



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년12월23일

(11) 등록번호 10-1689415

(24) 등록일자 2016년12월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 35/34 (2015.01) A61K 35/28 (2015.01)

A61K 35/44 (2015.01) A61K 38/18 (2006.01)

A61K 38/19 (2006.01) A61K 9/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-7028912

(22) 출원일자(국제) 2010년05월20일

심사청구일자 2015년05월18일

(85) 번역문제출일자 2011년12월02일

(65) 공개번호 10-2012-0046107

(43) 공개일자 2012년05월09일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2010/057004

(87) 국제공개번호 WO 2010/133686

국제공개일자 2010년11월25일

(30) 우선권주장

PCT/EP2009/056197 2009년05월20일 세계지적재

산권기구(WIPO)(WO)

(56) 선행기술조사문헌

US20080019944 A1\*

Baust JM, et al., Cryobiology. Vol.45(2),  
pages 97-108 (2002.10. 공개)\*

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

카디오3 바이오사이언시즈, 소씨에떼 아노님

벨기에 베-1435 몽-셍-길베르 뒤 에두아르 블랭  
12, 악시스파르 비즈니스 센터

(72) 발명자

가우신. 빈씨엔

벨기에, 비-1970 베っふ-オ웹, 애비뉴 드 레스풀  
라나드 6

고든-베레스포드, 르랜드

벨기에, 비-1310 라 훌프, 애비뉴 앙뚜아네뜨 헬  
린 11

홈시, 크리스티앙

벨기에, 비-1150 브뤼셀, 애비뉴 데 시렐레 99

(74) 대리인

조영현

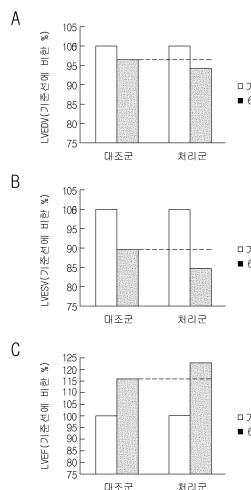
전체 청구항 수 : 총 59 항

심사관 : 정의준

(54) 발명의 명칭 심장병 치료를 위한 약제학적 조성물

**(57) 요약**

본 발명은 약제학적 생성물 제조에 대해 국제적으로 승인된 표준에 따라 생성된 심장 조직 발생 수임 세포 및 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물, 상기 약제학적 조성물의 제조 방법, 및 상기 약제학적 조성물을 함유하는 용기를 포함하는 상기 약제학적 조성물의 투여를 위한 키트에 관한 것이다.

**대 표 도 - 도1**

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

심장 조직 발생 수임 세포 및 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물로서, 상기 세포는,

(i) 참조와 비교하는 경우, Nkx2.5, Tbx5, MEF2C, GATA4, GATA6, Mesp1, FOG1, FOG2 및 Flk1으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자의 발현 수준에서 관찰된 증가; 또는

(ii) 참조와 비교하는 경우, Nkx2.5, Tbx5, GATA4, GATA6, Mesp1, FOG1, FOG2 및 Flk1으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 폴리펩티드 종의 관찰된 존재, 및 Nkx2.5 및 MEF2C 중 하나 이상의, 상기 세포의 핵으로의 핵 전위를 나타내고;

상기 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 부형제가 보존 용액인, 약제학적 조성물.

#### 청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 유전자의 발현 수준에서 관찰된 증가는, qPCR 방법에 의해 결정 시, 참조와 비교하여 최소 2배인 약제학적 조성물.

#### 청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 보존 용액이 -196°C 내지 0°C의 온도에서의 냉동보존을 가능케 하는 보존 용액, 및 0°C 내지 +40°C의 온도에서의 보존을 가능케 하는 보존 용액을 포함하는 군에서 선택되는 약제학적 조성물.

#### 청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 보존 용액이 이온, pH 완충제, 임퍼미언트(impermeant), 콜로이드 및 대사물, 디메틸셀록시드(DMSO), 글리세롤, 수크로오스, 혈청 알부민, 트레할로오스, 또는 이들의 임의의 배합물을 함유할 수 있는 보존 용액인 약제학적 조성물.

#### 청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 이온이  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$  및 이들 이온의 배합물로 구성된 군으로부터 선택되는 약제학적 조성물.

#### 청구항 6

제 4항에 있어서, 상기 pH 완충제가  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ , (4-(2-히드록시에틸)-1-피페라진에탄설폰산)(HEPES) 및 이들의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택되는 약제학적 조성물.

#### 청구항 7

제 4항에 있어서, 상기 임퍼미언트가 락토비오네이트, 수크로오스, 만니톨, 글루코오스 및 이들의 배합물로 구성된 군으로부터 선택되는 약제학적 조성물.

#### 청구항 8

제 4항에 있어서, 상기 콜로이드가 덱스트란-40(Dextran-40)인 약제학적 조성물.

#### 청구항 9

제 4항에 있어서, 상기 대사물이 아데노신, 글루타티온, 및 이들의 배합물로 구성된 군으로부터 선택되는 약제학적 조성물.

**청구항 10**

제 1항에 있어서, 상기 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 부형제가 성장인자, 사이토카인, 기관발생 신호전달과 관련된 단백질, 약제(pharmaceutical), 혈소판 용해질, 혈청, 동위원소, 생체내에서 세포를 추적하기 위한 수단, 희석제, 윤활제, 매트릭스 또는 스캐폴드 물질, 및 이들의 배합물로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 성분을 포함하는 약제학적 조성물.

**청구항 11**

제 1항에 있어서, 상기 심장 조직 발생 수임 세포가 줄기 세포인 약제학적 조성물.

**청구항 12**

제 1항에 있어서, 상기 심장 조직 발생 수임 세포가 줄기 세포로부터 유래되는 약제학적 조성물.

**청구항 13**

제 11항에 있어서, 상기 줄기 세포가 성체 줄기 세포, 배아 줄기 세포, 유도 만능 줄기 세포(induced pluripotent stem cell, IPS), 골수 분리 성체 다계열성 유도 세포(marrow-isolated adult multilineage inducible cell, MIAMI), 잔존 심근 줄기 세포(resident cardiac stem cell), 식물 줄기 세포, 및 이들의 배합물로 구성된 군에서 선택되는 약제학적 조성물.

**청구항 14**

제 13항에 있어서, 상기 줄기 세포가 골수, 지방 조직, 제대혈, 양수, 월경액 및 혈액으로 구성된 군에서 선택되는 조직원으로부터 수거된 중간엽 줄기 세포인 약제학적 조성물.

**청구항 15**

제 1항에 있어서, 상기 심장 조직 발생 수임 세포가 포유동물 세포인 약제학적 조성물.

**청구항 16**

제 15항에 있어서, 상기 포유동물 세포가 인간, 고양이, 개, 돼지, 말, 마우스, 래트, 햄스터 및 다른 포유동물로 구성된 군에서 선택되는 약제학적 조성물.

**청구항 17**

제 1항에 있어서, 상기 세포가 자가 세포, 동종이형 세포, 이종 세포, 또는 이들의 임의의 배합물인 약제학적 조성물.

**청구항 18**

제 1항에 있어서, 상기 심장 조직 발생 수임 세포가 인간 성체 중간엽 줄기 세포, 인간 배아 줄기 세포(단, 이러한 인간 배아 줄기 세포의 생성이 인간 배아 파괴를 의미하지는 않음), 배아-유사 줄기 세포, 유도 만능 줄기 세포, 잔존 심근 줄기 세포, 또는 이들의 배합물로부터 유래될 수 있는 심장형성 세포인 약제학적 조성물.

**청구항 19**

제 18항에 있어서, 상기 조성물이 심근세포, 조혈세포, 내피 전구 세포, 지방모세포, 지방세포, 연골모세포, 연골세포, 골모세포, 골세포, 신경모세포 및 신경세포를 포함하나, 이에 제한되지는 않는, 검출가능한 비-심장형성 세포를 함유하지 않는 약제학적 조성물.

**청구항 20**

제 19항에 있어서, 전체 비-심장형성 세포의 함량이 전체 세포수의 0% 내지 50%인 약제학적 조성물.

**청구항 21**

제 19항에 있어서, 전체 비-심장형성 세포의 함량이 전체 세포수의 0% 내지 15%인 약제학적 조성물.

**청구항 22**

제 19항에 있어서, 비-심장형성 세포의 각각의 종류의 함량이 전체 세포수의 0% 내지 50%인 약제학적 조성물.

**청구항 23**

제 19항에 있어서, 비-심장형성 세포의 각각의 종류의 함량이 전체 세포수의 0% 내지 15%인 약제학적 조성물.

**청구항 24**

제 1항에 있어서, 허혈성 심근병증, 급성 심근경색증, 만성 심근경색증, 비-허혈 기원의 심부전, 허혈 기원의 심부전, 선천성 심근병증, 또는 이들의 조합의 치료에 사용하기 위한 약제학적 조성물.

**청구항 25**

- 심장 조직 발생 수임 세포가 유래될 수 있는 세포를 수득하는 단계;
- 심장 조직 발생 수임 세포를 수득가능하게 하는 조건에서 상기 세포를 배양하는 단계;
- 상기 수임 세포를 수거하는 단계;
- 상기 수임 세포를 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 부형제에 첨가하는 단계로서, 상기 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 부형제가 보존 용액인 단계를 포함하는,

제 1항 내지 제 24항 중 어느 한 항에 따른 약제학적 조성물을 제조하는 방법.

**청구항 26**

제 25항에 있어서, 상기 심장 조직 발생 수임 세포가 유래될 수 있는 세포가 액티빈 A,  $\alpha$ -트롬빈, 안지오포이어틴, 골 형태형성 단백질(BMP), 예를 들어, BMP-1, BMP-2, BMP-4, BMP-5, BMP-6, 카디오토로핀(Cardiotrophin) 1, 카디오케놀 C(Cardiogenol C), 표피 성장인자(EGF), 에리트로포이어틴(EPO), 섬유모세포 성장인자(FGF), 예를 들어, FGF-1, FGF-2, FGF-4, FGF-5, FGF-12, FGF-13, FGF-15, FGF-20, 과립구-집락 자극 인자(G-CSF), 과립구-대식세포 집락 자극 인자(GM-CSF), 성장 분화 인자-9(GDF-9), 간세포 성장인자(HGF), 인슐린-유사 성장인자(IGF), 예를 들어, IGF-1, IGF-2, 미오스타틴(Myostatin)(GDF-8), 뉴로트로핀(Neurotrophin), 예를 들어, NT-3, NT-4, NT-1 및 신경 성장인자(NGF), 혈소판 유래 성장인자(PDGF), 예를 들어, PDGF-베타, PDGF-AA, PDGF-BB, 트롬보포이어틴(Thrombopoietin, TPO), TGF- (전환 성장인자 알파), 전환 성장인자  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), 예를 들어, TGF- $\beta$  1, TGF- $\beta$  2, TGF- $\beta$  3, VEGF(혈관 내피 성장인자), 예를 들어, VEGF-A, VEGF-C, TNF- $\alpha$ , 백혈병 억제 인자(LIF), 인터루킨 6(IL-6), 레티노산, C SDF-1(간질세포 유래 인자-1), BDNF(뇌 유래 신경영양 인자), 페리오스탄(Periostin), 안지오텐신 II, Flt3 리간드, 아교세포 유래 신경영양 인자, 인슐린-유사 성장 인자 결합 단백질-3, 인슐린-유사 성장인자 결합 단백질-5, 인터루킨-3, 인터루킨-8, 미드카인(Midkine), 프로게스테론, 푸트레신, 줄기세포 인자, TGF-알파, Wnt1, Wnt3a, Wnt5a, 카스파아제(caspase)-4, 케모카인 리간드 1, 케모카인 리간드 2, 케모카인 리간드 5, 케모카인 리간드 7, 케모카인 리간드 11, 케모카인 리간드 20, 합토글로빈, 렉틴, 콜레스테롤 25-수산화효소, 신팩신(syntaxin)-8, 신팩신-11, 세룰로플라스민, 보체 성분 1, 보체 성분 3, 인테그린 알파 6, 리소좀성 산 지질분해효소 1,  $\beta$ -2 마이크로글로불린, 유비퀴틴, 대식세포 유주저지 인자, 코필린, 사이클로필린 A(cyclophilin A), FKBP12, NDK, 프로필린 1, 시스타틴 C(cystatin C), 칼시클린(calcyclin), 스타니오칼신(stanniocalcin)-1, PGE-2, mpCCL2, IDO, iNOS, HLA-G5, M-CSF, PIGF, MCP-1, 세포외 기질 분자, CCL2 (MCP-1), CCL3(MIP-1 $\alpha$ ), CCL4(MIP-1 $\beta$ ), CCL5(RANTES), CCL7(MCP-3), CCL20(MIP-3 $\alpha$ ), CCL26(에오팩신-3), CX3CL1(프랙탈카인), CXCL5(ENA-78), CXCL11(i-TAC), CXCL1(GRO $\alpha$ ), CXCL2(GRO $\beta$ ), CXCL8(IL-8), CCL10(IP-10), 및 이들의 배합물로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 물질에서 선택된 심장발생 물질로 구성된 심장발생 조성물과 접촉되는 방법.

**청구항 27**

제 26항에 있어서, 상기 심장발생 조성물이, 우태아 혈청, 인간 혈청, 혈소판 용해질, 혈소판 유래 성장인자, 및 이들의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택된 화합물, 및

TGF  $\beta$ -1, BMP-4,  $\alpha$ -트롬빈, 카디오토로핀 1 및 IL-6으로 구성된 군으로부터 선택된 화합물, 및 카디오케놀 C 및 레티노산으로 구성된 군으로부터 선택된 화합물로 구성되는 제 1군;

TGF  $\beta$ -1, BMP-4,  $\alpha$ -트롬빈, 카디오토로핀 1, IL-6, 레티노산 및 카디오게놀 C로 구성되는 제 2군;

액티빈-A, FGF-2, IL-6, IGF-1 및 레티노산으로 구성되는 제 3군; 및

TGF- $\beta$  1, TGF- $\beta$  2, TNF- $\alpha$ , BMP-1, BMP-2, BMP-4, BMP-6, FGF-2, FGF-4, FGF-5, FGF-12, FGF-13, FGF-15, FGF-20, 백혈병 억제 인자, VEGF-A, VEGF-C, 인슐린 유사 성장인자 1, 인터루킨 6(IL-6), 액티빈 A,  $\alpha$ -트롬빈, 레티노산, 카디오토로핀 1, 카디오게놀 C, 및 이들의 배합물로 구성되는 제 4군;으로부터 선택된 화합물을 함유하는 배지에서 희석되는 방법.

### 청구항 28

제 25항에 있어서, 품질 제어 작업을 수행하기 위해 상기 방법 중 임의의 단계에서 샘플을 채취하는 것을 포함하는, 약제학적 생성물 제조에 대해 국제적으로 승인된 표준에 따라 수행되는 방법.

### 청구항 29

제 25항에 있어서, 활성 물질의 품질 제어를 수행하기 위해 세포 배양의 마지막 단계에서 샘플을 채취하는 것을 포함하는, 약제학적 생성물 제조에 대해 국제적으로 승인된 표준에 따라 수행되는 방법.

### 청구항 30

제 25항에 있어서, 활성 물질의 품질 제어 기준이 확인 시험, 동질성 시험, 순도 시험 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 시험을 포함하는 방법.

### 청구항 31

제 25항에 있어서, 심장 조직 발생 수임 세포가 심장형성 세포인 경우, 상기 심장형성 세포의 확인이 Nkx2.5, Tbx5, MEF2C, GATA4, GATA6, Mesp1, FOG1, FOG2, Flk1 및 이들의 동족체로 구성된 군에서 하나 이상의 유전자의 발현 수준에서 관찰된 증가에 해당하는 방법.

### 청구항 32

제 31항에 있어서, 상기 유전자 발현의 증가가, 참조와 비교하는 경우 qPCR 방법에 의해 결정시 최소 2배인 방법.

### 청구항 33

제 25항에 있어서, 심장 조직 발생 수임 세포가 심장형성 세포인 경우, 상기 심장형성 세포의 확인이 참조와 비교하는 경우 Nkx2.5, Tbx5, MEF2C, GATA4, GATA6, Mesp1, FOG1, FOG2, Flk1 및 이들의 동족체로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 폴리펩티드 종의 관찰된 존재, 및 Nkx2.5 또는 MEF2C 또는 Nkx2.5 및 MEF2C 둘 모두의 심장형성 세포 핵으로의 추가 전위에 의해 달성되는 것으로 간주되는 방법.

### 청구항 34

제 33항에 있어서, 관찰된 존재가 항-Nkx2.5, 항-Tbx5, 항-MEF2C, 항-GATA4, 항-GATA6, 항-Mesp1, 항-FOG1, 항-FOG2, 항-Flk1, 및 이들의 동족체로 구성된 군에서의 하나 이상의 항체를 이용한 면역표지에 의해 제시되는 방법.

### 청구항 35

제 25항에 있어서, 제공된 샘플에서 최소한 50%가 심장형성 세포인 경우에 동질성이 달성되는 방법.

### 청구항 36

제 25항에 있어서, 제공된 샘플에서 최소한 85%가 심장형성 세포인 경우에 동질성이 달성되는 방법.

### 청구항 37

제 25항에 있어서, 수거된 세포 중에서 중간엽 줄기 세포의 존재가 CD105, CD90, CD133, CD105, CD166, CD29, 및 CD44로 구성된 군에서 선택된 표면 마커에 대한 항체를 이용한 양성 면역표지, 및 CD14, CD34, 및 CD45로 구

성된 군에서 선택된 표면 마커에 대한 항체를 이용한 검출가능한 면역표지의 결핍에 의해 제시되는 방법.

#### 청구항 38

제 30항에 있어서, 상기 순도가 참조와 비교하는 경우 2배 이상의 CD34, FABP4, 오스테오칼신, 네스틴, Sox9, 및 MYH7 유전자 및 이들의 동종체의 발현 수준의 증가로 달성되지 않는 방법.

#### 청구항 39

제 38항에 있어서, 상기 유전자 발현의 증가가 참조와 비교하여 qPCR 방법에 의해 결정되는 방법.

#### 청구항 40

제 32항에 있어서, 상기 참조가 비-심장형성 세포로 구성되는 방법.

#### 청구항 41

제 38항에 있어서, 상기 참조가 비-심장형성 세포로 구성되는 방법.

#### 청구항 42

제 39항에 있어서, 상기 참조가 비-심장형성 세포로 구성되는 방법.

#### 청구항 43

제 40항에 있어서, 상기 참조가 임의의 심장발생 물질의 부재하에서 배양된 세포로 구성되는 방법.

#### 청구항 44

제 41항에 있어서, 상기 참조가 임의의 심장발생 물질의 부재하에서 배양된 세포로 구성되는 방법.

#### 청구항 45

제 42항에 있어서, 상기 참조가 임의의 심장발생 물질의 부재하에서 배양된 세포로 구성되는 방법.

#### 청구항 46

제 25항에 있어서, 배양 조건이 입자 또는 매트릭스 상에 상기 세포를 고정시키거나 이로 피막화시키고, 입자 또는 매트릭스의 베드(bed)를 통해 세포 배양 배지를 통과시키는 것을 포함하는 생물반응기를 이용하는 것을 포함하는 방법.

#### 청구항 47

제 1항에 따른 약제학적 조성물을 함유하는 용기를 포함하는, 상기 약제학적 조성물을 투여하기 위한 키트.

#### 청구항 48

제 47항에 있어서, 상기 용기가 수용자로의 전달을 위해 세포 생존 및 전세계로의 운송, 및 건강관리 공급자 또는 직원에 의한 편리한 취급을 가능케 하는 생체적합성 용기인 키트.

#### 청구항 49

제 47항에 있어서, 상기 용기가 기밀적으로 밀봉된 용기인 키트.

#### 청구항 50

제 47항에 있어서, 상기 용기가 부형제 및 보존 조건과 양립되는 키트.

#### 청구항 51

제 47항에 있어서, 상기 용기가 밀봉된 유리 용기인 키트.

#### 청구항 52

제 47항에 있어서, 상기 용기가 피어커블(piercable) 격벽 캡을 갖는 키트.

#### 청구항 53

제 52항에 있어서, 상기 피어커블 격벽 캡이 루어(lever) 활성화 밸브를 포함하는 바이얼(vial) 어댑터가 용기로부터 유체를 끌어당기는 것을 가능케 하는 키트.

#### 청구항 54

제 53항에 있어서, 상기 피어커블 격벽 캡이 바늘을 이용하여 접근될 수 있는 키트.

#### 청구항 55

제 47항에 있어서, 상기 약제학적 조성물이 기밀적으로 밀봉된 냉동보존용 용기에 저장되는 키트.

#### 청구항 56

제 47항에 있어서, 상기 용기 내에서의 약제학적 조성물의 저장수명이 48시간 이상인 키트.

#### 청구항 57

제 47항에 있어서, 상기 용기 내에서의 약제학적 조성물의 저장수명이 72시간 이상인 키트.

#### 청구항 58

제 47항에 있어서, 하나 이상의 카테터를 추가로 포함하는 키트.

#### 청구항 59

제 47항에 있어서, 하나 이상의 주사기를 추가로 포함하는 키트.

### 발명의 설명

#### 기술 분야

[0001]

본 발명은 심장병 장애 또는 이러한 장애의 소인을 치료할 필요가 있는 개체로의 약제학적 조성물의 전달을 통한 상기 심장병 장애 또는 이러한 장애의 소인의 치료에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 수용자로의 전달을 위해 세포 생존 및 전세계 지역으로의 운송, 및 직원에 의한 편리한 취급을 가능케 하는 방식으로 용기에 함유된, 심장 조직 발생 수임 세포(cells committed to the generation of heart tissue) 및 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물을 기재하며, 상기 세포는 약제학적 생성물 제조에 대해 국제적으로 승인된 표준에 따라 생성된다.

### 배경 기술

[0002]

재생 세포 요법은, 예를 들어, 병든 기관의 형태 및 기능을 회복시키기 위한 조직 재건이 요구되는 방식에 있어서 기관이 손상되는 질병에 대해, 또는 생리학적 복구 메커니즘이 손상된 경우에 특히 적절하다. 심장은 최종적으로 분화된 기관이며, 심장 발작에서와 같이 심근세포의 대량의 손실은 비가역적 손상을 발생시킴에 따라, 상기 손실을 복구할 필요가 있다. 또한, 심장병은 전세계적인 주요 사망 원인이다. 심장 복구를 위한 세포 요법은 매우 중요한 목표이다.

[0003]

세포 요법을 이용한 임상적 경험은 변경되지 않은 상태로 전달되는 성체 줄기 세포를 기초로 하여 왔다. 1세대의 생물학적 제제는 용이하게 접근 가능한 세포형으로 확인된 나이브(naive) 인간 줄기 세포이다. 소수의 개체가 나이브 인간 줄기 세포의 전달 후에 개선되는 것으로 밝혀졌다. 인간 심장 내 나이브 세포 이식 해당 분야의 상태는 특히 압델-라티프 에이 등(Abdel-Latif A. et al.)의 총설 논문[ 'Adult bone marrow-derived cells for cardiac repair: a systematic review and meta-analysis.' Arch Intern Med. (2007) 167:989-997] 및 이의 인용문헌에 기재되어 있다. 임상 결과 개선을 위해, 2세대 줄기 세포 요법의 개념이 개발되었으며, 이는 환자로의 전달 전에 나이브 줄기 세포의 심장 발생 잠재력을 개선시키는 것으로 구성된다.

[0004]

세포의 심장 발생 잠재력을 개선시키기 위한 방법을 조사하기 위해, 기초 연구는 먼저 심장 분화 동안 관련된 복잡한 신호전달 경로를 해명하기 위해 마우스 배아 줄기 세포(이하, mESC)를 이용하였다. 이러한 연구는 세포

와 접촉시 심장형성 세포로 분화되는 상기 세포의 능력을 개선시키는 심장발생 물질을 확인시켰다. 심장형성 세포는 세포가 심장 조직 발생에 수임되나, 아직 완전히 분화되지 않은 중간체 세포 표현형이다. 심장 재생 분야의 기초 연구에서의 중대 시점이 하기 문헌에 개시되어 있다:

- [0005] - Behfar et al. 'Derivation of a cardiopoietic population from human mesenchymal stem yields progeny', Nature Clin. Pract., Cardiovasc. Med. (2006) 3: S78-S82,
- [0006] - Behfar et al., 'Cardiopoietic programming of embryonic cells for tumor-free repairs', J. Exp. Med. (2007) 204: 405-420, 및
- [0007] - WO2006/015127, US2008/0019944 및 WO2009/151907(모두 Mayo Foundation for Medical Education and Research, Terzic A. 및 Behfar A가 출원인임).
- [0008] 상기 저자, 출원인 및 발명자는 mESC가 소위 심장발생 물질의 '칵테일', 즉, 용액 중에 심장발생 인자를 함유하는 조성물과 접촉하여 배양되는 경우에 mESC의 심장 조직 발생 수임 세포로의 분화가 개시될 수 있음을 제시하였다. WO2006/015127에 개시된 바와 같이, mESC-유래 심장형성 세포가 만성 경색인 뮤린 심장으로 전달되는 경우에, 심장 복구가 달성될 수 있다. 따라서, mESC-유래 심장형성 세포가 심장 조직을 재생시키는데 유리한 것을 나타내는 것으로 공지되어 있다. 그러나, ESC와 관련된 종양형성 위험은 상기 기초적 발견을 치료적 용도로 적용시키는데 있어서 안전성 문제를 발생시킨다. 또한, 실험은 배양물로부터 수거되고, 실험 튜브 내의 배양 배지에 혼탁되고, 동일 시설 내에서 이후에 신속히 사용되는 mESC-유래 심장형성 세포를 이용하는 실험실 환경에서 마우스에 대해 수행되었다.
- [0009] 성체 줄기 세포 요법은 종양형성 위험이 결여된 것으로 간주된다. 종양형성 위험이 문헌에 기록되지 않았고, 심장형성 세포로의 유도에 적합한 줄기 세포원의 확인은 베파르 등(Behfar et al.)의 문헌[ 'Derivation of a cardiopoietic population from human mesenchymal stem yields progeny', Nature Clinical Practice, Cardiovascular Medicine (2006) 3:S78-S82]에 기재되어 있다. US 2008/0019944에 중간엽 줄기 세포로부터 수득된 심장형성 세포가 기재되어 있다.
- [0010] 상기 저자, 출원인 및 발명자는 또한 인간 성체 중간엽 줄기 세포의 심장형성 세포로의 분화가 심장발생 인자의 칵테일을 이용하여 달성될 수 있음을 개시하고 있다(WO 2009/151907).
- [0011] 인간 심장에서의 세포 이식 해당 분야의 상태는 특히 압델-라티프 에이 등(Abdel-Latif A. et al.)의 총설 논문[ 'Adult bone marrow-derived cells for cardiac repair: a systematic review and meta-analysis.' Arch Intern Med. (2007) 167:989-997] 및 이의 인용문헌에 기재되어 있다. 베파르 등(Behfar et al.)에 의한 또 다른 총설 논문[ 'Guided stem cell cardiopoietic: Discovery and translation' J. Mol. and Cell. Cardiology (2008) 45: 523-529]에서, 심장 재생을 위해 심장형성 세포를 이용하는 개념이 또한 논의되어 있다.
- [0012] 벤치로부터 임상으로의 이동은 보통 약제학 산업에서 일종의 도전이다. 이러한 경우, 상기 도전은 특히 극복하기 어려웠는데, 이는 심장 조직 발생 수임 세포의 생물학적 특징, 및 개체가 제조 구내의 구내 가까이에 존재하지 않는 경우 상기 개체로의 전달까지 상기 특징을 유지하는 것이 절대적으로 필요하기 때문이다.
- [0013] 본 발명은 약제학적 생성물 제조에 대해 국제적으로 승인된 표준에 따른 심장 조직 발생 수임 세포 및 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 부형제를 함유하는 약제학적 조성물을 산업적으로 생산하는 방법, 및 수용자로의 전달을 위해 심장 조직 발생 수임 세포의 특징을 유지하면서 다양한 용도, 상기 세포의 생존, 전세계 장소로의 운송, 직원에 의한 편리한 취급을 가능케 하는 세포 보존 및 패키징 방법을 개시함으로 상기 문제점을 해소시킨다.

### 발명의 내용

- [0014] 정의
- [0015] 본 발명의 구조 내에서 반대로 기재하지 않는 경우, 따옴표 사이에 하기 기재된 용어는 다음과 같은 정의를 갖는다.
- [0016] 'BMMSC'는 골수 중간엽 줄기 세포를 나타낸다. 'hBMMSC'는 인간 기원의 BMMSC를 나타낸다.
- [0017] '심장형성 세포'는 중간체 세포 표현형, 즉, 심장 조직 발생 수임되나, 아직 완전히 분화되지 않은 세포 표현형이다. 심장형성 세포는 근육원섬유 단백질의 부재와 함께 Nkx2.5 및 MEF2C의 핵 전위를 특징으로 한다(Behfar et al. 'Derivation of a cardiopoietic population from human mesenchymal stem yields progeny', Nature

*Clin. Pract., Cardiovasc. Med. (2006) 3: S78-S82.* 심장형성 세포는 중식 능력을 보유한다. 심장형성 세포는, 예를 들어, 인간 성체 중간엽 줄기 세포, 인간 배아 줄기 세포(단, 이들의 생성은 인간 배아 파괴를 의미하지는 않음), 배아-유사 줄기 세포, 유도 만능 줄기 세포(induced pluripotent stem cell), 또는 임의의 다른 적합화된 공급원을 포함하는 줄기 세포로부터 유래될 수 있다.

- [0018] '심장발생 칵테일' 또는 '칵테일'은 두개 이상의 심장발생 물질을 함유하는 조성물을 나타낸다.
- [0019] '심장발생 물질'은 세포와 접촉시 심장형성 세포로 분화하는 상기 세포의 능력을 개선시키는 물질이다.
- [0020] '컨플루언스(confluence)'는 특정량의 공간 내에서 최대 수용량으로 세포가 성장한 상태를 나타낸다. 이 시점에서, 다른 세포와의 접촉은 이들을 성장 억제시킨다.
- [0021] '유효량'은 요망되는 치료 또는 생리학적 효과 또는 결과를 제공하는 약제학적 조성물의 충분한 양을 의미한다. 이러한 효과 또는 결과는 심장 조직의 복구, 유지, 재생, 증대 또는 심장 기능의 개선을 포함한다. 요망되지 않는 효과가 종종 요망되는 치료 효과와 함께 나타나므로, 진료의는 무엇이 적절한 유효량인지 결정하는데 있어서 잠재적 이익 대 잠재적 위험을 비교한다. 이러한 양은, 예를 들어, 피검체 연령, 전반적 건강, 유전적 및 후성적 변이성 등, 및 투여 방식에 따라 피검체마다 상이할 수 있다. 따라서, 정확한 '유효량'을 특정하는 것이 가능하지 않을 수 있다. 그러나, 임의의 개체의 경우에서의 적절한 '유효량'은 약제학적 조성물의 투여 절차 전, 또는, 예를 들어, 약제학적 조성물의 전달 동안 요망되지 않는 효과 없이 가능한 많은 양을 전달함으로써 약제학적 조성물의 투여 절차 동안 당업자에 의해 결정될 수 있다.
- [0022] '부형제'는 의약의 활성 성분에 대한 담체로 사용되는 비활성 물질이다. 많은 경우, "활성" 물질은 용이하게 투여되지 않고, 인체에 의해 흡수되지 않을 수 있으며, 이러한 경우, 당해 물질은 부형제에 용해되거나 부형제와 혼합될 수 있다. 단일-투여 용량에서의 부형제의 사용 외에, 부형제는 관련 활성 물질의 취급을 돋기 위해 제조 과정에서 사용될 수 있다. 투여 경로, 및 의약 형태에 따라, 다양한 부형제가 사용될 수 있다. 활성 성분을 안정화시키기 위해, 부형제가 첨가되어, 활성 성분이 "활성"인 채로 유지되고, 중요하게는, 생성물의 저장 수명을 다른 생성물과 경쟁할 수 있도록 만들기에 충분히 긴 기간 동안 안정적인 것이 보장된다.
- [0023] '중식 능력'은 본 발명의 구조 내에서 세포수의 증가를 나타낸다.
- [0024] '생활력'은 본 발명의 구조 내에서 세포가 트립판 블루 염료를 흡수하지 않음에 따라 세포막 온전성을 나타내는 특징을 의미한다.
- [0025] 용어 '피검체', '수용자' 및 '환자'는 본원에서 상호교환적으로 사용되며, 이는 명백히 언급하지 않는 한 본원에 개시된 약제학적 조성물을 이용하여 심장병 또는 심장 장애를 치료할 필요가 있는 임의의 인간 또는 포유동물을 의미한다. 피검체는 또한 상기 심장병 또는 심장 장애를 가질 위험이 있는 피검체를 포함한다.
- [0026] 본 명세서에서 사용되는 단수 형태 및 정관사는 문맥이 명백히 달리 지정하는 않는 경우 복수의 양태를 포함한다. 따라서, 예를 들어, '줄기 세포'에 대한 언급은 단일 세포 뿐만 아니라 두개 이상의 세포를 포함하며, '작용제' 또는 '시약'에 대한 언급은 단일한 작용제 또는 시약 뿐만 아니라 두개 이상의 작용제 또는 시약을 포함하며, '본 발명' 또는 '발명'에 대한 언급은 발명의 단일하거나 다수의 양태를 포함하며, 그 밖에도 마찬가지이다.
- [0027] 달리 정의되지 않는 경우, 본원에서 사용되는 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 분야의 당업자에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기재된 것과 유사하거나 동등한 방법 및 물질이 본 발명의 실시 또는 시험에 사용될 수 있으나, 적합한 방법 및 물질이 하기에 기재된다.
- [0028] **발명의 개요**
- [0029] 하기 상세한 설명에서, 본원에 청구된 주제의 충분한 이해를 제공하기 위해 다수의 세부사항이 기재된다. 그러나, 당업자는 상기 특정한 세부사항이 없이 청구된 주제가 실시될 수 있음을 이해할 것이다. 다른 예에서, 청구된 주제를 불명료하게 하지 않기 위해 널리 공지된 방법, 절차, 성분 등을 상세하게 기재되지 않는다.
- [0030] 본 발명은 심장 조직 발생 수임 세포 및 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다. 바람직하게는, 심장 조직 발생 수임 세포는 약제학적 생성물 제조에 대해 국제적으로 승인된 표준에 따라 생성된다. 가장 바람직하게는, 상기 약제학적으로 허용되는 부형제는 보존 용액이다. 바람직하게는, 보존 용액은 -196°C 내지 0°C의 온도에서의 냉동보존을 가능케 하는 보존 용액, 및 0°C 내지 +40°C의 온도에서의 보존을 가능케 하는 보존 용액을 포함하는 군에서 선택된다. 바람직하게는, 보존 용액은 이온, pH

완충제, 임퍼미언트(impermeant), 콜로이드 및 대사물, 디메틸실록시드(DMSO), 글리세롤, 수크로오스, 혈청 알부민, 트레할로오스, 또는 이들의 임의의 배합물을 함유할 수 있는 보존 용액이다. 바람직하게는, 이온은  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$  및 이러한 이온의 배합물로 구성된 군으로부터 선택된다. 바람직하게는, pH 완충제는  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ , (4-(2-히드록시에틸)-1-페페라진에탄설폰산)(HEPES) 및 이들의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택된다.

바람직하게는, 임퍼미언트는 락토비오네이트, 수크로오스, 만니톨, 글루코오스 및 이들의 배합물로 구성된 군으로부터 선택된다. 바람직하게는, 콜로이드는 텍스트란-40이다. 바람직하게는, 대사물은 아데노신, 글루타티온, 및 이들의 배합물로 구성된 군으로부터 선택된다. 바람직하게는, 상기 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 부형제는 성장인자, 사이토카인, 기관발생 신호전달과 관련된 단백질, 제약(pharmaceutical), 혈소판 용해질, 혈청, 동위원소, 생체내에서 세포를 추적하기 위한 수단, 희석제, 윤활제, 매트릭스 또는 골격 물질, 및 이들의 배합물로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 성분을 추가로 포함한다.

[0031]

바람직하게는, 심장 조직 발생 수임 세포는 줄기 세포이거나, 줄기 세포로부터 유래된 심장 조직 발생 수임 세포일 수 있다. 바람직하게는, 줄기 세포는 성체 줄기 세포, 배아 줄기 세포, 유도 만능 줄기 세포(IPS), 골수 분리 성체 다계열성 유도 세포(marrow-isolated adult multilineage inducible cells, MIAMI), 잔존 심근 줄기 세포(resident cardiac stem cell), 식물 줄기 세포, 또는 이들의 임의의 배합물로 구성된 군에서 선택된다. 바람직하게는, 줄기 세포는 골수, 지방 조직, 체대혈, 양수, 월경액, 혈액으로 구성된 군에서 선택된 적합한 조직원으로부터 수거된 중간엽 줄기 세포이다. 바람직하게는, 심장 조직 발생 수임 세포는 포유동물 세포이다. 바람직하게는, 포유동물 세포는 인간, 고양이, 개, 돼지, 말, 마우스, 래트, 햄스터 및 다른 포유동물로 구성된 군에서 선택된다. 바람직하게는, 상기 세포는 자가 세포, 동종이형 세포, 이종 세포, 또는 이들의 임의의 배합물이다.

[0032]

바람직하게는, 심장 조직 발생 수임 세포는 심장형성 세포이다. 바람직하게는, 심장형성 세포는, 예를 들어, 인간 성체 중간엽 줄기 세포, 인간 배아 줄기 세포(단, 이의 생성이 인간 배아 파괴를 의미하지는 않음), 배아-유사 줄기 세포, 유도 만능 줄기 세포, 잔존 심근 줄기 세포 또는 임의의 다른 적합화된 공급원, 또는 이들의 배합물을 포함하는 줄기 세포로부터 유래될 수 있다.

[0033]

바람직하게는, 상기 조성물은 심근세포, 조혈세포, 내피 전구 세포, 지방모세포, 지방세포, 연골모세포, 연골세포, 골모세포, 골세포, 신경모세포 및 신경세포를 포함하나, 이에 제한되지는 않는 검출 가능한 비-심장형성 세포를 함유하지 않는다. 바람직하게는, 전체 비-심장형성 세포의 함량은 전체 세포수의 0% 내지 50%, 바람직하게는 전체 세포수의 0% 내지 15%이다. 바람직하게는, 비-심장형성 세포의 각각의 종류의 함량은 전체 세포수의 0% 내지 50%, 바람직하게는 전체 세포수의 0% 내지 15%이다.

[0034]

본 발명은 또한 허혈성 심근병증, 급성 심근경색증, 만성 심근경색증, 비-허혈 기원의 심부전, 허혈 기원의 심부전, 선천성 심근병증, 또는 이의 배합의 치료에 사용하기 위한 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[0035]

본 발명은 또한 약제학적 조성물의 제조 방법에 관한 것으로, 이러한 방법은 하기 단계를 포함한다:

- 심장 조직 발생 수임 세포가 유래될 수 있는 세포를 수득하는 단계;

- 심장 조직 발생 수임 세포를 수득 가능하게 하는 조건에서 상기 세포를 배양하는 단계;

- 상기 수임 세포를 수거하는 단계;

- 상기 수임 세포를 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 부형제에 첨가하는 단계.

[0040]

바람직하게는, 본 발명의 방법은 약제학적 생성물 제조에 대해 국제적으로 승인된 표준에 따라 수행되고, 이는 품질 제어 작업을 수행하기 위해 상기 방법의 임의의 단계에서 샘플을 채취하는 것을 포함한다. 가장 바람직하게는, 본 발명의 방법은 약제학적 생성물 제조에 대해 국제적으로 승인된 표준에 따라 수행되고, 이는 활성 물질의 품질 제어를 수행하기 위해 세포 배양의 마지막 단계에서 샘플을 채취하는 것을 포함한다.

[0041]

바람직하게는, 활성 물질의 품질 제어 기준은 확인 시험, 동질성 시험, 순도 시험 및 이의 배합으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 시험을 포함한다. 바람직하게는, 심장 조직 발생 수임 세포가 심장형성 세포인 경우, 상기 심장형성 세포의 확인은 Nkx2.5, Tbx5, MEF2C, GATA4, GATA6, Mesp1, FOG1, FOG2, Flk1 및 이들의 동족체로 구성된 군에서 하나 이상의 유전자의 발현 수준에서 관찰된 증가에 해당한다. 바람직하게는, 유전자 발현의 증가는 참조와 비교하는 경우 qPCR 방법에 의해 결정시 최소한 2배이다. 바람직하게는, 심장 조직 발생 수임 세포가 심장형성 세포인 경우, 상기 심장형성 세포의 확인은 참조와 비교하는 경우 Nkx2.5, Tbx5, MEF2C,

GATA4, GATA6, Mesp1, FOG1, FOG2, Flk1 및 이들의 동족체로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 폴리펩티드 종의 관찰된 존재, 및 Nkx2.5 또는 MEF2C 또는 Nkx2.5 및 MEF2C 둘 모두의 심장형성 세포 핵으로의 추가 전위에 의해 달성되는 것으로 간주된다. 바람직하게는, 관찰된 존재는 항-Nkx2.5, 항-Tbx5, 항-MEF2C, 항-GATA4, 항-GATA6, 항-Mesp1, 항-FOG1, 항-FOG2, 항-Flk1, 및 이들의 동족체로 구성된 군에서의 하나 이상의 항체를 이용한 면역표지에 의해 제시된다. 바람직하게는, 동질성은 제공된 샘플에서 최소한 50%가 심장형성 세포인 경우에 달성된다. 바람직하게는, 동질성은 제공된 샘플에서 최소한 50%, 가장 바람직하게는 최소한 85%가 심장형성 세포인 경우에 달성된다. 바람직하게는, 수거된 세포 중에서 중간엽 줄기 세포의 존재는 CD105, CD90, CD133, CD105, CD166, CD29, 및 CD44로 구성된 군에서 선택된 표면 마커에 대한 항체를 이용한 양성 면역표지, 및 CD14, CD34, 및 CD45로 구성된 군에서 선택된 표면 마커에 대한 항체를 이용한 검출가능한 면역표지의 결핍에 의해 제시된다. 바람직하게는, 순도는 참조와 비교하는 경우 2배 이상의 CD34, FABP4, 오스테오칼신(osteocalcin), 네스틴(nestin), Sox9, 및 MYH7 유전자 및 이들의 동족체의 발현 수준의 증가로 달성되지 않는다. 바람직하게는, 유전자 발현의 증가는 참조와 비교하는 경우 qPCR 방법에 의해 결정된다. 바람직하게는, 순도는 면역표지에 의해 제시되는 경우 심근세포, 조혈세포, 내피 전구 세포, 지방모세포, 지방세포, 연골모세포, 연골세포, 골모세포, 골세포, 신경모세포 및 신경세포를 포함하나, 이에 제한되지는 않는 증가된 수의 비-심장형성 세포로 달성되지 않는다. 바람직하게는, 상기 참조는 비-심장형성 세포로 구성된다. 바람직하게는, 상기 참조는 임의의 심장발생 물질의 부재하에서 배양된 세포로 구성된다. 바람직하게는, 배양 조건은 입자 또는 매트릭스 상에 상기 세포를 고정시키거나 이로 피막화시키고, 입자 또는 매트릭스의 베드(bed)를 통해 세포 배양 배지를 통과시키는 것을 포함하는 생물반응기를 이용하는 것을 포함한다.

[0042] 본 발명은 또한 심장병 장애 또는 이러한 장애의 소인을 치료하는 방법에 관한 것으로, 여기서 약제는 유효량으로 개체에 전달된다. 바람직하게는, 개체는 심혈관계 부전을 나타낸다. 바람직하게는, 개체는 허혈성 심근병증, 심근경색증, 허혈 기원의 심부전, 또는 비-허혈 기원의 심부전, 선천성 심근병증, 또는 이의 배합에 걸려 있다.

[0043] 바람직하게는, 약제학적 조성물은 심근내, 심장내, 관상내, 근내, 피하, 복막내, 자궁내, 비경구, 또는 전신으로 구성된 군에서 선택된 투여 경로를 이용하여 전달된다. 바람직하게는, 약제학적 조성물은 카테터, 주사기, 또는 이들의 배합물을 이용하여 심근내 주사된다.

[0044] 심장 조직 발생 수임 세포가 유래될 수 있는 세포는 TGF- $\beta$  1, TGF- $\beta$  2, TNF- $\alpha$ , BMP-1, BMP-2, BMP-4, BMP-6, FGF-2, FGF-4, FGF-5, FGF-12, FGF-13, FGF-15, FGF-20, 백혈병 억제 인자(LIF), VEGF-A, VEGF-C, 인슐린-유사 성장인자 1(IGF-1), 인터루킨 6(IL-6), 액티빈 A,  $\alpha$ -트롬빈, 레티노산, 카디오토로핀(cardiotrophin) 1, 카디오게놀 C(cardiogenol C), 및 이들의 배합물로 구성된 군으로부터 선택될 수 있는 하나 이상의 심장발생 물질과 접촉될 수 있다.

[0045] 많은 수의 심장발생 각테일이 사용될 수 있다. 하기 제공되는 목록은 이로 한정되지는 않는다. 예를 들어, TGF  $\beta$ -1, BMP4,  $\alpha$ -트롬빈, 카디오토로핀 및 IL-6로 구성된 군으로부터 선택된 화합물, 및 카디오게놀 C 및 레티노산으로 구성된 군으로부터 선택된 화합물을 포함하는 심장발생 물질의 각테일을 사용할 수 있다. 또 다른 각테일은 TGF  $\beta$ -1, BMP4,  $\alpha$ -트롬빈, 카디오토로핀 및 카디오게놀 C를 포함할 수 있다. 또 다른 각테일은 FGF-2, IGF-1, 액티빈-A, TNF- $\alpha$ , FGF-4, LIF, VEGF-A, 및 이들의 배합물로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 화합물을 포함할 수 있다. 이들은 또한 FGF-2, IGF-1 및 액티빈-A를 포함할 수 있다. 다른 바람직한 각테일은 액티빈-A, FGF-2, IL-6, IGF-1 및 레티노산을 포함한다. 다른 각테일은 TNF- $\alpha$ , FGF-4, LIF, 및 VEGF-A로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 화합물이 결핍될 수 있다.

[0046] 하기 화합물 중 하나가 각테일에 존재하는 경우, 이는 1 내지 5 ng/ml의 상기 TGF  $\beta$ -1, 1 내지 10 ng/ml의 상기 BMP4, 0.5 내지 5 ng/ml의 상기 카디오토로핀, 0.5 내지 5 유닛/ml의 상기  $\alpha$ -트롬빈, 및 50 내지 500 nM의 상기 카디오게놀 C, 1 내지 10 ng/ml의 상기 FGF-2, 10 내지 100 ng/ml의 상기 IGF-1, 1 내지 50 ng/ml의 상기 액티빈-A, 1 내지 50 ng/ml의 상기 TNF- $\alpha$ , 1 내지 20 ng/ml의 상기 FGF-4, 10 내지 100 ng/ml의 상기 IL-6, 1 내지 10 유닛/ml의 상기 LIF, 1 내지 50 ng/ml의 상기 VEGF-A, 0.1 내지 1.0  $\mu$ M/ml의 상기 레티노산의 양으로 존재할 수 있다.

[0047] 특정 각테일 유형은 조합 방식으로 사용되는 재조합 TGF  $\beta$ -1(2.5 ng/ml), BMP4(5 ng/ml), 카디오토로핀(1 ng/ml), 카디오게놀 C(100 nM)를 포함한다. 특히 바람직한 각테일은 상기 화합물을 포함하고,  $\alpha$ -트롬빈(1 U/ml), FGF-2(10 ng/ml), IGF-1(50 ng/ml) 및 액티빈-A(5 ng/ml)를 추가로 포함한다.

[0048] 다른 바람직한 각테일은 조합 방식으로 사용되는 재조합 TGF  $\beta$ -1(2.5 ng/ml), BMP4(5 ng/ml), 액티빈-A(5

ng/ml), FGF-2(10 ng/ml), IL-6(100 ng/ml), 인자-IIa(ha-트롬빈, 1 U/ml), IGF-1(50 ng/ml), 및 레티노산( $1 \mu M$ )을 포함한다.

[0049] 각테일은 우태아 혈청, 인간 혈청, 혈소판 용해질, 혈소판-유래 성장인자, 및 이들의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택된 화합물, 및 선택 화합물을 함유하는 배지에서 희석될 수 있다.

[0050] 본 발명은 또한 상기 약제학적 조성물을 함유하는 용기를 포함하는 약제학적 조성물의 투여용 키트에 관한 것이다. 바람직하게는, 상기 용기는 수용자로의 전달을 위해 세포 생존 및 전세계로의 운송, 및 직원에 의한 편리한 취급을 가능케 하는 생체적합성 용기이다. 바람직하게는, 상기 용기는 기밀적으로 밀봉된다. 바람직하게는, 상기 용기는 부형제 및 보존 조건과 양립된다. 바람직하게는, 상기 용기는 밀봉된 유리 용기이다. 바람직하게는, 상기 용기는 피어커블(piercable) 격벽 캡을 갖는다. 바람직하게는, 상기 피어커블 격벽 캡은 루어(luer) 활성화 밸브를 포함하는 바이얼 어댑터가 용기로부터 유체를 끌어당기는 것을 가능케 한다. 바람직하게는, 상기 피어커블 격벽 캡은 바늘을 이용하여 접근될 수 있다. 바람직하게는, 상기 약제학적 조성물은 냉동보존에 적합한 기밀적으로 밀봉된 용기에 저장된다. 바람직하게는, 상기 용기 내의 약제학적 조성물의 저장수명은 48시간 이상, 바람직하게는 72시간이다. 바람직하게는, 상기 키트는 하나 이상의 카테터를 추가로 포함한다. 바람직하게는, 상기 키트는 하나 이상의 주사기를 추가로 포함한다.

#### 도면의 간단한 설명

[0051] 도 1은 대조군(n=8) 및 처리군(n=9)으로 무작위적으로 할당된 피검체에서 기준선 및 6개월 후에 측정된 좌심실(LV) 확장기말용적(LVEDV, 패널 A), LV 수축기말용적(LVESV, 패널 B), 및 LV 박출계수(LVEF, 패널 C)를 도시한다. 결과는 기준선에 대해 표준화되었다.

#### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

##### 발명의 상세한 설명

##### 실시예

[0053] 제조 개시: 환자의 장골릉(iliac crest)으로부터 수거되고, 최소 품질 기준을 충족하는 인간 골수 샘플을 175-cm<sup>3</sup> 플라스크에서 37°C/5% CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 배양하여 BMMSC를 정제하였다. 최소 품질 기준은 공여체의 음성 혈청학 시험(적어도 HIV 1/2, 매독, HBV, HCV), 수거 부위와 제조 부위 사이의 골수 운송 온도 조절, 전체 부피, 혈괴의 존재 및 부피 기록, 및 박테리아 오염의 부재를 포함한다. 24시간 후, 골수 및 세포 부스러기를 플라스크로부터 조심스럽게 폐기하였다. 부착 BMMSC를 인산염 완충 염수(PBS)로 세척하고, 배양 배지를 첨가하고, 최초 계대 P0까지 4 내지 6일마다 배지를 교환하면서 배양을 유지시켰다.

[0054] P0 - 콜로니로부터 세포층으로의 최초 확장: 최초 계대(P0)를 수행하여 콜로니를 분리시키고, 이를 확장시키고, 단층을 형성시켰다. 세포를 175-cm<sup>3</sup> 플라스크에서 1:1의 비로 시딩하고, 확장시키고, 6일 이하 동안 단층을 형성시켰다. 컨플루언스로 다음 계대 시기를 결정하였다. 이러한 단계는, BMMSC가 검출가능한 콜로니를 갖지 않는 단층을 자연스럽게 형성하는 경우에 생략될 수 있다. 'P0' 및 이후 순차적인 문자로 번호가 매겨진 유사한 계대를 이용하여 최소 50x10<sup>6</sup>개의 세포가 수득될때까지 상기 과정을 지속시켰다. 시딩시의 세포 밀도 및 컨플루언스 촉발 계대와 같은 파라미터를 결정하였다. 이는 수율을 최적화시키고, 접촉 억제를 피하기 위해 시딩에 사용되어야 하는 용기 크기를 결정하는 계대시에 수득되는 세포의 수이다. P0 단계에서의 제조과정중(in-process) 제어 시험은 세포수 및 생활력 백분율을 포함한다.

[0055] P1 - 심장발생 각테일 처리의 시작: 세포를 배양 배지 및 심장발생 각테일에서 5일 동안 배양하였다. 예를 들어, WO2006/015127, WO2009/151907 및 베파르 등(Behfar et al.)의 문헌[ 'Derivation of a cardiopoietic population from human mesenchymal stem yields progeny', Nature Clinical Practice, Cardiovascular Medicine, March 2006 vol. 3 supplement 1, pages S78-S82)]에 기재된 바와 같은 심장발생 각테일이 사용될 수 있다.

[0056] P2 - 심장발생 각테일 처리의 종료: 심장발생 각테일을 함유하는 배지를 폐기하였다. 배양물은 이제 심장형성 세포를 함유한다. 배양물을 계대하고, 필요시 배양 배지를 갖는 신규한 용기에 시딩하여 추가 확장시켰다.

[0057] P3 - 확장 및 수거: 이후의 계대를 'P3' 및 이 이후에 순차적 문자로 번호를 매겼다. 최적 컨플루언스에 도달하는 경우에 세포를 계대하고, 이를 수득되는 세포의 수가 600x10<sup>6</sup> 내지 1200x10<sup>6</sup>개의 세포가 될때까지 반복하였

다. 상기 기준이 충족되는 경우, 세포를 수거하였다. 이러한 단계는 최종 트립신처리 후의 세척 및 원심분리에 의한 농축 단계를 포함한다. 최종 세척을 세포 보존 용액 중에서 수행하였다. 적합하게는, 사용되는 보존 용액은 표준 기관 및 생물학적 조직 보존 저온 저장 수용액, 예를 들어, BioLifeSolutions(Bothell, Wash)사의 HypoThermosol-FRS<sup>®</sup>과 유사할 수 있다.

[0060] 이후, 세포 농축액을 생체적합성 용기(본 실시예에서, Type I의 유리병, Ph. Eur.)로 옮기고, 10 ml의 전체 부피 및  $60 \times 10^6$  내지  $120 \times 10^6$  세포/ml 범위의 세포 농도를 달성하도록 보존 용액을 첨가하였다. 이는 약제학적 조성물의 제조를 완성시킨다.

[0061] 약제학적 조성물 방출 기준은 통상적으로 외래 오염의 부재(무균, 낮은 수준의 내독소, 및 상기 과정에 의해 첨가되지 않는 미코플라스마)를 확인하는 제조 파라미터와 조합되는 세포 확인, 동질성 및 순도를 포함한다.

[0062] 본 발명에 대한 임의의 침해 없이, 심장발생 물질의 사용 대신 심장형성 세포의 다른 생성 방법이 예견될 수 있다는 것이 주목할 만한 가치가 있다.

[0063] 본 실시예에서, 보존 매질은 BioLifeSolutions(Bothell, Wash)사의 HypoThermosol-FRS<sup>®</sup>이다. HypoThermosol-FRS는 이온( $100 \text{ mM Na}^+$ ,  $42.5 \text{ mM K}^+$ ,  $0.05 \text{ mM Ca}^{2+}$ ,  $5 \text{ mM Mg}^{2+}$ ,  $17.1 \text{ mM Cl}^-$ ); pH 완충제( $10 \text{ mM H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $5 \text{ mM HC}_03^-$ ,  $25 \text{ mM HEPES}$ ); 세포 팽창을 억제시키는 임페미언트( $100 \text{ mM } \alpha\text{-락토비오네이트}$ ,  $20 \text{ mM 수크로오스}$ ,  $20 \text{ mM 만니톨}$ ); 콜로이드( $6\%$  텍스트란-40); 및 대사물( $5 \text{ mM 글루코오스}$ ,  $2 \text{ mM 아데노신}$ ,  $3 \text{ mM 글루타티온}$ )을 함유한다.

[0064] 약제학적 조성물의 보존은 또한 디메틸설폐시드(DMSO)에서의 냉동보존에 의해 본 발명에 따라 달성될 수 있다. 이는 운송 온도의 적절한 제어와 함께 드라이아이스 상에서 운송시 보다 긴 저장수명(1주 이상)을 가능케 하는 장점을 제공한다.

[0065] 부형제가 HypoThermosol-FRS인 본 발명의 약제학적 조성물의 구체예에 따르면, 용기에서의 약제학적 조성물의 저장수명은 72시간 이상이다.  $1200 \times 10^6$ 개 세포의 전체 수가 약 8 밀리리터의 부피를 갖는 반면, 심근내 주사를 위한 최대 욕망 부피는 약 10 밀리리터인 것이 관찰되는 것이 특히 주목할만 하다. 이는 HypoThermosol-FRS의 양이 세포 부피에 비해 적고, 단지 수 밀리리터 범위가 될 것이라는 것을 의미한다.

[0066] 놀랍게도, 약제학적 조성물에 대해 72시간의 중요한 저장수명을 유지하는데 적은 양의 HypoThermosol-FRS가 충분하다는 것이 관찰되었다. 이는 모든 방출 기준이 충족되는 것을 확인하고, 약제학적 조성물을 전세계 어디에라도 운송하고, 약제학적 조성물을 수용자에게 전달하기에 충분한 시간을 제공한다.

[0067] 약제학적 조성물 방출 기준 - 확인: 심장형성 세포를 양성 발현, 및 적용가능시, Nkx2.5, MEF2C 및 GATA-4를 포함하는 초기 심장 분화의 여러 마커의 핵 전위에 의해 특성규명하였다. 약제학적 조성물에 함유된 심장형성 세포의 양성 확인은 실시간 정량 RT-PCR(qPCR)에 의해 측정시 참조 표준에 비한 MEF2C 및/또는 Tbx5에 대한 발현 수준에서의 최소 2배의 증가, 및 저장수명 동안의 이의 유지로 표현된다.

[0068] 이러한 바람직한 구체예에서, 하기 표 1, 표 2 및 표 3은 약제학적 조성물이 이의 최종 용기에 저장된지 14일 후라는 오랜 기간 동안 초기 심장 분화 마커의 발현이 유지되고, 이러한 세포의 생활력 및 증식이 적어도 5일 동안 유지된 것을 나타낸다. 이는 심장발생 물질에 노출되는 세포의 초기 용도에 적합한 상태에서 상기 세포의 확인을 달성하고 이를 지속시키는 본원에 기재된 제조 방법의 독특한 능력을 입증한다.

## 표 1

ml당 전체 1억개의 살아있는 세포에서의 확인(qPCR).

일	batch(배치) 1		batch 2	
	MEF2C	Tbx5	MEF2C	Tbx5
0	2,5	2,6	3,0	2,0
1	2,1	2,4	2,2	1,7
2	2,5	2,6	2,6	2,0
3	2,2	2,1	2,9	1,9
4	2,3	2,5	2,3	3,0
5	2,0	1,8	2,5	2,0
6	2,3	1,0	2,7	1,7

10	2,1	2,0	3,0	3,1
14	2,3	1,5	3,5	2,6

표 2

[0070] ml당 전체 1억개의 살아있는 세포의 세포 농도에서의 약제학적 조성물의 생활력.

일	벳치 1	벳치 2
0	96	96
1	88	95
2	92	96
3	87	93
4	91	96
5	87	91

표 3

[0071] ml당 전체 1억개의 살아있는 세포의 세포 농도에서의 약제학적 조성물의 중식 능력.

일	벳치 1	벳치 2
1	444	456
2	297	481
3	417	333
4	306	417
5	303	722

[0072] 또한, 표 4 및 표 5는 약제학적 조성물이 단일하게 규정된 세포 농도 수율에 제한되지 않는 것을 나타낸다. 또한, 상이한 세포 농도에서의 세포 생활력 및 중식 능력의 유지가 본원에 기재된 약제학적 조성물의 특징이다.

표 4

[0073] 생활력 백분율에 대한 세포 농도의 영향

일	벳치 1(Mio 세포/ml 중)			벳치 2(Mio 세포/ml 중)	
	80	100	110	100	120
0	96	96	96	96	96
1	90	88	91	95	94
2	90	92	90	96	87
3	90	87	88	93	93
4	94	91	90	96	96
5	90	87	88	91	94

표 5

[0074] 중식 능력에 대한 세포 농도의 영향

일	벳치 1(Mio 세포/ml 중)			벳치 2(Mio 세포/ml 중)	
	80	100	80	100	80
1	375	444	333	456	444
2	174*	297	314	481	425
3	694	417	500	333	333
4	278	306	292	417	444
5	256	303	214	722	583

[0075] (\*)로 표시된 2일에서의 뱃치 1에 대해서 m1당 8천만개의 세포에 대해 수득된 값은 실험 오차로 간주하였다.

[0076] 약제학적 조성물 방출 기준 - 동질성: 본 바람직한 구체예에서 본원에 기재된 약제학적 조성물 내의 심장형성 세포의 백분율을 결정하기 위해, MEF2C 및 CD105에 대한 항체를 이용하여 세포의 분취량에서 이중-면역표지를 수행한 후, DAPI를 이용하여 핵 염색을 수행하였다. 목표는 심장형성 세포(MEF2C에 대한 핵 염색) 및 중간엽 줄기 세포(CD105-양성)의 백분율을 결정하는 것이며, 이는 DAPI-염색된 핵의 수에 의해 제공되는 계수된 세포의 전체 수이다. qPCR에 의한 확인 시험을 통과(MEF2C:2.8±0.6배 증가, Tbx5:2.2±0.6배 증가)한 환자 유래 심장형성 세포의 분석은 세포의 96±2%가 심장형성 세포임을 나타낸다. 또한, 계수된 세포의 100%가 CD105-양성이다. 조혈 세포 및 내피 전구 세포에 대한 마커('순도'에 대한 단락 참조)인 CD34의 발현 수준의 증가의 결핍과 함께 종합하면, 이는 세포의 100%가 중간엽 줄기 세포이거나 중간엽 줄기 세포로부터 유래된 세포임을 나타낸다.

[0077] 약제학적 조성물 방출 기준 - 순도: 본 발명의 바람직한 구체예에 따라 수행된 순도 시험은 심장형성 세포와 상이한 세포 유형을 결정하는 것을 목표로 하며, BMMSC는 약제학적 조성물에 부재한다. 순도 기준을 취급하기 위한 선택 방법은 qPCR이다. 순도 시험을 위한 qPCR 방법을 개발하기 위한 접근법은 적합한 마커의 확인, 전매프라이머 및 프로브 세트의 설계, 증폭 곡선 및 융해 피크의 분석, 및 시판되는 양성 대조군 RNA의 확인을 포함하였다. 둘 모두 골수에 보통 존재하는 조혈 표현형 및 내피 전구 표현형의 부재를 약제학적 조성물 내에서의 CD34-발현 세포의 검출가능한 수준의 부재에 의해 결정하였다. 지방모세포, 연골모세포, 골모세포 또는 신경모세포의 부재를 FABP4-발현 세포, Sox9-발현 세포, 오스테오칼신-발현 세포 및 네스틴-발현 세포 각각의 검출가능한 수준의 부재에 의해 약제학적 조성물 내에서 결정하였다. 성숙 심근세포의 배체를 약제학적 조성물 내에서 MYH7-발현 세포의 검출가능한 수준의 부재에 의해 평가하였다.

[0078] 본 발명의 약제학적 조성물에 대한 본원에 기재된 바람직한 구체예를 허혈 기원의 심부전을 갖는 인간에 전용 카테터를 이용하여 살아있지 않은 심근의 경계 구역으로  $1200 \times 10^6$  개 세포의 효과적인 양으로 심장내 주사하였다. 만족스러운 결과가 수득되었다.

[0079] 본 발명에 따른 심장형성 세포를 함유하는 약제학적 조성물의 실행가능성, 안전성 및 효능을 전향성, 무작위화, 개방형, 순차 병렬 2-암(two-armed), 다중심 임상 시험으로 평가하였다.

[0080] 허혈 심근병증에 부차적인 만성 심부전을 나타내는 피검체를 대조군 또는 치리군으로 무작위로 할당하였다. 대조군에는 최적 표준치료(standard of care)를 투여하였다. 치리군에는 최적 표준치료 외에 심장형성 세포를 함유하는 약제학적 조성물을 투여하였다.

[0081] 심장형성 세포를 함유하는 약제학적 조성물을 MyoStar® Injection Catheter(Biologics Delivery Systems, California, USA)를 이용하여 경색 영역의 경계 구역에 심실내 주사하였다. 단일 주사 절차에서,  $1,2 \times 10^9$  개 이하의 세포를 경색 영역 주위의 20개 이하의 주사 부위에 주사하였다.

[0082] 좌심실(LV) 기능의 이면성 심초음파검사(Two-dimensional echocardiography) 평가를 기준선 및 이로부터 6개월 후에 본 시험에 등록된 17명의 피검체(치료군 9명, 대조군 8명)에서 수행하였다. 기준선으로부터 세포 주사 후 6개월까지 LV 확장기말용적(LVEDV), LV 수축기말용적(LVESV), 및 LV 박출계수(LVEF)에서의 변화를 측정함으로써 심장 기능을 평가하였다. 치리군에서의 상기 3개의 중요한 파라미터에 대해 심장 기능에 대한 약제학적 조성물의 긍정적 효과에 유리한 경향이 관찰되었다(도 1). 당업자는 상기 결과가 갖는 중요한 예후 및 치료적 암시를 인지할 것이다.

### 0083] 다른 구체예

[0084] 본 발명은 이의 상세한 기재와 함께 기재되었으나, 상술된 기재는 예시를 위한 것으로, 첨부된 청구항의 범위에 의해 규정되는 본 발명의 범위를 제한하고자 함이 아님이 이해되어야 한다. 다른 양태, 이점 및 변형이 하기 청구항의 범위에 포함된다.

[0085] 특히, 저장 조건 및 저장수명을 포함하는 본원에 기재된 약제학적 조성물을 골수 중간엽 줄기 세포(BMMSC)로부터 유래되는 자가 심장형성 세포, 즉, BMMSC가 수거되는 동일 개체에서 사용되는 BMMSC로부터 제조된 약제학적 조성물의 사용을 기재하는 단지 바람직한 구체예이다. 본 발명의 범위는 자가 BMMSC에 제한되지 않으며, 이는 공급원과 상관 없이 임의의 줄기 세포의 사용을 포함한다. 심장 조직 발생 수임 세포를 수득하게 하는 세포(본

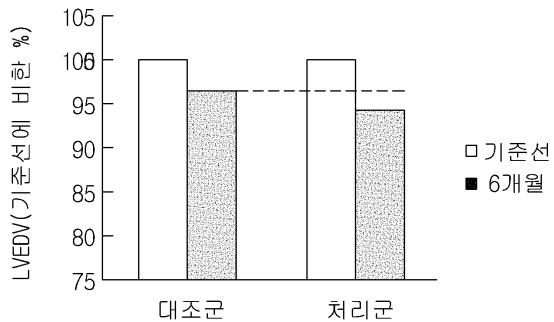
원에서 단락 '원형 세포' 이후)는 동종이형 및 이종일 수 있다. 원형 세포는 또한 신선한 골수 조달이 아닌 다른 수단에 의해 수득될 수 있다. 원형 세포는 배아 줄기 세포일 수 있으나, 단, 이들의 조달은 인간 배아의 파괴를 포함하지 않는다. 원형 세포는 트랜스펙션, 세포 재프로그래밍 또는 외인 유전자가 없는 IPS를 가능케 하는 다른 방법을 포함하는 임의의 수단에 의해 수득된 배아-유사 줄기 세포, 예를 들어, 유도 만능 줄기(IPS) 세포일 수 있다. 원형 세포는 또한 골수 분리 성체 다계열성 유도(MIAMI) 세포, 잔존 심근 줄기 세포, 식물 줄기 세포, 또는 이들의 임의의 배합물일 수 있다. 본 발명은 특정 제형 성분, 제조 방법, 생물학적 물질 또는 시약, 투여 양생법 등에 제한되지 않으며, 이들은 다양할 수 있다.

- [0086] 한 추가 구체예에서, 본원에 기재된 약제학적 조성물은 추가 성분, 예를 들어, 심장발생 물질, 성장인자, 예를 들어, 섬유모세포 성장인자, 태반 성장인자 또는 혈관 내피 성장인자, 사이토카인, 또는 기관발생 신호전달과 관련된 단백질, 분자 구조물, 생체외에서 변경된 비-심장형성 세포, 제약, 혈소판 용해질, 스캐폴드 물질, 예를 들어, 콜라겐, 라미닌, 또는 임의의 다른 세포외 기질 단백질을 포함할 수 있다.
- [0087] 한 추가 구체예에서, 본원에 기재된 키트는 PCT/EP2010/055869, TW099113613, US61/312371, BE2009/0271, PCT/EP2010/055856, TW099113627, 또는 BE2009/0272에 따른 카테터를 포함할 수 있다.
- [0088] 한 추가 구체예에서, 본원에 기재된 키트는 추가 성분, 예를 들어, 약제학적 조성물의 냉장, 냉동, 냉동보존, 동결건조, 유리화, 해동, 재수화, 세척, 분류, 농축, 여과, 동결건조, 원심분리, 재현탁, 샘플링, 또는 분취에 적합한 백 또는 매질을 포함할 수 있다.
- [0089] 한 추가 구체예에서, 본원에 기재된 키트는 써모모니터링(thermomonitoring), 안티-탬퍼(anti-tamper) 장치, 또는 무선 주파수 확인 장치를 포함할 수 있다.
- [0090] 본원에서 사용된 전문용어는 특정 구체예를 기재하기 위한 것으로, 이로 제한하고자 함이 아님이 또한 이해되어야 한다.

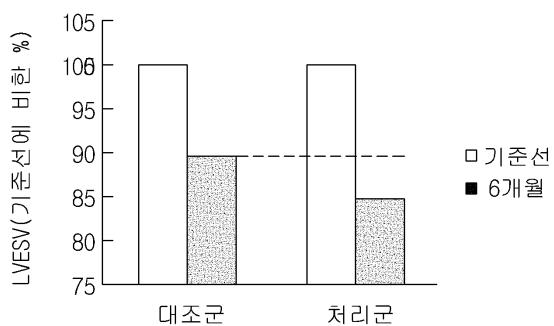
## 도면

## 도면1

A



B



C

