



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0161326
(43) 공개일자 2022년12월06일

- | | |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/12 (2020.01) A61K 35/545 (2015.01)
A61P 25/00 (2006.01) A61P 37/00 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
A61K 35/12 (2013.01)
A61K 35/545 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2022-7033647</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2021년03월29일
심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2022년09월27일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/IL2021/050349</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2021/199032
국제공개일자 2021년10월07일</p> <p>(30) 우선권주장
63/003,174 2020년03월31일 미국(US)
63/118,569 2020년11월25일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
미노비아 테라퓨틱스 리미티드
이스라엘, 3902603 티랏 하카멜, 3 하삿나 스트리트</p> <p>(72) 발명자
입기-오하나 나탈리
이스라엘, 3467405 하이파, 5/6 아비가일 스트리트</p> <p>서 노아
이스라엘, 3499102 하이파, 아파트먼트 3, 규레이 테이만 2</p> <p>브룸킨 모리야
이스라엘, 6299626 텔 아비브, 26 헬신키 스트리트</p> <p>(74) 대리인
특허법인한얼</p> |
|--|---|

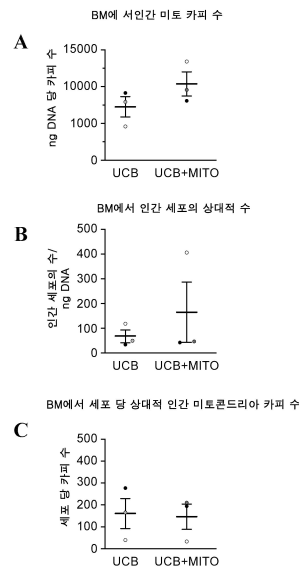
전체 청구항 수 : 총 62 항

(54) 발명의 명칭 **미토콘드리아 강화 요법**

(57) 요약

본 발명은 골수가 백혈구 세포의 생산을 증가시키도록 하는 방법 및 조성물을 제공한다. 구체적으로, 발명은 미토콘드리아로-풍부한 세포를 제공함에 의해 대상체에서 CD45+ 세포의 수준을 증가시키기 위한 방법 및 조성물을 제공한다. 더욱이 본 출원은 골수 세포충실성, CD34+ 세포의 생착 및 분화를 증가시키기 위한 방법을 제공한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 25/00 (2018.01)

A61P 37/00 (2018.01)

명세서

청구범위

청구항 1

대상체에서 백혈구 세포의 수준을 증가시키는 방법으로서,

- a) 대상체로부터 표적 세포를 수득하는 단계;
- b) 공여자 세포로부터 외인성 미토콘드리아를 수득하는 단계;
- c) 외인성 미토콘드리아가 표적 세포에 진입하도록 하는 조건 하에 표적 세포를 외인성 미토콘드리아와 접촉시킴에 의해 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포를 생산하는 단계; 및
- d) 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하며,

상기 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포의 미토콘드리아 함량은 표적 세포의 미토콘드리아 함량보다 검출가능하게 더 높으며, 이에 의해 대상체에서 백혈구 세포의 수준을 증가시키는, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 표적 세포는 만능성 줄기 세포, 배아 줄기 세포, 유도된 만능성 줄기 세포, 중간엽 줄기 세포, 조혈모세포, 조혈 전구 세포, 공통 골수성 전구 세포, 공통 림프성 전구 세포, CD34+ 세포 또는 이의 임의의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 표적 세포는 CD34+ 세포인, 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 표적 세포는 전혈, 혈액 분획, 말초 혈액, PBMC, 혈청, 혈장, 지방 조직, 태반, 구강 점막, 혈액, 체대혈 또는 골수로부터 수득되는, 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 대상체는 질환 또는 장애를 갖는, 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 질환 또는 장애는 연령 관련 장애, 암, 근육 질환 및 장애, 글리코겐-축적 질환 및 장애, 혈관 내피 장애 또는 질환, 뇌 장애 또는 뇌 질환, 태반 장애 또는 태반 질환, 흉선 장애 또는 흉선 질환, 자가 면역 질환, 신장 질환 또는 신장 장애, 원발성 미토콘드리아 질환, 췌장 장애 또는 췌장 질환, 전립선 장애 또는 전립선 질환, 신장 장애 또는 신장 질환, 혈액 장애 또는 혈액 질환, 심장 질환 또는 심장 장애, 피부 장애 또는 피부 질환, 면역 및 염증성 질환 및 장애, 골 질환 또는 골 장애, 위장 질환 또는 위장 장애, 눈 질환 또는 눈 장애 및 감염으로 구성된 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 외인성 미토콘드리아는 단리되거나 부분적으로 정제된 동결-해동 인간 미토콘드리아인, 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 외인성 미토콘드리아는 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포에서 총 미토콘드리아 함량의 적어도 1%를 구성하는, 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 외인성 미토콘드리아는 태반, 배양에서 성장된 태반 세포, 혈구 및 줄기 세포로 구성된 군으로부터 선택된 인간 세포 또는 조직으로부터 유래되는, 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포의 미토콘드리아 함량은 SDHA 및 COX1로부터 선택되는 적어도 하나의 미토콘드리아 단백질의 함량; 시트레이트 합성효소의 활성 수준; 산소(O_2) 소비의 속도; 아데노신 트리포스페이트 생성의 속도; 미토콘드리아 DNA 함량, 헤테로플라스미의 수준 및 이의 임의의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된 검정에 의해 결정되는, 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포의 투여는 정맥내, 복강내, 동맥내 또는 근육내 투여에 의한 것인, 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, 적어도 5×10^5 내지 5×10^9 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포는 대상체에게 투여되는, 방법.

청구항 13

제1항에 있어서, 상기 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포는 미토콘드리아 농후화 이전의 표적 세포와 비교하여:

- a) SDHA 및 COX1로부터 선택된 적어도 하나의 미토콘드리아 단백질의 증가된 함량;
- b) 산소(O_2) 소비의 증가된 속도;
- c) 시트레이트 합성효소의 증가된 활성 수준;
- d) 아데노신 트리포스페이트(ATP) 생산의 증가된 속도;
- e) 증가된 미토콘드리아 DNA 함량;
- f) 더 낮은 헤테로플라스미 수준; 또는
- g) 이의 임의의 조합을 갖는, 방법.

청구항 14

제1항에 있어서, 상기 대상체에게 투여 이전에 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포에 약학적으로 허용가능한 담체를 첨가하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 15

제1항에 있어서, 상기 외인성 미토콘드리아가 표적 세포에 진입하도록 하는 조건은 10^6 세포당 약 0.088 - 176mU 시트레이트 합성효소(CS) 활성의 비율로 표적 세포를 외인성 미토콘드리아와 인큐베이션하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 16

미토콘드리아로-풍부한 표적 세포 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 대상체에서 림프성 세포의 수준을 증가시키기 위한 약학적 조성물로서, 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포는 외인성 미토콘드리아로 풍부화되는, 약학적 조성물.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포는,

- a) 질환 또는 장애를 앓고 있는 대상체 또는 공여자로부터 표적 세포를 수득하는 단계;
- b) 공여자로부터 외인성 미토콘드리아를 수득하는 단계; 및

c) 외인성 미토콘드리아가 표적 세포에 진입하도록 하는 조건 하에 표적 세포를 외인성 미토콘드리아와 접촉시킴에 의해 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포를 생산하는 단계를 포함하는 방법에 의해 생산되고,

여기서 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포의 미토콘드리아 함량은 표적 세포의 미토콘드리아 함량보다 검출가능하게 더 높은, 약학적 조성물.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 표적 세포는 만능성 줄기 세포, 배아 줄기 세포, 유도된 만능성 줄기 세포, 중간엽 줄기 세포, 조혈모세포, 조혈 전구 세포, 공통 골수성 전구 세포, 공통 림프성 전구 세포, CD34+ 세포 및 이의 임의의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는, 약학적 조성물.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 표적 세포는 CD34+ 세포인, 약학적 조성물.

청구항 20

제17항에 있어서, 상기 표적 세포는 전혈, 혈액 분획, 말초 혈액, PBMC, 태반, 혈장, 지방 조직, 구강 점막, 혈액, 제대혈 또는 골수로부터 수득되는, 약학적 조성물.

청구항 21

제17항에 있어서, 상기 외인성 미토콘드리아는 단리되거나 부분적으로 정제된 동결-해동된 인간 미토콘드리아인, 약학적 조성물.

청구항 22

제17항에 있어서, 상기 표적 세포는 자가조직인, 약학적 조성물.

청구항 23

제17항에 있어서, 상기 외인성 미토콘드리아는 자가조직인, 약학적 조성물.

청구항 24

제17항에 있어서, 상기 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포의 미토콘드리아 함량은 SDHA 및 COX1로부터 선택되는 적어도 하나의 미토콘드리아 단백질의 함량; 시트레이트 합성효소의 활성 수준; 산소(O_2) 소비의 속도; 아데노신 트리포스페이트 생성의 속도; 미토콘드리아 DNA 함량 및 이의 임의의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된 검정에 의해 결정되는, 약학적 조성물.

청구항 25

제17항에 있어서, 상기 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포는 미토콘드리아 농후화 이전의 표적 세포와 비교하여:

- a) SDHA 및 COX1로부터 선택된 적어도 하나의 미토콘드리아 단백질의 증가된 함량;
- b) 산소(O_2) 소비의 증가된 속도;
- c) 시트레이트 합성효소의 증가된 활성 수준;
- d) 아데노신 트리포스페이트(ATP) 생산의 증가된 속도;
- e) 증가된 미토콘드리아 DNA 함량; 또는
- f) 더 낮은 헤테로플라스미 수준; 또는
- g) 이의 임의의 조합을 갖는, 약학적 조성물.

청구항 26

제16항에 있어서, 상기 대상체는 질환 또는 장애를 갖는, 약학적 조성물.

청구항 27

제26항에 있어서, 상기 질환 또는 장애는 연령 관련 장애, 암, 근육 질환 및 장애, 글리코겐-축적 질환 및 장애, 혈관 내피 장애 또는 질환, 뇌 장애 또는 뇌 질환, 태반 장애 또는 태반 질환, 흉선 장애 또는 흉선 질환, 자가면역 질환, 신장 질환 또는 신장 장애, 원발성 미토콘드리아 질환, 췌장 장애 또는 췌장 질환, 전립선 장애 또는 전립선 질환, 신장 장애 또는 신장 질환, 혈액 장애 또는 혈액 질환, 심장 질환 또는 심장 장애, 피부 장애 또는 피부 질환, 면역 및 염증성 질환 및 장애, 골 질환 또는 골 장애, 위장 질환 또는 위장 장애, 눈 질환 또는 눈 장애 및 감염으로 구성된 군으로부터 선택되는, 약학적 조성물.

청구항 28

제17항에 있어서, 상기 약학적 조성물은 대상체에게 투여되는, 약학적 조성물.

청구항 29

제28항에 있어서, 적어도 5×10^5 내지 5×10^9 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포가 대상체에게 투여되는, 약학적 조성물.

청구항 30

제17항에 있어서, 상기 외인성 미토콘드리아가 표적 세포에 진입하도록 하는 조건은 10^6 세포당 약 0.088 - 176mU 시트레이트 합성효소(CS) 활성의 비율로 표적 세포를 외인성 미토콘드리아와 인큐베이션하는 것을 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 31

대상체에서 림프구 결핍-관련된 질환 또는 질환들의 쇠약 효과를 감소시키는 방법으로서,

- (a) 외인성 미토콘드리아가 HSC에 진입하도록 하는 조건 하에 조혈모세포(HSC)를 외인성 미토콘드리아와 인큐베이션하는 단계; 및
- (b) (a)로부터의 HSC를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 32

제31항에 있어서, 상기 HSC는 자가 또는 동종이계 줄기 세포인, 방법.

청구항 33

제30항에 있어서, 상기 외인성 미토콘드리아는 적어도 하나의 동결-해동 주기를 겪는, 방법.

청구항 34

제30항에 있어서, 상기 외인성 미토콘드리아가 HSC에 진입하도록 하는 조건은 10^6 세포당 약 0.088 - 176mU 시트레이트 합성효소(CS) 활성의 비율을 포함하는, 방법.

청구항 35

대상체에서 조혈모세포(HSC) 이식을 개선하는 방법으로서,

- (a) 외인성 미토콘드리아가 HSC에 진입하도록 하는 조건 하에 조혈모세포(HSC)를 외인성 미토콘드리아와 인큐베이션하는 단계; 및
- (b) (a)로부터의 HSC를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 36

제35항에 있어서, 상기 HSC는 자가 또는 동종이계 줄기 세포인, 방법.

청구항 37

제35항에 있어서, 상기 외인성 미토콘드리아는 적어도 하나의 동결-해동 주기를 겪는, 방법.

청구항 38

제35항에 있어서, 상기 HSC는 시험관내에서 확장되는, 방법.

청구항 39

제35항에 있어서, 상기 HSC는 적어도 하나의 동결-해동 주기를 겪는, 방법.

청구항 40

제39항에 있어서, 상기 HSC는 시험관내 확장 이전 또는 이후에 적어도 하나의 동결 해동 주기를 겪는, 방법.

청구항 41

제39항에 있어서, 상기 HSC는 외인성 미토콘드리아와 인큐베이션 이전 또는 이후에 적어도 하나의 동결 해동 주기를 겪는, 방법.

청구항 42

제35항에 있어서, 상기 단리된 미토콘드리아가 HSC에 진입하도록 하는 조건은 10^6 세포당 약 0.088 - 176mU 시트레이트 합성효소(CS) 활성의 비율로 표적 세포를 외인성 미토콘드리아로 인큐베이션하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 43

미토콘드리아로-풍부한 표적 세포 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 대상체에서 유전자 요법을 위한 세포의 생착을 증강시키는 약학적 조성물로서, 상기 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포는 외인성 미토콘드리아로 풍부화되는, 약학적 조성물.

청구항 44

제43항에 있어서, 상기 표적 세포는 외인성 미토콘드리아로 농후화 이전, 동안 또는 이후에 유전적으로 변형된, 약학적 조성물.

청구항 45

대상체에서 면역결핍 또는 면역 관련된 질환을 치료하는 방법으로서,

(a) 외인성 미토콘드리아가 HSC에 진입하도록 하는 조건 하에 조혈모세포(HSC)를 외인성 미토콘드리아와 인큐베이션하는 단계; 및

(b) (a)로부터의 HSC를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 46

제45항에 있어서, 상기 HSC는 자가 또는 동종이계 줄기 세포인, 방법.

청구항 47

제45항에 있어서, 상기 외인성 미토콘드리아는 적어도 하나의 동결-해동 주기를 겪는, 방법.

청구항 48

제45항에 있어서, 상기 HSC는 시험관내에서 확장되는, 방법.

청구항 49

제45항에 있어서, 상기 HSC는 적어도 하나의 동결-해동 주기를 겪는, 방법.

청구항 50

제49항에 있어서, 상기 HSC는 시험관내 확장 이전 또는 이후에 적어도 하나의 동결 해동 주기를 겪는, 방법.

청구항 51

제49항에 있어서, 상기 HSC는 외인성 미토콘드리아와 인큐베이션 이전 또는 이후에 적어도 하나의 동결 해동 주기를 겪는, 방법.

청구항 52

제45항에 있어서, 상기 단리된 미토콘드리아가 HSC에 진입하도록 하는 조건은 10^6 세포당 약 0.088 - 176mU 시트레이트 합성효소(CS) 활성의 비율로 표적 세포를 외인성 미토콘드리아로 인큐베이션하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 53

질환 또는 장애를 치료하는 방법으로서,

- a) 외인성 미토콘드리아가 세포에 진입하도록 하는 조건 하에 세포를 외인성 미토콘드리아와 접촉시킴에 의해 미토콘드리아로-풍부한 세포를 생산하는 단계;
 - b) 관심있는 유전자를 포함하는 바이러스 벡터로 미토콘드리아로-풍부한 세포를 형질도입하는 단계; 및
 - c) 미토콘드리아로-풍부한 형질도입된 세포를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하며,
- 이에 의해 질환 또는 장애를 치료하는, 방법.

청구항 54

질환 또는 장애의 치료 방법으로서,

- a) 관심있는 유전자를 포함하는 바이러스 벡터로 세포를 형질도입하는 단계;
 - b) 외인성 미토콘드리아가 세포에 진입하도록 하는 조건 하에 형질도입된 세포를 외인성 미토콘드리아와 접촉시킴에 의해 미토콘드리아로-풍부한 형질도입된 세포를 생산하는 단계; 및
 - c) 미토콘드리아로-풍부한 형질도입된 세포를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하며,
- 이에 의해 질환 또는 장애를 치료하는, 방법.

청구항 55

제53항 또는 제54항에 있어서, 상기 세포는 줄기 세포인, 방법.

청구항 56

제55항에 있어서, 상기 줄기 세포는 조혈모세포(HSC)인, 방법.

청구항 57

제53항 또는 제54항에 있어서, 상기 세포는 면역결핍 세포인, 방법.

청구항 58

제53항 또는 제54항에 있어서, 상기 바이러스 벡터는 아데노-연관된 바이러스(AAV) 벡터 또는 렌티바이러스 벡터인, 방법.

청구항 59

제53항 또는 제54항에 있어서, 상기 미토콘드리아로-풍부한 형질도입된 세포의 투여는 비-강화된 세포와 비교하여 B 세포의 수를 증가시키는, 방법.

청구항 60

제59항에 있어서, 상기 B 세포는 pre-B 또는 pro-B 세포인, 방법.

청구항 61

제53항 또는 제54항에 있어서, 상기 미토콘드리아로-풍부한 형질도입된 세포의 투여는 비-강화된 세포와 비교하여 IgM 양성 세포의 수를 증가시키는, 방법.

청구항 62

제53항에 있어서, 미토콘드리아 농후화는 형질도입된 세포의 수를 증가시키는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 교차-참조

[0002] 본 출원은 35 U.S.C. § 119(e) 하에서 2020년 11월 25일에 출원된 미국 일련 번호 63/118,569 및 2020년 3월 31일에 출원된 미국 일련 번호 63/003,174의 우선권의 이익을 주장하며, 둘 모두의 전체 내용은 그 전체가 참조로 본 명세서에 통합된다.

[0003] 발명의 분야

[0004] 본 발명은 일반적으로 미토콘드리아가 풍부한 세포에 관한 것으로, 보다 구체적으로 줄기 세포 생착, 증식, 귀소 또는 생존을 증가시키고 줄기 세포 분화 패턴을 변형하기 위한 방법 및 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 미토콘드리아는 직경이 0.5 내지 1.0 μm의 범위인 대부분의 진핵 세포에서 발견되는 막 결합 소기관이다. 미토콘드리아는 거의 모든 진핵 세포에서 발견되고 세포 유형에 따라 수와 위치가 다양하다. 미토콘드리아는 그 자체 DNA(mtDNA)와 RNA 및 단백질을 합성하기 위한 그 자체 기구를 포함한다. mtDNA는 단지 37개의 유전자를 함유하고 따라서 포유동물 신체에서 대부분의 유전자 산물은 핵 DNA에 의해 인코딩된다.

[0006] 미토콘드리아는 피루브산 산화, 크렘스 회로 및 아미노산, 지방산 및 스테로이드의 대사와 같은 진핵 세포에서 수많은 필수 작업을 수행한다. 그러나, 미토콘드리아의 주요 기능은 전자-수송 사슬과 산화적-인산화 시스템("호흡 사슬")의 수단에 의해 아데노신 트리포스페이트(ATP)로 에너지의 생성이다. 미토콘드리아가 관여하는 추가 과정은 열 생산, 칼슘 이온의 저장, 칼슘 시그널링, 프로그래밍된 세포 사멸(아포토시스) 및 세포 증식을 포함한다.

[0007] 세포 내부의 ATP 농도는 전형적으로 1-10mM이고 ATP는 단순 및 복합 당(탄수화물) 또는 지질을 에너지원으로 사용하는 산화환원 반응에 의해 생성될 수 있다. 복합 연료가 ATP로 합성되기 위해서는 먼저 더 작고 단순한 분자로 분해되어야 할 필요가 있다. 복합 탄수화물은 글루코스 및 프럭토스와 같은 단순 당으로 가수분해된다. 지방(트리글리세리드)은 대사되어 지방산과 글리세롤을 제공한다.

[0008] 글루코스를 이산화탄소로 산화시키는 전반적인 과정은 세포 호흡으로 알려져 있고 글루코스의 단일 분자에서 약 30 분자의 ATP를 생성할 수 있다. ATP는 다수의 별개의 세포 과정에 의해 생성될 수 있다. 진핵 유기체에서 에너지를 생성하는데 사용되는 3가지 주요 경로는 세포 호흡의 양 구성요소인, 해당과정과 시트르산 회로/산화적 인산화 및 베타-산화이다.

[0009] 비-광합성 진핵생물에 의한 이 ATP 생산의 대부분은 미토콘드리아에서 일어나며, 이는 전형적인 세포의 총 부피의 거의 25%를 구성할 수 있다. 다양한 미토콘드리아 장애는 미토콘드리아 DNA에서 결함 유전자로 인해 발생하는 것으로 알려져 있다.

[0010] 백혈구는 감염성 질환 및 외부 침입자 둘 모두에 대해 신체를 보호하는데 관여하는 면역계의 세포이다. 백혈구는 그 물리적 및 기능적 특성으로 구별될 수 있는 상이한 유형의 세포를 포함한다.

[0011] 골수는 새로운 혈구 생성 또는 조혈의 주요 부위이다. 백혈구를 포함한 모든 유형의 조혈 세포는 골수에서 생성된다. 골수 부전은 상이한 질환(예를 들어 판코니 빈혈)에서 주요 병리학적 특징이다. 조혈모세포(HSC) 이식 요법은 줄기 세포 장애(예를 들어 점액다당질 축적 혈허 질환)로 고통받는 환자에서 결핍되거나 결함이 있는 혈구

계통과 같은 하나 이상의 혈구 유형을 채우거나 다시 채우기 위해 치료가 필요한 대상체에게 투여될 수 있다. 그러나, HSC는 상당한 치료 잠재력을 가지고 있는 반면 임상에서 그의 사용을 방해하는 한계는 숙주에서 조혈모세포 이식의 생착을 보장하는 것과 연관된 어려움이었다.

[0012] 환자의 자신의 면역계는 종종 외인성(자가, 동종이계 또는 동계) 이식된 세포를 공격하고 이식된 조혈모세포의 거부반응을 매개한다. 거부반응을 피하기 위해, 환자는 조혈모세포 이식에 앞서 면역계 파괴제, 예를 들어 화학요법제 또는 방사선으로 치료를 받는다. 불행히도, 환자에서 조혈모세포 이식의 내성을 유도하려는 노력은 종종 심각한 합병증을 초래한다. 따라서, 조혈모세포 이식을 개선하기 위한 새로운 조성물 및 방법이 필요하다.

[0013] 백혈구는 2가지 주요 범주인 - 골수모세포와 림프모세포로 분할될 수 있다. 림프구는 백혈구의 하위유형이고 자연 살해 세포(세포-매개된, 세포독성 선천성 면역에서 기능함), T 세포(세포-매개된, 세포독성 적응성 면역의 경우) 및 B 세포(체액성, 항체-구동된 적응성 면역의 경우)를 포함한다. 골수세포는 골수에서 정상적으로 발생하는 과립구 계열의 어린 세포이다. 골수세포는 그 모두가 면역계에서 중요한 역할을 수행하는 호중구, 호산구 및 호염기구로 성숙한다. 골수에서 림프구 및 골수세포의 생산을 변화시키면 특정 면역계 반응을 유도하는 능력을 초래할 수 있다. 낮은 림프구 수와 관련된 것으로 알려진 수많은 질환 및 장애가 있다. 부가적으로, 나이가 들수록 면역 기능이 저하되고 순환하는 림프구의 빈도가 변경되는 것으로 보고되었다.

[0014] 현재까지, 백혈구 함량을 증가시키고, 결핍된 면역계의 기능을 개선하고, 다양한 질환 및 장애를 치료하기 위한 새롭고 안전한 방법에 대한 요구가 남아 있다.

발명의 내용

[0015] 본 발명은 미토콘드리아가 풍부한 세포가 질환 및 장애를 치료하는 데 유용하다는 획기적인 발견에 기초한다. 본 발명은 골수가 백혈구 세포의 생산을 증가시키도록 하는 방법 및 조성물을 제공한다. 구체적으로, 발명은 미토콘드리아로-풍부한 세포를 제공함에 의해 대상체에서 CD45+ 세포의 수준을 증가시키기 위한 방법 및 조성물을 제공한다. 더욱이, 본 출원은 골수 세포충실성, CD34+ 세포의 생착 및 조혈모세포의 분화를 증가시키는 방법을 제공한다.

[0016] 일 실시형태에서, 본 발명은 질환 또는 장애를 갖는 대상체 또는 공여자로부터 표적 세포를 수득하는 단계; 외인성 미토콘드리아를 수득하는 단계; 외인성 미토콘드리아가 표적 세포에 진입하도록 하는 조건 하에서 표적 세포를 외인성 미토콘드리아와 접촉시킴에 의해 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포를 생산하는 단계; 및 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 대상체에서 백혈구 세포의 수준을 증가시키는 방법을 제공하며; 여기서 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포의 미토콘드리아 함량은 표적 세포의 미토콘드리아 함량보다 검출가능하게 더 높으며, 이에 의해 대상체에서 백혈구 세포의 수준을 증가시킨다.

[0017] 본 발명은 또한 골수가 골수성의 세포에 대한 림프성 세포의 비율을 증가시키도록 하는 방법 및 조성물을 제공한다. 추가로, 발명은 CD3+ 세포, CD14+ 세포, CD19+ 세포, CD33+ 세포의 수준을 변경하기 위한 방법 및 조성물을 제공한다. 발명은 또한 CD33+ 세포의 수준에 비해 CD3+ 세포의 수준을 증가시키는 것을 제공한다. 일부 실시형태에서, 발명은 또한 CD19+의 수준을 증가시키는 것을 제공한다.

[0018] 일 실시형태에서, 본 발명은 질환 또는 장애를 갖는 대상체 또는 건강한 공여자로부터 표적 세포를 수득하는 단계; 외인성 미토콘드리아를 수득하는 단계; 외인성 미토콘드리아가 표적 세포에 진입하도록 하는 조건 하에서 표적 세포를 외인성 미토콘드리아와 접촉시킴에 의해 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포를 생산하는 단계; 및 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 대상체에서 백혈구 세포의 수준을 증가시키는 방법을 제공하며; 여기서 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포의 미토콘드리아 함량은 표적 세포의 미토콘드리아 함량보다 검출가능하게 더 높으며, 이에 의해 대상체에서 골수성 세포에서 림프성 세포로의 이동을 야기한다.

[0019] 일 양태에서, 표적 세포는 만능성 줄기 세포, 배아 줄기 세포, 유도된 만능성 줄기 세포, 중간엽 줄기 세포, 조혈모세포, 조혈 전구 세포, 공통 골수성 전구 세포, 공통 림프성 전구 세포, CD34+ 세포 또는 이의 임의의 조합이다. 특정 양태에서, 표적 세포는 CD34+ 세포이다. 추가 양태에서, 표적 세포는 전혈, 혈액 분획, 말초혈액, PBMC, 혈청, 혈장, 지방 조직, 태반, 구강 점막, 혈액, 체대혈 또는 골수로부터 수득된다. 추가 양태에서, 표적 세포는 공여자로부터 온 것이다. 추가 양태에서, 표적 세포 및/또는 외인성 미토콘드리아는 자가조직이다.

[0020] 특정 양태에서 대상체는 질환 또는 장애가 있다. 일부 양태에서, 질환 또는 장애는 연령 관련된 장애, 암, 근육 질환 및 장애, 글리코젠-축적 질환 및 장애, 혈관 내피 장애 또는 질환, 뇌 장애 또는 뇌 질환, 태반 장애 또는

태반 질환, 흉선 장애 또는 흉선 질환, 자가면역 질환, 신장 질환 또는 신장 장애, 원발성 미토콘드리아 질환, 췌장 장애 또는 췌장 질환, 전립선 장애 또는 전립선 질환, 신장 장애 또는 신장 질환, 혈액 장애 또는 혈액 질환, 심장 질환 또는 심장 장애, 피부 장애 또는 피부 질환, 면역 및 염증성 질환 및 장애, 골 질환 또는 골 장애, 위장 질환 또는 위장 장애, 눈 질환 또는 눈 장애 또는 감염이다.

- [0021] 추가 양태에서, 외인성 미토콘드리아는 분리된 동결-해동된 인간 미토콘드리아이다. 추가 양태에서, 외인성 미토콘드리아는 인간 세포 또는 인간 조직으로부터 유래된다. 일부 실시형태에서, 인간 세포 또는 인간 조직은 태반, 배양물에서 성장된 태반 세포, 및 혈구로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 인간 세포는 인간 줄기 세포이다. 일부 실시형태에서, 인간 세포는 인간 체세포이다. 특정 양태에서, 외인성 미토콘드리아가 표적 세포에 진입하도록 하는 조건은 약 16 내지 37℃의 범위인 온도에서 약 0.5 내지 30시간의 범위인 시간 동안 외인성 미토콘드리아와 함께 표적 세포를 인큐베이션하는 것을 포함한다. 추가 양태에서, 외인성 미토콘드리아가 표적 세포에 진입하도록 하는 조건은 10^6 개 세포당 약 0.088 - 176 mU 시트레이트 합성효소(CS) 활성의 비율로 외인성 미토콘드리아와 함께 표적 세포를 인큐베이션하는 것을 포함한다. 일 양태에서, 외인성 미토콘드리아는 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포에서 총 미토콘드리아 함량의 적어도 1%를 구성한다.
- [0022] 일 양태에서, 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포의 외인성 미토콘드리아 함량은 SDHA 및 COX1로부터 선택된 적어도 하나의 미토콘드리아 단백질의 함량; 시트레이트 합성효소의 활성 수준; 산소(O_2) 소비의 비율; 아데노신 트리포스페이트 생성의 속도; 미토콘드리아 DNA 함량, 헤테로플라스미의 수준 및 이의 임의의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된 검정에 의해 결정된다.
- [0023] 추가 양태에서, 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포의 투여는 정맥내, 복강내, 동맥내, 척추강내 및 근육내 투여에 의한 것이다. 추가 양태에서, 적어도 5×10^5 내지 5×10^9 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포가 대상체에게 투여된다. 특정 양태에서, 약학적으로 허용가능한 담체는 대상체에 투여하기 이전에 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포에 첨가된다. 또 다른 양태에서, 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포는 CD45를 발현한다.
- [0024] 특정 양태에서, 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포는 미토콘드리아 농후화 이전의 표적 세포와 비교하여 SDHA 및 COX1로부터 선택된 적어도 하나의 미토콘드리아 단백질의 증가된 함량; 증가된 산소(O_2) 소비의 비율; 증가된 시트레이트 합성효소의 활성 수준; 증가된 아데노신 트리포스페이트(ATP) 생성의 속도; 증가된 미토콘드리아 DNA 함량; 낮은 수준의 헤테로플라스미; 또는 이의 임의의 조합을 갖는다.
- [0025] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 대상체에서 림프성 세포의 수준을 증가시키기 위한 약학적 조성물을 제공하며, 여기서 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포는 외인성 미토콘드리아가 풍부하다.
- [0026] 일 양태에서, 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포는 질환 또는 쇠약 장애를 앓는 대상체 또는 건강한 공여자로부터 표적 세포를 획득하는 단계; 공여자로부터 외인성 미토콘드리아를 획득하는 단계; 및 외인성 미토콘드리아가 표적 세포에 진입하도록 하는 조건 하에 표적 세포를 외인성 미토콘드리아와 접촉시켜 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포를 생산하는 단계를 포함하는 방법에 의해 생성되며, 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포의 미토콘드리아 함량은 표적 세포의 미토콘드리아 함량보다 검출가능하게 더 높다.
- [0027] 특정 양태에서, 표적 세포는 만능성 줄기 세포, 배아 줄기 세포, 유도된 만능성 줄기 세포, 중간엽 줄기 세포, 조혈모세포, 조혈 전구 세포, 공통 골수성 전구 세포, 공통 림프성 전구 세포, CD34+ 세포 또는 임의의 이의 조합이다. 특정 양태에서, 표적 세포는 CD34+ 세포이다. 추가 양태에서, 표적 세포는 전혈, 혈액 분획, 말초 혈액, PBMC, 혈청, 혈장, 지방 조직, 구강 점막, 혈액, 체대혈 또는 골수로부터 획득된다. 특정 양태에서, 표적 세포는 대상체에 대해 동종이계, 자가 또는 동계이다. 일부 양태에서, 분리된 미토콘드리아는 자가 조직이다.
- [0028] 일 양태에서, 외인성 미토콘드리아는 분리되거나 부분적으로 정제된 동결-해동된 인간 기능성 미토콘드리아이다.
- [0029] 추가 양태에서, 외인성 미토콘드리아가 표적 세포에 진입하도록 하는 조건은 표적 세포를 10^6 세포당 약 0.088 - 176mU 시트레이트 합성효소(CS) 활성의 비로 외인성 미토콘드리아와 인큐베이션하는 것을 포함한다. 또 다른 양태에서, 외인성 미토콘드리아가 표적 세포에 진입하도록 하는 조건은 약 16 내지 37℃의 범위인 온도에서 약 0.5 내지 30시간 범위의 시간 동안 표적 세포를 외인성 미토콘드리아와 함께 인큐베이션하는 것을 포함한다. 추가 양태에서, 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포의 미토콘드리아 함량은 SDHA 및 COX1에서 선택되는 적어도 하나

의 미토콘드리아 단백질의 함량; 시트레이트 합성효소의 활성 수준; 산소(O_2) 소비의 비율; 아데노신 트리포스페이트 생성 속도; 미토콘드리아 DNA 함량 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된 검정에 의해 결정된다.

[0030] 추가 양태에서, 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포는 미토콘드리아 농후화 이전의 표적 세포와 비교하여, SDHA 및 COX1로부터 선택된 적어도 하나의 미토콘드리아 단백질의 증가된 함량; 증가된 산소(O_2) 소비의 비율; 시트레이트 합성효소의 증가된 활성 수준; 증가된 아데노신 트리포스페이트(ATP) 생성 속도; 증가된 미토콘드리아 DNA 함량; 낮은 수준의 헤테로플라스미; 또는 이의 임의의 조합을 가진다.

[0031] 일 양태에서, 대상체는 질환 또는 장애를 갖는다. 추가 양태에서, 질환 또는 장애는 연령 관련 장애, 암, 근육 질환 및 장애, 글리코젠-축적 질환 및 장애, 혈관 내피 장애 또는 질환, 뇌 장애 또는 뇌 질환, 태반 장애 또는 태반 질환, 흉선 장애 또는 흉선 질환, 자가면역 질환, 신장 질환 또는 신장 장애, 원발성 미토콘드리아 질환, 췌장 장애 또는 췌장 질환, 전립선 장애 또는 전립선 질환, 신장 장애 또는 신장 질환, 혈액 장애 또는 혈액 질환, 심장 질환 또는 심장 장애, 피부 장애 또는 피부 질환, 면역 및 염증성 질환 및 장애, 골 질환 또는 골 장애, 위장 질환 또는 위장 장애, 눈 질환 또는 눈 장애 또는 감염이다.

[0032] 일 양태에서, 약학적 조성물은 대상체에게 투여된다. 특정 양태에서, 약학적 조성물은 정맥내, 복강내, 동맥내, 척추강내 및 근육내로 대상체에게 투여된다. 추가 양태에서, 적어도 5×10^5 내지 5×10^9 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포가 투여된다.

[0033] 일 실시형태에서, 본 발명은 조혈모세포(HSC)를 외인성 미토콘드리아가 HSC에 진입하도록 하는 조건 하에 외인성 미토콘드리아와 인큐베이션하는 단계 및 대상체에 HSC를 투여하는 단계를 포함하는 대상체에서 림프구 결핍-관련된 장애 또는 질환의 쇠약화 효과를 감소시키는 방법을 제공한다. 특정 양태에서, HSC는 자가 또는 동종이계 줄기 세포이다. 추가 양태에서, 외인성 미토콘드리아는 적어도 하나의 동결-해동 주기를 거쳤다. 다양한 양태에서, HSC는 대상체에 대해 투여 이전에 세정된다.

[0034] 골수 또는 조혈모세포 이식 이전에 대상체는 기저 질환을 제거하고/하거나 새로운 세포의 거부를 방지하기 위해 컨디셔닝 과정을 거칠 수 있다.

[0035] 추가 실시형태에서, 본 발명은 조혈모세포(HSC)를 외인성 미토콘드리아가 HSC에 진입하도록 하는 조건 하에 외인성 미토콘드리아와 인큐베이션하는 단계 및 대상체에 대해 HSC를 투여하는 단계를 포함하는 대상체에서 조혈모세포(HSC) 이식을 개선하는 방법을 제공한다. 특정 양태에서, HSC는 자가 또는 동종이계 줄기 세포이다. 추가 양태에서, 외인성 미토콘드리아는 공여자로부터 분리된다. 추가 양태에서, 외인성 미토콘드리아는 적어도 하나의 동결-해동 주기를 거쳤다. 일 양태에서, HSC는 *시험관내*에서 확장된다. 추가 양태에서, HSC는 적어도 하나의 동결-해동 주기를 거쳤다. 추가 양태에서, HSC는 *시험관내* 확장 이전 또는 이후에 적어도 하나의 동결-해동 주기를 거쳤다. 특정 양태에서, HSC는 외인성 미토콘드리아와의 인큐베이션 이전 또는 이후에 적어도 하나의 동결-해동 주기를 거쳤다. 추가 양태에서, 외인성 미토콘드리아가 표적 세포에 진입하도록 하는 조건은 10^6 세포당 약 0.088 - 176mU 시트르산 합성효소(CS) 활성의 비로 외인성 미토콘드리아와 함께 표적 세포를 인큐베이션하는 것을 포함할 수 있다.

[0036] 다양한 양태에서, HSC는 대상체에 대해 투여 이전에 세정된다.

[0037] 추가 실시형태에서, 본 발명은 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 대상체에서 유전자 요법을 위한 세포의 생착을 증강시키기 위한 약학적 조성물을 제공하며, 여기서 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포는 외인성 미토콘드리아가 풍부하다. 일 양태에서, 표적 세포는 외인성 미토콘드리아로 농후화되기 이전, 동안 또는 후에 유전적으로 변형되었다.

[0038] 일 실시형태에서, 본 발명은 조혈모세포(HSC)를 외인성 미토콘드리아가 HSC에 진입하도록 하는 조건 하에 외인성 미토콘드리아와 함께 인큐베이션하는 단계; 및 대상체에 대해 HSC를 투여하는 단계를 포함하는 대상체에서 면역결핍 또는 면역 관련된 질환을 치료하는 방법을 제공한다. 특정 양태에서, HSC는 자가 또는 동종이계 줄기 세포이다. 추가 양태에서, 외인성 미토콘드리아는 공여자로부터 분리된다. 추가 양태에서, 외인성 미토콘드리아는 적어도 하나의 동결-해동 주기를 거쳤다. 일 양태에서, HSC는 *시험관내*에서 확장된다. 추가 양태에서, HSC는 적어도 하나의 동결-해동 주기를 거쳤다. 추가 양태에서, HSC는 *시험관내* 확장 이전 또는 이후에 적어도 하나의 동결-해동 주기를 거쳤다. 특정 양태에서, HSC는 외인성 미토콘드리아와의 인큐베이션 이전 또는 이후에 적어도 하나의 동결-해동 주기를 거쳤다. 추가 양태에서, 외인성 미토콘드리아가 표적 세포에 진입하도록 하는 조건은

10^6 세포당 약 0.088 - 176mU 시트르산 합성효소(CS) 활성의 비로 외인성 미토콘드리아와 함께 표적 세포를 인큐베이션하는 것을 포함할 수 있다.

[0039] 일 실시형태에서, 본 발명은 외인성 미토콘드리아가 세포에 진입하도록 하는 조건 하에 세포를 외인성 미토콘드리아와 접촉시킴에 의해 미토콘드리아로-풍부한 세포를 생산하는 단계; 관심있는 유전자가 있는 바이러스 벡터로 미토콘드리아로-풍부한 세포를 형질도입하는 단계; 및 미토콘드리아로-풍부한 형질도입된 세포를 대상체에게 투여하는 단계에 의해 질환 또는 장애를 치료하는 방법을 제공한다. 일 실시형태에서, 본 발명은 관심있는 유전자를 포함하는 바이러스 벡터로 세포를 형질도입하는 단계; 외인성 미토콘드리아가 세포에 진입하도록 하는 조건 하에 형질도입된 세포를 외인성 미토콘드리아와 접촉시킴에 의해 미토콘드리아로-풍부한 세포를 생산하는 단계; 및 미토콘드리아로-풍부한 형질도입된 세포를 대상체에게 투여하는 단계에 의해 질환 또는 장애를 치료하는 방법을 제공한다. 일 양태에서, 세포는 줄기 세포이다. 특정 양태에서, 세포는 조혈모세포(HSC) 또는 면역결핍 세포이다. 일부 양태에서, 바이러스 벡터는 아데노-연관된 바이러스(AAV) 벡터 또는 렌티바이러스 벡터이다. 추가 양태에서, 미토콘드리아로-풍부한 형질도입된 세포의 투여는 비-강화된 세포와 비교하여 B 세포의 수를 증가시킨다. 특정 양태에서, B 세포는 pre-B 또는 pro-B 세포이다. 추가 양태에서, 미토콘드리아로-풍부한 형질도입된 세포의 투여는 비-강화된 세포와 비교하여 IgM 양성 세포의 수를 증가시킨다. 일 실시형태에서, 미토콘드리아 농후화는 형질도입된 세포의 수를 증가시킨다.

도면의 간단한 설명

[0040] 도 1a-c는 NSGS 마우스 안으로 미토콘드리아 농후화된 CD34+ 세포 및 비-농후화된 CD34+ 세포의 이식 후 2개월에 골수에서 생착에 대한 미토콘드리아 농후화의 효과의 분석을 나타낸다. 도 1a. 골수에서 인간 미토콘드리아 카피 수. 도 1b. 골수에서 인간 세포의 상대적 수. 도 1c. 골수에서 세포당 상대적 인간 미토콘드리아 카피.

도 2a-c는 NSGS 마우스 안으로 미토콘드리아 농후화된 CD34+ 세포 및 비-농후화된 CD34+ 세포의 이식 후 2개월에 말초 혈액에서 세포 함량 및 미토콘드리아에 대한 미토콘드리아 농후화의 효과의 분석을 나타낸다. 도 2a. 말초 혈액에서 인간 미토콘드리아 카피 수. 도 2b. 말초 혈액에서 인간 세포의 상대적 수. 도 2c. 말초 혈액에서 세포당 상대적 인간 미토콘드리아 카피.

도 3a-b는 NSGS 마우스 안으로 미토콘드리아 농후화된 CD34+ 세포의 이식 후 6개월에 골수의 분석을 나타낸다. 도 3a: 인간 CD45+ 세포 및 마우스 CD45+ 세포의 총계로부터 인간 CD45+ 세포의 퍼센트 및 인간 CD45+ 세포로부터의 CD3+ 세포 및 CD33+ 세포의 상대적 퍼센트의 유세포 분석. 도 3b: 외인성 인간 미토콘드리아 카피의 수를 보여주는 막대 그래프.

도 4는 NSGS 마우스 안으로 미토콘드리아 농후화된 CD34+ 세포 및 비-농후화된 CD34+ 세포의 이식 후 6개월에 골수의 유세포 분석을 나타낸다.

도 5a-b는 말초 혈액으로 CD45+ 세포 서브세트의 빈도를 나타낸다. 도 5a: 미토콘드리아 강화 요법(MAT)에 이어 특정 시점에서 골수 및 말초 혈구의 유세포 분석. 도 5b: MAT에 이어 특정 시점에서 말초 혈액으로 CD45+ 세포 서브세트의 빈도.

도 6은 수용체 세포로 전달된 외인성 미토콘드리아의 상대적 수준을 나타낸다.

도 7은 $CD3^+$ (T 세포), $CD19^+$ (B 세포), $CD11b^+$ (골수성 세포) 발현을 나타낸다. 4.5m 시점에서 골수성 모집단은 단핵구($Ly6C^{high}Ly6G^-$) 및 호중구($Ly6C^+Ly6G^+$) 서브세트로 추가 특성화되었다.

도 8은 단핵구 및 호중구가 외인성 미토콘드리아를 취함을 나타낸다.

도 9는 강화되고 BTK 유전자로 형질도입된 면역결핍 세포의 B-세포 발달을 시험하기 위한 실험 계획을 나타낸다.

도 10은 NTX101 또는 NTX109로 형질도입된 강화 및 비-강화된 세포, 강화된 비-형질도입된 세포, 비-강화된 비-형질도입된 세포, 및 야생형(WT) 세포에 대한 13일차에서 절대 세포의 수를 나타낸다.

도 11a-b는 HSPC 모집단의 백분율 및 절대 수를 나타낸다. 도 11a. NTX101 또는 NTX109로 형질도입된 강화된 및 비-강화된 세포, 강화된 비-형질도입된 세포, 비-강화된 비-형질도입된 세포 및 야생형 세포 내의 HSPC 모집단의 백분율의 유세포 분석. 도 11b. NTX101 및 NTX109 강화된 및 비-강화된 세포, 비-형질도입된 강화된 및 비강화된 세포, 및 야생형 세포 내의 HSPC 모집단의 절대 수.

도 12는 강화 13일 후, NTX101 또는 NTX109로 형질도입된 강화된 및 비-강화된 세포, 강화된 비-형질도입된 세포, 비-강화된 비-형질도입된 세포, 및 야생형 세포 내에서 pro-B 및 pre-B 세포 모집단의 퍼센트의 유세포 분석을 나타낸다.

도 13a-b는 강화 13일 후, pro B/pre B 세포 모집단 비율 및 pro B 및 pre B 모집단 절대 세포 수를 나타낸다. 도 13a. 강화 13일 후, NTX101 또는 NTX109로 형질도입된 강화된 및 비-강화된 세포, 강화된 비-형질도입된 세포, 비강화된 비-형질도입된 세포 및 야생형 세포에서 pro B/pre B 세포 모집단 비율. 도 13b. 강화 13일 후, NTX101 및 NTX109로 형질도입된 강화된 및 비-강화된 세포, 강화된 비-형질도입된 세포, 비강화된 비-형질도입된 세포 및 야생형 세포에서 pro B 및 pre B 세포 모집단의 절대 세포 수.

도 14는 강화 17일 후, NTX101 또는 NTX109로 형질도입된 강화된 및 비-강화된 세포, 강화된 비-형질도입된 세포, 비강화된 비-형질도입된 세포 및 야생형 세포 내의 B 세포의 백분율 및 절대 수의 유세포 분석을 나타낸다.

도 15는 강화 17일 후, NTX101 또는 NTX109로 형질도입된 강화된 및 비-강화된 세포, 강화된 비-형질도입된 세포, 비강화된 비-형질도입된 세포 및 야생형 세포 내의 IgM 양성 B 세포 모집단의 유세포 분석을 나타낸다.

도 16은 강화 13일 후, NTX101 또는 NTX109로 형질도입된 강화된 및 비-강화된 세포, 강화된 비-형질도입된 세포, 비-강화된 비-형질도입된 세포 및 야생형 세포 내의 GFP 발현의 유세포 분석을 나타낸다.

도 17은 강화 17일 후, NTX101 또는 NTX109로 형질도입된 강화된 및 비-강화된 세포, 강화된 비-형질도입된 세포, 비-강화된 비-형질도입된 세포 내의 GFP 발현의 유세포 분석을 나타낸다.

도 18은 렌티벡터(Xid^{pTC9})로 형질도입된 강화된 및 비-강화된 세포에 대한 이식유전자 발현을 나타낸다.

도 19는 대조군 세포, 비-강화된 형질도입된 세포 및 강화된 형질도입된 세포에서의 유전자 발현에 대한 유세포 분석 데이터를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0041] 본 발명은 외인성 미토콘드리아가 풍부한 세포가 질환 및 장애를 치료하는데 유용하다는 획기적인 발견에 기초한다. 본 발명은 미토콘드리아로-풍부한 세포를 제공함에 의해 대상체에서 골수가 백혈구 세포의 생산을 증가시키도록 하는 방법 및 조성물을 제공한다. 더욱이 본 출원은 골수 세포충실성, CD34+ 세포의 생착 및 분화를 증가시키는 방법을 제공한다.
- [0042] 본 조성물 및 방법을 기술하기 전에, 본 발명은 기술된 특정 조성물, 방법 및 실험 조건으로 제한되지 않고, 이는 그러한 조성물, 방법 및 조건이 다양할 수 있기 때문이다라는 것이 이해되어야 한다. 본 명세서에서 사용된 용어는 단지 특정 실시형태를 설명하기 위한 것이고, 본 발명의 범주는 첨부된 청구범위에서만 제한될 것이기 때문에 제한하려는 의도가 아님을 또한 이해해야 한다.
- [0043] 본 명세서 및 첨부된 청구범위에서 사용된 바와 같이, 단수 형태 "a", "an" 및 "the"는 문맥이 달리 명백하게 지시하지 않는 한 복수 참조를 포함한다. 따라서, 예를 들어, "방법"에 대한 언급은 본 개시내용 등을 읽을 때 당업자에게 명백할 본 명세서에 기재된 하나 이상의 방법 및/또는 유형의 단계 등을 포함한다.
- [0044] 본 명세서에 언급된 모든 간행물, 특허 및 특허 출원은 각각의 개별 간행물, 특허 또는 특허 출원이 참조로 포함되는 것으로 구체적이고 개별적으로 표시된 것처럼 동일한 정도로 참조로 본 명세서에 포함된다.
- [0045] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용되는 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본 명세서에 기재된 것과 유사하거나 등가인 임의의 방법 및 재료가 발명의 실시 또는 시험에 사용될 수 있지만, 변형 및 변경이 본 개시내용의 사상 및 범위 내에 포괄된다는 것이 이해될 것이다. 이제 바람직한 방법 및 재료가 기술된다.
- [0046] 본 발명은 치료학적으로-유익한 양의 완전히 단리된 미토콘드리아의 표적화된 및 전신 전달을 위한 세포 플랫폼, 보다 구체적으로 줄기 세포-유래된 세포 플랫폼 및 대상체에서 그의 이용에 대한 방법을 제공한다. 본 발명은 외인성 미토콘드리아가 풍부한 골수-유래된 조혈모세포의 정맥내 주사가 대상체의 다양한 조직에 유의하게 영향을 미칠 수 있음을 보여주는 몇 가지 놀라운 발견에 기초한다. 환언하면, 외인성 미토콘드리아가 풍부한 줄기세포의 투여에 이어 다양한 장기와 조직에서 기능에서의 향상이 달성될 수 있다.
- [0047] 본 발명은 부분적으로 예를 들어 WO 2016/135723에 개시된 바와 같이 줄기 세포 및 골수 세포는 온전한 외인성 미토콘드리아가 풍부하게 되도록 수용성이고 인간 골수 세포는 특히 미토콘드리아가 풍부하게 되도록 수용성이

다는 발견에 기초한다. 어떤 이론이나 작용기전에도 얽매이지 않고, 외인성 미토콘드리아와 줄기 세포 또는 골수 세포의 공동-인큐베이션은 온전한 기능적 미토콘드리아의 줄기 세포 또는 골수 세포 안으로의 전이를 촉진한다고 가정된다.

[0048] 또한 골수-유래된 조혈모세포를 포함하나 이에 제한되지 않는 줄기 세포 또는 골수 세포의 미토콘드리아로 농후화의 정도 및 세포의 미토콘드리아 기능성에서 개선은 단리된 외인성 또는 부분적으로 정제된 미토콘드리아의 농도뿐만 아니라 인큐베이션을 포함하지만 이에 제한되지 않는 미토콘드리아 농후화를 위해 사용되는 조건에 의존한다는 것이 밝혀졌다.

[0049] 본 발명은 특정 양태에서 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포의 생착, 증식, 및 골수로의 이들 강화된 세포의 귀소를 개선하기 위한 방법 및 조성물을 제공한다. 구체적으로, 외인성 미토콘드리아로 강화된 표적 세포는 외인성 미토콘드리아로 강화 또는 농후화되지 않은 표적 세포를 투여받은 대상체와 비교하여 또는 농후화 또는 강화 이전의 표적 세포와 비교하여 대상체의 골수에 대한 생착을 개선하고 강화된 세포의 지향성을 개선한다.

[0050] 일 양태에서, 본 발명은 질환 또는 장애를 앓고 있는 대상체 또는 외인성 미토콘드리아가 있는 건강한 대상체로부터 얻거나 유래된 표적 세포를 풍부화하고, "미토콘드리아로-풍부한" 표적 세포를 대상체 안으로 이식함에 의해, 대상체에서 CD45+ 세포의 수준을 증가시키고, CD33+ 세포에 비해 CD3+ 세포의 수준을 증가시키고, 골수성 세포에 대한 림프성 세포의 비율을 증가시키는 방법 및 조성물을 제공한다.

[0051] 본 발명은 대상체에서 림프성 세포의 수준을 증가시키는 방법을 제공하며, 방법은 질환 또는 장애를 앓거나 앓고 있는 대상체 또는 건강한 대상체로부터 표적 세포를 수득하는 단계; 공여자로부터 외인성 미토콘드리아를 수득하는 단계; 외인성 미토콘드리아가 표적 세포에 진입하도록 하는 조건 하에 표적 세포를 외인성 미토콘드리아와 접촉시켜 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포를 생산하는 단계; 및 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 농후화된 표적 세포의 미토콘드리아 함량은 표적 세포의 미토콘드리아 함량보다 검출가능하게 더 높다. 일 양태에서, 외인성 미토콘드리아가 표적 세포에 진입하도록 하기 위한 조건은 표적 세포당 10^6 당 약 0.088 - 176mU 시트레이트 합성효소(CS) 활성의 비율로 외인성 미토콘드리아와 함께 표적 세포를 인큐베이션하는 것을 포함한다.

[0052] 본 발명은 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 대상체에서 림프성 세포의 수준을 증가시키기 위한 약학적 조성물을 추가로 제공하며, 여기서 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포는 외인성 미토콘드리아가 풍부하다. 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포는 질환 또는 장애를 앓거나 앓고 있는 대상체 또는 건강한 대상체로부터 표적 세포를 수득하는 단계; 공여자로부터 외인성 미토콘드리아를 수득하는 단계; 및 외인성 미토콘드리아가 표적 세포에 진입하도록 하는 조건 하에 표적 세포를 외인성 미토콘드리아와 접촉시켜 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포를 생산하는 단계에 의해 생성되며; 여기서 농후화된 표적 세포의 미토콘드리아 함량은 표적 세포의 미토콘드리아 함량보다 검출가능하게 더 높다. 일 양태에서, 외인성 미토콘드리아가 표적 세포에 진입하도록 하기 위한 조건은 표적 세포당 10^6 당 약 0.088 - 176mU 시트레이트 합성효소(CS) 활성의 비율로 외인성 미토콘드리아와 함께 표적 세포를 인큐베이션하는 것을 포함한다.

[0053] 림프성 세포 또는 림프구는 항원에 대한 면역 반응을 제공하는 백혈구이다. 림프구 세포는 T 세포, B 세포 및 자연 살해(NK) 세포를 포함한다. T 세포와 B 세포는 적응 면역 반응의 주요 세포 구성요소이다. T 세포는 세포-매개된 면역에 관여하는 반면 B 세포는 주로 체액성 면역을 담당한다. NK 세포는 선천 면역계의 일부이고 종양과 바이러스로 감염된 세포로부터 숙주를 방어하는 데 중요한 역할을 수행한다.

[0054] 본 명세서에 사용된 용어 "증가된 수준의 백혈구 세포"는 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포가 투여된 대상체를 지칭하고 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포가 투여되지 않은 대상체에 비교하여, 미토콘드리아로 농후화되지 않은 표적 세포를 투여받은 대상체와 비교하여, 또는 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포의 투여 이전 대상체의 백혈구 세포의 수준과 비교하여, 백혈구 세포의 수에서 증가를 갖는다. 일부 실시형태에 따르면, CD45+ 세포의 수준은 적어도 1.1배, 1.3배, 1.5배, 2배, 적어도 2.5배, 적어도 3배, 적어도 3.5배, 적어도 4배, 적어도 4.5배 또는 적어도 5배 증가된다.

[0055] 본 명세서에 사용된 용어 "수준 증가의 림프성 세포"는 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포가 투여된 대상체를 지칭하고 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포가 투여되지 않은 대상체에 비교하여, 미토콘드리아로 농후화되지 않은 표적 세포를 투여받은 대상체와 비교하여, 또는 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포의 투여 이전 대상체의 림프성 세포의 수준과 비교하여, 림프성 세포의 수에서 증가를 갖는다. 특정 양태에서, CD3+ 세포의 수준은 적어도 1.1배, 1.3배, 1.5배, 2배, 적어도 2.5배, 적어도 3배, 적어도 3.5배, 적어도 4배, 적어도 4.5배 또는 적어도 5배

증가된다.

- [0056] 본 명세서에 사용된 용어 "골수성 세포에 대한 림프성 세포의 증가된 비율"은 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포가 투여된 대상체를 지칭하고, 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포가 투여되지 않은 대상체에 비교하여, 미토콘드리아로 농후화되지 않은 표적 세포를 투여받은 대상체와 비교하여, 또는 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포의 투여 이전 대상체의 골수성 세포에 대한 림프성 세포의 비율과 비교하여, 골수성 세포에 대한 림프성 세포의 비율에서 증가를 갖는다. 특정 양태에서, 증가는 적어도 1.1배, 1.3배, 1.5배, 2배, 적어도 2.5배, 적어도 3배, 적어도 3.5배, 적어도 4배, 적어도 4.5배, 또는 적어도 5배이다.
- [0057] 본 명세서에 사용된 용어 "표적 세포"는 줄기 세포, 전구 세포 또는 골수 유래된 줄기 세포이다. 구체적으로, 표적 세포는 만능성 줄기 세포, 배아 줄기 세포, 유도된 만능성 줄기 세포, 중간엽 줄기 세포, 조혈모세포, 조혈 전구 세포, 공통 골수성 전구 세포, 공통 림프성 전구 세포, CD34+ 세포 및 이의 임의의 조합을 포함한다. 발명의 방법에서, 표적 세포는 외인성 미토콘드리아로 농후화 이전에 활성적으로 변경되거나 변형되지 않는다(예를 들어, mtDNA 또는 미토콘드리아 기능의 감소). 보다 구체적으로, 표적 세포에서 미토콘드리아 기능 및/또는 미토콘드리아 DNA는 외인성 미토콘드리아와 접촉하기 이전에 활성적으로 변경되거나 변형되지 않는다.
- [0058] 본 명세서에 사용된 용어 "줄기 세포"는 일반적으로 임의의 포유동물 줄기 세포를 지칭한다. 줄기 세포는 다른 유형의 세포로 분화할 수 있고 분열하여 동일한 유형의 줄기 세포를 더 많이 생성할 수 있는 미분화된 세포이다. 줄기 세포는 전능성 또는 만능성일 수 있다.
- [0059] 본 명세서에 사용된 용어 "인간 줄기 세포"는 일반적으로 인간에서 자연적으로 발견되는 모든 줄기 세포, 및 생체의외에서 생성 또는 유래되고 인간과 양립가능한 모든 줄기 세포를 지칭한다. 일부 실시형태에서, 인간 줄기 세포는 자가조직이다. 일부 실시형태에서, 인간 줄기 세포는 동종이계이다. "전구 세포"는 줄기 세포와 마찬가지로 특정 유형의 세포로 분화하는 경향이 있지만 이미 줄기 세포보다 더 특이적이고 그 "표적" 세포로 분화하도록 프싱된다. 줄기 세포와 전구 세포 간의 가장 중요한 차이점은 줄기 세포는 무한정으로 복제할 수 있는 반면 전구 세포는 제한된 횟수만 분열할 수 있다는 것이다. 본 명세서에 사용된 용어 "인간 줄기 세포"는 "전구 세포" 및 "비-완전하게 분화된 줄기 세포"를 추가로 포함한다.
- [0060] HSPC는 모든 면역 세포, 선천성 및 적응성 면역계, 골수 및 림프 계통의 세포의 선조체이다. 줄기 세포로서, 그것은 긴 수명이고; 조혈 세포로서, 그것은 전신적으로 순환을 하고 신체의 모든 장기 시스템에 영향을 미치며, 이는 다중-전신성 질환을 해결하는 열쇠이다. 미토콘드리아 대사는 조혈 줄기 및 전구 세포의 지속성 및 기능뿐만 아니라 면역 세포의 기능 및 염증 균형에 중요하다. 면역 기능 장애는 미토콘드리아 질환 환자의 이환율 및 사망률의 주요 원인이고 신경퇴행성 후유증을 초래하는 것으로 알려져 있다. 면역계는 에너지 결핍의 영향을 받으며 미토콘드리아 질환 환자는 면역적격 모집단에서 일반적으로 볼 수 없는 비정상적인 감염을 포함하여 원발성 면역결핍이 있는 환자와 유사한 증상을 자주 나타낸다. 중요하기로는, 수혈 의존성이나 혈구감소증이 없는 환자에서도 감염 동안 대사 보상부전의 더 높은 위험이 존재하며, 이는 면역 세포 미토콘드리아 기능에서 세포 고유 결함 때문일 수 있다.
- [0061] 전임상적으로, 면역 세포 미토콘드리아 기능의 구제가 빈혈, 근육 소모, 신체 활동, 심혈관 기능의 개선 및 조직 노화의 감소를 포함하는 다중전신 효과를 나타낼 수 있음이 최근에 입증되었다. 조혈 세포가 비-조혈 효과를 발휘하는 제한된 작용기전에는 면역 세포에서 미토콘드리아 기능장애와 연관된 염증의 감소 또는 원위 조직에서 세포사멸을 억제할 수 있는 인자의 향상된 분비가 포함된다.
- [0062] 특정 실시형태에서, 줄기 세포는 만능성 줄기 세포(PSC)이다. 다른 실시형태에서, PSC는 비-배아 줄기 세포이다. 일부 실시형태에 따르면, 배아 줄기 세포는 발명의 범주에서 명시적으로 제외된다. 일부 실시형태에서, 줄기 세포는 유도된 PSC(iPSC)이다. 특정 실시형태에서, 줄기 세포는 배아 줄기 세포이다. 특정 실시형태에서, 줄기 세포는 골수 세포로부터 유래된다. 특정 실시형태에서, 줄기 세포는 CD34+ 세포이다. 특정 실시형태에서 줄기 세포는 중간엽 줄기 세포이다. 다른 실시형태에서, 줄기 세포는 지방 조직으로부터 유래된다. 또 다른 실시형태에서, 줄기 세포는 혈액으로부터 유래된다. 추가 실시형태에서, 줄기 세포는 제대혈로부터 유래된다. 추가 실시형태에서 줄기 세포는 구강 점막으로부터 유래된다. 특정 실시형태에서, 장애 질환을 앓고 있는 환자 또는 건강한 대상체로부터 수득된 줄기 세포는 골수 세포 또는 골수-유래된 줄기 세포이다. 각각의 가능성은 본 발명의 별개의 실시형태를 나타낸다.
- [0063] 본 명세서에 사용된 용어 "만능성 줄기 세포(PSC)"는 무기한 증식할 수 있을 뿐만 아니라 체내에서 복수의 세포 유형을 생성할 수 있는 세포를 지칭한다. 전능성 줄기 세포는 신체의 다른 모든 세포 유형을 생성할 수 있는 세

포이다. 배아 줄기 세포(ESC)는 전능성 줄기 세포이고 유도된 만능성 줄기 세포(iPSC)는 만능성 줄기 세포이다.

- [0064] 본 명세서에 사용된 용어 "유도된 만능성 줄기 세포(iPSC)"는 인간 성인 체세포로부터 생성될 수 있는 만능성 줄기 세포의 유형을 지칭한다. 본 명세서에서 iPSC가 생성될 수 있는 체세포의 일부 비-제한적인 예는 섬유아세포, 내피 세포, 모세혈관 세포, 각질세포, 골수성 세포 상피 세포를 포함한다.
- [0065] 본 명세서에 사용된 용어 "배아 줄기 세포(ESC)"는 배반포의 내부 세포 덩어리로부터 유래된 일종의 전능성 줄기 세포를 지칭한다.
- [0066] 본 명세서에 사용된 용어 "골수 세포"는 일반적으로 인간의 골수에서 자연적으로 발견되는 모든 인간 세포 및 인간의 골수에서 자연적으로 발견되는 모든 세포 모집단을 지칭한다. 용어 "골수 줄기 세포" 및 "골수-유래된 줄기 세포"는 골수에서 유래된 줄기 세포 모집단을 지칭한다.
- [0067] 일부 실시형태에서, 표적 세포는 만능성 줄기 세포, 배아 줄기 세포, 유도된 만능성 줄기 세포, 중간엽 줄기 세포, 조혈모세포, 조혈 전구 세포, 공통 골수성 전구 세포, 공통 림프성 전구 세포, CD34+ 세포 및 임의의 이의 조합이다.
- [0068] 일부 실시형태에서, 자가 또는 동종이계 인간 줄기 세포는 만능성 줄기 세포(PSC) 또는 유도된 만능성 줄기 세포(iPSC)이다. 추가 실시형태에서, 자가 또는 동종이계 인간 줄기 세포는 중간엽 줄기 세포이다.
- [0069] 여러 실시형태에 따르면, 인간 줄기 세포는 지방 조직, 구강 점막, 혈액, 체대혈 또는 골수로부터 유래된다. 각각의 가능성은 본 발명의 별개의 실시형태를 나타낸다. 특정 실시형태에서, 인간 줄기 세포는 골수로부터 유래된다.
- [0070] 특정 실시형태에서, 골수 유래 줄기 세포는 골수조혈 세포를 포함한다. 본 명세서에 사용된 용어 "골수조혈 세포"는 골수형성, 예를 들어, 골수의 생성 및 골수에서 발생하는 모든 세포, 즉 모든 혈구의 생성에 관여하는 세포를 지칭한다.
- [0071] 특정 실시형태에서, 골수 유래된 줄기 세포는 적혈구생성 세포를 포함한다. 본 명세서에 사용된 용어 "적혈구생성 세포"는 적혈구생성, 예를 들어 적혈구(적혈구들)의 생산에 관여하는 세포를 지칭한다.
- [0072] 특정 실시형태에서, 골수 유래된 줄기 세포는 다능성 조혈모세포(HSC)를 포함한다. 본 명세서에 사용된 용어 "다능성 조혈모세포" 또는 "혈구모세포"는 조혈의 과정을 통해 다른 모든 혈구를 발생시키는 줄기 세포를 지칭한다.
- [0073] 특정 실시형태에서, 골수 유래된 줄기 세포는 공통 골수성 전구 세포, 공통 림프성 전구 세포, 또는 이의 임의의 조합을 포함한다. 특정 실시형태에서, 골수 유래된 줄기 세포는 중간엽 줄기 세포를 포함한다. 본 명세서에 사용된 용어 "공통 골수성 전구 세포"는 골수성 세포를 생성하는 세포를 지칭한다. 본 명세서에 사용된 용어 "공통 림프성 전구 세포"는 림프구를 생성하는 세포를 지칭한다.
- [0074] 특정 실시형태에서, 골수 유래된 줄기 세포는 거핵구, 적혈구, 비만 세포, 근아세포, 호염기구, 호중구, 호산구, 단핵구, 대식세포, 자연 살해(NK) 세포, 소림프구, T 림프구, B 림프구, 형질 세포, 망상 세포, 또는 이의 임의의 조합을 추가로 포함한다. 각 가능성은 발명의 별도의 실시형태를 나타낸다.
- [0075] 특정 실시형태에서, 골수 유래된 줄기 세포는 중간엽 줄기 세포를 포함한다. 본 명세서에서 사용된 용어 "중간엽 줄기 세포"는 조골세포, 연골세포, 근세포 및 지방세포를 포함하는 다양한 세포 유형으로 분화할 수 있는 다능성 기질 세포를 지칭한다.
- [0076] 특정 실시형태에서, 골수 유래된 줄기 세포는 골수형성 세포를 포함한다. 특정 실시형태에서, 골수 유래된 줄기 세포는 적혈구생성 세포로 이루어진다. 특정 실시형태에서, 골수 유래된 줄기 세포는 다능성 조혈모세포(HSC)를 포함한다. 특정 실시형태에서, 골수 유래된 줄기 세포는 공통 골수성 전구 세포, 공통 림프성 전구 세포, 또는 이의 임의의 조합을 포함한다. 특정 실시형태에서, 골수 유래된 줄기 세포는 거핵구, 적혈구, 비만 세포, 근아세포, 호염기구, 호중구, 호산구, 단핵구, 대식세포, 자연 살해(NK) 세포, 소림프구, T 림프구, B 림프구, 형질 세포, 망상 세포, 또는 이의 임의의 조합을 포함한다. 특정 실시형태에서, 골수 유래된 줄기 세포는 중간엽 줄기 세포로 이루어진다. 특정 실시형태에서, 줄기 세포는 말초 혈액으로부터 수득된 복수의 인간 골수 줄기 세포를 포함한다.
- [0077] CD34 항원으로도 알려진 조혈 전구 세포 항원 CD34는 인간에서 CD34 유전자에 의해 인코딩되는 단백질이다. CD34는 세포 표면 당단백질에서 분화의 클러스터이며 세포-세포 접합 인자로 기능한다. 특정 실시형태에서, 골

수 줄기 세포는 골수 전구 세포 항원 CD34를 발현한다(CD34+이다). 특정 실시형태에서, 골수 줄기 세포는 그의 외부 막 상에 골수 전구 세포 항원 CD34를 제시한다. 특정 실시형태에서, CD34+ 세포는 제대혈로부터 유래한다.

[0078] 본 명세서에 사용된 용어 "CD34+ 세포"는 그 기원에 관계없이 CD34 양성인 것을 특징으로 하는 조혈모세포를 지칭한다. 특정 실시형태에서, CD34+ 세포는 골수, 혈액에 동원된 골수 세포, 또는 제대혈로부터 수득된다.

[0079] 본 명세서에 사용된 문구 "장애를 앓는 대상체 또는 장애를 앓지 않은 공여자로부터 수득된 줄기 세포"는 대상체로부터 그 단리시에 대상체/공여자에서의 줄기 세포였던 세포를 지칭한다.

[0080] 본 명세서에 사용된 문구 "장애를 앓고 있는 대상체로부터 유래된 줄기 세포" 또는 "장애를 앓고 있지 않은 공여자로부터 유래된"은 대상체/공여자에서 줄기 세포가 아니고 줄기세포가 되도록 조작된 세포를 지칭한다. 본 명세서에서 사용된 용어 "조작된"은 미분화된 상태로 체세포를 재프로그래밍하고 유도된 만능성 줄기 세포(iPSC)가 되도록 하기 위해 당해 분야에 공지된 방법(Yu J. 등, Science, 2007, Vol. 318(5858), pages 1917-1920) 및 선택적으로 iPSC를 추가로 재프로그래밍하여 원하는 계통 또는 모집단의 세포(Chen M. 등, IOVS, 2010, Vol. 51(11), pages 5970-5978), 예컨대 골수 세포(Xu Y. 등, PLoS ONE, 2012, Vol. 7(4), page e34321)가 되도록 하는 것 중 어느 하나의 사용을 지칭한다.

[0081] 일부 실시형태에서, 줄기 세포는 시험관내에서 배양되고 확장된다. 특정 실시형태에서, 줄기 세포는 미토콘드리아 농후화 이전 또는 후에 적어도 1회의 동결 해동 주기를 겪는다.

[0082] 특정 실시형태에서, 줄기 세포는 질환 또는 장애를 앓고 있는 대상체로부터 직접적으로 유래된다. 특정 실시형태에서, 줄기 세포는 공여자로부터 직접적으로 유래된다. 본 명세서에 사용된 용어 "직접적으로 유래된"은 다른 세포로부터 직접적으로 유래된 줄기 세포를 지칭한다. 특정 실시형태에서, 조혈모세포(HSC)는 골수 세포로부터 유래되었다. 특정 실시형태에서, 조혈모세포(HSC)는 말초 혈액으로부터 유래되었다.

[0083] 특정 실시형태에서, 줄기 세포는 질환 또는 장애를 앓고 있는 대상체로부터 간접적으로 유래된다. 특정 실시형태에서, 줄기 세포는 공여자로부터 간접적으로 유래된다. 본 명세서에 사용된 용어 "간접적으로 유래된"은 비-줄기 세포로부터 유래된 줄기 세포를 지칭한다. 특정 실시형태에서, 줄기 세포는 유도된 만능성 줄기 세포(iPSC)가 되도록 조작된 체세포로부터 유래되었다.

[0084] 일부 실시형태에서, 표적 세포는 전혈, 혈액 분획, 말초 혈액, PBMC, 혈청, 혈장, 지방 조직, 구강 점막, 혈액, 제대혈 또는 골수로부터 수득된다. 특정 실시형태에서, 줄기 세포는 질환 또는 장애를 앓고 있는 대상체의 골수로부터 직접적으로 수득된다. 특정 실시형태에서, 줄기 세포는 공여자의 골수로부터 직접적으로 수득된다. 본 명세서에 사용된 용어 "직접적으로 수득된"은, 예를 들어 수술이나 주사기에 의한 바늘을 통한 흡입과 같은 수단에 의해, 골수 자체로부터 수득된 줄기 세포를 지칭한다.

[0085] 특정 실시형태에서, 줄기 세포는 질환 또는 장애를 앓고 있는 환자의 골수로부터 간접적으로 수득된다. 특정 실시형태에서, 줄기 세포는 공여자의 골수로부터 간접적으로 수득된다. 본 명세서에 사용된 용어 "간접적으로 수득된"은 골수 자체가 아닌 다른 위치로부터 수득된 골수 세포를 지칭한다.

[0086] 특정 실시형태에서, 줄기 세포는 질환 또는 장애를 앓고 있는 대상체의 말초 혈액으로부터 수득된다. 특정 실시형태에서, 줄기 세포는 건강한 사람의 말초 혈액으로부터 수득된다. 본 명세서에 사용된 용어 "말초 혈액"은 혈액 시스템에서 순환하는 혈액을 지칭한다.

[0087] 본 명세서에 사용된 용어 "자가 세포" 또는 "자가인 세포"는 환자 자신의 세포인 것을 지칭한다. 용어 "자가 미토콘드리아"는 환자 자신의 세포 또는 모계 관련된 세포에서 얻은 미토콘드리아를 지칭한다. 용어 "동종이계 세포" 또는 "동종이계 미토콘드리아"는 다른 공여자 개체로부터 유래한 것임을 지칭한다.

[0088] 본 명세서 및 청구범위에서 사용된 용어 "동계"는 거부 없이 개체 간에 그래프팅을 허용하기에 충분한 유전적 동일성 또는 유전적 거의-동일성을 지칭한다. 미토콘드리아와 관련하여 동계라는 용어는 동일한 모계 혈통을 의미하는 자가 미토콘드리아라는 용어와 상호교환적으로 본 명세서에서 사용된다.

[0089] 용어 "질환" 및 "장애"는 정상으로 간주되지 않거나 생리학적 상태와 다른 임의의 고통을 지칭하는 것을 의미한다. 질환 및 장애는 거의 모든 기관, 조직 또는 신체 기능에 영향을 줄 수 있다. 질환 및 병태의 비제한적인 예는 암, 근육 질환 및 장애, 글리코겐-축적 질환 및 장애, 혈관 내피 장애 또는 질환, 뇌 장애 또는 뇌 질환, 태반 장애 또는 태반 질환, 흉선 장애 또는 흉선 질환, 자가면역 질환, 신장 질환 또는 장애, 척장 장애 또는 척장 질환, 전립선 장애 또는 전립선 질환, 신장 장애 또는 신장 질환, 혈액 장애 또는 혈액 질환, 심장 질환 또는 심장 장애, 피부 장애 또는 피부 질환, 면역 및 염증성 질환 및 장애, 골 질환 또는 골 장애, 위장 질환 또

는 위장 장애, 및 눈 질환 또는 눈 장애를 포함한다. 특정 양태에서, 질환 또는 장애는 연령 관련된 질환 또는 장애이다.

- [0090] 연령-관련된 질환은 세포 노화가 증가함에 따라 빈도가 증가하면서 가장 흔히 나타나는 질환이다. 필수적으로 연령-관련된 질환은 노화로 인한 합병증이다. 모든 성인 동물이 노화되지만 모든 성인 동물이 연령-관련된 질환을 경험하는 것은 아니기 때문에 연령-관련된 질환은 노화 과정 자체와 구별되어야 한다.
- [0091] 미토콘드리아의 질 및 활성에서 저하는 정상적인 노화와 연관되어 있고 광범위한 연령-관련된 질환의 발병과 상관관계가 있다. 미토콘드리아는 세포 노화, 만성 염증 및 줄기 세포 활성에서 연령-의존적 감소를 포함하여 노화 과정의 특정한 측면에 기여한다. 미토콘드리아 DNA 돌연변이의 축적으로 인해 미토콘드리아 기능장애가 나이가 들면서 발생한다는 것을 뒷받침하는 풍부한 증거가 있다. 다양한 미토콘드리아 DNA 점 돌연변이는 인간 뇌, 심장, 골격근 및 간 조직에서 나이가 들어감에 따라 크게 증가하는 것으로 나타났다. 동물 모델과 인간 둘 모두에서 연령이 증가함에 따라 미토콘드리아 DNA 결실/삽입의 빈도가 증가하는 것으로 보고되었다. 복제 주기와 미토콘드리아 DNA 돌연변이의 축적은 미토콘드리아가 노화의 다수의 주요 측면에 영향을 미치거나 조절하도록 줄기 세포 노화의 기저에 있는 보존된 작용기전일 수 있다는 것이 가정되었다(Sun 등, Cell, 2016, 61 : 654-66; Srivastava, Genes, 2017, 8:398; Ren 등, Genes, 2017, 8:397).
- [0092] 본 명세서에 사용된 용어 "미토콘드리아 질환" 및 용어 "원발성 미토콘드리아 질환"은 상호교환적으로 사용될 수 있다. 본 명세서에 사용된 용어 "원발성 미토콘드리아 질환"은 미토콘드리아 DNA에서 알려진 또는 명백한 병원성 돌연변이 또는 핵 DNA의 유전자 돌연변이에 의해 진단되는 미토콘드리아 질환을 지칭하며, 그의 유전자 산물은 미토콘드리아 안으로 도입된다. 일부 실시형태에 따르면, 원발성 미토콘드리아 질환은 선천성 질환이다. 일부 실시형태에 따르면, 원발성 미토콘드리아 질환은 이차 미토콘드리아 기능장애가 아니다. 용어 "이차 미토콘드리아 기능장애" 및 "후천성 미토콘드리아 기능장애"는 출원 전반에 걸쳐서 상호교환적으로 사용된다.
- [0093] 본 명세서에 사용된 용어 "질환 또는 장애를 앓고 있는 대상체" 또는 "질환 또는 장애를 앓았던 대상체"는 특정 병태에 의해 야기된 쇠약화 효과를 경험하는 인간 대상체를 지칭한다. 장애는 암, 연령 관련된 장애, 신장 질환, 췌장 질환, 간 질환, 근육 장애, 뇌 질환 또는 원발성 미토콘드리아 질환, 이차 미토콘드리아 기능장애 뿐만 아니라 기타 질환 또는 장애를 지칭할 수 있다.
- [0094] 본 명세서에 사용된 용어 "생체의 방법"은 단계가 인체 외부에서 배타적으로 수행되는 방법을 지칭한다. 특히, 생체의 방법은 후속적으로 치료될 대상체에 재도입되거나 이식되는 신체 외부의 세포의 조작을 포함한다.
- [0095] 본 명세서에 사용된 용어 "공여자"는 외인성 미토콘드리아를 제공하는 공여자를 지칭한다. 일부 실시형태에서, 공여자는 질환 또는 장애를 앓지 않거나 대상체가 앓는 동일한 장애 질환을 앓지 않는다.
- [0096] 미토콘드리아와 관련하여 용어 "외인성" 또는 "단리된 외인성"은 세포에 대해 외부인 공급원으로부터 표적 세포 (예를 들어, 줄기 세포)로 도입되는 미토콘드리아를 지칭한다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 외인성 미토콘드리아는 일반적으로 표적 세포와 상이한 공여자 세포로부터 유래되거나 단리된다. 예를 들어, 외인성 미토콘드리아는 공여자 세포에서 생산되거나 만들어지고, 공여자 세포로부터 정제, 단리 또는 수득된 후 표적 세포 안으로 도입될 수 있다. 외인성 미토콘드리아는 공여자로부터 얻은 동종이계 또는 대상체로부터 얻은 자가일 수 있다. 단리된 미토콘드리아는 기능적 미토콘드리아를 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 외인성 미토콘드리아는 전체 미토콘드리아이다.
- [0097] 미토콘드리아와 관련하여, 본 명세서에 사용된 용어 "단리된" 및 "부분적으로 정제된"은 다른 세포 성분으로부터 적어도 부분적으로 정제된 외인성 미토콘드리아를 포함한다. 외인성 단리되거나 부분적으로 정제된 미토콘드리아에서 미토콘드리아 단백질의 총량은 샘플 내의 세포 단백질의 총량의 약 10%-90%이다.
- [0098] 본 명세서에 사용된 용어 "기능적 미토콘드리아"는 정상 미토콘드리아 DNA(mtDNA) 및 정상, 비-병리학적 활성 수준을 나타내는 매개변수를 표시하는 미토콘드리아를 지칭한다. 미토콘드리아의 활성은 막 전위, O₂ 소모, ATP 생산 및 시트레이트 합성효소(CS) 활성 수준과 같은 당업계에 잘 알려진 다양한 방법에 의해 측정될 수 있다.
- [0099] 특정 실시형태에서, 외인성 미토콘드리아는 미토콘드리아로-풍부한 세포에서 총 미토콘드리아 함량의 적어도 1%를 구성한다. 특정 실시형태에서, 외인성 미토콘드리아는 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포에서 총 미토콘드리아 함량의 적어도 10%를 구성한다. 일부 실시형태에서, 외인성 미토콘드리아는 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포에서 총 미토콘드리아 함량의 적어도 약 3%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40% 또는 50%를 구성한다. 특정 실시형태에서, 단리된 미토콘드리아에서 미토콘드리아 단백질의 총량은 세포 단백질의 총량의 10-90%, 20-80%,

20-70%, 40-70%, 20-40%, 또는 20-30% 사이이다. 각각의 가능성은 본 발명의 별개의 실시형태를 나타낸다. 특정 실시형태에서, 단리된 미토콘드리아에서 미토콘드리아 단백질의 총량은 샘플 내의 세포 단백질의 총량의 20%-80% 사이이다. 특정 실시형태에서, 단리된 미토콘드리아에서 미토콘드리아 단백질의 총량은 미토콘드리아 및 기타 세포하 분획의 조합된 중량의 20%-80% 사이이다. 다른 실시형태에서, 단리된 미토콘드리아에서 미토콘드리아 단백질의 총량은 미토콘드리아와 다른 세포하 분획의 조합된 중량의 80% 이상이다.

[0100] 특정 실시형태에서, 외인성 미토콘드리아는 인간 세포 또는 인간 조직으로부터 취득된다. 일부 실시형태에서, 인간 세포 또는 인간 조직은 태반, 배양물에서 성장된 태반 세포, 및 혈구로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 인간 세포는 인간 줄기 세포이다. 일부 실시형태에서, 인간 세포는 인간 체세포이다. 일부 실시형태에서, 세포는 배양물에서의 세포이다. 본 명세서에서 iPSC가 생성될 수 있는 체세포의 일부 비-제한적인 예는 섬유아세포, 내피 세포, 모세혈관 혈구, 각질세포, 골수성 세포 및 상피 세포를 포함한다.

[0101] 미토콘드리아와 관련하여 용어 "자가"는 세포와 동일한 공급원으로부터 표적 세포(예를 들어, 줄기 세포)에 도입된 미토콘드리아를 지칭한다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 자가 미토콘드리아는 표적 세포의 공급원인 대상체로부터 유래되거나 단리된다. 예를 들어, 자가 미토콘드리아는 대상체의 세포에서 정제/단리/수득될 수 있고 그 후 대상체의 표적 세포 안으로 도입될 수 있다.

[0102] 미토콘드리아와 관련하여 용어 "내인성"은 세포에 의해 생성/발현/생산되고 외부 공급원으로부터 세포 내로 도입되지 않는 미토콘드리아를 지칭한다. 일부 실시형태에서, 내인성 미토콘드리아는 세포의 게놈에 의해 인코딩되는 단백질 및/또는 기타 분자를 함유한다. 일부 실시형태에서, 용어 "내인성 미토콘드리아"는 용어 "숙주 미토콘드리아"와 동등하다.

[0103] 본 발명의 원리에 따르면, 외인성 인간 미토콘드리아는 인간 줄기 세포일 수 있는 표적 세포 안으로 도입되어, 외인성 미토콘드리아로 이들 세포를 농후화한다. 이러한 농후화는 표적 세포의 미토콘드리아 함량을 변화시키고: 순수 인간 줄기 세포는 실질적으로 숙주/자가 미토콘드리아의 한 모집단을 가지고 있는 반면, 외인성 미토콘드리아가 풍부한 표적 세포는 실질적으로 두 모집단의 미토콘드리아, 숙주의 첫 번째 모집단/ 내인성 미토콘드리아 및 도입된 미토콘드리아의 다른 모집단(즉, 외인성 미토콘드리아)을 가지고 있음을 이해해야 한다. 따라서, 용어 "풍부화된"은 외인성 미토콘드리아를 수용/통합한 후 세포의 상태와 관련이 있다. 미토콘드리아의 두 모집단 사이의 수 및/또는 비율을 결정하는 것은, 두 모집단이 여러 측면에서, 예를 들어 그의 미토콘드리아 DNA에서 다를 수 있기 때문에 간단하다. 따라서 문구 "외인성 인간 미토콘드리아가 풍부한 인간 줄기 세포"는 문구 "내인성 미토콘드리아 및 외인성 단리된 미토콘드리아를 포함하는 인간 줄기 세포"와 동등하다. 예를 들어, 총 미토콘드리아 함량의 적어도 1% 외인성 단리된 미토콘드리아를 포함하는 인간 줄기 세포는 99:1의 비율로 숙주 내인성 미토콘드리아 및 외인성 단리된 미토콘드리아를 포함하는 것으로 간주된다. 예를 들어, "총 미토콘드리아의 3%"는 농후화 후 원래(내인성) 미토콘드리아 함량이 총 미토콘드리아의 97%이고 도입된(외인성) 미토콘드리아가 총 미토콘드리아의 3%임을 의미한다 - 이것은 $(3/97=)$ 3.1% 농후화와 동등하다. 또 다른 예 - "총 미토콘드리아의 33%"는 농후화 후 원래(내인성) 미토콘드리아 함량이 총 미토콘드리아의 67%이고 도입된(외인성) 미토콘드리아가 총 미토콘드리아의 33%임을 의미한다 - 이것은 $(33/67=)$ 49.2% 농후화와 동등하다.

[0104] 일부 실시형태에서, 외인성 미토콘드리아가 표적 세포 내로 도입된 후, 외인성 미토콘드리아로부터 내인성 미토콘드리아의 동정/식별은, 예를 들어, mtDNA 서열에서 차이, 예를 들어 내인성 미토콘드리아와 외인성 미토콘드리아 사이의 상이한 일배체형을 식별하는 것, 외인성 미토콘드리아의 공급원 조직에서 유래하는 특정 미토콘드리아 단백질, 예컨대 예를 들어 태반으로부터의 시토크롬 p450 콜레스테롤 측쇄 절단(P450SCC), 갈색 지방 조직 등으로부터 UCP1, 또는 이의 임의의 조합을 식별하는 것을 포함하나 이에 제한되지 않는 다양한 수단에 의해 수행될 수 있다.

[0105] 헤테로플라스미는 세포 또는 개체 내에 하나 초과 유형의 미토콘드리아 DNA가 존재하는 것이다. 헤테로플라스미 수준은 돌연변이 mtDNA 분자 대 야생형/기능성 mtDNA 분자의 비율이고 미토콘드리아 질환의 중증도를 고려하는 중요한 인자이다. 낮은 수준의 헤테로플라스미(충분한 양의 미토콘드리아가 기능적임)는 건강한 표현형과 연관되는 반면, 높은 수준의 헤테로플라스미(불충분한 양의 미토콘드리아가 기능적임)는 병리와 연관된다. 특정 실시형태에서, 농후화된 줄기 세포의 헤테로플라스미 수준은 대상체 또는 공여자로부터 수득되거나 유래된 줄기 세포의 헤테로플라스미 수준보다 적어도 1%, 3%, 5%, 15%, 20%, 25%, 또는 30% 낮다.

[0106] 본 명세서에 사용된 용어 "미토콘드리아로-풍부한 표적 세포"는 외인성 미토콘드리아가 삽입된 표적 세포를 지칭한다. 특정 실시형태에서, 미토콘드리아로 풍부한 표적 세포는 CD45, CD3, CD33, CD14, CD19, CD11, CD15, CD16 등을 발현하는 세포로 분화한다. 특정 실시형태에서, 미토콘드리아로 풍부한 표적 세포는 CD45, CD3,

CD33, CD14 또는 CD19를 발현한다. CD45는 적혈구 및 형질 세포를 제외한 조혈 계통의 모든 세포에 존재하는 수용체 연결된 단백질 티로신 포스파타제이다. CD3은 면역 반응 효율의 지표이다. 특히, CD3은 전-흉선세포에서 발현된다. 세포 상에 CD45 및 CD3의 발현은 유세포 분석을 포함하여 당업계에서 공지된 임의의 수단에 의해 결정될 수 있다. 일부 실시형태에 따르면, CD45, CD3, CD33, CD14 및/또는 CD19 발현은 미토콘드리아로-풍부한 세포가 대상체에게 투여된 후에 발생한다.

[0107] 본 명세서에 사용된 용어 "접촉"은 미토콘드리아 및 세포를 세포 안으로 미토콘드리아의 진입을 촉진하기에 충분히 근접하게 하는 것을 지칭한다. 용어 표적 세포 안으로 미토콘드리아를 도입하거나 삽입하는 것은 용어 접촉과 상호교환적으로 사용된다.

[0108] 본 명세서에 사용된 문구 "단리된 미토콘드리아가 표적 세포에 진입하도록 하는 조건"은 일반적으로 시간, 온도, 배양 배지 및 미토콘드리아와 줄기 세포 사이의 근접성과 같은 매개변수를 지칭한다. 예를 들어, 인간 세포와 인간 세포주는 액체 배지에서 일상적으로 인큐베이션되고 37°C 및 5% CO₂ 대기에서 조직 배양 인큐베이터와 같은 멸균 환경에 유지된다. 본 명세서에 개시되고 예시된 대안적인 실시형태에 따르면, 세포는 인간 혈청 알부민이 보충된 염수 중에서 실온에서 인큐베이션될 수 있다.

[0109] 특정 실시형태에서, 인간 줄기 세포는 약 16 내지 약 37°C의 범위인 온도에서 약 0.5 내지 30시간의 범위인 시간 동안 단리된 미토콘드리아와 함께 인큐베이션된다. 특정 실시형태에서, 인간 줄기 세포는 약 1 내지 30시간 또는 약 5 내지 25시간의 범위인 시간 동안 단리된 미토콘드리아와 함께 인큐베이션된다. 특정 실시형태에서, 인큐베이션은 약 20 내지 30시간 동안이다. 일부 실시형태에서, 인큐베이션은 적어도 1, 3, 5, 8, 10, 13, 15, 18, 20, 21, 22, 23 또는 24시간 동안이다. 다른 실시형태에서, 인큐베이션은 최대 5, 10, 15, 20 또는 30시간이다. 특정 실시형태에서, 인큐베이션은 24시간 동안이다. 특정 실시형태에서, 인큐베이션은 표적 세포의 미토콘드리아 함량이 초기 미토콘드리아 함량과 비교하여 평균 약 1% 내지 45% 증가할 때까지이다.

[0110] 일부 실시형태에서, 인큐베이션은 실온(16°C 내지 30°C)에서 된다. 다른 실시형태에서, 인큐베이션은 37°C에서 된다. 일부 실시형태에서, 인큐베이션은 5% CO₂ 대기에서 된다. 다른 실시형태에서, 인큐베이션은 공기에서 발견되는 수준 이상으로 추가된 CO₂를 포함하지 않는다.

[0111] 또 다른 실시형태에서, 인큐베이션은 인간 혈청 알부민(HSA)이 보충된 배양 배지에서 수행된다. 추가 실시형태에서, 인큐베이션은 HSA가 보충된 염수 중에서 수행된다. 특정 예시적인 실시형태에 따르면, 단리된 외인성 미토콘드리아가 인간 줄기 세포에 진입하도록 함에 의해 상기 인간 외인성 미토콘드리아로 상기 인간 줄기 세포를 풍부하게 하는 조건은 4.5% 인간 혈청 알부민이 보충된 염수 중에서 실온에서의 인큐베이션을 포함한다.

[0112] 특정 실시형태에서, 단리된 미토콘드리아는 미토콘드리아가 수득된 후 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 또는 60분에 표적 세포와 함께 인큐베이션된다. 추가 실시형태에서, 단리된 미토콘드리아는 단리된 미토콘드리아가 수득된 후 약 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 또는 24시간 동안 표적 세포와 함께 인큐베이션된다. 일 양태에서 미토콘드리아는 공여자로부터 얻어진다. 또 다른 양태에서 외인성 미토콘드리아는 표적 세포에 대해 자가 또는 동종이계이다.

[0113] 특정 실시형태에서, 인큐베이션은 37°C에서 수행된다. 특정 실시형태에서, 인큐베이션은 적어도 6시간 동안 수행된다. 특정 실시형태에서, 인큐베이션은 적어도 12시간 동안 수행된다. 특정 실시형태에서, 인큐베이션은 12 내지 24시간 동안 수행된다. 특정 실시형태에서, 인큐베이션은 0.88밀리단위의 시트레이트 합성효소(CS)를 갖거나 나타내는 외인성 미토콘드리아의 양당 약 1×10^5 내지 1×10^7 표적 세포의 비율로 수행된다. 특정 실시형태에서, 인큐베이션은 0.88밀리단위의 CS를 갖거나 나타내는 외인성 미토콘드리아의 양당 1×10^6 나이트 줄기 세포의 비율로 수행된다. 특정 실시형태에서, 조건은 CS 활성에 의해 결정될 때 나이트 줄기 세포의 미토콘드리아 함량을 적어도 약 1%, 3%, 5% 또는 10% 증가시키기에 충분하다. 각각의 가능성은 본 발명의 별개의 실시형태를 나타낸다.

[0114] 본 명세서에 사용된 용어 "풍부화"는 미토콘드리아의 함량, 예를 들어, 온전한 미토콘드리아의 수, 또는 포유동물 세포의 미토콘드리아의 기능성을 증가시키도록 설계된 임의의 작용을 지칭한다. 특정 실시형태에서, 외인성 미토콘드리아로 풍부화된 줄기 세포는 농후화 이전의 동일한 줄기 세포와 비교하여 향상된 기능을 나타낼 것이다.

- [0115] 시트레이트 합성효소(CS)는 미토콘드리아 기질에 국지화되지만 핵 DNA에 의해 인코딩된다. 시트레이트 합성효소는 크렘스 회로의 첫 번째 단계에 관여하고 온전한 미토콘드리아의 존재에 대한 정량적 효소 마커로 일반적으로 사용된다(Larsen S. 등, J. Physiol., 2012, Vol. 590(14), pages 3349-3360; Cook G.A. 등, Biochim. Biophys. Acta., 1983, Vol. 763(4), pages 356-367).
- [0116] 미토콘드리아의 용량은 본 명세서에 기술된 CS 활성의 단위 또는 외인성 미토콘드리아의 양의 다른 정량화가 가능한 측정의 mtDNA 카피 수의 관점에서 표현될 수 있다. "CS 활성의 단위"는 1mL 반응 부피에서 1분 동안 일 마이크로몰 기질의 전환을 가능하게 하는 양으로 정의된다.
- [0117] 일부 실시형태에서, 외인성 미토콘드리아로 줄기 세포의 농후화는 백만 세포당 적어도 0.044 내지 176 밀리단위 (mU)의 시트레이트 합성효소(CS) 활성; 백만 세포당 적어도 0.088 내지 176mU의 CS 활성; 백만 세포당 적어도 0.2 내지 150mU의 CS 활성; 백만 세포당 적어도 0.4 내지 100mU의 CS 활성; 백만 세포당 적어도 0.6 내지 80mU의 CS 활성; 백만 세포당 적어도 0.7 내지 50mU의 CS 활성; 백만 세포당 적어도 0.8 내지 20mU의 CS 활성; 백만 세포당 적어도 0.88 내지 17.6mU의 CS 활성; 또는 백만 세포당 적어도 0.44 내지 17.6밀리유닛의 CS 활성의 미토콘드리아의 용량을 표적 세포 안으로 도입하는 것을 포함한다.
- [0118] 본 명세서에 사용된 용어 "미토콘드리아 함량"은 세포 내 미토콘드리아의 양, 또는 복수의 세포 내 미토콘드리아의 평균 양을 지칭한다. 본 명세서에 사용된 용어 "증가된 미토콘드리아 함량"은 미토콘드리아 농후화 이전 표적 세포의 미토콘드리아 함량보다 검출가능하게 더 높은 미토콘드리아 함량을 지칭한다.
- [0119] 특정 실시형태에서, 외인성 미토콘드리아가 풍부한 인간 줄기 세포의 미토콘드리아 함량은 표적 세포의 미토콘드리아 함량보다 검출가능하게 더 높다. 다양한 실시형태에 따르면, 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포의 미토콘드리아 함량은 표적 세포의 미토콘드리아 함량보다 적어도 3%, 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 25%, 적어도 50%, 적어도 100%, 적어도 200% 이상 더 높다.
- [0120] 특정 실시형태에서, 표적 세포는 신선하게 사용된다. 일부 실시형태에서, 표적 세포는 미토콘드리아로 농후화 이전에 또는 후에 동결 및 해동된다.
- [0121] 특정 실시형태에서, 표적 세포 또는 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포의 미토콘드리아 함량은 시트레이트 합성효소의 함량을 결정함에 의해 결정된다. 특정 실시형태에서, 줄기 세포 또는 풍부화된 줄기 세포의 미토콘드리아 함량은 시트레이트 합성효소의 활성 수준을 결정함에 의해 결정된다. 특정 실시형태에서, 줄기 세포 또는 풍부화된 줄기 세포의 미토콘드리아 함량은 시트레이트 합성효소의 함량과 상관관계가 있다. 특정 실시형태에서, 줄기 세포 또는 풍부화된 줄기 세포의 미토콘드리아 함량은 시트레이트 합성효소의 활성 수준과 상관관계가 있다. CS 활성은 예를 들어 CS 활성 키트 CS0720(Sigma)을 사용하여 상업적으로 이용가능한 키트에 의해 측정될 수 있다.
- [0122] 미토콘드리아의 DNA 함량은 핵 유전자로 정규화된 미토콘드리아의 농후화 이전 및 후에 미토콘드리아 유전자의 정량적 PCR을 수행함에 의해 측정될 수 있다.
- [0123] 특정 상황에서 동일한 세포는 미토콘드리아 농후화 이전에 CS 및 ATP 활성을 측정하고 농후화 수준을 결정하기 위한 대조군으로 역할을 한다.
- [0124] 특정 실시형태에서, 본 명세서에 사용된 용어 "검출가능하게 더 높은"은 정상 값과 증가된 값 사이의 통계적으로-유의한 증가를 지칭한다. 특정 실시형태에서, 본 명세서에 사용된 용어 "검출가능하게 더 높은"은 비-병리학적 증가, 즉 실질적으로 더 높은 값과 연관된 병리학적 증상이 명백해지지 않는 수준을 지칭한다. 특정 실시형태에서, 본 명세서에 사용된 용어 "증가된"은 건강한 대상체 또는 복수의 건강한 대상체의 상응하는 세포 또는 상응하는 미토콘드리아 또는 미토콘드리아 농후화 이전의 표적 세포에서 발견되는 상응하는 값보다 약 1.05배, 1.1배, 1.25배, 1.5배, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배 또는 그 높은 값을 지칭한다. 각 가능성은 발명의 별도의 실시형태를 나타낸다.
- [0125] 본 명세서에 사용된 용어 "증가된 미토콘드리아 DNA 함량"은 미토콘드리아 농후화 이전 표적 세포에서 미토콘드리아의 DNA 함량보다 검출가능하게 더 높은 미토콘드리아의 DNA의 함량을 지칭한다. 미토콘드리아의 함량은 SDHA 또는 COX1 함량을 측정함에 의해 결정될 수 있다. 명세서 및 청구범위의 맥락에서 "정상 미토콘드리아의 DNA"는 미토콘드리아 질환과 연관된 것으로 알려진 돌연변이 또는 결실을 담지/보유하지 않은 미토콘드리아 DNA를 지칭한다. 본 명세서에 사용된 용어 "산소(O₂) 소비의 정상 비율"은 건강한 개체로부터 세포의 평균 O₂ 소비를 지칭한다. 본 명세서에 사용된 용어 "시트레이트 합성효소의 정상 활성 수준"은 건강한 개체로부터 세포에서

시트레이트 합성효소의 평균 활성 수준을 지칭한다. 본 명세서에 사용된 용어 "아데노신 트리포스페이트(ATP) 생산의 정상 비율"은 건강한 개체로부터 세포에서 평균 ATP 생산 비율을 지칭한다.

- [0126] 외인성 미토콘드리아로 줄기 세포의 농후화의 정도는 산소(O_2) 소비의 비율, 시트레이트 합성효소의 함량 또는 활성 수준, 아데노신 트리포스페이트(ATP) 생산의 비율을 포함하나 이에 제한되지 않는 기능적 및/또는 효소적 검정에 의해 결정될 수 있다. 대안으로 외인성 미토콘드리아로 줄기 세포의 농후화는 공여자의 미토콘드리아 DNA의 검출에 의해 확인될 수 있다. 일부 실시형태에 따르면, 외인성 미토콘드리아로 줄기 세포의 농후화의 정도는 헤테로플라스미에서 변화의 수준 및/또는 세포당 mtDNA의 카피 수에 의해 결정될 수 있다. 각각의 가능성은 본 발명의 별도의 실시형태를 나타낸다.
- [0127] TMRM(테트라메틸로다민 메틸 에스테르) 또는 관련된 TMRE(테트라메틸로다민 에틸 에스테르)는 미토콘드리아 막 전위의 변화를 식별함에 의해 살아있는 세포에서 미토콘드리아 기능을 평가하는 데 일반적으로 사용되는 세포-투과성 형광 염료이다. 일부 실시형태에 따르면, 농후화의 수준은 TMRE 또는 TMRM으로 염색함에 의해 결정될 수 있다.
- [0128] 일부 실시형태에 따르면, 미토콘드리아 막의 온전성은 당업계에 공지된 임의의 방법에 의해 결정될 수 있다. 비-제한적인 예에서, 미토콘드리아 막의 온전성은 테트라메틸로다민 메틸 에스테르(TMRM) 또는 테트라메틸로다민 에틸 에스테르(TMRE) 형광 프로브를 사용하여 측정된다. 각각의 가능성은 본 발명의 별도의 실시형태를 나타낸다. 현미경 하에서 관찰되고 TMRM 또는 TMRE 염색을 나타내는 미토콘드리아는 온전한 미토콘드리아 외부 막을 가지고 있다. 본 명세서에 사용된 용어 "미토콘드리아 막"은 미토콘드리아 내부 막, 미토콘드리아 외부 막 및 둘 모두로 구성된 군으로부터 선택된 미토콘드리아의 막을 지칭한다.
- [0129] 특정 실시형태에서, 미토콘드리아로-풍부한 인간 줄기 세포에서 미토콘드리아 농후화의 수준은 세포에서 총 미토콘드리아 DNA의 적어도 통계적으로-대표되는 부분을 시퀀싱하고 숙주/내인성 미토콘드리아 DNA 및 외인성 미토콘드리아 DNA의 상대적 수준을 결정함에 의해 결정된다. 특정 실시형태에서, 미토콘드리아로-풍부한 인간 줄기 세포에서 미토콘드리아 농후화의 수준은 단일 뉴클레오티드 다형성(SNP) 분석에 의해 결정된다. 특정 실시형태에서, 가장 큰 미토콘드리아 모집단 및/또는 가장 큰 미토콘드리아 DNA 모집단은 숙주/내인성 미토콘드리아 모집단 및/또는 숙주/내인성 미토콘드리아 DNA 모집단이고; 및/또는 두 번째로-가장 큰 미토콘드리아 모집단 및/또는 두 번째로-가장 큰 미토콘드리아 DNA 모집단은 외인성 미토콘드리아 모집단 및/또는 외인성 미토콘드리아 DNA 모집단이다. 각 가능성은 발명의 별도의 실시형태를 나타낸다.
- [0130] 특정 실시형태에 따르면, 외인성 미토콘드리아로 줄기 세포의 농후화는 당업계에서 인식되는 통상적인 검정에 의해 결정될 수 있다. 특정 실시형태에서, 미토콘드리아로-풍부한 인간 표적 세포에서 미토콘드리아 농후화의 수준은 (i) 숙주/내인성 미토콘드리아 DNA 및 외인성 미토콘드리아 DNA의 수준; (ii) 시트레이트 합성효소(CS), 시토크롬 C 산화효소(COX1), 숙시네이트 탈수소효소 복합체 플라보단백질 서브유닛 A(SDHA) 및 이의 임의의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된 미토콘드리아 단백질의 수준; (iii) CS 활성의 수준; 또는 (iv) (i), (ii) 및 (iii)의 임의의 조합에 의해 결정된다. 각 가능성은 발명의 별도의 실시형태를 나타낸다.
- [0131] 특정 실시형태에서, 미토콘드리아로-풍부한 인간 줄기 세포에서 미토콘드리아 농후화의 수준은 (i) 동종 미토콘드리아의 경우에 숙주 미토콘드리아 DNA 및 외인성 미토콘드리아 DNA의 수준; (ii) 시트레이트 합성효소 활성의 수준; (iii) 숙시네이트 탈수소효소 복합체 플라보단백질 서브유닛 A(SDHA) 또는 시토크롬 C 산화효소(COX1)의 수준; (iv) 산소(O_2) 소비의 비율; (v) 아데노신 트리포스페이트(ATP) 생산의 속도 또는 (vi) 이의 임의의 조합 중 적어도 하나에 의해 결정된다. 각각의 가능성은 본 발명의 별도의 실시형태를 나타낸다. 이들 다양한 매개변수를 측정하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다.
- [0132] 일부 실시형태에서, 외인성 인간 미토콘드리아로 줄기 세포의 농후화는 인간 줄기 세포를 상기 단리된 외인성 인간 외인성 미토콘드리아와 인큐베이션한 후 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포를 세정하는 것을 포함한다. 이 단계는 줄기 세포에 들어가지 않은 세포 파편이나 미토콘드리아 막 잔여물 및 미토콘드리아가 실질적으로 없는 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포를 제공한다. 일부 실시형태에서, 세정은 상기 단리된 외인성 인간 미토콘드리아와 인간 표적 세포의 인큐베이션 후 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포의 원심분리를 포함한다. 일부 실시형태에 따르면, 방법은 유리 미토콘드리아, 즉 줄기 세포에 들어가지 않은 미토콘드리아, 또는 다른 세포 파편으로부터 분리된 미토콘드리아로-풍부한 인간 줄기 세포를 생산하고, 약학적 조성물은 유리 미토콘드리아에서 분리된 미토콘드리아로-풍부한 인간 줄기 세포를 함유한다. 일부 실시형태에 따르면, 방법 및 약학적 조성물은 검출 가능한 양의 유리 미토콘드리아를 포함하지 않는 미토콘드리아로-풍부한 인간 줄기 세포를 생산하고 함유한다.

- [0133] 특정 실시형태에서, 상기 기재된 방법은 인큐베이션 및/또는 접촉 전 또는 동안 표적 세포 및 단리된 외인성 미토콘드리아를 농축하는 것을 추가로 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 기재된 방법은 인큐베이션 또는 접촉 전, 동안 또는 후에 표적 세포 및 단리된 외인성 미토콘드리아의 원심분리를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 그의 다양한 실시형태에서 상기 기재된 방법은 단리된 미토콘드리아와 표적 세포의 인큐베이션 전, 동안 또는 후에 단일 원심분리 단계를 포함한다.
- [0134] 특정 실시형태에서, 원심분리 속도는 약 7,000g 또는 8,000g이다. 추가 실시형태에 따르면, 원심분리는 300g-8000g; 500g-8000g; 1000g-8000g; 300g-5000g; 2000g-4000g; 2500g-8500g; 3000g-8000g; 4000g-8000g; 5,000-10,000g 7000g-8000g 사이 또는 2500g 이상 속도에서 된다. 일부 실시형태에서, 원심분리는 약 2분 내지 30분; 3분 내지 25분; 5분 내지 20분; 또는 8분 내지 15분의 범위인 시간 동안 수행된다.
- [0135] 일부 실시형태에서, 원심분리는 약 2 내지 6℃; 4 내지 37℃; 4 내지 10℃ 또는 16-30℃의 범위인 온도에서 수행된다. 특정 실시형태에서, 원심분리는 4℃에서 수행된다. 일부 실시형태에서, 그의 다양한 실시형태에서 상기 기재된 방법은 단리된 외인성 미토콘드리아로 표적 세포의 인큐베이션 전, 동안 또는 후에 단일 원심분리, 이어서 세포를 30℃ 미만의 온도에서 휴지시키는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 단리된 외인성 미토콘드리아가 인간 표적 세포에 진입하도록 하는 조건은 단리된 미토콘드리아로 표적 세포의 인큐베이션 전, 동안 또는 후에 단일 원심분리, 이어서 세포를 16 내지 28℃의 범위인 온도에서 휴지시키는 것을 포함한다.
- [0136] 일부 실시형태에서, 방법은 대상체의 체중 킬로그램당 적어도 10^4 내지 2×10^8 ; 5×10^5 내지 1.5×10^7 ; 또는 5×10^5 내지 4×10^7 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포의 농도에서 미토콘드리아로-풍부한 줄기 세포를 생성하고/하거나 약학적 조성물은 이를 함유한다. 일부 실시형태에서, 방법은 환자의 체중 킬로그램당 적어도 10^6 내지 10^7 미토콘드리아로-풍부한 인간 줄기 세포의 농도에서 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포를 생성하고/하거나 약학적 조성물은 이를 함유한다. 다른 실시형태에서, 방법은 환자의 체중 킬로그램당 적어도 10^5 또는 적어도 10^6 미토콘드리아로-풍부한 인간 줄기 세포의 농도에서 미토콘드리아로 풍부한 표적 세포를 생성하고/하거나 약학적 조성물은 이를 함유한다. 일부 실시형태에서, 방법은 총 적어도 5×10^5 내지 최대 5×10^9 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포의 농도에서 미토콘드리아로-풍부한 줄기 세포를 생성하고/하거나 약학적 조성물은 이를 함유한다. 일부 실시형태에서, 방법은 총 적어도 10^6 내지 최대 10^9 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포의 농도에서 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포를 생성하고/하거나 약학적 조성물은 이를 함유한다. 다른 실시형태에서, 방법은 총 적어도 2×10^6 내지 최대 5×10^8 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포를 생성하고/하거나 약학적 조성물은 이를 포함한다.
- [0137] 특정 실시형태에서, 표적 세포는 신선하다. 특정 실시형태에서, 표적 세포는 동결된 다음 인큐베이션 이전에 해동된다. 특정 실시형태에서, 단리된 외인성 미토콘드리아는 신선하다. 특정 실시형태에서, 단리된 외인성 미토콘드리아는 동결된 다음 인큐베이션 이전에 해동된다. 특정 실시형태에서, 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포는 신선하다. 특정 실시형태에서, 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포는 동결된 다음 투여 이전에 해동된다.
- [0138] 특정 실시형태에서, 미토콘드리아는 동결되지 않는다. 추가 실시형태에서, 단리된 미토콘드리아는 동결된 다음, 사용 이전에 저장 및 해동된다. 추가 실시형태에서 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포는 동결 및 저장 없이 사용된다. 또 다른 실시형태에서, 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포는 동결, 저장 및 해동 후에 사용된다. 생존력을 보존하기 위해 세포 제제의 동결 및 해동에 적합한 방법은 당업계에 잘 알려져 있다.
- [0139] 본 명세서에 사용된 용어 "동결-해동 주기"는 단리된 외인성 미토콘드리아를 0℃ 미만의 온도로 동결시키고, 정의된 기간 동안 0℃ 미만의 온도에서 미토콘드리아를 유지하고, 단리된 미토콘드리아로 표적 세포를 처리할 수 있는 실온 또는 체온 또는 0℃ 이상의 온도로 단리된 미토콘드리아를 해동하는 것을 지칭한다. 본 명세서에 사용된 용어 "실온"은 전형적으로 18℃ 내지 25℃의 온도를 지칭한다. 본 명세서에 사용된 용어 "체온"은 35.5℃ 내지 37.5℃, 바람직하게는 37℃의 온도를 지칭한다.
- [0140] 다른 실시형태에서, 동결-해동 주기를 거친 미토콘드리아는 -20℃ 이하; -4℃ 이하; 또는 -70℃ 이하의 온도에서 동결되었다. 다른 실시형태에 따르면, 미토콘드리아의 동결은 점진적이다. 일부 실시형태에 따르면, 미토콘드리아의 동결은 플래시-동결을 통한 것이다. 본 명세서에 사용된 용어 "플래시-동결"은 미토콘드리아를 극저온에 가하여 이를 급속으로 동결시키는 것을 지칭한다.
- [0141] 다른 실시형태에서, 동결-해동 주기를 겪은 미토콘드리아는 해동 이전에 적어도 30분 동안 동결되었다. 다른 실시형태에 따르면, 동결-해동 주기는 해동 이전에 적어도 30, 60, 90, 120, 180, 210분 동안 단리된 외인성 미토

콘드리아를 동결시키는 것을 포함한다. 각각의 가능성은 본 발명의 별도의 실시형태를 나타낸다. 또 다른 실시형태에서, 동결-해동 주기를 겪은 단리된 외인성 미토콘드리아는 해동 이전 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 24, 48, 72, 96, 또는 120시간 동안 동결된다. 또 다른 실시형태에서, 동결-해동 주기를 겪은 단리된 외인성 미토콘드리아는 해동 이전에 적어도 4, 5, 6, 7, 30, 60, 120, 365일 동안 동결되었다. 다른 실시형태에 따르면, 동결-해동 주기는 해동 이전 적어도 1, 2, 3주 동안 단리된 외인성 미토콘드리아를 동결시키는 것을 포함한다. 다른 실시형태에 따르면, 동결-해동 주기는 해동 이전 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6개월 동안 단리된 외인성 미토콘드리아를 동결시키는 것을 포함한다. 각각의 가능성은 본 발명의 별도의 실시형태를 나타낸다. 또 다른 실시형태에 따르면, 동결-해동 주기 후 단리된 외인성 미토콘드리아의 산소 소비는 동결-해동 주기 이전의 외인성 미토콘드리아의 산소 소비와 동일하거나 더 높다.

[0142] 특정 실시형태에 따르면, 해동은 실온에서 된다. 다른 실시형태에서, 해동은 체온에서 된다. 다른 실시형태에 따르면, 해동은 발명의 방법에 따라 미토콘드리아를 투여할 수 있는 온도에서 된다. 다른 실시형태에 따르면, 해동은 점진적으로 수행된다.

[0143] 특정 실시형태에서, 상기 기재된 방법은 골수 세포의 말초 혈액으로의 동원을 유도하는 제제를 질환 또는 장애를 앓고 있는 대상체 또는 공여자에게 투여하는 선행 단계를 추가로 포함한다.

[0144] 특정 실시형태에서, 골수에서 생성된 골수 세포/줄기 세포의 말초 혈액으로의 동원을 유도하는 제제는 과립구-집락 자극 인자(G-CSF), 과립구-대식세포 집락-자극 인자(GM-CSF), 1,1'-[1,4-페닐렌비스(메틸렌)]비스[1,4,8,11-테트라아자사이클로테트라데칸](Plerixafor, CAS 번호 155148-31-5), CXCR4 억제제, 이의 염, 및 이의 임의의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된다. 각 가능성은 발명의 별도의 실시형태를 나타낸다.

[0145] 특정 실시형태에서, 상기 기재된 방법은 질환 또는 장애를 앓고 있는 대상체 및/또는 공여자의 말초혈로부터 줄기 세포를 단리하는 것을 추가로 포함한다. 본 명세서에 사용된 용어 "말초혈액으로부터 단리"는 혈액의 다른 구성성분으로부터 줄기 세포의 단리를 지칭한다.

[0146] 성분채집 동안, 대상체 또는 공여자의 혈액은 하나의 특정 성분을 분리하고 나머지를 순환계로 되돌리는 장치를 통과한다. 따라서 그것은 신체 외부에서 수행되는 의료 절차이다. 특정 실시형태에서, 단리는 성분채집에 의해 수행된다.

[0147] 특정 실시형태에서, 줄기 세포일 수 있는 표적 세포는 질환 또는 장애를 앓고 있는 대상체 또는 공여자로부터 수득되고, 표적 세포는 (i) 산소(O_2) 소비의 정상 속도; (ii) 시트레이트 합성효소의 정상 함량 또는 활성 수준; (iii) 아데노신 트리포스페이트(ATP) 생산의 정상 속도; 또는 (iv) (i), (ii) 및 (iii)의 임의의 조합을 갖는다.

[0148] 특정 실시형태에서, 줄기 세포일 수 있는 표적 세포는 질환 또는 장애를 앓고 있는 대상체 또는 공여자로부터 수득되고, 표적 세포는 질환 또는 장애를 앓지 않은 대상체와 비교하여 (i) 산소(O_2) 소비의 감소된 속도; (ii) 시트레이트 합성효소의 감소된 함량 또는 활성 수준; (iii) 아데노신 트리포스페이트(ATP) 생산의 감소된 속도; 또는 (iv) (i), (ii) 및 (iii)의 임의의 조합을 갖는다.

[0149] 특정 실시형태에서, 미토콘드리아-풍부한 표적 세포는 표적 세포와 비교하여 (i) 산소(O_2) 소비의 증가된 속도; (ii) 시트레이트 합성효소의 증가된 함량 또는 활성 수준; (iii) 아데노신 트리포스페이트(ATP) 생산의 증가된 속도; (iv) 증가된 미토콘드리아 DNA 함량 (v) 더 낮은 수준의 헤테로플라스미 또는 (vi) (i), (ii), (iii) (iv) 및 (v)의 임의의 조합을 갖는다.

[0150] 본 명세서에 사용된 용어 "산소(O_2) 소비의 증가된 속도"는 미토콘드리아 농후화 이전의 산소(O_2) 소비의 속도보다 검출가능하게 더 높은 산소(O_2) 소비의 속도를 지칭한다.

[0151] 본 명세서에 사용된 용어 "시트레이트 합성효소의 증가된 함량 또는 활성 수준"은 미토콘드리아 농후화 이전의 시트레이트 합성효소의 함량 값 또는 활성 수준보다 검출가능하게 더 높은 시트레이트 합성효소의 함량 또는 활성 수준을 지칭한다.

[0152] 본 명세서에 사용된 용어 "아데노신 트리포스페이트(ATP) 생성의 증가된 속도"는 미토콘드리아 농후화 이전 아데노신 트리포스페이트(ATP) 생성의 속도보다 검출가능하게 더 높은 아데노신 트리포스페이트(ATP) 생성의 속도를 지칭한다.

- [0153] 일부 양태에 따르면, 본 발명은 이러한 치료를 필요로 하는 인간 대상체에서 질환 또는 장애 또는 그의 증상을 치료하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 복수의 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포를 포함하는 약학적 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0154] 용어 "치료"는 본 명세서에서 용어 "치료적 방법"과 상호교환적으로 사용되고, 1) 진단된 병리학적 병태 또는 장애의 증상을 치유, 감소, 경감 및/또는 진행을 중지하는 치료적 처리 또는 조치, 및 2) 예방적/방어적 조치들 모두를 지칭한다. 치료가 필요한 이들에게는 이미 특정 의학적 장애가 있는 개체뿐만 아니라 궁극적으로 장애를 얻을 수 있는 이들(예를 들어 예방적 조치가 필요한 이들)이 포함될 수 있다.
- [0155] 용어 "치료적으로 유효한 양", "유효 용량", "치료적으로 유효한 용량", "유효량" 등은 연구자, 의사, 의사 또는 기타 임상가가 추구하는 조직, 시스템, 동물 또는 인간의 생물학적 또는 의학적 반응을 이끌어낼 대상 화합물의 그 양을 지칭한다. 일반적으로, 반응은 환자에서 증상의 개선 또는 원하는 생물학적 결과이다. 유효량은 본 명세서에 기재된 바와 같이 결정될 수 있다.
- [0156] 용어 "~의 투여" 및/또는 "투여하는"은 치료를 필요로 하는 대상체에게 치료학적으로 유효한 양의 약학적 조성물을 제공하는 것을 의미하는 것으로 이해되어야 한다. 투여 경로는 경장, 국소 또는 비경구일 수 있다. 이와 같이, 투여 경로는 정맥내, 복강내, 동맥내 및 근육내를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 본 명세서에 사용된 문구 "비경구 투여" 및 "비경구로 투여되는"은 장 및 국소 투여 이외의 투여의 방식을 의미한다. 약학적 조성물은 투여 방법에 의존하여 다양한 단위 투여 형태로 투여될 수 있다. 적합한 단위 투여 형태는 분말, 정제, 환제, 캡슐, 로젠지, 좌약, 패치, 비강 스프레이, 주사제, 이식가능한 서방성 제형, 지질 복합체 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0157] 본 발명은 또 다른 양태에서 상기 기재된 바와 같은 복수의 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포를 포함하는 약학적 조성물을 추가로 제공한다. 특정 실시형태에서, 상기 기재된 약학적 조성물은 장애가 있는 인간 대상체에서 특정 증상을 치료하는 방법에 사용하기 위한 것이다.
- [0158] 본 명세서에 사용된 "약학적 조성물"은 활성 성분, 및 선택적으로 약학적으로 허용가능한 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는 제형을 지칭한다. 용어 "활성 성분"은 "유효 성분"을 상호교환가능하게 지칭할 수 있고, 투여 시 후에-원하는 효과를 유도할 수 있는 임의의 제제를 지칭하는 것을 의미한다. 활성 성분의 예는 화합물, 약물, 치료제, 소분자 등을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다.
- [0159] "약학적으로 허용가능한"은 담체, 희석제 또는 부형제가 제형의 다른 성분과 상용성이야 하고 이의 수용자 또는 제형의 활성 성분의 활성에 유해하지 않아야 함을 의미한다. 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 안정화제는, 예를 들어 Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)로 당업계에 잘 알려져 있다. 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 안정화제는 이용된 투여량 및 농도에서 수용자에게 무독성이고 포스페이트, 시트레이트 및 기타 유기산과 같은 완충액; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함하는 항산화제; 방부제(예컨대 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤잘코늄 클로라이드, 벤제토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알코올; 메틸 또는 프로필 파라벤과 같은 알킬 파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 시클로헥산올; 3-펜탄올; 및 m-크레졸); 저분자량(약 10 미만의 잔기) 폴리펩티드; 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린과 같은 단백질; 폴리비닐피롤리돈과 같은 친수성 고분자; 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 라이신과 같은 아미노산; 단당류, 이당류, 및 글루코스, 만노오스 또는 텍스트린을 비롯한 기타 탄수화물; EDTA와 같은 킬레이트제; 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨과 같은 당류; 나트륨과 같은 염-형성 반대-이온; 금속 착물(예를 들어 Zn-단백질 착물); 및/또는 TWEEN™, PLURONICS™ 또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)과 같은 비-이온성 계면활성제를 포함할 수 있다. 담체의 예는 리포솜, 나노입자, 연고, 미셀, 마이크로스피어, 마이크로입자, 크림, 에멀전 및 겔을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 부형제의 예는 마그네슘 스테아레이트와 같은 부착 방지제, 당류 및 이의 유도체(수크로스, 락토스, 전분, 셀룰로오스, 당 알코올 등)와 같은 결합제 젤라틴 및 합성 중합체 같은 단백질, 탈크 및 실리카와 같은 윤활제, 및 항산화제, 비타민 A, 비타민 E, 비타민 C, 레티닐 팔미테이트, 셀레늄, 시스테인, 메티오닌, 시트르산, 황산나트륨 및 파라벤과 같은 방부제를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 희석제의 예는 물, 알코올, 식염수, 글리콜, 광유 및 디메틸 설펝사이드(DMSO)를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다.
- [0160] 특정 실시형태에서, 증상은 손상된 보행 능력, 손상된 운동 능력, 손상된 언어 능력, 손상된 기억, 체중 감소, 약액질, 낮은 혈중 알칼리성 포스파타제 수준, 낮은 혈중 마그네슘 수준, 높은 혈중 크레아티닌 수준, 낮은 혈중 중탄산염 수준, 낮은 혈중 염기 과잉 수준, 높은 소변 글루코스/크레아티닌 비율, 높은 소변 염화물/크레아티닌 비율, 높은 소변 나트륨/크레아티닌 비율, 높은 혈중 락테이트 수준, 높은 소변 마그네슘/크레아티닌

비율, 높은 소변 칼륨/크레아티닌 비율, 높은 소변 칼슘/크레아티닌 비율, 글루코스노증, 마그네슘노증, 높은 혈중 요소 수준, 낮은 C-펩티드 수준, 높은 HbA1C 수준, 부갑상선기능저하증, 안검하수, 청력 상실, 심장 전도 장애, 림프구에서 낮은 ATP 함량 및 산소 소비, 양극성 장애, 강박 장애, 우울 장애 및 성격 장애를 포함한 기분 장애로 구성된 군으로부터 선택된다. 각각의 가능성은 본 발명의 별도의 실시형태를 나타낸다. 증상을 "높음" 및 "낮음"으로 정의하는 것은 각각 "정상보다 검출가능하게 높음" 및 "정상보다 검출가능하게 낮음"에 해당하며, 여기서 정상 수준은 미토콘드리아의 질환에 걸리지 않은 복수의 대상체에서 상응하는 수준임을 이해해야 한다.

[0161] 특정 실시형태에서, 풍부화된 줄기 세포는 특정 조직 또는 기관에 투여된다. 특정 실시형태에서, 풍부화된 줄기 세포는 적어도 10^4 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포를 갖는다.

[0162] 특정 실시형태에서, 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포는 비경구 투여에 의해 투여된다. 특정 실시형태에서, 약학적 조성물은 전신 투여; 정맥내 주사 또는 정맥내 주입에 의해 투여된다. 특정 실시형태에서, 풍부화된 줄기 세포는 적어도 10^5 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포를 갖는다. 특정 실시형태에서, 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포는 약 적어도 약 10^4 ; 적어도 10^4 내지 적어도 10^8 ; 적어도 10^6 내지 적어도 10^8 ; 적어도 10^5 내지 적어도 2×10^7 ; 적어도 10^6 내지 적어도 5×10^6 ; 또는 적어도 10^5 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포를 갖는다.

[0163] 특정 실시형태에서, 줄기 세포일 수 있는 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포는 (i) 미토콘드리아 농후화 이전 표적 세포에서의 미토콘드리아 DNA 함량과 비교하여 증가된 미토콘드리아 DNA 함량; (ii) 미토콘드리아 농후화 이전의 표적 세포에서의 산소(O_2) 소비의 속도와 비교하여 산소(O_2) 소비의 증가된 속도; (iii) 미토콘드리아 농후화 이전 표적 세포에서의 시트레이트 합성효소의 함량 또는 활성 수준과 비교하여 시트레이트 합성효소의 증가된 함량 또는 활성 수준; (iv) 미토콘드리아 농후화 이전 표적 세포에서의 아데노신 트리포스페이트(ATP) 생산의 속도와 비교하여 아데노신 트리포스페이트(ATP) 생산의 증가된 속도; (v) 헤테로플라스미의 낮은 수준; 또는 (i), (ii), (iii) (iv) 및 (v)의 임의의 조합 중 적어도 하나를 갖는다.

[0164] 특정 실시형태에서, 분리된 외인성 미토콘드리아에서 미토콘드리아 단백질의 총량은 세포 단백질의 총량의 10%-80%, 20-70%, 40-70%, 20-40%, 또는 20-30% 사이이다. 각각의 가능성은 본 발명의 별도의 실시형태를 나타낸다. 특정 실시형태에서, 분리된 외인성 미토콘드리아에서 미토콘드리아 단백질의 총량은 샘플 내의 세포 단백질의 총량의 20%-80% 사이이다. 특정 실시형태에서, 분리된 외인성 미토콘드리아에서 미토콘드리아 단백질의 총량은 미토콘드리아 및 기타 아세포 분획의 조합된 중량의 20%-80% 사이이다. 다른 실시형태에서, 분리된 외인성 미토콘드리아에서 미토콘드리아 단백질의 총량은 미토콘드리아 및 다른 아세포 분획의 조합된 중량의 80% 초과이다.

[0165] 일부 실시형태에서, 그의 다양일 실시형태에서 상기 기재된 방법은 표적 세포를 확장시킬 수 있는 증식 배지에서 상기 줄기 세포를 배양함에 의해 표적 세포를 확장시키는 것을 추가로 포함한다. 다른 실시형태에서, 방법은 표적 세포를 확장시킬 수 있는 배양 또는 증식 배지에서 상기 세포를 배양함에 의해 미토콘드리아로-풍부한 표적 세포를 확장시키는 것을 추가로 포함한다. 본 출원 전반에 걸쳐 사용된 용어 "배양 또는 증식 배지"는 세포에 영양을 제공하는 세포 배양 배지, 세포 성장 배지, 완충액과 같은 유체 배지이다.

[0166] 특정 실시형태에서, 표적 세포는 장애를 앓고 있는 대상체에 대해 동종이계이다. 용어 "대상체에 대해 동종이계"는 환자의 세포에 HLA가 일치하거나 적어도 부분적으로 HLA가 일치하는 줄기 세포 또는 미토콘드리아를 지칭한다. 특정 실시형태에 따르면, 공여자는 특정 미토콘드리아 DNA 하플로그룹의 동정에 따라 대상체에 매칭된다. 특정 실시형태에서, 대상체는 줄기 세포 및/또는 미토콘드리아의 공급원이다.

[0167] 본 명세서에 사용된 용어 "HLA-일치"는, 적어도 대상체가 공여자의 표적 세포에 대한 급성 면역 반응을 전개하지 않는 정도까지, 대상체와 표적 세포의 공여자가 가능한 한 근접하게 HLA-일치화되는 요구를 지칭한다. 이러한 면역 반응의 예방 및/또는 치료는 면역-억제제의 급성 또는 만성 사용으로 또는 사용 없이 달성될 수 있다. 특정 실시형태에서, 공여자로부터의 줄기 세포는 환자가 줄기 세포를 거부하지 않는 정도로 환자에 대해 HLA-일치된다.

[0168] 특정 실시형태에서, 환자는 줄기 세포 이식편의 면역 거부 반응을 예방하기 위해 면역억제 요법에 의해 추가로 치료된다.

[0169] 본 명세서에 사용된 용어 "하플로그룹"은 모계에서 공통 조상을 공유하는 사람들의 유전적 모집단 그룹을 지칭

한다. 미토콘드리아 하플로그룹은 시퀀싱에 의해 결정된다.

- [0170] 특정 실시형태에서 미토콘드리아는 동일한 하플로그룹으로부터 유래한다. 다른 실시형태에서 미토콘드리아는 상이한 하플로그룹으로부터 유래한다.
- [0171] 특정 실시형태에서, 상기 기재된 방법은 약학적 조성물의 투여 이전에 대상체에게 이식-전 컨디셔닝제를 투여하는 선행 단계를 추가로 포함한다. 본 명세서에 사용된 용어 "이식-전 컨디셔닝제"는 인간 대상체의 골수 내 골수 세포를 사멸할 수 있는 임의의 제제를 지칭한다. 특정 실시형태에서, 이식-전 컨디셔닝제는 부설판이다.
- [0172] 특정 실시형태에 따르면, 단리된 미토콘드리아는 대상체의 장애에 따라 특정 미토콘드리아 하플로그룹으로부터 선택된 공여자로부터 단리된다.
- [0173] 림프구 결핍은 대상체가 비정상적으로 낮은 수준의 림프구를 갖는 상태이다. 대상체는 T 림프구감소증, B 림프구감소증 또는 NK 림프구감소증을 앓을 수 있다. 림프구 결핍은 코르티코스테로이드 사용; 바이러스, 미생물 및 곰팡이 감염; 영양실조; 과도한 신체 운동; 전신성 홍반성 루푸스; 류마티스 관절염; 유육종증 및 다발성 경화증과 연관이 있다.
- [0174] 림프구 결핍-관련된 질환 또는 장애는 대상체가 비정상적으로 낮은 수준의 림프구를 갖는 임의의 질환 또는 장애이다. 림프구 결핍-관련된 질환 또는 장애의 예는 바이러스, 미생물 및 곰팡이 감염; 전신성 홍반성 루푸스; 류마티스 관절염; 유육종증 및 다발성 경화증을 포함한다.
- [0175] 일 실시형태에서, 본 발명은 단리된 외인성 미토콘드리아를 HSC에 진입하도록 하는 조건 하에서 단리된 외인성 미토콘드리아와 조혈모세포(HSC)를 인큐베이션하고 대상체에게 (a)로부터의 HSC를 투여하는 것을 포함하는 대상체에서 림프구 결핍-관련된 질환 또는 질환들의 쇠약화 효과를 감소시키는 방법을 제공한다. 특정 양태에서, HSC는 자가 또는 동종이계 줄기 세포이다. 추가 양태에서, 외인성 미토콘드리아는 공여자로부터 단리된다. 추가 양태에서, 외인성 미토콘드리아는 적어도 하나의 동결-해동 주기를 거쳤다. 다양한 양태에서, HSC는 대상체에게 투여 이전에 세정된다.
- [0176] 골수 또는 조혈모세포 이식 이전에 대상체는 기저 질환을 제거하고 새로운 세포의 거부를 방지하기 위해 컨디셔닝 과정을 거칠 수 있다. 화학요법제의 투여 및/또는 전신 방사선조사를 포함한 컨디셔닝 요법.
- [0177] 본 명세서에서 사용된 용어 "컨디셔닝된 대상체"는 골수 또는 HSC 이식을 받을 예정이고 화학요법제의 투여 및/또는 전신 방사선조사를 포함하는 컨디셔닝 처리를 거친 대상체를 지칭한다.
- [0178] 본 명세서에서 사용된 용어 "비-컨디션 대상체"는 골수 또는 HSC 이식을 받을 예정이고 화학요법제의 투여 및/또는 전신 방사선조사를 포함하는 컨디셔닝 처리를 거치지 않은 대상체를 지칭한다.
- [0179] 추가 양태에서, 본 발명은 조혈모세포(HSC)를 단리된 외인성 미토콘드리아와 함께 외인성 미토콘드리아가 HSC에 진입하도록 하는 조건 하에 인큐베이션하는 것; 및 대상체에게 HSC를 투여하는 것을 포함하는 대상체에서 조혈모세포(HSC) 이식을 개선하는 방법을 제공한다. 특정 양태에서, HSC는 자가 또는 동종이계 줄기 세포이다. 추가 양태에서, 외인성 미토콘드리아는 공여자로부터 단리된다. 추가 양태에서, 외인성 미토콘드리아는 적어도 하나의 동결-해동 주기를 거쳤다. 다양한 양태에서, HSC는 대상체에게 투여 이전에 세정된다.
- [0180] 일 실시형태에서, 본 발명은 외인성 미토콘드리아가 세포에 진입하도록 하는 조건 하에 세포를 외인성 미토콘드리아와 접촉시킴에 의해 미토콘드리아로-풍부한 세포를 생산하는 것; 관심있는 유전자를 갖는 바이러스 벡터로 미토콘드리아로-풍부한 세포를 형질도입하는 것; 및 미토콘드리아로-풍부한 형질도입된 세포를 대상체에게 투여하는 것에 의해 질환 또는 장애를 치료하는 방법을 제공한다. 일 실시형태에서 본 발명은 관심있는 유전자를 갖는 바이러스 벡터로 세포를 형질도입하는 것; 외인성 미토콘드리아가 세포에 진입하도록 하는 조건 하에 형질도입된 세포를 외인성 미토콘드리아와 접촉시켜 미토콘드리아로-풍부한 세포를 생산하는 것; 및 미토콘드리아로-풍부한 형질도입 세포를 대상체에게 투여하는 것에 의해 질환 또는 장애를 치료하는 방법을 제공한다. 일 양태에서, 세포는 줄기 세포이다. 특정 양태에서, 세포는 조혈모세포(HSC) 또는 면역결핍 세포이다. 일부 양태에서, 바이러스 벡터는 아데노-연관된 바이러스(AAV) 벡터 또는 렌티바이러스 벡터이다. 추가 양태에서, 미토콘드리아로-풍부한 형질도입된 세포의 투여는 비-강화된 세포와 비교하여 B 세포의 수를 증가시킨다. 특정 양태에서, B 세포는 pre-B 또는 pro-B 세포이다. 추가 양태에서, 미토콘드리아로-풍부한 형질도입된 세포의 투여는 비-강화된 세포와 비교하여 IgM 양성 세포의 수를 증가시킨다. 일 실시형태에서, 미토콘드리아 농후화는 형질도입된 세포의 수를 증가시킨다.
- [0181] 유전자 요법 기술은 유전적으로 변형된 자가 조혈모세포(HSC)의 이식을 기반으로 한다. 유전자 요법은 유전자를

사용하여 질환을 치료하거나 예방한다. 유전자 요법의 가장 일반적인 형태는 비정상 유전자를 대체하기 위해 정상 유전자를 삽입하는 것을 포함한다. 다른 접근법은 비정상 유전자를 정상 유전자로 교환, 비정상 유전자 복구, 유전자가 커지거나 꺼지는 정도 변경을 포함한다. 줄기세포 유전자 요법은 상대적으로 적은 수의 줄기 세포의 유전적 변형을 기반으로 한다. 이들은 자가-재생을 거쳐 체내에서 장기간 지속되고 다수의 유전적으로 "교정된" 자손을 생성한다. HSC는 그의 유전자 변형은 그들이 분화할 때 모든 혈구 계통으로 계대되기 때문에 유전자 요법에 특히 매력적인 표적이다.

[0182] HSC 및 그 자손의 효율적인 장기 유전자 변형은 HSC 기능에 영향을 미치지 않으면서 교정 DNA를 계놈 안으로 안정적으로 통합할 수 있는 기술을 필요로 한다. 따라서, γ -레트로바이러스, 렌티바이러스 및 스푸마바이러스와 같은 통합 재조합 바이러스 시스템의 사용이 이 분야를 지배하고 있다(Chang, A.H. 등 (2007) Mol. Ther. 15: 445-456). 아데노신 디아미나제 중증 복합 면역결핍증(ADA-SCID; Aiuti, A. 등 (2009) N. Engl. J. Med. 360: 447-458), X-연관된 중증 복합 면역결핍증(SCID-X1; Hacein-Bey-Abina, S. 등 (2010) N. Engl. J. Med. 363: 355-364) 및 Wiskott-Aldrich 증후군(WAS; Boztug, K. 등 (2010) N. Engl. J. Med. 363: 1918-1927)에 대한 γ -레트로바이러스-기반 임상 시험에서 치료적 이점이 이미 달성되었다. 부가하여, 렌티바이러스는 X-연관된 부신백질이영양증(ALD; Cartier, N. 등 (2009) Science 326: 818-823) 및 이색성 백혈이영양증(MLD; Biffi, A. 등(2013) Science 341: 1233158) 및 WAS(Aiuti, A. 등(2013) Science 341: 1233151)의 치료에서 전달 비히클로 이용되었다.

[0183] 벡터는 발현 카세트 및/또는 이식유전자를 세포의 계놈 안으로 통합하는 벡터의 능력을 나타내는 통합 또는 비-통합 벡터일 수 있다. 통합 벡터 또는 비-통합 벡터를 사용하여 조절 요소에 작동가능하게 연결된 유전자를 함유하는 발현 카세트를 전달할 수 있다. 벡터의 예는 (a) 선형 올리고뉴클레오티드 및 원형 플라스미드를 포함하는 핵산 벡터와 같은 비-바이러스성 벡터; 인간 인공 염색체(HAC), 효모 인공 염색체(YAC) 및 박테리아 인공 염색체(BAC 또는 PAC)와 같은 인공 염색체; 에피솜 벡터; 트랜스포존(예를 들어, PiggyBac); 및 (b) 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터 및 AAV 벡터와 같은 바이러스 벡터를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 바이러스는 특정 표적 세포 또는 조직에 대한 높은 감염성 및/또는 항성을 포함하여 핵산의 전달에 대한 몇 가지 이점을 갖는다. 일부 경우에, 바이러스는 유전자에 작동가능하게 연결된, 본 명세서에 기재된 바와 같은 하나 이상의 조절 요소를 포함하는 발현 카세트 또는 핵산 분자를 전달하는 데 사용된다.

[0184] 발현 벡터는 관심있는 폴리뉴클레오티드의 전사를 제어하기 위한 조절 요소를 포함할 수 있다. 조절 요소의 비-제한적인 예는 프로모터, 폴리아데닐화 서열, 번역 제어 서열(예를 들어 내부 리보솜 진입 분절, IRES), 인핸서 또는 인트론을 포함한다. 이러한 요소는 전사, mRNA의 안정성, 번역 효율 등에 영향을 미침에 의해 발현을 증가시킬 수 있지만, 필요하지 않을 수 있다. 이러한 요소는 세포(들)에서 핵산의 최적 발현을 얻기 위해 원하는 대로 핵산 작제물에 포함될 수 있다. 벡터는 또한 다른 요소를 포함할 수 있다. 예를 들어, 벡터는 인코딩된 폴리펩티드가 특정 세포 위치(예를 들어, 단백질이 세포에 의해 분비되도록 하는 신호 분비 서열)로 지향되도록 신호 펩티드를 인코딩하는 핵산 또는 선택가능한 마커를 인코딩하는 핵산을 포함할 수 있다. 선택가능한 마커의 비-제한적 예는 푸로마이신, 아데노신 디아미나제(ADA), 아미노글리코사이드 포스포트랜스퍼라제(neo, G418, APH), 디하이드로폴레이트 환원효소(DHFR), 하이그로마이신-B-포스포트랜스퍼라제, 티미딘 키나제(TK) 및 크산틴-구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제(XGPRT)를 포함한다. 이러한 마커는 배양에서 안정한 형질전환체를 선택하는 데 유용하다. 조절 서열은 일반적으로 포유동물, 미생물, 바이러스 또는 곤충 유전자로부터 유래될 수 있다. 통상적으로 복제의 기점과 형질전환체의 인식을 용이하게 하는 선택 유전자에 의해 부여된, 숙주에서 복제하는 능력. 당업자는 이러한 벡터에 포함되는 적절한 조절 영역을 선택할 수 있다.

[0185] 벡터는 숙주 세포의 염색체 DNA 내로 통합될 수 있는, 계놈 통합 벡터, 또는 "통합 벡터"; 또는 에피솜 벡터, 예를 들어 염색체-외 복제가 가능한 핵산일 수 있다. 작동가능하게 연결된 유전자의 발현을 지시할 수 있는 벡터는 본 명세서에서 "발현 벡터"로 지칭된다. 바이러스 벡터는 아데노바이러스, 아데노-연관된 바이러스(AAV), 레트로바이러스, 렌티바이러스, 백시니아 바이러스, 홍역 바이러스, 헤르페스 바이러스 및 소 유두종 바이러스 벡터를 포함한다(바이러스 및 비-바이러스 벡터의 검토에 대해서는 Kay 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 12744-12746(1997)을 참고한다). 바이러스 벡터가 변형되어 바이러스의 고유 항성 및 병원성이 변경되거나 제거된다. 바이러스의 계놈은 또한 그의 감염성을 증가시키고 관심있는 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산의 패키징을 수용하도록 변형될 수 있다.

[0186] 용어 "AAV"는 아데노-연관된 바이러스의 약어이고, 바이러스 자체 또는 이의 유도체를 지칭하는 데 사용될 수 있다. 용어는 달리 요구된 경우를 제외하고 모든 혈청형, 하위유형 및 자연 발생 및 재조합 형태 둘 모두 포괄한다. 약어 "rAAV"는 재조합 AAV 벡터(또는 "rAAV 벡터")로도 지칭되는, 재조합 아데노-연관된 바이러스를 지칭

한다. 용어 "AAV"는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, rh10 및 이의 혼성, 조류 AAV, 소 AAV, 개 AAV, 말 AAV, 영장류 AAV, 비-영장류 AAV 및 양의 AAV를 포함한다.

[0187] 유전자 요법에서 "렌티바이러스 벡터"의 사용은 렌티바이러스를 사용하여 유기체에 유전자가 삽입, 변형 또는 결실될 수 있는 방법을 지칭한다. 렌티바이러스는 그 숙주 세포의 게놈 안으로 DNA를 삽입함에 의해 감염시키는 바이러스의 계열이다. 그러한 많은 바이러스는 유전자 요법에 바이러스를 사용하는 연구의 기초가 되었지만 렌티바이러스는 비-분열 세포를 감염시키는 그 능력이 독특하므로 더 넓은 범위의 잠재적 응용이 있다. 렌티바이러스는 내인성(ERV)이 되어, 그의 게놈을 숙주 생식계열 게놈 안으로 통합하여 이후 바이러스가 숙주의 후손에게 유전될 수 있다. 유전자 요법에 효과적이기 위해서는 숙주 세포 유전자의 삽입, 변형 및/또는 제거가 있어야 한다. 이를 위해 과학자들은 렌티바이러스의 감염의 작용기전을 사용하여 유전자 요법에 대한 원하는 결과를 달성한다. 유전자 요법에 사용될 수 있는 비-제한적인 예 또는 렌티바이러스는 소 면역결핍 바이러스, 염소 관절염 뇌염 바이러스, 말 감염성 빈혈 바이러스, 고양이 면역결핍 바이러스, 인간 면역결핍 바이러스 1, 인간 면역결핍 바이러스 2, 켈브라나병 바이러스, 퓨마 렌티바이러스, 원숭이 면역결핍 바이러스 또는 비스나-마에디 바이러스로부터 유래의 것들을 포함한다.

[0188] 레트로- 및 렌티바이러스-기반 벡터의 사용에 부가하여, 아데노바이러스 및 아데노-연관된 바이러스(AAV)와 같은 다른 바이러스로부터 유래된 벡터는 또한 조혈모세포 및 전구 세포의 변형을 위해 이용될 수 있다.

[0189] 당업자에게 공지된 바와 같이, 유전자 변형은 DNA에서 이중-가닥 파손(DSB)을 유도하기 위해 부위-특이적 엔도뉴클레아제를 이용함에 의해 표적화된 유전자 편집에 의해 달성될 수 있다(예를 들어, 아연 핑거 뉴클레아제(ZFN), 전사 활성화제 유사 이펙터 뉴클레아제(TALEN), 클러스터링된 규칙적으로 이격된 짧은 회문 반복체(CRISPR)).

[0190] 다른 실시형태에서, 유전자 요법은 유전자 발현을 향상시키기 위해 사용될 수 있다. 일부 실시형태에 따르면, 강화된 형질도입된 세포는 비강화된 형질도입된 세포와 비교하여 증가된 증식을 제공한다. 일부 실시형태에 따르면, 강화된 형질도입된 세포는 비강화된 형질도입된 세포와 비교하여 증가된 분화를 갖는다. 또 다른 양태에서, 미토콘드리아로 강화된 형질도입된 세포는 비-강화된 형질도입된 세포와 비교하여 증가된 유전자 발현을 갖는다. 일부 실시형태에 따르면, 강화된 형질도입된 세포는 비-강화된 형질도입된 세포와 비교하여 이식유전자를 발현하는 증가된 수의 세포를 갖는다.

[0191] 추가 실시형태에서, 본 발명은 외인성 미토콘드리아가 HSC에 진입하도록 하는 조건 하에 단리된 외인성 미토콘드리아와 조혈모세포(HSC)를 인큐베이션하는 것; 및 대상체에게 HSC를 투여하는 것을 포함하는 대상체에서 조혈모세포(HSC) 이식을 개선하는 방법을 제공한다. 일 양태에서, HSC는 유전적으로 변형된다. 추가 양태에서, 대상체는 원발성 면역 결핍증(예를 들어 Wiskott-Aldrich 증후군, 백혈구 부착 결핍증, X-연관 고 IgM 증후군, X-연관 림프증식성 질환, X-연관 무감마글로불린혈증, X-연관 중증 복합 면역 결핍증, 만성 육아종 질환), 혈액소병증(예를 들어 겸상 적혈구 질환, 베타-지중해빈혈), 저장 및 대사 장애(예를 들어 고셔병 및 기타 지질, 점액다당증(I-VII), X-연관 부신백질영양증, 이색성 백혈구 이영양증, 골석화증), 선천성 혈구감소증 및 줄기 세포 결함(예를 들어 판코니 빈혈, 슈바흐만-다이아몬드 증후군, 코스트만 증후군)으로부터 선택된 질환 또는 장애가 있다. 추가 양태에서, 리소좀 저장 장애는 고셔병 유형 I이다. 특정 양태에서, HSC는 자가 또는 동종이계 줄기 세포이다. 추가 양태에서, 외인성 미토콘드리아는 공여자로부터 단리된다. 추가 양태에서, 외인성 미토콘드리아는 적어도 하나의 동결-해동 주기를 거쳤다. 다양한 양태에서, HSC는 대상체에게 투여 이전에 세정된다.

[0192] 일 실시형태에서, 본 발명은 외인성 미토콘드리아가 HSC에 진입하도록 하는 조건 하에 외인성 미토콘드리아와 조혈모세포(HSC)를 인큐베이션하는 것; 및 대상체에게 HSC를 투여하는 것에 의해 대상체에서 면역결핍 또는 면역 관련된 질환을 치료하는 방법을 제공한다. 특정 양태에서, HSC는 자가 또는 동종이계 줄기 세포이다. 추가 양태에서, 외인성 미토콘드리아는 공여자로부터 단리된다. 추가 양태에서, 외인성 미토콘드리아는 적어도 하나의 동결-해동 주기를 거쳤다. 일 양태에서, HSC는 시험관내에서 확장된다. 추가 양태에서, HSC는 적어도 하나의 동결-해동 주기를 거쳤다. 추가 양태에서, HSC는 시험관내 확장 이전 또는 이후에 적어도 하나의 동결 해동 주기를 거쳤다. 특정 양태에서, HSC는 외인성 미토콘드리아와 인큐베이션 이전 또는 이후에 적어도 하나의 동결 해동 주기를 거쳤다. 추가 양태에서, 외인성 미토콘드리아가 표적 세포에 진입하도록 하는 조건은 10^6 세포당 약 0.088 - 176mU 시트르산 합성효소(CS) 활성의 비율로 외인성 미토콘드리아와 표적 세포를 인큐베이션하는 것을 포함할 수 있다.

[0193] 본 명세서에 사용된 용어 "치료" 및 "치료하는"은 1) 진단된 병리학적 병태 또는 장애의 증상을 치유, 감속, 경감 및/또는 진행을 정지시키는 치료적 처리 또는 조치, 및 2) 및 예방적/방지적 조치 둘 모두를 지칭한다. 치료

가 필요한 이들은 이미 특정 의학적 장애가 있는 개체뿐만 아니라 궁극적으로 장애를 얻을 수 있는 이들(예를 들어, 예방적 조치가 필요한 이들)을 포함할 수 있다.

[0194] 면역 관련된 질환은 면역계에 영향을 미치는 질환이다. 이러한 질환 및 장애에는 자가면역 질환 및 면역결핍 질환 및 장애가 포함된다. 자가면역 질환은 면역계가 정상적인 신체 조직을 공격하는 항체를 생성하게 하는 질환이다. 자가면역 질환의 예는 원형 탈모증, 강직성 척추염, 항인지질 증후군, 자가면역 애디슨병, 자가면역 용혈성 빈혈, 자가면역 간염, 베체트병, 수포성 천포창, 심근병증, 셀리악 스프루-피부염, 만성 피로성 면역 장애 증후군(CFIDS), 만성 염증성 탈수초 다발신경병증, 처그-스트라우스 증후군, 간질천포창, CREST 증후군, 한랭응집소병, 크론병, 원판형 루푸스, 필수 혼합 한랭글로불린혈증, 섬유근육통-섬유근육염, 그레이브스병, 길랑-바, 하시모토 갑상선염, 갑상선기능저하증, 특발성 폐섬유증, 특발성 혈소판감소증 자반병(ITP), IgA 신병증, 인슐린 의존성 당뇨병, 소아 관절염, 편평 태선, 루푸스, 메니에르병, 혼합 결합 조직 질환, 다발성 경화증, 중증 근무력증, 심상 천포창, 악성 빈혈, 결절성 다발동맥염, 다발연골염, 다선 증후군, 류마티스성 다발성 근육통, 다발성 근염 및 피부근염, 원발성 무감마글로불린혈증, 원발성 담즙성 간경변증, 건선, 레이노 증후군, 라이터 증후군, 류마티스열, 류마티스 관절염, 유육종증, 경피증, 쇼그렌 증후군, 강직인간 증후군, 다카야수 동맥염, 측두 동맥염/거대 세포 동맥염, 궤양성 대장염, 포도막염, 혈관염, 백반증, 베게너 육아종증 및 중증 근무력증을 포함한다.

[0195] 면역결핍 질환 및 장애는 침입하거나 공격하는 외부 또는 비정상 세포(예를 들어 박테리아, 바이러스, 곰팡이 및 암세포)에 대해 신체를 방어하는 면역계의 능력을 손상시킨다. 결과적으로 비정상적인 박테리아, 바이러스 또는 곰팡이 감염이나 림프종 또는 기타 암이 발생할 수 있다. 2가지 유형의 면역결핍 장애 원발성 및 이차가 있다. 원발성 면역결핍 장애는 일반적으로 태어날 때 존재하고 일반적으로 유전성인 유전적 장애이다. 그들은 전형적으로 유아기 또는 어린 시절에 분명해진다. 그러나, 일부 원발성 면역결핍 장애(예컨대 공통 가변 면역결핍증)는 성인이 될 때까지 인식되지 않는다. 일반적인 원발성 면역결핍 장애의 예는 Wiscott-Aldrich 증후군, 중증 복합 면역결핍 질환(SCID), 디조지 증후군, 혈관확장성 운동실조증, 만성 육아종 질환, 영아의 일과성 저감마글로불린혈증, 무감마글로불린혈증, 보체 결핍 및 선택적 IgA 결핍을 포함한다.

[0196] 이차 면역결핍 장애는 일반적으로 노년기에 발병하고 종종 특정 약물의 사용 또는 당뇨병 또는 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 감염과 같은 다른 장애로 인해 발생한다. 그것은 원발성 면역결핍 질환보다 더 흔하다. 흔한 이차 면역결핍 장애의 예는 HIV, 백혈병, 림프종 및 다발성 골수종을 포함한다.

[0197] 다음 실시예는 발명의 보다 완전한 이해를 제공하기 위해 제공된다. 발명의 원리를 예시하기 위해 제시된 특정 기술, 조건, 재료, 비율 및 보고된 데이터는 예시적이고 발명의 범주를 제한하는 것으로 해석되지 않아야 한다.

[0198] **실시예**

[0199] **실시예 1**

[0200] **마우스 모델 안으로 풍부화된 줄기 세포의 이식**

[0201] 미토콘드리아는 건강한 인간 공여자의 혈액으로부터 분리하였다. 미토콘드리아는 -80℃에서 동결되었다. CD34+ 세포는 피어슨 증후군이 있는 대상체의 냉동 및 해동된 체대혈 세포(UBC)부터 분리하였다. 대상체는 mtDNA에서 8,470-13,447 위치에서 4,977개 뉴클레오타이드의 결실을 갖는 것으로 진단되었다. 미토콘드리아는 해동된 다음 대상체 CD34+ 세포는 1×10^6 세포당 0.88mU의 인간 미토콘드리아와 함께 22시간 동안 인큐베이션되었다. 이어서, 배지를 제거하고 세포를 세정하고 4.5% HSA에 재현탁하였다. 서열 분석을 사용하여, 세포에서 인간 미토콘드리아의 존재를 동정함에 의해 강화가 확인되었다. 강화된 세포는 그 다음 3주령 NSGS 마우스에 I.V. 주사하였다 (마우스당 50K 세포).

[0202] 3개의 마우스 그룹이 테스트되었다: MAT 그룹: 인간 강화된 CD34+ 세포, 50K 세포/150u1로 이식된 NSGS 마우스. 대조군: 인간 CD34+ 세포, 50K 세포/150u1로 이식된 NSGS 마우스. 나이트 그룹: 나이트 마우스.

[0203] [표 1]

그룹	마우스의 수
MAT: UBC+ MITO 강화	6
대조군: UBC	7
나이프	1

[0204]

[0205] 이식 후 2개월:

[0206] MAT 그룹의 마우스 3마리 및 대조군의 마우스 3마리를 희생시켰다. 말초혈액(PB)을 채취하고, 대퇴골 및 경골에서 골수(BM) 세포를 분리하였다. 인간 내인성 및 외인성 미토콘드리아 DNA(mtDNA)의 카피 수를 결정하기 위해, DNA를 BM 및 PB로부터 분리하고 dPCR을 사용하여 분석하였다.

[0207] CD34+ 세포의 조혈 세포의 하위모집단으로의 분화를 결정하기 위해, 말초 혈액 및 BM 샘플을 유세포 분석에서 분석하였다. 먼저, CD45 항원이 말초 혈액에서의 림프구, 단핵구, 과립구, 호산구 및 호염기구를 포함한 모든 인간 백혈구에 존재하기 때문에 인간 CD45+ 세포의 %를 결정했다. 후속적으로, CD45+ 세포는 CD45+CD33+(골수성 계통), CD45+CD3+(T 세포), CD45+CD19+(B 세포), CD45+CD14+(단핵구)의 하위모집단으로 추가로 분할되었다.

[0208] 더욱이, 유세포 분석을 이용하여 mCD45 세포 대 hCD45 세포의 %를 결정하였다.

[0209] 결과 BM: 치료 2개월 후 MAT 그룹과 대조군 사이의 BM에 대한 결과가 도 1에 도시되어 있다.

[0210] [표 2]

샘플	CD45+ 계수	CD45+			
		% hCD3	% hCD14	% hCD19	% hCD33
Nsgs calib 00014769 BM MITO 2	49.05	0.15	9.58	4.97	52.9
Nsgs calib 00014769 BM MITO 3	5.12	0.58	47.8	6.57	93.9
Nsgs calib 00014769 BM MITO 1	11.8	1.31	36	6.86	79.1
Nsgs calib 00014769 BM UCB 1	6.91	0.2	25.8	6.55	69.7
Nsgs calib 00014769 BM UCB 2	24.6	0.45	14.5	7.81	62.3
Nsgs calib 00014769 BM UCB 3	7.44	0.63	44.3	6.01	96.1
Nsgs calib 00014769 UNST BM 3	0.071				

[0211]

[0212] 결과 PB: PB dPCR: 대조군과 MAT 그룹 사이의 PB에서 인간 미토콘드리아 카피 수, 인간 세포 수 및 mtDNA 카피에 대한 결과는 도 2에 도시되어 있다. 세포당 총(외인성+내인성) mtDNA 카피에서 유의한 증가가 말초 혈액에서 관찰되었다.

[0213] 이식 후 6개월:

[0214] 각 그룹의 마우스와 나이브 마우스를 희생시켰다. 내인성 및 외인성 인간 mtDNA의 수준을 측정하기 위해, BM 및 말초 혈액에서 DNA를 분리하고 디지털 PCR(dPCR)을 사용하여 분석했다.

[0215] 결과 BM: BM dPCR은 대조군(비-강화된 인간 세포를 포함하는 마우스), MAT 그룹(미토콘드리아-강화된 인간 세포로 이식된 마우스), NTC("주형 없음"), 나이브(naïve) 그룹(치료 없음)에 대해 ng DNA당 외인성 미토콘드리아 카피 수를 나타내었다. 사용된 SNP 검정은 내인성 및 외인성 인간 mtDNA의 두 대립유전자(mtDNA의 위치 10831에 있는 G/A) 간을 구별하는 단일 뉴클레오타이드 변이를 기반으로 하기 때문에, 특정 대립유전자에 대한 선택성이 완벽하지 않고 따라서 위양성 결과는 또한 대조군에서 분명하였다. 그럼에도 불구하고, MAT 마우스로부터 유래된 BM 세포는 MAT 세포의 생착이 증가하고 가능하기로는 세포 증식이 증가함을 나타내는 ng DNA당 유의하게 더 많은 외인성 미토콘드리아 카피 수를 가졌다. (도 3, 오른쪽 막대 그래프).

[0216] BM 유세포 분석 결과: 이식 6개월 후 MAT 마우스로부터 유래된 BM 세포는 대조군 마우스로부터 유래된 BM 세포와 비교하여 유의하게 더 높은 수준의 CD45+ 인간 세포를 포함하였다. MAT 마우스에서 CD45+ 세포의 증가는 생

착 증가, 개선된 귀소, 세포 증식 증가, 세포 생존력 증가 또는 세포 자멸사 감소를 나타낸다. 인간 CD45+ 세포를 하위모집단으로의 그 분화에 대해 추가로 분석하였다. CD45+ 세포 하위모집단은 CD3+(T-세포), CD14+(대식세포), CD19+(B 세포), CD33+ 세포(골수성 세포)를 포함했다.

MAT 마우스는 대조군과 비교하여 상이한 패턴의 세포 분화를 가졌다. MAT 마우스는 CD3+ 세포(T-세포)의 더 높은 %와 CD33+ 세포의 더 낮은 %를 갖고 대조군 마우스는 유세포 분석에서 볼 수 있는 바와 같이 CD33+ 세포의 더 높은 %와 CD3+ 세포의 더 낮은 %를 가졌다. MAT 마우스는 또한 대조군 마우스에 비해 CD19+ 세포의 더 높은 %를 가졌다. 이들 결과는 골수성 세포에서 림프성 세포로의 전이를 나타낸다(도 4 및 표 3).

[표 3]

	CD45+	CD45+		
		% hCD33	% hCD3	% hCD19
UCB MAT4	7.92	44.9	16.3	0.15
UCB MAT5	8.49	13.1	58.7	0.34
UCB MAT6	7.07	28.1	10.4	0.17
UCB4	5.66	50.2	1.51	0.095
UCB5	6.01	49.3	0.52	5.55E-03
UCB6	5	67.3	4.38	0.096
UCB7	1.14	56.3	17.5	0.29

실시예 2

대상체에서 림프구 결핍 치료/림프구 모집단 증가

림프구 결핍-관련된 질환 또는 질환들을 앓고 있는 대상체에서 림프구 결핍의 쇠약 효과를 감소시키는 방법의 단계는: (1) 자가 또는 동종이계 조혈모세포를 수득하는 단계; (2) 공여자의 세포에서 미토콘드리아를 분리하는 단계이다. 외인성 미토콘드리아의 분리는 이 과정, -80℃(최소한)에서 동결하고 사용 이전에 해동된 미토콘드리아를 저장하는 것; (3) 분리된 외인성 미토콘드리아와 HSC의 인큐베이션; (4) 골수 세포를 세정하는 것; 및 (5) 대상체에게 미토콘드리아가 풍부한 HSC의 주입 이전에 수행될 수 있다. 전체 기간 동안, 환자의 혈구 계수 및 생화학적 혈액 마커에서의 변화를 평가한다.

실시예 3

골수 이식을 개선하기 위한 미토콘드리아 강화 요법

조건부 또는 비-조건부 환자에서 생착 및 이에 따른 세포 이식을 개선하기 위해, 세포는 환자에게 이식 이전에 미토콘드리아 강화를 겪는다. 이를 필요로 하는 대상체에서 조혈모세포 이식을 개선하는 방법은 (1) 대상체 또는 공여자로부터 조혈모세포(HSC)를 수득하는 것; (2) 공여자의 세포로부터 미토콘드리아를 분리하는 것(미토콘드리아의 분리는 이 과정인, -80℃(최소한)에서 동결하고 사용 이전에 해동된 미토콘드리아를 저장하는 것 이전에 수행될 수 있음); (3) 분리된 외인성 미토콘드리아와 HSC를 인큐베이션하는 것; (4) 골수 세포를 세정하는 것; 및 (5) 대상체에 미토콘드리아가 풍부한 HSC를 투여하는 것을 포함한다. HSC는 자가 또는 동종이계 조혈모세포일 수 있다.

실시예 4

유전자 요법을 개선하기 위한 미토콘드리아 강화 요법

HSC 및 그의 자손의 효율적인 장기 유전자 변형은 HSC 기능에 영향을 미치지 않으면서 게놈 안으로 교정 DNA의 안정적인 통합을 허용하는 기술을 필요로 한다. 따라서, γ-레트로바이러스, 렌티바이러스 및 스푸마바이러스와 같은 통합 재조합 바이러스 시스템의 사용이 이 분야를 지배하고 있다(Chang, A.H. 등 (2007) Mol. Ther. 15: 445-456). 아데노신 디아미나제 중증 복합 면역결핍증(ADA-SCID; Aiuti, A. 등 (2009) N. Engl. J. Med. 360: 447-458), X-연관된 중증 복합 면역결핍증(SCID-X1; Hacein-Bey-Abina, S. 등 (2010) N. Engl. J. Med. 363: 355-364) 및 Wiskott-Aldrich 증후군(WAS; Boztug, K. 등 (2010) N. Engl. J. Med. 363: 1918-1927)에 대한 γ-레트로바이러스-기반 임상 시험에서 치료적 이점이 이미 달성되었다. 부가하여, 렌티바이러스는 X-연관된 부신백질이영양증(ALD; Cartier, N. 등 (2009) Science 326: 818-823) 및 이색성 백혈이영양증(MLD; Biffi, A.

등(2013) Science 341: 1233158) 및 WAS(Aiuti, A. 등(2013) Science 341: 1233151)의 치료에서 전달 비히클로 이용되었다.

[0229] 클러스터링된 규칙적으로 이격된 짧은 회문 반복체/CRISPR-연관된(CRISPR/Cas) 시스템, CRISPR/Cas 시스템은 표적화된 DNA 서열에 상보적인 스페이서 서열을 함유하는 단일 가이드 RNA(sgRNA)가 DNA 엔도뉴클레아제 효소(예컨대 예를 들어 Cas9 효소)를 게놈 표적으로 가이드하는 신속한 게놈 엔지니어링을 위한 강력한 도구이다. 결합 시 Cas9는 이중-가닥 DNA 파손을 생성한다. DNA 복구 작용기전, 비-상동성 말단 연결(NHEJ) 또는 상동성 재조합(HR)을 이용하여 유전자 삽입 및 결실을 도입할 수 있다. CRISPR/Cas9는 대장균, *S. 세레비시애* 및 포유동물 세포와 같은 다양한 종에서 구현되었다. DNA 엔도뉴클레아제 효소의 다른 예는 Cas1, Cas1B, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8, Cas9 (Csn1 및 Csx12로도 알려짐), Cas10, Csy1, Csy2, Csy3, Cse1, Cse2, Csc1, Csc2, Csa5, Csn2, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csm6, Cmr1, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csb1, Csb2, Csb3, Csx17, Csx14, Csx10, Csx16, CsaX, Csx3, Csx1, Csx15, Csf1, Csf2, Csf3 및 Csf4를 포함한다.

[0230] CRISPR 시스템의 요소(예를 들어, 직접 반복부, 상동성 재조합 편집 주형, 가이드 서열, tracrRNA 서열, 표적 서열, 프라이밍 부위, 조절 요소, 및 RNA-가이드된 DNA 엔도뉴클레아제)는 당업자에게 잘 알려져 있다. 즉, 표적 서열이 주어지면, 당업자는 특정 표적 서열에 특이적인 기능적 CRISPR 요소를 설계할 수 있다. 본 명세서에 기술된 방법은 특정 CRISPR 요소의 사용으로 제한되지 않는다.

[0231] 레트로- 및 렌티바이러스-기반 벡터의 사용에 부가하여, 아데노바이러스 및 아데노-연관된 바이러스(AAV)와 같은 다른 바이러스로부터 유래된 벡터는 또한 조혈모세포 및 전구 세포의 변형을 위해 이용될 수 있다.

[0232] 유전자 요법(예를 들어, 고서병 유형 I 원발성 면역 결핍과 같은 리소좀 축적 장애)에 사용하고자 하는 세포의 생착을 증강시키기 위해, 세포는 단리된 외인성 미토콘드리아로의 강화를 겪는다. 세포는 유전자 요법을 위해 HSC를 유전적으로 변형하기 이전, 도중 또는 후에 강화를 겪을 수 있다. 대상체에서 세포의 생착을 증강시키는 방법은 (1) 대상체 또는 공여자로부터 조혈모세포(HSC)를 수득하는 것; (2) 공여자의 세포로부터 미토콘드리아를 단리하는 것(미토콘드리아의 단리는 이 과정인, -80°C(최소한)에서 동결하고 사용 이전에 해동된 미토콘드리아를 저장하는 것 이전에 수행될 수 있음); (3) 단리된 외인성 미토콘드리아와 HSC를 인큐베이션하는 것; (4) 골수 세포를 세정하는 것; 및 (5) 대상체에 미토콘드리아가 풍부한 HSC를 투여하는 것을 포함한다. HSC는 자가 또는 동종이계 조혈모세포일 수 있다.

[0233] 실시예 5

[0234] 미토콘드리아 강화 후 미토콘드리아 기능장애 마우스 모델에서 외인성 미토콘드리아의 지속적인 전달

[0235] 생체분포 및 강화된 HSPC 또는 그의 자손이 질환에 걸린 동물 모델에서 생체내 다른 세포로 미토콘드리아를 전달할 수 있는지 여부를 평가하기 위해, 유전적으로 표지된 세포를 미토콘드리아 기능장애의 마우스 모델(PoIG 마우스) 안으로 주입하였다.

[0236] 미토콘드리아로 강화된 골수 세포, 또는 이들이 담지하는 미토콘드리아가 정맥내 주입 후 귀소하는 위치 추적에 도움이 되는 새로운 퓨어라인 생체내 시스템을 사용하였다. 모든 세포 핵이 적색 형광(dTomato)으로 표지되고 모든 미토콘드리아가 녹색 형광(단백질 Cox8-Dendra)으로 표지되어, 여기서 '적색-녹색' 세포로 지칭된 ROSA^{nT-nG}/PhAM^{excised} 마우스 마우스 모델을 사용하였다. 증강은 ROSA^{nT-nG}/PhAM^{excised} 마우스에서 단리된 '녹색' 미토콘드리아로 수행되었다.

[0237] HSPC 및 외인성 미토콘드리아의 분포 또는 지속성이 유기체 스트레스에 의해 영향을 받을 수 있으므로, PolgD²⁵⁷A 돌연변이가 미토콘드리아 DNA 중합효소의 교정 기능을 손상시켜 mtDNA 돌연변이 및 결실의 축적을 초래하는 Polg 마우스 모델을 사용하였다. Polg 마우스 모델은 미토콘드리아로 강화된 세포 및 그 미토콘드리아의 생체내 생체 분포를 평가하기 위해 강화된 적색-녹색 HSPC로 처리되었다.

[0238] ROSA^{nT-nG}/PhAM^{excised} 마우스로부터 유래된 적색-표지된 핵(dTomato) 및 녹색-표지된 미토콘드리아(텐드라)를 편재적으로 발현하는 계통 음성 세포(Lin⁻)를 ROSA^{nT-nG}/PhAM^{excised} 마우스의 간 세포로부터 단리된 텐드라 미토콘드리아로 강화시켰고 25-28주령(수컷) 및 30-35주령(암컷)에 투여된 Polg 마우스에 주입하였다.

[0239] [표 4]

	COX-1 수준의 정규화된 배수	# 세포 주입된/마우스
Lin- 암컷	1.9	197 K
Lin- 수컷	1.5	242 K

[0240]

[0241] 강화 수준은 MAT 후 세포에서 mt-DNA-인코딩된 시토크롬 c 산화효소 1(COX-1)의 단백질 수준으로 측정되었다. COX-1 값은 비-처리된 세포 및 야누스 그린에 의해 평가된 세포 수로 정규화되었다.

[0242] 수용체 PolG 마우스에서 3가지 세포 유형이 잠재적으로 식별가능하다: 1) 주입된 세포 또는 그 자손에서 유래하는 적색-녹색 세포, 2) PolG 수용체에서 유래하는, 비-형광 세포, 및 3) 수용체 PolG 세포로의 미토콘드리아 전달의 증거를 제공하는, 녹색-단독 세포.

[0243] 주사-후 12시간, 1주 및 4.5개월에서, 혈액을 채취하고 BM을 추출하고 PB 및 BM 둘 모두를 유세포 분석 및 공초점 현미경에 의해 분석하였다.

[0244] 주입된 HSPC로부터 말초 혈액에서의 내인성 세포로의 외인성 미토콘드리아의 장기간 지속성 및 지속적인 전달이 입증되었다. 도 5a-b는 PB 내의 CD45⁺ 세포 서브세트의 빈도를 입증한다. dTomato⁺Dendra⁺의 비율은 주입-후 12시간에 0.0015%에서 4.5m에 0.37%로 시간 경과에 따라 증가했다. 유사하게, 미토콘드리아 전달이 일어난 dTomato⁻Dendra⁺ 세포의 비율은 0.0015%에서 7.3%로 증가했다. 미토콘드리아 Cox8-Dendra2 단백질은 ROSA^{NT-NG}/PhAM^{excised} 핵 게놈에 의해서만 인코딩되고 따라서 Polg 수용체 세포로 계대가 일단 전달되면 말초혈액에 dTomato⁻Dendra⁺ 세포의 지속적인 존재가 주입된 세포 또는 그의 자손에서 유래한 외인성 미토콘드리아의 지속적인 전달의 증거이다.

[0245] 수용체 세포로 전달된 외인성 미토콘드리아의 상대적 수준을 결정하기 위해, 말초 혈구를 MitoTracker Deep-red로 염색하였다. 미토콘드리아를 수용한 세포(녹색 세포)에서 총 미토콘드리아에 대한 외인성 대 적색-녹색 세포 간의 비율의 배수 변화를 측정하였다.

[0246] 외인성 미토콘드리아는 총 세포 미토콘드리아 함량의 1개월 시점에서 8.4%, 4.5개월 시점에서 6.1%인 것이 입증되었다. (도 6).

[0247] 녹색 미토콘드리아를 함유하는 세포는 또한 MAT 후 4.5개월에 마우스 신장에서 발견되었다.

[0248] 녹색 미토콘드리아가 수용체 PolG 세포에 존재함에 따라, 이 데이터는 외인성 미토콘드리아의 지속성 및 지속적인 전달이 있음을 시사한다. 중요하기로는 그것이 Cox8-Dendra 단백질의 반감기에 의해 제한되기 때문에 이것은 외인성 미토콘드리아 함량에 대한 하한이다.

[0249] 실시예 6

[0250] 미토콘드리아는 다양한 조혈 세포 유형으로 전달된다

[0251] 유세포 분석을 사용하여 조혈 세포 유형을 테스트하여 어떤 세포 유형이 세포내 미토콘드리아 전달의 수용체인지를 결정하였다. PB에서 주요 면역 세포 서브세트의 분포는 1m 및 4.5m 시점에서 총 CD45⁺ 및 CD45⁺dTomato-Dendra⁺ 모집단 둘 모두에서 평가되었다(도 7).

[0252] 4.5m 시점에서, 외인성 미토콘드리아를 흡수하는 골수성 모집단이 추가로 특성화되었고, 단핵구(Ly6C^{high}Ly6G⁻) 및 호중구(Ly6C⁺Ly6G⁺) 둘 모두가 미토콘드리아를 흡수함을 입증하였다(도 8).

[0253] 골수성 세포 모집단은 외인성 미토콘드리아를 우선적으로 흡수했지만, 수많은 세포 유형(T 세포 및 B 세포 포함)이 모두 미토콘드리아를 흡수하는 것으로 입증되었다.

[0254] 데이터는 주입된 HSPC로부터 유래하는 외인성 미토콘드리아가 말초 혈액에 존재하는 다양한 조혈 세포 유형으로 지속적으로 전달된다는 것을 입증한다. 더욱이, 원위 조직에 외인성 미토콘드리아를 담지하는 세포의 증거는 외

인성 미토콘드리아가 면역 세포뿐만 아니라 비-조혈 조직에서도 지속된다는 것을 시사한다.

[0255] 요약하면, 주입된 HSPC로부터의 미토콘드리아가 MAT 처리 후 적어도 4.5개월에 걸쳐 말초 혈액 및 원위 조직에서 추가 조혈 세포로 전달될 수 있음이 입증되었다.

[0256] 실시예 7

[0257] 미토콘드리아 강화에 이은 세포 기능의 평가

[0258] PolG 마우스의 말초 혈액에서 $CD11b^+$ 골수 세포가 $dTomato^+Dendra^+$ 세포로부터 외인성 미토콘드리아를 흡수하는 것이 관찰되었다. 따라서, 외인성 미토콘드리아를 포함하는 $CD11b^+$ 골수 세포의 활성 수준이 추가로 평가된다.

[0259] $dTomato^+Dendra^+$ 계통 음성 세포를 실온에서 21시간 동안 $ROSA^{nT-nG}/PhAM^{excised}$ 마우스의 간으로부터 분리된 $Dendra2^+$ 미토콘드리아로 강화시키고 PolG 마우스에 IV 주사하였다.

[0260] 말초 혈액(PB)을 처리 후 1주, 1개월, 3개월 및 4.5개월에서 미처리된 PolG 마우스 및 처리된 마우스로부터 추출한다. 추출된 PB는 FACS에 의해 골수성 세포에 대해 분류된다. 미처리된 또는 비히클 대조군 처리된 마우스로부터 추출된 골수성 세포를 하기 검정에서 대조군으로 사용한다.

[0261] 처리 및 대조군 마우스의 골수성 세포의 활성에서 차이를 평가하기 위해, RNAseq를 세포에 대해 수행하여 골수성 세포 전사체 변화를 평가하였다. 유사하게, RNAseq를 세포 표면 마커 또는 단일 세포 RNAseq에 의해 분류된 특정 골수성 세포 하위모집단(호중구, 호산구, 단핵구 등)에 대해 수행하였다. 부가하여, 골수성 세포 또는 골수성 세포 하위모집단 활성 수준은 사이토카인 발현, ATP 수준을 포함한 대사 및 미토콘드리아 활성, CS 활성, 미토콘드리아 막 전위, 또는 세포-특이적 기능 활성 평가 예컨대 단핵구에서 대식세포로 분화, 식균작용 검정, 유도제에 대한 반응 및 NETosis 검정을 포함하지만 이에 제한되지 않는 세포-기반 검정에서 평가된다.

[0262] 골수성 세포 하위모집단에 대한 강화의 효과는 나이브 및 미토콘드리아로 강화된 뮤어라인 또는 인간 PBMC로부터 분리된 골수성 세포를 사용하여 상기 기재된 검정으로 추가로 평가될 수 있다.

[0263] 미토콘드리아를 수취한 골수성 전구 세포는 증식, 분화 및/또는 활성이 증가하여 총 혈액 골수성 세포 및 골수성 하위모집단의 증가된 출현을 초래하는 것으로 예상된다. 부가적으로, 혈액 골수성 세포는 미토콘드리아 강화 후 미토콘드리아 흡수에 의해 프라이밍되어 보다 강력한 기능(예를 들어 병원체 또는 대식세포 식균작용에 반응한 호중구 NETosis)을 초래할 것이다.

[0264] 실시예 8

[0265] 면역 결핍 세포에 대한 강화 및 유전자 요법의 효과

[0266] B 세포 발달 진행은 B 세포 항원 수용체(BCR)의 조립, 발현 및 시그널링을 유도하는 순차적 사건에 의해 가이드된다. 중쇄(H) 및 경쇄(L) 면역글로불린 유전자는 pro-B 및 pre-B 단계(각각)에서 재배열되고 완전한 표면 IgM은 미성숙 단계에서 발현된다. 추가 발달 진행 및 성숙은 나이브 B 세포의 면역-유능한 수집을 제공한다. 브루톤 티로신 키나제(BTK) 유전자는 B-세포 항원 수용체(BCR) 시그널링 경로의 중요한 구성요소이고 B 세포의 발달, 생존 및 활성화에 중요한 역할을 한다. BTK는 대식세포 및 호중구를 포함하는 골수 계통의 세포에서도 발현되기 때문에 BTK의 발현은 B 세포에 제한되지 않는다. X-연관된 결핍(Xid) 마우스는 BTK 유전자에 자발적인 돌연변이를 담지한다. B 세포 발달이 손상된 Xid 마우스는 인간 X-연관된 면역결핍 장애의 모델로 사용된다. 예를 들어, X-연관된 무감마글로불린혈증(XLA), 브루톤 티로신 키나제(BTK) 유전자에서 돌연변이로 인한 유전 질환. 이들 돌연변이는 B-림프구 성숙의 실패, 낮은 혈청 면역글로불린 수준 및 특정 항체 생산의 실패뿐만 아니라 다른 면역 신호의 교대를 초래한다.

[0267] 이들 실험은 면역 결핍 세포 및 유전자 요법에 대한 강화의 효과를 결정한다. 이것은 BTK 유전자로 증강되고 형질도입된 면역결핍 세포의 B-세포 발달을 테스트함에 의해 수행되었다.

[0268] Lin⁻ 세포를 Xid 마우스의 골수로부터 분리하였다. 세포를 C57BL/6J 마우스 태반(1×10^6 세포당 4.4mU CS 활성)에서 유래한 미토콘드리아와 함께 또는 없이 21시간 동안 인큐베이션했다. 인큐베이션 후, 강화된 및 비-강화된 세포인, 동일한 수의 세포를 비-형질도입하거나 NTX109 또는 NTX101 렌티바이러스 작제물로 형질도입하였다. 각각의 작제물은 BTK 프로모터-BTK 이식유전자-A2-GFP(녹색 형광 단백질)를 포함하는 카세트를 포함하였다. 표 5는 테스트된 그룹을 나타낸다.

[0269] [표 5]

세포	MAT	렌티벡터	그룹 명칭
WT (CBA/Ca)	-	-	WT
Xid Lin ⁻	-	-	비-강화된 비-형질도입된 Lin ⁻
	-	NTX101	비-강화된 NTX101
	-	NTX109	비-강화된 NTX109
	+	-	강화된 비-형질도입된 Lin ⁻
	+	NTX101	강화된 NTX101
	+	NTX109	강화된 NTX109

[0270]

[0271]

형질도입 22시간 후, 세포를 세정하고 회수를 위해 도말하였다. 2일차부터 13일차까지는 IL 7의 존재에서 세포를 성장시키는 것과 같이 B 세포 증식 및 분화를 유도하는 조건 하에서 세포를 성장시켰다. 13일차에 세포를 LPS/CpG로 유도하여, 세포를 B220 및 IgM을 발현하는 세포로 분화하도록 하는, B-세포 성숙을 거쳤다. 13일차 및 17일차에, 절대 세포 수 및 B-세포 하위모집단을 결정하기 위해 유세포 분석을 사용하여 세포를 분석하였다. 실험 계획은 도 9에 나타나 있다.

[0272]

13일차에, 각각 비-강화된 NTX101 및 비-강화된 NTX109 세포와 비교하여 강화된 NTX101 세포 및 강화된 NTX109 세포 각각에서 절대 세포 수에서의 11.4-배수 및 5-배수 증가가 관찰되었다. 부가적으로, 강화된 NTX109 세포의 세포 수는 WT 세포 수에 해당하였다(도 10). 비-강화된 비-형질도입된 Lin⁻ 세포와 비교하여 강화된 비-형질도입된 Lin⁻ 세포에서 절대 세포 수에서의 6.9-배수 증가가 관찰되었다(도 10).

[0273]

이후의 HSPC 모집단은 13일차에 결정되었다(도 11a-b). 강화된 비-형질도입된 Lin⁻ 세포는 비-강화된 비-형질도입된 Lin⁻ 세포에 비해 HSPC 모집단 백분율에서 47% 감소를 가졌다. 비-강화된 NTX101 세포는 비-강화된 비-형질도입된 Lin⁻ 세포와 비교하여 HSPC 모집단 백분율에서 11% 감소를 나타냈다. 반면 강화된 NTX101 세포는 비-강화된 비-형질도입된 Lin⁻ 세포와 비교하여 HSPC 모집단 백분율에서 31% 감소를 나타냈다. 더욱이, 강화된 NTX101 세포는 비-강화된 NTX101 세포와 비교하여 HSPC 모집단 백분율에서 22% 감소를 나타냈다. 비-강화된 NTX109 세포는 비-강화된 비-형질도입된 Lin⁻ 세포와 비교하여 HSPC 모집단 백분율에서 22% 감소를 나타냈다. 반면, HSPC 모집단 백분율에서 37% 감소는 비-강화된 비-형질도입된 Lin⁻모집단과 비교하여 강화된 NTX109 모집단에서 관찰되었다. 부가적으로, 비-강화된 NTX109 세포와 비교하여 강화된 NTX109 세포에서 HSPC 모집단 백분율에서 19% 감소가 관찰되었다. 부가적으로, 표 5에 기재된 강화된 그룹은 그 각각의 비 강화된 그룹에 비해 훨씬 더 많은 HSPC를 포함했다(도 11b).

[0274]

B 세포 모집단(pre-B 및 pro-B 세포)은 강화 13일 후에 결정되었다. 강화 후 더 높은 pre-B 세포 모집단 백분율이 관찰되었다. 비-강화된 NTX101 세포와 비교하여 강화된 NTX101 세포에서 pre-B 세포의 백분율에서 1.76 배수 증가가 관찰되었다. 비-강화된 NTX109 세포와 비교하여 강화된 NTX109 세포에서 pre-B 세포의 백분율에서 1.73-배수 증가가 관찰되었다. 비-강화된 비-형질도입된 세포와 비교하여 강화된 비-형질도입된 Lin⁻ 세포에서 pre-B 세포의 백분율에서 1.14-배수 증가가 관찰되었다(도 12).

[0275]

강화 13 후 세포의 면역표현형을 수행하였다(도 13a-b). 강화된 NTX101 세포에서 Pro/Pre B 세포 비율은 2.54인 반면 비-강화된 NTX101 세포에서 Pro/Pre B 세포 비율은 6.6이었다. 따라서, 비-강화된 NTX101 세포에 비해 강화된 NTX101 세포에서 Pro B/Pre B 세포 비율에서 62% 감소. 강화된 NTX109 세포에서 Pro B/Pre B 세포 비율에서 53% 감소가 비-강화된 NTX109 세포와 비교하여 관찰되었다(Pro B/Pre B 세포 비율: 각각 4.7 대 9.9). 강화된 NTX109 세포의 Pro B/Pre B 세포 비율은 WT 세포에서 발견된 비율과 유사했다. 비-강화된 비-형질도입된 Lin⁻ 세포와 비교하여 강화된 비-형질도입된 Lin⁻ 세포의 Pro B/Pre B 세포 비율에서는 유의한 변화가 관찰되지 않았다(비율: 2.12 대 2.17). 부가적으로, 표 5에 기재된 강화된 그룹은 그 각각의 비 강화된 그룹에 비해 훨씬 더 많은 Pre B 세포 및 Pro B 세포를 포함했다(도 13b).

[0276]

세포 수 및 B 세포 모집단을 강화 17일 후에 결정하였다(도 14). 강화 17일 후, 강화된 비-형질도입된 세포는 비-강화된 비-형질도입된 Lin⁻ 세포에 비해 세포 수에서 18-배수의 증가를 나타냈다(각각 3,980 세포 대 72,500 세포). 부가적으로, 17일 후, 강화된 비-형질도입된 세포는 WT에 비해 1.9-배수 더 많은 세포를 포함했다(각각 72,500 대 37,000 세포). 강화된 비-형질도입된 세포의 B 세포 모집단 백분율은 비-강화된 비-형질도입된 세포의 B 세포 모집단보다 7.4-배수 더 높았으며, 이는 비-강화된 비-형질도입된 Lin⁻ 세포에서의 세포 모집단의

5.2%에 비해, 세포 모집단의 38.88%를 구성했다. 강화된 및 형질도입된 세포는 비-강화된 형질도입 세포와 비교하여 35-배수 및 16-배수 더 많은 세포를 나타냈다(NTX101은 1,259 세포를 포함하는 반면 강화된 NTX101은 45,000 세포를 포함하고 NTX109는 3,932 세포를 포함하는 반면 강화된 NTX109는 65,500 세포를 포함함). 비-강화된 NTX101 세포에 비해 강화된 NTX101 Lin⁻ 세포의 B-세포 모집단 백분율에서 3.3-배수 증가가 관찰되었다(66.9% 대 28.4%). 비-강화된 NTX109 세포와 비교하여 강화된 NTX109 세포의 세포 모집단의 B-세포 모집단 백분율에서 1.26-배수 증가가 관찰되었다(53.8% 대 42.6%).

[0277] IgM 양성 B-세포에 대한 강화의 효과는 강화 17일 후에 결정되었다(도 15). 형질도입된 세포는 강화 후 세포 모집단에서 IgM 양성 백분율에서 증가를 나타내지 않았다. IgM 양성 B-세포는 비-강화된 NTX101의 IgM 양성 세포의 19.7%에 비해 강화된 NTX101 모집단의 13.7%를 구성했다. NTX109의 경우, 비-강화된 NTX109 모집단의 세포의 25.61%에 비하여 강화된 NTX109 세포의 세포 모집단의 17.11%가 IgM 양성 세포였다. 그러나, 강화된 비-형질도입된 세포는 비-강화된 비-형질도입된 Lin⁻ 세포에 비해 IgM 양성 B-세포 모집단의 퍼센트에서 5.8-배수 증가를 나타냈다(각각 13.05% 대 2.24%). 강화된 세포에서 IgM 양성 세포 모집단의 백분율은 WT 대조군 마우스(CBA) 유래된 Lin⁻ 세포에서 IgM 양성 B-세포 백분율보다 2.5-배수 더 높았다(각각 13.05% 대 5.20%). 세포 모집단의 IgM 양성 B 세포 상대적 부분(즉, 세포의 백분율)은 비-강화된 형질도입 세포에 비해 강화된 형질도입 세포에서 더 낮았지만, 총 세포의 절대 수 및 이에 따른 IgM 양성 B 세포의 절대 수는 강화를 받은 세포에서 유의하게 더 높았다.

[0278] 유전자 발현은 강화 13일 후에 결정되었다(도 16). B-세포 분화의 과정에서 각 세포 그룹으로부터 동일한 세포 수를 추출하고 유세포 분석을 사용하여 GFP 발현에 대해 분석했다. 비-강화된 NTX109 세포와 비교하여 강화된 NTX109 세포에서, GFP에 의해 반영된 것과 같이, BTK를 발현하는 세포의 백분율에서 2.62-배수 증가가 관찰되어(도 16) 강화된 NTX109의 증가된 형질도입을 나타냈다. 증가된 GFP 발현은 비-강화된 NTX101 세포와 비교하여 강화된 NTX101 세포에서 관찰되지 않았다.

[0279] 유전자 발현은 강화 13일 후에 결정되었다(도 17). 비-강화된 NTX109 세포와 비교하여 강화된 NTX109 세포에서 BTK 발현에서의 4.2-배수 증가(각각 14.52% 대 3.43%)가 관찰되었다.

[0280] 강화된 Xid Lin⁻ 세포(형질도입 및 비-형질도입됨)는 비-강화된 세포와 비교하거나 WT 세포와 비교하여 세포의 절대 수로 측정할 때 증가된 세포 증식을 나타내었다. 강화된 Xid Lin⁻ 세포(형질도입 및 비-형질도입됨)는 모집단의 HSPC 퍼센트에서 감소를 나타냈다. 강화된 Xid Lin⁻ 세포(형질도입 및 비-형질도입됨)는 고양된 B 세포 분화를 나타내는 비-강화된 세포와 비교하여 모집단의 B-세포 백분율의 증가 및 절대 세포 수의 증가를 나타내었다. IgM 양성 세포의 백분율은 비-강화된 비-형질도입된 세포에 비해 강화된 비-형질도입된 세포에서 더 높았다. 총 세포의 절대 수 및 이에 따른 IgM 양성 B 세포의 절대 수는 비-강화된 그룹과 비교하여 강화를 받은 모든 세포 그룹에서 유의하게 더 높았다. NTX109 벡터로 형질도입된 강화된 세포는 비-강화된 NTX109 세포에 비해 BTK-발현 세포의 증가 %를 나타내어, Xid Lin⁻ 세포에서 BTK 발현을 회복하는데 강화의 유익한 효과를 시사한다.

[0281] 실시예 9

[0282] 유전자 요법에 대한 강화의 효과

[0283] 렌티벡터(Xid^{pTC9}) 또는 WT Lin⁻ 세포(Xid^{CBA/Ca})로 형질도입된 강화된 또는 비-강화된 Xid Lin⁻ 세포로 치사적으로 조사된 Xid 마우스를 이식하는 효과를 평가하였다.

[0284] Xid 마우스에 PGK 구성적 프로모터 하에 GFP 이식유전자를 포함하는 pTC9 렌티벡터로 형질도입된 강화된(MNV) 또는 비-강화된(NT) Xid Lin⁻ 세포를 이식하였다. 형질도입된 세포의 병렬 시험관내 특성화를 수행하여 비-형질도입된 Xid 및 WT Lin⁻ 세포와 비교하여 GFP의 상대적 벡터 카피 수(VCN) 및 단백질 발현을 측정함에 의해 세포 생성물에서 이식유전자의 발현 수준을 평가하였다.

[0285] 상대적 VCN은 모든 테스트된 조건에서 유사한 계통 통합 이벤트를 입증했다. 이식유전자 발현(GFP 양성 세포의 백분율)은 모든 형질도입된 세포(강화된 및 대조군 둘 모두)에서 명백하였다(도 18).

[0286] 형질도입된 Xid Lin⁻ 세포를 xid 마우스에 이식한 후 6주에 혈액을 수집하였고, 이식유전자 발현을 유세포 분석을 사용하여 평가하였다(NT PtC9의 경우 N=5 마우스, MNV PtC9의 경우 N=4 마우스).

[0287] GFP를 발현하는 세포의 퍼센트에 관하여 동물 사이에 편차가 있었지만, 강화는 GFP를 발현하는 세포의 최소, 최대 및 평균 퍼센트를 증가시켰다(도 19). 표 6은 테스트된 각각의 이식유전자 및 WT 동물에서 GFP를 발현하는

세포의 퍼센트를 나타낸다.

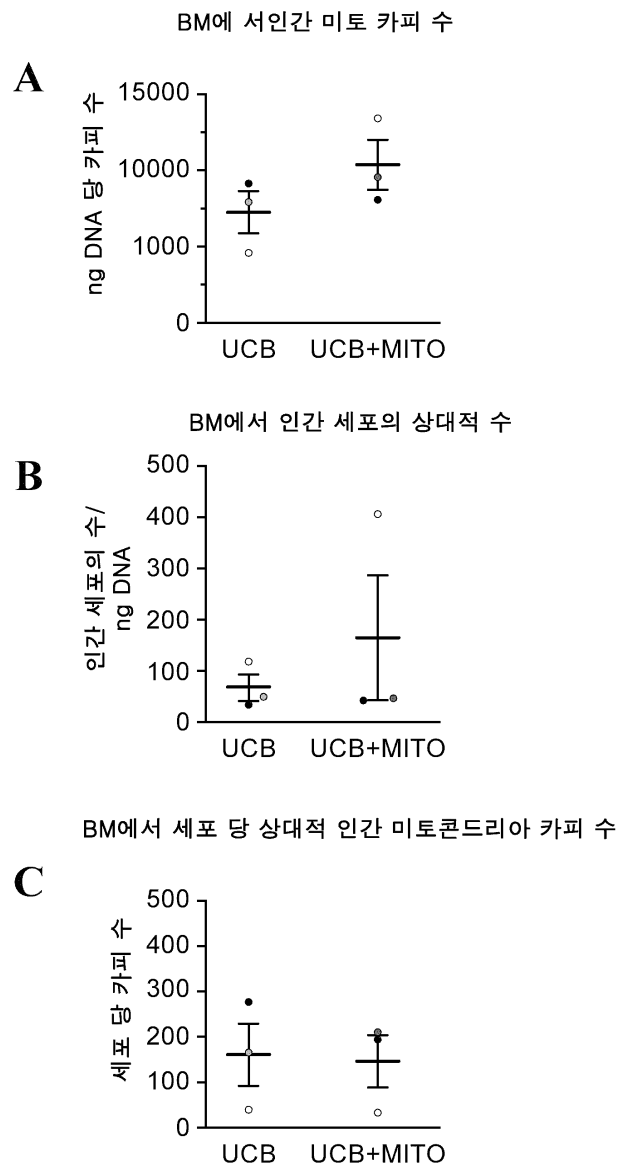
[표 6]

NT PtC9	MNV PtC9
33.45	35.37
11.31	46.52
13.87	60.31
33.39	41.14
52	

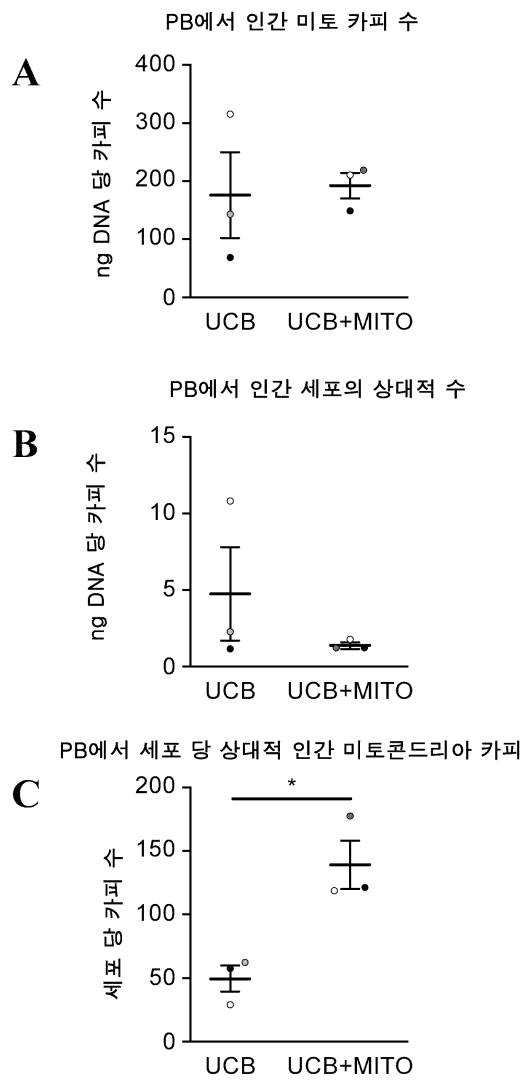
발명이 상기 실시예를 참조하여 기술되었지만, 변형 및 변경이 발명의 사상 및 범주 내에 포괄된다는 것이 이해될 것이다. 따라서, 발명은 다음 청구범위에 의해서만 제한된다.

도면

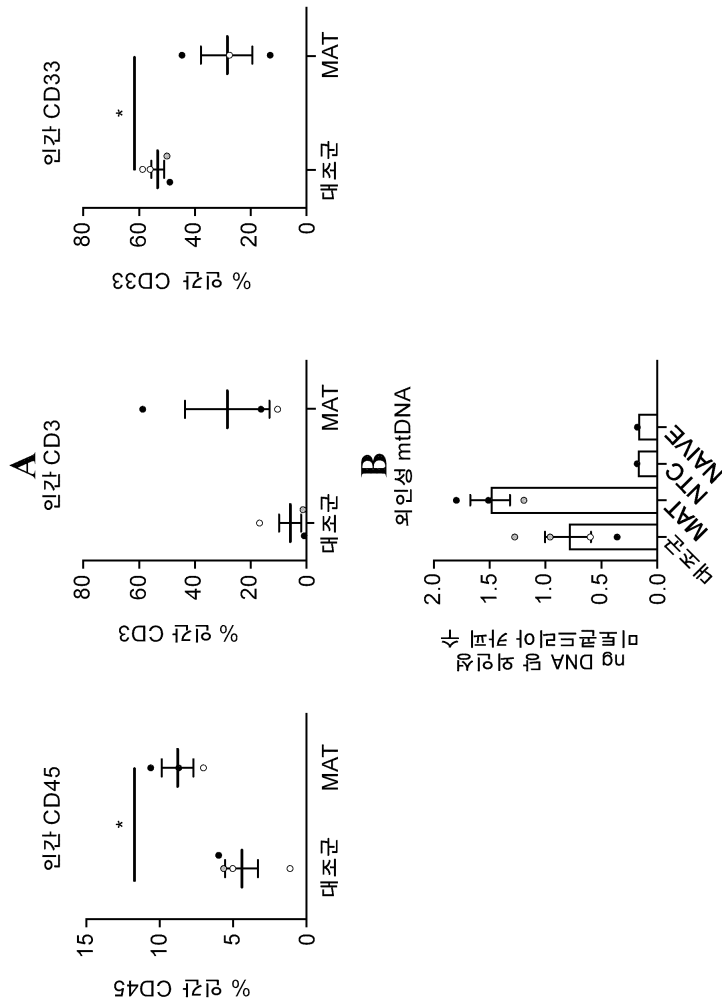
도면1



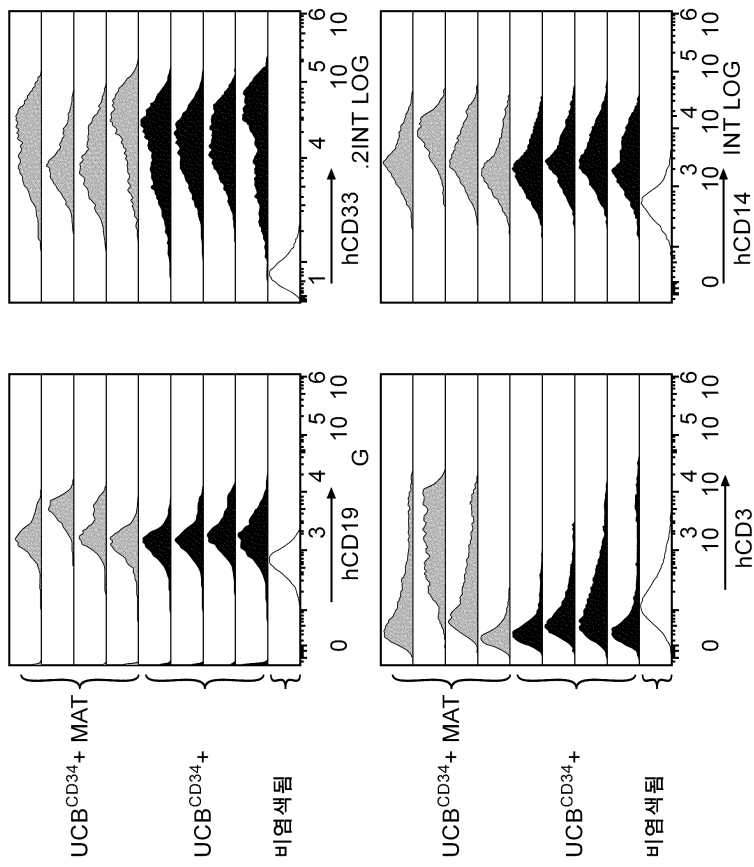
도면2



도면3

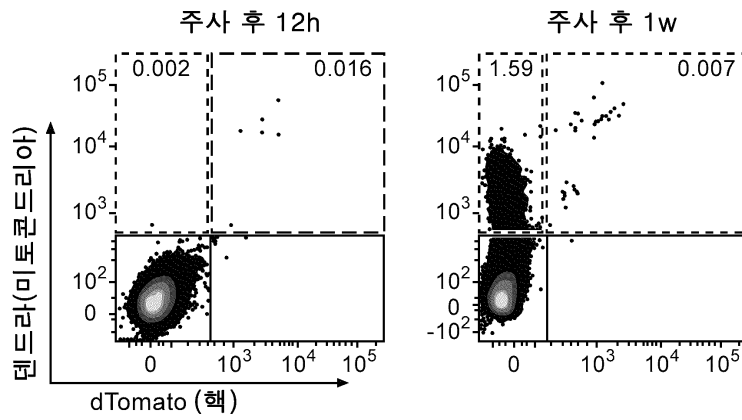


도면4

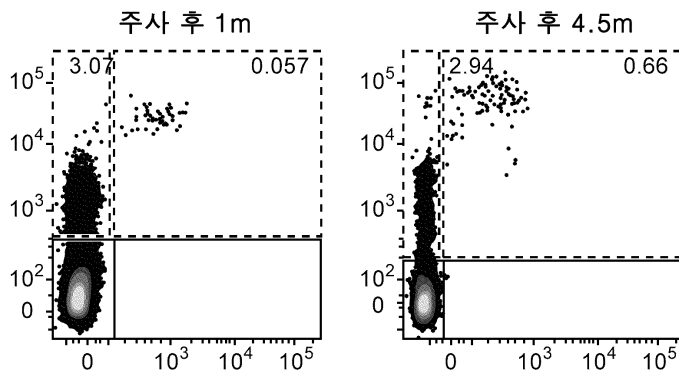


도면5a

말초 혈액(암컷)



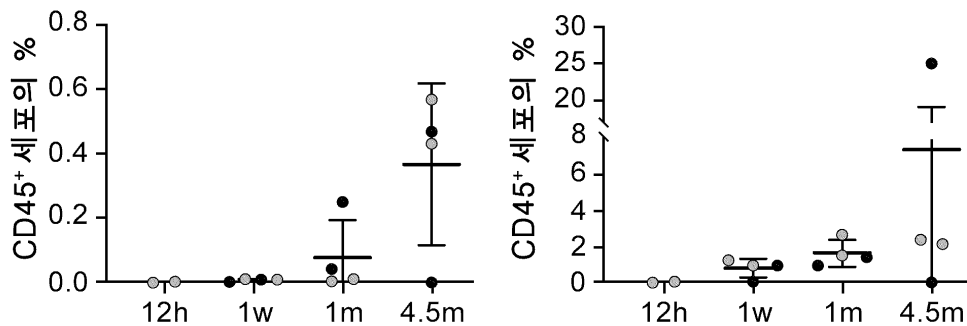
PB에서 레드-그린 세포의 %(CD+45세포로부터)



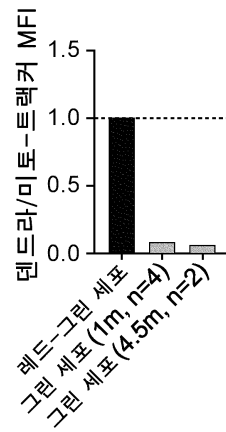
PB에서 그린 세포의 %(CD+45세포로부터)

도면5b

PB에서 dTomato⁺덴드라⁺세포의 % PB에서 dTomato⁻덴드라⁺세포의 %

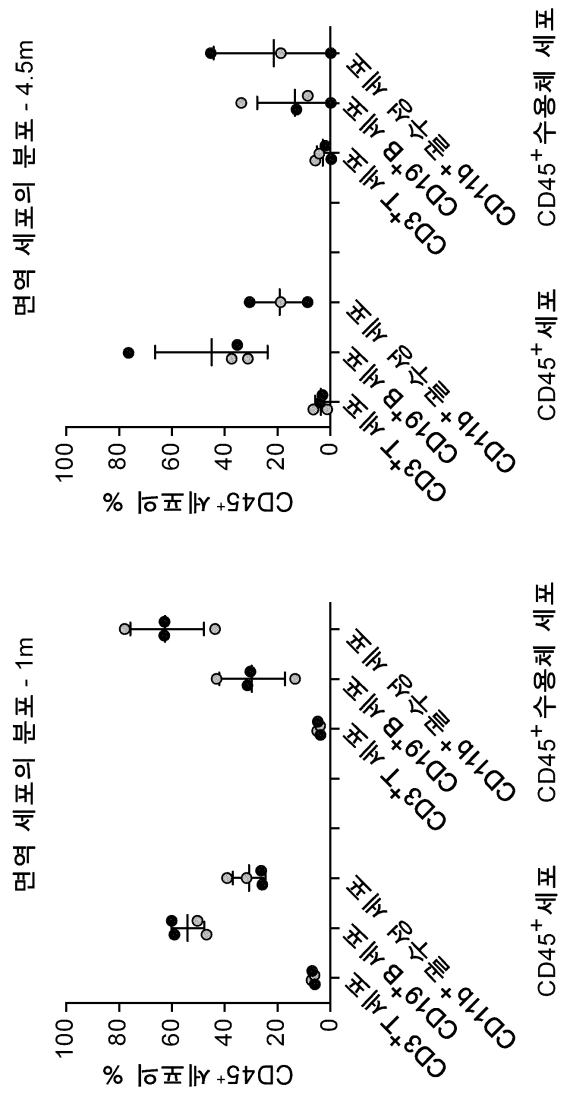


도면6



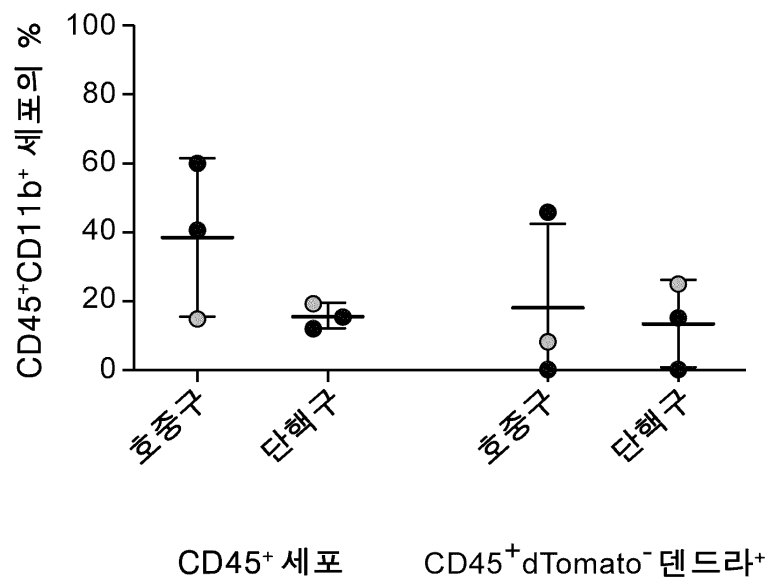
$$\text{외인성 미토콘드리아의 \%} = \frac{\left\{ \frac{I \text{ 그린 미토콘드리아/ (그린 세포)}}{I \text{ 총 미토콘드리아(그린 세포)}} \right\}}{\left\{ \frac{I \text{ 그린 미토콘드리아/ (레드-그린 세포)}}{I \text{ 총 미토콘드리아(레드-그린 세포)}} \right\}} \times \frac{\text{미토콘드리아 아이콘}}{\text{세포 아이콘}}$$

도면7

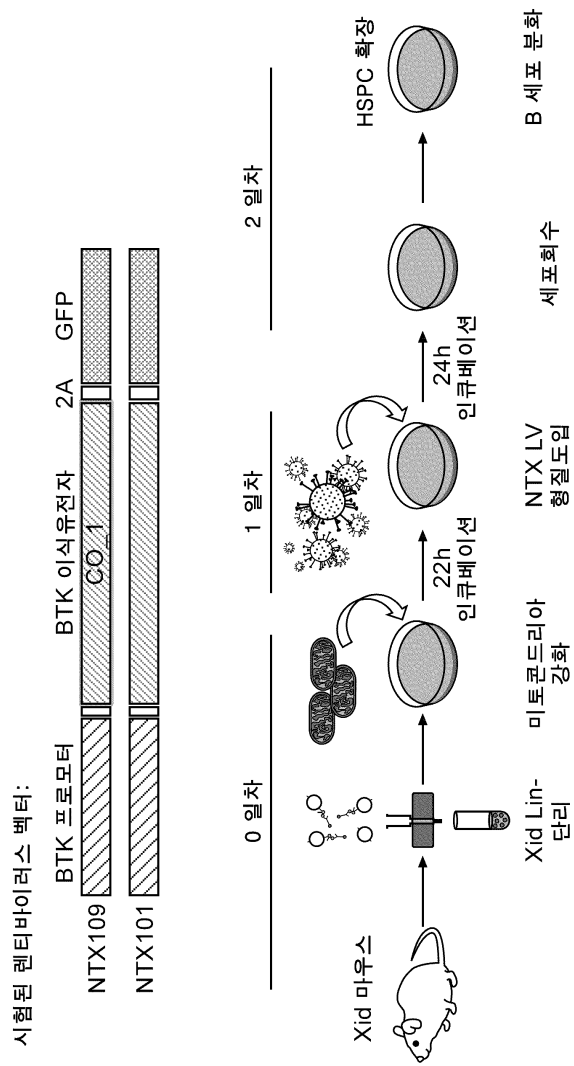


도면8

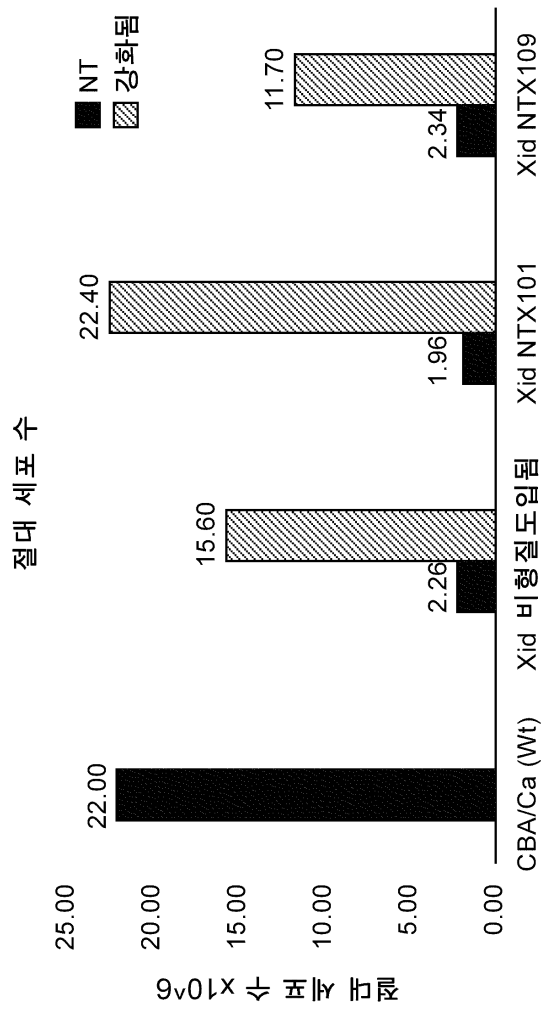
PB에서 호중구 및 단핵구에 대한 CD11b 분포 (4.5m)



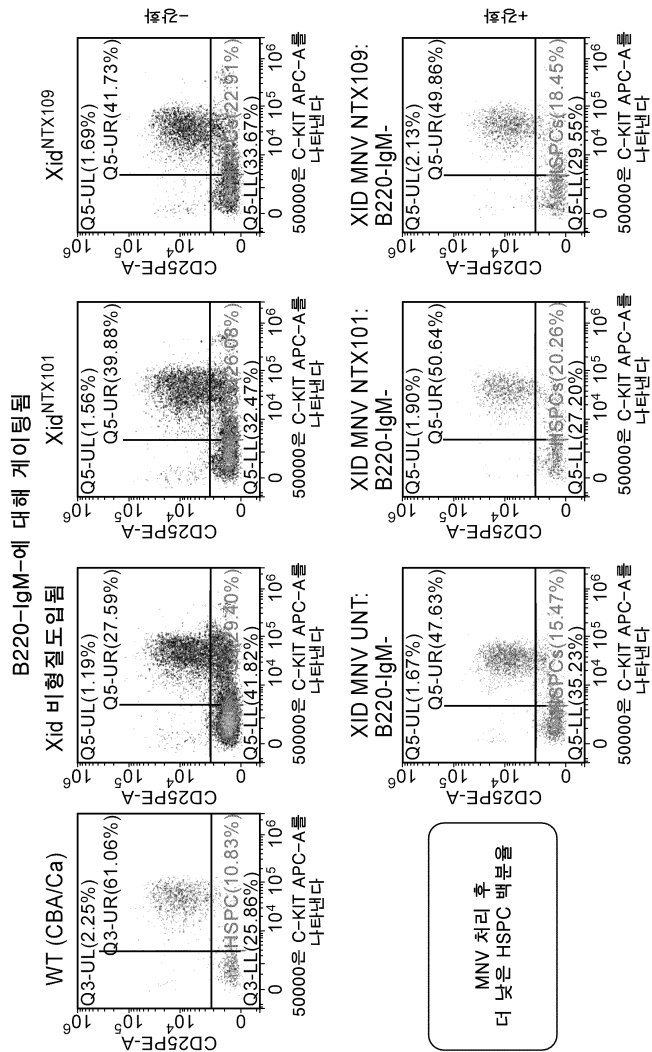
도면9



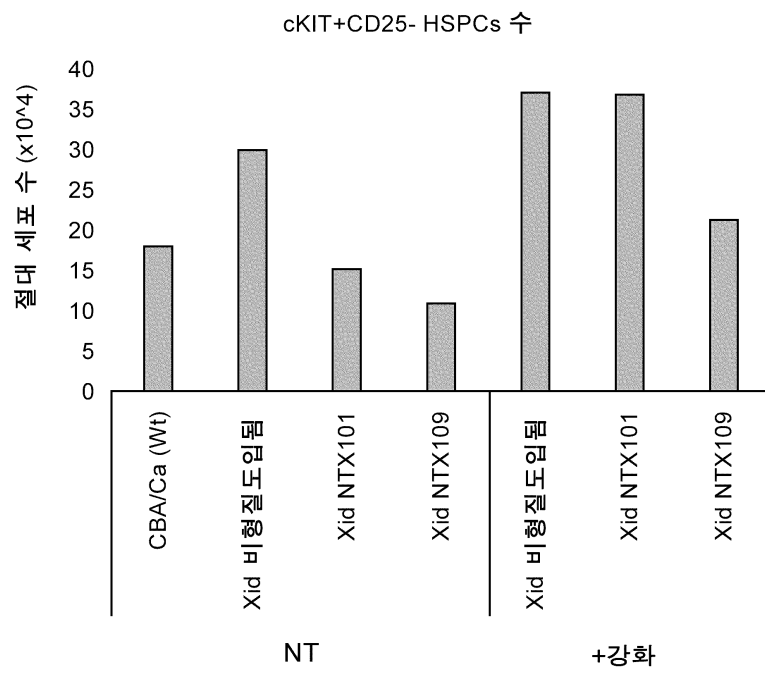
도면10



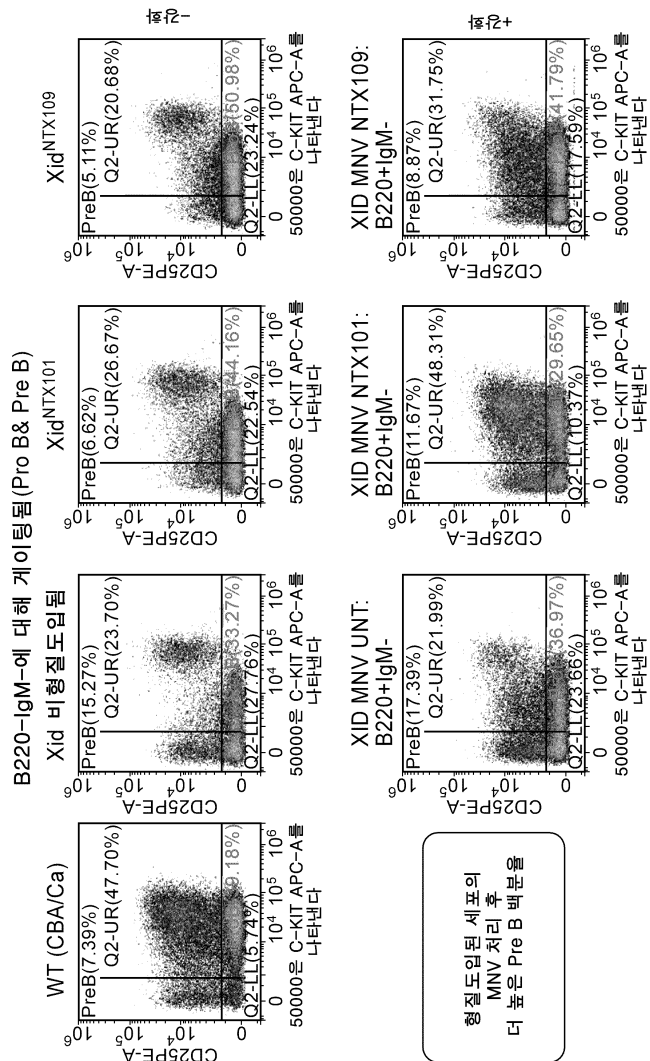
도면11a



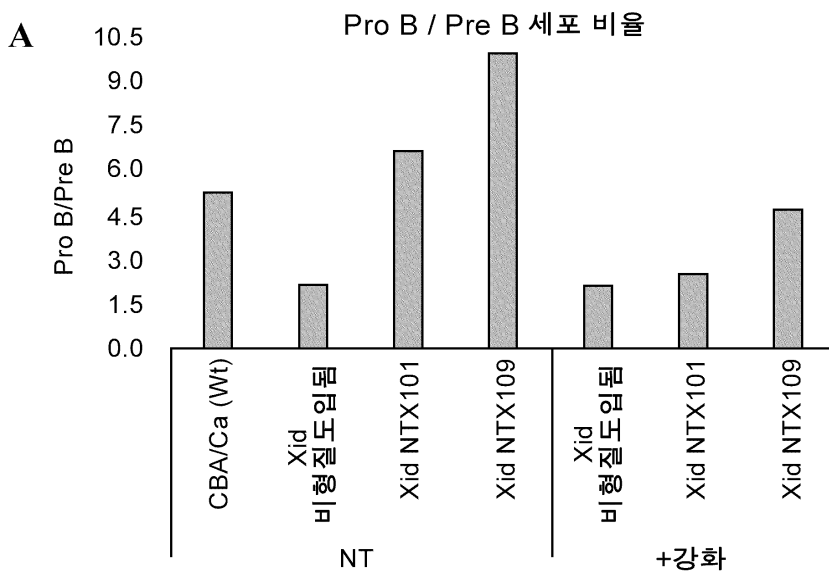
도면11b



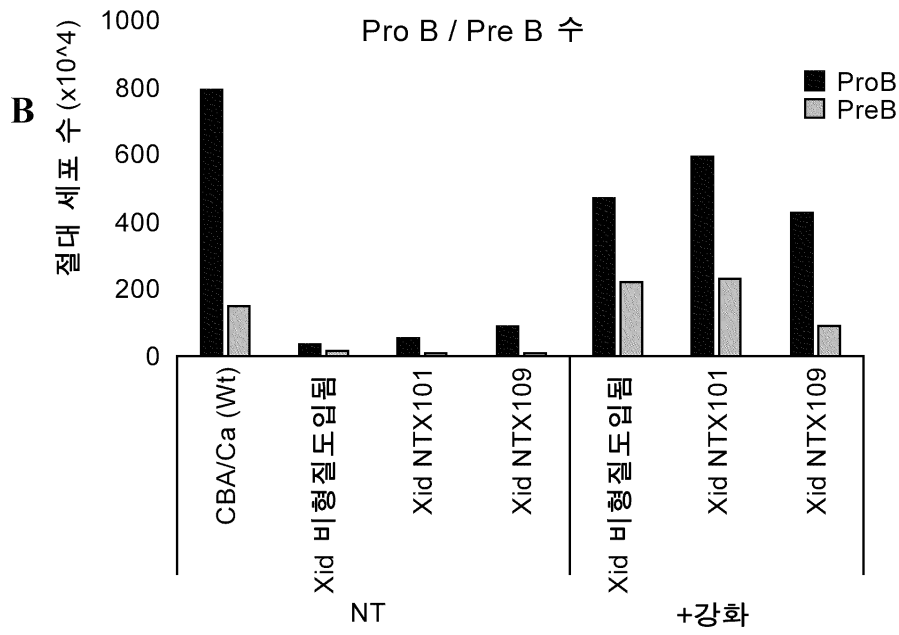
도면12



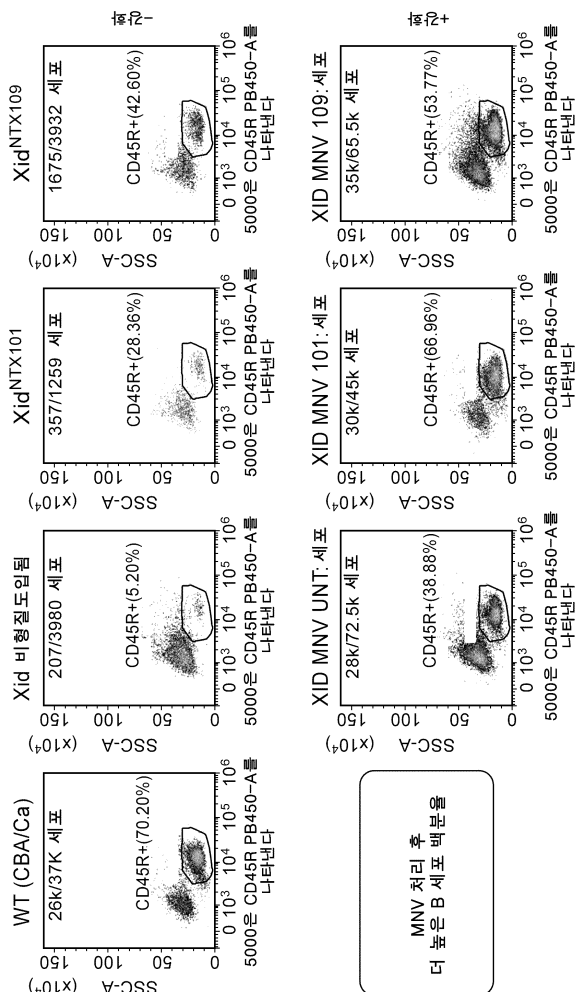
도면13a



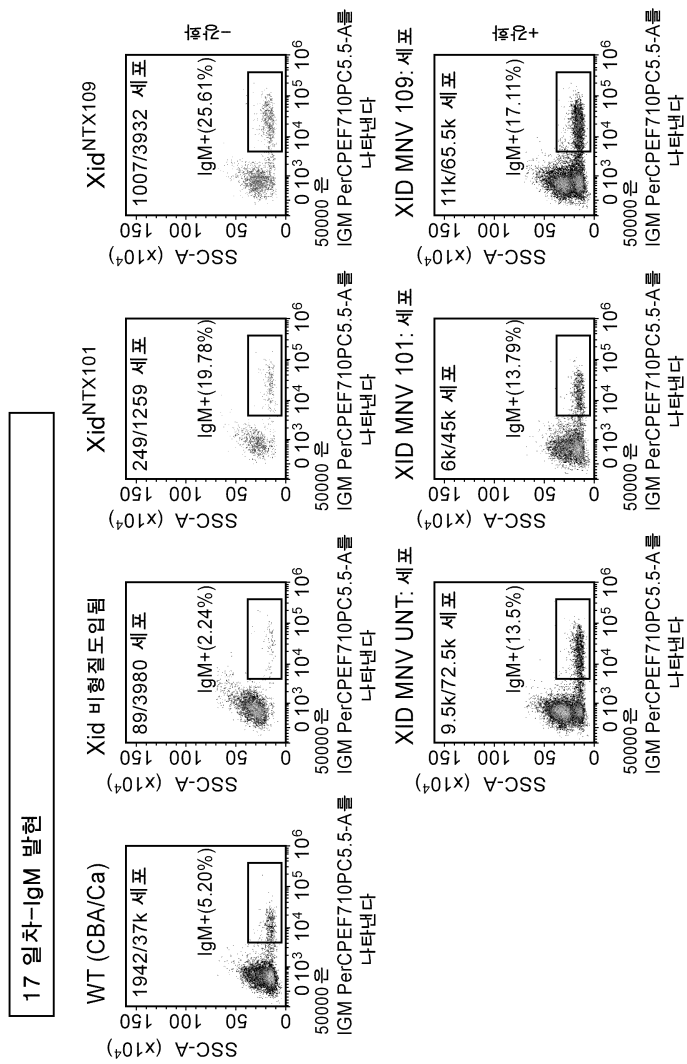
도면13b



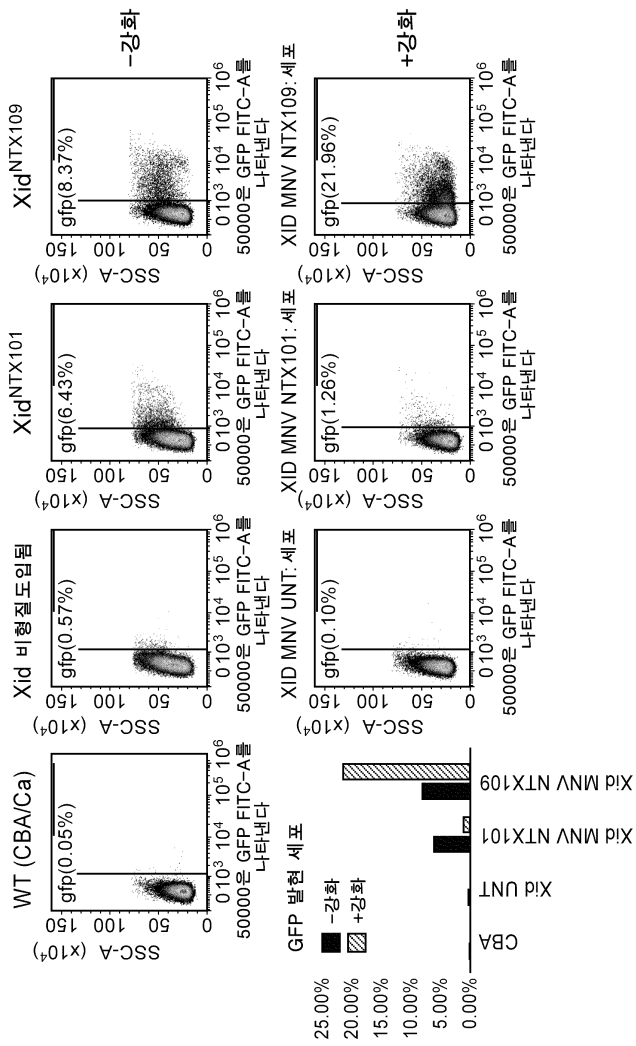
도면14



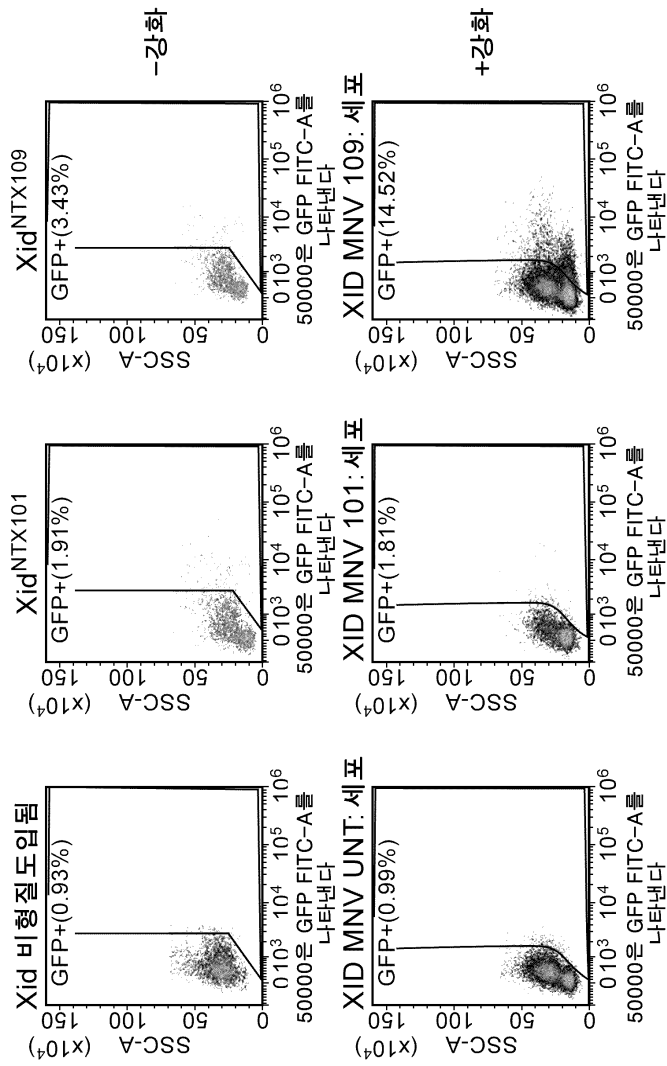
도면15



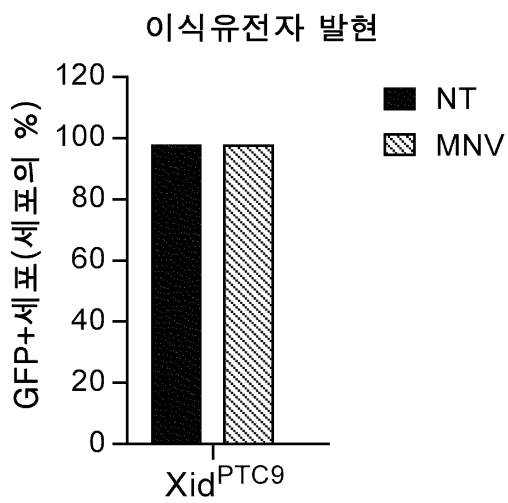
도면16



도면17



도면18



도면19

