(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0053940
(43) 공개일자 2014년05월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/28 (2006.01) *A61K 35/12* (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-7000067
(22) 출원일자(국제) 2012년06월04일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2014년01월02일
(86) 국제출원번호 PCT/AU2012/000626
(87) 국제공개번호 WO 2012/162754
국제공개일자 2012년12월06일
(30) 우선권주장
61/493,073 2011년06월03일 미국(US)

(71) 출원인
메소블라스트, 아이엔씨.
미국, 뉴욕 10016, 뉴욕, 매디슨 애비뉴 275, 4층
(72) 발명자
버나드 클라우드
오스트레일리아 빅토리아 3800 클레이튼 모나쉬 유니버시티 웰링턴 로드 빌딩 75 스트럽 레벨 3 이뮤놀로지 앤드 스템 셀 래버러토리즈 (엠아이에스씨엘)
(74) 대리인
리앤목특허법인

전체 청구항 수 : 총 35 항

(54) 발명의 명칭 **신경성 질환을 치료 또는 예방하는 방법들**

(57) 요 약

본 개시는 STRO-1^{+} 세포들 및/또는 그의 후손 및/또는 그로부터 유래된 가용성 인자들이 농축된 세포 집단을 투여하는 것을 포함하는 염증성 신경성 질환을 치료하는 방법을 제공한다.

특허청구의 범위

청구항 1

염증성 신경성 질환을 치료 또는 예방하는 방법으로서, 상기 방법은 STRO-1^{+} 세포들 및/또는 그의 후손 및/또는 그로부터 유래된 가용성 인자들이 농축된 세포 집단을 상기 대상에게 투여하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 염증성 신경성 질환은 염증성 자극에 대한 T 세포 반응과 연관되거나 또는 이로 인한 것인 방법.

청구항 3

청구항 1 또는 2에 있어서, STRO-1$^{밝음(bright)}$ 세포들 및/또는 그의 후손 및/또는 그로부터 유래된 가용성 인자들이 농축된 세포들의 집단을 투여하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 4

청구항 1 내지 3 중 어느 한 항에 있어서, 상기 염증성 신경성 질환은 다발성 경화증, 전신 홍반성 낭창, 길랑-바레 증후군, 람베르트-이튼 근무력 증후군, 근무력증, 횡단성 척추염, 백질이영양증, 및 진행성 다소성 백질뇌병증(progressive mulfifocal leukoencephalopathy)으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 5

청구항 1 내지 4 중 어느 한 항에 있어서, 상기 질환은 전신 홍반성 낭창인 것인 방법.

청구항 6

청구항 1 내지 4 중 어느 한 항에 있어서, 상기 질환은 다발성 경화증인 것인 방법.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 상기 질환은 만성 진행성 형태의 다발성 경화증 또는 재발-경감 형태(relapsing-remitting from)의 다발성 경화증인, 방법.

청구항 8

청구항 1 내지 7 중 어느 한 항에 있어서, 상기 STRO-1^{+} 세포들 및/또는 그의 후손 및/또는 그로부터 유래된 가용성 인자들이 농축된 집단은 전신으로 투여되는 것인 방법.

청구항 9

청구항 1 내지 8 중 어느 한 항에 있어서, 상기 질환은 재발-경감 질환(relapsing-remitting disease)이고, 상기 STRO-1^{+} 세포들 및/또는 그의 후손 및/또는 그로부터 유래된 가용성 인자들이 농축된 집단은 상기 질환의 재발을 방지 또는 지연시키기 위해 질환 재발 동안 투여되는 것인 방법.

청구항 10

청구항 1 내지 9 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상 및/또는 상기 질환의 발병 부위에 조절성 T(Treg) 세포의 수를 증가시키기 위해 효과적인 양의 STRO-1^{+} 세포들 및/또는 그의 후손 및/또는 그로부터 유래된 가용성 인자들이 농축된 집단을 투여하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 11

청구항 1 내지 10 중 어느 한 항에 있어서, kg 당 2 x 10^{6} 내지 8 x 10^{6}의 STRO-1^{+} 세포들 및/또는 그의 후손을 투여하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 12

청구항 1 내지 11 중 어느 한 항에 있어서, kg 당 3 x 10^6 내지 6 x 10^6의 STRO-1^+ 세포들 및/또는 그의 후손을 투여하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 13

청구항 1 내지 12 중 어느 한 항에 있어서, 낮은 용량의 STRO-1^+ 세포들 및/또는 그의 후손을 투여하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 14

청구항 13에 있어서, 상기 낮은 용량의 STRO-1^+ 세포들 및/또는 그의 후손은 kg 당 1 x 10^6 내지 3 x 10^6의 STRO-1^+ 세포들 및/또는 그의 후손을 포함하는 것인 방법.

청구항 15

청구항 14에 있어서, 상기 낮은 용량의 STRO-1^+ 세포들 및/또는 그의 후손은 kg 당 약 3 x 10^6의 STRO-1^+ 세포들 및/또는 그의 후손을 포함하는 것인 방법.

청구항 16

청구항 1 내지 15 중 어느 한 항에 있어서, STRO-1^+ 세포들 및/또는 그의 후손 및/또는 그로부터 유래된 가용성 인자들이 농축된 집단은 주당 1회 또는 더 낮은 빈도로 투여되는 것인 방법.

청구항 17

청구항 1 내지 15 중 어느 한 항에 있어서, STRO-1^+ 세포들 및/또는 그의 후손 및/또는 그로부터 유래된 가용성 인자들이 농축된 집단은 4주마다 1회 또는 더 낮은 빈도로 투여되는 것인 방법.

청구항 18

청구항 1 내지 17 중 어느 한 항에 있어서, STRO-1^+ 세포들 및/또는 그의 후손이 농축된 집단은 T 세포들의 자극을 차단시키는 분자를 발현시키도록 유전적으로-조작(genetically-engineer)되며 및/또는 가용성 인자들은 이러한 유전적으로-변형된(genetically-modified) 세포들로부터 유래되는 것인 방법.

청구항 19

청구항 1 내지 18 중 어느 한 항에 있어서, 상기 STRO-1^+ 세포들 및/또는 그의 후손 및/또는 그로부터 유래된 가용성 인자들이 농축된 집단은 T 세포들의 자극을 차단시키는 화합물과 함께 투여되는 것인 방법.

청구항 20

청구항 1 내지 19 중 어느 한 항에 있어서, STRO-1^+ 세포들 및/또는 후손 세포들이 농축된 집단은 자가(autogeneic) 또는 동종이계(allogeneic)이고, 및/또는 가용성 인자들은 자가 또는 동종이계 세포들로부터 유도되는 것인 방법.

청구항 21

청구항 1 내지 19 중 어느 한 항에 있어서, STRO-1^+ 세포들 및/또는 후손 세포들이 농축된 집단은 투여에 앞서 및/또는 가용성 인자들을 획득하기에 앞서 배양 확장(culture expand)되는, 방법.

청구항 22

항원에 반응한 면역 반응을 방지하는 방법으로서, 상기 방법은 STRO-1^+ 세포들 및/또는 그의 후손 및/또는 그로

부터 유래된 가용성 인자들이 농축된 세포들의 집단을 대상에게 투여하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 23

청구항 22에 있어서, 상기 면역 반응은 T 세포-매개 면역 반응인 것인 방법.

청구항 24

청구항 23에 있어서, 상기 T 세포-매개 면역 반응은 T 세포 증식을 포함하는 것인 방법.

청구항 25

청구항 22 내지 24 중 어느 한 항에 있어서, 상기 T 세포-매개 면역 반응은 특이적 항원에 반응하여 억제되고, 또 다른 항원에 반응한 T 세포-매개 면역 반응은 억제되지 않는 것인 방법.

청구항 26

청구항 22 내지 25 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상은 상기 항원에 대해 면역 반응을 이전에 일으켰으며, 상기 집단, 후손 및/또는 가용성 인자들은 상기 항원에 대한 추가 면역 반응을 억제하는 것인 방법.

청구항 27

청구항 26에 있어서, 상기 대상이 상기 항원에 대한 면역 반응을 일으킨 후, 상기 집단, 후손 및/또는 가용성 인자들이 투여되고, 그에 의해 상기 항원에 대한 추가 면역 반응이 방지되는 것인 방법.

청구항 28

청구항 22 내지 27 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역 반응은 STRO-1^+ 세포들 및/또는 그의 후손 및/또는 그로부터 유래된 가용성 인자들이 농축된 세포들의 집단을 투여한 후 약 24일 이상 동안 억제되는 것인 방법.

청구항 29

대상에서 항원에 대한 내성을 유도하는 방법으로서, 상기 방법은 STRO-1^+ 세포들 및/또는 그의 후손 및/또는 그로부터 유래된 가용성 인자들이 농축된 세포들의 집단을 상기 대상에게 투여하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 30

청구항 22 내지 29 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항원 또는 특이적 항원은 그에 대한 염증성 반응을 일으키는 항원인 것인 방법.

청구항 31

청구항 30에 있어서, 상기 염증성 반응은 염증성 신경성 질환의 원인이 되는 것인 방법.

청구항 32

청구항 1 내지 31 중 어느 한 항에 있어서, 상기 STRO-1^+ 세포들 및/또는 그의 후손 및/또는 그로부터 유래된 가용성 인자들이 농축된 세포 집단은 염증성 신경성 질환을 치료 또는 예방하는 화합물과 함께 투여되는 것인 방법.

청구항 33

청구항 32에 있어서, 상기 화합물은 글라티라머 아세테이트(glatiramer acetate) 및/또는 베타-인터페론인 것인 방법.

청구항 34

염증성 신경성 질환의 치료 또는 예방 및/또는 항원에 대한 면역 반응의 억제 및/또는 항원에 대한 내성의 유도를 위해 사용되는, STRO-1^+ 세포들 및/또는 그의 후손 및/또는 그로부터 유래된 가용성 인자들이 농축된 집단.

청구항 35

염증성 신경성 질환을 치료 또는 예방하고, 및/또는 항원에 대한 면역 반응을 억제하고, 및/또는 항원에 대한 내성을 유도하기 위한 약물의 제조에서, STRO-1^{+} 세포들 및/또는 그의 후손 및/또는 그로부터 유래된 가용성 인자들이 농축된 집단의 용도.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] **관련된 출원 데이터**

[0002] 본 출원은 2011년 6월 3일자로 제출된 "신경성 질환을 치료 또는 예방하는 방법들"이란 제목의 미국 가출원 번호 61/493,073을 우선권으로 주장하며, 이의 전문이 여기에 참고자료로 편입된다.

[0003] **서열 목록**

[0004] 본 출원과 함께 서열 목록은 전자 형태로 제출된다. 전체 서열 목록은 여기에 참고자료로 편입된다.

[0005] **분야**

[0006] 본 개시내용은 신경성 질환의 치료 또는 예방을 위한 방법들에 관계한다.

배 경 기 술

[0007] 염증성 신경성 질환은 대상의 면역계가 신경계의 성분들을 표적으로 하거나 또는 공격하는 분류의 질병이다다. 이들 질환은 면역계가 예를 들면, 뉴런, 슈반(Schwann) 세포들 또는 신경계 미엘린 또는 신경전달물질들의 기타 세포들을 공격하여 발생될 수 있다. 일부 경우들에서, 염증성 신경성 질환은 기존 질환의 합병증 또는 성분일 수 있는데, 가령, 예시적인 염증성 신경성 질환은 다발성 경화증, 전신 홍반성 낭창 (SLE), 길랑-바레(Guillain-Barre) 증후군, 람베르트-이튼(Lambert-Eaton) 근무력 증후군, 근무력증, 횡단성 척추염(transverse myelitis), 백질이영양증 또는 진행성 다소성 백질 뇌병증(progressive multifocal leukoencephalopathy)을 포함한다.

[0008] MS는 좀더 흔한 염증성 신경성 질환중에 하나다. 이는 인간 중추 신경계 (CNS)의 염증성 및 탈수초화 퇴행성 질환이다. 미국에서만 대략 300,000명이 앓고 있는 전세계적 질환이다. MS를 앓고 있는 대부분의 사람 (케이스의 약 70%-80%)은 20-40대에 개시되었다. MS는 임상 과정, 자기 공명 영상 (MRI) 스캔 평가, 그리고 생검 및 부검의 재료의 병리학 분석에 기초하여 이질적 장애다. 이 질환은 척추, 뇌간(brainstem), 뇌 신경, 소뇌, 뇌, 그리고 인지 증후군들을 포함하는 많은 결함의 가능한 조합에서 자체로 명백하다. 진행성 신체장애는 MS 환자 대부분의 운명이다. MS 환자들의 대략 절반은 질환의 개시 15년 이내에 걷을 때 지팡이가 필요하다.

[0009] MS는 완전한 또는 부분적인-되돌아가는 촛점 신경성 결함들을 특징으로 하는 임상 재발에서 대부분의 경우(약 80%)에 존재한다. 이러한 형태의 MS는 재발-경감 MS (relapsing-remitting multiple sclerosis, RRMS)로 알려져 있고, 그리고 염증 및 부종이 우세하다. CNS의 활성 염증은 MRI상에서 백질 병소들을 강조하는 가돌리늄으로 볼 수 있다. 약 39세 중반 이후, RRMS 케이스의 대략 절반은 MRI에 의해 탐지될 때 임상 재발 또는 새로운 백질 병소들 없이 비가역성 신경계 결함이 점차 축적된다. 이 단계의 질환은 2차 진행성 MS (SPMS) 또는 만성 질환으로 알려져 있다. RRMS가 없는 환자의 20%는 질병의 개시이후 진행성 임상 악화가 있는데, 이는 1차 진행성 MS (PPMS)으로 알려져 있으며, 이는 또다른 형태의 만성 질환이다.

[0010] 현재, 급성 MS 재발은 고-용량(dose), 단기 정맥내 코르티코스테로이드로 보통 치료된다. 이런 치료는 재발 기간을 단축시키지만, 회복 정도 또는 질환의 장기 과정을 개선시키지 않는다. USA에서 승인된 현재 몇 가지 승인된 질환-조절 요법이 있는데, 이들은 임상 재발비율을 낮추고, 다음 재발까지의 시간을 연장시키고 및/또는 MRI에서 새로운 병소들의 축적을 감소시키는 경향이 있다. 그러나, 이들 요법은 재발-경감 단계 동안 특히 MS를 치료하는데 단지 중간수준의 효과만 있다. 이들 치료는 질환의 진행을 단순히 지체시키지만, 재수초화를 야기하지는 못한다.

[0011] SLE는 신체내 다양한 장기에 영향을 주는 염증성 질환이다. SLE를 앓고 있는 대상은 다양한 신경성 장애들 이를테면 두통, 인격 변조, 기질적 뇌 증후군, 말초신경병증, 감각 신경병증, 편집증, 조병, 및 정신분열증을 포함하는 정신적 문제들, 간질, 횡단성 척추염, 그리고 중풍 및 뇌졸중이 발생할 수 있다. 이들 변화중 일부는 항

인지질 항체 (가령, 항-카르디오리핀 항체) 및/또는 혈전증에 의해 야기될 수 있는데, 이들 항체는 중추 신경계의 세포들에 결합하여, 기능을 파괴할 수 있다.

[0012] 낭창에 대한 통상적인 약리적 치료는 코르티코스테로이드 또는 면역억제성 약물들의 사용을 포함하는데, 이 둘 모두 바람직하지 못한 부작용을 가지며, 발생되는 증후들을 단순히 치료한다.

[0013] 기타 염증성 신경성 질환은 예를 들면, 면역억제성 약물들, 코르티코스테로이드, 혈장사혈 또는 정맥내 면역글로블린을 이용하여 치료되는데, 이들 각각은 감염의 위험 또는 기타 부작용을 수반한다.

[0014] 따라서 염증성 신경성 질환을 치료하는데 유용한 새로운 요법이 이 업계에 필요하다는 것은 당업계 숙련자에게 자명할 것이다.

[0015] **요약**

[0016] 발명자들은 염증성 신경성 질환, 이를테면, 만성 마비성 실험적 염증성 뇌척수염 (EAE)의 인정된 동물 모델에서 STRO-1^{+} 다능성 세포 조제물(preparations)의 효과를 연구하였다. 발명자들은 EAE의 유도 이후 투여된 STRO-1^{+} 세포들이 이 질환의 심각성을 감소시켰다는 사실을 알았다.

[0017] STRO-1^{+} 세포들은 항원으로 기존에 면역화된 동물로부터 유도된 T 세포들에 의한 항원에 대항하는 면역 반응을 막았다는 사실도 발명자들은 또한 알았다.

[0018] 본 개시내용은 염증성 신경성 질환을 치료 또는 예방하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 STRO-1^{+} 세포들 및/또는 그의 후손 및/또는 그로부터 유래된 가용성 인자들이 농축된 세포들의 집단(a population of cells enriched for STRO-1^{+} cells and/or progeny thereof and/or soluble factors derived therefrom)을 대상에게 투여하는 것을 포함한다.

[0019] 한 실시예에서, 염증성 신경성 질환은 염증성 자극에 대한 T 세포 반응과 연관되거나 또는 이로 인하여 발생된다.

[0020] 한 실시예에서, 이 방법은 STRO-$1^{밝음}$ 세포들 및/또는 그의 후손 및/또는 그로부터 유래된 가용성 인자들이 농축된 세포들의 집단을 투여하는 것을 포함한다.

[0021] 한 실시예에서, 염증성 신경성 질환은 다발성 경화증, 전신 홍반성 낭창, 길랑-바레 증후군, 람베르트-이튼 근무력 증후군, 근무력증, 횡단성 척추염, 백질이영양증 및 진행성 다소성 백질 뇌병증으로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0022] 한 실시예에서, 이 질환은 전신 홍반성 낭창이다.

[0023] 또다른 실시예에서, 이 질환은 다발성 경화증이다. 한 실시예에서, 이 질환은 만성 진행성 형태의 다발성 경화증이다. 또다른 실시예에서, 이 질환은 재발-경감 형태의 다발성 경화증이다.

[0024] 한 실시예에서, 이 방법은 STRO-$1^{밝음}$ 세포들 및/또는 그의 후손 및/또는 그로부터 유래된 가용성 인자들이 농축된 세포들의 집단을 투여하는 것을 포함한다. 한 실시예에서, 이 후손은 추가적으로 STRO-$1^{밝음}$ 세포들에 대해 농축된다.

[0025] 예시적인 세포들 및/또는 후손은 추가적으로 조직 비-특이적 알칼리 포스파타제 (TNAP) 및/또는 열 쇼크 단백질 90β (HSP90p) 및/또는 CD146을 발현시킨다.

[0026] 한 실시예에서, 세포들의 집단은 골수 또는 치수(dental pulp)로부터 유도된다.

[0027] 한 실시예에서, STRO-1^{+} 세포들 및/또는 그의 후손 및/또는 그로부터 유래된 가용성 인자들이 농축된 집단은 전신으로 투여된다. 예를 들면, STRO-1^{+} 세포들 및/또는 그의 후손 세포들 및/또는 그로부터 유래된 가용성 인자들이 농축된 세포들의 집단은 정맥내, 동맥내, 근육내, 피하내, 심장의 심방 또는 심실, 또는 염증성 신경 질환에 영향을 받은 장기에 연결된 혈관으로 투여될 수 있다. 예를 들면, 이 집단 및/또는 후손 및/또는 가용성 인자들은 정맥내로 투여된다.

[0028] 또다른 실시예에서, STRO-1^{+} 세포들 및/또는 그의 후손 및/또는 그로부터 유래된 가용성 인자들이 농축된 집단

은 뇌 척수액으로 또는 중추 신경계로 투여된다.

[0029] 추가 실시예에서, STRO-1^+ 세포들 및/또는 그의 후손 및/또는 그로부터 유래된 가용성 인자들이 농축된 집단은 질환의 부위, 가령, 미엘린 퇴행 부위에 투여된다.

[0030] 재발-경감 질환 (가령, 재발-경감 MS)의 경우, 이들 세포는 이 질환의 방지 또는 재발 지연을 위하여 질환 재발 동안 투여될 수 있다.

[0031] 한 실시예에서, 이 방법은 STRO-1^+ 세포들 및/또는 그의 후손 및/또는 그로부터 유래된 가용성 인자들이 농축된 집단의 유효량을 투여하는 것을 포함한다. 한 실시예에서, 유효량은 대상에서 및/또는 발병 부위에서 조절성 T(Treg)의 수를 증가시키는데 충분한 양이다.

[0032] 임의의 실시예에 따라 본 명세서에서 개시된 예시적인 방법은 염증성 신경성 질환의 임상적 평가를 개선하는데 및/또는 염증성 신경성 질환과 연합된 항원에 대항한 면역 반응을 감소 또는 방지하는데 충분한 이 집단 및/또는 이 후손 및/또는 가용성 인자들의 용량을 투여하는 것을 포함한다.

[0033] 한 실시예에서, 이 방법은 이 집단 및/또는 후손 및/또는 가용성 인자들의 효과적인 용량 또는 치료요법적으로 효과적인 용량을 투여하는 것을 포함한다.

[0034] 한 실시예에서, 이 방법은 kg당 1 x 10^4 내지 5 x 10^6의 STRO-1^+ 세포들 및/또는 그의 후손을 투여하는 것을 포함한다. 예를 들면, 이 방법은 kg당 1 x 10^5 내지 1 x 10^6의 STRO-1^+ 세포들 및/또는 그의 후손을 투여하는 것을 포함한다. 예를 들면, 이 방법은 kg당 2 x 10^5 내지 8 x 10^5의 STRO-1^+ 세포들 및/또는 그의 후손을 투여하는 것을 포함한다. 예를 들면, 이 방법은 kg당 약 2 x 10^5의 STRO-1^+ 세포들 및/또는 그의 후손의 투여 또는 kg당 4 x 10^5의 STRO-f 세포들 및/또는 그의 후손의 투여, 또는 kg당 약 8 x 10^5의 STRO-1^+ 세포들 및/또는 그의 후손을 투여하는 것을 포함한다.

[0035] 한 실시예에서, 임의의 실시예에 따라 본 명세서에서 개시된 방법은 낮은 용량의 STRO-1^+ 세포들 및/또는 그의 후손을 투여하는 것을 포함한다. 예를 들면, 낮은 용량의 STRO-1^+ 세포들 및/또는 그의 후손은 kg당 1 x 10^3 내지 3 x 10^5의 STRO-1^+ 세포들 및/또는 그의 후손을 포함한다.

[0036] 한 실시예에서, 이 집단 및/또는 이 후손 및/또는 가용성 인자들은 많은 횟수로 투여된다. 예를 들면, 이 집단 및/또는 이 후손 및/또는 가용성 인자들은 한 주에 다수로, 또는 4주 또는 그 이상의 주 동안 1회 투여된다.

[0037] 한 실시예에서, 이 집단 및/또는 이 후손 및/또는 가용성 인자들은 염증성 신경성 질병의 진정동안 투여된다.

[0038] 또다른 실시예에서, STRO-1^+ 세포들 및/또는 그의 후손이 농축된 집단은 T 세포들의 자극을 차단시키기 위하여 분자를 발현시키도록 유전적으로 조작되고 및/또는 가용성 인자들은 이러한 유전적으로-변형된 세포들로부터 유래된다.

[0039] 또다른 실시예에서, STRO-1^+ 세포들 및/또는 그의 후손 및/또는 그로부터 유래된 가용성 인자들이 농축된 집단은 T 세포들의 자극을 차단시키는 화합물와 함께 투여된다.

[0040] STRO-1^+ 세포들 및/또는 후손 세포들이 농축된 집단은 자가(autogeneic) 또는 동종이계(allogeneic)이며 및/또는 이 가용성 인자들은 자가 또는 동종이계 세포들로부터 유도될 수 있다. 한 실시예에서,세포들의 집단 및/또는 후손 세포들은 동종이계이거나 및/또는 가용성 인자들은 동종이계 세포들의 것이다.

[0041] 실시예에서, STRO-1^+세포들 및/또는 후손 세포들이 농축된 집단은 투여에 앞서 및/또는 가용성 인자들을 획득하기에 앞서 배양 확장되었다.

[0042] 또다른 실시예에서, 본 명세서에서 설명된 방법은 면역억제성 물질을 투여하는 것을 더 포함한다. 이 면역억제성 물질은 전술한 이식된 세포들이 기능을 발휘할 수 있도록 충분한 시간동안 투여될 수 있다.

[0043] 본 개시내용은 항원에 대한 반응에서 면역 반응을 방지하는 방법을 또한 제공하는데, 이 방법은 STRO-1^+ 세포들

및/또는 그의 후손 및/또는 그로부터 유래된 가용성 인자들이 농축된 세포 집단을 이 대상에게 투여하는 것을 포함한다.

[0044] 한 실시예에서, 면역 반응은 T 세포-매개 면역 반응이다. 예시적인 T 세포-매개 면역 반응은 T 세포 증식을 포함한다.

[0045] 한 실시예에서, T 세포-매개 면역 반응은 특이적 항원에 대한 반응에서 억제되고, 또다른 항원에 대한 반응에서 T 세포-매개 면역 반응은 억제되지 않는다.

[0046] 한 실시예에서, 이 대상은 이 항원에 대한 면역 반응이 이미 생성되었고, 이 집단, 후손 및/또는 가용성 인자들은 이 항원에 대한 추가 면역 반응을 억제한다.

[0047] 한 실시예에서, 이 집단, 후손 및/또는 가용성 인자들은 이 대상에서 이 항원에 대한 면역 반응이 발행된 이후에 투여되고, 이로 인하여 이 항원에 대한 추가 면역 반응을 막는다.

[0048] 한 실시예에서, 면역 반응은 STRO-1^{+} 세포들 및/또는 그의 후손 및/또는 그로부터 유래된 가용성 인자들이 농축된 세포들의 집단 투여 후 최소한 약 24일 동안 억제된다.

[0049] 본 개시내용은 대상에서 항원에 대한 내성(tolerance)을 유도하는 방법을 또한 제공하는데, 이 방법은 STRO-1^{+} 세포들 및/또는 그의 후손 및/또는 그로부터 유래된 가용성 인자들이 농축된 세포 집단을 이 대상에게 투여하는 것을 포함한다.

[0050] 본 명세서에서 설명된 방법의 한 실시예에서 항원 또는 특이적 항원은 염증성 반응이 발생되는 항원이다. 예를 들면, 염증성 반응은 염증성 신경성 질환의 원인이다.

[0051] 임의의 실시예에 따라 본 명세서에서 개시된 방법의 한 실시예에서, STRO-1^{+} 세포들 및/또는 그의 후손 및/또는 그로부터 유래된 가용성 인자들이 농축된 세포 집단은 염증성 신경성 질환을 치료 또는 예방하는 화합물과 함께 투여된다. 예시적인 화합물은 글라티라머(glatiramer) 아세테이트 및/또는 베타 인터페론이다.

[0052] 이 화합물은 이 집단 및/또는 후손 및/또는 가용성 인자들과 혼합되거나 또는 이 집단 및/또는 후손 및/또는 가용성 인자들과 동시에 및/또는투여되기 전 또는 이후에 투여된다 (가령, 이 화합물 및 이 집단 및/또는 후손 및/또는 가용성 인자들은 동시에 장점을 제공하도록).

[0053] 본 개시내용은 염증성 신경성 질환의 치료 또는 예방에서의 용도 및/또는 항원에 대항하는 T 세포-매개 면역 반응을 억제하기 위하여 항원 및/또는 항원에 대한 내성을 유도하기 위한 용도로, STRO-1^{+} 세포들 및/또는 그의 후손 및/또는 그로부터 유래된 가용성 인자들이 농축된 세포 집단을 또한 제공한다.

[0054] 본 개시내용은 염증성 신경성 질환의 치료 또는 예방을 위한 약물 제조 및/또는 항원에 대항하는 T 세포-매개 면역 반응을 억제하기 위한 약물 제조 및/또는 항원 및/또는 항원에 대한 내성을 유도하기 위한 약물 제조에 있어서, STRO-1^{+} 세포들 및/또는 그의 후손 및/또는 그로부터 유래된 가용성 인자들이 농축된 세포 집단의 용도를 제공한다.

[0055] 본 개시내용의 각 실시예는 미엘린 파괴 및/또는 미엘린 또는 이의 성분에 대항하는 염증성 반응을 감소, 지연 또는 예방하는 방법에 적절한 변형을 가하여 적용시킬 수 있다.

[0056] 본 개시내용의 각 실시예는 신경계 또는 이의 성분에서 염증에 적절한 변형을 가하여 적용시킬 수 있다.

[0057] 본 개시내용의 각 실시예는 재수초화 또는 신경돌기 파생(outgrowth)을 유도 또는 촉진시키는 방법에 적절한 변형을 가하여 적용시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0058] 도 1. 성숙 인간 골수 다형핵 세포(BMMNC)에 의한 TNAP(STRO-3) 및 간엽성 전구 세포 마커, STRO-$1^{밝음}$의 공동-발현. 이중-칼라 면역형광과 유세포분석법은 FITC에 커플링된 염소 항-뮤린 IgM 항체로 간접적으로 표지된 STRO-1 MACS-선별된 BMMNC(x 축), 그리고 PE에 커플링된 염소 항-뮤린 IgG로 간접적으로 표지된 STRO-3 mAb(뮤린 IgG1)(y 축)의 배양에 의해 수행되었다. 점도표 히스토그램은 리스트모드 데이터(listmode data)로서 수집된 5 x 10^{4} 이벤트를 나타낸다. 수직선과 수평선은 동일한 조건 하에 처리된 아이소타입-정합된 대조 항체,

1B5(IgG)와 1A6.12(IgM)로 획득된 <1.0% 평균 형광의 반응성 수준으로 설정되었다. 이들 결과는 STRO-1^{밝음} 세포의 소수 집단이 TNAP(위쪽 오른쪽 사분면)을 공동-발현하지만, 나머지 STRO-1^{+} 세포가 STRO-3 mAb와 반응하지 않는다는 것을 증명한다.

도 2. 배양된 그리고 확장된 STRO-1$^{밝음(bri)}$ MPC의 STRO-1^{밝음} 또는 STRO-1$^{흐림(dim)}$ 후손의 유전자 발현 프로파일. 탈체 확장된 골수 MPC의 단일 세포 현탁액은 트립신/EDTA 처리에 의해 준비되었다. 세포들은 STRO-1 항체로 착색되며, 후속적으로 염소-항 뮤린 IgM-플루오레세인 이소티오시아네이트와 항온처리에 의해 나타난다. 형광 활성화된 세포 분류(A)이후, 전체 세포성 RNA는 STRO-1^{흐림} 또는 STRO-1^{밝음}을 발현시키는 세포들의 정제된 집단으로부터 준비된다. RNAzolB 추출 방법, 및 표준 절차들을 이용하여, 각 준집단으로부터 총 RNA를 단리시켰고, cDNA 합성을 위한 주형으로 이용되었다. 다양한 전사체들의 발현은 이미 언급된 것과 같이 표준 프로토콜을 이용한 PCR 증폭에 의해 평가되었다(Gronthos *et al. J Cell Sci.* 775:1827-1835, 2003). 본 연구에 이용된 프라이머 세트는 표 2에 나타낸다. 증폭 이후, 각 반응 혼합물은 1.5% 아가로즈 겔 전기영동에 의해 분석되고, 에티디움 브롬화물 착색에 의해 시각화되었다(B). 각 세포 표식에 대한 상대적인 유전자 발현은 ImageQant 소프트웨어를 이용하여 하우스-키핑(house-keeping) 유전자, GAPDH의 발현에 대한 기준으로 평가되었다(C).

도 3. 배양된 그리고 확장된 STRO-1^{+} MPC의 STRO-1^{밝음} 후손은 높은 수준의 SDF-1를 발현시키지만, STRO-1^{흐림} 후손은 발현되지 않는다. (A) STRO-1^{+} BMMNC의 MACS-단리된 조제물은 FACS를 이용하여, 영역, STRO-1^{밝음} 및 STRO-1$^{흐림/둔감(dull)}$에 따라 상이한 STRO-1 하위세트로 분할된다. 총 RNA는 각 STRO-1 하위집단으로부터 준비되었고, STRO-1^{밝음} 공제 혼성화 라이브러리를 구축하는데 이용되었다(B-C). 대표적인 PCR 산물로 블랏된 복제 니트로셀룰로오즈 필터들은 STRO-1^{밝음} 공제된 cDNA로 형질변환된 세균 클론으로부터 증폭되었다. 그 다음 필터들은 [^{32}P] 데옥시시티딘 삼인산염 (dCTP>-라벨된 STRO-1^{밝음}(B) 또는 STRO-1$^{흐림/둔감}$ (C) 공제된 cDNA로 프로브시켰다. 화살표는 인간 SDF-1에 대응하는 cDNA 단편을 내포하는 1 클론의 차등 발현을 나타낸다. (D) 역 전사효소(RT)-PCR 분석은 배양에 앞서, 새로 MACS/FACS-단리된 BMMNC STRO-1 집단으로부터 준비된 총 RNA에서 SDF-1 및 글리세르알데히드-3-인산염 탈수소효소 (GAPDH) 전사체들의 상대적 발현을 설명한다. bp는 염기쌍을 나타낸다.

도 4은 만성 진행성 EAE의 모델에서 평균 임상 질환 득점에서 MPC 치료의 효과를 보여주는 그래프다. C57BL/6 마우스는 0일 시점에 MOG35-55로 면역화되고, 그 다음 질환 유도후 8일, 10일 및 12일에 MPC를 정맥 주사하여 치료받았다. MPC의 투여량이 표시된다.

도 5는 MPC 치료가 만성 진행성 EAE에서 누적 질환 지수(평균 임상 질환 득점의 곡선 분석 아래 전체 면적)에서 용량-의존적 감소를 유도한다는 것을 보여주는 그래프다.

도 6은 **MOG35.55**로 자극 이후 자극안된 비장세포와 비교하여, **MOG35.55**로 면역화된 마우스로부터 단리된 비장세포의 증식에서 배수 변화를 보여주는 그래프다.

도 7은 PMA/이노마이신으로 비-특이적 재자극 이후 자극안된 비장세포와 비교하여, **MOG35.55**로 면역화된 마우스로부터 단리된 비장세포의 증식에서 배수 변화를 보여주는 그래프다.

서열 목록에서 핵심

SEQ ID NO: 1 GAPDH를 인코드하는 핵산 증폭을 위한 올리고뉴클레오티드

SEQ ID NO: 2 GAPDH를 인코드하는 핵산 증폭을 위한 올리고뉴클레오티드

SEQ ID NO: 3 SDF-1을 인코드하는 핵산 증폭을 위한 올리고뉴클레오티드

SEQ ID NO: 4 SDF-1을 인코드하는 핵산 증폭을 위한 올리고뉴클레오티드

SEQ ID NO: 5 IL-1β를 인코드하는 핵산 증폭을 위한 올리고뉴클레오티드

SEQ ID NO: 6 IL-1β를 인코드하는 핵산 증폭을 위한 올리고뉴클레오티드

SEQ ID NO: 7 FLT-1을 인코드하는 핵산 증폭을 위한 올리고뉴클레오티드

SEQ ID NO: 8 FLT-1을 인코드하는 핵산 증폭을 위한 올리고뉴클레오티드

SEQ ID NO: 9 TNF-α를 인코드하는 핵산 증폭을 위한 올리고뉴클레오티드

SEQ ID NO: 10 TNF-α를 인코드하는 핵산 증폭을 위한 올리고뉴클레오티드

SEQ ID NO: 11 KDR을 인코드하는 핵산 증폭을 위한 올리고뉴클레오티드

SEQ ID NO: 12 KDR을 인코드하는 핵산 증폭을 위한 올리고뉴클레오티드

SEQ ID NO: 13 RANKL을 인코드하는 핵산 증폭을 위한 올리고뉴클레오티드

SEQ ID NO: 14 RANKL을 인코드하는 핵산 증폭을 위한 올리고뉴클레오티드

SEQ ID NO: 15 렙틴(Leptin)을 인코드하는 핵산 증폭을 위한 올리고뉴클레오티드

SEQ ID NO: 16 렙틴을 인코드하는 핵산 증폭을 위한 올리고뉴클레오티드

SEQ ID NO: 17 CBFA-1을 인코드하는 핵산 증폭을 위한 올리고뉴클레오티드

SEQ ID NO: 18 CBFA-1을 인코드하는 핵산 증폭을 위한 올리고뉴클레오티드

SEQ ID NO: 19 PPARγ2를 인코드하는 핵산 증폭을 위한 올리고뉴클레오티드

SEQ ID NO: 20 PPARγ2를 인코드하는 핵산 증폭을 위한 올리고뉴클레오티드

SEQ ID NO: 21 OCN을 인코드하는 핵산 증폭을 위한 올리고뉴클레오티드

SEQ ID NO: 22 OCN을 인코드하는 핵산 증폭을 위한 올리고뉴클레오티드

SEQ ID NO: 23 MyoD를 인코드하는 핵산 증폭을 위한 올리고뉴클레오티드

SEQ ID NO: 24 MyoD를 인코드하는 핵산 증폭을 위한 올리고뉴클레오티드

SEQ ID NO: 25 SMMHC를 인코드하는 핵산 증폭을 위한 올리고뉴클레오티드

SEQ ID NO: 26 SMMHC를 인코드하는 핵산 증폭을 위한 올리고뉴클레오티드

SEQ ID NO: 27 GFAP를 인코드하는 핵산 증폭을 위한 올리고뉴클레오티드

SEQ ID NO: 28 GFAP를 인코드하는 핵산 증폭을 위한 올리고뉴클레오티드

SEQ ID NO: 29 네스틴(Nestin)을 인코드하는 핵산 증폭을 위한 올리고뉴클레오티드

SEQ ID NO: 30 네스틴을 인코드하는 핵산 증폭을 위한 올리고뉴클레오티드

SEQ ID NO: 31 SOX9를 인코드하는 핵산 증폭을 위한 올리고뉴클레오티드

SEQ ID NO: 32 SOX9를 인코드하는 핵산 증폭을 위한 올리고뉴클레오티드

SEQ ID NO: 33 콜라겐 유형 X를 인코드하는 핵산 증폭을 위한 올리고뉴클레오티드

SEQ ID NO: 34 콜라겐 유형 X를 인코드하는 핵산 증폭을 위한 올리고뉴클레오티드

SEQ ID NO: 35 어그레칸(Aggrecan)을 인코드하는 핵산 증폭을 위한 올리고뉴클레오티드

SEQ ID NO: 36 어그레칸을 인코드하는 핵산 증폭을 위한 올리고뉴클레오티드

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0059] 일반적 기술 및 선택된 정의들

[0060] 명세서를 통하여, 다른 언급이 없는 한 또는 내용이 다른 것들을 요구하지 않는 한다, 이들 단계중 하나 및 다수(가령, 하나 또는 그 이상), 문제의 조성물의 단계들의 집단 또는 집단을 포괄하도록 단일 단계, 문제의 조성물, 문제의 조성물의 단계들의 집단 또는 집단에 대한 언급이 있을 것이다.

[0061] 본 명세서에서 기술된 각 실례는 다른 명시적 언급이 없는 한, 본 개시내용의 각 실례 및 모든 다른 실례에 대해 필요한 변경을 하여 적용될 수 있다.

[0062] 본 개시내용은 명시적으로 언급된 것 이외의 다양한 변화 및 수정을 서용할 수 있다는 것을 당업계 숙련자들은 인지할 것이다. 본 개시내용은 이러한 모든 변화 및 수정을 포함하는 것으로 이해된다. 본 개시내용은 이 명

세서에서 개별적으로 또는 집합적으로 언급된 또는 표시된 모든 단계들, 특징들, 조성물들 및 화합물들, 그리고 전술한 단계들 또는 특징들의 임의의 그리고 모든 조합들 또는 임의의 두 개 또는 그 이상의 전술한 단계들 또는 특징들을 또한 포함한다.

[0063] 본 개시내용은 본 명세서에서 기술된 특정 실시예들에 의해 그 범위가 제한되지 않으며, 이들 실례는 설명을 목적으로만 의도된 것이다. 기능적으로 등가의 산물들, 조성물들 그리고 방법들은 개시내용의 범위내에 명백히 있다.

[0064] 본 개시내용은 다른 언급이 없는 한, 분자 생물학, 미생물학, 바이러스학, 재조합 DNA 기술, 용액에서 펩티드 합성, 고형상 펩티드 합성, 그리고 면역학의 통상적인 기술을 이용하여 과도한 실험없이 실시된다. 이러한 과정들은 예를 들면, Sambrook, Fritsch & Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories, New York, Second Edition (1989), Vols I, II, 및 III 전체; DNA Cloning: A Practical Approach, Vols. I and II (D. N. Glover, ed., 1985), IRL Press, Oxford, 전체 내용; Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach (M. J. Gait, ed, 1984) IRL Press, Oxford, 전체 내용, 그리고 Gait, ppl-22의 논문; Atkinson *et al*, pp35-81; Sproat *et al*, pp 83-1 15; 및 Wu *et al*, pp 135-151; 4. Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach (B. D. Hames & S. J. Higgins, eds., 1985) IRL Press, Oxford, 전체 내용; Immobilized Cells and Enzymes: A Practical Approach (1986) IRL Press, Oxford, 전체 내용; Perbal, B., A Practical Guide to Molecular Cloning (1984); Methods In Enzymology (S. Colowick and N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.), 시리즈 전체; J.F. Ramalho Ortigao, "The Chemistry of Peptide Synthesis" In: Knowledge database of Access to Virtual Laboratory website (Interactiva, Germany); Sakakibara, D., Teichman, J., Lien, E. Land Fenichel, R.L. (1976). *Biochem. Biophys. Res. Commun. 73* 336-342; Merrifield, R.B. (1963). *J. Am. Chem. Soc. 85,* 2149-2154; Barany, G. and Merrifield, R.B. (1979) in The Peptides(Gross, E. and Meienhofer, J. eds.), vol. 2, pp. 1-284, Academic Press, New York. 12. Wunsch, E., ed. (1974) Synthese von Peptiden in Houben-Weyls Metoden der Organischen Chemie (Miiler, E., ed.), vol. 15, 4th edn., Parts 1 and 2, Thieme, Stuttgart; Bodanszky, M. (1984) Principles of Peptide Synthesis, Springer-Verlag, Heidelberg; Bodanszky, M. & Bodanszky, A. (1984) The Practice of Peptide Synthesis, Springer-Verlag, Heidelberg; Bodanszky, M. (1985) *Int. J. Peptide Protein Res. 25*, 449-474; Handbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds., 1986, Blackwell Scientific Publications); and Animal Cell Culture: Practical Approach, Third Edition (John R. W. Masters, ed., 2000), ISBN 0199637970, 전체 내용에 기술된다.

[0065] 명세서를 통하여, 다른 언급이 없는 한, 단어 "포함하다(comprise)" 또는 "포함하다(comprises)" 또는 "포함하는(comprising)"과 같은 변형은 언급된 단계 또는 요소 또는 정수(integer) 또는 단계들 또는 요소들 또는 정수들의 집단을 포함하나 그러나 임의의 다른 단계 또는 요소 또는 정수 또는 요소들 또는 정수들의 집단을 배제하지 않는다는 의미로 이해될 것이다.

[0066] 본 명세서에서 사용된 것과 같이, "~로부터 유도된"은 특정 원천으로부터 반드시 직접적으로 유도될 필요는 없지만, 해당 원천으로부터 명시된 완전체(integer)를 획득할 수 있다. STRO-1^+ 세포들 및/또는 그의 후손 세포들로부터 유도된 가용성 인자들의 내용에서, STRO-1^+ 세포들 및/또는 그의 후손 세포들을 시험관에서 배양하는 동안 생성된 하나 또는 그 이상의 인자들, 가령, 단백질들, 펩티드들, 탄수화물들, 등을 의미할 것이다.

[0067] 본 명세서에서 이용된 것과 같이, 용어 "염증성 신경성 질환"은 염증성 반응, 및 일부 실시예에서는 자가면역 반응으로 인하여 뉴런 신호생성 및/또는 뉴런 기능이상 및/또는 뉴런 세포 사멸에 결함을 특징으로 하는 임의의 장애를 포함할 것이다. 한 실시예에서, 염증성 신경성 장애는 미엘린 퇴행 및/또는 신경계의 성분들, 이를 테면, 예를 들면 미엘린의 성분 또는 인지질 또는 강글리오시드에 대항하는 자가항체들에 의해 야기되는 또는 연합된 장애다. 염증성 신경성 질환은 1차 질환 또는 기존 질환, 가령, 일부 경우들에서 SLE의 합병증일 수 있다.

[0068] 본 명세서에서 이용된 것과 같이, 용어 "유효량"은 대상에서 신경성 질환의 원인이 되는 또는 이와 연합된 염증성 반응을 감소시키는데 충분한 양의 STRO-1^+ 세포들 및/또는 그의 후손 세포들 및/또는 그로부터 유래된 가용성 인자들을 의미한다. 예를 들면, STRO-1^+ 세포들 및/또는 그의 후손 세포들 및/또는 그로부터 유래된 가용성 인자들의 유효량은 자기 공명 영상 (MRI) 및/또는 미엘린에 대항하는 자가항체 및/또는 CSF에서 올리고클론 밴드를 이용하여 탐지가능한, 뇌 또는 척추에서 병소들을 감소시킬 수 있다.

[0069] 본 명세서에서 이용된 것과 같이, 용어 "치료요법적으로 유효량"은 임상 염증성 신경성 질환의 하나 또는 그 이상의 증상을 감소 또는 저해시키는데 있어서 STRO-1^+ 세포들 및/또는 그의 후손 세포들 및/또는 그로부터 유래된 가용성 인자들의 충분한 양을 의미한다.

[0070] 본 명세서에서 이용된 것과 같이, 용어 "예방적으로 유효량"은 임상 염증성 신경성 질환의 하나 또는 그 이상의 탐지가능한 증상들을 방지 또는 저해 또는 개시의 지연하는데 있어서 STRO-1^+ 세포들 및/또는 그의 후손 세포들 및/또는 그로부터 유래된 가용성 인자들의 충분한 양을 의미한다.

[0071] 본 명세서에서 이용된 것과 같이, 용어 "낮은 용량(low dose)"은 $0.7x10^6$ 미만의 STRO-1^+ 세포들 및/또는 그의 후손의 양을 의미하지만, 염증성 신경성 질환을 야기하는 또는 이와 연합된 및/또는 염증성 신경성 질환을 치료 또는 예방하기 위하여 대상에서 지질 및/또는 지단백질 수준에 충분한 양을 의미한다. 예를 들면, 낮은 용량은 0.5×10^6 또는 이보다 적은 세포들, 또는 0.4×10^6 이보다 적은 세포들 또는 0.3×10^6 이보다 적은 세포들 또는 0.2×10^6 이보다 적은 세포들을 포함한다.

[0072] 본 명세서에서 이용된 것과 같이, 용어 "치료하다(treat)" 또는 "치료(treatment)" 또는 "치료하는(treating)"은 치료요법적으로 유효량의 가용성 인자들 및/또는 세포들을 투여하고, 염증성 신경성 질병과 연합된 또는 이로 인한 임상 질병의 최소한 하나의 증상을 감소 또는 저해시킨다는 것을 의미하는 것으로 이해된다.

[0073] 본 명세서에서 이용된 것과 같이, 용어 "방지하다(prevent)" 또는 "방지하는(preventing)" 또는 "방지(prevention)"는 예방적으로 유효량의 가용성 인자들 및/또는 세포들을 투여하고, 그리고 임상 염증성 신경성 질병의 최소한 하나의 증상의 발생 또는 진행을 중단 또는 방해 또는 지연시킨다는 것을 의미한다.

[0074] 본 명세서에서 사용된 것과 같이, 용어 "가용성 인자"는 물 용해성인 STRO-1^+ 세포 및/또는 이들의 후손에 의해 생산된, 임의의 분자, 예를 들면, 단백질, 펩티드, 당단백질, 당펩티드, 지질단백질, 지질펩티드, 탄수화물 등을 의미할 때 사용된다. 이런 가용성 인자는 세포내의 것이고 및/또는 세포에 의해 분비될 수 있다. 이런 가용성 인자는 복잡한 혼합물(가령, 상층액) 및/또는 이의 분획이고 및/또는 정제된 인자일 수 있다. 본 개시내용의 한 실시예에서, 가용성 인자는 상층액이거나 이에 포함된다. 따라서 하나 또는 그 이상의 가용성 인자의 투여에 관한 본 명세서에서 임의의 실시예는 상층액의 투여에 준용될 수 있는 것으로 간주된다.

[0075] 본 명세서에서 사용된 것과 같이, 용어 "상층액(supernatant)"은 적합한 배지, 가령, 액상 배지에서 간엽성 전구 세포들 및/또는 그의 후손을 시험관내에서 배양한 후 생성된 비-세포성 물질을 지칭한다. 전형적으로, 상층액은 적합한 조건 및 시간하에 배지에서 세포를 배양하고, 이어서 원심분리와 같은 과정에 의해 세포성 물질을 제거함으로써 생산된다. 상층액은 투여 전 추가 정제 단계를 거치거나 또는 거치지 않을 수 있다. 한 실례에서, 상층액은 10^5 미만의 세포들, 10^4 미만, 예를 들면, 10^3 미만의 세포, 가령, 살아있는 세포가 없다.

[0076] 본 명세서에서 이용된 것과 같이, 용어 "항원에 대한 면역 반응을 막는다"는 임의의 실시예에 따라 본 명세서에서 개시된 집단 및/또는 후손 및/또는 가용성 인자들이 기존 면역 반응을 억제하는 것과는 반대로, 면역 반응의 발생을 지연 및/또는 감소 및/또는 중단시킨다는 것으로 이해될 것이다.

[0077] 본 명세서의 일부 실시예들에서, 항원에 대한 면역 반응을 방지하는 것에 대한 개시내용의 실시예는 기존 항원에 대한 면역 반응을 감소 또는 저해시키는데 준용될 것이다.

[0078] 본 명세서에서 사용된 것과 같이, 용어 "정상 또는 건강한 개인"은 당분야에 공지된 임의의 방법에 의해 및/또는 본 명세서에서 설명된 방법에 평가될 때 염증성 신경성 질병을 겪지 않는 대상을 의미할 때 사용된다.

[0079] 본 명세서에서 이용된 것과 같이, 용어 "글라티라머 아세테이트"는 상표명 Copaxone으로 현재 시판되는, 미엘린 기본 단백질에서 발견되는 발견되는 4가지 아미노산, 즉 글루타민산, 리신, 알라닌, 및 티로신의 무작위 폴리머를 포함하는 면역조절 약물을 의미하는 것으로 이해될 것이다.

[0080] STRO-1^+ 세포들 또는 후손 세포들, 및 그로부터 유래된 상층액 또는 하나 이상의 가용성 인자들

[0081] STRO-1^+ 세포는 골수, 혈액, 치수 세포, 지방 조직, 피부, 비장, 췌장, 뇌, 신장, 간, 심장, 망막, 뇌, 모낭, 장, 폐, 림프절, 흉선, 골, 인대, 힘줄, 골격근, 피부, 그리고 골막에서 발견되는 세포들이고; 그리고 생식세포주(germ line) 예를 들면, 중배엽(mesoderm) 및/또는 내배엽(endoderm) 및/또는 외배엽(ectoderm)으로 분화될

수 있다.

[0082] 한 실시예에서, STRO-1^{+} 세포는 지방성, 골질, 연골성, 탄성, 근육성, 그리고 섬유성 연결 조직이 포함되지만 이들에 국한되지 않는 다수의 세포 유형으로 분화할 수 있는 다능성 세포이다. 이들 세포가 들어가는 특정한 계통 결정(lineage-commitment)와 분화 경로는 기계적 영향 및/또는 내인성 생물활성 인자, 예를 들면, 성장 인자, 사이토킨, 및/또는 호스트 조직에 의해 확립된 국소 미세환경 조건(local microenvironmental condition)으로부터 다양한 영향에 좌우된다. 따라서 STRO-1^{+} 다능성 세포는 분열하여 딸 세포를 산출하는 비-조혈성 기원 세포이고, 이들은 줄기 세포이거나, 또는 때가 되면, 비가역적으로 분화하여 표현형 세포를 산출하는 전구 세포이다.

[0083] 한 실시예에서, STRO-1^{+} 세포는 개체, 예를 들면, 치료되는 개체 또는 관련된 개체 또는 관련 없는 개체(동일한 종 또는 상이한 종인지에 상관없이)로부터 획득된 샘플로부터 농축된다. 본 명세서에서, 용어 "농축되는(enriched)", "농축(enrichment)" 또는 이의 변형은 세포의 처리되지 않은 집단(가령, 고유 환경에서 세포)과 비교할 때, 한 가지 특정 세포 유형의 비율 또는 다수의 특정 세포 유형의 비율이 증가되는 세포의 집단을 기술하는데 이용된다. 한 실례에서, STRO-1^{+} 세포들에 대해 농축된 집단은 적어도 약 0.1% 또는 0.5% 또는 1% 또는 2% 또는 5% 또는 10% 또는 15% 또는 20% 또는 25% 또는 30% 또는 50% 또는 75% STRO-1^{+}_ 세포들을 포함한다. 이에 대해, 용어 "STRO-1^{+} 세포들에 대해 농축된 세포들의 집단"은 "X% STRO-1* 세포들을 포함하는 세포 집단"에 대한 명백한 뒷받침을 제공하기 위해 사용되며, 이때 X%는 본 명세서에서 언급된 백분율이다. STRO-1^{+} 세포들은 일부 실례들에서, 클론생성 콜로니, 가령 CFU-F (fibroblasts)를 형성하고 또는 이의 하위 집단(가령, 50% 또는 60% 또는 70% 또는 70% 또는 90% 또는 95%)은 이 활성을 보유할 수 있다.

[0084] 한 실시예에서, 세포들의 집단은 선택가능한 형태의 STRO-1^{+} 세포들을 포함하는 세포 조제물로부터 농축된다. 이 점에 있어서, 용어 "선택가능한 형태"는 이 세포들이 STRO-1^{+} 세포들의 선별을 허용하는 마커(가령, 세포 표면 마커)를 발현시킨다는 것으로 이해될 것이다. 이 마커는 STRO-1일 수 있지만, 반드시 그렇지는 않다. 예를 들면, 본 명세서에서 설명된 및/또는 구체화된 것과 같이, STRO-2 및/또는 STRO-3 (TNAP) 및/또는 STRO-4 및/또는 VCAM-1 및/또는 CD146 및/또는 3G5를 발현시키는 세포들(가령, MPC)은 또한 STRO-1를 발현시킨다(그리고 STRO-1^{밝음}일 수 있다). 따라서, 세포들이 STRO-1^{+} 이라는 표시는 이 세포들이 STRO-1 발현에 의해 선택될 수 있다는 것을 의미하지 않는다. 한 실례에서, 이 세포들은 적어도 STRO-3 발현에 의해 선택되는데, 가령, 이들은 STRO-3^{+} (TNAP*)이다.

[0085] 세포 또는 이의 집단의 선택에 대한 언급은 특정 조직 원천으로부터 선택을 요구하지 않는다. 본 명세서에서 기술된 것과 같이, STRO-1* 세포들은 방대한 원천으로부터 선택되거나 또는 단리되거나 농축될 수 있다. 즉, 일부 실시예들에서, 이들 용어는 STRO-1* 세포들 (가령, MPC) 또는 맥관화된 조직을 포함하는 임의의 조직으로부터 또는 혈관주위세포 (가령, STRO-1* 혈관주위세포) 또는 본 명세서에서 언급된 임의의 하나 또는 그 이상의 조직을 포함하는 것으로부터 선택을 위한 뒷받침을 제공한다.

[0086] 한 실시예에서, 본 개시내용에 이용된 세포는 TNAP*, VCAM-1*, THY-1*, STRO-4*(HSP-90p), STRO-2*, CD45*, CD146*, 3G5* 또는 이들의 임의의 조합으로 구성된 군에서 개별적으로 또는 집단적으로 선택되는 하나 또는 그 이상의 마커를 발현한다.

[0087] "개별적으로"는 본 발명이 언급된 마커 또는 마커의 그룹을 하나하나씩 포함하고, 그리고 개별 마커 또는 마커의 그룹이 본 명세서에 하나하나씩 열거되지 않았음에도 불구하고, 첨부된 청구항이 이런 마커 또는 마커의 그룹을 하나하나씩 및 서로로부터 나누어 정의한다는 것을 의미한다.

[0088] "집단적으로"는 본 발명이 임의의 숫자 또는 조합의 언급된 마커 또는 마커의 그룹을 포함하고, 그리고 이런 숫자 또는 조합의 마커 또는 마커의 그룹이 본 명세서에 구체적으로 열거되지 않았음에도 불구하고, 첨부된 청구항이 이런 조합 또는 하위-조합을 하나하나씩, 그리고 임의의 다른 조합의 마커 또는 마커의 그룹으로부터 나누어 정의한다는 것을 의미한다.

[0089] 한 실시예에서, STRO-1^{+} 세포는 STRO-1$^{밝음(bright)}$(동의어, STRO-1$^{밝음(bri)}$)이다. 한 실시예에서, Stro-1^{밝음} 세포는 STRO-1^{흐림} 또는 STRO-1^{중간} 세포에 비하여 우선적으로 농축된다.

[0090] 한 실시예에서, STRO-1^{밝음} 세포는 추가적으로, TNAP^{+}, VCAM-1^{+}, THY-1^{+}, , STRO-4^{+} (HSP-90p), STRO-2^{+} 및/또는 CD146^{+} 중에서 하나 또는 그 이상이다. 예를 들면, 이 세포들은 전술한 마커들중 하나 또는 그 이상에 대해 선택되고 및/또는 전술한 마커들중 하나 또는 그 이상을 발현하는 것으로 보인다. 이점에 있어서, 기존에 농축된 또는 단리된 세포들이라기 보다는 명시적으로 테스트할 필요가 없는 마커을 발현하는 것으로 나타난 세포들이 테스트되고, 그리고 후속적으로 이용되며, 단리된 또는 농축된 세포들은 동일한 마커을 또한 발현하는 것으로 합당하게 추정될 수 있다.

[0091] 한 실례에서, 간엽성 전구 세포는 WO 2004/85630에서 정의된 바와 같은 혈관주위 간엽성 전구 세포이다. 예를 들면, 간엽성 전구 세포들은 혈관주위 세포의 표식을 발현시키는데, 가령, 이들 세포는 STRO-1^{+} 또는 STRO-1^{밝음} 및/또는 3G5^{+}이다. 한 실시예에서, 이들 세포는 맥관화된 조직 또는 장기들 또는 이의 일부로부터 단리된 세포들 또는 기존의 세포들 또는 세포들의 후손이다.

[0092] 소정의 마커에 대해 "양성"인 것으로 지칭되는 세포는 마커가 세포 표면 상에 존재하는 정도에 따라, 상기 마커를 낮은(lo 또는 흐림) 또는 높은(밝음(bright), 밝음(bri)) 수준으로 발현할 수 있고, 여기서 이들 용어는 세포의 분류 과정에 이용된 형광 또는 다른 마커의 강도에 관계한다. lo(또는 흐림 또는 둔감) 및 밝음의 구별은 분류되는 특정 세포 집단에서 이용된 마커의 문맥에서 이해될 것이다. 소정의 마커에 대해 "음성"인 것으로 지칭되는 세포는 상기 세포로부터 반드시 완전하게 존재하지 않는 것은 아니다. 이 용어는 마커가 상기 세포에 의해 상대적으로 매우 낮은 수준에서 발현되고, 그리고 검출가능하게 표지될 때 매우 낮은 신호를 발생시키거나, 또는 배경 수준, 예를 들면, 아이소타입 대조 항체를 이용하여 검출된 수준 이상으로 검출되지 않는다는 것을 의미한다.

[0093] 본 명세서에서 이용된, 용어 "밝음"은 검출가능하게 표지될 때 상대적으로 높은 신호를 발생시키는 세포 표면 상에 마커를 지칭한다. 이론에 한정됨 없이, "밝음" 세포는 샘플 내에 다른 세포보다 표적 마커 단백질(가령, STRO-1에 의해 인식되는 항원)을 더욱 많이 발현하는 것으로 제안된다. 가령, STRO-1^{밝음} 세포는 형광 활성화 세포 분류(FACS) 분석에 의한 측정에서 FITC-접합된 STRO-1 항체로 표지될 때, 비-밝음 세포 (STRO-1$^{둔감/흐림}$)보다 더욱 큰 형광 신호를 발생시킨다. 한 실례에서, "밝음" 세포는 출발 샘플 내에 포함된 가장 밝게 표지된 골수 단핵 세포 중에서 적어도 약 0.1%를 구성한다. 다른 실례들에서, "밝음"세포는 출발 샘플 내에 포함된 가장 밝게 표지된 골수 단핵 세포 중에서 적어도 약 0.1%, 적어도 약 0.5%, 적어도 약 1%, 적어도 약 1.5%, 또는 적어도 약 2%를 구성한다. 한 실시예에서, **STRO-1**^{밝음} 세포는 "배경", 다시 말하면, **STRO-1"** 세포에 비하여, **STRO-1** 표면 발현의 2 로그 크기(log magnitude) 높은 발현을 갖는다. 그에 비해, **STRO-1**^{흐림} 및/또는 **STRO-1**^{중간} 세포는 "배경"보다 STRO-1 표면 발현의 2 로그 크기 이하, 전형적으로 약 1 로그 또는 그 이하 높은 발현을 갖는다.

[0094] 본 명세서에서, 용어 "TNAP"는 조직 비-특이적 알칼리성 포스파타아제의 모든 동족체(isoform)를 포함하는 것으로 의도된다. 가령, 용어는 간 동족체(LAP), 골 동족체(BAP) 및 신장 동족체(KAP)를 포함한다. 한 실례에서, TNAP는 BAP이다. 한 실례에서, 본 명세서에서 TNAP는 Budapest Treaty의 규정 하에 수탁 번호 PTA-7282로 2005년 12월 19일자에 ATCC에 기탁된 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 STRO-3 항체에 결합할 수 있는 분자를 지칭한다.

[0095] 더 나아가, 바람직한 실례에서, STRO-1* 세포는 클론원성 CFU-F를 발생시킬 수 있다.

[0096] 한 실시예에서, STRO-1^{+} 다능성 세포 중에서 유의미한 부분이 적어도 2가지 상이한 생식세포주로 분화할 수 있다. 다능성 세포가 결정(commitment)될 수 있는 계통의 무제한적 실례에는 골 전구 세포; 담관 상피 세포와 간세포에 대해 다능성인 간세포 기원; 희소돌기아교세포(희돌기교세포)와 별아교세포(astrocyte)로 진행하는 아교세포 전구체를 발생시킬 수 있는 신경 국한된 세포; 뉴런으로 진행하는 뉴런 전구체; 심근과 심근세포, 포도당-반응성 인슐린 분비 췌장 베타 세포주에 대한 전구체가 포함된다. 다른 계통에는 치아모세포(odontoblast), 상아질-생산 세포(dentin-producing cell)와 연골세포, 그리고 망막 색소 상피 세포, 섬유아세포, 피부 세포, 예를 들면, 케라티노사이트, 수상돌기 세포, 모낭 세포, 신관 상피 세포, 평활근과 골격근 세포, 고환 기원

(testicular progenitor), 혈관 내피 세포, 힘줄, 인대, 연골, 지방세포, 섬유아세포, 골수 간질, 심근, 평활근, 골격근, 혈관주위, 혈관, 상피, 아교, 뉴런, 별아교 및 희소돌기아교 세포의 전구 세포가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.

[0097] 또다른 실시예에서, STRO-1^+ 세포는 배양 시에, 조혈 세포를 발생시킬 수 없다.

[0098] 한 실시예에서, 이들 세포는 치료되는 개체로부터 채취되고, 표준 기술을 이용하여 시험관내에서 배양되고, 그리고 자기조직 또는 동종이계 조성물로서 개체에 투여를 위한 상층액 또는 가용성 인자 또는 확대된 세포를 획득하는데 이용된다. 대안적 실시예에서, 하나 또는 그 이상의 확립된 인간 세포주의 세포가 이용된다. 본 개시내용의 또다른 유용한 가지 실시예에서, 비-인간 동물의 세포(또는 환자가 인간이 아니면, 다른 종으로부터)가 이용된다.

[0099] 본 개시내용에서는 또한, 시험관내 배양액으로부터 생산되는 STRO-1^+ 세포 및/또는 이들의 후손 세포(후자는 또한, 확대된 세포로서 지칭됨)로부터 획득되거나 유래되는 상층액 또는 가용성 인자의 이용을 고려한다. 본 발명의 확대된 세포는 배양액 조건(배양 배지에서 자극 인자의 숫자 및/또는 유형 포함), 계대배양(passage)의 횟수 및 이와 유사한 것에 따라, 매우 다양한 표현형을 가질 수 있다. 특정 실례에서, 후손 세포는 모(母) 집단으로부터 약 2, 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 또는 약 10회 계대배양(passage)후 획득된다. 하지만, 후손 세포는 모(母) 집단으로부터 임의의 횟수의 계대배양후 획득될 수도 있다.

[0100] 후손 세포는 적절한 배지에서 배양함으로써 획득될 수 있다. 세포 배양액과 관련하여 이용될 때, 용어 "배지"는 세포를 둘러싸는 환경의 성분을 포함한다. 배지는 고체, 액체, 기체 또는 상(phase)과 물질(material)의 혼합물일 수 있다. 배지에는 액체 성장 배지뿐만 아니라 세포 성장을 유지하지 않는 액체 배지가 포함된다. 배지에는 또한, 아교질 배지, 예를 들면, 아가, 아가로오스, 젤라틴 및 콜라겐 매트릭스가 포함된다. 예시적인 기체 배지에는 페트리 접시 또는 다른 고형 또는 반고형 서포트 상에서 성장하는 세포가 노출되는 기체 상(gaseous phase)이 포함된다. 용어 "배지"는 또한, 비록 세포와 아직 접촉되지 않은 경우에도 세포 배양에서 이용이 의도되는 물질을 지칭한다. 다시 말하면, 박테리아 배양액에 대해 제조된 영양소 농축된 액체가 배지이다. 물 또는 다른 액체와 혼합될 때 세포 배양에 적합해지는 분말 혼합물은 "분말 배지"로 명명될 수 있다.

[0101] 한 가지 실례에서, 본 발명의 방법에 유용한 후손 세포는 STRO-3 항체로 표지된 자성 구슬을 이용하여 골수로부터 $TNAP^+$ STRO-1^+ 세포를 단리하고, 그리고 이후, 단리된 세포를 배양 확대함으로써 획득된다(적절한 배양 조건의 실례를 위해 Gronthos ***et al. Blood 85***: 929-940, 1995를 참고한다).

[0102] 한 가지 실례에서, 이런 확대된 세포(후손)(가령, 적어도 5회 계대배양후)는 $TNAP^-$, $CC9^+$, HLA 클래스 I^+, HLA 클래스 II″, CD14＼, $CD19^-$, CD3″, CD11ac′ , CD31″, CD86″, CD34″ 및/또는 CD80′ 일 수 있다. 하지만, 본 명세서에서 기술된 것들과 상이한 배양 조건 하에, 상이한 마커의 발현이 변할 수도 있다. 또한, 이들 표현형의 세포가 확대된 세포 집단에서 우세할 수 있긴 하지만, 이것은 이러한 표현형(들)을 갖지 않는 적은 부분의 세포가 존재한다는 것을 의미하지 않는다(가령, 확대된 세포 중에서 적은 비율은 $CC9^-$일 수 있다). 한 가지 실례에서, 확대된 세포는 상이한 세포 유형으로 분화하는 능력을 여전히 갖는다.

[0103] 한 가지 실시예에서, 상층액 또는 가용성 인자, 또는 세포 그 자체를 획득하는데 이용되는 확대된 세포 집단은 세포 중에서 적어도 25%, 예를 들면, 적어도 50%가 $CC9^+$인 세포를 포함한다.

[0104] 다른 실시예에서, 상층액 또는 가용성 인자, 또는 세포 그 자체를 획득하는데 이용되는 확대된 세포 집단은 세포 중에서 적어도 40%, 예를 들면, 적어도 45%가 STRO-1^+인 세포를 포함한다.

[0105] 추가의 실례에서, 확대된 세포는 LFA-3, THY-1, VCAM-1, ICAM-1, PECAM-1, P-셀렉틴, L-셀렉틴, 3G5, CD49a/CD49b/CD29, CD49c/CD29, CD49d/CD29, CD 90, CD29, CD18, CD61, 인테그린 베타 6-19, 트롬보모듈린, CD10, CD13, SCF, PDGF-R, EGF-R, IGF1-R, NGF-R, FGF-R, 렙틴-R (STRO-2 = 렙틴-R), RANKL, STRO-$1^{밝음}$ 및 CD146 또는 이들 마커의 임의의 조합으로 구성된 군에서 선택되는 하나 또는 그 이상의 마커를 집단적으로 또는 개별적으로 발현할 수 있다.

[0106] 한 가지 실례에서, 후손 세포는 WO 2006/032092에서 정의되고 및/또는 기술된 바와 같은 다능성 확대된 STRO-1^+ 다능성 세포 자손(MEMP)이다. 후손이 유래될 수 있는 STRO-1^+ 다능성 세포의 농축된 집단을 제조하는 방법은 WO

01/04268 및 WO 2004/085630에서 기술된다. 시험관내 배경에서, STRO-1^{+} 다능성 세포는 드물게는, 절대 순수한 조제물로서 존재하고, 그리고 일반적으로 조직 특이적 결정된 세포(TSCC)인 다른 세포와 함께 존재할 것이다. WO 01/04268에서는 약 0.1% 내지 90%의 순도 수준에서 골수로부터 이런 세포를 수확하는 것을 언급한다. 후손이 유래되는 MPC를 포함하는 집단은 조직 공급원으로부터 직접적으로 수확되거나, 또는 대안으로, 탈체(*ex vivo*)에서 이미 확대된 집단일 수 있다.

[0107] 예를 들면, 후손은 그들이 존재하는 집단의 전체 세포 중에서 적어도 약 0.1, 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 또는 95%를 포함하는, 실질적으로 정제된 STRO-1^{+} 다능성 세포의 수확된, 확대되지 않은 집단으로부터 획득될 수 있다. 이러한 수준은 예로써, TNAP, STRO-1$^{\wedge\prime}$, 3G5^{+}, VCAM-1, THY-1, CD146 및 STRO-2로 구성된 군에서 개별적으로 또는 집단적으로 선택되는 적어도 하나의 마커에 대해 양성인 세포를 선별함으로써 달성될 수 있다.

[0108] MEMPS는 그들이 마커 STRO-1^{밝음}에 대해 양성이고 마커 알칼리성 포스파타아제(ALP)에 대해 음성인 점에서, 새로 수확된 STRO-1^{+} 다능성 세포로부터 구별될 수 있다. 대조적으로, 새로 단리된 STRO-1^{+} 다능성 세포는 STRO-1^{밝음}과 ALP 둘 모두에 대해 양성이다. 본 개시내용의 한 가지 실시예에서, 투여된 세포 중에서 적어도 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 95%는 표현형 STRO-1^{밝음}, ALP$^{'}$를 갖는다. 한 가지 실시예에서, MEMPS는 마커 Ki67, CD44 및/또는 CD49c/CD29, VLA-3, α3β1 중에서 하나 또는 그 이상에 대해 양성이다. 또 다른 실례에서, MEMPS는 TERT 활성을 나타내지 않고 및/또는 마커 CD18에 대해 음성이다.

[0109] STRO-1^{+} 세포 출발 집단은 WO 01/04268 또는 WO 2004/085630에서 기술된 임의의 하나 또는 그 이상의 조직 유형, 다시 말하면, 골수, 치수 세포, 지방 조직 및 피부, 또는 아마도 더욱 넓게는, 지방 조직, 치아, 치수, 피부, 간, 신장, 심장, 망막, 뇌, 모낭, 장, 폐, 비장, 림프절, 흉선, 췌장, 골, 인대, 골수, 힘줄 및 골격근으로부터 유래될 수 있다.

[0110] 본 개시내용을 실시함에 있어서, 임의의 소정의 세포 표면 마커를 보유하는 세포의 분리가 다수의 상이한 방법에 의해 달성될 수 있지만, 일부 방법은 관련된 마커에 결합제(가령, 항체 또는 이의 항원 결합 단편)의 결합, 그 이후에 높은 수준 결합, 또는 낮은 수준 결합 또는 결합 없음을 나타내는 것들의 분리에 의존하는 것으로 이해될 것이다. 가장 편리한 결합 작용제는 항체 또는 항체-기초된 분자, 예를 들면, 단클론 항체이거나, 또는 이들 후자 작용제의 특이성으로 인하여 단클론 항체에 기초된 분자이다. 항체가 양쪽 단계에 이용될 수 있지만, 다른 작용제가 이용될 수도 있고, 따라서 이들 마커에 대한 리간드는 또한, 그들을 보유하거나, 또는 그들이 없는 세포를 농축하는데 이용될 수 있다.

[0111] 항체 또는 리간드는 조제(粗製) 분리를 가능하게 하는 고형 서포트에 부착될 수 있다. 일부 실시예에서, 분리 기술은 수집되는 분획의 생존능의 유지를 극대화시킨다. 상이한 효능의 다양한 기술이 상대적 조제(粗製) 분리를 달성하는데 이용될 수 있다. 이용되는 특정 기술은 분리의 효능, 연관된 세포독성, 수행의 용이함과 속도, 그리고 정교한 장비 및/또는 기술에 대한 필요성에 좌우될 것이다. 분리를 위한 절차에는 항체-코팅된 자성 구슬을 이용한 자성 분리, 친화성 크로마토그래피 및 고형 매트릭스에 부착된 항체로 "팬닝(panning)"이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 정확한 분리를 제공하는 기술에는 FACS가 포함되지만 이에 국한되지 않는다. FACS를 수행하는 방법은 당업자에게 명백할 것이다.

[0112] 본 명세서에서 기술된 각 마커에 대한 항체는 상업적으로 구입가능하고(가령, STRO-1에 대한 단클론 항체는 R&D Systems(USA)로부터 상업적으로 구입가능하다), ATCC 또는 다른 기탁 기관으로부터 입수가능하고 및/또는 당분야의 인정된 기술을 이용하여 생산될 수 있다.

[0113] 예를 들면, STRO-1^{+} 세포를 단리하는 방법은 예로써, STRO-1의 높은 수준 발현을 인식하는 자성 활성화된 세포 분리(MACS)를 이용하는 고형 상 분류 단계인 첫 번째 단계를 포함한다. 특허 명세서 WO 01/14268에서 기술된 바와 같이, 더욱 높은 수준의 전구 세포 발현을 유발하기 위해 요망되면, 두 번째 분류 단계가 뒤따를 수 있다. 이러한 두 번째 분류 단계는 2개 또는 그 이상 마커의 이용을 필요로 할지도 모른다.

[0114] STRO-1^{+} 세포를 획득하는 방법은 또한, 공지된 기술을 이용한 첫 번째 농축 단계전 이들 세포의 공급원을 수확을 포함할 지도 모른다. 따라서 상기 조직은 외과적으로 제거될 것이다. 공급원 조직을 포함하는 세포는 이후, 소위 단일 세포 현탁액 내로 분리될 것이다. 이러한 분리는 물리적 및/또는 효소적 수단에 의해 달성될 수

있다.

[0115] 일단 적절한 STRO-1^{+} 세포 집단이 획득되면, 이것은 임의의 적절한 수단에 의해 배양되거나 확대되어 MEMP가 획득될 수 있다.

[0116] 한 가지 실례에서, 이들 세포는 치료되는 개체로부터 채취되고, 표준 기술을 이용하여 시험관내에서 배양되고, 그리고 자기조직 또는 동종이계 조성물로서 개체에 투여를 위해 상층액 또는 가용성 인자 또는 확대된 세포를 획득하는데 이용된다. 대안적 실례에서, 확립된 인간 세포주 중에서 하나 또는 그 이상의 세포는 상층액 또는 가용성 인자를 획득하는데 이용된다. 본 발명의 다른 유용한 가지 실례에서, 비-인간 동물의 세포(또는 환자가 인간이 아니면, 다른 종으로부터)가 상층액 또는 가용성 인자를 획득하는데 이용된다.

[0117] 본 개시내용은 비-인간 영장류 세포, 유제류, 개, 고양이, 토끼목, 설치류, 조류, 그리고 어류 세포가 포함되지만 이들에 국한되지 않는 임의의 비-인간 동물 종으로부터 세포를 이용하여 실시될 수 있다. 본 개시내용이 실시될 수 있는 영장류 세포에는 침팬지, 비비, 게잡이 원숭이, 그리고 임의의 다른 신세계 또는 구세계 원숭이의 세포가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 본 개시내용이 실시될 수 있는 유제류 세포에는 소, 돼지, 양, 염소, 말, 물소 및 들소의 세포가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 본 개시내용이 실시될 수 있는 설치류 세포에는 생쥐, 쥐, 기니 피그, 햄스터 및 게르빌루스 세포가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 본 개시내용이 실시될 수 있는 토끼목 종의 실례에는 집토끼, 산토끼, 야토, 솜꼬리토끼, 눈신토끼, 그리고 새앙토끼가 포함된다. 닭(*Gallus gallus*)은 본 개시내용이 실시될 수 있는 조류 종의 실례이다.

[0118] 본 발명의 방법에 유용한 세포는 사용에 앞서, 또는 상층액 또는 가용성 인자를 획득하기에 앞서 보관될 수 있다. 진핵 세포, 특히 포유동물 세포의 보존과 보관을 위한 방법과 프로토콜은 당분야에 공지되어 있다(예로써, Pollard, J. W. and Walker, J. M. (1997) Basic Cell Culture Protocols, Second Edition, Humana Press, Totowa, N.J.; Freshney, R. I. (2000) Culture of Animal Cells, Fourth Edition, Wiley-Liss, Hoboken, N.J.를 참고한다). 단리된 줄기 세포, 예를 들면, 간엽성 줄기/기원 세포, 또는 이의 자손의 생물학적 활성을 유지하는 임의의 방법이 본 발명과 관련하여 이용될 수 있다. 한 가지 실례에서, 이들 세포는 냉동-보존(cryo-preservation)을 이용함으로써 유지되고 보관된다.

[0119] 유전자 조작된 세포

[0120] 한 실시예에서, STRO-1^{+} 세포 및/또는 이들의 후손 세포는 예로써, 목적 단백질, 가령, 치료 및/또는 예방 장점을 제공하는 단백질, 가령, T 세포 활성화를 감소 또는 방지하는 또는 뉴런의 증식 및/또는 분화 및/또는 미엘린 생산을 유도하는 폴리펩티드을 발현시키기 위하여 유전적으로 변형된다. 예시적인 T 세포 길항제들은 예를 들면, Toda ***et al., Eur. J. Immunol., 30***: 403-414, 2000에서 설명된 펩티드들을 포함한다.

[0121] 또다른 실시예에서, STRO-1^{+} 세포들 및/또는 그의 후손 세포들은 염증성 신경성 질병을 치료하는 단백질, 가령, 베타-인터페론을 발현시키도록 유전적으로 변형된다.

[0122] 세포를 유전자 조작하기 위한 방법은 당업자에게 명백할 것이다. 가령, 세포 내에서 발현되는 핵산은 세포 내에서 발현을 유도하기 위한 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 가령, 핵산은 개체의 다양한 세포에서 작동하는 프로모터, 예를 들면, 바이러스 프로모터, 예를 들면, CMV 프로모터(가령, CMV-IE 프로모터) 또는 SV-40 프로모터에 연결된다. 추가 적절한 프로모터는 당분야에 공지되어 있고, 그리고 본 개시내용의 현재 구체예에 준용될 것이다.

[0123] 한 실시예에서, 핵산은 발현 구조체의 형태로 제공된다. 본 명세서에서, 용어 "발현 구조체"는 세포 내에서, 발현 구조체가 작동가능하게 연결되는 핵산(가령, 리포터 유전자 및/또는 역-선택가능 리포터 유전자)에 발현을 공여하는 능력을 갖는 핵산을 지칭한다. 본 개시내용의 문맥 내에서, 발현 구조체는 이종기원 DNA를 발현가능 형식으로 유지하고 및/또는 복제할 수 있는 플라스미드, 박테리오파아지, 파지미드, 코스미드, 바이러스 하위-게놈 또는 게놈 단편, 또는 기타 핵산이거나, 또는 이를 포함할 수 있는 것으로 이해된다.

[0124] 본 개시내용의 실시를 위한 적절한 발현 구조체의 작제를 위한 방법은 당업자에게 명백할 것이고, 그리고 예로써, Ausubel et al (In: Current Protocols in Molecular Biology. Wiley Interscience, ISBN 047 150338, 1987) 또는 Sambrook et al (In: Molecular Cloning: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories, New York, Third Edition 2001)에서 기술된다. 가령, 발현 구조체의 각 성분은 예로써, PCR을 이용하여 적절한 주형 핵산으로부터 증폭되고, 그리고 적절한 발현 구조체, 예를 들면, 플라스미드 또는

파지미드 내로 차후 클로닝된다.

[0125] 이런 발현 구조체에 적합한 벡터는 당분야에 공지되어 있고 및/또는 본 명세서에서 기술된다. 가령, 포유동물 세포에서 본 발명의 방법에 적합한 발현 벡터는 예로써, Invitrogen에 의해 공급된 pcDNA 벡터 스위트의 벡터, pCI 벡터 스위트(Promega)의 벡터, pCMV 벡터 스위트(Clontech)의 벡터, pM 벡터(Clontech), pSI 벡터(Promega), VP 16 벡터(Clontech) 또는 pcDNA 벡터 스위트(Invitrogen)의 벡터이다.

[0126] 당업자는 추가 벡터 및 이런 벡터의 공급원, 예를 들면, Life Technologies Corporation, Clontech 또는 Promega을 인지할 것이다.

[0127] 발현을 위한 세포 내로 단리된 핵산 분자 또는 이를 포함하는 유전자 구조체를 도입하기 위한 수단은 당업자에게 공지되어 있다. 소정의 생물체에 대해 이용되는 기술은 공지된 성공적인 기술에 좌우된다. 세포 내로 재조합 DNA을 도입하기 위한 수단에는 그중에서도 특히, 미세주사, DEAE-덱스트란 매개된 형질감염(transfection), 리포좀(liposome), 예를 들면, 리포펙타민(lipofectamine)(Gibco, MD, USA) 및/또는 셀펙틴(cellfectin)(Gibco, MD, USA)에 의해 매개된 형질감염, PEG-매개된 DNA 흡수, 전기천공(electroporation) 및 예로써, DNA-코팅된 텅스텐 또는 금 입자(Agracetus Inc., WI, USA)를 이용한 미세입자 폭발(microparticle bombardment)이 포함된다.

[0128] 대안으로, 본 개시내용의 발현 구조체는 바이러스 벡터이다. 적절한 바이러스 벡터는 당분야에 공지되어 있고 상업적으로 구입가능하다. 핵산의 전달 및 상기 핵산의 호스트 세포 게놈으로의 통합(integration)을 위한 전통적인 바이러스-기초된 시스템에는 예로써, 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 또는 아데노-연관된 바이러스 벡터가 포함된다. 대안으로, 아데노바이러스 벡터는 에피솜(episome) 상태로 남아있는 핵산을 호스트 세포 내로 도입하는데 유용하다. 바이러스 벡터는 표적 세포와 조직에서 유전자 전달의 효율적이고 다재다능한 방법이다. 추가적으로, 높은 형질도입(transduction) 효율이 많은 상이한 세포 유형과 표적 조직에서 관찰되었다.

[0129] 가령, 레트로바이러스 벡터는 일반적으로, 최대 6-10 kb의 외래 서열에 대한 포장 수용력(packaging capacity)을 갖는 시스-작용 긴 말단 반복(long terminal repeat, LTR)을 포함한다. 최소 시스(cis)-작용 LTR은 벡터의 복제와 포장에 충분하고, 이것은 이후, 발현 구조체를 표적 세포 내로 통합하여 장기 발현을 제공하는데 이용된다. 폭넓게 이용되는 레트로바이러스 벡터에는 뮤린 백혈병 바이러스(MuLV), 긴팔 원숭이 백혈병 바이러스(GaLV), 유인원 면역결핍 바이러스(SrV), 인간 면역결핍 바이러스(HIV), 그리고 이들의 조합에 기초된 것들이 포함된다(예로써, Buchscher *et al., J Virol. 5(5*:2731-2739 (1992); Johann *et al, J. Virol. 65*:1635-1640 (1992); Sommerfelt *et al, Virol. 76*:58-59 (1990); Wilson *et al, J. Virol. 653*:274-2318 (1989); Miller *et al., J. Virol. 65*:2220-2224 (1991); PCT/US94/05700; Miller and Rosman *BioTechniques* 7:980-990, 1989; Miller, A. D. *Human Gene Therapy* 7:5-14, 1990; Scarpa *et al Virology* 75:849-852, 1991; Burns *et al. Proc. Natl. Acad. Sci USA* 90:8033-8037, 1993).

[0130] 핵산 전달을 위해 다양한 아데노-연관된 바이러스(AAV) 벡터 시스템 역시 개발되었다. AAV 벡터는 당분야에 공지된 기술을 이용하여 용이하게 작제될 수 있다. 예로써, U.S. 특허 번호 5,173,414 및 5,139,941; 국제 공개 번호 WO 92/01070 및 WO 93/03769; Lebkowski *et al. Molec. Cell. Biol.* 5:3988-3996, 1988; Vincent et al. (1990) Vaccines 90 (Cold Spring Harbor Laboratory Press);Carter *Current Opinion in Biotechnology 5*:533-539, 1992; Muzyczka. *Current Topics in Microbiol, and Immunol. 158:97-129*, 1992; Kotin, Human Gene *Therapy* 5:793-801, 1994; Shelling and Smith *Gene Therapy* 7:165-169, 1994; 그리고 Zhou *et al. J Exp. Med.* 779:1867-1875, 1994를 참고.

[0131] 본 발명의 발현 구조체를 전달하는데 유용한 추가 바이러스 벡터에는 예로써, 바이러스의 폭스 패밀리(pox family), 예를 들면, 우두 바이러스(vaccinia virus) 및 조류 폭스바이러스(avian poxvirus) 또는 알파바이러스(alphavirus) 또는 접합체 바이러스 벡터로부터 유래된 것들(가령, Fisher-Hoch *et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA* 56:317-321, 1989에서 기술된 것들)이 포함된다.

[0132] 세포 및 가용성 인자의 치료적/예방적 잠재력 분석

[0133] 염증성 신경성 질병의 개시 또는 진행을 치료 또는 예방 또는 지연시키기 위하여 세포들 또는 가용성 인자들의 능력을 측정하는 방법들은 당업자에게 자명할 것이다.

[0134] 예를 들면, 세포들 또는 가용성 인자들 (가령, 인자들의 혼합물 또는 단일 인자 또는 인자들의 분획물(가령, 친화력 정제 또는 크로마토그래피에 의해 유도된))은 스크리닝되어, 염증성 신경성 질환 (가령, MS) 병리학의 성분들의 시험관 모델에서 치료 물질들을 확인한다. 예시적인 모델들은 MS의 유전자전이 마우스 모델로부터 단리

된 T 세포들 또는 초(sheath)의 성분, 가령, 미엘린 기본 단백질, 미엘린 희돌기교세포 당단백질 또는 미엘린 프로테오리피드 단백질의 성분과 반응하는 유전자전이 T 세포 수용체를 포함하는 혼합된 림프 세포 집단을 이용하는 것을 포함한다. 이들 세포는 세포들 및/또는 가용성 인자들의 존부하에서 미엘린 단백질과 접촉되고, 염증성 반응의 수준은 전(pro)-염증성 사이토킨, 이를 테면 인터루킨 (IL)-2 또는 인터페론 γ의 배출을 탐지함으로써 평가된다. 대안으로, 또는 추가적으로, 세포들의 증식성 반응은 (^{3}H)티미딘 통합을 이용하여 평가된다. 염증성 반응을 감소시키는 세포 및/또는 가용성 인자들이 치료제로 선택된다. 예시적인 분석은 Illes *et ai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101: 11749-11754, 2004 또는 Rossi *et ai., J. Biomolecular Screening, 12*: 481-489, 2007에서 설명된다.

[0135] 세포 및/또는 가용성 인자들은 염증성 신경성 질환의 생체내 모델에서 또한 테스트된다. 예시적인 모델들은 EAE 모델들을 포함하는데, 이때 마우스 또는 쥐는 미엘린 초(sheath) 단백질 또는 그로부터 유래된 펩티드(가령, MOG, MBP 또는 PLP)로 면역화되고, 그리고 이 단백질에 대항하여 면역 반응이 생성되고, 이로 인하여 MS 모델이 유도된다. 대안으로, 미엘린 초(sheath) 단백질로 면역활성인 T 세포들은 마우스 또는 쥐로 도입되어 EAE를 유도한다. 예시적인 EAE 모델들은 예를 들면 Tsunoda and Fujinami, *J Neuropathol Exp Neurol.55*:673-686, 1996에서 검토된다.

[0136] MS의 다른 모델들은 미엘린 단백질, 가령, MOG, MBP 또는 PLP에 특이적인 T 세포 수용체들을 발현시키는 유전자전이 동물들을 포함한다. 예시적인 모델들은 예를 들면, Bettelli *et ai., JEM* 797:1073-1081, 2003; Illes *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101: 11749-11754, 2004; 또는 Rossi *et al., J. Biomolecular Screening, 12*: 481-489, 2007; 또는 가령, Jackson Laboratories USA (가령 마우스 2D2는 MOG와 반응성이 있는 유전자전이 T 세포 수용체들을 보유한다)로부터 시판되는 것이 이용가능하다.

[0137] 염증성 신경성 증상을 발생시키는 SLE의 예시적인 모델들은 모델들 또는 항-인지질 증후군 (가령, Ziporen *et ai., J. Clin, Invest., 100*: :613-613, 1997에서 설명된 것과 같은) 또는 Brey *et ai., Annals NY Acad Sci., 823*: 97-106, 1996에서 검토된 모델을 포함한다.

[0138] 길랑-바레 증후군의 모델들은 가령, 강글리오시드 GM1로 감작화된 토끼로 인한 것들을 포함한다 (가령, Yuki *et al., Ann Neurol. 49*: 712-720, 2001에서 설명된 것과 같은).

[0139] 본 개시내용은 염증성 신경 질병의 치료, 예방 또는 지연을 위한 세포 또는 가용성 인자의 확인 또는 단리를 위한 방법을 또한 제공한다는 것은 전술한 내용으로부터 당업자에게 자명할 것이며, 이 방법은 다음을 포함한다:

[0140] (i) 염증성 신경 질병을 앓고 있는 시험 대상에게 세포 또는 가용성 인자를 투여하고, 그리고 이 대상에게서 염증 반응 또는 신경 기능/기능이상을 평가하고;

[0141] (ii) 세포 또는 가용성 인자가 투여되지 않은, 염증성 신경 질병을 앓고 있는 대조군 대상에서 염증 반응 또는 신경 기능/기능이상을 (i)의 대상에게서 염증 반응 또는 신경 기능/기능이상과 비교하고,

[0142] 이때 대조군 대상과 비교하여 시험 대상에서 개선된 염증 반응 또는 신경 기능/기능이상은 이 세포 또는 가용성 인자가 염증성 신경 질병을 치료한다는 것을 나타낸다.

[0143] 이 세포는 임의의 실시예에 따라 본 개시내용에서 기술된 임의의 세포일 수 있다.

[0144] 세포 조성물

[0145] 본 개시내용의 한 실시예에서, STRO-1^{+} 세포 및/또는 이들의 후손 세포는 조성물의 형태로 투여된다. 예를 들면, 이런 조성물은 제약학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 포함한다.

[0146] 용어 "담체"와 "부형제"는 활성 화합물의 보관, 투여, 및/또는 생물학적 활성을 용이하게 하기 위해 당분야에서 편의적으로 이용되는 물질의 조성(composition of matter)을 지칭한다(예로써, Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Ed., Mac Publishing Company (1980)을 참고한다). 담체는 또한, 활성 화합물의 임의의 바람직하지 않은 부작용을 감소시킬 수 있다. 적절한 담체는 예로써, 안정적인데, 예를 들면, 담체 내에 다른 성분과 반응할 수 없다. 한 실례에서, 담체는 치료에 이용되는 용량과 농도에서 수용자에서 유의미한 국소 또는 전신 부작용을 발생시키지 않는다.

[0147] 본 개시내용에 적합한 담체에는 편의적으로 이용되는 것들이 포함된다, 예를 들면, 물, 염수, 수성 덱스트로스, 락토오스, 링거 용액, 완충된 용액, 히알루로난(hyaluronan)과 글리콜은 특히, 용액(등장성일 때)에 대한 선호되는 액체 담체이다. 적절한 제약학적 담체와 부형제에는 전분, 셀룰로오스, 포도당, 락토오스, 수크로오스, 젤

라틴, 맥아, 쌀, 밀가루, 백악, 실리카 겔, 스테아레이트 마그네슘, 스테아레이트 나트륨, 모노스테아레이트 글리세롤, 염화나트륨, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 물, 에탄올 등이 포함된다.

[0148] 또다른 실시예에서, 담체는 예로써, 세포가 성장되거나 현탁되는 배지 조성물이다. 예를 들면, 이런 배지 조성물은 투여되는 개체에서 임의의 유해한 효과를 유도하지 않는다.

[0149] 예시적인 담체와 부형제는 염증성 신경 질병을 감소, 예방 또는 지연시키는 세포의 능력에 유해한 영향을 주지 않는다.

[0150] 한 가지 실례에서, 담체 또는 부형제는 세포 및/또는 가용성 인자를 적절한 pH에 유지시켜 생물학적 활성을 발휘하도록 하는 완충 활성을 제공한다, 예를 들면, 담체 또는 부형제는 포스페이트 완충된 염수(PBS)이다. PBS는 매력적인 담체 또는 부형제인데, 그 이유는 이것이 세포 및 인자와 최소한으로 상호작용하고 세포 및 인자의 신속한 방출을 가능하게 하기 때문이고, 이런 경우에 본 개시내용의 조성물은 예로써, 주사에 의해 혈류에, 또는 조직 또는 조직을 둘러싸거나 조직에 인접한 구역 내로 직접 적용을 위한 액체로서 생산될 수 있다.

[0151] STRO-1^+ 세포 및/또는 이들의 후손 세포는 또한, 수용자-화합성이고 수용자에게 유해하지 않는 산물로 분해되는 골격(scaffolds) 내에 함입되거나 끼워 넣어질 수 있다. 이들 골격은 수용자 대상 내로 이식되는 세포에 대한 서포트와 보호를 제공한다. 자연 및/또는 합성 생물분해성 골격은 이런 골격의 실례이다.

[0152] 다양한 상이한 골격이 본 개시내용의 실행에 성공적으로 이용될 수 있다. 예시적인 골격에는 생물학적, 분해성 골격이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 자연 생물분해성 골격에는 콜라겐, 피브로넥틴, 그리고 라미닌 골격이 포함된다. 세포 이식 골격에 적합한 합성 재료는 광범위한 세포 성장과 세포 기능을 지원할 수 있어야 한다. 이런 골격은 또한, 재흡수될 수도 있다. 적절한 골격에는 예로써, Vacanti, *et al. J. Ped. Surg. 23:3-9* 1988; Cima, *et al. Biotechnol. Bioeng.* 55:145 1991; Vacanti, *et al. Plast. Reconstr. Surg.* 55:753-9 1991에서 기술된 바와 같은 폴리글리콜산 골격; 또는 합성 중합체(synthetic polymer), 예를 들면, 폴리무수물(polyanhydride), 폴리오르토에스테르(polyorthoester), 그리고 폴리락트산(polylactic acid)이 포함된다.

[0153] 또다른 실시예에서, 이들 세포는 겔 골격(가령, Upjohn Company로부터 Gelfoam)에 담겨 투여될 수 있다.

[0154] 본 개시내용에 유용한 세포 조성물은 단독으로, 또는 다른 세포와의 혼합물로서 투여될 수 있다. 본 개시내용의 조성물과 공동으로 투여될 수 있는 세포에는 다능성(multipotent) 또는 만능성(pluripotent) 세포 또는 줄기 세포, 또는 골수 세포가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 상이한 유형의 세포는 투여 직전에 또는 조금 전에 본 발명의 조성물과 혼합되거나, 또는 이들은 투여에 앞서 일정한 기간 동안 함께 공동-배양될 수 있다.

[0155] 한 실시예에서, 조성물은 효과량 또는 치료적 또는 예방적 효과량의 세포를 포함한다. 가령, 조성물은 약 $1x10^5$ STRO-1^+ 세포/kg 내지 약 $1x10^7$ STRO-1^+ 세포/kg 또는 약 $1x10^6$ STRO-1^+ 세포/kg 내지 약 $5x10^6$ STRO-1^+ 세포/kg을 포함한다. 투여되는 세포의 정확한 양은 환자의 연령, 체중과 성별, 그리고 염증성 신경 질병의 정도와 심각도를 비롯한 다양한 인자에 좌우된다.

[0156] 일부 실시예들에서, 세포는 이들 세포가 개체의 순환(circulation) 내로 빠져나가는 것을 허용하지 않지만, 이들 세포에 의해 분비되는 인자가 순환 내로 들어가도록 허용하는 챔버 내에 포함된다. 이러한 방식으로, 가용성 인자는 세포가 이들 인자를 개체의 순환 내로 분비하도록 허용함으로써 개체에 투여될 수 있다. 이런 챔버는 가용성 인자의 국소 수준을 증가시키기 위해 개체 내에 부위에 동등하게 이식될 수 있다, 예를 들면, 이식된 췌장 내에 또는 인근에 이식될 수 있다.

[0157] 본 개시내용의 일부 실시예들에서, 세포 조성물로 치료의 개시에 앞서 환자를 면역억제하는 것이 필요하거나 바람직하지 않을 수도 있다. 따라서 동종이계, 또는 심지어 이종 STRO-1^+ 세포 또는 이의 후손으로 이식이 일부 경우에 관용될 수 있다.

[0158] 하지만, 다른 경우들에, 세포 조성물에 대항하여 대상의 면역 반응을 감소시키기 위하여, 세포 요법을 시작하기에 앞서, 환자를 약리학적으로 면역억제하는 것이 바람직하거나 적절할 수 있다. 이것은 전신 또는 국소 면역억제 작용제의 이용을 통해 달성되거나, 또는 캡슐화된 장치에서 세포를 전달함으로써 달성될 수 있다. 세포는 세포 및 세포의 치료 인자에 의해 요구되는 영양소와 산소에 침투성이고, 그리고 면역 체액 인자와 세포에 불침투성인 캡슐 내에 캡슐화될 수 있다. 한 실시예에서, 봉합제(encapsulant)는 저자극성(hypoallergenic)이고, 표적 조직 내에 쉽고 안정되게 위치되고, 그리고 이식된 구조에 부가된 보호를 제공한다. 이식된 세포에 대한 면역 반응을 감소시키거나 제거하기 위한 이들 수단 및 다른 수단은 당분야에 공지되어 있다. 대안으로서, 이들 세포

는 그들의 면역원성을 줄이기 위해 유전자 조작될 수 있다.

[0159] 가용성 인자의 조성물

[0160] 본 개시내용의 한 실시예에서, STRO-1* 세포-유래된 및/또는 후손 세포-유래된 상층액 또는 가용성 인자는 예로써, 적절한 담체 및/또는 부형제를 포함하는 조성물의 형태로 투여된다. 예를 들면, 담체 또는 부형제는 가용성 인자 또는 상층액의 생물학적 효과에 부정적인 영향을 주지 않는다.

[0161] 한 실시예에서, 조성물은 상층액의 가용성 인자 또는 성분, 예를 들면, 프로테아제 저해제를 안정화시키는 물질의 조성을 포함한다. 한 실시예에서, 프로테아제 저해제는 개체에 대한 유해한 효과가 나타낼 만큼 충분한 양으로 포함되지 않는다.

[0162] STRO-1^{+} 세포-유래된 및/또는 후손 세포-유래된 상층액 또는 가용성 인자를 포함하는 조성물은 예로써, 배양액 배지에서 또는 안정된 담체 또는 완충액 용액, 예를 들면, 포스페이트 완충된 염수에서 적절한 액체 현탁액으로서 제조될 수 있다. 적절한 담체는 상기 본 개시내용에서 기술된다. 또다른 실례에서, STRO-1^{+} 세포-유래된 및/또는 자손 세포-유래된 상층액 또는 가용성 인자를 포함하는 현탁액은 주사를 위한 유성 현탁액이다. 적절한 친유성 용매 또는 운반제에는 지방 오일, 예를 들면, 참깨 오일; 또는 합성 지방산 에스테르, 예를 들면, 에틸 올리에이트 또는 트리글리세리드; 또는 리포좀이 포함된다. 주사에 이용되는 현탁액은 또한, 현탁액의 점도를 증가시키는 물질, 예를 들면, 카르복시메틸 셀룰로오스 나트륨, 소르비톨, 또는 덱스트란을 내포할 수 있다. 선택적으로, 현탁액은 또한, 고도로 농축된 용액의 제조가 가능하도록 화합물의 용해도를 증가시키기 위해 적절한 안정화제 또는 작용제를 내포할 수 있다.

[0163] 무균 주사가능 용액은 적절한 용매에서 필요한 양으로 상층액 또는 가용성 인자를 필요에 따라, 앞서 열거된 성분 중에서 한 가지 또는 이들의 조합과 통합하고, 그 이후에 여과된 멸균에 의해 제조될 수 있다.

[0164] 일반적으로, 분산액은 상층액 또는 가용성 인자를 기본 분산 매체 및 앞서 열거된 것들로부터 필요한 다른 성분을 내포하는 무균 운반제 내로 통합함으로써 제조된다. 무균 주사가능 용액의 제조를 위한 무균 분말의 경우에, 바람직한 제조 방법은 미리 무균-여과된 용액으로부터 활성 성분 + 임의의 추가 원하는 성분의 분말을 산출하는 진공 건조(vacuum drying) 및 냉동-건조(freeze-drying)이다. 본 개시내용의 대안적 양태에 따라서, 상층액 또는 가용성 인자는 용해성을 증강시키는 하나 또는 그 이상의 추가 화합물로 조제될 수 있다.

[0165] 다른 예시적인 담체 또는 부형제는 예로써, Hardman, et al. (2001) Goodman and Gilman's The Pharmaceutical Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, N. Y.; Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams, and Wilkins, New York, N. Y.; Avis, et al. (eds.) (1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY; Lieberman, et al. (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY; Lieberman, et al. (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY; Weiner and Kotkoskie (2000) Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y에서 기술된다.

[0166] 치료적 조성물은 전형적으로, 제조와 보관의 조건 하에 무균이고 안정되어야 한다. 조성물은 용액, 마이크로에멀젼, 리포좀, 또는 기타 정연한 구조로서 조제될 수 있다. 담체는 예로써, 물, 에탄올, 폴리올(가령, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 그리고 액상 폴리에틸렌 글리콜 등), 그리고 이들의 적절한 혼합물을 내포하는 용매 또는 분산 매체일 수 있다. 적절한 유동성(fluidity)은 예로써, 레시틴과 같은 코팅의 이용에 의해, 분산액의 경우에 필요한 입자 크기의 유지에 의해, 그리고 계면활성제의 이용에 의해 유지될 수 있다. 많은 경우들에서, 조성물 내에 등장성 작용제, 예를 들면, 당, 다가알코올, 예를 들면, 만니톨, 소르비톨, 또는 염화나트륨을 포함하는 것이 바람직할 것이다. 주사가능 조성물의 연장된 흡수는 흡수를 지연시키는 작용제, 예를 들면, 모노스테아레이트 염과 젤라틴을 조성물 내에 포함함으로써 달성될 수 있다. 게다가, 가용성 인자는 시한 방출 제제(time release formulation), 예를 들면, 느린 방출 중합체(slow release polymer)를 포함하는 조성물에 담겨 투여될 수 있다. 활성 화합물은 급속한 방출로부터 화합물을 보호하는 담체로, 이식물 및 미세캡슐화된 전달 시스템(microencapsulated delivery system)을 비롯한 방출 제어형 제제(controlled release formulation)로서 제조될 수 있다. 생물분해성, 생체적합성 중합체, 예를 들면, 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리무수물, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르, 폴리락트산 및 폴리락틱, 폴리글리콜릭 공중합체(PLG)가 이용될 수 있다. 이런 제제의 제조를 위한 많은 방법이 특허화되거나, 또는 당업자에게 일반적으로 공지되어 있다.

[0167] 상층액 또는 가용성 인자는 예로써, 가용성 인자의 느린 방출을 제공하기 위해 적절한 매트릭스와 공동으로 투

여될 수 있다.

[0168] 조성물의 추가 성분들

[0169] STRO-1^{+} 세포-유도된 상층액 또는 가용성 인자들, STRO-1^{+} 세포들 또는 이의 후손은 다른 유익한 약물들 또는 생물학적 분자들(성장 인자들, 영양에 관한 인자들)과 함께 투여될 수 있다. 다른 물질들과 함께 투여될 때, 이들은 단일 약학 조성물 안에서 함께 투여될 수 있거나, 또는 별도의 약학 조성물로서, 다른 물질들과 동시에 또는 순차적으로(다른 물질들의 투여 전 또는 후) 투여될 수 있다. 함께 투여될 수 있는 생활성 인자들은 항-자가사멸제(apoptotic agent)(가령, EPO, EPO 미메티바디(mimetibody), TPO, IGF-I 및 IGF-II, HGF, 카스파제 억제제들); 항-염증성 물질(가령, p38 MAPK 억제제들, TGF-베타 억제제들, 스타틴, IL-6 및 IL-1 억제제들, PEMIROLAST, TRANILAST, REMICADE, SIROLIMUS, 그리고 NSAID (비-스테로이드성 항-염증성 약물들; 가령, TEPQXALIN, TOLMETIN, SUPROFEN); 면역억제성/면역조절성 물질들(가령, 칼시뉴린 억제제들, 예를 든다면 사이클로스포린, 타크로리무스; mTOR 억제제(가령, SIROLIMUS, EVEROLIMUS); 항-증식제 (가령, 아자티오프린, 미코페놀레이트 모페틸); 코르티코스테로이드(가령, 프레디니솔론, 하이드로코르티손); 항체들 이를 테면, 단클론 항-IL-2R알파 수용체 항체들 (가령, 바실리시마브, 다클리주마브), 다클론성 항-T-세포 항체들 (가령, 항-흉선세포 글로블린(ATG); 항-임파세포 글로블린(ALG); 단클론 항-T 세포 항체 OKT3)); 항-트롬보겐 물질들 (가령, 헤파린, 헤파린 유도체들, 유로키나제, PPack (덱스트로페닐알라닌 프롤린 아르기닌 클로로메틸케톤), 항트롬빈 화합물들, 혈소판 수용체 길항물질들, 항-트롬빈 항체들, 항-혈소판 수용체 항체들, 아스피린, 디피리다몰 프로타민, 히루딘, 프로스타글란딘 억제제들, 그리고 혈소판 억제제들); 그리고 항-산화제(가령, 프로부콜, 비타민 A, 아스코르브산, 토코페롤, 코엔자임 Q-10, 글루타티온, L-시스테인, N-아세틸시스테인) 뿐만 아니라 국소 마취제를 포함한다.

[0170] 한 실시예에서, 임의의 실시예에 따라 본 개시내용에서 설명된 조성물은 본 개시내용에서 설명된 것과 같이 염증성 신경성 질병의 치료 또는 예방을 위한 추가 인자를 포함한다.

[0171] 대안으로, 또는 추가적으로, 임의의 실시예에 따라 본 개시내용에 설명된 것과 같이, 세포들, 분비된 인자들 및/또는 조성물은 염증성 신경성 질병의 공지된 치료와 조합된다.

[0172] 한 실시예에서, 임의의 실시예에 따라 본 개시내용에서 설명된 것과 같이 약학 조성물은 염증성 신경성 질병 또는 이의 증상을 치료하는데 이용된 화합물을 포함한다. 대안으로, 본 개시내용의 임의의 실시예에 따라 설명된 것과 같이 치료/예방 방법은 염증성 신경성 질병 또는 이의 증상을 치료하는데 이용되는 화합물의 투여를 포함한다. 예시적인 화합물들은 세포독성 물질, 화학요법 물질, 면역억제성 물질, 사이토킨, 사이토킨 길항제 또는 항체, 성장 인자, 호르몬, 인테그린, 인테그린 길항제 또는 항체 (가령 항-LFA-1 항체 이를 테면 Genentech에서 시판되는 에팔리주마브 (RAPTIVA®), 또는 Biogen Idec/Elan Pharmaceuticals, Inc에서 시판되는 항 알파-4 인테그린 항체 이를 테면 나탈리주마브 (TYSABRI®)) 등, 또는 B 세포 표면 표식에 결합되는 항체 (가령 항-CD20 항체 이를 테면 리투시마브 (Rituxan® 또는 Mabthera® 또는 오크레리주마브(둘다 Genentech에서 시판되는) 또는 Genmab/Glaxo Group에서 시판되는 오파투무마브(Arzerra®))를 포함한다.

[0173] 복합 요법의 일부 실시예에서, 이들 세포, 인자들 및/또는 조성물은 인터페론 분류 약물 이를 테면 IFN-베타-1a (REBIF® 및AVONEX®) 또는 IFN-베타-1b (BETASERON®); 글라티라머 아세테이트 (COPAXONE®)와 같은 올리고펩티드; 세포독성 물질 이를 테면 미토산트론 (NOVANTRONE®), 메토트렉세이트, 사이클로포스파미드, 클로람부칠, 아자티오프린; 정맥내 면역글로블린 (감마 글로불린); 림프구-고갈 요법 (가령, 미토산트론, 사이클로포스파미드, 캄패스(Campath), 항-CD4 항체, 클라드리빈(cladribine), 전 신체 조사(irradiation), 골수 이식); 전신 코르티코스테로이드 요법을 포함하는 코르티코스테로이드 (가령 메틸프레드니솔론, 프레드니손, 덱사메타손, 또는 글루코르티코이드); 비-림프구-고갈 면역억제성 요법 (가령, 미코페놀레이트 모페틸(mycophenolate mofetil) (MMF) 또는 사이클로스포린); "스타틴(statin)"분류의 콜레스테롤-낮추는 약물로써, 세리바스타틴(BAYCOL®), 플루바스타틴(LESCOL®), 아토르바스타틴(LIPITOR®), 로바스타틴(MEVACOR®), 프라바스타틴(PRAVACHOL®), 심바스타틴(Simvastatin) (ZOCOR®); 에스트라디올을 포함하고; 테스토스테론(선택적으로 상승된 투약량에서; Stuve *et al. Neurology 8:290*-301, 2002); 호르몬 대체 요법; MS에 대해 부차적 또는 관련된 증상들에 대한 치료 (가령, 경련, 실금, 통증, 피로); 질환-변경된 항-류마티스성 약물 (DMARD); 비-스테로이드성 항염증성 약물 (NSAID); 혈장사혈; 레보티록신(levothyroxine); 사이클로스포린 A; 소마토스타틴 유사체; 사이토킨 또는 사이토킨 수용체 길항제; 항-대사물질; 면역억제성 물질; 재활성 수술; 방사능요오드; 또는 갑상선적출과 복합된다.

[0174] 또다른 실시예에서, 임의의 실시예에 따라 본 개시내용에서 설명된 조성물은 선조 세포가 맥관 세포로의 분화를

유도 또는 강화시키는 인자를 추가적으로 포함한다. 예시적인 인자들은 맥관 내피 성장 인자(VEGF), 혈소판 유도된 성장 인자 (PDGF; 가령, PDGF-BB), 그리고 FGF를 포함한다.

[0175] 또다른 실시예에서, 임의의 실시예에 따라 본 개시내용에서 설명된 조성물은 조직 특이적 결정된(committed) 세포 (TSCC)를 추가적으로 포함한다. 이 점에 있어서, 국제 특허 출원 PCT/AU2005/001445는 TSCC 및 STRO-1$^+$ 세포들의 투여는 TSCC의 강화된 증식을 유도할 수 있다고 설명한다. 한 실시예에서, TSCC는 뉴런 세포, 가령, 뉴런, 뉴런 전구 세포 또는 슈반(Schwann) 세포다. 대상에게 이러한 조성물의 투여는 맥관 구조의 증가된 생산, 가령, 병에 걸린 조직으로 운반될 영양분의 증가로 이어질 수 있다.

[0176] 의료 장치들

[0177] 본 개시내용은 임의의 실시예에 따른 본 명세서에서 기술된 방법에 이용되거나 또는 용도의 의료 장치를 또한 제공한다. 예를 들면, 본 개시내용은 임의의 실시예에 따라 본 개시내용에서 설명된 것과 같은 STRO-1$^+$ 세포들 및/또는 그의 후손 세포들 및/또는 이로부터 얻은 가용성 인자들을 포함하는 주사기 또는 카테테르 또는 다른 적합한 운반 장치를 제공한다. 선택적으로, 주사기 또는 카테테르는 임의의 실례에 따른 본 명세서에서 기술된 방법에 사용을 위한 지침과 함께 포장된다.

[0178] 또다른 실시예에서, 본 개시내용은 임의의 실시예에 따라 본 개시내용에서 설명된 것과 같은 STRO-1$^+$ 세포들 및/또는 그의 후손 세포들 및/또는 이로부터 얻은 가용성 인자들을 포함하는 이식물을 제공한다. 선택적으로, 이식물은 임의의 실례에 따른 본 명세서에서 기술된 방법에 사용을 위한 지침과 함께 포장된다. 적합한 이식물은 상기 본 개시내용에서 설명된 것과 같이 골격과 STRO-1$^+$ 세포들 및/또는 그의 후손 세포들 및/또는 이로부터 얻은 가용성 인자들로 형성될 수 있다.

[0179] 투여 방식

[0180] STRO-1$^+$ 세포-유래된 상층액 또는 가용성 인자, STRO-1$^+$ 세포 또는 이의 후손은 외과적으로 이식되거나, 주사되거나, 전달되거나(가령, 카테터 또는 주사기에 의해), 또는 복구 또는 증가가 요구되는 부위로 직접적으로 또는 간접적으로 달리 투여될 수 있다.

[0181] 한 실시예에서, STRO-1$^+$ 세포-유래된 상층액 또는 가용성 인자, STRO-1$^+$ 세포 또는 이의 자손은 대상의 혈류로 전달된다. 가령, STRO-1$^+$ 세포-유래된 상층액 또는 가용성 인자, STRO-1$^+$ 세포 또는 이의 후손은 비경구 전달된다. 비경구 투여의 예시적인 루트에는 복막내, 복막내, 심실내, 뇌실내, 척수강내가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 한 실시예에서, STRO-1$^+$ 세포-유래된 상층액 또는 가용성 인자, STRO-1$^+$ 세포 또는 이의 후손은 동맥내, 대동맥 내로, 심장의 심이 또는 심실 내로, 혈관, 예를 들면, 정맥내로 전달된다.

[0182] 심장의 심이 또는 심실에 세포 전달의 경우에, 세포는 폐에 세포의 급속한 전달로부터 발생할 수 있는 합병증을 피하기 위해 왼쪽 심이 또는 심실에 투여될 수 있다.

[0183] 한 실시예에서, STRO-1$^+$ 세포-유래된 상층액 또는 가용성 인자, STRO-1$^+$ 세포 또는 이의 후손은 예로써, 주사기를 이용하여, 또는 카테터 또는 중심선(central line)을 통해 전달 부위 내로 주사된다.

[0184] 치료적 제제에 대한 투여 섭생의 선별은 독립체의 혈청 또는 조직 회전율(turnover rate), 증상의 수준, 그리고 독립체의 면역원성(immunogenicity)을 비롯한 여러 인자에 좌우된다. 예를 들면, 투여 섭생은 허용되는 수준의 부작용과 일관되게, 환자의 전달되는 치료적 화합물의 양을 극대화시킨다. 따라서 전달되는 제제의 양은 특정 독립체 및 치료되는 질환의 심각도에 부분적으로 좌우된다.

[0185] 한 실시예에서, STRO-1* 세포-유래된 상층액 또는 가용성 인자, STRO-1$^+$ 세포 또는 이의 자손은 단일 일시주사 복용량(single bolus dose)으로서 전달된다. 대안으로, STRO-1$^+$ 세포-유래된 상층액 또는 가용성 인자, STRO-1$^+$ 세포 또는 이의 자손은 연속 주입(continuous infusion)에 의해, 또는 예로써, 하루, 1주 또는 주당 1-7회의 간격에서 투약에 의해 투여된다. 예시적인 투약 프로토콜은 유의미한 원치 않는 부작용을 회피하는 최대량 또는 투약 빈도(dose frequency)를 수반하는 것이다. 총 1주 용량은 이용되는 화합물의 유형과 활성에 좌우된다. 적절한 용량의 결정은 예로써, 치료에 영향을 주거나, 또는 치료에 영향을 줄 것으로 예측되는 당분야에서 공지되거나 예상되는 파라미터 또는 인자를 이용하여 임상의에 의해 만들어진다. 일반적으로, 투약은 최적 용량

(optimum dose)보다 다소 적은 양으로 시작되고, 그 이후 임의의 부정적인 부작용에 비하여 원하는 또는 최적 효과가 달성될 때까지 작은 증분(increment)에 의해 증가된다.

[0186] 염증성 신경 질병의 치료 또는 진행을 지연시키기 위한 본 개시내용의 실시예에 따르면, STRO-1^{+} 세포들 및/또는 그의 후손 세포들 및/또는 그로부터 유래된 가용성 인자들은 가령, 당 분야에 공지된 표준 방법들 및/또는 본 개시내용에서 설명된 방법들을 이용하여 질환의 진단 이후 투여될 수 있다.

[0187] 염증성 신경성 질병을 예방 또는 개시를 지연시키는 이들 실시예의 경우, STRO-1^{+} 세포들 및/또는 그의 후손 세포들 및/또는 그로부터 유래된 가용성 인자들은 질환의 임상 전 진단에 앞서 투여될 수 있는데, 예를 들면 대상이 미엘린내 병소로 고통을 받지만, 아직 MS로 진단되지 않거나 및/또는 항인지질 항체를 생산할 때 투여될 수 있다.

[0188] 본 개시내용은 다음의 비-제한적 실시예들을 포함한다.

[0189] **실시예들**

[0190] 실시예 1: STRO-3^{*} 세포의 선별에 의한 MPC의 면역선별

[0191] 골수(BM)는 건강한 정상 성인 지원자(20-35세 연령)로부터 수확되었다. 간단히 말하면, 40 ml의 BM이 후장골극(posterior iliac crest)으로부터 리튬-헤파린 항응혈약-내포 튜브 내로 흡출된다.

[0192] BMMNC는 기존 문헌(Zannettino, A.C. *et al.* (1998) *Blood* 92: 2613-2628)에서 기술된 바와 같이, Lymphoprep™(Nycomed Pharma, Oslo, Norway)을 이용한 밀도 구배 분리에 의해 제조된다. 4℃에서 30분 동안 400 x g에서 원심분리 이후에, 연층(buffy layer)은 이전 피펫(transfer pipette)으로 제거되고, 그리고 5% 소 태아 혈청(FCS, CSL Limited, Victoria, Australia)을 내포하는 Hank 균형 염 용액(HBSS; Life Technologies, Gaithersburg, MD)으로 구성되는 "HHF"에서 3회 세척된다.

[0193] STRO-3^{+} (또는 $TNAP^{+}$) 세포는 기존 문헌(Gronthos *et al.* (2003) *Journal of Cell Science 116*: 1827-1835; Gronthos, S. and Simmons, P.J. (1995) *Blood* 85: 929-940)에서 기술된 바와 같이, 자성 활성화 세포 분리에 의해 차후 단리되었다. 간단히 말하면, 대략 1-3 x 10^{8} BMMNC는 HHF에서 10%(v/v) 정상 토끼 혈청으로 구성되는 차단 완충액에서, 얼음 위에서 20분 동안 배양되었다. 이들 세포는 차단 완충액에서 STRO-3 mAb의 ^ μg/ml 용액 200 μℓ와 함께, 얼음 위에서 1시간 동안 배양된다. 이들 세포는 400 x g에서 원심분리에 의해 HHF에서 차후 2회 세척된다. HHF 완충액에서 1/50 희석의 염소 항-생쥐 γ-비오틴(Southern Biotechnology Associates, Birmingham, UK)이 첨가되고, 그리고 이들 세포는 얼음 위에서 1시간 동안 배양된다. 세포는 MACS 완충액(1% BSA, 5 mM EDTA 및 0.01% 나트륨 아지드로 보충된 Ca^{2+}-와 Mn^{2+}-없는 PBS)에서 상기와 같이 2회 세척되고 0.9 ml MACS 완충액의 최종 부피에서 재현탁되었다.

[0194] 100 μℓ 스트렙타비딘 마이크로구슬(Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach, Germany)이 세포 현탁액에 첨가되고 얼음 위에서 15분 동안 배양된다. 세포 현탁액은 2회 세척되고, 0.5 ml의 MACS 완충액에서 재현탁되고, 그리고 미니 MACS 칼럼(MS Columns, Miltenyi Biotec) 위에 차후 적하되고, 그리고 STRO-3 mAb(수탁 번호 PTA-7282로 2005년 12월 19일자에 American Type Culture Collection(ATCC)에 기탁됨 - International Publication No. WO 2006/108229를 참고한다)에 결합하지 않은 세포를 회수하기 위해 0.5 ml MACS 완충액으로 3회 세척된다. 추가의 1 ml MACS 완충액의 첨가 후, 칼럼은 자석으로부터 제거되고, 그리고 $TNAP^{+}$ 세포는 정압(positive pressure)에 의해 단리된다. 각 분획으로부터 세포의 분취량(aliquot)은 스트렙타비딘-FITC로 염색될 수 있고, 그리고 순도는 유세포분석법에 의해 평가될 수 있다.

[0195] 실시예 2: STRO-3 mAb에 의해 선별된 세포는 STRO-$1^{밝음}$ 세포이다

[0196] 세포 STRO-$1^{밝음}$ 세포를 단리하기 위한 단일 반응물로서 STRO-3 mAb를 이용하는 잠재력을 확증하기 위한 실험이 설계되었다.

[0197] STRO-3(IgG1)은 STRO-1(IgM)의 것과 상이한 아이소타입이라는 점을 고려하여, 클론원성 CFU-F를 확인하는 STRO-3의 능력은 MACS 절차를 이용하여 단리된 STRO-1^{+} 세포와의 공동-발현에 기초하여 이중-칼라 FACS 분석에 의해

평가되었다(도 1). 점도표 히스토그램은 리스트모드 데이터로서 수집된 5 x 10^4 사건을 나타낸다. 수직선과 수평선은 동일한 조건 하에 처리된 아이소타입-정합된 대조 항체, 1B5(IgG)와 1A6.12(IgM)로 획득된 <1.0% 평균 형광의 반응성 수준으로 설정되었다. 이들 결과는 STRO-$1^{밝음}$ 세포의 소수 집단이 TNAP(위쪽 오른쪽 사분면)을 공동-발현하지만, 나머지 STRO-1^{+} 세포가 STRO-3 mAb와 반응하지 않는다는 것을 증명한다. 4개의 사분면 모두로부터 FACS에 의해 단리된 세포는 CFU-F의 발생에 대해 차후 검정되었다(표 1).

표 1

세포 표면 마커 STRO-1과 TNAP의 공동-발현에 기초된 이중-칼라 FACS 분석에 의한 인간 골수 세포의 농축(도 1을 참고한다). FACS 분류된 세포는 20% FCS로 보충된 알파 MEM에서 표준 클론원성 조건 하에 배양되었다. 상기 데이터는 도말된 10^5 세포당 14일 집락-형성 세포(CFU-F)의 평균 숫자 ± SE(n=3 상이한 골수 흡입물)를 나타낸다. 이들 데이터는 인간 MPC가 STRO-1 항원을 밝게 공동-발현하는 BM의 TNAP 양성 분획에 배타적으로 국한된다는 것을 암시한다.

골수 분획	CFU-F/10^5 세포들의 빈도	농축(증가 배수)
분획화안된	11.0 ± 2.2	1.0
TNAP^{+}/STRO-$1^{밝음}$	4,511 ± 185	410
TNAP^{+}/STRO-$1^{둔감}$	0.0	0.0

[0198]

[0199] 실시예 3: STRO-$1^{둔감}$ 및 STRO-$1^{밝음}$ 세포들의 상대적 유전자 및 표면 단백질 발현

[0200] 실험의 첫 시리즈에 있어서, 절반-정량적 RT-PCR 분석을 이용하여 형광 활성화된 세포 분류에 의해 단리된 STRO-$1^{둔감}$ 및 STRO-$1^{밝음}$ 집단에 의해 발현되는 다양한 계통-연합된 유전자들의 유전자 발현 프로파일을 검사하였다(도 2A). 실험의 두 번째 시리즈에 있어서, 유동 세포분석법 및 평균 채널 형광 분석을 이용하여 형광 활성화된 세포 분류에 의해 단리된 STRO-$1^{둔감}$ 및 STRO-$1^{밝음}$ 집단에 의해 발현되는 다양한 계통-연합된 단백질들의 표면 단백질 발현 프로파일을 검사하였다.

[0201] 총 세포성 RNA는 2 x 10^6 STRO-$1^{밝음}$ 또는 STRO-$1^{둔감}$ 분류된 1차 세포들, 연골세포 펠렛 및 다른 유도된 배양물로부터 준비하였고, 그리고 제조업자의 추천에 따라 RNAzolB 추출 방법 (Biotecx Lab. Inc., Houston, TX)을 이용하여 용해시켰다. 각 하위집단으로부터 단리된 RNA를 첫-가닥(First-strand) cDNA 합성 키트(Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)를 이용하여 준비된, cDNA 합성을 위한 주형으로 이용되었다. 다양한 전사체들의 발현은 기존에 설명된 것과 같이 표준 프로토콜을 이용하여 PCR 증폭에 의해 평가되다(Gronthos *et al., J. Bone and Min. Res.* 74:48-57, 1999). 본 연구에 이용된 프라이머 세트는 표 2에 나타낸다. 증폭 이후, 각 반응 혼합물은 1.5% 아가로즈 겔전기영동에 의해 분석되었고, 그리고 에티디움 브롬화물 착색으로 시각화되었다. RNA 온전성(integrity)은 GAPDH의 발현에 의해 평가되었다.

[0202] 각 세포 표식에 대한 상대적인 유전자 발현은 ImageQant 소프트웨어를 이용하여 하우스-키핑 유전자, GAPDH의 발현을 참고하여 평가되었다(도 2B, C). 추가적으로, 이중-색 유동 세포분석을 이용하여 STRO-1 항체와 조합된 광범위한 세포 계통-연합된 표식의 발현에 기초하여 탈체 확장된 MPC의 단백질 발현 프로파일을 검사하였다. STRO-$1^{둔감}$ 및 STRO-$1^{밝음}$ 배양된 세포들의 유전자 및 단백질 발현에 기초하여 일반적인 유전자형의 요약은 표 3에 제시된다. 이 데이터에서 탈체 확장된 STRO-$1^{밝음}$ MPC는 혈관 주위 세포들과 연합된 앙기오포에틴-1, VCAM-1, SDF-1, IL-1p, TNF α, 및 RANKL을 포함하는 표식들을 차등적으로 더 많이 발현하였다는 것을 나타낸다. STRO-1

^{둔감} 및 STRO-1^{밝음} 배양된 세포들의 단백질 및 유전자 발현 프로파일의 비교는 표 3 및 4에 요양된다.

[0203] 공제(substractive) 혼성화 연구를 또한 실행하여 STRO-1^{밝음} 세포들에 의해 독특하게 발현되는 유전자를 확인하였다. 간략하게 설명하자면, STRO-1^{둔감} 및 STRO-1^{밝음} 은 상기에서 설명된 것과 같이 단리되었다(도 3A 참고). RNA STAT-60 시스템(TEL-TEST)을 이용하여 5가지 상이한 골수 시료로부터 모은 STRO-1^{둔감} 및 STRO-1^{밝음} 세포들로부터 총 RNA가 준비되었다. 제 1-가닥 합성은 SMART cDNA 합성 키트(Clontech Laboratories)를 이용하여 실행되었다. 생성된 mRNA/단일-가닥으로된 cDNA 하이브리드는 제조업자의 설명에 따라 첫 RT 과정 동안 형성된 3' 및 5' 프라임 말단에서 특이적 프라이머 부위들을 이용하여 먼-거리(long-distance) PCR(Advantage 2 PCR 키트; Clontech)에 의해 증폭되었다. STRO-1^{밝음} cDNA의 Rsa1 절단 이후, Clontech PCR-Select cDNA Substraction 키트를 이용하여 상이한 특이적 어뎁터 올리고뉴클레오티드를 결찰시키는데 2 분획(aliquots)이 이용되었다. 2회의 공제 혼성화는 제조업자의 프로토콜에 따라, STRO-1^{밝음} (테스터) 및 STRO-1^{둔감} (드라이버) cDNA를 이용하여, 그리고 반대경우도 마찬가지로, 실행되었다. 이 과정은 STRO-1^{밝음} 드라이버 cDNA에 대항하여 혼성화된 STRO-1^{둔감} 테스터 cDNA를 이용하여 또한 실행되었다.

[0204] STRO-1^{밝음} 집단에 의해 독특하게 발현되는 유전자를 확인하기 위하여, STRO-1^{밝음}-공제된 cDNA를 이용하여 T/A 클로닝 벡터안에 결찰된 STRO-1^{밝음} 공제된 cDNA로 형질변환된 200개의 무작위로 선택된 세균 클론을 포함하는 모사(replicate) 저-밀도 마이크로어레이 필터를 구축하였다. 마이크로어레이는 [^{32}P] dCTP라벨된 STRO-1^{밝음}또는 STRO-1^{둔감} 공제된 cDNA로 후속적으로 프로브되었다(도 3B-C). 분별 스크리닝으로 총 44개의 클론이 확인되었는데, 이들은 STRO-1^{둔감} 및 STRO-1^{밝음} 하위집단 사이에 매우 차등적으로 발현되었다. 차등적으로 발현된 모든 클론의 DNA 서열과에서 오직 1개의 클론이 공지의 기질(stromal) 세포 미토겐; 즉, 혈소판-유도된 성장 인자(PDGF)을 나타내었다(Gronthos and Simmons, *Blood. 85*: 929-940, 1995). 흥미로운 것은, 44개의 클론중 6개는 케모킨, 기질-유도된 인자-1(SDF-1)에 대응하는 DNA 삽입물을 함유하는 것으로 밝혀졌다. 인간 STRO-1^{밝음} 세포들에서 SDF-1 전사체들의 매우 풍부함은 새로 분류된 STRO-1^{밝음}, STRO-1^{둔감}, 그리고 STRO-1^{음성} 골수 하위집단으로부터 준비된 총 RNA의 반정량적 RT-PCR에 의해 확인되었다(도 3D 및 표 3).

표 2

인간 mRNA의 특이적 증폭을 위한 RT-PCR 프라이머와 조건들

표적 유전자	센스/안티센스(5'-3') 프라이머 서열	생성물 크기
GAPDH	CACTGACACGTTGGCAGTGG (SEQ ID NO: 1) CATGGAGAAGGCTGGGGCTC (SEQ ID NO: 2)	417
SDF-1	GAGACCCGCGCTCGTCCGCC (SEQ ID NO: 3) GCTGGACTCCTACTGTAAGGG (SEQ ID NO: 4)	364
IL-1β	AGGAAGATGCTGGTTCCCTCTC (SEQ ID NO: 5) CAGTTCAGTGATCGTACAGGTGC (SEQ ID NO: 6)	151
FLT-1	TCACTATGGAAGATCTGATTTCTTACAGT (SEQ ID NO: 7) GGTATAAATACACATGTGCTTCTAG (SEQ ID NO: 8)	380
TNF-α	TCAGATCATCTTCTCGAACC (SEQ ID NO: 9) CAGATAGATGGGCTCATACC (SEQ ID NO: 10)	361
KDR	TATAGATGGTGTAACCCGGA (SEQ ID NO: 11) TTTGTCACTGAGACAGCTTGG (SEQ ID NO: 12)	450
RANKL	AACAGGCCTTTCAAGGAGCTG (SEQ ID NO: 13) TAAGGAGGGGTTGGAGACCTCG (SEQ ID NO: 14)	538
렙틴	ATGCATTGGGAACCCTGTGC (SEQ ID NO: 15) GCACCCAGGGCTGAGGTCCA (SEQ ID NO: 16)	492
CBFA-1	GTGGACGAGGCAAGAGTTTCA (SEQ ID NO: 17) TGGCAGGTAGGTGTGGTAGTG (SEQ ID NO: 18)	632
PPARγ2	AACTGCGGGGAAACTTGGGAGATTCTCC (SEQ ID NO: 18) AATAATAAGGTGGAGATGCAGGCTCC (SEQ ID NO: 19)	341
OCN	ATGAGAGCCCTCACACTCCTC (SEQ ID NO: 20) CGTAGAAGCGCCGATAGGC (SEQ ID NO: 21)	289
MyoD	AAGCGCCATCTCTTGAGGTA (SEQ ID NO: 22) GCGAGAAACGTGAACCTAGC (SEQ ID NO: 23)	270
SMMHC	CTGGGCAACGTAGTAAAACC (SEQ ID NO: 24) TATAGCTCATTGCAGCCTCG (SEQ ID NO: 25)	150
GFAP	CTGTTGCCAGAGATGGAGGTT (SEQ ID NO: 26) TCATCGCTCAGGAGGTCCTT (SEQ ID NO: 27)	370
네스틴	GGCAGCGTTGGAACAGAGGTTGGA (SEQ ID NO: 28) CTCTAAACTGGAGTGGTCAGGGCT (SEQ ID NO: 29)	460
SOX9	CTCTGCCTGTTTGGACTTTGT (SEQ ID NO: 30) CCTTTGCTTGCCTTTTACCTC (SEQ ID NO: 31)	598
콜라겐 유형 X	AGCCAGGGTTGCCAGGACCA (SEQ ID NO: 32) TTTTCCCACTCCAGGAGGGC (SEQ ID NO: 33)	387
어그레칸	CACTGTTACCGCCACTTCCC (SEQ ID NO: 34) ACCAGCGGAAGTCCCCTTCG (SEQ ID NO: 35)	184

[0205]

표 3

STRO-1^{밝음} 및 STRO-1^{흐림} 집단에서 상대적인 유전자 발현의 요약. 역 전사-PCR에 의해 정의된 바와 같이, STRO-1^{밝음} 및 STRO-1^{흐림} 집단 사이에서 측정가능하고 차등적 발현을 나타내는 유전자들의 목록이 제시된다. 값들은 하우스-키핑 유전자, GAPDH를 참고한 상대적 유전자 발현을 나타낸다.

		GAPDH에 비교한 유전자 발현	
조직	*표식*	STRO-1^{밝음}	STRO-1^{흐림}
뉴런	*GFAP (신경교 섬유질 산성 단백질)*	0.1	0.7
뼈	*OCN (오스테오칼신)*	1.1	2.5
	OSX (오스테릭스)	0.4	1.3
	CBFA-1 (코어 인자 결합 단백질-1)	0.3	0.6
면역 조절	*RANKL (핵 인자 κ B의 수용체 활성물질)*	1.6	0.3
	SDF-1-알파(기질 유도된 인자-1-알파)	3.2	0.1
지방	*렙틴*	3.1	4.2
심근세포	*GATA-4*	1.1	2.9
내피 세포들	*Ang-1 (앙기오포에틴-1)*	1.5	0.8
연골세포	*Sox 9*	0.3	1.1
	COL X (콜라겐 X)	3.5	2.8
전(Pro)-염증성 사이토킨	*TNF-알파 (종양 괴사 인자 알파)*	1.7	0.9

[0206]

[0207] 단백질 표면 발현과 STRO-1 발현의 밀도와의 상관관계를 위하여, 탈체 확장된 세포들 유도된 골수 MPC의 단일 세포 현탁액을 트립신/EDTA 분리에 의해 준비하였고, 후속적으로 세포 계통-연합된 광범위한 표식들을 확인하는 항체와 함께 STRO-1 항체로 항온처리되었다. STRO-1은 염소 항-뮤린 IgM-플루오레세인 이소티오시아네이트를 이용하여 확인되었으며, 모든 다른 표식들은 염소 항-마우스 또는 항-토끼 IgG-피코에리트린을 이용하여 확인되었다. 세포내 항원을 확인하는 이들 항체의 경우, 세포 조제물을 우선 STRO-1 항체로 라벨시키고, 차가운 70% 에탄올에 고정시켜, 세포 막이 삼투성이 되도록 하고, 그 다음 세포내 항원-특이적 항체와 함께 항온처리되었다. 아이소타입 정합된 대조군 항체들이 동일한 조건에서 이용되었다. 이중-색조 유동 세포분석은 COULTER EPICS 유동 세포측정기를 이용하여 실행하였고, 리스트 모드 데이터가 수집되었다. 점도표는 각 계통 세포 표식 (y-축) 및 STRO-1 (x-축)에 대한 형광 강도 수준을 나타내는 5,000개 리스트모드 이벤트를 나타낸다. 수직 및 수평 사분면은 아이소타입 정합된 음성 대조군 항체를 기준하여 확립되었다.

표 4

STRO-1^{밝음} 및 STRO-1^{흐림} 집단에서 상대적인 단백질 발현 요약. 유동 세포분석법에 의해 정의된 바와 같이, STRO-1^{밝음} 및 STRO-1^{흐림} 집단 사이에서 차등적 발현을 나타내는 단백질들의 목록이 제시된다. 값들은 착색의 상대적인 평균 형광 강도를 나타낸다.

[0208]

		평균 형광 강도	
조직	표식	STRO-1^{밝음}	STRO-1^{흐림}
뉴런	*신경섬유*	1.7	20.5
뼈	*ALK PHOS (알칼리 포스파타제)*	5.7	44.5
면역조절	*RANKL (핵 인자 κ B의 수용체 활성물질)*	658.5	31.0
상피세포	*사이토케라틴 10+13*	1.2	23.3
	사이토케라틴 14	1.8	8.8
평활근	*α-SMA (알파 평활근 액틴)*	318.0	286.0
연골세포	*비글리칸(Byglycan)*	84.4	65.9
기저 섬유아세포	*테나신 C*	22.2	6.9
심근세포	*트로포닌 C*	2.5	15.0

[0209] 이들 결과에서 SDF-1 알파와 RANKL이 STRO-1^{밝음} 세포들에 의해 많이 발현된다는 것을 알 수 있다. 면역 장애들 이를 테면 EAE에 대항하여 보호를 보유하는 $CD4^+$ $CD25^+$ 조절성 T (Treg)의 상향-조절에 관련된 것으로 알려져 있기 때문이 이러한 사실은 중요하다(Loser *et al.*, Nature Medicine 12:1372-1379, 2006; Hess, Biol. Blood Marrow Transplant, 12 (1 Suppl 2):13-21, 2006; 그리고 Meiron *et al.*, J. Exp. Medicine 205:2643-2655, 2008).

[0210] 실시예 4 - EAE에서 STRO-1$^+$ 세포들의 효과

[0211] 다음 실험을 위하여, C57Bl/6J 마우스에서 미엘린 희돌기교세포 당단백질 (MOG)-유도된 실험적 염증성 뇌척수염(EAE)이 이용되었다. C57Bl/6J 마우스는 MS 환자들의 것과 유사한 표현형 증상(진행성 중풍)을 나타낼 뿐만 아니라, CNS에서 상당한 염증, 탈수초화 그리고 엑손 상실/손상을 보여준다. 이용된 EAE의 유도, 임상 증상의 평가 및 MPC 이식에 대한 면역화 절차들은 다음과 같다.

[0212] ***EAE의 활성 유도***

[0213] 마우스는 400 μg의 죽은 미코박테리움 튜베르쿨로시스(Mycobacterium tuberculosis) H37Ra를 포함하는 Freund의 완전 어쥬번트 동량과 혼합된, 인산 완충 염수(PBS)에 용해된 200μg의 재조합 MOG로 면역화되었다. 0.1 ml의 이 혼합물은25 가우지(G) 바늘을 이용하여 좌우 옆구리로 피하 주사되었다(총 0.2 ml/마우스). 마우스는 29 G 바늘을 이용하여 0일 시점 및 2일차 시점에 꼬리 정맥을 통하여 정맥을 통하여 0.30 ml PBS에 350ng의 비활성화된 보르데텔라 페르투시스(***Bordetella*** pertussis) 독소로 또한 면역화되었다. i.v. 부위로부터 출혈 위험을 감소시키기 위하여 주사후 30초간 I.V. 부위에 가벼운 압력이 적용되었다.

[0214] 활발한 출혈이 없음을 확인하기 위하여 10-15분 동안 2-5분마다 마우스를 관찰하였다.

[0215] ***MPC로 치료***

[0216] MPC는 실시예 1에서 설명된 것과 같이 기본적으로 단리되었다. 질환 유도 후 8일, 10일 및 12일 시점에서, $2x10^5$ 또는 $4x10^5$ MPC는 200μl PBS의 용적으로 단일 정맥 주사(i.v.)로 투여되었다(표 5 참고). 대조군들은 동량의 PBS 만으로 i.v. 주사를 맞았다. 마우스를 매일 관찰하였고, 하기에서 설명된 등급에 따라 임상 징후를

기록하였다. 질환 과정을 관찰하기 위하여 약 36일 동안 실험들이 계속되었다. 실험 종료시, 뇌, 척추 및 시신경을 잘라내고, 포르말린 용액에 고정시켰다.

표 5

치료 섭생의 요약

[0217]

치료	주사당 한 마리 마우스에서 세포들의 수	20g의 마우스에 주사된 총 PMC	마우스의 숫자
PBS I.V.	-	-	12
고 용량 MPC I.V.	4 x10^5 MPC	6x10^6 MPC/Kg	5
저 용량 MPC I.V.	2x10^5 MPC	3x10^6 MPC/Kg	5

[0218] ***마우스의 관찰***

[0219] 모든 마우스는 전체 실험 동안 신경성 기능이상의 신호에 대해 매일 검사받는다.

[0220] 신경성 기능이상의 등급:

[0221] 0 - 정상

[0222] 1 - 꼬리 신호만 상실

[0223] 2 - 1 또는 2개의 뒷다리의 약간의 쇠약 및 비정상적인 걸음

[0224] 3 - 뒷 다리의 움직임 불가능

[0225] 4 - 뒷 다리의 움직임 불가능 및 앞다리들의 약간의 쇠약

[0226] 5 - 사망

[0227] ***결과***

[0228] 대조군 C57Bl/6J 마우스는 MS 환자들의 것과 유사한 표현형 증상(진행성 중풍)을 나타낼 뿐만 아니라, CNS에서 상당한 염증, 탈수초화 그리고 엑손 상실/손상을 보여준다.

[0229] 도 4에 보여진 것과 같이, EAE 질환 유도 개시때 정맥으로 투여된 MPC는 PBS로 처리된 EAE 동물들과 비교하였을 때 36일 과정에 걸쳐 평균 임상 질환 득점의 심각함을 저해시킬 수 있다.

[0230] 도 5에서 MPC 치료는 만성 진행성 EAE에서 누적 질환 지수의 용량-의존적 감소를 유도한다는 것을 보여준다(평균 임상 질환 득점의 곡선 분석 아래 총 면적).

[0231] MPC의 투여 효과는 표 6에 요약된다:

표 6

MPC로 치료 후 마우스 EAE 모델에서 임상 결과의 요약

[0232]

	PBS	총 MPC 용량 0.6×10^5 (3×10^6 MPC/kg)	총 MPC 용량 1.2×10^5 (6×10^6 MPC/kg)
질환 발생	12/12	5/5	5/5
질환 개시 일 (범위)	13.92 ± 0.54 (11-18)	11.6 ± 0.6 (10-13)	13.8 ± 0.97 (12-17)
사망 또는 중증 질환 (%)	3/12 (25)	0/5 (0)	0/5 (0)
최대 임상 득점	3.5 ± 0.26	3	2.6 ± 0.4
누적 질환 지수 (곡선 아래 면적)	62 ± 5.8	55.7 ± 2.1	44.3 ± 4.4

[0233] 표 6의 데이터에서 모든 동물은 MOG 펩티드 35-55로 EAE 유도후 10-18일 사이에 신경성 질환을 나타내는 것을 알 수 있다. MPC로 처리된 동물의 0/15와 비교하여, PBS로 처리된 대조군 동물의 25% (3/12)가 죽었다. 최대 임상 득점은 대조군에서 가장 높았고, 모든 MPC 처리된 집단은 더 낮은 최대 임상 득점을 보였다.

[0234] 36일 동안 평균 임상 득점에 대한 곡선 아래 면적(AUC)인 누적 질환 지수는 대조군에서 관찰되는 것과 비교하여 MPC 요법 집단에서 모두 더 낮았고, 이는 MPC에 의해 강력하고 지속적인 EAE 질환 억제를 나타낸다.

[0235] 이들 데이터는 인간 염증성 신경성 질병의 모델에서 인간 MPC는 EAE의 임상 중증을 감소시키는데 효과적이라는 것을 보여준다.

[0236] 실시예 4 - T 세포 증식에서 MPC의 효과

[0237] 실시예 3에서 설명된 것과 같이 MPC-처리된 마우스 및 대조군들은 질환 유도 (MOG35-55 면역화) 후 36일 시점에서 도태되었다. 비장세포들은 배지 단독으로 시험관에서 배양되거나 또는 MOG35.55로 재-자극되었고, 그 다음 T-세포 증식성 반응은 [^{3}H]-티미딘 통합을 통하여 측정되었다. MOG에 대한 특이적 증식성 반응은 배지만으로 (자극안된) 배양된 정합된 비장세포들과 비교되었다. PMA/이노마이신에서 배양된 비장세포는 세포 증식의 비-특이적 자극(항원-독립적)을 특정화시키는데 작용되었다.

[0238] 도 6에서 제시된 데이터에서 2차 시험관내에서 MOG로 항원 도전에 대한 T 세포 면역 반응이 대조군 동물에서 배양된 T 세포들과 비교하여 저해된다는 것을 설명한다. 도 7의 데이터에서 생체내에서 MPC로 이미 처리된 동물에서 T 세포 면역 반응은 PBS-처리된 대조군 동물의 배양된 T 세포들과 비교하여 시험관내에서 PMA/이노마이신으로의 비-특이적 자극에 대해 강력한 반응을 유지한다는 것을 보여준다. 비-특이적 자극에 대한 이러한 과장된 반응은 마우스 T-세포들에 의해 인간 항원에 대한 이종(xenogenic) 반응을 반영할 수 있다.

[0239] 이들 데이터는 인간 MPC가 MPC의 최종 투여 후 24일에도 특이적 항원(가령 MOG에 의한 항원 자극)에 대한 T 세포 면역 반응을 감소 또는 방지한다는 것을 보여준다. 이들 데이터에서 STRO-1 농축된 MPC는 다발성 경화증 항원에 대한 내성을 유도한다는 것을 나타낸다.

[0240] 실시예 6 - MPC의 시험관내 효과들

[0241] MPC의 면역조절 성질은 하기에서 설명된 것과 같이 증식 분석, 혼합된 림프구 반응 및 사이토킨 생산에 의해 테스트된다.

[0242] *증식 분석 및 혼합된 림프구 반응*

[0243] 단핵 세포들은 실시예 4에서 설명된 것과 같이 MPC 또는 비이클 단독으로 기본적으로 처리된 건강한 C57BL/6 마우스, 2D2 유전자전이 마우스 또는 MOG-면역화된 마우스의 비장으로부터 수집되었다. 단일 세포 현탁액은 10% FBS, 2mM L-글루타민, 100units/ml 페니실린, 100㎍/ml 스트렙토마이신(모두 Invitrogen 제품), 1mM 피루베이트 나트륨(Sigma) 및 50㎍M β-멀캅토에탄올(Sigma)을 포함하는 완전 RPMI 배지에서 준비된다. 적혈 세포 용해 후, 세포들은 2회 세척되고, 그 다음 96-웰 편평한 바닥 미량적정 플레이트에서 20㎍/ml MOG35.55 (GL Biochem), 800ng/ml 이노마이신 및 20pg/ml 포르볼 미리스테이트 아세테이트 (PMA) (둘다 Sigma 제품) 존재하, 또는 10㎍/ml 항-CD3 및 ^g/ml 항-CD8 (둘다 BD 제품)으로 사전 피복된 웰에 웰당 2.5 x 10^5 세포의 농도로 3중 접종된다. 그 다음 세포는 72시간 동안 37℃, 5% CO_2에서 항온처리되고, ^Ci/웰 [3H] 티미딘은 배양시 최종 18시간 동안에 추가된다. 세포를 필터 메트 상에서 수확하고, Top Count Harvester (Packard Biosciences)에 탑재된 방사능활성 핵산이 통합된다. MPC에 의한 T-세포 증식의 억제와 관련된 실험에서, 웰당 2.5 내지 0.002 x 10^4 세포 범위의 농도를 비장세포 추가에 앞서 접종시킨다.

[0244] 혼합된 림프구 반응에서(MLR), C57BL/6 마우스의 2 x 10^5 비장세포(응답자)는 동일한 수의 조사된(irradiated) (20Gy) Balb/c 자극물질 또는 조사된(irradiated) MPC로 항온처리되고, 그리고 배양 최종 24시간 동안 1㎍Ci/웰 [3H] 티미딘의 추가와 함께 5일간 배양된다.

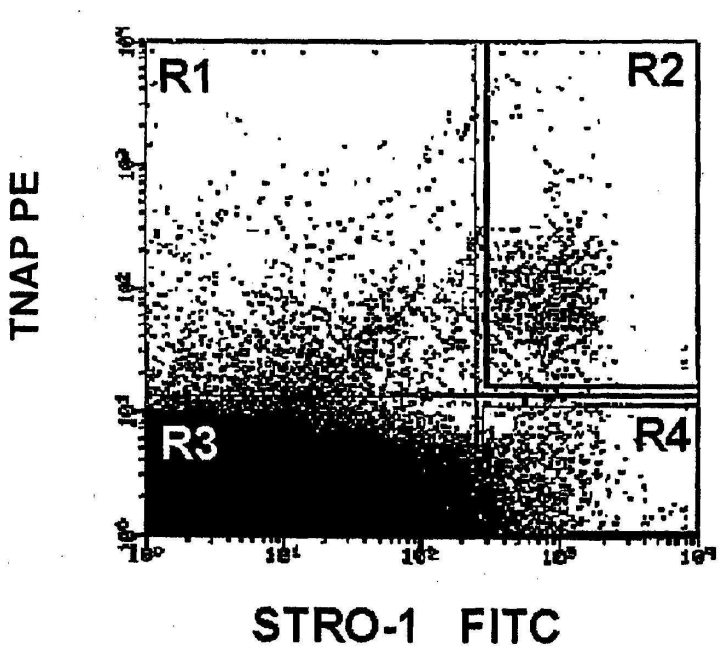
[0245] T-세포 저해와 관련된 MLR에서, 2 x 10^4 조사된(irradiated) MPC는 비장세포 첨가에 앞서 웰에 접종된다.

[0246] *사이토킨 생산*

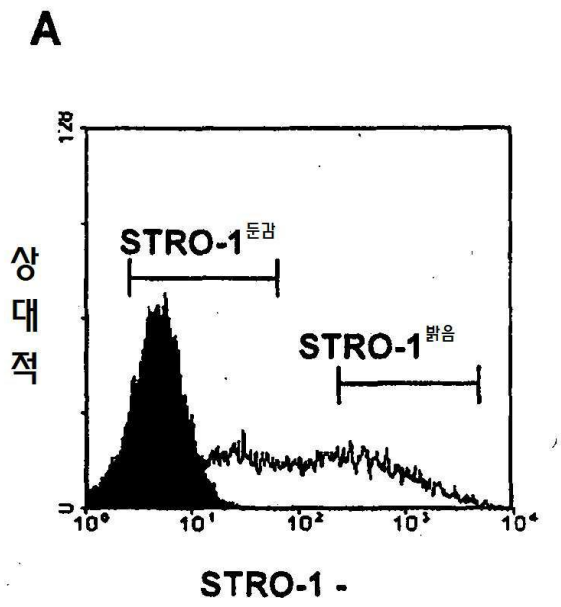
[0247] 사이토킨 생산의 분석에 이용된 상층액은 20㎍/ml MOG35.55 단독으로 자극된 또는 2 x 10^4 MPC (MPC: 비장세포 1:10의 비율)로 자극된 2D2 유전자전이 마우스로부터 2.5x10^6 비장세포의 공동 배양 2일차로부터 획득한다. 사이토킨의 정량 분석은 제조업자의 지시에 따라 기본적으로 마우스 Th1/Th2/Th17 세포계산 비드 어레이(CBA) 키트(BD)를 이용하여 실행되며, 그리고 BD FACSCanto II 유동 세포분석기에서 분석된다. 다음의 사이토킨이 측정된다: 인터루킨 (IL)-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, 인터페론-γ (IFN-γ) 및 종양 괴사 인자-α (TNF-α).

도면

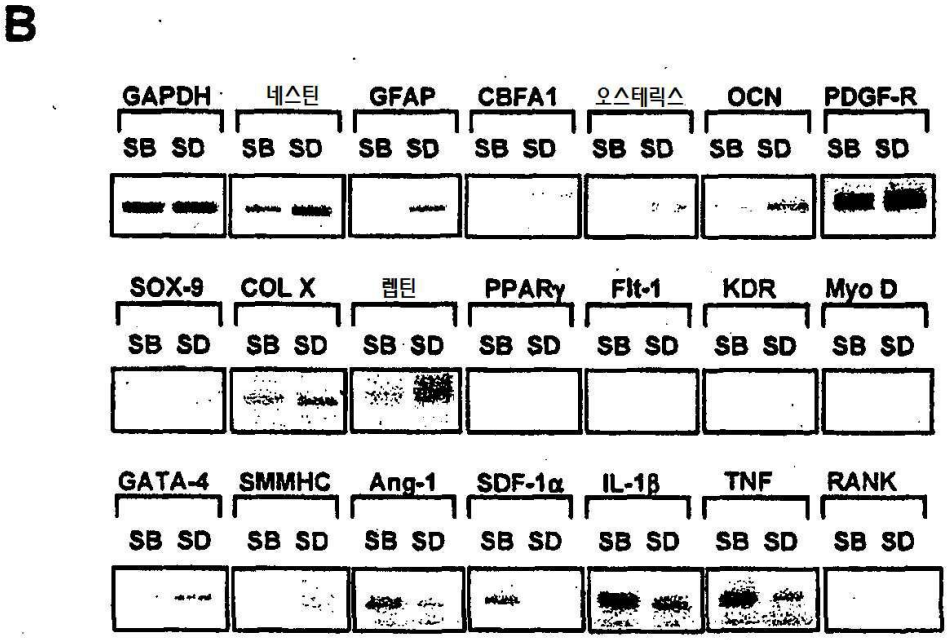
도면1



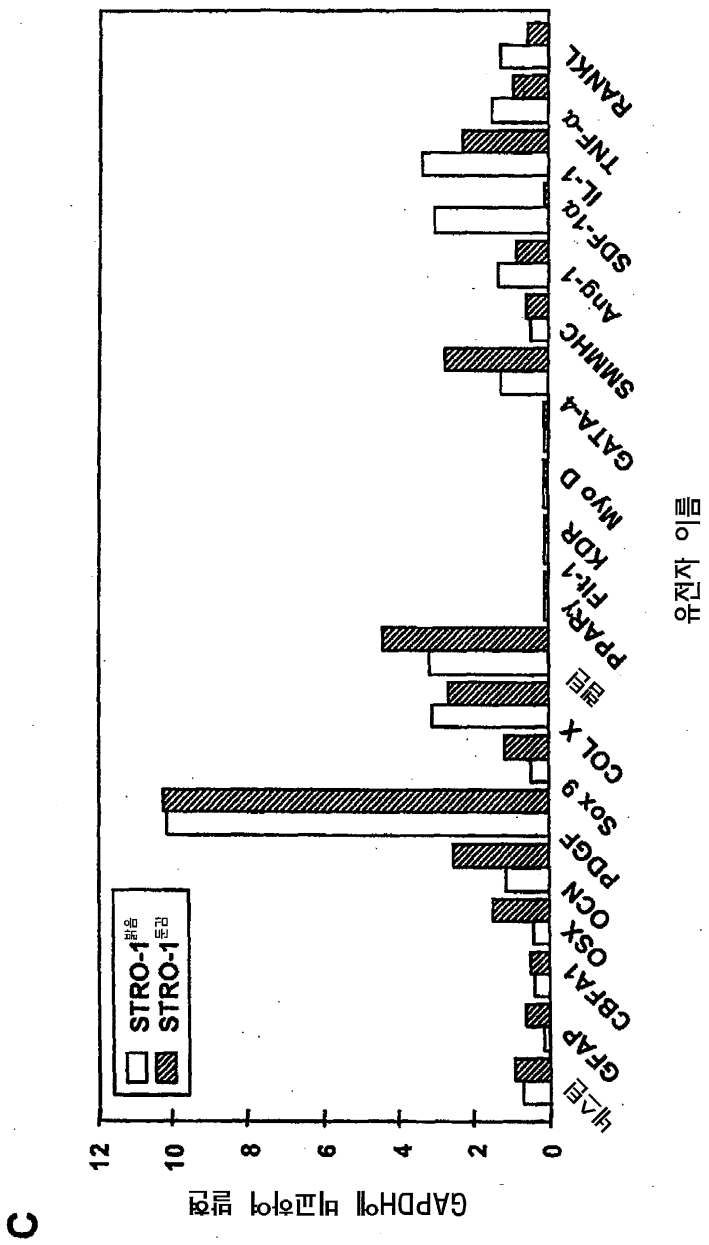
도면2a


A
상대적
STRO-1 둔감
STRO-1 밝음
STRO-1 -

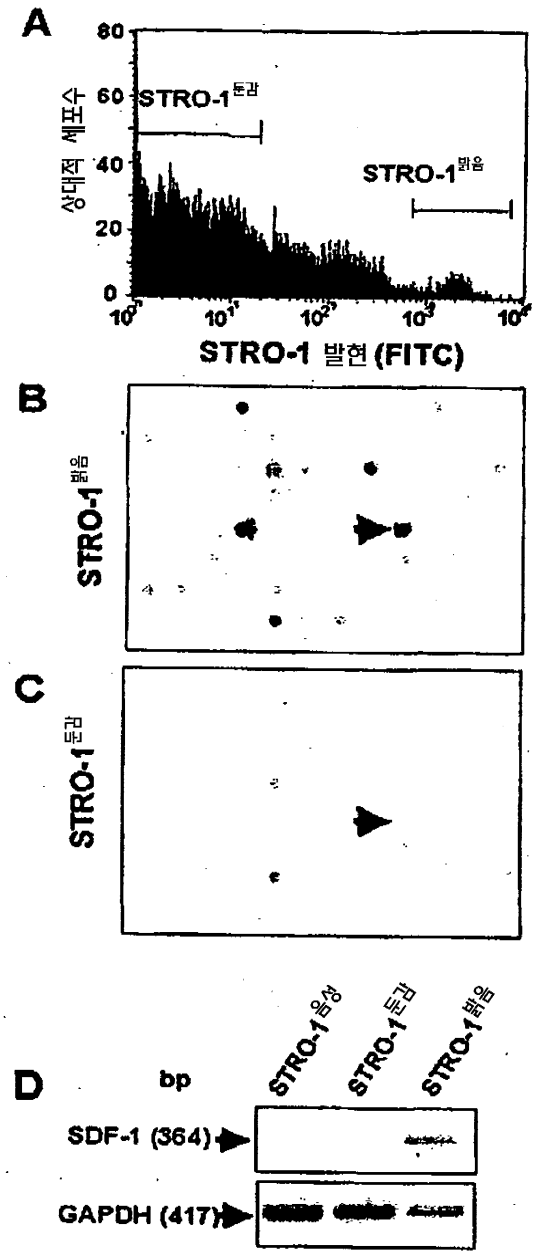
도면2b


B
GAPDH
네스틴
GFAP
CBFA1
오스테릭스
OCN
PDGF-R
SOX-9
COL X
렙틴
PPARγ
Flt-1
KDR
Myo D
GATA-4
SMMHC
Ang-1
SDF-1α
IL-1β
TNF
RANK
SB SD

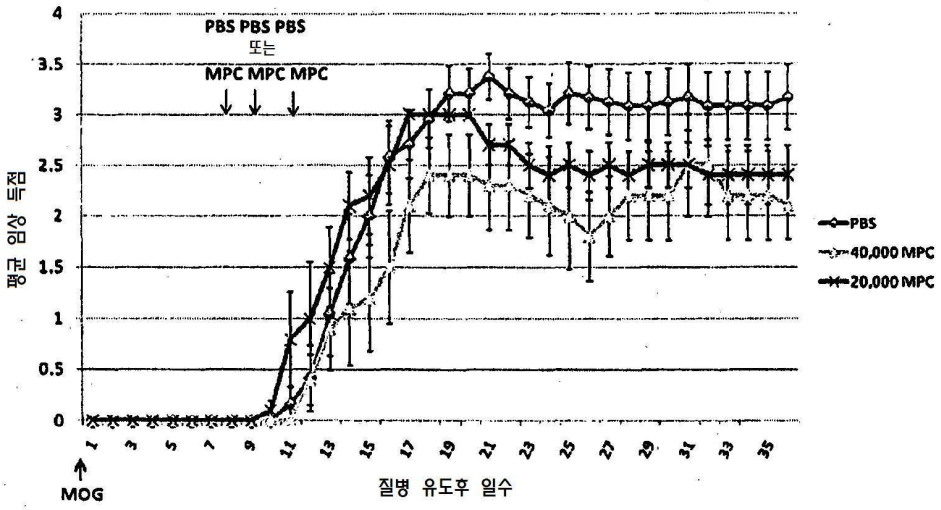
도면2c


C
GAPDH에 비교하여 발현
12
10
8
6
4
2
0
STRO-1 높음
STRO-1 낮음
내지표
GFAP
CBFA1
OSX
OCN
PDGF
Sox 9
COL X
렙틴
PPARγ
Fit-1
KDR
Myo D
GATA-4
SMMHC
Ang-1
SDF-1α
IL-1
TNF-α
RANKL
유전자 이름

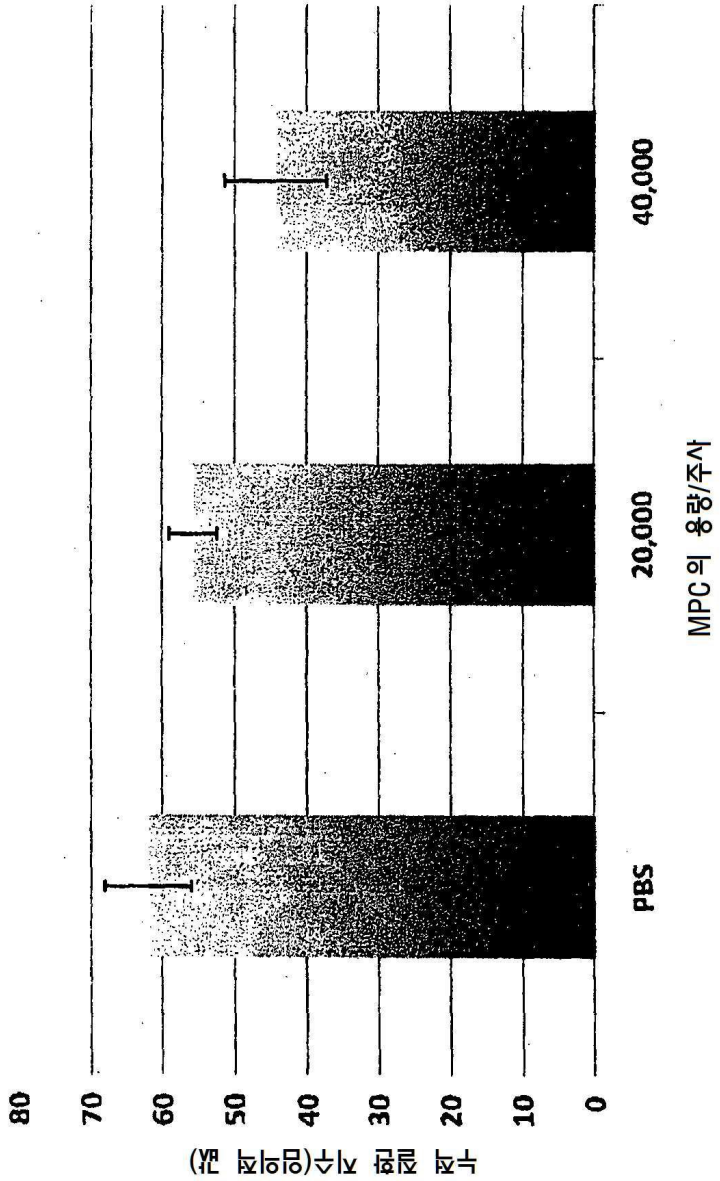
도면3


A
80
60
40
20
0
상대적 세포수
STRO-1 돈감
STRO-1 밝음
STRO-1 발현 (FITC)
B
STRO-1 밝음
C
STRO-1 돈감
D
bp
STRO-1 음성
STRO-1 돈감
STRO-1 밝음
SDF-1 (364)
GAPDH (417)

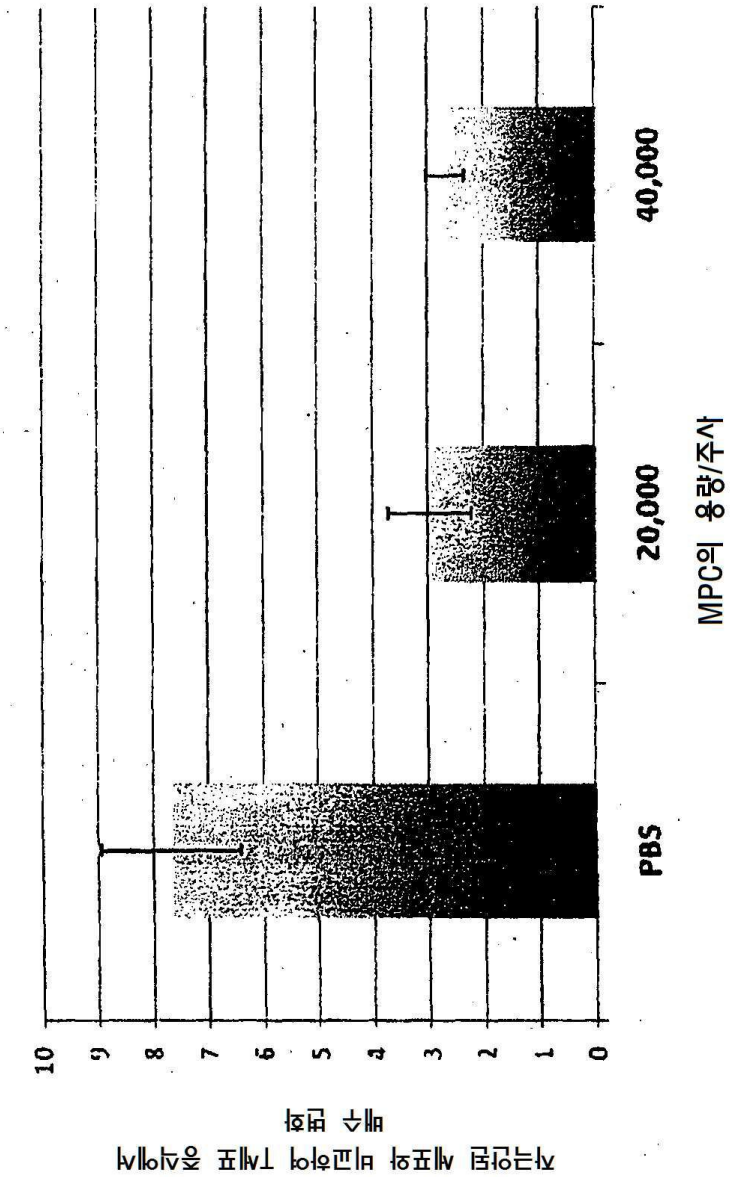
도면4


PBS PBS PBS
또는
MPC MPC MPC
평균 임상 득점
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
1
3
5
7
9
11
13
15
17
19
21
23
25
27
29
31
33
35
MOG
질병 유도후 일수
PBS
40,000 MPC
20,000 MPC

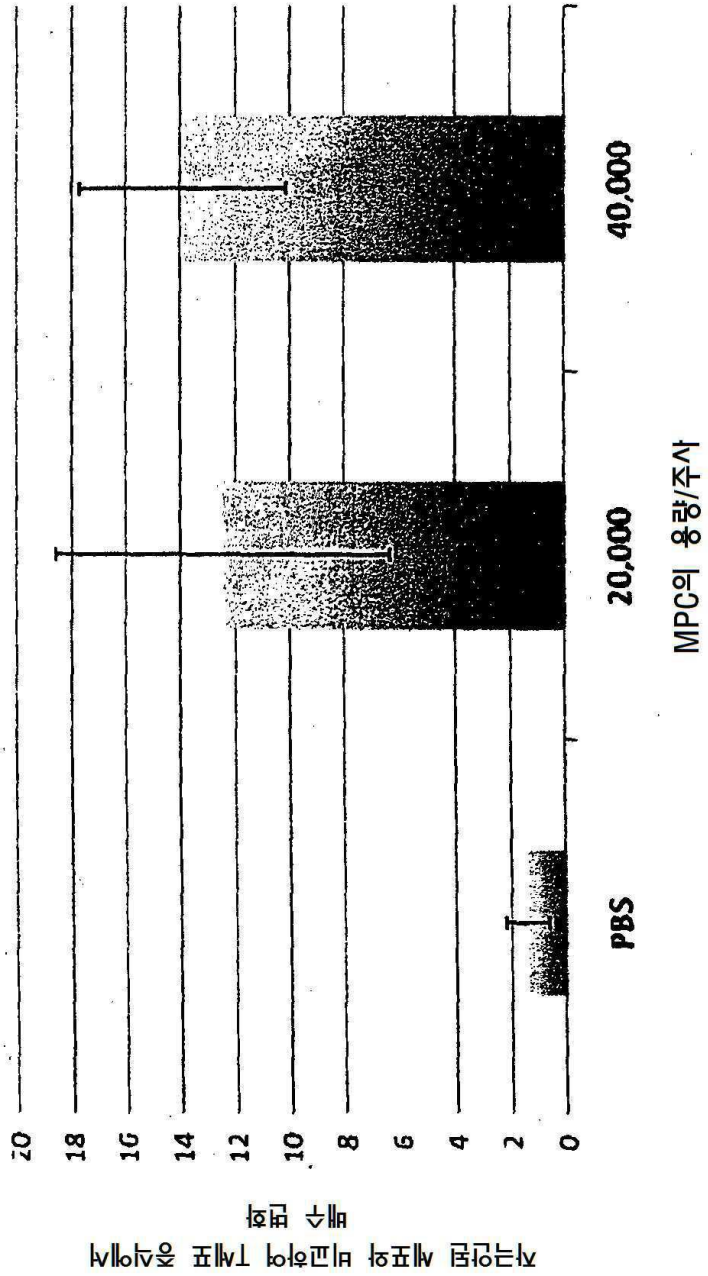
도면5



도면6


자극안된 세포와 비교하여 TAM 증식에서
배수 변화
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
PBS
20,000
40,000
MPC의 용량/주사

도면7



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Meoblast, Inc

<120> METHODS OF TREATING OR PREVENTING NEUROLOGICAL DISEASE

<130> 512123

<150> 61/493073

<151> 2011-06-03

<160> 36

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> oligonucleotide for amplifying GAPDH

<400> 1

cactgacacg ttggcagtgg 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> oligonucleotide for amplifying GAPDH

<400> 2

catggagaag gctggggctc 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> oligonucleotide for amplifying SDF-1

<400> 3

gagacccgcg ctcgtccgcc 20

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> oligonucleotide for amplifying SDF-1

<400> 4

gctggactcc tactgtaagg g 21

<210> 5

<211> 22

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> oligonucleotide for amplifying IL-1beta

<400> 5

aggaagatgc tggttccctc tc 22

<210> 6

<211> 23

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> oligonucleotide for amplifying IL-1beta

<400> 6

cagttcagtg atcgtacagg tgc 23

<210> 7

<211> 29

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> oligonucleotide for amplifying FLT-1

<400> 7

tcactatgga agatctgatt tcttacagt 29

<210> 8

<211> 25

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> oligonucleotide for amplifying FLT-1

<400> 8

ggtataaata cacatgtgct tctag 25

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> oligonucleotide for amplifying TNFalpha

<400> 9

tcagatcatc ttctcgaacc 20

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> oligonucleotide for amplifying TNFalpha

<400> 10

cagatagatg ggctcatacc 20

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> oligonucleotide for amplifying KDR

<400> 11

tatagatggt gtaacccgga 20

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> oligonucleotide for amplifying KDR

<400> 12

tttgtcactg agacagcttg g 21

<210> 13

<211> 21

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> oligonucleotide for amplifying RANK-ligand

<400> 13

aacaggcctt tcaaggagct g 21

<210> 14

<211> 22

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> oligonucleotide for amplifying RANK-ligand

<400> 14

taaggagggg ttggagacct cg 22

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> oligonucleotide for amplifying Leptin

<400> 15

atgcattggg aaccctgtgc 20

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> oligonucleotide for amplifying Leptin

<400> 16

gcacccaggg ctgaggtcca 20

<210> 17

<211> 21

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> oligonucleotide for amplifying CBFA-1

<400> 17

gtggacgagg caagagtttc a 21

<210> 18

<211> 21

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> oligonucleotide for amplifying CBFA-1

<400> 18

tggcaggtag gtgtggtagt g 21

<210> 19

<211> 28

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> oligonucleotide for amplifying PPARgamma2

<400> 19

aactgcgggg aaacttggga gattctcc 28

<210> 20

<211> 26

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> oligonucleotide for amplifying PPARgamma2

<400> 20

aataataagg tggagatgca ggctcc 26

<210> 21

<211> 21

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> oligonucleotide for amplifying OCN

<400> 21

atgagagccc tcacactcct c 21

<210> 22

<211> 19

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> oligonucleotide for amplifying OCN

<400> 22

cgtagaagcg ccgataggc 19

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> oligonucleotide for amplifying MyoD

<400> 23

aagcgccatc tcttgaggta 20

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> oligonucleotide for amplifying MyoD

<400> 24

gcgagaaacg tgaacctagc 20

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> oligonucleotide for amplifying SMMHC

<400> 25

ctgggcaacg tagtaaaacc 20

<210> 26

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> oligonucleotide for amplifying SMMHC

<400> 26

tatagctcat tgcagcctcg 20

<210> 27

<211> 21

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> oligonucleotide for amplifying GFAP

<400> 27

ctgttgccag agatggaggt t 21

<210> 28

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> oligonucleotide for amplifying GFAP

<400> 28

tcatcgctca ggaggtcctt 20

<210> 29

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> oligonucleotide for amplifying nestin

<400> 29

ggcagcgttg gaacagaggt tgga 24

<210> 30

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> oligonucleotide for amplifying nestin

<400> 30

ctctaaactg gagtggtcag ggct 24

<210> 31

<211> 21

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> oligonucleotide for amplifying SOX9

<400> 31

ctctgcctgt ttggactttg t 21

<210> 32

<211> 21

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> oligonucleotide for amplifying SOX9

<400> 32

cctttgcttg ccttttacct c 21

<210> 33

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> oligonucleotide for amplifying collagen type X

<400> 33

agccagggtt gccaggacca 20

<210> 34

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> oligonucleotide for amplifying collagen type X

<400> 34

ttttcccact ccaggagggc 20

<210> 35

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> oligonucleotide for amplifying aggrecan

<400> 35

cactgttacc gccacttccc 20

<210> 36

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> oligonucleotide for amplifying aggrecan

<400> 36

accagcggaa gtccccttcg 20