



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0065478
(43) 공개일자 2009년06월22일

(51) Int. Cl.

A61K 35/12 (2006.01) *C12N 5/06* (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01) *A61P 29/00* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-7025380

(22) 출원일자 2008년10월17일

심사청구일자 **없음**

번역문제출일자 2008년10월17일

(86) 국제출원번호 PCT/US2007/020724

국제출원일자 2007년09월26일

(87) 국제공개번호 WO 2008/042174

국제공개일자 2008년04월10일

(30) 우선권주장

11/541,853 2006년10월02일 미국(US)

(71) 출원인

오시리스 셰라퓨틱스, 임크.

미국 21231 메릴랜드주 벌티모어 앤리스안나 스트리트 2001

(72) 별명자

피텐거, 마크

미국 21146 메릴랜드주 세버나 파크 사우쓰웨이 스트리트 108

아가왈, 수딥타

미국 21043 메릴랜드주 엘리콧 씨티 리체스터 드 라이브 5167

바니, 티모시

미국 21229 메릴랜드주 벌티모어 #101 아리온 파크 로드 100

(74) 대리인

양영준, 양영환

전체 청구항 수 : 총 32 항

(54) 중간엽 줄기 세포 및 그에 대한 용도

(57) 요약

동물에게 효과적인 양으로 중간엽 줄기 세포를 투여하여 동물에서 자가 면역 질환, 알레르기 반응, 암, 또는 염증 질환을 치료하고, 상처 치유를 촉진시키고, 상피 손상을 수복시키고, 동물의 기관과 조직에서 혈관형성을 촉진시키는 방법.

특허청구의 범위

청구항 1

동물에게 중간엽 줄기 세포를 동물의 심장 이외의 기관 또는 조직에서의 혈관형성을 촉진시키는데 효과적인 양으로 투여하는 것을 포함하는, 동물의 심장 이외의 기관 또는 조직에서의 혈관형성을 촉진시키는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 동물이 포유동물인 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 포유동물이 영장류인 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 영장류가 인간인 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 중간엽 줄기 세포가 약 1×10^5 세포/kg 내지 약 1×10^7 세포/kg의 양으로 투여되는 것인 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 중간엽 줄기 세포가 약 1×10^6 세포/kg 내지 약 5×10^6 세포/kg의 양으로 투여되는 것인 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 중간엽 줄기 세포가 전신투여되는 것인 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 중간엽 줄기 세포가 정맥내로 투여되는 것인 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 중간엽 줄기 세포가 직접적인 주사에 의해 상기 동물의 심장 이외의 기관 또는 조직으로 투여되는 것인 방법.

청구항 10

동물에게 중간엽 줄기 세포를 동물에서 자가 면역 질환 및 이식편대 숙주로 구성된 군으로부터 선택되는 질환을 치료하는데 효과적인 양으로 투여하는 것을 포함하는, 동물에서 자가 면역 질환 및 이식편대 숙주로 구성된 군으로부터 선택되는 질환을 치료하는 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 동물이 포유동물인 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 포유동물이 인간인 방법.

청구항 13

제10항에 있어서, 질환이 다발경화증인 방법.

청구항 14

동물에게 중간엽 줄기 세포를 동물에서 염증 반응을 치료하는데 효과적인 양으로 투여하는 것을 포함하는, 동물에서 염증 반응을 치료하는 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 동물이 포유동물인 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 포유동물이 인간인 방법.

청구항 17

제14항에 있어서, 염증 반응이 건선과 관련된 것인 방법.

청구항 18

동물에게 중간엽 줄기 세포를 동물에서 암을 치료하는데 효과적인 양으로 투여하는 것을 포함하는, 동물에서 암을 치료하는 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 동물이 포유동물인 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 포유동물이 인간인 방법.

청구항 21

동물에게 중간엽 줄기 세포를 동물에서 알레르기성 질환 또는 장애를 치료하는데 효과적인 양으로 투여하는 것을 포함하는, 동물에서 알레르기성 질환 또는 장애를 치료하는 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, 동물이 포유동물인 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 포유동물이 인간인 방법.

청구항 24

제14항에 있어서, 알레르기성 질환 또는 장애가 관절염인 방법.

청구항 25

동물에게 중간엽 줄기 세포를 동물에서 상처 치유를 촉진시키는데 효과적인 양으로 투여하는 것을 포함하는, 동물에서 상처 치유를 촉진시키는 방법.

청구항 26

제25항에 있어서, 동물이 포유동물인 방법.

청구항 27

제26항에 있어서, 포유동물이 인간인 방법.

청구항 28

동물에게 중간엽 줄기 세포를 동물에서 섬유증을 예방하는데 효과적인 양으로 투여하는 것을 포함하는, 동물에서 섬유증을 예방하는 방법.

청구항 29

동물에게 중간엽 줄기 세포를 동물에서 상피 손상을 수복시키는데 효과적인 양으로 투여하는 것을 포함하는, 동

물에서 상피 손상을 수복시키는 방법.

청구항 30

제29항에 있어서, 동물이 포유동물인 방법.

청구항 31

제30항에 있어서, 포유동물이 인간인 방법.

청구항 32

제29항에 있어서, 상피 손상이 이식편대 숙주 질환의 결과인 방법.

명세서

기술 분야

- <1> 본 발명은 해군성에 의하여 재정된 계약 번호 N66001-02-C-8068하에서 정부의 지원으로 만들어졌다. 정부는 본 발명에 대한 일정 권리를 갖는다.
- <2> 본 출원은, 2004년 3월 22일 출원된 가출원 시리얼 번호 제60/555,118호 (상기 내용 전문이 본원에서 참고로 인용된다)에 기초한 우선권을 주장하는 2005년 3월 15일 출원된 출원 시리얼 번호 제11/080,298호의 일부계속출원이다.
- <3> 본 발명은 중간엽 줄기 세포에 관한 것이다. 더욱 특히, 본 발명은 다양한 조직과 기관에서 혈관형성을 촉진시키고, 자가 면역 질환을 치료하고, 알레르기 반응을 치료하고, 암을 치료하고, 염증 질환 및 장애를 치료하고, 상처 치유를 촉진시키고, 염증을 치료하고, 상피 손상을 수복시키는 것을 비롯한, 중간엽 줄기 세포에 대한 신규의 용도에 관한 것이다.

배경기술

- <4> 중간엽 줄기 세포(MSC)는 골모세포, 근육세포, 연골세포, 및 지방세포를 비롯한 계통으로 쉽게 분화될 수 있는 다능성 줄기 세포이다 (문헌 ([Pittenger, et al., Science. Vol. 284, pg. 143 (1999)]; [Haynesworth, et al., Bone. Vol. 13, pg. 69 (1992)]; [Prockop, Science. Vol. 276, pg. 71 (1997)]). 시험관내 연구를 통해 MSC가 근육 (문헌 [Wakitani, et al., Muscle Nerve. Vol. 18, pg. 1417 (1995)]), 뉴런-유사 전구체 (문헌 ([Woodbury, et al., J. Neurosci. Res.. Vol. 69, pg. 908 (2002)]; [Sanchez-Ramos, et al., Exp. Neuro., Vol. 171, pg. 109 (2001)])), 심근세포 (문헌 ([Toma, et al., Circulation. Vol. 105, pg. 93 (2002)]; [Fakuda, Artif. Organs. Vol. 25, pg. 187 (2001)])) 및 가능한 기타 세포 유형으로 분화될 수 있는 능력이 입증되었다. 추가로, MSC는 조혈 및 배아 줄기 세포 확장을 위한 효과적인 영양 세포층을 제공하는 것으로 나타났다 (문헌 ([Eaves, et al., Ann. N.Y. Acad. Sci.. Vol. 938, pg. 63 (2001)]; [Wagers, et al., Gene Therapy. Vol. 9, pg. 606 (2002)])). 각종 동물 모델을 사용한 최근 연구에서는 MSC가 손상된 뼈, 연골, 반월상 연골 또는 심근 조직의 수복 또는 재생에 유용할 수 있다고 제시되었다 (문헌 ([DeKok, et al., Clin. Oral Implants Res.. Vol. 14, pg. 481 (2003)]; [Wu, et al., Transplantation, Vol. 75, pg. 679 (2003)]; [Noel, et al., Curr. Opin. Investig. Drugs, Vol. 3, pg. 1000 (2002)]; [Ballas, et al., J. Cell. Biochem. Suppl., Vol. 38, pg. 20 (2002)]; [Mackenzie, et al., Blood Cells Mol. Pis.. Vol. 27 (2002)])). 여러 연구자들은 MSC를 사용하여 불완전골형성증 (문헌 [Pereira, et al., Proc. Nat. Acad. Sci.. Vol. 95, pg. 1142 (1998)]), 파킨슨증 (문헌 [Schwartz, et al., Hum. Gene Ther.. Vol. 10, pg. 2539 (1999)]), 척수 손상 (문헌 ([Chopp, et al., Neuroreport, Vol. 11, pg. 3001 (2000)]; [Wu, et al., J. Neurosci. Res.. Vol. 72, pg. 393 (2003)])) 및 심장 장애 (문헌 ([Tomita, et al., Circulation. Vol. 100, pg. 247 (1999)]; [Shake, et al., Ann. Thorac. Surg., Vol. 73, pg. 1919 (2002)]))를 비롯한 동물 질환 모델에서 유망한 이식 결과를 얻었다. 중요하게는 불완전골형성증 (문헌 ([Horwitz, et al., Blood. Vol. 97, pg. 1227 (2001)]; [Horowitz, et al. Proc. Nat. Acad. Sci. Vol. 99, pg. 8932 (2002)])) 및 이종 골수 이식의 착상 증진 (문헌 [Frassoni, et al., Int. Society for Cell Therapy. SA006 (abstract) (2002)]; [Koc, et al., J. Clin. Oncol.. Vol. 18, pg. 307 (2000)]))에 대한 임상 시험에서 기대할만한 결과도 보고되어 있다.

<5> MSC는 그의 표면 상에 주조직 적합 복합체(MHC) I형 항원을 발현하지만, MHC II형 항원 (문헌 ([Le Blanc, et al., Exp. Hematol. Vol. 31, pg. 890 (2003)]; [Potian, et al., J. Immunol. Vol. 171, pg. 3426 (2003)]) 및 어떤 B7 또는 CD40 공-자극 분자 (문헌 [Majumdar, et al., J. Biomed. Sci. Vol. 10, pg. 228 (2003)])도 발현하지 못하는데, 이는 이를 세포가 면역원성이 낮은 표현형을 갖는다는 것을 제안하다 (문헌 [Tse, et al., Transplantation. Vol. 75, pg. 389 (2003)]). MSC는 또한 MHC-독립적인 방식으로 T-세포 증식 반응을 저해한다 (문헌 ([Bartholomew, et al., Exp. Hematol. Vol. 30, pg. 42 (2002)]; [Devine, et al., Cancer J. Vol. 7, pg. 576 (2001)]; [DiNicola, et al., Blood. Vol. 99, pg. 3838 (2002)])). MSC의 이러한 면역학적 성질이 그의 이식 착상을 증진시킬 수 있고, 이식 후 수혜자의 면역계가 동종이형의 세포를 인식하고 거절할 수 있는 능력을 제한할 수 있다. 국소 자극하에 적절한 세포 유형으로 분화될 수 있는 MSC의 능력과 함께, MSC가 면역 반응을 조절하고 조혈을 지원하는 인자를 생산함으로써 이는 세포 이식 연구용으로서 바람직한 줄기 세포가 될 수 있다 (문헌 ([Majumdar, et al., Hematother. Stem Cell Res.. Vol. 9, pg. 841 (2000)]; [Haynesworth, et al., J. Cell. Physiol.. Vol. 166, pg. 585 (1996)])).

발명의 상세한 설명

<6> 이에, 출원인들은 중간엽 줄기 세포와, 가지 세포 (DC1 및 DC2), 효과기 T-세포(Th1 및 Th2) 및 NK 세포를 비롯한 단리된 면역 세포 군집과의 상호작용을 연구하였다. 그러한 상호작용에 기초하여, 출원인들은 중간엽 줄기 세포가, 면역 반응 과정에서 여러 단계를 조절할 수 있는 다양한 인자들의 생산을 조절할 수 있다는 것을 발견하게 되었다. 따라서, 중간엽 줄기 세포는 면역계가 관련된 질환, 용태, 및 장애, 또는 염증, 상피 손상, 또는 알레르기 반응이 관련된 질환, 용태, 및 장애 치료에 사용될 수 있다. 그러한 질환, 용태, 및 장애로는 자가 면역 질환, 알레르기, 관절염, 염증 상처, 원형탈모증 (대머리), 치은염 및 치주염을 비롯한 치주 질환, 및 면역 반응이 관련된 기타 질환, 용태, 및 장애를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

<7> 추가로, 중간엽 줄기 세포는 새로운 혈관의 형성을 자극함으로써 혈관형성을 촉진시키는 혈관 내피 성장 인자 (또는 VEGF)를 발현하고 분비한다고 여겨진다. 중간엽 줄기 세포는 또한 말초 혈액 단핵구 세포(PBMC)를 자극하여 VEGF를 생산한다.

<8> 추가로, 중간엽 줄기 세포는 가지 세포(DC)를 자극하여 종양 억제와 바이러스 감염에 대한 면역을 촉진시키는 인터페론-베타(IFN- β)를 생산하는 것으로 여겨진다.

<9> 본 발명의 하나의 측면에 따라 동물에서 자가 면역 질환 및 이식편대 숙주 질환으로 구성된 군으로부터 선택되는 질환을 치료하는 방법을 제공한다. 본 방법은 동물에게 중간엽 줄기 세포를 동물의 상기 질환을 치료하는데 효과적인 양으로 투여하는 것을 포함한다.

<10> 비록 본 발명의 상기 측면의 범주가 어떤 이론적인 논거로 제한되는 것은 아니지만, 중간엽 줄기 세포가 자가 면역 질환 및 이식편대 숙주 질환을 억제시키는 1 이상의 기작은 조절 T-세포(T_{reg} 세포) 및/또는 가지 세포(DC)로부터 인터루킨-10(IL-10)을 방출시킴으로써 이루어지는 것으로 여겨진다.

<11> 본 발명에 따라 치료될 수 있는 자가 면역 질환으로는 I형 당뇨병, 류마티스 관절염, 포도막염, 자가면역 갑상선 질환, 염증성 장 질환, 공피증, 그레이브스병, 루프스, 크론병, 자가면역 림프세포증식성 질환(ALPS), 탈수 초성 질환, 자가면역 뇌척수염, 자가면역 위염(AIG), 및 자가면역 사구체 질환을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 또한, 상기 언급한 바와 같이, 이식편대 숙주 질환이 치료될 수 있다. 그러나, 본 발명의 범주를 본원에서 언급한 특정 질환 치료로 제한하려는 것이 아님을 이해하여야 한다.

<12> 하나의 실시태양에서, 중간엽 줄기 세포가 투여되는 동물은 포유동물이다. 포유동물은 인간 및 비인간 영장류를 비롯한, 영장류일 수 있다.

<13> 일반적으로, 중간엽 줄기 세포(MSC) 요법은 예를 들면, 하기 순서에 기초한다: MSC-함유 조직 수거, MSC의 단리 및 확장, 및 MSC를 생화학적으로 또는 유전적으로 조작하거나, 하지 않고 동물에게 투여.

<14> 투여되는 중간엽 줄기 세포는 균질 조성물일 수 있거나, MSC를 농축한 혼합된 세포 군집일 수 있다. 균질 중간엽 줄기 세포 조성물은 부착성 클러스터 또는 클러스터 세포를 배양함으로써 수득할 수 있고, 중간엽 줄기 세포는 독특한 모노클로날 항체로 동정되는 특이 세포 표면 마커에 의해 동정될 수 있다. 중간엽 줄기 세포를 농축한 세포 군집을 수득하는 방법은 예를 들면, 미국 특허 번호 제5,486,359호에 기술되어 있다. 중간엽 줄기 세포에 대한 대체 공급원으로는 혈액, 피부, 제대혈, 근육, 지방, 뼈, 및 연골막을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- <15> 중간엽 줄기 세포는 다양한 방법에 의해 투여될 수 있다. 중간엽 줄기 세포는 예를 들면, 정맥내, 동맥내, 또는 복강내 투여와 같이 전신 투여될 수 있다.
- <16> 중간엽 줄기 세포는 자가, 동종이형, 또는 이종을 비롯한, 각종 공급원으로부터 유래될 수 있다.
- <17> 중간엽 줄기 세포는 동물에서 자가 면역 질환 또는 이식편대 숙주 질환을 치료하는데 효과적인 양으로 투여된다. 중간엽 줄기 세포는 약 1×10^5 세포/kg 내지 약 1×10^7 세포/kg의 양으로 투여될 수 있다. 또 다른 실시태양에서, 중간엽 줄기 세포는 약 1×10^6 세포/kg 내지 약 5×10^6 세포/kg의 양으로 투여된다. 중간엽 줄기 세포의 투여량은 환자의 연령, 체중, 및 성별, 치료하고자 하는 자가 면역 질환, 및 그의 정도 및 중증도를 비롯한 다양한 인자에 따라 달라진다.
- <18> 중간엽 줄기 세포는 허용가능한 약제학적 담체와 함께 투여될 수 있다. 예를 들면, 중간엽 줄기 세포는 주사용 또는 국소용의 약제학적으로 허용가능한 액체 매질 또는 젤 중 세포 혼탁액으로서 투여될 수 있다.
- <19> 본 발명의 다른 측면에 따라, 동물에서 염증 반응을 치료하는 방법을 제공한다. 본 방법은 동물에게 중간엽 줄기 세포를 동물의 염증 반응을 치료하는데 효과적인 양으로 투여하는 것을 포함한다.
- <20> 비록 본 발명의 상기 측면의 범주가 어떤 이론적인 논거로 제한되는 것은 아니지만, 중간엽 줄기 세포는 T-세포가 조절 T-세포(T_{reg})로 성숙해지는 것을 촉진시켜 염증 반응을 조절하는 것으로 여겨진다. 또한, 중간엽 줄기 세포가 1형 헬퍼 T 세포(Th1 세포)를 저해함으로써 예를 들면, 건선과 관련된 것과 같은 특정 염증 반응에서 인터페론- γ (IFN- γ)의 발현을 감소시키는 것으로 여겨진다.
- <21> 하나의 실시태양에서, 치료될 수 있는 염증 반응은 건선과 관련된 것이다.
- <22> 또 다른 실시태양에서, 중간엽 줄기 세포는, 중간엽 줄기 세포가 뇌내의 미세아교세포 및/또는 성상세포와 접촉하여 염증을 감소시킴으로써, 그에 의해 중간엽 줄기 세포가 예를 들면, 알츠하이머병, 파킨슨병, 뇌졸중, 또는 뇌 세포 손상과 같은 질환 또는 장애에서 활성화된 아교 세포에 의해 유발된 신경퇴행을 제한할 수 있도록 동물에게 투여될 수 있다.
- <23> 추가의 다른 실시태양에서, 중간엽 줄기 세포는, 중간엽 줄기 세포가 피부 표피내의 각질 세포 및 랑게르ハン스 세포와 접촉하여 건선, 만성 피부염, 및 접촉 피부염에서 발생할 수 있는 것과 같은 염증을 감소시킬 수 있도록 동물에게 투여될 수 있다. 비록 본 실시태양이 어떤 이론적인 논거로 제한되는 것은 아니지만, 중간엽 줄기 세포는 표피내의 각질 세포 및 랑게르ハン스 세포와 접촉할 수 있고, T-세포 수용체의 발현 및 사이토카인 분비 프로파일을 변경시킬 수 있으며, 이를 통해 종양 피사 인자-알파(TNF- α)의 발현을 증가시킬 수 있고, 조절 T-세포(T_{reg} 세포) 군집을 증가시킬 수 있을 것으로 여겨진다.
- <24> 추가의 실시태양에서, 골관절염 및 류마티스 관절염, 및 웹사이트 www.arthritis.org/conditions/diseases에 열거되어 있는 기타 관절염성 질환을 포함하나, 이에 한정되지 않는 관절염 및 관절염-유사 용태에서 발생하는 것과 같은, 골내 염증을 감소시키기 위해 중간엽 줄기 세포가 사용될 수 있다. 비록 본 실시태양의 범주가 어떤 이론적인 논거로 제한되는 것은 아니지만, 중간엽 줄기 세포는 유후액내 기억 T-세포에 의해 인터루킨-17 분비를 저해할 수 있는 것으로 여겨진다.
- <25> 또 다른 실시태양에서, 중간엽 줄기 세포는 염증성 장 질환 및 만성 간염시에 각각 장 및 간에서 염증을 제한하기 위해 사용될 수 있다. 비록 본 발명의 이러한 측면을 어떤 이론적인 논거로 제한하고자 하는 것은 아니지만, 중간엽 줄기 세포가 인터루킨-10(IL-10) 분비 증가 및 조절 T-세포(T_{reg} 세포) 생성을 촉진하는 것으로 여겨진다.
- <26> 또 다른 실시태양에서, 중간엽 줄기 세포는 예를 들면, 화상, 수술, 및 이식을 비롯한 패혈증 및 외상과 같은 병적 용태에서 중성구 및 대식세포의 과도한 활성화를 저해하기 위해 사용될 수 있다. 비록 본 실시태양의 범주가 어떤 이론적인 논거로 제한되는 것은 아니지만, 중간엽 줄기 세포는 예를 들면, IL-10과 같은 억제 사이토카인의 분비를 촉진시키고, 대식세포 이동 저해 인자를 저해하는 것으로 여겨진다.
- <27> 또 다른 실시태양에서, 중간엽 줄기 세포는 예를 들면, 각막, 수정체, 색소 상피, 및 망막을 비롯한 눈, 뇌, 척수, 임산부의 자궁 및 태반, 난소, 정소, 부신 피질, 간, 및 모낭과 같은 면역 특전 부위에서의 염증을 억제하기 위해 사용될 수 있다. 비록 본 실시태양의 범주가 어떤 이론적인 논거로 제한되는 것은 아니지만, 중간엽 줄기 세포는 예를 들면, IL-10과 같은 억제 사이토카인의 분비와 T_{reg} 세포의 생성을 촉진시키는 것으로 여겨진다.

다.

- <28> 추가의 또 다른 실시태양에서, 중간엽 줄기 세포는 투석 및/또는 사구체신염시 말기 신질환(ESRD) 감염과 관련된 조직 손상을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 비록 본 실시태양의 범주가 어떤 이론적인 논거로 제한되는 것은 아니지만, 중간엽 줄기 세포는 신장 수복을 촉진시킬 수 있는 것으로 여겨진다. 중간엽 줄기 세포는 또한 새로운 혈관 형성을 자극하는 혈관 내피 성장 인자 (또는 VEGF)를 발현하고 분비하는데, 이는 손상된 신장 조직의 수복에 도움이 되어야 하는 것이다.
- <29> 추가의 실시태양에서, 중간엽 줄기 세포는 예를 들면, 인플루엔자, C형 간염, 단순 헤르페스 바이러스, 백시니아 바이러스 감염, 및 앰스타인-바 바이러스와 같은 바이러스 감염을 억제하기 위해 사용될 수 있다. 비록 본 실시태양의 범주가 어떤 이론적인 논거로 제한되는 것은 아니지만, 중간엽 줄기 세포는 인터페론-베타(IFN- β)의 분비를 촉진시키는 것으로 여겨진다.
- <30> 추가의 또 다른 실시태양에서, 중간엽 줄기 세포는 예를 들면, 리슈마니아(*Leishmania*) 감염 및 헬리코박터 (*Helicobacter*) 감염과 같은 기생충 감염을 억제하기 위해 사용될 수 있다. 비록 본 실시태양의 범주가 어떤 이론적인 논거로 제한되는 것은 아니지만, 중간엽 줄기 세포는 2형 T 헬퍼(Th2) 세포에 의해 반응을 매개하고, 이로써, β -세포에 의해 면역글로불린 E(IgE)의 생산 증가를 촉진시키는 것으로 여겨진다.
- <31> 그러나, 본 발명의 이러한 측면의 범주가 임의의 특정 염증 반응 치료로 제한되는 것은 아니라는 점을 이해하여야 한다.
- <32> 중간엽 줄기 세포는 본원 상기에 기술되어 있는 바와 같이, 인간 및 비인간 영장류를 비롯한 포유동물에게 투여될 수 있다.
- <33> 중간엽 줄기 세포는 또한 본원 상기에 기술되어 있는 바와 같이, 전신 투여될 수 있다. 별법으로, 골관절염 또는 류마티스 관절염의 경우, 중간엽 줄기 세포는 관절염성 관절에 직접 투여될 수 있다.
- <34> 중간엽 줄기 세포는 동물에서 염증 반응을 치료하는데 효과적인 양으로 투여된다. 중간엽 줄기 세포는 약 1×10^5 세포/kg 내지 약 1×10^7 세포/kg의 양으로 투여될 수 있다. 또 다른 실시태양에서, 중간엽 줄기 세포는 약 1×10^6 세포/kg 내지 약 5×10^6 세포/kg의 양으로 투여된다. 중간엽 줄기 세포의 정확한 투여량은 환자의 연령, 체중, 및 성별, 치료하고자 하는 염증 반응, 및 그의 정도 및 중증도를 비롯한 다양한 인자에 따라 달라진다.
- <35> 중간엽 줄기 세포는 본원 상기에 기술되어 있는 바와 같이, 허용가능한 약제학적 담체와 함께 투여될 수 있다.
- <36> 본 발명의 또 다른 측면에 따라, 동물에서 염증을 치료하고/거나 상피 손상을 수복하는 방법을 제공한다. 본 방법은 동물에게 중간엽 줄기 세포를 동물의 염증 및/또는 상피 손상을 치료하는데 효과적인 양으로 투여하는 것을 포함한다.
- <37> 비록 본 발명의 상기 측면의 범주가 어떤 이론적인 논거로 제한되는 것은 아니지만, 중간엽 줄기 세포가 T-세포에 의한 전염증성 사이토카인 TNF- α 및 인터페론- γ 의 분비를 감소시키고, T-세포에 의한 항-염증성 사이토카인 인터루킨-10(IL-10) 및 인터루킨-4(IL-4)의 분비를 증가시키는 것으로 여겨진다. 또한 중간엽 줄기 세포가 자연살(NK) 세포에 의한 인터페론- γ 의 분비를 감소시키는 것으로 여겨진다.
- <38> 본 발명의 측면에 따라 치료될 수 있는 염증 및/또는 상피 손상으로는 자가 면역 질환, 이식 기관 거부, 화상, 창상, 열상, 및 피부 궤양화 및 당뇨성 궤양화를 비롯한 궤양화를 포함하나, 이에 한정되지 않는 다양한 질환 및 장애에 의해 유발되는 염증 및/또는 상피 손상을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- <39> 하나의 실시태양에서, 중간엽 줄기 세포는, 류마티스 관절염, 크론병, 1형 당뇨병, 다발경화증, 공피증, 그레이브스병, 루프스, 염증성 장 질환, 자가면역 위염(AIG), 및 자가면역 사구체 질환을 포함하나, 이에 한정되지 않는 자가 면역 질환으로부터 유발된 상피 손상을 수복시키기 위하여 동물에 투여된다. 중간엽 줄기 세포는 또한 이식편대 숙주 질환(GVHD)으로부터 유발된 상피 손상을 수복시킨다.
- <40> 본 발명의 이러한 측면은 특히 이식편대 숙주 질환으로부터 유발된 상피 손상을 수복시키는데 적용가능하고, 더욱 특하는 피부 및/또는 위장관계에 악영향을 주는, III 등급 내지 IV 등급 이식편대 숙주 질환을 비롯한 중증 이식편대 숙주 질환으로부터 유발된 상피 손상을 수복시키는데 적용가능하다. 본 출원인들은 종종 이식편대 숙주 질환, 및 특히, III 등급 내지 IV 등급 위장관 이식편대 숙주 질환을 앓고 있는 환자에게 특히 중간엽 줄기 세포가 투여될 때, 중간엽 줄기 세포 투여가 환자의 피부 및/또는 궤양화된 장 상피 조직을 수복시켰다는 것을

발견하게 되었다.

- <41> 또다른 실시태양에서, 중간엽 줄기 세포는 이식된 기관 또는 조직의 거절에 의해 유발된 상피 손상을 수복시키기 위하여 신장, 심장, 및 폐를 포함하나, 이에 한정되지 않는 이식된 기관 또는 조직으로 동물에게 투여된다.
- <42> 추가의 또다른 실시태양에서, 중간엽 줄기 세포는 화상, 창상, 열상, 및 피부 궤양화 및 당뇨성 궤양화를 포함하나, 이에 한정되지 않는 궤양화에 의해 유발된 상피 손상을 수복시키기 위하여 동물에게 투여된다.
- <43> 중간엽 줄기 세포는 본원 상기에 기술되어 있는 바와 같이, 인간 및 비인간 영장류를 비롯한 포유동물에게 투여될 수 있다.
- <44> 중간엽 줄기 세포는 또한 본원 상기에 기술되어 있는 바와 같이, 전신 투여될 수 있다.
- <45> 중간엽 줄기 세포는 동물에서 상피 손상을 수복시키는데 효과적인 양으로 투여된다. 중간엽 줄기 세포는 약 1×10^5 세포/kg 내지 약 1×10^7 세포/kg의 양으로 투여될 수 있다. 또다른 실시태양에서, 중간엽 줄기 세포는 약 1×10^6 세포/kg 내지 약 5×10^6 세포/kg의 양으로 투여된다. 중간엽 줄기 세포의 정확한 투여량은 환자의 연령, 체중, 및 성별, 치료하고자 하는 상피 손상의 유형, 및 그의 정도 및 중증도를 비롯한 다양한 인자에 따라 달라진다.
- <46> 본 발명의 추가의 또다른 측면에 따라, 동물에서 암을 치료하는 방법을 제공한다. 본 방법은 동물에게 중간엽 줄기 세포를 동물의 암을 치료하는데 효과적인 양으로 투여하는 것을 포함한다.
- <47> 비록 본 발명의 상기 측면의 범주가 어떤 이론적인 논거로 제한되는 것은 아니지만, 중간엽 줄기 세포는 가지 세포와 상호작용하여 IFN-β가 분비될 수 있도록 하고, 이는 결국에는 종양 억제자로서 작용한다고 여겨지고 있다. 치료될 수 있는 암으로는 간세포암종, 자궁경부암, 혀암, 전립선암, 섬유육종, 수모세포종, 및 성상세포종을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 그러나, 본 발명의 이러한 측면의 범주가 임의의 특정 암으로 제한되는 것은 아니라는 점을 이해하여야 한다.
- <48> 동물은 본원 상기에 기술되어 있는 바와 같이, 인간 및 비인간 영장류를 비롯한 포유동물일 수 있다.
- <49> 중간엽 줄기 세포는 동물에서 암을 치료하는데 효과적인 양으로 동물에게 투여된다. 일반적으로, 중간엽 줄기 세포는 약 1×10^5 세포/kg 내지 약 1×10^7 세포/kg의 양으로 투여된다. 또다른 실시태양에서, 중간엽 줄기 세포는 약 1×10^6 세포/kg 내지 약 5×10^6 세포/kg의 양으로 투여된다. 중간엽 줄기 세포의 정확한 투여량은 환자의 연령, 체중, 및 성별, 치료하고자 하는 암 질환, 및 그의 정도 및 중증도를 비롯한 다양한 인자에 따라 달라진다.
- <50> 중간엽 줄기 세포는 본원 상기에 기술되어 있는 바와 같이, 허용가능한 약제학적 담체와 함께 투여될 수 있고, 전신투여될 수 있다. 별법으로, 중간엽 줄기 세포는 치료하고자 하는 암에 직접 투여될 수 있다.
- <51> 본 발명에 따른 추가의 또다른 측면에 따라, 동물의 알레르기성 질환 또는 장애를 치료하는 방법을 제공한다. 본 방법은 동물에게 중간엽 줄기 세포를 동물의 질환 또는 장애를 치료하는데 효과적인 양으로 투여하는 것을 포함한다.
- <52> 비록 본 발명의 상기 측면의 범주가 어떤 이론적인 논거로 제한되는 것은 아니지만, 중간엽 줄기 세포가 급성 알레르기 반응 이후에 투여되는 경우, 비만 세포 활성화 및 탈파립화를 저해하는 것으로 여겨진다. 또한, 중간엽 줄기 세포가 호염기구 활성화를 하향조절하고, 사이토카인, 예를 들면, TNF-α, 케모카인, 예를 들면, 인터루킨-8 및 단핵구 화학 유인 물질 단백질, 또는 MCP-1, 지질 매개 인자, 예를 들면, 류코트리엔을 저해하며, 주요 매개 인자, 예를 들면, 히스타민, 해파린, 콘드로이틴황산염, 및 카텝신을 저해하는 것으로 여겨진다.
- <53> 치료될 수 있는 알레르기성 질환 또는 장애로는 천식, 알레르기성 비염, 아토피 피부염, 및 접촉 피부염을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 그러나, 본 발명의 범주를 임의의 특정 알레르기성 질환 또는 장애로 제한하려는 것이 아님을 이해하여야 한다.
- <54> 중간엽 줄기 세포는 동물에서 알레르기성 질환 또는 장애를 치료하는데 효과적인 양으로 동물에게 투여된다. 동물은 포유동물일 수 있다. 포유동물은 인간 및 비인간 영장류를 비롯한, 영장류일 수 있다. 일반적으로, 중간엽 줄기 세포는 약 1×10^5 세포/kg 내지 약 1×10^7 세포/kg의 양으로 투여된다. 또다른 실시태양에서, 중간엽 줄기 세포는 약 1×10^6 세포/kg 내지 약 5×10^6 세포/kg의 양으로 투여된다. 정확한 투여량은 환자의 연령, 체중,

및 성별, 치료되는 알레르기성 질환 또는 장애, 및 그의 정도 및 중증도를 비롯한 다양한 인자에 따라 달라진다.

- <55> 중간엽 줄기 세포는 본원 상기에 기술되어 있는 바와 같이, 허용가능한 약제학적 담체와 함께 투여될 수 있다. 중간엽 줄기 세포는 예를 들면, 정맥내, 또는 동맥내 투여와 같이 전신 투여될 수 있다.
- <56> 본 발명의 추가의 측면에 따라, 동물에서 상처 치유를 촉진시키는 방법을 제공한다. 본 방법은 동물에게 중간엽 줄기 세포를 동물의 상처 치유를 촉진시키는데 효과적인 양으로 투여하는 것을 포함한다.
- <57> 비록 본 발명의 상기 측면의 범주가 어떤 이론적인 논거로 제한되는 것은 아니지만, 상기 언급한 바와 같이 중간엽 줄기 세포는 T_{reg} 세포 및 가지 세포가 인터루킨-10(IL-10)을 방출하도록 유발하는 것으로 여겨진다. IL-10은 상처내 염증을 제한하거나 억제하여 상처 치유를 촉진시킨다.
- <58> 추가로, 중간엽 줄기 세포는 다른 세포 유형에 의한 분비 인자를 유도함으로써 상처 치유 및 골절 치유를 촉진시킬 수 있다. 예를 들면, 중간엽 줄기 세포는 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)에 의한 혈관 내피 성장 인자(VEGF)의 프로스타글란딘 E2(PGE2)-매개 방출 뿐만 아니라, 성장 호르몬, 인슐린, 인슐린-유사 성장 인자 1(IGF-1), 인슐린-유사 성장 인자 결합 단백질-3(IGFBP-3), 및 엔도텔린-1의 PGE2-매개 방출을 유도할 수 있다.
- <59> 치유될 수 있는 상처로는 창상, 열상, 화상 및 피부 궤양화로부터 유발된 것을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- <60> 중간엽 줄기 세포는 동물에서 상처 치유를 촉진시키는데 효과적인 양으로 동물에게 투여된다. 동물은 포유동물일 수 있고, 포유동물은 인간 및 비인간 영장류를 비롯한, 영장류일 수 있다. 일반적으로, 중간엽 줄기 세포는 약 1×10^5 세포/kg 내지 약 1×10^7 세포/kg의 양으로 투여된다. 또다른 실시태양에서, 중간엽 줄기 세포는 약 1×10^6 세포/kg 내지 약 5×10^6 세포/kg의 양으로 투여된다. 중간엽 줄기 세포의 정확한 투여량은 환자의 연령, 체중, 및 성별, 치료되는 상처의 정도 및 중증도를 비롯한 다양한 인자에 따라 달라진다.
- <61> 중간엽 줄기 세포는 본원 상기에 기술되어 있는 바와 같이, 허용가능한 약제학적 담체와 함께 투여될 수 있다. 중간엽 줄기 세포는 본원 상기에 기술되어 있는 바와 같이, 전신 투여될 수 있다. 별법으로, 중간엽 줄기 세포는 예를 들면, 중간엽 줄기 세포를 함유하는 드레싱 또는 저장소상의 액체로 상처에 직접 투여될 수 있다.
- <62> 본 발명의 추가의 또다른 측면에 따라, 동물에서 섬유증을 치료하거나 예방하는 방법을 제공한다. 본 방법은 동물에게 중간엽 줄기 세포를 동물의 섬유증을 치료하거나 예방하는데 효과적인 양으로 투여하는 것을 포함한다.
- <63> 중간엽 줄기 세포는, 간경화, 말기 신질환과 관련된 신장 섬유증, 및 폐섬유증 (급성 호흡기 질환 증후군(ARDS) 및 만성 폐쇄 폐 질환(COPD)을 포함하나, 이에 한정되지 않음)을 포함하나, 이에 한정되지 않는, 동물의 임의 유형의 섬유증을 치료 또는 예방하기 위해 동물에게 투여될 수 있다. 본 발명의 범주가 임의의 특정 유형의 섬유증으로 제한되는 것은 아니라는 점을 이해하여야 한다.
- <64> 중간엽 줄기 세포는 동물에서 섬유증을 치료 또는 예방하는데 효과적인 양으로 동물에게 투여된다. 동물은 포유동물일 수 있고, 포유동물은 인간 및 비인간 영장류를 비롯한, 영장류일 수 있다. 일반적으로, 중간엽 줄기 세포는 약 1×10^5 세포/kg 내지 약 1×10^7 세포/kg의 양으로 투여된다. 또다른 실시태양에서, 중간엽 줄기 세포는 약 1×10^6 세포/kg 내지 약 5×10^6 세포/kg의 양으로 투여된다. 중간엽 줄기 세포의 정확한 투여량은 환자의 연령, 체중, 및 성별, 치료 또는 예방되는 섬유증의 정도 및 중증도를 비롯한 다양한 인자에 따라 달라진다.
- <65> 중간엽 줄기 세포는 본원 상기에 기술되어 있는 바와 같이, 허용가능한 약제학적 담체와 함께 투여될 수 있다. 중간엽 줄기 세포는 또한 본원 상기에 기술되어 있는 바와 같이, 전신 투여될 수 있다.
- <66> 본 발명의 또다른 목적은 혈관형성을 필요로 하는 동물의 조직 또는 기관에서 혈관형성을 촉진시키는 것이다.
- <67> 따라서, 본 발명의 추가의 측면에 따라, 동물의 조직 또는 기관에서 혈관형성을 촉진시키는 방법을 제공한다. 본 방법은 동물에게 중간엽 줄기 세포를 동물의 조직 또는 기관에서 혈관형성을 촉진시키는데 효과적인 양으로 투여하는 것을 포함한다.
- <68> 혈관형성은 기존 미세혈관상으로부터 새로운 혈관을 형성하는 것이다.
- <69> 혈관형성 유도를 사용함으로써 관상 및 말초 동맥 기능부전을 치료할 수 있고, 따라서, 이는 관상 동맥 질환,

허혈성 심장 질환, 및 말초 동맥 질환 치료에 대한 비침습성의 치료적인 접근법이 될 수 있다. 혈관형성은 심장 이외의 조직 및 기관의 질환 및 장애 치료 뿐만 아니라, 심장 이외의 기관의 발생 및/또는 유지에서 중요한 역할을 할 수 있다. 혈관형성은 내부 및 외부 상처 뿐만 아니라, 피부 궤양 치료에서 중요한 역할을 할 수 있다. 혈관형성은 또한 배아 착상, 및 태반 성장 뿐만 아니라, 배아 혈관계 발생에서 중요한 역할을 할 수 있다. 혈관형성은 또한 연골 흡수와 뼈 형성을 커플링시키는데 필수적이며, 올바른 성장판 형태형성에 필수적이다.

- <70> 추가로, 혈관형성은 충분한 영양분과 가스를 수송하기 위해서는 조밀한 맥관 그물이 필요한, 예를 들면, 간과 같은 고도의 대사 기관을 성공적으로 공학처리하고 유지시키는데 필요하다.
- <71> 중간엽 줄기 세포는 다양한 방법에 의해 혈관형성을 필요로 하는 조직 또는 기관에 투여될 수 있다. 중간엽 줄기 세포는 예를 들면, 정맥내, 동맥내, 또는 복강내 투여와 같이 전신 투여될 수 있거나, 중간엽 줄기 세포는 예를 들면, 혈관형성을 필요로 하는 조직 또는 기관에 직접 주사하는 것과 같이, 혈관형성을 필요로 하는 조직 또는 기관에 직접 투여될 수 있다.
- <72> 중간엽 줄기 세포는 자가, 동종이형, 또는 이종을 비롯한, 각종 공급원으로부터 유래될 수 있다.
- <73> 비록 본 발명의 범주가 어떤 이론적인 논거로 제한되는 것은 아니지만, 동물에게 투여될 때, 중간엽 줄기 세포는 새로운 혈관 형성을 자극시키는 혈관 내피 성장 인자 (또는 VEGF)를 생산하도록 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 자극한다고 여겨진다.
- <74> 하나의 실시태양에서, 동물은 포유동물이다. 포유동물은 인간 및 비인간 영장류를 비롯한, 영장류일 수 있다.
- <75> 본 발명에 따른 중간엽 줄기 세포는 혈관형성을 통해 완화, 치료, 또는 예방될 수 있는 임의의 질환 또는 장애의 치료, 완화, 또는 예방에 사용될 수 있다. 따라서, 예를 들면, 중간엽 줄기 세포는 사지, 즉, 팔, 다리, 손, 및 발 뿐만 아니라, 목 또는 다양한 기관내에 있는 차단된 동맥을 비롯한 차단된 동맥을 치료하기 위하여 동물에게 투여될 수 있다. 예를 들면, 중간엽 줄기 세포는 뇌에 공급해 주는 차단된 동맥을 치료하여 뇌졸중을 치료하거나 예방하기 위하여 사용될 수 있다. 또한, 중간엽 줄기 세포는 배아 및 생후 각막내 혈관을 치료하기 위해 사용될 수 있고, 사구체를 조직화하는데 사용될 수 있다. 또 다른 실시태양에서, 중간엽 줄기 세포는 내부 및 외부, 둘 모두의 상처를 치료하는데 사용될 수 있을 뿐만 아니라, 질환, 예를 들면, 당뇨병 및 겹상 적혈구 성 빈혈에 의해 유발되는 피부 궤양을 포함하나, 이에 한정되지 않는 것으로 발, 손, 다리 또는 팔에서 발견되는 피부 궤양을 치료하는데 사용될 수 있다.
- <76> 추가로, 혈관형성이 배아 착상, 및 태반 성장에 관여하기 때문에 중간엽 줄기 세포는 배아 착상을 촉진시키고, 유산을 예방하는데 사용될 수 있다.
- <77> 추가로, 중간엽 줄기 세포는 인간을 비롯한 태내 동물에서 혈관계 발생을 촉진시키기 위해 태내 동물에게 투여될 수 있다.
- <78> 또 다른 실시태양에서, 중간엽 줄기 세포는 연골 흡수 및 뼈 형성을 촉진시키기 위해서 뿐만 아니라, 올바른 성장판 형태형성을 촉진시키기 위해 태아 동물 또는 태내 동물에게 투여될 수 있다.
- <79> 중간엽 줄기 세포는 동물에서 혈관형성을 촉진시키는데 효과적인 양으로 투여된다. 중간엽 줄기 세포는 약 1×10^5 세포/kg 내지 약 1×10^7 세포/kg의 양으로 투여될 수 있다. 또 다른 실시태양에서, 중간엽 줄기 세포는 약 1×10^6 세포/kg 내지 약 5×10^6 세포/kg의 양으로 투여된다. 중간엽 줄기 세포의 투여량은 환자의 연령, 체중, 및 성별, 치료, 완화, 또는 예방하고자 하는 질환 또는 장애, 및 그의 정도 및 중증도를 비롯한 다양한 인자에 따라 달라진다.
- <80> 중간엽 줄기 세포는 허용가능한 약제학적 담체와 함께 투여될 수 있다. 예를 들면, 중간엽 줄기 세포는 주사용의 약제학적으로 허용가능한 액체 배지 중의 세포 혼탁액으로서 투여될 수 있다. 주사는 국소적으로, 즉, 혈관형성을 필요로 하는 조직 또는 기관내로 이루어질 수 있거나, 전신으로 이루어질 수 있다.
- <81> 중간엽 줄기 세포는 치료제를 코딩하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 사용하여 유전적으로 공학처리될 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 적절한 발현 비히클을 통해 중간엽 줄기 세포로 전달될 수 있다. 중간엽 줄기 세포를 유전적으로 공학처리하는데 사용될 수 있는 발현 비히클로는 레트로바이러스 백터, 아데노바이러스 백터, 및 아데노-관련 바이러스 백터를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- <82> 치료제를 코딩하는 적절한 폴리뉴클레오티드를 선택하는 것은 치료되는 질환 또는 장애, 및 그의 정도 및 중증도를 비롯한 다양한 인자에 따라 달라진다. 치료제를 코딩하는 적절한 폴리뉴클레오티드, 및 적절한 발현 비히

클이 추가로 미국 특허 번호 제6,355,239호에 기재되어 있다.

- <83> 중간엽 줄기 세포는 상기 언급한 요법 및 치료법에서 사용될 때, 성장 인자, 사이토카인, 약물, 예를 들면, 항염 약물, 및 중간엽 줄기 세포 이외의 세포, 예를 들면, 가지 세포를 포함하나, 이에 한정되지 않는, 당업자에게 공지되는 기타 치료제와 배합되어 사용될 수 있으며, 세포용의 가용성 담체, 예를 들면, 하이알유론산과 함께 투여될 수 있거나, 적절한 고체 매트릭스, 예로서, 콜라겐, 젤라틴, 또는 다른 생체적합성 중합체와 배합되어 투여될 수 있다는 것을 이해하여야 한다.
- <84> 본원에 기술된 방법은 다양한 방식으로 수행될 수 있으며, 당업계에 널리 공지된 그의 다양한 변형과 변경이 이루어 질 수 있음을 이해하여야 한다. 또한, 세포 유형간의 작용 모드 또는 상호작용에 관해 제시된 임의의 이론이 어느 방식으로든 본 발명을 제한하는 것으로서 해석되어서는 안되는 것이며, 이는 본 발명의 방법이 보다 완전하게 이해될 수 있도록 제시되는 것으로서 이해될 수 있다.

실시예

- <94> 실시예 1
- <95> 물질 및 방법
- <96> 인간 MSC 배양
- <97> 인간 MSC는 문헌 [Pittenger et al., *Science*, Vol. 284, pg. 143 (1999)]에 기재되어 있는 바와 같이 배양하였다. 간략하게, 포이에틱스 테크놀러지, 디비젼 오브 캠브렉스 바이오사이언시스(Poietics Technologies, Div of Cambrex Biosciences)에 의해 사전 동의를 구한 후 익명의 기증자의 장골농으로부터 골수 샘플을 수집하였다. 1% 항생제-항축동제(antimyotic) 용액 (캘리포니아주 칼즈배드에 소재하는 인비트로젠(Invitrogen)) 및 10% 우태아 혈청 (FBS: 캔자스주 레넥사에 소재하는 JRH 바이오사이언시스(JRH BioSciences))을 함유하는 완전 둘베코 변형 이글 배지-저포도당(Dulbecco's Modified Eagle's Medium-Low Glucose) (캘리포니아주 칼즈배드에 소재하는 라이프 테크놀러지스(Life Technologies))에서 MSC를 배양하였다. MSC를 부착성 단층으로 배양하고, 트립신/EDTA (3분 동안 37°C에서 0.05% 트립신)로 탈착시켰다. 사용된 모든 MSC의 다계열 잠재능에 대해서는 미리 특징화하였고, 이는 중간엽 계열 (연골성, 지방형성성, 및 뼈형성성)로 분화될 수 있는 능력을 보유하였다 (문헌 [Pittenger, et al., *Science*, Vol. 284, pg. 143 (1999)]).
- <98> 가지 세포 단리
- <99> 포이에틱스 테크놀러지, 디비젼 오브 캠브렉스 바이오사이언시스 (메릴랜드주 워커스빌 소재)로부터 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 입수하였다. 문헌 [Dzionaek, et. al., *J. Immunol.*, Vol. 165, pg. 6037 (2000)]에 따라 2 단계 자기 분리 방법을 사용하여 단핵구 계열(CD1c⁺)의 가지 세포(DC) 전구체를 PBMC로부터 양성적으로 선별하였다. 간략하게, 자기 비드를 사용하여 CD1c 발현 B 세포를 CD19⁺ 세포에서 제거한 후, B 세포가 제거된 분획을 바이오틴-표지된 CD1c (BDCA1⁺) 및 항-바이오틴 항체로 표지하고, 이는 제조사의 설명서 (캘리포니아주 오번에 소재하는 밀텐이 바이오텍(Miltenyi Biotech)에 따라 자기 칼럼을 사용하여 미표지 세포 분획으로부터 분리하였다. 형질세포모양 계열의 DC 전구체는 양성 표지된 항체가 코팅된 세포 (BDCA2⁺) (캘리포니아주 오번에 소재하는 밀텐이 바이오텍)의 면역-자기 분류에 의해 PBMC로부터 단리시켰다.
- <100> MSC-DC 배양
- <101> 대부분의 실험에서, 인간 MSC 및 DC는 다양한 기간 동안 동수로 배양하고, 세포 배양물 상등액을 수집하고, 추가로 평가할 때까지 -80°C에서 저장하였다. 선택 실험에서는, MSC를 3일 동안 성숙한 DC1 또는 DC2 세포 (MSC:DC 비는 1:1)와 함께 배양한 후, 배합된 배양물 (MSC 및 DC)에 방사선을 조사하여 어떤 증식도 일어나지 못하도록 하였다. 이어서, 항체 정제된 천연 동종이형 T 세포 (CD4⁺, CD45RA⁺)를 방사선 조사된 MSC/DC에 가하고, 추가로 6일 동안 배양하였다. 이어서, 비-부착성 세포 분획 (정제된 T 세포)을 배양물로부터 수집하고, 2회에 걸쳐 세척하고, 추가의 24시간 동안 PHA로 다시 자극시킨 후, 세포 배양물 상등액을 수거하고, ELISA에 의해 분비된 IFN-γ 및 IL-4에 대하여 분석하였다.
- <102> NK 세포 단리
- <103> 제1 시약으로서 바이오틴-접합된 모노클로날 항체 (항-CD3, -CD14, -CD19, -CD36 및 항-IgE 항체)와, 제2 표지

시약으로서, 마이크로비드에 접합된 항-바이오틴 모노클로날 항체의 칵테일을 사용하여 자기적으로 표지된 비-NK 세포를 제거함으로써 정제된 NK 세포 군집을 수득하였다. 기적으로 표지된 비-NK 세포는 자기장내 MACS (캘리포니아주 오번에 소재하는 밀텐이 바이오텍) 칼럼에 유지된 반면, NK 세포는 통과함으로써 수집되었다.

<104> T_{Reg} 세포 군집 단리

<105> 2단계 단리 방법을 사용하여 T_{Reg} 세포 군집을 단리시켰다. 먼저, 비-CD4⁺ T 세포는 간접적으로 바이오틴 표지된 항체와 항-바이오틴 마이크로비드의 칵테일을 사용하여 자기적으로 표지하였다. 이어서, 표지된 세포는 MACS 칼럼 (캘리포니아주 오번에 소재하는 밀텐이 바이오텍) 상에서 분리하여 제거하였다. 이어서, CD4⁺CD25⁺ 세포는 CD25 마이크로비드를 사용하여 직접 표지하고, 사전에 농축된 CD4⁺ T 세포 분획으로부터 양성 선별에 의해 단리시켰다. 자기적으로 표지된 CD4⁺CD25⁺ T 세포는 칼럼상에 유지시키고, 자기장으로부터 칼럼을 제거한 후 용리시켰다.

<106> MSC의 존재하에 생성된 CD4⁺CD25⁺ 군집 증가가 사실상 억제성인지 여부를 결정하기 위하여 2단계 자기 단리 방법을 사용하여 PBMC 또는 MSC+PBMC (MSC 대 PBMC의 비 1:10) 배양물 (3일 동안 어떤 추가의 자극도 없이 배양됨)로부터 CD4⁺CD25⁺ T_{reg} 세포 군집을 단리시켰다. 이들 세포에 방사선을 조사하여 임의의 추가 증식을 차단하고, 반응자가 PHA (2.5 µg/ml) 존재하의 동종이형 PBMC (자극제 대 반응자의 비 1:100)인 혼합 럼프구 반응 (MLR)에서의 자극제로서 사용하였다. 배양을 48시간 동안 수행한 후, ³H 티미딘을 가하였다. 24시간 후에 혼입된 방사능을 계수하였다.

<107> MSC의 부재 또는 존재 (MSC 대 PBMC의 비 1:10)하에 PBMC를 배양한 후, 비-부착성 분획을 수거하고, FITC-표지된 글루코코르티코이드-유도 TNF 수용체 (또는 GITR), 및 PE-표지된 CD4로 면역염색하였다.

<108> T_{H1}/T_{H2} 세포 생성

<109> 단핵구를 제거하기 위하여 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 2x10⁶ 세포/ml로 37°C에서 45분 동안 플레이팅하였다. 비-부착성 분획을 MSC의 존재 또는 부재하의 3일 동안 T_{H1} (IL-2 (4 ng/ml) + IL-12 (5 ng/ml) + 항-IL-4 (1 µg/ml)) 또는 T_{H2} (IL-2 (4 ng/ml) + IL-4 (4 ng/ml) + 항-IFN-γ (1 µg/ml)) 조건하에 플레이트-결합된 항-CD3 (5 µg/ml) 및 항-CD28 (1 µg/ml) 항체의 존재하에서 인큐베이션시켰다. 세포를 세척한 후, 추가의 24시간 또는 48시간 동안 PHA (2.5 µg/ml)로 다시 자극시킨 후, IFN-γ 및 IL-4 수준을 ELISA (미네소타주 미니애폴리스에 소재하는 R&D 시스템즈(R&D Systems))에 의해 배양물 상등액에서 측정하였다.

<110> MSC의 배양물 상등액중 VEGF, PGE₂, 및 프로-MMP-1 수준 분석

<111> 앞서 특징화된 인간 MSC를 사용하여 PBMC의 존재하에 (MSC 대 PBMC의 비 1:10) 또는 그의 부재하에 24시간 동안 배양된 배양물 상등액 중 인터루킨-6 (IL-6), VEGF, 지질 매개 인자 프로스타글란дин E₂(PGE₂), 및 기질 금속단백질분해효소 1 (프로-MMP-1)의 수준을 분석하였다.

<112> PBMC 증식

<113> 피콜-하이팩(Ficoll-Hypaque) (노르웨이 오슬로 림포프렙(Lymphoprep)) 상에서 류코팩 (메릴랜드주 워커스빌에 소재하는 캠브렉스(Cambrex))을 원심분리하여 정제된 PBMC를 제조하였다. 분리된 세포는 미토겐 PHA (미주리주 세인트루이스에 소재하는 시그마 케미칼즈(Sigma Chemicals))의 존재하에 48시간 동안 MSC (정착될 수 있도록 PBMC 첨가 이전에 3-4시간 동안 플레이팅됨)의 존재 또는 부재하에 배양하였다 (3중으로). 선택 실험에서 PBMC는 PGE₂ 저해제 인도메타신 (미주리주 세인트루이스에 소재하는 시그마 케미칼즈) 또는 NS-938 (미시간주 앤아버에 소재하는 케이만 케미칼즈(Cayman Chemicals))을 함유하는 배지에 재현탁시켰다. (³H)-티미딘을 첨가하고 (200 µl 배양물 중 20 µl), 추가로 24시간 배양한 후 자동 수거기를 사용하여 세포를 수거하였다. PHA의 존재하의 대조군 반응 (100%)에 대한 백분율로서 MSC 또는 PGE₂ 차단제의 효과를 계산하였다.

<114> 정량 RT-PCR

<115> 시판용 키트 (캘리포니아주 발렌시아에 소재하는 큐아젠(Qiagen))를 사용하여 제조사의 설명서에 따라 세포 펠

로부터 총 RNA를 제조하였다. DNA가 없는 키트 (텍사스주 오스틴에 소재하는 앰비온(Ambion))를 사용하여 오염성 게놈 DNA를 제거하였다. 0.5 μ M 농도의 프라이머와 함께 콘티렉트 SYBR 그런 RT-PCR 키트(Quant iTect SYBR Green RT-PCR kit) (캘리포니아주 발렌시아에 소재하는 퀴아젠)를 사용하여 MJ 리서치 옵션 검출 시스템 (캘리포니아주 사우쓰 샌프란시스코 소재)에서 정량 RT-PCR을 실시하였다. 내부 대조군으로서 β -액틴을 사용하여 Ct 값 (교차점) 차이에 의해서 상이한 조건하에 배양한 세포의 발현 수준 상의 상대적인 변화를 계산하였다. COX-1 및 COX-2 특이 프라이머에 대한 서열은 COX-1: 5'-CCG GAT GCC AGT CAG GAT GAT G-3' (정방향), 5'-CTA GAC AGC CAG ATG CTG ACA G-3' (역방향); COX-2: 5'-ATC TAC CCT CCT CAA GTC CC-3' (정방향), 5'-TAC CAG AAG GGC AGG ATA CAG-3' (역방향)이었다.

<116> 72시간 동안 PHA (2.5 μ g/ml)의 존재하에 96-웰 플레이트 상에 플레이팅된 일정한 갯수의 MSC (2,000개의 세포/웰)와 함께 동종이형 PBMC의 갯수를 증가시키면서 인큐베이션시키고, 3 H 티미딘 혼입을 측정하였다 (분당 계수, cpm). MSC:PBMC의 비를 1:1, 1:3, 1:10, 1:30, 및 1:81로하여 PBMC 및 MSC를 배양하였다.

결과

<118> 본 연구에서, 인간 MSC와, 가지 세포 (DC1 및 DC2), 효과기 T 세포(T_{H1} 및 T_{H2}) 및 NK 세포를 비롯한, 단리된 면역 세포 군집 사이의 상호작용을 조사하였다. MSC와 각 면역 세포 유형 사이의 상호작용은 특이적인 결과를 가졌는데, 이는 MSC가 면역 반응 과정에서 여러 단계를 조절할 수 있다는 것을 제안한다. MSC 면역조절 효과를 조정하고, 그에 대한 원인이 될 수 있는 분비된 인자(들)의 생산을 평가하고, 프로스타글란дин 합성을 관련시켰다.

<119> 각각 BDCA1 $^+$ 및 BDCA2 $^+$ 세포의 면역-자기 분류에 의해 골수모양 (DC1) 및 형질세포모양 (DC2) 전구체 가지 세포를 단리시키고, DC1 세포의 경우 GM-CSF 및 IL-4 (각각 1×10^3 IU/ml 및 1×10^3 IU/ml), 또는 DC2 세포의 경우 IL-3 (10 ng/ml)과 함께 인큐베이션시킴으로써 성숙화시켰다. 유세포 측정법을 사용하였는데, DC1 세포는 HLA-DR $^+$ 및 CDHc $^+$ 인 반면, DC2 세포는 HLA-DR $^+$ 및 CD123 $^+$ 이었다 (도 1A). 염증 발생원인 세균 지질다당질 (LPS, 1 ng/ml)의 존재하에 DC1 세포는 중간 정도 수준의 TNF- α 를 생산하였지만, MSC가 존재하는 경우 (1:1 내지 1:10의 비로 조사), TNF- α 분비가 50% 초과로 감소하였다 (도 1B). 한편, LPS 존재하에서 DC2 세포는 IL-10을 생산하였고, 그의 수준은 MSC:DC2 공배양시 (1:1) 2배 초과로 증가하였다 (도 1B). 그러므로, MSC는 배양물내 활성화된 DC의 사이토카인 프로파일을 보다 내성인 표현형 쪽으로 변형시켰다. 추가로, 활성화된 DC는 MSC와 함께 배양되었을 때, IFN- γ 는 감소시킬 수 있고, 천연 CD4 $^+$ T 세포에 의해 분비된 IL-4 수준은 증가시킬 수 있었으며 (도 1C), 이는 전염증성 표현형으로부터 항-염증성 T-세포 표현형으로의 MSC-매개 변동을 제안한다.

<120> IL-10 분비 증가가 조절 세포 생성에 있어 중요한 역할을 하기 때문에 (문헌 [Kingsley, et al., *J. Immunol.* Vol. 168, pg. 1080 (2002)]), PBMC 및 MSC 공배양물에서의 유세포 측정에 의해 T-조절 세포(T_{Reg})를 정량하였다. 3-5일 동안 MSC와 함께 PBMC를 배양하였을 때, 항-CD4 및 항-CD25 항체로 PBMC를 염색하여 측정한 바에 따르면 T_{Reg} 세포의 수는 증가하였고 (도 2A), 이는 추가로 MSC-유도된 면역허용원 반응을 입증한다. MSC의 존재하에 생성된 CD4 $^+$ CD25 $^+$ T_{Reg} 세포 군집은 T_{Reg} 세포 군집 상에서 발현된 세포 표면 수용체인 글루코코르티코이드-유도된 TNF 수용체 (GITR)를 증가된 수준으로 발현시켰고, 동종이형 T 세포 증식을 억제하였는 바 (도 3A,B), 사실상 억제성이었다. 이어서, T 세포 분화에 영향을 줄 수 있는 MSC의 직접적인 능력에 관해 MSC를 조사하였다. 항체 선별된 정제된 T 세포 (CD4 $^+$ Th 세포)를 사용하여 IFN- γ 생산 T_{H1} 및 IL-4 생산 T_{H2} 세포를 MSC의 존재 또는 부재하에서 생성하였다. 분화하는 동안 MSC가 존재할 때, T_{H1} 세포에 의한 IFN- γ 분비는 감소하였고, T_{H2} 세포에 의한 IL-4 분비는 증가하였다 (도 2B). Th 세포가 효과기 T_{H1} 또는 T_{H2} 유형으로 분화된 (3일째) 이후에 MSC를 배양물에 첨가하였을 때에는 IFN- γ 또는 IL-4 수준에 있어 어떤 유의적인 변화도 관찰되지 않았다 (데이터를 나타내지 않음). 이러한 실험은 MSC가 직접적으로 효과기 T 세포 분화에 영향을 미칠 수 있으며, T 세포 사이토카인 분비를 체액 표현형 쪽으로 변경시킬 수 있음을 제안한다.

<121> 유사하게, 상이한 기간 (0-48 hrs) 동안 MSC를 정제된 NK 세포 (CD3-, CD14-, CD19-, CD36-)와 함께 1:1의 비율로 배양하였을 때, 배양물 상등액 중 IFN- γ 분비는 감소하였고, 이로써 MSC는 또한 NK 세포 기능 또한 조절 할 수 있다는 것을 제안한다.

<122> 이전 연구를 통해 MSC가 가용성 인자(들)에 의해 T-세포 기능을 변형시킨다는 것은 제시된 바 있다 (문헌 ([LeBlanc, et al., Exp. Hematol., Vol. 31, pg. 890 (2003)]; [Tse, et al., Transplantation, Vol. 75, pg. 389 (2003)])). MSC는 구성적으로 IL-6, 프로스타글란딘 E₂, VEGF 및 프로-MMP-1을 비롯한 수개의 인자를 분비하였고, PBMC와 함께 배양하였을 때 각 수준은 증가하였다 (도 5). TNF-α를 저해하고, DC에 의한 IL-10 생산을 증가시키는 MSC-유도 인자를 조사하기 위하여, 활성화된 DC에 의해 TNF-α 생산이 저해되는 것으로 나타나바, 프로스타글란딘 E₂의 잠재적인 역할에 대하여 조사하였다 (문헌 [Vassiliou, et al., Cell. Immunol., Vol. 223, pg. 120 (2003)]). MSC 배양물 (0.5×10^6 세포/ml의 24시간된 배양물)로부터의 조절된 배지는 대략 1000 pg/ml의 PGE₂를 함유하였다 (도 4A). MSC에 의한 PGE₂의 구성적 분비를 나타내는, 배양물 상등액 중의 공지된 PGE₂ 분비 유도 인자, 예로서, TNF-α, IFN-γ 또는 IL-1β는 검출가능할 정도로는 존재하지 않았다 (데이터로 나타내지 않음). PGE₂ 생산의 저해제인 NS-398 (5 μM) 및 인도메타신 (4 μM)의 존재하에서 hMSC에 의한 PGE₂ 분비는 60-90% 저해되었다 (도 4A). 구성적으로 활성인 사이클로옥시게나제 효소 1 (COX-1) 및 유도성 사이클로옥시게나제 효소 2 (COX-2)의 효소 활성의 결과로 PGE₂ 분비 방출이 일어나는 바 (문헌 [Harris, et al., Trends Immunol., Vol. 23, pg. 144 (2002)]), 트랜스-웰 배양물 시스템을 사용하여 MSC 및 PBMC 중 COX-1 및 COX-2에 대한 mRNA 발현에 대하여 분석하였다. MSC는 PBMC와 비교하여 유의적으로 더 높은 수준으로 COX-2를 발현하였고, 24시간 동안 MSC 및 PBMC (MSC 대 PBMC의 비 1:10)를 공배양하였을 때 발현 수준은 3배 초과로 증가하였다 (도 4B). COX-1 수준에 있어 작은 변화가 관찰되었는데, 이는 MSC-PBMC 공배양시 PGE₂ 분비가 증가하였다는 것 (도 5)은 COX-2 상향조절에 의해 매개된다는 것을 제안한다. DC 및 T-세포에 대한 면역조절 효과가 PGE₂에 의해 매개되는지 여부를 조사하기 위하여 MSC를 PGE₂ 저해제 NS-398 또는 인도메타신의 존재하에 활성화된 가지 세포 (DC1) 또는 T_H1 세포와 함께 배양하였다. NS-398 또는 인도메타신의 존재는 각각 DC1에 의한 TNF-α 분비 및 T_H1 세포로부터의 IFN-γ 분비를 증가시켰는데 (도 4C), 이는 면역 세포 유형에 대한 MSC 효과는 PGE₂에 의해 매개될 수 있다는 것을 제안한다. 최근 연구를 통해 MSC가 다양한 자극에 의해 유도된 T-세포 증식을 저해한다는 것으로 나타났다 (문헌 ([DeNicola, et al., Blood, Vol. 99, pg. 3838 (2002)]; [LeBlanc, et al., Scand. J. Immunol., Vol. 57, pg. 11 (2003)])). MSC는 용량-의존 방식으로 미토겐-유도성 T 세포 증식을 저해한다는 것이 관찰되었고 (도 6), PGE₂ 저해제 NS-398 (5 μM) 또는 인도메타신 (4 μM)이 존재할 경우, 저해제가 없는 대조군과 비교할 때, MSC 함유 배양물내 PHA-처리 PBMC에 의한 ³H 티미딘 흡입은 70% 초과로 증가하였다 (도 4D).

<123> 요약하면, MSC와 다른 면역 세포 유형 사이의 상호작용 모델 (도 7)을 제안한다. 성숙한 T 세포가 존재할 때, MSC는 성숙한 T 세포와 직접 상호작용할 수 있고, 전염증성 IFN-γ 생산을 저해할 수 있고 (경로 (1)), 조절 T 세포 표현형 (경로 (3)) 및 항-염증성 T_H2 세포 (경로 (5))를 촉진시킬 수 있다. 추가로, MSC는 PGE₂를 분비하고, 전염증성 DC1 세포를 저해하고 (경로 (2)), 항-염증 DC2 세포 (경로 (4)) 또는 조절 DC (경로 (3))를 촉진시킴으로써 DC를 통한 T 세포 면역 반응의 결과를 바꿀 수 있다. 결과적으로, T_H2 면역 쪽으로의 변동은 IgE/IgG1 하위유형 항체 생성이 증가되는 쪽으로 B 세포 활성이 바뀌었음을 제안한다 (경로 (7)). MSC는 NK 세포로부터 IFN-γ 분비를 저해할 수 있는 그의 능력에 의해서 NK 세포 기능을 변형시킬 수 있다 (경로 (6)). 이러한 MSC:면역 세포 상호작용 모델은 다른 여러 실험실에서 실시된 실험과 일치한다 (문헌 ([LeBlanc, et al., Exp. Hematol., Vol. 31, pg. 890 (2003)]; [Tse, et al., Transplantation, Vol. 75, pg. 389 (2003)]; [DiNicola, et al., Blood, Vol. 99, pg. 3838 (2002)]). 제안된 기전에 관한 추가 연구가 진행중에 있으며, MSC 투여의 생체내 효과를 연구하기 위해서는 현재 동물 연구가 필요하다.

실시예 2

<125> 중증의 IV 등급 위장관 이식편대 숙주 질환(GVHD)을 앓는 33세의 여성 환자에게 중간엽 줄기 세포를 투여하였다. 환자는 모든 다른 GVHD 치료법에 대하여 무반응이었다. 환자의 결장을 내시경 촬영하여 치료 이전의 궤양화 및 염증 부위를 나타내었다. 환자의 결장에 대한 조직학적 연구를 통해 이식편대 숙주 질환이 치료 이전 환자의 장샘 대부분을 파괴시켰다는 것이 나타났다.

<126> 50 ml의 플라즈마 라이트 A(Plasma Lyte A) 중 동종이형 중간엽 줄기 세포를 체중 1 kg당 3×10^6 의 양으로 정맥 주입하여 환자에게 투여하였다.

<127> 주입후 2주째에 환자를 평가하였다. 주입후 2주째, 환자의 결장을 내시경 촬영한 바, 치료 이전에 관찰되었던 염증 및 궤양화 부위가 치유된 것으로 나타났다. 추가로, 환자의 결장 생검을 통해 장샘이 현저히 재생된 것으로 나타났다. 따라서, 환자에게 중간엽 줄기 세포를 투여함으로써 위장관 이식편대 숙주 질환의 염증성 구성 요소가 현저히 감소하였고, 새로운 기능성 장 조직이 재생되었다.

<128> 공개된 특허 출원, 기탁소 수탁 번호, 및 데이터베이스 수탁 번호를 비롯한 모든 특허와 간행물의 개시 내용들은 각각의 특허, 간행물, 기탁소 수탁 번호, 및 데이터베이스 수탁 번호가 구체적이고 개별적으로 참고로 인용된 것과 동일한 범위로 참고로서 인용된다.

<129> 그러나, 본 발명의 범주가 상기 기술된 특정 실시태양으로 제한되는 것은 아니라는 것을 이해하여야 한다. 본 발명은 특별히 기술된 것 이외의 것으로 실시될 수 있고, 이는 여전히 첨부된 청구의 범위 범주내에 존재할 수 있다.

도면의 간단한 설명

<85> 이에, 본 발명은 하기 도면과 관련하여 기술될 것이다:

<86> **도 1 MSC가 가지 세포 기능을 조절한다.** (A) HLA-DR 및 CD11c에 대한 항체를 사용한 성숙한 단핵구성 DC1 세포 및 HLA-DR 및 CD123 (IL-3 수용체)에 대한 항체를 사용한 형질세포모양 DC2 세포의 유세포 측정 분석. (---): 동형 대조군; (—): FITC/PE 접합된 항체. (B) MSC는 각각의 활성화된 DC1 및 DC2로부터 TNF- α 분비를 저해하고 (제1 y축), IL-10 분비를 증가시킨다 (제2 y축). (C) MSC 또는 DC 단독인 것과 비교하여, 성숙한 DC1 세포와 함께 배양된 MSC는 T 세포에 의한 IFN- γ 분비를 저해하고 (제1 y축), IL-4 수준을 증가시킨다 (제2 y축). MSC의 존재하에 전염증성 IFN- γ 의 생산이 감소하고, 항-염증성 IL-4 생산이 증가하였다는 것은 T 세포 군집이 항-염증성 표현형으로 변하였다는 것을 지시하였다.

<87> **도 2 MSC가 전염증성 효과기 T 세포 기능을 저해한다.** (A) FITC-접합된 CD4 (x축) 및 PE 접합된 CD25 (y축) 항체로 MSC+PBMC 배양물 (MSC+PBMC)내의 PBMC 또는 비-부착성 분획을 염색함에 의한 T_{Reg} 세포수(%)의 유세포 측정 분석. 게이트는 배경으로서 동형 대조군 항체에 기초하여 설정하였다. 그레프는 5개의 독립적인 실험을 나타낸다. (B) MSC의 존재하에 생성된 T_{H1} 세포는 세포 배양물 상등액 중 IFN- γ 을 감소된 수준으로 분비하였고 (제1 y축), MSC의 존재하에 생성된 T_{H2} 세포는 세포 배양물 상등액 중 IL-4를 증가된 양으로 분비하였다 (제2 y축). (C) MSC는 24-웰 플레이트에서 0, 24, 또는 48시간 동안 배양된, 정제된 NK 세포로부터의 IFN- γ 분비를 저해한다. 제시된 데이터는 하나의 실험의 평균±SD 사이토카인 분비이며, 이는 3개의 독립적인 실험을 나타낸다.

<88> **도 3 MSC가 T_{Reg} 세포 군집의 수를 증가시키고, GITR 발현을 증가시킨다.** (A) PBMC 또는 MSC+PBMC (MSC 대 PBMC의 비 1:10) 배양물 (3일간 어떤 추가의 자극없이 배양됨)로부터의 CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ T_{Reg} 세포 군집은 2단계 자기 단리 방법을 사용하여 단리시켰다. 이를 세포에 방사선을 조사하고 (임의의 추가적인 증식을 차단하기 위해), 이를, 반응자가 식물적혈구응집소 (PHA) (2.5 mg/ml) 존재하의 동종이형 PBMC (자극제 대 반응자의 비 1:100)인 혼합 림프구 반응 (MLR)에서의 자극제로서 사용하였다. 세포를 48시간 동안 배양한 후, 3H 티미딘을 가하고, 24시간 후에 혼입된 방사능을 계수하였다. MSC의 존재하에 생성된 T_{Reg} 군집 (레인 3)은 MSC의 부재하에 생성된 T_{Reg} 세포 (레인 2)와 기능상 유사하다는 결과가 나왔다. (B) PBMC를 MSC 부재하에 (상단 플롯) 또는 MSC 존재하에 (MSC 대 PBMC의 비 1:10) (하단 플롯) 3일 동안 배양한 후, 비-부착성 분획을 수거하고, FITC-표지된 GITR 및 PE-표지된 CD4로 면역염색하였다. MSC 존재하에 배양된 세포의 GITR 발현이 2배 초과로 증가되었다는 결과가 나왔다.

<89> **도 4 MSC는 PGE₂를 생산하고, PGE₂를 차단하는 것이 MSC-매개 면역 조절 효과를 가역화시킨다.** (A) 다양한 농도의 PGE₂ 차단제 NS-398 또는 인도메타신 (인도메트.(Indometh.)) 존재 또는 부재하에서 배양된 MSC로부터 수득한 배양물 상등액 중 PGE₂ 분비 (평균±SD). 저해제 농도는 μM 으로 표시되고, 제시된 데이터는 24시간 배양한 후에 수득한 값이다. (B) 실시간 RT-PCR을 사용한 MSC 및 PBMC에서의 COX-1 및 COX-2 발현. MSC는 PBMC와 비교하였을 때 현저히 더 높은 수준의 COX-2를 발현시켰고, PBMC의 존재하에 MSC를 배양하였을 때에는 MSC에서 COX-2 발현이 3배 초과로 증가하였다. 3개의 독립 실험중 1개로부터 대표적인 데이터를 나타낸다. 하부 챕터

상에는 MSC가 플레이팅되어 있고, 상부 챔버 상에는 PBMC가 플레이팅되어 있는 트랜스-웰 챔버 플레이트에 MSC+PBMC 배양물을 놓았다. (C) 대조군과 비교할 때 PGE₂ 차단제 인도메타신 (인도.(Indo.)) 또는 NS-398의 존재가 활성화된 DC로부터의 TNF-α 분비 (□) 및 T_H1 세포로부터의 IFN-γ 분비 (■)를 증가시켰다. 데이터는 MSC 및 PGE₂ 저해제의 부재하에 생성된 배양물로부터의 변화율(%)로서 계산하였다. (D) MSC-PBMC (1:10) 공배 양시 PGE₂ 차단제 인도메타신 (인도.) 및 NS-398의 존재는 PHA-처리된 PBMC에 대한 MSC-매개 항-증식성 효과를 가역화시킨다. 제시한 데이터는 하나의 실험으로부터 얻은 것이며, 3개의 독립적인 실험을 나타낸다.

<90> **도 5 구성적 MSC 사이토카인 분비는 동종이형 PBMC의 존재하에서 상승한다.** 앞서 특징화된 인간 MSC를 사용하여 PBMC의 존재하에 (MSC 대 PBMC의 비 1:10) (빛금친 막대) 또는 그의 부재하에 (흰색 막대) 24시간 동안 배양된 배양물 상등액 중 사이토카인 IL-6 및 VEGF, 지질 매개 인자 PGE₂, 및 기질 금속단백질분해효소 1 (프로 MMP-1)의 수준을 분석하였다. MSC는 구성상 IL-6, VEGF, 및 PGE₂를 생산하였고, 이들 인자 수준은 PBMC와 공배 양시에 증가되었는 바, 이는 MSC가 염증 환경에서 면역 작용을 조절하는데 중요한 역할을 할 수 있다는 것을 제안한다.

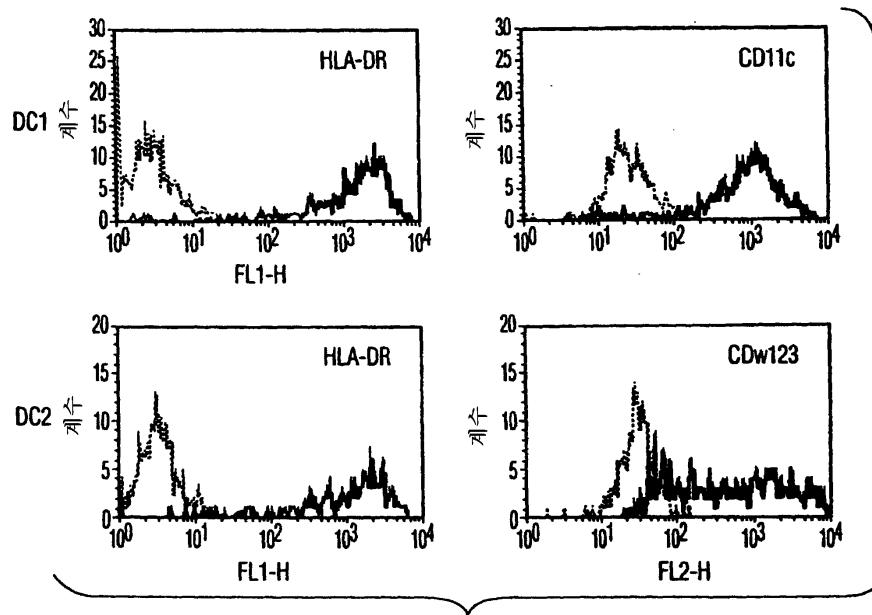
<91> **도 6 MSC는 용량-의존 방식으로 미토겐-유도성 T 세포 증식을 저해한다.** 72시간 동안 PHA (2.5 mg/ml)의 존재 또는 부재하에서 96-웰 플레이트 상에 플레이팅된 일정한 갯수의 MSC (2,000개의 세포/웰)와 함께 동종이형 PBMC의 갯수를 증가시키면서 인큐베이션시키고, ³H 티미딘 혼입을 측정하였다 (분당 계수, cpm). MSC의 존재하에 PHA-처리된 PBMC의 증식은 용량-의존 방식으로 저해되었다. 3개의 독립 실험중 1개로부터 대표적인 데이터를 나타낸다. 유사한 결과가 문헌 [LeBlanc, et al., *Scand J. Immunol.*, Vol. 57, pg. 11 (2003)]에 보고되어 있다.

<92> **도 7 제안된 MSC 작용 기전에 관한 계략도.** MSC는 선천 (DC-경로 (2)-(4); 및 NK-경로 (6)) 및 적응 (T-경로 (1) 및 (5), 및 B-경로 (7)) 면역계, 둘 모두로부터의 세포에 영향을 줌으로써 그들의 면역조절 효과를 매개한다. 침입 병원체에 대한 반응에서, 미성숙 DC는 유력한 진입 부위로 이동하여, 성숙해지고, 천연 세포를 초회 감작할 수 있는 능력을 획득하여 (항원 특이 및 공자극 신호에 의해) 방어 효과기 T 세포가 된다 (세포-매개 T_H1 또는 체액 T_H2 면역). MSC-DC 상호작용시, MSC는 직접적인 세포와 세포 사이의 접촉에 의해 또는 분비된 인자를 통해 세포-매개 반응을 개시할 수 있는 DC의 능력을 제한하거나 (경로 (2)), 체액 반응을 개시할 수 있는 능력을 촉진시킴으로써 (경로 (4)) 면역 반응의 결과를 바꿀 수 있다. 또한, 성숙한 효과기 T 세포가 존재할 때, 상기와 MSC는 상호작용하여 T_H1 (경로 (1)) 반응의 균형을 T_H2 반응 쪽으로 (경로 (5)), 가능하게는, GvHD 및 자가 면역 질환 증상의 억제를 위해서는 바람직한 결과인, B 세포 활성을 유발하는 IgE를 증가시키는 쪽으로 (경로 (7)) 편중시킬 수 있다. T_{Reg} 군집의 생성을 증가시키는 (경로 (3)) MSC의 능력에 있어서 MSC는 내성인 표현형을 일으킬 수 있고, 그의 국소 미세환경내 방관자 염증을 완충시킴으로써 수혜자 숙주에 도움을 줄 수 있다. 점선 (---)은 제안된 기전을 나타낸다.

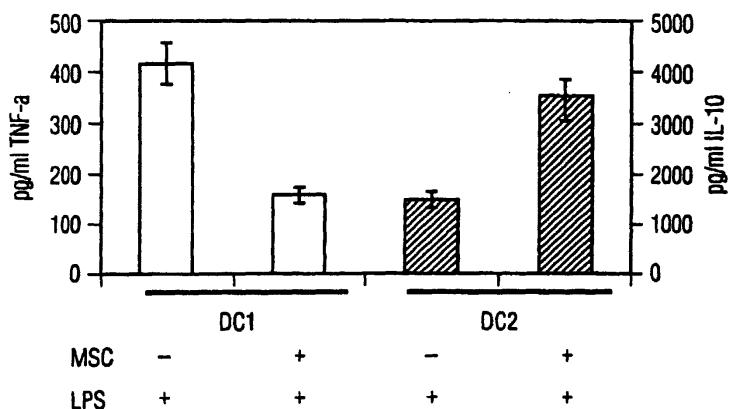
<93> 이에, 본 발명은 하기 실시예와 관련하여 기술될 것이지만, 본 발명의 범주가 그에 의해 제한되지는 않는다는 것을 이해하여야 한다.

도면

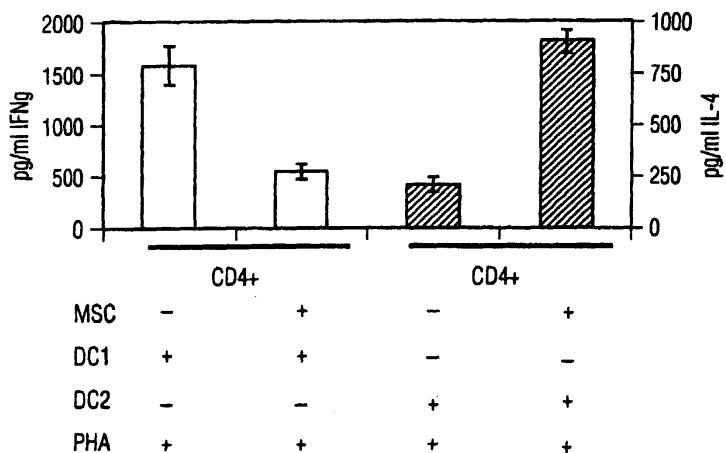
도면1A



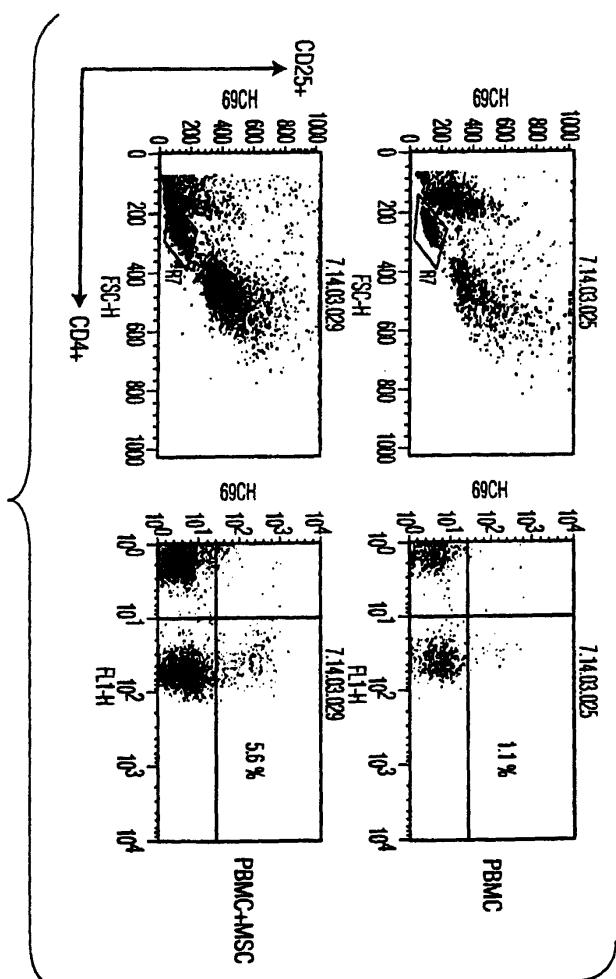
도면1B



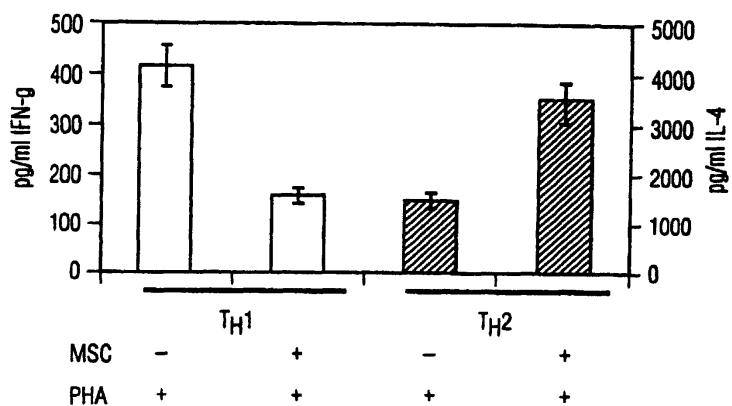
도면1C



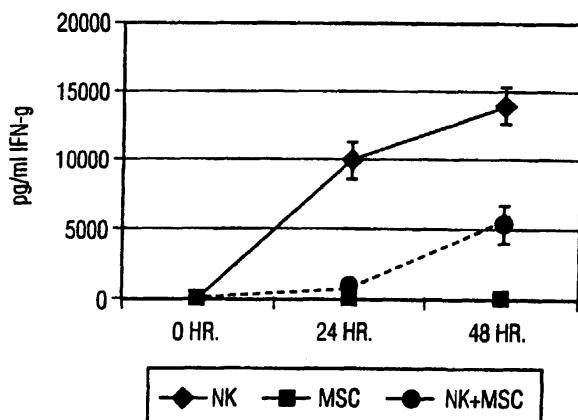
도면2A



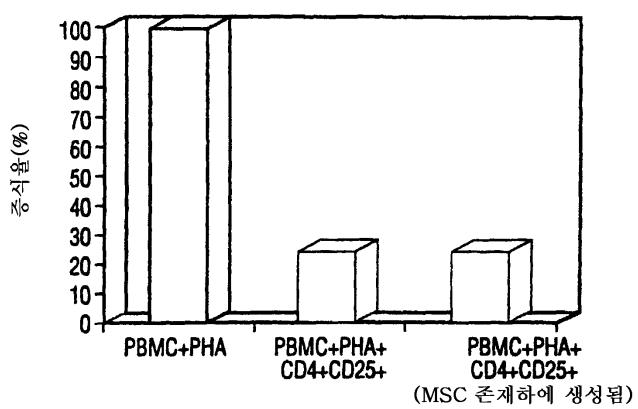
도면2B



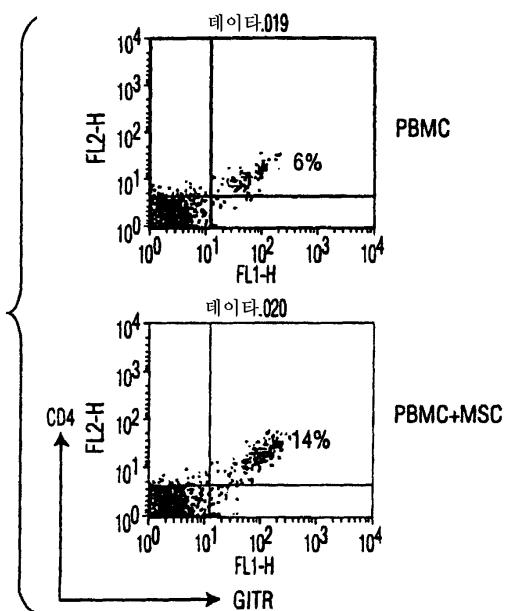
도면2C



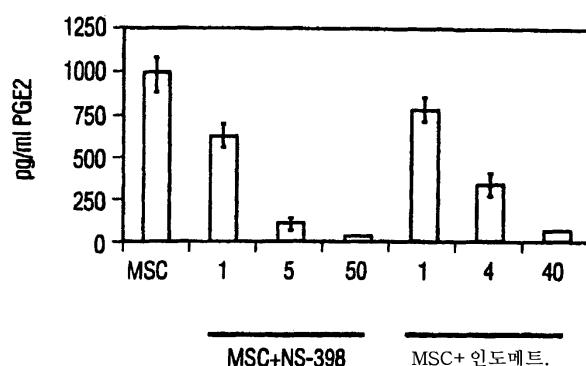
도면3A



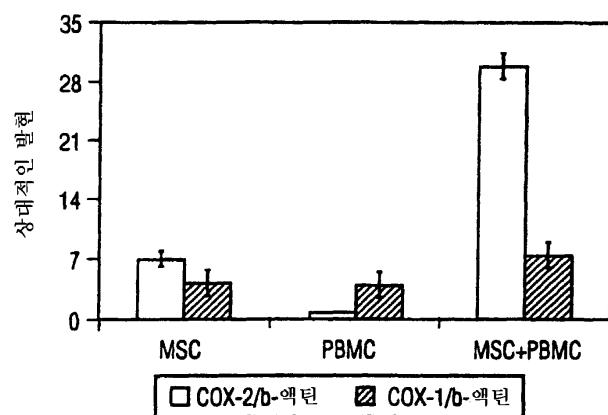
도면3B



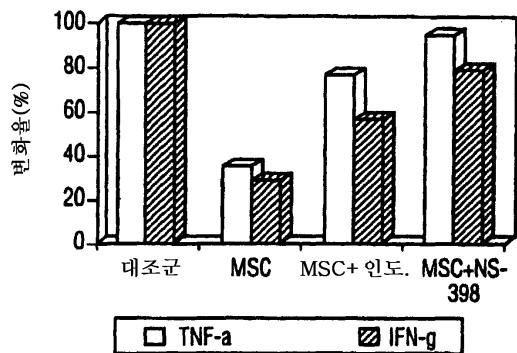
도면4A



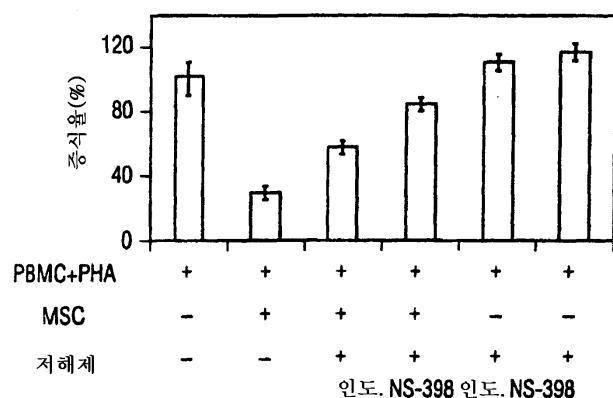
도면4B



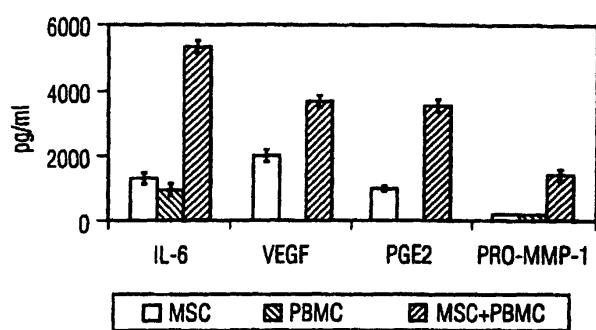
도면4C



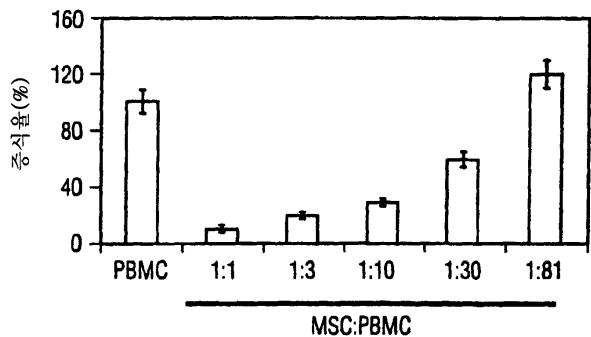
도면4D



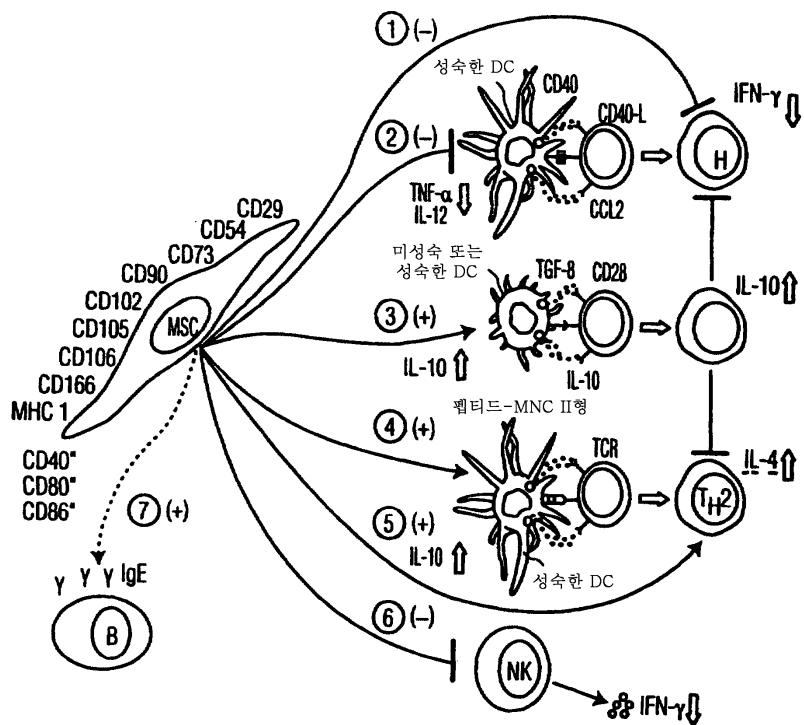
도면5



도면6



도면7



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Aggarwal, Sudeepa
Pittenger, Mark F.
Varney, Timothy
Danilkovitch, Alla

<120> MESENCHYMAL STEM CELLS AND USES THEREFOR

<130> 19231US03

<140> US 11/726,676
<141> 2007-03-22

<150> US 11/541,853
<151> 2006-10-02

<150> US 11/080,298
<151> 2005-03-15

<150> US 60/555,118
<151> 2004-03-22

<160> 4

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic sequences and are primers for PCR derived from human
COX-1

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(22)
<223> COX-1 forward primer

<400> 1
ccggatgcca gtcaggatga tg 22

<210> 2
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic sequences and are primers for PCR derived from human
COX-1

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(22)
<223> COX-1 reverse primer

<400> 2
ctagacagcc agatgctgac ag 22

<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> synthetic sequences and are primers for PCR derived from human
COX-2

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(20)
<223> COX-2 forward primer

<400> 3
atctaccctc ctcaagtccc 20

<210> 4
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer for PCR derived from human COX-2

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(21)
<223> COX-2 reverse primer

<400> 4
taccagaagg gcaggataca g 21