



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년03월19일

(11) 등록번호 10-1504110

(24) 등록일자 2015년03월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 35/30 (2015.01) C12N 5/07 (2010.01)

A61P 25/16 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-7007866

(22) 출원일자(국제) 2008년09월04일

심사청구일자 2012년09월26일

(85) 번역문제출일자 2010년04월12일

(65) 공개번호 10-2010-0094450

(43) 공개일자 2010년08월26일

(86) 국제출원번호 PCT/US2008/075223

(87) 국제공개번호 WO 2009/035901

국제공개일자 2009년03월19일

(30) 우선권주장

12/109,066 2008년04월24일 미국(US)

60/971,284 2007년09월11일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

US20020169102 A1

EP1438942 A1

US20050118561 A1

(73) 특허권자

프레이 2세, 윌리엄 에이치.

미국, 미네소타 55127, 화이트 비어 레이크, 아파트 216, 센터빌 로드 4800

다니엘안, 루지네

독일, 튀빙엔 72076, 뷔스도른베그 14/67

글라이터, 크리스토프

독일 튀빙엔 암 운터렌 헤를레스베르크 5 (

우:72074)

(72) 발명자

프레이 2세, 윌리엄 에이치.

미국, 미네소타 55127, 화이트 비어 레이크, 아파트 216, 센터빌 로드 4800

다니엘안, 루지네

독일, 튀빙엔 72076, 뷔스도른베그 14/67

글라이터, 크리스토프

독일 튀빙엔 암 운터렌 헤를레스베르크 5 (

우:72074)

(74) 대리인

남호현

전체 청구항 수 : 총 7 항

심사관 : 윤소라

(54) 발명의 명칭 동물 중추신경계에 치료세포를 투여하는 방법, 약학 조성물 및 제조 물품

(57) 요약

본 발명은 CNS 세포의 손실 또는 사멸을 경험하는 손상 및/또는 퇴화 CNS 를 예방 및 치료하는 방법 및 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 다양한 구현예는 치료학적 유효량의, 그 중에서도 하나 이상의 치료세포를, 비강의 상부 제3부에 비내(internasal) 적용하고 이에 의하여 뇌-혈관 장벽을 통과함으로써 CNS 에 전달한다. 본 발명에 의한 약학 조성물은 하나 이상의 치료세포, 하나 이상의 전달강화제, 하나 이상의 항생제, 하나 이상의 조절제 및/또는 하나 이상의 면역억제제를 포함할 수 있으며, 여기서 상기 조성물은 비강의 상부 제3부로 전달된다. 일단 CNS 에 전달된 상기 치료세포는 상해 또는 퇴화중의 영역을 선호적으로 이동한다.

특허청구의 범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

하나 이상의 증배엽 줄기세포; 및

상기 하나 이상의 증배엽 줄기세포가 뇌-혈관 장벽을 통과하는데 도움을 주는 히알루론산분해효소를 포함하는 약학 조성물이되,

상기 약학 조성물은 포유동물의 비강의 상부 제3부로 투여되고,

상기 히알루론산분해효소의 효과적인 용량 범위는 체중당 0.0001 - 1.0 mg/kg 인 것을 특징으로 하는 세포의 손실 및/또는 사멸로 인한 신경변성(neurodegeneration) 치료용 비내(intranasally) 전달 약학 조성물.

청구항 25

삭제

청구항 26

제 24 항에 있어서, 상기 조성물은 뉴레귤린을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 27

제 24 항에 있어서, 상기 조성물이 하나 이상의 항생제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 28

제 27 항에 있어서, 상기 조성물이 하나 이상의 면역억제제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 29

제 24 항에 있어서, 상기 조성물은 사이클로스포린, 인터루킨, 종양 괴사인자, CAP23, GAP43 및 골원성 단백질(OP-1)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 조절제의 유효량을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 30

제 28 항에 있어서, 상기 조성물은 사이클로스포린, 인터루킨, 종양 괴사인자, CAP23, GAP43 및 골원성 단백질(OP-1)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 조절제의 유효량을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 31

제 24 항에 있어서, 상기 조성물은 손상되거나 손실된 신경세포의 대체 및 재수초형성(remyelination)을 포함하는 줄기세포를 사용한 CNS의 일반적인 회복(repair), 자연 노화로부터 초래되는 세포 손실 또는 손상에 의한 신경변성, 일반적인 뇌졸중, 대뇌 허혈성 뇌졸중, 뇌내 출혈, 파킨슨병, 헌팅턴병, 알츠하이머병, 다발경화증, 척수 기능장애, 가벼운 외상성 뇌손상, 심각한 외상성 뇌손상, 뇌염, 근육위축가쪽경화증(ALS), 발작, 우울증 및 스트레스를 치료하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

명세서

기술분야

[0001] **관련 출원의 상호참조**

[0002] 본 출원은 2007년 9월 11일에 출원된 "중추신경계에 대한 치료세포의 비내(intranasal) 전달"을 발명의 명칭으로 하는 번호 제60/971,284호 가출원의 이익을 주장하며, 그 전체 내용은 본원에 참조문헌으로 편입된다.

[0003] **발명의 배경**

[0004] **발명의 분야**

[0005] 본 발명은 포유동물의 비강의 상부 제3부에 치료세포를 투여하며, 이에 의하여 치료세포가 뇌-혈관 장벽을 통과하고, 포유동물의 손상 및/또는 퇴화 및/또는 상해된 중추신경계를 예방 및/또는 치료하는 방법 및 그 약학 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0006] **관련 기술의 기재**

[0007] 다수의 신경학적 상태들은 노화, 질병 또는 상해를 통한 중추신경계 특정 세포군의 손상 내지 또는 손실, 즉 괴사로부터 비롯된다. 이러한 상태에서 손상 또는 파괴된 세포들은 내재적으로 대체되지 않으며, 따라서 중추신경계가 그 결과 발생하는 기능의 손실과 함께 손상 및/또는 퇴화하게 된다. 최근의 증거는 신경 대체 및 부분적 신경 회로의 복구가 세포 이식 치료를 통하여 가능하다는 것을 보여준다. 상기 분야의 초기 작업의 상당부분이 태아 세포 치료법을 사용하였다. 그러나, 더욱 최근에는, 발달 중 및 심지어는 성인 포유동물 신경계도, 다수의 상기 신경 상태에 대한 보다 효과적인 신경 재생 전략의 고안에 유리한 성형 특성을 나타내는 미분화 다능성 신경 줄기 세포 집단을 함유하고 있다는 것이 명확해졌다.

[0008] 손상 및/또는 퇴화된 CNS, 즉 세포사를 야기하는 신경 상태, 질병 및/또는 상해는 알츠하이머병, 경도 인지장애, 연령관련 기억 장애, 파킨슨병, 뇌졸중을 포함하는 뇌혈관 질병, 크로이츠펠트-야콥병(Creutzfeldt-Jakob disease), 가족 근위축 측삭 경화증, 루이소체(Lewy-body) 치매, 죽상동맥경화증, 정신분열증, 자폐증, 지연성 운동장애, 다발경화증, 발작장애, 윌슨병, 진행성 핵상마비, 할러보든-스파츠 증후군(Hallervorden-Spatz syndrome), 다발성 위축증, 헌팅턴병, 가족 기저핵 퇴화, 다운 증후군, 백내장, 혈액색소증, 지중해빈혈, 뇌출혈, 지주막하 출혈, 두부 손상 및 척수 손상을 포함한다. 더구나, 특정 의학적 방법, 예컨대 심장동맥우회술(CABG surgery)은 중추신경계의 손상 및/또는 퇴화 및 동반 세포사를 유발하는 신경학적 합병증과 연관되어 있다. CABG의 경우, 매년 전세계적으로 800,000명 이상의 환자에 대하여 수술이 행하여진다. 수행되는 다수의 CABG 절차는 신경학적 합병증과 연관되어 있다. 이러한 합병증은 환자 중 16% 미만에서의 뇌졸중에서부터, 향후 5년에 걸쳐 일부 환자에서 발생하는 진행성 저하와 함께 수술후 장애를 갖는 환자 중 50%에서의 일련 인지저하에 이른다. 또한, 물리적 및 행동 장애가 일부 CABG 환자에서 나타난다. Newman M F et al., N. Eng. J. Med. 344:395-402 (2001); [Brillman J., Neurol. Clin. 11:475-495 (1993); 및 Selnes, O. A., Ann. Thorac. Surg. 67:1669-1676 (1999) 가 유익하다.

[0009] 신경 줄기세포는 세포 대체 치료법에 있어서 손상 및/또는 퇴화 CNS의 손실 및 사멸중인 세포 및 손실된 신경

회로를 대체하는 것으로 밝혀져 있다. 예를 들어, 뇌 줄기에서 도파민성 세포를 선택적으로 파괴하는 약물인 MPTP 를 이용한 마우스 치료는 공여 및 숙주 세포 모두로 구성되는 복구된 도파민성 세포 집단을 만들어낸다.

저산소증-허혈성 뇌 손상 모델을 이용한 마우스에서의 유사한 연구가, 신경 줄기세포의 이식이 손상된 시스템의 회복을 강화시키는 것임을 보여준다(Park et al. (1999) J. Neurotrauma 16:675-687 및 Park et al. (1997) Soc. Neurosci. Abst. 23:346). 뇌졸중을 갖고 있는 환자에서, 인간 신경 세포주 유래의 세포의 이식은 신경학적 기능의 개선을 나타낸다(Kondziolka D., et al., (2000) "Transplantation of cultured human neuronal cells for patients with stroke". Neurology. 55:565-9). 알츠하이머병의 마우스 모델에서, 전전두엽(prefrontal) 및 두정엽(parietal) 피질의 신경 줄기세포의 이식은 콜린성 결핍 및 AD 와 연관된 최근 기억과파괴(recent memory disruption)를 극적으로 경감시킨다(Wang, Q., et al., (2006) "Neural stem cells transplantation in cortex in a mouse model of Alzheimer's disease". J Med Invest., 53:61-9).

[0010] 또한, 파킨슨병에서 포유동물 중추신경계에서 퇴화중인 뉴런(neuron)은 흑색질의 도파민성 뉴런을 포함한다. 진행된 파킨슨병 환자에 대한 현재의 세포 이식 전략은 6 내지 9 주령 인간 배아로부터의 흑색질 도파민성 뉴런의 선조체내 이식편을 포함한다. 임상적 발전은 이식 후 최초 6 - 24 월에 걸쳐 점차적으로 발달하였다(Olanow et al. (1996) Trends Neurosci. 19:102-109 및 Lindvall et al. (1999) Mov. Disord. 14:201-205). 예컨대, 조혈, 배아와 같은 상이한 기원의 줄기세포 이식은 심각한 파킨슨병을 갖고 있는 환자에서 몇몇 임상적 이점을 나타내는 것으로 밝혀졌다(Freed, CR, et al. (Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. N Engl J Med 2001; 344:710-719).

[0011] 진행성 다발 경화증 환자에 대한 유사한 이점이 알려졌다(Ni XS, et al., (2006) "Autologous hematopoietic stem cell transplantation for progressive multiple sclerosis: report of efficacy and safety at three yr of follow up in 21 patients" Clin Transplant. 20:485-9)(MS 치료법이 면역제어와 세포 기제 치료와 같은 신경보호 조절을 결합시켜 최대의 임상적 이점을 얻어야 함을 추가적으로 암시하고 있음).

[0012] 또한, 인간 태아에서 성인으로의 선조체 이식에 대한 첫번째 연구는 중등도의 헌팅턴병을 갖고 있는 세명의 비치매 환자에 대해 수행되었다. 1년에서의 자기 공명 영상 평가는 주위 조직의 전위(displacement)없는 이식편 생존 및 성장을 기록하였다. 인지 기능의 몇몇 측정에 대하여 모든 환자들이 개선을 나타냈다(Kopyov et al. (1998) J. Exp. Neurol. 149:97-108). 또한, Date et al. (1997) J. Exp. Neurol. 147:10-17 을 참조한다.

[0013] 치료학적 세포 기제 치료법에 대한 각각의 공지된 모델 및 방법은, 중추신경계의 손상된 부위를 타겟으로 하지 않는 침습성 이식 기술 및/또는 전신성 전달 방법을 이용한 신경 줄기세포의 외과적 시술, 즉 이식을 요구한다. 신경 줄기세포를 포함하지만 이에 제한되지 않는 치료세포를 비침습성이며 고도로 타겟화된 방법으로 제공할 수 있는 방법, 약학 조성물 및/또는 제조물품 또는 키트를 제공하는 것은 매우 유익할 것이다.

[0014] 예를 들어, 상기 치료세포를 퇴화중인 중추신경계에 전신 노출을 회피하기 위하여 상기와 같은 방법으로 전달하는 것은 매우 유익하다. 현재 상기와 같은 이점을 제공하는 어떠한 방법 또는 약학 조성물도 공지되어 있지 않다. 본 발명은 치료세포를 비강의 상부 제3부에 적용하며, 이에 의하여 뇌-혈관 장벽을 통과하고, 중추신경계에 치료세포 및 기타 화합물을 직접 투여함으로써 상기와 같은 이점을 제공한다.

[0015] 본 발명의 특정 구현에는, 신경 경로를 따른 비내(intranasal) 박테리아의 이동을 방지하고, 치료세포 및/또는 약학적 화합물을 적용함으로써 대상 환자를 보호하는데 도움이 되는 비내 및/또는 점막 항생제를 포함한다. 상기 항생제는 국소적으로 적용되는 것으로 잘 알려져 있으나, 어느 것도 치료세포 및/또는 약학적 화합물의 비내 적용과 함께 사전치료, 공동치료 및/또는 사후치료로서, 전신적 및/또는 비내로 투여되지 않는다.

[0016] 예를 들면, 한 연구에서, 코 내부에 도포된 뮤피로신이 감염율을 절반 또는 그 이상으로 차단하는데, 스타필로코쿠스 아우레우스(Staphylococcus aureus)는 유해를 야기하지 않으면서 전체 입원 환자의 대략 25 내지 30% 의 외비공(nostril) 내에 통상적으로 존재하는 널리 분포된 세균이다. 그러나, 이 박테리아는 면역 시스템이 약화된 사람에게서 심각 및 종종 치명적인 감염을 일으키면서 수술 부위를 오염시킬 수 있다.

[0017] 또 다른 연구는 건강 식품 가게에서 시판중인 OTC(over the counter) 치료제인 비내 자일리톨이 비내 박테리아 및 비내 점막 내에서 접착 및 세포를 감염시키는 능력을 감소시킬 수 있다는 것을 밝혀냈다. 여전히 다른 연구들이 인간 점막에서 발견되는 천연 항생물질인 디펜신(defensin)이 박테리아 감염으로부터 보호하고 면역 보호 기능을 강화시킬 수 있음을 밝혀냈다. 포유동물 디펜신은 선천 면역의 중요한 항생물질 유사 효과기로 고려되는 숙주에 의하여 인코딩된 작고, 양이온성이며, 항균성의 펩티드이다. 수상돌기 세포 및 T 세포 상의 케모카인(chemokine) 수용체를 사용함으로써, 디펜신은 미생물의 침입에 대하여 숙주 적응성 면역의 조절에 또한

기여할 수 있다. 디펜신은 상당한 면역학적 보조 활성을 가지며, 베타-디펜신 또는 선택된 케모카인과 개별특이형 림프종(idiotypic lymphoma) 항원과의 연결은 강력한 항암 백신을 생산해 왔다. 디펜신과 케모카인 사이의 기능적인 중복은 일부 케모카인이 항미생물 활성을 갖는다는 보고에 의하여 강화되었다. 비록 활성 및 3차 구조의 유사성을 나타내기는 하지만, 디펜신과 케모카인의 진화적인 관계는 결정되어야 하는 것으로 남는다(De Yang, et al., Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. Trends Immunol. 2002 Jun ;23 (6):291-612072367).

[0018] 더욱이, 에리스로포이에틴(EPO), 뇌 유도 신경영양성 인자(BDNF), 신경 성장 인자(NGF), 섬유모세포 성장 인자(FGF) 및 표피 성장 인자(EGF)와 같은 영양 및 성장 인자가 줄기세포의 in-vitro 및 in-vivo 에서의 생존 및 분화에 결정적인 역할을 한다는 것이 잘 알려져 있다(Erickson et al., Roles of insulin and transferring in neural progenitor survival and proliferation. J Neurosci Res. 2008 Feb 21; Bossolasco et al., Neuroglial differentiation of human bone marrow stem cells in vitro. Exp Neurol. 2005 Jun; 1993(2):312-25). EPO 의 동시 적용의 경우에서 외과적으로 이식된 세포의 보다 나은 생존이 나타난다(Kanaan et al., Exogenous erythropoietin provides neuroprotection of grafted dopamine neurons in a rodent model of Parkinson's disease. Brain Res. 2006 Jan 12;1068(1):221-9). 그러나, 치료세포 및/또는 그 약학 조성물의 비내 적용과 함께 그러한 조절 인자 또는 약제를 비강의 상부 제3부에 도입하고, 이로써 뇌-혈관 장벽을 통과하는 것은 공지되어 있지 않다.

[0019] 또한, 인슐린 유사 성장 인자-I (IGF-I), 신경 성장 인자(NGF), 및 염기성 섬유모세포 성장인자(bFGF)를 포함하는 다양한 성장인자를 포함하는 조절제가 말초 및 중추신경계의 발달 동안에 신경 세포의 생존 및 분화를 조절한다는 것이 밝혀졌다. 신경영양물질(neurotrophin)과 같은 조절제는 발달 동안의 신경 성장을 위하여도 또한 요구된다(Tucker et al. (2001) Nature Neurosci. 4:29-37). 성숙한 신경계에서, 이러한 영양 인자들은 신경 세포의 형태학적 및 신경화학적 특징을 유지시키며, 기능적으로 활성인 시냅스 연결을 강화한다. 상기 조절 인자는 본 발명에 따른 세포-대체 치료의 방법을 강화하는데 있어서의 용도를 발견한다.

[0020] 예를 들면, bFGF 는 in vitro 에서의 뉴런의 생존 및 성장을 강화시킨다. 또한, bFGF 는 삽입된 뉴런이 유전적으로 가공되어 bFGF 를 발현시킬 때 삽입된 뉴런에 대하여 in vivo 에서 강력한 성장 촉진 효과를 나타낸다(Takayama et al. (1995) Nat. Med. 1:53-8). 또한, 표피 성장 인자 및 bFGF 를 분비하는 중합체 기재 생활성 막대의 이식된 태아 복측 중뇌 조직으로의 삽입은 개선된 기능성 특징 및 강화된 세포 생존을 나타낸다(Tornqvist et al. (2000) Exp. Neurol. 164:130-138).

[0021] 신경 성장 인자(NGF)는 또한 중추신경계에 이식된 조직에 영향을 끼치는 것으로 밝혀졌다. 예를 들어, 콜린성 세포 활성을 지시하는 분석인 ChAT 활성은, 이식된 세포에 인접하는 NGF-방출 펠렛을 함유하는 뇌 조직으로 이식된 콜린성 뉴런에서 중요하게 평가된다(Mahoney et al. (1999) Med. Sci. 96:4536-4539). IGF-I 는 또한 유사분열후 포유동물 CNS 신경 줄기세포의 분화를 촉진하고 인간 적혈구 전구세포의 세포사멸(apoptosis)에 영향을 끼치는 것으로 밝혀졌다. 예를 들어, Arsenijevic et al. (1998) J. Neurosci. 18:2118-2128; Tanigachi et al. (1997) Blood 90:2244-2252; Reboarcet et al. (1996) J. Biol. Reprod. 55:1119-1125; Muta et al. (1994) J. Clin. Invest. 94:34-43; 및 Muta et al. (1993) J. Cell. Phys. 156:264-271 을 참조한다. 또한, GAP-43 및 CAP-23 과 같은 단백질과 연관된 특정 성장이 손상된 액손(axon)의 재생을 촉진하는 작용을 하며, 척수 및 CNS 에서 재생을 지원할 수 있다는 것이 밝혀졌다. 예를 들어, Bomze et al. (2001) Nature Neurosci. 4:38-43 및 Woolf et al. (2001) Nature Neurosci. 4:7-9 를 참조한다.

[0022] 그러나, 신경 재생, 즉 치료세포 기재 전략을 경험한 포유동물의 임상적 결과를 개선하기 위한 수단으로서의 조절제의 투여는 어려움을 맞이하게 되었다. 일반적으로, 이러한 약제들은 전신적으로 투여될 수가 없다. 더욱이, 다수의 이러한 조절제는 뇌-혈관 장벽을 효율적으로 통과하지 못한다. 뇌실내 투여는 조절제를 전달하는 가능한 효율적인 방법이지만 임상적 설정에서는 바람직하지 않은 침습적인 기술이다. 조절제를 함유하는 중합체의 삽입 또한 침습적이며, 조절제가 효과를 유발할 수 있는 중합체 삽입물 주위의 상대적으로 작은 반경에 의하여 추가적으로 제한된다. 또한, 조절제를 발현시키기 위한 이식된 세포의 유전적 가공 동안에, 삽입에 이은 세포의 안정적인 이입(transfection) 및 생존이 문제점으로 남는다.

[0023] 본 발명은 그 중에서도 이러한 문제점에 대한 해결책을 제공한다.

발명의 내용

[0024] **발명의 요약**

[0025] 상기 기재된 상황을 고려하여 볼 때, 손상 및/또는 퇴화중인 중추신경계에 대한 치료세포 및/또는 약학 조성물의 효율적이고 비침습적인 전달의 방법에 대한 필요성이 존재한다.

[0026] 그 중에서도, 본 발명은 CNS 세포의 손실 또는 사멸을 야기하는 질병 또는 기타 상태에 의하여 손상 및/또는 퇴화중인 중추신경계의 예방 및/또는 치료에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 치료학적 유효량의 하나 이상의 치료세포를 비강의 상부 제3부에 대한 비내 적용에 의하여 CNS 에 전달하고, 이에 의하여 뇌-혈관 장벽을 통과하며, 원치 않는 침습적인 전달 방법 뿐만 아니라 전신성 노출을 회피하는 방법, 약학 조성물 및 제조 물품에 관한 것이다.

[0027] 본 발명의 다양한 구현에는 비내 예방, 사전치료, 사후치료 및/또는 치료세포의 CNS 에 대한 전달을 강화하기 위한 치료학적 유효량의 전달 강화제의 치료세포를 포함하는 약학 조성물의 성분을 포함한다. 또 다른 구현예들은, 치료세포 치료과정 동안에 환자를 보호하는 사전치료, 공동치료(동시 또는 치료세포를 포함하는 치료 조성물의 구성성분으로서 투여), 및/또는 사후치료 장치로서 비내 및/또는 전신적으로 적용되는 하나 이상의 항생제를 포함한다. 또 다른 구현예들은, 치료세포 치료과정 동안에 *in vivo* 에서 치료세포의 생활성을 강화하기 위한 사전치료, 공동치료(동시 또는 치료세포를 포함하는 치료 조성물의 구성성분으로서 투여), 및/또는 사후치료 장치로서 비내 및/또는 전신적으로 적용되는 하나 이상의 면역억제제를 포함한다. 본 발명은 포유동물의 CNS 로 직접 전달되는 치료세포의 뇌-혈관 장벽의 통과를 포함하는 신경 재생 전략을 경험한 포유동물의 임상적 결과를 개선하는 용도를 발견한다.

[0028] 본 발명의 다양한 구현에는 신경학적 손상 및 퇴화, 즉 CNS 내에서의 세포 손실 및 사멸 및 알츠하이머병, 경도 인지장애, 연령관련 기억 장애, 파킨슨병, 뇌졸중을 포함하는 뇌혈관 질병, 크로이츠펠트-야콥병, 가족 근위축 측삭 경화증, 루이소체 치매, 죽상동맥경화증, 정신분열증, 자폐증, 지연성 운동장애, 다발경화증, 발작장애, 윌슨병, 진행성 핵상마비, 할리보든-스파츠 증후군, 다발성 위축증, 헌팅턴병, 가족 기저핵 퇴화, 다운 증후군, 백내장, 혈색소증, 지중해빈혈, 뇌출혈, 지주막하 출혈, 두부 손상, 척수 손상 및 CNS 에 영향을 끼치는 대사 장애와 같은 특정 의학적 상태의 위험이 있거나 진단받은 환자에 있어서의 허혈 및/또는 신경퇴화에 의한 기억 손실의 치료 및 기억 손실의 개선을 포함하지만 이에 제한되지 않는 이로 인한 효과들을 예방 및 치료하는 방법 및 약학 조성물에 관한 것이다.

[0029] **발명의 상세한 설명**

[0030] **정의**

[0031] 본원에서 사용되는, "중추신경계(CNS)"는 뇌 및 척수 및 관련 조직들을 지칭한다.

[0032] 본원에서 사용되는, "CNS 의 신경학적 장애 및 질병"은, 허혈, 즉 뇌혈관 허혈, 허혈, 뇌졸중, 신경퇴화, 알츠하이머병, 파킨슨병, 윌슨병, 루이소체 치매, 다발경화증, 발작 장애, 소뇌성 운동실조, 진행성 핵상마비, 근위축 측삭 경화증, 자폐증, 정동장애, 불안장애, CNS 에 영향을 끼치는 대사장애, 및/또는 정신분열증; 세포 손상; 뇌 및 척수에서의 뇌졸중과 같은 뇌혈관 장애, 수막염 및 HIV 를 포함하는 CNS 감염, 뇌 및 척수의 종양, 프리온 병(prion disease) 및 통상적인 노화(예컨대, 후각상실)로부터 기인하는 CNS 장애와 같은 것으로부터 유래하는 신경학적 합병증, 두부 및/또는 뇌 손상, 또는 척수 손상을 포함하는 뇌 질병 및 상태 및 본원에서 신경학적 세포 손실, 손상 및/또는 퇴화와 함께 언급되는 기타 다른 의학적 질병 및 상태를 지칭한다.

[0033] 세포 및/또는 약제의 "유효량"은 임의의 상기의 장애 또는 질병의 증상 및/또는 내재 원인을 예방, 치료, 감소 및/또는 개선하는데 충분한 양을 지칭한다. 몇몇의 예에서, "유효량"은 그러한 질병의 증상을 제거하고, 아마도, 질병 그 자체를 극복하는데 충분하다. 바람직하게는, 만성 또는 단일 적용에 있어서의 $50 - 10^8$ 세포의 용량 범위에서 유효량의 본 세포 및/또는 $0.001 - 2.0 \text{ mg/kg}$ 의 용량 범위에서 유효량의 약제는, ml 조직 당 $10 - 10^5$ 세포 및 약 10^{-13} 몰 내지 약 10^{-5} 몰의 범위에서 약제의 조직 농도를 나타내지만, 상기 농도는 독성이 회피된다면 더 커질 수 있다.

[0034] 본 발명의 문맥에서, 용어 "치료(treat)" 및 "치료법(therapy)" 및 이와 유사한 것은 CNS 에서 세포 사멸을 갖거나 일으키고 있는 존재하는 질병 또는 상태의 완화, 진행의 지연, 예방(prophylaxis), 약화(attenuation) 또는 치료(cure)를 지칭한다. 본원에서 사용되는 "예방(prevent)"은 상기 질병 또는 장애의 발병(onset)의 연기, 지연, 저속화, 저해 또는 그 외에 정지, 감소 또는 완화를 지칭한다. 질병에 대한 효과적인 수준의 활성을 제공하기 위하여 충분히 다량의 세포 및/또는 약제가 비독성 수준에서 적용되는 것이 바람직하다. 본 발명의 방법은 포유동물 또는 새(조류)와 같은 임의의 동물에서, 더욱 바람직하게는 포유동물에서 사용될 수

있다. 가금류는 바람직한 조류이다. 대표적인 포유동물은 래트, 마우스, 고양이, 개, 말, 소, 양, 돼지, 및 더욱 바람직하게는 인간을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0035] 본원에서 "치료세포"는, 예컨대(다만, 이에 제한되지는 않음), 대상자의 비강의 상부 제3부 및 세포 대체 치료법을 경험한 대상자의 손상 및/또는 퇴화 CNS 로 비내 적용을 통하여 이식되는 신경 줄기세포와 같은, 하나 이상의 세포 또는 세포 형태를 포함하는 것으로 정의된다. 치료세포가 본 발명에 따른 세포 대체 치료법으로 치료되는 신경학적 장애, 질병 및/또는 상태의 형태 및/또는 행동적 신경학적 증상을 예방 또는 완화하는데 충분한 한, 치료세포는 임의의 기원으로부터 유래될 수 있으며 발달 분화의 다양한 단계에 있을 수 있다. 더욱이, 치료세포는 숙주에 대하여 이종성(heterologous) 또는 동원성(autologous) 어느 것일 수도 있다. 이종성이라 함은 치료세포가 대상 환자 외의 포유동물로부터 유래된 것을 의미하며, 반면 동원성이라 함은 치료세포가 대상 환자로부터 유래하고, ex vivo 에서 조종되며, 본 발명의 방법에 의하여 대상 환자의 CNS 로 다시 이식되는 것을 말한다. 치료 림프구는 또한 본 발명을 사용하여 비강의 상부 제3부에 투여되어 중추신경계 및 림프계 모두를 타겟으로 할 수 있다. 림프구는 신체의 방어 부분으로서 기능하며 자연 살해 세포(NK cell), T 세포 및 B 세포를 포함한다. 상기 세포들은 뇌 종양 및 기타 CNS 및 림프관 장애의 치료에 유용하다. 치료세포에 대한 추가적인 논의는 하기에 행해지며, 그러한 각각의 측면은 "치료세포"의 정의에 포함된다.

[0036] 본원에서 사용되는 "조절제(regulatory agent)"는 본 발명의 이식된 공여자 세포 상에서 성장, 증식, 분화 또는 영양 효과를 갖는 임의의 분자를 지칭한다. 이식된 공여자 세포의 발달을 조절할 수 있는 임의의 조절제는 본 발명의 방법에 의하여 투여될 수 있다. 예를 들어, 본원에 참조문헌으로 편입되는 Mackay-Sim et al. (2000) Prog. Neurobiol. 62:527-559 를 참조한다. 조절제에 대한 추가적인 논의는 하기에 행해지며, 그러한 각각의 측면은 "조절제"의 정의에 포함된다.

[0037] 본 발명의 문맥에서, 용어 "치료(treat)" 및 "치료법(therapy)" 및 "치료학적(therapeutic)" 및 이와 유사한 것은 CNS 세포의 손실 또는 사멸을 수반하는 손상 또는 퇴화 CNS 의 완화, 진행의 지연, 예방(prophylaxis), 약화(attenuation) 또는 치료(cure)를 지칭한다. 상기 정의는 추가적으로 CNS 세포의 손실 또는 사멸을 수반하는 손상 또는 퇴화 CNS 의 연기, 지연, 저속화, 저해 또는 그 외에 정지, 감소 또는 완화를 포함한다. 본 발명의 방법은 포유동물 또는 새(조류)와 같은 임의의 동물에서, 더욱 바람직하게는 포유동물에서 사용될 수 있다. 가금류는 바람직한 조류이다. 대표적인 포유동물은 래트, 마우스, 고양이, 개, 말, 소, 양, 돼지, 및 더욱 바람직하게는 인간을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0038] 본원에서 사용되는, 용어 "분화(differentiate)" 및 "성숙(mature)"은 분화의 가능성을 가지고 있는 단계에서부터 특수 세포로 될 2 이상의 상이한 세포 계열(lineage)까지의 세포의 진행을 지칭한다. 이러한 용어는 본 발명의 용도를 위하여 교환적으로 사용될 수 있다. 용어 "계열(lineage)"은 최초 전구 세포에서부터 완전히 성숙한 세포(즉, 특수 세포)에 이르기까지 발달 세포 형태의 모든 단계를 지칭한다. 따라서, 본 발명의 이식된 치료세포는 다능성 세포 계열, 바람직하게는 신경 계열로부터 유래될 수 있으며, 분화의 임의의 단계일 수 있다. 따라서, 본 발명은 자연적으로 오직 하나의 형태의 계열로 분화하도록 프로그래밍된 치료세포를 포함한다. 이러한 형태의 세포는 몇몇 종류의 섬유모세포 또는 단순 분화된 성상아교세포(astroglia), 뉴런, 희소돌기아교세포(oligodendrocyte), 미세아교세포(microglia) 또는 내피세포를 포함할 수 있으며, 이들은 사망한 공여자의 조직으로부터 유래 또는 단순 분리될 수 있다.

[0039] 이러한 용어들의 추가적 측면은 하기에 논의되며, 그러한 각각의 측면은 이러한 용어들의 정의에 포함된다.

[0040] 본원에서 사용된, 용어 "다능성 줄기세포(multipotent stem cell)"는 다양한 계열로 분화할 수 있는 세포를 지칭한다. 다능성 치료세포, 예컨대 줄기 세포는 연속적인 세포 증식을 겪고, 자신의 정확한 복제물을 재생하며 (자가갱신), 많은 숫자의 국소적 세포 후손(regional cellular progeny)을 생성하며, 손상 또는 질병에 대한 반응으로 새로운 세포를 만들어내는 능력에 의하여 특징지워진다. "다능성 세포 집단"은 세포의 모든 계열 이하지만, 적어도 2 개의 세포 계열로 분화할 수 있는 세포의 구성을 지칭한다. 최근 연구는 비신경학적 부위로부터 유래한 다능성 줄기세포가 그 발달 기원에 대하여 계열 제한적이지 않지만, 적절한 환경 신호(cue)에 노출될 때 부위-특이적 뉴런을 생성할 수 있음을 밝혀냈다(Lamga et al. (2001) J. Neurosci. 20:8727-8735).

[0041] "신경 줄기세포"는 본원에서 신경계에 존재하는 미성숙 및 미결정(uncommitted) 다능성 세포인 다능성 세포로 정의된다(Ourednik et al. (1999) Clinical Genetics 55:267-278). 특이적 조건 하에서, 신경 줄기세포는 최종적으로 뉴런 및 아교세포(즉, 성상세포 (I형 및 II형) 및 희소돌기아교세포로 분화할 수 있는 자세포(daughter cell)를 생성할 수 있다. 이들은 발달중인 신경계 및 성인 신경계 모두에 존재한다. 신경 줄기세포의 특성에 대한 상세한 특징화는, 예컨대 McInnes et al. (1999) Clin. Genet. 56:267-278 에서 발견될 수

있다.

- [0042] "신경 전구세포"는 신경 줄기세포로부터 유래되며 분화의 특정 경로를 향하게 되는 미분화된 세포이며, 자기유지(self-maintenance)를 나타내지 않고, 적절한 조건 하에서 신경모세포(신경 생성 세포) 또는 섬유모세포(아교 생성 세포)로 분화하게 된다. 이식에 있어서 이러한 다능성 신경 세포 계열의 사용은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, Synder et al.(1992) Cell 68:33 을 참조하며, 여기서 다능성 신경세포주는 래트 소뇌에 이식되어 뉴런 및 아교 세포를 생성한다. 또한, 문헌 Campell et al. (1995) Neuron 15:1259-1273; Fishell et al. (1995) Development 121:803-812; 및, Olsson et al. (1995) Eur. J. Neurosci. 10:71-85 를 참조한다.
- [0043] "허혈(ischemia)" 또는 허혈성 반응 또는 상태는 본원에서 뇌 또는 뇌의 부분이 정상 신경 기능을 유지할 수 있는 충분한 혈류를 받지 못하여, CNS 세포의 손실 또는 사멸 및 수반되는 손상 및/또는 CNS 의 퇴화를 일으키는 허혈성 상태를 포함하는 것으로 정의된다. 다양한 상태 및/또는 질병이 허혈을 야기할 수 있으며, 이는 뇌졸중을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 본원에서 정의 및 논의되는 몇몇의 CNS 의 신경학적 장애 및 질병은 허혈의 일부 수준에 의하여 특징화된다. 본원에서 정의 및 논의되는 CNS 의 신경학적 장애 및 질병은 본 발명의 치료세포 대체 전략을 사용한 치료에 순응적이다.
- [0044] 치료세포 및/또는 치료세포를 포함하는 본 발명의 약학 조성물의 구성성분의 "유효량"은 임의의 언급된 장애 또는 질병의 증상, 신경 손상 및/또는 내재 원인을 예방, 치료, 감소 및/또는 개선하는데 충분한 양이다. 일부의 예에서, "유효량"은 그러한 질병의 증상을 제거하고, 질병 자체를 극복하는데 충분하다. 오직 예시적인 의도로서, 일반적으로 본원에 개시된 치료제에 관한 용량 범위, 부피 및 투여 빈도를 포함하는 대표적인 치료 요법이 하기에 제공된다:
- [0045] 전달 강화제, 조절제, 면역억제제 및/또는 항생제에 있어서의 효과적인 용량 범위는 0.0001 - 1.0 mg/kg 를 포함한다.
- [0046] 더욱 바람직한 용량 범위는 0.005 - 1.0 mg/kg 이다.
- [0047] 가장 바람직한 용량 범위는 0.05 - 1.0 mg/kg 이다.
- [0048] 치료세포의 "유효량", 즉 효과적인 용량 범위는 50 세포 - 10⁸ 세포이다.
- [0049] 더욱 바람직한 치료세포에 있어서의 용량 범위는 10³ 세포 - 10⁸ 세포이다.
- [0050] 가장 바람직한 치료세포에 있어서의 용량 범위는 10⁴ 세포 - 10⁸ 세포이다.
- [0051] 용량 부피(비내 분무 또는 적하에 적합) 범위는 0.015 ml - 1.0 ml 이다.
- [0052] 바람직한 용량 부피(비내 분무 또는 적하에 적합) 범위는 0.03 ml - 0.6 ml 이다.
- [0053] 단일 용량에 있어서 상기에 제공된 용량 범위를 사용하여 얻게되는 뇌 농도는 다음과 같다: ml 조직 당 10 - 10⁸ 세포 및 0.1 nM - 5 μM. 다중용량 치료 계획의 과정에 걸쳐서, 최대 뇌 농도는 ml 조직 당 10⁶ 세포 및 전달 강화제, 조절제, 면역억제제 및 항생제에 있어서 50 μM 이다.
- [0054] 따라서, 본 발명은 임의의 CNS 질병 또는 장애, 즉 CNS 세포의 손실 또는 사멸에 의하여 손상되었거나 퇴화를 겪고 있는 신경 조직을 재생하는데 사용되는 세포 기체 치료법을 개선하는 방법 및 약학 조성물을 제공한다. 본 발명의 범위 내의 CNS 장애는, 예컨대, 두부 손상, 척수 손상, 뇌졸중 및 허혈을 포함한다. 또한, 본 발명의 범위 내의 CNS 장애는 예컨대, 그러나 이에 제한되지는 않는, 뇌 질병 및 허혈, 즉, 뇌혈관 허혈, 허혈, 뇌졸중, 신경퇴화, 알츠하이머병, 파킨슨병, 윌슨병, 루이소체 치매, 다발경화증, 소뇌성 운동실조, 진행성 핵상 마비, 근위축 측삭 경화증, 정동장애, 불안장애(anxiety disorder), 자폐증 및/또는 정신분열증; 세포 손상; 뇌 및 척수에서의 뇌졸중과 같은 뇌혈관 장애, 수막염 및 HIV 를 포함하는 CNS 감염, 뇌 및 척수의 종양, 프리온 병 및 통상적인 노화(예컨대, 후각상실)로부터 기인하는 CNS 장애와 같은 것으로부터 유래하는 신경학적 합병증, 뇌 손상, 척수 손상 및/또는 CNS 에 영향을 주는 대사 장애로부터 유래하는 신경학적 합병증과 같은 신경퇴화 질병을 포함한다.
- [0055] 따라서, 본 발명의 구현예들은 신경 재생, 즉 대상 동물 비강의 상부 제3부를 통하여 비내 적용하고, 이에 의하여 뇌-혈관 장벽을 통과하여, 하나 이상의 치료세포를 허혈 및/또는 CNS 세포 손실 또는 사멸을 수반하는 CNS

의 신경학적 질병 또는 장애를 치료하기 위한 포유동물의 CNS 내로 투입하는 것을 포함하는 세포기재의 전략을 경험한 동물에서의 손상된 신경조직의 재생 또는 복구를 강화하는데 있어서의 유용성을 발견한다.

[0056] 공여자 세포의 숙주 CNS 로의 이식을 포함하는 신경 재생 전략은 당업계에서 공지되어 있다. 그러나, 치료세포를 이용하여 뇌-혈관 장벽을 통과하고, 이로써 비강의 상부 제3부에 비내 적용에 의하여 상기 세포를 숙주 검체의 손상 또는 퇴화 CNS 에 직접 이식하는 것은 공지되어 있지 않다. 치료세포는 하나 이상의 전달강화제에 의하여 이식에 있어서 도움이 될 수 있고, 하나 이상의 면역억제제에 의하여 생활성에 있어서 도움이 될 수 있고/있거나 하나 이상의 조절제에 의하여 발달적으로 조절될 수 있는 반면, 환자는 하나 이상의 항생제의 사용을 통하여 뇌-혈관 장벽을 통과하는 점막 박테리아로부터 보호될 수 있고, 이들 각각은 하기에 추가적으로 기재된 바와 같은 본 발명의 방법에 의하여 투여될 수 있으며, 치료 방법의 일부 구성성분은 전신적으로 및/또는 비내로 투여될 수 있다.

[0057] **뇌-혈관 장벽을 통과하는 이식 경로**

[0058] **후각 신경**

[0059] 본 발명의 다양한 방법은 본 발명의 치료세포 및/또는 약학조성물을 후각 신경에 의하여 신경자극되며 비강의 상부 제3부에 위치하는 조직에 투여하는 것을 포함한다. 본 발명의 치료세포 및/또는 약학 조성물은 비강의 상부 제3부에 적용을 통하여 후각 신경에 전달될 수 있다.

[0060] 후각 신경의 섬유는 비강 점막의 상부 1/3 에 위치하는 후각 수용체 세포의 무수 액손(unmyelinated axon)이다. 후각 수용체 세포는 비내로 투사되는 모발유사(hair-like)의 섬모(cilia)로 덮혀진 종창(swelling)을 가진 양극성 뉴런이다. 다른 말단부에서, 이러한 세포들로부터의 액손은 응집체로 모이게 되고, 코의 천정부에서 두개강(cranial cavity)으로 들어간다. 연질막(pia)의 얇은 튜브로 둘러싸여서, 후각 신경은 CSF 를 함유하는 지주막하 공간을 통과하며 후각 망울(bulb)의 하면으로 들어간다. 본 발명의 치료세포 및/또는 약학 조성물이 비강의 상부 제3부에 적용되고 나면, 본 발명의 치료세포 및/또는 약학 조성물은 비내 점막을 통과하여 후각 망울 및 후각핵, 전두 피질, 해마 형성체, 편도핵, 마이너트 기저핵(nucleus basalis of Meynert), 시상하부, 중뇌, 소뇌, 경부척수 등과 같은 CNS 의 기타 부위로 이동하게 된다.

[0061] **신경 전달**

[0062] 본 발명의 구현예는 본 발명의 치료세포 및/또는 약학 조성물을 포유동물 검체의 비강의 상부 제3부에 적용에 의하여 검체에 투여하는 것을 포함한다. 이러한 방법에 의한 본 발명의 치료세포 및/또는 약학 조성물의 적용은 치료세포 및/또는 약학 조성물을 전신적 손실 및 전신적 노출을 감소시키면서 신경 경로를 따라 CNS, 뇌 및/또는 척수에 전달되는 것을 가능케 한다. 신경 경로는 뉴런 내 또는 뉴런을 따른 전달, 뉴런을 이용한 림프관의 경로를 통한 또는 이에 의한 전달, 뉴런 또는 뉴런 경로를 이용한 혈관의 혈관주위(perivascular) 공간을 통한 또는 이에 의한 전달, 뉴런 또는 뉴런 경로를 이용한 혈관의 외막을 통한 또는 이에 의한 전달, 또는 혈관림프계를 통한 전달을 포함한다.

[0063] 본 발명은 순환계보다는 신경 경로에 의한 치료세포 및/또는 약학 조성물의 전달을 포함하며, 따라서 혈류로부터 뇌에 이르는 뇌-혈관 장벽을 통과하지 못하게 하거나, 오직 저조하게 통과하게 하는 조절제는 림프관, CNS, 뇌 및/또는 척수에 전달될 수 있다. 본 발명의 치료세포 및/또는 약학 조성물은, 일단 뇌-혈관 장벽을 통과하여 CNS 에 들어가면, 림프관 채널을 통하여, 혈관주위(perivascular) 공간을 통하여, 또는 뉴런을 통한 또는 뉴런을 따른 전달을 통하여 뇌 또는 척수의 다양한 부위로 전달될 수 있다. 하나의 구현예에서, 치료세포는 CNS 내의 손상 및/또는 퇴화 영역으로 이동한다.

[0064] 조절제를 뇌, 척수 또는 중추신경계의 다른 구성부분으로 전달하기 위한 신경 경로의 사용은 뇌-혈관 장벽에 의하여 제공되는 장애물을 제거하며, 따라서 통상적으로 그 장벽을 통과할 수 없는 약물, 본 발명의 치료세포 및/또는 약학 조성물이 CNS, 예컨대 뇌 및 척수로 직접 전달될 수 있다. 또한, 본 발명의 치료세포 및/또는 약학 조성물이 혈류에 존재하는 체액에서 희석되지 않으므로, 본 발명은 본 발명의 치료세포 및/또는 약학 조성물의 신경세포로의 보다 고농도 수준의 전달을 제공한다. 이와 같이, 본 발명은 본 발명의 치료세포 및/또는 약학 조성물의 뇌 및/또는 척수를 포함하는 CNS 로의 개선된 전달 방법을 제공한다.

[0065] **후각 신경 경로**

[0066] 본 발명의 방법의 하나의 구현예는 후각 신경 경로를 따라 조절제가 CNS, 예컨대 뇌, 및/또는 척수로 전달되는 방법에 의한 조절제의 검체로의 전달을 포함한다. 전형적으로, 이러한 방법은 조절제를 비내에 있으면서 후각

신경에 의하여 신경자극된 조직에 투여하는 것을 포함한다. 상기 기재된 바와 같이, 후각 신경 경로는 주로 비강의 상부 제3부의 후각 상피를 신경자극한다. 조절제의 후각 신경에 의하여 신경자극된 조직에의 적용은 조절제를 CNS, 뇌, 및/또는 척수의 손상된 뉴런 또는 세포에 전달할 수 있다. 후각 뉴런은 상기 조직을 신경자극하며 CNS, 뇌, 및/또는 척수로의 직접 연결을 제공하는데, 이는 후각에서의 그 역할에 기인한 것으로 믿어진다.

[0067] 후각 신경 경로를 통한 전달은 후각신경과 함께 다양한 뇌 영역으로, 그로부터 척수와 같은 CNS 의 부분과 연관되어 있는 경질 림프관으로 이동하는 림프관을 사용한다. 또한, 후각 신경을 통한 전달은 조절제를 후각 망울(bulb)로 전달할 수 있다. 뇌 혈관의 외막 내에서 이동하는 림프관 채널과 같은 혈관주위 경로 및/또는 혈관 림프 경로는 치료용 조절제를 후각 신경에 의하여 신경자극된 조직으로부터 뇌 및 척수로 전달하는 추가적인 메커니즘을 제공할 수 있다.

[0068] 치료세포 및/또는 이의 약학 조성물은 예컨대 비강의 상부 제3부에 위치하는 후각 상피를 통하여 후각 신경에 투여될 수 있다. 이러한 투여는 조절제가 후각 신경을 통하여 뇌 및 그 수막으로, 뇌간으로, 또는 척수로 들어가는 세포의 또는 세포내(예컨대, 신경통과성) 전진성(anterograde) 및 역행성(retrograde) 전달을 사용할 수 있다. 치료세포 및/또는 그 약학 조성물이 후각 신경에 의하여 신경자극된 조직 내 또는 상에서 일단 분포되면, 치료세포 및/또는 그 약학 조성물 및/또는 그 구성성분은 조직을 통하여 전달되고, 뇌간, 소뇌, 척수, 뇌척수액, 후각 망울, 및 피질 및 피질하 구조를 포함하는 CNS 의 영역으로 후각 뉴런을 따라 이동할 수 있다.

[0069] 본 발명에서 뇌-혈관 장벽은 치료세포 및/또는 치료세포를 포함하는 약학 조성물의 적용에 의하여 비강의 상부 제3부로 전달된다. 본 발명의 치료세포 및/또는 약학 조성물은 후각 신경 경로를 따라 체판(cribriform plate)의 구멍(foramina)을 통하여 비내 점막으로부터 CNS 로 이동한다. 하기에 제공되는 가설적인 방법으로 뇌-혈관 장벽을 통과하는 실험적 증거의 실시예 1 을 참조한다.

[0070] 따라서, 신경 경로를 사용한 비내로의 투여는 진핵세포 및 줄기 세포를 포함하나, 이에 제한되지는 않는 치료세포, 및/또는 본 발명의 치료세포를 포함하는 약학 조성물을 림프관, 뇌간, 소뇌, 척수, 및 피질 및 피질하 구조에 전달할 수 있다. 본 발명의 치료세포 및/또는 약학 조성물은 단독으로 CNS, 즉, 뇌 및/또는 척수로의 이러한 운동을 촉진시킬 수 있다. 대안적으로, 담체 및/또는 전달강화제는 본 발명의 치료세포 및/또는 약학 조성물의 신경 경로로의 및 이에 따르는 전달에 도움을 줄 수 있다. 따라서, 본 발명의 치료세포 및/또는 약학 조성물의 비강 상부 제3부의 투여는 비내 점막 및/또는 상피로부터 CNS, 즉, 뇌 및 척수로의 전달 시스템을 통하여 뇌-혈관 장벽을 통과한다.

[0071] 본 발명의 다양한 구현예는 본 발명의 치료세포 및/또는 약학 조성물을 후각 신경에 의하여 신경자극된 조직으로 투여한다. 이러한 신경 시스템은 외부 환경과 뇌 사이에서의 직접 연결을 제공하며, 따라서 뇌, 뇌간, 및/또는 척수를 포함하는 CNS 에 조절제의 유리한 전달을 제공한다. 본 발명의 치료세포 및/또는 약학 조성물은 혈류로부터 뇌로의 뇌-혈관 장벽을 통과하지 못하거나, 비효율적으로 통과한다. 따라서, 본 발명의 방법은 순환계를 통하기 보다는 후각 신경의 방법에 의하여 치료세포 및/또는 약학 조성물의 전달을 가능케 한다. 이러한 투여의 방법은 전신적인 손실 또는 노출없이 본 발명의 치료세포 및/또는 약학 조성물의 CNS, 뇌, 또는 척수로의 효율적인 전달을 가능케 한다.

[0072] 면역억제제 및/또는 항생제가 본 발명의 다양한 구현예에 따라 전신적 또는 비강 상부 제3부 단독으로, 또는 치료세포를 포함하는 약학적 조합으로 전달될 수 있다.

[0073] **대체 경로**

[0074] 상기 논의된 후각 신경 경로에 대한 대체경로는 당업자에게 공지되어 있는 비강을 신경자극하는 다른 신경을 따른 경로, 예컨대, 3차신경 경로(trigeminal pathway)를 포함한다.

[0075] **치료 세포**

[0076] 본 발명의 치료세포는 골수를 포함하는 임의의 태아 또는 성인 포유동물 조직, 또는 헤마, 후각 상피, 후각 망울, 뇌실하 부위, 소뇌, 척수, 피질(즉, 운동 또는 체감각 피질), 선조체, 기저 전뇌(콜린성 뉴런), 복측 중뇌(흑색질의 세포), 및 청반(중추신경계의 아드레날린 신경 세포)으로부터의 조직을 포함하는 신경 조직으로부터 유래할 수 있다. 더욱이, 치료세포(들)은 신경 및/또는 다능성 줄기세포, 신경 전구세포, 유전적으로 가공된 세포, T-세포 및/또는 자가세포를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0077] 발달중 및 성인 동물 중추신경계는 치료세포로서 본 발명에서 특정 관심을 갖는 신경 줄기세포 및 전구물질 세

포의 집단을 포함한다. 상이한 발달 단계에서의 상이한 조직으로부터 유래한 다양한 신경 전구물질 세포를 분리 및 이식하는 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 예컨대, 선조체 피질 (Winkler et al. (1998) Mol. Cell. Neurosci. 11:99-116; Hammang et al. (1997) Exp. Neurol. 147:84-95); 피질 (Brustle et al. (1998) Nat. Biotechnol. 16:1040-1044 및 Sabate et al. (1995) Nat. Genet. 9:256-260); 인간 중뇌(telencephalon) (Flax et al (1998) Nature 392:18-24 및 Vescovi et al. (1999) Neuron 11:951-966); 해마 (Gage et al. (1995) J. Neurobiol. 36:249-266 및 Suhonen et al. (1996) Nature 383:624-627); 기저 전뇌 (Minger et al. (1996) Exp. Neurol. 141:12-24); 복측 중뇌 (Winkler et al. (1998) Mol. Cell. Neurosci. 11:99-116; Svendsen et al. (1996) Exp. Neurol. 137:376-388; Hammang et al. (1997) Exp. Neurol. 147:84-95; Studer et al. (1997) Nat. Neurosci. 1:290-295; Milward et al. (1997) J. Neurosci. Res. 50:862-971); 및 뇌실하 부위 (Milward et al. (1997) Milward et al. (1997) J. Neurosci. Res. 50:862-871)를 포함한다.

[0078] 본 발명의 치료세포는 또한 신경주위(paraneural) 기원일 수 있다. 이러한 세포의 바람직한 예는 부신 수질 크롬친화 세포이다. 예를 들어, 크롬친화 세포의 파킨슨병 치료에 대한 유용성을 보여주는 Bjorklund et al. (1985) Neural Grafting in the Mammalian CNS (Amsterdam: Elsevier), pp. 3-11, 및 Lindvall et al (1997) Ann. Neurol. 22: 457-468 을 참조한다.

[0079] 신경 기원이 아니지만, 신경학적 관심 물질을 생산하도록 변화되는 본 발명의 치료세포 역시 본 발명의 범위 내이다. 바람직한 세포 형태는 용이하게 수득 및 배양될 수 있는 인간 포피(foreskin) 섬유모세포이다(예컨대, 미국 특허 제 6,060,048 호 참조). 이러한 세포는 바람직하게는 당업계에 공지된 방법을 사용하여 유전적으로 변경되어, 신경성장인자, 신경전달물질, 신경펩티드, 또는 뇌 대사에 관여하는 효소를 발현시킨다. 예컨대, 본원에 참조문헌으로 편입되는 Gage et al. (1987) Neurosci. 23: 795-807; Rosenberg et al. (1988) Science 242: 1575-1578; Shimohama et al. (1989) Mol. Brain Res. 5:271-278 을 참조한다. 대안적으로, 표피 세포와 같이 비신경 기원으로부터 유래하는 치료세포는 신경 세포의 상이한 형태로 전환 또는 교차분화될 수 있다. 예컨대, 미국 특허 제 6,087,168 호를 참조한다.

[0080] 본 발명의 치료세포는 숙주에의 이식 전에 유전적으로 변경될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "유전적으로 변경"은 이종(foreign) 핵산, 예컨대 DNA 가 도입된 세포를 지칭한다. 이종 핵산은 인산칼슘-매개 이입, DEAE-매개 이입, 미세주사(microinjection), 바이러스 형질전환, 원형질체 융합 및 리포펙션(lipofection)을 포함하나 이에 제한되지는 않는 다양한 기술에 의하여 도입된다. 유전적으로 변경된 세포는 일과성 또는 장기성 방법 중 어느 하나에서 이종 핵산을 발현시킬 수 있다. 일반적으로 일과성 발현은 이종 DNA 가 이입된 세포의 염색체 DNA 로 안정적으로 통합되지 않을 때 발생한다. 이와 대조적으로, 이종 DNA 의 장기성 발현은 이종 DNA 가 이입된 세포의 염색체 DNA 로 안정적으로 통합될 때 발생한다.

[0081] 이러한 관심 유전자들은 신경전달물질 합성 효소(즉, 티로신 가수분해효소(TH) 및 콜린아세틸전이효소를 포함한다. 이러한 방법은 통상적으로 당업계에 공지되어 있다. 예컨대, 뇌의 다양한 영역으로부터 및 발달의 다양한 단계에 있는 치료 공여자 세포는 유전적 변경을 통하여 분리 및 무한증식(immortalized)된다. 예컨대, 후각 및 소뇌 세포는 바이러스 myc(v-myc) 종양유전자(oncogene)를 사용하여 무한증식되어 신경 및 아교세포(glia) 표현형을 갖는 세포주를 생성한다(Ryder et al. (1990) J. Neurobiol. 21:356). 스나이더 등에 의한 유사한 연구(Snyder et al. ((1992) Cell 68:33)는 래트 소뇌로 이식되어 뉴런 및 아교세포를 형성하는 다능성 신경 세포주를 나타낸다. 다른 연구에서는, 마우스 신경상피 세포가 c-myc 를 함유하는 레트로바이러스 벡터(retrovirus vector)를 사용하여 무한증식되고, 성장 인자를 사용하여 배양되어, 정상세포 및 뉴런과 유사한 분화된 세포 형태를 형성하였다(Barlett et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:3255).

[0082] 더욱이, 비내로 전달된 본 발명의 유전적으로 가공된 치료세포는 CNS 로 들어가며, 인간 CNS 에서 결핍되었거나 결손된 물질을 방출하는 생물학적 공장을 포함한다. 예를 들면, 지질 축적 질병 및 페닐케톤뇨증(PKU)과 같은 유전적 대사 장애, 윌슨병, 테이-삭스(Tay Sachs), 리소좀 축적 질병, 또는 니만 피크 병(Niemann Pick disease)에서, 출생시부터 뇌에 결손된 효소가 있을 수 있다. 본 발명의 치료세포는 그러한 특정 결손 효소를 포함할 수 있다. 이렇게 유전적으로 가공된 치료세포는 비강의 상부 제3부로 전달되어, 뇌-혈관 장벽을 통과하고, 뇌로 들어가서 결손된 대사 기능을 수행한다. 더욱 일반적으로, 본 발명의 유전적으로 가공된 치료세포는 하나 또는 그 이상의 하기의 것을 생성 및 방출하는 작은 생물학적 공장으로서 작용할 수 있다: 그 필요에 있어서 검체에 도움이 되는 효소, 성장 인자, 항염증제, 신경전달물질, 신경조절물질, 항산화제 등.

[0083] 대안적으로, 본 발명의 유전적으로 가공된 치료세포는 그 필요에 있어서 검체의 생식능력을 증가시키는 유전적으로 가공된 성선자극호르몬-방출 호르몬 분비 세포를 포함할 수 있다.

- [0084] **전달강화제**
- [0085] 특정 화합물, 즉 전달강화제가 치료세포의 중추신경계 및 그 손상된 부위에의 전달에 도움을 주도록 본 발명에 의하여 사용될 수 있다. 바람직한 전달강화제는 본 발명의 치료세포 적용에 앞서 유효량으로 투여되는 사전치료로서, 또는 본 발명의 치료세포를 포함하는 약학 조성물의 구성성분으로서, 또는 치료세포 및/또는 약학 조성물로서 비강 상부 제3부에 실질적으로 동시에 비내로 투여되는 분리된 화합물 중 어느 하나로서, 비강의 상부 제3부에 적용될 때, 치료세포의 CNS 로의 전달을 매우 크게 증가시키는 것으로 관찰된 히알루론산분해효소(hyaluronidase)를 포함한다. 히알루론산분해효소는 세포외 기질에 있는 히알루론산에 작용하여 치료세포 및/또는 치료세포를 포함하는 약학 조성물의 CNS 로의 전달을 강화하는 것으로 보인다. 하기의 실시예 2 는 세포의 CNS 로의 전달에 있어서의 이러한 전달강화제에 의한 효과의 증가를 보여준다.
- [0086] 대안적인 전달강화제는 뉴레귤린(neuregulin), 이동유도활성(migration-inducing activity) 및 백혈병 저해 인자를 포함한다. 이러한 전달강화제, 예컨대, 히알루론산분해효소, 친지질성 약제, 뉴레귤린, 이동유도활성 및 백혈병 저해 인자는 각각, 또는 임의의 조합으로 사용되어, 본 발명에 따라 치료세포의 CNS 로의 전달을 강화할 수 있다. 따라서, 하나 이상의 전달강화제는 치료세포 및/또는 약학 조성물 및/또는 치료세포를 포함하는 약학 조성물의 구성성분으로서의 전달에 대한 사전치료로서 사용될 수 있다.
- [0087] 본 발명의 치료세포 및/또는 치료세포를 포함하는 약학 조성물의 점막 전달을 추가적으로 강화하는 대안적인 전달강화제는, 효소 저해제, 특히 당업계에 잘 알려진 단백분해효소 저해제를 포함한다. 단백분해효소 저해제는 안티파인(antipain), 아르파메닌(arphamenine) A 및 B, 벤즈아미딘 HCl, AEBSF, CA-074, 칼파인(calpain) 저해제 I 및 II, 칼펩틴(calpeptin), 펩스타틴(pepstatin A), 악티노닌(actinonin), 아마스타틴(amastatin), 베스트타틴(bestatin), 보로루신(boroleucine), 캡토프릴(captopril), 클로로아세틸-HOleu-Ala-Gly-NH₂, DAPT, 디프로틴(diprotin) A 및 B, 에벨락톤(ebelactone) A 및 B, 포록시미틴(foroxymithine), 루펩틴(leupeptin), 펩스타틴(pepstatin) A, 포스포라미돈(phosphoramidon), 아프로티닌(aprotinin), 퓨로마이신(puromycin), BBI, 대두 트립신 저해제, 페닐메틸술폰닐 플루오라이드, E-64, 키모스타틴(chymostatin), 1,10-페난트롤린(phenanthroline), EDTA 및 EGTA 를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0088] 또한 추가적인 대안적 전달강화제는 계면활성제, 담즙산염, 디하이드로푸시데이트(dihydrofusidate), 생접착제(bioadhesive agent), 인지질 첨가제, 혼합 마이셀(mixed micelle), 리포솜, 또는 담체(carrier), 알콜, 에나민(enamine), 양이온성 중합체, NO 공여자 화합물, 장쇄 양친매성 분자, 소형 소수성 침투 강화제; 나트륨 또는 살리실산 유도체, 아세트아세트산의 글리세롤 에스테르, 사이클로텍스트린 또는 베타-사이클로텍스트린 유도체, 중쇄 지방산, 킬레이트화제, 아미노산 또는 그 염, N-아세틸아미노산 또는 그 염, 점액용해제, 선택된 막 구성성분에 특이적으로 표적화된 효소, 지방산 합성 저해제 및 콜레스테롤 합성 저해제를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 본 발명은 하나 또는 그 이상, 즉 하나 이상의 상기 전달강화제를 단독 또는 유효량의 약학적 화합물로서 치료제와의 조합으로 사용하는 것을 고려한다.
- [0089] **조절제**
- [0090] 그 중에서도 CNS 내에서 전달된 치료세포의 성장 및 분화를 조절하는 특정 조절제는 본 발명의 범위에 속하며, 예컨대, 면역 및 염증 반응을 조절함에 의하여 공여자 세포의 생존을 촉진하는 유효량의 조절제를 포함한다. 이러한 조절제는 예컨대, 사이클로스포린 및 인터루킨(즉, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10); 종양 괴사 인자(즉, TNF-알파 및 TNF-베타); 및 인터페론(즉, IFN-알파, IFN-베타, IFN-감마, IFN-오메가, 및 IFN-타우); 및 임의의 생물학적으로 활성인 그 변이체(variant)를 포함하는 기타 다양한 면역조절제를 포함한다. 본 발명의 방법에 의한 이들 면역조절제의 투여에 관한 보다 상세한 사항은 본원에 참조문헌으로 편입되는 2000 년 12 월 9 일 출원된, 발명의 명칭 "중추신경계 및 림프계에 대한 사이토카인의 투여 방법"의 미국 특허 일련번호 제 09/733,168 호에서 발견될 수 있다.
- [0091] 본 발명의 방법에서의 용도를 발견하는 추가적인 조절제는 주요한 피질 세포골격-연관 및 칼모듈린(calmodulin) 결합 단백질인 CAP23, 및 신경 성장-연관 단백질인 GAP43 을 포함한다. 예컨대, Frey et al. (2000) J. Cell. Biol. 7:1443-1453 을 참조한다. 관심있는 추가적인 약제는 성장, 분화, 및 분화 유지를 자극하는 형태 발생(morphogenic) 단백질인 골원성 단백질(OP-1) (미국 특허 제 6,153,583 호); 도파민성 뉴런의 생존을 촉진하는 것으로 나타나는 폴리펩티드인 소닉 헤지호그(sonic hedgehog) (Miao et al. (1996) Cell Transplant 55:2-17); 기타 다양한 아교세포 성장 인자(미국 특허 제 5,716,930 호; 제 6,147,190 호; 제 5,530,109 호); 및 이들의 임의의 생물학적으로 활성인 변이체를 포함한다. 상기 모든 문헌들은 본원에 참조문헌으로 편입된

다.

- [0092] 본 발명의 범위 내이면서 관심있는 기타 조절제는 성장 인자를 포함한다. 본원에서 사용된 "성장 인자"는 이식된 공여자 세포의 발달을 조절할 수 있는 폴리펩티드를 지칭한다. 본 발명의 방법에 유용한 성장 인자는, 뉴로트로핀 계열의 것(즉, 신경 성장 인자(NGF), 너유래 신경영양물질 인자(BDNF), 뉴로트로핀-3(NT-3), 및 NT-4/5 또는 NT-5 로 또한 알려진 뉴로트로핀-4(NT-4)); 섬유모세포 성장 인자(FGFs, 즉, 염기성 섬유모세포 성장 인자); 표피 성장 인자 계열 (즉, EGF, TGF.알파., 암피레굴린(amphiregulin), 헤파린-결합 EGF-유사 성장 인자(HB-EGF), 바타셀루인(BTC), 및 뉴레굴린 군); 혈소판-유래 성장 인자; 인슐린; 인슐린-유사 성장 인자(즉, IGF-1 및 IGF-2); 섬유 신경영양물질 인자(CNTF), 아교세포주-유래 신경영양물질 인자 계열(GDNF)(즉, GDNF 및 뉴투린(neurturin), 페르세핀(PSP), 및 아르테민(ART)); 전환성 성장 인자.베타.수퍼계열(즉, 수퍼계열은 TGF 베타 1, TGF 베타 2, TGF 베타 3, TGF 베타 4, TGF 베타 5, 액티빈(activin), 인히빈(inhibin), 디카펜타플레직(decapentaplegic)을 포함); 성장 분화 인자(GDF) (즉, GDF1, GDF2, GDF3, GDF5, GDF6, GDF7, GDF9, GDF9, GDF9B, GDF10, GDF11, 및 GDF15); 아교세포-유래 넥신(nexin); 신경영양물질 인자에 의존적인 활성화(ADNF); 아교세포 성장 인자(GGF); 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 이들 성장 인자의 임의의 생물학적 활성 변이체가 본 발명의 방법에서 또한 유용하다는 것이 추가적으로 인식된다.
- [0093] 본 발명의 조절제는 설치류(rodent), 조류(avian), 개류(canine), 소류(bovine), 돼지류(porcine), 말류(equine), 및 바람직하게는 인간을 포함하는 임의의 동물 종으로부터 유래할 수 있다. 바람직하게는 투여되는 조절제는 치료를 받는 동물과 동일한 종으로부터 유래한다.
- [0094] 생물학적으로 활성인 조절 폴리펩티드(즉, IGF-I, NGF, 및 염기성 FGF, 사이토카인 등과 같은 성장인자)의 변이체는 본 발명의 다양한 방법 및 약학 조성물에 또한 포함된다. 이러한 변이체는 조절제의 생물학적 활성, 특히 공여자 세포의 발달을 조절하는 능력(즉, 생존의 촉진, 바람직한 표현형의 유지 및/또는, 공여자 세포에 의하여 생성되는 발달 신호의 조절)을 보유해야 한다. 예를 들면, 조절 폴리펩티드가 IGF-I, NGF-I 또는 FGF 계열의 것과 같은 성장인자일 때, 각각의 수용체 부위를 결합하는 능력이 보유된다. 이러한 수용체 결합 활성은 표준 생분석을 사용하여 측정될 수 있다.
- [0095] 본 발명에서 유용한 성장인자인 이러한 조절제의 하나는 IGF-I 이다. 본원에서 사용되는 용어 "IGF-I" 는 70 아미노산 및 약 7,600 달톤(dalton)의 분자량을 갖는 단쇄 펩티드인 인슐린-유사 성장인자 I (IGF-I)을 지칭한다. 인슐린-유사 성장 인자 I 는 유사분열 및 세포 발달과 관련되는 성장 과정을 자극한다. IGF-I 에 대한 아미노산 및 뉴클레오티드 서열은 당업계에 공지되어 있다. 예컨대, 인간 IGF-I 서열을 개시하고 있는 미국 특허 제 5,324,639 호; 소 IGF-I 의 서열을 개시하고 있는 유전자은행(Genbank) 접근 번호 X15726, 및 래트 IGF-I 의 서열을 개시하고 있는 유전자은행 접근 번호 X06043 을 참조한다. 각각의 문헌들은 본원에서 참조문헌으로 편입된다.
- [0096] 본 발명의 다른 구현예에서, 조절제는 성장 인자 및/또는 생물학적으로 활성인 그 변이체의 FGF 계열의 것을 포함한다. 섬유모세포 성장 인자 계열은 헤파린을 고친화력으로 결합하는 일군의 구조적으로 관련된 단백질을 포함한다. FGF 계열의 것들은 분열촉진물질(mitogen) 활성을 가지며, 널리 다양한 세포 형태의 증식을 유도한다. FGF 계열의 것은 또한 혈관형성(angiogenesis), 분화, 세포 이동, 배아 발달, 및 신경 유지/생존에 관여할 수 있다. 본원에서 사용된 용어 "FGF" 는 예컨대, FGF-1(산성 FGF), FGF-2(염기성 FGF), FGF-3, FGF-4, FGF-5, FGF-6, FGF-8, FGF-9, FGF-98, 또는 이들의 생물학적으로 활성인 단편(fragment) 또는 변이체를 포함하는 섬유모세포 성장 인자 계열의 것을 지칭한다. 다수의 FGF 계열의 것의 제조를 위한 아미노산 서열 및 방법이 당업계에 공지되어 있다.
- [0097] 본 발명의 다른 구현예에서, 조절제는 신경 성장 인자(NGF) 또는 생물학적으로 활성인 그 변이체일 수 있다. NGF 는 본래 130 kDa 의 원자량 및 7S 의 침강 계수를 갖는 복합체로서 분리된다. 이러한 7S 복합체는 3 가지 형태의 소단위를 포함하며, ".베타" 소단위는 NGF 의 모든 생물학적 활동을 수행한다. 신경 성장 인자는 세포, 특히 신경세포의 유사분열 및 성장 과정을 자극하며, 발달을 조절(즉, 복구, 생존 및 분화에 영향)한다. 인간 pre-pro-NGF 및 인간 성숙 NGF 에 대한 바람직한 아미노산 서열이 본원 참조문헌으로 편입되는 미국 특허 제 5,288,622 호에 제공된다.
- [0098] 본 발명에서 사용되는 NGF 는 실질적으로 정제되고, 선천적이며, 재조합적으로 생성된 형태 또는 화학적으로 합성된 형태일 수 있다. 예를 들면, NGF 는 NGF 를 자연적으로 발현하는 세포로부터 직접 분리될 수 있다. NGF 는 또한 모두 본원 참조문헌으로 편입되는 Edwards et al. (1988) Mol. Cell. Biol. 8:2456; 미국 특허 제 5,986,070 호; 및 미국 특허 제 6,005,081 호에 기재된 바와 같이 진핵 또는 원핵 세포 발현 시스템에서 재조합

적으로 생성될 수도 있다. 대안적으로, 본 발명의 조절제는 에리스로포이에틴(EPO), 뇌-유래 신경영양물질 인자(BDNF) 및 표피 성장 인자(EGF) 를 포함할 수 있다. 본원에 기재된 각각의 조절제는 in-vivo 에서 본 발명 방법 및 약학 조성물의 치료세포의 생존 및 분화에서 중요한 역할을 수행한다.

[0099] 단독 및/또는 치료세포와의 조합으로서, 본 발명의 방법에 의한, 즉 비강 상부 제3부예의 비내로 유효량의 하나 이상의 조절제의 투여는 CNS 로 이식되는 치료세포의 발달을 조절한다. 본원에서 표현 "발달의 조절"은 그 중에서도, 조절제가 이식된 치료세포의 생존, 분화, 축삭돌기 발달(axonal development), 수상돌기 발달(dendritic development) 및/또는 증식의 강화; 이식된 치료세포의 숙주 뉴런과 시냅스 연결을 확립하는 능력의 개선(즉, 공여자 세포에서 신경 섬유 형성을 강화; 공여자 세포의 신경 섬유 투사 거리를 증가; 또는 공여자 세포의 신경 섬유 밀도를 강화); 및/또는 이식된 치료세포의 특정 신경 계열로의 결정을 지시(즉, 신경(GABA성 뉴런, 도파민성 뉴런, 콜린성 뉴런, 해마성 뉴런 등), 성장아교 또는 희소돌기아교 세포 운명을 선택)하는 것을 의미한다. 조절제가 검체의 면역 반응을 조절함에 의하여 이식된 공여자 세포의 생존을 강화할 수 있다는 것이 추가적으로 알려졌다. "조절"이라 함은 면역 또는 염증 반응(즉, 전신성 면역 기능, 항원 제공, 사이토카인 생성, 림프구 증식, 및 림프구 및 대식세포의 CNS 로의 유입에 영향을 주는 것)의 하향 조절을 의도한다.

[0100] 더 나아가, 조절제의 투여는 이식된 공여자 세포에 의하여 방출되는 발달 신호에 영향(즉, 공여자 세포가 도파민, 아세틸콜린, GABA, 또는 기타 신경보호 인자와 같은 신경전달물질을 방출하는 것을 촉진)을 줌으로써 침습적으로 이식된 공여자 세포의 "발달을 조절"하는 것으로 알려져 있다. 이와 같이, 주위 숙주 조직의 기능과 복구(즉, 강화된 신경 섬유 형성, 신경 섬유 투사 거리, 및/또는 신경 섬유 밀도)는 본 발명의 비침습적 방법에 의하여 강화될 수 있다.

[0101] 유효량의 하나 또는 그 이상의, 즉 하나 이상의 조절제의 포유동물의 CNS 로의 전달은 이러한 약제의 치료학적으로 유효량을 포함하는 약학 조성물의 투여를 통하여 달성될 수 있다. 대안적으로, 유효량의 하나 이상의 조절제는 본 발명의 약학 조성물 및/또는 치료세포의 적용에 대한 사전치료, 공동치료 및/또는 사후치료로서, 비강 상부 제3부에 비내 전달 및/또는 전신적으로 전달될 수 있다. "유효량"은 그 중에서도 본원에 기재된 바와 같이 공여자 세포의 발달을 조절하는 것에 대하여 바람직한 치료 효과를 유발하는데 충분한 조절제의 농도를 의미한다. 따라서, 유효량의 조절제는 단지 세포 대체 전략으로 치료된 동물과 비교하여 세포 대체 치료법의 임상적 결과를 증강시킨다. 이와 같이, 치료학적 유효량은 치료되는 CNS 장애와 연관된 신경 결핍의 감소를 통하여 분석될 수 있고, 따라서 임상적 증상에 있어서의 개선으로서 특징지워 진다.

[0102] 신경 손상의 정도를 정량화하고 CNS 장애가 치료되었는지 여부를 측정하는 방법은 당업자에게 공지되어 있다. 이러한 방법은 조직학적 방법, 분자 마커(marker) 분석, 및 기능/행동 분석을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 예를 들면, 공여자 세포의 강화된 기능적 통합 및/또는 주위 신경 조직의 강화된 기능 및 복구는 인지, 감각, 운동 및 내분비를 포함하는 다양한 기능의 복구를 시험함으로써 분석될 수 있다. 운동 시험은 뇌의 퇴화 측면으로부터 회전 운동을 정량평가하는 것, 및 균형, 협응, 운동의 지연, 경직 및 진전(tremor)에 대하여 분석하는 것을 포함한다. 인지 시험은 기억 테스트 및 공간 학습을 포함한다. 신경 질병의 치료법을 결정하기 위하여 사용되는 특정 분석은 장애에 의존하여 변화한다.

[0103] 전달된 치료세포 발달의 조절에 유익한 바람직한 생물학적 활성은, 예컨대 전달된 치료세포의 생존 및/또는 증식의 강화; 전달된 치료세포의 숙주 뉴런과의 시냅스 연결을 확립하는 능력의 개선; 및/또는 전달된 치료세포가 특정 신경 계통으로 결정되는 것을 지시하는 것을 포함한다. 이러한 이벤트(event)를 분석하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들면, 조절제의 투여 후 전달된 치료세포의 생존의 개선은 전산화 단층 촬영술(CAT 스캔 또는 CT 스캔), 핵 자기 공명 또는 자기 공명 영상(NMR 또는 MRS) 또는 양전자방출 단층 촬영술(PET) 스캔과 같은 다양한 비침습성 스캔을 사용하여 분석될 수 있다. 대안적으로, 전달된 치료세포 생존은 전달된 치료세포 이식의 부위의 현미경 검사에 의하여 사후(post-mortem) 분석될 수 있다. 전달된 치료 세포 부위는 예컨대, 전달된 치료세포에 특이적인 분자 마커의 분석, 또는 대안적으로 표지 색소의 사전 편입에 의하여 특정될 수 있다. 이러한 염료는, 예컨대 로다민-(rhodamine-) 또는 형광표지 미세구, 또는 패스트 블루(fast blue) 또는 레트로바이러스적으로 도입된 조직화학 마커를 포함한다.

[0104] 유효량은 예컨대, 치료되는 CNS 장애, 포유동물에 이식된 공여자 세포의 종류, 및 치료중인 검체의 반응성을 포함하는 다수의 인자에 의존한다. 치료학적 유효량이 바람직한(즉, 전달된 치료세포의 생존 및/또는 증식의 강화; 전달된 치료세포의 숙주 뉴런과의 시냅스 연결을 확립하는 능력의 개선; 전달된 치료세포에 의하여 방출되는 발달 신호의 조절; 또는 주위 신경 조직의 개선된 기능 및 복구) 전달된 치료세포의 발달 조절의 형태에 의존한다는 것이 추가적으로 알려졌다. 효과 및 용량을 결정하는 방법이 당업계에 공지되어 있다.

- [0105] 예를 들면, 파킨슨병에서 퇴화하는 뉴런은 흑색질의 도파민성 뉴런이다. 진행된 파킨슨병을 갖는 환자에 있어서의 세포 대체 전략은 공지되어 있으며, 예컨대, 6 내지 9 주령 인간 배아로부터의 흑색질 도파민성 뉴런의 선조체내 이식을 포함한다(Olanow et al. (1996) Trends Neurosci. 19:102-109 및 Lindvall et al. (1999) Mov. Disord. 14:201-205). 약리학적으로 활성인 조절제의 파킨슨병에 의하여 영향을 받는 뇌 부위(즉, 중뇌 및 흑색질)로의 전달은 당업계에 공지되어 있으나, 그러한 뇌-혈관 장벽이 통과되는 방법에서 치료세포의 비내 전달과의 조합은 공지되어 있지 않다.
- [0106] 본원에서 사용된 본 발명의 투여 방법을 사용하여 파킨슨병의 치료를 위한 본 발명의 전달된 치료세포 및/또는 치료세포를 포함하는 약학 조성물과 조합된 조절제는 파킨슨 병의 임상적 증상을 감소 또는 약화시키는 데에 충분하다. 이와 같이 본 발명의 방법에 의하여 투여되는 유효량의 조절제(즉, 성장 인자)는 파킨슨병의 치료를 위하여 본 발명 하에서 수행되는 세포 대체 전략을 강화한다. 따라서, 본 발명의 방법은 세포 대체 전략 단독으로 치료되는 동물과 비교하여 치료되는 동물의 생존을 강화 및/또는 임상적 상태를 개선시킨다. 파킨슨병에 대한 임상적 상태의 개선은, 예컨대 아포모르핀(apomorphine)-유도 회전 감소의 면에서 복측 중뇌 이식 효율의 개선, 선조체 신경재지배(striatal reinnervation)의 밀도의 증가, 및 신경 생존의 증가를 포함한다(Tornqvist et al. (2000) Exp. Neurol. 164:130-138).
- [0107] 헌팅턴병은 특히 선조체 및 피질에서의 진행성 신경퇴화로 특징지워지는데, 이는 운동 및 인지 기능에 심각한 손상을 유도한다. 최근 세포 대체 치료법은 저해제 연결을 선조체 전구세포의 삽입을 통하여 선조체에서 담창구(globus pallidus)와 같은 다른 구조로 대체하였다. 약리학적으로 활성인 조절제의 헌팅턴병에 의하여 영향을 받는 뇌의 부위(즉, 미상-피각(caudate-putamen, 시상, 딘세팔론(diencephalon), 소뇌 및 전두피질)로의 전달은 당업계에 공지되어 있으나, 뇌-혈관 장벽이 통과되는 본 발명의 치료세포 및/또는 치료세포를 포함하는 약학 조성물과의 관계에서는 공지되어 있지 않다.
- [0108] 본원에서 사용된 본 발명의 투여 방법을 이용하여 헌팅턴병의 치료를 위한 조절제의 "유효량"은 헌팅턴병의 임상적 증상을 감소 또는 약화시키는데 충분하다. 따라서, 본 발명의 방법에 의하여 투여되는 유효량의 조절제(즉, 성장 인자)는 헌팅턴병의 치료를 위하여 본 발명 하에서 통상적으로 수행되는 세포 대체 전략을 강화시킨다. 이와 같이, 본 발명의 방법은 세포 대체 전략 단독으로 치료되는 동물과 비교하여, 치료되는 동물의 생존을 강화 및/또는 임상적 상태를 개선한다. 임상적 상태에서의 개선은, 예컨대, 담창구 배출(pallidal output), 감소된 운동 과다활동, 복합체 운동 및 인지 행동의 회복, 및 병변된 선조체에서의 새로운 습관-학습 시스템의 회복을 포함한다. 예컨대, 모두 본원 참조문헌으로 편입되는 Bjorklund et al. (1994) Functional Neural Transplantation (Raven, N.Y.), pp. 157-195; Dunnett et al. (1995) Behav. Brain Res. 66:133-142; Kendall et al. (1998) Nat. Med. 4:727-729; Palfi et al. (1998) Nat. Med. 4:963-966; Brasted et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:10524-10529; 및 Wictorin et al. (1992) Prog. Neurobiol. 38:611-639 를 참조한다. 본 발명의 방법에 의한 조절제의 투여는 세포 대체 치료법의 임상적 결과를 증가시키는데에 충분하다. 이러한 분석법은 헌팅턴병의 효과적인 치료를 위하여 용량 범위 및/또는 적절한 조절제의 선택을 결정하기 위하여 당업자에 의해 용이하게 실시될 수 있다.
- [0109] CNS 에 대한 허혈성 손상(및 그 결과의 세포 손실 및 사멸)은, 예컨대 심장정지 또는 관상 동맥 폐색, 또는 대뇌 동맥 폐색 또는 뇌졸중으로부터 기인할 수 있다. 허혈성 이벤트(event)에 이어 손상된 CNS 의 신경 회로는 다양한 세포 대체 전략을 사용하여 복구된다. 예컨대, 초점(focal) 허혈성 이벤트에 있어서, 배아 선조체의 손상된 선조체로의 삽입(Hodges et al. (1994) Functional Neural Transplantation (Raven, N.Y.), pp. 347-386) 및 인간 기형암종(teratocarcinoma) 세포주로부터 유래한 뉴런의 삽입(Borlongan et al. (1998) Exp. Neurol. 149:310-321 및 Borlongan et al.(1998) Neuroreport 9:3703-3709)이 수행된다. 또한, 예컨대, Hodges et al. (1996) Neurosci. 72:959-988, Sorensen et al. (1996) Exp. Neurol. 138:227-235, 및 Sinden et al. (1997) Neurosci. 81:599-608 을 참조한다.
- [0110] 본원에서 사용된, 허혈성 손상의 치료를 위한 조절제의 "유효량"은 허혈성 이벤트의 임상적 증상을 감소 또는 약화시키는데에 충분하다. 이와 같이, 본 발명의 방법에 의하여 투여되는 유효량의 조절제는 허혈성 손상의 치료에 있어서 본 발명에 의하여 통상적으로 수행되는 세포 대체 전략을 강화시킨다. 임상적 상태의 개선은, 예컨대 경색(infarct) 크기, 부종, 및/또는 신경 결핍(즉, 개선된 운동, 감각, 전정운동(vestibulomotor), 및/또는 체감각 기능)의 감소를 포함한다. 개선은 추가적으로 신경 결핍의 감소, 및 이에 따른 개선된 운동, 감각, 전정운동, 및/또는 체감각 기능의 회복을 포함한다.
- [0111] 경색 크기, 부종, 및 신경 결핍의 발달을 포함하는 허혈성 손상의 감소와 특히 관련하여, 허혈성 이벤트가 치료

되었는지 여부를 결정하는 방법은 당업자에게 공지되어 있다. 예컨대, 허혈성 손상 후에, 오메가 3(말초형 벤조디아제핀) 결합 부위의 밀도의 현저한 증가가 있다(Benazodes et al. (1990) Brain Res. 522:275-289). 오메가 3 부위를 검출하는 방법은 공지되어 있으며, 허혈성 손상의 정도를 측정하는데에 이용될 수 있다. 예컨대, Gotti et al. (1990) Brain Res. 522:290-307 및 이에 언급된 참조문헌을 참조한다. 대안적으로, 성장 관련 단백질-43(GAP-43)은 허혈성 이벤트에 이은 새로운 축삭(axonal) 성장에 대한 마커로 사용될 수 있다. 예컨대, Stroemer et al. (1995) Stroke 26:2135-2144, 및 Vaudano et al. (1995) J. Neurosci 15:3594-3611 을 참조한다. 치료 효과는 개선된 운동 기술, 인지 기능, 감각 지각, 연설 및/또는 치료를 경험하는 포유동물에서 발작 경향의 감소에 의하여 또한 측정될 수 있다. 감각운동 및 반사 기능을 평가하는 이러한 기능/행동 시험은, 예컨대 Bederson et al. (1986) Stroke 17:472-476, DeRyck et al. (1992) Brain Res. 573:44-60, Markgraf et al. (1992) Brain Res. 575:238-246, Alexis et al. (1995) Stroke 26:2338-2346 에 기재되어 있다. 신경 생존의 강화는 스칸디나비아 스트로크 스케일(Scandinavian Stroke Scale; SSS) 또는 바르텔 인덱스(Barthel Index)를 사용하여 또한 측정될 수 있다. 이러한 분석법은 허혈성 이벤트의 효과적인 치료를 위하여 용량 범위 및/또는 적절한 조절제의 선택을 결정하기 위하여 당업자에 의해 용이하게 실시될 수 있다.

[0112] 포유동물의 뇌-혈관 장벽의 통과를 이용한 CNS 내로의 비내 전달에 이은, 본 발명의 치료세포의 발달을 조절하기 위한 의도로서, 치료학적 유효량 또는 용량의 조절제는 체중 중 약 0.002 mg/kg 내지 약 2.0 mg/kg 또는 체중 중 약 0.03 mg/kg 내지 약 0.6 mg/kg 을 포함할 수 있다. 대안적으로, 조절제는 체중 중 0.0004, 0.001, 0.005, 0.007, 0.009, 0.01, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8 또는 2.0 mg/kg 일 수 있다. 특정 조절제(즉, ADNF)의 보다 낮은 용량 범위가 바람직하다는 것이 추가적으로 알려져 있다. 이러한 구현예에서, 조절제는 약 0.1 ng/kg 내지 약 20 ng/kg 에서 투여될 수 있다. 대안적으로, 조절제는 체중 중 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 2, 4, 8, 12, 15, 18 및 19 ng/kg 로 투여될 수 있다.

[0113] **항생제**

[0114] 다양한 구현예에서, 치료세포 치료법을 경험중인 환자를 보호하기 위하여, 본 발명은 유효량의 하나 이상의 항생제, 또는 대안적으로 비강의 상부 제3부에 약학 조성물의 적용 이전의 하나 이상의 항생제 사전치료 또는 그 조합으로 사용될 수 있다. 또한, 항생제는 사전치료, 공동치료 및/또는 사후치료로서 전신적 및/또는 비강의 상부 제3부에의 적용에 의하여 전달될 수 있다. 본 발명 내의 이러한 항생제 성분의 이용은, 비내에서 발견되는 박테리아가 치료세포 및/또는 약학 조성물의 적용 동안에 비강 상부 제3부의 비내 조직으로 들어가고, 뇌-혈관 장벽을 통과하며, CNS 내의 다른 조직을 감염시키는 위험을 줄이는 것을 목적으로 한다. 관심있는 특정 조직은, 뇌, 수막, 혈액, 척수 및 기타 말초 조직을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 바람직한 구현예는 전달강화제, 예컨대 히알루론산분해효소가 비강 상부 제3부에 적용될 때, 항생제를 사용하여 환자를 사전치료 및/또는 동시에 치료하는 것이다.

[0115] 본 발명에서의 사용을 위한 대표적인 항생제는, 본 발명의 치료세포 및/또는 약학 조성물을 투여받고 있는 환자를 보호하는데 도움을 주기 위한, 단독 또는 조합형태의 뮤피로신(mupirocin), 데펜신(defensin), 겐타마이신(gentamycin), 게네티신(geneticin), 세프미녹심(cefminoxime), 페니실린(penicillin), 스트렙토마이신(streptomycin), 자일리톨(xylitol) 또는 기타 항생제를 포함한다. 비내 치료 내의 이러한 항생제의 사용은 문헌에서 널리 보고되며 당업자에 의하여 용이하게 인식되지만, 어떠한 비내 치료도 뇌-혈관 장벽이 통과되는 비강의 상부 제3부에 치료세포 및/또는 치료세포를 포함하는 약학 조성물의 비내 투여와 관련하여 보고된 바 없다.

[0116] **면역억제제**

[0117] 본 발명의 대안적인 구현예는 염증 반응으로부터의 보호 및/또는 숙주 면역적격(immunocompetent) 세포의 활성화를 통하여 치료세포의 생활성을 강화하는 유효량의 하나 이상의 면역억제제를 추가적으로 포함할 수 있다. 면역억제제는 사전치료, 치료세포 및/또는 약학 조성물과 동시에 및/또는 치료세포 및/또는 약학 조성물의 사후치료 중 어느 하나로서 투여될 수 있다. 비강의 상부 제3부에 적용된 치료세포 및/또는 약학 조성물과 조합된 이러한 면역억제 치료법은 상기 세포의 생존을 개선시킨다.

[0118] CNS, 비내 점막 및 비내 점막과 CNS 사이의 신경 경로의 숙주 면역적격 세포가 본 발명의 적용된 치료세포를 검출할 때, 염증 반응 및/또는 숙주 면역적격 세포의 활성화가 일어날 수 있다. 이러한 일련의 이벤트들은 치료세포 생존을 감소시킨다. 따라서, 치료세포의 생존 및 생활성에서 중요한 역할을 수행하기 위하여 비강의 상부 제3부에 치료세포의 적용 전, 적용 동안 및/또는 적용 후에 면역억제제가 사용될 수 있다. 면역억제제는 비강의 상부 제3부에 비내 및/또는 전신적으로 적용될 수 있다. 본 발명에서 단독 또는 조합으로 사용되는 통

상적이며, 잘 알려진 면역억제제는, 사이클로스포린 A, 타크롤리무스(tacrolimus), 프레드니솔론(prednisolone), 아자티오프린(azathioprine), 메틸프레드니솔론(methylprednisolone), 마이코페닐레이트 모페틸(mycophenylate mophetil) 및 시롤리무스(sirolimus)를 포함한다. 다른 면역억제제는 Fas 리간드를 발현시키는 유전적으로 가공된 세포의 적용을 포함한다.

[0119] **약학 조성물**

[0120] 포유동물 비강의 상부 제3부에 투여되는 유효량의 하나 이상의 치료세포 외에, 약학 조성물이 비강의 상부 제3부에 적용 또는 투여될 수 있다. 이러한 약학 조성물은 유효량의 하나 이상의 치료세포 외에, 예컨대 모두 상기 기재되었으며 하기에서 추가적으로 논의될 하나 이상의 상기 기재된 조절제, 하나 이상의 항생제, 및/또는 하나 이상의 면역 억제제를 포함할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 치료 전, 치료와 함께, 치료 후에, 하나 이상의 조절제, 전달강화제, 항생제 및/또는 면역억제제의 전신적 및/또는 비강 상부 제3부에 대한 적용의 임의의 조합으로 조합될 수 있다.

[0121] 약학 조성물의 치료세포와 조합될 수 있는 대안 중에, CNS 의 손상 및/또는 퇴화세포에 도달하기 위하여 비내 점막 또는 상피를 통한 조절제의 흡수를 강화시킬 수 있는 친지질성 약제와 같은 전달강화제가 있다. 조절제는 친지질성 약제 또는 보조제 단독 또는 담체와의 조합으로 혼합되거나, 하나 또는 몇개의 형태의 마이셀(micelle) 또는 리포솜 물질과 조합될 수 있다. 바람직한 친지질성 물질 중에, 하나 또는 그 이상의 포스파티딜 콜린(phosphatidyl choline), 리포펙틴, DOTAP 등을 포함하는 양이온성 리포솜이 있다.

[0122] 바람직한 전달강화제는 본 발명의 치료세포 적용에 대한 사전치료, 또는 본 발명의 치료세포를 포함하는 약학 조성물의 구성성분으로서 비강의 상부 제3부에 적용될 때, 치료세포의 CNS 로의 전달을 매우 현저하게 증가시키는 것으로 관찰된 히알루론산분해효소를 포함한다. 대안적인 전달강화제는 뉴레굴린 및 이동-유도 활성을 포함한다. 이러한 전달강화제, 예컨대 히알루론산분해효소, 친지질성 약제, 뉴레굴린 및 이동-유도 활성은 개별적으로, 또는 임의의 조합으로 사용되어, 본 발명에 의한 치료세포의 CNS 로의 전달을 강화시킨다. 따라서, 하나 이상의 전달강화제는 치료세포 및/또는 약학 조성물 및/또는 치료세포를 포함하는 약학조성물의 구성성분으로서의 전달에 대한 사전치료로서 사용될 수 있다.

[0123] 본 발명의 약학 조성물은 추가적으로 하나 이상의 항생제를 포함할 수 있거나, 또는 대안적으로 비강 상부 제3부에 대한 약학 조성물의 적용 이전의 항생제 사전치료, 또는 그 임의의 조합이 사용되어 세포 치료를 경험중인 환자를 보호한다. 또한, 항생제는 사전치료, 공동치료 및/또는 사후치료로서 비내 및/또는 전신적으로 전달될 수 있다. 본 발명 내의 이러한 항생제 성분의 사용은 비내에서 발견되는 박테리아가 치료세포 및/또는 약학 조성물의 적용 동안에 비강의 상부 제3부에 있는 비내 조직으로 들어가고, 뇌-혈관 장벽을 통과하며, CNS 내의 다른 조직을 감염시키는 위험을 감소시킨다. 관심있는 특정 조직은, 뇌, 수막, 혈관, 척수 및 다른 말초 조직을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 바람직한 구현에는 히알루론산분해효소와 같은 전달강화제가 적용될 때, 비강 상부 제3부에 단독 또는 약학 조성물로서, 항생제를 사용하여 환자를 사전치료 및/또는 동시에 치료하는 것이다.

[0124] 본 발명의 치료세포 및/또는 약학 조성물을 투여받고 있는 환자를 보호하는데 도움을 주기 위한, 단독 또는 조합형태의, 본 발명의 용도를 위한 대표적인 항생제는 뮤피로신, 세프미녹심, 페니실린, 스트렙토마이신, 자일리틀 또는 기타 항생제를 포함한다. 코 치료에서 이러한 항생제의 사용은 널리 문헌에 보고되었으며, 당업자에게 용이하게 인식될 수 있다.

[0125] 본 발명은 사전치료, 치료세포 및/또는 약학 조성물과의 동시치료 및/또는 치료세포 및/또는 약학 조성물의 사후치료 중 어느 하나로서 전달되는 하나 이상의 면역억제제, 전달강화제를 추가적으로 포함할 수 있다. 비강 상부 제3부에 적용된 치료세포 및/또는 약학 조성물과 조합된 이러한 면역억제 치료법은 이러한 세포의 생존을 개선시킨다. CNS, 비내 점막 및 비내 점막과 CNS 사이의 신경 경로의 숙주 면역적격 세포가 본 발명의 적용된 치료세포를 검출할 때 염증 반응 및/또는 숙주 면역적격 세포의 활성화가 일어난다. 이러한 일련의 이벤트들은 치료세포 생존을 감소시킨다. 따라서, 면역억제제가 비강의 상부 제3부에 대한 치료세포의 적용 전, 적용 동안 및/또는 적용 후에 사용되어 치료세포의 생존 및 생활성에 중요한 역할을 할 수 있다. 면역억제제는 비강 상부 제3부에 대하여 비내로 및/또는 전신적으로 적용될 수 있다. 본 발명에서 단독 또는 조합으로 사용되는 통상적이고 잘 알려진 면역억제제는 사이클로스포린 A, 타크롤리무스, 프레드니솔론, 아자티오프린, 메틸프레드니솔론, 마이코페닐레이트 모페틸 및 시롤리무스를 포함한다. 다른 면역억제제는 Fas 리간드를 발현시키는 유전적으로 가공된 세포의 적용을 포함한다.

- [0126] 또한, 본 발명의 약학 조성물은, 삼차 신경 또는 후각 신경에 의하여 또는 신경 경로를 따라서 또는 신경 경로를 통하여 신경자극된 조직내 또는 이를 통한 상기 약제의 전달을 촉진하는, 임의의 약학적으로 허용가능한 첨가제, 담체 및/또는 보조제를 포함할 수 있다.
- [0127] "약학적으로 허용가능한 담체"는, 본 발명의 약학 조성물 내의 치료세포, 조절제, 전달강화제, 항생제 및/또는 면역억제제의 축적, 투여, 및/또는 생물학적 활성을 촉진시키는 당업계에서 통상적으로 사용되는 담체를 의미한다. 담체는 이러한 약학 조성물의 구성성분의 임의의 원치않는 부작용(side effect)을 감소시킨다. 적절한 담체는 안정, 즉 제형 내의 다른 성분과 반응하지 않아야 한다. 이는 치료를 위하여 사용되는 용량 및 농도에서 수용자에게 현저한 국소적 또는 전신적 역효과(adverse effect)를 생성하지 않아야 한다. 이러한 담체는 일반적으로 당업계에 공지되어 있다.
- [0128] 본 발명의 다양한 구현예에 있어서의 적절한 담체는, 알부민(albumin), 젤라틴(gelatin), 콜라겐(collagen), 폴리사카라이드(polysaccharide), 모노사카라이드(monosaccharide), 폴리비닐피롤리돈(polyvinylpyrrolidone), 폴리락트산(polylactic acid), 폴리글리콜산(polyglycolic acid), 중합체성 아미노산(polymeric amino acid), 고정유(fixed oil), 에틸 올레이트(ethyl oleate), 리포솜(liposome), 글루코스(glucose), 수크로스(sucrose), 락토스(lactose), 만노스(mannose), 덱스트로스(dextrose), 덱스트란(dextran), 셀룰로스(cellulose), 만니톨(mannitol), 소르비톨(sorbitol), 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol; PEG) 등과 같은, 크고 안정한 거대 분자에 대하여 통상적으로 사용되는 것을 포함한다. 추가적인 약학 조성물은 본 발명의 다양한 구현예에서 CNS 로 전달될 수 있는 세포 및 세포 집합에 대하여 접착 물질로 작용하여, 이에 따라 비내 점막으로부터 CNS 로 전달되는 세포의 손실을 감소시키는 미세입자, 유기 및 무기 화합물을 포함한다. 이러한 화합물은 몇몇 종류의 접착성 분자, 겔(세포에 대한 캡슐화/함몰화(embedding) 물질로 작용), 세포의 매트릭스(matrix) 또는 매트릭스(matrices)의 성분 및 피브린 또는 피브로넥틴 카본- 또는 클레이- 및 덱스트란 입자 및 그 조성물과 같은 유기 및/또는 무기 입자를 포함한다.
- [0129] 물, 식염수, 수성 덱스트로스, 및 글리콜은, 특히 (등장성인 경우) 용액에 대하여 바람직한 액체 담체이다. 담체는 석유, 동물, 식물 또는 합성 기원, 예컨대, 피넛유(peanut oil), 대두유(soybean oil), 미네랄유(mineral oil), 세사미유(sesame oil) 등과 같은 것을 포함하는 다양한 오일로부터 선택될 수 있다. 상기 조성물은 멸균과 같은 통상적인 약학적 방법에 처해질 수 있으며, 보존제, 안정화제, 습윤제 또는 유화제와 같은 통상적인 약학적 첨가제, 삼투압을 조정하기 위한 염, 완충액 등을 함유할 수 있다. 담체가 액체인 경우, 담체는 체액과 저장성 또는 등장성이고, 4.5 - 8.5 의 범위에서의 pH 를 갖는 것이 바람직하다.
- [0130] 약학 조성물의 다른 허용가능한 구성성분은 물, 식염수 및 인산염, 시트르산염, 숙신산염, 아세트산 및 기타 유기산 또는 그 염을 포함하는 완충액과 같은 등장성 조절제를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 전형적으로, 약학적으로 허용가능한 담체는 하나 또는 그 이상의 안정화제, 환원제, 항산화제 및/또는 킬레이트화제를 또한 포함한다. 단백질 기재 조성물, 특히 약학 조성물의 제조에서 완충액, 안정화제, 환원제, 항산화제 및 킬레이트화제의 사용은 당업계에 공지되어 있다. Wang et al. (1980) J. Parent. Drug Assn. 34(6):452-462; Wang et al.(1988) J. Parent. Sci. Tech. 42:S4-S26 (Supplement); Iachman et al. (1968) Drug and Cosmetic Industry 102(1):36-38, 40, and 146-148; Akers (1988) J. Parent. Sci. Tech. 36(5):222-228; 및 Methods in Enzymology, Vol. XXV. ed. Colowick and Kaplan, "Reduction of Disulfide Bonds in Proteins with Dithiothreitol," by Konigsberg, pp. 185-188 을 참조한다.
- [0131] 본 발명의 약학 조성물의 다양한 구현예는 아세트산염, 아디프산염, 벤조산염, 시트르산염, 락트산염, 말레산염, 인산염, 타르타르산염, 붕산염, 트리(하이드록실메틸 아미노메탄), 숙신산염, 글리신, 히스티딘, 다양한 아미노산의 염 등, 또는 이의 조합과 같은 적절한 완충액을 포함한다. 상기의 Wang (1980) 455 면을 참조한다. 적절한 염 및 등장화제는 염화나트륨, 덱스트로스, 만니톨, 수크로스, 트레할로스(trehalose) 등을 포함한다.
- [0132] 본 발명의 약학 조성물의 다양한 구현예는, 환원된 시스테인의 환원을 유지하고, 0.01% 내지 0.1% wt/wt 로 디티오트레이톨(DDT, 클리랜드(Cleland) 시약으로도 알려짐) 또는 디티오에리트ريت; 0.1% 내지 0.5% (pH 2-3) 로 아세틸시스테인 또는 시스테인; 및 0.1% 내지 0.5% (pH 3.5 내지 7.0) 으로 티오글리세롤 및 글루타티온을 포함하는 적절한 환원제를 추가적으로 포함할 수 있다. 적절한 항산화제는 이아황산 나트륨(sodium bisulfite), 아황산 나트륨(sodium sulfite), 메타이아황산 나트륨, 티오황산나트륨, 소듐 포름알데히드 술폭실레이트 및 아스코르브산을 포함한다. 환원된 시스테인의 미량 금속 촉매 산화를 방지하기 위하여 미량 금속을 킬레이트화하는 적절한 킬레이트화제는, 시트르산, 타르타르산, 그 디소듐, 테트라소듐 및 칼슘 디소디

움 염의 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA), 및 디에틸렌트리아민 펜타아세트산(DTPA)를 포함한다. 예컨대, 상기의 Wang (1980) 457-458 및 460-461 면, 및 상기의 Akers (1988)224-227 면을 참조한다.

- [0133] 본 발명의 약학 조성물의 다양한 구현에는 하나 또는 그 이상의 페놀, 크레졸, 파라아미노벤조산, BDSA, 소르비트레이트, 클로르헥시딘, 벤즈알코늄 클로라이드 등과 같은 보존제를 추가적으로 포함할 수 있다. 적절한 안정화제는 트레할로스 또는 글리세롤과 같은 탄수화물을 포함한다. 상기 조성물은 예컨대, 조성물의 물리적 형태를 안정화하기 위하여 하나 또는 그 이상의 미세결정형 셀룰로스, 스테아르산 마그네슘, 만니톨 또는 수크로스; 및 예컨대, 조성물의 화학적 구조를 안정화하기 위하여 하나 또는 그 이상의 글리신, 아르기닌, 가수분해된 콜라겐 또는 단백분해효소 저해제와 같은 안정화제를 포함할 수 있다.
- [0134] 본 발명의 약학 조성물의 다양한 구현에는 카르복시메틸 셀룰로스, 하이드록시프로필 메틸셀룰로스, 히알루론산, 알긴산염, 황산 콘드로이틴, 텍스트란, 말토덱스트린, 황산 텍스트란 등과 같은 적절한 현탁화제를 또한 포함한다. 상기 조성물은 폴리소르베이트 20, 폴리소르베이트 80, 플루로닉(pluronic), 트리올레인(triolein), 대두유, 레시틴, 스쿠알렌 및 스쿠알란, 소르비탄 트라이올레이트 등과 같은 유효제를 포함할 수 있다.
- [0135] 본 발명의 약학 조성물은 하나 이상의 페닐에틸 알콜, 페놀, 크레졸, 벤즈알코늄 클로라이드, 페녹시에탄올, 클로르헥시딘, 티메로졸 등과 같은 향미생물제를 추가적으로 포함할 수 있다. 적절한 비후제(thickener)는 만난(mannan), 아라비난(arabinan), 알긴산염, 히알루론산, 텍스트로스 등과 같은 천연 폴리사카라이드; 및 저분자량의 PEG 하이드로겔과 같은 합성의 것을 포함하며; 그리고 상기 언급된 현탁화제는 본 발명의 약학 조성물에 포함될 수 있다.
- [0136] 본 발명에 의한 약학 조성물은 세틸 트리메틸 암모늄 브로마이드, BDSA, 콜레이트, 데옥시콜레이트, 폴리소르베이트 20 및 80, 푸시드산 등과 같은 보조제를 추가적으로 포함할 수 있다. 적절한 당은 글리세롤, 트레오스, 글루코스, 갈락토스, 만니톨 및 소르비톨을 포함한다.
- [0137] 본 발명의 약학 조성물의 다양한 구현에는 하나 또는 그 이상의 용해도 강화 첨가제, 바람직하게는 사이클로덱스트린; 흡수 촉진 첨가제, 바람직하게는 콜레이트, 데옥시콜레이트, 푸시드산 또는 키토산; 양이온성 계면활성제, 바람직하게는 세틸 트리메틸 암모늄 브로마이드; 점도 강화 첨가제, 바람직하게는 조성물의 잔류 시간을 증진시키는 것, 바람직하게는 카르복시메틸 셀룰로스, 말토덱스트린, 알긴산, 히알루론산, 또는 황산염 콘드로이틴; 또는 방출조절 기질, 바람직하게는 폴리안하이드라이드, 폴리오르토에스테르, 하이드로겔, 미립자 저속 방출 데포(depo) 시스템, 바람직하게는 폴리락타이드 공-글리콜라이드(PLG), 데포 포말, 전분 미세구, 셀룰로스 유도 협부(buccal) 시스템; 지질-기재 담체, 바람직하게는 유탕액, 리포솜, 니오솜(niosome) 또는 마이셀을 추가적으로 포함할 수 있다. 상기 조성물은 이중층 불안정화 첨가제, 바람직하게는 포스파티딜 에탄올아민; 용해성 첨가제, 바람직하게는 콜레스테롤 헤미숙시네이트를 포함할 수 있다.
- [0138] 상기 약학 조성물은 조절제 또는 생물학적으로 활성인 그 변이체의 안정성을 증가시키기 위하여 용해화 화합물을 추가적으로 포함할 수 있다. IGF-I 에 있어서, 바람직한 용해화제는 그 용해도를 증가시킬 수 있는 구아니디늄 군을 포함한다. 이러한 용해화 화합물의 대표적인 예는 pH 5.5 이상에서 IGF-I 또는 생물학적으로 활성인 그 변이체의 용해도를 증가시키는 능력을 보유하는 아르기닌의 아미노산 유사체 뿐만 아니라 아미노산 아르기닌을 포함한다. 이러한 유사체는 아르기닌을 함유하는 디펩티드 및 트리펩티드를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. "용해도의 강화"는 구아니디늄-함유 화합물이 없는 것을 제외하고는 동일한 성분으로된 용액에서 pH 5.5 이상에서 용해될 수 있는 단백질의 양과 비교하여, 구아니디늄-함유 화합물의 존재 중 pH 5.5 이상에서 용해될 수 있는 성장 인자 또는 생물학적으로 활성인 그 변이체의 양의 증가를 나타낸다. 구아니디늄-함유 화합물의 성장 인자 또는 생물학적으로 활성인 그 변이체의 용해도를 증가시키는 능력은 당업계에 공지된 방법을 사용하여 측정될 수 있다. 일반적으로, 약 10 mM 내지 약 1 M 의 범위에서, 예컨대 화합물 아르기닌의 경우, 약 20 mM 내지 약 200 mM 의 농도 범위에서 조성물에 존재하는 용해화 화합물의 농도를 제공하는 것이 공지되어 있다.
- [0139] 이러한 담체 및 첨가제의 목록은 결코 완성되지 않았으며, 당업자는 약학 제제에 허용되는 화학물질 및 국소적 및 비경구적 제형에서 현재 허용되는 것의 GRAS (일반적으로 안전한 것으로 고려되는) 목록으로부터 부형제를 선택할 수 있다.
- [0140] 더욱이, 약학 조성물을 제형화하는 방법은 일반적으로 당업계에 공지되어 있다. 약학적으로 허용가능한 담체, 안정화제 및 이소몰라이트(isomolyte)에 대한 철저한 논의는 본원 참조문헌으로 편입되는 Remington's

Pharmaceutical Science (18.sup.th ed.; Mack Publishing Company, Eaton, Pa., 1990) 에서 발견된다.

[0141] 본 발명의 의도에 있어서, 본원에 기재된 바와 같은 약학 조성물은 비강 상부 제3부에의 적용을 위하여 단위 용량 및 용액, 현탁액 또는 유탁액과 같은 형태로 제형화될 수 있다. 후각 뉴런에 의하여 신경자극된 조직에 대한 비강의 상부 제3부에 적용 및 투여되는 약학 조성물은 분말, 과립, 용액, 분무(예컨대, 에어로졸), 연고, 주입액, 점적(drop) 또는 중합체 디스크와 같은 방출조절 조성물의 형태일 수 있다. 투여를 위한 조성물의 다른 형태는 유탁액, 리포솜, 약학 조성물을 서서히 방출시키는 인서트(insert) 등과 같은 미립자의 현탁액을 포함한다. 약학 조성물의 분말 또는 과립 형태는 용액 및 희석, 분산 또는 계면 활성 조절제와 조합될 수 있다. 또한, 상기 조성물은 투여 전에 용액, 현탁액 또는 유탁액으로 전환될 수 있는 동결건조 분말의 형태일 수 있다. 하나 이상의 조절제를 포함하는 약학 조성물은 바람직하게는 막 여과에 의하여 멸균되며, 밀봉된 바이알 또는 앰플과 같은 단위용량 또는 다중용량 용기에 보관된다.

[0142] **치료세포 및/또는 약학적 화합물의 투여**

[0143] 본 발명의 방법에 의한 치료세포의 투여는 치료세포 단독의 적용 또는 약학 조성물로서 상기 기재된 하나 또는 그 이상의 화합물과의 제형화 및 약학 조성물을 인간 환자를 포함하는 동물 검체 또는 숙주에 비강의 상부 제3부에 비내로 투여하는 것을 포함한다. 치료세포 및/또는 이의 약학 조성물의 다른 구성성분, 예컨대 전달강화제, 조절제, 항생제 및/또는 면역억제제는 치료세포 및/또는 약학 조성물 구성성분의 작용의 바람직한 지점에 유효량을 공급하는데 충분한 다양한 용량 중 하나로 투여될 수 있다. 인간 및 다른 포유동물에 대한 용량은 약 0.001 mg/kg 내지 약 100 mg/kg 의 범위에 있으며, 바람직하게는 약 0.01 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 바람직하게는 약 0.1 mg/kg 내지 약 1-10 mg/kg 이다. 주목되는 바와 같이, 전달강화제, 조절제, 항생제, 및/또는 면역억제제는 치료세포 및/또는 약학 조성물을 사용한 단독 또는 약학 조성물의 구성성분으로서의 사전치료, 공동치료 및/또는 사후치료로서 전달될 수 있으며, 약학 조성물 내에 포함되지 않을 경우, 전신적으로 또는 비강 상부 제3부로 전달될 수 있다.

[0144] 현탁액, 에어로졸, 스프레이 또는 점적으로서 비강의 상부 제3부에 대한 적용을 위하여, 치료세포 및/또는 약학 조성물은 약학 제형의 분야에서 공지된 기술에 따라 제조될 수 있다. 상기 조성물은 식염수와 같은 염, pH 를 유지하기 위한 인산염, 숙신산염 또는 시트르산염 완충액과 같은 구성성분, 타우린(taurine)과 같은 삼투조절 및 삼투제, 및 적절한 보존제, 생물학적 이용가능성을 증진시키기 위한 흡수 촉진제, 플루오로카본 또는 기타 당업계에 공지된 용해화 또는 분산제를 포함하는 용액 중 세포의 현탁액으로 제조될 수 있다. 약학 조성물을 비강 상부 제3부에 비내로 적용하는 방법은 분말, 분무, 젤 또는 점비제(nose drop)와 같은 다양한 형태일 수 있다.

[0145] 치료세포 및/또는 약학 조성물 또는 그 성분에 있어서의 조성물의 다른 형태는 유탁액, 리포솜 또는 개체에서 약학 조성물의 잔류를 연장시키는 방출조절 형태와 같은 미립자의 현탁액을 포함한다. 약학 조성물의 분말 또는 과립 형태는 용액 및 희석, 분산 또는 계면활성제와 조합될 수 있다. 투여를 위한 추가적인 조성물은 비강의 상부 제3부의 투여 위치에서 약제를 보유하는 생접착제, 예컨대 점막에 적용된 스프레이, 페인트 또는 도말(swab)을 포함한다. 생접착제는 친수성 지정에 의해서 수 용해성 또는 팽윤성일 수 있으며, 약학 조성물과 호환성인 천연 또는 합성의 친수성 중합체를 지칭한다. 이러한 접착제는 제형이 비강 상부 제3부의 점막 조직에 부착되는데 기능한다. 이러한 접착제는 하이드록시프로필 셀룰로스, 하이드록시프로필 메틸셀룰로스, 하이드록시 에틸셀룰로스, 에틸셀룰로스, 카르복시메틸 셀룰로스, 텍스트란, 구아 검(guar gum), 폴리비닐 피롤리돈, 펙틴, 전분, 젤라틴, 카제인, 아크릴산 중합체, 아크릴산 에스테르의 중합체, 아크릴산 공중합체, 비닐 중합체, 비닐 공중합체, 비닐 알콜의 중합체, 알콕시 중합체, 폴리에틸렌 산화물 중합체, 폴리에테르 및 이들의 조합을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 상기 조성물은 투여 전에 용액, 현탁액 또는 유탁액으로 전환될 수 있는 동결건조 분말의 형태일 수 있다. 약학 조성물은 바람직하게는 막 여과에 의하여 멸균되며 밀봉된 바이알 또는 앰플과 같은 단위용량 또는 다중용량 용기에 저장된다.

[0146] 약학 조성물은 치료되는 개체에서 활성 약제의 잔류를 연장시키기 위하여 방출조절 형태로 제형화될 수 있다. 방출조절 제형의 다양한 제조 방법이 당업계에 공지되어 있으며, Remington's Pharmaceutical Science 에 개시되어 있다. 일반적으로, 치료세포, 약학 조성물 및/또는 약학 조성물의 구성성분, 즉 전달강화제, 조절제, 항생제 및/또는 면역억제제는 고형 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스에 포착될 수 있다. 매트릭스는 필름 또는 미세캡슐로 형성화될 수 있다. 매트릭스는 폴리에스테르, L-글루탐산 및 감마 에틸-L-글루타메이트의 공중합체, 폴리락타이드(polyactide), 폴리락테이트 폴리글리콜레이트(polyactate polyglycolate), 하이드로젤, 비분해성 에틸렌-비닐 아세테이트, 분해성 락트산-글리콜산 공중합체, 히알루론산 겔 및 알긴산 현탁액을 포함

하나, 이에 제한되지는 않는다. 적절한 미세캡슐은 하이드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴 및 폴리-메틸 메타크릴레이트를 포함할 수 있다. 미세유타액 또는 리포솜 및 알부민 미세구와 같은 콜로이드 약물 전달 시스템이 또한 사용될 수 있다.

[0147] **전달 시스템**

[0148] 치료세포 및/또는 본 발명의 치료세포 및/또는 약학 조성물의 구성성분을 포함하는 약학 조성물은 튜브 또는 카테터(catheter)를 통하여, 시린지에 의하여, 팩테일(packtail)에 의하여, 플레짓(pledget)(소형의 편평 흡수 패드)에 의하여, 비내 탐폰(tampon)에 의하여 또는 점막하 주입에 의하여, 분말 또는 액체 비내 분무, 현탁액, 비점적, 젤, 필름 또는 연고로서, 비강의 상부 제3부에 비내로 추가적으로 분산 및 적용될 수 있다. 본 발명의 일부 측면에서, 상기 방법은 각각의 치료세포 및/또는 이의 약학 조성물의 비강의 상부 제3부에의 전달 장치에 의한 투여를 포함한다. 비내 약물 전달은 단위 용량 용기, 펌프 스프레이, 적하기, 압축병, 무공기 및 무보존제 스프레이, 분무기(액체 약물을 에어로졸 미립자 형태로 변화시키는데 사용되는 장치), 계량 흡입기 및 가압 계량 흡입기를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 일부 측면에서, 정확한 유효량은 직접 비강의 상부 제3부 내 또는 상에 존재하는 생접착성 패치(patch) 내에 함유된다.

[0149] 치료세포 및/또는 본 발명의 치료세포 및/또는 치료 조성물의 구성성분을 포함하는 약학 조성물은 가압 팩 또는 분무기(nebulizer) 및 디클로로디플루오로메탄, 트리클로로플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로에탄, 탄화수소, 압축공기, 질소 또는 이산화탄소를 포함하나, 이에 제한되지는 않는 적절한 분사제(propellant)를 사용하여 에어로졸 스프레이의 형태로 비강의 상부 제3부에 편리하게 전달될 수 있다. 에어로졸 시스템은 분사제가 치료세포 및/또는 약학 조성물에 대하여 불활성(inert)일 것이 요구되며, 이는 당업자에게 용이하게 인식된다. 가압 에어로졸의 경우에서, 용량 단위는 정확한 측정된 양을 전달하는 밸브를 제공함으로써 조절될 수 있다.

[0150] 치료세포 또는 본 발명의 치료세포 및/또는 약학 조성물의 구성성분을 포함하는 약학 조성물을 분말로서 비강의 상부 제3부에 전달하는 방법은 비내 취분 장치(신체의 공간(cavity)안으로 기체, 분말 또는 증기를 불어넣는 장치) 또는 가압 에어로졸 캐니스터(canister)에 의하여 전달되는 미세구와 같은 형태일 수 있다. 취분기(insufflator)는 건조 분말 또는 미세구의 미세하게 분리된 클라우드(cloud)를 생성한다. 취분기는 약학 조성물의 실질적으로 측정된 양의 투여를 담보하는 장치를 가질 수 있다. 분말 또는 미세구는 건조, 공기에서 분산가능한 형태로 투여되어야 한다. 분말 또는 미세구는 분말 또는 미세구를 위한 병 또는 용기를 가진 취분기와 함께 직접 사용될 수 있다. 대안적으로, 분말 또는 미세구는 젤라틴 캡슐 또는 비내 투여에 적합한 기타 단일 용량 장치와 같은 캡슐로 충전될 수 있다. 취분기는 캡슐을 파쇄 개봉하는 니들(needle) 및 분말 조성물의 제트(jet)가 비강의 상부 제3부에 전달될 수 있도록 하는 홀(hole)을 제공하는 기타 장치를 가질 수 있다. 이러한 구현예에서, 치료세포는, 비내 점막의 후속하는 재수화와 함께, 탈수 및/또는 동결건조될 수 있다.

[0151] **간헐적 및 주기적 투여**

[0152] 본 발명의 다양한 구현예에서, 치료세포 및/또는 유효량의 치료세포 및/또는 약학 조성물의 구성성분을 포함하는 약학 조성물은 단일 및 일회용량으로 투여될 수 있거나, 또는 대안적으로 치료세포 및/또는 약학 조성물의 구성성분은 1 회 이상 및 간헐적으로 투여될 수 있다. "간헐적 투여"는 그 후 불연속(discontinuance)의 기간이 있고, 그 후 다시 유효량의 또 다른 투여가 있는 등의 유효량의 치료세포 및/또는 약학 조성물의 구성성분의 투여를 의도한다. 유효량의 치료세포 및/또는 약학 조성물의 구성성분의 투여는 연속적인 방법, 예컨대 방출 조절 제형으로서 달성될 수 있거나, 바람직한 일일 투여량 요법, 예컨대, 하루 당 1, 2, 3 또는 그 이상의 투여에 의하여도 달성될 수 있다. "불연속의 기간"은 치료세포 및/또는 약학 조성물의 구성성분의 연속적인 방출 조절 또는 일일투여의 불연속을 의미한다. 불연속의 기간은 연속적인 방출조절 또는 일일투여의 기간보다 장기 또는 단기일 수 있다. 불연속의 기간 동안에, 관련 조직에서의 치료세포 및/또는 약학 조성물의 구성성분 수준은, 실질적으로 치료 동안의 얻어지는 최대 수준 미만이다. 불연속 기간의 바람직한 길이는 유효 용량의 농도 및 사용되는 치료세포 및/또는 치료세포의 구성성분의 형태에 의존한다. 불연속 기간은 2 일 이상, 바람직하게는 4 일 이상, 더욱 바람직하게는 1 주 이상일 수 있으며, 일반적으로 4 주를 초과하지 않는다. 방출 조절 제형이 사용되는 경우, 불연속 기간은 손상 부위에서 조절제의 더 큰 잔류 시간을 위하여 연장되어야만 한다. 대안적으로, 유효량의 방출조절 제형의 투여의 빈도는 따라서 감소될 수 있다. 치료세포 및/또는 약학 조성물의 구성성분의 투여의 간헐적인 일정은 바람직한 치료 효과 및 질병의 궁극적인 치료가 달성될 때까지 계속될 수 있다.

[0153] 또 다른 구현예에서, 유효량의 치료세포 및/또는 약학 조성물의 구성성분의 간헐적 투여는 주기적이다. "주기적"이라 함은 약 1 달 내지 약 2, 3, 4, 5 또는 6 월의 범위의 주기를 갖는 투여의 휴식(break)이 동반되는 간

혈적 투여를 의미한다. 예를 들면, 투여 일정은, 단일의 단기 용량이 4 주 동안 주당 1 회로 주어지고, 그 후 3 월의 기간 동안 간헐적인 투여의 휴식이 따르며, 그 후 4 주 동안 주당 1 회로 단일 단기용량의 투여의 간헐적 투여가 따르고, 3 주의 기간 동안 간헐적 투여의 휴식이 따르는 등의 유효량의 치료세포 및/또는 약학 조성물의 구성성분의 간헐적 투여일 수 있다. 다른 예에서, 단일 단기용량은 2 주 동안 주당 1 회로 주어지고, 1 달의 기간 동안 간헐적인 투여의 휴식이 따르며, 2 주 동안 주당 1 회로 단일 단기용량이 따르고, 다시 1 달의 기간 동안 간헐적인 투여의 휴식이 따르는 동일 수 있다. 치료세포 및/또는 약학 조성물의 구성성분의 투여의 주기적 간헐적 일정은 바람직한 치료 효과 및 장애 또는 질병의 궁극적 치료가 달성될 때까지 계속될 수 있다.

[0154]

치료세포 발달을 조절하고 이에 의하여 치료중인 신경 장애의 임상적 소견을 감소 또는 예방하기 위한 의도로서, 하나 또는 그 이상의 치료학적 유효량의 하나 이상의 조절제의 비내 투여가 본 발명의 치료세포 및/또는 약학 조성물의 최초 적용의 분, 시간, 일, 또는 심지어 주 내에 일어날 수 있다. 예를 들면, 최초의 치료학적 용량의 하나 이상의 조절제는 약 2 내지 4 시간 내, 약 2 내지 6 시간 내, 약 8 시간 내, 약 10 시간 내, 약 15 시간, 약 24 시간, 약 36 시간 내, 48 시간, 72 시간, 또는 약 96 시간, 또는 본 발명의 치료세포 및/또는 약학 조성물의 더 장기의 후속 적용에 투여될 수 있다. 하나 또는 그 이상의 조절제의 추가적인 용량은 최초 용량에 이은 시간, 일 또는 주 동안 투여될 수 있다. 또한, 본 발명의 구현예에 따라 세포 대체 재생 치료법을 경험하는 동물은 환자 관리(care) 전략에 따른 시간 동안 간헐적으로 추가적인 조절제 및/또는 치료세포 및/또는 약학 조성물이 투여될 수 있다. 따라서, 예컨대, 세포 대체 치료법을 경험하는 동물은 최초 적용 전, 동안 또는 후에 하나 또는 그 이상의 치료학적 유효량의 조절제, 치료세포 및/또는 이의 본 발명에 따른 약학 조성물을 투여받을 수 있다. 유사하게, 전달강화제, 면역억제제 및/또는 항생제가 본 발명의 치료세포 및/또는 약학 조성물의 최초 적용 전, 동안 또는 후에 투여될 수 있다. 본원에 제공된 간헐적 및 주기적 투여 체계/framework)는 오직 대표적 예인 것이고 이에 제한하려는 어떠한 의도도 아니다. 당업자는 각각의 경우에 대한 다양한 투여 체계/빈도를 인식할 수 있으며, 이러한 각각의 투여 체계/빈도는 본 발명의 범위 내에 있다.

[0155]

제조물품 및 제조방법

[0156]

본 발명은 비강의 상부 제3부로의 비내 투여 및 연속하는 뇌-혈관 장벽의 통과 및 CNS 로의 이동을 위한, 치료 세포 및/또는 본 발명에 의한 치료세포 및/또는 약학 조성물의 구성성분을 포함하는 약학 조성물을 제공하는 제조물품을 또한 포함한다. 상기 제조물품은 본 발명 방법에 적절한 조성물을 건조 또는 액체 형태의 임의의 담체와 함께 함유하는 바이알 또는 기타 용기를 포함할 수 있다. 상기 제조물품은, 본 발명의 방법을 수행하기 위한 용기 상의 라벨(label) 형태 및/또는 용기가 포장되어 있는 박스 내에 포함된 삽입 형태의 지시서(instruction)를 추가적으로 포함한다. 상기 지시서는 바이알이 포장되어 있는 박스 상에 인쇄될 수도 있다. 상기 지시서는, 검체 또는 근로자가 치료세포 및/또는 본 발명의 치료세포 및/또는 약학 조성물의 구성성분을 포함하는 약학 조성물을 투여할 수 있도록 충분한 용량 및 투여 정보와 같은 정보를 포함할 수 있다. 당해 분야에서의 근로자는 치료세포 및/또는 본 발명의 치료세포 및/또는 약학 조성물의 구성성분을 포함하는 약학 조성물을 투여할 수 있는 임의의 의사, 간호사, 기술자, 배우자 또는 기타 간병인(care-giver)을 포함하는 것으로 여겨진다. 치료세포 및/또는 약학 조성물의 구성성분은 검체에 의하여 자가투여될 수도 있다.

[0157]

본 발명은 하기의 실시예를 참조하여 보다 잘 이해될 수 있다. 이러한 실시예들은 본 발명의 특정 구현예를 대표하는 의도일 뿐, 본 발명의 범위를 제한하고자 하는 의도는 아니다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0158]

실시예

[0159]

실시예 1 - 파킨슨병의 래트(rat) 모델에서, 비강의 상부 제3부에 비내 적용된 후 뇌-혈관 장벽을 통과하는 치료세포

[0160]

본 발명자들은 건강한 설치류(마우스 및 래트) 및 파킨슨병의 모델을 만들어내는 6-OHDA 로 치료되는 래트에 의하여 치료세포가 실제로 뇌-혈관장벽을 통과할 수 있다는 가설을 시험하였다. 본 실시예에서, 중배엽 줄기세포, 즉, 진핵세포를 성체인 건강한 마우스 및 파킨슨병을 가진 환자의 손상 및/또는 퇴화 CNS 를 모형화하는 6-하이드록시도파민(6-OHDA) 편측 병변된 래트의 비강의 상부 제3부에 비내로 투여하였다. 추가적으로, 신경아교종 세포를 신생의(young) 건강한 래트의 비강의 상부 제3부에 비내로 투여하였다. 하나의 (1) 투여/적용의 시간 내에, 두 세포 형태 모두 건강한 동물의 후각 망울, 피질, 해마, 선조체 및 소뇌에 도달하였다. 파킨슨병의 6-OHDA 래트 모델에서 세포는 투여 4 시간 후에 검출되었다. 세포가 양 경우 모두에서 한 시간 이내에 뇌에 도달한 것으로 보인다. 세포가 체관을 통과한 후에, 두 개의 이동 경로가 관찰되었다: (1) 후각 망울 및

또한 피질 및 선조체를 포함하는 뇌의 기타 부위로의 이동; 및 (2) 피질의 표면을 따른 이동과 함께 뇌척수액의 유입과 이에 이은 뇌 실질로의 유입.

[0161] **실시예 2 - 비강의 상부 제3부에 비내 적용에 이은 치료세포의 전달에 대한 전달강화제의 효과**

[0162] 7 주령 C57 b1/6 마우스의 비강의 상부 제3부로 CFDA 또는 획스트(Hoechst) 염료로 표지된 래트 증배엽 줄기세포(MSCs)의 비내 적용 후, 이에 따라 치료세포의 투여 및 적용 및 전달에서 뇌-혈관 장벽을 통과한 후에 뇌로의 치료세포의 비내 전달에 대해서 그 효과를 평가하였다.

[0163] 최초에, 상기 동물들을 3 개의 군(각각의 군에서 n = 5)으로 나누었다: 1) 오직 비내로 치료세포를 투여받은 A 군; 2) 세포의 비내 적용 전에 비내로 30 분 전달강화제 히알루론산분해효소를 투여받은 B 군; 3) 비내로 (24 μl PBS) 운반체를 투여받은 C 군. 세포의 적용 한 시간 후에, 상기 동물들을 마취 하에 희생(sacrifice)시키고, 두개골을 -80°C 에서 동결시킨 후, DAPI 또는 PI 함유 배지로 고정된 시상(sagittal) 또는 수평(horizontal) 슬라이스 (20 μm)로 절단하고, 형광 현미경에 의하여 분석하였다.

[0164] 세포 표지된 획스트 염료는 비내로 치료세포 단독으로 전달된 A 군 동물의 측뇌실의 벽 및 주변, 및 소뇌에서 후각 망울, 선조체, 피질의 모든 층에서 나타났다. 후각 망울에서, 상기 세포는 A 및 B 군 동물의 모든 층에 걸쳐서 분포되었다. 히알루론산분해효소(B 군에서 100 U/동물)의 비내 투여는, A 군으로부터의 결과와 비교하여 볼 때, 뇌, 특히 후각 망울에서의 MSCs 의 수를 증가시켰다.

[0165] A 및 B 군에서의 상이한 피질층에서 MSCs 의 분포는 치료세포의 표면으로부터 실질로의 이동을 암시한다. 수많은 세포가 피질의 상층에 이미 도달한 MSCs 와 매우 인접한 지주막하 공간에 위치하였다. 이러한 세포의 일부는 그 분화에서의 진행을 암시하는 과정을 가졌다. 비내 접막에서 체관을 통한 뇌로의 치료세포 이동을 지시하는 적용 1 시간 후에 상부 비강(도2D의 화살표)에 잔류하는 다량의 비내 적용된 CFDA-표지 MSCs 는 수시간 및 아마도 심지어 수일 동안 지속될 가능성이 있다.

[0166] 피질의 표면으로부터 보다 심층으로의 세포의 단계적 이동이 특정 밀도의 세포가 하나의 층에 도달한 후에 관찰되었으며; 보다 심층의 세포의 응집체가 피질의 표면에 보다 가깝게 위치한 세포 열(row)의 단지 근처에 나타났다.

[0167] **실시예 3 - 비강의 상부 제3부의 비내 적용에 이은 CNS 내 병변으로의 치료세포의 표적화된 이동**

[0168] 실시예 2 에서 획득 및 상기 기재된 결과가 피질, 후각 망울 및 소뇌 외에 비내로 적용된 치료세포가 선조체 영역에 또한 나타난다는 것을 보여주었으므로, 본 발명자들은 성체 래트에서 6-OHDA 로 편측 병변된 모델을 사용하여 신경퇴화가 적용된 세포의 병변된 면으로의 이동을 표적화하는지 여부를 조사하기로 결정하였다.

[0169] 파킨슨 형 모델을 유도하기 위한 신경독소 6-하이드록시도파민(6-OHDA)의 편측 주사(좌측 반구)에 의하여 선조체 손상이 성체 래트에서 유도되었다. 상기 세포를 2 개의 군의 동물(각각에서 n = 5)로 적용하였다: 병변 3 일 후에 세포의 비내 투여 전에 30 분의 비내 히알루론산분해효소 치료(200 U/동물) 과정이 없는 것 1) 또는 있는 것 2). 동물의 뇌는 세포의 적용 4 시간 후에 제거하였으며, -80°C 에서 동결하였다. 6-OHDA-병변 후 좌측(병변된) 선조체에서의 퇴화적 변화를 보여주기 위하여, 각각의 동물로부터의 10 개의 수평 슬라이스를 티로신 가수분해효소(TH)로 염색된 브레그마(bregma)로부터의 5 mm 내지 8 mm 의 부위에서 취하였다.

[0170] 비병변된 면에서 TH 에 의한 거의 모든 선조체의 강력한 염색과 대조적으로, 병변된 면에서의 TH 의 발현은 분명히 감소하였다. 형광 현미경을 사용한 뇌 슬라이스의 선별(screening)은 병변된 면 및 맞은편 면 사이의 세포의 수에서 주목할 만한 차이점을 드러냈다: 대다수의 CFDA 표지된 MSCs 는 후각 망울(OB), 병변의 수준에서의 피질 및 병변된 선조체 내에서 발견된 반면, 반면에 단지 매우 적은 세포가 반대쪽 반구의 선조체, 피질 및 OB 에서 발견되었다. 일부 MSCs 가 TH 로 염색된 슬라이스에서 때로는 발견되었다: 흥미롭게도 매우 적은 MSCs 가 OB 발현 TH 에서 발견된 반면, 병소에 인접한 피질에 위치하는 대다수의 세포는 TH-양성이었다.

[0171] 이러한 결과는 6-OHDA-병변 설치류에서 병변의 부위에 대한 표적화된 줄기 세포 선호 이동의 증거를 제공한다. 또한, 골수 줄기세포의 뇌로의 보다 양호한 전달이 본 발명의 구현예를 사용하여 비병변된 면에서의 것과 비교하여 병변된 반구에서 보여진다.

[0172] **실시예 4 - 파킨슨 모델에서 비강의 상부 제3부의 비내 적용에 이은 뇌-혈관 장벽을 통과하는 종양세포를 포함하는 치료세포**

[0173] 본 발명은 치료세포 뿐만 아니라 종양세포도 비내 투여 후에 뇌로 전달될 수 있는지 여부를 조사하였다. 인간

Phi-황색 및 CFDA-표지 T406 신경아교종 세포의 10 일령 래트 (n = 5) 의 비강의 상부 제3부로의 비내 투여를 수행하였다. 투여 1 시간 후에, 상기 동물을 희생시켰다. 동물의 전체 두부(두개골 및 뇌 포함)의 시상 절단(20 μm)을 형광 현미경으로 가공하였다. CFDA-표지 신경아교종 세포를 비강, 체관, 후각 망울, 전두 피질 및 해마 부위에서 검출하였다.

[0174] 본 발명에서, 진행 세포(줄기세포 뿐만 아니라 종양세포)의 설치류의 무손상 및 병변된 뇌로의 비내 전달을 제시하였다. 뇌 종양은 비정상적 또는 비제어된 세포 분열로부터 생긴 두개내 종양으로 이루어진다. 이는 뇌, 수막, 뇌신경 또는 중추신경계의 혈관 또는 림프관에서 발생할 수 있다. 대부분의 일차적 뇌 종양은 어린이의 후두개와(posterior cranial fossa) 및 성인의 대뇌반구의 앞부분에서 발생한다. 소아 뇌 종양은 소아암의 약 1/4 를 구성한다. 미국에서 매년 약 10,000 이상이 뇌 종양 때문에 사망하고 있다. 가장 1 차적인 뇌 종양은 중추신경계의 아교종 세포로부터 비롯된다. 그러나, 신체 내 어느 부위에서의 암으로부터 발달하고 뇌로 전이하는 2 차적인 뇌 종양이 훨씬 더 통상적이다. 암은 폐, 피부, 신장, 유방, 결장 및 기타 기관으로부터 뇌로 전이할 수 있다.

[0175] 대부분의 화학요법제는 뇌-혈관 장벽을 용이하게 통과하지 않으므로 뇌 종양은 치료하기가 어려우며, 호흡, 심장 기능 등과 같은 중요한 자율신경 기능을 제어하는 뇌의 부위에 인접한 위치 때문에, 특정 형태의 뇌 종양, 예컨대 뇌간 신경아교종을 안전하고 성공적으로 제거하는 것은 가능하지 않다.

[0176] 최근, 뇌 종양에 대한 새로운 치료법을 개발 및 시험하는 연구자들은 신약을 시험하는데 사용될 수 있는 동물 뇌 종양 모델을 만들기 위하여 종양세포를 동물의 뇌에 외과적으로 이식할 필요가 있다. 본 발명자들은 본원에서 종양세포가 이들을 비강의 상부 제3부에 투여함으로써 비침습적으로 뇌에 도입될 수 있으며, 히알루론산분해효소 및 기타 약제가 이러한 과정을 촉진하는데 사용될 수 있음을 밝혀냈다. 따라서 본 실험예들은, 본 발명의 구현예를 사용하여 신경수술 및 종양 세포의 직접 삽입과 연관되는 문제점 없이, 뇌 종양 모델이 비침습적으로 제조될 수 있음을 보여준다.

[0177] 본 발명은 다양하고 구체적이며 바람직한 구현예 및 기술들로 기재되었다. 그러나, 다수의 변화 및 변형들이 본 발명의 범위를 벗어나지 않으면서 가해질 수 있음이 이해되어야만 한다.