서, 개체는 라파마이신, 사이클로스포린 A, 미코페놀레이트 모페틸, 메틸프레드니솔론, 타크로리무스 또는 이들의 조합과 같은 면역억제제로 치료받지 않는다.

[0299]

본 발명의 예후 측정 방법:

[0300] 또 다른 측면에서, 본 발명은 환자가 이식 거부반응, GVHD, 만성 염증성 질환, 자가면역 질환, 치료학적 단백질에 대한 원하지 않은 면역 반응 또는 알레르기(상기 기재된 바와 같음)의 위험이 있는지를 결정하는 시험관 내 방법에 관한 것이고, 본 발명의 방법에 의해 상기 환자로부터 수득한 생물학적 샘플에서 본 발명의 CD8⁺ 인간 Tregs, 특히 상기 기재된 바와 같은 IFN γ⁺IL-10⁺IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포의 존재를 결정하는 단계를 포함하고, 여기에서 본 발명의 CD8⁺ 인간 Tregs, 특히 상기 기재된 바와 같은 IFN γ⁺IL-10⁺IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포의 존재는 이식 거부반응, GVHD, 만성 염증성 질환, 자가면역 질환, 치료학적 단백질에 대한 원하지 않은 면역 반응 또는 알레르기의 위험의 감소를 보여주는 지표이다.

[0302] 본 발명에서 사용된 바와 같이, 용어 "위험"은 이식 거부반응의 발생과 같은 사건이 특정 시간 기간에 걸쳐 발생할 가능성을 지칭하고, 개체의 "절대적인" 또는 "상대적인" 위험을 의미할 수 있다. 절대적인 위험은 적절한 시간 집단에 대한 실제적인 관찰 사후-측정(post-measurement)에 관하여 또는 적절한 시간 기간 동안 추적된 통계학적으로 유효한 역사적 집단으로부터 개발된 지표 값에 관하여 측정될 수 있다. 상대적인 위험은 임상적 위험 요인을 어떻게 평가하는지에 의해 다양할 수 있는 낮은 위험 집단의 절대적인 위험 또는 평균 집단 위험과 비교한 환자의 절대적인 위험의 비율을 지칭한다. 주어진 테스트 결과에 대한 부정적인 사건에 대한 긍정적인 사건의 비율인, 승산비(odd ratio)가 또한 일반적으로 사용된다(승산은 공식 $p/(1-p)$ 에 따른 것이고, 여기에서 p 는 사건의 가능성, $(1-p)$ 는 사건이 없는 가능성이다).

[0303] 본 발명의 내용 내의 "위험 결정"은 사건이 일어날 수 있는 가능성, 승산 또는 가망의 예측을 하는 것을 포함한다. 위험 결정은 또한 사후의 임상 매개변수, 나이, 성별 미스매치, HLA-검사 등과 같은 통상적인 실험실 위험 인자 값; 이전에 측정된 집단에 관한 절대적인 또는 상대적인 관계(term)에서의 예측을 포함한다. 본 발명의 방법은 이식 거부반응의 위험의 범주적인(categorical) 측정법을 만드는데 사용될 수 있고, 이에 따라 이식 거부반응의 위험이 있는 것으로 정의된 이식된 환자의 카테고리의 위험 범위를 정의한다.

[0304] 본 발명에서 사용된 바와 같이, 용어 "존재의 결정"은 제어값 또는 설정값에 관계 있거나 또는 관계 없이 정성적인 및/또는 정량적인 검출(예를 들어, 존재의 검출 및/또는 측정)을 포함한다. 본 발명에서 사용된 바와

같이, "검출"은 본 발명의 CD8⁺ 인간 Tregs, 특히 상기 기재된 바와 같은 IFNγ⁺IL-10⁺IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포가 생물학적 샘플에서 존재하는지 여부를 결정하는 것을 의미하고, "측정"은 생물학적 샘플에서 본 발명의 CD8⁺ 인간 Tregs의 양, 특히 상기에 기재된 바와 같은 IFNγ⁺IL-10⁺IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포의 양을 결정하는 것을 의미한다.

[0305] 본 발명에서 사용된 바와 같이, 용어 "생물학적 샘플"은 당업계에서의 이의 일반적인 의미를 가지고, 시험관 내 평가의 목적을 위해 환자로부터 수득될 수 있는 임의의 샘플을 지칭한다. 바람직한 생물학적 샘플은 혈액 샘플(예를 들어, 전혈 샘플, 혈청 샘플 또는 플라스마 샘플), 보다 특히 이식된 환자 또는 자가면역 질환 또는 알러지를 앓고 있는 환자로부터 수득되는 혈액 샘플을 지칭한다.

[0306] 또 다른 측면에서, 본 발명은 이식된 환자(수여자)가 내성이 있는지 결정하기 위한 시험관 내 방법에 관한 것이고, 본 발명의 방법에 의해 상기 이식된 환자로부터 수득되는 생물학적 샘플에서 본 발명의 CD8⁺ 인간 Tregs, 특히 상기 기재된 바와 같은 IFNγ⁺IL-10⁺IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포의 존재를 결정하는 단계를 포함하고, 여기에서 본 발명의 CD8⁺ 인간 Tregs, 특히 상기 기재된 바와 같은 IFNγ⁺IL-10⁺IL-34⁺ 분비 인간 CD8⁺CD45RC^{low} Treg 세포의 존재는 내성을 보여주는 지표이다.

[0307] 본 발명에서 사용된 바와 같이, 용어 "내성" 또는 "면역 관용"은 면역 반응을 유도하는 능력을 가진 물질 또는 조직에 대한 면역 시스템의 무반응 상태를 지칭한다. 본 발명에서 사용된 바와 같이, 용어 "면역 반응"은 T 세포 매개된 및/또는 B 세포 매개된 면역 반응을 포함한다. 전형적인 면역 반응은 T 세포 반응, 예를 들어, 사이토카인 생성 및 세포성 세포독성을 포함하고, 또한, 용어 면역 반응은 T 세포 활성화에 의해 간접적으로 영향을 받는 면역 반응, 예를 들어, 항체 생성(체액성 반응) 및 사이토카인 반응성 세포, 예를 들어, 대식세포의 활성화에 의해 간접적으로 영향을 받는 면역 반응을 포함한다. 면역 반응에 관련된 면역 세포는 B 세포 및 T 세포(CD4⁺, CD8⁺, Th1 및 Th2 세포)와 같은 림프구; 항원 제시 세포(예를 들어, 수지상 세포와 같은 전문 항원 제시 세포(professional antigen presenting cell)); 자연 살생 세포; 대식세포, 호산구, 비만세포, 호염구 및 과립구와 같은 골수성 세포를 포함한다.

[0308] 본 발명은 하기의 도면 및 실시예에 의해 추가로 설명될 것이다. 그러나, 이러한 실시예 및 도면이 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다.

[0309]

도면의 간단한 설명

[0310] 도 1. 인간 CD8⁺CD45RC^{low} Tregs는 인간 CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Tregs 보다 더 효과적으로 항-공여자 면역 반응을 억제 한다. CD8⁺CD45RC^{low} T 세포를 16:1 내지 1:4 이펙터:억제제 비율의 범위에서 동종이형 T-고갈된 PBMCs로 자극되는 동(질)유전자적 이펙터 CD4⁺CD25⁻ T 세포의 증식에 대한 억제 활성에 대하여 통상적인 CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Tregs와 비교하였다. 이원 반복측정 분산분석(Two Way RM ANOVA). 증식은 Tregs의 부재 하에 증식으로 정규화되었다. *, p<0.05.

도 2. 인간 CD8⁺CD45RC^{low} Tregs의 억제 활성은 pDCs와의 상호작용에 의해 우선적으로 증가된다. 분류된 CD8⁺ Tregs를 항-CD3 및 항-CD28로 12시간 자극하였고, 이펙터:억제제 8:1 내지 1:1 비율의 범위에서 동종이형 T-고갈된 PBMCs(APC), cDCs 또는 pDCs로 자극된 동(질)유전자적 이펙터 CD4⁺CD25⁻ T 세포의 증식에 대한 억제 활성에 대하여 분석하였다. 이원 반복측정 분산분석. 증식은 Tregs의 부재 하에 증식으로 정규화되었다. *p<0.05, **, p<0.01.

도 3. 인간 CD8⁺CD45RC^{low} Tregs의 아집단은 GITR을 억제한다. 표면 수용체 GITR의 발현을 분리된 CD8⁺CD45RC^{low} Tregs 및 분리된 CD8⁺CD45RC^{high} Tregs에서 유세포 분석기에 의해 분석하였다. 결과를 GITR을 발현하는 세포(+/- SEM)의 평균 백분율로 표현하였다.

도 4. TGFβ-1, IL34, IFNγ 및 GITR의 발현은 Foxp3⁺ 인간 CD8⁺ Tregs에서 강화된다. PBMCs를 Ficoll 구배에

의해 건강한 지원자의 혈액으로부터 분리하였고, 4시간 동안 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ Brefeldine A의 존재 하에 $50\text{ng}/\text{ml}$ PMA 및 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 이오노마이신으로 자극하였다. 살아있는 세포에 대하여 케이트를 연 후에 분리된 CD8^+ 세포 집단을 FACS 염색에 의해 Foxp3^+ , IL-34^+ , $\text{IFN}\gamma^+$, $\text{TGF}\beta-1^+$ 및 GITR^+ 의 발현에 대하여 분석하였다. 하나의 대표적인 실험. A. Foxp3^+ 및 CD45RC^+ 의 발현을 CD8^+ Tregs에서 분석하였다. B. IL-34^+ , $\text{IFN}\gamma^+$, GITR^+ 및 $\text{TGF}\beta-1^+$ 의 발현을 $\text{Foxp3}^+ \text{CD45RC}^{\text{low}}$, $\text{Foxp3}^- \text{CD45RC}^{\text{low}}$ 및 $\text{CD45RC}^{\text{high}} \text{CD8}^+$ 세포에서 측정하였다.

도 5. 인간 $\text{CD8}^+ \text{CD45RC}^{\text{low}}$ Tregs의 특정 아집단은 생체의 높은 억제 능력을 나타낸다. A. 분류된 CD8^+ Tregs는 항- CD3 및 항- CD28 mAbs로 24시간 자극하였고, $\text{IFN}\gamma^+$ 및/또는 IL-10 분비에 대하여 분류하였고, 동(질)유전자적 CFSE-라벨된 $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+$ T 세포가 동종이형 T-고갈된 PBMCs에 의해 자극되는 MLR 분석에서 이펙터:억제제 비율의 범위에서 억제 활성에 대하여 시험하였다. 분류된 CD8^+ Tregs는 총 항- CD3^+ 항- CD28 mAbs로 자극된 CD8^+ Tregs와 비교하였다. 이원 반복측정 분산분석. 증식은 Tregs의 부재 하에 증식으로 정규화되었다. **, p<0.01. B. 분류된 $\text{CD8}^+ \text{CD45RC}^{\text{low}}$ Tregs는 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 항- CD3 및 항- CD28 mAbs로 12시간 자극하였고, FACS Aria에 의해 GITR 발현에 대하여 갓 분류하였다. GITR $^+ \text{CD8}^+ \text{CD45RC}^{\text{low}}$ Tregs 및 GITR $^- \text{CD8}^+ \text{CD45RC}^{\text{low}}$ Tregs는 32:1 내지 1:1 이펙터:억제제 비율의 범위에서 동종이형 T-고갈된 PBMCs로 자극된 동(질)유전자적 이펙터 $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+$ T 세포의 증식에 대한 억제 활성에 대하여 분석하였다. 이원 반복측정 분산분석. 증식은 Tregs의 부재 하에 증식으로 정규화되었다. **, p<0.01

도 6. $\text{IFN}\gamma^+$, IL-10 및 IL-34 는 $\text{CD8}^+ \text{CD45RC}^{\text{low}}$ Tregs 억제의 주요한 매개체이다. $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 항- IL-34 (α -IL-34), 항- IL-10 (α -IL-10) 또는 항- $\text{IFN}\gamma^+$ 사이토카인(α -IFN γ^+) 또는 그들의 항-수용체 항- IL-10R (α -IL-10R) 또는 항- $\text{IFN}\gamma^+ \text{R}$ (α -IFN $\gamma^+ \text{R}$) 정제된 차단 Abs를 분류된 $\text{CD8}^+ \text{CD45RC}^{\text{low}}$ T 세포를 사용한 공동-배양 분석의 0일차에 첨가하였고, 동(질)유전자적 CRSE-라벨된 이펙터 $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+$ T 세포를 동종이형 T-고갈된 PBMCs로 자극하였다. Tregs의 존재하에 증식은 Tregs의 부재 하에 증식으로 정규화되었다. 차단 Abs의 존재 하에 억제는 아이소타입 조절 Ab의 존재 하에 억제로 정규화되었다.

도 7. 인간 $\text{CD8}^+ \text{CD45RC}^{\text{low}}$ Tregs의 억제 활성은 접촉 의존적이다. 트랜스웰 실험을 다음과 같이 수행하였다: 분류된 CD8^+ Tregs를 항- CD3 및 항- CD28 mAbs로 12시간 자극하였고, IL-2 존재 하에 5-일 배양 후 동종이형 T-고갈된 PBMCs로 자극된 동(질)유전자적 이펙터 $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+$ T 세포의 증식에 대한 억제 활성에 대하여 분석하였다. 동종이형 T-고갈된 PBMCs를 상부 및 하부 웰 모두에 첨가하였다. 1:1 내지 1:4 이펙터:억제제 비율의 범위에서 상기 Tregs를 상부 웰에, 상기 $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+$ T 세포를 하부 웰에 첨가하였다. 이원 반복측정 분산분석. 증식은 Tregs의 부재 하에 증식으로 정규화되었다. *, p<0.05.

도 8. 14-일 자극 후 갓 분류되고 해동된 $\text{CD8}^+ \text{CD45RC}^{\text{low}}$ Tregs의 상당한 확장. A. 분류된 CD8^+ Tregs를 0일에 동종이형 APCs(APC)와 선택적으로 항- CD3 및 항- CD28 mAbs(poly: 다형핵 백혈구)로 자극하였고, 동일한 APCs 또는 APCs 및 항- CD3^+ 및 항- CD28 mAbs(다형핵 백혈구)로 다시 자극하거나 자극하지 않았다(X 표시). 그래프는 14-일 배양에서 수득된 세포의 배수 확장을 나타낸다. B. 갓 분류된(신규) 또는 해동된 $\text{CD8}^+ \text{CD45RC}^{\text{low}}$ 세포를 0일차에 1:4 Tregs:APCs 비율의 동종이형 T-고갈된 PBMCs와 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 항- CD3 및 항- CD28 로 3.3×10^5 세포/ ml 에서 완전 배지에 시딩하였다. 7일차에, 상기 Tregs를 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 항- CD3 및 항- CD28 로 다시 자극하였다. 0, 7, 10 및 12일차에, 상기 배양 배지를 $1000\text{U}/\text{ml}$ 인간 IL-2 및 $10\text{ng}/\text{ml}$ 인간 IL-15 로 보충하였다. 14일차에, 상기 Tregs를 확장 수득률에 대하여 분석하였다. 그래프는 14-일 배양에서 수득된 세포의 배수 확장을 나타낸다. 해동된 세포는 상당히 증가된 확장을 보여준다. Mann Whitney t test ***, p<0.001.

도 9. 확장된 CD8^+ Tregs는 면역억제제의 존재 하에 생존한다. 분류된 CD8^+ Tregs를 0일차에 1:4 Tregs:APCs 비율에서의 동종이형 T-고갈된 PBMCs와 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 항- CD3 및 항- CD28 Abs로 자극하였다. 7일차에, Tregs를 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 항- CD3 및 항- CD28 로 다시 자극하였다. 0, 7, 10 및 12일차에, 배양 배지를 인간 IL-2 ($1000\text{U}/\text{ml}$) 및 인간 IL-15 ($10\text{ng}/\text{ml}$)로 보충하였다. 14일차에, 면역억제제(IS): 사이클로스포린 A(CsA), 미코페놀레이트모페틸(MPA), 메틸프리드니솔론(MPr), 라파마이신(Rapa) 또는 타크로리무스(Tacrol)의 존재 또는 부재(처리 안함-NT) 및 $\text{IL-2}/\text{IL-15}$ 의 존재 또는 부재 하에 Tregs를 동종이형 APCs로 다시 자극하였다. 6일 후 Treg 생존율을 분석하였다.

그래프는 배양 6일 후에 수득된 세포 생존율을 나타낸다. 생존율은 면역억제제(IS)의 첨가 전에 14일차에 증식에 대하여 정규화되었다.

도 10. 동일한 배양 조건에서 $CD8^+$ Tregs는 $CD4^+$ Tregs 보다 더 효과적으로 증식한다. 분류된 $CD8^+ CD45RC^{low}$ ($CD8^+$) 및 $CD4^+ CD25^{high} CD127^{low}$ ($CD4^+$) Tregs를 0일차에 1:4 Tregs:APCs 비율에서의 동종이형 T-고갈된 PBMCs와 1 μ g/ml 항-CD3 및 항-CD28 Abs로 자극하였다. 7 및 14일차에, Tregs는 1 μ g/ml 항-CD3 및 항-CD28로 다시 자극하였다. 0, 7, 10, 12, 14, 17 및 19일차에, 배양 배지를 1000U/ml 인간 IL-2 및 10ng/ml 인간 IL-15로 보충하였다. Treg 확장 수득률을 7일 마다 분석하였다. 이원 반복측정 Bonferroni post test *, p<0.05

도 11. 확장된 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Tregs는 동종이형 $CD4^+ CD25^-$ 이펙터 T 세포 반응을 억제하는데 있어 상당히 더 효과적이다. 7일 동안 APCs 또는 항-CD3 + 항-CD28 mAbs + APCs에 의해 확장된 Tregs는 확장을 위해 사용된 동종이형 APCs로 자극된 동(질)유전자적 $CD4^+ CD25^-$ T 세포(Tregs의 공여자로부터 분류됨)에 대한 억제 활성에 대하여 시험하였다. 동일한 공여자로부터 해동되고, 분류되고 비-확장된 Tregs(X 표시)는 초기 억제 활성을 정의하였다. 증식은 Tregs의 부재 하에 증식으로 정규화되었다.

도 12. IFN γ , IL-10 및 IL-34-분비 Tregs에서 확장된 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Tregs는 강화된다. 14-일 확장된 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Tregs("확장된")의 사이토카인 발현(IL-10, IL-34 및 IFN γ)을 분석하였고, 확장 전의 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Tregs("신규")의 그것과 비교하였다. **p<0.01, ***p<0.001.

도 13. $CD8^+ CD45RC^{low}$ Tregs의 상층액에서 IFN γ 의 증가된 분비가 검출될 수 있다. $CD8^+ CD45RC^{low}$ 세포를 하룻밤 동안 1 μ g/ml 항-CD3 및 항-CD28 Abs로 자극하였고, 14-일 확장을 위해, 동(질)유전자적 이펙터 CD4+CD25-T 세포가 1:1 이펙터:억제제 비율에서의 동종이형 T-고갈된 PBMC로 자극되는 MLR 분석에 첨가하였거나, 1:4 Tregs:APCs 비율에서의 동종이형 T-고갈된 PBMCs와 1 μ g/ml 항-CD3 및 항-CD28 Abs와 함께 3.3×10^5 세포/ml에서 완전 배지에 시딩하였다. 7일차에, 상기 Tregs를 1 μ g/ml 항-CD3 및 항-CD28 Abs로 다시 자극하였고, 배양 배지를 변화시켰다. 0, 7, 10 및 12일차에, 배양 배지를 1000U/ml 인간 IL-2 및 10ng/ml 인간 IL-15로 보충하였다. 14일차에 배양 상층액에서 ELISA에 의해 IFN γ 를 측정하였다.

도 14. 확장된 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Tregs는 동종이형 인간 피부 거부 반응을 효과적으로 억제한다. A. 인간 피부를 NSG 마우스에 이식시켰고 수용을 위해 15일 동안 두었다. 그 다음, 이식편에 동종이형인 5×10^6 PBMCs를 동(질) 유전자적 15일 확장된 Tregs(eTregs)의 존재 또는 부재 하에 복강 내로 전이시켰다. B. 이식 거부반응을 평가하였고 수치를 기록하였다. C. 마우스 생존율을 평가하였다.

도 15. 인간화 마우스(humanized mice)에서 확장된 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Tregs는 GVHD를 효과적으로 억제한다. A. 이종의(xenogeneic) GVHD 실험을 위해, 12시간-전에 조사된(irradiated) NSG 마우스에서 1:1 및 1:2 PBMCs:확장된 Tregs 비율에서의 다클론성 확장된 Tregs(eTregs)의 존재 또는 부재 하에 1.5×10^7 동(질)유전자적 PBMCs를 정맥내로 전이시켰다. B. 인간 PBMCs 이식을 혈액에서 모니터링하였고, GVH 발생을 체중 손실에 의해 측정하였다. C. 마우스 생존율을 평가하였다. *p<0.05, **p<0.01.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0311] 실시예: IFN γ $+ IL-10$ $+ IL-34$ 분비 인간 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Tregs의 신규한 집단은 효과적으로 이식 거부반응을 억제한다.

[0312] 재료 및 방법

[0313] 건강한 공여자의 혈액 수집 및 PBMC 분리:

혈액은 Etablissement Francais du Sang (Nantes, France)에서 건강한 공여자로부터 수집하였다. 본 연구에 대한 승인은 기관 검토위원회로부터 획득하였다. 기관 지침에 따라 서면 동의서가 제공되었다. PBMC가 실온에서 제동 없이 20회 2000 rpm으로 Ficoll-Paque 농도-구배 원심분리(Eurobio, Courtaboeuf, France)에 의해 분리되기 전에, 혈액을 PBS로 2배 희석하였다. 수집된 PBMC는 50 mL PBS로 10분 동안 1800 rpm에서 세척하였고, 잔류 적혈구 및 혈소판은 저장액에서 5분 항온처리 및 1000 rpm에서 10분 원심분리 후에 제거하였다. PBMC가 나타

날 때, PBMC는 DMSO:SVF 1:9에서 동결시켰고 배지-해동을 위한 10% SVF에서 2번 세척하였다.

[0315] 세포 분리:

[0316] CD3⁺CD4⁺CD25⁻ 세포를 반응군 세포(responder cell)로, CD3⁺CD4⁻CD45RC^{low}를 CD8⁺ Tregs로 및 CD3⁺CD4⁺CD25⁻ CD127^{low} 세포를 CD4⁺ Tregs 세포로 분류하기 전에, T 세포를 세정(elutriation)에 의한 음성 선택(DTC Plateforme, Nantes) 및 B 세포(CD19⁺ 세포) 및 잔류 단핵구(CD14⁺ 및 CD16⁺ 세포)의 자성 고갈(Dynabeads, Invitrogen)에 의해 PBMC로부터 수득하였다. 해동된 PBMCs로부터 분류한 Tregs는 플레이팅 전에 250U/ml IL-2의 존재 하에 항-CD3 및 항-CD28 mAbs로 24시간 자극되었다. Miltenyi의 분비 분석 검출 키트를 사용하여 24시간 Tregs의 다클론성 자극 후에, IFNγ 및/또는 IL-10 분비 세포를 분류하였다. FACS ARIA I (BD Biosciences, Mountain View, CA)을 세포를 분류하는데 사용하였다.

[0317] 자극기 세포(stimulator cell)로서 사용되는 APCs를 CD3⁺ 세포의 자성 고갈 및 35Gy 조사에 의해 수득하였다. pDCs 및 cDCs를 CD3, CD14 및 CD16 양성 세포 고갈 및 각각 Nrp1⁺ 또는 CD1c⁺ 세포 분류에 의해 수득하였다.

[0318] 단클론 항체 및 유세포 분석:

[0319] 인터류킨, IFNγ 및 Foxp3 분석을 위해, PBMCs를 7시간 동안 PMA (50ng/ml) 및 이오노마이신(ionomycin, 1μg/ml)으로, Brefeldine A의 존재 하에 지난 4시간 동안 자극하였다.

[0320] 형광을 LSR II 또는 Canto II 세포계산기(cytometer (BD Biosciences, Mountain View, CA))로 각각 표현형 및 기능 분석을 위해 측정하였고, FLOWJO 소프트웨어(Tree Star, Inc. USA)가 데이터를 분석하는데 사용되었다. 생존 가능한 세포를 선택함으로써 사멸된 세포를 제외하여, 세포는 먼저 그들의 형태학에 의해 게이트되었다.

[0321] 혼합 립프구 반응:

[0322] Tregs 억제 활성을 동종이계 APCs로 자극된 동질유전자적 이펙터 CD4⁺CD25⁻ T 세포(Tregs의 공여자로부터 수득됨)에 대하여 평가하였다. DCs로 자극되었을 때, 반응군 세포의 유의한 증식에 도달할 때까지 자극기: 이펙터 비율의 범위를 시험하였고, 다른 실험은 1:1 APCs:반응군 비율으로 나타났다. 블로킹 mAbs 또는 동종형 조절 mAbs를 50 μg/ml으로 공동-배양의 0일에 첨가하였다. 트랜스웰(transwell) 막(0.4 μM Ø)을 반응기 세포로부터 Tregs를 격리하는데 사용하였으며, 둘다 반응기 세포와 접촉시켰다. 1000U/ml IL-2(Miltenyi)를 Tregs에 의한 사이토카인 고갈을 평가하기 위해 첨가하였다. 확장에 사용되었던 동일한 공여자로부터 동종이계 APCs로 자극된 동질유전자적 이펙터 세포 및 해동된 PBMCs의 동일한 공여자로부터 분류된 자극되지 않은 Tregs와 비교하여 해동된 PBMCs로부터 확장된 Tregs의 억제 활성을 평가하였다. 5% AB 혈청 배지에서 공동 배양의 4.5일 후에, 첨가되었을 때 CD3⁺CD4⁺ 살아있는 세포에 대해 게이트를 열고 CPD-V450 라벨된 CD4⁺ Tregs에 대해 제외시킴으로써, CFSE-라벨된 반응기 세포의 증식을 유세포 분석기에 의해 평가하였다.

[0323] Tregs의 확장:

[0324] Tregs는 IL-2 (1000U/ml) 및 IL-15 (10ng/ml)로 보충된 5% AB 혈청 배지에서 약 3x10⁵/ml로 시딩하였고, 코팅된 항-CD3 mAb(1μg/ml), 가용성 항-CD28 mAb(1μg/ml) 및/또는 동종이계 APCs에 의해 1:4 Tregs:APCs 비율로 자극하였다. 7일에, 확장된 세포를 1x10⁵/ml에서 회석하였고 다시 자극하였거나 자극하지 않았다. IL-2 및 IL-15 사이토카인은 0, 7, 10 및 12일에 새롭게 첨가하였다. 14일에, 확장된 Tregs는 사용하기 전에 PBS로 세척하였다.

[0325] 인간화 마우스 모델:

[0326] 8-12주령 NOD/SCID/IL-2Rγ^{-/-} (NSG) 마우스를 SPF 조건에서 동물 시설에서 길렀다. 본 연구는 Pays de la Loire 동물 실험 윤리위원회에 의해 승인된 프로토콜(승인 번호 CEEA.2012.155)을 엄격히 따라 수행하였다.

[0327] 이종발생(xenogeneic) GVHD 실험에 대하여, 12시간-이전에 조사된 NSG 마우스에서 1:1 및 1:2 PBMCs: 확장된 Tregs 비율에서 다클론성으로 확장된 Tregs의 존재 또는 부재 하에 1.5x10⁷ 동질유전자적 PBMCs를 정맥 내로 전달시켰다. 인간 PBMCs 이식은 혈액에서 모니터링하였고, GVH 발생은 체중 감소 및 폐, 간, 장, 비장, 신장의 병리조직학적 분석에 의해 평가하였다.

- [0328] 이식 모델의 경우, 인간 피부에 건강한 공여자로부터 CHU Nantes를 공급하였고, NSG 마우스에 의해 15일 내에 이식이 받아들여졌다. 이식에 대하여 동종이계인 5×10^6 PBMCs는 동질유전자적 15일 확장된 Tregs의 존재 또는 부재 하에 복강 내로 전달되었다. 이식 거부 지수를 평가하였다.
- [0329] 결과
- [0330] 인간 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Tregs은 인간 $CD4^+ CD25^+ CD127^-$ Tregs보다 항-공여자 면역 반응의 더 효과적인 억제제이다.
- [0331] 이전의 연구는 MHC-미스매치된 심장 동종이식 래트 모델에서 CD40Ig 처리에 의해 유도되는 이식 수용(graft acceptance)에서 $CD8^+ CD45RC^{low}$ T 조절 세포의 관련성을 기재하였다(Guillonneau *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2010). 두 연구 모두 CD40Ig-유도된 동종이식 수용에서 IFN γ 의 주요한 역할을 강조하였다.
- [0332] 몇몇 개체의 오버레이에 의해 밝혀진 바와 같이, 건강한 개체에서 CD45RC 마커의 표현형 분석은 CD45RC 마커가 건강한 개체에서 상이하게 나타남을 보여준다. 이러한 상이한 표현은 나이 또는 성별과 관련이 없었다.
- [0333] 먼저, CFSE-라벨된 $CD4^+ CD25^-$ T 세포가 동종이계 T-고갈된 PBMCs(T-depleted PBMCs)에 의해 자극되는 MLR 분석에서 상이한 비율로 참가되었을 때, 총 인간 $CD8^+ CD45RC^{low}$ T 세포 서브세트의 억제 활성을 평가하였고, 잘 알려진 $CD4^+ CD25^+ CD127^-$ Tregs의 억제 활성과 비교하였다(도 1). 흥미롭게도, 모든 비율에서 인간 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Tregs은 $CD4^+ CD25^+ CD127^-$ Tregs와 비교하여 항-공여자 $CD4^+ CD25^-$ 이펙터 T 세포 증식에 대한 상당히 우수한 억제 능력을 보여준다.
- [0334] 래트에서, $CD8^+ CD45RC^{low}$ Tregs와 pDCs의 차별적인 상호 작용은 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Tregs에 대하여 선택적인 억제 활성을 발휘하는 것으로 확인되었다. 따라서, 인간 $CD8^+ CD45RC^{low}$ 의 억제 가능성을 cDCs ($CD3^- CD19^- CD1c^+ Nrp-1^-$), pDCs ($CD3^+ CD19^- CD1c^- Nrp-1^+$)의 상이한 비율의 존재 하에 자극제로서의 T-고갈된 PBMCs와 비교하여 시험하였다(도 2). 흥미롭게도, pDCs 및 T-고갈된 PBMCs와 비교하여 cDCs의 존재 하에, $CD8^+ CD45RC^{low}$ Tregs의 더 낮은 억제 활성이 관찰되었으며, 이는 래트의 경우와 같이, 인간에서 pDCs는 $CD4^+$ 이펙터 T 세포에 대한 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Tregs 억제 활성을 a매개하는데 필요함을 시사한다.
- [0335] 결론적으로, pDCs의 존재 하에 인간 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Tregs는 $CD4^+ CD25+CD127^-$ Tregs 보다 항-공여자 $CD4^+ CD25^+$ 이펙터 T 세포 반응을 더 효과적으로 억제한다.
- [0336] $CD8^+ CD45RC^{low}$ Tregs의 아집단은 IFN γ , IL-34 및 IL-10을 발현한다.
- [0337] 인간 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg의 특징을 나타내기 위해, 13-색 유세포 분석기를 사용하여 심층 표현형 분석을 수행하였다. 총 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 서브세트 내의 아집단의 존재를 평가하기 위해 몇몇의 마커를 분석하였다: Tregs에 대하여 이전에 기재된 CD103, CTLA-4, GITR 또는 IFN γ , IL-34 또는 IL-10과 같은 사이토카인과 같은 마커뿐만 아니라 인간 $CD8^+$ Tregs의 공지의 마커, 즉 CD28 및 CD122를 포함한다.
- [0338] 마커의 스크리닝은 $CD8^+ CD45RC^{high}$ T 세포와 비교하여 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Tregs에서 CD69, CD71, CD103, Foxp3, Tbet, HLA-DR, CD154, IFN γ , IL-2 및 IL-34 발현의 현저한 상향조절 및 CD38 발현의 감소가 나타났고, 이는 전체적으로 보아 활성화된 전-면역관용성(pro-tolerogenic) 세포의 프로파일을 시사한다.
- [0339] CD45RC, CD28 및 CD122의 공동-발현 분석은 각 아집단이 CD45RC 마커 내에 존재하였지만, $CD8^+ CD28^-$ Tregs 및 $CD8^+ CD122^+$ Tregs는 $CD45RC^{low}$ 마커 내에 모두 함유되어 있지 않았음을 나타내었고, 이는 각 마커가 별개의 Tregs 아집단을 확인할 수 있음을 시사한다.
- [0340] 특히 흥미롭게도, IL-10 분비 세포에 의해 IL-34가 공동-발현되는 것과 함께 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Tregs에서 IFN γ 및 IL-34의 현저한 발현이 관측되었다(각각 약 60% 및 20%).
- [0341] 세포 표면 수용체 GITR의 발현을 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Tregs 및 $CD8^+ CD45RC^{high}$ Tregs에서 평가하였다(도 3). 유세포 분

석기 분석은 GITR⁺ CD8⁺CD45RC^{high} Tregs의 집단(세포의 약 5%는 GITR을 발현함)에서 보다 CD8⁺CD45RC^{low} Tregs 집단(세포의 약 15%는 GITR을 발현함)에서 현저하게 더 발현됨을 보여주었다. 따라서 CD8⁺CD45RC^{low} Tregs 중에 GITR⁺ CD8⁺CD45RC^{low} Tregs의 아집단이 있다.

[0342] 마지막으로, 살아있는 세포에 대하여 게이트가 열린 후에, CD3⁺CD8⁺CD45RC^{low} Tregs를 Foxp3, IL-34, IFN γ, TGF β-1 및 GITR의 발현에 대하여 FACS 염색에 의해 분석하였다(도 4). CD3⁺CD8⁺CD45RC^{low} Tregs를 10μg/ml Brefeldine A의 존재 하에 50ng/ml PMA 및 1μg/ml 이오노마이신으로 4시간 동안 자극된 PBMCs로부터 수득하였다. Foxp3⁺CD8⁺CD45RC^{low} Tregs만이 GITR, TGFb1 및 IL-34를 발현하였다. Foxp3⁺CD8⁺CD45RC^{low} Tregs는 또한 Foxp3⁻CD8⁺CD45RC^{low} Tregs보다 더 높은 수준으로 IFN γ를 발현하였다.

[0343] 결론적으로, CD8⁺CD45RC^{low} Tregs에서 IL-34, TGFb1 및 GITR의 발현은 Foxp3 발현과 밀접하게 관련이 있다.

[0344] IL-10⁺IL-34⁺IFN γ⁺-분비 CD8⁺CD45RC^{low} Tregs의 아집단은 생체외(*in vitro*) 높은 억제 능력을 보인다.

[0345] IFN γ 및 IL-34를 발현하는 인간 CD8⁺CD45RC^{low} Tregs의 아집단의 억제 가능성을 평가하였다. 우선, CD8⁺CD45RC^{low} Tregs의 아집단을 살아있는 세포를 분류할 수 있는 IFN γ 또는 IN-10 분비 분석 검출 키트를 사용하여 IFN γ 및 IL-10의 발현에 기초하여 분류하였다. IL-34는 대부분 IL-10 분비 세포에 의해 공동-발현됨을 관측한 것으로부터, IL-10⁺ 세포는 또한 IL-34⁺ 세포임을 예측하였다. 따라서, CD8⁺CD45RC^{low} Tregs의 4개의 아집단이 분류되었다: IL-10⁻(IL-34⁻)IFN γ⁻, IL-10⁻(IL-34⁻)IFN γ⁺, IL-10⁺(IL-34⁺)IFN γ⁻ 및 IL-10⁺(IL-34⁺)IFN γ⁺ CD8⁺CD45RC^{low} Tregs. 상기에 기재된 바와 같이, 분류된 세포를 MLR 분석에 참가하였다(도 5A). 중요하게, 상기 IL-10⁺(IL-34⁺)IFN γ⁺ CD8⁺CD45RC^{low} Tregs는 상기 IL-10⁻(IL-34⁻)IFN γ⁺ CD8⁺CD45RC^{low} Tregs 보다 현저하게 억제되었고, 이는 IL-10 및 IL-34의 주요한 역할을 시사한다.

[0346] 결론적으로, IL-10⁺(IL-34⁺)IFN γ⁺ 분비 CD8⁺CD45RC^{low} Tregs의 아집단은 생체외 높은 억제 능력을 보여준다.

[0347] GITR⁺ 분류된 CD8⁺CD45RC^{low} Tregs는 GITR⁻ CD8⁺CD45RC^{low} Treg 보다 더 효과적인 억제제이다.

[0348] 총 CD8⁺CD45RC^{low} Treg 집단을 세포-표면 마커: GITR, CD38, HLA-DR, CD45RA, CD127, CD197, CD27, CD28, CD25로 세분화하여 유사한 분석을 수행하였다. 억제 활성의 작은 손실은 CD45RA 및 CD28과 같은 몇몇의 다른 마커에 의해 관측될 수 있었지만, 현저한 차이는 없었다. 하나의 예외에서, 억제 활성이 증가되지 않았고, 이는 이러한 마커들은 CD8⁺CD45RC^{low} Tregs를 억제 활성으로 추가적으로 구분하는데 사용될 수 없음을 시사한다.

[0349] 그러나, 가장 흥미롭게도, GITR⁺CD3⁺CD8⁺CD45RC^{low} Tregs는 GITR⁻CD3⁺CD8⁺CD45RC^{low} Tregs 보다 더 효과적으로 항-공여자 면역 반응을 억제하였다(도 5B). 결론적으로, GITR 발현은 동종이형 이펙터 CD4⁺CD25⁻ T 세포 증식에 대한 더 높은 억제 능력으로서 CD8+ Tregs의 아집단을 확인한다.

[0350] CD8⁺CD45RC^{low} Treg 매개되는 억제 활성은 IL-34, IL-10 및 IFN γ 분비에 의존한다.

[0351] CD8⁺CD45RC^{low} Tregs의 억제 활성을 뒷받침할 수 있는 작용의 상이한 메커니즘을 검토하였다. 작용의 이러한 메커니즘은 이펙터 T 세포 증식을 억제하기 위한 사이토카인 분비, 접촉 의존적 활성, IL-2 고갈 또는 사멸시키는 것을 포함한다.

[0352] 우선, IFN γ, IL-34 및 IL-10⁺ CD8⁺CD45RC^{low} Treg 아집단을 최상의 조절 활성으로 구별하기 때문에, 사이토카인 생성을 MLR 상충액에서 시험하였다. 5일 까지의 MLR 상충액에서 사이토카인 생성의 분석은 Tregs의 부재 및 CD8⁺CD45RC^{high} T 세포의 존재에 비하여, CD8⁺CD45RC^{low} Treg의 존재 하에 IFN γ의 현저한 생산을 나타내었다(도 13).

[0353] CD8⁺CD45RC^{low} Treg-매개된 억제에서 IFN γ, IL-34 및 IL-10의 역할을 추가로 평가하기 위해, CD8⁺CD45RC^{low}

Tregs의 존재 하에 억제 MLR 분석에서 다음과 같은 차단(blocking) 항체를 첨가하였다: 항-IL-34, 항-IL-10, 항-IL-10R, 항-IFN- γ 및 항-IFN- γ R(도 6). 흥미롭게도, IL-34, IL-10 및 IL-10R, IFN- γ 및 IFN- γ R의 차단은 CD4 $^+$ CD25 $^-$ T 세포 항-공여자 면역 반응에 대한 CD8 $^+$ CD45RC low Tregs의 억제 활성의 유사한 손실을 일으켰다.

[0354] CD8 $^+$ CD45RC low Treg 매개된 억제 활성은 또한 접촉에 의존한다.

[0355] CD8 $^+$ CD45RC low Tregs 매개된 억제를 위한 접촉의 중요성을 측정하기 위해, 트랜스웰 실험을 수행하였다(도 7). 하부 챔버에서의 동종이형 T-고갈된 PBMCs로 자극된 CFSE-라벨된 CD4 $^+$ CD25 $^-$ T 세포의 증식을 하부 또는 상부 챔버에서 CD8 $^+$ CD45RC low Tregs의 존재 또는 부재 하에 평가하였다. CD8 $^+$ CD45RC low Tregs가 상부 챔버에서 별개로 첨가되었을 때 억제 활성의 완전한 손실이 측정되었고, 이는 접촉을 위해 필요함을 보여준다.

[0356] 사멸을 통한 억제 메커니즘이 제안될 수 있기 때문에, 다음으로 15시간 배양 이후, 동질유전자적 CD4 $^+$ CD25 $^-$ 이펙터 T 세포 또는 동종이형 T-고갈된 PBMC에 대하여 CD8 $^+$ CD45RC low Tregs-매개된 세포독성의 증가하는 비율을 시험하였다. 동(질)유전자적 또는 동종이형 타겟에 대한 괴사 또는 후기 세포사멸 유도가 없었지만, 높은 타겟:이펙터 비율에서 양 타겟에 대한 작은 초기 세포사멸 유도는 관측되었다(데이터 표시되지 않음). 마지막-단계 세포사멸 유도의 부재는 세포독성 메커니즘이 CD8 $^+$ CD45RC low Tregs에 의해 매개된 억제 효과에 있어 큰 역할을 하지 않음을 시사한다.

[0357] CD8 $^+$ CD45RC low Tregs는 심지어 해동 후에도 효과적으로 확장될 수 있다.

[0358] CD4 $^+$ Tregs를 사용한 세포 치료법은 동종 이식 거부를 예방하기 위한 유망한 생점이고, CD8 $^+$ CD45RC low Tregs는 생체외(*ex vivo*) 항-공여자 면역 반응을 억제하는데 있어 CD4 $^+$ CD25 high CD127 $^-$ Tregs 보다 더 효과적이기 때문에(도 1), CD8 $^+$ CD45RC low Tregs 확장의 프로토콜을 수립하였다.

[0359] 우선 총 CD8 $^+$ CD45RC low Tregs의 확장을 위한 가장 효과적인 조건은 상이한 APCs의 비율(1:1 내지 1:16 Treg:APCs 비율), 상이한 세라(sera)의 공급원(AB 혈청, 자가이식 플라스마, Tex Mecs 또는 알부민 2%) 및 상이한 자극(다클론성 항-CD3 + 항-CD28 대 풀(pooled) 동종이형 T-고갈된 APCs)을 이용하여 확인하였다.

[0360] 따라서 1:4 Treg:APC 비율이 효과적인 7일 Treg 확장을 위해 필요하고 충분함 및 이러한 비율에서 배양 배지 내의 AB 혈청의 사용은 효과적인 CD8 $^+$ CD45RC low Tregs 확장을 일으킨다는 것을 발견하였다. 다음으로, 배양 0 내지 7일에 다클론성 항-CD3 + 항-CD28 mAbs의 존재 또는 부재, 고용량의 IL-2 및 IL-15의 존재 하에, 동종이형 T-고갈된 APCs로 보통으로 자극하였고 7일 내지 14일에 재-자극하였을 때, 심지어 해동 후에도, CD8 $^+$ CD45RC low Tregs는 14일 내에 1000배까지 효과적으로 확장할 수 있음을 관측하였다(도 8A).

[0361] 각 분류된 CD8 $^+$ CD45RC low Tregs 및 해동된 CD8 $^+$ CD45RC low Tregs의 확장을 배양 14일 후에 비교하였다(도 8B). 0일 차에, 세포를 1:4 Treg:APCs 비율에서 동종이형 T-고갈된 PBMCs 및 다클론성 항-CD3 + 항-CD28 Abs로 자극하였다. 7일 차에, 세포를 항-CD3 + 항-CD28 Abs로 다시 자극하였다. 0, 7, 10 및 12일 차에 배양 배지를 IL-2 및 IL-15로 보충하였다. 14일 후에, 각 분류된 CD8 $^+$ CD45RC low Tregs는 135배 확장되었고, 해동된 CD8 $^+$ CD45RC low Tregs는 612배로 확장되었다. 따라서, 해동된 CD8 $^+$ CD45RC low Tregs는 각 분류된 CD8 $^+$ CD45RC low Tregs보다 더 효과적으로 증식하였다.

[0362] 결론적으로, CD8 $^+$ CD45RC low Tregs는 효과적으로 확장될 수 있고, 심지어 해동 후에 보다 더 확장될 수 있다.

[0363] 또한, 면역억제제의 존재 하에 확장된 CD8 $^+$ CD45RC low Tregs의 생존을 평가하였다(도 9). 0일 차에, 세포를 1:4 Treg:APCs 비율에서 동종이형 T-고갈된 PBMCs 및 다클론성 항-CD3 + 항-CD28 mAb로 자극하였다. 7일 차에 세포를 항-CD3 + 항-CD28 mAbs로 다시 자극하였다. 0, 7, 10 및 12일 차에 배양 배지를 IL-2 및 IL-15로 보충하였다. 14일 차에, 면역억제제(사이클로포린 A, 미코페놀레이트 모페탈, 메틸프리드니솔론, 라파마이신 또는 타크로리무스)의 존재 또는 부재 및 IL-2/IL-15의 존재 또는 부재 하에 Tregs를 동종이형 APCs로 다시 자극하였다. 20일 차에, Tregs를 생존에 대해 분석하였다. CD8 $^+$ CD45RC low Tregs 생존은 면역억제제의 존재 하에 변화

하지 않았다. 또한, $CD8^+ CD45RC^{low}$ Tregs는 미코페놀레이트 모페틸을 제외하고 시험된 면역억제제의 존재 하에 증식하였다. 증식은 IL-2/IL-15 보충으로 더 효과적이었고, 이는 두 사이토카인 모두 $CD8^+$ Tregs 증식을 유지하기 위해 $CD8^+$ Tregs의 생체외 보충으로 첨가될 수 있음을 시사한다.

[0364] 마지막으로, $CD8^+ CD45RC^{low}$ Tregs 및 $CD4^+ CD25^{high} CD127^{low}$ Tregs의 증식을 동일한 배양 조건에서 비교하였다(도 10). 0일차에, Tregs의 두 아집단 모두 21일 동안 1:4 Tregs:APCs 비율에서 동종이형 T-고갈된 PBMCs 및 다클론성 항-CD3 + 항-CD28 mAbs로 자극하였다. 7일 및 14일차에, Tregs를 항-CD3+ 항-CD28 mAbs로 다시 자극하였다. 0, 7, 10, 12, 14 및 19일차에, 배양 배지를 IL-2 및 IL-15로 보충하였다. 다클론성 자극에 반응하여 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Tregs는 354배 확장된 반면에, $CD4^+ CD25^{high}$ Tregs는 11배만 확장되었다. 또한, 효과적이고 지수적인 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Tregs 증식은 적어도 21일까지 유지되었고, 이와 반대로 $CD4^+ CD25^{high}$ Treg 증식은 14일차에 정체기에 도달하였다.

[0365] 14일 확장된 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Tregs는 면역 거부반응을 억제하기 위해 IFN γ , IL-10 및 IL-34를 상향 조절한다.

[0366] 중요하게, 두 동종이형 및 다클론성의 확장된 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Tregs는 모두 해동된, 분류된 및 비-확장된 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Tregs 보다 동종이형 $CD4^+ CD25^-$ 이펙터 T 세포 반응을 억제하는데 있어 현저하게 보다 효과적이었다(도 11).

[0367] 또한, 이러한 14일 확장된 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Tregs는 비-확장된 또는 7일 확장된 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Tregs 보다 유사한 세포독성 활성을 보였고, 이는 확장 동안 얻어지는 우수한 억제 능력은 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Tregs의 증가된 사멸 활성 때문이 아님을 시사한다.

[0368] 가장 중요하게, 확장의 이러한 프로토콜은 IFN γ IL-34 $^+$ IL-10-분비 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Tregs의 상당한 강화를 일으킨다(도 12).

[0369] IFN γ 는 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 기능에 있어 결정적인 역할을 할 것으로 보인다.

[0370] IFN γ 의 측정을 상이한 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 배양의 상층액에서 평가하였다(도 13). 분리된 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Tregs를 다클론성 항-CD3 및 항-CD28 Abs로 하룻밤 동안 자극하였고, 동(질)유전자적 이펙터 $CD4^+ CD25^-$ T 세포를 0일차에 1:1 이펙터:억제제 비율에서 동종이형 T-고갈된 PBMCs 또는 1:4 Tregs:APCs 비율에서 동종이형 T-고갈된 PBMCs로 자극하였고 14일 확장 동안 다클론성 항-CD3 및 항-CD28 Abs로 자극하였던 MLR 분석에 첨가하였다. 7일 차에, 세포를 항-CD3 및 항-CD28 Abs로 다시 자극하였다. 0, 7, 10 및 12일차에, 배양 배지를 IL-2 및 IL-15로 보충하였다. IFN γ 를 14일차에 배양 상층액에서 ELISA에 의해 측정하였다. IFN γ 분비는 이펙터 $CD4^+ CD25^-$ T 세포 및 APCs(평균 2.5ng/ml)의 존재 하에 측정될 수 있었지만, 이후의 $CD8^+$ Tregs(평균 3.9ng/ml)와 함께 6일 배양 또는 항-CD3 및 항-CD28 mAbs로 $CD8^+$ Tregs(평균 8.7ng/ml)의 14일 확장에 따라 증가하였다.

[0371] 결론적으로, 높은 수준의 IFN γ 는 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 배양의 상층액에서 측정될 수 있었고, 이는 이 사이토카인의 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Treg 기능에 있어 결정적인 역할을 시사한다.

[0372] 확장된 IFN γ IL-10 $^+$ IL-34 $^+$ 분비 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Tregs는 생체외 치료학적 효과를 나타낸다.

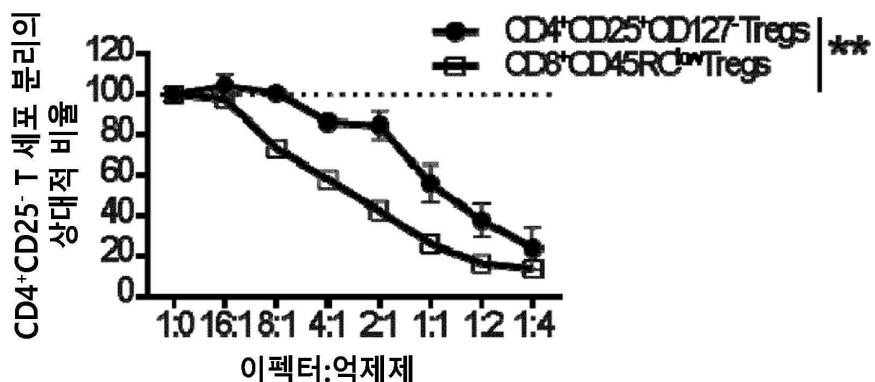
[0373] 마지막으로, 이러한 확장된 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Tregs의 억제 가능성을 NSG 마우스를 이용한 이식의 두가지 별개의 모델, 인간 피부의 동종이식 거부, 이후 동종이형 PBMCs의 주입의 모델(도 14) 및 이종이식 GVHD, 이후 인간 PBMCs의 주입의 모델(도 15)을 사용하여 평가하였다.

[0374] 이러한 모델에서, 생존 백분율, 피부 조직학 및 체중 손실을 측정함으로써 항-공여자 면역반응을 억제하는데 있어 PBMCs에 비하여 그들의 가능성은 평가하기 위해, 동(질)유전자적 확장된 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Tregs를 동일한 시점에 주입하였다.

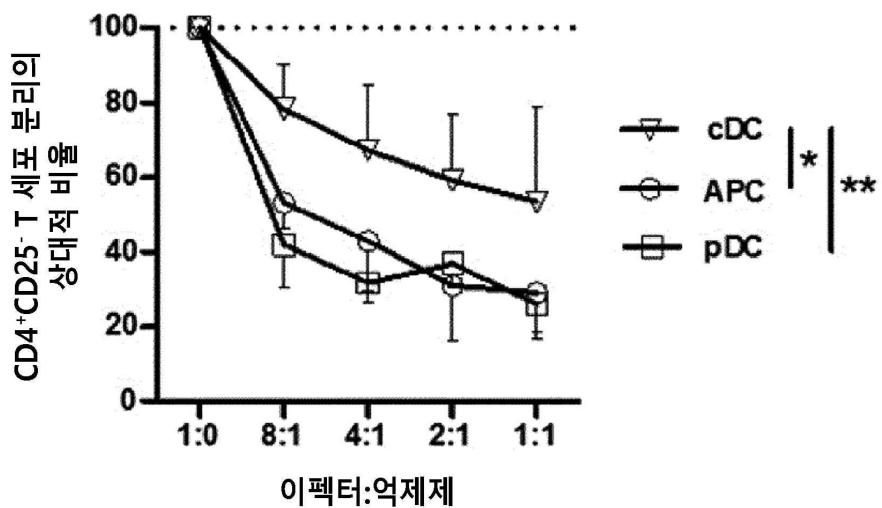
- [0375] 흥미롭게도, 두 경우에서 확장된 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Tregs의 공동-전달이 이식 거부반응을 현저하게 억제하였고, 이는 세포 치료법으로서 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Tregs의 가능성을 시사한다.
- [0376] 참고문헌:
- [0377] 본원에 걸쳐, 다양한 참고문헌은 본 발명이 속하는 기술의 상태를 기술한다. 이를 참고문헌의 개시는 본원에 참고로 포함된다.
- [0378] Feng S. 2008 Long-term management of immunosuppression after pediatric liver transplantation: is minimization or withdrawal desirable or possible or both? *Curr Opin Organ Transplant*. Oct;13(5):506-12.
- [0379] Guillonneau, C., Hill, M., Hubert, F.X., Chiffolleau, E., Herve, C., Li, X.L., Heslan, M., Usal, C., Tesson, L., Menoret, S., et al. 2007. CD40Ig treatment results in allograft acceptance mediated by CD8CD45RC T cells, IFN-gamma, and indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Clin Invest* 117:1096-1106.
- [0380] Li, X.L., Menoret, S., Bezie, S., Caron, L., Chabannes, D., Hill, M., Halary, F., Angin, M., Heslan, M., Usal, C., et al. 2010. Mechanism and localization of CD8 regulatory T cells in a heart transplant model of tolerance. *J Immunol* 185:823-833.
- [0381] Picarda, E., Bezie, S., Venturi, V., Echasserieau, K., Merieau, E., Delhumeau, A., Renaudin, K., Brouard, S., Bernardeau, K., Anegon, I., et al. 2014. MHC-derived allopeptide activates TCR-biased CD8⁺ Tregs and suppresses organ rejection. *J Clin Invest* 124:2497-2512.
- [0382] Sadelain M, Brentjens R, Rivière I. 2013 The basic principles of chimeric antigen receptor (CAR) design; *Cancer Discov*. April ; 3(4): 388-398.
- [0383] Streuli, M., Hall, L.R., Saga, Y., Schlossman, S.F., and Saito, H. 1987. Differential usage of three exons generates at least five different mRNAs encoding human leukocyte common antigens. *J Exp Med* 166:1548-1566.

도면

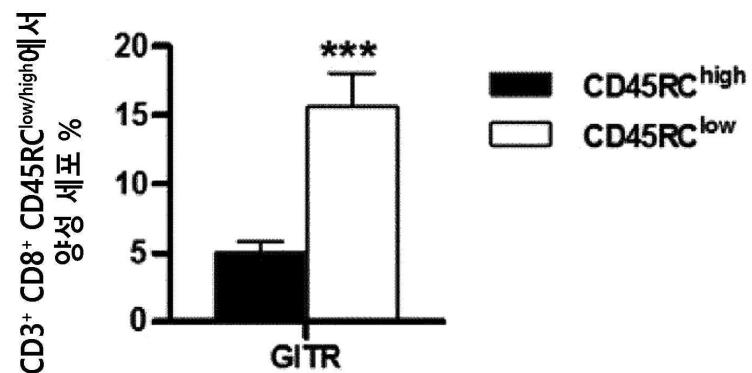
도면1



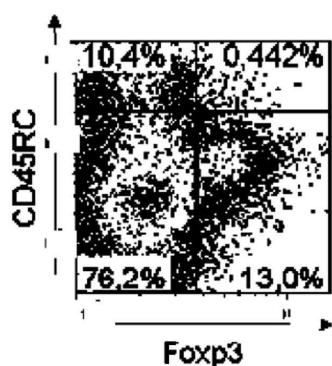
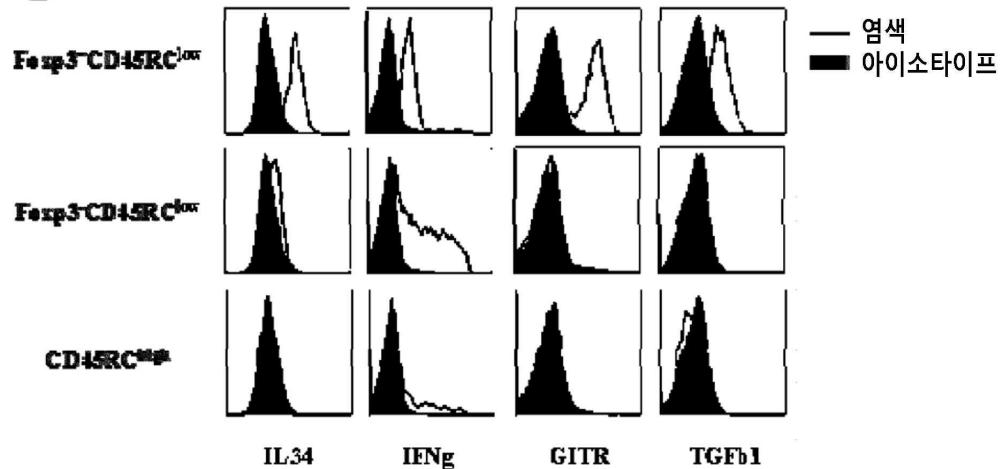
도면2



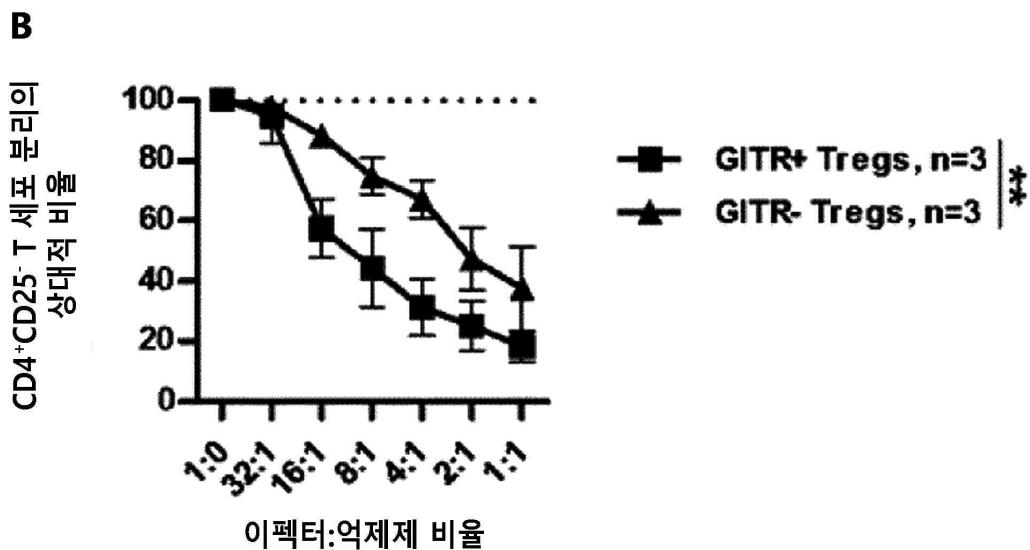
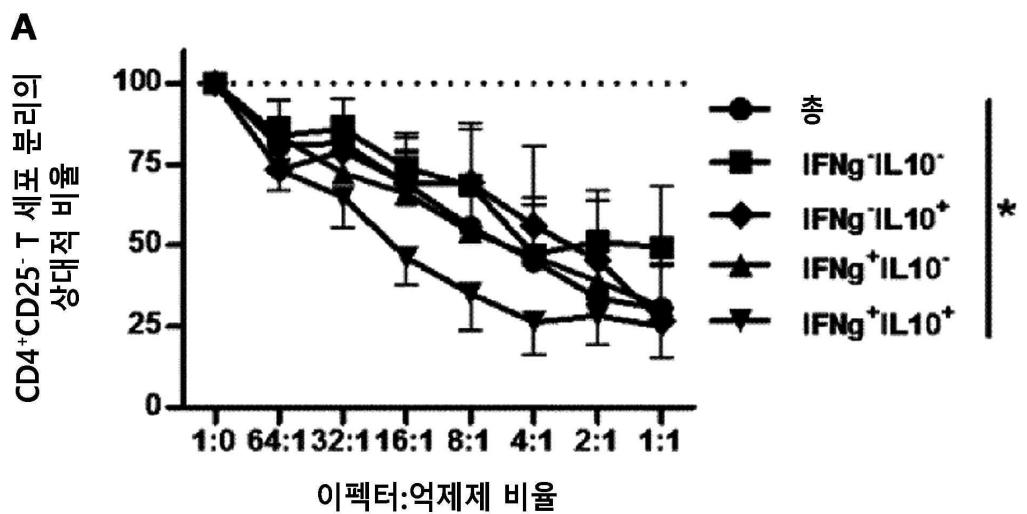
도면3



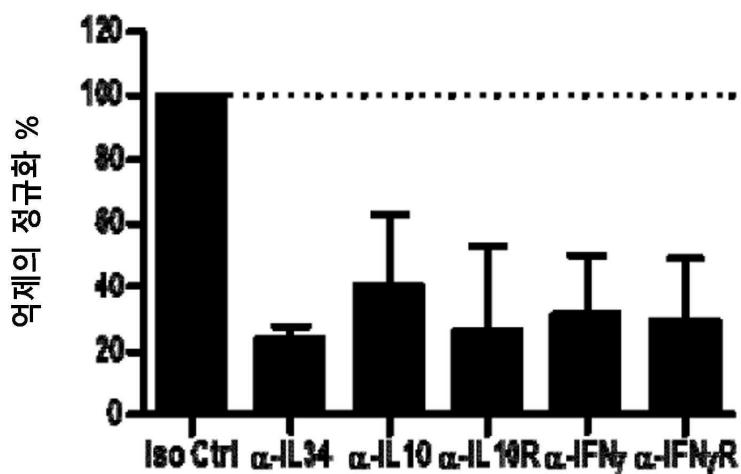
도면4

A**B**

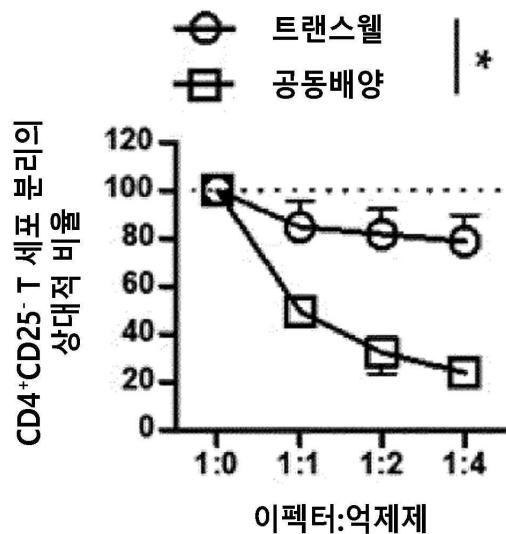
도면5



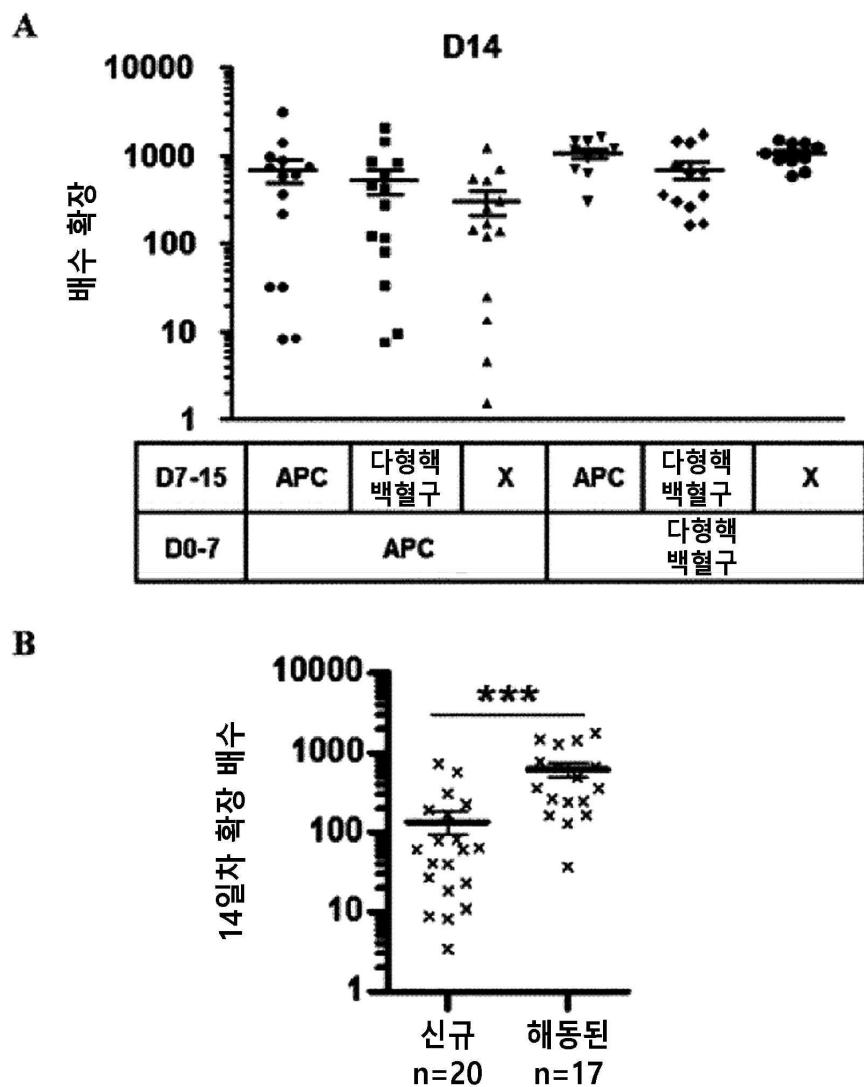
도면6



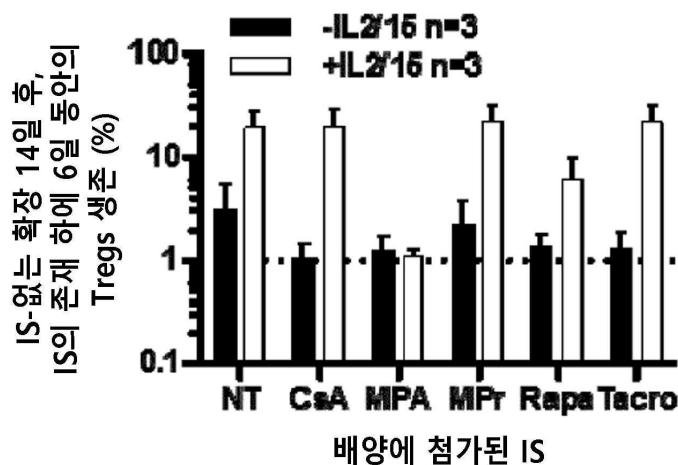
도면7



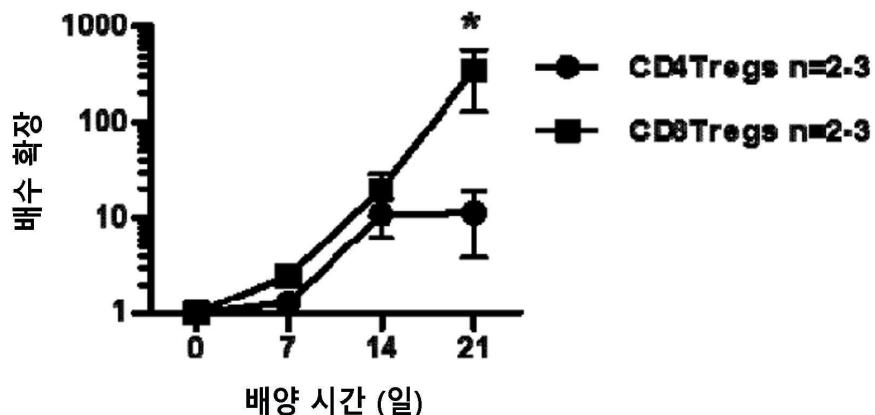
도면8



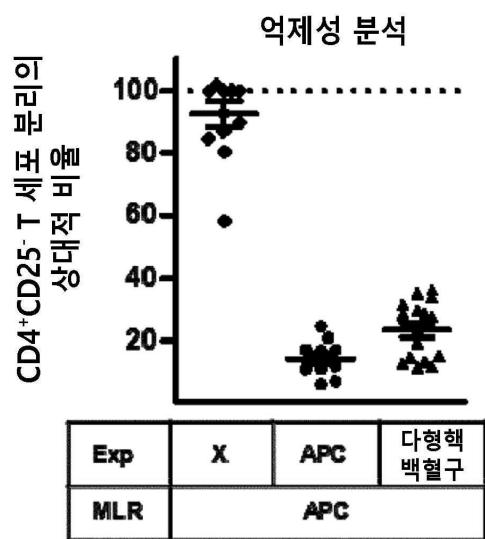
도면9



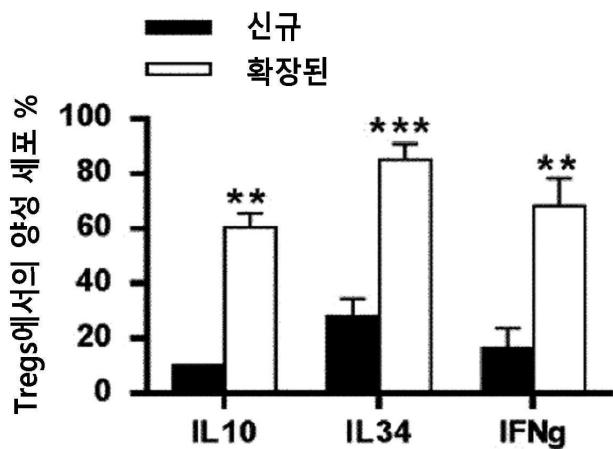
도면10



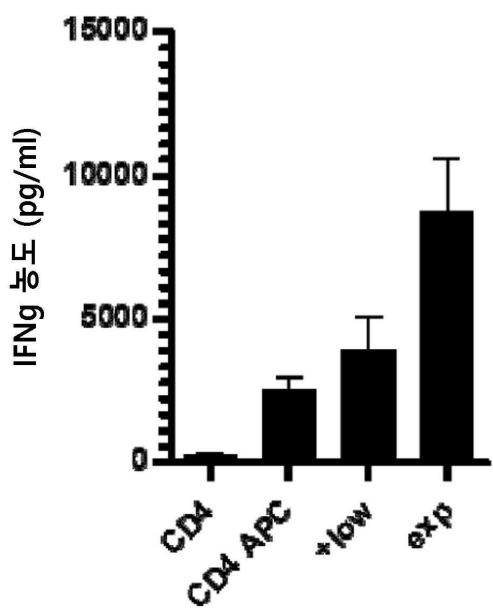
도면11



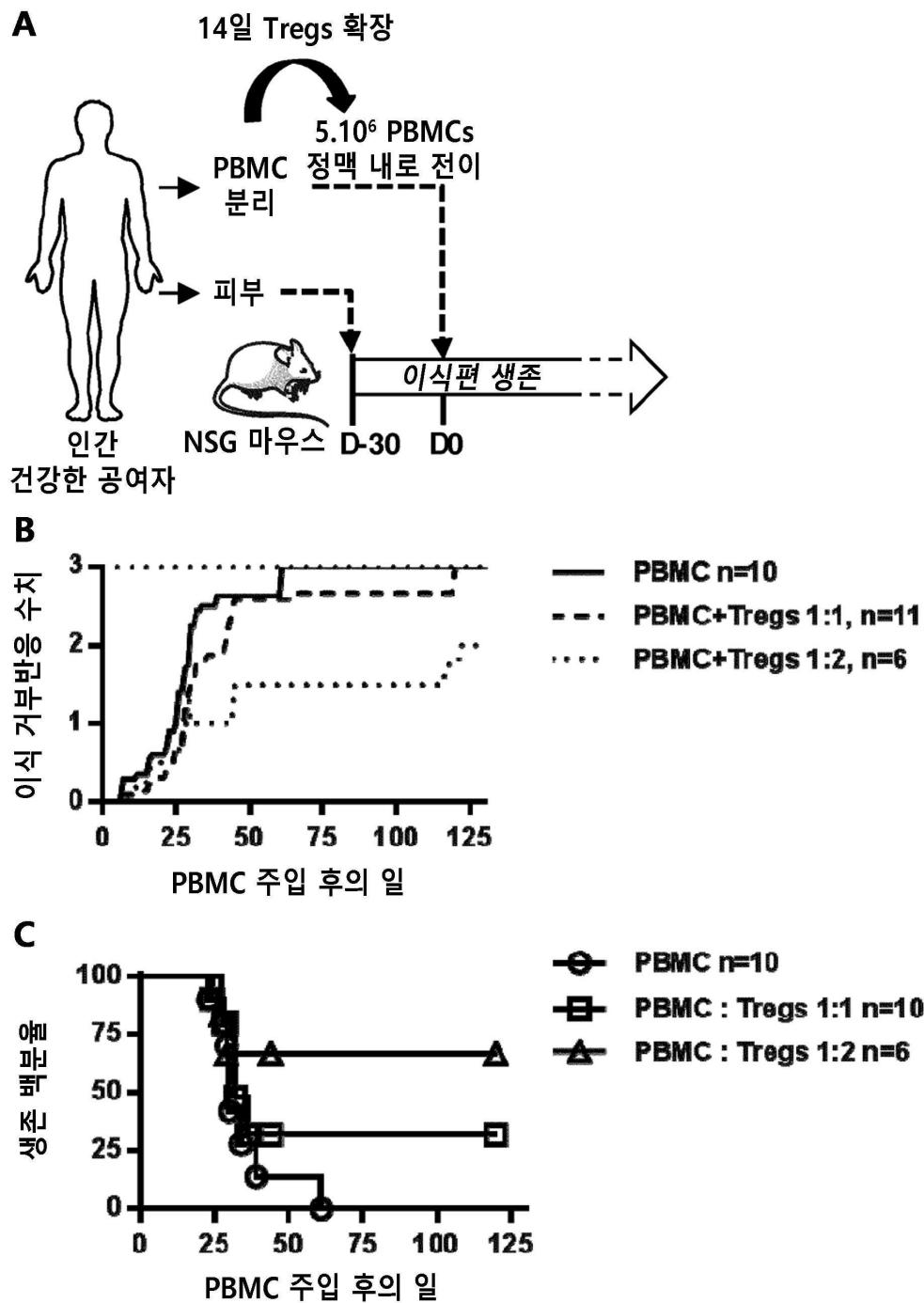
도면12



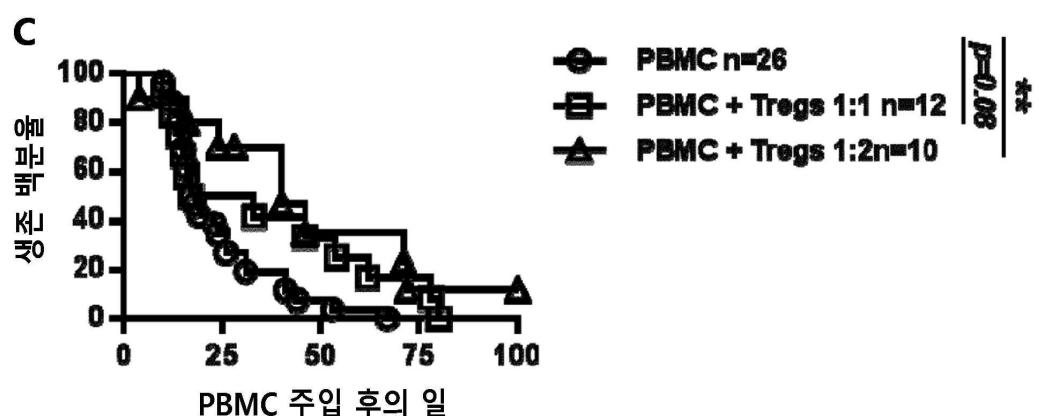
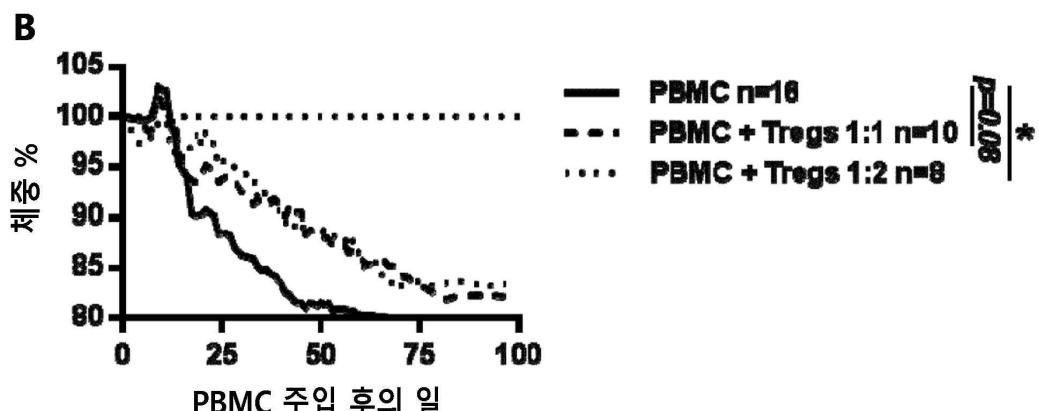
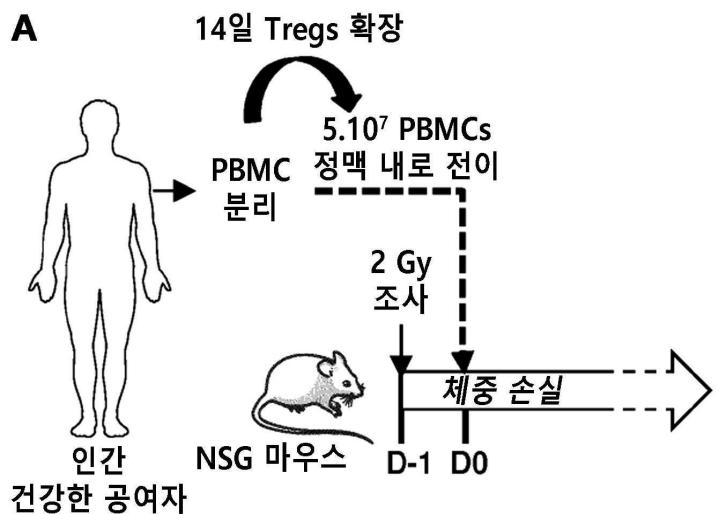
도면13



도면14



도면15



서 열 목록

- <110> INSERM (Institut National de la Sante et de la Recherche Medicale)
UNIVERSITE DE NANTES
CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE NANTES
- <120> A NEW SUBPOPULATION OF CD8+CD45RClow TREGS AND USES THEREOF
- <130> IPA180223-FR
- <150> EP 15306366.4

<151> 2015-09-07
<160> 18
<170> BiSSAP 1.3.6
<210> 1
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Peptide derived from a MHC class II molecule
<400> 1
Arg Glu Glu Tyr Ala Arg Phe Asp Ser Asp Val Gly Glu Tyr Arg

1 5 10 15
<210> 2
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Peptide derived from a MHC class II molecule
<400> 2

Asn Arg Glu Glu Tyr Ala Arg Phe Asp Ser Asp Val Gly Glu Tyr Arg

1 5 10 15
<210> 3
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Peptide derived from a MHC class II molecule
<400> 3

Arg Glu Glu Tyr Ala Arg Phe Asp Ser Asp Val Gly Glu Phe Arg

1 5 10 15
<210> 4
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Peptide derived from a MHC class II molecule
<400> 4

Arg Glu Glu Tyr Val Arg Phe Asp Ser Asp Val Gly Glu Tyr Arg

1 5 10 15

<210> 5

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide derived from a MHC class II molecule

<400> 5

Gln Glu Glu Tyr Ala Arg Phe Asp Ser Asp Val Gly Glu Tyr Arg

1 5 10 15

<210> 6

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide derived from a MHC class II molecule

<400> 6

Arg Glu Glu Tyr Ala Arg Phe Asp Ser Asp Val Gly Val Tyr Arg

1 5 10 15

<210> 7

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide derived from a MHC class II molecule

<400> 7

Asn Arg Glu Glu Tyr Ala Arg Phe Asp Ser Asp Val Gly Glu Phe Arg

1 5 10 15

<210> 8

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide derived from a MHC class II molecule

<400> 8

Asn Arg Glu Glu Tyr Val Arg Phe Asp Ser Asp Val Gly Glu Tyr Arg

1 5 10 15
<210> 9
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Peptide derived from a MHC class II molecule
<400> 9
Asn Gln Glu Glu Tyr Ala Arg Phe Asp Ser Asp Val Gly Glu Tyr Arg

1 5 10 15
<210> 10
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Peptide derived from a MHC class II molecule
<400> 10
Asn Arg Glu Glu Tyr Ala Arg Phe Asp Ser Asp Val Gly Val Tyr Arg
1 5 10 15
<210> 11
<211> 40
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Peptide derived from a MHC class II molecule
<400> 11
Arg Leu Leu Ala Arg Leu Ile Tyr Asn Arg Glu Glu Tyr Ala Arg Phe

1 5 10 15
Asp Ser Asp Val Gly Glu Tyr Arg Ala Val Thr Glu Leu Gly Arg Pro
20 25 30
Ser Ala Glu Tyr Arg Asn Lys Gln
35 40
<210> 12
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide derived from a MHC class II molecule

<400> 12

Tyr Leu Arg Tyr Asp Ser Val Gly Glu Tyr Arg Ala Val Thr Glu

1	5	10	15
---	---	----	----

<210> 13

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide derived from a MHC class II molecule

<400> 13

Asp Ser Asp Val Gly Glu Tyr Arg Ala Val Thr Glu Leu Gly Arg Pro

1	5	10	15
---	---	----	----

<210> 14

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide derived from a MHC class II molecule

<400> 14

Tyr Leu Arg Tyr Asp Ser Val Gly Glu Tyr Arg

1	5	10
---	---	----

<210> 15

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide derived from a MHC class II molecule

<400> 15

Tyr Leu Arg Tyr Asp Ser Val Gly Glu Tyr Arg Ala Val

1	5	10
---	---	----

<210> 16

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide derived from a MHC class II molecule

<400> 16

Ser Asp Val Gly Glu Tyr Arg Ala Val Thr Glu Leu Gly Arg

1

5

10

<210> 17

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide derived from a MHC class II molecule

<400> 17

Leu Arg Tyr Asp Ser Asp Val Gly Glu Tyr Arg Ala Val Thr Glu

1

5

10

15

<210> 18

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide derived from a MHC class II molecule

<400> 18

Ser Asp Val Gly Glu Tyr Arg

1

5