(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년05월08일
(11) 등록번호 10-2108245
(24) 등록일자 2020년04월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/12 (2020.01) *A61K 38/30* (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) *A61P 19/02* (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-7017312
(22) 출원일자(국제) 2012년11월30일
심사청구일자 2017년11월30일
(85) 번역문제출일자 2014년06월24일
(65) 공개번호 10-2014-0127209
(43) 공개일자 2014년11월03일
(86) 국제출원번호 PCT/US2012/067464
(87) 국제공개번호 WO 2013/082543
국제공개일자 2013년06월06일
(30) 우선권주장
61/565,358 2011년11월30일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
US20090232777 A1*
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
아스텔라스 인스티튜트 포 리제너러티브 메디슨
미국 01752 매사추세츠주 말보로우 로크 드라이브 33
(72) 발명자
란자 로버트
미국 01510 매사추세츠주 클린턴 사우스 메도우 로드 35
킴브렐 에린 앤
미국 01776 매사추세츠주 서드버리 오스틴 로드 72
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김진회

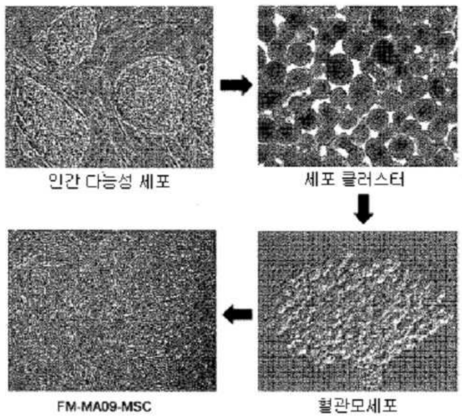
전체 청구항 수 : 총 21 항 심사관 : 홍성제

(54) 발명의 명칭 **중간엽 간질 세포 및 이에 관련된 용도**

(57) 요 약

본 발명은 일반적으로 혈관모세포에서 유래된 신규한 중간엽 간질 세포 (MSC) 제제, 이러한 MSC를 수득하는 방법, 이러한 MSC를 사용하여 병상을 치료하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 방법은 상당수의 역가-보유 젊은 표현형을 갖는 MSC를 생산하며, 이는 병상 치료에 유용하다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자
추 지안린
미국 01730 매사추세츠주 베드포드 리버티 로드 27
코우리스 니콜라스 아더
미국 01749 매사추세츠주 허드슨 유닛 에이 스쿨 스트리트 35

(56) 선행기술조사문헌
US20110129918 A1*
Autoimmunity reviews, Vol.10, no.7, pp.410-415, (2011, 05)*
Cell Stem Cell. (2010)*
PLoS MEDICINE, Volume 2, Issue 6, (2005)*
PLoS medicine, Vol.2, no.6, pp.e161, (2005)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

명 세 서

청구범위

청구항 1

혈관모세포를 하나 이상의 성장 인자를 포함하는 배양 배지에서 배양하는 단계 및 중간엽 줄기 세포를 생산하는 단계를 포함하는 중간엽 간질 세포 생성 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 혈관모세포를 배양 배지에서 배양하는 단계 이전에, 다능성 세포를 배양시키는 단계 및 다능성 세포의 배양물로부터 혈관모세포를 생산하는 단계를 더 포함하는 것인 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 다능성 세포가 유도 다능성 줄기(iPS) 세포 또는 배아 줄기 세포인 방법.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 다능성 세포가 혈관 내피 성장 인자(VEGF), 골형성 단백질 4(BMP-4), 또는 VEGF 및 BMP-4 둘 모두의 존재하에 배양되는 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 VEGF, BMP-4 또는 VEGF 및 BMP-4 둘 모두가 상기 다능성 세포 배양물에 상기 세포 배양 개시 0 내지 48시간 내에 첨가되는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 VEGF가 20 내지 100 nm/mL의 농도로 첨가되는 방법.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 BMP-4가 15 내지 100 ng/mL의 농도로 첨가되는 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 적어도 8천만, 8천5백만, 9천만, 9천5백만, 1억, 1억2천5백만, 또는 1억5천만 개의 중간엽 간질 세포가 생성되는 방법.

청구항 9

제2항에 있어서, 상기 중간엽 간질 세포가 상기 다능성 세포 분화 유도 개시 적어도 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 또는 50 일 이내에 생성되는 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 중간엽 간질 세포가 인간 중간엽 간질 세포인 방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조된 중간엽 간질 세포를 포함하는, 자가면역 질환을 치료하거나, 동종이계(allogenic) 이식된 세포에 대한 면역반응을 감소시키거나, 또는 뼈 소실 또는 연골 손상을 치료하는데 사용하기 위한 약제학적 제제.

청구항 12

제11항에 있어서, 다발경화증, 전신성경화증, 혈액암, 심근경색, 기관이식거부, 만성동종이식신장병, 경화, 간

기능상실, 심장 기능상실, GvHD, 정강 골절, 좌심실 기능이상, 백혈병, 골수형성이상증후군, 크론병, 당뇨병, 만성폐쇄폐질환, 불완전골생성증, 동형접합 가족성 저콜레스테롤혈증, 반원상 연골절제술후 처치, 성인 치주염, 중증 심근허혈환자에서 혈관형성, 척수손상, 뼈형성장애, 중증하지허혈, 당뇨병성 발질환, 원발성 쇼그렌 증후군, 골관절염, 연골 결함, 제엽염, 다발적 전신 위축, 근위축성 측색 경화증, 심장 수술, 전신성 홍반성 루프스, 생 신장 동종이식, 비악성 적혈구 질환, 열화상, 방사선 화상, 파킨슨병, 미세골절, 표피수포증, 중증 관상 허혈, 특발성 확장심근병, 대퇴골두 괴사, 루프스 신장염, 골강 결손(bone void defects), 허혈성 대뇌 뇌졸중, 뇌졸중후, 급성 방사선 증후군, 폐병, 관절염, 골재생, 포도막염 또는 이들의 조합을 치료하는데 사용되기 위한 약제학적 제제.

청구항 13

제12항에 있어서, 포도막염을 치료하는데 사용되기 위한 약제학적 제제.

청구항 14

제12항에 있어서, 전신성 홍반성 루프스 또는 루프스 신장염을 치료하는데 사용되기 위한 약제학적 제제.

청구항 15

제12항에 있어서, 크론병을 치료하는데 사용되기 위한 약제학적 제제.

청구항 16

제12항에 있어서, 허혈성 대뇌 뇌졸중을 치료하는데 사용되기 위한 약제학적 제제.

청구항 17

제11항에 있어서, 적어도 10^6개의 중간엽 간질 세포 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약제학적 제제.

청구항 18

제11항에 있어서, 이식을 필요로 하는 수용자로의 이식을 위한 다른 세포를 추가적으로 포함하는 약제학적 제제.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 다른 세포는 동종이계 또는 동계(syngeneic)의 췌장 세포, 신경 세포, 간 세포, 심장 세포, 망막 색소 상피 세포, 각막 세포 또는 피부 세포인 약제학적 제제.

청구항 20

자가면역 질환을 치료하거나, 동종이계 이식된 세포에 대한 면역반응을 감소시키거나, 또는 뼈 소실 또는 연골 손상을 치료하는데 사용하기 위한 키트로서, (a) 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 방법에 의해 생성된 중간엽 간질 세포, 및 (b) 약제학적으로 허용 가능한 담체, 세포 전달 비히클, 또는 약제학적으로 허용 가능한 담체 및 세포 전달 비히클을 포함하는 키트.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 중간엽 간질 세포는 냉동 보존되는 것인 키트.

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

청구항 99

삭제

청구항 100

삭제

청구항 101

삭제

청구항 102

삭제

청구항 103

삭제

청구항 104

삭제

청구항 105

삭제

청구항 106

삭제

청구항 107

삭제

청구항 108

삭제

청구항 109

삭제

청구항 110

삭제

청구항 111

삭제

청구항 112

삭제

청구항 113

삭제

청구항 114

삭제

청구항 115

삭제

청구항 116

삭제

청구항 117

삭제

청구항 118

삭제

청구항 119

삭제

청구항 120

삭제

청구항 121

삭제

청구항 122

삭제

청구항 123

삭제

청구항 124

삭제

청구항 125

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 "혈관모세포(hemangioblast)를 사용하여 중간엽 간질 세포를 생성하는 방법" 이라는 명칭으로 2011년 11월 30일 출원된 미국 가출원 일련번호 61/565,358(변호사 사건 제75820.210001호)에 대해 우선권을 주장하며, 출원의 내용은 그 전체가 본 출원에 참조로 포함된다.

[0003] 본 발명은 대상에서 부적절한 면역 반응을 특징으로 하는 병상의 발현을 감소시키기 위해서, 또한 병상을 정의하는 이상이 정상 상태로 돌아가도록 병상의 원인에 영향을 미치기 위해 세포-기반 요법을 사용하는 것에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 대상에서 병상 발현의 감소에 있어 높은 역가를 부여하는 "젊은" 세포의 표현형을 보유하는 중간엽 간질 세포(MSC)에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0004] 많은 병리 현상들이 이식 거부, 염증 및 자가면역 질환과 같은 숙주내 원하지 않는 또는 과잉 면역반응을 통해 임상적으로 발현된다. 면역억제요법은 과잉 면역 반응을 특징으로 하는 병리 현상의 기저 원인이 아니라, 증상을 치료하기 위해 개발되어 왔다. 이들 요법은 면역 기능의 하향-조정에 효과적이며, 따라서 암과 기회 감염을 포함하는 심각한 역효과 및 프레드니손, 사이클로스포린 및 타크롤리무스와 같은 약제로부터 오는 백내장, 고혈당, 타박상 및 신독성 등의 부작용에 대한 잠재성을 갖는다.

[0005] 비록 전체 면역 시스템을 억제하지는 않는 요법이 개발되었으나 이들 요법도 여전히 한계가 있다. 이들 면역 조절 치료는 면역 시스템 안에서 더 협소한 개입 지점을 표적화하고, 따라서 상이하고 때로는 덜 심각한 부작용을 갖는다. 이러한 면역조절 요법의 예는 항체, 예를 들면, 항-CD3 또는 항-IL2R의 사용을 포함한다. 이들 면역조절 요법은 비-반응성의 강화된 상태를 유도하는데 성공적이나, 그 면역조절 요법의 철회는 바람직하지 않은 병상으로의 복귀를 초래한다.

[0006] 중간엽 줄기 세포(MSC)는 자가-재생능 및 다른 중간엽 세포 계통 중에서 골모세포, 연골세포 및 지방세포로의 분화능을 갖는 중복성(multipotent) 줄기 세포이다. 최근 몇년 동안 인간 MSC의 다중 계통 분화 잠재능 및 면역조절 성질에 대한 집중적인 연구 결과 이들 세포가 면역학적 질환 및 퇴행성 질환을 포함하는 다양한 임상적 상태를 치료하는데 사용될 수 있음을 보여주었다. 결과적으로, MSC를 사용한 임상 연구의 수는 다양한 상태(다른 것들 중에서, 이식편대숙주병 (GVHD), 심근경색 및 염증 및 자가면역 질환 및 질병)에 대해 꾸준히 증가하였다. 최근 MSC를 활용한 임상 프로그램은 성체 공급원 및 제대혈에서 유래된 이러한 세포의 분리에 의존한다. MSC 임상 응용에 요구되는 높은 세포 용량(환자 kg 당 수백만 세포에 이르는)은 공여자 공급원으로부터 분리된 세포로부터 많은 수의 세포를 생성할 수 있는, 신뢰할 수 있고, 재현가능하며 효과적인 확장 프로토콜을 요구한다.

[0007] 그러나 세포 치료 및 조직 공학적 응용을 위한 임상적으로 의미있는 세포수에 도달하기 위해서는 MSC 시험관 외 확장이 필수적이다. 생체 내 노화 동안에서와 같이, MSC의 제대혈, 태아 및 성체 공급원(골수 또는 지방 조직과 같은)으로부터의 순차적 생체 외 세포 계대(passage)는 복제 스트레스, 염색체 이상 또는 기타 확률적 세포 결함을 일으키고, 확장된 MSC의 증식성, 클론원성 및 분화 잠재성의 점진적인 소실을 야기하여 종국적으로 MSC의 임상적인 안전성 및 유효성을 위험하게 할 수 있다. 치료에 있어 노화된 MSC의 사용은 과소평가되면 안되는데 세포가 분화 잠재성의 일부를 잃고 분비 프로파일 또한 변경되기 때문이다. 배양중 MSC 노화는 텔로미어의 단축과 함께 세포 성장 정지를 유도하는 것으로 밝혀졌으며, 골수(BM) MSC에 대해 계대 증가에 따라 지방 분화 잠재성은 계속적으로 감소되는 반면, 골형성 계통으로의 분화 경향은 증가하는 것으로 보고되었다.

[0008] 따라서, MSC의 임상 적용에 앞서 해결되어야 할 본질적인 여러 문제가 남아 있다. ESC 유래 MSC는 충분한 양으로 또한 상당히 조절가능한 방식으로 생성될 수 있어 공여자-의존성 공급원이 갖는 문제를 경감한다. MSC의 장기적 이식이 요구되지 않으므로 기본적으로 주조직적합성(MHC)의 미스매치에 대한 우려는 없다[7, 8]. 당업계에서 ESC 유래 MSC는 뮤린(murine) OP9 세포와의 공-배양 또는 핸드 피킹 시술을 포함하여 다양한 방법을 통해 수득되었다[9-13]. 그러나 이들 방법들은 힘들고, MSC 생성에 있어 수율이 낮으며, 품질이 상이하며 역가가 낮다. 또한, 더 양호한 치료적 계수, CB-유도, BM-유도 또는 지방-유도된 MSC에 비해 감소된 용량(세포수)로 사용될 수 있는 능력을 갖는 세포 산물을 제공할 수 있는 측면, 및/또는 CB-유도, BM-유도 또는 지방-유도된 MSC가 충분히 효과적이지 않은 염증 및 자가면역 질환에 대해 다루기 쉬운 치료를 제공하는 MSC에 대한 능력의 측면에 있어서, 주입된 세포의 역가를 최대화하는 것이 바람직하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 중간엽 간질 세포(MSC) 및 MSC 생성 방법에 관한 것이다. 본 발명의 방법은 상당수의 고 품질의 중간엽 간질 세포를 생성하며, 이들 세포는 높은 역가를 부여하는 젊은 세포의 표현형에 의해 특징지어진다. 본 발명의 일 실시예에서, MSC는 혈관모세포에서 유래된다. 본 발명의 MSC의 제제는 바람직하지 않은 면역 반응, 예를 들면, 자가면역 질병 및 질환 및 염증 질병 및 질환을 포함하는 병적 상태의 치료에 유용하다.

과제의 해결 수단

[0010] 일 양태에서, 본 발명은 혈관모세포를 배양하는 개선된 방법을 사용하여 혈관모세포에서 생성된 개선된 MSC 제제를 포함한다. 예시적 실시예에서, 본 발명의 중간엽 간질 세포는 높은 수준의 역가를 보유하며, 응괴되지 않거나 또는 배아 줄기 세포(ESC)에서 직접 유래된 중간엽 간질 세포보다 실질적으로 덜 응괴된다. 본 발명의 방법 중 어느 하나 이상에 따라 생성된 중간엽 간질 세포는 더 높은 수준의 역가를 보유하며, 응괴되지 않거나 또는 배아 줄기 세포(ESC)에서 직접 유래된 중간엽 간질 세포보다 실질적으로 덜 응괴될 수 있다.

[0011] 일 양태에서, 본 발명은 중간엽 간질 세포를 포함하는 약제학적 제제를 제공하며, 중간엽 간질 세포는 적어도 10 세포수 증식(population doublings)를 진행할 수 있으며, 예를 들면, 약 22 내지 27일 이내에 적어도 10 세포수 증식이 일어난다. 다른 양태에서, 본 발명은 중간엽 간질 세포를 포함하는 약제학적 제제를 제공하며, 중간엽 간질 세포는 적어도 15 세포수 증식을 진행할 수 있으며, 예를 들면, 약 22 내지 27일 이내에 적어도 15 세포수의 증식이 일어난다. 본 약제학적 제제는 혈관모세포의 시험관 내 분화에 의해 제조될 수 있다. 중간엽 간질 세포는 영장류 세포, 예를 들면, 인간 세포일 수 있다. 중간엽 간질 세포는 적어도 15 세포수 증식을 진행할 수 있다. 예컨대, 중간엽 간질 세포는 적어도 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 또는 그 이상의 세포수 증식을 진행할 수 있다. 본 제제는 약 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.9%, 0.8%, 0.7%, 0.6%, 0.5%, 0.4%, 0.3%, 0.2%, 0.1%, 0.09%, 0.08%, 0.07%, 0.06%, 0.05%, 0.04%, 0.03%, 0.02%, 0.01%, 0.009%, 0.008%, 0.007%, 0.006%, 0.005%, 0.004%, 0.003%, 0.002%, 0.001%, 0.0009%, 0.0008%, 0.0007%, 0.0006%, 0.0005%, 0.0004%, 0.0003%, 0.0002%, 또는 0.0001% 미만의 다능성 세포(pluripotent cells)를 포함할 수 있다. 바람직하게, 본 제제는 다능성 세포가 없다. 본 제제는 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 중간엽 간질 세포를 포함할 수 있다.

[0012] 일 양태에서, 적어도 50%의 중간엽 간질 세포는 (i) CD10, CD24, IL-11, AIRE-1, ANG-1, CXCL1, CD105, CD73 및 CD90 중 적어도 하나; (ii) CD10, CD24, IL-11, AIRE-1, ANG-1, CXCL1, CD105, CD73, CD90, CD105, CD13, CD29, CD 44, CD166, CD274, 및 HLA-ABC 중 적어도 하나; 또는 (iii) 이들의 조합에 대해 양성이다. 다른 양태에서, 적어도 50%의 중간엽 간질 세포는 (i) CD10, CD24, IL-11, AIRE-1, ANG-1, CXCL1, CD105, CD73 및 CD90

중 적어도 두개; (ii) CD10, CD24, IL-11, AIRE-1, ANG-1, CXCL1, CD105, CD73, CD90, CD105, CD13, CD29,CD 44, CD166, CD274, 및 HLA-ABC 모두에 대해 양성이다. 또 다른 양태에서, 적어도 50%의 중간엽 간질 세포는 (i) CD10, CD24, IL-11, AIRE-1, ANG-1, CXCL1, CD105, CD73, CD90, CD105, CD13, CD29,CD 44, CD166, CD274, 및 HLA-ABC의 모두에 대해 양성이고 (ii) CD31, 34, 45, 133, FGFR2, CD271, Stro-1, CXCR4, TLR3 중 적어도 하나를 발현하지 않거나 낮은 수준으로 발현한다. 부가적으로, 적어도 60%, 70%, 80% 또는 90%의 이러한 중간엽 간질 세포는 (i) CD10, CD24, IL-11, AIRE-1, ANG-1, CXCL1, CD105, CD73 및 CD90 중 하나 이상; 또는 (ii) CD10, CD24, IL-11, AIRE-1, ANG-1, CXCL1, CD105, CD73, CD90, CD105, CD13, CD29,CD 44, CD166, CD274, 및 HLA-ABC 중 하나 이상에 대해 양성일 수 있다.

[0013] 일 양태에서, 본 약제학적 제제는 필요로 하는 대상에서 바람직하지 않은 면역 반응을 치료 또는 예방하는데 효과적인 양의 중간엽 간질 세포를 포함한다. 본 약제학적 제제는 필요로 하는 수여자 내로 이식되기 위한 다른 세포, 조직 또는 기관을 더 포함할 수 있다. 예시적인 다른 세포 또는 조직은 RPE 세포, 피부 세포, 각막 세포, 췌장 세포, 간 세포, 또는 심장 세포 또는 임의의 상기 세포를 포함하는 조직을 포함한다.

[0014] 다른 양태에서, 중간엽 간질 세포는 골수에서 유래된 것이 아니며, 면역 조절 어세이에서 제제의 역가가 골수에서 유래된 중간엽 간질 세포 제제의 역가보다 더 크다. 역가는 EC50 용량을 결정하는 면역 조절 어세이에 의해 측정될 수 있다.

[0015] 일 양태에서, 본 제제는 10 세포수 증식후 그 증식능의 약 50 내지 100%를 보유한다.

[0016] 다른 양태에서, 본 약제학적 제제의 중간엽 간질 세포는 다능성 세포에서 직접 유래된 것이 아니며, 중간엽 간질 세포는 (a)응괴되지 않거나 또는 ESC 에서 직접 유래된 중간엽 간질 세포보다 실질적으로 덜 응괴된다; (b) ESC 에서 직접 유래된 중간엽 간질 세포에 비해 분리시(splitting) 더 쉽게 산포(disperse)된다; (c) 동일수의 ESC로 시작할 때 ESC 에서 직접 유래된 중간엽 간질 세포보다 숫적으로 더 많으며; 및/또는 (d) ESC에서 직접 유래된 중간엽 간질 세포보다 더 빨리 특징적인 중간엽 세포 표면 마커를 획득한다.

[0017] 본 발명은 혈관모세포 세포를 중간엽 줄기 세포가 생기는 조건하에서 배양하는 것을 포함하는 중간엽 간질 세포를 생성하는 방법을 더 포함한다. 혈관모세포는 피더-프리 조건(feeder-free conditions)에서 배양될 수 있다. 또한, 혈관모세포는 예를 들면, 형질전환 성장 인자 베타(TGF-베타), 표피 성장 인자(EGF), 인슐린-유사 성장 인자 1, 소 섬유모세포 성장 인자(bFGF), 및/또는 혈소판-유래 성장 인자 (PDGF)를 포함하는 매트릭스상에 플레이팅될 수 있다. 매트릭스는 라미닌, 피브로넥틴, 비트로넥틴, 프로테오글리칸, 엔탁틴, 콜라겐, 콜라겐 I, 콜라겐 IV, 헤파란 설페이트, 마트리겔(엔젤브레쓰-홈-스왐(Engelbreth-Holm-Swarm; EHS) 마우스 육종 세포 유래 가용성 제제), 인간 기저막 추출물, 및 이들의 조합으로 구성된 군에서 선택될 수 있다. 매트릭스는 엔젤브레쓰-홈-스왐 마우스 육종 세포 유래 가용성 제제를 포함할 수 있다.

[0018] 일 양태에서, 중간엽 간질 세포는 포유류일 수 있다. 바람직하게, 중간엽 간질 세포는 인간, 개 또는 말 세포일 수 있다.

[0019] 일 양태에서, 혈관모세포는 α MEM를 포함하는 배지 내에서 배양될 수 있다. 다른 양태에서, 혈관모세포는 혈청 또는 혈청 대체물을 포함하는 배지 내에서 배양될 수 있다. 예를 들면, 혈관모세포 세포는 0%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 또는 20% 우태아 혈청이 보충된 αMEM을 포함하는 배지 내에서 배양될 수 있다. 부가적인 예시적인 실시예에서 배지는 더 높은 퍼센트의 우태아 혈청, 예를 들면, 20% 초과, 예를 들면, 25% 이상, 30% 이상, 35% 이상, 40% 이상, 또는 그 이상의 더 높은 퍼센트의 우태아 혈청을 포함할 수 있다. 혈관모세포는 매트릭스 상에서 적어도 약 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30 일간 배양될 수 있다

[0020] 일 양태에서, 혈관모세포 또는 혈관-콜로니 형성 세포는 다능성 세포, 예를 들면, iPS 세포, 또는 할구(blastomeres)로부터 분화된다. 다능성 세포는 인간 배아를 파괴하지 않고 하나 이상의 할구에서 유래될 수 있다. 부가적으로, 혈관모세포는 다능성 세포로부터 (a) 다능성 세포를 배양하여 세포 클러스터를 형성하는 단계를 포함하는 방법에 의해 분화될 수 있다. 일 양태에서, 다능성 세포는 혈관 내피 성장 인자(VEGF) 및/또는 골형성 단백질 4(BMP-4)의 존재하에 배양된다. VEGF 및 BMP-4는 다능성 세포 배양물에 세포 배양 개시 0 내지 48 시간내에 추가될 수 있고, VEGF는 임의로 20 내지 100 nm/mL의 농도로 추가되며 BMP-4는 임의로 15 내지 100 ng/mL의 농도로 추가된다.

[0021] 일 양태에서, 혈관모세포는 다능성 세포로부터: (b) 세포 클러스터를 혈관모세포로 분화를 유도하기에 충분한 양의 적어도 하나의 성장인자의 존재하에 단일 세포를 배양하는 단계를 더 포함하는 방법에 의해 분화된다. 단

계 (b)에서 추가되는 적어도 하나의 성장 인자는 염기성 섬유모세포 성장 인자 (bFGF), 혈관 내피 성장 인자 (VEGF), 골형성 단백질 4(BMP-4), 줄기 세포 인자(SCF), Flt 3L(FL), 트롬보포이에틴(TPO), EPO, 및/또는 tPTD-HOXB4 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 단계 (b)에서 추가되는 적어도 하나의 성장 인자는 단계 (a)의 개시에서 36 내지 60 시간내에 배양물에 추가될 수 있다. 바람직하게, 단계 (b) 에서 추가되는 적어도 하나의 성장 인자는 단계 (a)의 개시에서 40 내지 48 시간내에 배양물에 추가될 수 있다. 단계 (b)에서 추가되는 적어도 하나의 인자는 bFGF, VEGF, BMP-4, SCF, FL 및/또는 tPTD-HOXB4 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 성장 인자가 단계 (b)에서 추가되는 경우 그 농도는 대략 하기 범위일 수 있다: bFGF는 약 20 내지 25 ng/ml, VEGF는 약 20 내지 100 ng/ml, BMP-4는 약 15 내지 100 ng/ml, SCF는 약 20 내지 50 ng/ml, FL는 약 10 내지 50 ng/ml, TPO는 약 20 내지 50 ng/ml이고 tPTD-HOXB4는 약 1.5 내지 5 U/ml이다.

[0022] 다른 양태에서, 본 방법은 (c) 세포 클러스터를 임의로 단일 세포로 분리하는 단계를 더 포함한다. 다른 양태에서, 본 방법은 (d) 혈관모세포를 혈관모세포 또는 혈관-콜로니 형성 세포를 확장하기에 충분한 양으로 존재하는 적어도 하나의 부가적 성장 인자를 포함하는 배지내에서 배양하는 단계를 더 포함한다. (d)의 적어도 하나의 부가적 성장 인자는 인슐린, 트랜스페린, 과립구 대식세포 콜로니-자극 인자(GM-CSF), 인터루킨-3(IL-3), 인터루킨-6(IL-6), 과립구 콜로니-자극인자(G-CSF), 에리스로포이에틴(EPO), 줄기 세포 인자(SCF), 혈관 내피 성장 인자(VEGF), 골형성 단백질 4(BMP-4), 및/또는 tPTD-HOXB4 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 단계 (d)에서의 예시적인 농도는 인슐린 약 10 내지 100 μg/ml, 트랜스페린 약 200 내지 2,000μg//ml, GM-CSF 약 10 내지 50 ng/ml, IL-3 약 10 내지 20 ng/ml, IL-6 약 10 내지 1000 ng/ml, G-CSF 약 10 내지 50 ng/ml, EPO 약 3 내지 50 U/ml, SCF 약 20 내지 200 ng/ml, VEGF 약 20 내지 200 ng/ml, BMP-4 약 15 내지 150 ng/ml, 및/또는 tPTD-HOXB4 약 1.5 내지 15U/ml를 포함한다. 단계 (a), (b), (c) 및/또는 (d)에서의 배지는 무-혈청 배지일 수 있다.

[0023] 일 양태에서, 본 방법은 적어도 8천만, 8천5백만, 9천만, 9천5백만, 1억, 1억2천5백만, 또는 1억5천만 중간엽 간질 세포를 생성한다. 혈관모세포는 다능성 세포 분화의 분화 유도 개시후 적어도 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 또는 18일 후에 수확될 수 있다. 중간엽 간질 세포는 다능성 세포 분화 유도 개시후 적어도 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 또는 50일 이내에 생성될 수 있다. 다른 양태에서, 본 방법은 배양 약 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 또는 35일 내 약 200,000 혈관모세포에서 생성되는 적어도 8천만, 8천5백만, 9천만, 9천5백만, 1억, 1억2천5백만, 또는 1억5천만 중간엽 간질 세포를 생성한다. 중간엽 간질 세포는 혈관모세포 및/또는 혈관-콜로니 형성 세포로부터 혈관모세포 대 중간엽 간질 세포가 적어도 1:200, 1:250, 1:300, 1:350, 1:400, 1:415, 1:425, 1:440; 1:450, 1:365, 1:475, 1:490 및 1:500의 비율로 배양 약 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 또는 35일 내에 생성될 수 있다. 세포는 인간 세포일 수 있다.

[0024] 본 발명은 또한 기술된 방법에 의해 수득된 혈관모세포에서 유래된 중간엽 간질 세포를 포함한다. 일 양태에서, 본 발명은 혈관모세포의 시험관 내 분화에 의해 유래된 중간엽 간질 세포를 포함한다. 적어도 50%의 중간엽 간질 세포는 (i) CD10, CD24, IL-11, AIRE-1, ANG-1, CXCL1, CD105, CD73, CD90, CD105, CD13, CD29, CD 44, CD166, CD274, 및 HLA-ABC 모두에 양성이고 (ii) CD31, 34, 45, 133, FGFR2, CD271, Stro-1, CXCR4, TLR3 중 적어도 하나를 발현하지 않거나 낮은 수준으로 발현할 수 있다. 또는, 적어도 50%의 중간엽 간질 세포는 (i) CD10, CD24, IL-11, AIRE-1, ANG-1, CXCL1, CD105, CD73 및 CD90 모두; 또는 (ii) CD73, CD90, CD105, CD13, CD29, CD44, CD166, CD274, 및 HLA-ABC 모두에 양성일 수 있다. 적어도 60%, 70%, 80% 또는 90%의 이들 중간엽 간질 세포는 (i) CD10, CD24, IL-11, AIRE-1, ANG-1, CXCL1, CD105, CD73 및 CD90 중 적어도 하나; 또는 (ii) CD73, CD90, CD105, CD13, CD29, CD 44, CD166, CD274, 및 HLA-ABC 중 적어도 하나에 양성일 수 있다. 바람직하게, 중간엽 간질 세포는 CD31, CD34, CD45, CD133, FGFR2, CD271, Stro-1, CXCR4, TLR3 중 적어도 하나를 발현하지 않거나 또는 낮은 수준으로 발현한다.

[0025] 다른 양태에서, 본 발명은 본 명세서에 기술된 중간엽 간질 세포 제제를 포함한다. 본 제제는 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.9%, 0.8%, 0.7%, 0.6%, 0.5%, 0.4%, 0.3%, 0.2%, 0.1%, 0.09%, 0.08%, 0.07%, 0.06%, 0.05%, 0.04%, 0.03%, 0.02%, 0.01%, 0.009%, 0.008%, 0.007%, 0.006%, 0.005%, 0.004%, 0.003%, 0.002%, 0.001%, 0.0009%, 0.0008%, 0.0007%, 0.0006%, 0.0005%, 0.0004%, 0.0003%, 0.0002%, 또는 0.0001% 미만의 다능성 세포를 포함할 수 있다. 바람직하게, 본 제제는 다능성 세포가 결여된다. 본 제제는 실질적으로 정제되며 임의로 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 인간 중간엽 간질 세포를 포함할 수 있다. 본 제제는 실질적으로 유사한 수준으로 p53 및 p21 단백질을 포함하거나 p53 단백질이 p21 단백질에 비해 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 배 더 많은 수준으로 포함할 수 있다. 중간엽 간질

세포는 배양에서 적어도 5 세포수 증식을 진행할 수 있다. 바람직하게, 중간엽 간질 세포는 배양에서 적어도 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 세포수 증식을 진행할 수 있다.

[0026] 일 양태에서, 본 발명의 중간엽 간질 세포는 (a) 응괴하지 않거나 또는 ESC에서 직접 유래된 중간엽 간질 세포보다 실질적으로 적게 응괴한다; (b) ESC에서 직접 유래된 중간엽 간질 세포에 비해 분리시 더 쉽게 산포된다; (c) 동일수의 ESC로 시작할 때 ESC에서 직접 유래된 중간엽 간질 세포보다 숫적으로 더 많으며; 및/또는 (d) ESC에서 직접 유래된 중간엽 간질 세포보다 더 빨리 특징적인 중간엽 세포 표면 마커를 획득한다. 본 발명은 바람직하지 않은 면역 반응을 치료하기에 효과적인 양의 중간엽 간질 세포를 포함하는, 중간엽 간질 세포 포함 약제학적 제제를 제공한다. 본 제제는 바람직하지 않은 면역 반응을 치료하기에 효과적인 양의 중간엽 간질 세포를 포함하고, 필요로 하는 수여자 내로 이식되기 위한 다른 세포, 조직을 더 포함할 수 있다. 예시적인 다른 세포는 동종이형(allogeneic) 또는 동계(syngeneic) 췌장, 신경, 간, RPE, 또는 각막 세포 또는 이들 중 어느 하나를 함유하는 조직을 포함한다. 약제학적 제제는 비제한적인 예로 다발경화증, 전신성경화증, 혈액암, 심근경색, 기관이식거부, 만성동종이식신장병, 경화, 간 기능상실, 심장 기능상실, GvHD, 정강 골절, 좌심실 기능이상, 백혈병, 골수형성이상증후군, 크론병, 당뇨병, 만성폐쇄폐질환, 불완전골생성증, 동형접합 가족성 저콜레스테롤혈증, 반원상 연골절제술후 처치, 성인 치주염, 중증 심근허혈환자에서 혈관형성, 척수손상, 뼈형성장애, 중증하지허혈, 당뇨병성 발질환, 원발성 쇼그렌 증후군, 골관절염, 연골 결함, 제엽염, 다발적 전신위축, 근위축성 측색 경화증, 심장 수술, 전신성 홍반성 루프스, 생 신장 동종이식, 비악성 적혈구 질환, 열화상, 방사선 화상, 파킨슨병, 미세골절, 표피수포증, 중증 관성 허혈, 특발성 확장심근병, 대퇴골두 괴사, 루프스 신장염, 골강 결손(bone void defects), 허혈성 뇌졸중, 뇌졸중후(after stroke), 급성 방사선 증후군, 폐병, 관절염, 골재생, 포도막염 또는 이들의 조합을 포함하는 자가면역 질환 또는 동종이형 세포에 대한 면역 반응의 치료에 유용할 수 있다. 대상 MSC (이들의 제형 또는 제제 포함)는 성인 호흡곤란증후군, 외상후 성인 호흡곤란증후군, 이식 폐 질환, 만성 폐쇄 폐질환, 폐기종, 만성 폐쇄성 기관지염, 기관지염, 알러지 반응, 박테리아 또는 바이러스성 폐렴으로 인한 손상, 천식, 자극원에의 노출 및 담배 이용(tobacco use)과 같은 염증 성분 또는 급성 손상을 포함하는 호흡기 상태를 치료하는데 사용될 수 있다. 부가적으로, 대상 MSC (이들의 제형 또는 제제 포함)는 아토피성 피부염, 알러지성 비염, 청각 소실(특히 자가면역 청각 소실 또는 소음-유도 청각 소실), 건선을 치료하는데 사용될 수 있다.

[0027] 본 발명은 또한 본 명세서에 기술된 중간엽 간질 세포 또는 중간엽 간질 세포 제제를 포함하는 키트를 제공한다. 키트는 냉동 또는 동결보존된 중간엽 간질 세포 또는 중간엽 간질 세포 제제를 포함할 수 있다. 키트에 포함된 중간엽 간질 세포 또는 중간엽 간질 세포 제제는 세포 송달 비히클내에 포함될 수 있다.

[0028] 또한, 본 발명은 본 명세서에 기술된 중간엽 간질 세포 또는 중간엽 간질 세포 제제의 유효량을 이를 필요로 하는 대상에 투여하는 단계를 포함하는, 질병 또는 질환을 치료하는 방법을 제공한다. 본 방법은 또한 다른 세포 또는 조직, 예를 들면, 망막, RPE, 각막, 신경, 면역, 골수, 간 또는 췌장 세포의 이식을 포함할 수 있다. 예시적인 치료되는 질병 또는 질환은, 비제한적으로 다발경화증, 전신성경화증, 혈액암, 심근경색, 기관이식거부, 만성동종이식신장병, 경화, 간 기능상실, 심장 기능상실, GvHD, 정강 골절, 좌심실 기능이상, 백혈병, 골수형성이상증후군, 크론병, 당뇨병, 만성폐쇄폐질환, 불완전골생성증, 동형접합 가족성 저콜레스테롤혈증, 반원상 연골절제술후 처치, 성인 치주염, 중증 심근허혈환자에서 혈관형성, 척수손상, 뼈형성장애, 중증하지허혈, 당뇨병성 발질환, 원발성 쇼그렌 증후군, 골관절염, 연골 결함, 제엽염, 다발적 전신 위축, 근위축성 측색 경화증, 심장 수술, 불응성 전신성 홍반성 루프스, 생 신장 동종이식, 비악성 적혈구 질환, 열화상, 방사선 화상, 파킨슨병, 미세골절, 표피수포증, 중증 관상 허혈, 특발성 확장심근병, 대퇴골두 괴사, 루프스 신장염, 골강 결손(bone void defects), 허혈성 뇌졸중, 뇌졸중후, 급성 방사선 증후군, 폐병, 관절염, 골재생, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일 양태에서, 질병 또는 질환은 포도막염이다. 다른 양태에서, 질병 또는 질환은 자가면역 질환, 예를 들면, 다발경화증, 또는 동종이형 세포에 대한 면역 반응이다.

[0029] 본 발명은 또한 본 명세서에 기술된 중간엽 간질 세포 또는 중간엽 간질 세포 제제의 유효량을 이를 필요로 하는 대상에 투여하는 것을 포함하는, 뼈 소실 또는 연골 손상을 치료하는 방법을 제공한다. 중간엽 간질 세포는 동종이형 또는 동계 이식된 세포 또는 조직, 예를 들면, 망막 색소상피세포, 망막 세포, 각막 세포, 또는 근육 세포와 함께 투여될 수 있다.

[0030] 본 발명은 세포수 증식 수의 증가에도 불구하고 역가를 유지하는 MSC 제제를 생성하는 혈관모세포를 배양하는 방법을 제공한다. 본 발명의 약제학적 중간엽 간질 세포 제제는 투여가 필요한 포유류 숙주에 투여될 때 개선된 치료적 성질을 보여준다.

도면의 간단한 설명

[0031] 도 1은 다능성 세포로부터 FM-MA09-MSC의 생성을 도시한 것으로, ESC로부터 혈관모세포를 경유하여 중간엽 간질 세포를 생성하는 현미경 사진이다.

도 2는 다능성 세포-유래 혈관모세포에서 수득된 FM-MA09-MSC의 표현형을 도시한 것으로, 초기 혈관모세포 집단에서(그래프 좌측, 7 내지 11일 혈관모세포) 및 마트리겔 코팅 플레이트상에 혈관모세포를 배양한 후(그래프 우측)의 MSC 표면 마커에 양성인 세포수 퍼센트와 혈관모세포에서 유래된 중간엽 간질 세포의 현미경 사진(우측 패널 사진)을 보여준다.

도 3은 상이한 배양 방법에서 유래된 중간엽 간질 세포의 표현형을 나타낸 것으로, 젤라틴 코팅 플레이트 상에서 ESC(좌측 패널), 마트리겔 코팅 플레이트 상에서 ESC(중간 패널), 및 마트리겔 코팅 플레이트 상에서 혈관모세포(우측 패널)를 배양한 후 MSC 표면 마커에 양성인 세포수 퍼센트를 보여준다.

도 4는 다능성 세포로부터의 중간엽 간질 세포 수율을 도시한 것으로, 젤라틴 코팅 플레이트 상에서 ESC(제1 칼럼-수율 없음), 마트리겔 코팅 플레이트 상에서 ESC(제2 칼럼), 및 마트리겔 코팅 플레이트 상에서 혈관모세포(제3 칼럼)를 배양한 후 수득된 MSC 표면 마커에 양성인 세포의 수율을 보여준다.

도 5는 중간엽 간질 세포 마커의 획득을 나타낸 것으로, 혈관모세포(상부 선) 및 ESC(하부 선)을 이용하여 수득되는 MSC 표면 마커에 대한 시간을 도시한 것이다.

도 6은 상이한 배양 방법으로 유래된 중간엽 간질 세포의 표현형을 나타낸 것으로, 마트리겔 코팅 플레이트 상에서 ESC(좌측 패널) 및 마트리겔 코팅 플레이트 상에서 혈관모세포(우측 패널)를 배양한 후 MSC 마커에 양성이고 조혈 및 내피 마커에 음성인 세포 퍼센트를 보여준다.

도 7은 FM-MA09-MSC 분화능을 나타낸 것으로, MA09 ESC로부터 분화된 혈관모세포에서 유래한 중간엽 간질 세포가 지방세포 및 골세포를 형성하는 분화능을 도시한다.

도 8은 MSC 연골발생 분화를 나타낸 것으로, MA09 ESC 혈관모세포-유래 중간엽 간질 세포의 연골발생 분화를 아그레칸(콘드로이틴 프로테오글리칸 설페이트 1) 및 콜라겐 IIa의 mRNA 발현에 의해 도시한 것이다.

도 9는 FM-MA09-MSC에 의한 CD309의 일시적 발현을 나타낸 것으로, 세포 표면 마커 CD309의 일시적 발현을 보여준다.

도 10a는 마이토겐에 반응한 T 세포 증식이 FM-MA09-MSC에 의해 억제됨을 보여주며, 화학적 자극(PMA/이오노마이신)에 의해 유발된 T 세포 증식에 대한 혈관모세포-유래 중간엽 간질 세포 억제를 보여준다.

도 10b는 항원 제시 세포에 반응한 T 세포 증식이 FM-MA09-MSC에 의해 억제됨을 보여주며, 수지상 세포에의 노출에 의해 유발된 T 세포 증식에 대한 혈관모세포-유래 중간엽 간질 세포 억제를 보여준다.

도 11은 항원 제시 세포에 반응한 T 세포 증식이 FM-MA09-MSC에 의해 억제됨을 도시한 것으로, 도 11a는 혈관모세포-유래 중간엽 간질 세포가 IL2 자극에 반응하여 유도된 CD4/CD25 이중 양성 Treg의 퍼센트를 증가시킬 수 있음을 보여준다.

도 11b는 혈관모세포-유래 중간엽 간질 세포가 IFNγ의 Th1 분비를 저해함을 보여준다.

도 12는 전염증 사이토카인 IFNg가 FM-MA09-MSC 표면 마커 발현에서의 변화를 자극함을 도시한 것으로, 감마 인터페론이 MSC 표면 마커 발현에서의 변화를 자극하며 MSC 면역억제 효과를 증강시킬 수 있음을 보여준다.

도 13은 FM-MA09-MSC의 증강된 역가 및 더 커진 저해 효과를 BM-MSC에 비교하여 도시한 것으로, FM-MA09-MSC는 BM-MSC 보다 T 세포 증식에 더 큰 저해효과를 나타낸다. (a)PBMC과의 공배양에서의 MSC양의 증가는 PMA 및 이오노마이신에 반응한 T 세포 증식의 용량-의존적 감소를 유발한다. 젊은(p4) FM-MA09-MSC가 모든 검사된 세포 타입중 가장 강력하였다. (b)FM-MA09-MSC는 PHA에 반응한 T 세포 증식을 BM-MSC보다 더 큰 수준으로 저해하였다. 5:1 비율의 PBMCs:MSC를 6일간 공배양하였다 (c)FM-MA09-MSC는 수지상 세포의 양 증가에 반응한 T 세포 증식을 BM-MSC 보다 더 잘 저해하였다. 13a 내지 13c에서, T 세포 증식 퍼센트는 CD4+ 및/또는 CD8+ 세포 집단에서 BrdU 포함에 의해 평가되었다.

도 14는 FM-MA09-MSC가 Treg 유도를 증강시킴을 도시한 것으로, 빠른 계대 MSC는 늦은 계대 MSC 보다 더 큰 효과를 나타낸다. 비-부착성 PBMC(상이한 공여자)를 FM-MA09-MSC의 존재 또는 비존재하에서 4일간 +/- IL2 배양하였다. CD4/CD25 이중 양성 Treg의 퍼센트는 유세포 분석으로 평가하였다. 젊은(p6) 또는 늙은(p16-18) FM-

MA09-MSC가 사용되었다. 흑색 막대는 6개 실험의 평균을 나타낸다. MSC는 전체적으로 Treg의 유도에 대해 통계적으로 유의한 효과를 나타내었다(p=0.02).

도 15는 FM-MA09-MSC에 의한 증강된 Treg 확장을 BM-MSC에 대비하여 도시한 것으로, FM-MA09-MSC는 BM-MSC에 비해 확장을 더 잘 유도한다. (a)CD4/CD25 이중 양성 Treg에서의 배율(fold) 증가. 마이너스 IL2 조건을 1로 하고 다른 그룹은 이 수준을 넘는 배율 유도로 표현하였다. MM=MA09-MSC, BM=골수 MSC. "p"=계대 수. (b)FM MA09-MSC(MM)는 CD4/CD25/FoxP3 삼중 양성 Treg를 BM-MSC보다 더 잘 유도한다. (c)CD4+ 반응 PBMC의 퍼센트는 상이한 처치 그룹 중에 일관되었다. (d)CD25+ 반응 PBMC의 퍼센트는 상이한 처치 그룹에 따라 달랐다. FM-MA09-MSC는 BM-MSC 보다 더 큰 CD25 발현을 유도하였다. 이러한 차이는 Treg 유도에서의 차이를 설명해 준다.

도 16은 FM-MA09-MSC가 BM-MSC 보다 더 큰 증식능을 가짐을 보여주는 것으로, FM-MA09-MSC는 BM-MSC 보다 더 큰 증식능을 가진다. 누적 세포수 증식을 배양에서의 일수에 대해 도표화하였다. ESC-유래 혈관모세포 또는 골수-유래 단핵구 세포의 초기 플레이팅 후, 부착성 세포는 p0 MSC로 간주되었다. 연속적인 MSC 계대를 7000 세포/sq cm의 밀도로 다시 플레이팅하고, 배양이 약 70% 합류(confluent)일 때(3 내지 5 일 마다) 수확하였다.

도 17는 FM-MA09-MSC 생성 과정에서 마트리겔 효과를 도시한 것으로, 빠른 계대(즉, p2)에서 마트리겔로부터 세포를 제거할 경우, p6까지 마트리겔상에서 유지된 세포에 비해 일시적으로 MSC 성장을 지연시킬 수 있다.

도 18은 BM-MSC 및 FM-MA09-MSC가 연골형성을 진행하는 것으로 보여주며, 사프라닌 O 염색(연골 매트릭스 침착을 지시함)을 파라핀-내포 펠렛 매스 배양물 상에 21일 후 수행하였다. 이미지는 40X 배율이다.

도 19는 기저 상태에서 FM-MA09-MSC가 BM-MSC보다 PGE2를 덜 분비하나 IFNγ 또는 TNFα 자극시 배율 증가는 더 큼을 보여준다. (a)프로스타글란딘 E2 분비량(pg/ml)을 BM-MSC 대 FM-MA09-MSC에 대해 기저 또는 다양한 자극 조건하에서 나타내었다. PGE2양은 세포 수에 대해 정규화하였다. (b) 기저 PGE2 값을 1로 하고(흑색선) 다양한 자극하에서의 PGE2 분비를 기저선을 넘는 배율 증가로 표현하였다.

도 20은 FM-MA09-MSC의 시간의 경과에 따른 표현형의 유지를 보여준다. 상이한 MSC 집단을 유세포 분석하였다. (a)FM-MA09-MSC의 세포 표면 마커 발현이 세개의 상이한 기질에서 유지되며 BM-MSC에 대비되었다. (b)FM-MA09-MSC의 세포 표면 마커 발현을 시간의 경과에 따라 (표시된 바와 같이 연속적인 계대로) 평가하였다.

도 21는 FM-MA09-MSC가 BM-MSC에 비해 Stro-1를 더 적게 CD10를 더 많이 발현함을 보여준다. 상이한 MSC 집단의 유세포 분석. Stro-1 발현은 표시된 계대 수에서 BM-MSC 보다 FM-MA09-MSC에서 더 낮았다. CD10 발현은 BM-MSC 보다 FM-MA09-MSC에서 더 높았다. 다른 마커는 양 MSC 집단에서 동일하였다.

도 22는 10개의 상이한 로트의 빠른 계대 FM-MA09-MSC에서 Stro-1 및 CD10 발현을 보여주며, 일관되게 낮은 Stro-1 및 중등도의 CD10 발현을 보여준다. 상이한 MSC 집단의 유세포 분석. 10개의 상이한 로트의 FM-MA09-MSC를 표시된 계대 수에서 Stro-1 및 CD10 발현에 대해 평가하였다. Stro-1 발현은 상이한 로트의 FM-MA09-MSC에서 일관되게 낮았다(평균 5-10%). CD10 발현은 상이한 로트의 FM-MA09-MSC에서 일관되게 중등도이었다(평균 약 40%).

도 23은 FM-MA09-MSC가 배양에서 나이가 들어가도 그 크기를 유지하는 반면, BM-MSC 세포의 사이즈는 노화에 따라 증가됨을 보여준다. 유세포 분석 상에서 전방 산란 측면 산란 도트 플롯(좌측상에 도시)을 사용하여 MSC의 크기를 측정하였다. 우측상면 사분면에서의 세포 퍼센트를 모니터하고 바 그래프로 나타내었다.

도 24는 CD10 및 CD24가 BM-MSC에 대비시 FM-MA09-MSC에서 상향조절됨을 보여준다. 기저 상태에서 BM-MSC 및 FM-MA09-MSC의 유전자 발현 분석을 도시한다. 정량적 RT-PCR를 Taqman 프로브와 함께 사용하여 표시된 유전자의 발현을 평가하고 두개의 하우스키핑 유전자로 표준화하였다. 사중 판독 평균을 +/- 표준편차로 나타내었다.

도 25는 Aire-1 및 IL-11가 BM-MSC에 대비시 FM-MA09-MSC에서 상향조절됨을 보여준다. 기저 상태에서 BM-MSC 및 FM-MA09-MSC의 유전자 발현 분석을 도시한다. 정량적 RT-PCR를 Taqman 프로브와 함께 사용하여 표시된 유전자의 발현을 평가하고 두개의 하우스키핑 유전자로 정규화하였다. 사중 판독 평균을 +/- 표준편차로 나타내었다.

도 26은 Ang-1 및 CXCL1가 BM-MSC에 대비시 FM-MA09-MSC에서 상향조절됨을 보여준다. 기저 상태에서 BM-MSC 및 FM-MA09-MSC의 유전자 발현 분석을 도시한다. 정량적 RT-PCR를 Taqman 프로브와 함께 사용하여 표시된 유전자의 발현을 평가하고 두개의 하우스키핑 유전자로 정규화하였다. 사중 판독 평균을 +/- 표준편차로 나타내었다.

도 27은 IL6 및 VEGF가 BM-MSC에 대비시 FM-MA09-MSC에서 하향조절됨을 보여준다. 기저 상태에서 BM-MSC 및 FM-MA09-MSC의 유전자 발현 분석을 도시한다. 정량적 RT-PCR를 Taqman 프로브와 함께 사용하여 표시된 유전자의 발현을 평가하고 두개의 하우스키핑 유전자로 정규화하였다. 사중 판독 평균을 +/- 표준편차로 나타내었다.

도 28은 FM-MA09-MSC 및 BM-MSC가 IFNγ 자극 3일에 반응한 인돌아민 2,3 데옥시게나제(IDO) 활성을 증가시킴을 보여준다. MSC에 대해 50 ng/ml IFNg으로 3일간 자극하고, 트립토판을 키누레닌으로 전환시키는 활성(IDO 활성의 지표)을 비교하여 도시하였다. 각 MSC 집단에 대해, 1 백만 세포를 용해하고 어세이에 사용하였다.

도 29는 각각 면역 억제 및 증식에 관련된 두개의 단백질인 Aire-1 및 프리온 단백질(PrP)의 FM-MA09-MSC 발현에 있어서 연령-관련 변화를 도시한다: 상이한 계대 수(p)의 FM-MA09-MSC 전 세포 용해물에서 Aire-1 및 PrP 발현의 웨스턴 블롯 분석. 액틴 발현이 로딩 대조군으로 도시된다. Aire-1 및 PrP 발현의 차이가 액틴 로딩 대조군을 참조로 하여 표시된다.

도 30는 FM-MA09-MSC가 BM-MSC 보다 기저 상태에서 IL6를 덜 분비함을 보여준다. 사이토카인 어레이는 MSC 조건화 매질 내 정규화에 대한 양성 대조군(좌측 4 점) 및 IL6(박스처리)를 보여준다. 두명의 상이한 공여자에서 온 BM-MSC가 4개의 상이한 로트의 FM-MA09-MSC와 대비되었다.

도 31은 FM-MA09-MSC가 BM-MSC 보다 기저 및 IFNγ-자극 상태에서 IL6를 덜 분비함을 보여준다. 사이토카인 어레이는 MSC 조건화 매질 내 정규화에 대한 양성 대조군(좌측 4 점) 및 IL6(박스처리)를 보여준다. +/- IFNγ 처치 48 시간 후에, 계대 7 BM-MSC가 p7 FM-MA09-MSC와 대비되었다.

도 32는 FM-MA09-MSC가 BM-MSC 보다 기저 및 IFNγ-자극 상태에서 VEGF를 덜 분비함을 보여준다. 사이토카인 어레이는 MSC 조건화 매질 내 정규화에 대한 양성 대조군(좌측 4 점) 및 VEGF(박스처리)를 보여준다. +/- IFNγ 처치 48 시간 후에, 계대 7 BM-MSC가 p7 FM-MA09-MSC와 대비되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0032] 본 발명은 혈관모세포를 배양하여 중간엽 간질세포, 중간엽 간질세포 제제를 생성하는 방법, 혈관모세포를 배양하는 방법 및 중간엽 간질 세포를 사용하여 질병을 치료하는 방법에 관한 것이다.

[0033] 본 발명의 방법은 선행 방법에 비교하여 혈관모세포 배양에 의해 증가된 수율로 중간엽 간질 세포를 생성하며, 실질적으로 ESC가 없는 중간엽 간질 세포 제조에 있어 선행 방법보다 더 효율적이다. 본 발명의 혈관모세포-유래 중간엽 간질 세포는 특정 마커의 발현 또는 발현부족으로 정의되는 새롭고 젊은 표현형을 보유한다.

[0034] 어떤 실시예에서, MSC 제제(예, 적어도 10^3, 10^4, 10^5 또는 심지어 10^6 MSC를 갖는 배양물)는 평균적으로 ESC 및/또는 인간 iPS 세포(또는 ESC 및/또는 인간 iPS 세포 집단의 평균) 텔로미어 길이의 적어도 30 퍼센트의 텔로미어 길이를 가지며, 바람직하게 ESC 및/또는 인간 iPS 세포(또는 ESC 및/또는 인간 iPS 세포 집단의 평균)의 텔로미어 길이의 적어도 40, 50, 60, 70 80 또는 심지어 90 퍼센트를 가질 수 있다. 예를 들면, ESC 및/또는 인간 iPS 세포(또는 ESC 및/또는 인간 iPS 세포 집단)는 MSC 세포가 분화되어 온 세포 또는 세포 집단일 수 있다.

[0035] MSC 제제는 집단으로서, 4 kb 이상, 바람직하게 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 이상 또는 심지어 13 kb의 평균 말단 제한 단편 길이(TRF)를 가질 수 있다. 예시적인 실시예에서, 본 MSC 제제는 10 kb 이상의 평균 TRF를 가질 수 있다.

[0036] 어떤 실시예에서, MSC 제제(예, 적어도 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7 또는 심지어 10^8 MSC를 갖는 배양물)는 다른 공급원(예를 들면, 공여된 인간 조직, 예컨대 태아, 유아, 어린이, 청소년 또는 성인 조직으로부터 유래된 배양물)에서 수득한 MSC 제제의 복제 수명보다 더 큰 복제 수명을 갖는다. 복제 수명은 10, 20, 30, 40 이상 또는 심지어 50 퍼센트의 세포가 배양에서 다음 증식 또는 계대 전에 노화되는 때인 복제 노화 전에 배양에서의 세포수 증식 또는 계대의 수를 측정함으로써 평가될 수 있다. 예를 들면, 대상 MSC 제제는 공여된 인간 조직(특히 성인 골수 또는 성인 지방 조직으로부터 유래)에서 유래된 MSC 제제보다 적어도 10 증식 이상의 복제 수명을 가질 수 있으며, 바람직하게 적어도 20, 30, 40, 50, 60, 70 80, 90 또는 심지어 100 세포수 증식을 가질 수 있다. 어떤 실시예에서, MSC 제제는 50 퍼센트 이상의 세포가 노화 및/또는 비-MSC 세포 타입(예, 섬유모세포)로 분화되기 전에, 적어도 8 계대, 더욱 바람직하게는 그 점에 도달하기 전에 적어도 10, 12, 14, 16, 18 또는 심지어 20 계대를 허용하는 복제수명을 가질 수 있다. 어떤 실시형태에서, MSC 제제는 50 퍼센트 이상의 세포가 노화 및/또는 비-MSC 세포 타입(예, 섬유모세포)로 분화되기 전에, 성인 골수-유래 MSC 제제 및/또는 지방-유래

MSC 제제(예, 동일수의 세포로 시작)에 비해 적어도 2배, 더욱 바람직하게 적어도 4, 6, 8 또는 심지어 10배의 증식 또는 계대를 허용하는 복제수명을 가질 수 있다.

[0037] 어떤 실시예에서, MSC 제제(예, 적어도 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7 또는 심지어 10^8 MSC를 갖는 배양물)는 다른 공급원(예를 들면, 공여된 인간 조직, 예컨대 태아, 유아, 어린이, 청소년 또는 성인 조직으로부터 유래된 배양물)에서 유래된 계대 1(P1), 계대 2(P2), 계대 3(P3), 계대 4(P4) 및/또는 계대 5(P5) MSC 제제 및 특히 골수-유래 MSC 및 지방-유래 MSC에 비해 세포 사이클 조절 및 노화에 관련된 단백질의 함량 및 효소활성이 통계적으로 유의하게 감소된다. 예를 들면, 대상 MSC 제제는 프로테아좀 26S 서브유닛, 비-ATPase 조절 서브유닛 11(PSMD11) 단백질 함량이 공여된 인간 조직(특히 성인 골수 또는 성인 지방 조직으로부터 유래)에서 온 MSC 제제에서의 함량의 75 퍼센트 미만, 더욱 바람직하게는 60, 50, 40, 30, 20, 심지어 10 퍼센트 미만의 함량을 갖는다.

[0038] 어떤 실시예에서, 본 발명의 MSC 제제(예, 적어도 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7 또는 심지어 10^8 MSC를 갖는 배양물)는 다른 공급원(예를 들면, 공여된 인간 조직, 예컨대 태아, 유아, 어린이, 청소년 또는 성인 조직으로부터 유래된 배양물)에서 유래된 계대 1(P1), 계대 2(P2), 계대 3(P3), 계대 4(P4) 및/또는 계대 5(P5) MSC 제제 및 특히 골수-유래 MSC 및 지방-유래 MSC에 비해, 세포의 에너지 및/또는 지질 대사에 관련된 단백질의 함량 및 효소활성이 통계적으로 유의하게 감소된다. 예시하면, 대상 MSC 제제는 해당과 같은 ATP 또는 NADPH 합성에 대한 대사 경로에 관련된 하나 이상의 단백질(예, 프락토스-바이포스페이트 알도라제 A, ALDOA; 알도-케토 리덕타제 패밀리 1, 멤버 A1, AKR1A1); 글리세르알데하이드-3-포스페이트, GAPDH), 트리카르복실산 사이클(TCA 사이클)(예, 이소시트레이트 데하이드로게나제 1, IDH1), 펜토스 포스페이트 경로(예, 글루코스-6-포스페이트 데하이드로게나제, G6PD) 및 글루쿠론산 생합성 경로에서의 UDP-글루코스 생합성(예, UDP-글루코스 6-데하이드로게나제, UGDH)에 대해, 공여된 인간 조직(특히 성인 골수 또는 성인 지방 조직으로부터 유래)에서 온 MSC 제제에서의 함량의 90 퍼센트 미만, 더욱 바람직하게는 60, 50, 40, 30, 20, 심지어 10 퍼센트 미만의 함량을 갖는다. 더 예시하면, 대상 MSC 제제는 지질 대사에 관련된 하나 이상의 단백질, 예컨대 에노일-CoA 하이드라타제, 단쇄, 1(ECHS1) 및/또는 아세틸- CoA 아세틸트랜스퍼라제(ACAT2)에 대해 공여된 인간 조직(특히, 성인 골수 또는 성인 지방 조직 유래)에서 온 MSC에서의 함량의 90% 미만, 더욱 바람직하게 60, 50, 40, 30, 20 또는 심지어 10 퍼센트 미만의 단백질 함량을 갖는다.

[0039] 어떤 실시예에서, 본 발명의 MSC 제제(예, 적어도 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7 또는 심지어 10^8 MSC를 갖는 배양물)는 다른 공급원(예를 들면, 공여된 인간 조직, 예컨대 태아, 유아, 어린이, 청소년 또는 성인 조직으로부터 유래된 배양물)에서 유래된 계대 1(P1), 계대 2(P2), 계대 3(P3), 계대 4(P4) 및/또는 계대 5(P5) MSC 제제 및 특히 골수-유래 MSC 및 지방-유래 MSC에 비해, 세포의 아폽토시스에 관련된 단백질의 함량 및 효소활성이 통계적으로 유의하게 감소된다. 예시하면, 대상 MSC 제제는 하나 이상의 단백질, 예컨대 아넥신 A1(ANXA1), A2(ANXA2), A5(ANXA5), 전압-의존 음이온-선택성 채널 단백질 1(VDAC1), 및/또는 글리세르알데하이드-3-포스페이트 데하이드로게나제(GAPDH)에 대하여, 공여된 인간 조직(특히, 성인 골수 또는 성인 지방 조직 유래)에서 온 MSC에서의 함량의 90% 미만, 더욱 바람직하게 60, 50, 40, 30, 20 또는 심지어 10% 미만의 단백질 함량을 갖는다.

[0040] 이론에 매임없이 본 발명의 혈관모세포-유래 MSC가 보이는 세포 에너지 및/또는 지질 대사 및/또는 아폽토시스에 관련된 단백질의 함량 및/또는 효소 활성의 통계적으로 유의한 차이는 적어도 부분적으로 본 제제의 균일한 성질에 기인하는 것으로 생각된다. 예를 들면, 본 발명의 혈관모세포-유래 MSC는 세포가 다수의 상이한 공여자에서 유래하는 즉 MHC가 미스매치되는 성인 유래 MSC 은행과 달리, 균일한 MHC 유전자 발현, 즉, 완전히 MHC가 매치된다. MSC의 치료적 용량은 약 2-8 백만 세포/kg (또는 용량당 약 1억3천만-5억 세포)이다.

[0041] <u>정의</u>

[0042] "다능성 세포" 및 "다능성 줄기 세포(pluripotent stem cells)"는 본 명세서에서, 지속적이거나 또는 실질적으로 무한한 시험관 내 증식을 나타낼 수 있으며 동시에 미분화상태를 보유하고, 안정한(바람직하게 정상인) 핵형을 보이며, 적절한 조건하에서 모두 세개의 배엽(즉, 외배엽, 중배엽 및 내배엽)으로 분화될 수 있는 능력을 가진 세포를 광범위하게 지칭한다. 통상적으로 다능성 세포는 (a) 면역결핍(SCID) 마우스에 이식시 기형종을 유발할 수 있고; (b) 모두 세개의 배엽의 세포타입(예를 들면, 외배엽, 중배엽 및 내배엽 세포 타입)으로 분화될 수 있으며; 그리고 (c) 적어도 하나의 hES 세포 마커(예, Oct-4, 알칼리 포스파타제, SSEA 3 표면 항원, SSEA 4 표면 항원, NANOG, TRA 1 60, TRA 1 81, SOX2, REX1)를 발현한다. 예시적인 다능성 세포는 Oct-4, 알칼리 포스파

타제, SSEA 3 표면 항원, SSEA 4 표면 항원, TRA 1 60, 및/또는 TRA 1 81를 발현할 수 있다. 부가적 예시적인 다능성 세포는 비제한적으로 배아 줄기 세포, 유도 다능성 세포(iPS) 세포, 배아-유래 세포, 배아 생식(EG) 세포에서 제조된 다능성 세포(예를 들면, FGF-2, LIF 및 SCF의 존재하에서 배양에 의해), 단성생식 ES 세포, 배양된 이너 세포 매스 세포에서 제조된 ES 세포, 할구에서 제조된 ES 세포, 및 핵 이전에 의해 제조된 ES 세포(예를 들면, 수여자 난자에 이전된 체세포핵)를 포함한다. 예시적인 다능성 세포는 배아의 파괴 없이 제조될 수 있다. 예를 들면, 다능성 세포는 배아 파괴 없이 수득된 세포에서 제조될 수 있다. 추가적 예로서, 다능성 세포는 생검된 할구(배아에 위해를 가함 없이 수행될 수 있는)로부터 제조될 수 있다; 임의로, 잔여 배아는 냉동보존, 배양되고/되거나 적합한 숙주에 이식된다. 다능성 세포(공급원이 무엇이든지 간에) 유전자적으로 변경되거나 또는 수명, 역가, 호밍(homing)을 증가시키거나 또는 이러한 다능성 세포(예를 들면, MSC 및 혈관모세포)로부터 분화된 세포내로 원하는 인자를 송달하기 위해 다르게 변경될 수 있다. 이들의 비-제한적 예로서, 다능성 세포는 Sirt1을 발현하도록(따라서 수명이 늘도록), 임의로 유도 또는 억제 프로모터의 조절하에서 하나 이상의 텔로머라제 서브유닛 유전자를 발현하도록, 형광 표지를 삽입하도록, 산화철 입자나 다른 시약을 삽입하도록(생체내 영상 MRI, 등을 통해 세포 추적에 사용될 수 있는, Thu et al., Nat Med. 2012 Feb 26;18(3):463-7 참조), 수명을 개선하는 bFGF를 발현하도록(Go et al., J. Biochem. 142, 741-48 (2007) 참조), 호밍을 위해 CXCR4를 발현하도록(Shi et al., Haematologica. 2007 Jul;92(7):897-904 참조), 신경아교종과 같은 암세포에서 카스파제-매개 아폽토시스를 유도하도록 재조합 TRAIL을 발현하도록(Sasportas et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Mar 24;106(12):4822-7 참조), 등으로 유전자적으로 변경될 수 있다.

[0043] "배아(embryo)" 또는 "배아의(embryonic)"는 본 명세서에서 모성 숙주의 자궁막에 이식되지 않은 발달되는 세포 매스를 광범위하게 지칭한다. "배아 세포"는배아에 포함되거나 배아에서 분리된 세포이다. 이는 또한 이세포 단계와 같이 초기에 얻어진 할구 및 응집된 할구를 포함한다.

[0044] "배아 줄기 세포" (ES 세포 또는 ESC)는 배아 세포(예, 배양된 이너 세포 매스 세포 또는 배양된 할구에서 유래된 것들) 및 유도 다능성 세포(하기에 기술됨)에서 제조된 다능성 세포를 포함한다. 자주 이러한 세포는 세포주로서 연속적으로 계대된 것이거나 되어온 것이다. 배아 줄기 세포는 여기에 기술된 혈관모세포를 제조하는 과정에서 다능성 줄기 세포로서 사용될 수 있다. 예를 들면, ES 세포는 예컨대, 난자의 정자 또는 정자 DNA와의 수정, 핵 이전(체세포 핵이전을 포함) 또는 단성생식과 같은 임의의 방법(유성 또는 무성적인 수단을 포함하여)으로 제조된 배아에서 파생되는 것을 포함하여 당업계 알려진 방법에 의해 제조될 수 있다. 추가적 예로서, 배아 줄기 세포는 또한 비-배아 세포가 과정중에 사용되는 체 세포 핵 이전에 의해 제조된 세포도 포함한다. 예를 들면, ES 세포는 포배 단계 배아의 ICM 및 하나 이상의 할구에서 유래된 배아 줄기 세포에서 유래될 수 있다. 이러한 배아 줄기 세포는 수정 또는 체세포 핵이전(SCNT), 단성생식, 및 동정생식을 포함하는 무성적 수단에 의해 제조된 배아 물질에서 생성될 수 있다. 하기에 더 논의되는 바와 같이("다능성 세포 참조), ES 세포는 수명, 역가, 호밍을 증가시키거나 또는 이러한 다능성 세포(예를 들면, MSC 및 혈관모세포)로부터 분화된 세포내로 원하는 인자를 송달하기 위해, 유전자적으로 또는 다르게 변경될 수 있다.

[0045] ES 세포는 하나 이상의 HLA 유전자에서 동종접합 또는 이형접합으로, 예를 들면, 유전자 조작, 이형접합의 자발적 소실을 위한 스크리닝 등으로 생성될 수 있다. ES 세포는 수명, 역가, 호밍을 증가시키거나 또는 이러한 다능성 세포(예를 들면, MSC 및 혈관모세포)로부터 분화된 세포내로 원하는 인자를 송달하기 위해, 유전자적으로 또는 다르게 변경될 수 있다. 배아 줄기 세포는 그 공급원이나 제조에 사용된 특정 방법과 상관없이, 통상적으로 하나 이상의 하기 특성을 보유한다: (i) 모두 세개의 배엽의 세포로 분화될 수 있는 능력, (ii) 적어도 Oct-4 및 알칼리 포스파타제를 발현, 및 (iii) 면역약화 동물에 이식되었을 때 기형종을 생성하는 능력. 본 발명의 실시예에서 사용될 수 있는 배아 줄기 세포는 비제한적으로, MA01, MA09, ACT-4, No. 3, H1, H7, H9, H14 및 ACT30 배아 줄기 세포와 같은 인간 ES 세포("ESC" 또는 "hES 세포")을 포함한다. 부가적 예시적인 세포주는 NED1, NED2, NED3, NED4, NED5, 및 NED7을 포함한다. NIH 인간 배아 줄기 세포 등록부 참조. 사용될 수 있는 예시적인 인간 배아 줄기 세포주는 MA09 세포이다. MA09 세포 분리 및 제제는 Klimanskaya, et al. (2006) "단일 할구 유래 인간 배아 줄기 세포주" Nature 444: 481 - 85에 기술되어 있다. 본 발명의 예시적인 실시예에 따라 사용된 인간 ES 세포는 GMP 기준에 따라 유도 및 유지될 수 있다.

[0046] 예시적인 hES 세포 마커는 비제한적으로 알칼리 포스파타제, Oct-4, Nanog, 단계-특이적 배아 항원-3(SSEA-3), 단계- 특이적 배아 항원-4(SSEA-4), TRA-1-60, TRA-1-81, TRA-2-49/6E, Sox2, 성장 및 분화 인자 3(GDF3), 감소 발현 1(REX1), 섬유모세포 성장 인자 4(FGF4), 배아 세포-특이적 유전자 1(ESG1), 발달 다능성-관련 2(DPPA2), DPPA4, 텔로머라제 역전사효소(hTERT), SALL4, E-CADHERIN, 클러스터 데지그네이션 30(CD30), 크립토(TDGF-1), GCTM-2, 발생, 배세포 핵인자, 및 줄기 세포 인자(SCF 또는 c-Kit 리간드)를 포함한다. 부가적인 예

로서, 배아 줄기 세포는 Oct-4, 알칼리 포스파타제, SSEA 3 표면 항원, SSEA 4 표면 항원, TRA 1 60, 및/또는 TRA 1 81를 발현할 수 있다.

[0047] ESC는 초기에 뮤린 배아 피더 세포(MEF)와 함께 공배양될 수 있다. MEF 세포는 공배양시 ESC를 접종하기 전에 마이토마이신 C에 노출시켜 유사분열적으로 불활성화될 수 있으며, 이로써 MEF는 배양에서 증식되지 않는다. 부가적으로, ESC 세포 배양은 현미경적으로 검사될 수 있으며, 비 ESC 세포 형태를 포함하는 콜로니는 예를 들면, 줄기 세포 절단 툴, 레이저 절제나 다른 수단을 사용하여 집어서 버릴 수 있다. 통상적으로, 배상체(embryoid body) 형성을 위해 접종용 ESC 수확점 이후에는 부가적 MEF 세포가 사용되지 않는다.

[0048] "배아-유래 세포" (EDC)는 본 명세서에서 다능성 상실배-유래 세포, 이너 세포 매스, 배아 쉴드, 또는 외배엽을 포함하는 포배-유래 세포, 또는 원시 내배엽, 외배엽, 및 중배엽 및 이들의 유도체를 포함하는 초기 배아의 다른 다능성 줄기 세포를 광범위하게 지칭한다. "EDC"는 또한 할구 및 응집된 단일 할구 또는 다양한 발달 단계의 배아에서 온 세포 매스를 포함하나, 세포주로서 계대된 인간 배아 줄기 세포는 배제된다.

[0049] 예시적인 ESC 세포 마커는 비제한적으로 알칼리 포스파타제, Oct-4, Nanog, 단계-특이적 배아 항원-3(SSEA-3), 단계-특이적 배아 항원-4(SSEA-4), TRA-1-60, TRA-1-81, TRA-2-49/6E, Sox2, 성장 및 분화 인자 3(GDF3), 감소 발현 1(REX1), 섬유모세포 성장 인자 4(FGF4), 배아 세포-특이적 유전자 1(ESG1), 발달 다능성-관련 2(DPPA2), DPPA4, 텔로머라제 역전사효소(hTERT), SALL4, E-CADHERIN, 클러스터 데지그네이션 30(CD30), 크립토(TDGF-1), GCTM-2, 발생, 배세포 핵인자, 및 줄기 세포 인자(SCF 또는 c-Kit 리간드)를 포함한다.

[0050] "역가(potency)"는 본 명세서에서, 특정 효과를 발생시키는 시약(예, 혈관모세포-유래 MSC)의 예컨대 몰농도를 광범위하게 지칭한다. 역가는 최대 효과를 측정하지 않고 대신 용량반응곡선을 따라 다양한 위치에서의 효과와 관련된 유효 농도(EC50)로 정의될 수 있다. 역가는 또한 등급화(EC50) 또는 양자적 용량-반응 곡선(ED50, TD50 및 LD50)에서 측정될 수도 있다; 그러나 역가는 바람직하게 EC50로 측정한다. 용어 "EC50"는 특정 노출 시간 이후 기저 및 최대효과간에 반의 반응을 유도하는 약물, 항체 또는 독성물질의 농도를 지칭한다. 따라서 등급화된 용량 반응 곡선의 EC50는 최대 효과의 50%가 관찰되는 화합물 농도를 대표한다. 양자적 용량 반응 곡선의 EC50는 특정 노출 기간 후 집단의 50%가 반응을 나타내는 화합물 농도를 대표한다. EC50는 약물 적용에 반응하여 측정가능한 생리적 변화를 나타내는 특정 동물 모델에서 동물 연구; 약물의 추가에 대해 측정가능한 생물학적 반응을 나타내는 특정 세포 시스템을 사용하는 세포-기반 어세이; 및/또는 약물의 생물학적 활성이 약물에 의해 촉진된 화학적 반응에 따른 산물 축적에 의해 측정될 수 있는 효소적 반응을 사용하여 측정될 수 있다. 바람직하게, 면역 조절 어세이가 EC50 결정에 사용된다. 이러한 면역 조절 어세이의 비-제한적 예는 세포내 사이토카인, 세포독성, 조절능, 세포 신호전달 능력, 증식능, 아폽토시스 평가 및 다른 어세이를 포함한다.

[0051] "중간엽 줄기 세포" (MSC)는 본 명세서에서 자가-재생능을 가지며, 다른 중간엽 세포 계통 중에서 골모세포, 연골세포, 및 지방세포로 분화될 수 있는 능력을 갖는 다능성 줄기 세포를 지칭한다. 이러한 특징이외에 MSC는 후술하는 바와 같이 하나 이상의 마커의 발현에 의해 동정될 수 있다. 이러한 세포는 면역학적 질환 및 퇴행성 질환을 포함하는 임상적인 상태, 예컨대 이식편대숙주병 (GVHD), 심근경색 및 염증, 특히 자가면역 질병 및 질환의 치료에 사용될 수 있다. 본 명세서에서 달리 지시하지 않는 한, MSC는 성인 공급원 및 제대혈에서 유래된 세포를 포함한다. MSC(또는 다능성 세포와 같이 이들을 생성하는 세포)는 수명, 역가, 호밍(homing)을 증가시키거나 또는 MSC 또는 이러한 MSC로부터 분화된 세포내로 원하는 인자를 송달하기 위해, 유전자적으로 또는 다르게 변경될 수 있다. 이들의 비제한적 예시로서, MSC 세포는 Sirt1을 발현하도록(따라서 수명이 늘도록), 임의로 유도 또는 억제 프로모터의 조절하에서 하나 이상의 텔로머라제 서브유닛 유전자를 발현하도록, 형광 표지를 삽입하도록, 산화철 입자나 다른 시약을 삽입하도록(생체 내 영상 MRI, 등을 통해 세포 추적에 사용될 수 있는, Thu et al., Nat Med. 2012 Feb 26;18(3):463-7 참조), 수명을 개선하는 bFGF를 발현하도록(Go et al., J. Biochem. 142, 741-748 (2007) 참조), 호밍을 위해 CXCR4를 발현하도록(Shi et al., Haematologica. 2007 Jul;92(7):897-904 참조), 신경아교종과 같은 암세포에서 카스파제-매개 아폽토시스를 유도하도록 재조합 TRAIL을 발현하도록(Sasportas et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Mar 24;106(12):4822-7 참조), 등으로 유전자적으로 변경될 수 있다.

[0052] "요법", "치료적", "치료하는", "치료" 또는 "처치"는 본 명세서에서 질병의 치료, 질병의 진행 또는 임상 증상의 정지 또는 감소, 및/또는 질병의 경감, 질병 또는 그 임상 증상의 퇴화를 유발하는 것을 광범위하게 지칭한다. 요법은 질병의 방지, 예방, 처치, 치료, 구제, 감소, 경감, 및/또는 질병, 사인 및/또는 증상에서의 완화 제공을 포함한다. 치료는 현재 진행중인 질병 징후 및/또는 증상(예, 근육 쇠약, 다발경화증)을 겪는 환자에서 징후 및/또는 증상의 경감을 포함한다. 요법은 "예방" 및 "방지"를 포함한다. 방지는 환자에서 질병의 처치에

후속하여 일어나는 질병을 방지하거나 또는 환자에서 질병의 빈도나 심각성을 경감하는 것을 포함한다. 치료의 목적을 위한 용어 "경감된" 은 징후 및/또는 증상에서의 임상적으로 유의한 감소를 광범위하게 지칭한다. 요법은 재발 또는 되풀이되는 징후 및/또는 증상(예를 들면, 망막 퇴행, 시각 소실)을 치료하는 것을 포함한다. 요법은 언제든지 징후 및/또는 증상의 출현을 막고 기존의 징후 및/또는 증상을 경감하고 제거하는 것을 포함하며 이에 한정되지 않는다. 요법은 만성질환("유지") 및 급성 질환의 치료를 포함한다. 예를 들면, 치료는 징후 및/또는 증상의 재발 또는 회귀(예를 들면, 근육쇠약, 다발경화증)을 치료 또는 예방하는 것을 포함한다.

[0053] 조절 컴플라이언스를 유지하기 위하여, MSC 은행은 적어도 수백 내지 10,000 환자들을 치료하기에 충분한 세포 공급양을 유지하여야 하며, 반드시 적어도 500억 MSC을 보유하여야 한다. 본 발명은 GMP-항의(complaint) 및/또는 냉동보존된 MSC 은행을 포함한다. 일 양태에서, 본 발명의 MSC 제제는 적어도 10^{10}개의 혈관모세포-유래 MSC를 포함한다. 다른 양태에서, 본 발명은 적어도 10^{11}, 10^{12}, 10^{13}, 또는 10^{14} 혈관모세포-유래 MSC를 포함하는 MSC 제제를 제공한다.

[0054] "병상(pathology)을 정상화하는 것"은 본 명세서에서, 질병으로부터 결과하는 이상 구조 및/또는 기능을 더욱 정상 상태로 반전시키는 것을 지칭한다. 정상화는 질병으로부터 결과하는 조직, 기관, 세포 타입의 구조 및/또는 기능의 이상을 수정함으로써, 병상의 진전을 조절하고 개선할 수 있음을 제안한다. 예를 들면, 본 발명의 ESC-MSC로 처치한 후 자가면역질환의 결과로서 면역 시스템의 이상, 예를 들면, MS가 개선, 수정 및/또는 반전될 수 있다.

[0055] <u>유도 다능성 줄기 세포(induced pluripotent stem cell)</u>

[0056] 나아가 예시적인 다능성 줄기 세포는 인자 조합("재프로그램 인자")의 발현 또는 발현 유도에 의해 체세포를 재프로그램하여 생성된 유도 다능성 줄기 세포(iPS 세포)를 포함한다. iPS 세포는 태아, 출생후(postnatal), 신생아, 청소년 또는 성인 체세포를 사용하여 생성될 수 있다. iPS 세포는 세포 은행에서 수득될 수 있다. 또는, iPS 세포는 RPE 세포 또는 다른 세포 타입으로의 분화가 시작되기 전에 새로이 생성될 수 있다(당업계 공지 방법에 의해). iPS 세포 제조는 분화된 세포의 제조에 있어 초기단계일 수 있다. iPS 세포는 조직-매칭된 RPE 세포를 생성할 목적으로 특정 환자 또는 매칭된 공여자로부터 온 물질을 사용하여 특이적으로 생성될 수 있다. iPS 세포는 의도된 수여자에서 실질적으로 면역원성이 아닌 세포, 예를 들면 자가세포 또는 의도된 수여자에 세포 조직적합한 세포에서 제조된 세포에서 제조될 수 있다. 전술한 바와 같이("다능성 세포" 참조), iPS 세포를 포함하는 다능성 세포는 수명, 역가, 호밍을 증가시키거나 또는 이러한 다능성 세포(예를 들면, MSC 및 혈관모세포)로부터 분화된 세포내로 원하는 인자를 송달하기 위해, 유전자적으로 또는 다르게 변경될 수 있다.

[0057] 추가적 예시로서, 유도 다능성 줄기 세포는 체세포 또는 다른 세포를 하나 이상의 재프로그램 인자로 세포를 접촉하여 재프로그램함으로써 생성될 수 있다. 예를 들면, 재프로그램 인자는 세포에 의해, 예를 들면, 세포에 부가된 외인성 핵산으로부터, 또는 소분자, microRNA, 등 그 유전자 발현을 촉진 또는 유도하는 인자에 반응하는 내인성 유전자로부터 발현될 수 있다(Suh and Blelloch, Development 138, 1653-1661 (2011); Miyosh et al., Cell Stem Cell (2011), doi:10.1016/j.stem.2011.05.001; Sancho-Martinez et al., Journal of Molecular Cell Biology (2011) 1-3; Anokye-Danso et al., Cell Stem Cell 8, 376-388, April 8, 2011; Orkin and Hochedlinger, Cell 145, 835-850, June 10, 2011 참조, 이들 문헌들은 전체로 본 출원에 참조로 포함된다). 재프로그램 인자는 외인성 공급원을 예를 들면, 배양 배지에 추가하고 세포내로 당업계에 알려진 방법 예컨대 세포 도입 펩타이드, 단백질 또는 핵산 트랜스펙션제, 리포펙틴과의 커플링, 전기천공, 비행입자송달 시스템(유전자총), 마이크로주입법 등에 의해 도입됨으로써 제공될 수 있다. iPS 세포는 태아, 출생후, 신생아, 청소년 또는 성인 체세포를 사용하여 생성될 수 있다. 어떤 실시예에서, 체세포를 다능성 줄기 세포로 재프로그램하는데 사용되는 인자들은 예를 들면, Oct4(Oct 3/4로도 지칭됨), Sox2, c-Myc, 및 Klf4의 조합을 포함한다. 다른 실시예에서, 체세포를 다능성 줄기 세포로 재프로그램하는데 사용되는 인자들은 예를 들면, Oct-4, Sox2, Nanog, 및 Lin28의 조합을 포함한다. 다른 실시예에서, 체세포는 적어도 두개의 재프로그램 인자, 적어도 세개의 재프로그램 인자, 또는 네개의 재프로그램 인자를 발현시킴으로써 재프로그램된다. 다른 실시예에서, 부가적 재프로그램 인자는 동정되고, 체세포를 다능성 줄기 세포로 재프로그램하기 위해 단독으로 또는 하나 이상의 공지 재프로그램 인자와 조합하여 사용된다. 특정 iPS 세포주는 그 발현 프로파일이 다양할 수 있으나, iPS 세포는 통상적으로 배아 줄기 세포와 동일한 마커의 발현에 의해 동정할 수 있다.

[0058] 유도 다능성 줄기 세포는 체세포에서 하나 이상의 재프로그램 인자를 발현하거나 발현을 유도함으로써 제조될 수 있다. 체세포는 진피 섬유모세포, 활액 섬유모세포, 또는 폐 섬유모세포와 같은 섬유모세포, 또는 비-섬유모세포성 체세포이다. 체세포는 적어도 1, 2, 3, 4, 5개의 재프로그램 인자를 발현함으로써 재프로그램된다. 재프

로그램 인자는 Oct 3/4, Sox2, NANOG, Lin28, c Myc 및 Klf4로부터 선택될 수 있다. 재프로그램 인자의 발현은 재프로그램 인자의 발현을 유도하는 소 유기분자물질과 같은 적어도 하나의 물질과 체세포를 접촉함으로써 유도될 수 있다.

[0059] 체세포는 또한 재프로그램인자가 발현되고(예, 바이러스 벡터, 플라스미드 등을 사용하여) 재프로그램인자의 발현이 유도되는(예를 들면 소 유기분자를 사용하여) 조합적 시도를 사용하여 재프로그램될 수 있다. 예를 들면, 재프로그램 인자는 체세포에서 레트로바이러스 벡터 또는 렌티바이러스 벡터와 같은 바이러스 벡터를 사용한 감염에 의해 발현될 수 있다. 또한, 재프로그램 인자는 체세포에서 에피소말 플라스미드와 같은 비-통합적 벡터를 사용하여 발현될 수 있다. 예를 들면, 본 명세서에 전체로서 참조로 포함되는 Yu et al., Science. 2009 May 8;324(5928):797-801 참조. 재프로그램 인자가 비-통합적 벡터를 사용하여 발현될 때, 인자는 전기천공, 형질감염 또는 벡터로의 체세포 형질전환을 사용하여 발현될 수 있다. 예를 들면, 마우스 세포에서 통합적 바이러스 벡터를 사용한 네 개의 인자(Oct3/4, Sox2, c myc, 및 Klf4)들의 발현은 체세포를 재프로그램하는데 충분하다. 인간 세포에서 통합적 바이러스 벡터를 사용한 네개의 인자(Oct3/4, Sox2, NANOG, 및 Lin28)들의 발현은 체세포를 재프로그램하는데 충분하다.

[0060] 일단 재프로그램 인자가 세포내에서 발현되면, 세포는 배양될 수 있다. 시간이 경과되면서 ES 특성을 지닌 세포가 배양 접시에 출현한다. 세포는 예를 들면, ES 형태에 기초하여 또는 선택 및 검출가능한 마커의 발현에 기초하여 선택 및 계대배양될수 있다. 세포는 ES 세포를 닮은 세포- 이들은 추정된 iPS 세포이다--의 배양물을 제조하기 위해 배양될 수 있다. 특정 iPS 세포주는 그 발현 프로파일이 다양할 수 있으나, iPS 세포는 통상적으로 다른 배아 줄기 세포와 동일한 마커의 발현에 의해 동정할 수 있다. 예시적인 iPS 세포는 Oct-4, 알칼리 포스파타제, SSEA 3 표면 항원, SSEA 4 표면 항원, TRA 1 60, 및/또는 TRA 1 81를 발현할 수 있다.

[0061] iPS 세포의 다능성을 확인하기 위해, 세포는 하나 이상의 다능성 어세이에서 검사될 수 있다. 예를 들면, 세포는 ES 세포 마커의 발현에 대해 검사될 수 있다; 세포는 SCID 마우스에 이식시 기형종을 제조할 수 있는 능력에 대해 평가될 수 있으며; 모든 세 배엽의 세포 타입을 생성하도록 분화하는 능력에 대해 평가될 수 있다. 다능성 iPS 세포가 수득되면 혈관모세포 및 MSC 세포를 제조하는데 사용될 수 있다.

[0062] <u>혈관모세포</u>

[0063] 혈관모세포는 다능성이며 조혈 및 내피 세포 계통 양쪽에 대해 공통의 전구체로서 기능한다. 배아 발달동안, 이들은 초기 중배엽이 발달되는 동안 나타나 원시 혈액섬을 개척하는 과도기적 세포 타입으로서 생성되는 것으로 생각된다(Choi et al. Development 125 (4): 725-732 (1998). 거기에서, 혈관모세포는 원시 및 특정의 조혈 세포, HSC 및 내피 세포 모두를 생성할 수 있다(Mikkola et al, J. Hematother. Stem Cell Res 11(1): 9-17 (2002).

[0064] 혈관모세포는 마우스 ESC(Kennedy et al, Nature (386): 488-493 (1997); Perlingeiro et al, Stem Cells (21): 272-280 (2003)) 및 인간 ESC(ref. 14, 15, Yu et al., Blood 2010 116: 4786-4794) 양 쪽으로부터 시험관 내 유도될 수 있다. 다른 연구는 제대혈(Bordoni et al, Hepatology 45 (5) 1218-1228), 말초혈로부터의 순환 CD34- lin- CD45- CD133- 세포 (Ciraci et al, Blood 118: 2105-2115), 및 마우스 자궁(Sun et al, Blood 116 (16): 2932-2941 (2010))으로부터 혈관모세포를 분리하였음을 주장한다. 마우스 및 인간 ESC-유래 혈관모세포 모두 액체 배양에서 성장된 세포 클러스터의 배양 및 분화 및 후속하는 다양한 사이토카인과 성장인자를 포함하는 반고형 배지내에서 세포성장에 의해 수득되었다(Kennedy, Perlingeiro, ref 14, 15); 또한 본 출원에 전체가 참조로 포함되는 미국 특허 제8,017,393호 참조. 본 출원의 목적을 위해, 용어 혈관모세포는 미국 특허 제8,017,393호에 기술된 혈관-콜로니 형성 세포를 포함하며, 이 세포는 조혈 및 내피 세포 계통으로 분화될 수 있을 뿐 아니라 평활근 세포로 될 수 있고, CD34, CD31, KDR, 및 CD133에 양성이 아니다. 본 명세서에 기술된 본 방법에서 유용한 혈관모세포는 이들 공지 방법에 의해 유래되거나 수득될 수 있다. 예를 들면, 배상체는 비-부착성 조건, 예를 들면, 저-부착성 기질 상에서 또는 "행잉 드롭(hanging drop)"의 조건하에 다능성 세포를 배양함으로써 형성될 수 있다. 이러한 배양물에서, ES 세포는 덩어리 또는 배상체로 명명되는 세포 클러스터를 형성할 수 있다. 본 출원에 전체가 참조로 포함되는 Itskovitz-Eldor et al., Mol Med. 2000 Feb;6(2):88-95 참조. 통상적으로, 배상체는 초기에 고체 덩어리 또는 다능성 세포 클러스터로서 형성되며, 시간이 지남에 따라 일부 배상체는 액체로 채워진 강(cavity)이 되며, 전자는 문헌에 "단순" EB로 후자는"낭성" 배상체로 지칭된다. Id. 이들 EB안에서 세포는 (고형 및 낭성 형태 모두) 분화될 수 있으며 시간이 지남에 따라 증가되는 수의 세포를 제조할 수 있다. 임의로 이후 EB는 부착성 배양물로서 배양되며 파생물을 형성하게 할 수 있다. 유사하게, 과잉성장 및 다층 세포집단을 형성하도록 허용된 다능성 세포는 시간이 지남에 따라 분화될 수

있다.

[0065] 일 실시예에서, 혈관모세포는 (a) ESC 라인을 2, 3, 4, 5, 6 또는 7일 동안 배양하여 세포 클러스터의 형성, 및 (b) 세포 클러스터의 혈관모세포로의 분화 유도를 포함하는 단계들에 의해 생성된다. 추가적인 실시예에서, 단계 (b)의 세포 클러스터는 사이토카인-풍부 무-혈청 메틸셀룰로스 기반 배지(14, 15)에서 배양된다.

[0066] 일 실시예에서, 혈관모세포는 (a) MA09, H7, H9, MA01, HuES3, 및 H1gfp로 이루어진 군에서 선택되는 ESC 라인을 2, 3, 4, 5, 6 또는 7일 동안 배양하여 세포 클러스터의 형성, 및 (b) 세포 클러스터를 사이토카인-풍부 무-혈청 메틸셀룰로스 기반 배지 내에 배양함으로써 혈관모세포로의 분화 유도를 포함하는 단계들에 의해 생성된다

[0067] 다른 실시예에서, 혈관모세포는 여기에 기술된 바와 같은 임의의 다능성 세포를 유도함으로써 생성된다. 추가적 실시예에서, 혈관모세포는 수정, 체세포 핵이전(SCNT), 단성생식, 동정생식, 또는 다른 유성 또는 무성 수단에 의해 제조되었는지에 상관없이 포배, 플레이팅(plated) ICM, 하나 이상의 할구, 또는 전 이식-단계 배아 또는 배아-유사구조의 다른 부분, 및 재프로그램을 통해 유래된 ESC(예를 들면, iPS 세포)를 포함하는 군에서 선택되는 다능성 세포의 분화를 유도함으로써 생성된다. 또 다른 실시예에서, 혈관모세포는 iPS 세포로부터 생성되며, iPS 세포는 외인적으로 추가된 인자 또는 공지된 다른 방법, 예컨대 단백질 또는 microRNA를 사용하여 생성된다 (Zhou et al., Cell Stem Cell (4): 1-4, 2009; Miyoshi et al. Cell Stem Cell (8): 1-6, 2011; Danso et al., Cell Stem Cell (8): 376-388, 2011 참조).

[0068] 다른 양태에서, 본 발명은 중간엽 간질 세포(MSC) 제제 및 혈관모세포를 사용하여 MSC를 생성하는 방법을 제공한다. 본 MSC는 후술하는 바와 같이 하나 이상의 측면에서 기존의 MSC와 다를 수 있다. 일 실시예에서, 수정, 체세포 핵이전(SCNT), 단성생식, 동정생식, 또는 다른 유성 또는 무성 수단에 의해 제조되었는지에 상관없이 혈관모세포는 포배, 플레이팅된 ICM, 하나 이상의 할구, 또는 전 이식-단계 배아 또는 배아-유사구조의 다른 부분, 및 재프로그램을 통해 유래된 ESC(예를 들면, iPS 세포)를 포함하는 군에서 선택되는 다능성 세포의 분화를 유도함으로써, 페니실린/스트렙토마이신(pen/strp), EX-CYTE® 성장 보충물(9.0 내지 11.0 g/L 콜레스테롤 및 13.0 내지 18.0 g/L 리포단백질 및 지방산을 pH 7 내지 8.4에서 포함하는 수용성 농축물), Flt3-리간드(FL), 혈관 내피 성장 인자(VEGF), 트롬보포이에틴(TPO), 염기성 섬유모세포 성장 인자(bFGF), 줄기 세포 유래 인자(SCF), 과립구 대식세포 콜로니-자극 인자(GM-CSF), 인터루킨 3(IL3), 및 인터루킨 6(IL6)을 포함하는 군에서 선택되는 하나 이상의 성분 플러스 무혈청 메틸셀룰로스 배지를 사용한 배양물 내에서 적어도 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20 일 후 수확한다. 본 발명의 바람직한 실시예에서, 혈관모세포는 전술한 실시예의 성분 플러스 무-혈청 메틸셀룰로스에서 배양되는 6 내지 14일 중에 수확된다. 바람직한 실시예에서, 성분들은 배지내에 하기 농도로 존재한다: Flt3-리간드(FL) 50 ng/ml, 혈관 내피 성장 인자(VEGF) 50ng/ml, 트롬보포이에틴(TPO) 50ng/ml, 및 염기성 섬유모세포 성장 인자(bFGF) 20 ng/ml, 줄기 세포 유래 인자(SCF) 50 ng/ml, 과립구 대식세포 콜로니-자극 인자(GM-CSF) 20 ng/ml, 인터루킨 3(IL3) 20 ng/ml, 인터루킨 6(IL6) 20ng/ml, FL 50 ng/ml, VEGF 50 ng/ml, TPO 50 ng/ml, 및 bFGF 30 ng/ml.

[0069] 다른 실시예에서, 실질적으로 혈관모세포가 포함된 세포 클러스터는 재-플레이팅되고 적어도 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, 또는 36일 동안 배양되어 중간엽 간질 세포 제제를 형성한다. 일 실시예에서, 중간엽 간질 세포는 (a) ESC의 8 내지 12일 동안 배양, (b) 세포 클러스터를 형성하는 혈관모세포의 수확, (c) 단계 (b)의 혈관모세포의 재플레이팅, 및 (d) 단계 (c)의 혈관모세포의 14 내지 30일 동안 배양을 포함하는 단계들에 의해 생성된다.

[0070] 일 실시예에서, 혈관모세포는 마우스 배아 섬유모세포, OP9 세포, 또는 당업자에 공지된 다른 세포 타입과 같은 피더 세포층이 배양내 함유되어 있지 않은 피더-프리 조건하 액체 배지내에서 수확, 재-플레이팅 및 배양된다. 바람직한 실시예에서, 혈관모세포는 세포외 매트릭스상에서 배양된다. 더욱 바람직한 실시예에서, 혈관모세포는 세포외 매트릭스상에서 배양되며, 매트릭스는 실온에서 겔화되어 재구성된 기저막(마트리겔)을 형성하는 엔겔브레쓰-홈-스왐(EHS) 마우스 육종 세포 유래 가용성 제제를 포함한다. 더 바람직한 실시예에서, 혈관모세포는 (a) 혈관모세포를 마트리겔상에서 적어도 7 일간 배양, (b) 단계 (a)의 혈관모세포를 비-코팅된 조직 배양 플레이트에 이송하고 단계 (b)의 혈관모세포를 약 7 내지 14일 동안 더 배양을 포함하는 단계에 따라 생성된다. 혈관모세포는 형질전환 성장 인자 베타(TGF-베타), 표피 성장 인자(EGF), 인슐린-유사 성장 인자 1, 소 섬유모세포 성장 인자(bFGF), 및/또는 혈소판-유래 성장 인자(PDGF), 인간 기저막 추출물(BME)(예를 들면, Cultrex BME, Trevigen) 또는 EHS 매트릭스, 라미닌, 피브로넥틴, 비트로넥틴, 프로테오글리칸, 엔탁틴, 콜라겐(예를 들면, 콜라겐 I, 콜라겐 IV), 및 헤파란 설페이트로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 인자들을 포함하는 기질상에서 배양될 수 있다. 매트릭스 또는 매트릭스 성분들은 포유류, 특히 인간 기원일 수 있다. 일 실시예에서,

혈관모세포는 마트리겔-코팅 플레이트 상에서 혈청을 포함하는 액체 배지내에서 배양되며, 배양 배지는 10-20% 우태아 혈청(αMEM+20% FCS) 보충αMEM(Sigma-Aldrich), 10-20% 열-불활성화 인간 AB 혈청 보충 αMEM 및 10-20% 열 불활성화 AB 인간 혈청 보충 IMDM에서 선택된 성분을 포함할 수 있다.

[0071] 혈관모세포를 배양하여 생성된 중간엽 간질 세포

[0072] 본 발명의 실시예는 개선된 중간엽 간질 세포를 포함한다. 본 발명의 중간엽 간질 세포는 혈관모세포를 배양하는 개선된 방법을 사용하여 혈관모세포로부터 생성될 수 있다.

[0073] 본 발명의 중간엽 간질세포는 더 높은 수준의 역가를 보유할 수 있으며, 응괴되지 않거나 또는 ESC에서 직접 유래된 중간엽 간질 세포보다 실질적으로 덜 응괴된다. 본 발명의 일 실시예에서, 본 발명의 방법 중 어느 하나 이상에 따라 생성된 중간엽 간질 세포 제제는 더 높은 수준의 역가를 보유하며, 응괴하지 않거나 ESC에서 직접 유래된 중간엽 간질 세포보다 실질적으로 덜 응괴된다.

[0074] 본 발명의 일 실시예는 중간엽 간질 세포 제제를 생성하는 혈관모세포를 배양하는 방법을 제공하며, 중간엽 간질 세포는 젊은 표현형을 보유한다. 본 발명의 중간엽 간질세포 약제학적 제제는 치료가 필요한 포유류 숙주에 투여시 개선된 치료적 성질을 나타낸다.

[0075] 본 발명의 일 실시예는 인간 혈관모세포를 배양함으로써 생성된 중간엽 간질 세포 제제를 제공한다. 본 발명의 추가 실시예는 인간 혈관모세포를 배양함으로써 중간엽 간질 세포 제제를 생성하는 방법을 제공한다. 본 방법의 일 실시예에서 인간 혈관모세포는 피더-프리 조건에서 배양된 후 매트릭스상에 플레이팅된다. 본 발명의 추가 실시예에서, 매트릭스는 형질전환 성장 인자 베타(TGF-베타), 표피 성장 인자(EGF), 인슐린-유사 성장 인자 1, 소 섬유모세포 성장 인자(bFGF), 혈소판-유래 성장 인자(PDGF), 라미닌, 피브로넥틴, 비트로넥틴, 프로테오글리칸, 엔탁틴, 콜라겐, 콜라겐 I, 콜라겐 IV, 헤파란 설페이트, 엔젤브레쓰-홈-스왐(EHS) 마우스 육종 세포 유래 가용성 제제, 마트리겔, 및 인간 기저막 추출물을 포함하는 군에서 선택된다. 추가 실시예에서, 매트릭스 포유류 또는 인간 기원에서 유래될 수 있다.

[0076] 다른 실시예에서, 혈관모세포는 혈청 또는 혈청 대체물을 포함하는 배지, 예컨대, 20% 우태아 혈청 보충 αMEM 배지에서 배양된다. 추가 실시예에서, 혈관모세포는 약 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30일 동안 매트릭스상에서 배양된다. 더 추가적인 본 발명의 실시예에서, 중간엽 간질 세포 제제는 (a) 마트리겔상에서 혈관모세포 7일 동안 배양하는 것, (b) 단계 (a)의 혈관모세포를 마트리겔로부터 이송하고 비코팅 조직 배양 접시상에서 혈관모세포 9 내지 100 일 동안, 약 9, 10, 11, 12, 13,14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90 또는 100일 동안 더 성장시키는 것을 포함하는 단계들에 의해 생성된다.

[0077] 본 발명의 실시예에서 중간엽 간질 세포 제제는 혈관모세포를 혈청 또는 혈청 대체물을 포함하는 배지, 예컨대 20% 우태아 혈청 보충 αMEM에서 배양함으로써 생성된다. 본 발명의 추가 실시예에서, 혈관모세포는 약 9, 10, 11, 12, 13,14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30일 동안 매트릭스 상에서 배양된다.

[0078] 본 발명의 실시예에서 혈관모세포는 ESC로부터 분화된다. 본 발명의 추가 실시예에서, 이전 실시예의 혈관모세포는 iPS, MA09, H7, H9, MA01, HuES3, H1gfp, 이너 세포 매스 세포 및 할구를 포함하는 군에서 선택되는 ESC로부터 분화된다.

[0079] 본 발명의 일 실시예는 혈관모세포가 ESC로부터 분화되는 방법에 의해 생성된 중간엽 간질 세포 제제를 포함한다. 본 발명의 추가 실시예에서, 이전 실시예의 혈관모세포는 iPS, MA09, H7, H9, MA01, HuES3, H1gfp, 이너 세포 매스 세포 및 할구를 포함하는 군에서 선택되는 ESC로부터 분화된다.

[0080] 본 발명의 일 실시예에서 혈관모세포는 하기 단계들에 의해 ESC로부터 분화된다:(a) 예를 들면, 혈관 내피 성장 인자(VEGF) 및/또는 골형성 단백질 4(BMP-4) 존재하에 ESC를 배양하여 세포 클러스터를 형성하는 단계; (b) 세포 클러스터를 혈관모세포로의 분화를 유도하기에 충분한 양으로 적어도 하나의 성장 인자(예를 들면, 염기성 섬유모세포 성장 인자(bFGF), 혈관 내피 성장 인자(VEGF), 및 골형성 단백질 4(BMP-4), 줄기 세포 인자(SCF), Flt 3L(FL), 트롬보포이에틴(TPO), 및/또는 tPTD-HOXB4)의 존재하에 배양하는 단계; 및 (c) 혈관모세포를 적어도 하나의 부가적 성장 인자(예를 들면, 인슐린, 트랜스페린, 과립구 대식세포 콜로니-자극 인자(GM-CSF), 인터루킨-3(IL-3), 인터루킨-6(IL-6), 과립구 콜로니-자극인자(G-CSF), 에리스로포이에틴(EPO), 줄기 세포 인자(SCF), 혈관 내피 성장 인자(VEGF), 골형성 단백질 4(BMP-4), 및 tPTD-HOXB4)를 포함하는 배지에서 배양하는 단계, 이때 적어도 하나의 부가적 성장 인자는 배양 내 세포 클러스터를 확장하기에 충분한 양으로 제공되며,

구리가 임의로 단계 (a)-(c) 중 임의의 하나에 추가된다.

[0081] 본 발명의 실시예에서 중간엽 간질 세포 제제는 하기 단계에 의해 ESC로부터 분화되는 혈관모세포를 배양함으로써 생성된다:(a) 혈관 내피 성장 인자(VEGF) 및 골형성 단백질 4(BMP-4)의 존재하에 ESC를 상기 배양 개시 0 내지 48 시간내에 배양하여 세포 클러스터를 형성하는 단계; (b) 세포 클러스터를 혈관모세포로 분화 유도하기에 충분한 양의 염기성 섬유모세포 성장 인자(bFGF), 혈관 내피 성장 인자(VEGF), 골형성 단백질 4(BMP-4), 줄기세포 인자(SCF), Flt 3L(FL), 트롬보포이에틴(TPO), 및 tPTD-HOXB4를 포함하는 군에서 선택되는 적어도 하나의 성장 인자 존재하에 세포 클러스터를 배양하는 단계; 및 (c) 혈관모세포를 인슐린, 트랜스페린, 과립구 대식세포 콜로니-자극 인자(GM-CSF), 인터루킨-3(IL-3), 인터루킨-6(IL-6), 과립구 콜로니-자극인자(G-CSF), 에리스로포이에틴(EPO), 줄기 세포 인자(SCF), 혈관 내피 성장 인자(VEGF), 골형성 단백질 4(BMP-4), 및 tPTD-HOXB4를 포함하는 군에서 선택되는 적어도 하나의 부가적 성장 인자를 포함하는 배지에서 배양하는 단계, 여기에서 적어도 하나의 부가적 성장 인자는 배양 내 인간 세포 클러스터를 확장하기에 충분한 양으로 제공된다.

[0082] 다른 실시예에서, 중간엽 줄기 세포 제제는 (a) ESC의 혈관모세포로의 유도 적어도 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 또는 14일 후에 혈관모세포를 수확하는 단계, 및 (b) 단계 (a)에서 온 혈관모세포의 중간엽 세포로의 유도 약 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 또는 50일 이내에 생성된 중간엽 간질세포를 수확하는 단계에 의해 생성된다.

[0083] 또 다른 실시예에서, 적어도 8천만, 8천5백만, 9천만, 9천5백만, 1억, 1억2천5백만 또는 1억2천5백만 중간엽 간질 세포 제제가 약 200,000 혈관모세포로부터 혈관모세포의 배양 약 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 또는 35일 이내에 생성되며, 중간엽 간질 세포 제제는 약 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.9%, 0.8%, 0.7%, 0.6%, 0.5%, 0.4%, 0.3%, 0.2%, 0.1%, 0.09%, 0.08%, 0.07%, 0.06%, 0.05%, 0.04%, 0.03%, 0.02%, 0.01%, 0.009%, 0.008%, 0.007%, 0.006%, 0.005%, 0.004%, 0.003%, 0.002%, 0.001%, 0.0009%, 0.0008%, 0.0007%, 0.0006%, 0.0005%, 0.0004%, 0.0003%, 0.0002%, 또는 0.0001% 미만의 인간 배아 줄기 세포를 포함한다. 또 다른 실시예에서, 적어도 8천만, 8천5백만, 9천만, 1억, 1억2천5백만 또는 1억5천만 중간엽 간질 세포가 약 200,000 혈관모세포로부터 혈관모세포 배양 약 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 또는 35일 이내에 생성된다.

[0084] 본 발명 방법의 일 실시예에서 중간엽 간질 세포 제제는 인간 배아 줄기 세포에 대해 실질적으로 정제된다. 본 발명 방법의 추가 실시예에서 중간엽 간질 세포 제제는 인간 배아 줄기 세포에 대해 실질적으로 정제되며, 상기 제제는 적어도 약 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 중간엽 간질 세포를 포함한다.

[0085] 본 발명 방법의 다른 실시예에서, 본 발명 방법 중 임의의 어느 하나에 의해 생성된 중간엽 간질 세포 제제는 숙주 도입시 기형종을 형성하지 않는다.

[0086] 본 발명의 다른 실시예에서, 적어도 50%의 중간엽 간질 세포 제제는 배양 약 7 내지 20(예를 들면, 15)일 이내에 CD105 또는 CD73에 대해 양성이다. 본 발명의 바람직한 실시예에서, 적어도 50%의 본 발명 방법 중 임의의 어느 하나에 의해 생성된 중간엽 간질 세포 제제는 배양 약 7 내지 15일 후에 CD105 또는 CD73에 대해 양성이다. 본 발명의 추가 실시예에서, 적어도 80%의 중간엽 간질 세포 제제는 배양 약 20일 이내에 CD105 또는 CD73에 대해 양성이다. 본 발명의 더 추가적인 실시예에서, 적어도 80%의 본 발명 방법 중 임의의 어느 하나 이상에 의해 생성된 중간엽 간질 세포 제제는 배양 약 20일 이내에 CD105 또는 CD73에 대해 양성이다.

[0087] 예시적인 양태에서, 본 발명은 적어도 10^6 중간엽 간질 세포 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 포유류 환자에 적합한 약제학적 제제를 제공하며, 중간엽 간질 세포는 세포 배양에서 적어도 10 세포수 증식을 진행하는 복제능을 가지며, 10번째 증식까지 25 퍼센트 미만의 세포가 세포치사, 노화 또는 비-MSC 세포로의 분화가 진행된다.

[0088] 예시적인 양태에서, 본 발명은 적어도 10^6 중간엽 간질 세포 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 포유류 환자에 사용하기 적합한 약제학적 제제를 제공하며, 중간엽 간질 세포는 세포 배양에서 적어도 5 계대를 진행하는 복제능을 가지며, 5번째 계대까지 25 퍼센트 미만의 세포가 세포치사, 노화 또는 섬유모세포로의 분화가 진행된다.

[0089] 예시적인 양태에서, 본 발명은 적어도 10^6 중간엽 간질 세포 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약제학적 제제를 제공하며, 중간엽 간질 세포는 혈관모세포 세포로부터 분화된다.

[0090] 예시적인 양태에서, 본 발명은 적어도 10^8 중간엽 간질 세포를 포함하는 극저온 세포 은행(cryogenic cell bank)을 제공하며, 중간엽 간질 세포는 세포 배양에서 적어도 10 세포수 증식을 진행하는 복제능을 가지며, 10번째 증식까지 25 퍼센트 미만의 세포가 세포치사, 노화 또는 섬유모세포로의 분화가 진행된다.

[0091] 예시적인 양태에서, 본 발명은 적어도 10^6 중간엽 간질 세포 및 1 퍼센트 미만의 임의의 다른 세포 타입을 포함하는 정제된 세포성 제제를 제공하고, 이때 중간엽 간질 세포는 세포 배양에서 적어도 10 세포수 증식을 진행하는 복제능을 가지며, 10번째 증식까지 25 퍼센트 미만의 세포가 세포치사, 노화 또는 비-MSC 세포로의 분화가 진행된다.

[0092] 본 중간엽 간질 세포는 배아 줄기 세포주 또는 유도 다능성 줄기 세포주와 같은 다능성 줄기 세포 공급원으로부터 분화된다. 예를 들면, 본 제제 또는 은행의 모든 중간엽 간질 세포는 공통의 다능성 줄기 세포 공급원으로부터 분화될 수 있다. 부가적으로, 본 중간엽 간질 세포는 다능성 줄기 세포 공급원으로부터 분화되고, 중간엽 간질 세포수를 확장하기 위해 배양내에서 계대되며, 20 미만의 세포수 증식 후 배양에서 분리될 수 있다.

[0093] 본 중간엽 간질 세포는 HLA-유전자형적(genotypically)으로 동일할 수 있다. 중간엽 간질 세포는 유전자적(genomically)으로 동일할 수 있다.

[0094] 적어도 30%의 본 중간엽 간질 세포는 CD10에 양성일 수 있다. 부가적으로, 적어도 60%의 본 중간엽 간질 세포는 CD73, CD90, CD105, CD13, CD29, CD44, 및 CD166 마커 및 HLA-ABC에 양성일 수 있다. 예시적인 실시예에서, 30% 미만의 본 중간엽 간질 세포가 마커 CD31, CD34, CD45, CD133, FGFR2, CD271, Stro-1, CXCR4 및 TLR3에 대해 양성일 수 있다.

[0095] 본 중간엽 간질 세포는 25일 미만에 세포 배양에서 적어도 10 세포수 증식을 진행하는 복제 속도를 가질 수 있다. 본 중간엽 간질 세포는 8kb 초과의 평균 말단 제한 단편 길이(TRF)를 가질 수 있다. 본 중간엽 간질 세포는 5 세포수 증식을 진행한 골수 유래 중간엽 간질 세포 제제에 비하여, (i) 세포 사이클 조절 및 세포 노화, (ii) 세포 에너지 및/또는 지질 대사, 및 (iii) 아폽토시스 중 하나 이상에 관련된 단백질의 함량 및/또는 효소 활성이 통계적으로 유의하게 감소할 수 있다. 본 중간엽 간질 세포는 골수 유래 중간엽 간질 세포 제제에 비하여, 세포골격 구조 및 이에 관련된 세포 역학에 관련된 단백질의 함량 및/또는 효소 활성이 통계적으로 유의하게 증가할 수 있다. 본 중간엽 간질 세포는 배양내 10 세포수 증식에 걸쳐 유세포 분석에 의해 측정시 5,000,000를 초과하는 전방 산란 광가(forward-scattered light value)를 갖는 세포에서 75 퍼센트를 초과하여 증가하지 않는다. 본 중간엽 간질 세포는 휴지 상태에서 골수 또는 지방 조직에서 유래된 휴지 상태의 중간엽 간질 세포 제제가 발현하는 IL-6 mRNA 수준의 10 퍼센트 미만의 수준으로 인터루킨-6을 코딩하는 mRNA을 발현할 수 있다.

[0096] 본 제제는 인간 환자에 투여하기에 적합할 수 있다. 본 제제는 비-인간 포유류 동물에 투여하기에 적합할 수 있다.

[0097] 예시적인 양태에서, 본 발명은 중간엽 간질 세포를 포함하는 약제학적 제제를 제공하며, 여기에서 중간엽 간질 세포는 적어도 10 세포수 증식을 진행할 수 있고, 10 세포수 증식이 약 27일 이내, 더 바람직하게 약 26일 미만, 바람직하게 25일 미만, 더 바람직하게 약 24일 미만, 더욱 더 바람직하게 약 23일 미만, 보다 더 바람직하게 약 22일 미만 또는 더 적은 일수 내에 진행될 수 있다.

[0098] 예시적인 양태에서, 본 발명은 중간엽 간질 세포를 포함하는 약제학적 제제를 제공하며, 여기에서 중간엽 간질 세포는 적어도 15 세포수 증식을 진행할 수 있다.

[0099] 상기 중간엽 간질 세포는 적어도 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 또는 그 이상의 세포수 증식을 진행할 수 있다.

[0100] 예시적인 양태에서, 본 발명은 중간엽 간질 세포를 포함하는 약제학적 제제를 제공하며, 여기에서 중간엽 간질 세포는 배양에서 적어도 15 세포수 증식, 적어도 20 세포수 증식, 또는 적어도 25 세포수 증식을 진행할 수 있다.

[0101] 본 중간엽 간질 세포는 혈관모세포의 시험관 내 분화에 의해 제조될 수 있다. 본 중간엽 간질 세포는 영장류 세포 또는 다른 포유류 세포일 수 있다. 본 중간엽 간질 세포는 인간 세포일 수 있다.

[0102] 세포수 증식은 약 35일 이내, 더 바람직하게 약 34일 이내, 바람직하게 33일 이내, 더 바람직하게 32일 이내, 보다 더 바람직하게 31일 이내, 또는 더욱 더 바람직하게 약 30일 이내 일어날 수 있다.

[0103] 본 제제는 약 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.9%, 0.8%, 0.7%, 0.6%, 0.5%, 0.4%, 0.3%, 0.2%,

0.1%, 0.09%, 0.08%, 0.07%, 0.06%, 0.05%, 0.04%, 0.03%, 0.02%, 0.01%, 0.009%, 0.008%, 0.007%, 0.006%, 0.005%, 0.004%, 0.003%, 0.002%, 0.001%, 0.0009%, 0.0008%, 0.0007%, 0.0006%, 0.0005%, 0.0004%, 0.0003%, 0.0002%, 또는 0.0001% 미만의 다능성 세포를 포함할 수 있다.

[0104] 본 제제는 다능성 세포가 전혀 없을 수 있다.

[0105] 본 제제는 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 중간엽 간질 세포를 포함할 수 있다.

[0106] 적어도 50%의 중간엽 간질 세포는 (i) CD10, CD24, IL-11, AIRE-1, ANG-1, CXCL1, CD105, CD73 및 CD90 중 적어도 하나; (ii) CD10, CD24, IL-11, AIRE-1, ANG-1, CXCL1, CD105, CD73, CD90, CD105, CD13, CD29,CD 44, CD166, CD274, 및 HLA-ABC 중 적어도 하나; (iii) CD105, CD73 및/또는 CD90 또는 (iv) 이들의 조합에 양성일 수 있다. 적어도 50%의 중간엽 간질 세포는 (i) CD105, CD73 및/또는 CD90 중 적어도 두개, (ii) CD10, CD24, IL-11, AIRE-1, ANG-1, CXCL1, CD105, CD73 및 CD90 중 적어도 두개; 또는 (iii) CD10, CD24, IL-11, AIRE-1, ANG-1, CXCL1, CD105, CD73, CD90, CD105, CD13, CD29, CD 44, CD166, CD274, 및 HLA-ABC 모두에 대하여 양성일 수 있다. 적어도 50%의 중간엽 간질 세포는 (i) CD105, CD73 및 CD90 모두에 양성; (ii) CD10, CD24, IL-11, AIRE-1, ANG-1, CXCL1, CD105, CD73, CD90, CD105, CD13, CD29, CD 44, CD166, CD274, 및 HLA-ABC 모두에 대해 양성이거나/이고 (ii) 5% 미만 또는 10% 미만의 세포가 CD31, 34, 45, 133, FGFR2, CD271, Stro-1, CXCR4, 및/또는 TLR3에 대해 음성일 수 있다. 적어도 60%, 70%, 80% 또는 90%의 중간엽 간질 세포는 (i) CD105, CD73 및 CD90 중 하나 이상 (ii) CD10, CD24, IL-11, AIRE-1, ANG-1, CXCL1, CD105, CD73 및 CD90 중 하나 이상; 또는 (iii) CD10, CD24, IL-11, AIRE-1, ANG-1, CXCL1, CD105, CD73, CD90, CD105, CD13, CD29, CD 44, CD166, CD274, 및 HLA-ABC 중 하나 이상에 대해 양성일 수 있다.

[0107] 본 약제학적 제제는 필요로 하는 대상에서 바람직하지 않은 면역 반응을 치료하는데 유효량의 중간엽 간질 세포를 포함할 수 있다.

[0108] 본 약제학적 제제는 필요로 하는 수여자 내로 이식되기 위한 다른 세포, 조직 또는 기관을 포함할 수 있다. 이 다른 세포 또는 조직은 RPE 세포, 피부 세포, 각막 세포, 췌장 세포, 간 세포, 심장 세포 또는 임의의 상기 세포를 함유하는 조직일 수 있다. 중간엽 간질 세포는 골수에서 유래된 것이 아닐 수 있으며, 면역 조절 어세이에서 본 제제의 역가는 골수 유래 중간엽 간질 세포 제제의 역가보다 더 클 수 있다. 역가는 EC50 용량을 결정하는 면역 조절 어세이에 의해 어세이될 수 있다. 본 제제는 10 세포수 증식 후에 그 증식능의 약 50 내지 100%를 보유할 수 있다.

[0109] 본 중간엽 간질 세포는 다능성 세포에서 직접 유래한 것이 아닐 수 있으며, 여기에서 중간엽 간질 세포는 (a) 응괴하지 않거나 다능성 세포에서 직접 유래한 중간엽 간질 세포 보다 실질적으로 덜 응괴한다; (b) 다능성 세포에서 직접 유래한 중간엽 간질 세포에 비해 분리시 더 쉽게 산포된다; (c) 동일수의 다능성 세포로 시작할 때 다능성 세포에서 직접 유래한 중간엽 간질 세포보다 숫적으로 더 많으며; 및/또는 (d) 다능성 세포에서 직접 유래한 중간엽 간질 세포보다 더 빨리 특징적인 중간엽 세포 표면 마커를 획득한다.

[0110] 본 중간엽 간질 세포는 포유류일 수 있다. 본 중간엽 간질 세포는 인간, 개, 소, 비-인간 영장류, 뮤린, 고양이 또는 말의 세포일 수 있다.

[0111] 예시적인 양태에서, 본 발명은 중간엽 줄기 세포가 생기는 조건하에서 혈관모세포를 배양하는 것을 포함하는, 중간엽 간질 세포 생성방법을 제공한다. 혈관모세포는 피드-프리 조건에서 배양될 수 있다. 혈관모세포는 매트릭스상에 플레이팅될 수 있다. 매트릭스는 하나 이상의 형질전환 성장 인자 베타(TGF-베타), 표피 성장 인자(EGF), 인슐린-유사 성장 인자 1, 소 섬유모세포 성장 인자(bFGF), 및/또는 혈소판-유래 성장 인자(PDGF)를 포함할 수 있다. 매트릭스는 라미닌, 피브로넥틴, 비트로넥틴, 프로테오글리칸, 엔탁틴, 콜라겐, 콜라겐 I, 콜라겐 IV, 헤파란 설페이트, 마트리겔(엔젤브레쓰-홈-스왐(EHS) 마우스 육종 세포 유래 가용성 제제), 인간 기저막 추출물 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다. 매트릭스는 엔젤브레쓰-홈-스왐 마우스 육종 세포 유래 가용성 제제를 포함할 수 있다.

[0112] 중간엽 간질 세포는 포유류의 세포일 수 있다. 중간엽 간질 세포는 인간, 개, 소, 비-인간 영장류, 뮤린, 고양이 또는 말의 세포일 수 있다.

[0113] 혈관모세포는 αMEM를 함유하는 배지에서 배양될 수 있다. 혈관모세포는 혈청 또는 혈청 대체물을 함유하는 배지에서 배양될 수 있다. 혈관모세포는 0%, 0.1%-0.9%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 또는 20% 우태아 혈청이 보충된 αMEM를 함유하는 배지에서 배양될 수 있

다. 혈관모세포는 매트릭스상에서 적어도 약 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30일 동안 배양될 수 있다.

[0114] 혈관모세포는 다능성 세포로부터 분화될 수 있다.

[0115] 다능성 세포는 iPS 세포이거나 또는 할구에서 제조된 다능성 세포일 수 있다. 다능성 세포는 인간 배아의 파괴 없이 하나 이상의 할구에서 유래될 수 있다.

[0116] 혈관모세포는 (a) 다능성 세포를 배양하여 세포 클러스터를 형성하는 단계를 포함하는 방법에 의해 다능성 세포로부터 분화될 수 있다. 다능성 세포는 혈관 내피 성장 인자(VEGF) 및/또는 골형성 단백질 4(BMP-4)의 존재하에서 배양될 수 있다. 단계 (a)에서, 다능성 세포는 혈관 내피 성장 인자(VEGF) 및/또는 골형성 단백질 4(BMP-4)의 존재하에서 배양될 수 있다. VEGF 및 BMP-4는 다능성 세포 배양물에 세포 배양 개시 0 내지 48시간 내에 추가될 수 있으며, VEGF는 임의로 20 내지 100 nm/mL의 농도로 BMP-4는 임의로 15 내지 100 ng/mL의 농도로 추가될 수 있다. VEGF 및 BMP-4는 단계 (a)의 세포 배양물에 세포 배양 개시 0 내지 48시간 내에, VEGF는 임의로 20 내지 100 nm/mL의 농도로 BMP-4는 임의로 15 내지 100 ng/mL의 농도로 추가될 수 있다. 혈관모세포는 (b) 세포 클러스터를 혈관모세포로 분화를 유도하기에 충분한 양의 적어도 하나의 성장 인자의 존재하에 세포 클러스터를 배양하는 단계를 추가로 포함하는 방법에 의해 다능성 세포로부터 분화될 수 있다. 단계 (b)에 추가되는 적어도 하나의 성장 인자는 염기성 섬유모세포 성장 인자(bFGF), 혈관 내피 성장 인자(VEGF), 골형성 단백질 4(BMP-4), 줄기 세포 인자(SCF), Flt 3L(FL), 트롬보포이에틴(TPO), EPO, 및/또는 tPTD-HOXB4중 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0117] 단계 (b)에 추가되는 적어도 하나의 성장 인자는 약 20 내지 25 ng/ml 염기성 섬유모세포 성장 인자(bFGF), 약 20 내지 100 ng/ml 혈관 내피 성장 인자(VEGF), 약 15 내지 100 ng/ml 골형성 단백질 4(BMP-4), 약 20 내지 50 ng/ml 줄기 세포 인자(SCF), 약 10 내지 50 ng/ml Flt 3L(FL), 약 20 내지 50 ng/ml 트롬보포이에틴(TPO), EPO, 및/또는 1.5 내지 5 U/ml tPTD-HOXB4 중 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0118] 단계 (b)에 추가되는 적어도 하나의 성장 인자는 배양물에 단계 (a) 개시로부터 36 내지 60 시간 또는 40 내지 48 시간 이내에 추가될 수 있다.

[0119] 단계 (b)에 추가되는 적어도 하나의 성장 인자는 배양물에 단계 (a) 개시로부터 48 내지 72시간 이내에 추가될 수 있다

[0120] 단계 (b)에 추가되는 적어도 하나의 성장 인자는 bFGF, VEGF, BMP-4, SCF 및/또는 FL 중 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0121] 본 방법은 (c) 세포 클러스터를 임의로 단일 세포로 분리하는 단계를 더 포함한다.

[0122] 본 방법은 (d) 혈관모세포를 확장하기에 충분한 양으로 존재하는 적어도 하나의 부가적 성장 인자를 포함하는 배지내에서 혈관모세포를 배양하는 단계를 더 포함한다.

[0123] 단계 (d)에서, 적어도 하나의 부가적 성장 인자는 인슐린, 트랜스페린, 과립구 대식세포 콜로니-자극 인자(GM-CSF), 인터루킨-3(IL-3), 인터루킨-6(IL-6), 과립구 콜로니-자극인자(G-CSF), 에리스로포이에틴(EPO), 줄기 세포 인자(SCF), 혈관 내피 성장 인자(VEGF), 골형성 단백질 4(BMP-4), 및/또는 tPTD-HOXB4 중 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0124] 단계 (d)에서, 적어도 하나의 부가적 성장 인자는 약 10 내지 100 μg/ml 인슐린, 약 200 내지 2,000 μg/ml 트랜스페린, 약 10 내지 50 ng/ml 과립구 대식세포 콜로니-자극 인자(GM-CSF), 약 10 내지 20 ng/ml 인터루킨-3(IL-3), 약 10 내지 1000 ng/ml 인터루킨-6(IL-6), 약 10 내지 50 ng/ml 과립구 콜로니-자극인자(G-CSF), 약 3 내지 50 U/ml 에리스로포이에틴(EPO), 약 20 내지 200 ng/ml 줄기 세포 인자(SCF), 약 20 내지 200 ng/ml 혈관 내피 성장 인자(VEGF), 약 15 내지 150 ng/ml 골형성 단백질 4(BMP-4), 및/또는 약 1.5 내지 15U/ml tPTD-HOXB4 중 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0125] 단계 (a), (b), (c) 및/또는 (d)의 배지는 무-혈청 배지일 수 있다.

[0126] 전술한 바와 같은 본 방법은 (e) 중간엽 간질 세포를 유사분열적으로 불활성화하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0127] 적어도 8천만, 8천5백만, 9천만, 9천5백만, 1억, 1억2천5백만, 또는 1억5천만 중간엽 간질 세포가 생성될 수 있다.

[0128] 혈관모세포는 다능성 세포의 분화 유도 개시 적어도 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 또는 18일 후에 수확될 수 있다.

[0129] 중간엽 간질 세포는 다능성 세포 분화 유도 개시 적어도 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 또는 50일 이내에 생성될 수 있다.

[0130] 본 방법은 배양 약 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 또는 35일 이내 약 200,000 혈관모세포로부터 생성되는 적어도 8천만, 8천5백만, 9천만, 9천5백, 1억, 1억2천5백만, 또는 1억5천만 중간엽 간질 세포를 결과한다.

[0131] 중간엽 간질 세포는 혈관모세포로부터 혈관모세포 대 중간엽 간질 세포가 적어도 1:200, 1:250, 1:300, 1:350,1:400, 1:415,1:425, 1:440; 1:450, 1:365, 1:475, 1:490 및 1:500의 비율로 혈관모세포로서 배양 약 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 또는 35일 이내에 생성된다.

[0132] 상기 세포는 인간의 것일 수 있다.

[0133] 다른 양태에서, 본 발명은 전술한 임의의 본 방볍에 의해 수득된 혈관모세포로부터 유래된 중간엽 간질 세포를 제공한다.

[0134] 다른 양태에서, 본 발명은 혈관모세포의 시험관 내 분화에 의해 유래된 중간엽 간질 세포를 제공한다.

[0135] 적어도 50%의 중간엽 간질 세포는 (i) CD10, CD24, IL-11, AIRE-1, ANG-1, CXCL1, CD105, CD73, CD90, CD105, CD13, CD29, CD 44, CD166, CD274, 및 HLA-ABC 모두에 양성일 수 있으며 (ii) CD31, 34, 45, 133, FGFR2, CD271, Stro-1, CXCR4 및/또는 TLR3에 음성이거나 또는 5% 미만 또는 10% 미만의 세포가 이들중 적어도 하나를 발현할 수 있다.

[0136] 적어도 50%의 중간엽 간질 세포는 (i) CD10, CD24, IL-11, AIRE-1, ANG-1, CXCL1, CD105, CD73 및 CD90 모두; 또는 (ii) CD73, CD90, CD105, CD13, CD29, CD44, CD166, CD274, 및 HLA-ABC 모두에 대해 양성일 수 있다.

[0137] 적어도 60%, 70%, 80% 또는 90%의 중간엽 간질 세포는 (i) CD10, CD24, IL-11, AIRE-1, ANG-1, CXCL1, CD105, CD73 및 CD90 중 적어도 하나; 또는 (ii) CD73, CD90, CD105, CD13, CD29, CD 44, CD166, CD274, 및 HLA-ABC 중 적어도 하나에 대해 양성일 수 있다.

[0138] 중간엽 간질 세포는 CD31, 34, 45, 133, FGFR2, CD271, Stro-1, CXCR4, 또는 TLR3 중 적어도 하나를 발현하지 않거나 또는 5% 미만 또는 10% 미만의 세포가 이들 중 적어도 하나를 발현할 수 있다.

[0139] 다른 양태에서, 본 발명은 전술한 바와 같은 중간엽 간질 세포 제제를 제공한다.

[0140] 본 제제는 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.9%, 0.8%, 0.7%, 0.6%, 0.5%, 0.4%, 0.3%, 0.2%, 0.1%, 0.09%, 0.08%, 0.07%, 0.06%, 0.05%, 0.04%, 0.03%, 0.02%, 0.01%, 0.009%, 0.008%, 0.007%, 0.006%, 0.005%, 0.004%, 0.003%, 0.002%, 0.001%, 0.0009%, 0.0008%, 0.0007%, 0.0006%, 0.0005%, 0.0004%, 0.0003%, 0.0002%, 또는 0.0001% 미만의 다능성 세포를 포함할 수 있다.

[0141] 본 제제는 다능성 세포가 전혀 없을 수 있다.

[0142] 본 제제는 실질적으로 정제되며 임의로 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 인간 중간엽 간질 세포를 포함할 수 있다.

[0143] 본 제제는 실질적으로 유사한 수준의 p53 and p21 단백질을 포함할 수 있으며, p53 단백질의 수준은 p21 단백질에 비교시 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10배 더 많을 수 있다.

[0144] 본 제제내 중간엽 간질 세포 또는 MSC는 배양에서 적어도 5 세포수 증식을 진행할 수 있거나, 배양에서 적어도 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 또는 그 이상의 세포수 증식을 진행할 수 있다.

[0145] 중간엽 간질 세포는 (a) 응괴하지 않거나 다능성 세포에서 직접 유래한 중간엽 간질 세포 보다 실질적으로 덜 응괴한다; (b)다능성 세포에서 직접 유래한 중간엽 간질 세포에 비해 분리시 더 쉽게 산포된다; (c) 동일수의 다능성 세포로 시작할 때 다능성 세포에서 직접 유래한 중간엽 간질 세포보다 숫적으로 더 많으며; 및/또는 (d) 다능성 세포에서 직접 유래한 중간엽 간질 세포보다 더 빨리 특징적인 중간엽 세포 표면 마커를 획득한다.

[0146] 다른 양태에서, 본 발명은 전술한 임의의 중간엽 간질 세포 또는 중간엽 간질 세포 제제를 포함하는 약제학적 제제를 제공한다.

[0147] 본 약제학적 제제는 바람직하지 않은 면역 반응을 치료하기에 유효량의 중간엽 간질 세포를 포함한다.

[0148] 본 약제학적 제제는 바람직하지 않은 면역 반응을 치료하기에 유효량의 중간엽 간질 세포를 포함하고, 필요로 하는 수여자에게 이식되기 위한 다른 세포 또는 조직을 더 포함할 수 있다.

[0149] 다른 세포 또는 조직은 동종이형 또는 동계 췌장, 신경, 간, RPE, 각막 세포 또는 전술한 임의의 세포들을 함유하는 조직일 수 있다.

[0150] 본 약제학적 제제는 자가면역 질환 또는 동종이형 세포에 대한 면역반응의 치료 또는 다발경화증, 전신성경화증, 혈액암, 심근경색, 기관이식거부, 만성동종이식신장병, 경화, 간 기능상실, 심장 기능상실, GvHD, 정강 골절, 좌심실 기능이상, 백혈병, 골수형성이상증후군, 크론병, 당뇨병, 만성폐쇄폐질환, 불완전골생성증, 동형접합 가족성 저콜레스테롤혈증, 반원상 연골절제술후 처치, 성인 치주염, 중증 심근허혈환자에서 혈관형성, 척수손상, 뼈형성장애, 중증하지허혈, 당뇨병성 발질환, 원발성 쇼그렌 증후군, 골관절염, 연골 결함, 제엽염, 다발적 전신 위축, 근위축성 측색 경화증, 심장 수술, 전신성 홍반성 루프스, 생 신장 동종이식, 비악성 적혈구 질환, 열화상, 방사선 화상, 파킨슨병, 미세골절, 표피수포증, 중증 관상 허혈, 특발성 확장심근병, 대퇴골두 괴사, 루프스 신장염, 골강 결손(bone void defects), 허혈성 뇌졸중, 뇌졸중후, 급성 방사선 증후군, 폐병, 관절염, 골재생, 포도막염 또는 이들의 조합의 치료에 사용될 수 있다.

[0151] 다른 양태에서, 본 발명은 전술한 바와 같은 임의의 중간엽 간질 세포 또는 중간엽 간질 세포 제제를 포함하는 키트를 제공한다.

[0152] 다른 양태에서, 본 발명은 전술한 바와 같은 중간엽 간질 세포 또는 중간엽 간질 세포 제제를 포함하는 키트를 제공하며, 이때 상기 세포 또는 세포 제제는 냉동 또는 동결보존될 수 있다.

[0153] 다른 양태에서, 본 발명은 전술한 바와 같은 중간엽 간질 세포 또는 중간엽 간질 세포 제제를 포함하는 키트를 제공하며, 이때 상기 세포 또는 세포 제제는 세포 송달 비히클내에 함유될 수 있다.

[0154] 다른 양태에서, 본 발명은 전술한 바와 같은 유효량의 중간엽 간질 세포 또는 중간엽 간질 세포 제제를 이를 필요로 하는 대상에 투여하는 것을 포함하는 질병 또는 질환을 치료하는 방법을 제공한다.

[0155] 본 방법은 다른 세포 또는 조직의 이식을 더 포함할 수 있다. 세포 또는 조직은 망막, RPE, 각막, 신경, 면역, 골수, 간 또는 췌장 세포를 포함할 수 있다. 질병 또는 질환은 다발경화증, 전신성경화증, 혈액암, 심근경색, 기관이식거부, 만성동종이식신장병, 경화, 간 기능상실, 심장 기능상실, GvHD, 정강 골절, 좌심실 기능이상, 백혈병, 골수형성이상증후군, 크론병, 당뇨병, 만성폐쇄폐질환, 불완전골생성증, 동형접합 가족성 저콜레스테롤혈증, 반원상 연골절제술후 처치, 성인 치주염, 중증 심근허혈환자에서 혈관형성, 척수손상, 뼈형성장애, 중증하지허혈, 당뇨병성 발질환, 원발성 쇼그렌 증후군, 골관절염, 연골 결함, 다발적 전신 위축, 근위축성 측색 경화증, 심장 수술, 불응성 전신성 홍반성 루프스, 생 신장 동종이식, 비악성 적혈구 질환, 열화상, 파킨슨병, 미세골절, 표피수포증, 중증 관상 허혈, 특발성 확장심근병, 대퇴골두 괴사, 루프스 신장염, 골강 결손(bone void defects), 허혈성 뇌졸중, 뇌졸중후, 급성 방사선 증후군, 폐병, 관절염, 골재생, 또는 이들의 조합 중에서 선택될 수 있다.

[0156] 질병 또는 질환은 포도막염일 수 있다. 질병 또는 질환은 자가면역 질환 또는 동종이형 세포에 대한 면역반응일 수 있다. 자가면역질환은 다발경화증일 수 있다.

[0157] 다른 양태에서, 본 발명은 유효량의 중간엽 간질 세포 또는 중간엽 간질 세포 제제를 이를 필요로 하는 대상에 투여하는 것을 포함하는 뼈 소실 또는 연골 손상을 치료하는 방법을 제공한다.

[0158] 중간엽 간질 세포는 동종이형 또는 동계 이식된 세포 또는 조직과 함께 투여될 수 있다. 동종이형 이식 세포는 망막 색소상피세포, 망막 세포, 각막 세포, 또는 근육 세포를 포함할 수 있다.

[0159] 다른 양태에서, 본 발명은 유사분열적으로 불활성화된 중간엽 간질 세포를 포함하는 약제학적 제제를 제공한다. 중간엽 간질 세포는 혈관모세포로부터 분화될 수 있다.

[0160] 본 약제학적 제제는 적어도 10^6 중간엽 간질 세포 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함할 수 있다.

[0161] 다른 양태에서, 본 발명은 본 방법에 의해 제조된 유사분열적으로 불활성화된 중간엽 세포를 포함하는 약제학적 제제를 제공한다.

[0162] 본 제제는 인간 환자에의 투여에 적합할 수 있다. 본 제제는 비-인간 포유류 동물에의 투여에 적합할 수 있다.

[0163] 본 약제학적 제제는 다능성 세포가 전혀 없을 수 있다.

[0164] 본 약제학적 제제는 필요로하는 대상에서 바람직하지 않은 면역 반응의 치료에 유효량의 중간엽 간질 세포를 포함할 수 있다.

[0165] 본 약제학적 제제는 염증성 호흡 상태, 급성 손상으로 인한 호흡 상태, 성인 호흡곤란증후군, 외상후 성인 호흡곤란증후군, 이식 폐 질환, 만성폐쇄폐질환, 폐기종, 만성폐쇄 기관지염, 기관지염, 알러지 반응, 박테리아성 폐렴으로 인한 손상, 바이러스성 폐렴으로 인한 손상, 천식, 자극원에의 노출, 담배 이용, 아토피성 피부염, 알러지성 비염, 청각 소실, 자가면역 청각 소실, 소음-유도 청각 소실, 건선 및 이들의 임의의 조합에서 선택된 질병 또는 상태의 치료에 유효량의 중간엽 간질 세포를 포함할 수 있다.

[0166] <u>중간엽 간질 세포 제제</u>

[0167] 본 발명의 실시예에서, ESC 배양에 의한 중간엽 간질 세포에 비해 원하는 중간엽 간질 세포 표현형이 더 빨리 제시되는 중간엽 간질 세포 제제(예를 들면, 혈관모세포를 배양함으로써 생성된)가 제공된다(도 5 참조). 본 발명의 추가 실시예에서, ESC 배양에 의한 중간엽 간질 세포에 비해 원하는 중간엽 간질 세포 표현형이 더 빨리 제시되며, 원하는 표현형이 CD9, CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD166, 및 HLA-abc 중에서 선택되는 적어도 두개의 마커의 발현으로 정의되는, 중간엽 간질 세포 제제(예를 들면, 혈관모세포를 배양함으로써 생성된)가 제공된다.

[0168] 본 발명의 추가 실시예는, 중간엽 간질 세포의 표현형이 CD9, CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD166, 및 HLA-ABC 중에서 선택되는 적어도 두개의 마커의 발현으로 정의되는, 중간엽 간질 세포 제제를 포함한다. 본 발명의 또 추가 실시예는, 중간엽 간질 세포의 표현형이 CD9, CD13, CD29, CD44, CD73, CD90 및 CD105를 포함하는 군에서 선택되는 적어도 두개의 마커의 발현으로 정의되고, 중간엽 간질 세포가 CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD14, CD15, CD16, CD19, CD20, CD22, CD33, CD36, CD38, CD61, CD62E 및 CD133를 발현하지 않는 중간엽 간질 세포 제제를 포함한다.

[0169] 본 발명의 일 실시예에서 약 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 또는 100%의 중간엽 간질 세포(예를 들면, 혈관모세포를 배양하여 생성된)는 CD9, CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD166, 및 HLA-abc의 마커의 발현으로 정의된 표현형을 배양 약 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30일 후에 제시한다. 본 발명의 일 실시예에서, 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 또는 100%의 중간엽 간질 세포(예를 들면, 혈관모세포를 배양하여 생성된)는 CD9, CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD166, 및 HLA-abc를 포함하는 군에서 선택되는 적어도 두개의 마커는 발현하고, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD14, CD15, CD16, CD19, CD20, CD22, CD33, CD36, CD38, CD61, CD62E, CD133 및 Stro-1의 발현은 없는 것으로 정의되는 표현형을 배양 약 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30일 후에 제시한다. 이전 실시예에서, 표현형은 AIRE-1, IL-11, CD10, CD24, ANG-1, 및 CXCL1을 포함하는 군에서 선택되는 마커로 추가적으로 정의된다.

[0170] 본 발명의 바람직한 방법이 제공되며, 여기에서 혈관모세포에서 유래된 중간엽 간질 세포의 수는 중간엽 간질 세포의 배양 약 30일 이내에 약 2 x 105 혈관모세포로부터 유래된 약 8 x 10^7, 8.5 x 10^7, 9 x 10^7, 9.5 x 10^7, 1 x 10^8, 1.25 x 10^8, 또는 1.5 x 10^8의 중간엽 간질 세포이다. 본 발명의 대체 실시예에서, 중간엽 간질 세포는 혈관모세포로부터, 중간엽 간질 세포 배양 약 30일 이내에 혈관모세포 대 중간엽 간질 세포가 약 1:200, 1:400, 1:415, 1:425, 1:440; 1:450, 1:465, 1:475, 1:490, 및 1:500의 비율로 생성될 수 있다.

[0171] 본 발명의 바람직한 실시예에서, 혈관모세포 배양에 의해 수득된 중간엽 간질 세포의 수는 ESC로부터 직접 수득된 중간엽 간질 세포의 수보다 더 많다. 본 발명의 더 바람직한 실시예에서, 혈관모세포 배양에 의해 수득된 중간엽 간질 세포의 수는 ESC로부터 직접 수득된 중간엽 간질 세포의 수보다 적어도 5배, 10배, 20배, 22배 더 많다(도 4 참조).

[0172] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 본 중간엽 간질 세포 제제는 포유류 숙주에 도입시 기형종을 형성하지 않는다.

[0173] 본 발명의 실시예는 본 발명의 임의의 방법을 사용하여 혈관모세포를 배양함으로써 생성된 중간엽 간질 세포 제제를 제공한다. 본 발명의 실시예는 본 발명의 임의의 방법을 사용하여 혈관모세포를 배양함으로써 생성된 중간엽 간질 세포 제제를 포함하며, 여기에서 제제의 표현형은 AIRE-1, IL-11, CD10, CD24, ANG-1, 및 CXCL1를 포함하는 군에서 선택되는 임의의 또는 모든 마커의 존재에 의해 정의된다. 본 발명의 추가 실시예는 본 발명의 임의의 방법을 사용하여 혈관모세포를 배양함으로써 생성된 중간엽 간질 세포 제제를 포함하며, 여기에서 제제

의 표현형은 AIRE-1, IL-11, CD10, CD24, ANG-1, 및 CXCL1를 포함하는 군에서 선택되는 임의의 또는 모든 마커의 존재에 의해 정의되고, 제제는 감소된 IL-6, Stro-1 및 VEGF의 발현을 나타낸다.

[0174] 본 발명의 일 실시예에서, 본 중간엽 간질 세포 제제(예를 들면, 혈관모세포 배양으로 생성된)가 제공되며, 여기에서 제제는 실질적으로 유사한 수준의 p53 및 p21 단백질을 포함하거나, p53의 수준이 p21에 비해 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10배 더 높다. 본 발명의 일 실시예에서, 본 중간엽 간질 세포 제제(예를 들면, 혈관모세포 배양으로 생성된)가 제공되며, 제제는 실질적으로 유사한 수준의 p53 및 p21 단백질을 포함하거나, p53의 수준이 p21에 비해 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10배 더 높다. 본 발명의 일 실시예에서, 본 중간엽 간질 세포 약제학적 제제(예를 들면, 혈관모세포 배양으로 생성된)가 제공되며, 약제학적 제제는 실질적으로 유사한 수준의 p53 및 p21 단백질을 포함하거나, p53의 수준이 p21에 비해 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10배 더 높다.

[0175] 본 발명의 일 실시예에서, 본 중간엽 간질 세포 제제(예를 들면, 혈관모세포 배양으로 생성된)가 제공되며, 상기 제제는 실질적으로 유사한 퍼센트의 p53 및 p21 단백질에 대해 양성인 세포를 포함하거나, p53에 양성인 세포 퍼센트가 p21에 양성인 세포 퍼센트에 비해 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10배 더 높다. 본 발명의 일 실시예에서, 본 중간엽 간질 세포 제제(예를 들면, 혈관모세포 배양으로 생성된)가 제공되며, 상기 제제는 실질적으로 유사한 퍼센트의 p53 및 p21 단백질에 대해 양성인 세포를 포함하거나, p53에 양성인 세포 퍼센트가 p21에 양성인 세포 퍼센트에 비해 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10배 더 높다. 본 발명의 일 실시예에서, 본 중간엽 간질 세포 약제학적 제제(예를 들면, 혈관모세포 배양으로 생성된)가 제공되며, 상기 약제학적 제제는 실질적으로 유사한 퍼센트의 p53 및 p21 단백질에 대해 양성인 세포를 포함하거나, p53에 양성인 세포 퍼센트가 p21에 양성인 세포 퍼센트에 비해 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10배 더 높다.

[0176] 본 발명의 일 실시예에서, 본 중간엽 간질 세포 제제(예를 들면, 혈관모세포 배양으로 생성된)가 제공되며, 상기 제제는 실질적으로 유사한 퍼센트의 S100A1, VIM, MYADM, PIM1, ANXA2, RAMP, MEG3, IL13R2, S100A4, TREM1,DGKA, TPBG, MGLL, EML1, MYO1B, LASS6, ROBO1, DKFZP586H2123, LOC854342, DOK5, UBE2E2, USP53, VEPH1, SLC35E1, ANXA2, HLA-E, CD59, BHLHB2, UCHL1, SUSP3, CREDBL2, OCRL, OSGIN2, SLEC3B, IDS, TGFBR2, TSPAN6, TM4SF1, MAP4, CAST, LHFPL2, PLEKHM1, SAMD4A, VAMP1, ADD1, FAM129A, HPDC1, KLF11, DRAM, TREM140, BHLHB3, MGC17330, TBC1D2, KIAA1191, C5ORF32, C15ORF17, FAM791, CCDC104, PQLC3, EIF4E3, C7ORF41, DUSP18, SH3PX3, MYO5A, PRMT2, C8ORF61, SAMD9L, PGM2L1, HOM-TES-103, EPOR, 및 TMEM112를 포함하는 군 또는 S100A1, VIM, MYADM, PIM1, ANXA2, RAMP, MEG3, IL13R2, S100A4,TREM1, DGKA, TPBG, MGLL, EMLI, MYO1B, LASS6, ROBO1, DKFZP586H2123, LOC854342, DOK5, UBE2E2, USP53, VEPH1, 및 SLC35E1를 포함하는 군에서 선택되는 노화 마커들의 배경수준을 갖는 세포를 포함하거나, 또는 S100A1, VIM, MYADM, PIM1, ANXA2, RAMP, MEG3, IL13R2, S100A4, TREM1,DGKA, TPBG, MGLL, EML1, MYO1B, LASS6, ROBO1, DKFZP586H2123, LOC854342, DOK5, UBE2E2, USP53, VEPH1, SLC35E1, ANXA2, HLA-E, CD59, BHLHB2, UCHL1, SUSP3, CREDBL2, OCRL, OSGIN2, SLEC3B, IDS, TGFBR2, TSPAN6, TM4SF1, MAP4, CAST, LHFPL2, PLEKHM1, SAMD4A, VAMP1 ADD1, FAM129A, HPDC1, KLF11, DRAM, TREM140, BHLHB3, MGC17330, TBC1D2, KIAA1191, C5ORF32, C15ORF17, FAM791, CCDC104, PQLC3, EIF4E3, C7ORF41, DUSP18, SH3PX3, MYO5A, PRMT2, C8ORF61, SAMD9L, PGM2L1, HOM-TES-103, EPOR, TMEM112를 포함하는 군 또는 S100A1, VIM, MYADM, PIM1, ANXA2, RAMP, MEG3, IL13R2, S100A4, TREM1,DGKA, TPBG, MGLL, EML1, MYO1B, LASS6, ROBO1, DKFZP586H2123, LOC854342, DOK5, UBE2E2, USP53, VEPH1, 및 SLC35E1를 포함하는 군에서 선택되는 노화 마커들에 양성인 세포 퍼센트가 배경보다 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10배 더 많다. 본 발명의 일 실시예에서, 본 중간엽 간질 세포 제제(예를 들면, 혈관모세포 배양으로 생성된)가 제공되며, 상기 제제는 실질적으로 유사한 퍼센트의 HoxB3, HoxB7, MID1, SNAPC5, PPARG, ANXA2, TIPIN, MYLIP, LAX1, EGR1CRIP1, SULT1A3, STMN1, CCT8, SFRS10, CBX3, CBX1, FLJ11021, DDX46, ACADM, KIAA0101, TYMS, BCAS2, CEP57, TDG, MAP2K6, CSRP2, GLMN, HMGN2, HNRPR, EIF3S1, PAPOLA, SFRS10, TCF3, H3F3A, LOC730740, LYPLA1, UBE3A, SUMO2, SHMT2, ACP1, FKBP3, ARL5A,GMNN, ENY2, FAM82B, RNF138, RPL26L1, CCDC59, PXMP2, POLR3B, TRMT5, ZNF639, MRPL47, GTPBP8, SUB1, SNHG1, ATPAF1, MRPS24, C16ORF63, FAM33A, EPSTL1, CTR9, GAS5, ZNF711, MTO1, 및 CDP2를 포함하는 군에서 선택되는 마커들의 배경수준을 갖는 세포를 포함하며, 또는 HoxB3, HoxB7, MID1, SNAPC5, PPARG, ANXA2, TIPIN, MYLIP, LAX1, EGR1, CRIP1, SULT1A3, STMN1, CCT8, SFRS10, CBX3, CBX1, FLJ11021, DDX46, ACADM, KIAA0101, TYMS, BCAS2, CEP57, TDG, MAP2K6, CSRP2, GLMN, HMGN2, HNRPR, EIF3S1, PAPOLA, SFRS10, TCF3, H3F3A, LOC730740, LYPLA1, UBE3A, SUMO2, SHMT2, ACP1, FKBP3, ARL5A,GMNN, ENY2, FAM82B, RNF138, RPL26L1, CCDC59, PXMP2, POLR3B, TRMT5, ZNF639, MRPL47, GTPBP8, SUB1, SNHG1, ATPAF1, MRPS24, C16ORF63, FAM33A, EPSTL1, CTR9, GAS5, ZNF711, MTO1, 및 CDP2을 포함하는 군에서 선택된 마커들에 양성인 세포 퍼센트가 배경보다 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8,

9, 또는 10배 더 적다.

[0177] 본 발명의 일 실시예에서, 본 중간엽 간질 세포 제제(예를 들면, 혈관모세포 배양으로 생성된)가 제공되며, 상기 제제는 실질적으로 유사한 퍼센트의 HoxB3, HoxB7, MID1, SNAPC5, PPARG, ANXA2, TIPIN, MYLIP, LAX1, EGR1, CRIP1, SULT1A3, STMN1, CCT8, SFRS10, CBX3, CBX1, FLJ11021, DDX46, ACADM, KIAA0101, TYMS, BCAS2, CEP57, TDG, MAP2K6, CSRP2, GLMN, HMGN2, HNRPR, EIF3S1, PAPOLA, SFRS10, TCF3, H3F3A, LOC730740, LYPLA1, UBE3A, SUMO2, SHMT2, ACP1, FKBP3, ARL5A,GMNN, ENY2, FAM82B, RNF138, RPL26L1, CCDC59, PXMP2, POLR3B, TRMT5, ZNF639, MRPL47, GTPBP8, SUB1, SNHG1, ATPAF1, MRPS24, C16ORF63, FAM33A, EPSTL1, CTR9, GAS5, ZNF711, MTO1, 및 CDP2를 포함하는 군 또는 HoxB3, HoxB7, MID1, SNAPC5, PPARG, ANXA2, TIPIN, MYLIP, LAX1, EGR1, CRIP1 및 SULT1A3을 포함하는 군에서 선택된 노화 마커의 배경수준을 갖는 세포를 포함하거나, 또는 HoxB3, HoxB7, MID1, SNAPC5, PPARG, ANXA2, TIPIN, MYLIP, LAX1, EGR1, CRIP1, SULT1A3, STMN1, CCT8, SFRS10, CBX3, CBX1, FLJ11021, DDX46, ACADM, KIAA0101, TYMS, BCAS2, CEP57, TDG, MAP2K6, CSRP2, GLMN, HMGN2, HNRPR, EIF3S1, PAPOLA, SFRS10, TCF3, H3F3A, LOC730740, LYPLA1, UBE3A, SUMO2, SHMT2, ACP1, FKBP3, ARL5A,GMNN, ENY2, FAM82B, RNF138, RPL26L1, CCDC59, PXMP2, POLR3B, TRMT5, ZNF639, MRPL47, GTPBP8, SUB1, SNHG1, ATPAF1, MRPS24, C16ORF63, FAM33A, EPSTL1, CTR9, GAS5, ZNF711, MTO1, 및 CDP2을 포함하는 군 또는 HoxB3, HoxB7, MID1, SNAPC5, PPARG, ANXA2, TIPIN, MYLIP, LAX1, EGR1, CRIP1, SULT1A3을 포함하는 군에서 선택되는 노화 마커에 양성인 세포 퍼센트가 배경보다 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10배 더 적다.

[0178] 다른 실시예에서, 혈관모세포-유래 MSC는 성인-유래 MSC에 비해 더 젊은 세포 표현형을 갖는다. 일 실시예에서, 대상 MSC는 배양에서 적어도 또는 약 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 또는 그 이상의 세포수 증식을 진행할 수 있다. 반면에, 성인-유래 중간엽 간질 세포는 배양에서 통상적으로 2-3 증식을 진행한다. 다른 실시예에서, 혈관모세포-유래 MSC는 성인-유래 MSC에 비하여 더 긴 텔로미어 길이, 더 큰 면역억제 효과, 더 적은 액포를 가지며, 더 빨리 분열하고 배양에서 더 쉽게 분열하며, CD90 발현이 더 높고, 계통 관련이 더 적으며 또는 이들의 조합을 나타낸다. 다른 실시예에서, 혈관모세포-유래 MSC는 성인-유래 MSC에 비하여 전사촉진세포증식의 발현이 증가되며(즉, 더 높은 증식능을 갖는다), 말단 세포분화에 관련된 전사발현이 감소된다.

[0179] 본 발명의 일 실시예에서, 중간엽 간질 세포 제제는 하나 이상의 임의의 본 발명의 방법에 의해 생성되며, 이때 중간엽 간질 세포는 배양에서 적어도 또는 약 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 또는 그 이상의 세포수 증식을 진행할 수 있다.

[0180] 본 발명의 다른 실시예에서, 본 중간엽 간질 세포 제제(예를 들면, 혈관모세포 배양에 의해 생성된)는 배양에서 적어도 또는 약 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 또는 그 이상의 세포수 증식을 진행할 수 있다. 본 발명의 다른 실시예에서, 본 중간엽 간질 세포 제제는 배양에서 적어도 또는 약 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 또는 그 이상의 세포수 증식을 진행할 수 있으며, 이때 세포수 증식후 50%, 40%, 30%, 20%, 15%, 10%, 5%, 또는 1% 미만의 중간엽 간질 세포가 복제 노화를 진행한다. 추가 실시예에서, 상기 제제는 약제학적 제제이다.

[0181] 본 발명의 다른 실시예에서, 본 중간엽 간질 세포 제제가 제공되며, 여기에서 중간엽 간질 세포는 배양에서 적어도 또는 약 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 또는 60 세포수 증식을 진행할 수 있다.

[0182] 본 발명의 다른 실시예에서, 본 중간엽 간질 세포 제제가 제공되며, 여기에서 중간엽 간질 세포 배양에서 적어도 또는 약 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 또는 60 세포수 증식을 진행할 수 있으며, 50%, 40%, 30%, 20%, 15%, 10%, 5%, 또는 1% 미만의 중간엽 간질 세포가 복제 노화를 진행하고, 중간엽 간질 세포는 젊은 표현형 및 역가를 보유하고, 상기 제제는 약제학적 제제이다. 상기 제제는 면역학적 이상, 퇴행 질환, 또는 MSC를 사용한 치료에 반응하는 다른 질환과 같은 질병의 치료에 필요한 유효수의 중간엽 간질 세포를 포함할 수 있다.

[0183] 본 발명의 다른 실시예에서, 본 중간엽 간질 세포 제제(예를 들면, 혈관모세포 배양에 의해 생성된)가 제공되며, 여기에서 중간엽 간질 세포는 배양에서 적어도 또는 약 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 또는 60 세포수 증식을 진행하며, 50%, 40%, 30%, 20%, 15%, 10%, 5%, 또는 1% 미만의 중간엽 간질 세포가 이러한 증식 이후 복제 노화를 진행하고, 중간엽 간질 세포는 젊은 표현형 및 역가를 보유하고, 상기 제제는 약제학적 제제이다. 상기 제제는 약제학적 제제이다. 상기 제제는 면역학적 이상, 퇴행 질환, 또는 MSC를 사용한 치료에 반응하는 다른 질환과 같은 질병의 치료에 필요한 유효수의 중간엽 간질 세포를 포함할 수 있다.

[0184] 본 발명의 다른 실시예에서, 본 중간엽 간질 세포 제제(예를 들면, 혈관모세포 배양에 의해 생성된)가 제공되며, 여기에서 중간엽 간질 세포는 배양에서 약 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 또는 60 세포수 증식을 진행할 수 있다. 이전 실시예에서 50%, 40%, 30%, 20%, 15%, 10%, 5%, 1% 미만의 중간엽 간질 세포가 복제 노화를 진행하고, 중간엽 간질 세포는 젊은 표현형 및 역가를 보유하고, 상기 제제는 약제학적 제제이며, 약제학적 제제는 유효수의 중간엽 간질 세포를 포함하며, 약제학적 제제는 보존된다.

[0185] 다른 실시예에서, 본 발명은 중간엽 간질 세포 약제학적 제제를 포함하는 키트를 제공한다. 다른 실시예에서, 본 발명은 중간엽 간질 세포 약제학적 제제를 포함하는 키트를 제공하며, 여기에서 상기 제제는 보존된다. 다른 실시예에서, 본 발명은 중간엽 간질 세포 약제학적 제제(혈관모세포 배양에 의해 생성된)를 포함하는 키트를 제공한다. 다른 실시예에서, 본 발명은 중간엽 간질 세포 약제학적 제제(혈관모세포 배양에 의해 생성된)를 포함하는 키트를 제공하며, 여기에서 상기 제제는 보존된다.

[0186] 다른 실시예에서, 본 발명은 유효량의 혈관모세포에서 유래된 중간엽 간질 세포를 필요로 하는 대상에 투여함으로써 병상을 치료하는 방법을 제공한다. 병상은 자가면역 질환, 포도막염, 뼈 소실 또는 연골 손상을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0187] 혈관모세포 배양에 의해 수득된 중간엽 간질 세포는 ESC에서 직접 유래된 MSC에 비하여 개선된 특성을 갖는다. 예를 들면, ESC-유래 MSC는 혈관모세포-유래 MSC에 비해 더 응괴되며, 분리시 산포되기 어렵고, 동일수의 ESC로 시작할 때 비슷한 수의 많은 MSC를 생성하지 못하며, 특징적인 중간엽 세포 표면 마커를 획득하는데 더 오래 걸린다. 실시예 2 및 도 3 내지 6 참조.

[0188] 일 실시예에서, 본 발명은 본 중간엽 간질 세포 제제(예를 들면, 혈관모세포 배양에 의해 생성된)를 제공하며, 여기에서 상기 제제는 병상을 정상화하는데 유효하다. 본 발명의 추가 실시예에서, 본 중간엽 간질 세포 제제(예를 들면, 혈관모세포 배양에 의해 생성된)가 제공되며, 상기 제제는 과잉 또는 바람직하지 않은 면역 반응을 감소시키는데 유효하다. 본 발명의 추가 실시예에서, 본 중간엽 간질 세포 제제(예를 들면, 혈관모세포 배양에 의해 생성된)가 제공되며, 상기 제제는 자가면역 질환을 경감시키는데 유효하다. 본 발명의 추가 실시예에서, 유효량의 본 중간엽 간질 세포(예를 들면, 혈관모세포 배양에 의해 생성된)를 숙주에 투여함으로써 병상의 정상화가 제공된다. 본 발명의 추가 실시예에서, 병상의 정상화가 제공되며, 이러한 병상의 정상화는 MSC에 의한 사이토카인 방출, 조절 T 세포의 수의 증가 촉진, Th1 세포에서의 특정량의 IFN 감마 방출 저해 및 Th2 세포에서의 특정량의 IL4 분비 촉진을 포함하는 군에서 선택되는 효과에 의해 특징지어진다. 추가 실시예에서, 본 중간엽 간질 세포 제제(예를 들면, 혈관모세포 배양에 의해 생성된)의 투여는 형질전환 성장 인자 베타, 인돌아민 2, 3디옥시게나제, 프로스타글란딘 E2, 헤파토사이트 성장 인자, 산화질소, 인터루킨 10, 인터루킨 6, 대식세포-콜로니 자극 인자, 및 가용성 인간 류코사이트 항원 (HLA) G5를 포함하는 군에서 선택된 사이토카인의 중간엽 간질세포로부터의 방출을 결과한다.

[0189] 본 발명의 추가 실시예에서, 본 중간엽 간질 세포 제제(예를 들면, 혈관모세포 배양에 의해 생성된)의 투여는 형질전환 성장 인자 베타, 인돌아민 2, 3디옥시게나제, 프로스타글란딘 E2, 헤파토사이트 성장 인자, 산화질소, 인터루킨 10, 인터루킨 6, 대식세포-콜로니 자극인자, 가용성 인간 류코사이트 항원 (HLA) G5, 인터루킨 4, 8, 11, 과립구 대식세포 콜로니-자극 인자, 혈관 내피 성장 인자, 인슐린-유사 성장 인자 1, 포스파티딜이노시톨-글리칸 생합성 클래스 F 단백질, 단핵구 화학주성 단백질 1, 기질 유래 인자 1, 암 괴사 인자 1, 형질전환 성장 인자 베타, 염기성 섬유모세포 성장 인자, 안지오포이에틴 1 및 2, 감마 인터페론에 의해 유도된 모노킨, 인터페론 유도성 단백질 10, 뇌 유래 신경영양성 인자, 인터루킨 1 수용체 알파, 케모카인 리간드 1 및 2를 포함하는 군에서 선택되는 사이토카인의 중간엽 간질 세포로부터의 방출을 결과한다.

[0190] <u>MSC 약제학적 제제</u>

[0191] 본 발명의 MSC는 약제학적으로 허용가능한 담체로 제형화될 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 MSC는 단독으로 또는 약제학적 제형의 성분으로 투여될 수 있으며, MSC는 의약품으로 사용되기에 편리한 방식으로 투여되도록 제형화될 수 있다. 일 실시예에서, 분산액, 현탁액, 에멀젼, 임의로 사용직전 멸균주사용액 또는 분산액으로 재구성되는 멸균 분말, 항산화제, 버퍼, 정균제, 용질 또는 현탁 및 농후제로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 약제학적으로 허용가능한 멸균 등장 수 또는 비수용액과 함께 중간엽 간질 세포를 포함하는 중간엽 간질 세포의 약제학적 제제를 제공한다.

[0192] 본 발명의 일 실시예에서, 중간엽 간질 세포의 약제학적 제제가 제공되며, 이때 중간엽 간질 세포는 약 5 내지 약 100 세포수 증식을 진행한다. 본 발명의 추가 실시예에서, 중간엽 간질 세포의 약제학적 제제가 제공되며,

이때 중간엽 간질 세포는 약 10 내지 약 80 세포수 증식을 진행한다. 본 발명의 추가 실시예에서, 중간엽 간질 세포의 약제학적 제제가 제공되며, 이때 중간엽 간질 세포는 약 25 내지 약 60 세포수 증식을 진행한다. 본 발명의 추가 실시예에서, 중간엽 간질 세포의 약제학적 제제가 제공되며, 이때 중간엽 간질 세포는 10 미만의 세포수 증식을 진행한다. 본 발명의 더 추가적인 실시예에서, 중간엽 간질 세포의 약제학적 제제가 제공되며, 이때 중간엽 간질 세포는 20 미만의 세포수 증식을 진행한다. 본 발명의 더 추가적인 실시예에서, 중간엽 간질 세포의 약제학적 제제가 제공되며, 이때 중간엽 간질 세포는 30 미만의 세포수 증식을 진행하며, 중간엽 간질 세포는 복제 노화를 겪지 않는다. 본 발명의 추가적인 실시예에서, 중간엽 간질 세포의 약제학적 제제가 제공되며, 이때 중간엽 간질 세포는 30 미만의 세포수 증식을 진행하며, 약 25% 미만의 중간엽 간질 세포가 복제 노화를 겪는다. 본 발명의 추가적인 실시예에서, 중간엽 간질 세포의 약제학적 제제가 제공되며, 이때 중간엽 간질 세포는 30 미만의 세포수 증식을 진행하며, 약 10% 미만의 중간엽 간질 세포가 복제 노화를 겪는다. 본 발명의 추가적인 실시예에서, 중간엽 간질 세포의 약제학적 제제가 제공되며, 이때 중간엽 간질 세포는 30 미만의 세포수 증식을 진행하며, 약 10% 미만의 중간엽 간질 세포는 복제 노화를 겪으며, 중간엽 간질 세포는 AIRE-1, IL-11, CD10, CD24, ANG-1, 및 CXCL1를 포함하는 군에서 선택되는 마커를 발현한다.

[0193] 본 MSC 약제학적 제제의 주사 농도는 임의의 유효량일 수 있으며, 예를 들면, 실질적으로 ESC가 없다. 예를 들면, 본 약제학적 제제는 본 명세서에 기술된 MSC 타입과 수를 포함할 수 있다. 특정 실시예에서, 본 MSC 약제학적 제제는 필요로 하는 숙주에 전신 투여되기 위해 약 1 x 10^6의 MSC(예를 들면, 혈관모세포의 배양에 의해 생성된), 필요로 하는 숙주에 국소 투여되기 위해 혈관모세포의 배양에 의해 생성된 MSC 약 1 x 10^4을 포함할 수 있다.

[0194] 예시적인 본 발명의 조성물은 무-발열원 또는 본질적으로 무-발열원이고 무-병원균과 같이 인간 환자를 치료하는데 사용되기에 적합한 제형일 수 있다. 투여시 본 발명에서 사용되기 위한 약제학적 제제는 무-발열원, 무-병원균, 생리학적으로 허용가능한 형태일 수 있다.

[0195] 본 명세서에 기술된 본 방법에 사용되는 MSC를 포함하는 본 제제는 현탁액, 겔, 콜로이드, 슬러리 또는 혼합물에 이식될 수 있다. 또한, 주사시 냉동 보관된 MSC를 상업적으로 입수가능한 균형 염 용액과 함께 재현탁하여 주입(예, 볼러스 또는 정맥 투여)에 의한 투여에 적합한 삼투압 및 농도를 갖도록 할 수 있다.

[0196] 본 발명의 일 양태는 포유류 환자에 사용하기에 적합한, 적어도 10^6, 10^7, 10^8 또는 심지어 10^9 중간엽 간질 세포 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약제학적 제제에 관한 것이다. 본 발명의 다른 양태는 적어도 10^6, 10^7, 10^8 또는 심지어 10^9 중간엽 간질 세포 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하며, 중간엽 간질 세포가 혈관모세포 세포로부터 분화된 약제학적 제제에 관한 것이다. 본 발명의 다른 양태는 적어도 10^8, 10^9, 10^{10}, 10^{11}, 10^{12} 또는 심지어 10^{13} 중간엽 간질 세포를 포함하는 극저온 세포 은행을 제공한다. 본 발명의 또 다른 양태는 실질적으로 비-인간 세포 및/또는 비-인간 동물 산물이 없는 정제된 세포제제를 제공하며, 이는 적어도 10^6, 10^7, 10^8 또는 심지어 10^9 중간엽 간질 세포를 포함하며, 1% 미만의 임의의 다른 세포 타입, 더 바람직하게는 0.1%, 0.01% 또는 심지어 0.001% 미만의 임의의 다른 세포 타입을 포함한다. 상기 제제, 조성물 및 은행 중 바람직한 실시예는 비제한적으로 하기 문단에 목록화된 것들을 포함한다:

[0197] 어떤 실시예에서, 본 중간엽 간질 세포는 세포 배양에서 적어도 10 세포수 증식을 진행하는 복제능을 가지며, 25, 20, 15, 10 또는 심지어 5 퍼센트 미만의 세포들이 10번째 증식까지 세포 치사, 노화 또는 비-MSC 세포(예, 섬유모세포, 지방세포 및/또는 골세포)로 분화한다.

[0198] 어떤 실시예에서, 본 중간엽 간질 세포는 세포 배양에서 적어도 15 세포수 증식을 진행하는 복제능을 가지며, 25, 20, 15, 10 또는 심지어 5 퍼센트 미만의 세포들이 15번째 증식까지 세포 치사, 노화 또는 비-MSC 세포(예, 섬유모세포, 지방세포 및/또는 골세포)로 분화한다.

[0199] 어떤 실시예에서, 본 중간엽 간질 세포는 세포 배양에서 적어도 20 세포수 증식을 진행하는 복제능을 가지며, 25, 20, 15, 10 또는 심지어 5 퍼센트 미만의 세포들이 20번째 증식까지 세포 치사, 노화 또는 비-MSC 세포(예, 섬유모세포, 지방세포 및/또는 골세포)로 분화한다.

[0200] 어떤 실시예에서, 본 중간엽 간질 세포는 세포 배양에서 적어도 5 계대를 진행하는 복제능을 가지며, 25, 20, 15, 10 또는 심지어 5 퍼센트 미만의 세포들이 5번째 계대까지 세포 치사, 노화 또는 비-MSC 세포(예, 섬유모세포, 지방세포 및/또는 골세포)로 분화한다.

[0201] 어떤 실시예에서, 본 중간엽 간질 세포는 세포 배양에서 적어도 10 계대를 진행하는 복제능을 가지며, 25, 20, 15, 10 또는 심지어 5 퍼센트 미만의 세포들이 10번째 계대까지 세포 치사, 노화 또는 비-MSC 세포(예, 섬유모세포, 지방세포 및/또는 골세포)로 분화한다.

[0202] 어떤 실시예에서, 본 중간엽 간질 세포 다능성 줄기 세포 공급원, 예컨대 OCT-4, 알칼리 포스파타제, Sox2, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, 및 TRA-1-80를 발현하는 다능성 줄기 세포(예, 배아 줄기 세포주 또는 유도 다능성 줄기 세포주)로부터 분화되며, 더욱 바람직하게는 공통 다능성 줄기 세포 공급원으로부터 분화된다.

[0203] 어떤 실시예에서, 중간엽 간질 세포는 HLA-유전자적으로 동일하다.

[0204] 어떤 실시예에서, 중간엽 간질 세포 유전자적으로 동일하다

[0205] 어떤 실시예에서, 적어도 30%, 35%, 40%, 45% 또는 심지어 50%의 중간엽 간질 세포가 CD10에 양성이다.

[0206] 어떤 실시예에서, 적어도 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% 또는 심지어 90% 의 중간엽 간질 세포가 마커 CD73, CD90, CD105, CD13, CD29, CD44, CD166 and CD274 및 HLA-ABC에 양성이다.

[0207] 어떤 실시예에서, 30%, 25%, 20%, 15% 또는 심지어 10% 미만의 중간엽 간질 세포가 마커 CD31, CD34, CD45, CD133, FGFR2, CD271, Stro-1, CXCR4 및 TLR3에 양성이다.

[0208] 어떤 실시예에서, 본 중간엽 간질 세포는 세포 배양에서 25, 24, 23, 22, 21 또는 심지어 20일 미만에 적어도 10 세포수 증식을 진행하는 복제 속도를 갖는다.

[0209] 어떤 실시예에서, 본 중간엽 간질 세포 7kb, 7.5kb, 8kb, 8.5kb, 9kb, 9.5kb, 10kb, 10.5kb, 11kb, 11.5kb 또는 심지어 12kb 보다 더 긴 평균 말단 제한 단편 길이(TRF)를 갖는다.

[0210] 어떤 실시예에서, 본 중간엽 간질 세포는 배양내 10, 15 또는 심지어 20 세포수 증식에 걸쳐, 유세포 분석에 의해 측정시 5,000,000 초과의 전방 산란 광가를 갖는 세포에서 75, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 또는 심지어 45%를 초과하여 증가하지 않는다.

[0211] 어떤 실시예에서, 휴지 상태의 본 중간엽 간질 세포는, 제대혈, 골수 또는 지방 조직에서 유래된 휴지 상태의 중간엽 간질 세포 제제가 발현하는 IL-6 mRNA 수준의 10%, 8%, 6%, 4% 또는 심지어 2% 미만의 수준으로 인터루킨-6을 코딩하는 mRNA을 발현한다.

[0212] 어떤 실시예에서, 본 중간엽 간질 세포는 제대혈, 골수 또는 지방 조직에서 유래된 MSC보다 적어도 2, 4, 6, 8, 10, 20, 50 또는 심지어 100 배 더 강력하다.

[0213] 어떤 실시예에서, 백만의 본 중간엽 간질 세포는, MOG35-55 EAE 마우스 모델(예, MOG35-55 펩타이드로 면역화된 C57BL/6 마우스)에 주사시, 평균적으로 3.5의 임상 점수를 2.5 미만으로, 더 바람직하게는 임상 점수를 2, 1.5 또는 심지어 1 미만으로 감소시킬 것이다.

[0214] 어떤 실시예에서, 본 제제는 인간 환자에 투여하기 적합하며, 더 바람직하게 발열원이 없고/없거나 비-인간 동물 산물이 없다.

[0215] 다른 실시예에서, 본 제제는 개, 고양이 또는 말과 같은 비-인간 포유류 동물에 투여하기 적합하다.

[0216] <u>혈관모세포 배양으로부터 유래된 MSC를 이용하여 치료가능한 질병 및 상태</u>

[0217] MSC가 다양한 질병 및 상태에 치료효과를 나타내는 것이 알려져 있다. 특히, MSC는 손상 부위로 이동하여, 면역억제 효과를 나타내고, 손상된 조직의 수복을 촉진한다. 본 발명의 실시예에서 중간엽 간질 세포의 약제학적 제제가 병상의 발현을 감소시키는 것이 제공된다. 본 발명의 일 실시예로 중간엽 간질 세포의 약제학적 제제가 병상으로 인해 고통받는 숙주에 투여되는 것이 제공된다. 본 발명의 추가적 실시예에서, 본 MSC 약제학적 제제(혈관모세포 배양에 의해 생성된)는 상처 치유, 이식편대숙주병 (GvHD), 질병, 만성 눈 질환, 망막 퇴화, 녹내장, 포도막염, 급성 심근경색, 만성 통증, 간염 및 신염을 포함하는 군에서 선택되는 병상의 발현을 감소한다. 본 발명의 추가적 실시예에서, 혈관모세포 배양에 의해 생성된 중간엽 간질 세포의 약제학적 제제는 말의 제엽염의 발현을 감소시킨다. 추가적 예로, MSC는 동종이형 이식된 세포 또는 조직(예를 들면, 망막 색소상피(RPE) 세포, 회돌기교세포 전구체, 망막, 각막, 골격근, 평활근 또는 심장근 또는 이들의 임의의 조합 등과 같은 근육과 같은 ES 세포로부터 분화된 세포를 포함하는 제제)과 함께 투여될 수 있으며, 이로써 이식된 세포 또는 조직에 대한 면역 반응 가능성을 감소시키고, 다른 면역 억제에 대한 필요를 잠재적으로 피할 수 있게 한다. 본 명세서에 기술된 MSC(혈관모세포 배양에 의해 생성된)은 유사한 적용에 사용될 수 있다. 본 발명의 일 방법에서, MSC(혈

관모세포 배양에 의해 생성된) 약제학적 제제는 숙주에 투여되어 향후 치료에 대한 필요를 감소시킨다. 본 발명의 일 방법에서, MSC(혈관모세포 배양에 의해 생성된) 약제학적 제제는 숙주에 투여되어, 면역기능을 억제하는 향후 치료에 대한 필요를 감소시킨다.

[0218] 본 발명의 일 실시예에서, MSC(혈관모세포 배양에 의해 생성된) 약제학적 제제는 병상의 치료를 위해 숙주에 투여된다. 본 발명의 일 실시예에서, MSC(혈관모세포 배양에 의해 생성된) 약제학적 제제는, 상처 치유, 다발경화증, 전신성경화증, 혈액암, 심근경색, 조직 및 기관 이식, 조직 및 기관 거부, 만성동종이식신장병, 경화, 간 기능상실, 심장 기능상실, GvHD, 정강 골절, 좌심실 기능이상, 백혈병, 골수형성이상증후군, 크론병, I형 또는 II형 당뇨병, 만성폐쇄폐질환, 폐고혈압, 만성 통증, 불완전골생성증, 동형접합 가족성 저콜레스테롤혈증, 반원상 연골절제술후 처치, 성인 치주염, 중증 심근허혈환자에서 혈관형성, 척수손상, 뼈형성장애, 당뇨병 수반 중증하지허혈, 당뇨병성 발질환, 원발성 쇼그렌 증후군, 골관절염, 연골 결함 (예를 들면, 관절 연골 결함), 제엽염, 다발적 전신 위축, 근위축성 측색 경화증, 심장 수술, 불응성 전신성 홍반성 루프스, 생 신장 동종이식, 비악성 적혈구 질환, 열화상, 방사선 화상, 파킨슨병, 미세골절 (예를 들면, 무릎 관절 연골 손상 또는 결함이 있는 환자에서), 표피수포증, 중증 관상 허혈, 특발성 확장심근병, 대퇴골두 괴사, 루프스 신장염, 골강 결손(bone void defects), 허혈성 뇌졸중, 뇌졸중후, 급성 방사선 증후군, 폐병, 관절염, 및 골재생을 포함하는 군에서 선택되는 병상의 치료를 위해 숙주에 투여된다.

[0219] 본 발명의 추가 실시예에서, MSC(혈관모세포 배양에 의해 생성된) 약제학적 제제는, 급성괴사출혈뇌백질염, 애디슨병, 무감마글로불린혈증, 원형탈모, 아밀로이드증, 강직성 척추염, 항-GBM/항-TBM 신염, 항인지질 증후군(APS), 자가면역 혈관부종, 자가면역 재생불량성 빈혈, 자가면역 자율신경장애, 자가면역 간염, 자가면역 고지혈증, 자가면역 면역결핍, 자가면역 내이질환(AIED), 자가면역 심근염, 자가면역 췌장염, 자가면역 망막증, 자가면역 혈소판감소성 자반병(ATP), 자가면역 갑상선병, 자가면역 담마진, 축삭 & 신경성 신경장애, 발로병, 베체트병, 수포성류천포창, 심근증, 캐슬맨병, 소아지방변증(celiac disease), 샤가스병, 만성피로증후군, 만성염증 탈수초성 다발성 신경병증 (CIDP), 만성 재발성 다초점 골수염(Chronic recurrent multifocal osteomyelitis; CRMO), 쳐그-스트라우스 증후군, 반흔성 유천포창/양성 점막 유천포창, 크론병, 코간증후군, 한랭응집소병, 선천성 심장 차단, 콕사키 심근염, CREST 질병, 필수혼합한랭글로불린혈증, 파종성 신경질환(Demyelinating neuropathies), 포진성 피부염, 피부근염, 데빅 질병(시신경 척수염), 원판성 루프스, 드레슬러 증후군(Dressler퓔 syndrome), 자궁내막증, 호산성 식도염, 호산성 근막염, 결절성 홍반, 실험적 알러지성 뇌척수염, 에반스 증후군, 결합조직염(Fibromyalgia), 섬유성 폐렴, 거세포동맥염(일시적 동맥염), 사구체신염, 굳파스추어 증후군(Goodpasture퓔 syndrome), 다발성맥관염과 육아종증(GPA)(베게너병 참조), 그레이브병, 갈란-바레 증후군, 하시모토 뇌염, 하시모토 갑상선염, 용혈성 빈혈, 헤노흐-쇤라인자반병, 임신성 포진, 저감마글로불린혈증, 특발성 혈소판감소성 자반병(ITP), IgA 신장애, IgG4-관련 경화질환, 면역조절 리포단백질, 봉입체근염, 인슐린-의존성 당뇨병(1형), 간질성 방광염, 소아 관절염, 소아 당뇨병, 카와사키 증후군, 람베르트-이튼 증후군(Lambert-Eaton syndrome), 백혈구파쇄성 맥관염, 편평태선, 경화태선, 목질 결막염, 선형 IgA 질환(LAD), 루프스(SLE), 라임병, 만성, 메니에르병, 현미경 다발성 맥관염, 혼합 결합 조직 질환(MCTD), 모렌 궤양(Mooren퓔 ulcer), 뮤차-하버만 질병(Mucha-Habermann disease), 다발경화증, 중증근무력증, 근염, 기면증, 시신경척수염(Devic's), 호중구감소증, 눈 반흔성 유천포창, 시신경염, 재발성 류마티즘, PANDAS(스트렙토코커스에 수반되는 소아 자가면역 신경정신 질환), 방종양성 소뇌퇴행, 발작성야간혈색소뇨증 (PNH), 패리 롬버그 증후군(Parry Romberg syndrome), 파소니지-터너 증후군(Parsonnage-Turner syndrome), 파스플라니티스(말초 포도막염), 수포창, 말초신경증, 정맥주위뇌척수염(Perivenous encephalomyelitis), 악성빈혈, POEMS 증후군, 결절성다발성동맥염, I형, II형 및 III형 자가면역 다선성 증후군, 류마티스성 다발근육통, 다발근육염, 심근경색후 증후군, 심막절개술후 증후군, 프로게스테론 피부염, 원발담즙성 경화, 일차성 경화성 담관염, 건선, 건선성 관절염, 특발성 폐섬유증, 괴저성 농피증, 순수적혈구 무형성증, 레이노이드현상, 반사성교감신경성이영양, 라이터 증후군, 재발성다발연골염, 하지불안증후군, 후복막섬유증, 류마티스열, 류마티스 관절염, 유육종증, 슈미트증후군(Schmidt syndrome), 공막염, 경피증, 쇼그렌 증후군, 정자 및 고환 자가면역, 강직인간 증후군(Stiff person syndrome), 아급성세균성심내막염(SBE), 수삭 증후군(Susac's syndrome), 교감성 안염, 타카야수 동맥염, 측두동맥염/거세포 동맥염, 혈소판 감소성 자반(TTP), 톨로사-헌트 증후군, 횡단 척수염, 궤양성 대장염, 미분화 결합 조직 질환(UCTD), 포도막염, 맥관염, 수포성 피부염, 백반, 및 베게너육아종증 (현재는 다발성맥관염과 육아종증(GPA)으로 명명)을 포함하는 자가면역 병상의 치료를 위해 숙주에 투여된다.

[0220] <u>혈관모세포 배양으로부터 유래된 MSC를 사용한 처치 계획</u>

[0221] 본 명세서에 기술된 MSC 및 MSC를 포함하는 약제학적 제제는 세포-기반 치료에 사용될 수 있다. 특히, 본 발명

은 유효량의 혈관모세포를 배양하여 유래된 MSC를 포함하는 약제학적 제제를 투여하는 것을 포함하는 본 명세서에 기재된 질병 및 상태를 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다.

[0222] 본 발명의 MSC는 특정의 치료될 병상에 의존하여 비제한적인 예로 정맥주사, 심근내 주사, 경심장내 주사, 유리체내 주사, 또는 근육내 주사 또는 국소 이식을 포함하는 당업계에 알려진 양상으로 투여될 수 있다.

[0223] 본 발명의 중간엽 간질세포는 송달 디바이스가 사용되어 국소 이식에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 송달 디바이스는 생체적합하며 생체분해가능하다. 본 발명의 송달 디바이스는 생체적합성 섬유, 생체적합성 얀(yarns), 생체적합성 포움(foams), 지방족 폴리에스테르, 폴리(아미노산), 코폴리(에테르-에스테르), 폴리알킬렌 옥살레이트, 폴리아미드, 티로신 유래 폴리카보네이트, 폴리(이미노카보네이트), 폴리오르토에스테르, 폴리옥사에스테르, 폴리아미도에스테르, 아민 그룹 함유 폴리옥사에스테르, 폴리(언하이드라이드), 폴리포스파젠, 바이오폴리머; 락타이드의 호모폴리머 및 코폴리머, 글리코라이드, 입실론-카프로락톤, 파라-디옥사논, 트리메틸렌카보네이트; 락타이드의 호모폴리머 및 코폴리머, 글리코라이드, 입실론-카프로락톤, 파라-디옥사논, 트리메틸렌카보네이트, 근원(fibrillar) 콜라겐, 비-근원 콜라겐, 비-펩신 처리 콜라겐, 다른 폴리머와 결합된 콜라겐, 성장인자, 세포외 매트릭스 단백질, 생물학적 관련 단백질 단편, 헤파토사이트 성장 인자, 혈소판-유래 성장 인자, 혈소판 강화 혈장, 인슐린 성장 인자, 성장 분화 인자, 혈관 내피 세포-유래 성장 인자, 니코틴아미드, 글루카곤 유사 펩타이드, 테나신 -C, 라미닌, 항-거부제, 진통제, 항-산화제, 항-아폽토시스제, 항-염증제 및 세포증식억제제를 포함하는 군에서 선택되는 물질을 이용하에 제조될 수 있다.

[0224] 특정 치료 계획(regimen), 투여 경로 및 보조 요법은 특정 병상, 병상의 심각도, 및 환자의 전반적인 건강상태에 기초하여 적정화될 수 있다. MSC 함유 약제학적 제제는 병상의 발현의 심각도를 감소시키고/거나 병상 발현의 추가적인 퇴행을 예방할 수 있다.

[0225] 본 발명의 치료 양식은 단일 용량의 MSC 투여를 포함할 수 있다. 또는, 본 명세서에 개시된 치료 양식은 일정 시간 간격에 걸쳐 복수회 MSC를 투여하는 치료 코스를 포함할 수 있다. 예시적인 치료 코스는 매주, 격주, 매달, 매분기별, 매반년마다 또는 매년 치료를 포함한다. 또는 치료는 다수 용량이 초기에 요구되고(예를 들면 첫주 동안은 일일 용량), 뒤에는 더 작고 덜 빈번한 용량이 필요되는 단계 형태로 진행될 수 있다.

[0226] 일 실시예에서, 혈관모세포 배양에 의해 수득된 중간엽 간질 세포 약제학적 제제는 환자의 일생을 거쳐 하나 이상의 시간 주기적으로 투여된다. 본 발명의 추가 실시예에서, 본 MSC 약제학적 제제(예를 들면, 혈관모세포 배양에 의해 생성된)는 일년에 한번, 매 6 내지 12 개월마다 한번, 매 3 내지 6 개월마다 한번, 매 1 내지 3 개월마다 한번, 또는 매 1 내지 4주마다 한번 투여될 수 있다. 또는, 어떤 상태나 질환을 위해서는 보다 빈번한 투여가 바람직할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서 본 MSC 약제학적 제제(예를 들면, 혈관모세포 배양에 의해 생성된)는 디바이스를 통해 환자의 일생에 걸쳐 한번, 한번 이상, 주기적으로 또는 특정 환자 및 치료되는 환자의 병상에 따라 필요할 때 투여된다. 시간에 따라 변화하는 치료적 계획도 유사하게 생각될 수 있다. 예를 들면, 처음에는 보다 빈번한 처치가 필요할 수 있다(예를 들면, 날마다 또는 주마다 치료). 시간이 경과됨에 따라 환자의 상태가 개선되면 덜 빈번하게 치료하거나 심지어 치료가 더 이상 필요하지 않을 수 있다.

[0227] 본 발명에 따라, 질병 또는 질환은 본 명세서에 기술된 중간엽 줄기 세포의 정맥 투여에 의해 치료 또는 예방될 수 있다. 어떤 실시예에서, 약 2천만, 약 4 천만, 약 6 천만, 약 8 천만, 약 1억, 약 1억2천만, 약 1억4천만, 약 1억6천만, 약 1억8천만, 약 2억, 약 2억2천만, 약 2억4천만, 약 2억6천만, 약 2억8천만, 약 3억, 약 3억2천만, 약 3억4천만, 약 3억6천만, 약 3억8천만, 약 4억, 약 4억2천만, 약 4억4천만, 약 4억6천만, 약 4억8천만, 약 5억, 약 5억2천만, 약 5억4천만, 약 5억6천만, 약 5억8천만, 약 6억, 약 6억2천만, 약 6억4천만, 약 6억6천만, 약 6억8천만, 약 7억, 약 7억2천만, 약 7억4천만, 약 7억6천만, 약 7억8천만, 약 8억, 약 8억2천만, 약 8억4천만, 약 8억6천만, 약 8억8천만, 약 9억, 약 9억2천만, 약 9억4천만, 약 9억6천만 또는 약 9억8천만 세포가 정맥 주사된다. 어떤 실시예에서, 약 10억, 약 20억, 약 30억, 약 40억 또는 약 50억 세포 또는 그 이상이 정맥 주사된다. 어떤 실시예에서, 세포수는 약 2천만 내지 약 40억 세포, 약 4천만 내지 약 10억 세포, 약 6천만 내지 약 7억5천만 세포, 약 8천만 내지 약 4억 세포, 약 1억 내지 약 3억5천만 세포, 및 약 1억7천5백만 내지 약 2억5천만 세포의 범위이다.

[0228] 본 명세서에 기술된 본 방법은 당업계에 알려진 방법을 사용하여 치료 또는 예방의 유효성을 모니터링하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0229] 키트

[0230] 본 발명은 본 명세서에 기재된 임의의 조성물을 포함하는 키트를 제공한다. 본 중간엽 간질 세포 제제는 미국

특허출원 2002/0103542, 유럽특허출원 EP 1 454 641의 방법을 포함하는 당업자에 알려진 방법에 따라 제조된 송달 디바이스에 함유될 수 있으며, 또는 미국 특허 8,198,085, PCT 출원 WO2004/098285, 및 미국 특허출원공개 2012/0077181를 포함하는 당업자에 알려진 방법에 따라 보관될 수 있다. 본 발명의 실시예에서, 적어도 약 8 x 10^7, 8.5 x 10^7, 9 x 10^7, 9.5 x 10^7, 1 x 10^8, 1.25 x 10^8, 또는 1.25 x 10^8의 혈관모세포 배양에서 유래된 MSC 포함하는 제제를 포함하는 키트가 제공된다. 다른 실시예에서, 약 8 x 10^7, 8.5 x 10^7, 9 x 10^7, 9.5 x 10^7, 1 x 10^8, 1.25 x 10^8, 또는 1.25 x 10^8 의 MSC(예를 들면, 혈관모세포 배양으로 생성된)를 포함하는 키트가 제공되며, 이때 이 제제는 약제학적 제제이다. 본 발명의 추가 실시예에서, 약 8 x 10^7, 8.5 x 10^7, 9 x 10^7, 9.5 x 10^7, 1 x 10^8, 1.25 x 10^8, 또는 1.25 x 10^8의 MSC(예를 들면, 혈관모세포 배양으로 생성된)의 약제학적 제제를 포함하는 키트가 제공되며, 이때 이 약제학적 제제는 보존된다. 본 발명의 추가 실시예에서, 약 8 x 10^7, 8.5 x 10^7, 9 x 10^7, 9.5 x 10^7, 1 x 10^8, 1.25 x 10^8, 또는 1.25 x 10^8의 MSC(예를 들면, 혈관모세포 배양으로 생성된)의 약제학적 제제를 포함하는 키트가 제공되며, 이때 이 약제학적 제제는 세포 송달 비히클내에 함유된다.

[0231] 부가적으로, 본 키트는 동결보존(cryopreserved) MSC 또는 냉각 보관 MSC 제제, 냉동 MSC 또는 냉동 MSC 제제, 해동된 냉동 MSC 또는 해동된 냉동 MSC 제제를 포함할 수 있다.

[0232] <u>다양한 실시예 및 개념의 조합</u>

[0233] 본 명세서에 기술된 실시예 및 개념은 조합되어 사용될 수 있다. 예를 들면, 본 발명은 ESC로부터 혈관모세포를 생성하는 단계, 혈관모세포를 적어도 4일간 배양하는 단계, 혈관모세포를 수확하는 단계, 혈관모세포를 마트리겔-코팅된 플레이트 상에 재-플레이팅하는 단계, 및 여기에 기술된 혈관모세포를 적어도 14일간 배양하는 단계를 포함하는 MSC 생성방법을 제공하며, 여기에서 본 방법은 실질적으로 ESC가 없는 적어도 8천5만 MSC를 생성한다.

[0234] <u>실시예</u>

[0235] 하기 실시예는 어떤 방식으로든 본 발명을 제한하지 않는다.

[0236] <u>실시예 1 - 혈관모세포로부터의 MSC 생성</u>

[0237] 혈관모세포는 임상 등급의 단일-할구 유래 ESC 라인, MA09[16]로부터 하기와 같이 생성되었다:

[0238] 먼저, 초기-단계 세포 클러스터가 몰포겐(morphogen) 및 초기 조혈 사이토카인, 특이적 골형성 단백질-4(BMP-4), 혈관 내피 성장 인자(VEGF), 염기성 섬유모세포 성장 인자(bFGF), 줄기 세포 인자(SCF), 트롬보포이에틴(Tpo) 및 fms-관련 티로신 키나제 3 리간드(FL) 조합이 보충된 무-혈청 배지에서 배양된 MA09 ESC로부터 생성되었다. 특히, 6-웰 조직-배양 처리된 플레이트의 한 웰에서 온 ESC를 6웰 초저부착 플레이트(코닝)의 한 웰내 50 ng/ml의 VEGF 및 50 ng/ml의 BMP-4(R & D)로 보충된 3 ml 줄기주 II 배지(Sigma)내에 플레이팅하고, 37℃, 5% CO_2에서 인큐베이션하였다. 세포 클러스터가 초기 24시간 이내에 형성되었다. 40 내지 48 시간후, 배지의 반(1.5 ml)을 50 ng/ml의 VEGF, 50ng/ml의 BMP-4, 및 20 내지 22.5ng/ml의 bFGF가 보충된 신선한 줄기주 II 배지로 대체하고, 40 내지 48 시간 더 계속하여 인큐베이션하였다 (즉, 전체 3.5 내지 4 일).

[0239] 세포 클러스터를 분리하고 무-혈청 반고체 블라스트-콜로니 성장배지(BGM)내에 단일 세포를 플레이팅하였다. 특히 세포 클러스터는 0.05% 트립신-0.53 mM EDTA(Invitrogen)로 2 내지 5분 동안 분리하였다. 세포 현탁액을 아래위로 피페팅하고 DMEM + 10% FCS을 가하여 트립신을 불활성화하였다. 이후 세포를 40㎛ 스트레이너를 통과시켜 단일 세포 현탁액을 수득하였다. 이후 세포를 계수하고 1 내지 1.5 X 10^6 세포/ml로 줄기주 II 배지내에 재현탁하였다.

[0240] 단일 세포 현탁액(0.3 ml, 3 내지 4.5 X 10^5 세포)를 2.7 ml의 혈관모세포 성장 배지(전술한 바와 같은 H4536 기초 배지 레시피)와 함께 간단하게 볼텍스하여 혼합하고, 5분간 방치하였다. 이후 세포 혼합물을 18G 니들 부착 시린저(3ml)를 사용하여 6-웰 초저부착 플레이트(코닝)의 한 웰내 이송하고, 37℃, 5% CO_2에서 인큐베이션하였다.

[0241] 일부 세포가 포도-유사(grape-like) 블라스트 콜로니(BC)로 발달하였다. 특히 BC는 3일때 육안에 보였고(통상적으로 처음 3일에는 10 미만의 세포가 포함됨), 4 내지 6일 후 포도-유사 hES-BCs가 현미경하에 쉽게 동정되었다

(BC 당 100 보다 더 많은 세포가 함유). 배양내 존재하는 BC의 수는 수일의 코스에 걸쳐 점진적으로 증가하였다. 6 내지 7일 후, BC는 마우스-글라스 모세관(mouth-glass capillary)을 사용하여 집을 수 있었다.

[0242] 혈관모세포는 배양 7 내지 12일 사이에 수확될 수 있고 마트리겔-코팅 조직 배양 플레이트상의 αMEM+20% FCS 내에 재플레이팅된다. 유세포 분석 결과 MSC에 통상 발견되는 5 세포 표면 마커의 발현 수준이 출발 혈관모세포 집단에서 비교적 낮은 것으로 나타났다(도 2, 좌측 패널, 4 실험 평균 +/- 표준 편차). 그러나, MSC 성장 조건에서 배양 3주후, 이 5개의 특징적인 MSC 마커에 >90% 양성으로 염색되는 균일한 부착성 세포 집단이 생겼다(도 2, 우측 패널-22 내지 23일, 4 실험 평균 +/- 표준 편차). MSC 배양 조건상에서, 분화 세포가 MSC 표면 마커를 획득하는데 걸리는 시간은 사용된 특정 ESC주, 혈관모세포 수확일 및 마트리겔상에 플레이팅된 혈관모세포수에 따라 다를 수 있다. 어떤 실험에서, 90%의 세포가 7 내지 14일까지 마커가 생성된 반면, 다른 실험에서는 이 많은 세포가 이들 MSC 마커들을 획득하는데 22 내지 24일 정도 소요될 수 있다.

[0243] 상기 실험과 관련하여, 도 1은 다능성 세포로부터의 FM-MA09-MSC의 생성과, ESC로부터 혈관모세포를 경유하여 중간엽 간질 세포가 생성되는 것을 보여주는 현미경 사진이다. 또한 도 2는 전술한 바와 같이 제조된 다능성 세포-유래 혈관모세포로부터 수득한 FM-MA09-MSC의 표현형을 포함한다. 이 도는 초기 혈관모세포 집단에서(그래프 좌측, 7 내지 11일 혈관모세포) 및 혈관모세포를 마트리겔 코팅 플레이트에 배양한 후(그래프 우측)에서의 MSC 표면 마커에 양성인 세포 퍼센트와 혈관모세포로부터 유래된 중간엽 간질 세포의 현미경사진이다(우측 패널 사진). 또한 상기 실험과 관련하여 도 17은 FM-MA09-MSC 생성 과정과 마트리겔의 영향을 도시한다: 즉, 마트리겔로부터 빠른 계대(즉, p2)에서 세포를 제거하는 것은 p6까지 마트리겔에 유지된 경우에 비해 일시적으로 MSC 성장을 더디게 할 수 있다.

[0244] 도 18은 또한 수득된 BM-MSC 및 FM-MA09-MSC가 연골을 형성하는 것을 보여준다.

[0245] <u>실시예 2 - ESC 및 MSC-유래 혈관모세포의 분화 비교</u>.

[0246] 이 실시예는 두 방법에 의해 ESC를 MSC로 분화하는 것을 비교하여 기술한 것이다: 직접 분화(ESC를 직접 젤라틴 또는 마트리겔에 플레이팅함) 또는 혈관모세포 방법(실시예 1에 기재된 바와 같이 ESC를 혈관모세포로 먼저 분화한 후 마트리겔에 플레이팅). 젤라틴에 직접 분화하는 경우 MSC-유사 세포가 발생되었으나, 이 세포들은 CD105 발현이 없었으며, 이는 MSC 운명의 불완전한 채택을 제안한다(도 3, 좌측 패널). ESC가 직접 마트리겔에 플레이팅된 경우, 생성되는 세포는 MSC에 예상되는 CD105를 발현하였다(도 3, 중간 패널). 그러나, 혈관모세포 방법에 의해 제조된 MSC에 비하여, 직접 분화된 MSC 세포는 덩어리로 성장하였으며, 분리시 산포되기가 어렵고, 동일수의 ESC로부터 시작된 경우 그만큼 많은 MSC를 생성하지 못하였다(도 4).

[0247] ESC에서 직접 분화된 MSC는 특징적인 MSC 세포 표면 마커를 획득하는데도 더 긴 시간이 소요되었다(도 5). 일단 MSC가 수득되면, 연장된 면역 표현형분석(phenotyping) 결과, 양 방법 모두 MSC에 통상적으로 발견되는, HLA-ABC와 같은 다른 마커에는 양성인 반면, CD34 및 CD45와 같은 조혈-관련 마커에는 음성이었다(도 6). 이러한 결과는 혈관모세포-중간 단계의 사용이 ESC로부터 건실한 균일한 MSC의 생성을 가능하게 함을 제안한다. 이러한 발견을 감안하여, MSC에 대한 부가적 연구가 혈관모세포-유래 MSC로 수행되었다.

[0248] 또한, ESC-MSC 또는 BM-MSC 대 혈관모세포-유래 MSC의 상이한 성질을 비교하는 실험을 수행하고, 그 결과를 도 3 내지 6, 13, 15, 16, 19, 및 21 내지 27(전술된 바와 같은)에 나타내었으며, 그 결과 이들 세포들은 이들 세포 및 이들로부터 유래된 조성물의 치료적 유효성에 영향을 줄 수 있는 상당한 차이를 나타낸다는 사실이 밝혀졌다. 특히, 도 3은 젤라틴 코팅 플레이트상에 인간 배아 줄기 세포 (ESC)를(좌측 패널), 마트리겔 코팅 플레이트에 ESC를(중간 패널), 마트리겔 코팅 플레이트상에 혈관모세포를(우측 패널) 배양한 후 MSC 표면 마커에 양성인 세포의 퍼센트를 도시한 것이다. 부가적으로, 도 4는 다능성 세포로부터 MSC 수율을 나타낸 것이고, 도 5는 중간엽 간질 세포 마커의 획득을 도시하며, 도 6은 상이한 배양 방법으로부터 유래된 중간엽 간질 세포의 표현형을 도시한 것이며, MSC 마커 발현, 및 조혈 및 내피 마커의 발현 결여를 포함한다. 또한, FM-MA09-MSC를 어세이하여 역가 및 저해효과(도 13), Treg 확장의 자극(도 15), 증식능(도 16), PGE2 분비(도 19), Stro-1 및 CD10 발현(도 21 내지 22), 계대동안 크기의 유지(도 23), CD10 및 CD24 발현(도 24), Aire-1 및 IL-11 발현(도 25), Ang-1 및 CXCL1 발현(도 26), 및 IL6 및 VEGF 발현(도 27)에 있어 BM-MSC에 대한 주목할 만한 차이를 검출하였다.

[0249] <u>실시예 3 - 혈관모세포에서 유래된 MSC는 다른 세포 타입으로 분화한다</u>.

[0250] MSC는 정의상 지방세포, 골세포, 및 연골세포를 발생할 수 있어야 한다. 표준 방법을 사용하여, 도 7은 혈관모

세포-유래 MSC의 지방세포 및 골세포로의 분화능을 나타내고, 도 8은 연골세포-특이적 유전자의 발현을 통해 연골세포로의 분화 잠재력을 나타내며, 도 18은 펠렛 덩어리 배양을 사프라닌 O 염색하여 연골세포로의 분화 잠재력을 나타내었다.

[0251] 혈관모세포로부터 분화된 MSC는 지방세포, 골세포, 및 연골세포로 분화되는 것으로 기대된다. 이들 분화 경로는 당 기술분야에 보고된 방법을 사용하여 검사될 수 있다. Karlsson et al, Stem Cell Research 3: 39-50 (2009) (혈관모세포-유래 및 직접 ESC-유래 MSC의 지방세포 및 골세포 분화를 위해) 참조. 특히, FM-MA09-MSC는 지방세포 및 골세포로의 분화능을 포함하는 분화능을 나타내었다(도 7). 연골세포 분화를 위해, Gong et al, J. Cell. Physiol. 224: 664-671 (2010) 으로부터 방법들을 도입하여 이 과정을 연구하고 연골세포 특이적 유전자(예를 들면 아그레칸 및 콜라겐 IIa) 및 글리코사미노글리칸 침착을 사프라닌 O, 알시안 블루, 및/또는 톨루엔 블루 염색을 통해 계속 검사하였다. 특히, MA09 ESC 혈관모세포-유래 중간엽 간질 세포의 연골발생 분화를 아그레칸(콘드로이틴 프로테오글리칸 설페이트 1) 및 콜라겐 IIa(도 8)의 mRNA 발현으로 검출하였다. 문헌에는, MSC에서 유래된 이들 세 세포 타입, 지방세포, 골세포, 또는 연골세포 중 아무것도 면역자극성 HLA DR 분자를 발현하지 않을 것으로 보고되었다(Le Blanc 2003, Gotherstrom 2004, Liu 2006). 면역 염색 및/또는 유세포 분석이 보고된 관찰을 확인하기 위해 완전 분화된 MSC 세포에 수행될 것이다. 이는 생체 내 환경에서 MSC의 분화가 숙주 수여자로부터 면역반응을 유도하지 않는다는 것을 확인하는데 중요하다. 이들 세 세포 타입중, 연골발생 분화는 특히 관심분야인데 스포츠 손상, 노화 관절통, 골관절염 등을 위해 연골 대체물 요법으로 사용될 가능성 때문이다. 이러한 요법을 위해, MSC는 치료적으로 사용되기 위해 연골세포로의 완전 분화를 필요로 하지 않을 수 있다.

[0252] <u>실시예 4 - 혈관모세포에서 유래된 MSC는 실질적으로 ESC가 없음을 확인</u>

[0253] MSC는 기형종을 형성하는 경향이 있는 ESC가 전혀 없어야 한다. MSC는 계대 12(배양내 ~50일)까지 정상 핵형을 갖는 것으로 확인되었다(데이터 미도시). 블라스트-유래 MSC가 미량의 ESC를 포함하지 않은 것을 확인하기 위해, 기형종 형성 어세이를 NOD/SCID 마우스에 수행하였다. 5 x 10^6 MSC를 3마리의 마우스 좌측 대퇴근에 피하 주사하였다. CT2 ECs를 양성 대조군으로 사용하고, MSC 대 ESCC-주사 마우스에서 기형종 형성을 6주간에 걸쳐 모니터링하였다. MSC를 주사한 마우스에서 기형종이 형성되지 않았다.

[0254] <u>실시예 5 - 혈관모세포 유래 MSC에 의한 EAE 점수 감소</u>.

[0255] 혈관모세포-유래 ESC-MSC로 6-8주령의 C57BL/6 마우스의 실험적 자가면역 뇌척수염 (EAE)치료를 위한 파일럿 연구가 수행되었다. EAE는 보조 오일내 50 pg의 MOG(35-55) 펩타이드 및 250 pg의 M. 튜베르쿨로시스 에멀젼 100 pL을 0일에 마우스 측면에 피하주사하여 유도하고, 500 ng의 백일해 독소를 마우스에 복강 주사하였다. 6일 후, 마우스에 PBS 내 백만 ESC-MSC(n = 3) 또는 대조군으로서 비히클(n = 4)을 복강주사하였다. 면역 29일 후 동물의 임상 점수를 기록하였다. 질병 점수의 현저한 감소가 관찰되었다(데이터 미도시).

[0256] <u>실시예 6 - 혈관모세포-유래 ESC-MSC의 EAE 치료 및 부가적 동물 질병 모델의 사용에서의 유효성 확인</u>

[0257] A. EAE 마우스 모델에서의 ESC-MSC 테스트는 그들의 항-EAE 효과를 확인한다.

[0258] 실시예 5에서 수득된 결과를 확인하기 위해, 세포 용량, 투여 프로토콜을 달리하고, 동물 수 및 정상군 수를 늘려 부가적 검사를 수행하였다. 임상 점수 및 치사율도 기록하였다. 마우스의 뇌 및 척수에서의 임파구 침윤정도도 평가되었다. MSC 항-EAE 효과는 일반적으로 Th17 세포의 억제와 같은 면역억제 활동과 관련된 것으로 생각되며 CNS에서의 임파구 침윤정도를 감소시키는 것으로 기대되었다.

[0259] B. 마우스 골수(BM)-MSC, 인간 BM-MSC 및 인간 UCB-MSC와 ESC-MSC의 비교.

[0260] 마우스 BM-MSC가 처음으로 EAE 치료에 사용되었으며 철처히 연구되었다 [1]. ESC-MSC(그 이종적 성질을 감안)는 항-EAE 유효성에 대해 뮤린 BM-MSC와 직접 비교될 수 있다. 인간 UCB-MSC도 면역억제활성을 갖는 것으로 보고되었다[19]. 인간 UCB-MSC 및 인간 BM-MSC의 항-EAE 활성은 EAE 마우스 모델에서 ESC-MSC 활성과 비교될 수 있다. 이들 다양한 세포 타입의 나이 또는 계대 수는 이들의 항-EAE 행동에 영향을 미칠수 있으므로 우리는 EAE 마우스 모델 시스템에서 MSC 유효성에 대한 나이의 결과를 평가할 것이다.

[0261] C. 투여 용량, 경로 및 ESC-MSC 타이밍의 적정화.

[0262] ESC-MSC의 주사는 면역 29일 이내 기록된 바와 같이 EAE 점수를 감소시킬 수 있다. 장기적인 질병 예방 및 치료를 연구하기 위해, ESC-MSC는 다양한 용량, 경로 및 시간으로 투여될 수 있다.

[0263] MSC는 H1gfp ESC로부터 생성되었으며, 이들은 MSC 상태에서 여전히 GFP를 발현하는 것이 확인되었다. EAE 마우스는 이들 GFP+ ESC-MSC로 주사되고, 이들의 분포는 이종원(Xenogen) 생체 내 이미징 시스템을 사용하여 생체 내 추척할 수 있다. 이러한 접근을 통해, ESC-MSC의 다양한 투여 용량, 경로 및 타이밍이 분석되고, MSC의 항-EAE 활성 기전(즉, 측분비 또는 내분비 효과), 마우스내 MSC 수명 및 MSC 생체분포 및 소실/제거 경로에 대한 정보를 제공할 수 있다.

[0264] 항-EAE 효과는 하나 이상의 임상 점수 감소, 생존 증가 및/또는 임파구 침윤 약화 및 CNS의 탈수초화에 의해 반영될 수 있다. 상이한 ESC주는 MSC 생성에 있어 상이한 내재능을 가질 수 있다. 따라서, 이 연구에서는 복수의 ESC주가 사용되고 각 ESC주에 대해 시간에 따른 MSC 마커 획득이 모니터링되고 비교될 수 있다. ESC-MSC를 사용한 실험간 변경을 더 감소시키기 위해, 대용량의 냉동 ESC-MSC 원액을 분액으로 하고 각 분액 원액을 복수의 실험에 사용할 수 있다.

[0265] D. 다른 질병 모델에서 혈관모세포-유래 MSC 유효성 확인

[0266] 전술한 바와 같이, MSC는 크론병, 궤양성 대장염 및 안-질환, 포도막염과 같은 다른 타입의 자가면역질환에 대해 치료적 활성을 갖는다. 이러한 질환에 대한 동물 모델이 존재하며 당업계에 잘 알려져 있다(예를 들면, Pizarro et al 2003, Duijvestein et al 2011, Liang et al 2011, Copland. et al 2008 참조). 생체 내 연구는 하나 이상의 이들 동물 모델 시스템에서의 MSC 치료적 유용성의 평가를 포함하는 것으로 확장될 수 있다. 이러한 모델을 사용하여 인간 사이토카인에 대한 주사된 동물의 혈청을 분리 및 스크리닝함으로써, 인간 MSC의 사이토카인 분비 프로파일을 검사할 수 있다. 특히, 포도막염 모델은 국소적 유리체내(intraviteal) 주사로서 유용하게 비-전신적 환경에서 MSC 효과를 연구할 수 있다.

[0267] MSC는 관절 연골의 소실 및 침범된 관절의 염증에 관련된 상태(Noth et al, 2008)들을 포함하는 골관절염 상태를 치료하는데 매우 큰 치료적 유용성을 갖는다. 골관절염, 연골 소실 및 관절 염증 검사를 위한 모델은 당업계에 잘 알려져 있다(예를 들면, Mobasheri et al 2009 참조). 이들 연구들 중에서, MSC가 염증감소 및/또는 관절수복의 측면에서 국소의 비-전신적 치료효과를 갖는지 여부를 결정하기 위하여(Wakitani et al 2002), 인간 BM-MSC는 반고형 스캐폴드내 또는 마이크로스피어내 봉입되어 인간내 침범된 관절내로 이식되었다. 이 방법은 퇴행관절 상태를 치료하기 위해 우리의 ESC 혈관모세포-유래 MSC의 치료적 유용성을 결정하는데 보조할 것이다.

[0268] 주사된 MSC의 수명은 매우 짧으며[8], 이는 이식된 세포의 장기적 생존이 필수적이지 않음을 가리킨다. 따라서, 유사분열적-불활성화된 ESC-MSC(예를 들면, 조사되거나 마이토마이신 C로 치료된)도 전술한 동물 모델에서 항-EAE 효과 또는 다른 항-질병 효과에 대해 테스트될 것이다. 그렇다면, 생 ESC-MSC가 필요로 되지 않으며, 따라서 이식된 ESC-MSC에서 잠재적인 잔여 ESC 오염으로부터 생안전성 염려를 감소시킬 수 있다.

[0269] E. 결과

[0270] 상이한 공여자 유래 공급원로부터의 MSC(마우스 BM-MSC, 인간 BM-MSC 및 인간 UCB-MSC)는 항-EAE 효과를 갖는 것으로 기대된다. 그러나, 이들 효과는 실험에 따라 다양할 수 있는데 MSC가 공여자-제한 공급원으로부터 유래되기 때문이다. 반면, 본 발명의 ESC-MSC는 보다 일관적인 효과를 가질 수 있다. 왜냐하면 많은 세포 표면 마커가 MSC를 특정하는데 사용되며, 모든 MSC가 모든 마커, 서브세트 마커를 발현하는 것이 아니며, 예를 들면, CD73+ 및 CD45-가 상이한 공급원으로부터의 MSC 유효성을 비교하기 위해 사용될 수 있기 때문이다.

[0271] ESC-MSC는 크론병, 궤양성 대장염 및 포도막염 동물 모델에서 치료적 유용성을 가진 것으로 기대되는데 이들이 자가면역 성분 및 염증 반응을 포함하기 때문이다.

[0272] 유사분열적으로 불활성화된 MSC(예를 들면 조사되거나 마이토마이신 C 불활성화된 MSC 또는 ESC-MSC)는 적어도 부분적으로 면역억제기능을 보유할 수 있으며, 이들은 여전히 사이토카인을 분비하고 그 기능과 관련된 세포 표면 마커를 발현하기 때문이다[29]. 그러나 이들의 효과는 생체 내에서의 수명이 짧기 때문에 감소될 수 있다. 그런 경우, 조사되거나 다른 유사분열적으로 불활성화된 세포의 용량이나 투여 주기는 면역억제기능을 증강시키기 위해 증가될 수 있다. 유사분열적으로 불활성화된 MSC 및 ESC-MSC는 부분적으로 면역억제기능을 보유할 수 있으며, 이들은 여전히 사이토카인을 분비하고 그 기능과 관련된 세포 표면 마커를 발현하기 때문이다[29]. 그러나 이들의 효과는 생체 내에서의 수명이 짧기 때문에 감소될 수 있다. 그런 경우, 유사분열적으로 불활성화된 세포의 용량이나 투여 주기는 면역억제기능을 증강시키기 위해 증가될 수 있다.

[0273] EAE 치료를 위한 두번째 파일럿 연구가 수행되었다. 8 내지 10주령의 C57BL/6 마우스를 완전 프로이드 어쥬번트 내 MOG35-55 펩타이드로 subQ 주사로 면역하였다. 백일해 독소의 복강주사와 함께 수행되었다. 6일후, 마우스당

백만개의 생(또는 2 백만개의 조사된) 혈관모세포-유래 다능성 세포-중간엽 간질 세포를 복강주사하였다. 질병의 심각도는 이전에 공개된 바와 같이 마우스 사지/몸 움직임을 모니터링하여 0 내지 5의 점수로 매겼다. 비히클 대조군에 대해 계대 4의 혈관모세포-유래 다능성 세포-중간엽 간질 세포 및 조사된 혈관모세포-유래 다능성 세포-중간엽 간질 세포는 임상 점수에 있어서 상당히 감소되는 결과가 나타났다(데이터 미도시). 양 파일럿 연구를 위한 점수는 하기 프로토콜에 따라 수행되었다: 1점은 꼬리가 축처진 것을 가리키며, 2점은 부분적인 뒷다리 마비를 나타내며, 3점은 완전한 뒷다리 마비, 4점은 완전한 뒷다리 마비 및 부분적인 앞다리 마비를 나타내고, 5점은 빈사상태를 나타낸다.

[0274] 또한 본 발명에 따른 MSC 및 이로부터 유도된 제품의 상이한 요법에서의 사용에 대한 유효성은 다른 동물 모델, 예를 들면, 고려되는 치료적 적응증에 따른 다른 이식 또는 자가면역 모델에서 확인될 수 있다.

[0275] <u>실시예 7 - ESC-MSC의 기능적 구성성분의 탐구</u>

[0276] MSC는 미유도된 상태로 배양시(예, 사이토카인 없이 정규 αMEM+20%FCS에서 배양) 세포 표면 마커 CD105, CD73, CD29, CD90, CD166, CD44, CD13, 및 HLA-클래스 I (ABC)를 발현하고, 동시에 CD34, CD45, CD14, CD19, CD11b, CD79a 및 CD31에는 음성인 플라스틱(plastic) 부착성세포로 정의될 수 있다. 이 조건하에서, 이들은 세포내 HLA-G를 발현하여야 하며 CD40 및 HLA 클래스 II (DR)에 대해서 음성이어야 한다. 기능적으로, 이러한 세포는 또한 표준 시험관 내 배양 어세이로 평가시 지방세포, 골세포, 및 연골세포로 분화될 수 있어야만 한다. 감마 인터페론 (IFNγ)으로의 자극 7일 후, MSC는 세포 표면에 HLA-G 뿐 아니라, CD40 및 세포 표면에 HLA-클래스 II (DR)를 발현하여야 한다. 이러한 요건에도 불구하고, 임의의 공급원에서 유래된 MSC는 일부 이질성을 포함할 수 있으며, ESC의 만능성으로 인해 ESC에서 유래된 MSC는 3배엽으로부터의 임의의 계통 세포를 함유할 수 있다. 본 명세서에 기술된 배양 시스템은 90%를 초과하는 세포들이 일상적으로 전술한 면역 표현형 및 기능적 특성을 나타내는 것을 가리키지만, MSC 배양내 하나 이상의 MSC 세포 표면 마커의 발현이 부족하고 없어야 할 하나 이상의 마커를 발현하는 작은 서브집단세포들이 존재할 수 있다. MSC 배양내 이러한 서브집단의 정도는 오염 이질성 정도를 측정하기 위해 검사된다. 전술한 마커간의 중첩을 결정하기 위해 BD LSR II 유세포분석기상에 다색 유세포 분석 (동시 8+색)을 수행할 수 있다. 이는 또한 가장 큰 면역억제활성에 요구되는 정확한 세포 표면 마커 프로파일을 찾아내는데 도움을 줄 수 있다.

[0277] A. 면역억제 효과에 관련하여 ESC-MSC의 분화 단계, 서브집단, 및 활성화 상태의 특정.

[0278] ESC-MSC를 수확(예를 들면, 도 1 참조)하는데 큰 시간 창이 있다(예를 들면, MSC 분화 배지내에서 적어도 14일 내지 28일). 수개의 연구는 연속적으로 계대됨에 따라 MSC가 그들의 면역억제 기능을 잃어버리고 노쇠하는 경향이 있으며 긴 배양 기간동안 노화함을 가리킨다. 따라서 MSC 배지내에서 가장 큰 면역억제활성을 나타내는 특정 일수를 결정하기 위해 상이한 시간점에서 세포를 수확할 수 있다. 실제로, 초기 시간점에서 수집된 MSC (예를 들면, MSC 배양 조건에서 14일)는 특징적인 모든 MSC 세포 표면 마커를 완전히 획득하지 못하였으나 높은 강력한 면역억제 효과를 나타내는 전구체 세포를 포함할 수 있다. 잠재적으로 유용한 MSC 전구체 집단을 특정하기 위해, 광범위한 세포 표면 마커 발현을 MSC 분화 과정 전반을 통해 7일에서 28일까지 추적하였다. 적어도 50%의 배양물이 세포 표면 마커 CD309(다른 명칭은 VEGFR2, KDR를 포함)을 MSC 배양 조건의 14일 이내에 획득하는 것이 관찰되었다. CD309는 출발 혈관모세포 집단 (도 9, 제1 시점, 7일 및 8일에 수확된 MA09 혈관모세포)에서는 거의 없으나, MSC 배양 조건의 첫 2주내에 생성되어 28일에는 다시 세포 5% 미만으로 다시 감소되었다(도 9, 제2, 3 및 4 시점). 이 패턴은 MA09 혈관모세포-유래 MSC에서 뿐만 아니라 MA01, H1gfp, 및 H7 ESCs에서 유래된 것들에서도 발견되었다. 이 실험에서, 혈관모세포는 그 수확일(6 내지 14일)에 상관없이 CD309에 대해 일상적으로 음성이었다(5% 미만의 세포가 염색 양성). 그러나 CD309 발현을 획득하는 발달하는 MSC 퍼센트는 더 늙은 혈관모세포(예를 들면, d10 또는 d12 블라스트)에서부터 발전될 때 감소될 수 있다. 유사한 식으로, 혈관모세포-유래 MSC의 확장 성질은 혈관모세포의 수확일에 따라 다른 것이 관찰되었다. 더 젊은 혈관모세포 (6일 또는 7일)에서 발달하는 MSC는 더 늙은(d8 내지 12) 혈관모세포로부터 발달하는 MSC 만큼 건실하게 확장을 계속하지 못한다. 최적의 혈관모세포 수확일은 MSC 발달의 대리 마커로서 CD309의 적절한 획득을 허용하고 반면 여전히 28일 및 이를 넘어 계속 건실한 확장능을 유지할 수 있도록 중간일(8 내지 10일)일 수 있다. MSC 전구체 발달의 측면들을 최적화하기 위한 작업들이 진행되고 있다.

[0279] MSC에 대해 가장 전형적인 마커로 증명된 CD105, CD90 및 CD73을 제외하고(세포 치료를 위한 국제사회에 의해 MSC의 최저 분류로서 알려진 바와 같이 (Dominici et al., Cytotherapy 8 (4): 315-317 (2006)), 상기에서 언급되지 않은 CD49a, CD54, CD80, CD86, CD271, VCAM, 및 ICAM와 같은 많은 다른 세포 표면 분자도 역시 MSC 마커로서 제안되거나 사용되었다[22]. 따라서 ESC-MSC는 혈관모세포로부터 분화되는 동안 다양한 면역억제활성을

가지는 다양한 다른 마커의 조합을 발현하는 서브집단을 포함하는 것이 가능하다. 서브집단은 시험관 내 또는 생체 내 방법을 사용하여 이들의 면역억제활성을 비교 분석하기 위한 하나 이상의 마커 (개별 또는 조합)에 기초하여 분류될 수 있다(예를 들면, FACS를 사용하여).

[0280] B. 다량의 기능성 ESC-MSC를 수득하기 위한 분화 및 확장 조건의 최적화.

[0281] 예비 실험이 MSC가 IMDM + 10% 열-불활성화된 인간 혈청내에 유지될 수 있음을 보이는 동안, 우리는 이 배지에서 이들의 유도를 아직 시험하지 않았다. 배양 구성성분(예, 기초 배지, 혈청 공급원, 혈청 대체물 산물, 인간 혈청 혈소판 용해물)의 대체가 여기에 기술된 유효한 서브집단을 강화하는지 여부를 결정하기 위해 상이한 배양 조건이 테스트되었다. ESC 배양 및 MSC 제조를 위해 동물-프리 및 특정 배양(FBS 없음) 시스템을 포함하는 상이한 기초배지가 평가되었다. 특히, StemPro® MSC SFM(Invitrogen) 및 MSCM bullet 키트(Lonza)가 사용되어 무-혈청 특정 배양 시스템이 원하는 질과 양으로 ESC-MSC를 생성시킬지를 검사하였다. 또한 다양한 성장 인자, 예컨대 FGFs, PDGF, 및 TGFI3와 시그널링 경로 또는 세포구조를 조절하는 소화합물이 ESC-MSC의 질과 양을 강화시키기 위해 사용될 수 있다.

[0282] C. 결과

[0283] ESC-MSC는 전형적인 마커 CD73(ecto-5' nucleotidase [26]), CD90 및 CD105를 발현한다. 또한, 도 20은 본 발명에 따라 제조된 FM-MA09-MSC가 시간의 경과에eh 그들 표현형을 유지함을 보여준다(시간 및 연속적인 계대에 걸친 상이한 MSC 집단의 유세포 분석동안 검출된 마커 발현에 기초하여).

[0284] <u>실시예 8 - ESC-MSC에 의한 면역억제기전</u>

[0285] A. ESC-MSC가 어떻게 T 세포 매개 적응 면역 반응을 억제하는지에 관한 연구.

[0286] PBMC 내 T 세포의 일반적인 반응은 피토헤마글루티닌(PHA) 또는 포볼 미리스테이트 아세테이트(PMA)/이오노마이신과 같은 유사분열자극제로 유도되었을때 또는 수지상세포와 같은 항원 제시 세포 (APCs)를 만났을 때 증식되는 것이다. 이는 혼합 백혈구 반응(MLR) 어세이에서 CD4+ 및 CD8+ T 세포의 일반적인 증식에 의해 가장 잘 예시된다. 이전 연구는 MSC가 MLR 어세이에서 T 세포 증식을 억제할 수 있는 것을 보여준다.

[0287] 본 발명의 ESC-혈관모세포 유래 MSC가 화학적 자극(PMA/이오노마이신, 도 10a 및 13a)(PHA, 도 13b) 또는 APC에의 노출(수지상 세포, 도 10b 및 13c)에 의해 유발된 T 세포 증식을 저해하는 능력을 조사하였다. MSC가 화학적 자극 또는 APC와의 공배양으로 인한 T 세포 증식 반응을 약화시키고 이 억제는 용량 의존적으로 일어난다는 것이 관찰되었다(도 10b, 그래프 우측). 또한, 유사분열적으로 불활성화된 MSC(도 10b)가 생 MSC와 동일한 정도로 T 세포 증식을 억제시키는 것이 발견되었으며, 이는 유사분열적으로 불활성화된 MSC이 면역억제를 위해 실제로 생체 내에서 유용하다는 것을 제안한다.

[0288] 다양한 기능적 서브세트 T 세포가 존재하며 이들은 전염증 반응, 항-염증 반응, 또는 T 세포 무감작(anergy) 유도에 관련된 특이 기능을 수행한다. 조절 T 세포(Treg)는 자연 발생 면역억제 T 세포로 생각될 수 있으며, 정상적인 세팅에서 과민성 자가-반응성 T 세포 반응을 약화시킨다. 이들은 통상 체 T 세포의 매우 적은 부분을 대표하나 이들의 성행은 다양한 환경적 인자에 의해 영향을 받을 수 있다. MSC는 Treg 세포의 유도를 통해 말단 내성을 유도하는 것으로 보여진다[33-35].

[0289] 짧은 5일 공배양 어세이에서, 이전 연구와 유사하게, 혈관모세포-유래 MSC는 IL2 자극에 반응하여 유도된 CD4/CD25 이중 양성 Treg 퍼센트를 증가시킬 수 있음이 확인되었다(도 11a, 14, 15a). 비-부착성 말초 혈액 단핵구 세포(PBMC) 유래 혼합 T 세포 집단과 MSC의 공배양(10 PBMCs:1 MSC의 비율)은 MSC가 IL2 유도된 배양에 포함되었을 때 Treg 유도가 거의 두배가 됨을 보여준다. 이러한 정도의 Treg 유도는 Blood, 2005에 발표되어 자주 인용되는 Aggarwal et al 연구에서 발견되는 것과 유사하다. CD4/CD25 이중 양성 집단 내 유도된 FoxP3의 양을 조사한 결과 이들이 실제 진짜 Treg임을 확인하였다(도 15b). 세포내 유세포 분석기를 사용하여 IL2-유도된 T 세포 배양에서 MSC 존재 및 부재하에서 FoxP3 유도를 연구하였다. 비-부착성 PBMC와 정제된 CD4+ T 세포 집단 모두가 이들 어세이에서 Treg 유도 연구에 사용될 수 있다. 이론에 얽매임없이, ES-MSC는 Treg 유도에 더욱 유효한데 이들이 BM뺈SC보다 더 효과적으로 CD25의 발현을 증가시키기 때문으로 사료된다(도 15b)

[0290] Th1 및 Th17 세포는 MS 및 다른 자가면역 질환에서 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다. Th1 및 Th17 CD4+ T 세포의 분화 및 기능은 가장 먼저 시험관 내 어세이를 사용하여 분석된다; 이들은 EAE 모델 또는 우리가 사용하는 다른 동물 모델에서도 검사될 수 있다. MSC의 Th1 시험관 내 유도에 대한 효과가 조사되었다. 생(naive) CD4+ T 세포로부터 Th1 특정화를 촉진하는 배양조건은 본 분야에 공지이다(Aggarwal et al). 이들 배양 조건

(항-CD3, 항-CD28, 및 항-CD4 항체와 인간 IL3 및 IL12 포함)을 사용하여 생, 비-부착성 PBMC로부터 MSC 존재(10 PBMCs:1 MSC) 또는 비존재하에 Th1 세포를 유도하였다. 공배양 48시간 후, 비-부착성 세포를 분리하고, 헹구고 새 웰내에서 16시간 동안 PMA/이오노마이신으로 자극하였다. 16 시간 유도후, 상등액을 수집하고 Th1 사이토카인 IFNγ의 분비를 분석하였다. 예상된대로, MSC와 함께 배양된 PBMC는 48 시간내 Th1 유도 조건에서 MSC없이 배양된 PBMC 만큼 많은 IFNγ을 생성하지 못하였다. 이는 MSC가 주된 Th1 세포 기능, 즉 IFNγ 분비를 억제할 수 있음을 나타낸다(도 11b). Th17 세포를 시험관 내 분화하고, 배양 상등액상의 ELISA 어세이를 사용하여 MSC의 전-염증 IL17 분비에 대한 효과를 측정하여 유사한 연구를 수행할 수 있다.

[0291] Th2 세포는 IL4와 같은 항-염증 효과를 갖는 사이토카인을 분비하는 것으로 알려져 있다. MSC는 Th2 분화와 IL4 분비를 증강시킬 수 있다. Th1 세포에 대해 전술한 실험과 유사하게, Th2 유도 조건을 48 시간 배양 시스템에 사용하여 T 세포 함유 생 PBMC로부터 Th2 분화를 자극한다. IL4 분비에 대한 MSC 공배양의 효과는 ELISA 어세이를 사용하여 검사한다.

[0292] 최근 연구들은 CD8 T 세포가 EAE 모델 및 MS의 근본적인 기전에서 중추적 역할을 하는 것을 제안하였다[30]. 발명자는 ESC-MSC와의 시험관 내 공배양이 CD8 T 세포의 기능에 영향을 미치는지 여부를 검사하였다. 이를 위해, 비-부착성 PBMC 또는 정제된 CD8+ T 세포를 EAE-수반 MBP110-118 펩타이드에 APC를 사용하여 노출시켰다. 이는 항원-특이적 CD8+ T 세포 집단을 나타나게 하고 이러한 집단이 CD3/CD28 확장자 비드(Invitrogen)를 사용하여 확장할 수 있게 한다. 항원-특이적 CD8+ T 세포의 존재는 유세포 분석에서 MBP-펩타이드(프로면역)에 특이적인 펜타머 시약을 사용하여 검증될 수 있다. MBP110-118-로딩 APC로의 재자극이 수행되어 항원 특이적 면역 반응을 유도하고, 이는 항원-특이적 CD8+ T 세포 확장과 IFNγ의 분비를 포함한다. MSC 존재 및 부재에서 배양된 T 세포에서의 반응을 비교하여 MSC가 이들 세포독성 EAE-수반 항원 특이적 T 세포의 유도를 억제할 수 있는지 여부를 결정할 수 있다. 펜타머 특이적 유세포 분석, BrdU 삽입, 및 ELISA 어세이가 이러한 목적을 위해 사용된다.

[0293] B. 염증 인자 및 세포간 부착 분자(ICAMs)가 ESC-MSC의 면역억제효과에 기여하는지의 결정.

[0294] TGF베타, PGE2, IDO, 산화질소(NO), 및 ICAM가 MSC의 면역억제 기능에 중요한 것으로 나타났다[7]. ESC-MSC에 의한 이들 분자의 분비 및 ICAM 발현은 ELISA 어세이 및 유세포 분석을 사용하여 조사된다.

[0295] 전-염증 사이토카인, IFNγ가 MSC 활성화에 요구되며[23], Toll-유사 수용체(TLR)에 대한 다양한 아고니스트, 예를 들면 LPS 및 폴리(I:C)가 상이한 서브세트의 MSC를 유도할 수 있는 것으로 보여졌다[24]. 예를 들면, 최근에 IFNγ-활성화된 MSC가 미처리 MSC 보다 대장염 마우스 모델에서 더 치료학적으로 유효한 것이 밝혀졌다(Duijvestein et al 2011). MSC 성질에 대한 IFNγ 효과가 검사되기 시작했다. ESC-MSC는 IFNγ로 7일까지 시험관 내 처리되었으며 세포 표면 마커 발현에서 눈에 띄는 변화가 결과되었다. 이러한 발견은 기존 연구에서 이루어진 관찰과 일치하며(Gotherstrom et al 2004, Rasmusson et al 2006, Newman et al 2009) 혈관모세포 유래 ESC-MSC가 몸에서 분리된 MSC와 유사하게 기능함을 확인한다. 예를 들면, 휴지상태에서 MSC는 통상적으로 HLA G을 그 세포 표면에 많이 발현하지 않으며(<10%), 이들은 이 특정 클래스의 면역 내성 HLA 마커의 세포내 스토어(store)를 갖는다. IFNα 처치 7일에, HLA G는 세포 표면에 손쉽게 검출될 수 있으며(도 12) 분비되도록 유도될 수 있다(아직 테스트는 안됨). 부가적으로, IFNγ 처치는 CD40 발현 및 세포표면에서 HLA DR 발현의 상향조절을 일으킨다(도 12). 이러한 변화는 이들의 면역억제 효과를 증가시키는 것으로 제안된다. 예를 들면, 우리는 MSC의 IFNγ로의 전처치가 Treg 집단의 유도능, IFNγ의 Th1 분비를 억제시키는 능력 또는 Th2 세포로부터 IL4 분비를 증가시키는 능력을 증강시키는지를 전술한 시험관 내 공배양 어세이를 사용하여 결정할 것이다. IFNγ는 MLR 어세이에서 일반적인 T 세포 증식을 저해하는 MSC의 능력에 영향을 미칠 수 있다. TNFα, LPS, 및/또는 폴리 I:C의 이러한 타입의 MSC 면역억제 성질에의 효과도 테스트될 수 있다.

[0296] C. 결과

[0297] 기능적 Treg가 자극 유도에 반응하여 그 발현을 상향조절하는 것으로 보고된 바와 같이, MSC에 의해 유도된 CD4/CD25 이중 양성 Treg 집단은 또한 전사 인자, FoxP3를 발현하는 것으로 보여진다(도 15b).

[0298] MSC는 Th17 세포에 의한 IL17의 전-염증 분비를 일정 정도로 저해하며 MSC는 또한 상당히 항-염증 Th2 세포에 의한 IL4 분비를 증가시킬 수 있는 것으로 예측된다. 이러한 관찰은 이전 연구에서 이루어졌으며 혈관모세포-유래 MSC의 진실한 기능성을 확인하는데 보조할 것이다.

[0299] ESC-MSC는 적어도 부분적으로 항원-유도된 CD8+ T 세포의 활성화를 저해하여야 한다. NK 세포, 마크로파지 및 수지상 세포의 ESC-MSC 공배양후 기능도 조사될 수 있다. 다른 타입의 면역세포의 성숙, 세포독성 및/또는 특이적 사이토카인 생성에 미치는 ESC-MSC의 효과도 조사될 것이다.

[0300] 예를 들면, 도 11a의 실험은 혈관모세포-유래 중간엽 간질 세포가 IL2 자극에 반응하여 유도된 CD4/CD25 이중 양성 Treg의 퍼센트를 증가시킴을 보여준다. 또한, 도 12의 실험은 전염증 사이토카인 IFNg가 FM-MA09-MSC 표면 마커 발현의 변화를 자극하며 감마 인터페론이 MSC 표면 마커 발현의 변화를 자극하며 MSC 면역억제 효과를 증강함을 보여준다.

[0301] 또한 도 14의 실험은 FM-MA09-MSC이 Treg 유도를 증강시키며 특히 빠른 계대 MSC가 늦은 계대 MSC 보다 더 큰 효과를 가짐을 보여준다. 비-부착성 PBMC(상이한 공여자)가 IL2와 함께 또는 없이 4 일간 FM-MA09-MSC의 존재 및 부존재하에 배양되었다. CD4/CD25 이중 양성 Treg의 퍼센트를 유세포 분석으로 평가하였다. 젊은(p6) 또는 늙은(p16-18) FM-MA09-MSC가 사용되었다. 흑색 막대는 6개 실험의 평균을 나타낸다. MSC는 전체로 Treg 유도에 통계학적으로 유의한 효과를 나타내었다(p=0.02).

[0302] <u>실시예 9- ESC-MSC는 BM-MSC 보다 더 증가된 역가 및 더 큰 저해효과를 가진다.</u>

[0303] 혼합 백혈구 반응(MLR) 어세이를 실시하여 상이한 MSC 집단이 T 세포 증식 저해에서 상이한 능력을 갖는지 조사하였다. 결과는 유사분열적 자극("원-웨이 MLR")(도 13a 및 13b 참조) 또는 항원-제시 세포(수지상 세포, DCs; "투-웨이" MLR)(도 13c 참조)에 반응하는 T 세포 증식을 저해하는 능력에 있어 ESC-MSC가 BM-MSC보다 더 강력함을 제안한다.

[0304] "원-웨이" R 어세이는 하기와 같이 수행되었다: 인간 PBMC를 AllCells로부터 구입하였다. 동결 바이알을 해동하고, PBMC를 적어도 1 시간 또는 밤새 IMDM+10% 열-불활성 인간 혈청내에 플레이팅하여 단핵구를 선택적으로 부착하였다. 비-부착성 세포(T 세포 함유)는 T 세포 반응자의 조 공급원으로서 사용하였다. ESC-유래 MSC 또는 BM-유래 MSC를 저해제로서 사용하였다. 이들 MSC는 살아있거나 또는 마이토마이신으로 유사분열적으로 정지시킨 것이었다. 비-부착성 PBMC 및 MSC를 다양한 비율로 함께 혼합하고 5일간 공배양하였다. 3일째에 마이토겐, 포볼-12-미리스테이트13-아세테이트(PMA) 및 이오노마이신 또는 피토헤마글루티닌(PHA)을 배양에 넣고 T 세포 증식을 유도하였다. 4일째, 브로모데옥시우리딘(BrdU)을 추가하였다. 5일째, T 세포 증식을 BrdU 삽입 키트(B&D Biosystem s)를 사용하여 CD4, CD8, 및 BrdU에 대한 항체로 유세포 염색을 통해 평가하였다. T 세포 증식은 BrdU를 DNA내로 삽입하는(즉, BrdU+) CD4+ 및/또는 CD8+ 세포 %로 평가하였다(도 13a 및 13b에 나타냄).

[0305] "투-웨이" MLR에서, ESC-유래 MSC 또는 BM-유래 MSC가 저해제로서 사용되며, 비-부착성 말초 혈액 단핵구 세포(PBMCs)가 반응자의 조 공급원으로서 사용되고, 단핵구-유래 수지상 세포(DCs)가 자극자로서 사용되었다. DC를 유도하기 위해, 플라스틱-부착성 단핵구를 PBMC로부터 분리하였다. PBMC는 적어도 1 시간 또는 밤새 IMDM+10% 열-불활성화된 인간 혈청(10% HuSer)내에 플레이팅하여 단핵구를 선택적으로 부착하였다. 비-부착성 세포를 제거하고 부착성 세포를 IMDM+10% HuSer내에 4일간 SCF, FL, GM-CSF, IL3, 및 IL4와 함께 배양하였다. 이 어세이의 변형에서, 3일에 마이토겐이 추가되지 않는다. BrdU는 전술한 유세포 분석을 위해 세포를 수확하기 16-24 시간전에 간단히 가한다. MSC 및 DC는 이 어세이에서 마이토마이신 C로 유사분열적으로 불활성화되었다(도 13c에 나타냄).

[0306] <u>실시예 10 뺁M-MSC 및 늙은 ESC-MSC와 대비된 젊은 ESC-MSC에 의한 Treg 확장의 개선된 유도</u>.

[0307] MSC의 존재가 PBMC 집단 내에서 조절 T 세포(Treg) 확장을 유도할 수 있는지를 알아보기 위해 PBMC 및 MSC로 공배양 실험을 수행하였다. 그 결과 젊은 ESC-MSC는 BM-MSC 및 늙은 ESC-MSC 보다 Treg 확장을 더 잘 유도하는 것으로 나타났다(도 14 및 도 15 참조).

[0308] 비-부착성 PBMC와 상이한 타입의 MSC(봵 틩 ESC-유래(~p5-6), 볩컥틩 ESC-유래(~p12 또는 그 이상), BM-유래)를 10:1 비율(PBMC:MSC)로 공배양하였다. 공배양물은 IMDM +10% 열 불활성화 인간 혈청 + 300 units/ml 재조합 인간 IL2내에 4일간 인큐베이션하였다. Treg의 존재는 FoxP3 세포내 유세포 분석 염색 키트(Biolegend)를 사용하여 CD4, CD25, 및 FoxP3에 대해 양성으로 염색되는 PBMC의 퍼센트로 결정하였다.

[0309] <u>실시예 11 - ESC-MSC는 더 큰 증식능을 갖는다</u>

[0310] MSC 공급원이 그 증식능에 영향을 미치는지 알아보기 위해, 상이한 MSC 집단의 성장 속도를 시간에 따라 모니터하였다. 그 결과 ESC-유래 MSC가 BM-유래 MSC보다 더 큰 증식능을 갖는 것으로 나타났다. 또한 결과는 p2와 같이 더 초기 계대에서 세포를 기질로부터 이동시키는 것보다 ESC-MSC을 기질(예, 마트리겔)상에 더 긴 시간(6 계대 까지)동안 배양하는 것이 더 높은 성장 속도를 유지하는데 도움을 줄 수 있음을 제안하였다(도 16 및 도 17 참조).

[0311] ESC-유래 혈관모세포를 마트리겔-코팅 조직-배양 플라스틱상에 50,000 세포/cm^2로 αMEM +20% Hyclone FBS + l-

글루타민+ 비-필수아미노산(=p0 로서 MSC 성장 배지)에 접종하였다. 뼈-골수 단핵구 세포를 정규 조직 배양 플라스틱상에 50,000 세포/cm^2로 MSC 성장 배지내 p0로서 접종하였다. 세포들이 p0에서 ~50 내지 60% 합류 또는 p1으로부터 계속 70 내지 80% 합류(통상 3 내지 5일마다)에 도달 할 때 0.05% 트립신-edta(Gibco)로 수확하였다. 수확시, 세포를 스핀다운하고, 계수하고 7000 세포/cm^2로 재플레이팅하였다. ESC-MSC를 마트리겔에서 제거하고 이어서 달리 지시하지 않은 한 p3에서 시작하여 정규 조직 배양 플라스틱에서 성장시켰다. 시간의 경과에 따른 누적 세포수 증식을 도표화하여 MSC가 배양내 유지될 때 세포성장속도를 나타내었다.

[0312] 실시예 12 - ESC-MSC는 연골발생 분화를 진행한다

[0313] 상이한 MSC 집단의 연골발생 잠재력을 조사하기 위해, ESC-MSC 또는 BM-MSC를 펠렛 덩어리 배양물로 접종하고, 분화 배지내에서 연골세포로의 분화를 유도하였다(또는 음성 대조군으로서 정규 MSC 성장 배지에 두었다). 그 결과 ESC-MSC는 BM-MSC와 비슷하게 연골형성을 진행하는 것으로 나타났다. ESC-MSC 및 BM-MSC 펠렛은 모두 사프라닌 O 염색을 통해 연골 매트릭스(프로테오글리칸) 침착을 나타내었다(도 18 참조).

[0314] 연골발생 펠렛 배양물을 형성하기 위해, 2.5 X 10^5 세포 ESC-MSC를 500 X g로 5분간 15 mL 삼각튜브에서 원심분리하였다. 배양 배지를 흡입하고, 0.5 mL의, 1Mm 소듐 피루베이트(Life Technologies), 0.1 mM 아스코르브산 2-포스페이트(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 0.1 μM 덱사메타손(Sigma-Aldrich), 1% ITS(Collaborative Biomedical Products, Bedford, MA), 10 ng/mL TGF-β3(Peprotech, Rocky Hill, NJ)를 보충한 DMEM-HG(Life Technologies, Gaithersburg, MD)로 이루어진 연골발생 배양 배지, 또는 배양 배지 (대조)를 펠렛에 가하였다. 펠렛 배양물을 2 내지 3일 마다 배지를 교환하면서 21일간 유지하였다. 21일이 끝났을 때, 펠렛을 4% 파라포름알데하이드로 고정하고 MassHistology(Worcester, MA)로 보내어 표준 과정을 사용하여 파라핀-내포, 섹션화 및 사프라닌 O 염색하였다.

[0315] 실시예 13 - IFN-ɣ 또는 TNF-α 자극하에서 프로스타글란딘 E2 (PGE2)의 증강된 분비

[0316] ESC-MSC는 부분적으로 PGE2의 분비를 통해 면역조절 효과를 나타낸다. FM ESC-MSC 및 BM-MSC로부터 수집된 조건화 배지는 BM-MSC가 FM ESC-MSC보다 기저 상태에서 더 높은 수준으로 PGE2를 분비하였음을 보여준다. 자극 조건하에서 PGE2 분비 결정 실험(다양한 농도의 IFN-ɣ 및/또는 TNF-α)은 FM ESC-MSC가 이들 세포가 자극에 반응하여 PGE2 분비를 크게 증가시킴을 보여준다(도 19) 참조. 사실상, 기저에서 자극 상태까지 PGE2 분비에 대한 배율 유도(fold induction)는 BM-MSC보다 FM ESC-MSC에서 더 크게 나타났다. 그러나 자극 조건하에서 실제 PGE2 분비 원량(pg/ml)은 FM ESC-MSC와 BM-MSC가 비슷하였다.

[0317] ESC-MSC를 6웰 플레이트(BD Falcon, Franklin Lakes, NJ)내에 7.5 X 10^6 세포/cm^2로 플레이팅하였다. 배양을 배양 배지내에 24 시간동안 유지하고, 이어서 10, 50, 100, 또는 200 ng/ml IFN-ɣ 및/또는 10, 25, 50 ng/mL TNF-α(Peprotech)로 자극하였다. 상등액을 인큐베이션 3일후에 수집하고 -20℃에 보관하였다. ESC-MSC를 수확하고 계수하여 PGE2 수준을 세포수에 대해 정규화하였다. PGE2 농도를 제조자 프로토콜에 따라 ELISA 키트 (R&D PGE2 파라미터 또는 프로스타글란딘 E2 Express EIA 키트, Cayman Chemicals)를 사용하여 측정하였다.

[0318] 실시예 14 - ESC-MSC 표현형 평가

[0319] 상이한 MSC 집단에 대해 개별적인 면역 표현형을 결정하기 위해 다양한 세포 표면 마커 발현을 평가하였다. ESC-유래 MSC는 다양한 기질상에서 분화될 수 있다. 세개의 상이한 매트릭스(마트리겔, 피브로넥틴, 또는 콜라겐 I)에서 유래된 MSC 상의 발현 프로파일 대 BM-MSC 상에서의 발현을 결정하기 위해 세포 표면 마커 패널을 조사하였다. 그 결과 그 초기분화에 사용된 기질에 상관없이 이들 마커들에 대해 유사한 발현 패턴을 갖는 것으로 나타났다. 이들은 CD13, 29, 44, 73, 90, 105, 166, 및 HLA-ABC에 대해 95% 양성이고, CD31, 34, 45, HLA-DR, FGFR2, CD271에 대해 음성을 나타내었다(도 20a 참조). Stro-1 발현은 ESC-MSC에 대해 약 5%에서 BM-MSC에 대해 약 30%로 다양하였다.

[0320] 계대 수 증가에 따라 MSC의 성장 및 세포수 증식이 늦어졌다. 이 실험의 목적은 FM-ESC-MSC에서 계대 3 에서 17까지 다수의 상이한 MSC 마커에 대한 표면 마커 발현을 보는 것이다. 모든 계대의 FM-ESC-MSC 세포는 CD90, CD73, CD105, HLA-ABC, CD166, CD13, 및 CD44에 대해 양성으로 염색되었다. 세포는 CD34, CD45, TLR3, HLA-DR, CD106, CD133, 및 CD271에 대해서는 음성이었다(도 20b 참조).

[0321] 각 주/계대 수에 대해, 동일한 프로토콜로 수행하였다. 세포는 T75 또는 T175 플라스크내 MSC 배지에서 성장시켰다. 세포는 3-4 일마다 계대하였다. 세포 계대는 플라스크를 PBS로 세척하고, 세포 분리 배지 TryPLE Express

로 세포를 수집하고 MSC 배지로 세척하는 것으로 이루어진다. 세포는 생육성 검사를 위해 트립판블루로 계수하고 조건당 50 내지 100,000 생육세포로 분획하였다. 하기 항체를 사용하였다: CD34-Fitc, CD34-PE, CD44-Fitc, CD73-PE, CD106-PE, CD45-APC (BD); HLA-DR-APC, CD90-Fitc, HLA-ABC-Fitc, CD133-APC, CD29(ebioscience); CD166-PE, CD105-APC, CD13-PE, CD13- APC, CD271-Fitc, CD10-Fitc, Stro-1-AF647, CD10(Biolegend); TLR3-Fitc(Santa Cruz Biotech). 프로피디움 아이오다이드를 생육성 마커로서 추가하였다. 세포를 실온에서 30분간 인큐베이션하고, 스핀다운하고, 40μm 세포 스트레이너를 통과시키고, na Accuri C6 유세포분석기로 분석하였다. 각 세포 타입에 대해, 세포들을 MSC 집단(FSC 대 SSC), PI 음성으로 게이팅하였다. 양성 퍼센트는 히스토그램 플롯을 게이팅하고 비염색 세포 집단을 음성 대조로 사용하여 결정하였다. Wagner W, et al. Replicative Senescence of Mesenchymal Stem Cells: A Continuous and Organized Process. PLoS ONE (2008). 3(5): e2213. doi:10.1371/journal.pone.0002213; and Musina, R, et al. Comparison of Mesenchymal Stem Cells Obtained from Different Human Tissues. Cell Technologies in Biology and Medicine (2005) April. 1(2), 504-509 참조.

[0322] 부가적으로, FM ESC-MSC는 FM ESC-MSC 및 BM-MSC 보다 더 큰 CD10 발현 수준 및 더 적은 Stro-1 발현 수준을 갖는다(도 21 참조). 이러한 낮은 수준의 Stro-1(세포의 5 내지 10%) 및 중등-수준의 CD10(세포의 ~40%) 발현 패턴이 10개의 상이한 로트의 FM-MA09-MSC에서 확인되었다(도 22 참조). 또한 유세포 분석을 상이한 집단에 사용하여 세포 크기를 평가하였다(도 23 참조). 결과는 세포가 배양에서 더 오랜 기간 유지될 수록 BM-MSC의 크기는 증가되는 반면 FM ES-유래 MSC는 세포 크기를 유지하는 것을 보여준다. 세포 크기는 유세포 분석 도트 플롯에서 전방 대 측면 산란에 의해 결정된다. 사분면 게이트(quadrant gate)를 사용하여 도표를 4 영역으로 분리하였다. 우측상단 사분면은 큰 세포를 포함하며, 즉 그 영역의 세포는 큰 전방 산란(세포 부피) 및 또한 높은 측면 산란(과립 상태)를 갖는다.

[0323] ESC-MSC는 전술한 바와 같이 수확되어 1X DPBS (Life Technologies)로 세척하였다. 75-100 X 10^5 세포를 유동버퍼(3% FBS; Atlas Biologicals, Fort Collins, CO)로 세척한 후, 1차 항체 또는 이소형 대조 항체를 포함하는 100 큌의 유동 버퍼와 함께 45분간 아이스상에서 인큐베이션하였다. 세포를 2 mL 의 유동 버퍼로 세척하고 2차 항체를 포함하는 100 큌의 유동 버퍼내에서 45분간 아이스상에서 인큐베이션하였다. 세포를 마지막으로 세척하고 프로피디움 아이오다이드 함유 유동 버퍼내 재현탁하고 Accuri C6 유세포 분석기(Accuri Cytometers Inc., Ann Arbor, MI)상에서 분석하였다.

[0324] <u>실시예 15 뻃SC-MSC에서의 유전자 발현 분석</u>

[0325] 이 연구의 목적은 FM-ESC-MSC 및 BM-MSC 간의 mRNA 발현의 유사성 및 차이점을 결정하는 것이었다. 첫 세트의 실험(기초 실험)에서, FM-ESC-MSC 및 BM-MSC로부터의 세포의 mRNA 발현의 상대적 차이를 정량적 중합효소 연쇄반응(QPCR)으로 비교하였다. 다양한 유전자에 대한 Taqman 프로브(Life Technologies)를 사용하고 ??Ct 방법을 사용하여 내인성 대조, GAPDH에 대한 상대적 발현을 결정하였다. FM-ESC-MSC 대 BM-MSC 기초 실험에서 28개의 유전자 목록에서 하기 유전자들이 상향조절되었다: AIRE, ANGPT1 (ANG-1), CXCL1, CD10, CD24, 및 IL11 (도 24-26 참조). IL6 및 VEGF는 FM-ESC-MSC 대 BM-MSC에서 하향 조절되었다(도 27 참조). 하기 유전자는 MSC 공급원간 유의한 차이가 없었다: ALCAM, FGF7, HGF, LGALS1, NT5E, 및 TNFSF1B (데이터 미도시). 하기 유전자는 어느 MSC 공급원에서도 검출되지 않았다: ANGPT2, CD31, CD34, CD45, HLA-G, IL2RA, IL3, IL12B (데이터 미도시). 음성 대조로서, 조혈 전구 마커, CD34, CD41, 및 CD45의 발현에 대해 모든 MSC를 테스트하였다. 이 실험에서, FM-ESC-MSC가 동등한 BM-MSC 보다 더 높거나 낮은 수준으로 일부 유전자들을 발현하는 것이 결정되었다.

[0326] MSC를 T 세포로 처리한 후 자극자, 피토헤마글루티닌(PHA)을 가함으로써 면역 반응을 모방하는 환경으로 MSC를 도전시켰다. ESC-MSC는 T 세포(비자극) 또는 T 세포 플러스 PHA(자극)의 존재하에서 2일간 성장시키고, RNA를 수거하기전에 2일간 더 2.5μg/ml PHA를 가하였다. 자극되거나 자극되지 않은 ESC-MSC의 유전자 발현이 자극되거나 자극되지 않은 BM-MSC mRNA 수준과 비교되었다.

[0327] 기초 실험을 위해: FM-ESC-MSC 및 BM-MSC을 전술한 조건하에서 10 cm 접시내에서 약 500,000 세포의 시작 밀도에서 4일간 배양하였다. 또한 기초 실험의 음성 대조는 조혈 전구체 유래 MA09 ESC이었다.

[0328] 자극 실험을 위해: FM-ESC-MSC 및 BM-MSC을 전술한 조건하에서 10 cm 접시내에서 약 500,000 세포의 시작 밀도에서 3 내지 4일간 배양하였다. 이후 MSC를 T 세포에 2일간 노출한 후 2.5μg/ml PHA에 +/- 노출하였다. 대조로서, MSC를 T 세포 존재하에 PHA 없이 배양하고, 별도로 T 세포 플러스 PHA(MSC 없음)도 성장시켰다. 배지를 흡입하고, PBS 내에서 2차례 헹구고 흡입 건조시켰다. RNA는 제조자 지시에 따라 RNAeasy 키트(Qiagen)를 사용하여 분리하였다. RNA의 농도와 순도는 Nanodrop 2000(Thermo Scientific)을 사용하여 분석하였다. cDNA 합성은

SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR(Life Technologies)를 사용하고, 시작 물질로서 1 마이크로그램 RNA를 사용하여 수행하였다. cDNA는 5 마이크로리터/웰을 위해 약 30배 희석하였다. 웰당 희석된 cDNA, 1 마이크로리터의 QPCR Taqman 프로브(Life Technologies), 및 15 마이크로리터의 SSO Fast Mastermix(Biorad)를 혼합하였다. QPCR를 Biorad CFX 96 상에서 수행하였다. CFX manager 2.1 (Biorad)를 사용하여 데이터를 분석하였다. mRNA 발현의 상대적 양을 내인성 대조 GAPDH와 ??Ct 방법을 사용하여 결정하였다.

[0329] 실시예 16 - ESC-MSC에서의 인돌아민 2, 3-디옥시게나제(IDO) 효소 활성

[0330] 인돌아민 2, 3-디옥시게나제(IDO)는 트립토판을 키누레닌로 전환시키는데 관련된 효소이다. IFNγ-활성화 MSC는 IDO를 생성하며, IDO가 T 세포 대사를 저해하므로, 이는 부분적으로 T 세포 증식을 억제하는 능력을 나타내게 한다. 본 연구에서, BM-MSC의 IDO 활성을 ESC-MSC과 비교하는 실험을 수행하였다. IDO 발현은 IFNγ 또는 T 세포와 함께 공배양하여 세포를 자극한 후 또는 그 전에 측정하였다. 실험은 모든 MSC 집단이 IFN감마로 자극한 경우 IDO 활성이 상당히 증가됨을 보여준다(도 28 참조).

[0331] 세포는 IFNγ(50ng/ml)을 배지에 가하거나 또는 T 세포와 3일간 공배양함으로써 자극하였고; IDO 발현 측정은 분광학적(spectrophotometric) 어세이로 수행하였다. 자극후 세포를 수집하고, 1 내지 2 X 10^6 세포를 용해하였다. 용해물을 수집하고, 2X IDO 버퍼(40mM 아스코르베이트, 20μM 메틸렌블루, 200μg/ml 카탈라제 및 800μM L-트립토판이 가해진 PBS)와 1:1로 혼합하고 30분간 37℃에서 인큐베이션하였다. 30% 트리클로로아세트산을 가하여 반응을 정지시키고, 30분간 52℃에서 인큐베이션하였다. 용해물을 스핀다운한 후, 상등액을 에를리히 시약(0.8% 아세트산내 p-디메틸아미노벤잘데하이드, 즉시 조제)과 함께 1:1로 혼합하였다. 발색후, 분광기상에서 492nm에서의 흡광도를 판독하였다. 트립토판에서 키누레닌으로의 전환을 평가하기 위해, 0 내지 1000μM의 표준 키누레닌으로 OD 값을 비교하였다.

[0332] Meisel R et. al. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. Blood. (2004) Jun 15; 103 (12): 4619-21 참조.

[0333] Braun, D et. al. A two-step induction of indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO) activity during dendritic-cell maturation. Blood. (2005) Oct 1; 106 (7): 2375-81 참조.

[0334] 실시예 17 - ESC-MSC에서의 Aire-1 및 프리온-단백질의 발현 수준

[0335] Aire-1 및 프리온-단백질(Prp)의 발현수준이 상이한 MSC 집단(세포 공급원, 유도 방법, 또는 MSC 계대 수에 기초하여) 간에 차이가 있는지 결정하기 위해 웨스턴 블롯 분석으로 모니터하였다. Aire-1는 후속하여 MHC에 제시되며 이웃하는 T 세포의 반응을 가라앉히는 드문 말초 조직-제한 항원(PTA)의 전사 유도를 도운다. Aire-1는 또한 초기 T 세포 활성화 인자-1(ETA-1)의 발현을 억제하여 T 세포 염증 반응을 저해한다. 프리온 단백질(PrP)은 다양한 줄기 세포 집단(조혈, 신경, 등)의 증식 및 자가-재생을 증강하는 것으로 나타났으며, 그 발현은 배양에서 상이한 MSC 집단의 성장 특성과 관련될 수 있다. 결과는 양 단백질에서 노화-관련 감소를 보였다(각 샘플에 대한 로딩 대조, 액틴을 고려한 후). FM MA09-MSC는 시간의 경과에 따라 Aire-1 및 PrP 모두의 발현을 유지시키는 것으로 보인다(도 29 참조).

[0336] MSC 전 세포 용해물을 표준 프로토콜에 따라 12% 아크릴아마이드 SDS-PAGE겔 상에서 전개시켰다. 단백질을 니트로셀룰로스 막으로 이송하고 PBS 내 5% 우유+ 0.05% 트윈 20으로 차단하였다. 막은 Aire-1(Santa Cruz Biotechnology) 또는 프리온 단백질(Abcam)에 대한 항체, 후속하여 HRP-콘쥬게이트 2차 항체로 탐침하였다. 증광 화학발광 시약을 사용하여 시그널을 전개하고 Biorad GelDoc 이미징 시스템에서 분석하였다.

[0337] Parekkadan et al. Molecular Therapy 20 (1): 178-186 (2011) 참조.

[0338] Mohanty et al. Stem Cells 30: 1134-1143 (2012) 참조.

[0339] 실시예 18 - ESC-MSC의 사이토카인 분비

[0340] MSC는 기저 상태 및 다양한 자극에 반응하여 다양한 사이토카인 및 성장 인자를 분비하는 것으로 알려져 있다. 20개 이상의 상이한 분비된 인자들이 사이토카인 어레이를 사용하여 분석되었다. 결과는 ESC-MSC 및 BM-MSC간에 기저 및 자극 상태 모두에서 분비된 인자에 있어 몇가지 핵심적인 차이가 있음을 보여준다. BM-MSC는 기저 및 IFN γ-자극 상태 모두에서 ESC-MSC보다 더 높은 수준의 VEGF 및 IL6을 발현한다(도 30-32 참조).

[0341] 동일수의 MSC가 초기에 플레이팅되고, 플레이팅 3-4일 후에 MSC로부터 조건화된 배지를 수집하였다. CM을 잠시 스핀다운하여 세포 부스러기를 제거하고 -20℃로 동결하였다. CM를 해동하여 RayBiotech(Norcross, GA) 커스텀

막 어레이 또는 다양한 R&D 시스템(Minneapolis, MN) 레디-메이드 사이토카인 어레이상에서 제조자 프로토콜에 따라 분석하였다.

[0342] 실시예 19 뺌SC 분화를 위한 인간 ES 세포 배양

[0343] 본 실험의 목적은 MSC로의 분화 전에 hESC 배양에 사용되는 상이한 성장 배지를 평가하는 것이다.

[0344] 인간 ES 세포는 일반적으로 조사 또는 마이토마이신-C 처리된 마우스 배아 섬유모세포 (MEF) 피더 세포상에서 인간 ES 세포 성장 배지(녹아웃 DMEM 또는 DMEM/F12(1:1) 기초 배지, 20% 혈청 대체물, l-글루타민, 비-필수아미노산, 및 10ng/ml bFGF)내에 배양되었다. 0.05% 트립신/EDTA를 사용하여 계대를 수행한다. 또는, hESC는 MEF 피더상에 영장류 배지내에서 배양되고 분리용액(ReproCELL구매)을 사용하여 계대하였다. 결과는 영장류 배지가 녹아웃 DMEM를 함유하는 인간 ES 세포 성장 배지에서 성장한 세포에 비해 일관되게 "양호한" 외관의 hESC 콜로니(더 둥글고, 단단한 콜로니, 덜 자발적인 분화)를 산출함을 보여주었다.

[0345] 인용 문헌

[0346] 1. Zappia, E., et al., *Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy*. Blood, 2005. 106(5): p. 1755-61.

[0347] 2. Gerdoni, E., et al., *Mesenchymal stem cells effectively modulate pathogenic immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis*. Ann Neurol, 2007. 61(3): p. 219-27.

[0348] 3. Lanza, C., et al., *Neuroprotective mesenchymal stem cells are endowed with a potent antioxidant effect in viva* J Neurochem, 2009. 110(5): p. 1674-84.

[0349] 4. Rafei, M., et al., *Allogeneic mesenchymal stem cells for treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis*. Mol Ther, 2009. 17(10): p. 1799-803.

[0350] 5. Rafei, M., et al., *Mesenchymal stromal cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting CD4 Th 17 T cells in a* CC *chemokine ligand 2-dependent manner*. J Immunol, 2009. 182(10): p. 5994-6002.

[0351] 6. Constantin, G., et al., *Adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorate chronic experimental autoimmune encephalomyelitis*. Stem Cells, 2009. 27(10): p. 2624-35.

[0352] 7. Uccelli, A. and D.J. Prockop, *Why should mesenchymal stem cells (MSCs) cure autoimmune diseases?* Curr Opin Immunol, 2010. 22(6): p. 768-74.

[0353] 8. Ohtaki, H., et al., *Stem/progenitor cells from bone marrow decrease neuronal death in global ischemia by modulation of inflammatory/immune responses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. 105(38): p. 14638-43.

[0354] 9. Barberi, T., et al., *Derivation of multipotent mesenchymal precursors from human embryonic stem cells*. PLoS Med, 2005. 2(6): p. e161.

[0355] 10. Hwang, N.S., et al., *In vivo commitment and functional tissue regeneration using human embryonic stem cell-derived mesenchymal cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. 105(52): p. 20641-6.

[0356] 11. Olivier, E.N., A.C. Rybicki, and E.E. Bouhassira, *Differentiation of human embryonic stem cells into bipotent mesenchymal stem cells*. Stem Cells, 2006. 24(8): p. 1914-22.

[0357] 12. Brown, S.E., W. Tong, and P.H. Krebsbach, *The derivation of mesenchymal stem cells from human embryonic stem cells*. Cells Tissues Organs, 2009. 189(1-4): p. 256-60.

[0358] 13. Karlsson, C., Emanuelsson, K., Wessberg, F., Kajic, K., Axell, M. Z., Eriksson, P. S., Lindahl, A., Hyllner, J., and Strehl, R., *Human embryonic stem cell-derived mesenchymal progenitors-Potential in regenerative medicine*. Stem Cell Res., 2009. 3(1): 39-50.

[0359] 14. Lu, S. J., Feng, Q., Caballero, S., Chen, Y., Moore, M. A., Grant, M. B., and Lanza, R., *Generation of functional hemangioblasts from human embryonic stem cells*, Nat. Methods 4 (2007) 501-509.

[0360] 15. Lu, S. J., Luo, C., Holton, K., Feng, Q., Ivanova, Y., and Lanza, R., *Robust generation of hemangioblastic progenitors from human embryonic stem cells*, Regen. Med. 3 (2008) 693-704.

[0361] 16. Klimanskaya, I., Chung, Y., Becker, S., Lu, S.-J., and Lanza, R., *Human embryonic stem-cell lines derived from single blastomeres*, Nature 444 (2006) 481-485.

[0362] 17. Madsen, L.S., et al., *A humanized model for multiple sclerosis using HLA-DR2 and a human T-cell receptor.* Nat Genet, 1999. 23(3): p. 343-7.

[0363] 18. Stromnes, I.M. and J.M. Goverman, *Passive induction of experimental allergic encephalomyelitis.* Nat Protoc, 2006. 1(4): p. 1952-60.

[0364] 19. Liang, J., et al., *Allogeneic mesenchymal stem cells transplantation in treatment of multiple sclerosis.* Mult Scler, 2009. 15(5): p. 644-6.

[0365] 20. Costa, M., et al., *The ESC line Envy expresses high levels of GFP in all differentiated progeny.* Nat Methods, 2005. 2(4): p. 259-60.

[0366] 21. Pomper, M.G., et al., *Serial imaging of human embryonic stem-cell engraftment and teratoma formation in live mouse models.* Cell Res, 2009. 19(3): p. 370-9.

[0367] 22. Phinney, D.G. and D.J. Prockop, *Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views.* Stem Cells, 2007. 25(11): p. 2896-902.

[0368] 23. Ryan, J.M., et al., *Interferon-gamma does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells.* Clin Exp Immunol, 2007. 149(2): p. 353-63.

[0369] 24. DelaRosa, O. and E. Lombardo, *Modulation of adult mesenchymal stem cells activity by toll-like receptors: implications on therapeutic potential.* Mediators Inflamm, 2010. 2010: p. 865601.

[0370] 25. English, K., et al., *IFN-gamma and TNF-alpha differentially regulate immunomodulation by murine mesenchymal stem cells.* Immunol Lett, 2007. 110(2): p. 91-100.

[0371] 26. Barry, F., et al., *The SH-3 and SH-4 antibodies recognize distinct epitopes on CD73 from human mesenchymal stem cells.* Biochem Biophys Res Commun, 2001. 289(2): p. 519-24.

[0372] 27. Alhadlaq, A. and J.J. Mao, *Mesenchymal stem cells: isolation and therapeutics.* Stern Cells Dev, 2004. 13(4): p. 436-48.

[0373] 28. Mikami, Y., et al., *CD271/p75NTR inhibites the differentiation of mesenchymal stem cells into osteogenic, adipogenic, chondrogenic, and myogenic lineages.* Stern Cells Dev, 2010..

[0374] 29. Di Nicola, M., et al., *Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli.* Blood, 2002. 99(10): p. 3838-43.

[0375] 30. Johnson, T.A., F.R. Jirik, and S. Fournier, *Exploring the roles of CD8(+) T lymphocytes in the pathogenesis of autoimmune demyelination.* Semin Immunopathol, 2010. 32(2): p. 197-209.

[0376] 31. Huseby, E.S., C. Ohlen, and J. Goverman, *Cutting edge: myelin basic protein-specific cytotoxic T cell tolerance is maintained in vivo by a single dominant epitope in H-2k mice.* J Immunol, 1999. 163(3): p. 1115-8.

[0377] 32. Tang, Q. and J.A. Bluestone, *Regulatory T-cell physiology and application to treat autoimmunity.* Immunol Rev, 2006. 212: p. 217-37.

[0378] 33. Boumaza, I., et al., *Autologous bone marrow-derived rat mesenchymal stem cells promote PDX-1 and insulin expression in the islets, alter T cell cytokine pattern and preserve regulatory T cells in the periphery and induce sustained normoglycemia.* J Autoimmun, 2009. 32(1): p. 33-4.

[0379] 34. Maccario, R., et al., *Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4+ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype.* Haematologica, 2005. 90(4): p. 516-25.

[0380] 35. Locatelli, F., R. Maccario, and F. Frassoni, *Mesenchymal stromal cells, from indifferent spectators to principal actors. Are we going to witness a revolution in the scenario of allograft and immune-mediated disorders?* Haematologica, 2007. 92(7): p. 872-7.

[0381] 36. Wan, Y.Y. and R.A. Flavell, *Identifying Foxp3-expressing suppressor T cells with a bicistronic reporter.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. 102(14): p. 5126-31.

[0382] 37. Duijvestein et al. Stem Cells 29 (10): 1549-1558 (2011)

[0383] 38. Liang et al. Cell Transplant 20 (9): 1395-1408 (2011)

[0384] 39. Pizarro et al. Trends Mol Med 9 (5): 218-222 (2003)

[0385] 40. Copland et al. IOVS 49 (12): 5458-5465 (2008)

[0386] 41. Wakitani et al. Osteoarthritis and Cartilage 10: 199-206 (2002)

[0387] 42. Mobasheri et al. Histol. Histopathol 24 (3): 347-366 (2009)

[0388] 43. Noth et al. Nat Clin Pract Rheumato 4(7): 371-380 (2008)

[0389] 44. Gotherstrom et al. Am J Obstet Gynecol 190(1): 239-45 (2004)

[0390] 45. Rasmusson et al. Exp. Cell Research 312(12): 2169-79 (2006)

[0391] 46. Newman et al. Inflamm Allergy Drug Targets 8(2): 110-123 (2009)

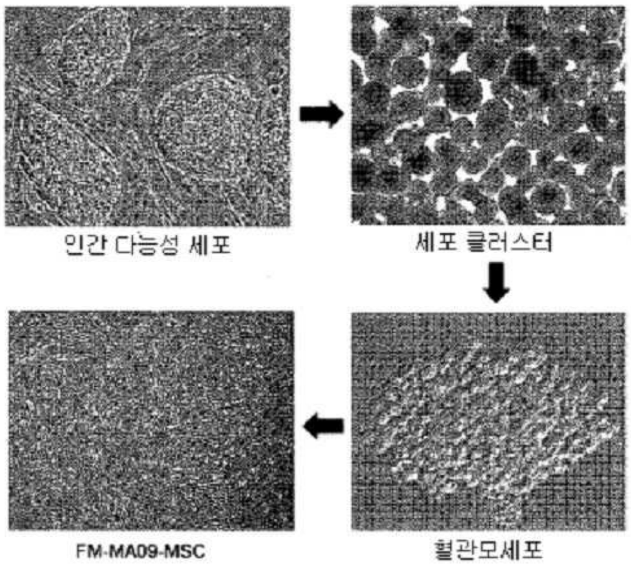
[0392] 47. Le Blanc et al. Exp. Hematol. 31: 890-896 (2003)

[0393] 48. Liu et al. J. of Immunol. 176: 2864-2871 (2006)

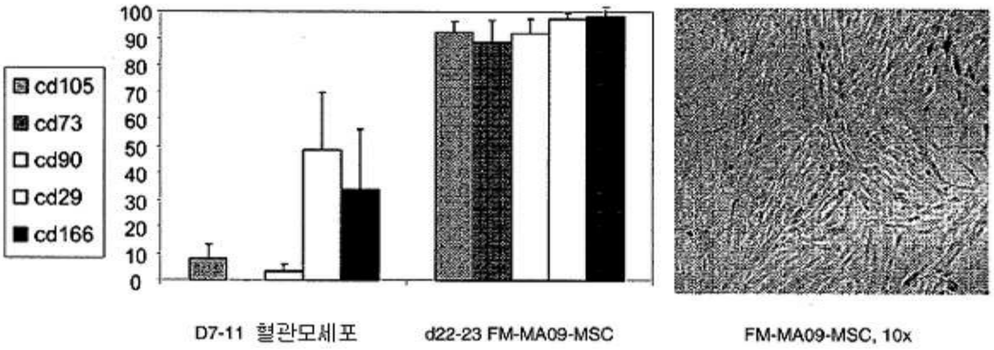
[0394] 본 명세서에 인용된 각 문헌(예를 들면, 미국 특허, 공개된 미국 출원, 비특허 문헌등)은 전체가 본 명세서에 참조로 포함된다.

도면

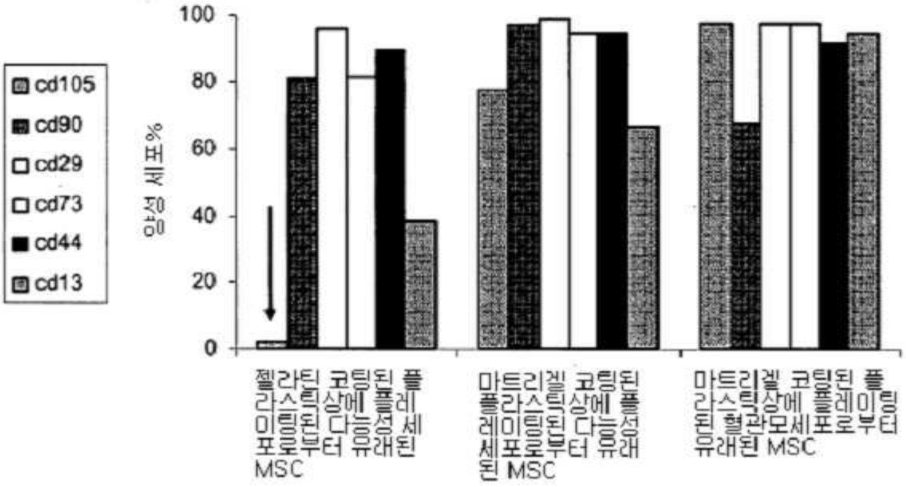
도면1


인간 다능성 세포
세포 클러스터
FM-MA09-MSC
혈관모세포

도면2


cd105
cd73
cd90
cd29
cd166
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
D7-11 혈관모세포
d22-23 FM-MA09-MSC
FM-MA09-MSC, 10x

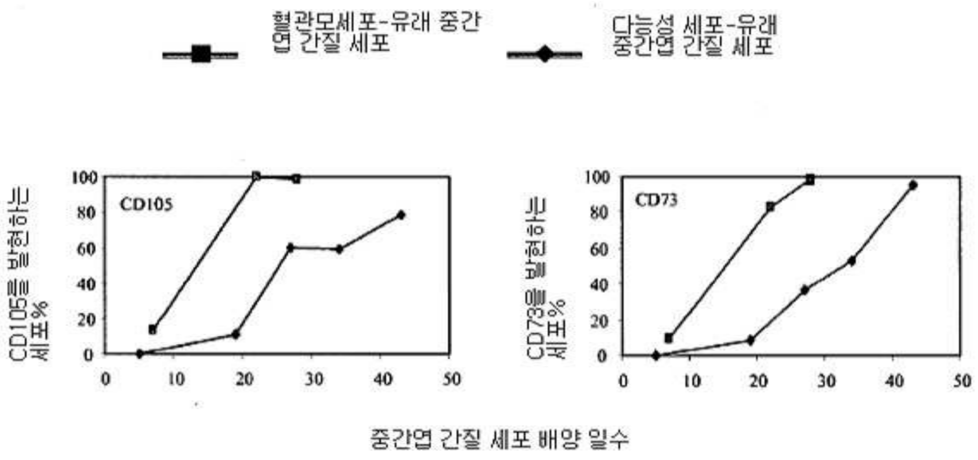
도면3



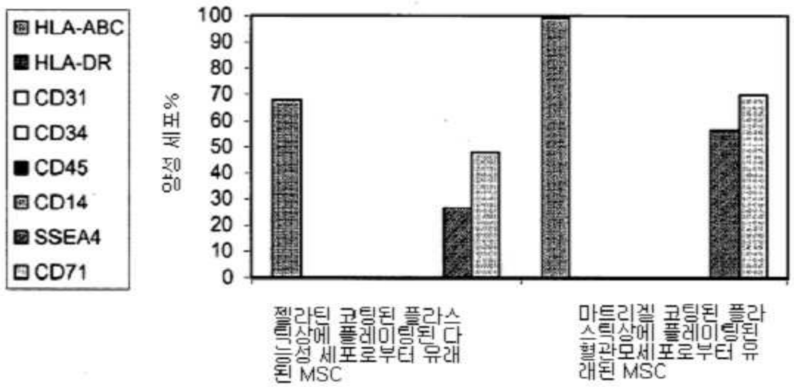
도면4

	젤라틴 코팅된 플라스틱상에 플레이팅된 다능성 세포로부터 유래된 MSC	마트리겔 코팅된 플라스틱상에 플레이팅된 다능성 세포로부터 유래된 MSC	마트리겔 코팅된 플라스틱상에 플레이팅된 혈관모세포로부터 유래된 MSC
출발 다능성 세포수:	300,000	350,000	~200,000
수율:	n/a	4 백만	8천5백만
수율 수집일:	n/a	48일	44일

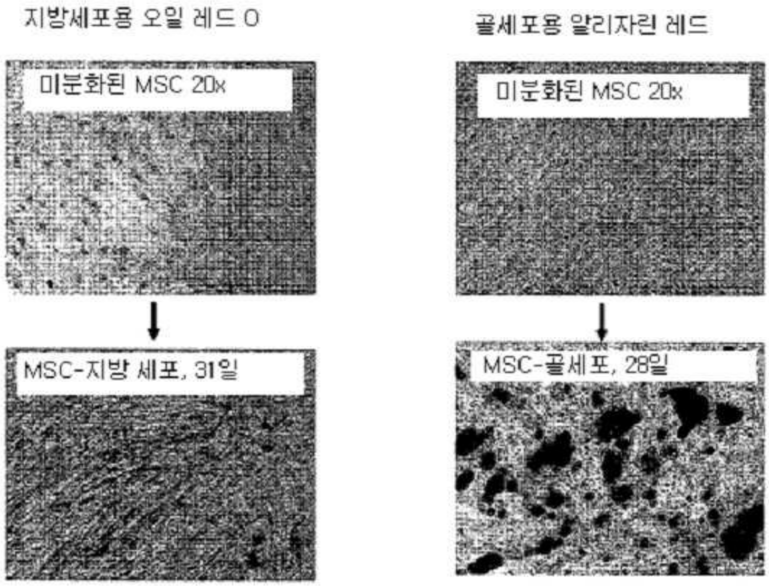
도면5


혈관모세포-유래 중간엽 간질 세포
다능성 세포-유래 중간엽 간질 세포
CD105를 발현하는 세포%
CD105
CD73을 발현하는 세포%
CD73
0
10
20
30
40
50
60
80
100
중간엽 간질 세포 배양 일수

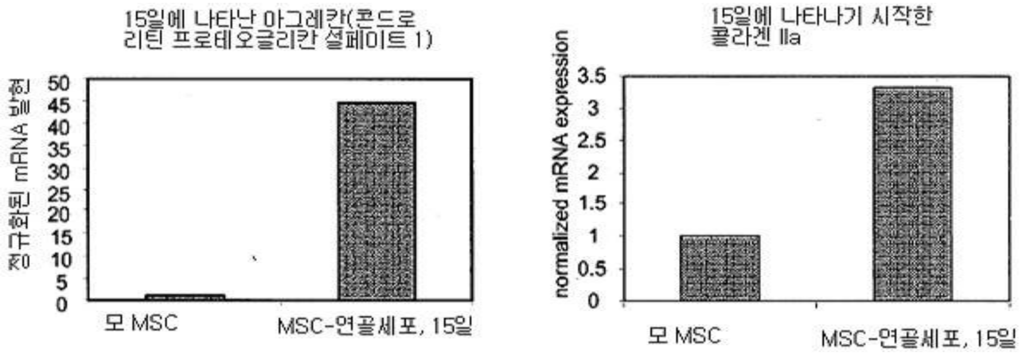
도면6


HLA-ABC
HLA-DR
CD31
CD34
CD45
CD14
SSEA4
CD71
양성 세포%
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
젤라틴 코팅된 플라스틱상에 플레이팅된 다능성 세포로부터 유래된 MSC
마트리겔 코팅된 플라스틱상에 플레이팅된 혈관모세포로부터 유래된 MSC

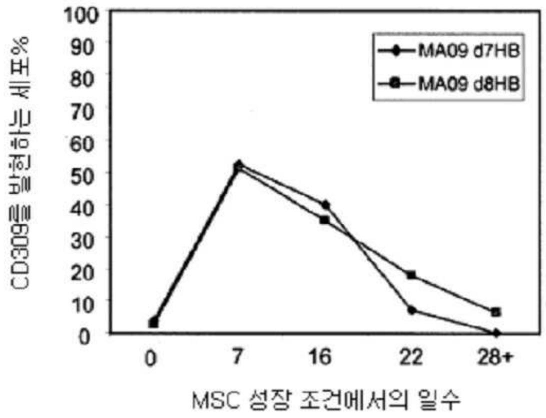
도면7


지방세포용 오일 레드 O
미분화된 MSC 20x
MSC-지방 세포, 31일
골세포용 알리자린 레드
미분화된 MSC 20x
MSC-골세포, 28일

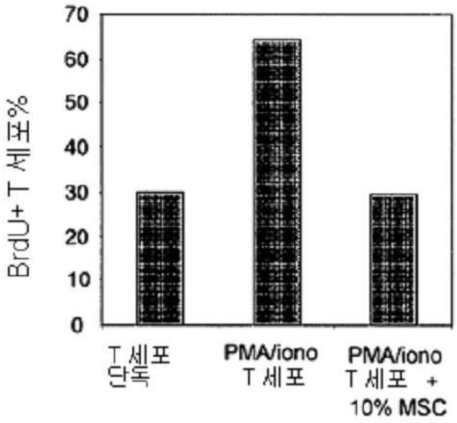
도면8


15일에 나타난 아그레칸(콘드로
리틴 프로테오글리칸 설페이트 1)
정규화된 mRNA 발현
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
모 MSC
MSC-연골세포, 15일
15일에 나타나기 시작한
콜라겐 IIa
normalized mRNA expression
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
모 MSC
MSC-연골세포, 15일

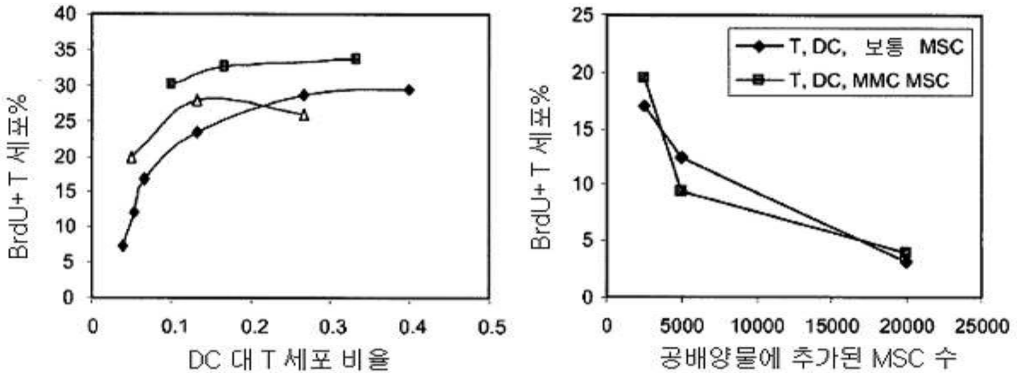
도면9


CD309를 발현하는 세포%
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
MA09 d7HB
MA09 d8HB
0
7
16
22
28+
MSC 성장 조건에서의 일수

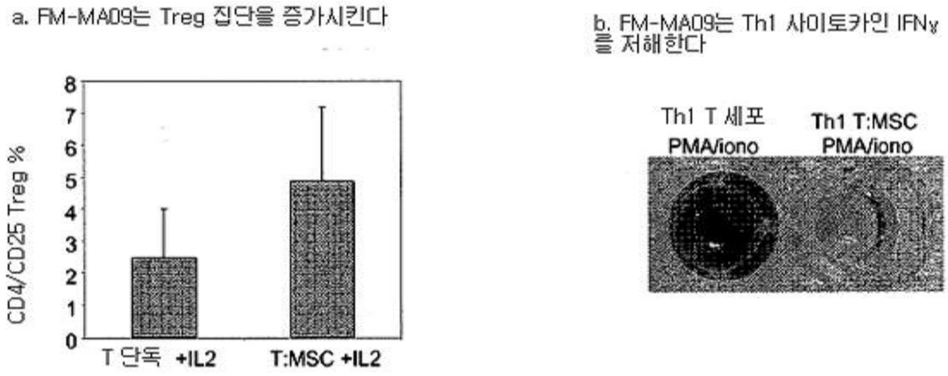
도면10a


BrdU+ T 세포%
70
60
50
40
30
20
10
0
T 세포 단독
PMA/iono T 세포
PMA/iono T 세포 + 10% MSC

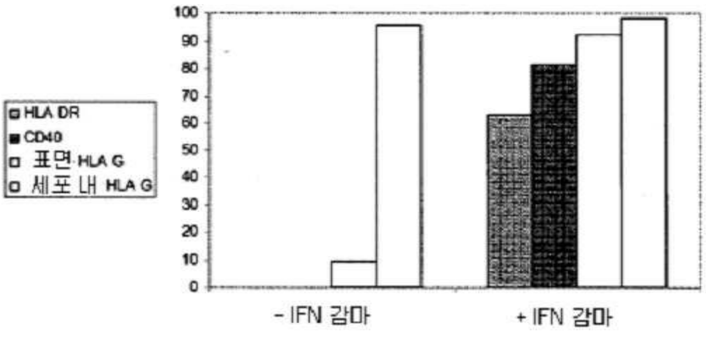
도면10b



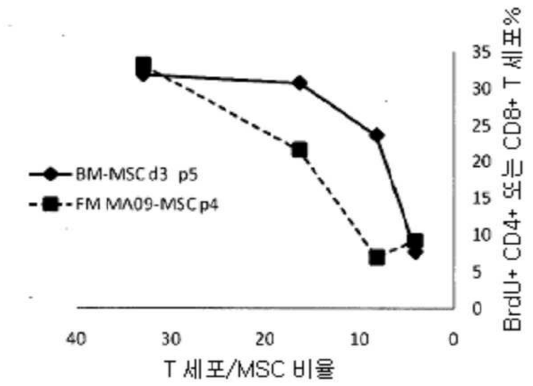
도면11



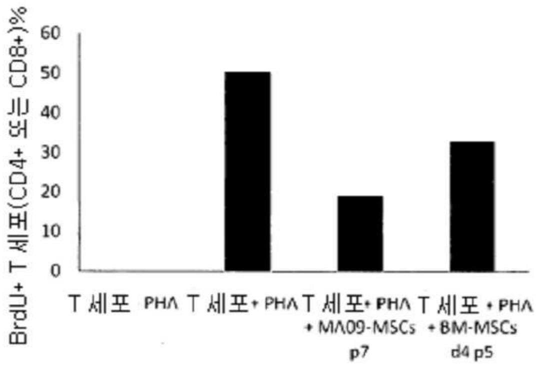
도면12



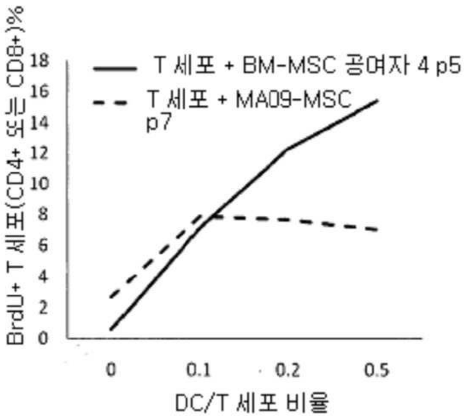
도면13a



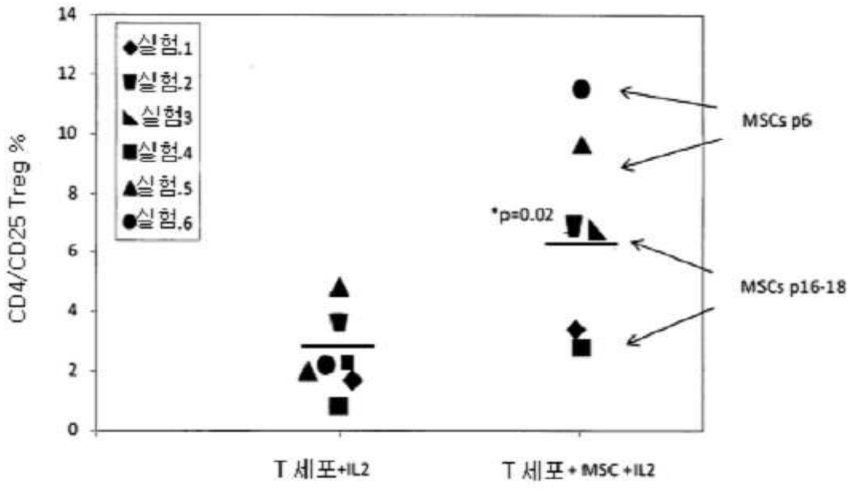
도면13b



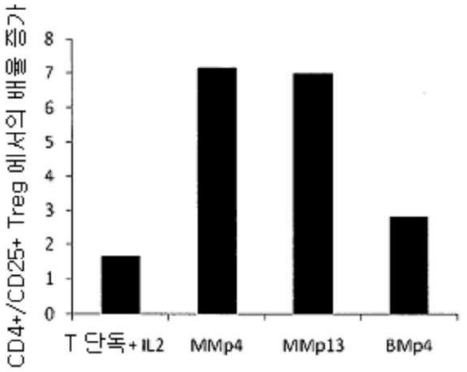
도면13c



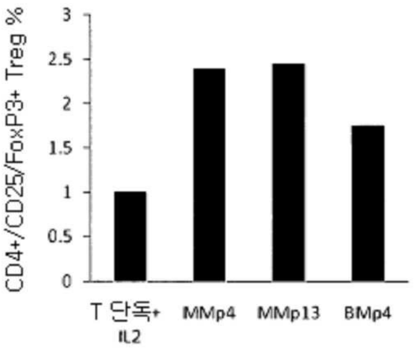
도면14



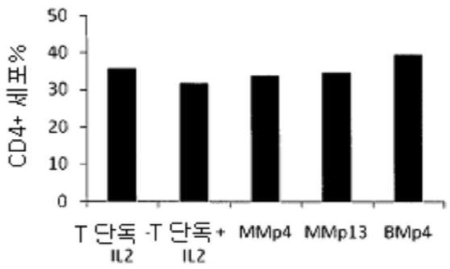
도면15a



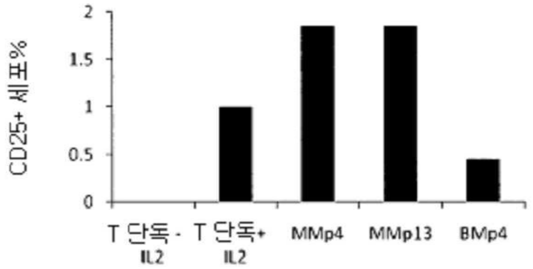
도면15b



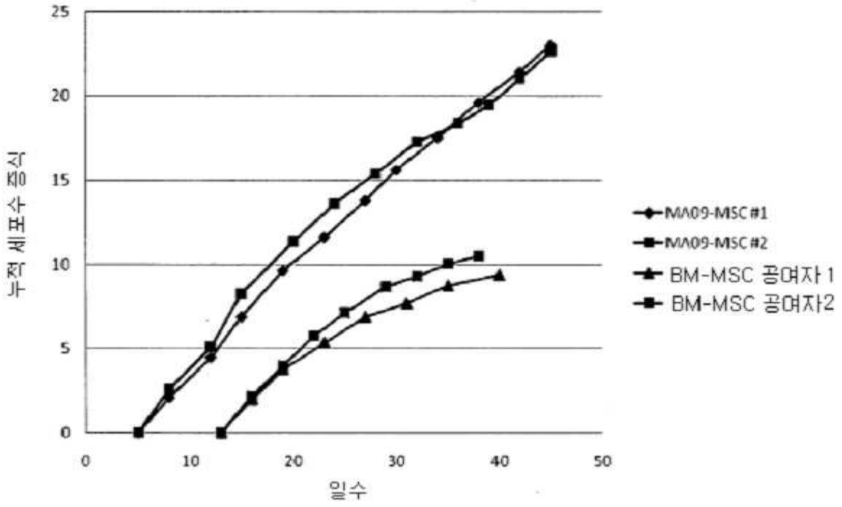
도면15c



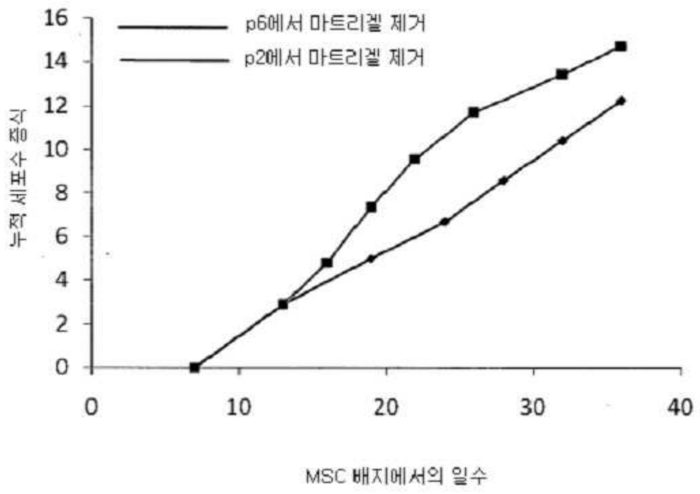
도면15d



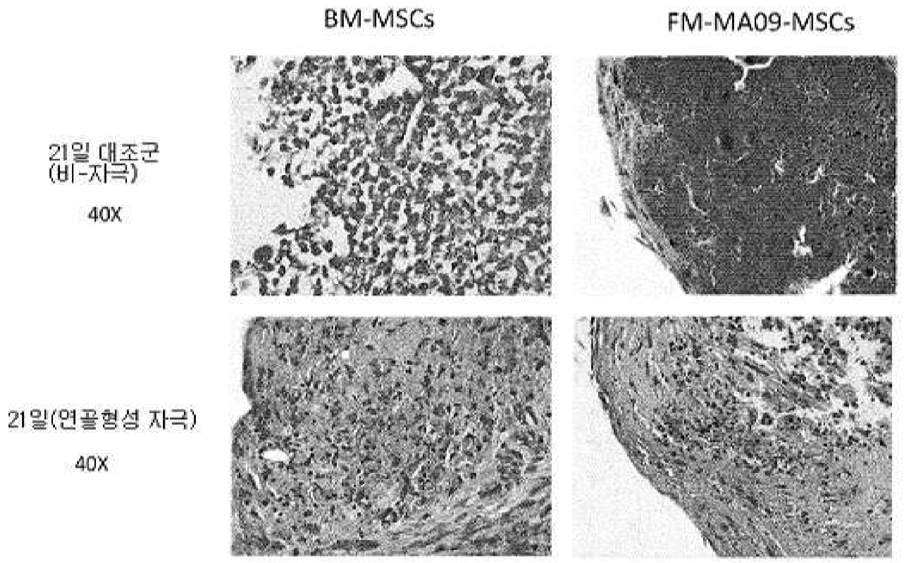
도면16



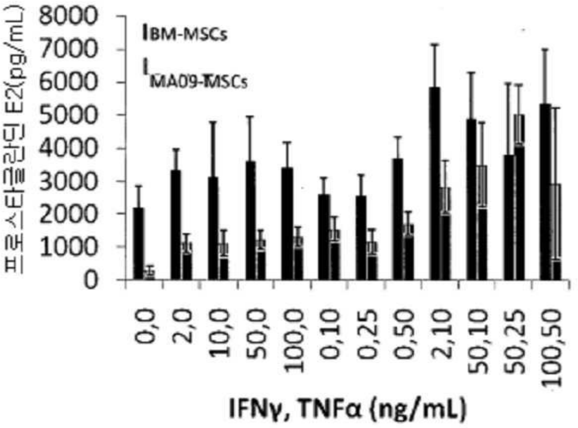
도면17


16
14
12
10
8
6
4
2
0
누적 세포수 증식
p6에서 마트리겔 제거
p2에서 마트리겔 제거
0
10
20
30
40
MSC 배지에서의 일수

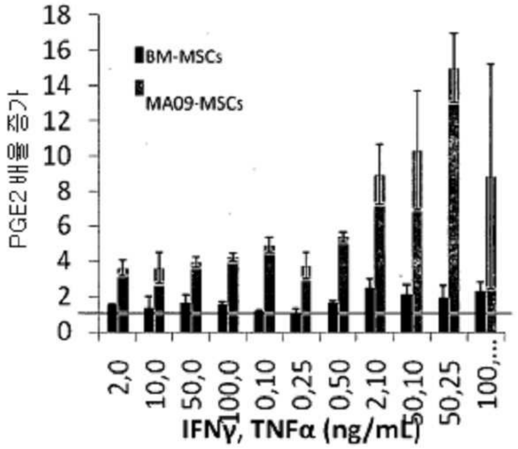
도면18


BM-MSCs
FM-MA09-MSCs
21일 대조군
(비-자극)
40X
21일(연골형성 자극)
40X

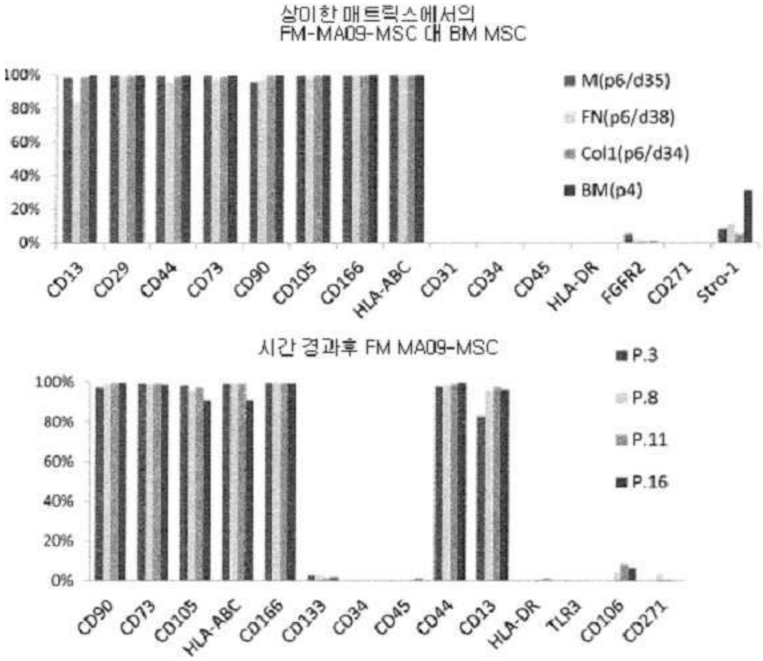
도면19a


프로스타글란딘 E2(pg/mL)
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
BM-MSCs
MA09-MSCs
0,0
2,0
10,0
50,0
100,0
0,10
0,25
0,50
2,10
50,10
50,25
100,50
IFNγ, TNFα (ng/mL)

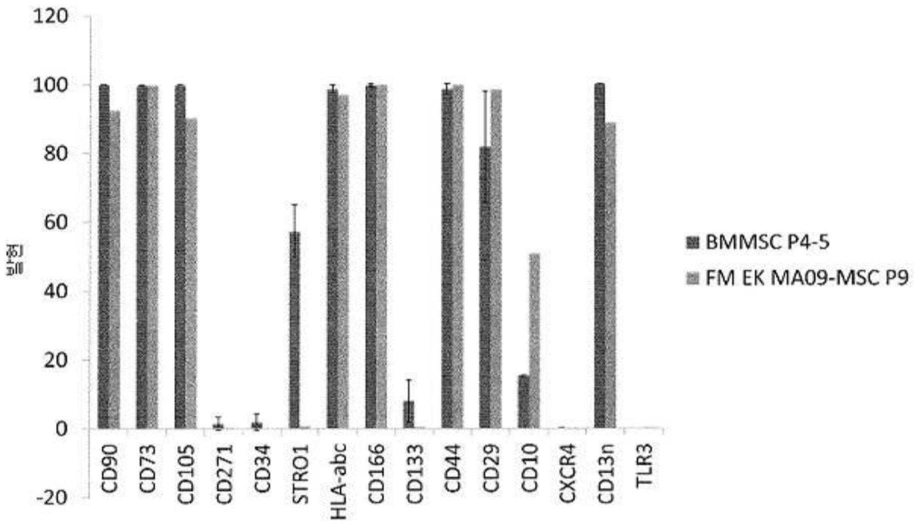
도면19b


PGE2 배율 증가
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
BM-MSCs
MA09-MSCs
2,0
10,0
50,0
100,0
0,10
0,25
0,50
2,10
50,10
50,25
100,...
IFNγ, TNFα (ng/mL)

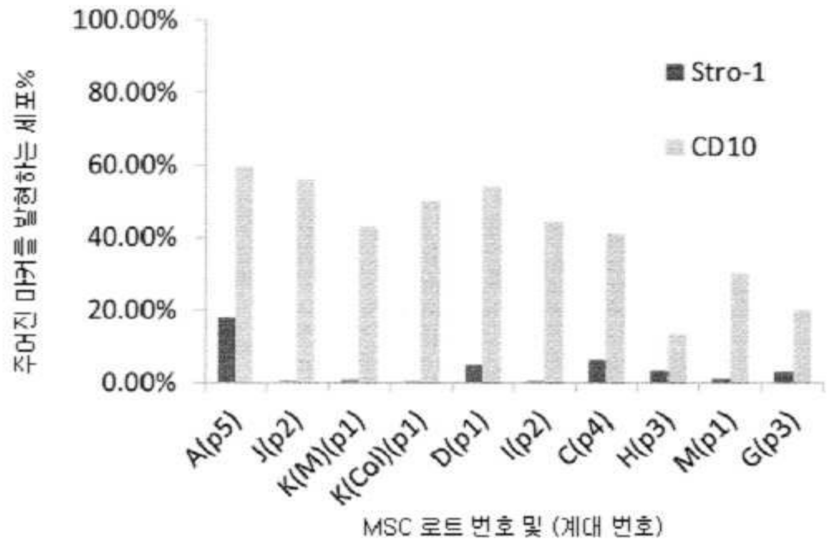
도면20


상이한 매트릭스에서의
FM-MA09-MSC 대 BM MSC
100%
80%
60%
40%
20%
0%
M(p6/d35)
FN(p6/d38)
Col1(p6/d34)
BM(p4)
CD13
CD29
CD44
CD73
CD90
CD105
CD166
HLA-ABC
CD31
CD34
CD45
HLA-DR
FGFR2
CD271
Stro-1
시간 경과후 FM MA09-MSC
P.3
P.8
P.11
P.16
CD90
CD73
CD105
HLA-ABC
CD166
CD133
CD34
CD45
CD44
CD13
HLA-DR
TLR3
CD106
CD271

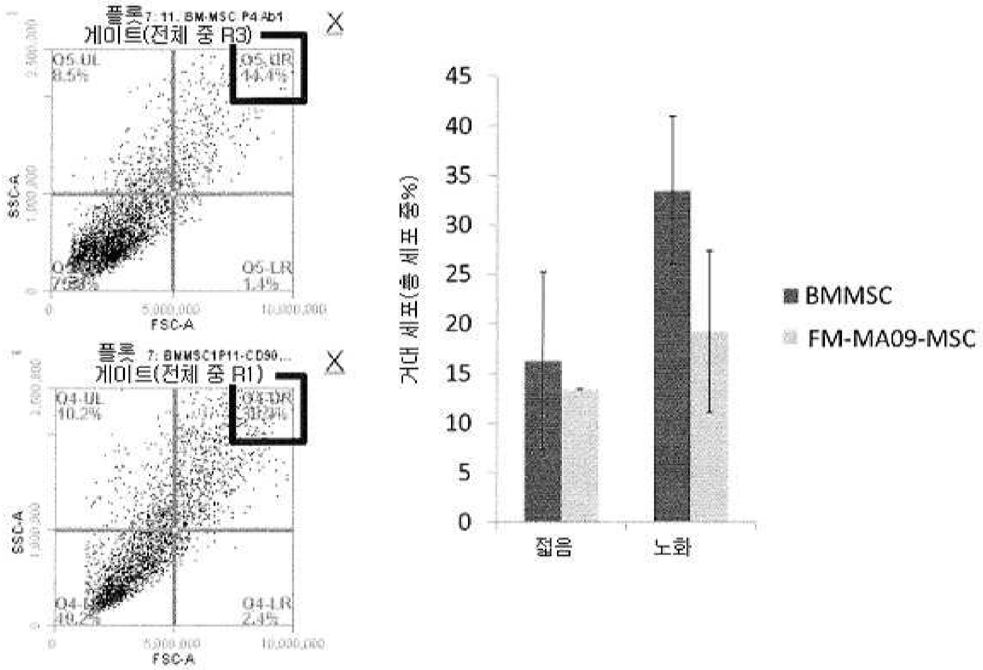
도면21


120
100
80
60
40
20
0
-20
BMMSC P4-5
FM EK MA09-MSC P9
CD90
CD73
CD105
CD271
CD34
STRO1
HLA-abc
CD166
CD133
CD44
CD29
CD10
CXCR4
CD13n
TLR3

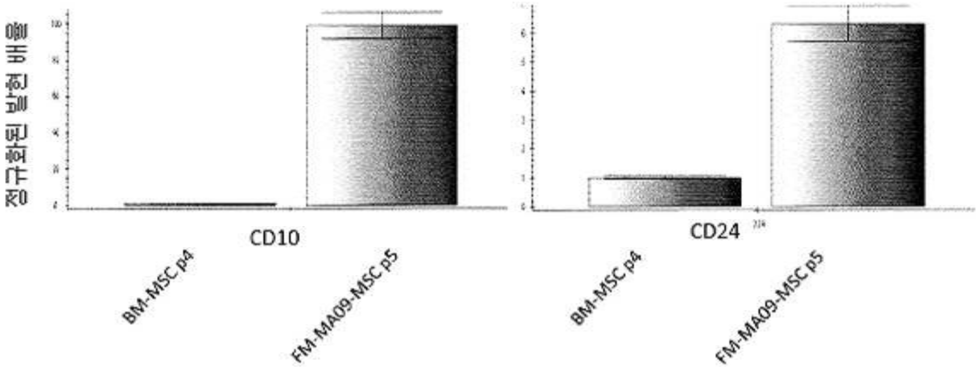
도면22


100.00%
80.00%
60.00%
40.00%
20.00%
0.00%
주어진 마커를 발현하는 세포%
Stro-1
CD10
A(p5)
J(p2)
K(M)(p1)
K(Col)(p1)
D(p1)
I(p2)
C(p4)
H(p3)
M(p1)
G(p3)
MSC 로트 번호 및 (계대 번호)

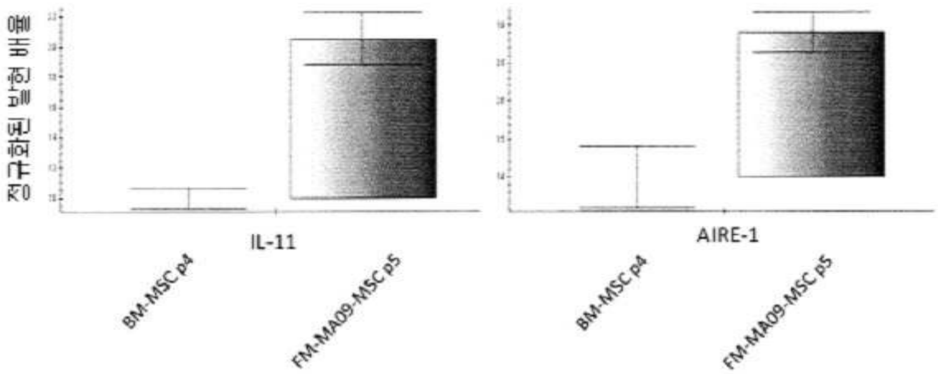
도면23


플롯 7: 11. BM-MSC P4 Ab1
게이트(전체 중 R3)
Q5-UL
8.5%
Q5-UR
44.4%
Q5-LR
1.4%
SSC-A
FSC-A
플롯 7: BMMSC1P11-CD90...
게이트(전체 중 R1)
Q4-UL
10.2%
Q4-LR
2.4%
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
거대 세포(총 세포 중%)
BMMSC
FM-MA09-MSC
젊음
노화

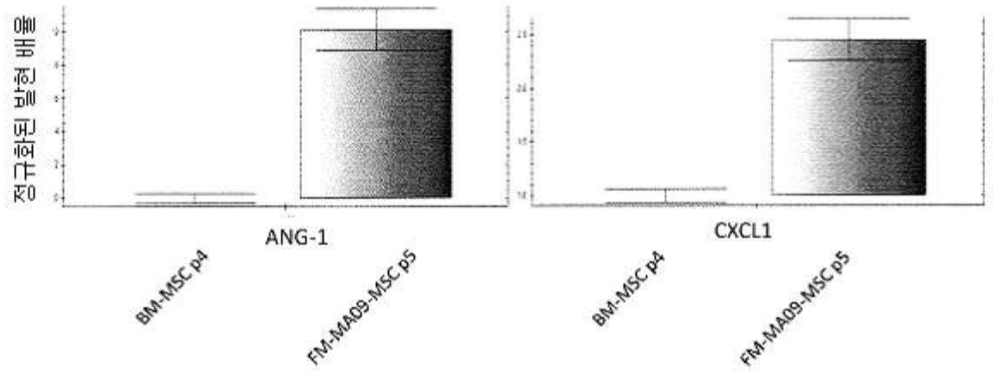
도면24


정규화된 발현 배율
CD10
BM-MSC p4
FM-MA09-MSC p5
CD24
BM-MSC p4
FM-MA09-MSC p5

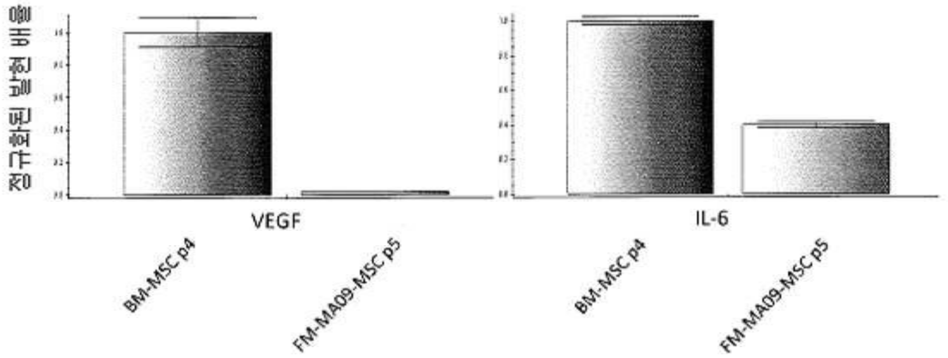
도면25


정규화된 발현 배율
IL-11
BM-MSC p4
FM-MA09-MSC p5
AIRE-1
BM-MSC p4
FM-MA09-MSC p5

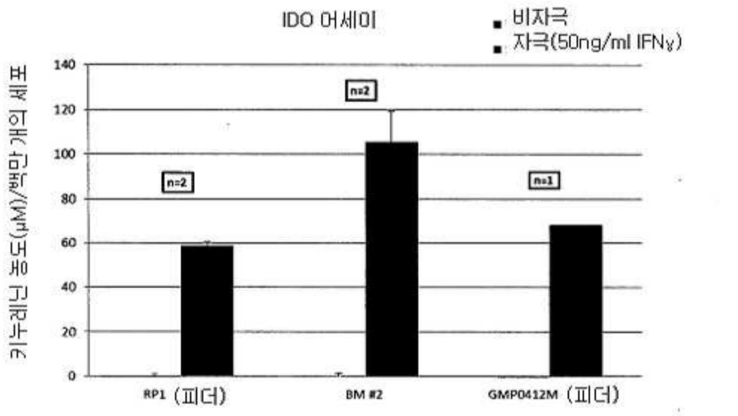
도면26


정규화된 발현 배율
ANG-1
CXCL1
BM-MSC p4
FM-MA09-MSC p5
BM-MSC p4
FM-MA09-MSC p5

도면27

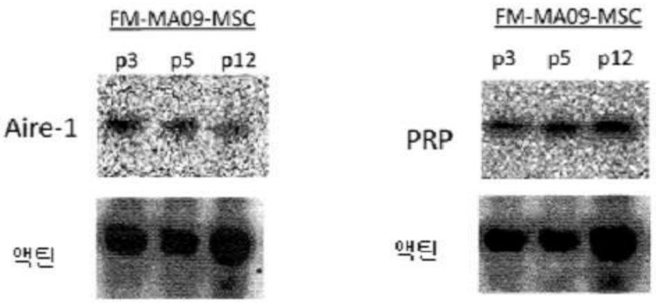

정규화된 발현 배율
VEGF
IL-6
BM-MSC p4
FM-MA09-MSC p5
BM-MSC p4
FM-MA09-MSC p5

도면28

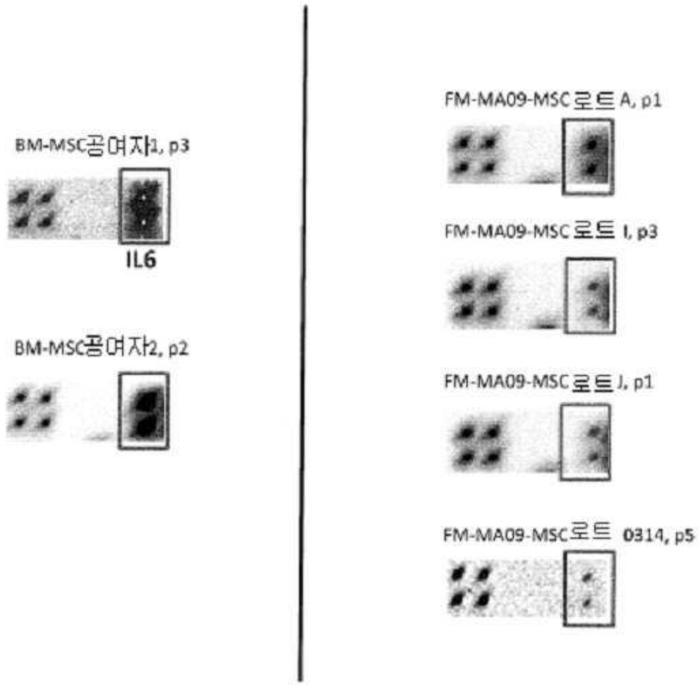


도면: 50 ng/ml IFNɣ로 3일간 자극된 MSC의 얻어진 키누레닌 농도를 사용한 비교. 각 세포주에 대하여 1 x 106개의 세포를 용해하고 IDO 발현에 대해 어세이하였다.

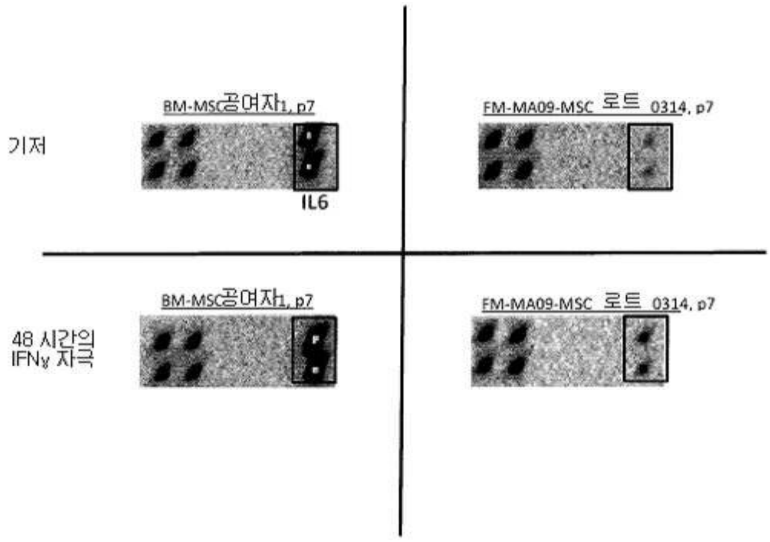
도면29



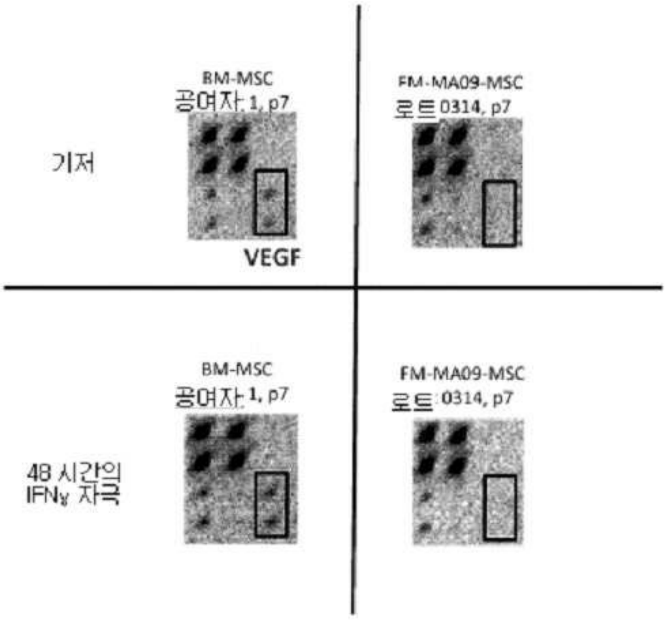
도면30


BM-MSC공여자1, p3
IL6
BM-MSC공여자2, p2
FM-MA09-MSC로트 A, p1
FM-MA09-MSC로트 I, p3
FM-MA09-MSC로트 J, p1
FM-MA09-MSC로트 0314, p5

도면31


기저
BM-MSC공여자1, p7
IL6
FM-MA09-MSC 로트 0314, p7
48 시간의
IFNγ 자극
BM-MSC공여자1, p7
FM-MA09-MSC 로트 0314, p7

도면32


BM-MSC
공여자 1, p7
FM-MA09-MSC
로트 0314, p7
기저
VEGF
BM-MSC
공여자 1, p7
FM-MA09-MSC
로트 0314, p7
48 시간의
IFNγ 자극