(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0001172
(43) 공개일자 2024년01월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/28 (2015.01) *A61K 31/573* (2021.01)
A61P 31/12 (2006.01) *A61P 31/14* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 35/28 (2013.01)
A61K 31/573 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-7039592
(22) 출원일자(국제) 2022년04월22일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년11월16일
(86) 국제출원번호 PCT/IB2022/053763
(87) 국제공개번호 WO 2022/224207
국제공개일자 2022년10월27일
(30) 우선권주장
2021901214 2021년04월23일 오스트레일리아(AU)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
메조블라스트 인터내셔널 에스에이알엘
스위스 메이린 1217 루트 드 프리-보아 20
(72) 발명자
이메스쿠, 실비우
호주 빅토리아 3000 멜버른 콜린스 스트리트 55 씨/오 레벨 38
(74) 대리인
이처영, 장제환

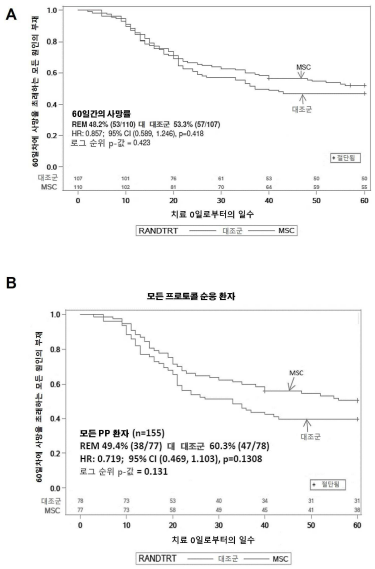
전체 청구항 수 : 총 43 항

(54) 발명의 명칭 **중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포를 이용하는 급성 호흡 곤란 증후군(ARDS)의 치료 방법**

(57) 요 약

본 개시는 이를 필요로 하는 대상체에서 급성 호흡 곤란 증후군(ARDS)을 치료 또는 예방하는 방법에 관한 것으로서, 이 방법은 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포(MLPSC)를 함유하는 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61P 31/12 (2018.01)
A61P 31/14 (2018.01)
A61K 2300/00 (2023.05)

(30) 우선권주장
2021902180 2021년07월15일 오스트레일리아(AU)
2022900260 2022년02월09일 오스트레일리아(AU)
2022900372 2022년02월18일 오스트레일리아(AU)

명 세 서

청구범위

청구항 1

치료 또는 예방을 필요로 하는 인간 대상체에서 급성 호흡 곤란 증후군(ARDS)을 치료 또는 예방하는 방법으로서, 상기 방법은 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포(MLPSC)를 함유하는 조성물 및 코르티코스테로이드를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 대상체가 65세 미만인, 방법.

청구항 3

치료 또는 예방을 필요로 하는 인간 대상체에서 급성 호흡 곤란 증후군(ARDS)을 치료 또는 예방하는 방법으로서, 상기 방법은 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포(MLPSC)를 함유하는 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하고, 상기 대상체는 65세 미만이고 코르티코스테로이드를 복용하고 있는, 방법.

청구항 4

치료 또는 예방을 필요로 하는 인간 대상체에서 급성 호흡 곤란 증후군(ARDS)을 치료 또는 예방하는 방법으로서, 상기 방법은 65세 미만인 ARDS를 앓고 있는 대상체를 선택하는 것, 및 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포(MLPSC)를 함유하는 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 5

청구항 1 내지 청구항 4 중 어느 한 항에 있어서, ARDS가 중등도 또는 중증인, 방법.

청구항 6

청구항 4에 있어서, 상기 방법은 코르티코스테로이드를 또한 복용하고 있는 대상체를 선택하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 7

청구항 3 내지 청구항 6 중 어느 한 항에 있어서, 코르티코스테로이드를 투여하는 것을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 8

청구항 1 내지 청구항 7 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체가 60세 미만인, 방법.

청구항 9

청구항 1 내지 청구항 3 또는 청구항 5 내지 청구항 7 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체가 18세 내지 65세 또는 18세 내지 60세인, 방법.

청구항 10

청구항 1 내지 청구항 3 또는 청구항 5 내지 청구항 9 중 어느 한 항에 있어서, 상기 코르티코스테로이드가 덱사메타손인, 방법.

청구항 11

청구항 1 내지 청구항 10 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ARDS가 바이러스 감염, 예를 들어 리노바이러스, 인플루엔자 바이러스, 호흡기 세포융합 바이러스(RSV) 또는 코로나바이러스에 의해 발생되는, 방법.

청구항 12

청구항 11에 있어서, 상기 바이러스 감염이 코로나바이러스에 의해 발생되는, 방법.

청구항 13

청구항 12에 있어서, 상기 코로나바이러스가 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스(SARS-CoV), 중동 호흡기 증후군 코로나바이러스(MERS-CoV) 또는 COVID-19인, 방법.

청구항 14

청구항 1 내지 청구항 13 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ARDS가 정맥 혈전증 또는 동맥 혈전증과 같은 혈전증에 의해 발생되는, 방법.

청구항 15

청구항 1 내지 청구항 14 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ARDS가 폐색전증에 의해 발생되는, 방법.

청구항 16

청구항 1 내지 청구항 15 중 어느 한 항에 있어서, 치료받은 대상체의 사망 위험이 치료 후에 감소되는, 방법.

청구항 17

청구항 1 내지 청구항 15 중 어느 한 항에 있어서, 치료받은 대상체의 사망 위험이 30 내지 60% 감소되는, 방법.

청구항 18

청구항 1 내지 청구항 15 중 어느 한 항에 있어서, 치료받은 대상체의 60일 생존율이 향상되는, 방법.

청구항 19

청구항 1 내지 청구항 18 중 어느 한 항에 있어서, 상기 MLPSC가 동결보존되고 해동된 것인, 방법.

청구항 20

청구항 1 내지 청구항 19 중 어느 한 항에 있어서, 상기 MLPSC가 중간 동결보존된 MLPSC의 집단으로부터 배양 증식된 것인, 방법.

청구항 21

청구항 20에 있어서, 상기 MLPSC가 적어도 약 5 계대 동안 배양 증식된 것인, 방법.

청구항 22

청구항 1 내지 청구항 21 중 어느 한 항에 있어서, 상기 MLPSC가 100만 MLPSC당 적어도 13 pg TNFR1을 발현하는, 방법.

청구항 23

청구항 1 내지 청구항 22 중 어느 한 항에 있어서, 상기 MLPSC가 100만 MLPSC당 약 13 pg 내지 약 44 pg TNFR1을 발현하는, 방법.

청구항 24

청구항 20 내지 청구항 23 중 어느 한 항에 있어서, 상기 배양 증식이 적어도 20 또는 30회의 집단 배증을 포함하는, 방법.

청구항 25

청구항 1 내지 청구항 24 중 어느 한 항에 있어서, 상기 MLPSC가 중간엽 줄기 세포(MSC)인, 방법.

청구항 26

청구항 1 내지 청구항 25 중 어느 한 항에 있어서, 상기 MLPSC가 동종이계인, 방법.

청구항 27

청구항 1 내지 청구항 26 중 어느 한 항에 있어서, 상기 MLPSC가 항바이러스 약물 또는 혈전 용해제를 운반하거나 발현하도록 변형되는, 방법.

청구항 28

청구항 1 내지 청구항 27 중 어느 한 항에 있어서, 용량당 1 x 10^7 내지 2 x 10^8 세포를 투여하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 29

청구항 1 내지 청구항 28 중 어느 한 항에 있어서, 용량당 약 1 x 10^8 세포를 투여하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 30

청구항 28 또는 청구항 29에 있어서, 상기 대상체가 2회 용량을 받는, 방법.

청구항 31

청구항 30에 있어서, 상기 대상체가 첫 번째 용량의 투여 후 7일 이내에 두 번째 용량을 받는, 방법.

청구항 32

청구항 31에 있어서, 상기 두 번째 용량이 첫 번째 용량 4일 후에 투여되는, 방법.

청구항 33

청구항 30 내지 청구항 32 중 어느 한 항에 있어서, 용량이 2 x 10^6 세포/체중 kg을 포함하는, 방법.

청구항 34

청구항 1 내지 청구항 33 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물이 플라즈마-라이트(Plasma-Lyte) A, 디메틸 설폭사이드(DMSO), 인간 혈청 알부민(HSA)을 추가로 함유하는, 방법.

청구항 35

청구항 1 내지 청구항 33 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물이 플라즈마-라이트 A(70%), DMSO(10%), HSA(25%) 용액을 추가로 함유하며, 상기 HSA 용액이 5% HSA 및 15% 완충액을 함유하는, 방법.

청구항 36

청구항 1 내지 청구항 35 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물이 6.68x10^6 초과의 생존 세포/mL를 함유하는, 방법.

청구항 37

청구항 1 내지 청구항 36 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체가 인공 호흡기를 착용하고 있는. 방법.

청구항 38

청구항 37에 있어서, 치료 후 대상체의 인공 호흡기가 제거되는, 방법.

청구항 39

청구항 38에 있어서, 치료 후 60일 이내에 대상체의 인공 호흡기가 제거되는, 방법.

청구항 40

청구항 1 내지 청구항 39 중 어느 한 항에 있어서, 치료가 기준선에 비해 적어도 하나의 염증성 바이오마커(들)의 수준을 감소시키며, 상기 적어도 하나의 바이오마커(들)가 다음을 나타내는, 방법:

(a) 폐로의 호중구 및 대식세포 유입 감소;

(b) 인플라마좀 감소;

(c) 대식세포 활성화 및 폐로의 호중구 이동 감소;

(d) T 세포 유입 및 활성화 감소; 또는

(e) 대식세포 및 호중구 염증의 순환 바이오마커 감소.

청구항 41

청구항 40에 있어서, 상기 염증성 바이오마커(들)이 다음 중 하나 이상인, 방법:

- CXCR3-결합 케모카인, 바람직하게는 CXCL10, 및/또는 CXCL9;

- CCR2-결합 케모카인, 바람직하게는 CCL2, CCL3, 및/또는 CCL7;

- IL-6;

- IL-8;

- TNF;

- IL-18;

- CCL19;

- IL-4;

- IL-13;

- GM-CSF;

- CRP; 또는

- 페리틴(Ferritin).

청구항 42

청구항 1 내지 청구항 41 중 어느 한 항에 있어서, 치료가 MLPSC를 투여한 후 3 내지 14일 이내에 CRP 및/또는 페리틴 수준을 감소시키는, 방법.

청구항 43

청구항 42에 있어서, 베를린 기준(Berlin criteria)에 의해 정의된 호흡 기능이 14일 및/또는 21일에 개선되는, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 개시는 이를 필요로 하는 대상체에서 급성 호흡 곤란 증후군(ARDS)을 치료 또는 예방하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 바이러스 감염과 같은 다양한 증상과 관련된 호흡기 질환은 일반 대중에게 문제가 되고 있다. 많은 경우에 염증이 동반되어, 폐의 상태를 악화시키고 급성 호흡 곤란 증후군(ARDS)을 초래할 수 있다.

[0003] 급성 호흡 곤란 증후군(ARDS)을 앓고 있는 환자의 경우, 특히 새로운 치료 옵션이 필요한 바이러스 감염에 이차

적인 경우에, 충족되지 않은 치료 욕구가 남아 있다.

발명의 내용

[0004] 본 발명자들은 ARDS에서 덱사메타손을 이용한 코르티코스테로이드 치료가, 특히 65세 미만의 환자에서, 사망에 대한 보호를 제공하지 않음을 밝혀냈다. 본 발명자들은 놀랍게도 MLPSC를 덱사메타손과 함께 투여함으로써 이러한 결함이 보완된다는 것을 확인하였다. 이러한 발견은 ARDS 환자를 코르티코스테로이드와 MLPSC로 치료함으로써, 특히 생존 가능성과 관련하여 ARDS 치료를 개선할 수 있음을 시사한다. 따라서, 첫 번째 예에서, 본 개시는 이를 필요로 하는 인간 대상체에서 급성 호흡 곤란 증후군(ARDS)을 치료 또는 예방하는 방법에 관한 것으로서, 이 방법은 코르티코스테로이드 및 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포(MLPSC)를 함유하는 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 일 예에서, 대상체는 65세 미만이다.

[0005] 본 발명자들은 또한 65세 미만의 급성 호흡 곤란 증후군(ARDS)을 앓는 대상체에게 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포(MLPSC)를 투여함으로써 이들 대상체를 치료하는 효과적인 방법을 확인하였다. 따라서, 다른 예에서, 본 개시는 이를 필요로 하는 인간 대상체에서 급성 호흡 곤란 증후군(ARDS)을 치료 또는 예방하는 방법에 관한 것으로서, 이 방법은 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포(MLPSC)를 함유하는 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하고, 여기서 대상체는 65세 미만이다. 일 예에서, 본 방법은 코르티코스테로이드를 투여하는 것을 추가로 포함한다.

[0006] 본 발명자들의 발견은 본 명세서에 개시된 방법에 따른 효과적인 치료를 위해 65세 미만의 대상체를 선택할 수 있음을 시사한다. 따라서, 일 예에서, 본 개시는 이를 필요로 하는 인간 대상체에서 급성 호흡 곤란 증후군(ARDS)을 치료 또는 예방하는 방법에 관한 것으로서, 이 방법은 65세 미만의 ARDS를 앓는 대상체를 선택하는 것, 및 대상체에게 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포(MLPSC)를 함유하는 조성물을 투여하는 것을 포함한다. 일 예에서, 65세 미만이고 코르티코스테로이드를 복용하고 있는 대상체를 선택한다.

[0007] 위의 예들에서, 대상체는 60세 미만일 수 있다. 다른 예에서, 대상체는 18세 내지 65세일 수 있다. 다른 예에서, 대상체는 18세 내지 60세일 수 있다.

[0008] 일 예에서, 대상체의 ARDS는 중등도 또는 중증이다.

[0009] 일 예에서, 상기 대상체는 본 명세서에 개시된 세포 조성물을 투여하기 전에 코르티코스테로이드를 복용하고 있다. 일 예에서, 코르티코스테로이드는 덱사메타손이다.

[0010] 일 예에서, 상기 대상체는 인공 호흡기를 착용하고 있다. 예를 들어, MLPSC를 투여하기 전에 대상체는 기계적으로 환기될 수 있다. 일 예에서, 치료 후 대상체의 인공 호흡기가 제거된다. 일 예에서, 치료 후 60일 이내에 대상체의 인공 호흡기가 제거된다.

[0011] 일 예에서, ARDS는 바이러스 감염에 의해 발생된다. 바이러스 감염은, 예를 들어, 리노바이러스, 인플루엔자 바이러스, 호흡기 세포융합 바이러스(RSV) 또는 코로나바이러스에 의해 발생될 수 있다.

[0012] 일 예에서, ARDS는 코로나바이러스 감염에 의해 발생된다. 코로나바이러스는, 예를 들어, 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스(SARS-CoV), 중동 호흡기 증후군 코로나바이러스(MERS-CoV), COVID-19, 229E, NL63, OC43, 또는 KHU1일 수 있다. 일 예에서, 코로나바이러스는 SARS-CoV, MERS-CoV 또는 COVID-19(SARS-CoV-2)이다.

[0013] 일 예에서, ARDS는 정맥 혈전증 또는 동맥 혈전증과 같은 혈전증에 의해 발생된다. 다른 예에서, ARDS는 폐색전증에 의해 발생된다.

[0014] 일 예에서, 치료받은 대상체의 사망 위험은 치료 후에 감소한다. 일 예에서, 치료받은 대상체의 사망 위험은 30 내지 60% 감소한다. 일 예에서, 치료받은 대상체는 60일 생존율이 향상된다.

[0015] 일 예에서, 생존율의 향상은 환기에 의한 생존 일수의 증가이다. 따라서, 일 예에서, 사망 위험의 감소는 기계적 환기의 도움 없이 호흡하는 대상체에서 결정된다.

[0016] 일 예에서, 본 개시에 따른 치료는 환기 없이 생존할 수 있는 일수를 증가시킨다. 일 예에서, 치료 후 60일째에 증가가 관찰된다.

[0017] 일 예에서, 치료는 호흡 기능을 개선시킨다. 일 예에서, 호흡 기능의 개선은 치료 후 7일, 14일, 21일, 및 30일 중 하나 이상 또는 모두에서 베를린 기준(Berlin criteria)에 의해 정의된 ARDS의 해소 및/또는 개선으로 정의된다. 일 예에서, 상기 개선은 7일째에 관찰된다. 일 예에서, 상기 개선은 14일째에 관찰된다. 예를 들어, 치료

는 14일 및/또는 21일에 베를린 기준에 의해 정의된 호흡 기능을 개선시킬 수 있다. 일 예에서, 개선된 호흡 기능은 기준선 호흡 기능에 비해 7일 이후에도 유지된다. 일 예에서, 개선된 호흡 기능은 기준선 호흡 기능에 비해 14일째에 유지된다.

[0018] 일 예에서, 치료는 임상 결과를 개선시킨다. 일 예에서, 임상 결과의 개선은 기준선과 7일, 14일, 21일, 30일 중 하나 이상 또는 모두 및 퇴원 시에 7점 순서 척도에 기초하여 평가된다.

[0019] 다른 예에서, 치료는 기준선에 비해 적어도 하나의 염증성 바이오마커(들)의 수준을 감소시키며, 여기서 적어도 하나의 염증성 바이오마커(들)는 다음을 나타낸다:

[0020] - 폐로의 호중구 및 대식세포 유입 감소;

[0021] - 인플라마좀 감소;

[0022] - 대식세포 활성화 및 폐로의 호중구 이동 감소;

[0023] - T 세포 유입 및 활성화 감소; 또는

[0024] - 대식세포 및 호중구 염증의 순환 바이오마커 감소.

[0025] 일 예에서, 염증성 바이오마커(들)는 다음 중 하나 이상이다:

[0026] - CXCR3-결합 케모카인, 바람직하게는 CXCL10, 및/또는 CXCL9;

[0027] - CCR2-결합 케모카인, 바람직하게는 CCL2, CCL3, 및/또는 CCL7;

[0028] - IL-6;

[0029] - IL-8;

[0030] - TNF;

[0031] - IL-18;

[0032] - CCL19;

[0033] - IL-4;

[0034] - IL-13;

[0035] - GM-CSF;

[0036] - CRP; 또는

[0037] - 페리틴.

[0038] 일 예에서, 치료는 MLPSC 투여 후 3 내지 14일 이내에 CRP 및/또는 페리틴 수준을 감소시킨다.

[0039] 일 예에서, MLPSC는 동결보존되고 해동된 것이다.

[0040] 일 예에서, MLPSC는 중간 동결보존된 MLPSC 집단으로부터 배양 증식된(culture expanded) 것이다. 다른 예에서, MLPSC는 적어도 약 5 계대 동안 배양 증식된다. 일 예에서, MLPSC는 100만 MLPSC당 적어도 13 pg TNF-R1을 발현한다. 일 예에서, MLPSC는 100만 MLPSC당 약 13 pg 내지 약 44 pg TNF-R1을 발현한다. 일 예에서, 배양 증식된 MLPSC는 적어도 20회의 집단 배증 동안 배양 증식된 것이다. 다른 예에서, 배양 증식된 MLPSC는 적어도 30회의 집단 배증 동안 배양 증식된다. 일 예에서, MLPSC는 중간엽 줄기 세포(MSC)이다. 다른 예에서, MLPSC는 동종이계이다. 예를 들어, MLPSC는 동종이계 MSC일 수 있다.

[0041] 다른 예에서, MLPSC는 항바이러스 약물 또는 혈전 용해제를 운반하거나 발현하도록 변형된다. 일 예에서, 항바이러스 약물은 렘데시비르(Remdesivir)이다. 일 예에서, 혈전 용해제는 에미나제(아니스트레플라제), 레타바제(레테플라제), 스트렙타제(스트렙토키나제, 카비키나제)로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0042] 다른 예에서, MLPSC는 항바이러스 펩티드 또는 이를 코딩하는 핵산을 발현하도록 유전적으로 변형된다.

[0043] 일 예에서, 조성물은 정맥내로 투여된다.

[0044] 일 예에서, 본 개시의 방법은 1×10^7 내지 2×10^8 세포를 투여하는 것을 포함한다. 예를 들어, 1×10^7 내지 2

x 10^8 세포의 다회 용량이 0일, 30일, 60일 및 90일에 투여될 수 있다. 일 예에서, 본 개시의 방법은 용량당 약 1 x 10^8 세포를 투여하는 것을 포함한다. 일 예에서, 대상체는 2회 용량을 투여받는다.

[0045] 일 예에서, 대상체는 첫 번째 용량의 투여 후 7일 이내에 두 번째 용량을 받는다. 일 예에서, 두 번째 용량은 첫 번째 용량 4일 후에 투여된다. 일 예에서, 용량은 2 x 10^6 세포/체중 kg을 포함한다.

[0046] 다른 예에서, 조성물은 플라즈마-라이트(Plasma-Lyte) A, 디메틸 설폭사이드(DMSO), 인간 혈청 알부민(HSA)을 추가로 함유한다. 일 예에서, 조성물은 플라즈마-라이트 A(70%), DMSO(10%), HSA(25%) 용액을 추가로 함유하며, HSA 용액은 5% HSA 및 15% 완충액을 함유한다.

[0047] 일 예에서, 조성물은 6.68x10^6 초과의 생존 세포/mL를 함유한다.

도면의 간단한 설명

[0048] **도 1:** 세포 치료제는 모든 환자에서 60일차 사망에 대해 어느 정도의 보호를 제공한다. A: 모든 치료 목적(intention to treat; ITT) 환자; B: 모든 프로토콜 순응(per protocol; PP) 환자.

도 2 : 세포 치료제는 <65세 환자에서 60일차 사망에 대한 보호를 제공한다. A: <65세 ITT 환자; B: ≥65세 ITT 환자.

도 3: 세포 치료제는 <65세 환자에서 60일차 사망에 대한 보호를 제공한다. A: <65세 PP 환자(n=123); B: ≥65세 PP 환자(n=94).

도 4: 세포 치료제는 기준선에서 덱사메타손을 투여받은 <60세의 ITT 및 PP 환자에서 60일차 사망을 초래하는 모든 원인에 대해 보호한다. A: ITT 환자; B: PP 환자.

도 5: 기준선에서의 덱사메타손은 대조군 환자의 60일차 사망에 대한 보호를 제공하지 않는다. A: <65세 ITT 환자; B: ≥65세 ITT 환자.

도 6 : 기준선에서의 덱사메타손은 <65세 환자에서 세포 치료제와 병용할 경우 60일차 사망에 대한 시너지적 보호를 제공한다. 또한, 세포 치료제 + 덱사메타손은 60일 간의 사망률 감소에서 다른 모든 치료군보다 우수하였다. A: ITT 환자; B: PP 환자; C: 덱사메타손을 복용 중인 치료받은 모든 <65세 환자(n=73).

도 7: 세포 치료제 + 덱사메타손: <65세의 탐구 집단에서 호흡 기능 및 임상 개선 분석. 무작위배정 후 7일, 14일, 21일, 및 30일에 베를린 기준에 의해 정의된 ARDS의 해소 및/또는 개선으로서 측정된 호흡 기능 개선; 임상 개선은 기준선과 7일, 14일, 21일, 30일 및 퇴원 시에 7점 순서 척도에 기초하여 평가되었다. A: 덱사메타손을 복용 중인 <65세 ITT 환자(n=73)의 호흡 기능 개선. B: 덱사메타손을 복용 중인 <65세 ITT 환자(n=73)의 임상 개선.

도 8: A: <65세 환자 및 B: ≥65세 환자의 호흡 기능 개선 분석. 무작위배정 후 7일, 14일, 21일, 및 30일에 베를린 기준에 의해 정의된 ARDS의 해소 및/또는 개선으로서 측정된 호흡 기능.

도 9 : 미리 지정된 <65세(n=123) 분석에서 세포 치료제는 90일 간의 사망률을 48% 감소시킨다.

도 10 : 세포 치료제는 <65세 환자에서 60일 동안 인공호흡기 없이 생존할 수 있는 일수를 증가시킨다. A) 치료받은 모든 <65세 환자(n=123). B) 덱사메타손을 복용 중인 치료받은 모든 <65세 환자(n=73).

도 11: A: 기준선과 3일, 7일 및 14일의 CRP 수준; B: 기준선과 3일, 7일 및 14일의 페리틴 수준 ; C: 기준선과 3일, 7일 및 14일의 D-이량체.

도 12: >65세 환자는 기준선 염증 수준이 더 높다. 데이터는 수준의 폴드 변화이다.

도 13: 연령대별 염증성 바이오마커 계층화 분석. 데이터는 기준선 대비 수준의 폴드 변화이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0049] 본 명세서 전반에 걸쳐, 특별히 달리 언급되지 않거나 문맥상 달리 요구하지 않는 한, 단일 단계, 물질 조성, 단계의 그룹 또는 물질 조성의 그룹에 대한 언급은 하나 및 복수(즉, 하나 또는 그 이상)의 이러한 단계, 물질 조성, 단계의 그룹 또는 물질 조성의 그룹을 포괄하는 것으로 간주되어야 한다.

[0050] 당업자는 본 명세서에 기술된 개시가 구체적으로 기술된 것 이외의 다른 변형 및 수정이 가능하다는 것을 이해할 것이다. 본 개시는 이러한 모든 변형 및 수정을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 본 개시는 또한 본 명세서에 개별적으로 또는 집합적으로 언급되거나 표시된 모든 단계, 특징, 조성물 및 화합물, 및 임의의 조합 및 모든 조합 또는 임의의 둘 또는 그 이상의 상기 단계 또는 특징을 포함한다.

[0051] 본 개시는 단지 예시의 목적으로 의도되는, 본 명세서에 기술된 특정 실시양태에 의해 그 범위가 제한되지 않는다. 기능적으로 동등한 생성물, 조성물 및 방법은, 본 명세서에 기술된 바와 같이, 명백히 본 개시의 범위 내에 있다.

[0052] 본 명세서에 개시된 임의의 예는 구체적으로 언급되지 않는 한 필요한 변경을 가하여 임의의 다른 예에 적용되는 것으로 간주되어야 한다.

[0053] 달리 구체적으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 당해 기술 분야(예를 들어, 세포 배양, 분자 유전학, 줄기 세포 치료, 면역학, 면역 조직 화학, 단백질 화학, 및 생화학)의 통상의 기술자가 일반적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는 것으로 간주되어야 한다.

[0054] 달리 명시되지 않는 한, 본 개시에서 활용되는 수술 기술은 당업자에게 잘 알려진 표준 절차이다.

[0055] 중간엽 계통 줄기 또는 전구체 세포 집단을 획득하고 농축하는 방법은 당해 기술 분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 중간엽 계통 줄기 또는 전구체 세포의 농축된 집단은 중간엽 계통 줄기 또는 전구체 세포에서 발현되는 세포 표면 마커의 사용에 기초하여 유세포 분석 및 세포 분류 절차를 사용하여 얻을 수 있다.

[0056] 본 명세서에 인용되거나 참조된 모든 문서, 및 본 명세서에 인용된 문서에 인용되거나 참조된 모든 문서는, 본 명세서에 언급되거나 또는 본 명세서에 참조로 포함된 임의의 문서에 언급된 임의의 제품에 대한 제조업체의 지침, 설명, 제품 사양, 및 제품 시트와 함께, 그 전체가 본 명세서에 참조로 포함된다.

[0057] 선택된 정의

[0058] 용어 "및/또는", 예를 들어 "X 및/또는 Y"는, "X 및 Y" 또는 "X 또는 Y" 중의 어느 하나를 의미하는 것으로 이해되어야 하며, 두 의미 모두 또는 두 의미 중의 어느 하나에 대해 명시적인 지원을 제공하는 것으로 간주되어야 할 것이다.

[0059] 본 명세서에서 사용된 용어 "약"은, 달리 명시되지 않는 한, 지정된 값의 +/- 10%, 보다 바람직하게는 +/- 5%를 의미한다.

[0060] 용어 "수준" 및 "양"은 세포 제제에서 특정 물질의 양을 정의하는 데 사용된다. 예를 들어, 특정 농도, 중량, 백분율(예를 들어, v/v%) 또는 비율을 사용하여 특정 물질의 수준을 정의할 수 있다. 일 예에서, 상기 수준은 배양 조건 하에서 본 개시의 세포에 의해 특정 마커가 얼마나 많이 발현되는지로 표현된다. 일 예에서, 발현은 세포 표면 발현을 나타낸다. 다른 예에서, 상기 수준은 배양 조건 하에서 본 명세서에 기술된 세포로부터 특정 마커가 얼마나 많이 방출되는지로 표현된다.

[0061] 일 예에서, 상기 수준은 pg/ml로 표현된다. 다른 예에서, 상기 수준은 10^6 세포당 pg로 표현된다. 필요한 경우 pg/ml 수준을 10^6 세포당 pg로 변환할 수 있다. 예를 들어, TNF-R1과 관련하여, 일 예에서, 200 pg/ml TNF-R1은 10^6 세포당 약 23.5 pg의 TNF-R1에 해당한다. 일 예에서, TNF-R1과 관련하여, 일 예에서, 225 pg/ml TNF-R1은 10^6 세포당 약 26.5 pg의 TNF-R1에 해당한다. 일 예에서, 230 pg/ml TNF-R1은 10^6 세포당 약 27 pg의 TNF-R1에 해당한다. 다른 예에서, 260 pg/ml TNF-R1은 10^6 세포 당 약 30 pg의 TNF-R1에 해당한다. 다른 예에서, 270 pg/ml TNF-R1은 10^6 세포 당 약 32 pg TNF-R1 등에 해당한다.

[0062] 일 예에서, 특정 마커의 수준은 배양 조건 하에서 결정된다. 용어 "배양 조건"은 배양에서 성장하는 세포를 지칭하는 데 사용된다. 일 예에서, 배양 조건은 활발하게 분열하는 세포 집단을 지칭한다. 이러한 세포는, 일 예에서, 기하급수적 성장 단계에 있을 수 있다. 예를 들어, 특정 마커의 수준은 세포 배양 배지의 샘플을 채취하고 샘플 내 마커의 수준을 측정하여 결정할 수 있다. 다른 예에서, 특정 마커의 수준은 세포의 샘플을 채취하고 세포 용해물 내 마커의 수준을 측정함으로써 결정할 수 있다. 당업자는 분비된 마커가 배양 배지를 샘플링함으로써 측정될 수 있는 반면, 세포 표면에 발현된 마커는 세포 용해물의 샘플을 평가함으로써 측정될 수 있다는 것을 이해할 것이다. 일 예에서, 세포가 기하급수적 성장 단계에 있을 때 샘플을 채취한다. 일 예에서, 적어도

배양 2일 후에 샘플을 채취한다.

[0063] 동결보존된 중간체로부터 세포를 배양 증식한다는 것은 극저온 동결된 세포를 해동하고 세포의 성장에 적합한 조건 하에서 *시험관 내* 배양하는 것을 의미한다.

[0064] 일 예에서, TNF-R1과 같은 특정 마커의 "수준" 또는 "양"은 세포를 동결보존한 다음 배양물에 다시 파종한(seeded back) 후에 결정된다. 예를 들어, 상기 수준은 세포의 첫 번째 동결보존 후에 결정된다. 다른 예에서, 상기 수준은 세포의 두 번째 동결보존 후에 결정된다. 예를 들어, 세포는 동결보존된 중간체로부터 배양 증식될 수 있고, 배양 조건 하에서 특정 마커의 수준이 결정될 수 있도록 배양물에 다시 파종되기 전에 두 번째로 동결보존될 수 있다.

[0065] 본 명세서 전반에 걸쳐, 단어 "포함하다(comprise)", 또는 "포함하다(comprises)" 또는 "포함하는(comprising)"과 같은 변형은 언급된 요소, 정수 또는 단계, 또는 요소, 정수 또는 단계의 그룹을 포함하는 것을 의미하지만, 다른 요소, 정수 또는 단계, 또는 요소, 정수 또는 단계의 그룹의 배제를 의미하지 않는 것으로 이해될 것이다.

[0066] 본 명세서에서 사용된 단수 형태 "a", "an" 및 "the"는 문맥상 달리 나타내지 않는 한 단수 및 복수 참조를 포함한다.

[0067] "단리된" 또는 "정제된"이란 자연 환경의 적어도 일부 구성요소로부터 분리된 세포를 의미한다. 이 용어에는 자연 환경으로부터 세포를 완전히 물리적으로 분리하는 것(예를 들어, 공여체로부터의 제거)이 포함된다. 용어 "단리된"은, 예를 들어, 해리에 의해 직접적으로 인접 세포와의 세포 관계가 변경되는 것을 포함한다. 용어 "단리된"은 조직 섹션에 있는 세포를 지칭하지 않는다. 세포 집단을 지칭하기 위해 사용되는 경우, 용어 "단리된"은 본 개시의 단리된 세포의 증식으로부터 생성된 세포 집단을 포함한다.

[0068] 용어 "계대(passage)", "계대배양(passaging)" 또는 "하위배양(sub-culture)"은 본 개시와 관련하여 세포 수가 지속적으로 증가할 수 있도록 세포를 생존시키고 연장된 기간 동안 배양 조건 하에서 성장시키는 데 이용되는 공지된 세포 배양 기술을 지칭하는 데 사용된다. 세포주를 하위배양하는 정도는 보통 "계대수(passage number)"로 표현되며, 이는 일반적으로 세포가 하위배양된 횟수를 지칭하는 데 사용된다. 일 예에서, 한 계대는 비부착성 세포를 제거하고 부착성 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포를 남기는 것을 포함한다. 그런 다음 이러한 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포를 (예를 들어, 트립신 또는 콜라게나제와 같은 프로테아제를 사용하여) 기질 또는 플라스크로부터 해리할 수 있고, 배지를 추가할 수 있으며, 임의선택적 세척(예를 들어, 원심분리에 의해)을 수행할 수 있고, 이어서 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 총 표면적이 더 큰 하나 이상의 배양 용기에 재배양되거나 재파종될 수 있다. 그 다음 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 배양에서 계속해서 증식될 수 있다. 다른 예에서, 비부착성 세포를 제거하는 방법에는 비효소 처리(예를 들어, EDTA 사용) 단계가 포함된다. 일 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 합류점 또는 그 근처(예를 들어, 약 75% 내지 약 95% 합류점)에서 계대배양된다. 일 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 약 10%, 약 15%, 또는 약 20% 세포/ml 배양 배지의 농도로 파종된다.

[0069] 본 개시와 관련하여 사용된 용어 "배지" 또는 "배지들"은 배양 시 세포를 둘러싸는 환경의 구성요소를 포함한다. 배지는 세포가 성장하도록 하기에 적합한 조건에 기여하고 및/또는 이러한 조건을 제공하는 것으로 예상된다. 배지는 고체, 액체, 기체 또는 상과 물질의 혼합물일 수 있다. 배지에는 액체 성장 배지뿐만 아니라 세포 성장을 유지하지 않는 액체 배지도 포함될 수 있다. 예시적인 기체 배지에는 페트리 접시 또는 다른 고체 또는 반고체 지지체에서 성장하는 세포가 노출되는 기체상이 포함된다.

[0070] 본 명세서에 사용된 용어 "치료하는", "치료하다" 또는 "치료"는 중간엽 계통 줄기 또는 전구체 세포 및/또는 이의 자손 및/또는 이로부터 유래된 가용성 인자의 집단을 투여함으로써 ARDS 중 적어도 하나의 증상을 감소시키거나 제거하는 것을 포함한다. 일 예에서, 치료는 배양 증식된 중간엽 계통 줄기 또는 전구체 세포 집단을 투여하는 것을 포함한다. 일 예에서, 치료 반응은 기준선에 대하여 결정된다. 일 예에서, 치료 반응은 대조군 환자 집단에 대하여 결정된다. 일 예에서, 치료는 대상체의 ARDS를 중증에서 중등도로 개선한다.

[0071] 일 예에서, 본 개시의 방법은 대상체의 질환 진행 또는 질환 합병증을 억제한다. 대상체의 질환 진행 또는 질환 합병증의 "억제"는 대상체의 질환 진행 및/또는 질환 합병증을 예방하거나 감소시키는 것을 의미한다. 따라서, 일 예에서, 본 개시의 방법은 ARDS 중증도의 진행을 억제한다.

[0072] 본 명세서에 사용된 용어 "예방하다" 또는 "예방하는"은 중간엽 계통 줄기 또는 전구체 세포 및/또는 이의 자손 및/또는 이로부터 유래된 가용성 인자의 집단을 투여함으로써 ARDS의 적어도 하나의 증상의 발생을 중지하거나

억제하는 것을 포함한다.

[0073] 본 명세서에 사용된 용어 "대상체"는 인간 대상체를 지칭한다. 예를 들어, 대상체는 성인일 수 있다. "대상체", "환자" 또는 "개체"와 같은 용어는, 문맥상, 본 개시에서 상호교환적으로 사용될 수 있는 용어이다.

[0074] 용어 "혈전증"은 혈전 또는 혈병의 형성을 지칭하기 위해 본 명세서에서 사용된다. 일 예에서, 혈전증은 동맥에서 혈병이 발생하는 "동맥 혈전증"이다. 이러한 혈병은 심장이나 뇌와 같은 주요 기관으로의 혈액 흐름을 방해할 수 있기 때문에 대상체에게 특히 위험한다. 일 예에서, 혈전증은 정맥에서 혈병이 발생하는 "정맥 혈전증"이다.

[0075] 용어 "폐색전증"은 신체의 다른 곳으로부터 혈류를 통해 이동한 물질에 의해 폐 동맥이 막히는 것을 지칭하기 위해 본 명세서에서 사용된다.

[0076] 본 명세서에 사용된 용어 "유전적으로 변형되지 않은"은 핵산을 이용한 형질감염에 의해 변형되지 않은 세포를 지칭한다. 의심을 피하기 위해, 본 개시의 맥락에서 Ang1을 코딩하는 핵산으로 형질감염된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 유전적으로 변형된 것으로 간주될 것이다.

[0077] "C-반응성 단백질" 또는 "CRP"는 급성 염증 재발 조건 하에서 수준이 상승하고 염증이 가라앉으면 빠르게 정상화되는 염증 매개체이다. 순환 CRP 수준은 혈장 샘플에서 측정하여 대상체의 염증 측정을 제공할 수 있다.

[0078] 용어 "총 용량"은 본 개시의 맥락에서 본 개시에 따라 치료된 대상체에 의해 수용된 세포의 총 수를 지칭하기 위해 사용된다. 일 예에서, 총 용량은 1회 세포 투여로 구성된다. 다른 예에서, 총 용량은 2회 세포 투여로 구성된다. 다른 예에서, 총 용량은 3회 세포 투여로 구성된다. 다른 예에서, 총 용량은 4회 이상의 세포 투여로 구성된다. 예를 들어, 총 용량은 2회 내지 4회 세포 투여로 구성될 수 있다.

[0079] 용어 "임상적으로 입증된"(독립적으로 사용되거나 또는 용어 "유효한"을 수정하기 위해 사용됨)은 미국 식품의약국, EMEA 또는 상응하는 국가 규제 기관의 승인 표준을 충족한 임상 시험을 통해 효능이 입증되었음을 의미할 것이다. 예를 들어, 임상 연구는 조성물의 효과를 임상적으로 입증하는 데 사용되는 적절한 규모의, 무작위, 이중 맹검 연구일 수 있다. 일 예에서, 임상적으로 입증된 유효량은 특정 엔드포인트(endpoint)를 충족하는 것으로 임상 시험에서 나타난 양이다. 일 예에서, 엔드포인트는 사망에 대한 보호이다.

[0080] 따라서, 용어 "임상적으로 입증된 효능" 및 "임상적으로 효과가 입증된"은 본 개시의 맥락에서 본 명세서에 개시된 용량, 투약 용법, 치료 또는 방법을 지칭하는 데 사용될 수 있다. 효능은 본 명세서에 개시된 조성물의 투여에 반응하는 질환의 경과 변화에 기초하여 측정될 수 있다. 예를 들어, 본 개시의 조성물은 ARDS의 중증도를 반영하는 적어도 하나의 지표의 개선, 바람직하게는 지속적인 개선을 유도하기에 충분한 양 및 시간으로 대상체에게 투여된다. 치료의 양과 시간이 충분한지를 결정하기 위해 ARDS의 중증도를 반영하는 다양한 지표를 평가할 수 있다. 이러한 지표에는, 예를 들어, 질환 중증도 또는 증상에 대해 임상적으로 인식된 지표가 포함된다. 일 예에서, 개선 정도는 징후, 증상, 또는 기타 테스트 결과에 기초하여 결정을 내릴 수 있는 의사에 의해 결정된다. 일 예에서, 임상적으로 입증된 유효량은 환자의 생존율을 향상시킨다. 다른 예에서, 임상적으로 입증된 유효량은 대상체의 사망 위험을 감소시킨다. 다른 예에서, 임상적으로 입증된 유효량은 대상체의 순환 CRP 수준을 감소시킨다.

[0081] 급성 호흡 곤란 증후군(ARDS)

[0082] 본 개시의 방법은 본 명세서에 개시된 조성물을 투여함으로써 급성 호흡 곤란 증후군(ARDS)을 치료하는 것에 관한 것이다. 일 예에서, 본 방법은 MLPSC를 함유하는 조성물을 투여하는 것을 포함한다. 따라서, 일 예에서, 본 조성물은 MSC를 함유할 수 있다. 일 예에서, 본 개시의 방법은 MLPSC를 함유하는 조성물과 같은 본 명세서에 개시된 세포 조성물, 및, 코르티코스테로이드를 투여하는 것을 포함한다. 이 예에서, 코르티코스테로이드는 세포 조성물과 동시에 또는 순차적으로 투여될 수 있다. 일 예에서, 대상체는 본 명세서에 개시된 세포 조성물을 투여하기 전에 이전에 코르티코스테로이드를 복용한 적이 있다. 이 예에서, 코르티코스테로이드는 세포 조성물과 함께 계속 투여될 수 있다.

[0083] 일 예에서, 코르티코스테로이드는 장시간 작용성 또는 중간 작용성(반감기 <36시간) 코르티코스테로이드이다. 일 예에서, 코르티코스테로이드는 장시간 작용성(반감기 36 내지 72시간)이다. 일 예에서, 코르티코스테로이드는 덱사메타손이다. 코르티코스테로이드의 다른 예로는 프레드니손과 메틸프레드니솔론이 있다.

[0084] 용어 "급성 호흡 곤란 증후군(ARDS)"은 폐의 광범위한 염증, 산소 공급 부족, 및 비순응성 또는 "뻣뻣한(stiff)" 폐를 특징으로 하는 호흡 부전의 일종이다. 이 장애는 일반적으로 모세혈관 내피 손상 및 미만성 폐포

손상과 관련이 있다.

[0085] 일 예에서, 본 개시의 방법은 경증 ARDS를 앓고 있는 대상체를 예방하거나 치료한다. 다른 예에서, 본 개시의 방법은 중등도 ARDS를 앓고 있는 대상체를 예방하거나 치료한다. 다른 예에서, 본 개시의 방법은 중증 ARDS를 앓고 있는 대상체를 예방하거나 치료한다. 다른 예에서, 본 개시의 방법은 중등도 또는 중증 ARDS를 앓고 있는 대상체를 예방하거나 치료한다. 일 예에서, 본 개시의 방법은 환기가 필요한 ARDS를 앓고 있는 대상체를 치료한다. 예를 들어, 대상체는 기계식 인공호흡기를 사용하고 있을 수 있다.

[0086] 일 예에서, ARDS의 중증도는 PaO2/FiO2 비에 따라 진단된다. 예를 들어, ARDS의 중증도는 다음: (경증: 26.6 kPa < PaO2/FiO2 ≤ 39.9 kPa; 중등도: 13.3 kPa < PaO2/FiO2 ≤ 26.6 kPa; 중증: PaO2/FiO2 ≤ 13.3 kPa)로 진단될 수 있다. 일 예에서, ARDS의 중증도는 아래 표에 요약된 베를린 정의에 따라 진단될 수 있다.

[0087]

타이밍	알려진 임상적 손상 또는 새로운/악화되는 호흡기 증상이 발생한 후 1주 이내.
흉부 영상	양쪽 불투명은 삼출로 충분히 설명되지 않는다. 엽성/폐 붕괴 또는 결절.
부종의 기원	호흡 부전은 심부전이나 체액 과부하로 충분히 설명되지 않는다.
	위험 인자가 없는 경우 정수압 부종을 배제하려면 객관적인 평가(예를 들어, 심장초음파 검사)가 필요하다.
산소화	경증—PEEP 또는 CPAP ≥ 5cm H_2O에서 26.6 kPa < PaO2/FiO2 ≤ 39.9 kPa 중등도—PEEP 또는 CPAP ≥ 5cm H_2O에서 13.3 kPa < PaO2/FiO2 ≤ 26.6 kPa. 중증—PEEP ≥ 5cm H_2O에서 PaO2/FiO2 ≤ 13.3 kPa.

[0088] 다른 예에서, ARDS의 중증도는 다음: 경증(PaO2/FiO2 200 내지 300 mmHg); 중등도(PaO2/FiO2 100 내지 200 mmHg); 중증(PaO2/FiO2 100 mmHg 미만)으로 진단될 수 있다.

[0089] 일 예에서, 중등도 내지 중증 ARDS를 앓고 있는 대상체의 순환 CRP 수준은 >4 mg/L이다.

[0090] 일 예에서, 본 개시의 방법에 따라 치료되는 대상체는 65세 미만이다. 다른 예에서, 대상체는 60세 미만이다. 일 예에서, 대상체는 적어도 18세이다. 일 예에서, 대상체는 18세 내지 65세이다. 다른 예에서, 대상체는 18세 내지 60세이다.

[0091] 다른 예에서, 본 개시의 방법에 따라 치료되는 대상체는 코르티코스테로이드를 복용하고 있다. 예를 들어, 대상체는 덱사메타손을 복용하고 있을 수 있다. 일 예에서, 대상체는 65세 미만이고 덱사메타손과 같은 코르티코스테로이드를 복용하고 있다. 일 예에서, 대상체는 60세 미만이고 덱사메타손과 같은 코르티코스테로이드를 복용하고 있다. 일 예에서, 코르티코스테로이드는 장기간 작용성 또는 중간 작용성(반감기 <36시간) 코르티코스테로이드이다. 일 예에서, 코르티코스테로이드는 장기간 작용성이다(반감기 36 내지 72시간). 일 예에서, 코르티코스테로이드는 덱사메타손이다. 코르티코스테로이드의 다른 예로는 프레드니손과 메틸프레드니솔론이 있다.

[0092] 다른 예에서, 본 개시의 방법은 본 명세서에 개시된 세포 조성물 및 코르티코스테로이드를 투여하는 것을 포함한다. 이 예에서, 코르티코스테로이드는 세포 조성물과 동시에 또는 순차적으로 투여될 수 있다. 일 예에서, 대상체는 본 명세서에 개시된 세포 조성물을 투여하기 전에 이전에 코르티코스테로이드를 복용한 적이 있다. 이 예에서, 코르티코스테로이드는 세포 조성물과 함께 계속 투여될 수 있다.

[0093] 일 예에서, 본 개시의 방법은 치료를 위해 65세 미만의 대상체를 선택하는 것을 포함한다. 다른 예에서, 본 개시의 방법은 치료를 위해 65세 미만이고 코르티코스테로이드를 복용하고 있는 대상체를 선택하는 것을 포함한다. 다른 예에서, 본 개시의 방법은 치료를 위해 65세 미만이고 복용하고 있는 대상체를 선택하는 것을

포함한다. 일 예에서, 대상체는, 예를 들어 대상체의 연령과 현재의 투약에 대해 묻는 치료 임상의로부터의 적절한 설문지 또는 일련의 질문에 기초하여 선택된다.

[0094] 본 개시에 따라 치료된 대상체는 ARDS를 나타내는 증상이 있을 수 있다. 대표적인 증상으로는 피로, 호흡 곤란, 숨가쁨, 운동 능력 저하 또는 무능력, 혈액이나 점액이 있거나 없는 기침, 숨을 들이쉬거나 내쉴 때의 통증, 천명음, 가슴 답답함, 설명할 수 없는 체중 감소, 근골격계 통증, 빠른 호흡(빈호흡), 및 푸른 빛을 띠는 피부 착색(청색증)이 포함될 수 있다.

[0095] 다른 예에서, 대상체는 폐렴을 앓고 있다.

[0096] 다른 예에서, 대상체는 바이러스 감염에 이차적인 ARDS를 앓고 있다. 일 예에서, 대상체 ARDS는 리노바이러스, 인플루엔자 바이러스, 호흡기 세포융합 바이러스(RSV) 또는 코로나바이러스 감염에 이차적으로 발생한다. 일 예에서, 대상체의 ARDS는 코로나바이러스 감염에 이차적으로 발생한다. 예를 들어, 대상체의 ARDS는 SARS-CoV, MERS-CoV 또는 COVID-19 감염에 이차적으로 발생할 수 있다.

[0097] 일 예에서, 대상체는 심근염, 심낭염, 또는 판막염 중 하나 이상을 앓고 있다. 일 예에서, 대상체는 바이러스 유발 심근염, 심낭염, 또는 판막염을 앓고 있다. 예를 들어, 대상체는 바이러스성 심근염을 앓을 수 있다.

[0098] 일 예에서, ARDS는 바이러스 감염에 의해 발생한다. 예를 들어, ARDS는 리노바이러스, 인플루엔자 바이러스, 호흡기 세포융합 바이러스(RSV) 또는 코로나바이러스에 의해 발생할 수 있다. 일 예에서, ARDS는 코로나바이러스에 의해 발생할 수 있다. 예를 들어, 코로나바이러스는 코로나바이러스(SARS-CoV), 중동 호흡기 증후군 코로나바이러스(MERS-CoV) 또는 COVID-19일 수 있다. 일 예에서, ARDS는 엡스타인-바 바이러스(EBV) 또는 단순 포진 바이러스(HSV)에 의해 발생한다.

[0099] 다른 예에서, ARDS는 혈전증으로 인해 발생한다. 다른 예에서, ARDS는 색전증으로 인해 발생한다. 일 예에서, ARDS는 폐색전증으로 인해 발생한다.

[0100] 다른 예에서, ARDS는 혈구탐식성 림프조직구증가증(HLH)에 이차적으로 발생한다. HLH는 림프구와 대식세포의 과다염증을 특징으로 하는 생명을 위협하는 질환이다. HLH는 EBV, CMV, HHV와 같은 바이러스 감염에 의해 유발될 수 있다. 따라서, 일 예에서, HLH는 이차적인 또는 획득된 HLH이다. 예를 들어, HLH는 바이러스 감염에 이차적으로 발생하여 대상체에서 ARDS가 발생할 수 있다.

[0101] 일 예에서, 치료는 사망으로부터 보호하거나 생존율을 향상시킨다. 일 예에서, 사망에 대한 보호는 치료 60일 후에 결정된다. 다른 예에서, 사망에 대한 보호는 치료 50 내지 70일 후에 결정된다. 예를 들어, 치료받은 대상체의 사망 위험은 치료 후에 감소될 수 있다. 일 예에서, 치료받은 대상체의 사망 위험은 30 내지 60% 감소된다. 일 예에서, 치료받은 대상체의 사망 위험은 40 내지 50% 감소된다. 일 예에서, 치료받은 대상체의 사망 위험은 적어도 30% 감소된다. 일 예에서, 치료받은 대상체의 사망 위험은 적어도 40% 감소된다.

[0102] 일 예에서, 본 개시의 방법에 따른 치료는 대상체의 혈전증 위험을 감소시킨다. 일 예에서, 치료를 받지 않은 대상체에 비해 대상체의 위험이 감소된다. 일 예에서, 치료는 동맥 혈전증인 혈전증의 위험을 감소시킨다. 따라서, 일 예에서, 치료는 ARDS를 앓고 있는 대상체에서 심장마비 또는 뇌졸중의 위험을 감소시킨다.

[0103] 일 예에서, 치료는 대상체의 CRP 수준을 감소시킨다. 일 예에서, 치료는 기준선과 비교하여 CRP를 적어도 100 mg/dl 감소시킨다. 다른 예에서, 치료는 기준선과 비교하여 CRP를 적어도 150 mg/dl 감소시킨다.

[0104] 일 예에서, 치료는 대상체의 순환 CRP 수준을 80 mg/dl 이하로 감소시킨다. 일 예에서, 치료는 대상체의 순환 CRP 수준을 60 mg/dl 이하로 감소시킨다. 다른 예에서, 치료는 대상체의 순환 CRP 수준을 50 mg/dl 이하로 감소시킨다. 다른 예에서, 치료는 대상체의 순환 CRP 수준을 CRP에 대해 CPR 30 mg/dl 이하로 감소시킨다. 다른 예에서, 치료는 대상체의 순환 CRP 수준을 CRP에 대해 CPR 40 mg/dl 이하로 감소시킨다. 다른 예에서, 치료는 대상체의 순환 CRP 수준을 20 mg/dl 이하로 감소시킨다. 다른 예에서, 치료는 대상체의 순환 CRP 수준을 10mg/dl 이하로 감소시킨다. 다른 예에서, 치료는 대상체의 순환 CRP 수준을 5 mg/dl 이하로 감소시킨다. 다른 예에서, 치료는 대상체의 순환 CRP 수준을 3 mg/dl 이하로 감소시킨다.

[0105] 다른 예에서, 치료는 CRP를 0.5 mg/dl 내지 30 mg/dl로 감소시킨다. 다른 예에서, 치료는 CRP를 0.5 mg/dl 내지 10 mg/dl로 감소시킨다. 일 예에서, 치료는 MLPSC 투여 후 3 내지 14일 이내에 CRP 및/또는 페리틴 수준을 감소시킨다.

[0106] 다른 예에서, 본 개시는 치료를 위해 ARDS를 앓고 있는 대상체를 선택하는 것을 포함한다. 일 예에서, 상기 대

상체는 중등도 또는 중증 ARDS를 앓고 있다. 일 예에서, 본 방법은 65세 미만의 ARDS를 앓고 있는 대상체를 선택하는 것을 포함한다. 일 예에서, 본 방법은 65세 미만이고 코르티코스테로이드를 복용하고 있는 대상체를 선택하는 것을 포함한다. 일 예에서, 선택된 대상체는 본 명세서에 개시된 방법에 따라 치료된다.

[0107] 염증성 바이오마커

[0108] 일 예에서, 치료는 대상체의 염증성 바이오마커(들) 수준(들)을 감소시킨다. 일 예에서, 염증성 바이오마커의 감소는 폐로의 호중구 및 대식세포 유입 감소를 나타내고, 예를 들면 CCL2, CCL3 및 CCL7과 같은 CCR2-결합 케모카인이다. 일 예에서, 대상체는 감소된 CCL2 수준을 갖는다. 다른 예에서, 대상체는 감소된 CCL3 수준을 갖는다. 다른 예에서, 대상체는 감소된 CCL7 수준을 갖는다. 다른 예에서, 염증성 바이오마커는 CXCL10 및 CXCL9와 같은 CXCR3-결합 케모카인이다. 예를 들어, 대상체는 감소된 CXCL10 수준을 갖는다. 다른 예에서는 대상체는 감소된 CXCL9 수준을 갖는다.

[0109] 다른 예에서, 염증성 바이오마커의 감소는 인플라마좀의 감소를 나타낸다. 인플라마좀은 자극에 의해 유도된 세포질 다량체 단백질 복합체이다. 다른 예에서, 염증성 바이오마커의 감소는 대식세포 활성화 및 폐로의 호중구 귀소 감소를 나타낸다. 인플라마좀 감소 및 감소 시 대식세포 활성화/폐로의 호중구 귀소 감소를 나타내는 염증성 바이오마커의 예로는 IL-6, IL-8, 종양괴사인자(TNF) 및 인터루킨-18(IL-18)이 있다. 일 예에서, 대상체는 감소된 IL-6 수준을 갖는다. 다른 예에서, 대상체는 감소된 IL-8 수준을 갖는다. 다른 예에서, 대상체는 감소된 TNF 수준을 갖는다. 다른 예에서, 대상체는 감소된 IL-18 수준을 갖는다.

[0110] 다른 예에서, 염증성 바이오마커의 감소는 감소된 T 세포 유입 및 활성화를 나타낸다. 감소 시 T 세포 유입 및 활성화 감소를 나타내는 염증성 바이오마커의 예로는 C-C 모티프 케모카인 리간드 19(CCL19), 인터루킨-4(IL-4) 인터루킨-13(IL-13), 및 과립구-대식세포 콜로니-자극 인자(GM-CSF)가 있다. 일 예에서, 대상체는 감소된 CCL19 수준을 갖는다. 다른 예에서, 대상체는 감소된 IL-4 수준을 갖는다. 다른 예에서, 대상체는 감소된 IL-13 수준을 갖는다. 다른 예에서, 대상체는 감소된 GM-CSF 수준을 갖는다.

[0111] 다른 예에서, 염증성 바이오마커의 감소는 대식세포 및 호중구 염증의 감소된 순환 바이오마커를 나타내고, 예를 들면, CRP, 페리틴, 또는 D-이량체이다. 일 예에서, 감소된 순환 바이오마커는 "C-반응성 단백질" 또는 "CRP"이다. CRP는 급성 염증 재발 조건 하에서 수준이 상승하고 염증이 가라앉으면 빠르게 정상화되는 염증 매개체이다. 순환 CRP 수준은 혈장 샘플에서 측정하여 대상체의 염증 측정을 제공할 수 있다.

[0112] 일 예에서, 치료는 대상체의 CRP 수준을 감소시킨다. 일 예에서, 치료는 기준선과 비교하여 CRP를 적어도 100 mg/dl 감소시킨다. 다른 예에서, 치료는 기준선과 비교하여 CRP를 적어도 150 mg/dl 감소시킨다. 일 예에서, 치료는 대상체의 CRP 수준을 약 0.1배 감소시킨다. 다른 예에서, 치료는 대상체의 CRP 수준을 약 0.2배 감소시킨다. 다른 예에서, 치료는 대상체의 CRP 수준을 약 0.3배 감소시킨다. 다른 예에서, 치료는 대상체의 CRP 수준을 약 0.4배 감소시킨다. 다른 예에서, 치료는 대상체의 CRP 수준을 약 0.5배 감소시킨다. 다른 예에서, 치료는 대상체의 CRP 수준을 0.6배 감소시킨다. 이들 예에서, 치료는 대상체의 기준선 CRP 수준에 비해 폴드 변화로 대상체의 CRP 수준을 감소시킨다.

[0113] 다른 예에서, 감소된 순환 바이오마커는 페리틴이다. 페리틴은 철분을 함유한 혈액 단백질이다. 페리틴 수준은 혈액 샘플에서 측정하여 대상체의 철분 수준의 측정을 제공할 수 있다. 일 예에서, 치료는 대상체의 페리틴 수준을 감소시킨다. 일 예에서, 치료는 대상체의 페리틴 수준을 약 0.1배 감소시킨다. 다른 예에서, 치료는 대상체의 페리틴 수준을 약 0.2배 감소시킨다. 다른 예에서, 치료는 대상체의 페리틴 수준을 약 0.3배 감소시킨다. 다른 예에서, 치료는 대상체의 페리틴 수준을 약 0.4배 감소시킨다. 다른 예에서, 치료는 대상체의 페리틴 수준을 약 0.5배 감소시킨다. 이들 예에서, 치료는 대상체의 기준선 페리틴 수준에 비해 폴드 변화로 대상체의 페리틴 수준을 감소시킨다.

[0114] 본 명세서에 개시된 염증성 바이오마커의 수준을 결정하는 방법은 당해 기술 분야에 공지되어 있다. 일 예에서, 특정 마커의 수준은 환자 또는 대상체로부터 얻어진 샘플(예를 들어, 혈액 샘플, 혈장 샘플, 또는 혈청 샘플)에서 결정된다. 예를 들어, 본 개시에 따른 염증성 바이오마커의 수준은 혈장 샘플에서 결정된다. 다른 예에서, 염증성 바이오마커의 수준은 혈청 샘플에서 결정된다.

[0115] 일 예에서, 염증성 바이오마커의 수준은 대상체로부터 얻은 샘플에서 단백질 발현 수준을 측정함으로써 결정된다. 예를 들면, 염증성 바이오마커 수준은 항체 기반 면역분석, 예컨대 효소 결합 면역흡착(ELISA) 분석, 다중 면역분석, 예를 들어 루미넥스(Luminex) 분석(예를 들어, Cook et al. Methods. 158: 27-32. 2019 참조), 또는 형광 비드 기반 면역분석을 사용하여 샘플에서 측정할 수 있다. 이들 예에서, 염증성 바이오마커의 수준은

pg/mL로 표현된다. 다른 예에서, 염증성 바이오마커의 수준은 적절한 대조군에 대한 폴드 변화로 표현된다. 다른 예에서, 염증성 바이오마커의 수준은 대상체로부터 얻은 샘플의 유전자 발현 수준을 측정함으로써 결정된다. 예를 들면, 염증성 바이오마커 수준은 분자 기반 분석, 예컨대 정성적 중합효소 연쇄 반응(PCR) 기반 분석, 또는 다중 PCR 분석, 예를 들어 루미넥스 분석(예를 들어, Cook et al. Methods. 158: 27-32. 2019 참조)을 사용하여 샘플에서 측정할 수 있다. 일 예에서, 염증성 바이오마커의 유전자 발현 수준은 적절한 대조군에 대한 폴드 변화로 표현된다. 예를 들면, 폴드 변화는 log2(fold-change)로 계산된다.

[0116] 일 예에서, 다중 염증성 바이오마커의 수준은 단일 샘플에서 측정된다. 다른 예에서, 다중 염증성 바이오마커의 수준은 별개의 샘플들에서 측정된다. 일 예에서, 바이오마커의 수준은 MLPSC로 치료하기 전에 측정된다. 다른 예에서, 바이오마커의 수준은 MLPSC로 치료한 후 측정된다. 다른 예에서, 바이오마커의 수준을 기준선에서 측정하고, 시간 경과에 따라 모니터링하여, 대상체에 더 많이 또는 더 장기간 투여할 필요가 있는지를 결정한다.

[0117] 염증성 바이오마커의 수준은 샘플 간 비교를 통해 염증성 바이오마커의 수준이 감소하였는지를 결정할 수 있다. 이들 예에서는, 샘플을 평가하여 염증이 감소하였는지와, 염증 감소가 지속되는지를 결정할 수 있다. 일 예에서, 염증의 지속적인 감소는 세포 치료제 투여 후 적어도 2개의 샘플에서 기준선으로부터 관찰된 염증 감소에 기초하여 결정된다.

[0118] 중간엽 계통 전구체

[0119] 본 명세서에 사용된 용어 "중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포(MLPSC)"는 다능성을 유지하면서 자가 재생하는 능력, 및 중간엽 기원, 예를 들어 골아세포, 연골세포, 지방세포, 스트로마 세포, 섬유아세포 및 힘줄, 또는 비중배엽 기원, 예를 들어 간세포, 신경 세포 및 상피 세포 중 어느 쪽의 다수의 세포 유형으로 분화하는 능력을 갖는 미분화된 다능성 세포를 지칭한다. 의심의 여지를 없애기 위해, "중간엽 계통 전구체 세포"는 뼈, 연골, 근육 및 지방 세포, 및 섬유성 결합 조직과 같은 중간엽 세포로 분화할 수 있는 세포를 지칭한다.

[0120] 용어 "중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포"는 부모세포 및 이들의 미분화 자손을 모두 포함한다. 이 용어에는 또한 중간엽 전구체 세포, 다능성 스트로마 세포, 중간엽 줄기 세포(MSC), 혈관주위 중간엽 전구체 세포, 및 이들의 미분화 자손도 포함된다.

[0121] 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 자가, 동종이계, 이종, 동계 또는 동종일 수 있다. 자가 세포는 재이식될 동일한 개체로부터 단리된다. 동종이계 세포는 동일한 종의 공여체로부터 단리된다. 이종 세포는 다른 종의 공여체로부터 단리된다. 동계 또는 동종 세포는, 쌍둥이, 클론, 또는 고도로 근친교배된 연구 동물 모델과 같은, 유전적으로 동일한 유기체로부터 단리된다.

[0122] 일 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 동종이계이다. 일 예에서, 동종이계 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 배양 증식되고 동결보존된다.

[0123] 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 주로 골수에 존재하지만, 예를 들어 제대혈 및 탯줄, 성인 말초 혈액, 지방 조직, 해면골 및 치수를 비롯한 다양한 숙주 조직에도 존재하는 것으로 나타났다. 이들은 또한 피부, 비장, 췌장, 뇌, 신장, 간, 심장, 망막, 뇌, 모낭, 장, 폐, 림프절, 흉선, 인대, 힘줄, 골격근, 진피, 및 골막에서도 발견되고; 중배엽 및/또는 내배엽 및/또는 외배엽과 같은 생식계열로 분화할 수 있다. 따라서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 지방, 뼈, 연골, 탄력, 근육, 및 섬유성 결합 조직을 포함하지만 이에 제한되지 않는 다수의 세포 유형으로 분화할 수 있다. 이들 세포가 진입하는 특정의 계통 결정 및 분화 경로는 기계적 영향 및/또는 내인성 생물 활성 인자, 예컨대 성장 인자, 사이토카인, 및/또는 숙주 조직에 의해 확립된 국소 미세환경 조건으로부터의 다양한 영향에 의존한다.

[0124] 용어 "농축된", "농축" 또는 이의 변형은 하나의 특정 세포 유형의 비율 또는 다수의 특정 세포 유형의 비율이, 치료되지 않은 세포(예를 들어, 고유 환경의 세포) 집단과 비교할 때, 증가된 세포 집단을 설명하기 위해 본 명세서에서 사용된다. 일 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포가 농축된 집단은 적어도 약 0.1% 또는 0.5% 또는 1% 또는 2% 또는 5% 또는 10% 또는 15% 또는 20% 또는 25% 또는 30% 또는 50% 또는 75% 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포를 포함한다. 이와 관련하여, 용어 "중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포가 농축된 세포 집단"은 용어 "X% 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포를 포함하는 세포 집단"에 대한 명시적인 지원을 제공하는 것으로 간주될 것이고, 여기서 X%는 본 명세서에서 인용된 백분율이다. 일부 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 클론 형성 콜로니를 형성할 수 있고, 예를 들어 CFU-F(섬유아세포) 또는 이의 서브세트(예를 들어, 50% 또는 60% 또는 70% 또는 70% 또는 90% 또는 95%)는 이러한 활성을 가질 수 있다.

[0125] 본 개시의 일 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 중간엽 줄기 세포(MSC)이다. MSC는 균질한 조성물

일 수 있거나 또는 MSC가 풍부한 혼합 세포 집단일 수 있다. 균질한 MSC 조성물은 부착성 골수 또는 골막 세포를 배양하여 얻을 수 있으며, 상기 MSC는 고유한 단일클론 항체로 식별되는 특정 세포 표면 마커로 식별될 수 있다. MSC가 풍부한 세포 집단을 얻는 방법은, 예를 들어 미국 특허 번호 5,486,359에 설명되어 있다. MSC의 대체 공급원에는 혈액, 피부, 제대혈, 근육, 지방, 뼈 및 연골막이 포함되지만 이에 제한되지 않는다. 일 예에서, 상기 MSC는 동종이계이다. 일 예에서, 상기 MSC는 동결보존된다. 일 예에서, 상기 MSC는 배양 증식되고 동결보존된다.

[0126] 다른 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 CD29+, CD54+, CD73+, CD90+, CD102+, CD105+, CD106+, CD166+, MHC1+ MSC이다.

[0127] 일 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 CD73, CD90, CD105 및 CD166을 비롯한 마커를 발현하고, CD45 및 CD31과 같은 조혈 세포 표면 항원의 발현이 결여된 MSC 집단으로부터 배양 증식된 것이다. 예를 들어, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 CD73+, CD90+, CD105+, CD166+, CD45- 및 CD31-인 MSC 집단으로부터 배양 증식될 수 있다. 일 예에서, MSC 집단은 추가로 낮은 수준의 주요 조직적합성 복합체(MHC) 클래스 I을 특징으로 한다. 다른 예에서, MSC는 주요 조직적합성 복합체 클래스 II 분자에 대해 음성이고, 공동자극 분자 CD40, CD80, 및 CD86에 대해 음성이다. 일 예에서, 배양 증식은 5 계대를 포함한다.

[0128] 일 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 CD105+, CD156+, 및 CD45-이다. 다른 예에서, 중간엽 계통 또는 전구체 세포는 또한 TNFR1을 발현하고 활성화된 림프구에서 IL-2Rα 발현을 억제한다.

[0129] 단리되거나 농축된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 배양에 의해 *시험관 내* 증식될 수 있다. 단리되거나 농축된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 동결보존, 해동 및 이후 배양에 의해 *시험관 내* 증식될 수 있다.

[0130] 일 예에서, 단리되거나 농축된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 배양 배지(무혈청 또는 혈청 보충됨), 예를 들어 5% 소 태아 혈청(FBS) 및 글루타민이 보충된 알파 최소 필수 배지(αMEM)에 50,000 생존 세포/cm^2로 파종하고, 37℃, 20% O_2에서 밤새 배양 용기에 부착되도록 한다. 배양 배지는 이후에 필요에 따라 교체 및/또는 변경하고 세포는 37℃, 5% O_2에서 추가로 68 내지 72시간 동안 배양한다.

[0131] 당업자에 의해 인지되는 바와 같이, 배양된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 *생체 내* 세포와 표현형이 상이하다. 예를 들어, 일 실시양태에서 이들은 다음 마커, CD44, NG2, DC146 및 CD140b 중 하나 이상을 발현한다. 배양된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 또한 *생체 내* 세포와 생물학적으로 다르며, *생체 내에서* 대부분 비순환성인(정지되어 있는) 세포에 비해 증식률이 더 높다.

[0132] 일 예에서, 상기 세포 집단은 선택 가능한 형태의 STRO-1+ 세포를 포함하는 세포 제제로부터 농축된다. 이와 관련하여, 용어 "선택 가능한 형태"는 세포가 STRO-1+ 세포의 선택을 허용하는 마커(예를 들어, 세포 표면 마커)를 발현한다는 것을 의미하는 것으로 이해될 것이다. 상기 마커는 STRO-1일 수 있지만 반드시 그럴 필요는 없다. 예를 들어, 본 명세서에 기재 및/또는 예시된 바와 같이, STRO-2 및/또는 STRO-3(TNAP) 및/또는 STRO-4 및/또는 VCAM-1 및/또는 CD146 및/또는 3G5를 발현하는 세포(예를 들어, 중간엽 전구체 세포)는 또한 STRO-1(및 STRO-1bright일 수 있음)을 발현한다. 따라서, 세포가 STRO-1+라는 표시는 세포가 STRO-1 발현에 의해서만 선택된다는 것을 의미하지 않는다. 일 예에서, 상기 세포는 적어도 STRO-3 발현에 기초하여 선택되며, 예를 들어 이는 STRO-3+(TNAP+)이다.

[0133] 세포 또는 이의 집단의 선택에 대한 언급은 반드시 특정 조직 공급원으로부터의 선택을 요구하지는 않는다. 본 명세서에 기재된 바와 같이 STRO-1+ 세포는 매우 다양한 공급원으로부터 선택되거나 단리되거나 농축될 수 있다. 즉, 일부 예에서, 이들 용어는 STRO-1+ 세포(예를 들어, 중간엽 전구체 세포)를 포함하는 임의의 조직 또는 혈관화된 조직 또는 혈관 주위 세포(예를 들어, STRO-1+ 혈관 주위 세포)를 포함하는 조직 또는 본 명세서에 인용된 조직 중 임의의 하나 이상으로부터의 선택에 대한 지원을 제공한다.

[0134] 일 예에서, 본 개시에 사용된 세포는 TNAP+, VCAM-1+, THY-1+, STRO-2+, STRO-4+(HSP-90β), CD45+, CD146+, 3G5+ 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 개별적으로 또는 집합적으로 선택된 하나 이상의 마커를 발현한다.

[0135] "개별적으로"는 본 개시가 언급된 마커 또는 마커 그룹을 별도로 포괄하고, 개별 마커 또는 마커 그룹이 본 명세서에 별도로 나열되지 않을 수 있음에도 불구하고, 첨부된 청구범위가 이러한 마커 또는 마커 그룹을 서로 별도로 그리고 나누어서 정의할 수 있음을 의미한다.

[0136] "집합적으로"는 본 개시가 인용된 마커 또는 마커 그룹의 임의의 수 또는 조합을 포괄하고, 이러한 마커 또는 마커 그룹의 수 또는 조합이 본 명세서에 구체적으로 나열되지 않을 수 있음에도 불구하고, 첨부된 청구범위가 임의의 다른 마커 조합 또는 마커 그룹과 별도로 그리고 나누어서 이러한 조합 또는 하위 조합을 정의할 수 있음을 의미한다.

[0137] 본 명세서에 사용된 용어 "TNAP"는 조직 비특이적 알칼리성 포스파타제의 모든 이소형을 포괄하는 것으로 의도된다. 예를 들어, 이 용어는 간 이소형(LAP), 뼈 이소형(BAP) 및 신장 이소형(KAP)을 포괄한다. 일 예에서, 상기 TNAP는 BAP이다. 일 예에서, 본 명세서에 사용된 TNAP는 기탁 수탁 번호 PTA-7282 하에 부다페스트 조약의 규정에 따라 2005년 12월 19일에 ATCC에 기탁된 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 STRO-3 항체에 결합할 수 있는 분자를 지칭한다.

[0138] 더욱이, 일 예에서, 상기 STRO-1+ 세포는 클론원성 CFU-F를 발생시킬 수 있다.

[0139] 일 예에서, 상당한 비율의 STRO-1+ 세포는 적어도 2개의 서로 다른 생식계열으로 분화할 수 있다. 상기 STRO-1+ 세포가 속할 수 있는 계통의 비제한적 예에는 뼈 전구체 세포; 담관 상피 세포 및 간세포에 대해 다능성인 간세포 전구세포; 희소돌기아교세포 및 성상세포로 진행하는 신경아교세포 전구체를 생성할 수 있는 신경 제한 세포; 뉴런으로 진행하는 뉴런 전구체; 심장 근육 및 심근 세포의 전구체, 포도당 반응성 인슐린 분비 췌장 베타 세포주가 있다. 다른 계통에는 상아모세포, 상아질 생성 세포 및 연골세포, 및 다음: 망막 색소 상피 세포, 섬유아세포, 각질 형성세포와 같은 피부 세포, 수지상 세포, 모낭 세포, 신관 상피 세포, 평활근 및 골격근 세포, 고환 전구세포, 혈관 내피 세포, 힘줄, 인대, 연골, 지방 세포, 섬유아세포, 골수 간질, 심장 근육, 평활근, 골격근, 혈관 주위 세포, 혈관, 상피, 신경아교세포, 신경 세포, 성상세포 및 희소돌기아교세포의 전구체 세포가 포함되나 이에 제한되지 않는다.

[0140] 일 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 단일 공여체로부터 얻거나, 또는 공여체 샘플 또는 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포가 후속적으로 풀링된(subsequently pooled) 다음 배양 증식되는 다중 공여체로부터 얻는다.

[0141] 본 개시에 포함된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 또한 대상체에게 투여하기 전에 동결보존될 수 있다. 일 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 배양 증식되고 대상체에게 투여되기 전에 동결보존된다.

[0142] 일 예에서, 본 개시는 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포뿐만 아니라 이의 자손, 이로부터 유래된 가용성 인자, 및/또는 이로부터 단리된 세포외 소포체를 포함한다. 다른 예에서, 본 개시는 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포뿐만 아니라 이로부터 단리된 세포외 소포체도 포함한다. 예를 들어, 세포외 소포체가 세포 배양 배지로 분비되기에 적합한 기간 동안과 적합한 조건 하에서, 본 개시의 중간엽 전구체 계통 또는 줄기 세포를 배양 증식하는 것이 가능하다. 분비된 세포외 소포체는 후속적으로 치료에 사용하기 위해 배양 배지로부터 얻을 수 있다.

[0143] 본 명세서에 사용된 용어 "세포외 소포체"는 세포로부터 자연적으로 방출되고 크기가 약 30 nm 내지 10 마이크론 만큼 큰 범위인 지질 입자를 지칭하지만, 전형적으로 이의 크기는 200 nm 미만이다. 이는 방출 세포(예를 들어, 중간엽 줄기 세포, STRO-1^{+} 세포)로부터의 세포 소기관, 대사산물, 지질, 핵산, 또는 단백질을 포함할 수 있다.

[0144] 본 명세서에 사용된 용어 "엑소좀"은 일반적으로 크기가 약 30 nm 내지 약 150 nm의 범위이고 포유동물 세포의 엔도좀 구획에서 유래하여 세포막으로 수송되어 방출되는 세포외 소포체의 유형을 지칭한다. 이는 핵산(예를 들어, RNA, 마이크로RNA), 단백질, 지질 및 대사산물을 포함할 수 있으며, 하나의 세포에서 분비되고 다른 세포에 흡수되어 이의 카고(cargo)를 전달함으로써 세포간 통신의 기능을 수행할 수 있다.

[0145] 세포의 배양 증식

[0146] 일 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 배양 증식된다. "배양 증식된" 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포 배지는 세포 배양 배지에서 배양되고 계대(즉, 하위배양)되었다는 점에서 방금(freshly) 단리된 세포와 구별된다. 일 예에서, 배양 증식된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 약 4 내지 10 계대 동안 배양 증식된다. 일 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10 계대 동안 배양 증식된다. 예를 들어, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 적어도 5 계대 동안 배양 증식될 수 있다. 일 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 적어도 5 내지 10계대 동안 배양 증식될 수 있다. 일 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 적어도 5 내지 8 계대 동안 배양 증식될 수 있다. 일

예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 적어도 5 내지 7 계대 동안 배양 증식될 수 있다. 일 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 10 초과의 계대 동안 배양 증식될 수 있다. 다른 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 7 초과의 계대 동안 배양 증식될 수 있다. 이들 예에서, 줄기 세포는 동결보존되기 전에 배양 증식되어 중간 동결보존된 MLPSC 집단을 제공할 수 있다. 일 예에서, 본 개시의 조성물은 중간 동결보존된 MLPSC 집단으로부터 제조된다. 예를 들어, 중간 동결보존된 MLPSC 집단은 아래에서 추가로 논의되는 바와 같이 투여 전에 추가로 배양 증식될 수 있다. 따라서, 일 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 배양 증식되고 동결보존된다. 이들 예의 실시양태에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 단일 공여체로부터 얻어지거나, 또는 공여체 샘플 또는 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포가 후속적으로 풀링된 다음 배양 증식되는 다중 공여체로부터 얻어질 수 있다. 일 예에서, 배양 증식 과정은 다음을 포함한다.

[0147] -i. 계대 증식에 의해 생존 세포의 수를 증식하여 적어도 약 10억 개의 생존 세포의 제제를 제공하는 단계로서, 상기 계대 증식은 단리된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포의 1차 배양물을 확립한 다음, 이전 배양물로부터 단리된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포의 제1 비-1차(P1) 배양물을 연속적으로 확립하는 것을 포함하는 단계;

[0148] -ii. 계대 증식에 의해 상기 단리된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포의 P1 배양물을 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포의 제2 비-1차(P2) 배양물로 증식시키는 단계; 및,

[0149] -iii. 상기 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포의 P2 배양물로부터 얻어지는 공정 중의 중간(in-process intermediate) 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포 제제를 제조하고 동결보존하는 단계; 및,

[0150] -iv. 상기 동결보존된 공정 중의 중간 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포 제제를 해동하고 계대 증식에 의해 상기 공정 중의 중간 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포 제제를 증식시키는 단계.

[0151] 일 예에서, 상기 증식된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포 제제는 다음을 포함하는 항원 프로파일 및 활성 프로파일을 갖는다.

[0152] -i. 약 0.75% 미만의 CD45+ 세포;

[0153] -ii. 적어도 약 95%의 CD105+ 세포;

[0154] -iii. 적어도 약 95%의 CD166+ 세포.

[0155] 일 예에서, 상기 증식된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포 제제는 CD3/CD28-활성화된 PBMC에 의한 IL2Ra 발현을 대조군에 비해 적어도 약 30% 억제할 수 있다.

[0156] 일 예에서, 배양 증식된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 약 4 내지 10 계대 동안 배양 증식되며, 여기서 상기 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 추가 배양 증식 전, 적어도 2 또는 3 계대 후에 동결보존된 것이다. 일 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5 계대 동안 배양 증식되고, 동결보존된 후, 투여전 또는 추가의 동결보관 전에 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5 계대 동안 추가로 배양 증식된다.

[0157] 일 예에서, 본 개시의 조성물에서 대부분의 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 대략 동일한 세대 수에 속한다(즉, 이들은 서로 약 1 또는 약 2 또는 약 3 또는 약 4의 세포 배증 이내임). 일 예에서, 본 조성물에서 평균 세포 배증 수는 약 20 내지 약 25 배증이다. 일 예에서, 본 조성물에서 평균 세포 배증 수는 1차 배양으로부터 발생하는 약 9 내지 약 13(예를 들어, 약 11 또는 약 11.2) 배증 + 계대당 약 1, 약 2, 약 3 또는 약 4 배증(예를 들어, 계대당 약 2.5 배증)이다. 본 조성물에서 예시적인 평균 세포 배증은, 각각 약 1, 약 2, 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 및 약 10 계대에 의해 생성될 때. 약 13.5, 약 16, 약 18.5, 약 21, 약 23.5, 약 26, 약 28.5, 약 31, 약 33.5, 및 약 36 중 어느 하나이다.

[0158] 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포 단리 및 *생체 외* 증식의 과정은 당해 기술 분야에 공지된 임의의 장비 및 세포 취급 방법을 이용하여 수행될 수 있다. 본 개시의 다양한 배양 증식의 실시양태는 세포의 조작을 필요로 하는 단계, 예를 들어 파종, 공급, 부착 배양물의 해리, 또는 세척 단계를 이용한다. 세포를 조작하는 임의의 단계는 세포를 손상시킬(insult) 가능성이 있다. 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 일반적으로 제조 중에 일정량의 손상을 견딜 수 있지만, 세포에 대한 손상을 최소화하면서 주어진 단계(들)를 적절하게 수행하는 절차 및/또는 장비를 취급함으로써 세포를 조작하는 것이 바람직하다.

[0159] 일 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 세포 공급원 백, 세척액 백, 재순환 세척 백, 입구 및 출구

포트가 있는 스피닝 멤브레인 필터, 여과액 백, 혼합 구역, 세척된 세포용 최종 생성물 백, 및 예를 들어, 본 명세서에 참고로 포함된 US 6,251,295에 설명된 바와 같은, 적절한 튜빙을 포함하는 장치에서 세척된다.

[0160] 일 예에서, 본 개시에 따른 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포 조성물은 CD105 양성 및 CD166 양성이고 CD45 음성임에 대하여 95% 균질하다. 일 예에서, 이러한 균질성은 *생체 외* 증식을 통해 지속되는데; 즉, 다중 집단 배증에도 불구하고 그러하다. 일 예에서, 본 조성물은 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포의 적어도 1회 치료 용량을 함유하고, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 약 1.25% 미만의 CD45+ 세포, 적어도 약 95%의 CD105+ 세포, 및 적어도 약 95%의 CD166+ 세포를 포함한다. 일 예에서, 이러한 균질성은 극저온 저장 및 해동 후에도 지속되며, 여기서 세포는 또한 일반적으로 약 70% 이상의 생존력을 갖는다.

[0161] 일 예에서, 본 개시의 조성물은 상당한 수준의 TNF-R1, 예를 들어 100만 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포당 13 pg 초과의 TNF-R1을 발현하는 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포를 함유한다. 일 예에서, 이 표현형은 *생체 외* 증식 및 극저온 저장 전반에 걸쳐 안정적이다. 일 예에서, 100만 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포당 약 13 내지 약 179 pg(예를 들어, 약 13 pg 내지 약 44 pg) 범위의 TNF-R1 수준의 발현은 *생체 외* 증식 및 동결보존을 통해서도 지속되는 바람직한 치료 잠재력과 연관되어 있다.

[0162] 일 예에서, 상기 배양 확정된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 종양 괴사 인자 수용체 1(TNF-R1)을 적어도 110 pg/ml의 양으로 발현한다. 예를 들어, 상기 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 TNF-R1을 적어도 150 pg/ml, 또는 적어도 200 pg/ml, 또는 적어도 250 pg/ml, 또는 적어도 300 pg/ml, 또는 적어도 320 pg/ml, 또는 적어도 330 pg/ml, 또는 적어도 340 pg/ml, 또는 적어도 350 pg/ml의 양으로 발현할 수 있다.

[0163] 일 예에서, 상기 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 TNF-R1을 적어도 13 pg/10^6 세포의 양으로 발현한다. 예를 들어, 상기 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 TNF-R1을 적어도 15 pg/10^6 세포, 또는 적어도 20 pg/10^6 세포, 또는 적어도 25 pg/10^6 세포, 또는 적어도 30 pg/10^6 세포, 또는 적어도 35 pg/10^6 세포, 또는 적어도 40 pg/10^6 세포, 또는 적어도 45 pg/10^6 세포, 또는 적어도 50 pg/10^6 세포의 양으로 발현한다.

[0164] 다른 예에서, 본 명세서에 개시된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 T 세포에서 IL-2Rα 발현을 억제한다. 일 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 IL-2Rα 발현을 적어도 약 30%, 대안적으로 적어도 약 35%, 대안적으로 적어도 약 40%, 대안적으로 적어도 약 45%, 대안적으로 적어도 약 50%, 대안적으로는 적어도 약 55%, 대안적으로는 적어도 약 60% 억제할 수 있다.

[0165] 일 예에서, 본 개시의 조성물은, 예를 들어 적어도 약 1억 세포 또는 약 1억 2500만 세포를 포함할 수 있는, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포의 적어도 1회 치료 용량을 함유한다.

[0166] 세포의 변형

[0167] 일 예에서, 본 개시의 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 투여 시 세포의 용해가 억제되는 방식으로 변경될 수 있다. 항원의 변경은 면역학적 무반응 또는 내성을 유도함으로써, 정상적인 면역 반응에서 외부 세포 거부의 궁극적인 책임이 있는 면역 반응의 이펙터 단계(effector phases)(예를 들어, 세포독성 T 세포 생성, 항체 생성 등)의 유도를 방지할 수 있다. 이 목표를 달성하기 위해 변경될 수 있는 항원에는, 예를 들어 MHC 클래스 I 항원, MHC 클래스 II 항원, LFA-3 및 ICAM-1이 포함된다.

[0168] 상기 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 또한 줄무늬 골격근 세포의 분화 및/또는 유지에 중요한 단백질을 발현하도록 유전적으로 변형될 수 있다. 예시적인 단백질에는 성장 인자(TGF-β, 인슐린 유사 성장 인자 1(IGF-1), FGF), 미오제닌 인자(예를 들어, myoD, 미오제닌, 미오제닌 인자 5(Myf5), 미오제닌 조절 인자(MRF)), 전사 인자(예를 들어, GATA-4), 사이토카인(예를 들어, 카디오트로핀-1), 뉴레귤린 계열 구성원(예를 들어, 뉴레귤린 1, 2 및 3) 및 호메오박스 유전자(예를 들어, Csx, tinman 및 NKx 계열)이 포함된다.

[0169] 본 개시의 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 또한 항바이러스제 또는 혈전 용해제를 운반하거나 발현하도록 변형될 수 있다. 일 예에서, 상기 작용제는 항바이러스 약물이다. 일 예에서, 상기 작용제는 항인플루엔자이다. 일 예에서, 상기 작용제는 항-SARS-CoV(예를 들어, SARS-Cov2)이다. 예시적인 작용제는 렘데시비르이다. 일 예에서, 상기 작용제는 혈전용해 약물이다. 혈전 용해제의 예로는 에미나제(아니스트렙라제), 레타바제(레테플라제), 스트렙타제(스트렙토키나제, 카비키나제)가 있다. 일 예에서, 혈전 용해제는 헤파린이다.

[0170] 본 개시의 중간엽 전구체 또는 줄기 세포는 항바이러스제 또는 혈전 용해제가 세포에 의해 흡수될 수 있도록 충분한 시간 동안 및 충분한 조건 하에서 상기 작용제와 함께 세포를 배양함으로써 상기 작용제를 운반하도록 변

형될 수 있다. 일 예에서, 항바이러스제 또는 혈전 용해제는 본 명세서에 개시된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포의 배양 배지에 첨가된다. 예를 들어, 본 명세서에 개시된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 항바이러스제 또는 혈전 용해제를 포함하는 배양 배지에서 배양 증식될 수 있다.

[0171] 다른 예에서, 항바이러스제 또는 혈전 용해제는 펩티드이다. 일 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 항바이러스성 또는 혈전용해성 펩티드 또는 이를 코딩하는 핵산을 발현하도록 유전적으로 변형된다. 일 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 *시험관 내* 바이러스 벡터와의 접촉을 통해 변형된다. 예를 들어, 바이러스를 세포 배양 배지에 첨가할 수 있다. 비바이러스성 유전자 변형 방법도 이용될 수 있다. 이의 예로는 인테그라제 또는 트랜스포사제 기술, 리포좀 또는 단백질 형질도입 도메인 매개된 전달 및 전기천공과 같은 물리적 방법의 사용을 통한 표적 유전자 통합 적용 및 플라스미드 전달이 포함된다.

[0172] 유전자 변형의 효율성은 100%인 경우가 거의 없으며, 성공적으로 변형된 세포 집단을 풍부하게 하는 것이 통상적으로 바람직한다. 일 예에서, 새로운 유전자형의 기능적 특징을 활용하여 변형된 세포를 풍부하게 할 수 있다. 변형된 세포를 풍부하게 하는 한 가지 예시적인 방법은 선택 가능하거나 스크리닝 가능한 마커 유전자를 사용하는 양성 선택이다. "마커 유전자"는 마커 유전자를 발현하는 세포에 별개의 표현형을 부여하여 이러한 형질전환된 세포가 마커를 갖지 않는 세포와 구별되게 하는 유전자를 지칭한다. 선택 가능한 마커 유전자는 선택적 작용제(예를 들어, 항생제)에 대한 내성에 기초하여 "선택"할 수 있는 형질을 부여한다. 스크리닝 가능한 마커 유전자(또는 리포터 유전자)는 관찰 또는 테스트, 즉 "스크리닝"을 통해 식별할 수 있는 형질을 부여한다(예를 들어, β-글루쿠로니다제, 루시퍼라제, GFP 또는 형질전환되지 않은 세포에 존재하지 않는 기타 효소 활성). 일 예에서, 유전적으로 변형된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 네오마이신과 같은 약물에 대한 내성 또는 lacZ의 발현을 기반으로 한 비색 선택에 기초하여 선택된다.

[0173] 본 개시의 조성물

[0174] 본 개시의 일 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포 및/또는 이의 자손 및/또는 이로부터 유래된 가용성 인자는 조성물의 형태로 투여된다. 일 예에서, 이러한 조성물은 약제학적으로 허용되는 담지체 및/또는 부형제를 함유한다. 따라서, 일 예에서, 본 개시의 조성물은 배양 증식된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포를 함유할 수 있다.

[0175] 용어 "담지체" 및 "부형제"는 활성 화합물의 저장, 투여, 및/또는 생물학적 활성을 촉진하기 위해 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 물질의 조성물을 지칭한다(예를 들어, Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Ed., Mac Publishing Company (1980) 참조). 담지체는 또한 활성 화합물의 임의의 바람직하지 않은 부작용을 감소시킬 수 있다. 적합한 담지체는, 예를 들어 안정한 것, 예를 들어 담지체 내의 다른 성분과 반응할 수 없는 것이다. 일 예에서, 담지체는 치료에 사용되는 용량과 농도에서 수용자에게 심각한 국소 또는 전신 부작용을 일으키지 않는다.

[0176] 본 개시에 적합한 담지체는 통상적으로 사용되는 것들을 포함하며, 예를 들어 물, 식염수, 수성 덱스트로스, 락토스, 링거액, 완충 용액, 히알루로난 및 글리콜이, 특히 (등장성인 경우) 용액에 대해 예시적인 액체 담지체이다. 적합한 약제학적 담지체 및 부형제는 전분, 셀룰로스, 글루코스, 락토스, 수크로스, 젤라틴, 맥아, 쌀, 밀가루, 백악, 실리카겔, 스테아르산마그네슘, 스테아르산나트륨, 글리세롤 모노스테아레이트, 염화나트륨, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 물, 에탄올, 등을 포함한다.

[0177] 다른 예에서, 담지체는, 예를 들어 세포가 성장하거나 현탁되는 배지 조성물이다. 예를 들어, 이러한 배지 조성물은 이것이 투여되는 대상체에서 어떠한 부작용도 유발하지 않는다.

[0178] 예시적인 담지체 및 부형제는 세포의 생존력 및/또는 대사 증후군 및/또는 비만을 감소, 예방 또는 지연시키는 세포의 능력에 악영향을 미치지 않는다.

[0179] 일 예에서, 담지체 또는 부형제는 완충 활성을 제공하여 세포 및/또는 가용성 인자를 적합한 pH에서 유지함으로써 생물학적 활성을 발휘하며, 예를 들어 담지체 또는 부형제는 인산염 완충 식염수(PBS)이다. PBS는 세포 및 인자와 최소한으로 상호작용하고 세포 및 인자의 신속한 방출을 허용하기 때문에 매력적인 담지체 또는 부형제를 대표하는데, 이러한 경우 본 개시의 조성물은, 예를 들어 주사에 의해 혈류에, 또는 조직 또는 조직을 둘러싸거나 이에 인접한 영역으로 직접 적용하기 위한 액체로서 생성될 수 있다.

[0180] 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포 및/또는 이의 자손 및/또는 이로부터 유래된 가용성 인자는 또한 수용자에게 적합하고 수용자에게 해롭지 않은 생성물로 분해되는 스캐폴드 내에 통합되거나 봉입될 수 있다. 이러한 스캐폴드는 수용자 대상체에게 이식될 세포를 지원하고 보호한다. 천연 및/또는 합성 생분해성 스캐폴드가 이러한

스캐폴드의 예이다.

[0181] 다양한 상이한 스캐폴드가 본 개시의 실시에 성공적으로 사용될 수 있다. 예시적인 스캐폴드에는 생물학적, 분해성 스캐폴드가 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 천연 생분해성 스캐폴드에는 콜라겐, 피브로넥틴, 및 라미닌 스캐폴드가 포함된다. 세포 이식 스캐폴드에 적합한 합성 물질은 광범위한 세포 성장과 세포 기능을 지원할 수 있어야 한다. 이러한 스캐폴드는 또한 재흡수될 수도 있다. 적합한 스캐폴드는 폴리글리콜산 스캐폴드(예를 들어, Vacanti, et al. J. Ped. Surg. 23:3-9 1988; Cima, et al. Biotechnol. Bioeng. 38:145 1991; Vacanti, et al. Plast. Reconstr. Surg. 88:753-9 1991에 기술된 바와 같음); 또는 폴리무수물, 폴리오르토에스테르, 및 폴리락트산과 같은 합성 중합체를 포함한다.

[0182] 다른 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포 및/또는 이의 자손 및/또는 이로부터 유래된 가용성 인자는 겔 스캐폴드(예컨대 Upjohn Company의 Gelfoam)로 투여될 수 있다.

[0183] 본 명세서에 기술된 조성물은 단독으로 또는 다른 세포와의 혼합물로서 투여될 수 있다. 상이한 유형의 세포를 투여 직전 또는 바로 전에 본 개시의 조성물과 혼합할 수 있거나, 또는 투여 전에 일정 기간 동안 함께 공배양할 수 있다.

[0184] 일 예에서, 본 조성물은 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포 및/또는 이의 자손 및/또는 이로부터 유래된 가용성 인자의 유효량 또는 치료적 또는 예방적 유효량을 포함한다. 예를 들어, 본 조성물은 약 $1x10^5$ 줄기 세포 내지 약 $1x10^9$ 줄기 세포 또는 약 $1.25x10^3$ 줄기 세포 내지 약 $1.25x10^7$ 줄기 세포/kg(80kg 대상체)을 함유한다. 일 예에서, 본 조성물은 $2x10^6$ 세포/kg을 함유한다. 투여되는 세포의 정확한 양은 대상체의 연령, 체중, 및 성별, 및 치료할 장애의 정도 및 중증도를 비롯한 다양한 요인에 의존한다.

[0185] 일 예에서, 50 x 10^6 내지 200 x 10^7 세포가 투여된다. 다른 예에서, 60 x 10^6 내지 200 x 10^6 세포 또는 75 x 10^6 내지 150 x 10^6 세포가 투여된다. 일 예에서, 75 x 10^6 세포가 투여된다. 다른 예에서, 150 x 10^6 세포가 투여된다.

[0186] 일 예에서, 본 조성물은 $5.00x10^6$ 초과의 생존 세포/mL를 함유한다. 다른 예에서, 본 조성물은 $5.50x10^6$ 초과의 생존 세포/mL를 함유한다. 다른 예에서, 본 조성물은 $6.00x10^6$ 초과의 생존 세포/mL를 함유한다. 다른 예에서, 본 조성물은 $6.50x10^6$ 초과의 생존 세포/mL를 함유한다. 다른 예에서, 본 조성물은 $6.68x10^6$ 초과의 생존 세포/mL를 함유한다.

[0187] 일 예에서, 본 개시의 방법은 6억 세포의 총 용량을 투여하는 것을 포함한다. 예를 들어, 본 개시에 따라 치료되는 대상체는 세포의 총 용량이 6억 세포를 초과하지 않는 한, 상기 언급된 조성물의 다회 용량을 받을 수 있다. 예를 들어, 대상체는 2억 세포의 3회 용량을 받을 수 있다. 일 예에서, 세포의 총 용량은 5억 세포이다. 일 예에서, 세포의 총 용량은 4억 세포이다. 예들 들어, 대상체는 1억 세포의 4회 용량을 받을 수 있다. 일 예에서, 대상체는 기준선에서 1억 세포의 1회 용량을 받은 후, 3개월에 걸쳐 매월 1회 투여되는 1억 세포의 3회 용량을 받는다. 일 예에서, 용량은 $2x10^6$ 세포/kg이다. 일 예에서, 용량은 $2x10^6$ 세포/kg이고, 대상체는 2회 용량 또는 3회 용량을 받는다. 일 예에서, 용량은 $2x10^6$ 세포/kg이고, 대상체는 3회 초과의 용량을 받는다.

[0188] 일 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 조성물의 세포 집단을 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 99% 포함한다.

[0189] 본 개시의 조성물은 동결보존될 수 있다. 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포의 동결보존은 당해 기술 분야에 공지된 저속 냉각 방법 또는 '신속' 동결 프로토콜을 사용하여 수행할 수 있다. 바람직하게는, 동결보존 방법은 동결되지 않은 세포와 비교하여 동결보존된 세포의 유사한 표현형, 세포 표면 마커 및 성장률을 유지한다.

[0190] 동결보존된 조성물은 동결보존액을 함유할 수 있다. 동결보존액의 pH는 전형적으로 6.5 내지 8, 바람직하게는 7.4이다.

[0191] 동결보존액은, 예를 들어 플라즈마라이트 A(PlasmaLyte A™)와 같은 멸균, 비발열성 등장액을 포함할 수 있다.

플라즈마라이트 A™ 100mL에는 염화나트륨, USP(NaCl) 526 mg; 글루콘산나트륨($C_6H_{11}NaO_7$) 502 mg; 아세트산나트륨 삼수화물, USP($C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$) 368 mg; 염화칼륨, USP(KCl) 37 mg; 및 염화마그네슘, USP($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) 30 mg이 포함되어 있다. 항균제는 포함되어 있지 않다. pH는 수산화나트륨으로 조정된다. pH는 7.4(6.5 내지 8.0)이다.

[0192] 동결보존액은 프로프리즈(Profreeze™)를 포함할 수 있다. 동결보존액은 추가로 또는 대안적으로 배양 배지, 예를 들어 αMEM을 포함할 수 있다.

[0193] 동결을 촉진하기 위해, 통상적으로, 예를 들어 디메틸술폭시드(DMSO)와 같은 동결보호제를 동결보존액에 첨가한다. 이상적으로, 동결보호제는 세포 및 환자에 대해 무독성이어야 하고, 비항원성, 화학적으로 불활성이어야 하며, 해동 후 높은 생존율을 제공하고, 세척 없이 이식이 가능해야 한다. 그러나, 가장 일반적으로 사용되는 동결보호제인, DMSO는, 어느 정도 세포 독성을 나타낸다. 하이드록실에틸 전분(HES)이 동결보존액의 세포 독성을 줄이기 위해 대체물로서 사용되거나 DMSO와 조합하여 사용될 수 있다.

[0194] 동결보존액은 DMSO, 하이드록시에틸 전분, 인간 혈청 성분 및 기타 단백질 증량제 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 일 예에서, 동결보존액은 약 5% 인간 혈청 알부민(HSA) 및 약 10% DMSO를 포함한다. 상기 동결보존액은 메틸셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈(PVP) 및 트레할로스 중 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다.

[0195] 한 실시양태에서, 세포는 42.5% 프로프리즈™/50% αMEM/7.5% DMSO에 현탁되고 제어 속도 냉동기에서 냉각된다.

[0196] 동결보존된 조성물은 해동되어 대상체에게 직접 투여될 수 있거나, 또는, 예를 들어, HA를 포함하는 다른 용액에 첨가될 수 있다. 대안적으로, 동결보존된 조성물은 해동되고 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포가 투여 전에 대체 담지체에 재현탁될 수 있다.

[0197] 일 예에서, 본 개시의 세포 조성물은 플라즈마-라이트(Plasma-Lyte) A, 디메틸 설폭사이드(DMSO) 및 인간 혈청 알부민(HSA)을 함유할 수 있다. 예를 들어, 본 개시의 조성물은 플라즈마-라이트 A(70%), DMSO(10%), HSA(25%) 용액을 함유할 수 있으며, HSA 용액은 5% HSA 및 15% 완충액을 함유한다.

[0198] 일 예에서, 본 명세서에 기술된 조성물은 단일 용량으로 투여될 수 있다.

[0199] 일부 예에서, 본 명세서에 기술된 조성물은 다회 용량에 걸쳐 투여될 수 있다. 예를 들어, 적어도 2회, 적어도 3회, 적어도 4회 용량. 다른 예에서, 본 명세서에 기술된 조성물은 적어도 5회, 적어도 6회, 적어도 7회, 적어도 8회, 적어도 9회, 적어도 10회 용량에 걸쳐 투여될 수 있다.

[0200] 일 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 대상체에 투여되기 전에 배양 증식될 수 있다. 다양한 세포 배양 방법이 당해 기술 분야에 공지되어 있다. 일 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 약 4 내지 10 계대 동안 배양 증식된다. 일 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10 계대 동안 배양 증식된다. 일 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 적어도 5 계대 동안 배양 증식된다. 이들 예에서, 줄기 세포는 동결보존되기 전에 배양 증식될 수 있다.

[0201] 일 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 투여 전에 무혈청 배지에서 배양 증식된다.

[0202] 일부 예에서, 세포는 세포가 대상체의 순환계로 나가는 것을 허용하지 않지만 세포에 의해 분비된 인자가 순환계로 들어가는 것을 허용하는 챔버 내에 함유된다. 이러한 방식으로 가용성 인자는 세포가 대상체의 순환계로 인자를 분비하도록 함으로써 대상체에게 투여될 수 있다. 이러한 챔버는 가용성 인자의 국소 수준을 증가시키기 위해 대상체의 부위에 동일하게 이식될 수 있다.

[0203] 일 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 전신 투여될 수 있다. 일 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 대상체의 기도에 투여될 수 있다. 일 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 대상체의 폐(들)에 투여될 수 있다. 다른 예에서, 본 개시의 조성물은 정맥내로 투여된다. 다른 예에서, 조성물은 정맥내로 및 대상체의 기도로 투여된다.

[0204] 일 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 주 1회 투여된다. 예를 들어, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 2주마다 주 1회 투여될 수 있다. 다른 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 주 2회 투여된다. 일 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 월 1회 투여될 수 있다. 일 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포의 2회 용량이 2주에 걸쳐 주 1회 투여된다. 다른 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포의 2회 용량이 2주마다 주 1회 투여된다. 다른 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포의 4회 용량이 2주에 걸쳐

투여된 후 후속 용량이 월 1회 투여된다. 일 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포의 2회 용량이 2주마다 주 1회 투여된 후 후속 용량이 월 1회 투여될 수 있다. 일 예에서, 4회 용량이 월 1회 투여된다.

[0205] 일 예에서, 본 개시의 조성물은 "임상적으로 입증된 유효한" 양의 MLPSC를 함유한다. 일 예에서, 본 개시의 조성물은 "임상적으로 입증된 유효한" 양의 MSC를 함유한다.

[0206] 당업자는 본 개시의 광범위한 일반 범위를 벗어나지 않고 위에서 설명한 실시양태에 대해 다양한 변형 및/또는 수정이 이루어질 수 있음을 이해할 것이다. 그러므로, 본 실시양태는 모든 면에서 예시적인 것이며 제한적이지 않은 것으로 간주되어야 한다.

[0207] 다음의 특정 실시예는 단지 예시적인 것으로 해석되어야 하며, 어떤 식으로든 개시의 나머지 부분을 제한하는 것이 아니다. 추가 설명 없이도, 당업자는 본 명세서의 설명에 기초하여, 본 발명을 최대한 활용할 수 있다고 여겨진다.

[0208] 실시예

[0209] **급성 호흡 곤란 증후군(ARDS)의 치료를 위한, *생체 외* 배양 증식된 성인 동종이계 골수 유래 중간엽 줄기 세포(MSC)**

[0210] 조성물

[0211] 본 조성물은 건강한 성인 공여자의 골수로부터 단리된 배양 증식된 중간엽 줄기 세포(ceMSC)로 구성되어 있다. 최종 조성물은 플라즈마-라이트 A, 디메틸 설폭사이드(DMSO) 및 인간 혈청 알부민(HSA)으로 제형화된 ceMSC를 함유한다.

[0212] 목적

[0213] 다음을 결정하기 위함:

[0214] - 안전성

[0215] - 생존율 개선.

[0216] 대상체

[0217] 중등도의 COVID-19 관련 ARDS를 앓고 있는 것으로 특징지어지는 환자는 중간엽 줄기 세포(정맥 내; kg당 200만 세포) 또는 대조군 치료를 받았다. 125명의 환자는 <65세이었다(즉, 치료 목적(intention to treat; ITT) 집단; 표 1). ITT 집단 중 58명은 세포 치료제를 받았고 67명은 대조군 치료를 받았다. 일부 ITT 환자는 경미한 ARDS 및/또는 순환 CRP <4를 특징으로 하는 낮은 수준의 염증을 갖는 것으로 확인되었다. 이들 환자는 프로토콜 순응(per protocol; PP) 환자 집단에서 제외되었다. 이에 따라, PP 집단은 세포 치료제를 받은 38명, 대조군 치료를 받은 51명으로 (125명으로부터) 89명으로 감소되었다. 또한, PP 집단은 모두 중등도 내지 중증 ARDS를 앓고 있기 때문에 일관되게 가장 심각한 질환을 앓고 있는 연구 집단을 나타낸다.

표 1: 기준선 요약 데이터: 미리 지정된 <65세 및 ≥65세의 치료 목적 환자.

범주	ITT 환자 <65세		ITT 환자 ≥65세	
	REM 평균	대조군 평균	REM 평균	대조군 평균
	n=58	n=67	n=54	n=43
성별(%)	76%	70%	65%	65%
남성	24%	30%	35%	35%
여성				
연령(세)	**52 (9.9)**	**51 (9.8)**	**72 (5.7)**	**73 (5.5)**
BMI(kg/m^2)	34.1 (7.7)	36.6 (8.2)	32 (7)	32 (6)
CRP(mg/L)	29.8 (58.8)	19.5 (17.5)	17.2 (27.8)	26.4 (51.9)
PF 비	**163 (79)**	**144 (85)**	**132 (50)**	**150 (54)**
ARDS 중증도 (경증, 중등도, 중증)	**17.%, 48%, 24%**	**9.%, 48%, 37%**	**13.%, 57%, 28%**	**14%, 67%, 14%**
	(11% 누락 또는 ARDS 없음)	**6% 누락 또는 ARDS 없음)**	**(2% 누락 또는 ARDS 없음)**	**(5% 누락 또는 ARDS 없음)**
SOFA 점수	6.3 (2.4)	6.6 (1.8)	6.3 (2)	6.4 (1.9)
기준선의 임의의 스테로이드	67%	84%	98%	93%
기준선의 덱사메타손	50%	67%	78%	67%
기준선의 렘데시비르	62%	63%	72%	74%
기준선의 항-IL6	3%	4%	7%	5%

[0218]

[0219] 분석

[0220] 세포 치료제는 모든 환자의 60일차 사망에 대해 어느 정도의 보호를 제공한다(도 1).

[0221] 그러나, 치료받은 환자를 추가로 분석한 결과 놀랍게도 세포 치료제는 65세 초과의 환자(도 2, 도 3 및 도 9; B)에 비해 65세 미만의 환자(도 2, 도 3 및 도 9; A)에서 60일차 사망에 대해 상당한 보호를 제공하는 것으로 나타났다. 중요한 것은, 65세 미만 환자의 60일차 사망에 대한 보호가 치료 목적(ITT) 환자(대조군 대비 사망 38.3% 감소; p=0.0484; 도 2) 및 프로토콜 순응(PP) 환자(대조군 대비 사망 43.3% 감소; p=0.0285; 도 3) 모두에서 분명하였다는 것이다. 도 2와 도 3에서도 볼 수 있듯이, ITT 환자에 비해 PP 환자에서 사망이 더 많이 감소한 것으로 나타났다. 이는 PP 환자가 ITT 환자보다 일관되게 더 심각한 질환을 겪었기 때문에 예상치 못한 결과이다. 이들 데이터는 중등도에서 중증 ARDS와 같은 보다 심각한 ARDS를 앓고 있는 대상체가 세포 치료제에 의한 치료에 더 잘 반응할 수 있음을 시사한다.

[0222] 기준선에서 덱사메타손을 투여받은 60세 미만의 환자에서도 사망에 대한 상당한 보호가 관찰되었는데, 이는, 특히 대상체가 또한 코르티코스테로이드를 투여 중인 경우, 세포 치료제에 의한 치료를 위해 65세 미만의 ARDS 환자를 선택하는 이론적 근거를 추가로 뒷받침한다(도 4: A, ITT 환자 사망 68.9% 감소, p=0.0074; B, PP 환자, 사망 78.9% 감소, p=0.0043).

[0223] 65세 미만의 환자는 일반적으로 65세 초과의 환자보다 건강 상태가 더 높을 것으로 예상된다. 높은 건강 상태에도 불구하고, 이들 환자는 ARDS로 사망하고 있었는데, 65세 초과의 환자에 비해 치료 후 결과는 놀라울 정도로 개선되었다. 이들 데이터는, 특히 이들 환자의 사망에 대해 제공되는 보호의 측면에서, 세포 치료제에 잘 반응하는 ARDS 환자 집단의 식별을 뒷받침한다.

[0224] 대조군 집단의 분석에 따르면 기준선에서 덱사메타손을 투여해도 대조군 환자의 사망률이 감소하지 않는 것으로 나타났다(도 5: A: <65세의 모든 대조군 ITT 환자, p=0.554; B: ≥65세의 모든 대조군 ITT 환자, p=0.815). 놀랍게도, 이러한 60일차의 사망에 대한 보호의 부족은 세포 치료제와 덱사메타손으로 치료받은 환자에서 보완되었으며(도 4), 세포 치료제와 덱사메타손으로 치료받은 환자에서는 사망에 대한 추가적인 보호 이상의 효과가 관찰되었다(도 6, 도 7 및 도 8). 중요한 것은, 세포 치료제와 덱사메타손 사이에서 관찰된 시너지 효과가 ITT 환자(p=0.0669)와 PP 환자(p=0.0363) 모두에서 분명하였다는 것이다. <65세 환자에 대한 탐색적 분석에서 세포 치료제와 덱사메타손의 병용은 60일 동안 인공호흡기 없이 생존하는 일수를 늘리는 데에도 시너지 효과가 있었다(도 10).

[0225] 65세 미만 환자의 사망에 대한 보호는 도 6에 요약되어 있다. 대조군 환자 또는 덱사메타손 단독 투여 환자에 대한 보호는 제공되지 않았다. 세포 치료제에 의한 치료는 사망에 대한 어느 정도의 보호를 제공했으며, 이는 세포 치료제와 덱사메타손에 의한 치료를 통해 상당히 증가하였다(또한 도 4 참조). 세포 치료제와 덱사메타손을 병용한 후 임상 및 호흡 기능 모두의 개선이 나타났다(도 7 및 도 8). 이러한 병용은 또한 환자가 인공호흡기 없이 생존하는 일수를 증가시켰다(도 10).

[0226] 이들 데이터는 세포 치료제에 의한 치료, 특히 세포 치료제 및 덱사메타손과 같은 코르티코스테로이드에 의한 치료를 위해 65세 미만의 ARDS 환자를 선택하는 데 설득력 있는 이론적 근거를 제공한다. 이들 데이터는 또한 코르티코스테로이드를 복용하고 있는 65세 미만의 ARDS 환자를 선택하고 이들 환자에게 세포 치료제를 투여함으로써 ARDS 환자에서 치료 성적에 상당한 개선이 달성될 수 있음을 시사한다.

[0227] 바이오마커 분석

[0228] 107명의 치료받은 환자와 106명의 대조군(치료 <65 n = 55, 대조군 <65 n = 65, 치료 >65 n = 52, 대조군 >65 n = 41)에서 기준선 시점과 세포 치료제 치료(3 내지 5일 이내에 200만($2x10^6$) 세포/kg x 2회 용량의 고정 투여 요법) 후에 염증성 바이오마커 수준을 측정하였다. 세포 치료제는 <65세 환자의 경우 3일, 7일, 14일째에 CRP 수준(도 11A)과 7일 및 14일째(도 11B)에 페리틴 수준을 크게 감소시켰다. 세포 치료제는 모든 치료받은 환자에서 D-이량체 수준의 상당한 증가를 방지하였다(도 11C).

[0229] <65세 및 >65세의 치료받은 대상체 간의 염증성 바이오마커 수준을 비교하는 것은 치료하기 위한 환자를 선택하기 위한 측정 가능한 기준을 식별할 수 있는 고유한 기회를 제공하였다. 놀랍게도, 도 12와 도 13에서 볼 수 있듯이, 환자가 코르티코스테로이드를 복용하였는지 여부에 관계 없이, >65세의 연령은 기준선에서 염증 활성의 증가와 관련이 있는 것으로 보인다. 실제로, 기준선에서 코르티코스테로이드를 투여 중인 모든 환자를 분석한 결과, <65세 환자에 비해 >65세 환자에서 염증 활성(사이토카인/케모카인)이 >5배 높은 것으로 나타났다.

[0230] 도 12는 65세 초과의 환자가 <65세 환자보다, 특히 다음과 같은 염증성 사이토카인/케모카인의 기준선 수준이 더 높았음을 나타낸다:

[0231] (i) CCR2-결합 케모카인(CXCL10/IP10 및 CXCL9 포함) 및 CXCR3-결합 케모카인(CCL2, CCL3, 및 CCL7/MCP3 포함). 이 케모카인 그룹은 폐로의 호중구 및 대식세포 유입 증가를 나타낸다.

[0232] (ii) 대식세포 염증 증가 및 폐로의 호중구 이동 증가를 나타내는, IL-6 및 IL-8.

[0233] (ii) T 세포 활성화/증식 및 세포사멸을 나타내는 CCL19 및 IL-2.

[0234] >65세 환자에서 증가된 다른 염증성 바이오마커는 TGF-알파, TNF, CXCL8, G-CSF/CSF-3, 및 IL17C를 포함하였다(도 12 및 도 13).

[0235] <65세 환자는 기준선 수준이 더 낮음에도 불구하고 >65세 환자와 동일한 염증 경로를 나타냈다. <65세 환자에서, 세포 치료제는 특히, <65세 환자에서 COVID-19 ARDS 중증도와 관련이 있는, 염증 지표를 다음과 같이 현저하게 감소시켰다:

[0236] - 폐로의 호중구 및 대식세포 유입을 감소시킬 가능성이 있는, CCR2- 및 CXCR3-결합 케모카인;

[0237] - IL-18 유발 인플라마좀 감소, 및 대식세포 활성화/폐로의 호중구 귀소 감소를 나타내는, IL-6/IL-8/TNF/IL-18;

[0238] - 감소된 T 세포 유입 및 활성화를 나타내는, 감소된 CCL19, 및 IL-4/IL-13/GM-CSF.

[0239] 요약하면:

[0240] - <65세의 치료받은 환자에서 염증 경로가 하향 조절되었으며(도 12 및 도 13), 이는 예후 개선(도 2 내지 도 4) 및 호흡 기능의 지속적인 개선(도 8)에 상응하였고;

[0241] - 7일째에 치료받은 >65세 환자에서 호흡 기능 개선이 관찰되었으나 지속되지 않았으며(도 8); 후속 바이오마커 분석을 통해 이들 환자의 염증의 기준선 수준이 더 높은 것으로 나타났고(도 12 및 도 13);

[0242] - 바이오마커 분석에서는 연령(<65세 대 >65세)에 관계 없이 ARDS 환자에서 유사한 염증 경로가 관여하는 것으로 나타났다.

[0243] 안전성

[0244] 주사와 관련된 유해 사례는 없었다.

[0245] 광범위하게 기술된 본 발명의 사상 또는 범위를 벗어나지 않으면서 특정 실시양태에 나타낸 바와 같이 본 발명에 대해 다양한 변형 및/또는 수정이 이루어질 수 있다는 것이 당업자에 의해 인식될 것이다. 그러므로, 본 실시양태는 모든 면에서 예시적인 것이며 제한적이지 않은 것으로 간주되어야 한다.

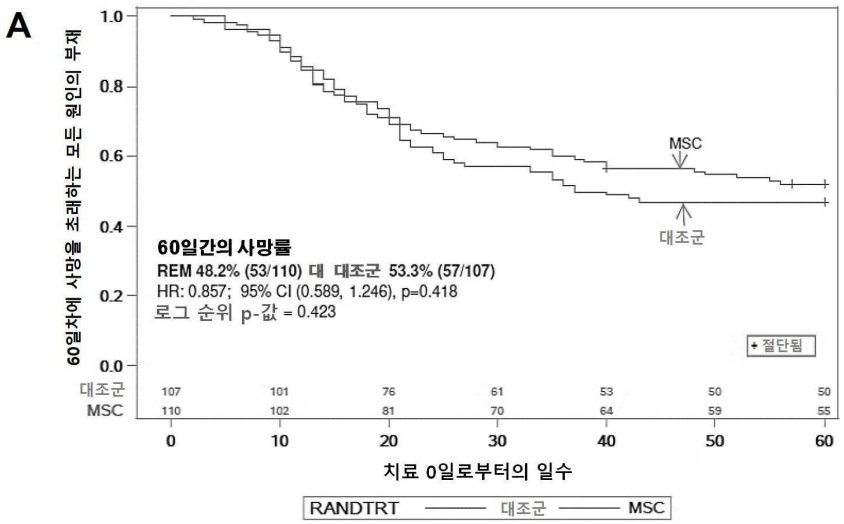
[0246] 상기 논의된 모든 간행물은 그 전체가 본 명세서에 포함된다.

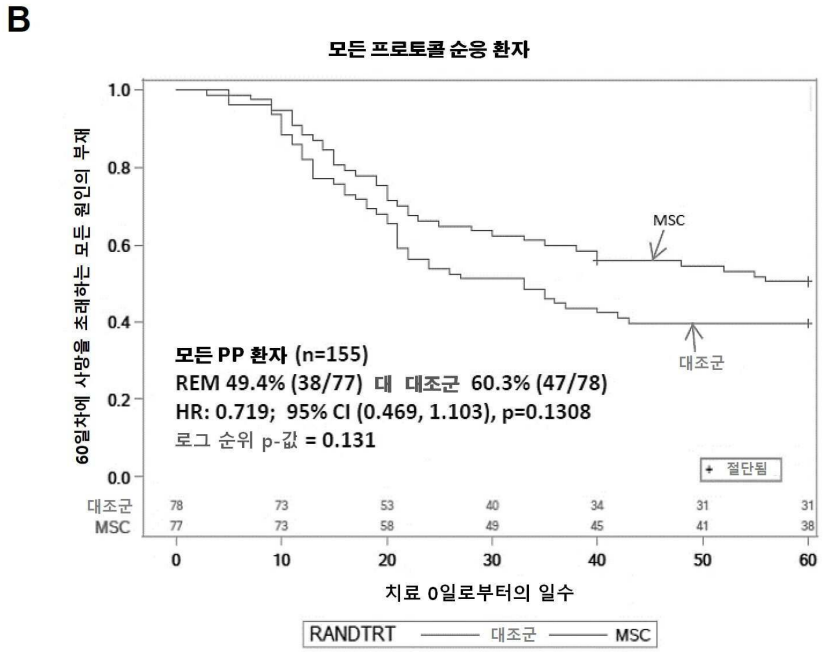
[0247] 본 출원은 2021년 4월 23일에 출원된 AU2021901214, 2021년 7월 15일에 출원된 AU2021902180, 2022년 2월 9일에 출원된 AU2022900260 및 2022년 2월 18일에 출원된 AU2022900372를 우선권 주장하며, 이들의 개시는 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0248] 본 명세서에 포함된 문서, 법률, 재료, 장치, 물품 등에 대한 임의의 논의는 오로지 본 발명에 대한 맥락을 제공하기 위한 것이다. 이들 사항 중 임의의 것 또는 전부가 본 출원의 각 청구항의 우선일 이전에 존재하였기 때문에 선행 기술 기반의 일부를 형성한다거나 본 발명과 관련된 분야의 상식 일반 지식이었다고 인정하는 것으로 간주해서는 안 된다.

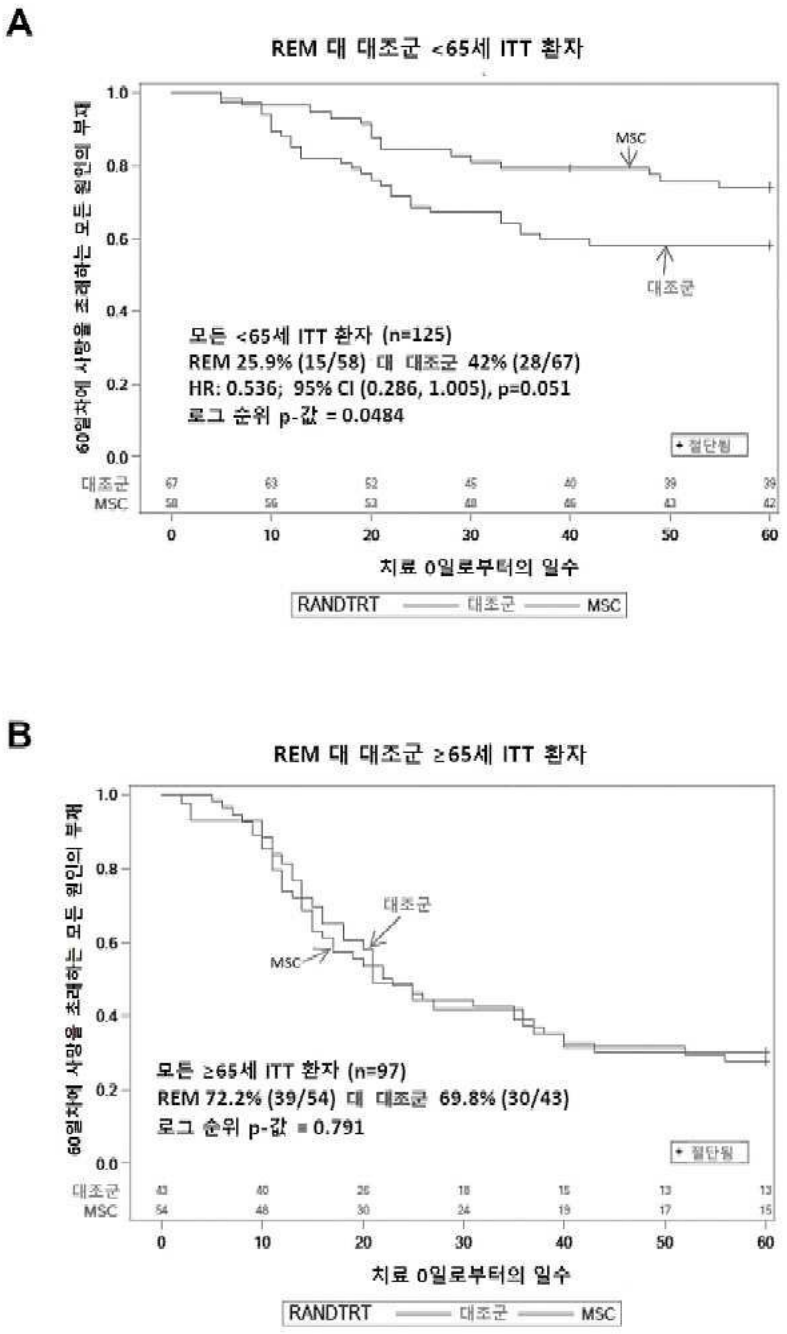
도면

도면1

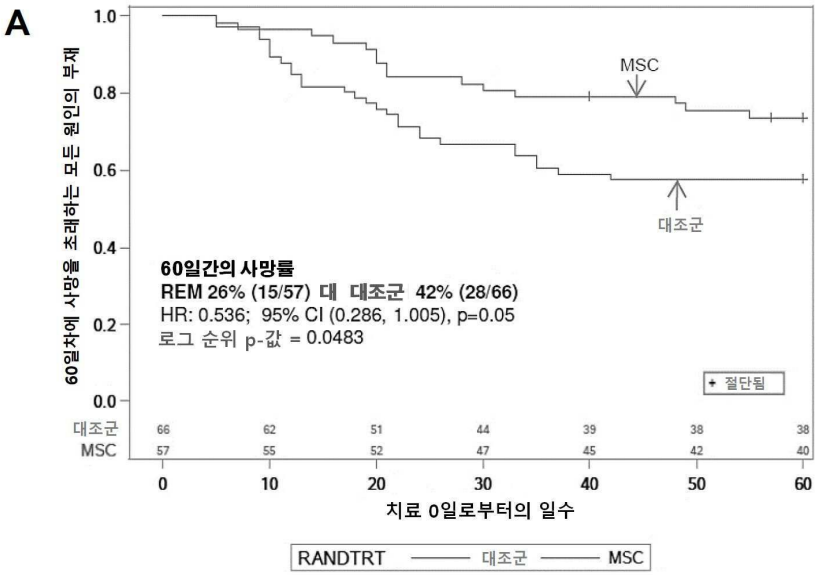

A
60일차에 사망을 초래하는 모든 원인의 부재
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
MSC
대조군
60일간의 사망률
REM 48.2% (53/110) 대 대조군 53.3% (57/107)
HR: 0.857; 95% CI (0.589, 1.246), p=0.418
로그 순위 p-값 = 0.423
+ 절단됨
대조군 107 101 76 61 53 50 50
MSC 110 102 81 70 64 59 55
0 10 20 30 40 50 60
치료 0일로부터의 일수
RANDTRT 대조군 MSC

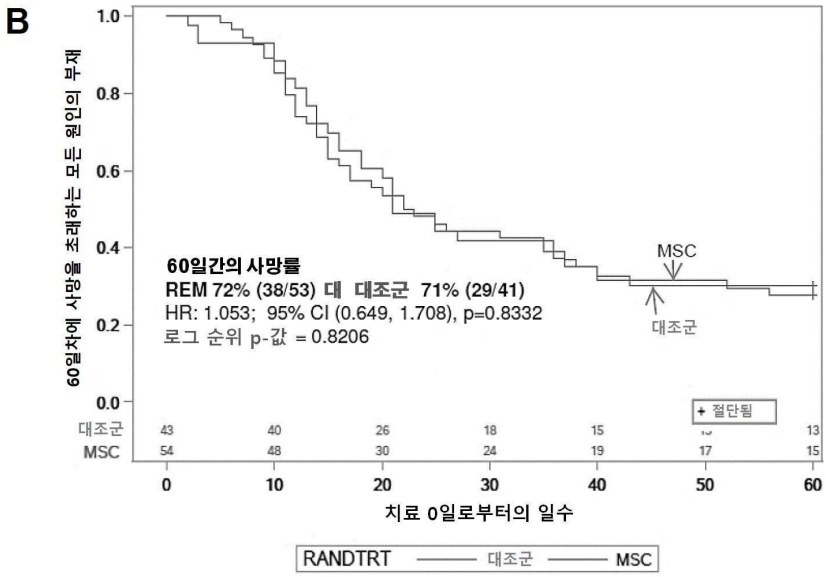

B
모든 프로토콜 순응 환자
60일차에 사망을 초래하는 모든 원인의 부재
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
MSC
대조군
모든 PP 환자 (n=155)
REM 49.4% (38/77) 대 대조군 60.3% (47/78)
HR: 0.719; 95% CI (0.469, 1.103), p=0.1308
로그 순위 p-값 = 0.131
+ 절단됨
대조군 78 73 53 40 34 31 31
MSC 77 73 58 49 45 41 38
0 10 20 30 40 50 60
치료 0일로부터의 일수
RANDTRT 대조군 MSC

도면2


A
REM 대 대조군 <65세 ITT 환자
60일차에 사망을 초래하는 모든 원인의 부재
MSC
대조군
모든 <65세 ITT 환자 (n=125)
REM 25.9% (15/58) 대 대조군 42% (28/67)
HR: 0.536; 95% CI (0.286, 1.005), p=0.051
로그 순위 p-값 = 0.0484
+ 절단됨
대조군 67 63 52 45 40 39 39
MSC 58 56 53 48 46 43 42
0 10 20 30 40 50 60
치료 0일로부터의 일수
RANDTRT 대조군 MSC
B
REM 대 대조군 ≥65세 ITT 환자
60일차에 사망을 초래하는 모든 원인의 부재
대조군
MSC
모든 ≥65세 ITT 환자 (n=97)
REM 72.2% (39/54) 대 대조군 69.8% (30/43)
로그 순위 p-값 = 0.791
+ 절단됨
대조군 43 40 26 18 15 13 13
MSC 54 48 30 24 19 17 15
0 10 20 30 40 50 60
치료 0일로부터의 일수
RANDTRT 대조군 MSC

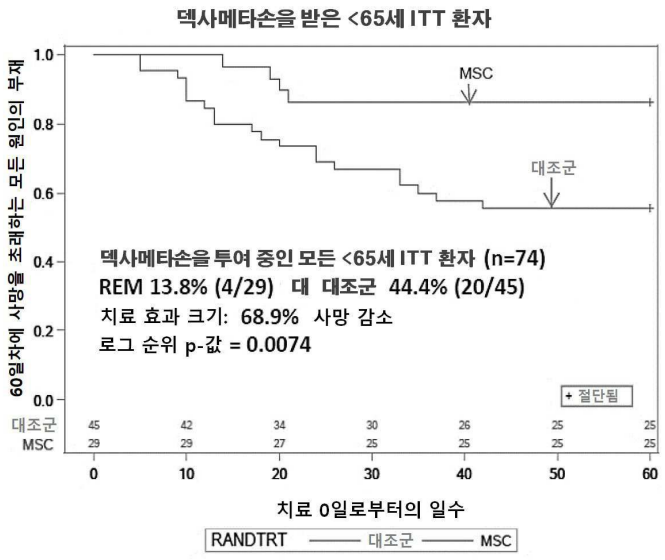
도면3


A
60일차에 사망을 초래하는 모든 원인의 부재
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
MSC
대조군
60일간의 사망률
REM 26% (15/57) 대 대조군 42% (28/66)
HR: 0.536; 95% CI (0.286, 1.005), p=0.05
로그 순위 p-값 = 0.0483
+ 절단됨
대조군 66 62 51 44 39 38 38
MSC 57 55 52 47 45 42 40
0 10 20 30 40 50 60
치료 0일로부터의 일수
RANDTRT 대조군 MSC

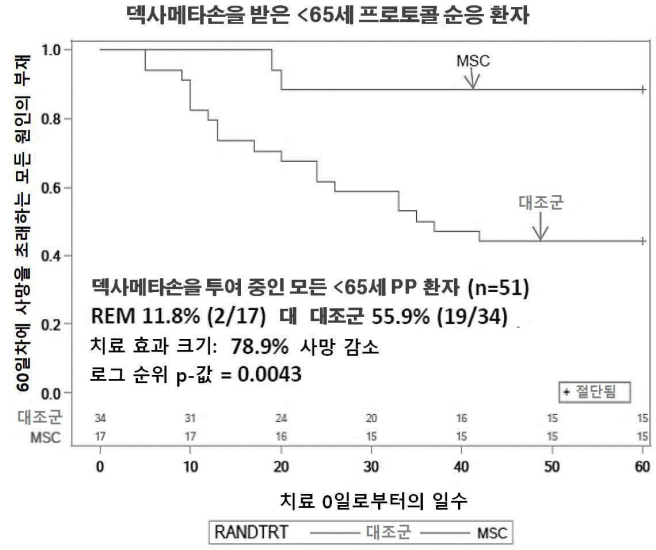

B
60일차에 사망을 초래하는 모든 원인의 부재
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
MSC
대조군
60일간의 사망률
REM 72% (38/53) 대 대조군 71% (29/41)
HR: 1.053; 95% CI (0.649, 1.708), p=0.8332
로그 순위 p-값 = 0.8206
+ 절단됨
대조군 43 40 26 18 15 13
MSC 54 48 30 24 19 17 15
0 10 20 30 40 50 60
치료 0일로부터의 일수
RANDTRT 대조군 MSC

도면4

A

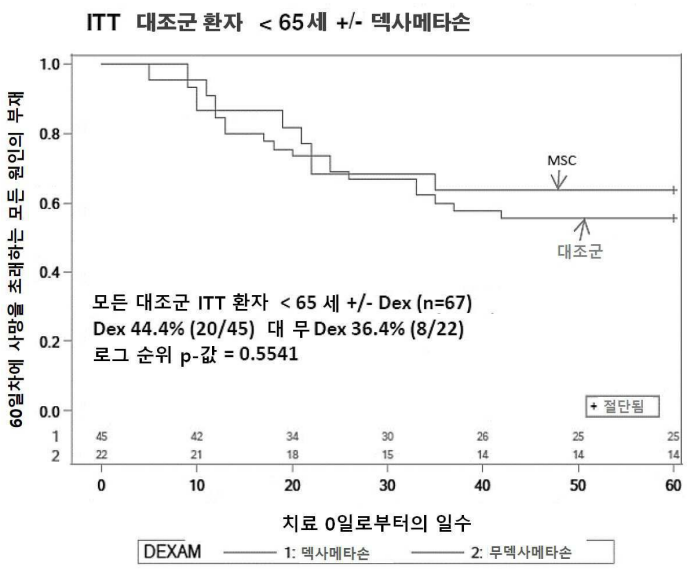

덱사메타손을 받은 <65세 ITT 환자
60일차에 사망을 초래하는 모든 원인의 부재
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
MSC
대조군
덱사메타손을 투여 중인 모든 <65세 ITT 환자 (n=74)
REM 13.8% (4/29) 대 대조군 44.4% (20/45)
치료 효과 크기: 68.9% 사망 감소
로그 순위 p-값 = 0.0074
+ 절단됨
대조군 45 42 34 30 26 25 25
MSC 29 29 27 25 25 25 25
0 10 20 30 40 50 60
치료 0일로부터의 일수
RANDTRT 대조군 MSC

B

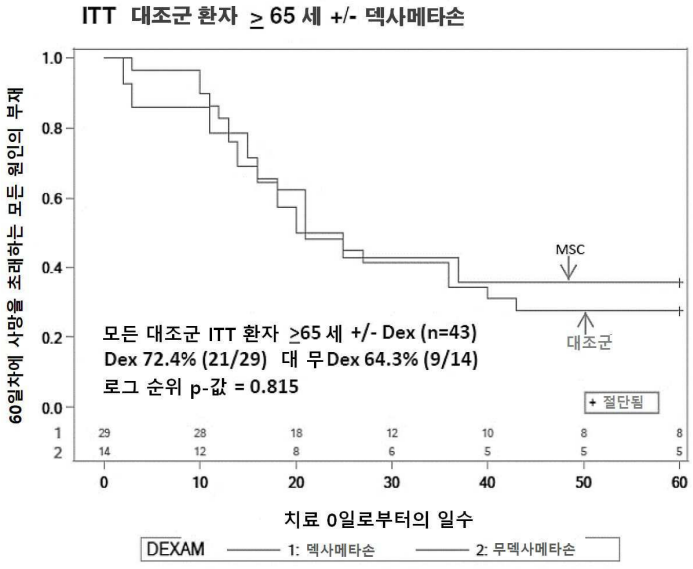

덱사메타손을 받은 <65세 프로토콜 순응 환자
60일차에 사망을 초래하는 모든 원인의 부재
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
MSC
대조군
덱사메타손을 투여 중인 모든 <65세 PP 환자 (n=51)
REM 11.8% (2/17) 대 대조군 55.9% (19/34)
치료 효과 크기: 78.9% 사망 감소
로그 순위 p-값 = 0.0043
+ 절단됨
대조군 34 31 24 20 16 15 15
MSC 17 17 16 15 15 15 15
0 10 20 30 40 50 60
치료 0일로부터의 일수
RANDTRT 대조군 MSC

도면5

A

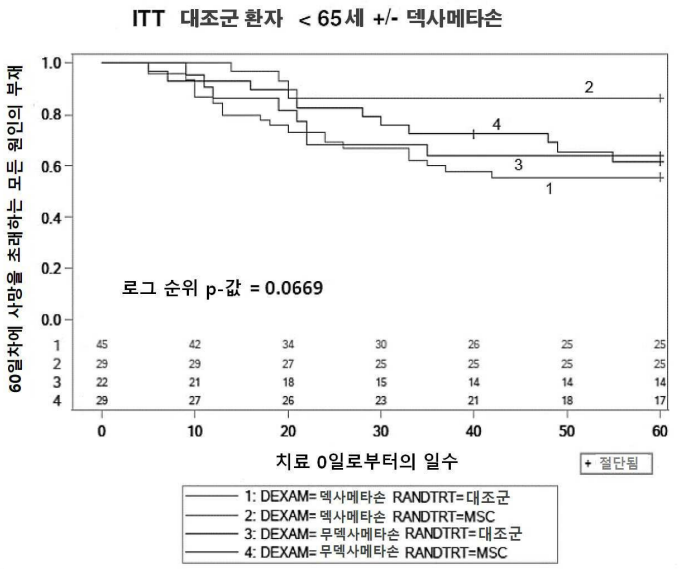

ITT 대조군 환자 < 65세 +/- 덱사메타손
60일차에 사망을 초래하는 모든 원인의 부재
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
MSC
대조군
모든 대조군 ITT 환자 < 65 세 +/- Dex (n=67)
Dex 44.4% (20/45) 대 무 Dex 36.4% (8/22)
로그 순위 p-값 = 0.5541
+ 절단됨
1 45 42 34 30 26 25 25
2 22 21 18 15 14 14 14
0 10 20 30 40 50 60
치료 0일로부터의 일수
DEXAM 1: 덱사메타손 2: 무덱사메타손

B

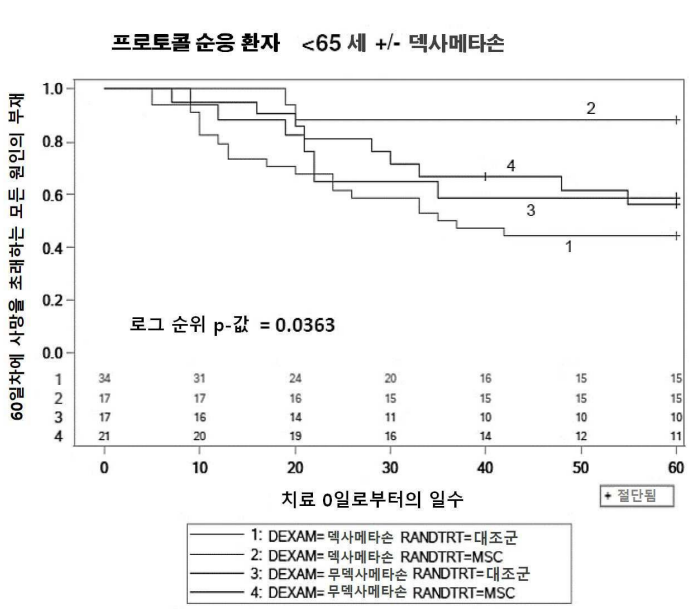

ITT 대조군 환자 ≥ 65 세 +/- 덱사메타손
60일차에 사망을 초래하는 모든 원인의 부재
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
MSC
대조군
모든 대조군 ITT 환자 ≥65 세 +/- Dex (n=43)
Dex 72.4% (21/29) 대 무 Dex 64.3% (9/14)
로그 순위 p-값 = 0.815
+ 절단됨
1 29 28 18 12 10 8 8
2 14 12 8 6 5 5 5
0 10 20 30 40 50 60
치료 0일로부터의 일수
DEXAM 1: 덱사메타손 2: 무덱사메타손

도면6a

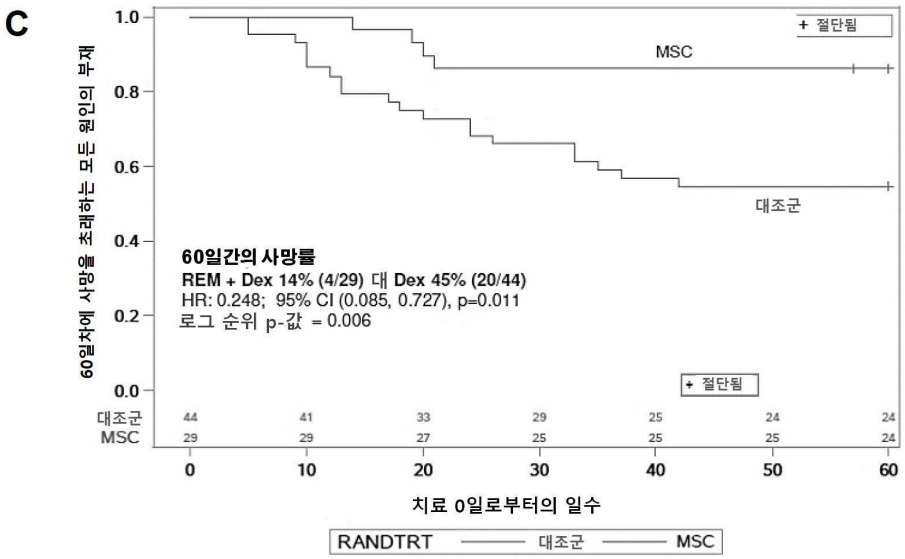
A


ITT 대조군 환자 < 65세 +/- 덱사메타손
60일차에 사망을 초래하는 모든 원인의 부재
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
2
4
3
1
로그 순위 p-값 = 0.0669
1 45 42 34 30 26 25 25
2 29 29 27 25 25 25 25
3 22 21 18 15 14 14 14
4 29 27 26 23 21 18 17
0 10 20 30 40 50 60
치료 0일로부터의 일수
+ 절단됨
1: DEXAM= 덱사메타손 RANDTRT= 대조군
2: DEXAM= 덱사메타손 RANDTRT=MSC
3: DEXAM= 무덱사메타손 RANDTRT= 대조군
4: DEXAM= 무덱사메타손 RANDTRT=MSC

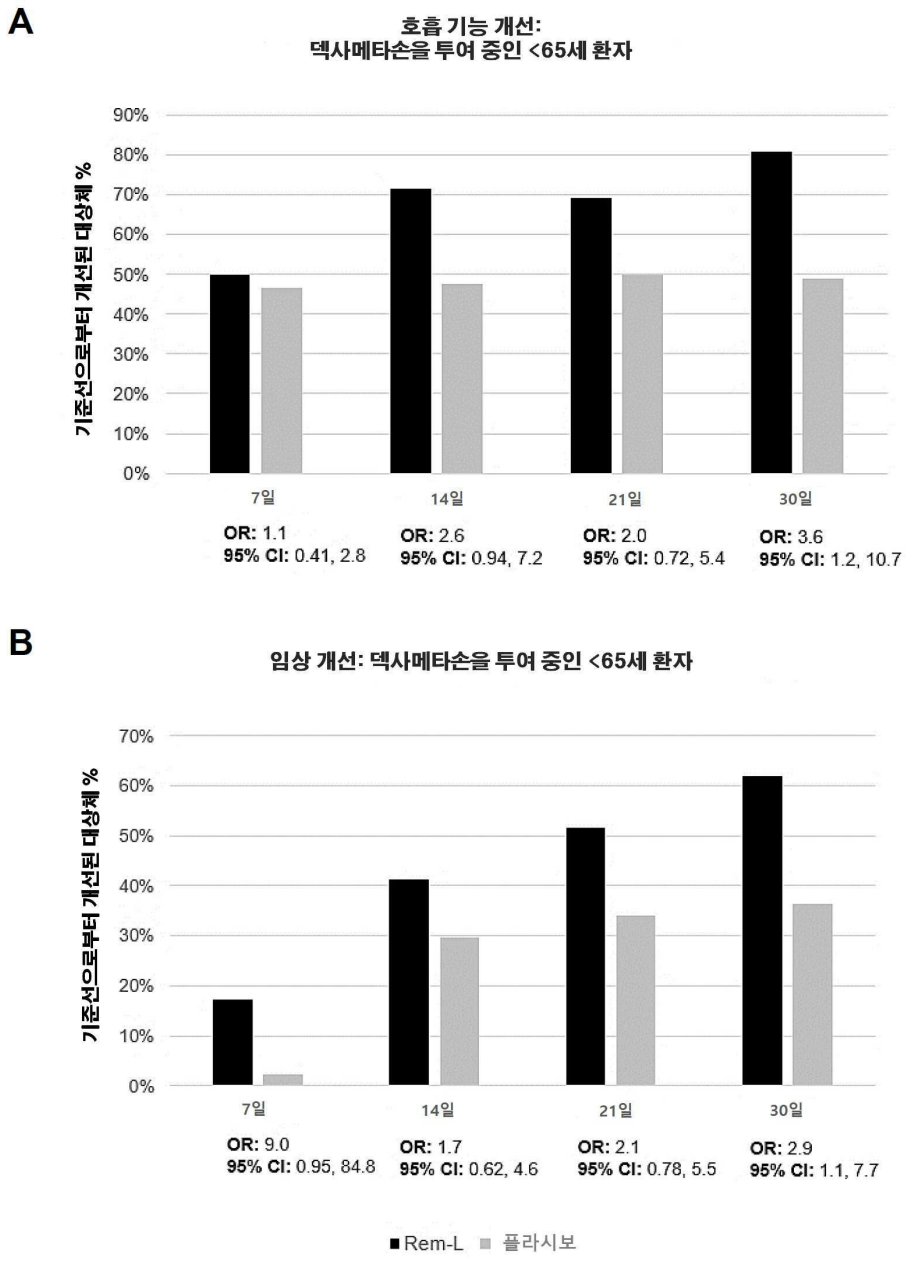
B


프로토콜 순응 환자 <65 세 +/- 덱사메타손
60일차에 사망을 초래하는 모든 원인의 부재
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
2
4
3
1
로그 순위 p-값 = 0.0363
1 34 31 24 20 16 15 15
2 17 17 16 15 15 15 15
3 17 16 14 11 10 10 10
4 21 20 19 16 14 12 11
0 10 20 30 40 50 60
치료 0일로부터의 일수
+ 절단됨
1: DEXAM= 덱사메타손 RANDTRT= 대조군
2: DEXAM= 덱사메타손 RANDTRT=MSC
3: DEXAM= 무덱사메타손 RANDTRT= 대조군
4: DEXAM= 무덱사메타손 RANDTRT=MSC

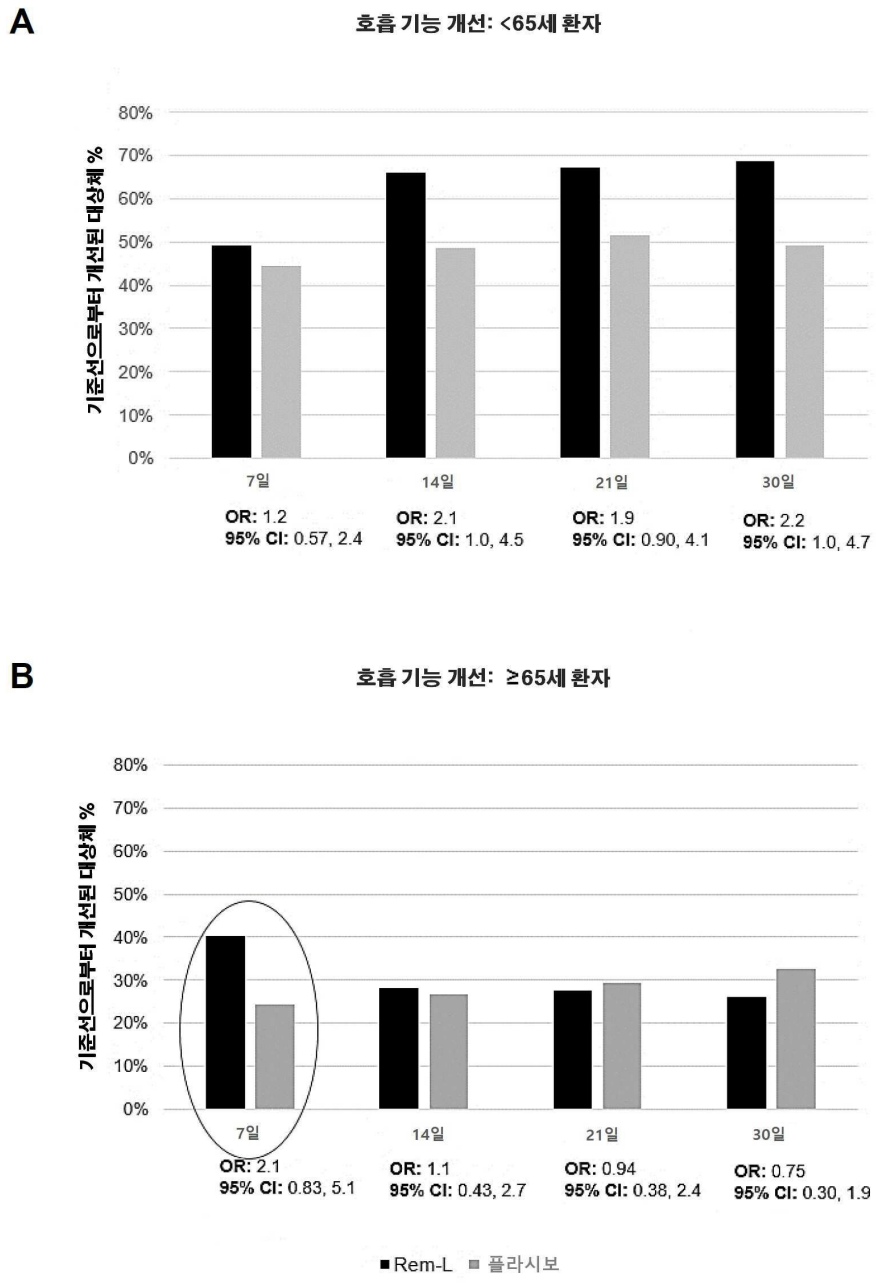
도면6b


C
60일차에 사망을 초래하는 모든 원인의 부재
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
+ 절단됨
MSC
대조군
60일간의 사망률
REM + Dex 14% (4/29) 대 Dex 45% (20/44)
HR: 0.248; 95% CI (0.085, 0.727), p=0.011
로그 순위 p-값 = 0.006
+ 절단됨
대조군 44 41 33 29 25 24 24
MSC 29 29 27 25 25 25 24
0 10 20 30 40 50 60
치료 0일로부터의 일수
RANDTRT 대조군 MSC

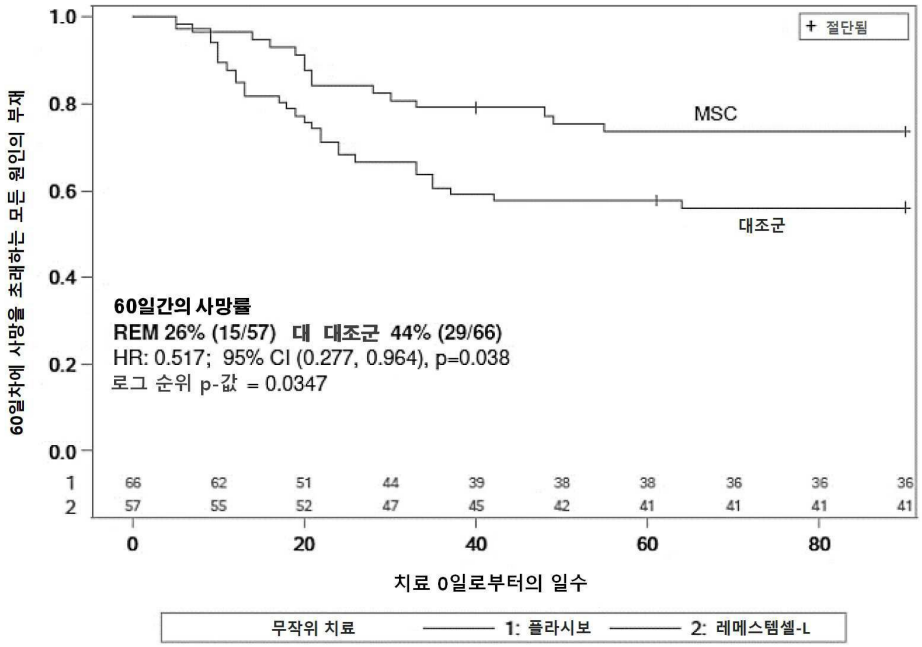
도면7


A
호흡 기능 개선:
덱사메타손을 투여 중인 <65세 환자
기준선으로부터 개선된 대상체 %
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
7일
14일
21일
30일
OR: 1.1
95% CI: 0.41, 2.8
OR: 2.6
95% CI: 0.94, 7.2
OR: 2.0
95% CI: 0.72, 5.4
OR: 3.6
95% CI: 1.2, 10.7
B
임상 개선: 덱사메타손을 투여 중인 <65세 환자
기준선으로부터 개선된 대상체 %
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
7일
14일
21일
30일
OR: 9.0
95% CI: 0.95, 84.8
OR: 1.7
95% CI: 0.62, 4.6
OR: 2.1
95% CI: 0.78, 5.5
OR: 2.9
95% CI: 1.1, 7.7
Rem-L
플라시보

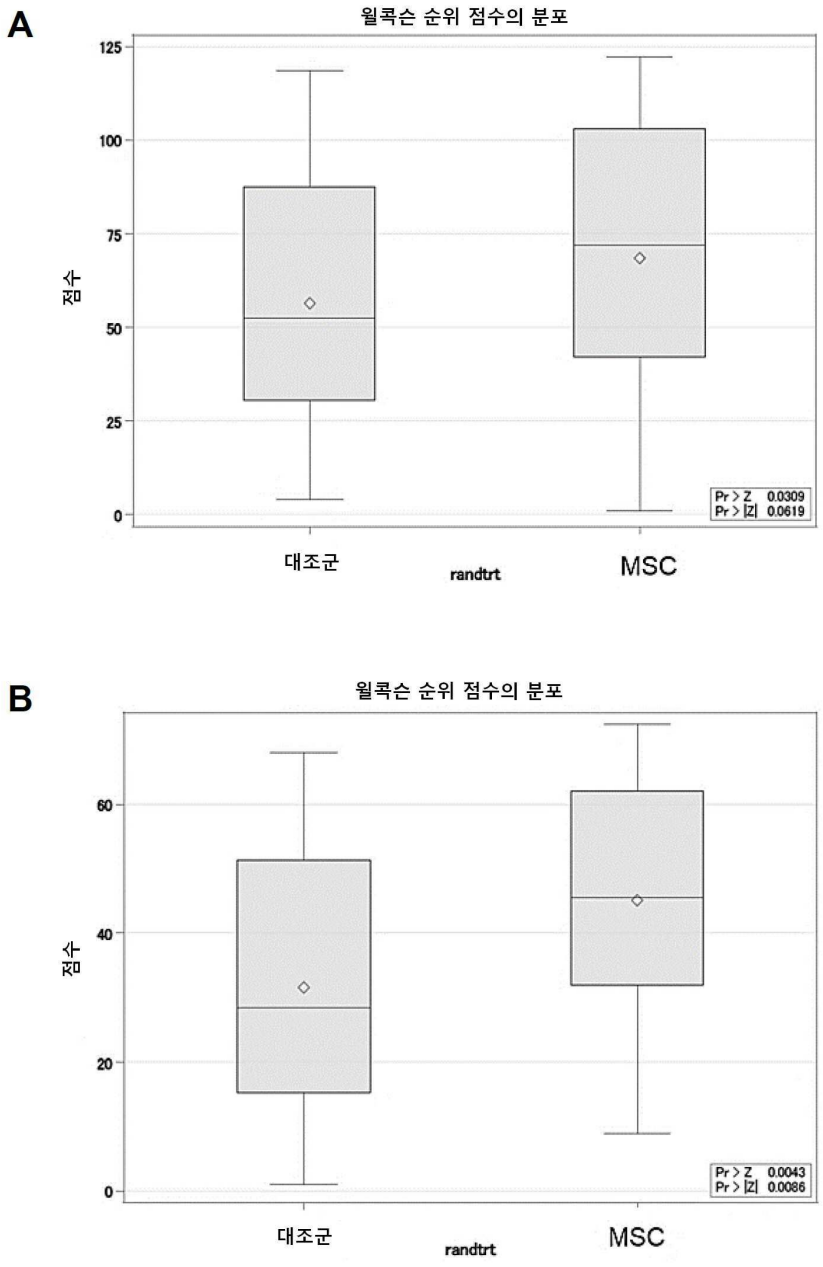
도면8


A
호흡 기능 개선: <65세 환자
기준선으로부터 개선된 대상체 %
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
7일
14일
21일
30일
OR: 1.2
95% CI: 0.57, 2.4
OR: 2.1
95% CI: 1.0, 4.5
OR: 1.9
95% CI: 0.90, 4.1
OR: 2.2
95% CI: 1.0, 4.7
B
호흡 기능 개선: ≥65세 환자
기준선으로부터 개선된 대상체 %
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
7일
14일
21일
30일
OR: 2.1
95% CI: 0.83, 5.1
OR: 1.1
95% CI: 0.43, 2.7
OR: 0.94
95% CI: 0.38, 2.4
OR: 0.75
95% CI: 0.30, 1.9
Rem-L
플라시보

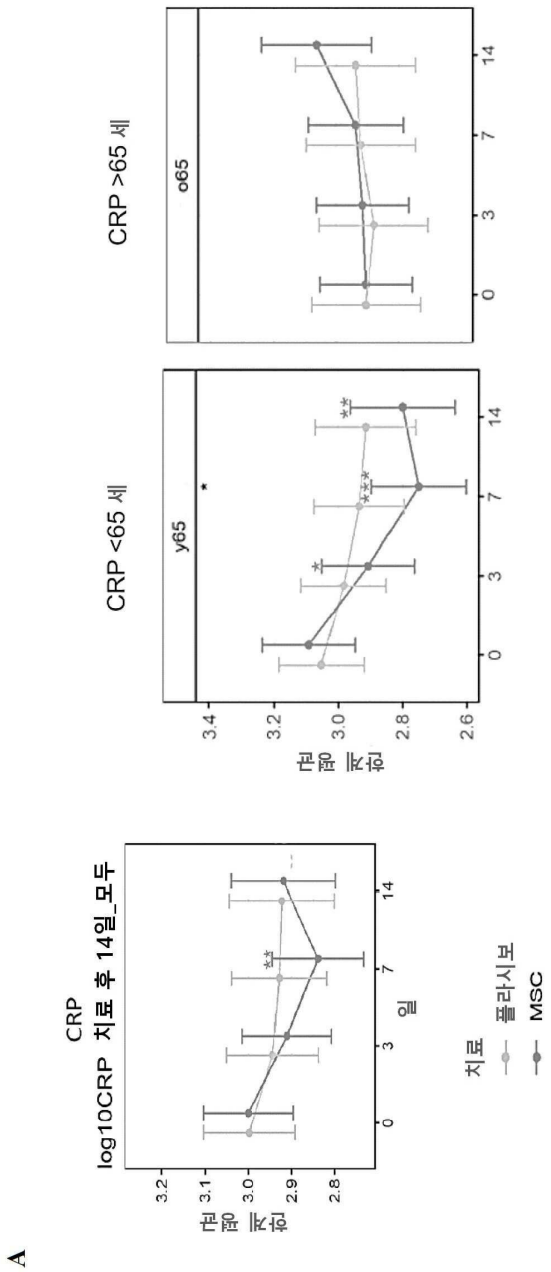
도면9


+ 절단됨
MSC
대조군
60일간의 사망률
REM 26% (15/57) 대 대조군 44% (29/66)
HR: 0.517; 95% CI (0.277, 0.964), p=0.038
로그 순위 p-값 = 0.0347
60일차에 사망을 초래하는 모든 원인의 부재
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
1 66 62 51 44 39 38 38 36 36 36
2 57 55 52 47 45 42 41 41 41 41
0
20
40
60
80
치료 0일로부터의 일수
무작위 치료
1: 플라시보
2: 레메스템셀-L

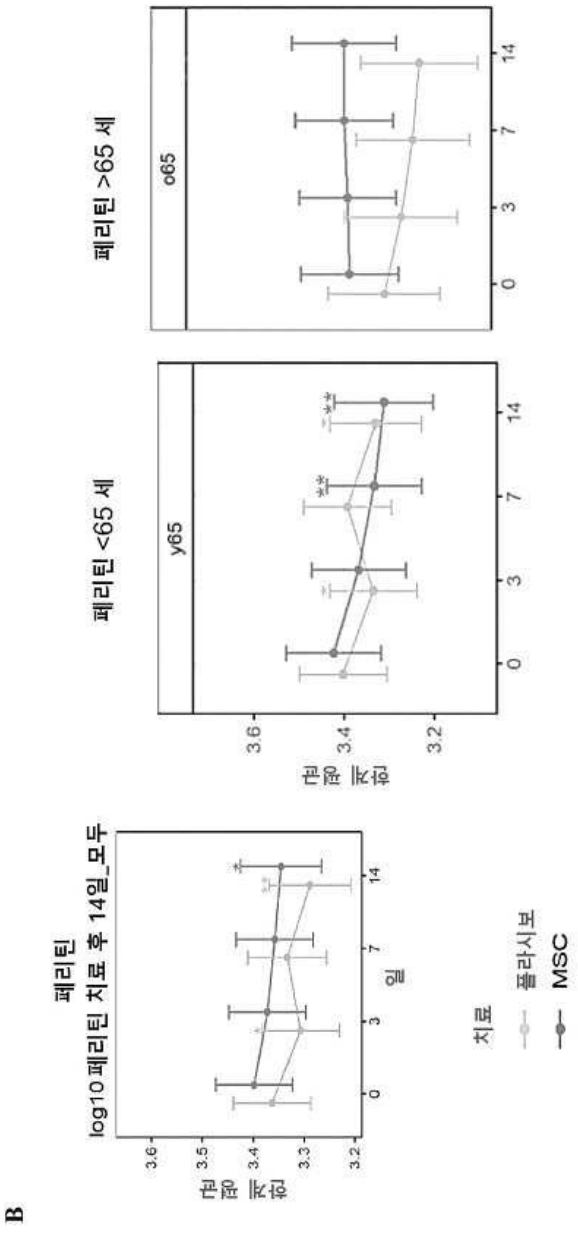
도면10


A
윌콕슨 순위 점수의 분포
125
100
75
50
25
0
점수
Pr > Z 0.0309
Pr > |Z| 0.0619
대조군
randtrt
MSC
B
윌콕슨 순위 점수의 분포
60
40
20
0
점수
Pr > Z 0.0043
Pr > |Z| 0.0086
대조군
randtrt
MSC

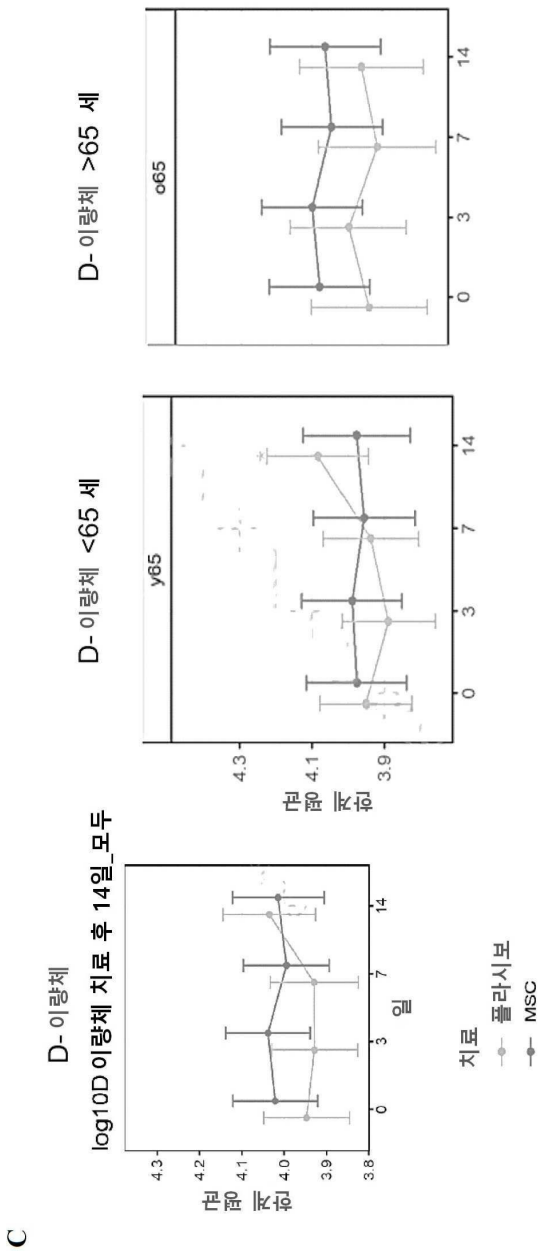
도면11a


A
CRP
log10CRP 치료 후 14일_모두
CRP <65 세
CRP >65 세
y65
o65
추정 평균
일
치료
플라시보
MSC

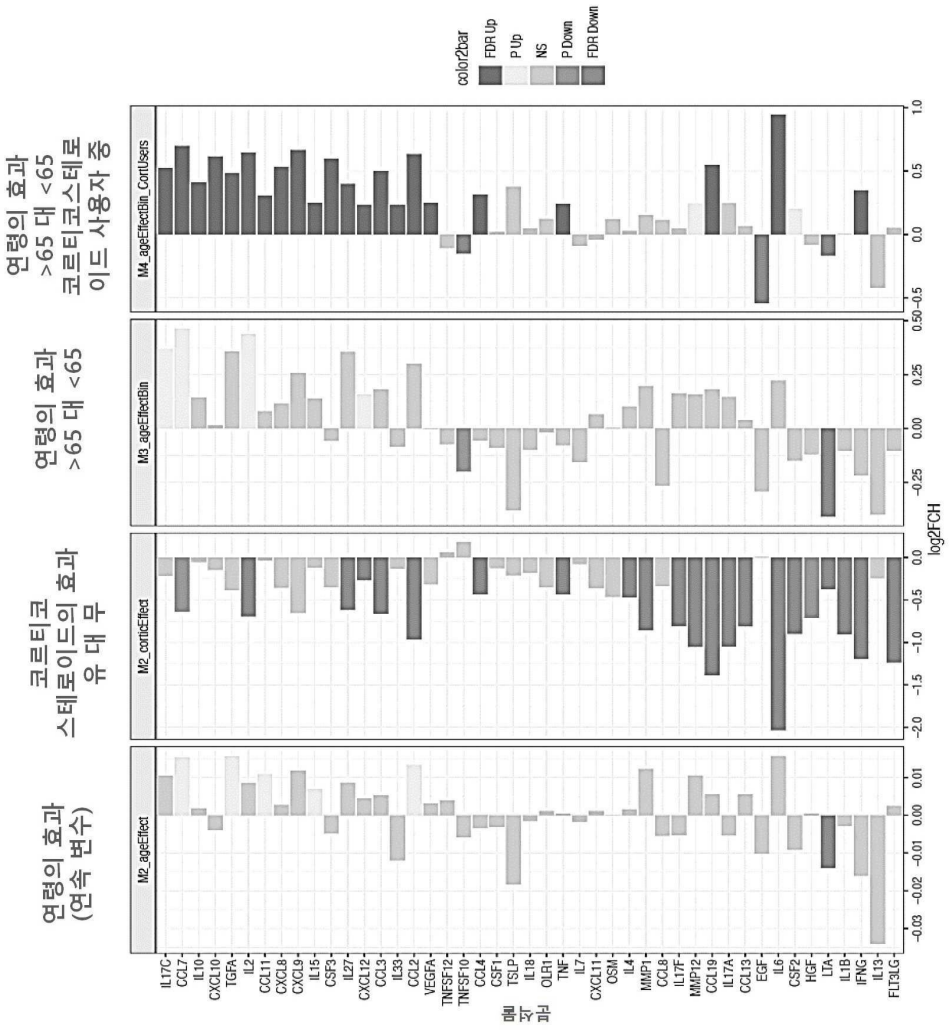
도면11b



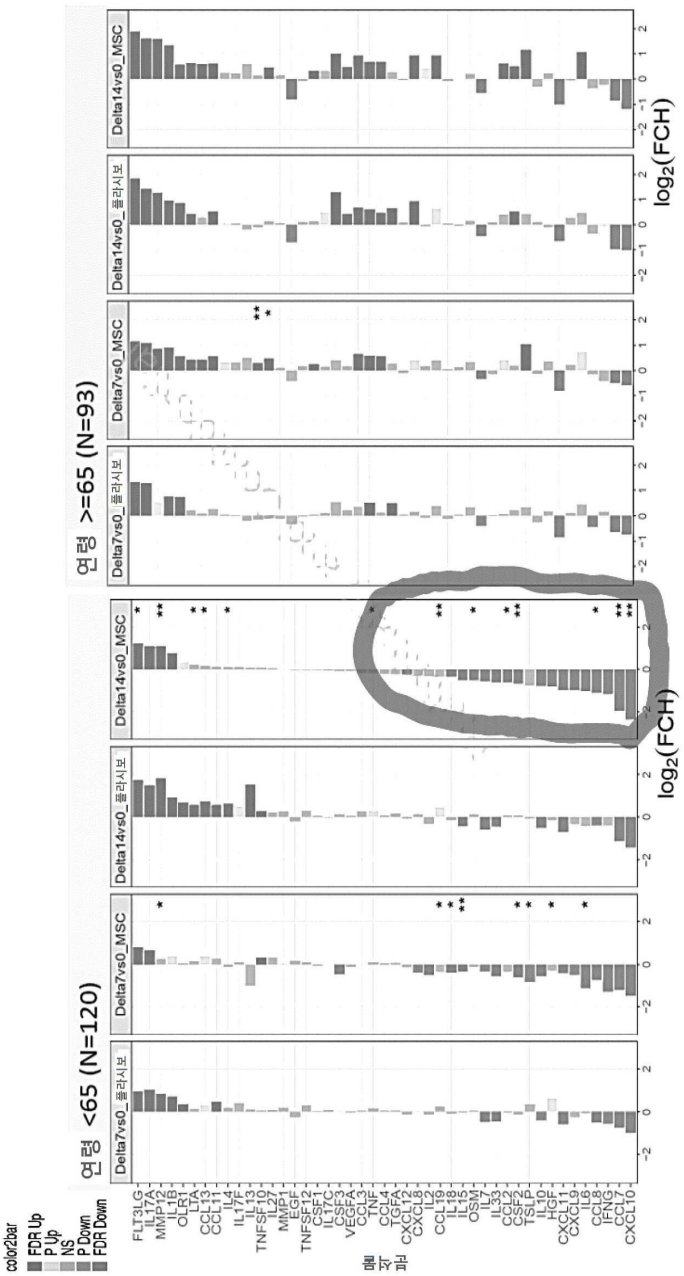
도면11c


C
D- 이량체
log10D 이량체 치료 후 14일_모두
D- 이량체 <65 세
D- 이량체 >65 세
y65
o65
약제 역가
일
치료
플라시보
MSC

도면12


color2bar
FDR Up
P Up
NS
P Down
FDR Down
연령의 효과
(연속 변수)
코르티코
스테로이드의 효과
유 대 무
연령의 효과
>65 대 <65
연령의 효과
>65 대 <65
코르티코스테로
이드 사용자 중
M2_ageEffect
M2_corticEffect
M3_ageEffectBin
M4_ageEffectBin_CortUsers
log2FCH
IL17C
CCL7
IL10
CXCL10
TGFA
IL2
CCL11
CXCL8
CXCL9
IL15
CSF3
IL27
CXCL12
CCL3
IL33
CCL2
VEGFA
TNFSF12
TNFSF10
CCL4
CSF1
TSLP
IL18
OLR1
TNF
IL7
CXCL11
OSM
IL4
MMP1
CCL8
IL17F
MMP12
CCL19
IL17A
CCL13
EGF
IL6
CSF2
HGF
LTA
IL1B
IFNG
IL13
FLT3LG
사이토카인

도면13


color2bar
FDR Up
P Up
NS
P Down
FDR Down
연령 <65 (N=120)
연령 >=65 (N=93)
Delta7vs0_플라시보
Delta7vs0_MSC
Delta14vs0_플라시보
Delta14vs0_MSC
log2(FCH)
FLT3LG
IL17A
MMP12
IL18
OLR1
LTA
CCL13
CCL11
IL4
IL17F
IL13
TNFSF10
IL27
MMP1
EGF
TNFSF12
CSF1
IL17C
IL33
VEGFA
CCL3
TNF
CCL4
TGFA
CXCL12
CXCL8
IL2
CCL19
IL18
IL15
OSM
IL7
IL33
CSF2
CSF3
TSLP
IL10
HGF
CXCL11
CXCL9
IL6
CCL8
IFNG
CCL7
CXCL10