



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0119039
(43) 공개일자 2022년08월26일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/15 (2014.01) A61K 35/17 (2014.01)
A61P 37/08 (2006.01) C12N 5/0786 (2010.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 35/15 (2013.01)
A61K 35/17 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2022-7021365
- (22) 출원일자(국제) 2022년12월23일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2022년06월22일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2020/087757
- (87) 국제공개번호 WO 2021/130305
국제공개일자 2021년07월01일
- (30) 우선권주장
19219342.3 2019년12월23일
유럽특허청(EPO)(EP)
- (71) 출원인
아포사이언스 에이취
오스트리아 빈 1200, 드레스너 스트라쎬 87/A21
- (72) 발명자
앙케르밋, 헨리크 안
오스트리아 1060 빈, 스템퍼가쎬 51/26
마일드너, 마이클
오스트리아 3040 노을랭바흐, 와이닝거가쎬 10
- (74) 대리인
이희숙, 김석만

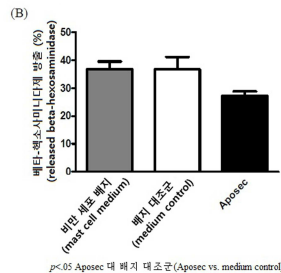
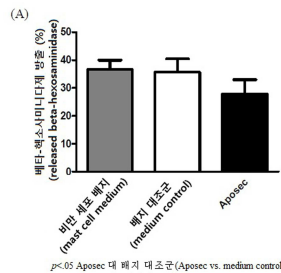
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 알레르기 또는 알레르기 반응의 치료 또는 예방용 조성물

(57) 요약

본 발명은 적어도 하나 이상의 식품 및/또는 흡입 알레르겐의 투여 또는 인간 또는 포유동물의 신체에 대한 적어도 하나 이상의 약물의 전신 투여에 의해 야기되는 알레르기 또는 알레르기 반응의 치료 /또는 예방에 사용하기 위한 초혈액 단핵세포(PBMC) 세포 배양물의 상층액을 포함하는 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 37/08 (2018.01)

C12N 5/0645 (2013.01)

C12N 2529/10 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

적어도 하나 이상의 식품 및/또는 흡입 알레르겐의 투여 또는 인간 또는 포유동물 신체에 대한 적어도 하나 이상의 약물의 전신 투여에 의해 야기된 알레르기 또는 알레르기 반응의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 말초혈액단핵세포(peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 세포 배양물의 상등액을 포함하는 조성물로서, 상기 PBMC는 배양 전 또는 배양 동안 이온화 방사선에 노출된 것인 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 적어도 하나 이상의 알레르겐이 생물학적 또는 화학적 알레르겐인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 생물학적 알레르겐은 동물 알레르겐, 식물 알레르겐, 곰팡이 알레르겐 또는 박테리아 알레르겐으로 이루어진 그룹에서 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 PBMC 세포 배양물이 단핵구, T 세포, B 세포 및/또는 NK 세포를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 PBMC는 세포 성장 배지, 바람직하게는 CellGro 배지, 보다 바람직하게는 Cellgro GMP DC 배지, RPMI, DMEM, X-vivo 및 Ultraculture로 이루어진 그룹으로부터 선택된 세포 배양 배지에서 배양되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 PBMC는 배양 전 또는 배양 동안 하나 이상의 추가 스트레스 유도 조건에 적용되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제7항에 있어서, 상기 스트레스 유도 조건이 UV 방사선, 저산소증, 오존, 열, 삼투압 및 pH 이동으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 PMC는 적어도 10 Gy 이상, 바람직하게는 적어도 20 Gy 이상, 보다 바람직하게는 적어도 40 Gy 이상, 보다 바람직하게는 적어도 50 Gy 이상의 투여량에서 이온화 방사선에 노출되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 PBMC를, 이의 상층액을 단리하기 전에 적어도 4 시간 이상, 바람직하게는 적어도 6 시간 이상, 보다 바람직하게는 적어도 12 시간 이상 배양되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 알레르기 반응의 발명 및/또는 적어도 하나 이상의 알레르겐에 노출전, 동안 및/또는 후에 투여되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 PCBMC 세포 배양물은 1×10^5 내지 1×10^8 PBMCs/ml, 바람직하게는 1×10^6 내지 1×10^7 PBMCs/ml, 보다 바람직하게는 2×10^6 내지 5×10^6 PBMCs/ml를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 0.1 내지 5 ml 상층액/kg 체중, 바람직하게는 0.3 내지 3 ml/kg 체중, 보다 바람직하게는 0.5 내지 2 ml/kg 체중, 보다 바람직하게는 0.8 내지 1.2 ml/kg 체중을 인간 또는 포유동물 신체에 투여되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 13

제1항 내지 제12항에 있어서, 상기 조성물은 흡입, 국소적으로, 경구적으로, 설하로, 구강으로, 피하로 또는 정맥 내로 투여되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 14

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 포유동물은 말, 개, 고양이 또는 낙타인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 15

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 정의된 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 적어도 하나 이상의 식품 및/또는 흡입 알레르겐의 투여 또는 인간 또는 포유동물 신체에 적어도 하나 이상의 약물의 전신 투여에 의해 야기된 알레르기 또는 알레르기 반응을 치료 또는 예방하는 방법.

청구항 16

하기 단계를 포함하는 적어도 하나 이상의 식품 및/또는 흡입 알레르겐의 투여 또는 인간 또는 포유동물 신체에 대한 적어도 하나 이상의 약물의 전신 투여에 유발된 알레르기 또는 알레르기 반응의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 정의된 조성물의 적합성을 결정하는 방법:

- a) 포유동물의 적어도 2개 이상의 피부 영역을 알레르겐과 접촉시키는 단계,
- b) 제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 정의된 조성물을 적어도 하나 이상의 상기 피부 영역에 투여하는 단계로서, 상기 적어도 하나 이상의 피부 영역은 상기 조성물로 치료되지 않고,
- c) 상기 알레르겐과 접촉된 피부 영역과 상기 알레르겐 및 상기 조성물과 접촉된 피부 영역과 비교하는 단계,
- d) 상기 영역들 사이에 차이점을 확인하는 단계, 및
- e) 상기 조성물이 상기 장애 또는 질병을 치료 또는 예방하기에 적합한지 여부를 결정하는 단계.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 인간 또는 포유동물 신체에 대한 알레르겐의 흡수에 의해 야기되는 장애를 치료 및 예방하기 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 알레르기의 민감화 단계 동안, 전문 항원-제시 세포(professional antigen-presenting cells)는 항원(알레르겐을 의미하는 알레르기에 대해)을 포식하고 및 처리된 항원을 T_H2 림프구에 교차-제시한다. 이러한 세포는 인터루킨 4(interleukin 4)의 방출에 의해 알레르겐-만남(allergen-encounter)에 반응하고 B 림프구와 상호작용한다. 활성화된 B 세포는 IL-4와 함께 알레르겐에 대한 E형 면역글로불린(IgE)을 생성한다. 분비된 IgE는 예를 들어, 비만 세포에 존재하는 IgE 특이적 수용체에 의해 결합된다. 이러한 면역 세포는 알레르겐에 민감하다. 채노출은

IgE-코팅된 면역 세포에 대한 알레르겐의 결합을 초래하며, 이는 수용체 가교결합 후, 민감화된 세포의 활성화를 유발한다. 활성화된 비만 세포는 세포 내 과립에서 히스타민, 사이토카인 및 염증유발 물질 등과 같은 면역 매개체의 방대한 방출에 의해 반응한다. 방출된 매개체는 혈관 확장, 점액 분비, 신경 자극을 포함한 다면발현 효과(pleiotropic effect)가 있어 가려움증과 발적을 유발한다. 이러한 증상은 국소적이거나 전신적일 수 있다.

[0003] 비만 세포는 주로 피부, 기도 및 위장관과 같은 병원성 자극에 반복적으로 직면하는 조직에 존재한다. 일반적으로, 비만 세포는 항원/IgE 복합체, 보체 시스템의 단백질 또는 톨 유사 수용체 작용제(toll-like receptor agonists)에 의해 가교결합된 Fc γ 수용체와 같은 면역 신호에 의해 활성화된다. 비만 세포는 면역 매개체의 방대한 방출로 활성화에 반응한다. 비만 세포는 IgE-의존성 알레르기 반응에서의 역할로 가장 잘 알려져 있으며 탈과립(degranulation)과 같은 비만 세포 기능을 표적화 하는 것은 알레르기 반응과 관련된 가장 고통스러운 증상을 완화하는 데 도움이 될 수 있다.

[0004] 본 발명의 목적은 인간 또는 포유동물의 신체에 투여되는 알레르겐에 의해 유발되는 알레르기 반응을 예방 또는 치료하는 방법 및 수단을 제공하는 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 적어도 하나 이상의 식품 및/또는 흡입 알레르겐의 투여 또는 인간 또는 포유동물 신체에 대한 적어도 하나 이상의 약물의 전신 투여에 의해 야기된 알레르기 또는 알레르기 반응의 이료 또는 예방에 사용하기 위한 말초 혈액 단핵 세포(peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 세포 배양물의 상층액을 포함하는 조성물에 관한 것으로, 상기 PBMC는 배양 전 또는 배양 동안 이온화 방사선에 노출된다.

[0006] 놀랍게도, PBMC 배양물의 상층액은 인간 또는 포유동물에게 투여되는 식품 또는 흡입 알레르겐에 의해 야기되는 알레르기 및 알레르기 반응을 치료 또는 예방하는데 사용될 수 있음이 밝혀졌다. 게다가, 본 발명의 조성물은 또한 적어도 하나 이상의 알레르겐의 전신 투여에 의해 야기되는 알레르기 또는 알레르기 반응을 치료 또는 예방하는데 사용될 수 있다.

[0007] 오랫동안, 줄기세포-기반 치료법은 다양한 손상된 조직 및 기관의 재생을 위한 유망한 도구로 여겨져 왔다. 그 이후로 세포 자체가 아니라 분비 인자가 관찰된 재생 효과를 발휘한다는 보고를 통해 이 개념에 도전하는 수많은 연구가 있었다. 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)는 줄기 세포와 대조적으로 다양한 기능을 가진 세포 분비의 매력적이고 쉽게 접근할 수 있는 소스를 나타낸다. 면역 조절 효과는 바람직하게는 γ -조사된 PBMC(Aposec)의 분비물에 기인하지만, PBMC 배양물의 상층액이 특히 알레르겐을 유발할 때, 알레르기 반응 및 알레르기와 관련하여 유익한 효과를 나타낸다는 것은 놀라운 일이다.

[0008] 본 발명의 추가 양태는 본원에 정의된 바와 같이 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 인간 또는 포유동물 신체에 대한 적어도 하나 이상의 알레르겐의 흡수에 의해 야기되는 알레르기 또는 알레르기 반응을 치료 또는 예방하는 방법에 관한 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 양태는 하기 단계를 포함하는 적어도 하나 이상의 식품 및/또는 흡입 알레르겐의 투여 또는 인간 또는 포유동물 신체에 대한 적어도 하나 이상의 약물의 전신 투여에 유발된 알레르기 또는 알레르기 반응의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 본원에 정의된 바와 같은 조성물의 적합성을 결정하는 방법에 관한 것이다:

- [0010] a) 포유동물의 적어도 2개 이상의 피부 영역을 알레르겐과 접촉시키는 단계,
- [0011] b) 제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 정의된 조성물을 적어도 하나 이상의 상기 피부 영역에 투여하는 단계로서, 상기 적어도 하나 이상의 피부 영역은 상기 조성물로 치료되지 않고,
- [0012] c) 상기 알레르겐과 접촉된 피부 영역과 상기 알레르겐 및 상기 조성물과 접촉된 피부 영역과 비교하는 단계,
- [0013] d) 상기 영역들 사이에 차이점을 확인하는 단계, 및
- [0014] e) 상기 조성물이 상기 장애 또는 질병을 치료 또는 예방하기에 적합한지 여부를 결정하는 단계.

과제의 해결 수단

[0015] 본 발명은 적어도 하나 이상의 식품 및/또는 흡입 알레르겐의 투여 또는 인간 또는 포유동물의 신체에 대한 적어도 하나 이상의 약물의 전신 투여에 의해 야기되는 알레르기 또는 알레르기 반응의 치료 또는 예방에 사용하

기 위한 PBMC 세포 배양물의 상층액을 포함하는 조성물에 관한 것이다.

- [0016] 세포, 특히 포유동물 세포는 세포 배양 배지로 배양하는 동안 수많은 물질을 분비하는 것으로 알려져 있다. 이렇게 수득된 조절된 배양 배지는 다양한 질병 및 장애의 치료 및/또는 예방에 사용될 수 있다. 예를 들어, WO 2010/070105 및 WO 2010/079086은 PBMC의 배양에 의해 수득되고 다양한 염증 상태의 치료에 사용될 수 있는 조절된 배양 배지("상층액(supernatants)")를 기재한다. 따라서, 본원에 사용된 바와 같이, "말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 세포 배양물의 상층액(a supernatant of a peripheral blood mononuclear cell (PBMC) cell culture)"은 배양 배지에서 시험관 내에서 PBMC를 배양함으로써 얻을 수 있는 임의의 상층액을 의미한다. 배양 단계 후, 실질적으로 무-세포(cell-free), 바람직하게는 완전히 무-세포 상층액을 얻기 위해 배양된 PBMC를 배양 배지로부터 제거한다. 상기 PBMC 배양물의 상층액은 PBMC 및/또는 심지어 용해된 PBMC에 의해 생성 및 분비되는 물질을 배양 배지 성분 옆에 포함한다. "상층액(supernatant)"은 PBMC를 배양하여 얻을 수 있는 조절된 배양 배지와 상호 교환하여 사용할 수 있다.
- [0017] 본 발명의 상층액은 배양 전 또는 배양 중에 이온화 방사선을 받는 PBMC를 배양함으로써 얻을 수 있다. 상기 이온화 방사선은 바람직하게는 감마 방사선이다.
- [0018] 본원에 사용된 바와 같이, "적어도 하나 이상의 식품 및/또는 흡입 알레르겐 또는 적어도 하나 이상의 약물을 인간 또는 포유동물 신체에 전신 투여하는 것에 의해 야기되는 알레르기 또는 알레르기 반응(An allergy or an allergic reaction caused by the administration of at least one food and/or inhalation allergen or by the systemic administration of at least one drug to a human or mammal body)"은 식품 및/또는 흡입 알레르겐을 인간 또는 포유동물의 신체에 투여함으로써 야기되는 모든 이상반응을 의미한다. 식품 알레르겐은 일반적으로 인간 또는 포유동물 신체에 경구투여된다. 흡입 알레르겐은 전형적으로 코나 입을 통해 폐와 기도로 흡입함으로써 투여된다. 인간 및 포유동물 신체를 치료하는 데 사용되는 일부 약물은 일단 그러한 신체에 전신 투여되면 알레르기 반응을 일으킬 수 있다. 그러한 약물은 경구, 흡입, 비경구 또는 인간 또는 포유동물 신체에 대한 임의의 다른 투여 경로에 의해 투여되어 이러한 신체 내에서 약물의 전신 분포를 초래할 수 있다. 약물의 비경구 투여는 근육내, 복강내, 정맥내 및 기타 투여 경로를 포함할 수 있다. 피부에 약물 알레르겐 또는 기타 알레르겐을 국소 투여해도 전신 퍼짐이 발생하지 않으므로 인간 또는 포유동물 신체에 전신 투여가 발생한다.
- [0019] 인간 또는 포유동물의 신체에 투여될 때 알레르기 또는 알레르기 반응을 일으키는 알레르겐은 식품 알레르겐, 약물 알레르겐, 흡입 알레르겐(예를 들어, 꽃가루, 화학물질) 및 인간 또는 포유동물의 신체에 투여/도입되는 모든 종류의 알레르겐을 포함한다. 따라서, 상기 알레르겐이 예를 들어 혈류로 도입되는 경우, 인간 또는 포유동물의 신체에 알레르겐을 투여함으로써 야기되는 전형적인 알레르기 반응은, 콧물, 호흡 곤란, 메스꺼움, 설사, 코피, 귀 문제, 천명(wheezing), 기침 또는 아나필락시스(anaphylaxis)가 포함된다.
- [0020] 본원에 사용된 바와 같이, "알레르겐(allergen)"은 전형적으로 비만 세포로부터 히스타민의 과도한 방출을 야기하는 면역글로불린 E(IgE) 반응을 통해 인간 및/또는 포유동물 신체에서 과민 반응을 자극할 수 있는 항원을 의미한다. 상기 용어 "알레르겐(allergen)"은 - 알레르겐이 생물학적 기원이고 단백질 또는 폴리펩타이드인 경우 - 또한 이러한 단편이 인간 또는 포유동물 신체 내에서 히스타민의 방출과 관련하여 자연 발생 알레르겐과 유사한 효과를 나타낼 때 이러한 자연 발생 알레르겐의 단편이 포함된다.
- [0021] 본원에 사용된 바와 같이, 상기 용어 "예방하는(preventing)" 및 "예방(prevention)"은 본 발명에 따른 상층액의 투여로부터 야기하는 인간 및 포유동물 신체에서 알레르기 또는 이의 증상의 재발, 발병 및 발달의 예방 또는 억제를 의미한다. 일부 실시양태에서, "예방하는(preventing)" 및 "예방(prevention)"은 특정 알레르겐에 대한 알레르기가 발병할 위험의 감소를 의미한다. 상기 용어 "예방하는(preventing)"은 알레르기의 발생을 예방할 뿐만 아니라, 알레르기의 진행을 막고 일단 발병하면 그 결과를 감소시키기 위한 조치를 포함한다.
- [0022] 본원에 사용된 바와 같이, "치료(treatment)" 및 "치료하는(treating)"은 알레르기의 진행 및 기간의 감소 또는 억제, 상기 알레르기의 중증도 및 하나 이상의 이의 증상의 감소 또는 개선을 의미한다. "치료(treatment)"는 또한 알레르기 또는 알레르기 반응의 증상의 개선 및/또는 역전을 포함한다. 상기 용어 "치료(treatment)"는 치료적 치료 및 예방 조치를 모두 의미한다. 예를 들어, 본 발명의 조성물 및 방법으로 치료함으로써 이익을 얻을 수 있는 사람들은 이미 알레르기가 있는 사람과 알레르기를 예방해야 하는 사람을 포함한다.
- [0023] 본 발명의 다른 바람직한 실시양태에 따르면, 적어도 하나 이상의 알레르겐은 생물학적 또는 화학적 알레르겐이다.

- [0024] 생물학적 알레르겐은 식물, 동물(예를 들어, 곤충, 거미류) 또는 미생물(예를 들어, 곰팡이, 박테리아)과 같은 생물학적 시스템에서 유래된 알레르겐을 포함한다. 이러한 알레르겐은 대부분의 경우 단백질, 폴리펩티드 또는 펩티드이다.
- [0025] 생물학적 알레르겐은 당업계에 잘 알려져 있으며, 생물학적 알레르겐은 식물, 동물(예: 곤충, 거미류) 또는 미생물(예: 곰팡이, 박테리아)과 같은 생물학적 시스템에서 유래된 알레르겐을 포함한다. 이러한 알레르겐은 대부분의 경우 단백질, 폴리펩티드 또는 펩티드이다. 생물학적 알레르겐은 당업계에 잘 알려져 있으며 <http://www.allergen.org/> 또는 <http://www.allergome.org/>와 같은 다양한 데이터베이스에 공개되어 있다.
- [0026] 본 발명의 추가의 바람직한 실시양태에 따르면, 상기 생물학적 알레르겐은 동물 알레르겐, 식물 알레르겐, 곰팡이 알레르겐 또는 박테리아 알레르겐으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0027] 동물 알레르겐은 척추동물 및 무척추동물을 포함하는 동물에서 발견되는 하나 이상의 화합물을 포함하는 알레르겐이다. 혼합 알레르겐 조성물에 존재할 수 있는 척추동물 알레르겐은 계란 알레르겐, 예를 들어, nGal d 1 Ovomuroid, n Gal d 2 Ovalbumin, nGal d 3 Conalbumin, 계란 흰자 완전 알레르겐 등과 같은 조류 알레르겐; 우유 알레르겐, 예를 들어, nBos d 4 alpha-lactalbumin, nBos d 5 beta-lactoglobulin, nBos d 8 Casein, nBos d Lactoferrin, 우유 완전 알레르겐 등과 같은 포유동물 알레르겐; 예를 들어, rCyp c 1, rGad c 1, 대구 완전 알레르겐, 흰살 생선 알레르겐, 핑크 피쉬(pink fish) 알레르겐 등과 같은 어류 알레르겐을 포함한다. 혼합 알레르겐 조성물에 존재할 수 있는 무척추동물 알레르겐은 새우 알레르겐, 예를 들어, rPen a 1 tropomyosin, 새우 완전 알레르겐 등과 같은 갑각류 알레르겐; 예를 들어, 벌침 독 알레르겐(bee sting venom allergen), 말벌 침 독 알레르겐(wasp sting venom allergen), 모기 물림 알레르겐(mosquito bite allergen) 등과 같은 곤충 알레르겐; 등을 포함한다. 흡입성 동물 알레르겐에는 고양이 또는 개 털과 비듬, 바퀴벌레, 꽃받침 및 집먼지 진드기 배설물이 포함될 수 있다.
- [0028] 식물 알레르겐은 식물에서 발견되는 하나 이상의 화합물을 포함하는 알레르겐이다. 관심 식물 알레르겐은 다음을 포함한다: 밀 알레르겐, 예를 들어, rTri a 19 Omega-5 Gliadin, 밀 완전 알레르겐, 글리아딘 밀(gliadin wheat), rTri a 14 LTP 등; 키위 알레르겐, 예를 들어, rAct d 8 PR-10, 키위 완전 알레르겐 등; 셀러리 알레르겐, 예를 들어, rApi g 1.01 PR-10, rPhl p 12, 셀러리 완전 알레르겐, Bromelain의 CCD MUXF3 등; 대두 알레르겐, 예를 들어, rGly m 4 10 PR-10, 대두 완전 알레르겐, nGly m 5 Beta-conglycinin, nGly m 6 Glycinin 등; 핵과 알레르겐, 예를 들어, f419, f420, f421, f95, f242, o214 rPru p 1 PR-10, rPru p 3 LTP, 핵과 1차 완전 알레르겐(stone fruit primary complete allergen), Bromelain의 CCD MUXF3 등; 귀리 알레르겐, 예를 들어, 귀리 성분 알레르겐, 귀리 완전 알레르겐 등; 참깨 알레르겐, 예를 들어, 참깨씨 성분 알레르겐, 참깨 참조 완전 알레르겐 등. 식물 알레르겐은 꽃가루 알레르겐과 같은 흡입 알레르겐도 포함한다. 이러한 알레르겐은 자작나무 꽃가루 알레르겐(예를 들어, Bet v 1), 잔디 꽃가루 알레르겐(예를 들어, Phl p 1), 라이그래스(ryegrass) 및 티모시-풀 알레르겐(timothy-grass allergens)을 포함할 수 있다.
- [0029] 알레르겐은 천연 공급원으로부터 분리된 알레르겐 또는 재조합 또는 화학적으로 생성된 알레르겐을 포함한다.
- [0030] 본 발명의 다른 바람직한 실시양태에 따르면, 상기 PBMC 세포 배양물은 단핵구, T 세포, B 세포 및/또는 NK 세포를 포함한다.
- [0031] 본 발명의 추가 바람직한 실시양태에 따르면, 상기 PBMC 세포는 세포 성장 배지, 바람직하게는 CellGro 배지, 보다 바람직하게는 Cellgro GMP DC 배지, RPMI, DMEM, X-vivo 및 Ultraculture로 이루어진 그룹으로부터 선택된 세포 배양 배지에서 배양된다.
- [0032] 상기 PBMC 세포 배양물의 PBMC는 배양 전 또는 배양 동안 이온화 방사선에 노출된다. 이러한 스트레스 유도 조건 외에도 PBMC는 추가 스트레스를 받을 수 있다. 따라서, 본 발명의 바람직한 실시양태에 따르면, 상기 PBMC는 배양 전 또는 배양 동안 하나 이상의 추가 스트레스 유도 조건을 겪는다.
- [0033] 본원에 사용된 바와 같이, 상기 용어 “스트레스 유도 조건 하에서(under stress inducing conditions)”는 스트레스 받은 세포를 유도하는 배양 조건을 의미한다. 세포에 스트레스를 야기하는 조건은 열, 화학 물질, 방사선, 저산소증, 삼투압 등을 포함한다.
- [0034] 본 발명의 세포에 대한 추가적인 스트레스는 염증성 피부 상태, 특히 허혈과 관련된 피부 상태를 치료하는 데 유익한 물질의 발현 및 분비를 추가로 증가시킨다.
- [0035] 본 발명의 바람직한 실시양태에 따르면, 상기 스트레스 유도 조건은 저산소증, 오존, 열(예를 들어 2°C 이상,

바람직하게는 5℃ 이상, 보다 바람직하게는 10℃ 이상, PBMC의 최적 배양 온도, 즉 37℃보다 높음), 방사선(예를 들어, UV 방사선, 감마 방사선), 화학물질, 삼투압(즉, 체액, 특히 혈액에서 규칙적으로 발생하는 삼투 상태와 비교하여 적어도 10% 이상 상승된 삼투 상태) 또는 이들의 조합을 포함한다.

- [0036] 따라서, 본 발명의 추가 바람직한 실시양태에 따르면, 상기 스트레스 유도 조건은 UV 방사선, 저산소증, 오존, 열, 삼투압 및 pH 이동으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0037] 본 발명의 다른 바람직한 실시양태에 따르면, PMC는 적어도 10 Gy 이상, 바람직하게는 적어도 20 Gy 이상, 보다 바람직하게는 적어도 40 Gy 이상, 보다 바람직하게는 적어도 50 Gy 이상의 투여량에서 이온화 방사선, 바람직하게는 감마선에 노출된다.
- [0038] 본 발명의 바람직한 실시양태에 따르면, 상기 PBMC는 이의 상층액을 단리하기 전에 적어도 4시간 이상, 바람직하게는 적어도 6시간 이상, 보다 바람직하게는 적어도 12시간 이상 배양하였다.
- [0039] 본 발명의 바람직한 실시양태에 따르면, 본 발명의 조성물은 알레르기 반응의 발병 및/또는 적어도 하나 이상의 알레르겐에 노출되기 전, 동안 및/또는 후에 투여된다.
- [0040] 본 발명의 조성물은 알레르기 반응의 상이한 단계에서 또는 심지어 반응이 일어나기 전에 투여될 수 있다. 본 발명의 특히 바람직한 실시양태에서, 상기 조성물은 인간 또는 포유동물 신체가 알레르겐에 노출되기 전에 투여될 수 있다. 놀랍게도, 본 발명의 조성물은 항원 제시 세포에 대한 알레르겐 또는 이의 단편의 흡수를 방지할 수 있음이 밝혀졌다. 따라서, 그러한 흡수가 예방될 수 있다면, 상기 알레르겐 또는 이의 단편은 인간 또는 포유동물의 면역계에 제시되지 않을 것이다.
- [0041] 본 발명의 바람직한 실시양태에 따르면, 상기 PBMC 세포 배양물은 1×10^5 내지 1×10^8 PBMCs/ml, 바람직하게는 1×10^6 내지 1×10^7 PBMCs/ml, 보다 바람직하게는 2×10^6 내지 5×10^6 PBMCs/ml을 포함한다.
- [0042] PBMC를 배양하여 얻을 수 있는 상층액의 조성물은 세포 배양 배지 1ml당 일정량의 PBMC를 배양하면 유리한 특성을 나타내는 것으로 밝혀졌다.
- [0043] 본 발명의 다른 바람직한 실시양태에 따르면, 0.1 내지 5 ml 상층액/kg 체중, 바람직하게는 0.3 내지 3 ml/kg 체중, 보다 바람직하게는 0.5 내지 2 ml/kg 체중, 보다 바람직하게는 0.8 내지 1.2 ml/kg 체중을 인간 또는 포유동물 신체에 투여된다.
- [0044] 본 발명의 조성물은 알레르기 및 알레르기 반응을 치료 또는 예방하기에 충분한 양의 상층액을 포함한다. 상기 지시한 바와 같이 체중 kg당 투여되는 상층액의 부피는 상층액을 직접적으로 의미한다. 상기 부피가 너무 커서 인간 또는 포유동물의 신체에 투여할 수 없는 경우, 이 부피는 예를 들어 동결건조에 의해 감소될 수 있다. 따라서, 투여되는 본 발명의 조성물의 부피는 상기 상층액에 대해 나타난 것보다 더 낮을 수 있다. 당업자는 특정 투여 경로를 사용하여 투여될 수 있는 부피를 알고 있다.
- [0045] 본 발명의 바람직한 실시양태에 따르면, 상기 조성물은 흡입, 국소적으로, 경구적으로, 설하로, 구강으로, 피하로 또는 정맥 내로 투여된다.
- [0046] 본 발명의 조성물은 희석제, 안정화제, 담체 등과 같은 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함할 수 있다. 본 발명에 따른 제형의 투여량에 따라 각각의 성분을 포함한다. 이를 제조하는 방법은 당업자에게 잘 알려져 있다.
- [0047] 본 발명에 따른 조성물의 저장-수명(shelf-life)을 증가시키기 위해 상층액 또는 심지어 완전한 조성물이 동결건조될 수 있다. 이러한 제제를 동결건조시키는 방법은 당업자에게 잘 알려져 있다.
- [0048] 사용 전에 동결건조된 제제는 완충제, 안정화제, 염 등을 포함하는 물 또는 수용액과 접촉될 수 있다.
- [0049] 본 발명의 다른 바람직한 실시양태에 따르면, 상기 포유동물은 말, 개, 고양이 또는 낙타이다.
- [0050] 본 발명의 조성물은 임의의 종류의 포유동물을 치료하는데 사용될 수 있다. 그러나, 전술한 포유동물이 가장 바람직하다.
- [0051] 본 발명의 또 다른 양태는, 상기 정의된 바와 같이 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 인간 또는 포유동물 신체에 대한 적어도 하나 이상의 알레르겐의 흡수에 의해 야기되는 알레르기 또는 알레르기 반응을 치료 또는 예방하는 방법에 관한 것이다.
- [0052] 본 발명의 추가 양태는 하기 단계를 포함하는 적어도 하나 이상의 식품 및/또는 흡입 알레르겐의 투여 또는 인

간 또는 포유동물 신체에 대한 적어도 하나 이상의 약물의 전신 투여에 유발된 알레르기 또는 알레르기 반응의 치료 또는 예방에 사용하기 위해 상기 정의된 조성물의 적합성을 결정하는 방법에 관한 것이다:

- [0053] a) 포유동물의 적어도 2개 이상의 피부 영역을 알레르겐과 접촉시키는 단계,
 - [0054] b) 상기 정의된 바와 같이 조성물을 적어도 하나 이상의 상기 피부 영역에 투여하는 단계로서, 상기 적어도 하나 이상의 피부 영역은 상기 조성물로 치료되지 않고,
 - [0055] c) 상기 알레르겐과 접촉된 피부 영역과 상기 알레르겐 및 상기 조성물과 접촉된 피부 영역과 비교하는 단계,
 - [0056] d) 상기 영역들 사이에 차이점을 확인하는 단계, 및
 - [0057] e) 상기 조성물이 상기 장애 또는 질병을 치료 또는 예방하기에 적합한지 여부를 결정하는 단계.
- [0058] 본 발명의 조성물이 적어도 하나 이상의 식품 및/또는 흡입 알레르겐의 투여 또는 인간 또는 포유동물 신체에 대한 적어도 하나 이상의 약물의 전신 투여에 의해 야기된 알레르기 또는 알레르기 반응의 치료 또는 예방에 사용될 수 있는지 여부를 시험하기 위하여, 스크래치 분석(scratch assay)을 사용할 수 있다. 본 발명의 조성물이 미처리된 스크래치 사이트 또는 음성 대조군 조성물로 처리된 스크래치 사이트에 비해 상기 스트래치 사이트의 알레르기 반응을 감소시킬 수 있는 경우, 본 발명의 조성물은 이를 필요로 하는 인간 또는 포유동물 신체에 투여될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0059] 도 1은 MNCaposec이 1차 인간 비만 세포에 의한 화합물 48/80- 및 IgE/항-IgE-유도 매개체 방출을 방지하는 것을 나타낸다. 비만 세포 탈과립은 (A) 화합물 48/80 및 (B) 1차 인간 비만 세포의 IgE/항-IgE 자극 시 방출된 베타-헥사미니다제(beta-hexaminidase)에 의해 평가된다. 별표는 배지 대조군(CellGro)과 비교하여 Aposec의 p<.05를 나타낸다. 비만세포배지는 비만세포를 배양하는데 일상적으로 사용되는 배지(DMEM 단독)를 의미한다.
- 도 2는 PBMC 세크레툼 Aposec(PBMC secretome Aposec)이 DNFB-유도 과민증에서 귀 부종을 완화시키는 것을 나타낸다. 귀 두께는 DNFB 제시형 24시간 후 마이크로미터-보조 측정(micrometer-assisted measurements)에 의해 평가된다. p<0.05 Aposec 대 배지 대조군.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0060] 실시예 1: Aposec의 손상된 비만세포 탈과립
- [0061] 재료 및 방법
- [0062] Aposec 제조
- [0063] PBMC의 세크레툼(“Aposec”)은 Wagner T et al. (Sci Rep. 2018;8(1):18016)에 기재된 바와 같이 생성하였다. 간단히 말해서, PBMC는 Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare, USA)-보조 밀도 구배 원심분리에 의해 얻어지고, 2.5×10^7 cells/mL의 농도로 조정되었다. 이어서, 세포를 60 Gy 세슘 137 γ -조사(IBM 437C, Isotopen Diagnostik CIS GmbH, Germany)에 노출시키고, 페놀 레드-프리 CellGenix GMP DC 배지(CellGenix GmbH, 독일)에서 24±2시간 동안 배양하였다. 세포와 세포 파편을 원심분리에 의해 제거하고 상층액을 0.2 μ m 필터에 통과시켰다. 이전에 설명한 바와 같이(Haider T et al. Exp Neurol. 2015;267:230-42) Theraflex methylene blue 기술(MacoPharma, France)을 사용하고 동결건조 분말(25,000 Gy, Gammatro 1500, Mediscan, Austria)을 γ -조사하여 바이러스 제거를 수행하였다. 멸균 동결건조물은 -80°C에서 일상적으로 동결보존되었다.
- [0064] 1차 인간 비만 세포의 분리 및 시험관 내(in vitro) 유지
- [0065] 비만 세포 분리에 사용된 피부 및 피하 지방 조직은 복부 성형술을 받은 환자로부터 얻었다. 피하 조직과 그물 모양 진피를 제거하고 나머지 조직을 작은 조각으로 자르고 4°C에서 밤새 효소 소화(Bacillus polymyxa, Roche, Switzerland의 2.4U/mL dispase II)를 가했다. 상기 표피를 제거한 후, 진피 조직을 콜라게나제 I(Gibco, Thermo Fisher Scientific, USA)로 37°C에서 2시간 동안 소화시켰다. CD117⁺ 비만 세포는 제조업체가 제시한 바와 같이 자기 세포 분류 기술(magnetic cell sorting technology) (MACS System, Miltenyi Biotec, Germany)에 의해 강화되었다. 분리된 세포의 순도를 높이기 위해, 첫 번째 분리 실행에서 CD117⁺ 세포를 사용하여 분리 절차를 한 번 이상 반복하였다. CD117⁺ 비만 세포는 10%(vol/vol) 열-불활성화된 송아지 태아 혈청(둘 모두 Gibco),

1%(vol/vol) 페니실린/스트렙토마이신(Biochrom, 독일), 및 100ng/mL 재조합 인간 줄기 세포 인자(PeproTech, USA)가 보충된 DMEM에서 배양되었다.

[0066] 1차 인간 비만 세포의 화합물 48/80-유도된 탈과립화(Compound 48/80-induced degranulation)

[0067] 1차 인간 비만 세포를 상기 기재된 바와 같이 혈청 및 SCF로 보충된 착색된 pH 지시약 없이 50 μL DMEM의 평평한-바닥 96 웰 플레이트에 웰당 50,000 내지 100,000의 밀도로 시딩하였다. 세포를 50 μL Aposec 또는 50 μL 배지 대조군(CellGenix)으로 밤새 사전 처리하였다. 다음 날, 세포를 100 μL HEPES(N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethane sulfonic acid; Thermo Fisher Scientific)로 조심스럽게 세척하고, 50 μg/mL 화합물 48/80 (Sigma Aldrich, USA)을 함유하는 100 μL HEPES를 첨가하여 탈과립을 유도하였다. 자극되지 않은 대조군의 경우 HEPES가 추가되었다. 세포를 정상 주변 CO₂와 함께 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. 50 μL의 상층액을 분리하여 보존하고 세포를 100 μL 0.1% triton X-100(Sigma Aldrich)에 용해하였다.

[0068] 1차 인간 비만세포의 IgE/항-IgE-유도된 탈과립화

[0069] 1차 인간 비만 세포를 상기 기재된 바와 같이 혈청 및 SCF로 보충된 착색된 pH 지시약 없이 50 μL DMEM의 평평한 바닥 96 웰 플레이트에 웰당 50,000 내지 100,000의 밀도로 시딩하였다. 세포를 50 μL Aposec, 50 μL 배지 대조군(CellGenix) 또는 50 μL DMEM(비만 세포 배지)으로 전-처리하고 100 ng/mL 인간 IgE(골수종, Merck KGaA, 독일)로 밤새 추가로 자극하였다. 다음 날, 세포를 100 μL HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethane sulfonic acid; Thermo Fisher Scientific)로 조심스럽게 세척하고, 5 μg/mL 항-IgE 항체 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., USA)를 함유하는 100 μL HEPES를 첨가하여 탈과립을 유도하였다. 자극되지 않은 대조군의 경우 HEPES가 추가되었다. 세포를 정상 주변 CO₂와 함께 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. 50 μL의 상층액을 분리하여 보존하고 세포를 100 μL 0.1% triton X-100(Sigma Aldrich)에 용해하였다.

[0070] 베타-헥소사미니다제 분석(beta-hexosaminidase assay)용 시약

[0071] 50 μL 기질 용액을 50 μL 상층액 및 50 μL 트리톤-용해된 세포에 각각 첨가하고, 샘플을 90분 동안 주변 CO₂와 함께 37°C에서 배양하였다. 75 μL 정지 버퍼를 추가하였고 FIUOstar OPTIMA 소프트웨어(버전 1.20-0, BMG LABTECH)를 사용하여 플레이트-판독 광도계 LUMIstar OPTIMA Reader(BMG LABTECH, Ortenberg, Germany)에 의해 405 nm의 광학 밀도를 결정하였다.

[0072] 데이터 및 통계 분석

[0073] 방출된 베타-헥소사미니다제의 백분율은 다음 공식을 사용하여 계산된다:

$$\% = \frac{2 \times \text{상층액의 효소(enzyme in supernatant)}}{\frac{1}{2} \times \text{상층액의 효소} + 4 \times \text{세포 용해물의 효소(enzyme in cell lysate)}} \times 100$$

[0074]

[0075] 데이터는 기술 복제의 산술 수단과 평균의 표준 오차로 표시된다. 통계 분석은 두 그룹 Aposec 대 배지 대조군을 p<.05로 통계적으로 유의미한 것으로 비교하는 단측 t 검정(one-tailed t test)에 의해 수행되었다.

[0076] 결과

[0077] Aposec은 강제된 비만 세포 탈과립을 폐지하다.

[0078] Aposec이 비만세포 탈과립을 방지할 수 있는지 확인하기 위해, 비만 세포를 Aposec 또는 배지 대조군으로 전-처리하고 화합물 48/80 및 IgE/항-IgE로 자극한 후 1차 인간 비만 세포의 베타-헥소사미니다제 방출을 평가하였다. Aposec은 배지 대조군과 비교하여 화합물 48/80- 및 IgE/항-IgE-유도 매개체 방출을 모두 현저하게 방지하였다 (화합물 48/80 및 IgE/항-IgE 자극 후 각각 Aposec과 함께 27.9±3.6% 및 27.3±1.1% 방출된 β-헥소사미니다아제 대 대조군 배지에서 35.7±3.4% 및 36.7±3.1% 방출된 매개체, 둘 다 p<.05 aposec 대 컨트롤) (도 1). 대조적으로, 상기 대조군 배지는 비만 세포 배지와 비교하여 비만 세포 탈과립에 대한 영향을 나타내지 않았다[36.7±2.3 및 36.9±1.9는 각각 화합물 48/80 및 IgE/항-IgE 자극 후 비만 세포 배지와 함께 매개체를 방출하였다. (A) 및 (B)에서 p>.05 비만 세포 배지 대 배지 대조군].

[0079] 결론

[0080] 본 데이터는 Aposec이 화합물 48/80 및 IgE/항-IgE로 자극될 때 1차 인간 비만 세포에 의한 매개체 방출을 효과

적으로 방지한다는 것을 입증한다. 효소 방출은 화학적 자극 후 20% 이상 감소한 반면, IgE/항-IgE 처리 후 베타-헥소사미니다제 방출은 배지 대조군과 비교하여 Aposec에서 25% 이상 감소하였다. 종합하면, 이러한 데이터는 비만 세포 탈과립-매개된 알레르기 반응을 치료하기 위한 Aposec의 사용을 시사한다.

[0081] **실시예 2: 생체 내(*in vivo*) Aposec 적용에 의한 알레르기 과민증의 증상 완화**

[0082] 배경

[0083] 지난 수십 년 동안, 알레르기성 과민증 병리에 대한 광범위한 연구는 면역학적 반응에 대한 더 나은 이해에 기여하였다. 그러나, 복잡하고 다면적인 질병 병인은 효과적인 새로운 치료 중재의 개발에 대한 주요 장애물을 나타내며 임상 치료 옵션은 현재까지 제한되어 있다. Aposec의 강력한 항-염증 효과가 이전에 설명되었으므로, Aposec의 알레르기 과민증 관련 증상을 완화시키는 잠재력을 조사하였다.

[0084] 재료 및 방법

[0085] 마우스 모델(Mouse model)

[0086] 1-플루오로-2,4-디니트로벤젠(1-Fluoro-2,4-dinitrobenzene) (DNFB, Sigma-Aldrich)은 C57BL/6 마우스에서 염증 상태를 유도하는 알레르겐으로 작용하였다. 올리브 오일 중 20 μ L 0.25%(vol/vol) DNFB를 0일과 1일에 투여하였다. 귀는 매일 Aposec으로 처리되었고, 반대쪽 귀는 0일째부터 연속 6일 동안 비히클 배지를 받았다.

[0087] 마이크로메트릭 측정(Micrometric measurements)

[0088] DNFB 재-시험 24시간 후, 전자 디지털 마이크로미터(0-25mm, Marathon Management Inc, USA)를 사용하여 귀 두께를 평가하여, 귀의 바깥쪽 2/3의 두께를 측정하였다. 측정은 4회 수행되었다.

[0089] 통계 분석(Statistical analysis)

[0090] 데이터는 GraphPad Prism 6 소프트웨어(GraphPad Software Inc.)를 사용하여 통계적으로 평가되었다. Aposec 대 대조군 배지를 비교하기 위해 단측, 대응 t 검정(paired t test)을 수행하였다. 0.05 미만의 p-값은 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다. 데이터는 생물학적 복제의 산술 수단과 평균의 표준 오차로 표시된다.

[0091] 결과

[0092] Aposec은 알레르겐 유발 조직 팽창을 완화.

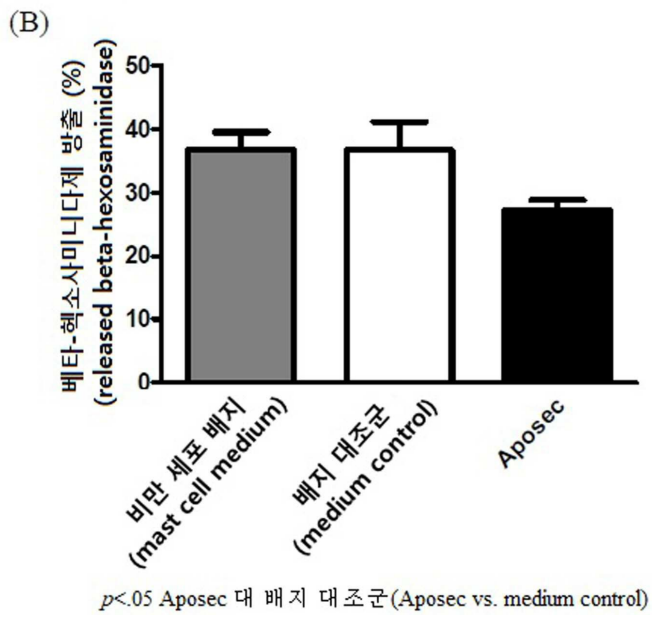
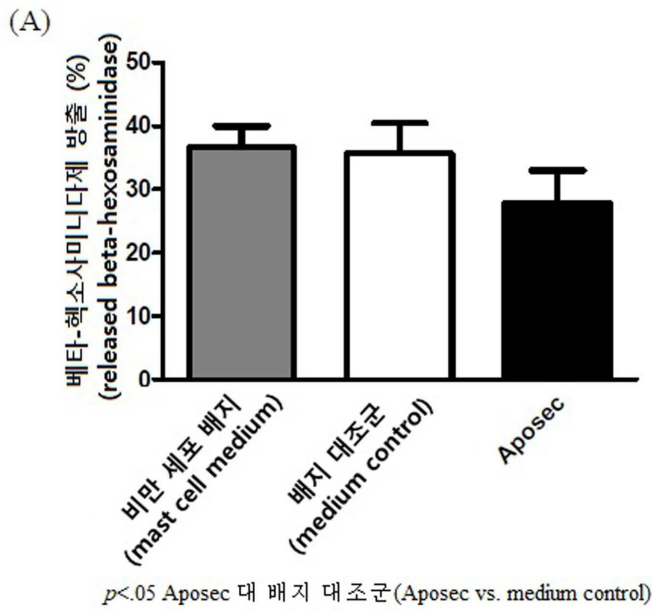
[0093] 무린 DNFB-유도 과민증(Murine DNFB-induced hypersensitivity)은 생체내 알레르기 반응에서 Aposec의 항염증 효과를 연구하기 위한 모델로 사용되었다. 면역 반응의 심각성을 반영하는 귀 팽창의 정도는 DNFB 재-노출 24시간 후 배지 대조군과 비교하여 Aposec에 의해 현저히 감소된 것으로 나타났다(베히클-처리된 귀의 두께 $553.9 \pm 12.7 \mu$ m 대 Aposec $472.4 \pm 47.3 \mu$ m, $p < .05$ Aposec 대 배지 대조군. 미처리대조군(naive) 귀: $355 \pm 12.7 \mu$ m 두께) (도 2).

[0094] 결론

[0095] 이러한 데이터는 Aposec의 적용이 알레르겐 재-노출 후 조직 팽창을 효과적으로 방지했음을 나타낸다. 이러한 발견은 Aposec이 알레르기 반응과 관련된 증상을 치료하는 유망한 후보임을 나타낸다.

도면

도면1



도면2

