



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0152240
(43) 공개일자 2022년11월15일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/28 (2015.01) A61K 9/00 (2006.01)
A61P 1/04 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 35/28 (2013.01)
A61K 9/0031 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2022-7032830
- (22) 출원일자(국제) 2021년03월11일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2022년09월21일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2021/056193
- (87) 국제공개번호 WO 2021/180851
국제공개일자 2021년09월16일
- (30) 우선권주장
2020900743 2020년03월11일 오스트레일리아(AU)

- (71) 출원인
메조블라스트 인터내셔널 에스에이알엘
스위스 메이린 1217 루트 드 프리-보아 20
- (72) 발명자
이메스쿠, 실비우
호주, 빅토리아 3000, 멜버른, 55 콜린스 스트리트, 레벨 38
- (74) 대리인
이처영, 장제환

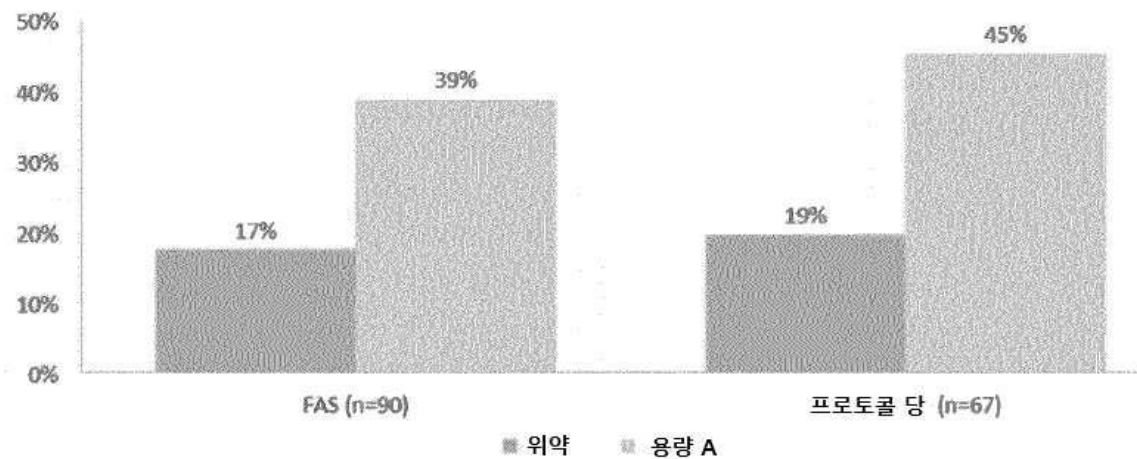
전체 청구항 수 : 총 46 항

(54) 발명의 명칭 **염증성 장 질환 II의 치료 방법**

(57) 요약

본 개시내용은 염증성 장 질환(IBD) 치료 또는 예방을 필요로 하는 대상체에서 염증성 장 질환(IBD)을 치료 또는 예방하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포(MLPSC)를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 9/0053 (2013.01)

A61P 1/04 (2018.01)

A61P 29/00 (2018.01)

A61P 37/00 (2018.01)

명세서

청구범위

청구항 1

염증성 장 질환 치료 또는 예방을 필요로 하는 인간 대상에서 염증성 장 질환을 치료 또는 예방하는 방법으로서, 상기 방법은 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포(MLPSC)를 포함하는 조성물을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하며, 상기 대상체는 적어도 하나의 생물학적 요법에 불응성인, 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 대상체는 단일 생물학적 요법에 불응성인, 방법.

청구항 3

단일 생물학적 요법에 불응성인 인간 대상체에서 염증성 장 질환을 치료 또는 예방하는 방법으로서, 상기 방법은 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포(MLPSC)를 포함하는 조성물을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하며, 상기 방법은 6억 미만의 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포의 총 용량을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 4

청구항 1 내지 3 중 어느 한 항에 있어서, 상기 생물학적 요법은 항-TNF 요법인, 방법.

청구항 5

청구항 1 내지 3 중 어느 한 항에 있어서, 상기 생물학적 요법은 인플릭시맙, 아달리무맙, 세르톨리주맙 페골, 베돌리주맙 또는 우스테키누맙인, 방법.

청구항 6

청구항 1 내지 4 중 어느 한 항에 있어서, 상기 생물학적 요법은 인플릭시맙 또는 아달리무맙인, 방법.

청구항 7

청구항 1 내지 6 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체는 아자티오프린, 머캅토피린(6-MP), 메토티렉세이트, 사이클로스포린 또는 스테로이드 중 하나 이상에도 불응성인, 방법.

청구항 8

청구항 1 내지 7 중 어느 한 항에 있어서, 상기 염증성 장 질환은 크론 질환 또는 궤양성 대장염인, 방법.

청구항 9

청구항 8에 있어서, 상기 염증성 장 질환은 크론 질환인, 방법.

청구항 10

청구항 9에 있어서, 상기 크론 질환은 상기 대상체의 직장 및/또는 결장에 존재하는, 방법.

청구항 11

청구항 1 내지 10 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체는 23 미만의 C-반응성 단백질(CRP) 수준을 갖는, 방법.

청구항 12

청구항 1 내지 10 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체는 20 미만의 C-반응성 단백질(CRP) 수준을 갖는, 방법.

청구항 13

청구항 1 내지 12 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체는 치료 후 적어도 28일에 부분 임상 및/또는 내시경 반응을 갖는, 방법.

청구항 14

청구항 1 내지 12 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체는 치료 후 적어도 28 내지 56일에 부분 임상 및/또는 내시경 반응을 갖는, 방법.

청구항 15

청구항 13 또는 14에 있어서, 부분 임상 반응은 다음 중 하나 이상 또는 모두를 특징으로 하는, 방법:

- C-반응성 단백질(CRP)의 25% 초과 감소;
- CD 활동 지수(CDAI)의 100점 미만의 감소;
- 염증이 개선된 MR 장조영술을 통해 평가된 방사선학적 치유.

청구항 16

청구항 13 또는 14에 있어서, 부분 내시경 반응은 다음 중 하나 또는 둘 모두를 특징으로 하는, 방법:

- 25% 초과 크론 질환에 대한 단순 내시경 점수(SES-CD: Simple Endoscopic Score for Crohn Disease) 감소 및 50% 미만의 SES-CD 감소;
- 10-15의 SES-CD 점수.

청구항 17

청구항 1 내지 12 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체는 치료 후 적어도 28일에 임상 및/또는 내시경 반응을 갖는, 방법.

청구항 18

청구항 1 내지 12 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체는 치료 후 적어도 28 내지 56일에 임상 및/또는 내시경 반응을 갖는, 방법.

청구항 19

청구항 17 또는 18에 있어서, 임상 반응은 다음 중 하나 이상 또는 모두를 특징으로 하는, 방법:

- CRP의 50% 초과 감소;
- CRP의 정상화;
- CDAI의 100점 이상의 하락;
- 염증이 개선된 MR 장조영술을 통해 평가된 방사선학적 치유.

청구항 20

청구항 17 또는 18에 있어서, 내시경 반응은 다음 중 하나 또는 둘 모두를 특징으로 하는, 방법:

- SES-CD의 25% 초과 그러나 50% 미만의 감소;
- 5-10의 SES-CD 점수.

청구항 21

청구항 1 내지 12 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체는 치료 후 적어도 28일에 임상적 및/또는 내시경적 관해 상태에 있는, 방법.

청구항 22

청구항 1 내지 12 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체는 치료 후 적어도 28 내지 56일에 임상적 및/또는 내시

경적 관해 상태에 있는, 방법.

청구항 23

청구항 21 또는 22에 있어서, 임상적 관해는 다음 중 하나 또는 둘 모두를 특징으로 하는, 방법:

- 리터당 2.87 mg 미만으로 CRP의 정상화;
- 염증이 개선된 MR 장조영술을 통해 평가된 방사선학적 치유.

청구항 24

청구항 21 또는 22에 있어서, 내시경적 관해는 다음 중 하나 또는 둘 모두를 특징으로 하는, 방법:

- 점막 궤양의 부재;
- 0-5의 SES-CD 점수.

청구항 25

청구항 1 내지 24 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 상기 대상체의 위장관 벽에 투여되는, 방법.

청구항 26

청구항 1 내지 25 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 대상체 위장관 벽의 점막하층에 투여되는, 방법.

청구항 27

청구항 1 내지 26 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 대상체 위장관 벽의 염증 부위에 투여되는, 방법.

청구항 28

청구항 1 내지 27 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 대상체의 결장 및/또는 직장에 투여되는, 방법.

청구항 29

청구항 1 내지 28 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 관강내 주사를 통해 투여되는, 방법.

청구항 30

청구항 1 내지 29 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 대상체 결장 벽의 점막하층에 투여되는, 방법.

청구항 31

청구항 1 내지 30 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 대상체 위장관 벽의 다중 부위로 투여되는, 방법.

청구항 32

청구항 1 내지 24 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 정맥내 투여되는, 방법.

청구항 33

청구항 25 내지 31 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 정맥내에도 투여되는, 방법.

청구항 34

청구항 1 내지 33 중 어느 한 항에 있어서, 상기 MLPSC는 중간엽 줄기 세포(MSC)인, 방법.

청구항 35

청구항 1 내지 34 중 어느 한 항에 있어서, 상기 MLPSC는 동종인, 방법.

청구항 36

청구항 9 내지 35 중 어느 한 항에 있어서, 상기 크론 질환은 중등도 내지 중증인, 방법.

청구항 37

청구항 1 내지 36 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체는 300 초과와 CDAI를 갖는, 방법.

청구항 38

청구항 9 내지 37 중 어느 한 항에 있어서, 상기 크론 질환은 누공 크론 질환인, 방법.

청구항 39

청구항 1 내지 31 및 33 내지 38 중 어느 한 항에 있어서, 상기 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포(MLPSC)는 내시경을 통해 투여되는, 방법.

청구항 40

청구항 1 내지 39 중 어느 한 항에 있어서, 1×10^7 개와 2×10^8 개 사이의 세포를 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 41

청구항 1 내지 31 및 33 내지 40 중 어느 한 항에 있어서, 1×10^7 개와 2×10^8 개 사이의 세포를 2, 3, 4, 5, 6 개 이상의 부위에서 대상체의 위장관 벽에 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 42

청구항 1 내지 41 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 혈장-라이트(Plasma-Lyte) A, 디메틸 설펍사이드(DMSO), 인간 혈청 알부민(HSA)을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 43

청구항 1 내지 39 또는 42 중 어느 한 항에 있어서, 7.5×10^7 개 세포를 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 44

청구항 1 내지 39 또는 42 중 어느 한 항에 있어서, 1.5×10^8 개 세포를 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 45

청구항 1 내지 44 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 혈장-라이트 A(70%), DMSO(10%), HSA(25%) 용액을 추가로 포함하고, 상기 HSA 용액은 5% HSA 및 15% 완충액을 포함하는, 방법.

청구항 46

청구항 1 내지 45 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 6.68×10^6 개 초과와 생존 세포/mL을 포함하는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 개시내용은 염증성 장 질환(IBD) 치료 또는 예방을 필요로 하는 대상체에서 염증성 장 질환(IBD)을 치료 또는 예방하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 염증성 장 질환(IBD)은 젊은 성인기에 처음 나타나고 환자의 일생에 걸쳐 영향을 미칠 수 있는 쇠약하게 하는 재발성 병태이다. IBD는 위장관에 염증이 생기는 일련의 장애를 다룬다. IBD의 주요 유형은 염증이 위장관을 따라 모든 장벽의 전체 두께에 영향을 미치는 크론 질환과 염증이 결장 및 직장의 내벽(점막)에 영향을 미치는 궤양성 대장염을 포함한다.

[0003] 크론 질환은 미국에서 거의 200만 명 그리고 전 세계적으로 수백만 명에게 영향을 미치고 있으며, 알려지지 않은 이유로 발병률이 계속 증가하고 있다. 단일클론 항체는 2006년 FDA가 인플릭시맙을 승인한 이후 중등도에서 중증 질환에 대한 의학적 요법의 토대가 되었다. 그러나, 1차 및 2차 무반응과 심각한 기회 감염의 위험에 의해 이들의 유용성이 제한된다. 또한, 생물학은 임상적 개선을 입증하는 데 오랜 시간이 걸릴 수 있다. 따라서, 무반응 환자는 이 기간 동안 대부분 치료되지 않을 수 있으며, 영양실조, 빈혈이 증가하고, 의학적 반응의 평가를 기다리는 동안 이들의 질환의 합병증을 겪을 수 있다.

[0004] 따라서, IBD 및/또는 이와 관련된 병태 또는 증상을 가진 환자에게는 충족되지 않은 치료 필요성이 남아 있으며 새로운 치료 옵션이 요구된다.

발명의 내용

[0005] 발명의 요약

[0006] 본 발명자들은 놀랍게도 적어도 하나의 생물학적 요법에 불응성인 염증성 장 질환을 갖는 대상체에서 조기 질환 관해(28일)가 달성될 수 있음을 확인하였다. 따라서, 첫 번째 예에서, 본 개시내용은 염증성 장 질환 치료 또는 예방을 필요로 하는 대상체에서 염증성 장 질환의 치료 또는 예방 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포(MLPSC)를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하고, 여기서, 대상체는 적어도 하나의 생물학적 요법에 불응성이다. 한 예에서, 대상체는 단일 생물학적 요법에 불응성이다. 다시 말해, 한 예에서, 대상체는 다중 생물학적 요법에 불응성이 아니다.

[0007] 본 발명자들은 또한 놀랍게도 단일 생물학적 요법에 불응성인 염증성 장 질환을 갖는 대상체가 다중 생물학적 제제에 불응성인 염증성 장 질환 대상체보다 더 낮은 수준의 염증을 갖는다는 것을 확인하였다. 결과적으로, 본 발명자들은 다중 생물학에 불응성인 염증성 장 질환 대상체가 CDAI 점수에서 적어도 100점 감소를 달성하기 전에 더 많은 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포(MLPSC)를 요구하는 경향이 있음을 확인하였다. 따라서, 또 다른 예에서, 본 개시내용은 단일 생물학적 요법에 불응성인 인간 대상체에서 염증성 장 질환을 치료 또는 예방하는 방법을 포함하고, 상기 방법은 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포(MLPSC)를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하며, 여기서, 조성물은 6억 개 미만의 세포를 포함한다.

[0008] 또 다른 예에서, 본 개시내용의 방법은 i) 단일 생물학적 요법에 불응성인 염증성 장 질환을 갖는 대상체를 선택하는 단계 및 ii) 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포(MLPSC)를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하며, 여기서, 조성물은 6억 개 미만의 세포를 포함한다. 또 다른 예에서, 본 개시내용의 방법은 i) C-반응성 단백질(CRP) 수준이 25 미만인 염증성 장 질환을 갖는 대상체를 선택하는 단계 및 ii) 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포(MLPSC)를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하며, 여기서, 대상체에게 투여된 총 용량은 6억 개 미만의 세포이다. 한 예에서, 방법은 CRP 수준이 23 미만인 대상체를 선택하는 단계를 포함한다. 또 다른 예에서, 방법은 CRP 수준이 20 미만인 대상체를 선택하는 단계를 포함한다. 또 다른 예에서, 방법은 CRP 수준이 15와 25 사이인 대상체를 선택하는 단계를 포함한다. 또 다른 예에서, 방법은 CRP 수준이 20과 23 사이인 대상체를 선택하는 단계를 포함한다.

[0009] 한 예에서, 생물학적 제제는 항-TNF 요법이다. 또 다른 예에서, 생물학적 요법은 인플릭시맙, 아달리무맙, 세르톨리주맙 페골, 베롤리주맙 또는 우스테키누맙이다. 또 다른 예에서, 생물학적 요법은 인플릭시맙 또는 아달리무맙이다. 한 예에서, 대상체는 또한 아자티오프린, 머캅토프린(6-MP), 메토티렉세이트, 사이클로스포린 또는 스테로이드 중 하나 이상에 불응성이다.

[0010] 한 예에서, 염증성 장 질환은 크론 질환 또는 궤양성 대장염이다. 한 예에서, 염증성 장 질환은 크론 질환이다. 한 예에서, 크론 질환은 대상체의 직장 및/또는 결장에 존재한다. 한 예에서, 대상체는 C-반응성 단백질(CRP) 수준이 23 미만이다. 또 다른 예에서, 대상체는 C-반응성 단백질(CRP) 수준이 20 미만이다.

[0011] 또 다른 예에서, 대상체는 치료 후 적어도 28일에 부분 임상 및/또는 내시경 반응을 갖는다. 또 다른 예에서, 대상체는 치료 후 적어도 28 내지 56일에 부분 임상 및/또는 내시경 반응을 갖는다. 한 예에서, 부분 임상 반응은 다음 중 하나 이상 또는 모두를 특징으로 한다:

[0012] - C-반응성 단백질(CRP)의 25% 초과 감소;

[0013] - CD 활동 지수(CDAI)의 100점 미만의 감소;

[0014] - 염증이 개선된 MR 장조영술을 통해 평가된 방사선학적 치유.

- [0015] 한 예에서, 부분 내시경 반응은 다음 중 하나 또는 둘 모두를 특징으로 한다:
- [0016] - 25% 초과와 크론 질환에 대한 단순 내시경 점수(SES-CD: Simple Endoscopic Score for Crohn Disease) 감소 및 50% 미만의 SES-CD 감소;
- [0017] - 10-15의 SES-CD 점수.
- [0018] 또 다른 예에서, 대상체는 치료 후 적어도 28일에 임상 및/또는 내시경 반응을 갖는다. 또 다른 예에서, 대상체는 치료 후 적어도 28 내지 56일에 임상 및/또는 내시경 반응을 갖는다. 한 예에서, 임상 반응은 다음 중 하나 이상 또는 모두를 특징으로 한다:
- [0019] - CRP의 50% 초과와 감소;
- [0020] - CRP의 정상화;
- [0021] - CDAI의 100점 이상의 하락;
- [0022] - 염증이 개선된 MR 장조영술을 통해 평가된 방사선학적 치유.
- [0023] 한 예에서, 내시경 반응은 다음 중 하나 또는 둘 모두를 특징으로 한다:
- [0024] - SES-CD의 25% 초과 그러나 50% 미만의 감소;
- [0025] - 5-10의 SES-CD 점수.
- [0026] 또 다른 예에서, 대상체는 치료 후 적어도 28일에 임상적 및/또는 내시경적 관해 상태에 있다. 또 다른 예에서, 대상체는 치료 후 적어도 28 내지 56일에 임상적 및/또는 내시경적 관해 상태에 있다. 한 예에서, 임상적 관해는 다음 중 하나 또는 둘 모두를 특징으로 한다:
- [0027] - 리터당 2.87 mg 미만으로 CRP의 정상화;
- [0028] - 염증이 개선된 MR 장조영술을 통해 평가된 방사선학적 치유.
- [0029] 한 예에서, 내시경적 관해는 다음 중 하나 또는 둘 모두를 특징으로 한다:
- [0030] - 점막 궤양의 부재;
- [0031] - 0-5의 SES-CD 점수.
- [0032] 또 다른 예에서, 조성물은 대상체의 위장관 벽에 투여된다. 한 예에서, 조성물은 대상체 위장관 벽의 점막하층에 투여된다. 한 예에서, 조성물은 대상체 위장관 벽의 염증 부위에 투여된다. 또 다른 예에서, 조성물은 대상체의 결장 및/또는 직장에 투여된다. 또 다른 예에서, 조성물은 관강내 주사를 통해 투여된다. 한 예에서, 조성물은 대상체 결장 벽의 점막하층에 투여된다. 한 예에서, 조성물은 대상체 위장관 벽의 다중 부위에 투여된다. 한 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포(MLPSC)는 내시경을 통해 투여된다.
- [0033] 또 다른 예에서, 조성물은 정맥내 투여된다. 한 예에서, 조성물은 대상체의 위장관 벽에 그리고 정맥내 투여된다.
- [0034] 한 예에서, MLPSC는 중간엽 줄기 세포(MSC)이다. 또 다른 예에서, MLPSC는 동종이다. 예를 들어, MLPSC는 동종 MSC일 수 있다.
- [0035] 한 예에서, 대상체 크론 질환은 중등도 내지 중증이다. 한 예에서, 대상체는 300 초과와 CDAI를 가질 수 있다. 한 예에서, 대상체 크론 질환은 누공 크론 질환이다.
- [0036] 한 예에서, 본 개시내용의 방법은 1×10^7 개와 2×10^8 개 사이의 세포를 투여하는 단계를 포함한다. 예를 들어, 1×10^7 개와 2×10^8 개 사이의 세포의 3회 용량이 투여될 수 있다. 한 예에서, 본 개시내용의 방법은 2, 3, 4, 5, 6개 이상의 부위에서 대상체의 위장관 벽에 1×10^7 개와 2×10^8 개 사이의 세포를 투여하는 단계를 포함한다. 한 예에서, 7.5×10^7 개의 세포가 투여된다. 또 다른 예에서, 1.5×10^8 개의 세포가 투여된다.
- [0037] 또 다른 예에서, 조성물은 혈장-라이트(Plasma-Lyte) A, 디메틸 설폭사이드(DMSO), 인간 혈청 알부민(HSA)을 추가로 포함한다. 한 예에서, 조성물은 혈장-라이트 A(70%), DMSO(10%), HSA(25%) 용액을 추가로 포함하고, HSA 용액은 5% HSA 및 15% 완충액을 포함한다.

[0038] 한 예에서, 조성물은 6.68×10^6 개 초과와 생존 세포/mL를 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0039] **도 1:** 28일차에 CDAI 점수 150 이하를 달성한 환자의 백분율. FAS: 모든 무작위 배정, 적어도 1회의 치료, 적어도 1회의 기준선 후 평가; PP: 주요 프로토콜 이벤트가 없는 모든 FAS.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0040] 본 명세서 전반에 걸쳐, 달리 구체적으로 언급되지 않거나 문맥에서 달리 요구하지 않는 한, 단일 단계, 물질의 조성, 단계의 그룹 또는 물질의 조성의 그룹에 대한 언급은 하나 및 복수(즉, 하나 이상)의 이러한 단계, 물질의 조성, 단계의 그룹 또는 물질의 조성의 그룹을 포함하는 것으로 간주되어야 한다.

[0041] 당업자는 본원에 기재된 개시내용이 구체적으로 기재된 것 이외의 변경 및 변형이 가능하다는 것을 인식할 것이다. 본 개시내용은 그러한 모든 변경 및 변형을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 본 개시내용은 또한 개별적으로 또는 집합적으로 본 명세서에서 언급되거나 나타낸 모든 단계, 특징, 조성 및 화합물, 및 상기 단계 또는 특징 중 임의의 및 모든 조합 또는 임의의 둘 이상을 포함한다.

[0042] 본 개시내용은 예시 목적으로만 의도된 본원에 기재된 특정 구현예에 의해 범위가 제한되지 않는다. 기능적으로 동등한 제품, 조성물 및 방법은 명백히 본원에 기재된 바와 같이 본 개시내용의 범위 내에 있다.

[0043] 본원에 개시된 임의의 예는, 달리 구체적으로 언급되지 않는 한, 임의의 다른 예에 필요한 변경을 가하여 취해야 한다.

[0044] 달리 구체적으로 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는 것으로 간주되어야 한다(예를 들어, 세포 배양, 분자 유전학, 줄기 세포 분화, 면역학, 면역조직화학, 단백질 화학 및 생화학에서).

[0045] 달리 나타내지 않는 한, 본 개시내용에서 사용되는 수술 기술은 당업자에게 잘 알려진 표준 절차이다.

[0046] 중간엽 계통 줄기 또는 전구체 세포의 집단을 얻고 풍부화하는 방법은 당업계에 알려져 있다. 예를 들어, 중간엽 계통 줄기 또는 전구체 세포의 풍부화된 집단은 중간엽 계통 줄기 또는 전구체 세포에서 발현되는 세포 표면 마커의 사용을 기반으로 하는 유세포 분석 및 세포 분류 절차를 사용하여 얻을 수 있다.

[0047] 본원에 인용되거나 참조된 모든 문서, 및 본원에 인용된 문서에 인용되거나 참조된 모든 문서는 본원에 언급된 임의의 제품에 대한 임의의 제조업체의 지침, 설명, 제품 사양 및 제품 시트와 함께, 또는 본원에 참조로 포함된 임의의 문서에서 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

선택된 정의

[0049] 용어 "및/또는", 예를 들어, "X 및/또는 Y"는 "X 및 Y" 또는 "X 또는 Y"를 의미하는 것으로 이해되어야 하며 두 의미 또는 어느 한 의미에 대한 명시적 지원을 제공하는 것으로 간주되어야 한다.

[0050] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 약은, 달리 언급되지 않는 한, 지정된 값의 +/- 10%, 보다 바람직하게는 +/- 5%를 지칭한다.

[0051] 본 명세서 전반에 걸쳐, "포함하다"라는 용어 또는 "포함하다" 또는 "포함하는"과 같은 변형은 언급된 요소, 정수 또는 단계, 또는 요소의 그룹, 정수 또는 단계의 포함을 암시하지만, 임의의 다른 요소, 정수 또는 단계, 또는 요소의 그룹, 정수 또는 단계의 배제를 암시하는 것으로 이해되지 않는다.

[0052] 본원에 사용된 바와 같이, 단수형 "a", "an" 및 "the"는 문맥에서 달리 나타내지 않는 한 단수 및 복수 참조를 포함한다.

[0053] "단리된" 또는 "정제된"이란, 이의 자연 환경의 적어도 일부 성분으로부터 단리된 세포를 의미한다. 이 용어는 이의 자연 환경으로부터 세포를 물리적으로 완전히 분리하는 것을 포함한다(예를 들어, 공여자로부터 제거). 용어 "단리된"은, 예를 들어, 해리에 의해 직접적으로 인접한 세포와의 세포 관계의 변경을 포함한다. 용어 "단리된"은 조직 절편에 있는 세포를 지칭하지 않는다. 세포 집단을 지칭하기 위해 사용되는 경우, 용어 "단리된"은 본 개시내용의 단리된 세포의 증식으로부터 생성된 세포 집단을 포함한다.

[0054] 용어 "계대", "계대하는" 또는 "계대-배양(sub-culture)"은 세포 수가 지속적으로 증가할 수 있도록 장기간 동

안 배양 조건 하에 세포를 생존 및 성장시키는 데 사용되는 알려진 세포 배양 기술을 지칭하기 위해 본 개시내용의 맥락에서 사용된다. 세포주가 계대-배양되는 정도는 종종 "계대수"로서 표현되며 이는 일반적으로 세포가 계대-배양된 횟수를 지칭하는 데 사용된다. 한 예에서, 한 계대는 비부착 세포를 제거하고 부착 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포를 남기는 것을 포함한다. 이어서, 그러한 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 기질 또는 플라스크로부터 분리될 수 있고(예를 들어, 트립신 또는 콜라게나제와 같은 프로테아제를 사용함으로써), 배지가 첨가될 수 있고, 임의의 세척(예를 들어, 원심분리에 의해)을 수행한 다음, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 총 표면적이 더 큰 하나 이상의 배양 용기에 재도말되거나 재시딩될 수 있다. 이어서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 배양시 계속 확장할 수 있다. 또 다른 예에서, 비부착 세포를 제거하는 방법은 비효소 처리 단계(예를 들어, EDTA를 사용)를 포함한다. 한 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 컨플루언스(예를 들어, 약 75% 내지 약 95% 컨플루언스)에서 또는 그 근처에서 계대된다. 한 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 배양 배지 ml당 약 10%, 약 15% 또는 약 20% 세포의 농도로 시딩된다.

[0055] 본 개시내용의 맥락에서 사용된 용어 "배지" 또는 "배지들"은 배양물에서 세포를 둘러싼 환경의 성분을 포함한다. 배지는 세포가 성장하도록 하는 데 적합한 조건에 기여 및/또는 제공하는 것으로 예상된다. 배지는 고체, 액체, 가스 또는 상과 물질의 혼합물일 수 있다. 배지는 액체 성장 배지만 아니라 세포 성장을 지속하지 않는 액체 배지를 포함할 수 있다. 예시적인 가스 배지는 페트리 접시 또는 다른 고체 또는 반고체 지지체 상에서 성장하는 세포가 노출되는 가스상을 포함한다.

[0056] 용어 "위장관" 또는 "GI 관"은 입에서 항문까지 이어지는 인간 기관계를 포함한다. 위장관은 입, 식도, 위 및 내장을 포함한다. 따라서, 본 개시내용에서 위장관의 벽에 대한 언급은 입, 식도, 위 및 내장의 벽을 포함한다. 의식을 피하기 위해, 용어 "장"은 결장 및 직장을 포함한다.

[0057] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "치료하는", "치료하다" 또는 "치료"는 중간엽 계통 줄기 또는 전구체 세포 및/또는 이의 자손 및/또는 이로부터 유래된 가용성 인자의 집단을 투여하여 염증성 장 질환의 적어도 하나의 증상을 감소 또는 제거하는 것을 포함한다. 한 예에서, 치료는 배양 확장된 중간엽 계통 줄기 또는 전구체 세포의 집단에 투여하는 것을 포함한다. 한 예에서, 치료는 부분 임상 및/또는 내시경 반응을 유도한다. 한 예에서, 부분 임상 및/또는 내시경 반응은 치료 후 적어도 25일에 유도된다. 한 예에서, 부분 임상 및/또는 내시경 반응은 치료 후 적어도 28일에 유도된다. 한 예에서, 부분 임상 및/또는 내시경 반응은 치료 후 적어도 30일에 유도된다. 한 예에서, 부분 임상 및/또는 내시경 반응은 치료 후 적어도 35일에 유도된다. 또 다른 예에서, 부분 임상 및/또는 내시경 반응은 치료 후 적어도 28 내지 65일에 유도된다. 또 다른 예에서, 부분 임상 및/또는 내시경 반응은 치료 후 적어도 28 내지 56일에 유도된다.

[0058] 한 예에서, 부분 임상 반응은 다음 중 하나 이상 또는 모두를 특징으로 한다:

[0059] - C-반응성 단백질(CRP)의 25% 초과 감소;

[0060] - CD 활동 지수(CDAI)의 100점 미만의 감소;

[0061] - 염증이 개선된 MR 장조영술을 통해 평가된 방사선학적 치유.

[0062] 한 예에서, 부분 내시경 반응은 다음 중 하나 또는 둘 모두를 특징으로 한다:

[0063] - 25% 초과 크론 질환에 대한 단순 내시경 점수(SES-CD) 감소 및 50% 미만의 SES-CD 감소;

[0064] - 10-15의 SES-CD 점수.

[0065] 한 예에서, 치료는 임상 및/또는 내시경 반응을 유도한다. 한 예에서, 임상 및/또는 내시경 반응은 치료 후 적어도 25일에 유도된다. 한 예에서, 임상 및/또는 내시경 반응은 치료 후 적어도 28일에 유도된다. 한 예에서, 임상 및/또는 내시경 반응은 치료 후 적어도 30일에 유도된다. 한 예에서, 임상 및/또는 내시경 반응은 치료 후 적어도 35일에 유도된다. 또 다른 예에서, 임상 및/또는 내시경 반응은 치료 후 적어도 28일 내지 65일에 유도된다. 또 다른 예에서, 임상 및/또는 내시경 반응은 치료 후 적어도 28일 내지 56일에 유도된다.

[0066] 한 예에서, 임상 반응은 다음 중 하나 이상 또는 모두를 특징으로 한다:

[0067] - CRP의 50% 초과 감소;

[0068] - CRP의 정상화;

[0069] - CDAI의 100점 이상의 하락;

- [0070] - 염증이 개선된 MR 장조영술을 통해 평가된 방사선학적 치유.
- [0071] 한 예에서, 내시경 반응은 다음 중 하나 또는 둘 모두를 특징으로 한다:
- [0072] - SES-CD의 25% 초과 그러나 50% 미만의 감소;
- [0073] - 5-10의 SES-CD 점수.
- [0074] 한 예에서, 치료는 임상적 및/또는 내시경적 관해를 유도한다. 한 예에서, 임상적 및/또는 내시경적 관해는 치료 후 적어도 25일에 유도된다. 한 예에서, 임상적 및/또는 내시경적 관해는 치료 후 적어도 28일에 유도된다. 한 예에서, 임상적 및/또는 내시경적 관해는 적어도 30일에 유도된다. 한 예에서, 임상적 및/또는 내시경적 관해는 적어도 35일에 유도된다. 또 다른 예에서, 임상적 및/또는 내시경적 관해는 적어도 28 내지 65일에 유도된다. 또 다른 예에서, 임상적 및/또는 내시경적 관해는 적어도 28 내지 56일에 유도된다
- [0075] 한 예에서, 임상적 관해는 다음 중 하나 이상 또는 모두를 특징으로 한다:
- [0076] - 리터당 2.87 mg 미만으로 CRP의 정상화;
- [0077] - 염증이 개선된 MR 장조영술을 통해 평가된 방사선학적 치유.
- [0078] 한 예에서, 내시경적 관해는 다음 중 하나 또는 둘 모두를 특징으로 한다:
- [0079] - 점막 궤양의 부재;
- [0080] - 0-5의 SES-CD 점수.
- [0081] 한 예에서, 치료는 기준선 값(즉, 중간엽 계통 줄기 또는 전구체 세포 및/또는 이의 자손 및/또는 이로부터 유래된 가용성 인자의 투여 전 또는 대조군)에 비해 감소된 C-반응성 단백질(CRP); 감소된 CD 활동 지수(CDAI); MR 장조영술을 통해 평가된 방사선학적 치유; 감소된 크론 질환에 대한 단순 내시경 점수(SES-CD)를 유도할 수 있다.
- [0082] 한 예에서, 치료 반응은 기준선에 대해 결정된다. 한 예에서, 기준선은 단일 생물학적 요법이 실패했을 때 또는 그 시기에 결정된 수준이다.
- [0083] 본원에 사용된 용어 "예방하다" 또는 "예방하는"은 중간엽 계통 줄기 또는 전구체 세포 및/또는 이의 자손 및/또는 이로부터 유래된 가용성 인자의 집단을 투여하여 염증성 장 질환의 적어도 하나의 증상의 발병을 중지 또는 억제하는 것을 포함한다.
- [0084] 본 개시내용의 맥락에서 사용된 용어 "염증성 장 질환"(IBD)은 위장관의 염증성 질환, 예컨대 궤양성 대장염(UC), 과민성 장 증후군, 과민성 결장 증후군 크론 대장염 및 크론 질환(CD)을 지칭한다.
- [0085] 용어 "궤양성 대장염(UC)"은 경도 내지 중등도 궤양성 대장염을 포함할 수 있다. 경도 내지 중등도 궤양성 대장염은 다음 중 하나 이상 또는 모두를 특징으로 할 수 있다:
- [0086] - 궤양성 대장염-질환 활동 지수(UC-DAI)에서 4-10의 점수;
- [0087] - 4 초과의 S상 결장경검사 점수;
- [0088] - 2 초과의 의사의 종합 평가(PGA) 점수.
- [0089] "크론 질환 활동 지수(CDAI 점수)"는 크론 질환을 가진 환자의 증상을 정량화하기 위해 1976년에 일리노이주 중서부 지역 건강 센터의 WR Best와 동료에 의해 개발된 연구 도구이다. 지수는 크론 질환 활성을 평가하기 위해 가장 널리 사용되는 도구이며(Sandbom 등 (2002) Gastroenterology., 122:512-530), 8개의 인자/변수로 이루어진다. 8개의 변수는 가중 인자로 조정된 후 합산된다. CDAI의 구성요소와 가중 인자는 다음 표에 나타낸다:

임상 또는 실험실 변수	가중치 인자
액체 또는 묽은 대변의 수 (7 일 동안의 매일의 합)	X2
복통 (중증도에 따라 0-3 등급) (7 일 동안의 매일의 합)	X5
전반적인 웰빙, 주관적으로 0(좋음)에서 4(끔찍함)까지 평가됨 (7 일 동안의 매일의 합)	X7
크론 질환 합병증의 존재	X20
지난 주 동안 설사에 디페녹실레이트 또는 로페라미드 사용 (0 = 사용하지 않음, 1 = 사용함)	X30
복부 종괴의 존재 (0: 없음, 2: 의심, 5: 확실)	X10
헤마토크리트의 절대 편차는 남성의 경우 47%이고 여성의 경우 42%임	X6
표준 체중으로부터의 백분율 편차	X1

[0090]

[0091]

총 CDAI 점수는 0 내지 대략 600의 범위이며, 여기서, 점수가 높을수록 질환이 더 활성화이다. 한 예에서, 150점 미만의 CDAI 점수는 크론 질환의 "임상적 관해"를 나타낸다. 한 예에서, 150점과 219점 사이는 "활성 정도 크론 질환"을 나타낸다. 한 예에서, 220점과 450점 사이는 "활성 중증도 크론 질환"을 나타낸다. 한 예에서, 450점 초과는 "활성 중증 크론 질환"을 나타낸다.

[0092]

한 예에서, 치료는 CDAI의 50점 이상의 하락을 유도한다. 또 다른 예에서, 치료는 CDAI의 75점 이상의 하락을 유도한다. 또 다른 예에서, 치료는 CDAI의 90점 이상의 하락을 유도한다. 또 다른 예에서, 치료는 CDAI의 100점 이상의 하락을 유도한다. 또 다른 예에서, 치료는 CDAI의 150점 이상의 하락을 유도한다. 또 다른 예에서, 치료는 CDAI의 50 내지 150점의 하락을 유도한다. 또 다른 예에서, 치료는 CDAI의 75 내지 125점의 하락을 유도한다. 또 다른 예에서, 치료는 CDAI의 90 내지 110점의 하락을 유도한다.

[0093]

"C-반응성 단백질" 또는 "CRP"는 염증 매개체로, 그 수준은 급성 염증 재발의 조건 하에 상승하고 염증이 가라앉으면 신속하게 정상화된다. 한 예에서, 본 개시내용에 따라 치료된 대상체는 초기 CRP 수준이 25 미만이다. 또 다른 예에서, 대상체는 초기 CRP 수준이 23 미만이다. 또 다른 예에서, 대상체는 초기 CRP 수준이 20 미만이다. 또 다른 예에서, 대상체는 초기 CRP 수준이 18과 25 사이이다. 또 다른 예에서, 대상체는 초기 CRP 수준이 20과 23 사이이다. 예를 들어, 단일 생물학적 요법에 실패한 대상체는 본 개시내용에 따라 치료되기 전에 상기 언급된 CRP 수준을 가질 수 있다. 예를 들어, 단일 생물학적 요법에 실패한 대상체는 본 개시내용에 따라 치료되기 전에 CRP 수준이 23 미만일 수 있다.

[0094]

한 예에서, 치료는 기준선으로부터 CRP를 20% 초과까지 감소시킨다. 또 다른 예에서, 치료는 기준선으로부터 CRP를 30% 초과까지 감소시킨다. 또 다른 예에서, 치료는 기준선으로부터 CRP를 40% 초과까지 감소시킨다. 또 다른 예에서, 치료는 기준선으로부터 CRP를 50% 초과까지 감소시킨다. 또 다른 예에서, 치료는 기준선으로부터 CRP를 60% 초과까지 감소시킨다. 또 다른 예에서, 치료는 기준선으로부터 CRP를 20% 내지 60%까지 감소시킨다. 또 다른 예에서, 치료는 기준선으로부터 CRP를 30% 내지 50%까지 감소시킨다. 또 다른 예에서, 치료는 CRP를 리터당 2.95 mg 미만으로 감소시킨다. 또 다른 예에서, 치료는 CRP를 리터당 2.87 mg 미만으로 감소시킨다. 또 다른 예에서, 치료는 대상체의 CRP 수준을 정상화한다.

[0095]

한 예에서, 치료는 0-5의 SES-CD 점수를 제공한다. 또 다른 예에서, 치료는 5-10의 SES-CD 점수를 제공한다. 또 다른 예에서, 치료는 10-15의 SES-CD 점수를 제공한다. 또 다른 예에서, 치료는 0-15의 SES-CD 점수를 제공한다.

[0096]

한 예에서, 본 개시내용의 방법은 대상체에서 질환 진행 또는 질환 합병증을 억제한다. 대상체에서 질환 진행 또는 질환 합병증의 "억제"는 대상체에서 질환 진행 및/또는 질환 합병증을 예방 또는 감소시키는 것을 의미한다.

- [0097] 본원에 사용된 용어 "대상체"는 인간 대상체를 지칭한다. 예를 들어, 대상체는 성인일 수 있다. 또 다른 예에서, 대상체는 어린이일 수 있다. 또 다른 예에서, 대상체는 청소년일 수 있다. "대상체", "환자" 또는 "개체"와 같은 용어는 맥락에서 본 개시내용에서 상호교환적으로 사용될 수 있는 용어이다.
- [0098] 본 개시내용에 따라 치료된 대상체는 염증성 장 질환을 나타내는 증상을 가질 수 있다. 예를 들어, 대상체는 염증성 장 질환을 나타내는 위장 증상을 가질 수 있다. 예시적인 위장 증상은 설사, 변비, 메스꺼움, 구토, 고창(flatulence), 경련, 팽만감, 복통, 지방변, 직장 출혈을 포함한다. 한 예에서, 본 개시내용에 따라 치료된 대상체는 피로, 허약 및 혼수, 철 결핍, 빈혈, 비타민 및 미네랄 결핍, 성장 실패, 지연된 사춘기, 체중 감소, 골 및 관절 통증, 재발성 구강 궤양 및/또는 입 또는 혀의 부기, 변화된 정신적 각성 및 과민성, 피부염과 같은 피부 발진, 포진, 피부의 쉬운 타박상 및 규칙적인 역류(regular reflux)로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 증상을 나타낼 수 있다. 한 예에서, 대상체는 이전에 적어도 하나의 항-TNF 요법에 실패한 적이 있다. 한 예에서, 대상체는 생물학적 요법에 대한 금기(contra-indication)를 갖는다.
- [0099] 또 다른 예에서, 대상체는 18-75세이다. 또 다른 예에서, 대상체는 크론 질환을 가진다. 또 다른 예에서, 대상체는 궤양성 대장염을 가진다. 또 다른 예에서, 대상체는 크론 질환 및 궤양성 대장염을 가진다. 또 다른 예에서, 대상체 크론 질환은 대상체의 장에 나타난다. 또 다른 예에서, 대상체 크론 질환은 대상체의 직장 및/또는 결장에 나타난다.
- [0100] 또 다른 예에서, 대상체는 적어도 6개월 기간 동안 크론 질환을 가진다. 또 다른 예에서, 대상체 크론 질환은 중등도 내지 중증이다. 또 다른 예에서, 대상체 크론 질환은 누공 크론 질환이다(예를 들어 문헌(Gecse 등 2013 United European Gastroenterol J., 1:206-213) 참조).
- [0101] 또 다른 예에서, 대상체는 CDAI가 200 초과이다. 또 다른 예에서, 대상체는 CDAI가 250 초과이다. 또 다른 예에서, 대상체는 CDAI가 300 초과이다. 또 다른 예에서, 대상체는 CDAI가 200과 450 사이이다. 또 다른 예에서, 대상체는 CDAI가 250과 400 사이이다. 또 다른 예에서, 대상체는 CDAI가 300과 400 사이이다.
- [0102] 또 다른 예에서, 본 개시내용의 방법은 활성 경도 크론 질환을 가진 대상체를 예방 또는 치료한다. 또 다른 예에서, 본 개시내용의 방법은 활성 중등도 크론 질환을 가진 대상체를 예방 또는 치료한다. 또 다른 예에서, 본 개시내용의 방법은 활성 중증 크론 질환을 가진 대상체를 예방 또는 치료한다. 또 다른 예에서, 본 개시내용의 방법은 활성 중등도 또는 중증 크론 질환을 가진 대상체를 예방 또는 치료한다.
- [0103] 한 예에서, 본 개시내용의 방법에 따라 치료된 대상체는 적어도 하나의 생물학적 요법에 불응성이다. 한 예에서, 본 개시내용의 방법에 따라 치료된 대상체는 단일 생물학적 요법에 불응성이다. 예를 들어, 본 개시내용의 방법은 생물학적 요법에 불응성인 활성 중등도 크론 질환인 대상체를 예방 또는 치료하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 대상체 크론 질환은 TNF-알파 길항제에 불응성일 수 있다.
- [0104] 특정 예에서, 대상체는 또한 염증성 장 질환에 대한 다른 치료에 불응성일 수 있다. 한 예에서, 대상체는 적어도 하나의 생물학적 요법 및 아자티오프린, 머캅토피린(6-MP), 메토티렉세이트, 사이클로스포린 또는 스테로이드 중 하나 이상에 불응성일 수 있다. 또 다른 예에서, 대상체는 단일 생물학적 요법 및 아자티오프린, 머캅토피린(6-MP), 메토티렉세이트, 사이클로스포린 또는 스테로이드 중 하나 이상에 불응성일 수 있다.
- [0105] 본원에 사용된 용어 "불응성"은 본 개시내용의 맥락에서 "생물학적 요법"과 같은 특정 치료, 예를 들어, 인플릭시맵 또는 아달리무맵과 같은 생물학적 제제를 사용한 치료에 실패하거나 내성이 있는 대상체를 지칭하기 위해 사용된다. 한 예에서, 의학적 관리에서 다음 단계가 의학적 관리의 확대인 경우, 대상체는 생물학적 요법에 불응성이다. 한 예에서, 의학적 관리에서 다음 단계가 대체 생물학적 요법인 경우, 대상체는 생물학적 요법에 불응성이다. 또 다른 예에서, 의학적 관리에서 다음 단계가 결장아전절제술(subtotal colectomy)인 경우, 대상체는 생물학적 요법에 불응성이다. 한 예에서, 대상체는 단일 생물학적 요법에 불응성이다. 이 예에서, 대상체는 하나 초과 생물학적 요법으로 치료받지 않았다.
- [0106] 용어 "생물학적 요법"은 살아있는 생물학적 유기체로부터 유래되거나 합성된 재조합 단백질을 지칭하기 위해 본 개시내용의 맥락에서 사용된다. 한 예에서, 생물학적 요법은 크론 대장염과 같은 염증성 장 질환과 같은 염증병태의 치료에 사용된다. 한 예에서, 생물학적 요법은 항체이다. 예를 들어, 생물학적 요법은 단일클론 항체일 수 있다. 또 다른 예에서, 생물학적 요법은 항-TNF 요법이다. 본 개시내용에 의해 포함된 생물학적 요법의 예는 인플릭시맵, 아달리무맵, 세르톨리주맵 페골, 베돌리주맵 또는 우스테키누맵을 포함한다. 따라서, 한 예에서, 본 개시내용에 의해 포함된 대상체는 인플릭시맵, 아달리무맵, 세르톨리주맵 페골, 베돌리주맵 또는 우스테키누맵에 불응성일 수 있다.

- [0107] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "유전적으로 비변형된"은 핵산으로 형질감염에 의해 변형되지 않은 세포를 지칭한다. 의심의 여지를 피하기 위해, 본 개시내용의 맥락에서, AngI를 암호화하는 핵산으로 형질감염된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 유전적으로 변형된 것으로 간주될 수 있다.
- [0108] 용어 "총 용량"은 본 개시내용에 따라 치료된 대상체에 의해 수용된 세포의 총 수를 지칭하기 위해 본 개시내용의 맥락에서 사용된다. 한 예에서, 총 용량은 세포의 1회 투여로 이루어진다. 또 다른 예에서, 총 용량은 세포의 2회 투여로 이루어진다. 또 다른 예에서, 총 용량은 세포의 3회 투여로 이루어진다. 또 다른 예에서, 총 용량은 세포의 4회 이상의 투여로 이루어진다. 예를 들어, 총 용량은 세포의 2 내지 4회 투여로 이루어질 수 있다.
- [0109] 중간엽 계통 전구체 세포
- [0110] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포 (MLPSC)"는 다분화능을 유지하면서 자가 재생 능력 및 중간엽 기원의 다수의 세포 유형으로 분화하는 능력을 갖는 미분화 다능성 세포, 예를 들어, 조골 세포, 연골세포, 지방세포, 기질 세포, 섬유아세포 및 힘줄, 또는 비-중배엽 기원, 예를 들어, 간세포, 신경 세포 및 상피 세포를 지칭한다. 의심의 여지를 피하기 위해, "중간엽 계통 전구체 세포"는 골, 연골, 근육 및 지방 세포, 및 섬유 결합 조직과 같은 중간엽 세포로 분화할 수 있는 세포를 지칭한다.
- [0111] 용어 "중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포"는 모 세포(parent cell) 및 이들의 미분화 자손 둘 모두를 포함한다. 용어는 또한 중간엽 전구체 세포, 다능성 기질 세포, 중간엽 줄기 세포(MSC), 혈관주위 중간엽 전구체 세포, 및 이들의 미분화 자손을 포함한다.
- [0112] 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 자가, 동종, 이종, 동계 또는 동유전자형일 수 있다. 자가 세포는 이들이 재이식될 동일한 개체로부터 단리된다. 동종 세포는 동일한 종의 공여자로부터 단리된다. 이종 세포는 또 다른 종의 공여자로부터 단리된다. 동계 또는 동유전자형 세포는 쌍둥이, 클론 또는 고도로 근친 교배된 연구 동물 모델과 같이 유전적으로 동일한 유기체로부터 단리된다.
- [0113] 한 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 동종이다. 한 예에서, 동종 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 배양 확장되고 동결보존된다.
- [0114] 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 주로 골수에 존재하지만, 또한, 예를 들어, 체대혈 및 탯줄, 성인 말초혈, 지방 조직, 소주골(trabecular bone) 및 치수(dental pulp)를 포함한 다양한 숙주 조직에도 존재하는 것으로 나타났다. 이들은 또한 피부, 비장, 췌장, 뇌, 콩팥, 간, 심장, 망막, 뇌, 모낭, 장, 폐, 림프절, 흉선, 인대, 힘줄, 골격근, 진피 및 골막에서 발견되고; 중배엽 및/또는 내배엽 및/또는 외배엽과 같은 생식선으로 분화할 수 있다. 따라서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 지방, 골성, 연골, 탄력, 근육 및 섬유 결합 조직을 포함하지만 이에 제한되지 않는 다수의 세포 유형으로 분화할 수 있다. 이들 세포가 진입하는 특정 계통-결정(lineage-commitment) 및 분화 경로는 기계적 영향 및/또는 내인성 생리 활성 인자, 예컨대 성장 인자, 사이토카인 및/또는 숙주 조직에 의해 설정된 국소 미세환경 조건으로부터 다양한 영향에 따라 달라진다.
- [0115] 용어 "풍부화된", "풍부화" 또는 이의 변형은 하나의 특정 세포 유형의 비율 또는 다수의 특정 세포 유형의 비율이 처리되지 않은 세포 집단(예를 들어, 이들의 천연 환경에서의 세포)과 비교할 때 증가된 세포 집단을 설명하기 위해 본원에서 사용된다. 한 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포가 풍부한 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% 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포를 포함한다. 이와 관련하여, "중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포가 풍부한 세포 집단"이라는 용어는 "X% 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포를 포함하는 세포 집단"이라는 용어에 대한 명시적 지원을 제공하는 것으로 간주될 것이며, 여기서, X%는 본원에 인용된 백분율이다. 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 일부 예에서 클론원성 콜로니를 형성할 수 있으며, 예를 들어, CFU-F(섬유아세포) 또는 이의 하위세트(예를 들어, 50% 또는 60% 또는 70% 또는 70% 또는 90% 또는 95%)는 이러한 활성을 가질 수 있다.
- [0116] 본 개시내용의 한 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 중간엽 줄기 세포(MSC)이다. MSC는 균질한 조성일 수 있거나 MSC가 풍부한 혼합 세포 집단일 수 있다. 균질한 MSC 조성은 부착성 골수 또는 골막 세포를 배양하여 얻을 수 있으며, MSC는 독특한 단일클론 항체로 식별되는 특정 세포 표면 마커에 의해 식별될 수 있다. MSC가 풍부한 세포 집단을 얻는 방법은, 예를 들어, 미국 특허 번호 5,486,359에 기재되어 있다. MSC에 대한 대체 공급원은 혈액, 피부, 체대혈, 근육, 지방, 골 및 연골막을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 한 예에서, MSC는 동종이다. 한 예에서, MSC는 동결보존된다. 한 예에서, MSC는 배양 확장되고 동결보존된다.

- [0117] 또 다른 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 CD29+, CD54+, CD73+, CD90+, CD102+, CD105+, CD106+, CD166+, MHC1+ MSC이다.
- [0118] 단리된 또는 풍부화된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 배양에 의해 시험관내에서 확장될 수 있다. 단리된 또는 풍부화된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 동결보존, 해동 및 이후에 배양에 의해 시험관내에서 확장될 수 있다.
- [0119] 한 예에서, 단리된 또는 풍부화된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 배양 배지(무혈청 또는 혈청-보충된), 예를 들어, 5% 소 태아 혈청(FBS) 및 글루타민이 보충된 알파 최소 필수 배지(α MEM)에 50,000개 생존 세포/cm²로 시딩되고 37°C, 20% O₂에서 밤새 배양 배지에 부착되도록 한다. 배양 배지는 이후에 필요에 따라 교체 및/또는 변경하고 세포를 37°C, 5% O₂에서 추가로 68 내지 72시간 동안 배양한다.
- [0120] 당업자에 의해 인식되는 바와 같이, 배양된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 생체내 세포와 표현형적으로 상이하다. 예를 들어, 한 구현예에서, 이들은 다음 마커 중 하나 이상을 발현한다: CD44, NG2, DC146 및 CD140b. 배양된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 또한 생체내 세포와 생물학적으로 상이하며, 생체내 대부분의 비순환(정지) 세포에 비해 증식 속도가 더 높다.
- [0121] 한 예에서, 세포 집단은 선택 가능한 형태의 STRO-1+ 세포를 포함하는 세포 제제로부터 풍부화된다. 이와 관련하여, 용어 "선택 가능한 형태"는 세포가 STRO-1+ 세포의 선택을 허용하는 마커(예를 들어, 세포 표면 마커)를 발현함을 의미하는 것으로 이해될 것이다. 마커는 STRO-1일 수 있지만 그럴 필요는 없다. 예를 들어, 본원에 기재되고/되거나 예시된 바와 같이, STRO-2 및/또는 STRO-3(TNAP) 및/또는 STRO-4 및/또는 VCAM-1 및/또는 CD146 및/또는 3G5를 발현하는 세포(예를 들어, 중간엽 전구체 세포)도 STRO-1을 발현한다 (그리고 STRO-1 브라이트일 수 있음). 따라서, 세포가 STRO-1+라는 표시는 세포가 STRO-1 발현에 의해서만 선택된다는 것을 의미하지 않는다. 한 예에서, 세포는 적어도 STRO-3 발현에 기반하여 선택되며, 예를 들어, 세포는 STRO-3+(TNAP+)이다.
- [0122] 세포 또는 이의 집단의 선택에 대한 언급은 반드시 특정 조직 공급원으로부터의 선택을 필요로 하지 않는다. 본원에 기재된 바와 같이, STRO-1+ 세포는 매우 다양한 공급원으로부터 선택되거나 이로부터 단리되거나 이로부터 풍부화될 수 있다. 즉, 일부 예에서, 이러한 용어는 STRO-1+ 세포(예를 들어, 중간엽 전구체 세포)를 포함하는 임의의 조직 또는 혈관화된 조직 또는 혈관주위세포(예를 들어, STRO-1 + 혈관주위세포)를 포함하는 조직 또는 본원에 인용된 임의의 하나 이상의 조직으로부터 선택을 위한 지원을 제공한다.
- [0123] 한 예에서, 본 개시내용에 사용된 세포는 하기로 이루어진 그룹으로부터 개별적으로 또는 집합적으로 선택된 하나 이상의 마커를 발현한다: TNAP+, VCAM-1 +, THY-1+, STRO-2+, STRO-4+ (HSP-90 β), CD45+, CD146+, 3G5+ 또는 이들의 임의의 조합.
- [0124] "개별적으로"란 본 개시내용이 인용된 마커 또는 마커 그룹을 별도로 포함하며 개별 마커 또는 마커 그룹이 본원에 별도로 나열되지 않을 수 있음에도 불구하고 첨부된 청구범위는 그러한 마커 또는 마커 그룹을 별도로 그리고 서로 분할 가능하게 정의할 수 있음을 의미한다.
- [0125] "집합적으로"란 본 개시내용이 인용된 마커 또는 마커 그룹의 임의의 수 또는 조합을 포함하며 마커 또는 마커 그룹의 그러한 수 또는 조합이 본원에 구체적으로 나열되지 않을 수 있음에도 불구하고 첨부된 청구범위는 마커 또는 마커 그룹의 임의의 다른 조합과 별도로 그리고 분할 가능하게 그러한 조합 또는 하위조합을 정의할 수 있음을 의미한다.
- [0126] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "TNAP"는 조직 비-특이적 알칼리성 포스파타제의 모든 이소형을 포함하는 것으로 의도된다. 예를 들어, 상기 용어는 간 이소형(LAP), 골 이소형(BAP) 및 콩팥 이소형(KAP)을 포함한다. 한 예에서, TNAP는 BAP이다. 한 예에서, 본원에 사용된 TNAP는 기탁 수탁 번호 PTA-7282 하에 부다페스트 조약의 규정 하에 2005년 12월 19일 ATCC에 기탁된 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 STRO-3 항체에 결합할 수 있는 분자를 지칭한다.
- [0127] 또한, 한 예에서, STRO-1+ 세포는 클론원성 CFU-F를 생성할 수 있다.
- [0128] 한 예에서, 상당한 비율의 STRO-1+ 세포는 적어도 2개의 상이한 생식선으로 분화할 수 있다. STRO-1+ 세포가 개입(committed)될 수 있는 계통의 비제한적인 예는 골 전구체 세포; 담관 상피 세포 및 간세포에 대해 다능성인 간세포 전구세포(progenitor); 희소돌기아교세포 및 성상세포로 진행되는 신경교세포 전구체를 생성할 수 있

는 신경 제한 세포; 뉴런으로 진행되는 뉴런 전구체; 심장근 및 심근 세포에 대한 전구체, 글루코스-반응성 인슐린 분비 베타 세포주를 포함한다. 다른 계통은 상아모세포, 상아질-생성 세포 및 연골 세포 및 하기의 전구체 세포를 포함하지만 이에 제한되지 않는다: 망막 색소 상피 세포, 섬유아세포, 피부 세포, 예컨대 각질형성세포, 수지상 세포, 모낭 세포, 신관 상피 세포, 평활근 및 골격근 세포, 고환 전구세포, 혈관 내피 세포, 힘줄, 인대, 연골, 지방세포, 섬유아세포, 골수 기질, 심장근, 평활근, 골격근, 혈관주위세포, 혈관, 상피, 신경교, 신경세포, 성상세포 및 희소돌기아교세포를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0129] 한 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 단일 공여자로부터 얻거나, 공여자 샘플 또는 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포가 이후에 풀링된 다음, 배양 확장되는 다중 공여자로부터 얻는다.

[0130] 본 개시내용에 포함되는 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 또한 대상체에 투여하기 전에 동결보존될 수 있다. 한 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 대상체에게 투여하기 전에 배양 확장되고 동결보존된다.

[0131] 한 예에서, 본 개시내용은 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포뿐만 아니라 이의 자손, 이로부터 유래된 가용성 인자 및/또는 이로부터 단리된 세포의 소포를 포함한다. 또 다른 예에서, 본 개시내용은 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포뿐만 아니라 이로부터 단리된 세포의 소포를 포함한다. 예를 들어, 세포 배양 배지 내로 세포의 소포의 분비에 적합한 조건하에 특정 기간 동안 본 개시내용의 중간엽 전구체 계통 또는 줄기 세포를 배양 확장하는 것이 가능하다. 분비된 세포의 소포는 이후에 치료에 사용하기 위해 배양 배지로부터 얻을 수 있다.

[0132] 본원에 사용된 용어 "세포의 소포"는 전형적으로 크기가 200 nm 미만이지만 세포로부터 자연적으로 방출되고 약 30 nm 내지 10 마이크론만큼 큰 크기 범위의 지질 입자를 지칭한다. 이들은 단백질, 핵산, 지질, 대사산물, 또는 방출 세포로부터의 세포기관(organelle) (예를 들어, 중간엽 줄기 세포; STRO-1⁺ 세포)을 포함할 수 있다.

[0133] 본원에 사용된 용어 "엑소좀"은 일반적으로 크기가 약 30 nm 내지 약 150 nm 범위이고 세포막으로 수송되어 방출되는 포유동물 세포의 엔도솜 구획에서 기원하는 세포의 소포의 유형을 지칭한다. 이들은 핵산 (예를 들어, RNA; 마이크로RNA), 단백질, 지질, 및 대사산물을 포함할 수 있으며 한 세포로부터 분비되고 이들의 카고(cargo)를 전달하기 위해 다른 세포에 의해 흡수되어 세포간(intercellular) 소통 기능을 한다.

[0134] 세포의 배양 확장

[0135] 한 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 배양 확장된다. "배양 확장된" 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포 배지는 이들이 세포 배양 배지에서 배양되고 계대된다(즉, 계대-배양된다)는 점에서 갓 단리된 세포와 구별된다(즉, 계대-배양된다). 한 예에서, 배양 확장된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 약 4 - 10회 계대 동안 배양 확장된다. 한 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10회 계대 동안 배양 확장된다. 예를 들어, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 적어도 5회 계대 동안 배양 확장될 수 있다. 한 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 적어도 5 - 10회 계대 동안 배양 확장될 수 있다. 한 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 적어도 5 - 8회 계대 동안 배양 확장될 수 있다. 한 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 적어도 5 - 7회 계대 동안 배양 확장될 수 있다. 한 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 10회 초과 계대 동안 배양 확장될 수 있다. 또 다른 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 7회 초과 계대 동안 배양 확장될 수 있다. 이들 예에서, 줄기 세포는 중간 동결보존된 MLPSC 집단을 제공하기 위해 동결보존되기 전에 배양 확장될 수 있다. 한 예에서, 본 개시내용의 조성물은 중간 동결보존된 MLPSC 집단으로부터 제조된다. 예를 들어, 중간 동결보존된 MLPSC 집단은 아래에서 추가로 논의된 바와 같이 투여 전에 추가 배양 확장될 수 있다. 따라서, 한 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 배양 확장되고 동결보존된다. 이들 예의 한 구현예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 단일 공여자, 또는 공여자 샘플 또는 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포가 이후에 풀링된 다음, 배양 확장되는 다중 공여자로부터 얻을 수 있다. 한 예에서, 배양 확장 과정은 다음을 포함한다:

[0136] - i. 적어도 약 10억 개의 생존 세포의 제제를 제공하기 위해 생존 세포의 수를 계대 확장에 의해 확장하는 단계로서, 여기서, 계대 확장은 단리된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포의 1차 배양물을 확립한 다음, 이전 배양물로부터 단리된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포의 제1 비-일차(P1) 배양물을 연속적으로 확립함을 포함하는, 단계;

[0137] - ii. 계대 확장에 의한 단리된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포의 P1 배양물을 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포의 제2 비-일차(P2) 배양물로 확장하는 단계; 및

[0138] - iii. 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포의 P2 배양물로부터 얻어진 공정 중(in-process) 중간 중간엽 계통

전구체 또는 줄기 세포 제제를 제조하고 동결보존하는 단계; 및

- [0139] - iv. 동결보존된 공정 중 중간 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포 제제를 해동하고 계대 확장에 의한 공정 중 중간 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포 제제를 확장하는 단계.
- [0140] 한 예에서, 확장된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포 제제는 항원 프로파일 및 다음을 포함하는 활성 프로파일을 갖는다:
 - [0141] - i. 약 0.75% 미만의 CD45+ 세포;
 - [0142] - ii. 적어도 약 95% CD105+ 세포;
 - [0143] - iii. 적어도 약 95% CD166+ 세포.
- [0144] 한 예에서, 확장된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포 제제는 대조군에 비해 적어도 약 30%만큼 CD3/CD28-활성화 PBMC에 의한 IL2Ra 발현을 억제할 수 있다.
- [0145] 한 예에서, 배양 확장된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 약 4 - 10회 계대 동안 배양 확장되며, 여기서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 추가 배양 확장 전에 적어도 2 또는 3회 계대 후에 동결보존되었다. 한 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5회 계대 동안 배양 확장되고, 동결보존된 다음, 투여되거나 추가로 동결보존되기 전에 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5회 계대 동안 추가로 배양 확장된다.
- [0146] 한 예에서, 본 개시내용의 조성물에서 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포의 대부분은 거의 동일한 세대 수를 갖는다(즉, 이들은 서로 약 1 또는 약 2 또는 약 3 또는 약 4 세포 배가 내에 있다). 한 예에서, 본 발명의 조성물에서 세포 배가의 평균 수는 약 20 내지 약 25 배가이다. 한 예에서, 본 발명의 조성물에서 세포 배가의 평균 수는 1차 배양물로부터 발생하는 약 9 내지 약 13(예를 들어, 약 11 또는 약 11.2) 배가 + 계대당 약 1, 약 2, 약 3, 또는 약 4 배가(예를 들어, 계대당 약 2.5 배가)이다. 본 발명의 조성물에서 예시적인 평균 세포 배가는 각각 약 1, 약 2, 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 및 약 10회 계대에 의해 생성될 때 약 13.5, 약 16, 약 18.5, 약 21, 약 23.5, 약 26, 약 28.5, 약 31, 약 33.5, 및 약 36 중 어느 하나이다.
- [0147] 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포 단리 및 생체의 확장의 과정은 당업계에 알려진 임의의 장비 및 세포 취급 방법을 사용하여 수행될 수 있다. 본 개시내용의 다양한 배양 확장 구현에는 세포의 조작을 필요로 하는 단계, 예를 들어, 시딩, 공급, 부착 배양물 해리 또는 세척 단계를 사용한다. 세포를 조작하는 임의의 단계는 세포를 손상시킬 가능성이 있다. 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 일반적으로 제조 동안 특정량의 손상을 견딜 수 있지만, 세포는 바람직하게는 세포에 대한 손상을 최소화하면서 주어진 단계(들)를 적절하게 수행하는 절차 및/또는 장비를 처리함으로써 조작된다.
- [0148] 한 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는, 예를 들어, 본원에 참조로 포함된 US 6,251,295에 기재된 바와 같이, 세포 공급원 백(bag), 세척 용액 백, 재순환 세척 백, 입구 및 출구 포트를 갖는 스파밍 멤브레인 필터(spirming membrane filter), 여과액 백, 혼합 구역, 세척된 세포용 최종 생성물 백, 및 적절한 튜브를 포함하는 장치에서 세척된다.
- [0149] 한 예에서, 본 개시내용에 따른 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포 조성물은 CD105 양성 및 CD166 양성 및 CD45 음성에 대해 95% 균질하다. 한 예에서, 이러한 균질성은 생체의 확장을 통해, 즉, 다중 집단 배가를 통해 지속된다. 한 예에서, 조성물은 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포의 적어도 하나의 치료 용량을 포함하고, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 약 1.25% 미만의 CD45+ 세포, 적어도 약 95% CD105+ 세포, 및 적어도 약 95% CD166+ 세포를 포함한다. 한 예에서, 이러한 균질성은 극저온 저장 및 해동 후에도 지속되며, 여기서, 세포는 또한 일반적으로 약 70% 이상의 생존력을 갖는다.
- [0150] 한 예에서, 본 개시내용의 조성물은 실질적인 수준의 TNFR1을 발현하는 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포, 예를 들어, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포 백만 개당 13 pg 초과 TNFR1을 포함한다. 한 예에서, 이러한 표현형은 생체의 확장 및 극저온 저장 전반에 걸쳐 안정적이다. 한 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포 백만 개당 약 13 내지 약 179 pg(예를 들어, 약 13 pg 내지 약 44 pg) 범위의 TNFR1의 발현 수준은 생체의 확장 및 동결보존을 통해 또한 지속되는 바람직한 치료 잠재력과 관련이 있다.
- [0151] 한 예에서, 배양 확장된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 적어도 110 pg/ml의 양으로 중양 피사 인자 수용체 1(TNFR1)을 발현한다. 예를 들어, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 적어도 150 pg/ml, 또는 적어도

200 pg/ml, 또는 적어도 250 pg/ml, 또는 적어도 300 pg/ml, 또는 적어도 320 pg/ml, 또는 적어도 330 pg/ml, 또는 적어도 340 pg/ml, 또는 적어도 350 pg/ml의 양으로 TNFR1을 발현할 수 있다.

[0152] 한 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 적어도 $13 \text{ pg}/10^6$ 세포의 양으로 TNFR1을 발현한다. 예를 들어, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 적어도 $15 \text{ pg}/10^6$ 세포, 또는 적어도 $20 \text{ pg}/10^6$ 세포, 또는 적어도 $25 \text{ pg}/10^6$ 세포, 또는 적어도 $30 \text{ pg}/10^6$ 세포, 또는 적어도 $35 \text{ pg}/10^6$ 세포, 또는 적어도 $40 \text{ pg}/10^6$ 세포, 또는 적어도 $45 \text{ pg}/10^6$ 세포, 또는 적어도 $50 \text{ pg}/10^6$ 세포의 양으로 TNFR1을 발현한다.

[0153] 또 다른 예에서, 본원에 개시된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 T-세포에서 IL-2R α 발현을 억제한다. 한 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 IL-2R α 발현을 적어도 약 30%, 대안적으로 적어도 약 35%, 대안적으로 적어도 약 40%, 대안적으로 적어도 약 45%, 대안적으로 적어도 약 50%, 대안적으로 적어도 약 55%, 대안적으로 적어도 약 60% 억제할 수 있다.

[0154] 한 예에서, 본 개시내용의 조성물은, 예를 들어, 적어도 약 1억 개의 세포 또는 약 1억 2,500만 개의 세포를 포함할 수 있는 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포의 적어도 하나의 치료 용량을 포함한다.

[0155] 세포의 변형

[0156] 본 개시내용의 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 투여 시 세포의 용해가 억제되는 방식으로 변경될 수 있다. 항원의 변경은 면역학적 무반응 또는 내성을 유도하여 정상 면역 반응에서 외부 세포의 거부에 궁극적으로 책임이 있는 면역 반응의 이펙터 단계(예를 들어, 세포독성 T 세포 생성, 항체 생성 등)의 유도를 방지할 수 있다. 이러한 목표를 달성하기 위해 변경될 수 있는 항원은, 예를 들어, MHC 부류 I 항원, MHC 부류 II 항원, LFA-3 및 ICAM-1을 포함한다.

[0157] 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 또한 줄무늬 골격근 세포의 분화 및/또는 유지에 중요한 단백질을 발현하도록 유전적으로 변형될 수 있다. 예시적인 단백질은 성장 인자(TGF- β , 인슐린-유사 성장 인자 1(IGF-1), FGF), 근육생성 인자(예를 들어, myoD, 미오게닌, 근육생성 인자 5(Myf5), 근육생성 조절 인자(MRF)), 전사 인자(예를 들어, GATA-4), 사이토카인(예를 들어, 카디오토로핀-1), 뉴레굴린 패밀리의 구성원(예를 들어, 뉴레굴린 1, 2 및 3) 및 호메오박스 유전자(예를 들어, Csx, 틴맨(tinman) 및 NKx 패밀리를 포함한다.

[0158] 본 개시내용의 조성물

[0159] 본 개시내용의 한 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포 및/또는 이의 자손 및/또는 이로부터 유래된 가용성 인자는 조성물의 형태로 투여된다. 한 예에서, 그러한 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 포함한다. 따라서, 한 예에서, 본 개시내용의 조성물은 배양 확장된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포를 포함할 수 있다.

[0160] 용어 "담체" 및 "부형제"는 활성 화합물의 저장, 투여 및/또는 생물학적 활성을 용이하게 하기 위해 당업계에서 통상적으로 사용되는 물질의 조성물을 지칭한다(예를 들어, 문헌(Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Ed., Mac Publishing Company (1980)) 참조). 담체는 또한 활성 화합물의 바람직하지 않은 부작용을 감소시킬 수 있다. 적합한 담체는, 예를 들어, 안정하며, 예를 들어, 담체 내의 다른 성분과 반응할 수 없다. 한 예에서, 담체는 치료에 사용되는 투여량 및 농도에서 수용자에게 상당한 국소 또는 전신 부작용을 일으키지 않는다.

[0161] 본 개시내용에 적합한 담체는 통상적으로 사용되는 것들을 포함하고, 예를 들어, 물, 식염수, 수성 텍스트로스, 락토스, 링거 용액, 완충 용액, 히알루로난 및 글리콜은 용액에 대해 특히 (등장성인 경우) 예시적인 액체 담체이다. 적합한 약제학적 담체 및 부형제는 전분, 셀룰로오스, 글루코스, 락토스, 수크로스, 젤라틴, 맥아, 쌀, 밀가루, 초크, 실리카 겔, 스테아르산마그네슘, 스테아르산나트륨, 모노스테아르산글리세롤, 염화나트륨, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 물, 에탄올 등을 포함한다.

[0162] 또 다른 예에서, 담체는, 예를 들어, 세포가 성장하거나 현탁된 배지 조성물이다. 예를 들어, 그러한 배지 조성물은 그것이 투여되는 대상체에서 어떠한 부작용도 유발하지 않는다.

[0163] 예시적인 담체 및 부형제는 세포의 생존력 및/또는 대사 증후군 및/또는 비만을 감소, 예방 또는 지연시키는 세포의 능력에 악영향을 미치지 않는다.

[0164] 한 예에서, 담체 또는 부형제는 세포 및/또는 가용성 인자를 적합한 pH로 유지하여 생물학적 활성을 발휘하도록 완충 활성을 제공하며, 예를 들어, 담체 또는 부형제는 인산염 완충 식염수(PBS)이다. PBS는 세포 및 인자와

최소한으로 상호작용하고 세포 및 인자의 신속한 방출을 허용하기 때문에 매력적인 담체 또는 부형제를 나타내며, 그러한 경우에, 본 개시내용의 조성물은, 예를 들어, 주사에 의해 혈류에 또는 조직 또는 조직을 둘러싸거나 이에 인접한 영역에 직접 적용하기 위한 액체로서 생성될 수 있다.

- [0165] 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포 및/또는 이의 자손 및/또는 이로부터 유래된 가용성 인자는 또한 수용자에게 적합하고 수용자에게 해롭지 않은 생성물로 분해되는 스캐폴드 내에 통합되거나 매립될 수 있다. 이들 스캐폴드는 수용자 대상체에게 이식될 세포를 지원하고 보호한다. 천연 및/또는 합성 생분해성 스캐폴드는 그러한 스캐폴드의 예이다.
- [0166] 다양한 상이한 스캐폴드가 본 개시내용의 실시에서 성공적으로 사용될 수 있다. 예시적인 스캐폴드는 생물학적, 분해성 스캐폴드를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 천연 생분해성 스캐폴드는 콜라겐, 피브로넥틴 및 라미닌 스캐폴드를 포함한다. 세포 이식 스캐폴드에 적합한 합성 물질은 광범위한 세포 성장과 세포 기능을 지원할 수 있어야 한다. 그러한 스캐폴드는 또한 재흡수될 수 있다. 적합한 스캐폴드는 폴리글리콜산 스캐폴드(예를 들어, 문헌(Vacanti, 등 J. Ped. Surg. 23:3-9 1988; Cima, 등 Biotechnol. Bioeng. 38:145 1991; Vacanti, 등 Plast. Reconstr. Surg. 88:753-9 1991)에 기재된 바와 같음); 또는 합성 중합체, 예컨대 폴리무수물, 폴리오르토에스테르, 및 폴리락트산을 포함한다.
- [0167] 또 다른 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포 및/또는 이의 자손 및/또는 이로부터 유래된 가용성 인자는 겔 스캐폴드(예컨대, Upjohn Company로부터의 겔폼)에서 투여될 수 있다.
- [0168] 본원에 기재된 조성물은 단독으로 또는 다른 세포와의 혼합물로서 투여될 수 있다. 상이한 유형의 세포는 투여 직전 또는 바로 전에 본 개시내용의 조성물과 혼합될 수 있거나, 이들은 투여 전에 일정 기간 동안 함께 공배양될 수 있다.
- [0169] 한 예에서, 조성물은 유효량 또는 치료학적 또는 예방학적 유효량의 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포 및/또는 이의 자손 및/또는 이로부터 유래된 가용성 인자를 포함한다. 예를 들어, 조성물은 약 1×10^5 개 줄기 세포 내지 약 1×10^9 개 줄기 세포 또는 약 1.25×10^3 개 줄기 세포 내지 약 1.25×10^7 개 줄기 세포/kg (80 kg 대상체)을 포함한다. 투여될 세포의 정확한 양은 대상체의 연령, 체중 및 성별, 치료되는 장애의 정도 및 중증도를 포함한 다양한 인자에 따라 다르다.
- [0170] 한 예에서, 50×10^6 내지 200×10^7 개 세포가 투여된다. 다른 예에서, 60×10^6 내지 200×10^6 개 세포 또는 75×10^6 내지 150×10^6 개 세포가 투여된다. 한 예에서, 75×10^6 개 세포가 투여된다. 또 다른 예에서, 150×10^6 개 세포가 투여된다.
- [0171] 한 예에서, 조성물은 5.00×10^6 개 초과인 생존 세포/mL를 포함한다. 또 다른 예에서, 조성물은 5.50×10^6 개 초과인 생존 세포/mL를 포함한다. 또 다른 예에서, 조성물은 6.00×10^6 개 초과인 생존 세포/mL를 포함한다. 또 다른 예에서, 조성물은 6.50×10^6 개 초과인 생존 세포/mL를 포함한다. 또 다른 예에서, 조성물은 6.68×10^6 개 초과인 생존 세포/mL를 포함한다.
- [0172] 한 예에서, 본 개시내용의 방법은 6억 개 세포의 총 용량을 투여하는 단계를 포함한다. 예를 들어, 본 개시내용에 따라 치료된 대상체는 세포의 총 용량이 6억 개 세포를 초과하지 않는 한 상기 언급된 조성물의 다중 용량을 투여받을 수 있다. 예를 들어, 대상체는 2억 개 세포를 3회 투여받을 수 있다. 한 예에서, 세포의 총 용량은 5억 개 세포이다.
- [0173] 한 예에서, 중간엽 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%, 적어도 약 95%, 적어도 약 99%를 구성한다.
- [0174] 본 개시내용의 조성물은 동결보존될 수 있다. 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포의 동결보존은 당업계에서 알려진 저속 냉각 방법 또는 '신속한' 동결 프로토콜을 사용하여 수행할 수 있다. 바람직하게는, 동결보존 방법은 동결되지 않은 세포와 비교하여 동결보존된 세포의 유사한 표현형, 세포 표면 마커 및 성장률을 유지한다.
- [0175] 동결보존된 조성물은 동결보존 용액을 포함할 수 있다. 동결보존 용액의 pH는 전형적으로 6.5 내지 8, 바람직

하계는 7.4이다.

- [0176] 동결보존 용액은, 예를 들어, PlasmaLyte A™와 같은 멸균, 비발열성 등장 용액을 함유할 수 있다. 100 mL의 PlasmaLyte A™는 526 mg의 염화나트륨, USP(NaCl); 502 mg의 글루콘산나트륨(C₆H₁₁NaO₇); 368 mg의 아세트산나트륨 삼수화물, USP(C₂H₃NaO₂ · 3H₂O); 37 mg의 염화칼륨, USP(KCl); 및 30 mg의 염화마그네슘, USP(MgCl₂ · 6H₂O)를 함유한다. 이에는 항균제가 함유되어 있지 않다. pH는 수산화나트륨으로 조정된다. pH는 7.4(6.5 내지 8.0)이다.
- [0177] 동결보존 용액은 Profreeze™를 포함할 수 있다. 동결보존 용액은 추가로 또는 대안적으로 배양 배지, 예를 들어, αMEM을 포함할 수 있다.
- [0178] 동결을 용이하게 하기 위해, 예를 들어, 디메틸설폭사이드(DMSO)와 같은 동결보호제가 일반적으로 동결보존 용액에 첨가된다. 이상적으로, 동결보호제는 세포와 환자에 대해 무독성이어야 하고, 비항원성, 화학적으로 불활성이어야 하며, 해동 후 높은 생존율을 제공하고 세척 없이 이식이 가능해야 한다. 그러나, 가장 일반적으로 사용되는 동결보호제인 DMSO는 약간의 세포독성을 나타낸다. 하이드록시에틸 전분(HES)은 동결보존 용액의 세포독성을 감소시키기 위해 대체물로서 또는 DMSO와 함께 사용될 수 있다.
- [0179] 동결보존 용액은 DMSO, 하이드록시에틸 전분, 인간 혈청 성분 및 기타 단백질 증량제 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 한 예에서, 동결보존된 용액은 약 5% 인간 혈청 알부민(HSA) 및 약 10% DMSO를 포함한다. 동결보존 용액은 메틸셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈(PVP) 및 트레할로스 중 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다.
- [0180] 한 구현예에서, 세포는 42.5% Profreeze™/50% αMEM/7.5% DMSO에 현탁되고 제어-속도 냉동고에서 냉각된다.
- [0181] 동결보존된 조성물은 해동되어 대상체에게 직접 투여되거나, 예를 들어, HA를 포함하는 또 다른 용액에 첨가될 수 있다. 대안적으로, 동결보존된 조성물은 해동될 수 있고 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 투여 전에 대체 담체에 재현탁될 수 있다.
- [0182] 한 예에서, 본 개시내용의 세포 조성물은 혈장-라이트 A, 디메틸 설폭사이드(DMSO) 및 인간 혈청 알부민(HSA)을 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 개시내용의 조성물 혈장-라이트 A(70%), DMSO(10%), HSA(25%) 용액을 포함할 수 있으며, HSA 용액은 5% HSA 및 15% 완충액을 포함한다.
- [0183] 한 예에서, 본원에 기재된 조성물은 단일 용량으로서 투여될 수 있다.
- [0184] 일부 예에서, 본원에 기재된 조성물은 다중 용량에 걸쳐 투여될 수 있다. 예를 들어, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4회 용량이다. 다른 예에서, 본원에 기재된 조성물은 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10회 용량에 걸쳐 투여될 수 있다.
- [0185] 한 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 대상체에 투여하기 전에 배양 확장될 수 있다. 다양한 세포 배양 방법이 당업계에 알려져 있다. 한 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 약 4 - 10회 계대 동안 배양 확장된다. 한 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10회 계대 동안 배양 확장된다. 한 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 적어도 5회 계대 동안 배양 확장된다. 이들 예에서, 줄기 세포는 동결보존되기 전에 배양 확장될 수 있다.
- [0186] 한 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 투여 전에 무혈청 배지에서 배양 확장된다.
- [0187] 일부 예에서, 세포는 세포가 대상체의 순환계로 나가는 것을 허용하지 않지만 세포에 의해 분비된 인자가 순환계에 들어가는 것을 허용하는 챔버 내에 포함된다. 이러한 방식으로, 가용성 인자는 세포가 인자를 대상체의 순환계로 분비하도록 함으로써 대상체에게 투여될 수 있다. 그러한 챔버는 가용성 인자의 국소 수준을 증가시키기 위해 대상체의 부위에 동일하게 이식될 수 있으며, 예를 들어, 위장관 벽 내부 또는 이 근처에 이식될 수 있다.
- [0188] 한 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 대상체 위장관의 벽에 투여될 수 있다. 한 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 위장관의 관강내 벽에 국소적으로 투여된다. 또 다른 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 국소적으로 투여될 수 있다. 예를 들어, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 대상체 위장관의 벽으로 투여될 수 있다. 예를 들어, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 대상체 위장관의 벽의 점막 하로 투여될 수 있다. 한 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 대상체 위장관 벽의 염증 부위로 투여

될 수 있다. 예를 들어, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 대상체 위장관 벽의 염증 부위에 투여될 수 있다. 이러한 예에서, 염증 부위는 투여 전에 내시경으로 확인할 수 있다. 예를 들어, 내시경 확인은 숙련된 의사의 육안 검사 및/또는 내시경 생검의 조직학적 분석을 기반으로 할 수 있다. 한 예에서, 위장관의 벽은 장벽(intestinal wall)이다. 예를 들어, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 대상체 결장 벽 및/또는 장벽에 투여될 수 있다. 한 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 대상체 결장 벽 및/또는 장벽의 점막하로 직접 투여될 수 있다. 한 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 대상체 결장 벽 및/또는 직장 벽의 점막하로 직접 투여될 수 있다. 또 다른 예에서, 본 개시내용의 조성물은 관강내 주사를 통해 투여될 수 있다. 또 다른 예에서, 본 개시내용의 조성물은 정맥내 투여된다. 또 다른 예에서, 조성물은 정맥내 및 국소적으로 투여된다.

[0189] 다양한 예에서, 세포의 용량은 대상체 위장관의 다중 부위에 투여될 필요가 있을 수 있다. 용량당 필요한 투여 부위의 수는 투여되는 세포의 수에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 위장관의 5개 부위에 약 7,500만 개의 세포 용량을 투여할 필요가 있을 수 있다. 또 다른 예에서, 위장관의 15개 부위에 약 1억 5,000만 개의 세포 용량을 투여할 필요가 있을 수 있다. 다른 예에서, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20개 이상의 부위에서 대상체 위장관에 용량을 투여할 필요가 있을 수 있다. 이들 예의 한 구현예에서, 용량은 대상체 맹장, 근위 횡행 결장, 원위 횡행 결장 하행 결장, S상 결장 및 직장의 벽에 투여된다. 이 구현예에서, 용량은 1, 2, 3, 4, 5개 이상의 부위에서 대상체 맹장, 근위 횡행 결장, 원위 횡행 결장 하행 결장, S상 결장 및 직장의 벽에 투여될 수 있다.

[0190] 한 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 내시경을 통해 투여된다. 예를 들어, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 내시경을 통해 대상체 위장관 벽의 점막하로 주사될 수 있다. 한 예에서, 내시경은 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포가 염증 부위에 직접 투여되기 전에 염증 부위를 시각적으로 식별하는 데 사용된다.

[0191] 한 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 매주 1회 투여된다. 예를 들어, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 2주마다 매주 1회 투여될 수 있다. 한 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 매월 1회 투여될 수 있다. 한 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포의 2회 용량은 2주에 걸쳐 매주 1회 투여된다. 또 다른 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포의 2회 용량은 2주마다 매주 1회 투여된다. 또 다른 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포의 4회 용량은 후속 용량이 매월 투여되기 전에 2주에 걸쳐 투여된다. 한 예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포의 2회 용량은 후속 용량이 매월 1회 투여되기 전에 2주마다 매주 1회 투여될 수 있다.

[0192] 당업자는 본 개시내용의 광범위한 일반적인 범위를 벗어나지 않고 상기 기재된 구현예에 대해 다양한 변경 및/또는 변형이 이루어질 수 있음을 인식할 것이다. 따라서, 본 구현예는 모든 면에서 예시적이며 제한적이지 않은 것으로 간주되어야 한다.

[0193] 다음의 특정 실시예는 단지 예시적인 것으로 해석되어야 하며, 어떤 식으로든 개시내용의 나머지를 제한하는 것이 아니다. 추가 설명 없이, 당업자는 본원의 설명에 기반하여 본 발명을 최대한 활용할 수 있다고 여겨진다.

[0194] 본 출원은 2020년 3월 11일에 출원된 호주 가특허 출원 2020900743으로부터 우선권을 주장하며, 그 전체 내용은 본원에 참조로 포함된다.

[0195] 실시예

[0196] **의학적으로 불응성 크론 대장염 치료를 위한 생체의 배양-확장된 성체 동종 골수 유래 중간엽 줄기 세포(MSC)**

[0197] **조성물**

[0198] 조성물은 건강한 성인 공여자의 골수로부터 단리된 배양-확장된 중간엽 기질 세포(ceMSC)로 구성된다. 최종 조성물은 $\geq 6.68 \times 10^6$ 개 생존 세포/mL의 농도로 혈장-라이트 A(70%), 디메틸 설폭사이드(DMSO, 10%) 및 인간 혈청 알부민(HSA) (25%) 용액(20%, 5% HSA 및 15% 완충액 포함)으로 제형화된 ceMSC를 포함한다. 각 용량 바이알은 3.8 mL의 동결보존된 세포 현탁액을 포함한다(바이알당 총 세포 $\geq 25 \times 10^6$ 개).

[0199] **목표**

[0200] 1차 목표

[0201] MSC의 내시경 전달의 안전성을 결정하기 위해, 의학적으로 불응성 크론 대장염 치료를 위한 생체의 확장된 동종

골수 유래 MSC.

- [0202] **2차 목표**
- [0203] MSC의 내시경 전달에 의해 유도된 관강 치유의 반응을 예비 방식으로 평가하기 위해, 의학적으로 불응성 크론 대장염의 치료를 위한 생체의 확장된 동종 골수 유래 MSC.
- [0204] 임상적으로
- [0205] - 감소된 24시간 배변 횟수;
- [0206] - 감소된 대변 내 혈액;
- [0207] - 감소된 C-반응성 단백질 혈청 수준;
- [0208] - 감소된 크론 질환 활동 지수(CDAI 점수).
- [0209] 방사선학적으로
- [0210] - 자기 공명(MR) 장조영술을 사용한 단면 영상.
- [0211] 내시경 및 조직병리학
- [0212] - 대장내시경에서 개선된 크론 질환에 대한 단순 내시경 점수(SES-CD);
- [0213] - MSC 전달 전 내시경 생검과 비교하여 내시경 생검 또는 외과적 병리학에서 개선된 조직학적 치유.
- [0214] **대상체**
- [0215] 24명의 환자는 7,500만(n = 12; 8개의 치료, 4개의 대조군) 또는 1억 5,000만(n = 12; 8개의 치료, 4개의 대조군)의 용량으로 MSC로 치료된 이들의 관강 질환을 가질 것이다. MSC는 표적화된 내시경 전달을 통해 수술실에서 결장 벽의 점막하층으로 전달될 것이다. MSC 용량 증량은 치료에 할당될 환자의 2가지 용량 그룹에 걸쳐 수행될 것이다: 2:1 방식으로 4회 제어(각 용량 그룹에서 8:4 비율). 12명의 환자는 7,500만 개의 세포를 투여받을 것이고 12명의 환자는 1억 5,000만 개의 세포를 투여받을 것이다.
- [0216] 포함 기준:
- [0217] - 18-75세의 남성과 여성;
- [0218] - 한 번의 항-TNF 요법에 실패한 의학적 불응성 증상이 있는 적어도 6개월 기간의 크론 대장염으로, 의학적 관리에서 다음 단계는 결장아전절제술 또는 확대;
- [0219] - 코르티코스테로이드, 5-ASA 약물, 티오피린, 메토틀렉세이트, 항-TNF 요법, 항인테그린 및 항-인터루킨에 대한 노출은 허용되지만 코르티코스테로이드, 5-ASA, 티오피린, 메토틀렉세이트의 경우 2주의 휴약 기간이 수행되고 임의의 생물학적 요법의 4주의 휴약 기간이 수행될 것임;
- [0220] - MSC 전달 30일 이내에 대장내시경에 의해 배제된 결장 이형성 및 악성종양 없음;
- [0221] - 적어도 하나의 항-TNF에 실패했거나 생물학적 요법에 대한 금기를 가져야함.
- [0222] **1차 종료점**
- [0223] 이 연구의 1차 종료점은 크론 대장염의 치료를 위한 MSC의 내시경 주사의 안전성 및 실행 가능성을 결정하는 것이다.
- [0224] **2차 종료점**
- [0225] 임상적 및 내시경적 관해:
- [0226] - 임상적 치료:
 - [0227] o 리터당 2.87 mg 미만으로 CRP의 정상화;
 - [0228] o CDAI의 150 미만의 하락.
- [0229] - 방사선학적 치유:

- [0230] o 염증이 개선된 MR 장조영술.
- [0231] - 내시경 치유:
- [0232] o 점막 궤양의 부재 및 0-5의 SES-CD 점수.
- [0233] 임상적 및 내시경 반응:
- [0234] - 임상적 치유:
- [0235] o CRP의 50% 초과 감소 또는 정상화;
- [0236] o CDAI의 100점 초과 하락.
- [0237] - 방사선학적 치유:
- [0238] o 염증이 개선된 MR 장조영술.
- [0239] - 내시경 치유:
- [0240] o SES-CD의 50% 초과 감소 또는 5-10의 점수.
- [0241] 부분 임상 및 내시경 반응:
- [0242] - 임상적 치유:
- [0243] o CRP의 25% 초과 감소;
- [0244] o CDAI의 100점 미만의 감소.
- [0245] - 방사선학적 치유:
- [0246] o 염증이 개선된 MR 장조영술.
- [0247] 내시경 치유:
- [0248] o SES-CD의 25% 초과 그러나 50% 미만 감소 또는 10-15의 점수.
- [0249] 응답 부족:
- [0250] - 임상 치유:
- [0251] o 개선되지 않음.
- [0252] - 방사선학적 치유:
- [0253] o 염증이 해소되지 않은 MR 장조영술.
- [0254] - 내시경 치유:
- [0255] o SES-CD가 개선되지 않음.
- [0256] **치료 용법**
- [0257] 대상체는 MSC를 사용한 치료 대 정상 식염수를 사용한 대조군으로 무작위화한 후 7,500만 개의 세포 또는 1억 5,000만 개의 세포(인간 혈청 알부민(5%) 및 디메틸 설폭사이드(10%)가 보충된 3.8 mL의 혈장-라이트® 2,500만 개)를 투여받는다. 제1 코호트는 7,500만 개의 MSC 또는 생리 식염수를 투여받고, 다음 12명의 환자 코호트는 1억 5,000만 개의 MSC 또는 생리 식염수를 투여받는다. 7,500만 투여량의 경우, 7,500만 개의 세포가 맹장, 근위 횡행 결장, 원위 횡행 결장 하행 결장, S상 결장, 직장에 전달되는 11.4 mL에 현탁되어 각 위치에서 1.9 mL로 전달된다. 1억 5,000만 투여량의 경우, 22.8 mL는 결장/직장 벽의 12시, 6시 및 9시 위치에서 3회 주사(각각 1.3 mL)로 이전에 언급된 각 위치에 전달된다. 절차 동안, 성인 대장내시경이 사용될 것이다. 23-게이지 일회용 경화요법 바늘은 점막하에 생긴 작은 수포에 의해 명백한 바와 같이 점막하층으로 세포를 전달하는 데 사용될 것이다. 각 주사 부위에서, MSC 주사 후 모든 나머지 MSC의 경화요법 바늘을 플러싱하기 위해 0.5 mL의 혈장-라이트 A가 뒤따를 것이다.
- [0258] 방문 1(스크리닝/기준선) MSC 처리된 대상체

- [0259] 환자는 이번 방문에서 완료된 다음 시험 및 절차를 가질 것이다:
- [0260] - 의학적 불응성 크론 대장염에 대한 생물학적 요법 또는 결장아전절제술의 변경을 위한 위장병학 또는 외과 상담 시 적격성(포함/제외 체크리스트);
- [0261] - 서면 동의성;
- [0262] - 다음 약물에 대한 휴약 기간:
- [0263] o 5-ASA, 코르티코스테로이드, 아자티오프린, 메토틱세이트, 및 6-머캅토피린을 포함한 면역조절제 요법의 경우 2주;
- [0264] o 생물학의 경우 4주: 항 TNF, 항 인테그린, 및 인터루킨.
- [0265] - 의료 및 수술 이력;
- [0266] - 복부 검사 및 활력 징후(BP, 맥박수, 호흡수 및 체온)를 포함한 일반적인 검사;
- [0267] - 크론 질환 활동 지수(CDAI) 점수;
- [0268] - 염증성 장 질환 설문지(IBDQ) 점수를 얻을 것이다;
- [0269] - 지난 30일 이내에 이전에 수행되지 않은 경우, 자기 공명 장조영술(MRE);
- [0270] - 지난 30일 이내에 이전에 수행되지 않은 경우, 생검을 통한 대장내시경;
- [0271] - 거대세포바이러스 대장염(CMV 대장염)을 배제함;
- [0272] - 크론 질환에 대한 단순 내시경 점수(SES-CD);
- [0273] - 다음을 포함한 실험실 연구:
- [0274] o 임신 가능성이 있는 여성(WOCBP)에 대해서만 소변 임신 검사가 수행될 것이다
- [0275] o 간 기능 검사, AST/ALT
- [0276] o 급성 간염 패널
- [0277] o 인간 면역결핍 바이러스(HIV)
- [0278] o 전혈구수 (CBC)
- [0279] o 완전한 대사 패널(CMP)
- [0280] o 프리알부민
- [0281] o C-반응성 단백질(CRP)
- [0282] o 적혈구 침강 속도(ESR)
- [0283] o 클로스트리듐 디피실, 분변(C.diff)
- [0284] o 칼프로텍틴, 분변
- [0285] o 병용 약물
- [0286] - 부작용(의학적 관리 또는 수술적 관리의 변경, 및 약물에 대한 임의의 부작용 및 임의의 수술후 합병증 보고 포함)
- [0287] 방문 2(0일차 - 치료)
- [0288] 방문 2 전 7일 이내에, 환자는 이 방문에서 다음 시험 및 절차를 완료할 것이다:
- [0289] - 복부 검사 및 활력 징후를 포함한 일반적인 검사;
- [0290] - 염증성 장 질환 설문지(IBDQ) 점수;
- [0291] - CDAI 점수;

- [0292] - 치료군 또는 대조군으로 무작위화;
- [0293] - 대장내시경(MSC를 투여하는데 사용될 것임);
- [0294] - 병용 약물;
- [0295] - 부작용;
- [0296] - MSC 또는 생리 식염수의 전달.
- [0297] 방문 3(1일차)
- [0298] 다음 날, 다음 시험 및 절차가 완료될 것이다:
- [0299] - 복부 검사 및 활력 징후를 포함한 일반적인 검사;
- [0300] - 마지막 방문 이후의 의료 수술 이력;
- [0301] - CDAI 점수;
- [0302] - 병용 약물;
- [0303] - 부작용.
- [0304] 방문 4(4주차 +/- 3일)
- [0305] 이 방문에서 다음 시험 및 절차가 완료되었다:
- [0306] - 복부 검사 및 활력 징후를 포함한 일반적인 검사;
- [0307] - 마지막 방문 이후의 의료 수술 이력;
- [0308] - 생검을 사용한 유연한 S상 결장경검사;
- [0309] - 염증성 장 질환 설문지(IBDQ) 점수;
- [0310] - CDAI 점수;
- [0311] - 병용 약물;
- [0312] - 부작용.
- [0313] 방문 5(6주차 +/- 3일)
- [0314] 이 방문에서 다음 시험 및 절차가 완료되었다:
- [0315] - 복부 검사 및 활력 징후를 포함한 일반적인 검사;
- [0316] - 마지막 방문 이후의 의료 수술 이력;
- [0317] - 생검을 사용한 유연한 S상 결장경검사;
- [0318] - 염증성 장 질환 설문지(IBDQ) 점수;
- [0319] - CDAI 점수;
- [0320] - 병용 약물;
- [0321] - 부작용.
- [0322] 방문 6(3개월 +/- 7일)
- [0323] 이 방문에서 다음 시험 및 절차가 완료되었다:
- [0324] - 복부 검사 및 활력 징후를 포함한 일반적인 검사;
- [0325] - 마지막 방문 이후의 의료 수술 이력;
- [0326] - SES-CD 및 생검을 사용한 대장내시경;
- [0327] - 염증성 장 질환 설문지(IBDQ) 점수;

- [0328] - CDAI 점수;
- [0329] - MRE;
- [0330] - 실험실 작업:
- [0331] o CBC;
- [0332] o CMP;
- [0333] o 프리알부민;
- [0334] o CRP;
- [0335] o ESR;
- [0336] o 칼프로텍틴, 분변.
- [0337] - 병용 약물;
- [0338] - 부작용.
- [0339] 방문 7(6개월차 +/- 7일)
- [0340] 이 방문에서 다음 시험 및 절차가 완료되었다:
- [0341] - 복부 검사 및 활력 징후를 포함한 일반적인 검사;
- [0342] - 마지막 방문 이후의 의료 수술 이력;
- [0343] - 염증성 장 질환 설문지(IBDQ) 점수;
- [0344] - CDAI 점수;
- [0345] - MRE;
- [0346] - 실험실 작업:
- [0347] o CBC;
- [0348] o CMP;
- [0349] o 프리알부민;
- [0350] o CRP;
- [0351] o ESR;
- [0352] o 칼프로텍틴, 분변.
- [0353] - 병용 약물;
- [0354] - 부작용.
- [0355] 방문 8(9개월차 +/- 14일)
- [0356] 이 방문에서 다음 시험 및 절차가 완료되었다:
- [0357] - 복부 검사 및 활력 징후를 포함한 일반적인 검사;
- [0358] - 마지막 방문 이후의 의료 수술 이력;
- [0359] - 염증성 장 질환 설문지(IBDQ) 점수;
- [0360] - CDAI 점수;
- [0361] - MRE;
- [0362] - 실험실 작업:
- [0363] o CBC;

- [0364] o CMP;
- [0365] o 프리알부민;
- [0366] o CRP;
- [0367] o ESR;
- [0368] - 칼프로텍틴, 분변.
- [0369] - 병용 약물;
- [0370] - 부작용.
- [0371] 방문 9(12개월차 +/- 14일)
- [0372] 이 방문에서 다음 시험 및 절차가 완료되었다:
- [0373] - 복부 검사 및 활력 징후를 포함한 일반적인 검사;
- [0374] - 마지막 방문 이후의 의료 수술 이력;
- [0375] - 염증성 장 질환 설문지(IBDQ) 점수;
- [0376] - CDAI 점수;
- [0377] - MRE;
- [0378] - 생검을 사용한 대장내시경(치료 환자에서만).
- [0379] - 실험실 작업:
- [0380] o CBC;
- [0381] o CMP;
- [0382] o 프리알부민;
- [0383] o CRP;
- [0384] o ESR;
- [0385] o 칼프로텍틴, 분변.
- [0386] - 병용 약물;
- [0387] - 부작용.
- [0388] 방문 10(15개월차 +/- 14일)
- [0389] 이 방문에서 다음 시험 및 절차가 완료되었다:
- [0390] - 복부 검사 및 활력 징후를 포함한 일반적인 검사;
- [0391] - 마지막 방문 이후의 의료 수술 이력;
- [0392] - 염증성 장 질환 설문지(IBDQ) 점수;
- [0393] - CDAI 점수;
- [0394] - MRE;
- [0395] - 대조군 arm에서 생검을 사용한 대장내시경(MSC 치료로부터 12개월);
- [0396] - 실험실 작업:
- [0397] o CBC;
- [0398] o CMP;
- [0399] o 프리알부민;

- [0400] o CRP;
- [0401] o ESR;
- [0402] o 칼프로텍틴, 분변.
- [0403] - 병용 약물;
- [0404] - 부작용.

[0405] **중간 분석**

[0406] 단일 생물학적 불응성 및 다중-생물학적 불응성 크론 질환 및 누공 질환을 포함한, 치료에 가장 반응성인 환자 그룹의 가능한 식별을 탐색하기 위해 하위-그룹 분석을 수행하였다. 이러한 데이터는 아래 표 1 및 2와 도 1에 요약되어 있다.

[0407] 대조군과 비교하여 통계적으로 유의한 반응률로, 통상적인 요법, 스테로이드 및 TNF-알파 억제제에 실패한 중등도 내지 중증 활성 크론 질환 환자에서 조기(28일차) 관해의 명확한 입증이 있었다(p = 0.02; 도 1). 지속적인 관해의 증거는 28일차에서 56일차까지의 반응률을 비교할 때 입증되었다.

[0408] 하나의 생물학적 제제로 치료된 집단에서 28일차 1차 종료점.

[0409] [표 1]

하나의 생물학적 제제, 관찰됨	위약		치료 용량 A		위약과 치료 간의 p-값 비교
	N = 46	8/46 (17.4%)	N = 44	17/44 (38.6%)	
28 일차에 CDAI 점수 150 이하를 달성한 환자의 FAS 비율					P = 0.021
28 일차에 CDAI 점수 150 이하를 달성한 환자의 PP 비율	N = 36	7/36 (19.4%)	N = 31	14/31 (45.2%)	P = 0.021

주목: 큰 샘플 이항 시험 (양측)으로부터의 p 값

- [0410]
- [0411] 28일차부터 56일차까지의 반응율.

[0412] [표 2]

PP, 하나의 생물학적 제제, 관찰됨	위약 (n = 36)	치료 용량 A (n = 31) (0, 3, 7, 14 일차에서)	위약과 치료 간의 p-값 비교
28 일 및 56 일차에 CDAI 점수 150 이하를 달성한 환자의 비율	2/30 (6.7%)	11/28 (39.3%)	P = 0.003
28 일 및 56 일차에 CDAI 점수의 100 점 감소를 달성한 환자의 비율	14/30 (46.7%)	16/28 (57.1%)	P = 0.43
28 일 및 56 일차에 CDAI 점수의 70 점 감소를 달성한 환자의 비율	16/30 (53.3%)	22/28 (78.6%)	P = 0.043

[0413]

[0414] **추가 분석**

[0415] CRP 수준은 또한 단일 생물학적 불응성 및 다중-생물학적 불응성 크론 질환을 가진 대상체에서 평가되었다. 놀랍게도, 단일 생물학적 불응성 대상체는 다중-생물학적 불응성 크론 질환에 비해 CRP 수준이 더 낮았다(CRP 수

준은 표 3에 나타냄). 또한, 다중-생물학적 불응성 크론 질환을 가진 대상체는 CDAI 점수에서 100점 감소를 달성하기 전에 2회 용량의 세포를 필요로 하는 경향이 있었다($p = 0.055$, 표 4에 나타낸 데이터). 종합하면, 이러한 발견은 단일 생물학적 불응성 대상체가 더 적은 수의 세포로 치료될 수 있음을 시사한다.

[0416] [표 3]

CRP	단일 생물학적 제제		다중-생물학적 제제	
	위약 (N=35)	치료 (N=31)	위약 (N=35)	치료 (N=35)
기준선 평균 (SD)	14.5 (17.3)	18.2 (17.2)	23.3 (28.9)	29.6 (33.9)
28 일차: 평균 (SD)	14.4 (15.6)	19.3 (22.9)	29.2 (40.3)	22.9 (27.2)
기준선으로부터 28 일차까지의 평균 변화	-0.1	+1.0	+5.9*	-6.7*

* $p =$ 위약에 대해 0.07 대 다중-생물학적 제제 그룹에서의 레메스텔셀

[0417]

[0418] [표 4]

PP, 관찰됨	위약 (n = 36)	레메스텔셀-L 용량 A (n = 31)	위약과 레메스텔셀-L 간의 p-값 비교
28 일차에 CDAI 점수 150 이하를 달성한 환자의 비율	8/35 (23%)	5/36 (14%)	$P = 0.33$
56 일 및 84 일차에 CDAI 점수 150 이하를 달성한 환자의 비율	2/26 (8%)	6/28 (21%)	$P = 0.16$
56 일 및 84 일차에 100 점 감소를 달성한 환자의 비율	9/26 (35%)	17/28 (61%)	$P = 0.055$
56 일 및 84 일차에 70 점 감소를 달성한 환자의 비율	14/26 (54%)	20/28 (71%)	$P = 0.18$

주목: 42 일차까지의 평가는 유도 프로토콜에서 발생했다; 56 일 및 84 일차 평가는 42 일차에 연장된 치료 프로토콜에 투여된 추가 용량 후에 발생했다.
주목: 큰 샘플 이항 시험 (양측)으로부터의 p-값

[0419]

도면

도면1

