



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(11) 공개번호 10-2022-0143092  
(43) 공개일자 2022년10월24일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 35/28 (2015.01) A61P 37/06 (2006.01)  
C12N 5/077 (2010.01) C12N 5/0775 (2010.01)
- (52) CPC특허분류  
A61K 35/28 (2013.01)  
A61P 37/06 (2018.01)
- (21) 출원번호 10-2022-7032165
- (22) 출원일자(국제) 2021년02월18일  
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2022년09월16일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2021/054066
- (87) 국제공개번호 WO 2021/165420  
국제공개일자 2021년08월26일
- (30) 우선권주장  
2020900472 2020년02월19일 오스트레일리아(AU)

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

전체 청구항 수 : 총 26 항

(54) 발명의 명칭 **만성 이식편 대 숙주 질환의 치료 방법**

**(57) 요약**

본 개시내용은 치료를 필요로 하는 대상체에서 만성 이식편 대 숙주 질환을 치료하거나 예방하는 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은 배양 확장된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포(MLPSC)를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

(52) CPC특허분류

*C12N 5/0663* (2013.01)

*C12N 5/0669* (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

치료를 필요로 하는 인간 대상체에서 만성 이식편 대 숙주 질환(cGvHD)을 치료하거나 예방하는 방법으로서, 배양 확장된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포(MLPSC)를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

#### 청구항 2

청구항 1에 있어서,  
상기 MLPSC가 동결보존되고 해동된, 방법.

#### 청구항 3

청구항 1 또는 청구항 2에 있어서,  
상기 MLPSC가 중간 동결보존된 MLPSC 집단으로부터 확장된 배양물인, 방법.

#### 청구항 4

청구항 1 내지 3 중 어느 한 항에 있어서,  
상기 MLPSC가 적어도 약 5 계대 동안 배양 확장된, 방법.

#### 청구항 5

청구항 1 내지 4 중 어느 한 항에 있어서,  
상기 MLPSC가 백만 MLPSC 당 적어도 13 pg TNFR1을 발현하는, 방법.

#### 청구항 6

청구항 1 내지 4 중 어느 한 항에 있어서,  
상기 MLPSC가 백만 MLPSC 당 약 13 pg 내지 약 44 pg TNFR1을 발현하는, 방법.

#### 청구항 7

청구항 1 내지 6 중 어느 한 항에 있어서,  
상기 배양 확장이 적어도 20개의 집단 배가(population doubling)를 포함하는, 방법.

#### 청구항 8

청구항 1 내지 6 중 어느 한 항에 있어서,  
상기 배양 확장이 적어도 30개의 집단 배가를 포함하는, 방법.

#### 청구항 9

청구항 1 내지 8 중 어느 한 항에 있어서,  
상기 대상체가 스테로이드 면역억제제 및/또는 생물학적 요법에 불응성인, 방법.

#### 청구항 10

청구항 1 내지 9 중 어느 한 항에 있어서,  
상기 대상체가 치료 28일 후에 적어도 부분 반응을 갖는, 방법.

**청구항 11**

청구항 1 내지 9 중 어느 한 항에 있어서,  
상기 대상체가 적어도 치료 28 내지 90일 후에 적어도 부분 반응을 갖는, 방법.

**청구항 12**

청구항 10 또는 청구항 11에 있어서,  
상기 부분 반응은 다음 중 하나 이상 또는 모두로 특징화되는, 방법:

- 적어도 1점의 피부 % BSA 점수 감소;
- 적어도 1점의 구강 점수 감소;
- 적어도 1점의 눈 점수 감소;
- 적어도 1점의 피부 특징 점수 감소;
- 적어도 1점의 위장관 점수 감소;
- 적어도 1점의 간 점수 감소;
- 적어도 1점의 폐 증상 점수 감소;
- 적어도 1점의 폐 FEV1 점수 감소;
- 적어도 1점의 관절 및 근막 점수 감소;
- 적어도 1점의 생식기 점수 감소.

**청구항 13**

청구항 10 또는 청구항 11에 있어서,  
상기 부분 반응은 다음 중 하나 이상 또는 모두로 특징화되는, 방법:

- 적어도 1점의 피부 % BSA 점수 감소;
- 적어도 1점의 구강 점수 감소;
- 적어도 1점의 눈 점수 감소.

**청구항 14**

청구항 1 내지 13 중 어느 한 항에 있어서,  
상기 MLPSC는 정맥내 투여되는, 방법.

**청구항 15**

청구항 1 내지 14 중 어느 한 항에 있어서,  
상기 MLPSC는 중간엽 줄기 세포(MSC)인, 방법.

**청구항 16**

청구항 1 내지 15 중 어느 한 항에 있어서,  
상기 MLPSC는 동종이체인, 방법.

**청구항 17**

청구항 1 내지 16 중 어느 한 항에 있어서,  
용량당  $10 \times 10^6$  내지  $2 \times 10^8$  세포를 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

**청구항 18**

청구항 1 내지 16 중 어느 한 항에 있어서,  
용량당  $20 \times 10^6$  내지  $1 \times 10^7$  세포를 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

**청구항 19**

청구항 17 또는 청구항 18에 있어서,  
상기 대상체는 적어도 2회 용량을 받는, 방법.

**청구항 20**

청구항 17 또는 청구항 18에 있어서,  
상기 대상체는 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10회 용량을 받는, 방법.

**청구항 21**

청구항 19 또는 청구항 20에 있어서,  
상기 첫 2회 용량은 2주 동안 매주 투여되는, 방법.

**청구항 22**

청구항 19 또는 청구항 20에 있어서,  
상기 첫 2회 용량은 2주마다 매주 투여되는, 방법.

**청구항 23**

청구항 22에 있어서,  
세번째 및 후속 용량은 매일 투여되는, 방법.

**청구항 24**

청구항 1 내지 23 중 어느 한 항에 있어서,  
상기 조성물은 Plasma-Lyte A, 디메틸 설폭사이드(DMSO), 인간 혈청 알부민(HSA)을 추가로 포함하는, 방법.

**청구항 25**

청구항 1 내지 23 중 어느 한 항에 있어서,  
상기 조성물은 Plasma-Lyte A(70%), DMSO(10%), HSA(25%) 용액을 추가로 포함하며, 상기 HSA 용액은 5% HSA 및 15% 완충액을 포함하는, 방법.

**청구항 26**

청구항 1 내지 25 중 어느 한 항에 있어서,  
상기 조성물은 1 mL 당  $6.68 \times 10^6$  개 초과인 생존 세포를 포함하는, 방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 개시내용은 치료를 필요로 하는 대상체에서 만성 이식편 대 숙주 질환을 치료하거나 예방하는 방법에 관한 것이다.

**배경 기술**

- [0002] 급성 및 만성 이식편 대 숙주 질환(GvHD)은 동종 줄기 세포 이식의 성공 및 이용가능성을 제한하는 주요 인자인 면역학적 장애이다. 급성 및 만성 GvHD는 모두 만성 질환을 유발하고 숙주 포유동물의 죽음을 초래할 수 있는 전신 염증 반응과 관련이 있다. 그러나, 지난 몇 년 동안, 만성 GvHD(cGvHD)는 동종 골수 또는 줄기 세포 이식의 가장 골치 아픈 합병증으로 부상했다.
- [0003] cGvHD는 급성 GvHD(aGvHD)와 구별된다. aGvHD 및 cGvHD가 별개의 병리학적 과정을 포함한다는 것은 잘 알려져 있다. aGvHD는 주로 Th1/Th17 구동 과정이고 강한 염증 성분을 갖는 것으로 생각되는 반면, cGvHD는 자가면역 및 섬유증 특징을 더 많이 나타낸다.
- [0004] B 세포는 최근 cGvHD의 주요 인자로 점점 더 인식되고 있다. 예를 들어, 줄기 세포 이식 후, cGvHD 환자는 CD5+ B 세포의 재구성이 분명히 손상되었다.
- [0005] 난치성 cGvHD 환자에서 중간엽 줄기 세포(MSC)의 실험은 다양한 결과를 관찰했다. 따라서, cGvHD 및/또는 관련 증상이 있는 환자에서 충족되지 않은 치료 요구가 남아 있으며, 새로운 치료 옵션이 필요하다.

**발명의 내용**

- [0006] 본 발명자들은 놀랍게도 동결보존되고 해동된, 배양 확장된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포의 투여에 의해 만성 이식편 대 숙주 질환(cGvHD)을 갖는 대상체에서 초기 질환 반응(28일)이 달성될 수 있음을 확인하였다. 이러한 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 "기성품" 제품을 구성하며, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포 공여자와 cGvHD 환자의 HLA 일치에 대한 요구 사항은 없다.
- [0007] 따라서, 제1 예에서, 본 개시내용은 치료를 필요로 하는 인간 대상체에서 만성 이식편 대 숙주 질환(cGvHD)을 치료하거나 예방하는 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은 배양 확장된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포(MLPSC)를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0008] 한 예에서, 배양 확장된 MLPSC는 동결보존되고 해동되었다. 따라서, 또 다른 예에서, 본 개시내용은 치료를 필요로 하는 인간 대상체에서 만성 이식편 대 숙주 질환(cGvHD)을 치료하거나 예방하는 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은 배양 확장된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포(MLPSC)를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하고, 상기 배양 확장된 MLPSC는 동결보존 및 해동되었다.
- [0009] 한 예에서, MLPSC는 중간 동결보존된 MLPSC 집단으로부터 확장된 배양물이다. 또 다른 예에서, MLPSC는 적어도 약 5세대 동안 배양 확장된다.
- [0010] 한 예에서, MLPSC는 백만 MLPSC 당 적어도 13 pg TNFR1을 발현한다. 한 예에서, MLPSC는 백만 MLPSC당 약 13 pg 내지 약 44 pg TNFR1을 발현한다.
- [0011] 또 다른 예에서, 배양 확장은 적어도 20개의 집단 배가(Population doubling)를 포함한다. 또 다른 예에서, 배양 확장은 적어도 30개의 집단 배가를 포함한다.
- [0012] 한 예에서, 대상체는 스테로이드 면역억제제 및/또는 생물학적 요법에 불응성이다. 또 다른 예에서, 대상체는 치료 28일 후에 적어도 부분 반응을 갖는다. 또 다른 예에서, 대상체는 적어도 치료 28 내지 90일 후에 적어도 부분 반응을 갖는다. 한 예에서, 부분 반응은 다음 중 하나 이상 또는 모두로 특징화된다:
- [0013] - 적어도 1점의 피부 % BSA 점수 감소;
- [0014] - 적어도 1점의 구강 점수 감소;
- [0015] - 적어도 1점의 눈 점수 감소;
- [0016] - 적어도 1점의 피부 특징 점수 감소;
- [0017] - 적어도 1점의 위장관 점수 감소;
- [0018] - 적어도 1점의 간 점수 감소;
- [0019] - 적어도 1점의 폐 증상 점수 감소;
- [0020] - 적어도 1점의 폐 FEV1 점수 감소;
- [0021] - 적어도 1점의 관절 및 근막 점수 감소;

- [0022] - 적어도 1점의 생식기 점수 감소.
- [0023] 또 다른 예에서, 부분 반응은 다음 중 하나 이상 또는 모두로 특징화된다:
- [0024] - 적어도 1점의 피부 % BSA 점수 감소;
- [0025] - 적어도 1점의 구강 점수 감소;
- [0026] - 적어도 1점의 눈 점수 감소.
- [0027] 또 다른 예에서, MLPSC는 정맥내 투여된다. 한 예에서, MLPSC는 중간엽 줄기 세포(MSC)이다. 또 다른 예에서, MLPSC는 동종이계이다.
- [0028] 또 다른 예에서, 본 개시내용의 방법은 용량 당  $10 \times 10^6$  내지  $2 \times 10^8$  세포를 투여하는 단계를 포함한다. 또 다른 예에서, 본 개시내용의 방법은 용량 당  $20 \times 10^6$  내지  $1 \times 10^7$  세포를 투여하는 단계를 포함한다. 또 다른 예에서, 대상체는 적어도 2회 용량을 받는다. 또 다른 예에서, 대상체는 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 회 용량을 받는다. 한 예에서, 첫 2회 용량은 2주 동안 매주 투여된다. 또 다른 예에서, 첫 2회 용량은 2주마다 매주 투여된다. 또 다른 예에서, 세번째 및 후속 용량은 매월 투여된다.
- [0029] 한 예에서, 조성물은 Plasma-Lyte A, 디메틸 설폭사이드(DMSO), 인간 혈청 알부민(HSA)을 추가로 포함한다. 또 다른 예에서, 조성물은 Plasma-Lyte A(70%), DMSO(10%), HSA(25%) 용액을 추가로 포함하며, 상기 HSA 용액은 5% HSA 및 15% 완충액을 포함한다.
- [0030] 한 예에서, 조성물은 1 mL 당  $6.68 \times 10^6$  개 초과인 생존 세포를 포함한다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0031] 본 명세서 전반에 걸쳐, 달리 구체적으로 언급되지 않거나 문맥이 달리 요구하지 않는 한, 단일 단계, 물질의 조성, 단계의 그룹 또는 물질의 조성 그룹에 대한 언급은 하나 및 복수(즉, 하나 이상의)의 이러한 단계, 물질의 조성, 단계의 그룹 또는 물질의 조성 그룹을 포함하는 것으로 간주된다.
- [0032] 당업자는 본원에 기재된 개시내용이 구체적으로 기재된 것 이외의 변형 및 수정이 가능하다는 것을 이해할 것이다. 본 개시내용은 이러한 모든 변형 및 수정을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 본 개시내용은 또한 개별적으로 또는 집합적으로 본 명세서에서 언급되거나 표시된 모든 단계, 특징, 조성물 및 화합물, 및 상기 단계들 또는 특징들 중 임의의 및 모든 조합들 또는 임의의 둘 이상을 포함한다.
- [0033] 본 개시내용은 단지 예시의 목적으로 의도된, 본원에 기재된 특정 실시형태에 의해 범위가 제한되지 않는다. 기능적으로 동등한 제품, 조성물 및 방법은 본원에 기재된 바와 같이 본 개시내용의 범위 내에 분명히 있다.
- [0034] 본원에 개시된 임의의 예는 달리 구체적으로 언급되지 않는 한, 필요한 수정을 가하여 다른 예에 적용되어야 한다.
- [0035] 달리 구체적으로 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 당업자가 일반적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는 것으로 간주되어야 한다(예를 들어, 세포 배양, 분자 유전학, 줄기 세포 분화, 면역학, 면역조직화학, 단백질 화학 및 생화학).
- [0036] 달리 표시되지 않는 한, 본 개시내용에서 사용되는 수술 기술은 당업자에게 잘 알려진 표준 절차이다.
- [0037] 중간엽 계통 줄기 또는 전구체 세포의 집단을 얻고 농축시키는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 중간엽 계통 줄기 또는 전구체 세포의 농축된 집단은 중간엽 계통 줄기 또는 전구체 세포에서 발현되는 세포 표면 마커의 사용을 기반으로 하는 유세포 분석 및 세포 분류 절차를 사용하여 획득될 수 있다.
- [0038] 본원에서 인용되거나 참조된 모든 문서, 그리고 본원에 인용된 문서에서 인용되거나 참조된 모든 문서는, 본원에 또는 본원에 참조로 포함된 문서에 언급된 모든 제품에 대한 제조업체의 지침, 설명, 제품 사양 및 제품 시트와 함께, 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.
- [0039] 선택된 정의들
- [0040] 용어 "및/또는", 예를 들어, "X 및/또는 Y"는 "X 및 Y" 또는 "X 또는 Y"를 의미하는 것으로 이해되어야 하며, 두 가지 의미 또는 어느 한 의미에 대한 명시적 지원을 제공하기 위해 취해져야 한다.

- [0041] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 약은, 달리 언급되지 않는 한, 지정된 값의 +/- 10%, 보다 바람직하게는 +/- 5%를 지칭한다.
- [0042] 본 명세서 전반에 걸쳐, 단어 "포함하다", 또는 "포함한다" 또는 "포함하는"과 같은 변형은 언급된 요소, 정수 또는 단계, 또는 요소, 정수 또는 단계들의 그룹을 포함하는 것을 의미하는 것으로 이해될 것이지만, 임의의 다른 요소, 정수 또는 단계, 또는 요소, 정수 또는 단계들의 그룹을 제외하지 않는다.
- [0043] 본원에 사용된 바와 같이, 단수 형태 "a", "an" 및 "the"는 문맥이 달리 나타내지 않는 한 단수 및 복수 참조를 포함한다.
- [0044] "단리된" 또는 "정제된"은 그의 자연 환경의 적어도 일부 성분으로부터 분리된 세포를 의미한다. 이 용어는 그의 자연 환경에서 세포를 물리적으로 완전히 분리하는 것을 포함한다(예를 들어, 공여자로부터 제거). 용어 "단리된"은 예를 들어, 해리에 의한 직접적인 인접 세포와의 세포 관계의 변경을 포함한다. 용어 "단리된"은 조직 절편에 있는 세포를 지칭하지 않는다. 세포 집단을 지칭하기 위해 사용될 때, 용어 "단리된"은 본 개시내용의 단리된 세포의 증식으로부터 생성된 세포 집단을 포함한다.
- [0045] 용어 "계대(passage)", "계대(passaging)" 또는 "하위 배양"은 본 개시내용의 맥락에서 장기간 동안 배양 조건 하에 세포가 생존하고 성장하도록 유지하여 세포 수가 지속적으로 증가할 수 있도록 하는 공지된 세포 배양 기술들을 지칭한다. 세포주가 하위 배양된 정도는 종종 "계대 수"로 표현되는데, 이는 일반적으로 세포가 하위 배양된 횟수를 나타내는 데 사용된다. 한 예에서, 한 계대는 비-부착 세포를 제거하고 부착 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포를 남기는 것을 포함한다. 그런 다음, 이러한 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 (예를 들어, 트립신 또는 콜라게나제와 같은 프로테아제를 사용하여) 기질 또는 플라스크로부터 분리될 수 있고, 배지가 첨가될 수 있고, 선택적인 세척(예를 들어, 원심분리에 의해)이 수행될 수 있고, 그런 다음 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 전체적으로 더 큰 표면적을 포함하는 하나 이상의 배양 용기에 다시 플레이팅되거나 다시 시드될 수 있다. 그런 다음 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 배양에서 계속 확장될 수 있다. 또 다른 예에서, 비-부착 세포를 제거하는 방법은 비-효소적 처리 단계(예를 들어, EDTA 사용)를 포함한다. 한 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 합류점에서 또는 그 근처에서 계대된다(예를 들어, 약 75% 내지 약 95% 합류점). 한 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 약 10%, 약 15%, 또는 약 20% 세포/ml 배양 배지의 농도로 시딩된다.
- [0046] 본 개시내용의 맥락에서 사용되는 용어 "배지(medium)" 또는 "배지(media)"는 배양물에서 세포를 둘러싼 환경의 성분을 포함한다. 배지는 세포가 성장하도록 하는 데 적합한 조건에 기여하고/하거나 그러한 조건을 제공하는 것으로 예상된다. 배지는 고체, 액체, 기체 또는 상과 물질의 혼합물일 수 있다. 배지는 액체 성장 배지 뿐만 아니라 세포 성장을 지속하지 않는 액체 배지를 포함할 수 있다. 예시적인 기체 배지는 페트리 접시 또는 다른 고체 또는 반고체 지지체 상에서 성장하는 세포가 노출되는 기체상을 포함한다.
- [0047] "이식편 대 숙주 질환(GvHD)"은 동종 골수 또는 줄기 세포 이식의 성공 및 이용가능성을 제한하는 주요 인자인 면역학적 장애이다. GvHD는 급성(aGvHD) 또는 만성(cGvHD) 형태로 발생한다. 급성 GvHD는 일반적으로 골수 또는 줄기 세포 이식 후 100일 이내에 나타난다. 만성 GvHD는 일반적으로 aGvHD보다 늦게 나타나며(이식 후 100일 초과) 자가면역 질환의 일부 특징을 갖는다. aGvHD의 해상도에 따라 또는 aGvHD의 확장으로 새로 개발될 수 있다. 만성 GvHD는 광범위한 피부 발진, 고통스러운 구강 궤양, 숨가쁨, 사지 및 관절 통증을 포함하여 종종 쇠약하게 하는 여러 증상을 유발할 수 있다. 한 예에서, cGvHD 환자는 CD5+ B 세포의 재구성이 손상되었다. 한 예에서, cGvHD는 스테로이드 요법에 불응성이다. 한 예에서, cGvHD는 생물학적 요법에 불응성이다. 한 예에서, cGvHD는 스테로이드 요법 및 생물학적 요법에 대해 불응성이다.
- [0048] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "치료하는", "치료하다" 또는 "치료"는 중간엽 계통 줄기 또는 전구체 세포 및/또는 그의 자손 및/또는 그로부터 유래된 가용성 인자의 집단을 투여하여 cGvHD의 적어도 하나의 증상을 감소시키거나 제거하는 것을 포함한다. 한 예에서, 치료는 배양 확장된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포의 집단을 투여하는 것을 포함한다. 한 예에서, 치료는 치료가 개시된 후 부분 반응을 유도한다. 한 예에서, 부분 반응은 치료가 개시된 후 28일 후에 유도된다. 한 예에서, 부분 반응은 치료가 개시된 후 적어도 28일 후에 유도된다. 한 예에서, 부분 반응은 치료가 개시된 후 적어도 30일 후에 유도된다. 한 예에서, 부분 반응은 치료가 개시된 후 적어도 2개월 후에 유도된다. 또 다른 예에서, 부분 반응은 치료가 개시된 후 적어도 3개월 후에 유도된다. 또 다른 예에서, 부분 반응은 치료가 개시된 후 28 내지 56일 후에 유도된다. 또 다른 예에서, 부분 반응은 2회 용량 후에 유도된다. 또 다른 예에서, 부분 반응은 매주 1회 투여된 2회 용량 후에 유도된다. 또 다른 예에서, 부분 반응은 2주마다 매주 1회 투여된 2회 용량 후에 유도된다. 또 다른 예에서, 부분 반응은 3회 이상의 용량

후에 유도된다.

- [0049] 한 예에서, 부분 반응은 다음 중 하나 이상 또는 모두로 특징화된다:
- [0050] - 적어도 1점의 피부 % BSA 점수 감소;
  - [0051] - 적어도 1점의 구강 점수 감소;
  - [0052] - 적어도 1점의 눈 점수 감소;
  - [0053] - 적어도 1점의 피부 특징 점수 감소;
  - [0054] - 적어도 1점의 위장관 점수 감소;
  - [0055] - 적어도 1점의 간 점수 감소;
  - [0056] - 적어도 1점의 폐 증상 점수 감소;
  - [0057] - 적어도 1점의 폐 FEV1 점수 감소;
  - [0058] - 적어도 1점의 관절 및 근막 점수 감소;
  - [0059] - 적어도 1점의 생식기 점수 감소.
- [0060] 한 예에서, 부분 반응은 적어도 1점의 피부 % BSA 점수 감소를 특징으로 한다. 또 다른 예에서, 부분 반응은 적어도 1점의 구강 점수 감소를 특징으로 한다. 또 다른 예에서, 부분 반응은 적어도 1점의 눈 점수 감소를 특징으로 한다. 이러한 예에서, 점수는 GvHD를 위한 NIH Consensus Criteria 2014(예를 들어, 이하의 실시예 섹션 참조)를 사용하여 얻을 수 있다.
- [0061] 또 다른 예에서, 부분 반응은 다음 중 하나 이상 또는 모두로 특징화된다:
- [0062] - 적어도 1점의 피부 % BSA 점수 감소;
  - [0063] - 적어도 1점의 구강 점수 감소;
  - [0064] - 적어도 1점의 눈 점수 감소.
- [0065] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "예방하다" 또는 "예방하는"은 중간엽 계통 줄기 또는 전구체 세포 및/또는 그의 자손 및/또는 그로부터 유래된 가용성 인자의 집단을 투여하여, 적어도 하나의 cGvHD 증상 발병을 중지 또는 억제하는 것을 포함한다.
- [0066] GvHD를 특징짓는 다양한 분류 체계가 있다(Lee, S.,(2017) *Blood.*, 129(1): 30-37). 한 예에서, NIH Consensus Criteria 2014는 본원에 개시된 스코어링 결과에 사용될 수 있다(Jagasia 등,(2015) *Biol Blood Marrow Transplant.*, 21:389-401). NIH Consensus Criteria 2014의 구성 요소는 다음 표에 개시되어 있다:

[0067] cGVHD의 기관 스코어링

기관	0 점	1 점	2 점	3 점
피부 % BSA <sup>1</sup>	BSA 관련 없음	1-18% BSA	19-50% BSA	>50% BSA
피부 특징	경화 특징 없음	N/A	표면 경화 특징이지만, "숨겨진" 특징은 아님	깊은 경화 특징; "숨겨진"; 손상된 이동성; 궤양
구강	증상 없음	경증의 질환 징후가 있지만 경구 섭취를 크게 제한하지 않는 경증	경구 섭취가 부분적으로 제한되는 질환 징후가 있는 중등도 증상	경구 섭취가 크게 제한되는 질병 징후가 있는 중증 증상
눈	증상 없음	ADL에 영향을 미치지 않는 가벼운 안구 건조 증상(윤활제 점적 ≤3x/일 필요)	건성 각결막염(KCS)으로 인한 새로운 시력 손상 없이 ADL에 부분적으로 영향을 미치는 중등도 안구 건조 증상(윤활제 점적 >3x/일 또는 누점 플러그 필요)	ADL에 중대한 영향을 미치는 심한 안구 건조 증상(통증 완화용 특수 안경) 또는 안구 증상으로 인해 작업할 수 없거나 건성 각결막염(KCS)으로 인한 시력 상실
위장관	증상 없음	상당한 체중 감소(<5%)가 없는 증상	3개월 이내에 경증에서 중등도의 체중 감소(<15%)와 관련된 증상 또는 일상 생활에 심각한 지장이 없는 중등도 설사	3개월 이내에 상당한 체중 감소(>15%)와 관련된 증상, 대부분의 칼로리 요구량에 대한 영양 보충이 필요하거나 식도 확장 또는 일상 생활에 심각한 지장을 주는 심한 설사
간	정상 총 빌리루빈 및 ALT 또는 AP <3 x ULN	정상 총 빌리루빈 ALT ≥3 내지 5 x ULN 또는 AP ≥3 x ULN	상승된 총 빌리루빈 그러나 ≤3 mg/dL 또는 ALT >5 x ULN	상승된 총 빌리루빈 그러나 >3 mg/dL
폐 증상 점수	증상 없음	경증(1 계단 등반 후 SOB)	중등도 증상(경지 보행 후 SOB)	중증 증상(휴식 시 SOB; O2 필요)
폐 폐 점수	FEV1 ≥80%	FEV1 60-79%	FEV1 40-59%	FEV1 ≤39%
관절 및 근막	증상 없음	팔과 다리의 경미한 조임, 정상 또는 경미한 운동 범위 감소 및 ADL에 영향 없음	팔 또는 다리의 조임 또는 관절 구축, 근막염으로 인한 것으로 생각되는 흉부, 운동 범위의 중등도 감소 및 AID의 경증에서 중등도로의 제한	운동 범위의 현저한 감소와 ADL의 상당한 제한을 동반한 구축(신발, 단추 셔츠, 드레스 선택 등을 묶을 수 없음)
생식기 <sup>2</sup>	징후 없음	가벼운 징후 및 여성은 검사에 불편함을 동반하거나 동반하지 않음	중등도의 징후 및 검사에서 불편함의 징후가 있을 수 있음	증상이 있거나 없는 중증 징후
기타 특징들 <sup>3</sup>	GVHD 없음	경증	보통	중증

[0068]

[0069]

한 예에서, 부분 반응은 위의 표에서 기관별 NIH Consensus Criteria 2014 점수가 1점 이상 감소한 것이다. 따라서, 한 예에서, 치료는 1점 이상의 피부 % BSA 점수 감소를 유도한다. 또 다른 예에서, 치료는 1점 이상의 구강 점수 감소를 유도한다. 또 다른 예에서, 치료는 1점 이상의 눈 점수 감소를 유도한다. 또 다른 예에서, 치료는 1점 이상의 피부 특징 점수 감소를 유도한다. 또 다른 예에서, 치료는 1점 이상의 위장관 점수 감소를 유도한다. 또 다른 예에서, 치료는 1점 이상의 간 점수 감소를 유도한다. 또 다른 예에서, 치료는 1점 이상의 폐 증상 점수 감소를 유도한다. 또 다른 예에서, 치료는 1점 이상의 폐 FEV1 점수 감소를 유도한다. 또 다른 예에서, 치료는 1점 이상의 관절 및 근막 점수 감소를 유도한다. 또 다른 예에서, 치료는 1점 이상의 생식기 점수 감소를 유도한다.

[0070]

한 예에서, 치료는 치료가 개시된 후 완전한 반응을 유도한다. 한 예에서, 완전한 반응은 치료가 개시된 후 28일 후에 유도된다. 한 예에서, 완전한 반응은 치료가 개시된 후 적어도 28일 후에 유도된다. 한 예에서, 완전한 반응은 치료가 개시된 후 적어도 30일 후에 유도된다. 한 예에서, 완전한 반응은 치료가 개시된 후 적어도 2개

일 후에 유도된다. 또 다른 예에서, 완전한 반응은 치료가 개시된 후 적어도 3개월 후에 유도된다. 또 다른 예에서, 완전한 반응은 치료가 개시된 후 28 내지 56일 후에 유도된다. 또 다른 예에서, 완전한 반응은 2회 용량 후에 유도된다. 또 다른 예에서, 완전한 반응은 매주 1회 투여된 2회 용량 후에 유도된다. 또 다른 예에서, 완전한 반응은 2주마다 매주 1회 투여된 2회 용량 후에 유도된다. 또 다른 예에서, 완전한 반응은 3회 이상의 용량 후에 유도된다.

- [0071] 한 예에서, 본 개시내용의 방법은 대상체의 cGvHD 질환 진행 또는 질환 합병증을 억제한다. 대상체의 cGvHD 질환 진행 또는 질환 합병증 "억제"는 대상체의 cGvHD 진행 및/또는 질환 합병증을 예방하거나 감소시키는 것을 의미한다.
- [0072] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "대상체"는 인간 대상체를 지칭한다. 예를 들어, 대상체는 성인일 수 있다. 또 다른 예에서, 대상체는 아동일 수 있다. 또 다른 예에서, 대상체는 청소년일 수 있다. "대상체", "환자" 또는 "개인"과 같은 용어들은 문맥상 본 개시내용에서 상호교환가능하게 사용될 수 있는 용어이다.
- [0073] 본 개시내용에 따라 치료되는 대상체는 cGvHD를 나타내는 증상을 가질 수 있다. 예를 들어, 대상체는 중등도 또는 중증 cGvHD를 가질 수 있다. 예시적인 증상으로는 안구 건조, >19% BSA, >50% BSA, 반구진 발진/홍반, 구진 편평 병변/어린선, 과다색소침착, 경구 섭취의 부분적 또는 주요 제한, 설사, 총 빌리루빈 증가, FEV1 감소 및 관절의 압박감 또는 통증이 있다.
- [0074] 한 예에서, 대상체는 이전에 적어도 하나의 항-TNF 요법에 실패한 적이 있다. 한 예에서, 대상체는 생물학적 요법에 대한 금기 사항을 가지고 있다. 또 다른 예에서, 대상체는 이전에 적어도 하나의 스테로이드 요법에 실패한 적이 있다.
- [0075] 또 다른 예에서, 대상체는 90일 초과 동안 GvHD를 가졌다. 또 다른 예에서, 대상체는 100일 초과 동안 GvHD를 가졌다.
- [0076] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "유전적으로 변형되지 않은"은 핵산으로의 형질감염에 의해 변형되지 않은 세포를 지칭한다. 의심의 여지를 피하기 위해, 본 개시내용의 맥락에서, Ang1을 암호화하는 핵산으로 형질감염된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 유전적으로 변형된 것으로 간주될 것이다.
- [0077] 중간엽 계통 전구체 세포
- [0078] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포(MLPSC)"는 다분화능을 유지하면서 자가 재생하는 능력과 중간엽 기원, 예를 들어, 조골세포, 연골세포, 지방세포, 기질 세포, 섬유아세포 및 힘줄, 또는 비-중배엽 기원, 예를 들어, 간세포, 신경 세포 및 상피 세포의 여러 세포 유형으로 분화할 수 있는 능력을 갖는 미분화 다능성 세포를 지칭한다. 의심의 여지를 피하기 위해, "중간엽 계통 전구체 세포"는 뼈, 연골, 근육 및 지방 세포, 섬유 결합 조직과 같은 중간엽 세포로 분화할 수 있는 세포를 지칭한다.
- [0079] 용어 "중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포"는 모 세포 및 이들의 미분화된 자손을 모두 포함한다. 이 용어는 또한 중간엽 전구체 세포, 다능성 기질 세포, 중간엽 줄기 세포(MSC), 혈관주위 중간엽 전구체 세포, 및 이들의 미분화된 자손을 포함한다.
- [0080] 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 자가, 동종이계, 이종, 동계 또는 동종일 수 있다. 자가 세포는 재이식될 동일한 개체로부터 단리된다. 동종이계 세포는 동일한 종의 공여자로부터 단리된다. 이종 세포는 다른 종의 공여자로부터 단리된다. 동계 또는 동종 세포는 쌍둥이, 클론 또는 고도로 근친 교배된 연구 동물 모델과 같이 유전적으로 동일한 유기체로부터 단리된다.
- [0081] 한 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 동종이계이다. 한 예에서, 동종이계 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 배양 확장되고 동결보존된다.
- [0082] 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 주로 골수에 존재하지만, 예를 들어, 체대혈 및 멧줄, 성인 말초혈액, 지방 조직, 소주골 및 치수를 비롯한 다양한 숙주 조직에도 존재하는 것으로 나타났다. 그들은 또한 피부, 비장, 췌장, 뇌, 신장, 간, 심장, 망막, 뇌, 모낭, 장, 폐, 림프절, 흉선, 인대, 힘줄, 골격근, 진피 및 골막에서 발견되며; 중배엽 및/또는 내배엽 및/또는 외배엽과 같은 생식선으로 분화할 수 있다. 따라서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 지방, 골, 연골, 탄력, 근육 및 섬유 결합 조직을 포함하지만 이에 제한되지 않는 다수의 세포 유형으로 분화할 수 있다. 이들 세포가 진입하는 특정 혈통-의지 및 분화 경로는 기계적 영향 및/또는 성장 인자, 사이토카인, 및/또는 숙주 조직에 의해 확립된 국소 미세환경 조건과 같은 내인성 생리활성 인자로부터

터의 다양한 영향에 따라 달라진다.

- [0083] 용어 "농축된", "농축" 또는 그의 변형은 하나의 특정 세포 유형의 비율 또는 다수의 특정 세포 유형의 비율이 치료되지 않은 세포(예를 들어, 그의 고유 환경의 세포) 집단과 비교할때 증가되는 세포 집단을 설명하기 위해 본원에서 사용된다. 한 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포가 풍부한 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 풍부한 세포 집단"은 용어 "X% 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포를 포함하는 세포 집단"을 명시적으로 뒷받침하는 것으로 간주될 것이며, 여기서 X%는 본원에 인용된 백분율이다. 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 일부 예에서, 클론 생성 콜로니를 형성할 수 있으며, 예를 들어 CFU-F(섬유아세포) 또는 이의 하위집합(예를 들어, 50% 또는 60% 또는 70% 또는 70% 또는 90% 또는 95%)이 이 활성을 가질 수 있다.
- [0084] 본 개시내용의 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 중간엽 줄기 세포(MSC)이다. MSC는 균질한 조성물일 수 있거나 MSC가 풍부한 혼합 세포 집단일 수 있다. 균질한 MSC 조성물은 부착성 골수 또는 골막 세포를 배양하여 얻을 수 있으며, MSC는 독특한 단일클론 항체로 식별되는 특정 세포 표면 마커에 의해 식별될 수 있다. MSC가 풍부한 세포 집단을 얻는 방법은, 예를 들어, 미국 특허 번호 제5,486,359호에 기재되어 있다. MSC의 대체 공급원은 혈액, 피부, 제대혈, 근육, 지방, 뼈 및 연골막을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 한 예에서, MSC는 동종이계이다. 한 예에서, MSC는 동결보존된다. 한 예에서, MSC는 배양 확장되고 동결보존된다.
- [0085] 또 다른 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 CD29+, CD54+, CD73+, CD90+, CD102+, CD105+, CD106+, CD166+, MHC1+ MSC이다.
- [0086] 단리되거나 농축된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 배양에 의해 시험관내에서 확장될 수 있다. 단리되거나 농축된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 동결보존, 해동 및 배양에 의해 시험관 내에서 확장될 수 있다.
- [0087] 한 예에서, 단리되거나 농축된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 배양 배지(무혈청 또는 혈청-보충됨), 예를 들어, 5% 소태아혈청(FBS) 및 글루타민이 보충된 알파 최소 필수 배지( $\alpha$ MEM)에 50,000개 생존 세포/cm<sup>2</sup>로 시딩되고, 37°C, 20% O<sub>2</sub>에서 밤새 배양 용기에 부착되도록 하였다. 필요에 따라 배양 배지를 교체 및/또는 변경하고, 세포를 37°C, 5% O<sub>2</sub>에서 추가로 68 내지 72시간 동안 배양한다.
- [0088] 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 배양된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 생체내 세포와 표현형이 상이하다. 예를 들어, 한 실시형태에서, 이들은 하기 마커들, CD44, NG2, DC146 및 CD140b 중 하나 이상을 발현한다. 배양된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 또한, 생체내 세포와 생물학적으로 상이하며, 생체내에서 대부분 비순환(정지) 세포에 비해 증식 속도가 더 높다.
- [0089] 한 예에서, 세포 집단은 선택가능한 형태의 STRO\_1+ 세포를 포함하는 세포 체제로부터 농축된다. 이와 관련하여, 용어 "선택가능한 형태"는 세포가 STRO\_1+ 세포의 선택을 허용하는 마커(예를 들어, 세포 표면 마커)를 발현함을 의미하는 것으로 이해될 것이다. 마커는 STRO\_1일 수 있지만 반드시 그럴 필요는 없다. 예를 들어, 본원에 기술되고/되거나 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\_1을 발현하고(STRO\_1bright일 수 있다). 따라서, 세포가 STRO\_1+라는 표시는 STRO\_1 발현에 의해서만 세포가 선택된다는 것을 의미하지 않는다. 한 예에서, 세포는 적어도 STRO\_3 발현에 기초하여 선택되며, 예를 들어, 이들은 STRO\_3+(TNAP+)이다.
- [0090] 세포 또는 그의 집단의 선택에 대한 언급은 반드시 특정 조직 공급원으로부터의 선택을 필요로 하지 않는다. 본원에 기재된 바와 같이, STRO\_1+ 세포는 매우 다양한 공급원으로부터 선택되거나 단리되거나 농축될 수 있다. 즉, 일부 예에서, 이러한 용어는 STRO\_1+ 세포(예를 들어, 중간엽 전구체 세포)를 포함하는 임의의 조직 또는 혈관화된 조직 또는 혈관주위세포(예를 들어, STRO\_1+ 혈관주위세포)를 포함하는 조직 또는 본원에 인용된 조직들 중 임의의 하나 이상으로부터의 선택을 위한 지원을 제공한다.
- [0091] 한 예에서, 본 개시내용에 사용된 세포는 TNAP+, VCAM\_1+, THY\_1+, STRO\_2+, STRO\_4+(HSP-90 $\beta$ ), CD45+, CD146+, 3G5+ 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 개별적으로 또는 집합적으로 선택된 하나 이상의 마커를 발현한다.
- [0092] "개별적으로"는 본 개시내용이 인용된 마커 또는 마커들의 그룹을 별도로 포함하고, 개별 마커 또는 마커들의

그룹이 본원에 별도로 열거되지 않을 수 있음에도 불구하고, 첨부된 청구범위가 이러한 마커 또는 마커들의 그룹을 서로 별도로 분리하여 정의할 수 있음을 의미한다.

[0093] "집합적으로"는 본 개시내용이 인용된 마커 또는 마커들의 그룹의 임의의 수 또는 조합을 포함하고, 마커 또는 마커들의 그룹의 그러한 수 또는 조합이 본원에 구체적으로 열거되지 않을 수 있음에도 불구하고, 첨부된 청구범위가 이러한 조합 또는 하위 조합을 마커 또는 마커들의 그룹의 임의의 다른 조합과 별도로 및 분리하여 정의할 수 있음을 의미한다.

[0094] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "TNAP"는 조직 비-특이적 알칼리성 포스파타제의 모든 동형을 포괄하는 것으로 의도된다. 예를 들어, 이 용어는 간 동형(LAP), 뼈 동형(BAP) 및 신장 동형(KAP)을 포함한다. 한 예에서, TNAP는 BAP이다. 한 예에서, 본원에 사용된 바와 같은 TNAP는 기탁 수탁 번호 PTA-7282 하에 부다페스트 조약의 조항 하에 2005년 12월 19일 ATCC에 기탁된 하이브리도마 세포주에 의해 생성된 STRO\_3 항체에 결합할 수 있는 분자를 지칭한다.

[0095] 또한, 한 예에서, STRO\_1+ 세포는 클론생성 CFU-F를 생성할 수 있다.

[0096] 한 예에서, 상당한 비율의 STRO\_1+ 세포는 적어도 2개의 상이한 생식선으로 분화할 수 있다. STRO\_1+ 세포가 수입될 수 있는 계통의 비-제한적인 예는 골 전구체 세포; 담관 상피 세포 및 간세포에 대해 다능성인 간세포 전구체; 희소돌기아교세포 및 성상교세포로 진행되는 신경교 세포 전구체를 생성할 수 있는 신경 제한 세포; 뉴런으로 진행되는 뉴런 전구체; 심장 근육 및 심근 세포의 전구체, 포도당-반응성 인슐린 분비 췌장 베타 세포주를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 다른 계통에는 상아모세포, 상아질-생성 세포 및 연골세포, 및 하기의 전구체 세포: 망막 색소 상피 세포, 섬유아세포, 피부 세포 예컨대 케라티노사이트, 수지상 세포, 모낭 세포, 신관 상피 세포, 평활근 및 골격근 세포, 고환 전구체, 혈관 내피 세포, 힘줄, 인대, 연골, 지방세포, 섬유아세포, 골수 기질, 심장 근육, 평활근, 골격근, 혈관주위세포, 혈관, 상피, 신경교, 뉴런, 성상세포 및 희소돌기아교세포가 포함되지만, 이에 제한되지는 않는다.

[0097] 한 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 단일 공여자, 또는 공여자 샘플 또는 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포가 후속적으로 풀링된 다음 배양 확장되는 다중 공여자로부터 얻어진다.

[0098] 본 개시내용에 포함된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 또한 대상체에 투여하기 전에 동결보존될 수 있다. 한 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 대상체에 투여하기 전에 배양 확장되고 동결보존된다.

[0099] 한 예에서, 본 개시내용은 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포 뿐만 아니라 그의 자손, 그로부터 유래된 가용성 인자, 및/또는 이로부터 단리된 세포의 소포를 포괄한다. 또 다른 예에서, 본 개시내용은 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포 뿐만 아니라 그로부터 단리된 세포의 소포를 포괄한다. 예를 들어, 세포 배양 배지로의 세포의 소포의 분비에 적합한 조건 및 기간 동안 본 개시내용의 중간엽 전구체 계통 또는 줄기 세포를 배양 확장할 수 있다. 분비된 세포의 소포는 이후에 치료에 사용하기 위해 배양 배지에서 얻을 수 있다.

[0100] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "세포의 소포"는 세포로부터 자연적으로 방출되고 크기가 약 30 nm 내지 10 마이크로미터 크기의 범위인 지질 입자를 지칭하지만, 전형적으로 이들은 크기가 200 nm 미만이다. 이들은 단백질, 핵산, 지질, 대사산물 또는 방출 세포의 소기관(예를 들어, 중간엽 줄기 세포; STRO\_1<sup>+</sup> 세포)을 함유할 수 있다.

[0101] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "엑소좀"은 일반적으로 크기가 약 30 nm 내지 약 150 nm이고 이들이 세포막으로 수송되고 방출되는 포유동물 세포의 엔도솜 구획에서 기원하는 세포의 소포의 유형을 지칭한다. 그들은 핵산(예를 들어, RNA; microRNA), 단백질, 지질 및 대사 산물을 함유할 수 있으며, 한 세포에서 분비되고 카고(cargo)를 전달하기 위해 다른 세포에 의해 흡수되어 세포 간 통신 기능을 한다.

[0102] 세포의 배양 확장

[0103] 한 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 배양 확장된다. "배양 확장된" 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포 배지는 세포 배양 배지에서 배양되고 계대(즉, 계대 배양)된다는 점에서 새로 단리된 세포와 구별된다. 한 예에서, 배양 확장된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 약 4 - 10 계대 동안 배양 확장된다. 한 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10 계대 동안 배양 확장된다. 예를 들어, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 적어도 5 계대 동안 배양 확장될 수 있다. 한 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 적어도 5 - 10 계대 동안 배양 확장될 수 있다. 한 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 적어도 5 - 8 계대 동안 배양 확장될 수 있다. 한 예에서, 중간엽 계통 전구

체 또는 줄기 세포는 적어도 5 - 7 계대 동안 배양 확장될 수 있다. 한 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 10 이상의 계대 동안 배양 확장될 수 있다. 또 다른 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 7 이상의 계대 동안 배양 확장될 수 있다. 이러한 예에서, 줄기 세포는 동결보존된 중간 MLPSC 집단을 제공하기 위해 동결 보존되기 전에 배양 확장될 수 있다. 한 예에서, 본 개시내용의 조성물은 동결보존된 중간 MLPSC 집단으로부터 제조된다. 예를 들어, 동결보존된 중간 MLPSC 집단은 아래에서 추가로 논의되는 바와 같이 투여 전에 추가 배양 확장될 수 있다. 따라서, 한 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 배양 확장되고 동결보존된다. 이들 예의 실시형태에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 단일 공여자, 또는 공여자 샘플 또는 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포가 후속적으로 풀링된 다음, 배양 확장되는 다중 공여자로부터 수득될 수 있다. 한 예에서, 배양 확장 과정은 하기를 포함한다:

- [0104] - i. 계대 확장에 의해 생존 세포의 수를 확장하여, 적어도 약 10억 개의 생존 세포의 제제를 제공하는 단계로서, 여기서 계대 확장이 단리된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포의 1차 배양물을 확립한 다음, 이전 배양물로부터의 단리된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포의 제1 비-1차(P1) 배양물을 연속해서 확립하는 것을 포함하는, 단계;
  - [0105] - ii. 계대 확장에 의해 단리된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포의 P1 배양물을 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포의 제2 비-1차(P2) 배양물로 확장하는 단계; 및,
  - [0106] - iii. 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포의 P2 배양물로부터 수득된 공정중 중간 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포 제제를 제조 및 동결보존하는 단계; 및,
  - [0107] - iv. 동결보존된 공정중 중간 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포 제제를 해동하고 공정중 중간 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포 제제를 계대 확장에 의해 확장하는 단계.
- [0108] 한 예에서, 확장된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포 제제는:
- [0109] - i. 약 0.75% 미만의 CD45+ 세포;
  - [0110] - ii. 적어도 약 95% CD105+ 세포;
  - [0111] - iii. 적어도 약 95% CD166+ 세포
- [0112] 를 포함하는 항원 프로파일 및 활성 프로파일을 갖는다.
- [0113] 한 예에서, 확장된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포 제제는 대조군에 비해 적어도 약 30%만큼 CD3/CD28-활성화된 PBMC에 의한 IL2Ra 발현을 억제할 수 있다.
- [0114] 한 예에서, 배양 확장된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 약 4 - 10 계대 동안 배양 확장되고, 여기서 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 추가 배양 확장되기 전에 적어도 2 또는 3 계대 후에 동결보존되었다. 한 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5 계대 동안 배양 확장되고, 동결보존되고, 투여 또는 추가로 동결보존되기 전에 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5 계대 동안 추가 배양 확장된다.
- [0115] 한 예에서, 본 개시내용의 조성물 중 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포의 대부분은 대략 동일한 세대 수이다 (즉, 이들은 서로 약 1 또는 약 2 또는 약 3 또는 약 4 세포 배가 이내이다). 한 예에서, 본 조성물에서 세포 배가의 평균 수는 약 20 내지 약 25 배가이다. 한 예에서, 본 조성물에서 세포 배가의 평균 수는 1차 배양물로부터 발생하는 약 9 내지 약 13(예를 들어, 약 11 또는 약 11.2) 배가, 플러스 계대당 약 1, 약 2, 약 3, 또는 약 4 배가(예를 들어, 계대당 약 2.5 배가)이다. 본 발명의 조성물에서 예시적인 평균 세포 배가는 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 임의의 것이다.
- [0116] 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포 단리 및 세포의 확장의 과정은 당업계에 공지된 임의의 장비 및 세포 전달 방법을 사용하여 수행될 수 있다. 본 개시내용의 다양한 배양 확장 실시형태는 세포의 조작을 필요로 하는 단계, 예를 들어, 시딩, 공급, 부착 배양물 해리 또는 세척 단계를 사용한다. 세포를 조작하는 모든 단계는 세포를 손상시킬 가능성이 있다. 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포가 일반적으로 준비 동안 특정 양의 손상을 견딜 수 있지만, 세포는 바람직하게는 세포에 대한 손상을 최소화하면서 주어진 단계(들)를 적절하게 수행하는 처리 절차 및/또는 장비에 의해 조작된다.
- [0117] 한 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 세포 공급원 백, 세척 용액 백, 재순환 세척 백, 입구 및 출

구 포트를 갖는 방사 막 필터, 여과액 백, 혼합 구역, 세척된 세포를 위한 최종 생성물 백, 및 예를 들어 본원에 참고로 포함된 미국 특허 제6,251,295호에 기재된 바와 같은 적절한 배관을 포함하는 장치에서 세척된다.

[0118] 한 예에서, 본 개시내용에 따른 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포 조성물은 CD105 양성 및 CD166 양성 및 CD45 음성에 대해 95% 균질하다. 한 예에서, 이 균질성은 즉, 다중 집단 배가에도 불구하고 생체 외 확장을 통해 지속된다. 한 예에서, 조성물은 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포의 적어도 하나의 치료 용량을 포함하고, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 약 1.25% 미만의 CD45+ 세포, 적어도 약 95% CD105+ 세포, 및 적어도 약 95% CD166+ 세포를 포함한다. 한 예에서, 이러한 균질성은 극저온 저장 및 해동 후에도 지속되며, 여기서 세포는 또한 일반적으로 약 70% 이상의 생존력을 갖는다.

[0119] 한 예에서, 본 개시내용의 조성물은 실질적인 수준의 TNFR1, 예를 들어 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포 백만 개당 13 pg 초과와 TNFR1을 발현하는 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포를 포함한다. 한 예에서, 이 표현형은 생체 외 확장 및 극저온 저장 전반에 걸쳐 안정적이다. 한 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포 백만 개당 약 13 내지 약 179 pg(예를 들어 약 13 pg 내지 약 44 pg) 범위의 TNFR1 수준의 발현은 생체의 확장 및 동결보존을 통해서도 지속되는 바람직한 치료 가능성과 관련되어 있다.

[0120] 한 예에서, 배양 확장된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 적어도 110 pg/ml의 양으로 종양 괴사 인자 수용체 1(TNFR1)을 발현한다. 예를 들어, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 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 TNFR1을 발현할 수 있다.

[0121] 한 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 적어도 13 pg/10<sup>6</sup> 세포의 양으로 TNFR1을 발현한다. 예를 들어, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 적어도 15 pg/10<sup>6</sup> 세포, 또는 적어도 20 pg/10<sup>6</sup> 세포, 또는 적어도 25 pg/10<sup>6</sup> 세포, 또는 적어도 30 pg/10<sup>6</sup> 세포, 또는 적어도 35 pg/10<sup>6</sup> 세포, 또는 적어도 40 pg/10<sup>6</sup> 세포, 또는 적어도 45 pg/10<sup>6</sup> 세포, 또는 적어도 50 pg/10<sup>6</sup> 세포의 양으로 TNFR1을 발현한다.

[0122] 또 다른 예에서, 본원에 개시된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 T-세포 상에서의 IL-2R $\alpha$  발현을 억제한다. 한 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 IL-2R $\alpha$  발현을 적어도 약 30%, 대안적으로 적어도 약 35%, 대안적으로 적어도 약 40%, 대안적으로 적어도 약 45%, 대안적으로 적어도 약 50%, 대안적으로 적어도 약 55%, 대안적으로 적어도 약 60% 억제할 수 있다.

[0123] 한 예에서, 본 개시내용의 조성물은 예를 들어, 적어도 약 1억개 세포 또는 약 1억 2천 500개 세포를 포함할 수 있는 적어도 하나의 치료 용량의 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포를 포함한다.

[0124] 세포의 변형

[0125] 본 개시내용의 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 투여시 세포의 용해가 억제되는 방식으로 변경될 수 있다. 항원의 변경은 면역학적 무반응 또는 내성을 유도할 수 있으며, 이에 의해 정상 면역 반응에서 외래 세포의 거부에 궁극적인 책임이 있는 면역 반응(예를 들어, 세포독성 T 세포 생성, 항체 생성 등)의 이펙터 단계 유도를 방지할 수 있다. 이러한 목표를 달성하기 위해 변경될 수 있는 항원은 예를 들어, MHC 클래스 I 항원, MHC 클래스 II 항원, LFA-3 및 ICAM-1을 포함한다.

[0126] 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 또한 줄무늬 골격근 세포의 분화 및/또는 유지에 중요한 단백질을 발현하도록 유전적으로 변형될 수 있다. 예시적인 단백질은 성장 인자(TGF- $\beta$ , 인슐린-유사 성장 인자 1(IGF-1), FGF), 근육생성 인자(예를 들어 myoD, 미오게닌, 근육생성 인자 5(Myf5), 근육생성 조절 인자(MRF)), 전사 인자(예를 들어 GATA-4), 사이토카인(예를 들어 카디오프로틴-1), 뉴레굴린 계열의 구성원(예를 들어 뉴레굴린 1, 2 및 3) 및 호메오박스 유전자(예를 들어 Csx, 틴만(tinman) 및 NKx 계열)를 포함한다.

[0127] 본 개시내용의 조성물

[0128] 본 개시내용의 한 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포 및/또는 그의 자손 및/또는 이로부터 유래된 가용성 인자는 조성물의 형태로 투여된다. 한 예에서, 이러한 조성물은 약제학적으로 허용가능한 담체 및/또는 부형제를 포함한다. 따라서, 한 예에서, 본 개시내용의 조성물은 배양 확장된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포를 포함할 수 있다.

[0129] 용어 "담체" 및 "부형제"는 활성 화합물의 저장, 투여 및/또는 생물학적 활성을 용이하게 하기 위해 당업계에서

통상적으로 사용되는 물질의 조성물을 지칭한다(예를 들어, Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Ed., Mac Publishing Company(1980) 참조). 담체는 또한 활성 화합물의 바람직하지 않은 부작용을 감소시킬 수 있다. 적합한 담체는 예를 들어 안정하며, 예를 들어 담체 내의 다른 성분과 반응할 수 없다. 한 예에서, 담체는 치료에 사용되는 투여량 및 농도에서 수혜자에게 심각한 국소 또는 전신 부작용을 일으키지 않는다.

- [0130] 본 개시내용을 위한 적합한 담체는 통상적으로 사용되는 것들을 포함하며, 예를 들어 물, 식염수, 수성 텍스트로스, 락토스, 링거액, 완충 용액, 히알루로난 및 글리콜은 특히 용액에 대해 (등장성인 경우) 예시적인 액체 담체이다. 적합한 약제학적 담체 및 부형제는 전분, 셀룰로스, 글루코스, 락토스, 수크로스, 젤라틴, 맥아, 쌀, 밀가루, 백악, 실리카 겔, 마그네슘 스테아레이트, 나트륨 스테아레이트, 글리세롤 모노스테아레이트, 염화나트륨, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 물, 에탄올, 등을 포함한다.
- [0131] 또 다른 예에서, 담체는 예를 들어, 세포가 성장하거나 현탁된 배지 조성물이다. 예를 들어, 그러한 배지 조성물은 그것이 투여되는 대상체에서 어떠한 부작용도 유발하지 않는다.
- [0132] 예시적인 담체 및 부형제는 세포의 생존력 및/또는 대사 증후군 및/또는 비만을 감소, 예방 또는 지연시키는 세포의 능력에 악영향을 미치지 않는다.
- [0133] 한 예에서, 담체 또는 부형제는 완충 활성을 제공하여 세포 및/또는 가용성 인자를 적합한 pH에서 유지하여 생물학적 활성을 발휘하며, 예를 들어 담체 또는 부형제는 인산염 완충 식염수(PBS)이다. PBS는 세포 및 인자와 최소한으로 상호작용하고 세포 및 인자의 신속한 방출을 허용하기 때문에 매력적인 담체 또는 부형제를 나타내며, 이러한 경우, 본 개시내용의 조성물은 혈류에 또는, 예를 들어 주사에 의해 조직 또는 조직을 둘러싸거나 이에 인접한 영역에 직접 적용하기 위한 액체로서 생성될 수 있다.
- [0134] 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포 및/또는 그의 자손 및/또는 이로부터 유도된 가용성 인자는 또한 수혜자에게 적합하고 수혜자에게 유해하지 않은 생성물로 분해되는 스캐폴드 내에 통합되거나 포매될 수 있다. 이 스캐폴드는 수혜자 대상체에게 이식될 세포를 지원하고 보호한다. 천연 및/또는 합성 생분해성 스캐폴드는 이러한 스캐폴드의 예이다.
- [0135] 다양한 상이한 스캐폴드가 본 개시내용의 실시에서 성공적으로 사용될 수 있다. 예시적인 스캐폴드는 생물학적, 분해성 스캐폴드를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 천연 생분해성 지지체에는 콜라겐, 피브로넥틴 및 라미닌 지지체가 포함된다. 세포 이식 스캐폴드에 적합한 합성 물질은 광범위한 세포 성장과 세포 기능을 지원할 수 있어야 한다. 이러한 스캐폴드는 또한 재흡수될 수 있다. 적합한 스캐폴드는 폴리글리콜산 스캐폴드, (예를 들어, Vacanti, 등 J. Ped. Surg. 23:3-9 1988; Cima, 등 Biotechnol. Bioeng. 38:145 1991; Vacanti, 등 Plast. Reconstr. Surg. 88:753-9 1991에 기재된 바와 같음); 또는 폴리무수물, 폴리오르토에스테르 및 폴리락트산과 같은 합성 중합체를 포함한다.
- [0136] 또 다른 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포 및/또는 그의 자손 및/또는 이로부터 유도된 가용성 인자는 겔 스캐폴드(예컨대 Upjohn Company로부터의 Gelfoam)로 투여될 수 있다.
- [0137] 본원에 기재된 조성물은 단독으로 또는 다른 세포와의 혼합물로서 투여될 수 있다. 상이한 유형의 세포는 투여 직전 또는 직전에 본 개시내용의 조성물과 혼합될 수 있거나, 또는 투여 전에 일정 기간 동안 함께 공배양될 수 있다.
- [0138] 한 예에서, 조성물은 유효량 또는 치료적 또는 예방적 유효량의 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포 및/또는 그의 자손 및/또는 이로부터 유도된 가용성 인자를 포함한다. 예를 들어, 조성물은 약  $1 \times 10^5$  중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포 내지 약  $1 \times 10^9$  중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포 또는 약  $1.25 \times 10^3$  중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포 내지 약  $1.25 \times 10^7$  중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포/kg(80 kg 대상체)을 포함한다. 또 다른 예에서, 조성물은 약  $1 \times 10^6$  중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포 내지 약  $3 \times 10^6$  중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포/kg(80 kg 대상체)을 포함한다.
- [0139] 투여될 세포의 정확한 양은 대상체의 연령, 체중 및 성별, 및 치료되는 장애의 정도 및 중증도를 포함하는 다양한 인자에 의존한다.
- [0140] 한 예에서,  $50 \times 10^6$  내지  $200 \times 10^7$  중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포가 투여된다. 다른 예에서,  $60 \times 10^6$  내지  $200 \times 10^6$  세포 또는  $75 \times 10^6$  내지  $150 \times 10^6$  중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포가 투여된다. 한 예에서,

75 x 10<sup>6</sup> 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포가 투여된다. 또 다른 예에서, 150 x 10<sup>6</sup> 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포가 투여된다.

- [0141] 한 예에서, 조성물은 1 mL 당 5.00x10<sup>6</sup> 초과의 생존 세포를 포함한다. 또 다른 예에서, 조성물은 1 mL 당 5.50x10<sup>6</sup> 초과의 생존 세포를 포함한다. 또 다른 예에서, 조성물은 1 mL 당 6.00x10<sup>6</sup> 초과의 생존 세포를 포함한다. 또 다른 예에서, 조성물은 1 mL 당 6.50x10<sup>6</sup> 초과의 생존 세포를 포함한다. 또 다른 예에서, 조성물은 1 mL 당 6.68x10<sup>6</sup> 초과의 생존 세포를 포함한다.
- [0142] 한 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 조성물의 세포 집단의 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%를 포함한다.
- [0143] 본 개시내용의 조성물은 동결보존될 수 있다. 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포의 동결보존은 당업계에 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 성장물을 유지한다.
- [0144] 동결보존된 조성물은 동결보존 용액을 포함할 수 있다. 동결보존 용액의 pH는 전형적으로 6.5 내지 8, 바람직하게는 7.4이다.
- [0145] 동결보존 용액은 예를 들어, PlasmaLyte A<sup>TM</sup>과 같은 멸균, 비발열성 등장액을 포함할 수 있다. 100 mL의 PlasmaLyte A<sup>TM</sup>은 526 mg의 염화나트륨, USP(NaCl); 502 mg의 글루콘산나트륨(C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>NaO<sub>7</sub>); 368 mg의 아세트산나트륨 삼수화물, USP(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub> · 3H<sub>2</sub>O); 37 mg의 염화칼륨, USP(KCl); 및 30 mg의 염화마그네슘, USP(MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O)를 함유한다. 항균제는 함유하지 않는다. pH는 수산화나트륨으로 조정된다. pH는 7.4(6.5 내지 8.0)이다.
- [0146] 동결보존 용액은 Profreeze<sup>TM</sup>를 포함할 수 있다. 동결보존 용액은 추가로 또는 대안적으로 배양 배지, 예를 들어, αMEM를 포함할 수 있다.
- [0147] 동결을 용이하게 하기 위해, 동결보호제 예컨대, 예를 들어, 디메틸설폭사이드(DMSO)가 일반적으로 동결보존 용액에 첨가된다. 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 약간의 세포 독성을 나타낸다. 하이드록실에틸 전분(HES)은 동결보존 용액의 세포 독성을 감소시키기 위해 대체물로 또는 DMSO와 함께 사용될 수 있다.
- [0148] 동결보존 용액은 DMSO, 하이드록실에틸 전분, 인간 혈청 성분 및 기타 단백질 증량제 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 한 예에서, 동결보존된 용액은 약 5% 인간 혈청 알부민(HSA) 및 약 10% DMSO를 포함한다. 동결보존 용액은 메틸셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈(PVP) 및 트레할로스 중 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다.
- [0149] 한 실시형태에서, 세포는 42.5% Profreeze<sup>TM</sup>/50% αMEM/7.5% DMSO 현탁되고, 제어 속도 냉동고에서 냉각된다.
- [0150] 동결보존된 조성물은 해동되어 대상체에게 직접 투여되거나, 예를 들어 HA를 포함하는 다른 용액에 첨가될 수 있다. 대안적으로, 동결보존된 조성물은 해동될 수 있고, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 투여 전에 대체 담체에 재현탁될 수 있다.
- [0151] 한 예에서, 본 개시내용의 세포 조성물은 Plasma-Lyte A, 디메틸 설폭사이드(DMSO) 및 인간 혈청 알부민(HSA)을 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 개시내용의 조성물은 Plasma-Lyte A(70%), DMSO(10%), HSA(25%) 용액을 포함할 수 있으며, 상기 HSA 용액은 5% HSA 및 15% 완충액을 포함한다.
- [0152] 한 예에서, 본원에 기재된 조성물은 단일 용량으로 투여될 수 있다.
- [0153] 일부 예에서, 본원에 기재된 조성물은 다중 용량에 걸쳐 투여될 수 있다. 예를 들어, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10회의 용량.
- [0154] 일부 예에서, 세포는 세포가 대상체의 순환계로 나가는 것을 허용하지 않지만 세포에 의해 분비된 인자가 순환계에 들어가는 것을 허용하는 챔버 내에 함유된다. 이러한 방식으로, 가용성 인자는 세포가 인자를 대상체의 순

환계로 분비하도록 함으로써 대상체에게 투여될 수 있다. 이러한 챔버는 가용성 인자의 국소 수준을 증가시키기 위해 대상체의 부위에 동일하게 이식될 수 있다.

[0155] 한 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 정맥내 투여될 수 있다. 또 다른 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 매주 1회 투여된다. 예를 들어, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 2주마다 매주 1회 투여될 수 있다. 한 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 매일 1회 투여될 수 있다. 한 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포의 2회 용량이 매주 1회 투여된다. 또 다른 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포의 2회 용량이 2주마다 매주 1회 투여된다. 예를 들어, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포의 2회 용량은 2주마다 매주 1회 투여될 수 있으며, 이후 용량은 매일 1회 투여된다. 본 예의 한 실시형태에서, 용량은 추가로 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7개월 또는 그 이상 동안 매일 투여된다.

[0156] 당업자는 본 개시내용의 광범위하고 일반적인 범위를 벗어나지 않으면서 상술한 실시형태에 대해 수많은 변형 및/또는 수정이 이루어질 수 있음을 이해할 것이다. 따라서, 본 실시형태는 모든 면에서 예시적이며 제한적이지 않은 것으로 간주되어야 한다.

[0157] 하기 특정 실시예들은 단지 예시적인 것으로 간주되어야 하며, 어떤 식으로든 개시내용의 나머지 부분을 제한하는 것이 아니다. 추가 설명 없이, 당업자는 본 명세서의 설명에 기초하여 본 발명을 최대한 활용할 수 있을 것으로 믿어진다.

[0158] **실시예**

[0159] **만성 이식편 대 숙주 질환(cGvHD) 치료를 위한 생체 외 배양 확장된 성인 동종이계 골수 유래된 중간엽 줄기 세포(MSC)**

[0160] **조성물**

[0161] 조성물은 건강한 성인 공여자의 골수로부터 단리된 배양 확장된 중간엽 기질 세포(ceMSC)로 구성된다. 최종 조성물은 1 mL 당 6.68x10<sup>6</sup> 초과와 생존 세포의 농도로 Plasma-Lyte A(70%), 디메틸 설폭사이드(DMSO, 10%) 및 인간 혈청 알부민(HSA)(25%) 용액(20%, 5% HSA 및 15% 완충액 포함)으로 제형화된 ceMSC를 포함한다. 각 용량 바이알에는 3.8 mL의 동결보존된 세포 현탁액(바이알 당 총 세포  $\geq 25 \times 10^6$ )이 함유한다.

[0162] **목표**

[0163] 1차 목표

[0164] 기존 요법으로의 사전 치료에 반응하는데 실패한 cGvHD를 갖는 대상체에서최초 투여일로부터 6개월에 걸쳐 정맥내 투여된 상기 조성물의 반복 투여의 효능 평가.

[0165] 2차 목표

[0166] 생존에 대한 상기 조성물의 효과 평가.

[0167] **스코어링 및 효능 평가**

[0168] 만성 GvHD 기관 스코어링.

[0169] 만성 GvHD의 기관 스코어링

기관	0점	1점	2점	3점
피부 % BSA <sup>1</sup>	BSA 관련없음	1-18% BSA	19-50% BSA	50% 초과 BSA
피부 특징들	경화 특징 없음	N/A	표면 경화 특징이지만, "숨겨진" 특징은 아님	깊은 경화 특징; "숨겨진"; 손상된 이동성; 궤양
구강	증상 없음	경증의 질화 징후가 있지만 경구 섭취를 크게 제한하지 않는 경증	경구 섭취가 부분적으로 제한되는 질화 징후가 있는 중등도 증상	경구 섭취가 크게 제한되는 질병 징후가 있는 중증 증상
눈	증상 없음	ADL에 영향을 미치지 않는 가벼운 안구 건조 증상(윤활제 점적 <3x/일 필요)	건성 각결막염(KCS)으로 인한 새로운 시력 손상 없이 ADL에 부분적으로 영향을 미치는 중등도 안구 건조 증상(윤활제 점적 >3x/일 또는 누점 플러그 필요)	ADL에 중대한 영향을 미치는 심한 안구 건조 증상(통증 완화용 특수 안경) 또는 안구 증상으로 인해 작업할 수 없거나 건성 각결막염(KCS)으로 인한 시력 상실
위장관	증상 없음	상당한 체중 감소(<5%)가 없는 증상	3개월 이내에 경증에서 중등도의 체중 감소(5-15%)와 관련된 증상 또는 일상 생활에 심각한 지장이 없는 중등도 설사	3개월 이내에 상당한 체중 감소(>15%)와 관련된 증상, 대부분의 칼로리 요구량에 대한 영양 보충이 필요하거나 식도 확장 또는 일상 생활에 심각한 지장을 주는 심한 설사
간	정상 총 빌리루빈 및 ALT 또는 AP <3 x ULN	정상 총 빌리루빈	정상 총 빌리루빈 및 ALT 또는 AP <3 x ULN	정상 총 빌리루빈
폐 증상 점수:	증상 없음	경증(1계단 동반 후 SOB)	중등도 증상(평지 보행 후 SOB)	중증 증상(휴식 시 SOB; O2 필요)
폐들 폐 점수:	FEV1 > 80%	FEV1 60-79%	FEV1 40-59%	FEV1 <39%
관절 및 근막	증상 없음	팔과 다리의 경미한 조임, 정상 또는 경미한 운동 범위 감소 및 ADL에 영향 없음	팔 또는 다리의 조임 또는 관절 구축, 근막염으로 인한 것으로 생각되는 팔, 운동 범위의 중등도 감소 및 ALD의 경증에서 중등도로의 제한	운동 범위의 현저한 감소와 ADL의 상당한 제한을 동반한 구축(신발, 단추 셔츠, 드레스 선반 등을 묶을 수 없음)
생식기	징후 없음	가벼운 징후 및 여성은 검사에 불편함을 동반하거나 동반하지 않음	중등도의 징후 및 검사에서 불편함의 징후가 있을 수 있음	증상이 있거나 없는 중증 징후
기타 특징들	GVHD 없음	경증	보통	중증

[0170]

[0171] 만성 GvHD 반응 기준.

약어	정의
CR	완전한 반응: cGVHD의 전체 해상도
PR	부분 반응: 기관-특이적 NIH cGVHD 점수에서 1점 이상 감소
SD	안정한 질환: cGVHD 변화 없음
PD	진행성 질환: MSC 치료 중 또는 치료 후 최대 8주까지 cGVHD 진행

[0172]

[0173] 치료 성공은 대상체가 살아있는 것으로 정의되고, 치료 개시 후 6개월 후에 등급이 CR 또는 PR로 매겨졌다.

[0174] 대상체

[0175] 대상체는 첫 달 동안 2주 동안 매주 1회(± 1일) 2 x 10<sup>6</sup> MSC/kg(2 x 10<sup>6</sup> MSC/kg)의 용량으로 정맥내(IV) 줄기 세포 조성물로 치료될 것이다. 적절한 경우, 최대 5개월 동안 매월 1회 2 x 10<sup>6</sup> MSC/kg의 지속적인 요법이 제공될 것이다.

[0176] 평가

[0177] GvHD 평가는 스크리닝 시 수행되고 그 후 초기 줄기 세포 주입 후 12개월까지 매월(2-6개월 동안 ±2일, 7-12개월 동안 ±7일) 수행될 것이다. 대상체가 계속 세포 요법을 받을 수 있는지 여부의 결정은 조성물의 1회 투여(0일) 후 4주(28일(±2일))에 수행된 대상체의 cGVHD 평가/등급에 기초하여 조사자가 결정할 것이다.

- [0178] 1개월차(28일차(±2일)) 치료 평가:
- [0179] 치료 반응을 결정하고 대상체가 계속 치료를 받을 수 있는지 여부를 결정하기 위해 세포 조성물의 첫 번째 주입 으로부터 4주(28일(±2일))에 치료 평가를 수행할 것이다. 28일차 치료 평가는 세포 조성물의 마지막 투여 후 적어도 24시간이 경과해야 한다. 아래에 설명된 바와 같이 치료 반응에 따라 대상체에 대해 지속적인 치료가 허용될 것이다.
- [0180] 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 및 12개월 치료 평가:
- [0181] 치료 반응을 결정하기 위해 치료 평가를 매월 1회(2-6개월 동안 ±2일, 7-12개월동안 ±7일) 수행할 것이다. 각 월별 요법 평가는 세포 조성물의 마지막 투여로부터 적어도 24시간 후에 이루어져야 한다.
- [0182] 지속적인 치료
- [0183] 대상체는 초기 치료 후 4주(28일(±2일))에 수행된 초기 요법 평가 후 1주 이내에 시작될, 스크리닝시 실제 체 중 1 kg 당  $2 \times 10^6$  MSC의 동일한 초기 용량으로 매월 1회 세포 조성물의 추가 주입을 받을 수 있다. 지속적인 치료 주입은 최대 5개월 동안 매월 1회(±2일) 제공될 것이다.
- [0184] **분석**
- [0185] 환자#1 AO 030-02C:
- [0186] - 환자가 4/7 세포 조성물 주입을 완료함.
- [0187] 기준선 평가:
- [0188] - 기관 관련: 피부, 구강, 눈
- [0189] - 피부 특징: 반구진성 발진/홍반, 구진편평병변/어린선
- [0190] - 기타 피부 소견: 과색소침착, 모발 관련
- [0191] - 피부 % BSA 점수 = 3(50%BSA 초과)
- [0192] - 눈 점수 = 1(ADL에 영향을 미치지 않는 경미한 안구 건조 증상(윤활유 방울이 3x/일 이하인 조건)
- [0193] - 구강 점수 = 1(질병 징후가 있는 경미한 증상이지만 경구 섭취를 크게 제한하지 않음)
- [0194] - cGvHD의 최대 등급(최상의 임상 판단에 따름) = 중증
- [0195] 부분 반응으로 평가된 28일차 반응:
- [0196] - 기관 관련: 피부, 눈(구강 관련 없음)
- [0197] - 피부 특징: 반구진성 발진/홍반(기준 소견) 구진편평 병변 또는 어린선(28일 소견)
- [0198] - 기타 피부 소견: 모발 관련(개선됨), 손톱 관련(개선됨)
- [0199] - 피부 % BSA 점수 = 1(1-18% BSA)
- [0200] - 눈 점수 = 1(ADL에 영향을 미치지 않는 경미한 안구 건조 증상(윤활유 방울이 3x/일 이하인 조건)
- [0201] - 중증도에 대한 주관적인 임상 의견: 경증
- [0202] 환자#2 CL 054-001:
- [0203] - 5/7 세포 조성물 주입 완료.
- [0204] 기준선 평가:
- [0205] - 기관 관련: 피부, 구강, 눈
- [0206] - 피부 특징: 반구진 발진/홍반
- [0207] - 기타 피부 소견: 중증/전신 가려움증, 모발 관련, 손톱 관련
- [0208] - 피부 % BSA 점수 = 1(1-18% BSA)

- [0209] - 눈 점수 = 1(ADL에 영향을 미치지 않는 경미한 안구 건조 증상(윤활유 방울이 3x/일 이하인 조건)
- [0210] - 구강 점수 = 1(질병 징후가 있는 경미한 증상이지만 경구 섭취를 크게 제한하지 않음)
- [0211] - cGvHD의 최대 등급(최상의 임상 판단에 따름) = 보통
- [0212] 부분 반응으로 평가된 28일차 반응:
- [0213] - 기관 관련: 피부, 눈(구강 관련 없음)
- [0214] - 피부 특징: 구진편평 병변 또는 어린선
- [0215] - 기타 피부 소견: 모발 관련(개선됨), 손톱 관련
- [0216] - 피부 % BSA 점수 = 1(1-18% BSA)
- [0217] - 눈 점수 = 1(ADL에 영향을 미치지 않는 경미한 안구 건조 증상(윤활유 방울이 3x/일 이하인 조건)
- [0218] - 중증도에 대한 주관적인 임상 의견: 경증
- [0219] 2개월: 부분 반응으로 평가됨:
- [0220] - 기관 관련: 피부, 눈(구강 관련 없음)
- [0221] - 피부 특징: 손가락 위의 붉은 부분이 거의 없고, 등 상부 및 하부 만성 부위가 2-3개의 작은 원형 패치로 해결됨, 귀에 약간의 발적이 있음, 두피에 발진이 없고 모발이 굵어짐
- [0222] - 기타 피부 소견: 모발 관련, 손톱 관련
- [0223] - 피부 % BSA 점수 = 1(1-18% BSA)
- [0224] - 눈 점수 = 1(ADL에 영향을 미치지 않는 경미한 안구 건조 증상(윤활유 방울이 3x/일 이하인 조건)
- [0225] - 중증도에 대한 주관적인 임상 의견: 경증
- [0226] 환자#3 PF 055-001:
- [0227] - 2/7 세포 조성물 주입 완료.
- [0228] 기준선 평가:
- [0229] - 피부 % BSA 점수 = 2(19-50% BSA)
- [0230] - 눈 점수 = 2(건성 각결막염으로 인한 새로운 시력 손상 없이 ADL에 부분적으로 영향을 미치는 중간 정도의 안구 건조 증상(3x/일 초과인 윤활제 점적 또는 누점 플러그 필요))
- [0231] - 구강 점수 = 1(질병 징후가 있는 경미한 증상이지만 경구 섭취를 크게 제한하지 않음)
- [0232] - cGvHD의 최대 등급(최상의 임상 판단에 따름) = 보통
- [0233] 부분 반응으로 평가된 28일차 반응:
- [0234] - 환자의 피부(관련 주요 장기)가 극적으로 개선되었다. 기준선에서 수많은 병변이 2로 감소하였다.
- [0235] 당업자라면 광범위하게 기재된 본 개시내용의 사상 또는 범위를 벗어나지 않으면서 특정 실시형태에 나타난 바와 같이 본 개시내용에 대한 다양한 변형 및/또는 수정이 이루어질 수 있음을 이해할 것이다. 따라서, 본 실시 형태는 모든 면에서 예시적이며 제한적이지 않은 것으로 간주되어야 한다.
- [0236] 상기 논의된 모든 공보들은 그 전체가 본원에 포함된다.
- [0237] 본 명세서에 포함된 문서, 실험, 자료, 장치, 물품 등에 대한 모든 논의는 오로지 본 개시내용에 대한 맥락을 제공하기 위한 목적을 위한 것이다. 이들 문제의 일부 또는 전부가 본 출원의 각 청구항의 우선권 일자 이전에 존재했던 바와 같이 본 개시내용과 관련된 분야에서 선행 기술 기반의 일부를 형성하거나 일반적인 일반 지식이었다는 것을 인정하는 것으로 간주되어서는 안된다.
- [0238] 본 출원은 2020년 2월 19일에 출원된 호주 가특허 출원 2020900472호로부터 우선권을 주장하며, 그 전체 내용은 본원에 참조로 포함된다.