



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0164741
(43) 공개일자 2022년12월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/28 (2015.01) A61P 29/00 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01) A61P 7/02 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 35/28 (2013.01)
A61P 29/00 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2022-7037690
(22) 출원일자(국제) 2021년04월01일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년10월27일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2021/058683
(87) 국제공개번호 WO 2021/198454
국제공개일자 2021년10월07일
(30) 우선권주장
2020901052 2020년04월03일 오스트레일리아(AU)
(뒷면에 계속)

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

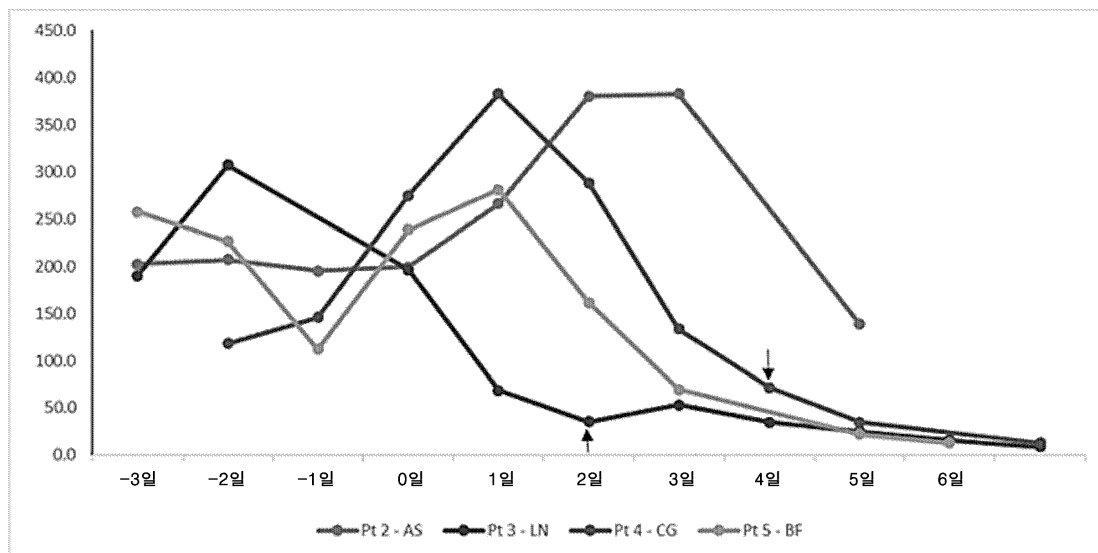
전체 청구항 수 : 총 37 항

(54) 발명의 명칭 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포를 이용한 과염증 치료 방법

(57) 요약

본 개시내용은 과염증(hyperinflammation)의 치료 또는 예방이 필요한 대상체에서 과염증을 치료 또는 예방하는 방법으로서, 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포(mesenchymal lineage precursor or stem cell, MLPSC)를 포함하는 조성물을 상기 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

A61P 31/14 (2018.01)

A61P 7/02 (2018.01)

(30) 우선권주장

2020901124	2020년04월08일	오스트레일리아(AU)
2020902312	2020년07월06일	오스트레일리아(AU)
2020902425	2020년07월14일	오스트레일리아(AU)
2020903041	2020년08월25일	오스트레일리아(AU)
2020903694	2020년10월12일	오스트레일리아(AU)
2020904312	2020년11월23일	오스트레일리아(AU)

명세서

청구범위

청구항 1

과염증(hyperinflammation)의 치료 또는 예방이 필요한 인간 대상체에서 과염증을 치료 또는 예방하는 방법으로서, 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포(mesenchymal lineage precursor or stem cell, MLPSC)를 포함하는 조성물을 상기 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 과염증이 바이러스 감염에 의해 유발되는 것인 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 바이러스 감염이 리노바이러스(rhinovirus), 인플루엔자 바이러스(influenza virus), 호흡기 세포융합 바이러스(respiratory syncytial virus, RSV) 또는 코로나바이러스(coronavirus)에 의해 유발되는 것인 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 바이러스 감염이 코로나바이러스에 의해 유발되는 것인 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 코로나바이러스가 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스(Severe Acute Respiratory Syndrome coronavirus, SARS-CoV), 중등 호흡기 증후군 코로나바이러스(Middle East Respiratory Syndrome coronavirus, MERS-CoV) 또는 COVID-19인 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 또한 급성 호흡곤란 증후군(Acute Respiratory Distress Syndrome, ARDS)이 있는 방법.

청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, MLPSC가 냉동보존되고 해동된 것인 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, MLPSC가 중간 냉동보존된 MLPSC 집단으로부터 배양 증식된(culture expanded) 것인 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, MLPSC가 적어도 약 5 세대 동안 배양 증식된 것인 방법.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, MLPSC가 MLPSC 백만 개당 적어도 13pg의 TNFR1을 발현하는 것인 방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, MLPSC가 MLPSC 백만 개당 약 13pg 내지 약 44pg의 TNFR1을 발현하는 것인 방법.

청구항 12

제9항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 배양 증식이 적어도 20 또는 30의 집단 배가(population doubling)를 포함하는 방법.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 MIS가 있는 방법.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 바이러스성 심근염(viral myocarditis)이 있는 방법.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, MLPSC가 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell, MSC)인 방법.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, MLPSC가 동종이계(allogeneic)인 방법.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, MLPSC가 항바이러스 약물 또는 혈전용해제(thrombolytic agent)를 운반하거나 발현하도록 변형되는 것인 방법.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 용량당 1×10^7 내지 2×10^8 개의 세포를 투여하는 것을 포함하는 방법.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 용량당 약 1×10^8 개의 세포를 투여하는 것을 포함하는 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 대상체가 2회 용량을 받는 방법.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체의 순환 CRP 수준(circulating CRP level)이 치료 후에 감소하는 방법.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체의 백혈구 수가 치료 후에 감소하는 방법.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체의 FiO2 수준이 치료 후에 감소하고/하거나 대상체의 P/F 비율이 치료 후에 증가하는 방법.

청구항 24

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체의 D-이량체 수준이 치료 후에 감소하는 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, 대상체의 D-이량체 수준이 $5 \mu\text{g/ml}$ 미만으로 감소하는 방법.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체의 BNP 수준이 치료 후에 감소하는 방법.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체의 LVEF%가 치료 후에 증가하는 방법.

청구항 28

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물이 플라즈마-라이트(Plasma-Lyte) A, 디메틸 설펍사이드(dimethyl sulfoxide, DMSO), 인간 혈청 알부민(human serum albumin, HSA)을 추가로 포함하는 방법.

청구항 29

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물이 플라즈마-라이트 A(70%), DMSO(10%), HSA(25%) 용액을 추가로 포함하고, HSA 용액이 5% HSA 및 15% 버퍼를 포함하는 방법.

청구항 30

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물이 6.68×10^6 개 초과와 생존 세포/mL를 포함하는 방법.

청구항 31

다계통 염증 증후군(multi-system inflammatory syndrome, MIS)의 치료 또는 예방이 필요한 인간 대상체에서 다계통 염증 증후군(MIS)을 치료 또는 예방하는 방법으로서, 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포(MLPSC)를 포함하는 조성물을 상기 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법.

청구항 32

제31항에 있어서, 대상체가 어린이인 방법.

청구항 33

상승된 D-이량체 수준과 관련된 질환의 치료 또는 예방이 필요한 인간 대상체에서 상승된 D-이량체 수준과 관련된 질환을 치료 또는 예방하는 방법으로서, 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포(MLPSC)를 포함하는 조성물을 상기 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법.

청구항 34

제33항에 있어서, 질환이 혈전증(thrombosis) 또는 폐색전증(pulmonary embolism)인 방법.

청구항 35

제33항 또는 제34항에 있어서, 치료가 대상체의 D-이량체 수준을 $15 \mu\text{g/ml}$ 미만으로 감소시키는 방법.

청구항 36

제33항 또는 제34항에 있어서, 치료가 대상체의 D-이량체 수준을 $5 \mu\text{g/ml}$ 미만으로 감소시키는 방법.

청구항 37

제34항에 있어서, 혈전증이 동맥 혈전증인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 개시내용은 과염증(hyperinflammation)의 치료 또는 예방이 필요한 대상체에서 과염증을 치료 또는 예방하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 바이러스 감염과 같은 다양한 병태와 관련된 호흡기 질환은 일반 집단에서 문제가 된다. 많은 경우 폐의 상태를 악화시키는 과염증이 동반된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0003] 따라서, 특히 새로운 치료 옵션이 요구되는 바이러스 감염에 이차적인 경우 과염증이 있는 환자에서 충족되지 않은 치료 필요성이 남아 있다.

과제의 해결 수단

[0004] 본 발명자들은 놀랍게도 과염증의 치료가 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포(mesenchymal lineage precursor or stem cell, MLPSC)를 투여함으로써 달성될 수 있음을 확인하였다.

[0005] 따라서, 첫 번째 예에서, 본 개시내용은 과염증의 치료 또는 예방이 필요한 인간 대상체에서 과염증을 치료 또는 예방하는 방법으로서, 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포(MLPSC)를 포함하는 조성물을 상기 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법에 관한 것이다.

[0006] 한 예에서, 과염증은 바이러스 감염에 의해 유발된다. 바이러스 감염은, 예를 들어, 리노바이러스(rhinovirus), 인플루엔자 바이러스(influenza virus), 호흡기 세포융합 바이러스(respiratory syncytial virus, RSV) 또는 코로나바이러스(coronavirus)에 의해 유발될 수 있다.

[0007] 한 예에서, 과염증은 코로나바이러스 감염에 의해 유발된다. 코로나바이러스는, 예를 들어, 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스(Severe Acute Respiratory Syndrome coronavirus, SARS-CoV), 중동 호흡기 증후군 코로나바이러스(Middle East Respiratory Syndrome coronavirus, MERS-CoV), COVID-19, 229E, NL63, OC43 또는 KHU1일 수 있다. 한 예에서, 코로나바이러스는 SARS-CoV, MERS-CoV 또는 COVID-19(SARS-CoV-2)이다.

[0008] 다른 예에서, 대상체는 또한 급성 호흡곤란 증후군(Acute Respiratory Distress Syndrome, ARDS)이 있다. 다른 예에서, 대상체는 다계통 염증 증후군(multi-system inflammatory syndrome)이 있다. 이 예에서, 대상체는 21 세 미만일 수 있다. 한 예에서, MIS가 있는 대상체는 어린이이다. 다른 예에서, 대상체는 바이러스성 심근염(viral myocarditis)이 있다.

[0009] 따라서, 한 예에서, 본 개시내용은 ARDS의 치료가 필요한 인간 대상체에서 ARDS를 치료하는 방법으로서, 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포(MLPSC)를 포함하는 조성물을 상기 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법에 관한 것이다.

[0010] 한 예에서, MLPSC는 냉동보존되고 해동되었다. 한 예에서, MLPSC는 중간 냉동보존된 MLPSC 집단으로부터 배양 증식된다(culture expanded). 또 다른 예에서, MLPSC는 적어도 약 5 세대 동안 배양 증식된다. 한 예에서, MLPSC는 MLPSC 백만 개당 적어도 13pg의 TNFR1을 발현한다. 한 예에서, MLPSC는 MLPSC 백만 개당 약 13pg 내지 약 44pg의 TNFR1을 발현한다. 한 예에서, 배양 증식된 MLPSC는 적어도 20의 집단 배가에 대해 배양 증식된다. 다른 예에서, 배양 증식된 MLPSC는 적어도 30의 집단 배가에 대해 배양 증식된다. 한 예에서, MLPSC는 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell, MSC)이다. 다른 예에서, MLPSC는 동종이계(allogeneic)이다. 예를 들어, MLPSC는 동종이계 MSC일 수 있다.

[0011] 다른 예에서, MLPSC는 항바이러스 약물 또는 혈전용해제(thrombolytic agent)를 운반하거나 발현하도록 변형된다. 예를 들어, 항바이러스 약물은 렘데시비르(Remdesivir)이다. 한 예에서, 혈전용해제는 에미나제(Eminase)(아니스트렙라제(anistreplase)), 레타바제(retapase), 스트렙타제(Streptase)(스트렙토키나제(streptokinase), 카비키나제(kabikinase))로 이루어진 군에서 선택된다.

[0012] 또 다른 예에서, MLPSC는 항바이러스 펩티드 또는 이를 암호화하는 핵산을 발현하도록 유전적으로 변형된다.

[0013] 한 예에서, 조성물은 정맥내 투여된다.

[0014] 한 예에서, 본 개시내용의 방법은 1×10^7 내지 2×10^8 개의 세포를 투여하는 것을 포함한다. 예를 들어, 1×10^7 내지 2×10^8 개의 세포의 다중 용량이 0일, 30일, 60일 및 90일에 투여될 수 있다. 한 예에서, 본 개시내용의 방법은 용량당 약 1×10^8 개의 세포를 투여하는 것을 포함한다. 한 예에서, 대상체는 2회 용량이 투여된다.

[0015] 한 예에서, 대상체의 순환 CRP 수준(circulating CRP level)은 치료 후에 감소한다. 한 예에서, 대상체의 백혈구 수치는 치료 후에 감소한다. 한 예에서, 대상체의 D-이량체 수준은 치료 후에 감소한다. 한 예에서, 대상체

의 D-이량체 수준은 5ug/ml 미만으로 감소한다. 한 예에서, 대상체의 BNP 수준은 치료 후에 감소한다. 한 예에서, 대상체의 FiO2 수치는 치료 후에 감소한다. 한 예에서, 대상체의 P/F 비율은 치료 후에 증가한다. 한 예에서, 대상체의 LVEF%는 치료 후에 증가한다.

[0016] 또 다른 예에서, 조성물은 플라즈마-라이트(Plasma-Lyte) A, 디메틸 설펍사이드(dimethyl sulfoxide, DMSO), 인간 혈청 알부민(human serum albumin, HSA)을 추가로 포함한다. 한 예에서, 조성물은 플라즈마-라이트 A(70%), DMSO(10%), HSA(25%) 용액을 추가로 포함하고, HSA 용액은 5% HSA 및 15% 버퍼를 포함한다.

[0017] 한 예에서, 조성물은 6.68×10^6 개 초과와 생존 세포/mL를 포함한다.

[0018] 또 다른 예에서, 본 개시내용은 다계통 염증 증후군(MIS)의 치료 또는 예방이 필요한 인간 대상체에서 다계통 염증 증후군(MIS)을 치료 또는 예방하는 방법으로서, 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포(MLPSC)를 포함하는 조성물을 상기 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법에 관한 것이다. 한 예에서, 대상체는 어린이일 수 있다.

[0019] 다른 예에서, 본 개시내용은 상승된 D-이량체 수준과 관련된 질환의 치료 또는 예방이 필요한 인간 대상체에서 상승된 D-이량체 수준과 관련된 질환을 치료 또는 예방하는 방법으로서, 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포(MLPSC)를 포함하는 조성물을 상기 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법에 관한 것이다. 한 예에서, 질환은 정맥 폐색에 의해 유발된다. 한 예에서, 질환은 동맥 폐색에 의해 유발된다. 한 예에서, 질환은 혈전증(thrombosis)에 의해 유발된다. 한 예에서, 질환은 폐색전증(pulmonary embolism)에 의해 유발된다. 한 예에서, 치료는 대상체의 D-이량체 수준을 $15 \mu\text{g/ml}$ 미만으로 감소시킨다. 한 예에서, 대상체는 치료 전 LVEF가 55% 미만이다. 한 예에서, 대상체는 치료 전 LVEF가 52% 미만이다. 다른 예에서, 대상체는 BNP 수준이 400pg/ml 초과이다. 다른 예에서, 대상체는 BNP 수준이 500pg/ml 초과이다.

[0020] 또 다른 예에서, 본 개시내용은 상승된 D-이량체 수준과 관련된 질환의 치료 또는 예방이 필요한 인간 대상체에서 상승된 D-이량체 수준과 관련된 질환을 치료 또는 예방하는 방법으로서, 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포(MLPSC)를 포함하는 조성물을 상기 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법에 관한 것이다. 한 예에서, 질환은 혈전증 또는 색전증이다. 한 예에서, 혈전증은 동맥 혈전증이다. 한 예에서, 색전증은 폐색전증이다.

[0021] 또 다른 예에서, 본 개시내용은 혈전증의 치료 또는 예방이 필요한 인간 대상체에서 혈전증을 치료 또는 예방하는 방법으로서, 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포(MLPSC)를 포함하는 조성물을 상기 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법에 관한 것이다. 한 예에서, 혈전증은 정맥 혈전증이다. 다른 예에서, 혈전증은 동맥 혈전증이다. 또 다른 예에서, 본 개시내용은 폐색전증의 치료 또는 예방이 필요한 인간 대상체에서 폐색전증을 치료 또는 예방하는 방법으로서, 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포(MLPSC)를 포함하는 조성물을 상기 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법에 관한 것이다. 한 예에서, 치료는 대상체의 D-이량체 수준을 $15 \mu\text{g/ml}$ 미만으로 감소시킨다. 한 예에서, 대상체는 치료 전 LVEF가 55% 미만이다. 한 예에서, 대상체는 치료 전 LVEF가 52% 미만이다. 다른 예에서, 대상체는 BNP 수준이 400pg/ml 초과이다. 다른 예에서, 대상체는 BNP 수준이 500pg/ml 초과이다. 한 예에서, 혈전증은 동맥 혈전증이다.

[0022] 한 예에서, 투여된 MLPSC는 중간엽 줄기세포(MSC)이다. 한 예에서 MLPSC는 동종이체이다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1: 예비 결과 1 - PaO2/FiO2; 백혈구 수.

도 2: 예비 결과 1 - CRP; 페리틴.

도 3: 예비 결과 3 - PaO2/FiO2; 백혈구 수.

도 4: 예비 결과 3 - CRP; 페리틴.

도 5: 결과 요약.

도 6: PaO2/FiO2 비율 최저값(n=5).

도 7: PaO2/FiO2 비율 중앙값(n=5).

도 8: 순환 CRP 수준(n=5).

도 9: 크레아티닌 수준(n=5).

도 10: 페리틴 수준($n=5$).

도 11: 세포 요법 주입으로부터 시간에 따른 이벤트의 스위머 플롯(Swimmer Plot). 왼쪽의 숫자는 표 2에 표시된 개별 환자 식별자를 나타낸다.

도 12: 세포 요법 주입으로부터 시간에 따른 P:F 비율 중앙값 및 사분 범위(Interquartile Range).

도 13: 세포 요법 주입으로부터 시간에 따른 C-반응성 단백질 수준 중앙값 및 사분범위.

도 14: 상세한 임상 경과; 환자 1.

도 15: 상세한 임상 경과; 환자 2.

도 16: LVEF%, BNP(pg/ml) 및 D-이량체(ug/ml) 수준의 비교.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0024] 본 명세서 전반에 걸쳐, 달리 구체적으로 언급되지 않거나 문맥이 달리 요구하지 않는 한, 단일 단계, 물질 조성, 단계의 그룹 또는 물질 조성의 그룹에 대한 언급은 하나 및 복수(즉, 하나 이상의)의 이러한 단계, 물질 조성, 단계의 그룹 또는 물질 조성의 그룹을 포함하는 것으로 간주한다.
- [0025] 당업자는 본원에 기술된 개시내용이 구체적으로 기술된 것 이외의 변형 및 수정이 가능하다는 것을 이해할 것이다. 본 개시내용은 이러한 모든 변형 및 수정을 포함하는 것으로 이해해야 한다. 본 개시내용은 또한 개별적으로 또는 집합적으로 본 명세서에서 언급되거나 표시된 모든 단계, 특징, 조성물 및 화합물, 및 상기 단계 또는 특징 중 임의의 것 및 모든 조합 또는 임의의 둘 이상을 포함한다.
- [0026] 본 개시내용은 단지 예시의 목적으로 의도된 본원에 기술된 특정 실시양태에 의해 범위가 제한되지 않는다. 기능적으로 동등한 제품, 조성물 및 방법은 본원에 기술된 바와 같이 본 개시내용의 범위 내에 분명히 있다.
- [0027] 본원에 개시된 모든 예는 달리 구체적으로 언급되지 않는 한, 준용(*mutatis mutandis*)하여 임의의 다른 예에 적용되어야 한다.
- [0028] 달리 구체적으로 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 당해 기술분야(예를 들어, 세포 배양, 분자 유전학, 줄기세포 분화, 면역학, 면역조직화학, 단백질 화학 및 생화학)의 숙련가가 일반적으로 이해하는 것과 동일한 의미인 것으로 간주해야 한다.
- [0029] 달리 표시되지 않는 한, 본 개시내용에서 사용되는 수술 기술은 당업자에게 잘 알려진 표준 절차이다.
- [0030] 중간엽 계통 줄기세포 또는 전구 세포의 집단을 수득하고 농축하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 중간엽 계통 줄기세포 또는 전구세포의 농축된 집단은 중간엽 계통 줄기세포 또는 전구세포에서 발현되는 세포 표면 마커의 사용에 기초하여 유세포분석 및 세포 분류 절차를 사용하여 수득할 수 있다.
- [0031] 본원에 인용되거나 참조된 모든 문서, 및 본원에 인용된 문서에서 인용되거나 참조된 모든 문서는 본원 또는 본원에 참조로 포함된 임의의 문서에 언급된 임의의 제품에 대한 제조업체의 지침, 설명, 제품 사양 및 제품 시트와 함께 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.
- [0032] 선택된 정의
- [0033] 용어 "및/또는", 예를 들어, "X 및/또는 Y"는 "X 및 Y" 또는 "X 또는 Y"를 의미하는 것으로 이해해야 하며, 두 의미 모두 또는 둘 중 어느 쪽이든 그 의미를 명시적으로 뒷받침하는 것으로 간주해야 한다.
- [0034] 본원에 사용된 약이라는 용어는 달리 언급되지 않는 한 지정된 값의 $\pm 10\%$, 더욱 바람직하게는 $\pm 5\%$ 를 의미한다.
- [0035] 본 명세서 전반에 걸쳐 "포함하다(comprise)"라는 단어, 또는 "포함하다(comprises)" 또는 "포함하는(comprising)"과 같은 변형은 언급된 요소, 정수 또는 단계, 또는 요소, 정수 또는 단계의 그룹을 포함하는 것을 의미하는 것으로 이해될 것이지만, 다른 요소, 정수 또는 단계, 또는 요소, 정수 또는 단계의 그룹을 제외하지 않는다.
- [0036] 본원에 사용된 단수 형태 "일(a)", "하나(an)" 및 "그(the)"는 문맥이 달리 나타내지 않는 한 단수 및 복수 대상을 포함한다.

- [0037] "분리된" 또는 "정제된"은 세포의 자연 환경의 적어도 일부 구성요소로부터 분리된 세포를 의미한다. 이 용어는 세포의 자연 환경으로부터 세포가 물리적으로 완전히 분리된 것을 포함한다(예를 들어, 공여자로부터의 제거). "분리된"이라는 용어는, 예를 들어, 해리에 의한 직접적인 인접 세포와의 세포 관계의 변경을 포함한다. "분리된"이라는 용어는 조직 절편에 있는 세포를 의미하지 않는다. 세포 집단을 지칭하기 위해 사용될 때, 용어 "분리된"은 본 개시내용의 분리된 세포의 증식으로 인한 세포 집단을 포함한다.
- [0038] 용어 "계대(passage)", "계대(passaging)" 또는 "계대배양(sub-culture)"은 본 개시내용의 맥락에서 세포 수가 지속적으로 증가할 수 있도록 장기간 동안 배양 조건하에 세포를 생존 및 성장시키는 데 사용되는 공지된 세포 배양 기술을 지칭하기 위해 사용된다. 세포주가 계대배양된 정도를 흔히 "계대수"로 표현하며, 이는 일반적으로 세포가 계대배양된 횟수를 나타낸다. 한 예에서, 한 계대는 비부착성 세포를 제거하고 부착성 중간엽 계통 전구 세포 또는 줄기세포를 남기는 것을 포함한다. 그런 다음 이러한 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포는 (예를 들어, 트립신 또는 콜라게나제와 같은 프로테아제를 사용하여) 기질 또는 플라스크로부터 해리될 수 있고, 배지가 첨가될 수 있고, (예를 들어, 원심분리에 의한) 선택적인 세척이 수행될 수 있고, 이어서 중간엽 계통 전구 세포 또는 줄기세포는 전체적으로 표면적이 더 큰 하나 이상의 배양 용기에 다시 플레이팅되거나 다시 시딩될 수 있다. 그러면 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포가 배양물에서 계속 증식될 수 있다. 또 다른 예에서, 비부착성 세포를 제거하는 방법은 (예를 들어, EDTA를 사용한) 비효소적 처리 단계를 포함한다. 한 예에서, 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포는 컨플루언스(confluence)에서 또는 그 부근에서 계대된다(예를 들어, 약 75% 내지 약 95% 컨플루언스). 한 예에서, 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포는 배양 배지 ml당 약 10%, 약 15% 또는 약 20% 세포의 농도로 시딩된다.
- [0039] 본 개시내용의 맥락에서 사용되는 용어 "배지(medium)" 또는 "배지(media)"는 배양물에서 세포를 둘러싼 환경의 구성요소를 포함한다. 배지는 세포가 성장하도록 하는 데 적합한 조건에 기여하고/거나 그러한 조건을 제공하는 것으로 예상된다. 배지는 고체, 액체, 기체 또는 상(phase)과 물질의 혼합물일 수 있다. 배지는 액체 성장 배지 뿐만 아니라 세포 성장을 지속하지 않는 액체 배지를 포함할 수 있다. 예시적인 기체 배지는 페트리 접시나 다른 고체 또는 반고체 지지체 상에서 성장하는 세포가 노출되는 기상(gaseous phase)을 포함한다.
- [0040] 본원에 사용된 용어 "치료하는", "치료하다" 또는 "치료"는 중간엽 계통 줄기세포 또는 전구세포 및/또는 이의 자손 및/또는 이로부터 유래된 가용성 인자 집단을 투여하여 과염증의 적어도 한 증상을 줄이거나 없애는 것을 포함한다. 한 예에서, 치료는 배양 증식된 중간엽 계통 줄기세포 또는 전구세포 집단을 투여하는 것을 포함한다. 한 예에서, 치료 반응은 기준선에 대해 결정된다.
- [0041] 한 예에서, 치료는 대상체의 CRP 수준에 기초하여 결정된다. 다른 예에서, 치료는 백혈구 수, P/F 비율 또는 페리틴 수준 중 하나 이상에 기초하여 결정된다. 한 예에서, 치료는 기준선과 비교하여 P/F를 50만큼 개선한다. 다른 예에서, 치료는 대상체의 P/F를 200 넘게 증가시킨다. 다른 예에서, 치료는 대상체의 P/F를 250 넘게 증가시킨다.
- [0042] "C-반응성 단백질" 또는 "CRP"는 염증 매개체로서, 그 수준은 급성 염증 재발 조건하에 증가되고 염증이 가라앉으면 빠르게 정상화된다.
- [0043] 한 예에서, 치료는 CRP, 프로칼시토닌(Procalcitonin, PCT) 및 페리틴 수준의 감소에 기초하여 결정된다.
- [0044] 한 예에서, 치료는 기준선과 비교하여 CRP를 적어도 100mg/dl만큼 감소시킨다. 다른 예에서, 치료는 기준선과 비교하여 CRP를 적어도 150mg/dl만큼 감소시킨다. 한 예에서, 순환 CRP 수준의 감소는 CRP가 80mg/dl 이하로 감소하는 것이다. 한 예에서, 순환 CRP 수준의 감소는 CRP가 60mg/dl 이하로 감소하는 것이다. 다른 예에서, 순환 CRP 수준의 감소는 CRP가 50mg/dl 이하로 감소하는 것이다. 다른 예에서, 순환 CRP 수준의 감소는 CRP가 40mg/dl 이하로 감소하는 것이다. 다른 예에서, 순환 CRP 수준의 감소는 CRP가 20mg/dl 이하로 감소하는 것이다. 다른 예에서, 순환 CRP 수준의 감소는 CRP가 10mg/dl 이하로 감소하는 것이다. 다른 예에서, 순환 CRP 수준의 감소는 CRP가 5mg/dl 이하로 감소하는 것이다. 다른 예에서, 순환 CRP 수준의 감소는 CRP가 3mg/dl 이하로 감소하는 것이다.
- [0045] 다른 예에서, 치료는 CRP를 0.5mg/dl 내지 60mg/dl로 감소시킨다. 다른 예에서, 치료는 CRP를 0.5mg/dl 내지 30mg/dl로 감소시킨다. 다른 예에서, 치료는 CRP를 0.5mg/dl 내지 10mg/dl로 감소시킨다.
- [0046] 한 예에서, 치료는 페리틴 수준을 2000mg/dl 미만으로 감소시킨다. 또 다른 예에서, 치료는 기준선과 비교하여 페리틴 수준을 적어도 500mg/dl만큼 감소시킨다. 다른 예에서, 치료는 기준선과 비교하여 페리틴 수준을 적어도 750mg/ml만큼 감소시킨다. 다른 예에서, 치료는 페리틴 수준을 700mg/dl 미만으로 감소시킨다.

- [0047] 다른 예에서, 치료는 PCT 수준을 0.12ng/ml 미만으로 감소시킨다. 다른 예에서, 치료는 PCT 수준을 0.1ng/ml 미만으로 감소시킨다. 다른 예에서, 치료는 PCT 수준을 0.08ng/ml 미만으로 감소시킨다.
- [0048] 한 예에서, ARDS가 있는 대상체에서, 치료는 중등도에서 중증까지의 대상체 ARDS를 개선시킨다. 이 예에서, 치료는 기준선과 비교하여 대상체의 P/F를 적어도 50만큼 개선한다. 한 예에서, 치료는 대상체의 P/F를 200 넘게 향상시킨다.
- [0049] 한 예에서, 치료는 IL-6 수준을 감소시킨다. 다른 예에서, 치료는 트리글리세라이드 수준의 변화에 기초한다.
- [0050] 한 예에서, 치료는 폐활량 측정에 기초하여 결정된다. 한 예에서 폐활량 측정은 American Association for Respiratory Care(AARC) Spirometry Clinical Practice Guideline(American Association for Respiratory Care: AARC Clinical practice guideline: Spirometry, 1996 Update., Respir Care., 41:629-638)에 기초하여 결정된다.
- [0051] 한 예에서, 치료는 대상체의 FEV1을 개선시킨다. 한 예에서, 치료는 대상체의 FVC를 개선시킨다. 다른 예에서, 치료는 대상체의 FEV1/FVC를 개선시킨다. 또 다른 예에서, 치료는 대상체의 6분 걷기 테스트를 개선시킨다.
- [0052] 한 예에서, 6분 걷기 테스트 결과는 ATS statement: guidelines for the six-minute walk test (2002) Am J Respir Crit Care Med., 166:111-7에 기초하여 결정된다.
- [0053] "D-이량체"는 혈병(clot)에 대한 플라스민의 작용에 따라 형성된 피브린의 순환 말단 분해 생성물 중 하나이다. D-이량체 수준은 주요 혈전증 및 응혈의 지표이다. 한 예에서, 본 개시내용에 따른 치료는 대상체에서 D-이량체 수준을 감소시킴에 따라 혈전증 및 응혈의 위험을 감소시킨다. 한 예에서, 치료는 대상체의 D-이량체 수준을 감소시킨다. 한 예에서, 치료는 대상체의 D-이량체 수준을 25 μ g/ml 미만으로 감소시킨다. 한 예에서, 치료는 대상체의 D-이량체 수준을 20 μ g/ml 미만으로 감소시킨다. 한 예에서, 치료는 대상체의 D-이량체 수준을 15 μ g/ml 미만으로 감소시킨다. 한 예에서, 치료는 대상체의 D-이량체 수준을 10 μ g/ml 미만으로 감소시킨다. 한 예에서, 치료는 대상체의 D-이량체 수준을 5 μ g/ml 미만으로 감소시킨다. 한 예에서, 치료는 대상체의 D-이량체 수준을 3 μ g/ml 미만으로 감소시킨다. 한 예에서, 치료는 대상체의 D-이량체 수준을 1 μ g/ml 내지 15 μ g/ml로 감소시킨다. 한 예에서, 치료는 대상체의 D-이량체 수준을 1 μ g/ml 내지 10 μ g/ml로 감소시킨다.
- [0054] 한 예에서, 본 개시내용의 방법에 따른 치료는 대상체의 혈전증 위험을 감소시킨다. 한 예에서, 대상체의 위험은 치료를 받지 않은 대상체에 비해 감소한다. 한 예에서, 치료는 동맥 혈전증인 혈전증의 위험을 감소시킨다. 따라서, 한 예에서, 치료는 심장마비 또는 뇌졸중의 위험을 감소시킨다.
- [0055] "B형 나트륨 이뇨 펩티드(B-type natriuretic peptide)" 또는 "BNP"는 심장 내부의 압력 변화에 반응하여 방출되는 심장에 의해 생성되는 호르몬이다. 따라서 BNP는 심부전의 맥락에서 통상 평가되는 마커이다. BNP 수준은 일반적으로 정상 심장을 가진 대상체에 비해 심장 기능이 저하된 대상체에서 더 높다. 한 예에서, 치료는 대상체의 BNP 수준을 향상시킨다. 예를 들어, BNP 수준은 기준선 또는 본 개시내용의 방법으로 치료하기 전에 관찰된 수준에서 감소될 수 있다. 한 예에서, BNP 수준은 500pg/ml 미만으로 감소된다. 다른 예에서, BNP 수준은 400pg/ml 미만으로 감소된다. 다른 예에서, BNP 수준은 300pg/ml 미만으로 감소된다. 다른 예에서, BNP 수준은 200pg/ml 미만으로 감소된다. 다른 예에서, BNP 수준은 150pg/ml 미만으로 감소된다. 다른 예에서, BNP 수준은 100pg/ml 내지 400pg/ml로 감소된다. 다른 예에서, BNP 수준은 100pg/ml 내지 300pg/ml로 감소된다.
- [0056] 한 예에서, 치료는 대상체의 좌심실 박출률(ventricular ejection fraction, LVEF) 백분율을 개선한다. 예를 들어, LVEF%는 55% 초과로 증가될 수 있다. 한 예에서, LVEF%는 58% 초과로 증가된다. 다른 예에서, LVEF%는 60% 초과로 증가된다. 다른 예에서, LVEF%는 65% 초과로 증가된다. 한 예에서 LVEF는 심초음파(echocardiogram)를 통해 측정된다.
- [0057] 본원에 사용된 용어 "예방하다" 또는 "예방하는"은 중간엽 계통 줄기세포 또는 전구세포 및/또는 이의 자손 및/또는 이로부터 유래된 가용성 인자 집단을 투여하여 과염증의 적어도 하나의 증상의 발병을 방지 또는 억제하는 것을 포함한다.
- [0058] 본 개시내용의 맥락에서 사용되는 용어 "과염증"은 신체에서 진행 중인 중증의 염증 과정을 지칭한다. 예를 들어, 과염증은 기도 및/또는 폐, 신장 또는 간에서 진행 중인 중증의 염증 과정을 지칭할 수 있다. 이런 식으로 과염증은 신체의 여러 기관과 이의 혈관 구조에 영향을 줄 수 있다. 예를 들어, 과염증은 바이러스 감염에 의해 유발된다. 한 예에서, 과염증은 사이토카인 폭풍(cytokine storm) 또는 사이토카인 방출 증후군(cytokine release syndrome, CRS)과 관련이 있다. 한 예에서, 사이토카인 폭풍 또는 CRS는 IL-6과 같은 염증성 사이토카

인의 상당한 방출을 수반한다.

- [0059] 한 예에서, 과염증은 이차적(또는 후천적) 혈구탐식성 림프조직구증(secondary hemophagocytic lymphohistiocytosis, sHLH)을 유발한다. 따라서, 한 예에서, 본 개시내용의 방법은 혈구탐식성 림프조직구증(sHLH)의 치료를 포함한다.
- [0060] 다른 예에서, 과염증은 상승된 CRP, PCT, IL-6 및/또는 페리틴과 관련이 있다. 예를 들어, 페리틴은 2000mg/dl 초과일 수 있다. 다른 예에서, 페리틴은 2500mg/dl 초과이다. 예를 들어, 과염증은 박테리아 감염과 관련이 있다. 한 예에서, 본 개시내용에 따라 치료되는 대상체는 상승된 순환 CRP 수준을 갖는다. 예를 들어, 본 개시내용에 따라 치료되는 대상체는 순환 CRP 수준이 100mg/dl 초과일 수 있다. 다른 예에서, 치료되는 대상체는 순환 CRP 수준이 120mg/dl 초과이다. 다른 예에서, 치료되는 대상체는 순환 CRP 수준이 150mg/dl 초과이다. 다른 예에서, 치료되는 대상체는 순환 CRP 수준이 90mg/dl 내지 300mg/dl이다.
- [0061] 다른 예에서, 과염증은 상승된 트리글리세라이드 또는 감소된 피브리노겐과 관련된다. 예를 들어, 본 개시내용에 따라 치료되는 대상체는 트리글리세라이드 수준이 >1.5mmol/L일 수 있다. 또 다른 예에서, 치료되는 대상체는 트리글리세라이드 수준이 >2, >3, >4 mmol/L이다. 다른 예에서, 치료되는 대상체는 트리글리세라이드 수준이 1.5 내지 5mmol/L이다. 다른 예에서, 치료되는 대상체는 피브리노겐 수준이 5g/L 이하이다. 다른 예에서, 치료되는 대상체는 피브리노겐 수준이 2.5g/L 미만이다.
- [0062] 한 예에서, 과염증은 다계통 염증 증후군(MIS)을 유발한다. 예를 들어, 과염증은 어린이의 MIS(MIS-C)로 이어질 수 있다.
- [0063] 한 예에서, 과염증은 바이러스 감염에 의해 유발된다. 예를 들어, 과염증은 리노바이러스, 인플루엔자 바이러스, 호흡기 세포융합 바이러스(RSV) 또는 코로나바이러스에 의해 유발될 수 있다. 한 예에서, 과염증은 코로나바이러스에 의해 유발될 수 있다. 예를 들어, 코로나바이러스는 코로나바이러스(SARS-CoV), 중동 호흡기 증후군 코로나바이러스(MERS-CoV) 또는 COVID-19일 수 있다. 한 예에서, 과염증은 엡스타인-바 바이러스(Epstein-Barr virus, EBV) 또는 단순 포진 바이러스(herpes simplex virus, HSV)에 의해 유발된다.
- [0064] 한 예에서, 본 개시내용의 방법은 대상체에서 질환 진행 또는 질환 합병증을 억제한다. 대상체에서 질환 진행 또는 질환 합병증의 "억제"는 대상체에서 질환 진행 및/또는 질환 합병증을 예방하거나 감소시키는 것을 의미한다. 따라서, 한 예에서, 본 개시내용의 방법은 과염증이 sHLH로 진행되는 것을 억제한다.
- [0065] 본원에 사용된 용어 "대상체"는 인간 대상체를 지칭한다. 예를 들어, 대상체는 성인일 수 있다. 다른 예에서, 대상체는 어린이일 수 있다. 다른 예에서, 대상체는 청소년일 수 있다. "대상체", "환자" 또는 "개체"와 같은 용어는 문맥상 본 개시내용에서 상호교환적으로 사용될 수 있는 용어이다.
- [0066] 본 개시내용에 따라 치료되는 대상체는 과염증을 가리키는 증상이 있을 수 있다. 대표적인 증상으로는 피로, 호흡곤란, 숨가쁨(shortness of breath), 운동불능 또는 운동 능력 감소, 혈액 또는 점액이 있거나 없는 기침, 숨을 들이쉬거나 내쉴 때의 통증, 천명(wheezing), 흉부 압박감(chest tightness), 원인모를 체중 감소 및 근골격통(musculoskeletal pain)을 포함한다.
- [0067] 다른 예에서, 대상체는 18-75세이다. 한 예에서, 대상체는 50세가 넘는다. 다른 예에서, 대상체는 ARDS가 있다. 또 다른 예에서, 대상체는 폐렴을 앓고 있다. 한 예에서, 대상체는 30세 미만이다. 한 예에서, 대상체는 21세 미만이다.
- [0068] 다른 예에서, 대상체는 바이러스 감염에 이차적인 ARDS가 있다. 한 예에서, 대상체의 ARDS는 리노바이러스, 인플루엔자 바이러스, 호흡기 세포융합 바이러스(RSV) 또는 코로나바이러스 감염에 이차적이다. 예를 들어, 대상체의 ARDS는 코로나바이러스 감염에 이차적이다. 예를 들어, 대상체의 ARDS는 SARS-CoV, MERS-CoV 또는 COVID-19 감염에 이차적일 수 있다.
- [0069] 한 예에서, 본 개시내용의 방법은 다계통 염증 증후군(MIS)이 있는 대상체를 예방하거나 치료한다. 예를 들어, 대상체는 MIS가 있는 어린이이다. 예를 들어, MIS가 있는 대상체는 1개월에서 18세 사이일 수 있다. 예를 들어, 대상체는 급성 심부전을 앓고 있다. 심부전(HF)은 일반적으로 일단의 증상(호흡 곤란(dyspnoea), 기좌호흡(orthopnoea), 하지 종창(lower limb swelling))과 징후(경정맥압 상승, 폐 울혈)를 특징으로 하는 임상 증후군이다. 급성 심부전은 심부전의 신규 또는 악화 징후 및 증상의 급속한 발병으로 광범위하게 정의된다. 예를 들어, 대상체는 좌심실 박출률이 저하되었다. 예를 들어, 대상체의 LVEF는 45% 미만일 수 있다. 한 예에서, LVEF는 40% 미만이다. 다른 예에서, LVEF는 30% 미만이다.

- [0070] 한 예에서, MIS가 있는 대상체는 다음 기준을 충족한다:
- [0071] - 다음 중 하나 이상:
- [0072] o 저혈압 또는 쇼크(심장성(cardiogenic) 또는 혈관성(vasogenic))
- [0073] o 심근염(myocarditis), 심장막염(pericarditis) 또는 판막염(valvulitis), 현저히 상승된 트로포닌(troponin)/proBNP 또는 관상동맥 이상을 포함하지만 이에 제한되지 않는 중증 심장 질환의 특징.
- [0074] o 신경계 또는 신장 질환(심각한 호흡기 질환만 제외)을 포함하지만 이에 제한되지 않는 기타 중증의 말단 기관 침범;
- [0075] 또는,
- [0076] - 다음 중 두 가지 이상:
- [0077] o 반구진 발진(maculopapular rash)
- [0078] o 양측성 비화농성 결막염(bilateral non-purulent conjunctivitis)
- [0079] o 점막피부 염증 징후(입, 손 또는 발)
- [0080] o 급성 위장관 증상(설사, 구토 또는 복통).
- [0081] 한 예에서, 상기 언급된 MIS 기준을 충족하는 대상체는 열(섭씨 38도 이상의 온도)이 있다.
- [0082] 또 다른 예에서, MIS가 있는 대상체는 상승된 염증 마커를 나타낸다. 예를 들어, 대상체는 호중구증가증(neutrophilia), 림프구감소증(lymphopenia), 혈소판 감소증(thrombocytopenia), 저알부민혈증(hypoalbuminemia), 상승된 CRP, 적혈구 침강 속도(erythrocyte sedimentation rate, ESR), 피브리노겐, D-이량체, 페리틴, 락트산 탈수소효소(lactic acid dehydrogenase, LDH), 인터루킨 6(IL-6), 상승된 프로칼시토닌 중 하나 이상을 나타낸다. 한 예에서, 대상체는 호중구증가증, 림프구감소증, 혈소판 감소증, 저알부민혈증, 상승된 CRP, ESR, 피브리노겐, D-이량체, 페리틴, LDH, IL-6, 상승된 프로칼시토닌 중 둘 이상을 갖는다.
- [0083] 한 예에서, 대상체는 심근염, 심장막염 또는 판막염 중 하나 이상을 앓고 있다. 한 예에서, 대상체는 바이러스 유발 심근염, 심장막염 또는 판막염을 앓고 있다. 예를 들어, 대상체는 바이러스성 심근염을 앓고 있을 수 있다.
- [0084] 한 예에서, MIS는 SARS-CoV, MERS-CoV 또는 COVID-19에 의한 감염에 이차적이다.
- [0085] 또 다른 예에서, 본 개시내용의 방법은 경증 ARDS가 있는 대상체를 예방하거나 치료한다. 다른 예에서, 본 개시내용의 방법은 중등도 ARDS가 있는 대상체를 예방하거나 치료한다. 다른 예에서, 본 개시내용의 방법은 중증 ARDS가 있는 대상체를 예방하거나 치료한다. 또 다른 예에서, 본 개시내용의 방법은 중등도 또는 중증 ARDS가 있는 대상체를 예방하거나 치료한다. 다른 예에서, 본 개시내용의 방법은 중등도, 중증 또는 매우 중증 ARDS가 있는 대상체를 예방하거나 치료한다.
- [0086] 용어 "혈전증"은 혈전(thrombus) 또는 혈병(blood clot)의 형성을 지칭하기 위해 본원에서 사용된다. 예를 들어, 혈전증은 동맥에서 혈병이 발생하는 "동맥 혈전증"이다. 이러한 혈병은 심장이나 뇌와 같은 주요 기관으로의 혈류를 방해할 수 있으므로 대상체에게 특히 위험하다. 예를 들어, 혈전증은 정맥에서 혈병이 발생하는 "정맥 혈전증"이다.
- [0087] 용어 "혈전용해제"는 혈전을 분해하는 본 개시내용의 조성물을 지칭하기 위해 사용된다. 한 예에서, 본 개시내용의 혈전용해성 조성물은 대상체의 혈전증 위험을 감소시킨다. 한 예에서, 대상체의 위험은 조성물을 받지 않은 대상체에 비해 감소된다. 한 예에서, 조성물의 투여는 동맥 혈전증의 위험을 감소시킨다. 따라서, 한 예에서, 조성물의 투여는 심장마비 또는 뇌졸중의 위험을 감소시킨다.
- [0088] 용어 "폐색전증"은 혈류를 통해 신체의 다른 곳으로부터 이동된 물질에 의한 폐의 동맥 폐색을 지칭하기 위해 본원에서 사용된다.
- [0089] 본원에 사용된 용어 "유전적으로 변형되지 않은"은 핵산에 의한 형질감염에 의해 변형되지 않은 세포를 지칭한다. 의심을 피하기 위해, 본 개시내용의 맥락에서 Ang1을 암호화하는 핵산으로 형질감염된 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포는 유전적으로 변형된 것으로 간주될 것이다.

- [0090] 용어 "총 용량"은 본 개시내용에 따라 치료되는 대상체에 의해 수용된 세포의 총 수를 지칭하기 위해 본 개시내용의 맥락에서 사용된다. 한 예에서, 총 용량은 1회의 세포 투여로 이루어진다. 다른 예에서, 총 용량은 2회의 세포 투여로 이루어진다. 다른 예에서, 총 용량은 3회의 세포 투여로 이루어진다. 다른 예에서, 총 용량은 4회 이상의 세포 투여로 이루어진다. 예를 들어, 총 용량은 2 내지 4회의 세포 투여로 이루어질 수 있다.
- [0091] 중간엽 계통 전구세포
- [0092] 본원에 사용된 용어 "중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포(MLPSC)"는 다능성(multipotency)을 유지하면서 자가 재생 능력이 있고 중간엽 기원의 여러 세포 유형, 예를 들어, 조골세포(osteoblast), 연골세포(chondrocyte), 지방세포(adipocyte), 기질 세포(stromal cell), 섬유아세포(fibroblast) 및 힘줄(tendon), 또는 비-중배엽 기원의 여러 세포 유형, 예를 들어, 간세포, 신경 세포 및 상피 세포로 분화하는 능력이 있는 미분화된 다능성 세포를 지칭한다. 오해의 소지를 없애기 위해 "중간엽 계통 전구세포"는 뼈, 연골, 근육 및 지방 세포, 및 섬유 결합 조직과 같은 중간엽 세포로 분화할 수 있는 세포를 의미한다.
- [0093] 용어 "중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포"는 모 세포 및 이들의 미분화된 자손 모두를 포함한다. 이 용어는 또한 중간엽 전구세포, 다능성 기질 세포, 중간엽 줄기세포(MSC), 혈관주위 중간엽 전구세포 및 이들의 미분화된 자손을 포함한다.
- [0094] 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포는 자가(autologous), 동종이계, 이종계(xenogenic), 동계(syngenic) 또는 동질유전자형(isogenic)일 수 있다. 자가 세포는 재이식될 동일한 개체로부터 분리된다. 동종이계 세포는 동일한 종의 공여자로부터 분리된다. 이종계 세포는 다른 종의 공여자로부터 분리된다. 동계 또는 동질유전자형 세포는 쌍둥이, 클론 또는 고도로 근친 교배된 연구 동물 모델과 같이 유전적으로 동일한 유기체에서 분리된다.
- [0095] 한 예에서, 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포는 동종이계이다. 한 예에서, 동종이계 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포는 배양 증식되고 냉동보존된다.
- [0096] 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포는 주로 골수에 존재하지만, 예를 들어, 제대혈 및 탯줄, 성인 말초혈, 지방 조직, 해면골(trabecular bone) 및 치수(齒髓, dental pulp)를 포함한 다양한 숙주 조직에도 존재하는 것으로 나타났다. 이는 또한 피부, 비장, 췌장, 뇌, 신장, 간, 심장, 망막, 뇌, 모낭, 장, 폐, 림프절, 흉선, 인대, 힘줄, 골격근, 진피 및 골막(periosteum)에서 발견되고; 중배엽 및/또는 내배엽 및/또는 외배엽과 같은 생식선으로 분화할 수 있다. 따라서, 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포는 지방, 뼈(osseous), 연골(cartilaginous), 탄성, 근육 및 섬유 결합 조직을 포함하지만 이에 제한되지 않는 다수의 세포 유형으로 분화할 수 있다. 이러한 세포가 들어가는 특정한 계통 투입(lineage-commitment) 및 분화 경로는 기계적 영향 및/또는 내인성 생물활성 인자, 예컨대 성장 인자, 사이토카인, 및/또는 숙주 조직에 의해 설정된 국소 미세환경 조건의 다양한 영향에 따라 달라진다.
- [0097] 용어 "농축된(enriched)", "농축(enrichment)" 또는 이의 변형은 하나의 특정 세포 유형의 비율 또는 다수의 특정 세포 유형의 비율이 처리되지 않은 세포(예를 들어, 고유 환경에서의 세포) 집단과 비교할 때 증가되는 세포 집단을 기술하기 위해 본원에서 사용된다. 한 예에서, 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포가 농축된 집단은 적어도 약 0.1% 또는 0.5% 또는 1% 또는 2% 또는 5% 또는 10% 또는 15% 또는 20% 또는 25% 또는 30% 또는 50% 또는 75%의 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포를 포함한다. 이와 관련하여 "중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포가 농축된 세포 집단"이라는 용어는 "X%의 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포를 포함하는 세포 집단"이라는 용어를 명시적으로 뒷받침하는 것으로 간주되며, 여기서 X%는 본원에 인용된 대로 백분율이다. 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포는 일부 예에서 클론원성 집락(clonogenic colony)을 형성할 수 있다. CFU-F(섬유아세포) 또는 이의 서브셋(예를 들어, 50% 또는 60% 또는 70% 또는 70% 또는 90% 또는 95%)이 이러한 활성을 가질 수 있다.
- [0098] 본 개시내용의 한 예에서, 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포는 중간엽 줄기세포(MSC)이다. MSC는 균질한 조성일 수 있거나 MSC가 농축된 혼합 세포 집단일 수 있다. 균질한 MSC 조성물은 부착성 골수 또는 골막 세포를 배양하여 수득할 수 있으며, MSC는 독특한 단클론 항체로 식별되는 특정 세포 표면 마커에 의해 식별될 수 있다. MSC가 농축된 세포 집단을 수득하는 방법은, 예를 들어, 미국 특허 제5,486,359호에 기술되어 있다. MSC의 대체 공급원은 혈액, 피부, 제대혈, 근육, 지방, 뼈 및 연골막(perichondrium)을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 한 예에서, MSC는 동종이계이다. 한 예에서 MSC는 냉동보존된다. 한 예에서, MSC는 배양 증식되고 냉동보존된다.
- [0099] 다른 예에서, 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포는 CD29+, CD54+, CD73+, CD90+, CD102+, CD105+, CD106+,

CD166+, MHC1+ MSC이다.

- [0100] 분리되거나 농축된 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포는 배양에 의해 시험관 내에서 증식될 수 있다. 분리되거나 농축된 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포는 냉동보존되고, 해동되며 후속적으로 배양에 의해 시험관 내에서 증식될 수 있다.
- [0101] 한 예에서, 분리되거나 농축된 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포는 배양 배지(무혈청 또는 혈청 보충), 예를 들어, 5% 소 태아 혈청(FBS) 및 글루타민이 보충된 알파 최소 필수 배지(α MEM)에 50,000개의 생존 세포/ cm^2 로 시딩하고 37°C, 20% O_2 에서 밤새 배양 용기에 부착되도록 한다. 후속적으로 필요에 따라 배양 배지를 교체 및/또는 변경하고 세포를 37°C, 5% O_2 에서 추가로 68 내지 72시간 동안 배양한다.
- [0102] 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 배양된 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포는 생체 내 세포와 표현형이 상이하다. 예를 들어, 한 실시양태에서 이는 마커 CD44, NG2, DC146 및 CD140b 중 하나 이상을 발현한다. 배양된 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포는 또한 생체 내 세포와 생물학적으로 상이하며, 생체 내에서 대체로 비순환(정지) 세포에 비해 증식 속도가 더 높다.
- [0103] 한 예에서, 세포 집단은 선택 가능한 형태의 STRO-1+ 세포를 포함하는 세포 체제로부터 농축된다. 이와 관련하여, 용어 "선택 가능한 형태"는 세포가 STRO-1+ 세포의 선택을 허용하는 마커(예를 들어, 세포 표면 마커)를 발현함을 의미하는 것으로 이해될 것이다. 마커는 STRO-1일 수 있지만 반드시 그럴 필요는 없다. 예를 들어, 본원에 기술되고/거나 예시된 바와 같이, STRO-2 및/또는 STRO-3(TNAP) 및/또는 STRO-4 및/또는 VCAM-1 및/또는 CD146 및/또는 3G5를 발현하는 세포(예를 들어, 중간엽 전구세포)도 STRO-1을 발현한다(STRO-1bright일 수 있음). 따라서 세포가 STRO-1+라는 표시는 세포가 STRO-1 발현에 의해서만 선택된다는 것을 의미하지 않는다. 한 예에서, 세포는 적어도 STRO-3 발현에 기초하여 선택되며, 예를 들어, 세포는 STRO-3+(TNAP+)이다.
- [0104] 세포 또는 이의 집단의 선택에 대한 언급은 반드시 특정 조직 공급원으로부터의 선택을 필요로 하지 않는다. 본원에 기술된 바와 같이 STRO-1+ 세포는 매우 다양한 공급원으로부터 선택되거나 분리되거나 농축될 수 있다. 즉, 일부 예에서, 이러한 용어는 STRO-1+ 세포(예를 들어, 중간엽 전구 세포)를 포함하는 임의의 조직 또는 혈관화된 조직 또는 혈관 주위 세포(예를 들어, STRO-1+ 혈관 주위 세포)를 포함하는 조직 또는 본원에 인용된 조직 중 임의의 하나 이상으로부터 선택을 뒷받침한다.
- [0105] 한 예에서, 본 개시내용에 사용된 세포는 TNAP+, VCAM-1+, THY-1+, STRO-2+, STRO-4+(HSP-90 β), CD45+, CD146+, 3G5+ 또는 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 개별적으로 또는 단체로 선택된 하나 이상의 마커를 발현한다.
- [0106] "개별적으로"란 본 개시내용이 인용된 마커 또는 마커 그룹을 개별적으로 포함하고, 개별 마커 또는 마커 그룹이 본원에 별도로 나열되지 않을 수 있음에도 첨부된 청구범위가 이러한 마커 또는 마커 그룹을 서로 별도로 나누어서 정의할 수 있음을 의미한다.
- [0107] "단체로"란 본 개시내용이 인용된 마커 또는 마커 그룹의 임의의 수 또는 조합을 포함하고, 마커 또는 마커 그룹의 이러한 수 또는 조합이 첨부된 청구범위에 구체적으로 나열되지 않을 수 있음에도 이러한 조합 또는 하위 조합을 마커 또는 마커 그룹의 임의의 다른 조합과 별도로 나누어서 정의할 수 있음을 의미한다.
- [0108] 본원에 사용된 용어 "TNAP"는 조직 비특이적 알칼리성 포스파타제의 모든 이소형(isoform)을 포괄하는 것으로 의도된다. 예를 들어, 이 용어는 간 이소형(LAP), 뼈 이소형(BAP) 및 신장 이소형(KAP)을 포함한다. 한 예에서 TNAP는 BAP이다. 한 예에서, 본원에 사용된 TNAP는 기탁 번호 PTA-7282 하에 부다페스트 조약의 조항에 따라 2005년 12월 19일 ATCC에 기탁된 하이브리도마 세포주에 의해 생성된 STRO-3 항체에 결합할 수 있는 분자를 지칭한다.
- [0109] 또한, 한 예에서, STRO-1+ 세포는 클론원성 CFU-F를 생성할 수 있다.
- [0110] 한 예에서, 상당한 비율의 STRO-1+ 세포는 적어도 2개의 상이한 생식세포계열(germ line)로 분화할 수 있다. STRO-1+ 세포가 투입될 수 있는 계통의 비제한적인 예는 골 전구세포; 담관 상피 세포 및 간세포에 대해 다능성인 간세포 전구세포; 희소돌기아교세포 및 성상교세포로 진행되는 신경교 세포 전구체를 생성할 수 있는 신경제한 세포; 뉴런으로 진행되는 뉴런 전구세포; 심장 근육 및 심근 세포의 전구세포, 포도당 반응성 인슐린 분비 췌장 베타 세포주를 포함한다. 다른 계통은 상아모세포(odontoblast), 상아질 생성 세포(dentin-producing cell) 및 연골세포, 및 다음의 전구세포가 포함되지만 이에 제한되지 않는다: 망막 색소 상피 세포(retinal pigment epithelial cell), 섬유아세포, 피부 세포, 예컨대 케라티노사이트(keratinocyte), 수지상 세포, 모낭

세포, 신관 상피 세포(renal duct epithelial cell), 평활근 및 골격근 세포, 고환 전구세포, 혈관 내피 세포, 힘줄, 인대, 연골, 지방 세포, 섬유아세포, 골수 기질(marrow stroma), 심장 근육, 평활근, 골격근, 혈관주위 세포, 혈관, 상피, 신경교, 신경 세포, 성상 세포 및 희소돌기아교세포.

[0111] 한 예에서, 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포는 단일 공여자, 또는 공여자 샘플 또는 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포가 후속적으로 풀링된 후 배양 증식되는 다중 공여자로부터 획득된다.

[0112] 본 개시내용에 포함되는 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포는 또한 대상체에 투여하기 전에 냉동보존될 수 있다. 한 예에서, 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포는 대상체에 투여하기 전에 배양 증식되고 냉동보존된다.

[0113] 한 예에서, 본 개시내용은 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포뿐만 아니라 이의 자손, 이로부터 유래된 가용성 인자 및/또는 이로부터 분리된 세포와 소포를 포함한다. 또 다른 예에서, 본 개시내용은 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포뿐만 아니라 이로부터 분리된 세포와 소포를 포괄한다. 예를 들어, 세포와 소포가 세포 배양 배지로 분비되기에 적합한 조건하에 적합한 기간 동안 본 개시내용의 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포를 배양하는 것이 가능하다. 분비된 세포와 소포는 후속적으로 치료에 사용하기 위해 배양 배지에서 획득할 수 있다.

[0114] 본원에 사용된 용어 "세포와 소포"는 세포로부터 자연적으로 방출되고 크기가 약 30nm 내지 10마이크론만큼 큰 범위인 지질 입자를 지칭하지만, 전형적으로 이의 크기는 200nm 미만이다. 이는 단백질, 핵산, 지질, 대사산물 또는 방출 세포(예를 들어, 중간엽 줄기세포; STRO-1+ 세포)의 소기관을 포함할 수 있다.

[0115] 본원에 사용된 용어 "엑소좀(exosome)"은 일반적으로 크기가 약 30nm 내지 약 150nm 범위이며 세포막으로 수송되고 방출되는 포유동물 세포의 엔도솜 구획에서 기원하는 세포와 소포 유형을 지칭한다. 이는 핵산(예를 들어, RNA; 마이크로RNA), 단백질, 지질 및 대사산물을 함유할 수 있으며 하나의 세포에서 분비되고 이의 카고(cargo)를 전달하기 위해 다른 세포에 의해 흡수되어 세포 간 통신 기능을 한다.

[0116] 세포의 배양 증식

[0117] 한 예에서, 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포는 배양 증식된다. "배양 증식된" 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포 배지는 세포 배양 배지에서 배양되고 계대(즉, 계대배양)된다는 점에서 갓 분리된 세포와 구별된다. 한 예에서, 배양 증식된 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포는 약 4-10 계대 동안 배양 증식된다. 한 예에서, 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포는 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10 계대 동안 배양 증식된다. 예를 들어, 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포는 적어도 5 계대 동안 배양 증식될 수 있다. 한 예에서, 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포는 적어도 5-10 계대 동안 배양 증식될 수 있다. 한 예에서, 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포는 적어도 5-8 계대 동안 배양 증식될 수 있다. 한 예에서, 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포는 적어도 5-7 계대 동안 배양 증식될 수 있다. 한 예에서, 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포는 10 초과 계대 동안 배양 증식될 수 있다. 다른 예에서, 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포는 7 초과 계대 동안 배양 증식될 수 있다. 이러한 예에서, 줄기세포는 중간 냉동보존된 MLPSC 집단을 제공하기 위해 냉동보존되기 전에 배양 증식될 수 있다. 한 예에서, 본 개시내용의 조성물은 중간 냉동보존된 MLPSC 집단으로부터 제조된다. 예를 들어, 중간 냉동보존된 MLPSC 집단은 아래에서 추가로 논의되는 바와 같이 투여 전에 추가 배양 증식될 수 있다. 따라서, 한 예에서, 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포는 배양 증식되고 냉동보존된다. 이러한 예의 실시양태에서, 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포는 단일 공여자, 또는 공여자 샘플 또는 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포가 후속적으로 풀링된 후 배양 증식되는 다중 공여자로부터 획득될 수 있다. 한 예에서, 배양 증식 과정은 다음을 포함한다:

[0118] - i. 계대 증식에 의해 생존 세포의 수를 늘려 적어도 약 10억 개의 생존 세포의 제제를 제공하는 단계로서, 여기서 계대 증식은 분리된 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포의 1차 배양물을 확립한 다음, 이전 배양물로부터의 분리된 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포의 제1 비-1차(P1) 배양물을 연속적으로 확립하는 단계;

[0119] - ii. 계대 증식에 의해 분리된 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포의 P1 배양물을 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포의 제2 비-1차(P2) 배양물로 증식시키는 단계; 및,

[0120] - iii. 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포의 P2 배양물로부터 획득한 공정 중의 중간 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포 제제를 제조하고 냉동보존하는 단계; 및,

[0121] - iv. 냉동보존된 공정 중의 중간 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포 제제를 해동하고 계대 증식에 의해 상기 공정 중의 중간 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포 제제를 증식시키는 단계.

- [0122] 한 예에서, 증식된 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포 제제는 다음을 포함하는 활성 프로파일을 갖는다:
- [0123] - i. 약 0.75% 미만의 CD45+ 세포;
- [0124] - ii. 적어도 약 95%의 CD105+ 세포;
- [0125] - iii. 적어도 약 95%의 CD166+ 세포.
- [0126] 한 예에서, 증식된 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포 제제는 대조군에 비해 적어도 약 30%만큼 CD3/CD28 활성화된 PBMC에 의한 IL2Ra 발현을 억제할 수 있다.
- [0127] 한 예에서, 배양 증식된 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포는 약 4 내지 10 계대 동안 배양 증식되고, 여기서 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포는 추가로 배양 증식되기 전에 적어도 2 또는 3 계대 후에 냉동보존되었다. 한 예에서, 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포는 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5 계대 동안 배양 증식되고, 냉동보존된 후, 투여 전 또는 추가로 냉동보존되기 전에 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5 계대 동안 배양 증식된다.
- [0128] 한 예에서, 본 개시내용의 조성물 중 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포의 대부분은 대략 동일한 세대 수이다 (즉, 이는 서로 약 1 또는 약 2 또는 약 3 또는 약 4의 세포 배가 이내이다). 한 예에서, 본 조성물에서 세포 배가의 평균 수는 약 20 내지 약 25 배가이다. 한 예에서, 본 조성물에서 세포 배가의 평균 수는 1차 배양으로부터 발생하는 약 9 내지 약 13(예를 들어, 약 11 또는 약 11.2)의 배가 + 계대당 약 1, 약 2, 약 3 또는 약 4 배가이다(예를 들어, 계대당 약 2.5 배가). 본 조성물에서 예상적인 평균 세포 배가는 약 1, 약 2, 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9 및 약 10 계대에 의해 생성될 때 각각 약 13.5, 약 16, 약 18.5, 약 21, 약 23.5, 약 26, 약 28.5, 약 31, 약 33.5 및 약 36 중 임의의 것이다.
- [0129] 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포 분리 및 생체 외 증식 과정은 당업계에 공지된 임의의 장비 및 세포 처리 방법을 사용하여 수행할 수 있다. 본 개시내용의 다양한 배양 증식 실시양태는 세포 조작이 필요한 단계, 예를 들어, 시딩, 공급, 부착성 배양물 해리 또는 세척 단계를 사용한다. 세포를 조작하는 임의의 단계는 세포를 손상시킬 가능성이 있다. 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포는 일반적으로 준비 동안 특정 양의 손상을 견딜 수 있지만, 세포는 세포에 대한 손상을 최소화하면서 주어진 단계(들)를 적절하게 수행하는 처리 절차 및/또는 장비에 의해 조작되는 것이 바람직하다.
- [0130] 한 예에서, 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포는 세포 공급원 백(bag), 세척 용액 백, 재순환 세척 백, 유입구 및 유출구가 있는 스피닝 막 필터(spining membrane filter), 여과물 백, 혼합 구역, 세척된 세포를 위한 최종 생성물 백, 및 예를 들어, 본원에 참고로 포함된 US 6,251,295에 기술된 바와 같은 적절한 튜브를 포함하는 기기 내에서 세척한다.
- [0131] 한 예에서, 본 개시내용에 따른 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포 조성물은 CD105 양성 및 CD166 양성이고 CD45 음성으로 95% 균질하다. 한 예에서, 이 균질성은 생체 외 증식을 통해 지속되는데; 즉, 다중 집단 배가에도 불구하고 그렇다. 한 예에서, 본 조성물은 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포의 적어도 1회의 치료 용량을 포함하고 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포는 약 1.25% 미만의 CD45+ 세포, 적어도 약 95%의 CD105+ 세포 및 적어도 약 95%의 CD166+ 세포를 포함한다. 한 예에서, 이러한 균질성은 극저온(cryogenic) 저장 및 해동 후에도 지속되며, 여기서 세포는 또한 일반적으로 약 70% 이상의 생존력을 갖는다.
- [0132] 한 예에서, 본 개시내용의 조성물은 상당한 수준의 TNFR1, 예를 들어, 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포 백만 개당 13pg 초과 TNFR1을 발현하는 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포를 포함한다. 한 예에서, 이 표현형은 생체 외 증식 및 극저온 저장 전반에 걸쳐 안정적이다. 한 예에서, 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포 백만 개당 약 13 내지 약 179pg(예를 들어, 약 13pg 내지 약 44pg) 범위의 TNFR1 수준의 발현은 생체 외 증식 및 냉동보존에도 지속되는 바람직한 치료 잠재력과 관련이 있다.
- [0133] 한 예에서, 배양 증식된 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포는 적어도 110pg/ml의 양으로 종양 괴사 인자 수용체(tumor necrosis factor receptor) 1(TNFR1)을 발현한다. 예를 들어, 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포는 적어도 150pg/ml, 또는 적어도 200pg/ml, 또는 적어도 250pg/ml, 또는 적어도 300pg/ml, 또는 적어도 320pg/ml, 또는 적어도 330pg/ml, 또는 적어도 340pg/ml, 또는 적어도 350pg/ml의 양으로 TNFR1을 발현할 수 있다.
- [0134] 한 예에서, 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포는 적어도 $13\text{pg}/10^6$ 개의 세포의 양으로 TNFR1을 발현한다. 예를

들어, 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포는 적어도 $15\text{pg}/10^6$ 개의 세포, 또는 적어도 $20\text{pg}/10^6$ 개의 세포, 또는 적어도 $25\text{pg}/10^6$ 개의 세포, 또는 적어도 $30\text{pg}/10^6$ 개의 세포, 또는 적어도 $35\text{pg}/10^6$ 개의 세포, 또는 적어도 $40\text{pg}/10^6$ 개의 세포, 또는 적어도 $45\text{pg}/10^6$ 개의 세포, 또는 적어도 $50\text{pg}/10^6$ 개의 세포의 양으로 TNFR1을 발현한다.

[0135] 또 다른 예에서, 본원에 개시된 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포는 T-세포에서 IL-2R α 발현을 억제한다. 한 예에서, 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포는 IL-2R α 발현을 적어도 약 30%, 대안적으로 적어도 약 35%, 대안적으로 적어도 약 40%, 대안적으로 적어도 약 45%, 대안적으로 적어도 약 50%, 대안적으로 적어도 약 55%, 대안적으로 적어도 약 60 억제할 수 있다.

[0136] 한 예에서, 본 개시내용의 조성물은, 예를 들어, 적어도 약 1억 개의 세포 또는 약 1억 2,500만 개의 세포를 포함할 수 있는 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포의 적어도 1회의 치료 용량을 포함한다.

[0137] 세포의 변형

[0138] 한 예에서, 본 개시내용의 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포는 투여 시 세포의 용해가 억제되는 방식으로 변경될 수 있다. 항원의 변형은 면역학적 무반응 또는 내성을 유도할 수 있으며, 이에 의해 정상 면역 반응에서 외래 세포의 거부에 긍정적인 책임이 있는 면역 반응의 이펙터 단계(예를 들어, 세포독성 T 세포 생성, 항체 생산 등)의 유도를 방지할 수 있다. 이러한 목적을 달성하기 위해 변경될 수 있는 항원은, 예를 들어, MHC 클래스 I 항원, MHC 클래스 II 항원, LFA-3 및 ICAM-1을 포함한다.

[0139] 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포는 또한 가로무늬 골격근 세포(striated skeletal muscle cell)의 분화 및/또는 유지에 중요한 단백질을 발현하도록 유전적으로 변형될 수 있다. 예시적인 단백질은 성장 인자(TGF- β , 인슐린 유사 성장 인자(insulin-like growth factor) 1(IGF-1), FGF), 근원성 인자(myogenic factor)(예를 들어, myoD, 미오게닌(myogenin), 근원성 인자 5(Myf5), 근원성 조절 인자(myogenic regulatory factor, MRF)), 전사 인자(예를 들어, GATA-4), 사이토카인(예를 들어, 카디오토프린(cardiotropin)-1), 뉴레굴린(neuregulin) 패밀리의 구성원(예를 들어, 뉴레굴린 1, 2 및 3) 및 호메오박스(homeobox) 유전자(예를 들어, Csx, tinman 및 NKx 패밀리를 포함한다.

[0140] 본 개시내용의 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포는 또한 항바이러스 약물 또는 혈전용해제를 운반하거나 발현하도록 변형될 수 있다. 한 예에서, 상기 작용제는 항바이러스 약물이다. 한 예에서, 상기 작용제는 항인플루엔자이다. 한 예에서, 상기 작용제는 항-SARS-CoV(예를 들어, SARS-Cov2)이다. 예시적인 작용제는 램테시비르이다. 한 예에서, 상기 작용제는 혈전용해제이다. 혈전용해제의 예는 에미나제(아니스트렙라제), 레타바제(레테플라제), 스트렙타제(스트렙토키나제, 카비키나제)를 포함한다. 한 예에서, 혈전용해제는 헤파린이다.

[0141] 본 개시내용의 중간엽 전구세포 또는 줄기세포는 항바이러스 약물 또는 혈전용해제가 세포에 의해 흡수될 수 있도록 하기에 충분한 시간 동안 그러한 조건하에 상기 작용제와 함께 세포를 배양함으로써 상기 작용제를 운반하도록 변형될 수 있다. 한 예에서, 항바이러스 약물 또는 혈전용해제는 본원에 개시된 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포의 배양 배지에 첨가된다. 예를 들어, 본원에 개시된 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포는 항바이러스 약물 또는 혈전용해제를 포함하는 배양 배지에서 배양 증식될 수 있다.

[0142] 다른 예에서, 항바이러스 약물 또는 혈전용해제는 펩티드이다. 한 예에서, 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포는 항바이러스성 또는 혈전용해성 펩티드 또는 이를 암호화하는 핵산을 발현하도록 유전적으로 변형된다. 한 예에서, 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포는 시험관 내 바이러스 벡터와의 접촉을 통해 변형된다. 예를 들어, 바이러스가 세포 배양 배지에 첨가될 수 있다. 유전자 변형의 비-바이러스성 방법이 또한 사용될 수 있다. 이의 예는 플라스미드 전달 및 인테그라제(integrase) 또는 트랜스포사제(transposase) 기술, 리포솜 또는 단백질 형질도입 도메인 매개된 전달 및 전기천공과 같은 물리적 방법의 사용을 통한 표적 유전자 통합 적용을 포함한다.

[0143] 유전자 변형의 효율성은 좀처럼 100%가 아니고, 성공적으로 변형된 세포 집단을 농축시키는 것이 일반적으로 바람직하다. 한 예에서, 변형된 세포는 새로운 유전자형(genotype)의 기능적 특징을 이용함으로써 농축시킬 수 있다. 변형된 세포를 농축시키기 한 가지 예시적인 방법은 선택 가능하거나 스크리닝 가능한 마커 유전자를 사용하는 양성 선택(positive selection)이다. "마커 유전자"는 마커 유전자를 발현하는 세포에 별개의 표현형을 부여하여 이러한 형질전환된 세포가 마커를 갖지 않는 세포와 구별되도록 하는 유전자를 지칭한다. 선택 가능한 마커 유전자는 선택제(예를 들어, 항생제)에 대한 내성에 기초하여 "선택"할 수 있는 특성을 부여한다. 스크리닝 가능한 마커 유전자(또는 리포터 유전자)는 관찰 또는 테스트, 즉 "스크리닝"을 통해 식별할 수 있는 특성을

부여한다(예를 들어, β -글루쿠로니다제, 루시페라제, GFP 또는 형질전환되지 않은 세포에는 존재하지 않는 기타 효소 활성). 한 예에서, 유전적으로 변형된 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포는 네오마이신(neomycin)과 같은 약물에 대한 내성 또는 lacZ의 발현에 기초한 비색 선택(colorimetric selection)에 기초하여 선택된다.

[0144] 본 개시내용의 조성물

[0145] 본 개시내용의 한 예에서, 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포 및/또는 이의 자손 및/또는 이로부터 유래된 가용성 인자는 조성물 형태로 투여된다. 한 예에서, 이러한 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 포함한다. 따라서, 한 예에서, 본 개시내용의 조성물은 배양 증식된 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포를 포함할 수 있다.

[0146] 용어 "담체" 및 "부형제"는 활성 화합물의 저장, 투여 및/또는 생물학적 활성을 촉진하기 위해 당업계에서 통상적으로 사용되는 물질의 조성물을 지칭한다(예를 들어, Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Ed., Mac Publishing Company(1980) 참조). 담체는 또한 활성 화합물의 바람직하지 않은 부작용을 감소시킬 수 있다. 적합한 담체는, 예를 들어, 안정한 것, 예를 들어, 담체 내의 다른 성분과 반응할 수 없는 것이다. 한 예에서, 담체는 치료에 사용되는 용량 및 농도에서 수용자에게 심각한 국소 또는 전신 부작용을 일으키지 않는다.

[0147] 본 개시내용에 적합한 담체는 통상적으로 사용되는 것들을 포함하며, 예를 들어, 물, 식염수, 수성 텍스트로스, 락토스, 링거액, 완충 용액, 히알루로난 및 글리콜이 특히 (등장성인 경우) 용액에 대해 예시적인 액체 담체이다. 적합한 약제학적 담체 및 부형제는 전분, 셀룰로스, 글루코스, 락토스, 수크로스, 젤라틴, 맥아, 쌀, 밀가루, 백악, 실리카겔, 마그네슘 스테아레이트, 나트륨 스테아레이트, 글리세롤 모노스테아레이트, 염화나트륨, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 물, 에탄올, 등을 포함한다.

[0148] 다른 예에서, 담체는, 예를 들어, 세포가 성장하거나 현탁되는 배지 조성물이다. 예를 들어, 이러한 배지 조성물은 이것이 투여되는 대상체에서 어떠한 부작용도 유발하지 않는다.

[0149] 예시적인 담체 및 부형제는 세포의 생존력 및/또는, 대사 증후군 및/또는 비만을 감소, 예방 또는 지연시키는 세포의 능력에 악영향을 미치지 않는다.

[0150] 한 예에서, 담체 또는 부형제는 완충 활성을 제공하여 세포 및/또는 가용성 인자를 적절한 pH에서 유지하여 생물학적 활성을 발휘하며, 예를 들어, 담체 또는 부형제는 인산염 완충 식염수(PBS)이다. PBS는 세포 및 인자와 최소한으로 상호작용하고 세포 및 인자의 신속한 방출을 허용하기 때문에 매력적인 담체 또는 부형제를 대표하는데, 이러한 경우 본 개시내용의 조성물은, 예를 들어, 주사에 의해 혈류에, 또는 조직 또는 조직을 둘러싸거나 이에 인접한 영역으로 직접 적용하기 위한 액체로서 생성될 수 있다.

[0151] 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포 및/또는 이의 자손 및/또는 이로부터 유래된 가용성 인자는 또한 수용자에게 적합하고 수용자에게 해롭지 않은 생성물로 분해되는 스캐폴드(scaffold) 내에 통합되거나 봉입될 수 있다. 이러한 스캐폴드는 수용자 대상체에게 이식될 세포를 지원하고 보호한다. 천연 및/또는 합성 생분해성 스캐폴드가 이러한 스캐폴드의 예이다.

[0152] 다양한 상이한 스캐폴드가 본 개시내용의 실시예 성공적으로 사용될 수 있다. 예시적인 스캐폴드는 생물학적, 분해성 스캐폴드를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 천연 생분해성 스캐폴드는 콜라겐(collagen), 피브로넥틴(fibronectin) 및 라미닌(laminin) 스캐폴드를 포함한다. 세포 이식 스캐폴드에 적합한 합성 물질은 광범위한 세포 성장과 세포 기능을 지원할 수 있어야 한다. 이러한 스캐폴드는 또한 재흡수될 수 있다. 적합한 스캐폴드는 (예를 들어, Vacanti, 등. J. Ped. Surg. 23:3-9 1988; Cima, 등. Biotechnol. Bioeng. 38:145 1991; Vacanti, 등. Plast.Reconstr.Surg.88:753-9 1991에 기술된 바와 같은) 폴리글리콜산 스캐폴드; 또는 폴리무수물, 폴리오르토에스테르 및 폴리락트산과 같은 합성 중합체를 포함한다.

[0153] 다른 예에서, 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포 및/또는 이의 자손 및/또는 이로부터 유래된 가용성 인자는 겔 스캐폴드(예컨대 Upjohn Company의 Gelfoam)로 투여될 수 있다.

[0154] 본원에 기술된 조성물은 단독으로 또는 다른 세포와의 혼합물로서 투여될 수 있다. 상이한 유형의 세포를 투여 직전 또는 바로 전에 본 개시내용의 조성물과 혼합할 수 있거나, 투여 전에 일정 기간 동안 함께 공배양할 수 있다.

[0155] 한 예에서, 본 조성물은 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포 및/또는 이의 자손 및/또는 이로부터 유래된 가용성 인자를 유효량, 또는 치료적 또는 예방적 유효량 포함한다. 예를 들어, 본 조성물은 약 1×10^5 개의 줄기세포

내지 약 1×10^9 개의 줄기세포 또는 약 1.25×10^3 개의 줄기세포 내지 약 1.25×10^7 개의 줄기세포/kg(80kg의 대상체)을 포함한다. 한 예에서, 본 조성물은 2×10^6 개의 세포/kg을 포함한다. 투여될 세포의 정확한 양은 대상체의 연령, 체중 및 성별, 및 치료되는 장애의 정도 및 중증도를 포함한 다양한 요인에 따라 다르다.

[0156] 한 예에서, 50×10^6 개 내지 200×10^7 개의 세포가 투여된다. 다른 예에서, 60×10^6 개 내지 200×10^6 개의 세포 또는 75×10^6 개 내지 150×10^6 개의 세포가 투여된다. 한 예에서, 75×10^6 개의 세포가 투여된다. 다른 예에서, 150×10^6 개의 세포가 투여된다.

[0157] 한 예에서, 본 조성물은 5.00×10^6 개 초과와 생존 세포/mL를 포함한다. 다른 예에서, 본 조성물은 5.50×10^6 개 초과와 생존 세포/mL를 포함한다. 다른 예에서, 본 조성물은 6.00×10^6 개 초과와 생존 세포/mL를 포함한다. 다른 예에서, 본 조성물은 6.50×10^6 개 초과와 생존 세포/mL를 포함한다. 또 다른 예에서, 본 조성물은 6.68×10^6 개 초과와 생존 세포/mL를 포함한다.

[0158] 한 예에서, 본 개시내용의 방법은 6억 개의 세포의 총 용량을 투여하는 것을 포함한다. 예를 들어, 본 개시내용에 따라 치료되는 대상체는 세포의 총 용량이 6억 개의 세포를 초과하지 않는 한 상기 언급된 조성물의 다중 용량을 받을 수 있다. 예를 들어, 대상체는 2억 개의 세포를 3회 투여받을 수 있다. 한 예에서, 세포의 총 용량은 5억 개의 세포이다. 한 예에서, 세포의 총 용량은 4억 개의 세포이다. 예를 들어, 대상체는 1억 개의 세포를 4회 용량 받을 수 있다. 한 예에서, 대상체는 기준선으로 1억 개의 세포를 1회 용량 받은 후 3개월에 걸쳐 매달 1회 1억 개의 세포를 3회 용량 투여받는다. 한 예에서, 용량은 2×10^6 개의 세포/kg이다. 한 예에서, 용량은 2×10^6 개의 세포/kg이고 대상체는 2회 용량 또는 3회 용량을 받는다. 한 예에서, 용량은 2×10^6 개의 세포/kg이고 대상체는 3회 초과와 용량을 받는다.

[0159] 한 예에서, 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포는 조성물의 세포 집단을 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 99% 포함한다.

[0160] 본 개시내용의 조성물은 냉동보존될 수 있다. 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포의 냉동보존은 당업계에 공지된 저속 냉각 방법 또는 '신속' 냉동 프로토콜을 사용하여 수행할 수 있다. 바람직하게는, 냉동보존 방법은 냉동되지 않은 세포와 비교하여 냉동보존된 세포의 유사한 표현형, 세포 표면 마커 및 성장물을 유지한다.

[0161] 냉동보존 조성물은 냉동보존액을 포함할 수 있다. 냉동보존액의 pH는 전형적으로 6.5 내지 8, 바람직하게는 7.4이다.

[0162] 냉동보존액은, 예를 들어, PlasmaLyte A™과 같은 멸균, 비발열성 등장액을 포함할 수 있다. 100mL의 PlasmaLyte A™는 염화나트륨, USP(NaCl) 526mg; 나트륨 글루코네이트($C_6H_{11}NaO_7$) 502mg; 나트륨 아세테이트 삼수화물, USP($C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$) 368mg; 염화칼륨, USP(KCl) 37mg; 및 염화마그네슘, USP($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) 30mg을 함유한다. 이것은 항균제를 함유하지 않는다. pH는 수산화나트륨으로 조정한다. pH는 7.4(6.5 내지 8.0)이다.

[0163] 냉동보존액은 Profreeze™를 포함할 수 있다. 냉동보존액은 추가로 또는 대안적으로 배양 배지, 예를 들어, α MEM을 포함할 수 있다.

[0164] 냉동을 용이하게 하기 위해, 예를 들어, 디메틸설폭사이드(DMSO)와 같은 동결보호제가 보통 냉동보존액에 첨가된다. 이상적으로, 동결보호제는 세포 및 환자에 대해 무독성이어야 하고, 비항원성, 화학적 불활성이어야 하며, 해동 후 높은 생존율을 제공하고 세척 없이 이식이 가능해야 한다. 그러나 가장 일반적으로 사용되는 동결보호제인 DMSO는 약간의 세포독성을 보인다. 하이드록시에틸 전분(hydroxyethyl starch, HES)이 냉동보존액의 세포독성을 감소시키기 위해 대체물로서 또는 DMSO와 조합하여 사용될 수 있다.

[0165] 냉동보존액은 DMSO, 하이드록시에틸 전분, 인간 혈청 성분 및 기타 단백질 증량제 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 한 예에서, 냉동보존액은 약 5% 인간 혈청 알부민(HSA) 및 약 10% DMSO를 포함한다. 냉동보존액은 메틸셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈(PVP) 및 트레할로스 중 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다.

[0166] 한 실시양태에서, 세포는 42.5% Profreeze™/50% α MEM/7.5% DMSO에 현탁되고 제어 속도 냉동기(controlled-

rate freezer)에서 냉각된다.

- [0167] 냉동보존된 조성물은 해동되어 대상체에게 직접 투여될 수 있거나, 예를 들어, HA를 포함하는 다른 용액에 첨가될 수 있다. 대안적으로, 냉동보존된 조성물은 해동될 수 있고 투여 전에 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포가 대체 담체에 재현탁될 수 있다.
- [0168] 한 예에서, 본 개시내용의 세포 조성물은 플라즈마-라이트 A, 디메틸 설펍사이드(DMSO) 및 인간 혈청 알부민(HSA)을 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 개시내용의 조성물은 플라즈마-라이트 A(70%), DMSO(10%), HSA(25%) 용액을 포함할 수 있으며, HSA 용액은 5% HSA 및 15% 버퍼를 포함한다.
- [0169] 한 예에서, 본원에 기술된 조성물은 단일 용량으로 투여될 수 있다.
- [0170] 일부 예에서, 본원에 기술된 조성물은 다중 용량에 걸쳐 투여될 수 있다. 예를 들어, 적어도 2회, 적어도 3회, 적어도 4회 용량. 다른 예에서, 본원에 기술된 조성물은 적어도 5회, 적어도 6회, 적어도 7회, 적어도 8회, 적어도 9회, 적어도 10회 용량에 걸쳐 투여될 수 있다.
- [0171] 한 예에서, 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포는 대상체에 투여되기 전에 배양 증식될 수 있다. 다양한 세포 배양 방법이 당업계에 공지되어 있다. 한 예에서, 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포는 약 4-10 세대 동안 배양 증식된다. 한 예에서, 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포는 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10 세대 동안 배양 증식된다. 한 예에서, 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포는 적어도 5 세대 동안 배양 증식된다. 이러한 예에서, 줄기세포는 냉동보존되기 전에 배양 증식될 수 있다.
- [0172] 한 예에서, 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포는 투여 전에 무혈청 배지에서 배양 증식된다.
- [0173] 일부 예에서, 세포는 세포가 대상체의 순환계로 나가는 것을 허용하지 않지만 세포에 의해 분비된 인자가 순환계에 들어가는 것을 허용하는 챔버 내에 함유된다. 이러한 방식으로 가용성 인자는 세포가 상기 인자를 대상체의 순환계로 분비하도록 함으로써 대상체에게 투여될 수 있다. 이러한 챔버는 가용성 인자의 국소 수준을 증가시키기 위해 대상체의 부위에 동일하게 이식될 수 있다.
- [0174] 한 예에서, 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포는 전신 투여될 수 있다. 한 예에서, 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포는 대상체의 기도에 투여될 수 있다. 한 예에서, 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포는 대상체의 폐(들)에 투여될 수 있다. 다른 예에서, 본 개시내용의 조성물은 정맥내 투여된다. 또 다른 예에서, 조성물은 정맥내 및 대상체의 기도에 투여된다.
- [0175] 한 예에서, 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포는 주 1회 투여된다. 예를 들어, 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포는 2주마다 주 1회 투여될 수 있다. 다른 예에서, 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포는 주 2회 투여된다. 한 예에서, 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포는 월 1회 투여될 수 있다. 한 예에서, 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포의 2회 용량이 2주에 걸쳐 주 1회 투여된다. 다른 예에서, 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포의 2회 용량이 2주마다 주 1회 투여된다. 또 다른 예에서, 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포의 4회 용량이 2주에 걸쳐 투여된 후 후속 용량이 월 1회 투여된다. 한 예에서, 중간엽 계통 전구세포 또는 줄기세포의 2회 용량이 2주마다 주 1회 투여된 후 후속 용량이 월 1회 투여될 수 있다. 한 예에서, 4회 용량이 월 1회 투여된다.
- [0176] 당업자는 본 개시내용의 광범위한 일반 범위를 벗어나지 않고 상술한 실시양태에 대해 많은 변형 및/또는 수정이 이루어질 수 있음을 이해할 것이다. 따라서, 본 실시양태는 모든 면에서 예시적이며 제한적이지 않은 것으로 간주해야 한다.
- [0177] 다음의 특정 실시예는 단지 예시적인 것으로 해석해야 하며 어떤 식으로든 개시내용의 나머지 부분을 제한하는 것이 아니다. 추가 설명 없이, 당업자는 본원의 설명에 기초하여 본 발명을 최대한 활용할 수 있다고 여겨진다.
- [0178] 실시예
- [0179] **과염증 치료를 위한 생체 외 배양 증식된 성체 동종이계 골수 유래 중간엽 줄기세포(MSC)**
- [0180] **조성물**
- [0181] 조성물은 건강한 성인 공여자의 골수로부터 분리된 배양 증식된 중간엽 기질 세포(culture-expanded mesenchymal stromal cell, ceMSC)로 구성된다. 최종 조성물은 플라즈마-라이트 A로 제형화된 ceMSC, 디메틸 설펍사이드(DMSO) 및 인간 혈청 알부민(HSA)을 포함한다.
- [0182] **목적**

[0183] 다음을 측정하기 위함:

[0184] - 안전성

[0185] - 다음의 기준선으로부터의 변화:

[0186] o 백혈구 수.

[0187] o P/F 비율.

[0188] o 순환 CRP 수준.

[0189] o 페리틴 수준

[0190] 측정

[0191] 기준선 측정은 제1 용량을 투여하기 전에 취한 것으로 간주하였다(연구 0일). 백혈구 수, P/F 비율, 순환 CRP 수준 및 페리틴 수준을 매일 측정하였다.

[0192] 대상체

[0193] 중등도의 COVID-19 관련 ARDS가 있는 것이 특징인 환자(n=5)에게 중간엽 줄기세포(200만 개의 세포/kg)가 정맥 내 주입(들)되었다.

[0194] 분석

[0195] 치료된 환자에 대한 예비 데이터는 표 1 및 도 1 내지 5에 제시되어 있다.

표 1

	연령	PF 비율	WBC	FIO2	hsCRP	크레아티닌	FERR
환자 1	60	↑	↓	↓	↓↓	↓	↓
환자 2	39	↑↑↑	↓↓↓	↓↓	↓	↔	
환자 3	35	↑↑	↓↓↓	↓↓	↓↓	↔	↓↓
환자 4	60	↑↑	↓	↓↓		↔	
환자 5	51	↑↑↑		↓	↓↓	↑	
척도:	↑/↓	약간의 개선이 관찰됨					
	↑↑/↓↓	50% 초과 개선이 관찰됨					
	↑↑↑/↓↓↓	정상 범위로 돌아감					

[0196]

[0197] 5명의 환자에서 MSC 주입(들) 후 11일 동안 P/F 비율, CRP, 크레아티닌 및 페리틴 수준을 표시한다(도 6 내지 10). 0일은 1차 투여 직전이다. 모든 환자는 2-5일째에 2차 용량을 받았다. P/F 비율은 일반적으로 시간이 지남에 따라 증가했으며 일부 경우에 ARDS 등급의 개선을 나타냈다. 순환 CRP 수준은 일반적으로 시간이 지남에 따라 감소했으며 이는 염증 감소를 나타낸다.

[0198] 확장된 집단

[0199] 환자 집단을 11명으로 확장하였고 대상체(표 2)는 48-120시간 간격으로 2백만 개의 세포/kg/주입으로 2회 용량(정맥내)을 받았다. 세포 생존율은 78-90% 범위였다.

표 2

환자	성별	연령, 세	공존 병태	체질량지수, kg/m ²	APACHE II 점수*	입원 시 P:F 최저값, mmHg**
1	남	60	비만	32.0	14	78
2	남	39	비만	38.9	15	132
3	남	35	비만	37.7	16	91
4	남	60	비만 천식	32.9	12	80
5	남	51	비만	34.4	13	133
6	여	67	비만 당뇨병 고혈압	37.8	14	106
7	남	48	당뇨병	23.0	11	127
8	남	58	고혈압 천식	25.2	14	144
9	여	34	비만	36.4	8	134
10	남	50	비만 당뇨병 고혈압	35.6	16	151
11	남	60	없음	23.6	17	71

[0200]

[0201]

임상 결과

[0202]

임상 결과는 도 11에 나와 있다. 모든 환자를 사망 또는 ICU 퇴실까지 추적했으며, ICU 사망률은 18%(95% CI: 2-52%)였다. 관찰 기간 동안 10명의 환자(91%, 95% CI: 59-100%)에서 발관(extubation)하였다. 1명의 환자(환자 7)는 추정되는 대규모 폐색전증(massive pulmonary embolism)으로 인한 갑작스런 대상부전(decompensation) 때문에 발관 3일 후에 다시 삽관하였다. 혈전용해 요법은 산소 포화(oxygenation) 및 혈류역학(hemodynamics) 개선을 가져왔지만 상기 환자는 여전히 기계적 인공호흡이 필요하면서 패혈성 쇼크로 주입 후 23일째에 결국 사망하였다. 연구 기간이 끝날 때 9명(82%, 95% CI: 48-97%)의 환자가 기계적 인공호흡에서 해방되었고 9명(82%, 95% CI: 48-97%)이 중환자실에서 나갔으며 7명(64%, 95% CI: 31-89)이 퇴원하였다. 2명은 의료 층에 안정된 상태로 입원해 있다. 1차 주입에서 발관까지 시간의 중앙값은 10일(IQR: 3-10일)이었다. 기계적 인공호흡 기간의 중앙값은 12일(IQR: 7-12일)이었다.

[0203]

생리학적 데이터

[0204]

0일부터 3일까지 P:F 비율의 일일 중앙값(중앙값 차이 +78mmHg, p=0.002)에 의해 평가된 바와 같이 산소 포화가 개선되었다(표 3 및 4; 도 12). CRP 수준은 0일부터 5일까지 감소하였다(중앙값 219.2 내지 36.5mg/L, p=0.002, 도 13, 표 3 및 4). 발열 곡선이나 백혈구 수에는 변화가 없었다. 페리틴 수준과 SOFA 점수는 0일부터 3일 또는 5일까지 유의미한 변화가 없었다.

표 3

*삽관 후 24-48 시간 이내에 얻은 값.

매개변수	주입 전 값*	0일	3일	5일	p 값**
일일 최고 체온, 섭씨	38.4 (37.6-39.0)	38.1 (36.2-39.5)	37.3 (37.0-38.5)	37.7 (37.1-38.3)	0.229
백혈구 수, $\times 10^3/L$	15.8 (12.0-19.6)	12.7 (8.6-19.0)	15.5 (11.0-17.1)	15.8 (10.8-20.1)	0.234
C 반응성 단백질, mg/L	207.0 (145.5-308.6)	219.2 (166.4-275.1)	82.3 (53.2-147.6)	36.5 (22.1-58.5)	<0.001
페리틴, mg/dL	1027 (716-1755)	909 (632-1524)	719 (528-1411)	704 (554-1089)	0.061
P:F 비율***	156 (125-172)	120 (103-205)	197 (192-230)	200 (148-218)	<0.001
SOFA 점수 ^a	7.0 (6.0-10.0)	6.0 (3.0-7.0)	4.0 (3.0-7.0)	3.5 (2.5-6.0)	0.009

*삽관 후 24-48시간 이내에 얻은 값.

**프리드만(Friedman) 테스트

*** 동맥혈 산소 분압 대 흡기 산소 비율인 P:F 비율

^a 순차 장기 부전 평가 점수(Sequential Organ Failure Assessment Score)

[0205]

표 4

매개변수	비교	차이 중앙값 (IQR)	p 값*
C 반응성 단백질	0일부터 3일까지의 차이	-141.8 (-211.0, 183.6)	0.032
	0일부터 5일까지의 차이	-176.2 (-240.0, -41.2)	0.002**
P:F 비율***	0일부터 3일까지의 차이	78 (3-154)	0.002**
	0일부터 5일까지의 차이	49 (30-166)	0.004**
SOFA 점수 ^a	0일부터 3일까지의 차이	-1 (-8, 6)	0.523
	0일부터 5일까지의 차이	-1 (-8, 4)	0.438

*윌콕슨(Wilcoxon) 부호 순위 테스트

**알파<0.008에서 유의함, 다중 비교를 위해 본페로니(Bonferroni) 보정을 사용

***동맥혈 산소 분압 대 흡기 산소 비율인 P:F 비율

^a 순차 장기 부전 평가 점수

[0206]

[0207]

안전성

[0208]

주입 관련 유해 사례는 없었다.

[0209]

다계통 염증 중후군(MIS) 치료를 위한 생체 외 배양 증식된 성체 동종이계 골수 유래 중간엽 줄기세포(MSC)

[0210]

이전에 건강했던 남아가 고열을 보였고 COVID-19 항체에는 양성이었지만 바이러스에는 양성이지 않았다. 상기 남아는 처음에 고용량 스테로이드, 정맥 면역글로불린, 혈관 수축제, 고용량 아스피린 및 항혈소판제로 MIS 치료를 받았다. 이러한 여러 치료법에도 불구하고 심장 펌프 기능이 저하되고 염증, 심장 울혈 및 혈관 내 응혈에 대한 바이오마커가 지속적으로 상승하였다. 입원 4일 후 정맥내 중간엽 줄기세포 용량(2×10^6 개의 세포/kg)으로 치료하고 이틀 후 2차 정맥내 용량으로 치료하였다.

[0211]

2회의 MSC 용량이 투여된 3일의 기간 동안, CRP, D-이량체 및 BNP 수준은 감소한 반면 LVEF%는 증가하였다(표

5; 도 14). 염증성 바이오마커의 현저한 감소도 관찰되었다(도 14). 표 5에 나타난 바와 같이, 주요 혈전증 및 응혈의 마커인 D-이량체 수준은 극적으로 감소되었고(>20에서 2.6 µg/mL로) 심장 기능은 박출률이 51%에서 68%로 증가함에 따라 유의하게 개선되었다. 아이는 이후 집으로 퇴원하였다.

표 5

MSC 투여량 @ 2 x 10 ⁶ 개의 세포/kg					
4세 남아; 이전에 건강했음; 18kg					
		용량 #1		용량 #2	
일	-1	0	1	2	3
hsCRP	8.7	6.2	3.7	3	1.4
D-이량체 ug/ml	>20	17	-	-	2.57
LVEF %	51	64	-	68	-
BNP pg/ml	785	153	240	49	-

[0212]

[0213]

이전에 건강한 여아는 COVID-19 항체에 대해 양성이었지만 바이러스에는 양성이지 않았다. 상기 여아는 처음에 IV 스테로이드, 숭압제, 저용량 아스피린으로 MIS 치료를 받았고 예방 차원에서 삼관하였다. 입원 2일 후 정맥내 중간엽 줄기세포 용량(2×10⁶개의 세포/kg)으로 치료하고 이틀 후 2차 정맥내 용량으로 치료하였다.

[0214]

2회의 MSC 용량이 투여된 4일의 기간 동안, CRP, 트로포닌 I, 페리틴, 크레아티닌, BUN 및 BNP 수준은 감소한 반면 LVEF%는 증가하였다(표 6; 도 15). 염증성 바이오마커의 현저한 감소도 관찰되었다(도 15). 감소된 피브리노겐 수준은 세포의 2차 투여 후에 관찰되었다. 또한, 표 6에 나타난 바와 같이 박출률이 43.3%에서 61.8%로 증가함에 따라 심장 기능이 크게 개선되었다.

표 6

MSC 투여량 @ 2 x 10 ⁶ 개의 세포/kg							
10세 여아; 이전에 건강했음; 58kg							
		용량 #1		용량 #2			
일	-2	0	1	2	3	4	5
hsCRP	23.0	-	7.2	4.5	2.5	1.49	0.86
트로포닌 I	13	-	-	-	7.4	-	-
LVEF %	43.3	48.1	49.2	-	61.8	-	-
BNP	6500	2900	-	2279	443	160	93
페리틴	1700	1250	732	782	748	814	803
크레아티닌	4.3	1.5	-	1.1	0.8	0.8	0.6
BUN	46	-	-	44	30	27	21
피브리노겐	-	-	572	532	427	384	382

[0215]

[0216]

상기 표에서 언급한 바와 같이, 세포 요법의 투여 후, 두 어린이 모두 레메스텔셀(remestemcel)-L 치료와 일시적으로 관련된 LV 박출률 및 B형 나트륨 이노 단백질의 빠른 정상화뿐만 아니라 D-이량체의 개선을 나타냈다(도 16). 또한, 연속 심초음파 영상(echocardiographic imaging)은 판-판막 역류(pan-valvular regurgitation)의

중증도 감소와 LV 수축기말 용적의 증가를 보였다. 후자의 관찰은 세포 요법 투여와 일시적으로 관련된 LV 수축 상태의 개선과 일치한다.

[0217] 이식 수용자의 과염증 치료를 위한 생체 외 배양 증식된 성체 동종이계 골수 유래 중간엽 줄기세포(MSC)

[0218] 성인 남성이 심각한 크론병으로 결장 절제 및 이식을 받았다. 환자는 이후에 박테리아성 ARDS 및 이식 거부를 나타내는 증상이 발생하였다. 환자는 또한 COPD를 앓고 있었고 폐상엽(upper lobe)에 소엽중심 폐기종(centrilobular emphysema)의 CT 소견을 보였다. 환자는 경구 반코마이신(vancomycin)(재발성 클로스트리디움 디피실리(Clostridium difficile) 감염의 병력으로 시작) 및 경구 오그멘틴(Augmentin)(폐렴에 대해 시작)을 포함한 어떤 치료에도 반응하지 않았다. 대장내시경 검사에서 급성 세포 거부 반응에 대해 불확정적(indeterminant)인, 부분적인 활성 염증, 구조적 왜곡 및 국소적으로 증가된 세포자멸 활성(연속 5/10 선와)이 소장 점막에 있는 것으로 밝혀졌다. 흉부 CT에서 다초점성 기관지주위 결절(multifocal peribronchial nodular) 및 경결 음영(dependent consolidative opacity)이 주로 폐하엽에서 보여 폐렴이 의심되는 새로운 소견을 보였다. 추가의 대장 내시경 검사에서 회장은 정상이었고 결장 점막은 전체적으로 홍반이 돌아 있었다. 급성 세포 거부 반응에 대한 병리학은 불확정적이었지만 염증 변화가 있었다.

[0219] 후속적으로 환자에게 정맥내 중간엽 줄기세포(2×10^6 개의 세포)를 2회 주입한 후 결장벽에 1억 5천만 개의 MSC를(내시경으로) 직접 투여하였다. 환자의 호흡기 ARDS는 세포 치료 후 없어졌고 환자는 산소를 끊고 집으로 퇴원하였으며 하루에 3-4번 배변을 하였다. 점도가 반고체. 2주 후 추적 조사 결과, 임상 징후의 급격한 개선, 회장의 최소 염증, 결장 배경 염증(background inflammation) 없음 및 이식 거부의 증거가 없음이 드러났다. 숨가쁨은 보고되지 않았고 설사는 기준선으로 돌아갔고(10 - 12x 발생), 발열이나 SOB는 보고되지 않았으며 추가 O_2 사용이 필요하지 않았다. 기관지 세척 배양물도 감염에 대해 음성이었다. 추가 후속 조치로 특허가 집에 있었고 기분이 좋은 것으로 나타났다.

[0220] 광범위하게 기술된 본 발명의 사상 또는 범위를 벗어나지 않으면서 특정 실시양태에 나타난 바와 같이 본 발명에 대해 다양한 변형 및/또는 수정이 이루어질 수 있다는 것이 당업자에 의해 인식될 것이다. 따라서, 본 실시양태는 모든 면에서 예시적이며 제한적이지 않은 것으로 간주해야 한다.

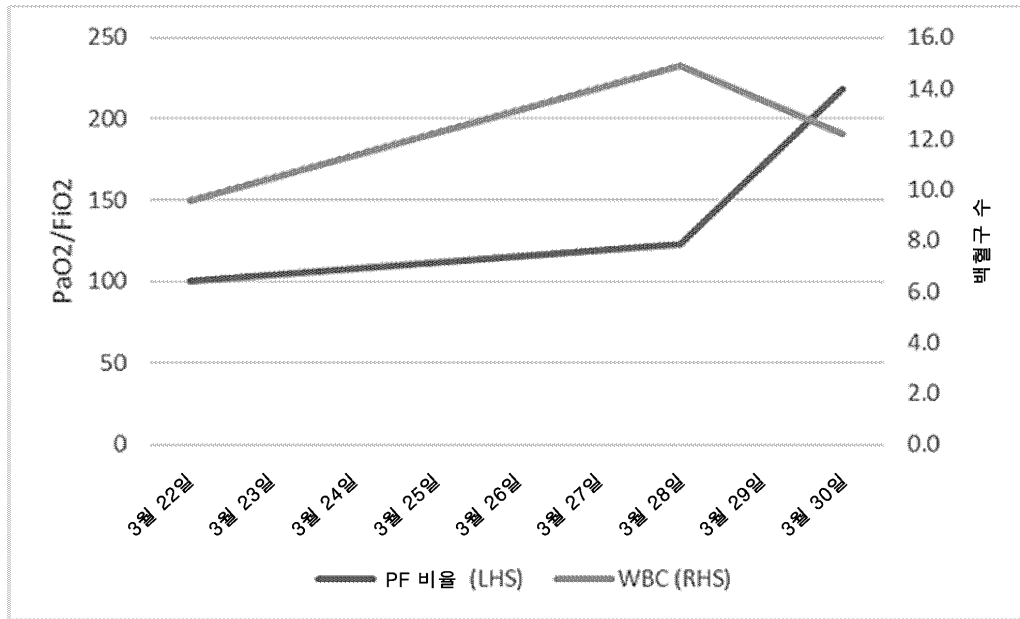
[0221] 상기 논의된 모든 간행물은 전체가 본원에 포함된다.

[0222] 본 명세서에 포함된 문서, 법률, 자료, 장치, 물품 등에 대한 모든 논의는 오로지 본 발명에 대한 맥락을 제공하기 위한 것이다. 이들 중 임의의 것 또는 전부가 본 출원의 각 청구항의 우선일 이전에 존재했기 때문에 본 발명과 관련된 분야에서 선행 기술 기반의 일부를 형성하거나 상식이었다는 것을 인정하는 것으로 간주해서는 안 된다.

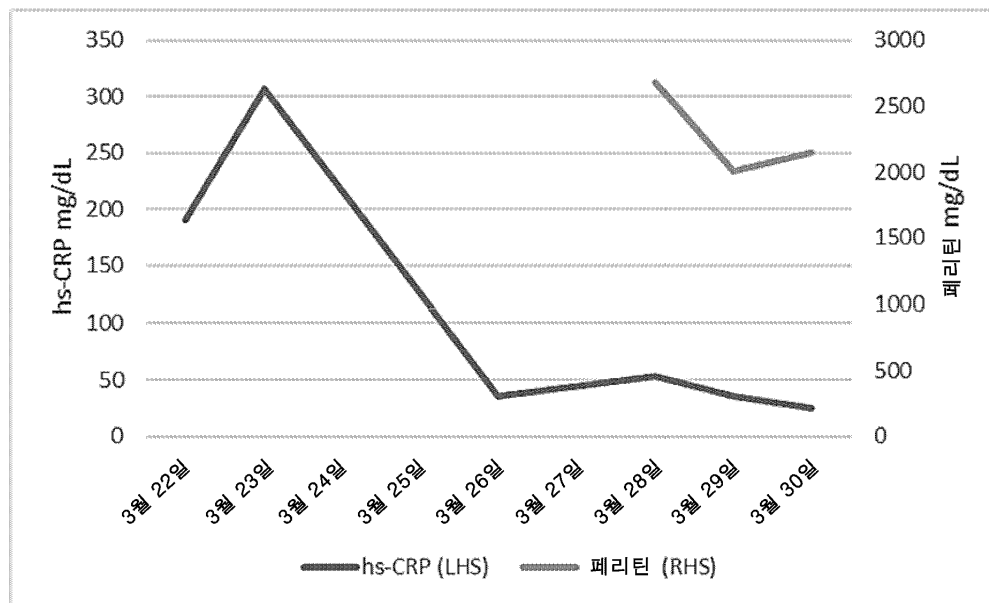
[0223] 본 출원은 2020년 4월 3일 출원된 AU2020901052, 2020년 4월 8일 출원된 AU2020901124, 2020년 7월 6일 출원된 AU2020902312, 2020년 7월 14일 출원된 AU2020902425, 2020년 8월 25일 출원된 AU2020903041, 2020년 10월 12일 출원된 AU2020903694 및 2020년 11월 23일 출원된 AU2020904312를 우선권 주장하며, 이들의 기재내용은 본원에 참조로 포함된다.

도면

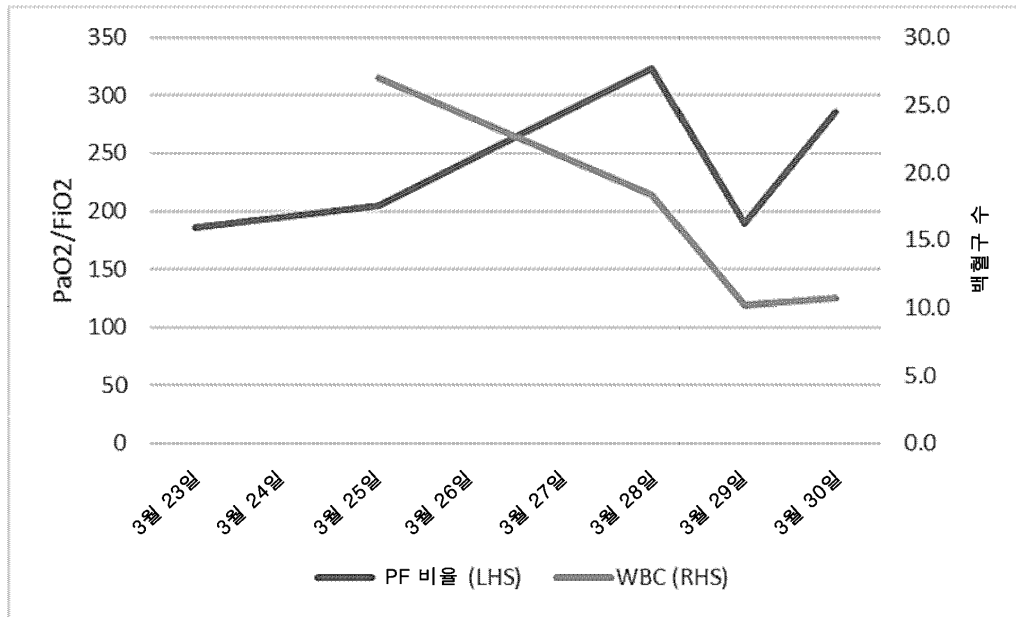
도면1



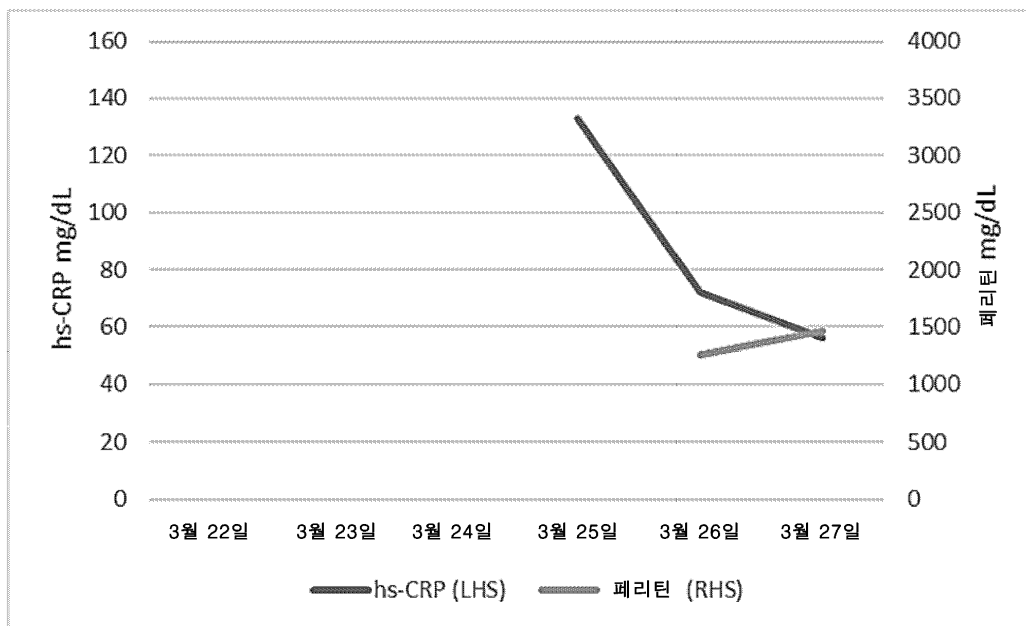
도면2



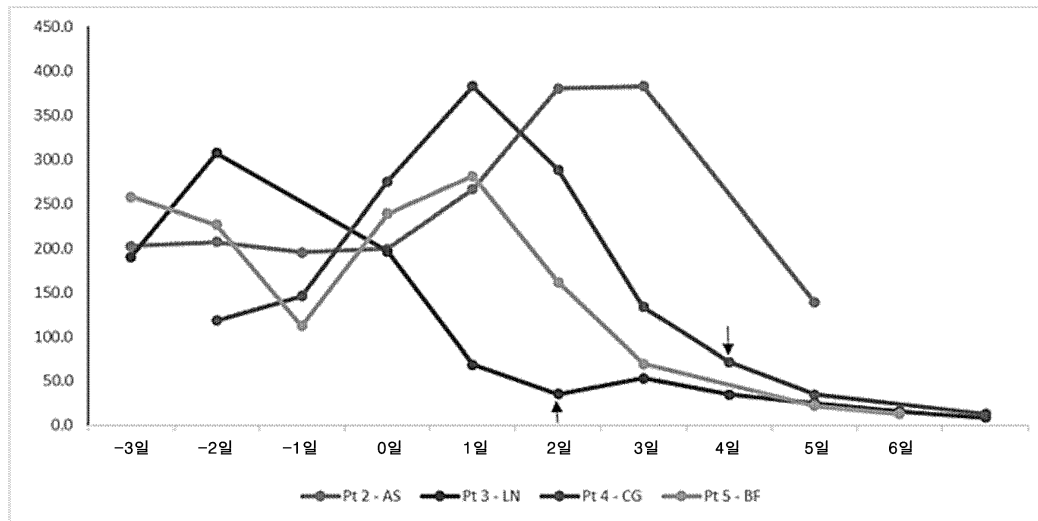
도면3



도면4



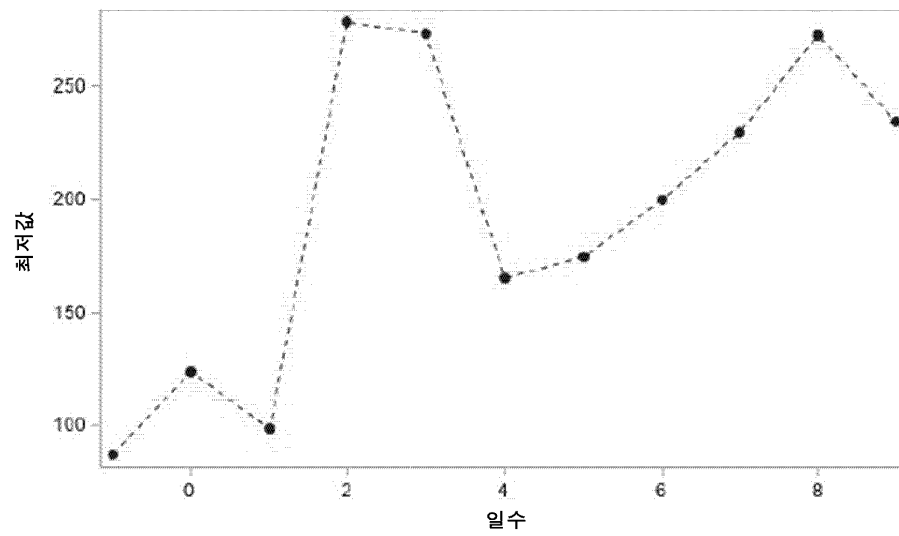
도면5



도면6a

A

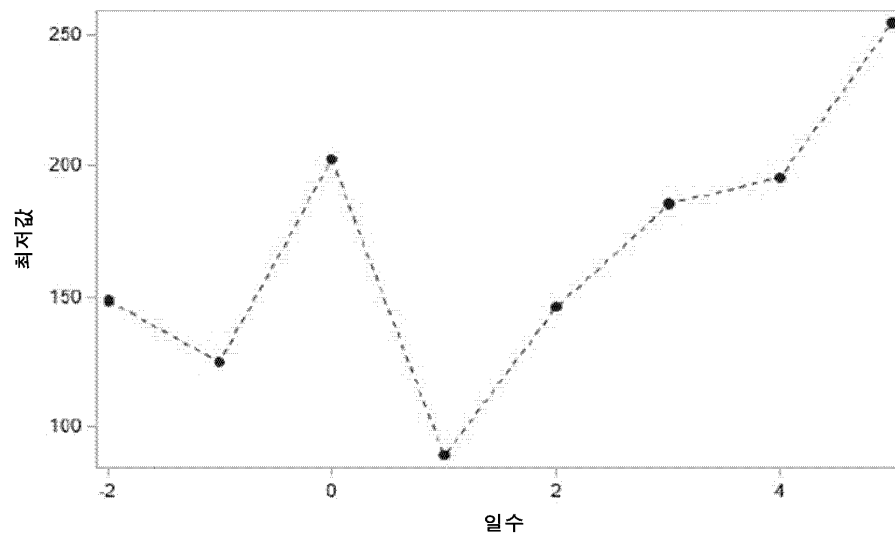
MSC 주입으로부터 시간에 따른 P:F 비율 최저값
환자 ID=AS



B

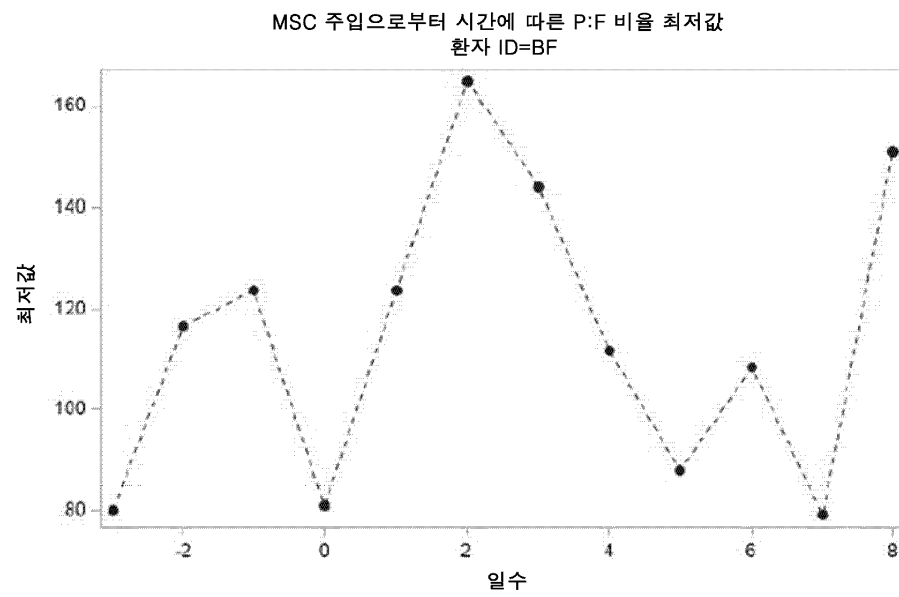
MSC 주입으로부터 시간에 따른 P:F 비율 최저값

MSC 주입으로부터 시간에 따른 P:F 비율 최저값
환자 ID=ASC

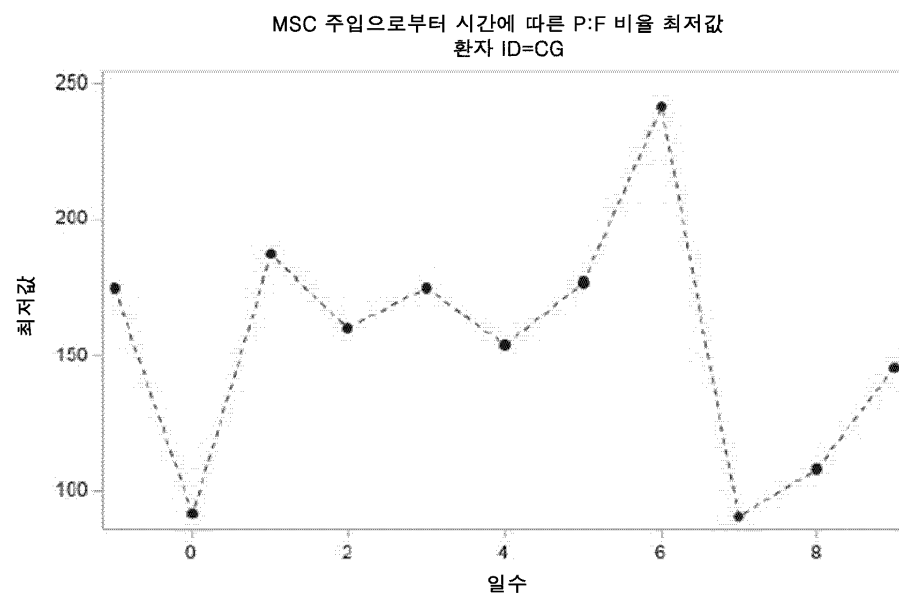


도면6b

C

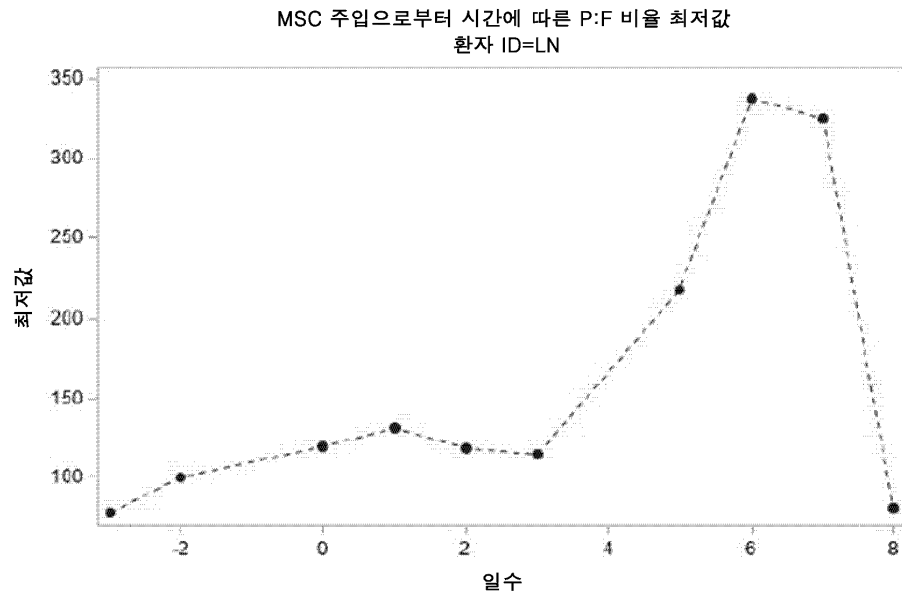


D



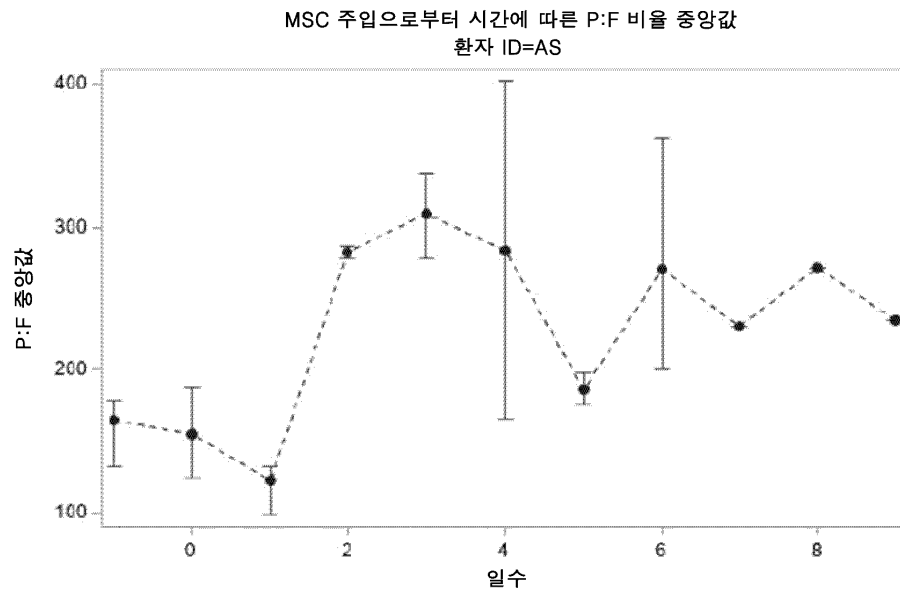
도면6c

E

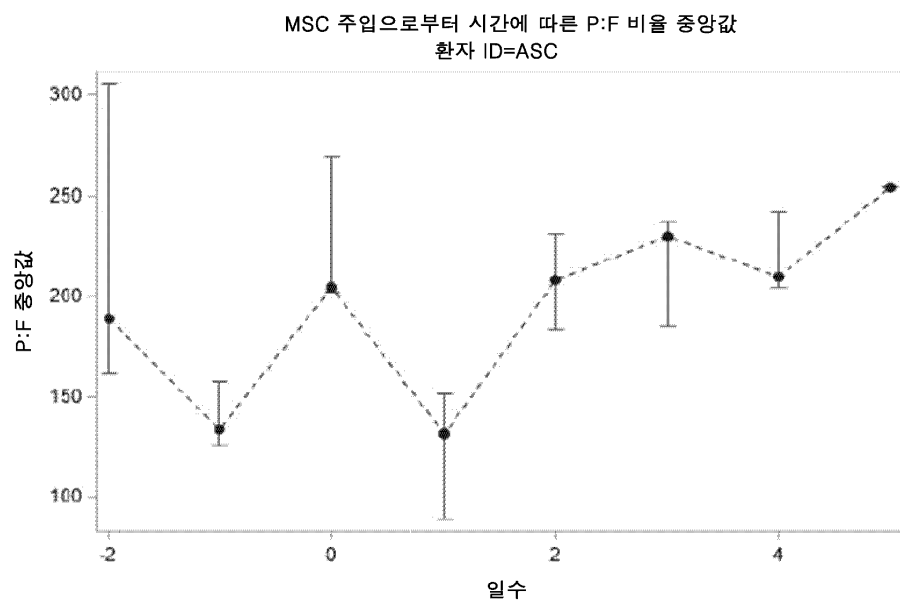


도면7a

A

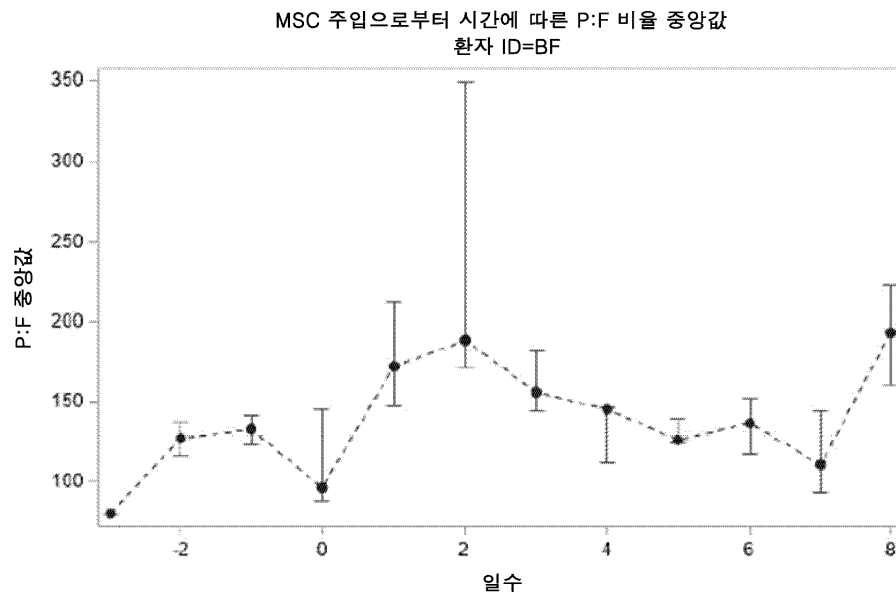


B

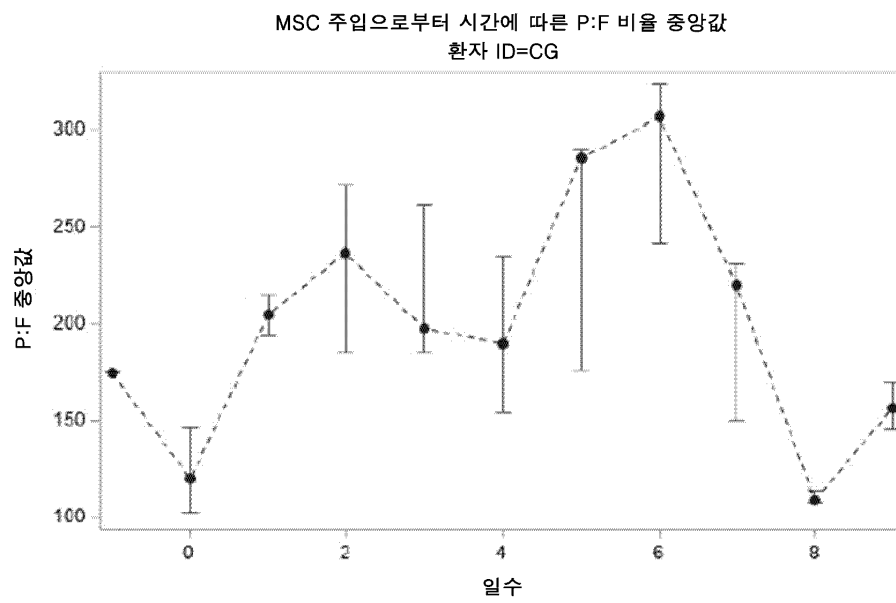


도면 7b

C



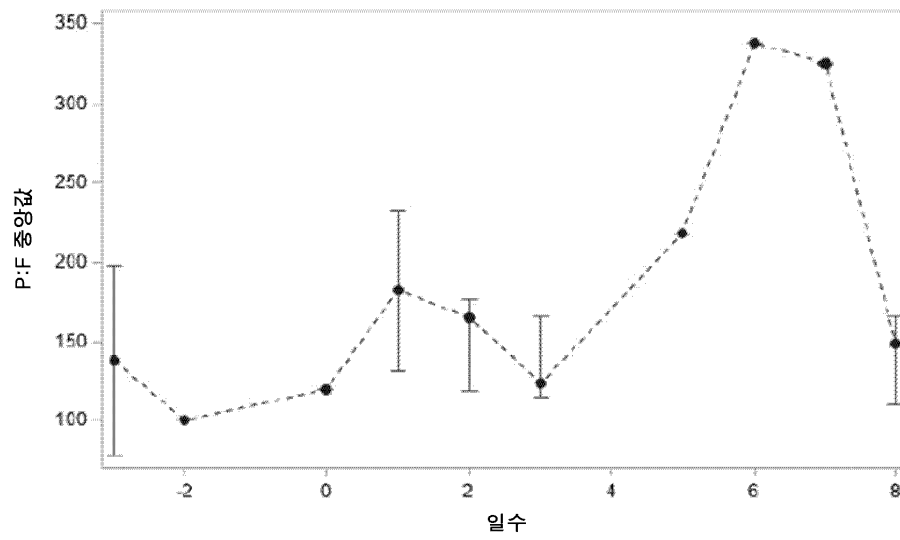
D



도면7c

E

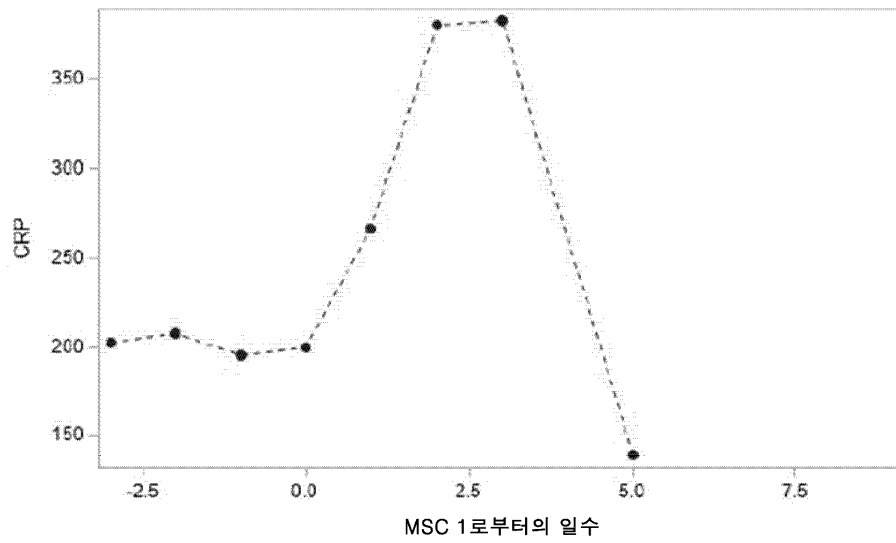
MSC 주입으로부터 시간에 따른 P:F 비율 증감값
환자 ID=LN



도면 8a

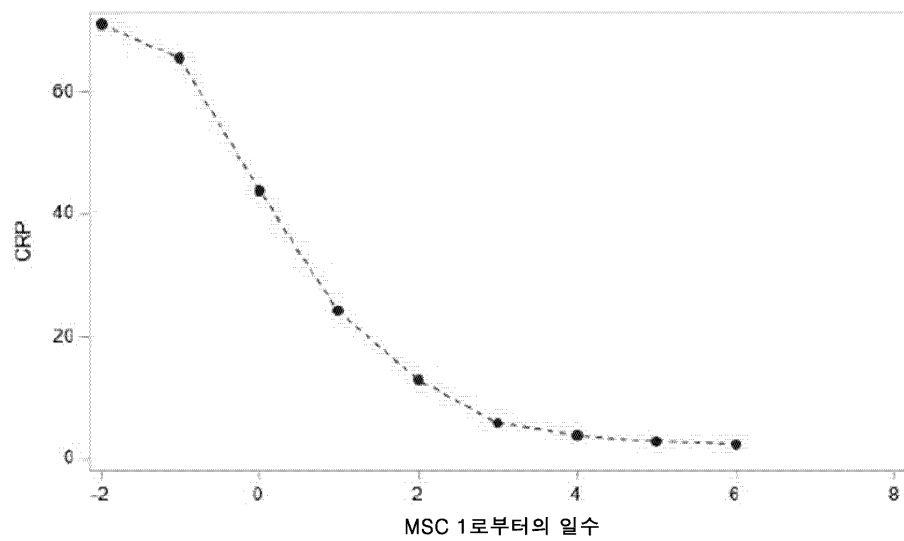
A

MSC 주입으로부터 시간에 따른 C 반응성 단백질
환자 ID=AS



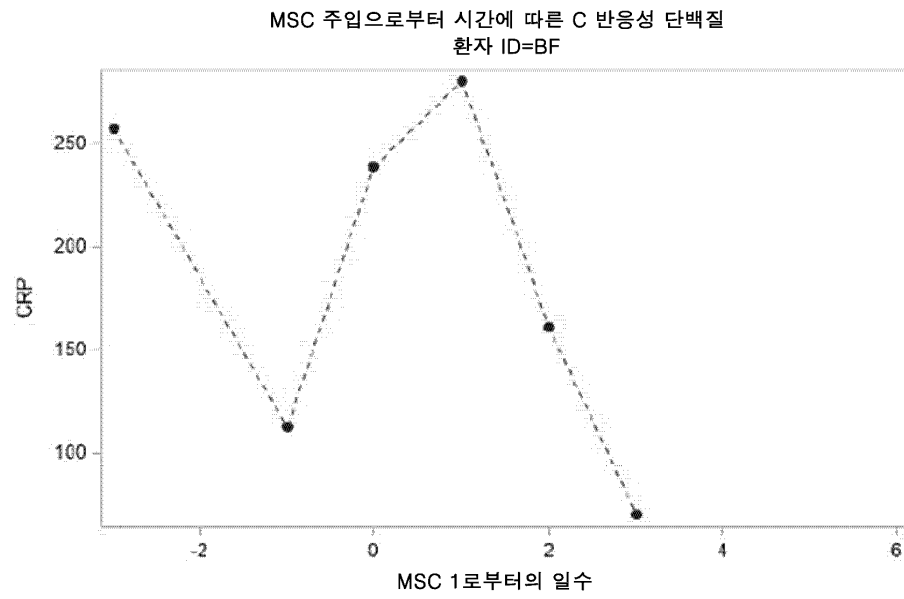
B

MSC 주입으로부터 시간에 따른 C 반응성 단백질
환자 ID=ASC

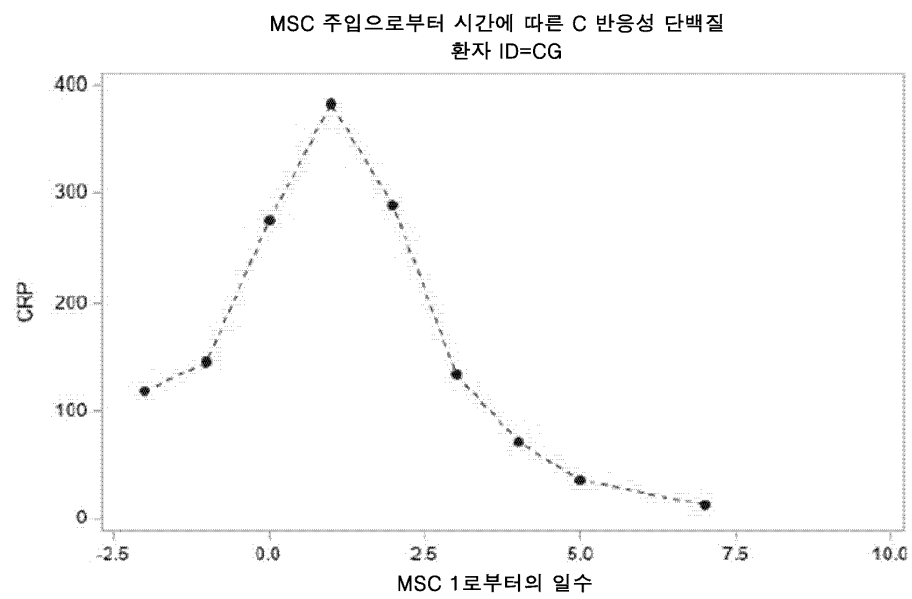


도면 8b

C

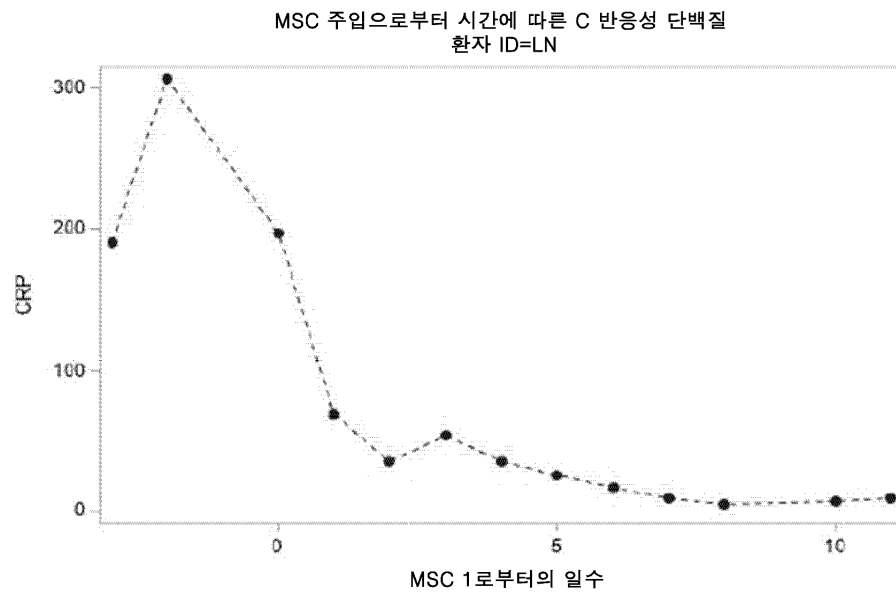


D



도면8c

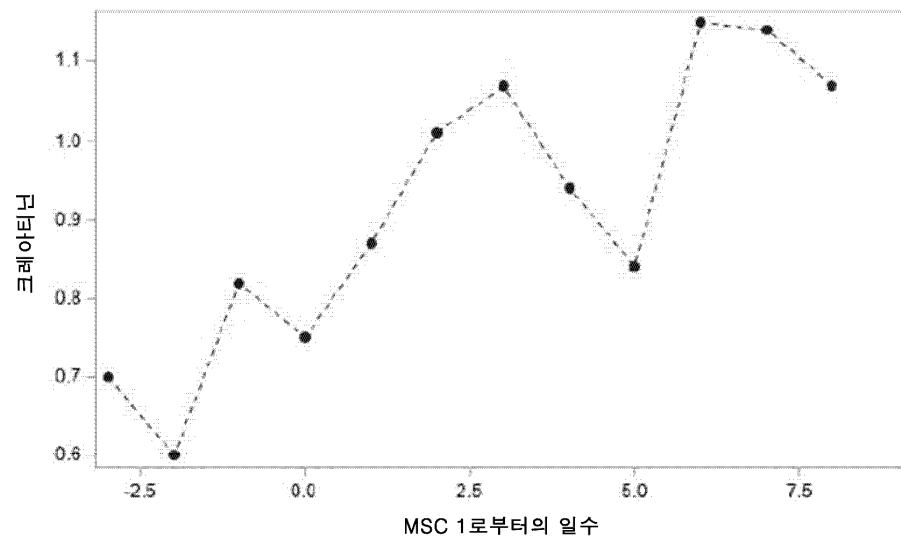
E



도면9a

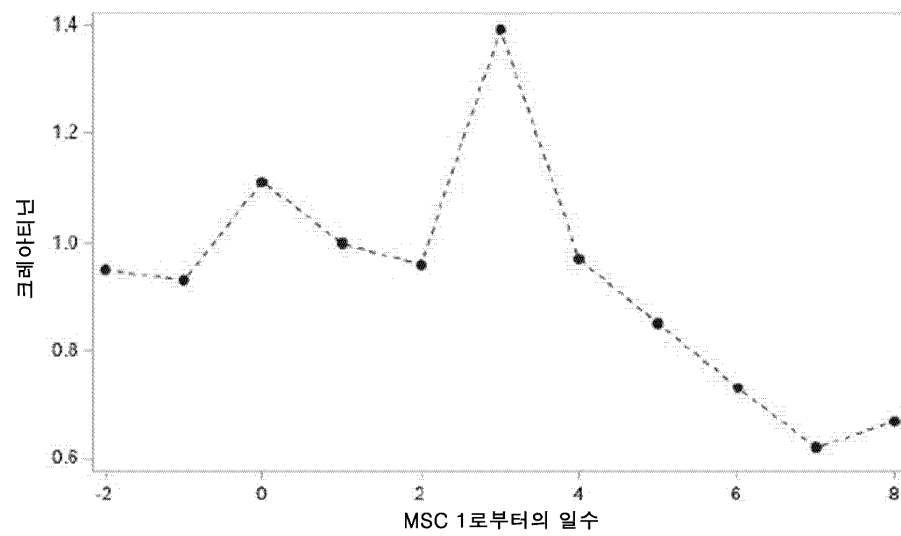
A

MSC 주입으로부터 시간에 따른 혈청 크레아티닌
환자 ID=AS



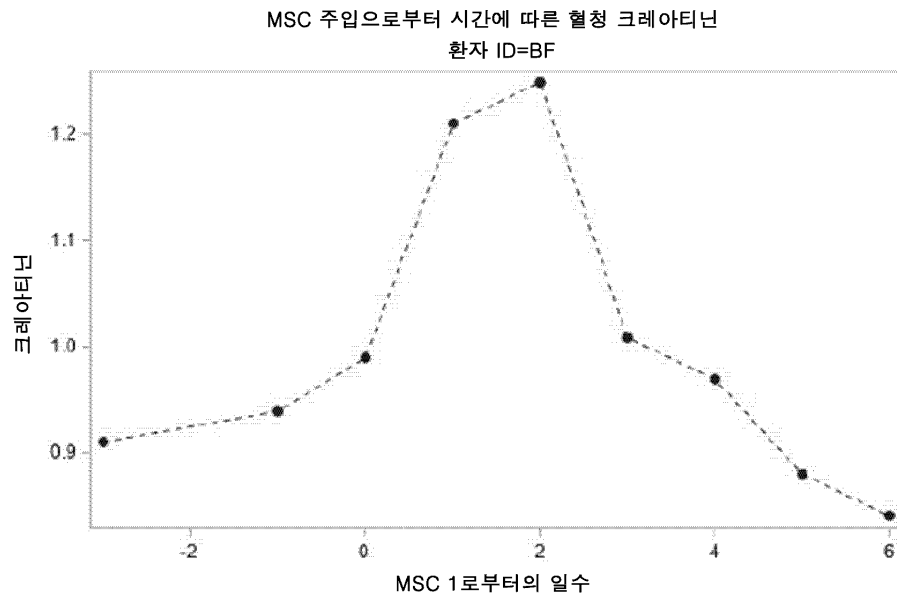
B

MSC 주입으로부터 시간에 따른 혈청 크레아티닌
환자 ID=ASC

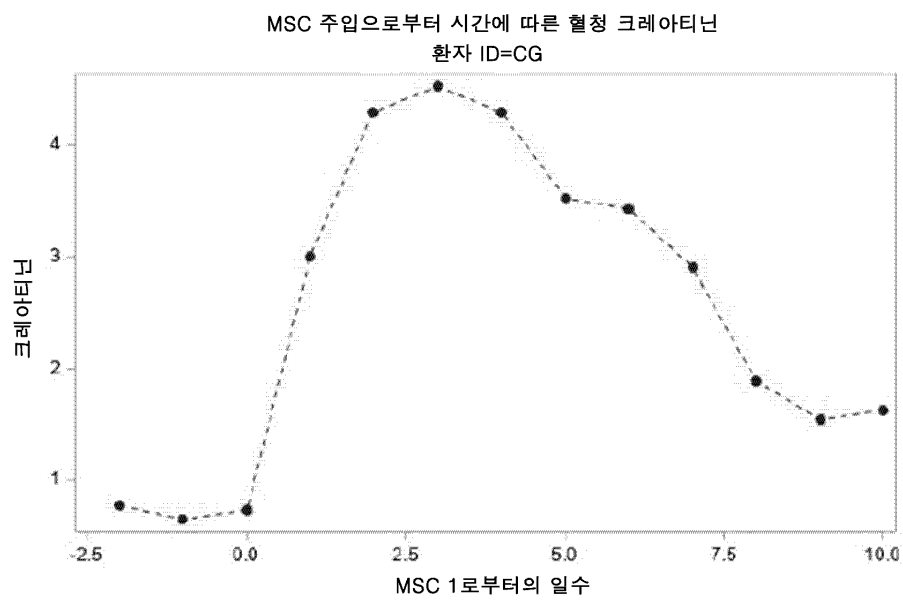


도면9b

C

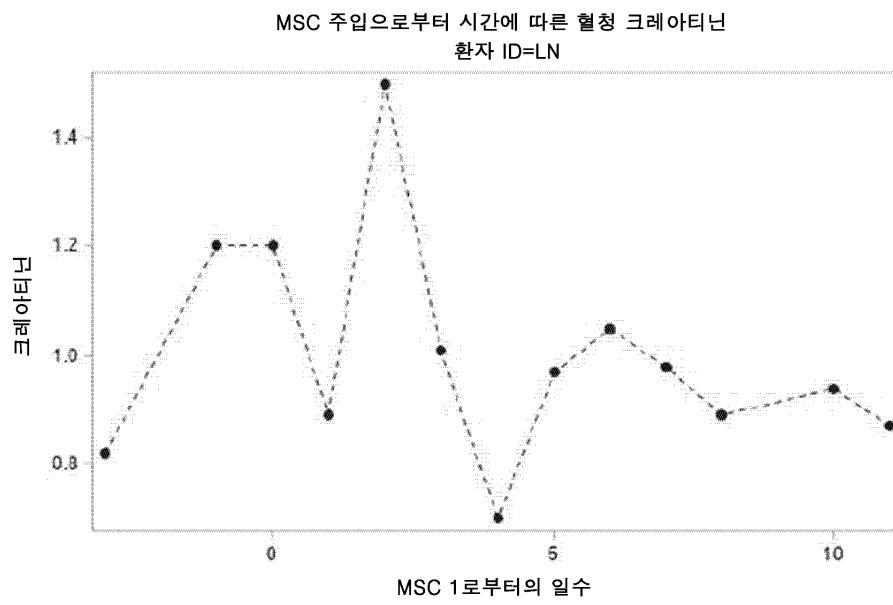


D



도면9c

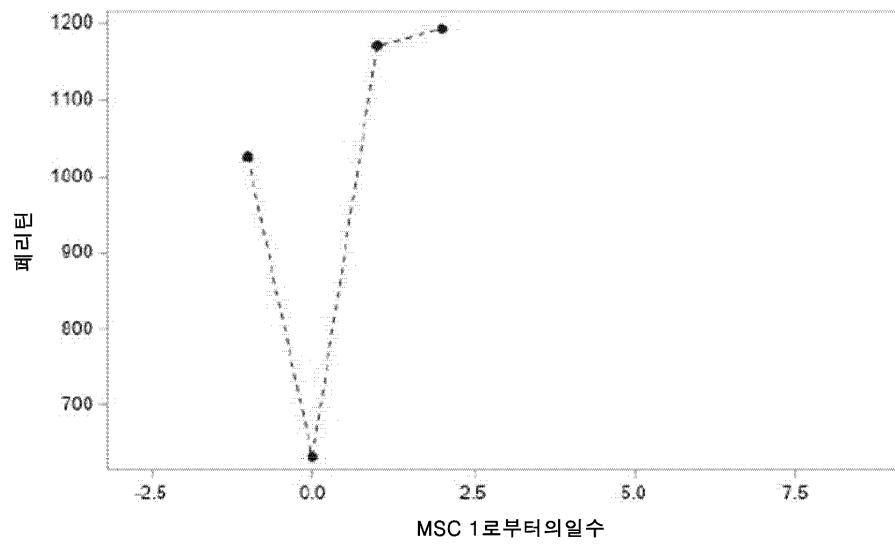
E



도면10a

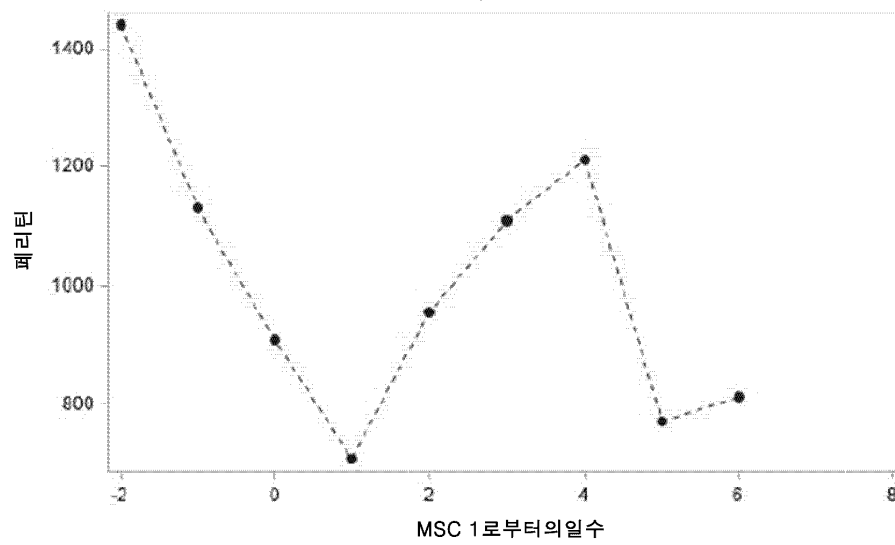
A

MSC 주입으로부터 시간에 따른 페리틴 수준
환자 ID=AS



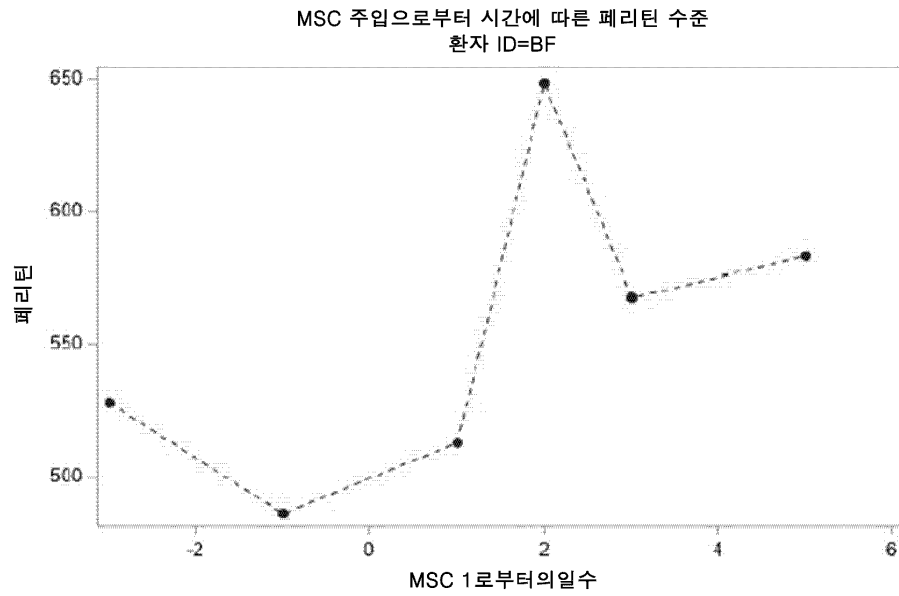
B

MSC 주입으로부터 시간에 따른 페리틴 수준
환자 ID=ASC

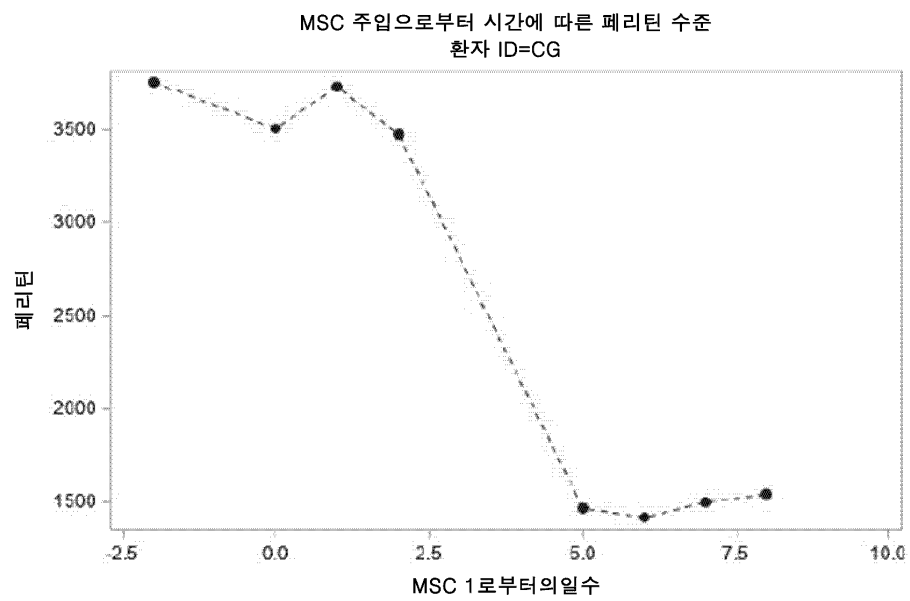


도면10b

C

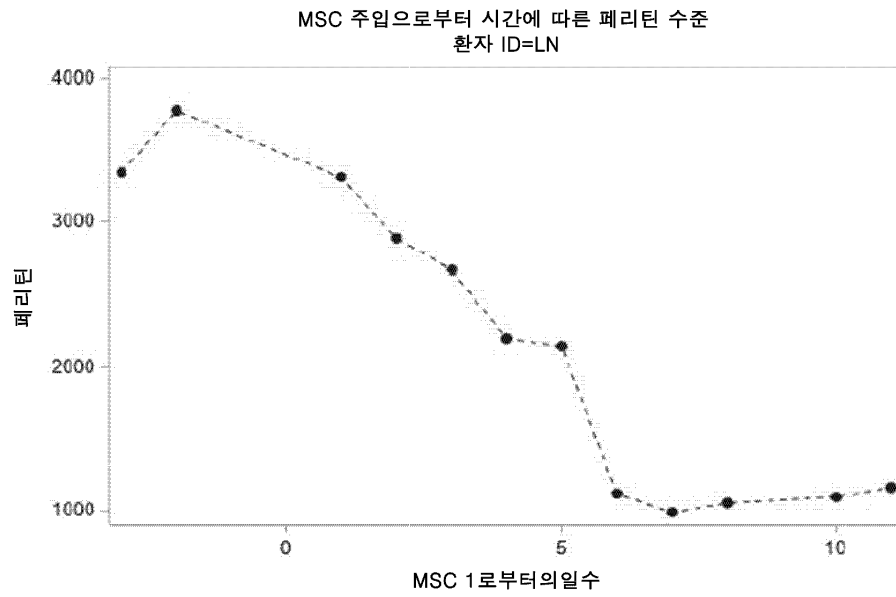


D

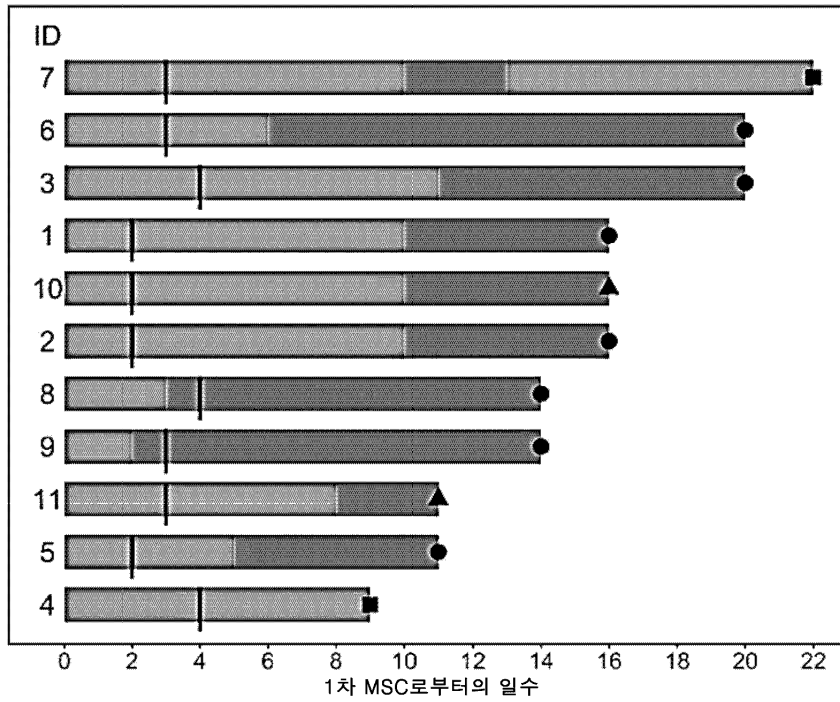


도면10c

E



도면11



2차 MSC의 수용

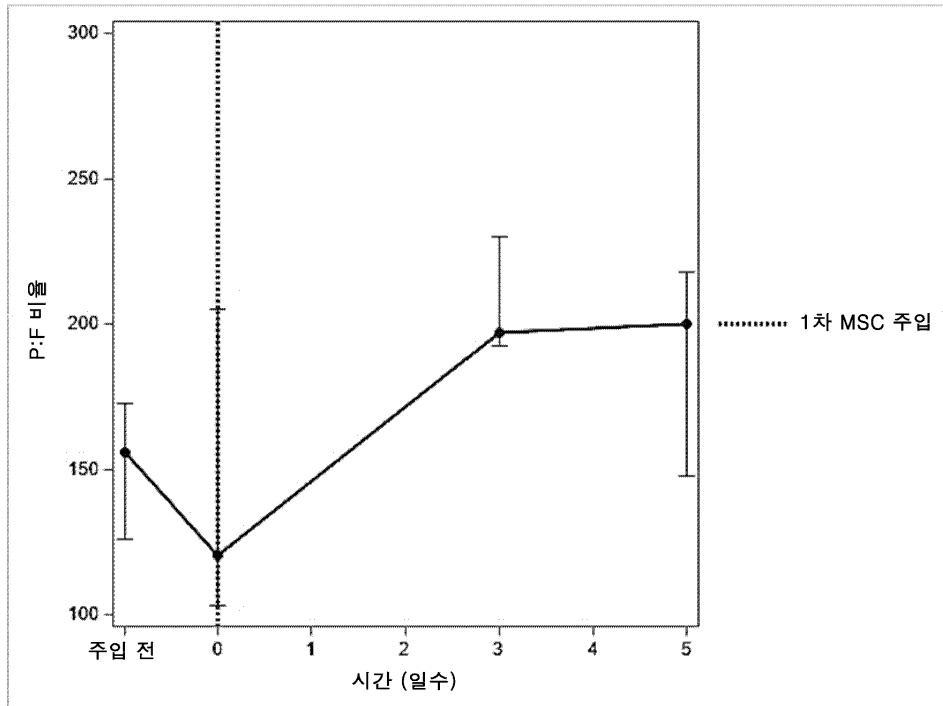
최종 추적 상태

- 퇴원
- ▲ ICU에서 퇴실했지만 아직 입원 중
- 사망

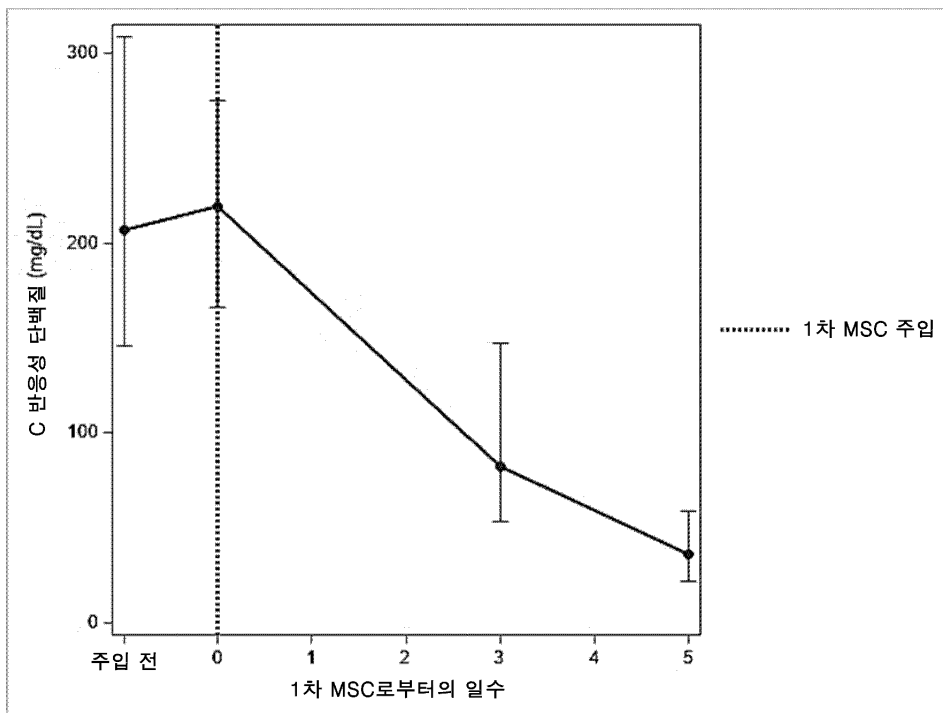
삼관

발관

도면12



도면13



도면14a

A. 환자 #1

	입원 ↓									퇴원 ↓				외래 환자 ↓	
증상 발생 후 일수	6	7	8	9	10	11	12	13	14			32-40			
입원일	1	2	3	4	5	6	7	8	9			--			
MSC 치료일	-4	-3	-2	-1	0*	+1	+2**	+3	+4			+22-33†			
		IVIg		IVIg											
치료 기준 MIS-C치료		메틸프레드니솔론					프레드니솔론				프레드니솔론				
		LMWH													
		고용량 ASA									저용량 ASA				
주요 실험실 결과															
총 WBC, k/cumm	32.9	42.6	38.7	22.2	18.8	21.0	23.5	18.5	26.8			17.2			
호중구, k/cumm	29.6	40.1	35.6	16.2	14.8	11.8	12.0	12.6	19.8			15.0			
림프구, k/cumm	1.65	0.85	2.49	3.77	1.13	5.88	8.45	4.44	2.95			3.63			
혈소판, k/cumm	102	108	112	79	152	163	201	227	274			116			
헤모글로빈, g/dL	12.1	8.1	7.6	9.0	9.6	9.5	7.9	5.2	8.7			10.6			
C-반응성 단백질, mg/dL	57.1	41.5	--	14.7	8.7	6.2	3.7	3.1	1.4			<0.02			
ESR, mm/hr	>100	81	--	--	32	--	--	26	--			6			
프로칼시토닌, ng/mL	>100	--	--	--	14.8	--	--	2.0	--			--			
D-이량체, µg/mL	12.2	16.7	15.9	>20	>20	>20	17.0	8.5	2.6			<0.43			
피브리노겐, mg/dL	831	807	588	302	230	167	149	144	154			189			
페리틴, ng/mL	417	369	333	244	274	262	202	299	258			16.3			
락테이트 탈수소효소, U/L	1230	408	--	--	395	--	--	243	--			--			
트로포닌, ng/mL	0.02	0.01	0.02	0.01	--	--	--	--	--			--			
BNP, pg/mL	1057	1339	3691	4465	785	153	240	47.4	--			<10.0			
크레아티닌, mg/dL	4.5	1.4	0.5	0.5	0.4	0.4	0.3	0.3	0.3	0.3					
혈액 우레아 질소, mg/dL	83	54	22	30	31	28	19	24	16	11					
AST, U/L	169	177	57	38	29	25	28	29	--	22					
ALT, U/L	66	77	45	36	29	25	25	24	--	27					

도면14b

주요 심초음파 소견												
LV 박출률, % LV 수축기말 용적, mL LV 확장기말 용적, mL	--	57.6	42.3	51.2	--	64.1	--	67.8	--			59.2
	--	19.6	37.7	37.0	--	20.3	--	19.6	--			23.2
	--	46.4	65.3	75.9	--	56.5	--	60.9	--			56.8
주요 임상 소견	저혈압, 빈맥; 에피/ 노르에피 네프린		간헐적 서맥, 고혈압		빈혈; PRBC		임상적 의문 없음					임상적으로 중음

도면15a

B. 환자 #2

	OSH 입원 ↓	MUSC로 전실 ↓												퇴원 ↓	외래 환자 ↓
증상 발생 후 일수	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		33	
입원일	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		--	
MSC 치료일	-4	-3	-2	-1	0*	+1	+2**	+3	+4	+5	+6	+7		+26	
치료 기준 MIS-C치료			IVIG	IVIG											
			메틸프레드니솔론					프레드니솔론					프레드니솔론		
			LMWH												
			저용량 ASA		고용량 ASA		저용량 ASA					저용량 ASA			
주요 실험실 결과															
총 WBC, k/cumm			31.1	16.1	17.7	16.1	22.6	21.7	22.0	17.2	--	18.2		8.2	
호중구, k/cumm			26.5	14.8	15.	14.4	18.5	17.8	18.5	15.1	--	15.7		4.16	
림프구, k/cumm			1.56	0.53	0.65	0.81	2.03	2.17	1.32	0.86	--	1.28		2.78	
혈소판, k/cumm			197	249	170	193	312	342	354	352	--	375		193	
헤모글로빈, g/dL			11.1	9.3	8.1	8.7	10.1	10.1	10.0	10.0	--	10.0		11.4	
C-반응성 단백질, mg/dL			19.8	23.1	13.7	7.2	4.8	2.5	1.5	0.86	--	0.27		0.20	
ESR, mm/hr			>100	--	--	--	--	--	--	--	--	--		30	
프로칼시토닌, ng/mL			29.2	31.6	18.1	7.3	2.5	0.86	0.61	0.36	--	0.09		--	
D-이량체, µg/mL			3.1	3.7	2.5	2.7	3.8	3.9	3.3	2.4	--	1.7		1.4	
피브리노겐, mg/dL			876	891	726	572	532	427	384	382	--	312		--	
페리틴, ng/mL			1057	1786	1251	733	783	749	814	803	--	956		322	
락테이트 탈수소효소, U/L			754	--	--	--	--	--	--	--	--	--		--	
트로포닌, ng/mL			20.0	13.2	9.7	8.8	7.4	5.8	3.5	2.4	--	1.1		0.01	
BNP, pg/mL			3433	6528	2910	3246	2279	443	160	93	--	95		31	
크레아티닌, mg/dL			4.3	3.6	2.5	1.8	1.5	1.1	0.8	0.8	--	0.6		0.8	
혈액 우레아 질소, mg/dL			48	47	49	52	44	30	27	21	--	17		12	
AST, U/L			86	34	--	27	31	33	41	47	--	32		18	
ALT, U/L			72	47	--	31	29	28	36	47	--	46		25	

도면15b

주요 심초음파 소견													
주요 임상 소견	LV 박출률, %	43.3	43.8	48.1	49.2	--	61.8	--	--	--	61.1		65.6
	LV 수축기말 용적, mL	64.7	61.8	59.7	58.8	--	40.1	--	--	--	39.2		36.8
	LV 확장기말 용적, mL	114	110	115	116	--	105	--	--	--	103		107
주요 임상 소견	저혈압; 에피/노르에피네프린 고혈압; 니카르디핀 적은 심박출량:밀리논 호흡 곤란:삼관												
	고혈압; 리시노프렐 임상적으로 좋은												
	고혈압; 리시노프렐 임상적으로 좋은												

도면16

