

**(19) 대한민국특허청(KR)**
(12) 공개특허공보(A)**(11) 공개번호** 10-2021-0035212
(43) 공개일자 2021년03월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/28 (2015.01) **A61K 35/545** (2014.01)
C12N 5/0789 (2010.01)

(52) CPC특허분류
A61K 35/28 (2013.01)
A61K 35/545 (2013.01)

(21) 출원번호 **10-2021-7004316**

(22) 출원일자(국제) **2019년07월22일**
 심사청구일자 **없음**

(85) 번역문제출일자 **2021년02월10일**

(86) 국제출원번호 **PCT/IL2019/050823**

(87) 국제공개번호 **WO 2020/021536**
 국제공개일자 **2020년01월30일**

(30) 우선권주장
 62/701,783 2018년07월22일 미국(US)
 62/753,947 2018년11월01일 미국(US)

(71) 출원인
미노비아 테라퓨틱스 리미티드
 이스라엘, 3902603 티랏 하카멜, 3 하삿나 스트리트

(72) 발명자
입기 오하나 나탈리
 이스라엘, 3467405 하이파, 아파트. 6, 5 아비가일 스트리트
하라비 우리엘
 이스라엘, 6993734 텔 아비브, 31 아브너 스트리트
 (뒷면에 계속)

(74) 대리인
특허법인한얼

전체 청구항 수 : 총 38 항

(54) 발명의 명칭 원발성 미토콘드리아 질환을 위한 미토콘드리아 확대 요법**(57) 요약**

본 발명은 기능성 미토콘드리아가 풍부한 인간 줄기 세포를 제공하며, 여기서 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아는 미토콘드리아-풍부 인간 줄기 세포에서 총 미토콘드리아의 3% 이상 33% 미만을 구성한다. 이러한 세포의 생산 방법, 및 원발성 미토콘드리아 질환을 치료하기 위한 이의 용도가 추가로 개시된다.

(52) CPC특허분류
C12N 5/0647 (2013.01)

(72) 발명자
복시관 사무엘

이스라엘, 4734002 라맛 하샤론, 57 하쇼프팀 스트리트

셔 노아

이스라엘, 3499102 하이파, 2 규레이 테이만 스트리트

브롬킨 모리야

이스라엘, 6299626 텔 아비브, 26 헬신키 스트리트

명세서

청구범위

청구항 1

원발성 미토콘드리아 질환(primary mitochondrial disease), 장애 또는 이의 증상의 치료를 필요로 하는 인간 환자에서 원발성 미토콘드리아 질환, 장애 또는 이의 증상을 치료하는 데 사용하기 위한 약제학적 조성물로서, 약제학적 조성물이 세포의 생존력(viability)을 지원할 수 있는 약제학적으로 허용되는 액체 배지에 환자의 체 중 kg당 적어도 10^5 내지 2×10^7 개의 인간 줄기 세포를 포함하고, 인간 줄기 세포는 미토콘드리아 DNA의 병원성 돌연변이(pathogenic mutation) 없이 동결-해동된 건강한 기능적 인간 외인성 미토콘드리아가 풍부하고, 건강한 기능적 인간 외인성 미토콘드리아가 미토콘드리아-풍부 인간 줄기 세포(mitochondrially-enriched human stem cell)에서 총 미토콘드리아의 3% 이상 33% 미만을 구성하는, 약제학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 농축이 백만개의개의 세포당 적어도 0.088 밀리유닛(milliunit) 이상 176 밀리유닛 이하의 CS 활성의 미토콘드리아 용량(dose)을 줄기 세포에 도입하는 단계를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 농축이 줄기 세포를 백만개의개의 세포당 0.88 밀리유닛 이상 17.6 밀리유닛 이하의 CS 활성의 미토콘드리아 용량과 접촉시키는 단계를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 건강한 기능적 인간 외인성 미토콘드리아가 동계(syngeneic) 또는 동종이계(allogeneic)인, 약제학적 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 줄기 세포가 CD34⁺인, 약제학적 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 원발성 미토콘드리아 질환 또는 장애가 미토콘드리아 DNA의 돌연변이와 관련되는, 약제학적 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 미토콘드리아 DNA의 돌연변이와 관련된 원발성 미토콘드리아 질환 또는 장애가 피어슨 증후군(Pearson syndrome; PS); 컨스-세이어 증후군(Kearns-Sayre syndrome; KSS); 미토콘드리아 뇌병증, 젖산 증 및 뇌졸중 유사 에피소드(Mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes; MELAS) 증후군; 레버 유전성 시신경병증(Leber's hereditary optic neuropathy; LHON); 신경병증(Neuropathy), 운동 실조(ataxia), 및 색소성 망막염(retinitis pigmentosa)(NARP) 증후군; 불규칙한 적색 섬유를 갖는 근간대성 간질(myoclonic epilepsy with ragged red fibers; MERRF) 증후군; 모계 유전성 당뇨병 및 난청(maternally inherited diabetes and deafness; MIDD); 알퍼스 유사 증후군(Alpers-like syndrome); 만성 진행성 외안근 마비(Chronic progressive external ophthalmoplegia; CPEO); 미토콘드리아 DNA 관련 형태의 선천성 젖산 증(Congenital lactic acidosis; CLA); 미토콘드리아 DNA 고갈 증후군(MDDS); 및 미토콘드리아 DNA 관련 형태의 레이 증후군(Leigh syndrome)으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 약제학적 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 원발성 미토콘드리아 질환 또는 장애가 핵 DNA의 돌연변이와 관련되는, 약제학적 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 핵 DNA의 돌연변이와 관련된 원발성 미토콘드리아 질환 또는 장애가 미토콘드리아 신경 위장 뇌병증(Mitochondrial neurogastrointestinal encephalopathy; MNGIE) 증후군; 알퍼스 증후군(Alpers syndrome); 프리드리히 운동 실조(Friedreich's ataxia; FA); 진행성 외안근 마비(progressive external ophthalmoplegia; PEO); 철적모구 빈혈(Sideroblastic anemia); 운동 실조 신경병증 증후군(ataxia neuropathy syndrome; ANS); 멘델 신경퇴행성 미토콘드리아병증(Mendelian neurodegenerative mitochondriopathy); 3-메틸 글루타콘산노증(3-methylglutaconic aciduria; MEG) 난청(deafness; D), 뇌병증(encephalopathy; E) 및 레이 유사 질환(Leigh-like disease; L) 증후군 (MEGDEL); 쟈거스 증후군(Sengers syndrome); 미세 변화 신증후군 (Minimal change nephrotic syndrome; MCNS); 핵 DNA 관련 형태의 선천성 젖산 증(Congenital lactic acidosis; CLA); 미토콘드리아 DNA 고갈 증후군(Mitochondrial DNA depletion Syndrome; MDDS); 및 핵 DNA 관련 형태의 레이 증후군으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 약제학적 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 원발성 미토콘드리아 질환 또는 장애가 신장, 간, 뇌, 근육, 췌장, 눈 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 기관과 관련되는, 약제학적 조성물.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 증상이 보행 능력 장애, 운동 능력 장애, 언어 능력 장애, 기억 장애, 체중 증가 장애, 성장 장애(failure to thrive), 낮은 혈중 알칼리성 포스파타제 수준, 낮은 혈중 마그네슘 수준, 높은 혈중 크레아티닌 수준, 낮은 혈중 비카보네이트 수준, 낮은 혈중 염기 과잉 수준, 높은 소변 글루코스/크레아티닌 비율, 높은 소변 클로라이드/크레아티닌 비율, 높은 소변 나트륨/크레아티닌 비율, 높은 혈중 락테이트 수준, 높은 소변 마그네슘/크레아티닌 비율, 높은 소변 칼륨/크레아티닌 비율, 높은 소변 칼슘/크레아티닌 비율, 당뇨(glucosuria), 마그네슘리아(magnesiumuria), 높은 혈중 요소 수준, 낮은 C-펩티드 수준, 높은 HbA1C 점수, 부갑상선 기능 저하증(hypoparathyroidism), 안검 하수증(ptosis), 청력 상실(hearing loss), 심장 전도 장애(cardiac conduction disorder), 간질성 발작(epileptic seizures), 뇌졸중 유사 에피소드, 손상된 EEG, 높은 혈중 아스파르테이트 아미노트랜스퍼라제(AST) 수준, 높은 혈중 알라닌 아미노트랜스퍼라제(ALT), 림프구의 낮은 ATP 함량 및 산소 소비량(oxygen consumption)으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 약제학적 조성물.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 약제학적 조성물이 특정 조직 또는 기관에 투여되는, 약제학적 조성물.

청구항 13

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 약제학적 조성물이 전신 투여로 투여되는, 약제학적 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서, 환자의 체중 kg당 약 10^6 개의 미토콘드리아-풍부 인간 줄기 세포를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 15

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 총 약 5×10^5 내지 5×10^9 개의 미토콘드리아-풍부 인간 줄기 세포를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 미토콘드리아-풍부 인간 줄기 세포가 미토콘드리아 농축 전 줄기 세포에서 상응하는 수준에 비해,

- (i) 증가된 미토콘드리아 DNA 함량;
- (ii) 증가된 CS 활성의 수준;

- (iii) SDHA 및 COX1로부터 선택된 적어도 하나의 미토콘드리아 단백질의 증가된 함량;
- (iv) 증가된 O₂ 소비량;
- (v) 증가된 ATP 생산 속도; 또는
- (vi) 이들의 임의의 조합 중 적어도 하나를 갖는, 약제학적 조성물.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 줄기 세포가 외인성 미토콘드리아로 농축 전 환자로부터 수득되거나 유래되는, 약제학적 조성물.

청구항 18

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 줄기 세포가 외인성 미토콘드리아로 농축 전 환자와 다른 공여자(donor)로부터 수득되거나 유래되는, 약제학적 조성물.

청구항 19

제18항에 있어서, 공여자가 환자와 적어도 부분적으로 HLA-일치된(HLA-matched), 약제학적 조성물.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 줄기 세포가 조혈 줄기 세포인, 약제학적 조성물.

청구항 21

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 줄기 세포가 중간엽 줄기 세포인, 약제학적 조성물.

청구항 22

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 줄기 세포가 만능 줄기 세포(PSC) 또는 유도 만능 줄기 세포(iPSC)인, 약제학적 조성물.

청구항 23

제2항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 줄기 세포가 동결-해동된 건강한 기능적 인간 외인성 미토콘드리아를 상기 인간 줄기 세포에 도입하기 전에 적어도 하나의 동결-해동 주기를 겪는, 약제학적 조성물.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 줄기 세포가 골수, 지방 조직, 구강 점막, 피부 섬유아세포, 혈액 또는 체대혈로부터 단리, 유래 또는 수득되는, 약제학적 조성물.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아가 태반, 배양물에서 성장된 태반 세포 또는 혈액 세포로부터 단리되거나 수득되는, 약제학적 조성물.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 줄기 세포가 건강한 기능적 인간 외인성 미토콘드리아로 농축된 후 적어도 하나의 동결-해동 주기를 겪은, 약제학적 조성물.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아가 총 미토콘드리아의 5% 내지 30%를 구성하는, 약제학적 조성물.

청구항 28

제27항에 있어서, 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아가 총 미토콘드리아의 10% 내지 30%를 구성하는, 약제학적

조성물.

청구항 29

인간 줄기 세포를 상기 건강한 기능적 인간 외인성 미토콘드리아로 풍부하게 하는 *생체의* 방법(*ex-vivo* method)으로서, 방법이

(i) 미토콘드리아 질환, 장애 또는 이의 증상을 앓고 있는 환자로부터, 또는 공여자로부터의 복수의 단리되거나 부분적으로 정제된 인간 줄기 세포를 포함하는 제1 조성물을 제공하는 단계;

(ii) 미토콘드리아 DNA의 병원성 돌연변이 없이 공여자로부터 수득된 복수의 단리된 동결-해동된 건강한 기능적 인간 외인성 미토콘드리아를 포함하는 제2 조성물을 제공하는 단계;

(iii) 제1 조성물의 인간 줄기 세포를 10^6 개의 줄기 세포당 0.088 내지 176 mU CS 활성의 비율로 제2 조성물의 동결-해동된 건강한 기능적 인간 외인성 미토콘드리아와 접촉시켜 제3 조성물을 제공하는 단계; 및

(iv) 동결-해동된 건강한 기능적 인간 외인성 미토콘드리아가 인간 줄기 세포에 들어가도록 허용하는 조건하에서 제3 조성물을 배양함으로써 인간 줄기 세포를 상기 건강한 기능적 인간 외인성 미토콘드리아로 풍부하게 하여 미토콘드리아-풍부 인간 줄기 세포를 포함하는 제4 조성물을 제공하는 단계를 포함하고,

건강한 기능적 인간 외인성 미토콘드리아가 제4 조성물에서 총 미토콘드리아의 3% 이상 33% 미만을 구성하는, *생체의* 방법.

청구항 30

제29항에 있어서, 건강한 기능적 인간 외인성 미토콘드리아가 인간 줄기 세포로 들어가도록 허용하는 조건이 인간 줄기 세포를 상기 건강한 기능적 인간 외인성 미토콘드리아와 함께 0.5 내지 30시간 범위의 시간 동안 16 내지 37°C 범위의 온도에서 배양하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 31

제29항 또는 제30항에 있어서, 방법이, 배양 전에, 2500xg 이상의 원심분리력에서 인간 줄기 세포와 건강한 기능적 인간 외인성 미토콘드리아의 단일 원심분리를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 32

제29항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 줄기 세포가 CD34⁺인, 방법.

청구항 33

제29항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 미토콘드리아-풍부 인간 줄기 세포 중 미토콘드리아 농축의 수준이

(i) 동종이계 미토콘드리아의 경우 내인성 미토콘드리아 DNA 및 외인성 미토콘드리아 DNA의 수준;

(ii) 시트레이트 신타제 활성의 수준;

(iii) 석시네이트 데하이드로게나제 복합체 플라보 단백질 서브유닛 A(SDHA) 또는 사이토크롬 C 옥시다제(COX1) 단백질의 수준;

(iv) 산소(O₂) 소비율;

(v) ATP 생산 속도; 또는

(vi) 이들의 임의의 조합 중 적어도 하나에 의해 결정되는, 방법.

청구항 34

제29항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 미토콘드리아-풍부 인간 줄기 세포를 동결시키는 단계를 추가로 포함하고, 임의로 해동하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 35

제29항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 건강한 기능적 인간 외인성 미토콘드리아에 의한 농축 전 또는 후에 줄기 세포를 확장시키는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 36

제29항 내지 제35항 중 어느 한 항의 방법에 의해 수득된 건강한 기능적 인간 외인성 미토콘드리아가 풍부한 복수의 인간 줄기 세포를 포함하는 조성물로서, 건강한 기능적 인간 외인성 미토콘드리아가 미토콘드리아-풍부 인간 줄기 세포에서 총 미토콘드리아의 3% 이상 33% 미만을 구성하는, 조성물.

청구항 37

원발성 미토콘드리아 질환, 장애 또는 이의 증상의 치료를 필요로 하는 인간 환자에서 원발성 미토콘드리아 질환, 장애 또는 이의 증상을 치료하는 방법으로서, 방법이 억제학적 조성물을 환자에게 비경구로 투여하는 단계를 포함하고, 억제학적 조성물이 적어도 약 5×10^5 내지 5×10^9 개의 인간 줄기 세포를 포함하고, 인간 줄기 세포가 미토콘드리아 DNA의 병원성 돌연변이 없이 동결-해동된 건강한 기능적 인간 외인성 미토콘드리아가 풍부하고, 건강한 기능적 인간 외인성 미토콘드리아가 미토콘드리아-풍부 인간 줄기 세포에서 총 미토콘드리아의 3% 이상 33% 미만을 구성하는, 방법.

청구항 38

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항의 억제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 원발성 미토콘드리아 질환 또는 장애 또는 이의 증상의 치료를 필요로 하는 환자에서 원발성 미토콘드리아 질환 또는 장애 또는 이의 증상을 치료하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 외인성 기능적 인간 미토콘드리아가 풍부한 포유류 줄기 세포, 보다 구체적으로 인간 줄기 세포에 관한 것이다. 본 발명은 또한 이들의 생산 방법, 및 이러한 농축된 세포를 사용하는 치료 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 미토콘드리아는 직경이 0.5 내지 1.0 μ m인, 대부분의 진핵 세포에서 발견되는 막 결합 세포 기관이다. 미토콘드리아는 거의 모든 진핵 세포에서 발견되며, 세포 유형에 따라 수와 위치가 다르다. 미토콘드리아는 자체 DNA(mtDNA)와 RNA 및 단백질을 합성하기 위한 자체 기구를 함유한다. mtDNA는 37개의 유전자만 함유하고, 따라서 포유류 신체 중 대부분의 유전자 산물은 핵 DNA에 의해 인코딩된다.

[0003] 미토콘드리아는 피루베이트 산화, 크렙스 주기 및 아미노산, 지방산 및 스테로이드의 대사와 같은 진핵 세포에서 수많은 필수 작업을 수행한다. 그러나, 미토콘드리아의 주요 기능은 전자 수송 쇄와 산화적-인산화 시스템 ("호흡 연쇄")에 의해 아데노신 트리포스페이트(ATP)로서 에너지를 생성하는 것이다. 미토콘드리아가 관여하는 추가의 과정에는 열 생산, 칼슘 이온의 저장, 칼슘 신호 전달, 프로그램된 세포사(세포자멸사) 및 세포 증식이 포함된다. 따라서, 치료를 필요로 하는 미토콘드리아의 기능 부전 또는 기능 장애와 관련된 당업계에 공지된 많은 질환 및 장애가 있다.

[0004] 세포 내부의 ATP 농도는 전형적으로 1 내지 10mM이다. ATP는 단순당 및 복합당(탄수화물) 또는 지질을 에너지 원으로 사용하는 산화 환원 반응에 의해 생성될 수 있다. ATP로 합성되는 복합 연료의 경우, 그들은 먼저 더 작고 보다 단순한 분자로 분해되어야 한다. 복합 탄수화물은 단순당, 예를 들어, 글루코스 및 프럭토스로 가수 분해된다. 지방(트리글리세라이드)은 대사되어 지방산 및 글리세롤을 생성한다.

[0005] 글루코스를 이산화탄소로 산화시키는 전체 과정은 세포 호흡으로 공지되어 있으며, 단일 글루코스 분자에서 약 30개 분자의 ATP를 생성할 수 있다. ATP는 다수의 별개의 세포 과정에 의해 생성될 수 있다. 진핵 생물에서 에너지를 생성하는 데 사용되는 세 가지 주요 경로는 해당작용 및 세포 호흡의 두 구성 요소인 시트르산 순환/산화적 인산화, 및 베타 산화이다. 비-광합성 호기성 진핵 생물에 의한 이 ATP 생산의 대부분은 전형적인 세포

의 전체 용적의 거의 25%를 구성할 수 있는 미토콘드리아에서 일어난다.

[0006] 미토콘드리아 질환은 미토콘드리아 기능 장애로 인한 장애 그룹이다. 원발성 미토콘드리아 질환(primary mitochondrial disease)은 미토콘드리아 기능에 영향을 미치는 미토콘드리아 DNA의 돌연변이 또는 유전자 산물이 미토콘드리아 (미토콘드리아 단백질)로 유입되는 핵 DNA 유전자의 돌연변이로 인해 발생할 수 있다. 미토콘드리아 질환은 질환이 종종 유전되는 방식과 미토콘드리아가 세포 기능에 매우 중요하기 때문에 독특한 특징을 가지고 있다. 신경근 질환 증상을 갖는 이러한 질환의 하위 분류는 종종 미토콘드리아 근병증이라고 칭명된다. 원발성 미토콘드리아 질환과 달리, 후천성 미토콘드리아 기능 장애로서 공지되기도 한 2차 미토콘드리아 기능 장애는 미토콘드리아 산화적 인산화 캐스케이드에 직접 관여하지 않는 핵 DNA의 유전자에 의해 발생할 수 있다. 영향을 받은 유전자는 미토콘드리아 단백질을 인코딩하지 않으며 OXPHOS 공정을 실행하는 데 필요한 복잡한 기구의 생산에 영향을 미침으로써 산화적 인산화(OXPHOS)에 영향을 미치지도 않는다. 2차 미토콘드리아 기능 장애는 많은 질환 또는 장애, 예를 들어, 지방간 질환(fatty liver disease), 심근 경색(myocardial infarction) 및 뇌졸중(stroke)을 동반할 수 있고, 산화 스트레스를 유발할 수 있는 불리한 환경적 또는 약물 관련 영향으로 인해 2차적으로 획득될 수도 있다. 후자는 노화, 염증 반응, 세포분열독성 약물 등과 같은 미토콘드리아에 악영향을 미치는 다양한 다른 과정에서 볼 수 있듯이 mtDNA 변경 및/또는 미토콘드리아 기능 장애를 초래할 수 있다.

[0007] 미토콘드리아 질환은 영향을 받은 미토콘드리아의 수가 특정 수준에 도달하면 임상적으로 명백해질 수 있고; 이 현상은 "이형 상태 역치(Heteroplasmy threshold)"라고 칭명된다. 미토콘드리아 DNA 돌연변이는 비효율적인 오류 검사 능력으로 인해, 그리고 DNA가 네이키드되고 핵 히스톤과 같은 보호 기능이 없기 때문에, 빈번하게 발생한다. 이는 미토콘드리아 DNA 장애가 자발적이고 비교적 자주 발생할 수 있음을 의미한다. 미토콘드리아 DNA 복제(모두 핵 DNA의 유전자에 의해 인코딩됨)를 제어하는 효소의 결함도 미토콘드리아 DNA 돌연변이를 일으킬 수 있다. 대부분의 미토콘드리아 기능과 생물 발생(biogenesis)은 핵 DNA에 의해 제어된다. 인간 미토콘드리아 DNA는 호흡 연쇄의 13개 단백질만 인코딩하는 반면, 미토콘드리아에 표적화된 추산된 1,500개의 단백질과 구성 요소의 대부분은 핵-인코딩된다. 핵-인코딩된 미토콘드리아 유전자의 결함은 빈혈(anemia), 치매(dementia), 간질(epilepsy), 당뇨병(diabetes), 근병증(myopathy), 고혈압(hypertension), 림프종(lymphoma), 망막병증(retinopathy), 발작(seizures) 및 신경 발달 장애(neurodevelopmental disorders)를 포함한 광범위한 임상 질환 표현형(phenotype)과 관련이 있다.

[0008] 피어슨 증후군(Pearson syndrome; PS)은 골수 부전, 빈혈 및 췌장 기능 장애를 특징으로 하는 미토콘드리아 질환이다. 다른 임상적 특징은 성장 장애(failure to thrive), 인슐린 의존성 당뇨병 및 외비비 췌장 결핍을 동반한 췌장 섬유증(pancreatic fibrosis), 신장 기능 부전, 근육 및 신경 장애이다. 성인기에 생존한 소수의 환자는 종종 컨스-세이어 증후군(Kearns-Sayre syndrome; KSS)의 증상이 발생한다.

[0009] 신 판코니 증후군(Renal Fanconi syndrome) 또는 판코니 증후군(Fanconi's syndrome)은 신장의 근위 신세관에 서 부적합한 재흡수 증후군이다. 이 증후군은 다양한 기저 선천성 또는 후천성 질환, 독성 또는 약물 부작용으로 인해 발생할 수 있다. 이는 다양한 신진 대사 소분자가 관상 액(tubular fluid)에서 재흡수되는 대신 소변으로 전달되도록 한다.

[0010] KSS는 미토콘드리아 근병증으로, 눈과 눈꺼풀의 움직임 제어하는 근육의 단리된 관여를 특징으로 하는 증후군인 만성 진행성 외안근 마비(chronic progressive external ophthalmoplegia; CPEO)의 더 심각한 증후군 변형이다. KSS는 안검 하수증(ptosis)과 안근 마비(ophthalmoplegia)를 일으킨다. KSS는 CPEO와 눈의 색소성 망막병증(pigmentary retinopathy)의 조합 및 심장 전도 이상(cardiac conduction abnormality)을 동반한다. 다른 증상으로는 소뇌 운동 실조증(cerebellar ataxia), 근위 근육 약화, 난청, 진성 당뇨병(diabetes mellitus), 성장 호르몬 결핍 및 부갑상선 기능 저하증(hypoparathyroidism)이 포함될 수 있다.

[0011] 레버의 유전성 시신경병증(Leber's hereditary optic neuropathy; LHON) 또는 레버 시신경 위축(Leber optic atrophy)은 중심 시력의 급성 또는 아급성 상실을 유발하여 주로 젊은 성인 남성들에게 영향을 미치는 망막 신경절 세포(RGC) 및 그들의 축삭의 미토콘드리아 유전된(어머니로부터 자손으로 전이된) 퇴화이다. 그러나, LHON은 주로 미토콘드리아 (핵이 아님) 게놈의 돌연변이로 인한 것이며 남자만이 미토콘드리아를 배아에 기부하기 때문에 어머니를 통해서만 전이된다. LHON은 일반적으로 세 가지 병원성 미토콘드리아 DNA (mtDNA) 점 돌연변이 중 하나 때문이다. 이들 돌연변이는 미토콘드리아에서 산화적 인산화 연쇄의 복합체 I의 ND4, ND1 및 ND6 서브유닛 유전자의 뉴클레오티드 위치 11778 G 내지 A, 3460 G 내지 A 및 14484 T 내지 C에 각각 있다. 이러한 돌연변이는 세포 에너지 생산을 감소시킬 수 있고, 이는 또한 세포 손상과 특정 시신경 세포의 사망을

초래한다. 현재 전문가들은 임의의 가족 구성원이 증상을 보일지 알 수 없지만 평균적으로 LHON 돌연변이가 있는 남성의 50%와 여성의 15%가 평생에 시력을 잃을 것이다.

- [0012] 미토콘드리아 뇌병증(Mitochondrial encephalomyopathy), 젖산 증(lactic acidosis) 및 뇌졸중 유사 에피소드(stroke-like episodes)- MELAS로 약칭됨- 는 MERRF 및 레버의 유전성 시신경병증을 또한 포함하는 미토콘드리아 세포병증 계열 중 하나이다. 질환은 남녀 모두에서 나타날 수 있다. MELAS는 미토콘드리아 DNA 유전자의 돌연변이로 인해 발생된다. MELAS에서 영향을 받은 일부 유전자(MT-ND1, MT-ND5)는 미토콘드리아에서 NADH 데하이드로게나제(복합체 I라고 칭명되기도 함)의 일부이고, 산소와 단순당을 에너지로 전환하는 데 도움을 주는 단백질을 인코딩한다. 다른 유전자(MT-TH, MT-TL1 및 MT-TV)는 미토콘드리아 특이적 전달 RNA(tRNA)를 인코딩한다. MT-TL1의 돌연변이는 모든 MELAS 사례의 80% 이상을 유발한다. 그들은 미토콘드리아가 단백질을 만들고 산소를 사용하며 에너지를 생산하는 능력을 손상시킨다.
- [0013] 미토콘드리아 호흡 연쇄 장애(MRCD)는 미토콘드리아 산화적 인산화 시스템(OXPHOS)에 영향을 미치는 분자 결함으로 인해 세포 생물-에너지 기구의 관여를 공유하는 이질적인 장애 그룹이다. 임상적으로, 그들은 주로 신경계와 골격근에 영향을 미치는 경향이 있지만 일반적으로 여러 조직을 포함한다. 심장 증상은 빈번하고, 비대성 또는 확장성 심근병증 및 심장 전도 결함을 포함하며, 성인 또는 유아의 다중 전신 미토콘드리아 장애의 일부이거나 드물게는 단리된 임상 상태로 나타난다. 특정 구현예에서, 미토콘드리아 질환은 미토콘드리아 호흡 연쇄 질환(MRCD)이다.
- [0014] 줄기 세포는 일반적으로 다른 유형의 세포로 분화할 수 있고/있거나 동일한 유형의 줄기 세포를 더 많이 생산하기 위해 분열할 수 있는 세포이다. 포유동물에서, 줄기 세포의 주요 유형은 배아 줄기 세포와 성체 줄기 세포이다. 골수 줄기 세포, 지방 조직 줄기 세포 및 혈액 줄기 세포인 인간의 성인 줄기 세포의 적어도 3개의 공지된 공급원이 있다. 다른 줄기 세포는 중간엽 줄기 세포(MSC), 조직 특이적 줄기 세포 및 유도 만능 줄기 세포(iPSC)를 포함한다.
- [0015] WO 2013/002880은 생식력 향상 절차에 사용하기 위해 노화된 난모 세포의 품질을 복원하고, 난모 줄기 세포를 향상시키거나 이의 유도체(예: 세포질 또는 단리된 미토콘드리아)를 향상시키기 위한 생물-에너지 작용제를 포함하는 조성물 및 방법을 기재한다.
- [0016] 본 발명자들의 WO 2013/035101은 미토콘드리아 조성물 및 이를 사용하는 치료 방법에 관한 것이고, 부분적으로 정제된 기능성 미토콘드리아의 조성물 및 조성물을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여함으로써 미토콘드리아 기능 증가로부터 유익한 상태를 치료하기 위해 조성물을 사용하는 방법을 개시한다.
- [0017] WO 2016/008937은 공여자(donor) 세포 집단으로부터 단리된 미토콘드리아를 수령인 세포 집단으로 세포간 전달하는 방법에 관한 것이다. 방법은 미토콘드리아 양의 전달의 개선된 효능을 보여준다.
- [0018] US 2012/0107285는 세포의 미토콘드리아 향상에 관한 것이다. 특정 구현예는 줄기 세포를 변형시키는 방법, 또는 변형된 줄기 세포를 적어도 하나의 생물학적 조직에 투여하는 방법을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0019] WO 2016/135723은 기능성 미토콘드리아로 적어도 50% 농축된 인간 골수 세포, 이들의 생산 방법 및 이러한 세포를 이용하는 치료 방법에 관한 것이다.
- [0020] 다양한 원발성 미토콘드리아 질환 및 장애에 의해 영향을 받은 세포 및 기관에서 미토콘드리아 기능을 증가시키는 새로운 방법이 당업계에서 여전히 필요하다.

[0021]

발명의 내용

해결하려는 과제

[0022] 미토콘드리아 확대 요법은 결함이 있는 미토콘드리아로 인한 심각한 영향으로 고통받고 있는 어린이의 다양한 생리학적 파라미터의 결핍을 개선하기 위해 처음으로 사용되었다. 미토콘드리아 확대 요법의 긍정적인 효과는 결함이 있는 미토콘드리아의 기능을 복원할 수 있다고 가정되었지만, 그것은 인간 청소년 환자에서 성공적으로 구현되지 않았다. 특히, 건강한 미토콘드리아에 의한 낮은 수준의 농축 조차도 환자의 건강에 매우 유익한 장기 지속적 개선 및 다양한 기관 및 조직의 생리학적 파라미터의 유의한 개선을 성공적으로 제공할 수 있다는 것이 이하 개시된다.

[0023] 동물 모델 시스템을 사용하면 숙주 세포의 미토콘드리아 함량을 50% 또는 100% 이상 쉽게 증가시킬 수 있음이 이전에 제시되었다. 이하 본원에 예시된 바와 같이, 공여자에서 수령인까지 미토콘드리아의 약간의 증가조차도 목적하는 임상 결과를 달성할 수 있다는 것이 밝혀졌다.

[0024] 본 발명은 외인성 기능적 미토콘드리아가 풍부한 포유류 줄기 세포 및 다양한 원발성 미토콘드리아 질환을 치료하는 방법을 제공한다. 특히, 본 발명은 건강한 공여자로부터 수득된 기능성 미토콘드리아가 풍부한 인간 줄기 세포 (mitochondrially-enriched human stem cell)를 포함하는 조성물을 제공한다. 본 발명은 또한 원발성 미토콘드리아 질환을 갖는 대상체를 치료하기 위한 동종 이계 또는 자가 "미토콘드리아-풍부" 줄기 세포의 사용 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0025] 미토콘드리아 질환을 앓고 있고, 생체외 처리되고, 동일한 대상체에게 반환된 대상체의 줄기 세포를 제공하면 동종 이계 세포 요법을 포함하는 다른 방법에 비해 큰 이점을 제공한다. 예를 들어, 본원에 제공된 방법은 집단을 스크리닝하고 환자와 인간 백혈구 항원(HLA)-일치된(HLA-matched) 공여자를 찾을 필요성을 제거하나, 이는 길고 비용이 많이 드는 과정이며, 항상 성공적이지는 않다. 방법은 추가로 유리하게는 동종 이계 세포 집단의 거부를 예방하기 위해 평생 면역 억제 요법의 필요성을 제거한다. 따라서, 본 발명은 유리하게는 생체의 교정 요법의 독특한 방법론을 제공하고, 여기서 세포는 환자의 신체로부터 채취되고, 외인성(예: 동종 이계) 미토콘드리아로 생체의 처리되며 동일한 대상체에게 반환된다. 더욱이, 본 발명은 상이한 조직 및 기관에서 신체 전반에 걸쳐 경험적으로 분포되고, 이들 부위에서 미토콘드리아 기능을 증가시키는 줄기 세포의 투여에 관한 것이다.

[0026] 본 발명은 미토콘드리아-풍부 줄기 세포로 원발성 미토콘드리아 질환을 앓고 있는 청소년을 치료하면 표적 조직 및 기관에서 미토콘드리아 기능 및 함량을 증가시키고, 미토콘드리아 기능 장애와 관련된 다양한 부작용 및 증상을 개선시킨다는 놀라운 발견에 부분적으로 기초한다.

[0027] 추가로, 농축된 인간 줄기 세포가 이들 세포의 미토콘드리아 함량이 미토콘드리아 농축된 후에 단지 적당히 상승된 경우에도, 본원에서 처음으로 예시된 바와 같이, 인간 환자의 다양한 질환 및 증상을 치료하는 데 효과적이라는 것이 예기치 않게 발견되었다. 본 발명자들 중 일부의 WO 2016/135723은 적어도 50%까지 골수 세포의 미토콘드리아 농축에 관한 것인 반면, 놀랍게도 약 5% 내지 약 45%까지 인간 줄기 세포의 미토콘드리아 농축이 인간 환자의 많은 임상적 파라미터에서 장기간 지속하는 유의한 개선을 제공하기에 충분하다는 것이 밝혀졌다.

[0028] 본 발명에 의해 제공되는 조성물 및 방법은 미토콘드리아 "증강 요법"의 한 형태로 간주될 수 있다. 본 발명의 원리에 따르면, 적은 수의 기능성 미토콘드리아 및/또는 감소된 미토콘드리아의 기능성은 건강한 야생형 기능성 미토콘드리아가 풍부한 줄기 세포를 추가함으로써 완화된다. 온전한 기능성 미토콘드리아가 풍부한 줄기 세포의 환자의 조직 및 기관으로의 융합 및 도입은 세포/조직/기관 당 미토콘드리아 카피 수의 증가 및 미토콘드리아 기능의 증가 모두를 제공한다. 더욱이, 본 발명의 원리에 따르면, 낮은 수준의 미토콘드리아 기능을 나타내는 세포는 기능성 미토콘드리아가 풍부한 줄기 세포를 첨가함으로써 대체될 수 있다. 농축된 줄기 세포가 기능이 손상되었거나 기능이 낮은 동일한 유형의 세포로 분화되어 기능 장애를 개선하거나 기능을 복원할 수 있다고 가정된다.

[0029] 본 발명은 하나의 측면에서 원발성 미토콘드리아 질환, 장애 또는 이의 증상의 치료를 필요로 하는 인간 환자에서 원발성 미토콘드리아 질환, 장애 또는 이의 증상을 치료하는 방법을 제공하며, 방법은 환자에게 약제학적 조성물을 비경구 투여하는 단계를 포함하고, 약제학적 조성물은 적어도 약 5×10^5 내지 5×10^9 개의 인간 줄기 세포를 포함하고, 여기서 인간 줄기 세포는 미토콘드리아 DNA의 병원성 돌연변이(pathogenic mutation) 없이 동결-해동된 건강한 기능적 인간 외인성 미토콘드리아가 풍부하고, 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아는 미토콘드리아-풍부 인간 줄기 세포에서 총 미토콘드리아의 3% 이상 33% 미만을 구성한다.

[0030] 또 다른 측면에서, 본 발명은 원발성 미토콘드리아 질환, 장애 또는 이의 증상의 치료를 필요로 하는 인간 환자에서 원발성 미토콘드리아 질환, 장애 또는 이의 증상을 치료하는 데 사용하기 위한 약제학적 조성물을 제공하며, 약제학적 조성물은 세포의 생존력(viability)을 지원할 수 있는 약제학적으로 허용되는 액체 배지에 환자의 체중 kg당 적어도 10^5 내지 2×10^7 개의 인간 줄기 세포를 포함하며, 여기서 인간 줄기 세포는 미토콘드리아 DNA의 병원성 돌연변이 없이 동결-해동된 건강한 기능적 인간 외인성 미토콘드리아가 풍부하고, 건강한 기능적 인간 외인성 미토콘드리아는 미토콘드리아-풍부 인간 줄기 세포에서 총 미토콘드리아의 3% 이상 33% 미만을

구성한다.

- [0031] 일부 구현예에서, 농축은 백만개의 세포당 적어도 0.088 밀리유닛(miliunit) 내지 176 밀리유닛의 CS 활성의 미토콘드리아 용량(dose)을 줄기 세포에 도입하는 단계를 포함한다.
- [0032] 추가의 구현예에서, 농축은 백만개의 세포당 0.88 밀리유닛 이상 17.6 밀리유닛 이하의 CS 활성의 미토콘드리아 용량을 줄기 세포와 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 단리된 미토콘드리아의 용량을 목적하는 농도로 수령인 세포에 첨가한다. 미토콘드리아 공여자 세포의 수 대 미토콘드리아 수령인 세포의 수의 비율은 2:1 이상의 비율이다(공여자 세포 대 수령인 세포). 전형적인 구현예에서, 비율은 적어도 5, 대안적으로 적어도 10 또는 더 높다. 특정 구현예에서, 미토콘드리아가 수집되는 공여자 세포 대 수령인 세포의 비율은 적어도 20, 50, 100 또는 가능하게는 그 이상이다. 각각의 가능성은 별도의 구현예이다.
- [0033] 특정 구현예에서, 인간 줄기 세포는 CD34⁺이다.
- [0034] 특정 구현예에서, 건강한 기능적 인간 외인성 미토콘드리아는 동종 이계 미토콘드리아이다. 다른 구현예에서, 건강한 기능적 인간 외인성 미토콘드리아는 동계(syngeneic)이다.
- [0035] 특정 구현예에서, 원발성 미토콘드리아 질환 또는 장애는 미토콘드리아 DNA의 돌연변이와 관련된다. 특정 구현예에서, 미토콘드리아 DNA의 돌연변이와 관련된 원발성 미토콘드리아 질환 또는 장애는 피어슨 증후군(Pearson syndrome; PS); 켄스-세이어 증후군(Kearns-Sayre syndrome; KSS); 미토콘드리아 뇌병증, 젓산 증 및 뇌졸중 유사 에피소드(Mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes; MELAS) 증후군; 레버 유전성 시신경병증(Leber's hereditary optic neuropathy; LHON); 신경병증(Neuropathy), 운동 실조(ataxia), 및 색소성 망막염(retinitis pigmentosa)(NARP) 증후군; 불규칙한 적색 섬유를 갖는 근간대성 간질(myoclonic epilepsy with ragged red fibers; MERRF) 증후군; 모계 유전성 당뇨병 및 난청(maternally inherited diabetes and deafness; MIDD); 알퍼스 유사 증후군(Alpers-like syndrome); 만성 진행성 외안근 마비(Chronic progressive external ophthalmoplegia; CPEO); 미토콘드리아 DNA 관련 형태의 선천성 젓산 증(Congenital lactic acidosis; CLA); 미토콘드리아 DNA 고갈 증후군(MDDS); 및 미토콘드리아 DNA 관련 형태의 레이 증후군(Leigh syndrome)으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 각각의 가능성은 본 발명의 별도의 구현예를 나타낸다.
- [0036] 특정 구현예에서, 원발성 미토콘드리아 질환 또는 장애는 미토콘드리아 기능에 필요한 유전자 산물을 인코딩하는 핵 DNA의 돌연변이와 관련된다. 특정 구현예에서, 핵 DNA의 돌연변이와 관련된 원발성 미토콘드리아 질환 또는 장애는 미토콘드리아 신경 위장 뇌병증(Mitochondrial neurogastrointestinal encephalopathy; MNGIE) 증후군; 알퍼스 증후군(Alpers syndrome); 프리드리히 운동 실조(Friedreich's ataxia; FA); 진행성 외안근 마비(progressive external ophthalmoplegia; PEO); 철적모구 빈혈(Sideroblastic anemia); 운동 실조 신경병증 증후군(ataxia neuropathy syndrome; ANS); 멘델 신경퇴행성 미토콘드리아병증(Mendelian neurodegenerative mitochondriopathy); 3-메틸글루타콘산뇨증(3-methylglutaconic aciduria; MEG) 난청(deafness; D), 뇌병증(encephalopathy; E) 및 레이 유사 질환(Leigh-like disease; L) 증후군 (MEGDEL); 쟈거스 증후군(Sengers syndrome); 미세 변화 신증후군(Minimal change nephrotic syndrome; MCNS); 핵 DNA 관련 형태의 선천성 젓산 증(Congenital lactic acidosis; CLA); 미토콘드리아 DNA 고갈 증후군(Mitochondrial DNA depletion Syndrome; MDDS); 및 핵 DNA 관련 형태의 레이 증후군으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 각각의 가능성은 본 발명의 별도의 구현예를 나타낸다.
- [0037] 특정 구현예에서, 원발성 미토콘드리아 질환 또는 장애는 신장, 간, 뇌, 근육, 궤장, 눈 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 기관과 관련된다. 각각의 가능성은 본 발명의 별도의 구현예를 나타낸다.
- [0038] 특정 구현예에서, 손상된 미토콘드리아 기능의 증상은 보행 능력 장애, 운동 능력 장애, 언어 능력 장애, 기억 장애, 체중 증가 장애, 성장 장애, 낮은 혈중 알칼리성 포스파타제 수준, 낮은 혈중 마그네슘 수준, 높은 혈중 크레아티닌 수준, 낮은 혈중 비카보네이트 수준, 낮은 혈중 염기 과잉 수준, 높은 소변 글루코스/크레아티닌 비율, 높은 소변 클로라이드/크레아티닌 비율, 높은 소변 나트륨/크레아티닌 비율, 높은 혈중 락테이트 수준, 높은 소변 마그네슘/크레아티닌 비율, 높은 소변 칼륨/크레아티닌 비율, 높은 소변 칼슘/크레아티닌 비율, 당뇨(glucosuria), 마그네슘뇨(magnesiumuria), 높은 혈중 요소 수준, 낮은 C-펩티드 수준, 높은 HbA1C 점수, 부갑상선 기능 저하증(hypoparathyroidism), 안감 하수증, 청력 상실(hearing loss), 심장 전도 장애(cardiac conduction disorder), 간질성 발작(epileptic seizures), 뇌졸중 유사 에피소드, 손상된 EEG, 높은 혈액 AST/ALT, 림프구의 낮은 ATP 함량 및 낮은 산소 소비량(oxygen consumption)으로 이루어진 그룹으로부터 선택된

다. 각각의 가능성은 본 발명의 별도의 구현예를 나타낸다.

- [0039] 특정 구현예에서, 억제학적 조성물은 특정 조직 또는 기관에 투여된다.
- [0040] 특정 구현예에서, 상기 억제학적 조성물은 전신 투여에 의해 투여된다. 특정 구현예에서, 억제학적 조성물은 환자의 체중 kg당 약 10^6 개의 미토콘드리아-풍부 인간 줄기 세포를 포함한다. 특정 구현예에서, 억제학적 조성물은 약 총 5×10^5 내지 5×10^9 개의 미토콘드리아-풍부 인간 줄기 세포를 포함한다.
- [0041] 특정 구현예에서, 미토콘드리아-풍부 인간 줄기 세포는 미토콘드리아 농축 이전 줄기 세포에서 상응하는 수준에 비해 (i) 증가된 미토콘드리아 DNA 함량; (ii) 증가된 CS 활성의 수준; (iii) SDHA 및 COX1에서 선택된 적어도 하나의 미토콘드리아 단백질 함량 증가; (iv) 증가된 O_2 소비량; (v) ATP 생산 속도의 증가; 또는 (vi) 이들의 임의의 조합 중 적어도 하나를 갖는다. 각각의 가능성은 본 발명의 별도의 구현예를 나타낸다.
- [0042] 특정 구현예에서, 인간 줄기 세포는 외인성 미토콘드리아로 농축 전에 환자로부터 획득되거나 유래된다. 특정 구현예에서, 인간 줄기 세포는 외인성 미토콘드리아로 농축 전에 환자와 다른 공여자로부터 획득되거나 유래된다.
- [0043] 특정 구현예에서, 줄기 세포의 공여자는 환자와 적어도 부분적으로 HLA-일치된다.
- [0044] 특정 구현예에서, 미토콘드리아-풍부 인간 줄기 세포는 미토콘드리아-풍부 인간 전구 세포이다. 특정 구현예에서, 미토콘드리아-풍부 인간 줄기 세포는 조혈 줄기 세포이다. 특정 구현예에서, 미토콘드리아-풍부 인간 줄기 세포는 만능 줄기 세포(PSC) 또는 유도 만능 줄기 세포(iPSC)이다.
- [0045] 특정 구현예에서, 인간 줄기 세포는 동결-해동된 건강한 기능적 인간 외인성 미토콘드리아를 상기 인간 줄기 세포에 도입하기 전에 적어도 하나의 동결-해동 주기를 겪었다. 특정 구현예에서, 방법은 (a) 인간 줄기 세포를 동결시키는 단계, (b) 인간 줄기 세포를 해동하는 단계, (c) 동결-해동된 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아를 상기 인간 줄기 세포에 도입하는 단계를 포함한다.
- [0046] 특정 구현예에서, 인간 줄기 세포는 골수 세포로부터 단리, 유래 또는 획득된다. 다른 구현예에서, 인간 줄기 세포는 지방 조직, 구강 점막, 피부 섬유아세포, 혈액 또는 제대혈로부터 단리, 유래 또는 획득된다. 각각의 가능성은 본 발명의 별도의 구현예를 나타낸다.
- [0047] 특정 구현예에서, 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아는 태반, 배양물에서 성장된 태반 세포 또는 혈액 세포로부터 단리되거나 획득된다. 각각의 가능성은 본 발명의 별도의 구현예를 나타낸다. 특정 구현예에서, 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아는 인간 태반, 배양물에서 성장된 인간 태반 세포 또는 인간 혈액 세포로부터 단리되거나 획득된다. 각각의 가능성은 본 발명의 별도의 구현예를 나타낸다.
- [0048] 특정 구현예에서, 인간 줄기 세포는 건강한 기능적 인간 외인성 미토콘드리아로 농축된 후 적어도 하나의 동결-해동 주기를 겪었다. 특정 구현예에서, 상기 기재된 방법은 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아가 풍부한 인간 줄기 세포를 환자에게 투여하기 전에 (a) 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아가 풍부한 인간 줄기 세포를 동결시키고, (b) 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아가 풍부한 인간 줄기 세포를 해동하는 추가의 단계를 추가로 포함한다.
- [0049] 특정 구현예에서, 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아는 총 미토콘드리아의 5% 내지 30%를 구성한다. 특정 구현예에서, 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아는 총 미토콘드리아의 10% 이상 30% 미만을 구성한다. 특정 구현예에서, 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아는 총 미토콘드리아의 10% 이상 25% 미만을 구성한다.
- [0050] 본 발명은 건강한 기능적 인간 외인성 미토콘드리아로 인간 줄기 세포를 풍부하게 하는 *생체외* 방법(*ex-vivo* method)을 제공하며, 방법은 (i) 미토콘드리아 질환, 장애 또는 이의 증상을 앓고 있는 환자로부터, 또는 적합한 공여자로부터의 복수의 단리되거나 부분적으로 정제된 인간 줄기 세포를 포함하는 제1 조성물을 제공하는 단계; (ii) 미토콘드리아 DNA의 병원성 돌연변이 없이 공여자로부터 획득된 복수의 단리된 동결-해동된 건강한 기능적 인간 외인성 미토콘드리아를 포함하는 제2 조성물을 제공하는 단계; (iii) 제1 조성물의 인간 줄기 세포를 10^6 개의 줄기 세포당 0.088 내지 176 mU CS 활성의 비율로 제2 조성물의 동결-해동된 건강한 기능적 인간 외인성 미토콘드리아와 접촉시켜 제3 조성물을 제공하는 단계; 및 (iv) 동결-해동된 건강한 기능적 인간 외인성 미토콘드리아가 인간 줄기 세포에 들어가도록 허용하는 조건하에서 제3 조성물을 배양함으로써 인간 줄기 세포를

상기 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아로 풍부하게 하여 미토콘드리아-풍부 인간 줄기 세포를 포함하는 제4 조성물을 제공하는 단계를 포함하고, 여기서 제4 조성물의 총 미토콘드리아는 3% 이상 33% 미만의 건강한 기능적 인간 외인성 미토콘드리아를 포함한다.

- [0051] 일부 구현예에서, 건강한 기능적 인간 외인성 미토콘드리아가 인간 줄기 세포에 들어가도록 허용하는 조건은 인간 줄기 세포를 상기 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아와 함께 16 내지 37°C 범위의 온도에서 0.5 내지 30시간 범위의 시간 동안 배양하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 건강한 기능적 인간 외인성 미토콘드리아가 인간 줄기 세포에 들어가도록 허용하는 조건은 인간 줄기 세포를 상기 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아와 함께 16 내지 37°C 범위의 온도에서 0.5 내지 30시간 범위의 시간 동안 세포 생존을 지원하는 환경하의 배양 배지에서 배양하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에 따르면, 배양 배지는 인간 혈청 알부민을 함유하는 식염수이다. 일부 구현예에서, 배양 조건은 5% CO₂를 함유하는 대기를 포함한다. 일부 구현예에서, 배양 조건은 공기에서 발견되는 수준 이상으로 추가된 CO₂를 포함하지 않는다.
- [0052] 일부 구현예에서, 방법은 배양 전, 동안 또는 후에 인간 줄기 세포 및 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아의 원심분리를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 배양 전에, 방법은 2500xg 이상의 원심분리력에서 인간 줄기 세포 및 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아의 단일 원심분리를 추가로 포함한다.
- [0053] 일부 구현예에서, 동결-해동 주기를 거친 미토콘드리아는 동결-해동 주기를 거치지 않은 대조군 미토콘드리아와 비교하여 해동 후 필적할 만한 산소 소비율(oxygen consumption rate)을 입증한다.
- [0054] 특정 구현예에서, 상기 기재된 방법은 미토콘드리아-풍부 인간 줄기 세포를 동결시키는 단계를 추가로 포함하고, 임의로 해동하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0055] 추가의 구현예에서, 인간 줄기 세포는 미토콘드리아 확대 전 또는 후에 확장된다.
- [0056] 일부 측면 및 구현예에서, 본 발명은 이의 다양한 구현예에서 상기 기재된 방법에 의해 수득된 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아가 풍부한 복수의 인간 줄기 세포를 포함하는 조성물을 제공하고, 여기서 상기 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아는 미토콘드리아-풍부 인간 줄기 세포에서 총 미토콘드리아의 3% 이상 33% 미만을 구성한다.
- [0057] 본 발명은, 또 다른 측면에서, 상기 기재된 미토콘드리아-풍부 인간 줄기 세포를 포함하는 약제학적 조성물을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 원발성 미토콘드리아 질환 또는 장애 또는 이의 증상의 치료를 필요로 하는 인간 환자에서 원발성 미토콘드리아 질환 또는 장애 또는 이의 증상을 치료하는 방법을 추가로 제공한다.
- [0058] 본 발명의 추가의 구현예 및 이용 가능성의 전체 범위는 이후 제공된 상세한 설명으로부터 명백해질 것이다. 그러나, 본 발명의 사상 및 범위 내에서 다양한 변화 및 변경이 이 상세한 설명으로부터 당업자에게 명백해질 것이기 때문에, 본 발명의 바람직한 구현예를 나타내는 상세한 설명 및 특정 실시예는 단지 예시로서 제공되는 것이 이해되어야 한다. 통상적 및 전통적인 접근법의 추가의 제한 및 단점은 도면을 참조하여 이러한 시스템을 본 출원의 나머지 부분에 제시된 바와 같은 본 발명의 일부 측면과 비교함으로써 당업자에게 명백해질 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0059] **도 1**은 HeLa-TurboGFP-미토콘드리아 세포로부터 단리된 GFP-표지 미토콘드리아와 함께 배양된 형광 공초점 현미경법 CD34⁺ 세포로 수득된 현미경 사진이다.
- 도 2a**는 미처리된 세포(NT)와 비교하여 다양한 농도(0.044, 0.44, 0.88, 2.2, 4.4, 8.8, 17.6 mU CS 활성)에서 C57BL 마우스의 외인성 미토콘드리아와 함께 세포를 배양한 후 FVB/N 골수 세포에서 C57BL mtDNA의 카피 수를 나타내는 막대 그래프이다.
- 도 2b**는 미처리된 세포(NT)와 비교하여 야누스 수준으로 정규화된 다양한 농도(0.044, 0.44, 0.88, 2.2, 4.4, 8.8, 17.6 mU CS 활성)에서 C57BL 마우스의 외인성 미토콘드리아와 함께 세포를 배양한 후 FVB/N 골수 세포에서 mtDNA 인코딩된 (COX1) 단백질의 함량을 나타내는 막대 그래프이다.
- 도 2c**는 미처리된 세포(NT)와 비교하여 야누스 수준으로 정규화된 다양한 농도(0.044, 0.44, 0.88, 2.2, 4.4, 8.8, 17.6 mU CS 활성)에서 C57BL 마우스의 외인성 미토콘드리아와 함께 세포를 배양한 후 FVB/N 골수 세포에서 핵 인코딩된 (SDHA) 단백질의 함량을 나타내는 막대 그래프이다.

도 3a는 증가하는 양의 GFP-표지 미토콘드리아로 농축된 후 뮤린 BM 세포에서 CS 활성의 비교를 보여주는 막대 그래프이다.

도 3b는 GFP-표지 미토콘드리아(회색 막대)에서의 활성과 비교하여 이들 세포(검은색 막대)에서 사이토크롬 c 리덕타제 활성의 비교를 보여주는 막대 그래프이다.

도 4는 C57BL 마우스의 외인성 미토콘드리아가 풍부한 골수 세포의 IV 주사 후 다양한 시점에서 FVB/N 마우스의 골수에서 C57BL mtDNA의 수준을 나타내는 막대 그래프이다.

도 5는 2개의 상이한 태반 유래 미토콘드리아 배치(PLC1 & PLC2)를 사용한 MAT 후 건강한 공여자 CD34⁺ 세포에서 태반 하플로그룹 백분율을 나타내는 점 플롯이다.

도 6a는 원심분리를 포함하거나 포함하지 않고 인간 태반 세포로부터 단리된 GFP-표지 미토콘드리아와 함께 배양된 대조군, 미처리된 인간 BM 세포 및 인간 BM 세포에서의 CS 활성의 비교를 보여주는 막대 그래프이다.

도 6b는 원심분리를 포함하고 인간 태반 세포로부터 단리된 GFP-표지 미토콘드리아와 함께 배양된 대조군, 미처리된 인간 BM 세포 및 인간 BM 세포에서의 ATP 수준의 비교를 보여주는 막대 그래프이다.

도 7a는 피어슨 환자 체대혈 세포에서의 mtDNA 결실 및 결실을 보여주는 서던 블롯 분석의 예시이다.

도 7b는 비-증강된 체대혈 세포(UCB)가 주입된 마우스와 비교하여 인간 미토콘드리아가 풍부한 피어슨 체대혈 세포(UCB + Mito)를 사용한 미토콘드리아 확대 요법 2개월 후 NSGS 마우스의 골수에서 인간 mtDNA 카피의 수를 나타내는 막대 그래프이다.

도 8은 C57BL 태반으로부터 수득된 건강한 기능성 미토콘드리아가 풍부한 줄기 세포의 투여 1개월 후 FVB/N 마우스의 골수에서 FVB/N ATP8 돌연변이된 mtDNA의 수준을 보여주는 막대 그래프이다.

도 9a는 본 발명에 의해 제공된 바와 같이, 피어슨 증후군(PS) 환자의 상이한 치료 단계의 도식이다.

도 9b는 요법 전후 시간의 함수로서 본 발명에 제공된 방법에 의해 처리된 PS 환자의 MET 점수를 나타내는 막대 그래프이다.

도 9c는 요법 전(B) 및 후 시간의 함수로서 본 발명에 제공된 방법에 의해 처리된 PS 환자의 혈액에서 발견된 락테이트 수준을 나타내는 막대 그래프이다.

도 9d는 요법 전후 시간의 함수로서 본 발명에 제공된 방법에 의해 처리된 PS 환자의 체중 및 신장의 표준 편차 점수를 나타내는 선 그래프이다.

도 9e는 요법 전후 시간의 함수로서 본 발명에 제공된 방법에 의해 처리된 PS 환자의 알칼리성 포스파타제(ALP) 수준을 나타내는 선 그래프이다.

도 9f는 본 발명에 의해 제공된 요법 전후의 PS 환자에서 혈액 적혈구(RBC) 수준의 장기간 상승을 나타내는 선 그래프이다.

도 9g는 본 발명에 의해 제공된 요법 전후의 PS 환자에서 혈중 헤모글로빈(HGB) 수준의 장기간 상승을 나타내는 선 그래프이다.

도 9h는 본 발명에 의해 제공된 요법 전후의 PS 환자에서 혈중 헤마토크릿(HCT) 수준의 장기간 상승을 나타내는 선 그래프이다.

도 9i는 마그네슘 보충 전후, 요법 전후 시간의 함수로서 본 발명에 제공된 방법에 의해 처리된 PS 환자에서 혈중 마그네슘 수준을 나타내는 막대 그래프이다.

도 9j는 요법 전후 시간의 함수로서 본 발명에 제공된 방법에 의해 처리된 PS 환자의 크레아티닌 수준을 나타내는 선 그래프이다.

도 9k는 요법 전후 시간의 함수로서 본 발명에 제공된 방법에 의해 처리된 PS 환자의 비카보네이트 수준을 나타내는 선 그래프이다.

도 9l은 요법 전후 시간의 함수로서 본 발명에 제공된 방법에 의해 처리된 PS 환자의 염기 과잉 수준을 나타내는 선 그래프이다.

- 도 9m**은 요법 전후 시간의 함수로서 본 발명에 제공된 방법에 의해 처리된 PS 환자의 소변에서 글루코스 대 크레아티닌 비율을 나타내는 막대 그래프이다.
- 도 9n**은 요법 전후 시간의 함수로서 본 발명에 제공된 방법에 의해 처리된 PS 환자의 소변에서 칼륨 대 크레아티닌 비율을 나타내는 막대 그래프이다.
- 도 9o**는 요법 전후 시간의 함수로서 본 발명에 제공된 방법에 의해 처리된 PS 환자의 소변에서 클로라이드 대 크레아티닌 비율을 나타내는 막대 그래프이다.
- 도 9p**는 요법 전후 시간의 함수로서 본 발명에 제공된 방법에 의해 처리된 PS 환자의 소변에서 나트륨 대 크레아티닌 비율을 나타내는 막대 그래프이다.
- 도 10a**는 세포당 정상 mtDNA의 수를 나타내는 18S 게놈 DNA와 비교하여 결실된 영역(각 환자에서)에 대해 디지털 PCR에 의해 측정되고 기준선당 정규화된 바와 같이, 요법 전후 시간의 함수로서 본 발명에 제공된 방법에 의해 처리된 3명의 PS 환자(Pt.1, Pt.2 및 Pt.3)에서 정상적 mtDNA 함량을 나타내는 선 그래프이다.
- 도 10b**는 MAT 후 기준선에서 3명의 PS 환자(Pt.1, Pt.2 및 Pt.3) 중 이형 상태 수준(총 mtDNA와 비교하여 결실된 mtDNA)을 나타내는 선 그래프이다. 점선은 각 환자의 기준선을 나타낸다.
- 도 11a**는 본 발명에 의해 추가로 제공되는 바와 같이, 피어슨 증후군(PS) 환자의 상이한 치료 단계의 또 다른 도식이다.
- 도 11b**는 요법 전(B) 및 후 시간의 함수로서 본 발명에 제공된 방법에 의해 처리된 PS 환자의 혈중 락테이트 수준을 나타내는 막대 그래프이다.
- 도 11c**는 요법 전후 시간의 함수로서 본 발명에 제공된 방법에 의해 처리된 PS 환자의 앉기-서기 점수를 나타내는 막대 그래프이다.
- 도 11d**는 요법 전후 시간의 함수로서 본 발명에 제공된 방법으로 처리된 PS 환자의 6분-보행 테스트 점수를 나타내는 막대 그래프이다.
- 도 11e**는 요법 전후 시간의 함수로서 본 발명에 제공된 방법에 의해 처리된 PS 환자의 3개의 연속 반복(R1, R2, R3)의 동력계 점수를 나타내는 막대 그래프이다.
- 도 11f**는 요법 전후 시간의 함수로서 본 발명에 제공된 방법에 의해 처리된 PS 환자에서 소변 마그네슘 대 크레아티닌 비율을 나타내는 막대 그래프이다.
- 도 11g**는 요법 전후 시간의 함수로서 본 발명에 제공된 방법으로 처리된 PS 환자에서 소변 칼륨 대 크레아티닌 비율을 나타내는 막대 그래프이다.
- 도 11h**는 요법 전후 시간의 함수로서 본 발명에 제공된 방법으로 처리된 PS 환자에서 소변 칼슘 대 크레아티닌 비율을 나타내는 막대 그래프이다.
- 도 11i**는 요법 전후 시간의 함수로서 본 발명에 제공된 방법에 의해 처리된 PS 환자의 소변에서 ATP8 대 18S 카피 수 비율을 나타내는 막대 그래프이다.
- 도 11j**는 요법 전후 시간의 함수로서 본 발명에 제공된 방법에 의해 처리된 PS 환자의 림프구에서 ATP 수준을 나타내는 막대 그래프이다.
- 도 12a**는 본 발명에 의해 추가로 제공된 바와 같이, 피어슨 증후군(PS) 환자 및 컨스-세이어 증후군(KSS) 환자의 상이한 치료 단계의 또 다른 도식이다.
- 도 12b**는 요법 전(B) 및 후 시간의 함수로서 본 발명에 제공된 방법에 의해 처리된 PS 환자의 혈중 락테이트 수준을 나타내는 막대 그래프이다.
- 도 12c**는 요법 전후 시간의 함수로서 본 발명에 제공된 방법에 의해 처리된 PS 환자의 AST 및 ALT 수준을 나타내는 막대 그래프이다.
- 도 12d**는 요법 전후 시간의 함수로서 본 발명에 제공된 방법에 의해 처리된 PS 환자의 트리글리세라이드, 총 콜레스테롤 및 VLDL 콜레스테롤 수준을 나타내는 막대 그래프이다.
- 도 12e**는 요법 전후 시간의 함수로서 본 발명에 제공된 방법에 의해 처리된 PS 환자의 헤모글로빈 A1C(HbA1C)

점수를 나타내는 막대 그래프이다.

도 12f는 요법 전후 시간의 함수로서 본 발명에 제공된 방법에 의해 처리된 PS 환자(Pt.3)의 앓기-서기 점수를 나타내는 선 그래프이다.

도 12g는 요법 전후 시간의 함수로서 본 발명에 제공된 방법에 의해 처리된 PS 환자(Pt.3)의 6분-보행-테스트 점수를 나타내는 선 그래프이다.

도 13은 요법 전후에 본 발명에 제공된 방법에 의해 처리된 KSS 환자의 말초 혈액 내 ATP 함량을 나타내는 막대 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0060] 본 발명은 치료적으로 유의미한 양의 외인성 기능적이고 건강한 미토콘드리아의 표적화 및/또는 전신 전달을 위한 세포 플랫폼, 보다 구체적으로 줄기 세포 플랫폼을 제공한다. 본 발명은 추가로 이러한 세포 플랫폼을 생산하는 방법, 및 미토콘드리아 질환을 치료하는 데 이들의 사용 방법을 제공한다.
- [0061] 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아로 심지어 적당히 농축된 인간 줄기 세포가 미토콘드리아 질환 및 다양한 병리 장애를 앓고 있는 환자의 기관, 조직 및 세포에 건강한 기능성 미토콘드리아의 생체내 전신 전달(*in-vivo systemic delivery*)을 달성할 수 있다는 것이 이제 처음으로 밝혀졌다.
- [0062] 기능성 미토콘드리아가 적당히 풍부한 줄기 세포의 제공은 지금까지 불가능했던 인간의 원발성 미토콘드리아 질환의 개선된 요법을 가능하게 한다. 예를 들어, 피어슨 증후군 (PS) 및 컨스-세이어 증후군(KSS)과 같은 미토콘드리아 DNA의 돌연변이와 관련된 원발성 미토콘드리아 질환은 이제 기능성 미토콘드리아가 단지 적당히 풍부한 줄기 세포를 질환 감염된 조직 또는 기관에 이식하여 질환의 장기간 소멸을 초래함으로써 치료될 수 있다. 질환 감염된 세포가 자체 줄기 세포인 경우, 투여된 농축 줄기 세포는 감염된 세포를 대체하여 다시 질환의 장기간 소멸로 이어질 수 있다. 다른 예에서, 원발성 미토콘드리아 질환이 핵 DNA의 돌연변이와 관련되고, 감염된 세포가 줄기 세포이거나 줄기 세포로부터 유래되는 경우, 투여된 줄기 세포는 감염된 세포를 대체하여 다시 질환의 장기간 소멸로 이어질 수 있다. 본 발명은 처음으로 인간의 원발성 미토콘드리아 질환의 병리학적 상태를 지속적으로 교정하고 이러한 질환의 장기적 소멸을 위한 줄기 세포 기반 수단 및 방법을 제공하여, 투여 전 이들 세포의 낮거나 중간 정도의 미토콘드리아 농축만 필요하다는 점을 강조해야 한다.
- [0063] 본 발명은 또한 몇 가지 놀라운 발견에 기초하고 있는데, 그 중에서 미토콘드리아-풍부 인간 줄기 세포의 단일 투여는 다양한 임상적 파라미터의 결과에 의해 결정된 바와 같이 적어도 1년 동안 반복적인 개입의 필요 없이 신장, 간, 뇌, 근육 및 뼈와 같은 기관의 기능을 포함한 인간 환자의 전반적인 생리학적 및 인지적 상태를 개선시키기에 충분했다는 것이다. 단일 라운드의 요법이 다양한 기관과 증상에서 장기적인 효과를 수득하기에 충분했지만, 이러한 효과의 적어도 일부를 유지하기 위해 추가 라운드의 치료가 필요할 가능성이 남아 있다.
- [0064] 본 발명은, 한 측면에서, 원발성 미토콘드리아 질환, 장애 또는 이의 증상의 치료를 필요로 하는 대상체에서 원발성 미토콘드리아 질환, 장애 또는 이의 증상을 치료하는 방법을 제공하며, 방법은 복수의 줄기 세포를 포함하는 약제학적 조성물을 환자에게 투여하는 단계를 포함하고, 여기서 줄기 세포는 미토콘드리아 DNA의 병원성 돌연변이 없이 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아가 풍부하다. 일부 구현예에서, 대상체는 포유류 대상체이고, 줄기 세포는 포유류 줄기 세포이다. 특정 구현예에서, 대상체는 인간 대상체이고, 줄기 세포는 인간 줄기 세포이다.
- [0065] 다른 측면에서, 본 발명은 원발성 미토콘드리아 질환, 장애 또는 이의 증상의 치료를 필요로 하는 인간 환자에서 원발성 미토콘드리아 질환, 장애 또는 이의 증상을 치료하는 데 사용하기 위한 약제학적 조성물을 제공하고, 조성물은 미토콘드리아 DNA의 병원성 돌연변이 없이 동결-해동된 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아가 풍부한 복수의 인간 줄기 세포를 포함하고, 여기서 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아는 미토콘드리아-풍부 인간 줄기 세포에서 총 미토콘드리아의 3% 이상 33% 미만을 구성한다.
- [0066] 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 환자의 체중 kg당 적어도 10^5 내지 4×10^7 개의 미토콘드리아-풍부 인간 줄기 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 환자의 체중 kg당 적어도 10^5 내지 2×10^7 개의 미토콘드리아-풍부 인간 줄기 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 환자의 체중 kg당 적어도 5×10^5 내지 1.5×10^7 개의 미토콘드리아-풍부 인간 줄기 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 환자

의 체중 kg당 적어도 10^6 내지 10^7 개의 미토콘드리아-풍부 인간 줄기 세포를 포함한다. 다른 구현예에서, 약제학적 조성물은 환자의 체중 kg당 적어도 10^5 또는 적어도 10^6 개의 미토콘드리아-풍부 인간 줄기 세포를 포함한다. 각각의 가능성은 본 발명의 별도의 구현예를 나타낸다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 총 적어도 5×10^5 내지 5×10^9 개의 미토콘드리아-풍부 인간 줄기 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 총 적어도 10^6 내지 10^9 개의 미토콘드리아-풍부 인간 줄기 세포를 포함한다. 다른 구현예에서, 약제학적 조성물은 총 적어도 2×10^6 내지 5×10^8 개의 미토콘드리아-풍부 인간 줄기 세포를 포함한다.

[0067] 또 다른 측면에서, 본 발명은 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아가 풍부한 복수의 인간 CD34⁺ 줄기 세포를 포함하는 조성물을 제공하고, 여기서 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아는 미토콘드리아-풍부 인간 CD34⁺ 줄기 세포에서 총 미토콘드리아의 3% 이상 33% 미만을 구성한다.

[0068] 또 다른 측면에서, 본 발명은 원발성 미토콘드리아 질환 또는 장애 또는 이의 증상을 치료하는 데 사용하기 위한 약제학적 조성물을 제공하고, 여기서 약제학적 조성물은 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아가 풍부한 복수의 인간 CD34⁺ 줄기 세포를 포함하고, 여기서 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아는 미토콘드리아-풍부 인간 CD34⁺ 줄기 세포에서 총 미토콘드리아의 3% 이상 33% 미만을 구성한다. 본원에 사용된 용어 "방법"은 일반적으로 화학, 약리학, 생물학, 생화학 및 의학 분야의 실무자에게 공지되거나 이들에 의해 공지된 방식, 수단, 기술 및 절차로부터 쉽게 개발된 방식, 수단, 기술 및 절차를 포함하지만 이에 제한되지 않는, 주어진 작업을 달성하기 위한 방식, 수단, 기술 및 절차를 지칭한다.

[0069] 본원에 사용된 용어 "치료하는"은 질환 또는 상태에 의해 관련되거나 유도된 적어도 하나의 증상의 감소, 완화 또는 개선을 포함한다. 본원에 사용된 용어 "치료하는"은 또한 예방적(예: 예방적), 완화적 및 치유적 치료를 포함한다.

[0070] 본원에 사용된 용어 "약제학적 조성물"은 적어도 하나의 생리학적 활성제를 포함하는 임의의 조성물을 지칭한다. 본원에 사용된 용어 "약제학적 조성물"은 추가로, 예를 들어, 치료, 예방, 진단, 예방 또는 예후 효과를 위해 대상체에게 전달되는 약제학적 활성 성분을 포함하는 조성물을 지칭한다. 본원에 사용된 용어 "약제학적 조성물"은 추가로 인간 줄기 세포를 포함하고, 임의로 세포가 생존 가능한 상태로 유지되는 배지 또는 담체를 추가로 포함하는 임의의 조성물을 지칭한다. 특정 구현예에서, 약제학적 조성물은 약제학적 활성 성분 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본원에 사용된 용어 "약제학적으로 허용되는 담체"는 생리학적으로 적합한 임의의 및 모든 용매, 분산 매질, 코팅, 항균제 및 항진균제, 등장성 및 흡수 지연제 등을 포함한다. 약제학적으로 허용되는 담체의 예는 물, 식염수, 인산염 완충 식염수, 텍스트로스, 글리세롤, 에탄올 등 뿐만 아니라 이의 조합 중 하나 이상을 포함한다.

[0071] 본원에 사용된 용어 "생물학적 활성제"는, 예를 들어, 살아 있는 세포(들), 조직(들), 기관(들) 및 존재(들)와 같은 생물학적 시스템에서 반응을 유도할 수 있는 임의의 분자를 지칭한다. 본 발명에 따르는 생물학적 활성제의 비제한적인 예는 세포, 온전한 미토콘드리아, 미토콘드리아 DNA 및 미토콘드리아 단백질을 포함한다. 본 발명의 원리에 따르면, 미토콘드리아 DNA의 병원성 돌연변이가 없이 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아가 풍부한 복수의 인간 줄기 세포는 생물학적 활성제이다.

[0072] 본원에 사용된 용어 "줄기 세포"는 일반적으로 임의의 유형의 줄기 세포를 지칭한다. 줄기 세포는 다른 유형의 세포로 분화할 수 있고, 분화되어 더 많은 동일한 유형의 줄기 세포를 생성할 수 있는 미분화 세포이다. 줄기 세포는 전능성 또는 만능일 수 있다. 본원에 사용된 용어 "인간 줄기 세포"는 일반적으로 인간에서 자연적으로 발견된 모든 줄기 세포, 및 생체외에서 생성되거나 유래된 모든 줄기 세포를 지칭하며, 인간과 양립할 수 있다. 줄기 세포와 같은 "전구 세포"는 특정 유형의 세포로 분화하는 경향을 갖지만, 줄기 세포보다 이미 더 특이적이며, 이의 "표적" 세포로 분화하도록 밀려난다. 줄기 세포와 전구 세포 사이의 가장 중요한 차이점은 줄기 세포는 무한정 복제할 수 있는 반면, 전구 세포는 제한된 횟수만 분열할 수 있다는 것이다. 본원에 사용된 용어 "인간 줄기 세포"는 "전구 세포" 및 "비-완전 분화된 줄기 세포"를 추가로 포함한다.

[0073] 본 발명의 원리에 따르면, 줄기 세포는 미토콘드리아의 수 및/또는 기능을 증가시키기 위해 필요한 환자에게 투여되기 전에 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아로 풍부하게 된다. 임의의 이론 또는 메커니즘에 제한되지 않고, 투여된 줄기 세포에서 미토콘드리아의 증가된 수 및/또는 기능은 인간 환자에서 처음으로 본원에 예시된 다

양한 치료 효과의 원인이 된다.

- [0074] 용어 "기능성 미토콘드리아", "건강한 미토콘드리아", "건강한 기능성 미토콘드리아" 및 "건강한 기능적 외인성 미토콘드리아"는 본원에서 상호교환적으로 사용되며, 정상적인 비-병리 수준의 활성을 나타내는 미토콘드리아 DNA에서 병원성 돌연변이가 없는 미토콘드리아를 지칭한다. 미토콘드리아의 활성은 테트라메틸로다민 에틸 에스테르 퍼클로레이트(TMRE) 염색, O₂ 소비, ATP 생산 및 CS 활성의 수준과 같은 당업계에 익히 공지된 다양한 방법으로 측정될 수 있다.
- [0075] 이하 예시된 구현예에서, 미토콘드리아는 인간 미토콘드리아이다.
- [0076] 용어 "건강한 기증자" 및 "건강한 대상체"는 상호교환적으로 사용되며, 치료되는 질환 또는 상태를 앓지 않는 대상체를 지칭한다.
- [0077] 특정 구현예에서, 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아는 동계 또는 동종이계(allogeneic)이다.
- [0078] 본원에 사용된 용어 "풍부화"는 생체외에서 수행되는 임의의 작용을 지칭하며, 이는 인간 세포의 미토콘드리아 함량, 예를 들어, 온전하고 기능적이며 건강한 미토콘드리아의 수를 증가시킨다. 본 발명의 원리에 따르면, 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아가 인간 줄기 세포에 도입되어 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아로 이들 세포를 풍부하게 한다. 이러한 농축은 인간 줄기 세포의 미토콘드리아 함량을 변화시키는 반면: 나이브 인간 줄기 세포는 실질적으로 숙주/자가/내인성 미토콘드리아의 한 집단을 갖고, 외인성 미토콘드리아가 풍부한 인간 줄기 세포는 실질적으로 두 집단의 미토콘드리아 - 한 집단의 숙주/자가/내인성 미토콘드리아와 또 다른 집단의 도입된 미토콘드리아(즉, 외인성 미토콘드리아)를 갖는 것으로 이해되어야 한다. 따라서, 용어 "풍부화"는 외인성 미토콘드리아의 수용/혼입 후 세포의 상태와 관련된다. 두 집단이 여러 측면에서, 예를 들어, 미토콘드리아 DNA에서 다르기 때문에, 두 집단의 미토콘드리아 사이의 수 및/또는 비율을 결정하는 것은 간단하다. 따라서, "건강한 기능성 인간 미토콘드리아가 풍부한 인간 줄기 세포"라는 구는 "내인성 미토콘드리아 및 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아를 포함하는 인간 줄기 세포"라는 구와 동등하다. 예를 들어, 총 미토콘드리아의 1% 이상 33% 미만의 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아를 포함하는 인간 줄기 세포는 99:1의 비율 내지 67:33의 비율로 숙주/자가/내인성 미토콘드리아와 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아를 포함하는 것으로 간주된다. 예를 들어, "총 미토콘드리아의 3%"는 농축된 후 원래 (내인성) 미토콘드리아 함량이 총 미토콘드리아의 97%이고, 도입된 (외인성) 미토콘드리아가 총 미토콘드리아의 3%임을 의미하고- 이는 (3/97=) 3.1% 농축과 동등하다. 또 다른 예 - "총 미토콘드리아의 33%"는 농축된 후 원래 (내인성) 미토콘드리아 함량이 총 미토콘드리아의 67%이고, 도입된 (외인성) 미토콘드리아가 총 미토콘드리아의 33%임을 의미하고- 이는 (33/67=) 49.2% 농축과 동등하다.
- [0079] 특정 구현예에서, 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아는 줄기 세포에서 총 미토콘드리아의 1% 이상 33% 미만을 구성한다. 특정 구현예에서, 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아는 총 미토콘드리아의 약 1%, 3%, 5%, 7%, 10%, 15% 또는 20% 내지 약 25%, 27%, 29% 또는 31%를 구성한다. 각각의 가능성은 본 발명의 별도의 구현예를 나타낸다. 본원에 사용된 용어 "약"은 주어진 수보다 10% 이상 또는 이하를 의미한다. 예를 들어, 약 10%는 9%, 9% 내지 11% 또는 11%를 의미한다. 전형적으로, 본원에 사용된 수치는 지시된 수치의 ± 10%를 의미한다.
- [0080] 특정 구현예에서, 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아는 줄기 세포의 총 미토콘드리아의 적어도 1%를 구성하고, 여기서 줄기 세포는 골수 세포 또는 그로부터 유래되거나 획득된 세포가 아니다. 특정 구현예에서, 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아는 줄기 세포의 총 미토콘드리아의 약 1% 내지 약 99% 및 이의 임의의 하위 범위를 구성하며, 여기서 줄기 세포는 골수 세포 또는 그로부터 유래되거나 획득된 세포가 아니다. 특정 구현예에서, 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아는 줄기 세포의 총 미토콘드리아의 적어도 약 1%, 3%, 5%, 7%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 99%를 구성하고, 여기서 줄기 세포는 골수 세포 또는 그로부터 유래되거나 획득된 세포가 아니다. 각각의 가능성은 본 발명의 별도의 구현예를 나타낸다.
- [0081] 기능성 미토콘드리아에 의한 줄기 세포의 농축 정도는 산소(O₂) 소비율, 시트레이트 신타제의 함량 또는 활성의 수준, 아데노신 트리포스페이트(ATP) 생산 속도를 포함하지만, 이에 제한되지 않는 기능 및/또는 효소 검정에 의해 결정될 수 있다. 대안에서, 건강한 공여자 미토콘드리아에 의한 줄기 세포의 농축은 공여자의 미토콘드리아 DNA의 검출에 의해 확인될 수 있다. 일부 구현예에 따르면, 기능성 미토콘드리아에 의한 줄기 세포의 농축 정도는 이형 상태의 변화 수준 및/또는 세포당 mtDNA의 카피 수에 의해 결정될 수 있다. 각각의 가능성은 본 발명의 별도의 구현예를 나타낸다.

[0082] TMRM(테트라메틸로다민 메틸 에스테르) 또는 관련된 TMRE(테트라메틸로다민 에틸 에스테르)는 미토콘드리아 막 전위의 변화를 동정하여 살아 있는 세포에서 미토콘드리아 기능을 평가하는 데 일반적으로 사용되는 세포 투과성 형광 염료이다. 일부 구현예에 따르면, 농축의 수준은 TMRE 또는 TMRM으로 염색함으로써 결정될 수 있다. 특정 구현예에 따르면, 건강한 기능성 미토콘드리아에 의한 줄기 세포의 농축은 당업계에서 인식되는 통상적인 검정에 의해 결정될 수 있다. 특정 구현예에서, 미토콘드리아-풍부 인간 줄기 세포에서 미토콘드리아 농축의 수준은 (i) 숙주/내인성 미토콘드리아 DNA 및 외인성 미토콘드리아 DNA의 수준; (ii) 시트레이트 신타제(CS), COX1, SDHA 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 미토콘드리아 단백질의 수준; (iii) CS 활성의 수준; 또는 (iv) (i), (ii) 및 (iii)의 임의의 조합에 의해 결정된다. 각각의 가능성은 본 발명의 별도의 구현예를 나타낸다. 특정 구현예에서, 미토콘드리아-풍부 인간 줄기 세포에서 미토콘드리아 농축의 수준은 (i) 동종이계 미토콘드리아의 경우 숙주(내인성) 결합이 있는 미토콘드리아 DNA 및 건강한 외인성 미토콘드리아 DNA의 수준; (ii) 시트레이트 신타제 활성의 수준; (iii) 석시네이트 데하이드로게나제 복합체 플라보 단백질 서브유닛 A (SDHA) 또는 사이토크롬 C 옥시다제 (COX1) 단백질의 수준; (iv) 산소(O₂) 소비율; (v) 아데노신 트리포스페이트(ATP) 생산 속도 또는 (vi) 이들의 임의 조합 중 적어도 하나에 의해 결정된다. 각각의 가능성은 본 발명의 별도의 구현예를 나타낸다.

[0083] 본원에 사용된 구 "건강한 기능적 외인성 미토콘드리아가 풍부한 인간 줄기 세포"는 건강한 기능성 미토콘드리아를 포함하는 인간 줄기 세포를 지칭하며, 여기서 건강한 기능성 미토콘드리아는 인간 줄기 세포와 다른 기원을 갖는다, 즉 이러한 미토콘드리아는 외인성 공급원으로부터 수득/유래/단리되는 것으로 이해되어야 한다. 인간 줄기 세포 내에 "외인성", "외래" 또는 "비-원래" 건강한 기능성 미토콘드리아의 존재는 이러한 세포가 상기 미토콘드리아로 풍부하게 된다는 증거로 작용한다. 당업자는 인간 줄기 세포가 당업계에 익히 공지된 방법에 기초하여 상이한 기원으로부터의 외인성 미토콘드리아를 포함한다는 것을 결정하는 방법을 알 것이다(참조: 예를 들어, Zander J. et al., *Forensic Sci. Int. Genet.*, 2017, Vol.29, pages 242-249). 이러한 방법은, 예를 들어, 인간 줄기 세포 내 또는 복수의 인간 줄기 세포 내에서 상이한 미토콘드리아 집단 사이의 유전적 차이에 기초할 수 있다. 예를 들어, 인간에서, 미토콘드리아 DNA가 37개의 유전자를 인코딩하고(참조: *Nature*, 290 (5806): 457-65), 따라서 mtDNA를 서열분석함으로써 인간 줄기 세포 또는 복수의 인간 줄기 세포에서 1, 2 또는 그 이상의 다른 mtDNA 집단의 존재를 쉽게 결정할 수 있다. 특정 구현예에서, 미토콘드리아-풍부 인간 줄기 세포에서 미토콘드리아 농축의 수준은 세포에서 총 미토콘드리아 DNA의 적어도 통계적으로 대표되는 부분을 서열 분석하고 숙주/내인성 미토콘드리아 DNA와 외인성 미토콘드리아 DNA의 상대적 수준을 결정함으로써 결정된다. 특정 구현예에서, 미토콘드리아-풍부 인간 줄기 세포에서 미토콘드리아 농축의 수준은 단일 뉴클레오티드 다형성(SNP) 분석에 의해 결정된다. 특정 구현예에서, 가장 큰 미토콘드리아 집단 및/또는 가장 큰 미토콘드리아 DNA 집단은 숙주/내인성 미토콘드리아 집단 및/또는 숙주/내인성 미토콘드리아 DNA 집단이고/이거나; 두 번째로 큰 미토콘드리아 집단 및/또는 두 번째로 큰 미토콘드리아 DNA 집단은 외인성 미토콘드리아 집단 및/또는 외인성 미토콘드리아 DNA 집단이다. 각각의 가능성은 본 발명의 별도의 구현예를 나타낸다.

[0084] 일부 구현예에서, 건강한 기능적 인간 외인성 미토콘드리아에 의한 줄기 세포의 농축은 인간 줄기 세포를 상기 건강한 기능적 인간 외인성 미토콘드리아와 함께 배양한 후 미토콘드리아-풍부 줄기 세포를 세척하는 단계를 포함한다. 이 단계는 세포 파편 또는 미토콘드리아 막 잔류물 및 줄기 세포에 들어 가지 않은 미토콘드리아가 실질적으로 없는 미토콘드리아-풍부 줄기 세포의 조성물을 제공한다. 일부 구현예에서, 세척은 인간 줄기 세포를 건강한 기능적 인간 외인성 미토콘드리아와 함께 배양한 후 미토콘드리아-풍부 줄기 세포의 원심분리를 포함한다. 일부 구현예에 따르면, 미토콘드리아-풍부 인간 줄기 세포를 포함하는 약제학적 조성물은 유리 미토콘드리아, 즉 줄기 세포에 들어 가지 않은 미토콘드리아 또는 다른 세포 파편으로부터 분리된다. 일부 구현예에 따르면, 미토콘드리아-풍부 인간 줄기 세포를 포함하는 약제학적 조성물은 검출 가능한 양의 유리 미토콘드리아를 포함하지 않는다.

[0085] 본원 및 청구범위에 사용된 용어 "미토콘드리아 질환" 및 용어 "원발성 미토콘드리아 질환"은 상호교환적으로 사용될 수 있다. 본원에 사용된 용어 "원발성 미토콘드리아 질환"은 공지된 또는 부인할 수 없는 미토콘드리아 DNA의 병원성 돌연변이에 의해 또는 유전자 산물이 미토콘드리아로 유입되는 핵 DNA 유전자의 돌연변이에 의해 진단되는 미토콘드리아 질환을 지칭한다. 일부 구현예에 따르면, 원발성 미토콘드리아 질환은 선천성 질환이다. 일부 구현예에 따르면, 원발성 미토콘드리아 질환은 2차 미토콘드리아 기능 장애가 아니다. 용어 "2차 미토콘드리아 기능 장애" 및 "후천적 미토콘드리아 기능 장애"는 출원 전반에 걸쳐 상호교환적으로 사용된다.

[0086] 일부 구현예에 따르면, 원발성 미토콘드리아 질환은 영향 받은 세포에서 정상 이하의 미토콘드리아 파라미터를

특징으로 한다. 일부 구현예에 따르면, 영향 받은 세포는 (i) 정상 이하의 산소(O₂) 소비율; (ii) 정상 이하의 시트레이트 신타제 함량 또는 활성의 수준; (iii) 정상 이하의 아데노신 트리포스페이트(ATP) 생산 속도; 또는 (iv) (i), (ii) 및 (iii)의 임의의 조합을 갖는다.

- [0087] 본원에 사용된 용어 "정상 이하의 산소(O₂) 소비율"은 미토콘드리아 질환을 앓지 않은 대상체 또는 복수의 대상체의 상응하는 세포 또는 상응하는 미토콘드리아에서 발견된 산소(O₂) 소비율로부터 유래되거나 이에 상응하는 대조군 산소(O₂) 소비율보다 실질적으로 더 낮은 산소(O₂) 소비율을 지칭한다.
- [0088] 본원에 사용된 용어 "정상 이하의 시트레이트 신타제 함량 또는 활성의 수준"은 미토콘드리아 질환을 앓지 않은 대상체 또는 복수의 대상체의 시트레이트 신타제의 함량 또는 활성의 수준으로부터 유래되거나 이에 상응하는 대조군 시트레이트 신타제의 함량 값 또는 활성의 수준보다 실질적으로 더 낮은 시트레이트 신타제의 함량 또는 활성의 수준을 지칭한다.
- [0089] 본원에 사용된 용어 "정상 이하의 아데노신 트리포스페이트(ATP) 생산 속도"는 미토콘드리아 질환을 앓지 않은 대상체 또는 복수의 대상체의 상응하는 세포 또는 상응하는 미토콘드리아에서 발견된 아데노신 트리포스페이트(ATP) 생산 속도로부터 유래되거나 이에 상응하는 대조군 아데노신 트리포스페이트(ATP) 생산 속도보다 실질적으로 더 낮은 아데노신 트리포스페이트(ATP) 생산 속도를 지칭한다.
- [0090] 특정 구현예에서, 본원에 사용된 용어 "실질적으로 더 낮은"은 정상 값 미만의 통계적으로 유의한 감소를 지칭한다. 특정 구현예에서, 본원에 사용된 용어 "실질적으로 더 낮은"은 병리학적 감소, 즉 실질적으로 더 낮은 값과 관련된 적어도 하나의 병리학적 증상이 명백해지는 수준을 지칭한다.
- [0091] 특정 구현예에서, 본원에 사용된 용어 "정상 이하"는 미토콘드리아 질환을 앓지 않은 대상체 또는 복수의 대상체의 상응하는 세포 또는 상응하는 미토콘드리아에서 발견된 상응하는 값보다 적어도 2배, 적어도 3배, 적어도 4배, 적어도 5배, 적어도 6배, 적어도 7배, 적어도 8배, 적어도 9배 또는 적어도 10배 더 낮은 값을 지칭한다. 각각의 가능성은 본 발명의 별도의 구현예를 나타낸다.
- [0092] 특정 구현예에서, 원발성 미토콘드리아 질환 또는 장애는 미토콘드리아 DNA의 돌연변이와 관련된다. 본원에 사용된 구 "미토콘드리아 DNA의 돌연변이와 관련된"은 일반적으로 미토콘드리아 질환 또는 장애의 병인이 적어도 부분적으로, 미토콘드리아 분자를 코딩하는, 미토콘드리아 DNA의 코딩 영역에서 돌연변이 또는 돌연변이 그룹에 작동가능하게 연결된다는 것을 의미한다.
- [0093] 특정 구현예에서, 미토콘드리아 DNA의 돌연변이와 관련된 미토콘드리아 질환 또는 장애는 피어슨 증후군(PS); 쾨스-셰이어 증후군(KSS); 미토콘드리아 뇌병증 젖산 증 및 뇌졸중 유사 에피소드(MELAS) 증후군; 레버의 유전성 시신경병증(LHON); 신경병증, 운동 실조 및 색소성 망막염(NARP) 증후군; 불규칙한 적색 섬유를 갖는 근간대성 간질(MERRF) 증후군; 모계 유전성 당뇨병 및 난청(MIDD); 알퍼스 유사 증후군; 만성 진행성 외안근 마비(CPEO); 미토콘드리아 DNA 관련 형태의 선천성 젖산 증(CLA); 미토콘드리아 DNA 고갈 증후군(MDDS); 및 미토콘드리아 DNA 관련 형태의 레이 증후군으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 각각의 가능성은 본 발명의 별도의 구현예를 나타낸다.
- [0094] 특정 구현예에서, 원발성 미토콘드리아 질환 또는 장애는 핵 DNA의 돌연변이와 관련된다. 본원에 사용된 구 "핵 DNA의 돌연변이와 관련된"은 일반적으로 미토콘드리아 질환 또는 장애의 병인이 적어도 부분적으로 미토콘드리아 분자를 코딩하는 핵 DNA의 코딩 영역에서 돌연변이 또는 돌연변이 그룹에 작동 가능하게 연결된다는 것을 의미한다. 용어 "미토콘드리아 분자"는 일반적으로 건강한 기능성 미토콘드리아에서 전달 및/또는 활성 및/또는 발견되는 임의의 분자를 지칭한다. 이러한 분자는 핵산 분자, 단백질 분자, 효소 분자 동일 수 있다. 일부 구현예에서, 원발성 미토콘드리아 질환 또는 장애는 OXPHOS 단백질을 직접 인코딩하거나 OXPHOS 공정을 작동시키는 필요한 복잡한 기구의 생산에 영향을 미침으로써 OXPHOS 기능에 간접적으로 영향을 미치는 핵 DNA 유전자의 돌연변이와 관련된다.
- [0095] 특정 구현예에서, 핵 DNA의 돌연변이와 관련된 원발성 미토콘드리아 질환 또는 장애는 미토콘드리아 신경 위장 뇌병증(MNGIE) 증후군; 알퍼스 증후군, 프리드리히 운동 실조(FA); 진행성 외안근 마비(PEO); 철적모구 빈혈; 운동 실조 신경병증 증후군(ANS); 멘델 신경퇴행성 미토콘드리아병증; 3-메틸글루타콘산뇨증(MEG), 난청(D), 뇌병증(E) 및 레이 유사 질환(L)(MEGDEL) 증후군; 쟈거스 증후군; 미세 변화 신증후군(MCNS); 핵 DNA 관련 형태의 선천성 젖산 증(CLA); 미토콘드리아 DNA 고갈 증후군(MDDS); 및 핵 DNA 관련 형태의 레이 증후군으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 각각의 가능성은 본 발명의 별도의 구현예를 나타낸다.

- [0096] 특정 구현예에서, ANS는 미토콘드리아 열성 운동 실조 증후군(mitochondrial recessive ataxia syndrome; MIRAS); 간질을 동반한 척수소뇌성 운동 실조(spinocerebellar ataxia with epilepsy; SCAE); 감각 실조 신경병증 구음장애 및 안근 마비(sensory ataxia neuropathy dysarthria and ophthalmoplegia; SANDO); 및 근간대성 간질 근병증 감각 실조증(myoclonic epilepsy myopathy sensory ataxia; MEMSA)으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 각각의 가능성은 본 발명의 별도의 구현예를 나타낸다.
- [0097] 특정 구현예에서, 미토콘드리아 질환 또는 장애는 후천성 미토콘드리아 기능 장애와 관련된다. 본원에 사용된 구 "후천성 미토콘드리아 기능 장애와 관련된다"은 일반적으로 미토콘드리아 질환 또는 장애가 성인기에 증상을 보이게 되고, 시간이 지남에 따라 악화되고/되거나, 미토콘드리아 분자를 코딩하는 미토콘드리아 또는 핵 DNA의 코딩 영역에서 돌연변이 또는 돌연변이 그룹에 반드시 작동 가능하게 연결되지 않는 것을 의미한다.
- [0098] 특정 구현예에서, 후천성 미토콘드리아 기능 장애와 관련된 미토콘드리아 질환 또는 장애는 성인기에 증상을 보이게 된다. 특정 구현예에서, 후천성 미토콘드리아 기능 장애와 관련된 미토콘드리아 질환 또는 장애는 시간이 지남에 따라 악화된다. 특정 구현예에서, 후천성 미토콘드리아 기능 장애와 관련된 미토콘드리아 질환 또는 장애는 미토콘드리아 분자를 코딩하는 미토콘드리아 또는 핵 DNA의 코딩 영역에서 돌연변이 또는 돌연변이 그룹에 작동 가능하게 연결되지 않거나, 단지 부분적으로 연결된다. 특정 구현예에서, 환자는 성인이다. 특정 구현예에서, 환자는 20세 이상이다. 특정 구현예에서, 환자는 30, 40, 50, 60 또는 70세 이상이다.
- [0099] 특정 구현예에서, 미토콘드리아 질환 또는 장애는 신장, 간, 뇌, 근육, 뼈, 눈 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 기관과 관련된다. 특정 구현예에서, 미토콘드리아 질환 또는 장애는 신장과 관련된다. 특정 구현예에서, 미토콘드리아 질환 또는 장애는 간과 관련된다. 특정 구현예에서, 미토콘드리아 질환 또는 장애는 뇌와 관련된다. 특정 구현예에서, 미토콘드리아 질환 또는 장애는 근육과 관련된다. 특정 구현예에서, 미토콘드리아 질환 또는 장애는 심장과 관련된다. 특정 구현예에서, 미토콘드리아 질환 또는 장애는 뼈와 관련된다. 특정 구현예에서, 미토콘드리아 질환 또는 장애는 눈과 관련된다.
- [0100] 특정 구현예에서, 증상은 보행 능력 장애, 운동 능력 장애, 언어 능력 장애, 기억 장애, 체중 증가 장애, 성장 장애, 낮은 혈중 알칼리성 포스파타제 수준, 낮은 혈중 마그네슘 수준, 높은 혈중 크레아티닌 수준, 낮은 혈중 비카보네이트 수준, 낮은 혈중 염기 과잉 수준, 높은 소변 글루코스/크레아티닌 비율, 높은 소변 클로라이드/크레아티닌 비율, 높은 소변 나트륨/크레아티닌 비율, 높은 혈중 락테이트 수준, 높은 소변 마그네슘/크레아티닌 비율, 높은 소변 칼륨/크레아티닌 비율, 높은 소변 칼슘/크레아티닌 비율, 당뇨, 마그네슘 결핍, 높은 혈중 요소 수준, 낮은 C-펩티드 수준, 높은 HbA1C 수준, 부갑상선 기능 저하증, 안검 하수증, 청력 상실, 심장 전도 장애, 림프구의 낮은 ATP 함량 및 산소 소비율로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 각각의 가능성은 본 발명의 별도의 구현예를 나타낸다. 증상을 "높음" 및 "낮음"으로 정의하는 것은 각각 "정상보다 검출 가능하게 더 높음" 및 "정상보다 검출 가능하게 더 낮음"에 상응하고, 여기서 정상 수준은 미토콘드리아 질환을 앓지 않은 복수의 대상체에서 상응하는 수준인 것으로 이해되어야 한다.
- [0101] 특정 구현예에서, 약제학적 조성물은 특정 조직 또는 기관에 투여된다. 특정 구현예에서, 약제학적 조성물은 적어도 10^4 개의 미토콘드리아-풍부 인간 줄기 세포를 포함한다. 특정 구현예에서, 약제학적 조성물은 약 10^4 개 내지 약 10^8 개의 미토콘드리아-풍부 인간 줄기 세포를 포함한다.
- [0102] 특정 구현예에서, 약제학적 조성물은 비경구 투여에 의해 투여된다. 특정 구현예에서, 상기 약제학적 조성물은 전신 투여에 의해 투여된다. 특정 구현예에서, 약제학적 조성물은 정맥내 주사에 의해 투여된다. 특정 구현예에서, 약제학적 조성물은 정맥내 주입에 의해 투여된다. 특정 구현예에서, 약제학적 조성물은 적어도 10^5 개의 미토콘드리아-풍부 인간 줄기 세포를 포함한다. 특정 구현예에서, 약제학적 조성물은 약 10^6 개 내지 약 10^8 개의 미토콘드리아-풍부 인간 줄기 세포를 포함한다. 특정 구현예에서, 약제학적 조성물은 환자의 체중 kg당 적어도 약 10^5 개 내지 2×10^7 개의 미토콘드리아-풍부 인간 줄기 세포를 포함한다. 특정 구현예에서, 약제학적 조성물은 환자의 체중 kg당 적어도 약 10^5 개의 미토콘드리아-풍부 인간 줄기 세포를 포함한다. 특정 구현예에서, 약제학적 조성물은 환자의 체중 kg당 적어도 약 10^5 개 내지 약 2×10^7 개의 미토콘드리아-풍부 인간 줄기 세포를 포함한다. 특정 구현예에서, 약제학적 조성물은 환자의 체중 kg당 적어도 약 10^6 개 내지 약 5×10^6 개의 미토콘드리아-풍부 인간 줄기 세포를 포함한다.
- [0103] 특정 구현예에서, 인간 줄기 세포는 농축 전에 환자로부터 획득되거나 유래된다. 추가의 구현예에서, 농축 전

에 환자로부터 수득되거나 유래된 인간 줄기 세포는 (i) 정상 이하의 산소(O₂) 소비율; (ii) 정상 이하의 시트레이트 신타제 함량 또는 활성의 수준; (iii) 정상 이하의 아데노신 트리포스페이트(ATP) 생산 속도; 또는 (iv) (i), (ii) 및 (iii)의 임의의 조합을 갖는다.

- [0104] 특정 구현예에서, 미토콘드리아-풍부 인간 줄기 세포는 농축 전에 환자와 다른 공여자로부터 수득되거나 유래된다.
- [0105] 특정 구현예에서, 공여자는 환자와 적어도 부분적으로 인간 백혈구 항원(HLA)-일치된다. 특정 구현예에서, 상기 기재된 방법은 환자와 미토콘드리아-풍부 인간 줄기 세포 사이의 유해한 면역원성 반응을 예방, 지연, 최소화 또는 폐지하는 제제를 환자에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 각각의 가능성은 본 발명의 별도의 구현예를 나타낸다. 특정 구현예에서, 유해한 면역원성 반응은 이식편-대-숙주 질환(graft-versus-host-disease; GvHD)이다.
- [0106] 특정 구현예에서, 인간 줄기 세포는 CD34⁺이다. 특정 구현예에서, 인간 줄기 세포는 조혈 줄기 세포이다. 특정 구현예에서, 인간 줄기 세포는 중간엽 줄기 세포이다. 특정 구현예에서, 인간 줄기 세포는 만능 줄기 세포(PSC) 또는 유도 만능 줄기 세포(iPSC)이다. 본원에 사용된 용어 "만능 줄기 세포(PSC)"는 무기한 증식할 수 있을뿐만 아니라 신체에서 복수의 세포 유형을 야기할 수 있는 세포를 지칭한다. 본원에 사용된 용어 "유도 만능 줄기 세포(iPSC)"는 인간 성인 체세포로부터 생성될 수 있는 만능 줄기 세포의 유형을 지칭한다. 일부 구현예에서, PSC는 비배아 줄기 세포이다. 특정 구현예에서, 인간 배아 줄기 세포는 청구범위의 범위로부터 명시적으로 배제된다는 것이 명백하게 이해되어야 한다. 본원에 사용된 용어 "배아 줄기 세포(ESC)"는 배반포의 내부 세포 괴상으로부터 유래된 전능성 줄기 세포의 유형을 지칭한다. 전능성 줄기 세포는 신체의 다른 모든 세포 유형을 야기할 수 있는 세포이다.
- [0107] 본원에 사용된 용어 "CD34⁺ 세포"는 그들의 기원에 관계 없이 CD34-양성임을 특징으로 하는 줄기 세포이다. 용어는 추가로 줄기 세포로부터 수득되거나 골수로부터 동원되거나 제대혈로부터 수득된 CD34 양성임을 특징으로 하는 조혈 줄기 세포를 지칭한다. 본원에 사용된 용어 "CD34⁺ 세포"는 표면 마커 단백질 CD34를 발현하는 세포를 나타낸다. CD34의 발현은 CD34에 대해 지시된 항체를 사용하는 면역 형광 분석 또는 FACS 분석에 의해 결정될 수 있다.
- [0108] 특정 구현예에서, CD34⁺ 세포는 제대 세포이다. 특정 구현예에서, CD34⁺ 세포는 골수 세포이다. 특정 구현예에서, CD34⁺ 세포는 조혈 세포이다. 특정 구현예에서, CD34⁺ 세포는 중간엽 줄기 세포이다. 특정 구현예에서, CD34⁺ 세포는 내피 전구 세포이다. 특정 구현예에서, CD34⁺ 세포는 혈관의 내피 세포이다. 특정 구현예에서, CD34⁺ 세포는 비만 세포이다. 특정 구현예에서, CD34⁺ 세포는 아집단 수지상 세포(이는 인자 XIIIa-음성임)이다. 특정 구현예에서, CD34⁺ 세포는 장기 조혈 줄기 세포(LT-HSC)이다. 특정 구현예에서, CD34⁺ 세포는 인간 HSC 세포이다. 특정 구현예에서, CD34⁺ 세포는 대상체에 대해 동종이계이고, 여기서 상기 CD34⁺ 세포는 환자에 대해 HLA-일치된다. 특정 구현예에서, CD34⁺ 세포는 환자와 HLA-일치된다. 특정 구현예에서, CD34⁺ 세포는 환자에 대해 자가 조직이다.
- [0109] 특정 구현예에서, 미토콘드리아-풍부 인간 줄기 세포는 동결-해동된 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아를 상기 인간 줄기 세포에 도입함으로써 수득된다. 특정 구현예에서, 상기 기재된 방법은 인간 줄기 세포를 단리, 유도 또는 수득하고, 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아를 상기 인간 줄기 세포에 도입하여 미토콘드리아-풍부 인간 줄기 세포를 생산하는 선행 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 기재된 방법은 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아를 세포에 도입하기 전에 인간 줄기 세포로부터 CD34 양성 세포를 선별하는 단계를 추가로 포함한다. CD34 양성 세포의 선별은 CliniMACS 또는 프로디지 시스템(Prodigy systems)(Miltenyi)을 포함하지만 이에 제한되지 않는 당업계에 공지된 방법에 의해 수행될 수 있다.
- [0110] 특정 구현예에서, 인간 줄기 세포는 동결-해동된 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아를 상기 인간 줄기 세포에 도입하기 전에 적어도 하나의 동결-해동 주기를 겪었다. 특정 구현예에서, 방법은 (a) 인간 줄기 세포를 동결시키는 단계, (b) 인간 줄기 세포를 해동하는 단계, 및 (c) 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아를 상기 인간 줄기 세포에 도입하는 단계를 포함한다.
- [0111] 일부 구현예에서, 방법은 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아로 농축 전 또는 후에 줄기 세포를 확장시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 줄기 세포를 확장할 수 있는 배양물 또는 증식 배지에서 상기 세포를 배양함으로써 제1 조성물의 줄기 세포를 확장하는 단계를 추가로 포함한다. 다른 구현예에서, 방법은

줄기 세포를 확장할 수 있는 배양물 또는 증식 배지에서 상기 세포를 배양함으로써 제4 조성물의 미토콘드리아-풍부 줄기 세포를 확장하는 단계를 추가로 포함한다. 출원 전반에 걸쳐 사용된 용어 "배양물 또는 증식 배지"는 세포에 영양물을 제공하는 세포 배양 배지, 세포 성장 배지, 완충제와 같은 유체 배지이다. 본 출원 전반 및 청구범위에 사용된 용어 "약제학적 조성물"은 세포에 영양물을 제공하는 세포 배양 배지, 세포 성장 배지, 완충제와 같은 유체 담체를 포함한다.

- [0112] 본 발명의 원리에 따르면, 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아로 농축 전에 인간 줄기 세포를 동결시킬 가능성은, 예를 들어, 인간 줄기 세포의 특정 속성을 테스트하기에 충분한 시간을 제공하고/하거나 인간 줄기 세포의 저장 수명을 증가시키고/시키거나 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아로 농축 전에 인간 줄기 세포가 쉽게 분포되도록 하기 때문에, 유익하다.
- [0113] 본 발명의 원리에 따르면, 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아로 농축된 후에 인간 줄기 세포를 동결시킬 가능성은, 예를 들어, 농축된 인간 줄기 세포의 특정 속성을 테스트하기에 충분한 시간을 제공하고/하거나 농축된 인간 줄기 세포의 저장 수명을 증가시키고/시키거나 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아로 농축된 후 농축된 인간 줄기 세포가 쉽게 분포되도록 하기 때문에, 유익하다.
- [0114] 특정 구현예에서, 인간 줄기 세포는 골수, 지방 조직, 구강 점막, 피부 섬유아세포, 혈액 또는 체대혈의 세포로부터 단리, 유래 또는 수득된다. 각각의 가능성은 본 발명의 별도의 구현예를 나타낸다. 특정 구현예에서, 인간 줄기 세포는 골수 또는 골수 세포로부터 단리, 유래 또는 수득되지 않는다.
- [0115] 특정 구현예에서, 상기 기재된 방법은 적합한 공급원으로부터 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아를 단리 또는 수득하고, 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아를 상기 인간 줄기 세포에 도입하여 미토콘드리아-풍부 인간 줄기 세포를 생성하는 선행 단계를 추가로 포함한다. 특정 구현예에서, 방법은 (a) 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아를 동결시키는 단계, (b) 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아를 해동하는 단계, 및 (c) 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아를 상기 인간 줄기 세포에 도입하는 단계를 포함한다.
- [0116] 본 발명의 원리에 따르면, 인간 줄기 세포를 농축시키기 전에 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아를 동결시킬 가능성은, 예를 들어, 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아의 기능성 및/또는 특정 속성을 테스트하기에 충분한 시간을 제공할뿐만 아니라 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아의 저장 수명을 증가시키고/시키거나 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아가 인간 줄기 세포를 농축시키기 전에 쉽게 분포되도록 하기 때문에, 미토콘드리아 확대 요법 과정에 중요하다.
- [0117] 임의의 이론 또는 메커니즘에 결부시키지 않고, 동결-해동 주기를 거친 미토콘드리아는 동결-해동 주기를 거치지 않은 대조군 미토콘드리아와 비교하여 해동 후 필적할 만한 산소 소비율을 입증한다.
- [0118] 일부 구현예에 따르면, 동결-해동 주기는 해동 전 적어도 24시간 동안 상기 기능성 미토콘드리아를 동결시키는 단계를 포함한다. 다른 구현예에 따르면, 동결-해동 주기는 해동 전 적어도 1개월, 해동 전 수 개월 또는 그 이상 동안 상기 기능성 미토콘드리아를 동결시키는 단계를 포함한다. 각각의 가능성은 본 발명의 별도의 구현예를 나타낸다. 또 다른 구현예에 따르면, 동결-해동 주기 후 기능성 미토콘드리아의 산소 소비율은 동결-해동 주기 이전의 기능성 미토콘드리아의 산소 소비율과 동일하거나 더 높다.
- [0119] 본원에 사용된 용어 "동결-해동 주기"는 기능성 미토콘드리아를 0°C 미만의 온도로 동결시키고, 미토콘드리아를 소정의 기간 동안 0°C 미만의 온도로 유지하고, 미토콘드리아를 실온 또는 체온 또는 미토콘드리아에 의한 줄기 세포의 치료를 가능하게 하는 0°C 이상의 임의의 온도로 해동시킴을 지칭한다. 각각의 가능성은 본 발명의 별도의 구현예를 나타낸다. 본원에 사용된 용어 "실온"은 전형적으로 18°C 내지 25°C의 온도를 지칭한다. 본원에 사용된 용어 "체온"은 35.5°C 내지 37.5°C, 바람직하게는 37°C의 온도를 지칭한다. 다른 구현예에서, 동결-해동 주기를 거친 미토콘드리아는 기능성 미토콘드리아이다.
- [0120] 또 다른 구현예에서, 동결-해동 주기를 거친 미토콘드리아는 -70°C 이하의 온도에서 동결시켰다. 또 다른 구현예에서, 동결-해동 주기를 거친 미토콘드리아는 -20°C 이하의 온도에서 동결시켰다. 또 다른 구현예에서, 동결-해동 주기를 거친 미토콘드리아는 -4°C 이하의 온도에서 동결시켰다. 또 다른 구현예에 따르면, 미토콘드리아의 동결은 점진적이다. 일부 구현예에 따르면, 미토콘드리아의 동결은 플래시-동결을 통해 이루어진다. 본원에 사용된 용어 "플래시-동결(flash-freezing)"은 미토콘드리아를 극저온에 노출시켜 미토콘드리아를 신속히 동결시킴을 지칭한다.
- [0121] 또 다른 구현예에서, 동결-해동 주기를 거친 미토콘드리아는 해동 전에 적어도 30분 동안 동결시켰다. 또 다른 구현예에 따르면, 동결-해동 주기는 해동 전에 적어도 30, 60, 90, 120, 180, 210분 동안 기능성 미토콘드리아

를 동결시키는 단계를 포함한다. 각각의 가능성은 본 발명의 별도의 구현예를 나타낸다. 다른 구현예에서, 동결-해동 주기를 거친 미토콘드리아는 해동 전에 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 24, 48, 72, 96 또는 120시간 동안 동결시켰다. 각각의 동결 시간은 본 발명의 별도의 구현예를 제시한다. 또 다른 구현예에서, 동결-해동 주기를 거친 미토콘드리아는 해동 전에 적어도 4, 5, 6, 7, 30, 60, 120, 365일 동안 동결시켰다. 각각의 동결 시간은 본 발명의 별도의 구현예를 제시한다. 또 다른 구현예에 따르면, 동결-해동 주기는 해동 전에 적어도 1, 2, 3주 동안 기능성 미토콘드리아를 동결시키는 단계를 포함한다. 각각의 가능성은 본 발명의 별도의 구현예를 나타낸다. 또 다른 구현예에 따르면, 동결-해동 주기는 해동 전 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6개월 동안 기능성 미토콘드리아를 동결시키는 단계를 포함한다. 각각의 가능성은 본 발명의 별도의 구현예를 나타낸다.

[0122] 다른 구현예에서, 동결-해동 주기를 거친 미토콘드리아는 해동 전에 적어도 30분 동안 -70℃에서 동결시켰다. 임의의 이론 또는 메커니즘에 결부시키지 않고, 미토콘드리아를 동결시키고 장기간 후 해동할 가능성은 장기간 저장 후에도 재현 가능한 결과와 함께 미토콘드리아를 쉽게 저장하고 사용할 수 있도록 한다.

[0123] 하나의 구현예에 따르면, 해동은 실온에서 이루어진다. 다른 구현예에서, 해동은 체온에서 이루어진다. 또 다른 구현예에 따르면, 해동은 본 발명의 방법에 따라 미토콘드리아를 투여할 수 있도록 하는 온도에서 이루어진다. 또 다른 구현예에 따르면, 해동은 점진적으로 수행된다.

[0124] 또 다른 구현예에 따르면, 동결-해동 주기를 거친 미토콘드리아는 동결 완충제 내에서 동결시켰다. 또 다른 구현예에 따르면, 동결-해동 주기를 거친 미토콘드리아는 단리 완충제 내에서 동결시켰다. 본원에 사용된 용어 "단리 완충제"는 본 발명의 미토콘드리아가 단리된 완충제를 지칭한다. 비제한적인 예에서, 단리 완충제는 수크로스 완충제이다. 임의의 메커니즘 또는 이론에 결부시키지 않고, 단리 완충제 내에서 미토콘드리아를 동결시키면, 동결 전에 단리 완충제를 동결 완충제로 교체하거나 해동시 동결 완충제를 교체할 필요가 없기 때문에, 시간과 단리 단계를 절약할 수 있다.

[0125] 또 다른 구현예에 따르면, 동결 완충제는 동결보호제를 포함한다. 일부 구현예에 따르면, 동결보호제는 단당류, 올리고당류 또는 다당류이다. 각각의 가능성은 본 발명의 별도의 구현예를 나타낸다. 또 다른 구현예에 따르면, 동결 완충제의 당류 농도는 미토콘드리아 기능을 보존하는 역할을 하는 충분한 당류 농도이다. 또 다른 구현예에 따르면, 단리 완충제는 단당류를 포함한다. 또 다른 구현예에 따르면, 단리 완충제의 당류 농도는 미토콘드리아 기능을 보존하는 역할을 하는 충분한 당류 농도이다. 또 다른 구현예에 따르면, 당류는 수크로스이다.

[0126] 특정 구현예에서, 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아는 태반, 배양물에서 성장된 태반 세포 및 혈액 세포로부터 단리되거나 수득된다. 각각의 가능성은 본 발명의 별도의 구현예를 나타낸다.

[0127] 일부 측면에 따르면, 본 발명은 원발성 미토콘드리아 질환, 장애 또는 이의 증상의 치료를 필요로 하는 인간 환자에서 원발성 미토콘드리아 질환, 장애 또는 이의 증상을 치료하는 방법을 제공하고, 방법은 복수의 인간 CD34⁺ 줄기 세포를 포함하는 약제학적 조성물을 환자에게 투여하는 단계를 포함하고, 여기서 인간 CD34⁺ 줄기 세포는 미토콘드리아 DNA의 병원성 돌연변이 없이 동결-해동된 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아가 풍부하며, 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아는 미토콘드리아-풍부 인간 CD34⁺ 줄기 세포에서 총 미토콘드리아의 3% 이상 33% 미만을 구성한다.

[0128] 본 발명은, 하나의 측면에서, 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아로 인간 줄기 세포를 풍부하게 하는 생체의 방법을 제공하며, 방법은 (i) 원발성 미토콘드리아 질환, 장애 또는 이의 증상을 앓고 있는 환자로부터의 복수의 인간 줄기 세포를 포함하는 제1 조성물을 제공하는 단계; (ii) 미토콘드리아 DNA의 병원성 돌연변이 없이 공여자로부터 수득된 복수의 단리된 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아를 포함하는 제2 조성물을 제공하는 단계; (iii) 제1 조성물의 인간 줄기 세포를 제2 조성물의 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아와 접촉시켜 제3 조성물을 제공하는 단계; 및 (iv) 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아가 인간 줄기 세포에 들어가도록 허용하는 조건 하에서 제3 조성물을 배양함으로써 상기 인간 줄기 세포를 상기 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아로 풍부하게 하여 미토콘드리아-풍부 인간 줄기 세포를 포함하는 제4 조성물을 제공하는 단계를 포함하고, 여기서 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아는 제4 조성물의 총 미토콘드리아의 3% 이상 33% 미만을 포함한다.

[0129] 본원에 사용된 용어 "생체의 방법"은 인체 외부에서만 수행되는 단계를 포함하는 임의의 방법을 지칭한다. 특히, 생체의 방법은 치료될 대상체에게 후속적으로 재도입되거나 이식되는 체외 세포의 조작을 포함한다.

- [0130] 용어 "접촉하는"은 미토콘드리아의 세포내로의 진입을 촉진하기 위해 미토콘드리아 및 세포의 조성물을 충분히 근접하게 하는 것을 지칭한다. 미토콘드리아를 줄기 세포에 "도입하는"이라는 용어는 접촉하는 이라는 용어와 상호교환적으로 사용된다.
- [0131] 일부 구현예에 따르면, 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아로 인간 줄기 세포를 풍부하게 하는 방법은 세포의 막 전위를 측정하는 단계를 포함하지 않는다.
- [0132] 일부 구현예에서, 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아에 의한 줄기 세포의 농축은 백만개의 세포당 적어도 0.044 밀리유닛 이상 176 밀리유닛 이하의 CS 활성의 미토콘드리아 용량을 줄기 세포에 도입하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아에 의한 줄기 세포의 농축은 백만개의 세포당 적어도 0.088 밀리유닛 이상 176 밀리유닛 이하의 CS 활성의 미토콘드리아 용량을 줄기 세포에 도입하는 단계를 포함한다. 다른 구현예에서, 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아에 의한 줄기 세포의 농축은 백만개의 세포당 적어도 0.2 밀리유닛 이상 150 밀리유닛 이하의 CS 활성의 미토콘드리아 용량을 줄기 세포에 도입하는 단계를 포함한다. 다른 구현예에서, 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아에 의한 줄기 세포의 농축은 백만개의 세포당 적어도 0.4 밀리유닛 이상 100 밀리유닛 이하의 CS 활성의 미토콘드리아 용량을 줄기 세포에 도입하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아에 의한 줄기 세포의 농축은 백만개의 세포당 적어도 0.6 밀리유닛 이상 80 밀리유닛 이하의 CS 활성의 미토콘드리아 용량을 줄기 세포에 도입하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아에 의한 줄기 세포의 농축은 백만개의 세포당 적어도 0.7 밀리유닛 이상 50 밀리유닛 이하의 CS 활성의 미토콘드리아 용량을 줄기 세포에 도입하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아에 의한 줄기 세포의 농축은 백만개의 세포당 적어도 0.8 밀리유닛 이상 20 밀리유닛 이하의 CS 활성의 미토콘드리아 용량을 줄기 세포에 도입하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아에 의한 줄기 세포의 농축은 백만개의 세포당 적어도 0.88 밀리유닛 이상 17.6 밀리유닛 이하의 CS 활성의 미토콘드리아 용량을 줄기 세포에 도입하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아에 의한 줄기 세포의 농축은 백만개의 세포당 적어도 0.9 밀리유닛 이상 15 밀리유닛 이하의 CS 활성의 미토콘드리아 용량을 줄기 세포에 도입하는 단계를 포함한다.
- [0133] 미토콘드리아 용량은 본원에서 설명된 바와 같이 건강한 기능성 미토콘드리아 양의 다른 정량화 가능한 측정의 CS 활성 단위 또는 mtDNA 카피 수의 관점에서 표현될 수 있다. "CS 활성 단위"는 1mL 반응 용액에서 1분 내에 1마이크로몰 기질의 전환을 가능하게 하는 양으로 정의된다.
- [0134] 본 발명은, 또 다른 측면에서, 기재된 미토콘드리아-풍부 인간 줄기 세포를 포함하는 약제학적 조성물을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 원발성 미토콘드리아 질환 또는 장애 또는 이의 증상의 치료를 필요로 하는 인간 환자에서 원발성 미토콘드리아 질환 또는 장애 또는 이의 증상을 치료하는 방법을 추가로 제공한다.
- [0135] 본원에 사용된 구 "미토콘드리아 질환을 앓고 있는 환자로부터 수득된 줄기 세포"는 환자로부터 단리시킬 때 환자의 줄기 세포였던 세포를 지칭한다.
- [0136] 본원에 사용된 구 "미토콘드리아 질환을 앓고 있는 환자로부터 유래된 줄기 세포"는 환자의 줄기 세포가 아니었고 줄기 세포가 되도록 조작된 세포를 지칭한다. 이 구는 다른 유형의 줄기 세포가 되도록 조작된 특정 유형의 줄기 세포를 추가로 포함한다. 본원에 사용된 용어 "조작된"은 체세포를 미분화 상태로 재프로그래밍하고, 유도 만능 줄기 세포(iPSC)가 되도록 하고, 임의로 iPSC를 추가로 재프로그래밍하여 목적하는 계통 또는 집단의 세포(참조: Chen M. et al., IOVS, 2010, Vol. 51(11), pages 5970-5978), 예를 들어, 골수 세포(참조: Xu Y. et al., PLoS ONE, 2012, Vol. 7(4), page e34321)가 되도록 하기 위한 당업계에 공지된 방법(참조: Yu J. et al., Science, 2007, Vol. 318 (5858), pages 1917-1920) 중 어느 하나를 사용함을 지칭한다.
- [0137] 본원에 사용된 용어 "미토콘드리아 질환을 앓고 있는 환자"는 미토콘드리아 질환으로 진단되거나, 미토콘드리아 질환이 의심되거나 미토콘드리아 질환이 발병할 위험군에 있는 인간 대상체를 지칭한다. 특정 미토콘드리아 질병은 유전되기 때문에, 미토콘드리아 질환의 유전적 담체 또는 미토콘드리아 질환으로 진단된 대상자의 자손은 미토콘드리아 질환이 발병할 위험군으로 간주된다.
- [0138] 본원에 사용된 용어 "미토콘드리아 질환을 앓지 않은 대상체/공여자"는 미토콘드리아 질환으로 진단되지 않았고, 미토콘드리아 질환이 있는 것으로 의심되지 않고/않거나 미토콘드리아 질환이 발병할 위험군에 속하지 않는 인간 대상체를 지칭한다. 이 용어는 추가로 미토콘드리아 DNA의 돌연변이가 없는 대상체 및/또는 미토콘드리아로 전달된 분자(예: 단백질 또는 RNA 분자)를 인코딩하는 핵 DNA의 돌연변이가 없는 대상체를 포함한다.
- [0139] 본원에 사용된 용어 "단리된 건강한 기능적 인간 외인성 미토콘드리아"는 미토콘드리아 질환을 앓지 않은 대상

체로부터 수득된 세포로부터 수득되거나 유래된 온전한 미토콘드리아를 지칭한다. 용어는 추가로 미토콘드리아 DNA의 돌연변이를 동반하지 않는 대상체로부터 수득된 기능성 미토콘드리아를 포함한다. 일부 구현예에서, 이러한 미토콘드리아는 외인성 미토콘드리아이다. 미토콘드리아의 맥락에서 본원 및 청구범위에 사용된 용어 "단리된"은 상기 공급원에서 발견된 다른 성분으로부터 적어도 부분적으로 정제된 미토콘드리아를 포함한다. 특정 구현예에서, 복수의 단리된 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아를 포함하는 제2 조성물 중 미토콘드리아 단백질의 총량은 샘플 내 세포 단백질의 총량의 20%-80%, 20-70%, 40-70%, 20-40%, 또는 20-30% 사이이다. 각각의 기능성은 본 발명의 별도의 구현예를 나타낸다. 특정 구현예에서, 복수의 단리된 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아를 포함하는 제2 조성물 중 미토콘드리아 단백질의 총량은 샘플 내 세포 단백질의 총량의 20%-80% 사이이다. 특정 구현예에서, 복수의 단리된 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아를 포함하는 제2 조성물 중 미토콘드리아 단백질의 총량은 미토콘드리아와 다른 준세포 분획의 조합된 중량의 20%-80% 사이이다. 다른 구현예에서, 복수의 단리된 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아를 포함하는 제2 조성물 중 미토콘드리아 단백질의 총량은 미토콘드리아와 다른 준세포 분획의 조합된 중량의 80%를 초과한다.

[0140] 본원에 사용된 구 "인간 기능성 미토콘드리아가 인간 줄기 세포에 들어가도록 허용하는 조건"은 일반적으로 시간, 온도, 및 미토콘드리아와 인간 줄기 세포 사이의 근접성과 같은 파라미터를 지칭한다. 이러한 조건은 본 발명에 의해 제공된다.

[0141] 특정 구현예에서, 인간 줄기 세포는 약 16 내지 약 37°C 범위의 온도에서 0.5 내지 30시간 범위의 시간 동안 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아와 함께 배양된다. 특정 구현예에서, 인간 줄기 세포는 1 내지 30시간 또는 5 내지 25시간 범위의 시간 동안 건강한 기능적 외인성 미토콘드리아와 함께 배양된다. 각각의 기능성은 본 발명의 별도의 구현예를 나타낸다. 특정 구현예에서, 배양은 20 내지 30시간 동안이다. 일부 구현예에서, 배양은 적어도 1, 5, 10, 15 또는 20시간 동안이다. 각각의 기능성은 본 발명의 별도의 구현예를 나타낸다. 다른 구현예에서, 배양은 최대 5, 10, 15, 20 또는 30시간이다. 각각의 기능성은 본 발명의 별도의 구현예를 나타낸다. 특정 구현예에서, 배양은 24시간 동안이다. 일부 구현예에서, 배양은 실온(16°C 내지 30°C)에서 이루어진다. 다른 구현예에서, 배양은 37°C에서 이루어진다. 일부 구현예에서, 배양은 5% CO₂ 대기에서 이루어진다. 다른 구현예에서, 배양은 공기에서 발견된 수준 이상으로 추가된 CO₂를 포함하지 않는다. 특정 구현예에서, 배양은 줄기 세포 중 미토콘드리아 함량이 초기 미토콘드리아 함량과 비교하여 평균 1% 내지 45% 증가될 때까지이다.

[0142] 배양 조건을 조작함으로써, 제품의 특징을 조작할 수 있다. 특정 구현예에서, 배양은 37°C에서 수행된다. 특정 구현예에서, 배양은 적어도 6시간 동안 수행된다. 특정 구현예에서, 배양은 적어도 12시간 동안 수행된다. 특정 구현예에서, 배양은 12 내지 24시간 동안 수행된다. 특정 구현예에서, 배양은 4.4 밀리유닛의 CS를 갖거나 나타내는 외인성 미토콘드리아의 양당 1*10⁵ 내지 1*10⁷개의 나이브 줄기 세포의 비율로 수행된다. 특정 구현예에서, 배양은 4.4 밀리유닛의 CS를 갖거나 나타내는 외인성 미토콘드리아의 양당 1*10⁶개의 나이브 줄기 세포의 비율로 수행된다. 특정 구현예에서, 조건은 CS 활성화에 의해 결정될 때 나이브 줄기 세포의 미토콘드리아 함량을 적어도 약 3%, 5% 또는 10% 증가시키기에 충분하다. 각각의 기능성은 본 발명의 별도의 구현예를 나타낸다.

[0143] 본원에 사용된 용어 "미토콘드리아 함량"은 세포 내의 미토콘드리아의 양을 지칭한다. 일부 구현예에서, 배양은 세포 생존을 지원하는 배지에서 이루어진다. 일부 구현예에서, 배지는 둘베코 변형 이글 배지(DMEM)이다. 다른 구현예에서, 배지는 HSA(인간 혈청 알부민)를 함유하는 식염수이다. 일부 구현예에서, 식염수는 1% 내지 10% HSA를 함유한다. 추가의 구현예에서, 식염수는 3 내지 6% HSA를 함유한다. 추가의 구현예에서, 식염수는 4.5% HSA를 함유한다. 특정 구현예에서, 건강한 기능성 미토콘드리아와 줄기 세포의 배양은 공기에서 발견된 수준 이상으로 첨가된 CO₂ 없이 3 내지 6% HSA를 함유하는 식염수에서 15 내지 30시간 범위의 시간 동안 16 내지 30°C 범위의 온도에서 이루어진다.

[0144] 특정 구현예에서, 이의 다양한 구현예에서 상기 기재된 방법은 외인성 미토콘드리아와 함께 줄기 세포의 배양 전, 동안 또는 후에 원심분리를 추가로 포함한다. 각각의 기능성은 본 발명의 별도의 구현예를 나타낸다. 일부 구현예에서, 이의 다양한 구현예에서 상기 기재된 방법은 외인성 미토콘드리아와 함께 줄기 세포의 배양 전, 동안 또는 후에 단일 원심분리를 포함한다. 일부 구현예에서, 원심분리력은 1000g 내지 8500g 범위이다. 일부 구현예에서, 원심분리력은 2000g 내지 4000g 범위이다. 일부 구현예에서, 원심분리력은 2500g 이상이다. 일부 구현예에서, 원심분리력은 2500g 내지 8500g 범위이다. 일부 구현예에서, 원심분리력은 2500g 내지 8000g 범위

이다. 일부 구현예에서, 원심분리력은 3000g 내지 8000g 범위이다. 다른 구현예에서, 원심분리력은 4000g 내지 8000g 범위이다. 특정 구현예에서, 원심분리력은 7000g이다. 다른 구현예에서, 원심분리력은 8000g이다. 일부 구현예에서, 원심분리는 2분 내지 30분 범위의 시간 동안 수행된다. 일부 구현예에서, 원심분리는 3분 내지 25분 범위의 시간 동안 수행된다. 일부 구현예에서, 원심분리는 5분 내지 20분 범위의 시간 동안 수행된다. 일부 구현예에서, 원심분리는 8분 내지 15분 범위의 시간 동안 수행된다.

- [0145] 일부 구현예에서, 원심분리는 4 내지 37°C 범위의 온도에서 수행된다. 특정 구현예에서, 원심분리는 4 내지 10°C 또는 16 내지 30°C 범위의 온도에서 수행된다. 각각의 가능성은 본 발명의 별도의 구현예를 나타낸다. 특정 구현예에서, 원심분리는 2 내지 6°C에서 수행된다. 특정 구현예에서, 원심분리는 4°C에서 수행된다. 일부 구현예에서, 이의 다양한 구현예에서 상기 기재된 방법은 줄기 세포와 외인성 미토콘드리아의 배양 전, 동안 또는 후 단일 원심분리에 이어 세포를 30°C 미만의 온도에서 휴지시킴을 포함한다. 일부 구현예에서, 인간 기능성 미토콘드리아가 인간 줄기 세포에 들어가도록 허용하는 조건은 외인성 미토콘드리아와 함께 줄기 세포의 배양 전, 동안 또는 후 단일 원심분리에 이어 세포를 16 내지 28°C 범위의 온도에서 휴지시킴을 포함한다.
- [0146] 특정 구현예에서, 제1 조성물은 신선하다. 특정 구현예에서, 제1 조성물을 동결시킨 다음 배양 전에 해동했다. 특정 구현예에서, 제2 조성물은 신선하다. 특정 구현예에서, 제2 조성물을 동결시킨 다음 배양 전에 해동했다. 특정 구현예에서, 제4 조성물은 신선하다. 특정 구현예에서, 제4 조성물을 동결시킨 다음 투여 전에 해동했다.
- [0147] 일부 구현예에서, 제4 조성물의 줄기 세포는 제1 조성물의 줄기 세포와 비교하여 (i) 증가된 미토콘드리아 DNA 함량; (ii) CS, COX1 및 SDHA로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 미토콘드리아 단백질의 증가된 함량; (iii) 증가된 산소(O₂) 소비율; (iv) 증가된 시트레이트 신타제 활성의 수준; (v) 증가된 아데노신 트리포스페이트(ATP) 생산 속도; 또는 (vi) (i), (ii), (iii), (iv) 및 (v)의 임의의 조합을 갖는다. 각각의 가능성은 본 발명의 별도의 구현예를 나타낸다. 이들 다양한 파라미터를 결정하는 방법은 당업계에 익히 공지되어 있다.
- [0148] 본원에 사용된 용어 "증가된 미토콘드리아 DNA 함량"은 미토콘드리아 농축 이전에 제1 조성물의 미토콘드리아 DNA 함량보다 검출 가능하게 더 높은 미토콘드리아 DNA 함량을 지칭한다. 미토콘드리아 DNA 함량은 핵 유전자로 정규화된 미토콘드리아 농축 전후에 미토콘드리아 유전자의 정량적 PCR을 수행하여 측정할 수 있다.
- [0149] 본원에 사용된 용어 "적어도 하나의 미토콘드리아 단백질의 증가된 함량"은 핵-인코딩된 또는 미토콘드리아-인코딩된 미토콘드리아 단백질, 예를 들어, CS, COX1 및 SDHA의 함량을 지칭하며, 이는 미토콘드리아 농축 이전에 제1 조성물의 상기 미토콘드리아 단백질의 함량보다 검출 가능하게 더 높다.
- [0150] 본원에 사용된 용어 "증가된 산소(O₂) 소비율"은 미토콘드리아 농축 이전에 제1 조성물의 산소(O₂) 소비율보다 검출 가능하게 더 높은 산소(O₂) 소비율을 지칭한다.
- [0151] 본원에 사용된 용어 "증가된 시트레이트 신타제의 함량 또는 활성의 수준"은 미토콘드리아 농축 이전에 제1 조성물의 시트레이트 신타제의 함량 값 또는 활성의 수준보다 검출 가능하게 더 높은 시트레이트 신타제의 함량 또는 활성의 수준을 지칭한다.
- [0152] 본원에 사용된 용어 "증가된 아데노신 트리포스페이트(ATP) 생산 속도"는 미토콘드리아 농축 이전에 제1 조성물의 아데노신 트리포스페이트(ATP) 생산 속도보다 검출 가능하게 더 높은 아데노신 트리포스페이트(ATP) 생산 속도를 지칭한다.
- [0153] 특정 구현예에서, 본원에 사용된 용어 "검출 가능하게 더 높은"은 정상 값과 증가된 값 사이의 통계적으로 유의한 증가를 지칭한다. 특정 구현예에서, 본원에 사용된 용어 "검출 가능하게 더 높은"은 비-병리학적 증가, 즉 실질적으로 더 높은 값과 관련된 어떠한 병리학적 증상도 명백해지지 않는 수준을 지칭한다. 특정 구현예에서, 본원에 사용된 용어 "증가된"은 복수의 건강한 대상체의 상응하는 세포 또는 상응하는 미토콘드리아에서 또는 미토콘드리아 농축 이전의 제1 조성물의 줄기 세포에서 발견된 상응하는 값보다 1.05배, 1.1배, 1.25배, 1.5배, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배 또는 그 이상 더 높은 값을 지칭한다. 각각의 가능성은 본 발명의 별도의 구현예를 나타낸다.
- [0154] 특정 상황에서, 동일한 세포는 미토콘드리아 농축 전에 CS 및 ATP 활성을 측정하고 농축의 수준을 결정하는 대조군 역할을 한다.
- [0155] 시트레이트 신타제(CS)는 미토콘드리아 매트릭스에 국한되지만, 핵 DNA에 의해 인코딩된다. 시트레이트 신타제

는 크랩스 주기의 첫 번째 단계에 관여하며, 일반적으로 온전한 미토콘드리아의 존재에 대한 정량적 효소 마커로서 사용된다(참조: Larsen S. et al., 2012, J. Physiol., Vol. 590(14), pages 3349-3360; Cook G.A. et al., Biochim. Biophys. Acta., 1983, Vol. 763(4), pages 356-367). 특정 구현예에서, 제1 조성물 또는 제4 조성물에서 줄기 세포의 미토콘드리아 함량은 시트레이트 신타제의 함량을 결정함으로써 결정된다. 특정 구현예에서, 제1 조성물 또는 제4 조성물에서 줄기 세포의 미토콘드리아 함량은 시트레이트 신타제의 활성의 수준을 결정함으로써 결정된다. 특정 구현예에서, 제1 조성물 또는 제4 조성물에서 줄기 세포의 미토콘드리아 함량은 시트레이트 신타제의 함량과 관련된다. 특정 구현예에서, 제1 조성물 또는 제4 조성물에서 줄기 세포의 미토콘드리아 함량은 시트레이트 신타제의 활성의 수준과 관련된다. CS 활동은, 예를 들어, CS 활성 키트 CS0720(Sigma)를 사용하여 측정될 수 있다.

- [0156] 진핵 생물 NADPH-사이토크롬 C 리덕타제(사이토크롬 C 리덕타제)는 소포체에 국한된 플라보 단백질이다. 그것은 NADPH로부터 전자를 여러 옥시게나제로 전달하고, 그중 가장 중요한 것은 이종 생물 해독(xenobiotic detoxification)을 담당하는 효소의 사이토크롬 P450 계열이다. 사이토크롬 C 리덕타제는 소포체 마커로서 널리 사용된다. 특정 구현예에서, 제2 조성물은 사이토크롬 C 리덕타제 또는 사이토크롬 C 리덕타제 활성이 실질적으로 없다. 특정 구현예에서, 제4 조성물은 제1 조성물과 비교하여 사이토크롬 C 리덕타제 또는 사이토크롬 C 리덕타제 활성이 풍부하지 않다.
- [0157] 특정 구현예에서, 줄기 세포는 골수 형성 세포를 포함한다. 본원에 사용된 용어 "골수 형성 세포"는 골수 형성, 예를 들어, 골수 및 그것으로부터 발생하는 모든 세포, 즉 모든 혈액 세포의 생산에 관여하는 세포를 지칭한다.
- [0158] 특정 구현예에서, 줄기 세포는 적혈구 생성 세포를 포함한다. 본원에 사용된 용어 "적혈구 생성 세포"는 적혈구 생성, 예를 들어, 적혈구(red blood cell)[적혈구(erythrocyte)]의 생산에 관여하는 세포를 지칭한다.
- [0159] 특정 구현예에서, 줄기 세포는 다능성 조혈 줄기 세포(HSC)를 포함한다. 본원에 사용된 용어 "다능성 조혈 줄기 세포" 또는 "혈구모세포"는 조혈 과정을 통해 다른 혈액 세포 모두를 야기하는 줄기 세포를 지칭한다.
- [0160] 특정 구현예에서, 줄기 세포는 공통 골수성 전구 세포, 공통 림프성 전구 세포 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다. 본원에 사용된 용어 "공통 골수성 전구 세포"는 골수성 세포를 생성하는 세포를 지칭한다. 본원에 사용된 용어 "공통 림프성 전구 세포"는 림프구를 생성하는 세포를 지칭한다.
- [0161] 특정 구현예에서, 약제학적 조성물은 거핵구, 적혈구, 비만 세포, 근아세포, 호염기구, 호중구, 호산구, 단핵구, 대식세포, 자연 살해(NK) 세포, 작은 림프구, T 림프구, B 림프구, 형질 세포, 망상 세포 또는 이들의 임의의 조합을 추가로 포함한다. 각각의 가능성은 본 발명의 별도의 구현예를 나타낸다.
- [0162] 특정 구현예에서, 줄기 세포는 중간엽 줄기 세포를 포함한다. 본원에 사용된 용어 "중간엽 줄기 세포"는 골아 세포[골 세포], 연골 세포(chondrocyte)[연골 세포(cartilage cell)], 근세포(근육 세포) 및 지방 세포(adipocyte)[지방 세포(fat cell)]를 포함한 다양한 세포 유형으로 분화할 수 있는 다능성 간질 세포를 지칭한다.
- [0163] 특정 구현예에서, 줄기 세포는 골수 형성 세포로 구성된다. 특정 구현예에서, 줄기 세포는 적혈구 생성 세포로 구성된다. 특정 구현예에서, 줄기 세포는 다능성 조혈 줄기 세포(HSC)로 구성된다. 특정 구현예에서, 줄기 세포는 공통 골수성 전구 세포, 공통 림프성 전구 세포, 또는 이들의 임의의 조합으로 구성된다. 각각의 가능성은 본 발명의 별도의 구현예를 나타낸다. 특정 구현예에서, 줄기 세포는 중간엽 줄기 세포로 구성된다.
- [0164] CD34 항원으로도 공지된 조혈 전구 세포 항원 CD34는 인간에서 CD34 유전자에 의해 인코딩되는 단백질이다. CD34는 세포 표면 당단백질의 분화 클러스터이며, 세포-세포 접착 인자로 기능한다. 특정 구현예에서, 줄기 세포는 골수 전구 세포 항원 CD34를 발현한다(CD34⁺이다). 특정 구현예에서, 줄기 세포는 외부 막에 골수 전구 세포 항원 CD34를 제공한다. 특정 구현예에서, 줄기 세포는 골수 전구 세포 항원 CD34를 발현하지 않는다(CD34⁻이다). 특정 구현예에서, 줄기 세포는 외부 막에 골수 전구 세포 항원 CD34를 제공하지 않는다.
- [0165] 특정 구현예에서, 제1 조성물의 줄기 세포는 미토콘드리아 질환을 앓고 있는 환자로부터 직접 유래된다. 특정 구현예에서, 제1 조성물의 줄기 세포는 미토콘드리아 질환을 앓지 않은 대상체로부터 직접 유래된다. 본원에 사용된 용어 "직접 유래된"은 다른 세포로부터 직접 유래된 줄기 세포를 지칭한다. 특정 구현예에서, 줄기 세포는 조혈 줄기 세포로부터 유래되었다.

- [0166] 특정 구현예에서, 제1 조성물의 줄기 세포는 미토콘드리아 질환을 앓고 있는 환자로부터 간접적으로 유래된다. 특정 구현예에서, 제1 조성물의 줄기 세포는 미토콘드리아 질환을 앓지 않은 대상체로부터 간접적으로 유래된다. 본원에 사용된 용어 "간접적으로 유래된"은 비-줄기 세포 또는 다른 유형의 줄기 세포로부터 유래된 줄기 세포를 지칭한다. 특정 구현예에서, 줄기 세포는 유도 만능 줄기 세포 (iPSC)가 되도록 조작된 체세포로부터 유래되었다.
- [0167] 특정 구현예에서, 제1 조성물의 줄기 세포는 미토콘드리아 질환을 앓고 있는 환자의 골수로부터 직접 수득된다. 특정 구현예에서, 제1 조성물의 줄기 세포는 미토콘드리아 질환을 앓지 않은 대상체의 골수로부터 직접 수득된다. 본원에 사용된 용어 "직접 수득된"은, 예를 들어, 수술 또는 주사기에 의한 바늘을 통한 흡입과 같은 수단에 의해 골수 자체로부터 수득된 줄기 세포를 지칭한다.
- [0168] 특정 구현예에서, 제1 조성물의 줄기 세포는 미토콘드리아 질환을 앓고 있는 환자의 골수로부터 간접적으로 수득된다. 특정 구현예에서, 제1 조성물의 줄기 세포는 미토콘드리아 질환을 앓지 않은 대상체의 골수로부터 간접적으로 수득된다. 본원에 사용된 용어 "간접적으로 수득된"은 골수 자체보다 다른 위치로부터 수득된 줄기 세포를 지칭한다.
- [0169] 특정 구현예에서, 제1 조성물의 줄기 세포는 지방 조직, 구강 점막, 피부 섬유아세포, 혈액 및/또는 제대혈로부터 직접 또는 간접적으로 수득된다. 각각의 가능성은 별도의 구현예이다.
- [0170] 특정 구현예에서, 제1 조성물의 줄기 세포는 미토콘드리아 질환을 앓고 있는 환자의 말초 혈액으로부터 수득된다. 특정 구현예에서, 제1 조성물의 줄기 세포는 미토콘드리아 질환을 앓지 않은 대상체의 말초 혈액으로부터 수득된다. 본원에 사용된 용어 "말초 혈액"은 혈액 시스템에서 순환하는 혈액을 지칭한다.
- [0171] 특정 구현예에서, 상기 기재된 방법은 선행 단계를 추가로 포함하고, 단계는 미토콘드리아 질환을 앓고 있는 환자에게 말초 혈액으로 줄기 세포의 동원을 유도하는 제제를 투여하는 단계를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 기재된 방법은 선행 단계를 추가로 포함하고, 단계는 미토콘드리아 질환을 앓지 않은 대상체에게 말초 혈액으로 줄기 세포의 동원을 유도하는 제제를 투여하는 단계를 포함한다.
- [0172] 특정 구현예에서, 골수 세포의 말초 혈액으로의 동원을 유도하는 제제는 과립구 콜로니 자극 인자(G-CSF), 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자(GM-CSF), 1,1'-[1,4-페닐렌비스(메틸렌)]비스[1,4,8,11-테트라아자사이클로테트라데칸](플레릭사포, CAS 번호 155148-31-5), 이의 염, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 각각의 가능성은 본 발명의 별도의 구현예를 나타낸다.
- [0173] 특정 구현예에서, 상기 기재된 방법은 미토콘드리아 질환을 앓고 있는 환자의 말초 혈액으로부터 줄기 세포를 분리하는 단계를 추가로 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 기재된 방법은 미토콘드리아 질환을 앓지 않은 대상체의 말초 혈액으로부터 줄기 세포를 분리하는 단계를 추가로 포함한다. 본원에 사용된 용어 "말초 혈액으로부터 분리하는"은 혈액의 다른 성분으로부터 줄기 세포의 분리를 지칭한다.
- [0174] 성분채집(apheresis) 동안, 공여자 또는 환자의 혈액은 하나의 특정 성분을 분리하고 나머지는 순환으로 반환하는 장치를 통해 통과한다. 따라서, 그것은 신체 외부에서 수행되는 의료 절차이다. 특정 구현예에서, 분리는 성분채집에 의해 수행된다.
- [0175] 특정 구현예에서, 상기 기재된 방법은 배양 전에 제3 조성물에서 줄기 세포 및 기능성 미토콘드리아를 농축시키는 단계를 추가로 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 기재된 방법은 배양 동안 제3 조성물에서 줄기 세포 및 기능성 미토콘드리아를 농축시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 배양 동안 제3 조성물에서 줄기 세포 및 기능성 미토콘드리아의 농축은 연속 원심분리에 의해 수행된다.
- [0176] 특정 구현예에서, 상기 기재된 방법은 배양 전에 제3 조성물의 원심분리를 추가로 포함한다. 다른 구현예에서, 상기 기재된 방법은 배양 동안 제3 조성물의 원심분리를 추가로 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 기재된 방법은 배양 후 제3 조성물의 원심분리를 추가로 포함한다.
- [0177] 복수의 세포 또는 미토콘드리아에 지시된 임의의 측정 가능한 특성 또는 특징 또는 측면에 대한 임의의 참조는 복수의 세포 또는 미토콘드리아의 측정 가능한 평균 특성 또는 특징 또는 측면에 대한 것임을 강조해야 한다.
- [0178] 이형 상태는 세포 또는 개체 내에 하나 이상의 유형의 미토콘드리아 DNA가 존재하는 것이다. 이형 상태 수준은 돌연변이체 mtDNA 분자 대 야생형/기능성 미토콘드리아 분자의 비율이며, 미토콘드리아 질환의 중증도를 고려하는 데 중요한 인자이다. 더 낮은 수준의 이형 상태(충분한 양의 미토콘드리아가 기능적임)는 건강한 표현형과 관련이 있는 반면, 더 높은 수준의 이형 상태(미토콘드리아의 불충분한 양이 기능적임)는 병리와 관련이 있다.

특정 구현예에서, 제4 조성물 중 줄기 세포의 이형 상태 수준은 제1 조성물 중 줄기 세포의 이형 상태 수준보다 적어도 1% 미만이다. 특정 구현예에서, 제4 조성물 중 줄기 세포의 이형 상태 수준은 제1 조성물 중 줄기 세포의 이형 상태 수준보다 적어도 3% 미만이다. 특정 구현예에서, 제4 조성물 중 줄기 세포의 이형 상태 수준은 제1 조성물 중 줄기 세포의 이형 상태 수준보다 적어도 5% 미만이다. 특정 구현예에서, 제4 조성물 중 줄기 세포의 이형 상태 수준은 제1 조성물 중 줄기 세포의 이형 상태 수준보다 적어도 10% 미만이다. 특정 구현예에서, 제4 조성물 중 줄기 세포의 이형 상태 수준은 제1 조성물 중 줄기 세포의 이형 상태 수준보다 적어도 15% 미만이다. 특정 구현예에서, 제4 조성물 중 줄기 세포의 이형 상태 수준은 제1 조성물 중 줄기 세포의 이형 상태 수준보다 적어도 20% 미만이다. 특정 구현예에서, 제4 조성물 중 줄기 세포의 이형 상태 수준은 제1 조성물 중 줄기 세포의 이형 상태 수준보다 적어도 25% 미만이다. 특정 구현예에서, 제4 조성물 중 줄기 세포의 이형 상태 수준은 제1 조성물 중 줄기 세포의 이형 상태 수준보다 적어도 30% 미만이다.

- [0179] 특정 구현예에서, 방법은 제4 조성물을 동결시키는 단계를 추가로 포함한다. 특정 구현예에서, 방법은 제4 조성물을 동결시킨 다음, 해동하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0180] 본원에 사용된 용어 "자가 세포" 또는 "자가인 세포"는 환자 자신의 세포임을 지칭한다. 용어 "동종이계 세포"는 다른 공여자 개체의 세포를 지칭한다. 용어 "자가 미토콘드리아"는 동일한 모계 유전적 관련 세포로부터 수득된 미토콘드리아를 지칭한다. 용어 "동종이계 미토콘드리아"는 상이한 공여자 개체로부터 유래되는 미토콘드리아를 지칭하고, 여기서 상이한 공여자 개체는 치료될 대상체와 모계 유전적으로 관련되지 않는다.
- [0181] 본원 및 청구범위에서 사용된 용어 "동계"는 거부 없이 개체간에 이식을 허용하기에 충분한 유전적 동일성 또는 유전적 유사 동일성을 지칭한다. 미토콘드리아의 맥락에서 용어 "동계"는 본원에서 동일한 모계 혈통을 의미하는 "자가 미토콘드리아"라는 용어와 상호교환적으로 사용된다.
- [0182] 용어 "외인성 미토콘드리아"는 세포 외부 공급원으로부터 표적 세포(즉, 줄기 세포)로 도입되는 미토콘드리아를 지칭한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 외인성 미토콘드리아는 표적 세포와 상이한 세포로부터 유래되거나 단리될 수 있다. 예를 들어, 외인성 미토콘드리아는 공여자 세포에서 생산/제조되고, 공여자 세포로부터 정제/단리/수득된 후 표적 세포에 도입될 수 있다.
- [0183] 용어 "내인성 미토콘드리아"는 세포에 의해 제조/발현/생산되고, 외부 공급원으로부터 세포로 도입되지 않는 미토콘드리아를 지칭한다. 일부 구현예에서, 내인성 미토콘드리아는 세포의 계놈에 의해 인코딩되는 단백질 및/또는 다른 분자를 함유한다. 일부 구현예에서, 용어 "내인성 미토콘드리아"는 용어 "숙주 미토콘드리아"와 동등하다.
- [0184] 특정 구현예에서, 건강한 기능적 인간 외인성 미토콘드리아는 자가 또는 동종이계 미토콘드리아이다.
- [0185] 일부 구현예에서, 외인성 미토콘드리아가 표적 세포에 도입된 후, 외인성 미토콘드리아로부터 내인성 미토콘드리아의 동정/차별은, 예를 들어, 내인성 미토콘드리아와 외인성 미토콘드리아 사이의 미토콘드리아 DNA(mtDNA) 서열의 차이, 예를 들어, 상이한 하플로타입을 동정하고, 예를 들어, 태반으로부터 사이토크롬 p450 콜레스테롤 측쇄 절단(P450SCC), 갈색 지방 조직으로부터 UCP1 등과 같은 외인성 미토콘드리아의 조직으로부터 유래된 특정 미토콘드리아 단백질을 동정하거나 이들의 임의의 조합을 포함하지만, 이에 제한되지 않는 다양한 수단에 의해 수행될 수 있다.
- [0186] 특정 구현예에서, 상기 기재된 방법은 미토콘드리아 생물 발생을 촉진하는 제제를 환자에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 본원에 사용된 용어 "미토콘드리아 생물 발생"은 미토콘드리아의 성장 및 분열을 지칭한다. 특정 구현예에서, 미토콘드리아 생물 발생을 촉진하는 제제는 에리트로포이에틴(EPQ) 또는 이의 염이다. 특정 구현예에서, 제제는 재조합 인간 에리트로포이에틴 및 단리된 인간 에리트로포이에틴으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0187] 특정 구현예에서, 상기 기재된 방법은 환자와 줄기 세포 사이의 유해한 면역원성 반응을 예방, 지연, 최소화 또는 폐지하는 제제를 환자에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 특정 구현예에서, 유해한 면역원성 반응은 이식편-대-숙주 질환(GvHD)이다. 특정 구현예에서, GvHD는 급성 형태의 질환(aGvHD)이다. 특정 구현예에서, GvHD는 만성 형태의 질환(cGvHD)이다.
- [0188] 특정 구현예에서, 상기 기재된 방법은 약제학적 조성물의 투여 전에 이식 전 컨디셔닝제를 환자에게 투여하는 선행 단계를 추가로 포함한다. 본원에 사용된 용어 "이식 전 컨디셔닝제"는 인간 대상체 내의 골수 세포를 사멸할 수 있는 임의의 제제를 지칭한다. 특정 구현예에서, 이식 전 컨디셔닝제는 부설판(Busulfan)이다.

- [0189] 본원에 사용된 용어 "돌연변이"는 미토콘드리아 또는 핵 DNA에서 적어도 하나의 뉴클레오티드의 삽입, 결실 또는 대체를 지칭한다. 특정 구현예에서, 돌연변이는 병리적 돌연변이이다.
- [0190] 특정 구현예에서, 약제학적 조성물은 국소 투여된다. 특정 구현예에서, 약제학적 조성물의 대상체에의 투여는 대상체의 골수에의 직접 투여에 의해서 이루어진다. 특정 구현예에서, 약제학적 조성물의 대상체에의 투여는 조직 또는 기관에 대한 것이다. 특정 구현예에서, 약제학적 조성물의 대상체에의 투여는 눈에 대한 것이다. 유리체액은 수정체와 망막 사이의 눈 공간을 채우는 투명하고 무색의 젤라틴 덩어리이다. 특정 구현예에서, 약제학적 조성물의 대상체에의 투여는 눈의 유리체액에 대한 것이다. 특정 구현예에서, 약제학적 조성물의 대상체에의 투여는 직접적인 근육내 주사에 의해서 이루어진다. 특정 구현예에서, 상기 약제학적 조성물은 전신 투여된다. 특정 구현예에서, 약제학적 조성물의 대상체에의 투여는 정맥내, 동맥내, 근육내, 피하, 및 조직 또는 기관으로의 직접 주사로 이루어진 그룹으로부터 선택된 경로에 의해 이루어진다. 각각의 가능성은 본 발명의 별도의 구현예를 나타낸다.
- [0191] 특정 구현예에서, 기능성 미토콘드리아는 태반, 배양물에서 성장된 태반 세포 및 혈액 세포로 이루어진 그룹으로부터 선택된 인간 세포 또는 인간 조직으로부터 획득된다. 각각의 가능성은 본 발명의 별도의 구현예를 나타낸다.
- [0192] 일부 구현예에 따르면, 미토콘드리아 막의 온전성(intactness)은 당업계에 공지된 임의의 방법에 의해 결정될 수 있다. 비제한적인 예에서, 미토콘드리아 막의 온전성은 테트라메틸로다민 메틸 에스테르(TMRM) 또는 테트라메틸로다민 에틸 에스테르(TMRE) 형광 프로브를 사용하여 측정된다. 각각의 가능성은 본 발명의 별도의 구현예를 나타낸다. 현미경하에 관찰되고 TMRM 또는 TMRE 염색을 보여주는 미토콘드리아는 온전한 미토콘드리아 외막을 갖는다. 본원에 사용된 용어 "미토콘드리아 막"은 미토콘드리아 내막, 미토콘드리아 외막, 및 둘 모두로 이루어진 그룹으로부터 선택된 미토콘드리아 막을 지칭한다.
- [0193] 본 발명은 특정 구현예를 참조하여 기재되었지만, 당업자는 본 발명의 범위를 벗어나지 않고 다양한 변화가 이루어질 수 있고 등가물이 대체될 수 있음을 이해할 것이다. 또한, 본 발명의 범위를 벗어나지 않고 본 발명의 교시에 특정 상황 또는 재료를 적용하기 위해 많은 변형이 이루어질 수 있다. 따라서, 본 발명은 개시된 특정 구현예에 제한되지 않고, 본 발명은 첨부된 청구범위의 범위 내에 속하는 모든 구현예를 포함하는 것으로 의도된다.
- [0194] 본 발명의 보다 완전한 이해를 제공하기 위해 다음의 실시예가 제시된다. 본 발명의 원리를 예시하기 위해 제시된 특정 기술, 조건, 재료, 비율 및 보고된 데이터는 예시적이며, 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다.
- [0195] **실시예**
- [0196] **실시예 1. 미토콘드리아는 MAT 절차 후 신속하게 CD34⁺ 세포에 들어감.**
- [0197] 건강한 공여자의 CD34⁺ 세포를 Mitotracker Orange(MTO)로 처리하고, HeLa-TurboGFP-미토콘드리아 세포(CellTrend GmbH)로부터 단리된 미토콘드리아를 사용하여 MAT 전에 세척했다. 세포를 2% PFA로 10분 동안 고정시키고, DAPI로 고정시켰다. 세포는 60X/1.42 오일 침지 대물 렌즈가 장착된 공초점 현미경을 사용하여 스캔했다.
- [0198] 도 1에서 알 수 있는 바와 같이, 외인성 미토콘드리아는 MAT(밝음, 거의 흰색, 세포 내부에 반점) 후 0.5시간 만큼 빨리 CD34⁺ 세포에 들어가고, 테스트된 8시간 및 24시간 동안 계속된다.
- [0199] **실시예 2. 마우스에서 미토콘드리아 확대 요법.**
- [0200] 상이한 마우스 세포를 37°C 및 5% CO₂ 대기에서 24시간 동안 10% FCS를 함유하는 DMEM에서 단리된 미토콘드리아와 함께 배양하여 미토콘드리아 함량 및 활성을 증가시켰다. 표 1은 공정 전 세포의 CS 활성과 비교하여 공정 후 세포의 CS 활성의 상대적인 증가로 결정된, 미토콘드리아 확대 공정의 대표적인 결과를 기재한다.

표 1

세포의 기원	미토콘드리아의 기원	미토콘드리아의 CS 활성/세포 수	세포의 CS 활성의 상대적 증가
ICR 마우스 - 전체 골수로부터 단리됨	인간 미토콘드리아	4.4 mU CS/1X10 ⁶ 세포	+ 41%
FVB/N 마우스 - 전체 골수로부터 단리됨	C57/BL 태반 미토콘드리아	4.4 mU CS/1X10 ⁶ 세포	+ 70%
FVB/N 마우스 - 전체 골수로부터 단리됨	C57/BL 간 미토콘드리아	4.4 mU CS/1X10 ⁶ 세포	+ 25%

[0201]

[0202]

[0203]

[0204]

[0205]

[0206]

[0207]

[0208]

[0209]

[0210]

[0211]

[0212]

[0213]

FVB/N 골수 세포(mtDNA ATP8에 돌연변이 동반)를 다양한 용량(1mL 중 1M 세포당 0.044, 0.44, 0.88, 2.2, 4.4, 8.8, 17.6 mU CS 활성)의 태반으로부터 단리된 C57/BL 야생형(WT) 미토콘드리아와 함께 배양했다. 도 2a에서 알 수 있는 바와 같이, WT 특이적 서열을 사용하는 dPCR은 대부분의 투여량에 대해 용량 의존 방식으로 WT mtDNA의 증가를 나타냈다. 농축된 세포는 또한 mtDNA 인코딩된 (COX1)(도 2b) 및 핵 인코딩된 (SDHA)(도 2c) 단백질 함량의 용량-의존적 증가를 나타냈다.

마우스 골수 세포(10⁶)를 처리하지 않거나 마우스 흑색종 세포로부터 단리된 GFP-표지 미토콘드리아(17 mU 또는 34 mU, 미토콘드리아 함량에 대한 마커로서 시트레이트 신타제 활성의 수준을 나타냄)와 함께 24시간 동안 배양했다. 세포를 미토콘드리아와 혼합하고, 8000g에서 원심분리하고 재현탁시켰다. 24시간 배양 후, 세포를 PBS로 두 번 세척하고, 시트레이트 신타제(CS) 활성(도 3a) 및 사이토크롬 c 리덕타제 활성(도 3b)의 수준을 이전에 WO 2016/135723에 기재된 바와 같이, 각각 CS0720 및 CY0100 키트(Sigma)를 사용하여 측정했다.

도 3에서 입증된 결과는 상기 실험에서 사용된 기능성 미토콘드리아의 조성이 미토콘드리아로 골수 세포를 풍부하게 하지만 ER로는 그렇지 않음을 명백하게 나타낸다.

생체내에서 미토콘드리아 확대 요법의 효과를 조사하기 위해, 4.4 mU CS 활성의 C57/BL 태반 미토콘드리아가 풍부한 FVB/N 골수 세포(1x10⁶)를 FVB/N 마우스에 IV 주사했다. 치료 1일, 1주, 1개월 및 3개월 후 마우스로부터 골수를 수집하고 dPCR을 사용하여 WT mtDNA의 수준을 검출하였다. 도 4에서 알 수 있는 바와 같이, 치료 1일 후 골수에서 상당한 양의 WT mtDNA가 검출되었다.

실시예 3. MAT는 세포 내에 외인성 및 내인성 mtDNA의 공존을 초래함.

건강한 공여자 CD34⁺ 세포의 미토콘드리아 확대는 두 개의 상이한 태반 유래 미토콘드리아 배치로 수행되었으며, 세포는 24시간 배양 후 광범위하게 세척되었다. mtDNA의 Illumina 기반 서열분석은 동일 세포 내에 전달된 미토콘드리아와 내인성 미토콘드리아 둘 다의 존재를 보여준다.

도 5에서 알 수 있는 바와 같이, 상이한 태반으로부터의 두 MAT 실험은 유사한 확대 백분율을 초래했다.

실시예 4. 미토콘드리아는 인간 골수 세포에 들어갈 수 있음.

인간 CD34⁺ 세포(1.4*10⁵, ATCC PCS-800-012)는 처리하지 않거나 인간 태반 세포로부터 단리된 GFP-표지 미토콘드리아와 함께 20시간 동안 배양했다. 세포를 플레이팅하기 전에, 미토콘드리아를 세포와 혼합하고 8000g에서 원심분리하고 재현탁시켰다. 배양 후, 세포를 PBS로 두 번 세척하고, CS 활성은 CS0720 시그마 키트를 사용하여 측정했다(도 6a). ATP 함량은 WO 2016/135723에 이미 기재된 바와 같이, ATPlite(퍼킨 엘머)를 사용하여 측정했다(도 6b).

도 6에서 입증된 결과는 인간 골수 세포의 미토콘드리아 함량이 단리된 인간 미토콘드리아와의 상호작용 및 공동 배양에 의해 인간 또는 무린 섬유아세포 또는 무린 골수 세포의 능력을 넘어서는 정도까지 여러배 증가될 수 있음을 명백히 나타낸다.

실시예 5. 인간 제대혈이 이식된 NSGS 마우스의 골수는 MAT 2개월 후 더 많은 인간 mtDNA를 함유함.

피어슨 환자의 제대혈 세포를 0.88 mU의 인간 미토콘드리아와 함께 24시간 동안 배양한 후 배지를 제거하고 세포를 세척하고 4.5% HSA에 재현탁시켰다. 농축된 세포를 NSGS 마우스에 IV 주사했다(마우스당 100,000개의

CD34⁺ 세포).

- [0214] **도 7a**는 4978kb 결실된 UCB mtDNA 영역을 보여주는 피어슨-환자 제대혈 세포에서의 mtDNA 결실(왼쪽) 및 결실을 보여주는 서던 블롯 분석(오른쪽)의 예시이다.
- [0215] 골수는 MAT 2개월 후 마우스로부터 수집되었고, 비결실된 WT mtDNA의 카피 수는 UCB 비결실된 WT mtDNA 서열을 동정하는 프라이머 및 프로브를 사용하여 dPCR에서 분석되었다.
- [0216] 도 7b에서 알 수 있는 바와 같이, 미토콘드리아 확대 요법 2개월 후, 마우스의 골수는 비증강된 제대혈 세포가 주사된 마우스의 골수와 비교하여 약 100% 더 많은 인간 mtDNA를 함유했다.
- [0217] **실시예 6. 생체내 안전성 및 생물 분포 동물 연구**
- [0218] 미토콘드리아는 두 가지 다른 배경에서 건강한 마우스 대조군의 골수 세포에 도입된다: 미토콘드리아의 공급원은 상이한 mtDNA 서열을 가진 마우스로부터 유래될 것이다(참조: Jenuth JP et al., Nature Genetics, 1996, Vol. 14, pages 146-151).
- [0219] 야생형 마우스(C57BL) 태반으로부터 미토콘드리아를 단리시켰다. 골수 세포는 FVB/N 마우스로부터 단리시켰다. 돌연변이된 FVB/N 골수 세포(10^6)에 건강한 기능성 C57BL 미토콘드리아(4.4 mU)를 로딩하고 FVB/N 마우스에 IV 투여했다.
- [0220] 방법의 단계들은 다음과 같다: (1) C57BL 마우스의 태반으로부터 미토콘드리아를 단리시키고, -80°C에서 동결시키고, 해동하거나 신선하게 사용하는 단계; (2) mtDNA 돌연변이된 FVB/N 마우스로부터 골수 세포를 수득하는 단계; (3) 미토콘드리아와 골수 세포를 접촉시키고, 8,000g에서 5분 동안 원심분리하고, 재현탁시키고, 24시간 동안 배양하는 단계; (4) 골수 세포를 PBS로 두 번 세척하고 FVB/N 마우스의 꼬리 정맥에 주사하는 단계. 다양한 시점에, 예를 들어, 이식 24시간, 1주, 1개월 및 3개월 후에, 조직(혈액, 골수, 림프구, 뇌, 심장, 신장, 간, 폐, 비장, 골격근, 눈, 난소/고환)을 수집하고, 추가의 서열 분석을 위해 DNA를 추출했다.
- [0221] 이식 1개월 후 골수에서 FVB/N의 감소된 수준은 **도 8**에 묘사된다.
- [0222] **실시예 7. 피어슨 중후군(PS) 및 신 판코니 중후군(FS)을 앓고 있는 청소년을 위한 MNV-BLD(혈액 유래 미토콘드리아)가 풍부한 자가 CD34⁺ 세포를 사용한 동정적 치료.**
- [0223] 환자 1은 자신의 mtDNA에서 뉴클레오티드 5835-9753의 결실을 갖는 PS로 진단된 6.5세 남성 환자였다. 미토콘드리아 확대 요법(MAT) 이전에, 체중은 14.5KG이었고, 그는 100m 이상 걸을 수 없거나 계단을 오를 수 없었다. 그의 성장은 치료 전 3년 동안 현저하게 지연되었으며, 기준선에서 그의 체중은 -4.1 표준 편차 점수(SDS) 및 신장 -3.2 SDS(집단에 비해)였으며, 1년 이상 동안 위루 관(G-tube)에 의한 공급에도 불구하고 개선은 없었다. 그는 신부전(GFR 22ml/분)과 전해질 보충이 필요한 근위 세뇨관 병증(proximal tubulopathy)이 있었다. 그는 칼슘 보충이 필요한 부갑상선 기능 저하증이 있었고 심전도에서 불완전한 우각 차단(ICRBB)이 있었다.
- [0224] 조혈 줄기 및 전구 세포(HSPC)의 동원은 5일 동안 단독으로 제공된 GCSF의 피하 투여로 수행되었다. 백혈구 채집은 기관 지침에 따라 말초 정맥 접근을 통해 Spectra Optia 시스템(TerumoBCT)을 사용하여 수행되었다. CD34 양성 선별은 제조사의 지침에 따라 CliniMACS CD34 시약을 사용하여 동원된 말초 혈액 유래 세포에서 수행되었다. 미토콘드리아는 차등 원심분리에 의해 250mM 수크로스 완충제 pH 7.4를 사용하여 모계 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)로부터 단리되었다. MAT의 경우, 자가 CD34⁺ 세포를 환자 어머니의 건강한 미토콘드리아(4.4 mU의 시트레이트 신타제(CS)를 갖는 미토콘드리아 양당 1×10^6 개 세포)와 함께 배양하여 세포의 미토콘드리아 함량을 1.56배 증가시켰다(CS 활성에 의해 입증된 미토콘드리아 함량의 56% 증가). 미토콘드리아와의 배양은 4.5% HSA를 함유하는 식염수에서 R.T.에서 24시간 동안 수행되었다. 농축된 세포를 식염수 중 4.5% 인간 혈청 알부민에 현탁시켰다. 환자는 **도 9a**에 제시된 타임라인에 따라 체중 1kg당 건강한 미토콘드리아가 풍부한 1.1×10^6 개의 자가 CD34⁺ 세포의 IV 주입으로 단일 라운드 치료를 받았다.
- [0225] **도 9b**는 세포 요법 후 시간의 함수로서 환자의 호기성 작업 대사 당량(MET) 점수의 수준을 제시한다. 데이터는 환자의 호기성 MET 점수가 경시적으로 5(보행 및 자전거 타기와 같은 중간 강도 활동)에서 8(달리기, 조깅 및 줄넘기와 같은 격렬한 강도 활동)로 상당히 증가되었음을 교시한다.
- [0226] **도 9c**는 IV 주사 후 시간의 함수로서 환자의 혈액에서 발견되는 락테이트의 수준을 제시한다. 혈중 락테이트는

미토콘드리아가 손상되거나 조직으로의 산소 전달이 미토콘드리아 기능 장애의 특징 중 하나인 정상적인 대사 요구를 지원하기에 불충분할 때 혐기성 대사의 결과로 혈액에서 나타나는 락트산이다. 도 4c에서 알 수 있는 바와 같이, MAT 후 환자 1의 혈중 락테이트 수준은 정상 값으로 감소되었다.

[0227] 표 2는 소아 미토콘드리아 질환 척도(IPMDS) - 세포 요법 후 시간의 함수로서 환자의 삶의 질(QoL) 설문지 결과를 제시한다. "불만 & 증상" 및 "신체 검사" 범주 모두에서, 0은 관련 속성에 대해 "정상"을 나타내는 반면, 악화된 상태는 심각도에 따라 1-5로 점수가 매겨진다.

표 2

	치료전	+6개월
불만 & 증상	24	11
신체 검사	13.4	4.6

[0228]

[0229] 환자는 치료 전 3년 동안 체중이 증가하지 않았으며, 즉 3.5세 이후 체중이 증가하지 않았다는 점에 유의해야 한다. 도 4d에 제시된 데이터는 MAT 4년 전에 시작하고 추적 기간 동안 데이터와 함께 환자의 체중 및 신장의 표준 편차 점수로 측정된 성장을 보여준다. 데이터는 단일 치료 약 9개월 또는 15개월 후에 각각 환자의 체중 및 신장이 증가했음을 나타낸다.

[0230] 환자의 성장에 대한 또 다른 증거는 그의 알칼리성 포스파타제 수준에서 비롯된다. 알칼리성 포스파타제 수준 테스트(ALP 테스트)는 혈류 내 알칼리성 포스파타제 효소의 양을 측정한다. 혈중 정상 ALP 수준보다 더 낮으면 특정 비타민과 미네랄의 결핍으로 인해 발생할 수 있는 영양실조를 나타낼 수 있다. 도 9e에 제시된 데이터는 단일 치료가 단지 12개월 내에 환자의 알칼리성 포스파타제 수준을 159로부터 486IU/L로 상승시키기에 충분하였다는 것을 나타낸다.

[0231] 도 9f 내지 9h에서 알 수 있는 바와 같이, 치료는 적혈구 수준(도 9f), 헤모글로빈 수준(도 9g) 및 헤마토크릿 수준(도 9h)에서 현저한 개선을 초래했다. 이러한 결과는 단일 치료가 빈혈 증상을 개선시키기에 충분하였음을 나타낸다. 도 9i는 마그네슘 보충 및 세포 요법 후 시간의 함수로서 환자의 혈액 내 마그네슘의 수준을 제시한다. 데이터는 환자의 마그네슘 혈중 수준이 경시적으로 현저하게 증가되어 마그네슘 보충이 더 이상 필요하지 않음을 교시한다. 마그네슘 보충 없이 높은 수준의 마그네슘을 달성하는 것은 신장 근위 세뇨관에서 마그네슘 흡수뿐만 아니라 재흡수가 개선된다는 증거이다.

[0232] 도 9j는 세포 요법 전후 시간의 함수로서 환자의 혈액 내 크레아티닌 수준을 제시한다. 데이터는 환자의 크레아티닌 수준이 처음에는 정상이었지만(1mg/dL 미만), 치료 약 12개월 전에 경시적으로 상태가 악화되었음을 교시한다. 높은 수준의 크레아티닌에 도달하는 것은 신부전의 마커이다. 세포 요법을 시작한 후, 그의 상태는 안정되고, 추가의 악화(점선으로 표시됨)가 예방되었다.

[0233] 도 9k 내지 9l에서 추가로 알 수 있는 바와 같이, 세포 치료는 또한 비카보네이트를 보충하지 않고 비카보네이트(도 9j) 및 염기 과잉(도 9l) 수준을 현저히 개선시켰다.

[0234] 도 9m 내지 9p에서 알 수 있는 바와 같이, 단일 치료는 또한 글루코스 수준(도 9m) 및 소변에서 특정 염 수준(도 9n- 칼륨; 도 9o- 클로라이드; 도 9p- 나트륨)과 같은 여러 가지 신 세뇨관병증 지표 수준을 현저히 감소시켰다.

[0235] 사용된 요법의 성공에 대한 유전적 징후는 총 mtDNA와 비교하여 정상적 mtDNA의 유병률이다. 도 10a(Pt.1)에 예시된 바와 같이, 환자에서 정상적 mtDNA의 유병률은 단지 4개월 내에 약 1의 기준선으로부터 1.6(+ 60%)만큼 높게, 치료 20개월 후 1.9(+90%)로 증가되었다. 특히, 정상적 mtDNA의 수준은 대부분의 시점에서 기준선 수준 이상이었다. 도 10b(Pt.1)에 제시된 바와 같이, 기준선에서 상대적으로 높은 수준의 이형 상태를 보였던 MAT 후 이형 상태가 감소되었다(덜 결실된 mtDNA). 이는 추적 기간 내내 계속되었다.

[0236] 병원의 신경학자의 보고서에 따르면, 신경학적 개선은 (결실 돌연변이를 동반하지 않은) 건강한 미토콘드리아와 함께 자가 세포 이식 후 환자에서 입증되었다. 환자는 보행 능력, 계단을 오르는 능력, 가위를 사용하고 그림을 그리는 능력이 향상되었다. 명령을 실행하는 능력, 반응 시간 뿐만 아니라 운동 및 언어 능력에서 상당한 개선이 또한 주목되었다. 또한, 환자의 어머니는 환자의 기억력이 향상되었다고 보고했다.

[0237] 위에 제시된 데이터가 나타내는 바와 같이, 본 발명에 의해 제공된 단일 라운드의 치료 방법은 PS, FS를 치료하고, 신장 기능을 개선시키고, 말초 혈액에서 정상적 mtDNA의 유병률을 증가시키는 데 성공적이었다. 이러한

유익한 효과의 조합에 대한 증거는 그의 연령대의 건강한 대상체에게 정상인 환자의 체중 증가 및 그의 인지 상태에서 추가로 발견된다.

[0238] 실시예 8. 피어슨 증후군(PS)을 갖는 청소년을 위한 MNV-BLD(혈액 유래 미토콘드리아)가 풍부한 자가 CD34⁺ 세포를 사용한 동정적 치료.

[0239] 환자 2는 그녀의 mtDNA에서 4977 뉴클레오티드의 결실을 갖는 PS로 진단된 7세 여성 환자였다. 환자는 또한 빈혈, 내분비 체장 기능 부전을 앓았으며, 또한 4년 동안 인슐린 의존성 당뇨병이 있었다. 환자는 높은 락테이트 수준(> 25mg/dL), 저체중, 식사 및 체중 증가 문제를 가졌다. 환자는 추가로 고마그네슘뇨증(소변 내 높은 수준의 마그네슘, 혈중 낮은 수준)을 앓고 있다. 환자는 TMRE, ATP 함량 및 O₂ 소비율(건강한 어머니에 비해)에 의해 결정된 바와 같이 기억 및 학습 문제, 난시 및 말초 림프구에서 낮은 미토콘드리아 활성을 갖는다.

[0240] 조혈 줄기 세포 및 전구 세포(HSPC)의 동원, 백혈구 채집 및 CD34 양성 선별은 백혈구 채집 -1일 전 플렉시사포(n= 2)를 추가하여 환자 1(실시예 3)과 유사하게 수행했다. 미토콘드리아는 차등 원심분리에 의해 250 mM 수크로스 완충제 pH 7.4를 사용하여 모계 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)로부터 분리되었다. MAT의 경우, 자가 CD34⁺ 세포를 환자 어머니의 건강한 미토콘드리아(4.4 mU의 시트레이트 신타제(CS)를 갖는 미토콘드리아의 양당 1*10⁶ 개 세포)와 함께 배양하여 세포 미토콘드리아 함량을 1.62배 증가시켰다(CS 활성에 의해 입증된 바와 같은 미토콘드리아 함량의 62% 증가). 미토콘드리아와의 배양은 4.5% HSA를 함유하는 식염수에서 R.T.에서 24시간 동안 수행되었다. 미토콘드리아 농축된 후 환자의 CD34⁺ 세포가 콜로니 형성 비율을 26% 증가시켰음을 유의해야 한다.

[0241] 환자 2(치료 당일 15KG)는 도 11a에 제시된 타임라인에 따라서 체중 1kg당 건강한 미토콘드리아가 풍부한 1.8*10⁶개의 자가 CD34⁺ 세포를 IV 주입으로 처리했다.

[0242] 도 11b는 I.V. 주사 후 시간의 함수로서 환자의 혈액에서 발견된 락테이트 수준을 제시한다. 혈중 락테이트는 미토콘드리아가 손상되거나, 조직으로의 산소 전달이 미토콘드리아 기능 장애의 특징 중 하나인 정상적인 대사 요구를 지원하기에 불충분할 경우 혐기성 대사의 결과로 혈액에서 나타나는 락트산이다. 데이터는 혈중 락테이트의 수준이 경시적으로 상당히 감소되었음을 교시한다.

[0243] 도 11c 및 11d는 I.V. 주사 후 시간의 함수로서 환자의 "앉기-서기" 및 "6분 보행" 테스트 결과를 제시한다.

[0244] 도 11e는 I.V. 주사 후 시간의 함수로서 환자의 오른쪽 다리 근육에 수행된 동력계 테스트 결과를 제시한다. 각 테스트에서, 3개의 연속 반복이 기록되었다. 데이터는 환자의 근육 능력이 근력 증가 측면 및 피로 감소 측면 모두에서 시간이 지남에 따라 향상되었음을 교시한다.

[0245] 도 11f 내지 11h는 각각 I.V. 주사 후 시간의 함수로서 환자의 소변에서 발견되는 크레아티닌과 비교된 마그네슘, 칼륨 및 칼슘의 비율을 제시한다.

[0246] 도 11i는 I.V. 주사 후 시간의 함수로서 환자의 소변에서 ATP8 대 18S 사이의 유전적 비율을 제시한다.

[0247] 도 11j는 I.V. 주사 후 시간의 함수로서 환자의 림프구 중 ATP 함량을 제시한다. 대조군은 미토콘드리아의 공여자인 환자 어머니의 림프구 중 ATP 함량이다.

[0248] 도 10a(Pt.2)는 I.V. 주사 후 시간의 함수로서 정상적 mtDNA의 유병률을 제시한다. 도 6b(Pt.2)에서 알 수 있는 바와 같이, 정상적 mtDNA의 유병률은 단지 1개월 이내에 약 1의 기준선으로부터 2(+ 100%)만큼 높게 증가되었고, 치료 10개월 후까지 비교적 높게 잔류한다. 특히, 정상적 mtDNA의 수준은 모든 시점에서 기준선 수준 이상이었다.

[0249] 도 10b(Pt.2)는 MAT 후 시간의 함수로서 이형 상태 수준의 변화를 제시한다. 환자 2에서 MAT 후 이종 상태가 감소되었음(덜 결실된 mtDNA)을 알 수 있다. 이것은 추적 기간 내내 계속되었다.

[0250] 실시예 9. 피어슨 증후군(PS) 및 판코니 증후군(FS)을 앓고 있는 청소년을 위한 MNV-BLD(혈액 유래 미토콘드리아)가 풍부한 자가 CD34⁺ 세포를 사용한 동정적 치료.

[0251] 환자 3은 그녀의 mtDNA에서 뉴클레오티드 12113-14421의 결실을 갖는 PS로 진단된 10.5세 여성 환자였다. 환자는 또한 빈혈과 신장 기능 부전 단계 4로 발전한 판코니 증후군을 앓았다. 환자는 일주일에 3회 투석 치료를

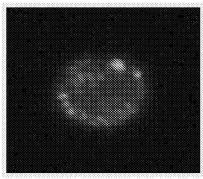
받았다. 지난 2개월 동안, 환자는 또한 심각한 시력 장애, 시야의 좁아짐 및 근거리 시력 상실로 고통 받았다. 환자는 임의의 신체 활동을 전혀 할 수 없었다(걷지 않고 유모차에 앉음). 환자는 높은 락테이트 수준(> 50mg/dL)과 인슐린으로 치료된 췌장 장애를 가졌다. 뇌 MRI는 많은 병변과 위축 부위를 나타냈다. 환자는 위루 형성술을 통해서만 급식되었다. 환자는 기억 및 학습 문제가 있었다. 환자는 테트라메틸로다민 에틸 에스테르(TMRE), ATP 함량 및 O₂ 소비율 (건강한 어머니에 비해) 테스트에 의해 결정된 바와 같이 말초 림프구에서 낮은 미토콘드리아 활성을 가졌다.

- [0252] 조혈 줄기 및 전구 세포(HSPC)의 동원뿐만 아니라 백혈구 채집 및 CD34 양성 선별은 백혈구 채집 -1일째에 플렉사포(n=1)를 첨가하여 환자 1(실시에 3)과 유사하게 수행했다. 백혈구 채집은 영구적 투석 카테터를 통해 수행되었다. 미토콘드리아는 자동 원심분리에 의해 250 mM 수크로스 완충제 pH 7.4를 사용하여 모계 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)로부터 분리되었다. MAT의 경우, 자가 CD34⁺ 세포를 환자 어머니의 건강한 미토콘드리아(4.4 mU의 시트레이트 신타제(CS)를 갖는 미토콘드리아 양당 1*10⁶개 세포)와 함께 배양하여 세포 미토콘드리아 함량을 1.14배 증가시켰다(CS 활성에 의해 입증된 바와 같이 미토콘드리아 함량의 14% 증가). 세포는 4.5% HSA를 함유하는 식염수에서 R.T.에서 24시간 동안 미토콘드리아와 함께 배양되었다. 미토콘드리아 농축된 후, 환자의 CD34⁺ 세포가 콜로니 형성 비율을 52%까지 증가시켰음을 유의해야 한다.
- [0253] 환자 3(21kg)은 도 12a에 제시된 타임라인에 따라서 체중 1kg당 그녀의 어머니의 건강한 미토콘드리아가 풍부한 2.8*10⁶개의 자가 CD34⁺ 세포를 IV 주입하여 처리했다.
- [0254] 도 12b는 요법 전후 시간의 함수로서 환자의 혈액에서 발견된 락테이트의 수준을 제시한다.
- [0255] 도 12c는 세포 요법 전후 시간의 함수로서 환자의 혈액에서 AST 및 ALT 간 효소의 수준을 제시한다. 혈중 간 효소의 낮은 수준을 달성하는 것은 간 손상이 감소되었다는 증거이다.
- [0256] 도 12d는 세포 요법 전후 시간의 함수로서 환자의 혈중 트리글리세라이드, 총 콜레스테롤 및 초저밀도 지단백(VLDL) 콜레스테롤의 수준을 제시한다. 혈중 트리글리세라이드, 총 콜레스테롤 및 VLDL 콜레스테롤의 낮은 수준을 달성하는 것은 간 기능이 증가되고 지질 대사가 개선되었다는 증거이다.
- [0257] 당화 헤모글로빈(때로는 헤모글로빈 A1c, HbA1c, A1C, Hb1c, Hb1c 또는 HGBA1C로서 지칭되기도 함)은 주로 3개월 평균 혈장 글루코스 농도를 동정하기 위해 측정되는 헤모글로빈의 한 형태이다. 적혈구의 수명이 4개월(120일)이기 때문에 테스트는 평균 3개월로 제한된다. 도 12e는 요법 전후 시간의 함수로서 환자의 A1C 테스트 결과를 제시한다.
- [0258] 도 12f 및 12g는 I.V. 주사 후 시간의 함수로서 환자의 "앉기-서기"(12f) 및 "6분 보행"(12g) 테스트 결과를 제시하며, 치료 5개월 후에 두 파라미터의 개선을 보여준다.
- [0259] 도 10a(Pt.3)는 I.V. 주사 후 시간의 함수로서 정상적 mtDNA의 유병률을 제시한다. 도 10a(Pt.3)에서 알 수 있는 바와 같이, 정상적 mtDNA의 유병률은 치료 7개월 후 50%로 증가되었다. 특히, 정상적 mtDNA의 수준은 대부분의 시점에서 기준선 수준 이상이었다.
- [0260] 도 10b(Pt.3)는 MAT 후 시간의 함수로서 이형 상태 수준의 변화를 제시한다. 기준선에서 비교적 낮은 수준의 이형 상태를 갖는 환자 3에서 MAT 이후 이형 상태가 감소되었음(덜 결실된 mtDNA)을 알 수 있다. 이것은 추적 기간 내내 계속되었다.
- [0261] 전체적으로, 상기 제시된 결과는 외인성 건강한 기능성 미토콘드리아가 풍부한 자가 CD34⁺ HSPC의 확대가 낮은 내지 중등도의 미토콘드리아 농축(본원에 예시 된 바와 같이 14%)에서도 질환 진행을 중단할 수 있고 PS 환자의 많은 증상을 개선시킬 수 있음을 입증한다.
- [0262] **실시에 10. 컨스-세이어 증후군(KSS)을 앓고 있는 청소년을 위한 MNV-BLD(혈액 유래 미토콘드리아)가 풍부한 자가 CD34⁺ 세포를 사용한 동정적 치료.**
- [0263] 환자 4는 터널 시력, 안검 하수증, 안근 마비 및 망막 위축을 겪은 컨스-세이어 증후군으로 진단된 14세의 19.5kg 여성 환자였다. 환자는 시력 문제, CPEO, 간질성 발작, 병리적 EEG, 앉거나 걸을 수 없는 심각한 근육 병증, 심장 부정맥을 가졌다. 환자는 다음 유전자 TK, NC8, ATP8, ATP6, CO3, TG, ND3, TR, ND4L, TH, TS2, TL2, ND5, ND6, TE, NC9 및 CYB를 포함한 미토콘드리아 DNA에서 7.4Kb 결실이 있었다.

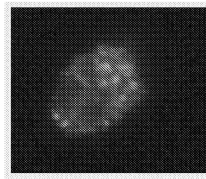
- [0264] 조혈 줄기 및 전구 세포(HSPC)의 동원뿐만 아니라 백혈구 채집 및 CD34 양성 선별은 환자 3(실시에 5)과 유사하게 수행했다. MAT의 경우, 자가 CD34⁺ 세포를 4.5% HSA를 함유하는 식염수에서 환자 어머니의 건강한 미토콘드리아(4.4 mU의 시트레이트 신타제(CS)를 갖는 미토콘드리아 양당 1*10⁶개 세포)와 함께 R.T.에서 24시간 동안 배양했다. 농축은 세포 미토콘드리아 함량을 1.03배 증가시켰다(CS 활성에 의해 입증된 바와 같이 미토콘드리아 함량의 3% 증가).
- [0265] 환자 4는 도 12a에 제시된 타임라인에 따라서 체중 1kg당 건강한 미토콘드리아가 풍부한 2.2*10⁶개의 자가 CD34⁺ 세포로 처리했다. 예기치 않게, 건강한 미토콘드리아로 3%만 농축된 CD34⁺에 의한 단일 치료 4개월 후, 환자는 간질성 발작 없이 EEG에서 현저한 개선을 보였다. 치료 5개월 후, 환자는 질환 관련 방실계(AV) 차단을 겪었고, 페이스(pacer)가 설치되었다. 환자는 회복되었고 개선은 계속되었다. 말초 혈액의 ATP 함량은 치료 6개월 후 측정되었으며, 도 13에 도시된 바와 같이, 치료 전과 비교하여 ATP 함량이 약 100% 증가한 것으로 나타났다. 치료 7개월 후, 환자는 혼자 앉을 수 있고, 도움을 받아 걷고 말할 수 있으며, 식욕이 좋아지고 3.6KG 증가했다.
- [0266] **실시에 11. 인간 미토콘드리아가 풍부한 인간 줄기 세포를 사용하여 미토콘드리아 질환을 앓고 있는 환자의 치료.**
- [0267] 환자는 미토콘드리아 또는 핵 DNA의 하나 이상의 돌연변이(들), 그가 경험하는 증상 또는 둘 다에 근거하여 미토콘드리아 질환으로 진단된다.
- [0268] 환자는 연령, 체중 및 임상 상태에 적합한 타임라인에 따라서 건강한 공여자로부터 획득되고 단리된 건강한 기능성 미토콘드리아가 풍부한 자가 또는 동종이계 인간 줄기 세포로 치료된다. 투여된 인간 줄기 세포는 건강한 기능성 미토콘드리아와 함께 나이브 인간 줄기 세포를 배양함으로써 제조된다.
- [0269] 환자의 임상 상태는 요법 전, 동안 및/또는 후에 모니터링된다. 환자의 생리학적 및/또는 인지적 임상 상태는 다음 테스트 중 하나에 의해 결정될 수 있다: 웨슬러 유아용 지능 검사(Wechsler preschool & primary scale of intelligence)(WPPSI V3), 국제 소아 미토콘드리아 질환 척도(IPMDS) 설문지, 신체 검사, 신경 심리학 테스트(예: 발달 신경 심리학 평가에 따른 목록 기억 테스트, NEPSY II (NEPSY II - 2nd Edition), 아동용 웨슬러 지능 척도(WIS)에 따르는 숫자 범위 테스트 - 4th Edition, 및 시각 운동 통합의 비이리-부크테니카(Beery-Buktenica) 발달 테스트에 따르는 시각 운동 통합(VMI): 관리, 채점 및 교육 매뉴얼(6th Edition) 완전 혈구 수, 혈액 가스, 혈액 생화학, 수동 감별 혈액 검사, 소변 생화학, 체중 증가, 호흡 기능 및 정상 미토콘드리아 DNA 함량.
- [0270] 본 발명은 본원에 기재된 특정 구현예에 의해 범위가 제한되지 않는다. 실제로, 본원에 기재된 것들 이외에 본 발명의 다양한 변형은 상기한 설명 및 첨부되는 도면으로부터 당업자에게 자명해질 것이다. 이러한 변형은 첨부된 청구범위 내에 속하는 것이 의도된다.
- [0271]

도면

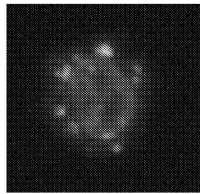
도면1



30분

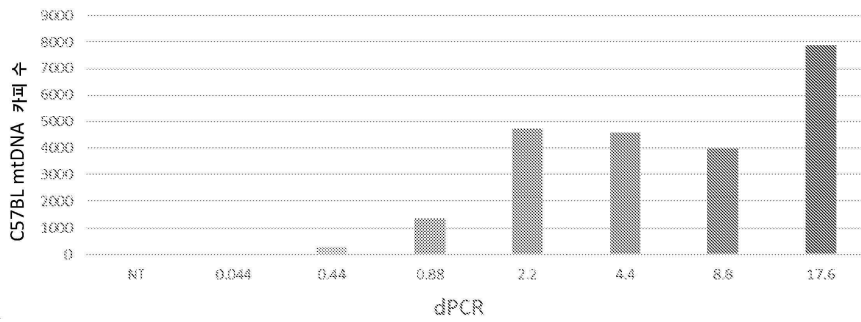


8시간

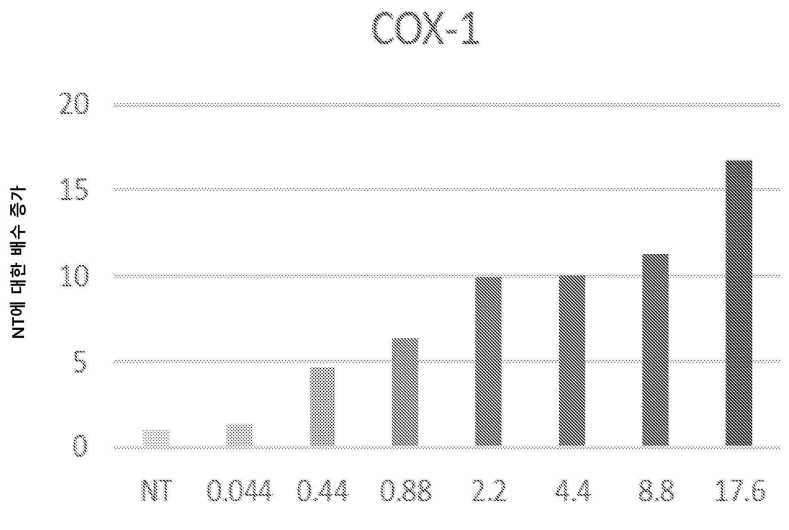


24시간

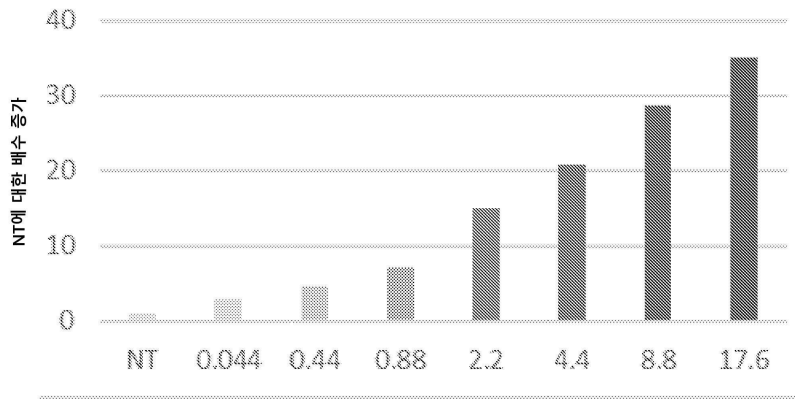
도면2a



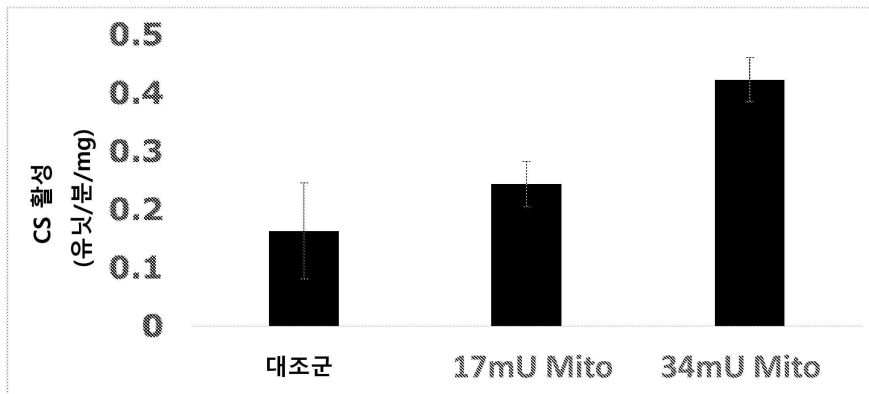
도면2b



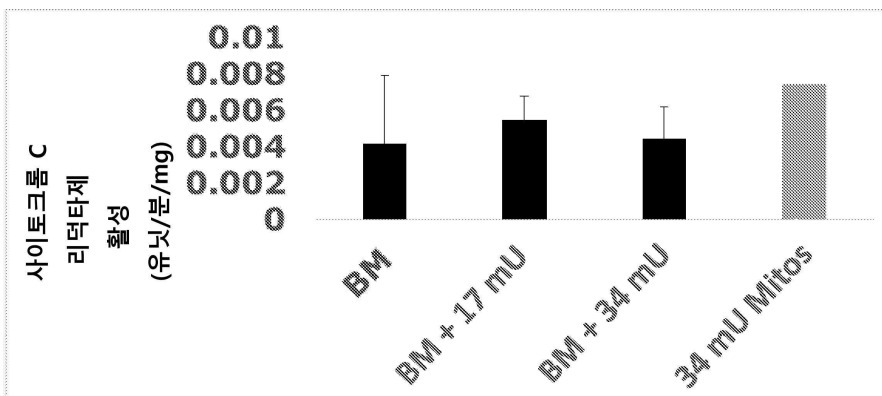
도면2c



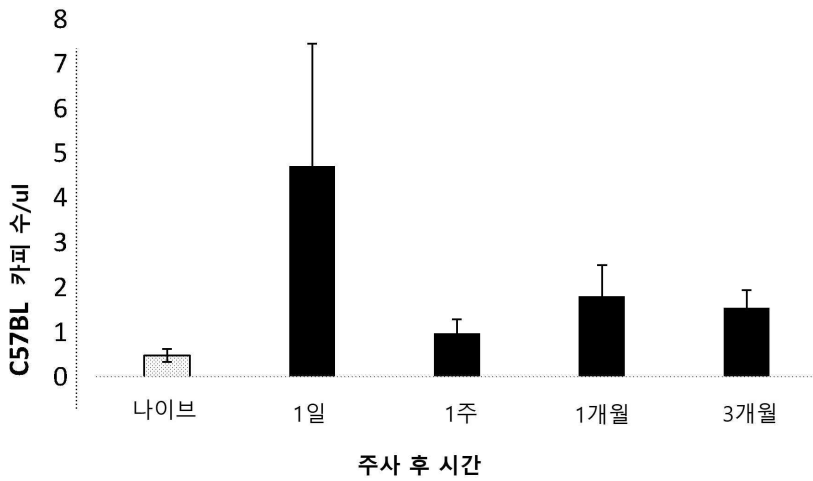
도면3a



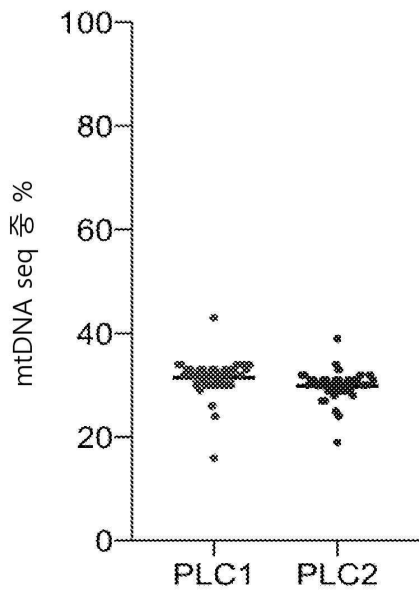
도면3b



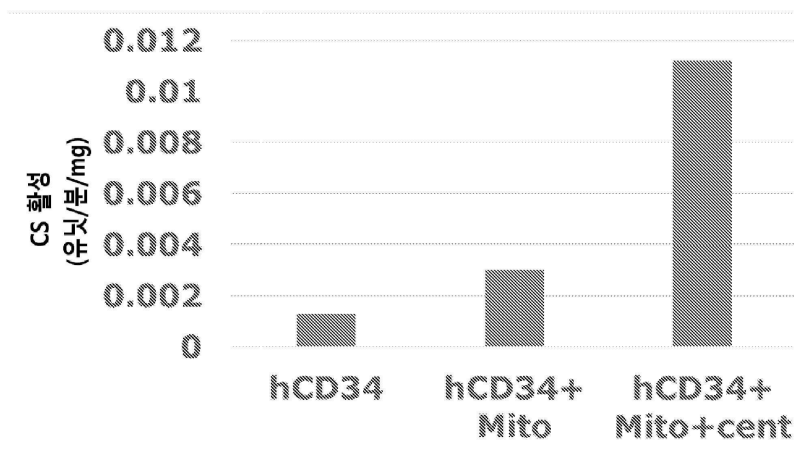
도면4



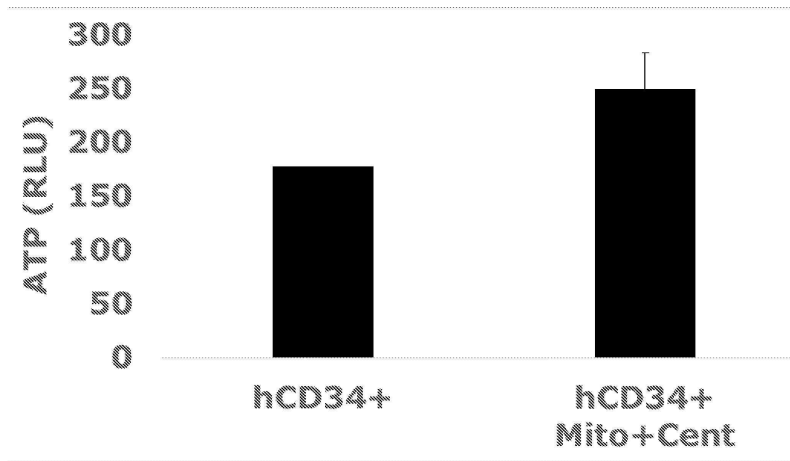
도면5



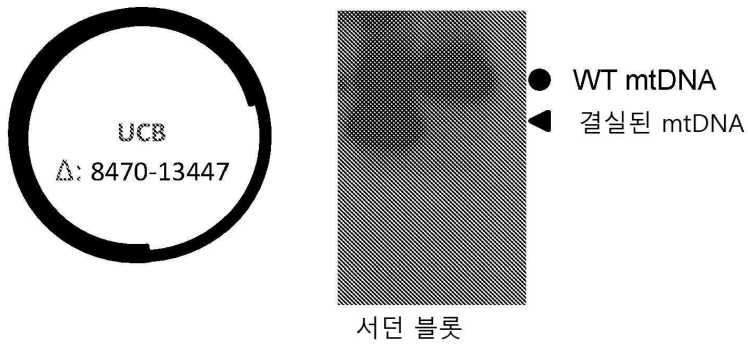
도면6a



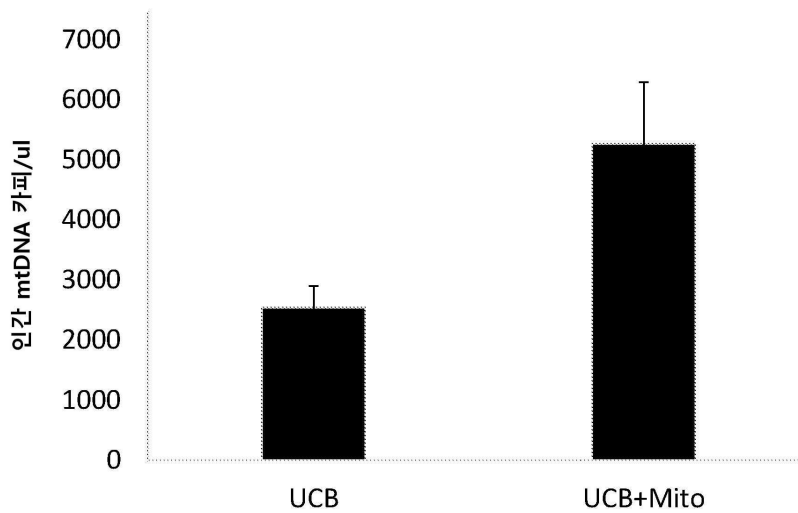
도면6b



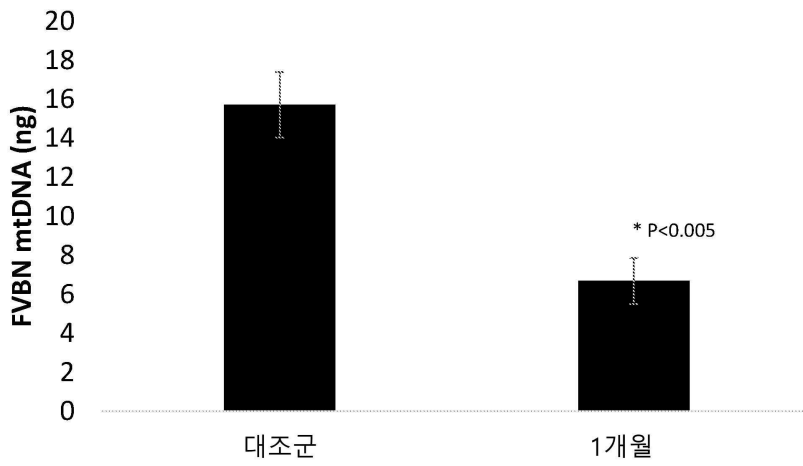
도면7a



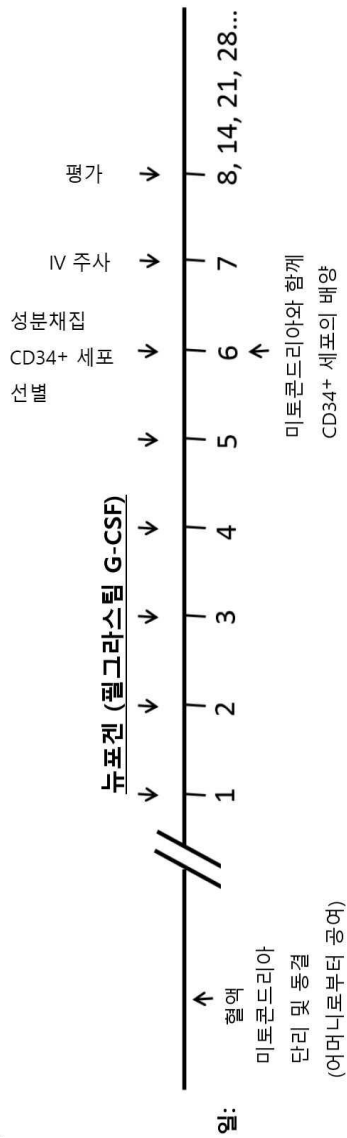
도면7b



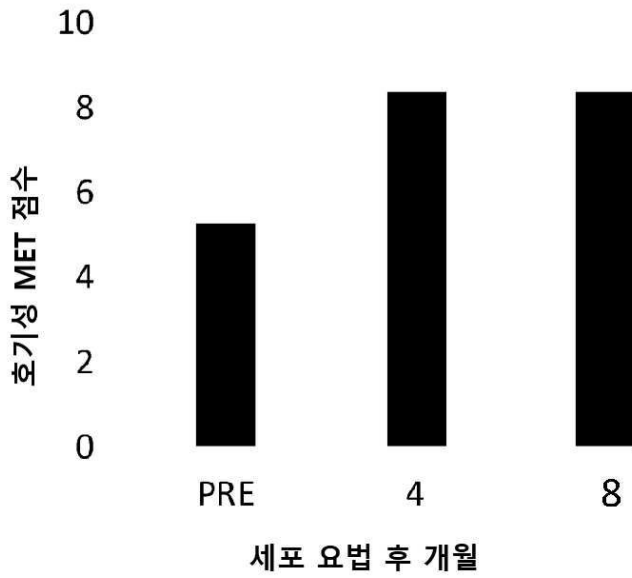
도면8



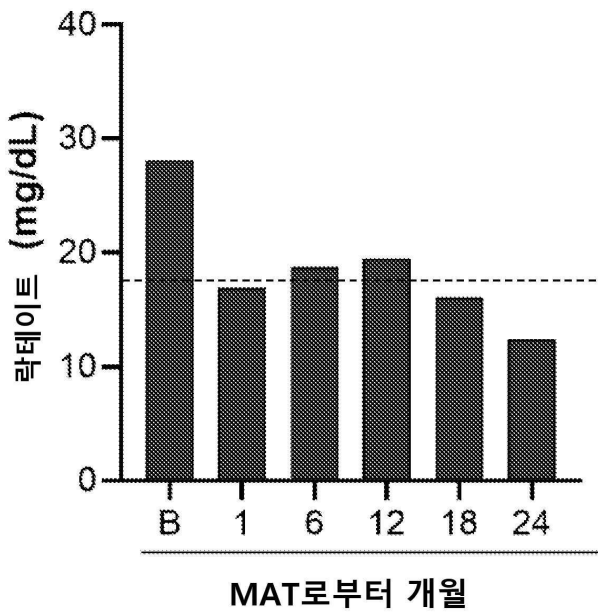
도면9a



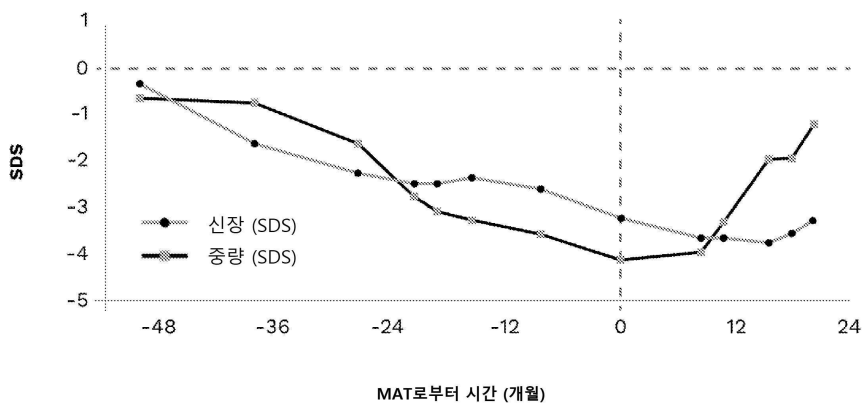
도면9b



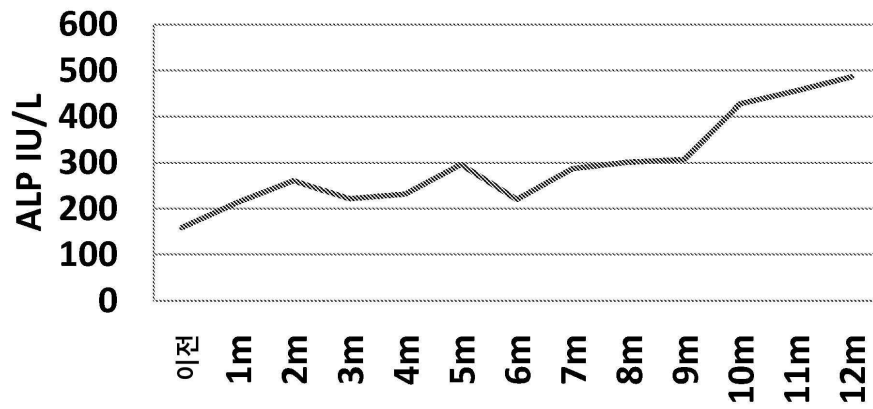
도면9c



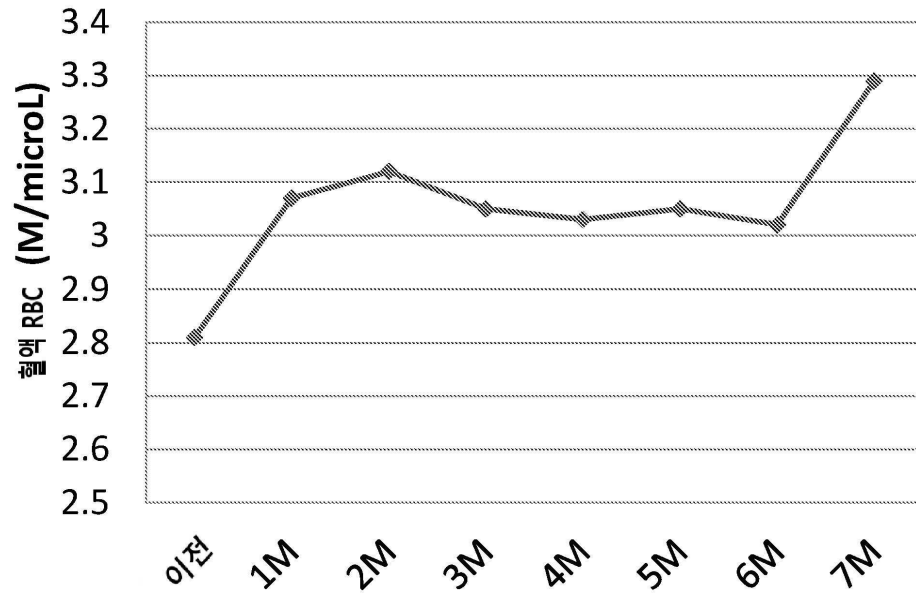
도면9d



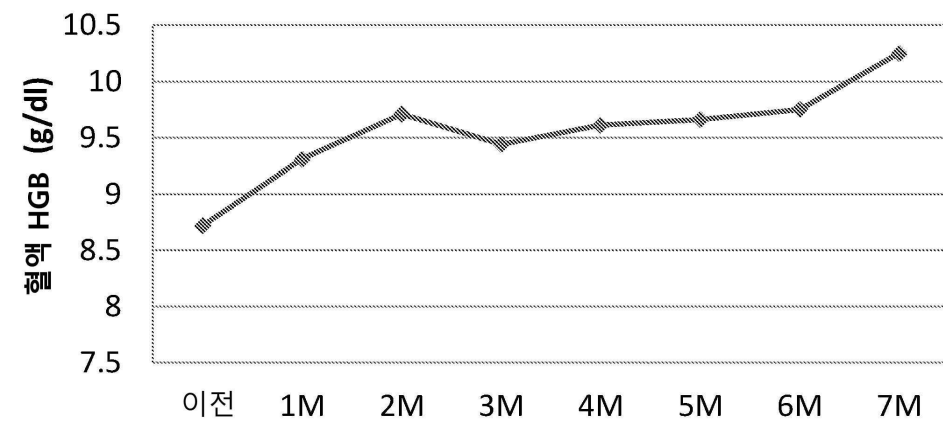
도면9e



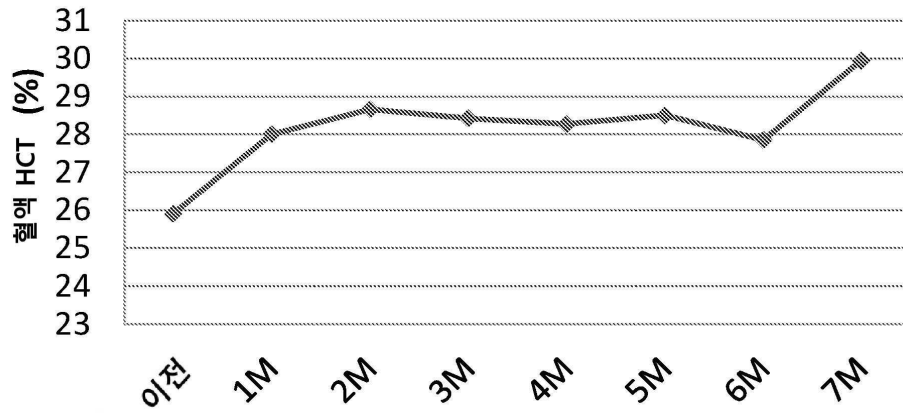
도면9f



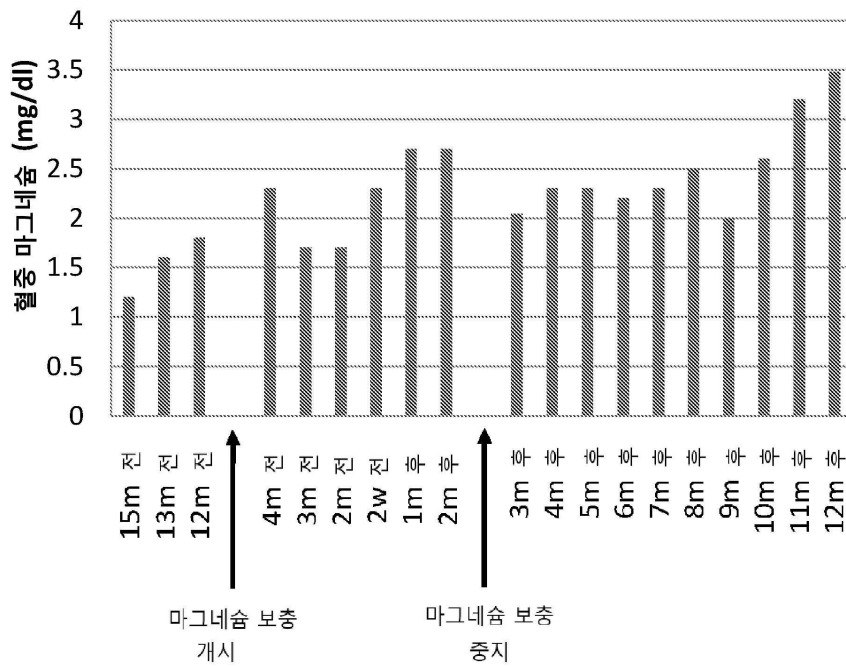
도면9g



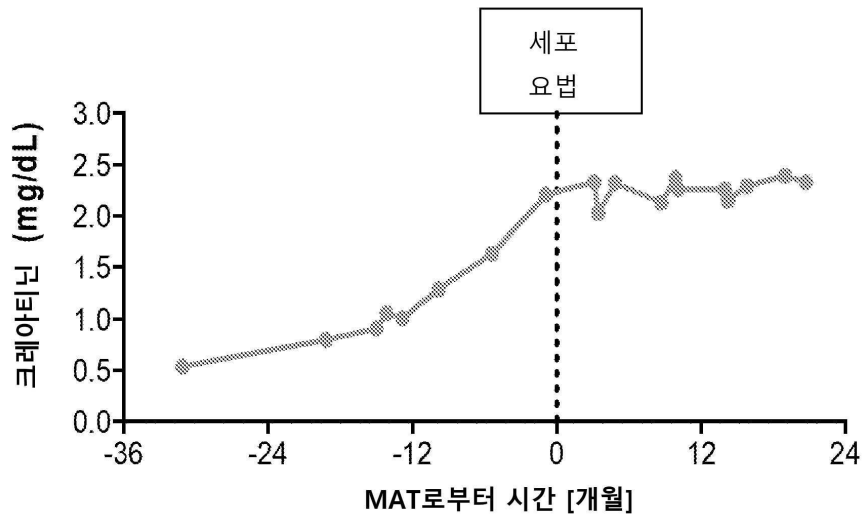
도면9h



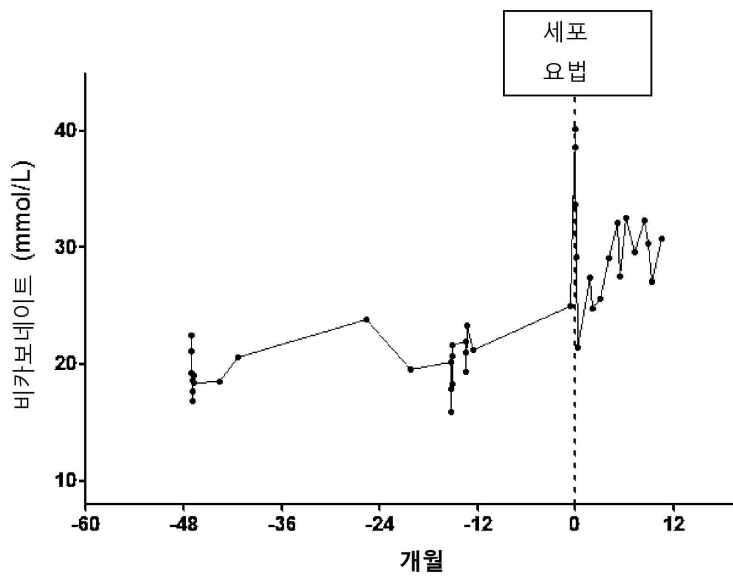
도면9i



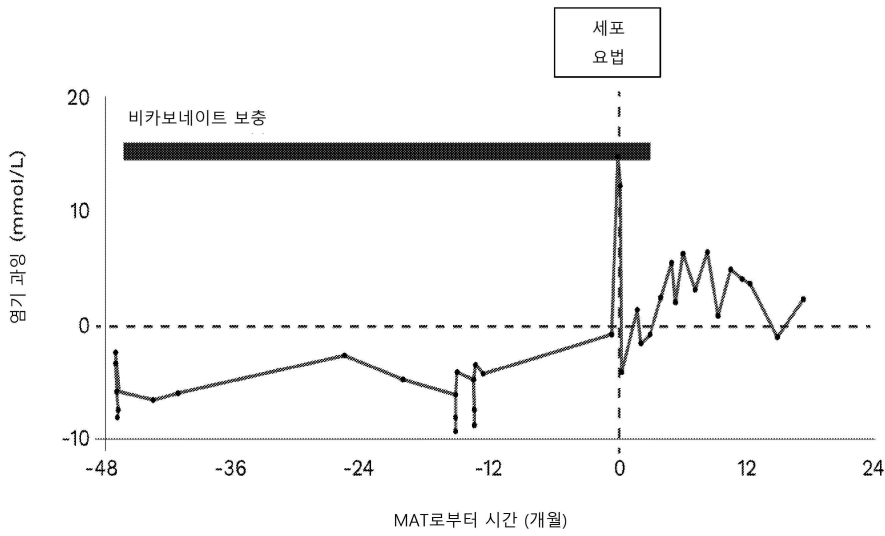
도면9j



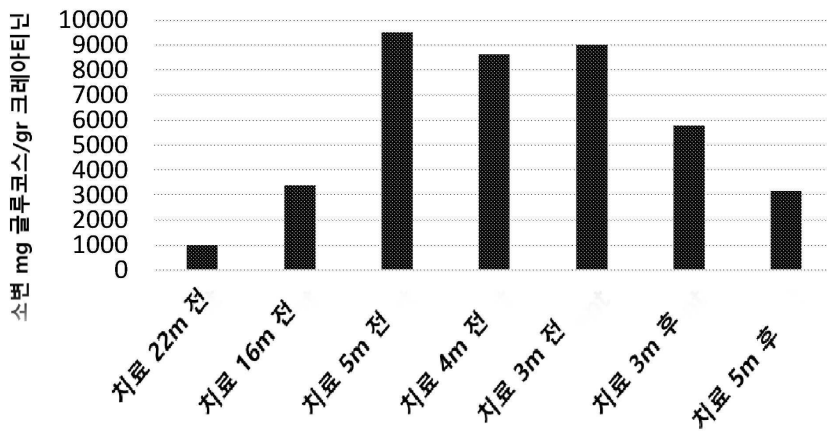
도면9k



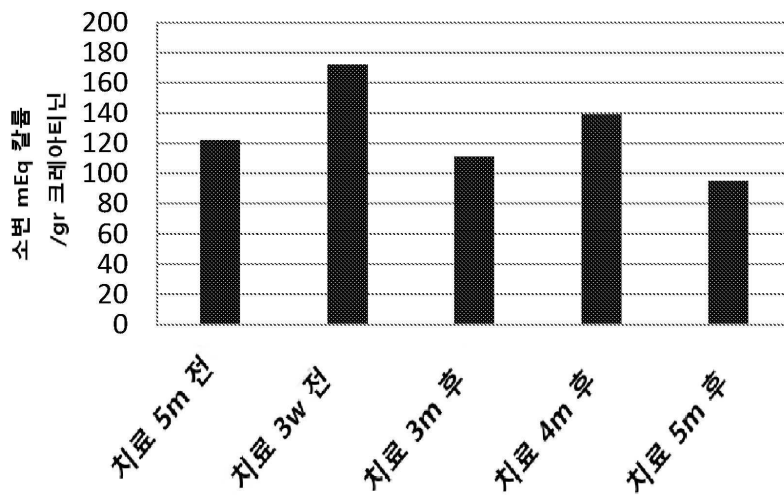
도면91



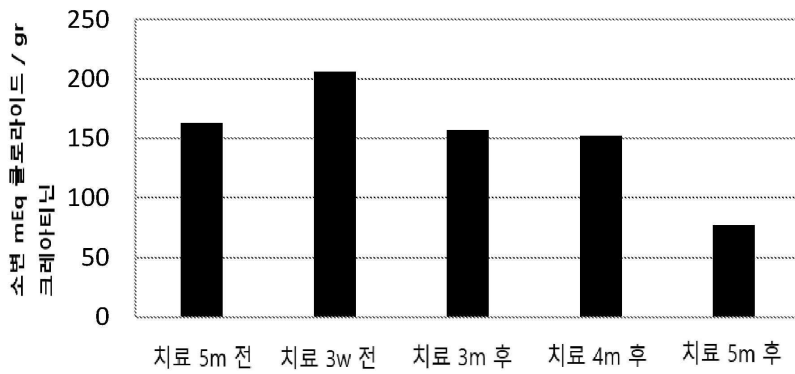
도면9m



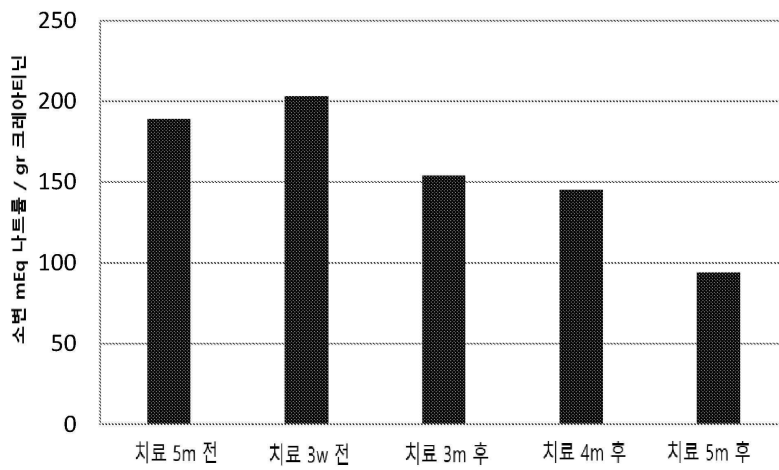
도면9n



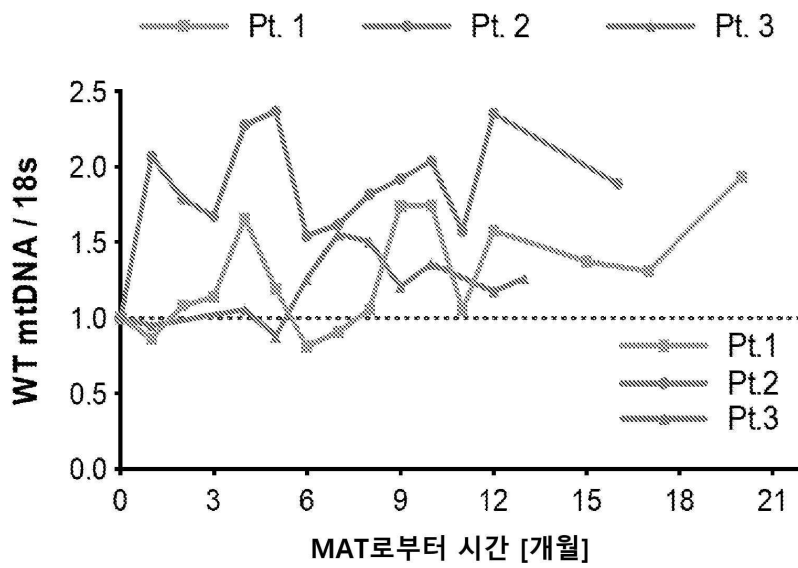
도면9a



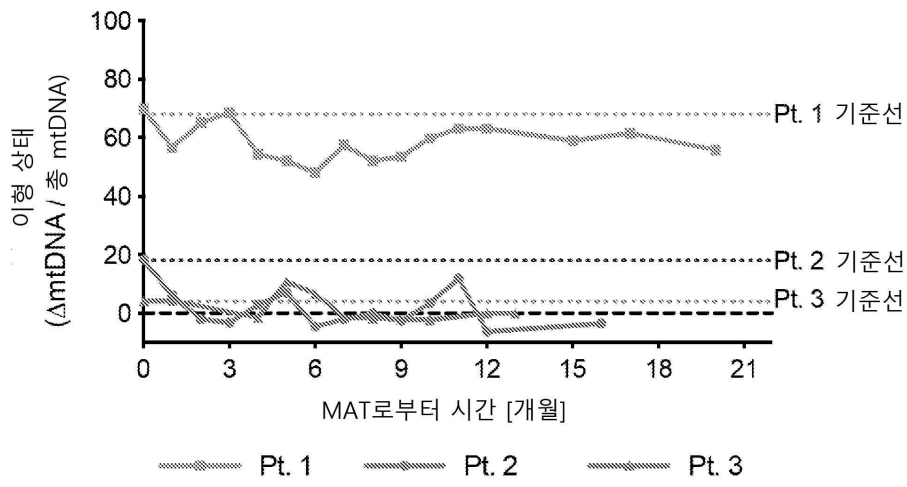
도면9b



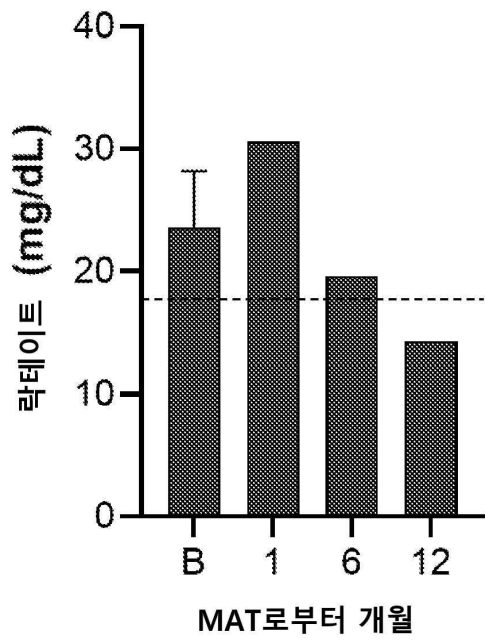
도면10a



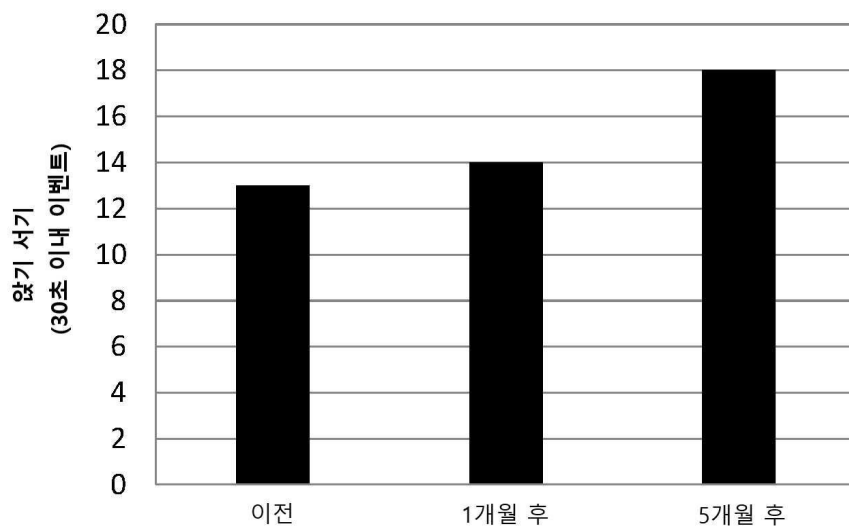
도면10b



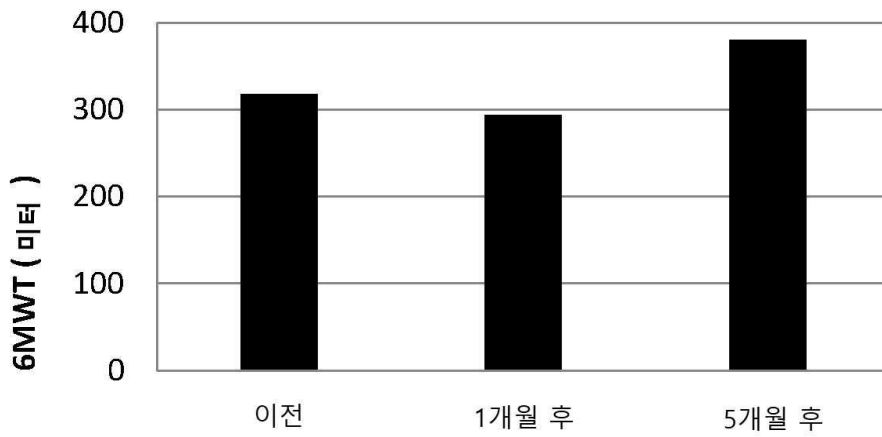
도면11b



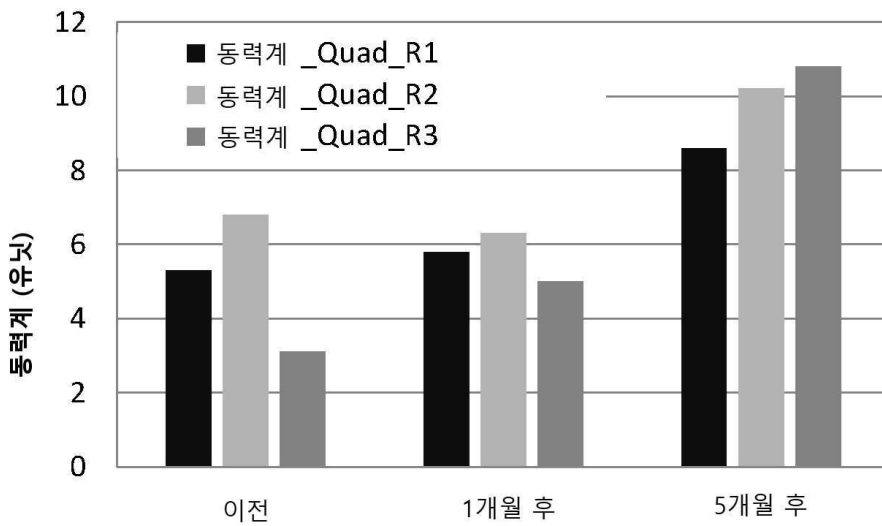
도면11c



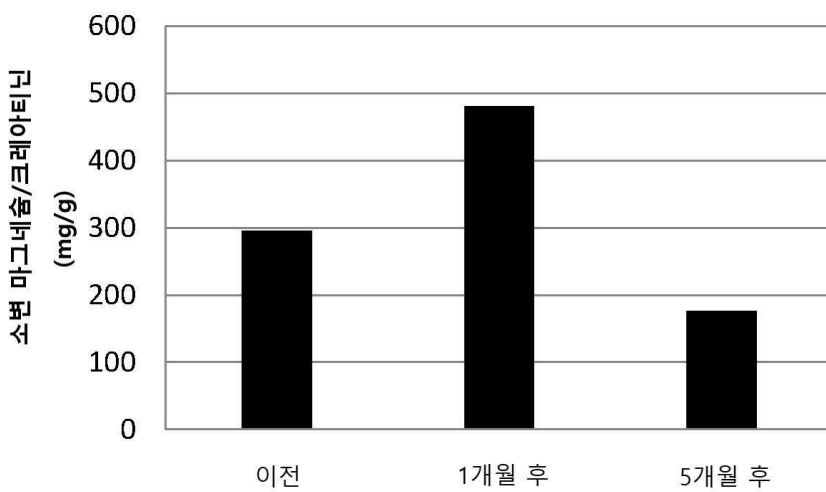
도면11d



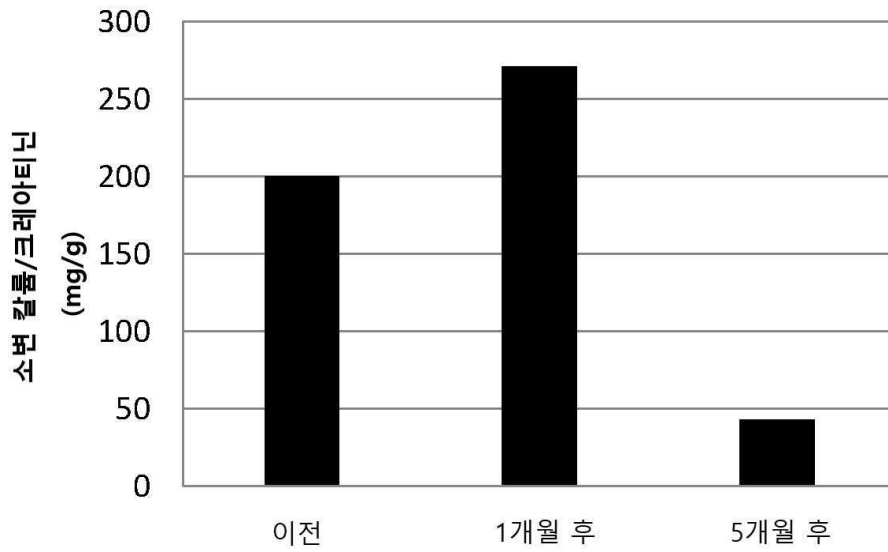
도면11e



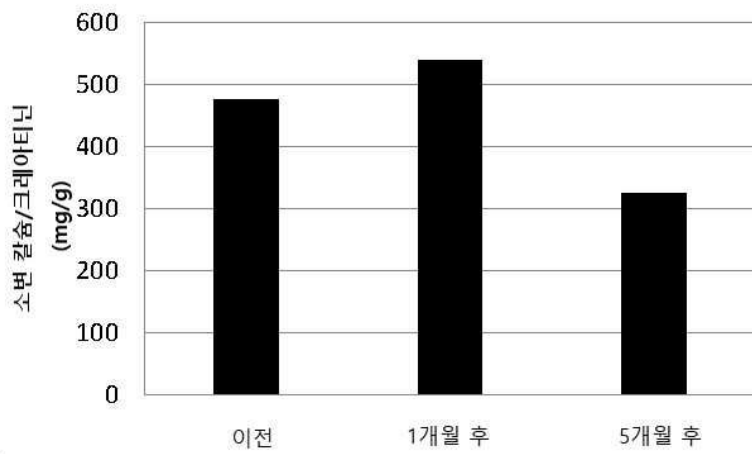
도면11f



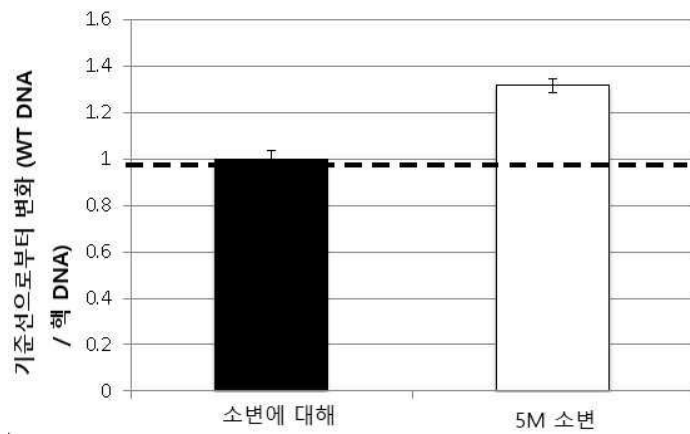
도면11g



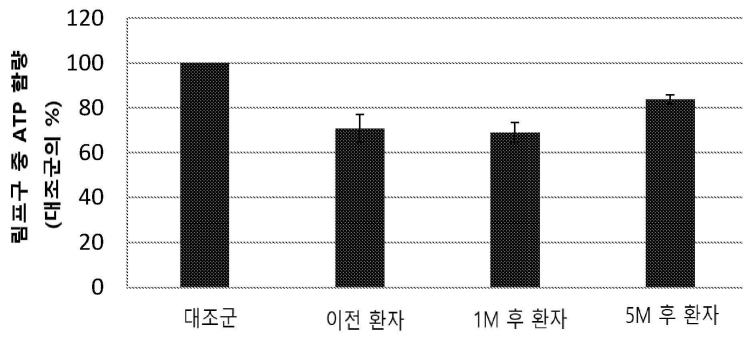
도면11h



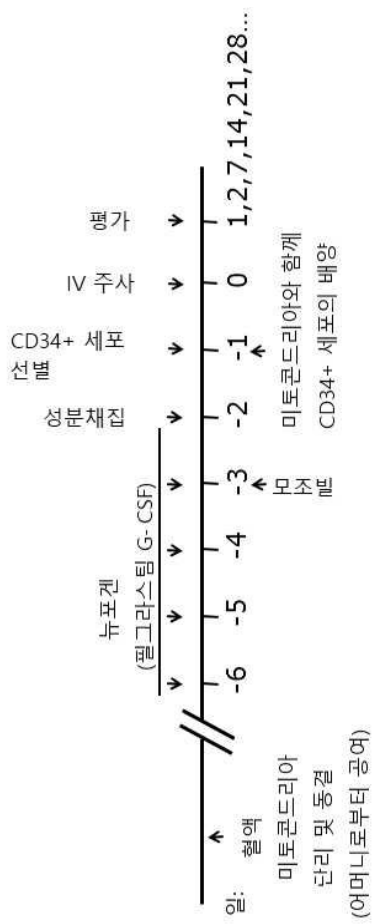
도면11i



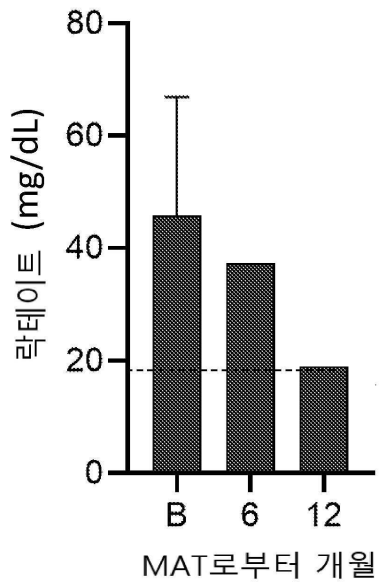
도면11j



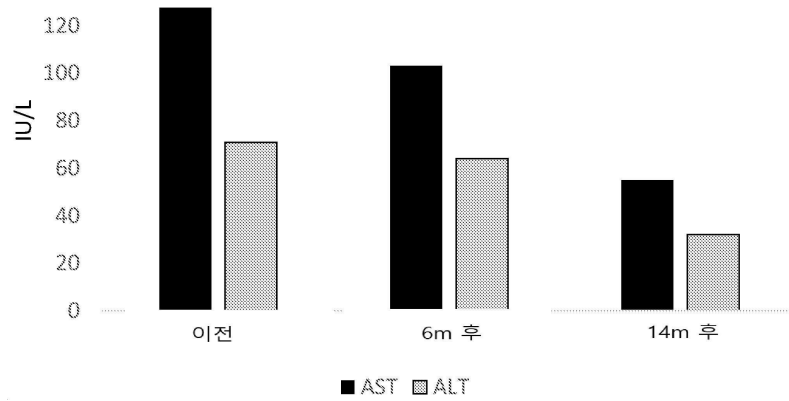
도면12a



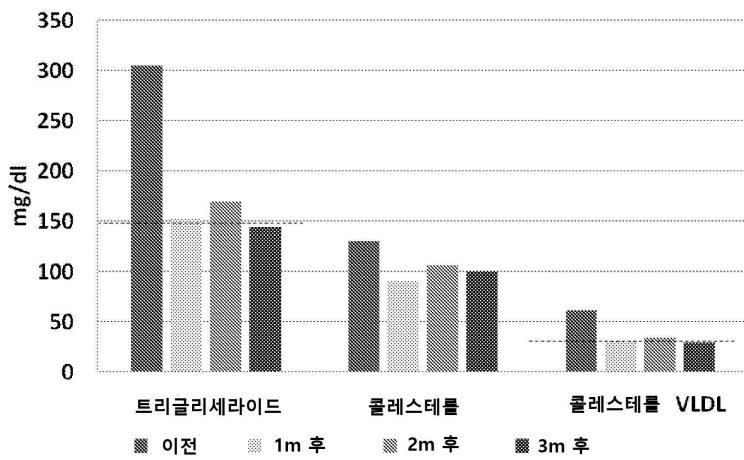
도면12b



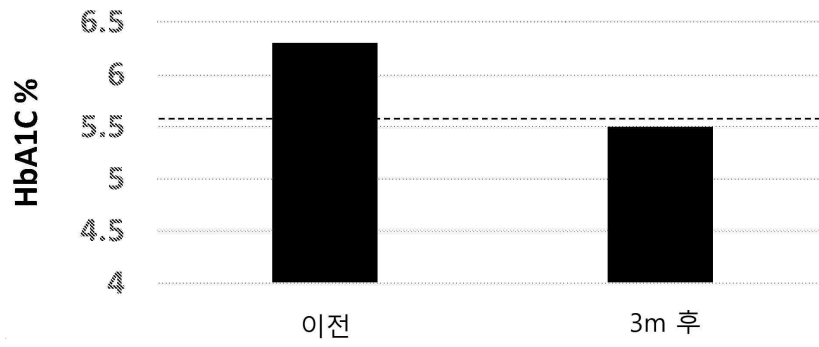
도면12c



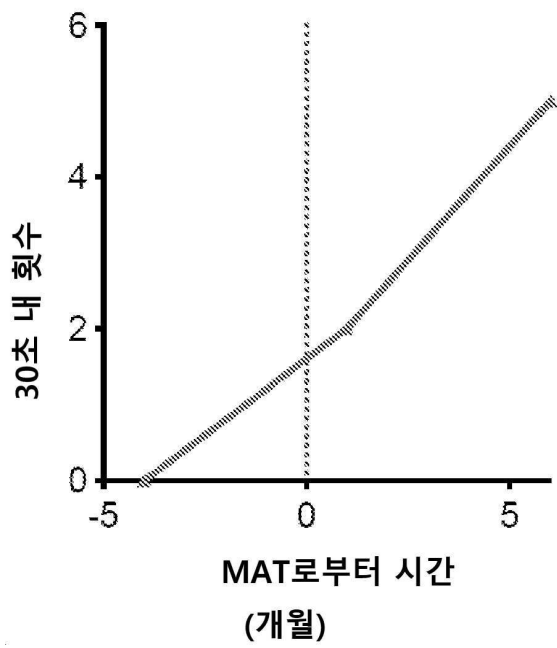
도면12d



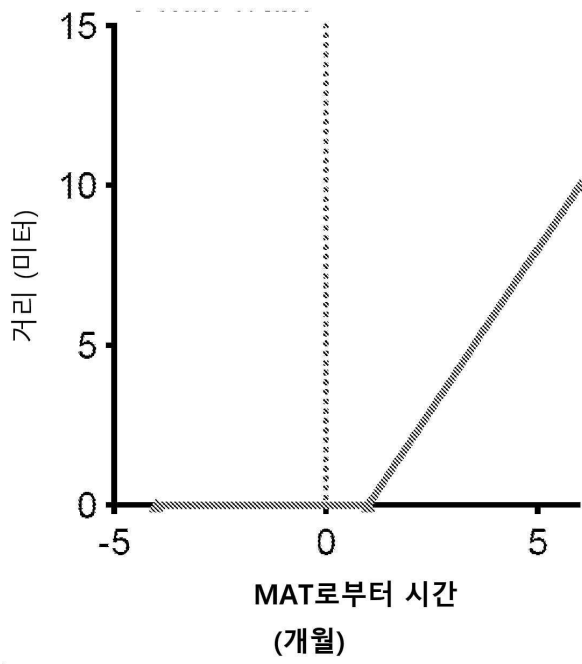
도면12e



도면12f



도면12g



도면13

