



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년11월01일

(11) 등록번호 10-2319899

(24) 등록일자 2021년10월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61L 27/38 (2006.01) A61K 35/28 (2015.01)

A61L 27/24 (2006.01) A61L 27/26 (2006.01)

A61L 27/54 (2006.01) A61L 27/56 (2006.01)

C12N 5/0775 (2010.01)

(52) CPC특허분류

A61L 27/3834 (2013.01)

A61K 35/28 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-7034739

(22) 출원일자(국제) 2014년05월09일

심사청구일자 2019년05월09일

(85) 번역문제출일자 2015년12월07일

(65) 공개번호 10-2016-0042816

(43) 공개일자 2016년04월20일

(86) 국제출원번호 PCT/US2014/037435

(87) 국제공개번호 WO 2014/182994

국제공개일자 2014년11월13일

(30) 우선권주장

61/822,134 2013년05월10일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

US20080003206 A1*

(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 34 항

(73) 특허권자

칠드런'즈 메디컬 센터 코퍼레이션

미국 매사추세츠 보스턴 새터 스트리트 55 (우편
번호:02115)

더 브리검 앤드 우먼즈 হাসপিট, 인크.

미국 02115 매사추세츠주 보스턴 프란시스 스트리
트 75

브이에이 보스턴 헬스케어 시스템

미국 02130 매사추세츠주 보스턴 사우쓰 헌팅턴
애비뉴 150

(72) 발명자

프랭크, 마르쿠스, 에이치.

미국 02138 매사추세츠주 캄브릿지 브루어 스트리
트 9

프랭크, 나타샤, 와이.

미국 02138 매사추세츠주 캄브릿지 브루어 스트리
트 9

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

양영준, 김영

심사관 : 이수희

(54) 발명의 명칭 상처 치유 및 조직 공학

(57) 요약

본 발명은 줄기 세포 집단이 공동이식된 상처 치유 스캐폴드에 관한 것이며, 여기서 줄기 세포 집단은 ABCB5+ 줄기 세포이다. 스캐폴드는, 예를 들어 콜라겐 글리코사미노글리칸 스캐폴드이다.

(52) CPC특허분류

A61L 27/24 (2013.01)
A61L 27/26 (2013.01)
A61L 27/3839 (2013.01)
A61L 27/3886 (2013.01)
A61L 27/54 (2013.01)
A61L 27/56 (2013.01)
C12N 5/0668 (2013.01)
A61L 2430/40 (2013.01)

(72) 발명자

오르길, 데니스, 피.

미국 02478 매사추세츠주 벨몬트 클라폴린 스트리트 217

머피, 조지, 에프.

미국 02115 매사추세츠주 보스턴 패슬로지 디파트먼트 프란시스 스트리트 75

(56) 선행기술조사문헌

S. P. Zhong et al., "Advanced ReviewTissue scaffolds for skin woundhealing and dermal reconstruction", Advanced Review(2010), Vol.2, pp. 510-525*

W02007143139 A1

W02014130518 A1

US20130017175 A1

JP2006519681 A

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

명세서

청구범위

청구항 1

줄기 세포 집단이 공동이식된 콜라겐 글리코사미노글리칸 스캐폴드로 구성된 상처 치유 스캐폴드이며, 여기서 줄기 세포 집단의 80% 이상은 ABCB5+ 줄기 세포인 상처 치유 스캐폴드.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

ABCB5+ 안구 줄기 세포 집단이 공동이식된 콜라겐 글리코사미노글리칸 스캐폴드로 구성된 상처 치유 스캐폴드이며, 여기서 세포 집단에는 비-안구 세포가 없는 것인 상처 치유 스캐폴드.

청구항 5

대상체의 조직으로부터 분리된 ABCB5+ 줄기 세포 집단이 공동이식된 콜라겐 글리코사미노글리칸 스캐폴드로 구성된 상처 치유 스캐폴드이며, 여기서 ABCB5+ 줄기 세포는 ABCB5에 대해 특이적인 항체를 사용하여 상기 대상체 내의 다른 세포로부터 분리된 것인 상처 치유 스캐폴드.

청구항 6

제1항, 제4항 및 제5항 중 어느 한 항에 있어서, ABCB5+ 줄기 세포가 ABCB5+ 진피 중간엽 줄기 세포인 상처 치유 스캐폴드.

청구항 7

제1항, 제4항 및 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 줄기 세포 집단의 85% 이상이 ABCB5+ 줄기 세포인 상처 치유 스캐폴드.

청구항 8

제1항, 제4항 및 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 줄기 세포 집단의 90% 이상이 ABCB5+ 줄기 세포인 상처 치유 스캐폴드.

청구항 9

제1항, 제4항 및 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 가교된 콜라겐과 글리코사미노글리칸의 다공성 매트릭스인 상처 치유 스캐폴드.

청구항 10

제9항에 있어서, 콜라겐이 소의 힘줄 콜라겐인 상처 치유 스캐폴드.

청구항 11

제1항, 제4항 및 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 반투과성 층을 포함하는 상처 치유 스캐폴드.

청구항 12

제11항에 있어서, 반투과성 층이 폴리실록산인 상처 치유 스캐폴드.

청구항 13

제1항, 제4항 및 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 메쉬 스캐폴드인 상처 치유 스캐폴드.

청구항 14

제1항, 제4항 및 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 조직 내로의 삽입을 위한 형상으로 만들어진 상처 치유 스캐폴드.

청구항 15

제1항, 제4항 및 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 반투과성 폴리실록산 층을 갖는 콜라겐과 글리코사미노글리칸 매트릭스인 상처 치유 스캐폴드.

청구항 16

제1항, 제4항 및 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 10-500 마이크로미터의 세공 크기를 갖는 상처 치유 스캐폴드.

청구항 17

제1항, 제4항 및 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 50-350 마이크로미터의 세공 크기를 갖는 상처 치유 스캐폴드.

청구항 18

제1항, 제4항 및 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 70-200 마이크로미터의 세공 크기를 갖는 상처 치유 스캐폴드.

청구항 19

제1항, 제4항 및 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 글리코사미노글리칸이 콘드로이틴 6-술페이트, 콘드로이틴 4-술페이트, 히알루론산, 히알루론산 술페이트, 케라틴 술페이트, 더마탄 술페이트 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 상처 치유 스캐폴드.

청구항 20

제1항, 제4항 및 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상처 치유를 증강시키는데 유효한 하나 이상의 생물활성 분자를 추가로 포함하는 상처 치유 스캐폴드.

청구항 21

제20항에 있어서, 생물활성 분자가 성장 인자, 항염증제, 상처 치유제, 항반흔형성제, 항미생물제, 세포 부착 펩티드, 조직 생성 조절 세포, 핵산, 핵산 유사체, 단백질, 펩티드, 아미노산, 세라믹 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 구성원인 상처 치유 스캐폴드.

청구항 22

제1항, 제4항 및 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 2 인치 x 2 인치 (25 cm²), 4 인치 x 5 인치 (125 cm²), 4 인치 x 10 인치 (250 cm²), 또는 8 인치 x 10 인치 (500 cm²)로서 크기가 표시되는 상처 치유 스캐폴드.

청구항 23

제1항, 제4항 및 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상처 치유를 촉진시키기 위해 상처 치유 스캐폴드와 상처를 접촉시키는 것을 포함하는, 상처 치유를 촉진시키는 방법에 사용되는 상처 치유 스캐폴드.

청구항 24

제23항에 있어서, 상처가 화상인 상처 치유 스캐폴드.

청구항 25

제23항에 있어서, 상처가 당뇨병성 궤양인 상처 치유 스캐폴드.

청구항 26

제23항에 있어서, 방법이 음압 상처 요법을 스캐폴드와 함께 사용하는 것을 추가로 포함하는 것인 상처 치유 스

캐폴드.

청구항 27

제23항에 있어서, 방법이 후속적으로 상처를 의학상 허용되는 커버링으로 고정시켜 상처를 치료하는 것을 추가로 포함하는 것인 상처 치유 스캐폴드.

청구항 28

제23항에 있어서, 접촉시키는 것이 조성물을 출혈 부위에 적용하여 출혈을 제어하는 것을 포함하는 것인 상처 치유 스캐폴드.

청구항 29

제23항에 있어서, 상처가 부분층 및 전층 상처, 압박성 궤양, 정맥성 궤양, 당뇨병성 궤양, 만성 혈관성 궤양, 터널형/웁손 상처, 수술 상처, 외상 상처 및 배액성 상처로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 상처 치유 스캐폴드.

청구항 30

콜라겐 글리코사미노글리칸 스캐폴드에 ABCB5+ 줄기 세포를 시딩하고, 이러한 스캐폴드를 조직과 접촉시켜 조직이 형성되도록 유지시키는 것을 포함하며, 줄기 세포 집단의 80% 이상이 ABCB5+ 줄기 세포인, 시험관내 조직 공학 방법.

청구항 31

제30항에 있어서, 시험관내 조직 공학 방법이 조직 재생 방법인 시험관내 조직 공학 방법.

청구항 32

제31항에 있어서, 조직 재생 방법이 노화된 피부를 치료하는 방법인 시험관내 조직 공학 방법.

청구항 33

생물학적 조직 스캐폴드에 ABCB5+ 안구 줄기 세포를 시딩하고, 이러한 스캐폴드를 조직과 접촉시켜 조직이 형성되도록 유지시키는 것을 포함하는, 시험관내 조직 공학 방법.

청구항 34

제33항에 있어서, 생물학적 조직 스캐폴드가 동종이식편 또는 자가이식편인 시험관내 조직 공학 방법.

청구항 35

제33항에 있어서, 생물학적 조직 스캐폴드가 이종 조직인 시험관내 조직 공학 방법.

청구항 36

제33항에 있어서, 생물학적 조직 스캐폴드가 탈세포화 조직인 시험관내 조직 공학 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원

[0002] 본 출원은 35 U.S.C. § 119(e) 하에 "상처 치유 및 조직 공학"이란 발명의 명칭으로 2013년 5월 10일에 출원된 미국 가출원 일련 번호 61/822134를 우선권 주장하며, 이 가출원은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0003] 정부 후원

[0004] 본 발명은 NIH/NCI에 의해 수여된 승인 번호 5R01CA113796 하에 정부의 지원으로 이루어졌다. 정부가 본 발명에 특정 권리를 갖고 있다.

[0005] **발명의 분야**

[0006] 본 발명은 콜라겐 글리코사미노글리칸 스캐폴드 내의 ABCB5 양성 줄기 세포와 관련된, 상처 치유 및 조직 공학을 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0007] 재생 의학은 스캐폴드와 같은 외인성 물질을 사용하여 조직 및 기관을 복구, 재생, 유지 및 대체하는 것을 수반한다. 이러한 스캐폴드에 일차 세포 또는 줄기 세포와 같은 세포, 및 조직 성장을 조장하기 위한 각종 인자를 시딩할 수 있다. 그러나, 재생 의학과 조직 공학에 적당한 물질을 설계하는 데 있어서 수많은 어려운 과제가 여전히 남아 있다.

[0008] 매년 미국에서는 1백만개가 넘는 새로운 만성 상처가 발생하는데, 그 치료 비용은 10억 달러에 육박하는 것으로 추정되고 있다. 상처는 개개의 기관 또는 기관 시스템을 보호 커버링하는 데 있어서의 결함으로서 개념화될 수 있다. 이러한 생리학적 장벽이 없게 되면, 정상적으로 상피 커버링에 의해 보호를 받고 있는 조직은 생물학적 구획화를 상실하게 된다. 조직이 더 이상 생리학상 구획화되지 않을 경우, 이는 유체를 상실하게 되고, 미생물에 의한 침입을 당하며, 전해질 불균형이 초래되고, 일부 경우에는 대사 기능장애가 생긴다. 비-구획화된 조직에 의해 상실된 유체는 혈액, 혈장, 림프, 장 내용물, 담즙, 뇌척수액, 점액을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 이들 유체 상실로 인해, 기저 조직의 건조가 초래되고 미생물에 의한 침입이 가능해져, 잠재적 감염이 유발될 수 있으며, 많은 경우에는 점진적인 조직 상실이 야기된다. 예를 들어, 하체 상의 만성 피부 상처를 치유할 수 없으면, 병에 걸린 사지의 일부 또는 전부를 절단할 수도 있다. 기계적 외상, 화상, 방사선, 동맥 부전, 정맥 울혈, 만성 감염, 신경병증 및 전신 질환, 예컨대 당뇨병을 포함한, 상피 만성 하체 피부 상처에 대한 몇 가지 병인론이 있다. 상처 치유를 개선하기 위한 현재의 방법은 효과적인 배액, 감염 방지, 염증 저하 및 조직과 유체 상실의 최소화를 강조하고 있다.

[0009] 만성 피부 상처는 다양한 의학적 병태, 예컨대 당뇨병, 화상, 외상, 예컨대 전신-지속 외상, 척수 손상 및 혈관 기능저하 환자에 대한 심각한 건강 상의 문제점을 초래한다. 이들 환자 중 일부는 부동과 압박성 궤양에 따른 결과로서 뿐만 아니라 당뇨병 또는 말초 혈관 질환에 기인한 만성 비-치유 궤양에 따른 결과로서 만성 상처가 발생할 위험이 있다. 출생 후 인간 피부에 있어서의 손상에 대한 기본 반응은 신속한 상처 봉합의 필요성에 의해 구동되고, 반흔 형성을 초래하도록 운명지어진다. 반흔이 피부 장벽 기능의 복원에 충분하긴 하지만, 필수 피부 구조물을 결합 조직으로 대체함으로써 다른 정상 기능을 종종 손상시킨다. 발생하는 피부가 멸균성 양수 내에 잠겨있는, 보다 보호된 환경인 태내 기에서는, 인간의 외피가 완전히 반흔없이 재생될 수 있으며, 즉 재생적 상처 치유를 할 수 있다. 성체 줄기 세포의 고유의 가소성에 관한 현재의 이해는 상기와 같은 현상이 출생 후에도 반복될 수 있다는 것을 제안하고 있다.

발명의 내용

[0010] 본 발명은 ABCB5를 발현하는 줄기 세포가 분화 가소성을 나타내고, 단독으로 이용되거나 또는 생분해성 스캐폴드의 맥락에서 이용되는 경우에 상처 치유 및/또는 조직 재생을 추가로 증강시킨다는 발견을 포함하며, 적어도 부분적으로는 이러한 발견에 근거한다.

[0011] 일부 측면에서 본 발명은 줄기 세포 집단이 공동이식된 콜라겐 글리코사미노글리칸 스캐폴드로 구성된 상처 치유 스캐폴드이며, 여기서 줄기 세포 집단의 80% 이상은 ABCB5+ 줄기 세포이다.

[0012] 다른 측면에서 본 발명은 줄기 세포 집단이 공동이식된 콜라겐 글리코사미노글리칸 스캐폴드로 구성된 상처 치유 스캐폴드이며, 조성물의 세포의 50% 미만은 ABCB5(-) 세포이다.

[0013] 또 다른 측면에서 본 발명은 ABCB5+ 줄기 세포 집단이 공동이식된 콜라겐 글리코사미노글리칸 스캐폴드로 구성된 상처 치유 스캐폴드이며, 여기서 세포 집단은 5% 미만의 각질세포 및/또는 표피 세포를 포함한다.

[0014] ABCB5+ 안구 줄기 세포 집단이 공동이식된 콜라겐 글리코사미노글리칸 스캐폴드로 구성된 상처 치유 스캐폴드 (여기서 세포 집단에는 비-안구 세포가 없음)가 본 발명의 다른 측면에서 제공된다.

[0015] 대상체의 조직으로부터 분리된 ABCB5+ 줄기 세포 집단이 공동이식된 콜라겐 글리코사미노글리칸 스캐폴드로 구성된 상처 치유 스캐폴드 (여기서 ABCB5+ 줄기 세포는 ABCB5에 대해 특이적인 항체를 사용하여 상기 대상체 내의 다른 세포로부터 분리되었음)가 다른 측면에서 제공된다.

- [0016] ABCB5+ 줄기 세포는 ABCB5+ 진피 중간엽 줄기 세포일 수 있다. 일부 실시양태에서 상기 줄기 세포 집단의 85% 또는 90% 이상은 ABCB5+ 줄기 세포이다.
- [0017] 일부 실시양태에서 스캐폴드는 가교된 콜라겐과 글리코사미노글리칸의 다공성 매트릭스이다. 콜라겐은, 예를 들어 소의 힘줄 콜라겐일 수 있다. 일부 실시양태에서 글리코사미노글리칸은 콘드로이틴 6-술페이트, 콘드로이틴 4-술페이트, 히알루론산, 히알루론산 술페이트, 케라틴 술페이트, 더마탄 술페이트 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0018] 스캐폴드는 반투과성 층, 예컨대 폴리실록산 (실리콘)을 포함할 수 있다. 다른 실시양태에서 스캐폴드는 메쉬 스캐폴드이다. 임의로, 스캐폴드는 조직 내로의 삽입을 위한 형상으로 만들 수 있다.
- [0019] 일부 실시양태에서 스캐폴드는 인테그라(INTEGRA)® 메쉬형 이중층 상처 매트릭스이다.
- [0020] 스캐폴드는 다양한 세공 크기를 가질 수 있다. 예를 들어, 스캐폴드는 약 10-500 또는 약 50-350 또는 약 70-200 마이크로미터의 세공 크기를 가질 수 있다.
- [0021] 스캐폴드는 상처 치유를 증강시키는 데 유효한 하나 이상의 생물활성 분자를 포함할 수 있다. 예를 들어, 이러한 생물활성 분자는 성장 인자, 항염증제, 상처 치유제, 항반흔형성제, 항미생물제, 세포 부착 펩티드, 조직 생성 조절 세포, 핵산, 핵산 유사체, 단백질, 펩티드, 아미노산, 세라믹 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 구성원일 수 있다.
- [0022] 일부 실시양태에서 스캐폴드는 2 인치 x 2 인치 (25 cm²), 4 인치 x 5 인치 (125 cm²), 4 인치 x 10 인치 (250 cm²), 또는 8 인치 x 10 인치 (500 cm²)로서 크기를 표시할 수 있다.
- [0023] 상처를 치유를 촉진시키기 위해 본원에 기재된 상처 치유 스캐폴드와 상처를 접촉시킴으로써 상처 치유를 촉진시키는 방법이 본 발명의 다른 측면에서 제공된다. 일부 실시양태에서 접촉시키는 것은 상기 조성물을 출혈 부위에 적용하여 출혈을 제어하는 것을 포함한다.
- [0024] 일부 실시양태에서 상처는 화상 또는 당뇨병성 궤양이다.
- [0025] 일부 실시양태에서 음압 상처 요법이 상기 스캐폴드와 함께 사용된다.
- [0026] 다른 실시양태에서 상기 방법은 후속적으로 상처를 의학상 허용되는 커버링으로 고정시켜 상처를 치료하는 것을 포함할 수 있다.
- [0027] 상처는 부분층 및 전층 상처, 압박성 궤양, 정맥성 궤양, 당뇨병성 궤양, 만성 혈관성 궤양, 터널형/웜손 상처, 수술 상처, 외상 상처 및 배액성 상처로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0028] 본 발명은 다른 측면에서, 콜라겐 글리코사미노글리칸 스캐폴드에 ABCB5+ 줄기 세포를 시딩하고, 이러한 스캐폴드를 조직이 형성되도록 하는 조건 하에 유지시키는 것을 포함하는, 조직 공학 방법이다. 일부 실시양태에서 이러한 조직 공학 방법은 조직 재생 방법이며, 스캐폴드를 조직이 재생되도록 하는 조건 하에 유지시킨다. 또 다른 실시양태에서 상기 조직 재생 방법은 노화된 피부를 치료하는 방법이다.
- [0029] 생물학적 조직 스캐폴드에 ABCB5+ 줄기 세포를 시딩하고, 이러한 스캐폴드를 조직이 형성되도록 하는 조건 하에 유지시키는 것을 포함하는, 조직 공학 방법이 본 발명의 다른 측면에서 제공된다.
- [0030] 생물학적 조직 스캐폴드는, 예를 들어 동종이식편 또는 자가이식편, 이중 조직 및/또는 탈세포화 조직일 수 있다.
- [0031] 본 발명의 기타 이점 및 신규 특징은 첨부되는 도면과 연계해서 고려해 볼때 본 발명의 각종 비-제한적 실시양태의 다음 상세한 설명으로부터 명백해질 것이다. 본 명세서와 참조로 포함된 문헌이 상반되고/되거나 모순되는 개시내용을 포함하는 경우에는, 본 명세서가 우선할 것이다.
- [0032] 특정 대상체에게 특정한 병태를 치료하기 위한 조성물을 투여하는 몇 가지 방법이 본원에 개시된다. 이러한 본 발명의 각 측면에서, 본 발명이 구체적으로 또한, 그 특정한 병태를 치료하는 데 사용하기 위한 조성물 뿐만 아니라 그 특정한 병태를 치료하기 위한 의약을 제조하기 위한 상기 조성물의 용도를 포함한다는 것을 이해해야 한다.
- [0033] 본 발명은 다음 설명에 제시되거나 또는 도면에 예시된 성분들의 배열 및 구축의 상세 내역으로 그의 적용을 제한하지 않는다. 본 발명은 다른 실시양태일 수 있고 각종 방식으로 실시되거나 수행될 수 있다. 또한, 본원에

사용된 어법 및 용어는 설명하기 위한 것이고, 이로써 제한되는 것으로 간주되서는 안된다. "포함하는", "갖는", "함유하는" 또는 "수반하는", 및 본원에서의 그의 변동의 사용은 그 후에 열거된 항목 및 그의 등가물 뿐만 아니라 추가 항목을 포괄하는 것을 의미한다.

도면의 간단한 설명

[0034]

수반되는 도면은 일정한 비율로 그려져야 하는 것으로 의도되지 않는다. 본 도면에서, 각종 도면에 예시되는 각각의 동일하거나 거의 동일한 성분은 비슷한 숫자로써 나타낸다. 명료하게 하기 위하여, 모든 성분이 모든 도면에 표시되지 않을 수 있다.

도 1. ABCB5+ 세포의 다능 분화 잠재력. 분화 전 및 후, 스펙트린 (근발생 검정), CD31 (혈관신생 검정) 및 TUJ1 (신경발생 검정)의 발현을 위한 ABCB5+ (왼쪽 패널) 또는 ABCB5- (오른쪽 패널) 인간 피부 세포의 면역형광 염색 (상부 3개 줄). DAPI로 핵을 가시화하였다. 하부 2개 줄: 분화 전 및 후, 인간 피부 세포의 ABCB5+ (왼쪽 패널) 또는 ABCB5- (오른쪽 패널)의 오일 레드(Oil Red) (지방생성 검정) 및 알리자린 레드(Alizarin Red) (골형성 검정) 염색. 반복 검증 표본 (n = 3)에서, 각 마커에 대한 화소 강도 (근발생, 혈관신생 및 신경발생 검정에서) 또는 양성 염색 세포 % (지방생성 및 골형성 검정에서)의 종합 분석이 오른쪽의 막대 도표에 도시되어 있다. *, P < 0.05.

도 2. 뮤린 ABCB5 유전자의 유전자좌 및 단백질 위상기하학의 도식. 뮤린 Abcb5 유전자는 28개 엑손을 함유하고, 12qF2 유전자좌에 게놈 DNA의 102 kb에 걸쳐있다. 이는 11개의 막횡단 나선과 5개의 세포외 루프를 수반하는 1255 AA 단백질을 코딩한다. 엑손 23은 3C2-1D12 항-ABCB5 항체 결합 에피토프를 함유하는 세포외 루프를 형성하는 AA 911-957을 코딩한다.

도 3. Abcb5 WT 마우스 (상부 패널) 및 Abcb5 KO 마우스 (하부 패널)의 분석. H&E 염색은 KO 동물에서 피하지방이 감소되고 평활 근조직이 붕괴된 진피의 세선화를 나타낸다 (WT 표본과 KO 표본에 대한 배율은 동일하다). IHC 및 유동 세포측정법은 Abcb5null/null 마우스에서 Abcb5 단백질 발현의 완전한 상실을 보여준다. 로다민-123 유출 연구는 Abcb5null/null 마우스에서 신생 염료-유지 세포 집단을 확인시켜 주는데 (R1 게이트, 오른쪽 하단 패널), 이는 특징적인 Abcb5 기능, 로다민-123 유출의 상실과 일치한다¹.

도 4a-4c. ABCB5에 의한 줄기 세포 휴지기의 조절. 생체내에서 BrdU로 표지된 Abcb5 WT (b) 및 Abcb5 KO (c) 마우스로부터의 뮤린 피부 세포와 표지되지 않은 Abcb5 WT 대조군 (a)으로부터의 뮤린 피부 세포의 대표적인 이중-색상 유동 세포측정 분석. 세포를 항-BrdU FITC 항체와 7-AAD로 공동-염색하였다. 세포 주기의 G0 기의 BrdU-양성 세포는 R1 게이트에 제시된다. 세포 주기의 S/G2/M 기의 BrdU-음성 세포는 R2 게이트에 도시된다.

도 5a-5b. Abcb5 KO 마우스와 Abcb5 WT 마우스 간의 세포 주기 조절에 관여한 유전자의 차별적 발현. (A) 실시간 PCR 분석에 의해 결정된 바와 같이 Abcb5 WT 마우스와 비교해서 Abcb5 KO 마우스에서 하향조절된 유전자의 목록. (B) 여기서 도시된 유전자는 Abcb5 KO 마우스에서 하향조절된다. 화살표를 수반한 라인은 공지된 유전자 상호작용을 나타낸다. 정규 경로, 예컨대 p53 신호전달, G1/S 체크포인트 조절, 시클린 및 세포 주기 조절, 및 칼슘 신호전달 경로에 대한 유전자 관계가 화살표 없는 라인과 함께 주석으로 달렸다. 유전자 관계 및 상호작용은 인저너티(Ingenuity) 경로 분석 (인저너티; 미국 캘리포니아주)에 근거한다.

도 6a-6c. Abcb5 KO 마우스와 Abcb5 WT 마우스의 비교되는 상처 치유 분석. (a) Abcb5 WT 마우스 (상부 패널)와 Abcb5 KO 마우스 (하부 패널)에서 생성된 전층 피부 상처의 대표적인 제0일 및 제7일 디지털 사진. (b) Abcb5 WT 마우스 (상부 패널)와 Abcb5 KO 마우스 (하부 패널)로부터 실험 제7일에 수거한 기저 근육 조직과 피부를 둘러싸고 있는, 중앙 상처 횡단면의 대표적인 H&E 염색. (c) Abcb5 KO 상처와 Abcb5 WT 상처의 상처 봉합 (상부 패널) 및 염증성 기질 두께 (하부 패널)의 정량적 분석.

도 7a-7c. Abcb5 KO 마우스와 Abcb5 WT 마우스에서 비교되는 CD31 발현 분석. (a) 및 (b) Abcb5 WT 마우스 (상부 패널)와 Abcb5 KO 마우스 (하부 패널)로부터 실험 제7일에 수거한 기저 근육 조직과 피부를 둘러싸고 있는, 중앙 상처 횡단면의 대표적인 H&E 및 CD31 염색. (c) Abcb5 KO 상처와 Abcb5 WT 상처에서 혈관성 CD31+ 층 두께 (상부 패널) 및 무혈관성 CD31- 층 두께 (하부 패널)의 정량적 분석.

도 8. Abcb5 KO 마우스와 Abcb5 WT 마우스에서 혈관 형성의 비교 분석. Abcb5 WT 마우스 (왼쪽 패널)와 Abcb5 KO 마우스 (오른쪽 패널)로부터 실험 제7일에 수거한 조직으로부터의 중앙 상처 횡단면의 혈관 층의 대표적인 CD31 염색.

도 9a-9b. Abcb5 WT 마우스 상처와 비교해서 Abcb5 KO 마우스 상처에서 혈관신생에 관여한 유전자의 차별적 발현. (a) 실시간 PCR 분석에 의해 결정된 바와 같은 유전자 발현 수준. (b) Abcb5 KO 상처에서 하향조절된, 혈관신생을 증진시키는 시토카인이 제시되고 표지된다. 화살표는 혈관신생을 증진시키는 효과를 표시한다. 항혈관신생 막형단 수용체 Bai1은 Abcb5 KO 상처에서 과발현된다. 하단의 막대는 항혈관신생 효과를 표시한다. 유전자 관계는 인저너티 경로 분석 (인저너티; 미국 캘리포니아주)에 근거한다.

도 10a-10d. NSG 마우스에서 상처 치유에 대한 ABCB5+ 세포의 효과. (a) 4개의 실험 군에 입힌 상처의 염증성 기질 두께의 정량적 분석. (b) 실험 제14일에 수거한 상처 횡단면의 대표적인 H&E 염색. (c) 이식한지 14일 후 인간-특이적 $\beta 2M$ 에 의한 인테그라[®] 매트릭스 내로 주사된 인간 세포의 검출. 검정 화살표는 $\beta 2M$ 인간 세포 군락과 개개의 $\beta 2M$ 인간 세포를 표시한다. (d) 인간-특이적 GAPDH, $\beta 2$ -마이크로글로불린 및 부하 대조군으로서 사용된 *류린* β -액틴의 발현에 대한 류린 상처 횡단면의 RT-PCR 분석.

도 11a-11c. 생착 후 8주째 마우스 등에 확립된 인간 피부 이식편을 보여주는 인간 대 마우스 이종이식편 모델 (a). 인간-류린 피부 문합을 명확하게 보여주는 상응하는 조직병리학이 (b)에 도시된다. 인간 이종이식편 (c)의 상처형성은 상처 형성 후 0일, 2일, 4일 및 7일의 시점에서 (상부에서 하부) 특이적 진피 세포 및 세포외 매트릭스 요소의 면역조직화학적 검출을 가능하게 해준다.

도 12. 인간 재생적 상처 치유에 있어서의 ABCB5의 역할. 반흔 형성과 인테그라[®] 스캐폴드-유도된 재생에 따른 치유 반응의 면역조직화학적 프로파일을 조사하는 비교 연구 (반흔 대 스캐폴드)를 확인할 수 있다 (스캐폴드를 보유하고 있는 상처에서 ABCB5+ 진피 세포의 현저하게 증강된 발현과 액틴-발현성 근섬유모세포의 놀라운 재정렬에 주목해야 한다).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0035] 본 발명은 부분적으로, ABCB5 양성 줄기 세포가 시딩된 콜라겐 글리코사미노글리칸 스캐폴드가 증강된 상처 치유와 조직 공학 특성을 명확하게 보여준다는 발견에 근거한다. 본 발명의 구축물은 조직 합성을 초래하는 독특한 재생 활성을 보유하고 있는 것으로 밝혀졌다. 증강된 조직 합성은 조직의 복구와 재생, 및 상처 복구와 치유에 유용하다.
- [0036] 본 발명에 따라 유용한 세포는 ABCB5 양성 줄기 세포이다. ABCB5는 정상 인간 조직으로부터 다능 줄기 세포 집단을 단리시키기 위한 신규의 중요한 마커이다. 본원에 사용된 바와 같은 "ABCB5(+)" 줄기 세포"는 자기 재생할 수 있고 다중 성체 세포 계통의 성숙한 세포로 분화될 수 있는 능력을 지닌 세포를 지칭한다. 이들 세포는 세포 표면 상에서 ABCB5를 발현시키는 것을 특징으로 한다. 본 발명의 일부 실시양태에서, ABCB5(+) 줄기 세포는 진피 또는 안구 줄기 세포이다.
- [0037] 본원에 사용된 바와 같은 "ABCB5 양성 진피 중간엽 줄기 세포"는 자기 재생할 수 있고 다중 성체 세포 계통의 성숙한 세포, 예컨대 골, 지방 및 연골로 분화될 수 있는 능력을 지닌 피부의 세포를 지칭한다. 이들 세포는 세포 표면 상에서 ABCB5를 발현시키는 것을 특징으로 한다. 배양시, 중간엽 줄기 세포는 특이적 배지를 사용하여 골, 지방, 연골 또는 근육 세포로 분화되도록 인도될 수 있다 (Hirschi KK and, Goodell MA. *Gene Ther.* 2002; 9: 648-652. Pittenger MF, et al., *Science.* 1999; 284: 143-147. Schwartz RE, et al., *J Clin Invest.* 2002; 109: 1291-1302. Hirschi K and Goodell M. *Differentiation.* 2001; 68: 186-192).
- [0038] ABCB5 양성 진피 중간엽 줄기 세포는 피부로부터 수득될 수 있다. 이러한 피부는 피부를 갖는 모든 대상체로부터 유래될 수 있지만, 일부 실시양태에서 바람직하게 인간 피부이다. 피부는 모든 연령의 대상체로부터 유래될 수 있지만, 일부 실시양태에서 바람직하게, 청소년 또는 유아 피부가 아니라 성인 피부이다.
- [0039] 본 발명의 다른 실시양태에서, ABCB5(+) 줄기 세포는 망막 줄기 세포이다. ABCB5(+) 줄기 세포는 눈의 기저 윤부 상피 또는 망막 색소 상피 (RPE)로부터 수득될 수 있다 (예를 들어, 그로부터 단리되거나 유래될 수 있다). 일부 실시양태에서, ABCB5(+) 줄기 세포는 인간의 눈으로부터 수득된다. 다른 ABCB5(+) 줄기 세포 유형, 예컨대 예를 들어, 중심성 각막으로부터 수득된 세포가 본 발명의 각종 측면 및 실시양태에 사용될 수 있다.
- [0040] ABCB5(+) 줄기 세포는 단리될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은, "단리된 ABCB5(+) 줄기 세포"는 그것이 본래 발견되는 유기체로부터 제거된 세포, 또는 이러한 세포의 자손을 지칭한다. 단리된 세포는 또한, 자연 환경 이외의 조건에 놓여진 세포를 지칭한다. 이러한 세포는 나중에 제2 유기체 내로 도입될 수 있거나 또는 그것이 단리되는 유기체 (또는 그의 후손으로부터의 세포 또는 세포 집단) 내로 재도입될 수 있다. 이러한 세포가 본 발명의 방법에 따라서 일단 조작되면, 이는 여전히 단리된 세포인 것으로 간주된다. 용어 "단리된"은 다른 세

포와 조합되거나 또는 혼합되어 또는 생체내 환경 하에서 그 후에 세포를 사용하는 것을 배제하지 않는다.

[0041] ABCB5(+) 줄기 세포는 피부 세포, 예컨대 진피 세포, 및 기저 윤부 상피 또는 RPE의 안구 세포를 포함한 조직 샘플을 단리한 다음, ABCB5(+) 줄기 세포를 정제함으로써 특정 대상체로부터 수득할 수 있다. 수많은 방식으로 특정 샘플에 ABCB5+ 줄기 세포를 강화시킬 수 있다는 것은 통상의 기술자에게 명백할 것이다. 예를 들어, 줄기 세포는 이러한 세포 상의 ABCB5 세포 표면 분자와 결합하는 항체 또는 다른 결합 분자를 사용하여 선택될 수 있다. 줄기 세포는 공여자로부터 직접 수득할 수 있거나 또는 냉동보존 저장고로부터 인출할 수 있다. 줄기 세포는, 예를 들어 ABCB5에 대한 항체를 사용하여 분리할 수 있고, 표준 방법론을 사용하여 배양 하에 유지시킬 수 있거나 또는 예를 들어, 나중에 사용하기 위하여 액체 질소에서 동결시킬 수 있다.

[0042] 구체적으로 언급하면, 중간엽 줄기 세포 분자 표현형을 지닌 순수한 ABCB5+ 진피 세포 집단은, 예를 들어 확립되고 민감하며 특이적인 ABCB5 모노클로날 항체 (mAb)를 사용하여 건강한 인간 피부의 수술 표본으로부터 분리될 수 있다. 이와 같이 분리된 ABCB5+ 진피 줄기 세포는 다능 분화 능력을 지니고 있으므로, 이들은 3가지 발아 층 모두의 세포 계통, 즉 외배엽, 중배엽 및 내배엽으로 분화된다.

[0043] 본 발명은 혼합 세포 집단으로부터 ABCB5(+) 줄기 세포를 분리시키기 위하여 ABCB5-결합 분자, 예컨대 예를 들어, 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 인간 항체, 키메라 항체, 인간화 항체, 단일 체 항체, F(ab')₂, Fab, Fd, Fv 또는 단일 체 Fv 단편을 이용하는 적합한 모든 방법을 고려한다. 따라서, 방법은 세포의 세포 현탁액을 제공하는 단계; 이러한 세포 현탁액을, ABCB5(+) 세포 상의 에피토프 (ABCB5 포함)를 인식하는 모노클로날 항체, 또는 모노클로날 항체의 조합물과 접촉시키는 단계; 및 이러한 모노클로날 항체에 의해 결합된 세포를 상기 세포 현탁액으로부터 분리 및 회수하는 단계를 포함하는, ABCB5(+) 줄기 세포 집단을 생성시키는 방법을 포함한다. 이러한 모노클로날 항체는 고체 상에 연결하고 활용하여 ABCB5+ 줄기 세포를 포획할 수 있다. 이어서, 이와 같이 결합된 세포를, 항체와 고체 상의 성질에 따라서 공지된 방법에 의해 고체 상으로부터 분리시킬 수 있다.

[0044] 본원에 사용된 바와 같은 "모노클로날 항체"는 항원의 동일한 에피토프와 결합하는 이뮤노글로불린의 단일 클로날 집단으로부터 수득된 항체를 지칭한다. 본 발명의 세포 집단을 제조하는 데 적당한 모노클로날 기반 시스템은 양성 또는 음성 선별을 위하여 항체를 활용하는 자기 비드/상자성 입자 칼럼; 비오틴 또는 스트렙타비딘 친화성에 근거한 분리; 및 다른 세포의 현탁액에서 혼합된 면역형광성-염색된 LSC의 고속 유동 세포측정 분류를 포함한다. 따라서, 본 발명의 방법은 세포 집단을 분리시키고, 표면 항원 ABCB5에 대하여 유도된 모노클로날 항체 (예를 들어, ABCB5와 선택적으로 결합하는 모노클로날 항체)를 사용하여 증강시키는 것을 포함한다. 일부 경우에, ABCB5와 선택적으로 결합하는 시판용 항체 또는 항체 단편이 본원에 개시된 방법에 사용될 수 있다. 이러한 항체는, 모노클로날 항체가 다른 항원 (즉, ABCB5 이외의 항원)과 결합할 수 있는 친화도 보다 더 큰 친화도로 ABCB5와 결합하거나 결합할 수 있는 경우에, ABCB5와 선택적으로 결합하는 것으로 간주된다. 이러한 결합은 표준 단백질-단백질 상호작용 검정 (예를 들어, 항체-항원 또는 리간드-수용체 검정), 예컨대 예를 들어, 경쟁적 검정, 포화 검정 또는 표준 면역검정 (효소 결합 면역흡착 검정, 방사성 면역검정 및 방사성 면역-필터 결합 검정을 포함하나, 이에 제한되지 않는다)에 의해 측정되거나 결정될 수 있다.

[0045] ABCB5(+) 줄기 세포는 실질적으로 순수한 제제로서 제조될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "실질적으로 순수한"은 ABCB5(+) 줄기 세포 이외의 세포가 실질적으로 없는 제제를 지칭한다. 예를 들어, ABCB5(+) 줄기 세포의 실질적으로 순수한 제제는 제제에 존재하는 총 세포의 85% 이상, 86% 이상, 87% 이상, 88% 이상, 89% 이상, 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상 또는 100%가 ABCB5(+) 줄기 세포인 제제를 구성할 수 있다.

[0046] 본 발명의 조성물은 기질, 예컨대 예를 들어, 상처 치유를 촉진시키는 생체 적합성 물질 (생분해성 스캐폴드 포함)을 포함한다. ABCB5(+) 줄기 세포를 상기 기질 또는 스캐폴드에 가하여, 예를 들어 이식을 위한 조직 또는 조직 이식편을 형성할 수 있다. 상기 스캐폴드는 콜라겐 및 글리코사미노글리칸으로 구성된 고도로 다공성 격자, 즉 콜라겐 글리코사미노글리칸 매트릭스 또는 스캐폴드이다. 콜라겐 글리코사미노글리칸 스캐폴드의 예는 미국 특허 번호 4,060,081, 4,280,954 및 4,505,266에 열거된 것을 포함한다. 콜라겐 글리코사미노글리칸 스캐폴드에 유용한 다른 물질은 콘드로이틴 6-설페이트, 콘드로이틴 4-설페이트, 헤파린, 헤파린 설페이트, 케라틴 설페이트, 더마틴 설페이트, 키틴 및 키토산을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 콜라겐 글리코사미노글리칸 스캐폴드는 조직 공동 내에서부터 혈관 및 주변 조직 세포가 이동하여 유입되는 지지성 또는 스캐폴딩 구조물로서 제공된다 (이러한 과정은 "침윤"으로서 지칭된다). 침윤은 스캐폴드가 생분해됨에 따라 이를 대체하는 새로운 조직을 창출시키는 데 책임이 있다.

- [0047] 일부 실시양태에서 상기 스캐폴드는 인테그라®이다. 인테그라®는 세포의 매트릭스 (콜라겐 및 GAG)로 구성된, FDA 승인된 무세포성 진피 피부 대체물이다. 이는 정맥 다리 궤양과 같은 비치유성 상처 또는 광범위한 조직 결함을 치료하는 데 사용되어 왔다.
- [0048] 본원에서의 "조성물"은 단리된 세포 제제 또는 스캐폴드 (조직 스캐폴드 및 인공 스캐폴드 포함)를 지칭할 수 있다. 일부 경우에, 본 발명의 조성물에는 단리된 ABCB5(+) 줄기 세포가 강화된다. 상기 제제에 존재하는 우세 세포 하위유형이 ABCB5(+) 줄기 세포인 경우에, 특정 조성물에는 단리된 ABCB5(+) 줄기 세포가 강화된 것으로 간주된다. 예를 들어, ABCB5(+) 줄기 세포-강화된 조성물은 이러한 조성물의 세포의 50% 이상, 55% 이상, 60% 이상, 65% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 98% 이상, 99% 이상 또는 100%가 ABCB5(+) 줄기 세포인 조성물이다. 일부 실시양태에서, 단리된 ABCB5(+) 줄기 세포가 강화된 조성물은 이러한 조성물의 세포의 50% 미만, 45% 미만, 40% 미만, 35% 미만, 30% 미만, 25% 미만, 20% 미만, 15% 미만, 10% 미만, 9% 미만, 8% 미만, 7% 미만, 6% 미만, 5% 미만, 4% 미만, 3% 미만, 2% 미만 또는 1% 미만이 ABCB5(-) 세포인 조성물이다. 일부 실시양태에서, 조성물의 세포는 단지 진피 세포이다. 예를 들어, 모든 세포가 ABCB5+ 진피 세포가 되도록 스캐폴드에 세포를 시딩한다. 즉, 일부 실시양태에서, 조성물은 비-진피 세포를 함유하지 않을 수 있다. 일부 실시양태에서 세포는 각질세포 및/또는 표피 세포를 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 조성물의 세포는 단지 안구 세포이다. 즉, 일부 실시양태에서, 조성물은 비-안구 세포를 함유하지 않을 수 있다. 일부 실시양태에서, 조성물은 ABCB5(-) 안구 세포를 함유하지 않을 수 있다.
- [0049] 본 발명의 스캐폴드는 각종 방식으로, 예컨대 단일 시트로서, 또는 다수의 콜라겐 층 또는 시트를 함유하는 적층 시트로서 포맷될 수 있다. 특정의 실시양태에서, 스캐폴드는 2 내지 15개의 시트를 포함한다. 이러한 시트는 바늘땀이나 봉합사에 의해 연결될 수 있다.
- [0050] 특정한 실시양태에서, 중합체는 줄기 세포 이외에, 생물활성 분자, 예를 들어 소분자 또는 펩티드를 추가로 포함한다. 생물활성 분자는 중합체 내로 비공유적으로 혼입될 수 있는데, 예를 들어 현탁액으로서 혼입될 수 있거나, 입자, 미세입자 또는 콜로이드, 또는 그의 혼합물로서 피막화될 수 있다. 생물활성 분자는 이러한 생물활성 분자를 중합체에 부착시키는 데 적합한 모든 화학을 사용하여, 중합체 내로 공유적으로 혼입시킬 수도 있다. 생물활성 분자는 치료상 바람직한 모든 분자, 예컨대 성장 인자, 항미생물제, 진통제, 지혈제, 혈관신생 증진제, 또는 항혈관신생제일 수 있다. 예시적 실시양태에서, 중합체는 FGF2, NGF, 독시시클린, 아목시실린, 및 폴리-L-리신 중 하나 이상을 포함한다.
- [0051] 또 다른 특정한 실시양태에서, 스캐폴드는 10 cm 이상의 폭을 갖는다. 예를 들어, 스캐폴드는 10 cm 이상의 폭과 10 cm 이상의 길이를 가질 수 있다. 따라서, 특정의 스캐폴드는 100 cm² 초과, 예를 들어 400 cm²의 표면적을 가질 수 있다. 본 발명의 스캐폴드는 80 N 이상의 2축 강도를 가질 수 있다.
- [0052] 본 발명의 조직 스캐폴드는 다수의 적용에 사용될 수 있는데, 이러한 적용은 조직 결함 또는 상처를 커버하는 것, 연질 조직과 같은 조직을 보강하는 것, 및 기관/조직의 생성 또는 재생을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 따라서, 또 다른 측면에서, 본 발명은 손상된 조직을 본 발명의 스캐폴드와 접촉시키는 것을 포함하는, 손상된 조직의 복구를 유도시키는 방법을 특징으로 한다. 본 발명은 추가로, 연질 조직을 본 발명의 스캐폴드와 접촉시키는 것을 포함하는, 연질 조직 재생을 자극하는 방법을 특징으로 한다. 스캐폴드를 조직과 접촉한 상태로 놓아두는 경우, 이러한 스캐폴드는 스캐폴드 근처에 위치한 세포의 증식을 증가시킬 수 있다. 또한, 스캐폴드는 이것이 부착되는 조직 내에서의 혈관화를 증진시킬 수 있다. 따라서, 또 다른 측면에서, 본 발명은 세포 증식이 자극되도록 특정 조직을 스캐폴드와 접촉시키는 것을 포함하는, 상기 조직 내에서의 세포의 증식을 자극하는 방법을 제공한다. 본 발명은 추가로, 혈관화가 특정 조직 내에서 발생하도록 이러한 조직을 스캐폴드와 접촉시키는 것을 포함하는, 상기 조직의 혈관화를 유도시키는 방법을 제공한다.
- [0053] 스캐폴드는 조직 결함을 증진시키도록 성형될 수 있다. 대부분의 경우에, 이는 중합체 섬유를 가위 또는 나이프로 트리밍함으로써 달성될 수 있고; 또 다른 한편으로, 스캐폴드는 휘발성 용매에서 용해시키거나 가열함으로써 형성된 중합체 용액으로부터 주조할 수 있다.
- [0054] 세포 현탁액을 스캐폴드에 적용함으로써 중간엽 줄기 세포를 이러한 스캐폴드 상으로 시딩한다. 이는 상기 스캐폴드를 세포 배양 용기에 침지시키거나, 또는 세포를 스캐폴드에 주사하거나 또는 기타 직접적으로 적용함으로써 달성될 수 있다.
- [0055] 세포가 시딩된 스캐폴드는 표준 외과적 기술을 사용하여 상기 결함 부위에 이식한다. 스캐폴드는 체내 이식 이전에 시험관내에서 시딩되고 배양될 수 있거나, 시딩되고 즉시 이식될 수 있거나, 또는 이식된 다음, 세포가 시

딜될 수 있다. 특정 실시양태에서, 세포를 스캐폴드 상으로 및 스캐폴드 내로 시딩하고, 대략 16시간 내지 2주 동안 시험관내에서 배양하지만, 더 길어질 수도 있다. 시딩 또는 체내 이식 시점에서의 세포 밀도는 상황에 따라 다양할 것이다. 예를 들어, 세포 밀도는 대략 25,000개 세포/mm²일 수 있다. 통상의 기술자는 적당한 세포 밀도를 알고 있을 것이다.

[0056] 본원에 사용된 바와 같이, 대상체는 포유동물, 예컨대 예를 들어, 인간, 비-인간 영장류, 암소, 말, 돼지, 양, 염소, 개, 고양이 또는 설치류일 수 있다. 인간 ABCB5(+) 줄기 세포와 인간 대상체가 특히 중요한 실시양태이다.

[0057] 일부 실시양태에서, 단리된 ABCB5(+) 줄기 세포 [예를 들어, ABCB5(+) 줄기 세포 이식편의 형태의 조성물로서, 또는 이식된 이식편에 전달된 세포의 체제로서]는 대상체에게 2회 이상 투여할 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, 대상체에게 수주, 수개월 또는 수년의 과정에 걸쳐 단리된 ABCB5(+) 줄기 세포의 다수 용량 또는 이식편 (예를 들어, 2, 3, 4 또는 그 초과)을 투여할 수 있다. 일부 실시양태에서, 줄기 세포는 첫번째 적용 후 3개월, 6개월, 9개월, 12개월, 18개월, 21개월 또는 24개월에 다시 투여한다. 적용 횟수와 적용 빈도는, 예를 들어 첫 번째 줄기 세포 투여/이식 후 달성된 세포 재생 정도에 좌우될 수 있다. 줄기 세포 적용 횟수 및 빈도는 의료 전문가 (예를 들어, 외과의, 내과의)에 의해 결정될 수 있다.

[0058] 본 발명의 조성물 (ABCB5 + 줄기 세포가 시딩된 스캐폴드)은 상처 치유에 유용하다. 피부 및 기타 기관 시스템에서의 대부분의 상처는 보호 외부 층 뿐만 아니라 기저 층 및 조직으로부터의 세포 및 결합 조직 매트릭스의 상실을 특징으로 한다. 피부 상처의 경우에는, 표피가 상실되는 외부 층이다. 표피는 진피 뿐만 아니라 더 심부 구조, 예컨대 지방, 근육 및 골 위에 놓여있다. 피부 및 기타 기관 시스템에서의 큰 상처를 봉합하기 위해서는 전형적으로, 수십억개의 세포를 생성해야 하고, 혈관 망상을 통한 영양이 필요하며, 신생 세포의 매트릭스 (ECM)에 존재하는 단백질과 글리코사미노글리칸으로부터의 기계적 강도가 필요하다.

[0059] 본원에서의 목적상 용어 "상처"는 특정 기관 또는 기관 시스템에 대한 손상을 광범위하게 지칭한다. 피부의 경우에는, 이러한 손상이 표피, 진피 및/또는 피하 조직에 대한 것일 수 있다. 피부 상처는 상처의 깊이에 따라서 4가지 등급 중 하나로 분류될 수 있다: i) 등급 I: 상피로 제한된 상처; ii) 등급 II: 진피 내로 확장된 상처; iii) 등급 III: 피하 조직 내로 확장된 상처; 및 iv) 등급 IV (또는 전층 상처): 골이 노출되는 (예를 들어, 대전자 또는 천골과 같은 골의 압력점) 상처. 용어 "부분층 상처"는 등급 I 내지 III을 포괄하는 상처를 지칭하고; 부분층 상처의 예는 화상 상처, 압박성 궤양, 정맥성 울혈 궤양, 및 당뇨병성 궤양을 포함한다. 용어 "심부 상처"는 등급 III과 등급 IV 상처 둘 다를 포함한다. 본 발명의 방법은 만성 상처와 급성 상처를 포함한, 모든 등급의 상처를 치료하는 데 유용하다. 용어 "만성 상처"는 30일 이내에 치유되지 않는 상처를 지칭한다.

[0060] 본원에서의 목적상, 용어 "상처 치유를 촉진시키는 것"은 특정 기관 또는 기관 시스템의 정상적인 생리학적 장벽의 재구성을 가능하게 하는 것을 지칭한다. 피부 상처의 경우에, 상처 치유를 촉진시키는 것은 과립화 조직의 형성의 유도, 및/또는 상처 수축의 유도, 및/또는 재혈관화의 유도, 및/또는 상피화 (즉, 상피 내에서의 새로운 세포의 생성)의 유도를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, ABCB5+ 세포는 적어도 부분적으로, 매개인자, 예컨대 예를 들어, VEGF의 분비에 의해 기능할 수 있다.

[0061] 본 발명의 방법에 의해 치료하고자 하는 상처의 유형은 외과적 상처; 외상성 상처; 방사선 손상 상처; 독성 표피 괴사 상처; 감염성 상처; 종양의 상처; 전층 상처; 부분층 상처; 및 화상 상처를 포함하나 이에 제한되지 않는 각종 종류의 상처 뿐만 아니라 각종 유형의 궤양, 예컨대 피부 궤양, 각막 궤양, 동맥 폐쇄성 궤양, 연속적인 압력 유도 욕창성 및 당뇨병성 궤양, 화상 궤양, 손상 궤양, 방사선 궤양, 약물-유도된 궤양, 수술 후 궤양, 염증성 궤양, 위장관 궤양, 단순 궤양 및 기타 유형의 혈관장해성 궤양 및 만성 (난치성) 궤양으로부터 비롯된 상처를 포함한다.

[0062] 본 발명의 각종 실시양태의 방법은 복합 상처 또는 치유하기가 어려운 상처를 치료하는 데 특히 유용할 수 있다. 감염, 방사선 조직, 전신 질병, 의약, 환자 연령, 환자 건강, 및 대상체의 영양 상태를 포함한 많은 인자가 상처 치유 과정에 불리한 영향을 미칠 수 있다. 또한, 말초혈 순환을 지연시키는 모든 과정, 예컨대 동맥 경화증, 장기간 압력, 정맥류 질환, 및 정맥 울혈이 산소의 전달에 불리한 영향을 미칠 수 있고, 손상을 입은 대상체에게서 치유를 매개하는 데 적당한 세포 유형, 영양분 및 화학적 신호가 상처 치유를 악화시킬 것이다. 상처 치유를 억제하는 인자는 상처 건조, 의약, 예컨대 화학요법 또는 스테로이드, 및 불량한 환자 건강 및/또는 영양을 포함한다. 특정의 부분층 및 전층 손상, 예컨대 화상, 피부 이식편, 및 각종 유형의 궤양은 복구에 저항하고 대상체에게 상당한 통증과 불편을 가져다 준다.

- [0063] 환자의 일반적인 신체 조건이 또한, 상처 치유에 중요하다. 연령이 증가함에 따라, 피부는 더 얇아지고 섬유모세포의 수와 총 피부 콜라겐의 양이 감소하기 때문에, 손상된 조직을 복구할 수 있는 능력은 저하된다. 알콜 중독, 빈혈, 당뇨병, 영양 실조, 충격 및 요독증과 같은 질환 상태는 상처 부위의 산소 및 영양분의 전달 장애를 야기시킴으로써, 치유 과정을 억제한다. 또한, 단핵구감소증을 초래하는 질환이 상처 치유를 상당히 약화시킬 수 있다.
- [0064] 장애를 치료하기 위해 사용된 의약은 상처 치유 약화를 초래할 수 있다. 암 환자에서 분할되는 세포를 제거하기 위해 사용된 화학요법은 또한, 신규 세포 성장에 의존적이기도 하는, 상기 환자가 상처를 치유할 수 있는 능력을 저해한다. 스테로이드는 상처 복구의 3가지 단계, 즉 초기 염증 반응을 억제하는 단계, 새로운 상피 조직과 혈관 조직의 생성을 느리게 하는 단계 및 반흔 조직 내에서 콜라겐 매트릭스를 약화시키는 단계 모두에 부정적으로 영향을 미친다.
- [0065] 박테리아성 상처 감염이 장기간 상처 치유에 대한 통상의 국소적 원인이다. 인간 피부는 전형적으로, 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*), 스태필로코쿠스 에피데르미디스(*Staphylococcus epidermidis*), 스태필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 및 일부 스트렙토코쿠스(*Streptococcus*) 균주를 포함한 수많은 미생물에 의해 콜로니화된다. 따라서, 기저 조직을 환경에 노출시키는 어떠한 상처도, 적어도 상주 미생물총에 감염되게 된다. 잘 돌봐지고 고도의 혈관화 조직 내에 있는 상처는 감염에 저항하는 반면, 허혈성 조직 내의 상처는 감염에 훨씬 더 잘 걸리기 쉽다.
- [0066] 일부 실시양태에서 대상체는 피부 상처를 가질 수 있다. 다른 실시양태에서 대상체는, 예를 들어 각막 상피 내에 안구 병태, 예컨대 안구 상처 (예를 들어, 사멸되거나, 손상되거나 또는 감염된 안구 세포)를 가질 수 있다. 따라서, 본 발명에 따르는 안구 병태를 갖는 대상체는 그의 각막 상피에 상처를 입을 수 있다.
- [0067] 일부 실시양태에서 본 발명의 스캐폴드는 상처에 압력을 가하기 위한 장치와 조합될 수 있다. 필요에 따라 고정적이거나 시간-의존적인 방식으로 긴장 또는 압축을 기계적으로 유도시키는 장치를 사용하여, 상기 상처 내의 세포에 제어 변형을 실시할 수 있다. 제어되고 국한된 힘을 상처 표면에 적용하기 위해서는, 예를 들어 상처 표면 상에 위치 설정될 수 있는 매트릭스 내의 미세구조물, 예컨대 마이크로챔버와 유동적으로 접촉된 수많은 마이크로채널을 갖는 장치를 사용할 수 있다. 각 마이크로챔버에 적용된 진공 압력 (또는 양압)은 마이크로채널을 통하여 제어된다. 본원에서의 목적상, 용어 "진공 압력"은 참조 챔버, 물질, 조직 또는 대기 보다 그 크기가 더 낮은, 관심 챔버 또는 물질 내의 압력을 지칭한다. 본원에서의 목적상, 용어 "양압"은 참조 챔버, 물질, 조직 또는 대기 보다 그 크기가 더 높은, 관심 챔버 또는 물질 내의 압력을 지칭한다. 본원에서의 목적상, 용어 "압력"은 진공 압력과 양압 둘 다를 포괄하고자 한다. 본 발명의 스캐폴드는 압력을 적용하기 위한 장치를 이용하기 전, 후, 또는 간헐적으로 상처에 적용할 수 있다.
- [0068] 상처 치유는 섬유소 혈전 형성, 염증 세포의 동원, 재상피화, 및 매트릭스 형성과 재형성을 포함한다. 조직 손상 직후에, 혈관 파열로 인해 혈액이 혈관의 유출되고, 이와 동시에 혈소판 응집과 혈액 응고가 유발되어, 섬유소 혈전이 형성된다. 섬유소 혈전 내에 불잡힌 활성화된 혈소판은 탈과립화되고 각종 시토카인과 성장 호르몬을 방출한다. 이들 시토카인과 성장 호르몬을 염증 세포를 손상 부위에 동원하는 데 도움을 주어, 혈관신생을 자극하고, 재상피화 및 결합 조직 수축과 연관된 조직 이동을 개시한다.
- [0069] 호중구 및 단핵구는 탈과립화 혈소판에 의해 방출된 성장 인자와 시토카인, 박테리아성 단백질로부터 절단된 포르밀 메티오닐 펩티드, 및 섬유소와 기타 매트릭스 단백질의 단백질 분해의 부산물을 포함한 수많은 화학주성 신호에 의해 손상 부위로 동원된다. 호중구 침윤은 수 일 후에 멈추지만, 단핵구가 상처 부위로 계속해서 동원됨으로써 대식세포가 지속적으로 축적된다. 활성화된 대식세포는 성장 인자와 시토카인을 방출함으로써, 탈과립화 혈소판으로부터 초기의 신호를 증폭시킨다. 외인성 인자를 상처에 적용하여 이들 과정을 지원할 수 있다.
- [0070] 따라서, 본 발명의 실시양태는 또한, 가용성 인자를 ABCB5+ 세포와 함께 봉입시키는 것을 포함하는 방법을 포함한다. 상기 장치를 상처 위에 놓아둔 후에는, 이러한 장치에 첨가된 가용성 인자 (예를 들어, 성장 인자 유사 표피 성장 인자, 시토카인, PGDF, 인슐린 유사 성장 인자, TGF-베타, 각질세포 성장 인자 시토카인, TNF, 케모카인, 화학주성 펩티드, 메탈로프로테이나제의 조직 억제제 등)가 조직의 일부가 된다.
- [0071] 수많은 재조합 성장 인자가 동물 모델의 급성 상처와 만성 상처 둘 다에서 상처 치유 과정을 촉진시킬 수 있는 것으로 언급되어 왔다. 이들 재조합 유래된 인자는 혈소판-유래 성장 인자 (PDGF), 섬유모세포 성장 인자 (FGF), 표피 성장 인자 (EGF), 및 전환 성장 인자 α 및 β (TGF- α 및 TGF- β)를 포함한다. 추가로, 인슐린, 인슐린-유사 성장 인자 I 및 II (각각 IGF-I 및 IGF-II), 인터페론 (IFN), 인터류킨 (IL), KGF (각질세포 성장

인자), 대식세포 콜로니 자극 인자 (M-CSF), 혈소판-유래 내피 세포 성장 인자 (PD-ECGF), 및 줄기 세포 인자 (SCF)를 포함한, 기타 재조합 성장 인자가 상기 상처 치유 과정에 관여한 세포 유형의 활성화, 증식 및/또는 자극을 촉진시킬 수 있다.

[0072] 가용성 인자는 단백질일 수 있거나 또는 세포에서 발현될 수 있다. 단백질, 펩티드, 또는 폴리펩티드는 아미노산의 중합체를 지칭하고, 이들 용어는 상호교환적으로 사용된다. 상기 중합체는 자연 또는 비자연 아미노산을 포함할 수 있다. 단백질 또는 폴리펩티드는 시험관내 또는 생체내에서 자연, 재조합, 합성 또는 기타 수단을 통하여 생성될 수 있다. 단백질 또는 폴리펩티드는 번역 후 변형을 가질 수 있거나 또는 인산화, 글리코실화, 파르네실화, 아세틸화, 메틸화, 티올의 산화 등을 포함하도록 화학적으로 변형될 수 있었다.

[0073] 본 발명의 조성물에 대한 또 다른 용도는 조직 재생에 사용하는 것이다. 상처 치유는 조직 복구 또는 조직 재생을 통하여 달성될 수 있다. 통상적으로 반흔의 형성을 초래하는 복구와 비교해서, 조직 재생은 정상 구조물의 완전한 형태학적 및 기능적 복원을 제공한다. 자발적인 조직 재생은 출생 후의 삶에서는 발생하지 않지만; 엄청 심각한 화상 환자에 사용하고 재건 결함과 만성 상처를 치료하는 데 사용하는 것으로 미국 식품 의약국에 의해 승인된, 임상적으로 인테그라® [인테그라 라이프사이언스(Integra LifeSciences; 미국 뉴저지주 플레인스보로)]로서 공지된 스캐폴드와 같은 외인성 생물학적 매트릭스에 의해 적어도 부분적으로 지원받을 수 있다. 재생된 피부는 기계적으로 적격하고, 완전히 혈관화되었으며, 감촉과 열 또는 냉기에 대해 민감하지만⁶, 중요한 피부 부속기, 예를 들어 모낭과 땀샘이 결여되어 있다⁵.

[0074] ABCB5-결핍 진피 이식편이 아니라, ABCB5-양성 줄기 세포를 함유하는 이식편을 이식하는 것이 인테그라®-유도된 재생적 상처 치유를 추가로 증강시킬 것이고, 재생적 반응 관련된 다능 줄기 세포 집단의 증가된 국소 유용성을 통하여 피부 부속기 형성을 잠재적으로 증강시킬 것이다. 이로써, 상기 상처 치유 반응을 상당히 개선시키면, 진피와 표피의 동시 재생이 수반되고 반흔 형성이 감소될 것으로 예상된다.

[0075] 이러한 본 발명의 측면에서, ABCB5 양성 세포가 시딩된 스캐폴드를 사용하여, 분화를 유도함으로써 조직을 생성시킨다. 단리되고 정제된 중간엽 줄기 세포는 특이적 배지에서 유사분열 확장을 통하여 미분화된 상태로 성장될 수 있다. 이어서, 이들 세포를 수거하고 활성화시켜, 기계적, 세포성 및 생화학적 자극을 포함한 수많은 인자에 의해 골, 연골, 및 결합 조직의 각종 다른 유형으로 분화시킬 수 있다. 인간 중간엽 줄기 세포는 광범위한 중간엽 조직 세포를 생성시키는 세포, 예컨대 골모세포 및 연골세포 뿐만 아니라 힘줄, 인대 및 진피로 분화될 수 있는 잠재력을 보유하고 있고, 이러한 잠재력은 단리 후에 및 배양 중인 몇 가지 집단 확장을 위해 유지된다. 따라서, 중간엽 줄기 세포를 단리하고, 정제하며, 크게 증대시킨 다음, 활성화시켜, 목적하는 중간엽 세포의 특이적 유형, 예컨대 골격 및 결합 조직, 예컨대 골, 연골, 힘줄, 인대, 근육 및 지방질로 분화시킬 수 있음으로써, 골격과 기타 결합 조직 장애를 치료하는 방법이 존재한다. 용어 결합 조직은 특수 요소들을 지지해주는 신체 조직을 포함하기 위해 본원에서 사용되고, 이는 골, 연골, 인대, 힘줄, 기질, 근육 및 지방 조직을 포함한다.

[0076] 또 다른 측면에서, 본 발명은 결합 조직 손상을 복구하는 방법에 관한 것이다. 이러한 방법은 줄기 세포를 복구에 필요한 결합 조직 유형이 되도록 분화시키는 데 적합한 조건 하에, 스캐폴드를 결합 조직 손상 부위에 적용하는 단계를 포함한다.

[0077] 용어 "결합 조직 결함"은 외상, 질환, 연령, 선천성 장애, 외과 수술 등에 기인하여 발생할 수 있는, 정상적인 결합 조직과 비교해서 어떠한 손상이나 불규칙성도 포함하는 결함을 지칭한다. 결합 조직 결함은 또한, 예를 들어 미용적 확대를 위하여 골 형성만이 요망되는 비-손상된 부위를 지칭한다.

[0078] 스캐폴드는 또한, 간 질환의 치료에 유용하다. 간 질환은 간 조직에 대한 손상을 초래하는 간염과 같은 질환을 포함한다. 보다 일반적으로, 본 발명의 스캐폴드는 알콜성 간 질환, 간염 (A형, B형, C형, D형 등), 국소성 간 병변, 원발성 간세포 암종, 간의 큰 낭성 병변, 국소성 결절성 괴형성 육아종성 간 질환, 간 육아종, 혈색소 침착증, 예컨대 유전성 혈색소 침착증, 철 과부하 증후군, 급성 지방간, 임신 입덧, 임신 중의 병발성 간 질환, 간내 담즙울체, 간부전증, 전격성 간부전증, 황달 또는 무증상 고빌리루빈혈증, 간세포에 대한 손상, 크리글러-나자르(Crigler-Najjar) 증후군, 윌슨병(Wilson's disease), 알파-1-항트립신 결핍증, 길버트(Gilbert) 증후군, 고빌리루빈혈증, 비알콜성 지방 간염, 포르피린증, 비경변성 문맥 고혈압, 비경변성 문맥 고혈압, 문맥 섬유증, 주혈흡충증, 원발성 담즙성 간경변, 버드-키아리(Budd-Chiari) 증후군, 골수 이식 후 간 정맥 폐쇄성 질환 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는 간 질환, 장애 또는 병태를 치료하는 데 사용될 수 있다.

[0079] 일부 실시양태에서, 본 발명은 본 발명의 스캐폴드를 사용하여 신경변성 질환을 치료하는 것에 관한 것이다.

일부 경우에, 본 발명은 신경변성 질환이 있는 대상체를 치료하거나 또는 신경변성을 초래할 수 있는 신경 세포에 대한 손상이 있는 대상체를 치료하는 것을 고려한다. 뉴런 세포는 주로, 그들의 국소/부위 시냅스 연결 (예를 들어, 국소 회로 개재뉴런 대 장거리 투사 뉴런) 및 수용체 세트, 및 관련 제2 메신저 시스템에 근거하여 분류된다. 뉴런 세포는 중추 신경계 (CNS) 뉴런과 말초 신경계 (PNS) 뉴런 둘 다를 포함한다. 상이한 많은 뉴런 세포 유형이 있다. 그의 예는 감각 및 교감 뉴런, 콜린 작동성 뉴런, 후근 신경절 뉴런, 고유 수용성 뉴런 (삼차 신경 중간뇌핵 내의), 섬모체 신경절 뉴런 (부교감 신경계 내의) 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 통상의 기술자는 전형적으로 세포-형태학적 특징, 세포-특이적 마커의 발현, 특정 분자의 분비 등을 활용하여, 뉴런 세포를 용이하게 확인하고, 이를 비-뉴런 세포, 예컨대 신경절 세포와 구별할 수 있을 것이다. "신경변성 장애" 또는 "신경변성 질환"은 말초 신경계 또는 중추 신경계에서 뉴런의 점진적인 상실이 발생하는 장애로서 본원에 정의된다. 이들 장애는 부상 관련 뉴런 손상, 예컨대 척수 손상 및 두부 손상을 포함한다.

[0080] 대부분의 만성 신경변성 질환은 중년기 동안 발병되는 것을 특징으로 하고, 신경계 내의 뉴런의 특이적 서브세트의 급격한 변성을 유발시켜, 궁극적으로는 미성숙한 사망을 초래한다. 진피 중간엽 줄기 세포를 포함하는 조성물을 대상체에게 단독으로 투여하거나 또는 신경변성 장애 또는 질환의 치료 또는 예방을 위한 다른 치료 화합물의 투여와 조합하여 신경변성 질환을 치료할 수 있다.

[0081] 신경변성 질환의 치료에 있어서의 성체 줄기 세포의 유용성이 보고되었다. 중간엽 줄기 세포는 뇌졸중을 경험한 마우스에서 뉴런-유사 세포로 변화될 수 있는 것으로 입증되었다 (Journal of Cell Transplantation Vol. 12, pp. 201-213, 2003). 추가로, 골수로부터 유래된 줄기 세포는, 파킨슨병(Parkinson's disease), 근위축성 측삭 경화증 (ALS), 및 척수 손상 환자를 치료하는 것으로 기대할 수 있는 신경 세포로 발달하였다.

[0082] 본 발명의 방법은 또한, 신장 질환과 연관된 장애를 치료하는 데 유용하다. 신장에 미리 주사된 중간엽 줄기 세포가 신장 기능과 세포 재생에 있어서 거의 즉각적인 개선을 초래하는 것으로 입증되었다 (Resnick, Mayer, Stem Cells Brings Fast Direct Improvement, Without Differentiation, in Acute Renal Failure, EurekAlert!, August 15, 2005). 따라서, 본 발명의 스캐폴드는 신장 질환이 있는 대상체에게 단독으로 투여되거나 또는 신장 기능과 세포 재생을 개선시키기 위한 기타 치료제 또는 과정, 예컨대 투석과 조합하여 투여될 수 있다.

[0083] 본 발명의 방법에 따라서 치료될 수 있는 기타 질환은 각막 및 폐의 질환을 포함한다. 이들 조직에서의 중간엽 줄기 세포의 투여에 근거한 요법은 긍정적인 결과를 명확하게 보여주었다. 예를 들어, 인간 중간엽 줄기 세포를 사용하여 손상된 각막을 재구축하였다 (Ma Y et al., Stem Cells, August 18, 2005). 추가로, 골수로부터 유래된 줄기 세포는 폐 복구와, 폐 손상에 대한 보호에 중요한 것으로 밝혀졌다 (Rojas, Mauricio, et al., American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, Vol. 33, pp. 145-152, May 12, 2005). 따라서, 본 발명의 진피 중간엽 줄기 세포는 또한, 각막 조직 또는 폐 조직의 복구에 사용될 수 있다.

[0084] ABCB5(+) 줄기 세포는 대상체에 대한 자기 유래 (동일한 대상체로부터 수득됨)이거나 또는 비-자기 유래, 예컨대 대상체에 대해 동종 또는 동계인 세포일 수 있다. 또 다른 한편, ABCB5(+) 줄기 세포는 대상체에 대해 이종인 공급원으로부터 수득할 수 있다.

[0085] 동종은 대상체와 동일한 종에 속하거나 또는 동일한 종으로부터 유래되긴 하지만, 유전적으로 상이한 세포를 지칭한다. 따라서, 동종 인간 ABCB5(+) 줄기 세포는 이러한 줄기 세포의 의도한 수용자 이외의 인간으로부터 수득된 줄기 세포이다. 동계는 대상체와 유전적으로 동일하거나 밀접하게 관계되고 면역학상 상용성인 (즉, 동일한 유전자형을 갖는 개체 또는 조직으로부터 유래된) 세포를 지칭한다. 이종은 대상체와 상이한 종의 유기체로부터 유래되거나 또는 이러한 상이한 종의 유기체로부터 수득된 세포를 지칭한다.

[0086] 본 발명에 따르는 ABCB5(+) 줄기 세포는 스캐폴드에 적용하기 이전에 생체의 또는 시험관내에서, 또는 투여 후 생체내에서 확장될 수 있다. 따라서, 일부 경우에, ABCB5 발현은 ABCB5(+) 줄기 세포를 시험관내에서 확인, 단리, 클로닝, 증식 및 확장시키기 위한 토대를 제공한다. ABCB5(+) 줄기 세포를 다른 세포로부터 분리시키기 위해 ABCB5와 결합하는 작용제, 예를 들어 단리된 펩티드, 예를 들어 항체를 사용하는 적합한 모든 방법을 이용할 수 있다. 이와 같이 단리된 ABCB5(+) 줄기 세포는, 예를 들어 매질, 보충제 및 시약의 조합물을 사용하여 적당한 배양 환경 하에 유지시킬 수 있다. 임의로, 공급자 세포 집단, 또는 공급자 세포 집단으로부터 수득된 적용용 배지를 사용하여, ABCB5(+) 줄기 세포 집단을 확장시킬 수 있다.

[0087] 본 발명에 따라서 줄기 세포 확장에 사용될 수 있는 접착, 부착 및 매트릭스 인자는 E-카데린, 콜라겐, 피브로넥틴, 슈퍼피브로넥틴, 헤파린 술페이트 프로테오글리칸, ICAM-I, 라미닌, 오스테오펀틴, 프로테오글리칸, E-셀

렉틴, L-셀렉틴, VCAM 및 비트로넥틴을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

- [0088] 본 발명에 따라서 줄기 세포 확장에 사용될 수 있는 생물활성제 및 보충제는 효소 (예를 들어, 카텝신 G, Flt-3/Fc), 단백질 및 펩티드 [예를 들어, 액티빈 A, 알부민, 안지오텐신, 안지오펜이오텐, BAX 억제 펩티드, 헤레글린 베타-1, SMAC/디아블로(Diablo)], 비타민, 호르몬 및 각종 기타 물질 [예를 들어, L-아스코르브산, 텍사메타손, EGF, EGF-수용체, 배아 유체 (소), flt3-리간드, 프로게스테론, 레티노산, 레티닐 아세테이트, 트롬보포이에틴 및 TPO], 항체, 케모카인, 시토카인, 성장 인자 및 수용체를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0089] 본 발명에 따라서 줄기 세포 확장에 사용될 수 있는 배양 시약은 항생제 (예를 들어, 시클로헥시미드, 에토포시드, 젠타마이신, 미토마이신, 페니실린-스트렙토마이신), 전통적인 배지 [예를 들어, 클레이콤브(Claycomb) 배지, 돌베코(Dulbecco) 변형 이글 배지, 이스코브(Iscove) 변형 돌베코 배지, 최소 필수 배지], 세포 동결 배지-DMSO, L-글루타민을 수반하지 않는 클레이콤브 배지, 스템라인(Stemline)® 배지 [시그마-알드리치(Sigma-Aldrich; 미국)]를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0090] 본 발명의 조성물은 줄기 세포, 또는 단리된 줄기 세포 제제를 포함할 수 있으며, 세포 표면 상에 ABCB5가 발현되는 것을 특징으로 하는 상기 줄기 세포는 글리코사미노글리칸 스캐폴드에 공동이식된다. 조성물은 단리된 ABCB5(+) 줄기 세포가 강화된 제제를 포함할 수 있거나, 또는 실질적으로 순수한 ABCB5(+) 줄기 세포 집단을 포함할 수 있다. 조성물은 본원에 논의된 스캐폴드를 포괄하는 것을 의미한다.
- [0091] 조성물은 일부 실시양태에서, 세포 재생과 분화를 증진시키기 위한 추가의 생물활성제 및 보충제를 포함할 수 있다. 본 발명에 따라서 사용될 수 있는 상기 생물활성제 및 보충제는 상기 언급되어 있고, 각종 효소, 단백질 및 펩티드, 비타민, 항체, 케모카인, 시토카인, 성장 인자 및 수용체를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 일부 실시양태에서, 조성물은 면역억제제 및/또는 항혈관생성제를 포함할 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 조성물은 이식편 거부를 예방하고/하거나 치료하기 위하여 사용될 수 있는 시클로스포린 (예를 들어, CyA)을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 조성물은 베바시주맵 (예를 들어, 아바스틴(AVASTIN)®)을 포함할 수 있다. 항혈관생성제의 사용은 일부 경우에, 이식 후 종종 발생하고 이식편 거부를 야기할 수 있는 혈관 형성을 방지하기 위해 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 면역억제제 및/또는 항혈관생성제는 조성물 또는 스캐폴드의 구성분으로서 투여되는 것이 아니라, 오히려 ABCB5(+) 줄기 세포의 투여 이전 또는 투여 후에 독립적으로 투여된다.
- [0092] ABCB5+ 세포는 유전자 또는 재조합 조작될 수 있다. 재조합은 유기체, 세포, 핵산, 및 단백질을 지칭할 수 있다. 재조합 세포 및 유기체는 재조합 DNA를 함유하는 세포 및 유기체이다. 재조합 DNA는 자연에서는 정상적으로 발견되지 않는 핵산 서열을 지칭한다. 통상적으로 상기 용어는 비자연 생성물을 형성하기 위하여 함께 스플라이싱된 DNA의 2개 이상의 조각을 지칭한다. 재조합 단백질은 재조합 DNA (즉, 자연에서 존재하는 것과는 상이한 핵산)로부터 생성된 단백질이다. 재조합 단백질을 생성하는 데 있어서, 이러한 단백질을 코딩하는 유전자의 조절성 서열이 통상적으로, 자연 유전자에 존재하는 것과는 상이하다. 이러한 유전자는 또한, 목적하는 유기체 내의 그 단백질을 생성하기 위하여 상기 유전자를 정상적으로 보유하지 않는 유기체 내에 넣어 질 수 있었다.
- [0093] 목적 유전자 또는 다른 핵산 구축물을, 스캐폴드 상으로 시딩된 세포 내로 삽입하는 것은, 예를 들어 문헌 [Ausubel et al., eds., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., New York]에 기재된 바와 같은, 통상적인 유전자 및 재조합 조작 기술을 사용하여 달성될 수 있다.
- [0094] 진피 중간엽 줄기 세포는 본원에 보다 상세히 기재된 바와 같이, 치료 적응증에 또한 유용한 단백질을 발현하도록 변형될 수 있다. 예를 들어, 상기 세포는 중간엽 줄기 세포를 분화된 계통으로 분화시키는 것을 추가로 유도하거나 가속시키는 하나 이상의 생물활성 인자를 생성시키는 핵산을 포함할 수 있고/있거나 상기 세포는 분화된 매개인자를 생성시키는 핵산을 포함할 수 있다. 골이 형성되는 경우에는, 상기 생물활성 인자가 각종 조직 성장 인자, 특히 골 형태발생 단백질, 예컨대 BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-6 및 BMP-7로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 포함하는 TGF-베타 슈퍼패밀리의 구성원일 수 있다. 다른 경우에, 상기 분화된 매개인자는 VEGF일 수 있다.
- [0095] 핵산을 세포 내로 도입하기 위한 각종 기술을 이용할 수 있다. 이러한 기술은 핵산-CaPO₄ 침전물의 형질감염, DEAE와 연관된 핵산의 형질감염, 관심 핵산을 포함한 레트로바이러스를 이용한 형질감염, 리포솜 매개된 형질감염 등을 포함한다. 특정 용도의 경우에, 상기 핵산이 특정한 세포를 표적으로 하는 것이 바람직하다. 이러한

경우에, 본 발명에 따르는 핵산을 특정 세포 내로 전달하는 데 사용된 비히클 (예를 들어, 레트로바이러스, 또는 기타 바이러스; 리포솜)은 이에 부착된 표적화 분자를 가질 수 있다. 예를 들어, 특정 분자, 예컨대 표적 세포 상의 표면 막 단백질에 대해 특이적인 항체, 또는 표적 세포 상의 수용체에 대한 리간드가 상기 핵산 전달 비히클과 결합될 수 있거나 또는 이러한 비히클 내에 혼입될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 핵산을 전달하기 위하여 리포솜이 이용되는 경우에는, 세포내이입과 연관된 표면 막 단백질과 결합하는 단백질이, 표적화를 위해 및/또는 흡수를 촉진시키기 위해 리포솜 제제 내로 혼입될 수 있다.

[0096] 외인성 유전 물질을 진피 중간엽 줄기 세포 내로 도입하는 한 가지 방법은 복제-결핍 레트로바이러스를 사용하여 상기 세포를 형질도입하는 것이다. 복제-결핍 레트로바이러스는 모든 비리온 단백질의 합성을 지시할 수 있지만, 감염성 입자를 만들 수는 없다. 따라서, 이들 유전적으로 변경된 레트로바이러스성 벡터는 배양된 세포 내에서 유전자의 고 효율 형질도입에 대한 일반적인 유용성을 지니고 있다. 레트로바이러스는 유전 물질을 세포 내로 전이시키는 데 광범위하게 사용되어 왔다. 복제-결핍 레트로바이러스를 생성시키기 위한 표준 프로토콜 (외인성 유전 물질을 플라스미드 내로 혼입시키는 단계, 패키징 세포주를 플라스미드로 형질감염시키는 단계, 상기 패키징 세포주에 의해 재조합 레트로바이러스를 생성시키는 단계, 조직 배양 배지로부터 바이러스성 입자를 수집하는 단계, 및 표적 세포를 상기 바이러스성 입자로 감염시키는 단계를 포함한다)이 관련 기술분야에 제공되어 있다.

[0097] 레트로바이러스를 이용하는 경우의 주요 이점은 이러한 바이러스가 치료제를 코딩하는 유전자의 단일 카피를 숙주 세포 게놈 내로 효율적으로 삽입함으로써, 외인성 유전 물질이, 이것이 분할될 때 세포의 자손에 전달될 수 있도록 한다는 것이다. 또한, LTR 영역 내의 유전자 프로모터 서열이 각종 세포 유형 내에서 삽입된 코딩 서열의 발현을 증강시키는 것으로 보고되었다. 레트로바이러스 발현 벡터를 이용하는 경우의 주요 단점은 (1) 삽입형 돌연변이 유발, 즉 치료 유전자가 표적 세포 게놈 내의 바람직하지 못한 위치 내로 삽입하여, 예를 들어 조절되지 않은 세포 성장을 초래하고, (2) 상기 벡터에 의해 수반된 치료 유전자가 표적 게놈 내로 통합되기 위해서는 표적 세포 증식이 필요하다는 것이다. 이러한 명백한 제한 사항에도 불구하고, 레트로바이러스를 통하여 치료상 유효량의 치료제를 전달하는 것은, 형질도입 효율이 높고/높거나 형질도입에 이용 가능한 표적 세포의 수가 많은 경우에 유효할 수 있다.

[0098] 또한, 진피 중간엽 줄기 세포의 형질전환을 위한 발현 벡터로서 유용한 또 다른 바이러스 후보는 이중 가닥 DNA 바이러스인 아데노바이러스이다. 아데노바이러스 게놈은 레트로바이러스와 같이, 즉 바이러스 그 자체의 생성을 제어하는 유전 정보를 제거함으로써, 유전자 형질도입을 위한 발현 벡터로서 사용하도록 적응될 수 있다. 아데노바이러스는 통상적으로, 염색체의 방식으로 기능하기 때문에, 재조합 아데노바이러스는 삽입형 돌연변이 유발의 이론적 문제점을 갖고 있지 않다. 다른 한편으로, 표적 진피 중간엽 줄기 세포의 아데노바이러스 형질전환으로 인해, 안정적인 형질도입이 초래될 수 없다. 그러나, 보다 최근에는, 특정의 아데노바이러스 서열이 염색체내 통합 특이성을 운반체 서열에 부여하므로, 이로 인해 외인성 유전 물질의 안정적인 형질도입이 초래된다고 보고되었다.

[0099] 따라서, 통상의 기술자에게 명백해지는 바와 같이, 외인성 유전 물질을 진피 중간엽 줄기 세포 내로 전이시키는 데 적합한 각종 벡터가 이용 가능하다. 유전자 대체 요법을 잘 받아들이는 특정한 병태에 대한 치료제를 전달하는 데 적당한 벡터의 선별과, 이와 같이 선별된 발현 벡터를 상기 세포 내로 삽입하기 위한 조건의 최적화는 과도한 실험에 대한 필요성 없이도 관련 기술분야의 통상의 기술 범위 내에 있다.

[0100] 따라서, 본 발명은 진피 중간엽 줄기 세포가, 정상적으로는 인간 줄기 세포에서 생물학상 유의적인 양으로 생성되지 않거나 또는 과생성으로 인해 치료 이득을 초래할 수도 있는 상황하에서만 소량으로 생성되는 폴리펩티드, 호르몬 및 단백질을 생성하도록 하는 방식으로 상기 진피 중간엽 줄기 세포를 유전자 조작할 수 있게 해준다. 이어서, 이들 생성물은 혈류 또는 신체의 다른 부위, 예컨대 중추 신경계 내로 분비될 것이다. 이러한 방식으로 형성되고 스캐폴드에 매립된 인간 줄기 세포는 지속적인 약물 전달 시스템으로서 제공되어, 필요로 하는 물질을 주기적으로 투여해야만 하는 (섭취, 주사, 데포 주입 등에 의함) 현재의 요법을 대체할 수 있다. 본 발명은 호르몬, 효소 및 약물을 필요로 하는 인간에게 이러한 물질들을 제공하는 데 적용 가능하다. 본 발명은 상기 물질, 예컨대 장 기간 동안 지속적으로 투여될 필요가 있고 복구되는 조직과 연관되는 호르몬 (예를 들어, 부갑상선 호르몬, 인슐린)을 제공하는 데 특히 유용하다.

[0101] ABCB5(+) 줄기 세포는 전능, 다능 또는 만능 줄기 세포 [예를 들어, 유도된 만능 줄기 세포 (iPSC)] (이로부터 다른 세포, 조직 및/또는 완전 동물이 발생될 수 있다)를 생성하도록 단리될 수 있다. 따라서, ABCB5(+) 줄기 세포를 스캐폴드에 시딩하기 전 또는 후에, 이러한 세포가 전능, 다능 또는 만능 줄기 세포가 되도록 직접적으

로 재프로그래밍하거나 유도시키는 방법이 본 발명의 일부 측면에 제공된다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "재프로그래밍"은 세포 또는 세포 집단 (예를 들어, ABCB5(+) 줄기 세포)의 발생 잠재력을 역전시키는 과정을 지칭한다. 따라서, 재프로그래밍은 특정 세포를 보다 높은 발생 잠재력을 지닌 상태로 되도록 구동시키는, 즉 덜 분화된 상태로 꺼꾸로 가는 과정을 지칭한다. 재프로그래밍하고자 하는 세포는 재프로그래밍하기 이전에 부분적으로 또는 정기적으로 분화시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 재프로그래밍은 전능, 다능 또는 만능 상태를 지닌 세포가 되도록 분화 상태를 완전히 또는 부분적으로 역전시키는 것, 즉 세포의 발생 잠재력을 증가시키는 것을 포괄한다. 일부 실시양태에서, 재프로그래밍은 ABCB5(+) 줄기 세포를 전능, 다능 또는 만능 상태가 되도록 구동시켜, 상기 세포가 배아 줄기 세포의 발생 잠재력, 즉 배아 줄기 세포 표현형을 갖도록 하는 것을 포괄한다. 재프로그래밍은 또한, 특정 세포의 분화 상태를, 추가의 조작을 적용한 경우에 전능, 다능 또는 만능 상태가 되도록 상기 세포가 완전한 재프로그래밍을 보다 더 잘 받아들이게 되는 상태로 부분 역전시키는 것을 포괄한다.

[0102] 전능, 다능 또는 만능 줄기 세포는 몇 가지 재프로그래밍 인자를 사용하여 ABCB5(+) 줄기 세포로부터 생성될 수 있다 (본원에서 "재프로그래밍된 ABCB5(+) 세포"로서 지칭됨). 이어서, ABCB5(+) 줄기 세포 보다 더 큰 발생 잠재력을 갖는, 상기와 같이 생성된 세포는 추가 조작을 위한 줄기 세포의 공급원이 될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 "재프로그래밍 인자"는 발생 잠재력 변경 인자를 지칭하는데, 그의 발현은 특정 세포, 예를 들어 ABCB5(+) 줄기 세포를 덜 분화되거나 분화되지 않은 상태, 예를 들어 만능 상태 또는 부분적으로 만능 상태의 세포로 재프로그래밍하는 데 기여한다. 재프로그래밍 인자는 OCT4, SOX2, KLF 4 및 c-MYC [달리 "야마나카 (Yamanaka) 인자"로서 공지됨]를 포함한다. 다른 재프로그래밍 인자는 SOX 1, SOX 3, SOX15, SOX 18, NANOG, KLF1, KLF 2, KLF 5, NR5A2, LIN28, 1-MYC, n-MYC, REM2, TBX3, TERT 및 LIN28을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 전술된 전사 인자 중 2가지 이상의 어떠한 조합도 사용하여, 단리된 ABCB5(+) 줄기 세포를 재프로그래밍할 수 있다. 세포를 전능, 다능 또는 만능 상태로 재프로그래밍하는 방법은 그의 전문이 본원에 참조로 포함된 문헌 (Stadtfield and Hochedlinger [33])에 기재되어 있다.

[0103] 분화된 세포는 또한, 재프로그래밍된 ABCB5(+) 세포로부터 생성되어 스캐폴드 내로 혼입될 수 있다. 이러한 방법은 보다 성숙한 분화된 세포 유형, 예컨대 예를 들어, 혈액 세포, 혈소판, 기질 세포, 골 세포, 근육 세포, 피부 세포, 지방 세포 또는 신경 세포로의 분화를 증진시키는 데 필요한 어느 하나 이상의 분화 인자를, 상기 재프로그래밍된 ABCB5(+) 세포에서 발현시키는 것을 포함할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "분화 인자"는 발생 잠재력 변경 인자, 예컨대 특정 세포가 목적하는 세포 유형으로 분화되도록 유도하는 단백질 또는 소분자를 지칭하는데, 예를 들어 분화 인자는 세포의 발생 잠재력을 저하시킨다. 특이적 세포 유형으로의 분화는 2개 이상의 분화 인자의 동시 및/또는 연속적인 발현을 포함할 수 있다. 상기 방법은 분화된 세포를 형성하도록 분화를 증진시키기 위한 조건 하에, 재프로그래밍된 ABCB5(+) 세포를 성장시키는 것을 추가로 포함할 수 있다.

[0104] 본원에 사용된 바와 같은 "줄기 세포"는 자가 재생 능력을 갖고 있고 다수의 세포 유형으로 분화될 수 있는 발생 잠재력을 지닌, 분화되지 않거나 부분적으로 분화된 세포이다. "만능 세포"는 상이한 조건 하에, 3가지 모든 생식 세포층의 특징적인 세포 유형, 즉 내배엽 (예를 들어, 소화관 조직), 중배엽 (혈액, 근육 및 혈관 포함) 및 외배엽 (예컨대, 피부 및 신경)이 되도록 분화될 수 있는 발생 잠재력을 지닌 세포이다. "다능" 세포는 3가지 생식 세포층 전부는 아니지만, 하나 이상의 생식 세포층의 세포가 되도록 분화될 수 있는 발생 잠재력을 지닌 세포이다. 이들 세포는, 예를 들어 성체 줄기 세포, 예컨대 예를 들어 조혈 줄기 세포 및 신경 줄기 세포를 포함한다. "전능" 세포는 배외 구조의 조직을 포함한, 유기체 내의 모든 분화된 세포가 되도록 분화될 수 있는 발생 잠재력을 지닌 세포이다. 줄기 세포는 분화된 표현형에 대한 성향을 가질 수 있지만, 이들 세포는 줄기 세포 표현형을 역전시키고 재발현하도록 유도될 수 있다. 이러한 과정은 "분화" 또는 "재프로그래밍"로서 지칭된다.

[0105] 본 발명의 ABCB5(+) 줄기 세포, 재프로그래밍된 ABCB5(+) 세포 및 분화된 세포는 이들 세포 유형에 대한 표준 조건 하에 조작할 수 있다. 상기 세포의 처리는 이러한 세포를 스캐폴드 내로 시험관내, 생체의 또는 생체내에서 혼입시키기 전 또는 후에 수행할 수 있다. 예를 들어, 상기 세포는 체내에 존재하거나 또는 배양 배지 내에 존재할 수 있다. 상기 조작은 고-산소 또는 저-산소 조건 하에 수행될 수 있다.

[0106] "배양 배지"는 세포 생존율을 유지시키고 증식을 지지하는 영양분을 함유한다. 전형적인 배양 배지는 염, 완충제, 아미노산, 글루코스 또는 기타 당(들), 항생제, 혈청 또는 혈청 대체물, 및/또는 기타 성분, 예컨대 켈티드 성장 인자를 포함한다. 전능, 다능 및 만능 세포를 유도시키고 이를 유지하는 데 사용하기 위한 세포 배양 배지는 관련 기술분야에 공지되어 있다. 배양 배지는 또한, 세포 특이적 성장 인자, 예컨대 안지오키프린, 골 형태

발생 단백질-1, 골 형태발생 단백질-2, 골 형태발생 단백질-3, 골 형태발생 단백질-4, 골 형태발생 단백질-5, 골 형태발생 단백질-6, 골 형태발생 단백질-7, 골 형태발생 단백질-8, 골 형태발생 단백질-9, 골 형태발생 단백질-10, 골 형태발생 단백질-11, 골 형태발생 단백질-12, 골 형태발생 단백질-13, 골 형태발생 단백질-14, 골 형태발생 단백질-15, 골 형태발생 단백질 수용체 1A, 골 형태발생 단백질 수용체 1B, 뇌 유래 신경영양성 인자, 섬모체 신경영양성 인자, 섬모체 신경영양성 인자 수용체-알파, 시토카인-유도된 호중구 화학주성 인자 1, 시토카인-유도된 호중구, 화학주성 인자 2-알파, 시토카인-유도된 호중구 화학주성 인자 2-베타, 베타-내피 세포 성장 인자, 내피 1, 표피 성장 인자, 상피 유래 호중구 유인물질, 섬유모세포 성장 인자 4, 섬유모세포 성장 인자 5, 섬유모세포 성장 인자 6, 섬유모세포 성장 인자 7, 섬유모세포 성장 인자 8, 섬유모세포 성장 인자 b, 섬유모세포 성장 인자 c, 섬유모세포 성장 인자 9, 섬유모세포 성장 인자 10, 산성 섬유모세포 성장 인자, 염기성 섬유모세포 성장 인자, 신경교 세포주 유래 호중구 인자 수용체-알파-1, 신경교 세포주 유래 호중구 인자 수용체-알파-2, 성장 관련 단백질, 성장 관련 단백질-알파, 성장 관련 단백질-베타, 성장 관련 단백질-감마, 헤파린 결합 표피 성장 인자, 간세포 성장 인자, 간세포 성장 인자 수용체, 인슐린-유사 성장 인자 I, 인슐린-유사 성장 인자 수용체, 인슐린-유사 성장 인자 II, 인슐린-유사 성장 인자 결합 단백질, 각질세포 성장 인자, 백혈병 억제 인자, 백혈병 억제 인자 수용체-알파, 신경 성장 인자, 신경 성장 인자 수용체, 뉴로트로핀-3, 뉴로트로핀-4, 태반 성장 인자, 태반 성장 인자 2, 혈소판 유래 내피 세포 성장 인자, 혈소판 유래 성장 인자, 혈소판 유래 성장 인자 A쇄, 혈소판 유래 성장 인자 AA, 혈소판 유래 성장 인자 AB, 혈소판 유래 성장 인자 B쇄, 혈소판 유래 성장 인자 BB, 혈소판 유래 성장 인자 수용체-알파, 혈소판 유래 성장 인자 수용체-베타, B 전구 세포 성장 자극 인자, 줄기 세포 인자, 줄기 세포 인자 수용체, 전환 성장 인자-알파, 전환 성장 인자-베타, 전환 성장 인자-베타-1, 전환 성장 인자-베타-1-2, 전환 성장 인자-베타-2, 전환 성장 인자-베타-3, 전환 성장 인자-베타-5, 잠복 중인 전환 성장 인자-베타-1, 전환 성장 인자-베타-결합 단백질 I, 전환 성장 인자-베타-결합 단백질 II, 전환 성장 인자-베타-결합 단백질 III, 종양 괴사 인자 수용체 유형 I, 종양 괴사 인자 수용체 유형 II, 우로키나제-유형 플라즈미노겐 활성화제 수용체, 혈관 내피 성장 인자 및 키메라 단백질, 및 그의 생물학상 또는 면역학상 활성 단편을 포함할 수 있다.

[0107] 세포의 분화 상태는 이를 평가하는 것으로 관련 기술분야에 공지된 모든 방법을 사용하여 평가할 수 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 방법에 따라서 처리된 세포의 분화 상태는 동일한 재프로그램화 또는 분화 인자의 발현을 초래하는 DNA를 전달하기 위하여 바이러스성 벡터를 사용하여 DNA로 처리된 세포 또는 처리되지 않은 세포와 비교할 수 있다.

[0108] 줄기 세포의 용량은 스캐폴드 내에 포함된 세포의 수에 의해 규정될 수 있고, 광범위한 한계 내에서 다양하며, 물론 각각의 특정한 경우에서의 개개의 요구 사항에 맞출 것이다. 사용된 세포의 수는 수용자의 체중과 상태, 및 통상의 기술자에게 공지된 기타 변수에 좌우될 것이다.

[0109] 본 발명은 또한, 본원에 기재된 병태의 치료를 위하여 상기 언급된 조성물을 사용하는 것에 관한 지침서를 임의로 포함한 키트 내에, 상기 언급된 조성물 중 어느 것을 제공한다. 즉, 상기 키트는 본원에 개시된 모든 생물학적 또는 화학적 기전에 참여하기 위하여 상기 조성물을 사용하는 것에 관한 설명서를 포함할 수 있다. 상기 키트는 추가로, 병태의 증상과는 대조적으로, 병리학을 치료하는 데 있어서의 상기 병태의 활성화에 관한 설명서를 포함할 수 있다. 즉, 상기 키트는 본원에 논의된 바와 같은 조성물의 용도에 관한 설명서를 포함할 수 있다. 키트는 또한, 상기 질환을 치료하기 위하여 세포와 스캐폴드의 조합물을 사용하는 것에 관한 지침서를 포함할 수 있다. 상기 조성물을 적합한 어느 기술에 의해 투여하는 것에 대한 지침서가 또한 제공될 수 있다. 상기 키트는 또한, 진피 중간엽 줄기 세포의 분리 및 증식과 연관된 하나 이상의 시약, 즉 ABCB5 항체와, 상기 세포를 분리 및/또는 정제하는 것에 대한 지침서일 수 있다.

[0110] 본원에 기재된 키트는 또한, 앞서 기재된 바와 같은 조성물 및 기타 성분을 함유할 수 있는 하나 이상의 용기를 함유할 수 있다. 이러한 키트는 또한, 일부 경우에 본 발명의 조성물을 혼합, 희석 및/또는 투여하는 것에 대한 지침서를 함유할 수 있다. 상기 키트는 또한, 하나 이상의 용매, 계면활성제, 보존제 및/또는 희석제 [예를 들어, 정상 식염수 (0.9% NaCl), 또는 5% 텍스트로스]를 수반한 기타 용기 뿐만 아니라 상기 성분을 특정 샘플 중에서 혼합 또는 희석하거나, 또는 이러한 성분을 상기 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하기 위한 용기를 포함할 수 있다.

[0111] 상기 키트의 조성물은 임의의 적합한 형태, 예를 들어 액상 용제로서 또는 건조된 분말로서 제공될 수 있다. 제공된 조성물이 건조 분말인 경우, 이러한 조성물은 적합한 용매를 추가함으로써 재구성될 수 있고, 이를 또한 제공할 수 있다. 액상 형태의 조성물이 사용된 실시양태에서, 이러한 액상 형태는 농축시키거나 또는 즉시 사

용할 수 있다.

[0112] 본 발명은 다음 실시예에 의해 추가로 예시되지만, 어떠한 방식으로든지 이로 인해 추가로 제한되는 것으로 간주되지 않아야 한다. 본 출원 전반에 걸쳐 인용된 모든 참고문헌 (참고 문헌, 허여된 특허, 공개된 특허 출원, 및 현재 계류중인 특허 출원 포함)의 전체 내용이 본원에 확실하게 참조로 포함된다.

[0113] 실시예

[0114] 실시예 1: 시험관내 및 생체내에서 ABCB5+ 진피 줄기 세포의 다능 분화 감소성.

[0115] 본 발명자들은 기존에, ABCB5가 인간 진피 내에 있는 중간엽 줄기 세포 집단을 식별한다는 사실을 밝혀냈는데, 이는 막 과분극을 부여하고, 막 전위의 조절인자로서 피부 전구 세포가 분화를 진행하는 성향을 결정한다. 추가의 연구 결과, ABCB5가 약물 내성을 부여하고, 인간 흑색종에서의 특이적 분화 감소성을 지닌 암 줄기 세포 (CSC) 서브세트를 표시하는 것으로 (이는 또한, 임상 질환 진행과 상관이 있다) 밝혀졌다.

[0116] 본 발명자들은 ABCB5+ 피부 세포가 망상 진피 내에 상주하고, 이웃하는 성숙한 섬유모세포, CD31+ 내피 세포 및 CD34+ 팽창 세포와는 별개라는 사실을 밝혀내었다. ABCB5는 인간 피부 표본 내의 모든 세포의 2.5 내지 5%에 의해 발현된다. ABCB5+ 세포는 중간엽 줄기 세포 마커 CD29 (세포의 $99.48 \pm 0.5\%$), CD44 ($99.09 \pm 0.9\%$), CD49e ($92.61 \pm 4.0\%$), CD90 (100%), 및 CD166 ($58.29 \pm 19.7\%$) 뿐만 아니라 줄기 세포 마커 CD133 ($6.29 \pm 5.1\%$)을 공동 발현시키지만, 분화 마커, 예컨대 내피 계통 마커 CD31, 조혈 계통 마커 CD45, 및 휴지기 섬유모세포 마커 CD34에 대해서는 음성이었다. 중요하게도, 보고된 MSC 마커 (CD29, CD44, CD49e, CD90 및 CD166)에 대하여 양성으로 염색되는 별개의 세포 아집단만이 ABCB5에 대하여 양성으로 염색한 반면, 이들 항원을 발현하는 세포의 상당 비율이 ABCB5에 대하여 음성인 것으로 밝혀졌는데, 이는 ABCB5+ 세포가 중간엽 줄기 세포의 독특한 신규 아집단을 나타낸다는 것을 입증해준다.

[0117] 본 발명자들은 ABCB5가 현재 이용되고 있는 MSC 항원 보다, 다능 중간엽 줄기 세포에 대해 더 특이적인 마커를 나타내는지를 조사하기 위하여, 시험관내 및 생체내에서 ABCB5- 세포와 비교해서 ABCB5+ 진피 줄기 세포의 다능 분화 감소성을 평가하였다.

[0118] 본 발명자들은 건강한 인간 자원자로부터 유래된 해리된 피부 세포 현탁액으로부터 양성 선별에 의해 단리된 ABCB5+ 세포의 분화 잠재력을 조사하였고, 이를 ABCB5- 진피 섬유모세포의 분화 잠재력과 비교하였다 (도 1). ABCB5+ 또는 ABCB5- 세포를 신경발생, 혈관신생, 근발생, 골형성 또는 지방생성 계통 유도성 배지에서 배양하였고, 계통-특이적 마커 (즉, 스펙트린 - 근발생, CD31 - 혈관신생, TUJ1 - 신경 발생, 오일 레드 - 지방생성, 및 알리자린 레드 - 골형성)의 단백질 발현 및 RNA의 유도 뿐만 아니라 계통-특정적 형태학적 변화를 측정함으로써 그들의 분화 감소성을 평가하였다 (도 1). ABCB5- 진피 세포가 아니라, ABCB5+ 진피 세포 만이 3가지 모든 배아 계통 [즉, 외배엽 (신경발생), 중배엽 (근발생) 및 내배엽 (혈관신생) 계통]을 유발시킬 수 있었다 (도 1).

[0119] 인간 ABCB5+ 진피 MSC의 분화 감소성을 추가로 해부하고 생체내에서 다능 분화에 대한 그들의 니치(niche)-비의존성 능력을 결정하기 위하여, 본 발명자들은 급성 근육 손상 모델에서 인간 ABCB5- 피부-유래된 세포와 비교해서 인간 ABCB5+ 피부-유래된 세포의 생체내 근육재생 잠재력을 조사하였다. ABCB5+ 피부 세포와 ABCB5- 피부 세포를 심각하게 면역손상된 NOD/SCID/IL2R $\gamma^{-/-}$ (NSG) 마우스의 카르디오톡신-손상된 경골근 (TA) 근육 내로 주사하였다. 인간 ABCB5+ 세포와 ABCB5- 세포가 주사된 무린 근육을 인간-특이적 $\beta 2$ -마이크로글로불린, Δ -사르코글리칸 및 스펙트린으로 면역형광 염색시킨 대표적인 것을 수득하였다. DAPI를 사용하여 핵을 가시화하였다. 주사된 근육과 주사되지 않은 대조군 근육을, 이식한지 2주 후에 수거하였고, 이를 대상으로 하여 인간-특이적 $\beta 2$ 마이크로글로불린 ($\beta 2M$) (이는 인간 기원의 모든 세포를 식별한다), 및 인간-특이적 스펙트린 (SPTBN1) 및 델타-사르코글리칸 (SGCD) (이들은 분화된 인간 근세포에 의해서는 특이적으로 발현되지만, 무린 근세포에 의해서는 그렇지 않다)의 발현에 관하여 조사하였다. 면역염색 결과, ABCB5+ 세포-주사된 근육과 ABCB5- 세포-주사된 근육 둘 다에 $\beta 2M$ + 인간 세포가 존재하는 것으로 (이는 성공적인 이식과 생착을 표시한다) 밝혀졌지만, ABCB5+ 세포가 주사된 TA 근육 만이 SPTBN1+ 및 SGCD+ 분화된 근세포를 함유하였다. 주사된 근육과 주사되지 않은 대조군 근육을 실시간 PCR 분석한 결과는 ABCB5+ 및 ABCB5- 세포-주사된 근육에서는 인간-특이적 $\beta 2M$ 전사체가 발현되었지만, 주사되지 않은 대조군에서는 그렇지 못하였다는 것을 입증하였고, 인간 특이적 SPTBN1 및 SGCD 전사체의 발현은 ABCB5+ 세포-주사된 근육에서만 입증되었다. 따라서, ABCB5는 현재 이용가능한 MSC 항원에 비해 실질적으로 증강된 차별적 마커 기능을 수반한, 다능 인간 진피 중간엽 줄기 세포에 대한 고도로 특이적인 마커를 나타낸다. 이러한 발견들은 줄기 세포-기반 조직 재생에 대한 신규 세포 공급원으로서의 ABCB5+ 진피 MSC의 능력을 강조한다.

[0120] 실시예 2: Abcb5 녹아웃 마우스의 줄기 세포 결핍 표현형

[0121] 발생 및 줄기 세포 기능에 있어서의 ABCB5의 역할을 추가로 해부하기 위하여, 본 발명자들은 첫 번째 조건부 Abcb5 녹아웃 (KO) 마우스를 창출시켰다. 현재까지, ABCB5 단백질 기능은 호모 사피엔스(*Homo sapiens*)에서 광범위하게 연구되었다. 인간 ABCB5 유전자는 세포의 ATP-결합 도메인과 세포내 ATP-결합 도메인 둘 다에 의해 플랭킹된 5개의 막횡단 나선을 수반한 812 아미노산 (AA) 단백질을 코딩한다¹. 본 발명자들의 기존의 연구 결과는, 인간 ABCB5 단백질의 아미노산 잔기 493-508을 함유하는 세포의 루프를 표적으로 하는, 본 발명자들의 모노클로날 항-ABCB5 항체 클론 중 하나인 3D2-1D12가 ABCB5-매개된 로다민-123 염료 유출, 막 분극 및 독소루비신 수송을 억제한다는 사실을 밝혀냈는데^{1,25}, 이는 분자의 상기 세포의 루프 영역의 결정적인 기능적 중요성을 명확하게 보여준다. 본 발명자들은 또한 기존에, 상응하는 ABCB5 마우스 동족체인 뮤린 Abcb5를 클로닝하였다²³. 마우스에서 Abcb5 기능을 붕괴시키기 위하여, 상기 뮤린 분자의 상동 부분을 표적화하였다. UCSC 블랫 (Blat) 검색 엔진을 사용하여, 본 발명자들은 3C2-1D12 ABCB5 mAb-결합 에피토프와 상동성인 Abcb5 단백질 도메인을 코딩하는 마우스 게놈 영역이 엑손 23에 의해 코딩된다는 사실을 확인하였다. 이러한 발견을 근거로 하여, 2개의 loxP 부위가 삽입되어 뮤린 엑손 23을 플랭킹하는 조건부 KO 구축물을 설계하였다 (도 2).

[0122] 완전한 기능 상실에 따른 결과를 결정하기 위하여, 접합자 단계 하의 마우스 배아 내에서 Cre 재조합효소를 발현하는 EIIa-Cre 트랜스유전자를 사용하여, Abcb5 유전자의 엑손 23을 결실시켰다^{48,49}. loxP 부위 간의 게놈 영역을 결실시킨 것은 게놈 DNA의 PCR에 의해 확증하였다. 이형접합성 Abcb5null/WT 마우스를 이중교배시켜 동형접합성 Abcb5null/null 돌연변이체를 생성시켰고, Abcb5null/null 돌연변이체 내에서의 Abcb5 발현 및 기능 상실을 유동 세포측정 분석 및 로다민-123 유출 검정에 의해 확증하였다¹ (도 3).

[0123] 상대 휴지기는 각종 포유동물 줄기 세포 집단에 기인된 두드러진 특징들 중 하나이다⁵⁰. 피부 줄기 세포는 처음에는, 비켄바흐(Bickenbach)⁵¹, 모리스(Morris)⁵² 및 코트사렐리스(Cotsarelis)⁵⁰에 의해 개발된 소위 "펄스 및 추적" DNA 표지화 실험 접근 방식을 사용하여, 느리게-순환되는 세포로서 확인되었다. 이들 접근 방식은 표지된 티미딘 유사체인 우리딘을 세포 주기의 복제기 (S-기) 동안 핵상 DNA 내로 혼입시키는 것에 의존한다. 첫째, DNA 표지화 또는 "펄스" 기 동안, 세포 또는 동물을 방사성 표지되거나 화학적으로 표지된 우리딘 (예를 들어, 브로모데옥시우리딘, BrdU)에 노출시킨 다음, 이를 각 세포 분할 동안 핵상 DNA 내로 혼입시킨다. 그 다음, 표지된 우리딘 (예를 들어, BrdU) 노출을 "추적" 기 동안 취소시키면, 대략 48 내지 72시간의 과정에 걸쳐, 자주 분할되는 세포에 의해 상기 표지가 후속 상실된다. 그러나, 느리게 순환되는 세포는 장기간 동안 DNA 표지를 보유할 수 있는데; 예를 들어, 마우스 모낭의 팽창 부위 줄기 세포는 4주 이상 동안 방사성 표지된 우리딘을 보유할 수 있으므로⁵⁰, "표지-보유성 세포"로 명명된다.

[0124] ABCB5가 포유동물 피부 내에 있는 휴지기 표지-보유성 세포 집단 (이는 상기 입증된 줄기 세포 표현형과 일치한다)을 식별하는 지의 여부와, 줄기 세포 휴지기를 유지하기 위해서는 온전한 ABCB5 기능이 필요한지의 여부를 결정하기 위하여, 본 발명자들은 Abcb5 WT 및 Abcb5 KO 마우스에서 생체내 BrdU-표지화 실험을 수행하였다. BrdU는 형광성-표지된 항-BrdU 항체를 사용하여 검출될 수 있는, 비-방사성 우리딘 유도체이다. 마우스에게, 느리게-분할되는 세포를 표지하도록 설계된 매일 전신 (정맥내) BrdU 투여의 9일 "펄스"를 수행한 다음, BrdU 처리의 중단시 4주 간의 BrdU-무함유 "추적" 기를 수행하였다. 이어서, 해리된 전층 피부 세포 현탁액에서의 BrdU-보유성 세포의 비율 (%)을, 항-BrdU 항체 염색과 유동 세포측정법을 사용하여 Abcb5 WT 마우스와 Abcb5 KO 마우스 간에 비교하였다. 이로써, 세포의 세포 주기 위치를 기준으로 하여 세포를 계산하고 정상 확인하기 위하여, 총 DNA와 결합하는 7-아미노-액티노마이신 D (7-AAD) 염료로 세포를 공동-염색하였다 (도 4). 유동 세포측정 분석 결과, 4주 "추적" 후, Abcb5 WT 마우스 내의 모든 BrdU-양성 세포 (즉, 표지-보유성 세포)가 G0 기에서 발견되었다는 사실과 (도 4b, 게이트 R1), 이러한 집단이 Abcb5 KO 마우스에서는 74% 감소되었다는 사실이 밝혀졌다 (도 4c, 게이트 R1). 또한, Abcb5 KO 마우스로부터 유래된 전층 피부 세포 현탁액이 Abcb5 WT 마우스로부터 유래된 것과 비교해서 S/G2/M 기에서 67% 더 증식하는 BrdU-음성 세포를 나타냈는데 (도 4b 및 4c, 게이트 R2), 이는 정상적인 ABCB5 기능을 없애면, 정상적으로 휴지기인 ABCB5+ 세포의 세포내 증식이 유도된다는 것을 표시한다.

[0125] 이러한 관찰 결과와 일치하게, 세포 주기 조절에 관련한 84개 세포 유전자 [SA바이오사이언스(SABiosciences), 카탈로그 번호 PAMM-020]를 실시간 PCR 분석한 결과, p53 신호전달, G1/S 체크포인트 조절, 사이클린 및 세포 주기 조절, 및 칼슘 신호전달 경로 (도 5)를 포함한, 몇 가지 정규 세포 주기 경로에 관련한 22개 분자 [G0/G1

세포 주기 체크포인트와 세포성 휴지기를 제어하는 p53 계열 (p53 및 p63) 및 cKip 계열 (p21 및 p27)의 구성원 포함]가 Abcb5 KO 마우스에서 상당히 하향조절되는 것으로 밝혀졌다.

[0126] 이들 결과는 ABCB5가 세포 주기 진행을 조절하고 줄기 세포 휴지기를 유지하는 데 요구된다는 것을 표시한다. ABCB5 기능을 없애면, G0/G1 세포 주기 진행의 결정적 음성 조절인자의 퇴행이 유발되고, 세포 증식이 증가된다. 세포 주기로부터의 철수가 정상적인 분화를 위한 전제 조건이고, 이와 같이 할 수 없다는 것은 다음에 기재된 Abcb5 KO 마우스에서의 정상적인 상처 치유의 약화를 설명할 수 있다. 이 데이터는 추가로, 포유동물 피부로부터의 줄기 세포 단리를 위한 기능상 관련된 마커로서의 ABCB5의 적합성을 뒷받침해준다.

[0127] 실시예 3: Abcb5 녹아웃 마우스에서의 약화된 상처 치유

[0128] 상처 치유는 4가지 순차적 기를 통하여 진행되는 복잡한 현상이다: 지혈, 염증, 증식 및 반흔 형성을 수반한 재형성⁵³. 본 발명자들은 Abcb5 WT 마우스와 Abcb5 KO 마우스를 활용하여, 정상적인 상처 치유에 온전한 ABCB5 기능이 요구되는지를 연구 조사하였다. 피부와 조직층 1 cm²를 제거함으로써 전층 피부 상처를 생성시켰고, 상처 치유의 초기 증식 기 동안 7일간 마우스를 후속 관찰하였다. 수술 절차 직후 및 조직 수거 시점 (7일)에 상처의 사진을 찍었다. 실험이 끝날 무렵에 포착한 디지털 사진을, 마우스 유전 상태에 대해서 전혀 모르고 있는 2명의 독립적인 관찰자가 찍은 상응하는 초기 사진과 비교해서 정량적으로 분석하였다.

[0129] 이로써, 이미지(Image) J 소프트웨어 패키지 (NIH; 미국 메릴랜드주 베데스다)를 사용하여 기존에 언급된 바와 같은⁵⁴ 구적 분석에 의해 수득된 측정치를 근거로 하여, 상처 봉합을 본래의 상처의 비율 (%)로서 계산하였다. 동일하지 않은 변동을 고려하여 웰치(Welch)의 보정과 짝을 이루지 않은 t 시험을 사용하여 상기 데이터를 비교하였다. Abcb5 KO 마우스 (n=15)는 Abcb5 WT 마우스 (n=19)와 비교해서 상당히 지연된 상처 봉합을 명확하게 보여주었다 (63.64 ± 7.6% 대 87.33 ± 3.4%, 평균 ± SEM, P = 0.01) (도 6). 추가로, 아페리오 이미지 스코프(Aperio Image Scope) 소프트웨어 (미국 캘리포니아주 비스타)를 사용하여, 스캐닝되고 H&E 염색된 제7일 상처 횡단면 상의 양 군에게서 염증성 기질 두께를 측정하였는데, Abcb5 KO 상처가 Abcb5 WT 상처와 비교해서 상당히 증가된 염증성 기질 두께를 명확하게 보여주었다 (820.2 ± 65.6 μm 대 590.0 ± 38.8 μm, 평균 ± SEM, P = 0.003) (도 6).

[0130] 신생혈관증식이 상처 재생의 초기 단계의 특징들 중 하나이고, 케로이드 반흔 형성에 기여하는 것으로 여겨지는 저산소증-유도된 과도한 근섬유모세포 증식을 제어하는 데 결정적이다 (⁵⁵에서 고찰됨). 기존의 연구 결과, 상처 혈관신생이 기존의 혈관으로부터 새로운 혈관의 발아를 통하여 주로 달성되긴 하지만, 새로이 형성된 혈관 중 일부는 골수 전구 세포로부터 유래될 수도 있는 것으로 밝혀졌다⁵⁶. 다른 상주 줄기 세포 집단이 상처 혈관신생에 기여하는지는 명확하지 않다. 인간 흑색종 혈관생성에 있어서의 ABCB5+ 세포의 결정적인 역할에 관한 본 발명자들의 기존의 관찰 결과를 근거로 하여²⁸, 본 발명자들은 온전한 ABCB5 기능이 상처난 피부에서의 효율적인 혈관신생에 필수적일 수도 있다고 가정하였다. 이러한 제안의 마지막 반복 이래로 발생된 추가의 예비 연구에서 상기 가설을 시험하기 위하여, 상기 언급된 바와 같이 발생된 유리 피부 상처에서의 혈관 형성을, 상처 층 내의 혈관화 생층 대 무혈관화 생층 (층)의 두께 맥락에서 상처 형성된지 7일 후에 Abcb5 KO 및 Abcb5 WT 마우스에서의 내피 마커 CD31의 발현을 비교함으로써 분석하였다. 아페리오 이미지 스코프 소프트웨어 (미국 캘리포니아주 비스타)를 사용하여, 스캐닝되고 CD31 염색된 제7일 상처 횡단면 상의 양 군에게서 혈관성 CD31-양성 및 무혈관성 CD31-음성 층 두께를 측정하였는데, Abcb5 KO 상처가 Abcb5 WT 상처와 비교해서 상당히 감소된 혈관 층 두께 (278.5 ± 51.45 μm 대 469.2 ± 40.30 μm, 평균 ± SEM, P = 0.0069)를 명확하게 보여주었고 상당히 증가된 무혈관 층 두께 (626.2 ± 41.18 μm 대 324.5 ± 28.55 μm, 평균 ± SEM, P < 0.0001)를 명확하게 보여주었다 (도 7).

[0131] 증식성 CD31-양성 혈관이 잘 형성된 루멘을 수반한 가변적으로 신장된 브랜칭 채널을 형성하는 야생형 동물과는 반대로, ABCB5 KO 동물로부터의 유사한 부위는 국소적으로, CD31-양성 구조물이 비교적 없거나 또는 CD31-양성 세포의 단독 또는 소형 군락과 혼합된 우발적 소형 혈관 프로파일로 구성되었다. 이들 후자 CD31-양성 세포는 효율적이고 생산적인 치유 반응에 요구되는 성숙한 혈관의 나뭇가지 모양의 네트워크를 형성하는 데 필요한 혈관신생 발아할 수 있는 세관으로 분화될 수 없다는 것을 반영하는 것으로 여겨진다 (도 8).

[0132] 이러한 관찰 결과와 일치하게, 혈관신생에 관여한 84개 유전자 (SA바이오사이언스, 카탈로그 번호 PAMM-024Z)를 실시간 PCR 분석한 결과, 혈관신생을 증진시키는 시토카인, 즉 Csf3, Cxcl12, Il1b, Ifng, Lep, 및 Mdk가 Abcb5 KO 상처에서 상당히 하향조절되었고, 공지된 항혈관신생 분자인 포스포티딜세린 수용체 Bai1이 상향조절된 것으로

로 밝혀졌는데 (도 9), 이는 Abcb5 KO 상처에서 관찰된 고도로 억제되었고 비정상적인 혈관신생 패턴에 대한 초기 설명을 제공한다.

[0133] 이들 결과는 상처 봉합 지연을 특징으로 하는 Abcb5 KO 마우스에서의 상처 치유 악화, 증가된 염증성 기질 두께 및 이상한 혈관신생을 명확하게 보여주는데, 이는 정상적인 피부 상처 치유에 있어서의 ABCB5의 결정적인 기능적 역할과, 이에 따른 ABCB5+ 중간엽 줄기 세포의 결정적인 기능적 역할을 추가로 뒷받침해준다.

[0134] **실시예 4: NSG 마우스에서 재생적 상처 치유에 대한 인간 ABCB5+ 진피 MSC의 효과**

[0135] 본 발명자들은 다음 4가지 처리 군을 사용하여 인테그라®-처리된 NSG 마우스에서 상처 치유에 대한 인간 ABCB5+ 진피 MSC의 효과를 연구 조사하였다: (1) 처리하지 않음; (2) 인테그라® 단독; (3) 1×10^6 개 ABCB5+ 진피 MSC가 주사된 인테그라®; 및 (4) 1×10^6 개 ABCB5- 진피 세포가 주사된 인테그라® (도 10b). 도 6에 기재된 바와 같이 피부와 조직층 1 cm²를 제거함으로써 모든 동물에게서 전층 피부 상처를 생성시켰다. 군 2, 3 및 4에서의 각 상처에 1 cm² 인테그라® 이식편을 즉시 이식한 다음, 1×10^6 개 ABCB5+ 세포 (군 3) 또는 1×10^6 개 ABCB5- 세포 (군 4)를 인테그라® 내 주사하였다. 실험군 2에는 세포가 전혀 주사되지 않았다. 군 1은 비처리 실험 대조군으로서 제공되었다. 상기 과정 후 제14일에, 인테그라®로 이루어진 상처 조직, 주변 피부 및 기저 근육 조직을 수거하였다. 아페리오 이미지 스코프 소프트웨어 (미국 캘리포니아주 비스타)를 사용하여, 스캐닝되고 H&E 염색된 제14일 상처 횡단면 상의 모든 군에게서 염증성 기질 두께를 측정하였다. 정량적으로 분석한 결과, 인테그라® 및 ABCB5+ 인간 진피 MSC로 처리된 마우스는 인테그라® 및 ABCB5- 진피 세포로 처리된 마우스 ($608.0 \pm 46.7 \mu\text{m}$ 대 $855.4 \pm 69.8 \mu\text{m}$, 평균 \pm SEM, $P=0.009$), 인테그라® 단독으로 처리된 마우스 ($874.7 \pm 43.3 \mu\text{m}$, $P=0.0001$), 또는 처리되지 않은 마우스 ($1014 \pm 49.4 \mu\text{m}$, $P<0.0001$)와 비교해서 상당히 감소된 염증성 기질 두께를 나타낸 것으로 밝혀졌다. 인테그라® 단독으로 처리된 마우스와 인테그라® 및 ABCB5- 진피 세포로 처리된 마우스 간에는 차이가 관찰되지 않았다. 인테그라® 단독으로의 처리는 처리되지 않은 상처와 비교해서 염증성 기질 두께를 단지 미미한 수준으로 감소시켰다 (도 10a). 인간 주사된 세포 집단의 생존율을 보장하기 위하여, 이식편을 대상으로 하여, 인간 기원의 모든 세포의 식별인자인 인간-특이적 $\beta 2$ 마이크로글로불린 ($\beta 2\text{M}$)의 발현에 관하여 추가로 조사하였다. 면역염색한 결과, 세포-주사된 인테그라® 이식편에 $\beta 2\text{M}^+$ 인간 세포 군락 뿐만 아니라 개개의 $\beta 2\text{M}^+$ 인간 세포가 존재하는 것으로 밝혀졌다 (도 10c). ABCB5+ 또는 ABCB5- 인간 진피 세포가 주사된 인테그라® 이식편을 실시간으로 PCR 분석한 결과, 예상된 바와 같이 주사되지 않은 인테그라® 단독-처리된 대조군에서는 검출가능하지 않았던 인간-특이적 GAPDH 및 $\beta 2\text{M}$ 전사체가 발현된 것으로 입증되었다 (도 10d). 따라서, 이식 가능한 인테그라® 매트릭스 내로의 주사 후 생존가능한 ABCB5+ 진피 MSC 또는 생존가능한 ABCB5- 진피 세포의 성공적인 생착과 영속성에도 불구하고, ABCB5- 인간 진피 세포가 아닌 ABCB5+ 진피 MSC의 이식만이, 상처난 NSG 마우스에서 염증성 기질 두께를 추가로 감소시켰는데, 이는 재생적 상처 치유를 추가로 증강시키기 위한 상기 신규 MSC 집단의 특이적 치료 유용성에 대한 초기 원리 증명을 제공한다.

[0136] **실시예 5: 인간화 마우스 모델**

[0137] 마우스 모델이 인간 질환의 연구를 위하여 광범위하게 이용되긴 하지만, 인간과 비인간 종 간의 상처 치유 과정에는 상당한 차이가 있다³¹. 이러한 이유로 인해, 전층 인간 피부 이식편을 면역결핍 마우스³² 상으로 이식한 대체 모델을 사용하였다. 이러한 모델에서는, 피부 이식편이 인간 피부와 조직학적으로 밀접하게 유사하고, 그들의 인간 표현형을 3개월 이상 동안 유지한다. 성형 수술 동안 제거된 폐기된 정상 성인 피부 샘플을, 8주령 면역결핍 NSG 마우스 상으로 인간 피부 이식하기 위해 사용하였다 (도 11a,b). 이러한 인간 피부 이중 이식편에 상처를 내면, 도 11c에 도시된 바와 같이 정상적인 인간 상처 치유 패턴이 초래되었다.

[0138] 또한, 인간 환자에게서 재생적 상처 치유에 대한 인테그라® 스캐폴드 이식의 효과를, 이식되지 않은 상처 (도 12, 상부 패널)로부터 수득되거나 또는 인테그라® 스캐폴드 이식편이 이식된 인간 환자 상처 (도 12, 하부 패널)로부터 수득된 생검에서 조사하였다. 비교 분석한 결과, 반흔 형성에 따른 치유 반응의 면역조직화학적 프로파일 (인테그라® 없음, 도 12, 상부 패널), 또는 스캐폴드를 보유하고 있는 상처에서 ABCB5+ 진피 세포의 현저하게 증강된 발현과 액틴-발현성 근섬유모세포의 재정렬을 특징으로 하는, 스캐폴드-유도된 재생에 따른 치유 반응의 면역조직화학적 프로파일 (인테그라®, 도 12, 하부 패널)이 밝혀졌다.

[0139] 이들 결과는 인테그라® 스캐폴드 이식과 이로써 생성되는 ABCB5+ 진피 MSC의 동원이, 반흔 형성을 통한 상처 치유와는 반대로 재생적 상처 치유를 우선적으로 유도시킨다는 것을 보여준다. 따라서, 인간 ABCB5+ 진피 MSC

는 인테그라®-매개된 재생적 상처 치유를 상당히 그리고 선택적으로 추가로 증강시키고 (도 10), 번역상 가장 관련이 있는 인간 피부 상처 치유 실험에서 인간 ABCB5+ 진피 MSC/인테그라® 스캐폴드 공동이식화의 치료 효능을 입증해준다.

[0140]

진피 중간엽 줄기 세포는 균형을 제공하는 데 요구됨으로써, 정상적인 치유 반응이 질서 정연하게 발생되어, 점진적인 상처 봉합과 생리적인 반흔 형성이 초래된다. 본 발명자들은 Abcb5 KO 마우스에서 진피 줄기 세포 기능에 장애가 오면, 비정상적인 상처 치유 반응이 유발되어, 불충분한 치유 또는 과도한 치유가 초래될 수 있을 것으로 예상하였다. 부족한 치유는 욕창에서 관찰된 바와 같이 피하 조직 상실로서 나타나거나, 또는 정맥성 궤양에서 관찰된 바와 같이 재상피화의 실패로서 나타나거나, 또는 당뇨병성 궤양에서 관찰된 바와 같이 괴사-감염 조합으로서 나타날 수 있었다. 조직학적으로, 부족한 상처 치유는 과도한 호중구성 침윤과 증가된 MMP-9 콜라게나제 분비를 특징으로 하여 콜라겐 붕괴를 초래할 수 있었다³. 이와는 반대로, 비후성 반흔은 TGF- β 를 포함한 성장 인자의 과생성을 초래하는 증폭된 염증성 반응으로 인한 콜라겐 침착 증가를 특징으로 한다⁵⁸.

[0141]

참고문헌

1. Frank, N.Y. et al. Regulation of progenitor cell fusion by ABCB5 P-glycoprotein, a novel human ATP-binding cassette transporter. *J Biol Chem* 278, 47156-65 (2003).
2. Ko, S.H. et al. The role of stem cells in cutaneous wound healing: what do we really know? *Plast Reconstr Surg* 127 Suppl 1, 10S-20S.
3. Diegelmann, R.F. & Evans, M.C. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front Biosci* 9, 283-9 (2004).
4. Sarkar, A., Tatlidede, S., Scherer, S.S., Orgill, D.P. & Berthiaume, F. Combination of stromal cell-derived factor-1 and collagen-glycosaminoglycan

[0142]

- scaffold delays contraction and accelerates reepithelialization of dermal wounds in wild-type mice. *Wound Repair Regen* 19, 71-9.
5. Yannas, I.V., Lee, E., Orgill, D.P., Skrabut, E.M. & Murphy, G.F. Synthesis and characterization of a model extracellular matrix that induces partial regeneration of adult mammalian skin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 933-7 (1989).
6. Yannas, I.V., Orgill, D.P. & Burke, J.F. Template for skin regeneration. *Plast Reconstr Surg* 127 Suppl 1, 60S-70S.
7. Badiavas, E.V. & Falanga, V. Treatment of chronic wounds with bone marrow-derived cells. *Arch Dermatol* 139, 510-6 (2003).
8. Falanga, V. et al. Autologous bone marrow-derived cultured mesenchymal stem cells delivered in a fibrin spray accelerate healing in murine and human cutaneous wounds. *Tissue Eng* 13, 1299-312 (2007).
9. Navsaria, H.A., Ojeh, N.O., Moiemien, N., Griffiths, M.A. & Frame, J.D. Reepithelialization of a full-thickness burn from stem cells of hair follicles micrografted into a tissue-engineered dermal template (Integra). *Plast Reconstr Surg* 113, 978-81 (2004).
10. Schurr, M.J. et al. Phase I/II clinical evaluation of StrataGraft: a consistent, pathogen-free human skin substitute. *J Trauma* 66, 866-73; discussion 873-4 (2009).
11. Toma, J.G. et al. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol* 3, 778-84 (2001).
12. Toma, J.G., McKenzie, I.A., Bagli, D. & Miller, F.D. Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin. *Stem Cells* 23, 727-37 (2005).
13. Fernandes, K.J. et al. A dermal niche for multipotent adult skin-derived precursor cells. *Nat Cell Biol* 6, 1082-93 (2004).
14. Bartsch, G. et al. Propagation, expansion, and multilineage differentiation of human somatic stem cells from dermal progenitors. *Stem Cells Dev* 14, 337-48 (2005).
15. Biernaskie, J.A., McKenzie, I.A., Toma, J.G. & Miller, F.D. Isolation of skin-derived precursors (SKPs) and differentiation and enrichment of their Schwann cell progeny. *Nat Protoc* 1, 2803-12 (2006).
16. Chen, F.G. et al. Clonal analysis of nestin(-) vimentin(+) multipotent fibroblasts isolated from human dermis. *J Cell Sci* 120, 2875-83 (2007).
17. Lavoie, J.F. et al. Skin-derived precursors differentiate into skeletogenic cell types and contribute to bone repair. *Stem Cells Dev* 18, 893-906 (2009).
18. Kuroda, Y. et al. Unique multipotent cells in adult human mesenchymal cell populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 8639-43.
19. Wilson, B.J. et al. ABCB5 identifies a therapy-refractory tumor cell population in colorectal cancer patients. *Cancer Res* 71, 5307-16 (2011).
20. Frank, N.Y. et al. VEGFR-1 expressed by malignant melanoma-initiating cells is required for tumor growth. *Cancer Res* 71, 1474-85 (2011).
21. Ma, J. et al. Isolation of tumorigenic circulating melanoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 402, 711-7.
22. Schatton, T. et al. Modulation of T-cell activation by malignant melanoma initiating cells. *Cancer Res* 70, 697-708.
23. Frank, N.Y. & Frank, M.H. ABCB5 gene amplification in human leukemia cells. *Leuk Res* 33, 1303-5 (2009).
24. Schatton, T. et al. Identification of cells initiating human melanomas. *Nature* 451, 345-9 (2008).
25. Frank, N.Y. et al. ABCB5-mediated doxorubicin transport and chemoresistance in human malignant melanoma. *Cancer Res* 65, 4320-33 (2005).

[0143]

26. Kim, S. et al. Identification of human ABCB5+ dermal progenitor cells with multipotent differentiation plasticity. in *Society of Investigative Dermatology, 2010 Annual Meeting* Vol. 130 (Supplement 1S) S107 (Abstract 642). (Journal of Investigative Dermatology Atlanta, 2010).
27. Cheung, S.T., Cheung, P.F., Cheng, C.K., Wong, N.C. & Fan, S.T. Granulin-epithelin precursor and ATP-dependent binding cassette (ABC)B5 regulate liver cancer cell chemoresistance. *Gastroenterology* 140, 344-55.
28. Frank, N.Y., Schatton, T. & Frank, M.H. The therapeutic promise of the cancer stem cell concept. *J Clin Invest* 120, 41-50.
29. Gazzaniga, P. et al. CD133 and ABCB5 as stem cell markers on sentinel lymph node from melanoma patients. *Eur J Surg Oncol* 36, 1211-4.
30. Sharma, B.K., Manglik, V. & Elias, E.G. Immuno-expression of human melanoma stem cell markers in tissues at different stages of the disease. *J Surg Res* 163, e11-5.
31. Cohen, I.K. & Mast, B.A. Models of wound healing. *J Trauma* 30, S149-55 (1990).
32. Yan, H.C. et al. Human/severe combined immunodeficient mouse chimeras. An experimental in vivo model system to study the regulation of human endothelial cell-leukocyte adhesion molecules. *J Clin Invest* 91, 986-96 (1993).
33. Gottesman, M.M. How cancer cells evade chemotherapy: sixteenth Richard and Hinda Rosenthal Foundation Award Lecture. *Cancer Res* 53, 747-54 (1993).
34. Bosch, I., Dunussi-Joannopoulos, K., Wu, R.L., Furlong, S.T. & Croop, J. Phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine behave as substrates of the human MDR1 P-glycoprotein. *Biochemistry* 36, 5685-94 (1997).
35. Frank, M.H. et al. Specific MDR1 P-glycoprotein blockade inhibits human alloimmune T cell activation in vitro. *J Immunol* 166, 2451-9 (2001).
36. van Helvoort, A. et al. MDR1 P-glycoprotein is a lipid translocase of broad specificity, while MDR3 P-glycoprotein specifically translocates phosphatidylcholine. *Cell* 87, 507-17 (1996).
37. Bunting, K.D., Galipeau, J., Topham, D., Benaim, E. & Sorrentino, B.P. Effects of retroviral-mediated MDR1 expression on hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation in culture. *Ann N Y Acad Sci* 872, 125-40; discussion 140-1 (1999).
38. Randolph, G.J. et al. A physiologic function for p-glycoprotein (MDR-1) during the migration of dendritic cells from skin via afferent lymphatic vessels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6924-9 (1998).
39. Gollapudi, S. & Gupta, S. Anti-P-glycoprotein antibody-induced apoptosis of activated peripheral blood lymphocytes: a possible role of P-glycoprotein in lymphocyte survival. *J Clin Immunol* 21, 420-30 (2001).
40. Johnstone, R.W., Ruefli, A.A., Tainton, K.M. & Smyth, M.J. A role for P-glycoprotein in regulating cell death. *Leuk Lymphoma* 38, 1-11 (2000).
41. Chaudhary, P.M. & Roninson, I.B. Expression and activity of P-glycoprotein, a multidrug efflux pump, in human hematopoietic stem cells. *Cell* 66, 85-94 (1991).
42. Zhou, S. et al. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat Med* 7, 1028-34 (2001).
43. Spangrude, G.J., Brooks, D.M. & Tumas, D.B. Long-term repopulation of irradiated mice with limiting numbers of purified hematopoietic stem cells: in vivo expansion of stem cell phenotype but not function. *Blood* 85, 1006-16 (1995).
44. Zijlmans, J.M. et al. Modification of rhodamine staining allows identification of hematopoietic stem cells with preferential short-term or long-term bone marrow-repopulating ability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 8901-5 (1995).

[0144]

45. Goodell, M.A., Brose, K., Paradis, G., Conner, A.S. & Mulligan, R.C. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med* 183, 1797-806 (1996).
46. Goodell, M.A. et al. Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species. *Nat Med* 3, 1337-45 (1997).
47. Leemhuis, T. et al. Isolation of primitive human bone marrow hematopoietic progenitor cells using Hoechst 33342 and Rhodamine 123. *Exp Hematol* 24, 1215-24 (1996).
48. Hutcheson, D.A. & Kardon, G. Genetic manipulations reveal dynamic cell and gene functions: Cre-ating a new view of myogenesis. *Cell Cycle* 8, 3675-8 (2009).
49. Lakso, M. et al. Efficient in vivo manipulation of mouse genomic sequences at the zygote stage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 5860-5 (1996).
50. Cotsarelis, G., Sun, T.T. & Lavker, R.M. Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. *Cell* 61, 1329-37 (1990).
51. Bickenbach, J.R. Identification and behavior of label-retaining cells in oral mucosa and skin. *J Dent Res* 60 Spec No C, 1611-20 (1981).
52. Morris, R.J., Fischer, S.M. & Slaga, T.J. Evidence that the centrally and peripherally located cells in the murine epidermal proliferative unit are two distinct cell populations. *J Invest Dermatol* 84, 277-81 (1985).
53. Erba, P., Ogawa, R., Vyas, R. & Orgill, D.P. The reconstructive matrix: a new paradigm in reconstructive plastic surgery. *Plast Reconstr Surg* 126, 492-8.
54. Peng, C. et al. Lack of FGF-7 Further Delays Cutaneous Wound Healing in Diabetic Mice. *Plast Reconstr Surg* 128, 673e-84e.
55. Schafer, M. & Werner, S. Cancer as an overhealing wound: an old hypothesis revisited. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 628-38 (2008).
56. Tepper, O.M. et al. Adult vasculogenesis occurs through in situ recruitment, proliferation, and tubulization of circulating bone marrow-derived cells. *Blood* 105, 1068-77 (2005).
57. Lau, K., Paus, R., Tiede, S., Day, P. & Bayat, A. Exploring the role of stem cells in cutaneous wound healing. *Exp Dermatol* 18, 921-33 (2009).
58. Colwell, A.S., Phan, T.T., Kong, W., Longaker, M.T. & Lorenz, P.H. Hypertrophic scar fibroblasts have increased connective tissue growth factor expression after transforming growth factor-beta stimulation. *Plast Reconstr Surg* 116, 1387-90; discussion 1391-2 (2005).

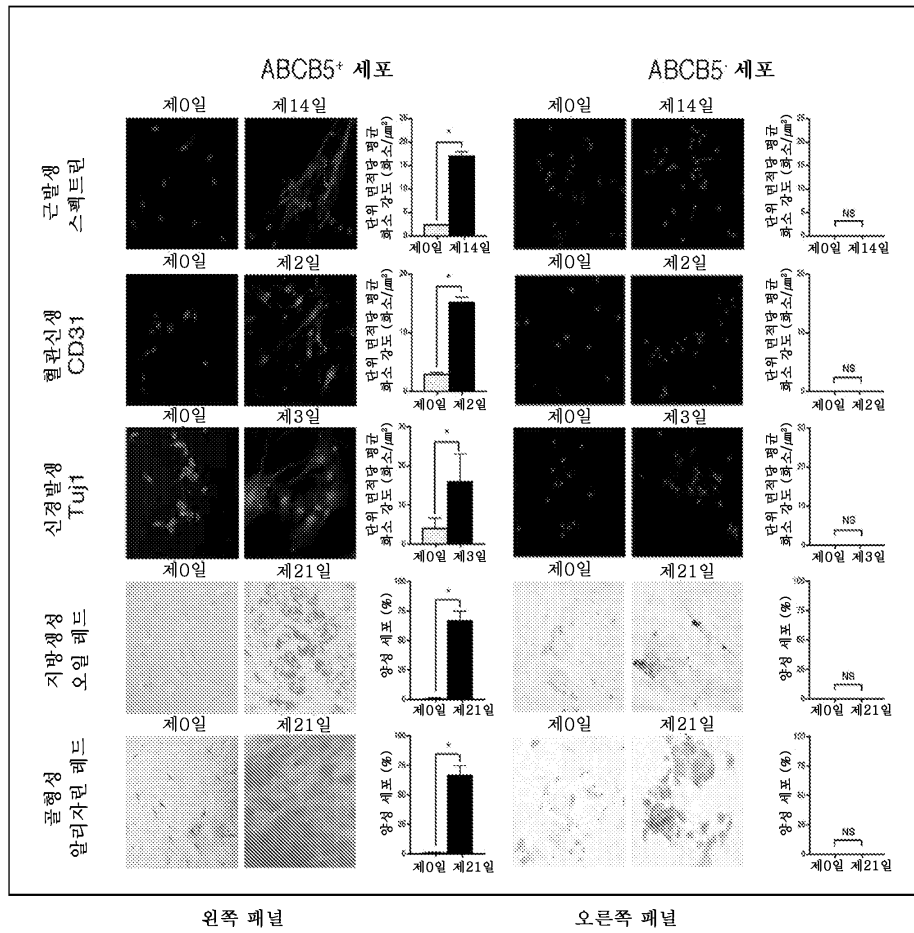
[0145]

[0146]

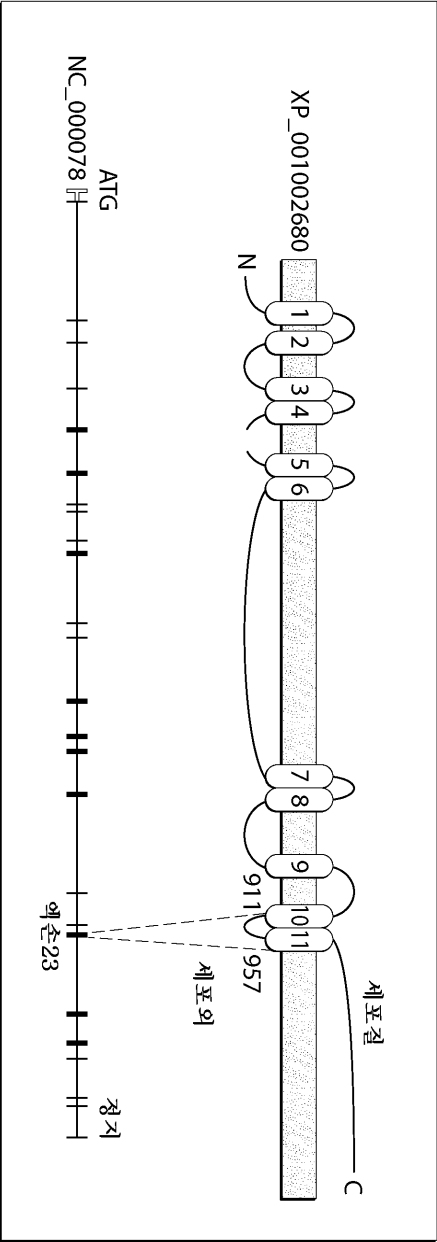
본원에 인용된 모든 참고문헌은 전부 참조로 포함된다. 따라서, 본 발명의 한 가지 이상의 실시양태의 몇 가지 측면이 기재되긴 하였지만, 각종 변경, 변형 및 개선이 통상의 기술자에게 용이하게 발생할 것이라는 사실을 인지해야 한다. 이러한 변경, 변형 및 개선은 본 개시내용의 일부인 것으로 의도되고, 본 발명의 요지 및 범위 내에 있는 것으로 의도된다. 따라서, 전술된 설명과 도면은 단지 예일 뿐이다.

도면

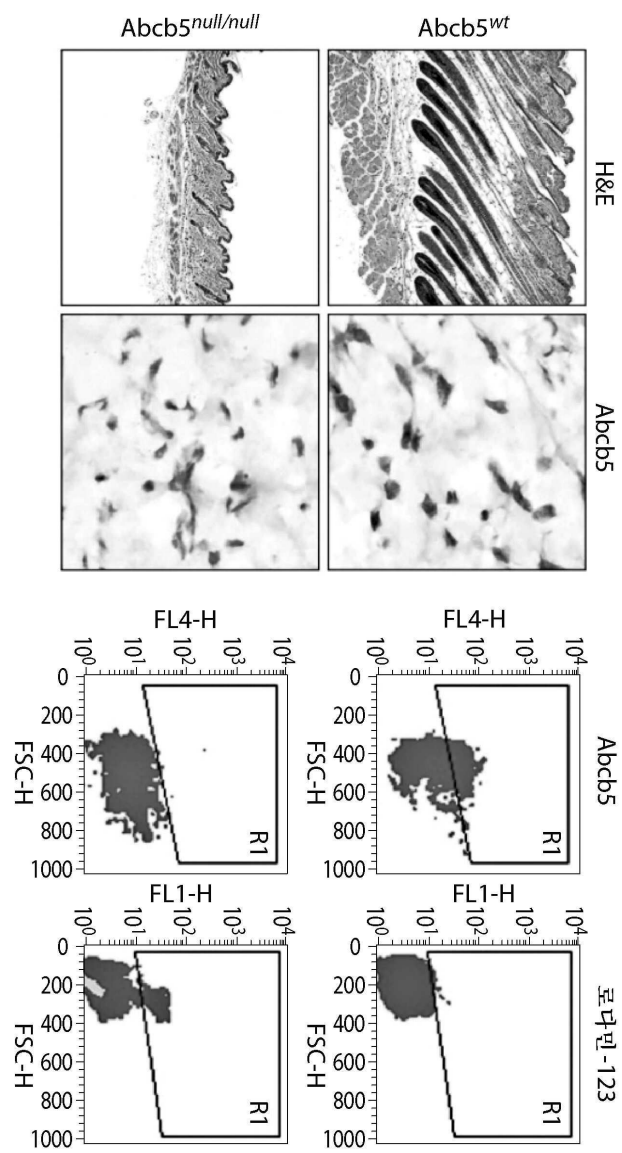
도면1



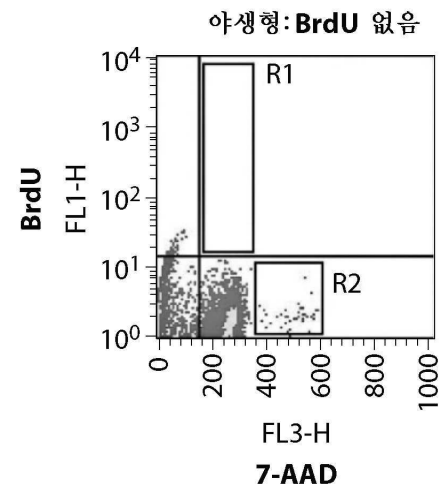
도면2



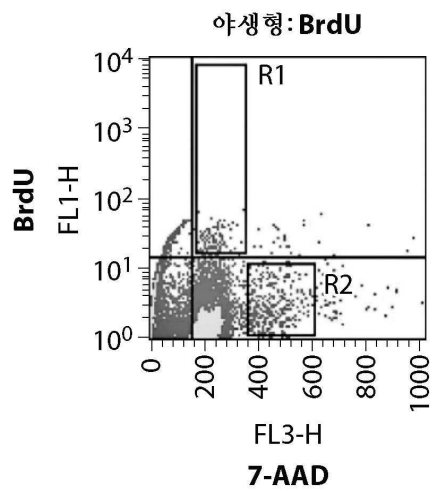
도면3



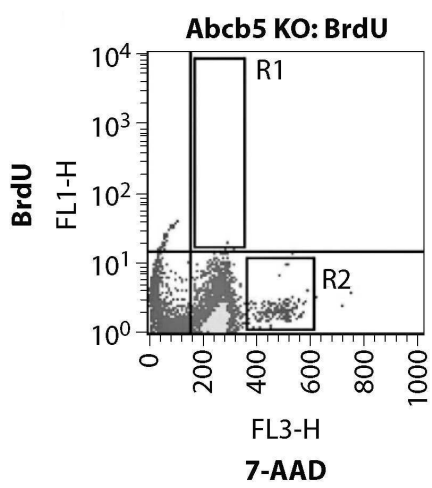
도면4a



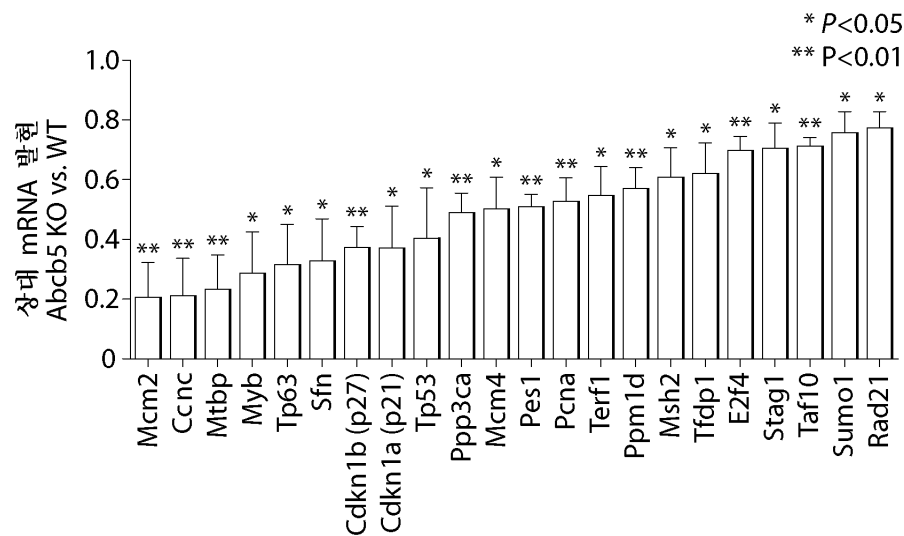
도면4b



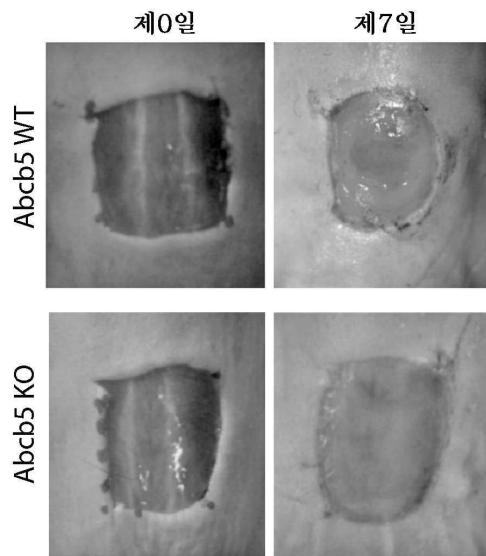
도면4c



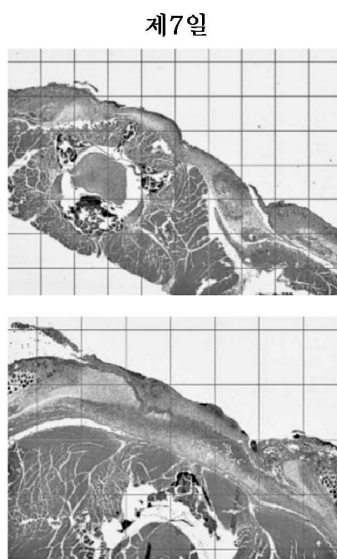
도면5a



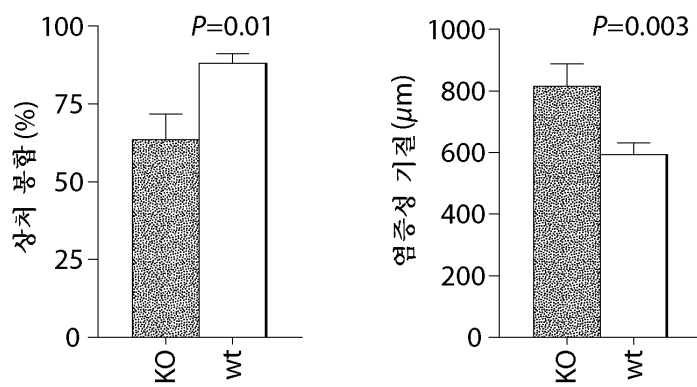
도면6a



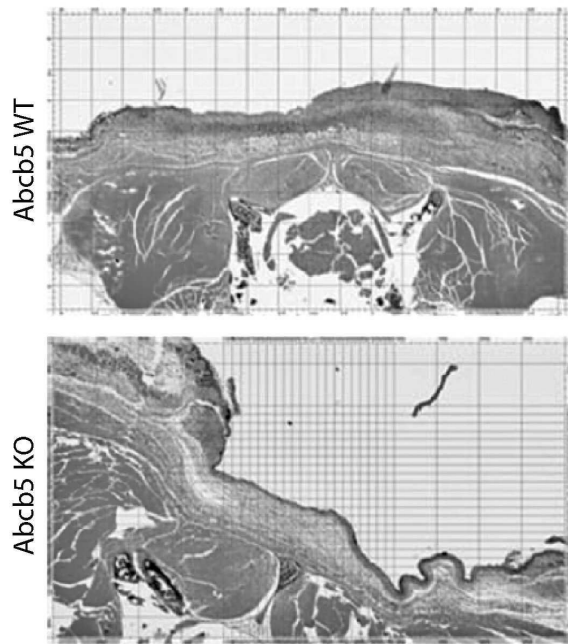
도면6b



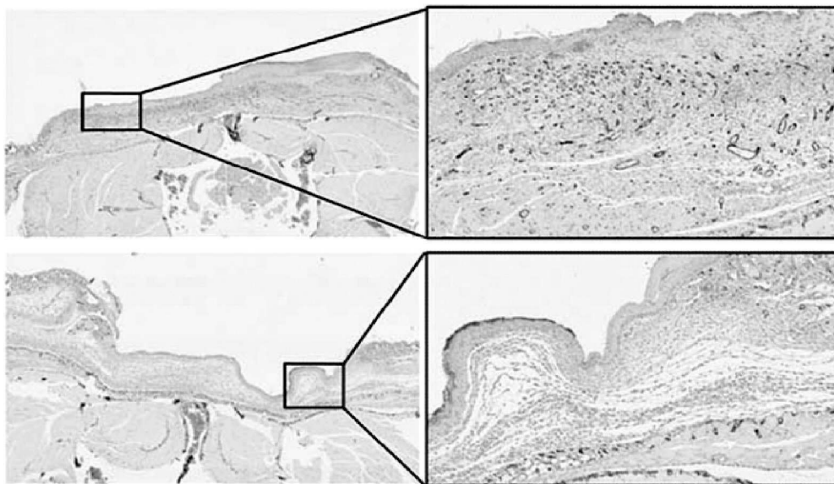
도면6c



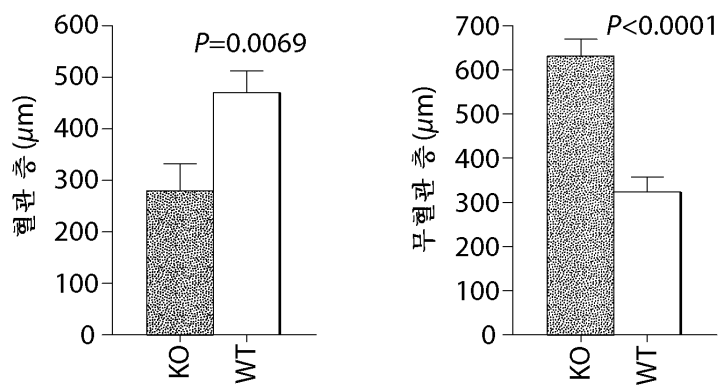
도면7a



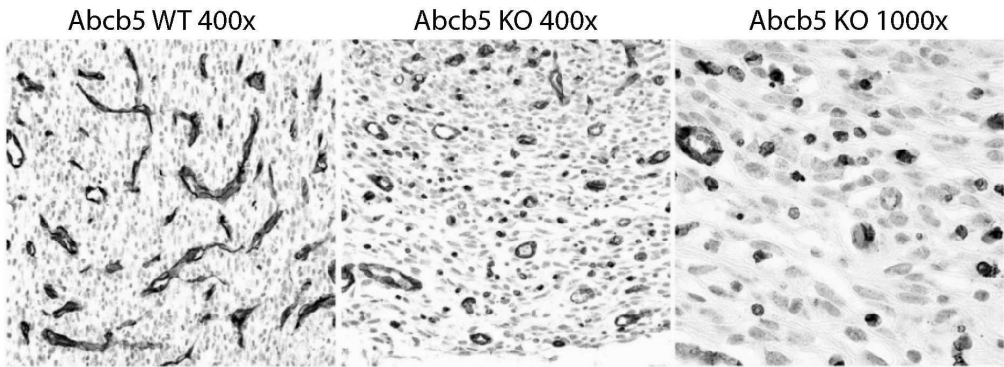
도면7b



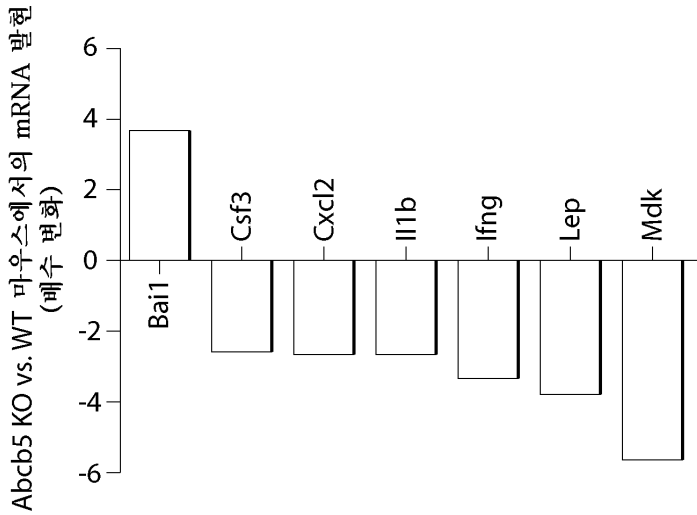
도면7c



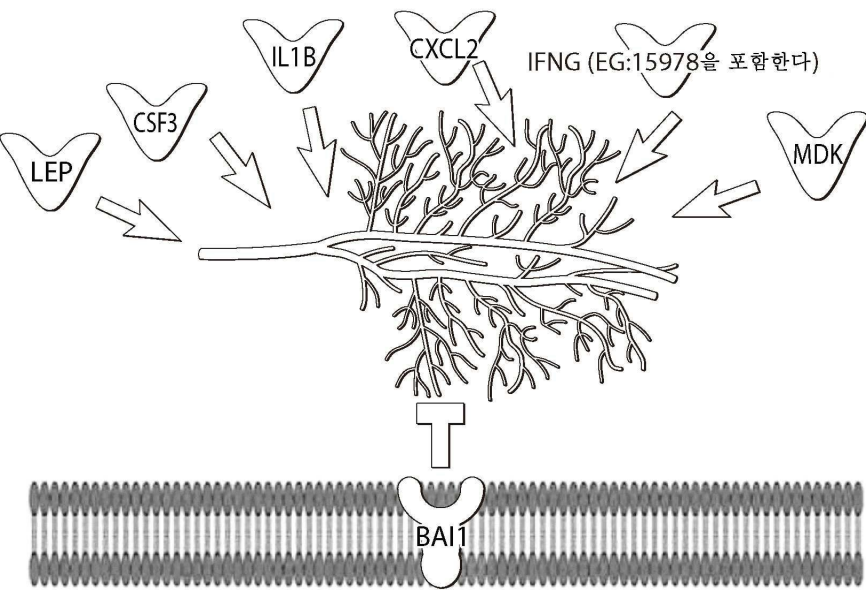
도면8



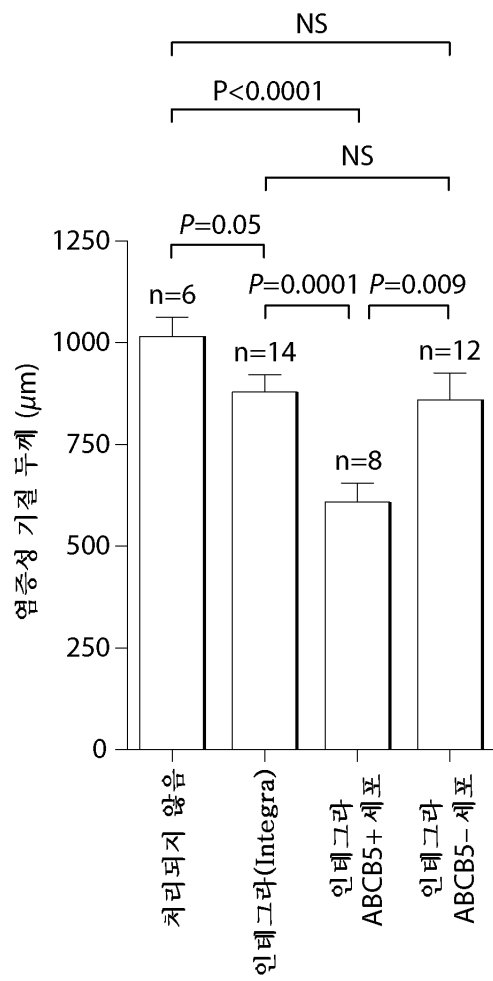
도면9a



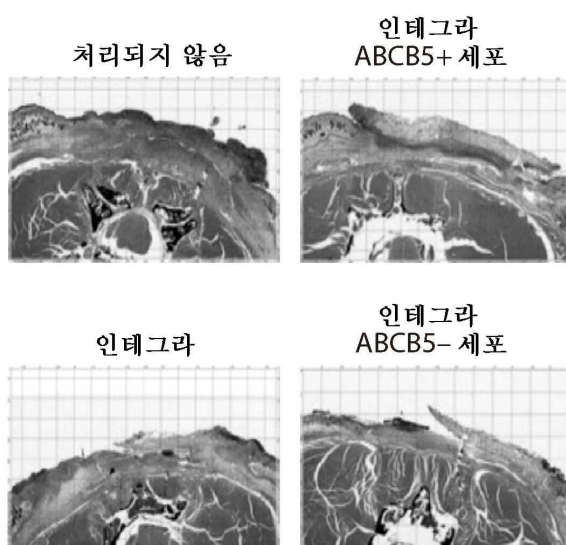
도면9b



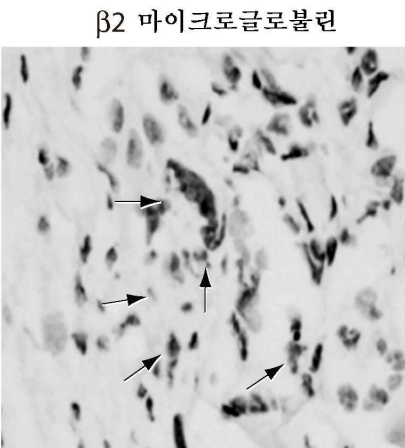
도면10a



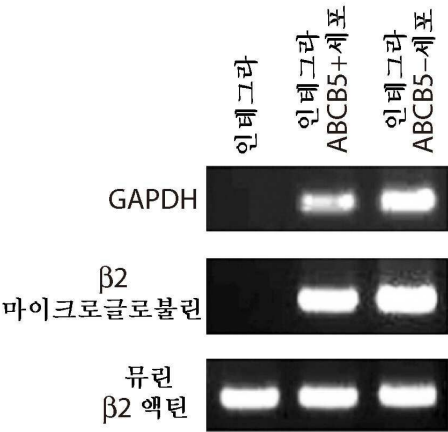
도면10b



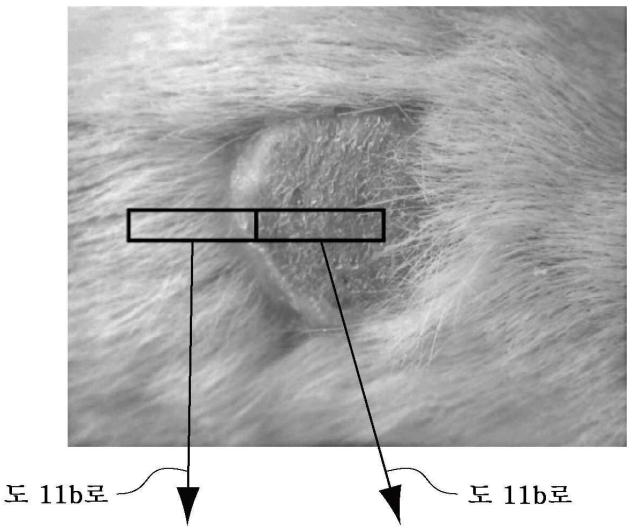
도면10c



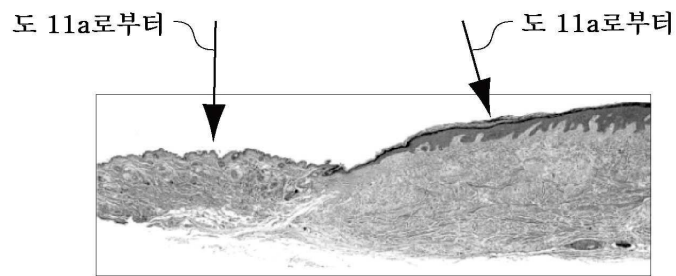
도면10d



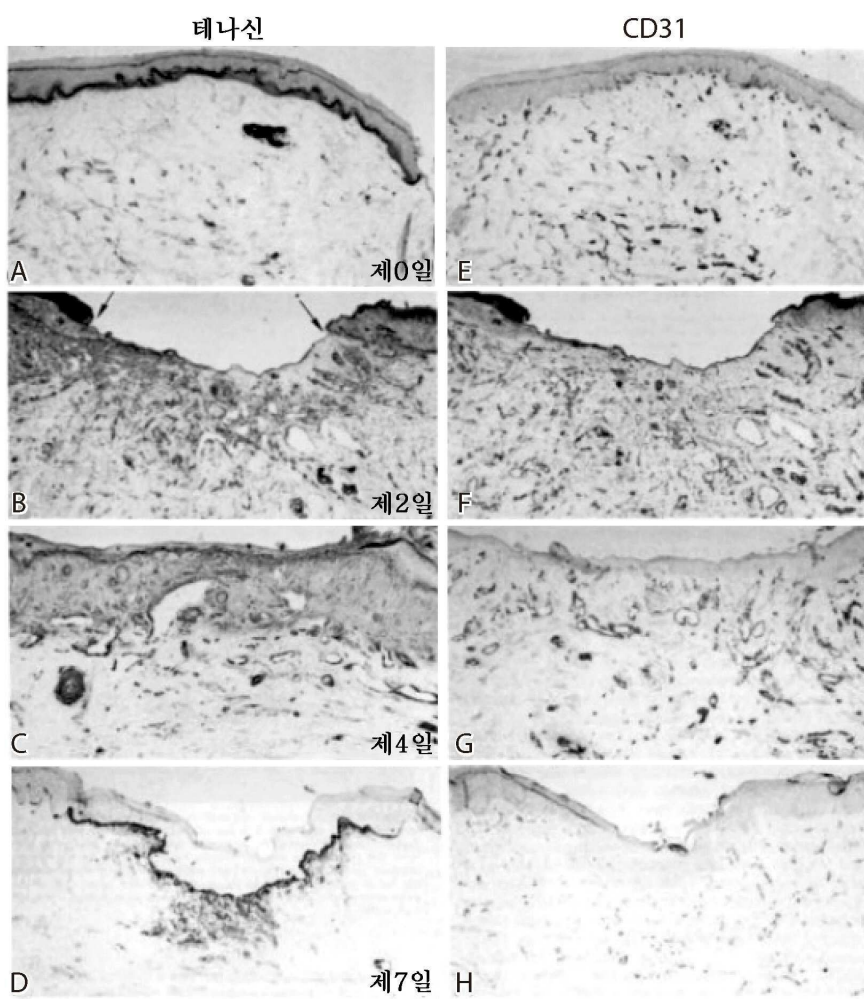
도면11a



도면11b



도면11c



도면12

