



공개특허 10-2022-0130833



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0130833
(43) 공개일자 2022년09월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 5/0775 (2010.01) *A61K 35/28* (2015.01)
A61P 29/00 (2006.01) *A61P 37/00* (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 5/0662 (2013.01)
A61K 35/28 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-7031764(분할)

(22) 출원일자(국제) 2015년09월24일

심사청구일자 2022년09월15일

(62) 원출원 특허 10-2021-7041459

원출원일자(국제) 2015년09월24일

심사청구일자 2021년12월23일

(85) 번역문제출일자 2022년09월14일

(86) 국제출원번호 PCT/US2015/052029

(87) 국제공개번호 WO 2016/053758

국제공개일자 2016년04월07일

(30) 우선권주장

14/504,399 2014년10월01일 미국(US)

(71) 출원인

센바이오, 인크.

미국 캘리포니아 94041, 마운틴 뷰, 사우스 워즈
먼 로드 231

(72) 별명자

베탕쿠르 알린

미국 92037 캘리포니아주 라 올라 크랜브룩 코트
3051

(74) 대리인

김진희, 김태홍

전체 청구항 수 : 총 30 항

(54) 발명의 명칭 줄기 세포 배양을 위한 유도 배지 및 방법 및 요법

(57) 요 약

세포 기반 요법에서 사용되는 분극화된, 프라이밍된, 활성화된, 또는 유도된 세포를 수득하면서, 별개의 균일한 세포 표현형을 유도, 활성화, 또는 프라이밍시켜 염증 및 면역을 선택적으로 촉진시키거나, 또는 억제시키는 것을 목적으로 하는, 신규한 MSC 줄기 세포 배양 및 치료 방법 및 배양 배지 조성물.

대 표 도

A2M A01	SH2B2 A02	BCL2L A03	CCND1 A04	COKN1 A A05	CEPB A05	CRK A07	CRP A08	CSP1R A09	CSP2R B A10	CXCL9 A11	EGFR A12
EPOR B01	F2 B02	P2R B03	PAS B04	FCER1 A B05	FCQRT B06	ISG15 B07	GATA3 B08	GBPT B09	QHR B10	HMGAT1 B11	IFNAR1 B12
IFMG C01	IFNGR1 C02	IL10RA C03	IL20 C04	IL2RA C05	IL2RG C06	IL4R C07	IL4R C08	IL6ST C09	INSR C10	IRF1 C11	IRF9 C12
JAK1 D01	JAK2 D02	JAK3 D03	JUN D04	JUNB D05	MMF3 D06	MPL D07	MYC D08	NFKB1 D09	NR2A2 D10	NR3C1 D11	QAS1 D12
OSM E01	PGCRR A E02	PIAS1 E03	PIAS2 E04	PPP2R 1A E05	PRLR E06	PTPN1 E07	PTPRC E08	SH2B1 E09	SIT1 E10	SLA2 E11	SMAD1 E12
SMAD2 F01	SMAD3 F02	SMAD4 F03	SMAD5 F04	SOCS1 F05	SOCS2 F06	SOCS3 F07	SOCS4 F08	SOCS5 F09	SP1 F10	SP1 F11	SRC F12
STAM G01	STAT1 G02	STAT2 G03	STAT3 G04	STAT5A G05	STAT5B G06	STAT5B G07	STAT6 G08	STUB1 G09	TYK2 G10	USP1 G11	YY1 G12
B2M H01	HPRT1 H02	RPL13 A H03	GAPDH H04	ACTB H05	HGDC H06	RTC H07	RTC H08	RTC H09	PPC H10	PPC H11	PPC H12

(52) CPC특허분류

A61P 29/00 (2018.01)
A61P 37/00 (2018.01)
C12N 5/0043 (2013.01)
C12N 5/0663 (2013.01)
C12N 5/0668 (2013.01)
C12N 2500/02 (2013.01)
C12N 2500/92 (2013.01)
C12N 2501/14 (2013.01)
C12N 2501/599 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

- (a) 중간엽 줄기 세포; 및
 (b) (i) 툴 유사 수용체 3(TLR3) 리간드 및 (ii) 에리트로포이에틴을 포함하는 유도 배지

를 포함하는, 항염증 특성을 갖는 면역학적으로 분극화된 중간엽 줄기 세포 집단을 생성하기 위한 세포 배양물로서, 배양은 저산소 조건 하에서 수행되는 것인 세포 배양물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 중간엽 줄기 세포가 인간 중간엽 줄기 세포인 세포 배양물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 중간엽 줄기 세포가 다능성 줄기 세포로부터 유래된 것인 세포 배양물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, TLR3 리간드가 폴리(I:C) 또는 폴리(A:U)인 세포 배양물.

청구항 5

제4항에 있어서, TLR3 리간드가 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 내지 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 존재하는 것인 세포 배양물.

청구항 6

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 에리트로포이에틴이 10 ng/ml 미만의 농도로 존재하는 것인 세포 배양물.

청구항 7

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 인터루킨 4 및/또는 인터루킨 13을 추가로 포함하는 세포 배양물.

청구항 8

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 유도 배지가 혈청을 포함하지 않는 것인 세포 배양물.

청구항 9

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 저산소 조건이 0.5% 내지 2%의 산소를 포함하는 것인 세포 배양물.

청구항 10

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 배양이 적어도 30분, 그러나 8시간 미만 동안 수행되는 것인 세포 배양물.

청구항 11

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 유도 배지가 (a) 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 내지 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도의 폴리(I:C) 및 (b) 10 ng/ml 미만 농도의 에리트로포이에틴을 포함하는 것인 세포 배양물.

청구항 12

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 면역학적으로 분극화된 중간엽 줄기 세포 집단이 자극을 받지 않은 중간엽 줄기 세포 집단에 비해 CXCL9, OAS1 및 ISG15 mRNA의 증가된 발현을 특징으로 하는 것인 세포 배양물.

청구항 13

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 면역학적으로 분극화된 중간엽 줄기 세포 집단이 자극을 받지 않은 중간엽 줄기 세포 집단에 비해 PIAS2의 감소된 발현을 특징으로 하는 것인 세포 배양물.

청구항 14

- (a) 중간엽 줄기 세포; 및
- (b) (i) 툴 유사 수용체 3(TLR3) 리간드 및 (ii) 에리트로포이에틴을 포함하는 배양 배지

를 포함하는 세포 배양물로부터 분리된 세포 집단으로서, 배양은 저산소 조건 하에서 수행되는 것인 세포 집단.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 중간엽 줄기 세포가 인간 중간엽 줄기 세포인 세포 집단.

청구항 16

제14항에 있어서, 상기 중간엽 줄기 세포가 다능성 줄기 세포로부터 유래된 것인 세포 집단.

청구항 17

제14항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, TLR3 리간드가 폴리(I:C) 또는 폴리(A:U)인 세포 집단.

청구항 18

제17항에 있어서, TLR3 리간드가 $0.1 \mu\text{g/mL}$ 내지 $100 \mu\text{g/mL}$ 의 농도로 존재하는 것인 세포 집단.

청구항 19

제14항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 에리트로포이에틴이 10 ng/mL 미만의 농도로 존재하는 것인 세포 집단.

청구항 20

제14항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 인터루킨 4 및/또는 인터루킨 13을 추가로 포함하는 세포 집단.

청구항 21

제14항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 배양 배지가 혈청을 포함하지 않는 것인 세포 집단.

청구항 22

제14항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 저산소 조건이 0.5% 내지 2%의 산소를 포함하는 것인 세포 집단.

청구항 23

제14항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 배양이 적어도 30분, 그러나 8시간 미만 동안 수행되는 것인 세포 집단.

청구항 24

제14항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 배양 배지가 (a) $0.1 \mu\text{g/mL}$ 내지 $100 \mu\text{g/mL}$ 농도의 폴리(I:C) 및 (b) 10 ng/mL 미만 농도의 에리트로포이에틴을 포함하는 것인 세포 집단.

청구항 25

제14항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 중간엽 줄기 세포에 비해 CXCL9, OAS1 및 ISG15 mRNA의 증가된 발현을 특징으로 하는 세포 집단.

청구항 26

제14항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 중간엽 줄기 세포에 비해 PIAS2의 감소된 발현을 특징으로 하는 세포 집단.

청구항 27

제14항 내지 제16항 중 어느 한 항의 세포 집단을 포함하는, 자가면역 또는 염증성 장애의 치료용 조성물.

청구항 28

제27항에 있어서, 장애가 류마티스 관절염, 염증성 장 질환, 급성 시신경염, 크라베병, 당뇨 망막병증, 크론병 및 급성 폐 손상으로 이루어진 군에서 선택되는 것인 조성물.

청구항 29

제27항에 있어서, 약학적으로 허용가능한 부형제, 희석제 또는 담체를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 30

제29항에 있어서, 장애가 류마티스 관절염, 염증성 장 질환, 급성 시신경염, 크라베병, 당뇨 망막병증, 크론병 및 급성 폐 손상으로 이루어진 군에서 선택되는 것인 조성물.

발명의 설명

발명의 내용

[0001]

연방 정부 지원 연구에 관한 진술

[0002]

본 발명은 NIH 1R43AR061902-01, 및 1P20RR20152-01; 및 미국 국방부 OC073102 및 OC110218 하에 미국 정부 지원으로 이루어졌다. 정부는 본 발명에 일정 권리를 갖는다.

[0003]

본 발명의 요약

[0004]

본 발명은 세포 기반 요법에서 사용되며, 공지된 배양 배지 및 방법에 비하여 상당한 이점을 제공하는 것으로서, 염증 및 면역을 선택적으로 촉진 또는 억제시키기 위해 별개의 균일한 세포 표현형을 유도, 활성화 또는 프라이밍시키기 위한 목적의 신규한 줄기 세포 배양 및 치료 방법 및 배양 배지 조성물을 제공한다. 본 발명은 세포 기반 요법을 위해 사용될 수 있는 것으로서, 더욱 균일하고, 예측가능한 생체외에서 확장되고, 유도, 프라이밍, 또는 활성화된 중간엽 줄기 세포(MSC: mesenchymal stem cell) 집단을 제공하는 데 사용될 수 있다. 세포 기반 요법에 필요한, 균일하고, 효과적인, 다수의 줄기 세포를 제공할 수 있는 개선된 방법이 당업계에서는 장기간 요구되어 왔다. 본 발명의 다양한 실시양태의 이점은 환자 내로의 도입시 예측가능한 방식으로 반응을 보이는 균일한 별개의 표현형으로의 중간엽 줄기 세포의 배양을 유도, 활성화, 또는 프라이밍시키는 데 사용될 수 있다는 점이다.

[0005]

특정 실시양태에서, 본원에서는 톨 유사 수용체 3(TLR3: Toll-like receptor 3) 리간드, 에리트로포이에틴, 및 0.5-2% 산소 또는 저산소 모방제(hypoxia mimetic)를 포함하는, 자극을 받지 않은 중간엽 줄기 세포 집단으로부터 면역학적으로 분극화된 중간엽 줄기 세포 집단을 생성하기 위한 유도 배지로서, 면역학적으로 분극화된 중간엽 줄기 세포 집단이 항염증성 또는 면역억제성 매개인자의 발현으로 특징지어지는 항염증 특성을 갖는 것인 유도 배지를 개시한다. 특정 실시양태에서, 톨 유사 수용체 3(TLR3) 리간드는 폴리(I:C)이다. 특정 실시양태에서, 톤 유사 수용체 3(TLR3) 리간드는 폴리(A:U)이다. 특정 실시양태에서, 에리트로포이에틴은 10 ng/mL 미만인 농도로 존재한다. 특정 실시양태에서, 저산소 모방제는 염화코발트이다. 특정 실시양태에서, 염화코발트는 5 μM 내지 500 μM인 농도로 존재한다. 특정 실시양태에서, 유도 배지는 인터루킨 4(IL-4)를 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 유도 배지는 인터루킨 13(IL-13)을 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 유도 배지는 인간 또는 동물 기원의 혈청을 포함하지 않는다. 특정 실시양태에서, 유도 배지는 농축 용액이다. 특정 실시양태에서, 본원에서는 유도 배지로 처리된 중간엽 줄기 세포 집단을 개시한다. 특정 실시양태에서, 본원에서는 유도 배지로 처리된 개, 고양이, 또는 말 중간엽 줄기 세포 집단을 개시한다. 특정 실시양태에서, 본원에서는 유도 배지로 처리된 중간엽 줄기 세포 집단을 개시한다. 특정 실시양태에서, 본원에서는 유도 배지로 처리된 중간엽 줄기 세포 집단으로서, 세포는 자극을 받지 않은 중간엽 줄기 세포 집단과 비교하여 CXCL9 mRNA의 증가된 발현으로 특징지어지는 중간

엽 줄기 세포 집단을 개시한다. 특정 실시양태에서, 본원에서는 유도 배지로 처리된 중간엽 줄기 세포 집단으로서, 세포는 자극을 받지 않은 중간엽 줄기 세포 집단과 비교하여 *OAS1* mRNA의 증가된 발현으로 특징지어지는 중간엽 줄기 세포 집단을 개시한다. 특정 실시양태에서, 본원에서는 유도 배지로 처리된 중간엽 줄기 세포 집단으로서, 세포는 자극을 받지 않은 중간엽 줄기 세포 집단과 비교하여 *ISG15* mRNA의 증가된 발현으로 특징지어지는 중간엽 줄기 세포 집단을 개시한다. 특정 실시양태에서, 본원에서는 유도 배지로 처리된 중간엽 줄기 세포 집단을 포함하는 질환 치료용 조성물로서, 질환은 염증성 또는 자가면역 장애인, 질환 치료용 조성물을 개시한다. 특정 실시양태에서, 염증성 또는 자가면역 장애는 류마티스 관절염이다. 특정 실시양태에서, 염증성 또는 자가면역 장애는 염증성 장 질환이다. 특정 실시양태에서, 염증성 또는 자가면역 장애는 급성 시신경염이다. 특정 실시양태에서, 염증성 또는 자가면역 장애는 크라베병이다. 특정 실시양태에서, 염증성 또는 자가면역 장애는 당뇨 망막병증이다. 특정 실시양태에서, 염증성 또는 자가면역 장애는 크론병이다. 특정 실시양태에서, 염증성 또는 자가면역 장애는 급성 폐 손상이다.

[0006] 특정 실시양태에서, 본원에서는 틀 유사 수용체 4(TLR4) 리간드, 에리트로포이에틴, 및 0.5-2% 산소 또는 저산소 모방제를 포함하는, 자극을 받지 않은 중간엽 줄기 세포 집단으로부터 면역학적으로 분극화된 중간엽 줄기 세포 집단을 생성하기 위한 유도 배지로서, 면역학적으로 분극화된 중간엽 줄기 세포 집단은 염증유발성(pro-inflammatory) 매개인자의 발현으로 특징지어지는 염증유발 특성을 갖는 것인 유도 배지를 개시한다. 특정 실시양태에서, 틀 유사 수용체 4(TLR4) 리간드는 지질다당류(LPS)이다. 특정 실시양태에서, 틀 유사 수용체 4(TLR4) 리간드는 아미노알킬 글루코사미나이드 4-포스페이트이다. 특정 실시양태에서, 에리트로포이에틴은 10 ng/mL 미만인 농도로 존재한다. 특정 실시양태에서, 저산소 모방제는 염화코발트이다. 특정 실시양태에서, 염화코발트는 5 μM 내지 500 μM인 농도로 존재한다. 특정 실시양태에서, 유도 배지는 인터페론을 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 유도 배지는 종양 괴사 인자 알파(TNF α : tumor necrosis factor alpha)를 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 유도 배지는 인간 또는 동물 기원의 혈청을 포함하지 않는다. 특정 실시양태에서, 유도 배지는 농축 용액이다. 특정 실시양태에서, 본원에서는 유도 배지로 처리된 중간엽 줄기 세포 집단을 개시한다. 특정 실시양태에서, 본원에서는 유도 배지로 처리된 인간 중간엽 줄기 세포 집단을 개시한다. 특정 실시양태에서, 본원에서는 유도 배지로 처리된 개, 고양이, 또는 말 중간엽 줄기 세포 집단으로서, 중간엽 줄기 세포는 다능성 줄기 세포로부터 유래된 것인, 중간엽 줄기 세포 집단을 개시한다. 특정 실시양태에서, 본원에서는 유도 배지로 처리된 중간엽 줄기 세포 집단으로서, 세포는 자극을 받지 않은 중간엽 줄기 세포 집단과 비교하여 *TNFSF10(TRAIL)* mRNA의 증가된 발현으로 특징지어지는 중간엽 줄기 세포 집단을 개시한다. 특정 실시양태에서, 본원에서는 유도 배지로 처리된 중간엽 줄기 세포 집단을 포함하는 질환 치료용 조성물로서, 질환이 암인, 질환 치료용 조성물을 개시한다. 특정 실시양태에서, 암은 난소암이다. 특정 실시양태에서, 암은 포도막 흑색종이다. 특정 실시양태에서, 본원에서는 유도 배지로 처리된 중간엽 줄기 세포 집단을 포함하는 질환 치료용 조성물로서, 질환이 바이러스성 병태인, 질환 치료용 조성물을 개시한다. 특정 실시양태에서, 본원에서는 유도 배지로 처리된 중간엽 줄기 세포 집단을 포함하는 질환 치료용 조성물로서, 질환이 박테리아 감염인, 질환 치료용 조성물을 개시한다.

[0007] 특정 실시양태에서, 본원에서는 0.1 μg/mL 내지 100 μg/mL인 농도의 폴리(I:C), 10 ng/mL 미만인 농도의 에리트로포이에틴, 및 5 μM 내지 500 μM인 농도의 염화코발트를 포함하는, 자극을 받지 않은 중간엽 줄기 세포 집단으로부터 면역학적으로 분극화된 중간엽 줄기 세포 집단을 생성하기 위한 유도 배지로서, 면역학적으로 분극화된 중간엽 줄기 세포 집단은 항염증 특성을 가지며, 자극을 받지 않은 중간엽 줄기 세포 집단과 비교하여 *CXCL9*, *OAS1* 및 *ISG15* mRNA의 증가된 발현으로 특징지어지는 유도 배지를 개시한다.

[0008] 특정 실시양태에서, 본원에서는 0.1 ng/mL 내지 1 μg/mL인 농도의 LPS, 10 ng/mL 미만인 농도의 에리트로포이에틴 및 5 μM 내지 500 μM인 농도의 염화코발트를 포함하는, 자극을 받지 않은 중간엽 줄기 세포 집단으로부터 면역학적으로 분극화된 중간엽 줄기 세포 집단을 생성하기 위한 유도 배지로서, 면역학적으로 분극화된 중간엽 줄기 세포 집단은 염증유발 특성을 가지며, 자극을 받지 않은 중간엽 줄기 세포 집단과 비교하여 *TNFSF10(TRAIL)*의 증가된 발현으로 특징지어지는 유도 배지를 개시한다.

[0009] 특정 실시양태에서, 본원에서는 자극을 받지 않은 중간엽 줄기 세포 집단을, 틀 유사 수용체 3(TLR3) 리간드, 에리트로포이에틴, 및 저산소 또는 저산소 모방제를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는, 자극을 받지 않은 중간엽 줄기 세포 집단으로부터 면역학적으로 분극화된 중간엽 줄기 세포 집단은 항염증성 또는 면역억제성 매개인자의 발현으로 특징지어지는 항염증 특성을 갖는 것인, 자극을 받지 않은 중간엽 줄기 세포 집단으로부터 면역학적으로 분극화된 중간엽 줄기 세포 집단을 생성하는 방법을 개시한다. 특정 실시양태에서, TLR3 리간드는 폴리(I:C)이다. 특정 실시양태에

서, TLR3 리간드는 폴리(A:U)이다. 특정 실시양태에서, 에리트로포이에틴은 10 ng/mL 미만인 농도로 존재한다. 특정 실시양태에서, 저산소 모방제는 염화코발트이다. 특정 실시양태에서, 염화코발트는 5 μM 내지 500 μM인 농도로 존재한다. 특정 실시양태에서, 조성물은 인터루킨 4(IL-4)를 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 조성물은 인터루킨 13(IL-13)을 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 조성물은 인간 또는 동물 기원의 혈청을 포함하지 않는다. 특정 실시양태에서, 조성물은 농축 용액이다. 특정 실시양태에서, 자극을 받지 않은 중간엽 줄기 세포 집단은 툴 유사 수용체 3 리간드, 에리트로포이에틴, 및 저산소 또는 저산소 모방제와 동시에 접촉하게 된다. 특정 실시양태에서, 조성물은 적어도 30분, 그러나 8시간 미만 동안 자극을 받지 않은 중간엽 줄기 세포 집단과 접촉하게 된다. 특정 실시양태에서, 본 방법은 CXCL9의 발현을 RNA 또는 단백질 수준에서 모니터링하는 단계를 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 본 방법은 OAS1의 발현을 RNA 또는 단백질 수준에서 모니터링하는 단계를 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 본 방법은 ISG15의 발현을 RNA 또는 단백질 수준에서 모니터링하는 단계를 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 본원에서는 본 방법에 의해 처리된 중간엽 줄기 세포 집단을 제공한다. 특정 실시양태에서, 본원에서는 본 방법에 의해 처리된 개, 고양이 또는 말 중간엽 줄기 세포 집단을 제공한다. 특정 실시양태에서, 본원에서는 본 방법에 의해 처리된 중간엽 줄기 세포 집단으로서, 중간엽 줄기 세포는 다능성 줄기 세포로부터 유래된 것인, 중간엽 줄기 세포 집단을 제공한다. 특정 실시양태에서, 본원에서는 본 방법에 의해 처리된 중간엽 줄기 세포 집단으로서, 세포는 자극을 받지 않은 중간엽 줄기 세포 집단과 비교하여 CXCL9 mRNA의 증가된 발현으로 특징지어지는 중간엽 줄기 세포 집단을 제공한다. 특정 실시양태에서, 본원에서는 본 방법에 의해 처리된 중간엽 줄기 세포 집단으로서, 세포는 자극을 받지 않은 중간엽 줄기 세포 집단과 비교하여 OAS1 mRNA의 증가된 발현으로 특징지어지는 중간엽 줄기 세포 집단을 제공한다. 특정 실시양태에서, 본원에서는 본 방법에 의해 처리된 중간엽 줄기 세포 집단으로서, 세포는 자극을 받지 않은 중간엽 줄기 세포 집단과 비교하여 ISG15 mRNA의 증가된 발현으로 특징지어지는 중간엽 줄기 세포 집단을 제공한다. 특정 실시양태에서, 본원에서는 본 방법에 의해 처리된 중간엽 줄기 세포 집단을 포함하는 질환 치료용 조성물로서, 질환이 염증성 또는 자가면역 장애인, 질환 치료용 조성물을 제공한다. 특정 실시양태에서, 염증성 또는 자가면역 장애는 류마티스 관절염이다. 특정 실시양태에서, 염증성 또는 자가면역 장애는 염증성 장 질환이다. 특정 실시양태에서, 염증성 또는 자가면역 장애는 급성 시신경염이다. 특정 실시양태에서, 염증성 또는 자가면역 장애는 크라베병이다. 특정 실시양태에서, 염증성 또는 자가면역 장애는 당뇨 망막병증이다. 특정 실시양태에서, 염증성 또는 자가면역 장애는 크론병이다. 특정 실시양태에서, 염증성 또는 자가면역 장애는 급성 폐 손상이다.

[0010] 특정 실시양태에서, 본원에서는 자극을 받지 않은 중간엽 줄기 세포 집단을, 툴 유사 수용체 4(TLR4) 리간드, 에리트로포이에틴, 및 저산소 또는 저산소 모방제를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는, 자극을 받지 않은 중간엽 줄기 세포 집단으로부터 면역학적으로 분극화된 중간엽 줄기 세포 집단을 생성하는 방법으로서, 면역학적으로 분극화된 중간엽 줄기 세포 집단은 염증유발성 또는 면역억제성 매개인자의 발현으로 특징지어지는 염증유발 특성을 갖는 것인, 자극을 받지 않은 중간엽 줄기 세포 집단으로부터 면역학적으로 분극화된 중간엽 줄기 세포 집단을 생성하는 방법을 개시한다. 특정 실시양태에서, TLR4 리간드는 지질다당류(LPS)이다. 특정 실시양태에서, TLR4 리간드는 아미노알킬 글루코사미나이드 4-포스페이트이다. 특정 실시양태에서, 에리트로포이에틴은 1 ng/mL인 농도로 존재한다. 특정 실시양태에서, 저산소 모방제는 염화코발트이다. 특정 실시양태에서, 염화코발트는 5 μM 내지 500 μM인 농도로 존재한다. 특정 실시양태에서, 조성물은 인터페론을 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 조성물은 종양 괴사 인자 알파(TNF α)를 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 조성물은 인간 또는 동물 기원의 혈청을 포함하지 않는다. 특정 실시양태에서, 조성물은 농축 용액이다. 특정 실시양태에서, 자극을 받지 않은 중간엽 줄기 세포 집단은 툴 유사 수용체 4 리간드, 에리트로포이에틴, 및 저산소 또는 저산소 모방제와 동시에 접촉하게 된다. 특정 실시양태에서, 조성물은 적어도 30분, 그러나 8시간 미만 동안 자극을 받지 않은 중간엽 줄기 세포 집단과 접촉하게 된다. 특정 실시양태에서, 본 방법은 TNFSF10(TRAIL)의 발현을 RNA 또는 단백질 수준에서 모니터링하는 단계를 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 본원에서는 본 방법에 의해 처리된 중간엽 줄기 세포 집단을 제공한다. 특정 실시양태에서, 본원에서는 본 방법에 의해 처리된 인간 중간엽 줄기 세포 집단을 제공한다. 특정 실시양태에서, 본원에서는 본 방법에 의해 처리된 개, 고양이 또는 말 중간엽 줄기 세포 집단을 제공한다. 특정 실시양태에서, 본원에서는 본 방법에 의해 처리된 중간엽 줄기 세포 집단으로서, 중간엽 줄기 세포는 다능성 줄기 세포로부터 유래된 것인, 중간엽 줄기 세포 집단을 제공한다. 특정 실시양태에서, 본원에서는 본 방법에 의해 처리된 중간엽 줄기 세포 집단과 비교하여 TNFSF10(TRAIL) mRNA의 증가된 발현으로 특징지어지는 중간엽 줄기 세포 집단을 제공한다. 특정 실시양태에서, 본원에서는 본 방법에 의해 처리된 중간엽 줄기 세포 집단을 포함하는 질환 치료용 조성물로서, 질환이 암인, 질환 치료용 조성물을 제공한다. 특정

실시양태에서, 암은 난소암이다. 특정 실시양태에서, 암은 포도막 흑색종이다. 특정 실시양태에서, 본원에서는 본 방법에 의해 처리된 중간엽 줄기 세포 집단을 포함하는 질환 치료용 조성물로서, 질환이 바이러스성 병태인, 질환 치료용 조성물을 제공한다. 특정 실시양태에서, 본원에서는 본 방법에 의해 처리된 중간엽 줄기 세포 집단을 포함하는 질환 치료용 조성물로서, 질환이 박테리아 감염인, 질환 치료용 조성물을 제공한다.

[0011] 본 발명의 유용성

[0012] 다양한 성인 조직으로부터 유래된 MSC(줄기 세포, 중간엽 줄기 세포, 골수 기질 세포, 다분화성 기질 세포, 다분화성 줄기 세포)의 균일한 집단을 유도, 활성화, 또는 프라이밍하기 위한 개선된 치료 방법 및 개선된 세포 배양 방법 및 배지가 요구되고 있다. MSC의 임상적 적용은 적합한 품질의 세포를 적절한 개수로 제공하고, 일관된 치료학적 이점을 제공하는, 재현가능한 세포 배양 방법 및 세포 확장 방법을 요구한다. 상이한 배양 배지 및 방법은 다양한 정도로 성공을 거두어 왔다. 안전하고, 일관되게 재현가능한 치료학적 효과를 가지는, 세포 기반 요법에서 사용되는 프라이밍된, 활성화된, 또는 유도된 세포의 수율을 확실하게 확장시킬 수 있는 MSC 배양 배지 및 방법에 대한 추가 개선이 여전히 요구되고 있다.

[0013] 유도되지 않은 종래 MSC 대비의 유도된, 활성화된, 또는 프라이밍된 MSC의 효능 또는 치료학적 이점은 임상전 질환 모델에서 입증되었다. 항염증성 유도 MSC 요법은 아픈 당뇨성 말초 신경병증, 류마티스 관절염, 염증성 장질환, 및 급성 폐 손상 모델에서 종래 MSC 요법에 비하여 유의적으로 개선된 방식으로 통증 및 염증을 경감시켰다. 추가로, 항염증성 유도 MSC 요법은 임상전 다발성 경화증(EAE) 및 크라베병 모델에서 임상 접수, 보행, 및 운동 기능을 개선시켰다. 뮤린 면역 적격 난소암 모델에서, 염증 유발 항종양 유도 MSC 세포 기반 면역요법은 종양 성장 및 확장을 약화시킨 반면, 종래 MSC 요법은 종양 성장 및 확장을 촉진시켰다.

[0014] 본 발명의 과학적 근거

[0015] 특정 틀 유사 수용체(TLR)의 자극은 MSC의 면역 조정 반응에 영향을 미친다. 틀 유사 수용체는 "위험" 신호를 인식하고, 그의 활성화는 선천 및 적응 숙주 면역 세포를 동원하는 심오한 세포 및 전신 반응을 유도한다. TLR을 일으키는 위험 신호는 대부분의 조직 병리 이후에 방출된다. 위험 신호는 면역 세포를 손상 부위로 동원하기 때문에, 본 발명자들은 MSC도 유사한 방식으로 동원될 수 있을 것으로 추론하였다. 본 발명자들은 MSC가 수개의 TLR(예컨대, 당업계에 공지된, TLR3 및 TLR4)을 발현하고, 그의 이동, 침윤, 및 면역 조정 인자 분비가 특이 TLR-효능제 체결에 의해 크게 영향을 받는다는 것을 관찰하게 되었다. 특히, 본 발명자들은 저수준의 단기간의 TLR-프라이밍 프로토콜에 의해, TLR4와 비교하여 TLR3 자극 이후에 MSC에 대한 다양한 결과를 관찰하게 되었다. 이러한 관찰 결과에 기초하여, 본 발명자들은 단핵구에 관한 문헌으로부터 그의 실마리를 얻은 MSC에 대한 새로운 패러다임을 제안하였다. 구체적으로, 상기 MSC는 MSC1 및 MSC2로 분류되는, 균일하게 작용하는 두 표현형으로 진행되는 하류의 TLR 신호전달에 의해 분극화될 수 있다(유도, 활성화 또는 프라이밍될 수 있다). TLR4 프라이밍된 MSC, 또는 MSC1은 대체로 면역유발 염증성 매개인자를 발현하는 반면, TLR3 프라이밍된 MSC, 또는 MSC2는 대체로 항염증성 또는 면역억제성 매개인자를 발현한다. 추가로, 본 발명자들은 말초 혈액 단핵구 세포(PBMC: peripheral blood mononuclear cell)와 함께 TLR 프라이밍된 MSC를 동종이계(비자기) 방식으로 공동 배양하면, 예측컨대, MSC2 공동 배양 후, T 립프구 활성화는 억제되고, MSC1과의 공동 배양에서는 T 립프구 활성화가 허용된다는 것을 입증하였다. TLR4 활성화에 의한 면역유발 MSC1 표현형으로의, 또는 TLR3 활성화에 의한 항염증성 MSC2 표현형으로의 MSC의 유도는 세포 기반 요법 적용에서 사용하기 위한 정의되고, 예측가능한 세포를 제공함으로써 산업상의 장애를 해결할 수 있는 균일하고, 정의된 세포를 보장한다.

[0016] EPO로도 알려져 있는 에리트로포이에틴은 적혈구생성, 또는 적혈구 세포 생산을 제어하는 당단백질 호르몬이다. 이는 골수에서 적혈구(적혈구 세포) 전구체에 대한 사이토카인 또는 세포 신호전달 분자이다. 인간 EPO의 분자량은 34 kDa이고, 이는 또한 혜마토포이에틴 또는 혜모포이에틴으로도 불린다. EPO는 요세관주위 모세혈관 및 관상 상피 세관과 밀접하게 연관된 신장 중 간질 섬유아세포에 의해 및 간에서 동모양 혈관 주위 세포에서 생산된다. 간 생산은 발생 중 조기(태아 및 출생전후기)에서 두드러지게 나타나는 반면, 신장은 성인에서의 주된 EPO 생산 부위이다. 적혈구생성 이외에도, 에리트로포이에틴은 또한 다른 생물학적 기능에 대해서도 공지되어 있다. 예를 들어, 이는 생존유발 항아폽토시스(프로그램화된 세포 사멸) 신호를 제공함으로써 뉴런 손상에 대한 뇌 반응에서 중요한 역할을 한다. EPO는 또한 상처 치유 과정에도 관여하다. 합성 에리트로포이에틴은 또한 세포 배양에서 재조합 DNA 기술에 의해 제조된다. 추가로, 수개의 상이한 약학 EPO 유사 작용제는 다양한 글리코실화 패턴으로 이용가능하고, 이는 총칭하여 적혈구생성 자극제(ESA: erythropoiesis-stimulating agent)로 불린다. EPO는 미성숙 세포 사멸을 예방하고, 세포 기반 요법에서 사용되는, 생산된 프라이밍된, 활성화된 또는 유도된 세포의 생존 기간을 연장시키는 수단으로서 본 발명에서 사용된다.

[0017]

일관된 산소 공급은 생존, 증식, 분화 및 이동을 비롯한, 세포 생물학상 중요한 모든 측면에 영향을 주는 중요한 인자이다. 전형적으로, (줄기 세포가 아닌) 포유동물 세포는 강력한 에너지 생산을 유지하기 위해, 및 정상적인 세포 기능 및 세포 생존을 보존하기 위해 일관된 산소 공급을 요구한다. 그에 반해, 포유동물의 줄기 세포는 골수의 저산소 환경(산소 분압 범위 0.5% 내지 7%)에서 번성하고, 지속되는 것으로 보인다. 여러 연구를 통해 저산소 환경은 골수에서의 줄기 세포의 증식 및 자기 재생 능력을 유지하는 데 필요한 것으로 밝혀졌다. 특히, 심지어 단기간의 MSC 배양 후에도 감소된 산소 분압이 미치는 효과는 세포 기반 요법에서 그의 생착 능력을 개선시키는 일반 방법으로 기술되었다. 저산소 환경은 세포 기반 요법에서 사용되는, 생산된 프라이밍된, 활성화된 또는 유도된 세포의 자기 재생 및 증식 잠재능을 유지시키는 수단으로서 본 발명에서 사용된다.

[0018]

정의 및 바람직한 값

[0019]

확실한 이해를 위해, 여기서, 및 필요할 경우, 본 명세서 전역에 걸쳐서도 또한 용어를 정의하고, 바람직한 값을 언급한다.

[0020]

"암"이라는 용어는 세포 한 부분에서의 제어되지 않은 세포 분열에 의해 유발되는 임의 질환을 의미한다. 암은 유전적, 환경적, 또는 화학론적 메커니즘에 의해 유발되는 백혈병, 림프종, 흑색종, 암종, 육종, 선종 또는 임의의 다른 악성 종양 또는 신생물을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0021]

"줄기 세포"라는 용어는 다중의 상이한 세포 유형을 일으킬 수 있는 세포를 의미한다. "중간엽 줄기 세포" 또는 "MSC"라는 용어는 원래 중간엽으로부터 유래된 줄기 세포를 의미한다. 상기 용어는 골아세포, 연골세포, 지방세포, 또는 근육세포 중 적어도 2개 이상의 것으로 분화될 수 있는 세포를 지칭한다. MSC는 임의 유형의 성인 조직으로부터 단리될 수 있다. 전형적으로, MSC는 골수, 지방 조직, 제대, 또는 말초 혈액으로부터 단리된다. 본 발명의 바람직한 측면에서, MSC는 골수, 또는 그 자체가 지방 조직으로부터 수득된 것인 지질 흡인물로부터 수득된다.

[0022]

"다분화성"이라는 용어 및 "다능성"이라는 대체 용어는 상이한 조직 계열의 다중의 세포 유형을 일으킬 수 있는 세포를 의미한다. "다분화성" 또는 "다능성"이라는 용어 또한 유도된 다분화성 줄기 세포 또는 유도된 다능성 줄기 세포, 또는 임의의 화학적 또는 유전적 수단을 사용하여 다능성 단계로 유도된 세포를 의미한다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 다분화성 또는 다능성 줄기 세포는 중간엽 줄기 세포이다.

[0023]

본 개시내용의 세포는 인간, 영장류, 개, 고양이, 말, 소, 염소, 양, 및 돼지를 비롯한, 임의의 포유동물 종의 임의 세포로부터 유래된 것이다. 세포는 1차 세포 또는 불멸화 세포주일 수 있다.

[0024]

"세포 요법" 또는 "세포 기반 요법"이라는 용어는 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 손상된 조직 또는 기관(장기)의 대체 또는 수복, 면역 반응의 조정, 및 염증성 증상 및 암 감소와 같이, 질환 또는 장애와 연관된 하나 이상의 증상을 예방, 치료, 또는 호전시키기 위해 인간 또는 동물 세포를 이식하는 것을 의미한다.

[0025]

"피험체"라는 용어는 동물, 바람직하게, 비영장류(예컨대, 소, 돼지, 말, 고양이, 개, 래트 또는 마우스) 또는 영장류(예컨대, 원숭이 또는 인간)를 비롯한 포유동물을 지칭한다. 바람직한 실시양태에서, 피험체는 인간이다.

[0026]

환자 또는 피험체와 관련하여 직접적으로 사용될 때, "치료하다", "치료" 및 "치료하는"이라는 용어는 임의의 암, 임의의 종양 또는 신생물, 염증성 장애, 자가면역 질환 또는 이식된 기관 및 조직의 거부를 비롯한 면역학적으로 매개된 질환을 포함하나, 이에 제한되지 않는 장애와 연관된 하나 이상의 증상을 호전시키는 것을 의미하며, 여기서, 호전은 본 발명에 의해 수득된 면역조절 세포, 또는 면역조절 세포를 포함하는 약학 조성물을 상기 치료를 필요로 하는 피험체에게 투여함으로써 이루어진다.

[0027]

"자극을 받지 않은"이라는 용어는 세포 집단이 본 개시내용의 방법에 의해 처리되지 않았거나, 분극화되지 않았거나, 또는 유도되지 않은 것을 의미한다. 신선한 또는 냉동된, 단리된 1차 중간엽 줄기 세포는 자극을 받지 않은 것으로 간주된다. 툴 유사 수용체 리간드, 에리트로포이에틴, 저산소 또는 저산소 모방제 중 적어도 하나가 부족한 복합물 또는 조성물로 사전에 처리된 세포는 자극을 받지 않은 것으로 간주된다.

[0028]

"수복하다" 및 "수복하는"이라는 용어는 손상된 조직과 관련하여 직접적으로 사용될 때, 예컨대, 손상된 조직을 재생시키는 것과 같이, 직접적인 메커니즘에 의해 뿐만 아니라, 예컨대, 염증을 감소시켜 조직이 형성될 수 있도록 하는 것과 같이, 간접적인 메커니즘을 통해, 이 둘 모두에 의하여 상기 손상을 호전시키는 것을 의미한다.

[0029]

"동종이계"란, 같은 종의 다른 개체로부터인 것을 의미한다. 개체가 하나 이상의 유전자좌에서 다른 유전자를 가질 때, 이를 동종이계라고 한다. 대조적으로, "자기 유래"라는 것은 같은 개체로부터의 것을 의미한다.

- [0030] "면역 질환"이라는 용어는 피험체의 면역학적 반응에 의해 유발되는 세포, 조직, 및/또는 기관 손상을 특징으로 하는 피험체의 병태를 의미한다.
- [0031] "자가면역 장애"라는 용어는 그 자신의 세포, 조직, 및/또는 기관에 대한 피험체의 면역학적 반응에 의해 유발되는 세포, 조직, 및/또는 기관 손상을 특징으로 하는 피험체의 병태를 의미한다. 본 발명에 의해 수득된 면역 조절 세포로 치료될 수 있는 자가면역 질환의 예시적인, 비제한적인 예로는 원형탈모증, 강직성 척추염, 항인지 질 증후군, 자가면역 애디슨병, 부신 자가면역 질환, 자가면역 용혈성 빈혈, 자가면역 간염, 자가면역 난소염 및 고환염, 자가면역 혈소판감소증, 베체트병, 수포성 유사천포창, 심근증, 복강 스프루우 피부염, 만성 피로 면역 부전 증후군(CFIDS: chronic fatigue immune dysfunction syndrome), 만성 염증성 탈수초성 다발성 신경 병증, 척-스트라우스 증후군(Churg-Strauss syndrome), 반흔성 유사천포창, CREST 증후군, 한랭 응집소 질환, 원판성 루푸스, 본태성 혼합형 한랭글로불린혈증, 섬유근육통-섬유근염, 사구체신염, 그레이브스병, 길랑-바레, 하시모토 갑상선염, 특발성 폐 섬유증, 특발성 혈소판감소증 자반증(ITP: idiopathic thrombocytopenia purpura), IgA 신경병증, 연소성 관절염, 편평 태선, 메니에르병, 혼합형 결합 조직 질환, 다발성 경화증, 1형 또는 면역 매개 당뇨병, 중증 근무력증, 심상성 천포창, 악성 빈혈, 결절성 다발동맥염, 다발연골염, 다선성 증후군, 류마티스성 다발성근통증, 다발근육염 및 피부근염, 원발성 무감마글로불린혈증, 원발성 쓸개판 간경화증, 건선, 건선성 관절염, 레이노 현상, 라이터 증후군, 사르코이드증, 피부경화증, 진행성 전신 경화증, 쇼그렌 증후군, 굿파스튜어 증후군, 강직 인간 증후군, 전신 홍반성 루프스, 홍반성 루프스, 타카야수 동맥염, 측두 동맥염/거대 세포 동맥염, 케양성 대장염, 포도막염, 혈관염, 예컨대, 피부염 포진형 혈관염, 백반증, 베게너 육아종증, 항사구체 기저막 질환, 항인지질 증후군, 중추계의 자가면역 질환, 가족성 지중해열, 램버트 이튼 근무력 증후군, 교감성 안염, 다발성 내분비병증, 건선 등을 포함한다.
- [0032] "면역 장애"로는 자가면역 질환 및 면역학적으로 매개된 염증성 질환을 포함한다.
- [0033] "면역 매개된 염증성 질환"이란, 정상적인 면역 반응의 조절장애로부터 발생되거나, 그와 연관되어 있거나, 또는 그에 의해 유발된 만성 또는 급성 염증을 특징으로 하는 임의의 질환을 의미하며; 예컨대, 크론병, 1형 당뇨병, 류마티스 관절염, 염증성 장 질환, 건선, 건선성 관절염, 강직성 척추염, 전신 홍반성 루프스, 하시모토 질환, 이식편 대 숙주 질환, 쇼그렌 증후군, 악성 빈혈, 애디슨병, 피부경화증, 굿파스튜어 증후군, 케양성 대장염, 자가면역 용혈성 빈혈, 불임, 중증 근무력증, 다발성 경화증, 바제도병, 혈소판감소 자반증, 길랑-바레 증후군, 알레르기, 천식, 아토피 질환, 동맥경화증, 심근염, 심근증, 사구체 신염, 저형성 빈혈, 및 장기 이식 후 거부가 있다.
- [0034] "면역조절"이라는 용어는 면역계의 하나 이상의 생물학적 활성을 변형, 증폭, 억제 또는 감소시키는 것을 의미하며, 이는 면역 반응의 하향조절, 면역 반응의 증대, 및 사이토카인 프로필, 세포독성 활성 및 항체 생산 변화에 의해 매개되는 염증성 상태의 변화 및 면역 및 면역 관련 세포에 미치는 이들의 효과를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0035] "염증성 장애"라는 용어는 예컨대, 만성 염증과 같은 염증을 특징으로 하는 피험체의 병태를 의미한다. 염증성 장애의 예시적인, 비제한적인 예로는 급성 시신경염, 당뇨성 신경병증, 크라베병, 급성 폐 손상, 크론병 셀리악 병, 류마티스 관절염(RA: rheumatoid arthritis), 염증성 장 질환(IBD: inflammatory bowel disease), 천식, 뇌염, 만성 폐쇄성 폐 질환(COPD: chronic obstructive pulmonary disease), 염증성 골용해, 알레르기성 장애, 패혈성 쇼크, 폐 섬유증(예컨대, 특발성 폐 섬유증), 염증성 혈관염(예컨대, 결절성 다발동맥염, 베게너 육아종증, 타카야수 동맥염, 측두 동맥염, 및 림프종양 육아종증), 외상성 혈관 혈관성형술 후의 것(예컨대, 혈관성형술 후 재협착), 미분화성 척추관절병증, 미분화성 관절증, 관절염, 염증성 골용해, 만성 간염, 및 만성 바이러스 또는 박테리아 감염으로부터 발생된 만성 염증을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0036] "바이러스성 병태"라는 용어는 바이러스에 의해 유발된 임의의 질환을 의미한다. 적합한 질환으로는 인플루엔자, 아데노바이러스 감염, 호흡기 세포융합 질환, 리노바이러스 감염, 단순 헤르페스, 수두(바리셀라), 홍역(루베올라), 풍진(루벨라), 볼거리(유행성 이하선염), 두창(천연두), 가와사키 질환, 황열, 뎅기열, 간염 A, 간염 B, NANB 간염, 바이러스성 위장염, 바이러스성 열, 거대세포바이러스 질환, AIDS(HIV), 광견병, 소아마비, 에볼라 바이러스, 출혈열, 앱스타인바, 및 상기 질환 중 임의의 것을 유발하는 바이러스에 의해 유발되는 암을 비롯한 질환을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0037] "박테리아 감염"이라는 용어는 백일해, 나병, 결핵, 독성 쇼크 증후군, 식중독, 살모넬라, *E. coli* 중독, 스타필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 클로스트리디움 디피실례(*Clostridium difficile*), 패혈증, 라임병, 콜레라, 이질 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는, 의학상 관련된 박테리아에 의

해 유발된 임의의 감염을 의미한다.

[0038] "단리된 세포 집단"이란, 생체내에서 또는 시험관내에서 세포 집단과 일반적으로 회합되어 있는 하나 이상의 다른 세포 집단을 실질적으로 함유하지 않는, 인간 또는 동물 신체로부터 단리된 세포 집단을 의미한다.

[0039] "리간드 유도인자"라는 용어는 상기 리간드 생산을 증가시키는 작용제 또는 작용제들을 의미한다. 틀 유사 수용체(TLR) 리간드에 대한 리간드 유도인자는 TLR 리간드를 증가시킬 것이며, 그러므로, 이는 본질적으로는 TLR 리간드 그 자체와 동가인 것이다.

[0040] "MHC"(주조직적합성 복합체: major histocompatibility complex)라는 용어는 세포 표면 항원 제시 단백질을 코딩하는 유전자의 서브세트를 지칭한다. 인간에서, 상기 유전자는 인간 백혈구 항원(HLA: human leukocyte antigen) 유전자로 지칭된다. 약어 MHC 또는 HLA는 상호교환적으로 사용된다.

[0041] "세포 집단"이라는 용어는 1개 초과의 임의 개수의 세포를 의미하지만, 적어도 1×10^3 개의 세포, 적어도 1×10^4 개의 세포, 적어도 1×10^5 개의 세포, 적어도 1×10^6 개의 세포, 적어도 1×10^7 개의 세포, 적어도 1×10^8 개의 세포, 또는 적어도 1×10^9 개의 세포 또는 그 초과의 세포이다. 세포 집단은 또한 생물 반응기에서 또는 다량의 세포를 배양하기 위한 목적의 다른 산업적 방법으로 성장시킨 배치 형성물(batch formation) 중의 세포를 지칭한다.

[0042] 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 초기 세포 집단에서 50% 이상, 55% 이상, 60% 이상, 65% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상 또는 95% 이상의 줄기 세포(세포 개수 %)는 미분화된 MSC일 것이다.

[0043] 세포 표면 마커에 관하여 사용될 때, "유의적인 발현"이라는 용어 또는 그의 등가 용어인 "양성" 및 "+"는 세포 집단에서, 20% 초과, 바람직하게, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, 또는 심지어는 100% 초과의 세포가 세포 표면 마커를 발현한다는 것을 의미한다.

[0044] 세포 표면 마커의 발현은 예를 들어, 종래 방법 및 장치(예를 들어, 상업적으로 이용가능한 항체와 함께 사용되는 베크만 쿨터 에픽스(BECKMAN COULTER EPICS) XL FACS 시스템 및 당업계에 공지된 표준 프로토콜)를 사용하여 특정 세포 표면 마커에 대한 유세포 분석법에 의해 측정될 수 있으며, 이는 종래 방법 및 장치를 사용하였을 때, 유세포 분석법에서 특정 세포 표면 마커에 대하여 배경 신호보다 큰 신호를 보이는 것에 대하여 측정될 수 있다. 배경 신호란, 종래 FACS 분석에서 각 표면 마커를 검출하기 위해 사용되는 특정 항체와 동일한 이소형의 비특이 항체에 의해 주어지는 신호 강도인 것으로 정의된다. 양성인 것으로 간주되는 마커의 경우, 관찰되는 특정 신호는 종래 방법 및 장치를 사용하였을 때, 배경 신호 강도보다 20% 더 강하고, 바람직하게, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 500%, 1,000%, 5,000%, 10,000% 또는 그 초과로 더 강하다. 추가로, 상기 세포 표면 마커(예컨대, 세포 수용체 및 막횡단 단백질)에 대한, 상업적으로 이용가능하고, 공지된, 단일클론 항체가 관련 세포를 확인하는 데 사용될 수 있다.

[0045] mRNA 발현은 유전자 발현 어레이(유전자 칩), mRNA-SEQ, 노던 블롯, 또는 중합효소 연쇄 반응(PCR: polymerase chain reaction)(역전사 효소를 사용하는 것을 포함하는 정량적 PCR(qPCR: quantitative PCR) 방법을 포함)을 포함하나, 이에 제한되지 않는, 임의의 적합한 기술에 의해 측정된다. QPCR 방법으로는 프로브 기반 정량화, 예컨대, 택맨(TaqMan)®; 염료 기반 정량화, 예컨대, SYBR 그린; 디지털 PCR을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. qPCR 방법은 절대 정량화 방법, 또는 하우스키핑 유전자, 예컨대, 액틴, GAPDH, 또는 리보솜 서브유니트에의 정규화가 필요한 상대적 정량화 방법을 사용하는 것일 수 있다.

인용에 의한 포함

[0047] 본 명세서에서 언급된 모든 공개 문헌, 특히, 및 특허 출원은 각 개별 공개 문헌, 특허, 및 특허 출원이 구체적으로 및 개별적으로 인용에 의해 포함되는 것과 같은 정도로 본원에서 인용에 의해 포함된다.

도면의 간단한 설명

[0048] 도 1은 TLR3 리간드 폴리(I:C)를 사용하여 항염증 특성을 가지고 있는 분극화된 MSC로부터 PCR 어레이를 사용하여 생성된 유전자 발현 데이터를 보여주는 것이다. 회색은 유전자 발현이 2배 이상 유도된 것을 나타내고; 검은 색은 유전자 발현이 2배 감소된 것을 나타내고; 두꺼운 상자로 표시된 것은 2배 초과로 상향조절되었고, 도 2에서의 추가 확인을 위해 선택된 유전자(단, 2배 이상 만큼 감소된 PIAS2는 제외)를 나타낸다.

도 2는 qPCR을 사용하여 도 1의 실험으로부터 선택된 유전자를 확인하는 것을 보여주는 것이다. 오차 막대는 SEM을 나타낸다.

도 3은 TLR4 리간드(MSC1), 또는 TLR4 리간드 + EPO 및 염화코발트(MSC1*) 처리 후의 MSC 세포에서의 IL-6 및 IL-8 분비 유도를 보여주는 것이다.

도 4는 TLR3 리간드(MSC2), 또는 TLR3 리간드 + EPO 및 염화코발트(MSC2*) 처리 후의 MSC 세포에서의 CCL5 및 CXCL10 분비 유도를 보여주는 것이다.

도 5는 TLR4 리간드(* 표시가 없는 것), 또는 TLR4 리간드 + EPO 및 염화코발트(* 표시가 있는 것) 처리 후의, 다른 인간 기증자로부터의 MSC 세포에서의 TNFSF10(TRAIL) 발현에 의한, MSC1 표현형 유도를 보여주는 것이다.

도 6은 TLR3 리간드(* 표시가 없는 것), 또는 TLR3 리간드 + EPO 및 염화코발트(* 표시가 있는 것) 처리 후의, 다른 인간 기증자로부터의 MSC 세포에서의 CXCL9 발현에 의한, MSC2 표현형 유도를 보여주는 것이다.

도 7은 TLR4 리간드(MSC1), 또는 TLR4 리간드 + EPO 및 염화코발트(MSC1*) 처리 후의, 시간 경과에 따른 MSC로부터의 MSC 세포에서의 TNFSF10(TRAIL) 발현 유도를 보여주는 것이다.

도 8은 TLR3 리간드(MSC2), 또는 TLR3 리간드 + EPO 및 염화코발트(MSC2*) 처리 후의, 시간 경과에 따른 MSC로부터의 MSC 세포에서의 CXCL9 발현 유도를 보여주는 것이다.

도 9는 TLR4 리간드(MSC1), TLR4 리간드 + EPO 및 염화코발트(MSC1*), TLR3 리간드(MSC2), 및 TLR3 리간드 + EPO 및 염화코발트(MSC2*)로 자극을 받은 MSC와 비교하여 자극을 받지 않은 MSC(음성 대조군)에 대한 트랜스웰 이동 검정법을 보여주는 것이다. 오차 막대는 SEM을 나타낸다.

도 10은 TLR4 리간드(MSC1), TLR4 리간드 + EPO 및 염화코발트(MSC1*), TLR3 리간드(MSC2), 및 TLR3 리간드 + EPO 및 염화코발트(MSC2*)로 자극을 받은 MSC와 비교하여 자극을 받지 않은 MSC(음성 대조군)에 대한 세포 증식 / 생존능 검정법을 보여주는 것이다. 오차 막대는 SEM을 나타낸다.

도 11은 TNFSF10(TRAIL) 발현을 측정하는 qPCR 검정법 확인을 나타낸 것으로: 이는 TNFSF10(TRAIL) 프라이머 PCR 증폭 생성물의 아가로스 겔을 보여주는 것이다.

도 12(A)는 MSC2로 분극화된 MSC에서의 시간 경과에 따른 CXCL9 발현을 보여주는 것이고; (B)는 CXCL9 프라이머 PCR 증폭 생성물의 아가로스 겔을 보여주는 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0049]

본 발명의 상세한 설명

[0050]

본 발명의 실시는 본 발명, 그 자체를 제외한, 세포 배양, 분자 생물학, 및 미생물학 분야의 종래 기술을 사용하며, 이는 당업자의 기술 범위 내에 포함되어 있다.

[0051]

본 발명은 당업계에 공지 및 본원에 기술된 세포 배양 배지의 추가의 표준 성분과 함께, 에리트로포이에틴(EPO)과 조합하여 및 저산소 또는 저산소 모방제에의 노출과 함께 틀 유사 수용체(TLR) 리간드 또는 TLR 리간드 유도인자를 포함하는, 중간엽 줄기 세포 집단을 위한 유도, 활성화, 분극화 또는 프라이밍용 배양 유도 배지를 제공한다.

[0052]

본 발명은 또한 다른 혈관 배양 배지에 첨가될 수 있는, 에리트로포이에틴(EPO)과 조합하여 및 저산소 또는 저산소 모방제에의 노출과 함께, 틀 유사 수용체(TLR) 리간드 또는 TLR 리간드 유도인자를 포함하는 배양 배지 유도 보충물을 제공한다. 특정 환경을 위해서는 특이 성분 또는 다른 성분의 농도가 적절할 경우, 상기 보충물을 적절할 수 있다.

[0053]

본 발명은 또한 본 발명의 배양 유도 배지 또는 배양 배지 유도 보충물을 함유하는 허메티컬리 실드 배양 베슬(용기)을 제공한다.

[0054]

본 발명은 또한 (a) 배양 배지를 수득하는 단계; 및 (b) 에리트로포이에틴(EPO)과 조합하여 및 저산소 또는 저산소 모방제에의 노출과 함께, 틀 유사 수용체(TLR) 리간드 또는 TLR 리간드 유도인자를 배양 배지에 첨가하는 단계를 포함하는, 본원에 개시된 바와 같은 배양 유도 배지를 제조하는 방법을 제공한다.

[0055]

본 발명은 또한 (a) 본 발명에 따른 배양 배지; 및 (b) 줄기 세포를 포함하는 조성물을 제공한다.

- [0056] 본 발명은 또한 (a) 본 발명에 따른 배양 배지; 및 (b) 고체 표면을 함유하는 조성물을 제공한다. 특정 실시 양태에서, 고체 표면은 2D 세포 배양에서 사용하기 위한 임의 크기의 조직 배양 플레이트, 플라스크 및 병을 비롯한, 임의의 조직 배양 적합성 표면이다. 특정 실시양태에서, 고체 표면은 마이크로캐리어 또는 3D 배양에서 사용되는 세포용의 임의의 다른 지지체 매트릭스이다.
- [0057] 본 발명은 또한 중간엽 줄기 세포 집단을 유도, 활성화, 또는 프라이밍하기 위한 본 발명의 배양 배지의 용도를 제공한다.
- [0058] 본 발명은 또한 (a) 중간엽 줄기 세포 집단을 제공하는 단계; (b) 본 발명의 배양 배지를 제공하는 단계; (c) 줄기 세포를 배양 배지와 접촉시키는 단계; 및 (d) 적절한 조건하에서 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 중간엽 줄기 세포 집단을 유도, 활성화, 또는 프라이밍시키는 생체외 방법을 제공한다.
- [0059] 한 측면에서, 본 발명은 세포 요법용 약제의 제조에서 에리트로포이에틴과 조합하여 및 저산소 또는 저산소 모 방제에의 노출과 함께, 사용되는 틀 유사 수용체(TLR) 리간드 또는 TLR 리간드 유도인자의 용도를 제공한다. 따라서, 한 실시양태에서, 본 발명은 또한, (a) 중간엽 줄기 세포 집단을 제공하는 단계; (b) 본 발명의 배양 배지를 제공하는 단계; (c) 줄기 세포를 배양 배지와 접촉시키는 단계; 및 (d) 적절한 조건하에서 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 세포 요법용 약제를 제조하는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 세포 요법용 약제의 제조를 위한, (a) 본 발명에 따른 배양 배지; 및 (b) 줄기 세포를 포함하는 조성물의 용도를 제공한다. 본 발명은 또한 세포 요법용 약제의 제조를 위한, (a) 본 발명에 따른 배양 배지; 및 (b) 고체 표면을 포함하는 조성물의 용도를 제공한다.
- [0060] 상기 약제는 손상된 조직, 또는 염증성 및/또는 면역 장애, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 자가면역 질환, 염증성 장애, 및 이식된 기관 및 조직의 거부 및 암을 비롯한 면역학적으로 매개된 질환과 연관된 하나 이상의 증상의 치료, 수복, 예방, 및/또는 호전에서 유용하다. 본 발명의 세포 요법용 약제는 예방학상 또는 치료학상 유효량의 줄기 세포 및 약학 담체를 포함한다. 중간엽 기원의 줄기 세포가 특히 바람직하다. 이를 각 세포 유형에 대한 투여량 및 투여 요법에 대한 예는 당업계에 공지되어 있다. 적합한 약학 담체는 당업계에 공지되어 있고, 바람직하게는 미 연방 정부 또는 주 정부의 규제 기관의 승인을 받았거나, 또는 동물용으로, 및 더욱 특히 인간용으로 미국 약전 또는 유럽 약전, 또는 일반적으로 인정되는 다른 약전에 열거되어 있는 것이다. "담체"라는 용어는 치료제와 함께 투여되는 희석제, 애주번트, 부형제, 또는 비허클을 지칭한다. 원하는 경우, 조성물은 소량의 pH 완충화제를 함유할 수 있다. 적합한 약학 담체의 예는 문헌 ["Remington's Pharmaceutical Sciences" by E W Martin]에 기술되어 있다. 상기 조성물은 피험체에게 투여에 적절한 형태로 제공하기 위하여 적합한 양의 담체와 함께 바람직하게는 정제된 형태의 예방제 또는 치료제를 예방학상 또는 치료학상 유효량으로 함유할 것이다. 제제는 투여 모드에 적합한 것이어야 한다. 바람직한 실시양태에서, 약제는 멸균성이고, 피험체, 바람직하게, 동물 피험체, 더욱 바람직하게, 포유동물 피험체, 및 가장 바람직하게, 인간 피험체에게 투여하는 데 적합한 형태이다.
- [0061] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 방법, 세포 및 유도 배지는 급성 통증 또는 만성 통증 치료를 위한 것이다. 특정 실시양태에서, 통증은 특정 진단과 연관이 없는 것이다. 특정 실시양태에서, 통증은 외상과 연관이 있는 것이다. 특정 실시양태에서, 통증은 요통이다. 특정 실시양태에서, 통증은 추간판 탈출증 또는 퇴행성 디스크 질환과 연관이 있는 것이다. 특정 실시양태에서, 통증은 신경병증 통증이다. 특정 실시양태에서, 통증은 좌골신경통에 기인하는 것이다.
- [0062] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 방법, 세포 및 유도 배지는 암 치료를 위한 것이다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 방법, 세포 및 유도 배지는 종양 치료를 위한 것이다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 방법, 세포 및 유도 배지는 암 치료를 증강시키기 위한 것이다. 특정 실시양태에서, 암은 성인 급성 림프아구성 백혈병; 소아 급성 림프아구성 백혈병; 성인 급성 골수양 백혈병; 소아 급성 골수양 백혈병; 부신피질 암종; AIDS 관련 암; AIDS 관련 림프종; 항문암; 충수암; 성상세포종; 비정형 기형/간상의 종양; 기저 세포 암종; 간외 담관암; 방광암; 골암, 골육종 및 악성 섬유 조직구종; 뇌간 신경아교종; 뇌 종양; 중추 신경계 배아성 종양; 성상세포종; 두개인두종; 뇌실상의아세포종; 뇌 종양, 상의세포종; 수모세포종; 수질상피종; 중간 분화형 송과체 실질 종양; 천막상 원시 신경외배엽 종양 및 송과체아세포종; 뇌 및 척수 종양; 유방암; 남성 유방암; 기관지 종양; 베켓 림프종; 카르시노이드 종양; 중추 신경계 비정형 기형/간상의 종양; 중추 신경계 배아성 종양; 중추 신경계(CNS: central nervous system) 림프종, 자궁경부암; 원발성; 자궁경부암; 소아 암; 척삭종; 만성 림프구성 백혈병; 만성 골수성 백혈병; 만성 골수증식성 장애; 결장암; 결장직장암; 두개인두종; 피부 T 세포 림프종; 배아성 종양, 중추 신경계; 자궁내막암; 뇌실상의아세포종; 상의세포종; 식도암; 감각신경아세포종; 유잉 육종 패

밀리 종양; 두개외 생식 세포 종양; 고환외 생식 세포 종양; 간외 담관암; 눈암, 안내 흑색종; 눈암, 망막아세포종; 담낭암; 위(위장) 암; 위장관 카르시노이드 종양; 위장관 기질 종양(GIST: Gastrointestinal Stromal Tumor); 두개외 생식 세포 종양; 고환외 생식 세포 종양; 난소 생식 세포 종양; 임신성 융모성 종양; 신경아교종; 모세포 백혈병; 두부경부암; 심장암; 성인 간세포(간) 암(원발성); 간세포(간) 암; 조직구증, 랑게르한스세포; 성인 호지킨 림프종; 소아 호지킨 림프종; 하인두암; 안내 흑색종; 섬세포 종양(내분비 췌장); 카포시 육종; 신장암(신장 세포암); 신장암; 랑게르한스 세포 조직구증; 후두암; 소아 후두암; 성인 급성 림프아구성 백혈병; 소아 급성 림프아구성 백혈병; 성인 급성 골수성 백혈병; 소아 급성 골수성 백혈병; 만성 림프구성 백혈병; 만성 골수성 백혈병; 모세포 백혈병; 구순암 및 구강암; 성인 간암(원발성); 간암; 비소세포 폐암; 소세포 폐암; 림프종, AIDS 관련; 버킷 림프종; 림프종, 피부 T 세포; 성인 호지킨 림프종; 소아 호지킨 림프종; 성인 비호지킨 림프종; 소아 비호지킨 림프종; 원발성 중추 신경계(CNS) 림프종; 발텐스트롬 마크로글로불린혈증; 골의 악성 섬유 조직구증 및 골육종; 수모세포종; 수질상피종; 흑색종; 안구내(눈) 흑색종; 메켈 세포 암종; 성인 악성 중피종; 중피종; 잠재성 원발성을 동반한 전이성 경부 편평 세포암; 입암; 다발성 내분비 신생물 증후군; 다발성 골수종/형질 세포 신생물; 균상 식육종; 골수이형성 증후군; 골수이형성/골수증식성 신생물; 만성 골수성 백혈병; 성인 급성 골수양 백혈병; 소아 급성 골수양 백혈병; 다발성 골수종; 만성 골수증식성 장애; 비강암 및 부비동암; 비인두암; 신경아세포종; 성인 비호지킨 림프종; 소아 비호지킨 림프종; 비소세포 폐암; 경구암; 구순, 구강암; 및 구강인두암; 골육종 및 골의 악성 섬유 조직구종; 난소암; 난소 상피성 암; 난소 생식 세포 종양; 난소 저 악성 잠재적 종양; 췌장암; 췌장암, 섬세포 종양; 유두종; 부비동암 및 비강암; 부갑상선암; 음경암; 인두암; 중간 분화형 송파체 실질 종양; 하수체 종양; 형질 세포 신생물/다발성 골수종; 흉막폐아세포종; 임신성 유방암; 원발성 중추 신경계(CNS) 림프종; 전립선암; 직장암; 신장 세포암(신장암); 신우뇨관 이행세포암; 염색체 15 변이를 동반한 기도암; 망막아세포종; 획문근육종; 타액선암; 타액선암; 육종, 유잉 육종 패밀리 종양; 카포시 육종; 성인 연조직 육종; 소아 연조직 육종; 자궁 육종; 시자리 증후군; 피부암(비흑색종); 피부암; 피부암(흑색종); 메켈 세포 피부 암종; 소세포 폐암; 소장암; 성인 연조직 육종; 소아 연조직 육종; 편평 세포 암종; 잠재성 원발성을 동반한, 전이성 경부 편평 세포암; 위암(위장암); 천막상 원시 신경외배엽 종양; 피부 T 세포 림프종; 고환암; 인후암; 흉선종 및 흉선 암종; 갑상선암; 신우뇨관 이행세포암; 임신성 융모성 종양; 원발 부위 미상 암종; 신우뇨관 이행세포암; 요도암; 자궁 자궁내막암; 자궁 육종; 포도막 흑색종; 질암; 외음부암; 발텐스트롬 마크로글로불린혈증 또는 빌름스 종양이다.

[0063]

특정 실시양태에서, 본 개시내용의 방법, 세포 및 유도 배지는 암, 자가면역 장애 또는 염증성 장애 치료를 필요로 하는 피험체에게 투여하기 위한 것이다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 방법 세포 및 유도 배지는 상이한 투여 경로를 포함한다. 특정 실시양태에서, 투여 경로는 피하, 뇌두정내, 근육내, 정맥내, 종양내, 안구내, 망막내, 유리체내 또는 두개내이다.

[0064]

특정 실시양태에서, 본 개시내용의 방법, 세포 및 유도 배지는 암, 자가면역 장애 또는 면역 매개 염증성 질환 치료를 필요로 하는 피험체에게 투여하기 위한 것이다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 방법 세포 및 유도 배지는 상이한 투여 빈도를 포함한다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 세포 및 약제는 1일 1회, 주 1회, 월 1회, 또는 연 1회 투여된다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 세포 및 방법은 1일 2회, 주 2회, 월 2회, 또는 연 2회 투여된다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 세포 및 방법은 1일 3회, 주 3회, 월 3회, 또는 연 3회 투여된다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 세포 및 방법은 1일 4회, 주 4회, 월 4회, 또는 연 4회 투여를 위한 것이다. 특정 실시양태에서, 1차 치료 다음으로 연 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12회에 걸쳐 유지용 투약이 이루어진다. 특정 실시양태에서, 유지용 투약은 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10년 또는 그 초과의 기간 동안 계속 진행된다. 특정 실시양태에서, 1회 투약(용량)당 1×10^6 개 이상의 세포가 투여된다. 특정 실시양태에서, 1회 투약당 2×10^6 개 이상의 세포가 투여된다. 특정 실시양태에서, 1회 투약당 3×10^6 개 이상의 세포가 투여된다. 특정 실시양태에서, 1회 투약당 4×10^6 개 이상의 세포가 투여된다. 특정 실시양태에서, 1회 투약당 5×10^6 개 이상의 세포가 투여된다. 특정 실시양태에서, 1회 투약당 6×10^6 개 이상의 세포가 투여된다. 특정 실시양태에서, 세포가 투여된다. 특정 실시양태에서, 1회 투약당 7×10^6 개 이상의 세포가 투여된다. 특정 실시양태에서, 1회 투약당 8×10^6 개 이상의 세포가 투여된다. 특정 실시양태에서, 1회 투약당 9×10^6 개 이상의 세포가 투여된다. 특정 실시양태에서, 1회 투약당 1×10^7 개 이상의 세포가 투여된다. 특정 실시양태에서, 1회 투약당 2×10^7 개 이상의 세포가 투여된다. 특정 실시양태에서, 1회 투약당 3×10^7 개 이상의 세포가 투여된다. 특정 실시양태에서, 1회 투약당 4×10^7 개 이상의 세포가 투여된다. 특정 실시양태에서, 1회 투약당 5×10^7 개 이상의 세포가 투여된다.

특정 실시양태에서, 1회 투약당 6×10^7 개 이상의 세포가 투여된다. 특정 실시양태에서, 1회 투약당 7×10^7 개 이상의 세포가 투여된다. 특정 실시양태에서, 1회 투약당 8×10^7 개 이상의 세포가 투여된다. 특정 실시양태에서, 1회 투약당 9×10^7 개 이상의 세포가 투여된다. 특정 실시양태에서, 1회 투약당 1×10^8 개 이상의 세포가 투여된다. 특정 실시양태에서, 1회 투약당 2×10^8 개 이상의 세포가 투여된다. 특정 실시양태에서, 1회 투약당 3×10^8 개 이상의 세포가 투여된다. 특정 실시양태에서, 1회 투약당 4×10^8 개 이상의 세포가 투여된다. 특정 실시양태에서, 1회 투약당 5×10^8 개 이상의 세포가 투여된다. 특정 실시양태에서, 1회 투약당 6×10^8 개 이상의 세포가 투여된다. 특정 실시양태에서, 1회 투약당 7×10^8 개 이상의 세포가 투여된다. 특정 실시양태에서, 1회 투약당 8×10^8 개 이상의 세포가 투여된다. 특정 실시양태에서, 1회 투약당 9×10^8 개 이상의 세포가 투여된다. 특정 실시양태에서, 1회 투약당 1×10^9 개 이상의 세포가 투여된다. 특정 실시양태에서, 1회 투약당 2×10^9 개 이상의 세포가 투여된다. 특정 실시양태에서, 1회 투약당 3×10^9 개 이상의 세포가 투여된다.

[0065] 본 발명의 약제는 다양한 형태의 것일 수 있다. 이는 예를 들어, 반고체, 및 액체 투여 형태, 예컨대, 동결건조된 제제, 액상 액제 또는 혼탁제, 주사액제 및 주입용 액제 등을 포함하고, 약제는 주사가능한 것이 바람직하다.

[0066] 특정 실시양태에서, 약제는 손상된 조직(바람직하게, 중간엽 조직)을 치료 또는 수복하기 위한 것 및/또는 염증성 및/또는 면역 장애와 연관된 하나 이상의 증상을 치료, 조절, 예방 및/또는 호전시키기 위한 것이다. 따라서, 본 발명의 방법 및 세포는 상기 증상 중 어느 것 또는 그들 모두를 특징으로 하는 임의의 장애를 치료하는 데 유용하다. 상기 장애에 관한 대표적인, 완전하지 않은 목록은 정의 섹션에 제공되어 있다. 면역 매개 염증성 질환 치료용 약제가 특히 바람직하다. 당뇨병, 류마티스 관절염(RA), 염증성 장 질환(IBD)(크론병 및/또는 궤양성 대장염 포함), 및 다발성 경화증(MS) 치료용 약제가 추가로 바람직하다. 본 발명은 또한 중간엽 줄기 세포 배양을 위한, 에리트로포이에틴과 조합하여 및 저산소 또는 저산소 모방제에의 노출과 함께, 사용되는 톨 유사 수용체(TLR) 리간드 또는 TLR 리간드 유도인자의 용도를 제공한다.

[0067] 본 발명의 배양 배지, 보충물 및 조성물의 특정 성분 및 성분비는 특정 필요성 및 적용에 따라 달라질 수 있다. 유사하게, 본 발명의 방법의 정확한 단계는 특정 필요성 및 적용에 따라 달라질 수 있다. 본 발명에 따른 배양 배지, 보충물, 방법, 조성물 및 용도는 통상의 실험에 의해 최적화될 수 있다. 예를 들어, 원한 결과가 항염증성 치료 효과일 경우, 배양 배지, 보충물 또는 조성물은 구체적으로, 에리트로포이에틴과 조합하여 및 저산소 또는 저산소 모방제(염화코발트 또는 데스페록사민)에의 노출과 함께, TLR3 리간드 또는 TLR 리간드 유도인자를 함유할 것이며, 그에 반해, 원하는 결과가 면역유발 치료 효과일 경우, 배양 배지, 보충물 또는 조성물은 구체적으로, 에리트로포이에틴과 조합하여 및 저산소 또는 저산소 모방제에의 노출과 함께, TLR4 리간드 또는 TLR 리간드 유도인자를 함유할 것이다. 본원에 기술된 각 성분의 양은 통상의 최적화에 의하여 다른 성분과는 독립적으로 최적화될 수 있거나, 또는 하나 이상의 성분이 첨가 또는 제거될 수 있다. 배양 배지는 그를 공지된 배양 배지와 함께, 또는 그 대신으로 시험함으로써 중간엽 줄기 세포의 유도, 활성화 또는 프라이밍을 지원할 수 있는 그의 능력에 대하여 시험될 수 있다. 본 발명의 배양 배지, 보충물, 방법, 조성물은 하기에서 더욱 상세하게 기술된다.

[0068] 본 발명의 유도 배지는 에리트로포이에틴과 조합하여 및 저산소 또는 저산소 모방제에의 노출과 함께, 톨 유사 수용체(TLR) 리간드 또는 TLR 리간드 유도인자를 포함한다. 한 측면에서, 본 발명의 유도 배지는 톨 유사 수용체(TLR) 리간드 또는 TLR 리간드 유도인자를 포함한다. 대체 측면에서, 본 발명의 유도 배지는 에리트로포이에틴 및 저산소 또는 저산소 모방제에의 노출을 포함한다. 추가 측면에서, 본 발명의 유도 배지는 에리트로포이에틴과 조합하여 및 저산소 또는 저산소 모방제에의 노출과 함께, 톨 유사 수용체(TLR) 리간드 또는 TLR 리간드 유도인자를 포함한다. 특정 실시양태에서, TLR 리간드는 TLR4 리간드이다. 특정 실시양태에서, TLR 리간드는 TLR3 리간드이다.

[0069] 본 발명의 유도 배지는 에리트로포이에틴(EPO)과 조합하여 및 저산소 또는 저산소 모방제에의 노출과 함께, 톨 유사 수용체(TLR) 리간드 또는 TLR 리간드 유도인자의 2 이상, 3 이상, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 그 초과의 조합을 포함할 수 있다.

[0070] 본 발명의 유도 배지는 약 0.5 mU/mL 내지 약 100 mU/mL의 에리트로포이에틴(EPO)과 조합하여 및 약 0.5 내지 약 2% 산소 조건(저산소) 또는 약 10 마이크로몰 내지 약 1 mM 농도의 저산소 모방제, 예컨대, 염화코발트 또는

데스페록사민에의 노출과 함께, 약 0.10 피코몰(pM) 내지 약 100 밀리몰(mM)의 TLR 리간드 또는 TLR 리간드 유도인자, 또는 상기 TLR 리간드 또는 TLR 리간드 유도인자, 에리트로포이에틴, 및 저산소 상태의 임의의 다른 조합을 포함할 수 있다.

[0071] 유도 배양 배지에서 사용되는 TLR3 리간드는 IL4, IL13, 폴리(A:U), 폴리(I:C), 및 그의 조합일 수 있고, 인큐베이션, 형질감염, 형질도입에 의해, 캐리어 분자에 의해, 또는 그의 조합에 의해 전달될 수 있다. 바람직하게, TLR3 리간드 또는 효능제는 폴리(I:C)이다.

[0072] 유도 배양 배지에서 사용되는 TLR4 리간드는 아미노알킬 글루코사미나이드 4-포스페이트, 인터페론, TNF-알파, GM-CSF, 지질다당류(LPS), 및 그의 조합일 수 있고, 인큐베이션, 형질감염, 형질도입에 의해, 캐리어 분자에 의해, 또는 그의 조합에 의해 전달될 수 있다. 바람직하게, TLR4 리간드 또는 효능제는 LPS이다.

[0073] TLR3 리간드 또는 효능제는 상기 언급된 바와 같이 배양 배지 또는 보충물 중 약 10 pg/mL 내지 약 100 µg/mL, 약 100 pg/mL 내지 약 100 µg/mL, 약 1 ng/mL 내지 약 100 µg/mL, 약 5 ng/mL 내지 약 100 µg/mL, 약 10 ng/mL 내지 약 100 µg/mL, 약 100 ng/mL 내지 약 100 µg/mL, 약 0.1 µg/mL 내지 약 50 µg/mL, 약 0.1 µg/mL 내지 약 10 µg/mL, 약 0.25 µg/mL 내지 약 7.5 µg/mL, 약 0.5 µg/mL 내지 약 5 µg/mL, 약 1 µg/mL 내지 약 5 µg/mL, 및 약 1 µg/mL 내지 약 2.5 µg/mL, 및 바람직하게, 약 1 µg/mL 내지 약 1.5 µg/mL인 양으로 제공될 수 있다.

[0074] 특정 실시양태에서, TLR3 리간드는 폴리(I:C)이고, 약 10 pg/mL 내지 약 100 µg/mL, 약 100 pg/mL 내지 약 100 µg/mL, 약 1 ng/mL 내지 약 100 µg/mL, 약 5 ng/mL 내지 약 100 µg/mL, 약 10 ng/mL 내지 약 100 µg/mL, 약 100 ng/mL 내지 약 100 µg/mL, 약 0.1 µg/mL 내지 약 50 µg/mL, 약 0.1 µg/mL 내지 약 10 µg/mL, 약 0.25 µg/mL 내지 약 7.5 µg/mL, 약 0.5 µg/mL 내지 약 5 µg/mL, 약 1 µg/mL 내지 약 5 µg/mL, 및 약 1 µg/mL 내지 약 2.5 µg/mL인 양으로 제공된다. 특정 실시양태에서, 폴리(I:C)는 약 1 µg/mL인 양으로 제공된다. 특정 실시양태에서, 폴리(I:C)는 약 2 µg/mL인 양으로 제공된다. 특정 실시양태에서, 폴리(I:C)는 약 3 µg/mL인 양으로 제공된다. 특정 실시양태에서, 폴리(I:C)는 약 4 µg/mL인 양으로 제공된다. 특정 실시양태에서, 폴리(I:C)는 약 5 µg/mL인 양으로 제공된다. 특정 실시양태에서, 폴리(I:C)는 약 6 µg/mL인 양으로 제공된다. 특정 실시양태에서, 폴리(I:C)는 약 7 µg/mL인 양으로 제공된다. 특정 실시양태에서, 폴리(I:C)는 약 8 µg/mL인 양으로 제공된다. 특정 실시양태에서, 폴리(I:C)는 약 9 µg/mL인 양으로 제공된다. 특정 실시양태에서, 폴리(I:C)는 약 10 µg/mL인 양으로 제공된다. 특정 실시양태에서, 폴리(I:C)는 약 100 ng/mL 미만인 양으로 제공된다. 특정 실시양태에서, 폴리(I:C)는 약 50 ng/mL 미만인 양으로 제공된다. 특정 실시양태에서, 폴리(I:C)는 약 20 ng/mL 미만인 양으로 제공된다. 특정 실시양태에서, 폴리(I:C)는 약 10 ng/mL 미만인 양으로 제공된다. 특정 실시양태에서, 폴리(I:C)는 약 50 ng/mL 미만인 양으로 제공된다.

[0075] TLR4 리간드 또는 효능제는 상기 언급된 바와 같이 배양 배지 또는 보충물 중 약 10 pg/mL 내지 약 10 µg/mL, 약 100 pg/mL 내지 약 10 µg/mL, 약 1 ng/mL 내지 약 1 µg/mL, 약 5 ng/mL 내지 약 1 µg/mL, 약 10 ng/mL 내지 약 1 µg/mL, 약 100 ng/mL 내지 약 1 µg/mL, 바람직하게, 약 5 ng/mL 내지 약 50 ng/mL, 및 또한 바람직하게, 약 5 ng/mL 내지 약 25 ng/mL인 양으로 제공될 수 있다.

[0076] 특정 실시양태에서, TLR4 리간드는 LPS이다. 특정 실시양태에서, LPS는 약 10 pg/mL 내지 약 10 µg/mL, 약 100 pg/mL 내지 약 10 µg/mL, 약 1 ng/mL 내지 약 1 µg/mL, 약 5 ng/mL 내지 약 1 µg/mL, 약 10 ng/mL 내지 약 1 µg/mL, 약 100 ng/mL 내지 약 1 µg/mL, 바람직하게, 약 5 ng/mL 내지 약 50 ng/mL, 및 또한 바람직하게, 약 5 ng/mL 내지 약 25 ng/mL인 양으로 존재한다. 특정 실시양태에서, LPS는 약 5 ng/mL인 농도로 존재한다. 특정 실시양태에서, LPS는 약 10 ng/mL인 농도로 존재한다. 특정 실시양태에서, LPS는 약 15 ng/mL인 농도로 존재한다. 특정 실시양태에서, LPS는 약 20 ng/mL인 농도로 존재한다. 특정 실시양태에서, LPS는 약 25 ng/mL인 농도로 존재한다. 특정 실시양태에서, LPS는 약 30 ng/mL인 농도로 존재한다. 특정 실시양태에서, LPS는 약 35 ng/mL인 농도로 존재한다. 특정 실시양태에서, LPS는 약 40 ng/mL인 농도로 존재한다. 특정 실시양태에서, LPS는 약 45 ng/mL인 농도로 존재한다. 특정 실시양태에서, LPS는 약 50 ng/mL인 농도로 존재한다. 특정 실시양태에서, LPS는 약 100 ng/mL 미만인 농도로 존재한다. 특정 실시양태에서, LPS는 약 50 ng/mL 미만인 농도로 존재한다. 특정 실시양태에서, LPS는 약 10 ng/mL 미만인 농도로 존재한다.

[0077] 특정 실시양태에서, 본 발명의 유도 배지는 저산소 또는 산소 고갈 환경에서의 인큐베이션을 포함한다. 특정 실시양태에서, 저산소 환경은 2% 미만의 산소를 가진다. 특정 실시양태에서, 저산소 환경은 1.5% 미만의 산소를 가진다. 특정 실시양태에서, 저산소 환경은 1.0% 미만의 산소를 가진다. 특정 실시양태에서, 저산소 환경은 0.5% 산소 미만의 산소를 가진다. 특정 실시양태에서, 저산소 환경은 효과적으로 0%의 산소를 가진다. 특정

[0081]

세포 유도 배지는 전형적으로 배양되는 세포 유지를 지원하는 데 필요한, 다수의 성분을 함유한다. 그러므로, 본 발명의 유도 배지는 보통은 에리트로포이에틴과 조합하여 및 저산소 또는 저산소 모방제(염화코발트 또는 테스페록사민)에의 노출과 함께, 톨 유사 수용체(TLR) 리간드 또는 TLR 리간드 유도인자 이외에도 다수의 다른 성분들을 함유한다. 성분들의 적합한 조합은 하기 개시내용을 고려하여, 당업자에 의해 쉽게 제제화될 수 있다. 본 발명에 따른 유도 배지는 하기에 더욱 상세하게 기술되는 바와 같이, 표준 세포 배양 성분, 예컨대, 아미노산, 비타민, 미량 금속, 무기 염, 탄소 에너지원, 및 완충제를 포함하는 영양 용액일 것이다.

[0082]

본 발명의 유도 배지는 혈청을 함유할 수 있다. 혈청은 세포 및 비세포 인자, 및 생존능 및 확장에 필요할 수 있는 성분을 함유한다. 우태아 혈청(FBS: fetal bovine serum), 소 혈청(BS: bovine serum), 송아지 혈청(CS: calf serum), 송아지 태아 혈청(FCS: fetal calf serum), 신생 송아지 혈청(NCS: newborn calf serum), 염소 혈청(GS: goat serum), 말 혈청(HS: horse serum), 돼지 혈청, 양 혈청, 토끼 혈청, 래트 혈청(RS: rat serum) 등을 비롯한, 임의의 적절한 공급원으로부터 수득된 혈청이 사용될 수 있다. 상기 MSC가 인간 기원의 것이라면, 세포 유도 배지는 인간 혈청, 바람직하게, 자가 기원의 것으로 보충된다는 것 또한 본 발명의 범주 내에 포함된다. 보체 캐스케이드 성분을 불활성화시키는 것이 필요하다고 간주될 경우, 혈청을 55-65°C에서 가열하여 불활성화시킬 수 있다는 것을 이해한다. 혈청 대체물이 사용되는 경우, 종래 기술에 따라 배지 부피의 약 2% 내지 약 40%로 사용될 수 있다.

[0083]

다른 실시양태에서, 본 발명의 유도 배지는 혈청 대체물을 함유할 수 있다. 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 혈청 알부민, 혈청 트랜스페린, 셀레늄, 및 인슐린, 혈소판 유래 성장 인자(PDGF: platelet-derived growth factor) 및 염기성 섬유아세포 성장 인자(bFGF: basic fibroblast growth factor)를 포함하나, 이에 제한되지 않는 재조합 단백질과 같은, 각종의 상이한 혈청 대체물 제제가 상업적으로 이용가능하며, 이는 당업자에게 공지되어 있다. 혈청 대체물이 사용되는 경우, 이는 종래 기술에 따라 배지 부피의 약 2% 내지 약 40%로 사용될 수 있다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 유도 배지는 무혈청 및/또는 혈청 대체물 무함유일 수 있다. 무혈청 배지는 어떤 유형의 동물 혈청도 함유하지 않는 것이다. 무혈청 배지는 줄기 세포의 가능한 이종 물질에 의한 오염을 피하도록 하는 데 바람직할 수 있다. 혈청 대체물 무함유 배지는 임의의 상업적 혈청 대체물 제제로 보충되지 않은 것이다.

[0084]

본 발명의 유도 배지는 보통 탈이온, 증류수에서 제제화될 것이다. 본 발명의 유도 배지는 전형적으로 오염을 막기 위하여 사용 이전에 예컨대, 자외선, 가열, 방사선 조사 또는 여파에 의해 멸균될 것이다. 유도 배지는 보관 또는 수송을 위해 냉동(예컨대, -20°C 또는 -80°C)될 수 있다. 박테리아, 마이코플라즈마 및 진균 오염을 경감시키기 위해 항미생물제 또한 전형적으로 배지에 사용된다. 배지는 오염을 막기 위해 하나 이상의 항미생물제 또는 항생제를 함유할 수 있다. 전형적으로, 사용되는 항생제 또는 항곰팡이성 화합물은 페니실린/스트렙토マイ신의 혼합물이고, 암포테리신(훈기존(Fungizone)[®]), 암피실린, 젠타마이신, 블레오마이신, 히그로마이신, 카나마이신, 미토마이신 등 또한 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.

[0085]

본 발명의 한 실시양태에서, 배양 배지는 에리트로포이에틴과 조합하여 및 저산소 또는 저산소 모방제(염화코발트 또는 테스페록사민)에의 노출과 함께, 톨 유사 수용체(TLR) 리간드 또는 TLR 리간드 유도인자에 의해 유도된 세포의 첨가에 의해 조정된(conditioned) 배지이다. 조정 배지는 배지를 조정하는데 충분한 시간 동안 유도 배지 중에서 상기 세포 집단을 배양한 후, 조정 배지를 수거함으로써 제조된다. 조정 배지가 사용되는 경우, 배지는 포유동물 세포, 예컨대, 마우스 세포 또는 인간 세포 상에서 조정될 수 있다. 중간엽 줄기 세포 유도에 적합한 조정 배지를 제조하는 데 각종의 상이한 유형의 포유동물 세포가 사용될 수 있다.

[0086]

유도 배지는 1x 제제 또는 농축 제제, 예컨대, 2x 내지 250x 농축 배지 제제일 수 있다. 1x 제제에서, 배지 중의 각 성분은 세포 유도 목적의 농도로 존재한다. 농축 제제에서, 성분들 중 하나 이상의 것은 세포 유도 목적의 농도보다 더 높은 농도로 존재한다. 유도 배지는 예컨대, 염 침전 또는 선택 여파와 같은 공지된 방법을 사용하여 농축될 수 있다. 농축 배지는 사용을 위해 물(바람직하게 탈이온수 및 증류수) 또는 임의의 적절한 용액, 예컨대, 수성 염수 용액, 수성 완충제 또는 배양 배지로 희석될 수 있다.

[0087]

본원에 개시된 유도 배지는 적절한 조건하에서 오직 단일 계대 또는 집단의 배가를 위해 다분화성, 미분화된 및 증식성 상태의 줄기 세포 집단을 유도, 활성화 또는 프라이밍시킬 수 있다. 줄기 세포가 본원 다른 곳에 더욱 상세하게 기술되어 있는 바와 같은 특정의 특징을 나타낼 경우, 이는 다분화성, 미분화된 및 증식성 상태인 것으로 간주된다. 적절한 조건은 당업자에 의해 보통 중간엽 줄기 세포 배양에 사용되는 조건으로부터 선택될 수 있다.

[0088]

본원 다른 곳에서도 언급되는 바와 같이, 본 발명은 또한 본 발명의 유도 배지를 함유하는 허메티컬리 실드 베쓸을 제공한다. 허메티컬리 실드 베쓸은 오염을 막기 위해서, 유도 배지를 수송 또는 보관하는 데 바람직할 수 있다. 베쓸은 임의의 적합한 베쓸, 예컨대, 생물 반응기, 플라스크, 플레이트, 병, 자, 바이알 또는 백일 수 있다. 본원 다른 곳에서도 언급되는 바와 같이, 본 발명은 또한 (a) 배양 배지를 수득하는 단계; 및 (b) 에리트로포이에틴(EPO)과 조합하여 및 저산소 또는 저산소 모방제(염화코발트 또는 데스페록사민)에의 노출과 함께, 유사 수용체(TLR) 리간드 또는 TLR 리간드 유도인자를 배양 배지에 첨가하는 단계를 포함하는, 유도 배지를 제조하는 방법을 제공한다. 유도 배지 중에 포함되는 특정 성분에 따라, 각종의 상이한 유도 배지 제조 방법이 구상된다. 예를 들어, 유도 배지를 제조하는 방법은 (a) 배양 배지를 수득하는 단계; 및 (b) 에리트로포이에틴(EP O)과 조합하여 및 저산소 또는 저산소 모방제(염화코발트 또는 데스페록사민)에의 노출과 함께, TLR 리간드 또는 TLR 리간드 유도인자를 배양 배지에 첨가하는 단계를 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 유도 배지를 제조하는 방법은 (a) 배양 배지를 수득하는 단계; 및 (b) TLR 리간드, EPO 및 염화코발트를 배양 배지에 첨가하는 단계를 포함할 수 있다.

[0089]

본 발명의 유도 배지는 중간엽 줄기 세포 집단을 유도, 활성화 또는 프라이밍시키는 데 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명은 세포 기반 요법을 위해 중간엽 줄기 세포 집단을 별개의 균일한 표현형으로 유도, 활성화 또는 프라이밍시키기 위한, 본원에 개시된 임의의 유도 배지의 용도를 제공한다.

[0090]

특정 실시양태에서, 본원에 개시된 유도 배지는 PCR; qPCR; qRT-PCR; 반정량적 RT-PCR; 디지털 PCR; 노던 블롯; mRNA-SEQ; 마이크로어레이 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는, 당업자에게 공지된 방법에 의해 측정될 수 있는 특정 유전자의 발현을 유도하거나, 또는 감소시킨다. 특정 실시양태에서, 본원에 개시된 유도 배지는 항체 기반 검정법; 효소 결합 면역흡착 검정법(ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay); 면역 또는 웨스턴 블롯; 유세포 분석법, 질량 분석법 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는, 당업자에게 공지된 방법에 의해 측정될 수 있는 단백질 수준을 증가시키거나, 또는 감소시킨다. 특정 실시양태에서, 본원에 개시된 유도 배지는 키나제 검정법; 단백질 인산화/탈인산화 측정; 단백질 유비퀴틴화/탈유비퀴틴화 측정; 단백질 아세틸화/탈아세틸화 측정; 단백질 분해/안정성 측정; 2차 메신저, 예컨대, 칼슘 또는 디아실글리세롤 측정; 또는 불활성 형태에서 활성 형태로의 절단 모니터링을 포함하나, 이에 제한되지 않는, 당업자에게 공지된 방법에 의해 측정될 수 있는 세포 신호 전달 경로의 활성화 또는 감소를 유도한다.

[0091]

특정 실시양태에서, 본원에 개시된 유도 배지는 세포 집단의 유전자 발현, 단백질 수준, 또는 세포 신호전달 경로의 측정가능한 변화를 유도한다. 특정 실시양태에서, 변화는 유전자 발현, 단백질 수준, 또는 세포 신호전달 증가이다. 특정 실시양태에서, 변화는 자극을 받지 않은 또는 대조군 샘플과, 자극을 받은 또는 시험 샘플 사이에 측정되는 임의의 통계학상 유의적인 변화이다. 특정 실시양태에서, 자극을 받지 않은 또는 대조군 샘플과, 자극을 받은 또는 시험 샘플 사이의 변화는 적어도 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배 또는 그 초과의 증가이다. 특정 실시양태에서, 자극을 받지 않은 또는 대조군 샘플과, 자극을 받은 또는 시험 샘플 사이의 변화는 적어도 100배 이상의 증가이다. 특정 실시양태에서, 자극을 받지 않은 또는 대조군 샘플과, 자극을 받은 또는 시험 샘플 사이의 변화는 적어도 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배 또는 그 초과의 감소이다. 특정 실시양태에서, 자극을 받지 않은 또는 대조군 샘플과, 자극을 받은 또는 시험 샘플 사이의 변화는 적어도 100배 이상의 감소이다.

[0092]

특정 실시양태에서, TLR3 리간드를 포함하는 유도 배지는 하기 유전자 중 임의의 것의 mRNA 발현을 자극을 받지 않은 세포 집단과 비교하였을 때 2배 이상 만큼 유도한다: CXCL9; EGFR; IRF1; A2M; FAS; IL2RG; MMP3; GBP1; ISG15; FCGR1; NFKB1; NOS2A; USF1; YY1; JAK2; STA2, STAT4; STAT5; SOCS1; 또는 IRF1. 특정 실시양태에서, TLR3 리간드를 포함하는 유도 배지는 하기 유전자 중 임의의 것의 mRNA 발현을 자극을 받지 않은 세포 집단과 비교하였을 때 2배 이상 만큼 감소시킨다: EPOR; F2R; STAM; PDGFRA; PIAS2; MYC; SH2B1; 또는 CSF2RB. 특정 실시양태에서, TLR3 리간드를 포함하는 유도 배지는 하기 유전자 중 임의의 것의 mRNA 발현을 자극을 받지 않은 세포 집단과 비교하였을 때 10배 이상 만큼 유도한다: CXCL9; GBP1; ISG15; SOCS1; MMP3; JAK2 또는 IRF1. 특정 실시양태에서, TLR3 리간드를 포함하는 유도 배지는 하기 유전자 중 임의의 것의 mRNA 발현을 자극을 받지 않은 세포 집단과 비교하였을 때 20배 이상 만큼 유도한다: CXCL9; GBP1; ISG15; 또는 SOCS1. 특정 실시양태에서, TLR3 리간드를 포함하는 유도 배지는 CXCL9의 mRNA 발현을 자극을 받지 않은 세포 집단과 비교하였을 때 100배 이상 만큼 유도한다.

[0093]

특정 실시양태에서, TLR4 리간드를 포함하는 유도 배지는 TNFSF10(TRAIL)의 mRNA 발현을 자극을 받지 않은 세포 집단과 비교하였을 때 적어도 2배, 10배, 100배 또는 1,000배 만큼 유도한다.

- [0094] 본 발명은 또한 (a) 중간엽 줄기 세포 집단을 제공하는 단계; (b) 본원에 개시된 유도 배지를 제공하는 단계; (c) 줄기 세포를 유도 배지와 접촉시키는 단계; 및 (d) 적절한 조건하에서 줄기 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 중간엽 줄기 세포 집단을 유도, 활성화 또는 프라이밍시키는 생체외 방법을 제공한다.
- [0095] 특정 실시양태에서, 본원에 개시된 중간엽 줄기 세포 집단을 유도, 활성화 또는 프라이밍시키는 생체외 방법은 PCR; qPCR; qRT-PCR; 반정량적 RT-PCR; 디지털 PCR; 노던 블롯; mRNA-SEQ; 마이크로어레이 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는, 당업자에게 공지된 방법에 의해 측정될 수 있는 특정 유전자의 발현을 유도하거나, 또는 감소시킨다. 특정 실시양태에서, 본원에 개시된 유도 배지는 항체 기반 검정법; 효소 결합 면역흡착 검정법 (ELISA); 면역 또는 웨스턴 블롯; 유세포 분석법, 질량 분석법 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는, 당업자에게 공지된 방법에 의해 측정될 수 있는 단백질 수준을 증가시키거나, 또는 감소시킨다. 특정 실시양태에서, 본원에 개시된 중간엽 줄기 세포 집단을 유도, 활성화 또는 프라이밍시키는 생체외 방법은 키나제 검정법; 단백질 인산화/탈인산화 측정; 단백질 유비퀴틴화/탈유비퀴틴화 측정; 단백질 아세틸화/탈아세틸화 측정; 단백질 분해/안정성 측정; 2차 메신저, 예컨대, 칼슘 또는 디아실글리세롤 측정; 또는 불활성 형태에서 활성 형태로의 절단 모니터링을 포함하나, 이에 제한되지 않는, 당업자에게 공지된 방법에 의해 측정될 수 있는 세포 신호전달 경로의 활성화 또는 감소를 유도한다.
- [0096] 특정 실시양태에서, 본원에 개시된 중간엽 줄기 세포 집단을 유도, 활성화 또는 프라이밍시키는 생체외 방법은 줄기 세포 집단의 유전자 발현, 단백질 수준, 또는 세포 신호전달 경로의 측정가능한 변화를 유도한다. 특정 실시양태에서, 변화는 유전자 발현, 단백질 수준, 또는 세포 신호전달 증가이다. 특정 실시양태에서, 변화는 자극을 받지 않은 또는 대조군 샘플과, 자극을 받은 또는 시험 샘플 사이에 측정되는 임의의 통계학상 유의적인 변화이다. 특정 실시양태에서, 자극을 받지 않은 또는 대조군 샘플과, 자극을 받은 또는 시험 샘플 사이의 변화는 적어도 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배 또는 그 초과의 증가이다. 특정 실시양태에서, 자극을 받지 않은 또는 대조군 샘플과, 자극을 받은 또는 시험 샘플 사이의 변화는 적어도 100배 이상의 증가이다. 특정 실시양태에서, 자극을 받지 않은 또는 대조군 샘플과, 자극을 받은 또는 시험 샘플 사이의 변화는 적어도 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배 또는 그 초과의 감소이다. 특정 실시양태에서, 자극을 받지 않은 또는 대조군 샘플과, 자극을 받은 또는 시험 샘플 사이의 변화는 적어도 100배 이상의 감소이다.
- [0097] 특정 실시양태에서, TLR3 리간드를 포함하는, 본원에 개시된 중간엽 줄기 세포 집단을 유도, 활성화 또는 프라이밍시키는 생체외 방법은 하기 유전자 중 임의의 것의 mRNA 발현을 자극을 받지 않은 세포 집단과 비교하였을 때 2배 이상 만큼 유도한다: CXCL9; EGFR; IRF1; A2M; FAS; IL2RG; MMP3; GBP1; ISG15; FCGR1; NFKB1; NOS2A; USF1; YY1; JAK2; STA2; STAT4; STAT5; SOCS1; 또는 IRF1. 특정 실시양태에서, TLR3 리간드를 포함하는, 본원에 개시된 중간엽 줄기 세포 집단을 유도, 활성화 또는 프라이밍시키는 생체외 방법은 하기 유전자 중 임의의 것의 mRNA 발현을 자극을 받지 않은 세포 집단과 비교하였을 때 2배 이상 만큼 감소시킨다: EPOR; F2R; STAM; PDGFRA; PIAS2; MYC; SH2B1; 또는 CSF2RB. 특정 실시양태에서, TLR3 리간드를 포함하는, 본원에 개시된 중간엽 줄기 세포 집단을 유도, 활성화 또는 프라이밍시키는 생체외 방법은 하기 유전자 중 임의의 것의 mRNA 발현을 자극을 받지 않은 세포 집단과 비교하였을 때 10배 이상 만큼 유도한다: CXCL9; GBP1; ISG15; SOCS1; MMP3; JAK2 또는 IRF1. 특정 실시양태에서, TLR3 리간드를 포함하는, 본원에 개시된 중간엽 줄기 세포 집단을 유도, 활성화 또는 프라이밍시키는 생체외 방법은 하기 유전자 중 임의의 것의 mRNA 발현을 자극을 받지 않은 세포 집단과 비교하였을 때 20배 이상 만큼 유도한다: CXCL9; GBP1; ISG15; 또는 SOCS1. 특정 실시양태에서, TLR3 리간드를 포함하는, 본원에 개시된 중간엽 줄기 세포 집단을 유도, 활성화 또는 프라이밍시키는 생체외 방법은 CXCL9의 mRNA 발현을 자극을 받지 않은 세포 집단과 비교하였을 때 100배 이상 만큼 유도한다.
- [0098] 특정 실시양태에서, TLR4 리간드를 포함하는, 본원에 개시된 중간엽 줄기 세포 집단을 유도, 활성화 또는 프라이밍시키는 생체외 방법은 TNFSF10(TRAIL)의 mRNA 발현을 자극을 받지 않은 세포 집단과 비교하였을 때 적어도 2배, 10배, 100배 또는 1,000배 만큼 유도한다.
- [0099] 본 발명은 또한 (a) 중간엽 줄기 세포 집단을 제공하는 단계; (b) 본 발명의 유도 배지를 제공하는 단계; (c) 줄기 세포 집단을 유도 배지와 접촉시키는 단계; 및 (d) 적절한 조건하에서 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 세포 치료 방법을 제공한다.
- [0100] 본 발명의 방법은 본원 다른 곳에서도 기술되는 바와 같이, 세포를 고체 표면과 접촉시키는 단계를 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 발명은 (a) 중간엽 줄기 세포 집단을 제공하는 단계; (b) 본원에 개시된 유도 배지를 제공하는 단계; (c) 줄기 세포를 유도 배지와 접촉시키는 단계; 및 (d) 적절한 조건하에서 및 고체 표면과 접촉시켜 세포를 배양하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 중간엽 줄기 세포 집단을 확장시키기 위한

본원에 개시된 유도 배지 및 고체 표면의 용도를 제공한다. 중간엽 줄기 세포를 상기 지지체 상에 부착, 접착시킬 수 있거나, 그 위에 시딩시킬 수 있다. 전형적으로, 줄기 세포의 유도, 활성화, 또는 프라이밍 이전에, 세포를 원하는 밀도로, 예컨대, 약 100개의 세포/cm² 내지 약 100,000개의 세포/cm²(예컨대, 약 500개의 세포/cm² 내지 약 50,000개의 세포/cm², 또는 더욱 특히, 약 1,000개의 세포/cm² 내지 약 20,000개의 세포/cm²)로 플레이팅한다. 특정 실시양태에서, 세포 밀도는 200-10,000개의 세포/cm²이다.

- [0101] 본원에 개시된 방법의 단계는 적절하게 임의 순서로 또는 동시에 수행될 수 있고, 상기 단계가 열거된 순서대로 수행될 필요는 없다는 것을 이해할 것이다. 예를 들어, 상기 방법에서 중간엽 줄기 세포 집단을 제공하는 단계는 유도 배지를 제공하는 단계 이전, 이후 또는 그와 동시에 수행될 수 있다.
- [0102] 본 발명의 방법 및 용도는 본원에 기술된 임의의 유도 배지 또는 보충물을 포함할 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, 본 발명의 방법은 무혈청 및/또는 혈청 대체물 무함유 방법일 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 방법은 피더 세포총과의 접촉 없이 세포를 유도하는 데 사용될 수 있다.
- [0103] 본 발명의 바람직한 방법 및 용도는 일단 세포가 확장된 후, 냉동보존되고, 세포 기반 요법에서 사용되기 이전에 이루어지는 중간엽 줄기 세포 집단의 유도, 활성화 또는 프라이밍을 위한 것이다.
- [0104] 상기 줄기 세포 집단은 성인 기원인 것이 바람직하고, 상기 세포는 골수 유래 또는 지방 조직 유래 세포에서와 같은 중간 줄기 세포 집단인 것이 추가로 바람직하다.
- [0105] 줄기 세포 배양 조건은 당업자에게 공지되어 있다. 배양은 중간엽 줄기 세포의 부착에 적합한 고체 지지체의 존재하에서 수행되는 것이 바람직하다.
- [0106] 상기 제조 방법은 임의적으로 (a) 세포를 본원에 개시된 배양 배지로 계대접종하는 단계; (b) 적절한 조건하에서 세포를 추가로 배양하는 단계, 및 (c) 세포를 유도, 활성화, 또는 프라이밍시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0107] 분화를 유도하지 않고, MSC를 생체외에서 확장시키는 것은 예를 들어, 특별히 스크리닝된 다수의 적합한 혈청(예컨대, 우태아 혈청 또는 인간 혈청)을 사용하여 장기간 동안에 달성될 수 있는 것으로 밝혀졌다. 생존능 및 수율을 측정하는 방법은 당업계에 공지되어 있다(예컨대, 트리판 블루 배제).
- [0108] 본 발명의 세포 집단의 세포를 단리시키기 위한 단계 및 절차 중 임의의 것은 원하는 경우, 수동으로 수행될 수 있다. 대안적으로, 상기 세포를 단리시키는 공정은 하나 이상의 적합한 장치(그의 예는 당업계에 공지되어 있다)를 통해 가속화 및/또는 자동화될 수 있다.
- [0109] 본 발명의 실시는 지지체로서 임의의 적합한 세포 배양 베슬을 사용하여 수행될 수 있다. 다양한 형상 및 크기의(예컨대, 플라스크, 단일 또는 다중 웰 플레이트, 단일 또는 다중 웰 디쉬, 병, 자, 바이알, 백, 생물반응기) 및 각종의 상이한 물질(예컨대, 플라스틱, 유리)로 구성된 세포 배양 베슬이 당업계에 공지되어 있다. 적합한 세포 배양 베슬은 당업자에 의해 쉽게 선택될 수 있다.
- [0110] 본 발명은 또한 본원에 개시된 배양 유도 배지를 제조하는 데 사용될 수 있는 배양 배지 유도 보충물을 제공한다. "배양 배지 유도 보충물"은 그 자체가 중간엽 줄기 세포를 지원하지는 못하지만, 다른 세포 배양 배지 성분과 조합되었을 때에는 중간엽 줄기 세포 배양을 할 수 있거나, 또는 그를 개선시키는, 성분들의 혼합물이다. 그러므로, 보충물은 그를 다른 세포 배양 성분과 조합하여 적절한 배지 제제를 제조함으로써 본 발명의 기능성 세포 배양 배지를 제조하는 데 사용될 수 있다. 배양 배지 보충물의 용도는 당업계에 널리 공지되어 있다. 본 발명은 에리트로포이에틴(EPO)과 조합하여 및 저산소 또는 저산소 모방제(염화코발트 또는 데스페록사민)에의 노출과 함께, TLR 리간드 또는 TLR 리간드 유도인자를 첨가하는 것을 포함하는, 배양 배지 유도 보충물을 제공한다. 보충물은 본원에 개시된 임의의 리간드를 함유할 수 있다. 보충물은 또한 하나 이상의 추가의 세포 배양 성분, 예컨대, 아미노산, 비타민, 무기 염, 미량 원소, 탄소 에너지원, 및 완충제로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 세포 배양 성분을 함유할 수 있다.
- [0111] 배양 배지 유도 보충물은 농축된 액상 보충물(예컨대, 2x 내지 250x 농축된 액상 보충물)일 수 있거나, 또는 건식 보충물일 수 있다. 액상 및 건식 유형의 보충물, 둘 모두 당업계에 널리 공지되어 있다. 보충물은 동결건조된 것일 수 있다.
- [0112] 본 발명의 배양 배지 유도 보충물은 전형적으로 오염을 막기 위하여 사용 이전에 예컨대, 자외선, 가열, 방사선 조사 또는 여과에 의해 멸균될 것이다. 배양 배지 유도 보충물은 보관 또는 수송을 위해 냉동(예컨대, -20°C 또

는 -80°C)될 수 있다.

[0113] 본 발명은 또한 본 발명의 배양 배지 보충물을 함유하는 허메티컬리 실드 베슬을 제공한다. 허메티컬리 실드 베슬은 오염을 막기 위해서, 본원에 개시된 배양 배지 보충물을 수송 또는 보관하는 데 바람직할 수 있다. 베슬은 임의의 적합한 베슬, 예컨대, 생물 반응기, 플라스크, 플레이트, 병, 자, 바이알 또는 백일 수 있다.

[0114] 다양한 물질이 부착성 줄기 세포 배양을 위한 표면으로서 사용되어 왔고, 적절한 물질은 당업자에 의해 쉽게 선택될 수 있다. 바람직하게, 고체 표면은 플라스틱을 포함하지만, 이는 대안적으로는 유리, 세포외 기질로 이루어질 수 있다. 표면은 평면, 관상 또는 스캐폴드, 비드 또는 섬유 형태일 수 있다.

[0115] 본 발명의 조성물은 본원 다른 곳에서도 기술되는 바와 같이, 혈청을 포함할 수 있거나, 또는 무혈청 및/또는 혈청 대체물 무함유일 수 있다.

[0116] 본 발명에서 사용하기 위한 중간엽 줄기 세포는 널리 공지된 방법을 사용하여 수득될 수 있다(하기 참조). 배아, 태아 또는 성인 조직으로부터 수득되었는지, 그와는 상관없이 다양한 유형의 중간엽 줄기 세포가 본 발명과 함께 사용될 수 있지만, 성인 조직 공급원으로부터 유래된 것이 바람직한 것으로 구상된다.

[0117] 본원에 개시된 유도 배지는 포유동물 줄기 세포, 특히, 인간 성인 줄기 세포를 배양하는 데 사용될 수 있다. 본 발명과 함께 사용될 수 있는 인간 성인 줄기 세포는 바람직하게 중간엽 줄기 세포이다. 마우스 또는 영장류 줄기 세포 또한 사용될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 줄기 세포는 인간 콜수 유래 줄기 세포(MSC)이다.

[0118] 중간엽 줄기 세포는 예컨대, 3개 배엽층 모두에 특이적인 마커의 검출가능한 발현을 보이는 세포로 분화될 수 있는 세포의 능력을 측정함으로써 3개 배엽층 모두의 세포로 분화될 수 있는 그의 능력에 의해 확인될 수 있다. 문맥상 달리 요구되지 않는 한, 단수 형태의 지시 대상(예컨대, "한 세포" 및 등가의 지시 대상)은 복수 형태의 것(예컨대, "세포들")을 포함한다.

[0119] 본 발명의 유도 배지는 중간엽 줄기 세포 집단을 유도, 활성화 또는 프라이밍시키는 데 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명은 세포 기반 요법을 위해 중간엽 줄기 세포 집단을 별개의 균일한 표현형으로 유도, 활성화 또는 프라이밍시키기 위한, 본원에 개시된 임의의 유도 배지의 용도를 제공한다. 상기 별개의 균일한 표현형은 항염증성 MSC 표현형(MSC2) 및 균일한 별개의 면역유발 항종양 MSC 표현형(MSC1)일 수 있다.

[0120] 균일한 별개의 항염증성 MSC 표현형(MSC2)을 유도하는 바람직한 방법은 70-90%의 컨플루언트 성장시 1시간 동안, 에리트로포이에틴(1 mU/mL 또는 5 ng/mL)과 조합하여 및 저산소(1% 산소) 또는 저산소 모방제(200 μM의 염화코발트 또는 데스페록사민)에의 노출과 함께, 틀 유사 수용체 3(TLR3) 리간드, 예컨대, 폴리이노신산:폴리시티딜산(또는 폴리(I:C); 1 μg/mL)을 함유하는 배양 배지와 함께 MSC를 인큐베이션시키는 것이다.

[0121] 균일한 별개의 면역유발 항종양 MSC 표현형(MSC1)을 유도하는 바람직한 방법은 70-90%의 컨플루언트 성장시 1시간 동안, 에리트로포이에틴(1 mU/mL 또는 5 ng/mL)과 조합하여 및 저산소(1% 산소) 또는 저산소 모방제(200 μM의 염화코발트 또는 데스페록사민)에의 노출과 함께, 틀 유사 수용체 4(TLR4) 리간드, 예컨대, 지질다당류(LPS, 내독소 10 ng/mL)를 함유하는 배양 배지와 함께 MSC를 인큐베이션시키는 것이다.

[0122] 에리트로포이에틴과 조합하여 및 저산소 또는 저산소 모방제(염화코발트 또는 데스페록사민)에의 노출과 함께, TLR 리간드를 새 배양 배지에, 또는 배양 보충물로서 첨가하고, 세포와 함께 1 hr 동안 인큐베이션시킨다. 상기 유도 단계 후, MSC를 배양 배지, 또는 TLR 리간드 무함유의 적합한 완충처리된 염수 용액 중에서 2회 세척하여 세포 및 배양 잔여물을 제거한다. 이론으로 제한하고자 하지 않으면서, 상기 언급된 농도(또는 그보다 더 낮은 농도)에서의 최소의 TLR 리간드 노출 및 단기간의 인큐베이션 시간(< 1 hr)이 원하는 표현형을 달성하는 데 중요하고, 추가로, 상기 프로토콜은 내인성 MSC가 손상 부위로부터 원거리에서 대면하게 되고, 그에 대해 반응하게 되는 위험 신호의 구배를 모방한다. 일단 세척시킨 후, 유도된, 활성화된, 또는 프라이밍된 MSC를 종래 방법, 예컨대, 트립신 및 EDTA에 의해 37°C에서 5초 내지 15분 동안, 또는 트립신 대체물(예컨대, 인비트로겐(Invitrogen)으로부터의 트립LE(TrypLE)), 콜라게나제, 디스파제, 어큐타제 또는 당업자에게 공지된 다른 시약을 사용하여 수거할 수 있다. 세포를 수거한 후, 프라이밍된, 활성화된 또는 유도된 MSC를 표준 방법에 의해 냉동 보존시킬 수 있다.

[0123] TLR3 효능제 또는 TLR4 효능제는 인큐베이션, 형질감염, 형질도입에 의해, 캐리어 분자에 의해, 또는 당업계의 숙련가에게 공지된 다른 기술에 의해 전달될 수 있다.

[0124] 세포를 에리트로포이에틴(EPO)과 조합하여 및 저산소 또는 저산소 모방제(염화코발트 또는 데스페록사민)에의 노출과 함께, TLR 리간드 또는 효능제 리간드와 약 1분 내지 약 480분, 약 5분 내지 약 475분, 약 10분 내지 약

470분, 약 15분 내지 약 400분, 약 20분 내지 약 120분, 약 25분 내지 약 90분, 약 30분 내지 약 80분, 약 35분 내지 약 70분, 약 40분 내지 약 65분, 약 45분 내지 약 60분, 약 55분 내지 약 60분, 및 바람직하게, 약 60분 동안 인큐베이션시킬 수 있다.

[0125] 실시예

[0126] 실시예 1 - 인간 1차 MSC로부터의 MSC2 유전자 발현 시그너처의 유도

[0127] 본 실험을 위해, 1차 인간 MSC를, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 폴리(I:C)를 함유하는 무혈청 배지 중에서 37°C 및 5% CO₂에서 6시간 동안 인큐베이션시켰다. 이어서, 세포를 2회 세척하고, RNA이지 미니 키트(RNeasy Mini Kit)(퀴아젠(Qiagen: 미국 캘리포니아주 빌렌시아))를 사용하여 RNA를 추출한 후, 터보 DNA 프리 키트(TURBO DNA-free kit)(엠비온(Ambion: 미국 텍사스주 오스틴))를 사용하여 처리하였다. RNA를 역전사시키고, 생성된 cDNA는 i사이클러 iQ5 실시간 PCR 검출 시스템(iCycler iQ5 Real-Time PCR Detection System)(바이오-래드(Bio-Rad: 미국 캘리포니아주 허큘리스)) 상에서 제조사의 설명서에 따라 JAK/STAT 신호전달 경로 RT2 프로파일러TM PCR 어레이(JAK/STAT Signaling Pathway RT2 ProfilerTM PCR Array)(수퍼어레이 바이오사이언스(SuperArray Bioscience: 미국 메릴랜드주 프레더릭))에서 사용하였다. 비처리군 및 처리군, 둘 모두로부터 얻은 원 데이터를 GE어레이 분석기(GEarray Analyzer) 소프트웨어(수퍼어레이 인크.(SuperArray Inc.: 미국 메릴랜드주 베데스다))를 사용하여 분석하였다. 상기 어레이에는 JAK/STAT 신호전달 경로에서의 84개의 상이한 유전자의 RNA 발현 수준을 측정한다. 본 결과는 도 1에 제시되어 있으며, 2배 이상의 유도를 보인 유전자는 회색 박스로 표시되어 있고, 2배 이상의 감소를 보인 유전자는 검은색 박스로 표시되어 있고, 2배 초과 만큼 유도되었고, 추가 확인을 위해 선택된 유전자는 두꺼운 박스로 표시되어 있다(단, 2배 초과 만큼 감소된 PIAS2는 제외). 도 2는 도 1에서 선택된 유전자를 추가로 확인하는 것을 보여주는 것이다. 확인은 도 1에서 분석된 것과 동일한 샘플에 대하여 유전자 특이 프라이머와 함께 SYBR 그린 마스터 믹스(SYBR green Master Mix)를 사용하여 qPCR에 의해 수행하였다.

[0128] 실시예-2 1차 인간 MSC로부터의 MSC1 및 MSC2 분극화

[0129] 1차 인간 MSC 기증자를 MSC1 또는 MSC2로 분극화시켰다. 0.5 ng/mL 인간 재조합 에리트로포이에틴 및 200 μM 염화코발트의 부재하에(MSC1) 또는 존재하에(MSC1*) 10 ng/mL의 LPS를 함유하는 배지를 사용하여 인간 MSC를 분극화시켰다. 0.5 ng/mL 인간 재조합 에리트로포이에틴 및 200 μM 염화코발트의 부재하에(MSC2) 또는 존재하에(MSC2*) 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 폴리(I:C)를 함유하는 배지를 사용하여 MSC2 세포를 분극화시켰다. 배양된 상청액을 수거한 후, 앞서 기술된 바와 같이, 바이오플렉스(bio-plex)에 의해 케모카인/사이토카인 발현에 대해 분석하였다. 간략하면, MSC를 24웰 플레이트에 50,000개의 세포인 밀도로 플레이팅하고, 부착되도록 밤새도록 허용한 후, 명시된 바와 같이 1 hr 동안 TLR 효능제로 프라이밍시켰다. 48 hr 후 조정된 배지를 수집하고, 바이오플렉스 사이토카인 검정법(Bio-Plex Cytokine Assays)(휴먼 그룹 I & II(Human Group I & II); 바이오-래드: 미국 캘리포니아주 허큘리스)을 사용하여 제조사의 설명서에 따라 분석하였다. 본 실험은 3개의 개별 MSC 기증자 풀에 대하여 3회 이상 수행하였다. MSC1 유도는 포뮬러에 상관없이, IL6, 및 IL8을 비롯한 사이토카인을 유의적으로 분비한 반면(도 3), MSC2 유도는 포뮬러에 상관없이, IP10(CXCL10), 및 RANTES(CCL5)를 유의적으로 분비한다(도 4). 오차 막대는 +/- SEM를 나타낸다

[0130] 실시예 3 - MSC1 및 MSC2 분극화는 MSC의 다중 공급원 간에 일치한다

[0131] 3개의 상이한 상업적 공급원 및 최대 6명의 기증자로부터의 인간 MSC 기증자를 MSC1로 분극화시켰다. 0.5 ng/mL 인간 재조합 에리트로포이에틴 및 200 μM 염화코발트의 부재하에(MSC1) 또는 존재하에(MSC1*) 10 ng/mL의 LPS를 함유하는 배지를 사용하여 인간 MSC를 분극화시켰다. 전체 RNA를 단리시키고, 정제하고, cDNA로 역전사시켰다. SYBR 그린 마스터 믹스를 사용하여 정량적 실시간 PCR을 수행하였다. 정량적 비교 CT 방법을 사용하여 데이터를 분석하고, 표적 유전자 발현을 18S rRNA 하우스키핑 유전자로 정규화하고, 비처리 대조군 대비 증가 배수로 나타내었다. *Trail* 유전자 발현은 혼합된 것을 비롯한 모든 기증자에서 MSC1 유도 이후에 유의적으로 증가되었다(도 5). 오차 막대는 평균의 +/- 표준 오차(SEM: standard error of the mean)를 나타낸다. 사용된 인간 cDNA 프라이머: *Cxcl19* 정방향-CTT TCCTGG CTA CTC CAT GTT 역방향-GTT GGT CACTGG CTG ATC TAT AA; *Trail* 정방향-CTT CAC AGT GCT CCT GCA GT 역방향-TTA GCC AACTAA AAA GGC CCC; 18SrRNA 정방향- GAGGGAGCCTGAGAACGG, 역방향-GTCGGGAGTGGGTAATTGTC, 여기서, 프로토콜: 1: 95.0°C에서 0:30 동안, 2: 95.0°C에서 0:10 동안, 3: 68.0°C에서 0:30 동안, 플레이트 판독, 4: GOTO 2, 39회 초과.

[0132] 3개의 상이한 상업적 공급원 및 최대 6명의 기증자로부터의 인간 MSC 기증자를 MSC2로 분극화시켰다. 0.5 ng/mL 인간 재조합 에리트로포이에틴 및 200 μM 염화코발트의 부재하에(MSC2) 또는 존재하에(MSC2*) 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 폴리

(I:C)를 함유하는 배지를 사용하여 인간 MSC를 분극화시켰다. 전체 RNA를 단리시키고, 정제하고, cDNA로 역전사시켰다. SYBR 그린 마스터 믹스를 사용하여 정량적 실시간 PCR을 수행하였다. 정량적 비교 CT 방법을 사용하여 데이터를 분석하고, 표적 유전자 발현을 18S rRNA 하우스키핑 유전자로 정규화하고, 비처리 대조군 대비 증가 배수로 나타내었다. CXCL9 유전자 발현은 혼합된 것을 비롯한 모든 기증자에서 MSC2 유도 이후에 유의적으로 증가되었다(도 6). 오차 막대는 평균의 +/- 표준 오차(SEM)를 나타낸다.

[0133] 실시예 4 - 시간 경과에 따른 MSC1 및 MSC2 분극화

인간 MSC 기증자를 MSC1로 분극화시켰다. 0.5 ng/mL 인간 재조합 에리트로포이에틴 및 200 μM 염화코발트의 부재하에(MSC1) 또는 존재하에(MSC1*) 10 ng/mL의 LPS를 함유하는 배지를 사용하여 인간 MSC를 분극화시켰다. 명시된 바와 같이 다른 시점에 세포를 수거하였다. 전체 RNA를 단리시키고, 정제하고, cDNA로 역전사시켰다. SYBR 그린 마스터 믹스를 사용하여 정량적 실시간 PCR을 수행하였다. 정량적 비교 CT 방법을 사용하여 데이터를 분석하고, 표적 유전자 발현을 18S rRNA 하우스키핑 유전자로 정규화하고, 비처리 대조군 대비 증가 배수로 나타내었다. Trail 유전자 발현은 MSC1 유도 후 4 hr째 유의적으로 증가되었다(도 7). 오차 막대는 평균의 +/- 표준 오차(SEM)를 나타낸다.

인간 MSC 기증자를 MSC2로 분극화시켰다. 0.5 ng/mL 인간 재조합 에리트로포이에틴 및 200 μM 염화코발트의 부재하에(MSC2) 또는 존재하에(MSC2*) 2 μg/mL의 폴리(I:C)를 함유하는 배지를 사용하여 인간 MSC를 분극화시켰다. 명시된 바와 같이 다른 시점에 세포를 수거하였다. 전체 RNA를 단리시키고, 정제하고, cDNA로 역전사시켰다. SYBR 그린 마스터 믹스를 사용하여 정량적 실시간 PCR을 수행하였다. 정량적 비교 CT 방법을 사용하여 데이터를 분석하고, 표적 유전자 발현을 18S rRNA 하우스키핑 유전자로 정규화하고, 비처리 대조군 대비 증가 배수로 나타내었다. Cxcl9 유전자 발현은 MSC2 유도 후 4 hr째 유의적으로 증가되었다(도 8). 오차 막대는 평균의 +/- 표준 오차(SEM)를 나타낸다.

[0136] 실시예 5 - MSC1 및 MSC2 세포의 생체 분포

나이브 MSC와 비교하여 분극화된 MSC의 생체내 효능을 측정하는 실험을 수행하였다. 본 실험을 위해, 인간 나이브 MSC, MSC1 및 MSC2(백만개의 세포)를 야생형 마우스에 IP 주사로 투여하고, 4시간 후, 모든 기관을 수거하였다. 이어서, 추출된 RNA를 인간 GAPDH에 대해 검정하고, 마우스 GAPDH DNA와 비교하여 조직 귀소를 확인했다. 본 결과는 하기 표 1에 제시되어 있다.

표 1

	투여 후 4시간째의 회수된 세포 비율(%)		
	나이브 MSC	MSC1	MSC2
뇌	0.10	0.3	0.4
폐	54.20	3.1	4.9
심장	0.20	0.001	0.5
비장	25.50	46.7	82.9
신장	20.60	26.9	2.6
간	1.70	22.2	8.9
장	0.60	0.001	0
립프절	0.00	0.2	0

[0138]

실시예 6 - MSC 분극화 동안 에리트로포이에틴 및 염화코발트와 함께 인큐베이션시키면, MSC1 및 MSC2 세포의 이동, 증식/생존능은 증가된다

에리트로포이에틴 및 저산소 존재하에 또는 부재하에서 배양된 MSC의 이동 능력을 측정하기 위해, 인간 나이브 MSC 세포, 및 MSC1 또는 MSC2 분극화된 세포를 개별 트랜스웰 인서트(8 uM 공극, 50,000개의 세포/인서트)에 투여하였다. 0.5 ng/mL 인간 재조합 에리트로포이에틴 및 200 μM 염화코발트의 부재하에(MSC1) 또는 존재하에(MSC1*) 10 ng/mL의 LPS를 함유하는 배지를 사용하여 MSC1 세포를 분극화시켰다. 0.5 ng/mL 인간 재조합 에리트로포이에틴 및 200 μM 염화코발트의 부재하에(MSC2) 또는 존재하에(MSC2*) 2 μg/mL의 폴리(I:C)를 함유하는 배지를 사용하여 MSC2 세포를 분극화시켰다. 음성 대조군인 무혈청 배지(SFM: serum free medium) 또는 양성 대조

군인 혈청 함유 성장 배지(CCM), 또는 명시된 바와 같은 상응하는 유도 배지를 함유하는 24웰 컴페니온 플레이트로 막을 아래로 내렸다. 16시간 동안 인큐베이션시킨 후, 니콘 이클립스(Nikon Eclipse) TE300 도립 형광 현미경을 사용하여 현미경 사진을 촬영하였다. **도 9**는 삼중으로 수행된(n=3), 독립적으로 실시된 3회 초과의 실험으로부터 얻은 4개의 대표 영상 사분면으로부터 계수된 이동 MSC의 대표 데이터를 보여주는 것이다. 오차 막대는 SEM을 나타낸다.

[0141] 증식 검정법을 사용하여 에리트로포이에틴 및 저산소 존재하에 또는 부재하에서 배양된 MSC의 증식능 및 생존능을 측정하였다. 0.5 ng/mL 인간 재조합 에리트로포이에틴 및 200 μ M 염화코발트의 부재하에(MSC1) 또는 존재하에(MSC1*) 10 ng/mL의 LPS를 함유하는 배지를 사용하여 인간 MSC를 분극화시켰다. 0.5 ng/mL 인간 재조합 에리트로포이에틴 및 200 μ M 염화코발트의 부재하에(MSC2) 또는 존재하에(MSC2*) 2 μ g/mL의 폴리(I:C)를 함유하는 배지를 사용하여 MSC2 세포를 분극화시켰다. 세포를 48시간 동안 지정된 배지와 함께 인큐베이션시켰다. 각 샘플로부터의 세포 증식 및 생존능을 각각 CyQUANT 검정법(라이프 테크놀러지즈(Life Technologies: 미국 캘리포니아주)) 및 트리판 블루 검정법에 의해 측정하였다. 세포 증식을 위해, 세포를 삼중으로 웰당 50 μ l 중 1 x 10³ 개의 세포로 96웰 플레이트에 시딩하고, 37°C, 5% CO₂에서 배양하였다. 샘플을 처리 후 0, 24, 48, 72, 및 96 hr 째에 수거하고, 제조사에 의해 기술된 바와 같이(CyQUANT 검정법, 라이프 테크놀러지즈: 미국 캘리포니아주) 프로세싱하였다. 제시된 데이터는 비처리 대조군 대비의 상대적인 값으로 표현된 것이다. 3회 이상의 별개의 실험으로 세포 증식 검정법을 수행하였으며, 여기서, 각 샘플은 96웰 플레이트의 8개의 웰을 따라 반복되었다(n=3). 오차 막대는 SEM을 나타낸다. 결과는 **도 10**에 제시되어 있다.

[0142] 실시예 7 CXCL9 및 TNFSF10에 대한 qPCR 검정법에 의한 확인

[0143] 인간 MSC는 MSC1로 유도되었다. 전체 RNA를 단리시키고, 정제하고, cDNA로 역전사시켰다. SYBR 그린 마스터 믹스를 사용하여 정량적 실시간 PCR을 수행하였다. 정량적 비교 CT 방법을 사용하여 데이터를 분석하고, 표적 유전자 발현을 18S rRNA 하우스키핑 유전자로 정규화하고, 비처리 대조군 대비 증가 배수로 나타내었다. Trail 유전자 발현은 MSC1 유도 후 유의적으로 증가되었다. 오차 막대는 평균의 +/- 표준 오차(SEM)를 나타낸다. 프라이머 효능 및 생성물 특이성(**도 11**)이 확립되었다.

[0144] 인간 MSC는 MSC2로 유도되었다. 전체 RNA를 단리시키고, 정제하고, cDNA로 역전사시켰다. SYBR 그린 마스터 믹스를 사용하여 정량적 실시간 PCR을 수행하였다. 정량적 비교 CT 방법을 사용하여 데이터를 분석하고, 표적 유전자 발현을 18S rRNA 하우스키핑 유전자로 정규화하고, 비처리 대조군 대비 증가 배수로 나타내었다. Cxcl9 유전자 발현은 MSC2 유도 후 유의적으로 증가되었다. 오차 막대는 평균의 +/- 표준 오차(SEM)를 나타낸다. 시간 경과에 따른 유전자 발현(**도 12A**), 및 생성물 특이성(**도 12B**)이 확립되었다.

[0145] 본 발명은 특히 그의 바람직한 실시양태를 참조로 하여 상세하게 기술되었고, 동시에 본 발명의 작동 원리 및 모드 또한 본 명세서에 기술되었다. 본 발명이 개시된 특정 형태로 제한되는 것으로 해석되지 않아야 하며, 상기의 개시된 특정 형태는 제한적이라기보다는 예시적인 것이다. 하기 특허청구범위에 의해 기술된 본 발명의 정신 및 범주로부터 벗어남 없이 당업자에 의해 수정, 변형, 및 변화가 이루어질 수 있다.

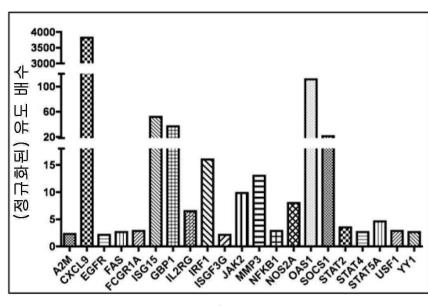
[0146] 본 발명의 바람직한 실시양태가 본원에 제시되고, 기술되었지만, 상기 실시양태는 단지 예로 제공된 것이라는 것은 당업자에게 명백할 것이다. 이에, 본 발명으로부터 벗어남 없이 당업자에게는 다수의 변형, 변화, 및 치환이 이루어질 수 있을 것이다. 본원에 기술된 본 발명의 실시양태에 대한 다양한 대안이 본 발명을 실시하는 데 사용될 수 있음을 이해하여야 한다. 하기의 특허청구범위가 본 발명의 범주를 정의하고, 이러한 특허청구범위의 범주 내에 포함되어 있는 방법 및 구조 및 그의 등가물이 그에 포함되는 것으로 의도된다.

도면

도면1

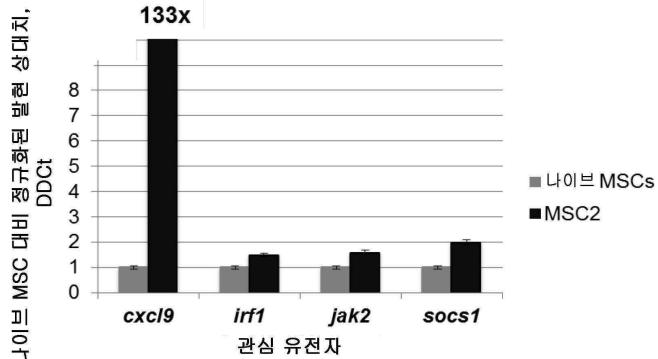
A2M A01	SH2B2 A02	BC12L A03	CCND1 A04	CDDN1 A05	CERPB A06	CRK A07	CRP A08	CSF1R A09	CS2R A10	CXCL9 A11	EGR A12
EPOX B01	F2R B02	F2R B03	FAS B04	FCER1 A B05	FCR1 A B06	FGF13 B07	GATAD3 B08	GSP1 B09	GHR B10	HMGKA1 B11	IFHAR1 B12
IFMG C01	IFNGR1 C02	IL10RA C03	IL120 C04	IL2RA C05	IL2RG C06	IL4 C07	IL4R C08	IL6ST C09	INSR C10	IRF1 C11	IRF9 C12
JAK1 D01	JAK2 D02	JAK3 D03	JUN D04	JUNB D05	MMP3 D06	MPL D07	MVC D08	NHRB1 D09	NR2SA D10	NR3C1 D11	OS1 D12
OSM E01	PDGFR A E02	PIAS1 E03	PIAS2 E04	PP2B 1A E05	PRIR E06	PTPN1 E07	PTPRC E08	SHB1 E09	SLA2 E10	SMAD1 E11	SMAD1 E12
SMAD2 F01	SMAD3 F02	SMAD4 F03	SMAD5 F04	SOCS1 F05	SOCS2 F06	SOCS3 F07	SOCS4 F08	SOCS5 F09	SP1 F10	SP11 F11	SRC F12
STAT1 G01	STAT1 G02	STAT2 G03	STAT3 G04	STAT4 G05	STAT5 G06	STAT5 G07	STAT6 G08	STUB1 G09	TK2 G10	USF1 G11	YY1 G12
B2M H01	HRPT1 H02	HRPT1 A H03	GPDRH H04	IGDC H05	ITRC H07	ITRC H08	ITRC H09	ITRC H10	PPC H11	PPC H12	

도면2



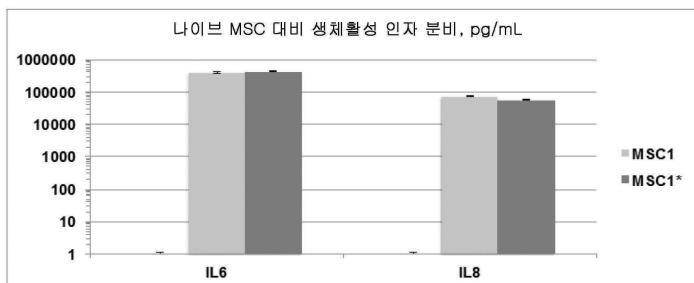
A

qPCR 검정법에 의한 유도 4 Hr 후의 유전자 발현

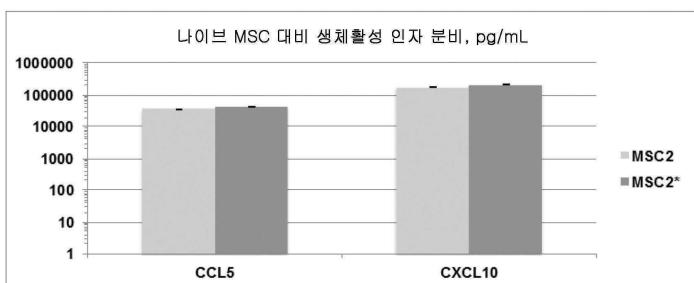


B

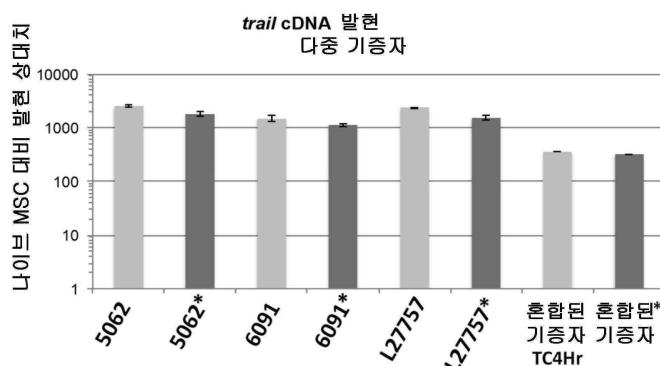
도면3



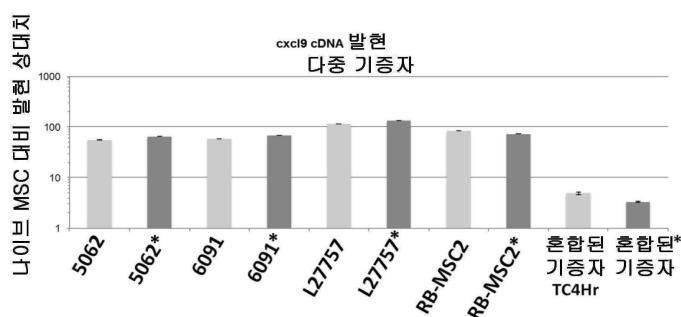
도면4



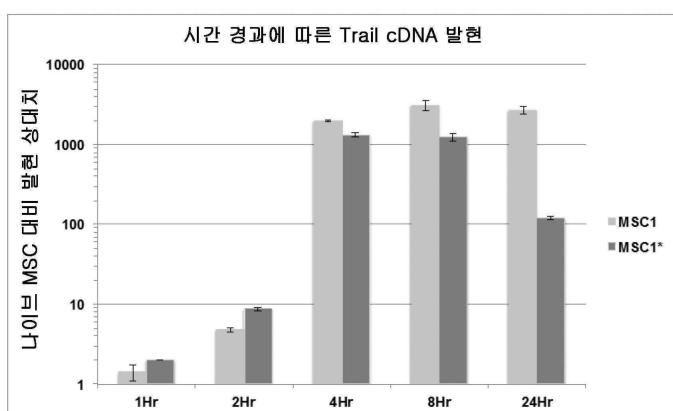
도면5



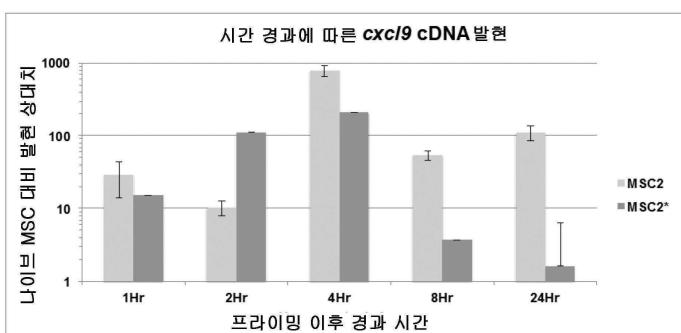
도면6



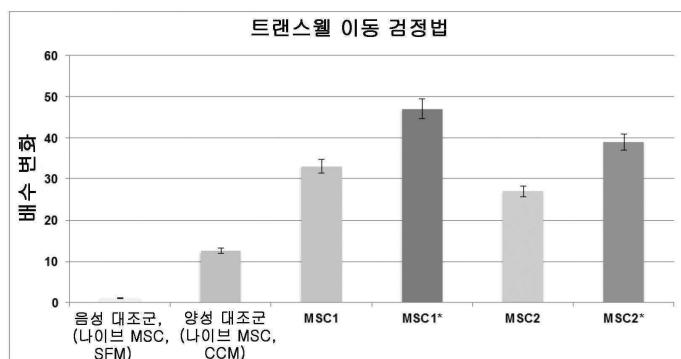
도면7



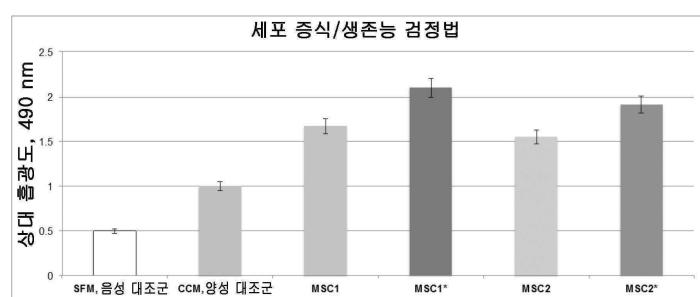
도면8



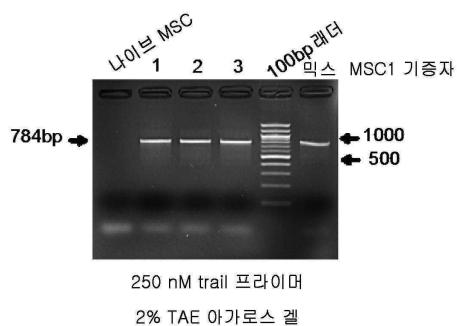
도면9



도면10



도면11



도면12

