



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0029092
(43) 공개일자 2016년03월14일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/071 (2010.01) C12N 5/078 (2010.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 5/0633 (2013.01)
C12N 5/0634 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2016-7002712
- (22) 출원일자(국제) 2015년06월09일
심사청구일자 2016년02월12일
- (85) 번역문제출일자 2016년01월29일
- (86) 국제출원번호 PCT/GB2015/051673
- (87) 국제공개번호 WO 2015/189587
국제공개일자 2015년12월17일
- (30) 우선권주장
1410504.3 2014년06월12일 영국(GB)

- (71) 출원인
셀 테라피 리미티드
영국 스완지 에스에이2 8피피 스완지 유니버시티 스쿨 오브 메디신 룸 137 퍼스트 플로어 인스티튜트 오브 라이프 사이언시스
- (72) 발명자
레지널드, 아얀
영국 스완지 웨스트 글래모건 에스에이2 8피피 싱글턴 파크 스완지 유니버시티 스쿨 오브 메디신 룸 137 퍼스트 플로어 인스티튜트 오브 라이프 사이언시스, 셀 테라피 리미티드
에반스, 마틴 존
영국 스완지 웨스트 글래모건 에스에이2 8피피 싱글턴 파크 스완지 유니버시티 스쿨 오브 메디신 룸 137 퍼스트 플로어 인스티튜트 오브 라이프 사이언시스, 셀 테라피 리미티드
술탄, 사메나
영국 스완지 웨스트 글래모건 에스에이2 8피피 싱글턴 파크 스완지 유니버시티 스쿨 오브 메디신 룸 137 퍼스트 플로어 인스티튜트 오브 라이프 사이언시스, 셀 테라피 리미티드
- (74) 대리인
박장원

전체 청구항 수 : 총 51 항

(54) 발명의 명칭 **면역조절 전구체(IMP) 세포**

(57) 요약

본 발명은 면역조절 전구체 (IMP) 세포 및 치료에 있어서 이들의 용도에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

C12N 2500/84 (2013.01)

C12N 2500/90 (2013.01)

C12N 2506/1353 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

MIC A/B, CD304 (뉴로필린 1), CD178 (FAS 리간드), CD289 (To11-유사 수용체 9), CD363 (스핑고신-1-포스페이트 수용체 1), CD99, CD181 (C-X-C 1형 케모카인 수용체; CXCR1), 표피성장인자 수용체 (EGF-R), CXCR2 및 CD126을 검출가능한 수준으로 발현하는 면역조절 전구체 (IMP) 세포.

청구항 2

제1항에 있어서, IMP 세포는 CD10, CD111, CD267, CD47, CD273, CD51/CD61, CD49f, CD49d, CD146, CD55, CD340, CD91, Notch2, CD175s, CD82, CD49b, CD95, CD63, CD245, CD58, CD108, B2-마이클로글로불린, CD155, CD298, CD44, CD49c, CD105, CD166, CD230, HLA-ABC, CD13, CD29, CD49e, CD59, CD73, CD81, CD90, CD98, CD147, CD151 및 CD276 중 1종 이상을 검출가능한 수준으로 발현하는 것인 IMP 세포.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, IMP 세포는 (a) CD156b, CD61, CD202b, CD130, CD148, CD288, CD337, SSEA-4, CD349 및 CD140b 또는 (b) CD156b, CD61, CD202b, CD130, CD148, CD288, CD337, SSEA-4, CD349, CD140b, CD10, CD111, CD267, CD47, CD273, CD51/CD61, CD49f, CD49d, CD146, CD55, CD340, CD91, Notch2, CD175s, CD82, CD49b, CD95, CD63, CD245, CD58, CD108, B2-마이클로글로불린, CD155, CD298, CD44, CD49c, CD105, CD166, CD230, HLA-ABC, CD13, CD29, CD49e, CD59, CD73, CD81, CD90, CD98, CD147, CD151 및 CD276 중 1종 이상을 검출가능한 수준으로 발현하는 것인 IMP 세포.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, IMP 세포는 CD72, CD133, CD192, CD207, CD144, CD41b, FMC7, CD75, CD3e, CD37, CD158a, CD172b, CD282, CD100, CD94, CD39, CD66b, CD158b, CD40, CD35, CD15, PAC-1, CLIP, CD48, CD278, CD5, CD103, CD209, CD3, CD197, HLA-DM, CD20, CD74, CD87, CD129, CDw329, CD57, CD163, TPBG, CD206, CD243 (BD), CD19, CD8, CD52, CD184, CD107b, CD138, CD7, CD50, HLA-DR, CD158e2, CD64, DCIR, CD45, CLA, CD38, CD45RB, CD34, CD101, CD2, CD41a, CD69, CD136, CD62P, TCR 알파 베타, CD16b, CD1a, ITGB7, CD154, CD70, CDw218a, CD137, CD43, CD27, CD62L, CD30, CD36, CD150, CD66, CD212, CD177, CD142, CD167, CD352, CD42a, CD336, CD244, CD23, CD45RO, CD229, CD200, CD22, CDH6, CD28, CD18, CD21, CD335, CD131, CD32, CD157, CD165, CD107a, CD1b, CD332, CD180, CD65 및 CD24 중 1종 이상을 검출가능한 수준으로 발현하는 것인 IMP 세포.

청구항 5

선행하는 항들 중 어느 하나의 항에 있어서, IMP 세포는 제2항, 제3항 및/또는 제4항에서 정의된 모든 마커들을 검출가능한 수준으로 발현하는 것인 IMP 세포.

청구항 6

선행하는 항들 중 어느 하나의 항에 있어서, IMP 세포는 항체 평균형광강도(MFI)가 MFI가 적어도 210, CD178 (FAS 리간드)의 경우 MFI가 적어도 221, CD289 (To11-유사 수용체 9)의 경우 MFI가 적어도 186, CD363 (스핑고신-1-포스페이트 수용체 1)의 경우 MFI가 적어도 181, CD99의 경우 MFI가 적어도 184, CD181 (C-X-C 1형 케모카인 수용체; CXCR1)의 경우 MFI가 적어도 300, 표피성장인자 수용체 (EGF-R)의 경우 MFI가 적어도 173, CXCR2의 경우 MFI가 적어도 236, CD126의 경우 MFI가 적어도 160인 것인 IMP 세포.

청구항 7

선행하는 항들 중 어느 하나의 항에 있어서, IMP 세포는 MIC A/B, CD304 (뉴로필린 1), CD178 (FAS 리간드), CD289 (To11-유사 수용체 9), CD363 (스핑고신-1-포스페이트 수용체 1), CD99, CD181 (C-X-C 1형 케모카인 수용체; CXCR1), 표피성장인자 수용체 (EGF-R), CXCR2 및 CD126 중 1종 이상을 중간엽 줄기세포 (MSC)에 비해 증

가된 양으로 발현하는 것인 IMP 세포.

청구항 8

선행하는 항들 중 어느 하나의 항에 있어서, IMP 세포는 CD85h, CD111, CD118, CD120a, CD125, CD143, CD148, CD158f, CD191, CD223, CD249, CD85j, CD141, CD324, SSEA-3, CD255, CD79a, CD17, CD218b, CD326, CDw210, CD112, FLMP-R, CD300e, CD86, CD362, CD201, CD215, CDH11, CD275, CD1C 및 CD85d 중 1종 이상을 MSC에 비해 증가된 양으로 발현하는 것인 IMP 세포.

청구항 9

제6항, 제7항 또는 제8항에 있어서, MFI 또는 양은 고처리량 형광활성세포정렬법(HT-FACS)을 이용하여 측정되는 것인 IMP 세포.

청구항 10

선행하는 항들 중 어느 하나의 항에 있어서, IMP 세포는 인터류킨-6 (IL-6), IL-8, C-X-C 모티프 케모카인 10 (CXCL10; 인터페론 감마-유도된 단백질 10; IP-10), 케모카인 (C-C 모티프) 리간드 2 (CCL2; 단백질 화학주성 단백질-1; MCP-1) 및 케모카인 (C-C 모티프) 리간드 5 (CCL5; regulated on activation, normal T cell expressed 및 secreted; RANTES) 중 1종 이상을 검출가능한 양으로 분비하는 것인 IMP 세포.

청구항 11

선행하는 항들 중 어느 하나의 항에 있어서, IMP 세포는 IL-6, IL-8, IP-10, MCP-1 및 RANTES 중 1종 이상의 MSC에 비해 증가된 양으로 발현하는 것인 IMP 세포.

청구항 12

선행하는 항들 중 어느 하나의 항에 있어서, IMP 세포는 표 1에 수록된 모든 마커들을 검출가능한 수준으로 발현하는 것인 IMP 세포.

청구항 13

선행하는 항들 중 어느 하나의 항에 있어서, IMP 세포는 환자의 손상된 특이 조직으로 이동할 수 있는 것인 IMP 세포.

청구항 14

선행하는 항들 중 어느 하나의 항에 있어서, IMP 세포는 환자의 손상된 특이 조직에 부착할 수 있는 것인 IMP 세포.

청구항 15

선행하는 항들 중 어느 하나의 항에 있어서, IMP 세포는 혈관내피를 통해 환자의 손상된 특이 조직으로 이동할 수 있는 것인 IMP 세포.

청구항 16

선행하는 항들 중 어느 하나의 항에 있어서, IMP 세포는 환자의 손상된 특이 조직에서 증식할 수 있는 것인 IMP 세포.

청구항 17

선행하는 항들 중 어느 하나의 항에 있어서, IMP 세포는 환자의 손상된 특이 조직에서 소염 효과를 가질 수 있는 것인 IMP 세포.

청구항 18

선행하는 항들 중 어느 하나의 항에 있어서, IMP 세포는 환자의 손상된 특이 조직에서 혈관형성을 촉진할 수 있는 것인 IMP 세포.

청구항 19

제13항 내지 제18항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 특이 조직은 심장, 뼈, 연골, 힘줄, 인대, 간, 신장 또는 폐 조직인 것인 IMP 세포.

청구항 20

선행하는 항들 중 어느 하나의 항에 있어서, IMP 세포는 시험관내에서 증배업 세포로 분화될 수 있는 것인 IMP 세포.

청구항 21

선행하는 항들 중 어느 하나의 항에 있어서, IMP 세포는 자가(autoologous)인 것인 IMP 세포.

청구항 22

제1항 내지 제20항 중 어느 하나의 항에 있어서, 세포는 동종이계(allogeneic)인 것인 IMP 세포.

청구항 23

선행하는 항들 중 어느 하나의 항에 기재된 2 이상의 IMP 세포들의 세포집단.

청구항 24

면역조절 전구체 (IMP) 세포들의 세포집단으로서, 여기서

- (i) 세포집단 내 세포들의 적어도 90%는 MIC A/B를 검출가능한 수준으로 발현하고,
- (ii) 세포집단 내 세포들의 적어도 60%는 CD304 (뉴로필린 1)을 검출가능한 수준으로 발현하며,
- (iii) 세포집단 내 세포들의 적어도 45%는 CD178 (FAS 리간드)를 검출가능한 수준으로 발현하고,
- (iv) 세포집단 내 세포들의 적어도 10%는 CD289 (To11-유사 수용체 9)를 검출가능한 수준으로 발현하며,
- (v) 세포집단 내 세포들의 적어도 15%는 CD363 (스핑고신-1-포스페이트 수용체 1)을 검출가능한 수준으로 발현하고,
- (vi) 세포집단 내 세포들의 적어도 20%는 CD99를 검출가능한 수준으로 발현하며,
- (vii) 세포집단 내 세포들의 적어도 80%는 CD181 (C-X-C 1형 케모카인 수용체; CXCR1)를 검출가능한 수준으로 발현하고,
- (viii) 세포집단 내 세포들의 적어도 30%는 표피성장인자 수용체 (EGF-R)를 검출가능한 수준으로 발현하며,
- (xi) 세포집단 내 세포들의 적어도 60%는 CXCR2를 검출가능한 수준으로 발현하고, 및
- (x) 세포집단 내 세포들의 적어도 5%는 CD126을 검출가능한 수준으로 발현하는 것인 면역조절 전구체(IMP) 세포들의 세포집단.

청구항 25

제24항에 있어서,

- (i) 세포집단 내 세포들의 적어도 97%는 MIC A/B를 검출가능한 수준으로 발현하고,
- (ii) 세포집단 내 세포들의 적어도 65%는 CD304 (뉴로필린 1)을 검출가능한 수준으로 발현하며,
- (iii) 세포집단 내 세포들의 적어도 51%는 CD178 (FAS 리간드)를 검출가능한 수준으로 발현하고,
- (iv) 세포집단 내 세포들의 적어도 11%는 CD289 (To11-유사 수용체 9)를 검출가능한 수준으로 발현하며,
- (v) 세포집단 내 세포들의 적어도 18%는 CD363 (스핑고신-1-포스페이트 수용체 1)을 검출가능한 수준으로 발현하고,
- (vi) 세포집단 내 세포들의 적어도 24%는 CD99를 검출가능한 수준으로 발현하며,

(vii) 세포집단 내 세포들의 적어도 85%는 CD181 (C-X-C 1형 케모카인 수용체; CXCR1)를 검출가능한 수준으로 발현하고,

(viii) 세포집단 내 세포들의 적어도 33%는 표피성장인자 수용체 (EGF-R)를 검출가능한 수준으로 발현하며,

(xi) 세포집단 내 세포들의 적어도 68%는 CXCR2를 검출가능한 수준으로 발현하고, 및

(x) 세포집단 내 세포들의 적어도 7%는 CD126을 검출가능한 수준으로 발현하는 것인 면역조절 전구체(IMP) 세포들의 세포집단.

청구항 26

제24항 또는 제25항에 있어서, 세포집단 내 세포들의 적어도 90%는 CD10, CD111, CD267, CD47, CD273, CD51/CD61, CD49f, CD49d, CD146, CD55, CD340, CD91, Notch2, CD175s, CD82, CD49b, CD95, CD63, CD245, CD58, CD108, B2-마이크로글로불린, CD155, CD298, CD44, CD49c, CD105, CD166, CD230, HLA-ABC, CD13, CD29, CD49e, CD59, CD73, CD81, CD90, CD98, CD147, CD151 및 CD276 중 1종 이상을 검출가능한 수준으로 발현하는 것인 세포집단.

청구항 27

제26항에 있어서, 세포집단 내 세포들의 적어도 90%는 제26항에 기재된 마커들 모두를 검출가능한 수준으로 발현하는 것인 세포집단.

청구항 28

제24항 내지 제27항 중 어느 하나의 항에 있어서, 세포집단 내 세포들의 적어도 80%는 CD156b, CD61, CD202b, CD130, CD148, CD288, CD337, SSEA-4, CD349 및 CD140b 중 1종 이상을 검출가능한 수준으로 발현하는 것인 세포집단.

청구항 29

제28항에 있어서, 세포집단 내 세포들의 적어도 80%는 제28항에 기재된 마커들 모두를 검출가능한 수준으로 발현하는 것인 세포집단.

청구항 30

제24항 내지 제29항 중 어느 하나의 항에 있어서, 세포집단 내 세포들의 적어도 70%는 CD318, CD351, CD286, CD46, CD119 및 CD132 중 1종 이상을 검출가능한 수준으로 발현하는 것인 세포집단.

청구항 31

제30항에 있어서, 세포집단 내 세포들의 적어도 70%는 제30항에 기재된 마커들 모두를 검출가능한 수준으로 발현하는 것인 세포집단.

청구항 32

제24항 내지 제31항 중 어느 하나의 항에 있어서, 세포집단 내 세포들의 1% 이하가 CD72, CD133, CD192, CD207, CD144, CD41b, FMC7, CD75, CD3e, CD37, CD158a, CD172b, CD282, CD100, CD94, CD39, CD66b, CD158b, CD40, CD35, CD15, PAC-1, CLIP, CD48, CD278, CD5, CD103, CD209, CD3, CD197, HLA-DM, CD20, CD74, CD87, CD129, CDw329, CD57, CD163, TPBG, CD206, CD243 (BD), CD19, CD8, CD52, CD184, CD107b, CD138, CD7, CD50, HLA-DR, CD158e2, CD64, DCIR, CD45, CLA, CD38, CD45RB, CD34, CD101, CD2, CD41a, CD69, CD136, CD62P, TCR 알파 베타, CD16b, CD1a, ITGB7, CD154, CD70, CDw218a, CD137, CD43, CD27, CD62L, CD30, CD36, CD150, CD66, CD212, CD177, CD142, CD167, CD352, CD42a, CD336, CD244, CD23, CD45RO, CD229, CD200, CD22, CDH6, CD28, CD18, CD21, CD335, CD131, CD32, CD157, CD165, CD107a, CD1b, CD332, CD180, CD65 및 CD24 중 1종 이상을 검출가능한 수준으로 발현하는 것인 세포집단.

청구항 33

제32항에 있어서, 세포집단 내 세포들의 1% 이하가 제32항에 기재된 마커들 모두를 검출가능한 수준으로 발현하

는 것인 세포집단.

청구항 34

제24항 내지 제33항 중 어느 하나의 항에 있어서, 세포집단 내 세포들은 제13항 내지 제22항 중 어느 하나의 항에 정의된 특성을 갖는 것인 세포집단.

청구항 35

제23항 내지 제34항 중 어느 하나의 항에 있어서, 세포집단은 적어도 5000 세포, 적어도 50,000 세포 또는 적어도 250,000 세포를 포함하는 것인 세포집단.

청구항 36

(a) 제1항 내지 제22항 중 어느 하나의 항에 기재된 IMP 세포 또는 제23항 내지 제35항 중 어느 하나의 항에 rlwohels 세포집단 및 (b) 약학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제, 1 이상의 리포좀 및/또는 미세기포를 포함하는 의약 조성물.

청구항 37

(a) MCs를 유도하는 조건 하에서 단핵세포 (MCs)를 배양하여 이를 IMP 세포들로 분화시키는 단계 및 (b) 제1항 내지 제8항 중 어느 하나의 항에 정의된 발현 패턴을 갖는 IMP 세포들을 수확 및 배양함으로써 제23항 내지 제35항 중 어느 하나의 항에 기재된 세포집단을 제조하는 단계를 포함하는, IMP 세포들의 세포집단을 생산하는 방법.

청구항 38

제37항에 있어서, MCs는 말초혈액 단핵세포 (PBMCs)인 것인 방법.

청구항 39

제37항 또는 제38항에 있어서, 단계 (a)는 IMP 세포의 부착을 허용하는 조건 하에서 MCs를 배양하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 40

제37항 내지 제39항 중 어느 하나의 항에 있어서, 단계 (a) 및/또는 (b)는 MSCs 및/또는 IMP 세포들을 혈소판 용해물과 함께 배양하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 41

제37항 내지 제40항 중 어느 하나의 항에 있어서, MCs는 환자로부터 또는 동종이게 공여자로부터 수득되는 것인 방법.

청구항 42

환자의 손상된 조직을 복구하는 방법으로서, 상기 방법은 제23항 내지 제35항 중 어느 하나의 항에 기재된 세포 집단 또는 제36항에 기재된 의약 조성물을 환자에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 상기 세포집단 또는 조성물은 치료적으로 유효한 갯수의 세포를 포함함으로써, 환자의 손상된 조직을 치료하는 것인 방법.

청구항 43

제42항에 있어서, 조직은 중배엽으로부터 유래하는 것인 방법.

청구항 44

제43항에 있어서, 조직은 심장, 뼈, 연골, 힘줄, 인대, 간, 신장 또는 폐 조직인 것인 방법.

청구항 45

제42항 내지 제44항 중 어느 하나의 항에 있어서, 조직은 상처 또는 질병에 의해 손상된 것인 방법.

청구항 46

제45항에 있어서, 상기 방법은 심장, 뼈, 연골, 힘줄, 인대, 간, 신장 또는 폐의 손상 또는 환자의 질병을 치료하기 위한 것인 방법.

청구항 47

제46항에 있어서, 심장의 손상 또는 질환은 심근경색, 좌심실비대, 우심실비대, 색전, 심부전, 선천성 심장질환, 심장판막질환, 부정맥 및 심근염으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 48

제46항에 있어서, 뼈의 손상 또는 질환은 골절, 슬터-해리스 골절, 불완전 골극골절, 뼈 돌출, 두개골유합, 코핀-로우리 증후군, 진행성 골화성 섬유성 골 이형성증, 섬유형성 이상, 풍 질환 (또는 녹색손발톱 증후군), 저인산증, 클리펠-파일 증후군, 대사성 골질환, 녹색손발톱 증후군, 골관절염, 변형성골염 (또는 뼈의 파렛씨병), 낭성 섬유성 골염 (또는 섬유성 골염 또는 뼈의 폰 텍클링하우젠씨병), 치골염, 치밀화 골염 (또는 osteitis condensans), 장골 치밀화 골염, 박리성 뼈연골염, 불완전 골형성, 골연화증, 골수염, 골감소증, 골화석증, 골다공증, 골괴사, 다공성 파골증(porotic hyperostosis), 원발성 부갑상선 항진증, 신장성 골형성장애, 골암, 전이암과 연관된 뼈 병변, 골함 스타우트병, 원발성 부갑상선 항진증, 치주질환, 및 골대체제의 무균 이완 (aseptic loosening of joint replacements)으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 49

제42항 내지 제48항 중 어느 하나의 항에 있어서, 세포집단은 환자 또는 동종이계 공여자로부터 수득된 MCs를 이용하여 생산되는 것인 방법.

청구항 50

환자의 손상된 조직을 복구하기 위한 방법에 사용되기 위한, 제23항 내지 제35항 중 어느 하나의 항에 기재된 세포집단 또는 제36항에 기재된 의약 조성물.

청구항 51

심장, 뼈, 연골, 힘줄, 인대, 간, 신장 또는 폐의 손상 또는 환자의 질병을 치료하기 위한 방법에 사용되기 위한, 제23항 내지 제35항 중 어느 하나의 항에 기재된 세포집단 또는 제36항에 기재된 의약 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 면역조절 전구체 (IMP: Immuno-Modulatory Progenitor) 세포 및 치료 분야에 있어서 이들의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 중배엽 세포는 몇몇 조직으로부터 유도되어 다른 세포 종류의 지지체 구조로서 작용하는 세포이다. 예컨대 골수는 조혈세포와 중간엽 유도 세포 두 가지 모두로 만들어진다. 두 가지 주요 중간엽 세포 유형이 이전부터 설명되어 특징화되어왔는데, 즉 골수에서 발견되는 (i) 중간엽 전구체 세포 (MPCs)와 (ii) 중간엽 줄기세포 (MSCs) 및 이들 전구체가 그들이다. 중간엽 줄기세포 (MSCs)는 다능성의 성체 줄기세포이다. MSCs는 분화하여 골격 조직에서 발견되는 여러가지 특화된 세포들을 형성한다. 예를 들어, 이들은 연골세포(chondrocytes), 골세포(osteoblasts), 지방 세포(adipocyte)로 분화될 수 있다.

[0003] MSCs는 노화관련 황반변성(Age-related Macular Degeneration: AMD) 및 심근경색의 치료와 같은 다양한 치료에 사용되고 있다. 일단 환자에 투여되면, MSCs는 일반적으로 손상된 조직으로 이동하거나 (또는 귀소)하여 측분비 시그널링 및 손상된 조직의 이웃 세포들의 생존, 복구 및 재생 촉진을 통해 그의 효과를 발휘한다.

[0004] 현행 치료법들에서는 대체로 MSC 서브타입들의 혼합물을 주입하고 있는데 서브타입들 중 몇몇은 목적하는 조직으로 효과적으로 이동하지 않는다. 이 때문에 높은 세포 투여량을 사용할 것이 요구되고 이는 다시 표적을 빚나

간 부작용에 이르거나 용량-관련 부작용으로 이어질 수 있다. MSCs는 일반적으로 골수로부터 수득되는데 대량으로 수득하기는 어렵다.

발명의 내용

해결하려는 과제

발명의 개요

본 발명은 이전까지 동정되거나 분리된 바 없는 신규한 세포 유형인 면역조절 전구체 세포(immuno-modulatory progenitor cell)에 관한 것이다. 이 IMP 세포는 매우 독특하며 개선된 면역조절능을 부여하는 그의 기능, 특징 및 조성 측면에서 MSCs 및 MPCs 두 가지 모두와 다르다.

본 발명자들은 놀랍게도 특이적인 마커 발현 패턴을 갖는 이 새로운 면역조절 전구체 (IMP) 세포를 동정해냈다. 특히, IMP 세포는 MIC A/B, CD304 (뉴로필린 1), CD178 (FAS 리간드), CD289 (To11-유사 수용체 9), CD363 (스핑고신-1-포스페이트 수용체 1), CD99, CD181 (C-X-C 1형 케모카인 수용체; CXCR1), 표피성장인자 수용체 (EGF-R), CXCR2 및 CD126를 발현한다. IMP 세포는 이들 마커들을 중간엽 줄기세포 (MSC)보다 훨씬 더 많은 양으로 발현한다. 본 발명의 IMP 세포들은 단핵세포 (MCs), 예컨대 말초혈액 MCs로부터 분리될 수 있다. IMP 세포들은 손상된 조직에 효과적으로 이동하여 이들을 복구시킬 수 있다. 특히, 이 세포들은 귀소(homing), 부착(adherence), 이행(transmigration), 증식, 혈관형성 효과 및 측분비 시그널링이 가능하다.

따라서, 본 발명은 MIC A/B, CD304 (뉴로필린 1), CD178 (FAS 리간드), CD289 (To11-유사 수용체 9), CD363 (스핑고신-1-포스페이트 수용체 1), CD99, CD181 (C-X-C 1형 케모카인 수용체; CXCR1), 표피성장인자 수용체 (EGF-R), CXCR2 및 CD126를 검출가능한 수준으로 발현하는 면역조절 전구체 (IMP) 세포를 제공한다.

본 발명은 또한:

- 본 발명의 2 이상의 IMP 세포들의 세포집단;

- 면역조절 전구체 (IMP) 세포들의 세포집단으로서, 여기서

(i) 세포집단 내 세포들의 적어도 90%는 MIC A/B를 검출가능한 수준으로 발현하고,

(ii) 세포집단 내 세포들의 적어도 60%는 CD304 (뉴로필린 1)을 검출가능한 수준으로 발현하며,

(iii) 세포집단 내 세포들의 적어도 45%는 CD178 (FAS 리간드)를 검출가능한 수준으로 발현하고,

(iv) 세포집단 내 세포들의 적어도 10%는 CD289 (To11-유사 수용체 9)를 검출가능한 수준으로 발현하며,

(v) 세포집단 내 세포들의 적어도 15%는 CD363 (스핑고신-1-포스페이트 수용체 1)을 검출가능한 수준으로 발현하고,

(vi) 세포집단 내 세포들의 적어도 20%는 CD99를 검출가능한 수준으로 발현하며,

(vii) 세포집단 내 세포들의 적어도 80%는 CD181 (C-X-C 1형 케모카인 수용체; CXCR1)를 검출가능한 수준으로 발현하고,

(viii) 세포집단 내 세포들의 적어도 30%는 표피성장인자 수용체 (EGF-R)를 검출가능한 수준으로 발현하며,

(ix) 세포집단 내 세포들의 적어도 60%는 CXCR2를 검출가능한 수준으로 발현하고, 및

(x) 세포집단 내 세포들의 적어도 5%는 CD126를 검출가능한 수준으로 발현하는 것인 면역조절 전구체 세포들의 세포집단;

- (a) 본 발명의 IMP 세포 또는 본 발명의 세포집단 및 (b) 약학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제, 1종 이상의 리포솜 및/또는 1종 이상의 마이크로버블을 포함하는 의약 조성물;

- (a) MCs를 유도하는 조건 하에서 단핵세포 (MCs)를 배양하여 이를 IMP 세포들로 분화시키는 단계 및 (b) 상기 정의한 바와 같은 발현 패턴을 갖는 IMP 세포들을 수확 및 배양함으로써 본 발명의 세포집단을 제조하는 단계를 포함하는, 본 발명의 IMP 세포의 세포집단을 제조하는 방법;

- 환자에 있어서 손상된 조직을 복구하는 방법으로서, 상기 환자에게 치료적으로 유효한 갯수의 세포를 포함하는 본 발명의 세포집단 또는 의약 조성물을 투여함으로써, 상기 환자의 손상된 조직을 치료하는 것을 포함하는,

환자에 있어서 손상된 조직을 복구하는 방법;

- [0025] - 환자에 있어서 손상된 조직을 복구하는 방법에 사용되기 위한, 본 발명의 세포집단 또는 본 발명의 의약 조성물; 및
- [0026] - 환자에 있어서 심장, 뼈, 연골, 힘줄, 인대, 간, 신장 또는 폐의 손상 또는 질환을 치료하는 방법에 사용하기 위한 본 발명의 세포집단 또는 본 발명의 의약 조성물
- [0027] 을 제공한다.

과제의 해결 수단

발명의 상세한 설명

- [0029] 다양한 적용예로, 상기 개시된 물(物) 및 방법을 기술분야의 특별한 요구 사항에 맞추어 다양한 적절히 조절할 수 있음을 이해하여야 한다. 본 명세서에서 사용된 용어들은 본 발명의 특정 구체예를 설명하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위를 한정하려는 의도는 아님을 이해하여야 한다.
- [0030] 이에 더해, 본 명세서와 첨부된 청구범위에서, 단수 형태 "a", "an", 및 "the"는 문맥상 달리 반대되는 의미가 아닌 한, 복수 개념을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 따라서, 예컨대, "세포 (a cell)"라는 표현은 "세포들 (cells)"를 포함하며 "조직 (a tissue)"라는 표현은 이러한 조직 2개 이상을 포함하는 것일 수 있고, "환자 (a patient)"는 2명 이상의 환자를 포함하는 것일 수 있다.
- [0031] 본 명세서에 인용된 모든 간행물, 특허 및 특허출원은 그 내용 전체가 본 발명에 참조 병합된다.
- [0032] 본 발명의 IMP 세포
- [0033] 본 발명은 면역조절 전구체 (IMP) 세포를 제공한다. IMP 세포는 MIC A/B, CD304 (뉴로필린 1), CD178 (FAS 리간드), CD289 (Toll-유사 수용체 9), CD363 (스핑고신-1-포스페이트 수용체 1), CD99, CD181 (C-X-C 1형 케모카인 수용체; CXCR1), 표피성장인자 수용체 (EGF-R), CXCR2 및 CD126을 검출가능한 수준으로 발현한다.
- [0034] MIC는 NK 살해에 대한 세포들의 민감성을 감소시킴으로써 염증 맥락에서 세포들의 면역-거동을 순응시킨다.
- [0035] CD304 (별칭 뉴로필린 1)은 혈관내피 성장인자 (VEGF)에 대한 공통 수용체이며 혈관형성, 혈관형성, 세포생존, 이동 및 침습에서 어떤 역할을 한다.
- [0036] CD178 (별칭 FAS 리간드)은 세포 표현형을 유지하고 분화를 조절한다. 이것은 또한 세포들의 증식을 가능하게도 한다. 비록 FAS 리간드는 주로 세포괴사 시그널링과 관련하여 알려져 있지만 FAS 및 FAS 리간드 발현 세포들이 FAS-유도된 세포자멸사에 내성인 것으로 나타났다.
- [0037] CD289 (별칭 Toll-유사 수용체 9)는 면역 응답의 조절과 관련이 있고 표적 조직을 향한 세포 이동을 용이하게 할 수 있다.
- [0038] CD363 (별칭은 스팅고신-1-포스페이트 수용체 1임)의 지속적인 활성화는 생체내(인 비보)에서 세포의 생착 (engraftment)를 증가시킨다. CD363은 또한 혈관형성을 촉진하고, 세포 귀소(homing)를 조정하며, 세포의 수송 (trafficking) 및 이동을 조정하고 화학주성을 제어한다.
- [0039] CD99는 세포부착(cell adhesion) 및 이행(transmigration)과 연관되어 있다.
- [0040] 인터류킨-8 (IL-8) 수용체에는, 두 가지 부류가 있는데 CXCR1 (또는 CD181)과 CXCR2가 그것이다. 이들 두 가지 수용체는 모두 다른 CXC 케모카인과는 대조적으로 IL-8에 고친화성으로 결합한다. 기능적으로, CXCR1 및 CXCR2는 증식, 이동, 침습 및 혈관형성에 유의한 역할을 하는 것으로 나타났다. 손상된 조직들은 다양한 용해성 염증 인자, 예컨대 대식세포 이동 억제인자(MIF: 대식세포 이동억제인자) 및 인터류킨-8를 방출하고 이들 인자들은 본 발명의 IMP 세포들 (및 기타 염증 세포들)을 CXCR1 및/또는 CXCR2에 대한 결합을 통해 손상된 조직으로 유인할 수 있다.
- [0041] EGF-R은 세포 이동, 부착 및 증식에 관여한다.
- [0042] CD126 (별칭 IL-6R1임)은 면역-특권(immune-privilege)을 증가시킨다.
- [0043] 본 발명의 IMP 세포들은 수많은 장점을 갖는다. 가장 중요한 장점을 이하에 요약한다. 그러나, 또 다른 추가의 장점들도 이하의 설명으로부터 명확히 이해될 수 있을 것이다.

- [0044] 본 발명의 IMP 세포들은 환자의 손상된 조직을 복구시키는데 유리하게 이용될 수 있다. IMP 세포들은 손상된 조직에 효과적으로 이동 (또는 귀소)하여 그 조직에서 소염효과를 발휘할 수 있다. 이에 관하여는 이하에서 보다 자세히 설명한다. IMP 세포의 가장 중요한 능력들 중 한 가지는 화학주성(chemoaxis)과 연관된, 손상된 부위로 이동 (또는 귀소)한다는 것이다. 이것은 케모카인-시그널링에 기반한 것으로서 롤링, 부착 및 이행과 같은 메카니즘을 이용하는 것이다. IMP 세포들의 소염효과는 손상된 조직 내의 이웃하는 세포들의 생존, 회복 및 재생을 촉진한다. 이 세포들은 또한 혈관형성인자, 화학주성인자 및 항세포자멸사인자의 분비와 같은 측분비 효과도 발휘할 수 있다. 이에 대하여는 이하에 상세히 설명하기로 한다.
- [0045] 이하에서 보다 상세히 설명하겠지만, IMP 세포들은 인간 개체와 같은 개체로부터 취해진 단핵세포 (MCs), 예컨대 말초 MCs로부터 생산된다. IMP 세포들은 MCs로부터 생산되기 때문에, 이들은 쉽게 (예컨대 말초혈액으로부터) 생산될 수 있고 치료하고자 하는 환자와 자가(autologous) 특성을 가질 수 있으므로 해서 환자에 의한 면역학적 거부 위험을 회피할 수 있다.
- [0046] 다양한 MC 샘플 (즉 다양한 혈액 샘플)을 얻을 수 있으므로, 이론 상 한 명의 개체로부터 IMP 세포를 무제한적인 수로 생산할 수 있다. 단일 개체로부터 대단히 많은 수의 IMP 세포를 생산할 수 있다는 것은 분명하다. 본 발명의 IMP 세포들은 따라서 대량으로 만들어낼 수 있다.
- [0047] 본 발명의 IMP 세포들은 임상적으로 적절한 조건, 예컨대 미량의 내독소 및 환경 오염물질 및 소태아 혈청과 같은 동물제품 부재 하에 생산된다. 이 때문에 본 발명의 IMP 세포들은 환자에게 투여하기에 특히 적합하다.
- [0048] 본 발명의 IMP 세포들은 MCs로부터 생산되기 때문에, 이들은 실질적으로 동종(homologous)이면서 자가(autologous)일 수 있다. 이들은 또한 MCSs에서 흔히 발생하는 공여자-투-공여자(donor-to-donor) 변이도 회피한다. 본 발명의 IMP 세포들의 무수한 세포집단들은 화학요법 또는 방사선요법과 같은 다른 치료를 개시하기 전에 환자로부터 취해진 단일 샘플로부터 제조될 수 있다. 따라서, 본 발명의 IMP 세포들은 이러한 치료로 인한 해로운 효과를 완전히 피할 수 있다.
- [0049] 본 발명의 IMP 세포들은 신속한 생산할 수 있다. IMP, 세포들은 MC로부터 30일 이내, 예컨대 약 22일 만에 만들어낼 수 있다.
- [0050] MCs로부터의 IMP 세포의 생산은 인간 배아줄기세포(hESCs)로부터 유도되는 중간엽 줄기세포 MSCs의 이용과 연관된 도덕적이고 윤리적인 연루문제를 피할 수 있다.
- [0051] 본 발명의 IMP 세포들은 일반적으로 인간 MCs로부터 만들어진다. 본 발명의 IMP 세포들은 따라서 전형적으로는 인간의 세포들이다. 별법으로, IMP 세포들은 말, 소, 양 또는 돼지와 같은 상업적으로 길러지는 동물들, 마우스나 래트와 같은 실험실 동물, 또는 고양이, 개, 토끼 또는 기니피그와 같은 애완동물 등의 인간 이외의 다른 동물 또는 포유동물로부터의 MCs로부터 생산될 수도 있다.
- [0052] 본 발명의 IMP 세포들은 계통 제한된 마커의 발현, 구조 및 기능적 특성을 비롯한, 기술분야에 알려진 표준법을 이용하여 면역조절 전구체 세포들로서 동정될 수 있다. IMP 세포들은 IMPs에 특이적인 것으로 알려진 세포표면 마커들을 검출가능한 수준으로 발현한다. 이에 관하여는 이하에 상술한다.
- [0053] 본 발명의 IMP 세포들에 대한 시험관내(*in vitro*) 분화 분석을 성공적으로 완수하여 이들이 중배엽 계통임을 확인할 수 있다. 이러한 분석법의 예로는 지방생성 분화분석법, 골형성 분화분석법 및 신경형성 분화분석법을 들 수 있으나 이에 한정되지 않는다 (Zaim M et al Ann Hematol. 2012 Aug;91(8):1175-86).
- [0054] 본 발명의 IMP 세포들은 줄기세포가 아니다. 특히, 이들은 MSCs가 아니다. 이들은 용어 측면에서 구별된다. 비록 이들이 시험관내 올바른 조건 하에서 예컨대 연골세포나 뼈세포로 분화하도록 강제될 수 있지만, 이들은 일반적으로 생체내에서는 분화하지 않는다. 본 발명의 IMP 세포들은 손상된 조직으로 이동하여 손상된 조직에서 측분비 시그널링을 발휘함으로써 해서 그 효과를 나타낸다. 특히, IMP 세포들은 손상된 조직에서 소염 효과를 유도할 수 있어 바람직하다. 이에 관하여는 이하에 자세히 설명한다.
- [0055] 본 발명의 IMP 세포들은 일반적으로 방추형상의 형태를 갖는다는 특징이 있다. IMP 세포들은 일반적으로 섬유모세포와 유사하다. 즉 이들은 세포 크기가 작고 얼마되지 않는 길고 가느다란 세포 프로세스를 갖는다. 이 세포들은 일반적으로 직경이 약 10 내지 약 20 μm 이다.
- [0056] 본 발명의 IMP 세포들은 이들의 마커 발현 패턴을 통해, MSCs를 비롯한 공지 세포와 구별된다. IMPs는 MIC A/B, CD304 (뉴로필린 1), CD178 (FAS 리간드), CD289 (To11-유사 수용체 9), CD363 (스핑고신-1-포스페이트 수용체 1), CD99, CD181 (C-X-C 1형 케모카인 수용체; CXCR1), 표피성장인자 수용체 (EGF-R), CXCR2 및 CD126을 검출

가능한 수준으로 발현한다. IMPs는 MSCs와 비교할 때 이들 마커들을 증가된 양으로 바람직하게 발현한다. 이것은 동일한 조건 하에 동일한 기술을 이용하여 본 발명의 IMP에서의 이들 마커들의 발현 수준/발현량을 MSC에서의 발현 수준/발현량과 비교함으로써 확인할 수 있다. 적절한 MSCs는 상업적으로 구득가능하다. 비교실험에 사용되는 MSC는 인간 MSC인 것이 바람직하다. 인간 MSCs는 Mesoblast[®] Ltd, Osiris Therapeutics[®] Inc. 또는 Lonza[®]로부터 상업적으로 구입 가능하다. 인간의 MSC는 종기로는 Lonza[®]사로부터 구입한 것이 좋다. 이러한 세포들은 실시예에서 비교를 위해 사용되었다. MSC는 전술한 동물 또는 포유동물 중 어느 것으로부터 유래된 것이든 무방하다. IMP 세포들은 MSC에 비해, MIC A/B, CD304 (뉴로필린 1), CD178 (FAS 리간드), CD289 (Toll-유사 수용체 9), CD363 (스핑고신-1-포스페이트 수용체 1), CD99, CD181 (C-X-C 1형 케모카인 수용체; CXCR1), 표피성장인자 수용체 (EGF-R), CXCR2 및 CD126 중 1종 이상을 증가된 양으로 발현하는 것이 바람직하다. IMP 세포들은 종기로는 MSC에 비해 상기 10종의 마커 전부를 증가된 양으로 발현하는 것이 좋다.

[0057] 기술분야에 알려진 표준법을 이용하여 전술한 (및 후술될) 다양한 마커들의 검출가능한 발현 또는 증가된 발현을 알아낼 수 있다. 적절한 방법으로는 면역세포화학, 면역분석, 유세포분석, 예컨대 형광활성세포정렬법 (fluorescence activated cells sorting: FACS), 및 폴리머라제 연쇄반응(PCR), 예컨대 역전사 PCR (RT-PCR)을 들 수 있으나 이에 한정되지 않는다. 적절한 면역분석법의 비제한적인 예로는 웨스턴 블로팅, 효소-결합 면역분석법(ELISA), 효소-결합 면역흡착 스팟 분석법(ELISPOT 분석법), 효소중식 면역분석 기법, 방사알레르기흡착(radioallergosorbent: RAST) 검사법, 방사면역측정법, 방사결합측정법 및 면역형광분석법을 들 수 있다. 웨스턴 블로팅, ELISAs 및 RT-PCR은 모두 정량적이며 따라서 다양한 마커들의 발현 수준(존재할 경우)을 측정하는데 이용가능하다. 실시예에는 고처리량 FACS(high-throughput FACS: HT-FACS)의 용례가 개시되어 있다. 본 명세서에 개시된 여하한 마커들의 발현이나 증가된 발현은 HT-FACS를 이용하여 측정하는 것이 바람직하다. 본 명세서에서 논의되는 모든 다양한 마커들에 대한 항체 및 형광-표지된 항체들은 상업적으로 구입가능하다.

[0058] 본 발명의 IMP 세포들은 종기로는 MIC A/B의 경우 평균형광강도(mean fluorescence intensity: MFI)가 적어도 330, 예컨대 적어도 350 또는 적어도 400, CD304 (뉴로필린 1)의 경우 MFI가 적어도 210, 예컨대 적어도 250 또는 적어도 300, CD178 (FAS 리간드)의 경우 MFI가 적어도 221, 예컨대 적어도 250 또는 적어도 300, CD289 (Toll-유사 수용체 9)의 경우 MFI가 적어도 186, 예컨대 적어도 200 또는 적어도 250, CD363 (스핑고신-1-포스페이트 수용체 1)의 경우 MFI가 적어도 181, 예컨대 적어도 200 또는 적어도 250, CD99의 경우 MFI가 적어도 184, 예컨대 적어도 200 또는 적어도 250, CD181 (C-X-C 1형 케모카인 수용체; CXCR1)의 경우 MFI가 적어도 300, 예컨대 적어도 350 또는 적어도 400, 표피성장인자 수용체 (EGF-R)의 경우 MFI가 적어도 173, 예컨대 적어도 200 또는 적어도 250, CXCR2의 경우 MFI가 적어도 236, 예컨대 적어도 250 또는 적어도 300 및 CD126의 경우 MFI가 적어도 160, 예컨대 적어도 200 또는 적어도 250인 것으로 입증되었다. 평균형광강도(MFI)는 평방미터 당 와트로 측정되는 시간평균 에너지 플럭스로서 강도의 척도이다. 이것은 SI 단위이다. 각 마커에 대한 MFI는 일반적으로 HT-FACS를 이용하여 측정된다. 각 마커에 대한 MFI는 종기로는 실시예에서 설명되는 바와 같이 HT-FACS를 이용하여 측정되는 것이 바람직하다

[0059] 상기 명시된 10개의 마커들에 더해서, 본 발명의 IMP 세포들은 일반적으로 실시예의 표 1에 나타난 다른 마커들 중 하나 이상을 검출가능한 수준으로 발현한다. IMP 세포는 이들 마커들 중 어느 거나 또는 이들 마커들의 어떠한 조합이든 검출가능한 수준으로 발현할 수 있다.

[0060] IMP 세포들은 종기로는 CD267, CD47, CD51/CD61, CD49f, CD49d, CD146, CD340, Notch2, CD49b, CD63, CD58, CD44, CD49c, CD105, CD166, HLA-ABC, CD13, CD29, CD49e, CD73, CD81, CD90, CD98, CD147, CD151 및 CD276 중 1종 이상을 검출가능한 수준으로 발현하는 것이 바람직하다. 더욱 종기로는 IMP 세포들은 CD10, CD111, CD267, CD47, CD273, CD51/CD61, CD49f, CD49d, CD146, CD55, CD340, CD91, Notch2, CD175s, CD82, CD49b, CD95, CD63, CD245, CD58, CD108, B2-마이클로글로블린, CD155, CD298, CD44, CD49c, CD105, CD166, CD230, HLA-ABC, CD13, CD29, CD49e, CD59, CD73, CD81, CD90, CD98, CD147, CD151 및 CD276 중 1종 이상을 검출가능한 수준으로 발현하는 것이 바람직하다. IMP 세포들은 이들 마커들을 몇 가지든 그리고 어떠한 조합이든 검출가능한 수준으로 발현할 수 있다. IMP 세포들은 종기로는 이들 마커들 모두를 검출가능한 수준으로 발현하는 것이 바람직하다.

[0061] IMP 세포들은 CD156b, CD61, CD202b, CD130, CD148, CD288, CD337, SSEA-4, CD349 및 CD140b 중 1종 이상을 검출가능한 수준으로 발현하는 것이 바람직하다.

[0062] IMP 세포들은 더욱 종기로는 CD156b, CD61, CD202b, CD130, CD148, CD288, CD337, SSEA-4, CD349, CD140b,

CD10, CD111, CD267, CD47, CD273, CD51/CD61, CD49f, CD49d, CD146, CD55, CD340, CD91, Notch2, CD175s, CD82, CD49b, CD95, CD63, CD245, CD58, CD108, B2-마이크로글로불린, CD155, CD298, CD44, CD49c, CD105, CD166, CD230, HLA-ABC, CD13, CD29, CD49e, CD59, CD73, CD81, CD90, CD98, CD147, CD151 및 CD276 중 1종 이상을 검출가능한 수준으로 발현하는 것이 바람직하다. IMP 세포들은 이들 마커들을 몇 가지든 그리고 어떠한 조합이든 검출가능한 수준으로 발현할 수 있다. IMP 세포들은 좋기로는 이들 마커들 모두를 검출가능한 수준으로 발현하는 것이 바람직하다.

[0063] IMP 세포들은 좋기로는 CD72, CD133, CD192, CD207, CD144, CD41b, FMC7, CD75, CD3e, CD37, CD158a, CD172b, CD282, CD100, CD94, CD39, CD66b, CD158b, CD40, CD35, CD15, PAC-1, CLIP, CD48, CD278, CD5, CD103, CD209, CD3, CD197, HLA-DM, CD20, CD74, CD87, CD129, CDw329, CD57, CD163, TPBG, CD206, CD243 (BD), CD19, CD8, CD52, CD184, CD107b, CD138, CD7, CD50, HLA-DR, CD158e2, CD64, DCIR, CD45, CLA, CD38, CD45RB, CD34, CD101, CD2, CD41a, CD69, CD136, CD62P, TCR 알파 베타, CD16b, CD1a, ITGB7, CD154, CD70, CDw218a, CD137, CD43, CD27, CD62L, CD30, CD36, CD150, CD66, CD212, CD177, CD142, CD167, CD352, CD42a, CD336, CD244, CD23, CD45RO, CD229, CD200, CD22, CDH6, CD28, CD18, CD21, CD335, CD131, CD32, CD157, CD165, CD107a, CD1b, CD332, CD180, CD65 및 CD24 중 1종 이상을 검출가능한 수준으로 발현하는 것이 바람직하다. IMP 세포들은 이들 마커들을 몇 가지든 그리고 어떠한 조합이든 검출가능한 수준으로 발현할 수 있다. IMP 세포들은 좋기로는 이들 마커들 모두를 검출가능한 수준으로 발현하는 것이 바람직하다.

[0064] 본 발명의 IMP 세포들은 좋기로는 환자의 특수한 손상된 조직으로 이동할 수 있는 것이 바람직하다. 달리 말하면, 손상된 조직을 갖는 환자에게 이들 세포가 투여될 경우, 이들 세포들은 손상된 조직으로 이동 (또는 귀소) 할 수 있다는 것이다. 이것은 이들 세포들이 표준 경로, 예컨대 정맥내 경로를 통해 주입될 수 있다는 것을 의미하고, 이는 다시 손상 부위를 표적화할 수 있음을 의미하는 것이어서 유리하다. 세포들이 손상된 조직에 반드시 전달되어야 하는 것은 아니다. 손상은 수술하는 바와 같이 상해 또는 질병에 기인하는 것일 수 있다.

[0065] 특수 조직은 좋기로는 심장, 뼈, 연골, 힘줄, 인대, 간, 신장 또는 폐 조직인 것이 바람직하다. 이하에 자세히 설명되는 바와 같이 이것은 이동에만 적용되는 것이 아니라 부착, 이행, 증식, 소염효과 및 혈관형성에도 적용된다.

[0066] 손상 조직에로의 본 발명의 IMP 세포들의 이동 능력은 기술분야에 공지인 표준 분석법을 이용하여 측정가능하다. 적절한 방법의 예로는 게놈 역전사 폴리머라제 연쇄반응(리포터 유전자 존재 또는 부재 하의 RT-PCR) 및 라벨링 기술을 들 수 있다.

[0067] RT-PCR은 환자에서 본 발명의 IMP 세포들을 추적하는 가장 직관적이고 간단한 수단이다. 이 목적을 위해 형질도입된 형질전환유전자(transgene) 또는 개체의 공여자 마커들을 이용할 수 있으며 이식된 세포-특이 시그널이 몇몇 환자 연구를 통해 획득되었다. 이러한 결과는 일반적으로 반-정량적(semi-quantitative)이다.

[0068] 별법으로, 본 발명의 IMP 세포들을 형광 염료와 같은 목적하는 염료로 염색하여 염료로부터의 시그널을 통해 이들을 환자 체내에서 모니터링할 수 있다. 이러한 방법은 기술분야에 널리 알려져 있다.

[0069] 이동 (또는 귀소)는 손상된 조직에 도달한 세포들의 수를 측정함으로써 일반적으로 알아낸다. 이것은 또한 폐 (손상된 조직보다)에 축적된 세포 수를 관찰함으로써 간접적으로 측정할 수도 있다.

[0070] 손상된 심장 조직은 염증성 케모카인과 시토카인, 예컨대 간질세포-유래 인자-1(SDF-1), 인터류킨-8 (IL-8), 종양괴사인자-알파 (TNF-알파), 과립구-집락-자극인자(G-CSF), 혈관내피 성장인자 (VEGF) 및 간세포 성장인자 (HGF)를 방출한다. 이에 더해, 심근경색은 VEGF 및 에리트로포이에틴 (EPO) 수준을 증가시킨다. CXCR4는 그의 리간드 SDF-1에 결합하여 CXCR4를 발현하는 본 발명의 IMP 세포들이 손상된 심장 조직에 의해 생산된 SDF-1 그라디언트로 이동하게 된다. 뼈와 같은 다른 손상된 조직들 역시도 SDF-1을 방출한다. 만일 손상된 특이 조직이 심장 조직일 경우, 본 발명의 IMP 세포들은 가급적이면 검출가능한 수준의 CXCR4를 발현하거나 또는 MSCs에 비해 증가된 양으로 CXCR4를 발현하는 것이 좋다.

[0071] 만일 손상된 특이 조직이 뼈 조직일 경우, 본 발명의 IMP 세포들은 가급적이면 검출가능한 수준의 TGF-베타 3, 뼈 형태형성 단백질-6 (BMP-6), SOX-9, 콜라겐-2, CD117 (c-kit), 케모카인 (C-C 모티프) 리간드 12 (CCL12), CCL7, 인터류킨-8 (IL-8), 혈소판-유도 성장인자-A (PDGF-A), PDGF-B, PDGF-C, PDGF-D, 대식세포 이동억제인자 (MIF), IGF-1, 간세포 성장인자 (HGF), PDGF-R α , PDGF-R β , CXCR4, C-C 1형 케모카인 수용체 (CCR1), IGF-1 수용체 (IGF-1R), 간세포 성장인자 수용체 (HGFR), CXCL12 및 NF κ B를 발현하는 것이 좋다. 본 발명의 뼈-귀소 IMP 세포들은 가급적이면 이들 인자들을 중간엽 줄기세포들 중 1종 이상 또는 심지어 전부를, MSCs에 비해

증가된 양으로 발현하는 것이 좋다. 이들 마커들의 검출가능한 발현은 전술한 바와 같이 측정될 수 있다.

- [0072] 본 발명의 IMP 세포들은 가급적이면 환자의 손상된 특이 조직에 부착할 수 있는 것이 좋다. 부착 및 부착 분석에 대하여는 기술분야에 잘 알려져 있다 (Humphries, *Methods Mol Biol.* 2009;522:203-10).
- [0073] 본 발명의 IMP 세포들은 가급적이면 혈관내피를 통해 환자의 손상된 특이 조직으로 이행할 수 있는 것이 좋다. 이행 분석은 기술분야에 잘 알려져 있다 (Muller 및 Lusinskas, *Methods Enzymol.* 2008; 443: 155-176).
- [0074] 본 발명의 IMP 세포들은 가급적이면 환자의 손상된 특이 조직에서 증식할 수 있는 것이 좋다. 세포 증식 분석에 대하여는 기술분야에 잘 알려져 있다. 이러한 분석법으로는 예컨대 Life Technologies[®]를 이용하는 것을 들 수 있다.
- [0075] 본 발명의 IMP 세포들은 가급적이면 환자의 손상된 특이 조직에서 혈관형성을 촉진할 수 있는 것이 좋다. 혈관형성 분석법에 대하여는 기술분야에 잘 알려져 있다 (Auerback *et al.*, *Clin Chem.* 2003 Jan;49(1):32-40).
- [0076] 본 발명의 IMP 세포들은 가급적이면 환자의 손상된 조직에서 소염 효과를 가질 수 있는 것이 바람직하다. 본 발명의 IMP 세포들의 소염 효과를 갖는 능력 역시 기술분야의 표준 분석법을 이용하여 측정될 수 있다. 적절한 방법의 예로는 유세포분석법에 의해 측정되는, 성숙 마커 및 공통자극 분자의 상향조절 및 증가된 혼합 백혈구 반응, 시토카인의 분비에 대한 효소-결합면역흡착 분석법 (ELISAs)을 들 수 있으나 이에 한정되지 않는다. 사용가능한 특이적 방법은 실시예에 개시되어 있다. 측정된 시토카인은 일반적으로 인터류킨, 예컨대 인터류킨-8 (IL-8), 세크렉틴, 부착 분자, 예컨대 세포내 부착 분자(Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1)), 및 화학유인물질 단백질, 예컨대 단핵구 화학주성 단백질-1 (MCP-1) 및 종양괴사인자 알파 (TNF-알파)이다. 이들 시토카인에 대한 분석은 상업적으로 구득가능하다. 소염인자들은 가급적이면 실시예에 설명된 Luminex[®] 분석법을 이용하여 탐지 및 측정되는 것이 좋다. 이러한 분석법은 Life Technologies[®]로부터 상업적으로 이용가능하다.
- [0077] IMP 세포들은 가급적이면 preferably secrete detectable levels of one 또는 more of 인터류킨-6 (IL-6), IL-8, C-X-C 모티프 케모카인 10 (CXCL10; 인터페론 감마-유도된 단백질 10; IP-10), 케모카인 (C-C 모티프) 리간드 2 (CCL2; 단핵구 화학주성 단백질-1; MCP-1) 및 케모카인 (C-C 모티프) 리간드 5 (CCL5; regulated on activation, normal T cell expressed and secreted; RANTES) 중 1종 이상을 검출가능한 수준으로 분비하는 것이 좋다. IMP 세포들은 이들 인자들을 어떠한 수로든 그리고 어떠한 조합으로든 분비할 수 있다. IMP 세포들은 가급적이면 이들 마커들을 전부 분비하는 것이 바람직하다.
- [0078] IMP 세포들은 가급적이면 IL-6, IL-8, IP-10, MCP-1 및 RANTES 중 1종 이상을 MSC에 비해 증가된 양으로 분비하는 것이 좋다. IMP 세포들은 이들 인자들을 어떠한 수로든 그리고 어떠한 조합으로든 분비할 수 있다. IMP 세포들은 가급적이면 이들 마커들을 전부 분비하는 것이 바람직하다.
- [0079] IMP 세포들은 가급적이면 인터류킨-10 (IL-10) 및/또는 IL-12를 중간엽 줄기세포 MSC에 비해 감소된 양으로 분비하는 것이 바람직하다. IL-10 및 IL-12는 전염증(pro-inflammatory) 시토카인이다.
- [0080] 본 발명의 IMP 세포들은 더욱 좋기로는 환자의 손상된 조직으로 이동하여 손상된 조직에서 소염효과를 일으키는 것이 바람직하다. 이에 따라 손상부가 효과적으로 회복되고 투여되어야 할 세포의 수가 감소된다.
- [0081] 본 발명의 IMP 세포들은 전술한 것들 이외의 여러가지 다양한 마커들을 발현한다. 이들 중 일부는 IMP 세포들이 손상된 조직으로 이동하여 일단 그 조직에 도달하면 소염효과를 발휘하도록 돕는다. 본 발명의 IMP 세포들 중 어느 것이든 다음 중 1종 이상을 검출가능한 수준으로 더 발현할 수도 있을 것이다: (i) 인슐린유사 성장인자-1 (IGF-1), (ii) IGF-1 수용체; (iii) C-C 1형 케모카인 수용체 (CCR1), (iv) 간질세포-유도인자-1 (SDF-1), (v) 저산소증-유도 인자-1 알파 (HIF-1 알파), (vi) Akt1 및 (vii) 간세포 성장인자 (HGF) 및/또는 과립구 집락-자극 인자 (G-CSF).
- [0082] IGF-1 수용체들은 IGF-1 구배에 대한 이동능을 촉진한다. IGF-1이 이동을 증가시키는 메카니즘들 중 한 가지는 세포 표면 상에서 CXCR4를 상향조절하는 것에 의한 것인데, 이는 이들을 SDF-1 시그널링에 대해 보다 민감하게 만든다. 이에 관하여는 전술한 바와 같다.
- [0083] CCR1은 CCL7 (이전에 MCP3으로 알려짐)에 대한 수용체로서 MSCs의 귀소 및 생착능을 증가시키고 (따라서 본 발명의 IMP 세포들에 대해서도 동일한 효과를 가질 것으로 기대되었음) 측분비 시그널링을 통해 손상된 심장근육에서 모세관 밀도를 증가시킬 수 있다.

- [0084] HIF-1 알파는 산소 전달을 증가시켜 순응성 전생존 반응(adaptive pro-survival responses)을 촉진하는 경로를 활성화시킨다. HIF-1 알파의 많은 표적 유전자 중에서도 에리트로포이에틴 (EPO), 엔도텔린 및 VEGF (그의 수용체 Flk-1와 함께)를 들 수 있다. HIF-1알파를 발현하거나 증가된 양으로 발현하는 IMP 세포들은 예컨대 보다 치료적인 서브타입을 촉진할 수 있는 몇몇 혈관형성 성장인자들의 촉분비 자극의 상향조절된 발현 양상을 가질 것이다. 이하에서 더 상세히 설명하는 바와 같이, 본 발명의 IMP 세포들은 예컨대 약 2% 또는 약 0% 산소와 같은 저산소 조건(20% 산소 미만)에서 이들을 배양함으로써 보다 치료적인 서브타입으로 예비조건화될 수 있다.
- [0085] Akt1은 글루코스 대사, 세포 증식, 세포자멸사, 전사 및 세포 이동과 같은 복수개의 세포 프로세스에 있어서 핵심적인 역할을 하는 세포내 세린/트레오닌 단백질 키나아제이다. Akt1의 과발현은 래트의 MSCs가 세포자멸사를 수행하는 것을 방지하는 것으로 나타났고 본 발명의 IMP 세포들에서도 동일한 효과가 나타나는 것으로 밝혀졌다. 세포자멸사로부터의 보호는 IMP 세포들의 치료효과를 향상시킬 것이다.
- [0086] MSCs에 의한 HGF의 과발현은 칼시뉴린-매개된 경로 및 혈관형성을 통한 세포자멸사의 억제에 의한 허혈후 심부전을 방지하는 것으로 나타났다. HGF 및 G-CSF는 이와 관련하여 상승 효과를 나타낸다. HGF 및 그의 수용체 c-met를 과발현하는 MSCs는 또한 손상된 조직으로의 증가된 이동능을 갖는데, 이는 호르몬계, 촉분비 및 자가분비 시그널링을 통해 달성된다. 이것은 HGF 및/또는 G-CSF를 발현하는 본 발명의 IMP 세포들의 경우도 같을 것이다.
- [0087] IMP 세포들은 상기 정의된 (i) 내지 (vii) 중 1종 이상을 검출가능한 수준으로 발현할 수도 있다. 본 발명의 IMP 세포들은 가급적으로 (i) 내지 (vii) 중 1종 이상을 MSCs에 비해 증가된 양으로 발현하는 것이 좋다. 세포 마커의 정량 분석에 대하여는 전술한 바와 같다. 이들 마커들의 검출가능한 발현 및 이들의 발현 수준은 전술한 바와 같이 측정할 수 있다.
- [0088] 본 발명의 IMP 세포들은 어느 것이든 (i) 혈관내피 성장인자 (VEGF), (ii) 형질전환 성장인자 베타 (TGF-베타), (iii) 인슐린유사 성장인자-1 (IGF-1), (iv) 섬유모세포 성장인자 (FGF), (v) 종양괴사인자 알파 (TNF-알파), (vi) 인터페론 감마 (IFN-감마) 및 (vii) 인터류킨-1 알파 (IL-1 알파) 중 1종 이상을 검출가능한 수준으로 발현할 수 있다. VEGF를 과발현하는 세포들로부터 얻어진 조건화 배지는 햄스터 모델에서 심부전을 완화시키는 것으로 나타났다. 따라서, VEGF를 발현하거나 증가된 양으로 발현하는 본 발명의 IMP 세포들은 손상된 심장 조직에 대해 동일한 효과를 나타낼 것이다.
- [0089] IMP 세포들은 (i) 내지 (vii) 중 1종 이상을 검출가능한 수준으로 발현할 수 있다. 본 발명의 IMP 세포들은 MSCs에 비해 (i) 내지 (vii) 중 1종 이상을 발현할 수 있다. 세포 마커들에 대한 정량적인 분석에 대하여는 전술한 바와 같다. 마커의 검출가능한 발현 및 이들의 발현 수준은 전술한 바와 같이 측정할 수 있다.
- [0090] 상기 언급된 (i) 내지 (vii)의 두 가지 모든 정의 세트에서, (i) 내지 (vii) 중 1종 이상의 어떠한 조합이든 발현가능하거나 증가된 양으로 발현가능하다. 예를 들어, (i) 내지 (vii)의 각 정의에 있어서, IMP 세포들은, (i); (ii); (iii); (iv); (v); (vi); (vii); (i) 및 (ii); (i) 및 (iii); (i) 및 (iv); (i) 및 (v); (i) 및 (vi); (i) 및 (vii); (ii) 및 (iii); (ii) 및 (iv); (ii) 및 (v); (ii) 및 (vi); (ii) 및 (vii); (iii) 및 (iv); (iii) 및 (v); (iii) 및 (vi); (iii) 및 (vii); (iv) 및 (v); (iv) 및 (vi); (iv) 및 (vii); (v) 및 (vi); (v) 및 (vii); (vi) 및 (vii); (i), (ii) 및 (iii); (i), (ii) 및 (iv); (i), (ii) 및 (v); (i), (ii) 및 (vi); (i), (ii) 및 (vii); (i), (iii) 및 (iv); (i), (iii) 및 (v); (i), (iii) 및 (vi); (i), (iii) 및 (vii); (i), (iv) 및 (v); (i), (iv) 및 (vi); (i), (iv) 및 (vii); (i), (v) 및 (vi); (i), (v) 및 (vii); (i), (vi) 및 (vii); (ii), (iii) 및 (iv); (ii), (iii) 및 (v); (ii), (iii) 및 (vi); (ii), (iii) 및 (vii); (ii), (iv) 및 (v); (ii), (iv) 및 (vi); (ii), (iv) 및 (vii); (ii), (v) 및 (vi); (ii), (v) 및 (vii); (ii), (vi) 및 (vii); (iii), (iv) 및 (v); (iii), (iv) 및 (vi); (iii), (iv) 및 (vii); (iii), (v) 및 (vi); (iii), (v) 및 (vii); (iii), (vi) 및 (vii); (iv), (v) 및 (vi); (iv), (v) 및 (vii); (iv), (vi) 및 (vii); (v), (vi) 및 (vii); (i), (ii), (iii) 및 (iv); (i), (ii), (iii) 및 (v); (i), (ii), (iii) 및 (vi); (i), (ii), (iii) 및 (vii); (i), (ii), (iv) 및 (v); (i), (ii), (iv) 및 (vi); (i), (ii), (iv) 및 (vii); (i), (ii), (v) 및 (vi); (i), (ii), (v) 및 (vii); (i), (ii), (vi) 및 (vii); (i), (iii), (iv) 및 (v); (i), (iii), (iv) 및 (vi); (i), (iii), (iv) 및 (vii); (i), (iii), (v) 및 (vi); (i), (iii), (v) 및 (vii); (i), (iii), (vi) 및 (vii); (i), (iv), (v) 및 (vi); (i), (iv), (v) 및 (vii); (i), (iv), (vi) 및 (vii); (i), (v), (vi) 및 (vii); (ii), (iii), (iv) 및 (v); (ii), (iii), (iv) 및 (vi); (ii), (iii), (iv) 및 (vii); (ii), (iii), (v) 및 (vi); (ii), (iii), (v) 및 (vii); (ii), (iii), (vi) 및 (vii); (ii), (iv), (v) 및 (vi); (ii), (iv), (v) 및 (vii); (ii), (iv), (vi) 및 (vii); (ii), (v), (vi) 및 (vii); (iii), (iv), (v) 및 (vi); (iii), (iv), (v) 및 (vii); (iii), (iv), (vi) 및 (vii); (iii), (v), (vi) 및 (vii);

(iv), (v), (vi) 및 (vii); (i), (ii), (iii), (iv) 및 (v); (i), (ii), (iii), (iv) 및 (vi); (i), (ii), (iii), (iv) 및 (vii); (i), (ii), (iii), (v) 및 (vi); (i), (ii), (iii), (v) 및 (vii); (i), (ii), (iii), (vi) 및 (vii); (i), (ii), (iv), (v) 및 (vi); (i), (ii), (iv), (v) 및 (vii); (i), (ii), (iv), (vi) 및 (vii); (i), (ii), (v), (vi) 및 (vii); (i), (iii), (iv), (v) 및 (vi); (i), (iii), (iv), (v) 및 (vii); (i), (iii), (iv), (vi) 및 (vii); (i), (iv), (v), (vi) 및 (vii); (ii), (iii), (iv), (v) 및 (vi); (ii), (iii), (iv), (v) 및 (vii); (ii), (iii), (iv), (vi) 및 (vii); (ii), (iii), (v), (vi) 및 (vii); (ii), (iv), (v), (vi) 및 (vii); (iii), (iv), (v), (vi) 및 (vii); (i), (ii), (iii), (iv), (v) 및 (vi); (i), (ii), (iii), (iv), (v) 및 (vii); (i), (ii), (iii), (iv), (vi) 및 (vii); (i), (ii), (iii), (v), (vi) 및 (vii); (i), (ii), (iv), (v), (vi) 및 (vii); (i), (iii), (iv), (v), (vi) 및 (vii); (ii), (iii), (iv), (v), (vi) 및 (vii); 또는 (i), (ii), (iii), (iv), (v), (vi) 및 (vii)을 검출가능한 수준으로 발현하거나 또는 증가된 양으로 발현할 수 있을 것이다. 상기 리스트로부터 (i) 내지 (vii)의 각 정의의 조합을 독립적으로 선택할 수 있다.

[0091] 전술한 바와 같은 마커들에 더해, 본 발명의 IMP 세포들은 종기로는 LIF 및/또는 혈소판-유도 성장인자 (PDGF) 수용체들도 검출가능한 수준으로 발현하는 것이 바람직하다. 본 발명의 IMP 세포들은 종기로는 중간엽 줄기세포에 비해 LIF 및/또는 혈소판-유도 성장인자 (PDGF) 수용체들을 증가된 양으로 발현하는 srjt이 바람직하다. PDGF 수용체는 PDGF-A 수용체 및/또는 PSDGF-B 수용체인 것이 좋다. 이들 수용체들을 고발현하는 MSCs는 상처 및 혈전 혈관과 같이 혈소판이 활성화되어 있는 장소로 효과적으로 이동할 수 있다. 이것은 수용체를 발현하거나 증가된 양으로 발현하는 IMP 세포들의 경우에도 동일할 것이다.

[0092] 본 발명의 IMP 세포들은 자가(autologous)인 것이 바람직하다. 달리 말하면, 이 세포들은 종기로는 이들이 투여될 환자로부터 유래되는 것이 바람직하다. 또는 IMP 세포들은 동종이계(allogeneic)인 것이 바람직하다. 달리 설명하면, 이 세포들은 이들이 투여될 환자와 면역학적으로 필적할만한 환자로부터 유래되는 것이 바람직하다.

[0093] 본 발명의 IMP 세포는 분리, 실질적으로 분리, 정제 또는 실질적으로 정제될 수 있다. IMP 세포에 예컨대 배양 배지, 본 발명의 다른 세포 또는 다른 세포 종류와 같은 기타 성분들이 완전히 없다면, 그 IMP 세포는 분리되거나 정제된 것이다. IMP 세포가 만일 그의 의도된 용도를 간섭하지 않는 담체 또는 희석제 예컨대 배양 배지와 혼합되어 있다면 그 IMP 세포는 실질적으로 분리된 것이다. 별법으로, 본 발명의 IMP 세포는 후술되는 바와 같이 성장 매트릭스에 존재하거나 표면에 고정될 수도 있다.

[0094] 본 발명의 IMP 세포들은 항체-기반 기술을 비롯한 다양한 기술을 이용하여 분리될 수 있다. 세포들은 IMP 세포 상에 존재하는 그의 표면 마커들에 대한 모노클로날 항체들의 결합에 기반한 음성 및 양성 선별 기술을 이용하여 분리할 수 있다 (상기 내용 참조). 따라서, IMP 세포들은 형광활성세포정렬법(FACS) 및 자성 비드 분리법을 비롯한, 항체-기반 기술을 이용하여 분리될 수 있다.

[0095] 이하에서 더 자세히 설명되는 바와 같이, IMP 세포들은 생체외(ex vivo)에서 처리될 수도 있다. 따라서 이들 세포들에 치료제 또는 진단제를 로딩시키거나 트랜스펙션한 다음 본 발명의 방법으로 치료적으로 이용하는 것도 가능하다.

[0096] 본 발명의 세포집단

[0097] 본 발명은 또한 본 발명의 2종 이상의 IMP 세포들의 집단도 제공한다. 세포집단 내에는 세포들이 어떠한 갯수로 든 존재가능하다. 본 발명의 세포집단은 본 발명의 IMP 세포들을 적어도 약 5×10^5 개 포함하는 것이 바람직하다. 더욱 종기로는 세포집단은 본 발명의 IMP 세포들을 적어도 약 1×10^6 , 적어도 약 2×10^6 , 적어도 약 2.5×10^6 , 적어도 약 5×10^6 , 적어도 약 1×10^7 , 적어도 약 2×10^7 , 적어도 약 5×10^7 , 적어도 약 1×10^8 또는 적어도 약 2×10^8 개 포함하는 것이 바람직하다. 몇몇 경우, 세포집단은 본 발명의 IMP 세포들을 적어도 약 1.0×10^7 , 적어도 약 1.0×10^8 , 적어도 약 1.0×10^9 , 적어도 약 1.0×10^{10} , 적어도 약 1.0×10^{11} 또는 적어도 약 1.0×10^{12} 개 또는 심지어 그 이상으로 포함하는 것이 바람직하다.

[0098] 본 발명의 IMP 세포들을 2개 이상 포함하는 세포집단은 본 발명의 IMP 세포들에 더해 다른 세포들을 포함할 수도 있다. 그러나, 세포집단 내의 세포들의 적어도 70%는 본 발명의 IMP 세포들인 것이 바람직하다. 더욱 종기로는, 세포집단 내의 세포들의 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 97%,

적어도 약 98% 또는 적어도 약 99%는 본 발명의 IMP 세포들인 것이 바람직하다.

- [0099] 본 발명은 또한 IMP 세포들의 특별한 세포집단을 제공한다. 본 발명은:
- [0100] (i) 세포집단의 세포들의 적어도 90%, 종기로는 적어도 97% 및 더욱 종기로는 적어도 97.1%가 MIC A/B를 검출가능한 수준으로 발현하고,
- [0101] (ii) 세포집단의 세포들의 적어도 60%, 종기로는 적어도 65% 및 더욱 종기로는 적어도 65.2%가 CD304 (뉴로필린 1)을 검출가능한 수준으로 발현하며,
- [0102] (iii) 세포집단의 세포들의 적어도 45%, 종기로는 적어도 51% 및 더욱 종기로는 적어도 51.6%가 CD178 (FAS 리간드)을 검출가능한 수준으로 발현하고 ,
- [0103] (iv) 세포집단의 세포들의 적어도 10%, 종기로는 적어도 11% 및 더욱 종기로는 적어도 11.3%가 CD289 (Toll-유사 수용체 9)를 검출가능한 수준으로 발현하며,
- [0104] (v) 세포집단의 세포들의 적어도 15%, 종기로는 적어도 18% 및 더욱 종기로는 적어도 18.7%가 CD363 (스핑고신-1-포스페이트 수용체 1)을 검출가능한 수준으로 발현하고,
- [0105] (vi) 세포집단의 세포들의 적어도 20%, 종기로는 적어도 24% 및 더욱 종기로는 적어도 24.8%가 CD99를 검출가능한 수준으로 발현하며,
- [0106] (vii) 세포집단의 세포들의 적어도 80%, 종기로는 적어도 85%가 CD181 (C-X-C 1형 케모카인 수용체; CXCR1)을 검출가능한 수준으로 발현하고,
- [0107] (viii) 세포집단의 세포들의 적어도 30%, 종기로는 적어도 33% 및 더욱 종기로는 적어도 33.3%가 표피성장인자 수용체 (EGF-R)를 검출가능한 수준으로 발현하며,
- [0108] (xi) 세포집단의 세포들의 적어도 60%, 종기로는 적어도 68% 및 더욱 종기로는 적어도 68.8%가 CXCR2를 검출가능한 수준으로 발현하고 및
- [0109] (x) 세포집단의 세포들의 적어도 5%, 종기로는 적어도 7% 및 더욱 종기로는 적어도 7.05%가 CD126을 검출가능한 수준으로 발현하는,
- [0110] 면역조절 전구체 (IMP) 세포의 세포집단을 제공한다.
- [0111] 이들 바람직한 세포집단의 세포들은 또한 본 발명의 IMP에 대해 전술된 바와 같은 여하한 마커들을 검출가능한 수준으로 추가 발현할 수도 있다. 이들 바람직한 세포집단의 세포들은 전술한 IMP 세포들의 여하한 유리한 특성들을 가질 수도 있다.
- [0112] 세포집단의 세포들의 적어도 90%, 예컨대 적어도 95%는 CD10, CD111, CD267, CD47, CD273, CD51/CD61, CD49f, CD49d, CD146, CD55, CD340, CD91, Notch2, CD175s, CD82, CD49b, CD95, CD63, CD245, CD58, CD108, B2-마이 크로글로블린, CD155, CD298, CD44, CD49c, CD105, CD166, CD230, HLA-ABC, CD13, CD29, CD49e, CD59, CD73, CD81, CD90, CD98, CD147, CD151 및 CD276 중 1종 이상을 검출가능한 수준으로 발현하는 것이 좋다. 세포집단의 세포들의 적어도 90%, 예컨대 적어도 95%는 이들 마커들 중 몇 가지든 또는 어떠한 조합이던지를 검출가능한 수준으로 발현할 수 있다. 세포집단의 세포들의 적어도 90%, 예컨대 적어도 95%는 이들 마커 모두를 검출가능한 수준으로 발현하는 것이 좋다.
- [0113] 세포집단의 세포들의 적어도 80%, 예컨대 적어도 85%는 CD156b, CD61, CD202b, CD130, CD148, CD288, CD337, SSEA-4, CD349 및 CD140b 중 1종 이상을 검출가능한 수준으로 발현하는 것이 바람직하다. **세포집단의 세포들의 적어도 80%, 예컨대 적어도 85%는 이들 마커들 중 몇 가지든 또는 어떠한 조합이던지를 검출가능한 수준으로 발현할 수 있다. 세포집단의 세포들의 적어도 80%, 예컨대 적어도 85%는 이들 마커 모두를 검출가능한 수준으로 발현하는 것이 좋다.**
- [0114] **세포집단의 세포들의 적어도 70%, 예컨대 적어도 75%는 CD318, CD351, CD286, CD46, CD119 및 CD132 중 1종 이상을 검출가능한 수준으로 발현하는 것이 바람직하다. 세포집단의 세포들의 적어도 70%, 예컨대 적어도 75%는 이들 마커들 중 몇 가지든 또는 어떠한 조합이던지를 검출가능한 수준으로 발현할 수 있다. 세포집단의 세포들의 적어도 70%, 예컨대 적어도 75%는 이들 마커 모두를 검출가능한 수준으로 발현하는 것이 좋다.**
- [0115] **세포집단의 세포들의 1% 이하, 예컨대 0.5% 이하가 CD72, CD133, CD192, CD207, CD144, CD41b, FMC7, CD75, CD3e, CD37, CD158a, CD172b, CD282, CD100, CD94, CD39, CD66b, CD158b, CD40, CD35, CD15, PAC-1, CLIP,**

CD48, CD278, CD5, CD103, CD209, CD3, CD197, HLA-DM, CD20, CD74, CD87, CD129, CDw329, CD57, CD163, TPBG, CD206, CD243 (BD), CD19, CD8, CD52, CD184, CD107b, CD138, CD7, CD50, HLA-DR, CD158e2, CD64, DCIR, CD45, CLA, CD38, CD45RB, CD34, CD101, CD2, CD41a, CD69, CD136, CD62P, TCR 알파 베타, CD16b, CD1a, ITGB7, CD154, CD70, CDw218a, CD137, CD43, CD27, CD62L, CD30, CD36, CD150, CD66, CD212, CD177, CD142, CD167, CD352, CD42a, CD336, CD244, CD23, CD45RO, CD229, CD200, CD22, CDH6, CD28, CD18, CD21, CD335, CD131, CD32, CD157, CD165, CD107a, CD1b, CD332, CD180, CD65 및 CD24 중 1종 이상을 검출가능한 수준으로 발현하는 것이 바람직하다. 세포집단의 세포들의 1% 이하, 예컨대 0.5% 이하는 이들 마커들 중 몇 가지 또는 어떠한 조합이던지를 검출가능한 수준으로 발현할 수 있다. 세포집단의 세포들의 1% 이하, 예컨대 0.5% 이하는 이들 마커 모두를 검출가능한 수준으로 발현하는 것이 좋다.

[0116] 세포집단의 몇 %가 특정 마커를 발현하는지 관점에서 설명된 상기 구체예에서, 상기 세포집단은 적어도 5,000개의 세포, 예컨대 적어도 6,000개, 적어도 7,000개, 적어도 8,000개, 적어도 9,000개, 적어도 10,000개, 적어도 20,000개, 적어도 30,000개 또는 적어도 40,000개의 세포를 포함하는 것이 좋다. 이들 세포집단들은 전술한 세포를 여하한 갯수로 포함할 수 있다.

[0117] 본 명세서에 개시된 세포들의 세포집단은 어느 것이든 사용 전에 다른 세포들로 희석될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 세포집단은 환자 혈액, 단핵세포 (MCs), MSCs, 중배엽 직계의 전구체 세포(PMLs) 또는 이들의 조합과 조합될 수 있다. PMLs은 PCT/GB2012/051600 (WO 2013/005053으로 공개됨)에 개시되어 있다.

[0118] 본 발명의 세포집단들은 후술하는 바와 같이 치료법에 사용되는데 유리하다. 본 발명의 IMP 세포들을 다수 포함하는 세포집단을 생산하는 능력은 본 발명의 핵심적인 장점 중 하나이다. 본 발명은 전부는 아니라 하더라도 대부분이 목적하는 조직으로 효과적으로 이동하여 일단 그 조직에 도달하면 소염 효과를 발휘하는, 세포들의 세포 집단으로 환자를 치료하는 방법을 가능케 한다. 이 방법은 세포를 낮은 투여량으로 사용하는 것을 가능케 할 뿐 아니라 표적을 빚나가는 부작용 및 규모-관련 부작용을 회피시켜준다.

[0119] 본 발명의 세포집단은 종기로는 동종(homologous)인 것이 좋다. 달리 설명하면, 세포집단 내 IMP 세포들 모두가 유전형과 표현형 모두의 측면에서 동일한 것이 바람직하다. 세포집단은 종기로는 상기 정의한 바와 같이 자가 또는 동종이계인 것이 바람직하다.

[0120] 그러나, 세포집단은 세미-동종이계(semi-allogeneic)일 수도 있다. 세미-동종이계 집단은 전형적으로 그 세포집단이 투여될 환자들과 면역학적으로 필적하는 2명 이상의 환자들로부터의 단핵세포로부터 생산된다. 달리 설명하면, 세포집단 애의 세포들 전부가 유전적으로 동일하거나 유전적으로 충분히 동일하여, 그 세포집단이 그 세포집단이 투여될 환자와 면역학적으로 필적할만한 한 것이 바람직하다. 본 발명의 IMP 세포들은 환자로 부터 유래할 수 있으며, 치료하고자 하는 환자에 자가일 수 있다 (즉, 그 환자와 유전적으로 동일하거나 유전적으로 충분히 동일하여 그 환자에게 이들이 투여되어도 공존가능함(compatible)).

[0121] 본 발명의 세포집단은 분리, 실질적으로 분리, 정제 또는 실질적으로 정제될 수 있다. 만일 세포집단에 배양 배지나 다른 세포와 같은 기타 성분이 전혀 없다면 그 세포집단은 분리되거나 정제된 것이다. 만일 세포집단에 그의 의도된 사용을 간섭하지 않는 담체 또는 희석제 예컨대 배양 배지가 혼합된 경우 그 세포집단은 실질적으로 분리된 것이다. 기타의 담체 및 희석제들에 관하여 이하에 더욱 상세히 설명한다. 실질적으로 분리 또는 실질적으로 정제된 세포집단은 본 발명의 IMP 세포들 외에는 다른 세포들을 포함하지 않는다. 몇몇 구체예에서, 본 발명의 세포집단은 후술하는 바와 같이 성장 매트릭스 내에 존재하거나 또는 표면에 고정될 수 있다.

[0122] 세포집단은 일반적으로 시험관내(*in vitro*) 배양될 수 있다. 세포 배양 기술은 통상의 기술자에게 잘 알려져 있다. 세포들은 무혈청 배지 중 37°C, 5% CO₂의 표준 조건 하에서 배양될 수 있다. 세포들은 이하에서 보다 상세히 설명하겠지만 저산소 조건 하에서 배양되는 것이 바람직하다. 세포들은 표준 6웰 플레이트와 같은 평판의 웰을 포함하여 적절한 플라스크 또는 용기에서 배양될 수 있다. 이러한 평판은 Fisher scientific, VWR suppliers, Nunc, Starstedt 또는 Falcon 사가 시판하고 있다. 웰의 용량은 일반적으로 약 1 ml 내지 약 4 ml 이다.

[0123] 세포집단이 함유되거나 배양될 플라스크, 용기 또는 웰은 IMP 세포들의 핸들링을 용이하게 하도록 조정될 수 있다. 예를 들어, 플라스크, 용기 또는 웰은 예컨대 성장 매트릭스를 포함시킴으로써, 세포의 배양을 용이하게 하도록 변형될 수 있다. 플라스크, 용기 또는 웰은 IMP 세포들의 부착을 가능케 하거나 또는 IMP 세포들의 표면에 상에의 고정을 가능케 하도록 변형될 수도 있다. 1 이상의 표면을, 세포의 매트릭스 단백질 예컨대 라미닌 또는 콜라겐로 코팅하거나 또는 세포들과 결합하여 그 표면(들) 상에 세포들을 고정 또는 포획시키는 기타 캡처 분자

들로 코팅할 수 있다.

- [0124] 세포집단은 본 발명에 설명된 여하한 기술을 이용하여 생체의(*ex vivo*) 변형될 수 있다. 예를 들어, 세포집단에 치료제 또는 진단제를 로딩하거나 트랜스펙션할 수 있다. 이어서 세포집단을 이하에서 상세히 설명될 치료방법에 이용할 수 있다.
- [0125] 본 발명의 IMP 세포의 생산방법
- [0126] 본 발명은 또한 본 발명의 세포집단의 생산방법도 제공한다. 이 방법은 단핵세포(MCs)를 유도하는 조건 하에서 MCs를 배양하여 이들을 IMP 세포들로 분화시키는 것을 포함한다. 이어서 이 방법은 MIC A/B, CD304 (뉴로필린 1), CD178 (FAS 리간드), CD289 (Toll-유사 수용체 9), CD363 (스핑고신-1-포스페이트 수용체 1), CD99, CD181 (C-X-C 1형 케모카인 수용체; CXCR1), 표피성장인자 수용체 (EGF-R), CXCR2 및 CD126을 검출가능한 수준으로 발현하는 IMP 세포들을 수확 및 배양하는 것을 포함한다. 수확된 세포들은 본 발명의 세포들에 대해 전술된 바와 같이 마커 및 인자들을 검출가능한 수준으로 또는 증가된 양으로 발현할 수 있다.
- [0127] 단핵세포 (MCs) 및 이들의 분리 방법은 기술분야에 알려져 있다. MCs는 골수로부터 분리된 일차(primary) MCs일 수 있다. MCs는 종기로는 말초혈액 MCs (PBMCs), 예컨대 림프구, 단구 및/또는 대식세포인 것이 바람직하다. PBMCs는 Ficoll[®]과 같은 친수성 다당류를 이용하여 혈액으로부터 분리될 수 있다. 예를 들어, PBMCs는 실시예란에 개시되는 바와 같이, Ficoll-Paque[®] (시판되는 밀도 매질)을 이용하여 혈액으로부터 분리될 수 있다.
- [0128] 이들을 배양하기 전에, MCs를 중간엽 줄기세포가 풍부한 카테일에 노출시킬 수 있다. 이 카테일은 종기로는 적혈구 성분 및 CD3, CD14, CD19, CD38, CD66b (원치 않는 세포 상에 존재)를 인식하는 항체들을 포함하는 것이 바람직하다. 이러한 카테일은 원치 않는 세포들을 적혈구 세포와 교차결합시켜 목적하는 MCs로부터 제거될 수 있는 면역로제트(immunorosettes)를 형성할 수 있다. 바람직한 카테일은 RosetteSep[®]이다.
- [0129] MCs가 중간엽 세포(중배엽으로부터 주로 유도되는 조직)로 분화하도록 유도하는데 적합한 조건은 기술 분야에 알려져 있다. 예를 들어, 적합한 조건이 문헌 [Capelli, C., *et al.* (Human platelet lysate allows expansion and clinical grade production of mesenchymal stromal cell from small samples of bone marros aspirates or marrow filter washouts. Bone Marros Transplantation, 2007. 40: p. 785-791)]에 알려져 있다. 이들 조건들은 MCs를 본 발명에 따른 IMP 세포들로 MCs를 분화하도록 유도하는데도 이용될 수 있다.
- [0130] 이 방법은 종기로는 MCs를 혈장 용해물과 함께 배양하여 MCs로 하여금 IMP 세포들로 분화하도록 하는 것을 포함하는 것이 바람직하다. 혈소판 용해물은 혈소판의 용해를 통해 분비된 혈소판 내에 함유된 천연 성장인자들의 조합을 가리킨다. 용해는 화학적 수단 (즉, CaCl₂), 삼투압 수단 (증류된 H₂O 사용) 또는 냉동/해동 방법을 통해 수행가능하다. 혈소판 용해물은 미국특허 No. 5,198,357에 설명된 바와 같이 전혈로부터 유래될 수 있다. 혈소판 용해물은 PCT/GB12/052911 (WO 2013/076507로 공개됨)에 설명된 바와 같이 제조하는 것이 바람직하다. 혈장 용해물은 종기로는 인간 혈장 용해물인 것이 바람직하다.
- [0131] 바람직한 일 구체예에서, 본 발명의 방법의 단계 (a)는 MCs가 IMP 세포들로 분화되도록 MCs를 유도하는데 충분한 시간 동안 혈소판 용해물을 포함하는 배지에서 MCs를 배양하는 것을 포함한다. 충분한 시간이란 전형적으로 약 15 내지 약 25일, 종기로는 약 22일이다. 배지는 종기로는 혈소판 용해물을 약 20 부피% 이하, 예컨대 약 15 부피% 이하 또는 약 10 부피% 이하로 포함하는 것이 좋다. 배지는 종기로는 혈소판 용해물을 약 5 내지 약 20 부피%, 예컨대 약 10 내지 약 15 부피%로 포함하는 것이 좋다. 배지는 종기로는 혈소판 용해물을 약 10 부피% 포함하는 것이 바람직하다.
- [0132] 또 다른 바람직한 구체예에서, 본 발명의 방법의 단계 (a)는 MC를 중간엽이 풍부한 카테일에 노출시킨 다음 MC가 IMP 세포들로 분화하도록 유도하는데 충분한 시간 동안 혈소판 용해물을 포함하는 배지에서 MCs를 배양하는 것을 포함한다. 충분한 시간이란 일반적으로 약 15일 내지 약 25일, 종기로는 약 22일이다.
- [0133] 단계 (a)에서, 배지는 종기로는 최소필수배지(MEM: Minimum Essential Medium)인 것이 바람직하다. MEM은 Sigma-Aldrich사를 비롯한 다양한 공급원으로부터 상업적으로 구득가능하다. 배지는 종기로는 1종 이상의 헤파린, L-글루타민 및 페니실린/스트렙트아비딘 (P/S)을 더 포함하는 것이 바람직하다. L-글루타민은 GlutaMAX[®] (Life Technologies가 시판함)으로 대체될 수도 있다.
- [0134] 전술한 바와 같이, 본 발명의 IMP 세포들 중 몇몇은 CXCR4를 검출가능한 수준으로 발현한다. CXCR4의 발현은 시토카인-의존성이며 세포들이 줄기세포 인자(SCF), 인터류킨-6 (IL-6), Flt-3 리간드, 간세포 성장인자 (HGF)

및 IL-3에 노출될 때 증가한다. 배지는 (i) SCF, (ii) IL-6, (iii) Flt-3 리간드, (iv) 간세포 성장인자 및 (v) IL-3, such as (i); (ii); (iii); (iv); (v); (i) 및 (ii); (i) 및 (iii); (i) 및 (iv); (i) 및 (v); (ii) 및 (iii); (ii) 및 (iv); (ii) 및 (v); (iii) 및 (iv); (iii) 및 (v); (iv) 및 (v); (i), (ii) 및 (iii); (i), (ii) 및 (iv); (i), (ii) 및 (v); (i), (iii) 및 (iv); (i), (iii) 및 (v); (i), (iv) 및 (v); (ii), (iii) 및 (iv); (ii), (iii) 및 (v); (ii), (iv) 및 (v); (iii), (iv) 및 (v); 또는 (i), (ii), (iii), (iv) 및 (v) 중 1종 이상을 포함할 수 있다. (i) 내지 (v) 중 어느 것이든 약 10 내지 약 150 ng/ml로 존재할 수 있다.

[0135] 단계 (a)는 좋기로는 IMP 세포들의 부착을 허용하는 조건 하에서 MC를 배양하는 것을 포함하는 것이 바람직하다. 적절한 조건은 위에서 더욱 상세히 설명한 바 있다.

[0136] 단계 (a)에서, MCs는 좋기로는 저산소 조건 하에서 배양되는 것이 바람직하다. MCs는 좋기로는 약 20%, 예컨대 약 19% 미만, 약 18% 미만, 약 17% 미만, 약 16% 미만, 약 15% 미만, 약 14% 미만, 약 13% 미만, 약 12% 미만, 약 11% 미만, 약 10% 미만, 약 9% 미만, 약 8% 미만, 약 7% 미만, 약 6% 미만, 약 5% 미만, 약 4% 미만, 약 3% 미만, 약 2% 미만 또는 약 1% 미만의 산소(O₂)에서 배양되는 것이 바람직하다. MCs는 좋기로는 약 0% 내지 약 19% O₂, 예컨대 약 1% 내지 약 15% O₂, 약 2% 내지 약 10% O₂ 또는 약 5% 내지 약 8% O₂에서 배양되는 것이 바람직하다. MCs는 가장 좋기로는 약 0% O₂에서 배양되는 것이 가장 바람직하다. 상기 % 산소 (또는 % O₂)와 관련하여 인용된 숫자는 배양하는 동안, 예컨대 세포 인큐베이터에 의해 배양하는 동안 세포에 가해진 가스 중의 산소의 부피% 기준이다. 산소의 일부는 인큐베이터 내로 새어 들어가거나 또는 문이 열릴 때 유입될 수도 있다.

[0137] 단계 (a)에서, MCs는 가장 좋기로는 혈소판 용해물의 존재 하에 저산소 조건에서 배양되는 것이 바람직하다. 이러한 조합은 손상된 조직의 천연 조건을 모방한 것으로 보다 건강하고 보다 치료효능이 높은 세포를 결과시킨다. 통상적인 세포 배양은 20% 또는 21% 산소 (대략 대기 중의 함량임)에서 수행되지만 인체에는 산소를 이 정도 수준으로 가질만한 장소가 없다. 폐 내의 상피세포들에서 이 정도의 산소 수준을 "볼 수 (see)"있을 수 있지만 일단 산소가 용해되어 폐를 떠나면, 산소 수준은 약 17%로 감소된다. 이로부터 대부분의 조직에서는 산소 수준이 약 1-2%로 더 감소되지만 관절 내 연골과 같은 무혈관 조직에서는 0.1% 수준으로 떨어진다.

[0138] 단계 (b)에서, 이 방법은 전술한 바와 같은 필요한 마커 발현 패턴을 갖는 IMP 세포들을 수확 및 배양하는 것을 더 포함한다. 필요한 마커 발현 패턴을 갖는 IMP 세포들은 형광활성세포정렬법(FACS) 및 자성 비드 분리법을 비롯한, 항체-기반 기술을 이용하여 수확될 수 있다. FACS가 바람직하다. HT-FACS가 더욱 바람직하다.

[0139] 단계 (a)와 관련하여 개시된 IMP 세포들의 배양 방법들은 모두 단계 (b)에도 동등하게 적용된다. 특히, 단계 (b)에서 세포들은 단계 (a)에서 논의된 것 처럼 혈소판 용해물의 존재 하에 저산소 조건에서 배양된다.

[0140] 상술한 내용으로부터 명확히 이해되겠지만, 본 발명의 방법은 임상적으로 합당한 조건, 즉 내독소 및 기타 환경 오염물, 예컨대 리포폴리사카라이드, 리포페바이드 및 퀵타이도글리칸이 미량도 없는 조건 하에서 수행된다. 이 때문에 본 발명의 IMP 세포들은 환자에게 투여하기에 특히 적합하다.

[0141] MCs는 특히 환자 또는 동종이계 공여자로부터 수득되는 것이 바람직하다. 본 발명은 또한 환자에게 투여하기에 적합한 본 발명의 세포집단의 생산방법도 제공하는데, 이 방법은 MCs가 IMP 세포들로 분화하도록 MCs를 유도하는 조건 하에서 환자들로부터 얻어진 MCs를 배양하고 (b) 전술한 바와 같은 발현 패턴을 갖는 전구체 세포들을 수확 및 배양함으로써 환자에게 투여하기에 적합한 본 발명의 세포집단을 생산하는 것을 포함한다. 세포집단은 환자와 자가(autoologous)이므로 이식거부를 일으키지 않는다. 본 발명은 또한 환자에게 투여하기에 적합하고 이러한 방식으로 생산되는 세포집단도 제공한다.

[0142] 별법으로, 본 발명은 환자에게 투여하기에 적합한 본 발명의 세포집단을 생산하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 세포가 투여될 환자와 면역학적으로 공존가능한 다른 환자로부터 수득된 MCs를, MCs가 IMP 세포로 분화하도록 유도되는 조건 하에서 배양하고 (b) 상기 정의된 바와 같은 발현 패턴을 갖는 IMP 세포들을 수확 및 배양함으로써 환자에게 투여하기에 적합한 본 발명의 세포집단을 생산하는 단계를 포함한다. 얻어진 세포집단은 환자와 동종이계이므로 이식거부 가능성이 낮아질 것이다. 본 발명은 또한 환자에게 투여하기에 적합하고 이러한 방식으로 생산된 세포집단도 제공한다.

[0143] 의약, 방법 및 치료 용도

[0144] 본 발명의 IMP 세포들은 인간이나 동물을 치료하는 방법에 사용가능하다. 따라서 본 발명은 인간 또는 동물의 치료방법에 사용되기 위한 본 발명의 IMP 세포 또는 세포집단을 제공한다. 특히 본 발명은 본 발명의 IMP 세포

들 또는 본 발명의 세포집단을 이용하여 환자의 손상된 조직을 복구하는 것에 관한 것이다. 본 발명은 또한 본 발명의 IMP 세포들 또는 본 발명의 세포집단을 이용하여 심장, 뼈, 연골, 힘줄, 인대, 간, 신장 또는 폐의 손상 또는 환자의 질병을 치료하는 것에 관한 것이기도 하다.

[0145] 본 발명은 치료적으로 효과적인 갯수의 세포를 포함하는 본 발명의 세포집단을 환자에게 투여함으로써, 환자의 손상된 조직을 치료하는 것을 포함하는, 환자의 손상된 조직을 복구하는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 환자의 손상된 조직을 복구하는데 사용하기 위한 본 발명의 세포집단도 제공한다. 본 발명은 또한 환자의 손상된 조직을 복구하기 위한 의약을 제조하는데 있어서의 본 발명의 세포집단의 용도도 제공한다.

[0146] 조직은 좋기로는 중배엽으로부터 유래하는 것이 바람직하다. 더욱 좋기로는 조직은 심장, 뼈, 연골, 힘줄, 인대, 간, 신장 또는 폐 조직인 것이 바람직하다.

[0147] 조직에 대한 손상은 상처 또는 질병에 기인할 수 있다. 상처 또는 질병은 환자의 심장, 뼈, 연골, 힘줄, 인대, 간, 신장 또는 폐의 손상 또는 질병인 것이 좋다. 본 발명은 따라서 치료적으로 효과적인 갯수의 세포들을 포함하는 본 발명의 세포집단을 환자에게 투여함으로써, 환자의 상처 또는 질병을 치료하는 것을 포함하는, 환자에게 있어서 심장, 뼈, 연골, 힘줄, 인대, 간, 신장 또는 폐의 손상 또는 질병을 치료하는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 환자의 심장, 뼈, 연골, 힘줄, 인대, 간, 신장 또는 폐의 손상 또는 질병을 치료하는데 사용되기 위한 본 발명의 세포집단도 제공한다. 본 발명은 또한 환자의 심장, 뼈, 연골, 힘줄, 인대, 간, 신장 또는 폐의 손상 또는 질병을 치료하기 위한 의약을 제조하는데 있어서의 본 발명의 세포집단의 용도도 제공한다.

[0148] 심장의 상처 또는 질병은 좋기로는 심근경색(MI), 좌심실비대, 우심실비대, 색전, 심부전, 선천성 심장질환, 심장판막질환, 부정맥 및 심근염으로부터 선택되는 것이 바람직하다.

[0149] MI는 심근에 의해 방출된 VEGF 및 EPO의 수준을 증가시킨다. 또한, MI는 염증반응과 연관되어 있고 경색된 조직은 대식세포 이동억제인자 (MIF), 인터류킨 (IL-6) 및 KC/Gro-알파도 방출한다. 심근경색 (MI)이 일어나면 CCL7 (이전에 MCP3로서 알려짐), CXCL1, CXCL2가 심장에서 유의적으로 상향조절되므로 MSCs가 경색된 심근으로의 생착 및 귀소에 연루되어 있을 수 있다.

[0150] 심근경색 마우스 모델에서, IL-8은 주로 MI 이후 최초 2일 이내에 유전자 발현을 고도로 상향조절하는 것으로 나타났다. 특히, 증가된 IL-8 발현은 경색 부위와 경계 지역에 집중되었으며 경색되지 않은 부분에서는 훨씬 적게 발현되었다. CXCR2의 활성화에 의해, MIF는 케모카인-유사 기능을 나타내며 염증세포 동원 및 죽종형성 (atherogenesis)의 주요조절자로서 작용한다.

[0151] 뼈 질환 또는 상처는 골절, 솔터-헤리스 골절, 불완전 골극골절, 뼈 돌출, 두개골유합, 코핀-로우리 증후군, 진행성 골화성 섬유성 골 이형성증, 섬유형성 이상, 풍 질환 (또는 녹색손발톱 증후군), 저인산증, 클리펠-파일 증후군, 대사성 골질환, 녹색손발톱 증후군, 골관절염, 변형성골염 (또는 뼈의 파렛씨병), 남성 섬유성 골염 (또는 섬유성 골염 또는 뼈의 폰 텍클링하우젠씨병), 치골염, 치밀화 골염 (condensing osteitis 또는 osteitis condensans), 장골 치밀화 골염, 박리성 뼈연골염, 불완전 골형성, 골연화증, 골수염, 골감소증, 골화석증, 골다공증, 골괴사, 다공성 과골증(porotic hyperostosis), 원발성 부갑상선 항진증, 신장성 골형성장애, 골암, 전이암과 연관된 뼈 병변, 골함 스타우트병, 원발성 부갑상선 항진증, 치주질환, 및 골대체제의 무균 이완 (aseptic loosening of joint replacements)으로부터 선택되는 것이 바람직하다. 골암은 유방암, 다발성골수종, 골육종(뼈의 거대종양), 골연골종 또는 파골세포종일 수 있다. 뼈 병변을 야기하는 전이암은 유방암, 전립선암, 신장암, 폐암 및/또는 성인 T 세포 백혈병일 수 있다.

[0152] 만일 손상된 조직이 심장 조직 또는 뼈 조직일 경우, 세포집단 내의 IMP 세포들은 CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD271, CXCR1, CXCR2 및 CXCR4은 검출가능한 수준으로 발현하고, CD14, CD34 및 CD45는 검출가능한 수준으로 발현하지 않는 것이 바람직하다. 만일 손상된 조직이 뼈 조직이면, 세포집단 내의 IMP 세포들은 더욱 좋기로는 CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD271, TGF-베타 3, 뼈형태형성 단백질-6 (BMP-6), SOX-9, 콜라겐-2, CD117 (c-kit), 케모카인 (C-C 모티프) 리간드 12 (CCL12), CCL7, 인터류킨-8 (IL-8), 혈소판-유도 성장인자-A (PDGF-A), PDGF-B, PDGF-C, PDGF-D, 대식세포 이동억제인자 (MIF), IGF-1, 간세포 성장인자 (HGF), PDGF-R α, PDGF-R β, CXCR4, C-C 1형 케모카인 수용체 (CCR1), IGF-1 수용체 (IGF-1R), 간세포 성장인자 수용체 (HGFR), CXCL12 및 NFκB를 검출가능한 수준으로 발현하고, CD14, CD34 및 CD45는 검출가능한 수준으로 발현하지 않는 것이 바람직하다.

[0153] 질병 또는 장애는 치주질환, 자궁내막증 또는 반월형 열상(meniscal tears)일 수 있다.

[0154] 모든 경우에 있어서, 본 발명의 IMP 세포들은 환자 또는 동종이게 공여자로부터 유래되는 것이 바람직하다. 환

자로부터 본 발명의 IMP 세포들을 유도함으로써 IMP 세포들 자체가 환자의 면역계에 의해 거부되지 않도록 할 수 있을 것이다. 공여자와 수혜자 간의 여하한 차이는 궁극적으로 IMP 세포들의 소거를 일으키겠지만, 손상된 조직의 적어도 일부가 복구된 후일 것이다.

- [0155] 본 발명은 환자에게 본 발명의 IMP 세포들을 치료적으로 유효한 갯수로 투여하는 것에 관한 것이다. 치료적으로 유효한 갯수는 손상, 질병 또는 상처의 증상을 한 가지 이상 경감시키는 갯수를 말한다. 치료적으로 유효한 갯수는 좋기로는 손상된 조직을 복구하거나 또는 질병 또는 상처를 치료하는 갯수인 것이 바람직하다.
- [0156] 본 발명의 IMP 세포들은 어떠한 적합한 환자에게든 투여가능하다. 환자는 일반적으로 인간 환자이다. 환자는 IMP 세포의 공급원과 관련하여 전술한 동물 또는 포유동물일 수 있다.
- [0157] 환자는 유아, 청소년 또는 성인일 수 있다. 환자는 손상된 조직을 갖는 것으로 알려지거나 또는 손상된 조직을 갖는 것으로 의심되는 환자일 수 있다. 환자는 해당 질환 또는 상처에 대해 감수성이 있거나 또는 결릴 위험이 있을 수 있다. 예를 들어, 환자는 유전적으로 심부전에 결릴 성향이 있는 환자일 수 있다.
- [0158] 본 발명은 손상된 조직을 복구하거나 진통 효과를 나타내는 다른 수단 및 물질과 조합 사용될 수도 있다. 몇몇 경우에서, 본 발명의 IMP 세포들은 손상된 조직을 복구하거나 진통 효과를 제공하는 다른 물질과 동시에, 순차적으로 또는 별도로 투여될 수 있다. IMP 세포들은 손상된 조직에 대한 기존 치료법과 조합적으로 사용될 수 있으며 예컨대 이러한 치료법과 단순 혼합 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명은 손상된 조직의 기존 치료법의 효능을 증가시키는데 이용될 수 있다.
- [0159] 본 발명은 좋기로는 치료제 및/또는 진단제가 로딩되거나 트랜스펙션된 IMP 세포들의 용도에 관한 것이기도 하다. 치료제는 손상된 조직을 복구하는데 도움이 될 수 있다. 진단제 예컨대 형광 분자는 환자 체내에서 IMP 세포들의 위치를 동정하는 것을 도울 수 있다. IMP 세포들은 기술분야에 공지인 여하한 방법을 이용하여 로딩되거나 트랜스펙션될 수 있다. IMP 세포들의 로딩은 시험관내 또는 생체외에서 수행될 수 있다. 각각의 경우, IMP 세포들은 배양 중 제제와 간단히 접촉시키면 된다. 별법으로, 리포솜과 같은 전달 비히클을 이용하여 IMP 세포에 제제를 로딩할 수 있다. 이러한 비히클은 기술분야에 공지이다.
- [0160] IMP 세포들의 트랜스펙션은 시험관내 또는 생체외에서 수행가능하다. 별법으로, MC 단계에서 안정한 트랜스펙션을 수행하여 트랜스유전자를 발현하는 IMP 세포들을 이들로부터 구별하는 것이 가능하다. IMP 세포들은 상기 제제를 인코딩하는 핵산으로 트랜스펙션시킨다. 예를 들어, 이들 제제를 인코딩하는 바이러스 입자 또는 기타 벡터를 이용할 수 있다. 이의 실행방법은 기술분야에 공지이다.
- [0161] 핵산은 IMP 세포들에서 이 제제의 발현을 일으킨다. 핵산 분자는 제제를 인코딩하는 서열에 작동적으로 연결되고, IMP 세포들에서 활성적이거나 IMP 세포들에서 유도될 수 있는 프로모터를 포함하는 것이 바람직하다.
- [0162] 특히 바람직한 일 구체예에서, 제제를 인코딩하는 핵산은 바이러스 입자를 통해 전달될 수 있다. 바이러스 입자는 효율적인 트랜스펙션을 위해 표적화 분자를 포함할 수 있다. 표적화 분자는 일반적으로 그 분자가 IMP 세포들에 그 바이러스를 표적화시킬 수 있도록, 그 바이러스의 표면에 전부 또는 일부 제공된다.
- [0163] 어떤 적합한 바이러스든지 이러한 구체예에서 사용가능하다. 바이러스는 예컨대 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스, 백시니아 바이러스 또는 단순포진 바이러스일 수 있다. 특히 바람직한 일 구체예에서 바이러스는 렌티바이러스일 수 있다. 렌티바이러스는 유전자 전달에 적합하게 사용될 수 있는 변형된 HIV 바이러스일 수 있다. 렌티바이러스는 SIV, FIV, 또는 말의 감염성 빈혈 바이러스 (EQIA) 기반 벡터일 수 있다. 바이러스는 몰로니 쥐의 백혈병 바이러스 (moloney murine leukaemia virus: MMLV)일 수 있다. 본 발명에서 사용된 바이러스들은 좋기로는 복제 결손(replication deficient)인 것이 바람직하다.
- [0164] 바이러스 입자들을 사용하여야만 하는 것은 아니다. 본 발명의 IMP 세포들을 트랜스펙션시킬 수 있는 벡터이면 어느 것이든 무방하며, 예컨대 통상적인 플라스미드 DNA 또는 RNA 트랜스펙션도 이용가능하다.
- [0165] 핵산 구조물의 업테이크는 예컨대 트랜스펙션 제제의 사용을 비롯한, 몇가지 공지된 트랜스펙션 기술에 의해 증강될 수 있다. 이들 제제의 예로는 양이온 제제, 예컨대, 칼슘 포스페이트 및 DEAE-덱스트란 및 리포펙턴트, 예컨대 리포펙타민, fugene 및 트랜스펙탐을 들 수 있다.
- [0166] 세포는 적절한 조건 하에서 로딩되거나 트랜스펙션될 수 있다. 세포와 제제 또는 벡터는 예컨대 5분 내지 10일, 좋기로는 1시간 내지 5일, 더욱 좋기로는 5 시간 내지 2일 및 더더욱 좋기로는 12시간 내지 1일 동안 접촉될 수 있다.

- [0167] 본 발명은 또한 전술한 바와 같은 제제가 로딩되거나 제제에 의해 트랜스펙션된 IMP 세포들도 제공한다. 이러한 IMP 세포들은 본 발명의 치료 구체에에 이용될 수 있다.
- [0168] 몇몇 구체에에서, MCs는 환자로부터 회수되어, 본 발명의 방법을 이용하여 IMP 세포들로 전환된 다음, 시험관내에서 로딩되거나 트랜스펙션된 후 같은 환자에게로 다시 돌아올 수 있다. 이러한 경우, 본 발명에서 사용되는 IMP 세포들은 그 환자에 대해 자가 세포가 되어 완전히 맷치된 것이다. 바람직한 경우, 본 발명에서 사용되는 세포들은 환자로부터 회수되어 생체외에서 사용된 다음 동일한 환자에게 다시 되돌아오는 것이 좋다.
- [0169] 의약 조성물 및 투여
- [0170] 본 발명은 부가적으로 본 발명의 IMP 세포 또는 본 발명의 세포집단을 약학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제, (ii) 1 이상의 리포좀 및/또는 (iii) 1 이상의 미세기포(microbubbles)와 조합하여 포함하는 의약 조성물을 제공한다. 이 조성물은 (i); (ii); (iii); (i) 및 (ii); (i) 및 (iii); (ii) 및 (iii); 또는 (i), (ii) 및 (iii)을 포함할 수 있다. IMP 세포 또는 세포집단은 종기로는 1 이상의 리포좀 및/또는 1 이상의 미세기포에 함유되는 것이 바람직하다. 리포좀 및/또는 미세기포는 어떠한 수로든 존재할 수 있다. 본 발명의 세포집단과 관련하여 전술된 모든 갯수가 리포좀 및/또는 미세기포에도 동등하게 적용된다. 리포좀 또는 미세기포는 1개의 IMP 세포 또는 두 개 이상의 IMP 세포를 함유할 수 있다.
- [0171] 조성물은 전술한 IMP 세포들 또는 세포집단들 및 몇몇 구체에에서 본 발명에 설명된 핵산 분자, 벡터 또는 바이러스를 어떠한 갯수로든 함유할 수 있다. 본 발명은 본 발명의 의약 조성물의 유효량을 환자에게 투여하는 것을 포함하는 환자에 있어서 손상된 조직을 복구하는 방법을 제공한다. 전술한 치료 관련 구체예들은 이 구체예에 동등하게 적용될 수 있다.
- [0172] 본 발명의 다양한 조성물들은 적절한 방법을 이용하여 조성될 수 있다. 표준 약학적으로 허용가능한 담체 및/또는 부형제를 이용하여 세포를 조성하는 것은 제약 기술분야의 통상적인 방법을 이용하여 수행가능하다. 제형(formulation)의 정확한 성질은 투여하고자 하는 세포와 소망되는 투여 경로를 비롯한 여러가지 인자에 따라 달라진다. 적절한 제형 유형은 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th Edition, Mack Publishing Company, Eastern Pennsylvania, USA]에 설명되어 있다.
- [0173] 세포는 어떠한 경로로든 투여가능하다. 적절한 경로의 비제한적인 예로는 정맥내, 근육내, 복강내 또는 기타 적절한 투여 경로를 들 수 있다. 만일 손상된 조직이 심장 조직일 경우, 세포들은 심내막심근, 표피심근(epimyocardial), 심실내, 심장내, 역방향 심장정맥굴(retrograde coronary sinus), 동맥내, 심막내 또는 정맥내 경로를 통해 투여될 수 있다.
- [0174] 만일 손상된 조직이 뼈이면, 세포는 골절이나 질병과 같은 상처 부위로 골내 경로로 투여될 수 있다. 만일 손상된 조직이 연골, 힘줄, 인대, 간, 신장 또는 폐 조직이면, 세포는 조직 내로 직접 투여될 수도 있다. 만일 손상된 조직이 폐 조직이면, 세포는 폐내 경로를 통해 도입될 수 있다. 만일 손상된 조직이 간 또는 신장이면, 세포는 복강내 경로를 통해 도입될 수 있다. 세포는 종기로는 정맥내로 투여되는 것이 바람직하다.
- [0175] 조성물은 생리적으로 허용가능한 담체 또는 희석제와 함께 제조될 수 있다. 일반적으로, 이러한 조성물은 세포의 액상 현탁액으로서 제조된다. 세포들은 약학적으로 허용가능하고 활성성분과 공용가능한 부형제와 혼합될 수도 있다. 적절한 부형제의 예로는 물, 염수, 텍스트로스, 글리세롤 등 및 이들의 조합을 들 수 있다.
- [0176] 이에 더해, 소망되는 경우, 본 발명의 의약 조성물은 습윤제, 유화제, pH 완충제 및/또는 효능을 증강시키는 아췌반트와 같은 보조물질을 소량 함유할 수 있다. 조성물은 종기로는 인간 혈청 알부민을 포함하는 것이 바람직하다.
- [0177] 한 가지 적합한 담체 또는 희석제는 Plasma-Lyte A[®]이다. 이것은 정맥내 투여를 위한 멸균, 비발열성 등장 용액이다. 100 mL 마다 526 mg의 염화나트륨(NaCl); 502 mg의 글루콘산나트륨(C6H11NaO7); 368 mg의 아세트산나트륨 삼수화물, USP (C2H3NaO2●3H2O); 37 mg의 염화칼륨, USP (KCl); 및 30 mg의 염화마그네슘, USP (MgCl2●6H2O)을 함유한다. 이것은 항미생물제는 함유하지 않는다. pH는 수산화나트륨으로 조정한다. pH는 7.4 (6.5 내지 8.0)이다.
- [0178] IMP 세포들은 1 이상의 리포좀 및/또는 1 이상의 미세기포 내에 함유될 수 있다. 적절한 리포좀은 기술분야에 알려져 있다. 적절한 리포좀은 예컨대 문헌 [Akbarzadeh et al. Nanoscale Research Letters 2013, 8:102 및 Meghana et al. International Journal Of Pharmaceutical 및 Chemical Sciences, 2012, 1(1): 1-10]에 개시

되어 있다. 리포좀 형성에 사용되기 위한 적절한 지질은 미세기포와 관련하여 후술된다.

- [0179] 미세기포, 이들의 형성 및 생물의학적 용도는 기술분야에 공지이다 (예컨대 Sirsi 및 Borden, Bubble Sci Eng Technol. Nov 2009; 1(1-2): 3-17). 미세기포는 직경이 1 밀리미터 미만이고 1 마이크로미터 보다는 큰 기포들이다. 본 발명에 사용되는 미세기포는 종기로는 직경이 8 μm 이하, 예컨대 직경이 7 μm 이하, 직경이 6 μm 이하, 직경이 5 μm 이하, 직경이 4 μm 이하, 직경이 3 μm 이하 또는 직경이 2 μm 이하이다.
- [0180] 미세기포는 여하한 물질로부터 형성되어도 무방하다. 미세기포의 일반 조성은 셸에 의해 안정화된 가스 코어이다. 가스 코어는 공기나 무거운 가스, 예컨대 과불화탄소, 질소 또는 과불화프로판올을 포함할 수 있다. 무거운 가스는 물에 덜 녹으며 따라서 미세기포의 용해를 야기하는 미세기포로부터의 누출을 일으킬 가능성이 더 적다. 코어에 무거운 가스를 갖는 미세기포들은 일반적으로 더 오래 동안 순환가능하다.
- [0181] 셸은 어떠한 소재로부터 형성되든 무방하다. 셸 소재는 종기로는 단백질, 계면활성제, 지질, 폴리머 또는 이들의 혼합물을 포함할 수 있다.
- [0182] 적절한 단백질의 비제한적인 예로는 알부민, 리소자임 및 아비딘을 들 수 있다. 셸 내 단백질들은 예컨대 시스템인-시스템인 결합에 의하여 화학적으로 가교될 수 있다. 기타 가교는 기술분야에 공지이다.
- [0183] 적절한 계면활성제의 비제한적인 예로는 소르비탄 모노팔미테이트 (예컨대 SPAN-40), 폴리소르베이트 세제 (polysorbate detergents) (예컨대 TWEEN-40), SPAN-40와 TWEEN-40의 혼합물 및 수크로스 스테아레이트(모노에스테르 및 디에스테르)를 들 수 있다.
- [0184] 적절한 폴리머의 비제한적인 예로는 알기네이트 폴리머, 에틸리텐의 더블 에스테르 폴리머, 코폴리머인 폴리(D,L-락타이드-코-글리콜라이드)(PLGA), 폴리(비닐 알코올) (PVA), 코폴리머인인 폴리퍼플루오로옥틸옥시카르보닐-폴리(락트산) (PLA-PFO) 및 기타 코폴리머들을 들 수 있다. 블록 코폴리머는 2개 이상의 모노머 서브-유닛이 함께 중합되어 단일 폴리머 사슬을 형성하는 폴리머 소재이다. 블록 코폴리머는 일반적으로 각각의 모노머 서브 유닛이 부여하는 특징들을 갖는다. 그러나, 블록 코폴리머는 개별적인 서브유닛으로부터 형성되는 폴리머가 갖지 않는 독특한 성질을 가질 수도 있다. 블록 코폴리머는 모노머 서브유닛들 중 하나는 소수성(즉, 친유성)인 반면 다른 서브유닛(들)은 수성 매질 중에서 친수성이 되도록 조작할 수 있다. 이 경우, 블록 코폴리머는 양쪽 특성을 가질 수 있어서, 생물학적 막(membrane)을 모방하는 구조를 형성할 수 있다. 블록 코폴리머는 다이블록(diblock: 2개의 모노머 서브유닛으로 구성됨)일 수 있으나, 2개 보다 많은 서브유닛들로 구성되어 양쪽성으로서 거동하는 보다 복잡한 배열을 형성할 수도 있다. 코폴리머는 트라이블록, 테트라블록 또는 펜타블록 코폴리머일 수 있다. 블록 코폴리머는 또한 지질 서브재료(lipid sub-materials)로서 분류되지 않는 서브유닛으로부터 제조될 수 있다; 예컨대 실록산 또는 기타 비탄화수소계 모노머로부터 소수성 폴리머를 만들 수 있다. 블록 코폴리머의 친수성 서브섹션 역시 저단백질 결합 특성을 가질 수 있으므로 해서, 원료 생물학적 샘플에 노출될 경우 고도로 내성인 막을 만드는 것이 가능하다. 이 헤드기 유닛은 또한 비전통적인 지질 헤드기로부터 유래할 수도 있다.
- [0185] 미세기포를 형성하는 여하한 지질 물질도 사용가능하다. 지질 조성물은 미세기포가 예컨대 표면전하, 충전밀도 또는 기계적 특징과 같은 소망되는 특성을 갖도록 선택된다. 지질 조성물은 1종 이상의 상이한 지질을 포함할 수 있다. 예를 들어, 지질 조성물은 최대 100종의 리피드를 함유할 수 있다. 지질 조성물은 종기로는 1 내지 10종의 리피드를 함유하는 것이 좋다. 지질 조성물은 자연발생적인 지질 및/또는 인공 지질을 포함할 수 있다.
- [0186] 지질은 일반적으로 헤드기, 인터페이스 모이어티 및 같거나 다를 수 있는 2개의 소수성 테일기를 포함한다. 적절한 헤드기의 비제한적인 예로는 중성 헤드기, 예컨대, 디아실글리세라이드(DG) 및 세라마이드 (CM); 쯔비터이온 헤드기, 예컨대 포스파티딜콜린(PC), 포스파티딜에탄올아민(PE) 및 스펅고미엘린 (SM); 음하전된 헤드기, 예컨대 포스파티딜글리세롤(PG); 포스파티딜세린(PS), 포스파티딜이노시톨 (PI), 포스파트산(phosphatic acid: PA) 및 카디올리핀(CA); 및 양하전된 헤드기, 예컨대 트리메틸암모늄-프로판 (TAP)을 들 수 있다. 적절한 인터페이스 모이어티의 비제한적인 예로는 자연발생적인 인터페이스 모이어티, 예컨대 글리세롤계 또는 세라마이드계 모이어티를 들 수 있다. 적절한 소수성 테일기의 비제한적인 예로는 포화 탄화수소 사슬, 예컨대 라우르산 (n -도데칸올산), 미리스트산 (n -테트라데코논산), 팔미트산 (n -헥사데칸산), 스테아르산 (n -옥타데칸산) 및 아라키드산(n -에이코산산); 불포화된 탄화수소 사슬, 예컨대 올레산 (시스-9-옥타데칸산); 분지되니 탄화수소 사슬, 예컨대 피타노일을 들 수 있다. 불포화 탄화수소 사슬 내의 사슬의 길이와 이중결합의 위치 및 갯수는 다양할 수 있다. 분지형 탄화수소 사슬 내의 사슬의 길이와 가지, 예컨대 메틸기의 위치 및 갯수도 다양할 수 있다. 소수성 테일기는 에테르 또는 에스테르로서 인터페이스 모이어티에 연결될 수 있다.

- [0187] 지질은 화학적으로 변형될 수 있다. 지질의 헤드기 또는 테일기는 화학적으로 변형될 수 있다. 헤드기가 화학적으로 변형되어있는 적절한 지질의 비제한적인 예로는 PEG-변형된 지질, 예컨대, 1,2-디아실-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[메톡시(폴리에틸렌 글리콜)-2000]; 관능기화된 PEG 지질, 예컨대 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[바이오틴(폴리에틸렌 글리콜)2000]; 및 컨쥬게이션을 위해 변형된 지질, 예컨대 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-(숙시닐) 및 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-(바이오틴)을 들 수 있다. 테일기가 화학적으로 변형되어 있는 적절한 지질의 비제한적인 예로는, 중합 가능한 지질, 예컨대, 1,2-비스(10, 12-트리카사디노일)-sn-글리세로-3-포스포콜린; 플루오르화 지질 예컨대 1-팔미토일-2-(16-Fluoropalmitoyl)-sn-글리세로-3-포스포콜린; 중수소화된(deuterated) 지질, 예컨대 1,2-디팔미토일-D62-sn-글리세로-3-포스포콜린; 및 에테르 결합된 지질, 예컨대 1,2-디-O-피타닐-sn-글리세로-3-포스포콜린을 들 수 있다. 지질은 반만-변형되거나 또는 관능화되어 리간드, 수용체가 전술한 항체와 커플링하는 것을 용이하게 할 수 있다.
- [0188] 지질 조성물은 미세기포의 특성에 영향을 미치는 첨가제를 1종 이상 포함할 수 있다. 적절한 첨가제의 비제한적인 예로는 지방산, 예컨대 팔미트산, 미리스트산 및 올레산; 지방 알코올, 예컨대 팔미트 알코올, 미리스트 알코올 및 올레 알코올; 스테롤, 예컨대 콜레스테롤, 에르고스테롤, 라노스테롤, 시토스테롤 및 스티그마스테롤; 라이소인지질 예컨대 1-아실-2-히드록시-sn-글리세로-3-포스포콜린; 및 세라마이드를 들 수 있다.
- [0189] 미세기포 쉘은 종기로는 인지질로부터 형성되는 것이 바람직하다. 적절한 인지질은 기술분야에 공지이다.
- [0190] Definity (Lantheus Medical Imaging) 및 Sonovue[®] (Bracco Diagnostics)와 같은 몇몇 시판되는 지질 쉘 미세기포 제형이 존재한다.
- [0191] 미세기포는 또한 미리 형성된 미세기포 상에 중합전해질 다층(PEM: polyelectrolyte multilayer) 쉘을 형성하는 것을 포함하는, 폴리머-계면활성제 하이브리드로부터도 형성가능하다. 미리 형성된 미세기포는 PEM 침착(deposition)의 기판으로 기능하는, 하전된 계면활성제 또는 단백질층으로 코팅된다. 미리 형성된 미세기포는 PEM 침착(deposition)의 기판 기능을 하는 하전된 계면활성제 또는 단백질 층으로 코팅된다. 레이어-바이-레이어(layer-by-layer) 어셈블리 기술은 반대 전하를 띠는 폴리이온들을 미세기포 쉘에 순차적으로 흡착시키는데 이용된다. 예컨대, 폴리이온 쌍의 경우 폴리(알릴아민 염산염) (PAH) 및 폴리(스티렌 설포네이트) (PSS)를 이용하여 PEM을 미세기포 상에 침착시킬 수 있다. 기저 쉘로서 양이온 헤드기 트리메틸암모늄 프로판(TAP)를 함유하고 폴리이온 쌍으로서 DNA 및 폴리(L-라이신)을 함유하는 인지질과의 PEM 미세기포 역시도 개발되었다.
- [0192] 미세기포는 일반적으로 가스 및 미세기포 쉘 소재 사이에 인터페이스를 제공함으로써 형성된다. 전술한 모든 재료가 이용가능하다. 몇몇 재료, 예컨대 인지질은 자연발생적으로 미세기포를 형성한다. 인지질은 그 자체로 미세기포로 조립된다. 기타의 재료들은 인터페이스를 초음파처리할 필요가 있다. 즉, 소리 에너지 또는 음파를 인터페이스에 적용시킬 필요가 있다. 초음파가 일반적으로 사용된다. 적절한 방법은 초음파 기술분야에 알려져 있다.
- [0193] 미세기포 형성 후 또는 미세기포가 형성되는 동안 미세기포에 IMP 세포들을 로딩할 수 있다.
- [0194] IMP 세포들은 투여 제형과 혼용가능한 방식으로, 그리고 치료적으로 유효한 양으로 투여된다. 투여될 양은 치료될 대상자, 대상자의 면역계 능력 및 목적하는 복구도에 따라 달라진다. 투여에 요구되는 IMP 세포들의 정확한 양은 임상적 판단에 따라 달라지며 각 대상자마다 독특할 수 있다.
- [0195] 적절한 갯수의 세포들을 대상자에게 투여할 수 있다. 예컨대, 환자 체중 1 kg 당 적어도, 또는 약, 0.2×10^6 , 0.25×10^6 , 0.5×10^6 , 1.5×10^6 , 4.0×10^6 또는 5.0×10^6 개의 세포들을 투여할 수 있다. 예를 들어, 적어도, 또는 약, 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 개의 세포들을 투여할 수 있다. 가이드로서, 투여하고자 하는 본 발명의 세포의 갯수는 10^5 내지 10^9 개, 종기로는 10^6 내지 10^8 개일 수 있다. 일반적으로는 각 환자에게 최대 2×10^8 개의 IMP 세포들이 투여된다. 본 발명의 세포집단들과 관련하여 전술된 특정 갯수들 중 어떠한 갯수로는 투여될 수 있다. 세포들이 투여되거나 존재하는 이러한 경우, 세포의 생존을 돕기 위해 배양 배지가 존재할 수도 있다. 몇몇 경우 본 발명의 세포들은 냉동 분주액(frozen aliquots)으로서 제공될 수 있으며 냉동 동안 생존을 용이하게 하기 위해 DMSO와 같은 물질이 존재할 수 있다. 이러한 냉동 세포들은 일반적으로 해동된 후 유지 또는 투여를 위해 완충액 또는 배지로 옮겨진다.
- [0196] 하이브리드 조성물

- [0197] 본 발명의 1 이상의 IMP 세포들은 이 출원과 동시에 출원된 UK 출원 (CTL Ref: FIBRE1)에 개시된 바와 같은 하이브리드 조성물의 일부를 형성할 수 있으며 그러한 조성물의 일부로서 환자에게 투여되는 것이 바람직하다. 특히, 본 발명은 하이브리드 조성물에 관한 것으로 이 하이브리드 조성물은:
- [0198] (a) 1 이상의 생체적합성(biocompatible) 섬유;
- [0199] (b) 1 이상의 본 발명의 IMP 세포들; 및
- [0200] (c) (i) 1 이상의 치료 세포들을 1 이상의 섬유에 부착시키/부착시키거나 1 이상의 치료 세포를 1 이상의 섬유에 내장(embed)하고/내장하거나 (ii) 상기 조성물을 조직에 부착시키는 1 이상의 생체적합성 성분
- [0201] 을 포함한다.
- [0202] 본 발명의 하이브리드 조성물은 1 이상의 생체적합성 섬유를 포함한다. 섬유가 손상된 조직과 접촉시 아무런 부작용이나 유해 반응을 일으키지 않으면 그 섬유는 생체적합성이다.
- [0203] 조성물에 존재할 수 있는 생체적합성 섬유의 갯수에는 제한이 없다. 조성물은 오직 1개의 섬유만을 포함할 수도 있다. 조성물은 일반적으로 섬유를 한 개보다 많은 갯수로, 예컨대 적어도 2, 적어도 5, 적어도 10, 적어도 20, 적어도 30, 적어도 40, 적어도 50, 적어도 100, 적어도 200, 적어도 500개의 섬유, 적어도 1000개의 섬유 또는 그 이상의 섬유를 포함한다.
- [0204] 적합한 생체적합성 섬유는 기술분야에 알려져 있다. 1 이상의 생체적합성 섬유는 천연 또는 합성섬유일 수 있다. 바람직한 생체적합성 섬유의 비제한적인 예로는, 셀룰로스 섬유, 콜라겐 섬유, 콜라겐-글리코사미노글리칸 섬유, 젤라틴 섬유, 실크 피브로인 섬유, 1 이상의 피브린 섬유, 키토산 섬유, 전분 섬유, 알지네이트 섬유, 히알루론산 섬유, 폴록사머 섬유 또는 이들의 조합을 들 수 있다. 글리코사미노글리칸이 바람직한 콘드로이틴이다. 셀룰로스는 종기로는 카르복시메틸셀룰로스, 히드록시프로필메틸셀룰로스 또는 메틸셀룰로스이다. 폴록사머는 플루론산, 임의로 Pluronic F-127인 것이 바람직하다.
- [0205] 단일 조성물 내에 섬유가 1개 보다 많이 존재할 경우, 섬유집단은 동질의 것 수 있다. 달리 설명하면, 집단 내의 모든 섬유들이 동종의 섬유, 예컨대 셀룰로스 섬유일 수 있다. 또는 섬유 집단은 이질적일 수 있다. 달리 설명하면, 섬유 집단은 상이한 종류의 섬유들, 예컨대 셀룰로스 섬유와 콜라겐 섬유를 함유할 수도 있다.
- [0206] 1 이상의 섬유들의 길이는 다양할 수 있다. 1 이상의 섬유들은 종기로는 상기 조성물을 이용하여 치료될 조직 내의 손상의 깊이와 대략 동일한 길이를 갖는 것이 바람직하다. 1 이상의 섬유의 길이는 종기로는 조성물이 소정의 깊이까지 손상된 조직을 관통할 수 있도록 고안되는 것이 바람직하다. 1 이상의 섬유들의 길이는 다양할 수 있다. 1 이상의 섬유의 길이의 하한은 일반적으로 1 이상의 치료 세포들의 직경에 의해 정해진다. 적절한 길이의 비제한적인 예로는, 적어도 1 μm 길이, 적어도 10 μm 길이, 적어도 100 μm 길이, 적어도 500 μm 길이, 적어도 1mm 길이, 적어도 10mm (1cm) 길이, 적어도 100mm (10cm) 길이, 적어도 500mm (50cm) 길이 또는 적어도 1000mm (100cm 또는 1m) 길이이다. 1 이상의 섬유들의 길이는 더 길 수도 있다. 예를 들어, 1 이상의 섬유들은 예컨대, 인간의 장관(intestinal tract)을 따라 나 있는 손상을 복구하는데 사용될 경우 길이가 최대 5m 또는 10m일 수 있으며, 또는 말과 같이 더 대형인 동물에 사용될 경우에는 그 길이가 더 길 수도 있다. 1 이상의 섬유의 길이는 일반적으로 이들의 의도된 용도 및/또는 예컨대 외과의, 로봇 또는 자석을 이용하는 등의 기타 수단에 의한 이들의 조작 용이성에 따라 정해진다.
- [0207] 1 이상의 섬유들은 하전될 수 있다. 1 이상의 섬유들은 종기로는 양전하를 띤다. 1 이상의 섬유는 종기로는 음전하를 띤다.
- [0208] 1 이상의 섬유들은 자성을 띌 수 있다. 1 이상의 섬유들은 1 이상의 자성 원자 또는 자성 기를 포함하도록 변형될 수 있다. 이에 의해 조성물을 자성 표적화할 수 있다. 자성 원자 또는 자성 기는 상자성 또는 초상자성일 수 있다. 적절한 원자 또는 기의 비제한적인 예로는 금 원자, 철 원자, 코발트 원자, 니켈 원자 및 이들 원자를 함유하는 금속 킬레이팅기, 예컨대 니트릴로트리아세트산을 들 수 있다. 금속 킬레이팅기는 예컨대 $-\text{C}(=\text{O})\text{O}^-$, $-\text{C}-\text{O}-\text{C}^-$, $-\text{C}(=\text{O})$, $-\text{NH}-$, $-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}$, $-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2-\text{I}$, $-\text{S}(=\text{O})_2^-$ 및 $-\text{S}$ -로부터 선택된 기를 포함할 수 있다.
- [0209] 조성물은 또한 1 이상의 생체적합성 성분들을 포함한다. 1 이상의 생체적합성 성분들은 (i) 1 이상의 치료 세포들을 1 이상의 섬유에 부착시키고/부착시키거나 1 이상의 치료제 및 1 이상의 섬유를 내장하고/내장하거나 (ii) 조성물을 조직에 부착시킬 수 있다. 1 이상의 생체적합성 성분들은 (a) 1 이상의 치료 세포들을 1 이상의 섬유에 부착시키고, (b) 1 이상의 치료 세포와 1 이상의 섬유를 내장하며, (c) 조성물을 조직에 부착시킬 수 있고,

(d) 1 이상의 치료 세포를 1 이상의 섬유에 부착하고 1 이상의 치료 세포 및 1 이상의 섬유에 내장할 수 있으며, (e) 1 이상의 치료 세포를 1 이상의 섬유에 부착하고 조성물을 조직에 부착할 수 있으며, (f) 1 이상의 치료 세포와 1 이상의 섬유를 내장하고 조성물을 조직에 부착할 수 있거나 또는 (g) 1 이상의 치료 세포를 1 이상의 섬유에 부착하고, 1 이상의 치료 세포 및 1 이상의 섬유를 내장하고 조성물을 조직에 부착시킬 수 있다.

- [0210] 어떤 성분이 손상된 조직과 접촉시 부작용이나 유해 반응을 일으키지 않으면 그 성분은 생체적합성이다.
- [0211] 조성물에는 생체적합성 성분들이 어떠한 수로든 존재할 수 있다. 조성물은 일반적으로 오직 1종 또는 2종의 성분들을 포함한다. 조성물은 이들 성분들을 2종 보다 많이, 예컨대 적어도 3, 적어도 5, 적어도 10, 적어도 20, 적어도 30, 적어도 40, 적어도 50종의 성분 또는 그 이상으로 포함할 수 있다.
- [0212] 1종 이상의 생체적합성 성분들은 종기로는 1 이상의 치료 세포를 1 이상의 섬유에 부착시키는 생체적합성 접착제(biocompatible adhesive)를 포함하는 것이 바람직하다. 생체적합성 접착제는 1 이상의 치료 세포를 (a) 1 이상의 섬유 표면에, (b) 1 이상의 섬유 내에 또는 (c) 1 이상의 섬유의 표면과 섬유 내 양방 모두에 부착시킬 수 있다.
- [0213] 생체적합성 접착제는 천연 또는 합성일 수 있다. 적절한 생체적합성 접착제들은 기술 분야에 알려져 있다. 적절한 접착제의 비제한적인 예로는, 피브린, 피브린 겔, 인테그린, 인테그린 겔, 카드헤린 및 카드헤린 겔을 들 수 있다.
- [0214] 1 이상의 생체적합성 성분들은 종기로는 1 이상의 치료 세포와 1 이상의 섬유를 내장하는 생체적합성 겔을 포함하는 것이 바람직하다. 적절한 생체적합성 겔은 기술 분야에 알려져 있다. 생체적합성 겔은 천연 또는 합성일 수 있다. 바람직한 생체적합성 겔의 비제한적인 예로는 셀룰로스 겔, 콜라겐 겔, 젤라틴 겔, 피브린 겔, 키토산 겔, 전분 겔, 알지네이트 겔, 히알루로난 겔, 아가로스 겔, 폴록사머 겔 또는 이들의 조합을 들 수 있다.
- [0215] 셀룰로스 겔은 전술한 셀룰로스들로부터 형성될 수 있다. 셀룰로스 폴리머 농도는 종기로는 약 1.5% (w/w) 내지 약 4.0% (w/w), 예컨대 약 2.0% (w/w) 내지 약 3.0% (w/w)인 것이 바람직하다. 셀룰로스 폴리머는 종기로는 분자량이 약 450,000 내지 약 4,000,000, 예컨대 약 500,000 내지 약 3,500,000, 약 500,000 내지 약 3,000,000 또는 약 750,000 내지 약 2,500,000 또는 약 1000,000 내지 약 2,000,000인 것이 바람직하다.
- [0216] 폴록사머 겔은 종기로는 플루론산 겔, 임의로 Pluronic F-127 겔인 것이 바람직하다.
- [0217] 접착제 및/또는 겔은 종기로는 점도가 실온에서 1000 내지 500,000 mPa·s (cps), 예컨대 실온에서 약 1500 내지 약 450,000 mPa·s, 실온에서 약 2000 내지 약 400,000 mPa·s, 실온에서 약 2500 내지 약 350,000 mPa·s, 실온에서 약 5000 내지 약 300,000 mPa·s, 실온에서 약 10,000 내지 약 250,000 mPa·s, 실온에서 약 50,000 내지 약 200,000 mPa·s, 또는 실온에서 from 약 50,000 내지 약 150,000 mPa·s인 것이 바람직하다.
- [0218] 점도는 전단응력 또는 인장강도에 의한 변형에 대한 접착제 및/또는 겔의 저항의 척도이다. 점도는 기술분야에 알려진 어떠한 방법으로든 측정 가능하다. 적절한 방법의 비제한적인 예로는 점도계 또는 유량계(rheometer)를 들 수 있다.
- [0219] 실온은 일반적으로 약 18°C 내지 약 25°C, 예컨대 약 19°C 내지 약 24°C 또는 약 20°C 내지 약 23°C 또는 약 21°C 내지 약 22°C이다. 실온은 종기로는 18°C, 19°C, 20°C, 21°C, 22°C, 23°C, 24 °C 및 25°C 중 어느 하나인 것이 바람직하다. 점도는 25°C에서 측정하는 것이 가장 바람직하다.
- [0220] 1 이상의 생체적합성 성분들은 1 이상의 치료 세포를 1 이상의 섬유에 부착시키는 생체적합성 접착제 및 1 이상의 치료 세포와 1 이상의 섬유를 내장하는 생체적합성 겔을 포함하는 것이 바람직하다. 예를 들어, 조성물은 1 이상의 치료 세포를 1 이상의 섬유에 부착시키는 피브린 겔 및 1 이상의 치료 세포와 1 이상의 섬유를 내장하는 셀룰로스 겔을 포함할 수 있다.
- [0221] 전술한 구체예들 모두에서, 생체적합성 접착제 및/또는 생체적합성 겔은 종기로는 혈소판 용해물을 포함하는 것이 바람직하다. 예를 들어, 접착제 및/또는 겔은 혈소판 용해물 겔일 수 있다. 혈소판 용해물이란 혈소판의 용해를 통해 방출되어 혈소판 내에 함유된 천연 성장인자들의 조합을 가리킨다. 용해(lysis)는 화학적 수단 (즉 CaCl₂), 삼투압 수단 (증류된 H₂O 사용) 또는 냉동/해동 방법을 통해 달성될 수 있다. 혈소판 용해물은 미국특허 No. 5,198,357에 설명된 바와 같이 전혈로부터 유도될 수 있다. 혈소판 용해물은 PCT/GB12/052911 (WO 2013/076507로서 공개됨)에 설명된 바와 같이 제조되는 것이 바람직하다. 예컨대, 이것은 혈소판 집단을 적어도 1회의 냉동-해동 사이클로 처리함으로써 (여기서 각 사이클의 냉동 부분은 - 78°C 이하의 온도에서 수행됨) 제

조될 수 있다.

- [0222] 접착제 및/또는 겔은 좋기로는 (a) 혈소판 용해물, (b) 적어도 1종의 약학적으로 허용가능한 폴리머 및 (c) 라이신, 아르기닌, 히스티딘, 아스파르트산, 글루탐산, 알라닌, 메티오닌, 프롤린, 세린, 아스파라긴, 시스테인, 폴리아미노산, 프로타민, 아미노구아니딘, 아연 이온 및 마그네슘 이온으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1종의 약학적으로 허용가능한 양하전된 화학종을 포함하는 것이 바람직하며, 여기서 조성물은 실온에서 점도가 1000 내지 500,000 mPa·s (cps) 범위인 수성 겔이다. 이것은 전술한 셀룰로스 및 폴록사머들 중 어느 것이든 무방하다.
- [0223] 혈소판 용해물은 인간의 혈소판 용해물인 것이 바람직하다. 혈소판 용해물은 상기에서 자세히 설명된 바 있다.
- [0224] 하이브리드 조성물은 1종 이상의 리포솜 또는 1종 이상의 미세기포 내에 함유될 수 있다. 이러한 구조물은 기술 분야에 알려져 있다.
- [0225] 다음에 실시예를 들어 본 발명을 더욱 상세히 설명한다

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0226] **실시예**
- [0227] 실시예 1 - 골수 및 말초혈액 세포 분리 & IMP 세포들의 증식
- [0228] 골수 샘플을 헵크 완충염 용액(Hank Buffered Saline Solution)으로 희석하고 원심분리로 단핵세포(MCs)를 분리하기 위해 Ficoll-Paque 상에 레이어링하였다. 이어서 MCs를 헵크 완충염 용액에 재현탁하고 0.4% 트리판 블루 배제 분석법을 이용하여 계수하여 세포 생존능을 평가하였다. 세포들을 T25 플라스크 (5 ml의 세포배양 배지 내에, MEM, GlutaMAX, 페니실린-스트렙토마이신, 혈소판 용해물, 헤파린)에 접종하고, 37°C, 5% CO2에서 인큐베이션하였다. 제8일에 배지를 갈아주었다. 세포들을 IMP-유사 세포에 대해 매일 모니터링하여, 이것이 존재할 경우, 제조사 지침에 따라 세포 분리용액을 이용하여 세포를 수확하고 상기와 동일한 배지에서 2차 배양하였다. 세포들을 10% 메틸 셀록사이드가 보강된 배양 배지에서 -80°C로 2 세대 저온보존(cryopreserved)하고 나중에 사용하기 위해 액체 질소에서 보관하였다.
- [0229] 실시예 2 - HT-FACS 분석
- [0230] 고처리량 형광활성세포정렬(HT-FACS) 분석법은 패널 내 370종 이상의 세포 표면 마커들을 이용하여, 현탁액 중 세포들의 세포 표면 표면형을 신속하게 특정화할 수 있는, 고처리량 스크리닝 플랫폼이다. 이 플랫폼은 철저한 검증을 거쳐 현재 다양한 인간 조직 및 세포에 대해 사용되고 있다. 패널은 96-웰 플레이트에 배치된 375종의 인간 세포 표면-특이 항체로 구성되어 있다.
- [0231] 이 분석의 목적은 본 발명의 인간 IMPs 및 Lonza[®]로부터 구득한 인간 MSCs의 표면 항원 발현 프로파일을 알아 내는데 있다. 고처리량-FACS (HT-FACS) 플랫폼을 이용함으로써 375종의 표면 항원들을 스크리닝할 수 있다.
- [0232] 저온보존된 PB-MSCs (1x10⁶ 세포/ml)의 바이알 1개를 15 mL의 CTL 배지 (37°C, 5% CO2)를 함유하는 T75 cm2 플라스크에 접종하였다. 배지를 2-3일마다 갈아주면서 세포가 80-90% 컨플루언시에 도달할 때까지 배양하였다. 세포를 계대배양하기 위해, 배지를 제거하고, 세포를 PBS로 2회 세척하였다. 세포를 분리하기 전까지 3 ml의 트립신 0.25%로 처리하였다. 배지 8 ml를 첨가하여 트립신을 불활성화시키고 400g에서 5분간 원심분리하여 세포를 수집하였다. 세포들을 5 ml의 배지에 재현탁하고 30 mL의 CTL 배지 (37°C, 5% CO2)를 함유하는 T175 cm2 플라스크에 접종하였다. HT-FACS 스크리닝을 위해 2천만 내지 3천만개의 세포 (4차 계대)를 수확하기 위해서는 80-90% 컨플루언시의 8 내지 10개의 T175 cm2 플라스크가 필요하다. 항체 하나 당 유세포분석 "이벤트"에 충분한 갯수를 얻기 위해서는, 약 2천만개의 살아있는 세포가 적절하다. 세포를 수집하기 위해, 배지를 제거하고 세포를 PBS로 2회 세척하였다. 세포들을 분리하기 전까지 5 ml의 트립신 0.25%로 처리하였다. 배지를 첨가하여 (8 ml) 트립신을 불활성화시키고 세포를 수집하였다. 세포들을 400g에서 5분간 원심분리하였다. 세포 펠렛을 총 5 ml의 HBSS (Hank's Balanced Salt Solution 마이너스 칼슘/마그네슘 (2mM EDTA 및 1% BSA가 보강됨))에 재현탁시켰다 (단일 세포 현탁액). 샘플 1개 분주액 (10 µl)을 이용하여 배제 염색 (0.2% 트리판 블루)을 이용함으로써 살아있는 세포의 총 갯수를 구하였다.
- [0233] 100 µl의 샘플을 각 웰에 로딩하였다 (FACS의 10,000 내지 20,000 이벤트의 수집을 위해 웰 당 약 40,000개의 세포). BD 고처리량 샘플러(자동화 샘플러)가 장착된 업그레이드된 BD FACSDiva로 샘플을 처리하였다. 유세포분

석 데이터의 분석은 FlowJo Software를 이용하여 수행하였다. 결과를 각 항체에 대한 중앙형광강도(MFI) 및 양성 세포 백분율을 포함시켜 엑셀 스프레드시트와 플롯으로 나타내었다.

표 1 - HT-FACS 분석 결과

#	마커	별칭:	% IMP	% Lonza 등록 상표 MSC
1	BLTR-1		6.7	1.37
2	B2- 마이크로글로 불린		99.8	100
3	CA9	탄산탈수효소 9	5.22	0
4	CDH3	카드헤린-3/P-카드헤린	2.93	0.475
5	CDH6	카드헤린-6	0.6	0.235
6	CDH11	카드헤린-11	61.6	0.88
7	CDw93		11.5	4.75
8	CDw198	CCR8	10.6	5.17
9	CDw199	CCR9	17.2	2.54
10	CDw210	인터류킨 10 수용체, 알파 서브유닛 (IL10RA)	10.8	0.622
11	CDw218a	인터류킨-18 수용체 1 (IL18R1)	0.384	0
12	CDw329	시알산-결합 Ig-유사 렉틴 9 (Siglec 9)	0.182	0
13	CD1a		0.338	0.28
14	CD1b		0.766	0.745
15	CD1c		15.7	0.926
16	CD1d	R3G1	2.7	0
17	CD2	LFA-2	0.292	0.526
18	CD3		0.158	0
19	CD3e		0.087	0
20	CD4		1.11	0.157
21	CD5	Leu-1	0.151	0.34
22	CD6		1.04	2.68
23	CD7	GP40/Leu-9	0.239	0.24

[0234]

24	CD8		0.214	0
25	CD8b		4.34	0.705
26	CD9	BTCC-1	38.1	51.9
27	CD10	네프리라이신 (NEP)/ 공통급성 림프모구 백혈병 항원 (CALLA)	90.6	87.1
28	CD11a	ITGAL, LFA-1	1.57	0
29	CD11b	인테그린 알파 M (ITGAM)	6.24	0
30	CD11c	인테그린, 알파 X (ITGAX)	1.8	0
31	CD13	알라닌 아미노펩티다제 (ANPEP)	100	100
32	CD14		8.03	6.25
33	CD15	SSEA-1	0.137	0.474
34	CD16	Fc 수용체	10.1	3.73
35	CD16b	IgG 의 Fc 단편, 저친화성 IIIb, 수용체 (FCGR3B)	0.331	0
36	CD17	락토실세라미드 (LacCer)	20.9	0.462
37	CD18	인테그린 베타-2	0.65	0
38	CD19		0.21	0
39	CD20		0.176	0
40	CD21	2 형 보체 수용체(Cr2)/ 엡스타인-바 바이러스 수용체 (EBV R)	0.66	0
41	CD22	BL-CAM/Siglec-2	0.596	0
42	CD23	저친화성면역글로불린 엡실론 Fc 수용체 (FCER2)	0.551	0.234
43	CD24		0.987	4
44	CD25	인터류킨-2 수용체 서브유닛 알파 (IL2RA)	1.44	1.67
45	CD26	디펩티딜 펩티다제 IV (DPP4)	21.3	6.33
46	CD27	종양괴사인자 수용체 슈퍼패밀리 멤버 7 (TNFRSF7)	0.409	0
47	CD28		0.643	0

[0235]

48	CD29	인테그린 베타-1 (ITGB1)	100	100
49	CD30	종양괴사인자 수용체 슈퍼패밀리 멤버 8 (TNFRSF8)	0.446	0
50	CD31	PECAM	1.29	0.214
51	CD32	저친화성면역글로불린 감마 Fc 영역 수용체 II-b	0.698	3.46
52	CD33	Siglec-3	1.25	0.372
53	CD34		0.287	0.885
54	CD35	I 형 보체 수용체 (Cr1)	0.134	0
55	CD36	혈소판 당단백질 4/트롬보스폰딘 수용체	0.458	3.57
56	CD37	테트라스파닌-26 (TSPAN26)	0.0917	0.182
57	CD38	ADP-리보실 사이클라제 1	0.28	0
58	CD39	엑토뉴클레오사이드 트리포스페이트 디포스포히드롤라제 NTPdase 1	0.126	21.8
59	CD40	종양괴사인자 수용체 슈퍼패밀리 멤버 5 (TNFRSF5)	0.132	3.12
60	CD41a		0.293	0
61	CD41b		0.075	0
62	CD42a	혈소판 당단백질 IX	0.528	0.131
63	CD42b	혈소판 당단백질 Ib 알파 사슬	7.29	0
64	CD43	류코시알린	0.406	1.81
65	CD44	에피칸	99.9	99.7
66	CD45	수용체형 티로신-단백질 포스파타제 C, 백혈구 공통 항원	0.271	0
67	CD45RA		5.18	2.99
68	CD45RB		0.283	0.671
69	CD45RO		0.57	0
70	CD46	막 공통인자 단백질, 트로포블라스트	78.1	22.5

[0236]

		백혈구 공통 항원		
71	CD47	항원표면 결정인자단백질 OA3	92.3	99.9
72	CD48	SLAMF2	0.141	0.125
73	CD49a	인테그린 알파-1 (ITGA1)	24	51.5
74	CD49b	인테그린 알파-2 (ITGA2)	97.7	45.8
75	CD49c	인테그린 알파-3 (ITGA3)	99.9	99.6
76	CD49d	인테그린 알파-4 (ITGA4)	93.7	26
77	CD49e	인테그린 알파-5 (ITGA5)	100	99.8
78	CD49f	인테그린 알파-6 (ITGA6)	93.3	24.1
79	CD50	ICAM-3	0.244	0.8
80	CD51/CD61		92.7	68
81	CD52	CAMPATH-1 항원	0.218	0.128
82	CD53		1.66	0.292
83	CD54	ICAM-1	23.1	23.7
84	CD55	보체붕괴-가속화인자	94.5	52.5
85	CD56	NCAM	3.05	4.71
86	CD57	살해 세포 렉틴-유사 수용체 서브패밀리 G 멤버 1	0.193	0
87	CD58	LFA-3	99.7	98.1
88	CD59	프로텍틴	100	100
89	CD60b		34	10.9
90	CD61	인테그린 베타-3 ITGB3	81.8	56.7
91	CD62E	E-셀렉틴 리간드	2.33	1.03
92	CD62L	L-셀렉틴 리간드	0.432	0.151
93	CD62P	P-셀렉틴 리간드	0.325	0.924
94	CD63	리소좀-관련 막 단백질 3 (LAMP-3)	99.1	95.8
95	CD64	고친화성 면역글로불린 감마 Fc 수용체 I (Fc-감마 RI)	0.263	0.225
96	CD65		0.825	0

[0237]

97	CD65s		7.62	0.539
98	CD66	임신-특이 베타-1-당단백질 1 PSGB1	0.474	0.737
99	CD66b		0.129	0
100	CD66c	암배아 항원-관련 세포 부착 분자 6	23.4	7.33
101	CD66d	암배아 항원-관련 세포 부착 분자 3	2.06	0.322
102	CD66e	암배아 항원-관련 세포 부착 분자 5	56.1	13.6
103	CD69	활성화 유도인자 분자 (AIM)	0.296	0.279
104	CD70	종양괴사인자 리간드 슈퍼패밀리 멤버 7 (TNFSF7)	0.36	0.187
105	CD71	트랜스페린 수용체 단백질 1	51	4.71
106	CD72		0.036	0.334
107	CD73	5'-뉴클레오티다제/SH3/SH4	100	99.8
108	CD74	HLA 클래스 II 조직적합성 항원 감마 사슬	0.177	0.587
109	CD75	베타-갈락토사이드 알파-2,6- 시알릴트랜스퍼라제 1	0.0789	0.304
110	CD77	락토실세라미드 4-알파- 갈락토실트랜스퍼라제	7.15	2.4
111	CD79a	B-세포 항원 수용체 복합체-관련 단백질 알파 사슬	15.4	0.45
112	CD79b	B-세포 항원 수용체 복합체-관련 단백질 베타 사슬	4.87	0.317
113	CD80	활성화 B7-1 항원	2.94	4.57
114	CD81	테트라스파닌-28	100	99.9
115	CD82	테트라스파닌-27	96.3	82.7
116	CD83		27.9	1.34
117	CD84	SLAMF5	7.94	4.1
118	CD85a	백혈구 면역글로불린-유사 수용체 서브패밀리 B 멤버 3 (LIR-3)	6.76	0.971

[0238]

119	CD85d	백혈구 면역글로불린-유사 수용체 서브패밀리 B 멤버 3 (LIR-2)	17	0.98
120	CD85g	백혈구 면역글로불린-유사 수용체 서브패밀리 A 멤버 4	47.2	6.15
121	CD85h	백혈구 면역글로불린-유사 수용체 서브패밀리 A 멤버 2 (LILRA2)	15.6	0
122	CD85j	백혈구 면역글로불린-유사 수용체 서브패밀리 B 멤버 1 (LIR-1)	20.6	0.221
123	CD86		24.7	0.702
124	CD87	Uro 키나아제 플라스미노겐 활성화제 표면수용체 (uPAR)	0.178	1.61
125	CD88	C5a 아나필락시스독소 화학주성 수용체 1	1.32	0.352
126	CD89	면역글로불린 알파 Fc 수용체	5.73	0.244
127	CD90	Thy-1 막 당단백질	100	99.3
128	CD91	Prolow-밀도 지질단백질 수용체-관련 단백질 1 (LRP-1)	95.5	63.4
129	CD92	콜린 전달자-유사 단백질 1	35.4	33.3
130	CD94	자연살해세포 항원 CD94 KLRD1	0.121	0.321
131	CD95	CD95L (리간드)/ 종양괴사인자 리간드 수퍼패밀리 멤버 6 (TNFSF6)	98.9	66.7
132	CD96	T-세포 표면 단백질 텍타일	21	2.63
133	CD97		1.64	0.434
134	CD98	대형 중성 아미노산 전달자 소형 서브유닛 1	100	99.9
135	CD99	T-세포 표면 당단백질 E2	24.8	0.224
136	CD100	세마포린-4D	0.103	0.132
137	CD101	면역글로불린 수퍼패밀리 멤버 2 (IgSF2)	0.29	0

[0239]

138	CD102	ICAM-2	9.24	2.91
139	CD103	인테그린 알파-E (ITGAE)	0.152	0.297
140	CD104	인테그린 베타-4 (ITGB4)	4.06	99.3
141	CD105	엔도글린 (SH2)	99.9	100
142	CD106	VCAM	6.93	4.64
143	CD107a	리소솜-관련 막 당단백질 1 (LAMP-1)	0.717	0.337
144	CD107b	리소솜-관련 막 당단백질 2 (LAMP-2)	0.221	0.225
145	CD108	세마포린-7A	99.7	78
146	CD109		1.89	0.253
147	CD110	트롬보포이에틴 수용체 (TPO-R)	55.6	16.6
148	CD111	헤르페스 바이러스 엔트리 매개자 C	90.7	0
149	CD112	Polio 바이러스 수용체-관련 단백질 2	12.1	0.64
150	CD114	과립구 콜로니-자극인자 수용체 (GCSFR/CSF3R)	54.9	4.83
151	CD115	대식세포 콜로니-자극인자 1 수용체 CSF-1 수용체 (CSF-1-R)	8.41	0
152	CD116	과립구-대식세포 콜로니-자극인자 수용체 서브유닛 알파 GM-CSF-R-알파	17	2.61
153	CD117	비만/줄기세포 성장인자 수용체 Kit (c-kit)	31.5	2.56
154	CD118	백혈병 억제인자 수용체 (LIF-R)	67.4	0
155	CD119	인터페론 감마 수용체 1 (IFN 감마 R)	78.5	24.8
156	CD120a	종양괴사인자 수용체 수퍼패밀리 멤버 1A (TNFR1)	38.1	0
157	CD120b	종양괴사인자 수용체 수퍼패밀리 멤버 1B (TNFR2)	1.11	0.297
158	CD121b	인터류킨-1 수용체 타입 2 (IL1R2)	39.8	2.75
159	CD122	인터류킨-2 수용체 서브유닛 베타	41.7	4.56

[0240]

		(IL2RB)		
160	CD123	인터류킨-3 수용체 서브유닛 알파 (IL3RA)	46.9	7.06
161	CD124	인터류킨-4 수용체 서브유닛 알파 IL4RA)	1.52	0.225
162	CD125	인터류킨-5 수용체 서브유닛 알파 (IL5RA)	19.5	0
163	CD126	인터류킨-6 수용체 서브유닛 알파 (IL-6R 1)	7.05	0.709
164	CD127	인터류킨-7 수용체 서브유닛 알파 (IL7RA)	18.5	12.5
165	CD129	인터류킨-9 수용체 (IL9R)	0.178	0
166	CD130	인터류킨-6 수용체 서브유닛 베타 (IL6ST)	83.6	8.15
167	CD131	시토카인 수용체 공통 서브유닛 베타	0.684	0
168	CD132	시토카인 수용체 공통 서브유닛 감마 (IL2RG)	78.8	3.43
169	CD133	AC-133 (프로미닌-1)	0.054	0
170	CD134	종양괴사인자 수용체 슈퍼패밀리 멤버 4 (TNFSF4)	8.15	1.29
171	CD135	수용체형 티로신-단백질 키나아제 FLT3	5.18	0.575
172	CD136	대식세포-자극 단백질 수용체 (MSP- R)	0.302	0
173	CD137	종양괴사인자 수용체 슈퍼패밀리 멤버 9 (TNFRSF9)	0.392	0
174	CD137L	마우스?	13.5	15.6
175	CD138	신데칸-1 (SYND1)	0.227	0
176	CD140a	혈소판-유도 성장인자 수용체 알파 (PDGFRA)	4.1	0.98

[0241]

177	CD140b	혈소판-유도 성장인자 수용체 베타 (PDGFRB)	89.1	97.8
178	CD141	트롬보모듈린	21	0.385
179	CD142	조직인자 / 트롬보플라스틴	0.478	0.555
180	CD143	안지오텐신-전환효소 (ACE)	29.3	0
181	CD144	카드헤린-5	0.0728	0.159
182	CD146	MUC18	94.2	89.5
183	CD147	바시킨	100	100
184	CD148	수용체형 티로신-단백질 포스파타제 eta	84.6	0
185	CD150	시그널링 림프구 활성화 분자 (SLAMF-1)	0.467	0.364
186	CD151	PETA-3	100	99.9
187	CD152	세포독성 T-림프구 단백질 4 (CTLA-4)	6.45	5.87
188	CD153	종양괴사인자 리간드 슈퍼페밀리 멤버 8 (TNFSF8)	10.9	1.19
189	CD154	CD40 리간드	0.357	0.893
190	CD155	폴리오 바이러스 수용체 (PVR)	99.8	100
191	CD156b	디스인테그린 및 메탈로프로테이나제 도메인-함유 단백질 17 (ADAM-17)	81	36.4
192	CD157	ADP-리보실 사이클라제 2/ 골수 간질 항원 1 (BST-1)	0.713	6.33
193	CD158a	살해 세포 면역글로불린-유사 수용체 2DL1	0.0919	0.22
194	CD158b	살해 세포 면역글로불린-유사 수용체 2DL2	0.129	0.195
195	CD158b2	살해 세포 면역글로불린-유사 수용체	2.54	0

[0242]

		2DL3		
196	CD158d	살해 세포 면역글로불린-유사 수용체 2DL4	56.3	1.56
197	CD158e2	살해 세포 면역글로불린-유사 수용체 3DL1	0.254	0
198	CD158f	살해 세포 면역글로불린-유사 수용체 2DL5A	25	0
199	CD158i	살해 세포 면역글로불린-유사 수용체 2DS4	21.9	3.12
200	CD159a	NKG2-A/NKG2-B 형 II 인테그랄 막 단백질 (KLR-C1)	6.57	0.462
201	CD159c	NKG2-C 타입 II 인테그랄 막 단백질 (KLR-C2)	2.44	0.917
202	CD160		1.07	0.9
203	CD161	살해 세포 렉틴-유사 수용체 서브패밀리 B 멤버 1 (KLRB1)	5.95	3.64
204	CD162	P-셀렉틴 당단백질 리간드 1 (PSGL-1)	13.2	4.41
205	CD163	스캐빈저 수용체 시스템-풍부 타입 1 단백질 M130	0.197	0
206	CD164	시알로뮤신 코어단백질 24 (MUC-24)	11.9	27
207	CD165		0.716	3.55
208	CD166	활성화된 세포 부착 분자	99.9	99.8
209	CD167	디스코이딘 도메인-함유 수용체 2 (DDR2)	0.496	7.69
210	CD169	시알로에드헤신/ 시글렉-1	1.76	0.178
211	CD170	시알산-결합 Ig-유사 렉틴 5 (시글렉- 5)	11.9	74.3
212	CD171	자연 세포 부착 분자 L1 (NCAM-L1)	1.9	0
213	CD172a	티로신-단백질 포스파타제 비-수용체 타입 기질 1 (SHP-1)	61.8	3.33

[0243]

214	CD172b	시그널-조절 단백질 베타-1 (SIRP-베타-1)	0.0955	0.285
215	CD172g	시그널-조절 단백질 감마 (SIRP-감마)	14.5	7.14
216	CD175s		96.2	27.1
217	CD177	인간 호중구 동종항원 2a (HNA-2a)	0.477	0.46
218	CD178	CD95L (리간드) / 종양괴사인자 리간드 수퍼패밀리 멤버 6 (TNFSF6)	51.6	0.49
219	CD179a		6.31	1.84
220	CD180		0.824	0.478
221	CD181	CXCR1	85	2.55
222	CD182	CXCR2	68.8	4.31
223	CD183	CXCR3	3.08	0
224	CD184	CXCR4	0.219	0.775
225	CD185	CXCR5	6.04	1.39
226	CD186	CXCR6	1.48	41.5
227	CD191	CCR1	12.6	0
228	CD192	CCR2	0.0662	0.0497
229	CD193	CCR3	51	8.16
230	CD194	CCR4	7.13	0
231	CD195	CCR5	1.02	1.94
232	CD196	CCR6	46.3	2.8
233	CD197	CCR7	0.159	0
234	CD200	OX-2 막 당단백질 (MOX-1) / (MOX-2)	0.594	0.912
235	CD201	내피 단백질 C 수용체	55.7	0.858
236	CD202b	안지오포이에틴-1 수용체 TIE2/TEK	82.7	23.2
237	CD203c	엑토뉴클레오타이드 파이로포스파타제 / 포스포디에스테라제 패밀리 멤버 3 (ENPP3)	8.66	0

[0244]

238	CD204	대식세포 스캐빈저 수용체 타입 I 및 II (MSR1)	13.7	1.44
239	CD205	림프구 항원 75 (Ly-75)	4.94	0
240	CD206	대식세포 만노스 수용체 I (MMR)	0.205	0
241	CD207	C 형 렉틴 도메인 패밀리 4 멤버 K (랑게린)	0.0679	2.7
242	CD208	리소좀-관련 막 당단백질 3 (LAMP-3)	3.27	0
243	CD209		0.153	0
244	CD212	인터류킨-12 수용체 서브유닛 베타-1 (IL12RB1)	0.476	0.127
245	CD213a2	인터류킨-13 수용체 서브유닛 알파-2 (IL13RA2)	8.7	8
246	CD215	인터류킨-15 수용체 서브유닛 알파	14.6	0.86
247	CD217	인터류킨-17 수용체 A (IL17RA)	29.8	35.8
248	CD218b	인터류킨-18 수용체 부속 단백질 (IL-18 R-베타)	23.4	0.463
249	CD220	인슐린 수용체 IR	2.93	1.5
250	CD221	인슐린-유사 성장인자 1 수용체 IGF-1R	3.16	1.1
251	CD222	인슐린-유사 성장인자 2 수용체 IGF-2R	8.09	0.768
252	CD223	림프구 활성화 유전자 3 단백질 (LAG-3)	38.9	0
253	CD226	DNAX 부속 분자 1 (DNAM-1)	1.15	0.22
254	CD227	뮤신-1 (MUC-1)	4.87	5.79
255	CD229	T-림프구 표면 항원 Ly-9	0.579	5.56
256	CD230	메이저 프리온 단백질 (PrP)	99.9	100
257	CD231	테트라스판-7 (TSPAN-7)	34.2	34.8
258	CD234	더피 항원/케모카인 수용체 (DARC)	7.7	0.397

[0245]

259	CD235a	글리코포린-A	55.8	5.11
260	CD243 (BC)		20.8	2.31
261	CD243 (BD)		0.208	0
262	CD244	자연 살해 세포 수용체 2B4	0.548	0
263	CD245		99.2	13.3
264	CD249	글루타밀 아미노펩티다제 (EAP)	19.7	0
265	CD252	종양괴사인자 리간드 슈퍼패밀리 멤버 4 (TNFSF4)	21.4	20.6
266	CD253	종양괴사인자 리간드 슈퍼패밀리 멤버 10 (TNFSF10)	44.1	7.07
267	CD254	RANKL, TNFSF11	12.3	3.85
268	CD255		10.1	0.437
269	CD256	종양괴사인자 리간드 슈퍼패밀리 멤버 13 (TNFSF13)	7.94	0.792
270	CD257	종양괴사인자 리간드 슈퍼패밀리 멤버 13B (TNFSF13B)	63.2	5.03
271	CD258	종양괴사인자 리간드 슈퍼패밀리 멤버 14 (TNFSF14)	3.17	0
272	CD261	종양괴사인자 수용체 슈퍼패밀리 멤버 10A (TNFRSF10A)	30.3	21.4
273	CD262	종양괴사인자 수용체 슈퍼패밀리 멤버 10B (TNFRSF10B)	12.1	4.55
274	CD263	종양괴사인자 수용체 슈퍼패밀리 멤버 10C (TNFRSF10C)	1.47	0
275	CD264	종양괴사인자 수용체 슈퍼패밀리 멤버 10D (TNFRSF10D)	44.9	9.09
276	CD267	종양괴사인자 수용체 슈퍼패밀리 멤버 13B (TNFRSF13B)	91.8	36.6
277	CD268	종양괴사인자 수용체 슈퍼패밀리	64.6	13.5

[0246]

		멤버 13C / (BAFF-R)		
278	CD269	종양괴사인자 수용체 슈퍼패밀리 멤버 17 (TNFRSF17)	8.51	2.4
279	CD270	종양괴사인자 수용체 슈퍼패밀리 멤버 14	31.6	8.79
280	CD271	저친화성 신경 성장인자 수용체 (NGFR)	1.63	10.4
281	CD272	B- 및 T-림프구 감쇠제	33.2	12.3
282	CD273	프로그래밍된 세포 사멸 1 리간드 2	92.4	51.7
283	CD274	프로그래밍된 세포 사멸 1 리간드 1	23.9	1.12
284	CD275	ICOS 리간드	26	0.904
285	CD276	4Ig-B7-H3	100	97.8
286	CD277	부티로필린 서브패밀리 3 멤버 A1	1.55	0
287	CD278	유도가능한 T-세포 공통자극인자	0.147	0.0836
288	CD279	프로그래밍된 세포 사멸 단백질 1	5.5	0.492
289	CD281	Toll-유사 수용체 1	54.7	2.12
290	CD282	Toll-유사 수용체 2	0.101	0.529
291	CD283	Toll-유사 수용체 3	68.9	6.92
292	CD284	Toll-유사 수용체 4	7.94	0.84
293	CD286	Toll-유사 수용체 6	76.9	11.4
294	CD288	Toll-유사 수용체 8	85.6	11.2
295	CD289	Toll-유사 수용체 9	11.3	0.359
296	CD290	Toll-유사 수용체 11	45.1	9.5
297	CD292	뼈 형태형성 단백질 수용체 타입-1A	2.39	0.522
298	CD294	프로스타글란딘 D2 수용체 2	8.81	34.1
299	CD295	렙틴 수용체 (Lep-R)	49	73.7
300	CD298	소듐/포타슘-전달 ATPase 서브유닛 베타-3	99.8	98.9

[0247]

301	CD299	C 형 렉틴 도메인 패밀리 4 멤버 M	29.5	1.07
302	CD300a	CMRF35-유사 분자 8 (CLM-8)	1.82	0.222
303	CD300c	CMRF35-유사 분자 6 (CML-6)	37.3	3.76
304	CD300e	CMRF35-유사 분자 2 (CML-2)	38.7	0.697
305	CD301	C 형 렉틴 도메인 패밀리 10 멤버 A	3.39	0.626
306	CD303	C 형 렉틴 도메인 패밀리 4 멤버 C	66.8	3.33
307	CD304	뉴로필린-1 (NRP-1)	65.2	0.502
308	CD305	백혈구-관련 면역글로불린-유사 수용체 1 (LIAR-1)	4.12	0.972
309	CD307		7.08	0.305
310	CD309	VEGFR2 / FLK-1 / KDR	34.4	14.2
311	CD312	EGF-유사 모듈-함유 류신-유사 호르몬 수용체-유사 2	24.8	12.2
312	CD314	NKG2-D 타입 II 인테그랄 막 단백질	38.5	11.6
313	CD317	골수 간질 항원 2	48.9	25
314	CD318	CUB 도메인-함유 단백질 1	71.7	12.3
315	CD319	SLAM 패밀리 멤버 7	27.8	21.9
316	CD321	접합부 접착 분자 A (JAM-A)	3.81	5.04
317	CD322	접합부 접착 분자 B (JAM-B/2)	4.37	0.248
318	CD324	카드헤린-1	17.2	0.387
319	CD325	카드헤린-2 / N-카드헤린	3.83	0.501
320	CD326	상피 세포 부착 분자 (EPCAM)	18.1	0.463
321	CD328	Siglec-7	32	1.99
322	CD332	FGFR2	0.814	0.181
323	CD333	FGFR3	7.78	1.01
324	CD334	FGFR4	1.35	1.76
325	CD335	NCR1	0.669	0.274
326	CD336	NCR2	0.544	0.212
327	CD337		87.3	26.4

[0248]

328	CD338	ATP-결합 카세트 서브-패밀리 G 멤버 2	49	19.5
329	CD339	단백질 jagged-1	1.76	1.22
330	CD340	수용체 티로신-단백질 키나아제 erbB-2	94.9	41
331	CD344	Frizzled 4	65.5	17.5
332	CD349	Frizzled 9	87.6	80.3
333	CD351	FCAMR	76.4	28.1
334	CD352	SLAMF6	0.518	0.394
335	CD354	TREM-1	13.6	1.66
336	CD355	세포독성 및 조절 T 세포 분자	10.4	1.24
337	CD357	종양괴사인자 수용체 슈퍼패밀리 멤버 18	10.4	1.95
338	CD358/DR6		45.1	7.63
339	CD360 (BD)		24.9	3.53
340	CD360 (BL)		33	4.5
341	CD362	신테칸-2	14.7	0.774
342	CD363	스핑고신 1-포스페이트 수용체 1	18.7	0.757
343	CLA		0.277	9.23
344	CLIP		0.138	0
345	DCIR		0.264	0.15
346	EGF-R		33.3	2.02
347	FMC7		0.0776	0
348	HLA-ABC		99.9	99.8
349	HLA-A2		3.52	20.9
350	HLA-DM		0.172	0.14
351	HLA-DR		0.247	0.481
352	HPC		2.14	6.31
353	ITGB7		0.34	0.159
354	LTBR	종양괴사인자 수용체 슈퍼패밀리 멤버 3	34.5	87.6

[0249]

355	MIC A/B		97.1	0.328
356	Notch1		20.5	4.01
357	Notch2		95.8	22.8
358	Notch3		5.37	2.15
359	PAC-1		0.137	0.971
360	Podoplanin		8.81	2.91
361	SSEA-3		20.7	0.395
362	SSEA-4		87.4	2.44
363	Stro-1		18.5	6.27
364	TCR 알파 베타		0.327	0.195
365	TCR 감마 delta		52.9	11.1
366	TPBG		0.197	0.178
367	VB8 TCR		25.1	3.93
368	VD2 TCR		13.2	12.1
369	fMLP-R		11.4	0.641

[0250]

[0251]

실시예 3 - 루미넥스 분석(Luminex assay)

[0252]

루미넥스 분석을 이용하여 Lonza 세포와 IMP 세포 배양물로부터 조건화된 배지 내의 다양한 시토카인들을 정량하였다. 데이터를 pg/ μ g RNA로 나타내었으며 이것은 배지내 세포들의 갯수에 알맞게 데이터를 표준화시키기 위함이다.

시토카인/케모카인	pg/ μ g RNA		결과
	MSCs	IMPs	
IL-6	162.4	596	증가
IL-8	6.9	59.8	증가
IP-10	1.4	13.7	증가
MCP-1	75.8	322.5	증가
RANTES	1.07	125.3	증가
IL-10	0.8	0.1	감소
IL-12 (p70)	41.6	21.9	감소

[0253]