(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0016933
(43) 공개일자 2014년02월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0775 (2010.01) *A61K 35/12* (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-7026776
(22) 출원일자(국제) 2012년03월12일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2013년10월10일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2012/054251
(87) 국제공개번호 WO 2012/123401
국제공개일자 2012년09월20일
(30) 우선권주장
11157930.6 2011년03월11일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
타이제닉스, 에스.에이.유.
스페인 마드리드 이-28760 트레스 칸토스, 1, 마르코니, 파르케 테크놀로히코 데 마드리드
(72) 발명자
가르시아 까사도, 하비에르
스페인, 이-10071 까세레스, 케이엠 41.8, 쎄르트라. 엔-521, 미니멀리 인바시브 설저리 센트레 헤수스 우손, 스템 셀 테라피 유니트
타라조나 라파르가, 라쿠엘
스페인, 이-10071 까세레스, 아베니다 유니버시다드 에스/엔, 유니버시티 오브 엑스트레마두라, 패컬티 오브 베터리나리, 이뮤놀로지 유니트
데 라 로사, 올가
스페인, 이-28760 트레스 칸토스 (마드리드), 씨/마르코니 1, 파르케 테크놀로히코 데 마드리드, 타이제닉스, 에스.에이.
(74) 대리인
특허법인주원

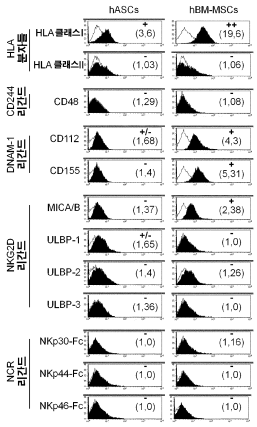
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **면역조절 활성을 갖는 세포군, 분리방법 및 용도들**

(57) 요 약

본 발명은 이에 제한되지는 않지만 자가 면역 질환, 염증 질환, 및 이식된 장기 및 조직들의 거부를 포함하는 면역학적으로 매개된 질환을 포함하는, 환자의 면역계의 조절이 유리한 장애들과 관련된 하나 이상의 증상들을 예방, 치료 또는 개선하는 데 이용하기 위한, 세포 표면 마커 CD112 및/또는 CD155 를 발현하지 않는 중간엽 줄기 세포의 세포군을 제공한다.

대 표 도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

분리된 중간엽 줄기 세포군으로서, 상기 세포군의 세포들이 CD112 및/또는 CD155 를 발현하지 않는 것을 특징으로 하는 분리된 중간엽 줄기 세포군.

청구항 2

제1항에 있어서, 다음의 세포표면 마커들 CD11b, CD11c, CD14, CD45, HLAII, CD31, CD34, CD45, 1B10 (αFSP), FceR1α 및 CD133 의 적어도 하나 및 바람직하게는 전부에 대하여 양성인 것을 특징으로 하는 세포군.

청구항 3

하기의 단계들을 포함하는 제1항에 따른 세포군을 분리하는 방법:

(i) 지방조직의 샘플로부터 세포현탁액을 준비하는 단계;

(ii) 상기 세포현탁액으로부터 세포들을 회복시키는 단계;

(iii) 상기 세포들을 세포들이 고체표면에 부착하고 증식하게 하는 조건하에서, 고체표면 상에서 적합한 세포배양배지 내에서 배양하는 단계;

(iv) 비-부착된 세포들을 제거하는 단계;

(v) 그러한 배지에서 적어도 2회 계대배양된 후 상기 고체표면에 부착된 채로 남아있는 세포들을 선별하는 단계; 및

(vi) 개별적 세포들 또는 아세포군들에서 마커 CD112 및/또는 CD155 의 존재 또는 부존재를 결정하는 단계

(vii) 마커 CD112 및/또는 CD155 에 대하여 음성인 세포들 또는 아세포군들을 선별하는 단계

청구항 4

a) 제1항 또는 제2항에 따른 세포군을 말초혈액 백혈구와 접촉시키는 단계, 및

(b) T-reg 세포군을 선별하는 단계,

를 포함하는 T-reg 세포군의 제조방법.

청구항 5

제4항의 방법에 따라서 수득가능한 분리된 T-reg 세포군.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 따른 세포군, 또는 제5항에 따른 T-reg 세포군, 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 7

자가면역 질환들, 염증성 장애들, 또는 이식된 장기 및 조직들의 거부를 포함하는 면역학적으로 매개된 질환들과 관련된 하나 이상의 증상들을 예방, 치료, 또는 개선시키기 위한 제1항 또는 제2항에 따른 세포군, 또는 제5항에 따른 T-reg 세포군, 또는 제6항에 따른 약학적 세포 조성물의 용도.

청구항 8

자가면역 질환들, 염증성 장애들, 또는 이식된 장기 및 조직들의 거부를 포함하는 면역학적으로 매개된 질환들과 관련된 하나 이상의 증상들을, 상기 장애들 또는 질환들을 겪고 있는 대상들에서, 예방, 치료, 또는 개선시키기 위한 방법으로, 예방적으로 또는 치료적으로 유효량의 제1항 또는 제2항에 따른 세포군, 또는 제5항에 따른 T-reg 세포군, 또는 제6항에 따른 약학적 세포 조성물을 그러한 치료를 필요로 하는 상기 대상에게 투여하는

것을 포함하는 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 염증성 질환은 만성 염증성 질환인 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 만성 염증성 질환은 염증성 장질환 (IBD) 및 류마티스 관절염 (RA) 으로부터 선택되는 방법.

청구항 11

하기의 단계들을 포함하는 제1항에 따른 세포들의 선발방법:

i) 적어도 두개의 세포계통으로 분화될 수 있는 능력을 가지는 세포들을 포함하는 중간엽 줄기 세포들의 세포군을 제공하는 단계

ii) 상기 지방 유래의 세포들의 세포군의 세포들 또는 아세포군에서 마커 CD112 및/또는 CD155 의 존재 또는 부존재를 결정하는 단계

iii) 마커 CD112 및/또는 CD155 에 대하여 음성인 세포들 또는 아세포군들을 선별하는 단계.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 성체 조직들로부터 유래한 세포군을 이용하는 대상의 면역계의 조절이 유익한 하나 이상의 장애 증상들의 예방, 치료 또는 개선에 관한 것이다.

[0002] 특히 본 발명은 이에 제한되지는 않지만 자가 면역 질환, 염증성 질환, 및 이식된 장기 및 조직들의 거부를 포함하는 면역학적으로 매개된 질환을 포함하는 어떤 대상의 면역계의 조절이 유리한 장애들과 관련된 하나 이상의 증상들을 예방, 치료 또는 개선하는 데 이용하기 위한, 세포 표면 마커 CD112 및/또는 CD155 를 발현하지 않는 중간엽 줄기세포의 세포군을 제공한다.

배 경 기 술

[0003] 중간엽 줄기세포들 (MSCs)은 다양한 세포 형태들로 분화할 수 있는 다능성 성체 줄기세포들이다. MSCs 는 전통적으로 골수로부터 분리되어 왔으나 최근 보고들은 태아 간 및 폐, 지방 조직, 골격근, 양수, 윤활막, 치수(dental pulp), 및 피부를 포함하는 다양한 조직들로부터 분리 및 시험관 확장(in vitro expansion)를 실행하고 있다. MSCs 는 우선, 그들의 다중계통 분화 능력을 통하여, 더 중요하게는, 국소의 전구세포들을 활성화시킬 수 있는 영양 인자(trophic factors)의 분비를 통하여, 조직재생 특성들을 가지는 것으로 추정된다. MSCs 는 또한 자연 살해(NK) 세포들, T 림프구들, γδ T 세포들 및 불변의(invariant) NKT 세포들의 증식 및 세포독성 잠재능을 저해하는 강한 면역 중재 능력들(immunomodulatory capacities)을 가진다. 더욱이, MSCs 는 항원 처리 및 제공의 제한된 효율을 가지며 수지상 세포의 기능을 조절함으로써 숙주 면역에 영향을 미친다.

[0004] 중간엽 줄기세포들은(이하에서는 또한 hASCs 라 언급함) 지방흡입 절차들로부터 얻을 수 있고 줄기세포의 특징들을 가지는 임상적으로 유용한 수의 세포들을 생산한다. 이러한 세포들은 임상실습을 위한 배양내에서 장기간에 걸쳐 확장될 수 있고, 세포 요법을 위한 흥미로운 도구가 될 수 있다. hASCs 의 치료법 적용들이 탐구되고 있으며, 몇몇 임상실험들이 대숙주성이식편병(graft-versus-host disease), 누공(fistula), 크론병 및 요실금(urinary incontinence)에서 진행중이다. hASCs 의 임상전연구 활동은 현재 당뇨병, 척수외상, 헌팅턴병, 다발성 경화증, 국소빈혈, 류머티스성 관절염, 피부 재생, 교아세포종(glioblastoma), 대장염과 같은 다양한 질환들에 전념하고 있다.

[0005] 비록 hASCs 및 골수-중간엽 줄기세포들 (이하에서는 hBM-MSCs 라고 언급함)이 상이한 출처들로부터 나온다 하더라도, 그들은 그들의 분화능력 및 그들의 면역 억제성 메커니즘에 있어서 기능적 유사점들을 공유한다.

[0006] 체외에서 MSCs 의 낮은 면역원성에도 불구하고, 우리는 환자의 면역억제 없이 동종 이계 환경에서 MSCs 를 이용하는데 있어 여전히 조심하여야 한다. 치료법 적용들을 위한 적응적(adaptive) 면역 시스템에 걸쳐 MSCs의 중

요한 역할을 고려해볼때 생득적 반응(innate response)의 맥락에서, 특히 동종 이계 환경에서 상기 줄기세포의 면역회피(immune privilege)가 유지되는지 여부를 명확히 하는 것은 흥미로운 일이다. 이런 의미에서, MSC (DP-MSC)에서 파생된 hBM-MSCs 및 치수(dental pulp)는 NK 세포과 같은 세포독성의 면역 이펙터(effector)에 의해 용해될 수 있다는 것이 몇몇의 군들에 의해 보고되었다. 이러한 세포들의 NK 민감성은 NK 및 표적 세포들 사이의 다수의 상호작용을 포함하는 활성화 수용체(receptor)에 대한 리간드들의 발현에 의할 것이다. NK 세포들에 의한 동종이계의 MSCs 의 인지 및 용해는 안전성 (면역거부반응과 관련된 부작용) 및 효능 (환자내에서 상기 세포의 감소된 지속)에서 중요한 의미를 가지며, 이를위해, MSCs 과 NK 세포들과의 상호작용을 이해하는 것이, 그들의 잠재적 치료용도를 최적화하기 위해 중요하다.

[0007] NK 세포들은 이전 민감화(prior sensitization) 없이 표적 세포들을 살해하는 능력을 가지는 림프구 세포들의 부분집합이다. 상기 NK 세포 활성화는 활성화 수용체들 및 그들 각각의 리간드들간의 특이적 상호작용을 통해 매개된다. 이러한 활성화 수용체들은, 일단 맞물리면, 상기 용해 및 사이토카인 방출을 유도한다. 그와는 반대로, NK 세포 저해를 향하여 균형을 이동하기 위해서는, NK 세포들의 활성화가 저해 NK 세포 수용체들에 의해 방지된다.

[0008] DNAM-1 와 같은 활성화 수용체들에 대한 리간드들이 hBM-MSCs 세포들의 표면상에서 확인되었고, 활성화된 NK 세포들은 hBM-MSCs 를 살해할 수 있으며 NK 수용체 활성이 포함된다는 것을 증명하였다.

[0009] 본 발명은 DNAM-1에 대하여 NK 수용체 리간드들을 발현하지 않는 중간엽 줄기세포들의 분리된 세포군을 제공한다.

발명의 내용

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명은 면역조절제(immunoregulatory agents)로 작용할 수 있는 지방 조직에 존재하는 다중계통 분화 능력(multilineage potential)을 가지는 세포군을 제공한다. 발명자들은 CD112 및/또는 CD155 세포 표면 마커들을 발현하지 않는 중간엽 줄기세포들의 세포군을 분리하였다. 상기 세포들의 면역조절 효과들은 특히 본 발명은 이에 제한되지는 않지만 자가 면역 질환, 염증성 질환, 및 이식된 장기 및 조직들의 거부를 포함하는 면역학적으로 매개된 질환을 포함하는 어떤 대상의 면역계의 조절이 유리한 장애들과 관련된 하나 이상의 증상들을 예방, 치료 또는 개선하는 데 이용될 수 있다. 치료제로서의 중간엽 줄기세포들의 용도가 기술분야에서 알려졌다 하더라도, 여기서 밝혀진 세포군은 환자 NK 세포들에 의해 인식되지 않고 따라서 환자들에서 오랬동안 지속됨으로서 보다 큰 치료 효과를 미친다는 점에서 지금까지 밝혀진 세포군을 넘어 중요한 이점을 제시한다.

[0011] 따라서, 하나의 측면에서, 본 발명은 중간엽 줄기 세포군에 관한 것으로 상기 세포군의 세포들은 세포표면 마커 CD112 및/또는 CD155 를 발현하지 않는다.

[0012] 또 하나의 측면에서, 본 발명은 상기 세포군의 분리 방법에 관한 것이다. 상기 방법에 따라 얻을 수 있는 상기 세포군은 본 발명의 추가적 측면을 구성한다.

[0013] 또 하나의 측면에서, 본 발명은 대상의 면역계의 조절이 유익한 하나 이상의 질환들의 예방, 치료 또는 개선에 있어서의 이용을 위한 상기 세포군에 관한 것이다.

[0014] 또 하나의 측면에서, 본 발명은 의약으로서 이용, 또는 이식 내성(transplantation tolerance) 유도용, 또는 자가 면역 치료용, 또는 염증성 질환 치료용, 또는 면역매개된 염증성 질환 치료용 상기 세포군에 관한 것이다. 특별한 구현에서, 상기 염증성 질환은, 예를 들면, 염증성 장 질환 (IBD) 또는 류마티스 관절염 (RA) 과 같은 만성 염증성 질환이다.

[0015] 또 하나의 측면에서, 본 발명은 대상의 면역계의 조절이 유익한 하나 이상의 증상들의 예방, 치료 또는 개선을 위한 의약, 예를들어, 이식 내성의 유도용 의약, 또는 자가면역 질환 치료용 의약, 또는 염증성 질환 치료용 의약, 또는 면역매개된 염증성 질환 치료용 의약과 같은 의약의 제조에 있어서의 상기 세포군의 용도에 관한 것이다.

[0016] 또 하나의 측면에서, 본 발명은 조절 T-세포들 (T-reg) 의 제조 또는 생성에 있어서의 상기 세포군의 용도에 관한 것이다. 상기 T-reg 세포군 뿐 아니라 그 분리 방법 또한 본 발명의 추가적 측면을 구성한다.

[0017] 또 하나의 측면에서, 본 발명은 의약용, 또는 이식 내성 유도용, 또는 자가면역 질환 치료용, 또는 염증성 질환

의 치료용, 또는 면역매개된 염증성 질환의 치료용 상기 T-reg 세포군에 관한 것이다.

[0018] 또 하나의 측면에서, 본 발명은 대상의 면역계의 조절이 유익한 장애의 하나 이상의 증상들의 예방, 치료 또는 개선을 위한 의약, 예를들어, 이식 내성 유도용의약, 또는 자가면역 질환 치료용 의약, 또는 염증성 질환 치료용 의약, 또는 면역매개된 염증성 질환 또는 예를들면, 과민증 유형 IV 반응, 그러나 이에 한정되지 않는 알러지 치료용 의약과 같은 의약의 제조에 있어서의 상기 T-reg 세포군의 용도에 관한 것이다.

[0019] 또 하나의 측면에서, 본 발명은 조사된(irradiated) 세포군의 분리방법에 관한 것이고, 상기 세포군을 적합한 조건들 하에서 이온화 방사선의 제어된 소스로 조사하는 것을 포함한다. 상기 조사된 세포군은 본 발명의 추가적 측면을 구성한다.

[0020] 또 하나의 측면에서, 본 발명은 의약으로서 이용, 또는 이식 내성 유도용, 또는 자가면역 치료용, 또는 염증성 질환 치료용, 또는 면역매개된 염증성 질환 치료를 위한 상기 조사된 세포군에 관한 것이다.

[0021] 또 하나의 측면에서, 본 발명은 예를들어, 이식 내성 유도용 의약, 또는 자가면역 질환 치료용 의약, 또는 염증성 질환 치료용 의약, 또는 면역매개된 염증성 질환 치료용 의약과 같은, 대상의 면역계의 조절이 유리한 장애들의 하나 이상의 증상의 예방, 치료 또는 개선을 위한 의약과 같은 의약 제조에 있어서 조사된 세포군의 용도에 관한 것이다.

[0022] 또 하나의 측면에서, 본 발명은 상기 세포군을 인터페론-γ(IFN-γ)으로 처리하는 것을 포함하는 방법에 관한 것이다. 상기 IFN-γ-처리된 세포군은 본 발명의 추가적 측면을 구성한다.

[0023] 또 하나의 측면에서, 본 발명은 의약으로서 용도의, 또는 이식 내성 유도용, 또는 자가면역 질환 치료용, 염증성 질환 치료용, 또는 면역매개된 염증성 질환 치료용 상기 IFN-γ-처리된 세포군에 관한 것이다.

[0024] 또 하나의 측면에서, 본 발명은 이식 내성 유도용 의약, 또는 자가면역 질환 치료용 의약, 또는 염증성 질환 치료용 의약, 또는 면역매개된 염증성 질환 치료용 의약과 같은, 대상의 면역계의 조절이 유리한 장애들의 하나 이상의 증상의 예방, 치료 또는 개선을 위한 의약과 같은 의약의 제조에서의 상기 IFN-γ-처치된 세포군의 용도에 관한 것이다.

[0025] 또 하나의 측면에서, 본 발명은 상기 세포군을 (i) 조사, 및 (ii) IFN-γ로 자극하는 것을 포함하는 방법에 관한 것이며, 치료들 (i) 및 (ii) 는 순서에 상관없이 수행되었다. 상기 조사된 IFN-γ-미리자극된 세포군 또는 IFN-γ-미리자극된 조사된 세포군은 본 발명의 추가적 측면을 구성한다.

[0026] 또 하나의 측면에서, 본 발명은 의약으로서의 용도, 또는 이식 내성 유도용, 또는 자가면역 질환 치료용, 또는 염증성 질환 치료용의 상기 조사된 IFN-γ-미리자극된 세포군 또는 IFN-γ-미리자극된 조사된 세포군에 관한 것이다.

[0027] 또 하나의 측면에서, 본 발명은 대상의 면역계의 조절이 유익한 장애들의 하나 이상의 증상들의 예방, 치료, 또는 개선을 위한 의약, 예를들어, 이식 내성 유도용 의약, 또는 자가면역 질환 치료용 의약, 또는 염증성 질환 치료용 의약, 또는 면역매개된 염증성 질환 치료용 의약과 같은 의약 제조에 있어서의 상기 조사된 IFN-γ-미리자극된 세포군 또는 IFN-γ-미리자극된 조사된 세포군의 용도에 관한 것이다.

[0028] 또 하나의 측면에서, 본 발명은 상기 세포군, 또는 상기 T-reg 세포군, 또는 상기 조사된 세포군, 또는 상기 IFN-γ-처리된 세포군, 또는 상기 조사된 IFN-γ-미리자극된 세포군, 또는 상기 IFN-γ-미리자극된 조사된 세포군의 자가 면역 질환, 면역매개된 염증성 질환 이식된 장기 및 조직들의 거부를 포함하는 면역학적으로 매개된 질환과 관련된 하나 이상의 증상들의 예방, 치료, 또는 개선을 위한 용도에 관한 것이다.

[0029] 또 하나의 측면에서, 본 발명은 어떠한 상기 장애들 또는 질환들을 겪고 있는 대상들에 있어서, 자가 면역 질환, 염증성 장애, 또는 면역학적으로 매개된 질환과 관련된 하나 이상의 증상들을 예방, 치료 또는 개선하는 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 그러한 치료를 필요로 하는 대상에게 예방적으로 또는 치료적으로 유효량의 상기 세포군, 또는 상기 T-reg 세포군, 또는 상기 조사된 세포군, 또는 상기 IFN-γ처리된 세포군, 또는 상기 조사된 IFN-γ-미리자극된 세포군, 또는 상기 IFN-γ-미리자극된 조사된 세포군을 투여하는 것을 포함한다. 본 발명은 또한 병용 요법에 있어서 그러한 방법들의 용도에 관한 것이며,다시 말하면, 본 발명의 세포군은 하나 이상의 약제들과 함께, 제 2 의 또는 추가의 약제와 함께 동시에 이거나 또는 따로따로, 예를 들어, 연속적으로, 공동투여된다.

[0030] 또 하나의 측면에서, 본 발명은 상기 세포군, 또는 상기 T-reg 세포군, 또는 상기 조사된 세포군, 또는 상기

IFN-γ-처리된 세포군, 또는 상기 조사된 IFN-γ-미리자극된 세포군, 또는 상기 IFN-γ-미리자극된 조사된 세포군 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0031] 또 하나의 측면에서, 본 발명은 세포 표면 마커 DNAM-1 를 발현하는지 여부를 확인하는 단계를 포함하는, 분화된 세포들로부터 성체 다능성 세포들을 구별하는 방법에 관한 것이다.

[0032] 또 하나의 측면에서, 본 발명은 상기 세포군, 또는 상기 T-reg 세포군, 또는 상기 조사된 세포군, 또는 상기 IFN-γ-처리된 세포군, 또는 상기 조사된 IFN-γ-미리자극된 세포군, 또는 상기 IFN-γ-미리자극된 조사된 세포군을 포함하는 키트에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

[0033] **도 1. hASCs 및 hBM-MSCs 에서의 HLA 분자 및 NK 활성화 수용체들에 대한 리간드들의 발현**

건강한 공여자들로부터 수득한 hASCs 및 hBM-MSCs 는 다색 유동 세포계측에 의해 표현형으로 특징되었다. HLA 분자들 및 NK 활성화 수용체들에 대한 리간드들의 정량화는 평균 형광 강도(Mean Fluorescent Intensity (MFI))를 그의 음성 대조군으로(괄호안의 숫자들) 나눔으로써 계산되는 평균 상대 형광 강도(Mean Relative Fluorescence Intensity (MRFI))로서 제공되었다. 상기 표준화 점수들은 다음의 키들에 따른 형광 강도로부터 결정되었다: 값 <1,5 = 음성, >1,5<2= +/-, 2-10= +, >10<100= ++, >100= +++. 각 마커의 대표적 히스토그램은 왼쪽 칼럼(hASCs) 및 오른쪽 칼럼(hBM-MSCs) 모두에서 나타났다. 검정색 굵은 히스토그램들은 상기 마커 발현을 보여주고, 빈 선들은 음성 대조구 약어들을 대표한다: HLA-ABC, 조직적합성 위치 항원-ABC(histocompatible locus antigen-ABC); HLA-DR, 조직적합성 위치 항원-DR; P, 통로(passage); ULBP, UL16-결합 단백질; NCR, 자연적 세포 독성 수용체(natural cytotoxicity receptor); Fc, IgG 의 단편 결정화가능 영역(fragment crystallizable region); DNAM, DNAX 액세서리 분자-1.

도 2. hASCs 는 IL-2-확장된 NK 세포들에서 낮은 탈과립(degranulation)을 유도한다.

동종이계의(Allogeneic) PBMCs 세포들이 rhIL-2 와 함께 5일동안 미리 자극되었고 그리고나서 CD56+CD3 - 표현형을 기초로 정리되었다.

세포독성 과립 엑소사이토시스(exocytosis)를 정량화하기 위해, CD107a/b 의 표면 발현이 표적세포들과(hASCs, hBM-MSCs, K562 또는 없이) 함께 1:1 (NK:표적) 비율로 공동배양된 정제된 NK 세포들의 활성화에 따라 분석되었다. 위쪽 그림은 CD56 양성의 세포들에 대한 CD107a/b의 퍼센티지의 평균 및 표준 편차를 제공한다. 아래쪽 열은 각 조건의 대표 점도표(dot plot)를 나타낸다. 상기 도표 내의 숫자들은 정제된 NK 세포들에 대한 CD107a/b 의 퍼센티지를 나타낸다. 결과들은 5개의 독립적인 실험들의 대표 점도표로서 제시되었다. $*p \leq 0.05$

도 3. hASCs 는 IL-2-확장된 NK 세포들에서 IFN-γ 생산을 유도한다.

동종이계의 PBMCs 세포들이 rhIL-2 와 함께 5일 동안 미리 자극되었고 그리고나서 CD56+CD3 - 표현형을 기초로 정리되었다. 표적세포들 (hASCs, hBM-MSCs, K562 또는 없이) 과 함께 1:1 (NK:표적) 비율로 정제된 NK 세포들의 활성화에 따라, 세포내 착색이 항-인간 IFN-γ를 사용하여 NK 세포들 상에서 수행되었다. 결과들은 대표 점도표와 함께 6개의 독립적인 실험들의 평균 ± SD 로서 제시되었다. 각 조건의 대표 점도표는 도면에서 제시되었고, 각 구역(plot)내의 숫자들은 정제된 NK 세포들 상의 IFN-γ의 퍼센티지를 보여준다.

도 4. 접촉- 의존적 및 비의존적 메커니즘을 통한 hASCs 및 hBM-MSCs 감소된 NK 세포 활성.

CD56+CD3-표현형을 기초로 정리된 동종이계의 NK 세포들은 hASCs 또는 hBM-MSCs 의 존재 또는 부재하에, 트랜스웰 내 또는 직접접촉으로 1:1의 비율로 72시간 동안 공동배양되었다. 이러한 세포들은 그 뒤에 NK-민감성 표적 세포계 (K562 세포들)에 대한 탈과립 분석에서 조사되었다. 위쪽 그래프는 hASCs 와 함께 미리배양된 NK 세포들의 탈과립을 나타낸다. 아래쪽 그래프는 hBM-MSCs 와 함께 미리배양된 NK 세포들의 탈과립을 나타낸다. 값들은 4개의 독립적으로 수행된 실험들의 평균 ± SD 를 나타낸다. 약어들: NK_{hASCs}, hASCs 와 함께 예비감작된 자연 살해자; $NK_{hBM-MSCs}$, hBM-MSCs 로 예비감작된 자연 살해자; $NK_{대조구}$, 단독으로 배양된 자연 살해자. $*p \leq 0.05$

도 5. NK 세포들은 IDO 유도를 통한 hASCs 의 면역조절능력을 향상시킨다.

위쪽 및 아래쪽 그래프는 각각 72시간동안 1:1의 비율로 공동배양된 NK/hASCs 또는 NK/hBM-MSCs 로부터의 상청액에서의 트립토판 (Trp) 및 카이뉴레닌(Kyn) 농도를 나타낸다. 조절된 상청액들은 HPLC 방법에 의해 측정되었다. 검정색 바들은 접촉 조건(contact conditions)의 평균 및 표준 편차를 나타내고, 하얀색 바들은 트랜스웰

조건의 평균 및 표준 편차를 나타낸다. 상기 바들에서 보여진 값들은 4개의 독립적으로 수행된 실험들의 평균 ± SD 를 대표한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0034] 이전에 언급한 바와 같이, 발명자들은 세포표면 마커 CD112 및/또는 CD155 를 발현하지 않으며 면역조절제로서 역할을 할 수 있는, 중간엽 유래의 조직들에 존재하는 다중계통 능력(multilineage potential)을 가지는 세포군들을 분리하였다. 상기 세포들의 면역억제성의 면역조절 효과들은 자가 면역 질환, 염증성 질환, 및 이식된 장기 및 조직들의 거부를 포함하는 면역학적으로 매개된 질환을 포함하되, 이에 한정되는 것은 아닌, 대상의 면역계의 조절이 유익한 장애들과 관련된 하나 이상의 증상들을 예방, 치료 또는 개선하는 데 이용될 수 있다.

[0035] **정의**

[0036] 본 발명의 설명의 이해를 촉진시키기 위하여, 본 발명의 본문에서의 몇가지 용어들 및 표현들의 의미가 아래에서 설명될 것이다. 필요한 경우 추가적인 정의들이 설명을 따라 포함될 수 있다.

[0037] 여기서 사용된 용어 "중간엽 줄기세포"(또한 여기서 "MSC" 로 언급됨)는 세포의 다중의 상이한 형태를 유발할 수 있고 본래 간엽(mesenchyme)으로부터 유래된 세포를 의미하는 것으로 생각된다. 상기 용어는 적어도 하나의 조골세포, 연골세포, 지방세포, 또는 근세포로 분화될 수 있는 세포를 말한다. MSCs 는 어떠한 형태의 조직으로부터 분리될 수 있다. 일반적으로 MSCs 골수, 지방 조직, 탯줄, 또는 말초혈액으로부터 분리될 수 있다.

[0038] 용어 "면역조절제(immunoregulatory agent)"는 하나 이상의 면역계의 생물학적 활성들을 저해 또는 감소시키는 약제를 말한다. 면역조절제는 하나 이상의 면역 세포들(예들들면, T 세포들)의 하나 이상의 생물학적 활성들(예를들면, the 증식, 분화, 프라이밍(priming), 작동자 기능(effector function), 시토카인 생산 또는 항원들의 발현)을 저해 또는 감소시키는 약제이다.

[0039] 용어 "면역 질환"은 대상의 면역반응에 의해 기인한 세포의, 조직 및/또는 장기손상으로 특징되는 대상에서의 상태를 말한다. 용어 "자가면역 질환"은 대상의 그 자신의 세포들에 대한 면역반응에 의해 기인한 세포의, 조직 및/또는 장기손상으로 특징되는 대상에서의 상태를 말한다. 상기 발명의 면역조절 세포들로 치료되어질 수 있는 자가면역 질환들의 비제한적인 실시예들은 원형탈모증, 강직성 척추염, 항인지질항체증후군, 자가면역 애디슨병, 부신의 자가면역 질환들, 자가면역 용혈성 빈혈, 자가면역 간염, 자가면역 난소염 및 및 고환염, 자가면역 혈소판 감소증, 베체트병, 수포성류천포창, 심근증, 복강 스프루우-피부염(celiac sprue-dermatitis), 만성피로 면역기능 장애 증후군(CFIDS), 만성 염증성 탈수초성 다발성 신경병증, 처그-스트라우스 증후군, 흉터성 유사천포창, CREST 증후군, 한랭 응집소병, 원판성 루푸스, 필수 혼합된 한랭글로불린혈, 섬유성근통-섬유성근염, 사구체신염, 그레이브즈 병(Graves' disease), 길랑-바레(Guillain-Barre), 하시모토병, 특발성 폐섬유화증, 특발성 혈소판 감소성 자반(ITP), IgA 신경병증, 소아 관절염, 편평태선, 메니에르 증후군, 혼합결합조직병, 다발성 경화증, 제1형 또는 면역-매개된 당뇨병, 중증 근무력증, 심상성 천포창(pemphigus vulgaris), 악성 빈혈, 결절성 다발성 동맥염(polyarteritis nodosa), 다발연골염(polychondritis), 다선 증후군(polyglandular syndromes), 다발성근육통, 다발성근염 및 피부근염, 원발성(primary) 무감마글로불린혈증, 원발성담즙성간경변, 건선, 건선성관절염, 레이놀즈 현상(Raynauld's phenomenon), 라이터 증후군, 유육종증, 경피증(scleroderma), 진행성 전신성 강피증(progressive systemic sclerosis), 쇼그렌 증후군, 굿 패스튜어 증후군(Good pasture's syndrome), 근육강직 증후군(stiff-man syndrome), 전신 홍반성 루프스, 만성 홍반성 루푸스, 타카야수 동맥염, 일시적 아르테리스티스(temporal arteristis)/거대세포 동맥염, 궤양성 대장염, 포도막염, 포진성 피부염 혈관염(dermatitis herpetiformis vasculitis)과 같은 혈관염, 백반, 베게너 육아종증, 항사구체 기저막 질환, 항인지질항체증후군, 신경계의 자가면역 질환들, 가족성 지중해열, 램버트-이튼 근무력증루군, 교감성 안염, 폴리엔도크리노패티스(Polyendocrinopathies), 건성, 등을 포함한다.

[0040] 용어 "면역 매개된 염증성 질병"은 정상적인 면역 반응의 조절장애와 관련되거나 또는 유발되는 것으로부터 원인이 되는 만성 또는 급성 염증으로 특징되는 어떠한 질환, 예를들어 크론병, 제1형 당뇨병, 류마티스성 관절염, 염증성 장 질환, 건선, 건선성 관절염, 강직성 척추염, 전신 홍반성 루푸스, 하시모토병, 대숙주성 이식편병, 쇼그렌 증후군, 악성빈혈, 애디슨병, 경피증, 굿 패스튜어 증후군(Good pasture's syndrome), 궤양성 대장염, 자가면역성 용혈성 빈형, 불임, 중증 근무력증, 다발성 경화증, 바제도병, 혈소판감소 자반병, 길랑-바레(Guillain-Barre) 증후군, 알러지, 천식, 아토피성 질환, 동백경화증, 심근염, 심근증, 사구체신염, 재생불량

성빈혈, 및 장기 이식 후 거부, 를 의미하는 것으로 이해될 수 있을 것이다.

[0041] 소아 지방변증(Celiac disease)은 복강질병(coeliac disease), 복강(c(o)eliac) 스프루, 비열대성 스프루(non-tropical sprue), 풍토적 스프루(endemic sprue), 글루텐 장질환 또는 글루텐-민감성 장질환, 및 글루텐 불내성으로 대체하여 언급된다.

[0042] 여기서 설명된 발명의 목적을 위하여, "면역 장애들"은 자가면역 질환들 및 면역학적으로- 매개된 질환들을 포함한다.

[0043] 용어 "감염성 질환들" 은 염증, 예를들면, 만성 염증, 에 의해 특징되는 대상 내의 상태를 말한다. 염증성 장애들의 구체적이며, 비제한적인 실시예들, 소아 지방변증(Celiac Disease), 류마티스성 관절염 (RA), 염증성 장질환(IBD), 천식, 뇌염, 만성 폐쇄성 폐질환(COPD), 염증성 골용해(inflammatory osteolysis), 알러지성 장애, 폐혈성 쇼크, 폐섬유증(예를들면, 특발성 폐섬유증), 염증성 vacultides (예를들면, 결절성 다발성 동맥염, 베게너 육아종증, 타카야수 동맥염, 측두동맥염(temporal arteritis), 및 림프종양육아종증), 외상후 맥관의 혈관형성술(예를들면, 혈관형성술 이후 재협착증), 구별되지 않는 척추관절증, 구별되지 않는 관절증(undifferentiated arthropathy), 관절염, 염증성 골용해(inflammatory osteolysis), 만성 간염, 및 만성 바이러스성 또는 세균성 감염으로 인한 만성 염증을 포함하되 이에 제한되는 것은 아니다.

[0044] 세포군에 적용된 용어 "분리된"은 인간의 또는 동물의 몸체로부터 분리된 세포군을 나타내며, 이는 실질적으로 생체내 또는 생체외에서 상기 세포군과 관련된 하나 이상의 세포군들을 포함하지 않는다.

[0045] 용어 "MHC"(주조직 적합성 복합체)는 세포-표면 항원-제시 단백질들을 암호화하는 유전자들의 부분집합을 나타낸다. 인간에서, 이러한 유전자들은 사람 백혈구 항원(HLA) 유전자들을 나타낸다. 여기서, 상기 약어 MHC 또는 HLA 는 교대해서 사용되었다.

[0046] 용어 "대상(subject)"은 동물, 바람직하게는 비-영장류 (예를들면, 소, 돼지, 말, 고양이, 개, 또는 쥐) 및 영장류 (예를들면, 원숭이 또는 인간)을 포함하는 포유류를 나타낸다. 바람직한 구현에서, 상기 대상은 인간이다.

[0047] 용어 "T-세포"는 T-세포 수용체(TCR)를 발현하는 림프구들의 부분집합(subset)인 면역계의 세포들을 나타낸다.

[0048] 용어 "조절성 T-세포(T-reg 세포들)는 면역계의 활성화를 활동적으로 억제하고 병리학적 자가 반응성, 예를들면 자가면역 질환들을 예방하는 T 세포 아군을 나타낸다.

[0049] 여기서 사용된 바와 같이, 용어 "치료하다", "치료" 및 "치료하는"은 자가 면역 질환, 염증성 질환, 및 이식된 장기 및 조직들의 거부를 포함하는 면역학적으로 매개된 질환을 포함하되, 이에 제한되지 않는, 장애와 관련된 하나 이상의 증상들의 개선에 관한 것이며, 상기 발명의 세포군, 상기 발명의 T-reg 세포군, 또는 상기 발명의 IFN-γ-미리 자극된 세포군, 또는 그들을 포함하는 약학적 조성물을 상기 치료를 필요로 하는 대상에게 투여하는 것으로부터 이루어진다.

[0050] 용어 "병용요법" 은 자가 면역 질환, 염증성 질환, 및 이식된 장기 및 조직들의 거부를 포함하는 면역학적으로 매개된 질환을 포함하되, 이에 제한되지 않는, 장애와 관련된 하나 이상의 증상들의 개선을 위하여, 본 발명의 방식으로, 다른 활성 약제들 또는 다른 치료방법들과 함께 본 발명의 세포군의 이용을 나타낸다. 이러한 다른 약제들 또는 치료들은 알려진 약물들 및 그러한 장애들의 치료를 위한 치료법들을 포함할 것이다. 상기 발명의 세포군들은 또한 코르티코스테로이드류, 비-스테로이드성 항염증 화합물들, 또는 염증을 치료하는데 유용한 다른 약제들과 혼합될 수 있다. 본 발명의 약제들의 이러한 다른 치료법들 또는 치료방법들과의 혼합된 용도는 공존하는, 순차적으로 주어진 것일 수 있으며, 즉, 상기 2가지 치료들은 본 발명의 세포군 또는 이를 포함하는 약학적 조성물이 사전에 또는 다른 치료법 또는 치료방법 이후에 주어질 수 있다는 것으로 나뉠 수 있을 것이다. 주치의는 상기 세포군, 또는 그를 포함하는 약학적 조성물을 다른 약제들, 치료법 또는 치료방법들과 혼합하여 투여하는 적합한 순서를 결정할 수 있을 것이다.

[0051] **발명의 세포들**

[0052] 한 측면에서, 본 발명은 여기서 "상기 발명의 세포군" 으로 언급된, 마커 CD112 및/또는 CD155 를 발현하지 않는 상기 세포군의 상기 세포들로 특징되는 분리된 중간엽 줄기 세포군에 관한 것이다. MSCs 는 다수의 중간엽 유래의 및 골수, 지방조직, 탯줄, 또는 말초혈액을 포함하되 이에 제한되지 않는 다른 조직들로부터 분리되어질

수 있다. 본 발명에서 사용된 MSCs 는 몇가지 구현들에서, 아마도 골수 (BM-MSCs) 또는 지방조직 (ASCs)으로부터 분리될 수 있을 것이다. 본 발명의 특히 바람직한 측면에서, MSCs 는 지방조직으로부터 얻은 그들의 흡인지방으로부터 얻을 수 있다. ASCs 의 생산은 예를들면, WO-A-2006/136244 에서 기술된 바와 같이 당해 기술분야에서 알려져 있다.

[0053] 바람직한 구현에서, 본 발명의 세포군의 세포들은 포유동물, 예를들면, 설치류, 영장류, 등, 바람직하게는 인간으로부터이다.

[0054] **마커들**

[0055] 본 발명의 세포들은 발현하지 않으며 따라서 세포표면 마커 CD112 및/또는 CD155 에 대하여 "음성(negative)"인 것으로 고려된다. 따라서, 본 발명의 세포들은 이전에 설명한 중간엽 줄기 세포들의 소집단(subpopulation)을 구성하지 않는다.

[0056] 나아가, 본 발명의 세포들은 아마도 다음의 세포표면 마커들의 적어도 하나, 둘, 또는 아마도 전부에 대하여 음성이다: CD11b, CD11c, CD14, CD45, HLAII, CD31, CD34, CD45, 1B10 (αFSP), FceR1α 및 CD133.

[0057] 여기서 사용한 바와 같이 용어 CD112 (IL2RB) 및 CD155 (PVR, Nectin 2)는 그들의 게놈서열(NM_000878.2 (CD112) 및 NM_001135768.1., NM_001135769.1., NM_001135770.1 또는 NM_006505.3 (CD155)) 로부터 전사된 폴리펩티드 또는 단편(모든 스플라이싱 변형체 및 아형(isoforms)을 포함하는) 을 의미하는 것으로 간주될 수 있고, 그것은 CD226 (DNAM-1) 의 리간드로서 결합 또는 작용하는 능력을 가진다.

[0058] 바람직한 구현에서, 용어 CD112 는 SEQ ID NO:1 에 따른 아미노산 서열에 대해 적어도 85% 동일한(바람직하게는, 적어도 90%, 95%, 98%, 99%, 또는 100% 동일) 서열 또는 그의 세포외 영역(아미노산 27-240)을 포함하는 폴리펩티드를 의미하는 것으로 간주된다.

[0059] 여기서 사용된 용어 CD155 는 SEQ ID NO:2 에 따른 아미노산 서열에 대해 적어도 85% 동일한(바람직하게는, 적어도 90%, 95%, 98%, 99%, 또는 100% 동일) 서열 또는 그의 세포외 영역 (아미노산 21-343)을 포함하는 폴리펩티드를 의미하는 것으로 간주된다.

[0060] 여기서 사용된, 세포표면 마커에 대하여 "음성"은, 본 발명의 세포들을 포함하는 세포군에서, 10% 미만, 바람직하게는 상기 세포의 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 또는 아무것도 아닌것이 종래의 방법들 및 장치들(예를들면 상업적으로 이용가능한 항체들 및 당해 기술분야에서 알려진 표준 프로토콜과 함께 사용된 Beckman Coulter Epics XL FACS 시스템)를 이용하는, 백그라운드 신호 이상의 유세포분석기에서, 특이적 세포 표면 마커에 대한 신호를 나타내는 것을 의미한다. 특별한 구현에서, 본 발명의 세포들은, 그들은 적어도 하나의, 두개의, 세개의, 네개의, 또는 바람직하게는 다음의 세포표면 마커들 모두에서 발현한다는 점에서 특징지어지며: CD9, CD44, CD54, CD90, CD29, CD59 및 CD105; 즉, 본 발명의 세포들은 적어도 하나의, 두개의, 세개의, 네개의, 또는 바람직하게는 다음의 세포표면 마커들 모두에서(CD9, CD44, CD54, CD90, CD29, CD59 및 CD105) 양성이다. 바람직하게는, 본 발명의 세포들은 그들이 적어도 하나의, 두개의, 세개의, 네개의, 또는 바람직하게는 다음의 세포표면 마커들 모두(CD9, CD44, CD54, CD90, CD29, CD59 및 CD105)의 의미있는 발현 수준들을 가지는 것에서 특징지어진다. 여기서 사용된 바와 같이, 표현 "상당한 발현(significant expression)"은 본 발명의 세포들을 포함하는 세포군에서, 10% 이상, 바람직하게는 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 세포 모두가 종래의 방법들 및 장치들(예를들면 상업적으로 이용가능한 항체들 및 당해 기술분야에서 알려진 표준 프로토콜과 함께 사용된 Beckman Coulter Epics XL FACS 시스템)를 이용하는, 백그라운드 신호 이상의 유세포분석법에서, 특이적 세포 표면 마커에 대한 신호를 나타내는 것을 의미한다. 백그라운드 신호는 종래의 FACS 분석에서 각 표면 마커를 탐지하는데 사용된 특이적 항체와 동일한 아이소타입(isotype)의 비특이적 항체에 의해 제공된 신호강도로서 정의된다. 따라서 양성으로 고려되어질 마커에 대하여 상기 관찰된 특이적 신호는, 종래의 방법들 및 장치(예를들면 상업적으로 이용가능한 항체들 및 당해 기술분야에서 알려진 표준 프로토콜과 함께 사용된 Beckman Coulter Epics XL FACS 시스템)를 이용하는 백그라운드 신호 강도보다도 10%, 바람직하게는 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 500%, 1000%, 5000%, 10000% 또는 그 이상, 강하다.

[0061] 임의적으로, 본 발명의 세포들은 또한 세포표면 마커 CD106 (VCAM-1)에 대하여 음성이다.

[0062] 상기 세포표면 마커들(예를들면, 세포성 수용체들 및 막관통 단백질들)에 대한 상업적으로 이용가능하고 알려진 단일클론성 항체들은 본 발명의 세포들을 확인하는데 사용되어질 수 있다.

[0063] **IDO 의 발현**

[0064] 본 발명의 세포들은 IDO 를 구성적으로(constitutively) 발현하지 않으나, IFN-γ 와의 자극에 대해 IDO를 발현한다. 상기 발명자들에 의해 수행된 실험들은 상기 세포들이, 그들자신들에 의한 다른 염증전 매개체들(3ng/ml농도에서 사용된 인터류킨-1 (IL-1), 농도 50ng/ml 농도에서 사용된 종양 괴사 인자-알파(TNF-α), 또는 100ng/ml 농도에서 사용된 엔도톡신 LPS 와 같은) 과의 자극에 대하여 종래의 RT-PCR 및 웨스턴 블롯 분석에 의해 측정된 바와 같이 IDO 발현을 유도하지 않았다는 것을 보여주었다. 예로서 3ng/ml 또는 더높은 IFN-γ와의 자극은 본 발명의 세포들에서 세포표면 마커에 대하여 여기서 정의된 바와 같이 양의 신호를 제공하도록 HLAII의 발현을 유도할 수 있다. 상기 발현은 특이적 단백질들의 발현의 탐지를 가능케하는 임의의 알려진 기술을 사용하여 당업자들에 의해 탐지될 수 있다. 바람직하게는, 상기 기술은 세포 분석법(cell cytometry) 기술이다.

[0065] **분화**

[0066] 본 발명의 세포들은 적어도 둘, 더욱 바람직하게는 세개의, 네개의, 다섯개의, 여섯개의, 일곱개의 또는 그 이상의 세포 계통들로 증식 및 분화될 수 있는 능력을 보여준다. 본 발명의 세포들에서, 세포 계통(cell lineages)의 예시적이며, 비제한적인 실시예들은 골세포, 지방세포, 연골세포, 테노사이트(tenocytes), 근세포, 심장근육 세포, 조혈-지지 줄기세포(hematopoietic-supporting stromal cells), 내피세포, 뉴우런, 성상세포(astrocytes), 및 간세포를 포함하여 분화될 수 있다.

[0067] 본 발명의 세포들은 종래의 방법들에 의해 다른 계통의 세포들로 증식 및 분화할 수 있다. 분화된 세포들을 확인하고 그 후 그들의 분화되지 않은 대응물로부터 분리하는 방법들 또한 기술분야에서 잘 알려진 방법들에 의해 수행되어질 수 있다.

[0068] 본 발명의 세포들은 또한 생체외(ex vivo)로 확장되어질 수 있다. 즉, 분리 후, 본 발명의 세포들은 유지될 수 있고 배양 배지에서 생체외(ex vivo) 증식할 수 있게 된다. 그러한 배지는, 예로서, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), 항생제와 함께(예로서, 100units/ml 페니실린 및 100mg/ml 스트렙토마이신) 또는 항생제 없이, 그리고 2 mM 글루타민으로 이루어지고, 2-20% 소태아 혈청(FBS)으로 보충되었다. 사용된 세포들에 대하여 필요한 경우 배지 및/또는 배지 보충제의 농도를 수정하거나 조절하는 것은 당해 기술분야의 하나의 기술범위 내이다. 혈청들(Sera) 은 흔히 세포성 및 비-세포성 인자들 및 생존능력 및 확장에 필요한 구성성분들을 함유한다. 혈청들의 예는 FBS, 소혈청 (BS), 송아지 혈청 (CS), 송아지 태아 혈청(FCS), 초생 송아지 혈청(NCS), 염소 혈청 (GS), 말 혈청 (HS), 돼지 혈청, 양 혈청, 토끼 혈청, 쥐 혈청 (RS), 등을 포함한다. 또한 고려된 것은, 만일 본 발명의 세포들이 인간 기원의 것이라면, 인간 혈청을 가지는 세포 배양 배지의 보충은, 바람직하게는 자가조직 기원의 것이다. 만일 전체 캐스케이드의 구성성분들을 비활성화시키는 것이 필요하다면, 혈청들은 55-65℃ 에서 열-비활성화 될 수 있다고 생각된다. 혈청 농도의 조절, 배양 배지로부터 혈청의 회수는 또한 하나 이상의 원하는 세포 유형들의 생존을 촉진시키는데 사용되어질 수 있다. 바람직하게는 본 발명의 세포들은 약 2% 내지 약 25%의 농도의 FBS 의 이득이 있을 것이다. 또다른 구현형태에서, 본 발명의 세포들은 일정 성분비의 배양 배지 내에 확장될 수 있고, 여기서 상기 혈청은 혈청 알부민, 혈청 트랜스페린, 셀레늄, 및 당해 기술분야에서 알려진 바와 같이 인슐린, 혈소판-유래의 성장 인자(PDGF), 및 기본 섬유아세포 성장 인자 (bFGF)를 포함하되 이에 한하지 않는 재조합 단백질들의 결합물에 의해 대체된다,

[0069] 많은 세포 배양 배지는 이미 아미노산들을 함유한다; 그러나 일부는 세포 배양 이전에 보충을 필요로 한다. 이러한 아미노산들은 L-알라닌, L- 아르기닌, L-아스파르트산, L-아스파라긴, L-시스테인, L-시스틴, L-글루탐산, L-글루타민, L-글리신, 및 기타등등을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0070] 항미생물제가 또한 세균성, 마이코플라스마성, 및 진균성 오염을 완화시키기 위하여 세포 배양에서 일반적으로 사용된다. 일반적으로, 사용된 항생제 또는 항진균성 화합물들은 페니실린/스트렙토마이신의 혼합물들이나, 또한 암포테리신 (Fungizone®), 암피실린, 젠타마이신, 블레오마이신, 하이그로마이신, 카나마이신, 미토마이신, 등을 포함할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0071] 호르몬들 역시 세포 배양에 유리하게 사용될 수 있으며, D-알도스테론, 디에틸스틸베스트롤 (DES), 덱사메타손, b-에스트라디올, 하이드로코르티손, 인슐린, 프로락틴, 프로게스테론, 소마토스타틴/인간 성장 호르몬 (HGH),

등을 포함하되 이에 한정되지 않는다.

[0072] 본 발명의 세포들의 유지 상태들은 또한 세포들이 미분화된 형태를 유지하게 하는 세포성 인자들을 함유할 수 있다. 분화 이전에 세포 분화를 저해하는 보충제(supplements)가 배양 배지로부터 반드시 제거되어야 한다는 사실은 기술분야의 당업에게 자명하다. 또한 모든 세포들이 이러한 인자들을 필요로 하지 않을 것이라는 점도 자명하다. 실제, 이러한 인자들은 세포 유형에 따라서 원치않는 효과들을 경감시킬 수 있다.

[0073] 유리하게, 본 발명의 세포들은 생체내 종양형성 활성이 부족하다. 따라서, 상기 세포들은 그들이 종양형성 활성을 보이지 않고, 즉, 그들이 변형된 행동 또는 종양 세포를 유발하는 증식적 표현형을 보이지 않는다는 점에서 특징화된다.

[0074] 한 구현에서, 본 발명의 세포들은 자가 면역 질환, 염증 질환, 및 이식된 장기 및 조직들의 거부와 같은 면역학적으로 매개된 질환을 겪고 있는 어떤 대상에게 상기 면역 반응을 억제하기 위하여 투여될 수 있다. 따라서, 본 발명의 세포들이 종양형성 활성을 보이지 않는 것이 필요하다.

[0075] 본 발명의 세포들의 종양형성 활성은 면역결핍 생쥐 스트레인들을 이용하여 동물 연구를 수행함으로써 테스트될 수 있다. 이러한 실험들에서, 수백만의 세포들이 상기 수령 동물들에서 피하주사로 이식되고, 이는 수주동안 유지되며 종양 형성을 위하여 분석되었다. 특별한 분석이 실시예 3에 기재되었다.

[0076] 본 발명의 세포들은 적어도, 하나의 항원성 폴리펩티드를 발현하도록 감염되거나 유전자조작될 수 있다. 하나의 구현에서, 항원은 그에 대해 내성이 유도되어지는 것이 바람직한 특이적 항원을 나타내는 정제된 또는 합성의 또는 재조합 폴리펩티드를 포함하거나, 그러한 항원의 아미노산 서열로부터 유래된 짧은 합성의 폴리펩티드 단편을 포함한다. 바람직하게는, 항원의 공급원(source)은 공여자 조직 이식에 의해 발현된 항원들을 포함한다. 또한 바람직하게는, 항원의 공급원은 환자가 그에 대해 자가면역 질환을 가지는 단백질을 포함한다.

[0077] **본 발명의 세포들을 분리하는 방법**

[0078] 한 측면에서, 본 발명은 세포군을 조직샘플로부터 분리하는 방법에 관한 것이다, 상기 세포군의 세포들은 (i) 마커 CD112 및/또는 CD155 에 대하여 음성이다; (ii) 그들은 적어도 두개의 세포 계통으로 분화될 수 있는 능력을 나타내는 것으로 특징되는 표현형을 나타내며, 상기 방법은 다음의 단계들을 포함한다:

[0079] (i) 조직 샘플로부터 세포 현탁액을 준비하는 단계;

[0080] (ii) 상기 세포 현탁액으로부터 세포들을 회복시키는 단계;

[0081] (iii) 상기 세포들을 세포들이 고체표면에 부착하고 증식하게 하는 조건하에서, 고체표면 상에서 적합한 세포 배양배지 내에서 배양하는 단계;

[0082] (iv) 부착되지 않은 세포들을 제거하는 단계;

[0083] (v) 그러한 배지에서 적어도 2회 계대되어진 후에 상기 고체 표면에 부착된 채로 남아있는 세포들을 선별하는 단계; 및

[0084] (vi) 개별적인 세포들 또는 아세포군들(subpopulations) 내에서 마커 CD112 및/또는 CD155 의 존재 또는 부존재를 결정하는 단계

[0085] (vii) 마커 CD112 및/또는 CD155 에 대하여 음성인 세포들 또는 아세포군들(subpopulations) 을 선별하는 단계.

[0086] 여기서 사용된 바와 같이, 용어 "고체표면"은 본 발명의 세포들이 부착되도록 하는 어떠한 물질을 의미한다. 특별한 구현에서 상기 물질은 그의 표면에 포유동물 세포들의 부착을 촉진시키도록 처리된 플라스틱 물질이며, 예로서 폴리-D-리신(Lysine) 또는 다른 시약으로 임의적으로 코팅된 상업적으로 허용가능한 폴리스티렌 플레이트이다.

[0087] 단계들 (i)-(vii) 은 상기 기술분야의 당업자들에게 알려진 종래의 기술에 의해 수행되어질 수 있다. 간략하게는, 본 발명의 세포들은 어떠한 적합한 동물로부터, 바람직하게는 인간, 예컨대, 인간 지방조직으로부터의 결합조직의 어떠한 적합한 근원으로부터 종래의 수단들에 의해 수득되어질 수 있다. 상기 동물은 동물 내의 조직 세포들이 독자생존 가능하는 한 살아있거나 죽은 것일 수 있다. 일반적으로, 인간 지방세포들은 외과수술 또는 지방흡입술과 같은 잘알려진 프로토콜을 사용하여, 살아있는 공여자들로부터 수득된다. 실제로, 지방흡입술 절

차는 매우 흔하기 때문에, 지방흡입술 오수는 본 발명의 세포들이 유래될 수 있는 특별히 바람직한 근원이다. 따라서, 특별한 구현에서, 본 발명의 세포들은 지방흡입술에 의해 수득한 인간 지방조직의 기질 분획으로부터 기원한다.

[0088] 지방조직의 샘플은, 바람직하게는, 재료의 나머지 부분으로부터 본 발명의 세포들을 분리하기 위해 가공되기 전에 세척된다. 프로토콜에서, 조직의 샘플은 생리학적으로 적합한 식염수 (예로서, 인산염 완충 식염수 (PBS))로 세척된 후, 힘차게 진탕되어 침전되도록 방치되며, 이는 유리된 물질 (예로서, 손상된 조직, 혈액, 적혈구 등)을 조직으로부터 제거하는 단계이다. 따라서, 세척 및 침전 단계들은 일반적으로, 상청액에 파편들이 비교적 없을 때까지 반복된다. 남아있는 세포들은 일반적으로 다양한 크기의 덩어리들로 존재할 것이며, 프로토콜은, 세포들 자신들에 대한 손상은 최소화하면서, 큰 구조를 분해하도록 맞추어진 단계들을 사용하여 진행된다. 이러한 목적을 달성하는 한 방법은 세포들의 세척된 덩어리들을 세포들 간의 결합들을 약화시키거나 또는 파괴하는 효소로 처리하는 것이다 (예로서, 콜라게나아제, 디스파제 (dispase), 트립신 등). 이러한 효소 처리의 양 및 기간은, 이용된 조건에 따라 변화할 것이나, 이러한 효소들의 사용은 본 기술 분야에 일반적으로 알려져 있다. 이러한 효소 처리에 대안적으로 또는 이와 함께, 세포들의 덩어리들은 기계적 진탕, 음파 에너지, 열 에너지 등과 같은 다른 처리들을 사용하여 분해될 수 있다. 분해가 효소적 방법에 의해 달성된 경우, 세포들에 대해 유해한 효과를 최소화하기 위하여, 적합한 기간 후에 효소를 중화하는 것이 바람직하다.

[0089] 상기 분해 단계는 전형적으로, 응집된 세포들의 슬러리 또는 현탁액 및 일반적으로 자유 간질 세포들을 함유하는 액 분획을 생성한다 (예로서, 적혈구 세포들, 평활근 세포들, 상피 세포들, 섬유아세포들 및 줄기 세포들). 분리 공정에서의 다음 단계는 본 발명의 세포들로부터 응집된 세포들을 분리하는 것이다. 이는 원심분리에 의해 달성될 수 있으며, 이는 세포들을 상청액으로 덮힌 펠렛이 되도록 만든다. 상청액은 그 후 폐기되고, 상기 펠렛은 생리학적으로 적합한 액 중에 현탁될 수 있다. 또한, 현탁된 세포들은 전형적으로 적혈구들을 포함하며, 대부분의 프로토콜들에서, 이들을 용해시키는 것이 바람직하다. 선택적으로 적혈구들을 용해하는 방법은 본 기술 분야에 알려져 있으며, 임의의 적합한 프로토콜이 이용된다 (예로서, 염화 암모늄 등을 이용하여 분해함에 의해, 고장성 (hypertonic) 또는 저장성 (hypotonic) 매질 중에 인큐베이션). 물론, 적혈구들이 용해된 경우, 남아있는 세포들은 그 후, 예로서 여과, 침강 또는 밀도 분획화에 의해 용해물로부터 분리되어야만 한다.

[0090] 적혈구들이 용해되는지의 여부에 상관없이, 현탁된 세포들은 1 회 이상 연속적으로 세척, 재원심분리, 및 재현탁되어 보다 큰 순도를 달성할 수 있다. 대안적으로, 상기 세포들은 세포 표면 마커 프로파일의 기초 하에 분리될 수 있거나 또는 세포 크기 및 입도를 기초로 하여 분리될 수 있다.

[0091] 최종 분리 및 재현탁에 이어, 세포들을 배양할 수 있으며, 바람직한 경우, 수율을 평가하기 위하여 숫자 및 생육력을 평가할 수 있다. 바람직하게는, 세포들은 분화 없이, 고체 표면 상에서, 적합한 세포 배지를 사용하여, 적절한 세포 밀도 및 배양 조건에서 배양될 것이다. 따라서, 특정 구현에서, 세포들은, 페트리 접시 또는 세포 배양 플라스크와 같이, 일반적으로 플라스틱 물질로 만든 고체 표면 상에서, 적합한 세포 배지의 존재 하에서 배양되고 [예로서, DMEM, 전형적으로 5-15% (예로서, 10%)의 적합한 혈청, 예컨대 우태 혈청 또는 인간 혈청으로 보충됨], 세포들이 고체 표면에 부착되어 증식되는 것을 가능하게 하는 조건 하에서 배양된다. 배양 후, 부착되지 않은 세포들 및 세포 절편들을 제거하기 위하여 세포들을 세척한다. 적절한 컨플루언스 (confluence), 전형적으로 약 80% 세포 컨플루언스에 도달할 때까지, 필요한 경우 세포 배지를 교체하며, 세포들을 동일한 매질 중 및 동일한 조건 하에서 배양을 유지한다. 원하는 세포 컨플루언스에 도달한 후, 트립신과 같은 탈착제를 사용하여, 적절한 세포 밀도 (일반적으로 2,000-10,000 세포들/㎠)로 보다 큰 세포 배양 표면 상에 접종하는 연속적인 계대를 통하여 확장될 수 있다. 이에 따라, 세포들의 발달 표현형을 그대로 유지하면서, 세포들을 그러한 매질 중에서 분화 없이 적어도 2 회 계대하고, 보다 바람직하게는 세포들을 발달 표현형을 잃지 않으면서 적어도 10 회 계대할 수 있다 (예로서, 적어도 15 회 또는 심지어는 적어도 20 회). 전형적으로, 세포들을 원하는 밀도, 예컨대 약 100 세포들/㎠ 내지 약 100,000 세포들/㎠ 사이 (예컨대 약 500세포들/㎠ 내지 약 50,000세포들/㎠, 또는 보다 구체적으로, 약 1,000세포들/㎠ 내지 약 2,000세포들/㎠ 사이)로 도말한다. 보다 낮은 밀도로 도말되는 경우 (예로서, 약 300세포들/㎠), 세포들은 클론적으로 보다 쉽게 분리될 수 있다. 예로서, 몇 일 후, 그러한 밀도로 도말된 세포들은 동종성 군으로 증식할 것이다. 특정 구현예에서, 세포 밀도는 2,000-10,000세포들/㎠ 사이이다.

[0092] 상기와 같이 적어도 2 회의 계대를 포함하는 처리 후, 고체 표면에 부착된 채로 남아있는 세포들을 선별하고, 마커 CD112 및/또는CD155 의 발현은 본 발명의 세포들의 정체를 확인하기 위하여 관심 대상이 되는 표현형을 통상적인 방법에 의해 분석되었다. 첫 번째 계대 후 고체 표면에 부착된 채로 남아있는 세포들은 이종성 기원으로

부터 유래하며; 따라서 상기 세포들은 적어도 다른 계대에 투입되어야만 한다. 첫번째 계대 후 고체 표면에 부착된 채로 남아있는 세포들은 이종성 기원으로부터 유래하며; 따라서, 상기 세포들은 적어도 다른 계대에 투입되어야만 한다. 적어도 2회의 계대를 포함하는 그러한 처리 후, 고체 표면에 부착된 채로 남아있는 세포들을 선별하고 마커 CD112 및/또는 CD155 의 발현은 본 발명의 세포들의 정체를 확인하기 위하여 통상적인 방법에 의해 분석되었다. 상기 방법의 결과로서, 관심 대상의 표현형을 갖는 동종성 세포 개체군이 수득된다.

[0093] 세포-표면 마커들은 임의의 적당한 통상적인 기술, 일반적으로 양성/음성 선발에 근거한 기술에 의해 동정될 수 있다; 예로서, 세포 중에서 그의 존재/부재가 확인되어져야만 하는, 세포 표면 마커들에 대한 단일클론성 항체들이 사용될 수 있다; 하지만 다른 기술들도 사용될 수 있다. 따라서, 특정 구현에서, CD112 및/또는 CD155 에 대한 단일클론성 항체들이 상기 선별된 세포들에서 상기 마커들의 부재를 확인하기 위하여 사용되었다. 추가의 구현에서 CD11b, CD11c, CD14, CD45, HLAII, CD31, CD34, CD45, 1B10 (αFSP), FceR1α 및 CD133 중 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 바람직하게는 이들 모두에 대한 단일클론성 항체들이, 선별된 세포들 중에서 상기 마커들의 부재를 확인하기 위하여 사용된다; 그리고 CD9, CD44, CD54, CD90,CD29, CD59 및 CD105 중 1, 2, 3, 4, 또는 바람직하게는 이들 모두에 대한 단일성 항체들이, 상기 마커들 중 적어도 하나 그리고 바람직하게는 이들 모두의 존재 또는 그의 검출가능한 발현 수준을 확인하기 위하여, 사용된다. 상기 단일클론성 항체들은 알려져 있으며, 상업적으로 구입가능하거나, 또는 본 기술 분야의 당업자에 의해 통상적인 방법들에 의해 수득될 수 있다.

[0094] 선별된 세포들의 적어도 두 개의 세포 계통으로의 분화능은 본 기술 분야에 알려진 것과 같은 통상적인 방법들에 의해 분석될 수 있다.

[0095] 본 발명에 의해 제공된 세포 및 세포 군들은, 바람직한 경우, 세포 개체군의 클로닝에 적합한 방법을 사용하여 클론적으로 확장될 수 있다. 예로서, 세포들의 증식된 군을 물리적으로 채집하여 별개의 플레이트 (또는 다중-웰 플레이트의 웰) 내로 접종할 수 있다. 선택적으로, 세포들은 다중 웰 플레이트 상에, 단일 세포를 각 웰 내로 배치하는 것을 용이하게 하기 위한 통계적 비율로 서브클로닝될 수 있다 (예로서, 약 0.1 내지 약 1 세포/웰 또는 약 0.25 내지 약 0.5 세포들/웰, 예로서 0.5세포들/웰). 물론, 세포들은 그들을 저밀도로 도말하고 (예로서, 페트리 접시 또는 기타 적합한 기질에), 그들을 클로닝 링 (ring)과 같은 장치들을 사용하여 기타 세포들로부터 분리함으로써 클로닝될 수 있다. 클론성 군의 제조는 임의의 적합한 배지 중에서 확장될 수 있다. 임의의 경우에, 분리된 세포들은 그들의 발달 표현형이 평가될 수 있는 때, 적합한 지점으로 배양될 수 있다.

[0096] 기술분야에서는, 분화 유도 없이 본 발명의 세포들의 생체 외 확장이, 예로서 특수하게 스크리닝된 많은 적합한 혈청 (예컨대 우태 혈청 또는 인간 혈청)을 이용함에 의해 연장된 기간 동안 달성될 수 있다는 것이 알려져있다. 생육성 및 수율 측정 방법은 본 기술 분야에서 알려져 있다 (예로서, 트립판 블루 배제법).

[0097] 본 발명의 세포 개체군의 세포들을 분리하기 위한 임의의 단계들 및 절차들은 바람직한 경우, 수동적으로 수행될 수 있다. 선택적으로, 그러한 세포들을 분리하는 방법은 하나 이상의 적합한 장치들을 통해 촉진 및/또는 자동화될 수 있으며, 그들의 예는 본 기술 분야에 알려져 있다.

[0098] **본 발명의 방사선 조사된 세포들**

[0099] 바람직한 경우, 본 발명의 세포들은, 감마 방사선 조사 장치와 같은 전리 방사선의 적합한 제어된 공급원을 사용하여 방사선 조사될 수 있다. 방사선 조사 조건은 본 발명의 세포들의 장기간 성장 정지를 일으키는 방사선 조사량을 부여하는데 필요한 노출 시간을 결정하기 위하여 본 발명의 당업자에 의해 실험적으로 조절되어야 한다. 상기 방사선 조사량은, 예로서 1-100, 5-85, 10-70, 12-60 Gy, 또는 보다 바람직하게는 15-45 Gy일 수 있다.

[0100] 본 발명의 세포들은 치료 용도로 사용될 수 있기 때문에, 대상에의 투여 전에 본 발명의 세포들의 방사선 조사는 유리한 결과를 가져올 수 있으며, 이는 상기 방사선 조사 처리가 상기 대상에서 세포들이 장기간 동안 증식 또는 생존할 수 없도록 만들기 때문이다. 상기 방사선 조사된 세포들은 본 발명의 추가적인 측면을 구성한다.

[0101] 본 발명의 방사선 조사된 세포들은, 이에 제한되지는 않지만 자가면역 질환, 염증성 장애 및 이식된 장기 및 조직의 거부반응을 포함하는 면역학적으로 매개된 질환들을 포함하는, 어떤 대상의 면역계를 조절하는 것이 유리한 장애들과 관련된 하나 이상의 증상들의 예방, 치료 또는 개선에 사용될 수 있다. 상기 용도는 본 발명의 추가적인 측면을 구성한다.

[0102] 따라서, 또다른 측면에서, 본 발명의 방사선 조사된 세포들은 의약으로서 사용된다. 특정 구현예에서, 본 발명의 방사선 조사된 세포들을 함유하는 의약은 이식 내성의 유도를 위해, 또는 자가면역 또는 염증성 장애들, 또는 이식된 장기 및 조직의 거부반응을 포함하는 면역학적으로 매개된 질환들의 증상들의 치료 및 그에 따른 개선을 위해, 상기 장애들 또는 질환들 중 임의의 것을 겪고 있는 대상에, 사용될 수 있다. 따라서, 방사선 조사된 세포들은 상기 장애들 중 임의의 것을 겪고 있는 대상에서 자가면역 또는 염증성 장애들의 증상들을 치료적으로 또는 예방적으로 치료하고 그에 따라 개선하기 위해, 또는 상기 질환들을 겪고 있는 대상에서 면역학적으로 매개된 질환들의 증상들을 개선하기 위해 사용될 수 있다.

[0103] 실질적으로, 임의의 자가면역 질환, 염증성 장애 또는 면역학적으로 매개된 질환이 본 발명의 방사선 조사된 세포들로 치료될 수 있다. 치료될 수 있는 상기 질환들 및 장애들의 예시적이고, 비제한적인 예들로는 "정의" 라는 제목 하에 앞서 열거된 것들이 있다. 특정 구현예에서, 상기 염증성 질환은 예로서, IBD 또는 RA와 같은 만성 염증성 질환이다.

[0104] 또다른 측면에서, 본 발명은 이에 제한되지는 않지만, 자가면역 질환, 염증성 장애 및 이식된 장기 및 조직의 거부반응을 포함하는 면역학적으로 매개된 질환들을 포함하는, 어떤 대상의 면역계를 조절하는 것이 유리한 장애들과 관련된 하나 이상의 증상들의 예방, 치료 또는 개선을 위한 의약의 제조를 위한 본 발명의 방사선 조사된 세포들의 용도에 관한 것이다. 따라서, 본 발명은 또한, 면역 반응의 억제를 위한, 또는 이식 내성 유도를 위한, 또는 자가면역 질환 치료를 위한, 또는 염증성 장애들의 치료를 위한 의약 제조를 위한 본 발명의 방사선 조사된 세포들의 용도에 관한 것이다. 상기 자가면역 질환들 및 염증성 질환들의 예들은 앞서 언급되었다. 특정 구현예에서, 질환은 염증성 질환으로, 예컨대 만성 염증성 질환, 예로서 IBD 또는 RA이다.

[0105] **본 발명의 IFN-γ 미리자극된 세포들**

[0106] 또한, 바람직한 경우, 본 발명의 세포들은 IFN-γ로 미리자극될 수 있다. IFN-γ을 이용한 미리자극 방법은 본 기술 분야의 숙련자들에게는 자명하며, 절차는 실시예 2 에 나타내었다. 바람직하게는, 상기 세포들은 0.1 내지 100, 0.5 내지 85, 1 내지 70, 1.5 내지 50, 2.5 내지 40 ng/ml 이상, 바람직하게는 3 내지 30 ng/ml 사이의 IFN-γ 농도를 사용하여 미리자극되며, 자극 시간은 바람직하게는 12 시간 이상, 예로서 13, 18, 24, 48, 72 시간 이상이다.

[0107] 본 발명의 세포들은 치료 용도로 사용될 수 있기 때문에, 대상에의 투여 전에 본 발명의 세포들의 IFN-γ를 이용한 미리자극은 유리한 결과를 가져올 수 있으며, 이는 대상에서의 IFN-γ 미리자극된 세포 투여 및 IDO 발현 사이의 기간이 감소될 수 있기 때문이다.

[0108] 따라서, 다른 측면에서, 본 발명은, 상기 세포들을 미리자극하기 위하여 IFN-γ를 이용한 본 발명의 세포들의 처리를 포함하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법에 따라 수득가능한 세포들은, 이하에서 "본 발명의 IFN-γ 미리자극된 세포들"로 언급되며, 이는 본 발명의 추가의 측면을 구성한다. 상기 본 발명의 IFN-γ 미리자극된 세포들은 본 기술 분야의 당업자에게 알려진 통상적인 수단들에 의해 분리된다.

[0109] 본 발명의 IFN-γ 미리자극된 세포들은 이에 제한되지는 않지만 자가면역 질환, 염증성 장애 및 이식된 장기 및 조직의 거부반응을 포함하는 면역학적으로 매개된 질환들을 포함하는, 어떤 대상의 면역계를 조절하는 것이 유리한 장애들과 관련된 하나 이상의 증상들의 예방, 치료 또는 개선에 사용될 수 있다. 상기 용도는 본 발명의 추가적인 측면을 구성한다.

[0110] 따라서, 다른 측면에서, 본 발명의 IFN-γ 미리자극된 세포들은 의약으로서 사용될 수 있다. 특정 구현예에서, 본 발명의 IFN-γ 미리자극된 세포들을 함유하는 의약은 이식 내성의 유도를 위해, 또는 자가면역 또는 염증성 장애들, 또는 이식된 장기 및 조직의 거부반응을 포함한 면역학적으로 매개된 질환들의 증상들을 치료 및 그에 따른 개선을 위해, 상기 장애들 또는 질환들 중 임의의 것을 겪고 있는 대상에 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명의 IFN-γ 미리자극된 세포들은 상기 장애들 중 임의의 것을 겪고 있는 대상에서 자가면역 또는 염증성 장애들의 증상들을 치료적으로 또는 예방적으로 치료하고 그에 따라 개선하기 위해, 또는 상기 질환들을 겪고 있는 대상에서 면역학적으로 매개된 질환들의 증상들을 개선하기 위해 사용될 수 있다.

[0111] 실질적으로, 임의의 자가면역 질환, 염증성 장애 또는 면역학적으로 매개된 질환이 본 발명의 IFN-γ 미리자극된 세포들로 치료될 수 있다. 치료될 수 있는 상기 질환들 및 장애들의 예시적이고, 비제한적인 예들로는 "정의" 라는 제목 하에 앞서 열거된 것들이 있다. 특정 구현예에서, 상기 염증성 질환은 예로서, IBD 또는 RA와

같은 만성 염증성 질환이다.

[0112] 다른 측면에서, 본 발명은, 이에 제한되지는 않지만, 자가면역 질환, 염증성 장애 및 이식된 장기 및 조직의 거부반응을 포함하는 면역학적으로 매개된 질환들을 포함하는, 어떤 대상의 면역계를 조절하는 것이 유리한 장애들과 관련된 하나 이상의 증상들의 예방, 치료 또는 개선을 위한 의약의 제조를 위한 본 발명의 INF-γ 미리자극된 세포들의 용도에 관한 것이다. 따라서, 본 발명은 또한, 면역 반응의 억제를 위한, 또는 이식 내성 유도를 위한, 또는 자가면역 질환 치료를 위한, 또는 염증성 장애들의 치료를 위한 의약 제조를 위한 본 발명의 IFN-γ 미리자극된 세포들의 용도에 관한 것이다. 상기 자가면역 질환들 및 염증성 질환들의 예들은 앞서 언급되었다. 특정 구현에서, 질환은 염증성 질환으로, 예컨대 만성 염증성 질환, 예로서 IBD 또는 RA이다.

[0113] **본 발명의 방사선 조사되고 IFN-γ 미리자극된 세포들 및 본 발명의 IFN-γ 미리자극되고 방사선 조사된 세포들**

[0114] 또한, 바람직한 경우, 본 발명의 세포들은 방사선 조사 및 IFN-γ 자극 처리에 임의의 순서로 투입될 수 있으며; 즉, 본 발명의 세포들은 먼저 방사선 조사에 투입되고, 그 결과의 세포들을 이어서 IFN-γ 자극에 투입할 수 있거나, 또는 그 반대로, 본 발명의 세포들을 먼저 IFN-γ 자극에 투입하고 이어서 결과의 세포들을 방사선 조사에 투입할 수 있다.

[0115] 따라서, 한 측면에서, 본 발명의 세포들을 IFN-γ 로 미리자극하고, 그 결과의 세포들 (본 발명의 IFN-γ 미리자극된 세포들)을 방사선 조사하여 방사선 조사된 세포들로 만들 수 있으며, 이는 이하에서 "본 발명의 방사선 조사되고 IFN-γ 미리자극된 세포들"로서 언급된다.

[0116] 다른 측면에서, 본 발명의 세포들을 방사선 조사하고, 결과의 세포들을 (본 발명의 방사선 조사된 세포들) IFN-γ 로 미리자극하여 IFN-γ 미리자극된 세포들로 만들 수 있으며, 이는 이하에서 "본 발명의 IFN-γ 미리자극되고 방사선 조사된 세포들"로서 언급된다.

[0117] IFN-γ을 이용하여 세포들을 미리자극하는 방법 및 세포들을 방사선 조사하는 방법들은 본 기술 분야의 숙련자들에게 공지이며, 이들 중 일부는 상기에서 이미 언급되었다. 상기 방법들 중 임의의 것이 사용될 수 있다.

[0118] 따라서, 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 세포들을 (i) 방사선 조사, 및(ii) IFN-γ를 이용한 자극에 투입하는 것을 포함하고, 여기에서 처리들 (i) 및 (ii)는, IFN-γ 미리자극된 세포들을 방사선 조사하거나 또는 방사선 조사된 세포들을 IFN-γ 미리자극하기 위하여, 임의의 순서로 실시될 수 있다. 상기 방법에 따라 수득가능한 세포들은, 이하에서 각각 "본 발명의 방사선 조사되고 IFN-γ 예비자극된 세포들"로서 언급되거나, 또는 "본 발명의 IFN-γ 미리자극되고 방사선 조사된 세포들"로서 언급되며, 이는 본 발명의 추가의 측면들을 구성한다. 상기 본 발명의 방사선 조사되고 IFN-γ 미리자극된 세포들 및 본 발명의 IFN-γ 미리자극되고 방사선 조사된 세포들은 본 기술분야의 당업자에 의해 알려진 통상적인 방법에 의해 분리될 수 있다.

[0119] 본 발명의 세포들은 치료 용도로 사용될 수 있기 때문에, 본 발명의, 임의의 순서로 미리 방사선 조사 및 IFN-γ 자극에 투입된 본 발명의 세포들의 대상에의 투여는 상기 언급된 것과 같은 이유로, 유리한 결과를 가져올 수 있으며, (예로서 세포들을 대상에서 장기간 동안 증식 또는 생존할 수 없도록 만들기 위하여 세포들을 방사선 조사 처리에 투입하는 것), 반면에 대상에의 투여 전 IFN-γ를 사용한 세포들의 미리자극은 대상에서 IFN-γ-미리자극된 세포의 투여와 IDO 발현 사이의 기간에서 감소를 연루할 수 있다.

[0120] 본 발명의 방사선 조사되고 IFN-γ 미리자극된 세포들 및 본 발명의 IFN-γ 미리자극되고 방사선 조사된 세포들은, 이에 제한되지는 않지만 자가면역 질환, 염증성 장애 및 이식된 장기 및 조직의 거부반응을 포함하는 면역학적으로 매개된 질환들을 포함하는, 어떤 대상의 면역계를 조절하는 것이 유리한 장애들과 관련된 하나 이상의 증상들의 예방, 치료 또는 개선에 사용될 수 있다. 상기 용도는 본 발명의 추가적인 측면을 구성한다.

[0121] 따라서, 다른 측면에서, 본 발명의 방사선 조사되고 IFN-γ 미리자극된 세포들 및 IFN-γ 미리자극되고 방사선 조사된 세포들은 의약으로서 사용될 수 있다. 특정 구현예에서, 본 발명의 방사선 조사되고 IFN-γ 미리자극된 세포들 또는 본 발명의 IFN-γ 미리자극되고 방사선 조사된 세포들을 함유하는 의약들은 이식 내성의 유도를 위해, 또는 자가면역 또는 염증성 장애들, 또는 이식된 장기 및 조직의 거부반응을 포함한 면역학적으로 매개된 질환들의 증상들을 치료 및 그에 따른 개선을 위해, 상기 장애들 또는 질환들 중 임의의 것을 겪고 있는 대상에, 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명의 방사선 조사되고 IFN-γ 미리자극된 세포들 및 본 발명의 IFN-γ 미리자극되고 방사선 조사된 세포들은 상기 장애들 중 임의의 것을 겪고 있는 대상에서 자가면역 또는 염증성 장애들의 증상들을 치료적으로 또는 예방적으로 치료하고 그에 따라 개선하기 위해, 또는 상기 질환들을 겪고

있는 대상에서 면역학적으로 매개된 질환들의 증상들을 개선하기 위해 사용될 수 있다.

[0122] 실질적으로, 임의의 자가면역 질환, 염증성 장애 또는 면역학적으로 매개된 질환은 본 발명의 방사선 조사되고 IFN-γ 미리자극된 세포들 또는 본 발명의 IFN-γ 미리자극되고 방사선 조사된 세포들로 치료될 수 있다. 치료될 수 있는 상기 질환들 및 장애들의 예시적이고, 비제한적인 예들로는 "정의" 라는 제목 하에 앞서 열거된 것들이 있다. 특정 구현예에서, 상기 염증성 질환은 예로서, IBD 또는 RA와 같은 만성 염증성 질환이다.

[0123] 다른 측면에서, 본 발명은, 이에 제한되지는 않지만, 자가면역 질환, 염증성 장애 및 이식된 장기 및 조직의 거부반응을 포함하는 면역학적으로 매개된 질환들을 포함하는, 어떤 대상의 면역계를 조절하는 것이 유리한 장애들과 관련된 하나 이상의 증상들의 예방, 치료 또는 개선을 위한 의약의 제조를 위한 본 발명의 방사선 조사되고 IFN-γ 미리자극된 세포들 또는 본 발명의 IFN-γ 미리자극되고 방사선 조사된 세포들의 용도에 관한 것이다. 따라서, 본 발명은 또한, 면역 반응의 억제를 위한, 또는 이식 내성 유도를 위한, 또는 자가면역 질환 치료를 위한, 또는 염증성 장애들의 치료를 위한 의약 제조를 위한 본 발명의 방사선 조사되고 IFN-γ 미리자극된 세포들 또는 본 발명의 IFN-γ 미리자극되고 방사선 조사된 세포들의 용도에 관한 것이다. 상기 자가면역 질환들 및 염증성 질환들의 예들은 앞서 언급되었다. 특정 구현예에서, 질환은 염증성 질환으로, 예컨대 만성 염증성 질환, 예로서 IBD 또는 RA이다.

[0124] **발명의 T-reg 세포들**

[0125] 본 발명은 추가로, 다른 측면에서 조절성 T-세포들 (T-reg)이라 하며, 즉, 면역계의 활성화를 적극적으로 억제하고 본 발명의 세포들로부터 수득가능한, 병리학적 자가-반응성, 즉 자가면역 질환을 방지하는 세포들 (Foxp3+CD4+CD25+ T-reg 및 IL-10/TGFb-생산 Tr1 세포들을 포함함), 이하에서는 본 발명의 T-reg 세포들이라 지칭되었다.

[0126] 따라서, 또 다른 측면에서, 본 발명은 하기를 포함하는 본 발명의 T-reg 세포군의 분리 방법에 관한 것이다:

[0127] (a) 본 발명의 세포군을 말초혈액 백혈구와 접촉시키는 단계, 및

[0128] (b) 본 발명의 T-reg 세포군을 선별하는 단계.

[0129] 따라서, 본 발명의 세포들은 T-세포들, 본 발명의 T-reg 세포들의 부분집합(subset)을 생산하는데 사용될 수 있고, 이는 본 발명의 추가적인 측면을 구성한다. 본 발명의 T-reg 세포들은 기술분야의 당업자들에 의해 알려진 종래의 수단들에 의해 분리될 수 있다.

[0130] 본 발명의 T-reg 세포들은 이에 제한되지는 않지만 자가 면역 질환, 염증 질환, 및 이식된 장기 및 조직들의 거부를 포함하는 면역학적으로 매개된 질환을 포함하는, 어떠한 대상의 면역계의 조절이 유익한 장애들과 관련된 하나 이상의 증상들을 예방, 치료 또는 개선하는 데 이용되어질 수 있다.

[0131] 따라서, 또다른 측면에서, 본 발명의 T-reg 세포들은 의약으로서 사용되었다. 특별한 구현에서, 본 발명의 T-reg 세포들을 함유하는 의약들은 임의의 상기 장애들 또는 질환들을 겪고 있는 임의의 대상에서, 이식 내성 (transplantation tolerance) 유도용, 또는 이식된 장기 및 조직의 거부를 포함하는, 자가 면역 또는 염증성 장애들의 증상, 또는 면역학적으로 매개된 질환들의 치료용, 및 그럼으로써 개선용으로 사용되어질 수 있다. 따라서, 본 발명의 T-reg 세포들은 임의의 상기 장애들을 겪고 있는 임의의 대상에서 치료적으로 또는 예방적으로 치료하고 그럼으로써 자가면역 또는 염증성 장애들의 증상들을 개선시키기 위하여 또는 상기 질환들을 겪고 있는 대상에서 면역학적으로 매개된 질환들의 증상들을 완화시키기 위하여 사용되어질 수 있다.

[0132] 사실상, 어떠한 자가면역 질환, 염증성 장애 또는 면역학적으로 매개된 질환은 본 발명의 T-reg 세포들로 치료될 수 있다. 치료되어질 수 있는 상기 질환들및 장애들의 예시적이며, 비제한적인 예들은 제목 "정의" 이하에서 사전에 나열된 것들이다. 특별한 구체양태에서, 상기 염증성 질환은 만성 염증성 질환으로, 예로서, IBD 또는 RA 이다.

[0133] 또하나의 측면에서, 본 발명은 이에 제한되지는 않지만, 본 발명의 T-reg 세포들의 자가면역 질환들, 염증성 장애들, 및 이식된 장기 및 조직들의 거부를 포함하는 면역학적으로 매개된 질환을 포함하는, 임의의 대상의 면역계의 조절이 유리한 장애들과 관련된 하나 이상의 증상들을 예방, 치료 또는 개선하기 위한 의약의 제조를 위한 용도에 관한 것이다. 따라서, 본 발명은 또한 본 발명의 T-reg 세포들의 면역 반응의 억제용, 또는 이식 내성

유도용, 또는 자가면역 질환들의 치료용, 또는 염증성 장애들의 치료용 의약의 제조를 위한 용도와 관련된다. 상기 자가면역 질환들 및 염증성 질환들의 실시예들은 앞서 언급되었다. 특별한 구현에서, 질환은 만성 염증성 질환, 예로서, IBD 또는 RA 와 같은 염증성 질환이다.

[0134] 본 발명은 또한 본 발명의 세포군의 선택된 항원 또는 항원들의 군에 대해 특이적인 Treg 세포들의 생산에서의 용도 및 그러한 항원 또는 항원들의 군과 관련된 질환 또는 장대들의 치료에 있어서의 그들의 용도를 제공한다. 그러한 항원들의 실시예들은, 예를들면, 류마티스 관절염, 크론병, 과민반응 유형 IV, 루푸스, 건선 및 기술분야에서 알려진 및 여기에서 어딘가에 설명된 다른 자가면역 장애들과 같은 자가면역 질환에서 역할을 하는 것들이다. 간단하게는, 본 발명의 세포군들은 선택된 항원, 항원들의 군 또는 이 항원 또는 항원들을 발현 및/또는 제공하는 세포 유형들의 존재하에 생체외에서 배양되었다. 본 발명의 세포들 IFNg, LPS 또는 기술분야에서 알려진 다른 활성화 약제들과 함께 임의적으로 미리자극될 수 있다. 약 2, 4, 6, 12, 24, 48 또는 그 이상의 시간의 배양기간, 바람직하게는 약 12 내지 약 24 시간 사이 이후, 임의적으로 항원, 항원들의 군 또는 상기 항원을 운반하는 세포들의 제거 후 본 발명의 상기 세포군이 대상으로터 수득한 말초혈액 백혈구와 함께 추가로 공동배양되었다. 이러한 공동배양은 상기 선택된 항원에 대해 특이적인 Treg 세포들의 생산을 가져올 것이며, 상기 대상의 치료를 위하여 사용될 수 있다. 임의적으로 이들 Treg 세포들은 환자에게 투여되기 이전에 기술분야에서 알려진 배양 기술들을 이용하여 모두 세포외 (ex vivo) 확장될 수 있다. 이론에 구속되길 바라지 않고, 발명자들은 본 발명의 세포군들이 상기 세포표면상에서 HLA Class II 를 통하여 상기 선택된 항원을 (겉보기에 IFNg 에 의해 유도된) 말초혈액 백혈구에 제공할 수 있고 따라서 Treg 세포들은 말초혈액 백혈구의 군 내에서 증가되었거나 또는 활성화되었다고 믿는다. 실시예 11에 나타낸바와 같이, 발명자들은 본 발명의 세포군들이 작은 분자량 분자들을 식균(phagocytose)할 수 있고 따라서 그러한 분자들을 HLA Class II 분자들을 통하여 IFN γ자극 이후 제공할 수 있다는 것을 증명하였다. 말초혈액 백혈구와의 상호작용을 가지는 이러한 메커니즘을 통하여 선택된 항원의 제공은 상기 설명된 Treg 세포 생산을 가져왔다고 믿었다. 다른 치료 방법론으로서, 실시예 7에서 설명된 바와 같이, 본 발명의 세포군은 어떠한 공동배양 없이 직접적으로 생체내에 투여되어 특이적인 Treg 세포들을 생성할 수 있고, 이는 결국 장애를 치료할 수 있다. 따라서 본 발명은 하기를 포함하는 선택된 항원 또는 항원들의 군에 특이적인 Treg 세포들을 수득하는 생체외 방법을 제공한다:

[0135] (a) 본 발명의 세포군을 상기 선택된 항원 또는 항원들의 군과 접촉시키는 단계;

[0136] (b) 상기 세포군을 말초혈액 백혈구와 접촉하게 하는 단계;

[0137] (c) 상기 선택된 항원 또는 항원들의 군에 대하여 특이적인 T-reg 세포군을 선별하는 단계

[0138] 본 발명은 또한 상기 Treg 세포들을 상기 말초혈액 백혈구가 수득된 대상에게 투여함으로써, 상기 선택된 항원 또는 항원들의 군과 관련된 질환들 및 장애들의 치료에 있어서의 단계 (c) 의 특이적 Treg 세포들의 용도를 제공한다. 이러한 방법에서 사용된 바와 같이 본 발명의 세포군은 대상(자가조직의) 또는 공여자(동종이계의)로부터일 수 있다.

[0139] **약학적 조성물**

[0140] 본 발명은, 자가면역 질환, 염증성 장애 및 이식된 장기 및 조직의 거부반응을 포함하는 면역학적으로 매개된 질환들과 같이, 어떤 대상의 면역계를 조절하는 것이 유리한 질병들과 관련된 하나 이상의 증상들의 예방, 치료 또는 개선을 위한 약학 조성물을 제공한다.

[0141] 따라서, 다른 측면에서, 본 발명은 약학 조성물에 관한 것으로, 이하에서는 본 발명의 약학 조성물로서 언급되며, 이는 본 발명의 세포, 또는 본 발명의 T-reg 세포 또는 본 발명의 방사선 조사된 세포, 또는 본 발명의 IFN-γ 미리자극된 세포, 또는 본 발명의 방사선 조사되고 IFN-γ 미리자극된 세포 또는 본 발명의 IFN-γ 미리자극되고 방사선 조사된 세포, 및 허용가능한 약학 담체를 포함한다. 상기 유형의 세포들의 둘 이상의 결합물들(combinations)이 본 발명에 의해 제공된 약학 조성물의 범위 내에 포함된다.

[0142] 본 발명의 약학 조성물은 예방적으로 또는 치료적으로 유효한 양의 하나 이상의 예방 또는 치료제 (즉, 본 발명의 세포, 본 발명의 T-reg 세포 또는 본 발명의 방사선 조사된 세포, 또는 본 발명의 IFN-γ-미리자극된 세포, 또는 본 발명의 방사선 조사되고 IFN-γ-미리자극된 세포, 또는 본 발명의 IFN-γ-미리자극되고 방사선 조사된 세포, 또는 그의 조합), 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함한다. 특정 구현에서, "약학적으로 허용가능한"이라는 용어는, 연방정부 또는 주정부의 규제당국에 의해 승인된 또는 US 약전, 또는 유럽 약전, 또는 동물들, 보다 구체적으로 인간에서의 용도를 위한 일반적으로 인지된 기타 약전에 열거된 것을 의미한다. "담체"라

는 용어는, 치료제가 함께 투여되는 희석제, 보조제, 부형제, 또는 비히클을 의미한다. 바람직한 경우, 상기 조성물은 소량의 pH 완충제를 함유할 수 있다. 적당한 약학적 담체들의 예들이 E.W. Martin에 의한 "Remington's Pharmaceutical Sciences"에 기재되어 있다. 그러한 조성물들은 예방적으로 또는 치료적으로 유효한 양의, 바람직하게는 정제된 형태의, 예방제 또는 치료제를, 적당한 양의 담체와 함께 함유하여, 대상에의 적절한 투여를 위한 형태를 제공할 것이다. 이러한 제형은 투여 방식에 적합하여야만 한다. 바람직한 구현예에서, 약학 조성물들은 멸균상태이며, 대상, 바람직하게는 동물, 보다 바람직하게는 포유동물, 그리고 가장 바람직하게는 인간 대상에의 투여에 적당한 형태이다.

[0143] 본 발명의 약학 조성물은 다양한 형태로 존재할 수 있다. 이들은, 예로서 고체, 반고체 및 액체 투약 형태를 포함하며, 예컨대 동결건조된 제형, 액상 용액 또는 현탁액, 주사 및 주입가능한 용액 등이 있다. 바람직한 형태는 투여 및 치료적 적용의 의도된 방식에 따라 달라진다.

[0144] 본 발명의 세포 개체군, 또는 그를 포함하는 약학 조성물의, 그를 필요로 하는 대상에의 투여는 통상적인 방법에 의해 실시될 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 세포 개체군은, 세포들을 시험관 내 (예로서 이식 또는 인그래프트 (engrafting) 전 그래프트로서) 또는 생체 내에서, 원하는 조직, 동물 조직으로 직접적으로 전달하는 것을 포함하는 방법에 의해 대상에게 투여된다. 상기 세포들은 적절한 방법에 의해 원하는 조직으로 이동될 수 있으며, 이는 일반적으로 조직 유형에 따라 변할 것이다. 예로서, 세포들은, 그래프트를 세포들을 함유하는 배지에 담그어 (또는 주입하여), 그래프트로 이동될 수 있다. 선택적으로 세포들은 개체군을 수립하여 조직 내에서 원하는 자리 상에 접종될 수 있다. 세포들은 카테테르 (catheters), 투관침 (trocars), 캐뉼러 (cannulae), 스텐트 (stents) (세포들과 함께 접종될 수 있음), 등과 같은 장치들을 사용하여 생체 내 자리들로 이동될 수 있다.

[0145] 본 발명의 세포들은, 대상에의 투여 전에 방사선 조사될 수 있다. 이러한 처리는 세포들이 상기 대상에서 장기간 동안 증식 또는 생존할 수 없게 만든다. 따라서, 특정 구현예에서, 본 발명의 약학 조성물은 본 발명의 방사선 조사된 세포들을 포함한다.

[0146] 또한, 대상에서 세포 투여 및 IDO 발현 사이의 기간을 감소시키기 위하여, 대상에의 투여 전에 본 발명의 세포들은 IFN-γ로 미리자극될 수 있다. 따라서, 특정 구현예에서, 본 발명의 약학 조성물은 본 발명의 IFN-γ 미리자극된 세포들을 포함한다.

[0147] 또한, 본 발명의 세포들은 대상에의 투여 전에, 임의의 순서로, 방사선 조사 및 IFN-γ 로 미리자극될 수 있다. 따라서, 특정 구현예에서, 본 발명의 약학 조성물은 본 발명의 방사선 조사되고 IFN-γ-미리자극된 세포들 또는 본 발명의 IFN-γ-미리자극되고 방사선 조사된 세포들을 포함한다.

[0148] 본 발명의 세포 개체군들 및 약학 조성물들은 병용 요법에서 사용될 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 병용 요법은 하나 이상의 소염제에 잘 듣지 않는 염증성 장애를 가진 대상에게 투여된다. 다른 구현예에서, 상기 병용 요법은, 이에 제한되지는 않지만, 소염성 약물 (NSAIDs), 스테로이드성 소염성 약물, 베타-아고니스트, 항콜린생성제 (anticholingeric agents), 및 메틸 크산틴을 포함하는, 기타 유형의 소염제들과 함께 사용된다. NSAIDs의 예들은, 이에 제한되지는 않지만, 이부프로펜, 셀레콕십 (celecoxib), 디클로페낙 (diclofenac), 에토돌락 (etodolac), 페노프로펜, 인도메타신 (indomethacin), 케토랄락 (ketoralac), 옥사프로진 (oxaprozin), 나부멘톤 (nabumentone), 술린닥 (sulindac), 톨멘틴(tolmentin), 로페콕십 (rofecoxib), 나프록센, 케토프로펜, 나부메톤 (nabumetone) 등을 포함한다. 그러한 NSAIDs 는 시클로옥시게나아제 효소 (예로서, COX-1 및/또는 COX-2)를 저해함에 의해 기능한다. 스테로이드성 소염성 약물들의 예는, 이에 제한되지는 않지만, 글루코코르티코이드, 덱사메타손, 코르티손, 하이드로코르티손, 프레드니손, 프레드니솔론, 트리암시놀론, 아줄피딘 (azulfidine) 및 에이코사노이드 예컨대 트롬복산, 및 류코트리엔 (leukotrienes)을 포함한다. 인플릭시맵과 같은 단일클론성 항체들도 사용될 수 있다.

[0149] 상기 구현예에 따라, 본 발명의 병용 요법들은, 그러한 소염제들의 투여 전, 투여와 함께, 또는 투여에 이어서 사용될 수 있다. 또한, 그러한 소염제들은 여기에서 림프 조직 유도물질 및/또는 면역조절제로서 특징된 약제들을 포괄하지 않는다.

[0150] **본 발명의 세포들의 용도들**

[0151] 본 발명의 다른 측면은 본 발명의 상기 세포들 또는 조절성 T-세포들의 투여에 의한, 본 발명의 세포들 또는 본 발명의 조절성 T-세포들의 손상된 조직(바람직하게는 중간엽 조직)의 치료 또는 회복용, 및/또는 염증성 및/또

는 면역 장애들과 관련된 하나 이상의 증상들의 치료, 조절, 예방, 및/또는 개선용 의약의 제조에서의 용도를 제공한다.

[0152] 추가적인 측면에서 본 발명은 본 발명의 상기 세포들 또는 조절성 T-세포들을 포함하는 약학적 조성물을 제공한다. 상기 약학적 조성물은 손상된 조직 또는 자가면역 질환들, 염증성 장애들, 및 이식된 장기들 및 조직들의 거부를 포함하는 면역학적으로 매개된 질환들을 포함하되 이에 한정되지 않는 것과 같은 염증성 및/또는 면역 장애들과 관련된 하나 이상의 증상들의 치료, 회복, 예방, 및/또는 개선에 있어서의 용도를 가진다. 본 발명의 하나의 구체양태에서 약학적 조성물은 항원, 항원들의 군 또는 상기 항원 또는 항원들을 발현 및/또는 제공하는 세포 유형들을 추가로 포함할 수 있다. 하나의 구체양태에서 항원은 하기로 이루어지는 군으로부터 선택된다: 자가면역을 겪고있는 환자로부터 유래된 자기항원들, 펩티드 항원, 핵산, 변화된 펩티드 리간드, 재조합 단백질 또는 그 단편의 혼합물.

[0153] 하나의 구체양태에서 상기 항원들은 관절염과 관련되며, 콜라겐 항원들과 같되 이에 한정되지 않는다. 다른 구체양태에서 상기 항원들은 셀리악병과 관련된다. 셀리악병과 관련된 항원들은 몇몇 프롤라민의(글리아딘, 호르데인, 및/또는 세칼린와 같으나 이에 한정되지 않음) 형태를 포함하는 글루텐 과(family)의 구성원이다. 글루텐 및 그의 구성성분들인, 글루타닌 및 글리아딘은 셀리악병과 관련된 바람직한 항원들이다. 추가의 구체양태에서 상기 항원들은 다발성 경과증과 관련되며, 미엘린 항원들 및 미엘린 기본 단백질 (MBP), 미엘린 올리고덴드로사이트 당단백질(MOG), 단백지질 단백질(PLP) 및 미엘린 당지질 예를들면 갈락토세레브로사이드와 같은 미엘린 구성성분 항원들과 같으나 이에 한정되지 않는다. 그러한 항원들의 분리, 정제 및 제조 방법들은 기술분야의 당업자들에게 알려져 있다.

[0154] 본 발명의 약학적 조성물은 예방적으로 또는 치료적으로 유효량의 본발명의 세포 또는 조절성 T -세포들, 임의적으로 항원, 및 약학적 담체를 포함한다. 이들 세포 유형들 각각에 대한 투여량들 및 투여량 체제의 실시예들은 상기에서 주어졌다. 적합한 약학적 담체들은 기술분야에서 알려져 있고, US 연방 또는 주정부의 관리기관에 의해 승인된 것들 또는 US 약전, 또는 유럽 약전, 또는 동물들, 및 더욱 특별하게는 인간에서 이용을 위한 다른 일반적으로 인식된 약전에 실려있는 것들이다. 용어 "담체"는 희석제, 보조제, 첨가제, 또는 치료적 약제가 함께 투여되는 비히클을 말한다. 상기 조성물은, 바람직하게는, 또한 적은 양의 pH 완충제를 함유할 수 있다. 적합한 약학적 담체들의 실시예들은 E W Martin 에 의한 "Remington's Pharmaceutical Sciences" 에서 설명되어 있다. 그러한 조성물들은 정제된 형태의, 대상에 적합한 투여를 위한 형태를 제공하기 위하여 적당량의 담체와 함께, 예방적으로 또는 치료적으로 유효량의 예방 또는 치료 약제를 함유할 것이다. 제형은 투여 방식에 편리하여야 한다. 바람직한 구체양태에서, 약학적 조성물들은 살균의 및 대상, 바람직하게는 동물 대상, 더욱 바람직하게는 포유류 대상, 및 가장 바람직하게는 인간 대상에 투여를 위한 적합한 형태이다.

[0155] 본 발명의 약학적 조성물은 다양한 형태로 존재할 수 있다. 이들은 , 예를들면, 반고체, 및 동결건조된 조제용 물질, 용액 또는 현탁액, 주사가능한 및 주입가능한 용액, 등과 같은 액체 복용 형태를 포함한다. 위에서 지적한 바와 같이, 약학적 조성물은 바람직하게는 주사가능하다.

[0156] 본 발명의 방법, 의약, 조성물, 세포들 및 조절성 T-세포들은 손상된 조직(바람직하게는 중간엽 조직)의 치료 또는 회복을 위하여, 및/또는 염증성 및/또는 면역 장애들과 관련된 하나 이상의 증상들의 치료, 조절, 예방, 및/또는 개선을 위하여 이용되는 것이 바람직하다. 따라서 본 발명의 방법들 및 세포들은 상기 증상 중 어느하나 또는 전부에 의해 특징화된 어떠한 장애의 치료에 있어서 유용하다. 그러한 장애들의 대표적 비전면적 목록은 정의 부분에서 제공되었다. 특별히 바람직한 것은 본 발명의 방법, 의약, 조성물, 세포들의 면역매개된 염증성 질환들의 치료에 있어서의 용도이다. 더욱 바람직한 것은 본 발명의 방법, 의약, 조성물, 세포들의 진성 당뇨병, 류마티스 관절염(RA), 염증성 장질환 (IBD, 크론병 및/또는 궤양성 대장염을 포함) 및 다발성 경화증(MS)의치료에 있어서의 용도이다. 더욱 특별하게 바람직한 것은 본 발명의 방법, 의약, 조성물, 세포들의 류마티스 관절염의 치료에 있어서의 용도이다.

[0157] 여기서 본 발명의 방법 또는 조성물은 하나 이상의 항원들을 포함하고 상기 방법 또는 조성물은 상기 항원과 관련되거나 상기 항원에 의해 유도된 장애들의 치료에 사용되며, 예를들어, 여기서 상기 항원은 콜라겐이고 상기 방법 또는 조성물은 관절염 치료에 사용될 수 있고, 여기서 상기 항원은 글루텐 구성성분이고 상기 방법 또는 조성물들은 셀리악병의 치료에 사용될 수 있고, 여기서 상기 항원은 미엘린 구성성분이고 상기 방법들 및 조성물들은 다발성 경화증의 치료를 위하여 사용될 수 있다. 바람직한 조성물들은 따라서 하기를 포함한다: 관절염 치료를 위하여 MSC, 바람직하게는 ASC, 및 콜라겐; 셀리악병의 치료를 위하여 MSC, 바람직하게는 ASC, 및 글루텐 및/또는 글루텐 구성성분; 다발성 경화증 치료를 위하여 MSC, 바람직하게는 ASC, 및 미엘린 및/또는 미엘린

구성성분.

[0158] 추가의 측면에서 본 발명은 i) 본 발명의 세포들 또는 조절성 T-세포들을 포함하는 의약 및 ii) 본 발명의 방법들에 따른 그의 용도를 위한 설명(instructions)을 포함하는 키트를 제공한다.

[0159] 추가의 구현에서 상기 키트는 iii) 하나 이상의 항원들을 추가로 포함할 수 있다.

[0160] **발명의 세포들을 확인하기 위한 방법**

[0161] 추가의 구현에서 본 발명은 하기의 단계들을 포함하는 본 발명의 세포들의 선별방법을 제공한다:

[0162] i) 적어도 두개의 세포 계통들로 분화될 수 있는 능력을 가지는 세포들을 포함하는 중간엽 줄기세포들의 세포군을 제공하는 단계

[0163] ii) 지방 조직 유래의 세포들의 상기 세포군의 세포들 또는 아세포군들에서 마커 CD112 및/또는 CD155 의 존재 또는 부존재를 결정하는 단계

[0164] iii) 마커 CD112 및/또는 CD155 에 대하여 음성인 세포들 또는 아세포군들을 선별하는 단계

[0165] i) 에서 제공된 중간엽 줄기 세포들의 세포군은 가장 바람직하게는 이전에 설명한 바와 같은 방법들에 따라 분리된 플라스틱 부착성 세포군이다. 가장 바람직하게는 상기 세포군은 근본적으로 적어도 두개의세포 계통들로 분화될 수 있는 능력을 가지는 세포들을 포함한다.

[0166] 간략하게는, 세포들의 군은 어떠한 적합한 동물로부터의 지방조직의 적합한 근원으로부터, 바람직하게는 인간, 예를들면, 인간 지방조직으로부터 종래의 수단들에 의해 수득된다. 상기 동물은 동물 내의 조직 세포들이 독자 생존 가능하는 한 살아있거나 죽은 것일 수 있다. 일반적으로, 인간 지방세포들은 외과수술 또는 지방흡입술과 같은 잘알려진 프로토콜을 사용하여, 살아있는 공여자들로부터 수득된다. 실제로, 지방흡입술 절차는 매우 흔하기 때문에, 지방흡입술 오수는 본 발명의 세포들이 유래될 수 있는 특별히 바람직한 공급원이다. 따라서, 특별한 구체양태에서, 본 발명의 세포들은 지방흡입술에 의해 수득한 인간 지방조직의 기질 분획으로부터 유래한다.

[0167] 지방조직의 샘플은, 바람직하게는, 재료의 나머지 부분으로부터 본 발명의 세포들을 분리하기 위해 가공되기 전에 세척된다. 프로토콜에서, 조직의 샘플은 생리학적으로 적합한 식염수 (예로서, 인산염 완충 식염수 (PBS))로 세척된 후, 힘차게 진탕되어 침전되도록 방치되며, 이는 유리된 물질 (예로서, 손상된 조직, 혈액, 적혈구 등)을 조직으로부터 제거하는 단계이다. 따라서, 세척 및 침전 단계들은 일반적으로, 상청액에 파편들이 비교적 없을 때까지 반복된다. 남아있는 세포들은 일반적으로 다양한 크기의 덩어리들로 존재할 것이며, 프로토콜은, 세포들 자신들에 대한 손상은 최소화하면서, 큰 구조를 분해하도록 맞추어진 단계들을 사용하여 진행된다. 이러한 목적을 달성하는 한 방법은 세포들의 세척된 덩어리들을 세포들 간의 결합들을 약화시키거나 또는 파괴하는 효소로 처리하는 것이다 (예로서, 콜라게나아제, 디스파제 (dispase), 트립신 등). 이러한 효소 처리의 양 및 기간은, 이용된 조건에 따라 변화할 것이나, 이러한 효소들의 사용은 본 기술 분야에 일반적으로 알려져 있다. 이러한 효소 처리에 대안적으로 또는 이와 함께, 세포들의 덩어리들은 기계적 진탕, 음파 에너지, 열 에너지 등과 같은 다른 처리들을 사용하여 분해될 수 있다. 분해가 효소적 방법에 의해 달성된 경우, 세포들에 대해 유해한 효과를 최소화하기 위하여, 적합한 기간 후에 효소를 중화하는 것이 바람직하다.

[0168] 상기 분해 단계는 전형적으로, 응집된 세포들의 슬러리 또는 현탁액 및 일반적으로 자유 간질 세포들을 함유하는 액 분획을 생성한다 (예로서, 적혈구 세포들, 평활근 세포들, 상피 세포들, 섬유아세포들 및 줄기 세포들). 분리 공정에서의 다음 단계는 본 발명의 세포들로부터 응집된 세포들을 분리하는 것이다. 이는 원심분리에 의해 달성될 수 있으며, 이는 세포들을 상청액으로 덮힌 펠렛이 되도록 만든다. 상청액은 그 후 폐기되고, 상기 펠렛은 생리학적으로 적합한 액 중에 현탁될 수 있다. 또한, 현탁된 세포들은 전형적으로 적혈구들을 포함하며, 대부분의 프로토콜들에서, 이들을 용해시키는 것이 바람직하다. 선택적으로 적혈구들을 용해하는 방법은 본 기술 분야에 알려져 있으며, 임의의 적합한 프로토콜이 이용될 수 있다(예로서, 염화 암모늄 등을 이용하여 분해함에 의해, 고장성 (hypertonic) 또는 저장성 (hypotonic) 배지 중에 인큐베이션). 물론, 적혈구들이 용해된 경우, 남아있는 세포들은 그 후, 예로서 여과, 침강 또는 밀도 분획화에 의해 용해물로부터 분리되어야만 한다.

[0169] 적혈구들이 용해되는지의 여부에 상관없이, 현탁된 세포들은 보다 큰 순도를 달성하기까지 1 회 이상 연속적으

로 세척, 재원심분리, 및 재현탁된다. 대안적으로, 상기 세포들은 세포 표면 마커 프로파일의 기초 하에 분리될 수 있거나 또는 세포 크기 및 입도를 기초로 하여 분리될 수 있다.

[0170] 최종 분리 및 재현탁에 이어, 세포들을 배양할 수 있으며, 바람직한 경우, 수율을 평가하기 위하여 숫자 및 생육력을 평가할 수 있다. 바람직하게는, 세포들은 분화 없이, 고체 표면 상에서, 적합한 세포 배지를 사용하여, 적절한 세포 밀도 및 배양 조건에서 배양될 것이다. 따라서, 특정 구현예에서, 세포들은, 페트리 접시 또는 세포 배양 플라스크와 같이, 일반적으로 플라스틱 물질로 만든 고체 표면 상에서, 적합한 세포 배지의 존재 하에서 배양되고 [예로서, DMEM, 전형적으로 5-15% (예로서, 10%)의 적합한 혈청, 예컨대 우태 혈청 또는 인간 혈청으로 보충됨], 세포들이 고체 표면에 부착되어 증식되는 것을 가능하게 하는 조건 하에서 배양된다. 배양 후, 부착되지 않은 세포들 및 세포 절편들을 제거하기 위하여 세포들을 세척한다. 적절한 컨플루언스(confluence), 전형적으로 약 80% 세포 컨플루언스에 도달할 때까지, 필요한 경우 세포 배지를 교체하며, 세포들을 동일한 매질 중 및 동일한 조건 하에서 배양을 유지한다. 원하는 세포 컨플루언스에 도달한 후, 트립신과 같은 탈착제를 사용하여, 적절한 세포 밀도 (일반적으로 2,000-10,000 세포들/㎠)로 보다 큰 세포 배양 표면 상에 접종하는 연속적인 계대를 통하여 확장될 수 있다. 이에 따라, 세포들의 발달 표현형을 그대로 유지하면서, 세포들을 그러한 매질 중에서 분화 없이 적어도 2 회 계대하고, 보다 바람직하게는 세포들을 발달 표현형을 잃지 않으면서 적어도 10 회 계대할 수 있다 (예로서, 적어도 15 회 또는 심지어는 적어도 20 회). 전형적으로, 세포들을 원하는 밀도, 예컨대 약 100 세포들/㎠ 내지 약 100,000 세포들/㎠ 사이 (예컨대 약 500세포들/㎠ 내지 약 50,000세포들/㎠, 또는 보다 구체적으로, 약 1,000세포들/㎠ 내지 약 2,000세포들/㎠ 사이)로 도말한다. 보다 낮은 밀도로 도말되는 경우 (예로서, 약 300세포들/㎠), 세포들은 클론적으로 보다 쉽게 분리될 수 있다. 예로서, 몇 일 후, 그러한 밀도로 도말된 세포들은 동종성 군으로 증식할 것이다. 특정 구현예에서, 세포 밀도는 2,000-10,000세포들/㎠ 사이이다.

[0171] 방법의 단계 ii) 에서 지방 유래의 세포들의 세포군의 세포들 또는 아세포군들에서 마커 CD112 및/또는 CD155의 존재 또는 부존재가 결정된다. 클론들 또는 아세포군들은 세포군들을 클로닝 하기 위한 기술분야에서 흔히 사용된 방법들을 이용하여 수립될 수 있을 것이다. 예로서, 세포들의 증식된 군을 물리적으로 채집하여 별개의 플레이트 (또는 다중-웰 플레이트의 웰) 내로 접종할 수 있다. 선택적으로, 세포들은 다중 웰 플레이트 상에, 단일 세포를 각 웰 내로 배치하는 것을 용이하게 하기 위한 통계적 비율로 서브클로닝될 수 있다 (예로서, 약 0.1 내지 약 1 세포/웰 또는 약 0.25 내지 약 0.5 세포들/웰, 예로서 0.5세포들/웰). 물론, 세포들은 그들을 저밀도로 도말하고 (예로서, 페트리 접시 또는 기타 적합한 기질에), 그들을 클로닝 링(ring)과 같은 장치들을 사용하여 기타 세포들로부터 분리함으로써 클로닝될 수 있다. 마커 CD112 및/또는 CD155 의 존재 또는 부존재는 유동 세포 분석법과 같으나 이에 한정되지 않는 기술분야에서 표준인 어떠한 수단에 의해서도 결정될 수 있다.

[0172] 방법의 단계 iii)에서 마커 CD112 및/또는 CD155 에 대하여 음성인 클론들 또는 아세포군들이 선택되었다. 여기서 사용한 바와 같이, 세포 표면 마커들에 대하여 "음성" 은, 본 발명의 세포들을 포함하는 세포군에서, 10 % 미만, 바람직하게는 세포의 .9%, .8%, .7%, .6%, .5%, .4%, .3%, .2%, .1% 또는 아무것도 아닌것이 종래의 방법들 및 장치들(예를들면 상업적으로 이용가능한 항체들 및 당해 기술분야에서 알려진 표준 프로토콜과 함께 사용된 Beckman Coulter Epics XL FACS 시스템)를 이용하는, 유세포분석법에서 특이적 세포표면 마커에 대하여 백그라운드 신호 이상의 신호를 나타내는 것을 의미한다. 상기 세포-표면 마커들(예로서, 세포성 수용체들 및 막통과 단백질들)에 대한 상업적으로 이용가능하며 알려진 단일클론성 항체들은 본 발명의 세포들을 확인하는 데 사용될 수 있다.

[0173] **본 발명의 세포들의 용도들**

[0174] 본 발명의 다른 측면은 본 발명의 상기 세포들 또는 조절성 T-세포들의 투여에 의한, 본 발명의 세포들 또는 본 발명의 조절성 T-세포들의 손상된 조직(바람직하게는 중간엽 조직)의 치료 또는 회복용, 및/또는 염증성 및/또는 면역 장애들과 관련된 하나 이상의 증상들의 치료, 조절, 예방, 및/또는 개선용 의약의 제조에서의 용도를 제공한다.

[0175] 추가적인 측면에서 본 발명은 본 발명의 상기 세포들 또는 조절성 T-세포들을 포함하는 약학적 조성물을 제공한다. 상기 약학적 조성물은 이에 제한되지는 않으나, 손상된 조직 또는 자가면역 질환들, 염증성 장애들, 및 이식된 장기들 및 조직들의 거부를 포함하는 면역학적으로 매개된 질환들과 같은 염증성 및/또는 면역 장애들과 관련된 하나 이상의 증상들의 치료, 회복, 예방, 및/또는 개선에 있어서의 용도를 가진다. 본 발명의 하나의

구현에서 약학적 조성물은 항원, 항원들의 군 또는 상기 항원 또는 항원들을 발현 및/또는 제공하는 세포 유형들을 추가로 포함할 수 있다. 하나의 구현에서 항원은 자가면역을 겪고있는 환자로부터 유래된 자기항원들, 펩티드 항원, 핵산, 변화된 펩티드 리간드, 재조합 단백질 또는 그 단편의 혼합물로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 하나의 구현에서 상기 항원들은 관절염과 관련되며, 콜라겐 항원들과 같되 이에 한정되지 않는다. 다른 구현에서 상기 항원들은 셀리악병과 관련된다. 셀리악병과 관련된 항원들은 몇몇 프롤라민의(글리아딘, 호르데인, 및/또는 세칼린와 같으나 이에 한정되지 않음) 형태를 포함하는 글루텐 과(family)의 구성원이다. 글루텐 및 그의 구성성분들인, 글루타닌 및 글리아딘은 셀리악병과 관련된 바람직한 항원들이다. 추가의 구현에서 상기 항원들은 다발성 경과증과 관련되며, 미엘린 항원들 및 미엘린 기본 단백질 (MBP), 미엘린 올리고덴드로사이트 당단백질(MOG), 단백지질 단백질(PLP) 및 미엘린 당지질 예를들면 갈락토세레브로사이드와 같은 미엘린 구성성분 항원들과 같으나 이에 한정되지 않는다. 그러한 항원들의 분리, 정제 및 제조 방법들은 기술분야의 당업자들에게 알려져 있다.

[0176] 본 발명의 약학적 조성물은 예방적으로 또는 치료적으로 유효량의 본발명의 세포 또는 조절성 T -세포들, 임의적으로 항원, 및 약학적 담체를 포함한다. 이들 세포 유형들 각각에 대한 투여량들 및 투여량 체제의 실시예들은 상기에서 주어졌다. 적합한 약학적 담체들은 기술분야에서 알려져 있고, US 연방 또는 주정부의 관리기관에 의해 승인된 것들 또는 US 약전, 또는 유럽 약전, 또는 동물들, 및 더욱 특별하게는 인간에서 이용을 위한 다른 일반적으로 인식된 약전에 실려있는 것들이다. 용어 "담체"는 희석제, 보조제, 첨가제, 또는 치료적 약제가 함께 투여되는 비히클을 말한다. 상기 조성물은, 바람직하게는, 또한 적은 양의 pH 완충제를 함유할 수 있다. 적합한 약학적 담체들의 실시예들은 E W Martin 에 의한 "Remington's Pharmaceutical Sciences" 에서 설명되어 있다. 그러한 조성물들은 정제된 형태의, 대상에 적합한 투여를 위한 형태를 제공하기 위하여 적당량의 담체와 함께, 예방적으로 또는 치료적으로 유효량의 예방 또는 치료 약제를 함유할 것이다. 제형은 투여 방식에 편리하여야 한다. 바람직한 구체양태에서, 약학적 조성물들은 살균의 및 대상, 바람직하게는 동물 대상, 더욱 바람직하게는 포유류 대상, 및 가장 바람직하게는 인간 대상에 투여를 위한 적합한 형태이다.

[0177] 본 발명의 약학적 조성물은 다양한 형태로 존재할 수 있다. 이들은 , 예를들면, 반고체, 및 동결건조된 조제용 물질, 용액 또는 현탁액, 주사가능한 및 주입가능한 용액, 등과 같은 액체 복용 형태를 포함한다. 위에서 지적한 바와 같이, 약학적 조성물은 바람직하게는 주사가능하다.

[0178] 본 발명의 방법, 의약, 조성물, 세포들 및 조절성 T-세포들은 손상된 조직(바람직하게는 중간엽 조직)의 치료 또는 회복을 위하여, 및/또는 염증성 및/또는 면역 장애들과 관련된 하나 이상의 증상들의 치료, 조절, 예방, 및/또는 개선을 위하여 이용되는 것이 바람직하다. 따라서 본 발명의 방법들 및 세포들은 상기 증상 중 어느하나 또는 전부에 의해 특징화된 어떠한 장애의 치료에 있어서 유용하다. 그러한 장애들의 대표적 비전면적 목록은 정의 부분에서 제공되었다. 특별히 바람직한 것은 본 발명의 방법, 의약, 조성물, 세포들의 면역매개된 염증성 질환들의 치료에 있어서의 용도이다. 더욱 바람직한 것은 본 발명의 방법, 의약, 조성물, 세포들의 진성 당뇨병, 류마티스 관절염(RA), 염증성 장질환 (IBD, 크론병 및/또는 궤양성 대장염을 포함) 및 다발성 경화증 (MS)의치료에 있어서의 용도이다. 더욱 특별하게 바람직한 것은 본 발명의 방법, 의약, 조성물, 세포들의 류마티스 관절염의 치료에 있어서의 용도이다.

[0179] 여기서 본 발명의 방법 또는 조성물은 하나 이상의 항원들을 포함하고 상기 방법 또는 조성물은 상기 항원과 관련되거나 상기 항원에 의해 유도된 장애들의 치료에 사용되며, 예를들어, 여기서 상기 항원은 콜라겐이고 상기 방법 또는 조성물은 관절염 치료에 사용될 수 있고, 여기서 상기 항원은 글루텐 구성성분이고 상기 방법 또는 조성물들은 셀리악병의 치료에 사용될 수 있고, 여기서 상기 항원은 미엘린 구성성분이고 상기 방법들 및 조성물들은 다발성 경화증의 치료를 위하여 사용될 수 있다. 바람직한 조성물들은 따라서 하기를 포함한다: 관절염 치료를 위하여 MSC, 바람직하게는 ASC, 및 콜라겐; 셀리악병의 치료를 위하여 MSC, 바람직하게는 ASC, 및 글루텐 및/또는 글루텐 구성성분; 다발성 경화증 치료를 위하여 MSC, 바람직하게는 ASC, 및 미엘린 및/또는 미엘린 구성성분.

[0180] **키트**

[0181] 다른 측면에서, 본 발명은 (i) 본 발명의 세포들 및/또는 (ii) 본 발명의 조절성 T 세포들 및/또는 (iii) 본 발명의 방사선 조사된 세포들 및/또는 (iv) 본 발명의 IFN-γ 미리-자극된 세포들 및/또는 (v) 본 발명의 방사선 조사되고 IFN-γ 미리-자극된 세포들 및/또는 (vi) 본 발명의 IFN-γ 미리-자극되고 방사선 조사된 세포들을 함유하는 세포 개체군을 포함하는 키트에 관한 것이다. 본 발명의 키트들은 그러한 세포 유형들 중 1, 2, 3, 4,

5 또는 모두를 포함할 수 있다.

[0182] 추가적인 측면에서 본 발명은 i) 발명의 세포들 또는 조절성 T-세포들을 포함하는 의약 및 ii)본 발명의 방법들에 따른 그들의 용도를 위한 설명(instructions)을 포함하는 키트를 제공한다.

[0183] 추가적인 구체양태에서 상기 키트는 iii) 하나 이상의 항원들을 더 포함할 수 있다.

[0184] **실시예들**

[0185] 이제 본 발명은, 실시예들에 의해 보다 상세히 설명될 것이며, 이들은 결코 본 발명의 범위를 제한하고자 하는 것이 아니며, 이들 실시예들은 첨부된 도면들을 참조하여 본 발명을 상술하는 역할을 할 것이다.

[0186] **물질 및 방법들**

[0187] **hASCs 및 hBM-MSCs 의 배양**

[0188] hASCs 는 건강한 성인 공여자들로부터의 인간 지방조직으로부터 수득한 지방흡인물로부터 분리되고, PBS 로 2회 세척되었고, PBS에서 37℃ 에서 30 분 동안 18U/ml 의 콜라게나아제 유형 I로 소화되었다. 소화된 샘플은 10% 의 소태아 혈청(FBS)으로 세척되었고, 염화 암모늄 160mM 로 처리되고, 배양배지(10% FBS 를 함유하는 DMEM) 에 현탁되었으며(suspended), 40-㎛ 나일론 메쉬를 통하여 여과되었다. 세포들은 조직 배양 플라스크 위에 접종되고(seeded) 37℃ 및 5% CO_2 에서 상기 배양 배지를 7일마다 교체하면서 확장되었다. 세포들은 배양물이 합류점(confluence)의 90% 에 도달한 때에 새로운 배양 플라스크에 옮겨졌다. 게다가, hASCs 는 HLA-I, CD90, 및 CD105 에 대하여 양성이고, HLA-II, CD40, CD80, CD86, 및 CD34 에 대하여 음성인 특이적 표면 마커과 함께 착색함으로써 확인되었다. 6 명(3명의 남자 및 3명의 여자, 35~47세)의 건강한 공여자들로부터의 풀이 연구에 있어 사용되었다. 세포들은 4-6 계대(passages) 에서 이용되었다. hASCs 는 적합한 조사 및 윤리위원회(Research and Ethics Committees)의 지휘하에 피험자 동의 이후 수득되었다.

[0189] 인간 골수 중간엽 간질 세포들(hBM-MSCs)이 MSC 참고 세포 공급원(source)으로서 이용되었다. hBM-MSCs 는 Lonza, Inc. (Walkersville, MD, USA)로부터 구매하였고 10% FBS 를 함유하는 DMEM 에서 공급자의 권고에 따라서 배양되었다.

[0190] **FACS 에 의한 hASCs 의 표현형 분석**

[0191] hASC 의 유세포 분석을 위하여, 세포들은 다음의 mAbs 와 함께 착색되었다 : BD 생명과학 (San Jose, CA, USA)으로부터의 항-HLA-ABC (G46-2.6), 항-HLA-DR (L243), 항-CD112 (R2.525), 항-CD155 (300907), 항-MICA/B (6D4). ULBPs 는 R&D 시스템즈 (Minneapolis, MN, USA)로부터의 항-ULBP-1(170818) 항-ULBP-2(165903) 및 항-ULBP-3 (166510)와 함께 적합한 FITC-복합 이차 항체를 이용하여 간접 면역형광검사법에 의해 평가되었다. R&D 시스템즈로부터의 재조합 인간 단백질 키메라 (NKp30-, NKp44- and NKp46-IgG1 (Fc) 의 분석이 다음과 같이 실행되었다: $2x10^5$ hASCs 가 100 ㎕ 의 Fc 수용체 차단제(Blocker) (Innovex Biosciences, Richmond, VA, USA)와 함께 실온에서 10분 동안 배양되었다. 세척 버퍼로 2회 세척 후에 2% FCS 를 함유한 PBS 에 재현탁되었다. 세포들은 그리고나서 5 ㎍/ml 의 단백질 키메라 또는 인간 IgG 과 함께 4℃ 에서 30분 동안 배양되었다. 2% FSC 를 함유하는 PBS 에서 4℃ 에서 3회 세척 후, 세포들은 인간 IgG-Fc 단편- 특이적, FITC-복합 염소 항체와 함께 4℃에서 30분 동안 배양되었다. 2회 세척 이후, 세포들은 PBS 에 재현탁되었고 유세포분석기에 의해 분석되었다. 유세포 분석이 10^5 이벤트의 취득 이후에 FACScan 세포계산기(BD Biosciences) 상에서 실행되었다. 독자생존 가능한 세포들이 전방 및 측면 흩어짐 특징들을 이용하여 선택되었고 CellQuest 소프트웨어 (BD Biosciences)를 사용하여 분석되었다. 아이소타잎-일치된(Isotype-matched) 음성 대조구 항체들이 모든 실험들에서 사용되었다. 평균 상대 형광 강도(Mean Relative Fluorescence Intensity (MRFI))는 평균 형광 강도(MFI)를 그의 음성 대조구로 나눔으로써 계산되었다.

[0192] **NK 세포 분리 및 배양**

[0193] 건강한 공여자들로부터의 말초혈액 단핵세포들(PBMCs)이 Histopaque-1077 (Sigma, St. Louis, MO)에 대한 원심분리에 의해 수득되었고 PBS 로 세척되었다. PBMCs 는 10% 인간 혈청, 1% 글루타민, 1% 페니실린, 1% 비-필수 아미노산, Cambrex Bio Science (Walkersville, MD USA)로부터의 1% 소디움 피루베이트(Sodium Pyruvate), 및 프레데릭의 국립 암 연구소로부터 입수한 500 U/ml 의 rhIL-2 로 보충된 RPMI 1640 에서 5일 동안 자랐다. NK 세포들은 FACS 밴티지 세포계수기(BD Biosciences) 를 이용하여 정제되었고 분류된(sorted) 개체군의 대표적인 순도는 95-98% 였다. 정제된 NK 세포들은 탈과립화 및 IFN-γ 생산을 위하여 그 뒤 분석되거나 또는 공동배양 실험들에서 테스트되었다.

[0194] **NK 세포 탈과립 분석**

[0195] CD107a/b 의 표면 발현이 BD GolgiStop™ (BD Biosciences) 및 FITC-표지된 CD107a/b 의 혼합물의 존재하에서 표적세포들과의 1:1 의 비율에서의 정제된 NK 세포들의 활성화 다음의 4시간 이후 분석되었다. NK 세포들은 BD Biosciences 로부터의 PE 표지된 항-CD56 (NCAM16.2) 로 착색되었고 CD107a/b 발현의 빈도를 측정하여 유세포분석기에 의해 분석되었다.

[0196] **인터페론-γ 분석**

[0197] IFN-γ분석이 BD GolgiStop™(BD Biosciences) 의 존재하에서 표적 세포들과 1:1 비율로 공동배양된 정제된 NK 세포들을 이용하여 실행되었다. 공동배양 8시간 후 정제된 NK 세포들은 BD Biosciences 로부터의 PE 표지된 항-CD56 (NCAM16.2)로 착색되었고, BD Cytofix/Cytoperm 고정/투과가능화 키트 (BD Biosciences)를 이용하여 고정 및 투과가능하게 되었다. 마지막으로, 세포들은 FITC-표지된 항-IFN-γ mAb (eBioscience, San Diego, CA)로 착색되었고 유세포 분석이 IFN-γ 발현의 빈도를 측정함으로써 실행되었다.

[0198] **NK 세포들의 hASCs 및 hBM-MSCs 와의 공동배양**

[0199] hASCs 및 hBM-MSCs 의 NK 세포들에 대한 저해 효과를 결정하기 위하여, 정제된 NK 세포들이 hASCs 또는 hBM-MSCs 의 존재 또는 부존재 하에서 직접 공동배양 또는 0.4 ㎛ 구멍 크기 막을 가지는 트랜스웰 플레이트 시스템 (Corning Costar, Schiphol-Rijk, The Netherlands)을 이용하여 공동배양되었다. 100U/ml 에서 rhIL-2와 함께 72시간 이후, NK 세포들은 수확되었고 그뒤에 NK 세포-민감성 표적 세포주 K562 에 대한 탈과립화 분석에서 테스트되었다. 상기 설명한 바와 같이 CD107a/b 발현의 빈도를 측정함으로써 유세포 분석기에 의한 분석이 실행되었다. 공동배양으로부터 상청액이 수집되고, 세포들 또는 세포 파괴물을 제거하기 위하여 스펀 다운(spun down) 되고, -20℃ 에서 동결 및 저장되었다.

[0200] **NK 세포들의 표현형 분석**

[0201] 정제된 NK 세포들은 hASCs 또는 hBM-MSCs 와 1:1 비율로 직접 접촉 또는 트랜스웰 공동배양 시스템에서 72 시간 동안공동배양되었다. 유세포 분석을 위하여, NK 세포들은 PBS 에서 2회 세척되었고 형광-표지된 mAbs 의 적절한 결합물들로 착색되었다. 다음의 mAbs 가 본 연구에 이용되었다: 페리디닌 클로로필 단백질(Peridinin chlorophyll protein (PerCP))-결합된 항-CD3 (SK1); 플루오레세인 이소티오시안산염(fluorescein isothiocyanate (FITC))-결합된 항-CD56 (NCAM16.2) 및 피코에리트린 (PE)-결합된 항-CD69 (HP-4B3), 항-NKp44 (p44-8.1), 항-NKp46 (9E2/NKp46), 항-CD226 (DX11), 항-NKG2D (1D11), 항-CD94 (HP-3D9), 항-CD69 (HP-4B3), BD Biosciences 로부터의 항-CD16 (NKP15), Miltenyi Biotec (Auburn, CA, USA) 로부터의 항-NKp30 (p30-15) 및 e-Bioscience (San Diego, CA)로부터의 항-CD244 (C1.7).

[0202] 세포내 착색을 위하여, 표면 마커 표지화 이후, 세포들은 BD Cytofix/Cytoperm 고정화/투과가능화 키트 (BD Biosciences) 를 이용하여 고정 및 투과가능하게 되었다. 세포들은 BD Biosciences 로부터의 항-퍼포린 (SG9), 항-그랜자임 A (CB9) 및 항-그랜자임 B (GB11) 으로 착색되었다.

[0203] 유세포 분석이 10^5-10^6 이벤트의 획득 이후 FACScan 계수기(BD Biosciences)상에서 실행되었다. 독자생존 가능한 세포들이 전방 및 측면 흩어짐 특징들을 이용하여 선택되었고 NK 세포들은 CD56+CD3- 표현형 상에 게이티드

되고(gated) CellQuest 소프트웨어 (BD Biosciences)를 사용하여 분석되었다. 아이소타입-일치된(Isotype-matched) 음성 대조구 항체들이 모든 실험들에서 사용되었다. 평균 상대 형광 강도(Mean Relative Fluorescence Intensity (MRFI))는 평균 형광 강도(MFI)를 그의 음성 대조구로 나눔으로써 계산되었다.

[0204] **IDO 활성**

[0205] IDO 활성은 NK 세포들의 hASCs 또는 hBM-MSCs 과의 공동배양으로부터의 상청액에서 Trp 및 Kyn 농도 모두를 결정함으로써 측정되었다. 약 200 μL 의 상청액이 50 μL 의 트리클로로아세트산 2M 에 첨가되었고 와류되고(vortexed), 스펀다운되고(spun down) (13,000 rpm 에서 10분) 및 HPLC (Waters 717plus Autosampler, Milford, MA)에 의해 분석되었다.

[0206] **통계적 분석**

[0207] 측정치를 통한 차이점들이 SPSS 소프트웨어를 이용하는 2-way ANOVA 에 대한 스튜던트 테스트(Student's t test) 및 페어드 테스트(paired test) 에 의하여 비교되었다. p 값 ≤ 0.05 가 중요하게 고려되었다.

[0208] **결과들**

[0209] **hASCs 및 hBM-MSCs 에서의 NK활성화 수용체들에 대한 리간드들의 발현**

[0210] hASCs 에서의 NK 활성화 수용체들에 대한 리간드의 표현형 분석이 건강한 공여자들로부터 분리된 hBM-MSCs 와 비교해서 수행되었다.

[0211] 그 결과들은 hASCs 가 hBM-MSCs 와 비교하여 더 낮은 수준의 HLA 클래스-I 분자를 발현하였고 HLA 클래스-II 의 음성 발현을 발현하였다는 것을 나타낸다. 양 경우 모두에서, 그들은 CD48 분자 (CD244 에 대한 리간드)를 발현하지 않았다. hASCs 에서의 NK 활성화 수용체들에 대한 리간드의 표현형 분석은 hBM-MSCs 와 비교하여 CD112 및 CD155 (DNAM-1 에 대한 리간드들)의 더 낮은 발현을 나타냈다.

[0212] 뿐만 아니라, MICA/B 및 ULBPs (NKG2D 에 대한 리간드들)의 발현은 hASCs 및 hBM-MSCs 에서 매우 낮거나 음성인 것이 밝혀졌다.(도 1). 유세포 분석기에 의한 천연의 세포독성 수용체들 (NCRs) 에 대한 리간드들의 확인을 위하여, 키메릭 NCRs 가 hASCs 및 hBMMSCs 에서의 그들의 표면 발현을 확인하는데 사용되었다. 우리의 결과들은 두가지 세포 유형들 모두에서 이들 리간드들의 음성 발현을 나타냈다(도 1). hASCs 는 기질 혈관 분획에서 잠재적으로 발견될 수 있는 잠재적인 오염물질 세포들의 부존재를 증명하는 CD45, CD14, CD31, CD34, FCR1a, 및 1B10 에 대하여 음성이었다. hASCs 는 상이한 공여자들로부터의 집단화된(pooled) hASCs 샘플들 및 개별적인 샘플들의 표현형에 있어서 중요한 차이점(데이터 미도시)을 가지지 않고 다른 계대들(passages) 이후에 중요한 차이점들을 가지지 않으며 CD29, CD59, CD73, CD90, 및 CD105 에 대하여 양성이었다.

[0213] 마지막으로, 염증성 환경에서 NK 활성화 수용체들에 대한 리간드의 발현 수준을 결정하기 위하여, hASCs 및 hBM-MSCs 가 IFN-γ로 72시간동안 자극되었다 (1, 10, 및 100 U/mL). 3개의 독립적인 실험들은 발현 수준이 CD112, CD155, MICA/B, CD48, 또는 ULBPs 에서 의미있게 증가하지 않았다는 것을 나타냈다.

[0214] 예상대로, HLA 클래스 I 및 클래스 II 분자들의 발현은 이러한 세포들이 IFN-γ로 처리되었을때 증대되었다. 100 U/mL 에서 72시간 이후, HLA 클래스 I 발현(MRFI)은 hASCs 에서 38.47-20.71 까지 및 hBM-MSCs 에서 48.74 - 38.5 증가하였다. 게다가, hASCs 및 hBM-MSCs 에서 HLA 클래스 II 는 각각 2.44 - 1.21 및 2.21 - 1.32 의 MRFI 에 도달하는 양의 값으로 전환되었다.

[0215] **hASCs 에 대응한 NK 세포들의 낮은 탈과립 활성.**

[0216] NK 세포-매개된 용해(lysis)에 대한 hASCs 및 hBMMSCs 의 민감성을 비교하기 위하여 탈과립 분석이 이전에 설명된 바와 같이 CD107a/b 표면 분자의 탐지에 의해 수행되었다. 탈과립 분석은 매우 민감한 방법이며, 그 결과들은 NK 세포 세포독성과 엄격하게 관련이 있다.

[0217] 이러한 실험들을 위하여, 동종이계의 NK 세포들은 그들의 세포독성 잠재능을 증가시키기 위하여 rhIL-2 로 미리 자극되었고 CD56 + CD3- 표현형에 근거하여 분류되었다. hASCs 및 hBM-MSCs 모두 탈과립 분석에서 표적 세포로서 사용되었다. 음성 및 양성 대조구로서, NK 세포들 단독으로 및 NK-민감성 표적 세포주 K562 에 대한 NK 세포들이 사용되었다.

[0218] 다른 비율들이 사용되었다 하더라도, 최대의 탈과립 활성을 달성하기 위하여, 탈과립 분석에서 최적의 이펙터 : 표적(E:T) 세포 비율은 1:1 (데이터 미도시)이었다. 그 결과들은 hASCs에 대응하여 탈과립 비율은 매우 낮았고 자극되지 않은 NK 세포들 (NK 대조구)에서의 탈과립과 비교하여 통계적으로 중요하지 않다는 것을 증명하였다. 대조적으로, hBM-MSCs 는 hASCs 와 비교했을때 상당히 향상된 NK 세포 탈과립 반응을 유도하였다(도 2).

[0219] HLA 클래스 I-특이적 저해 수용체들의 역할을 배제하기 위하여, 공동배양 전에 표적세포를 HLA-클래스 I 특이적 단일클론성 항체 W6/32 와 미리처리함으로써 HLA 클래스 I 블로킹이 수행되었다. 그 결과들은 HLA 클래스 I 의 항체 매개된 마스킹은 hASCs 에 대한 NK 세포의 탈과립을 증가시키지 않았다는 것을 나타내었다(데이터 미도시).

[0220] **hASCs 및 hBM-MSCs 은 NK 세포에 의한 인터페론-감마 생산을 유도한다**

[0221] 탈과립 분석에 추가하여, 우리는 hASCs 또는 hBM-MSCs 에 대한 NK 세포 사이토카인 반응을 검사하였다. 탈과립 분석과 유사하게, IFN-γ 생산이 hASCs, hBM-MSCs, 및 K562 (양의 대조구)에 대한 정제된 NK 세포들에서 분석되었다. 음성 대조구로서, 정제된 NK 세포들이 표적 세포들의 부존재에서 배양되었다. 세포내 착색 기술이 NK 세포들에 의한 IFN-γ 생산을 평가하기 위하여 사용되었다. 도 3은 hASCs 또는 hBM-MSCs 가 표적 세포들로서 이용되었들 때 IFN-γ 생산이 관찰되었다는 것을 나타낸다. 또한, hBM-MSCs 과 hASCs 를 비교할때 IFN-γ 반응은 통계적으로 다르지 않았다는 것을 주목하는 것은 흥미로운 일이다. NK 세포군에 대한 IFN-γ의 발현의 대표적 점도포(dot plot)는 또한 도 3에 그려졌다. 사이토카인 IFN-γ는 또한 hASCs 와 1:1 비율로 72 시간동안 공동배양된 정제된 NK 세포들로부터의 상청액에서 FlowCytomix 인간 Th1/Th2 11plex 키트 (Bender MedSystem)를 이용하여 탐지되었다. IFN-γ는 NK/hASCs 공동배양물(40-32.5 pg/mL) 에 분비되었고 자극되지 않은 NK 세포들 또는 자극되지 않은 hASCs 에 의해서는 분비되지 않았다(데이터 미도시).

[0222] **hASCs 및 hBM-MSCs 는 다른 표적 세포들에 대한 NK 세포 기능을 손상시킨다**

[0223] NK 세포들에 대한 hASCs 및 hBM-MSCs의 가능한 조절 효과를 더욱 연구하기 위하여, 공동배양 실험들이 직접접촉 공동배양에서 또는 트랜스웰 삽입(inserts)을 사용함으로써 수행되었다. 이들 실험들은 NK 활성의 조절에 있어서의 수용성 인자들 및 세포대 세포 접촉 (cell-to-cell contact)의 잠재적 기여를 수량화하기 위하여 고안되었다.

[0224] 정제된 NK 세포들은 hASC 또는 hBMMSCs 과 1:1 비율로 72 시간동안 공동배양되었고 그뒤에 수확되었고 민감한 표적 세포주에 대한 탈과립 능력에 대하여 테스트 되었다. 우리의 결과들은 첫번째 NK 세포들의 hASCs 및 hBM-MSCs 와의 미리 배양이 NK 탈과립 능력을 상당히 감소시킬 수 있다는 것을 보여주었다. 두번째, 우리의 결과들은 트랜스웰 환경에서 hASCs 와 미리 배양된 NK 세포들은 세포대세포 접촉보다도 상당히 더 강력한 저해 효과를 가진다는 것을 나타내었다. 마지막으로, NK 세포들에 대한 hBM-MSCs 의 효과에 관하여, hASCs 와 비슷한 결과들을 얻었다. 흥미롭게도, hBM-MSCs 로 미리배양된 NK 세포들에서 접촉 및 트랜스웰 조건들 사이에 어떠한 상당한 차이점들도 관찰되지 않았다 (도 4).

[0225] **hASCs 및 hBM-MSCs 는 NK 세포에서 표현형 변화들을 유도한다**

[0226] NK 세포 탈과립을 유도하는 hASCs 세포들의 낮은 능력의 증명 뒤에, 발명자들은 NK 세포 표현형 프로파일에 대한 변형들을 분석하였고 세포대세포 접촉 또는 오직 수용성 인자들이 포함되었는지 여부를 결정하였다. 이러한 목적을 위해, 접촉으로 또는 트랜스웰 환경 중 어느 하나에서 hASCs 또는 BM-MSCs 의 존재 하에서 공동배양된 NK 세포들 상의 활성화 수용체들, NK 세포 마커들, 및 이펙터 분자들이 분석되었다.

[0227] 3가지 독립적인 실험들이 수행되었고, 통계적 분석은 hBM-MSCs 와 접촉하여 공동배양된 NK 세포들이 DNAM-1 의 상당하게 감소된 발현을 보였다는 것을 밝혔고, 매우 유사한 결과들이 (비록 통계적으로는 중요하지 않다 하더

라도) hASCs 와의 접촉으로 공동배양된 NK 세포들에서 얻어졌다.(표 1)

[0228] 활성화 수용체 NKG2D 가 hASC 및 hBM-MSCs 와의 트랜스웰에서 공동배양된 NK 세포들에서 증가하였다(이 변화는 hASCs 의 경우에서만 통계학적으로 중요했다). 또한, 직접 접촉 공동배양에서는 차이점을 얻을 수 없었다(표 1). NCR 레퍼토리(repertoire)의 분석에서, 몇가지 변화들이 발견되었다(통계상으로 중요하지는 않음). 감소된 NKp30 표면 발현이 NK 세포들이 hASCs 및 hBM-MSCs 과 접촉하여 공동배양되었을때 관찰되었다. 그에 반해서, NKp46 발현은 약간 증가되었다(표 1). 데이터는 hASCs 및 hBM-MSCs 와 접촉한 NK 세포들은 CD16의 중요한 감소를 가졌다는 것을 밝혔다; 그러나, CD69 및 CD94 발현은 모든 실험 조건들에서 유지되었다. 마지막으로, 세포내 분자 퍼포린, 그랜자임 A, 및 그랜자임 B 또한 연구되었고, 퍼포린 및 그랜자임 B 에 대하여 변화들이 발견되지 않았다; 그러나, 그랜자임 A 는 접촉하여 및 트랜스웰 모두에서 hASCs 와 공동배양된 NK 세포들에서 상당히 감소되었다 (표 1).

표 1

Table 1. **접촉에서 및 트랜스웰 시스템에서 hASCs 또는 hBM-MSCs로 미리 민감화된 NK의 표현형 분석**

분자 (MRFI)	NK 대조구		NKhASCs **공동배양** CT		NKhASCs **공동배양** TW		NKhBM-MSCs **공동배양** CT		NKhBM-MSCs **공동배양** TW	
CD244	2,73	±0,82	2,64	±0,93	2,18	±0,63	2,21	±0,32	1,98	±0,30
DNAM-1	7,59	±1,70	4,05	±1,82	7,52	±1,31	3,89	±1,36	6,60	±2,42
NKG2D	12,53	±5,16	14,52	±3,53	17,21	±6,94	11,24	±2,88	16,98	±9,71
NKp30	16,63	±13,68	9,28	±7,02	10,41	±6,15	8,50	±6,46	12,41	±10,84
NKp44	1,21	±1,00	1,59	±0,64	1,76	±0,83	1,54	±0,82	1,84	±1,12
NKp46	6,89	±4,16	9,63	±7,09	9,79	±6,43	10,00	±7,29	8,25	±5,77
CD16	81,99	±43,81	59,76	±13,05	80,80	±50,25	55,77	±7,31	74,92	±41,24
CD69	5,82	±1,89	7,26	±2,08	6,10	±1,72	6,72	±3,33	6,10	±2,15
CD94	104,03	±55,02	103,52	±35,51	102,84	±50,48	105,32	±32,61	97,32	±52,01
퍼포린	31,98	±9,74	29,96	±8,51	30,65	±8,87	32,43	±10,31	31,16	±8,60
그랜자임 A	10,47	±2,96	7,07	±2,83	8,49	±3,29	8,90	±4,81	9,45	±3,97
그랜자임 B	4,77	±0,70	5,19	±0,92	4,67	±0,35	5,79	±1,31	4,50	±0,64

[0229]

[0230] **IDO 는 NK 세포들에 대응하여 hASCs 및 hBM-MSCs 에 의해 유도되었다.**

[0231] IDO, Trp 이화 효소의 발현은 MSCs 의 면역조절 기능에 기여하며, 이펙터 세포들의 면역 억제에 포함된다고 알려져 있다. IDO 발현은 IFN-γ 자극 후 유도된다. 도 3에서 앞서 보여진대로, hASCs 및 hBM-MSCs 는 NK 세포들에 의한 IFN-γ 생산을 유도하였다. NK 세포들에 의해 해리된 용해성 인자들이 hASCs 및 hBM-MSCs 에서 IDO 발현을 작동시킬 수 있고, 이는 NK 활성의 조절에 역할을 할 수 있다는 가설을 제기하였다. 따라서, HPLC 에 의해, 공동배양 이후 IDO 활성을 측정하였다.

[0232] 도 5에서 나타낸 바와 같이, NK 세포들은 IDO 활성을 나타내지 않았다(Trp 의 저하 및 그의 이화작용의 생산물

Kyn의 축적으로서 측정됨). 그러나, NK 세포들이 접촉으로 또는 트랜스웰 조건들에서 hASCs 또는 hBM-MSCs 와 공동배양되었을 때에 수반되는 Kyn 의 축적과 함께, Trp 의 농도가 서서히 감소된 것을 발견하였다.

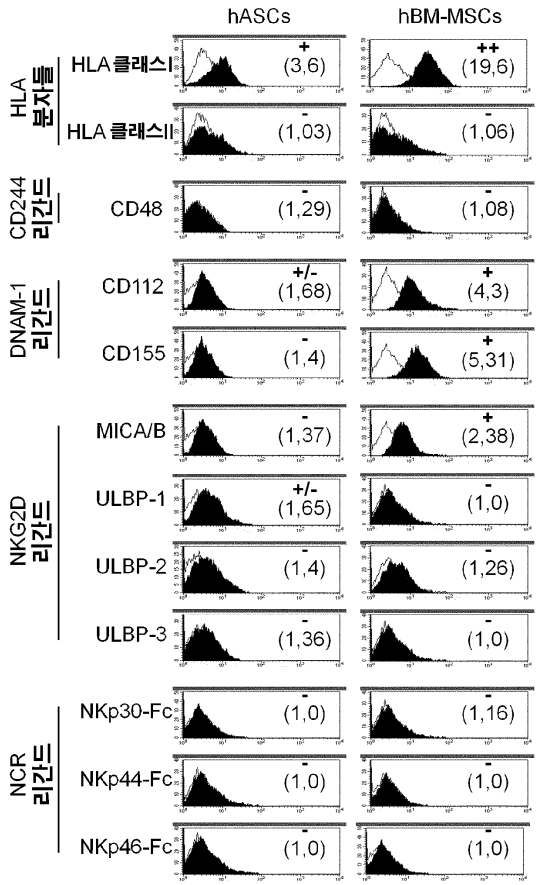
[0233] **결론**

[0234] 생체외 결과들은 hASCs 가 동종이계 환경에서 입양세포 치료(adoptive cell therapy)에 대한 최적의 특성들을 보여준다는 것을 증명한다. 첫째로, NK 활성화 수용체들에 대한 리간드의 낮은 발현의 가장 중요한 결과는 NK-매개된 인식에 대한 그들의 증가된 저항성일 것이다. hBM-MSCs 와 비교하여, hASCs 는 동종이계의 NK 세포용해로부터 더욱 보호되었다. 이는 그들이 장기간 동안 숙주에 남아있도록 할 것이다. 두번째로, NK 세포들에서 내성을 유도하기 위한 hASCs 의 메커니즘들은 용해성 인자들에 의해 매개될 수 있다는 것을 제안한다. NK/MSCs 혼선(crosstalk) 동안 NK 세포들에 의해 분비된 IFN-γ는 IDO 발현 및 면역억제 활성에서 상승효과를 행사할 수 있는 PGE2 와 같은 다른 인자들을 유도할 수 있다.

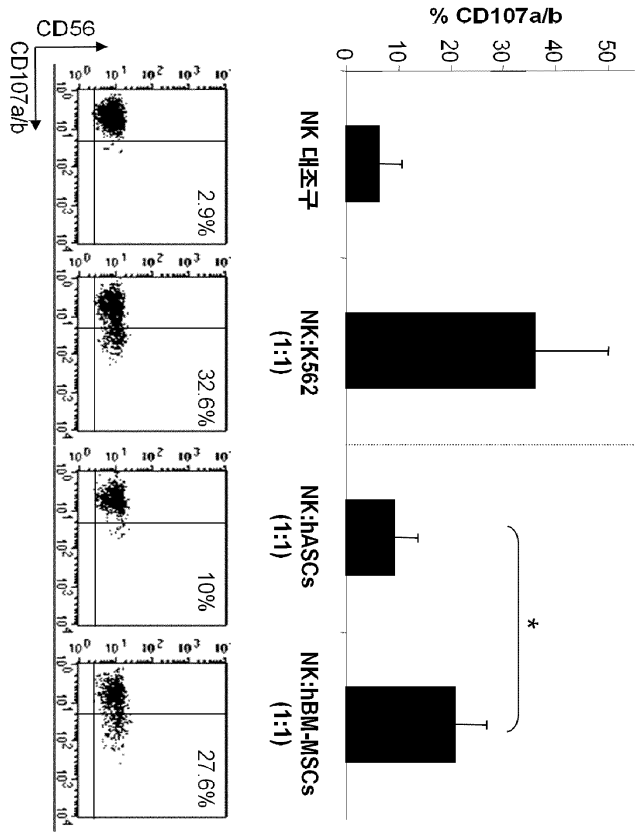
[0235] 요약하면, 본 연구는 NK 세포들 및 입양으로 이동된(adoptively transferred) hASCs 사이의 상호작용들에 대한 우리의 이해를 증가시키지 위하여 생물학적 및 치료적 중요성을 제공한다.

도면

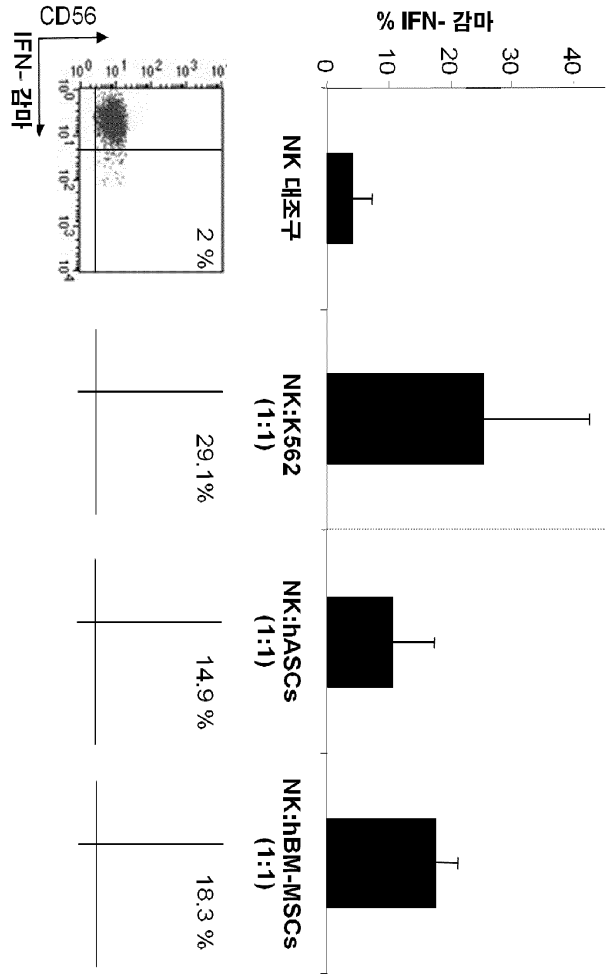
도면1



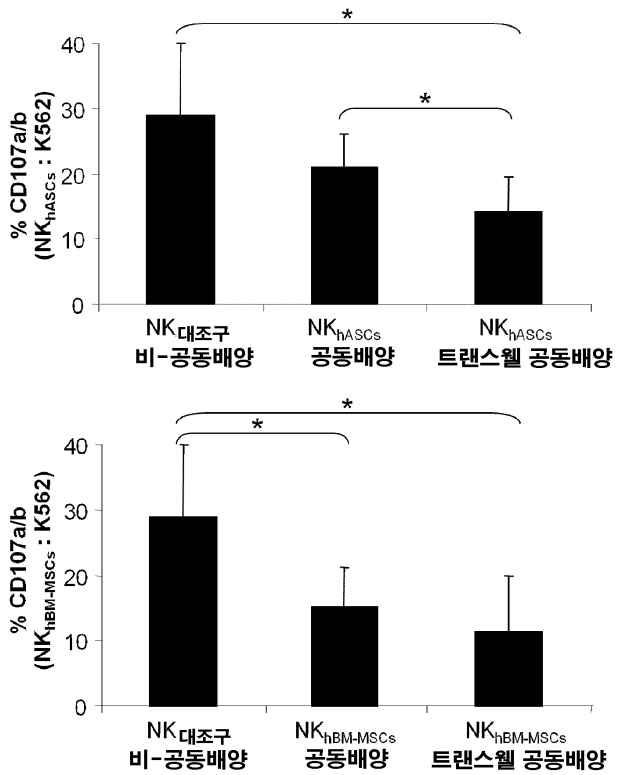
도면2


CD56
CD107a/b
2.9%
32.6%
10%
27.6%
% CD107a/b
0
10
20
30
40
50
NK 대조구
NK:K562 (1:1)
NK:hASCs (1:1)
NK:hBM-MSCs (1:1)
*

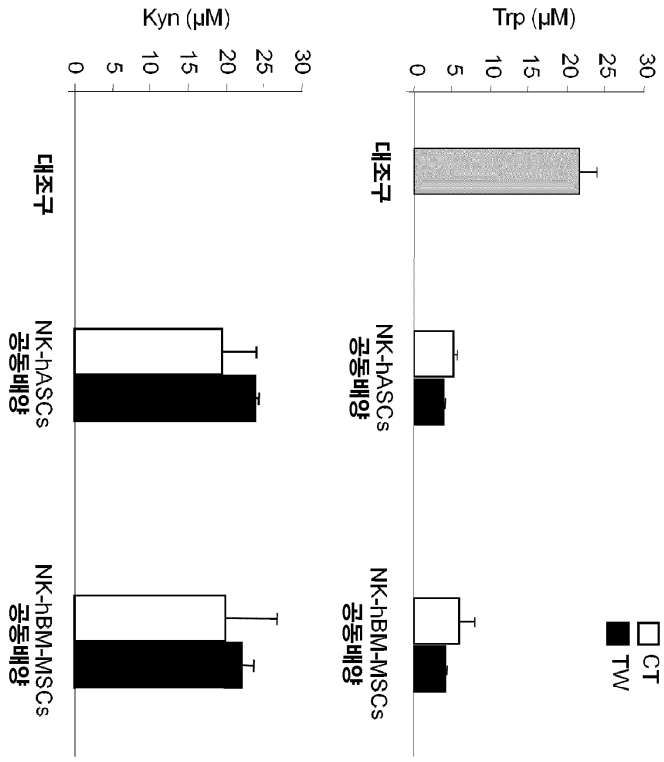
도면3


CD56
IFN- 감마
2 %
% IFN- 감마
0
10
20
30
40
NK 대조구
NK:K562 (1:1)
29.1%
NK:hASCs (1:1)
14.9 %
NK:hBM-MSCs (1:1)
18.3 %

도면4



도면5



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> TiGenix SA

<120> P8235PC00

<130> CELL POPULATIONS HAVING IMMUNOREGULATORY ACTIVITY, METHOD FOR ISOLATION AND USES

<150> EP11157930

<151> 2011-03-11

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 551

<212> PRT

<213> Human

<400> 1

Met Ala Ala Pro Ala Leu Ser Trp Arg Leu Pro Leu Leu Ile Leu Leu
1 5 10 15

Leu Pro Leu Ala Thr Ser Trp Ala Ser Ala Ala Val Asn Gly Thr Ser
20 25 30

Gln Phe Thr Cys Phe Tyr Asn Ser Arg Ala Asn Ile Ser Cys Val Trp
35 40 45

Ser Gln Asp Gly Ala Leu Gln Asp Thr Ser Cys Gln Val His Ala Trp
50 55 60

Pro Asp Arg Arg Arg Trp Asn Gln Thr Cys Glu Leu Leu Pro Val Ser
65 70 75 80

Gln Ala Ser Trp Ala Cys Asn Leu Ile Leu Gly Ala Pro Asp Ser Gln
85 90 95

Lys Leu Thr Thr Val Asp Ile Val Thr Leu Arg Val Leu Cys Arg Glu
100 105 110

Gly Val Arg Trp Arg Val Met Ala Ile Gln Asp Phe Lys Pro Phe Glu
115 120 125

Asn Leu Arg Leu Met Ala Pro Ile Ser Leu Gln Val Val His Val Glu
130 135 140

Thr His Arg Cys Asn Ile Ser Trp Glu Ile Ser Gln Ala Ser His Tyr

145 150 155 160

Phe Glu Arg His Leu Glu Phe Glu Ala Arg Thr Leu Ser Pro Gly His

165 170 175

Thr Trp Glu Glu Ala Pro Leu Leu Thr Leu Lys Gln Lys Gln Glu Trp

180 185 190

Ile Cys Leu Glu Thr Leu Thr Pro Asp Thr Gln Tyr Glu Phe Gln Val

195 200 205

Arg Val Lys Pro Leu Gln Gly Glu Phe Thr Thr Trp Ser Pro Trp Ser

210 215 220

Gln Pro Leu Ala Phe Arg Thr Lys Pro Ala Ala Leu Gly Lys Asp Thr

225 230 235 240

Ile Pro Trp Leu Gly His Leu Leu Val Gly Leu Ser Gly Ala Phe Gly

245 250 255

Phe Ile Ile Leu Val Tyr Leu Leu Ile Asn Cys Arg Asn Thr Gly Pro

260 265 270

Trp Leu Lys Lys Val Leu Lys Cys Asn Thr Pro Asp Pro Ser Lys Phe

275 280 285

Phe Ser Gln Leu Ser Ser Glu His Gly Gly Asp Val Gln Lys Trp Leu

290 295 300

Ser Ser Pro Phe Pro Ser Ser Ser Phe Ser Pro Gly Gly Leu Ala Pro

305 310 315 320

Glu Ile Ser Pro Leu Glu Val Leu Glu Arg Asp Lys Val Thr Gln Leu

325 330 335

Leu Leu Gln Gln Asp Lys Val Pro Glu Pro Ala Ser Leu Ser Ser Asn

340 345 350

His Ser Leu Thr Ser Cys Phe Thr Asn Gln Gly Tyr Phe Phe Phe His

355 360 365

Leu Pro Asp Ala Leu Glu Ile Glu Ala Cys Gln Val Tyr Phe Thr Tyr

370 375 380

Asp Pro Tyr Ser Glu Glu Asp Pro Asp Glu Gly Val Ala Gly Ala Pro

385 390 395 400

Thr Gly Ser Ser Pro Gln Pro Leu Gln Pro Leu Ser Gly Glu Asp Asp

405 410 415

Ala Tyr Cys Thr Phe Pro Ser Arg Asp Asp Leu Leu Leu Phe Ser Pro

420 425 430

Ser Leu Leu Gly Gly Pro Ser Pro Pro Ser Thr Ala Pro Gly Gly Ser

435 440 445

Gly Ala Gly Glu Glu Arg Met Pro Pro Ser Leu Gln Glu Arg Val Pro

450 455 460

Arg Asp Trp Asp Pro Gln Pro Leu Gly Pro Pro Thr Pro Gly Val Pro

465 470 475 480

Asp Leu Val Asp Phe Gln Pro Pro Pro Glu Leu Val Leu Arg Glu Ala

485 490 495

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

500 505 510

Trp Ser Arg Pro Pro Gly Gln Gly Glu Phe Arg Ala Leu Asn Ala Arg

515 520 525

Leu Pro Leu Asn Thr Asp Ala Tyr Leu Ser Leu Gln Glu Leu Gln Gly

530 535 540

Gln Asp Pro Thr His Leu Val

545 550

<210> 2

<211> 417

<212> PRT

<213> Human

<400> 2

Met Ala Arg Ala Met Ala Ala Ala Trp Pro Leu Leu Leu Val Ala Leu

1 5 10 15

Leu Val Leu Ser Trp Pro Pro Pro Gly Thr Gly Asp Val Val Val Gln

20 25 30

Ala Pro Thr Gln Val Pro Gly Phe Leu Gly Asp Ser Val Thr Leu Pro

35 40 45

Cys Tyr Leu Gln Val Pro Asn Met Glu Val Thr His Val Ser Gln Leu
50 55 60
Thr Trp Ala Arg His Gly Glu Ser Gly Ser Met Ala Val Phe His Gln
65 70 75 80
Thr Gln Gly Pro Ser Tyr Ser Glu Ser Lys Arg Leu Glu Phe Val Ala
85 90 95
Ala Arg Leu Gly Ala Glu Leu Arg Asn Ala Ser Leu Arg Met Phe Gly

100 105 110
Leu Arg Val Glu Asp Glu Gly Asn Tyr Thr Cys Leu Phe Val Thr Phe
115 120 125
Pro Gln Gly Ser Arg Ser Val Asp Ile Trp Leu Arg Val Leu Ala Lys
130 135 140
Pro Gln Asn Thr Ala Glu Val Gln Lys Val Gln Leu Thr Gly Glu Pro
145 150 155 160
Val Pro Met Ala Arg Cys Val Ser Thr Gly Gly Arg Pro Pro Ala Gln

165 170 175
Ile Thr Trp His Ser Asp Leu Gly Gly Met Pro Asn Thr Ser Gln Val
180 185 190
Pro Gly Phe Leu Ser Gly Thr Val Thr Val Thr Ser Leu Trp Ile Leu
195 200 205
Val Pro Ser Ser Gln Val Asp Gly Lys Asn Val Thr Cys Lys Val Glu
210 215 220
His Glu Ser Phe Glu Lys Pro Gln Leu Leu Thr Val Asn Leu Thr Val

225 230 235 240
Tyr Tyr Pro Pro Glu Val Ser Ile Ser Gly Tyr Asp Asn Asn Trp Tyr
245 250 255
Leu Gly Gln Asn Glu Ala Thr Leu Thr Cys Asp Ala Arg Ser Asn Pro
260 265 270
Glu Pro Thr Gly Tyr Asn Trp Ser Thr Thr Met Gly Pro Leu Pro Pro
275 280 285
Phe Ala Val Ala Gln Gly Ala Gln Leu Leu Ile Arg Pro Val Asp Lys

290 295 300

Pro Ile Asn Thr Thr Leu Ile Cys Asn Val Thr Asn Ala Leu Gly Ala

305 310 315 320

Arg Gln Ala Glu Leu Thr Val Gln Val Lys Glu Gly Pro Pro Ser Glu

325 330 335

His Ser Gly Ile Ser Arg Asn Ala Ile Ile Phe Leu Val Leu Gly Ile

340 345 350

Leu Val Phe Leu Ile Leu Leu Gly Ile Gly Ile Tyr Phe Tyr Trp Ser

355 360 365

Lys Cys Ser Arg Glu Val Leu Trp His Cys His Leu Cys Pro Ser Ser

370 375 380

Thr Glu His Ala Ser Ala Ser Ala Asn Gly His Val Ser Tyr Ser Ala

385 390 395 400

Val Ser Arg Glu Asn Ser Ser Ser Gln Asp Pro Gln Thr Glu Gly Thr

405 410 415

Arg