



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년09월21일

(11) 등록번호 10-1900664

(24) 등록일자 2018년09월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
**A61K 35/12** (2015.01) **A61P 19/02** (2006.01)  
**C12N 5/074** (2010.01) **C12N 5/077** (2010.01)  
(21) 출원번호 10-2013-7021276  
(22) 출원일자(국제) 2013년01월12일  
심사청구일자 2017년01월12일  
(85) 번역문제출일자 2013년08월12일  
(65) 공개번호 10-2014-0127139  
(43) 공개일자 2014년11월03일  
(86) 국제출원번호 PCT/IB2012/000097  
(87) 국제공개번호 WO 2012/095743  
국제공개일자 2012년07월19일  
(30) 우선권주장  
11250025.1 2011년01월12일  
유럽특허청(EPO)(EP)  
(56) 선행기술조사문헌  
W02010015929 A2\*  
Arthritis & Rheumatism, Vol. 60, No. 4, pp.  
1006-1019 (2009.04)\*  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
**타이제닉스, 에스.에이.유.**  
스페인, 마드리드 이-28760 트레스 칸토스, 파르  
케 테크놀로지코 데 마드리드, 칼레 마르코니, 1.  
**타이제닉스 엔브이**  
벨기에 루벤 3001 버스 2 루메인스 스트라트 12 하  
스로드 리서치파크 1724  
(72) 발명자  
**롬바르도, 엘레우테리오**  
스페인 마드리드 이-28760 트레스 칸토스, 1, 마  
르코니, 파르케 테크놀로지코 데 마드리드 타이제  
닉스 에스에이 칼레  
**달레만스, 윌프레드**  
벨기에 루벤 3001 버스 2 루메인스 스트라트 12 하  
스로드 리서치파크 1724 타이제닉스 엔브이  
(74) 대리인  
**한라특허법인(유한)**

전체 청구항 수 : 총 22 항

심사관 : 윤소라

(54) 발명의 명칭 자가면역 및 염증성 질환에서 림프내 투여를 위한 지방-유래 중간엽 줄기 세포

### (57) 요약

본 발명은 세포 요법의 림프내 투여를 위한 의학적 용도 및 방법을 제공한다. 본 발명의 추가의 태양은 세포 요법의 림프내 투여를 위한 조성물, 키트 및 용도를 제공한다.

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

류마티스성 관절염을 치료, 조절, 개선 또는 예방하는 방법에 사용하기 위한 중간엽 줄기 세포를 포함하는 약학 조성물로서,

상기 조성물은 1회 용량, 또는 12 시간 이상 분리된 수회 용량의 투여를 포함하는 투여 요법으로 인간의 림프계에 투여되고, 상기 용량 또는 각각의 용량이 500만 초과 1억의 중간엽 줄기 세포에서 1억의 중간엽 줄기 세포까지 포함하는 약학 조성물.

#### 청구항 2

제 1 항에 있어서,

용량 또는 각각의 용량이

(i) 500만 내지 1000만 중간엽 줄기세포; 또는

(ii) 1000만 중간엽 줄기 세포

를 포함하는 약학 조성물.

#### 청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

용량 또는 각각의 용량이 100만 중간엽 줄기 세포/ml의 농도로 투여되는 약학 조성물.

#### 청구항 4

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

용량들 간의 간격이 1 주일인 약학 조성물.

#### 청구항 5

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

3 회 이상의 용량이 투여되는 약학 조성물.

#### 청구항 6

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

용량들이 제 1 일 및 제 8 일째에 투여되는 약학 조성물.

#### 청구항 7

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

용량 또는 각각의 용량이 수회 주사에 의해 투여되는 약학 조성물.

#### 청구항 8

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

줄기 세포가 지방 줄기 세포인 약학 조성물.

#### 청구항 9

제 8 항에 있어서,

지방 줄기 세포가 확대된 지방 줄기 세포인 약학 조성물.

**청구항 10**

제 9 항에 있어서,

지방 줄기 세포가 동종 이계인 약학 조성물.

**청구항 11**

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

방법이 환자의 림프계에 항원의 투여를 또한 포함하는 약학 조성물.

**청구항 12**

제 11 항에 있어서,

항원이 조성물의 투여 전, 상기 투여와 동시에, 또는 상기 투여에 후속으로 투여되는 약학 조성물.

**청구항 13**

제 12 항에 있어서,

항원이 조성물 투여의 적어도 1, 2, 3, 5 또는 10 시간 전 또는 후에 투여되는 약학 조성물.

**청구항 14**

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

조성물이 림프 기관에 투여되는 약학 조성물.

**청구항 15**

제 14 항에 있어서,

림프 기관이 말초 림프 기관인 약학 조성물.

**청구항 16**

제 15 항에 있어서,

말초 림프 기관이 림프절인 약학 조성물.

**청구항 17**

제 16 항에 있어서,

림프절이 액와 또는 서혜부 림프절인 약학 조성물.

**청구항 18**

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

투여가 주사기에 의해 수행되는 약학 조성물.

**청구항 19**

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

방법이 주사 바늘의 위치를 모니터하기 위해서 방사성, 초음파 또는 영상화 장치를 사용하는 단계를 또한 포함하는 약학 조성물.

**청구항 20**

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

추가적으로 항원을 포함하는 약학 조성물.

#### 청구항 21

제 6 항에 있어서,

용량들이 제 1 일, 제 8 일 및 제 15 일째에 투여되는 약학 조성물.

#### 청구항 22

제 20 항에 있어서,

항원이 콜라겐인 약학 조성물.

#### 청구항 23

삭제

#### 청구항 24

삭제

#### 청구항 25

삭제

#### 청구항 26

삭제

#### 청구항 27

삭제

#### 청구항 28

삭제

#### 청구항 29

삭제

### 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 세포 요법의 제공 방법, 및 그의 치료 용도에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] 고등 척추동물의 면역계는 상기 척추동물 체내로 들어갈 수 있는 다양한 항원들, 예를 들어 다양한 질병들의 원인인자인 세균, 진균 및 바이러스와 같은 미생물들에 대해 방어 제 1 선을 나타낸다. 더욱이, 상기 면역계는 또한 자가면역 또는 면역병리학적 질병, 면역결핍 증후군, 죽상동맥경화증 및 다양한 신생물 질병을 포함한 다양한 다른 질병 또는 질환에 연루된다. 이들 질병을 치료하기 위한 방법들을 입수할 수 있지만, 많은 현행 요법들은 그다지 적합하지 못한 결과를 제공한다. 신규의 부상하는 치료 전략들 가운데, 세포 요법을 기본으로 하는 전략들이 다수의 질병들을 치료하는데 잠재적으로 유용한 도구를 구성하는 것으로 보인다. 따라서, 상기 목적을 성취하기 위해서 연구자들이 현재 대단한 노력을 수행 중이다.

[0003] 자가면역 질병

[0004] 자가면역 질병은 신체의 면역계(상기 신체를 세균, 바이러스 및 임의의 다른 외래 생성물에 대해 방어함을 의미

한다)가 제대로 기능하지 않고 건강한 조직, 세포 및 기관들에 대해 병적인 반응을 생성시킬 때 발생한다. 항체, T 세포 및 대식세포는 이로운 보호를 제공하지만, 또한 유해하거나 치사의 면역학적 반응을 생성시킬 수 있다.

[0005] 자가면역 질병은 기관 특이적이거나 전신적일 수 있으며 상이한 발병 기전에 의해 유발된다. 기관 특이적인 자가면역화는 주-조직적합성 복합체(MHC) 항원의 이상 발현, 항원 모방 및 MHC 유전자의 대립유전자 변이를 특징으로 한다. 전신적 자가면역 질병은 다클론 B 세포 활성화, 및 면역조절성 T 세포, T 세포 수용체 및 MHC 유전자의 이상을 수반한다. 기관 특이적 자가면역 질병의 예는 당뇨병, 갑상선 기능항진증, 자가면역 부신 기능저하증, 순수 적혈구 빈혈, 다발성 경화증 및 류마티스성 심장염이다. 전형적인 전신적 자가면역 질병은 전신 홍반성 루푸스, 만성 염증, 쇼그렌 증후군, 다발성 근염, 피부근염 및 강피증이다.

[0006] 자가면역 질병의 현행 치료는 면역억제제, 예를 들어 코르티손, 아스피린 유도체, 하이드록시클로로퀸, 메토트렉세이트, 아자티오프린 및 사이클로포스파미드 또는 이들의 조합을 투여함을 포함한다. 그러나 면역억제제 투여 시 직면하는 딜레마는 상기 자가면역 질병이 보다 유효하게 치료될수록, 환자가 보다 무방비로 되어 감염으로부터의 공격에 방치되고, 또한 종양 발생에 더욱 민감하게 된다. 따라서, 자가면역 질병의 치료를 위한 신규의 요법이 대단히 필요하다.

[0007] 염증성 질환

[0008] 염증은 신체의 백혈구 및 분비된 인자들이 우리의 몸을 외래 물질, 예를 들어 세균 및 바이러스에 의한 감염으로부터 보호하는 과정이다. 사이토킨 및 프로스타글란딘으로서 공지된 분비된 인자들은 상기 과정을 조절하며, 혈액 또는 감염된 조직 내로 정렬되고 자기-제한적인 캐스케이드로 방출된다.

[0009] 염증성 장 질병(IBD)

[0010] IBD는, 최종적으로는 원위의 소장 및 결장 점막의 손상에 이르게 하는 점막 T 세포의 기능이상, 변경된 사이토킨 생산 및 세포 염증을 특징으로 하는 만성, 특발성, 재발성, 및 조직-파괴성 질병 군이다. IBD는 임상적으로 2 개의 주요 표현형, 즉 크론병(CD)과 궤양성 대장염으로 세분된다. CD는 현재 0.05%의 이환율을 갖는 불치성 자가면역 질병으로, 복부 통증, 직장 출혈, 설사, 체중 감소, 피부 및 눈 질환, 및 아동에게서 지연된 성장 및 성 조숙을 포함한 일련의 위장 및 장 외 증상을 생성시키는 만성 염증에 이르게 된다. 이러한 증상들은 환자의 안녕, 삶의 질, 및 작용 능력에 큰 영향을 미칠 수 있다. CD는 만성적이고 전형적으로는 30 세 이전에 발생하기 때문에, 환자들은 일반적으로 평생 치료를 요한다. 그의 병인학은 여전히 확인되지 않은 채로 있지만, CD를, 내인성 항원에 대한 면역 반응을 악화시키는 점막 면역계의 기능부전과 연계시키는 추정적인 증거가 존재한다.

[0011] 아미노살리실레이트, 코르티코스테로이드, 아자티오프린, 6-머캅토피린, 항생제 및 메토트렉세이트를 포함한, CD에 대해 현재 사용되는 치료제들은 전적으로 유효한 것은 아니며, 비특이적이고, 다수의 부작용들을 갖는다. 대부분의 경우에, 외과적 절제가 최종적인 대안이다. 따라서, 현재의 치료 전략은 상기 질병의 2 개의 요소, 즉 염증 및 T-세포 구동된 반응을 모두 특이적으로 조절하는 약제 또는 작용제를 찾는 것이다.

[0012] 최근에, 약물 인플릭시맵이 표준 요법에 반응하지 않는 보통 내지 중증 크론병의 치료 및 개방된 배액 누공의 치료에 대해 승인되었다. 특히 크론병에 대해 승인된 최초의 치료제인 인플릭시맵은 항-종양 괴사 인자(TNF) 항체이다. TNF는 크론병과 관련된 염증을 유발할 수도 있는 면역계에 의해 생산되는 단백질이다. 항-TNF는 TNF가 장에 도달하기 전에 혈류로부터 제거하여 염증을 방지한다. 그러나, 상기 물질은 전신 효과를 가지며 TNF는 매우 다면발현성 인자이므로, 심한 부작용이 비교적 흔하고, 그의 장기간 안전성은 여전히 판정되어야 한다. 또한, 상기 환자에게서 발생하는 염증 과정들 중 다수는 TNF 신호전달에 의존하지 않으므로 효능도 또한 제한적이다.

[0013] 류마티스성 관절염(RA)

[0014] 류마티스성 관절염 및 소아 류마티스성 관절염은 염증성 관절염의 유형들이다. 관절염은 관절 중의 염증을 기술하는 일반적인 용어이다. 관절염 중 일부 유형(전체는 아닌)은 잘못된 방향의 염증의 결과이다. 류마티스성 관절염은 세계 인구의 약 1%가 걸리며 본질적으로 무력케 한다. 류마티스성 관절염은 자가면역 질환이며 이에 의해 신체의 면역계는 관절 중에 윤활액을 분비하는 활막을 이물질로서 부적합하게 인지한다. 염증이 발생하며, 관절 내 및 주위의 연골 및 조직을 손상시키거나 파괴한다. 신체는 손상된 조직을 반흔 조직으로 대체하여, 관절 내의 정상적인 공간을 좁아지게 하고 뼈들을 함께 융합되게 한다.

[0015] 류마티스성 관절염에서, 지속적인 항원 제공, T-세포 자극, 사이토킨 분비, 활액 세포 활성화 및 관절 파괴의 자가면역 주기가 존재한다.

[0016] 관절염에 대한 현행 요법은 상기 관절의 염증을 소염성 또는 면역억제성 약제로 감소시키는데 초점을 두고 있다. 임의의 관절염의 치료 제 1 선은 대개 소염제, 예를 들어 아스피린, 이부프로펜 및 Cox-2 억제제, 예를 들어 셀레코시브 및 로페콕시브이다. 항-TNF 인간화된 단클론 항체, 예를 들어 인플릭시맵이 또한 사용되지만, 이는 다수의 부차적인 효과 또는 부작용을 가지며 그의 효능이 매우 낮다. "제 2 선 약물"은 금, 메토트렉세이트 및 스테로이드를 포함한다. 이들은 관절염에 대해 잘 확립된 치료제이지만, 매우 소수의 환자들이 단독의 이들 계열의 치료제에 대해서 차도를 보이며, 류마티스성 관절염 환자들에게는 여전히 어려운 치료 문제가 남아 있다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0017] 일반적으로, 만성적인 염증 질환에 대한 현행 치료제들은 매우 제한된 효율을 가지며, 이들 중 다수는 높은 부작용 발생률을 갖거나 질병 진행을 완전히 방지하지는 못한다. 지금까지, 이상적인 치료제는 없으며, 이러한 유형의 병리에 대한 치유도 존재하지 않는다. 따라서, 염증성 질환의 치료를 위한 신규의 요법이 대단히 필요하다.

### 과제의 해결 수단

[0018] 발명의 요약

[0019] 본 발명은 부분적으로, 본 발명에 개시된 세포의 정맥 내 투여에 따라 상기 세포가 림프절로 이동한다는 발견을 기본으로 하며; 이로온 면역 및 소염 효과는, 림프계에서 발생하는 환자의 면역계와 세포 요법 간의 상호작용으로부터 생성되는 것으로 생각된다. 따라서, 림프계에 대한 세포 요법의 직접적인 투여는 개선된 치료를 제공하고, 이는 보다 낮은 투여량 및 잠재적으로 보다 빠른 환자 반응 시간을 허용한다. 본 발명에 이르러 세포 요법의 림프내 투여에 대해 특히 유용한 투여 섭생들이 실시예에 상세히 설명한 바와 같이 확인되었다. 따라서, 본 발명은 세포 요법이 필요한 환자에게 세포 요법의 개선된 방법을 제공한다. 본 발명의 추가의 태양은 림프내로 전달되는 세포 요법에 사용하기 위한 키트 및 조성물을 제공한다.

[0020] 하나의 태양에서, 손상된 조직의 치료 또는 보수, 및/또는 손상된 조직을 갖는 염증 및/또는 면역 질환과 관련된 하나 이상의 증상 및/또는 염증 및/또는 면역 질환과 관련된 하나 이상의 증상의 치료, 조절, 예방 및/또는 개선을 위한 방법을 개시하며, 상기 방법은 상기 환자의 림프계에 줄기 세포, 조절성 T-세포 및/또는 섬유아세포를 포함하는 조성물의 예방학적으로 또는 치료학적으로 유효한 투여 섭생을 투여함을 포함한다. 바람직하게는, 상기 투여는 1회 용량, 또는 12 시간 이상 분리된 수회 용량을 포함하며, 여기에서 상기 또는 각각의 용량은 100,000 내지 1억의 세포를 포함한다. 하나의 실시태양에서 본 발명은 림프 기관으로의 세포 요법의 직접적인 전달을 포함하는, 개인에게서 면역 및/또는 염증 질병을 예방, 치료 또는 개선하는 방법을 제공한다. 본 발명의 하나의 실시태양에서 상기 세포 요법은 항원과 함께 전달된다.

[0021] 또 다른 태양에서,

[0022] i. 손상된 조직을 치료 또는 보수하고/하거나;

[0023] ii. 염증 및/또는 면역 질환과 관련된 하나 이상의 증상을 치료, 조절, 개선 및/또는 예방하는

[0024] 방법에 사용하기 위한 줄기 세포, 조절성 T-세포 및/또는 섬유아세포를 개시하며, 여기에서 상기 세포는 투여 섭생으로 림프계에 투여된다. 바람직하게는 상기 투여는 1회 용량, 또는 12 시간 이상 분리된 수회 용량을 포함하며, 여기에서 상기 또는 각각의 용량은 100,000 내지 1억의 세포를 포함한다.

[0025] 더욱 또 다른 태양에서, 키트를 개시하며, 상기 키트는 i) 줄기 세포, 조절성 T-세포 및/또는 섬유아세포 집단을 포함하는 약제 및 ii) 치료가 필요한 환자에게서 손상된 조직의 치료 또는 보수, 및/또는 염증 및/또는 면역 질환과 관련된 하나 이상의 증상의 치료, 조절, 예방 및/또는 개선을 위한 방법에 대한 설명서를 포함하며, 상기 방법은 상기 환자의 림프계에 줄기 세포, 조절성 T-세포 및/또는 섬유아세포를 포함하는 조성물의 예방학적으로 또는 치료학적으로 유효한 투여 섭생을 투여함을 포함한다.

[0026] 더욱 또 다른 태양에서, 손상된 조직의 치료 또는 보수, 및/또는 염증 및/또는 면역 질환과 관련된 하나 이상의

증상의 치료, 조절, 예방 및/또는 개선을 위한 약제의 제조에 있어서 줄기 세포, 조절성 T-세포 및/또는 섬유아 세포의 용도를 개시하며, 상기 용도는 상기 투여 섭생으로 상기 림프계에 줄기 세포, 조절성 T-세포 및/또는 섬유아세포를 투여함을 포함한다. 바람직하게는, 상기 투여는 1회 용량, 또는 12 시간 이상 분리된 수회 용량을 포함하며, 여기에서 상기 또는 각각의 용량은 100,000 내지 1억의 세포를 포함한다.

[0027] 또 다른 태양은 투여 섭생으로 림프계에 투여하기 위한 줄기 세포, 조절성 T-세포 또는 섬유아세포에 관한 것이다. 더욱 또 다른 태양은 요법에 사용하기 위한 상기 세포에 관한 것이다.

[0028] 더욱 또 다른 태양은 줄기 세포, 조절성 T-세포 및/또는 섬유아세포, 및 항원을 포함하는, 투여 섭생으로 림프계에 투여하기 위한 약학 조성물에 관한 것이다.

[0029] 다른 태양, 특징 및 이점들은 이어지는 명세 및 첨부된 청구의 범위로부터 보다 충분히 자명해질 것이다.

### 발명의 효과

[0030] 본 발명은 세포 요법의 림프내 투여를 위한 의학적 용도 및 방법을 제공한다. 본 발명의 추가의 태양은 세포 요법의 림프내 투여를 위한 조성물, 키트 및 용도를 제공한다.

### 도면의 간단한 설명

[0031] 도 1은 확대된 지방 유래된 줄기 세포의 투여가 콜라겐-유발된 관절염 마우스 모델에서 관절염 점수를 감소시키고 림프내 투여가 정맥내 경로보다 더 치료학적으로 유효함을 예시한다. 그룹 A: 처리되지 않은 대조용; 그룹 C: 5일 연속해서 IV 투여된 100만의 ASC; 그룹 D: 제1일에 투여된 300만의 ASC 및 제3 및 5일에 투여된 100만의 ASC; 그룹 E: 제1일 및 7일에 림프 내로 투여된 320,000의 ASC; 그룹 F: 제1일 및 7일에 림프 내로 투여된 비히클. 유의수준 차이를 하기와 같이 나타낸다: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ . 그룹들 간의 차이를 둔(Dunn) 형태의 시험 후 다중 비교와 함께 독립 데이터에 대한 크루스칼-왈리스(Kruskal-Wallis) 시험에 의해 평가하였다.  $P < 0.05$ 의 값을 유의수준으로서 간주하였다.

도 2는 도 1에 나타낸 바와 같은 데이터를 도시한다.

도 3은 콜라겐-유발된 관절염 마우스 모델에서 확대된 지방 유래된 줄기 세포의 림프 내 투여의 상이한 투여 섭생에 대한 치료 출발로부터의 일수 대 관절염 점수를 예시한다. 그룹 A: 처리되지 않은 대조용; 그룹 B: 제1일에 림프절당 투여된 160,000의 ASC; 그룹 C: 제1 및 8일에 림프절당 투여된 160,000의 ASC; 그룹 D: 제1, 8 및 15일에 림프절당 투여된 160,000의 ASC; 그룹 E: 제1, 15 및 30일에 림프절당 투여된 160,000의 ASC; 그룹 F: 제1, 15 및 30일에 림프내로 투여된 비히클. 결과를 그룹당 10 내지 14 마리의 동물의 평균±상기 평균의 표준오차로서 나타낸다. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  대 그룹 A(ANOVA 비모수 + 둔 시험 후).

도 4는 실험 그룹들에서 백혈구(WBC)의 농도를 예시한다. 그룹 A: 처리되지 않은 대조용; 그룹 B: 제1일에 림프절당 투여된 160,000의 ASC; 그룹 C: 제1 및 8일에 림프절당 투여된 160,000의 ASC; 그룹 D: 제1, 8 및 15일에 림프절당 투여된 160,000의 ASC; 그룹 E: 제1, 15 및 30일에 림프절당 투여된 160,000의 ASC; 그룹 F: 제1, 15 및 30일에 림프내로 투여된 비히클; 그룹 G: 건강한 대조군, 처리 없음. 결과를 그룹당 10 내지 13 마리의 동물의 평균±상기 평균의 표준오차로서 나타낸다. \*\* $P < 0.01$  대 그룹 F(ANOVA + 둔넷 시험 후).

도 5는 콜라겐-유발된 관절염 마우스 모델에서 확대된 지방 유래된 줄기 세포의 림프 내 투여의 상이한 투여 섭생에 대한 치료 출발로부터의 일수 대 관절염 점수를 예시한다. 그룹 A: 처리되지 않은 대조용; 그룹 B: 제1, 8 및 15일에 림프절당 투여된 160,000의 ASC; 그룹 C: 제1, 8 및 15일에 림프절당 투여된 48,500의 ASC; 그룹 D: 제1, 8 및 15일에 림프절당 투여된 14,500의 ASC; 그룹 E: 제1, 8 및 15일에 림프내로 투여된 비히클.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0032] 정의

[0033] 본 명세서의 이해를 촉진하기 위해서, 본 발명과 관련하여 일부 용어 및 표현의 의미를 하기에 설명할 것이다. 추가의 정의들이 필요에 따라 명세서 전체를 통해 포함될 것이다.

[0034] 본 발명에 따른 "림프내 주사에 적합한" 또는 "결절내 주사에 적합한" 또는 "액와 및/또는 서혜부 림프절 내로의 직접 주사에 적합한"이란 용어들은 림프내 또는 결절내 주사에 적합한, 바람직하게는 면역조절 세포, 가장 바람직하게는 줄기 세포, 조절성 T-세포 및/또는 섬유아세포뿐만 아니라 이를 포함하는 약제 및 약학 조성물을



포함하는 세포 요법이 치료가 필요한 환자에게서 손상된 조직(바람직하게는 간엽성 조직)의 치료 또는 보수, 및/또는 염증 및/또는 면역 질환과 관련된 하나 이상의 증상의 치료, 조절, 예방 및/또는 개선을 위한, 개인, 특히 인간, 훨씬 더 바람직하게는 인간 환자의 림프 조직 내로 의학적 치료로서 상기 요법을 주사하기에 이롭거나 필요한 물리적, 화학적, 생물학적 및 다른 특징들을 가짐을 의미한다. 더욱 또한 본 발명에 따른 "림프내 주사에 적합하거나" 또는 "관절내 주사에 적합한" 면역조절성 세포뿐만 아니라 이를 포함하는 약제 및 약학 조성물은 림프 조직 내에 적합한 부피, 바람직하게는 약 10  $\mu$ l 내지 1500  $\mu$ l; 약 100  $\mu$ l 내지 1000  $\mu$ l; 약 10  $\mu$ l 내지 100  $\mu$ l; 약 100  $\mu$ l 내지 500  $\mu$ l; 약 500  $\mu$ l 내지 1000  $\mu$ l; 약 1000  $\mu$ l 내지 1500  $\mu$ l, 예를 들어 약 10  $\mu$ l 이하; 약 100  $\mu$ l 이하; 약 500  $\mu$ l 이하; 약 1000  $\mu$ l 이하; 약 1500  $\mu$ l 이하로, 적합한 양의 모든 구성성분들의 적용을 허용하는 농도의 상기 조성물의 모든 구성성분들을 함유한다.

[0035] 더욱 또한 "림프내 또는 관절내 주사에 적합한" 조성물은, 너무 많은 양으로 적용되는 경우 잠재적으로 유해한 물질, 예를 들어 림프 조직을 손상시킬 수도 있는 용매 및 보조제를 함유하지 않거나 단지 제한된 양으로 함유해야 한다. 림프 조직의 손상이란 세포에 대한 독성 효과, 세포의 화학적 파괴, 예를 들어 염증 반응, 괴사 등의 유발에 의한 세포에 대한 간접적인 손상으로 인한 직접적인 손상을 의미한다.

[0036] 더욱 또한 본 발명에 따른 "림프내 또는 관절내 주사에 적합한" 조성물은, 상기 주사가 림프 조직을 빗맞히는 경우 및 최악의 경우 면역조절 세포뿐만 아니라 이를 포함하는 약제 및 약학 조성물을 혈액 순환 내로 직접 주사하는 경우에, 이상적으로는 면역조절 세포뿐만 아니라 이를 포함하는 약제 및 약학 조성물의 우발적인 전신 적용을 방지하는, 일부 종류의 안전성-기전을 갖는다. 상기와 같은 안전성-기전은 생물 활성 물질의 짧은 세포 외 반감기를 포함한다.

[0037] 본 발명에 사용된 바와 같은 "주사"란 용어는, 신체, 대개는 피부의 일부를 찌름으로써 작용제를 상기 신체에 전달함을 지칭하는, 당해 분야에서 통상적인 그의 의미로 제공되어야 한다. 상기 용어는 중공 주사 및 고압 제트 주사 장치의 사용을 포함한다.

[0038] 본 발명에 사용된 바와 같은 "동종 이계"란 용어는 동일한 종의 상이한 개체로부터를 의미하는 것으로 간주될 것이다. 유전자들이 하나 이상의 유전자 좌에서 동일하지 않은 경우 2 개 이상의 개체를 서로에 대해 동종 이계라고 한다.

[0039] 본 발명에 사용된 바와 같은 "자가조직"이란 용어는 동일한 개체로부터를 의미하는 것으로 간주될 것이다.

[0040] "자가면역 질병"이란 용어는 환자의 자기 자신의 세포, 조직 및/또는 기관에 대한 면역학적 반응에 의해 야기된 세포, 조직 및/또는 기관 손상을 특징으로 하는 상기 환자의 병을 지칭한다. 본 발명의 면역조절 세포로 치료될 수 있는 자가면역 질병의 예시적인, 비제한적인 예는 원형 탈모증, 강직성 척추염, 항인지질 증후군, 자가면역 애디슨병, 부신의 자가면역 질병, 자가면역 용혈성 빈혈, 자가면역 간염, 자가면역 난소염 및 고환염, 자가면역 혈소판감소증, 베체트병, 수포성류천포창, 심근병증, 셀리악 스프루-피부염, 만성 피로 면역 기능이상 증후군(CFIDS), 만성 염증성 탈수초성 다발성 신경병증, 처그-스트라우스 증후군, 흉터성 유사천포창, CREST 증후군, 한랭응집소병, 홍판상 루푸스, 한랭 글로불린혈증, 섬유근육통-섬유근염, 사구체신염, 그레이브스병, 길랑-바레, 하시모토 갑상선염, 특발성 폐 섬유증, 특발성 혈소판감소증 자반(ITP), IgA 신경병증, 소아 관절염, 편평태선, 메니에르병, 혼합된 결합 조직 질병, 다발성 경화증, 1형 또는 면역-매개된 당뇨병, 중증 근무력증, 심상성 천포창, 악성 빈혈, 결절성 다발성 동맥염, 다발원골염, 다선성 증후군, 다발성 근육통, 다발성 근염 및 피부근염, 원발성 무감마글로불린혈증, 원발성 담즙성 간경변증, 건선, 건선 관절염, 레이놀드 현상, 라이터 증후군, 유육종증, 강피증, 진행성 전신 경화증, 쇼그렌 증후군, 굿파스처 증후군, 근육강직 증후군, 전신 홍반성 루푸스, 홍반성 루푸스, 타카야수 동맥염, 측두 동맥염/거대세포 동맥염, 궤양성 대장염, 포도막염, 혈관염, 예를 들어 포진성 피부염 혈관염, 백반증, 베게너 육아종증, 항사구체 기저막병, 항인지질 증후군, 신경계의 자가면역 질병, 가족성 지중해열, 램버트-이튼 근무력 증후군, 교감성 안염, 다발성 내분비병증, 건선 등을 포함한다.

[0041] "셀리악 병"은 만성 소화장애증, 셀리악 스프루, 비열대성 스프루, 풍토성 스프루, 글루텐 장질환 또는 글루텐-민감성 장질환, 및 글루텐 불내성으로서 달리 지칭된다.

[0042] 본 원에 개시된 발명의 목적을 위해서, "면역 질환"은 자가면역 질병 및 면역학적으로 매개되는 질병을 포함한다.

[0043] "염증 질병"이란 용어는 염증, 예를 들어 만성 염증을 특징으로 하는 환자의 병을 지칭한다. 염증 질병의 예시적인, 비제한적인 예는 비제한적으로 셀리악병, 류마티스성 관절염(RA), 염증성 장 질병(IBD), 천식, 뇌염, 만



성 폐쇄성 폐 질환(COPD), 염증성 골용해, 알러지 질환, 폐혈성 쇼크, 폐 섬유증(예를 들어 특발성 폐 섬유증), 염증성 혈관염(예를 들어 결절성 다발성 동맥염, 베게너 육아종증, 타카야수의 동맥염, 측두 동맥염 및 림프종 양 육아종증), 외상후 혈관성형술(예를 들어 혈관성형술 후 재협착증), 미분화된 척추관절증, 미분화된 관절증, 관절염, 염증성 골용해, 만성 간염, 및 만성적인 바이러스 또는 세균 감염으로부터 발생하는 만성 염증을 포함한다.

[0044] 세포 집단에 적용된 "단리된"이란 용어는 생체 내 또는 시험관 내에서 상기 세포 집단과 관련된 하나 이상의 세포 집단이 실질적으로 없는, 인간 또는 동물체로부터 단리된 세포 집단을 지칭한다. "MHC"(주 조직적합성 복합체)란 용어는 세포-표면 항원-제공 단백질질을 암호화하는 유전자의 부분집합을 지칭한다. 인간에서, 상기 유전자를 인간 백혈구 항원(HLA) 유전자라 칭한다. 여기에서, 약어 MHC 또는 HLA는 호환적으로 사용된다. "환자"란 용어는 동물, 바람직하게는 비-영장류(예를 들어 소, 돼지, 말, 고양이, 개, 래트 또는 마우스) 및 영장류(예를 들어 원숭이, 또는 인간)를 포함한 포유동물을 지칭한다. 바람직한 실시태양에서, 상기 환자는 인간이다.

[0045] "면역조절성"이란 용어는, 비제한적으로 면역반응 및 염증 상태의 하향조절뿐만 아니라 사이토킨 프로파일, 세포독성 활성 및 항체 생산의 변화를 포함하는, 면역계의 하나 이상의 생물 활성의 억제 또는 감소를 지칭한다. "항원 특이적 면역조절성"이란 용어는 동종항원 및 자가항원 모두를 포함하여, 특정 항원 또는 항원들과 관련된 면역계의 하나 이상의 생물 활성의 억제 또는 감소를 지칭한다. "면역조절성"이란 용어는 "항원 특이적 면역조절성"을 포함하는 것으로 간주될 것이다.

[0046] 본 발명에 사용된 바와 같이, 세포 표면 마커에 대하여 사용된 바와 같은 "음성" 또는 "-"는 세포 집단에서, 상기 마커를 발현하는 세포의 20% 미만, 10%, 바람직하게는 9% 미만, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 또는 상기 세포가 없음을 의미하는 것으로 간주될 것이다. 세포 표면 마커의 발현은 예를 들어 통상적인 방법 및 장치(예를 들어 상업적으로 입수할 수 있는 항체 및 당해 분야에 공지된 표준 프로토콜과 함께 사용되는 벡크만 쿨터 에픽스(Beckman Coulter Epics) XL FACS 시스템을) 사용하는 특이적인 세포 표면 마커에 대한 유식 세포측정에 의해 측정될 수 있다.

[0047] 본 발명에 사용된 바와 같이, "림프계"란 용어는 당해 분야에서 그의 통상적인 의미로 제공되며, 림프관 및 림프 모세관의 전도 시스템에 의해 연결된 림프 조직을 지칭한다. "림프 기관"이란 용어는 림프절 및 다른 림프 기구, 예를 들어 흉선, 골수 및 폐이러 패치를 지칭한다. "림프절"이란 용어는 인간 또는 동물체 중의 임의의 림프절, 예를 들어 비제한적으로 액와 림프절, 서혜부 림프절(심부 및/또는 표면), 경부 림프절, 턱밑 림프절, 턱끝밑 림프절, 쇄골위 림프절, 종격 림프절, 가슴 림프절, 대동맥 림프절, 대퇴부 림프절 및 오금 림프절을 지칭한다. 본 발명에 따라 사용하기에 전형적인 림프절은 액와 또는 서혜부 림프절, 또는 림프절이 없거나 결함이 있는 경우, 림프 조직 또는 면역 세포이다.

[0048] 본 발명에 사용된 바와 같이 "중간엽 줄기 세포"(또한 본 발명에서 "MSC"라 칭한다)란 용어는 원래 중간엽으로부터 유래한, 세포의 다수의 상이한 유형들을 생성시킬 수 있는 세포를 의미하는 것으로 간주될 것이다. 상기 용어는 조골세포, 연골세포, 지방세포 또는 근육세포 중 하나 이상으로 분화할 수 있는 세포를 지칭한다. MSC를 임의의 유형의 조직으로부터 단리할 수 있다. 일반적으로 MSC는 골수, 지방 조직, 탯줄, 또는 말초혈액으로부터 단리될 것이다. 본 발명에 사용되는 MSC는 일부 실시태양에서 골수(BM-MSC) 또는 지방 조직(ASC)으로부터 단리될 수 있다. 본 발명의 바람직한 태양에서, MSC를 지방 조직으로부터 수득된 지질흡인물 자체로부터 수득한다. ASC의 생산은 예를 들어 WO-A-2006/136244에 개시된 바와 같이, 당해 분야에 공지되어 있다.

[0049] 본 발명에 사용된 바와 같이, "현저한 발현" 또는 이와 등가의 용어인 "양성" 및 "+"란 표현은 세포 표면 마커에 관하여 사용될 때 세포 집단에서 상기 세포의 20% 초과, 바람직하게는 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% 초과 또는 심지어 상기 세포 전체가 상기 마커를 발현함을 의미하는 것으로 간주될 것이다.

[0050] 세포 표면 마커의 발현을 통상적인 방법 및 장치(예를 들어 상업적으로 입수할 수 있는 항체 및 당해 분야에 공지된 표준 프로토콜과 함께 사용되는 벡크만 쿨터 에픽스 XL FACS 시스템을)를 사용하여 유식 세포 측정 시 배경 신호 이상에서 특이적인 세포 표면 마커에 대한 신호를 나타내는 통상적인 방법 및 장치(예를 들어 상업적으로 입수할 수 있는 항체 및 당해 분야에 공지된 표준 프로토콜과 함께 사용되는 벡크만 쿨터 에픽스 XL FACS 시스템을)를 사용하는 특이적인 세포 표면 마커에 대한 유식 세포측정에 의해 측정할 수 있다. 상기 배경 신호는 통상적인 FACS 분석에서 각각의 표면 마커를 검출하는데 사용되는 특이적인 항체와 동일한 동위원소의 비-특이적인 항체에 의해 제공되는 신호 강도로서 정의된다. 양성으로 생각되는 마커의 경우 관찰되는 특이적인 신호는 통상적인 방법 및 장치(예를 들어 상업적으로 입수할 수 있는 항체 및 당해 분야에 공지된 표준 프로토콜과 함

게 사용되는 벡크만 쿨터 에픽스 XL FACS 시스템) 사용 시 배경 신호 강도보다 20% 더 강하다, 바람직하게는 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 500%, 1000%, 5000%, 10000% 이상 더 강하다.

[0051] 더욱 또한, 상기 세포-표면 마커에 대한 상업적으로 입수할 수 있고 공지된 단클론 항체(예를 들어 세포 수용체 및 막관통 단백질)를 사용하여 관련 세포를 동정할 수 있다.

[0052] "결합 조직"이란 용어는 중간엽으로부터 유래하는 조직을 지칭하며 세포가 세포 외 기질 내에 포함됨을 특징으로 하는 여러 조직들을 포함한다. 결합 조직의 예는 비제한적으로 지방 및 연골 조직을 포함한다.

[0053] 본 발명에 사용된 바와 같은 "섬유아세포"란 용어는 활액 세포와 같은 섬유아세포를 포함하는 것으로 간주될 것이다.

[0054] "T-세포"란 용어는 T 세포 수용체(TCR)를 발현하는 림프구의 부분집합인 면역계의 세포를 지칭한다. "조절성 T-세포"(또한 본 발명에서 T-reg 세포라 칭한다)란 용어는 면역계의 활성화를 능동적으로 억제하고 병적인 자기-반응성, 즉 자가면역 질병을 방지하는 T 세포 부분집합을 지칭한다. "조절성 T-세포" 또는 "T-reg 세포"란 용어는 천연 T-세포(FoxP3+ T-reg 세포) 및 FoxP3 분자를 발현하지 않는 적응성 T-세포(또한 Tr1 세포 또는 Th3 세포로서 공지됨) 모두를 포함하는 것으로 간주될 것이다.

[0055] "글루텐"이란 용어는 글리아딘 및 글루테닌 성분을 포함하는 단백질을 의미하는 것으로 간주될 것이다.

[0056] 본 발명에 사용된 바와 같이, "치료하다", "치료" 및 "치료하는"의 용어들은 환자에 관하여 직접 사용될 때 질환, 예를 들어 비제한적으로 염증 질환, 자가면역 질병 또는 면역학적으로 매개되는 질병, 예를 들어 이식된 기관 및 조직의 거부와 관련된 하나 이상의 증상의 개선을 의미하는 것으로 간주될 것이며, 여기에서 상기 개선은 상기 치료가 필요한 환자에게 본 발명의 면역조절성 세포 또는 이를 포함하는 약학 조성물의 투여로부터 발생한다.

[0057] 본 발명에 사용된 바와 같이 "보수" 및 "보수하는"이란 용어들은 손상된 조직에 관하여 직접 사용될 때 직접적인 기전, 예를 들어 손상된 조직의 재생뿐만 아니라 간접적인 기전, 예를 들어 염증의 감소에 의해 조직을 형성시킬 수 있음 모두에 의한 상기와 같은 손상의 개선을 의미하는 것으로 간주될 것이다.

[0058] "복합 요법"이란 용어는 본 발명의 면역조절성 세포 또는 상기 세포를 포함하는 약학 조성물을 다른 활성제 또는 치료 양식들과 함께, 질환, 예를 들어 비제한적으로 염증 질환, 자가면역 질병 또는 면역학적으로 매개되는 질병, 예를 들어 이식된 기관 및 조직의 거부와 관련된 하나 이상의 증상의 개선을 위해 본 발명의 방식으로 사용함을 지칭한다. 이러한 다른 작용제 또는 치료제는 상기와 같은 질환의 치료를 위해 공지된 약제 및 요법, 예를 들어 비제한적으로 코르티코스테로이드 및 비-스테로이드성 소염 화합물을 포함할 수 있다.

[0059] 본 발명의 면역조절성 세포, 또는 이를 포함하는 약학 조성물을 또한 다른 치료 양식들, 예를 들어 코르티코스테로이드, 비-스테로이드성 소염 화합물, 또는 염증 치료에 유용한 다른 작용제들과 병용할 수 있다. 본 발명의 작용제들과 이들 다른 요법 또는 치료 양식과의 병용은 동시적이거나, 또는 연속적으로 제공될 수 있다, 즉 상기 두 치료를 상기 면역조절성 세포 또는 이를 포함하는 약학 조성물이 다른 요법 또는 치료 양식 전에 또는 후에 제공될 수 있도록 분할 할 수도 있다. 주치의는 다른 작용제, 요법 또는 치료 양식들과 병용되는 상기 면역조절성 세포 또는 이를 포함하는 약학 조성물의 적합한 투여 순서를 결정할 수 있다.

## [0060] 발명의 상세한 설명

[0061] 하나의 태양에서 본 발명은 치료가 필요한 환자에서 손상된 조직(바람직하게는 간엽성 조직)의 치료 또는 보수, 및/또는 염증 및/또는 면역 질환과 관련된 하나 이상의 증상의 치료, 조절, 예방 및/또는 개선을 위한 방법을 제공하며, 상기 방법은 상기 환자의 림프계에 예방학적으로 또는 치료학적으로 유효한 양의 세포 요법을 포함하는 조성물을 투여함을 포함한다. 따라서, 추가의 태양에서, 본 발명은 손상된 조직(바람직하게는 간엽성 조직)의 치료 또는 보수, 및/또는 염증 및/또는 면역 질환과 관련된 하나 이상의 증상의 치료, 조절, 예방 및/또는 개선에 사용하기 위한 세포 요법, 바람직하게는 면역조절성 세포를 포함하는, 가장 바람직하게는 줄기 세포, 조절성 T-세포 및/또는 섬유아세포를 포함하는 세포 요법을 제공하며, 여기에서 상기 세포 요법을 림프계에 투여한다. 상기 세포 요법은 림프내 투여, 바람직하게는 림프내 주사에 적합하다.

[0062] 상기 림프계 내로 줄기 세포, 조절성 T-세포 및/또는 섬유아세포를 직접 투여하는 것은 종래 기술보다, 즉 상기 줄기 세포, 조절성 T-세포 및/또는 섬유아세포의 통상적인 피하 주사보다 여러가지 이점을 갖는다, 예를 들어 보다 적은 양의 면역조절성 세포면 충분하며; 상기 요법은 정기적인 피하 주사보다 환자에게 더 고통스럽지 않고; 보다 적은 부작용이 존재한다. 더욱이, 예를 들어 결절내 주사에 의한 림프 조직에의 직접 적용에 의해,

상기 면역조절성 세포를 상기 손상된 조직의 치료 또는 보수 부위에 더 가깝게 전달한다.

- [0063] 본 발명에 따른 면역조절성 세포뿐만 아니라 이를 포함하는 약제 및 약학 조성물을 림프내 투여와 동시에, 피하 투여 또는 설하 투여, 경구, 경피(국소 백신화), 피내, 골수내, 척수강내, 심실내, 비내, 결막내, 기관지내, 경피, 직장내, 복강내, 근육내, 폐내, 질내, 직장, 또는 안내와 같은 통상적인 경로에 의해 투여할 수 있다.
- [0064] 본 발명에 따른 세포 요법은 줄기 세포, 조절성 T-세포 및/또는 섬유아세포를 포함하는 것이 바람직하다. 상기 줄기 세포가 중간엽 줄기 세포(본 발명에서 이후부터 또한 MSC라 칭한다), 가장 바람직하게는 지방 유래된 중간엽 줄기 세포(본 발명에서 이후부터 또한 ASC라 칭한다)(지방 조직, 일반적으로 인간 지방 조직으로부터 기원하는 MSC(hASC)이다)인 것이 특히 바람직하다.
- [0065] 본 발명에 사용되는 섬유아세포는 세포 외 기질의 합성 및 유지와 관련된 중간엽 유래된 결합 조직이며 활액 세포와 같은 섬유아세포를 포함하는 것으로 간주될 것이다. 상기 섬유아세포를 임의의 적합한 동물, 가장 바람직하게는 인간으로부터 획득할 수 있다.
- [0066] 본 발명에 사용된 바와 같은 조절성 T-세포(때때로 억제제 T-세포로서 공지됨)는 임의의 적합한 공급원, 예를 들어 혈액 또는 비장으로부터 유래될 수 있다. 상기 조절성 T-세포는 천연  $CD4^{+}Foxp3^{+}$  세포이거나, 또는 생체 외 단리되고/되거나 확대된 조절성 T-세포일 수 있다. 상기 조절성 T-세포의 생체 외 확대 방법은 당해 분야에 공지되어 있으며 전혈(예를 들어 PBMC 분획의 부분으로서)로부터의 단리에 이어서 예를 들어 중간엽 줄기 세포 또는 라파마이신을 사용한 확대를 포함한다.
- [0067] 본 발명의 방법에 사용되는 MSC는 바람직하게는 결합 조직으로부터 유래한다. 바람직한 실시태양에서, 상기 MSC는 지방 조직으로부터, 및 추가의 바람직한 실시태양에서 상기 지방 조직의 기질 분획으로부터 유래한다. 또 다른 실시태양에서, 상기 MSC는 유리질 연골의 연골세포로부터 획득된다. 추가의 실시태양에서, 상기 MSC는 피부로부터 획득된다. 또 다른 실시태양에서, 상기 MSC는 골수로부터 획득된다.
- [0068] 상기 MSC를 임의의 적합한 동물, 가장 바람직하게는 인간으로부터의 결합 조직의 임의의 적합한 공급원으로부터 획득할 수 있다. 상기 세포를 병적이지 않은 포유동물 공급원, 바람직하게는 출생후(예를 들어 설치류 또는 영장류) 공급원으로부터 획득한다. 바람직한 실시태양에서, 상기 MSC를 결합 조직의 공급원, 예를 들어 비제한적으로 지방조직, 유리질 연골, 골수 또는 피부의 기질 분획으로부터 획득한다. 가장 바람직하게는 본 발명 방법의 MSC를 병적이지 않은 출생후 인간 기질 지방조직으로부터 획득한다.
- [0069] 본 발명의 방법에 따라 투여 시 상기 면역조절성 세포의 의도된 수용자에 관하여, 상술한 방법에 사용된 MSC, 조절성 T-세포 및/또는 섬유아세포는 동종이계(공여자) 또는 자기조직(환자) 기원의 것일 수 있다. 상기 방법의 하나의 실시태양에서, 상기 MSC, 조절성 T-세포 및/또는 섬유아세포는 동종이계 기원의 것이다. 상기 방법의 하나의 실시태양에서, 상기 MSC, 조절성 T-세포 및/또는 섬유아세포는 자기조직 기원의 것이다.
- [0070] 본 발명의 방법에 사용되는 상기 MSC, 조절성 T-세포 및/또는 섬유아세포는 바람직하게는 (i) 항원 제공 세포에 특이적인 마커를 발현하지 않고, (ii) IDO(인돌아민 2,3-다이옥시게나제)를 구성적으로 발현하지 않고, (iii) IFN-감마에 의해 자극 시 IDO를 발현하고, MSC의 경우에 (iv) 2 개 이상의 세포 계통으로 분화되는 능력을 제공할 특징으로 한다.
- [0071] 본 발명에 따른 줄기 세포, 조절성 T-세포 및/또는 섬유아세포를 바람직하게는 림프내 주사에 적합한 생리학적으로 허용 가능한 담체 중에서 전달한다. 일반적으로, 사용이 공지된 임의의 생리학적으로 허용 가능한 담체가 본 발명의 실시예에 사용될 수 있다. 상기와 같은 담체의 선택은 비제한적으로 링거용액, 물, 표준 염수 용액, 텍스트로스 용액 및 알부민 수를 포함하며, 상기 선택은 당해 분야의 기술 내에서 용이하다.
- [0072] 임의로, 상기 림프계 또는 그의 일부, 예를 들어 림프관 또는 림프 기관의 국소화된 영역, 바람직하게는 림프절을 상기 주사 과정 동안 가시화할 수도 있다. 초음파, 방사선, 또는 다른 가시화 수단, 예를 들어 컴퓨터 단층촬영(CAT 스캔)을 사용하여 상기 림프절을 가시화하고 상기 림프절 중의 바늘의 위치 및 변화, 예를 들어 팽창을 모니터링할 수 있다. 액와 및/또는 서혜부 림프절 내로의 주사가 초음파 유도된 위치 및 주사의 용이성으로 인해 바람직하다.
- [0073] 상기 주사에 사용되는 기법은 당해 분야의 기술 내에 있다. 한 가지 방법은 세포 제제가 하나의 챔버에 포함되고 액체 담체가 다른 챔버에 포함되어 주사 전에 혼합되는 이중-챔버 주사기를 사용하는 것이다. 또 다른 방법에서 액체 제형 중에 상기 세포를 함유하는 단일 챔버 주사기를 사용할 수도 있다.

[0074] 투여 섭생

[0075] 본 발명에 따라, 환자를 1 회 또는 수 회 용량의 상기 림프 내 투여되는 세포 요법으로 치료한다. 이러한 용량 수 및 빈도, 및 각 용량 중 투여되는 세포의 수가 투여 섭생을 형성한다. 본 발명에 따라 사용하기 위한 투여 섭생을 하기에 개시하며 마우스 모델에서 다양한 섭생들의 유효성을 입증하는 데이터를 실시예에 제공한다.

[0076] 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 이상의 용량을 12 시간에서부터 60일 이상까지의 간격으로 투여한다. 일부 실시태양에서, 각각의 용량은 약 100 내지 약 1억의 세포; 약 1000 내지 약 1000만의 세포; 약 10,000 내지 약 100만의 세포; 약 100 내지 약 1000의 세포; 약 1000 내지 약 10,000의 세포; 약 10,000 내지 100,000의 세포; 약 100,000 내지 100만의 세포; 약 100만 내지 1000만의 세포; 500만 개 초과와 세포; 100만 내지 1000만의 세포; 50만 내지 500만의 세포 또는 약 1000만 내지 1억의 세포를 포함한다. 다른 실시태양에서, 각각의 용량은 약 100 개 이하의 세포; 약 250 개 이하의 세포; 약 500 개 이하의 세포; 약 750 개 이하의 세포; 약 1000 개 이하의 세포; 약 2500 개 이하의 세포; 약 5000 개 이하의 세포; 약 7500 개 이하의 세포; 약 10,000 개 이하의 세포; 약 25,000 개 이하의 세포; 약 50,000 개 이하의 세포; 약 75,000 개 이하의 세포; 약 100,000 개 이하의 세포; 약 250,000 개 이하의 세포; 약 500,000 개 이하의 세포; 약 750,000 개 이하의 세포; 약 100만 개 이하의 세포; 약 250만 개 이하의 세포; 약 5백만 개 이하의 세포; 약 750만 개 이하의 세포; 약 1000만 개 이하의 세포; 약 2500만 개 이하의 세포; 약 5000만 개 이하의 세포; 약 7500만 개 이하의 세포; 또는 약 1억 개 이하의 세포를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 각각의 용량은 100,000 개 미만의 세포, 전형적으로는 90,000 개 미만의 세포, 80,000 개 미만의 세포, 70,000 개 미만의 세포, 60,000 개 미만의 세포, 또는 50,000 개 미만의 세포를 포함한다. 일부 실시태양에서, 각각의 용량은 1000 내지 50,000 세포, 예를 들어 5,000 내지 40,000 세포, 또는 10,000 내지 30,000 세포를 포함한다.

[0077] 하기 실시예 1 내지 3에 나타난 마우스 모델로부터의 데이터를 실시예 4에 상세히 나타난 바와 같은 유용한 인간 투여량과 서로 관련시킨다. 하기 표는 실시예 4에 나타난 가정에 근거한 인간 용량을 요약한다(20 그램의 평균 마우스 중량; 80 킬로그램의 평균 인간 체중).

표 1

[0078]

마우스 용량 (세포의 수)	마우스 용량 (세포/kg)	인간 등가 용량( 세포/kg)	(a)10; 또는 (b)20의 안전성 인자에 의한 권장된 인간 용량 (세포/kg)	(a)10; 또는 (b)20의 안전성 인자에 의한 인간 등가 용량 (세포의 수)
320,000	1600만	128만	(a) 128,000 (b) 64,000	(a) 1024만 (b) 512만
97,000	485만	388,000	(a) 38,800 (b) 19,400	(a) 310만 (b) 155만
29,000	145만	116,000	(a) 11,600 (b) 5,800	(a) 928,000 (b) 464,000

[0079] 따라서 상기 예시된 마우스 용량을 5,800 세포/kg(464,000 세포/용량) 내지 128,000 세포/kg(1024만 세포/용량)의 안전성-조정된 인간 용량에 상관시킨다. 안전성 조정은 종종 규제 당국에 의해 요구되지만, 모든 경우에 필수적이지 않을 수도 있으며; 안전성 조절을 하지 않는 경우, 상기 등가의 인간 용량 범위는 대략 900만 세포 (대략 100,000 세포/kg) 내지 대략 1억 세포(대략 130만 세포/kg)이다. 따라서, 본 발명에 따른 예시적인 용량 범위는 용량당 500,000 세포 내지 1억 세포이다. 전형적으로, 본 발명은 용량당 500,000 세포 내지 5000만 세포, 보다 전형적으로는 용량당 500,000 세포 내지 1000만 세포, 더욱 더 전형적으로는 용량당 100만 내지 1000만 세포, 예를 들어 용량당 200만 내지 1000만 세포, 용량당 300만 내지 1000만, 용량당 400만 내지 1000만 세포, 용량당 500만 내지 1000만 세포, 용량당 100만 내지 500만 세포, 용량당 500만 초과 세포, 또는 용량당 500만 이하 세포를 제공한다. 본 발명에 따른 유용한 투여량은 용량당 200만 이상 세포, 용량당 300만 이상 세포, 용량당 400만 이상 세포, 용량당 500만 이상 세포, 용량당 600만 이상 세포, 용량당 700만 이상 세포, 용량당 800만 이상 세포, 용량당 900만 이상 세포, 및 용량당 1000만 이상 세포를 포함한다. 실시예 4는 단일 용량으로서 500만 세포를 투여한 다음 (상이한 환자에서) 용량당 1000만 세포의 용량을 투여하는 임상 시험을 제안한다.

[0080] 본 발명에서 용량당 절대수로서 나타난 용량을 80 kg인 사람의 추정 체중을 기본으로 계산한다. 따라서, 이들 용량 중 임의의 용량을, 세포수를 80으로 나눔으로써 킬로그램당 용량으로서 나타낼 수 있다. 상기 표에 나타



낸 바와 같이, 킬로그램당 나타는 전형적인 용량은 대략적으로 6,000(이상) 세포/kg, 12,000(이상) 세포/kg, 19,000(이상) 세포/kg, 39,000(이상) 세포/kg, 64,000(이상) 세포/kg, 및 128,000(이상) 세포/kg이다. 따라서, 킬로그램당 나타낸 용량의 적합한 범위는 6,000 세포/kg 내지 128,000 세포/kg; 12,000 세포/kg 내지 64,000 세포/kg; 20,000 세포/kg 내지 50,000 세포/kg; 또는 30,000 세포/kg 내지 40,000 세포/kg을 포함한다.

[0081] 본 발명의 일부 실시태양에서 상기 세포의 농도는 약 100만 세포/ml 내지 7000만 세포/ml; 약 2000만 세포/ml 내지 6000만 세포/ml; 약 3000만 세포/ml 내지 5000만 세포/ml을 포함한다. 다른 실시태양에서, 각각의 용량은 약 100만 세포/ml 이하, 약 1000만 세포/ml 이하; 약 2000만 세포/ml 이하; 약 3000만 세포/ml 이하; 약 4000만 세포/ml 이하; 약 5000만 세포/ml 이하; 약 6000만 세포/ml 이하; 약 7000만 세포/ml 이하를 포함한다. 실시예 4에서 설계된 임상 시험은 1000만 세포/ml의 농도를 제한한다.

[0082] 상기 언급되고 실시예 1에 예시된 바와 같이, 림프내 투여는 치료 효과가 정맥내 투여의 경우 요구될 수 있는 경우보다 더 낮은 수의 세포를 사용하여 성취될 수 있으므로 유리하다.

[0083] 수회 용량을 모두 림프계의 동일한 부위 또는 특정한 부분에 투여할 수 있다. 한편으로, 상기 수회 용량을 상기 림프계의 상이한 부위 또는 특정한 부분들에 투여할 수 있다. 하나의 실시태양에서, 각각의 용량을 상이한 림프절에 투여한다. 이들 상이한 결절들은 동일한 유형의 2 개의 결절, 예를 들어 2 개의 상이한 서혜부 림프절이거나, 또는 2 개의 상이한 유형의 결절, 예를 들어 서혜부 림프절과 액와 림프절일 수도 있다. 다수 결절에의 투여는 각각의 주사 부위에 대한 감소된 외상 및 가능한 증가된 환자 순응성의 추가적인 이점을 갖는다.

[0084] 전형적으로, 용량들 간의 최소 간격은 대략 12 시간이며 용량들 간의 최대 간격은 대략 60일이다. 전형적으로, 용량들을 24 시간 이상 떨어져서, 2, 3, 4, 5, 6 또는 7일 이상 떨어져서, 또는 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 일 이상 떨어져서 투여한다. 3 개 이상의 용량을 투여하는 경우, 투여량들 간의 간격은 동일하거나 상이할 수 있다, 즉 첫 번째 투여량과 두 번째 투여량간의 간격이 후속 용량들 간의 간격과 동일하거나 상이할 수 있다. 예를 들어, 3 개의 용량을 투여하는 경우, 첫 번째 간격은 7일일 수 있고 두 번째 간격은 4, 5, 6, 8일 이상일 수 있다.

[0085] 상기 수회 용량을 투여하는 기간은 전형적으로는 12 시간 내지 60일, 예를 들어 5, 6, 7, 8, 9, 10일 이상, 전형적으로는 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21일 이상, 예를 들어 30일의 기간 동안이다. 따라서, 상기 투여되는 완전한 투여 섭생에 전형적인 기간은 1주일, 2주일, 3주일 또는 1 개월이다. 상기 기간 동안 투여되는 용량의 수는 투여의 빈도(즉 용량들 간의 간격)에 따라 변한다. 예를 들어 상기 투여 섭생에 대한 기간이 15일이고 용량들간의 간격이 14일인 경우, 1일 및 15일에, 단지 2 개의 용량만이 투여될 것이다.

[0086] 전형적으로, 1, 2, 3, 4 또는 5 개의 용량을 투여한다. 2 개의 용량을 투여하는 경우, 상기 2 개의 투여량을 전형적으로는 5, 6, 7, 8, 9, 10일 이상 떨어져서 투여한다. 예를 들어, 상기 2 개의 투여량을 1일 및 6일째에, 1일 및 7일째에, 1일 및 8일째에, 1일 및 9일째에, 1일 및 10일째에, 또는 1일 및 11일째에 투여할 수 있다. 상기 2 개의 투여량을 14일 이상 떨어져서, 예를 들어 1일 및 15일째에, 1일 및 30일째에, 또는 1일 및 15 내지 30일 중 임의의 날에 투여할 수 있다. 2-투여량 섭생에서 두 번째 투여량에 전형적인 날은 6, 7, 9, 10, 15 및 30일이다.

[0087] 3 개의 용량을 투여하는 경우에, 상기 3 개의 용량을 전형적으로는 11일 이상의 기간 동안, 예를 들어 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25일 이상, 예를 들어 30일의 기간 동안 5, 6, 또는 7일 이상 떨어져서 투여한다. 상기 실시태양에서, 전형적인 투여 스케줄은 1일, 8일 및 30일째의 1회 투여량의 투여를 포함한다. 동등하게 전형적인 투여 스케줄은 1일, 15일 및 30일째의 1 회 투여량의 투여를 포함한다. 간격이 상이한 3 개 용량의 투여가 또한 상기 언급한 바와 같이 가능하다. 이의 예는 1일, 15일 및 21일째의 투여이다.

[0088] 4 개 이상의 용량을 투여하는 경우, 상기 용량들을 전형적으로는 5, 6, 또는 7일 이상 떨어져서, 보다 전형적으로는 10, 11, 12, 13, 14일 이상 떨어져서 투여한다. 예를 들어, 5 개 용량에 전형적인 투여 스케줄은 1일, 15 일, 30일, 45일 및 60일째의 투여이다. 상기 간격이 동일하지 않은 4 개의 용량 스케줄의 예는 1일, 15일, 21 일 및 30일째의 투여이다.

[0089] 하기 실시예 2 및 3의 데이터는 7일 이상의 투여 간격을 나타낸다. 도 3 및 4는 1일 및 8일째의 세포의 투여가 이로우며, 1일, 8일 및 15일의 투여가 최적임을 나타낸다. 1일, 15일 및 30일째의 투여가 또한 이로운 것으로 나타났다.

[0090] 각각의 용량을 환자에게 단일 사건(예를 들어 주사)으로 또는 수회 투여 사건(예를 들어 수회 주사)에 의해 투여할 수 있다. 예를 들어, 1 회 용량이 50,000 세포의 투여를 필요로 하는 경우, 이들 세포를 단일 주사에 의

해 또는 각각 25,000 세포의 2 회 주사에 의해 투여할 수 있다. 유사하게, 80,000 세포를 투여해야 하는 경우, 이들을 단일 주사로 또는 수회 주사, 예를 들어 각각 40,000 세포의 2 회의 별도의 주사, 또는 각각 20,000 세포의 4 회의 별도의 주사에 의해 투여할 수 있다. 상기 실시예들은 각 용량의 절반을 서혜부 림프절에 투여하고 각 용량의 (나머지) 절반을 제 2 서혜부 림프절에 투여함을 설명한다, 즉 상기 용량이 500만 세포인 경우, 250만 세포를 제 1 서혜부 림프절에 투여하고 250만 세포를 제 2 서혜부 림프절에 투여할 수 있으며; 유사하게 상기 용량이 1000만 세포인 경우, 500만 세포를 제 1 서혜부 림프절에 투여하고 500만 세포를 제 2 서혜부 림프절에 투여할 수 있다. 단일 용량을 수회 투여 사건에 의해 투여하는 경우, 상기 수회 사건은 모두 대략 1 시간 이내에, 전형적으로는 30 분 이내에 완료되어야 한다. 전형적으로, 상기 수회 투여 사건(예를 들어 주사)을 연속적으로, 동반하여 또는 동시에 수행할 것이다. 상기 수회 투여 사건을 모두 림프계의 동일한 부위 또는 동일한 특정한 부분, 예를 들어 림프절에 투여할 수 있다. 한편으로, 상기 수회 투여 사건(예를 들어 주사)을 상기 림프계의 상이한 부위 또는 특정한 부분에 투여할 수 있다. 하나의 실시태양에서, 단일 용량을 수회 사건(예를 들어 주사)에 의해 상이한 림프절에 투여한다. 이들 상이한 결절은 동일한 유형의 2 개의 결절, 예를 들어 2 개의 상이한 서혜부 림프절이거나, 또는 상이한 유형의 2 개의 결절, 예를 들어 서혜부 림프절과 액와 림프절일 수도 있다. 다중 결절에의 투여는 각 주사 부위에서의 감소된 외상(잠재적으로 환자 순응성을 증가시킨다)의 추가적인 이점을 갖는다.

[0091] 하기의 실시예들은 본 발명에 따른 다양한 투여 섭생의 효능을 입증한다. 실시예 1은 류마티스 관절염의 마우스 모델에서 320,000 개의 확대된 인간 지방 줄기 세포(상기 표에 나타난 바와 같이, 사용된 안전성 인자에 따라 인간에서 용량당 대략 500만 내지 1000만 세포, 또는 안전성 인자 없이 대략 1억 세포에 상응한다)의 2 회 용량의 림프내 투여가 관절염을 현저하게 감소시키고 정맥내 투여보다 더 낮은 세포 수로 더 높은 치료 효과를 성취함을 입증한다. 실시예 2는 1주일 이상의 간격에 의해 분리된, 실시예 1과 동일한 용량의 림프내 투여(320,000의 확대된 인간 지방 줄기 세포; 인간에서 용량당 대략 500만 내지 1000만 세포와 동등함)가 관절염의 중증도를 감소시키는 것을 입증한다. 더욱이, 각각 1 주일의 간격으로 상기 용량의 3 회 투여(다시, 림프절당 160,000 eASC로서 전달됨)는 더 높은 치료 효과를 나타내었다. 더욱이, 실시예 2는 d1 + d8, 및 또한 d1, d8 및 d15의 투여가 건강한 대조용 동물(그룹 G)의 경우에 가까운 총 백혈구 수를 유지함(이는 eASC의 소염 효과를 가리킨다)을 보인다. 따라서 1 주일의 투여량 간격이 특히 유리한 것으로 나타났다. 실시예 3은 최적의 d1, d8, d15 간격을 사용하여 상이한 용량을 시험한다: (i) 320,000 세포(사용된 안전성 인자에 따라 인간에서 용량당 대략 500만 내지 1000만 세포와 동등함); (ii) 97,000 세포(인간에서 용량당 대략 150만 내지 300만 세포와 동등함); 또는 (iii) 29,000 세포(인간에서 용량당 대략 50만 내지 100만 세포와 동등함). 이들 각각의 용량은 관절염의 중증도를 감소시키는 것으로 나타났다. 놀랍게도, d1, d8 및 d15째에 투여된 97,000 세포의 "중간" 용량(사용된 안전성 인자에 따라 인간에서 용량당 대략 150만 내지 300만 세포, 또는 안전성 인자 없이 대략 3000만 세포와 동등함)이 관절염의 중증도를 최대로 감소시키는 것으로 나타났다.

[0092] 의심할바 없이, 상술한 투여 섭생은 림프계의 모든 부위에 투여하기에 적합하다. 따라서, 전형적인 투여 섭생은 상술한 투여 섭생을 사용하는 림프절, 예를 들어 서혜부 림프절(예를 들어 표면 및/또는 심부 서혜부 림프절)에의 투여를 포함한다.

[0093] MSC 표현형 마커

[0094] 본 발명의 바람직한 방법에 사용된 MSC는 바람직하게는 APC(항원 제공 세포) 표현형과 관련된 마커에 대해 음성이다. 따라서 상기 MSC는 하기의 마커 중 하나 이상, 2, 3, 4 또는 바람직하게는 전부에 대해 음성인 것이 바람직하다: CD 11b; CD 11c; CD 14; CD45; HLAII. 더욱 또한, 상기 MSC는 바람직하게는 하기의 세포 표면 마커 중 하나 이상, 2, 또는 바람직하게는 모두에 대해 음성이다: CD31; CD34; CD133.

[0095] 특정한 실시태양에서, 본 발명의 방법에 사용된 바와 같은 MSC는 바람직하게는 하기의 세포 표면 마커 CD9, CD44, CD54, CD90 및 CD105 중 하나 이상, 2, 3, 4 또는 바람직하게는 전부를 발현함(즉 이들에 대해 양성임)을 특징으로 한다. 바람직하게는, 상기 MSC는 상기 세포 표면 마커 CD9, CD44, CD54, CD90 및 CD105 중 하나 이상, 2, 3, 4 및 바람직하게는 전부를 현저하게 발현함을 특징으로 한다.

[0096] 임의로, 상기 MSC는 또한 세포 표면 마커 CD106(VCAM-1)에 대해 음성일 수도 있다. 본 발명의 방법에 사용하기에 적합한 MSC의 예는 당해 분야에, 예를 들어 내용 전체가 본 발명에 참고로 인용된 WO-A-2007/039150에 개시되어 있다.

[0097] 분화



- [0098] 본 발명의 방법에 사용하기에 적합한 MSC는 바람직하게는 다능성 또는 만능성 줄기 세포이며, 증식하고 2 개 이상, 보다 바람직하게는 3, 4, 5, 6, 7 개 이상의 세포 계통으로 분화되는 능력을 나타낼 수 있다. 상기 MSC가 분화될 수 있는 세포 계통의 예시적인 비제한적인 예는 골세포, 지방세포, 연골세포, 건세포, 근육세포, 심근세포, 조혈-지지 기질 세포, 내피 세포, 신경세포, 상장세포, 및 간세포를 포함한다. MSC는 통상적인 방법에 의해서 증식하고 다른 계통의 세포로 분화할 수 있다. 분화된 세포를 그의 분화되지 않은 대응물로부터 동정하고 후속으로 단리하는 방법을 또한 당해 분야에 널리 공지된 방법에 의해 수행할 수 있다.
- [0099] MSC 단리
- [0100] MSC의 단리 방법은 당해 분야에 공지되어 있으며, 임의의 적합한 방법을 사용할 수 있다.
- [0101] 하나의 실시태양에서 ASC의 단리는 하기의 단계들을 포함할 수 있다:
- [0102] (i) 지방조직의 샘플로부터 세포 현탁액을 제조하고;
- [0103] (ii) 상기 세포 현탁액으로부터 세포를 회수하고;
- [0104] (iii) 세포가 고체 표면에 부착하여 증식되게 하는 조건 하에 적합한 세포 배양 배지에서 상기 고체 표면 상에서 상기 세포를 배양하고;
- [0105] (iv) 상기 고체 표면을 배양 후에 세척하여 부착되지 않은 세포를 제거하고;
- [0106] (v) 상기와 같은 배지에서 2 회 이상 계대배양 후에 상기 고체 표면에 부착된 채로 있는 세포를 선택하고;
- [0107] (vi) 상기 선택된 세포 집단이 관심 표현형을 나타냄을 확인한다.
- [0108] 본 발명에 사용된 바와 같이, "고체 표면"이란 용어는 ASC가 부착할 수 있는 임의의 물질을 지칭한다. 특정한 실시태양에서 상기 물질은 그의 표면에 대한 포유동물 세포의 부착을 촉진하도록 처리된 플라스틱 물질, 예를 들어 폴리-D-리신 또는 다른 시약으로 임의로 코팅된 상업적으로 입수할 수 있는 폴리스타이렌 플레이트이다.
- [0109] 단계 (i) 내지 (vi)를 당해 분야의 숙련가들에 의해 공지된 통상적인 기법에 의해 수행할 수 있다. 간단히, 상기 ASC를 상기 논의된 바와 같이 임의의 적합한 동물로부터의 임의의 적합한 결합 조직 공급원으로부터 통상적인 수단에 의해 획득할 수 있다. 전형적으로, 인간 지방세포를 널리-인정된 프로토콜, 예를 들어 수술 또는 흡입 지방조직 절제술을 사용하여 살아있는 공여자로부터 획득한다. 실제로, 지방흡입술은 매우 통상적이므로, 지방흡입 유출물이 상기 ASC가 유래될 수 있는 특히 바람직한 공급원이다. 따라서, 특정한 실시태양에서, 상기 ASC는 지방흡입에 의해 획득된 인간 지방조직의 기질 분획으로부터 획득된다.
- [0110] 상기 조직을 바람직하게는, ASC를 상기 물질의 나머지에서 분리하기 위해서 처리 전에 세척한다. 하나의 통상적으로 사용되는 프로토콜에서, 상기 조직의 샘플을 생리학적으로 적합한 염수 용액(예를 들어 포스페이트 완충된 염수(PBS))으로 세척하고 이어서 격렬히 교반하고 방치하여 침전시킨다(이는 상기 조직으로부터 느슨한 물질(예를 들어 손상된 조직, 혈액, 적혈구 등)을 제거하는 단계이다). 따라서, 상기 세척 및 침전 단계를 일반적으로는 상등액에 찌꺼기가 비교적 없을 때까지 반복한다. 상기 남은 세포는 일반적으로 다양한 크기의 덩어리로 존재할 것이며, 상기 프로토콜은 상기 세포 자체에 대한 손상을 최소화하면서 전체 구조를 분해하는 것으로 판단된 단계들을 사용하여 진행한다. 상기 목적을 성취하는 한 가지 방법은 상기 세포의 세척된 덩어리를, 세포간의 결합을 약화시키거나 파괴하는 효소(예를 들어 콜라게나제, 디스파제, 트립신 등)로 처리하는 것이다. 상기와 같은 효소 처리의 양 및 지속기간은 사용되는 조건에 따라 변할 것이나, 상기와 같은 효소의 사용은 당해 분야에 일반적으로 공지되어 있다. 한편으로, 또는 상기와 같은 효소 처리와 함께, 상기 세포의 덩어리를 다른 처리, 예를 들어 기계적 교반, 음파 에너지, 열 에너지 등을 사용하여 분해시킬 수 있다. 분해를 효소적 방법에 의해 수행하는 경우, 상기 효소를 적합한 기간에 이어서 중화시켜 상기 세포에 대한 유해한 효과들을 최소화하는 것이 바람직할 수 있다.
- [0111] 상기 분해 단계는 전형적으로는 응집된 세포의 슬러리 또는 현탁액 및 일반적으로 유리 기질 세포(예를 들어 적혈구, 평활근 세포, 내피 세포, 섬유아세포 및 줄기 세포)를 함유하는 유체 분획을 생성시킨다. 상기 분리 공정에서 다음 단계는 상기 ASC로부터 응집된 세포를 분리시키는 것이다. 이를 원심분리에 의해 수행할 수 있으며, 상기 원심분리는 세포를 강제로 상등액으로 덮인 펠릿으로 만든다. 이어서 상기 상등액을 버리고 상기 펠릿을 생리학적으로 적합한 유체에 현탁시킨다. 더욱이, 상기 현탁된 세포는 전형적으로는 적혈구를 포함하며, 대부분의 프로토콜에서 이를 용해시키는 것이 바람직하다. 적혈구를 선택적으로 용해시키는 방법은 당해 분야에 공지되어 있으며, 임의의 적합한 프로토콜(예를 들어 고장성 또는 저장성 배지에서의 배양, 염화 암모늄을

사용하는 용해에 의해서 등)을 사용할 수 있다. 물론, 상기 적혈구가 용해되면, 남은 세포를, 예를 들어 여과, 침강, 또는 밀도 분별에 의해 상기 용해물로부터 분리시켜야 한다.

- [0112] 상기 적혈구의 용해 여부와 상관 없이, 현탁된 세포를 세척하고, 재원심분리시키고, 1 회 이상의 연속적인 회수로 재현탁시켜 보다 큰 순도를 성취할 수 있다. 한편으로, 상기 세포를 세포 표면 마커 프로파일에 근거하여 또는 세포 크기 및 입도에 근거하여 분리시킬 수 있다.
- [0113] 최종 단리 및 재-현탁에 이어서, 상기 세포를 배양하고 경우에 따라 수 및 생육성을 분석하여 수율을 평가할 수 있다. 바람직하게는, 상기 세포를 적합한 세포 밀도 및 배양 조건에서 적합한 세포 배양 배지를 사용하여 분화 없이 고체 표면에 배양할 것이다. 따라서, 특정한 실시태양에서, 세포를, 대개는 플라스틱 물질로 제조된 고체 표면, 예를 들어 페트리 디쉬 또는 세포 배양 플라스크 상에서 적합한 세포 배양 배지[예를 들어 전형적으로 5 내지 15%(예를 들어 10%)의 적합한 혈청, 예를 들어 소 태아 혈청 또는 인간 혈청이 보충된 DMEM]의 존재 하에서 분화 없이 배양하고, 세포가 상기 고체 표면에 부착되고 증식되는 조건 하에서 배양한다. 배양 후에, 세포를 부착되지 않은 세포 및 세포 단편을 제거하기 위해서 세척한다. 상기 세포를 동일한 배지 중에서 동일한 조건 하에, 필요에 따라 상기 세포 배양 배지를 교체하면서, 적합한 용합물, 전형적으로는 약 70%, 약 80%, 또는 약 90% 세포 용합물에 도달할 때까지 배양물 중에서 유지시킨다. 목적하는 세포 용합물에 도달한 후에, 상기 세포를 탈착제, 예를 들어 트립신을 사용하여 연속적인 계대배양에 의해서 및 적합한 세포 밀도(대개는 2,000 내지 10,000 세포/cm<sup>2</sup>)로 새로운 세포 배양 표면 상에 시딩함으로써 확대시킬 수 있다. 이어서, 세포를, 여전히 그의 발생 중인 표현형을 유지시키면서 분화 없이 상기와 같은 배지에서 2 회 이상 계대배양하고, 보다 바람직하게는 상기 세포를 발생 중인 표현형의 상실 없이 10 회 이상(예를 들어 15 회 이상 또는 심지어 20 회 이상) 계대배양할 수 있다.
- [0114] 전형적으로, 상기 세포를 목적하는 밀도, 예를 들어 약 100 세포/cm 내지 약 100,000 세포/cm(예를 들어 약 500 세포/cm 내지 약 50,000 세포/cm, 또는 보다 특히 약 1,000 세포/cm<sup>2</sup> 내지 약 20,000 세포/cm<sup>2</sup>)로 도달한다. 보다 낮은 밀도(예를 들어 약 300 세포/cm<sup>2</sup>)로 도달하는 경우, 상기 세포를 보다 쉽게 클론에 의해 단리할 수 있다. 예를 들어 수일 후에, 상기와 같은 밀도로 도달된 세포는 동종 집단으로 증식할 것이다. 특정한 실시태양에서, 상기 세포 밀도는 2,000 내지 10,000 세포/cm<sup>2</sup>이다.
- [0115] 2 회 이상의 계대배양을 포함한 상기와 같은 처리 후에 상기 고체 표면에 부착된 채로 있는 세포를 선택하고 하기에 언급되는 바와 같이 ASC의 존재를 확인하기 위해서 통상적인 방법에 의해 관심 표현형을 분석한다. 첫 번째 계대배양 후에 고체 표면에 부착된 채로 있는 세포는 이중 기원의 것이며; 따라서 상기 세포에 적어도 또 다른 계대배양을 가해야 한다. 상기 방법의 결과로서, 상기 관심 표현형을 갖는 동종 세포 집단이 수득된다. 2 회 이상의 계대배양 후에 고체 표면에 대한 세포의 부착은 상기 ASC를 선택하기 위한 본 발명의 바람직한 실시태양을 구성한다. 상기 관심 표현형의 확인을 통상적인 수단을 사용함으로써 수행할 수 있다.
- [0116] 바람직하게는 상기 확대를 1 회 이상, 2 회 이상, 3 회 이상, 4 회 이상, 5 회 이상, 10 회 이상, 15 회 이상, 또는 20 회 이상 상기 집단을 중복 또는 3회 중복함으로써 수행한다. 추가의 실시태양에서 상기 확대를 1 회 이상, 2 회 이상, 3 회 이상, 4 회 이상, 5 회 이상, 10 회 이상, 15 회 이상, 또는 20 회 이상의 계대배양 동안 수행한다.
- [0117] 세포-표면 마커를, 대개는 양성/음성 선택에 근거한 임의의 적합한 통상적인 기법에 의해 확인할 수 있다; 예를 들어 세포 중의 존재/부재를 확인하고자 하는 세포-표면 마커에 대한 단클론 항체를 사용할 수 있지만; 다른 기법들도 또한 사용할 수 있다. 따라서, 특정한 실시태양에서, CD1 Ib, CD1 Ic, CD14, CD45, HLAI, CD31, CD34 및 CD133 중 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 바람직하게는 전부에 대한 단클론 항체를 상기 선택된 세포 중의 상기 마커의 존재를 확인하기 위해서 사용하며; CD9, CD44, CD54, CD90 및 CD 105 중의 1, 2, 3, 4 또는 바람직하게는 전부에 대한 단클론 항체를 상기 마커 중 하나 이상 및 바람직하게는 전부의 존재 또는 검출 가능한 발현 수준을 확인하기 위해서 사용한다. 상기 단클론 항체는 공지되어 있고, 상업적으로 입수할 수 있거나, 또는 통상적인 방법에 의해 당해 분야의 숙련가에 의해 수득될 수 있다.
- [0118] 상기 선택된 세포에서의 IFN- $\gamma$ -유도성 IDO 활성을 임의의 적합한 통상적인 분석에 의해 측정할 수 있다. 예를 들어, 상기 선택된 세포를 IFN- $\gamma$ 로 자극하고 IDO 발현에 대해 분석할 수 있으며; 이어서 IDO 단백질 발현에 대한 통상적인 웨스턴-블롯 분석을 수행할 수 있고 상기 선택된 세포의 IFN- $\gamma$  자극에 따른 IDO 효소 활성을, 예를 들어 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC) 분석 및 관독으로서 상등액 중의 키누레닌 농도의 광도측정을 통해 트립토판에서 키누레닌으로의 전환에 의해 측정할 수 있다. 상기 ASC가 일정 조건 하에서 IDO를 발현하기 때문에, IFN- $\gamma$  자극에 따른 IDO 활성의 검출을 허용하는 임의의 적합한 기법을 상기 ASC의 선택에 사용할 수 있다.

상기 생성되는 IDO의 양은 평방 센티미터당 세포의 수(이는 바람직하게는 5000 세포/cm<sup>2</sup> 이상의 수준이나, 상기 농도로 제한되지 않는다) 및 IFN- $\gamma$ 의 농도(이는 이상적으로는 3 ng/ml이나, 상기 농도로 제한되지 않는다)에 따라 변한다. 상기 개시된 조건 하에서 생성되는 IDO의 활성은 24 시간 이상 후에 마이크로 M 범위의 키누레닌의 검출 가능한 생산을 생성시킬 것이다.

[0119] 2 개 이상의 세포 계통으로 분화하는 상기 선택된 세포의 능력을 당해 분야에 공지된 바와 같은 통상적인 방법에 의해 분석할 수 있다.

[0120] ASC를 경우에 따라 세포 집단의 적합한 클로닝 방법을 사용하여 클론에 의해 확대시킬 수 있다. 예를 들어, 세포의 증식된 집단을 물리적으로 골라내어 별도의 표면(또는 다중 웰 플레이트의 웰)에 시딩할 수 있다. 한편으로, 상기 세포를 다중 웰 플레이트 상에, 각 웰 내로의 단일 세포의 배치를 용이하게 하기 위해서 통계학적인 비(예를 들어 약 0.1 내지 약 1 세포/웰 또는 심지어 약 0.25 내지 약 0.5 세포/웰, 예를 들어 0.5 세포/웰)로 서브클로닝할 수 있다. 물론, 상기 세포를 저 밀도로 도말하고(예를 들어 페트리 디쉬 또는 다른 적합한 기질 중에) 이를 클로닝 고리와 같은 장치를 사용하여 다른 세포들로부터 단리함으로써 클로닝할 수 있다. 클론 집단의 생산을 임의의 적합한 배양 배지에서 확대시킬 수 있다. 어쨌든, 상기 단리된 세포를 그의 발생중인 표현형을 평가할 수 있는 적합한 시점으로 배양할 수 있다.

[0121] 분화의 유도 없이 상기 ASC의 생체 외 확대를, 예를 들어 특별하게 선별된 로트의 적합한 혈청(예를 들어 소 태아 혈청 또는 인간 혈청)을 사용함으로써 연장된 기간 동안 수행할 수 있다. 생육성 및 수율의 측정 방법은 당해 분야에 공지되어 있다(예를 들어 트립판 블루 배제).

[0122] 본 발명의 세포 집단의 세포의 단리를 위한 임의의 단계 및 과정들을 경우에 따라 수동으로 수행할 수 있다. 한편으로, 상기와 같은 세포의 단리 공정을 하나 이상의 적합한 장치(이의 예는 당해 분야에 공지되어 있다)를 통해 촉진하고/하거나 자동화할 수 있다.

[0123] MSC 세포 배양물

[0124] 상기 MSC는 또한 생체 외에서 확대될 수 있다. 즉, 단리 후에, 상기 MSC는 세포 배양 배지 중에서 생체 외에서 유지되고 증식될 수 있다. 상기와 같은 배지는 예를 들어 항생제(예를 들어 100 단위/ml의 페니실린 및 100  $\mu$ g/ml의 스트렙토마이신)와 함께 또는 항생제 없이 둘베코의 변형된 이글 배지(DMEM), 및 2 mM 글루타민으로 구성되며, 2 내지 20%의 소 태아 혈청(FBS)이 보충된다. 사용되는 세포에 대해 필요에 따라 배지 및/또는 배지 보충물의 농도를 변형 또는 조절하는 것은 당해 분야의 기술 내에 있다. 혈청은 종종 생육성 및 확대에 필요한 세포 및 비-세포 인자 및 성분들을 함유한다. 혈청의 예는 소 태아 혈청(FBS), 소 혈청(BS), 송아지 혈청(CS), 송아지 태아 혈청(FCS), 갓난 송아지 혈청(NCS), 염소 혈청(GS), 말 혈청(HS), 돼지 혈청, 양 혈청, 토끼 혈청, 래트 혈청(RS) 등을 포함한다. 상기 MSC가 인간 기원의 것인 경우, 상기 세포 배양 배지에 인간 혈청, 바람직하게는 동종 기원의 것을 보충하는 것이 또한 본 발명의 범위 내에 있다. 혈청을, 보체 캐스케이드의 성분들을 불활성화시키는 것이 필요한 것으로 생각되는 경우, 55 내지 65 °C에서 열-불활성화시킬 수 있는 것으로 생각된다. 혈청 농도의 조절 및/또는 상기 배양 배지로부터 혈청의 제거를 또한 사용하여 하나 이상의 목적하는 세포 유형의 생존을 촉진할 수 있다. 바람직하게는, 상기 MSC는 약 2% 내지 약 25%의 FBS 농도가 이로울 것이다. 또 다른 실시태양에서, 상기 MSC를 한정된 조성의 세포 배양 배지에서 확대시킬 수 있으며, 여기에서 상기 혈청을 혈청 알부민, 혈청 트랜스페린, 셀레늄 및 재조합 단백질, 예를 들어 비제한적으로 인슐린, 혈소판-유래된 성장 인자(PDGF), 및 당해 분야에 공지된 바와 같은 염기성 섬유아세포 성장 인자(bFGF)의 조합에 의해 대체한다.

[0125] 다수의 세포 배양 배지는 이미 아미노산을 함유하지만, 일부는 세포의 배양 전에 보충을 요한다. 상기와 같은 아미노산은 비제한적으로 L-알라닌, L-아르기닌, L-아스파르트산, L-아스파라진, L 시스테인, L-시스틴, L-글루탐산, L-글리신 등을 포함한다.

[0126] 항균제를 또한 세포 배양물에 전형적으로 사용하여 세균, 마이코플라스마, 및 진균 오염을 완화시킨다. 전형적으로, 사용된 항생제 또는 항진균 화합물은 페니실린/스트렙토마이신의 혼합물이나, 또한 비제한적으로 암포테리신(펀지존(Fungizone)(R)), 암피실린, 젠타미신, 블레오마이신, 하이그로마이신, 가나마이신, 미토마이신 등을 포함할 수 있다.

[0127] 호르몬이 또한 세포 배양물에 유리하게 사용될 수 있으며 비제한적으로 D-알도스테론, 다이에틸stil베스트롤(DES), 텍사메타손, b-에스트라디올, 하이드로코르티손, 인슐린, 프로락틴, 프로제스테론, 소마토스타틴/인간 성장 호르몬(HGH) 등을 포함한다.

- [0128] 확대된 세포
- [0129] 하나의 실시태양에서, 상기 MSC, 조절성 T-세포 및/또는 섬유아세포를 본 발명의 방법에 사용하기 전에 확대시킬 수도 있다. 세포 확대 방법은 상기에 나타난 바와 같이 당해 분야에 공지되어 있다.
- [0130] 유전자 조작된 세포
- [0131] 또 다른 실시태양에서, 상기 MSC, 조절성 T-세포 및/또는 섬유아세포는 유전자 조작된 세포(예를 들어 외부 핵산에 의해 형질도입된 또는 형질감염된)이거나, 또는 이로부터 유래할 수 있다.
- [0132] 예를 들어 상기 세포를, 예를 들어 인돌아민 2,3-다이옥시게나제(IDO)를 암호화하는 적합한 핵산 구조물 및 임의로 적합한 프로모터 서열로 형질감염시킴으로써 상기 효소를 구성적으로 발현하도록 유전자 조작할 수도 있다. 세포의 유전자 조작은 당해 분야에 공지되어 있으며 이를 당해 분야의 숙련가에 의해 수행할 수도 있다.
- [0133] 조사된 세포
- [0134] 더욱 또 다른 실시태양에서, 상기 MSC, 조절성 T-세포 및/또는 섬유아세포를 본 발명의 방법에 사용하기 전에 조사할 수도 있다. 세포의 조사는 그의 증식 능력 및 생존 시간을 감소시킨다.
- [0135] 상기 조사를 적합한 조절된 이온화 조사원, 예를 들어 감마 방사선 조사 장치를 사용하여 수행할 수 있다. 상기 조사 조건들을, 상기 MSC, 조절성 T-세포 및/또는 섬유아세포의 장기간 성장 정지를 유발하는 조사 용량을 부여하는데 필요한 노출 시간을 결정하기 위해서 당해 분야의 숙련가에 의해 실험적으로 조절해야 한다. 하나의 실시태양에서 상기 조사 용량은 1 내지 100 Gy; 5 내지 58 Gy, 10 내지 70 Gy, 12 내지 60 Gy로 이루어지는 그룹 중에서 선택된 범위 내에 있으나; 상기 조사 용량은 15 내지 45 Gy, 전형적으로 20 내지 30 Gy 또는 22 내지 28 Gy의 범위 이내인 것이 특히 바람직하다.
- [0136] CD26 길항물질 처리된 세포
- [0137] 더욱 또 다른 실시태양에서, 상기 MSC, 조절성 T-세포 및/또는 섬유아세포를 본 발명의 방법에 사용하기 전에 CD26 길항물질 또는 억제제로 처리할 수도 있다. CD26 길항물질 및 억제제는 당해 분야에 공지되어 있으며 비제한적으로 아미노메틸피리딘; P32/98; NVP DPP728; PSN9301; 아이소류신 티아졸리딘; 데나글립틴; 시타글립틴; 빌다글립틴; 삭사글립틴; 알로글립틴; 디프로틴 A를 포함하며, 상기와 같은 처리는 당해 분야의 숙련가에 의해 수행될 수 있다.
- [0138] IFN-감마 자극된 세포
- [0139] 또 다른 실시태양에서 상기 MSC, 조절성 T-세포 및/또는 섬유아세포를 본 발명의 방법에 사용하기 전에 인터페론 감마로 자극할 수도 있다. 자극을 위한 MSC의 IFN-감마 처리는 당해 분야에 공지되어 있으며(문헌[Krampera et al, Stem Cells. 2006 Feb;24(2):386-98]) 당해 분야의 숙련가에 의해 수행될 수 있다.
- [0140] 항원 자극된 세포
- [0141] 더욱 또 다른 실시태양에서 상기 MSC, 조절성 T-세포 및/또는 섬유아세포를 본 발명의 방법에 사용하기 전에 항원으로 자극할 수도 있다. 자극을 위한 MSC의 항원 처리는 당해 분야에 공지되어 있으며 당해 분야의 숙련가에 의해 수행될 수 있다.
- [0142] 미토마이신 C 처리된 MSC
- [0143] 더욱 또 다른 실시태양에서 상기 MSC, 조절성 T-세포 및/또는 섬유아세포를 본 발명의 방법에 사용하기 전에 미토마이신 C로 처리할 수도 있다. MSC의 미토마이신 C 처리는 당해 분야에 공지되어 있으며 당해 분야의 숙련가에 의해 수행될 수 있다.
- [0144] 더욱 또한, 경우에 따라, 상기 MSC, 조절성 T-세포 및/또는 섬유아세포를 본 발명의 방법에 사용하기 전에 상기 세포에 조사, IFN-감마 자극 및 미토마이신 C 처리로 이루어진 그룹 중에서 선택된 처리들 중 2 또는 3 개의 조합을 가할 수 있다.
- [0145] 상기 MSC의 유지 조건은 또한 세포를 분화되지 않은 형태로 남아있도록 하는 세포 인자를 함유할 수 있다. 분화 전에 세포 분화를 억제하는 보충물을 배양 배지로부터 제거해야 함은 당해 분야의 숙련가들에게 자명하다. 모든 세포가 이러한 인자가 필요하지는 않을 것임이 또한 자명하다. 실제로, 이들 인자는 세포 유형에 따라, 불필요한 효과를 유도할 수도 있다.



- [0146] 항원과과의 병용
- [0147] 또 다른 태양에서, 본 발명은 치료가 필요한 환자에서 손상된 조직(바람직하게는 간엽성 조직)의 치료 또는 보수 및/또는 염증 및/또는 면역 질환과 관련된 하나 이상의 증상의 치료, 조절, 예방 및/또는 개선을 위한 방법을 제공하며, 상기 방법은 상기 환자의 림프계에 예방학적으로 또는 치료학적으로 유효한 양의 세포 요법(가장 바람직하게는 MSC, 조절성 T-세포 및/또는 섬유아세포 포함)을 포함하는 조성물을 투여하고 상기 환자의 림프계에 항원을 직접 투여함을 또한 포함한다. 상기 항원을 상기 세포 요법의 투여 전에, 투여와 동시에, 또는 투여에 이어서 투여할 수도 있다. 상기 항원을 상기 세포요법 투여의 적어도 1, 2, 3, 5 또는 10 시간 전 또는 후에 투여할 수 있다. 필요한 항원의 용량은 숙련가에 의해 쉽게 결정될 수 있다. 전형적으로, 상기 항원을 1  $\mu$ g 내지 500 mg, 전형적으로 50  $\mu$ g 내지 250 mg, 100  $\mu$ g 내지 100 mg, 또는 1 mg 내지 50 mg의 용량으로 투여한다. 항원 100  $\mu$ g 내지 100 mg의 용량을 전형적으로는 상기 상세히 나타낸 바와 같은 세포 용량, 전형적으로 100,000 내지 1,000,000 세포, 250,000 내지 1,000,000 세포, 500,000 내지 1,000,000 세포, 100,000 내지 500,000 세포, 250,000 내지 500,000 세포, 또는 100,000 내지 250,000 세포와 병용한다. 또 다른 실시태양에서, 항원 100  $\mu$ g 내지 100 mg의 용량을 100,000 미만 세포 또는 500만 초과 세포를 포함하는 세포 용량과 병용한다.
- [0148] 상기 방법에 사용되는 항원은 선택된 항원, 항원들의 그룹 또는 상기 항원 또는 항원들을 발현하고/하거나 제공하는 세포 유형일 수 있다. 하나의 실시태양에서, 상기 항원을 자가면역을 앓고 있는 환자로부터 유래한 자가 항원, 펩타이드 항원, 핵산, 변경된 펩타이드 리간드, 재조합 단백질 또는 그의 단편의 혼합물을 포함하는 그룹으로부터 선택한다. 하나의 태양에서 상기 항원은 관절염과 관련된다(예를 들어 비제한적으로 콜라겐 항원, 예를 들어 인간 유형 1 및/또는 유형 2 콜라겐). 또 다른 실시태양에서 상기 항원은 셀리악 병과 관련된다. 셀리악 병과 관련된 항원은 일부 형태의 프롤아민을 포함하는 글루텐 계열의 구성원(예를 들어 비제한적으로 글리아딘, 호르데인 및/또는 세칼린의 항원)이다. 추가의 실시태양에서 상기 항원은 다발성 경화증과 관련된다(예를 들어 비제한적으로 마이엘린 항원). 상기와 같은 항원의 단리, 정제 및 제조 방법은 당해 분야의 숙련가에 공지되어 있다.
- [0149] 투여
- [0150] 본 발명의 모든 태양의 세포 요법을 림프 기관, 가장 바람직하게는 말초 림프 기관, 예를 들어 비제한적으로 림프절, 가장 바람직하게는 액와 또는 서혜부 림프절, 전형적으로는 표면 서혜부 림프절 또는 심부 서혜부 림프절에 직접 투여하는 것이 특히 바람직하다. 림프절이 없거나 또는 결함이 있는 개인에서 상기 세포 요법은 림프 조직 또는 면역 세포에 전달될 수도 있다.
- [0151] 림프내 투여 방법은 당해 분야에 공지되어 있으며 통상적으로는 주사 장치(예를 들어 주사기)에 의해 수행된다. 상기 투여는 영상 장치, 예를 들어 비제한적으로 방사선, 초음파 및 컴퓨터 단층 촬영(CAT 스캔)에 의해 지원되거나 관찰될 수 있다. 이는 상기 세포 요법의 정확한 투여 및 또한 부작용에 대한 상기 림프 기관의 모니터링을 허용한다.
- [0152] 용도, 약제 및 조성물
- [0153] 더욱 또 다른 태양에서, 본 발명은 림프계에 투여하기 위한 줄기 세포, 조절성 T-세포 및/또는 섬유아세포를 제공한다
- [0154] 또 다른 태양에서 본 발명은 줄기 세포, 조절성 T-세포 및/또는 섬유아세포를 림프계에 투여함으로써, 손상된 조직(바람직하게는 간엽성 조직)의 치료 또는 보수 및/또는 염증 및/또는 면역 질환과 관련된 하나 이상의 증상의 치료, 조절, 예방 및/또는 개선을 위한 약제로서 상기 줄기 세포, 조절성 T-세포 및/또는 섬유아세포의 용도를 제공한다.
- [0155] 또 다른 태양에서 본 발명은 줄기 세포, 조절성 T-세포 및/또는 섬유아세포를 림프계에 투여함으로써, 손상된 조직(바람직하게는 간엽성 조직)의 치료 또는 보수 및/또는 염증 및/또는 면역 질환과 관련된 하나 이상의 증상의 치료, 조절, 예방 및/또는 개선을 위한 약제의 제조에서의 상기 줄기 세포, 조절성 T-세포 및/또는 섬유아세포의 용도를 제공한다.
- [0156] 추가의 태양에서 본 발명은 줄기 세포, 조절성 T-세포 및/또는 섬유아세포를 포함하는, 림프계에 투여하기 위한 약학 조성물을 제공한다. 상기 약학 조성물은 손상된 조직, 또는 염증 및/또는 면역 질환, 예를 들어 비제한적으로 자가면역 질병, 염증 질환 및 이식된 기관 및 조직의 거부를 포함한 면역학적으로 매개된 질병과 관련된

하나 이상의 증상의 치료, 보수, 예방 및/또는 개선에 유용하다. 전형적으로, 약학 조성물은 1 회 용량에 필요한 세포의 수를 포함할 것이며; 용량당 적합한 세포수는 상기에 상세히 개시되어 있다. 예를 들어 약 100 내지 약 1억 세포; 약 1000 내지 약 1000만 세포; 약 10,000 내지 약 100만 세포; 약 100 내지 약 1000 세포; 약 1000 내지 약 10,000 세포; 약 10,000 내지 100,000 세포; 약 100,000 내지 100만 세포; 약 100만 내지 약 1000만 세포; 약 1000만 내지 1억 세포이다. 전형적으로 상기 조성물은 500,000 세포 내지 5000만 세포, 보다 전형적으로 500,000 세포 내지 1000만 세포, 더욱 더 전형적으로 100만 내지 10000만 세포, 예를 들어 100만 내지 500만 세포, 500만 초과 세포, 또는 500만 이하 세포를 함유할 것이다. 따라서, 본 발명에 따라 유용한 조성물은 200만 이상 세포, 300만 이상 세포, 400만 이상 세포, 500만 이상 세포, 600만 이상 세포, 700만 이상 세포, 800만 이상 세포, 900만 이상 세포, 또는 1000만 이상 세포를 포함한다.

[0157] 본 발명의 하나의 실시태양에서 상기 약학 조성물은 항원, 항원들의 그룹 또는 상기 항원 또는 항원들을 발현하고/하거나 제공하는 세포 유형을 추가로 포함할 수 있다. 상기 항원은 전형적으로는 상기 조성물 중에 1  $\mu$ g 내지 500 mg, 전형적으로 50  $\mu$ g 내지 250 mg, 100  $\mu$ g 내지 1000 mg, 또는 1 mg 내지 50 mg으로 존재한다. 하나의 실시태양에서, 상기 항원은 자가면역을 앓고 있는 환자로부터 유래한 자가항원, 펩타이드 항원, 핵산, 변형된 펩타이드 리간드, 재조합 단백질 또는 그의 단편의 혼합물을 포함하는 그룹으로부터 선택된다. 하나의 실시태양에서 상기 항원은 관절염과 관련된다(예를 들어 비제한적으로 콜라겐 항원, 전형적으로 인간 유형 1(유형 1 알파 1 및/또는 유형 1 알파 2) 콜라겐 및/또는 인간 유형 2 콜라겐). 또 다른 실시태양에서 상기 항원은 셀리악 병과 관련된다. 셀리악 병과 관련된 항원은 일부 형태의 프로아민을 포함하는 글루텐 계열의 구성원(예를 들어 비제한적으로 글리아딘, 호르데인 및/또는 세칼린의 항원)이다. 글루텐 및 그의 성분, 글루타닌 및 글리아딘이 셀리악 병과 관련된 바람직한 항원이다. 추가의 실시태양에서 상기 항원은 다발성 경화증과 관련된다(예를 들어 비제한적으로 마이엘린 항원 및 마이엘린 성분 항원, 예를 들어 마이엘린 염기성 단백질(MBP), 마이엘린 올리고덴드로사이트 당단백질(MOG), 단백질질 단백질(PLP) 및 마이엘린 당지질, 예를 들어 갈락토세레브로사이드). 상기와 같은 항원의 단리, 정제 및 제조 방법은 당해 분야의 숙련가에게 공지되어 있다.

[0158] 본 발명의 약학 조성물은 예방학적으로 또는 치료학적으로 유효한 양의 줄기 세포, 조절성 T-세포 및/또는 섬유아세포, 임의로 항원, 및 약학 담체를 포함한다. 이러한 세포 유형들 각각에 대한 투여량 및 투여 섭생의 예는 상기에 제공된다. 적합한 약학 담체는 당해 분야에 공지되어 있으며 바람직하게는 미국 연방 또는 주 정부의 규제 당국에 의해 승인된 것들 또는 미국 약전 또는 유럽 약전, 또는 다른 일반적으로 인정된 약전들에 동물, 및 보다 특히 인간에서의 사용에 대해 나열된 것들이다. "담체"란 용어는 치료제와 함께 투여되는 희석제, 보조제, 부형제 또는 비히클을 지칭한다. 적합한 담체의 예는 링거 락테이트 용액이다. 상기 조성물은 경우에 따라 소량의 pH 완충제를 또한 함유할 수 있다. 상기 담체는 저장 매질, 예를 들어 바이오라이프 솔루션즈 인코포레이티드(BioLife Solutions Inc.)(미국 소재)로부터 상업적으로 입수할 수 있는 하이포서모솔(Hypothermosol)(등록상표)을 포함할 수 있다. 적합한 약학 담체의 예는 문헌[E W Martin, "Remington's Pharmaceutical Sciences"]에 개시되어 있다. 상기와 같은 조성물은 환자에게 적합한 투여를 위한 형태를 제공하기 위해서 적합한 양의 담체와 함께, 바람직하게는 정제된 형태의, 예방학적 또는 치료학적 유효량의 예방제 또는 치료제를 함유할 것이다. 상기 제형은 투여 방식에 적합해야 한다. 바람직한 실시태양에서, 상기 약학 조성물은 멸균성이며 환자, 바람직하게는 동물 환자, 보다 바람직하게는 포유동물 환자, 및 가장 바람직하게는 인간 환자에게 투여하기에 적합한 형태이다.

[0159] 본 발명의 약학 조성물은 다양한 형태로 존재할 수 있다. 여기에는 예를 들어 반-고체, 및 액체 투여형, 예를 들어 동결건조된 제제, 액체 용액 또는 현탁액, 주사성 및 주입성 요액 등이 포함된다. 상기에 나타낸 바와 같이, 상기 약학 조성물은 바람직하게는 주사성이다.

[0160] 본 발명의 방법, 약제, 조성물 및 세포를 손상된 조직(바람직하게는 간엽성 조직)의 치료 또는 보수 및/또는 염증 및/또는 면역 질환과 관련된 하나 이상의 증상의 치료, 조절, 예방 및/또는 개선을 위해 사용한다. 따라서, 본 발명의 방법 및 세포는 상기 증상들 중 어느 하나 또는 전부를 특징으로 하는 임의의 질환의 치료에 유용하다. 상기와 같은 질환의 전형적인 망라되지 않은 목록을 상기 정의 섹션에 제공한다. 셀리악 병, 류마티스성 관절염(RA), 염증성 장 질환(IBD, 크론병 및/또는 궤양성 대장염 포함), 및 다발성 경화증(MS)의 치료에 있어서 본 발명의 방법, 약제, 조성물 및 세포의 용도가 특히 바람직하다. 류마티스성 관절염의 치료에 있어서 본 발명의 방법, 약제, 조성물 및 세포의 용도가 훨씬 더 특히 바람직하다.

[0161] 본 발명의 방법 또는 조성물이 하나 이상의 항원을 포함하는 경우에, 상기 방법 또는 조성물을 상기 항원과 관련되거나 또는 상기 항원에 의해 유발되는 질환의 치료에 사용하는 것이 바람직하다, 예를 들어 상기 항원이 콜라겐(전형적으로 인간 유형 1 알파 1, 인간 유형 1 알파 2 및/또는 인간 유형 2 콜라겐)인 경우, 상기 방법 또



는 조성물을 관절염의 치료에 사용할 수 있으며, 상기 항원이 글루텐 성분인 경우, 상기 방법 또는 조성물을 셀리악 병의 치료에 사용할 수 있고, 상기 항원이 마이엘린 성분인 경우 상기 방법 또는 조성물을 다발성 경화증의 치료에 사용할 수 있다. 따라서 바람직한 조성물은 관절염 치료의 경우 MSC, 바람직하게는 ASC, 및 콜라겐을; 셀리악 병의 치료의 경우 MSC, 바람직하게는 ASC, 및 글루텐 및/또는 글루텐 성분을; 다발성 경화증 치료의 경우에 MSC, 바람직하게는 ASC, 및 마이엘린 및/또는 마이엘린 성분을 포함한다.

[0162] 추가의 태양에서 본 발명은 i) 줄기 세포, 조절성 T-세포 및/또는 섬유아세포 집단을 포함하는 약제 및 ii) 본 발명의 방법에 따른 상기 약제의 사용 설명서를 포함하는 키트를 제공한다. 상기 줄기 세포, 조절성 T-세포 및/또는 섬유아세포 집단은 하나 이상, 및 전형적으로 2 회 이상의 용량(상술한 바와 같다)의 세포를 포함한다.

[0163] 추가의 실시태양에서 상기 키트는 iii) 하나 이상의 항원을 추가로 포함할 수도 있다. 전형적으로, 상기 키트 중의 항원은 하나 이상의 용량, 전형적으로는 2 회 이상의 용량을 포함하며, 여기에서 각각의 용량 범위는 1  $\mu$ g 내지 500 mg, 전형적으로 50  $\mu$ g 내지 250 mg, 100  $\mu$ g 내지 1000 mg, 또는 1 mg 내지 50 mg의 항원이다.

[0164] 본 발명의 상기 특징 및 이점들을 하기의 비제한적인 실시예들에 의해 보다 충분히 예시하며, 실시예에서 모든 부 및 백분율은 달리 명백히 나타내지 않는 한 중량 기준이다.

[0165] 실시예 1: 콜라겐-유발된 관절염(CIA)의 ASC에 의한 치료

[0166] 물질 및 방법

[0167] 콜라겐 유발된 관절염(CIA) 마우스 모델

[0168] 실험 관절염을 DBA1(H-2<sup>d</sup>) 수컷 마우스(6 내지 8 주령)에서 유발시켰다. 연구 개시일에, 각각의 마우스에게 0.1 ml/동물의 부피로 제 1 용량의 완전 프로인트 항원보강제(마이코박테리움 튜베르쿨로시스 1 mg/ml 최종 농도) 중의 치킨 유형 II 콜라겐(CII)(1 mg/ml 최종 농도)의 유화액을 꼬리(몸으로부터 2 내지 3 cm)에서 피하 주사하였다. 상기 콜라겐의 제 1 주사 후 21일째에, CII(0.1 ml/동물)의 제 2 주사(촉진제)를 각 동물에게, 다시 꼬리에 피하로, 상기 제 1 주사와 상이한 위치에서 투여하였다. 이 경우에 불완전 프로인트 항원보강제(IFA)를 사용하여 콜라겐 현탁액을 제조하였다.

[0169] 관절염 점수 지수가 대략 2 내지 4인 경우, 상기 동물을 확대된 지방 유래된 줄기세포 또는 대조용으로서 비히클(링거액)로 처리하였다. 사전 확립된 득점 시스템에 따라, 상기 및 하지 관절의 염증-적열-관절유착을 측정함으로써 CIA의 진전을 매일(월요일에서부터 금요일까지) 추적하였다.

[0170] 각 동물의 양쪽 뒷발의 부피를 상기 시험 품목 또는 비히클 투여 후 매일 측정하고 상기 두 발의 평균을 계산하였다. 더욱또한 각 동물에 대해 제1일에 측정된 뒷발 부피(제 1 콜라겐 주사 전 및 기본 부피로서 간주됨)를 이후 매일 측정된 뒷발 부피로부터 제하여 각 동물에 대한 발 부피(또는 부종)의 순 증가를 획득하였다. 추가로, 상기 관절염의 중증도를 하기의 관절염 지수 득점 시스템에 따라 앞발 및 뒷발 모두에 있어서 동일한 빈도 및 타이밍으로 채점하였다:

[0171] 0: 관절염 징후 없음

[0172] 1: 발 또는 한 손가락의 팽창 및/또는 붉어짐

[0173] 2: 염증이 발생한(팽창 및/또는 붉어짐) 관절 2 그룹

[0174] 3: 염증이 발생한(팽창 및/또는 붉어짐) 관절 2 그룹 초과

[0175] 4: 전체 발의 염증. 중증 관절염

[0176] 최종 점수는 네 발에 대한 점수들의 합이다. 최대 점수는 16이다.

[0177] 실험 설계

[0178] 대조군

[0179] 그룹 A = 처리 없음

[0180] 정맥 내 투여

[0181] 그룹 C = 용량당 100만 세포의 정맥 내 주사, 연속일당 1 회 용량. 총 5 회 용량.

[0182] 그룹 D = 최초 용량 300만 세포 및 제 2 및 제 3 용량으로 100만 세포의 정맥 내 주사, 하루 걸러 1 회 용량.

총 3 회 용량.

[0183] 림프내 투여

[0184] 그룹 E = 용량당 320,000 세포의 림프내 주사(160,000 우측 서혜부 결절, 160,000 좌측 결절). 총 2 회 용량, 최초 용량 후 7일째에 두 번째 용량.

[0185] 비히클 대조군

[0186] 그룹 F = 링거액의 림프내 주사. 총 2 회 용량, 최초 용량 후 7일째에 두 번째 용량.

[0187] N = 12 마우스/그룹.

[0188] 정맥 내 투여

[0189] 시험 품목을 멸균 나비 바늘(25G)을 사용하여 꼬리 정맥을 통해 정맥내로 투여하였다. 상기 동물에게 5 회의 연속적인 용량 또는 이를 걸러(하루에 1 회) 제공하였다. 동물들은 꼬리 정맥을 통해 정맥 내로 0.05 ml/분의 속도로 시험 품목 0.2 ml을 주입으로서 제공받았다.

[0190] 서혜부 림프절에서 림프내 투여

[0191] DBA1 마우스를 코 마스크를 통해 2.0 내지 2.5% 아이소플로란의 흡입에 의해 마취시키고 37 °C에서 따뜻한 플레이트 위에서 재웠다. 제모(비트(Veet) 민감성 제모 크림) 및 70% 에탄올에 의한 상기 서혜부 부위의 소독 후에, 상기 서혜부 부위에 6 내지 8 mm 절개를 수행하였다. 상기 서혜부 지방 내에 림프절이 집중되었으며 8  $\mu$ l의 비히클 또는 ASC(2000만 세포/ml의 밀도로)를 갖는 비히클을 30 게이지 바늘을 갖는 해밀턴(Hamilton) 주사기를 사용하여 주사하였다. 절개부를 하나 또는 2 개의 매듭으로 봉합하고 상기 시술을 다른쪽 서혜부 림프절에서 반복하였다. 마우스를 마취에서 회복시켰다. 7일 후에, 상기 시술을 반복하였다.

[0192] 확대된 지방 유래된 줄기 세포 제조

[0193] 인간 지방 조직을 국소 마취 및 일반적인 진정 하에 지방흡입술에 의해 획득하였다. 중공 블런트-단부 캐놀라를 작은 절개(직경 0.5 cm 미만)를 통해 피하 공간 내로 도입시켰다. 서서히 흡입하면서, 상기 캐놀라를, 지방 조직의 기계적 파괴를 위해 지방조직 복벽 구획을 통해 이동시켰다. 염수 용액 및 혈관수축제 에피네프린을 상기 지방조직 구획 내에 주사하여 혈액 손실을 최소화하였다. 이렇게 하여, 80 내지 100 ml의 생 지질흡인물을 치료하려는 각각의 환자로부터 획득하였다.

[0194] 상기 생 지질흡인물을 멸균 포스페이트 완충된 염수(PBS; 깁코(Gibco) BRL, 영국 스코틀랜드 페이슬리 소재)로 광범위하게 세척하여 혈액 세포, 염수 및 국소 마취제를 제거하였다. 상기 세포 외 기질을 37 °C에서 30 분 동안 균형 염 용액(5 mg/ml; 시그마, 미국 세인트 루이스 소재) 중의 유형 II 콜라게나제(0.075%; 깁코 BRL)의 용액으로 절단하여 세포 분획을 방출시켰다. 이어서 동 부피의 세포 배양 배지(10% 소 태아 혈청(FBS; 깁코 BRL)을 함유하는 돌베코의 변형된 이글 배지(DMEM; 깁코 BRL))의 첨가에 의해 상기 콜라게나제를 불활성화시켰다. 상기 세포의 현탁액을 250 x g에서 10 분간 원심분리시켰다. 세포를 0.16 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$  중에 재현탁하고 적혈구의 용해를 위해 실온(RT)에서 5 분간 정치시켰다. 상기 혼합물을 250 x g에서 원심분리시키고 세포를 DMEM + 10% FBS 및 1% 암피실린/스트렙토마이신 혼합물(깁코 BRL)에 재현탁하고 이어서 40  $\mu$ m 메쉬를 통해 여과하고 10 내지 30 x 10<sup>3</sup> 세포/ $\text{cm}^2$ 의 농도로 조직 배양 플라스크에 도달하였다.

[0195] 세포를 공기 중에서 5%  $\text{CO}_2$ 의 분위기 하에 37 °C에서 24 시간 동안 배양하였다. 이어서 상기 배양 플라스크를 PBS로 세척하여 부착되지 않은 세포 및 세포 단편을 제거하였다. 상기 세포를 동일한 배지 중에서 동일한 조건 하에 대략 80% 융합률에 도달할 때까지, 매 3 내지 4일마다 배양 배지를 교체하면서 배양물 중에서 유지시켰다. 이어서 세포를 트립신-EDTA(깁코 BRL)와 함께 1:3의 희석비(대략 5 내지 6 x 10<sup>3</sup> 세포/ $\text{cm}^2$ 의 세포 밀도에 상응함)로 계대배양시켰다.

[0196] 상기 실험을 위해서, 세포를 12 내지 16의 2배 배가로 트립신 처리하고 비히클(링거액) 중에 목적하는 세포 밀도로 재현탁하였다. 이어서 주사기로 옮기고 마우스에게 주사하였다.

[0197] 통계학적 분석

[0198] 상기 결과에 대한 통계학적 유의수준을 통계 프로그램 그래프패드 인스탯(GraphPad Instat) 3을 사용하여 평가하였다. 결과를 평균±평균의 표준오차로서 나타내며, 이때 (n)은 동물의 수이다.

- [0199] 도 1은 그룹 A 대 그룹 E의 비교의 p-값을 예시하는 주석이 달린다. 유의수준 차이는 \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001로서 나타난다. 그룹들 간 차이를 둔 형태의 시험 후 다중 비교와 함께 독립적인 데이터에 대한 크루스칼-왈리스 시험에 의해 평가하였다. P<0.05의 값을 유의수준으로서 간주하였다.
- [0200] 결과(도 1 및 2)
- [0201] 치킨 콜라겐 II의 주사에 의해 DBA1 마우스에서 관절염을 유발시켰다. 마우스가 2 내지 4의 관절염 점수를 나타내었을 때, 상기 마우스를 확대된 ASC로 정맥내 또는 림프내 경로에 의해 처리하였다. 상기 림프내 투여에 대한 대조군으로서, 마우스를 비히클로 처리하였다. 관절염 점수를 매일 모니터하였다(도 2 참조). 처리되지 않은 마우스 또는 비히클로 처리된 마우스는 시간 의존적인 방식으로 증가하는 높은 발 염증을 나타낸 반면, 림프내-전달된 확대된 ASC로 처리된 마우스는 현저하게 감소된 염증을 나타내었다. 더욱이, 림프내 투여의 치료 효과는 정맥내 투여보다 더 높았다(도 1 참조).
- [0202] 결론
- [0203] 본 연구는 DBA1 마우스에의 인간 ASC의 림프내 투여가 관절염의 중증도를 통계학적 유의수준으로 감소시킴을 보인다(관절염 지수 점수가 가리키는 바와 같이).
- [0204] 더욱이, 총 640,000 ASC의 림프내 투여(2 회 용량으로)의 치료 효과는 총 500만 세포의 정맥내 투여보다 현저하게 더 높았다. 이러한 결과는, 더 높은 치료 효과가 더 낮은 수의 세포에 의해 도달되므로, 상기 림프내 투여 경로가 보다 효능있음을 가리킨다.
- [0205] 실시예 2: 콜라겐-유발된 관절염(CIA) 마우스 모델에서 인간 ASC의 림프내 투여의 효능 연구
- [0206] 연구 목적은 림프내 경로를 통한 투여에 따른, 마우스 중 콜라겐에 의해 유발된 관절염의 모델에서 염증 반응을 억제하는 인간 확대된 ASC(eASC)의 능력을 조사하는 것이었다.
- [0207] 실험 그룹
- [0208] 동물들을 각각의 그룹에 n=14로 7 개의 실험 그룹으로 분할하였다.
- [0209] 그룹 A) 관절염 유발된(CIA) 마우스: 처리 없음
- [0210] 그룹 B) 림프내 투여(우측 및 좌측 서혜부 림프절 내: 제 1 일)를 통해, 배양되고 최근에 트립신 처리된( $16 \times 10^4$  세포/림프절/일) eASC로 처리된 CIA 유발된 마우스. 하이포씨모솔 중에서 제형화됨.
- [0211] 그룹 C) 림프내 투여(우측 및 좌측 서혜부 림프절 내: 제 1 및 8 일)를 통해, 배양되고 최근에 트립신 처리된( $16 \times 10^4$  세포/림프절/일) eASC로 처리된 CIA 유발된 마우스. 링거 락테이트 중에서 제형화됨.
- [0212] 그룹 D) 림프내 투여(우측 및 좌측 서혜부 림프절 내: 제 1, 8 및 15 일)를 통해, 배양되고 최근에 트립신 처리된( $16 \times 10^4$  세포/림프절/일) eASC로 처리된 CIA 유발된 마우스. 하이포씨모솔 중에서 제형화됨.
- [0213] 그룹 E) 림프내 투여(우측 및 좌측 서혜부 림프절 내: 제 1, 15 및 30 일)를 통해, 배양되고 최근에 트립신 처리된( $16 \times 10^4$  세포/림프절/일) eASC로 처리된 CIA 유발된 마우스. 하이포씨모솔 중에서 제형화됨.
- [0214] 그룹 F) 림프내 투여(우측 및 좌측 서혜부 림프절 내: 제 1, 15 및 30 일)를 통해 비히클(하이포씨모솔)로 처리된 CIA 유발된 마우스.
- [0215] 그룹 G) 처리 없이, 연구의 끝에서 죽인 대조용의 건강한 마우스(CIA 없음). 이 그룹을 건강한 대조군으로서 사용한다.
- [0216] 물질 및 방법
- [0217] 어리고, 건강한 수컷 DBA/1 (H-2<sup>q</sup>) 8 주된 마우스를 연구에 사용하였다. DBA/1 (H-2<sup>q</sup>) 계통의 마우스를, 상기 계통이 콜라겐에 의한 관절염 유발에 매우 민감하므로 선택하였다. 상기 마우스는 소, 돼지, 인간 및 치킨 유형 II 콜라겐에 대한 면역학적 반응을 탐제한다. 연구 개시일에, 각각의 마우스에게 0.1 ml/동물의 부피로 제 1 용량의 완전 프로인트 항원보강제(마이코박테리움 튜베르쿨로시스 1 mg/ml 최종 농도) 중의 치킨 유형 II 콜라겐(1 mg/ml 최종 농도)의 유화액을 꼬리(몸으로부터 2 내지 3 cm)에서 피하 주사하였다. 상기 콜라겐의 제 1 주사 후 21일째에, 유형 II 콜라겐(0.1 ml/동물)의 제 2 주사(촉진제)를 각 동물에게, 다시 꼬리에서 피하로,

상기 제 1 주사와 상이한 위치에서 투여하였다. 이 경우에 불완전 프로인트 항원보강제(엠 튜베르클로시스 없음)를 사용하여 콜라겐 현탁액을 제조하였다. 2 내지 4의 관절염 지수 점수가 획득되었을 때 시험 품목(또는 비히클)에 의한 처리를 시작하고 앞서 명시된 시간의 양 동안 계속하였다. 각 실험 그룹에서 동물들간에 큰 차이 없이, 관절염 지수 점수의 균일성을 보장하기 위해서, 각 실험 그룹에 대한 동물들의 분배를 연구 출발 시에 랜덤한 방식으로 수행하지 않았다. 대신에, 동물들을 2 내지 4의 관절염 지수 점수를 획득했을 때 실험 그룹으로 할당하였다. 14 마리의 동물들이 상기 점수를 획득했을 때, 실험 그룹을 완료시키고 시험 품목 또는 비히클 처리를 개시하였다. 이를 모든 실험 그룹이 구성될 때까지 점진적으로 수행하였다. 상기 시험 품목을 하이포써모솔 또는 링거 락테이트 용액(비히클) 중의 현탁액으로서 앞서 명시된 용량으로 투여하였다. 투여된 세포에 대해 나타낸 수는 총 세포수(생육성 + 비-생육성)이다. 그럼에도 불구하고, 생육성 세포의 수를 투여 전에 매일 측정하였다(트립판 블루 배제). 대조군(A)은 어떠한 처리도 받지 않았다.

- [0218] 콜라겐 제조: 0.05 M 아세트산 중의 2 mg/ml의 농도로 용해된 고도로 정제된 치킨 유형 II 콜라겐을 사용하였다. 상기 용액을 4 °C의 온도에서 밤새 서서히 교반함으로써 제조하였다. 상기 용해된 콜라겐을 4 °C에서 1주일 또는 -20 °C에서 더 오래 동안 보관할 수 있었다.
- [0219] 프로인트 완전 항원보강제(CFA) 중의 유형 II 콜라겐 유화액의 제조: 불완전 항원보강제의 사용 시 마우스가 관절염을 발병하지 않았으므로, 마우스에서 관절염을 유발하기 위해 프로인트 완전 항원보강제를 사용하는 것이 필요하다. 면역을 위한 상기 유화액의 성질은 관절염 유발에 중요한 점이다. 상기 유화액을 파마-크로스 이베리카(Farma-Cros Iberica)의 내부 표준 실험 과정(FCI-PNT-FT-84)에 따라 알렉트록(alectroc) 균질화제를 사용하여 제조하였다. 생성되는 CFA 중의 콜라겐 II 유화액은 1 mg/ml의 농도로 콜라겐(유형 II)을 함유하였다. 상기 콜라겐 현탁액을 몸통으로부터 대략 2 내지 3 cm인 꼬리에서, 0.1 ml의 부피로 피하 주사하였다.
- [0220] 촉진제 주사에 의한 관절염의 유발:
- [0221] 제 1 일: 콜라겐 현탁액을 몸통으로부터 대략 2 내지 3 cm인 꼬리에서, 0.1 ml의 부피로 피하 주사하였다.
- [0222] 제 21 일: 불완전 프로인트 항원보강제 중의 콜라겐 현탁액을 앞서 개시한 바와 같이 제조하였다. 0.1 ml을 각 마우스의 꼬리에서, 제 1 일에 사용된 것과 상이한 부위에서 피하 주사하였다.
- [0223] 처리: 실험 그룹을 형성하기에 충분한 동물(14)이 2 내지 4의 관절염 지수 점수를 획득했을 때 처리를 시작하였다.
- [0224] 관절염 지수 점수: 상기 관절염 지수 점수를 각각의 동물에 대해 제 21 일로부터 연구의 끝까지 평가하였다. 상기 관절염의 중증도를 실시예 1에 개시된 바와 동일한 관절염 지수 득점 시스템에 따라 앞발과 뒷발 모두에서 채점하였다. 최종 점수는 네 발의 점수들의 합이다. 최대 점수는 16이다.
- [0225] 희생일에 각 동물로부터 혈액을 채취하고 하기의 분석 모수들을 측정하였다: 헤마토크릿, RBC, WBC, 혈소판, 알부민/글로불린 비, 트라이글리세라이드, 차별적인 WBC 수(호중구, 림프구, 단핵구).
- [0226] 결과(도 3 내지 4)
- [0227] 그룹 B: 시험 품목 16 x 10<sup>4</sup> ASC 배양된 세포/신경절/일, 제 1 일만(하이포써모솔)
- [0228] 1 회 단일의 경우에 DBA1 마우스에 대한 시험 품목의 림프내 투여는 콜라겐 II 투여에 의해 유발된 관절염의 중증도를 감소시켰다. 이는 시험 품목 투여 시작으로부터 23 내지 31 일째에 통계학적으로 유의수준이었다. 단지 앞발에 대한 점수만을 고려했을 때, 소염 활성은 제 27 및 28 일째에만 유의수준이었다. 대조적으로 단지 뒷발에 대한 점수만을 고려했을 때, 관찰된 소염 활성은 22일 내지 31일(포함)째에 유의수준이었다. 이는 상기 실험 그룹에 대해 관찰된 관절염 지수 점수의 현저한 감소는 주로 뒷발에 대한 효과에 기인함을 암시한다.
- [0229] 그룹 C: 시험 품목 16 x 10<sup>4</sup> ASC 배양된 세포/신경절/일, 제 1 및 8 일(링거 락테이트)
- [0230] 2 회의 경우(제 1 및 8 일)에 DBA1 마우스에 대한 시험 품목의 림프내 투여는, 링거 락테이트 중에서 제형화 시, 콜라겐 II 투여에 의해 유발된 관절염의 중증도를 또한 감소시켰다. 이는 시험 품목 투여 시작으로부터 5 일 정도로 빨리 내지 41 일까지 통계학적으로 유의수준이었다. 단지 앞발에 대한 점수만을 고려했을 때, 소염 활성은 보다 불규칙했으며, 이는 5 내지 7 일, 9 내지 27 일 및 40 내지 41 일째에 통계학적 유의수준에 도달하였다. 대조적으로 단지 뒷발에 대한 점수만을 고려했을 때, 관찰된 소염 활성은 보다 일관적이었고 7 일 내지 27 일(포함)째에 유의수준에 도달하였으며, 이 날을 지나서는 유의수준이 아니었다. 이는 상기 실험 그룹에 대해 관찰된 관절염 지수 점수의 현저한 감소가 27 일까지는 앞발과 뒷발에 대한 복합 효과에 기인하지만, 이 날



짜 후에는 우세하게 앞발의 염증의 감소에 기인함을 암시한다.

[0231] 그룹 D: 시험 품목 16 x 10<sup>4</sup> ASC 배양된 세포/신경절/일, 제 1, 8 및 15 일(하이포씨모솔)

[0232] 3 회의 경우(제 1, 8 및 15 일)에 DBA1 마우스에 대한 시험 품목의 림프내 투여는, 하이포씨모솔 중에서 제형화 시, 콜라겐 II 투여에 의해 유발된 관절염의 증증도를 또한 감소시켰다. 이는 시험 품목 투여 시작으로부터 8 일 정도로 빨리 내지 44 일까지 통계학적으로 유의수준이었다. 단지 앞발에 대한 점수만을 고려했을 때, 소염 활성은 5 일째 및 이어서 9 일 내지 41 일까지 유의수준이었다. 단지 뒷발에 대한 점수만을 고려했을 때, 관찰된 소염 활성은 14 일 내지 21 일 및 26 일 내지 47 일까지 유의수준이었다. 이는 상기 실험 그룹에 대해 관찰된 관절염 지수 점수의 현저한 감소가 연구의 대부분을 통해 앞발과 뒷발에 대한 복합 효과에 기인하였으며 앞 발 끝이나 뒷발 끝에 유리한 것으로 보이지 않았음을 암시한다.

[0233] 그룹 E: 시험 품목 16 x 10<sup>4</sup> ASC 배양된 세포/신경절/일, 제 1, 15 및 30 일(하이포씨모솔)

[0234] 각각 15 일로 분리된 3 회의 경우(제 1, 15 및 30 일)에 DBA1 마우스에 대한 시험 품목의 림프내 투여는, 하이포씨모솔 중에서 제형화 시, 시험 품목 투여 시작으로부터 15 일 내지 31 일까지 콜라겐 II 투여에 의해 유발된 관절염의 증증도를 단지 유의수준으로 감소시켰다. 단지 앞발에 대한 점수만을 고려했을 때, 소염 활성은 21 일 내지 31 일까지 유의수준이었다. 단지 뒷발에 대한 점수만을 고려했을 때, 관찰된 소염 활성은 어떤 경우에도 유의수준이 아니었다. 이는 상기 실험 그룹에 대해 관찰된 관절염 지수 점수의 현저한 감소가 단지 앞발에 대한 효과에만 기인하였음을 암시한다.

[0235] 그룹 F: 비히클 하이포씨모솔, 제 1, 15 및 30 일(좌측 및 우측 서혜부 림프절에의 림프내 투여)

[0236] 3 회의 별도의 경우(제 1, 15 및 30 일)에 DBA1 마우스에 대한 비히클의 림프내 투여는 그룹 A(처리 없음)에 비해 연구된 3 개 시점 중 어느 시점에서도 관절염의 증증도에 대해 현저한 효과가 없었다.

[0237] 도 4는 그룹 C 및 D에서 동물들의 총 백혈구 수의 감소를 나타내며, 이는 건강한 동물의 경우(G)와 유사한 수준에 달하는 상기 시험 품목의 소염 활성을 가리킨다.

[0238] 결론

[0239] 상기 결과는 1주일 간격으로 림프절당 160,000 eASC(링거 락테이트 중에서 제형화됨)의 2 회 투여가 관절염의 증증도를 감소시킴을 입증한다(그룹 C). 더욱이, 1주일 간격으로 림프절당 160,000 eASC(하이포씨모솔 중에서 제형화됨)의 3 회 투여는 더 높은 치료 효과를 나타내었다. 하이포씨모솔 중에서의 제형화는 eASC의 치료 능력에 영향을 미치지 않는다(그룹 D). 더욱이, 그룹 C 및 D는 건강한 대조용 동물(그룹 G)의 경우에 가까운 총 백혈구 수를 또한 유지하였으며 이는 eASC의 소염 효과를 가리킨다.

[0240] 실시예 3: 림프절당 16,000, 48,500 및 14,500 eASC의 1 주일 간격의 3 회 투여를 비교하는 콜라겐 유발된 관절염(CIA) 마우스 모델에서 인간 ASC의 림프내 투여의 효능 연구

[0241] 연구 목적은 림프내 경로를 통한 투여에 따른, 마우스 중 콜라겐에 의해 유발된 관절염의 모델에서 염증 반응을 억제하는 상이한 용량의 인간 확대된 ASC(eASC)의 능력을 비교하는 것이었다.

[0242] 실험 그룹

[0243] 동물들을 각각의 그룹에 n=14로 7 개의 실험 그룹으로 분할하였다.

[0244] 그룹 A) 관절염 유발된(CIA) 마우스: 처리 없음

[0245] 그룹 B) 림프내 투여(우측 및 좌측 서혜부 림프절 내: 제 1, 8 및 15 일)를 통해, 배양되고 최근에 트립신 처리된(160,000 세포/림프절/일) eASC로 처리된 CIA 유발된 마우스. 하이포씨모솔 중에서 제형화됨.

[0246] 그룹 C) 림프내 투여(우측 및 좌측 서혜부 림프절 내: 제 1, 8 및 15 일)를 통해, 배양되고 최근에 트립신 처리된(48,500 세포/림프절/일) eASC로 처리된 CIA 유발된 마우스. 하이포씨모솔 중에서 제형화됨.

[0247] 그룹 D) 림프내 투여(우측 및 좌측 서혜부 림프절 내: 제 1, 8 및 15 일)를 통해, 배양되고 최근에 트립신 처리된(14,500 세포/림프절/일) eASC로 처리된 CIA 유발된 마우스. 하이포씨모솔 중에서 제형화됨.

[0248] 그룹 E) 림프내 투여(우측 및 좌측 서혜부 림프절 내: 제 1, 8 및 15 일)를 통해 비히클(하이포씨모솔)로 처리된 CIA 유발된 마우스.

- [0249] 그룹 F) 처리 없이, 연구의 끝에서 죽인 대조용의 건강한 마우스(CIA 없음). 이 그룹을 건강한 대조군으로서 사용한다.
- [0250] 결과(도 5)
- [0251] 그룹 B: 림프내 투여(우측 및 좌측 서혜부 림프절 내: 제 1, 8 및 15 일)를 통해, 배양되고 최근에 트립신 처리된(160,000 세포/림프절/일) eASC로 처리된 CIA 유발된 마우스. 하이포씨모술 중에서 제형화됨.
- [0252] 3 회(제 1, 8 및 15 일)에 DBA1 마우스에 대한 상기 용량의 림프내 투여는 콜라겐 II 투여에 의해 유발된 관절염의 중증도를 감소시켰다. 이는 상기 투여 시작으로부터 13 일 내지 34 일까지 통계학적으로 유의수준이었다.
- [0253] 그룹 C: 림프내 투여(우측 및 좌측 서혜부 림프절 내: 제 1, 8 및 15 일)를 통해, 배양되고 최근에 트립신 처리된(48,500 세포/림프절/일) eASC로 처리된 CIA 유발된 마우스. 하이포씨모술 중에서 제형화됨.
- [0254] 3 회(제 1, 8 및 15 일)에 DBA1 마우스에 대한 상기 용량의 림프내 투여는 160,000 세포의 용량에 비해 증가된 치료 효과(관절염 점수)를 나타내었다. 더욱이, 이는 상기 투여 시작으로부터 4 일 정도로 빨리 내지 50 일까지 통계학적으로 유의수준이었다.
- [0255] 그룹 D: 림프내 투여(우측 및 좌측 서혜부 림프절 내: 제 1, 8 및 15 일)를 통해, 배양되고 최근에 트립신 처리된(14,500 세포/림프절/일) eASC로 처리된 CIA 유발된 마우스. 하이포씨모술 중에서 제형화됨.
- [0256] 3 회(제 1, 8 및 15 일)에 DBA1 마우스에 대한 상기 용량의 림프내 투여는 일부 치료 이점을 나타내었지만, 상기 시험된 다른 2 개의 용량에 비해 감소되었다(관절염 점수). 이는 상기 투여 시작으로부터 14 일 내지 30 일까지 통계학적으로 유의수준이었다.
- [0257] 그룹 E: 림프내 투여(우측 및 좌측 서혜부 림프절 내: 제 1, 8 및 15 일)를 통해 비히클(하이포씨모술)로 처리된 CIA 유발된 마우스.
- [0258] 3 회(제 1, 8 및 15 일)에 DBA1 마우스에 대한 상기 용량의 림프내 투여는 그룹 A(처리 없음)에 비해 연구된 시점들 중 어느 시점에서도 관절염의 중증도에 대해 현저한 영향이 없었다.
- [0259] 결론
- [0260] 도 5로부터 알 수 있는 바와 같이, 투여당 최적의 총 용량은 상기 마우스의 경우 총 용량당 29,000 세포 내지 총 용량당 320,000 세포인 것으로 확인되었다.
- [0261] 실시예 4: 인간 투여량
- [0262] 최대 권장 출발 용량(MRSD)을, 인간 등가 용량(HED)을 안전성 지수로 나누어 결정한다.
- [0263] 상기 MRSD를 계산하기 위한 첫 번째 단계는 입수할 수 있는 데이터를 검토하고 평가하여 관찰된 부작용이 없는 수준(NOEL)을 결정한다. NOEL은 대조용 그룹에 비해 부작용의 현저한 증가를 생성시키지 않는 최고의 용량 수준으로서 정의된다(통계학적으로 유의수준이 아니더라도).
- [0264] 두 번째 단계는 체 표면적을 근거로 동물 용량을 인간 등가 용량으로 전환시키는 전환 인자를 사용하여 상기 NOEL을 HED로 전환시키는 것이다. 마우스에서 인간으로의 전환 인자는 상기 마우스 용량 x 0.08이다.
- [0265] 안전성 인자(SF)는 초기 임상 용량을 제공받은 인간 환자의 보호를 위한 안전성의 여유를 제공한다. 통상적으로 사용되는 디폴트 안전성 인자는 10이지만, 10 미만의 SF를 적합한 상황 하에서 사용할 수 있다.
- [0266] 마우스를 사용한 연구에 근거한 인간 투여량의 계산
- [0267] eASC를 사용한 인간 림프내 임상 시험에 적합한 용량을 제공하기 위해서, 상기 eASC의 독성학 및 안전성 데이터를 고려하였다. 상기 MRSD를 하기와 같이 단일 용량에 대해 결정하였다:
- [0268] (i) NOEL은 마우스에서 320,000 세포이다. 시험된 마우스의 중간 체중은 20 g이므로, 이는 1600만 세포/kg의 용량에 상응한다.
- [0269] (ii) HED로의 전환은  $1600\text{만 세포/kg} \times 0.08 = 128\text{만 세포/kg}$ 이다.
- [0270] (iii)  $\text{MRSD} = 1.28 / 10 = 128,000 \text{ 세포/kg}$ .
- [0271] 10의 SF가 적합한 것으로 간주되지만, 대략 80 kg의 인간에서 상응하는 용량이 500만 세포인 경우에 20의 SF가



보존적으로 적용되기를 바랄 수도 있다.

[0272] 따라서, 초기 임상 시험의 경우 제안된 초기 출발 용량은 하기와 같다:

표 2

eASC 농도 안전성 인자	서혜부 림프절당 부피	서혜부 림프절당 세포의 수
1000만 세포/ml		
SF 20	0.25 ml	250만 세포

[0274] 상기 초기 출발 용량은 5 명의 환자에게 2 개의 서혜부 림프절(좌측 및 우측) 모두에 제공될 것이다.

[0275] 이들 5 명의 환자를 평가한 후에, 또 다른 5 명의 환자에게 제 2의 제안된 용량을 제공할 것이다:

표 3

eASC 농도 안전성 인자	서혜부 림프절당 부피	서혜부 림프절당 세포의 수
1000만 세포/ml		
SF 10	0.5 ml	500만 세포

[0277] **실시예 5:** 추가의 투여 섭생

[0278] 콜라겐 유발된 관절염 마우스 모델에서 림프내 투여의 효능 및 최적 투여량을 처리 50일까지 확인할 수 있다 (GLP 조건 하에서). 각각의 마우스에게 하기에 개략된 투여량 및 간격으로 명시된 수의 ASC를 2 회 주사할 것이다(서혜부 림프절, "ILN" 당 1 회):

표 4

그룹	질병 모델	투여경로	용량 당 세포수	투여 스케줄
A	CIA	처리 없음	처리 없음	처리 없음
B	CIA	ILN	320,000 (결절 당 160,000)	d1 - d8
C	CIA	ILN	320,000 (결절 당 160,000)	d1-d8-d30
D	CIA	ILN	320,000 (결절 당 160,000)	d1-d15-d30
E	CIA	ILN	320,000 (결절 당 160,000)	d1-d15
F	CIA	ILN	320,000 (결절 당 160,000)	d1-d30
G	CIA	ILN	160,000 (결절 당 80,000)	d1-d8-d30
H	CIA	ILN	32,000 (결절 당 16,000)	d1-d8-d30
I	CIA	ILN	Vehicle(대조용)	d1-d8-d30

[0280] 독성학 및 생체분포 연구를 또한 그룹 A, B 및 C에 대해 수행할 것이다. 15, 21 및 30 일에 ILN 60 K/림프절을 주사한 CIA 마우스의 단기간 생체분포 연구를 위해 별도의 그룹이 또한 존재할 것이다.

[0281] 건강한 동물에서 ASC의 생체영상화 연구를 또한 수행할 것이다:

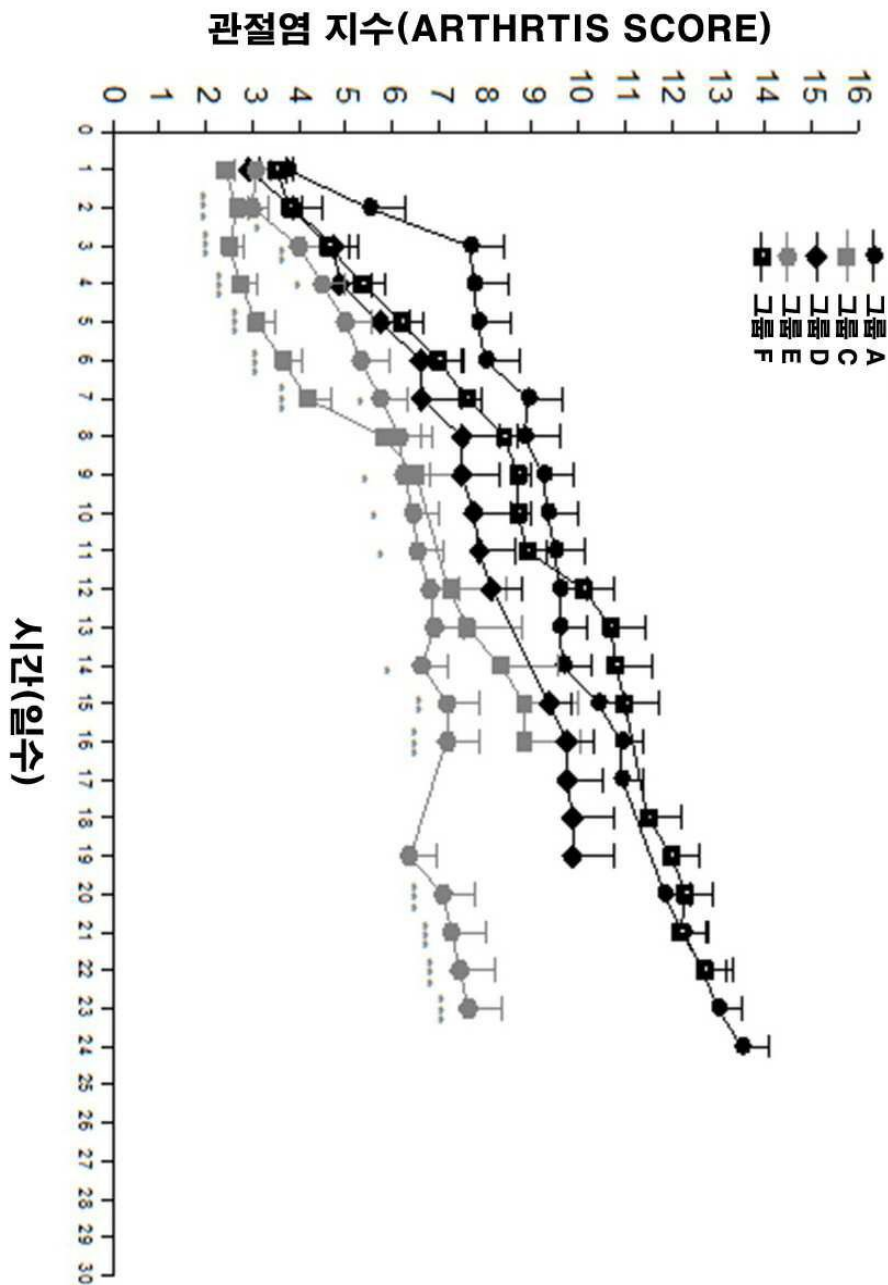
[0282] (i) 160 K/림프절(320 K 용량), ILN, d1-15-30-45-60, 최종 투여 후 14, 30 및 180 일째의 독성학. 생체분포에 대해 80 마리 마우스, 800 개의 조직을 평가함.

[0283] (ii) 30 일째의 DMEM, ILN, d1-15-30-45-60의 독성학.

[0284] 따라서, 본 발명을 여기에서 본 발명의 특정한 태양, 특징 및 예시적인 실시태양들에 관하여 개시하였지만, 본 발명의 유용성이 그렇게 제한되지 않고 오히려 다수의 다른 태양, 특징 및 실시태양으로 연장되며 이들을 포함함을 알 것이다. 따라서, 이후에 나타낸 청구의 범위를 그의 진의 및 범위 내에 모든 상기와 같은 태양, 특징 및 실시태양을 포함하는 것으로서 상응하게 광범위하게 해석하고자 한다.

도면

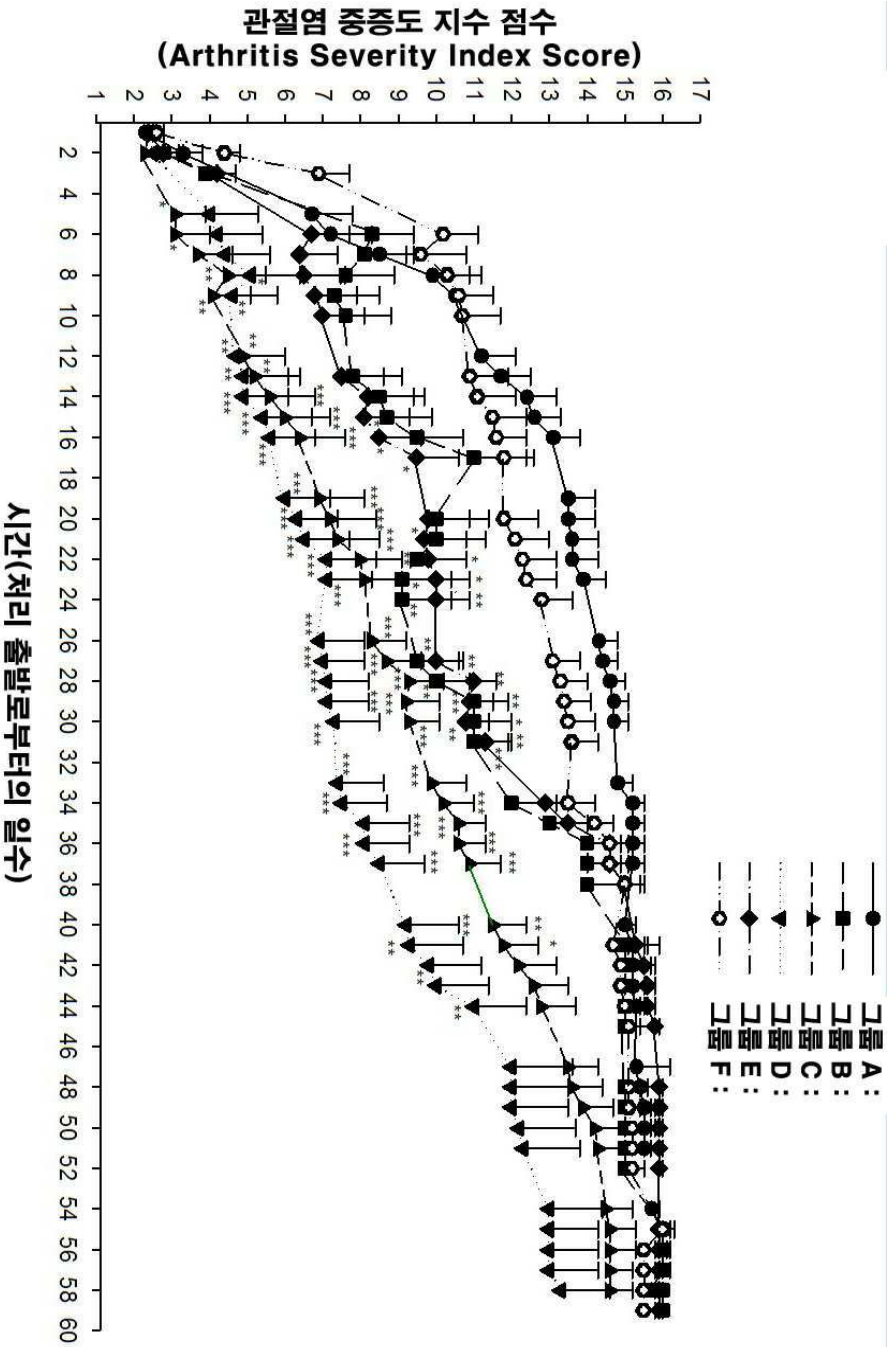
도면1



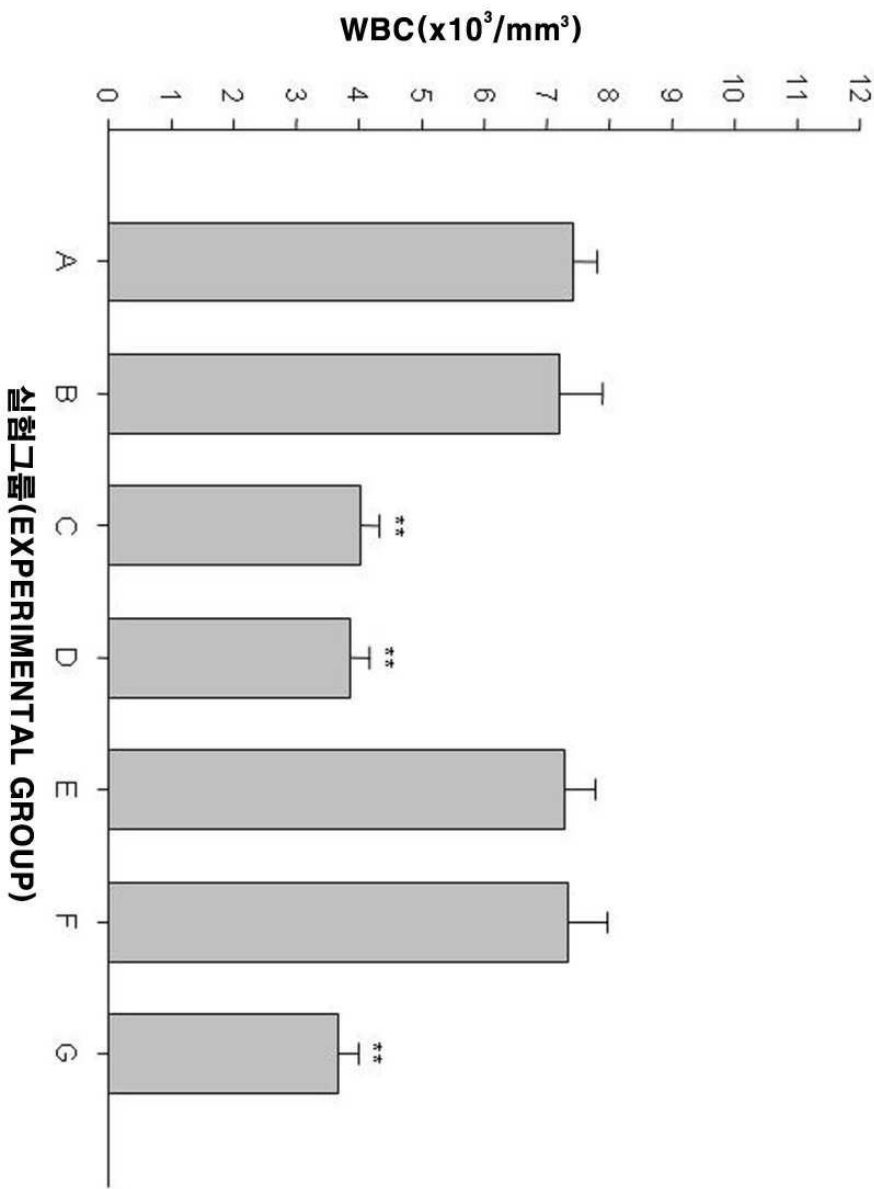
그룹 (Group)	관절염 점수측정 (Arthritis Score measurement)	일(DAY)																							
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	Mean	3.75	5.5	7.67	7.75	7.83	8	8.92	8.83	9.25	9.33	9.5	9.58	9.58	9.67	10.4	10.9	10.9	0	0	11.8	12.3	12.7	13	13.5
	SD	0.45	2.65	2.61	2.53	2.55	2.49	2.57	2.66	2.18	2.23	2.24	2.15	2.15	2.06	1.98	1.68	1.68	0	0	2.04	1.76	1.83	1.76	1.98
	SEM	0.13	0.76	0.75	0.73	0.74	0.72	0.74	0.77	0.63	0.64	0.65	0.62	0.62	0.59	0.57	0.48	0.48	0	0	0.59	0.51	0.53	0.51	0.57
	Mean	2.42	2.67	2.5	2.75	3.08	3.67	4.17	5.83	6.5	0	0	7.25	7.58	8.33	8.83									
C	SD	0.67	0.78	1.09	1.29	1.44	1.37	1.75	2.72	3.48	0	0	4.18	4.19	4.31	4	4.13								
	SEM	0.19	0.22	0.31	0.37	0.42	0.4	0.51	0.79	1	0	0	1.21	1.21	1.25	1.15	1.19								
	Mean	2.92	3.88	4.75	4.88	5.75	6.63	6.63	7.5	7.5	7.75	7.88	8.13	0	0	9.38	9.75	9.75	9.88	9.88					
	SD	0.79	1.73	1.49	1.96	1.75	2.39	2.39	2.27	2.27	2.19	2.17	1.89	0	0	1.3	1.58	2.19	2.47	2.47					
D	SEM	0.23	0.61	0.53	0.69	0.62	0.84	0.84	0.8	0.8	0.77	0.77	0.67	0	0	0.46	0.56	0.77	0.88	0.88					
	Mean	3.08	3	4	4.5	5	5.33	5.75	6.17	6.25	6.45	6.55	6.82	6.91	6.64	7.18	7.18	0	0	6.36	7.09	7.27	7.45	7.64	
	SD	1	1.13	1.48	1.62	1.91	2.06	2.05	2.33	1.96	1.81	1.81	2.04	2.07	1.86	2.32	2.36	0	0	1.91	2.26	2.41	2.54	2.38	
	SEM	0.29	0.33	0.43	0.47	0.55	0.59	0.59	0.67	0.57	0.55	0.55	0.62	0.62	0.56	0.7	0.71	0	0	0.58	0.68	0.73	0.77	0.72	
E	Mean	3.5	3.82	4.64	5.36	6.2	7	7.6	8.4	8.7	8.7	8.9	10.1	10.7	10.8	11	0	0	11.5	12	12.3	12.2	12.7		
	SD	0.8	0.75	1.43	1.57	1.55	1.63	0.97	0.97	0.95	0.82	1.29	2.13	2.31	2.44	2.31	0	0	2.27	1.94	1.89	1.81	2		
	SEM	0.23	0.23	0.43	0.47	0.49	0.52	0.31	0.31	0.3	0.26	0.41	0.67	0.73	0.77	0.73	0	0	0.72	0.61	0.60	0.57	0.63		
	Mean																								

도면2

도면3



도면4



도면5

