



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0031853
(43) 공개일자 2021년03월23일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/28 (2015.01) A61B 5/00 (2021.01)
A61B 5/16 (2006.01) A61P 25/18 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 35/28 (2013.01)
A61B 5/16 (2020.05)
- (21) 출원번호 10-2020-7031742
- (22) 출원일자(국제) 2019년04월04일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2020년11월03일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2019/025716
- (87) 국제공개번호 WO 2019/195506
국제공개일자 2019년10월10일
- (30) 우선권주장
62/652,722 2018년04월04일 미국(US)

- (71) 출원인
듀크 유니버시티
미국, 노스캐롤라이나 27705, 더럼, 스위트 406,
2812 에르윈 로드
- (72) 발명자
커츠버그, 조안느
미국, 노스캐롤라이나 27705, 더럼, 슈트 306, 에
르윈 로드 2812 듀크 유니버시티 씨오
도슨, 제럴딘
미국, 노스캐롤라이나 27705, 더럼, 슈트 306, 에
르윈 로드 2812 듀크 유니버시티 씨오
선, 제시카
미국, 노스캐롤라이나 27705, 더럼, 슈트 306, 에
르윈 로드 2812 듀크 유니버시티 씨오
- (74) 대리인
이재영

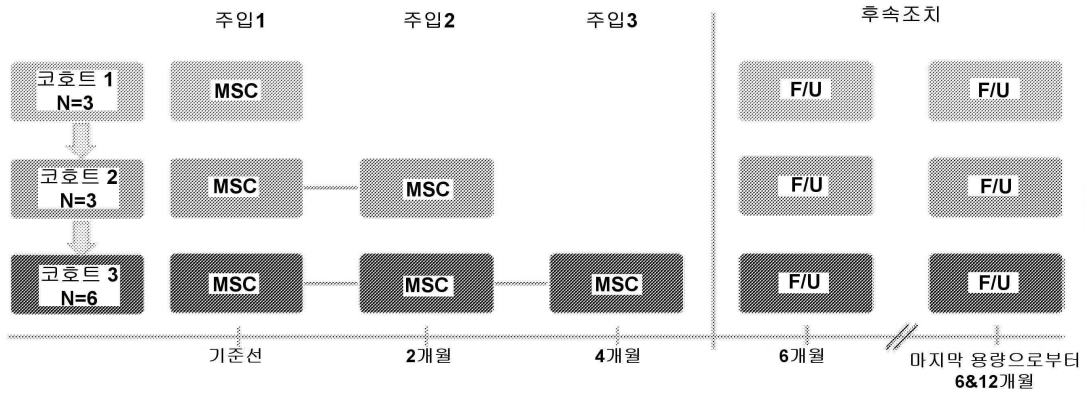
전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 발명의 명칭 **인간 제대 조직-유래 중간엽 간질 세포를 사용한 자폐 스펙트럼 장애 치료 방법**

(57) 요약

본 개시는 자폐 스펙트럼 장애를 치료하는 방법을 제공한다. 보다 구체적으로는, 본 개시는 자폐 스펙트럼 장애를 치료하기 위해 제대혈 조직-유래 중간엽 간질 세포를 사용하는 방법에 관한 것이다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61B 5/4848 (2013.01)

A61P 25/18 (2018.01)

명세서

청구범위

청구항 1

치료 유효량의 인간 동중 체대 조직 유래 중간엽 간질 세포(hCT-MSC)를 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 자체 스펙트럼 장애가 있거나 의심되는 환자를 치료하는 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서,
hCT-MSC는 전신 투여되는 방법.

청구항 3

제 1항 또는 제 2항에 있어서,
hCT-MSC는 정맥 내로 투여되는 방법.

청구항 4

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서,
환자는 약 1세 내지 약 45세인 방법.

청구항 5

제 4항에 있어서,
환자는 약 2세 내지 약 11세인 방법.

청구항 6

제 4항에 있어서,
환자는 약 4세 내지 약 8세인 방법.

청구항 7

제 1항 내지 제 6항 중 어느 한 항에 있어서,
hCT-MSC는 1회 용량, 2회 용량, 3회 용량, 또는 4회 이상의 용량으로 투여되는 방법.

청구항 8

제 1항 내지 제 7항 중 어느 한 항에 있어서,
각각의 용량은 약 1개월 내지 약 6개월 간격으로 투여되는 방법.

청구항 9

제 8항에 있어서,
각각의 용량은 약 2개월 간격으로 투여되는 방법.

청구항 10

제 1항 내지 제 9항 중 어느 한 항에 있어서,
hCT-MSC의 치료 유효 용량은 용량당 약 1.0×10^6 개 세포/kg 내지 약 6.0×10^6 개 세포/kg을 포함하는 방법.

청구항 11

제 10항에 있어서,

용량은 약 2.0×10^6 개 세포/kg을 포함하는 방법.

청구항 12

제 10항에 있어서,

용량은 약 3.0×10^6 개 세포/kg을 포함하는 방법.

청구항 13

제 10항에 있어서,

용량은 약 6.0×10^6 개 세포/kg을 포함하는 방법.

청구항 14

제 1항 내지 제 6항 중 어느 한 항에 있어서,

hCT-MSc의 치료 유효 용량은 총 약 6.0×10^6 개 세포/kg을 포함하고, 약 6개월 이내에 2 내지 3회 용량으로 투여 되는 방법.

청구항 15

제 1항 내지 제 14항 중 어느 한 항에 있어서,

hCT-MSc의 치료 유효 용량은 CD73+ 및 CD90+가 90% 초과인 방법.

청구항 16

제 1항 내지 제 14항 중 어느 한 항에 있어서,

hCT-MSc의 치료 유효 용량은 CD45+, CD3+ 또는 CD31+가 10% 미만인 방법.

청구항 17

자폐 스펙트럼 장애를 앓고 있는 환자에 대한 hCT-MSc 치료의 치료 효과를 평가하는 방법으로서,

- (a) 환자에 대해 하나 이상의 적절한 시험을 수행하여 행동 및/또는 바이오마커 기준선 점수(들)을 확립하는 단계;
- (b) 유효량의 hCT-MSc를 환자에게 투여하는 단계;
- (c) 단계 (a)에 제시된 동일한 하나 이상의 행동 및/또는 바이오마커 검사에 대해 hCT-MSc 투여 후 하나 이상의 시점에서 환자를 재평가하는 단계; 및
- (d) 단계 (c)의 결과를 단계 (a)에서 확립된 기준선 점수(들)와 비교하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 18

제 17항에 있어서,

단계 (a) 및 단계 (c)에서 수행된 행동 시험(들)은 바인랜드 적응 행동 척도-II (Vineland Adaptive Behavior Scales-II: VABS-II), 바인랜드 적응 행동 척도-III (Vineland Adaptive Behavior Scales-III: VABS-III), 전반적 임상 인상 척도 (Clinical Global Impression Scale: CGI), 전반적 발달 장애 행동 목록 (Pervasive Developmental Disorder Behavior Inventory: PDDBI), 한 단어 표현 그림 어휘 검사-4 (Expressive One-Word Picture Vocabulary Test-4: EOWPVT-4), 문제 행동 체크리스트(Aberrant Behavior Checklist), 감각 경험 설문지(Sensory Experiences Questionnaire), 반복 행동 척도(Repetitive Behavior Scale), 지능 척도 (Intelligence Scales)(조기 학습의 물린 척도(Mullen Scales of Early Learning) 또는 스탠포드-비네

(Stanford-Binet)), 언어 환경 분석(Language Environment Analysis), ATN GI 증상 목록(ATN GI Symptoms Inventory), 및 부모 양육 스트레스 검사(Parenting Stress Index) 중 하나 이상을 포함하는 방법.

청구항 19

제 17항 내지 제 18항 중 어느 한 항에 있어서,

단계 (c)에서의 환자의 재평가는 투여 후 2개월, 4개월, 6개월, 9개월, 12개월, 18개월, 24개월, 2년, 3년, 4년, 5년, 10년, 15년, 20년 또는 무기한을 포함하는 하나 이상의 시점에서 수행되는 방법.

발명의 설명

기술분야

- [0001] 우선권
- [0002] 본 출원은 2018년 4월 4일에 출원된 미국 가출원 일련 번호 62/652,722 호의 이익을 주장하며, 이의 전체내용이 본원에 참고로 포함된다.
- [0003] 본 개시 내용은 자폐 스펙트럼 장애를 치료하는 방법을 제공한다. 보다 구체적으로, 본 개시 내용은 자폐 스펙트럼 장애를 치료하기 위해 인간 제대혈 조직-유래 중간엽 간질 세포를 사용하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [0004] 자폐증 또는 자폐 스펙트럼 장애 (ASD)는 사회적 의사소통 장애 및 반복적이고 제한된 범위의 활동의 존재를 특징으로 하는 다양한 상태를 지칭하는 이질적인 신경 발달 장애로서, 삶의 초기에 발병한다. ASD는 유전적 및 환경적 영향의 다양한 조합으로 인해 발생할 수 있는 특정 행동 증상의 존재를 기반으로 한 임상 진단이다. 용어 "스펙트럼"은 자폐증을 앓는 각 개인이 갖는 도전과 강도의 광범위한 다양성을 반영한다.
- [0005] 질병 통제 예방 센터 (CDC)는 미국 내 ASD 유병률을 68명의 아동 중 1명인 것으로 추정한다 (MMWR Surveill Summ 2014; 63:1-21). 이는 남아 42명 중 1명, 여아 189명 중 1명을 포함한다. ASD 앓는 환자의 대다수는 독립적으로 생활할 수 없고 평생 지원이나 수용시설이 필요하다. 따라서, ASD를 앓는 개인을 지원하기 위한 평생 비용은 140만 달러인 것으로 추정된다. 또한, 지적 장애가 있는 사람들의 경우 예상 비용이 240만 달러로 증가한다. 자폐증을 앓는 약 50,000명의 십대가 학교 기반 자폐증 서비스를 받지 못하면서 매년 성인이 되고 있다. 자폐증을 앓는 사람 중 약 1/3은 무발화 상태를 유지한다. 자폐증 앓는 사람 중 약 40%는 지적 장애를 가지고 있다. 특정 의학적 문제 및 정신 건강 문제가 흔히 자폐증을 동반한다. 여기에는 위장관(gastrointestinal: GI) 장애, 발작, 수면 장애, 주의력 결핍 및 과잉 행동 장애(ADHD), 불안증 및 공포증이 포함된다. ASD에 대한 현재 치료 접근법에는 약물, 행동 치료, 작업 요법 및 언어 치료, 전문 교육 및 직업 지원이 포함된다. 초기 집중 행동 개입은 결과를 상당히 개선시키는 것과 관련이 있지만 그러한 개입을 하더라도 ASD를 앓는 많은 개인은 여전히 심각한 장애를 가지고 있다. 현재의 치료법은 도움이 되기는 하지만 물리 치료, 약물 및 수술로 후유증을 관리하는 데 중점을 두고 있다. 향정신성 약물과 같은 현재 이용 가능한 의학적 치료는 과민성과 같은 관련된 동반이환 증상을 개선하기 위한 것이지만 핵심 ASD 증상을 다루지는 못하고 있다. 이에 비추어 볼 때, ASD의 핵심 증상을 표적으로 하는 신규하고 효과적인 치료법에 대한 큰 미충족 수요가 있다.
- [0006] 유전적 및 환경적 요인 모두가 ASD의 병인에 기여한다 (de la Torre-Ubieta L, et al. *Nat Med* 2016; 22:345-361; Mandy W, Lai MC. *J. Child Psychol Psychiatry* 2016; 57:271-292; Sahin M, Sur M. *Science* 2015; 350). 최근 몇 년 동안 ASD의 위험 증가와 관련된 여러 드 노보 돌연변이(de novo mutation), 유전자 복제 변이 (CNV) 및 단일 뉴클레오티드 다형성 (SNP)을 확인한 유전적 서열확인 및 분석의 발전에도 불구하고, 20% 미만의 사례가 알려진 유전적 위험 요인으로 인한 것으로 추정된다 (Abrahams BS, Geschwind DH. *Arch Neurol* 2010; 67(4):395-399). 또한, 산모 기형 유발 물질 노출, 환경 독소 및 고령자 부계를 포함한 여러 환경 요인은 ASD 위험 증가와 관련이 있다. 마지막으로, 염증 및 면역 기능 장애는 ASD의 병인과 관련이 있다.
- [0007] 정확한 병태 생리학은 알려져 있지 않지만 의견에는 뇌 영역에서의 비정상적인 시냅스 기능 (Gao R, Penzes P. *Curr Mol Med* 2015; 15:146-167; Volk L, et al. *Annu Rev Neurosci* 2015; 38:127-149), 백색질 이상 (Wolff JJ, et al. *Am J Psychiatry* 2012; 169:589-600), 및 신경 염증 (Young AMH, et al. *Mol Autism* 2016; 7:1-8)을 포함한다. ASD 앓는 환자의 뇌에서의 면역 병리의 발병기전은 면역 관련 유전자 네트워크의 과발현 (Voineagu I, et al. *Nature* 2011; 474:380-384), 태아 뇌 조직에 대한 모체 항체의 존재 (Braunschweig D, et

al. *Transl Psychiatry* 2013; 3:e277), 대뇌 척수액에서 전 염증성 사이토카인 (IL-6, TNF- α)의 비정상 수준 (Vargas DL, et al. *Ann Neurol* 2005; 57:67-81), 및 비정상적인 신경 연결 경로로 이어지는 과도한 소교세포 활성화 (Morgan JT, et al. *Biol Psychiatry* 2010; 68:368-376; Suzuki K, et al. *JAMA Psychiatry* 2013; 70:49-58)에 기인한 것일 수 있다. 그와 같이, 면역조절 또는 신경 연결 조절에 영향을 미치는 치료 접근 방식은 이 모집단에 대한 신규한 치료를 위한 논리적 표적이다.

[0008] 여러 다른 의견들은 ASD의 병인에서 면역 활성화 및/또는 조절 장애의 역할을 지지한다. 여러 역학적 연구에 따르면 임신 중에 감염된 산모에게서 태어난 아동에서 증가한 ASD 비율이 나타내었다. 이 연관성은 미국 (Chess S. *J Autism Child Schizophr* 1971; 1(1):33-47)과 덴마크 (Atladdottir HO, et al. *J Autism Dev Disord* 2010; 40(12):1423-1430), 스웨덴 및 기타 국가에서 수십 년 동안 풍진 팬데믹이 발생한 이후 1970년대 초반에 보고된 바 있는 국가 및 기간에 걸쳐 일관된다. 산모의 발열, 항생제 치료, 높은 수준의 염증성 지표, 여러 다른 미생물에 의한 감염은 아동의 ASD 발병 위험 증가와 관련이 있으며, 이는 감염에 대한 면역 반응이 감염원 그 자체보다 더 원인이 될 가능성이 있음을 나타낸다. 따라서, 동물 모델에서는 임신부에서 면역 활성화를 유도함으로써 ASD 표현형을 가진 자손을 생산해냈다 (Harvey L, Boksa P. *Dev Neurobiol* 2012; 72(10):1335-1348; Malkova NV, et al. *Brain Behav Immun* 2012; 26(4):607-616). 잠재적인 병리 생리학적 메커니즘에는 모체-태아 면역 내성에서의 변화(모체 항체 및/또는 세포 면역을 통해) 및 태아 뇌 염증이 포함되며, 이는 태아 뇌 사이토카인 프로파일의 변화 및 신경 발달에 해로울 수 있는 소교세포 활성화로 이어진다. 부검 연구, 양전자 방출 단층 촬영 (PET) 뇌 영상 및 동물 모델을 통해 ASD에서 소교세포 수가 증가하고 소교세포 활성이 증가한다는 증거를 얻었다. 또한, 뇌의 면역계 측면에서 비정상 기능 (예컨대, 신경 시냅스에 대한 지원을 제공하는 소교세포)을 기재하고 있다 (Takano T. *Dev Neurosci* 2015; 37(3):195-202; Zantomio D, et al. *Neurosci Biobehav Rev* 2015; 52:172-177). ASD는 증가된 혈장 사이토카인 수준, 소교세포 활성화와 관련된 상향 조절된 유전자, 국소 염증 및 병리학 적 성상세포 활성화와 연관되었다 (Goines PE, Ashwood P. *Clin Rheumatol* 2013; 33(11):1611-1619). 주목할 점은, 고전적으로 면역조절과 관련된 많은 사이토카인과 분자가 이제 정상적인 신경 발달에도 역할을 하는 것으로 인식되고 있다. 이 이중 기능은 ASD에서 면역 관련 변화와 비정상적 신경 발달의 연관성에 중요한 연결 고리가 될 수 있다.

[0009] 소교세포는 중추 신경계 (CNS) 손상의 전파 및 해결에 중요한 역할을 하지만 불완전하게 이해되는 역할을 한다. 이 세포는 신경염증을 조절하고, 정상 세포, 회돌기교세포 및 뉴런의 활성을 조절하는 인자를 생성하고, 잔해를 제거하여 회돌기교세포가 뉴런을 수초재생하기 시작하는 환경을 제공한다. 마우스에서 소교세포는 원래 태아 발달 초기에 배아의 난황낭으로부터 유래된 뇌의 복제 전구체 풀로부터 발생한다. 골수-유래 순환성 혈액 단핵구는 CNS 손상을 악화시키거나 개선할 수 있는 침윤성 식세포의 또 다른 잠재적 원인이 되는 것으로 여겨진다. 최근 림프와 뇌실질 사이의 단핵구 순환 경로가 기재되어 있지만, 많은 수의 순환성 단핵구가 손상되지 않은 성체 마우스 뇌에 들어 가지 않지만 뇌 방사선요법, 화학 요법 또는 손상, 탈수초 상태, 또는 만성 스트레스와 같은 장애 후에 CNS에 침윤할 수 있다. 일부 모델에서 이러한 침윤성 혈액 단핵구는 염증을 활성화시키고 탈수초화 사건에 참여할 수 있다. 다른 모델에서는, 혈액 단핵구가 재수초화를 촉진시킬 수 있다.

[0010] 시냅스는 뉴런 간의 통신 지점으로, 전기적 및 화학적 신호를 통해 정보를 체계적으로 전달할 수 있다. 발달 초기에 강화된 시냅스 생성 기간이 있지만, 시냅스는 평생 동안 가소성을 유지하여 예를 들어 학습과 기억을 가능하게 한다. 정상적인 시냅스 발달 및 유지에 적절한 신경 기능에 필수적이며, ASD를 포함한 이들 과정에서 이상은 여러 신경 발달 상태와 관련이 있다. 시냅스 단백질을 암호화하는 유전자의 돌연변이는 ASD와 관련이 있다. 또한 인간 및 동물 연구에서 수상돌기 가지의 크기, 수 및 형태가 감소하고 ASD 및 자폐증 관련 장애에서 미성숙 가지 형태가 증가한 것으로 나타났다 (Phillips M, Pozzo-Miller L. *Neurosci Lett* 2015; 601:30-40). 환경적 요인도 시냅스 변화에 영향을 미칠 가능성이 있다. 이러한 변화로 인해 대범위 연결성 부족 및 단범위 연결성 과다와 같이 문제가 있는 신경 연결이 발생할 수 있다 (Geschwind DH, Levitt P. *Curr Opin Neurobiol* 2007; 17(1):103-111; Maximo JO, et al. *Neuropsychol Rev* 2014; 24(1):16-31).

[0011] 전적으로, 이러한 관찰에 따르면 환경적 및 유전적 위험 인자 모두가 정상적인 뇌 발달에 악영향을 미치는 면역 조절장애 및/또는 비정상적인 신경 연결을 유발함으로써 ASD의 발달에 기여할 수 있음을 시사한다. 따라서, 면역조절 요법은 ASD를 앓고 있는 아동의 치료에 중요한 역할을 할 수 있다. 중간엽 간질 세포 (MSC)는 면역조절 기능이 있는 것으로 알려져 있으며 진로소에서 다양한 응용 분야에 사용되며 유리한 안전성 프로파일을 가지고 있다. 또한, MSC는 근본적인 병리와 ASD를 앓고 있는 아동의 증상을 효과적으로 치료할 수 있는 가능성이 있다.

[0012] 중간엽 간질 세포 (MSC)는 골수, 지방 조직 및 출생 조직 (제대혈, 제대 조직, 태반)을 포함하는 여러 다른 조직으로부터 분리될 수 있는 미분화 다능성 세포의 이중 그룹이다. MSC는 뼈, 연골 및 지방을 포함한 증배업 조

직형을 유발할 수 있지만 이들의 주요 작용 메커니즘은 면역조절 및 주변분비 효과로 인한 것으로 생각된다. MSC는 체액성 및 세포 매개성 면역 반응 모두에 대한 다양한 면역조절 효과를 입증하였다. 여기에는 B-세포, T-세포, NK 세포, 수지상 세포 및 소교세포 증식을 억제하고, 전-염증성 사이토카인 생성을 감소하며, 호중구 모집을 차단하는 것을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 면역 반응을 조절하는 능력에도 불구하고 MSC 자체는 면역원성이 낮다. 이를 통해 다른 세포 유형의 전형적인 공여자-수여자 HLA 일치 없이도 HLA 장벽을 넘어 동종 설정에 MSC를 사용할 수 있다. 실제로, 정맥 내 동종 MSC 투여에 대한 13건의 인간 연구를 검토한 결과, 주입 독성에 대한 보고는 없으며 (Lalu MM, et al. PLoS One 2012; 7(10):e47559), MSC가 "면역 특권"이 있으며 면역학적 이식항원인식을 피할 수 있다는 개념을 뒷받침한다. 치료 세포로 활용되는 경우 MSC는 영양 신호를 통해 효과를 발휘한다. MSC는 수여자에게 생착되지 않는다.

[0013] ASD의 치료는 일반적으로 도움이 되며 다중양식의 치료이다. 접근 방식에는 약물, 행동 치료, 작업 요법 및 언어 치료, 전문 교육 및 직업 지원이 포함된다. 항정신성 약물과 같은 현재 이용 가능한 모든 의학적 치료법은 과민성과 같은 관련된 동반이환 증상을 개선하기 위한 것이지만 질병 완화는 아니다. 조기 진단 및 행동 요법의 발전에도 불구하고 ASD를 앓는 아동을 위한 보다 효과적인 치료가 필요하며, ASD에 대해 더 좋고 더 효과적이며 질병을 완화하는 치료법에 대한 큰 미충족 수요가 있다. 인간 제대 조직-유래 중간엽 간질 세포(hCT-MSC) 요법은 뇌의 염증 과정을 조절함으로써 ASD 증상을 완화시킬 수 있는 가능성이 있다.

발명의 내용

[0014] 본 개시 내용은 인간 동종 제대 조직 유래 중간엽 간질 세포 ("hCT-MSC")의 투여를 통해 자폐 스펙트럼 장애가 있다고 의심되는 환자 또는 자폐 스펙트럼 장애를 앓고 있는 환자를 치료하는 방법을 제공한다. 본 개시 내용은 저장관리된 또는 그 외의 이용 가능한 자가 제대혈 유닛이 갖는 제한을 제거한 이점을 제공한다.

[0015] 하나의 양상에서, 본 개시 내용은 치료 유효량의 인간 동종 제대 조직 유래 중간엽 간질 세포(hCT-MSC)를 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 자폐 스펙트럼 장애를 앓고 있거나 앓는 것으로 의심되는 환자를 치료하는 방법을 포함한다. 특정 구현예에서, hCT-MSC는 전신 투여된다. 일부 구현예에서, 이들은 정맥 내로 투여된다. 일부 구현예에서, 이들은 30분에 걸쳐 정맥 내 주입에 의해 투여된다. 특정 구현예에서, hCT-MSC는 단일 용량 또는 다중 용량으로 투여된다. 일부 구현예에서, hCT-MSC는 1회 용량, 2회 용량, 3회 용량 또는 4회 이상의 용량으로 투여된다. 특정 구현예에서, 각각의 용량은 약 1개월 내지 약 6개월 간격으로 투여된다.

[0016] 특정 구현예에서, 환자는 약 1.0×10^6 개 세포/kg 내지 약 6.0×10^6 개 세포/kg의 용량으로 hCT-MSC를 투여 받는다. 특정 구현예에서, 환자는 용량당 약 2.0×10^6 개 세포/kg의 용량으로 hCT-MSC를 투여 받는다. 특정 구현예에서, 환자는 용량당 약 3.0×10^6 개 세포/kg의 용량으로 hCT-MSC를 투여 받는다. 특정 구현예에서, 환자는 6개월 이내에 2회 내지 3회 용량으로 총 6.0×10^6 개 세포/kg이 투여된다. 일부 구현예에서, 용량은 90% 초과 CD73+ 및 CD90+ 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 용량은 10% 미만의 CD45+, CD3+ 또는 CD31+ 세포를 포함한다.

[0017] 또 다른 양상에서, 본 개시 내용은 (a) 환자에 대해 하나 이상의 적절한 시험을 수행하여 행동 및/또는 바이오마커 기준선 점수(들)을 확립하는 단계; (b) 유효량의 hCT-MSC를 환자에게 투여하는 단계; (c) 단계 (a)에 제시된 동일한 하나 이상의 행동 및/또는 바이오마커 검사에 대해 hCT-MSC 투여 후 하나 이상의 시점에서 환자를 재평가하는 단계; 및 (d) 단계 (c)의 결과를 단계 (a)에서 확립된 기준선 점수(들)와 비교하는 단계를 포함하는, 자폐 스펙트럼 장애를 앓고 있는 환자에 대한 hCT-MSC 처리의 치료 효과를 평가하는 방법을 포함한다. 본 개시의 이러한 양상의 특정 구현예에서, 단계 (a) 및 단계 (c)에서 수행된 행동 시험(들)은 바인랜드 적응 행동 척도-II (Vineland Adaptive Behavior Scales-II: VABS-II), 바인랜드 적응 행동 척도-III (Vineland Adaptive Behavior Scales-III: VABS-III), 전반적 임상 인상 척도 (Clinical Global Impression Scale: CGI), 전반적 발달 장애 행동 목록 (Pervasive Developmental Disorder Behavior Inventory: PDDBI), 한 단어 표현 그림 어휘 검사-4 (Expressive One-Word Picture Vocabulary Test-4: EOWPVT-4), 문제 행동 체크리스트(Aberrant Behavior Checklist), 감각 경험 설문지(Sensory Experiences Questionnaire), 반복 행동 척도(Repetitive Behavior Scale), 지능 척도(Intelligence Scales)(조기 학습의 물린 척도(Mullen Scales of Early Learning) 또는 스탠포드-비네(Stanford-Binet)), 언어 환경 분석(Language Environment Analysis), ATN GI 증상 목록(ATN GI 증상 Inventory), 및 부모 양육 스트레스 검사(Parenting Stress Index) 중 하나 이상을 포함한다. 본 개시의 이러한 양상의 특정 구현예에서, 단계 (c)에서의 환자의 재평가는 투여 후 2개월, 4개월, 6개월, 9개월, 12개월, 및 18개월, 24개월, 2년, 3년, 4년, 5년, 10년, 15년, 20년 또는 무기한을 포함하는 하나 이상의 시점

에서 수행된다.

도면의 간단한 설명

- [0018] 도 1은 ASD를 앓고 있는 아동에서 hCT-MSD의 I상 연구를 위한 연구 설계를 보여준다.
- 도 2는 I상 hCT-MSD 연구 동안 관찰된 유해효과의 요약을 보여준다. 총 3/53(5.7%)의 사건이 연구 제품인 저혈압 및 주입 관련 반응과 관련되어 있다.
- 도 3a-3b는 ASD를 앓고 있는 아동에서 hCT-MSD의 II상 연구를 위한 일반적인 연구 설계를 보여준다.
- 도 4는 주입에 대한 hCT-MSD 집단의 예시적인 유세포 분석을 보여준다. 그 집단은 CD73+ 및 CD90+가 90% 이상, CD45+, CD3+ 또는 CD31+ 10% 미만이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0019] 개시된 공정 및 재료를 기술하기 전에, 본원에 기술된 양상은 특정의 구현예, 장치, 또는 구성으로 제한되지 않으며, 그와 같이, 물론, 다양할 수 있음이 이해되어야 한다. 본원에 사용되는 용어는 단지 특별한 양상을 기술하기 위한 것이며 본원에서 구체적으로 정의되지 않는 한, 제한하는 것으로 의도되지 않음이 또한 이해되어야 한다.
- [0020] 또한, 문맥에 의해 달리 명확하게 나타내지 않는 한, 본 발명의 일 양상 또는 구현예에 대해 개시된 구현예들은 또한 본 발명의 다른 양상 또는 구현예에서 사용될 수 있고/있거나 본 발명의 동일한 또는 다른 양상에서 개시된 구현예와 조합되어 사용될 수 있음이 이해되어야 한다. 따라서, 개시는 그러한 조합을 포함하는 것으로 의도되고, 그러한 조합이 명시적으로 기술되지 않은 경우에도 본 발명은 그러한 조합을 포함한다.
- [0021] 본 명세서 전반에 걸쳐, 문맥상 달리 요구되지 않는 한, 단어 "포함하다"와 "로 이루어지다" 및 변형어(예컨대 "포함한다", "포함하는", "로 이루어진다", "로 이루어진")는 언급된 성분, 특징, 요소 또는 단계, 또는 성분들, 특징들, 요소들 또는 단계들의 군을 포함하지만, 임의의 다른 정수 또는 단계, 또는 정수들 또는 단계들의 군을 배제하지는 않는다는 것을 의미하는 것으로 이해될 것이다.
- [0022] 본 명세서 및 첨부된 청구범위에 사용된 단수 형태는 문맥이 달리 명백하게 지시하지 않는 한 복수 지시대상을 포함한다.
- [0023] 범위는 본원에서 "약" 하나의 특정의 값으로부터 및/또는 "약" 또 다른 특정 값까지로 표현될 수 있다. 그러한 범위가 표현될 때, 또 다른 양상은 하나의 특정의 값으로부터 및/또는 다른 특정의 값까지를 포함한다. 유사하게, 값들이 앞선 "약"의 사용에 의해 근사치로서 표현될 때, 특정의 값은 또 다른 양상을 형성한다는 것이 이해될 것이다. 범위의 각각의 종결점이 다른 종결점과 관련하여 그리고 다른 종결점과는 독립적으로 둘 모두의 면에서 유의미하다는 것이 추가로 이해될 것이다.
- [0024] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "접촉하는"은 적어도 하나의 물질과 또 다른 물질의 물리적인 접촉을 포함한다.
- [0025] 본원에 사용된 바와 같이, "치료", "치료법" 및/또는 "치료 요법"은 환자에 의해 발현되거나 환자가 민감할 수 있는 질병, 장애 또는 생리학적 상태(예컨대, 자폐 스펙트럼 장애)에 대한 반응으로 이루어진 임상 개입을 의미한다. 치료의 목적은 증상의 완화 또는 예방, 질병, 장애 또는 상태의 진행 또는 악화를 늦추거나 중지시키는 것 및/또는 질병, 장애 또는 상태(예컨대, 자폐 스펙트럼 장애)의 완화를 포함한다. 일부 구현예에서, 질병은 뇌성마비를 포함한다. 다른 구현예에서, 질병은 저산소-허혈성 뇌병증을 포함한다.
- [0026] 용어 "유효량" 또는 "치료 유효량"은 유의하거나 바람직한 생물학적 및/또는 임상 결과를 달성하기에 충분한 양을 지칭한다. "유효량" 또는 "치료 유효량"은 숙련된 건강 전문가 팀에 의해 결정될 수 있으며, 행동 시험, 바이오마커 검사 및 신경생리학적 또는 신경영상촬영 시험의 사용을 포함할 수 있다. 예를 들어, 행동 시험에는 DSM-5 체크리스트, 바인랜드 적응 행동 척도-III (Vineland Adaptive Behavior Scales-III: VABS-III), 전반적 임상 인상 척도 (Clinical Global Impression Scale: CGI), 전반적 발달 장애 행동 목록 (Pervasive Developmental Disorder Behavior Inventory: PDDBI), 한 단어 표현 그림 어휘 검사-4 (Expressive One-Word Picture Vocabulary Test-4: EOWPVT-4), 어린이-사회적 기술에 대한 행동 평가 부척도(Behavior Assessment for Children-Social Skills subscale), 문제 행동 체크리스트(Aberrant Behavior Checklist), 감각 경험 설문지(Sensory Experiences Questionnaire), 반복 행동 척도(Repetitive Behavior Scale), 지능 척도(Intelligence Scales)(조기 학습의 물런 척도(Mullen Scales of Early Learning) 또는 스탠포드-비네

(Stanford-Binet)), DAS-II(Differential Ability Scales, Second Edition), 언어 환경 분석(Language Environment Analysis), 취학 전 연령 정신의학적 평가(Preschool Age Psychiatric Assessment), 문제 행동 체크리스트(Aberrant Behavior Checklist), ATN GI 증상 목록(ATN GI Symptoms Inventory), 한 단어 표현 그림 어휘 검사-4 (Expressive One-Word Picture Vocabulary Test-4: EOWPVT-4), 및 부모 양육 스트레스 검사(Parenting Stress Index)가 포함되지만 이에 한정되는 것은 아니다. 추가 임상 평가에는 ADI-R (Autism Diagnostic Interview-Revised), ADOS-2 (Autism Diagnostic Observation Schedule, Second Edition), Noldus EthoVision을 이용한 PCI (Parent-Child Interaction), 문제 행동 체크리스트-커뮤니티 (ABC-C), BRIEF-P (Behavior Rating Inventory of Executive Function-Preschool Version), BRIEF (Behavior Rating Inventory of Executive Function), 감각 경험 설문지, 버전 2.1 (Sensory Experiences Questionnaire, Version 2.1: SEQ 2.1), ELEAT (Early Life Exposures Assessment Tool) 및 PedsQL 위장관 징후 척도 (Pediatric Quality of Life Inventory Gastrointestinal Symptoms Scales)가 포함되지만 이에 한정되는 것은 아니다. 집행되는 객관적인 신경학적 검사에는 EGT (Eye Gaze Tracking of Social Stimuli), EEG (Electroencephalogram), CVA (Computer Vision Analysis), 및 MRI (brain Magnetic Resonance Imaging)이 포함될 수 있지만 이에 한정되는 것은 아니다. 일부 구현예에서, 검사는 현재 이용 가능하거나 향후 이용 가능할 동형 또는 대리검사를 포함할 수 있다.

[0027] 본원에 사용되는 바와 같이, 용어 "대상체" 및 "환자"는 본원에서 상호교환적으로 사용되며, 인간 및 비인간 동물 둘 모두를 지칭한다. 본 개시의 용어 "비인간 동물"은 모든 척추동물, 예를 들어, 포유류 및 비-포유류, 예컨대, 비인간 영장류, 양, 개, 고양이, 말, 소, 닭, 양서류, 및 파충류 등을 포함한다. 특정 구현예에서, 대상체는 자폐 스펙트럼 장애를 가졌다 의심되거나, 가지고 있거나 앓고 있는 인간 환자이다. 일부 구현예에서, 인간 대상체는 아동이다. 특정 구현예에서, 인간 대상체는 성인이다.

[0028] 본원에 사용되는 바와 같이, 용어 "자폐 스펙트럼 장애" 및 "자폐증"은 상호교환적으로 사용되며, 다른 사람들과 의사소통하고 관계를 형성함에 있어서 그리고 언어 및 추상적 개념을 사용함에 있어서의 어려움을 특징으로 하는, 일반적으로는 유년기로부터 존재하는, 임의 범위의 정신 질환을 지칭한다. 자폐증은 모든 연령에서 진단될 수 있지만, 증상은 일반적으로 생후 첫 2년 동안 나타난다. 정신 장애 진단 및 통계 매뉴얼 (DSM-5; Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorder)에 따르면, ASD 환자는 다른 사람과의 의사소통 및 상호작용에 어려움이 있고, 제한된 관심 및 반복적인 행동을 하며, 학교, 직장 및 다른 생활 영역에서 제대로 기능하는 능력이 손상된 증상을 겪을 수 있다.

[0029] 중간엽 간질 세포 (MSC)는 골수, 지방 조직 및 출생 조직 (제대혈, 제대 조직, 및 태반)을 포함하는 여러 다른 조직으로부터 분리될 수 있는 미분화 다능성 세포의 이종 그룹이다. MSC는 뼈, 연골 및 지방을 포함한 증배업 조직형을 유발할 수 있지만 이들의 주요 작용 메커니즘은 면역조절 및 주변분비 효과로 인한 것으로 생각된다. MSC는 체액성 및 세포 매개성 면역 반응 모두에 대한 다양한 면역조절 효과를 입증하였다. 여기에는 B-세포, T-세포, NK 세포, 수지상 세포 및 소교세포 증식을 억제하고, 전-염증성 사이토카인 생성을 감소하며, 호중구 모집을 차단하는 것을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 면역 반응을 조절하는 능력에도 불구하고 MSC 자체는 면역원성이 낮다. 이를 통해 다른 세포 유형의 전형적인 공여자-수여자 HLA 일치 없이도 HLA 장벽을 넘어 동종 설정에 MSC를 사용할 수 있다. 실제로, 정맥 내 동종 MSC 투여에 대한 13건의 인간 연구를 검토한 결과, 주입 독성에 대한 보고는 없으며 (Lalu MM, et al. PLoS One 2012; 7(10):e47559), MSC가 "면역 특권"이 있으며 면역학적 이식항원인식을 피할 수 있다는 개념을 뒷받침한다. 치료 세포로 활용되는 경우 MSC는 영양 신호를 통해 효과를 발휘한다. 그들은 수여자에게 생각되지 않는다. ASD에서 MSC의 정확한 작용 메커니즘은 진행중인 연구의 주제이지만 MSC가 세포-매개 면역조절, 분자-매개 신경 보호, 및 기능적 신경 회로의 복원을 포함한 치료 효과를 발휘할 수 있는 몇 가지 잠재적 수단이 있다.

[0030] 본원에 사용되는 바와 같이, 용어 "동종"은 동일한 종이지만 유전적으로 상이한 다른 개체로부터 투여되는 개체의 전체 또는 일부 (예컨대, 세포, 조직, 기관 등)를 지칭한다. 동종 개체는 유전적으로 다르기 때문에 동종 개체는 타-개체가 투여되는 개체(수여자)에서 면역 반응을 유발할 수 있지만, MSC는 면역 특권이 있는 것으로 여겨져 면역학적 이식항원인식을 피할 수 있다. 이는 수여자 환자가 염증성 면역 반응을 유발하지 않고 동종 hCT-MSC의 도입을 견딜 수 있고 동종 hCT-MSC가 거부 발생없이 오랜 기간 동안 생존할 수 있음을 의미한다.

[0031] hCT-MSC에 의한 자폐 스펙트럼 장애 치료

[0032] 본 개시의 관점에서, 본원에 설명된 방법은 원하는 요구를 충족시키기 위해 당업자에 의해 구성될 수 있다. 일반적으로, 개시된 물질, 방법 및 장치는 자폐 스펙트럼 장애가 치료되도록 치료 유효량의 hCT-MSC 및/또는 요소

또는 이들 요소의 혼합물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하거나, 구성하거나, 필수적으로 구성하는, 자폐 스펙트럼 장애를 앓고 있는 것으로 의심되는 대상체 또는 자폐 스펙트럼 장애를 앓고 있는 대상체를 치료하는 방법을 제공한다.

[0033] 본원에서 사용된 바와 같이, 달리 언급되지 않는 한, 용어 "hCT-MS"는 구체적으로 언급되었는지 여부에 관계없이 임의의 포맷 및/또는 요소 또는 그 요소의 혼합물을 포함하는 것을 의미함을 이해해야 한다.

[0034] 환자는 임의의 인간 또는 비인간 동물일 수 있다. 일부 구현예에서, 환자는 인간이다. 특정 구현예에서, 환자는 18세 미만, 또는 이 넓은 연령 범위에 속하는 임의의 연령 범위의 인간이다. 비-제한적인 예에서, 환자는 2세 내지 18세, 2세 내지 17세, 2세 내지 16세, 2세 내지 15세, 2세 내지 14세, 2세 내지 13세, 2세 내지 12세, 2세 내지 11세, 2세 내지 10세, 2세 내지 9세, 2세 내지 8세, 2세 내지 7세, 2세 내지 6세, 2세 내지 5세, 2세 내지 4세, 2세 내지 3세, 3세 내지 18세, 3세 내지 17세, 3세 내지 16세, 3세 내지 15세, 3세 내지 14세, 3세 내지 13세, 3세 내지 12세, 3세 내지 11세, 3세 내지 10세, 3세 내지 9세, 3세 내지 8세, 3세 내지 7세, 3세 내지 6세, 3세 내지 5세, 3세 내지 4세, 4세 내지 18세, 4세 내지 17세, 4세 내지 16세, 4세 내지 15세, 4세 내지 14세, 4세 내지 13세, 4세 내지 12세, 4세 내지 11세, 4세 내지 10세, 4세 내지 9세, 4세 내지 8세, 4세 내지 7세, 4세 내지 6세, 4세 내지 5세, 5세 내지 18세, 5세 내지 17세, 5세 내지 16세, 5세 내지 15세, 5세 내지 14세, 5세 내지 13세, 5세 내지 12세, 5세 내지 11세, 5세 내지 10세, 5세 내지 9세, 5세 내지 8세, 5세 내지 7세, 5세 내지 6세, 6세 내지 18세, 6세 내지 17세, 6세 내지 16세, 6세 내지 15세, 6세 내지 14세, 6세 내지 13세, 6세 내지 12세, 6세 내지 11세, 6세 내지 10세, 6세 내지 9세, 6세 내지 8세, 6세 내지 7세, 7세 내지 18세, 7세 내지 17세, 7세 내지 16세, 7세 내지 15세, 7세 내지 14세, 7세 내지 13세, 7세 내지 12세, 7세 내지 11세, 7세 내지 10세, 7세 내지 9세, 또는 7세 내지 8세일 수 있다.

[0035] 일부 구현예에서, 환자는 약 45세 이하 연령의 인간, 또는 약 1세 내지 약 45세의 더 넓은 연령 범위에 속하는 임의의 연령 범위인 인간이다. 예를 들어, 약 18 내지 약 45세, 약 20 내지 약 45세, 약 25 내지 약 45세, 약 30 내지 약 45세, 약 35 내지 약 45세, 또는 약 40 내지 약 45세일 수 있다. 특정 구현예에서, 환자는 1 내지 45세 사이 임의의 연령의 인간이다. 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 또는 45세일 수 있다.

[0036] hCT-MS는 전신 전달을 포함하는 당업계에 공지된 임의의 기술에 의해 환자에게 투여될 수 있다. 투여 경로는 정맥 내 투여 또는 주입 기술을 포함하지만 이에 한정되는 것은 아니다. 주입 기술은 바늘 또는 카테터를 통한 hCT-MS의 투여를 포함할 수 있다. 일반적으로 주입은 hCT-MS가 정맥 내 또는 피하로 투여되는 것을 의미한다. 일부 구현예에서, hCT-MS는 전신 투여된다. 특정 구현예에서, hCT-MS는 정맥 내 (즉, 정맥 내 (IV) 주사에 의해) 투여된다.

[0037] 본 연구는 (1) ASD를 앓는 어린 아동에서 hCT-MS 1회, 2회 또는 3회 정맥 내 투여의 안전성, 및 (2) ASD를 앓는 어린 아동에서 여러 가지 평가 도구의 집행의 가용성 및 변화에 대한 민감도에 초점을 두었다. 3명(3) 환자의 제 1 코호트는 단일 용량의 hCT-MS를 투여받았다. 3명(3) 환자의 제 2 코호트는 2개월(2) 간격으로 2회 용량의 hCT-MS를 투여받았다. 6명(6) 환자의 제 3 코호트는 각 용량 간에 2개월(2) 간격으로 3회 용량의 hCT-MS를 투여받았다. 주요 종결점은 안전성으로, hCT-MS의 각 주입 동안, 각 주입 후 24시간 이내, 각 주입 후 7-10일 이내, 각 주입 후 2개월, 4개월 및 6개월, 그리고 최종 주입 후 6개월 및 12개월에 급성 주입 반응 및 감염 발생률을 평가하였다. 주입 기간과 최종 주입 후 12개월에 걸친 유해효과의 평가는 치료가 안전하고 잘 관용되는 것으로 나타났다. 유해효과가 보고되고 환자 12명 중 10명에서 적어도 하나의 유해효과가 보고되었다. 유해효과는 경미하고 예상되었고 연구 제품과 관련이 없었다. 심각한 유해효과는 보고되지 않았다. 이차 종결점은 기준선에, hCT-MS의 초기 주입 전, 및 초기 hCT-MS 주입 후 6개월 후에 ASD 특이적 결과 지표를 평가하였다. 기준선에서 무발화 IQ가 더 높은 환자에 대한 사회적 의사소통 기술 (바인랜드 적응 행동 척도)의 부모-보고형 측정에서 환자의 행동이 유의하게 개선됨이 관찰되었다.

[0038] hCT-MS의 준비

[0039] 인간 동종 체대-유래 중간엽 간질 세포는 당업계에 공지된 임의의 방법에 의해 제조, 보존 및 투여용으로 제조될 수 있다. 일부 경우에, hCT-MS는 체대 조직을 조각으로 절단하고 히알루로니다제, DNA 분해효소, 콜라겐분해효소 및 파파인으로 다져서 소화시킴으로써 무균실에서 준비될 수 있다. 그 후, 생성된 세포 현탁액은 배양액에 플레이팅되고, P0 배양액을 확립하기 위해 전연생장에 이르기까지 성장시키고, 냉동보존될 수 있다. P1 및 P2 배양액은 유사한 조건에서 성장시키고 배양장치로부터 제거될 수 있다. 최종 제품은 5% 인간 혈청 알부민은

로 된 플라즈마라이트(plasmalyte) 내에서 수거되고, 세척되고, 텍스트란과 10% DMSO의 최종 농축액에서 5천만-1억개의 세포를 포함하는 구획화된 냉동백에서 동결보존시켜 P2 배양액으로부터 과생될 수 있다. 투여 당일, 냉동백의 한 구획을 해동시키고 10-40mL의 플라즈마라이트 IV 용액으로 희석시켜 주사기 또는 백에 넣고 투여를 위해 침대 옆으로 이동시킬 수 있다.

- [0040] hCT-MSC 투여
- [0041] 제대혈의 투여 경로는 치료될 질병 및 원하는 결과에 의거하여 당업자에 의해 선택될 수 있다. 특정 구현예에서, hCT-MSC는 말초 정맥 (IV) 주입을 통해 투여된다.
- [0042] 일부 구현예에서, 본 개시의 hCT-MSC는 단일 용량으로 투여될 수 있다. 특정 구현예에서, hCT-MSC는 일정 기간 (예를 들어, 수일, 수주, 또는 수개월)에 걸쳐 다중 용량(예를 들어, 치료당 2, 3, 또는 4회 이상의 단일 용량)으로 투여될 수 있다. 특정 구현예에서, 본 개시의 hCT-MSC는 2회 이상의 용량으로 투여될 수 있으며, 각 용량은 적어도 약 1주, 약 2주, 약 3주 간격, 약 1개월 내지 약 2개월 간격, 약 1개월 내지 약 3개월 간격, 약 1개월 내지 약 4개월 간격, 약 1개월 내지 약 5개월 간격, 또는 약 1개월 내지 약 6개월 이상 간격으로 투여된다. 일부 구현예에서, 각 용량은 약 1주 간격으로 투여된다. 일부 구현예에서, 각 용량은 약 2주 간격으로 투여된다. 일부 구현예에서, 각 용량은 약 3주 간격으로 투여된다. 일부 구현예에서, 각 용량은 약 1개월 간격으로 투여된다. 일부 구현예에서, 각 용량은 약 2개월 간격으로 투여된다. 일부 구현예에서, 각 용량은 약 3개월 간격으로 투여된다. 일부 구현예에서, 각 용량은 약 4개월 간격으로 투여된다. 일부 구현예에서, 각 용량은 약 5개월 간격으로 투여된다. 일부 구현예에서, 각 용량은 약 6개월 간격으로 투여된다. 일부 구현예에서, 각 용량은 약 7개월 간격으로 투여된다. 일부 구현예에서, 각 용량은 약 8개월 간격으로 투여된다. 일부 구현예에서, 각 용량은 약 9개월 간격으로 투여된다. 일부 구현예에서, 각 용량은 약 10개월 간격으로 투여된다. 일부 구현예에서, 각 용량은 약 11개월 간격으로 투여된다. 일부 구현예에서, 각 용량은 약 12개월 간격으로 투여된다.
- [0043] 특정 구현예에서, 본 개시의 hCT-MSC의 각 용량은 약 20분 내지 약 75분의 기간에 걸쳐, 예컨대, 약 20분 내지 약 60분에 걸쳐, 또는 약 20분 내지 약 50분에 걸쳐, 또는 약 20분 내지 약 40분에 걸쳐, 또는 약 20분 내지 약 30분에 걸쳐, 또는 약 25분 내지 약 70분에 걸쳐, 또는 약 25분 내지 약 60분에 걸쳐, 또는 약 25분 내지 약 50분에 걸쳐, 또는 약 25분 내지 약 40분에 걸쳐, 또는 약 30분 내지 약 70분에 걸쳐, 또는 약 30분 내지 약 60분에 걸쳐, 또는 약 30분 내지 약 50분에 걸쳐, 또는 약 30분 내지 약 40분에 걸쳐 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 용량은 30분에 걸쳐 투여된다.
- [0044] hCT-MSC는 치료 유효 용량으로 존재할 수 있다. 특정 구현예에서, hCT-MSC의 치료 유효 용량은 투여 시점에 약 1×10^6 내지 약 6×10^6 개 세포/kg 체중; 예컨대, 약 1×10^6 내지 약 2.5×10^6 개 세포/kg, 또는 약 1.5×10^6 내지 약 3×10^6 개 세포/kg, 약 1.5×10^6 내지 약 2.5×10^6 개 세포/kg, 또는 약 2×10^6 개 세포/kg을 포함한다. 특정 구현예에서, hCT-MSC의 치료 유효 용량은 약 1.0×10^6 개 세포/kg 체중, 또는 약 2.0×10^6 개 세포/kg 체중, 또는 약 2.5×10^6 개 세포/kg 체중, 또는 약 3.0×10^6 개 세포/kg 체중, 또는 약 4.0×10^6 개 세포/kg 체중, 또는 약 5.0×10^6 개 세포/kg 체중, 또는 약 6.0×10^6 개 세포/kg 체중을 포함한다. 일부 구현예에서, hCT-MSC의 치료 유효 용량은 총 약 6×10^6 개 세포/kg 체중을 포함하고, 약 6개월의 기간에 걸쳐 2-3회 용량으로 투여된다. 당업자는 원하는 투여 경로에 의거하여 적절한 투여량의 용량을 선택할 수 있음을 인식할 것이다. 예를 들어, 정맥내 투여는 약 5 mL 내지 약 50 mL 범위의 용량 부피를 사용할 수 있으며; 예컨대, 약 5 mL 내지 약 40 mL, 또는 약 5 mL 내지 약 30 mL, 또는 약 5 mL 내지 약 20 mL, 또는 약 5 mL 내지 약 15 mL, 또는 약 10 mL 내지 약 40 mL, 또는 약 10 mL 내지 약 30 mL, 또는 약 10 mL 내지 약 20 mL, 또는 약 10 mL 내지 약 15 mL, 또는 약 20 mL 내지 약 50 mL, 또는 약 20 mL 내지 약 40 mL, 또는 약 20 mL 내지 약 30 mL, 또는 약 30 mL 내지 약 50 mL, 또는 약 30 mL 내지 약 40 mL, 또는 약 40 mL 내지 약 50 mL일 수 있다.
- [0045] 일부 구현예에서, hCT-MSC는 총 약 6×10^6 개 세포/kg 체중의 주입에 의해 투여되고, 약 6개월의 기간에 걸쳐 2-3회 용량으로 투여된다. 특정 구현예에서, hCT-MSC는 단일 용량의 2×10^6 개 세포/kg 체중의 주입으로 투여된다. 특정 구현예에서, hCT-MSC는 단일 용량의 6×10^6 개 세포/kg 체중의 주입으로 투여된다. 특정 구현예에서, hCT-MSC는 2회 용량의 2×10^6 개 세포/kg 체중의 주입으로 투여되고, 각 주입은 2개월 간격으로 제공된다. 특정 구현

예에서, hCT-MSc는 3회 용량의 2×10^6 개 세포/kg 체중의 주입으로 투여되고, 각 주입은 2개월 간격으로 제공된다. 특정 구현예에서, hCT-MSc는 단일 용량의 3×10^6 개 세포/kg 체중의 주입으로 투여된다. 특정 구현예에서, hCT-MSc는 단일 용량의 4×10^6 개 세포/kg 체중의 주입으로 투여된다. 일부 구현예에서, hCT-MSc는 2회 용량의 3×10^6 개 세포/kg 체중의 주입으로 투여되고, 각 주입은 약 2개월 간격으로 제공된다. 특정 구현예에서, hCT-MSc는 2회 용량의 3×10^6 개 세포/kg 체중의 주입으로 투여되고, 각 주입은 약 3개월 간격으로 제공된다. 특정 구현예에서, hCT-MSc는 3회 용량의 3×10^6 개 세포/kg 체중의 주입으로 투여되고, 각 주입은 약 2 내지 3개월 간격으로 제공된다.

[0046] 말초 IV 투여가 사용되는 특정 구현예에서, IV 수액은 유지용량의 약 1.0 내지 약 2.0배로 투여될 수 있다. 예를 들어, IV 수액은 주입 후 유지용량의 약 1.0 내지 약 1.5배, 또는 약 1.5 내지 약 2.0배로 투여될 수 있다. 유지 IV 수액은 hCT-MSc 주입 후 약 30분 내지 약 60분 동안 투여될 수 있다. 예를 들어, 유지 IV 수액은 주입 후 예컨대, 약 30분 내지 약 60분, 또는 약 30분 내지 약 45분, 또는 약 45분 내지 약 60분 동안 투여될 수 있다.

[0047] 임의의 적절한 정맥 내 수액이 hCT-MSc 주입 후 유지를 위해 사용될 수 있다. 특정 구현예에서, 유지 IV 수액은 식염수 또는 링거 락테이트 용액이다. 특정 구현예에서, 유지 IV 수액은 0.25% 생리 식염수이다. 특정 구현예에서, 유지 IV 수액은 0.5% 생리 식염수이다.

[0048] 향후 II상 및 III상 임상 시험을 위한 종결점으로서 유용성 및 투여의 가용성을 결정하기 위해 다차원 평가를 활용하였다. 이러한 평가 또는 검사에는 행동 시험, 바이오마커 검사 및 신경생리학적 또는 신경영상촬영 검사를 모두 포함하였다. 일부 구현예에서, 수행되거나 집행되는 행동 시험에는 DSM-5 체크리스트, 바인랜드 적응 행동 척도-II (VABS-II), 바인랜드 적응 행동 척도-III (VABS-III), 전반적 임상 인상 척도 (CGI), 전반적 발달 장애 행동 목록 (PDDBI), 한 단어 표현 그림 어휘 검사-4 (EOWPVT-4), 어린이-사회적 기술에 대한 행동 평가 부척도, 문제 행동 체크리스트, 감각 경험 설문지, 반복 행동 척도, 지능 척도 (조기 학습의 물린 척도(Mullen Scales of Early Learning) 또는 스탠포드-비네(Stanford-Binet)), DAS-II(Differential Ability Scales, Second Edition), 언어 환경 분석, 취학 전 연령 정신의학적 평가, 문제 행동 체크리스트, ATN GI 증상 목록, 한 단어 표현 그림 어휘 검사-4 (EOWPVT-4), 및 부모 양육 스트레스 검사를 포함하지만 이에 한정되는 것은 아니다. 추가 임상 평가에는 ADI-R (Autism Diagnostic Interview-Revised), ADOS-2 (Autism Diagnostic Observation Schedule, Second Edition), Noldus EthoVision을 이용한 PCI (Parent-Child Interaction), ABC-C (Aberrant Behavior Checklist-Community), BRIEF-P (Behavior Rating Inventory of Executive Function-Preschool Version), BRIEF (Behavior Rating Inventory of Executive Function), SEQ 2.1 (Sensory Experiences Questionnaire, Version 2.1), ELEAT (Early Life Exposures Assessment Tool), 및 PedsQL 위장관 징후 척도 (Pediatric Quality of Life Inventory Gastrointestinal Symptoms Scales)를 포함하지만 이에 한정되는 것은 아니다. 일부 구현예에서, 집행된 객관적인 신경학적 검사는 EGT (Eye Gaze Tracking of Social Stimuli), EEG (Electroencephalogram), CVA (Computer Vision Analysis), 및 MRI (brain Magnetic Resonance Imaging)를 포함할 수 있지만 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 언급된 검사 외에도 평가 및 검사에는 현재 또는 향후 임의의 대리 또는 동형 검사가 포함될 수 있다.

[0049] 일부 구현예에서, 하나 이상의 행동 시험 및 객관적 바이오마커 검사는 기준선 행동 및 바이오마커 점수를 확립하기 위해 유효량의 hCT-MSc를 투여하기 전에 ASD 환자에게 수행된다. 일부 구현예에서, 환자는 동일한 하나 이상의 행동 시험, 객관적인 바이오마커 검사 및 신경생리학적 또는 신경영상촬영 검사에 대해 유효량의 hCT-MSc 투여 후 재평가된다. 일부 구현예에서, hCT-MSc의 투여 후 수행된 검사 결과는 hCT-MSc의 투여 전에 수행된 동일한 검사의 기준선 결과와 비교된다. 일부 구현예에서, VABS-III 부모 인터뷰는 일차 행동 종결점이다. 일부 구현예에서, CGI, PDDBI 및 EOWPVT는 주요 이차 행동 종결점이다. 일부 구현예에서, 객관적인 바이오마커 검사는 EGT이다.

[0050] 일부 구현예에서, 환자는 유효량의 hCT-MSc 투여 후 하나 이상의 시점에서 재평가되고, 이는 hCT-MSc의 투여 후 3개월, 6개월, 9개월, 12개월, 18개월, 24개월, 3년, 4년, 5년, 10년, 20년 이상을 포함하지만 이에 한정되는 것은 아니다. 특정 구현예에서, 환자는 무기한 재평가된다. 일부 구현예에서, 환자는 유효량의 hCT-MSc 투여 후 3개월에 재평가된다. 일부 구현예에서, 환자는 유효량의 hCT-MSc 투여 후 6개월에 재평가된다. 일부 구현예에서, 환자는 유효량의 hCT-MSc 투여 후 9개월에 재평가된다. 일부 구현예에서, 환자는 유효량의 hCT-MSc 투여 후 12개월에 재평가된다. 일부 구현예에서, 환자는 유효량의 hCT-MSc 투여 후 18개월에 재평가된다. 일부

구현예에서, 환자는 유효량의 hCT-MSC 투여 후 24개월에 재평가된다. 일부 구현예에서, 환자는 유효량의 hCT-MSC 투여 후 3개월, 6개월, 9개월 및 12개월에 재평가된다.

- [0051] 이제, 본 개시의 특정 양상이 하기 비제한적인 실시예를 통해 추가로 설명된다.
- [0052] **실시예**
- [0053] 재료 및 방법
- [0054] 인간 제대 조직-유래 중간엽 간질 세포 (hCT-MSC)의 제조
- [0055] 세포원
- [0056] hCT-MSC는 배양, 냉동 보존 및 저장관리된 용해된 제대 조직의 동종 세포로부터 무균실 ISO 7 시설에서 cGMP하에 제조되었다.
- [0057] 수집/복구 방법
- [0058] hCT-MSC는 공여자 아기의 어머니의 서면 동의 후, FDA 승인되고 FACT 인증받은 듀크 대학 메디칼 센터의 공중 제대혈 저장관리인 카롤리나스 제대혈 뱅크에 아기의 제대혈이 기증된 것으로, 정상 분만시 태반에서 채취한 제대 조직으로부터 제조되었다. 제대 조직은 정상 만삭 임신 후 선택적 제왕절개를 통해 분만된 남자 아기의 태반에서 채취하였다. 공여자 선별 설문지는 모체 공여자가 작성하고, 노스캐롤라이나주 샬롯의 미국 적십자에 있는 CLIA-인증된 공여자 선별 검사실에서 모체 혈액을 전염성 질환에 대해 검사하였다. 공여자는 동종 용도로 공중 제대혈 뱅크에 기증할 자격이 있어야 한다. 태반과 제대를 분만 후, 제대혈은 무균상에서 태반으로부터 배출되었다. 그런 다음 제대를 건조시키고 클로라프렘으로 세척하고 태반의 기저부에서 분리한 다음 플라즈마라이트 A가 함유된 멸균병에 넣고, 적합한 용기에 담아 실온에서 로버트슨 임상 및 중개 세포 치료요법(Robertson Clinical and Translational Cell Therapy ct2: CT2) GMP 세포 처리 실험실로 옮겼다.
- [0059] 공여자 선별 및 검사
- [0060] 21 C.F.R. Part 1271의 모든 요건을 충족시키기 위해 카롤리나스 제대혈 저장관리 표준 운영 절차에 따라 공여자 선별 및 검사를 수행하였다. 선별 및 검사는 권장 사항에 따라 최신이며 생물학적 허가 번호 1870에 따라 FDA의 승인을 받았다. 제대혈의 모체 공여자를 HIV-1, HIV-2, B형 간염 바이러스 (HBV, 표면 및 코어 항원), C형 간염 바이러스 (HCV), Treponema pallidum (매독), CJD (선별 전용), 인간 T-림프영양성 바이러스 유형 1 및 2 (HTLV-1, HTLV-2), Chagas 및 CMV에 대해 선별하고 검사하였다. HIV-1/2/0, HBV, HCV 및 웨스트 나일 바이러스에 대해 핵산 검사도 모체 혈액에서 수행하였다. 지카 바이러스에 대한 선별도 수행하였다.
- [0061] 제대 조직은 카롤리나스 제대혈 뱅크에 기증하기로 동의한 공여자로부터 왔기 때문에, 그들은 이러한 카롤리나스 제대혈 뱅크 표준 운영 절차에 따라 공여자 선별 및 감염성 질환 검사를 받았다. 제대혈 관련 모체 샘플과 제대 조직 MSC 샘플은 이 연구의 일부로 향후 시험을 위해 참조 샘플로 보관되었다.
- [0062] 세포 저장관리 시스템
- [0063] 마스터 세포 저장관리(P0)
- [0064] hCT-MSC에 대한 마스터 세포 저장관리(MCB)는 용해된 제대 조직에서 유래된 것이고, 배양액은 7 내지 14일에 걸쳐 확장되어 약 2×10^7 개 세포를 생성하고, Cryostor CS10 (Biolife, Bothell, WA)에서 1×10^7 개 세포/mL의 농도로 바이알당 적절한 수 5×10^6 개 세포의 분취량으로 동결시켰다. 더 구체적으로, 조직은 GMP 등급 콜라겐분해 효소 (Roche, Basel, Switzerland), 파파인 (Worthington Biochemical, Lakewood, NJ), USP 등급 히알루루니다제 (Halozyme Therapeutics, San Diego, CA), GMP 등급 DNA 분해효소 (EMD Millipore, Billerica, MA), 및 Miltenyi Biotec GentleMacs Octo Dissociator (Bergisch Gladbach, Germany)를 포함하는 효소 칵테일을 사용하여 분해시켰다. 그 다음 조직을 4g 조각으로 자르고 효소 칵테일과 함께 멸균 GentleMacs 튜브에 넣고 분해하였다. 분해 후, 생성된 물질을 Prime XV MSC Expansion XFSM (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) 및 GMP 등급 혈소판 용해물 (Compass Biomedical, Cleveland, OH)에서 7-14일 동안 배양하였다. 트립신 처리에 의해 세포를 수확하고, 상기 기재된 바와 같이 동결 보존하였다. 세포는 마커 CD90, CD73, CD105, CD166, CD31, CD45, 및 CD3를 사용하여 유세포 분석으로 특성을 확인하였다. Cellometer (Nexcelom, Lawrence, MA)를 사용하여 세포 계수를 수행하여 생존력, 총 세포 농도 및 생존 세포 농도를 결정하였다. BacT/Alert System (BioMerieux, Durham, NC)을 사용한 무균 검사를 MSC 배양의 상청액에 대해 수행하였다. 샘플은 또한 마이코플라스마 및 내독

소 검사를 위해 보관하였다. MCB의 각 그룹은 후속 확장 자격을 갖추려면 하기 표 1의 기준을 충족해야 한다.

표 1

검사	사양
공여자 적격성	공여자 선별 및 검사 결과에 따라 공여자가 적격하다고 결정되었다.
멸균 (BacT/ALERT)	음성
내독소	< 5 EU/mL
마이코플라스마	음성
생존력	≥ 70% 생존
세포 구성 (동일성)	> 90% CD90+
	> 90% CD73+
	< 10% CD45+
	< 10% CD31+
	< 10% CD3+
	정보 선별용 CD105+
	정보 선별용 CD166+

[0065]

[0066]

작업용 세포 저장관리 (P1)

[0067]

작업용 세포 저장관리 (WCB)는 MCB (P0)로부터 생성하였다. MCB로부터의 적절한 수의 바이알을 해동하고 HYPERFlask (Corning Life Sciences, Corning, NY)에 넣고 5-7일 동안 확장하여 약 2.75×10^8 개 세포를 생성하였다. P1 세포를 수확하고 Cryostor CS10에서 1×10^7 개 세포/mL의 농도로 적절한 수의 5 mL 저온유리병에서 냉동 보존하였다. 세포는 마커 CD90, CD73, CD166, CD31, CD45, CD3 및 CD105를 사용하여 유세포 분석으로 특성을 확인하였다. 세포 계수는 생존력, 총 세포 농도 및 생존 세포 농도를 결정하기 위해 Cellometer를 사용하여 수행하였다. BacT/Alert System을 사용한 무균 검사는 배양 상청액에 대해 수행하였다. 샘플은 또한 마이코플라스마 및 내독소 검사를 위해 보관하였다. WCB의 각 그룹은 후속 확장 자격을 갖추려면 상기 표 1의 기준을 충족해야 한다.

[0068]

최종 연구 재료 (P2)

[0069]

최종 연구 재료는 WCB (P1)에서 생성시켰다. MCB로부터의 적절한 수의 바이알을 해동하고 20개의 HYPERFlask에 넣고 5-7일 동안 확장하여 약 1.25×10^9 개 세포를 생성하였다. P2 세포를 수확하고 5% HSA (Grifols, Barcelona, Spain) 및 10% DMSO (Akron Biotech, Boca Raton, FL)와 함께 플라즈마라이트 A (Baxter Healthcare, Deerfield, IL)에서 1×10^7 개 내지 2×10^7 개 세포/mL의 농도로 CryoPRO 5 구획화된 백 (SynGen, Sacramento, CA)에 냉동 보존하였다. 세포는 마커 CD90, CD73, CD166, CD31, CD45, CD3, 및 CD105를 사용하여 유세포 분석으로 특성을 확인하였다. 세포 계수는 생존력, 총 세포 농도 및 생존 세포 농도를 결정하기 위해 Cellometer를 사용하여 수행하였다. BacT/Alert System을 사용한 무균 검사는 배양 상청액에 대해 수행하였다. 샘플은 또한 마이코플라스마 및 내독소 검사를 위해 보관하였다. 각 그룹은 임상 사용 자격을 갖추려면 하기 표 2의 기준을 충족해야 한다.

표 2

P2 배양에 대한 hCT-MSC 자격 기준

검사	사양
멸균 (BacT/ALERT)	음성
내독소	< 5 EU/mL
마이코플라스마	음성
생존력	≥ 70% 생존
세포 구성 (동일성)	> 90% CD90+
	> 90% CD73+
	< 10% CD45+
	< 10% CD31+
	< 10% CD3+
	Report% CD105+ (정보 선별용)
Report% CD166+ (정보 선별용)	
P53 돌연변이	돌연변이가 감지되지 않음
모체 세포	음성
효능	제 3 자 MLC 분석에서 T 세포 증식의 ≥70%의 효능 억제

[0070]

표 3

제조에 사용되는 시약

항목명/설명	제조사	등급
플라즈마라이트 A	Baxter Healthcare - Deerfield, IL	USP
Hylenex (NDA 21859/S-023)	Halozyme Therapeutics - San Diego, CA	USP
Dulbecco 의 인산완충식염수	Thermo Fisher Scientific - Waltham, MA	GMP
Benzonase 핵산분해효소	EMD Millipore - Billerica, MA	GMP
파파인	Worthington Biochemical - Lakewood, NJ	무동물성물질 인증
Liberase	Roche - Basel, Switzerland	GMP
Hanks 평형 염류 완충액	GE Healthcare - Cardiff, UK	GMP
Prime-XV MSC Expansion XSFM	Irvine Scientific - Santa Ana, CA	GMP
혈소판 응해물	Compass Biomedical - Cleveland, OH	GMP
TrypLE Select 10X	Invitrogen - Carlsbad, CA	GMP
Cryostor CS10	Biolife - Bothell, WA	GMP
25% 인간 혈청 알부민	Grifols - Barcelona, Spain	주사용 약제
DMSO/덱스트란 (55% w/v DMSO, 5% w/v)	Akron Biotech - Boca Raton, FL	GMP

[0071]

[0072] 인간 제대 조직 유래 중간엽 간질 세포(hCT-MSC)의 제조

[0073] 세포 수집/가공/배양 조건 방법

[0074] 모든 제조는 CT2 GMP 시설에서 수행하였다. 무균실은 모니터링을 유지하고 프로토콜에 따라 청결히 하고 모든 직원은 적절한 교육을 받고 적절한 갱의 훈련을 받았다. 교육은 SOP에 따라 문서화하였다. 직원은 CT2 GMP 시설에 대해 검증된 문서 추적 시스템인 MasterControl에서 유지 관리되는 승인된 프로토콜을 따랐다. 다음 SOP는 갱의 및 청결에 대해 설명하며 요청시 제공되었다: CT2-SOP-003, CT2 시설 접근 및 사용; CT2-SOP-004, CT2 GMP 시설에 대한 갱의 절차; CT2-SOP-006, CT2 GMP 시설의 분류된 구역의 청결 및 위생; CT2-SOP-009, 자재,

제품, 장비 및 CT2 GMP 시설 안팎으로의 폐기물 이송.

- [0075] hCT-MSc 개시 물질은 서면 동의 후 모체가 기증한 제대 조직이었다. 제조에 사용된 제대 조직은 수술실에서 복잡하지 않은 선택적 제왕절개 분만으로부터 얻은 만삭 태반에서 채취하여 수집 시점에 12자리 ISBT 바코드 식별 번호가 지정되었다. 제대 조직이 CT2 GMP 시설에 도착하면 CT2 GMP 시설에 고유한 새로운 12자리 ISBT 바코드 식별 번호가 할당되고 hCT-MSc의 제조 공정 전체에서 추적되었다. 이 새로운 바코드 식별 번호는 수집 현장에서 조직에 배정된 원래 ISBT 번호에 연결시켰다. 공여자 선별 및 검사는 저장관리될 hCT-MSc에 대한 제대혈 인허가 사양을 충족해야 한다.
- [0076] 제대 조직 (CT2-MSc-002)을 처리하여 P0 (MCB) 생성
- [0077] 제조를 위한 0일에는 남자 공여자 제대 조직을 받은 후 시작하였다. 제대 조직은 플라즈마라이트 A가 들어있는 용기에서 숙달된 운반자에 의해 CT2 시설로 전달시켰다. 제대 조직이 처리 요건을 충족하는지 확인하기 위해 수령 즉시 육안 검사를 수행하였다. 수집할 때 제대 조직에 12 자리 바코드가 할당되고 조직이 CT2 시설에 도착하면 할당된 새로운 12자리 ISBT 바코드 식별 번호에 연결시켰다. 모든 제조 이력, 계측 출력물, 튜브, 바이알 등에 대한 충분한 수의 바코드 라벨을 발행하고, 제조 실행이 끝날 때 조정하였다.
- [0078] 생물안전성 캐비닛에서, 제대 조직의 무게를 재고 대략 4그램 조각으로 잘랐다. 제대 조직 조각을 리베라아제 (Liberase), 힐렉스(Hylenex), 파파인(Papain) 및 벤조나아제(Benzonase)를 포함하는 효소 칵테일과 함께 멸균 튜브에 넣었다 (표 3 참조). 그런 다음 조직 조각을 다져서 Miltenyi Biotec Octo GentleMacs Dissociator에서 분해하였다. 분리 후, 용해된 조직을 여과하고, 원심분리하고, 1% 혈소판 용해물로 보충된 Prime XV MSC Expansion XFSM을 함유하는 단층 CellSTACK (Corning Life Sciences, Corning, NY)에 플레이팅하고 5% CO₂와 함께 37°C에서 배양하였다.
- [0079] 배지 교환 및 수확 (CT2-MSc-003) (MCB)
- [0080] 배양 후 처음 3일 이내에 CellSTACK을 배양기에서 잠깐 꺼내어 현미경으로 오염 및/또는 비정상적인 형태 또는 비정상 성장의 시각적 증거를 관찰하였다. 그런 다음 모든 배지를 플라스크에서 제거하고 동일한 부피의 새로운 Prime XV MSC Expansion XFSM 및 1% 혈소판 용해물로 교체하였다. 플라스크를 7일차까지 배양기로 돌려보냈다.
- [0081] 7일째에 CellSTACK을 배양기에서 잠깐 꺼내어 현미경으로 오염 및/또는 비정상적인 형태 또는 비정상 성장의 시각적 증거를 관찰하였다. 배양액의 80-90% 합류에 도달하지 않은 경우, 모든 배지를 플라스크에서 제거하고 동일한 부피의 새로운 Prime XV MSC Expansion 배지 및 1% 혈소판 용해물로 교체하였다. 플라스크를 배양기로 돌려보냈다.
- [0082] 일단 80-90% 합류에 도달하면 P0 CellSTACK을 7일 내지 14일 사이에 수확하였다. 수확 일에 CellSTACK을 배양기에서 제거하고 오염 및/또는 비정상적인 형태 또는 비정상 성장의 시각적 증거를 현미경으로 관찰하였다. 세포를 1X TrypLE을 사용하여 CellSTACK에서 제거하고 계수하고 Cryostor CS10에서 냉동 보존하였다. 세포는 제어 속도 냉동고를 사용하여 2mL 저온유리병에 1×10^7 개 세포/mL의 농도로 약 5×10^6 개 세포의 분취량으로 냉동하였다. 세포는 액체 질소 냉동고에서 증기 상태로 저장시켰다. 잔류 배양 배지는 무균 검사를 위해 호기성 및 혐기성 배양병에 접종되었다. 세포 특성이 확인된, 마이코플라스마 및 내독소 검사를 위해 세포 분취량을 제거하였다.
- [0083] P1 (CT2-MSc-005) (WCB)을 생성하기 위한 P0의 해동 및 확장
- [0084] P0 바이알을 37°C 수조에서 해동하고 4개의 HYPERFlask에 Prime XV MSC Expansion 배지에 각각 1.7×10^6 개 세포를 주입하였다. 세포는 5% CO₂와 함께 37°C에서 배양시켰다. 일단 80-90% 합류에 도달하면 P1 HYPERFlask를 5-7일 사이에 수확하였다.
- [0085] P1 수확 (CT2-MSc-005) (WCB)
- [0086] 수확 일에, HYPERFlask를 배양기에서 제거하고 오염 및/또는 비정상적인 형태 또는 비정상 성장의 시각적 증거에 대해 현미경으로 관찰하였다. 세포를 1X TrypLE을 사용하여 HYPERFlasks에서 제거하고 계수하고 Cryostor CS10의 바이알에 냉동 보존하였다. 세포는 제어 속도 냉동고를 사용하여 5 mL 저온유리병에 1×10^7 개 세포/mL의 농도로 약 4.5×10^7 개 세포의 분취량으로 냉동하였다. 세포는 액체 질소 냉동고에서 증기 상태로 저장시켰다. 사용된 배양 배지는 무균 검사를 위해 호기성 및 혐기성 배양병에 접종시켰다. 세포 특성이 확인된, 마이코플라스

마 및 내독소 검사를 위해 세포 분취량을 제거하였다.

- [0087] P2 (연구용 제품) (CT2-MS-005 FRM4)를 생성하기 위해 P1 (WCB)의 해동 및 확장
- [0088] P1 바이알을 해동하고 20개의 HYPERFlask에 Prime XV MSC Expansion 배지에 각각 1.7×10^6 개 세포를 주입하였다. 세포는 5% CO₂와 함께 37°C에서 배양시켰다. 일단 80-90% 합류에 도달하면 P2 HYPERFlask를 5-7일 사이에 수확하였다.
- [0089] 최종 수확 - P2 (연구 제품) (CT2-MS-005 FRM5) 수확
- [0090] 수확 일에, HYPERFlask를 배양기에서 제거하고 오염 및/또는 비정상적인 형태 또는 비정형 성장의 시각적 증거에 대해 현미경으로 관찰하였다. 플라스크를 PBS로 세척하고 10x TrypLE을 사용하여 HYPERFlask에서 세포를 제거하였다. 이어서 세포를 플라즈마라이트/5% HSA로 세척하고 계수하고 20 mL의 플라즈마라이트/5% HSA로 제형화하였다. SynGen CryoPRO (SynGen, Sacramento, CA)는 텍스트란-40 (Akron Biotech, Boca Raton, FL)에 55% DMSO를 첨가하고 CryoPRO 5 구획화된 백 세트로 옮기는 데 사용하였다. 약 2.5×10^8 개 내지 5×10^8 개 세포를 25 mL의 플라즈마라이트/5% HSA/10% DMSO에 백당 1×10^7 개 내지 2×10^7 개 세포/mL의 농도로 첨가하였다. 따라서 각 구획에는 5천만에서 1억개의 세포가 들어 있다. 생성물을 제어 속도 냉동고를 사용하여 냉동 보존하고 액체 질소 냉동고에 증기 상태로 저장시켰다. 잔류 배양 배지는 무균 검사를 위해 호기성 및 혐기성 배양병에 접종시켰다. 마이코플라스마, 내독소, 세포 특성확인 및 기능 분석에 대한 검사를 위해 세포 분취량을 제거하였다. 면역표현형 패널에는 MSC 표현형을 확인하기 위한 CD73와 CD90, 및 조혈 또는 내피 세포에 대한 오염이 거의 또는 전혀 없음을 입증하는 CD45, CD3 및 CD31을 포함시켰다. 사양은 <10% CD45+, CD3+, 또는 CD31+와 함께 >90% CD73+ 및 CD90+이다 (도 4 참조). 다음의 마커를 정보용으로만 포함하였다: CD105 및 CD166. 세포 현탁액의 분취량을 형광 표지 항체와 함께 배양하고 PBS/HSA 완충액으로 세척하였다. 데이터는 DiVa 소프트웨어가 장착된 BD FACSCanto에서 수집하고 이전에 임상용으로 검증된 FCS Express 소프트웨어를 사용하여 분석하였다. 각 마커와 반응하는 세포의 비율은 분석 인증서에 보고하였다.
- [0091] 기능 검사는 P2 세포의 샘플에 대해 수행하였다. hCT-MS-005는 뼈, 지방 및 연골 조직으로 분화될 것으로 예상하였다. 세포는 오스테오칼신(Osteocalcin)의 발현에 의한 골 분화에 대해 조사하고, 지방산 결합 단백질 4 (Fatty acid binding protein 4; FABP-4)를 사용한 지방에 대해 조사하고, 아그레칸을 사용한 연골에 대해 조사하였다. 세포는 또한 유사분열인자에 대한 T 세포 반응을 억제하는 세포의 능력을 조사하기 위해 유사분열인자 분석에서 검사하였다. 검사 사양을 충족하지 않는 모든 그룹은 폐기하였다.
- [0092] 공정 시간 및 중간 저장물
- [0093] hCT-MS-005는 마스터 세포 저장관리, 작업용 세포 저장관리 및 연구 제품을 생성하는 일련의 세 단계로 제대 조직으로부터 제조하였다. 각 단계에 대한 생성물을 동결시키고 액체 질소 냉동고에서 증기 상태로 저장시켰다. 냉동 제품에 대한 안정성 프로그램은 제품 개발의 일부이었다.
- [0094] 최종 제형
- [0095] 대상체 치료 당일에, 세포를 해동하고 플라즈마라이트 A/5% HSA에서 1:1로 희석하고 세포 수, 생존력 및 무균 검사를 위해 분취량을 제거하였다. Nexcelom Cellometer Auto 2000을 사용하여 세포 수와 생존력을 측정하였다. 세포가 $\geq 70\%$ 생존할 수 있는 경우, 최종 제품 부피를 조정하여 연구 대상체에게 2×10^6 개 세포/kg을 전달하였다. 세포를 투여용 주사기로 옮겨 침상으로 전달하였다. 플라즈마라이트는 항균제를 포함하지 않는 멸균 비발열성 등장 용액이다. 임의의 제거된 세포 현탁액은 무균 검사를 위해 호기성 및 혐기성 배양병에 접종시켰다.
- [0096] hCT-MS-005 제품은 실온에서 최대 4시간 동안 안정하다. 최종 부형제에서의 해동된 hCT-MS-005 제품의 안정성은 CT2 GMP 시설 보고서 (CT2-2016-019-P)의 MSC 파일럿 처리 로트 제조시 문서화하였다.
- [0097] 주사기는 환자에게 투여하기 위해 실온에서 치료 지점까지 운반하기 위해 선적 컨테이너에 포장하였다. 생산 제조 이력 및 분석 인증서에 대한 QA 검토 후 SOP에 따라 진료소로 운송하기 위해 제품을 출시하였다. 분석 인증서와 관리 연속성 양식 모두 hCT-MS-005 제품과 함께 제공하였다. hCT-MS-005 제품을 포함하는 주사기는 진료소에 도착하자마자 연구 대상체에게 투여하였다.
- [0098] 정제
- [0099] hCT-MS-005의 세포 조성물은 MSC 표현형을 확인하기 위한 CD73과 CD90, 및 조혈 또는 내피 세포에 오염이 거의 없

음을 입증하기 위한 CD45, CD3, 및 CD31에 대한 형광 표지 항체 패널을 사용하여 면역 표현형으로 결정하였다. CD105 및 CD166은 정보용으로만 사용하였다. 사양은 <10% CD45+, CD3+, 또는 CD31+와 함께 >90% CD73+ 및 CD90+이다 (도 4 참조). 데이터는 DiVa 소프트웨어가 장착된 BD FACSCanto에서 수집하였다. 데이터는 이전에 임상용으로 검증된 FCS Express 소프트웨어를 사용하여 분석하였다. 각 마커를 발현하는 세포의 비율은 분석 인공서에 보고하였다. 비임상 데이터를 기반으로 한 CD73, CD90, CD45, CD3, 및 CD31, 과일렛 처리 실행 결과 및 대상체 안전성과 관련된 의료팀의 입력에 대한 방출 사양이 확립되었다. 패널에 있는 다른 모든 마커의 백분율은 정보 제공 목적에 의해 보고하였다. 후보 효능 분석이 나옴에 따라, 면역표현형 데이터가 상호 연관되어 후속 IND 단계 이전에 사양이 설정될 수 있다.

[0100] MSC로서, 이들 제대 조직 유래 제품은 뼈, 지방 및 연골 세포로 분화하는 능력을 입증할 것으로 예상된다. 각 세포 제품의 분화 능력은 잘 정의된 배양 조건을 사용하여 시험관 내에서 모니터링하였다. 궁극적으로 세포는 형광 현미경을 사용하여 검사하였다. 분화된 골세포는 오스테오칼신의 발현으로 구별하였다. 분화된 지방 세포는 지방산 결합 단백질 4의 발현으로 구별하였다. 마지막으로 분화된 연골 세포는 아그레칸의 발현으로 구별하였다.

[0101] 면역조절 능력을 모니터링하기 위해, hCT-MSC를 유사분열인자에 대한 T 세포 반응을 억제하는 능력에 대해 분석하였다. 이 억제 배후의 잠재적인 메커니즘을 조사하기 위해, 인터페론- γ 에 대한 세포 반응을 측정하였다. 그들이 이 전염증성 신호에 노출되는 경우, hCT-MSC는 인돌아민 2,3-이산소화효소 1 (IDO1)의 발현을 증가시켰다. 동시에 hCT-MSC는 이들 세포 표면에서 PD-L1 및 PD-L2 단백질의 발현을 증가시켰다. 이러한 연구는 hCT-MSC에 의해 매개되는 면역조절과 여러 가지 다른 메커니즘이 연관될 수 있음을 시사한다 (데이터는 표시되지 않음).

[0102] 순도

[0103] 내독소 수준은 FDA 승인된 Limulus Amebocyte Lysate (LAL) 카트리지와 함께 Charles River사의 Endosafe-PTS를 사용하여 SOP별로 측정되었다. 이 방법으로 검사할 모든 세포/배지 조합에 대해 검증하였다. 플라즈마라이트/5% HSA에서의 최대 250 μ L의 최종 제품을 내독소가 없는 탈이온수로 희석하고 SOP에 따라 검사하였다. 방출을 위해, 내독소 수준은 5 EU/kg 체중/시간 또는 5 EU/mL 미만 또는 이와 같아야 한다. hCT-MSC 제품의 예상 투여 시간은 1시간 미만이다. 최대유효희석배수(maximum valid dilution) 및 유닛/kg/시간에서 유닛/mL로의 변환은 분석 검증 중에 결정하였다. 내독소에 대한 상한은 주입용 제품의 방출 전에 각 대상체의 체중을 사용하여 계산하였다.

[0104] 모세포 검사

[0105] 임상 시험에서 사용하기 위해 선택된 모든 hCT-MSC 제품은 P1 및 P2의 제조를 위한 최종 선택 전에 고해상 HLA 클래스 I (ABC) 및 클래스 II (DR)에 대해 유형화시켰다. 이 기술은 제3자 (모체) HLA 대립유전자의 검출에 대해 매우 민감하다. 모세포 오염이 없는 유닛만 P1 및 P2 (WCB 및 최종 제품) 제조를 위해 선택하였다.

[0106] P53 돌연변이 검사

[0107] P53 돌연변이 존재에 대한 검사는 듀크 대학 임상 분자 진단 실험실(Clinical Molecular Diagnostics Laboratory)에 의해 임상 시험에 사용하기 위해 선택된 모든 P2 배양물에서 수행될 것이다. 세포 조제 물질에서 추출된 게놈 DNA는 TP53 엑손 4부터 11까지의 PCR 증폭에 사용하였다. 이어서, 정제된 DNA 앰플리콘은 유니버설 M13 정방향 및 역방향 프라이머와 Big Dye Terminator 순환 염기서열 키트를 사용하여 서열확인하였다. 제품은 Big Dye X Terminator 정제 키트로 정제시키고 ABI 3130xI Genetic Analyzer를 사용하여 분석하였다. 데이터는 ABI Data Collection 소프트웨어, Sequencing Analysis 소프트웨어 및 SeqScape 소프트웨어를 사용하여 분석하였다.

[0108] 효능

[0109] 효능은 정보성 검사로 보고된 결과와 함께, 개발중인 시험관 내 발현 분석에 의해 결정될 수 있다. FDA 산업용 지침: 세포 및 유전자 치료 제품에 대한 효능 검사(2011년 1월)에서의 권고에 따르면: 효능 분석의 개발은 전임상 개발에서 시작되어 BLA를 제출하기 전에 검증된 효능 분석 또는 분석 매트릭스를 목표로 임상 단계 전반에 걸쳐 지속되고 있다. 방출에 필요한 속성 외에도 광범위한 제품 속성이 측정되며, 작용 메커니즘을 연구하고 제품의 관련 생물학적 활동이 특성확인되었다. 제조 관행이 발전함에 따라 후보 효능 분석이 재평가되고 적절하게 자격이 부여되었다.

[0110] 생존력

- [0111] 생존력은 SOP에 따라 Nexcelom Cellometer Auto 2000을 사용하여 결정하였다. 출시를 위해서는 hCT-MSC 제품의 최소 70% 생존력이 필요하다.
- [0112] 세포 수/용량
- [0113] 이 연구에서 3개의 투약 코호트가 있었다. 이 연구에는 12명의 대상체를 등록하였다. 3명의 환자의 제 1 코호트는 단일 용량을 받았다. 안전성 문제가 없는 경우, 3명의 환자로 구성된 제 2 코호트는 2개월 간격으로 2회 용량을 받았다. 제 3 코호트는 6명의 환자로 구성되었으며, 각 환자는 용량들 간에 2개월 간격으로 3회 hCT-MSC 주입을 받았다. 해동 후 계수에 기초하여 대상체에게 2×10^6 개 hCT-MSC/kg을 투여하였다. 주입 당일 총 세포 수는 Cellometer Auto 2000을 사용하여 자동화된 세포 수에 의해 결정하였다. 해동 후 세포 수를 사용하여 상기한 바와 같은 최종 제형에 대한 용량을 계산하였다. 방출 검사 및 최종 제형에 필요한 세포를 초과하는 모든 세포는 효능 분석 개발을 위한 정보성 검사에 사용될 수 있다.
- [0114] 안전성 평가 기준
- [0115] 각 주입 동안 환자를 관찰하고 주입 후 24시간 동안 주입 반응을 모니터링하였다. 추가 유해효과 (AE)은 환자의 부모/보호자와의 전화 인터뷰를 통해 각 주입 후 7-10일, 2개월 및 4개월, 그리고 hCT-MSC의 마지막 주입 후 6개월 및 12개월에 확인하고, 기준선 및 6개월 진료소 방문시 직접 확인하였다. 분석을 위해 약어 AE 용어는 CTCAE (Common Terminology Criteria for Adverse Events) 버전 4.0에 정의된 표준 용어와 연관시키고 조사자의 판단에 따라 개입의 심각성과 관계에 따라 요약하였다.
- [0116] 임상 평가
- [0117] 향후 II상 및 III상 임상 시험을 위한 종결점으로서 투여의 가용성과 유용성을 결정하기 위해 다차원 평가를 이용하였다. ADOS-2(Autism Diagnostic Observation Schedule, Second Edition) 및 ADI-R(Autism Diagnostic Interview-Revised)-단축 버전에 공지된 DSM-5 체크리스트를 기반으로 ASD 진단을 확인하기 위해 초기 평가를 수행하였다. 진단 평가는 ADOS-2 및 ADI-R 시행에서 신뢰할 수 있는 연구로 입증된 임상 연구 직원에 의해 완료시켰다. 각 환자에 대한 기준선을 확립하고 향후 II상 및 III상 임상 시험의 종결점으로서 유용성을 결정하기 위해 추가 평가를 수행하였다. 여기에는 바인랜드 적응 행동 척도-III (VABS-III), 전반적 임상 인상 척도 (CGI), 전반적 발달 장애 행동 목록 (PDDBI), 지능 척도 (조기 학습의 물린 척도, AGS 에디션 및 DAS-II(Differential Ability Scales, Second Edition)가 포함된다. 기타 일반적으로 사용되는 평가로는 한 단어 표현 그림 어휘 검사-4 (EOWPVT-4), 점수, PDDBI 점수, 및 CGI-I 점수가 있다).
- [0118] ADI-R(Autism Diagnostic Interview-Revised)-단축 버전 (Rutter M, et al. ADI-R. Torrence, CA: Western Psychological Services; 2008)은 언어/의사소통, 상호호혜적 사회 상호작용, 제한적이고 반복적이며 상동적 행동과 관심의 3 영역에서 조기 기능을 평가하는 포괄적인 부모 인터뷰이다. 신뢰할 수 있는 연구 면접관은 정보를 얻고 반응을 기록하기 위해 표준화된 절차를 따른다. 인터뷰 질문에는 환자의 배경, 행동, 초기 발달 및 이 정표, 언어 습득, 현재 의사소통 기능, 사회 발달 및 놀이, 관심 및 행동, 기타 임상적으로 관련된 행동을 포함한 다양한 콘텐츠 영역이 포함되었다. ADI-R 단축 버전은 표준 ADI-R과 동일한 프로토콜을 따르지만 점수 획득에 필요하지 않은 일부 문제는 생략시켰다. ADI-R 단축 버전은 아동의 나이와 행동의 복잡성에 따라 90-150분 정도 소요된다. ADI-R은 각 환자의 선별 과정 동안 완료되며 ASD의 DSM-5 진단을 알리는 데 사용되었다.
- [0119] ADOS-2 (Autism Diagnostic Observation Schedule, Second Edition) (Lord C, et al. Autism Diagnostic Observation System. Los Angeles, CA: Western Psychological Services; 1999)은 핵심 ASD 증상에 대한 표준화된 관찰 평가이다. 연령별 및 언어별 모듈은 숙련된, 연구-신뢰성 있는 임상가가 이끄는 일련의 활동으로 구성되어, 아동의 의사소통, 사회적 상호작용, 놀이, 제한적이고 반복적인 행동을 관찰하였다. ADOS-2 프로토콜은 ASD DSM-5 기준과 직접 연관되는 행동을 유도하도록 설계하였다. ADOS-2는 생후 12개월 정도의 유아에게 투여할 수 있다. 연령과 언어 능력은 적절한 모듈(유아, 1, 2, 3 또는 4)을 결정하는 데 사용되었다. 각 ADOS-2 유아 모듈 평가에 대해, 다른 모듈과의 비교를 용이하게 하는 Esler 등(2015)이 개발한 유아 모듈 보정 중증도 점수 (Toddler Module Calibrated Severity Score)를 사용하여 점수를 생성하였다. 모듈 1-4에 대해서도 중증도 점수를 생성하였다. ADOS-2는 집행하는 데 약 45-60분이 소요된다. 이 평가는 ASD의 DSM-5 진단을 알리는 데 사용되며 각 환자의 기준선 방문시 완료되었다.
- [0120] DSM-5(Diagnostic Statistical Manual-5 Checklist)는 정신 장애 진단 및 통계 매뉴얼-5 내에서 ASD에 대한 진단 기준을 기반으로 한 임상 체크리스트이다. 진단 기준은 DSM-5에서 가져 와서 연구에 포함할 적절한 ASD 진단을 확인하기 위해 활용하였다. 이 체크리스트는 임상가의 최선의 판단을 사용하여 숙달된 임상가가 작성하고

ADI-R, 단축 버전 및 ADOS-2를 집행하는 동안 수집된 정보에 의해 통지되었다. DSM-5는 각 환자의 기준선 방문 시 완료되었다.

- [0121] 조기 학습의 물린 척도, AGS 에디션(Mullen Scales of Early Learning, AGS Edition) (Mullen EM, Western Psychological Services; 1995)은 출생부터 68개월까지의 영유아 및 미취학 아동을 위해 특별히 설계된 인지 기능 평가이다. 대근육 운동, 시지각, 소근육 운동, 표현 언어, 및 수용 언어의 5가지 인지 기능의 척도를 측정한다 (참고: 이 연구에서는 대근육 운동 하위 검사를 집행하지 않을 것임). 각 척도는 개별적으로 검사되며 시험 시간이 정해져 있지 않다. 일부 질문에는 아동의 능력을 평가하기 위해 부모의 의견이 필요할 수 있다. 시험은 대화형이며 아동이 시험 중에 관련된 장난감 및 조작 도구를 포함한다. 시험 집행 시간은 1세의 경우 약 15분 내지는 5세의 경우 1시간으로 다양하다. 물린은 기준선 방문시 0개월에 4세 미만의 환자에게 사용되며 기준선 방문시에만 수행되었다.
- [0122] DAS-II(Differential Ability Scales, Second Edition) (Elliott CG. Differential Ability Scales, 2nd ed. San Antonio, Tx: Harcourt Assessment; 2007)은 행동을 관찰하고 인지 능력을 평가하기 위한 점수를 계산하기 위해 숙달된 임상가가 집행하는 평가이다. 이 검사는 2세, 6개월부터 17세, 11개월까지 적합하며 기준선에서 4세, 0개월 이상의 환자에게 사용되었다. 이 평가는 약 45분이 소요되며 기준선 방문시 수행되었다.
- [0123] 바인랜드 적응 행동 척도-III (VABS-III) (Sparrow S, et al. Vineland Adaptive Behavior Scales: Interview Edition. Circle Pines, MN: American Guidance Service; 1984)는 광범위한 영역에 걸쳐 아동의 적응 행동을 평가하는 데 사용되는 간병인 설문지이다. VABS-III는 전체적인 종합 점수를 산출하는 강력한 신뢰성 및 타당성을 갖춘 우수하게 표준화된 척도이고 (Balboni G, et al. J Autism Dev Disord 2016; 46:42-52; Perry A, et al. J Autism Dev Disord 2009; 39:1066-1078; Yang S, et al. J Autism Dev Disord 2016; 46:64-73; Sparrow S, et al. Vineland Survey Forms Manual. 2nd ed. Minneapolis, MN; NCS Pearson Inc; 2005), 사회화, 의사소통, 일상생활 기술 및 운동 기술 분야의 하위검사 표준 점수이다. VABS-III는 기준선 및 6개월 방문시 각 환자의 주간병인으로부터 수집하였다. 사회화 하위검사 점수는 사회적 행동의 핵심 ASD 증상의 개선을 측정하는 데 사용하였다.
- [0124] Noldus EthoVision을 이용한 PCI (Parent-Child Interaction): 부모-아동 상호작용 치료(Parent-Child Interaction Task) 동안, Noldus EthoVision을 사용할 것이다. 비디오 추적의 목적은 사회적 접근 또는 회피와 관련된 아동의 움직임이 자동으로 추적할 수 있는지 여부를 결정하고 ASD를 앓고 있는 아동의 사회적 의사소통의 유효한 척도를 제공하는 것이다. 이 패러다임은 친숙한 성인과 함께 ASD를 가진 아동의 사회적 접근 및 회피 행동과 관련된 움직임을 자동으로 추적하도록 설계하였다. 일차 종속변인은 어른 주변에 비해 방 주변에서 보내는 시간이다. (1) 간병인이 방 구석에 조용히 앉아있는 동안 이용 가능한 장난감이 있는 6분 자유 놀이 세션 및 (2) 6분간의 부모-아동 상호 작용으로 구성되고, 아동이 어른과 어떻게 놀이를 하는지, 그리고 그 반대인 경우도 관찰하기 위해 부모가 상호작용 놀이를 아동과 함께하는 곳인, 동일한 방에서 진행되는 두 개의 연속 세션 동안 참가자를 관찰할 것이다. 천장에 장착된 카메라로 행동을 기록하고 소프트웨어를 사용하여 아동의 움직임을 자동으로 추적할 것이다. 종속변인에는 간병인 관심 영역 (ROI)에서 보낸 세션의 비율, 간병인 ROI에 접근하기 위한 대기 시간, 주변 ROI에서 보낸 시간 비율이 포함되었다. 부모-아동 상호작용 치료는 기준선, 6개월 및 12개월 방문시 수행하였다.
- [0125] CGI (Clinical Global Impression)는 증상 중증도 및 치료 반응 또는 시점 간의 행동 변화를 측정하는, 일반적으로 사용되는 등급 척도이다. 두 가지 버전의 CGI를 사용하였다: CGI-S (CGI-Severity) 및 CGI-I (CGI-Improvement). CGI-S는 평가 당시 각 환자의 ASD 증상의 중증도를 나타내는 7점 척도이며, 동일한 진단을 받은 환자에 대한 전문가 평가자의 과거 경험과 비교하였다. 전문가 평가자의 평생 임상 경험과 사용 가능한 모든 정보를 기반으로 각 환자는 1: 증상 없음 (ASD 없음), 2: ASD 증상이 거의 없음, 3: 경미한 ASD 증상, 4: 중등 ASD 증상, 5: 중등고도 ASD 증상, 6: 중증 ASD 증상, 또는 7: 고도중증 심각한 ASD 증상으로 평가하였다. 각 환자에게는 기준선 및 6개월 방문시 CGI-S 등급을 지정하였다. CGI-I는 기준선에 비해 ASD 증상의 개선도 또는 악화도를 나타내는 7점 척도이다. 사용 가능한 모든 정보를 기반으로 각 환자에 대해서는 1: 매우 많이 개선됨, 2: 많이 개선됨, 3: 약간 개선됨, 4: 변화 없음, 5: 약간 악화, 6: 많이 악화, 또는 7: 매우 많이 악화로 평가하였다. 6개월 방문시 각 환자에게 CGI-I 등급이 지정되었으며, 각 환자는 기준선 CGI-S 등급에 비해 개선도 또는 악화도를 참조하였다. 모든 CGI-S 및 CGI-I 등급은 ASD에 대한 전문 지식을 갖춘 고도로 숙련된 임상가가 만든 것이다.
- [0126] CGI 인터뷰: CGI 간병인 인터뷰는 임상가에 의해 완료되고 주간병인과 함께 진행되었다. 인터뷰는 참가자의 사

회적 의사소통 능력과 도전, 제한된 관심사, 반복적인 행동, 및 전반적인 기능에 중점을 두었다. 임상 의 가정, 학교 및 지역 사회와 같은 다양한 상황에서 행동의 빈도와 질에 대한 세부 정보는 물론 각 환경에서 아동이 기능하는 데 필요한 지원 수준에 대한 세부 정보를 얻을 수 있다. 인터뷰를 기준선 방문시 완료하고 6개월 및 12개월 방문시 최신화하였다. 인터뷰는 기준선 방문시 완료하는 데 약 45분이 소요되고 6개월 및 12개월 방문시 완료하는 데 약 30분이 소요되었다. 이 정보는 CGI-I 및 CGI-S 등급을 만드는 데 사용하였다.

- [0127] 전반적 발달 장애 행동 목록 (PDDBI) (Cohen IL, et al. J Autism Dev Disord. 33(1):31-45 (2003))은 ASD를 앓는 아동의 개입에 대한 반응을 평가하도록 설계된 간병인 설문지이다. PDDBI는 1세, 6개월 내지 12세, 5개월 연령의 아동을 위해 설계된 정보 제공자 기반 등급 척도이다. 문제 행동뿐 아니라 적절한 사회성, 언어 및 학습/기억 능력을 평가한다. PDDBI는 일반적으로 능동적이지만 괴이한 ASD의 하위 유형과 관련된 사회적 장애 및 개선된 호혜적 사회 행동에 필수적인 친 사회적 기술 개발을 모두 평가한다. PDDBI는 다양한 인종, 민족 및 사회 경제적 배경의 ASD를 가진 아동의 간병인 및 교사의 표준화된 ASD 모 집단과의 비교를 기반으로 원점수와 t-점수를 만들었다(Cohen IL, Sudhalter V. PDD Behavioral Inventory Professional Manual. Lutz, FL: Psychological Assessment Resources Inc; 2005). PDDBI는 기준선 및 6개월 방문시 각 환자의 주간병인으로부터 수집하였다.
- [0128] 한 단어 표현 그림 어휘 검사-4 (EOWPVT-4) (Martin NA, Brownell R. EOWPVT-4. 4th ed. Novator, CA: Academic Therapy Publication Inc; 2011)는 말을 물건, 동작 또는 개념의 이미지와 일치시키는 개인의 능력을 측정하는, 임상 의가 관리하는 평가이다. 컬러 삽화와 함께 제시될 때 하나의 단어, 사물, 동작 및 개념으로 명명하는 개인 능력을 검사한다. 이 검사는 2-80세에 적합하며 완료하는 데 약 10-30분이 소요되고; 완료 시간은 개인의 언어 능력에 따라 결정하였다. 이 평가는 기준선, 6개월 및 12개월 방문시 수행하였다.
- [0129] 환자가 행동, 말-언어, 작업요법과 기타 행동 치료 및 아동이 받은 교육 서비스에 참여한 시간에 대한 정보는 이 연구에 포함하지 않지만, 부모와의 구조화된 개입 이력 인터뷰(Intervention History Interview)를 통해 포함할 수 있다.
- [0130] 부모 간병인 설문지
- [0131] 모든 간병인 설문지는 듀크 승인된 EDC 시스템을 통한 온라인으로 또는 서면으로 작성시켰다. EDC 설문 조사는 틀은 듀크 사용자가 대학-웹사이트 라이선스를 통해 사용할 수 있다. EDC는 듀크의 NetID 인증 시스템과 통합되지만 듀크가 아닌 사용자와 설문 조사를 공유하게 한다.
- [0132] 전반적 발달 장애 행동 목록 (PDDBI). PDDBI는 ASD를 앓고 있는 아동의 개입에 대한 반응을 평가하기 위해 개발되었다. PDDBI는 1세, 6개월 내지 12세, 5개월의 아동을 위해 설계된 정보 제공자 기반 등급 척도이다. 문제 행동뿐 아니라 적절한 사회성, 언어 및 학습/기억 능력을 평가한다. PDDBI는 일반적으로 능동적이지만 괴이한 ASD의 하위 유형과 관련된 사회적 장애 및 개선된 호혜적 사회 행동에 필수적인 친 사회적 기술 개발을 평가한다. PDDBI는 표준화된 ASD 모 집단과의 비교를 기반으로 원점수와 t-점수를 만들었다. PDDBI는 1세에서 17세 사이의 아동 311명의 PDDBI 개발 샘플에서 검증되었다. 188개 항목이 포함된 부모 설문지이며 완료하는 데 약 30-45분이 소요되었다. 기준선, 6개월 및 12개월에는 방문으로, 그리고 3개월과 9개월에는 원격으로 PDDBI를 관리하였다.
- [0133] ABC-C (Aberrant Behavior Checklist-Community). 부모가 완료한 이러한 등급 척도는 사회적 위축에 중점을 두고 ASD와 관련된 비정상적 행동을 측정하는 데 사용하였다. ABC-C는 발달 장애가 있는 개인을 대상으로 한 연구에서 약물 및 기타 치료 효과를 평가할 수 있는 검증된 척도이다. 시선표호 참가자(1단계에서 n = 418 [평균 연령 29.5세] 및 2단계에서 n = 509 [평균 연령 25.9세])의 샘플에서 데이터에 대한 별도의 요인 분석으로 58개 항목을 포함한 5개 요인 척도를 생성하였다. 요인은 (1) 과민성, 초조함, 울음; (2) 사회적 위축; (3) 고정관념적 행동; (4) 과잉행동, 불복종; (5) 부적절한 발언으로 분류하였다. ABC-SQW는 자폐증의 핵심 사회적 및 의사소통 증상에 초점을 맞춘 다른 임상 시험에서 사용되었다. ABC-C에는 58개 항목이 있으며 각 항목은 0 = 전혀 문제가 없음, 1 = 행동이 문제이지만 정도가 경미함, 2 = 문제가 중등고도임, 또는 3 = 문제가 중증의 정도임으로 평가하였다. 부모가 완료한 이 등급 척도는 완료하는 데 약 10 내지 15분이 소요된다. 기준선, 6개월 및 12개월에는 방문으로, 그리고 3개월과 9개월에는 원격으로 ABC-C를 완료하였다.
- [0134] 개입 이력 설문지. 이 설문지는 아동/가족이 지난 3개월 동안 또는 설문지를 마지막으로 시행한 이후에 참여한 행동 건강 개입에 대한 자세한 정보를 얻기 위해 주간병인이 작성한다. 아동이 받은 개입, 서비스 및 치료의 유형과 양에 대한 정보를 수집하였다. 이 설문지는 매월 관리하였다.

- [0135] BRIEF-P (Behavior Rating Inventory of Executive Function-Preschool Version). 이 평가는 전문가가 가정 및 유치원 환경에서 집행 기능 행동을 평가할 수 있는 미취학 연령 아동의 부모를 위한 설문지이다. 그것은 응급 학습 장애 및 주의력 장애, 언어 장애, 외상성 뇌 손상, 납 노출, 전반적 발달 장애 및 기타 발달 신경학, 정신 의학적 및 의학적 상태를 가진 자를 포함하는 넓은 범위의 취학 전 아동을 위해 설계되었다. BRIEF-P에는 63개의 항목이 포함되고 완료하는 데 약 15분이 소요된다. BRIEF-P는 기준선에서 5세 미만의 참가자에게 사용하였다. 이 설문지는 기준선, 6개월 및 12개월 방문시에 작성되었다.
- [0136] BRIEF (Behavior Rating Inventory of Executive Function). 이 평가는 전문가가 가정 및 학교 환경에서 집행 기능 행동을 평가할 수 있도록 하는 취학 연령 아동의 부모를 위한 설문지이다. BRIEF의 원형에는 BRIEF의 상위 형식에는 집행 기능의 다양한 측면을 측정하는 이론적으로 그리고 경험적으로 파생된 임상 척도 8개 내에서 86개 항목이 포함된다: 억제, 주의전환, 감정 조절, 주도, 작업 기억, 계획/조직, 재료 조직 및 모니터링. BRIEF는 완료하는 데 약 15분이 소요되며 기준선에서 5세 이상의 참가자에게 사용하였다. 이 설문지는 기준선, 6개월 및 12개월 방문시 작성되었다.
- [0137] SEQ 2.1 (Sensory Experiences Questionnaire, Version 2.1). SEQ 2.1은 부모에게 일상 활동과 일상의 맥락에서 감각 자극에 대한 아동의 반응 빈도에 대한 45개의 질문에 5점 Likert 척도로 응답하도록 요청한다. 이 연구는 부모에게 Likert 척도 질문을 완료하도록 요청하고 모든 개방형 질문을 생략한 수정된 버전을 사용한다. SEQ 2.1은 2-12세의 자폐아동에 대해 검증되며, ASD 아동을 발달 지연 및 일반적인 통제 발달과 구별하는 것으로 나타났다으며, 내부 일관성이 높았다($\alpha = 0.80$). 요약 점수는 과민 반응 (SOR)에 대해 도출되었다. SEQ 2.1은 완료하는 데 약 10분이 소요되며 기준선 방문시에만 완료되었다.
- [0138] ELEAT (Early Life Exposures Assessment Tool). 이것은 부모/아동이 아동의 초기 생애와 발달 과정에서 노출되었을 수 있는 다양한 환경적 노출에 대해 평가하는 부모 설문지이다. 설문지는 임신 전, 임신 중, 그리고 생후 첫해에 대한 다양한 질문을 던지며 해로울 수 있는 화학 물질 또는 식품에 대한 노출 가능성을 매우 상세하고 정량적인 정보를 제공한다. 관련 변수만 포함하는 ELEAT의 수정 및 축약 버전을 연구에 사용하였다. 이 평가는 완료하는 데 약 10분이 소요되며 기준선 방문시에만 완료하였다.
- [0139] PedsQL 위장관 징후 척도 (Pediatric Quality of Life Inventory Gastrointestinal Symptoms Scales). PedsQL 위장관 징후 척도는 ASD를 앓고 있는 아동의 50% 이상이 위장 불편을 겪고 있기 때문에 아동의 위장 증상을 측정하는 10분 부모 설문지이다. 이 평가는 기준선, 6개월 및 12개월 방문시에 완료하였다.
- [0140] CABD (Center for Autism and Brain Development) 인구 통계 양식. CABD 인구 통계 양식은 NIH 보고 기준에 따라 인종과 민족을 수집한다. 추가 질문은 인구 특성확인에 도움이 되는 데이터를 수집한다. 이 부모 설문지는 작성하는 데 5분도 걸리지 않으며 기준선 방문시에만 작성하도록 하였다.
- [0141] 신경생리학 및 신경영상촬영
- [0142] 뇌파검사 (EEG): EEG는 뇌 활동의 비침습적 측정이다. 유연하고 고밀도의 전극 배열(EGI System 400, Electrical Geodesics Inc., Eugene, Oregon)을 머리 위에 배치하고 턱끈으로 고정한다. EEG 신호는 증폭되어 온라인보기를 위해 기록 컴퓨터로 전송시켰다. EEG는 여기에서 사회적 및 비사회적 자극에 의해 유도되는 뇌 활동의 패턴을 조사하는 데 사용하였다. EEG는 약 20분이 소요되며 기준선, 6개월 및 12개월 방문시에 완료하였다.
- [0143] EEG는 기준선 상태 동안 그리고 사회적 및 비사회적 자극을 보는 동안에 피질 활성화의 변화 (알파, 세타 및 베타 리듬의 변화에 의해 반영된다) 및 기능적 연결성 (EEG 일관성의 변화에 의해 반영된다)을 평가하는 데 사용하였다. 알파 진동은 시상-피질 네트워크의 활성화에서 나타나는 것으로 나타났으며 해마 영역을 포함한 피질하 영역에도 존재하는 것으로 입증되었다. 알파 주파수는 흥분성 뉴런과 억제 뉴런 사이의 상호작용으로 인해 발생하며 콜린성, 세로토닌성 및 글루타메타제성 메커니즘의 영향을 받는다. 알파 활동은 이완된 상태에서 증가하고 활성화 자극 처리 동안 감소한다. 세타 진동은 특히 해마 영역에서 두드러지며, 글루타메타제성 및 감마-아미노부티르산 산성 (GABAergic) 뉴런 간의 상호작용에 의해 영향을받으며 시냅스 가소성과 관련될 수 있다.
- [0144] EEG는 휴식 기준선 상태 동안 그리고 사회적 (동요를 부르는 여성) 및 비사회적 (활성화된 장난감) 자극에 대한 표준화된 영상녹화 부분을 보는 동안 기록되었다. ASD를 앓는 취학 전 연령의 아동을 대상으로 한 연구에서, 사회적 및 비사회적 자극을 보는 동안 알파 및 세타 EEG 파워는 행동 치료의 기능으로서 변화하는 것으로 나타났으며 특히 사회적 행동 개선과 관련이 있다. 듀크에서 실시하고 자폐증 치료를 위한 자가 제대혈의 안전성과 효능을 평가한 I상 공개 표지 시험은 치료 후 알파 파워 증가에 반영된 EEG 스펙트럼의 정상화를 입증하였다. EEG

데이터는 500Hz에서 128-채널 고밀도 전극 어레이 최단선 측정 센서 장치 (버텍스를 참조하여 온라인으로 기록된다), 0.1Hz에서 필터링된 고역 통과 및 200Hz에서 필터링된 저역 통과로 기록하였다. EEG는 자동 아티팩트 감지 소프트웨어 (Net Station 4.4)와 그룹 구성원에 대한 지식없이 수동 편집을 통해 편집되었다.

[0145] 스펙트럼 분석. EEG 데이터는 Welch의 방법을 사용하여 푸리에 변환하였다 (Matlab, R2012b로 시행한다). 전력 추정값은 전극 그룹(우측 후방 및 전방, 좌측 후방 및 전방, 정중선 후두 전극)에 걸쳐 평균화되고 왜곡을 줄이기 위해 자연 로그 변환하였다. 자폐증 증상을 개선하기 위한 자가 제대혈의 효능을 평가한 이전의 공개 표지 시험에서, 주입 후 EEG 스펙트럼 특성의 유의한 변화를 발견하고, 이는 알파 및 베타 파워가 증가하고 EEG 세타 파워가 감소하는 특징이 있다. 또한, 더 높은 기준선 후방 EEG 베타 파워는 결과의 변화를 예측할 수 있는 EEG 바이오마커에 대한 잠재력을 강조하여 사회적 의사소통 증상에서 더 큰 수준의 개선도와 관련이 있다.

[0146] 시선 추적 (EGT). EGT는 통제된 환경에서 특수 장비를 사용하여 자폐증을 앓는 아동의 눈 움직임을 통해 시각적 주의를 추적하는 15분 기술 평가이다. ASD를 앓는 아동은 일반적으로 발달하는 아동들보다 사회적 자극에 주의를 덜 기울이는 것으로 밝혀졌다. 듀크에서 자폐증 치료를 위한 자가 제대혈의 효능을 평가한, VABS에 보고된 I 상 공개 표지 시험은 사회적 능력의 증가와 상관 관계가 있는 사회적 자극에 대한 관심의 증가를 보여주었다. 이 평가는 1세부터 성인까지의 아동에게 적합하다. 아동에게는 사회적 및 비사회적 자극과 관련된 장면의 비디오 테이프를 보여준다. 중속변인에는 아동의 관심을 끌고 유지하는 사회적 자극의 특정 측면을 포함하여 아동이 비디오테이프의 사회적 자극과 비사회적 자극을 보는 데 시간이 얼마나 소요되는지 포함된다. EGT는 기준선, 6개월 및 12개월 방문시에 수행하였다.

[0147] CVA (Computer Vision Analysis). CVA 평가는 주의력 반응, 얼굴 영향 및 운동 반응을 포함하여 자폐증 증상을 유발하도록 설계된 일련의 간단한 동적 자극으로 구성된다. 이러한 행동을 자동으로 코딩하는 데 CVA를 사용하였다. 연구에 따르면 CVA는 객관적이고 신뢰할 수 있으며 민감하게 자폐증 증상을 정량화할 수 있다. CVA는 기준선, 6개월 및 12개월 방문시에 수행하였다.

[0148] 신경영상촬영. 세포 치료 전후의 뇌에서 잠재적인 구조적/해부학적 변형 및 기능적 변화를 평가하는 데 MRI를 사용하였다. 뇌 철분과 ASD 증상을 연관시키는 데 MRI 영상을 사용하였다. MRI 영상에서의 변화는 정상세포 활동, 혈액 관류, 섬유삭 통합성, 뇌 네트워크 통합성, 수초 미세구조 통합성, 및 뇌 기능 연결의 변질을 반영할 수 있다. 자폐증 증상을 치료하기 위한 자가 제대혈의 효능을 평가한 공개 표지 시험에서, 3가지 행동 결과 측정에 대한 개선은 좌측 측두엽과 좌측 해마 사이의 연결성 증가와 상관 관계가 있다 (VABS II $p < 0.001$; EOWPVT-4 $p < 0.05$; CGI-I $p < 0.0001$). VABS II와 EOWPVT-4의 개선은 좌측 뇌반구의 방추형과 피곡 사이의 연결성 증가 (VABS II $p < 0.05$; EOWPVT-4 $p = 0.01$) 뿐만 아니라 하측두회와 해마 사이의 연결성 증가 (모두 $p < 0.05$)와 관련이 있다. 마지막으로, VABS II와 CGI-I 모두에 대한 개선 간의 유의한 상관관계가 있고 좌측 뇌반구에서 하측두회와 상측두회 사이 (VABS II $p < 0.05$, CGI-I $p < 0.01$) 및 측두극과 담창구 사이 (VABS II $p < 0.01$; CGI-I $p < 0.05$)의 연결성이 증가하였다. VABS II 및 CGI-I에 대한 개선은 또한 우측 뇌반구의 뇌섬엽 및 피곡 및 전두엽과 담창구 사이의 연결성 증가와 유의한 상관관계가 있었다 (모두 $p < 0.05$).

[0149] 연구는 GE의 FDA 승인된 프리미어 시스템의 개선된 버전이지만 고해상도 촬영을 위한 더 나은 기능을 가진 GE Premier Performance 3T MRI 스캐너를 사용하여 연구를 수행하였다. 이 개선된 시스템의 모든 운영 매개변수는 동일한 최소 위험 장치 기준을 충족하고 인체 대상체의 안전을 보장하기 위한 FDA 지침 내에 있는 것이다. 따라서 IDE (Investigational Device Exemption)를 필요로 하지 않는다. 이 프로토콜에 따라 수행된 연구는 이 장치의 안전성과 효능을 평가하기 위한 것이 아니다.

[0150] 하기 촬영을 이용할 수 있다:

[0151] · 고해상도 T1 촬영, 3D IR-제조된 FSPGR, 1×1×1mm 해상도, 예상 촬영 시간 3분.

[0152] · 고해상도 관류 촬영, 동맥 스핀 표지가 있는 3D 나선형, 표적 해상도 1.5×1.5×1.5mm (SNR이 충분한 경우 1×1×1를 평가한다), 예상 촬영 시간 3분.

[0153] · 고해상도 확산텐서촬영, 2D 멀티샷 DW EPI 기본 시퀀스, 25개의 확산 인코딩 방향, b 팩터 800s/mm², 목표 해상도 1.5×1.5×1.5mm (SNR이 충분한 경우 1×1×1를 평가한다), 예상 촬영 시간 10분.

[0154] · 고해상도 fMRI, 2D 단일샷 또는 투샷 EPI 기본 시퀀스, 표적 해상도 1.5×1.5×1.5mm (SNR이 충분한 경우 1×1×1를 평가한다), 예상 촬영 시간 10분. (1회 5분, 2회).

[0155] · 고해상도 정량적 민감도 촬영, 멀티-에코 3D FSPGR 기반 획득, 표적 해상도 1×1×1mm, 예상 촬영 시간 5분.

- [0156] 분석 모집단
- [0157] 전체 분석 모집단. 임상에 등록된 모든 참가자.
- [0158] 안정성 모집단. 연구 제품을 적어도 한 번 투여받은 모든 참가자. 이 모집단에서 안전성 종결점 분석을 수행하였다.
- [0159] mITT (Modified Intention to Treat) 모집단. 기준선과 6개월에 일차 결과가 관찰된 모든 참가자. 이 모집단에서 일차 및 이차 종결점을 분석한다. 참가자를 배당된 치료에 따라 분석하였다. 누락된 데이터가 없는 경우 이 모집단은 전체 분석 모집단과 동일하다. 그러나, mITT와 전체 분석 모집단 간에 상당한 차이가 있는 경우 역확률 가중치 또는 누락된 데이터 시나리오에 적합한 다른 접근 방식을 고려하였다.
- [0160] 안전성 및 유해효과 보고
- [0161] 유해효과 (AE): 유해효과는 임상시험용 제품과 관련된 것으로 간주되는지 여부에 관계없이 임상시험용 제품의 사용과 연관된 모든 의학적 발생이다.
- [0162] 심각한 유해효과 (SAE): 조사자 또는 후원자의 관점에서 다음과 같은 결과가 발생하는 경우 유해효과 또는 의심되는 부작용을 "심각한" 것으로 간주하였다: 사망, 생명을 위협하는 유해효과, 입원환자 입원기간 또는 기존 입원기간의 연장, 정상적인 생활 기능을 수행하는 능력의 지속적 결격이나 유의한 결격 또는 상당한 장애, 또는 선천적 기형/선천적 결함. 사망을 초래하지 않거나 생명을 위협하지 않거나 입원이 필요하지 않을 수 있는 중요한 의학적 사건은 적절한 의학적 판단에 따라 환자 또는 대상체를 위태롭게 할 수 있고 이 정의에 나열된 결과 중 하나를 예방하기 위해 의학적 또는 외과적 개입이 필요할 수 있는 경우에 심각한 것으로 간주될 수 있다.
- [0163] 등급/심각도: 등급/심각도는 CTCAE v5.0 지침에 따라 평가하였다.
- [0164] 의심되는 부작용: 의심되는 부작용은 임상시험용 제품이 유해효과를 유발할 합리적인 가능성이 있는 임의의 유해효과이다. "합리적인 가능성"은 임상시험용 제품과 유해효과 사이에 인과 관계를 제시할 수 있는 증거가 있음을 의미한다.
- [0165] 인과성: 조사자는 임상시험용 제품에 대한 유해효과의 인과 관계를 평가하는 경우에 다음의 질문을 사용한다. "임상시험용 제품이 사건을 유발했을 합리적인 가능성이 있는가?" 긍정적인 대답은 해당 사건을 의심되는 부작용으로 지정하는 것이다.
- [0166] 유해효과 보고
- [0167] hCT-MSC 주입 시점에 시작되는 연구 동안 보고되거나 관찰된 모든 유해효과를 기록해야 한다. 등록된 참가자의 5%에서 발생하는 AE는 Clinicaltrials.gov에 보고될 것이다. 보고될 정보에는 현장에서 사건을 인지한 시기, 연구 치료와의 관계 및 심각도에 대한 조사자 지정 평가, 대체 병인론이 있는지 여부, 심각성뿐만 아니라, 임의의 필요한 치료 또는 평가 및 결과가 포함되었다. 일반적으로 조사자는 개별 구성 증상, 징후, 실험실검사치의 이상 및 후유증을 보고하는 대신 가능할 때마다 부작용을 질병 또는 증후군으로 유해효과를 보고해야 한다.
- [0168] 중증 역 주입 반응 (치명적, 생명을 위협하거나 입원을 필요로 한다)은 정보 수신 후 달력상 7일 이내에 보고하였다. 모든 치명적이거나 생명을 위협하는 SAE는 FDA 지침에 따라 정보 수신 후 7일 이내에 전화 또는 팩스로 조사자 또는 그 대리인이 FDA에 보고하였다. 모든 심각하고 예상치 못한 AE는 정보 수신 후 15일 이내에 서면 보고서를 통해 FDA에 보고하였다 (21 CFR 312.32). 연구 책임자가 연구와 관련 없는 사건을 평가하는 경우, 해당 사건은 신속보고가 필요하지 않지만 연간 요약 보고서에 포함시켰다.
- [0169] hCT-MSC 주입 24시간 이내의 하기 사건도 e-CRF에 기록하였다: 알리지 반응/과민증, 동서맥, 동빈맥, 고혈압, 저혈압, 발열, 오한(rigors/chills), 메스꺼움, 구토, 감염, 호흡곤란, 저산소증 및 혈색소뇨증.
- [0170] 심각한 유해효과 보고
- [0171] 연구 책임자 또는 그 대리인은 예상치 못한 SAE를 FDA에 전화 또는 팩스로 보고할 책임이 있다. 연구 책임자 또는 그 대리인은 가능한 한 빨리 하지만 정보 수신 후 달력상 7일 이내에 연구 요법의 사용과 연관된 치명적이거나 생명을 위협하는 경험을 FDA에 전화 또는 팩스(신속 보고서)로 통보한다. 최초 통지 후 달력상 15일 이내에 서면 보고서를 제공하였다. 연구 요법의 사용과 연관된 SAE의 경우, 연구 책임자는 가능한 한 빨리 하지만 15일 이내에 FDA에 정보 최초 수신을 알린다. 연구 책임자 또는 부 연구자는 연구와 관련된 모든 예상치 못한 임의의 SAE를 기관 검토위원회(IRB) 및 DSMB에 알릴 책임이 있다.

- [0172] 중단 지침
- [0173] 연구 기간 동안 다음 중단 지침이 모니터링될 것이다. 중단 지침은 연구팀에 의해 모니터링되며 조사자와 DSMB의 논의가 필요한 경계를 나타내는 데 사용되는 것이다. 다음과 같은 경우, 안전성 검토를 위해 연구를 중단하였다.
 - [0174] · 임의의 대상체가 주입 후 48시간 이내에 4-5 등급 주입 반응을 경험하였다; 또는
 - [0175] · 의료 안전성 모니터링 및/또는 DSMB에 의해 연구 제품과 일시적으로 관련이 있다고 결정된 2가지 이상의 4-5 등급 유해효과가 발생하였다; 또는
 - [0176] · 임의의 대상체가 주입 후 6개월 이내에 혈류 감염을 경험하였다; 또는
 - [0177] · 임의의 대상체가 II-IV 등급 GvHD로 발전하였다; 또는
 - [0178] · 임의의 사망.
- [0179] 실시예 1: hCT-MSD 주입은 자폐 스펙트럼 장애가 있는 어린 아동에게 안전하고 실행 가능하다.
- [0180] 연구 설계 및 개요
- [0181] 2개월마다 투여되는 인간 제대 조직-유래 중간엽 간질 세포(hCT-MSD)의 1, 2 또는 3번의 정맥 내 주입에 대한 I 상, 단일 기관, 공개-표지 시험이 ASD를 앓는 12명의 아동에 대해 수행되었다. 모든 아동은 처음에 선별 프로토콜에 등록하여 의료 기록을 수득하였다. 모든 환자의 간병인은 전화로 사전-연구 선별 인터뷰를 완료하고 연구팀이 검토할 수 있도록 의료 기록과 비디오를 제공하여 임상시험에 대한 적격성을 결정하였다. ASD 진단이 확인된 2세(2) 내지 11세(11) 사이의 아동이 참여할 수 있다. 임상시험의 선별 및 치료 단계 모두에 대해 서면 동의를 얻었다. 이 임상시험은 IND #17313에 따라 수행된 듀크 병원 기관 리뷰 이사회(Duke Hospital Institutional Review Board)의 승인을 받았다.
- [0182] 환자 (n = 12) 및 이들의 간병인은 연구 참여의 일환으로, 투여된 hCT-MSD 주입 횟수에 따라 2 내지 4회 듀크 대학을 방문하였다. 이들의 기준선 방문시, 각 환자를 평가하고 hCT-MSD의 단일 정맥 주입을 제공하였다. 3명의 환자의 제 1 코호트는 단일 용량을 받았다. 3명의 환자로 구성된 제 2 코호트는 두 달 간격으로 두 번의 투여를 받았다. 6명의 환자로 구성된 제 3 코호트는 각각 투여 2개월 간격으로 3회 접종을 받았다. 기준선 방문 및 초기 hCT-MSD 주입 후 6개월(6) 후에 환자는 후속 임상 평가를 위해 복귀하였다 (연구 스키마는 도 1 참조). 추가 간병인 인터뷰 및 설문 조사는 각 환자에 대해 각 주입 후 7-10일, 2개월 및 4개월, 마지막 hCT-MSD 주입 후 6개월 및 12개월에 수집하였다.
- [0183] 환자
- [0184] 정신 장애 진단 및 통계 매뉴얼, 제5판 (DSM-5) (DSM-5. American Psychiatric Association 2013; Washington, D.C.)에 기반한 ASD의 임상 진단 기준을 충족한 2세에서 11세 사이의 환자는 연구에 포함시키기에 적합하였다. 평균 연령이 6.4세(4-9세 범위)인 12명의 아동, 3명의 소녀, 9명의 소년을 등록시켰다. 11명의 대상체는 백인이고 1명은 아시아인이었다: 2명은 히스패닉 또는 라틴계이었다. 총 27개의 hCT-MSD 용량이 3개의 다른 로트에서 투여되었다. 각 투여에서 표적 용량은 2.0×10^6 TNC/kg (TNC = 총 유핵 세포 수)이었다. 주입된 실제 용량의 평균은 2.0×10^6 TNC/kg이고 표준편차는 0.4×10^6 TNC/kg이었다. 1명의 환자는 1.79×10^6 TNC/kg의 저용량을 받았다 (인퓨전 3의 환자 12). ASD의 DSM-5 진단은 전문 임상의로 인해 확립되며 ADOS-2 (Autism Diagnostic Observation Schedule, Second Edition) (Lord C, et al. ADOS-2. Torrence, CA: Western Psychological Services 2012) 및 ADI-R (Autism Diagnostic interview, Revised) (Rutter M, et al. ADI-R. Torrence, CA: Western Psychological Services 2008)에 의해 알 수 있었다. 추가 포함 기준에는 (1) 환자가 주입 전 최소 2개월 동안 현재 약물에 안정적이고, (2) 취약 X 검사 수행 및 음성, (3) 정상 절대 림프구 수치 ($\geq 1500/\mu\text{L}$), (4) 듀크 대학을 최대 4회 (기준선, 후속 주입의 경우 2개월마다, 초기 주입 후 6개월)까지 다닐 수 있는 능력, (5) 환자와 부모가 영어를 구사하고, (6) 부모의 동의를 포함하였다. 배제 기준에는 (1) 이전 세포 요법의 이력, 정맥 내 면역 글로블린 (IVIG)이나 기타 항 염증 약물 (NSAID 제외)의 사용 또는 현재 또는 이전의 면역 억제 요법, (2) 공지된 유전적 (예컨대, 취약 X) 증후군 또는 기타 유의한 의학적 동반질환, (4) CNS 감염 또는 HIV 양성과 같은 공지된 활성 또는 무통제성 감염, (5) 대사 장애, 미토콘드리아 기능 장애, 무통제성 발작 장애, 화학 요법으로 치료된 활성 악성종양 또는 이전 악성종양, 원발성 면역 결핍 장애, 자가면역 혈구감소증, 유전적 증후군을 암시하는 명백한 신체 이형, 신장 또는 간 기능 장애, 유의한 감각 또는 운동 장애와 같은 공

지된 의학적 장애를 포함하지만 이에 한정되는 것은 아니며, (6) 우울증, 양극성 장애, 조현병, 강박 장애, 투렛 증후군을 포함하는 공지된 공존하는 정신 질환의 진단을 포함하였다.

[0185] 연구 근거

[0186] 이 임상 연구에 대한 기계론적 근거는 hCT-MSC가 주변분비 및 이중분비 메커니즘을 통해 작용하여 뇌에서 진행 중인 염증 및/또는 면역 병리를 조절하고 가능하면 추가 손상으로부터 뉴런을 보호할 수 있다는 가설이었다. 많은 맥락에서 MSC는 면역학적 및 염증 반응을 증가시키는 것이 아니라 약화시켰다. 문서화된 메커니즘에는 조절 T 세포 집단의 생성과 같이 작용 T 세포의 이동 및 항 염증성 사이토카인으로 이어지는 단핵구/수지상 세포 사이토카인 생성의 변화가 포함되었다. 다중 투여 요법은 전반적인 반응 속도와 기간을 개선할 수 있다.

[0187] MSC는 면역조절 효과를 발휘하는 것으로 나타났다 (Vellasamy *et al.*, *Cytotherapy* 2016; 18(10):1270-1283; Gesundheit, *et al.*, *Med Hypotheses* 2015; 84(3):169-177; Koh *et al.*, *J Neurosci* 2015; 35(47):15649-15665; (Jaimes *et al.*, *Stem Cells* 2016; doi:10.1002/stem.2541; 및 Ooi *et al.*, *Neuroimmunomodulation* 2015; 22(4):233-242 참조). 이러한 현상이 MSC의 직접적인 효과에 의해 발생하는지 또는 다른 메커니즘을 통해 매개되는지는 확실하지 않다. 듀크 대학의 연구에 따르면 hCT-MSC가 RayBiotech(Norcross, GA)의 사이토카인 어레이를 사용하여 여러 사이토카인 및 케모카인을 생산하고 분비하는 것으로 나타났다. Bioplex 분석 및 ELISA를 사용하여 선택된 사이토카인/케모카인의 측정된 수준이 표 4에 나타내었다.

표 4

hCT-MSC 에 의한 사이토카인 및 케모카인 생성.

사이토카인/케모카인	P2 상정액 범위, pg/mL
BioPlex	
IL-6	178 - 1134
CCL2/MCP-1	270 - 453
CXCL1/GRO α	250 - 1280
CXCL5	880 - 3025
CXCL8/IL-8	250 - 837
ELISA	
트롬보스폰딘-1(Thrombospondin-1)	150 - 415
Bioplex 는 사이토카인 어레이의 많은 발견을 검증하였다. ELISA 분석은 트롬보스폰딘-1 및 -2 의 생산을 정량화하는 데 사용하였다.	

[0188]

[0189] 절차: hCT-MSC 주입

[0190] 상기 논의된 바와 같이, 최종 제품은 5% 인간 혈청 알부민 (HSA) (Grifols, Barcelona, Spain)과 함께 플라즈마라이트 (Baxter Healthcare, Deerfield, IL)로 수확되고, 세척되고, 텍스트란 (Akron Scientific, Boca Raton, FL)과 함께 최종 농도 10% DMSO 내에 5천만-1억개의 세포를 포함하는 5mL의 5개의 구획화된 냉동백 (Syngen) 내에서 냉동보존된 P2 배양물로부터 유래된 것이었다. 투여 당일, 한 구획을 해동하고 10-40mL의 플라즈마라이트 IV 용액으로 희석하고 주사기 또는 백에 넣고 30-60분에 걸쳐 투여하기 위해 침대 옆으로 이동시켰다.

[0191] 이 임상 시험을 위해 3개의 로트 hCT-MSC를 선택하였다. 각 로트는 표 5에 따라 각 용량 수준에서 1-2명의 환자를 대상으로 검사하였다. 총 12명의 환자를 3가지 용량 요법으로 치료하였다. 다중 투여받은 환자의 경우 각 투여량은 2×10^6 hCT-MSCs/kg으로 구성되었으며 투여량을 2개월 간격으로 제공하였다.

표 5

제공된 환자 투여량 및 hCT-MSC 세포 로트

	환자 #	투여량 #	hCT-MSC 로트 #
코호트 1	1	1	1 (GMP-047)
	2	1	2 (GMP-051)
	3	1	3 (GMP-058)
코호트 2	4	2	1 (GMP-047)
	5	2	2 (GMP-051)
	6	2	3 (GMP-058)
코호트 3	7	3	1 (GMP-047)
	8	3	1 (GMP-047)
	9	3	2 (GMP-051)
	10	3	2 (GMP-051)
	11	3	3 (GMP-058)
	12	3	3 (GMP-058)

[0192]

[0193]

모든 대상체는 동종 hCT-MSC 세포의 적어도 1회 주입을 받았다. 주입 당일, hCT-MSC 세포를 해동하고 표준 운영 절차에 따라 CT2 GMP 실험실에서 준비하고 연구팀과 소아 혈액 및 골수 이식 프로그램 직원의 감독하에 진료소에서 환자 주입을 제공하였다. 기준선 활력 징후 (심박수, 혈압, 체온, 호흡 수)를 획득하였다. 맥박산소측정법으로 주입 내내 그리고 주입 후 적어도 5분 동안 지속적 모니터링하였다. 임상 직원, 마취과 또는 연구팀 구성원이 말초 IV를 배치하였다. 베나드릴(Benadryl) (0.5mg/kg IV) 및 솔루메드롤(Solumedrol) (0.5mg/kg IV)로 전투약 후, 환자는 30-60분에 걸쳐 주입된 2×10^6 개 세포/kg 체중의 용량으로 hCT-MSC를 받았다. 환자를 주입 후 최소 1시간 동안 진료소에서 관찰하였다. 모든 활력 징후가 기준선 수준에 있고 환자가 독성의 증거없이 무증상이면 환자는 적어도 1시간 후에 진료소에서 퇴원시켰다. 주입과 관련된 임의의 부작용 또는 합병증을 평가하기 위해 주입 후 하루(24시간 이내)에 연구 직원이 환자를 평가하였다. 주입 후 7-10일에 부모/보호자에게 연락하여 연구 직원이 주입의 안전성을 평가하였다.

[0194]

hCT-MSC 주입의 안전성

[0195]

이 공개 표지 I상 시험의 일차 종결점은 안전성이었다. hCT-MSC 주입을 잘 관용하는 결과를 보여주었다. 12명의 환자(12)가 연구에 등록되어 hCT-MSC 1, 2 또는 3회 주입을 받았다. 12명의 환자 모두 hCT-MSC 주입(들)을 완료하였다. 주입 기간과 최종 주입 후 12개월에 걸친 유해효과의 평가는 치료가 안전하고 잘 관용되는 것으로 나타났다. 유해효과는 경미하고 예상되는 것이며 연구 제품과 관련이 없는 것이었다. 심각한 유해효과는 보고되지 않았다. 보다 구체적으로, 주입 24시간 이내에 2명의 환자에서 3건의 반응이 보고되었다. 코호트 2의 환자 1명은 주입 2 이후 알러지 및 중등 저혈압을 경험하였다. 초기 주입 동안 IV 베나드릴에 대한 부작용인 극심한 초조함으로 인해 이 환자는 두 번째 주입을 위한 대체 전투약으로 경구용 아타락스(Atarax)를 제공하였다. 두 번째 hCT-MSC 주입을 시작한 직후 환자는 미만성 홍피증 및 기침 후 경미한 저혈압과 저산소증이 발생하였다. 주입을 즉시 중단하고 환자는 수액을 볼루스로 주고 추가 용량의 IV 솔루메드롤로 완전히 회복시켰다. 나머지 hCT-MSC 주입은 IV 베나드릴 투여 후 성공적으로 완료되었다. 코호트 3의 환자 1명은 주입 3 후 중등 저혈압을 경험하고 추가 IV 수액을 받았다.

[0196]

등록된 12명의 환자 중 11명 중에서 총 53가지의 심각하지 않은 유해효과 (AE)가 보고되었다(경증 53명 및 중등 1명)(도 2). 가장 빈번하게 발생하는 사건은 초조(13건 또는 보고된 모든 사건 중 26%)이고 기타 정신의학적 증상(7건 또는 보고된 모든 사건 중 13%)이 그 뒤를 따랐다. 초조는 코호트 1 사건의 1/3, 코호트 2 사건의 1/2, 코호트 3 사건의 ~1/5를 차지하였다. 대부분의 초조에 대한 보고는 1차 주입 (8건 사건) 후 2차 주입 (4건 사건) 및 3차 주입 (1건 사건)이 있었다. 모든 초조 사건은 주입과 같은 날에 보고되며 또한 같은 날에 해결되었다. 8건의 기타 정신의학적 증상은 5명의 다른 대상체에서 보고되었다: 코호트 1에서 1명의 대상체/1건, 코호트 3에서 4명의 대상체/7건의 사건이 보고되었다. 정신의학적 증상 중 6건은 첫 번째 주입 후 발생하고 2건은 3차 주입 후 발생하였다. 주입 후 정신의학적 증상이 시작되는 평균 시간은 20일 (sd=15.2; 범위: 2-44일)이었다. 초기 hCT-MSC 투여 6개월 후, 검출 가능한 HLA 항체 전처리를 받지 않은 5명의 참가자에게서 HLA 항체의 발생이 관찰되었다(데이터는 표시되지 않았다). 이들은 계속 모니터링되고 있으며 임상적으로 유의하지 않다.

[0197]

행동 검사

[0198] 투여의 가용성도 검사하고, ASD를 앓고 있는 아동의 행동 결과를 평가하기 위해 일반적으로 사용되는 몇 가지 측정 결과를 설명하였다. 부모-등급 및 임상-등급 다중 측정을 평가하였다. 처음 10명의 환자를 분석한 결과, 10명의 환자 중 6명이 CGI (Clinical Global Impression) 척도에서 개선된 것으로 평가되었으며 환자 10명 중 7명이 VAB (Vineland Adaptive Behavior) 척도의 사회화 또는 의사소통 하위척도에서 개선된 것으로 평가되었다. 기준선에서 무발화 IQ가 더 높은 환자에 대한 사회적 의사소통 기술 (Vineland Adaptive Behavior Scale)의 부모-보고 측정에서 환자의 행동이 유의하게 개선됨을 관찰하였다.

[0199] 행동 결과 평가의 결과는 표 6에 제시하였다. 하기 보고된 측정에서는 사회적 의사소통 기술 (VABS)은 3점 이상 증가하면 개선을 나타내고, 자폐증 증상의 중증도 (PDD-BI)는 감소하면 개선을 나타내며, 전문가 임상 판단 (CGI)은 개선되지 않음에서 많은 개선에 이르는 범위로 나타내는 평가를 포함하였다. 환자의 58% (7/12)는 적어도 2/3 측정에서 개선을 보이고, 42% (5/12)는 3가지 측정 모두에서 개선을 보이며 16% (2/12)는 2/3 측정에서 개선을 보였다. 결과 지표의 2/3에서 개선된 8명의 아동 중 2명은 1회 용량을 받고, 2명은 2회 용량, 3명은 3회 용량을 받았다.

표 6

ASD를 앓는 아동에서의 행동 평가, I상 연구

ID	용량	성별	IQ	VABS*	PDDBI	CGI	개선을 나타내는 평가의 #
1	1	M	62	-2	-	Min	1
2	1	M	68	4	6	Min	2
3	1	M	45	22	-22	Min	3
4	2	F	59	0	-6	Much	2
5	2	M	40	-10	-1	No	0
6	2	M	36	8	-22	Min	3
7	3	M	42	-2	0	No	0
8	3	M	54	-8	-4	No	1
9	3	M	71	-3	6	Min	1
10	3	M	82	19	-20	Min	3
11	3	F	59	4	-7	Min	3
12	3	F	95	7	-2	Min	3

VABS=VABS-III(Vineland Adaptive Behavior Scales-Third Edition) 사회화 표준 점수, PDDBI=전반적 발달 장애 행동 목록 자폐증 총점, CGI= 전반적 임상 인상 척도-개선 등급
*임상적으로 유의한 개선 = 3 점.

[0200]

[0201] 토론

[0202] 이 I상 공개-표지 연구에서, ASD를 앓는 어린 아동에서 hCT-MSC의 1, 2 및 3회 정맥 내 주입의 안전성 및 가용성을 평가하였다. 다양한 행동 및 기능적 결과 지표의 변화는 또한 향후 세포 치료 시험에서 종결점으로 사용하기에 가장 적합한 측정치를 결정하기 위해 기재되었다. 주입 후 12개월에 걸쳐 유해효과를 평가한 결과 hCT-MSC 주입(들)이 안전하고 잘 관용되는 것으로 나타났다. 모든 관련 사건은 예상된 것으로 간주되며 hCT-MSC (연구 제품)와 관련이 없으며 후유증 없이 해결되었다.

[0203] 실시예 2. II상 연구: ASD를 앓는 아동에서 hCT-MSC의 단일 및 반복 정맥 내 투여의 효능 및 안전성.

[0204] 이 연구는 ASD를 앓는 어린 아동에서 hCT-MSC의 정맥 내 투여의 효능을 평가하기 위해 고안된 II상 전향적 무작위 시험이다. ASD를 앓는 4 내지 8세 아동은 참여할 수 있다. 모든 대상체는 hCT-MSC로 치료받았다. A군에 무작위 배정된 대상체는 기준선에 1회, 3개월에 1회로 킬로그램당 2×10^6 hCT-MSC의 2회 정맥 내 투여를 받은 후 6개월에 맹검 위약을 주입하였다. B군에 무작위 배정된 대상체는 기준선에 1회, 3개월에 1회로, 2회 위약 주입을 받은 후, 6개월에 킬로그램당 2×10^6 hCT-MSC의 정맥 내 투여받았다 (도 3a 참조). 모든 참가자는 ASD 진단을 확인하고 프로토콜 적격성을 확인하기 위한 초기 임상 평가를 받았다. 일차 종결점은 바인랜드 적응 행동 척도 (VABS)-3 설문 조사 인터뷰 양식, 사회화 부척도 표준 점수로 측정된 바와 같이, 기준선에서 초기 hCT-MSC 주입 후 6개월까지의 사회적 의사소통 기술 (자폐증의 핵심 증상)의 변화이다. 주요 이차 종결점에는 VABS-3 의사소

통 부척도 표준 점수, PDD-BI 종합 점수, 전반적 임상 인상 척도-심각도 및 개선, 표현 단 단어 어휘 검사 원점수가 포함되었다. 탐색적 분석은 NIMH (National Institute of Mental Health)에서 수행된 ASD의 자연적인 이력에 대한 종단적 연구에 참여한 ASD를 앓는 유사한 연령의 아동의 코호트에서 관찰된 동일한 결과와 이 연구의 일차 결과 측정값을 비교한다. 하기 설명된 추가 ASD 특이 결과 지표는 기준선, 6개월 및 12개월에 평가하였다. 급성 주입 반응, 감염 발생률, 동종 면역화 마커를 포함한 안전성 평가를 수집하고 설명한다. 연구 참여 기간은 첫 번째 hCT-MSD 주입 시점으로부터 12개월이다.

- [0205] 연구 목표
- [0206] 일차 목표: ASD를 앓고 있는 아동의 사회적 의사소통 능력 향상을 위한 hCT-MSD의 효능을 결정하기 위해.
- [0207] 이차 목적: 자폐증 증상의 중증도, 임상가가 평가한 전반적 개선 및 hCT-MSD 치료 후 언어 능력의 변화를 설명하기 위해.
- [0208] 탐색적 목표: (1) NIMH가 후원하는 ASD의 자연적인 이력에 대한 종단적 연구에서 관찰된 유사한 연령 범위의 ASD를 앓는 아동을 대상으로 한 이 연구에서 hCT-MSD로 치료받은 대상체 간의 사회적 의사소통 기술의 차이를 설명하기 위해. (2) hCT-ASD 치료 후 적응 행동 및 운동 능력의 변화를 설명하기 위해. (3) hCT-MSD 치료 후 MRI, EEG, 시선 추적형 주의력 측정 및 자폐증 증상의 컴퓨터 비전 분석의 변화를 설명하기 위해.
- [0209] 연구 설계
- [0210] 일반 디자인
- [0211] 이것은 ASD를 앓는 4-8세 아동 60명에서 정맥 내 hCT-MSD 주입의 단일 부위, II상, 전향적, 무작위 연구이다. 모든 대상체는 서로 다른 투여 스키마를 검사하는 1:1 무작위화 방식으로 hCT-MSD로 치료시켰다 (도 3a 및 도 3b 참조). 주요 종결점은 바인랜드 적응 행동 척도(VABS)-3 설문 조사 인터뷰 양식, 사회화 부척도 표준 점수로 측정된 바와 같이, 기준선에서 초기 hCT-MSD 주입 후 6개월까지의 사회적 의사소통 기술 (자폐증의 핵심 증상)의 변화이다. 연구 참여 기간은 첫 번째 hCT-MSD 주입 시점으로부터 12개월이다.
- [0212] 연구 종결점
- [0213] 일차 종결점: 이 연구의 일차 종결점은 VABS-3 사회화 표준 점수에 의해 측정된 바와 같이, 기준선에서 초기 hCT-MSD 주입 후 6개월까지의 사회화 기술 (자폐증의 핵심 증상)의 변화이다. A&B군(단일 용량에서 총 6×10^6 /kg 노출)은 C&D군(3개의 균등 분할 용량에서 총 6×10^6 /kg 노출)과 비교하였다. A&C군 및 B&D군은 DukeACT 임상 시험의 외부 위약 대조군과 비교하였다.
- [0214] 이차 종결점: 기준선에서 6개월까지 다음 종결점에서 측정된 변화를 A&B군, C&D군, 및 DukeACT 위약 그룹 간에 비교하였다.
- [0215] 1. VABS-3 의사소통 표준 점수.
- [0216] 2. CGI-S 및 CGI-I.
- [0217] 3. 표현 단 단어 그림 어휘 검사
- [0218] 탐색적 종결점: 기준선에서 12개월까지 측정된 변화는 다음 결과 지표에서 평가하였다. A, B, C, D 군은 DukeACT 임상 시험에서 서로 그리고 위약군과 비교하였다.
- [0219] 1. VABS-3 사회화 표준 점수.
- [0220] 2. VABS-3 의사소통 표준 점수.
- [0221] 3. VABS-3 적응 행동 종합 및 일상 생활 기술, 의사소통 및 운동 기술 부척도의 점수.
- [0222] 4. MRI 측정.
- [0223] 5. EEG 측정.
- [0224] 6. 시선 추적을 통해 주의력 평가.
- [0225] 7. 컴퓨터 비전 분석 (CVA)을 통해 평가된 자폐증 증상.
- [0226] 안전성 종결점: ASD를 앓고 있는 아동에서 hCT-MSD 주입의 안전성은 다음에 의해 평가하였다:

- [0227] 1. 주입 반응의 발생률 및 심각도.
- [0228] 2. 제품 관련 감염의 발생률 및 심각도.
- [0229] 3. 항-HLA 및 항-RBC 항체 및 전신 염증의 비특이적 마커 (ESR, CRP)를 통한 동종 면역화의 증거.
- [0230] 4. 이식편 대 숙주 질환의 발생률 및 심각도.
- [0231] 5. 연구 제품과 관련하여 예상치 못한 유해효과의 발생률 및 심각도.
- [0232] 연구 참가자 선정 및 철회
- [0233] 연구 모집단
- [0234] ASD 진단이 확인된 4-8세 아동 60명.
- [0235] 포함 기준
- [0236] 1. 동의 당시 연령 ≥ 4 세 내지 ≤ 9 세 (8세, 364일).
- [0237] 2. DSM-5를 이용한 자폐 스펙트럼 장애의 임상 DSM-5 진단 확인. 자폐증 진단 관찰 척도-2에 의해 고지된 체크 리스트.
- [0238] 3. 취약 X 검사 수행 및 음성; CMA 및/또는 전체 엑솜 서열확인이 수행되며 결과는 자폐증 진단과 관련이 없다.
- [0239] 4. 연구 제품 주입 전 적어도 2개월 동안 현재의 정신의학 적 약물 요법 (투여량 및 투약 일정)에서 안정적이다.
- [0240] 5. 정상 절대 림프구 수치 ($\geq 1500/uL$).
- [0241] 6. 참가자와 부모/보호자는 영어를 구사한다.
- [0242] 7. 듀크 대학을 3회(기준, 3개월, 6개월) 다닐 수 있고 부모/보호자는 중간 설문 조사 및 인터뷰에 참여할 수 있다.
- [0243] 8. 부모의 동의.
- [0244] 배제 기준
- [0245] 1. 일반:
 - [0246] a. 의료 기록 검토 결과 ASD 진단 가능성이 낮다.
 - [0247] b. 다음과 같은 공존하는 정신의학 적 상태의 공지된 진단: 우울증, 양극성 장애, 조현병, 양극성 장애와 관련된 강박 장애, 투렛 증후군.
 - [0248] c. 선별 데이터가 참가자가 연구팀이 평가한 연구 절차의 요구 사항을 준수 할 수 없음을 시사한다.
 - [0249] d. 가족이 프로토콜 후속 조치를 포함한, 모든 연구 관련 평가에 참여할 의사가 없거나 참여할 수 없다.
 - [0250] e. 형제자매가 이 연구(Duke hCT-MSD)에 등록되어 있다.
- [0251] 2. 유전:
 - [0252] a. 기록에 따르면 아동은 취약 X 증후군, 신경섬유종증, 레트 증후군, 결절성 경화증, PTEN 돌연변이, 낭포성 섬유증, 근디스트로피 또는 ASD와 관련된 것으로 확실하게 알려진 유전적 결함과 같은 공지된 유전적 증후군을 앓고 있다.
 - [0253] b. ASD와 연관된 공지된 병원성 돌연변이 또는 유전자 복제 변이 (CNV: copy number variation)(예컨대, 16p11.2, 15q13.2, 2q13.3).
- [0254] 3. 전염성:
 - [0255] a. 공지된 활성 CNS 감염.
 - [0256] b. 기록 또는 임상 평가에 근거한 무통제성 감염의 증거.
 - [0257] c. 공지된 HIV 양성.

- [0258] 4. 의료:
- [0259] a. 공지된 대사 장애.
- [0260] b. 공지된 미토콘드리아 기능 장애.
- [0261] c. 불안정한 간질 또는 무통제성 발작 장애, 영아 경련, 레녹스 가스트 증후군, 드라벡 증후군, 또는 기타 유사 만성 발작 장애의 병력.
- [0262] d. 화학 요법으로 치료된 활성 악성종양 또는 이전 악성종양
- [0263] e. 원발성 면역 결핍 질환의 병력.
- [0264] f. 자가면역 혈구감소증(즉, ITP, AIHA)의 병력
- [0265] g. 연구 절차 중 합병증 위험이 높아질 수 있는 병존하는 건강 상태
- [0266] h. 향후 줄기세포 이식이 필요할 수 있는 병행적 유전적 또는 후천적 질병 또는 동반질환(들)
- [0267] i. 유의한 감각 장애(예컨대, 실명, 청각소실, 교정되지 않는 청각 장애) 또는 운동 장애(예컨대, 뇌성마비).
- [0268] j. 공지된 질베르병 환자를 제외하고 혈청 크레아티닌 >1.5mg/dL 또는 총 빌리루빈 >1.3mg/dL에 의해 결정된 신장 또는 간 기능 장애
- [0269] k. 다음과 같이 정의된 유의한 혈액학적 이상: 헤모글로빈 <10.0g/dL, WBC <3,000개 세포/mL, ALC <1000/uL, 혈소판 <150×10e9/uL
- [0270] l. 신경 발달 상태와 연관된 기형 특징을 식별하도록 숙달된 의료 유전학자 및 정신과 의사를 포함한 PIs 또는 기타 연구자에 의해 감정된 유전적 증후군을 나타내는 임상 관련 물리적 기형의 증거
- [0271] 5. 현재/이전 치료:
- [0272] a. 저장관리되고 적격한 자가 제대혈 유닛의 유효성.
- [0273] b. 이전 세포 치료력.
- [0274] c. NSAID를 제외한 IVIG 또는 기타 항염증제의 현재 또는 이전 사용.
- [0275] d. 현재 또는 이전의 면역 억제 요법: i. >2주 동안 지속된 전신 스테로이드 요법 없음 및 등록 전 3개월 이내에 전신 스테로이드 요법 없음. 국소 및 흡입 스테로이드를 허용한다.
- [0276] 연구 참가자의 조기 철회
- [0277] 프로토콜 요법에서 제외하기 위한 기준: (a) 평가 중 또는 연구 중 유전병의 진단. (b) 연구 참여를 방해하는 의학적 상태의 변화.
- [0278] 프로토콜 요법 제외 환자는 연구 제외 기준을 충족할 때까지 추적해야 한다 (하기 참조). 동의를 철회하지 않는 한 프로토콜 제외 참가자에 대한 후속 데이터를 얻을 수 있다. hCT-MSC 주입 전에 연구를 중단한 대상체는 평가할 수 없는 것으로 간주되며 다른 대상체로 대체될 수 있다.
- [0279] 연구 제외 기준:
- [0280] 1. 사망.
- [0281] 2. 후속 조치의 손실.
- [0282] 3. 추가 데이터 수집에 대한 동의 철회.
- [0283] 4. 최종 연구 방문 완료.
- [0284] 인간 제대 조직-유래 중간엽 간질 세포 (hCT-MSC)
- [0285] hCT-MSC는 배양에서 확장되고, 동결 보존되고, 저장관리된 용해된 제대 조직으로부터 제조된 동종 세포의 산물이다. hCT-MSC는 아기의 모체로부터 서면 동의를 받은 후, 듀크 대학 메디칼 센터에 위치한 FDA 허가를 받고 FACT 인증을 받은 공중 제대혈 बैं크인 카롤리나스 제대혈 बैं크에 기증된 제대 조직으로 제조된다. 제대 조직은 정상적인 만기 임신 후 선택적 제왕절개를 통해 분만된 남아의 태반에서 채취한다. 공여자 선별 설문지는 모체

공여자가 작성하고, 미국 노스캐롤라이나주 샬롯에 있는 미국 적십자의 CLIA 인증 공여자 선별 실험실에서 모체 혈액을 전염성 질환에 대해 검사한다. 공여자는 동종 용도로 공중 제대혈 뱅크에 기증할 자격이 있어야 한다. 태반과 제대의 분만 후, 제대혈은 태반에서 무균적으로 배출된다. 그런 다음 제대를 건조시키고 클로라프렘으로 세척하고 태반의 기저부에서 분리한 다음 플라즈마라이트 A가 함유된 멸균병에 넣고, 적합한 용기에 담아 실온에서 Robertson CT2 GMP 세포 처리 실험실로 옮긴다.

[0286] 무균실 제조실의 생물안전성 캐비닛에서, 제대 조직을 배지에서 꺼내 멸균 접시에 넣고 작은 조각으로 자른 다음 GMP-등급 효소와 함께 Miltenyi Biotec GentleMacs Octo Dissociator 내에서 다져서 쪼갬다: 히알루로니다제, DNA 분해효소, 콜라겐분해효소, 파파인. 생성된 세포 현탁액을 1% 혈소판 용해물과 함께 Prime XV MSC Expansion XFSM (Irvine Scientific) 배지에서 배양하고 전면성장(~7-14일)까지 성장시켜 P0 배양을 확립한다. 마스터 세포 저장관리를 구축하기 위해, P0을 수확하고 저온유리병 내에서 Cryostor 10 배지 (BioLife)를 사용하여 동결보존하고 액체 질소의 기체상에서 저장한다. P1 및 P2 배양은 개별적으로 투여하기 위해 제조용 세포 저장관리 및 제품 생성의 필요에 따라 HYPERFlask 또는 혈소판 용해물이 없는 HYPERStack에서 유사한 조건 하에서 성장시킨다. TrypLE (Gibco)를 사용하여 P1 및 P2의 세포를 플라스틱 배양장치로부터 제거한다. 최종 제품은 5% 인간 혈청 알부민으로 된 플라즈마라이트 내에서 수거되고, 세척되고, 텍스트란 (Akron Scientific)과 10% DMSO의 최종 농축액에서 5천만-1억 개의 세포를 포함하는 5 mL로 5개 구획화된 냉동백(Syngen)에서 동결보존시켜 P2 배양액으로부터 파생된다. 투여 당일, 냉동백의 한 구획을 해동시키고 10-40mL의 플라즈마라이트 IV 용액으로 희석시켜 주사기 또는 백에 넣고 투여를 위해 30-60분에 걸쳐 침대 옆으로 이동시킬 수 있다.

[0287] 각 계대에서, 세포 생성물은 T-세포 증식 및 소교세포 활성화의 기관형 모델을 통한 유세포 분석 및 기능 분석에 의해 세포 표면 표현형을 평가하는 것을 특징으로 한다. P2의 동결보존 이전에 각 그룹은 무균, 내독소 및 마이코플라스마에 대해서도 실험되며 이러한 실험은 사양을 충족해야 한다. 투약의 경우, 해동 및 희석 후 방출 테스트에는 TNCC 및 셀로미터를 통한 생존력이 포함된다. 또한, 멸균 배양 (14일)을 개시하지만 주입 시점에는 결과를 확인할 수 없다. 해동 후 수를 기준으로 2×10^6 개 hCT-MSCs/kg을 투여 받는다.

[0288] 공여자 선별 및 검사

[0289] 21 CFR Part 1271의 모든 요건을 충족하기 위해 카롤리나스 제대혈 뱅크 표준 운영 절차에 따라 공여자 선별 및 검사를 수행한다. 선별 및 검사는 권장 사항에 따라 최신이며 생물학적 허가 번호 1870에 따라 FDA의 승인을 받았다. 제대혈의 모체 공여자는 HIV-1, HIV-2, B형 간염 바이러스 (HBV, 표면 및 코어 항원), C형 간염 바이러스 (HCV), Treponema pallidum (매독), CJD (선별 전용), Chagas, 인간 T- 림프영양성 바이러스 유형 1 및 2 (HTLV-1, HTLV-2) 및 CMV에 대해 선별되고 검사된다. HIV-1/2/0, HBV, WNV 및 HCV에 대한 핵산 검사도 모체 혈액에서 수행된다. 지카 바이러스에 대한 선별도 수행될 수 있다.

[0290] 공정 및 최종 제형

[0291] hCT-MSC는 마스터 세포 저장관리, 작업용 세포 저장관리 및 연구 제품을 생성하는 일련의 3단계로 단일 제대 조직으로부터 제조된다. 각 단계의 제품은 냉동되고 액체 질소 냉동고에서 증기 상태로 저장된다. P2에서 참조 냉동백을 해동하고 해당 제품을 가지고 임의의 환자의 치료 전에 자격을 부여한다. 검사에는 세포 수, 생존력, 표현형, 기능 분석, 내독소, 마이코플라스마, 그람염색 및 멸균이 포함된다.

[0292] 치료 당일, SOP CT2-MSC-006에 따라 세포를 해동하고, 10-40mL의 플라즈마라이트-A + 5% HSA로 희석하고, 세포 수, 생존력 및 무균 배양을 위해 분취량을 제거하였다. 세포가 방출 기준을 충족한 경우 최종 제품 부피는 연구 대상체에게 적절한 용량 (2 또는 6×10^6 개 세포/kg)을 전달하도록 조정되었다. 세포는 플라즈마라이트-A, 5% HSA 및 잔류 DMSO를 포함하는 백 또는 주사기에 넣어 침상으로 전달되었다. 제거된 세포 현탁액은 무균 실험을 위해 호기성 및 혐기성 배양병에 접종되었다. 세포는 해동 후 실온에서 4시간 만기이다.

[0293] hCT-MSC 최종 제품은 해동 후 세포 수 및 생존력을 시험한 후 환자에게 투여하기 위해 조건부로 방출되었다. 최종 방출은 연구 제품에 대한 14일 무균 배양 기간 후에 발생하였다. 제품 투여 후 멸균 배양물이 양성으로 바뀌면 유기체를 식별하고 항생제 민감성을 수행하였다. 환자의 가족에게 연락하여 증상이 있는지 (예컨대, 발열) 확인하였다. 무증상 환자는 항생제로 치료하지 않는다. 증상이 있는 환자는 적절한 혈액 배양과 항생제를 사용하여 그에 따라 평가 및 치료하였다. 이후 양성 무균 검사 제품을 받은 모든 환자는 양성 무균 검사가 확인된 후 14일 동안 연구 간호사가 매일 접촉하였다.

[0294] 위약 제품

- [0295] 투여를 위해 해동시킨 냉동보존된 hCT-MSc는 냉동 보존에 사용된 DMSO로 인해 특유의 향이 있다. 환자와 가족이 받는 주입 유형에 대해 진정으로 맹검하기 위해서는 위약 제품이 모양과 냄새가 비슷해야 한다. 따라서 위약 제품은 무세포성이며 세포 제품의 표준 성분인 1% DMSO가 포함된 플라즈마라이트-A로 구성되어 있다. 위약 제품의 부피는 10-40 mL로 hCT-MSc 제품에 사용된 것과 동일한 범위이다. 위약 용액을 동일한 최종 용기에 담아 임상 직원, 환자 및 가족이 맹검 상태로 6개월 주입 시점에 제품 또는 위약을 연구하였다.
- [0296] 제품의 투여
- [0297] 환자는 예정된 주입 일에 주입 센터에 입원한다. 환자가 가만히 있거나 협조 할 수 없는 경우 IV 배치 전에 약간의 진정제가 필요할 수 있다. 말초 IV는 임상 또는 연구 직원이 배치하였다. 환자에게 베나드릴 0.5mg/kg/용량 IV 및 솔루메드롤 0.5-1mg/kg IV로 사전 투약하였다. hCT-MSc 또는 위약 제품은 30-60분에 걸쳐 정맥으로 투여하였다. 활력 징후 (심박수, 혈압, 체온, 호흡 수)를 클리닉에 도착하면 모니터링하고 임상적 지시에 따라 모니터링하였다. 맥박 산소 측정은 주입 내내 그리고 주입 후 적어도 5분 동안 지속적으로 모니터링하였다. 환자는 주입 후 최소 15-30분을 관찰해야 한다.
- [0298] 안전 후속 조치
- [0299] 각 주입 후 1일에, 참가자는 주입 관련 부작용 또는 합병증을 평가하기 위해 연구 직원을 만났다. 각 주입 후 7-10일 후에 연구팀의 구성원이 전화나 이메일을 통해 부모 또는 보호자에게 연락하여 환자 상태 및 임의의 유해효과를 평가하였다. 심각한 유해효과를 평가하기 위해 각각의 후속 방문과 6개월 및 12개월에 설문문을 시행하였다. PRA는 전처리 및 MSc 투여 후 6개월 및 12개월에 획득되었다.
- [0300] 연구 계획
- [0301] 개요
- [0302] 모든 선별이 완료되고 환자가 연구 기준을 충족할 가능성이 높으면 환자는 첫 번째 방문을 위해 듀크를 다녀갈 것이다. 1일째에는 사전 동의를 얻고 환자 적격성을 DSM-5 기준에 따라 ASD 진단의 물리적 관찰 및 검증을 통해 결정하였다. 아동이 적격하다고 판단되면 그/그녀를 연구에 등록하고 hCT-MSc 투여 코호트 중 하나에 무작위로 배정하였다. 첫 방문 동안 추가 임상 평가 및 신경심리학적 평가, EEG 검사, 시선 추적, 및 CVA 평가, 및 MRI를 받았다. 참가자는 각 주입 다음날 직접 또는 전화로 평가를 받고, 후속 안전성 평가를 위해 주입 후 7-10일 후에 부모에게 연락하였다. 참가자들은 예정된 hCT-MSc 주입 및 모니터링을 위해 듀크로 복귀하고, 반복적인 임상, 신경심리학, EEG, 시선 추적, CVA, 및 안전성 후속 조치를 위해 초기 투여 후 6개월 및 12개월에 복귀하였다.
- [0303] 환자 선별
- [0304] 연구를 위한 선별은 별도의 IRB 승인된 선별 프로토콜 (Pro00063563)에 따라 수행되었다. 이 프로토콜에 따라 부모/보호자로부터 서면 동의를 얻은 후 환자의 의료기록 및 심리학적 기록, 학교 기록, 사진, 행동 비디오 및 모든 유전자 검사 결과를 수득하고 두 팀이 검토하였다. 의학적 검토는 소아과 간호사, 전담간호사, 및 내과의사 팀이 수행하여 대사, 면역, 신경, 감각, 유전 또는 실험실 배제 기준이 있는지 확인하였다. 그러한 배제 기준이 확인되지 않은 경우, 정신의학적 검토는 ASD를 앓고 있는 아동을 진단하고 치료하는 데 전문성을 갖춘 심리학자, 정신과 의사 및 사회복지사가 결합하여 수행하였다. 환자의 심리 기록뿐만 아니라 사용 가능한 모든 학교 및 치료 기록에 대한 광범위한 검토를 수행하였다. 정신의학적 선별 팀은 ADI-R 평가를 실시하였다. 두 팀 모두 환자의 사진과 기록을 검토하여 기형 특징을 평가하였다. 의심스러운 외모 특징이나 유전자 검사 결과가 있는 환자는 ASD와 연관된 유전적 상태에 대한 전문 지식을 갖춘 의료 유전학자가 검토하였다. 환자는 추가 검사 사실 또는 전화 또는 직접 선별 및 연구 등록을 진행하기 위해 의학적 및 정신의학적 선별 팀 모두의 승인을 받아야 한다. 선별 과정에서 이전에 진단되지 않은 병태 또는 유전적 발견에 대한 우려가 발생하면, 확인된 경우 환자의 부모(들)/보호자(들)와 논의하고 적절한 의료 또는 정신의학적 제공자에게 평가 및 치료를 의뢰한다.
- [0305] 연구 주입
- [0306] 모든 대상체는 적어도 1회 동종 hCT-MSc 세포 주입을 받았다. 주입 당일, hCT-MSc 세포 또는 위약 제품을 해동하고 표준 운영 절차에 따라 CT2 GMP 실험실 및/또는 듀크 줄기세포 실험실에서 준비하고 연구팀과 소아과 혈액 및 골수 이식 프로그램 직원의 감독하에 진료소에서 환자의 주입을 위해 제공되었다. 기준선 활력 징후 (심박수, 혈압, 체온, 호흡 수)를 얻었다. 임상 직원, 마취 또는 연구팀 구성원이 말초 IV를 배치하였다. 주입 전에 전투약물 (베나드릴, 솔루메드롤)을 투여하였다. 연구 제품은 30분에 걸쳐 주입되었다. 아동은 주입 후 최

소 15-30분 동안 진료소에서 관찰되었다. 1.5 유지 IV 수액 (D5 ½ NS)을 시도하였다. 환자는 모든 활력 징후가 기준선에 있고 독성 증거없이 무증상인 경우 적어도 1시간 후에 병원에서 퇴원한다. 주입과 관련된 부작용 또는 합병증을 평가하기 위해 주입 다음날 연구 직원이 환자를 평가하였다. 주입의 안전성을 평가하기 위해 연구 직원이 주입 후 7-10일에 부모/보호자에게 전화를 걸어 실시하였다.

- [0307] 계획된 주입 날에 환자가 >38.5°C의 발열, 구토, 설사 또는 호흡 곤란을 포함하나 이에 한정되지 않는 질병의 증거가 있는 경우 주입을 연기시켰다.
- [0308] 예상치 못한 사건에 대한 주의
- [0309] 환자가 연구 주입 중에 두드러기, 호흡 곤란, 기침, 천명, 또는 구토를 포함하는 아나필락시스의 징후 또는 증상을 보이는 경우에 주입을 종료하고 적절한 의학적 치료를 시작하였다.
- [0310] 평가

표 7

의료 및 안전성 평가

	시점#					
	선별	기준선 (방문 1)	각 hCT- MSC 용량 또는 위약	MSC 후 7-10 일	6개월	12개월
CBCD*, CMP*, 환자 HLA, 취약 X, CMA/WES	X					
이전 기록 ± 비디오 검토	X					
이력 & 신체검사		X	X		X	X
DNA 및 생존 단핵 세포의 보관용 샘플, DNA 추출물 및 보유		X				
CBCD, CMP, 직접 & 간접 콤스(Coombs)(T&S), HLA 항체 스크리닝(PRA), ESR, CRP, 면역 재구성 패널, 체액 면역 양상, 공여자 외리 패널		X*	X (CBC & CMP 전용)		X	X (PRA 전용)
신경심리학적 평가		X			X	X
MRI		X			X	
안정성 평가-직접 (주입후 날짜)		X	X		X	
안정성 평가-전화 통화/설문조사				X		
*CBCD & CMP 는 최초 방문시 또는 동의 전 6 개월 이내에 획득할 수 있다; 등록 전 언제든지 HLA, fragile X, CMA/WES. #안정성 및 복귀 평가는 지정된 시점으로부터 한 달 이내에 수행되어야 한다.						

[0311]

표 8

진단, 행동, 신경인지, 및 신경생리학적 평가.

	측정	시간(분)	시점#				
			기준선 (방문)	3개월 (원격)	6개월 (방문)	9개월 (원격)	12개월 (방문)
부모의 사전 방문 임상의 평가	ADI-R(Autism Diagnostic Interview-Revised) 단축 버전	90-150	X (사전 방문)				
아동의 임상의 평가	ADOS-2(Autism Diagnostic Observation Schedule, 2nd Ed.)	45-60	X		X		X
	조기 학습의 물론 척도 (MSEL), AGS 에디션	60	X				
	DAS-II(Differential Ability Scales, 2nd Ed.)	45	X				
	PCI(Parent-Child Interaction) (근접 검색)	12	X		X		X
	표현 단어 그림 어휘 검사-4 (EOWPVT-4)	10-30	X		X		X
아동의 생리적 및 기능적 평가	심전기 생리학 시험(Electrophysiol ogical testing: EEG)	20	X		X		X
	사회 자극의 시선 응시 추적 (EGT)	10-15	X		X		X
	컴퓨터 비전 분석(CVA)	10	X		X		X
부모의 임상의 평가	바인랜드 적응 행동 척도, 제 3 판(VABS-3) 설문 조사 인터뷰 양식	60	X		X		X

[0312]

부모 설문지	전반적 발달 장애 행동 목록 (PDDBI)	30	X	X	X	X	X
	개입 이력*	15	X	X	X	X	X
	ELEAT (Early Life Exposures Assessment Tool)	10	X				
	문제 행동 체크리스트- 커뮤니티	10	X	X	X	X	X
	감각 경험 설문지 2.1	10	X				
	BRIEF (Brief Rating Inventory of Executive Functioning) 또는 BRIEF-P (BRIEF- Preschool)	15	X		X		X
	PedsQL-위장관 징후 척도(PedQL)	10	X		X		X
다른 임상의 판단	Diagnostic 통계적 Manual 5-Checklist (DSM-5)	3-5	X		X		X
	전반적 임상 인상 척도-심각도 및 개선	15	X		X		X
*개입 이력은 매월 수집하였다. #평가는 표시된 시점으로부터 한 달 이내에 수행해야 한다.							

[0313]

[0314]

통계적 고려사항

[0315]

이것은 ASD를 앓는 2-7세 아동 60명에서 정맥 내 hCT-MSD 주입의 단일 부위, II상, 전향적 연구이다. 모든 대상체는 hCT-MSD로 치료받았다. 대상체에게는 균등 할당을 사용하여 4개의 투약 스키마 중 하나로 무작위로 배정하였다. 연구 참여 기간은 첫 번째 hCT-MSD 주입 시점으로부터 12개월이다. 효능을 평가하기 위해 외부 대조군을 사용하였다.

[0316]

연구 기간: 연구 참가자는 첫 번째 hCT-MSD 투여 후 12개월 동안 연구에 등록시켰다.

[0317]

인구 통계 및 기준선 특성: 모든 연구 참가자에 대한 인구 통계 및 기준선 특성을 요약하였다. 검사할 특성에는 연령, 성별, 인종/민족 및 기준선 행동 상태가 포함되었다.

[0318]

일차 종결점: 이 연구의 일차 종결점은 바인랜드 적응 행동 척도(VABS)-3 설문 조사 인터뷰 양식, 사회화 부척도 표준 점수에 의해 측정된 바와 같이, 기준선에서 초기 hCT-MSD 주입 후 6개월까지의 사회적 의사소통 기술(자폐증의 핵심 증상)의 변화이다. A&B군(단일 용량에서 총 6×10^6 /kg 노출)는 C&D군(3개의 균등 분할 용량에서 총 6×10^6 /kg 노출)과 비교하였다. A&C군 및 B&D군은 DukeACT 임상 시험의 외부 위약 대조군과 비교하였다. A부터 D까지의 군에 대한 분석은 개별적으로 탐색적 분석에 포함되었다.

[0319]

표본 크기 및 검정력 계산: 다음은 DukeACT의 환자 수준 데이터가 분석을 위해 본 연구의 데이터와 합쳐진다고 가정하였다. 통계적 검정력의 평가는 연속 공변량으로 일반 선형 모델 (GLM)이 기준선 점수, 연령, 무발화 발달 지수 (NVDQ), 및 연구 지표 (DukeACT 또는 현재 연구)를 사용하여 6개월 VABS-3 사회화 표준 점수를 예측하는데 적합하다고 가정한다. DukeACT 연구의 중간 분석에서 얻은 맹검 데이터(N=119)를 기반으로 하고 현재 연구와 DukeACT에서 유사한 자격 기준을 기반으로 한 연구 변동성이 제한적이라는 가정 하에 공변량과 6개월 점수 사이에 $r=0.85$ (R^2 -제공=0.7291)의 다중 상관 관계를 가정하였다.

[0320]

A&B군(단일 용량에서 총 6×10^6 /kg 노출) 및 C&D군(3개의 균등 분할 용량에서 총 6×10^6 /kg 노출)을 서로와 그리고 DukeACT 위약군과 비교하기 위해 GLM으로부터 도출될 것이라고 가정하여 통계적 검정력을 계산하였다. 이

러한 대조와 관련된 통계 가설은 하기 표 9에 기재하였다.

표 9

연구와 관련된 통계 가설

대조	귀무가설
치료의 주요 효과	$H_0: \mu_A - \mu_{위약} = 0$ 및 $\mu_B - \mu_{위약} = 0$ 및 $\mu_C - \mu_{위약} = 0$ 및 $\mu_D - \mu_{위약} = 0$
단일 용량 vs. 위약	$H_0: \mu_A - \mu_{위약} = 0$ 및 $\mu_B - \mu_{위약} = 0$
3회 용량 vs. 위약	$H_0: \mu_C - \mu_{위약} = 0$ 및 $\mu_D - \mu_{위약} = 0$
단일 용량 vs. 3회 용량	$H_0: \frac{1}{2}(\mu_A + \mu_B) - \frac{1}{2}(\mu_C + \mu_D) = 0$

[0321]

[0322]

각각의 A, B, C 및 D군에서 15명의 환자 샘플과 DukeACT 위약군에서 60명의 환자 샘플을 평가하여 검정력이 계산된 세 가지 가능한 대체 가설을 나타내기 위해 표준화된 효과 크기를 사용하였다. 검정력 계산은 0.0125의 검사별 알파를 가정하고 상기 기재된 연속 공변량 및 다중 상관을 가정하였다 (하기 표 10에 표시된 바와 같이 4개의 가설 검사 중 0.05의 실험별 알파를 나눈 값). 모든 분석은 SAS v9.4의 PROC GLMPower(SAS Institute, Cary, NC)를 사용하여 수행되었다.

표 10

통계적 분석

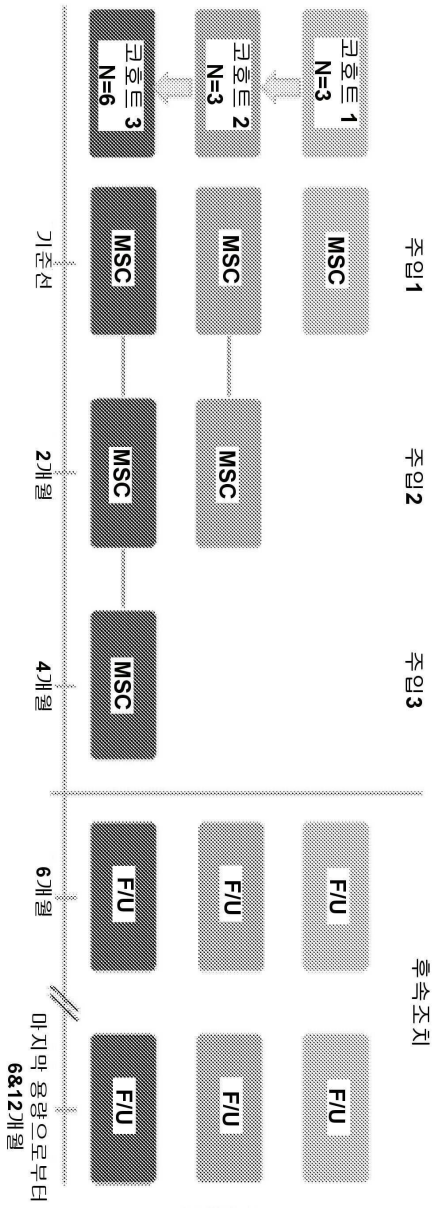
HA	코hen값 ^d	검사 유형 ^e	비교	검사 DF	검정력
선형 용량 반응		주요 효과	임의의 hCT-MSc vs. 위약	4	0.991
	0.33	대조	1회 용량 vs. 위약	2	0.512
	0.5	대조	1회 용량 vs. 3회 용량	1	0.534
	0.67	대조	3회 용량 vs. 위약	2	0.997
일반 치료 효과		주요 효과	임의의 hCT-MSc vs. 위약	4	0.963
	0.5	대조	1회 용량 vs. 위약	2	0.920
	0	대조	1회 용량 vs. 3회 용량	1	0.013b
	0.5	대조	3회 용량 vs. 위약	2	0.920
단일 군만의 효과 ^e		주요 효과	임의의 hCT-MSc vs. 위약	4	0.914
	0	대조	1회 용량 vs. 위약	2	0.013b
	0.5	대조	1회 용량 vs. 3회 용량	1	0.916
	0.5	대조	3회 용량 vs. 위약	2	0.920

표본 크기는 1회 용량 (N=30 [A 군=15, B 군=15]), 3회 용량 (N=30 [C 군=15, D 군=15]), 위약 (N=60) 및 임의의 hCT-MSc (N=60 [A+B+C+D 군])이다.
 HA=대안 가설. DF=자유도.
 a 검사별 알파는 각 HA의 모든 검사에 대해 0.0125이다.
 b 검정력은 대립 가설 하에서 비교되는 그룹간에 차이가 없기 때문에 이 경우 비교별 I형 오류를 나타낸다.
 c 실시에는 3회 용량 투여군에 국한된 치료 효과를 보여 주지만 1회 용량 투여군에 국한된 치료 효과가 있는 경우 동일한 작용 특성이 적용된다.

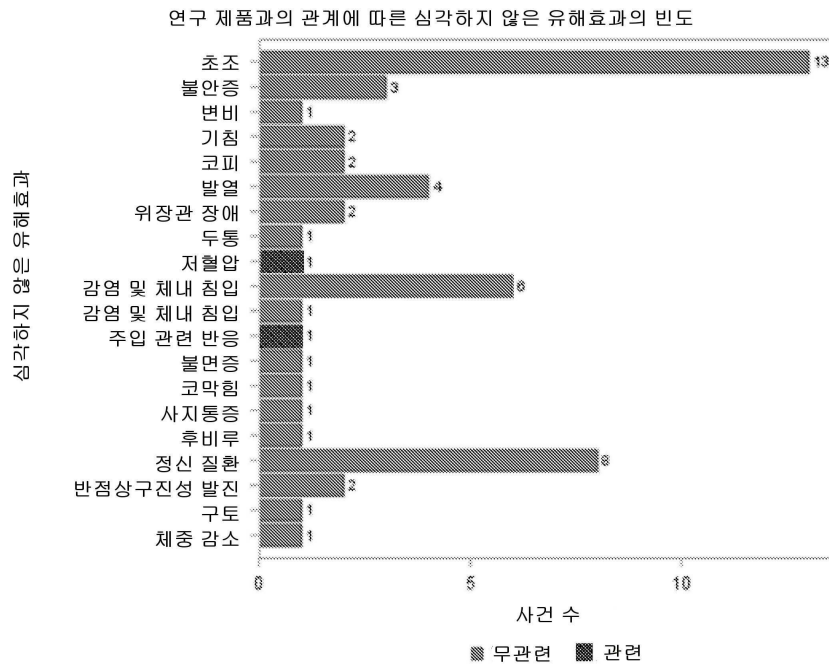
[0323]

- [0324] 표는 총 120명의 참가자(각 A&B군 및 C&D군에서 30명, DukeACT에서 60명)가 중등의 일반적인 hCT-MSD 치료 효과 또는 I형 오류 및 공변량 조절을 엄격하게 제어하는 hCT-MSD의 단일 투여 요법의 치료 효과를 검출하기 위해 적어도 90%의 검정력을 제공함을 보여주었다. 본 연구는 중소 규모의 선형 용량 반응을 탐지하기 위한 검정력이 더 낮았다. 특히, 이 대안에서 1회 또는 3회 용량 간의 효과를 구별하기 위해 검정력을 감소시켰다.
- [0325] 통계적 검정력의 상기 추정치는 공변량과 반응 간의 연관 강도에 매우 민감하다는 것을 이해해야 한다. ~0.8 미만의 상관 관계는 종래 표준에 의한 검정력이 부족한 연구의 결과를 초래한다.
- [0326] 본 개시는 ASD를 가진 유아에서의 동종 hCT-MSD의 정맥내 주입이 안전하고 실행 가능함을 입증하고 있다. 본 개시는 주입 후 첫번째 육(6)개월에 관찰된 행동에서의 유의한 개선에 대한 결론을 뒷받침하고 이러한 유의한 개선이 주입 후 12개월째에 지속되었음을 나타내고 있다. 더 높은 기준선 무발화 IQ가 더 큰 개선도와 연관되었다. 본 개시는 실행 가능하고, 변화에 민감하고, 발달상 적절하고, 그에 따라서 향후 임상 시험 및 치료 셋팅에서 ASD를 가진 유아의 치료를 위한 hCT-MSD 요법의 효능을 시험하는 데 사용하기에 적합한 결과 측정을 확인하고 있다.
- [0327] 본원에 기술된 실시예 및 구현예는 단지 예시 목적이란 것과, 그를 고려한 다양한 변형 또는 변화가 통상의 기술자에게 제안될 수 있고 본 출원의 사상 및 범위 및 첨부된 청구범위의 범위 내에 포함되어야 함이 이해된다. 본원에서 인용된 모든 간행물, 특허, 및 특허 출원은 본원에서 모든 목적으로 참고로 포함된다.

도면
도면1



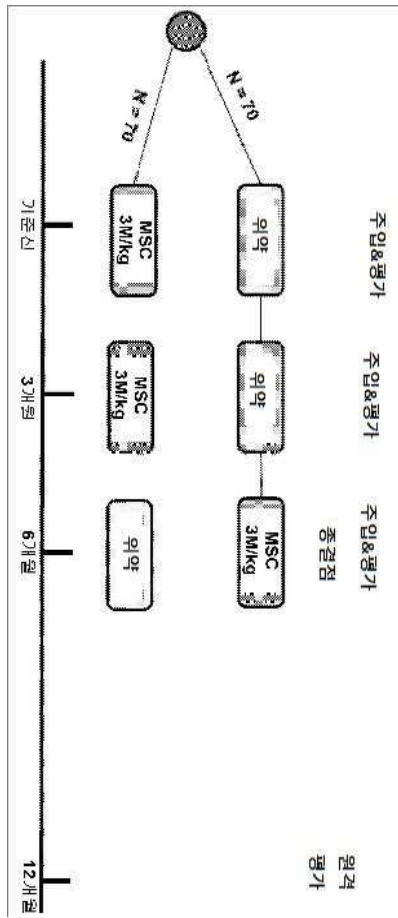
도면2



도면3a



도면3b



도면4

