



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년07월26일
(11) 등록번호 10-2280622
(24) 등록일자 2021년07월16일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/12 (2020.01) A61K 35/28 (2015.01)
A61K 35/35 (2014.01) A61K 35/50 (2015.01)
A61K 35/54 (2015.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 35/12 (2013.01)
A61K 35/28 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2020-7028622(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2014년04월14일
심사청구일자 2020년10월06일
- (85) 번역문제출일자 2020년10월06일
- (65) 공개번호 10-2020-0118511
- (43) 공개일자 2020년10월15일
- (62) 원출원 특허 10-2020-7027612
원출원일자(국제) 2014년04월14일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2014/034015
- (87) 국제공개번호 WO 2014/169277
국제공개일자 2014년10월16일
- (30) 우선권주장
61/811,525 2013년04월12일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
KR1020080092336 A
WO1999047163 A2
KR102161726 B1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
라프란체스카, 사베리오
미국, 텍사스 77005, 휴스턴, 포드햄 5901
탕, 안토니 피.
미국, 오하이오 44122, 웨이커 하이츠, 편웨이 로드 18019
던스, 로버트 제이.
미국, 캘리포니아 92506, 리버사이드, 램스게이트 코트 1609
- (72) 발명자
라프란체스카, 사베리오
미국, 텍사스 77005, 휴스턴, 포드햄 5901
탕, 안토니 피.
미국, 오하이오 44122, 웨이커 하이츠, 편웨이 로드 18019
던스, 로버트 제이.
미국, 캘리포니아 92506, 리버사이드, 램스게이트 코트 1609
- (74) 대리인
김진희, 김태홍

전체 청구항 수 : 총 10 항

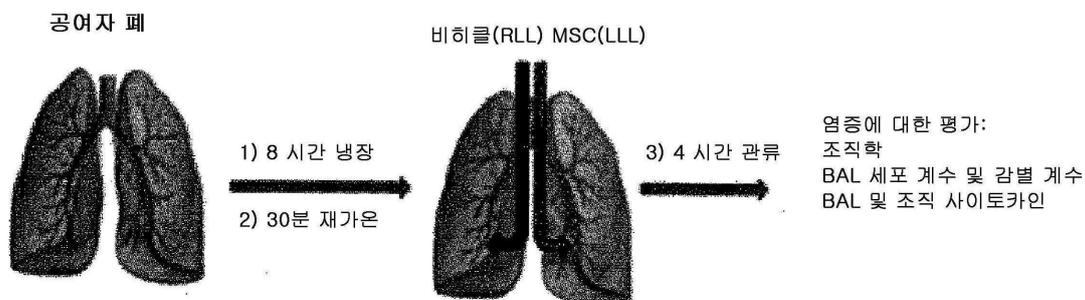
심사관 : 윤소라

(54) 발명의 명칭 이식용 장기의 개선

(57) 요약

본 발명은 장기 이식의 성공을 개선하는 방법 및 조성물을 제공한다. 본 발명의 방법 및 조성물은 이식 전, 동안 및/또는 후, 원하는 장기를 줄기 세포에 노출시키는 것에 관한 것이다. 하나의 양태에서, 줄기 세포는 이식을 위해 채취되는 것이 지정되거나 이식을 위해 채취된 장기에 대한 허혈의 해로운 효과를 감소시킨다. 이식을 위해 지정된 장기가 생체외에서 관류되는 또 다른 양태에서, 방법은 줄기 세포를 함유하는 매질로 장기를 관류함으로써 허혈성 재관류 손상을 감소시키는 것을 포함한다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 35/35 (2013.01)

A61K 35/50 (2013.01)

A61K 35/54 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

수용자에게 이식하기 위한 장기를 준비하는 생체외 방법으로서, 장기를, 이식 전에, 외인성 줄기 세포에 노출시키는 단계를 포함하며, 상기 줄기 세포는 텔로머라제를 발현하는 비배아, 비생식 세포이고, 종양형성성이 아니고, 정상 핵형을 갖고, 인간 골수 유래되는 것을 특징으로 하는 다능성 성체 전구 세포(MAPC)이며, 상기 줄기 세포가 비-HLA 일치의, 동종이계(allogeneic) 세포이고, 상기 줄기 세포에의 노출이 장기 내의 허혈성 재관류 손상을 감소시키는 것인 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 줄기 세포가 oct4를 발현하는 것인 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 줄기 세포가 내배엽, 외배엽, 및 중배엽의 배엽층 중 둘 이상의 세포 유형으로 분화될 수 있는 것인 방법.

청구항 4

◆청구항 4은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.◆

제1항에 있어서, 상기 줄기 세포가 oct4 및 텔로머라제를 발현하는 것인 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 줄기 세포가 oct4를 발현하고, 내배엽, 외배엽, 및 중배엽의 배엽층 중 둘 이상의 세포 유형으로 분화될 수 있는 것인 방법.

청구항 6

◆청구항 6은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.◆

제1항에 있어서, 상기 줄기 세포가 텔로머라제를 발현하고, 내배엽, 외배엽, 및 중배엽의 배엽층 중 둘 이상의 세포 유형으로 분화될 수 있는 것인 방법.

청구항 7

◆청구항 7은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.◆

제1항에 있어서, 상기 줄기 세포가 oct4 및 텔로머라제를 발현하고, 내배엽, 외배엽, 및 중배엽의 배엽층 중 둘 이상의 세포 유형으로 분화될 수 있는 것인 방법.

청구항 8

제3항 및 제5항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 줄기 세포가 내배엽, 외배엽, 및 중배엽의 배엽층의 세포 유형으로 분화될 수 있는 것인 방법.

청구항 9

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 줄기 세포가 적어도 10~40회의 세포 배증을 겪었거나 상기 줄기 세포가 적어도 30~35회의 세포 배증을 겪은 것인 방법.

청구항 10

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 장기에 노출되는 줄기 세포의 농도가 1×10^6 개 세포/ml 내지

10×10⁶ 개 세포/ml인 방법.

청구항 11

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 줄기 세포를 2~4 시간 동안 장기에 노출시키는 것인 방법.

청구항 12

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 줄기 세포가, 장기 내로의 관류를 위한 유체 중에 또는 장기내 투여를 위한 담체 중에 포함되어 있거나, 상기 줄기 세포가, 이식 전에 장기를 침욕(bathe)하는 매질 중에 포함되어 있는 것인 방법.

청구항 13

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 장기가 폐, 신장, 심장, 간, 췌장, 흉선, 위장관, 및 복합 동종이식편으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] [서열 목록]

[0002] 본 출원은 ASCII 형식으로 전자적으로 제출되고 본원에 이의 전문이 참조로서 인용되는 서열 목록을 포함한다. 2014년 4월 8일자로 생성된 상기 ASCII 카피의 명칭은 ATH-022234USORD_SL.txt이고 크기는 7,517 바이트이다.

[0003] [발명의 분야]

[0004] 본 발명의 분야는 장기 이식 및 장기 이식의 성공을 개선하는 방법 및 조성물을 제공하는 것이다. 방법 및 조성물은 이식 전 또는 이식 동안 원하는 장기를 줄기 세포에 노출시키는 것에 관한 것이다. 하나의 양태에서, 줄기 세포는 이식을 위해 채취되는 것이 지정되거나 이식을 위해 채취된 장기 상의 허혈의 해로운 효과를 감소시킨다. 또 다른 양태에서, 장기는 폐이다. 이식을 위해 지정된 장기가 생체의 관류되는 추가의 양태에서, 방법은 줄기 세포를 함유하는 매질로 장기를 관류함으로써 허혈성 재관류 손상을 감소시키는 것을 포함한다.

배경 기술

[0005] 장기 이식은 공여자 또는 공여 부위(공여자와 수용자가 동일한 경우)로부터의 장기의 준비 및 채취, 및 공여된 장기의 수용자 내로 또는 수용자로 장기의 이식, 유지 및/또는 사용을 나타낸다. 주요 건강관리 시장(예를

들면, 미국, 유럽 및 일본)에서 연간 50,000건 이상의 장기 이식이 존재하고, 장기 이식을 위한 대기자 명단에 170,000명 이상의 환자가 존재하는 것으로 추정되었다. 건강한 장기에 대한 수요는 공급을 상당히 앞지르고 있다.

[0006] 장기 이식에 있어서의 주요 도전과제는 장기 기능에 심각한 합병증 또는 이식 실패를 야기할 수 있는 이식 거부였다. 일반적으로, 이는 매우 유사한 혈청형을 갖는 공여자와 수용자의 매칭 및 이식 거부의 근원인 면역 거부를 관리하는 면역억제 약물의 사용을 통해 해결되어 왔다.

[0007] 또 다른 주요 도전과제는 이식 과정 전 및 그 동안 장기 생존능의 보존이었다. 장기의 제거, 저장 및 이식은 장기의 내부 구조 및 기능에 깊이 영향을 줄 수 있고, 이식이 완료된 후 정상적인 장기 기능의 회복이 지연되거나 방지되는 정도에 상당히 영향을 줄 수 있다. 이러한 장기 손상은 주로 허혈 및 저체온증의 결과로서 발생하지만, 또한 생체외 또는 이식 동안 장기의 재관류에 관련된 것일 수 있다. 생체외 관류를 포함하는 장기 보존 기술은 이러한 손해의 최소화를 제공하여 최적의 그래프트 생존 및 기능을 촉진한다. 그러나, 심지어 이들 기술 하에, 많은 경우에 장기 건강은 악화되고, 이는 이식 결과에 영향을 주며, 일부 경우에 악화가 너무 심각하여 공여된 장기가 생존불가능하여 이식 전에 거부된다.

[0008] 장기 이식에 있어서 이들 중요한 도전과제를 해결하는 기술은 환자의 삶의 질 및 생존, 및 이식과 관련된 합병증의 치료에 실질적인 영향을 주어야 한다.

발명의 내용

[0009] 본 발명은 이식 전, 동안 및/또는 후 외인성 줄기 세포에 노출된 장기의 이식을 포함하는 방법을 제공한다. 줄기 세포에의 노출은 성공적인 장기 이식의 가능성을 개선시킬 수 있다. 따라서, 본 발명은 하기 양태들에 관한 것이다.

[0010] 하나의 양태에서, 방법은 이식 전, 동안 및/또는 후 장기를 외인성 줄기 세포와 접촉시킴으로써 장기를 내성화(tolerizing)시키는 것을 포함할 수 있다. 장기의 내성화에 의하여, 장기는 상당한 면역학적 개입 없이 수용자에 의해 허용되도록 더 잘 준비된다. 내성화는, 예를 들면, 장기에서 T-조절 세포의 유도에 의해 달성될 수 있다(예를 들면, 문헌 [Eggenhofer et al., *Stem Cells Translation Medicine* 2013;2:000-000] 참조).

[0011] 하나의 양태에서, 본 발명은 이식 전, 동안 및/또는 후 외인성 줄기 세포를 함유하는 매질에 장기를 접촉시킴으로써 생체외 장기에서 손상을 감소시키는 방법에 관한 것이다.

[0012] 하나의 양태에서, 손상은 허혈성 재관류 손상의 결과로서 발생한다.

[0013] 하나의 양태에서, 본 방법은 이식되는 장기에서 일반 조직 또는 세포 분해를 감소시키는 것에 관한 것이다. 이는 허혈, 저체온증 및 재관류를 포함하지만 이에 한정되지 않는 인자로부터 야기될 수 있다. 따라서, 하나의 양태에서, 본 발명은 하나 이상의 이러한 사건의 결과로서의 손상을 감소시키는 것에 관한 것이다. 이러한 사건은, 적어도 부분적으로, 하기 중 하나 또는 이들의 조합에 의해 야기될 수 있다: (1) TH1 T-세포로부터 TH2 T-세포로의 면역조절; (2) M1 대식세포로부터 M2 대식세포로의 면역조절(예를 들면, 항염증 반응으로부터 항염증 반응으로의 이동을 야기함); (3) 호중구의 침윤의 억제(예를 들면, 세포 표면 수용체를 감소시킴으로써); (4) 항염증으로부터 항염증으로의 호중구의 이동; 및 (5) 외인성 줄기 세포에 의해 발생된 세포보호 또는 항아포토시스 효과.

[0014] 본원에 기재된 사건은 염증, 기타 면역 반응, 사이토카인 생성, 세포 아포토시스, 및 장기의 생존능 및 이식 적합성에 영향을 미치는 기타 사건을 야기할 수 있다. 따라서, 하나의 양태에서, 본 발명은 이러한 사건의 대상이 되는 장기 또는 이러한 사건이 이미 발생한 장기외 인성 줄기 세포를 투여함으로써 이러한 사건의 해로운 효과를 감소시키는 것에 관한 것이다.

[0015] 염증, 기타 면역 반응, 사이토카인 생성, 세포 아포토시스, 및 장기의 생존능 및 이식 적합성에 영향을 미치는 기타 사건을 야기할 수 있는 사건의 예는 내피 반응, 반응성 산소 종, 보체, 및 백혈구와 연관된 것들을 포함할 수 있지만 이에 한정되지 않는다. 내피 반응과 연관된 사건은 특정한 항염증성 유전자 산물(예를 들면, 백혈구 부착 분자, 사이토카인) 및/또는 생물활성제(예를 들면, 엔도텔린, 트롬복산 A₂)의 발현 및/또는 기타 "보호성" 유전자 산물(예를 들면, 구성적 산화질소 합성효소, 트롬보모듈린) 및/또는 생물활성제(예를 들면, 프로스타사이클린, 산화질소)의 억제를 포함할 수 있지만 이에 한정되지 않는다. 반응성 산소 종(예를 들면, (O₂-), (OH-), (HOCl), (H₂O₂), 및 산화질소 유래 퍼옥시니트라이드)과 연관된 사건은 지질 과산화에 의한 세포막의 직접적인 손상, 아라키돈산(트롬복산 A₂ 및 류코트리엔 B₄)을 형성하는 원형질 막 포스포리파제 A₂를 활성화시킴으로

써 백혈구 활성화 및 주화성을 자극하는 것, 및/또는 허혈성 재관류 후 백혈구 활성화, 주화성, 및 백혈구-내피 내피 부착을 증가시키는 것을 포함할 수 있지만 이에 한정되지 않는다. C3a, C5a, iC3b, C5b9(C5a가 가장 강력함)와 같은 보체 활성화와 연관된 사건은, 예를 들면, 혈관 항상성의 변경 및 백혈구-내피 부착의 증가에 의하여 허혈성 장기에 혈류를 절충함으로써 혈관 항상성을 변경하는 몇몇 항염증성 매개인자의 형성을 포함할 수 있지만 이에 한정되지 않는다. 백혈구와 연관된 사건은 증가된 미세혈관 투과도, 부종, 혈전증, 및 실질 세포 사멸을 야기하는, 백혈구가 독성 ROS, 프로테아제, 및 엘라스타제를 방출함에 따라, 기계적 폐색을 추가로 야기할 수 있는 백혈구 활성화, 주화성, 백혈구-내피 세포 부착 및 이행을 포함할 수 있지만 이에 한정되지 않는다.

- [0016] 하나의 양태에서, 장기는 폐, 신장, 심장, 간, 췌장, 흉선, 위장관 및 복합 동종이식편, 예를 들면, 사지, 얼굴 등, 및 각막, 피부, 정맥, 동맥, 뼈, 힘줄 및 판막, 예를 들면, 심장 판막 등을 포함하지만 이에 한정되지 않는 조직을 포함하지만 이에 한정되지 않는 군으로부터 선택된다.
- [0017] 하나의 양태에서, 줄기 세포는 장기에서 염증을 감소시킨다. 예를 들면, 장기는 장기에서 염증을 감소시키는 데 충분한 시간 및 용량으로 줄기 세포에 노출될 수 있다.
- [0018] 하나의 양태에서, 줄기 세포는 장기에서 염증 세포의 발생을 감소시킨다. 예를 들면, 장기는 장기에서 염증 세포의 발생을 감소시키는 데 충분한 시간 및 용량으로 줄기 세포에 노출될 수 있다.
- [0019] 하나의 양태에서, 줄기 세포는 장기에서 염증성 사이토카인을 감소시킨다. 예를 들면, 장기는 장기에서 염증성 사이토카인을 감소시키는 데 충분한 시간 및 용량으로 줄기 세포에 노출될 수 있다.
- [0020] 하나의 양태에서, 줄기 세포는 폐부종의 발생을 감소시킨다. 예를 들면, 장기는 폐부종의 발생을 감소시키는 데 충분한 시간 및 용량으로 줄기 세포에 노출될 수 있다.
- [0021] 하나의 양태에서, 줄기 세포는 폐 조직에서 IL-10 발현(단백질 및/또는 mRNA)의 발생을 증가시킨다. 예를 들면, 장기는 폐 조직에서 IL-10 발현의 발생을 증가시키는 데 충분한 시간 및 용량으로 줄기 세포에 노출될 수 있다.
- [0022] 하나의 양태에서 손상은 장기에서 저산소증을 야기한다.
- [0023] 하나의 양태에서, 줄기 세포는 장기에서 저산소증의 효과를 감소시킨다.
- [0024] 하나의 양태에서, 줄기 세포는 공여자로부터의 장기 제거와 수용자로의 이식 사이의 임의의 시점에서 투여된다.
- [0025] 하나의 양태에서, 줄기 세포는 이식 과정 동안 장기에 노출된다.
- [0026] 하나의 양태에서, 장기는 공여자로부터의 장기 제거 전에 장기가 여전히 공여자에게 그대로 있는 상태에서 줄기 세포에 노출될 수 있다.
- [0027] 하나의 양태에서, 장기는 일정 시간 기간 동안 줄기 세포에 노출될 수 있다. 시간 기간은 특정 장기에 따라 좌우될 수 있다. 예를 들면, 시간 기간은 약 1~2 시간, 약 2~3 시간, 약 3~4 시간, 약 4~5 시간, 약 5~6 시간, 약 7~8 시간, 약 8~9 시간, 약 9~10 시간, 또는 약 10 시간 이상일 수 있다. 적합한 시간 기간의 하나의 예는 문헌 [Zhao *et al.*, *BMC Medicine* 2012, 10:3]에 기재되고, 이는 정맥내 생체외 세포 공정을 위한 적합한 시간 기간을 포함한 생체외 과정의 교시에 대하여 본원에 참조로서 인용된다.
- [0028] 하나의 양태에서, 장기에 노출된 줄기 세포의 농도는 특정 장기에 따라 좌우될 수 있다. 예를 들면, 장기에 노출된 세포의 농도는 약 $0.01 \sim$ 약 5×10^7 개 세포/ml, 약 1×10^5 개 세포/ml \sim 약 5×10^7 개 세포/ml, 또는 약 10×10^6 개 세포/ml일 수 있다.
- [0029] 또 다른 양태에서, 장기에 노출된 줄기 세포의 농도는 약 1×10^5 개 세포/kg 장기 \sim 약 5×10^5 개 세포/kg 장기, 약 5×10^5 개 세포/kg 장기 \sim 1×10^6 개 세포/kg 장기 \sim 5×10^6 개 세포/kg 장기, 약 5×10^6 개 세포/kg 장기 \sim 1×10^7 개 세포/kg 장기, 약 1×10^7 개 세포/kg 장기 \sim 1.5×10^7 개 세포/kg 장기, 또는 약 1×10^7 개 세포/kg 장기 \sim 2×10^8 개 세포/kg 장기일 수 있다.
- [0030] 다른 양태에서, 줄기 세포는 장기 내로 관류를 위한 유체 또는 장기내(예를 들면, 기관지내) 투여를 위한 담체에 포함되어 있다.
- [0031] 또 다른 양태에서, 줄기 세포는 장기가 이식 전에 접촉되는 매질, 예를 들면, 관류가 아니라 장기를 침욕(bathe)하는 매질에 포함되어 있다.

- [0032] 발명자는 본 발명의 방법에서 임의의 원하는 줄기 세포의 사용을 고려한다. 이들은 배아 줄기 세포, 비배아 다능성 줄기 세포, 중간엽 줄기 세포, 신경 줄기 세포, 유도 만능 줄기 세포 등을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 하나의 양태에서, 줄기 세포는 비-HLA 일치의 동종이계(allogeneic) 세포일 수 있다.
- [0033] 세포는, 배아 줄기 세포가 아니고 생식 세포가 아니면서, 배아 줄기 세포의 일부 특성을 갖지만 비배아 조직으로부터 유래되고 본 출원에 기재된 효과를 제공하는 세포를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 세포는 천연적으로(즉, 유전적으로 또는 약학적으로 변형되지 않고) 이들 효과를 달성할 수 있다. 그러나, 효능(potency)을 증가시키기 위해, 천연 발현자(expressor)를 유전적으로 또는 약학적으로 변형시킬 수 있다.
- [0034] 세포는 oct4와 같은 만능성 마커를 발현할 수 있다. 이들은 또한 텔로머라제와 같은 확장된 복제능과 연관된 마커를 발현할 수 있다. 만능성의 기타 특성은 외배엽, 내배엽, 및 중배엽 배아 배엽층 중 둘 또는 셋과 같은 하나 이상의 배엽층의 세포 유형으로 분화될 수 있는 능력을 포함할 수 있다. 이러한 세포는 배양에서 불멸화 또는 형질전환될 수 있거나 될 수 없다. 세포는 형질전환되지 않고 매우 증폭될 수 있고 또한 정상 핵형을 유지할 수 있다. 하나의 양태에서, 비배아 줄기, 비생식 세포는 배양에서 원하는 수의 세포 배증(doubling)을 겪을 수 있다. 예를 들면, 비배아 줄기, 비생식 세포는 배양에서 10~40 이상의 세포 배증, 예를 들면, 30~35의 세포 배증을 겪을 수 있고, 여기서 세포는 형질전환되지 않고 정상 핵형을 갖는다. 세포는 내배엽, 외배엽, 및 중배엽 배아 계통 중 각각 둘의 하나 이상의 세포 유형으로 분화될 수 있고, 셋 모두로의 분화를 포함할 수 있다. 추가로, 세포는 기형종을 생성하지 않는 것과 같이 종양형성성이 아닐 수 있다. 세포가 형질전환되거나 종양형성성이고 이들을 주입에 사용하는 것이 바람직한 경우, 종양 내에서 세포 증식을 방지하는 처리에 의한 바와 같이, 이러한 세포는 이들이 생체내 종양을 형성할 수 없도록 비활성화될 수 있다. 이러한 처리는 당해 분야에 잘 알려져 있다.
- [0035] 세포는 하기 번호의 양태를 포함하지만 이에 한정되지 않는다:
- [0036] 1. 단리된 증폭된 비배아 줄기, 비생식 세포로서, 세포는 배양에서 10~40 이상의 세포 배증을 겪고, 세포는 oct4를 발현하고 형질전환되지 않으며 정상 핵형을 갖는 세포.
- [0037] 2. 상기 1번에 있어서, 텔로머라제, rex-1, rox-1, 또는 sox-2 중 하나 이상을 추가로 발현하는 것인 비배아 줄기, 비생식 세포.
- [0038] 3. 상기 1번에 있어서, 내배엽, 외배엽, 및 중배엽 배아 계통 중 둘 이상의 하나 이상의 세포 유형으로 분화될 수 있는 것인 비배아 줄기, 비생식 세포.
- [0039] 4. 상기 3번에 있어서, 텔로머라제, rex-1, rox-1, 또는 sox-2 중 하나 이상을 추가로 발현하는 것인 비배아 줄기, 비생식 세포.
- [0040] 5. 상기 3번에 있어서, 내배엽, 외배엽, 및 중배엽 배아 계통 중 각각의 하나 이상의 세포 유형으로 분화될 수 있는 것인 비배아 줄기, 비생식 세포.
- [0041] 6. 상기 5번에 있어서, 텔로머라제, rex-1, rox-1, 또는 sox-2 중 하나 이상을 추가로 발현하는 것인 비배아 줄기, 비생식 세포
- [0042] 7. 비배아, 비생식 조직 배양에 의해 수득된 단리된 증폭된 비배아 줄기, 비생식 세포로서, 세포는 배양에서 40 이상의 세포 배증을 겪고, 세포는 형질 전환되지 않고 정상 핵형을 갖는 세포.
- [0043] 8. 상기 7번에 있어서, oct4, 텔로머라제, rex-1, rox-1, 또는 sox-2 중 하나 이상을 발현하는 것인 비배아 줄기, 비생식 세포.
- [0044] 9. 상기 7번에 있어서, 내배엽, 외배엽, 및 중배엽 배아 계통 중 둘 이상의 하나 이상의 세포 유형으로 분화될 수 있는 것인 비배아 줄기, 비생식 세포.
- [0045] 10. 상기 9번에 있어서, oct4, 텔로머라제, rex-1, rox-1, 또는 sox-2 중 하나 이상을 발현하는 것인 비배아 줄기, 비생식 세포.
- [0046] 11. 상기 9번에 있어서, 내배엽, 외배엽, 및 중배엽 배아 계통 중 각각의 하나 이상의 세포 유형으로 분화될 수 있는 것인 비배아 줄기, 비생식 세포.
- [0047] 12. 상기 11번에 있어서, oct4, 텔로머라제, rex-1, rox-1, 또는 sox-2 중 하나 이상을 발현하는 것인 비배아 줄기, 비생식 세포.

- [0048] 13. 단리된 증폭된 비배아 줄기, 비생식 세포로서, 세포는 배양에서 10~40 이상의 세포 배증을 겪고, 세포는 텔로머라제를 발현하고 형질전화되지 않으며 정상 핵형을 갖는 세포.
- [0049] 14. 상기 13번에 있어서, oct4, rex-1, rox-1, 또는 sox-2 중 하나 이상을 추가로 발현하는 것인 비배아 줄기, 비생식 세포.
- [0050] 15. 상기 13번에 있어서, 내배엽, 외배엽, 및 중배엽 배아 계통 중 둘 이상의 하나 이상의 세포 유형으로 분화될 수 있는 것인 비배아 줄기, 비생식 세포.
- [0051] 16. 상기 15번에 있어서, oct4, rex-1, rox-1, 또는 sox-2 중 하나 이상을 추가로 발현하는 것인 비배아 줄기, 비생식 세포.
- [0052] 17. 상기 15번에 있어서, 내배엽, 외배엽, 및 중배엽 배아 계통 중 각각의 하나 이상의 세포 유형으로 분화될 수 있는 것인 비배아 줄기, 비생식 세포.
- [0053] 18. 상기 17번에 있어서, oct4, rex-1, rox-1, 또는 sox-2 중 하나 이상을 추가로 발현하는 것인 비배아 줄기, 비생식 세포.
- [0054] 19. 내배엽, 외배엽, 및 중배엽 배아 계통 중 둘 이상의 하나 이상의 세포 유형으로 분화될 수 있는 단리된 증폭된 비배아 줄기, 비생식 세포로서, 상기 세포는 배양에서 10~40 이상의 세포 배증을 겪는 세포.
- [0055] 20. 상기 19번에 있어서, oct4, 텔로머라제, rex-1, rox-1, 또는 sox-2 중 하나 이상을 발현하는 것인 비배아 줄기, 비생식 세포.
- [0056] 21. 상기 19번에 있어서, 내배엽, 외배엽, 및 중배엽 배아 계통 중 각각의 하나 이상의 세포 유형으로 분화될 수 있는 것인 비배아 줄기, 비생식 세포.
- [0057] 22. 상기 21번에 있어서, oct4, 텔로머라제, rex-1, rox-1, 또는 sox-2 중 하나 이상을 발현하는 것인 비배아 줄기, 비생식 세포.
- [0058] 하나의 양태에서, 컨디셔닝된 매질이 줄기 세포 대신에 사용된다.
- [0059] 하나의 양태에서, 장기는 인간으로부터의 것이다.
- [0060] 원하는 효과를 달성하기 위한 세포의 성질을 고려하여, 그 효과를 달성하는 원하는 효능(능력의 레벨)을 갖도록 선택되는 세포를 함유하는 세포 은행을 확립할 수 있다. 따라서, 본 발명은 세포 능력 검정을 포함한다. 은행은 장기로 투여되는 약학적 조성물을 제조하기 위한 공급원을 제공할 수 있다. 세포는 은행으로부터 직접적으로 사용될 수 있거나 사용 전 증폭될 수 있다. 특히 세포가 추가로 증폭의 대상이 되는 경우, 증폭 후, 세포가 여전히 원하는 효능을 갖는다는 것을 입증하는 것이 바람직하다. 은행은 장기 공여자 및 수용자에 동종이계인 세포의 "규격품(off the shelf)" 사용을 가능하게 한다.
- [0061] 따라서, 본 발명은 또한 줄기 세포를 장기에 노출시키기 전 수행되는 진단학적 과정에 관한 것이다. 과정은 본 출원에 기재된 효과를 달성하는 세포의 효능을 평가하는 것을 포함한다. 세포는 세포 은행으로부터 입수될 수 있고 직접적으로 사용되거나 투여 전에 증폭될 수 있다. 어떠한 경우에도, 세포는 원하는 효능에 대하여 평가될 수 있다. 특히 세포가 추가의 증폭에 대상이 되는 경우, 증폭 후, 세포가 여전히 원하는 효능을 갖는다는 것을 입증하는 것이 바람직하다.
- [0062] 효과를 위하여 선택된 세포가 선택 과정 동안 필수적으로 검정됨에도 불구하고, 치료를 위하여 대상에게 투여하기 전에 세포를 다시 검정하여 세포가 여전히 원하는 레벨에서 효과를 달성하는지를 확인하는 것이 바람직하고 신중하다. 이는 세포가 임의의 시간 기간 동안, 예를 들면, 세포 은행에 저장된 경우, 아마도, 세포가 저장 동안 냉동된 경우 특히 바람직하다.
- [0063] 최초의 세포 단리와 장기로의 투여 사이에, 효과에 대한 다중(즉, 순차적인) 검정이 있을 수 있다. 이는 당해 기간 내에 발생하는 조작 후, 세포가 여전히 원하는 레벨로 효과를 달성할 수 있다는 것을 확인하는 것이다. 예를 들면, 검정은 세포의 각각의 증폭 후 수행될 수 있다. 세포가 세포 은행에 저장된 경우, 이들은 저장으로부터 방출된 후 검정될 수 있다. 이들이 냉동된 경우, 이들은 해동 후 검정될 수 있다. 세포 은행으로부터 세포가 증폭되는 경우, 이들은 증폭 후 검정될 수 있다. 바람직하게는, (장기로 물리적으로 투여되는) 최종 세포 생성물의 일부분은 검정될 수 있다.
- [0064] 줄기 세포는 분비된 분자에 의하여 본원에 기재된 효과를 제공할 수 있기 때문에, 줄기 세포의 투여에 대하여

본원에 기재된 다양한 양태는 컨디셔닝된 배양 배지 중에 존재할 수 있는 하나 이상의 분비된 분자의 투여에 의해 수행될 수 있다.

[0065] 본 발명은 또한 원하는 효과를 달성하는 원하는 효능을 갖는 세포의 집단을 포함하는 조성물에 관한 것이다. 이러한 집단은 장기에 투여하는 데 적합한 약학적 조성물로서 및/또는 세포가 투여에 직접 사용될 수 있거나 투여 전 증폭될 수 있는 세포 은행에서 확인될 수 있다. 하나의 양태에서, 세포는 이전(모) 세포 집단과 비교하여 향상된(증가된) 효능을 갖는다. 모 세포는 본원에서 정의된 바와 같다. 향상은 천연 발현자의 선택 또는 세포 상에 작용하는 외부 인자에 의한 것일 수 있다.

[0066] 세포는 본원에 기재된 단리 및 배양 조건에 의해 제조될 수 있다. 특정한 양태에서, 이들은 지정된 세포 "멀티 스템(MultiStem)®"을 제조하는 데 사용되는 것들과 같은, 고혈청과 조합된 저산소 농도를 포함하는 본원에 기재된 배양 조건에 의해 제조된다.

도면의 간단한 설명

- [0067] 도 1. 연구 디자인의 도식.
- 도 2. 재관류 후 폐 2의 우하엽(RLL) 및 좌하엽(LL)의 대표적인 육안 외양. 비히클로 처리된 RLL이 부종 및 염증을 나타내는 반면, MSC로 처리된 LLL은 정상을 나타낸다.
- 도 3. 폐 5개 중 4개에서 및 전체적으로, 비히클로 처리된 RLL과 비교하여 MSC로 처리된 LLL에서 전체적인 염증의 상당한 감소를 증명하는 반정량적 점수화. 3명의 맹검 관찰자로부터의 통합 관찰의 평균±SD가 도시된다.
- 도 4a-b. 폐포 격벽 비대, 부종, 및 혈관주위 및 기관지주위 염증 세포 침윤물과 대조적으로 MSC로 처리된 LLL에서 최소 내지 유의미하지 않은 염증을 증명하는 폐 1의 대표적인 현미경사진. 오리지널 매그(Original Mag) 200X.
- 도 5a-c. 폐 3-5에서 MSC로 처리된 LLL에서 총 BAL액 세포수의 감소(도 5a). 총 세포 계수는 폐 1 또는 2에서 평가되지 않았다. MSC 적하는 또한 모든 5개의 폐에서 BAL액 총 호중구 및 호산구의 상승된 수의 상당한 감소를 야기하였다(도 5b-c). 데이터는 맹검 관찰자로부터의 통합 관찰의 평균±SD를 나타낸다.
- 도 6. MSC로 처리된 LLL에서 IL-10에서 유의미한 증가 및 iNOS, STC-1, 또는 TSG-6에서 유의미하지 않은 변화를 증명하는 폐 4로부터의 대표적인 BAL액 사이토카인 분석. 데이터는 각각의 LLL 또는 RLL 샘플의 3중 측정으로부터의 평균+표준 편차를 나타낸다.
- 도 7. 폐 조직의 사이토카인 분석. t=0, 2 및/또는 4시간에, 폐 2-5의 LLL 및 RLL로부터 수집된 폐 조직 샘플에 대해 qPCR 분석을 수행하였다. 발현 배수는 t=0 값에 비교한 표적 유전자의 레벨을 나타낸다. 모든 데이터는 하우스키핑 유전자, GAPDH에 대해 정규화되었다. 데이터는 폐 2-5로부터의 LLL 및 RLL 샘플로부터의 평균+표준 편차를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0068] 본 발명은 본원에 기재된 특정한 방법론, 프로토콜, 및 시약 등으로 한정되지 않고, 이와 같이, 다양할 수 있음이 이해되어야 한다. 본원에 사용된 용어는 오직 특정 양태를 설명하기 위한 것이고, 오로지 청구범위에 의해서만 정의되는 본 발명의 범위를 한정하는 것을 의도하지 않는다.

[0069] 부분 제목은 오직 구조적 목적으로만 본원에서 사용되고, 기재된 주제를 어떠한 방식으로도 한정하는 것으로 해석되지 않는다.

[0070] 본 출원의 방법 및 기술은 일반적으로 당해 분야에 잘 알려진 통상적인 방법에 따라 수행되고, 달리 기재되지 않는 한, 다양한 일반적인 문헌 및 본 발명의 명세서 전체에서 기재되고 논의되는 보다 구체적인 문헌에 기재된 바와 같이 수행된다. 예를 들면, 문헌 [Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001)], [Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates(1992)], 및 [Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(1990)]을 참조한다.

[0071] 정의

[0072] 본원에서 단수로 기재한 것은 하나 또는 하나 이상; 적어도 하나를 의미한다. 복수형이 사용되는 경우, 이는 일

반적으로 단수형을 포함한다.

- [0073] "세포 은행"은 미래 사용을 위하여 성장 및 저장된 세포에 대한 산업적 명명법이다. 세포는 분취되어 저장될 수 있다. 이들은 저장으로부터 직접적으로 사용될 수 있거나 저장 후 증폭될 수 있다. 이는 투여에 이용가능한 "규격품" 세포가 존재하도록 하는 편리한 것이다. 세포는 이들이 직접적으로 투여될 수 있도록 이미 약학적으로 허용되는 부형제 중에 저장되어 있을 수 있거나, 이들이 저장으로부터 방출시 적절한 부형제와 혼합될 수 있다. 세포는 냉동될 수 있거나 생존능을 보존하는 다른 형태로 저장될 수 있다. 본 발명의 하나의 양태에서, 세포 은행은 본 출원에 기재된 효과를 달성하는 향상된 효능을 위하여 세포가 선택되도록 생성된다. 저장으로부터의 방출 후, 투여 전, 효능에 대하여 세포를 다시 검정하는 것이 바람직할 수 있다. 이는 본 출원에 기재되거나 달리 당해 분야에 알려진, 직접 또는 간접, 임의의 검정을 사용하여 수행될 수 있다. 그 다음, 원하는 효능을 갖는 세포가 투여될 수 있다. 은행은 자가유래 세포(공여자 또는 수용자 장기로부터 유래)를 사용하여 제조될 수 있다. 또는 은행은 동종이계 사용을 위한 세포를 함유할 수 있다.
- [0074] "공동투여"는 둘 이상의 제제의 동시적인 또는 순차적인 투여를 포함하여 서로 연결되어, 함께, 대등하게 투여되는 것을 의미한다.
- [0075] "포함하는"은, 필수적으로, 포함될 수 있는 어떠한 것에 대한 임의의 조건 또는 배제 없이, 다른 한정없이 지시 대상을 포함하는 것을 의미한다. 예를 들면, "x 및 y를 포함하는 조성물"은 어떤 기타 성분이 조성물에 존재할 수 있더라도 x 및 y를 함유하는 임의의 조성물을 포함한다. 이와 같이, "x 단계를 포함하는 방법"은 x가 방법에서 유일한 단계인지, 여러 단계들 중 하나인지, 얼마나 많은 기타 단계가 존재할 수 있는지, 이들과 비교하여 x가 얼마나 단순하거나 복잡한지 여부와 관계없이, x가 수행되는 임의의 방법을 포함한다. "구성되다" 및 어원 "포함하다"를 사용하는 유사한 구는 "포함하는"과 동의어로서 본원에서 사용되고, 동일한 의미를 갖는다.
- [0076] "구성되다"는 "포함하는"의 동의어이다(상기 참조).
- [0077] 용어 "접촉하다"는, 줄기 세포 및 이식되는 장기와 관련하여 사용되는 경우, 장기를 노출시켜 줄기 세포를 장기 에 물리적으로 닿게하는 것을 의미할 수 있다. 이러한 예에서, 줄기 세포는 장기와 직접적으로 접촉한다. 기타 예에서, 줄기 세포는 장기에 간접적으로 접촉할 수 있고, 여기서 하나 이상의 구조(예를 들면, 또 다른 세포) 및/또는 유체(예를 들면, 혈액)가 줄기 세포와 장기 사이에 물리적으로 개입된다.
- [0078] "EC 세포"는 기형암종으로 지칭되는 암 유형의 분석으로부터 발견되었다. 1964에, 연구자들은 기형암종의 단일 세포가 단리될 수 있고 배양 중 미분화된 채로 남아 있을 수 있음을 주목하였다. 이러한 유형의 줄기 세포는 배아 암종 세포(EC 세포)로서 알려지기 시작하였다.
- [0079] "유효량"은 일반적으로, 예를 들면, 본 출원에 기재된 특정한 바람직한 효과를 달성하는 것을 포함하여, 목적하지 않는 염증 효과를 완화시키는 데 효과적인, 원하는 국소적 또는 전신적 효과를 제공하는 양을 의미한다. 예를 들면, 유효량은 유리하거나 원하는 임상학적 결과를 유발하는 데 충분한 양이다. 유효량은 단일 투여로 한번에 모두 제공될 수 있거나 몇몇 투여로 유효량을 제공하는 분획화된 양으로 제공될 수 있다. 유효량으로 간주될 것의 정밀한 측정은 장기의 유형, 치료되는 질환 또는 손상, 장기가 처리된 방식, 수집으로부터의 시간 길이 등을 포함하는 각각의 장기에 대한 개별적인 인자를 기반으로 할 수 있다. 당해 분야의 숙련가는 당해 분야에서 일상적인 고려사항을 기반으로 제공된 장기에 대한 유효량을 결정할 수 있을 것이다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "유효 용량"은 "유효량"과 동일한 바를 의미한다.
- [0080] "유효 경로"는 일반적으로 원하는 구획, 시스템, 또는 위치에 제제의 전달을 제공하는 경로를 의미한다. 예를 들면, 유효 경로는 이를 통해 제제가 투여되어 원하는 작용 면에 유리하거나 원하는 임상학적 결과(본 발명의 경우, 효과적인 이식)를 유발하는 데 충분한 제제의 양을 제공할 수 있는 것이다.
- [0081] "배아 줄기 세포(ESC)"는 당해 분야에 잘 알려져 있고 많은 상이한 포유동물 종으로부터 제조되었다. 배아 줄기 세포는 배반포로 알려진 초기 단계 배아의 내세포괴로부터 유래된 줄기 세포이다. 이들은 세 1차 배엽인 외배엽, 내배엽, 및 중배엽의 모든 유도체로 분화될 수 있다. 이들은 성체 신체에서 220종 이상의 세포 유형 각각을 포함한다. ES 세포는 신체에서 태반을 제외한 임의의 조직이 될 수 있다. 오직 상실배의 세포만이 모든 조직 및 태반이 될 수 있는 전능성이다. ESC와 유사한 일부 세포는 탈핵 수정란 내로 체세포핵을 핵 이식함으로써 제조될 수 있다.
- [0082] 용어 "외인성"은, 줄기 세포와 관련되어 사용되는 경우, 일반적으로 장기의 외부에 있으며 유효 경로에 의해 이식이 의도된 장기에 노출된(예를 들면, 접촉된) 줄기 세포를 의미한다. 외인성 줄기 세포는 동일한 대상 또는 상이한 대상으로부터의 것일 수 있다. 하나의 양태에서, 외인성 줄기 세포는 대상으로부터 채취되고, 단리되고,

생체의 증폭된 다음, 유효 경로에 의해 이식이 의도된 장기에 노출된 줄기 세포를 포함할 수 있다.

- [0083] 용어 "노출시키다"는 하나 이상의 줄기 세포를 이식이 의도된 장기에 투여하는 행동을 포함한다. 장기에 대한 투여는 생체의 또는 생체내(예를 들면, 대상 내로의 관류) 수행될 수 있다.
- [0084] 용어 "포함하다"의 사용은 한정을 의도하지 않는다.
- [0085] "증가하다" 또는 "증가하는"은 생물학적 사건 전체를 유도하거나 사건의 정도를 증가시키는 것을 의미한다.
- [0086] "유도 만능 줄기 세포(IPSC 또는 IPS 세포)"는, 예를 들면, 체세포에 덜 분화된 표현형을 부여하는 외인성 유전자를 도입함으로써 재프로그래밍된 체세포이다. 그 다음, 이들 세포는 덜 분화된 자손으로 분화되도록 유도될 수 있다. IPS 세포는 원래 2006년에 발견된 접근법의 변형을 사용하여 유도되었다(Yamanaka, S. *et al.*, *Cell Stem Cell*, 1:39-49(2007)). 예를 들면, IPS 세포를 생성하는 하나의 예에서, 과학자들은 피부 세포로부터 출발하였고, 이는 그 다음, 레트로바이러스를 사용하여 유전자를 세포 DNA 내로 삽입하는 표준 실험실 기술에 의해 변형되었다. 하나의 예에서, 삽입된 유전자는 배아 줄기 세포 유사 상태로 세포를 유지시키는 천연 조절자로서 함께 작용하는 것으로 알려진 Oct4, Sox2, Lif4, 및 c-myc이었다. 이들 세포는 문헌에 기재되어 있다. 예를 들면, 문헌 [Wernig *et al.*, *PNAS*, 105:5856-5861(2008)]; [Jaenisch *et al.*, *Cell*, 132:567-582(2008)]; [Hanna *et al.*, *Cell*, 133:250-264(2008)]; 및 [Brambrink *et al.*, *Cell Stem Cell*, 2:151-159(2008)]을 참조한다. 이들 참조는 IPSC 및 이의 제조 방법을 교시하기 위한 참조로서 인용된다. 이러한 세포는 특정한 배양 조건(특정한 제제에 대한 노출)에 의해 생성될 수 있다는 것이 또한 가능하다.
- [0087] 용어 "허혈성 재관류 손상"은 산업에서 이해되고, 예를 들면, [<http://emedicine.medscape.com/article/431140-overview#aw2aab6b3>](장기 보존에 대하여), 뿐만 아니라 문헌 [de Groot, H. *et al.*, *Transplant Proc.* 39(2):481-4(Mar. 2007)]에 기재되고, 이는 허혈성 재관류 손상 및 이의 메커니즘 세부사항의 교시에 대하여 참조로서 본원에 인용된다.
- [0088] "허혈"은 2 단계로 발생한다. 제1 상은 따뜻한 허혈 단계를 의미하고, 공여자 장기가 제거되고 순환이 중단되는 시간부터 장기에 저체온 보존 용액이 투여되는 시간까지를 포함한다. 차가운 허혈 단계는 수용자에 이식 및 정상 재순환 전에 장기가 저체온 상태로 보존되는 경우에 발생한다.
- [0089] 용어 "단리된"은 생체내에서 세포 또는 세포들과 연관된 하나 이상의 세포 또는 하나 이상의 세포내 성분들과 연관되지 않은 세포 또는 세포들을 의미한다. "농축된 집단"은 생체내 또는 1차 배양에서 하나 이상의 다른 세포 유형에 비해 원하는 세포의 수가 상대적으로 증가한 것을 의미한다.
- [0090] 그러나, 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "단리된"은 오직 본 발명의 세포만의 존재를 나타내는 것이 아니다. 그보다, 용어 "단리된"은 본 발명의 세포가 이들의 천연 조직 환경으로부터 제거되고 정상 조직 환경과 비교하여 더 높은 농도로 존재하는 것을 나타낸다. 따라서, "단리된" 세포 집단은 본 발명의 세포 이외의 세포 유형을 추가로 포함할 수 있고, 추가의 조직 성분들을 포함할 수 있다. 이는 또한, 예를 들면, 세포 배중에 관하여 표현될 수 있다. 세포는 생체내 또는 이의 원래 조직 환경(예를 들면, 골수, 말초혈, 태반, 탯줄, 제대혈, 지방 조직 등)에서 이의 원래 수와 비교하여 풍부하도록 시험관내 또는 생체의 10, 20, 30, 40 이상의 배증을 겪을 수 있다.
- [0091] "MAPC"는 "다능성 성체 전구 세포"의 두문자어이다. 이는 배아 줄기 세포 또는 생식 세포는 아니지만 이들의 일부 특성들을 갖는 세포를 의미한다. MAPC는 이들이 발견된 경우, 세포에 각각 신규함을 부여하는 대안적인 설명의 수로 특성화될 수 있다. 이들은, 따라서, 이들 설명 중 하나 이상에 의해 특성화될 수 있다. 첫째, 이들은 형질전환(종양형성)되지 않고 정상 핵형을 가지며 배양에서 확장된 복제능을 갖는다. 둘째, 이들은 분화되어 하나 이상의 배엽, 예를 들면, 둘 또는 모든 세 배엽(즉, 내배엽, 중배엽 및 외배엽)의 세포 자손이 생기게 할 수 있다. 셋째, 이들이 배아 줄기 세포 또는 생식 세포가 아님에도 불구하고, 이들은 이들 원시 세포 유형의 마커를 발현할 수 있고, 따라서 Oct 3/4(즉, Oct 3A), rex-1, 및 rox-1 중 하나 이상을 발현할 수 있다. 이들은 또한 sox-2 및 SSEA-4 중 하나 이상을 발현할 수 있다. 넷째, 줄기 세포와 같이, 이들은 자기-재생될 수 있고, 즉, 형질전환되지 않고 확장된 복제능을 갖는다. 이는 이들 세포가 텔로머라제를 발현하는 것(즉, 텔로머라제 활성을 갖는 것)을 의미한다. 따라서, "MAPC"라고 지정된 세포 유형은 일부 이의 신규한 성질을 통해 세포를 설명하는 대안적인 기본 특성에 의해 특성화될 수 있다.
- [0092] MAPC에서 용어 "성체"는 비제한적이다. 이는 비배아 체세포를 나타낸다. MAPC는 핵형이 정상이고 생체내 기형종을 형성하지 않는다. 이러한 두문자어는 미국 특허 제7,015,037호에서 골수로부터 단리된 만능성 세포를 설명하는 데 처음 사용되었다. 그러나, "MAPC"라고 먼저 지정된 이들 세포와 동일할 수 있는 만능성 마커 및/또는 분

화능을 갖는 세포가 순차적으로 본 발명의 목적을 위하여 발견되었다. 세포의 MAPC 유형의 필수적인 설명은 상기 발명의 개요에 제공된다.

- [0093] MAPC는 MSC보다 원시적인 원시 전구 세포 집단을 나타낸다(Verfaillie, CM., *Trends Cell Biol* 12:502-8(2002); Jahagirdar, B.N., *et al.*, *Exp Hematol*, 29:543-56(2001); Reyes, M. and CM. Verfaillie, *Ann N Y Acad Sci*, 938:231-233(2001); Jiang, Y. *et al.*, *Exp Hematol*, 30:896-904(2002); and Jiang, Y. *et al.*, *Nature*, 418:41-9.(2002)).
- [0094] 용어 "멀티스텝"은 미국 특허 제7,015,037호의 MAPC를 기반으로 한 세포 제형의 상표명이고, 즉 상기 기재된 바와 같은 비배아 줄기, 비생식 세포이다. 멀티스텝은 당해 특허 출원에 기재된 세포 배양 방법, 특히 저산소 및 고혈청에 따라 제조된다. 멀티스텝은 매우 증폭성이고 핵형이 정상이며 생체내 기형종을 형성하지 않는다. 이는 하나 이상의 배엽의 세포 계통으로 분화될 수 있고, 텔로머라제, oct3/4, rex-1, rox-1, sox-2, 및 SSEA4 중 하나 이상을 발현할 수 있다.
- [0095] 용어 "장기"는 이식을 위하여 공여자로부터 제거되었거나 수용자에게 이식을 위하여 공여자로부터 제거되는 것이 의도되는 전체 온전한 장기로서 산업에서 이의 통상적이고 이해되는 의미에 따라 사용될 수 있다. 용어 "장기"가 본 출원에서 강조되지 않더라도, 방법은 전체 장기를 구성하지 않을 수 있는 조직에 적용된다. 즉, 본 출원에서 달리 기재된 것들과 같은 장기의 부분에 적용된다. 따라서, 적절한 경우, 용어 "조직"은 용어 "장기"로 적절하게 치환될 수 있다.
- [0096] "약학적으로 허용되는 담체"는 본 발명에 사용되는 세포를 위한 임의의 약학적으로 허용되는 매질이다. 이러한 매질은 등장성, 세포 대사, pH 등을 유지할 수 있다. 이는 장기에의 투여와 혼화성이고, 따라서 세포 전달 및 치료를 위하여 사용될 수 있다.
- [0097] 용어 "효능"은 본 출원에 기재된 효과를 달성하는 세포의 능력을 의미한다. 따라서, 효능은 성공적인 이식 가능성의 증가, 이식전 장기의 악화 억제, 장기에서 염증 활성 감소, 장기에 면역 내성 제공, 장기에서 항염증성 사이토카인의 생성 증가, 장기에서 신경보호 T-세포 존재의 증가, 장기에서 반응성 T-세포 존재의 감소, 장기에서 항염증성 사이토카인 레벨의 감소, 장기에서 저산소증 효과의 감소, 장기에서 부종 레벨의 역전, 및 장기에서 저체온증 효과의 감소를 포함하지만 이에 한정되지 않는 다양한 레벨의 효과를 나타낸다. 회수, 보존, 및 이식 동안 지속되는 손상은 허혈 및 저체온증으로부터 주로 발생한다. 이들은 다양한 방식으로 장기에 영향을 줄 수 있다. 이들은 상기 기재된 참조 문헌 [Medscape]에 기재되고, 링크는 본 출원에 제공된다. 당해 참조에 따라, 조직 손상의 메커니즘은 세포 구조에서 완결성의 상실, 세포의 이온 조성의 붕괴, ATP 발생 붕괴를 포함하고, 재관류의 결과로서, 산소 자유 라디칼의 독성 누적에 의하여 재관류 동안 손상이 발생할 수 있다.
- [0098] 세포 구조의 완결성에 관하여, 완결성은 세포막에서 구조적 완결성의 손실에 의해 방해될 수 있다. 세포막의 완결성 유지는 온도, pH, 삼투압농도의 제어에 따라 좌우된다. 장기 허혈 및 보존은 모든 이들 파라미터에 지장을 준다.
- [0099] "원시 배아 생식 세포"(PG 또는 EG 세포)는 배양되고 자극되어 많은 덜 분화된 세포 유형을 생성할 수 있다.
- [0100] "전구 세포"는 이들 최종적으로 분화된 자손의 모든 특성은 아니지만 일부 특성을 갖는 줄기 세포의 분화 동안 생성된 세포이다. "심장 전구 세포"와 같이 제한된 전구 세포(defined progenitor cell)는 특이적인 또는 최종적으로 분화된 세포 유형이 아닌, 계통에 전념한다. 두문자어 "MAPC"에서 사용되는 용어 "전구"는 이들 세포를 특정 계통에 한정하지 않는다. 전구 세포는 전구 세포보다 높게 분화된 자손 세포를 형성할 수 있다.
- [0101] 본원에서 사용되는 용어 "감소하다"는 방지 뿐만 아니라 하락을 의미한다. 장기 처리의 맥락에서, "감소하다"는 장기 거부를 방지하거나 완화시키는 것이다. 이는 장기 거부의 원인 또는 증상을 포함한다. 이는, 예를 들면, 염증의 해로운 효과를 완화시키는 것과 같이 거부의 근본적인 생물학적 원인에 적용된다.
- [0102] 원하는 레벨의 효능을 갖는 세포의 "선택"은 세포의 확인(검정에 의한 바와 같이), 단리 및 증폭을 의미할 수 있다. 이는 세포가 단리된 것으로부터의 모 세포 집단보다 높은 효능을 갖는 집단을 생성할 수 있다. "모" 세포 집단은 선택된 세포가 나뉜 것으로부터의 모 세포를 의미한다. "모"는 실제 P1 → F1 관계(즉, 자손 세포)를 의미한다. 따라서 세포 X가 세포 X 및 Y의 혼합된 집단으로부터 단리되는 경우, 여기서 X가 발현자이고 Y는 아니라면, 향상된 발현을 갖고 있는 X의 단순한 단리를 분류할 수 없을 것이다. 하지만, X의 자손 세포가 더 높은 발현자라면, 향상된 발현을 갖고 있는 자손 세포를 분류할 수 있을 것이다.
- [0103] 원하는 효과를 달성하는 세포를 선택하는 것은 세포가 원하는 효과를 달성하는지 여부를 측정하는 검정 둘 다를

포함할 것이고, 또한 이들 세포를 수득하는 것을 포함할 것이다. 세포는 외인성 이식유전자/DNA에 의해 달성되지 않는 원하는 효과를 천연적으로 달성할 수 있다. 하지만 효과적인 세포는 효과를 증가시키는 제제와 배양되거나 이에 노출됨으로써 개선될 수 있다. 효과적인 세포가 선택되는 것으로부터의 세포 집단은 검정 수행 전에 효능을 갖는 것으로 알려지지 않을 수 있다. 세포는 검정 수행 전에 원하는 효과를 달성하는 것으로 알려지지 않을 수 있다. 효과는 유전자 발현 및/또는 분비에 따라 좌우될 수 있기 때문에, 또한 효과를 유발하는 하나 이상의 유전자를 기반으로 선택할 수 있다.

- [0104] 선택은 조직에서 세포로부터의 선택일 수 있다. 예를 들면, 당해 경우, 세포는 원하는 조직으로부터 단리되거나, 배양 중 증폭되거나, 원하는 효과를 달성하기 위하여 선택될 것이고, 선택된 세포는 추가로 증폭된다.
- [0105] 선택은 배양 중의 세포와 같은 생체의 세포로부터의 선택일 수 있다. 당해 경우, 배양 중의 하나 이상의 세포는 원하는 효과를 달성하기 위하여 검정될 수 있고, 원하는 효과를 달성하는 수득된 세포는 추가로 증폭될 수 있다.
- [0106] 세포는 또한 원하는 효과를 달성하는 향상된 능력에 대하여 선택될 수 있다. 당해 경우, 향상된 세포가 수득된 세포 집단은 이미 원하는 효과를 갖는다. 향상된 효과는 모 집단보다 높은 세포당 평균량을 의미한다.
- [0107] 향상된 세포가 선택되는 모 집단은 실질적으로 동질(동일한 세포 유형)일 수 있다. 당해 집단으로부터 이러한 향상된 세포를 수득하는 하나의 방식은 단일 세포 또는 세포 풀을 생성하고, 이들 세포 또는 세포 풀을 검정하여 향상된(더 큰) 효과를 천연적으로 갖는 클론을 수득하는 것이고(효과를 유도하거나 증가시키는 조절자로 세포를 표적화하는 것과 대조적으로), 그 다음, 이들 세포의 증폭은 천연적으로 향상된다.
- [0108] 그러나, 세포는 효과를 유도하거나 증가시킬 하나 이상의 제제로 처리될 수 있다. 따라서, 실질적으로 동질적인 집단은 처리되어 효과를 향상시킬 수 있다.
- [0109] 집단이 실질적으로 동질이 아닌 경우, 처리되는 모 세포 집단은 향상된 효과가 구해지는 원하는 세포 유형의 100 이상, 보다 바람직하게는 1,000 이상의 세포, 매우 보다 바람직하게는 10,000 이상의 세포를 함유하는 것이 바람직하다. 처리 후, 당해 하위-집단은 공지된 세포 선택 기술에 의해 이질적 집단으로부터 회수될 수 있고, 원하는 경우, 추가로 증폭될 수 있다.
- [0110] 따라서, 효과의 원하는 레벨은 제공된 기존 집단에서 레벨보다 높은 것일 수 있다. 예를 들면, 조직으로부터 1차 배양으로 가해지고 효과를 생성하도록 특정하게 지정되지 않은 배양 조건에 의하여 증폭되고 단리되는 세포는 모 집단을 제공할 수 있다. 이러한 모 집단을 처리하여 세포당 평균 효과를 향상시키거나, 고의적인 처리 없이 더 큰 효과 정도를 발현하는 집단 사이의 세포 또는 세포들을 스크리닝할 수 있다. 그 다음, 이러한 세포를 증폭하여 더 높은(원하는) 발현을 갖는 집단을 제공할 수 있다.
- [0111] 줄기 세포의 "자기-재생"은 이들이 발생하는 것들과 동일한 것인 분화능을 갖는 딸 줄기 세포를 복제 생성하는 능력을 의미한다. 당해 맥락에서 사용되는 유사한 용어는 "증식"이다.
- [0112] "줄기 세포"는 자기-재생(즉, 동일한 분화능을 가진 자손)을 겪을 수 있고 또한 분화능에서보다 제한된 자손 세포를 생성할 수 있는 세포를 의미한다. 본 발명의 맥락에서, 줄기 세포는 또한, 예를 들면, 핵 이식, 보다 원시적인 줄기 세포와의 융합, 특이적인 전사 인자의 도입, 또는 특이적인 조건하에 배양에 의해 탈분화된 더 분화된 세포를 포함할 것이다. 예를 들면, 문헌 [Wilmot *et al.*, *Nature*, 385:810-813(1997)]; [Ying *et al.*, *Nature*, 416:545-548(2002)]; [Guan *et al.*, *Nature*, 440:1199-1203(2006)]; [Takahashi *et al.*, *Cell*, 126:663-676(2006)]; [Okita *et al.*, *Nature*, 448:313-317(2007)]; 및 [Takahashi *et al.*, *Cell*, 131:861-872(2007)]을 참조한다.
- [0113] 탈분화는 또한 특정한 화합물의 투여에 의해 또는 탈분화를 유발할 수 있는 시험관내 또는 생체내 물리적 환경에 노출시킴으로써 유발될 수 있다. 줄기 세포는 또한 기형암종과 같은 비정상 조직, 및 배양체(이들은 내세포 괴로부터 직접적이지는 않지만, 배아 조직으로부터 유도되는 배아 줄기 세포로 간주될 수 있음에도 불구하고)와 같은 몇몇 다른 공급원으로부터 유도될 수 있다. 줄기 세포는 또한 줄기 세포와 연관된 유전자를 유도 만능 줄기 세포와 같은 비-줄기 세포 내로 도입함으로써 생성될 수 있다.
- [0114] "대상"은 척추동물, 예를 들면, 포유동물, 예를 들면, 인간을 의미한다. 포유동물은 인간, 개, 고양이, 말, 소, 및 돼지를 포함하지만 이에 한정되지 않는다.
- [0115] 용어 "치료학적 유효량"은 포유동물에서 임의의 치료학적 반응을 생성하는 것으로 측정된 제제의 양을

의미한다. 예를 들면, 유효한 항염증성 치료제는 환자의 생존가능성을 연장시키고/연장시키거나 명백한 임상학적 증상을 억제할 수 있다. 본원에서 사용되는 용어의 의미 내에서 치료학적으로 유효한 치료는, 심지어 이들이 질환 결과 그 자체를 개선시키지 않는 경우에도, 대상의 삶의 질을 개선하는 치료를 포함한다. 이러한 치료학적 유효량은 당해 분야의 숙련가에 의해 용이하게 확인된다. 따라서, "치료하다"는 이러한 양을 전달하는 것을 의미한다. 따라서, 치료는 임의의 병리학적 증상을 예방하거나 완화시킬 수 있다.

[0116] 용어 "내성화" 또는 "내성화하다"는 그래프트의 면역원성을 감소시켜 수용자에 의한 장기 내성의 발달을 가능하게 하거나 촉진하는 줄기 세포에 의한 이식전 장기(그래프트) 처리를 의미한다. 용어는 광범위하게는 이식 장기의 면역원성을 감소시켜 수용자에 의한 내성 발달을 가능하게 하거나 촉진하는 개념을 의미한다. 따라서, 장기의 내성화는 수용자에 의해 내성화되는 장기를 유발한다. 다시 말해서, 용어는 면역 반응을 정상적으로 끌어내는 세포 또는 조직에 대하여 면역 체계가 면역 반응을 끌어낼 수 없게 만드는 것을 의미할 수 있다. 이의 예는 T-조절 세포가 활성화된 T-세포를 억제하는 인자를 분비하는 경우, 항염증성 사이토카인을 더 이상 분비할 수 없는 것이다.

[0117] 이는 이식 전 생체의 처리, 또는 심지어 채취 전 국소적 투여를 통해 달성될 수 있다.

[0118] "치료하다", "치료하는", 또는 "치료"는 본 발명과의 관계에서 광범위하게는 사용되고, 각각 이러한 용어는, 그 중에서도, 치료법의 개입 및/또는 치료법의 원인을 포함하여, 결핍, 기능장애, 질환, 또는 기타 해로운 과정의 예방, 완화, 억제, 또는 치유를 포함한다.

[0119] "검증하다"는 확인하는 것을 의미한다. 본 발명의 맥락에서, 세포가 원하는 효능을 갖는 발현자라는 것을 확인한다. 이것은 (치료, 은행 구축, 약물 스크리닝 등에서) 합리적인 기대의 효능을 갖는 세포를 사용할 수 있도록 한다. 따라서, 검증하는 것은, 원래 원하는 활성을 갖는 것으로 확인되었거나 원하는 활성을 갖는 것으로 확립된 세포가, 실제로, 그 활성을 유지한다는 것을 확인하는 것을 의미한다. 따라서, 검증은 최초의 측정 및 추적 측정을 포함하는 2사건 과정의 확인 작업이다. 본원에서는 그 두 번째 사건을 "검증"이라 칭한다.

[0120] 줄기 세포

[0121] 본 발명은, 바람직하게는, 척추동물 중, 예를 들면, 인간, 비인간 영장류, 가축동물, 가축, 및 기타 비인간 포유동물의 줄기 세포를 사용하여 실시할 수 있다. 이들은 하기 기재된 세포를 포함하지만 이에 한정되지 않는다.

[0122] 배아 줄기 세포

[0123] 가장 잘 연구된 줄기 세포는 배아 줄기 세포(ESC)이고, 이는 무제한적인 자기-재생 및 다능성 분화능을 갖기 때문이다. 이들 세포는 배반포의 내세포괴로부터 유래되거나 이식-후 배아의 원시 생식 세포(배아 생식 세포 또는 EG 세포)로부터 유래될 수 있다. ES 및 EG 세포는 먼저 마우스로부터 유래되었고, 그 후, 많은 상이한 동물들, 및 가장 최근에는 비인간 영장류 및 인간으로부터 유래되었다. 마우스 배반포 또는 다른 동물의 배반포 내로 도입되는 경우, ESC는 동물의 모든 조직에 기여할 수 있다. ES 및 EG 세포는 SSEA1(마우스) 및 SSEA4(인간)에 대한 항체로 양성 염색됨으로써 확인될 수 있다. 예를 들면, 미국 특허 제5,453,357호; 제5,656,479호; 제5,670,372호; 제5,843,780호; 제5,874,301호; 제5,914,268호; 제6,110,739호; 제6,190,910호; 제6,200,806호; 제6,432,711호; 제6,436,701호; 제6,500,668호; 제6,703,279호; 제6,875,607호; 제7,029,913호; 제7,112,437호; 제7,145,057호; 제7,153,684호; 및 제7,294,508호를 참조하고, 이들 각각은 배아 줄기 세포 및 이의 제조 및 증폭 방법의 교시에 대하여 참조로서 인용된다. 따라서, ESC 및 이의 단리 및 증폭 방법은 당해 분야에 잘 알려져 있다.

[0124] 전사 인자 및 외인성 사이토카인의 수는 생체내 배아 줄기 세포의 효능 상태에 영향을 주는 것으로 확인되었다. 줄기 세포 만능성에 포함되는 것으로 설명되는 제1 전사 인자는 Oct4이다. Oct4는 전사 인자의 POU(Pit-Oct-Unc) 패밀리에 속하고, 프로모터 또는 인핸서 영역 사이의 "8량체 모티프"라고 지칭되는 8량체 서열을 함유하는 유전자의 전사를 활성화할 수 있는 DNA 결합 단백질이다. Oct4는 난원통이 형성될 때까지 수정된 접합자의 난할 단계의 순간에 발현된다. Oct3/4의 기능은 분화 유도 유전자(즉, FoxaD3, hCG)를 억제하고 만능성을 촉진시키는 유전자(FGF4, Utf1, Rex1)를 활성화시키는 것이다. 고이동도 군(HMG) box 전사 인자의 한 멤버인 Sox2는 Oct4와 협력하여 내세포괴에서 발현된 유전자의 전사를 활성화시킨다. 배아 줄기 세포에서 Oct3/4 발현이 특정한 레벨로 유지되는 것은 필수적이다. Oct4 발현 레벨의 >50%의 과발현 또는 하향조절은 각각 원시 내배엽/중배엽 또는 영양외배엽의 형성과 함께 배아 줄기 세포 운명을 변경할 것이다. 생체내, Oct4 결핍 배아는 배반포 단계로 발달하지만, 내세포괴 세포는 만능성이 아니다. 대신 이들은 배외 영양세포 계통에 따라 분화된다. 포유동물 Spalt 전사 인자인 Sal14는 Oct4의 업스트림 조절자이고, 따라서 발생학의 초기 단계 동안 Oct4의 적절한 레벨

을 유지하는 데 중요하다. Sa114 레벨이 특정한 한계점 이하로 떨어지는 경우, 영양외배엽 세포는 내세포괴 내로 위치를 벗어나 증폭될 것이다. 만능성에 필요한 또 다른 전사 인자는 켈트족 "티르 난 오그(Tir Nan Og)": 영원히 젊은 땅(the land of the ever young)에 따라 명명된 나노그(Nanog)이다. 생체내, 나노그는 수축 상실 배의 단계로부터 발현되고, 후속적으로 내세포괴로 제한되고, 이식 단계에 의해 하향조절된다. 나노그의 하향조절은 만능성 세포의 제어되지 않은 증폭을 피하고 장배형성 동안 다계통 분화를 가능하게 하는 데 중요할 것이다. 5.5 일에 단리된 나노그 무표지 배아는 주로 배외 내배엽을 함유하고 인식가능한 외배반을 함유하지 않는 체계화되지 않은 배반포로 구성된다.

[0125] 비배아 줄기 세포

[0126] 줄기 세포는 대부분의 조직에서 확인되었다. 아마도 가장 잘 특성화된 것은 조혈 줄기 세포(HSC)이다. HSC는 세포 표면 마커 및 기능적 특성을 사용하여 정체될 수 있는 중배엽 유래 세포이다. 이들은 골수, 말초혈, 제대혈, 태아 간, 및 난황낭으로부터 단리되었다. 이들은 조혈을 개시하고 다중 조혈 계통을 발생시킨다. 치명적으로 방사선처리된 동물 내로 이식되는 경우, 이들은 적혈구 호중성-대식세포, 거핵구, 및 림프 조혈 세포 풀을 다시 살게할 수 있다. 이들은 또한 일부 자기-재생 세포 분화를 겪도록 유도될 수 있다. 예를 들면, 미국 특허 제 5,635,387호; 제5,460,964호; 제5,677,136호; 제5,750,397호; 제5,681,599호; 및 제5,716,827호를 참조한다. 미국 특허 제5,192,553호에는 인간 신생아 또는 태아 조혈 줄기 또는 전구 세포의 단리 방법이 보고된다. 미국 특허 제5,716,827호에는 Thy-1+ 전구세포인 인간 조혈 세포 및 이들을 시험관내 재생시키는 적절한 성장 배지가 보고된다. 미국 특허 제5,635,387호에는 인간 조혈 세포 및 이의 전구체의 배양 방법 및 장치가 보고된다. 미국 특허 제6,015,554호에는 인간 림프 및 수지상 세포의 재구성 방법이 기재된다. 따라서, HSC 및 이들의 단리 및 증폭 방법은 당해 분야에 잘 알려져 있다.

[0127] 당해 분야에 잘 알려진 또 다른 줄기 세포는 신경 줄기 세포(NSC)이다. 이들 세포는 생체내 증식되고 연속적으로 적어도 일부 뉴런 세포를 재생시킬 수 있다. 생체의 배양되는 경우, 신경 줄기 세포는 증식 뿐만 아니라 뉴런 및 교질 세포의 상이한 유형으로의 분화가 유도될 수 있다. 뇌 내로 이식되는 경우, 신경 줄기 세포는 신경 및 교질 세포를 생착하고 발생시킬 수 있다. 예를 들면, 문헌 [Gage F.H., *Science*, 287:1433-1438(2000)], [Svendsen S.N. et al., *Brain Pathology*, 9:499-513(1999)], 및 [Okabe S. et al., *Mech Development*, 59:89-102(1996)]을 참조한다. 미국 특허 제5,851,832호에는 뇌 조직으로부터 수득된 다능성 신경 줄기 세포가 보고된다. 미국 특허 제5,766,948호에는 신생 대뇌 반구로부터의 신경모세포 생성이 보고된다. 미국 특허 제 5,564,183호 및 제5,849,553호에는 포유동물 신경관 줄기 세포의 사용이 보고된다. 미국 특허 제6,040,180호에는 포유동물 다능성 CNS 줄기 세포의 배양으로부터 분화된 뉴런의 시험관내 발생이 보고된다. 제WO 98/50526호 및 제WO 99/01159호에는 신경상피 줄기 세포, 희소돌기아교세포-성상세포 전구체, 및 계통-제한된 뉴런 전구체의 발생 및 단리가 보고된다. 미국 특허 제5,968,829호에는 배아 전뇌로부터 수득된 신경 줄기 세포가 보고된다. 따라서, 신경 줄기 세포 및 이들의 제조 및 증폭 방법은 당해 분야에 잘 알려져 있다.

[0128] 당해 분야에서 광범위하게 연구된 또 다른 줄기 세포는 중간엽 줄기 세포(MSC)이다. MSC는 배아 중배엽으로부터 유래되고, 그 중에서도, 성체 골수, 말초혈, 지방, 태반, 및 제대혈을 포함한 많은 공급원으로부터 단리될 수 있다. MSC는 근육, 뼈, 연골, 지방, 및 힘줄을 포함한 많은 중배엽 조직으로 분화될 수 있다. 이들 세포에 대한 상당한 문헌이 존재한다. 예를 들면, 미국 특허 제5,486,389호; 제5,827,735호; 제5,811,094호; 제5,736,396호; 제5,837,539호; 제5,837,670호; 및 제5,827,740호를 참조한다. 또한 문헌 [Pittenger, M. et al., *Science*, 284:143-147(1999)]을 참조한다.

[0129] 성체 줄기 세포의 또 다른 예는 전형적으로 지방흡입술 후, 콜라게나제를 사용하여 ADSC를 방출함으로써 지방으로부터 단리된 지방 유래 성체 줄기 세포(ADSC)이다. ADSC는 더 많은 세포가 지방으로부터 단리될 수 있다는 것을 제외하고, 골수로부터 유래된 MSC와 많은 부분에서 유사하다. 이들 세포는 뼈, 지방, 근육, 연골, 및 뉴런으로 분화되는 것으로 보고되었다. 단리 방법은 미국 특허 공보 제2005/0153442 A1호에 기재되었다.

[0130] 당해 분야에 알려진 다른 줄기 세포는 또한 "난원형 세포"라고 명명된, 위장 줄기 세포, 상피 줄기 세포, 및 간 줄기 세포를 포함한다(Potten, C, et al., *Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 353:821-830(1998), Watt, F., *Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 353:831(1997); Alison et al., *Hepatology*, 29:678-683(1998)).

[0131] 하나 이상의 배아 배엽층의 세포 유형으로 분화될 수 있다고 보고된 다른 비배아 세포는 제대혈로부터의 세포 (미국 공보 제2002/0164794호 참조), 태반(미국 공보 제2003/0181269호 참조), 태줄 기질(Mitchell, K.E. et al., *Stem Cells*, 21:50-60(2003)), 소 배아 유사 줄기 세포(Kucia, M. et al., *J Physiol Pharmacol*, 57 Suppl 5:5-18(2006)), 양수 줄기 세포(Atala, A., *J Tissue Regen Med*, 1:83-96(2007)), 피부 유래 전구체

(Toma *et al.*, *Nat Cell Biol*, 3:778-784(2001)), 골수(미국 특허 공보 제2003/0059414호 및 제2006/0147246호 참조), 골수로부터 단리된 성체 다계통 유도(MIAMI) 세포(제PCT US2004/002580호 참조), 및 자궁내막 세포(미국 공보 제2013/0156726호 참조)를 포함하지만 이에 한정되지 않고, 이들 각각은 이들 세포의 교시에 대하여 참조로서 인용된다.

[0132] 체세포 재프로그래밍 전략

[0133] 핵 이식, 세포 융합, 및 배양 유도 재프로그래밍과 같은 몇몇 상이한 전략이 사용되어 분화된 세포의 배아 상태로의 전환을 유도하였다. 핵 이식은 체세포 핵의 제핵 난모세포 내로의 주입을 포함하고, 이는 대리모 내에 이식되어 클론("생식 클로닝")을 발생시키거나, 배양에 외이식되어 유전적으로 매칭된 배아 줄기(ES) 세포를 발생시킬 수 있다("체세포 핵 이식," SCNT). 체세포와 ES 세포의 세포 융합은 만능성 ES 세포의 모든 특징을 나타내는 하이브리드의 발생을 야기한다. 배양에 체세포 외이식은 만능성 또는 다능성일 수 있는 불멸 세포주를 선택한다. 현재, 정조 줄기 세포는 출생 후 동물로부터 유래될 수 있는 만능성 세포의 유일한 공급원이다. 제한된 인자에 의한 체세포의 형질도입은 만능성 상태로 재프로그래밍을 시작할 수 있다. 이들 실험적 접근은 광범위하게 검토되었다(Hochedlinger and Jaenisch, *Nature*, 441: 1061-1067(2006) and Yamanaka, S., *Cell Stem Cell*, 1:39-49(2007)).

[0134] 핵 이식

[0135] 체세포 핵 이식(SCNT)으로도 언급되는 핵 이식(NT)은 양 돌리와 같은 클로닝된 동물을 발생시키는 공여자 체세포로부터 제핵 난모세포로의 핵 도입을 나타낸다(Wilmot *et al.*, *Nature*, 385:810-813(1997)). NT에 의한 살아 있는 동물의 발생은 안정한, 최종적으로 분화된 세포의 것을 포함한 체세포의 후생적 상태는 비가역적으로 고정되지 않지만, 신생 유기체의 발달을 향할 수 있는 배아 상태로 재프로그래밍될 수 있다는 것을 증명하였다. 배아 발달 및 질환에 포함된 기본적인 후생적 메커니즘을 해명하는 흥미로운 실험적 접근을 제공하는 것 이외에, 핵 클로닝 기술은 환자 특이적 이식 의학에 잠재적인 흥미가 있다.

[0136] 체세포와 배아 줄기 세포의 융합

[0137] 미분화된 상태로 체세포 핵의 후생적 재프로그래밍은 무린 하이브리드에서 배아 세포와 체세포의 융합에 의해 제조된다는 것을 증명하였다. 다양한 체세포 및 배아 암종 세포(Solter, D., *Nat Rev Genet*, 7:319-327(2006)), 배아 생식(EG), 또는 ES 세포(Zwaka and Thomson, *Development*, 132:227-233(2005)) 사이의 하이브리드는 모 배아 세포와 많은 특징을 공유하고, 이는 만능성 표현형이 이러한 융합 생성물에서 우성임을 나타낸다. 마우스(Tada *et al.*, *Curr Biol*, 11:1553-1558(2001))의 경우와 같이, 인간 ES 세포는 융합 후 체세포 핵을 재프로그래밍하는 가능성을 갖는다(Cowan *et al.*, *Science*, 309:1369-1373(2005)); Yu *et al.*, *Science*, 318:1917-1920(2006)). Oct4와 같은 침묵 만능성 마커의 활성화 또는 불활성 체세포 X 염색체의 재활성화는 하이브리드 세포에서 체세포 게놈의 재프로그래밍에 대한 분자적 증거를 제공하였다. DNA 복제는 만능성 마커의 활성화에 필수적이고, 이는 융합 후 2일에 먼저 관찰되고(Do and Scholer, *Stem Cells*, 22:941-949(2004)), ES 세포에서 나노그의 강제된 과발현은 신경 줄기 세포와 융합시 만능성을 촉진하는 것(Silva *et al.*, *Nature*, 441:997-1001(2006))으로 제시되었다.

[0138] 배양 유도 재프로그래밍

[0139] 만능성 세포는 배아 공급원, 예를 들면, 할구 및 배반포(ES 세포)의 내세포괴(ICM), 외배반(EpiSC 세포), 원시 생식 세포(EG 세포), 및 출생 후 정조 줄기 세포("maGSCsm" "ES 유사" 세포)로부터 유래되었다. 하기 만능성 세포는 이들의 공여자 세포/조직과 함께 하기와 같다: 병리유전적 ES 세포는 무린 난모세포로부터 유래되고(Narasimha *et al.*, *Curr Biol*, 7:881-884(1997)); 배아 줄기 세포는 할구로부터 유래되었고(Wakayama *et al.*, *Stem Cells*, 25:986-993(2007)); 내세포괴 세포(공급원 해당 없음)(Eggan *et al.*, *Nature*, 428:44-49(2004)); 배아 생식 및 배아 암종 세포는 원시 생식 세포로부터 유래되었고(Matsui *et al.*, *Cell*, 70:841-847(1992)); GMCS, maSSC, 및 MASC는 정조 줄기 세포로부터 유래되었고(Guan *et al.*, *Nature*, 440:1199-1203(2006); Kanatsu-Shinohara *et al.*, *Cell*, 119:1001-1012(2004); and Seandel *et al.*, *Nature*, 449:346-350(2007)); EpiSC 세포는 외배반으로부터 유래되고(Brons *et al.*, *Nature*, 448:191-195(2007); Tesar *et al.*, *Nature*, 448:196-199(2007)); 병리유전적 ES 세포는 인간 난모세포로부터 유래되었고(Cibelli *et al.*, *Science*, 295L819(2002); Revazova *et al.*, *Cloning Stem Cells*, 9:432-449(2007)); 인간 ES 세포는 인간 배반포로부터 유래되었고(Thomson *et al.*, *Science*, 282:1145-1147(1998)); MAPC는 골수로부터 유래되었고(Jiang *et al.*, *Nature*, 418:41-49(2002); Phinney and Prockop, *Stem Cells*, 25:2896-2902(2007)); 체대혈 세포(체대혈로부터

유래됨)(van de Ven *et al.*, *Exp Hematol*, 35:1753-1765(2007)); 신경구 유래 세포는 신경 세포로부터 유래되었다(Clarke *et al.*, *Science*, 288:1660-1663(2000)). PGC 또는 정조 줄기 세포와 같은 생식 세포 계통으로부터의 공여자 세포는 생체내 단분화능인 것으로 알려졌지만, 만능성 ES 유사 세포(Kanatsu-Shinohara *et al.*, *Cell*, 119:1001-1012(2004) 또는 maGSC(Guan *et al.*, *Nature*, 440:1199-1203(2006)가 연장된 시험관내 배양 후 단리될 수 있음이 나타났다. 이들 만능성 세포 유형의 대부분이 시험관내 분화될 수 있고 기형종을 형성할 수 있었지만, 보다 엄격한 기준에 의하면, 오직 ES, EG, EC, 및 정조 줄기 세포 유래 maGSC 또는 ES 유사 세포만이 출생 후 키메라를 형성하고 생식계열에 기여할 수 있기 때문에 이들만이 만능성이다. 현재, 다능성 성체 정조 줄기 세포(MASC)는 성체 마우스의 고환 정조 줄기 세포로부터 유래되고, 이들 세포는 ES 세포와 상이하지만(Seandel *et al.*, *Nature*, 449:346-350(2007)) EpiSC 세포와 유사한 발현 프로파일을 갖고, 이식후 마우스 배아의 외배반으로부터 유래되었다(Brons *et al.*, *Nature*, 448:191-195(2007); Tesar *et al.*, *Nature*, 448: 196-199(2007)).

[0140] 제한된 전사 인자의 재프로그래밍

[0141] 타카하시(Takahashi)와 야마나카(Yamanaka)는 ES 유사 상태로 다시 체세포를 재프로그래밍하는 것을 보고하였다(Takahashi and Yamanaka, *Cell*, 126:663-676(2006)). 이들은 네 전사 인자 Oct4, Sox2, c-myc, 및 Klf4의 바이러스 매개 형질도입 후, Oct4 표적 유전자 Fbx15의 활성화를 위한 선택 후, 마우스 배아 섬유모세포(MEF) 및 성체 섬유모세포를 만능성 ES 유사 세포로 성공적으로 재프로그래밍하였다. 활성화된 Fbx15를 갖는 세포는 코인형 iPS(유도 만능 줄기) 세포이고, 이들이 살아 있는 키메라를 발생시킬 수 없음에도 불구하고, 기형종을 형성하는 능력에 의해 만능성인 것으로 나타났다. 내인성 Oct4 및 나노그 유전자가 발현되지 않거나 ES 세포보다 낮은 레벨로 발현되는 반면, 이러한 만능성 상태는 형질도입된 Oct4 및 Sox2 유전자의 연속적인 바이러스 발현에 의존적이고, 이들의 각각의 프로모터는 크게 메틸화되는 것으로 확인되었다. 이는 Fbx15-iPS 세포가 ES 세포에 상응하지 않지만 재프로그래밍의 불완전 상태를 나타낼 수 있다는 결론과 일치한다. 유전적 실험은 Oct4 및 Sox2가 만능성에 필수적이고(Chambers and Smith, *Oncogene*, 23:7150-7160(2004); Ivanona *et al.*, *Nature*, 442:5330538(2006); Masui *et al.*, *Nat Cell Biol*, 9:625-635(2007)), 재프로그래밍에서 두 종양유전자 c-myc 및 Klf4의 역할이 덜 분명한 것으로 확립하였다. 낮은 효능에도 불구하고, 마우스 및 인간 iPS 세포는 둘 다 c-myc 형질도입의 부재하에 획득되었기 때문에, 일부 이들 종양유전자는, 실제로, 재프로그래밍에 불필요할 수 있다(Nakagawa *et al.*, *Nat Biotechnol*, 26: 191-106(2008); Werning *et al.*, *Nature*, 448:318-324(2008); Yu *et al.*, *Science*, 318: 1917-1920(2007)).

[0142] MAPC

[0143] 인간 MAPC는 미국 특허 제7,015,037호에 기재된다. MAPC는 다른 포유동물에서 확인되었다. 무린 MAPC은, 예를 들면, 또한 미국 특허 제7,015,037호에 기재된다. 랫트 MAPC는 또한 미국 특허 제7,838,289호에 기재된다.

[0144] 이들 참조는 캐서린 버파일리(Catherine Verfaillie)에 의해 처음 단리된 MAPC를 설명하기 위한 참조로서 인용된다.

[0145] MAPC의 단리 및 성장

[0146] MAPC 단리 방법은 당해 분야에 알려져 있다. 예를 들면, 미국 특허 제7,015,037호를 참조하고, 이들 방법은 MAPC의 특성화(표현형)와 함께, 참조로서 본원에 인용된다. MAPC는 골수, 태반, 탯줄 및 제대혈, 근육, 뇌, 간, 척수, 혈액 또는 피부를 포함하지만 이에 한정되지 않는 다중 공급원으로부터 단리될 수 있다. 따라서, 이는 골수 흡입, 뇌 또는 간 생검, 및 기타 장기를 수득하고, 이들 세포에서, 발현되는(또는 발현되지 않는) 유전자에 따라, 당해 분야의 숙련가가 이용가능한 양성 또는 음성 선택 기술을 사용하여 세포를 단리하는 것(예를 들면, 본원에 참조로서 인용된 상기 언급된 출원에 기재된 것들과 같은 기능 및 형태학 검정에 의하여)이 가능하다.

[0147] MAPC는 또한 이들 방법에 대해 참조로서 인용된 문헌 [Breyer *et al.*, *Experimental Hematology*, 34: 1596-1601(2006)] 및 [Subramanian *et al.*, *Cellular Programming and Reprogramming: Methods and Protocols*; S. Ding(ed.), *Methods in Molecular Biology*, 636:55-78(2010)]에 기재된 변형된 방법에 의해 얻었다.

[0148] 미국 특허 제7,015,037호에 기재된 바와 같은 인간 골수로부터의 MAPC

[0149] MAPC는 혼한 백혈구 항원 CD45 또는 적혈모구 특이적 글리코포린-A(Gly-A)을 발현하지 않는다. 세포의 혼합 집단에 피콜 하이팩(Ficoll Hypaque) 분리법을 수행하였다. 그 다음, 세포를 항-CD45 및 항-Gly-A 항체를 사용하여 CD45+ 및 Gly-A+ 세포의 집단을 감손시키는 음성 선택을 수행한 다음, 남은 약 0.1%의 골수 단핵구 세포를 회수하였다. 또한 세포를 피브로넥틴 코팅 웰에 놓고, 하기 기재된 바와 같이 2~4주 동안 배양하여 CD45+ 세포

및 Gly-A+ 세포를 감소시킬 수 있었다. 부착 골수 세포의 배양에서, 많은 부착 기질 세포는 약 30의 세포 배양 복제 노화를 겪고, 세포의 보다 동질 집단은 증폭을 계속하고 긴 텔로미어를 유지한다.

- [0150] 대안적으로, 양성 선택은 세포 특이적 마커의 조합을 통해 세포를 단리하는 데 사용될 수 있다. 양성 및 음성 선택 기술 둘 다는 당해 분야의 숙련자에게 이용가능하고, 음성 선택 목적에 적합한 많은 단클론 및 다클론 항체가 또한 당해 분야에서 이용가능하고(예를 들면, 문헌 [Leukocyte Typing V, Schlossman, *et al.*, Eds.(1995) Oxford University Press] 참조) 다수의 공급원으로부터 상업적으로 이용가능하다.
- [0151] 세포 집단의 혼합물로부터 포유동물 세포 분리법의 기술은 또한 미국 특허 제5,759,793호(Schwartz, *et al.*)(자력 분리법), 문헌 [Basch *et al.*, 1983](면역친화성 크로마토그래피), 및 문헌 [Wysocki and Sato, 1978](형광 활성화 세포 분류)에 기재되어 있다.
- [0152] 세포는 저혈청 또는 혈청 무함유 배양 배지에서 배양될 수 있다. MAPC 배양에 사용된 혈청 무함유 배지는 미국 특허 제7,015,037호에 기재된다. 통상적으로 사용되는 성장 인자는 혈소관 유래 성장 인자 및 상피 성장 인자를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 예를 들면, 미국 특허 제7,169,610호; 제7,109,032호; 제7,037,721호; 제6,617,161호; 제6,617,159호; 제6,372,210호; 제6,224,860호; 제6,037,174호; 제5,908,782호; 제5,766,951호; 제5,397,706호; 및 제4,657,866호를 참조하고; 모두 혈청 무함유 배지 중의 세포 성장의 교시에 대하여 참조로서 인용된다.
- [0153] 추가 배양 방법
- [0154] 추가 실험에서, MAPC가 배양되는 밀도는 약 200개 세포/cm²~약 1500개 세포/cm²~약 2000개 세포/cm²를 포함하여, 약 100개 세포/cm² 또는 약 150개 세포/cm²~약 10,000개 세포/cm²로 다양할 수 있다. 밀도는 종 사이에서 다양할 수 있다. 추가로, 최적 밀도는 배양 조건 및 세포 공급원에 따라 다양할 수 있다. 배양 조건 및 세포의 정해진 세트에 대한 최적 밀도를 결정하는 것은 당해 분야의 기술에 속한다.
- [0155] 또한, 약 1~5% 및, 특히 3~5%를 포함하여 약 10% 미만의 효과적인 대기 산소 농도는 배양에서 MAPC의 단리, 성장 및 분화 동안 언제라도 사용될 수 있다.
- [0156] 세포는 다양한 혈청 농도, 예를 들면, 약 2~20% 하에 배양될 수 있다. 소 태아 혈청이 사용될 수 있다. 고혈청이 저산소 분압, 예를 들면, 약 15~20%와 조합으로 사용될 수 있다. 세포는 배양 디쉬에 부착 전에 선택될 필요가 없다. 예를 들면, 피콜(Ficoll) 구배 후, 세포는 직접적으로, 예를 들면, 250,000~500,000/cm²로 플레이팅될 수 있다. 부착 콜로니는 선택되거나, 가능하게는 통합되거나, 증폭될 수 있다.
- [0157] 실시예의 실험 과정에서 사용된 하나의 양태에서, 고혈청(약 15~20%) 및 저산소(약 3~5%) 조건이 세포 배양에 사용되었다. 특히, 콜로니로부터의 부착 세포는 18% 혈청 및 3% 산소(PDGF 및 EGF 함유)에서 약 1700~2300개 세포/cm² 밀도로 플레이팅되고 계대배양되었다.
- [0158] MAPC에 특이적인 양태에서, 보충물은 MAPC가 하나 이상의 배아 계통, 예를 들면, 모든 세 계통의 세포 유형으로 분화될 수 있는 능력을 보유하도록 하는 세포내 인자 또는 성분이다. 이는 미분화된 상태의 특이적 마커, 예를 들면, Oct 3/4(Oct 3A) 및/또는 고증폭능의 마커, 예를 들면, 텔로머라제의 발현에 의해 지시될 수 있다.
- [0159] 세포 배양
- [0160] 하기 열거된 모든 구성요소에 있어서, 이들 구성요소의 교시에 대하여 참조로서 인용되는 미국 특허 제 7,015,037호를 참조한다.
- [0161] 일반적으로, 본 발명에 유용한 세포는 이용가능하고 당해 분야에 잘 알려진 배양 배지에서 유지되고 증폭될 수 있다. 또한 포유동물 혈청의 세포 배양 배지의 보충물이 고려된다. 유리하게는 최적의 성장 및 증폭을 위한 필수적인 미량 원소를 세포에 공급하는 추가의 보충물이 또한 사용될 수 있다. 호르몬이 또한 유리하게는 세포 배양에 사용될 수 있다. 지질 및 지질 담체가 또한 세포 유형 및 분화된 세포의 운명에 따라 세포 배양 배지를 보충하는 데 사용될 수 있다. 또한 공급자 세포층의 사용이 고려된다.
- [0162] 배양에서 세포는 현탁액 중에 유지되거나, 세포의 기질 구성요소와 같은 고체 지지체에 부착될 수 있다. 줄기 세포는 종종 I형 및 II형 콜라겐, 콘드로이틴 설페이트, 피브로넥틴, "수퍼피브로넥틴" 및 피브로넥틴 유사 중합체, 젤라틴, 폴리-D 및 폴리-L-리신, 트롬보스폰딘 및 비트로넥틴과 같은 고체 지지체에 이들의 부착을 돕는 추가의 인자를 필요로 한다. 본 발명의 하나의 양태는 피브로넥틴을 사용한다. 예를 들면, 문헌 [Ohashi *et*

al., *Nature Medicine*, 13:880-885(2007)]; [Matsumoto *et al.*, *J Bioscience and Bioengineering*, 105:350-354(2008)]; [Kirouac *et al.*, *Cell Stem Cell*, 3:369-381(2008)]; [Chua *et al.*, *Biomaterials*, 26:2537-2547(2005)]; [robinskaya *et al.*, *Stem Cells*, 26:2245-2256(2008)]; [Dvir-Ginzberg *et al.*, *FASEB J*, 22:1440-1449(2008)]; [Turner *et al.*, *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater*, 82B: 156-168(2007)]; 및 [Miyazawa *et al.*, *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 22: 1959-1964(2007)]을 참조한다.

- [0163] 세포는 또한 "3D"(응집된) 배양에서 성장할 수 있다. 예는 2009년 1월 21일에 출원된 제PCT US2009/31528호이다.
- [0164] 배양에서 확립된 후, 세포는 신선하게 사용되거나 냉동될 수 있고, 예를 들면, 40% FCS 및 10% DMSO를 함유한 DMEM을 사용하여 냉동 스톱으로 저장될 수 있다. 배양된 세포의 냉동 스톱을 제조하는 다른 방법은 또한 당해 분야의 숙련자에게 이용가능하다.
- [0165] 약학적 제형
- [0166] 미국 제7,015,037호는 약학적 제형의 교시에 대하여 참조로서 인용된다. 특정한 양태에서, 세포 집단은 전달을 위해 개작되고 이에 적합한, 즉 생리학적으로 혼화성인 조성물 내에 존재한다.
- [0167] 제형은 염증 감소, 아픔토시스, 부종 등의 감소, 특정한 인자 등의 상향조절과 같은 원하는 정도의 효과를 지향할 것이다.
- [0168] 일부 양태에서 장기에 투여되는 세포의 순도는 약 100%(실질적으로 동질)이다. 다른 양태에서 이는 95%~100%이다. 일부 양태에서 이는 85%~95%이다. 특히, 다른 세포와의 혼합물의 경우, 백분율은 약 10%~15%, 15%~20%, 20%~25%, 25%~30%, 30%~35%, 35%~40%, 40%~45%, 45%~50%, 60%~70%, 70%~80%, 80%~90%, 또는 90%~95%일 수 있다. 또는 단리/순도는 세포가, 예를 들면, 10~20, 20~30, 30~40, 40~50 또는 그 이상의 세포 배증을 겪는 세포 배증에 관하여 표현될 수 있다.
- [0169] 세포 투여를 위한 제형의 선택은 다양한 인자에 따라 좌우될 것이다. 이들 중 중요한 것은 공여자/수용자의 종, 처리되는 장기의 성질, 투여되는 다른 치료법 및 제제의 성질, 최적 투여 경로, 유효 경로를 통한 생존가능성, 투약 계획, 및 당해 분야의 숙련자에게 명백할 것인 기타 인자들일 것이다. 예를 들면, 적합한 담체 및 기타 첨가제의 선택은 정확한 투여 경로 및 특정 투여형의 성질에 따라 좌우될 것이다.
- [0170] 세포/매질의 수성 현탁액의 최종 제형은 전형적으로 현탁액의 이온 강도를 등장도(즉, 약 0.1~0.2) 및 생리학적 pH(즉, 약 pH 6.8~7.5)에 맞추는 것을 포함할 것이다. 최종 제형은 또한 전형적으로 유체 유통제를 함유할 것이다.
- [0171] 당해 분야의 숙련가는 본 발명의 방법에서 투여되는 조성물 중의 세포 및 임의의 첨가제, 비히클, 및/또는 담체의 양을 용이하게 결정할 수 있다. 전형적으로, 임의의 첨가제(세포 이외에)는 용액, 예를 들면, 인산염 완충 식염수 중에 0.001~50 중량%의 양으로 존재한다. 활성 성분은 대략 마이크로그램~밀리그램으로, 예를 들면, 약 0.0001~약 5 중량%, 바람직하게는 약 0.0001~약 1 중량%, 가장 바람직하게는 약 0.0001~약 0.05 중량% 또는 약 0.001~약 20 중량%, 바람직하게는 약 0.01~약 10 중량%, 가장 바람직하게는 약 0.05~약 5 중량%로 존재한다.
- [0172] 일부 양태에서, 특히 캡슐화가 유효성을 향상시키거나 관리 및/또는 저장 수명에 잇점을 제공하는 경우, 세포는 투여를 위해 캡슐화된다. 세포는 막 뿐만 아니라 캡슐에 의해 캡슐화될 수 있다. 많은 세포 캡슐화 방법 중 임의의 것이 사용될 수 있는 것으로 예상된다.
- [0173] 광범위하게 다양한 물질이 세포의 마이크로캡슐화를 위한 다양한 양태에서 사용될 수 있다. 이러한 물질은, 예를 들면, 중합체 캡슐, 알기네이트-폴리-L-리신-알기네이트 마이크로캡슐, 바륨 폴리-L-리신 알기네이트 캡슐, 바륨 알기네이트 캡슐, 폴리아크릴로니트릴/폴리비닐클로라이드(PAN/PVC) 중공 섬유, 및 폴리에테르설폰(PES) 중공 섬유를 포함한다.
- [0174] 세포의 투여에 사용될 수 있는 세포의 마이크로캡슐화 기술은 당해 분야의 숙련자에게 알려져 있고, 예를 들면, 문헌 [Chang, P., *et al.*, 1999; Matthew, H.W., *et al.*, 1991]; [Yanagi, K., *et al.*, 1989]; [Cai Z.H., *et al.*, 1988]; [Chang, T.M., 1992] 및 미국 특허 제5,639,275호(예를 들면, 생물학적 활성 분자를 안정하게 발현하는 세포의 장기간 유지를 위한 생혼화성 캡슐이 기재된다)에 기재된다. 추가의 캡슐화 방법이 유럽 특허 공보 제301,777호 및 미국 특허 제4,353,888호; 제4,744,933호; 제4,749,620호; 제4,814,274호; 제5,084,350호; 제5,089,272호; 제5,578,442호; 제5,639,275호; 및 제5,676,943호에 기재된다. 상기 모두는 부분적으로 세포의

캡슐화에 대하여 본원에 참조로서 인용된다.

- [0175] 특정한 양태는 세포를 중합체, 예를 들면, 생중합체 또는 합성 중합체 내로 도입시킨다. 생중합체의 예는 피브로넥틴, 피브린, 피브리노겐, 트롬빈, 콜라겐, 및 프로테오글리칸을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 기타 인자, 예를 들면, 상기 논의된 사이토카인이 또한 중합체 내로 도입될 수 있다. 본 발명의 다른 양태에서, 세포는 삼차원 겔의 공극 내로 도입될 수 있다. 큰 중합체 또는 겔은, 전형적으로, 수술적으로 삽입될 것이다. 작은 충분한 입자 또는 섬유로 제형화될 수 있는 중합체 또는 겔은 일반적으로, 보다 편리하게, 비수술적 경로에 의해 투여될 수 있다.
- [0176] 세포의 투여량은 광범위한 범위 내에서 다양할 것이고, 각각 특정한 경우에 개별적으로 필요한 것에 맞춰질 것이다. 세포의 수는 장기의 유형, 중량, 및 상태, 투여의 수 또는 빈도, 및 당해 분야의 숙련가에게 알려진 기타 변수들에 따라 다양할 것이다. 세포는 조직 또는 장기에 적합한 경로에 의해 투여될 것이다. 적합한 전달 경로의 예는 기관내 전달(예를 들면, 폐에 있어서), 정맥내 전달, 동맥내 전달(예를 들면, 관상동맥내), 장기로의 직접 주사, 및 림프계내 전달을 포함할 수 있다.
- [0177] 세포는 약 $0.01 \sim 1 \times 10^5$ 개 세포/ml, 약 1×10^5 개 세포/ml $\sim 10 \times 10^6$ 개 세포/ml, 또는 약 10×10^6 개 세포/ml $\sim 5 \times 10^7$ 개 세포/ml의 농도로 적절한 부형제 중에 현탁될 수 있다. 적합한 부형제는 세포 및 수용자 장기와 생물학적 및 생리학적으로 혼화성인 것들, 예를 들면, 완충 식염수 용액 또는 기타 적합한 부형제이다. 투여를 위한 조성물은 적절한 무균성 및 안정성을 따르는 표준 방법에 따라 제형화되고, 제조되고, 저장될 수 있다.
- [0178] 투약
- [0179] 인간 또는 기타 포유동물에 대한 용량(즉, 세포의 수)은 당해 분야의 숙련가에게 의해 본원의 설명, 본원에 기재된 문서, 및 당해 분야의 지식으로부터 과도한 실험없이 결정될 수 있다. 본 발명의 다양한 양태에 따라 사용되는 최적의 용량은 하기를 포함하는 많은 인자에 따라 좌우될 것이다: 치료되는 질환 및 이의 단계; 공여자의 종, 이의 건강, 성별, 연령, 체중 및 신진대사율; 공여자의 면역능력; 투여되는 기타 치료법; 및 공여자의 병력 또는 유전형으로부터 예상되는 잠재적인 합병증. 변수는 또한 세포가 동계, 자가유래, 동종이계, 또는 이종인지 여부; 이들의 효능; 표적이 되어야 하는 부위 및/또는 분포; 및 세포에 대한 접근가능성과 같은 부위의 이러한 특성을 포함한다. 추가의 변수는 기타 인자(예를 들면, 성장 인자 및 사이토카인)와의 공동투여를 포함한다. 정해진 상황에서 최적의 용량은 또한 세포가 제형화되는 방식, 이들이 투여되는 방식(예를 들면, 관류, 장기내 등), 및 투여 후 세포가 표적 부위에 국소화되는 정도를 고려할 것이다.
- [0180] 궁극적으로, 용량 레벨, 시기, 및 빈도는 유효성에 의해 결정될 것이다. 이는 장기 건강 및 생존능, 및 가능하게는 장기 기능 및 이식-후 임상학적 측정에 의해 측정될 것이다. 이러한 측정은 장기에 의해 다양할 것이다. 하나의 양태에서, 이들은 장기 기능 측정을 포함할 수 있다. 임상학적 문헌을 통해 이식에 대한 장기 생존능의 측정에 접근할 수 있다. 또 다른 양태에서, 특정한 마커의 레벨(들) 또는 패턴(들)(예를 들면, 조직 mRNA 레벨, 사이토카인 레벨, 및 염증 세포 수)을 검정(예를 들면, qPCR 사용)하여 유효성을 측정할 수 있다. 예를 들면, 폐 조직으로부터의 IL-10 mRNA의 레벨은 qPCR에 의해 검정되어 유효성을 측정할 수 있다. 또 다른 예에서, 사이토카인 레벨; 유체 중의 기타 염증성 마커(예를 들면, 기관지폐포 세척에 의한 것); 부종 레벨; 혈류역학 및 벤틸레이터 측정; 및 생체외 (재)관류된 폐에서 기체 교환의 평가에 대한 영향에 의해 폐에서 용량을 평가할 수 있다.
- [0181] 다양한 양태에서, 세포/매질은 초기 용량으로 투여된 후, 추가의 투여에 의해 유지될 수 있다. 세포는 초기에 하나의 방법에 의해 투여된 후, 동일한 방법 또는 하나 이상의 상이한 방법에 의해 투여될 수 있다. 레벨은 세포/매질의 진행 중인 투여에 의해 유지될 수 있다. 다양한 양태는 초기에 또는 대상에서 이들의 레벨을 유지하기 위하여 또는 둘 다 세포를 정맥내 주사에 의해 투여한다. 다양한 양태에서, 본원에 달리 논의된 바와 같은, 장기의 유형 및 조건 및 기타 인자에 따라 좌우되는 기타 투여 형태가 사용된다.
- [0182] 세포/매질은 광범위한 시간 동안 매우 빈번하게 투여될 수 있다. 일반적으로 치료 길이는 수집 및 관리 과정의 길이, 적용되는 치료법의 유효성, 및 처리되는 장기의 상태 및 반응에 비례할 것이다.
- [0183] 기타 양태에서, 세포는 장기 채취 이전에 공여자 대상에 (예를 들면, 정맥내, 동맥내, 기관내, 직접 주사 등에 의해) 투여될 수 있다. 투여 경로에 따라, 세포는 적합한 시간 기간(예를 들면, 수 분 내지 약 1~4 시간, 약 4~8 시간, 약 8~12 시간, 약 12~16 시간, 약 16~20 시간, 약 20~24 시간) 동안 투여될 수 있다. 장기는 일정한 시간 기간 후 통상적인 수술 기술(들)에 의해 채취될 수 있다. 채취 후, 세포는 세포가 장기 전체에 분배

되는데 충분한 시간(예를 들면, 약 1 시간 미만, 약 1~2 시간, 약 2~3 시간, 약 3~4 시간) 동안 장기와 접촉한다(예를 들면, 즉시 접촉한다). 세포는 주입 및/또는 세포를 함유하는 욕조에 장기의 함침에 의해 장기와 접촉할 수 있다. 그 다음, 장기를 열음 상에 저장하고/저장하거나 재관류 시스템에 부착시킬 수 있고, 그 후, 장기를 이식 부위에 전달한다.

[0184] 이식 부위에 도달하면, 장기는 세포를 함유하는 재관류 시스템(이미 수행되지 않은 경우) 상에 위치할 수 있다. 그 다음, 장기는 장기 및 재관류 시스템에 따라, 일정한 시간 기간(예를 들면, 약 1 시간 미만, 약 1~2 시간, 약 2~3 시간, 약 3~4 시간) 동안 세포 내에 주입될 수 있다. 이식 동안, 세포는 수용자 내로 주입(예를 들면, 정맥내로), 장기에 직접 주사, 및/또는 장기 표면에 직접 적용에 의해 장기와 접촉할 수 있다. 주입은, 예를 들면, 장기 입구 및 출구 관(들)의 폐쇄 전에 수행될 수 있다. 간 이식 동안, 예를 들면, 세포는 이식된 간에 대한 정맥의 부착 전에 간 문맥 정맥으로 주입될 수 있다. 추가로 또는 대안적으로, 세포는 전달 시스템 및 장기에 따라, 적합한 시간 기간(예를 들면, 수 분 내지 약 1~4 시간, 약 4~8 시간, 약 8~12 시간, 약 12~16 시간, 약 16~20 시간, 약 20~24 시간) 동안 이식 후(예를 들면, 장기 입구 및 출구 관(들)의 폐쇄 후) 장기에 전달될 수 있다

[0185] 조성물

[0186] 본 발명은 또한 본원에 기재된 임의의 효과를 달성하는 특정한 효능을 갖는 세포 집단에 관한 것이다. 상기 기재된 바와 같이, 이들 집단은 원하는 효능을 갖는 세포의 선택에 의해 확립된다. 이들 집단은 다른 조성물, 예를 들면, 특정 원하는 효능을 갖는 집단을 포함하는 세포 은행 및 특정 원하는 효능을 갖는 세포 집단을 함유하는 약학적 조성물을 제조하는 데 사용된다.

[0187] 실시예

[0188] 방법

[0189] 폐 채취 및 생체의 관류

[0190] 하기 연구 동의는 지역 장기 조달 에이전시, 라이프기프트(LifeGift)에 의해 입수되었고, 폐기된 공여된 폐는 휴스턴 메소디스트(Houston Methodist)(IRB(2)1111-0205)에서 확립된 IRB 프로토콜 하에 당해 연구를 위하여 조달되었다. 5명의 환자 각각으로부터의 폐는 폐 정맥을 통해 선행 페르파덱스(Perfadex)(Vitrolife AB, Gothenburg, Sweden) 60 ml/Kg 플러쉬에 역행 페르파덱스 관류를 더한 표준 방식으로 조달되었다. 그 다음, 폐를 페르파덱스 1 l를 함유하는 플라스틱 백에 저장하고, 이송 동안 열음 상에 유지하였다. 휴스턴 메소디스트에 폐가 도착한 후, 차가운 허혈 손상을 유도하기 위하여 이들을 4°C에서 총 8 시간 동안 정지 냉장으로 냉각고에 저장하였다.

[0191] 생체의 폐 관류(EVLP)는 CE-표시된 비보라인(Vivoline) LSI(Vivoline Medical AB, Lund, Sweden)으로 수행하였다(도 1)(Wierup, P. *et al.*, *Ann Thorac Surg* 2006;81(2):460-6; Ingemansson, R. *et al.*, *Ann Thorac Surg* 2009;87(1):255-60; and Cypel, M. *et al.*, *N Engl J Med* 2011; 364(15):1431-40). 시스템을 스티븐 솔루션(Steen Solution) 2.5 l로 프라이밍하였다(XVIVO 관류). 실현가능성 연구에서 변수의 수를 감소시키기 위하여 세척된 적혈구 또는 혈액의 사용을 피하였다. 메로페넴(Meropenem)(AstraZeneca AB, Sodertalje, Sweden) 100 mg 및 헤파린(Heparin)(LEO Pharmaceutical, Copenhagen, Denmark) 10,000 U를 관류액에 가하였다. 폐를 EVLP 유닛에 연결하기 전에, 트로메타몰(Addex-THAM, Fresenius Kabi AB, Uppsala, Sweden)을 사용하여 용액 중의 pH를 7.35~7.45로 조정하였다. 심장이 또한 조달되는 경우, 폐 동맥(PA)의 완결성을 재구성하고 EVLP 회로에 폐의 연결을 촉진하기 위하여 다크론 그래프트(Dacron Graft)를 나뉜 폐 동맥 분지에 봉합하였다. 기관지 직경에 맞는 실리콘 튜브 크기를 통해 기관지를 기계적 벤틸레이터에 연결하였다. 온도 프로브를 좌심방 내부에 위치시켰다. 초기에 회로를 탈기하기 위하여, 폐를 0.5 l/분의 유속으로 관류시켰다. 장기가 32°C에 도달할 때까지 유입 캐놀라 상의 탈기를 위한 셉트를 개방한 채로 유지한 다음, 세션 나머지 동안 폐쇄하였다. 그 다음, 폐의 특정한 세트에 대하여 추정된 심장 출력의 100% 흐름을 증가시켰다. 그 다음, 폐를 36°C를 표적으로 30 분 동안 가온하고, 폐 혈액 유입과 유출 사이의 온도차는 8°C를 초과하지 않도록 하였다. 그 다음, 공여자 체중 킬로그램당 70 ml/분의 표적 레벨로 유속을 점진적으로 증가시키고, 그 동안 PA 압력을 연속적으로 측정하고 15 mm Hg로 제한하였다. 재가온은 20~30 분 사이에 달성되었다. 관류액 온도가 32°C에 도달했을 때, 5 cm H₂O의 호기말 양압(PEEP) 레벨, 7~10 호흡/분의 속도, 및 0.5의 FiO₂로 공여자 체중 킬로그램당 3 ml의 초기 일호흡량으로 용량 제어 방식으로 기계적 환기를 시작하였다. 그 다음, 일호흡량을 공여자 체중 킬로그램당 최대 7 ml로 점진적으로 증가시켰다. 혈액 기체 분석을 위한 관류액 샘플을 시스템의 전용 포트로부터 끌어냈다.

- [0192] 세포
- [0193] 인간 골수 유래 MAPC(휴먼 멀티스템®, Athersys Inc., Cleveland)를 건강한 공여자로부터 동의하에 취득된, 단일 골수 흡인물로부터 단리하고, 이전에 기재된 방법에 따라 처리하였다(Perm, MS *et al.*, *Circ Res* 2012; 110(2):304-11; Maziarz, RT *et al.*, *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2012;18(2 Sup):S264-S265; and clinicaltrials.gov #NCT01436487, #NCT01240915 and #NCT01841632). 간단하게, MAPC를 피브로블라스트로 코팅된 플라스틱 조직 배양 플라스크에서 낮은 산소 분압하에 5% CO₂의 가슴 대기에서 배양하였다. 세포를 MAPC 배양 배지(FBS(Atlas Biologicals, Fort Collins, CO), ITS 액체 배지 보충물[Sigma], MCDDB[Sigma], 혈소판 유래 성장 인자(R&D Systems, Minneapolis, MN), 상피 성장 인자(R&D Systems), 텍사메타손[Sigma], 페니실린 스트렙토마이신[Life Technologies Invitrogen], 2-포스포-L-아스코르브산[Sigma, St. Louis, MO], 및 리놀레산-알부민(Sigma)으로 보충된 저글루코스 DMEM[Life Technologies Invitrogen]) 중에 배양하였다. 세포를 3-4 일마다 계대배양하고, 트립신/EDTA(Life Technologies Invitrogen, Carlsbad, CA)을 사용하여 채취하였다. 세포는 CD49c 및 CD90에 대하여 양성이고 MHC 클래스 II 및 CD45(모든 Ab는 BD 바이오사이언스(BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ)로부터 입수됨)에 대하여 음성이었다. 세포를 후속적으로 집단 배양 30~35로 크라이오바이알 내에서 1 ml(PiasmaLyte, 5% HSA 및 10% DMSO) 중의 1~10×10⁶ 농도의 액체 질소의 기체상으로 냉동시켰다. 이의 사용 직전에, MAPC를 해동시키고 바로 사용하였다.
- [0194] 세포 접종, 폐 인큐베이션, 및 기관지폐포 세척(BAL)액 및 조직 분석
- [0195] 심방내 프로브에 의해 측정된 온도가 약 32°C에 도달했을 때, 멀티스템 1 ml 바이알을 해동하고, 멸균 식염수 19 ml 중에 희석하고, 기관지경에 의해 LLL 기관지의 근위 부위로 투여하였다. 유사한 용량의 비히클(멸균 식염수 20 ml)을 RLL 기관지의 근위 부위에 유사하게 접종하였다. 멀티스템의 전달 5 분 후, 폐를 해밀턴-C2(Hamilton-C2) 기계적 벤틸레이터에 연결하였다. 비보라인 시스템 상에서 관류 2 또는 4 시간 후, 실험을 중단하였다. 관류 중단 5 분 전, 세포 또는 비히클을 미리 접종한 RLL 및 LLL의 동일한 부분분절(subsegment)을 식염수 60 ml로 세척하였다. 그 다음, 회수된 BAL액을 총 세포 계수 및 세포 감별 계수를 평가하기 위하여 그대로의 BAL액의 분취액으로 나누거나, 원심분리하고(4°C에서 1200 g×10 분), 상청액을 개별 튜브 내로 수집하고, 급속 냉동시키고, 70°C에서 저장하였다(Lathrop, MJ *et al.*, *Stem Cells Translational Medicine*(in press); and Goodwin, M. *et al.*, *Stem Cells* 2011;29(7):1137-48). 하나의 폐에 있어서, BAL액 샘플을 또한 환기 시작 전, MSC 또는 비히클 전달 직전에, 재가온 단계 동안 취득하였다.
- [0196] ADVIA® 헤마톨로지 애널라이저(Hematology Analyzer)(Siemens Diagnostics, Johnson City, TN)를 사용하여 총 BAL액 세포 수를 측정하였다. 미리 세척된, 미리 처리된 유리 슬라이드(Corning Incorporate, Coming, NY) 상에서 800 rpm에서 8 분 동안 원심분리된 5×10⁴개 세포를 사용하여 사이토스핀을 제조하고, 밤새 건조시키고, 디프퀵(DiffQuick)(Hema 3 Stain Set, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA)를 사용하여 염색하였다. 세포 집단을 3명의 개별적인 개체에 의해 수행된 200 세포의 맹검 수동 계산에 의해 측정하였다(Lathrop, MJ *et al.*, *Stem Cells Translational Medicine*(in press); and Goodwin, M. *et al.*, *Stem Cells* 2011;29(7):1137-48). 희석되지 않은 BAL액 중의 단백질 함량을 브래드포드(Bradford) 검정(Bio-Rad, Hercules, CA)으로 평가하였다. 휴먼 사이토카인 어레이 키트 패널 A(Human Cytokine Array Kit, Panel A)(R&D Systems, Minneapolis, MN)를 사용하여, C5/Ca, CD40L, CD54, CXCL1, CXCL10, G-CSF, Gro-1α, IL-1α, IL-1β, IL-1RA, IL-6, IL-8, IL-10, IL-16, IL-23, IP-10, I-TAC, MCP-1, MIF, PAI-1, RANES, 세르핀 E1, sICAM, sTREM-1, TNF α를 비롯한 가용성 사이토카인, 케모카인, 및 다른 물질들에 대해 BAL액 상청액을 검사하고, 내부 대조군과 비교한 사이토카인의 상대량을 UVP 바이오이미징(Bioimaging) 시스템(Upiand, CA)에서 측정하였다. 다른 특이적 사이토카인, IL-10(R&D Systems, Minneapolis, MN, Cat#:D1000B), 및 STC1, TSG-6 및 iNOS(MyBioSource, San Diego, CA, Cat#s: MBS946255, MBS926793, MBS723617)에 대하여 제조사의 설명서에 따라 엘라이자(Elisa)를 수행하였다.
- [0197] 조직학적 평가
- [0198] 관류 기간의 끝에서 BAL 후, 폐를 후속적으로 실온에서 1 시간 동안 10% 포르말린으로 중력 고정하였다. 고정된 폐를 절개하고, 세포가 주입된 영역을 파라핀 고정 전에 10% 포르말린 중에 저장하였다. 그 다음, 삽입된 5 μm 섹션을 조직학적 외양에 대하여 평가하였다. 이전에 기재된 바와 같이(Lathrop, MJ *et al.*, *Stem Cells Translational Medicine*(in press); and Goodwin, M. *et al.*, *Stem Cells* 2011;29(7):1137-48) 0~3 범위 및 0.5 스케일 증가를 사용하여, 확립된 반정량적 점수화 시스템을 사용하여 공지된 양성 및 음성 대조군과 비교된 기관지주위 세포 침윤물의 존재 및 강도를 기반으로, 3명의 개체에 의해 맹검 방식으로, 폐 염증을 동물당 10

기도에 대하여 점수화하였다.

- [0199] 조직 염증성 마커의 qPCR 분석
- [0200] 폐 2-5로부터의 폐 생검 샘플을 자동 스테이플러(Covidien GIA™ DST Series™ 80mm)를 사용하여 LLL 및 RLL의 주변부로부터 세포 또는 비히클 주입 직전에, 세포 또는 비히클 주입 후 2 및 4 시간에, 및 실험의 끝에 수득하였다. 샘플을 급속 냉동하고, 후속적으로 균질화시키고, 염증성 사이토카인 mRNA의 발현 레벨을 qPCR(하기 설명 참조)로 측정하였다.
- [0201] 샘플을 RNA 용해 버퍼 중에서 균질화시키고, RNeasy 키트(Qiagen, Gennantown, MD)를 제조사의 설명서에 따라 사용하여 RNA를 추출하였다. DNA 무함유 키트(Life Technologies, Carlsbad, CA)를 사용하여 추가의 DNase 처리를 수행하였다. 나노드롭 2000(NanoDrop 2000)(Thermo Scientific, Waltham, MA)를 사용하여 RNA 농도를 측정하고, M-MLV 역전사효소(Promega, Madison, WI)를 사용하여 1 µg RNA를 역전사한 다음, RNase-it 카테일(Agilent, Santa Clara, CA)을 사용하여 RNase 처리를 수행하였다. 역전사효소 음성 샘플 및 물을 대조군으로서 운용하였다. cDNA 5 µl를 SYBR 그린(Promega) 및 프라이머(IDT)와 혼합하고, ABI 7500 FAST 시스템(Applied BioSystems, Foster City, CA) 상에서 운용하였다. 샘플을 GAPDH에 대하여 정규화하고, 인간 기준(Agilent) +/- 표준 편차의 퍼센트로서 표현하였다.
- [0202] 프라이머 서열은 하기와 같았다:
- [0203] VEGFA-F1(서열 번호: 1);
- [0204] VEGFA-R1(서열 번호: 2);
- [0205] IGF1-F4(서열 번호: 3);
- [0206] IGF1-R4(서열 번호: 4);
- [0207] EGF-F1(서열 번호: 5);
- [0208] EGF-R1(서열 번호: 6);
- [0209] IL-10-F2(서열 번호: 7);
- [0210] IL-10-R2(서열 번호: 8);
- [0211] FGF2-F1(서열 번호: 9);
- [0212] FGF2-R1(서열 번호: 10);
- [0213] HGF-F1(서열 번호: 11);
- [0214] HGF-R1(서열 번호: 12);
- [0215] CCL5-F1(서열 번호: 13);
- [0216] CCL5-R1(서열 번호: 14);
- [0217] TGFB1-F1(서열 번호: 15);
- [0218] TGFB1-R1(서열 번호: 16);
- [0219] CXCL10-F1(서열 번호: 17);
- [0220] CXCL10-R1(서열 번호: 18);
- [0221] NOS3-F2(서열 번호: 19);
- [0222] NOS3-R2(서열 번호: 20);
- [0223] STC1-F1(서열 번호: 21);
- [0224] STC1-R1(서열 번호: 22);
- [0225] GAPDH-F1(서열 번호: 23);
- [0226] GAPDH-R1(서열 번호: 24);

- [0227] ANGPT1-F2(서열 번호: 25);
- [0228] ANGPT1-R2(서열 번호: 26);
- [0229] NOS2-F1(서열 번호: 27);
- [0230] NOS2-R1(서열 번호: 28);
- [0231] TNFAIP6-F1(서열 번호: 29);
- [0232] TNFAIP6-R1(서열 번호: 30);
- [0233] FGF7-F1(서열 번호: 31); 및
- [0234] FGF7-R1(서열 번호: 32).

[0235] 통계 분석

[0236] 적절한 경우, 부등 분산에 대한 웰치(Welch) 보정을 이용하여, 피셔(Fishers) LSD 사후 검정으로 일원 또는 이원 ANOVA를 이용하거나, 스튜던트 T 검정(Student's T-test)에 의한 두 그룹 사이의 직접적인 분석에 의해 그룹들을 비교하였다(Lathrop, MJ *et al.*, *Stem Cells Translational Medicine*(in press); and Goodwin, M. *et al.*, *Stem Cells* 2011:29(7):1137-48).

[0237] 결과

[0238] 공여자 폐의 관련 임상학적 특성을 표 1에 요약한다.

[0239] [표 1]

[0240] 공여자 폐의 임상학적 특성

공여자 특성	1	2	3	4	5	평균 ± SD
연령	55	56	44	66	50	54.2 ± 3.6
성별	남성	남성	남성	여성	남성	
사망 원인	CVA	SH	질식	IH	MVA	
PaO ₂ @100% FiO ₂	150	186	254	443	149	236.4 ± 55.1
Peep	10	10	10	5	10	9.0 ± 1.0
방사선학적 소견	침윤물-부종	침윤물-부종	침윤물-부종	깨끗함	부종-우하엽 붕괴, 오른쪽 늑막 유출	
폐 외양	부종성	부종성	부종성	다중 표면 결절	좌상, 부종성	

[0241]

[0242] CVA: 뇌혈관 발작; SH: 지주막하 출혈; IH: 두개내 출혈; MVA: 자동차 사고.

[0243] 공여자 연령은 44~66세 범위이고, 공여자 폐 5개 중 3개는 파괴적인 신경학적 사건의 환자로부터, 1개는 질식으로 부터, 1개는 자동차 사고로부터 수득되었다. 폐 5개 중 4개는, ±10 mmHg의 PEEP로, 100% FiO₂에서 184.75 mmHg의 평균을 갖는 낮은 PaO₂ 값을 포함하는 불량한 기능적 상태로 인하여 이식에 적합하지 않은 것으로 간주되었다. 이들 폐는 또한 다양하게 연속적인, 뚜렷한 폐기종을 포함한 방사선 이상, 또는 수술실에서 점증 조작에 반응하지 않는 엽성 붕괴를 가졌다. 이들 폐 각각은 폐부종의 방사선 징후를 갖고 들은 또한 늑막 유출도 갖고, 이들 모두는 수술적 제거 후 다양하게 부종성인 것에 주목한다. 폐 #5는 CXR 상에 RLL 붕괴를 갖지만, 이는 점액 플러그의 제거 및 기관지경 제거 후 증폭되었다. 하나의 폐(폐 #4)는 5 mmHg PEEP에서 정상 외양, 깨끗한 CXR, 및 우수한 산소처리와 함께 공여에 생리학적으로 적합하지만, 후속적으로 생검 상에서 양성으로 확인된 작은 표면 결절의 존재로 인하여 이용되지 않았다.

[0244] 각각의 폐에 이용된 프로토콜의 요약은 표 2 및 또한 도 1의 도식적 형태에 나타난다.

[0245] [표 2]

[0246] 실험적 프로토콜의 요약

공여자 폐	1	2	3	4	5	평균 ± SD
정지 냉장의 기간 (시간)	8	8	8	8	8	8.0 ± 0
재가온 시간(분)	22	25	28	26	24	25.0 ± 1.0
생체의 관류 기간 (시간)	4	2.5	4	4	4	3.6 ± 0.6
전달된 세포 또는 비히클	LLL에 10 ⁷ MSC RLL에 비히클	LLL에 10 ⁷ MSC RLL에 비히클	LLL에 10 ⁷ MSC RLL에 비히클	LLL에 10 ⁶ MSC RLL에 비히클	LLL에 10 ⁷ MSC RLL에 비히클	

[0247]

[0248] 전체적으로 폐는 유사한 냉장(8 시간) 및 재가온(25 + 2.2 분) 시간, 및 후속적으로 세포 또는 비히클의 기관지 경 투여 후 유사한 재관류 시간(3.7 ± 0.6시간)을 가졌다. 재관류 기간 끝에서, 각각의 폐에 발달된 약간의 추가의 부종이 존재하였고, 폐 4번은 또한 새로 발달된 약간의 부종을 가졌다. 그러나, 전체적으로, 심지어 폐 #4에서 이용된 저용량의 MAPC에서도, 비히클로 처리된(RLL) 옆에 비해서 MSC로 처리된(LLL) 옆에서 덜 가시적인 부종 및 염증이 존재하였다. 대표적인 이미지는 도 2에 나타낸다.

[0249] 재관류 기간 끝에 폐의 조직학적 평가는, 염증이 생긴 영역의 패치가 MAPC로 처리된 LLL 중 일부에서 확인될 수 있음에도 불구하고, 기관지주위, 혈관주위, 및 폐포 중격 부종의 반정량적 점수화 및 염증 세포 침윤물의 존재에 의해 평가된 바, 폐 5개 중 4개에서 유의미하게 및 모든 5개의 폐에 대하여 평균적으로 덜 전체적인 염증이 존재하였음이 증명되었다(도 3). 대표적인 현미경사진을 도 4에 도시한다.

[0250] 총 BAL액 세포 계수는 더 높은 세포 용량을 제공받은 폐 4개 중 2개(폐 3 및 5)에서 수득되었다. 두 경우, 비히클로 처리된 RLL과 비교하여 MSC로 처리된 LLL에서 유의미한 감소가 존재하였다(도 5a). 총 BAL액 세포 계수에서 감소하는 경향은 또한 낮은 MSC 용량을 제공받은 폐(폐 4, 도 5a)에서 관찰되었다. 모든 5개의 폐로부터의 BAL액 샘플에서 얻은 세포 감별 계수는, 비히클로 처리된 RLL에서 호중구 및 호산구의 일정한 증가를 증명하였고, 이는 MSC로 처리된 LLL에서 완화되었다(도 5b). BAL액 총 단백질 레벨의 측정은 폐 사이에서 다양하였지만, 비히클로 처리된 RLL에 비해 MSC로 처리된 LLL에서 총 단백질의 일정한 감소가 모든 5개의 폐에서 관찰되었다(도 5c).

[0251] 비히클 처리된 RLL과 비교하여 MSC로 처리된 LLL에서 IL-10 레벨의 증가가 관찰되었다(도 6). 그러나, 폐 손상에서 MSC 작용의 임상전 모델 및 기타 모델에 관련된 기타 가용성 항염증성 매개인자, 예를 들면, IL-1RA, STC, TGS-6, 및 iNOS는 5개의 폐 어느 것에서도 MSC로 처리된 LLL에서 확실하게 증가하지 않았다(도 6). 조직 mRNA 레벨은 세포 또는 비히클 투여 전 및 재관류 기간 2 또는 4 시간 후, 수득된 생검 샘플의 qPCR 분석에 의하여 폐 5개 중 4개(폐 2-5)에서 평가되었다. 전체적으로, 조직 mRNA 레벨의 패턴은 4개 폐 사이에서 더 일정하였다. IL-10 단백질의 BAL액 레벨과 유사하게, 2 시간째 평가된 바와 같이 비히클로 처리된 RLL에서의 단 1.6배 증가에 비해 MSC로 처리된 LLL에서 조직 IL-10 mRNA 레벨이 3.5배 증가하였다(도 7). RLL에 대비한 LLL에서의 유사한 증가가 2 시간째 Angpt1 및 STC1의 mRNA 레벨에서도 관찰되었다. 흥미롭게도, LLL 및 RLL 둘 다에 있어서, 2~4 시간째 TSG6의 발현 배수에 있어서 큰 증가가 있었다.

[0252] 고찰

[0253] 공여자 폐의 생존능을 개선시키고 온 또는 냉 허혈성 염증 손상을 감소시키는 다수의 상이한 방법이 연구되었다. 이들은 선행 및 역행 방식 둘 다로 전달되는 세포의 특성을 갖는 플러싱 용액 및 공여자 폐의 이송에서 사용을 위하여 임상 조사하에 현재 이동가능한 생체의 보존 시스템의 사용(Machuca, TN *et al.*, *Surg Clin North Am* 2013; 93(6):1373-94)을 포함한다. 치료적 개입을 위한 연구의 상이한 영역은 허혈 및 재관류에 의해 유도된 반응을 조절하는 것을 목표로 한다. 예를 들면, 실험적 동물 모델은 IL-10의 유전자 요법 전달(Cypel, M. *et al.*, *Sci Transl Med.* 2009; 1(4):4-9) 및 아데노신 수용체 활성화(Fernandez, LG *et al.*, *J Thorac Cardiovasc Surg* 2013; 145(6):1654-9; and Mulloy, DP *et al.*, *Ann Thorac Surg* 2013; 95(5):1762-7)로부터 유리한 효과를 나타내었다. 그러나, 실험적 데이터는 유망하지만, 많은 염증성 경로 중 하나를 조절하는 것으로 선천적 및 적응적 면역, 보체 캐스케이드의 활성화, 내피 기능장애, 및 세포 사멸의 촉발과 같은 몇몇 관련 세

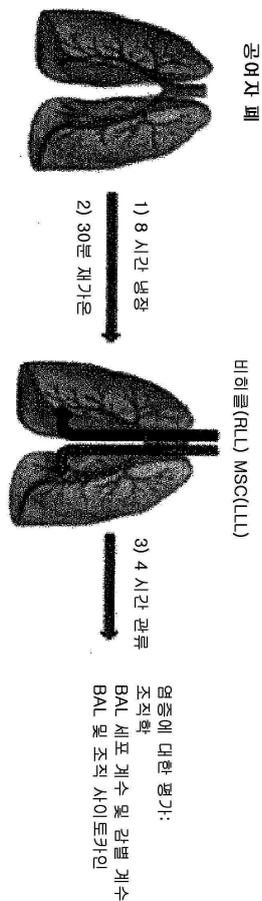
포 메커니즘을 변경하는 현상을 조절할 수 있을 것 같지는 않다. 대조적으로, 골수 유래 MSC 및 MAPC는 허혈/재관류 손상에 포함된 다중 염증 경로에 작용하는 유일한 가능성을 갖는다.

[0254] 생체의 폐 관류(EVLP)는 원래 심장사 후 기증(DCD)으로부터의 폐 및 기타 허용되지 않는 공여자 폐의 질을 평가하는 방법으로서 설계되었다(Wierup, P. *et al.*, *Ann Thorac Surg* 2006; 81(2):460-6; and Ingemansson, R. *et al.*, *Ann Thorac Surg* 2009; 87(1):255-60). 이러한 기술은 현재 기준하에 이식에 적합하지 않은 것으로 여겨지는 잠재적인 공여자 폐의 평가 및 재구성을 위한 임상학적 시도하에 있다(Cypel, M. *et al.*, *N Engl J Med* 2011; 364(15):1431-40). EVLP는 추가로 MSC 또는 MAPC를 이식 전에 기관내 또는 혈관내 경로로 공여자 폐에 직접적으로 투여하는 기회를 제공한다. 이러한 접근법을 사용하여, 본 발명자들은 각각의 개별적인 폐 내의 효과를 직접 평가하는 비교로서 대측성 폐에서 단일 엽으로 직접적인 기도 MAPC 투여를 초기에 평가하는 것을 선택하였다. 허혈 냉장(총 냉장 8 시간)을 폐에 대하여 일반적으로 허용되는 실제 시간 이상으로 연장하여 발달할 수 있는 임의의 IRI를 강화하고 MSC의 잠재적인 항염증 작용을 최대화하였다. 본 발명자들은 또한 실현가능성의 증거로서 "규격품" 비-HLA 일치의 MAPC를 사용하는 것을 선택하였다. 게다가, 본 발명자들은 MAPC의 일정하고 강력한 항염증 효과를 증명한다. 특히, IL-10에서 특히 증가한, 사이토카인 프로파일의 변화는 IRI에 특히 유리할 수 있다.

[0255] 본 발명의 상기 설명으로부터, 당해 분야의 숙련가는 개선, 변화 및 변형을 인지할 것이다. 이러한 개선, 변화, 및 변형은 당해 분야의 기술 내에 속하고, 첨부된 청구범위에 의해 포함되는 것이 의도된다. 본원에 기재된 모든 특허, 특허 출원, 및 공보는 그 전문이 본원에 참조로서 인용된다.

도면

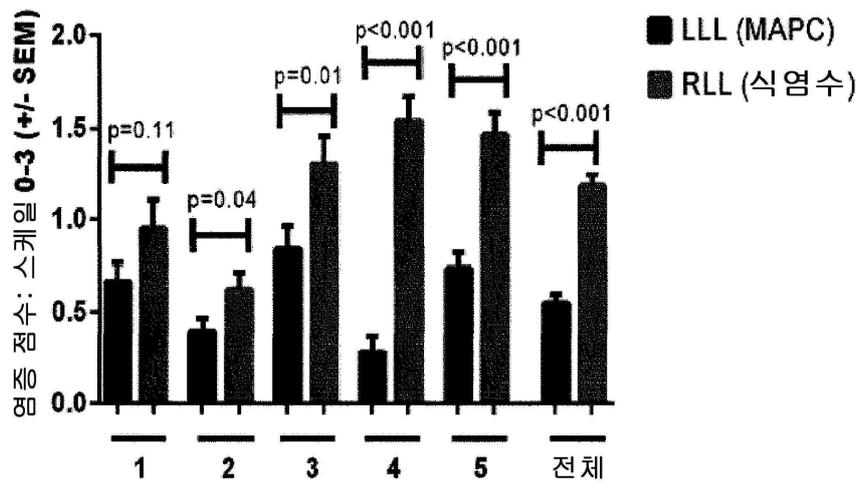
도면1



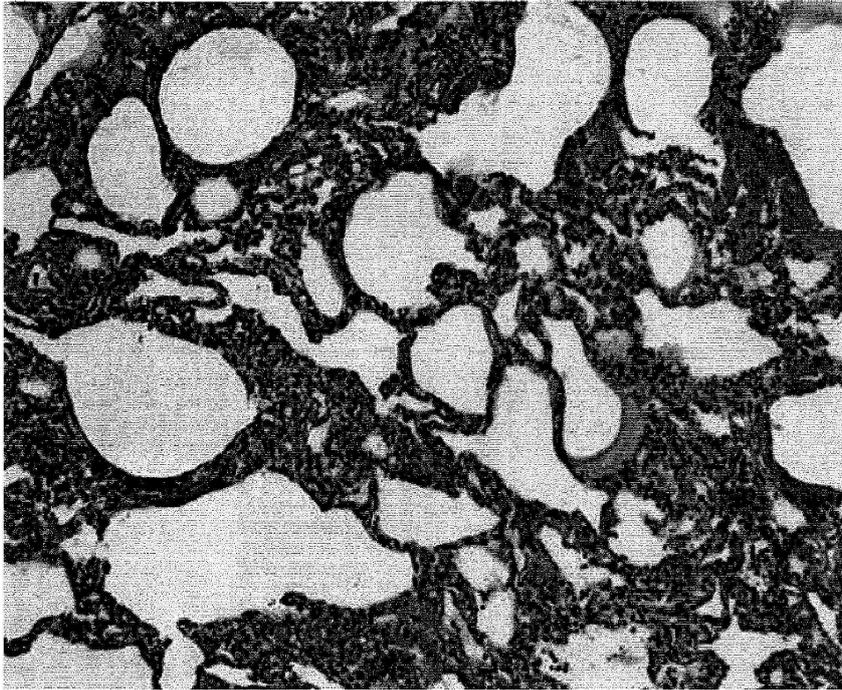
도면2



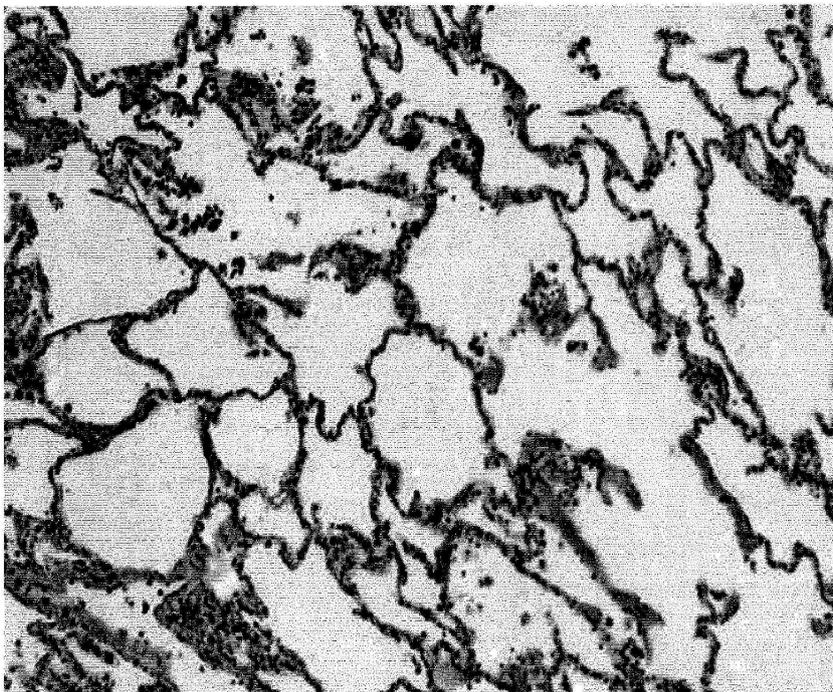
도면3



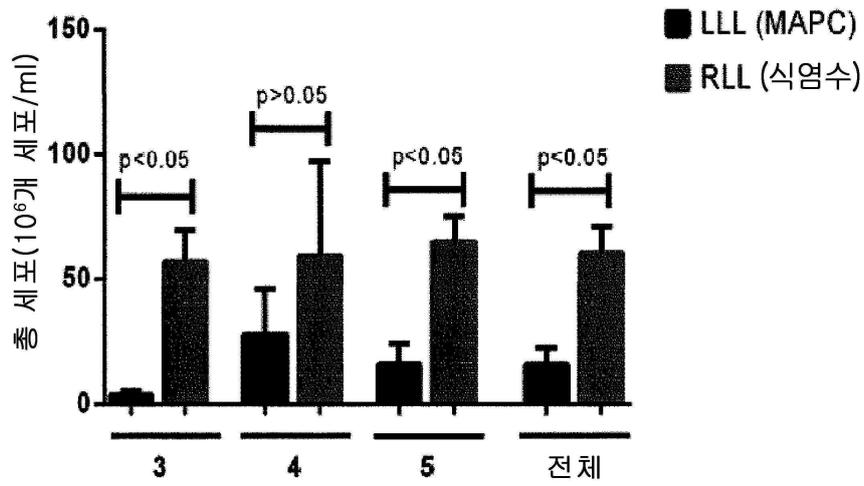
도면4a



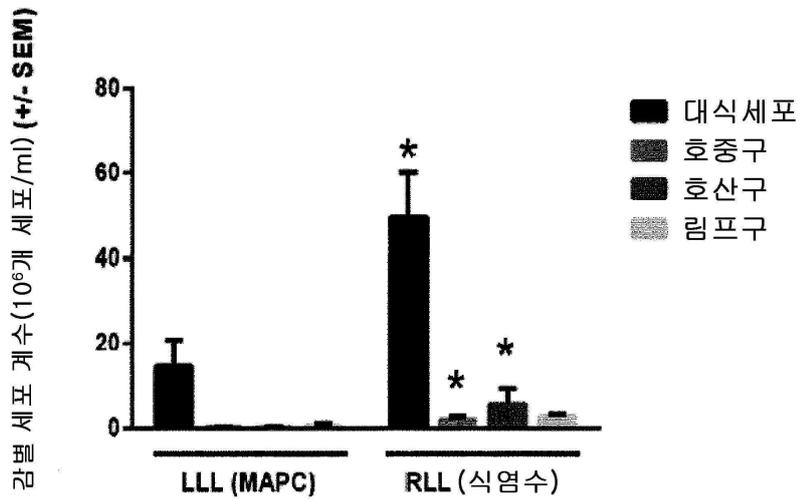
도면4b



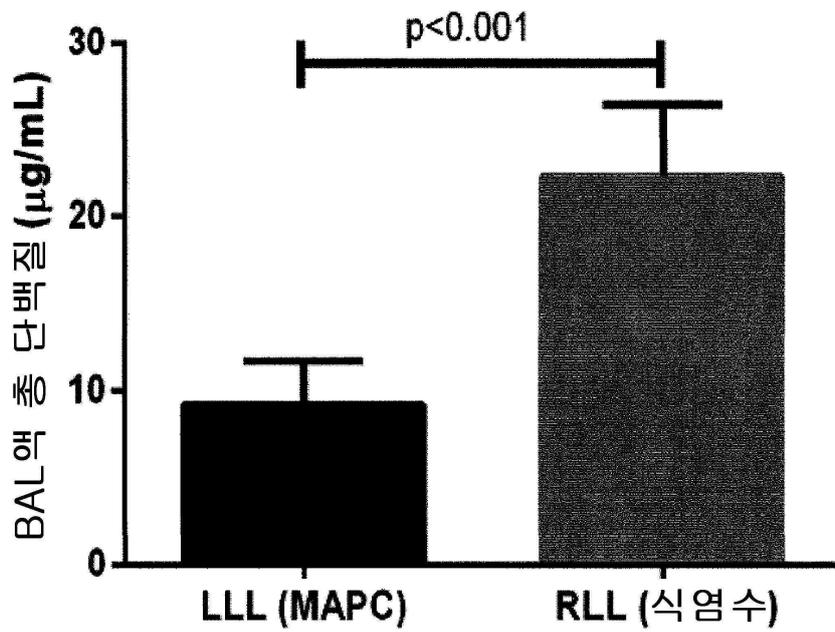
도면5a



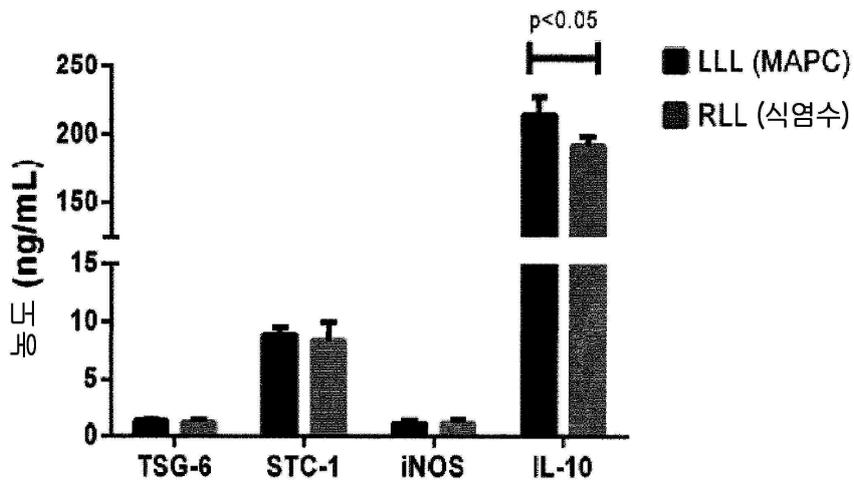
도면5b



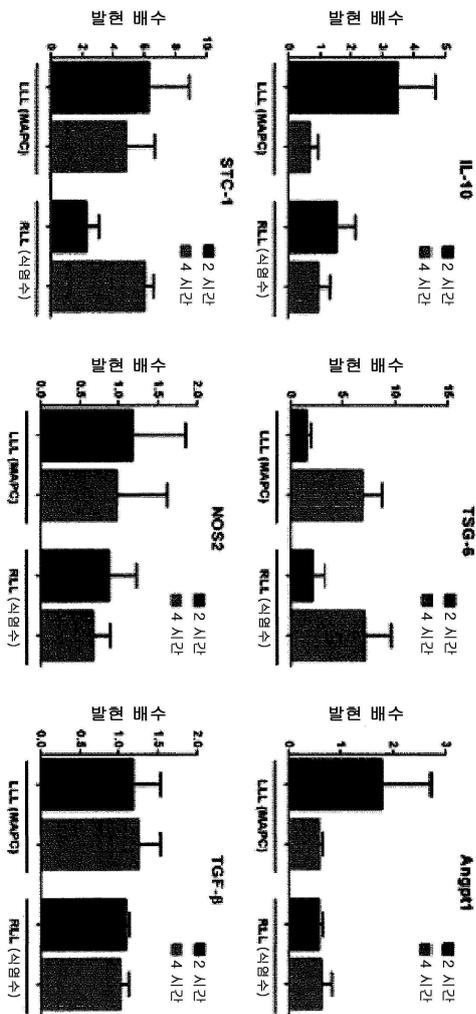
도면5c



도면6



도면7



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> LAFRANCESCA, SAVERIO

TING, ANTHONY A.

DEANS, ROBERT J.

<120> IMPROVING ORGANS FOR TRANSPLANTATION

<130> P101237EP-WO

<140> PCT/US2014/034015

<141> 2014-04-14

<150> 61/811,525

<151> 2013-04-12

<160> 32

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 1
 tgggtgtcttc agtggatgta ttt 23

<210> 2
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 2
 agtctctcat ctctctctcc tc 22

<210> 3
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 3
 gaatccttcc tctccttgga ac 22

<210> 4
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223>
 > Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 4
 gccttctccc aagtgcataa 20

<210> 5

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 5
 acacatgcta gtggctgaaa 20
 <210> 6
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400>
 > 6
 gcatcctctc cctctgaaat ac 22
 <210> 7
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 7
 gctggaggac ttaagggtt ac 22
 <210> 8
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 8
 gatgtctggg tcttggttct c 21
 <210> 9
 <211> 22

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 9
 gctggtgatg ggagttgtat tt 22
 <210> 10
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 10
 ctgccgcta aagccatatt 20
 <210> 11
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 11
 tgggaaccag atgcaagtaa g 21
 <210> 12
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 12
 aatgagtgga tttcccgtgt ag 22
 <210> 13
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer

<400> 13
 tgcccacatc aaggagtatt t 21

<210> 14
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer

<400> 14
 gatgtactcc cgaaccatt t 21

<210> 15
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer

<400> 15
 cgtggagctg taccagaaat ac 22

<210> 16
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer

<400> 16
 cacaactccg gtgacatcaa 20

<210> 17
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer
 <400> 17
 gtaataactc tacctggca ctataa 26
 <210> 18
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 ><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 18
 catgggaaag gtgagggaaa ta 22
 <210> 19
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 19
 ccggaacagc acaagagtta 20
 <210> 20
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 20
 gtctgtgta ctggactcct tc 22
 <210> 21
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer

<400> 21
 ggtcaatgtc aagagaggaa gag 23
 <210> 22
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 22
 ctagtgagag tcaagcacca atag 24

 <210> 23
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 23
 ggtgtgaacc atgagaagta tga 23
 <210> 24
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 24
 gagtcttcc acgataccea ag 22
 <210> 25
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 ><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 25

ccaaagaggc ctggaaggaa ta 22
 <210> 26
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 26
 gtactgcctc tgactggtaa tg 22
 <210> 27
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer

 <400> 27
 gtcagagtca ccatcctctt tg 22
 <210> 28
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 28
 gcaagctcat ctccacagta tc 22
 <210> 29
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 29
 caggttgctt ggctgattat g 21

<210> 30
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 30
 gcaagctcat ctccacagta tc 22
 <210> 31
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 31
 cttgagggtca gcctacagat aac 23
 <210> 32
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 ><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 32
 acctccatt ggtagacata taa 23