



등록특허 10-2660506



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년04월25일
(11) 등록번호 10-2660506
(24) 등록일자 2024년04월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0775 (2010.01) A61K 35/28 (2015.01)
A61P 29/00 (2023.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0663 (2013.01)
A61K 35/28 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-7035053
(22) 출원일자(국제) 2018년05월04일
심사청구일자 2021년04월21일
(85) 번역문제출일자 2019년11월27일
(65) 공개번호 10-2020-0003044
(43) 공개일자 2020년01월08일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2018/061503
(87) 국제공개번호 WO 2018/202853
국제공개일자 2018년11월08일
(30) 우선권주장
2017901633 2017년05월04일 오스트레일리아(AU)
(뒷면에 계속)
(56) 선행기술조사문헌
KR1020130092555 A*
US20140112893 A1*
KR1020150016117 A
KR1020160145066 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
메조블라스트 인터내셔널 에스에이알엘
스위스 메이린 1217 루트 드 프리-보아 20
(72) 발명자
이페스쿠, 실비우
호주, 빅토리아 3000, 멜버른, 55 콜린스 스트리트, 레벨 38
시몬스, 폴
호주, 빅토리아 3000, 멜버른, 55 콜린스 스트리트, 레벨 38
(74) 대리인
이처영, 장제환

전체 청구항 수 : 총 8 항

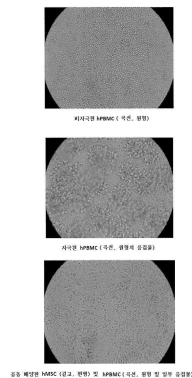
심사관 : 도현미

(54) 발명의 명칭 면역억제가 향상된 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포

(57) 요약

본 개시내용은 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포를 포함하는 세포 요법 제품 및 이들 제품에 대한 효능 분석에 관한 것이다. 본 개시내용은 또한 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포의 투여에 의한 면역 또는 염증 장애의 치료, 및 이식편대숙주질환(graft versus host disease: GVHD), 또는 GVHD와 연관된 하나 이상의 증상의 치료 또는 예방을 위한 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 29/00 (2023.02)
C12N 2502/1157 (2013.01)
C12N 2523/00 (2013.01)

(30) 우선권주장

2017901636	2017년05월04일	오스트레일리아(AU)
2018900551	2018년02월21일	오스트레일리아(AU)

명세서

청구범위

청구항 1

간충직 줄기 세포(mesenchymal stem cells: MSCs)를 포함하는 조성물로서, MSCs는:

- 1) 0.1% 내지 75%의 STRO-1+ 세포를 포함하는 제1 세포 집단으로부터 배양물 확장(culture expanded)되고;
- 2) 동결보존되며;
- 3) 해동되고,

해동된 MSCs는 IL-2R α 발현을 65% 이상 저해하며, IL-2R α 발현의 저해는 T 세포를 포함하는 세포 집단과 배양 배지 내 MSCs를 공동 배양시키는 단계; 및 IL-2R α 발현의 저해 수준을 결정하는 단계에 의해 결정되는, 간충직 줄기 세포를 포함하는 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, T 세포를 포함하는 세포 집단은 말초 혈액 단핵 세포(peripheral blood mononuclear cell: PBMC)를 포함하는 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, MSCs는 IL-2R α 발현을 70% 이상 저해하는 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, MSCs는 IL-2R α 발현을 80% 이상 저해하는 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, MSCs는 하기 단계들을 포함하는 방법에 의해 배양물 확장되는 조성물:

- a) 재조합 트립신을 포함하는 배양 배지에서 MSCs 집단을 배양시키는 단계;
- b) 하나 이상의 에어 필터가 부착된 세포 공장(cell factory)에서 세포를 배양시키는 단계;
- c) 상기 세포를 농축 및/또는 세척하는 단계; 및
- d) 상기 세포를 이중 스크린 메쉬 필터를 통해 통과시킴으로써, 가시적 미립자 및/또는 세포 응집물을 감소시키는 단계.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 포함하는, 대상체에서의 염증 장애의 치료를 위한 약제학적 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 염증 장애는 T-세포 매개 염증 장애인, 약제학적 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 포함하는, 대상체에서의 이식편대숙주질환(graft versus host disease: GVHD)의 치료를 위한 약제학적 조성물.

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 임의의 제조업자의 설명서, 설명, 제품 사양서 및 본 명세서에 언급된 임의의 제품에 대한 제품 시트와 함께 또는 본 명세서에 참고로 편입된 임의의 문헌에서 본 명세서에 인용되거나 또는 언급된 모든 문헌, 및 본 명세서에 인용된 문헌에서 인용되거나 또는 언급된 모든 문헌은 그들의 전문이 본 명세서에 참고로 편입된다.

[0002] 본 개시내용은 2017년 5월 4일자로 출원된 호주 가출원 특허 AU 2017901633(발명의 명칭: "Potency assay for immunosuppression"); 2017년 5월 4일자로 출원된 호주 가출원 특허 AU 2017901636(발명의 명칭: "Method for treating Graft versus Host Disease (GVHD)"); 및 2018년 2월 21일자로 출원된 호주 가출원 특허 AU 2018900551(발명의 명칭: "Potency assay for immunosuppression II")으로부터의 우선권을 주장한다. 이들 문헌의 전체 내용은 본 명세서에 그들의 전문이 참고로 편입된다.

[0003] **기술분야**

[0004] 본 개시내용은 간충식 계통 전구체 또는 줄기 세포를 포함하는 세포 요법 제품 및 이들 제품에 대한 효능 분석에 관한 것이다. 본 개시내용은 또한 간충식 계통 전구체 또는 줄기 세포의 투여에 의한 면역 또는 염증 장애의 치료, 및 이식편대숙주질환(graft versus host disease: GVHD), 또는 GVHD와 연관된 하나 이상의 증상의 치료 또는 예방을 위한 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 재생 또는 면역 요법 적용을 위한 몇몇 세포 요법 제품은 임상 평가 및 시판 허가로 진행되었다. 그러나, 이들 세포 요법 제품의 시장에 대한 방출은 그들의 복잡성 및 이질성에 의해 방해되는데, 이는 적절한 생물학적 활성의 동정 및 그에 따른 일관된 세포 요법 제품 품질의 정의를 어렵게 만든다.

[0006] 생리화학적 매개변수(예를 들어, 크기, 형태, 광-산란 특성, 인장강도, 세포수, 함유, 표현형 마커의 동정, 분비된 물질, 유전자형, 유전자 발현 프로파일의 특성규명)는 활성 물질, 중간체, 불순물 및 오염물질의 동정 및

정량화를 위해 일상적으로 사용된다. 그러나, 생리화학적 매개변수는 제품이 생물학적으로 활성이고 강하다는 것(즉, 목적하는 효과를 유발하는 것)을 확인할 수 없다. 대조적으로, 생물학적 특성규명은 동물에서 시험관내 또는 생체내에서 그리고 궁극적으로는 임상에서 모델링되는 생물학적 시스템에 대한 제품의 효과를 고려한다.

[0007] 미국 및 유럽에서 약제학적 입법은 분자 구조가 완전히 정해질 수 없는 활성 물질이 시장에 대한 방출 전에 그들의 효능에 대해 평가될 수 없을 것을 요구한다. 허가 받은 세포 요법 제품의 각각의 배취 효능을 평가하기 위한 법적 필요가 있다.

[0008] 효능 검사는 제품의 적절한 생물학적 활성 또는 활성들을 입증하여야 한다. 제품의 생물학적 작용 모두를 반영하는 효능 검사에 대한 필요는 없지만, 하나 이상의 적절한 생물학적 기능을 나타내어야 한다. 정확성, 민감성, 특이성 및 재현 가능성은 효능 검사에서 사용되는 분석 방법에 대해 확립되고 그들은 적당하게 강할 것이 예상된다.

[0009] 면역억제가 요망되는 질환의 치료에 대해 개선된 효능을 갖는 제품을 개발할 필요가 있다. 또한 세포 요법 제품의 효능에 중요한 매개변수를 동정하는 것과 일관된 품질의 제품이 제조되도록 (예를 들어, 효능 검사를 통해) 그들을 제어하는 것은 바람직하다.

발명의 내용

[0010] 본 출원인은 면역억제 활성이 개선된 기성품의(off-the-shelf) 생체외 확장된 동종이계 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포(mesenchymal lineage precursor or stem cell: MLPSC) 제품을 개발하였다.

[0011] 본 개시내용은 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포 또는 이들의 자손을 포함하는 조성물을 제공하되, 상기 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포는 동결보존되고, 해동 후에, PBMC 샘플에서 활성화된 T 세포의 증식을 적어도 약 65%만큼 저해한다.

[0012] 일 실시형태에서, 저해는 1의 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포:5의 PBMC 이하의 비로 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포와 PBMC의 공동 인큐베이션에 의해 측정된다. 예를 들어, 1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50, 1:60, 1:70 1:80, 1:90 또는 1의 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포:100의 PBMC 이하.

[0013] 일 실시형태에서, 1의 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포:5의 PBMC 이하의 비로 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포와 PBMC의 공동 인큐베이션은 T 세포 증식을 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85% 또는 적어도 약 90%만큼 저해한다.

[0014] 일 실시형태에서, 활성화된 T 세포의 증식 저해는 활성화된 T 세포에서 IL-2R 2R α 발현의 저해에 의해 측정된다.

[0015] 일 실시형태에서, 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포 조성물은 적어도 110pg/ml의 양으로 TNFR1을 발현시킨다. 예를 들어, 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포 조성물은 적어도 150pg/ml, 또는 적어도 200pg/ml, 또는 적어도 250pg/ml, 또는 적어도 300pg/ml, 또는 적어도 320pg/ml, 또는 적어도 330pg/ml, 또는 적어도 340pg/ml, 또는 적어도 350pg/ml의 양으로 TNFR1을 발현시킨다.

[0016] 일 실시형태에서, 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포는 적어도 13pg/10⁶개의 세포의 양으로 TNFR1을 발현시킨다. 예를 들어, 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포는 적어도 15pg/10⁶개의 세포, 또는 적어도 20pg/10⁶개의 세포, 또는 적어도 25pg/10⁶개의 세포, 또는 적어도 30pg/10⁶개의 세포, 또는 적어도 35pg/10⁶개의 세포, 또는 적어도 40pg/10⁶개의 세포, 또는 적어도 45pg/10⁶개의 세포, 또는 적어도 50pg/10⁶개의 세포의 양으로 TNFR1을 발현시킨다.

[0017] 일 실시형태에서, 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포는 면역선택에 의해 단리되고, 이어서, 배양물 확장된다.

[0018] 일 실시형태에서, 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포는 배양물 확장된다. 일 실시형태에서, 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포는 단리되거나, 또는 단리 및 농축되고, 동결보존 전에 생체외에서 또는 시험관내에서 배양물 확장된다. 다른 예에서, 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포는 단리되거나, 또는 단리 및 농축되고, 동결보존되고 나서, 해동되고, 후속적으로 배양물 확장된다. 또 다른 예에서, 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포는 냉동보존 전에 그리고 후에 확장된 배양물이다.

[0019] 일 실시형태에서, 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포는 조성물의 세포 집단의 적어도 5%를 포함한다.

- [0020] 일 실시형태에서, 조성물은 42.5% 프로프리즈(Profreeze)(상표명)/50% αMEM/7.5% DMSO에서 동결보존된다.
- [0021] 일 실시형태에서, 조성물은 플라즈마라이트-A(Plasmalyte-A), 25% HSA 및 DMSO 중에서 동결보존된다.
- [0022] 본 발명의 범주는 임의의 이론적 이유로 제한되지 않지만, 본 발명자들은 T 세포의 증식을 적어도 약 65%만큼 저해하는 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포가 면역 반응을 저해하는 데 특히 유용하고, 더 특별하게는 이러한 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포가 이식편대숙주질환; 고형 장기 이식 거부, 예를 들어, 심장 이식 거부, 간 이식 거부, 췌장 이식 거부, 장 이식 거부, 및 신장 이식 거부; 및 자가면역 질환, 예를 들어, 류마티스 관절염, 다발성 경화증, I형 당뇨병, 크론병, 길랑-바레 증후군, 홍반성 루푸스, 중증 근무력증, 시신경염, 건선, 그레이브스병, 하시모토병, 오드 갑상선염(Ord's thyroiditis), 재생불량성 빈혈, 라이터증후군, 자가면역 간염, 원발성 담즙성 경변증, 항인지질 항체 증후군, 안구간대경련 근간대경련 증후군, 측두동맥염, 급성 파종성 뇌척수염, 국파스처 증후군, 베게너 육아종증, 셀리악병, 천포창, 다발성관절염, 온난 자가면역 용혈성 빈혈 및 피부경화증의 예방 또는 치료에서 유용하다는 것을 발견하였다.
- [0023] 본 발명자들은 또한 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포가 또한 염증성 질환, 특히 T-세포 매개-염증 장애의 치료에 유용하다는 것을 발견하였다.
- [0024] 본 발명은 또한 다음의 단계 중 하나 이상을 포함하는 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포의 집단을 생성하는 방법을 제공한다:
- [0025] 제조합 트립신을 포함하는 배양 배지에서 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포 집단을 배양시키는 단계;
- [0026] 하나 이상의 에어 필터가 부착된 세포 공장(cell factory)에서 세포를 배양시키는 단계;
- [0027] 상기 세포를 접선유동여과(tangential flow filtration: TFF)로 농축 및/또는 세척하는 단계; 또는
- [0028] 채취된 세포를 이중 스크린 메쉬 필터를 통해 통과시킴으로써, 가시적 미립자 및/또는 세포 응집물을 감소시키는 단계.
- [0029] 일 실시형태에서, 상기 방법은 하기 단계들을 포함한다
- [0030] 제조합 트립신을 포함하는 배양 배지에서 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포 집단을 배양시키는 단계; 및
- [0031] 상기 세포를 접선유동여과(TFF)로 농축 및/또는 세척하는 단계.
- [0032] 일 실시형태에서, 상기 방법은 하기 단계들을 포함한다
- [0033] 제조합 트립신을 포함하는 배양 배지에서 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포 집단을 배양시키는 단계;
- [0034] 상기 세포를 접선유동여과(tangential flow filtration: TFF)로 농축 및/또는 세척하는 단계; 및
- [0035] 채취된 세포를 이중 스크린 메쉬 필터를 통해 통과시킴으로써, 가시적 미립자 및/또는 세포 응집물을 감소시키는 단계.
- [0036] 일 실시형태에서, 상기 방법은 다음의 단계들을 포함한다:
- [0037] 제조합 트립신을 포함하는 배양 배지에서 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포 집단을 배양시키는 단계;
- [0038] 하나 이상의 에어 필터가 부착된 세포 공장(에서) 세포를 배양시키는 단계;
- [0039] 상기 세포를 접선유동여과(tangential flow filtration: TFF)로 농축 및/또는 세척하는 단계; 및
- [0040] 채취된 세포를 이중 스크린 메쉬 필터를 통해 통과시킴으로써, 가시적 미립자 및/또는 세포 응집물을 감소시키는 단계.
- [0041] 일 실시형태에서, 상기 방법은 도 2에 약술된 단계 중 하나 이상 또는 모두를 포함한다.
- [0042] 일 실시형태에서, 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포는 면역선택에 의해 분리된다. 예를 들어, 면역선택에 의해 분리된 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포는 STRO-1+ 간충직 전구체 세포 또는 이들의 자손일 수 있다.
- [0043] 일 실시형태에서, 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포는 플라스틱 부착 기술에 의해 분리된다. 예를 들어, 플라스틱 부착 기술에 의해 분리된 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포는 간충직 줄기 세포 또는 이들의 자손일 수 있다.

- [0044] 본 발명자들은 또한 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포를 포함하는 세포 요법 제품의 생물학적 활성 또는 치료 효능을 측정하기 위한 효능 분석을 개발하였다.
- [0045] 따라서, 본 개시내용은 또한 하기를 포함하는 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포의 효능을 결정하기 위한 방법을 제공한다:
- [0046] (i) 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포를 포함하는 세포 집단을 얻는 단계로서, 상기 세포는 동결 보존되고 해동되는, 상기 세포 집단을 얻는 단계;
- [0047] (ii) T 세포를 포함하는 세포 집단과 배양 배지 내 세포를 공동 배양시키는 단계;
- [0048] (iii) T 세포 IL-2R α 발현의 저해 수준을 결정하는 단계로서, 65% 이상 저해의 양은 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포의 생물학적 활성 또는 치료 효능을 나타내는, 상기 결정하는 단계. 예를 들어, 적어도 약 70% 저해, 적어도 약 75% 저해, 적어도 약 80% 저해, 적어도 약 85% 저해 또는 적어도 약 90% 저해의 양은 치료 효능의 생물학적 활성을 나타낸다.
- [0049] 일 실시형태에서, 적어도 약 65% 저해의 양은 면역 반응을 저해함에 있어서 세포 치료 효능을 나타낸다.
- [0050] 하나의 또는 추가적인 실시형태에서, 적어도 약 65% 저해의 양은 이식편대숙주질환을 예방하거나 또는 치료함에 있어서 세포 치료 효능을 나타낸다.
- [0051] 본 개시내용은 또한 하기 단계들을 포함하는 강한 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포를 선택하는 방법을 제공한다:
- [0052] (i) 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포를 포함하는 세포 집단을 얻는 단계로서, 상기 세포는 동결 보존되고 해동되는, 상기 세포 집단을 얻는 단계;
- [0053] (ii) T 세포를 포함하는 세포 집단과 배양 배지 내 세포를 공동 배양시키는 단계;
- [0054] (iii) 65% 이상 저해의, T 세포 IL-2R α 발현의 저해 수준을 나타내는 세포를 선택하는 단계.
- [0055] 일 실시형태에서, 상기 기재한 분석 방법 또는 선택 방법을 사용하여 간충직 계통 전구체 줄기 세포의 농축 집단 효능을 결정한다. 예를 들어, 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포는 간충직 줄기 세포를 농축시킨다. 다른 실시형태에서, 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포는 STRO-1+ 세포의 선택에 의해 농축된다. 일 실시형태에서, 간충직 계통 전구체 세포는 STRO-1^{bright} 세포이다.
- [0056] 하나의 또는 추가적인 실시형태에서, 분석 또는 선택 방법을 사용하여 효능을 결정하거나 또는 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포의 생체내 또는 시험관내 확장 집단을 선택한다. 일례에서, 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포는 단리되거나, 또는 단리 및 농축되고, 동결보존 전에 생체외에서 또는 시험관내에서 배양물 확장된다. 다른 예에서, 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포는 단리되거나, 또는 단리 및 농축되고, 동결보존되고 나서, 해동되고, 후속적으로 배양물 확장된다. 또 다른 예에서, 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포는 냉동 보존 전에 그리고 후에 확장된 배양물이다.
- [0057] 일 실시형태에서, 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포는 인간 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포이다.
- [0058] 일 실시형태에서, T 세포는 인간 T 세포이다. 다른 실시형태에서, T 세포는 CD4 및 CD8을 발현시킨다. 다른 실시형태에서, T 세포는 CD69 및/또는 CD137을 발현시킨다.
- [0059] 하나의 또는 추가적인 예에서, T 세포를 포함하는 집단은 말초 혈액 단핵 세포(peripheral blood mononuclear cell: PBMC)의 집단이다.
- [0060] 일 실시형태에서, 분석 또는 선택 방법은 하나 이상의 T 세포 자극 리간드를 포함하는 배양 배지에서 T 세포와 함께 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포를 배양시키는 단계를 포함한다. 예를 들어, 배양 배지는 항-CD3 항체 또는 이의 단편 및 항-CD28 항체 또는 이의 단편을 포함한다. 다른 또는 추가적인 실시형태에서, 상기 방법은 간충직 계통 전구체 세포와 함께 공동 배양 전에 자극되고/되거나 활성화된 T 세포와 함께 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포를 배양시키는 단계를 포함한다.
- [0061] 일 실시형태에서, 분석 또는 선택 방법은 10% FBS 및 2mM 글루타민으로 보충된 DMEM 중에서 세포를 배양시키는 단계, 및 선택적으로, 하나 이상의 T 세포 자극 리간드를 포함하는 단계를 포함한다.
- [0062] 일 실시형태에서, 상기 방법은 약 1의 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포:2의 T 세포 이하의 비로 간충직 계통

전구체 또는 줄기 세포 및 T 세포를 공동배양시키는 단계를 포함한다. 예를 들어, 1:3, 1:4, 1:5, 1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50, 1:60, 1:70 1:80, 1:90, 또는 1의 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포:100의 T 세포 이하.

- [0063] 일 실시형태에서, 상기 방법은 IL-2R α 발현을 결정하기 전에 60 내지 84 시간 동안 세포를 공동배양시키는 단계를 포함한다.
- [0064] 하나의 또는 추가적인 실시형태에서, 상기 방법은 공동 배양 후에 세포를 수집하는 단계 및 그들을 용해시켜 세포 용해물을 생성하는 단계를 포함한다.
- [0065] 하나의 또는 추가적인 실시형태에서, 상기 방법은 효소-결합 면역흡착 분석(enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA)에 의해 세포 용해물 중의 IL-2R α 의 양을 결정하는 단계를 포함한다.
- [0066] 일례에서, ELISA는 하기를 포함한다:
- [0067] (i) IL-2R α 에 특이적인 단클론성 항체로 사전 코팅된 마이크로플레이트의 각각의 웰에 샘플 희석제를 첨가하는 단계;
- [0068] (ii) IL-2R α 에 특이적인 단클론성 항체로 사전 코팅된 마이크로플레이트의 웰에 공동 배양된 샘플을 첨가하는 단계;
- [0069] (iii) IL-2R α 에 특이적인 단클론성 항체가 샘플 내 임의의 IL-2R α 에 특이적으로 결합하도록 허용하는데 충분한 시간 동안 마이크로플레이트를 인큐베이션시키는 단계;
- [0070] (iv) 상기 마이크로플레이트를 세척하는 단계;
- [0071] (v) 상기 웰에 IL-2R α 접합체를 첨가하는 단계;
- [0072] (vi) 상기 접합체가 임의의 포획된 IL-2R α 에 특이적으로 결합하도록 허용하기에 충분한 시간 동안 마이크로플레이트를 인큐베이션시키는 단계;
- [0073] (vii) 상기 마이크로플레이트를 세척하는 단계;
- [0074] (viii) 상기 웰에 기질 용액을 첨가하는 단계;
- [0075] (ix) 발색 현상에 충분한 시간 동안 상기 마이크로플레이트를 인큐베이션시키는 단계;
- [0076] (x) 상기 웰에 정지 용액을 첨가하는 단계;
- [0077] (xi) 450nm로 설정한 마이크로플레이트 판독기 상에서 광학밀도를 판독하고 570nm에서 파장 보정하는 단계;
- [0078] (xii) IL-2R α 의 농도를 결정하는 단계.
- [0079] 일 실시형태에서, 상기 방법은 하기 단계들을 추가로 포함한다:
- [0080] 샘플 희석물 중에서 IL-2R α 표준품의 연속 희석물을 제조하여, 예를 들어, 7.8 내지 500pg/ml 범위의 최종 농도를 제공하는 단계;
- [0081] 단계 (iii) 전에 상기 마이크로플레이트에 표준품을 첨가하는 단계;
- [0082] 4모수 로지스틱 곡선 적합화를 이용하여 표준 곡선을 구성하는 단계; 및
- [0083] 표준 곡선을 참고하여 IL-2R α 의 농도를 결정하는 단계.
- [0084] 일 실시형태에서, 상기 방법은 하기 단계들을 추가로 포함한다:
- [0085] 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포 집단의 TNFR1 발현을 결정하는 단계로서, 100pg/ml 이상의 TNFR1의 양은 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포의 생물학적 활성 또는 치료 효능을 나타내는, 상기 결정하는 단계. 예를 들어, 적어도 약 101pg/ml TNFR1, 적어도 약 102pg/ml TNF β 1, 적어도 약 103pg/ml TNFR1, 적어도 약 104pg/ml TNFR1, 적어도 약 105pg/ml TNFR, 적어도 약 106pg/ml TNFR1, 적어도 약 107pg/ml TNFR1, 적어도 약 108pg/ml TNFR1, 적어도 약 109pg/ml TNFR1, 또는 적어도 약 110pg/ml TNFR1, 또는 적어도 약 150pg/ml, 또는 적어도 약 200pg/ml, 또는 적어도 약 250pg/ml, 또는 적어도 약 300pg/ml, 또는 적어도 약 320pg/ml, 또는 적어도 약 330pg/ml, 또는 적어도 약 340pg/ml, 또는 적어도 약 350pg/ml의 양은 생물학적 활성 또는 치료 효능을 나타낸다.
- [0086] 본 개시내용은 또한 면역 반응의 저해가 필요한 대상체에서 면역 반응을 저해하는 방법을 제공하며, 상기 방법

은 대상체에게 본 개시내용의 MLPSC 집단을 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.

- [0087] 본 개시내용은 또한 염증 장애의 예방 또는 치료가 필요한 대상체에서 염증 장애를 예방 또는 치료하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 대상체에게 본 개시내용의 MLPSC 집단을 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 염증 장애는 T-세포 매개 염증 장애일 수 있다.
- [0088] 본 개시내용은 또한 대상체에게 본 개시내용의 MLPSC 집단을 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 이식편대숙주질환의 발생을 예방하거나, 이를 완화하거나 또는 치료하는 방법을 제공한다.
- [0089] 본 개시내용은 또한 대상체에서 이식편대숙주질환을 예방하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 대상체에게 본 개시내용의 MLPSC와 함께 공동 배양된 조혈 줄기 세포를 투여하는 단계를 포함한다.
- [0090] 일 실시형태에서, 상기 조성물은 3×10^6 개의 세포/kg 체중 미만의 용량으로 주당 1회(qw) 투여된다.
- [0091] 본 개시내용은 또한 대상체에게, MLPSC 및/또는 이의 자손 세포를 3×10^6 개의 세포/kg 체중 미만의 용량으로 주당 1회(qw) 투여하는 단계를 포함하는, 이식편대숙주질환(GVHD)의 발생을 예방하거나, 이를 완화하거나 또는 치료하는 방법을 제공한다.
- [0092] 일 실시형태에서, 대상체는 MLPSC가 약 2×10^6 개의 세포/kg 체중의 용량으로 qw 투여된다. 다른 실시형태에서, 대상체는 세포가 2×10^6 개의 세포/kg 체중의 용량으로 qw 투여된다. 다른 실시형태에서, 대상체는 2×10^6 개의 세포/kg 체중의 최대 용량으로 qw 투여된다. 의심을 피하기 위해, 용어 "1주", "매주" 또는 "qw"는 7일마다 1회의 기간을 의미하는 것으로 의도된다.
- [0093] 다른 실시형태에서, MLPSC는 주당 1회(qw)의 단일 용량으로서 투여된다. 다른 실시형태에서, MLPSC는 주당(즉, 7일) 분할된 용량으로서 투여된다. 예를 들어, 대상체는 1주 과정에 걸쳐 1×10^6 개의 세포/kg 체중의 각각의 용량으로 2회 용량을 받을 수 있다. 다른 실시형태에서, 대상체는 주당 2회 이상이 용량을 받을 수 있되, 받은 총 용량은 2×10^6 개의 세포/kg 체중이다.
- [0094] 일 실시형태에서, 이식은 동종이계 세포를 포함한다. 다른 실시형태에서, 이식은 자가 세포를 포함한다.
- [0095] 일 실시형태에서, 대상체에게 투여되는 MLPSC는 MPC 및/또는 이의 자손 세포이다.
- [0096] 다른 실시형태에서, 대상체에게 투여되는 MLPSC는 MSC 및/또는 이의 자손 세포이다.
- [0097] 일 실시형태에서, MLPSC 및/또는 이의 자손 세포는 단일 용량으로서 qw로 전달된다. 다른 실시형태에서, MLPSC 및/또는 이의 자손 세포는 1주 과정에 걸쳐 분할된 용량으로서 전달된다.
- [0098] 일 실시형태에서, 포유류 대상체는 인간 대상체이다. 일 실시형태에서, 대상체는 소아 대상체이다. 다른 실시형태에서, 대상체는 성인 대상체이다.
- [0099] 다른 실시형태에서, 본 개시내용에 따른 대상체는 혈액의 악성 종양 또는 유전적 장애(예를 들어, 암)를 갖는 대상체이다. 추가 예에서, 대상체는 조혈 세포를 포함하는 공여자 이식편을 받았거나, 받는 중이거나 또는 받을 준비 중이다.
- [0100] 조혈 세포를 포함하는 이식편은 혈액, 말초 혈액 단핵 세포(PBMC), 혈액 산물, 또는 조혈 세포가 존재하는 고형 장기로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 일례에서, 이식편은 조혈 줄기 세포(HSC)를 포함한다.
- [0101] 일 실시형태에서, 대상체는 급성 GVHD를 가진다. GVHD의 증상은 전형적으로 표준 임상 기준에 의해 등급화된다 (Glucksberg H. et al. (1974) Transplantation 1974;18(4):295-304).
- [0102] 일 실시형태에서, 대상체는 간충식 계통 전구체 또는 줄기 세포의 투여 전에 스테로이드 요법을 받았다. 일례에서, 스테로이드는 메틸프레드니솔론이다. 다른 예에서, 스테로이드는 MLPSC 및/또는 이의 자손 세포의 투여의 적어도 삼(3)일 전에 대상체에게 투여된다.
- [0103] 일 실시형태에서, 대상체는 이식편(예를 들어, 골수 또는 PBMC)을 받는 날과 동일한 날에 MLPSC 및/또는 이의 자손 세포가 투여된다.
- [0104] MLPSC 및/또는 이의 자손 세포는 이식편의 이식 동안 또는 이식 후일 수 있는 적절한 시간에 대상체에게 투여될 수 있다. 예를 들어, 예방의 목적을 위해, MLPSC 및/또는 이의 자손 세포는 이식편의 이식일에 시작해서 대상체

에게 투여될 수 있다. 다른 예에서, MLPSC 및/또는 이의 자손 세포는 이식편을 받기 전에 대상체에게 투여될 수 있다. 다른 예에서, MLPSC 및/또는 이의 자손 세포는 이식편을 받기 전 7일 내에, 5일 내에, 3일 내에 또는 2일 내에 투여될 수 있다. 다른 예에서, MLPSC 및/또는 이의 자손 세포는 이식편을 받기 전날에 대상체에게 투여된다.

[0105] 다른 실시형태에서, MLPSC 및/또는 이의 자손 세포는 대상체가 스테로이드 난치성인 것으로 결정된 후에 대상체에게 투여된다. 일반적으로 스테로이드-난치성 급성 GVHD의 정의에 대해 동의한 것은 없지만, 전형적으로 스테로이드 난치성 급성 GVHD는 스테로이드 치료 3 내지 5일 후에 악화되거나, 5 내지 7일 후에 개선되지 않거나 또는 14일 후에 완전히 경감되지 않은, GVHD를 지칭한다. 다른 예에서, MLPSC 및/또는 이의 자손 세포는 스테로이드 또는 면역억제 치료의 적어도 3일 후에 대상체에게 투여된다. 다른 예에서, MLPSC 및/또는 이의 자손 세포는 스테로이드 또는 면역억제 치료의 적어도 1개월 후에 대상체에게 투여된다. 일례에서, 스테로이드 난치성 대상체는 스테로이드(예를 들어, 메틸프레드니솔론 또는 동등물)의 적어도 3일 후에 등급 B 내지 D 급성 GVHD에 대한 스테로이드 치료에 반응하지 않은 대상체이다. 추가 예에서, 대상체는 1mg/kg/일 초과인 메틸프레드니솔론 또는 동등물에 반응하지 않았다.

[0106] 다른 실시형태에서, 대상체는 MLPSC 및/또는 이의 자손 세포의 투여 전에 비스테로이드 면역억제 요법을 받았다. 다른 예에서, 대상체는 생체의 광투석(extracorporeal photophoresis: ECP), 인플릭시맙(infliximab), 룩솔리티닙(ruxolitinib), 마이코페놀레이트 모페틸(mycophenolate mofetil: MMF), 에타너셉트(etanercept) 및 바실릭시맙으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 비스테로이드 요법을 받았다. 일례에서, MLPSC 및/또는 이의 자손 세포는 비-스테로이드성 제제에 의한 면역억제 치료에 난치성인 대상체에게 투여된다.

[0107] 일례에서, 대상체는 GVHD의 개선이 관찰될 때까지 MLPSC 및/또는 이의 자손 세포가 투여된다. 다른 예에서, 대상체는 GVHD의 관해가 관찰될 때까지 MLPSC 및/또는 이의 자손 세포가 투여된다.

[0108] 일례에서, MLPSC 및/또는 이의 자손 세포의 투여는 주입-관련 반응, 고혈압, 구토, 구역, 서맥 및 발열 중 하나 이상으로부터 선택된 이상사례를 예방하거나, 완화하거나 또는 치료한다. 일례에서, MLPSC 및/또는 이의 자손 세포의 투여는 MLPSC 및/또는 이의 자손 세포를 받지 않은 대상체에 비해 대상체에 의해 경험되는 이상사례 수를 감소시킨다.

[0109] 일례에서, 대상체는 급성 GVHD 등급 B, C 또는 D를 가진다. 다른 예에서, GVHD는 피부, 위장관 또는 간 또는 이들 조직 중 임의의 하나 이상의 조합을 수반한다.

[0110] 일례에서, GVHD는 T 세포 면역 반응의 결과이다. 일례에서, T 세포는 공여자로부터 유래되고, 항원은 수용자로부터 유래된다. 예를 들어, T 세포는 이식편 중에 존재할 수 있다. 다른 실시형태에서, T 세포는 수용자로부터 유래되고, 항원은 공여자로부터 유래된다.

[0111] 이 방법의 다른 실시형태에서, 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포는 T-세포의 공자극을 차단시키는 분자를 발현시키도록 유전자 조작된다.

[0112] 본 방법의 다른 실시형태에서, 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포는 대상체에 대한 투여 전에 배양물에서 확장되었다.

[0113] 일 실시형태에서, MLPSC 및/또는 이의 자손 세포는 약제학적으로 허용 가능한 조성물의 형태로 투여된다. 추가 예에서, 약제학적으로 허용 가능한 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체 및/또는 부형제를 포함한다.

[0114] MLPSC 및/또는 이의 자손 세포는 사(4) 연속 주의 각각에 대해 대상체에게 매주 투여될 수 있다. 다른 예에서, MLPSC 및/또는 이의 자손 세포는 8 연속주의 각각에 대해 대상체에게 매주 투여된다. 다른 예에서, 대상체의 GVHD는 4회의 매주 1회 주입 후에 평가되고, 대상체의 GVHD 반응이 부분적이거나 또는 혼합된다면, 대상체는 추가적인 4회의 매주 1회 주입을 받을 자격이 있다. 일례에서, 대상체는 최대 8회까지 MLPSC 및/또는 이의 자손 세포가 투여된다. 다른 예에서, 대상체는 총 8회의 MPC 및/또는 이의 자손 세포가 투여된다. 다른 예에서, 대상체는 적어도 부분적 또는 완전한 반응이 관찰될 때까지 매주 기준으로 MLPSC 및/또는 이의 자손 세포 주입이 투여된다.

[0115] 일 실시형태에서, 대상체에서 GVHD 상태 또는 등급화는 기준(선별)에서 제0일에 평가된다.

[0116] 다른 실시형태에서, 대상체는 GVHD 상태 또는 등급화는 제14일, 제28일, 제56일 및 제100일에 평가된다. 다른 실시형태에서, GVHD는 이들 날짜 중 일부, 예를 들어, 기준(제0일), 제28일 및 제100일에 평가된다.

- [0117] 대상체는 완전한 반응, 부분적 반응, 혼합 반응, 약화 반응을 갖거나 또는 반응이 없는 것으로 평가될 수 있다.
- [0118] 본 개시내용은 또한 포유류 대상체에서 이식편대숙주질환(GVHD)의 발생을 예방하거나 또는 이를 완화하거나 또는 치료함에 있어서 사용하기 위해 매주 기준으로 3×10^6 개 미만의 세포/kg 체중의 용량으로 MLPSC 및/또는 이의 자손 세포를 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0119] 일 실시형태에서, 조성물은 약 2×10^6 개의 세포/kg 체중의 용량으로 MLPSC 및/또는 이의 자손 세포를 포함한다. 다른 실시형태에서, 조성물은 2×10^6 개의 세포/kg 체중까지의 용량으로 MPC 및/또는 이의 자손 세포를 포함한다. 다른 실시형태에서, 조성물은 이의 2×10^6 개의 세포/kg 체중의 최대 용량을 포함한다.
- [0120] 일례에서, 조성물은 약제학적 조성물이다.
- [0121] 본 개시내용은 또한 포유류 대상체에서 GVHD의 발생을 예방하거나 또는 치료하기 위한 의약의 제조에서 3×10^6 개의 세포/kg 체중 미만의 용량으로 MLPSC 및/또는 이의 자손 세포의 용도를 제공한다. 일례에서, MLPSC 및/또는 이의 자손 세포는 이것이 필요한 대상체에게 주당 1회(qw) 투여가 의도된다.
- [0122] 일례에서, 상기 의약은 약 2×10^6 개의 세포/kg 체중의 용량으로 MLPSC 및/또는 이의 자손 세포를 포함한다. 다른 예에서, 상기 의약은 2×10^6 개의 세포/kg 체중까지의 용량으로 MLPSC 및/또는 이의 자손 세포를 포함한다. 다른 예에서, 상기 의약은 2×10^6 개의 세포/kg 체중의 최대 용량을 포함한다.
- [0123] 일례에서, 간충식 계통 전구체 또는 줄기 세포는 STRO-1^{bright} 세포가 농축된 세포 집단이다. 다른 예에서, 간충식 계통 전구체 또는 줄기 세포는 TNAP+, VCAM-1+, THY-1+, STRO-2+, STRO-4+(HSP-90 β) 및/또는 CD146+로부터 선택된 1종 이상의 추가적인 마커가 농축된 세포 집단이다.
- [0124] 일례에서, 간충식 계통 전구체 또는 줄기 세포는 간충식 줄기 세포 집단이다.
- [0125] 일례에서, MLPSC 및/또는 이의 자손 세포는 전신으로 투여된다. 예를 들어, MLPSC 및/또는 이의 자손 세포는 정맥내, 동맥내, 근육내, 피하로, 대동맥 내로, 심장의 심방 또는 심실 내로 또는기관에 연결된 혈관 내로, 예를 들어, 복대동맥, 상장간막동맥, 횡장 십이지장 동맥 또는 비장 동맥에 투여될 수 있다.
- [0126] 다른 실시형태에서, 본 개시내용의 방법은 면역억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 면역억제제는 이식된 조혈 세포가 기능성이 되도록 허용하기에 충분한 시간 동안 투여될 수 있다. 면역억제제는 다음의 코티코스테로이드, 예컨대 프레드니손, 부테소나이드 및 프레드니솔론; 칼시뉴린 저해제, 예컨대 사이클로스포린 및 타크로리무스; mTOR 저해제, 예컨대 시롤리무스 및 에베롤리무스; IMDH 저해제, 예컨대 아자티오프린, 레플루노마이드 및 마이코페놀레이트; 생물제제, 예컨대 아바타셉트, 아달리무맙, 에타너셉트, 인플릭시맙 또는 리툭시맙을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 것 중 하나 이상으로부터 선택될 수 있다.
- [0127] 일례에서, 면역억제제는 사이클로스포린이다. 사이클로스포린은 5 내지 40mg/kg 체중의 투약량으로 투여될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0128] **도 1:** 비자극된 인간 PBMC, 자극된 인간 PBMC 및 공동 배양된 인간 MPC(길고, 편평함) 및 인간 PBMC(곡선, 원형 및 일부 응집물)의 형태를 도시한 도면.
- 도 2:** 이전의 제조 조건 하에 생성된 MLPSC의 3가지 상이한 샘플(즉, 샘플 MLPSC A, MLPSC B 및 MLPSC C) 및 개선된 면역선택된 MLPSC의 3가지 상이한 샘플(즉, 샘플 MLPSC D, MLPSC E 및 MLPSC F) 상에서 수행된 T 세포 증식 분석(IL2R 저해%)의 결과를 도시한 도면.
- 도 3:** 이전의 제조 조건 하에 생성된 MLPSC의 3가지 상이한 샘플(즉, 샘플 MLPSC A, MLPSC B 및 MLPSC C) 및 개선된 면역선택된 MLPSC의 3가지 상이한 샘플(즉, 샘플 MLPSC D, MLPSC E 및 MLPSC F) 상에서 수행된 TNFR1 발현에 대한 분석의 결과를 도시한 도면.
- 도 4:** 반응자 대 비반응자 대상체에 대한 MPC의 주입 후 100일까지의 생존을 도시한 도면. 제28일에 반응한 모 든 9명의 대상체는 제100일까지 생존하였지만, 그러나, 제28일에 3명의 비반응자 중 한 명만이 제100일까지 생

존하였다(p 값 =0.0068).

도 5: 개선된 배양물에 연루된 단계들이 MLPSC 제조 공정을 확장시켰다는 것을 도시한 도면.

도 6: 개선된 제조 조건 하에 생산된 10가지의 상이한 MLPSC 로트 제품에 대해 수행한 TNFR1 발현에 대한 분석 결과를 도시한 도면.

도 7: 개선된 제조 조건 하에 생산된 10가지의 상이한 MLPSC 로트 제품에 대해 수행한 T 세포 증식 분석(IL2R 저해%) 결과를 도시한 도면.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0129] 일반적 기법 및 정의

[0130] 본 명세서 전체적으로, 달리 구체적으로 언급되거나 문맥에서 달리 요구되지 않는 한, 단일 단계, 물질의 조성물, 단계들의 그룹 또는 물질 조성물의 그룹에 대한 언급은 해당 단계들, 물질 조성물, 단계들의 그룹 또는 물질 조성물의 그룹 중 하나 그리고 복수(즉, 하나 이상)를 포함하기 위해 취해질 것이다.

[0131] 당업자는 본 명세서에 기재된 개시내용은 구체적으로 기재된 것 이외의 변화 및 변형의 영향을 받기 쉽다는 것을 인식할 것이다. 본 개시내용은 모든 이러한 변화 및 변형을 포함한다는 것이 이해되어야 한다. 본 개시내용은 또한 개개로 또는 종합적으로 본 명세서에 언급되거나 또는 나타난 단계들, 특징들, 조성물들 및 화합물들 모두, 그리고 임의의 그리고 모든 조합물 또는 상기 단계들 또는 특징들 중 임의의 둘 이상을 포함한다.

[0132] 본 개시내용은 단지 예시의 목적으로 의도되는 본 명세서에 기재된 구체적 실시형태에 의해 범주가 제한되어서는 안 된다. 기능적으로 동등한 생성물, 조성물 및 방법은 본 개시내용의 범주 내에서 명확하다.

[0133] 본 명세서에 개시된 임의의 예는 달리 구체적으로 언급되지 않는 필요한 부분만 약간 수정하여 한 임의의 다른 예를 적용하도록 취할 것이다.

[0134] 달리 구체적으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용되는 모든 기술적 및 과학적 용어는 (예를 들어, 세포 배양물, 분자 유전학, 줄기 세포 분화, 면역학, 면역조직화학, 단백질 화학 및 생물 화학에서) 당업자에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖도록 취할 것이다.

[0135] 달리 표시되지 않는 한, 본 개시내용에서 이용되는 줄기 세포, 세포 배양물 및 수술 기법은 당업자에게 잘 공지된 표준 절차이다. 이러한 기법은 문헌[Perbal, 1984; Sambrook & Green, 2012; Brown, 1991; Glover & Hames, 1995 및 1996; Ausubel., 1987, 현재까지 존재하는 모든 업데이트를 포함함; Harlow & Lane, 1988; 및 Coligan et al., 1991, 현재까지 존재하는 모든 업데이트를 포함함]과 같은 원문의 문헌 전체적으로 기재되고 설명되어 있다.

[0136] 본 명세서 및 첨부하는 청구범위에서 사용되는 단수의 용어 및 단수 형태는, 예를 들어, 문맥이 달리 명확하게 나타내지 않는 한 복수의 대상을 포함한다.

[0137] 용어 "이식편대숙주질환" 또는 "GVHD"는 숙주의 조직, 가장 빈번하게는 피부, 간 및 장이 공여자로부터의 림프구에 의해 손상되는 동종이계 조혈 세포 이식의 합병증을 지칭한다. 이 질환은 이하에 더욱 상세하게 논의한다.

[0138] 본 명세서에서 사용하는 용어 "대상체"는 인간 및 비인간 동물을 포함하는 포유류를 지칭한다. 더 구체적으로는, 포유류는 인간이다. "대상체", "환자" 또는 "개체"와 같은 용어는 문맥에서 본 개시내용에서 상호 호환 가능하게 사용될 수 있는 용어이다. 소정의 예에서, 대상체는 성인 또는 아동(소아) 대상체일 수 있다.

[0139] "유효량"은 목적하는 치료적 또는 예방적 결과를 달성하기 위해, 적어도 효과적인 양으로, 필요한 투약량으로 그리고 시간 기간 동안을 지칭한다. 유효량은 1회 이상의 투여로 제공될 수 있다. 본 개시내용의 일부 예에서, 용어 "유효량"은 본 명세서에서 앞서 기재한 것과 같은 질환 또는 병태의 치료를 달성하는 데 필요한 양을 지칭하기 위해 사용된다. 유효량은 치료될 질환 또는 병태에 따라 그리고 또한 치료 중인 포유류에 대한 체중, 연령, 인종 배경, 성별, 건강상태 및/또는 신체 상태 및 다른 인자에 따라 다를 수 있다. 전형적으로, 유효량은 의사에 의한 일상적인 시행 및 실험을 통해 결정될 수 있는 상대적으로 넓은 범위(예를 들어, "투약량" 범위) 내에 속할 것이다. 유효량은 단일 용량으로 또는 치료 기간에 걸쳐 1회 또는 수회 반복되는 용량으로 투여될 수 있다.

[0140] "치료적 유효량"은 특정 장애(예를 들어, GVHD)의 측정 가능한 개선을 달성하기 위해 필요한 적어도 최소 농도이다. 본 명세서에서 치료적 유효량은 환자의 질환 상태, 연령, 성별 및 체중과 같은 인자, 및 개체에서 목적하

는 반응을 유발하는 세포 조성물의 능력에 따라 다를 수 있다. 치료적 유효량은 조성물의 임의의 독성 또는 유해한 효과가 치료적으로 유리한 효과보다 더 큰 것이다. GVHD의 경우에, 치료적 유효량은 GVHD의 중증도를 감소시키고/시키거나 진행을 저해 또는 지연시키고/시키거나 장애와 관련된 증상 중 하나 이상을 일정한 정도로 완화시킬 수 있다.

- [0141] 본 명세서에서 사용되는 용어 "예방하는" 또는 "예방한다"는 GVHD와 관련된 증상의 중증도를 예방하고/하거나, 지연시키고/시키거나 감소시키는 것을 의미한다. 이는 GVHD의 제1 증상의 개시 후에 일어나는 "치료"와 구별된다.
- [0142] 본 명세서에서 사용되는 용어 "완화시키는"은 질환 중증도 및/또는 질환(예를 들어, GVHD)과 관련된 하나 이상의 증상의 감소를 지칭한다. 이는 질환의 완전한 실효 또는 제거를 나타내지 않는다.
- [0143] 본 명세서에서 사용되는 용어 "치료"는 임상 병리 과정 동안 치료 중인 개체 또는 세포의 자연적 과정을 변경시키도록 설계된 임상적 개입을 지칭한다. 치료의 바람직한 효과는 질환 진행 속도의 감소, 질환 상태의 완화 또는 경감 및 관해 또는 개선된 예후를 포함한다. 개체는, 예를 들어, 질환과 연관된 하나 이상의 증상이 완화되거나 또는 제거된다면, 성공적으로 "치료된다".
- [0144] 본 명세서에서 지칭되는 용어 "완전한 반응" 또는 "CR"은 2차 GVHD 요법 없이 모든 기관에서 급성 GVHD 증상의 완전한 분해로서 정의된다.
- [0145] 본 명세서에서 지칭되는 용어 "부분적 반응" 또는 "PR"은 완전한 분해 없이 그리고 임의의 다른 GVHD 표적 기관의 악화 없이, 2차 GVHD 요법 없이 모든 초기 GVHD 표적 기관에서 적어도 하나의 GVHD 단계에 의한 개선으로서 정의된다.
- [0146] 본 명세서에 지칭되는 용어 "반응 없음" 또는 "NR"은 임의의 기관에서 동일한 등급의 GVHD 또는 GVHD의 진행(예를 들어, 하나 이상의 단계에 의해 적어도 하나의 평가 가능한 기관 증상의 악화) 또는 사망, 또는 2차 GVHD 요법의 부가로서 정의된다.
- [0147] 본 명세서에서 사용되는 용어 "악화하는"은 임의의 기관에서 개선과 함께 또는 개선 없이 적어도 하나의 기관에서의 GVHD 진행의 악화를 지칭한다.
- [0148] 용어 "매우 양호한 부분적 반응(very good partial response: VGPR)"은 (i) 비진행성 1기 발진(잔여 희미한 홍반 또는 과색소침착을 포함하지 않음), (ii) 기준의 25% 미만의 총 혈청 빌리루빈 상승의 해결; 또는 (iii) 최소 위장 증상 중 하나 이상을 제외한 완전한 반응 기준의 충족을 지칭한다.
- [0149] 용어 "혼합 반응" 또는 "MR"은 다른 것에서 악화되는 적어도 하나의 평가 가능한 기관 병기의 개선을 지칭한다.
- [0150] 용어 "진행"은 임의의 다른 기관에서의 개선 없이 1 이상의 병기에 의한 적어도 하나의 기관의 악화를 지칭한다.
- [0151] 본 명세서에서 사용되는 용어 "성인"은 18세 이상의 인간 대상체를 의미한다.
- [0152] 본 명세서에서 사용되는 용어 "소아"는 출생으로부터 17세까지(17세를 포함) 범위의 인간 대상체를 의미한다.
- [0153] 본 명세서에서 사용되는 용어 "급성 GVHD"는, 예를 들어, 보통 골수 이식을 받고 처음 6개월 내에 생기는 GVHD를 지칭한다. 이는 이식편을 받고 며칠 내에 일어날 수 있다.
- [0154] 본 명세서에서 사용되는 용어 "만성 GVHD"는 보통 이식을 받고 3개월 초과 후에 시작되는 GVHD를 지칭한다. 만성 GVHD의 증상은 생애 동안 지속될 수 있다.
- [0155] 본 명세서에서 사용되는 용어 "이식편"은 골수, 혈액(예를 들어, 전혈 또는 말초 혈액 단핵 세포(PBMC), 혈액 산물 또는 조혈 세포가 존재하는 고형 장기로부터 선택되는 생물학적 샘플을 지칭한다.
- [0156] 본 명세서에서 사용되는 용어 "동종이계"는, 특히 개체 세포의 표면 상에서 발현되는 구조조직적합 복합체(MHC) 및 부조직적합 체계에 관해, 유전적 특징이 수용자와 상이한 개체에 의해 공여되는 이식편(예를 들어, 조혈 세포)을 지칭한다.
- [0157] 본 명세서에서 사용되는 용어 "자가 유래"는 대상체 자신의 세포를 사용하는 이식편(예를 들어, 골수 또는 말초 혈액 중에 존재하는 조혈 세포)을 지칭한다. 세포는 보통 치료를 받는(예를 들어, 화학요법에 의한) 대상체보다 앞서서 채취되고 나서, 저장되고, 이어서, 대상체에게 재주입된다.

- [0158] 본 명세서에서 사용되는 용어 "스테로이드 난치성"은 5 내지 7일 후에 개선되지 않거나 또는 14일 후에 완전히 경감되지 않은 스테로이드 치료의 3 내지 5일 후에 악화된 GVHD를 지칭한다.
- [0159] 용어 "및/또는", 예를 들어, "X 및/또는 Y"는 "X 및 Y" 또는 "X 또는 Y" 중 하나를 의미하는 것으로 이해되며, 의미 둘 다 또는 의미 중 하나에 대한 명확한 근거를 제공하기 위해 취해질 것이다.
- [0160] 본 명세서에서 사용되는 용어 약은, 달리 대조적으로 언급되지 않는 한, 표시된 값의 $\pm 10\%$, 더 바람직하게는 $\pm 5\%$ 를 지칭한다.
- [0161] 본 명세서 전체적으로 단어 "포함한다(comprise)", 또는 변형, 예컨대 "포함한다(comprises)" 또는 "포함하는(comprising)"은 언급된 요소, 정수 또는 단계, 또는 요소들, 정수들 또는 단계들의 그룹의 포함하며, 임의의 다른 요소, 정수 또는 단계, 요소들, 정수들 또는 단계들의 그룹을 제외하지 않는다는 것을 나타내는 것으로 이해될 것이다.
- [0162] **간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포**
- [0163] 본 명세서에서 사용되는 용어 "간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포"는 자기 재생 능력을 갖는 한편, 다능성, 및 간충직 유래 중 하나의 다수의 세포 유형, 예를 들어, 조골세포, 연골세포, 지방세포, 기질 세포, 섬유아세포 및 힘줄, 또는 비중배엽 유래, 예를 들어, 간세포, 신경 세포 및 상피세포로 분화하는 능력을 유지하는, 비분화 다능 세포를 지칭한다.
- [0164] 용어 "간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포"는 모세포와 그들의 비분화 자손을 둘 다 포함한다. 상기 용어는 또한 간충직 전구체 세포(MPC), 다능 기질 세포, 간충직 줄기 세포, 혈관주위 간충직 전구체 세포, 및 그들의 비분화 자손을 포함한다.
- [0165] 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포는 자가 유래, 동종이계, 이종성, 동계 또는 공통유전자일 수 있다. 자가 유래 세포는 그들이 재이식될 동일한 개체로부터 단리된다. 동종이계 세포는 동일한 종의 공여자로부터 단리된다. 이종성 세포는 다른 종의 공여자로부터 단리된다. 동계 또는 공통유전자 세포는 유전적으로 동일한 유기체, 예컨대 쌍둥이, 클론 또는 고도로 근친교배한 연구 동물 모델로부터 단리된다.
- [0166] 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포는 주로 골수 내에 있지만, 또한, 예를 들어, 제대혈 및 탯줄, 성인 말초 혈액, 지방 조직, 소주골 및 치수를 포함하는 다양한 숙주 조직에 존재하는 것으로 나타났다.
- [0167] 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포는 숙주 조직으로부터 단리되고 면역선택에 의해 농축될 수 있다. 예를 들어, 대상체로부터의 골수 흡입물은 추가로 STRO-1 또는 TNAP에 대한 항체로 처리되어 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포의 선택을 가능하게 할 수 있다. 일례에서, 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포는 문헌[Simmons & Torok-Storb, 1991]에 기재된 STRO-1 항체를 이용함으로써 농축될 수 있다.
- [0168] STRO-1+ 세포는 골수, 혈액, 치수 세포, 지방 조직, 피부, 비장, 췌장, 뇌, 신장, 간, 심장, 망막, 뇌, 모낭, 장, 폐, 림프절, 흉선, 뼈, 인대, 힘줄, 골격근, 진피 및 골막에서 발견되며; 생식계열, 예컨대 중배엽 및/또는 내배엽 및/또는 외배엽으로 분화할 수 있다. 따라서, STRO-1+ 세포는 지방질, 골성, 연골질, 탄성, 근육 및 섬유 결합 조직을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 매우 다수의 세포 유형으로 분화할 수 있다. 이들 세포가 유입되는 특정 계통-투입(commitment) 및 분화는 메커니즘 영향 및/또는 내인성 생활성 인자, 예컨대 성장 인자, 사이토카인, 및/또는 숙주 조직에 의해 확립된 국소 미세환경 조건으로부터의 다양한 영향에 의존한다.
- [0169] 본 명세서에서 사용되는 용어 "농축된"은 하나의 특정 세포 유형의 비율 또는 다수의 특정 세포 유형의 비율이 비처리 세포 집단(예를 들어, 천연 환경 내 세포)에 비교할 때 증가된 집단을 기재한다. 일례에서, STRO-1+ 세포가 농축된 집단은 적어도 약 0.1% 또는 0.5% 또는 1% 또는 2% 또는 5% 또는 10% 또는 15% 또는 20% 또는 25% 또는 30% 또는 50% 또는 75%의 STRO-1+ 세포를 포함한다. 이와 관련하여, 용어 "STRO-1+ 세포가 농축된 세포의 집단"은 용어 "X% STRO-1+ 세포를 포함하는 세포의 집단"에 대한 명확한 근거를 제공하기 위해 취해질 것이되, X%는 본 명세서에 인용된 바와 같은 백분율이다. STRO-1+ 세포는, 일부 예에서, 클론원성 콜로니, 예를 들어, CFU-F(섬유아세포)를 형성할 수 있거나 또는 이들의 소집단(예를 들어, 50% 또는 60% 또는 70% 또는 70% 또는 90% 또는 95%)은 이 활성을 가질 수 있다.
- [0170] 일례에서, 세포의 집단은 선택 가능한 형태로 STRO-1+ 세포를 포함하는 세포 체제로부터 농축되게 된다. 이와 관련하여, 용어 "선택 가능한 형태"는 세포가 STRO-1+ 세포의 선택을 허용하는 마커(예를 들어, 세포 표면 마커)를 발현시킨다는 것을 의미하는 것으로 이해될 것이다. 마커는 STRO-1이지만, 필요하지 않을 수 있다. 예를 들어, 본 명세서에 기재되고/되거나 예시되는 바와 같은, STRO-2 및/또는 STRO-3(TNAP) 및/또는 STRO-4 및/

또는 VCAM-1 및/또는 CD146 및/또는 3G5를 발현시키는 세포(예를 들어, MPC)는 또한 STRO-1을 발현시킨다 (STRO-1^{bright}일 수 있다). 따라서, STRO-1+라는 표시는 세포가 STRO-1 발현에 의해 선택된다는 것을 의미하지는 않는다. 일례에서, 세포는 적어도 STRO-3 발현에 기반하여 선택되며, 예를 들어, 그들은 STRO-3+(TNAP+)이다.

[0171] 세포 또는 이의 집단의 선택에 대한 언급은 특이적 조직 공급원으로부터의 선택을 반드시 필요로 하지는 않는다. 본 명세서에 기재하는 바와 같이, STRO-1+ 세포는 매우 다양한 공급원으로부터 선택되거나 단리되거나 또는 농축될 수 있다. 일부 예에서, 이들 용어는 STRO-1+ 세포를 포함하는 임의의 조직 또는 혈관 조직 또는 주 피세포(예를 들어, STRO-1+ 주피세포)를 포함하는 조직 또는 본 명세서에 인용된 조직 중 임의의 하나 이상으로부터의 선택을 위한 근거를 제공한다는 것이 언급된다.

[0172] 일례에서, 본 개시내용의 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포는 TNAP+, VCAM-1+, THY-1+, STRO-2+, STRO-4+ (HSP-90 β), CD45+, CD146+, 3G5+로 이루어진 군으로부터 개개로 또는 총괄적으로 선택되는 하나 이상의 마커를 발현시킨다.

[0173] "개개로"는 본 개시내용이 인용된 마커 또는 마커 그룹을 별개로 포함한다는 것과, 개개 마커 또는 마커의 그룹이 본 명세서에 별개로 열거되지 않을 수 있다고 해도, 수반하는 청구범위는 이러한 마커 또는 마커의 그룹을 서로로부터 별개로 그리고 나눌 수 있게 정할 수 있다는 것을 의미한다.

[0174] "총괄적으로"는 본 개시내용이 인용된 마커 또는 마커의 그룹의 임의의 수 또는 조합물을 포함한다는 것과, 마커의 이러한 수 또는 조합 또는 마커 그룹이 본 명세서에 구체적으로 열거되지 않을 수 있다고 해도, 수반하는 청구범위는 이러한 조합물 또는 하위 조합물을 마커의 임의의 다른 조합 또는 마커의 그룹과 별개로, 나눌 수 있게 정할 수 있다는 것을 의미한다.

[0175] 주어진 마커에 대해 "양성"인 것으로 지칭되는 세포는 마커가 세포 표면 상에 존재하는 정도에 따라서 해당 마커의 낮은(lo 또는 dim 또는 dull), 중간(median) 또는 높은(bright, bri) 수준 중 하나를 발현시킬 수 있으며, 여기서 상기 용어들은 세포의 분류 과정 또는 세포의 유세포 분석에서 사용되는 형광 또는 다른 마커의 강도에 관한 것이다. 낮은(lo 또는 dim 또는 dull), 중간(median) 또는 높은(bright, bri)의 구별은 정렬 중이거나 또는 분석될 특정 세포 집단에 대해 사용된 마커와 관련하여 이해될 것이다. 주어진 마커에 대해 "음성인" 것으로 지칭되는 세포는 해당 세포가 반드시 완전히 부재는 아니다. 이 용어는 마커가 세포에 의해 상대적으로 매우 저수준에서 발현되고, 검출 가능하게 표지되거나 또는 검출 가능하지 않은 상기 배경 수준, 예를 들어, 아 이소타입 대조군 항체를 이용하여 검출된 수준일 때 매우 낮은 신호를 생성한다는 것을 의미한다.

[0176] 본 명세서에서 사용되는 용어 "선명한(bright)" 또는 bri는 검출 가능하게 표지될 때 상대적으로 높은 신호를 생성하는 세포 표면 상의 마커를 지칭한다. 이론에 의해 제한되는 것을 원하지는 않지만, "선명한" 세포는 샘플 내 다른 세포보다 더 많은 표적 마커 단백질(예를 들어, STRO-1 항체에 의해 인식되는 항원)을 발현시킨다는 것이 제안된다. 예를 들어, STRO-1^{bri} 세포는 비선명 세포(STRO-1^{lo/dim/dull/intermediate/median})보다 형광 활성화된 세포 분류(FACS) 분석에 의해 결정하여 FITC-접합 STRO-1 항체로 표지할 때, 더 큰 형광 신호를 생성한다. 일례에서, 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포는 골수로부터 단리되고, STRO-1+ 세포의 선택에 의해 농축된다. 이 예에서, "선명한" 세포는 시작 샘플에 함유된 가장 선명하게 표지된 골수 단핵 세포의 적어도 약 0.1%를 구성한다. 다른 예에서, "선명한" 세포는 시작 샘플에 함유된 가장 선명하게 표지된 골수 단핵 세포의 적어도 약 0.1%, 적어도 약 0.5%, 적어도 약 1%, 적어도 약 1.5% 또는 적어도 약 2%를 구성한다. 예에서, STRO-1^{bright} 세포는 "배경", 즉, STRO-1-인 세포에 비해 STRO-1 표면 발현의 2 log 규모 더 높은 발현을 가진다. 비교에 의해, STRO-1^{lo/dim/dull} 및/또는 STRO-1^{intermediate/median} 세포는 STRO-1 표면 발현의 2 log 규모 더 높은 발현 미만, 전형적으로 "배경"보다 약 1 log 이하이다.

[0177] 일례에서, STRO-1+ 세포는 STRO-1^{bright}이다. 일례에서, STRO-1^{bright} 세포는 STRO-1^{lo/dim/dull} 또는 STRO-1^{intermediate/median} 세포에 비해 우선적으로 농축된다.

[0178] 일례에서, STRO-1^{bright} 세포는 추가적으로 TNAP+, VCAM-1+, THY-1+, STRO-2+, STRO-4+(HSP-90 β) 및/또는 CD146+ 중 하나 이상이다. 예를 들어, 세포는 앞서 언급한 마커 중 하나 이상에 대해 선택되고/되거나 앞서 언급한 마커 중 하나 이상을 발현시키는 것으로 나타난다. 이와 관련하여, 마커를 발현시키는 것으로 나타난 세포는 구체적으로 시험될 필요는 없으며, 오히려 이전에 농축된 또는 단리된 세포는 시험되고 후속적으로 사용될 수 있고, 단리되거나 또는 농축된 세포는 또한 동일한 마커를 발현시키는 것으로 함의적으로 추정될 수 있다.

- [0179] 일례에서, STRO-1^{bright} 세포는 혈관주위 마커 3G5의 존재에 의해 특성규명된 WO 2004/85630에 정의된 바와 같은 혈관주위 간충직 전구체 세포이다.
- [0180] 본 명세서에서 사용되는 용어 "TNAP"는 조직 비특이적 알칼리성 포스파타제의 모든 동형체(isoform)를 포함하는 것으로 의도된다. 예를 들어, 상기 용어는 간 동형체(LAP), 뼈 동형체(BAP) 및 신장 동형체(KAP)를 포함한다. 일례에서, TNAP는 BAP이다. 일례에서, TNAP는 기탁 등록 번호 PTA-7282 하에 부다페스트 협약의 제공 하에 2005년 12월 19일자로 ATCC에 의해 기탁된 혼성 세포주에 의해 생성된 STRO-3 항체에 결합할 수 있는 분자를 지칭한다.
- [0181] 더 나아가, 일례에서, STRO-1+ 세포는 클론원성 CFU-F가 생기게 할 수 있다.
- [0182] 일례에서, 상당한 비율의 STRO-1+ 세포는 적어도 2개의 상이한 생식계열로 분화할 수 있다. 세포가 자살하는 계통의 비제한적 예는 골 전구체 세포; 담관 상피세포 및 간세포에 다능성인 간세포 전구체; 회소돌기신경교 및 성상 세포로 진행되는 교세포 전구체를 생성할 수 있는 신경 제한 세포; 뉴런으로 진행되는 뉴런 전구체; 심장근 및 심장 근육 세포, 글루코스-반응성 인슐린 분비 체장 베타 세포주에 대한 전구체를 포함한다. 다른 계통은 상아질모세포, 상아질-생성 세포 및 연골세포, 및 다음의 전구체 세포: 망막 색소 상피세포, 섬유아세포, 피부 세포, 예전대 각질세포, 수지상 세포, 모낭 세포, 신장관 상피세포, 평활근 및 골격근 세포, 고환 전구체, 혈관 내피세포, 힘줄, 인대, 연골, 지방세포, 섬유아세포, 골수 기질, 심장근, 평활근, 골격근, 주피세포, 혈관, 상피, 교세포, 뉴런, 성상 세포 및 회소돌기신경교 세포를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.
- [0183] 일례에서, 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포는 간충직 줄기 세포(mesenchymal stem cell: MSC)이다. MSC는 균질한 조성물일 수 있거나 또는 MSC에서 농축된 혼합 세포 집단일 수 있다. 균질한 MSC 조성물은 부착 골수 또는 골막세포를 배양시킴으로써 얻을 수 있고, MSC는 독특한 단클론성 항체로 동정된 특이적 세포 표면 마커에 의해 동정될 수 있다. 플라스틱 부착 기술을 이용하여 MSC에서 농축된 세포 집단을 얻기 위한 방법은, 예를 들어, 미국 특허 제5486359호에 기재되어 있다. 통상적인 플라스틱 부착 단리에 의해 제조된 MSC는 CFU-F의 비특이적 플라스틱 부착 특성에 의존한다. MSC에 대한 대안의 공급원은 혈액, 피부, 체대혈, 근육, 지방, 뼈 및 연골막을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.
- [0184] 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포는 대상체에 대한 투여 전에 동결보존될 수 있다.
- [0185] 본 발명의 바람직한 실시형태에서, 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포는 건강한 지원자의 골수로부터 농축된 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포로부터 유래된 마스터 세포뱅크로부터 얻어진다. 이러한 공급원으로부터 유래된 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포의 사용은 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포 공여자로서 작용할 수 있거나, 또는 즉시 치료가 필요하고 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포를 생성하는 시간 동안에 높은 재발 위험, 질환 관련 쇠퇴 또는 사망이 있는, 이용 가능한 적절한 패밀리 구성원을 갖지 않는 대상체에 대해 특히 유리하다.
- [0186] 본 발명자들은 본 개시내용의 간충직 전구체 세포가 동결보존 및 해동 후에 T 세포 증식을 저해하는 그들의 능력에 관해 예상치 못하게 높은 효능을 가진다는 것을 나타낸다. 대조적으로, 선행 간행물은 동결보존된 간충직 줄기 세포가 해동 후 손상된 면역억제 특성을 나타낸다는 것을 교시한다(Francois et al., 2012; Chinnadurai et al., 2016).
- [0187] 단리된 또는 농축된 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포는 배양물에 의해 생체외 또는 시험관내로 확장될 수 있다. 당업자에 의해 인식될 바와 같이, 단리된 또는 농축된 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포는 동결보존되고, 해동되고, 그리고 후속적으로 또는 추가로 배양물에 의해 생체외에서 또는 시험관내에서 확장될 수 있다.
- [0188] 배양된 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포는 생체내에서 세포와 표현형이 상이하다. 예를 들어, 일 실시형태에서, 그들은 다음의 마커, CD44, NG2, DC146 및 CD140b 중 하나 이상을 발현시킨다.
- [0189] 배양된 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포는 생체내에서 크게 비순환(휴지) 세포에 비해 더 고비율의 증식을 갖는, 생체내 세포와 생물학적으로 상이하다.
- [0190] 일례에서, 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포가 농축된 세포 집단은 혈청-보충된 배양 배지, 예를 들어, 10% 소태아 혈청(fetal bovine serum: FBS) 및 2mM 글루타민으로 보충된 돌베코 변형 이글 배지(Dulbecco's Modified Eagle medium: DMEM)에서 약 6000 내지 7000개의 생세포/cm²로 파종되고, 37°C, 20% O₂에서 밤새 배양 용기에 부착되게 하였다. 실시형태에서, 세포는 약 6000, 6100, 6200, 6300, 6400, 6500, 6600, 6700, 6800,

6810, 6820, 6830, 6840, 6850, 6860, 6870, 6880, 6890, 6890, 6900, 6910, 6920, 6930, 6940, 6970, 6980, 6990 또는 7000개의 생세포/cm², 바람직하게는 약 6850 내지 6860개의 생세포/cm²로 파종된다. 배양 배지 후속적으로 대체되고 세포는 37°C, 5% O₂에서 총 68 내지 72시간 동안 배양된 후에 T 세포와 함께 공동배양하고, T 세포에 의해 발현되는 IL-2R α 의 양을 결정한다.

[0191] **Ang1 및 VEGF 수준**

[0192] 예에서, 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포는 적어도 0.1 μ g/106개 세포의 양으로 Ang1을 발현시킨다. 그러나, 다른 예에서, MLPSC는 적어도 0.2 μ g/106개의 세포, 0.3 μ g/106개의 세포, 0.4 μ g/10⁶개의 세포, 0.5 μ g/10⁶개의 세포, 0.6 μ g/10⁶개의 세포, 0.7 μ g/10⁶개의 세포, 0.8 μ g/10⁶개의 세포, 0.9 μ g/10⁶개의 세포, 1 μ g/10⁶개의 세포, 1.1 μ g/10⁶개의 세포, 1.2 μ g/10⁶개의 세포, 1.3 μ g/10⁶개의 세포, 1.4 μ g/10⁶개의 세포, 1.5 μ g/10⁶개의 세포의 양으로 Ang1을 발현시킨다.

[0193] 다른 예에서, MLPSC는 약 0.05 μ g/10⁶개의 세포 미만의 양으로 VEGF를 발현시킨다. 그러나, 다른 예에서, 간충직 전구체 세포는 약 0.05 μ g/10⁶개의 세포, 0.04 μ g/10⁶개의 세포, 0.03 μ g/10⁶개의 세포, 0.02 μ g/10⁶개의 세포, 0.01 μ g/10⁶개의 세포, 0.009 μ g/10⁶개의 세포, 0.008 μ g/10⁶개의 세포, 0.007 μ g/10⁶개의 세포, 0.006 μ g/10⁶개의 세포, 0.005 μ g/10⁶개의 세포, 0.004 μ g/10⁶개의 세포, 0.003 μ g/10⁶개의 세포, 0.002 μ g/10⁶개의 세포, 0.001 μ g/10⁶개의 세포 미만의 양으로 VEGF를 발현시킨다.

[0194] MLPSC의 조성물 또는 배양물에서 발현되는 세포의 Ang1 및/또는 VEGF의 양은 당업자에게 공지된 방법에 의해 결정될 수 있다. 이러한 방법은 정량적 분석, 예컨대 정량적 ELISA 분석을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 본 예에서, 간충직 전구체 세포의 배양물로부터의 세포 용해물은 ELISA 플레이트의 웰에 첨가된다. 웰은 Ang1 또는 VEGF에 대해 1차 항체, 즉, 단클론성 또는 다클론성 항체(들) 중 하나로 코팅될 수 있다. 이어서, 웰은 세척되고, 이어서, 1차 항체에 대해 2차 항체, 즉, 단클론성 또는 다클론성 항체(들)와 접촉된다. 2차 항체는 적절한 효소, 예컨대 겨자무과산화효소에 접합된다. 이어서, 웰은 인큐베이션될 수 있고, 이어서, 인큐베이션 기간 후에 세척된다. 이어서, 웰은 2차 항체, 예컨대 1종 이상의 색원체에 접합되는 효소에 대한 적절한 기질과 접촉된다. 사용될 수 있는 색원체는 과산화수소 및 테트라메틸 벤지딘을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 기질이 첨가된 후에, 웰은 적절한 시간 기간 동안 인큐베이션된다. 인큐베이션의 완료 시, "정지" 용액은 기질(들)과 효소의 반응을 중단시키기 위해 웰에 첨가된다. 이어서, 샘플의 광학 밀도(optical density: OD)가 측정된다. 샘플의 광학 밀도는 시험 중인 줄기 세포 배양에 의해 발현되는 Ang1 또는 VEGF의 양을 결정하기 위해 알려진 양의 Ang1 또는 VEGF를 함유하는 샘플의 광학 밀도와 상관관계가 있다.

[0195] 다른 예에서, MLPSC는 적어도 약 2:1의 비로 Ang1:VEGF를 발현시킨다. 그러나, 다른 예에서, 간충직 전구체 세포는 적어도 약 10:1, 15:1, 20:1, 21:1, 22:1, 23:1, 24:1, 25:1, 26:1, 27:1, 28:1, 29:1, 30:1, 31:1, 32:1, 33:1, 34:1, 35:1, 50:1의 비로 Ang1:VEGF를 발현시킨다.

[0196] Ang1:VEGF 발현 비를 결정하기 위한 방법은 당업자에게 명확할 것이다. 예를 들어 Ang1 및 VEGF 발현 수준은 상기 논의한 바와 같이 정량적 ELISA를 통해 정량화될 수 있다. Ang1 및 VEGF 수준을 정량화한 후에, Ang1 및 VEGF의 정량화된 수준에 기반한 비는: (Ang1의 수준/VEGF의 수준) = Ang1:VEGF 비로서 나타낼 수 있다.

[0197] 예에서, 본 개시내용의 MLPSC는 상기 예시된 수준 또는 비로 Ang1 및/또는 VEGF를 발현시키도록 유전자 변형되지 않는다. Ang1 및/또는 VEGF를 발현시키기 위해 유전자 변형되지 않는 세포는 Ang1 및/또는 VEGF를 발현시키거나 또는 암호화하는 핵산에 의한 형질감염에 의해 변형되지 않았다. 의심을 피하기 위해, 본 개시내용과 관련하여, Ang1 및/또는 VEGF를 암호화하는 핵산으로 형질감염된 간충직 전구체 세포는 유전자 변형되는 것으로 고려된다. 본 개시내용과 관련하여 Ang1 및/또는 VEGF를 발현시키도록 유전자 변형되지 않은 세포는 Ang1 및/또는 VEGF를 암호화하는 핵산에 의한 형질감염 없이 일정한 정도로 Ang1 및/또는 VEGF를 자연적으로 발현시킨다.

[0198] **T 세포**

[0199] 본 개시내용의 효능 분석은 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포와 T-세포의 공동 배양을 필요로 한다. 실시형태에서, 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포는 적어도 하나의 T-세포 자극 리간드를 포함하는 배양 배지에서 T-세포와 공동배양된다. 실시형태 또는 추가 실시형태에서, T 세포는 활성화된다. T 세포는 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포와 공동 배양 전에 처음 자극되거나 또는 활성화될 수 있다.

- [0200] 본 명세서에서 사용되는 용어 "T-세포"는 다양한 세포-매개 면역 반응에 참여하는 흉선-유래 세포를 지칭한다.
- [0201] 본 명세서에서 사용되는 용어 "자극"은 자극 분자(예를 들어, TCR/CD3 복합체)와 그의 동족 리간드의 결합에 의해 유도됨으로써, 신호 전달 사건, 예컨대, 이하로 제한되는 것은 아니지만, TCR/CD3 복합체를 통한 신호 전달을 매개하는 1차 반응을 의미한다. 자극은 소정의 분자의 변경된 발현, 예컨대 TGF- β 의 하향조절, 및/또는 세포골격 구조의 재조직화 등을 매개할 수 있다.
- [0202] 본 명세서에서 사용되는 용어 "활성화"는 검출 가능한 세포 증식을 유도하도록 충분히 자극된 T 세포의 상태를 지칭한다. 활성화는 또한 유도된 사이토카인 생산, 및 검출 가능한 효과기 기능과 연관될 수 있다. 용어 "활성화된 T 세포"는, 특히, 세포 분할을 겪고 있는 T 세포를 지칭한다.
- [0203] 최근에 활성화된 T 세포는 전형적으로 활성화 후 상이한 시점에 일련의 활성화 마커를 발현시킬 것이다. 활성화 마커는 케모카인 및 사이토카인 수용체, 부착 분자, 공자극 분자 및 MHC-클래스 II 단백질과 같은 수용체를 포함한다. 유세포분석기는 T 세포의 활성화 상태를 나타내는 다양한 유형의 표면 또는 세포내 마커를 평가하기 위해 사용될 수 있다. 인간 말초 혈액 단핵구(PBMC) T 세포의 활성화를 평가하기 위한 가장 통상적으로 사용되는 급조기 활성화 마커 중 둘은 CD69 및 CD40L이다.
- [0204] CD69(AIM, Leu23, MLR3)는 T 세포 증식을 유도하는데 수반되는 신호전달 막 당단백질이다. CD69는 전형적으로 PBMC(<5 내지 10%) 중의 남아있는 CD4+ 또는 CD8+ T 세포에서 매우 저수준으로 발현되고, 가장 초기의 평가 가능한 활성화 마커 중 하나이며, TCR 자극의 1시간 이내에 CD4+ 또는 CD8+ T 세포 또는 단백질 키나제 C(PKC)의 존적 경로를 통해 다른 T 세포 활성화체, 예컨대 포볼 에스터 상에서 빠르게 상향조절된다. CD69의 발현은 전형적으로 16 내지 24시간까지 최대이고, 이어서, 자극이 중단되고 72시간 후에 거의 검출 가능하지 않게 감소한다.
- [0205] CD40L(CD154)은 항원 제시 세포(APC) 상에서 구성적으로 발현된 CD40에 의해 공자극 분자로서 작용하는 TNF-수용체 슈퍼패밀리의 구성원이다. CD40L-CD40 결합은 MAPK(JNK, p38, ERK1/2), NF- κ B 및 STAT3 전사 인자를 포함하는 다중 하류 경로의 활성화를 초래한다. CD40L 발현은 전사 인자 NFAT 및 AP-1을 통한 TCR 자극 후에 1 내지 2시간 이내에 빠르게 상향조절된다. CD40L 발현은 자극 후 6시간 근처에서 최대이고, 16 내지 24시간까지 감소한다. 그러나 CD40L 발현은 2상이고, TCR 자극과 함께 항-CD28 또는 IL-2의 첨가는 전형적으로 며칠 동안 지속되는 발현을 야기한다.
- [0206] 본 명세서에서 사용되는 "특이적으로 결합하는"은 샘플에 존재하는 동족 결합 상대(예를 들어, T 세포 상에 존재하는 자극 및/또는 공자극 분자)를 인식하고 이에 결합하지만, 샘플 내 다른 분자를 실질적으로 인식하거나 또는 이에 결합하지 않는 리간드, 예를 들어, 항체를 의미한다.
- [0207] 본 명세서에서 사용되는 용어 "자극 리간드"는 T 세포 상에서 동족 결합 상대(본 명세서에서 "자극 분자"로서 지칭됨)와 특이적으로 결합함으로써, T 세포에 의한 1차 반응을 매개할 수 있는 리간드를 의미한다. 자극 리간드는 당업계에 잘 공지되어 있으며, 특히, 펩타이드, 항-CD3 항체, 과작용제(superagonist) 항-CD28 항체 및 과작용제 항-CD2 항체가 부하된 MHC 클래스 I 분자를 포함한다. 자극 리간드는 가용성 형태로 사용되거나, 발현되거나 또는 세포 표면에 부착되거나 또는 표면 상에 고정될 수 있다.
- [0208] 본 명세서에서 사용되는 "과작용성 항체"는 T 세포 상에서 분자에 특이적으로 결합하는 항체를 의미하고, T 세포 상의 TCR/CD3 복합체 또는 CD2의 상호작용 없이 T 세포에서 1차 활성화 신호 사건을 매개할 수 있다. 예시적인 과작용성 항체는 과작용성 항-CD28 항체 및 과작용성 항-CD2 항체를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. "과작용성"으로서 지칭되지 않는다면, 항-CD2 항체, 또는 항-CD28 항체 등은 본 명세서의 다른 곳에 정의되는 바와 같은 공-자극 리간드이고, 1차 활성화 신호보다는 공자극 신호를 제공한다.
- [0209] 본 명세서에서 사용되는 "자극 분자"는 동족 자극 리간드에 특이적으로 결합하는 T 세포 상의 분자를 의미한다.
- [0210] 본 명세서에서 사용되는 "공자극 신호"는 1차 신호, 예컨대 TCR/CD3 결합과 조합하여, T 세포 반응, 예컨대, 이하로 제한되는 것은 아니지만, 활성화, 증식, 효과기 세포로의 분화, 세포독성의 유도 또는 사이토카인 분비를 매개하는 신호를 지칭한다.
- [0211] 본 명세서에서 사용되는 용어 "공-자극 리간드"는 항원 제시 세포(APC)(예를 들어, 수지상 세포, B 세포 등) 상에 분자 또는 T 세포 상의 동족 공자극 분자에 특이적으로 결합하는 인공 APC(aAPC)를 포함하고, 이에 의해, 예를 들어, 펩타이드가 부하된 MHC 분자와의 TCR/CD3 복합체의 결합에 의해 제공된 1차 신호에 추가로, 활성화, 증식, 효과기 세포로의 분화, 세포독성의 유도 또는 사이토카인 분비를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 T 세포 반응을 매개하는 신호를 제공한다. 공자극 리간드는 CD7, B7-1(CD80), B7-2(CD86), PD-L1, PD-L2, 4-1BBL,

OX40L, 유도성 공자극 리간드(ICOS-L), 세포내 부착 분자(ICAM), CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, MICB, HVEM, 림프톡신 베타 수용체, 3/TR6, ILT3, ILT4, HVEM, Toll 리간드 수용체에 결합하는 작용제 또는 항체 및 B7-H3에 특이적으로 결합하는 리간드를 포함할 수 있지만, 이들로 제한되지 않는다. 공자극 리간드는 또한, 특히, T 세포 상에 존재하는 공자극 분자에 특이적으로 결합하는 항체, 예컨대, 이하로 제한되는 것은 아니지만, CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, 림프구 기능-연관 항원-1(LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 및 CD83에 특이적으로 결합하는 리간드를 포함한다. 이들 및 다른 리간드는 당업계에 잘 공지되어 있고, 예를 들어, 문헌[Schwartz et al., 2001; Schwartz et al., 2002; 및 Zhang et al., 2004]에 기재된 바와 같이 잘 특성규명되었다. 당업자는 공지된 리간드의 돌연변이체 또는 변이체가 사용될 수 있으며 이러한 돌연변이체 및 변이체를 생성하는 방법이 당업계에 잘 공지되어 있다는 것을 인식할 것이다.

[0212] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "aAPC"는 세포 기반 aAPC, 비드 기반 APC, 마이크로입자 aAPC 및 나노입자 aAPC를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 사용된 물질은 유리, 폴리(글리콜산), 폴리(락트-코-글리콜산), 산화철, 리포솜, 지질 이중층, 세파로스 및 폴리스타이렌을 포함한다. aAPC는 자극 리간드, 예를 들어, 1차 신호가 전달되도록 TCR/CD3 복합체에 특이적으로 결합하는 자극 리간드를 포함한다. aAPC는 T 세포 상에 존재하는 적어도 하나의 공-자극 분자에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 공자극 리간드를 추가로 포함할 수 있다.

[0213] 본 개시내용에 대한 목적을 위해, 용어 "항체"는 Fv 내에 함유된 항원 결합 도메인에 의해 T 세포 상의 자극 분자에 특이적으로 결합할 수 있는 단백질을 포함한다. 상기 용어는 4쇄 항체(예를 들어, 2개의 경(L)쇄 및 2개의 중(H)쇄), 재조합 또는 변형된 항체(예를 들어, 키메라 항체, 인간화된 항체, 인간 항체, CDR-접합 항체, 영장류화된 항체, 탈면역화된 항체, 유사인간화된 항체, 절반-항체, 이중특이성 항체)를 포함한다.

[0214] 본 명세서에서 사용되는, "가변 영역"은 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 본 명세서에 정의된 바와 같은 항체의 경쇄 및/또는 중쇄의 일부를 지칭하고, 상보성 결정 영역(complementarity determining region: CDR), 즉, CDR1, CDR2 및 CDR3, 및 프레임워크(framework region: FR)의 아미노산 서열을 포함한다. 예를 들어, 가변 영역은 3개의 CDR과 함께 3 또는 4개의 FR(예를 들어, FR1, FR2, FR3 및 선택적으로 FR4)을 포함한다. V_H 는 중쇄의 가변 영역을 지칭한다. V_L 는 경쇄의 가변 영역을 지칭한다.

[0215] 본 명세서에서 사용되는 용어 "상보성 결정 영역"(CDR과 동의어, 즉, CDR1, CDR2 및 CDR3)은 항체 가변 영역의 아미노산 잔기를 지칭하며, 이의 존재는 특정 항원 결합에 대한 주된 기여자이다. 각각의 가변 영역 도메인(V_H 또는 V_L)은 전형적으로 CDR1, CDR2 및 CDR3으로서 동정된 3개의 CDR영역을 가진다.

[0216] "프레임워크 영역"(FR)은 CDR 잔기 이외의 해당 가변 영역 잔기이다.

[0217] 본 명세서에서 사용되는 용어 "Fv"는 다중 폴리펩타이드를 포함하든 또는 단일 폴리펩타이드를 포함하든 임의의 단백질을 의미하기 위해 취할 것이며, 이때 V_L 과 V_H 는 결합하고, 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 도메인을 갖는 복합체를 형성한다. 항원 결합 도메인을 형성하는 V_H 및 V_L 은 단일 폴리펩타이드에 또는 상이한 폴리펩타이드 쇄에 있을 수 있다. 더 나아가, 본 개시내용의 Fv(뿐만 아니라 본 개시내용의 임의의 단백질)는 동일한 항원에 결합할 수도 있고 또는 결합하지 않을 수도 있는 다중 항원 결합 도메인을 가질 수 있다. 이 용어는 항체로부터 직접적으로 유래된 단편뿐만 아니라 재조합 수단을 이용하여 생성된 이러한 단편에 대응하는 단백질을 포함하는 것으로 이해될 것이다. 일부 예에서, V_H 는 중쇄 불변 도메인(C_H) 1에 연결되지 않고/않거나 V_L 은 경쇄 불변 도메인(C_L)에 연결되지 않는다. 예시적인 Fv 함유 폴리펩타이드 또는 단백질은 Fab 단편, Fab' 단편, F(ab') 단편, scFv, 다이머바디, 트라이머바디, 테트라바디 또는 더 고차의 복합체, 또는 이들의 불변 영역 또는 도메인, 예를 들어, C_H2 또는 C_H3 도메인, 예를 들어, 미니바디에 연결된 앞서 언급한 것 중 어떤 것을 포함한다.

[0218] "Fab 단편"은 면역글로불린의 1가 항원-결합 단편으로 이루어지고, 무손상 경쇄 및 중쇄의 일부로 이루어진 단편을 수득하기 위해 효소 파파인에 의한 전체 항체의 분해에 의해 생성될 수 있거나 재조합 수단을 이용하여 생성될 수 있다.

[0219] 항체의 "Fab' 단편"은 펩신으로 전체 항원을 처리한 다음에 환원시켜, V_H 및 단일 불변 도메인을 포함하는 무손상 경쇄 및 중쇄의 일부로 이루어진 분자를 수득함으로써 얻을 수 있다. 2개의 Fab' 단편은 이런 방식으로 처리

되는 항체마다 얻어진다. Fab' 단편은 재조합 수단에 의해 생성될 수 있다.

- [0220] 항체의 "F(ab')₂ 단편"은 2개의 이황화결합에 의해 함께 보유되는 2개의 Fab' 단편의 이량체로 이루어지고, 후속적 환원 없이 전체 항체 분자를 효소 펩신으로 처리함으로써 얻어진다.
- [0221] "Fab₂" 단편은, 예를 들어, 류신 지퍼 또는 C₄H₃ 도메인을 이용하여 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 재조합 단편이다.
- [0222] "단일쇄 Fv" 또는 "scFv"는 경쇄의 가변 영역 및 중쇄의 가변 영역이 적합한, 가요성 폴리펩타이드 링커에 의해 공유 결합되는 항체의 가변 영역 단편(Fv)을 함유하는 재조합 분자이다.
- [0223] T 세포 자극
- [0224] 본 개시내용의 일 실시형태에서, T 세포는 단일 제제에 의해 자극될 수 있다. 다른 실시형태에서, T 세포는 2가지의 제제, 즉, 1차 신호를 유도하는 하나 및 공자극 신호인 두 번째로 자극된다.
- [0225] 단일 신호를 자극하거나 또는 1차 신호를 자극하는 데 유용한 리간드 및 2차 신호를 자극하는 부속 분자는 가용성 형태로 사용되거나, 발현되거나 또는 세포 표면에 부착되거나 또는 표면 상에 고정될 수 있다.
- [0226] 표면은 그에 결합되거나 또는 통합되고, 생체적합성인, 즉, 자극될 표적 세포에 대해 실질적으로 비독성인 제제/리간드를 가질 수 있는 임의의 표면일 수 있다. 생체적합성 표면은 생체분해성 또는 비-생체분해성일 수 있다. 표면은 천연 또는 합성일 수 있고, 합성면은 중합체일 수 있다.
- [0227] 제제는 당업계에 공지되고 입수 가능한 다양한 방법에 부착되거나 또는 결합되거나 또는 통합될 수 있다. 제제는 천연 리간드, 단백질 리간드 또는 합성 리간드일 수 있다. 부착은 공유 또는 비공유, 정전기 또는 소수성일 수 있고, 예를 들어, 화학적, 기계적, 효소적, 정전기적 또는 다른 수단을 포함하는 다양한 부착 수단에 의해 달성되며, 이에 의해 리간드는 세포를 자극할 수 있다. 예를 들어, 리간드에 대한 항체는 처음에 표면에 부착될 수 있거나, 또는 아비딘 또는 스트렙타비딘은 바이오틴일화된 리간드에 대한 결합을 위해 표면에 부착될 수 있다. 리간드에 대한 항체는 항-개별특이형(anti-idiotypic) 항체를 통해 표면에 부착될 수 있다. 다른 예는 항체에 결합하도록 표면에 부착되는 단백질 A 또는 단백질 G, 또는 다른 비특이적 항체 결합 분자를 이용하는 것을 포함한다. 대안적으로, 리간드는 화학적 수단, 예컨대 표면에 대한 가교에 의해, 상업적으로 입수 가능한 가교 시약(일리노이주 락포드에 소재한 피어스(Pierce)) 또는 다른 수단을 이용하여 표면에 부착될 수 있다.
- [0228] 표면에 부착된 특정 리간드의 양은 표면이 비드의 표면이라면 유세포분석에 의해 용이하게 결정되거나 또는 표면이, 예를 들어, 조직 배양 접시, 메쉬, 섬유, 백(bag)이라면, 효소-결합 면역흡착 분석(ELISA)에 의해 결정될 수 있다.
- [0229] 표면에 결합될 때, 제제는 동일한 표면에(즉, "시스" 형성으로) 또는 별개의 표면에(즉, "트랜스" 형성으로) 결합될 수 있다. 대안적으로, 1종의 제제는 용액 중에서 표면 및 다른 제제에 결합될 수 있다. 일 실시형태에서, 공자극 신호를 제공하는 제제는 세포 표면에 결합되고, 1차 활성화 신호를 제공하는 제제는 용액 중에 있거나 또는 표면에 결합된다. 바람직한 실시형태에서, 2종의 제제가 동일한 비드 상에, 즉, "시스" 또는 별개의 비드에, 즉, "트랜스"로 비드 상에 고정된다.
- [0230] 일 실시형태에서, 1차 활성화 신호를 제공하는 분자는 CD3 리간드이고, 공자극 분자는 CD28 리간드이다. 바람직한 실시형태에서, CD3 리간드는 항-CD3 항체 또는 이의 단편이고, CD28 리간드는 항-CD28 항체 또는 이의 단편이다. 일 실시형태에서, 항-CD3 항체 또는 이의 단편 및 항-CD28 항체 또는 이의 단편은 가용성 형태로 사용된다. 대안의 실시형태에서, 항-CD3 항체 또는 이의 단편 및 항-CD28 항체 또는 이의 단편 중 하나 또는 둘 다는 표면 상에 고정된다. 일 실시형태에서, 항-CD3 항체 또는 이의 단편 및 항-CD28 항체 또는 이의 단편은 둘 다 동일한 표면, 예를 들어, 비드 상에 공동 고정된다.
- [0231] 일 실시형태에서, 비드에 결합된 CD3:CD28 항체의 비는 100:1 내지 1:100 및 그 사이에 있는 모든 정수값의 범위이다. 본 발명의 일 양상에서, 더 많은 항-CD28 항체는 항-CD3 항체보다는 입자에 결합되고, 즉, CD3:CD28의 비는 1 미만이다. 본 발명의 소정의 실시형태에서, 비드에 결합된 항 CD28 항체 대 항 CD3 항체는 2:1 초과이다. 하나의 특정 실시형태에서, 비드에 결합된 항체의 1:100의 CD3:CD28 비가 사용된다. 다른 실시형태에서, 비드에 결합된 항체의 1:75의 CD3:CD28 비가 사용된다. 추가 실시형태에서, 비드에 결합된 항체의 1:50의 CD3:CD28 비가 사용된다. 다른 실시형태에서, 비드에 결합된 항체의 1:30의 CD3:CD28 비가 사용된다. 하나의 바람직한 실시형태에서, 비드에 결합된 항체의 1:10의 CD3:CD28 비가 사용된다. 다른 실시형태에서, 비드에 결합

된 항체의 1:3의 CD3:CD28 비가 사용된다. 또 다른 실시형태에서, 비드에 결합된 항체의 3:1의 CD3:CD28 비가 사용된다.

[0232] 당업자는 T 세포의 자극을 위해 사용되는 제제(들)는 T 세포 반응, 예컨대, 이하로 제한되는 것은 아니지만, 활성화, 증식, 효과기 세포로의 분화, 세포독성의 유도 또는 사이토카인 분비를 매개하는 데 충분한 양으로 제공된다는 것을 인식할 것이다. 바람직하게는, T 세포의 자극을 위해 사용되는 제제(들)는 T 세포 증식을 매개하는 데 충분한 양으로 제공된다.

[0233] T 세포의 공급원

[0234] 자극/활성화 전에, T 세포의 공급원은 대상체로부터 얻는다. 용어 "대상체"는 면역 반응이 유발될 수 있는 살아있는 유기체(예를 들어, 포유류)를 포함하도록 의도된다. 대상체의 예는 인간, 개, 고양이, 마우스, 래트 및 이들의 유전자식 종을 포함한다. T 세포는 말초 혈액 단핵 세포, 골수, 림프절 조직, 제대혈, 흉선 조직, 감염 부위로부터의 조직, 복수, 흉수, 비장 조직 및 종양을 포함하는, 다수의 공급원으로부터 얻을 수 있다. 본 발명의 소정의 실시형태에서, 당업계에서 입수 가능한 다수의 T 세포주가 사용될 수 있다. 본 발명의 소정의 실시형태에서, T 세포는 당업자에게 공지된 다수의 기법, 예컨대 피콜(ficoll) 분리를 이용하여 대상체로부터 수집한 혈액 단위로부터 얻을 수 있다. 하나의 바람직한 실시형태에서, 개체의 순환 혈액으로부터의 세포는 분리반출법 또는 백혈구분리반출법에 의해 얻는다. 분리반출법 생성물은 전형적으로 T 세포, 단핵구, 과립구, B 세포, 다른 유핵 백혈구, 적혈구 및 혈소판을 포함하는, 림프구를 함유한다. 일 실시형태에서, 분리반출법에 의해 수집된 세포는 혈장 분획을 제거하기 위해 그리고 후속 단계를 위해 적절한 완충제 또는 배지에 세포를 넣기 위해 세척될 수 있다. 일 실시형태에서, 세포는 인산염 완충 식염수(phosphate buffered saline: PBS)로 세척된다. 대안의 실시형태에서, 세척 용액은 칼슘을 결여하고 마그네슘을 결여하거나 또는 모든 2가 양이온을 결여하지는 않더라도 다수를 결여할 수 있다. 당업자는 세척 단계가 당업자에게 공지된 방법에 의해, 예컨대 제조업자의 설명서에 따라(예를 들어, 코브 2991 세포 처리기(Cobe 2991 cell processor), 박스터 사이토메이트(Baxter CytoMate) 또는 해모네틱스 셀 세이버 5(Haemonetics Cell Saver 5)) 반자동화된 "병류(flow-through)" 원심분리를 이용함으로써 달성될 수 있다는 것을 용이하게 인식한다. 세척 후에, 세포는 다양한 생체적합 완충제, 예를 들어, 무 Ca, 무 Mg PBS, 플라스마라이트 A 또는 완충제가 있는 다른 또는 완충제 용액이 없는 식염수 용액 중에서 재현탁될 수 있다. 대안적으로, 분리반출법 샘플의 바람직하지 않은 성분이 제거될 수 있고, 세포는 배양 배지에서 직접적으로 현탁될 수 있다.

[0235] 음성 선택에 의한 T 세포의 농축은 음성 선택된 세포에 독특한 표면 마커와 관련된 항체의 조합물에 의해 수행될 수 있다. 한 가지 방법은 세포 분류, 및/또는 음성 선택된 세포 상에 존재하는 세포 표면 마커와 관련된 단클론성 항체의 카테일을 사용하는 음성 자기 면역부착 또는 유세포분석을 통한 선택이다. 예를 들어, 음성 선택에 의해 T 세포(CD3+)를 농축시키기 위해, 단클론성 항체 카테일은 전형적으로 B 세포(CD19), 단핵구(CD14), NK 세포(CD56) 등에 특이적인 항체를 포함한다. 항체는 전형적으로 표면(예를 들어, 입자, 예컨대 비드) 상에 고정된다.

[0236] 양성 또는 음성 선택에 의한 세포의 목적하는 집단의 단리를 위해, 비드에 대한 세포의 농도는 변할 수 있다. 소정의 실시형태에서, 비드 및 세포가 함께 혼합되는 용적을 충분히 감소시켜(즉, 세포 농도를 증가), 세포 및 비드의 최대 접촉을 보장하는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들어, 일 실시형태에서, 2십억개 세포/㎖ 농도가 사용된다. 일 실시형태에서, 십억개의 세포/㎖의 농도가 사용된다. 추가 실시형태에서, 1억개 초과 세포/㎖가 사용된다. 추가 실시형태에서, 1천만, 1천 5백만, 2천만, 2천 5백만, 3천만, 3천 5백만, 4천만, 4천 5백만 또는 5천만개의 세포/㎖의 세포 농도가 사용된다. 또 다른 실시형태에서, 7천 5백만, 8천만, 8천 5백만, 9천만, 9천 5백만 또는 1억개의 세포/㎖의 세포 농도가 사용된다. 추가 실시형태에서, 1억 2천 5백만 또는 1억 5천만개의 세포/㎖의 농도가 사용될 수 있다. 고농도를 이용하는 것은 증가된 세포 수율, 세포 활성화 및 세포 확장을 초래할 수 있다. 추가로, 높은 세포 농도의 사용은 관심 대상의 표적 항원, 예컨대 CD28-음성 T 세포를 약하게 발현시킬 수 있는 세포의 더 효율적인 포획을 허용한다.

[0237] 원하거나 또는 필요하다면, 단핵구 집단(즉, CD14⁺ 세포)은 항-CD14 코팅 비드 또는 칼럼, 또는 제거를 용이하게 하기 위해 이들 세포의 식작용 활성의 이용, 또는 역류 원심분리세정의 사용을 포함하는 다양한 방법에 의해 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포와 함께 공동 배양 또는 생체의 확장 전에 혈액 제제로부터 고갈될 수 있다. 따라서, 일 실시형태에서, 본 발명은 식작용 단핵구에 의해 사로잡히기에 충분한 크기의 상자성 입자를 사용한다. 소정의 실시형태에서, 상자성 입자는 상업적으로 입수 가능한 비드, 예를 들어, 상표명 다이나비즈(Dynabeads)(상표명) 하에 다이날 AS(Dynal AS)에 의해 생산된 것이다. 이와 관련하여 예시적인 다이나비즈

(Dynabeads)(상표명)는 M-280, M-450 및 M-500이다. 일 양상에서, 다른 비특이적 세포는 "부적절한" 단백질(예를 들어, 혈청 단백질 또는 항체)로 상자성 입자를 코팅함으로써 제거된다. 부적절한 단백질 및 항체는 확장된 T 세포를 특이적으로 표적화하지 않는 해당 단백질 및 항체 또는 이의 단편을 포함한다. 소정의 실시형태에서, 부적절한 비드는 양 항-마우스 항체, 염소 항-마우스 항체 및 인간 혈청 알부민으로 코팅된 비드를 포함한다.

[0238] *T 세포의 확장*

[0239] 자극된 또는 활성화된 T 세포는 당업계에 일반적으로 공지된 방법을 이용하여 세포 배양물에서 추가로 확장될 수 있다.

[0240] 일 실시형태에서, T 세포를 확장시키기 위해 사용되는 배지는 CD3을 자극할 수 있는 제제 및 T 세포 상에서 CD28을 자극할 수 있는 제제를 포함한다.

[0241] *자극된 또는 활성화된 T 세포와 간충식 계통 전구체 또는 줄기 세포의 공동 배양*

[0242] 본 발명의 효능 분석은 간충식 계통 전구체 또는 줄기 세포와 함께 T 세포와 함께 T 세포의 공동 배양 후에 T 세포 IL-2R α 발현의 저해를 측정한다. IL-2R α 발현의 저해는 T 세포 증식에 대한 억제 효과와 관련된다. 이론에 의해 구속되기를 원하지는 않지만, 당업자는 간충식 계통 전구체 또는 줄기 세포는 T 세포 자극 및/또는 활성화를 저해하거나 또는 억제할 수 있고, 이에 의해, T 세포 증식을 억제하거나 또는 그들은 활성화된 T 세포의 증식을 억제하는 작용을 할 수 있다는 것을 인식할 것이다.

[0243] 실시형태에서, T 세포는 적어도 1종의 T 세포 자극제를 포함하는 배양 배지에서, 바람직하게는 T 세포를 자극하고/하거나 활성화할 수 있는 농도에서 간충식 계통 전구체 또는 줄기 세포와 함께 공동 배양된다. 다른 실시형태에서, T 세포는 간충식 계통 전구체 또는 줄기 세포와 공동배양 전에 처음 자극되고/되거나 활성화된다.

[0244] 실시형태에서, 간충식 계통 전구체 또는 줄기 세포는 PBMC와 함께 공동배양된다.

[0245] 실시형태에서, 간충식 계통 전구체 또는 줄기 세포는 CD3을 자극할 수 있는 제제 및 T 세포 상에서 CD28을 자극할 수 있는 제제, 예컨대 CD3에 대한 항체 및 CD28에 대한 항체, 예를 들어, 마우스 항-인간 CD3 및 마우스 항-인간 CD28을 포함하는 배양 배지에서 PBMC와 함께 공동배양된다. 실시형태에서, CD3에 대한 항체 및/또는 CD28에 대한 항체는 가용성 형태로, 각각 약 2 μ g/ml의 농도에서 배양 배지에 첨가된다.

[0246] 실시형태에서, PBMC는 5의 PBMC:1의 간충식 전구체 또는 줄기 세포의 비로 간충식 전구체 또는 줄기 세포와 함께 공동배양된다. 예를 들어, 1 $\times 10^6$ 개의 PBMC는 간충식 계통 전구체 또는 줄기 세포의 농축 집단으로부터 확장된 2 $\times 10^5$ 개의 세포와 함께 공동 배양될 수 있었다. 추가 실시형태에서, 세포는 1ml의 최종 용적으로 공동 배양된다.

[0247] 실시형태에서, 단리된 또는 농축된 간충식 계통 전구체 또는 줄기 세포는 배양에 의해 생체외에서 또는 시험관 내에서 처음 확장되고, 후속적으로 PBMC와 함께 공동배양시켰다.

[0248] 대안의 실시형태에서, 단리된 또는 농축된 또는 배양된 간충식 계통 전구체 또는 줄기 세포는 T 세포의 농축되고/되거나 확장된 집단과 함께 공동배양된다.

[0249] 간충식 계통 전구체 또는 줄기 세포는 하나 이상의 T-세포 자극제/리간드를 포함하는 배양 배지에서 T-세포와 함께 공동배양되는 것이 바람직하다. 당업자는 T-세포는 처음 자극되고/되거나 활성화되고, 이어서, 적어도 1종의 T 세포 자극제의 존재 또는 부재 하에 간충식 계통 전구체 또는 줄기 세포와 함께 공동배양될 수 있다는 것을 인식할 것이다.

[0250] *IL-2R α 수준 양의 결정*

[0251] 본 개시내용은 웨스턴 블롯, 효소-결합 면역흡착 분석(ELISA), 형광-결합 면역 흡착 분석(FLISA), 경쟁 분석, 방사면역분석, 측방유동면역분석, 병류 면역분석, 전자화확발광 분석, 혼탁기반 분석, 혼탁측정 기반 분석, 간충식 계통 또는 전구체 세포를 배양시키기 위해 사용된 배양 배지 내 TGF β 1의 검출을 위한 형광 활성화된 세포 분류(FACS)-기반 분석, 및 표면 플라즈몬 공명(SPR 또는 비아코어(Biacore))를 포함하는 임의의 분석 형태를 상정한다.

[0252] 간충식 계통 전구체 또는 줄기 세포 및 T 세포의 공동인큐베이션 후에, 세포는 수집하였고 당업계에 잘 공지된 방법을 이용하여 용해시킬 수 있다. 이어서, 세포 용해물은, 예를 들어, ELISA 또는 FLISA에 의해 IL-2R α 의 존재에 대해 분석될 수 있다. 대안적으로, IL-2R α 발현 수준은, 예를 들어, 유세포분석에 의해 무손상 항체를 분

석함으로써 결정될 수 있다.

- [0253] 적합한 분석의 한 가지 형태는, 예를 들어, ELISA 또는 FLISA이다.
- [0254] 하나의 형태에서, 이러한 분석은 고체 기질, 예를 들어, 폴리스타이렌 또는 폴리카보네이트 마이크로웰 또는 디스크, 막 또는 유리 지지체(예를 들어, 유리 슬라이드) 상에 IL-2R α 결합 단백질을 고정시키는 것을 수반한다. 이어서, 시험 샘플은 IL-2R α 결합 단백질과 직접 접촉되고, 샘플 중의 IL-2R α 는 결합되거나 또는 포획된다. 샘플 중의 임의의 비결합 단백질을 제거하기 위해 세척한 후에, 별개의 에피토프에서 IL-2R α 에 결합하는 단백질은 포획된 IL-2R α 와 직접 접촉되게 된다. 이 검출기 단백질은 일반적으로 검출 가능한 리포터 분자, 예를 들어, ELISA의 경우에 효소(예를 들어, 겨자무과산화효소(horseradish peroxidase: HRP)), 알칼리성 포스파타제(alkaline phosphatase: AP) 또는 β -갈락토시다제) 또는 FLISA의 경우에 형광단으로 표시된다. 대안적으로, 검출기 단백질에 결합하는 제2 표지 단백질이 사용될 수 있다. 임의의 비결합 단백질을 제거하기 위한 세척 후에, 검출 가능한 리포터 분자는 ELISA의 경우에 기질, 예를 들어, 과산화수소, TMB, 또는 톨루이딘 또는 5-브로모-4-클로로-3-인돌-베타-D-갈락토피라노사이드(x-gal)의 첨가에 의해 검출된다. 물론, 고정된(포획) 단백질 및 검출기 단백질은 반대의 방식으로 사용될 수 있다.
- [0255] 이어서, 샘플 내 IL-2R α 수준은 공지된 양의 마커를 이용하여 또는 대조군 샘플에 대한 비교에 의해 생성된 표준 곡선을 이용하여 결정된다.
- [0256] 실시형태에서, IL-2R α 발현의 저해는 T 세포를 포함하는 세포 집단과 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포를 포함하는 세포 집단의 공동 배양 후에 세포 집단의 IL-2R α 수준에 T 세포를 포함하는 세포 집단의 IL-2R α 발현 수준을 비교함으로써 측정되고, 차이는 "저해 백분율"로서 표현된다.
- [0257] 상기 기재된 분석은 검출에 대한 기준으로서 화학발광 또는 전기화학발광을 사용하도록 용이하게 변형된다.
- [0258] 당업자에게 분명할 바와 같이, 면역흡착 분석에 기반한 다른 검출 방법은 본 개시내용의 성능에서 유용하다. 예를 들어, 검출을 위한 방사성표지, 또는 금 표지(예를 들어, 콜로이드 금), 또는 리포솜, 예를 들어, 검출 또는 아크리딘염 결합 면역흡착 분석을 위한 NAD⁺ 캡슐화를 이용하는 상기 설명에 기반한 면역흡착 방법.
- [0259] 본 개시내용의 일부 예에서, IL-2R α 수준은 표면 플라즈몬 공명 검출기(예를 들어, 비아코어(BIAcore)(상표명), 뉴저지주 피스카타웨이에 소재한 GE 헬스케어(GE Healthcare)), 유동 장치(예를 들어, 미국 특허 제 7205159호 기재된 바와 같음), 마이크로- 또는 나노-면역분석 장치(예를 들어, 미국 특허 제 7271007호에 기재된 바와 같음), 측방 유동 장치(예를 들어, 미국 특허 공개 제 20040228761호 또는 미국 특허 공개 제 20040265926호에 기재된 바와 같음), 형광 분극화 면역분석(FPIA, 예를 들어, 미국 특허 제 4593089호 또는 미국 특허 제 4751190호에 기재된 바와 같음), 또는 면역탁도분석(예를 들어, 미국 특허 제 5571728호 또는 미국 특허 제 6248597호에 기재된 바와 같음)를 이용하여 결정된다.
- [0260] **TNFR1 수준 양의 결정**
- [0261] 본 개시내용의 효능 분석은 또한 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포에 의한 TNFR1의 발현을 결정하는 단계를 포함할 수 있다. TNFR1은 가용성 TNFR1(sTNFR1)일 수 있다. 이 단계는 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포와 T 세포의 공동 배양 후에 수행될 수 있다. 대안적으로, TNFR1 발현은 T 세포와의 공동 배양 전에 단리된 또는 농축된 또는 확장된 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포의 세포 용해물에서 측정될 수 있다. 실시형태에서, TNFR1 발현은 동결보존된 농축 및/또는 확장된 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포의 세포 용해물에서 측정된다.
- [0262] 당업자는 IL-2R α 발현의 검출에 대해 상기 기재한 방법은 또한 TNFR1 발현을 검출하기 위해 사용될 수 있다는 것이 인식될 것이다. 바람직한 실시형태에서, 세포 용해물은 ELISA 또는 FLISA에 의해 분석된다.
- [0263] 일 형태에서, 이러한 분석은 TNFR1 결합 단백질을 고체 기질 상에 고정시키는 것을 수반한다. 이어서, 시험 샘플은 TNFR1 결합 단백질과 직접 접촉되고, 샘플 중의 TNFR1은 결합되거나 또는 포획된다. 샘플 중의 임의의 비결합 단백질을 제거하기 위해 세척한 후에, 별개의 에피토프에서 TNFR1에 결합하는 단백질은 포획된 TNFR1과 직접 접촉되게 된다. 이 검출기 단백질은 일반적으로 상기 기재한 바와 표시된다. 대안적으로, 검출기 단백질에 결합하는 제2 표지 단백질이 사용될 수 있다. 임의의 비결합 단백질을 제거하기 위한 세척 후에, 검출 가능한 리포터 분자는 상기 기재한 바와 같은 ELISA의 경우에서 기질의 첨가에 의해 검출된다. 이어서, 샘플 내 TNFR1 수준은 공지된 양의 마커를 이용하여 또는 대조군 샘플에 대한 비교에 의해 생성된 표준 곡선을 이용하여 결정된다.
- [0264] 실시형태에서, TNFR1 발현은 동결보존된 농축 및/또는 확장된 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포의 세포 용해

물에서 측정되고, 적어도 100pg/ml TNFR1은 생물학적 활성 또는 치료 효능을 나타낸다.

[0265] **조성물 및 투여**

[0266] 간충식 계통 전구체 또는 줄기 세포를 포함하는 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체 중에서 제조될 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "약제학적으로 허용 가능한 담체"는 저장, 투여를 용이하게 하고/하거나 간충식 계통 전구체 또는 줄기 세포의 생물학적 활성을 유지하는 물질의 조성물을 지칭한다.

[0267] 일례에서, 담체는 수용자에서 상당한 국소 또는 전신 이상효과를 생성하지 않는다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는 고체 또는 액체일 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 담체의 유용한 예는 간충식 계통 전구체 또는 줄기 세포의 생존도 및 활성에 영향을 미치지 않는 희석제, 용매, 계면활성제, 부형제, 현탁제, 완충제, 윤활제, 보조제, 비히클, 유화제, 흡착제, 분산 매질, 코팅제, 안정제, 보호 콜로이드, 접착제, 점증제, 요변제, 침투제, 격리제, 스캐폴드, 등장제 및 흡수 지연제를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 적합한 담체의 선택은 당업자의 기술 내이다.

[0268] 본 개시내용의 조성물은 단위 투약량 형태로 편리하게 제시될 수 있고, 당업계에 잘 공지된 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "투약 단위 형태"는 치료 중인 대상체에 대한 단위 투약량으로서 적합한 물리적으로 별개의 단위를 지칭하며; 각각의 단위는 약제학적 담체와 함께 목적하는 치료 또는 예방 효과를 생성하도록 계산된 사전 결정된 양의 활성 화합물을 함유한다. 간충식 계통 전구체 또는 줄기 세포의 용량은 치료될 대상체의 질환 상태, 연령, 성별 및 체중과 같은 인자에 따라 다를 수 있다.

[0269] 용어 "대상체"는 동물, 바람직하게는 비영장류(예를 들어, 소, 돼지, 말, 고양이, 개, 래트 또는 마우스) 및 영장류(예를 들어, 원숭이 또는 인간)를 포함하는 포유류를 지칭한다. 바람직한 실시형태에서, 대상체는 인간이다.

[0270] 예시적인 용량은 적어도 약 1×10^6 개의 세포를 포함한다. 예를 들어, 용량은 약 1.0×10^6 내지 약 1×10^{10} 개의 세포, 예를 들어, 약 1.1×10^6 내지 약 1×10^9 개의 세포, 예를 들어, 약 1.2×10^6 내지 약 1×10^8 개의 세포, 예를 들어, 약 1.3×10^6 내지 약 1×10^7 개의 세포, 예를 들어, 약 1.4×10^6 내지 약 9×10^6 개의 세포, 예를 들어, 약 1.5×10^6 내지 약 8×10^6 개의 세포, 예를 들어, 약 1.6×10^6 내지 약 7×10^6 개의 세포, 예를 들어, 약 1.7×10^6 내지 약 6×10^6 개의 세포, 예를 들어, 약 1.8×10^6 내지 약 5×10^6 개의 세포, 예를 들어, 약 1.9×10^6 내지 약 4×10^6 개의 세포, 예를 들어, 약 2×10^6 내지 약 3×10^6 개의 세포를 포함할 수 있다.

[0271] 일례에서, 용량은 약 5×10^5 내지 2×10^7 개의 세포, 예를 들어, 약 6×10^6 개의 세포 내지 약 1.8×10^7 개의 세포를 포함한다. 용량은, 예를 들어, 약 6×10^6 개의 세포 또는 약 1.8×10^7 개의 세포일 수 있다.

[0272] 간충식 계통 전구체 또는 줄기 세포는 조성물의 세포 집단의 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90% 또는 적어도 약 95%를 포함한다.

[0273] 본 개시내용의 조성물은 동결보존될 수 있다. 간충식 계통 전구체 또는 줄기 세포의 동결보존은 당업계에 공지된 느린 속도(slow-rate) 냉각 방법 또는 '빠른' 냉동 프로토콜을 이용하여 수행될 수 있다. 바람직하게는, 동결보존 방법은 비냉동 세포에 비해 유사한 표현형, 세포 표면 마커 및 동결보존 세포의 성장물을 유지한다.

[0274] 동결보존된 조성물은 동결보존 용액을 포함할 수 있다. 동결보존 용액의 pH는 전형적으로 6.5 내지 8, 바람직하게는 7.4이다.

[0275] 동결보존 용액은 멸균, 비발열원성 등장 용액, 예를 들어, 플라스마라이트 A(PlasmaLyte A)(상표명)를 포함할 수 있다. 100ml의 플라스마라이트 A(상표명)는 526mg의 염화나트륨, USP(NaCl); 502mg의 글루콘산나트륨($C_6H_{11}NaO_7$); 368mg의 아세트산나트륨 3수화물, USP($C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$); 37mg의 염화칼륨, USP(KCl); 및 30mg의 염화마그네슘, USP($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)을 함유한다. 이는 항균제를 함유하지 않는다. pH는 수산화나트륨으로 조절된다. pH는 7.4(6.5 내지 8.0)이다.

[0276] 동결보존 용액은 프로프리즈(Profreeze)(상표명)를 포함할 수 있다. 동결보존 용액은 추가로 또는 대안적으로

배양 배지를 포함할 수 있다.

- [0277] 냉동을 용이하게 하기 위해, 동결보존제, 예를 들어, 다이메틸설폭사이드(DMSO)는 보통 동결보존 용액에 첨가된다. 이상적으로는, 동결보존제는 세포 및 환자에 대해 비독성이어야 하며, 비항원성, 화학적으로 비활성은 해동 후에 높은 생존율을 제공하고, 세척 없이 이식을 허용한다. 그러나, 가장 통상적으로 사용되는 동결보존제인 DMSO는 일부 세포독성을 나타낸다. 하이드록시에틸 전분(HES)은 동결보존 용액의 세포독성을 감소시키기 위해 치환체로서 또는 DMSO와 조합하여 사용될 수 있다.
- [0278] 동결보존 용액은 DMSO, 하이드록시에틸 전분, 인간 혈청 성분 및 다른 단백질 증량제 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 일례에서, 동결보존된 용액은 약 5% 인간 혈청 알부민(HSA) 및 약 10% DMSO를 포함한다. 동결보존 용액은 메틸셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈(PVP) 및 트레할로스 중 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다.
- [0279] 일 실시형태에서, 세포는 42.5% 프로프리즈(상표명)/50% αMEM/7.5% DMSO 중에서 현탁되고, 자동 온도 냉각기(controlled-rate freezer)에서 냉각시킨다.
- [0280] 동결보존된 조성물은 해동될 수 있고, 대상체에 직접적으로 투여되거나 또는, 예를 들어, HA를 포함하는 다른 용액에 첨가된다. 대안적으로, 동결보존된 조성물은 해동되고, 간충식 계통 전구체 또는 줄기 세포는 투여 전에 대안의 담체에서 재현탁될 수 있다.
- [0281] 본 개시내용의 조성물은 치료될 특정 질환 상태에 적합한 경로에 의해 투여될 수 있다. 예를 들어, 본 개시내용의 조성물은 전신으로, 즉, 비경구로, 정맥내 또는 주사에 의해 투여될 수 있다. 본 개시내용의 조성물은 특정 조직 또는 기관으로 표적화될 수 있다.
- [0282] 투약 요법은 최적의 치료 반응을 제공하도록 조절될 수 있다. 예를 들어, 단일 볼루스가 투여될 수 있거나, 몇몇 분할된 용량은 시간에 따라 투여될 수 있거나 또는 치료 상황의 긴급에 의해 나타나는 대로 용량은 비율적으로 감소되거나 또는 증가될 수 있다. 투여의 용이함 및 투약량의 균일함을 위해 투약 단위 형태로 비경구 조성물을 제형화하는 것이 유리할 수 있다.
- [0283] 일부 실시형태에서, 세포 조성물에 의한 요법의 개시 전에 환자를 면역억제하는 것이 필수이거나 또는 바람직하지 않을 수도 있다. 사실, 양에서 동종이계 STRO-1+ 세포의 이식은 면역억제의 부재 하에 잘 용인되었다. 그러나, 다른 예에서, 세포 요법을 개시하기 전에 환자를 약학적으로 면역억제하는 것이 바람직하거나 또는 적절할 수 있다. 이는 전신 또는 국소 면역억제제의 사용을 통해 달성될 수 있거나, 또는 캡슐화된 장치에서 세포를 전달함으로써 달성될 수 있다. 세포는 세포에 의해 요구되는 영양소 및 산소 및 치료 인자가 침투 가능한 캡슐에 캡슐화될 수 있고, 세포는 면역 체액 인자 및 세포에 대해 아직 불침투성이다. 바람직하게는, 캡슐화체는 저자극성이고, 표적 조직에서 용이하게 그리고 안정하게 위치되며, 이식된 구조에 추가된 보호를 제공한다. 이식 세포에 대한 면역 반응을 감소시키거나 또는 제거하기 위한 이들 및 다른 수단은 당업계에 공지되어 있다. 대안으로서, 세포는 그들의 면역원성을 감소시키도록 유전자 변형될 수 있다.
- [0284] 간충식 계통 전구체 또는 줄기 세포는 다른 유리한 약물 또는 생물학적 분자(성장 인자, 영양 인자)가 투여될 수 있다는 것이 인식될 것이다. 다른 제제와 함께 투여될 때, 그들은 단일 약제학적 조성물에서 함께, 또는 별개의 약제학적 조성물에서 다른 제제와 동시에 또는 순차적으로(다른 제제의 투여 전에 또는 후에) 투여될 수 있다. 공동투여될 수 있는 생활성 인자는 항세포자멸사제(예를 들어, EPO, EPO 모방제, TPO, IGF-I 및 IGF-II, HGF, 카스파제 저해제); 항염증제(예를 들어, p38 MAPK 저해제, TGF-베타 저해제, 스타틴, IL-6 및 IL-1 저해제, 페미롤라스트(PEMIROLAST)(상표명), 트라니라스트(TRANILAST)(상표명), 레미카드(REMICADE)(상표명), 시롤리무스(SIROLIMUS)(상표명) 및 비스테로이드성 항염증 약물(NSAID), 예컨대 테폭살린(TEPOXALIN)(상표명), 톨메틴(TOLMETIN)(상표명), 수프로펜(SUPROFEN)(상표명)); 면역억제제/면역조절제(예를 들어, 칼시뉴린 저해제, 예컨대 사이클로스포린, 타크로리무스); mTOR 저해제(예를 들어, 시롤리무스(SIROLIMUS)(상표명), 에베롤리무스(EVEROLIMUS)(상표명)); 항증식제(예를 들어, 아자티오프린, 마이코페놀레이트 모페틸); 코티코스테로이드(예를 들어, 프레드니솔론, 하이드로코티손); 단클론성 항-IL-2R알파 수용체 항체와 같은 항체(예를 들어, 바실릭시맙, 다클리주맙), 다클론성 항-T-세포 항체(예를 들어, 항-흉선 글로불린(ATG); 항-림프구 글로불린(ALG); 단클론성 항-T 세포 항체OKT3)); 항-혈전제(예를 들어, 헤파린, 헤파린 유도체, 유로키나제, PPACK(텍스트로페날알라닌 프롤린 알기닌 클로로메틸케톤), 항트롬빈 화합물, 혈소판 수용체 길항제, 항-트롬빈 항체, 항-혈소판 수용체 항체, 아스피린, 다이피리다몰, 프로타민, 히루딘, 프로스타글란딘 저해제, 및 혈소판 저해제); 및 항산화제(예를 들어, 프로부콜, 비타민 A, 아스코르브산, 토코페롤, 코엔자임 Q-10, 글루타티온, L-시스테인, N-아세틸시스테인)뿐만 아니라 국소 마취제를 포함한다.

[0285] 이식편대숙주질환 및 그의 병기

[0286] 급성 및 만성 이식편대숙주질환(GVHD)은 (보통 골수 또는 말초혈액 줄기 세포 채취의 형태로) 동종이계 조혈 세포 이식의 합병증인 다발계 장애이다. GVHD는 비동일 공여자(이식편)로부터 이식된 면역 세포가 이식 수용자(숙주)를 이물질로서 인식하여, 이식 수용자에서 질환을 야기하는 면역 반응을 개시할 때 일어난다. 급성 GVHD의 임상 징후는 반구진 발진, 지속적 구역 및/또는 구토; 설사를 동반한 경련성 복통; 및 상승하는 혈청 빌리루빈 농도를 포함한다. 대조적으로, 만성 GVHD를 갖는 환자는 편평태선과 비슷한 피부 이환 또는 피부경화증의 피부 징후; 궤양을 동반한 구강 점막 건조증 및 위장관의 경피증; 및 상승하는 혈청 빌리루빈 농도를 통상적으로 입증한다.

[0287] GVHD는 고전적으로 100일의 컷오프를 이용하는 개시 시간에 기반하여 급성 및 만성 변이체로 나누어졌다. 그러나, 이 통상적인 분할은 급성 및 만성 GVHD의 징후는 이들 표기된 기간 외에 일어날 수 있다는 인식에 의해 도전되었다. 이 관찰은 급성과 만성 GVHD를 구별하기 위해 한 세트의 기간보다는 임상 발견의 증가된 사용을 야기하였다. GVHD를 진단하기 위해 사용되는 널리 허용되는 미국국립보건원(National Institutes of Health: NIH) 일치 기준은 만성 GVHD의 "진단적" 또는 "독특한"으로서 또는 급성과 만성 GVHD 둘 다에 통상적으로 GVHD의 징후를 분류하였다(Filipovich AH et al. (2005) Biol Blood Marrow Transplant 11:945).

[0288] GVHD를 갖는 환자는 제공 시간 및 존재하는 특징에 기반하여 다시 분류된다:

[0289] • 고전적 급성 GVHD - 사례는 조혈 세포 이식(hematopoietic cell transplant: HCT)의 100일 이내에 존재하며, 급성 GVHD의 특징을 나타낸다. 만성 GVHD의 진단적 및 독특한 특징은 없다.

[0290] • 지속적, 재발성, 후기 개시 급성 GVHD - 사례는 급성 GVHD의 특징을 갖는 HCT의 100일 초과 후에 존재한다. 만성 GVHD의 진단적 및 독특한 특징은 없다.

[0291] • 고전적 만성 GVHD - 사례는 HCT 후 임의의 시간에 존재한다. 만성 GVHD의 진단적 및 독특한 특징이 존재한다. 급성 GVHD의 특징은 없다.

[0292] • 중복 증후군 - 사례는 만성 GVHD와 급성 GVHD 둘 다의 특징을 갖는 HCT 후 임의의 시간에 존재할 수 있다. 가끔, 이는 구어체로 "급성 또는 만성" GVHD로서 지칭된다.

[0293] 급성 GVHD의 병리생리학은 잘 기재되어 있고 광범위하게 검토되었다(Ferrara JL et al. (2006) Semin Hematol 43(1):3-10). 간략하게, 임상적으로 명백한 GVHD의 발생을 야기하는 사건은 이식전 병태 동안, 이식 수용자가 고용량 화학요법 및/또는 방사선요법을 받는 동안에 시작된다. 고용량 요법의 결과로서 생기는 조직 손상은 숙주 항원-제시 세포(APC)의 활성화, APC 표면 상에서 주조직적합 항원의 상향조절 및 숙주 항원의 제시를 초래한다. 줄기 세포 이식편을 주입한 공여자 T 림프구는 클론 확장, 조직 이동 및 직접적 세포-세포 세포독성에 의한 이런 환경에서 항원 차이에 반응한다. 고수준의 전염증 사이토카인, 특히 종양 괴사 인자 알파(TNF- α), 인터류킨-1(IL-1) 및 인터류킨-2(IL-2) 및 농축된 숙주 항원은 중증의 조직 손상, 기관 기능장애 및 사멸을 야기하는 염증 캐스케이드를 야기한다.

[0294] 임상적으로 유의한 급성 GVHD는 면역억제제를 이용하는 집중적 예방에도 불구하고 동종이계 조혈 세포 이식(HCT)을 받는 환자에서 일어난다. 동종이계 HCT 후에 급성 GVHD의 정확한 발생률은 알려져 있지 않다. 보고된 발생률은 유전자형으로 HLA-동일한 자매 세포로부터 동종이계 HCT를 받은 환자에서 9 내지 50%의 범위이다(Lee SE et al. (2013) Bone Marrow Transplant 48:587).

[0295] 급성 GVHD는 또한 매칭된 관련없는 공여자에서 그리고 반일치(haploidentical) 관련 공여자에서 통상적이다.

[0296] 수많은 연구는 급성 이식편대숙주질환(GVHD)의 발생에 대한 다음의 위험 인자를 동정하였다(Hahn T et al. (2008) J Clin Oncol 26:5728):

[0297] • HLA 불일치 정도(HLA 미스매치 또는 관련없는 공여자);

[0298] • 공여자 및 수용자 성별 불일치(여성 공여자 대 남성 수용자);

[0299] • 이식 조건화 요법의 강도;

- [0300]  예방된 급성 GVHD 예방적 요법; 및
- [0301]  이식편의 공급원(제대혈보다 큰 말초 혈액 또는 골수).
- [0302] 덜 확립된 위험 인자는 숙주의 증가된 연령, 공여자와 숙주의 거대세포바이러스(CMV) 상태, 공여자 엡스타인-바르 바이러스(EBV) 혈청 반응 양성(Styczynski J et al. (2016) J Clin Oncol 34:2212); 말초 혈액 줄기 세포 대 골수 이식, 멸균 환경의 존재(장 제독(gut decontamination)을 포함), 및 특정 HLA 단상형을 포함한다. 그러나, 급성 GVHD에 대한 위험 인자는 기저질환에 따라 상이하며, 각각의 병태에 대한 분명한 위험 모델을 필요로 한다(Hahn T et al. (2008) J Clin Oncol 26:5728).
- [0303] GVHD는 초기 이식후 기간에 고전적으로 존재하는 동종이계 조혈 세포 이식(HCT)의 통상적인 합병증이다. 급성 GVHD의 초기 징후 및 증상은 백혈구 생착 시점 무렵에 가장 통상적으로 일어난다. 급성 GVHD의 초기 정의는 이식 후 100일 전의 증상 개시를 요구하지만, 현재의 미국국립보건원(NIH) 일치 기준은 급성과 만성 GVHD를 구별하기 위해 일정 시간 기간 보다는 임상 조건을 이용한다. 이렇게 해서, 100일전 급성 GVHD의 전형적인 소견을 제시하는 환자는 "고전적 급성 GVHD"를 갖는 것으로 고려되는 반면, 100일 후, 전형적으로 면역억제의 감소 시 동일한 소견을 제시하는 환자는 "후기 개시 급성 GVHD"를 갖는 것으로 범주화된다(Vigorito AC et al. (2009) Blood 114:702). 일부 임상적의는 또한 이식 14일 내에 생기는 급성 GVHD의 증상을 설명하기 위해 용어 "조기 개시 급성 GVHD" 또는 "초급성 GVHD"를 사용한다(Sullivan KM et al. (1986) Blood 67:1172).
- [0304] 장기 침범
- [0305] 피부, 위장관 및 간은 급성 GVHD를 갖는 환자에서의 원칙적 표적 기관이다. 대부분의 환자에서, 급성 GVHD의 제1(가장 흔한) 임상 징후는 보통 백혈구 생착 시 또는 근처에서 생기는 반구진 발진이다. 발진은 초기에 목뒤, 귀, 어깨, 손바닥 및 발바닥을 침범한다. 이는 일광화상으로서 기재될 수 있고, 소양증 또는 통증이 있을 수 있다. 피부의 조직학적 시험은 진피 및 표피층에서의 변화를 나타낸다(Sale GE et al. (1977) Am J Pathol 89:621). 특징적 발견은 세포외배출된 림프구, 각화부전증 표피 각질세포, 여포성 침범, 각화부전증 표피 각질세포에 인접하거나 또는 주변의 위성 림프구, 및 진피 혈관주위 림프구성 침윤을 포함한다(Darmstadt GL et al. (1992) J Invest Dermatol 99:397). 피부 침범 병기는 급성 GVHD의 전반적 중증도 등급을 결정하기 위해 위장관 및 간 침범의 병기에 관한 정보와 조합된다.
- [0306] 급성 GVHD는 빈번하게 상부 위장관과 하부 위장관을 둘 다 침범한다. 위장 침범은 보통 설사 및 복통이 존재하지만, 또한 구역, 구토 및 식욕부진으로서 나타날 수 있다. 진단의 확인은 상부 내시경검사, 직장 생검 또는 대장내시경에 의해 얻어지는 조직의 병리학적 평가에 의해 제공된다. 위장 침범의 진단은 조직의 병리학적 평가를 필요로 한다. 일단 진단되면, 위장침범 정도는 설사의 중증도에 기반하여 등급화된다: 병기 1 - 설사 500 내지 1000ml/일; 병기 2 - 설사 1000 내지 1500ml/일; 병기 3 - 설사 1500 내지 2000ml/일; 및 병기 4 - 설사 >2000 ml/일 또는 통증 또는 장폐색증.
- [0307] 급성 GVHD를 가진 하부 위장관의 침범은 종종 중증이며, 혈변 및 복부 경련과 함께 또는 이들이 없는 설사를 특징으로 한다. 진단의 확인은 직장 생검 또는 대장내시경에 의해 얻어지는 조직의 병리학적 평가에 의해 확인된다. 급성 GVHD를 가진 환자는 때때로 하루에 10리터를 초과하는 중증의 설사가 발생할 수 있다. 대변은 초기에 묽지만, 빈번하게 혈변이 될 수 있다. 설사는 분비성이며, 단식에도 불구하고 특징적으로 지속되고, 주야로 일어난다. 또한 관리가 어려울 수 있는 경련성 복통을 수반할 수 있다. 중증의 장폐색증이 급성 GVHD와 관련하여 생길 수 있거나 또는 또는 신체적 불편함을 제어하는 데 필요한 증가된 오피오이드 사용으로부터 초래된다. 직장 생검은 보통 위장관에 영향을 미치는 급성 GVHD의 진단을 하는 데 도움을 준다. 조직학적 검사 시, 사멸된 선와 내 퇴행성 물질의 축적에 의한 창자샘세포 괴사가 관찰된다.
- [0308] 급성 GVHD를 가진 상부 위장관의 침범은 종종 식욕부진, 소화불량, 음식물 불내성, 구역 및 구토가 존재한다(Weisdorf DJ et al. (1990) Blood 76:624). 이들 발견은 전처치 효과때문에 더 통상적이지만, 환자는 또한 치은염 및 점막염을 나타낼 수 있다. 진단은 식도 및 위의 양성 상부 내시경 생검에 의해 확인된다. 차별적 진단은 단순포진 바이러스 또는 캐나다 식도염, 위염, 소화성 궤양 및 화학요법 및/또는 방사선에 기인하는 위장 독성을 포함한다.
- [0309] 간 침범은 보통 피부 및/또는 위장 급성 GVHD의 징후를 가진 환자에서 존재한다(Ratanatharathorn V et al. (1998) Blood 92:2303). 드물게, 환자는 다른 기관 침범의 증거 없이 보통 내지 중증의 간 GVHD를 가진다. 간 침범은 피부 또는 위장 GVHD 상황에서 간 기능 검사에서의 이상에 의해 나타날 수 있지만, 간 생검은 간의 GVHD

를 입증하는 데 필요하다. 간 침범은 비정상적 간 기능 검사에 의해 나타나며, 가장 초기의 그리고 가장 통상적인 발견은 접합된 빌리루빈 및 알칼리성 포스파타제의 혈청 수준의 증가이다. 혈청 콜레스테롤은 보통 상승되지만, 응고장애 및 고암모니아혈증은 매우 희귀하지만, 중증의 사례에서 생길 수 있다. 환자는 또한 통증성 간 비대, 진한 소변, 묽은 대변, 체액저류 및 소양증을 입증할 수 있다. 발열, 식욕부진 및 구역은 통상적인 비특이적 증상이다. 특징적 발진의 동시 존재는 암시적(suggestive) 임상 증거를 제공하지만, 생검은 간의 GVHD를 진단하는 가장 확정적인 방법이다. 그러나, 이는 HCT 직후에 중증의 혈소판 감소증에 기인하는 급성 출혈 가능성 때문에 실현 가능하지 않을 수도 있다.

[0310] 급성 GVHD의 진단을 위한 생체마커

[0311] 급성 GVHD의 진단을 위한 혈청 생체마커의 사용은 연구의 활성 영역이다. 생체마커 또는 생체마커의 패널은 일반적으로 서로 또는 다른 소견과 조합하여 사용된다. 이상적인 바이오마커는 임상 급성 GVHD의 외관을 예측할 수 있을 뿐만 아니라 관리를 가이드한다. 다수의 후보 바이오마커가 있지만, 바로 임상 용도로 사용 가능한 것은 없다.

[0312] 하나의 후보 바이오마커는 인터류킨-1 수용체 패밀리의 구성원인 종양형성능력 2의 억제(suppression of tumorigenicity 2: ST2)이다.

[0313] 프로테오믹스를 이용하는 혈장 및 소변 폴리펩타이드의 분석 패턴은 급성 GVHD의 조기 진단을 가능하게 하는 데 가능성을 나타내었다(Srinivasan R et al. (2006) Exp Hematol 34:796). 예로서, 인터류킨-2 수용체-알파, 종양괴사 인자 수용체-1, 인터류킨-8, 및 간세포 성장 인자를 포함하는 마커의 패널은 임상 증상의 개시에서 급성 GVHD의 진단을 확인할 수 있고, GVHD 중증도와 독립적인 예후 정보를 제공한다는 것이 제안되었다(Paczesny S et al. (2009) Blood 113:273). Reg3의 사용은 또한 급성 장 GVHD의 진단에 유용한 것으로 발견되었다(Ferrara JL et al. (2011) Blood 118:6702). 추가적으로, CD30의 혈장 수준은 급성 GVHD를 가진 환자에서 상승된 것을 발견하였다(Chen YB et al. (2012) Blood 120:691).

[0314] 혈장 마이크로RNA 서명의 분석은 급성 GVHD에 대한 비침습성 바이오마커를 제공할 수 있다. 일 연구에서, 6개의 마이크로RNA의 패널 평가는 급성 GVHD를 가진 HCT 수용자를 급성 GVHD가 없는 환자와 구별할 수 있었고, 급성 GVHD의 중증도를 예측할 수 있었다(Xiao B et al. (2013) Blood 122:3365). 4개를 급성 GVHD를 예측한 패널에 합하였고, miRNA 바이오마커 수준은 급성 GVHD 중증도와 양으로(positively) 관련되었다. 더 중요하게는, miRNA가 상승된 것은 급성 GVHD의 개시 전에 검출될 수 있다. 이들 데이터는 환자의 더 큰 코호트에서 입증되고 있다.

[0315] GVHD의 병기

[0316] 급성 GVHD를 병기화하기 위한 몇몇 시스템이 개발되었다. 가장 인기 있는 2가지는 글루크스버그(Glucksberg) 등급(I 내지 IV)(Glucksberg H et al (1974) Transplantation 18(4):295) 및 국제골수이식등록소(International Bone Marrow Transplant Registry: IBMTR) 등급화 시스템(A 내지 D)(Rowlings PA et al., (1997) Br J Hematol 97(4):855)이다. 급성 GVHD의 중증도는 피부, 간 및 위장관의 침범 정도의 평가에 의해 결정된다. 개개 기관 침범의 병기는 (글루크스버그)와 함께 또는(IBMTR) 없이 예후 유의도를 갖는 전반적 등급을 생성하기 위한 환자 수행 상태와 조합한다. 등급 I(A) GVHD는 경증 질환을 특징으로 하고, 등급 II(B) GVHD는 중등증을 특징으로 하고, 등급 III(C)은 중증을 특징으로 하며, 등급 IV(D)는 생명-위협적인 것을 특징으로 한다(Przepiorka D, Weisdorf D, Martin P, Klingemann HG, Beatty P, Hows J, Thomas ED (1995) Bone Marrow Transplant. 1995;15(6):825; Cahn JY et al. (2005) Blood 106(4):1495).

[0317] IBMTR 등급화 시스템은 급성 GVHD의 중증도를 다음과 같이 정한다:

[0318] ● 등급 A - 병기 1 간 또는 위장 침범이 없는 피부 침범 단독(신체의 25% 미만에 걸친 반구진 발진)

[0319] ● 등급 B - 병기 2 피부 침범; 병기 1 내지 2 장 또는 간 침범

[0320] ● 등급 C - 임의의 기관계의 병기 3 침범(일반화된 홍피증; 빌리루빈 6.1 내지 15.0mg/dL; 설사 1500 내지 2000mL/일)

[0321] ● 등급 D - 임의의 기관계의 병기 4 침범(수포 형성을 동반하는 일반화된 홍피증; 빌리루빈 >15mg/dL; 설사 >2000mL/일 OR 통증 OR 장폐색증).

- [0322] 등급화는 예방 또는 치료에 대한 반응, 생존 시 영향, 및 이식편대 백혈병 효과와의 연관을 평가하는 것에 관한 중요성이다. 중등증 내지 중증의 GVHD를 가진 환자는 경증 질환을 가진 환자에 비해 상당히 더 높은 사망률을 가진다. 예로서, 등급 III(C) 및 등급 IV(D) 급성 GVHD를 가진 환자의 추정된 5년 생존율은 각각 25 및 5%이다 (Przepiorka D et al. (1995) Bone Marrow Transplant 15:825). 그러나, HCT 진료 후 변화가 주어진 현재의 환자 집단에 대한 이들 추정 생존율을 적용할 때 경도가 사용되어야 한다. 현재의 예방 요법은 전반적 결과 및 질환의 발현을 변경시킬 수 있다. 전형적으로 각각의 기관의 초기 등급화는 스테로이드 요법 개시의 10일 창(-5 내지 +5일) 내에 계산된다. 이어서, 실시간 병기화 및 등급화는 매주 임상양의 의해 결정되고, 가능하다면, 실험실 및 임상 정보 및 조직학적 확인에 의해 뒷받침된다.
- [0323] 최근의 연구(예를 들어, 문헌[MacMillan ML et al (2010) Blood 115:5412-5417] 참조)는 PR 및 Cr을 포함하는 제28일 반응이 급성 GVHD를 가진 환자에 대한 후기 그리고 더 중요한 결과를 예측할 수 있는 초기 표적으로서 혼입되었다는 것을 제안하였다.
- [0324] 조혈 줄기 세포 이식(Hematopoietic Stem Cell Transplantation: HSCT)
- [0325] "조혈 줄기 세포 이식(HSCT)"은, 예를 들어, 골수 또는 말초 혈액으로부터 유래될 수 있는 다능 조혈 줄기 세포를 포함하는 이식편이다. 이식은 일부 비줄기 세포, 예를 들어, DC 및/또는 림프구를 포함하는 APC를 포함할 수 있다.
- [0326] "조혈 줄기 세포"는 자기 재생되고 분화되어, 골수성(단핵구 및 대식세포, 호중구, 호염기구, 호산구, 수지상 세포), 적혈구(erythrocyte), 거대핵세포(혈소판) 및 림프 계통(T-세포, B-세포, NK-세포)을 포함하는 모든 혈액 세포를 생기게 한다. 분화 내내, 조혈 줄기 세포는 그의 자기 재생 능력을 처음 상실하고, 이어서, 그것이 성숙 효과기 세포가 되는 것을 완료함에 따라 점차로 그의 계통 잠재력을 상실한다. 전형적으로 Lin⁻, CD34⁺, CD38⁻, CD90⁺, CD45RA⁻ 인간 세포는 조혈 줄기 세포이다. 일례에서, CD34의 발현은 인간 공여자로부터 단리된 말초 혈액에서 조혈 줄기 세포를 동정하는 데 사용된다.
- [0327] HSCT는 줄기 세포 이식편을 필요로 하는 질환 및 병태의 치료에서 사용될 수 있다. 예를 들어, 줄기 세포는 (예를 들어, 조사, 화학요법 또는 병원균에 의한 감염에 의한) 정상 혈액 세포 생성 및 성숙의 실패 또는 기능장애, 조혈 악성종양, 자가면역 질환, 간 질환 또는 면역결핍의 치료를 위해 사용될 수 있다.
- [0328] 줄기 세포는 대상체에 대한 투여 전에 생체외에서 확장되거나 또는 분화될 수 있다.
- [0329] 동종이계 조혈 줄기-세포 이식은 다음의 조건 중 하나 이상을 치료하는 데 사용될 수 있다: 급성 골수성 백혈병, 급성 림프아구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 골수증식성 장애, 골수이형성 증후군, 다발성 골수종, 비호지킨 림프종, 호지킨병, 재생불량성 빈혈, 진성 적혈구계 무형성증, 발작성 야간혈색소뇨증, 판코니 빈혈, 대탈라세미아, 겸상 적혈구 빈혈증, 중증 합병성 면역결핍(SCID), 비스코트-알드리치 증후군, 혈구탐식성 림프조직구 증식증(HLH), 선천성 대사장애증(예를 들어, 점액 다당류증, 고체병, 백질이영양증 및 부신백질이영양증).
- [0330] GVHD의 예방 또는 치료
- [0331] 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포 및/또는 이의 자손 세포는 대상체의 예방 또는 치료에 대한 유효 용량으로 세포를 투여하는 단계를 포함하는 GVHD를 가진 대상체의 예방 또는 치료 방법에서 사용될 수 있다. 일 실시형태에서, 대상체는 GVHD를 초래하는 하나 이상의 동종이계 조혈 줄기 세포 이식편을 받았다.
- [0332] GVHD의 증상은 경화성 피부, 경구접촉의 제한, 안구건조증, 위장(GI)관 증상, 예컨대 연하곤란, 식욕부진, 구역, 구토, 복통, 또는 설사, 상승된 빌리루빈에 의해 나타난 간 증상, 상승된 알칼리성 포스파타제, 및 상승된 알칼리성 아미노트랜스퍼라제(ALT)/아스파르트산염 아미노트랜스퍼라제(AST)(AST/ALT) 비, 숨이참, 및/또는 팔 다리의 긴장을 포함한다.
- [0333] 대상체는 이식편대숙주질환에 의해 영향받는 조직에 따라서 다중 증상을 나타낼 수 있다. 일부 대상체는 4 내지 5가지의 증상을 가지며, 나머지 대상체들은 1 내지 2가지의 증상을 가질 수 있다. 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포 및/또는 이의 자손 세포는 대상체에서 GVHD와 연관된 증상 중 하나, 하나 이상, 또는 모두 그리고 모두를 치료하기 위해 사용될 수 있다.
- [0334] 포유류 및 특히, 인간에서 GVHD 또는 GVHD 증상의 치료를 위한 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포 및/또는 이의 자손 세포의 주사당 유효 용량은 1×10^4 개의 세포/kg 체중 내지 1×10^8 개의 세포/kg 체중; 1×10^4 개의 세포/

kg 체중 내지 1×10^8 개의 세포/kg 체중; 2×10^4 개의 세포/kg 체중 내지 1×10^8 개의 세포/kg 체중; 2.5×10^4 개의 세포/kg 체중 내지 1×10^8 개의 세포/kg 체중; 2×10^4 개의 세포/kg 체중 내지 1×10^7 개의 세포/kg 체중; 2.5×10^4 개의 세포/kg 체중 및 1×10^7 개의 세포/kg 체중; 2×10^4 개의 세포/kg 체중 및 3×10^6 개의 세포/kg 체중; 2.5×10^4 개의 세포/kg 체중 및 3×10^6 개의 세포/kg 체중; 2×10^4 개의 세포/kg 체중 및 2×10^6 개의 세포/kg 체중; 2.5×10^4 개의 세포/kg 체중 및 2×10^6 개의 세포/kg 체중; 2×10^4 개의 세포/kg 체중 내지 1×10^6 개의 세포/kg 체중; 2.5×10^4 개의 세포/kg 체중 내지 1×10^6 개의 세포/kg 체중; 2×10^4 개의 세포/kg 체중 내지 1×10^5 개의 세포/kg 체중; 또는 2.5×10^4 개의 세포/kg 체중 내지 1×10^5 개의 세포/kg 체중일 수 있다.

[0335] 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포 및/또는 이의 자손 세포는 (예를 들어, 카테터 또는 주사기에 의해) 수술로 이식되거나, 주사되거나, 전달되거나, 또 다르게는 수선 또는 확대가 필요한 부위, 예를 들어, 대상체의 기관 또는 혈액계에 직접적으로 또는 간접적으로 투여될 수 있다.

[0336] 일 실시형태에서, 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포 및/또는 이의 자손 세포는 대상체의 혈류에 전달된다. 예를 들어, 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포 및/또는 이의 자손 세포는 비경구로 전달된다. 예시적인 비경구 투여 경로는 정맥내, 근육내, 피하, 동맥내, 복강내, 뇌실내, 뇌실내, 척추강내를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0337] 일 실시형태에서, 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포 및/또는 이의 자손 세포는, 예를 들어, 주사기를 이용하여 또는 카테터 또는 중심선을 통해, 전달 부위에 주사된다.

[0338] 치료 제형을 위해 투여 요법을 선택하는 것은 독립체의 혈청 또는 조직 전환율, 증상 수준 및 독립체의 면역원성을 포함하는 몇몇 인자에 의존한다. 바람직하게는, 투여 요법은 부작용의 허용 가능한 수준과 일치되는 환자에게 전달되는 치료 화합물의 양을 최대화한다.

[0339] 일례에서, 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포 및/또는 이의 자손 세포는 단일 볼루스 용량으로서 전달된다. 대안적으로, 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포 및/또는 이의 자손 세포는 지속적 주입에 의해 투여된다.

[0340] 임의의 특정 투여 방법으로 제한되는 일 없이, 비경구 투여 방법이 바람직하다. 전신 또는 부분적 신체 투여가 가능하지만, 전신 투여가 바람직하며, 정맥내 주사가 가장 바람직하다.

[0341] 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포 및/또는 이의 자손 세포 또는 이를 포함하는 조성물은 다른 활성제(들)와 조합하여 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 개시내용의 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포는 코티코스테로이드, 비-스테로이드성 항염증 화합물, 또는 염증을 치료하는 데 유용한 다른 제제와 조합될 수 있다. 이들 다른 제제와 함께 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포의 조합된 사용은 동시이거나, 또는 순차적으로 제공될 수 있으며, 즉, 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포 또는 이를 포함하는 조성물은 1종 이상의 다른 활성제에 의한 치료 전에 또는 후에 제공될 수 있다.

[0342] 일 실시형태에서, 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포 및/또는 이의 자손 세포는 조혈 줄기 세포의 투여 전에, 동시에 또는 후에 투여된다.

[0343] 다른 실시형태에서, 조혈 줄기 세포는 대상체의 투여 전에 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포 및/또는 이의 자손 세포와 함께 공동 배양된다.

[0344] 담당의사는 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포, 또는 이를 포함하는 조성물을 다른 활성제와 조합하여 투여하는 적절한 순서를 결정할 수 있다.

[0345] **염증 장애의 치료**

[0346] 본 개시내용은 또한 대상체에서 자가면역 질환을 치료하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 대상체에서 자가면역 질환을 치료하는 데 효과적인 양으로 본 명세서에 기재된 바와 같은 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포 또는 이들의 자손을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 본 개시내용에 따라 치료될 수 있는 자가면역 질환은 다발성 경화증, 1형 당뇨병, 류마티스 관절염, 포도막염, 셀리악병, 루푸스, 자가면역 갑상선질환, 염증성 장질환, 자가면역 림프증식질환(ALPS) 탈수초성 질환, 자가면역 뇌척수염, 자가면역 위염(AIG) 및 자가면역 사구체 질환을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

- [0347] **유전자 변형된 세포**
- [0348] 일 실시형태에서, 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포는, 예를 들어, 관심 대상의 단백질, 예를 들어, 치료적 및/또는 예방적 이점을 제공하는 단백질을 발현시키고/시키거나 분비하도록 유전자 변형된다.
- [0349] 세포를 유전자 변형시키는 방법은 당업자에게 분명할 것이다. 예를 들어, 세포에서 발현될 핵산은 세포에서 발현을 유도하기 위한 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 예를 들어, 핵산은 대상체의 다양한 세포에서 작동 가능한 프로모터, 예를 들어, 바이러스 프로모터, 예를 들어, CMV 프로모터(예를 들어, CMV-IE 프로모터) 또는 SV-40 프로모터에 연결된다. 추가적인 적합한 프로모터는 당업계에 공지되어 있다.
- [0350] 바람직하게는, 핵산은 발현 작제물의 형태로 제공된다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "발현 작제물"은 세포에서 작동 가능하게 연결된 핵산(예를 들어, 수용체 유전자 및/또는 계수기-선택 가능한 리포터 유전자) 상에서 발현을 부여하는 능력을 갖는 핵산을 지칭한다. 본 개시내용의 내용 내에서, 발현 작제물은 플라스미드, 박테리오파지, 파지미드, 코스미드, 바이러스 서브-게놈 또는 게놈 단편, 또는 발현 가능한 형식으로 이중성 DNA를 유지하고/하거나 복제할 수 있는 다른 핵산을 포함하거나 또는 이들일 수 있다는 것이 이해되어야 한다.
- [0351] 본 발명의 수행을 위한 적합한 발현 작제물의 작제 방법은 당업자에게 명확하며, 예를 들어, 문헌[Ausubel F. M., 1987, 현재까지의 모든 업데이트를 포함; 또는 Sambrook & Green, 2012]에 기재되어 있다. 예를 들어, 발현 작제물의 성분 각각은, 예를 들어, PCR을 이용하여 적합한 주형 핵산으로부터 증폭되고, 후속적으로 적합한 발현 작제물, 예를 들어, 플라스미드 또는 파지미드로 클로닝된다.
- [0352] 이러한 발현 작제물에 적합한 벡터는 당업계에 공지되어 있고/있거나 본 명세서에 기재되어 있다. 예를 들어, 포유류 세포에서 본 발명의 방법에 적합한 발현 벡터는, 예를 들어, pcDNA 벡터 스위트(pcDNA vector suite)의 벡터(인비트로젠(Invitrogen)), pCI 벡터 스위트의 벡터(프로메가(Promega)), pCMV 벡터 스위트의 벡터(클론테크(Clontech)), pM 벡터(클론테크), pSI 벡터(프로메가), VP 16 벡터(클론테크) 또는 pcDNA 벡터 스위트의 벡터(인비트로젠)이다.
- [0353] 당업자는 추가적인 벡터 및 이러한 벡터의 공급원, 예를 들어, 인비트로젠 코퍼레이션, 클론테크 또는 프로메가를 인식할 것이다.
- [0354] 단리된 핵산 분자 또는 이를 포함하는 유전자 작제물을 발현을 위해 세포에 도입하기 위한 수단은 당업자에게 공지되어 있다. 주어진 유기체에 대해 사용되는 기법은 공지된 성공적인 기법에 의존한다. 재조합 DNA를 세포에 도입하기 위한 수단은 미량주사법, DEAE-텍스트란에 의해 매개되는 형질감염, 리포솜에 의해, 예컨대, 리포펙타민(lipofectamine)(미국 매릴랜드주에 소재한 킵코사(Gibco)) 및/또는 셀펙틴(cellfectin)(미국 매릴랜드주에 소재한 킵코), PEG-매개 DNA 흡수, 전기천공법 및 마이크로입자총을 이용함으로써, 예컨대, DNA-코팅된 텅스텐 또는 금 입자(미국 위스콘신주에 소재한 아그라세투스 인코포레이티드(Agracetus Inc.))를 이용함으로써 매개되는 형질감염을 포함한다.
- [0355] 대안적으로, 본 발명의 발현 작제물은 바이러스 벡터이다. 적합한 바이러스 벡터는 당업계에 공지되어 있고, 상업적으로 입수 가능하다. 숙주 세포 게놈 내로 핵산의 전달 및 핵산의 통합을 위한 통상적인 바이러스 기반 시스템은, 예를 들어, 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 또는 아데노연관 바이러스 벡터를 포함한다. 대안적으로, 아데노바이러스 벡터는 에피솜을 남기는 핵산을 숙주 세포 내로 도입하는 데 유용하다. 바이러스 벡터는 표적 세포 및 조직에서 효율적이고 다재다능한 유전자 전달 방법이다. 추가적으로, 높은 형질도입 효율은 다수의 상이한 세포 유형 및 표적 조직에서 관찰되었다.
- [0356] 예를 들어, 레트로바이러스 벡터는 일반적으로 6 내지 10kb까지의 외래 서열에 대한 패키징 능력을 갖는시스-작용성 긴 말단 반복부(long terminal repeat: LTR)를 포함한다. 최소 시스-작용성 LTR은 벡터의 복제 및 패키징에 충분하고, 이어서, 장기간 발현을 제공하기 위해 표적 세포내로 발현 작제물을 통합하는 데 사용된다. 널리 사용되는 레트로바이러스 벡터는 뮌헨 백혈병 바이러스(MuLV), 일본 유인원 백혈병 바이러스(GaLV), 유인원 면역결핍 바이러스(SrV), 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 및 이들의 조합(예를 들어, 국제 특허 출원 공개 WO1994/026877; 문헌[Buchschacher & Panganiban, 1992; Johann et al., 1992; Sommerfelt & Weiss, 1990; Wilson et al., 1989; Miller et al., 1991; Lynch, et al., 1991; Miller & Rosman, 1989; Miller, 1990; Scarpa et al., 1991; Burnset al., 1993]에 기반하는 것을 포함한다.
- [0357] 또한 핵산 전달을 위해 다양한 아데노-연관 바이러스(AAV) 벡터 시스템이 개발되었다. AAV 벡터는 당업계에 공지된 기법을 이용하여 용이하게 작제될 수 있다. (예를 들어, 미국 특허 제5173414호 및 제5139941호; 국제 특허

허 출원 공개 WO 92/01070 및 WO 93/03769; 문헌[Lebkowski et al., 1988; Vincent et al., 1990; Carter, 1992; Muzyczka, 1992; Kotin, 1994; Shelling & Smith, 1994; Zhou et al., 1994] 참조.

[0358] 본 발명의 발현 작제물을 전달하는 데 유용한 추가적인 바이러스 벡터는, 예를 들어, 바이러스의 폭스파로부터 유래된 것, 예컨대, 백시니아 바이러스 및 조류 폭스바이러스 또는 알파바이러스 또는 집합 바이러스 벡터(예를 들어, 문헌[Fisher-Hoch et al., 1989]에 기재된 것)을 포함한다.

[0359] 수많은 변화 및/또는 변형이 본 개시내용의 광범위한 일반적 범주로부터 벗어나는 일 없이 상기 기재한 실시형태로 이루어질 수 있다는 것이 인식될 것이다. 따라서, 본 실시형태는 모든 양상에서 예시적 그리고 제한적이지 않은 것으로 고려되어야 한다.

[0360] 조혈 세포

[0361] 일부 예에서, 수용자 대상체는 조혈 세포를 포함하는 공여자 이식편을 받을 것이다. 추가 예에서, 공여자 이식편은 혈액으로부터 채취한 골수 또는 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)이다. 이러한 이식편은 조혈 세포를 포함할 것이다. 이식편, 골수 이식, PBMC 이식과 같은 용어는 조혈 세포를 함유하는 이식을 기재하기 위해 사용된다. 조혈 세포 이식(HCT)은 매우 다양한 악성종양 및 비악성종양 질환에 대한 중요하고 잠재적으로 근치적인 치료 선택이다. 이 절차에 필요한 다능성 조혈 줄기 세포는 보통 관련된 또는 관련없는 공여자의 골수 또는 말초 혈액으로부터 얻어진다. 영아 출생 후 탯줄 및 태반에 남아있는 혈액인 제대혈은 동종이계 HCT에서 조혈 줄기 세포의 확립된 대안의 공급원으로서 나타났다.

[0362] 본 명세서에서 지칭되는 용어 "조혈 세포"는 임의의 공급원(예를 들어, 골수, 말초혈액, 제대혈)으로부터의 전구체/조혈 줄기 세포를 지칭하는 일반적 용어이다. 다르게는, 이러한 세포의 공급원은 구체화될 것이다(예를 들어, 자가 유래 말초 혈액 전구체 세포 이식).

[0363] 일부 예에서, PBMC는 공여자의 분리반출법에 의해 얻어진다. 이와 관련하여, 공여자는 관련없는 공여자일 수 있는데, 이 경우에 이식편은 동종이계 PBPC 이식편으로서 지칭된다. 다른 예에서, PBMC는 치료(예를 들어, 화학요법 치료)를 받기 전에 수용자로부터 얻는다. 이와 관련하여, 이식편은 자가 유래 PBPC 이식편으로서 지칭된다.

[0364] 일부 예에서, PBPC는 공여자(한 명의 수용자)가 과립구 콜로니 줄기 세포 인자(G-CSF) 주사의 과정을 받은 후에 얻는다. 이론에 의해 구속되는 일 없이, 전형적으로 대상체는 매일 G-CSF의 피하 주사를 받을 것이고, 그들의 백혈구 계수는 며칠마다 모니터링되어 말초 혈액 내로 줄기 세포의 이동을 모니터링할 것이다. 일부 예에서, 대상체는 적어도 7일 동안 G-CSF의 연속적인 매일의 주사를 받을 것이다. 일부 예에서, 대상체는 적어도 10일 동안 G-CSF의 연속적인 매일의 주사를 받을 것이다. 일부 예에서, G-CSF는 다른 제제(예를 들어, 플렉사포르(plerixafor) 주사 또는 줄기 세포 인자(SCF))와 조합될 수 있다.

[0365] 수많은 변화 및/또는 변형이 본 개시내용의 광범위한 일반적 범주로부터 벗어나는 일 없이 상기 기재한 실시형태로 이루어질 수 있다는 것이 인식될 것이다. 따라서, 본 실시형태는 모든 양상에서 예시적 그리고 제한적이지 않은 것으로 고려되어야 한다.

[0366] 실시예

[0367] 실시예 1 물질 및 방법

[0368] 플라스틱 부착 기법을 이용하여 제조된 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포(MLPSC)

[0369] 미국 특허 제5,837,539호에 기재된 바와 같이 골수로부터 드 노보(de novo)로 MLPSC를 생성하였다. 대략 80 내지 100ml의 골수를 멸균 해파린-함유 주사기에 흡입하고 나서, MSC 생성을 위해 MDACC 세포 요법 연구실에 취하였다. 피콜-하이팩(ficoll-hypaque)을 이용하여 골수 단핵세포를 분리시키고 나서, 겐타마이신, 글루타민(2mM) 및 20%(v/v) 소태아 혈청(FBS)(하이클론(Hyclone))을 함유하는 알파 변형 MEM(α MEM)을 포함하는 MLPSC 확장 배지의 플라스크 당 50ml로 2개의 T175 플라스크에 넣었다.

[0370] 세포를 비부착 세포가 제거될 때 37°C, 5% CO₂에서 2 내지 3일 동안 배양시켰고; 세포 함유가 70% 이상에 도달될 때까지(7 내지 10일) 남아있는 부착 세포를 지속적으로 배양시켰고, 이어서, 세포를 트립신처리하고 나서, 확장 배지(플라스크당 50ml의 배지)를 갖는 6개의 T175 플라스크에서 교체하였다.

[0371] 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포(MLPSC)의 면역선택

[0372] 건강한 정상 성인 지원자(20 내지 35세)로부터 골수(BM)를 채취하였다. 간략하게, 40ml의 BM을 뒤엎땀병 능선의

로부터 리튬-헤파린 항응고제-함유관으로부터 흡입한다.

- [0373] 문헌[Zannettino et al., 1998]에 의해 앞서 기재한 바와 같이 림포프랩(Lymphoprep)(상표명)(노르웨이 오슬로에 소재한 나이코메드 파마(Nycomed Pharma))을 이용하는 밀도 구배 분리에 의해 골수 단핵세포(BMMNC)를 제조하였다. 400×g에서 30분 동안 4℃에서 원심분리 후에, 전달 피펫으로 연층을 제거하고 나서, 5% 소 태아 혈청(FCS, 호주 빅토리아에 소재한 CSL 리미티드(CSL Limited))을 함유하는 행크스 균형 염 용액(Hank's balanced salt solution: HBSS; 라이프 테크놀로지스(Life Technologies), 메릴랜드주 게이터스버그에 소재)으로 구성된 "HHF"로 3회 세척하였다.
- [0374] STRO-3+(또는 TNAP+) 세포를 후속적으로 문헌[Gronthos & Simmons, 1995; 및 Gronthos, 2003]에 의해 앞서 기재한 바와 같이 자기 활성화 세포 분류에 의해 분리시켰다. 간략하게, 대략 1 내지 3×10^8 개의 BMMNC를 20분 동안 얼음 상에서 HHF 중의 10%(v/v) 정상 토끼 혈청으로 이루어진 차단 완충제 중에서 인큐베이션시킨다. 세포를 1시간 동안 얼음 상에서 차단 완충제 중의 STRO-3 mAb의 10μg/ml 용액의 200μl와 함께 인큐베이션시킨다. 세포를 후속적으로 400×g에서 원심분리에 의해 HHF 중에서 2회 세척하였다. HHF 완충제 중의 염소 항-마우스 γ-바 이오틴(서던 바이오테크놀로지 어소시에이츠(Southern Biotechnology Associates), 영국 버밍엄에 소재)의 1/50 희석을 첨가하고 나서, 세포를 얼음 상에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 세포를 상기와 같은 MACS 완충제(1% BSA, 5mM EDTA 및 0.01% 아자이드 나트륨을 보충한 무 Ca^{2+} - 및 Mg^{2+} PBS) 중에서 2회 세척하고 나서, 최종 용적 0.9ml MACS 완충제 중에서 재현탁시켰다.
- [0375] 100μl 스트렙타비딘 마이크로비드(밀테니 바이오텍(Miltenyi Biotec); 독일 베르기슈글라트바흐에 소재)를 세포 현탁액에 첨가하고 나서, 15분 동안 얼음 상에서 인큐베이션시켰다. 세포 현탁액을 2회 세척하고 나서, 0.5ml의 MACS 완충제 중에서 재현탁시키고, 후속적으로 미니 MACS 칼럼(MS 칼럼, 밀테니 바이오텍) 상에 장입하고 나서, 0.5ml의 MACS 완충제로 3회 세척하여 STRO-3 mAb(미국 미생물 보존 센터(ATCC)에 의해 수탁 번호 PTA-7282 하에 2005년 12월 19일자로 기탁됨- 국제특허출원 공개 WO 2006/108229 참조)에 결합하지 않은 세포를 회수하였다. 추가 1ml의 MACS 완충제의 첨가 후에, 칼럼을 자석으로부터 제거하고 나서, TNAP+ 세포를 양압에 의해 분리시킨다. 각각의 분획으로부터의 세포의 분취액을 스트렙타비딘-FITC로 염색하고 나서 유세포분석에 의해 순도를 평가할 수 있다.
- [0376] **IL-2Rα 발현의 측정**
- [0377] 배양 배지의 제조
- [0378] 10% 소 태아 혈청 및 2mM 글루타맥스-I(GlutaMax-I)를 함유하는 DMEM을 제조하고 나서, 0.2μm 필터를 통해 여과시키고, 2 내지 8℃에서 1개월의 유효기간을 라벨링하였다. 배양 배지를 사용 전에 37℃ 수욕에서 30분 동안 사전 가온시켰다.
- [0379] 0.5% 트립신/EDTA의 제조
- [0380] 0.5% EDTA를 함유하는 EDTA를 제조하고 나서, 0.2μm 필터를 통해 여과시키고, 12개월 유효 기간 또는 시약 유효기간 중 빠른 것으로 라벨링하고, -20℃에서 분취액 중에 저장하였다.
- [0381] MLPSC의 해동
- [0382] MLPSC 배취 샘플 바이알을 해동시켰다. 배취당 최대 2개의 샘플을 해동시켰다. 기체상 LN₂ 냉동기로부터 샘플 바이알을 회수하고 나서, 15분 이내에 해동되었다면 드라이아이스 상에 옮기고 또는 즉시 해동되었다면(1분 이하) 젖은 얼음 상에 둔다. 샘플 바이알을 37℃±2℃ 수욕에 넣고 5분 이하 동안 해동시키고 나서, 수욕으로부터 제거하고, 외면에 70% 아이소프로필 알코올로 분사하거나 또는 닦고, 생물안전작업대에 옮겼다. 16g 또는 더 큰 바늘이 맞는 10ml 주사기를 이용하여 15ml의 사전 가온시킨 배양물을 적가하면서 50ml 원심분리관에 세포를 옮기고, 웰을 혼합하였다. 세포를 후속적으로 40μm 셀 스트레이너를 통해 통과시키고 나서, 새로운 50ml 관에서 수집하였다. 이어서, 세포를 250×g으로 RT 또는 2 내지 8℃에서 8분 동안 원심분리시켰다. 상청액을 버리고 나서, 세포를 8ml의 배양 배지(3 내지 5×10^6 개의 세포/ml 표적 농도) 중에서 재현탁시켰다. 세포를 부드럽게 분쇄하여 균일한 현탁액을 보장하였다. 0.2ml 샘플을 사용하여 트립핀 블루 세포 계수를 수행하였다. 평균 생존도는 70% 이상이었다. 두 샘플을 시험하였다면, 상기 절차를 반복하였다.
- [0383] MLPSC 사전 배양

- [0384] 세포를 최소 3, 바람직하게는 $4 \times T175$ 플라스크에서 6,857개의 세포/ cm^2 세포로 파종하였다. 플라스크를 세포가 균일하게 분포하도록 부드럽게 진탕시키고, 후속적으로 $37^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, $5 \pm 2\%$ CO_2 에서 밤새 24시간까지 인큐베이션시켰다. 세포를 인큐베이터로부터 제거하고 나서, 현미경 하에 시험하여 30% 이상의 합류를 보장하고, 오염물질의 시각적 징후에 대해 세포 형태를 관찰하였다. 각각의 플라스크로부터 배지를 멸균 흡입하고 나서, 30ml 사전 가온시킨 배양 배지로 대체하였다. 플라스크를 제1일에 인큐베이션 시작 시간으로부터 총 60 내지 84시간 동안 $37^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, $5 \pm 2\%$ CO_2 에서 인큐베이션시켰다.
- [0385] 공동 배양 배지의 제조
- [0386] 동일한 용적의 배양 배지 및 DMEM을 첨가함으로써 공동 배양 배지를 제조하였다. 공동 배양 배지를 사용 전에 37°C 수욕에서 30분 동안 사전 가온시켰다.
- [0387] PBMC의 해동
- [0388] 자격이 있는 PBMC 바이알을 해동시켰다. 해동시킨 바이알의 수는 바이알 당 총 세포 수(제조업자의 요구에 기반함)에 의존한다. 바이알당 2×10^7 개 초과와 생세포가 있다면, 1개의 바이알만을 해동시켰다. 기체상 LN_2 냉동기로부터 바이알(들)을 회수하고 나서, 15분 이내에 해동되었다면 드라이아이스 상에 옮기고 또는 즉시 해동되었다면(1분 이하) 젖은 얼음 상에 둔다. 바이알을 $37^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ 수욕에 넣고 2 내지 3분 동안 해동시키고 나서, 수욕으로부터 제거하고, 외면에 70% 아이소프로필 알코올로 분사하거나 또는 닦고, 생물안전작업대에 옮겼다. 16g 또는 더 큰 바늘이 맞는 10ml 주사기를 이용하여 20ml의 사전 가온시킨 배양 배지를 적가하면서 50ml 원심분리관에 세포를 옮기고, 웰을 혼합하였다. 바이알을 배양 배지로 린스하고 나서, 임의의 잔여 세포를 관에 첨가하였다. 세포를 후속적으로 $40\mu\text{m}$ 셀 스트레이너를 통해 통과시키고 나서, 새로운 50ml 관에서 수집하였다. 이어서, 세포를 $350 \times \text{g}$ 으로 RT 또는 2 내지 8°C 에서 5분 동안 원심분리시켰다. 상청액을 버리고 나서, 세포를 2.5×10^6 개의 세포/ml로 공동 배양 배지에서 재현탁시켰다. 0.2ml의 샘플을 사용하여 트립판 블루 세포 계수를 수행하였다. 평균 생존도는 70% 이상이었다. 2×10^6 개의 세포/ml로 8ml의 PBMC(총 1.6×10^7 PBMC)를 공동 배양 배지에서 제조하고 나서, PBMC를 얼음 상에서 인큐베이션시킨 한편, MLPSC를 제조하였다. 세포 계수 후에 총 생세포가 1.6×10^7 개 미만이라면, PBMC의 다른 바이알을 해동시키고 나서, 상기 절차를 반복하였다.
- [0389] MLPSC의 제조
- [0390] 인큐베이터로부터 간충직 계통 세포를 제거하고 나서, 세포 부착 및 세포 형태(길고 편평한 섬유아세포)를 관찰하기 위해 현미경 하에 시험하였다. 플라스크로부터 배지를 멸균 흡입하고 나서, 세포를 9ml의 사전 가온시킨 DPBS로 세척하였다. DPBS를 후속적으로 흡입하고 나서, 4ml 사전 가온시킨 0.05%의 트립신/EDTA를 플라스크마다 첨가하였다. 플라스크를 진탕시켜 코팅시키고 나서, 37°C 에서 3 내지 6분 동안 인큐베이션시켰다. 인큐베이션 동안에 플라스크의 측면을 두드렸다. 현미경 하에 세포를 시험하여 그들이 완전히 분리되는 것을 보장하였다. 분리되지 않는다면, 플라스크를 다시 두드렸다. 7ml의 사전가온시킨 배양 배지를 각각의 플라스크에 첨가하여 세포를 제거하였다. 플라스크로부터 세포를 50ml의 원뿔형관에 풀링하였다. 추가 1ml의 사전가온시킨 배양 배지로 플라스크를 세정하고 나서, 임의의 잔여 세포를 관에 첨가하였다. 후속적으로, 세포를 $350 \times \text{g}$ 으로 RT 또는 2 내지 8°C 에서 5분 동안 원심분리시켰다. 상청액을 흡입하고 나서, 세포를 2ml의 공동 배양 배지/플라스크에서 재현탁시켰다. 0.2ml의 샘플을 사용하여 트립판 블루 세포 계수를 수행하였다. 평균 생존도는 70% 이상이었다. 1.5ml의 MLC를 4×10^5 개의 세포/ml(총 6×10^5 개 MPC)를 공동-배양 배지에서 제조한 한편, PBMC를 자극하였다.
- [0391] PBMC의 자극
- [0392] 5ml의 PBMC 현탁액을 15ml 원뿔형관에 옮기고 나서, $20\mu\text{l}$ 의 1mg/ml CD3 항체 저장액 및 $20\mu\text{l}$ 의 1mg/ml CD28 항체 저장액을 첨가하여 $4\mu\text{g}/\text{ml}$ 항-CD3 항체 및 $4\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 항-CD28 항체(자극된PBMC)의 최종 농도를 달성하였다. 남아있는 PBMC를 자극하지 않았다. 24-웰 플레이트 레이아웃은 이하에 나타내는 바에 따랐다.

	1	2	3	4	5	6
A					샘플 1: _____ 공동배양 - 500 μ l	
B		500 μ l 비자극된 PBMC + 500 μ l 공동배양 배지	500 μ l 자극 PBMC + 500 μ l 공동배양 배지		자극 PBMC + 500 μ l ceMSC	
C					☐ N/A 샘플 2: _____ 공동배양 - 500 μ l	
D					자극 PBMC + 500 μ l ceMSC	

[0393]

[0394]

500 μ l의 비자극 PBMC(음성 대조군)를 24 웰 플레이트의 B2, B3, C2 및 C3의 웰에 첨가하였다. 500 μ l의 자극된 PBMC(양성 대조군)를 웰 B4 및 C4에 첨가하였다. 500 μ l의 자극된 PBMC를 웰 A5, B5, C5 및 D5에 첨가하였다. 하나의 MLPSC 샘플만을 시험하였다면, 500 μ l의 자극된 PBMC를 웰 A5 및 B5에만 첨가하였다. 500 μ l의 배양물 확장된 MLPSC(샘플 1)를 웰 A5 및 B5를 공동배양시키기 위해 첨가하였다. 500 μ l의 배양물 확장된 MLPSC(샘플 2)를 웰 C5 및 D5를 공동배양시키기 위해 첨가하였다. 500 μ l의 공동-배양 배지를 웰 B2, B3, B4, C2, C3 및 C4에 첨가하였다. 모든 비어있는 웰을 1000 μ l의 공동배양 배지에 첨가하여 증발 손실을 감소시켰다. 이들 조건은 대략 1 MLC: 5 PMBC의 비를 나타내었다.

[0395]

플레이트를 37 $^{\circ}$ C $\pm$ 2 $^{\circ}$ C, 5 $\pm$ 2% CO₂에서 60 내지 84시간 동안 인큐베이션시키고 나서, 형태를 관찰하였다(도 1 참조).

[0396]

ELISA

[0397]

제조업자의 설명서(알앤디 시스템즈(R&D systems))에 따라 상업적으로 입수 가능한 ELISA 키트에 의해 IL-2R α 발현을 측정하였다. 제조업자의 프로토콜에 따라 ELISA를 수행하였다. 분석은 정량적 샌드위치 효소 면역분석 기법을 사용한다. 분석은 IL-2R α 에 특이적인 단클론성 항체로 사전 코팅한 웰을 포함하는 마이크로플레이트를 사용한다. IL-2R α 는 캘리브레이터 샘플, 품질 관리 샘플에 존재하거나, 또는 공동배양된 샘플은 고정된 IL-2R α 항체에 의해 포획한다. 임의의 비결합 물질을 세척한 후에, IL-2R α 에 특이적인 효소결합 다클론성 항체를 웰에 첨가하였다. 임의의 비결합 효소 결합 항체를 제거하기 위한 세척 단계 후에, 기질 용액을 웰에 첨가하고 나서, 색은 결합된 IL-2R α 의 양에 대한 비율로 생긴다. 이어서, 발색현상이 중단되고, ELISA 판독기를 이용하여 색의 강도를 측정한다. ELISA의 상세한 설명을 이하에 제공한다.

[0398]

1000 μ l 피펫을 이용하여 각각의 웰에서 세포를 채취하고 나서, 마이크로원심분리관에 옮겼다. 웰을 200 μ l의 사전 가온시킨 DPBS로 세정하고 나서, 임의의 잔여 세포를 관에 첨가하였다. 세포가 완전히 제거되었다는 것을 확인하기 위해 현미경 하에 배양 플레이트를 관찰하였다. 최대 rpm으로 RT 또는 2 내지 8 $^{\circ}$ C에서 90초 동안 세포를 원심분리시켰다. 상청액을 흡입하고 나서, 세포 펠릿을 얼음에 둔 한편, 용해 완충제를 제조하였다. 10ml의 셀라이틱-엠(CellLytic-M) 세포 용해 추출 시약에 하나의 완전 미니-정제를 첨가함으로써 용해 완충제를 제조하였다. 용해 완충제를 교반시켜 혼합하고 얼음 상에서 저장하였다. 250 μ l의 용해 완충제를 각각의 관에 첨가하였다. 1000 μ l의 피펫을 이용하여 각각의 펠릿을 재현탁시키고 나서, 교반시켰다. 세포를 15분 동안 얼음 상에서 인큐베이션시켰다. 이어서, 2회 중복 용해물을 풀링시키고, 혼합하였다. 용해물을 최대 rpm으로 RT 또는 2 내지 8 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 원심분리시키고 나서, 용해물을 새로운 관에 옮겨서 임의의 펠릿화된 물질을 피하였다. 용해물을 29일까지 동안 -60 $^{\circ}$ C 이하로 저장하였고, 동일한 날에 ELISA를 수행하였다. 동일한 날에 ELISA를 수행하였다면, 용해물을 드라이 아이스 상에서 또는 -60 $^{\circ}$ C 이하의 냉동기에서 최소 15분 동안 처음 냉동시켰다.

[0399]

모든 샘플 및 시약을 주위 온도가 되게 하고, 사용 전 적어도 30분 동안 방치하였다. 20ml의 농축 세척 완충제를 480ml의 나노(NANO) 워터(1:25 희석을 제공) 중에서 희석시키고 나서, 잘 혼합하였다. 용액을 1개월의 유효 기간 또는 키트의 유효 기간 중 더 빠른 것으로 라벨링하고 2 내지 8 $^{\circ}$ C에서 저장하였다. 3회 웰을 마이크로플레이트 상에서 표준품, 대조군 및 샘플에 부여하였다. 마이크로플레이트로부터 과량의 스트립을 제거하였다. 20ml의 셀라이틱-엠 시약에 2개의 완전 미니-정제를 첨가함으로써 용해 완충제를 제조하였다. 용해 완충제를 교반시켜 혼합하고 얼음 상에서 저장하였다. 1ml의 용해 완충제를 2개의 IL-2R α 표준품에 첨가하여 5000pg/ml 표준품을 생성하였다. 표준품을 최소 30분 동안 부드럽게 교반시키면서 RT에서 인큐베이션시켰다. 인큐베이션 후에, 각각의 표준품의 용적을 풀링하고, 연속 희석물 및 대조군 희석물을 이하의 표 1 및 표 2에 따라 제조하였다:

표 1

연속 희석물

표준품 희석물			
초기 농도 (pg/ml)	표준품의 용적 (μ l)	용해 완충제의 용적 (μ l)	최종 농도 (pg/ml)
5000	400	N/A	5000
5000	400	400	2500
2500	400	400	1250
1250	400	400	625
625	400	400	313
313	400	400	156
156	400	400	78
N/A	N/A	750	0

[0400]

표 2

대조군 희석물

대조군 희석물				
초기 농도 (pg/ml)	표준품의 용적 (μ l)	용해 완충제의 용적 (μ l)	대조군	최종 농도 (pg/ml)
5000	300	75	1	4000
5000	150	225	2	2000
5000	90	910	3	450

[0401]

[0402] 비자극 샘플을 이하의 표 3에 따라 제조하였다:

표 3

비자극 샘플(음성 대조군)

PBMC 로트 번호	초기 비자극된 PBMC	순수 (unspiked) 샘플의 용적(μ l)	5000 pg/ml 표준품의 용적(μ l)	최종 혼합 (Spike) 농도 (pg/ml)	최종 샘플 희석
	1x	273	27	450	~1X
	1x	273	27	450	~1X

[0403]

[0404] 공동 배양 샘플을 이하의 표 4에 따라 제조하였다:

표 4

공동 배양물 샘플

샘플 ID	초기 희석	ceMSCs/hPBMSC 용해물의 용적 (μl)	용해 완충제의 용적 (μl)	최종 샘플 희석
	1x	50	200	5X
	1x	50	200	5X
	1x	50	200	5X
	1x	50	200	5X

[0405]

[0406]

100μl의 분석 희석제 RD1-1을 항-IL-2R α 단클론성 항체로 사전 코팅한 마이크로플레이트의 모든 웰에 첨가하였다. 50μl의 표준품, 대조군 또는 샘플을 적절한 웰에 첨가하였다. 다클론성 항-IL-2R α HRP 접합체를 각각의 웰에 첨가하고 나서, 플레이트를 3시간±20분 동안 RT에서 오비탈 진탕기 상에서 부드럽게 교반시키면서 인큐베이션시켰다. 이어서, 플레이트를 웰당 300μl의 세척 완충제로 4회 세척하였다. 마지막 세척 후에, 흡착 페이퍼 상에 플레이트를 블롯팅함으로써 잔여 액체를 제거하였다. 사용 15분 이내에, 동일 분량의 시약 A와 시약 B를 혼합함으로써 기질 용액을 제조하였다. 200μl 기질 용액을 각각의 웰에 첨가하고 나서, 플레이트를 뒤집고, 20±5분 동안 RT으로 암실에서 인큐베이션시켰다. 50μl의 정지 용액을 각각의 웰에 첨가하고 나서, 마이크로플레이트 판독기 상에서 판독한 각각의 샘플의 광학 밀도(OD)를 450nm로 설정하고 5 내지 30분 이내에 570nm에서의 파장 보정하였다. 4모수 로지스틱 곡선 적합화를 이용하여 표준 곡선을 구성하였다. 각각의 샘플에서 IL-2R α의 농도는 표준 곡선으로부터 유래되었고, 최종 결과를 얻기 위해 희석에 대해 보정하였다.

[0407]

TNFR1 발현의 측정

[0408]

배양 배지의 제조

[0409]

10% 소 태아 혈청 및 1mM 글루타맥스-I(GlutaMax-I)를 함유하는 DMEM을 제조하고 나서, 0.2μm 필터를 통해 여과시키고, 2 내지 8℃에서 1개월의 유효기간을 라벨링하였다. 배양 배지를 사용 전에 37℃ 수욕에서 30분 동안 사전 가온시켰다.

[0410]

0.5% 트립신/EDTA의 제조

[0411]

0.5% EDTA를 함유하는 EDTA를 제조하고 나서, 0.2μm 필터를 통해 여과시키고, 12개월 유효 기간 또는 시약 유효기간 중 빠른 것으로 라벨링하고, -20℃에서 분취액 중에 저장하였다.

[0412]

간충직 계통 세포의 해동

[0413]

MLPSC 배척 샘플 바이알을 해동시켰다. 배척당 최대 2개의 샘플을 해동시켰다. 기체상 LN₂ 냉동기로부터 샘플 바이알을 회수하고 나서, 15분 이내에 해동되었다면 드라이아이스 상에 옮기고 또는 즉시 해동되었다면(1분 이하) 젖은 얼음 상에 둔다. 샘플 바이알을 37℃±2℃ 수욕에 넣고 5분 이하 동안 해동시키고 나서, 수욕으로부터 제거하고, 외면에 70% 아이소프로필 알코올로 분사하거나 또는 닦고, 생물안전작업대에 옮겼다. 16g 또는 더 큰 바늘이 맞는 10ml 주사기를 이용하여 8ml의 사전 가온시킨 배양물을 적가하면서 50ml 원심분리관에 2ml의 세포를 옮기고, 웰을 혼합하였다. 세포를 후속적으로 40μm 셀 스트레이너를 통해 통과시키고 나서, 새로운 50ml 관에서 수집하였다. 이어서, 세포를 250×g으로 RT 또는 2 내지 8℃에서 5분 동안 원심분리시켰다. 상청액을 버리고 나서, 세포를 5ml의 배양 배지(3 내지 5×10⁶개의 세포/ml 표적 농도) 중에서 재현탁시켰다. 세포를 부드럽게 분쇄하여 균일한 현탁액을 보장하였다. 0.2ml의 샘플을 사용하여 트립판 블루 세포 계수를 수행하였다. 평균 생존도는 70% 이상이었다. 두 샘플을 시험할 것이라면, 상기 절차를 반복하였다.

[0414]

ELISA

[0415]

제조업자의 설명서(알앤디 시스템즈(R&D systems))에 따라 상업적으로 입수 가능한 ELISA 키트(퀀티카인(Quantikine))에 의해 TNFR1 발현을 측정하였다. 제조업자의 프로토콜에 따라 ELISA를 수행하였다. 이 분석은 가용성뿐만 아니라 세포 관련 TNFR1 둘 다의 측정을 제공한다(Qjwang et al., 1997). 분석은 정량적 샌드위치 효소 면역분석 기법을 사용한다. 분석은 TNFR1에 특이적인 단클론성 항체로 사전 코팅한 웰을 포함하는 마이크

로플레이트를 사용한다. TNFRI는 캘리브레이터 샘플, 품질 관리 샘플에 존재하거나, 또는 MPC 세포 용해물은 고정된 TNFRI 항체에 의해 포획한다. 임의의 비결합 물질을 세척한 후에, TNFRI 에 특이적인 효소결합 다클론성 항체를 웰에 첨가하였다. 임의의 비결합 효소 결합 항체를 제거하기 위한 세척 단계 후에, 기질 용액을 웰에 첨가하고 나서, 색은 결합된 TNFRI의 양에 대한 비율로 생긴다. 이어서, 발색현상이 중단되고, ELISA 판독기를 이용하여 색의 강도를 측정한다. ELISA의 상세한 설명을 이하에 제공한다.

[0416] 세포를 250×g으로 RT 또는 2 내지 8℃에서 5분 동안 원심분리시켰다. 상청액을 흡입하고 나서, 세포 펠릿을 얼음에 둔 한편, 용해 완충제를 제조하였다. 20ml의 셀라이틱-엠(CellLytic-M) 세포 용해 추출 시약에 2개의 완전 미니-정제를 첨가함으로써 용해 완충제를 제조하였다. 용해 완충제를 교반시켜 혼합하고 얼음 상에서 저장하였다. 용해 완충제를 첨가하였다. 1000 μ l의 피펫을 이용하여 각각의 펠릿을 재현탁시키고 나서, 교반시켰다. 세포를 10 내지 15분 동안 얼음 상에서 인큐베이션시키고 나서, 5분마다 교반시켰다. 이어서, 2회 중복 용해물을 풀링시키고, 혼합하고 나서, 2ml 마이크로원심분리관(들)에 옮겼다. 용해물을 최대 rpm으로 2 내지 8℃에서 10분 동안 원심분리시키고 나서, 용해물을 새로운 관에 옮겨서 임의의 펠릿화된 물질을 피하였다. 용해물을 29일까지 동안 -60℃ 이하로 저장하였고, 동일한 날에 ELIZA를 수행하였다. 동일한 날에 ELIZA를 수행하였다면, 용해물을 드라이 아이스 상에서 또는 -60℃ 이하의 냉동기에서 최소 1시간 동안 처음 냉동시켰다.

[0417] 모든 샘플 및 시약을 주위 온도가 되게 하고, 사용 전 적어도 30분 동안 방치하였다. 20ml의 농축 세척 완충제를 480ml의 나노(NANO) 워터(1:25 희석을 제공) 중에서 희석시키고 나서, 잘 혼합하였다. 용액을 1 개월의 유효기간 또는 키트의 유효기간 중 더 빠른 것으로 라벨링하고 2 내지 8℃에서 저장하였다. 3회 웰을 마이크로플레이트 상에서 표준품, 대조군 및 샘플에 부여하였다. 마이크로플레이트로부터 과량의 스트립을 제거하였다. 20ml의 셀라이틱-엠 시약에 2개의 완전 미니-정제를 첨가함으로써 용해 완충제를 제조하였다. 용해 완충제를 교반시켜 혼합하고 얼음 상에서 저장하였다. 0.5ml 용해 완충제를 sTNFRI 표준품에 첨가하여 5000pg/ml 표준품을 생성하였다. 표준품을 최소 15분 동안 부드럽게 교반시키면서 RT에서 인큐베이션시켰다. 인큐베이션 후에, 연속 희석물 및 대조군 희석물을 이하의 표 5 및 표 6에 따라 제조하였다:

표 5

연속 희석물

표준품 희석물			
초기 농도 (pg/ml)	표준품의 용적 (μ l)	용해 완충제의 용적 (μ l)	최종 농도 (pg/ml)
5000	150	1350	500
500	750	750	250
250	750	750	125
125	750	750	62.5
62.5	750	750	31.3
31.2	750	750	15.6
15.6	750	750	7.8
0	N/A	650	0

[0418]

표 6

대조군 희석물

대조군 희석물				
초기 농도 (pg/ml)	표준품의 용적 (μ l)	용해 완충제의 용적 (μ l)	대조군	최종 농도 (pg/ml)
5000	18	1982	1	45
5000	40	1960	2	100
5000	100	1900	3	250

[0419]

[0420]

이하의 표 7에 따라 샘플을 제조하였다:

표 7

샘플

샘플 ID#	5000 pg/ml 표준품의 용적 (μ l)	초기 샘플 희석	샘플의 용적 (μ l)	최종 혼합 농도 (pg/ml)
	13	1X	637	100
	13	1X	637	100
	13	1X	637	100
	13	1X	637	100

[0421]

[0422]

50 μ l의 분석 희석제 HD1-7을 항-TNFR1 단클론성 항체로 사전 코팅한 마이크로플레이트의 모든 웰에 첨가하였다. 200 μ l의 표준품, 대조군 또는 샘플을 적절한 웰에 첨가하였다. 플레이트를 뒤집고 나서, 오비탈 진탕기 상에서 부드럽게 진탕시키면서 2시간 $\pm$ 10분 동안 RT에서 인큐베이션시켰다. 이어서, 플레이트를 웰당 300 μ l의 세척 완충제로 3회 세척하였다. 마지막 세척 후에, 흡착 페이퍼 상에 플레이트를 블롯팅함으로써 잔여 액체를 제거하였다. 다클론성 항-TNFR1 HRP 접합체를 각각의 웰에 첨가하고 나서, 플레이트를 2시간 $\pm$ 10분 동안 RT에서 오비탈 진탕기 상에서 부드럽게 교반시키면서 인큐베이션시켰다. 이어서, 플레이트를 웰당 300 μ l의 세척 완충제로 3회 세척하였다. 마지막 세척 후에, 흡착 페이퍼 상에 플레이트를 블롯팅함으로써 잔여 액체를 제거하였다. 사용 15분 이내에, 동일 분량의 시약 A와 시약 B를 혼합함으로써 기질 용액을 제조하였다. 200 μ l 기질 용액을 각각의 웰에 첨가하고 나서, 플레이트를 뒤집고, 20 $\pm$ 10분 동안 RT으로 암실에서 인큐베이션시켰다. 50 μ l의 정지 용액을 각각의 웰에 첨가하고 나서, 마이크로플레이트 판독기 상에서 판독한 각각의 샘플의 광학 밀도(OD)를 450nm로 설정하고 5 내지 30분 이내에 570nm에서의 파장 보정하였다. 4모수 로지스틱 곡선 적합화를 이용하여 표준 곡선을 구성하였다. 각각의 샘플에서 TNFR1의 농도는 표준 곡선으로부터 유래되었고, 최종 결과를 얻기 위해 희석에 대해 보정하였다.

[0423]

통계학적 분석

[0424]

MSC 또는 MPC에 의한 처리에 대한 급성 GVHD(acute GVHD: aGVHD)의 반응의 객관적 평가를 제28일에 전반적 반응률로서 결정하였다. aGVHD 기관 병기에서의 변화를 제시하기 위해, 기준으로부터 제28일까지의 반응 데이터를 각각의 기관에 대해 완전한 반응, 부분적 반응, 악화 또는 안정한 것으로 분류하였다.

[0425]

전반적 생존에 대한 반응 효과를 평가하기 위해, 제100일에 2개의 카플란-마이어 생존 분석을 수행하였다. 카플란-마이어 곡선을 제28일에 전반적 반응(완전한 반응 또는 부분적 반응)을 받은 환자에 대해 생성하였고 제28일에 비반응자에 대해 다른 카플란 마이어 곡선을 생성하였다. 상업적 소프트웨어를 이용하여 로그-순위 검증으로 2개의 그룹 사이의 전반적 생존의 차이가 없다는 귀무가설을 검증하였다. 검증은 $p < 0.05$ 의 유의도 수준으로 수행하였다.

- [0426] 범주 변수를 빈도 및 백분율로서 요약하였다. 기술통계(수, 표준편차, 중앙값 및 범위)를 이용하여 지속적 변수를 요약하였다. 모든 신뢰구간은 95% 신뢰 수준을 가진다.
- [0427] **실시예 2: 향상된 면역억제 특성을 갖는 면역선택된 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포**
- [0428] 이전의 제조 과정(미국 특허 제9,828,586호에 기재한 바와 같음)에 의해 얻은 생성물과의 비교에 의해 면역선택된 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포(MLPSC)의 면역억제 잠재력을 평가하였다. 이전의 제조 조건 하에 생성된 MLPSC의 3가지 상이한 샘플(즉, 샘플 MLPSC A, MLPSC B 및 MLPSC C) 및 개선된 면역선택된 MLPSC의 3가지 상이한 샘플(즉, 샘플 MLPSC D, MLPSC E 및 MLPSC F) 상에서 수행된 T 세포 증식 분석(IL2R 저해%)의 결과를 도 2에 비교하여 나타내었다. 이들 결과는 분석이 T-세포 증식을 저해하는 능력에 관해 다능성 계통 세포의 제1 부류와 다능성 계통 세포의 제2 부류를 구별한다는 것을 나타낸다. 특히, 세포의 제2 부류는 제1 부류보다 T 세포 증식을 실질적으로 더 효과적으로 저해한다.
- [0429] 대조적으로, 도 3에 나타내는 바와 같은 TNFR1 발현 분석 결과는 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포의 동일한 두 부류 간에 유의한 차이를 나타내지 않았다. TNFR1 발현은 T 세포 증식을 저해하는 세포의 동정을 위한 마커로서 이전에 기재되었다(미국 특허 제20140248244호 참조).
- [0430] 본 명세서의 도 2 및 도 3에 제시한 결과는 T-세포 증식을 저해하는 향상된 능력을 갖는 개선된 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포 집단을 생성할 수 있다는 것을 나타낸다. 이들 개선된 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포 집단은 고수준의 TNFR1을 발현시키는 세포의 소집단이다. 다시 말해서, TNFR1 발현은 소정의 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포 집단의 T 세포 저해 특성과 분리하여 생각될 수 있다. 동결보존 및 해동 후조차 T-세포 증식을 저해하는 향상된 능력을 나타내는 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포 집단을 생성하는 것이 가능하다는 사실은 동결보존된 간충직 줄기 세포가 해동 후에 손상된 면역억제 특성을 나타낸다는 통상적인 지식에 비추어 특히 놀랍다(Francois et al., 2012; Chinnadurai et al., 2016).
- [0431] **실시예 3: 실시예 4: 스테로이드 난치성인 소아 대상체의 치료를 위해 주입한 낮은 IL-2R 저해를 갖는 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포(MLPSC)**
- [0432] 본 연구는 급성 이식편대 숙주 질환(GVHD)에 대한 스테로이드 치료에 반응하지 않은 소아 환자의 치료에 대한 것이다. 급성 GVHD에 대한 스테로이드 치료의 실패는 메틸프레드니솔론(1mg/kg/일 이상) 또는 동등물의 적어도 3일 후에 개선되지 않은 급성 GVHD의 임의의 등급 B 내지 D(IBMTR 등급)으로서 정의된다.
- [0433] 환자를 2×10^6 hMSC/kg(실제 체중)의 용량으로 각각 연속 4주 동안 주당 2회 낮은 IL-2R 저해와 함께 생체외에서 배양시킨 MLPSC로 처리하였다. 적어도 3일 간격으로 주입을 투여하였다.
- [0434] 연구 설계:
- [0435] HSCT를 받고 있는 241명의 소아 환자를 등록하고, 2007 내지 2014년에 북아메리카와 유럽의 50군데에서 치료하였다
- [0436] 2개월령 내지 17세
- [0437] 급성 GvHD 등급 B 내지 D(CIBMTR)
- [0438] 실패한 스테로이드 치료 및 다중의 다른 제제
- [0439] 메틸프레드니솔론(적어도 1 mg/kg/일 또는 동등물)의 적어도 3일 후에 개선되지 않은 aGVHD
- [0440] 결과:
- [0441] EAP 하에 241명의 아동에서, 제28일에 전반적 반응(CR+PR)은 65%(95% CI: 58.9%, 70.9%)였다. 제100일의 생존은 전반적 반응과 상관관계가 있었고, 제28일에 반응한 환자에서 상당히 개선되었다(82% 대 39%, $p < 0.0001$)
- [0442] **실시예 4: 스테로이드 난치성(저용량)인 소아 대상체의 치료를 위해 주입된 높은 IL-2R 저해를 갖는 간충직 계통 전구체 또는 줄기 세포(MLPSC)**
- [0443] 연구 목적
- [0444] 주된 목적은 동종이계 HSCT 후 스테로이드 치료에 반응하지 않은 등급 B 내지 D aGVHD를 갖는 대상체에서 정맥 내로 투여한 높은 IL-2R 저해를 갖는 MLPSC의 반복 용량의 안전성 정보를 수집하는 것과 동종이계 HSCT 후 스테

로이드 치료에 반응하지 않은 등급 B 내지 D aGVHD를 갖는 대상체에서 정맥내로 투여한 MPC의 반복 용량 효율을 평가하는 것이었다.

[0445] 연구의 2차적 목적은 제28일에 MPC에 대한 반응과 제100일에 생존 사이의 상관관계를 결정하는 것이었다.

[0446] 치료 계획

[0447] 소아 대상체를 연속 4주 각각에 대해 주당 1회 2×10^6 MPC/kg(선별시 체중)*의 용량으로 정맥내(IV) MPC로 치료하였다.

[0448] 자격이 있다면, 대상체는 초기 4회 용량 후에 1×10^6 MPC/kg의 감소된 용량으로 MPC의 1주 1회로 추가 4회를 받을 수 있다. 추가적인 요법을 받을 자격은 제28일에 수행한 대상체의 급성 GVHD(aGVHD) 반응 평가(부분적 또는 혼합)에 의존하였다.

[0449] 대상체는 최대 8회의 주입을 받았다.

[0450] 급성 GVHD 평가

[0451] 선별 시, 제14일, 제28일, 제56일 및 제100일/연구의 종료 시 수행하였다.

[0452] 대상체 인구통계학

[0453] 열두명(12)의 대상체를 7군데의 이식 센터에서 치료하였다. 대상체 중 6명을 페드 허치슨 암 연구 센터(Fed Hutchinson Cancer Research Centre)에서 치료하였고, 남아있는 대상체를 각각 상이한 이식 센터에서 치료하였다(표 10에 나타냄).

[0454] 모든 대상체는 18세 미만으로 3 내지 17세의 범위였다. 평균 연령은 10.3세이고 중위 연령은 10.5세였다.

[0455] 시험에 참가할 자격이 있는 대상체는 동종이계 조혈 줄기 세포 치료(HSCT) 후 등급 B 내지 D 급성 GVHD(aGVHD)에 대한 스테로이드 치료에 실패했어야 한다. 급성 GVHD에 대한 스테로이드 치료에 대한 반응의 실패는 메틸프레드니솔론($>1\text{mg/kg/일}$) 또는 동등물의 적어도 삼(3)일 후에 개선되지 않은 임의의 등급 B 내지 D 급성 GVHD로서 정의된다.

[0456] 모든 대상체는 하부 위장관(GI) 및/또는 간에 연루된 내장 질환이 있었다. 9명의 대상체는 하부 GI 단독(8명은 등급 D이고, 1명은 등급 B임)을 가지고; 한 명의 대상체는 등급 C 하부 GI 및 등급 D 간을 가지며; 한 명의 대상체는 등급 B 상부 GI 및 등급 C 하부 GI를 가지고; 한 명의 대상체는 등급 C 간을 가진다.

[0457] 기준에서, 12명의 대상체 중 9명(9/12 또는 75%)은 등급 D 이식편대숙주질환(GVHD)을 가지고, 12명의 대상체 중 2명(2/12 또는 17%)은 등급 C GVHD를 가지며, 1명의 대상체(1/12 또는 18%)는 등급 B GVHD를 가진다.

[0458] 대상체를 다음의 비스테로이드 요법을 포함하는 MPC 전에 평균 4.5회의 GVHD 요법으로 치료하였다: 체외광선요법(Extracorporeal photopheresis: ECP; 7명의 대상체), 인플릭시맵(5명의 대상체), 록솔리티닙(3명의 대상체), 마이코페놀산(MMF; 3명의 대상체), 에타너셉트(1명의 대상체) 또는 바실릭시맵(1명의 대상체).

[0459] 대상체를 선별 시 대상체의 체중에 기반하여 2×10^6 개의 세포/kg의 용량으로 정맥내(IV)로 치료하였다. 세포를 4 연속 주 각각에 대해 주당 1회(qw) 대상체에게 전달하였다.

[0460] 자격있는 대상체는 초기 4회 용량 후 1×10^6 개의 세포/kg의 감소된 용량으로 추가적인 4회의 1주 1회 세포 주입을 받았다. 추가적인 요법을 받을 자격은 제28일에 수행한 대상체의 급성 GVHD(aGVHD) 반응 평가(부분적 또는 혼합)에 의존하였다. 대상체는 최대 8회의 주입을 받았다.

[0461] 선별 시, 제14일, 제28일, 제56일 및 제100일(연구의 종료)에 GVHD 평가를 수행하였다.

[0462] 100일 내내 치료 및 생존에 대한 반응

[0463] 높은 IL-2R 저해를 갖는 MLPSC에 의한 치료(주당 1회 2×10^6 MPCs/kg 체중을 투여)에 대한 반응 및 대상체의 생존을 이하의 표 9에 요약한다. 선별 시(제0일), 세포 주입을 받은 후 제14일, 제28일, 제56일 및 제100일에 GVHD 평가를 수행하였다. 세포 용량을 계산하기 위한 체중은 선별 시 대상체의 체중을 기준으로 한다.

[0464] 열 두명 중 열 명(10/12)의 대상체(83%)는 제100일에 생존하였는데 7명은 8회의 주입을 받았고, 3명은 4회의 주입을 받았다. 모두 12명의 대상체는 하부 GI 및/또는 간 GVHD를 갖는데, 9/12명의 대상체(75%)는 기준 시 등급

D GVHD를 갖고 1명의 대상체(8%)만이 기준에서 등급 B GVHD를 가졌다. 급성 GVHD에 이른 사전 치료의 평균 수는 4.25였다.

표 9

[0465]

제100일에 대상체에서의 GVHD 평가				
결과	GVHD 평가			
임상 반응	제14일	제28일	제56일	제100일
전체(CR + PR)	7 (58%)	9 (75%)	9 (75%)	9 (75%)
완전	2 (17%)	1 (8%)	5 (42%)	5 (42%)
부분적	5 (42%)	8 (67%)	4 (33%)	4 (33%)
혼합	0	0	0	0
반응 없음-안정	2 (17%)	1 (8%)	0	1 (8%)
반응 없음-악화	2 (17%)	0	1 (8%)	0
사망	1 (8%)	2 (17%)	2 (17%)	2 (17%)
CR= 완전한 반응 PR= 부분적 반응				

[0466]

도 4는 제0일이 기준인 제1 연구 치료로부터의 생존 일수에 대해 생존 확률을 Y축에 나타낸 반응자 대 비반응자에 대한 100일 내내 생존을 그래프로 나타낸다. 제28일에 모두 9명의 반응자들은 제100일까지 내내 생존하였다. 대조적으로 제28일에 3명의 반응자 중 한명은 제28일 생존하였다(즉, 75% 대 8%).

[0467]

결과는 제28일에 전체 반응률(즉, 완전 및 부분적 반응률)이 75%였다는 것을 나타낸다. 이는 MSC의 주입 후 보이는 평균 전체 반응률보다 더 높다. 더 나아가, 제28일에 보이는 반응률은 제100일에 전체 생존의 강한 예측자였다(표 9 참조).

[0468]

특히, 높은 IL-2R 저해를 갖는 MLPSC의 주입 후 확립된 안전성 문제가 관찰되지 않았다.

[0469]

개개 대상체의 높은 IL-2R 저해 및 생존을 갖는 MLPSC를 이용하는 치료에 대한 반응을 이하에 제공하는 표 10에 나타낸다.

표 10

[0470]

대상체에서의 GVHD 평가						
Pt ID./연령 및 기관	GVHD 평가					총 MPC 주입 수
	기준	제14일	제28일	제56일	제100일	
프레드 허치슨						
001 8세	하부 GI 등급 D	CR	CR	CR	CR	4
002 3세	하부 GI 등급 D	사망	사망	사망	사망	2
003 12세	하부 GI 등급 D	PR	PR	PR	PR	8
004 15세	하부 GI 등급 D	PR	PR	NR-악화	CR	4
005 8세	하부 GI 등급 B	CR	PR	CR	PR	8
006 11세	하부 GI 등급 D	PR	PR	CR	CR	8
클리블랜드 클리닉 16759 10세	하부 GI 등급 D	NR-안정성	NR-안정성	PR	NR-안정성	4
몬테피오레 16896 17세	하부 GI 등급 D	NR-안정성	PR	CR	CR	8

메모리얼 슬로 안 17042 5세	하부 GI 등급 C 및 간 등급 D	NR-악화	PR	PR	PR	8
유니버시티 피 즈 메디컬 센터 하부 GI 등급 D	하부 GI 등급 D	PR	PR	PR	PR	8
듀크 유니버시 티 17093 17세	간 등급 C	NR-악화	사망	사망		1
UCSF 오클랜드 17163 3세	상부 GI 등급 B 및 하부 GI 등급 C	PR	PR	CR	CR	8
CR= 완전한 반응 PR= 부분적 반응						

[0471] 치료한 환자에서 어떠한 안전성 문제도 확인되지 않았고, GI 관 질환에서의 파일럿 연구는 75%의 전체 반응률을 보여주었다(표 1). 높은 IL-2R 저해를 갖는 MLPSC의 주입 후 제28일에 반응한 대상체 중에서, 100%가 제100일에 생존하였다. 이는 제28일 반응이 지속 가능한 의미있는 반응의 나타내고, 제100일에 생존과 상관관계가 있다는 것을 나타낸다.

[0472] 따라서, 결과는 IL-2R 저해를 갖는 MLPSC를 투여할 때 필요한 주당 2회 2×10^6 개의 세포/kg 체중의 절반인 용량으로 주당 1회로 높은 IL-2R 저해를 갖는 MLPSC(이 경우에 MPC)를 받는 대상체에서 우수하지 않은 반응률이 낮은 달성될 수 있다면, 비슷하다는 것을 나타낸다(상기 비교예 3 참조).

[0473] **실시예 5 MSC에 대한 개선된 제조 과정**

[0474] 높은 IL-2R 저해를 나타내는 MLPSC에 의한 GvHD의 치료에서 얻은 우수한 결과에 비추어(실시예 4에 기재한 바와 같음), 연구는 플라스틱 부착 기법을 이용하여 단리한 줄기 세포로부터 고효능 MLPSC를 생성하기 위한 과정으로 이루어졌다.

[0475] 플라스틱 부착 기법을 이용하여 단리한 세포로부터 MLPSC를 생성하기 위한 이전의 제조 과정은 제9,828,586에 기재되어 있다. 이하에 기재하는 다수의 변화를 이터한 이전의 제조 과정에 도입하였다. 놀랍게도, 이런 개선된 제조 과정(이하에 기재)은 향상된 면역억제 특징을 갖는 MLPSC의 생성을 초래하였다.

[0476] **장비 변화**

[0477] 하나의 장비 변화는 세포를 세척, 전달 및 농축시키기 위해 사용한 방법에 관한 것이다. 이전의 공정은 이들 활동을 위한 과정의 몇몇 상이한 단계에서 사이토메이트 셀 프로세서(Cytomate Cell Processor)(박스터(Baxter))를 사용하였다. 장비의 이런 조각은 백혈구를 본래 세척, 농축 및 전달하기 위해 설계된 일회용으로 연결된 벤치탑(benchtap) 장치이다. 이전의 공정에서, 사이토메이트(Cytomate)를 사용하여 세포를 배양 용기(세포 공장)에 파종시키고, 채취 시 이를 용적 감소에 따른 세포의 세척 및 농축을 위해 사용하였다. 새로운 공정에서, 세포 파종(주사기 나무) 및 세포 세척 및 농축 단계(접선유동여과(TFF))를 위한 절차를 사이토메이트(Cytomate)로 대체하였다.

[0478] **과정 및 검사에 대한 다른 변화**

[0479] ceMSC 생성물 제조 및 검사의 다음의 양상을 또한 개선된 제조 공정에서 실행하였다.

[0480] • 멸균 가공 위험을 감소시키기 위한 멸균화 전에 부착된(사전 조립된) 에어 필터가 있는 세포 공장의 사용.

[0481] • 동물 유래 우발적 제제, 예컨대 파코바이러스 및 서코바이러스로부터의 위험을 최소화하기 위해 돼지 트립신의 사용을 제거하도록 효모에서 생산된 제조합 트립신의 사용을 도입하였다. 이는 이 단계에서 사용한 세포 및 용액에 따른 트립신 인큐베이션 시간에 대한 변화를 필요로 하였다.

[0482]  세포 군집 및 시각적 미립자 물질에 대한 잠재력을 감소/최소화하기 위해 혈액 필터의 사용을 도입하였다.

[0483]  동결백 및 15ml 충전 용적보다는 최종 용기로서 냉동 바이알 및 4.3ml 충전 용적의 사용을 도입하였다. 이전의 과정에 대해 동일한 농도의 세포/ml를 유지하였지만, 하나의 동결백 대신에, 동일한 수의 세포를 4개의 바이알로 나누었다.

[0484] 해동 후 최종 생성물 중의 동결보존 세포 샘플에 대해 모든 최종 생성물 검사를 수행한다. 이전의 과정 하에서, 최종 용기를 나타내지 않는 관에 저장한 세포 분취액에 대한 일부 검사를 수행하였다. 도 5는 동결보존에 대한 공여자 세포 은행(donor cell bank: DCB)의 해동 및 ce-MSD 제품의 검사로부터의 모든 단계들을 나타낸다.

[0485] 실시예 6 - 개선된 제조 공정에 의해 얻은 MLPSC 제품의 검사

[0486] 실시예 5에 기재한 개선된 제조 공정에 따라 제조한 MLPSC 최종 제품 로트를 이하의 표 8에 제시하는 유통 기준에 대해 검사하였다:

표 8

	로트 번호	TNFR1	IL2r α	상태
검사 물질의 공급원		최종 제품	최종 제품	
허용 기준		> 108pg/ml%	> 30%	유통됨
	529821 (1)	317	84	유통됨
	529822 (2)	301	85	유통됨
	534826 (3)	339	89	유통됨
	534839 (4)	357	84	유통됨
	534865 (5)	316	81	유통됨
	534868 (6)	322	88	유통됨
	534871 (7)	352	91	유통됨
	534874 (8)	301	87	유통됨
	534875 (9)	291	87	유통됨
	541979 (10)	275	80	유통됨

[0488] 표 8은 시험한 제품 로트 모두에 의한 TNFR1의 지속적 고발현을 나타낸다. 도 6에 나타낸 바와 같이, 각각의 제품 로트는 275pg/ml 초과 TNFR1 발현 수준을 나타내었다.

[0489] 표 8은 또한 검사한 10개의 제품 로트에 의한 IL-2Ra 발현의 예상치 못한 고수준의 저해를 나타낸다. 도 7에 나타낸 바와 같이, 각각의 제품 로트는 80% 이상의 저해 수준을 나타내었다.

[0490]

참고문헌

- Ausubel, F. M. (Ed.). (1987 including all updates untill present). *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: John Wiley & Sons.
- Brown, T. A. (Ed.). (1991). *Essential Molecular Biology: A Practical Approach* (Vol. 1 and 2). Oxford: IRL Press at Oxford University Press.
- Buchsachacher & Panganiban (1992). *Journal of Virology*, 2731-2739.
- Burns et al., (1993). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 8033-8037.
- Carter (1992). *Current Opinion in Biotechnology*, 533-539.
- Chinnadurai et al., (2016). *Translational and Clinical Research*, 34(9), 2429-2442.
- Coligan, J. E., Kruisbeek, A. M., Margulies, D. H., Shevach, E. M., & Strober, W. (Eds.). (1991 including all updates until present). *Current Protocols in Immunology*. New York: John Wiley & Sons.
- Fisher-Hoch et al., (1989). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 56, 317-321.
- Francois et al., (2012). *Cytotherapy*, 14(2), 147-152.
- Glover, M., & Hames, B. D. (Eds.). (1995 and 1996). *DNA Cloning: A Practical Approach* (Vols. 1-4).
- Gronthos (2003). *Journal of Cell Science*, 116(Pt 9), 1827-1835.
- Gronthos & Simmons (1995). *Blood*, 85(4), 929-940.
- Harlow, E., & Lane, D. (1988). *Antibodies: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Johann et al., (1992). *Journal of Virology*, 65, 1635-1640.
- Kotin (1994). *Human Gene Therapy*, 793-801.
- Lebkowski et al., (1988). *Molecular and Cellular Biology*, 3988-3996.
- Miller (1990). *Human Gene Therapy*, 7, 5-14.
- Miller & Rosman (1989). *Biotechniques*, 7, 980-990.
- Miller et al., (1991). *Journal of Virology*, 65, 2220-2224.
- Muzyczka (1992). *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 158, 97-129.
- Perbal, B. V. (1984). *A Practical Guide to Molecular Cloning*. New York: Wiley.
- Qjwang et al., *Biochemistry* (1997) 36, 6033.
- Sambrook, J., & Green, M. R. (2012). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Fourth Edition)*. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Scarpa et al., (1991). *Virology*, 75, 849-852.
- Schwartz et al., (2001). *Nature* 410, 604-608.
- Schwartz et al., (2002). *Nature Immunol.* 3, 427-434.
- Sommerfelt & Weiss (1990). *Virology*, 76, 58-59.
- Vincent et al., (1990). *Vaccine*, 353-359.
- Wilson et al., (1989). *Journal of Virology*, 63, 2374-2378.

[0491]

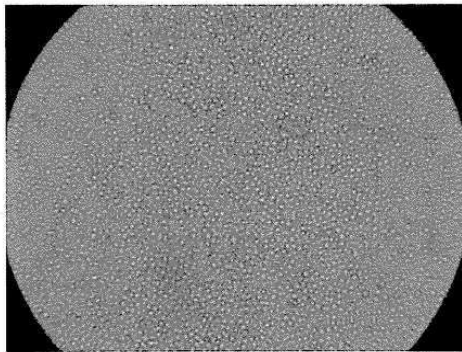
Zannettino et al., (1998). *Blood*, 92(8), 2613-2628.

[0492]

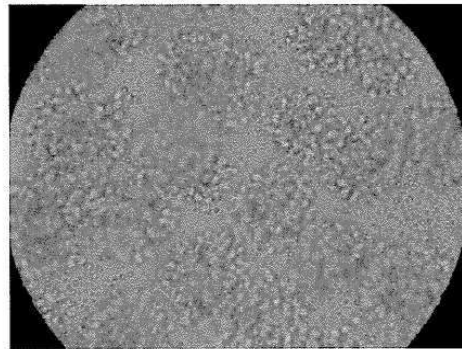
Zhang et al., (2004). *Immunity*, 20, 337-347.

도면

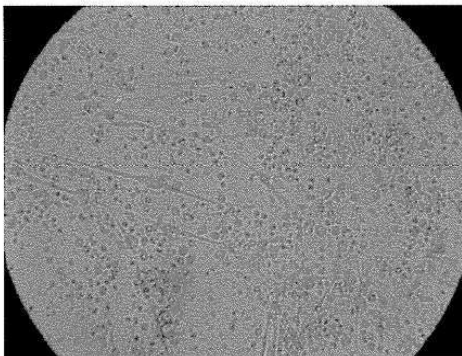
도면1



비자극된 hP BMC (곡선, 원형)

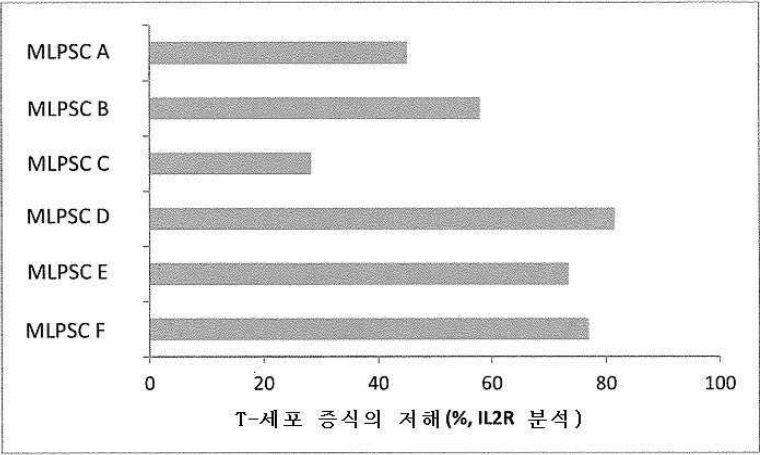


자극된 hP BMC (곡선, 원형의 응집물)

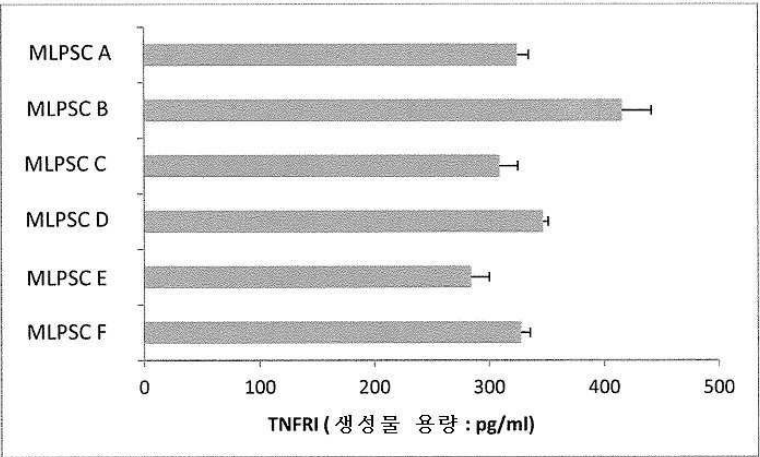


공동 배양된 hMSC (길고, 편평) 및 hP BMC (곡선, 원형 및 일부 응집물)

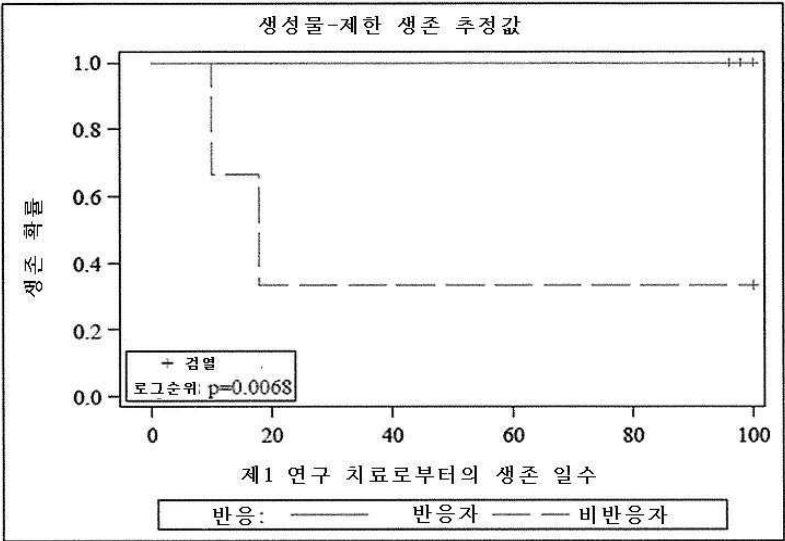
도면2



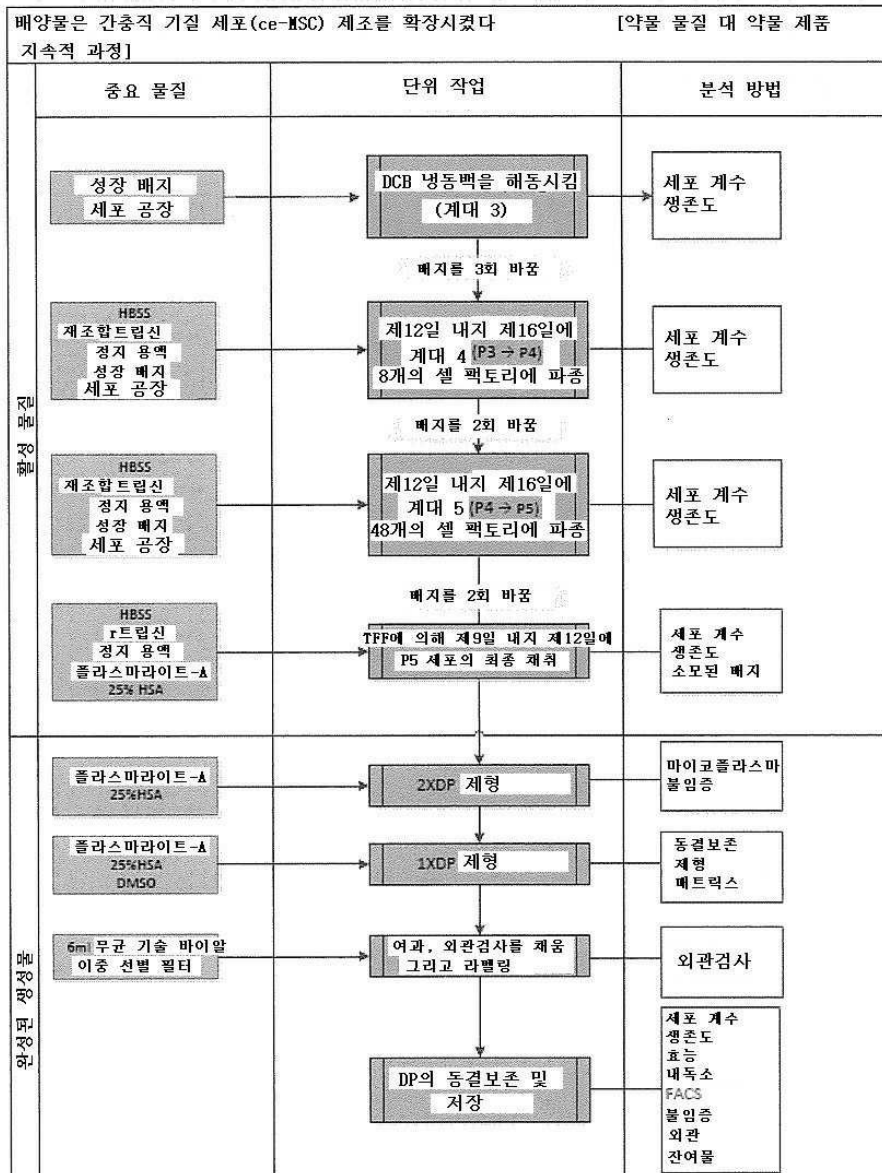
도면3



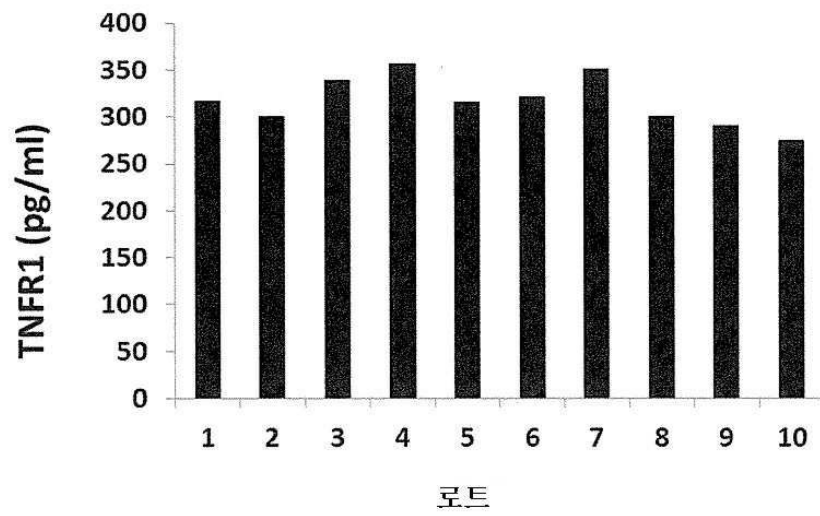
도면4



도면5



도면6



도면7

