



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년04월26일
(11) 등록번호 10-1851925
(24) 등록일자 2018년04월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/44 (2015.01) A61K 38/36 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-7006120
(22) 출원일자(국제) 2011년08월10일
심사청구일자 2016년07월18일
(85) 번역문제출일자 2014년03월06일
(65) 공개번호 10-2014-0054206
(43) 공개일자 2014년05월08일
(86) 국제출원번호 PCT/US2011/047264
(87) 국제공개번호 WO 2013/022447
국제공개일자 2013년02월14일
(56) 선행기술조사문헌
JP2009522024 A*
WO2010006219 A2*
WO2008008229 A2
WO2004111207 A1
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
디퍼이 신데스 프로덕츠, 인코포레이티드
미국 매사추세츠 02767-0350 레이넘 패러마운트
드라이브 325
(72) 발명자
부엔수세소 채리토 에스.
미국 뉴저지주 08902 노쓰 브런즈윅 아파트먼트
1제이 피튜니아 드라이브 11
김 안토니 제이.
미국 뉴저지주 08540 프린스턴 해로게이트 씨클 7
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
장훈

전체 청구항 수 : 총 23 항

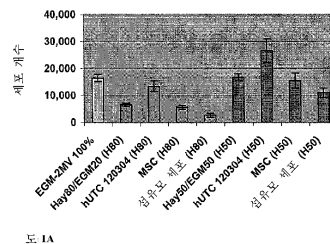
심사관 : 민경난

(54) 발명의 명칭 제대 조직-유래 세포를 사용한 말초 혈관 질환의 치료

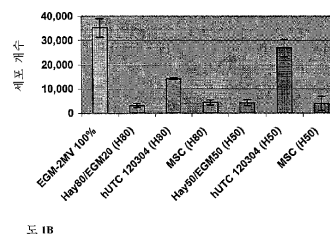
(57) 요약

말초 혈관 질환 환자에서 혈관신생을 자극 및 지원하고, 혈류를 향상시키고, 말초 허혈 사건에 의해 손상된 골격근을 재생, 회복 및 개선시키고, 허혈 손상으로부터 골격근을 보호하기 위한 제대 조직으로부터 유래된 세포를 사용하는 조성물 및 방법이 개시된다. 특히, 제대 유래 세포 및 피브린 글루를 사용한 말초 혈관 질환을 갖는 환자의 치료 방법이 개시된다.

대표도



도 1A



도 1B

(72) 발명자

다나라즈 스리데비

미국 뉴저지주 08869 래리턴 로더러 드라이브 3

아틀라스 로에

이스라엘 53101 기바타이임 피오 박스 213

누르 이스라엘

이스라엘 79860 모샤브 팀모립 하우스 넘버 277

메이들레르 로베르트

이스라엘 76447 레호보트 파인스 스트리트 6/9

바 릴리아나

이스라엘 76247 레호보트 메누하 베나할라 49/13

명세서

청구범위

청구항 1

말초 허혈을 갖는 환자에게서 재관류를 증진시키기 위한 약제로서,

상기 약제가 피브린 글루 (fibrin glue) 및 인간 제대 조직으로부터 수득되는 단리된 균질한 세포 집단을 포함하고; 상기 제대 조직에는 혈액이 없고; 상기 단리된 균질한 세포 집단은, 배양 중 자가-재생 및 증량 (expansion)이 가능하며, 분화 잠재력을 갖고, CD34, CD117 및 텔로머라제 (telomerase)를 발현하지 않는, 말초 허혈을 갖는 환자에게서 재관류를 증진시키기 위한 약제.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 단리된 세포 집단이 하기 특징들 중 하나 이상을 갖는, 약제:

- (a) 산화된 저밀도 리포단백질 수용체 1, 레티쿨론 (reticulon), 케모카인 수용체 리간드 3, 및 과립구 주화성 단백질을 발현하는 특징;
- (b) CD31 또는 CD45를 발현하지 않는 특징;
- (c) 인간 섬유모세포, 중간엽 줄기 세포 또는 장골능 골수 세포에 비하여 증가된 수준의 인터류킨 8 또는 레티쿨론 1을 발현하는 특징;
- (d) 골격근, 혈관평활근, 혈관주위세포 (pericyte) 또는 혈관 내피 표현형의 세포로 분화되는 잠재력을 갖는 특징; 및
- (e) CD10, CD13, CD44, CD73 및 CD90을 발현하는 특징.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 약제가 말초 허혈 부위에 투여하기 위해 제형화된, 약제.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 약제가 근육내 주사, 혈관내 주사 또는 근육 내의 지방 데포 (adipose depot)로의 주사에 의해 투여하기 위해 제형화된, 약제.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 약제가 국소 투여용으로 제형화된, 약제.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 약제가 주사, 주입, 환자에 이식된 장치에 의해, 또는 상기 약제를 함유하는 매트릭스 (matrix) 또는 스캐폴드 (scaffold)의 이식에 의해 투여하기 위해 제형화된, 약제.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 단리된 세포 집단이 시험관 내에서 유도되어, 투여 전에 골격근, 혈관근, 혈관주위세포 또는 혈관 내피 계통으로 분화하는, 약제.

청구항 8

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 세포 집단이 유전공학적으로 조작 (genetically engineered)되어, 말초 허혈의 치료를 촉진시키는 유전자 산물을 생성하는, 약제.

청구항 9

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 약제가 혈전방지제 (antithrombogenic agent), 면역억제제, 면역조절제, 혈관

신생유발제 (pro-angiogenic agent), 항세포사멸제 (antiapoptotic agent) 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 작용제 (agent)를 추가로 포함하는, 약제.

청구항 10

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 약제가 골격근 세포, 골격근 선구 세포, 혈관평활근 세포, 혈관평활근 선구 세포, 혈관주위세포, 혈관 내피 세포, 혈관 내피 선구 세포, 또는 다른 다능성 (multipotent) 또는 만능성 (pluripotent) 줄기 세포를 추가로 포함하는, 약제.

청구항 11

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 약제가 영양적 효과를 가하는, 약제.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 영양적 효과가 혈관 내피 세포의 증식인, 약제.

청구항 13

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 약제가 상기 말초 허혈의 부위로의 혈관 내피 세포 및 혈관 내피 선구 세포의 이동을 유도하는, 약제.

청구항 14

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 약제가 상기 말초 허혈의 부위로의 혈관 평활근 세포 및 혈관 평활근 선구 세포의 이동을 유도하는, 약제.

청구항 15

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 약제가 상기 말초 허혈의 부위로의 혈관주위세포의 이동을 유도하는, 약제.

청구항 16

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 피브린 글루가 피브리노겐 및 트롬빈을 포함하는, 약제.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 피브린 글루가 16 내지 24 IU/ml의 트롬빈 및 39.3 내지 60.7 mg/ml의 피브리노겐을 포함하는, 약제.

청구항 18

말초 허혈을 갖는 환자에게서 재관류를 증진시키기 위한 키트로서,

상기 키트는 피브리노겐, 트롬빈, 및 상기 질환을 치료하기 위한 유효량의, 인간 제대 조직으로부터 수득되는 단리된 균질한 세포 집단을 포함하며; 상기 제대 조직에는 혈액이 없고; 상기 단리된 균질한 세포 집단은, 배양 중 자가-재생 및 증량이 가능하며, 분화 잠재력을 갖고, CD34, CD117 및 텔로머라제를 발현하지 않는, 말초 허혈을 갖는 환자에게서 재관류를 증진시키기 위한 키트.

청구항 19

제18항에 있어서, 사용 설명서를 추가로 포함하는, 키트.

청구항 20

제18항 또는 제19항에 있어서, 피브리노겐 및 상기 단리된 균질한 세포 집단이 조성물 중에 존재하는, 키트.

청구항 21

제20항에 있어서, 트롬빈이 사용 직전에 상기 조성물에 첨가되는, 키트.

청구항 22

제18항에 있어서, 상기 키트가 16 내지 24 IU/ml의 트롬빈 및 39.3 내지 60.7 mg/ml의 피브리노겐을 포함하는, 키트.

청구항 23

제18항, 제19항 또는 제22항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 단리된 세포 집단이 하기의 특징들 중 하나 이상을 갖는, 키트:

- (a) 산화된 저밀도 리포단백질 수용체 1, 레티쿨론, 케모카인 수용체 리간드 3, 및 과립구 주화성 단백질을 발현하는 특징;
- (b) CD31 또는 CD45를 발현하지 않는 특징;
- (c) 인간 섬유모세포, 중간엽 줄기 세포 또는 장골능 골수 세포에 비하여 증가된 수준의 인터류킨 8 또는 레티쿨론 1을 발현하는 특징;
- (d) 골격근, 혈관평활근, 혈관주위세포 또는 혈관 내피 표현형의 세포로 분화되는 잠재력을 갖는 특징;
- (e) CD10, CD13, CD44, CD73 및 CD90을 발현하는 특징.

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원과의 상호 참조

[0002] 본 출원은 본 명세서에 전문이 참조로 포함되는 미국 가특허 출원 제60/754,366호 (출원일: 2005년 12월 28일)에 대한 이익을 주장하는 미국 특허 출원 제11/617,346호 (출원일: 2006년 12월 28일)의 일부계속출원이다.

[0003] 본 발명은 말초 혈관 질환 환자, 특히 말초 허혈이 있는 환자를 위한 세포 기반의 또는 재생 치료법의 분야에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 혈관신생을 자극 및 지원하고, 혈류를 향상시키고, 말초 허혈 사건에 의해 손상된 골격근을 재생, 회복 및 개선시키고, 허혈 손상으로부터 골격근을 보호하는 능력을 갖는 제대 조직으로부터 유래된 세포를 제공한다.

배경 기술

[0004] 특허, 공개된 특허 출원, 기술 논문 및 학술 논문을 비롯한 다양한 간행물이 본 명세서 전체에 걸쳐 인용된다. 이들 인용된 간행물 각각은 이들 전문이 본 명세서에 참조로 포함된다.

[0005] 말초 혈관 질환 (PVD)은 특히, 팔다리 및 심장에서 먼 영역에서 혈관의 죽상경화성 폐색으로부터 야기되어, 폐색 부근의, 그리고 이로부터 하류의 조직에 대한 혈류 감소 및 불충분한 산소 관류로 이어질 수 있다. PVD는 장골 혈관, 대퇴 및 오금 혈관, 및 세골하 혈관에서 빈번하게 나타나며, 이의 영향은 혈전, 색전 또는 외상에

의해 악화될 수 있다. 미국에서, 특히 노인 집단과 당뇨병 집단 중에 대략 800만 내지 1200만명의 개체가 PVD를 앓고 있는 것으로 추산된다.

- [0006] PVD의 흔한 징후는 팔과 다리 및 손발의 경련 (cramping), 저림, 위약감, 근육 피로, 팔다리 및 손발의 통증, 팔다리 및 손발의 체온저하, 손발의 변색, 건성 또는 인설이 있는 (scaly) 피부 및 고혈압을 포함한다. 가장 통상적인 징후는 절뚝거림, 또는 폐색된 혈관의 하류의 근육에서의 통증 감각, 긴장감 및 피로감이며, 이는 도보와 같은 일부 형태의 운동 동안 발생하나 휴식 기간 후에 스스로 해결된다.
- [0007] 병태생리학에서, 폐색된 혈관은 폐쇄 부위에서, 그리고 폐쇄보다 먼 부위에서, 조직의 허혈을 야기한다. 허혈은 일반적으로 말초 허혈로 지칭되며, 이것이 심장에서 먼 위치에서 발생하는 것을 의미한다. 허혈의 중증도는 폐쇄의 크기 및 개수, 폐쇄가 근육 또는 장기 근처에 위치하는지 여부 및 충분한 과잉의 혈관구조가 존재하는지 여부의 함수이다. 보다 중증의 경우에, 허혈은 이환 (affected) 조직의 사망을 야기하며, 이환 팔다리의 절단 또는 심지어는 환자의 사망을 야기할 수 있다.
- [0008] 보다 중증의 PVD의 경우의 현행의 치료 방법은 화학치료 요법, 혈관성형술, 스텐트의 삽입, 재건 수술, 우회로 이식술, 이환 조직의 절제 또는 절단을 포함한다. 불행히도, 많은 환자에 있어서, 이러한 시술은 오직 제한된 성공만을 보이며, 많은 환자는 증상 또는 징후의 악화를 경험한다.
- [0009] 현재, 분열 및 분화할 수 있는 줄기 세포, 또는 평활근 및 골격근 세포를 비롯한 다른 공급원으로부터의 근육 세포 중 어느 하나를 사용하여, 조직 손상의 회복 또는 역행을 보조하는데 관심이 있다. 줄기 세포의 이식은 표적 조직을 재구성하는 임상 도구로서 이용될 수 있으며, 이에 의해, 생리적 및 해부학적 기능성을 회복시킬 수 있다. 줄기 세포 기술의 적용은 광범위한 것이며, 이는 조직 공학 (tissue engineering), 유전자 치료 전달, 및 세포 치료제, 즉, 생물학적 치료제 (biotherapeutic agent)를 생성하거나 이를 함유하는 외인적으로 공급된 생 세포 또는 세포 성분을 통한 생물학적 치료제의 표적 위치로의 전달을 포함한다 (개관에 대해서는, 문헌[Tresco, P. A. et al., (2000) *Advanced Drug Delivery Reviews* 42:2-37] 참조). 줄기 세포의 동정은 재생 의학을 위한 특정 세포 유형의 선택적 생성을 목표로 하는 연구를 촉진시켰다.
- [0010] 줄기 세포 기술의 치료적 잠재력의 실현의 하나의 장애물은 충분한 수의 줄기 세포를 얻는 것의 어려움이었다. 배아 또는 태아 조직은 줄기 세포의 하나의 공급원이다. 배아 줄기 세포 및 선구 세포는 인간을 비롯한 다수의 포유류 종으로부터 단리되었으며, 몇몇의 이러한 세포 유형은 자가-재생 및 증량과, 다수의 상이한 세포 계통으로의 분화가 가능한 것으로 밝혀졌다. 그러나, 배아 또는 태아 공급원으로부터의 줄기 세포의 유래는 많은 윤리적인 그리고 도덕적인 쟁점을 불러 일으켰으며, 이는 다른 다능 (multipotent) 또는 만능 (pluripotent) 세포의 공급원을 동정함으로써 피하는 것이 바람직하다.
- [0011] 분만후 조직, 예를 들어 제대 및 태반이 줄기 세포의 대안적인 공급원으로서 관심이 생기었다. 예를 들어, 태반의 관류 또는 제대혈 또는 조직으로부터의 수집에 의한 줄기 세포의 회수 방법이 개시되었다. 이들 방법으로부터의 줄기 세포 조달의 한계는 부적당한 부피의 제대혈 또는 수득된 세포의 양과, 이들 공급원으로부터 수득된 세포 집단에 있어서의 이질성, 또는 세포 집단의 특징의 결여였다.
- [0012] 다수의 골격근, 혈관주위세포 (pericyte) 또는 혈관 계통으로 분화되는 능력을 갖는 이러한 세포의 실질적으로 균질한 집단의 신뢰성 있으며, 널리 특성화되고 풍부한 공급이 특히 PVD 환자에서 말초 허혈 사건 후에, 골격근 회복, 재생 및 개선을 위한, 혈관신생의 자극 및/또는 지원을 위한, 그리고 혈류의 개선을 위한 다양한 진단 응용 및 치료 응용에서 유리할 것이다.

발명의 내용

- [0013] 본 발명의 일 태양은 말초 혈관 질환을 갖는 환자의 치료 방법을 특징으로 하고, 상기 방법은 말초 혈관 질환을 치료하기 위한 유효량의 제대 조직-유래 세포를 환자에게 투여하는 단계를 포함하며, 여기서, 제대 조직-유래 세포에는 실질적으로 혈액이 없는 인간 제대 조직으로부터 유래되고, 세포는 배양 중 자가-재생 및 증량이 가능하며, 적어도 골격근, 혈관평활근 (vascular smooth muscle), 혈관주위세포 또는 혈관 내피 표현형의 세포로의 분화 잠재력을 가지며; 세포가 성장을 위해 L-발린을 필요로 하고, 적어도 약 5% 산소에서 성장할 수 있으며; 세포가 하기의 특징 중 적어도 하나를 추가로 포함한다: (a) 배양 중 적어도 약 40회의 배가 잠재력; (b) 코팅 조직 배양 용기가 젤라틴, 라미닌, 콜라겐, 폴리오르니틴, 비트로넥틴 또는 피브로넥틴의 코팅을 포함하는, 코팅 또는 비코팅 조직 배양 용기 상의 부착 및 증량; (c) 조직 인자, 비멘틴 (vimentin) 및 알파-평활근 액틴 중 적어도 하나의 생성; (d) CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-알파, PD-L2 및 HLA-A,B,C 중 적어도 하나의 생성; (e) 유세포분석기에 의해 검출시 CD31, CD34, CD45, CD80, CD86, CD117, CD141, CD178, B7-H2, HLA-G 및

HLA-DR, DP, DQ 중 적어도 하나의 생성의 결여; (f) 섬유모세포, 중간엽 줄기 세포, 또는 장골능 골수 세포 (iliac crest bone marrow cell)인 인간 세포에 비해, 인터류킨 8; 레티쿨론 (reticulon) 1; 케모카인 (C-X-C 모티프) 리간드 1 (흑색종 성장 자극 활성, 알파); 케모카인 (C-X-C 모티프) 리간드 6 (과립구 주화성 단백질 2); 케모카인 (C-X-C 모티프) 리간드 3; 종양 괴사 인자, 알파-유도 단백질 3을 암호화하는 유전자 중 적어도 하나에 대하여 증가된 유전자의 발현; (g) 섬유모세포, 중간엽 줄기 세포, 또는 장골능 골수 세포인 인간 세포에 비해, 쇼트 스테처 호메오박스 (short stature homeobox) 2; 열 충격 27 kDa 단백질 2; 케모카인 (C-X-C 모티프) 리간드 12 (기질 세포-유래 인자 1); 엘라스틴 (관상부대동맥협착증, 윌리엄스-보이렌 증후군 (Williams-Beuren syndrome)); 호모 사피엔스 (*Homo sapiens*) mRNA; cDNA DKFZp586M2022 (클론 DKFZp586M2022 유래); 중간엽 호메오 박스 2 (성장 정지-특이적 호메오 박스); 사인 오쿨리스 (sine oculis) 호메오박스 상동체 1 (드로소필라 (*Drosophila*)); 크리스탈린 (crystallin), 알파 B; 디셰벨드 어소시에이티드 액티베이터 오브 모포게네시스 (disheveled associated activator of morphogenesis) 2; DKFZP586B2420 단백질; 시밀러 투 뉴랄린 (similar to neuralin) 1; 테트라넥틴 (tetranectin) (플라스미노겐 결합 단백질); src 상동성 3 (src homology three; SH3) 및 시스테인 풍부 도메인; 콜레스테롤 25-하이드록실라제; runt-관련 전사 인자 3; 인터류킨 11 수용체, 알파; 프로콜라겐 C-엔도펩티다제 인핸서 (enhancer); 프리즐드 상동체 (frizzled homolog) 7 (드로소필라); 가상 유전자 BC008967; 콜라겐, 제VIII형, 알파 1; 테나신 C (헥사브라키온); 이로쿼이스 (iroquois) 호메오박스 단백질 5; 헤파에스틴 (hephaestin); 인테그린, 베타 8; 시냅스 소포 당단백질 2; 신경 모세포종, 종양 형성 억제 1; 인슐린-유사 성장 인자 결합 단백질 2, 36kDa; 호모 사피엔스 cDNA FLJ12280 fis, 클론 MAMMA1001744; 사이토카인 수용체-유사 인자 1; 칼슘 중간체/작은 전도도의 칼슘-활성화 채널, 하위 패밀리 N, 구성원 4; 인테그린, 베타 7; PDZ-결합 모티프를 갖는 전사 동시-활성자 (TAZ); 사인 오쿨리스 호메오박스 상동체 2 (드로소필라); KIAA1034 단백질; 소포-관련 막 단백질 5 (미오브레빈 (myobrevin)); EGF-함유 피불린 (fibulin)-유사 세포외 매트릭스 단백질 1; 초기 성장 반응 3; 디스탈-레스 호메오 박스 (distal-less homeo box) 5; 가상 단백질 FLJ20373; 알도-케토 리덕타제 패밀리 1, 구성원 C3 (3-알도 하이드록시스테로이드 데하이드로게나제, 제II형); 바이글리칸; PDZ-결합 모티프를 갖는 전사 동시-활성자 (TAZ); 피프로넥틴 1; 프로엔케팔린 (proenkephalin); 인테그린, 베타-유사 1 (EGF-유사 반복 도메인을 가짐); 호모 사피엔스 mRNA 전장 삽입 cDNA 클론 유로이미지 (EUROIMAGE) 1968422; EphA3; KIAA0367 단백질; 나트륨이노 펩티드 수용체 C/구아닐레이트 사이클라제 C (심방 나트륨이노 펩티드 수용체 C); 가상 단백질 FLJ14054; 호모 사피엔스 mRNA; cDNA DKFZp564B222 (클론 DKFZp564B222 유래); BCL2/아데노바이러스 E1B 19kDa 상호작용 단백질 3-유사; AE 결합 단백질 1; 사이토크롬 c 옥시다제 서브유닛 VIIa형 폴리펩티드 1 (근육); 시밀러 투 뉴랄린 1; B 세포 전좌 유전자 1; 가상 단백질 FLJ23191; 및 DKFZp586L151을 암호화하는 유전자 중 적어도 하나에 대하여 감소된 유전자 발현; (h) MCP-1, IL-6, IL-8, GCP-2, HGF, KGF, FGF, HB-EGF, BDNF, TPO, MIP1b, RANTES 및 TIMP1 중 적어도 하나의 분비; 및 (i) ELISA에 의해 검출시, TGF-베타2, ANG2, PDGFbb, MIP1a 및 VEGF 중 적어도 하나의 분비의 결여.

- [0014] 특정 실시형태에서, 말초 혈관 질환은 말초 허혈이다. 특정 실시형태에서, 세포는 시험관 내에서 유도되어, 투여 전에 골격근, 혈관평활근, 혈관주위세포 또는 혈관 내피 계통 세포로 분화한다. 다른 실시형태에서, 세포는 유전공학적으로 조작되어, 말초 혈관 질환의 치료를 촉진시키는 유전자 산물을 생성한다.
- [0015] 상기 방법의 일부 실시형태에서, 세포는 골격근 세포, 골격근 선구 세포 (progenitor cell), 혈관평활근 세포, 혈관평활근 선구 세포, 혈관주위세포, 혈관 내피 세포, 혈관 내피 선구 세포, 또는 다른 다능성 또는 만능성 줄기 세포를 포함할 수 있는 적어도 하나의 다른 세포 유형과 함께 투여된다. 다른 세포 유형이 제대 조직-유래 세포와 동시에, 또는 그 전에 또는 그 후에 투여될 수 있다.
- [0016] 다른 실시형태에서, 세포는 예를 들어, 혈전방지제, 항염증제, 면역억제제, 면역조절제, 혈관신생유발제 (pro-angiogenic) 또는 항세포사멸제 (antiapoptotic agent)일 수 있는 적어도 하나의 다른 작용제 (agent)와 함께 투여된다. 다른 작용제는 제대 조직-유래 세포와 동시에, 또는 그 전에, 또는 그 후에 투여될 수 있다.
- [0017] 세포는 바람직하게는 말초 허혈 부위에 또는 말초 허혈 부위의 근위에 투여될 수 있으나, 또한 말초 허혈의 원위의 부위에 투여될 수도 있다. 이들은 주사, 주입, 환자에 이식된 장치 또는 세포를 함유하는 매트릭스 (matrix) 또는 스캐폴드 (scaffold)의 이식에 의해 투여될 수 있다. 세포는 환자의 골격근, 혈관평활근 또는 혈관 내피 상에 영양적 (trophic) 효과, 예를 들어, 증식 (proliferation)을 가할 수 있다. 세포는 골격근 세포, 혈관평활근 세포, 혈관 내피 세포, 골격근 선구 세포, 혈관주위세포, 혈관평활근 선구 세포 또는 혈관 내피 선구 세포의 말초 혈관 질환 부위(들), 예를 들어, 말초 허혈로의 이동을 유도할 수 있다.
- [0018] 본 발명의 다른 태양은 약제학적으로 허용가능한 담체 및 상기 기술된 제대 조직-유래 세포, 또는 이러한 제대

조직-유래 세포로부터 제조된 제제를 포함하는, 말초 혈관 질환을 갖는 환자를 치료하기 위한 약제학적 조성물 및 키트를 특징으로 한다. 일부 바람직한 실시형태에서, 제제는 FGF 및 HGF를 포함한다. 약제학적 조성물 및 키트는 상기 약술된 바와 같이 본 발명의 방법을 실시하기 위해 설계되고/거나 제형화된다.

- [0019] 본 발명의 다른 태양에 따르면, 상기 기술된 방법은 제대 조직-유래 세포로부터 제조된 제제를 사용하여 실시될 수 있으며, 여기서, 제제는 제대 조직-유래 세포의 세포 용해물, 제대 조직-유래 세포의 세포외 매트릭스 또는 제대 조직-유래 세포가 성장하였던 조정 배지 (conditioned medium)를 포함한다. 이러한 제제가 FGF 및 HGF를 포함하는 것이 바람직하다.
- [0020] 본 발명의 다른 태양은 제대 조직-유래 세포의 세포 용해물, 세포외 매트릭스 또는 조정 배지를 포함하는 제제를 함유하는 약제학적 조성물 및 키트를 특징으로 한다.
- [0021] 본 발명의 일 실시형태는 피브린 글루 (fibrin glue), 및 질환을 치료하기 위한 유효량의, 인간 제대 조직으로부터 수득되는 단리된 균질한 세포 집단을 포함하는 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하며, 제대 조직에는 실질적으로 혈액이 없고, 단리된 균질한 세포 집단은 배양 중 자가-재생 및 증량이 가능하며, 분화 잠재력을 갖고, CD117 및/또는 텔로머라제 (telomerase)를 발현하지 않는 말초 혈관 질환을 갖는 환자의 치료 방법이다. 단리된 세포 집단은 또한 하기의 특징 중 하나 이상을 가질 수 있다:
- [0022] (a) 산화된 저밀도 리포단백질 수용체 1, 레티쿨론, 케모카인 수용체 리간드 3, 및/또는 과립구 주화성 단백질을 발현하는 특징;
- [0023] (b) CD31, CD34 또는 CD45를 발현하지 않는 특징;
- [0024] (c) 인간 섬유모세포, 중간엽 줄기 세포 또는 장골능 골수 세포에 비하여 증가된 수준의 인터류킨 8 또는 레티쿨론 1을 발현하는 특징;
- [0025] (d) 적어도 골격근, 혈관평활근, 혈관주위세포 또는 혈관 내피 표현형의 세포로 분화되는 잠재력을 갖는 특징; 및
- [0026] (d) CD10, CD13, CD44, CD73 및 CD90을 발현하는 특징.
- [0027] 일 실시형태에서, 말초 혈관 질환은 말초 허혈이다. 약제학적 조성물은 말초 허혈의 부위에 투여된다. 다른 실시형태에서, 약제학적 조성물은 국소 투여된다. 일 실시형태에서, 약제학적 조성물은 주사, 주입, 환자에 이식된 장치에 의해 또는 약제학적 조성물을 함유하는 매트릭스 또는 스캐폴드의 이식에 의해 투여된다. 대안적인 실시형태에서, 약제학적 조성물은 근육내 주사 및 근육 내의 지방 세포로의 주사에 의해 투여된다. 다른 실시형태에서, 약제학적 조성물은 혈액순환으로 직접 유입되지 않도록 사이 공간 (interstitial space)으로의 주사에 의해 투여된다. 단리된 세포 집단은 시험관 내에서 유도되어, 투여 전에 골격근, 혈관근, 혈관주위세포 또는 혈관 내피 계통 세포로 분화할 수 있다. 세포 집단은 또한 유전공학적으로 조작되어, 말초 혈관 질환의 치료를 촉진시키는 유전자 산물을 생성할 수 있다. 선택적으로, 조성물은 혈전방지제, 면역억제제, 면역조절제, 혈관신생유발제, 항세포사멸제 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 작용제를 추가로 포함한다. 대안적으로, 조성물은 적어도 하나의 다른 세포 유형 (예를 들어, 골격근 세포, 골격근 선구 세포, 혈관평활근 세포, 혈관평활근 선구 세포, 혈관주위세포, 혈관 내피 세포, 혈관 내피 선구 세포, 또는 다른 다능성 또는 만능성 줄기 세포)을 추가로 포함한다. 일 실시형태에서, 약제학적 조성물은 영양적 효과 (예를 들어, 혈관 내피 세포의 증식)를 가한다. 다른 실시형태에서, 약제학적 조성물은 혈관 내피 세포 및/또는 혈관 내피 선구 세포의 말초 질환의 부위로의 이동을 유도한다. 대안적인 실시형태에서, 약제학적 조성물은 혈관평활근 세포 및/또는 혈관평활근 선구 세포의 말초 질환의 부위로의 이동을 유도한다. 다른 실시형태에서, 약제학적 조성물은 말초 혈관 질환의 부위로의 혈관주위세포의 이동을 유도한다. 일 실시형태에서, 피브린 글루는 피브리노겐 및 트롬빈을 포함한다. 다른 실시형태에서, 피브린 글루는 약 16 내지 약 24 IU/ml의 트롬빈 및 약 39.3 내지 약 60.7 mg/ml의 피브리노겐을 포함한다.
- [0028] 본 발명의 다른 실시형태는 피브린 글루 (예를 들어, 피브리노겐 및 트롬빈을 포함하는 조성물), 및 질환을 치료하기 위한 유효량의, 인간 제대 조직으로부터 수득되는 단리된 균질한 세포 집단을 투여하는 단계를 포함하며, 제대 조직에는 실질적으로 혈액이 없고, 단리된 균질한 세포 집단은 배양 중 자가-재생 및 증량이 가능하며, 분화 잠재력을 갖고, CD117 및/또는 텔로머라제를 발현하지 않는 말초 혈관 질환을 갖는 환자의 치료 방법이다. 단리된 세포 집단은 다음 중 하나 이상을 포함하는 다른 특징을 가질 수 있다:
- [0029] (a) 산화된 저밀도 리포단백질 수용체 1, 레티쿨론, 케모카인 수용체 리간드 3, 및/또는 과립구 주화성 단백질을

을 발현하는 특징;

[0030] (b) CD31, CD34 또는 CD45를 발현하지 않는 특징;

[0031] (c) 인간 섬유모세포, 중간엽 줄기 세포 또는 장골능 골수 세포에 비하여 증가된 수준의 인터류킨 8 또는 레티칼론 1을 발현하는 특징;

[0032] (d) 적어도 골격근, 혈관평활근, 혈관주위세포 또는 혈관 내피 표현형의 세포로 분화되는 잠재력을 갖는 특징; 및

[0033] (d) CD10, CD13, CD44, CD73 및 CD90을 발현하는 특징.

[0034] 일 실시형태에서, 말초 혈관 질환은 말초 허혈이며, 임의로, 피브린 글루 및 세포 집단은 말초 허혈의 부위에 투여된다. 주사, 주입, 환자에 이식된 장치에 의해 또는 세포를 함유하는 매트릭스 또는 스캐폴드의 이식에 의해 투여되는 것을 포함하는 다양한 투여 경로가 사용될 수 있다. 일 실시형태에서, 세포 집단 및 피브린 글루는 국소로 (예를 들어, 근육내 주사 및 근육 내의 지방 테포로의 주사에 의해) 투여된다. 다른 실시형태에서, 세포 및 피브린 글루는 혈액순환으로 직접 유입되지 않도록 사이 공간으로의 주사에 의해 투여된다. 임의로, 단리된 세포 집단은 시험관 내에서 유도되어, 투여 전에 골격근, 혈관근, 혈관주위세포 또는 혈관 내피 계통으로 분화한다. 세포 집단은 또한 유전공학적으로 조작되어, 말초 혈관 질환의 치료를 촉진시키는 유전자 산물을 생성할 수 있다. 일 실시형태에서, 상기 방법은 혈전방지제, 면역억제제, 면역조절제, 혈관신생유발제, 항세포사멸제 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 작용제의 투여를 추가로 포함한다. 다른 실시형태에서, 상기 방법은 적어도 하나의 다른 세포 유형 (예를 들어, 골격근 세포, 골격근 선구 세포, 혈관평활근 세포, 혈관평활근 선구 세포, 혈관주위세포, 혈관 내피 세포, 혈관 내피 선구 세포, 또는 다른 다능성 또는 만능성 줄기 세포)의 투여를 추가로 포함한다. 일 실시형태에서, 세포 집단은 영양적 효과 (예를 들어, 혈관 내피 세포의 증식)를 가한다. 세포 집단은 말초 질환의 부위로의 혈관 내피 세포 및/또는 혈관 내피 선구 세포의 이동을 유도할 수 있다. 대안적으로, 세포 집단은 말초 질환의 부위로의 혈관평활근 세포 및/또는 혈관평활근 선구 세포의 이동을 유도할 수 있다. 또한, 세포 집단은 말초 혈관 질환의 부위로의 혈관주위세포의 이동을 유도할 수 있다. 피브린 글루는 피브리노겐 및 트롬빈을 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 피브린 글루는 인간 제대 조직으로부터 수득되는 단리된 균질한 세포 집단과 동시에, 또는 그 전에, 또는 그 후에 투여된다. 다른 실시형태에서, 피브린 글루는 약 16 내지 약 24 IU/ml의 트롬빈 및 약 39.3 내지 약 60.7 mg/ml의 피브리노겐을 포함한다.

[0035] 본 발명의 다른 실시형태는 피브리노겐, 트롬빈, 및 질환을 치료하기 위한 유효량의, 인간 제대 조직으로부터 수득되는 단리된 균질한 세포 집단을 포함하는 말초 혈관 질환을 갖는 환자의 치료용 키트이며, 여기서, 제대 조직에는 실질적으로 혈액이 없고, 단리된 균질한 세포 집단은 배양 중 자가-재생 및 증량이 가능하며, 분화 잠재력을 갖고, CD117 및/또는 텔로머라제를 발현하지 않는다. 키트는 사용 설명서를 추가로 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 피브리노겐 및 단리된 균질한 세포 집단은 트롬빈이 사용 직전에 첨가될 수 있는 조성물로 제공된다. 단리된 세포 집단은 또한 다음 중 하나 이상을 포함하는 다른 특징을 가질 수 있다:

[0036] (a) 산화된 저밀도 리포단백질 수용체 1, 레티칼론, 케모카인 수용체 리간드 3, 및/또는 과립구 주화성 단백질을 발현하는 특징;

[0037] (b) CD31, CD34 또는 CD45를 발현하지 않는 특징;

[0038] (c) 인간 섬유모세포, 중간엽 줄기 세포 또는 장골능 골수 세포에 비하여 증가된 수준의 인터류킨 8 및 레티칼론 1을 발현하는 특징;

[0039] (d) 적어도 골격근, 혈관평활근, 혈관주위세포 또는 혈관 내피 표현형의 세포로 분화되는 잠재력을 갖는 특징; 및

[0040] (d) CD10, CD13, CD44, CD73 및 CD90을 발현하는 특징.

[0041] 일 실시형태에서, 키트는 약 16 내지 약 24 IU/ml의 트롬빈 및 약 39.3 내지 약 60.7 mg/ml의 피브리노겐을 포함한다. 일 실시형태에서, 키트는 피브린 및 인자 XII를 포함하는 피브리노겐 성분 및 트롬빈 및 칼슘을 포함하는 트롬빈 성분을 포함한다.

[0042] 본 발명의 다른 특징 및 이점은 하기의 상세한 설명 및 실시예를 참조하여 이해될 것이다.

도면의 간단한 설명

[0043]

<도 1>

도 1은 내피 세포의 증식에 대한 hUTC lot#120304, MSC 및 섬유모세포의 영향을 보여준다. 공동-배양 배지 (헤이플릭 (Hayflick) 80% + EGM-2MV 20% 또는 헤이플릭 50% + EGM-2MV 50%) 중에, 내피 세포를 24-웰 조직 배양 접시의 저부에, 5000개 세포/cm² (10,000개 세포/웰)의 밀도로 접종하고, hUTC lot#120304, MSC 또는 섬유모세포를 트랜스웰 인서트 (transwell insert) 내측에 5000개 세포/cm² (1,650개 세포/인서트)의 밀도로 접종하였다. 7일의 공동-배양 후에, 세포를 수집하고, 구아바 (Guava) (등록 상표) 기기를 사용하여 계수하였다. 내피 세포를 또한 양성 대조군으로서 EGM-2MV 배지 중에 유지시켰다. a, HUVEC. b, HCAEC. c, HIAEC.

<도 2>

도 2는 내피 세포의 증식에 대한 hUTC lot#120304 및 중화 항체의 영향을 보여준다. 공동-배양 배지 (헤이플릭 50% + EGM-2MV 50%) 중에, HUVEC 또는 HCAEC를 24-웰 조직 배양 접시의 저부에, 5000개 세포/cm² (10,000개 세포/웰)의 밀도로 접종하고, hUTC lot#120304를 트랜스웰 인서트 내측에 5000개 세포/cm² (1,650개 세포/인서트)의 밀도로 접종하였다. FGF (7 µg/ml), HGF (1 µg/ml) 또는 VEGF (1µg/ml)에 대한 중화 항체도 또한 이 때 첨가하였다. 7일의 공동-배양 후에, 세포를 수집하고, 구아바 (등록 상표) 기기를 사용하여 계수하였다. 내피 세포를 또한 양성 대조군으로서 EGM-2MV 배지 중에 유지시켰다. 단독의 성장 인자 및 성장 인자 + 중화 항체로 처리된 세포가 나타나 있다. a 및 b, HUVEC. c 및 d, HCAEC.

<도 3>

도 3은 HUVEC의 증식에 대한 hUTC lot#120304 세포 용해물 및 중화 항체의 영향을 보여준다. HUVEC를 EGM-2MV 배지 중에 8시간 동안, 24-웰 조직 배양 접시의 저부에 5000개 세포/cm² (10,000개 세포/웰)의 밀도로 접종하였다. 이어서, 세포를 0.5% FBS를 함유하며 성장 인자가 없는 0.5 ml의 EGM-2MV 배지 중에서의 하룻밤 인큐베이션에 의해 혈청-기아처리 (serum-starved)하였다. 그 후, FBS, 신선하게 제조된 hUTC lot#120304 세포 용해물, 및 FGF에 대한 중화 항체 (7 µg/ml) 또는 HGF에 대한 중화 항체 (1 µg/ml)를 첨가하였다. 4일의 배양 후에, 세포를 수집하고, 구아바 (등록 상표) 기기를 사용하여 계수하였다. 밝은 회색 막대, 배지 대조군. 중간 회색 막대, 62.5 µg의 단백질을 함유하는 용해물과 인큐베이션시킨 HUVEC. 진한 회색 막대, 125 µg의 단백질을 함유하는 용해물과 인큐베이션시킨 HUVEC.

<도 4>

도 4는 내피 세포의 이동에 대한 hUTC 및 MSC의 영향을 보여준다. 공동-배양 배지 (헤이플릭 50% + EGM-2MV 50%) 중에, HUVEC 또는 HCAEC를 트랜스웰 인서트 내측에 5000개 세포/cm² (23,000개 세포/인서트)의 밀도로 접종하고, hUTC lot#120304 또는 MSC를 6-웰 조직 배양 접시의 저부에 5000개 세포/cm² (48,000개 세포/웰)의 밀도로 접종하였다. 7일의 공동-배양 후에, 트랜스웰 인서트의 아래측에 존재하는 세포를 수집하고, 구아바 (등록 상표) 기기를 사용하여 계수하였다. 또한, 내피 세포를 대조군으로서 EGM-2MV 배지 중에 유지시켰다. a, HUVEC. b, HCAEC.

<도 5>

도 5는 내피 세포의 이동에 대한 hUTC lot#120304 및 중화 항체의 영향을 보여준다. 공동-배양 배지 (헤이플릭 50% + EGM-2MV 50%) 중에, HUVEC 또는 HCAEC를 트랜스웰 인서트 내측에 5000개 세포/cm² (23,000개 세포/인서트)의 밀도로 접종하고, hUTC lot#120304를 6-웰 조직 배양 접시의 저부에 5000개 세포/cm² (48,000개 세포/웰)의 밀도로 접종하였다. FGF에 대한 중화 항체 (7 µg/ml) 또는 HGF에 대한 중화 항체 (1 µg/ml)를 이 때 첨가하였다. 7일의 공동-배양 후에, 트랜스웰 인서트의 아래측에 존재하는 세포를 수집하고, 구아바 (등록 상표) 기기를 사용하여 계수하였다. 또한, 내피 세포를 대조군으로서 EGM-2MV 배지 중에 유지시켰다. a, HUVEC. b, HCAEC.

<도 6>

도 6은 실시예 5에 개시된 연구에 대한 NSG 마우스를 사용한 실험으로부터의 레이저 도플러 (laser doppler) 관류 데이터를 보여준다. 데이터는 평균 ± sem으로 표현된다. 데이터 점의 아이덴티티는 범례에 나타나 있다. 괄호 안의 수는 (1) 적절한 대조군에 비한 P<0.001; (2) 피브린이 없는 hUTC 세포에 비한 P<0.05이다.

<도 7>

도 7은 실시예 5에 개시된 연구에 대한 누드 (nude) 마우스를 사용한 실험으로부터의 레이저 도플러 관류를 보여준다. 데이터는 평균 $\pm$ sem으로 표현된다. 데이터 점의 아이덴티티는 범례에 나타나 있다. 괄호 안의 수는 (1) 적절한 대조군에 비한 $P < 0.001$; (2) 피브린이 없는 hUTC 세포에 비한 $P < 0.05$ 이다.

<도 8>

도 8은 실시예 6에 개시된 연구에 대한 전신 (IV), 국소 (IM), 및 국소 + 피브린 글루 전달을 비교하는 레이저 도플러 관류 데이터를 보여준다. 데이터는 평균 $\pm$ sem으로 표현된다.

<도 9>

도 9는 실시예 6에 개시된 연구에 대한 국소 (IM) 전달된 피브린 글루 중의 상이한 hUTC의 용량을 보여주는 레이저 도플러 관류 데이터를 보여준다. 데이터는 평균 $\pm$ sem으로 표현된다.

<도 10>

도 10은 실시예 6에 개시된 연구에 대한 손상 후 14일에, 전신 (IV), 국소 (IM), 및 국소 + 피브린 글루 전달을 비교하는 레이저 도플러 관류 데이터를 보여준다. 데이터는 명료성을 위해 평균으로 나타나 있다.

<도 11>

도 11은 실시예 7에 개시된 연구에 대한 레이저 도플러 관류 데이터를 보여준다. 데이터 점의 아이덴티티는 범례에 나타나 있다. *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$.

<도 12>

도 12는 실시예 7에 개시된 연구에 대한 21일까지 생존한 마우스의 비-허혈 팔다리에 비한 허혈 팔다리의 모세혈관 밀도를 보여준다.

<도 13>

도 13은 실시예 7에 개시된 연구에 대한 21일까지 생존한 마우스의 비-허혈 팔다리에 비한 허혈 팔다리의 세동맥 밀도를 보여준다.

본 명세서 및 특허청구범위 전체에 걸쳐 다양한 용어가 사용된다. 이러한 용어는 달리 지시되지 않으면 본 발명이 속하는 기술 분야에서의 그의 일상적인 의미로 주어져야 한다. 다른 특정하게 정의된 용어는 본 명세서에 제공된 정의와 일치하는 방식으로 해석된다.

줄기 세포는 자가 재생할 뿐 아니라 분화하여, 자가 재생 선구 세포, 비재생 선구 세포, 및 최종 분화 세포를 비롯한 자손 세포 (progeny cell)를 생성하는 단일 세포의 능력에 의해 정의되는 미분화 세포이다. 줄기 세포는 또한 다수의 배엽층 (내배엽, 중배엽 및 외배엽)으로부터 다양한 세포 계통의 기능성 세포로 시험관 내에서 (in vitro) 분화하는 그들의 능력, 및 이식 후 다수의 배엽층의 조직이 생기게 하며 배반포 내로의 주사 후, 전부는 아니라 하더라도 대부분의 조직에 실질적으로 기여하는 그의 능력을 특징으로 한다.

줄기 세포는 그들의 발생 잠재력에 따라, (1) 전능성 (totipotent); (2) 만능성; (3) 다능성; (4) 소기능성 (oligopotent); 및 (5) 단일기능성 (unipotent)으로 분류된다. 전능성 세포는 모든 배아 및 배외 세포 유형이 생기게 할 수 있다. 만능성 세포는 모든 배아 세포 유형이 생기게 할 수 있다. 다능성 세포는 세포 계통의 서브셋이 생기게 할 수 있으나, 모두 특정 조직, 기관 또는 생체 시스템 내에 있는 것들을 포함한다. 예를 들어, 조혈모세포 (HSC)는 HSC (자가-재생), 혈구-제한 소기능성 선구세포 및 혈액의 보통의 성분인 모든 세포 유형 및 요소 (예를 들어, 혈소판)를 포함하는 자손을 생성할 수 있다. 소기능성인 세포는 다능성 줄기 세포보다 더 제한된 서브셋의 세포 계통이 생기게 할 수 있다. 단일기능성인 세포는 단일 세포 계통 (예를 들어, 정자발생 줄기 세포)이 생기게 할 수 있다.

줄기 세포는 또한 그들이 획득되는 공급원에 기초하여 분류된다. 성체 줄기 세포는 일반적으로 다수의 분화된 세포 유형을 포함하는 조직에서 관찰되는 다능성 미분화 세포이다. 성체 줄기 세포는 스스로 재생할 수 있다. 정상 환경 하에서, 이는 또한 분화하여, 이것이 기원하는 조직의 특수 세포 유형, 및 아마도 다른 조직 유형을 제공할 수 있다. 배아 줄기 세포는 배반포-단계 배아의 내세포집단으로부터의 만능성 세포이다. 태아 줄기 세포는 태아 조직 또는 막으로부터 기원하는 것이다. 산후 줄기 세포는 실질적으로 출산 후에 입수할 수 있는 배외 조직, 예를 들어, 태반 및 제대로부터 기원하는 다능성 또는 만능성 세포이다. 이들 세포는 급속한 증식 및 많은 세포 계통으로의 분화 잠재력을 포함하는 만능성 줄기 세포에 특징적인 특징을 보유하는 것으로 밝혀졌다.

산후 줄기 세포는 혈액-유래 (예를 들어, 제대혈로부터 수득되는 것들과 같음)이거나 비-혈액-유래 (예를 들어, 제대 및 태반의 비-혈액 조직으로부터 수득되는 것들과 같음)일 수 있다.

배아 조직은 전형적으로, 배아 (이는 인간에서 수정으로부터 약 6주의 발생까지의 기간을 지칭한다)로부터 기원하는 조직으로 정의된다. **태아** 조직은 인간에서 약 6주의 발생으로부터 분만까지의 기간을 말하는 태아로부터 기원하는 조직을 말한다. **배외** 조직은 배아 또는 태아와 관련이 있으나 이로부터 기원하지 않은 조직이다. 배외 조직은 배외막 (융모막, 양막, 난황난 및 요막), 제대 및 태반 (그 자체가 융모막 및 모계 바다탈락막으로부터 형성됨)을 포함한다.

분화는 특화되지 않은 ("미수입된") 또는 덜 특화된 세포가 예를 들어, 신경 세포 또는 근육 세포와 같은 특화된 세포의 특징을 획득하는 과정이다. **분화된** 세포는 세포의 계통 내에서 보다 특화된 ("수입된") 위치를 차지한 것이다. 분화 과정에 적용되는 경우, **수입된**이라는 용어는 분화 경로에서, 통상적인 환경하에서 특정 세포 유형 또는 세포 유형의 서브셋으로 계속 분화할 것이며, 통상적인 환경하에서 상이한 세포 유형으로 분화할 수 없거나 덜 분화된 세포 유형으로 돌아갈 수 없는 시점까지 진행된 세포를 말한다. **탈분화**는 세포가 세포의 계통 내의 덜 특화된 (또는 수입된) 위치로 돌아가는 과정을 말한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 세포의 계통은 세포의 유전, 즉, 어떤 세포로부터 왔는지 그리고 어떤 세포를 발생시킬 수 있는지를 규정한다. 세포의 계통은 세포를 발생과 분화의 유전적 체계 내에 둔다.

넓은 의미에서, **선구 세포**는 그 자체보다 더 분화되지만, 선구세포의 풀 (pool)을 보충하는 능력을 유지하는 자손을 생성하는 능력을 갖는 세포이다. 이 정의에 의하면, 줄기 세포 그 자체는 또한, 최종 분화된 세포에 대하여 더 가까운 선구세포가 그러하듯이, 선구 세포이다. 본 발명의 세포를 지칭하는 경우, 하기에 더욱 상세히 기술된 바와 같이, 이러한 넓은 정의의 **선구 세포**가 사용될 수 있다. 좁은 의미로, 선구 세포는 종종 분화 경로에서의 중간체인 세포로 정의되며, 다시 말하면, 이는 줄기 세포로부터 발생하고, 성숙 세포 유형 또는 세포 유형의 서브셋의 생성에서의 중간체이다. 이러한 유형의 선구 세포는 일반적으로 자가 재생할 수 없다. 따라서, 이러한 유형의 세포가 본 명세서에 지칭되는 경우, 이는 **비-재생 선구 세포** 또는 **중간 선구** 또는 **전구 세포**로 지칭될 것이다.

본 명세서에 사용되는 바와 같이, **중배엽**, **외배엽** 또는 **내배엽 계통으로 분화된**이라는 어구는 세포가 각각 특정 중배엽, 외배엽 또는 내배엽 계통으로 수입되는 것을 지칭한다. 중배엽 계통으로 분화되거나 특정 중배엽 세포가 생기게 하는 세포의 예에는 지방발생 (adipogenic), 연골발생 (chondrogenic), 심장발생 (cardiogenic), 피부발생 (dermatogenic), 조혈 (hematopoietic), 혈관발생 (hemangiogenic), 근육발생 (myogenic), 신장발생 (nephrogenic), 비뇨생식발생 (urogenitogenic), 골발생 (osteogenic), 심막발생 (pericardiogenic) 또는 기질 세포가 포함되나 이들에 한정되지 않는다. 외배엽 계통으로 분화되는 세포의 예에는 상피 세포, 신경발생 (neurogenic) 세포 및 신경아교 세포가 포함되나 이들에 한정되지 않는다. 내배엽 계통으로 분화되는 세포의 예에는 흉막발생 (pleurigenic) 세포, 간발생 (hepatogenic) 세포, 장의 내층이 생기게 하는 세포 및 췌장발생 (pancreogenic) 및 내장발생 (splanchnogenic) 세포가 생기게 하는 세포가 포함되나 이들에 한정되지 않는다.

본 발명에 사용되는 세포는 일반적으로 **제대 조직-유래 세포 (UTC 또는 hUTC)**로 지칭되는 것으로 지칭된다. 이들은 또한 때때로, **제대-유래 세포 (UDC)**로도 지칭된다. 또한, 세포는 줄기 또는 선구 세포인 것으로 기술될 수 있으며, 후자의 용어는 넓은 의미로 사용된다. 용어 **유래**는 세포를 이들의 생물학적 공급원으로부터 수득하고 성장시키거나 또는 다르게는 시험관 내에서 조작하는 것을 지칭하는 것으로 사용된다 (예를 들어, 성장 배지에서 배양하여, 집단을 증량시키고/거나 세포주를 생성). 제대 줄기 세포의 **시험관 내** 조작 및 본 발명의 제대-유래 세포의 독특한 특징은 하기에 상세히 기술된다.

혈관주위세포는 루제 (Rouget) 세포 또는 벽 세포 (mural cell)로도 본 발명이 속하는 기술 분야에 공지되어 있고, 전형적으로 미세혈관의 혈관 기저막 내에 매립되어 관찰되는 세포를 지칭하며 (문헌 [Armulik A *et al.* (2005) *Circ. Res.* 97:512-23]), 이는 다른 것들 중 특히, 내피 세포와의 연통 (communication)/신호전달, 혈관수축, 혈관확장, 혈류의 조절, 혈관구조 형성 및 발생, 혈관신생 및 내피 분화 및 성장 정지에서 역할을 수행하는 것으로 여겨진다 (문헌 [Bergers G *et al.* (2005) *Neuro-Oncology* 7:452-64]).

다양한 용어를 사용하여 배양 중 세포를 기술한다. **세포 배양물**은 일반적으로 살아있는 유기체로부터 취해지고, 조절된 조건 하에서 성장된 세포를 지칭한다 ("배양 중" 또는 "배양된"). **일차 세포 배양물**은 제1 계대배양 (subculture) 전에 유기체 (들)로부터 직접 취한 세포, 조직 또는 기관의 배양물이다. 세포를 세포 성장 및/또는 분열을 용이하게 하는 조건 하에 성장 배지 중에 둘 때, 세포는 배양 중 증량되어서 더욱 큰 세포 집단을 생성한다. 세포가 배양 중 증량될 때, 세포 증식 속도는 때때로 세포 개수의 배가에 필요한 시간의 양

으로 측정된다. 이는 "배가 시간"으로 지칭된다.

"세포주"는 일차 세포 배양물의 1회 이상의 계대배양에 의해 형성되는 세포 집단이다. 계대배양의 각각의 라운드(round)는 *계대* (passage)로 지칭된다. 세포가 계대배양될 때, 세포는 "계대된" 것으로 칭해진다. 세포의 특정 집단, 또는 세포주는 때로는 그가 계대된 횟수를 말하거나 또는 상기 횟수에 의해 특성화된다. 예를 들어, 10회 계대된 세포 배양 집단은 P10 배양물로서 지칭될 수 있다. 일차 배양물, 즉 조직으로부터 세포를 단리한 후 첫 번째 배양물을 P0으로 표기한다. 제1 계대배양 후에, 세포를 2차 배양물로 기술한다 (P1 또는 계대 1). 제2 계대배양 후에, 세포는 3차 배양물 (P2 또는 계대 2)이 되는 등등이다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 계대 기간 동안 많은 집단의 배가가 있을 수 있으며; 이에 따라 배양물의 집단 배가 수는 계대 수보다 크다는 것을 이해할 것이다. 계대 사이의 기간 동안 세포의 증량 (즉, 집단 배가 수)은 접종 밀도, 기재, 배지, 성장 조건 및 계대 사이 시간을 포함하지만 이들에 한정되지 않는 많은 인자에 좌우된다.

조정 배지는 특정 세포 또는 세포 집단이 배양된 다음 제거된 배지이다. 세포가 배지 중에 배양되는 때, 세포들은 다른 세포에 영양적 지원 (trophic support)을 제공할 수 있는 세포 인자를 분비할 수 있다. 이러한 영양적 인자에는 호르몬, 사이토카인, 세포외 매트릭스 (ECM), 단백질, 소포, 항체 및 과립이 포함되나 이들에 한정되지 않는다. 세포 인자를 함유하는 배지는 조정 배지이다.

일반적으로, 영양적 인자는 세포의 생존, 성장, 증식 및/또는 성숙을 촉진하거나 또는 세포의 활성 증가를 자극하는 물질로 정의된다.

배양된 척추동물 세포를 지칭하는 경우, 용어 노화 (senescence) (또한, 복제성 노화 (replicative senescence) 또는 세포성 노화 (cellular senescence))는 유한 (finite) 세포 배양물이 되게 하는 특성, 다시 말하면, 이들이 유한 집단 배가 수 (때때로 *헤이플릭 한계* (Hayflick's limit)로 지칭)를 넘어서 성장할 수 없음을 말한다. 세포 노화는 섬유모세포-유사 세포를 사용하여 먼저 설명되었지만, 배양 중 성공적으로 성장할 수 있는 대부분의 통상의 인간 세포 유형이 세포 노화를 겪는다. 상이한 세포 유형의 시험관 내 수명은 다양하나, 최대의 수명은 전형적으로, 100회 미만의 집단 배가이다 (이는 배양 중의 모든 세포가 노화되고, 이에 따라 배양물이 분열될 수 없게 되는 배가 수이다). 노화는 연대 시간에 좌우되지 않으며, 오히려, 배양물이 겪는 세포 분열 수 또는 집단 배가 수에 의해 측정된다. 따라서, 필수 성장 인자를 제거함으로써 휴지기 (quiescent)가 되게 한 세포는 성장 인자가 재도입되는 경우 성장 및 분열을 재개할 수 있고, 이후에, 지속적으로 성장한 동등한 세포와 동일한 배가 수를 이행한다. 유사하게, 세포가 다양한 집단 배가 수 후에 액체 질소 중에 동결된 다음 해동되고 배양되는 경우, 이들 세포는 배양 중 동결되지 않고 유지된 세포와 실질적으로 동일한 배가 수를 겪는다. 노화 세포는 사멸 또는 사멸 중인 세포가 아니며; 이들 노화 세포는 실제로 예정된 세포사 (세포사멸)에 저항성이며, 3년만큼 긴 기간 동안 이들의 미분열 상태로 유지된다. 이들 세포는 매우 생생하며, 대사 작용이 활성이지만, 이들은 분열하지 않는다. 노화 세포의 미분열 상태는 아직까지 임의의 생물학적, 화학적 또는 바이러스 작용제에 의해 역전되는 것으로 관찰되지 않았다.

본 명세서에 사용되는 성장 배지라는 용어는 일반적으로 계대 조직-유래 세포의 배양에 충분한 배지를 말한다. 특히, 본 발명의 세포를 배양하기 위한 현재 바람직한 한 배지는 돌베코 변형 필수 배지 (Dulbecco's Modified Essential Media, DMEM)를 포함한다. 특히 바람직한 것은 DMEM-저농도 글루코스 (low glucose) (DMEM-LG) (미국 캘리포니아주 칼스배드 소재의 인비트로젠 (Invitrogen))이다. DMEM-LG는 바람직하게는 혈청, 가장 바람직하게는 우태아혈청 또는 인간 혈청이 보충된다. 전형적으로, 15% (v/v) 우태아혈청 (예를 들어, 규명된 우태아혈청, 미국 유타주 로간 소재의 하이클론 (Hyclone))이 항생제/항진균제 (antimycotic) (바람직하게는 100 유닛/밀리리터의 페니실린, 100 밀리그램/밀리리터의 스트렙토마이신 및 0.25 마이크로그램/밀리리터의 암포테리신 B; 미국 캘리포니아주 칼스배드 소재의 인비트로젠), 및 0.001% (v/v)의 2-머캅토에탄올 (미국 미주리주 세인트루이스 소재의 시그마 (Sigma))과 함께 첨가된다. 일부 경우에, 상이한 성장 배지가 사용되거나, 상이한 보충물이 제공되며, 이들은 보통 성장 배지에 대한 보충물로서 문서로 설명되어 있다. 특정 화학적-규명 배지에서, 세포는 제시되는 혈청이 전혀 없이 성장할 수 있다. 이러한 경우에, 세포는 특정 성장 인자를 필요로 할 수 있으며, 이는 배지에 첨가되어 세포를 지원하고 지속시킬 수 있다. 무혈청 배지에서 성장시키기 위해 첨가되어야 하는 현재 바람직한 인자는 bFGF, EGF, IGF-I 및 PDGF 중 하나 이상을 포함한다. 더욱 바람직한 실시형태에서, 2개, 3개 또는 4개 모두의 인자가 무혈청 또는 화학적 규명 배지에 첨가된다. 다른 실시형태에서, LIF가 무혈청 배지에 첨가되어, 세포의 성장을 지원하거나 향상시킨다.

또한, 본 발명과 관련하여, 본 명세서에 사용되는 바와 같은 표준 성장 조건이라는 용어는 5% CO₂를 포함하는

표준 대기 중 37℃에서의 세포의 배양을 말한다. 상대 습도는 약 100%로 유지된다. 상기 조건이 배양에 유용하지만, 이러한 조건이 세포를 배양하기 위한 본 발명이 속하는 기술 분야에서 이용가능한 옵션을 인식할 통상의 기술자에 의해 달라질 수 있음이 이해되어야 한다.

유효량이라는 용어는 특정 생물학적 결과를 달성하기에 효과적인, 본 명세서에 기술된 바와 같은 화합물, 물질 또는 조성물의 농도 또는 양을 말한다. 이러한 결과는 말초 허혈 환자에서의 골격 조직의 재생, 회복 또는 개선, 혈류의 향상, 및/또는 혈관신생의 자극 및/또는 지원을 포함하나 이들에 한정되지 않는다. 이러한 유효 활성은 예를 들어, 본 발명의 세포 및/또는 조성물을 말초 허혈 환자에게 투여함으로써 달성될 수 있다. 생체 내에서 환자에 투여되는 바와 같은 제대 조직-유래 세포에 관하여, 유효량은 수백개 이하 만큼 적은 양부터 수백만 이상 만큼 많은 양까지의 범위일 수 있다. 특정 실시형태에서, 유효량은 10^3 내지 10^{11} , 더욱 구체적으로, 적어도 약 10^4 개 세포의 범위일 수 있다. 투여되어야 하는 세포의 개수는 의생물학자에게 친숙한 다른 인자들 중 특히, 치료할 크기 또는 총 부피/표면적, 및 치료할 영역의 위치에 대한 투여 부위의 근접성을 포함하나 이들에 한정되지 않는 치료할 장애의 세부 사항에 따라 달라질 것임이 인식될 것이다.

치료하다, 치료하는 또는 치료라는 용어는 징후의 경감, 완화, 감소와 같은, 또는 상해 (injury), 병태 (pathology) 또는 증상을 환자가 더욱 견딜만하게 만들거나, 퇴화 또는 쇠퇴 속도를 늦추거나, 퇴화의 최종점을 덜 쇠약하게 만들거나, 대상체의 신체적 또는 정신적 웰빙 (well-being)을 개선시키거나, 생존 기간을 연장시키는 임의의 객관적인 또는 주관적인 파라미터를 비롯한, 상해, 병태 또는 증상의 악화 또는 개선의 임의의 성공 또는 성공 지표를 말한다. 징후의 치료 또는 개선은 객관적인 또는 주관적인 파라미터를 기반으로 할 수 있으며; 이는 신체 검사, 신경학적 검사 및/또는 정신건강 평가의 결과를 포함한다.

유효 기간 (또는 시간) 및 유효 조건이라는 용어는 작용제 또는 약제학적 조성물이 그의 의도된 결과를 달성하는데 필요하거나 바람직한 소정의 기간 또는 다른 제어가능한 조건 (예를 들어, 시험관 내 방법을 위한 온도, 습도)을 말한다.

환자 또는 대상체라는 용어는 본 명세서에서 상호교환가능하게 사용되며, 약제학적 또는 치료적 조성물로 치료되거나, 본 명세서에 기술된 방법에 따라 치료되는 동물, 바람직하게는 포유류, 더욱 바람직하게는 인간을 말한다.

허혈은 혈관구조의 임의의 수축 또는 폐쇄에 의해 야기되는 임의의 신체 기관, 조직 또는 부분으로의 혈액 공급의 임의의 감소 또는 중지를 말한다. 허혈 에피소드 또는 허혈 사건은 본 명세서에서 상호교환가능하게 사용되며, 임의의 일시적 또는 영구적 허혈 기간을 지칭한다. 말초 허혈은 혈관구조의 임의의 수축 또는 폐쇄에 의해 야기되는 심장을 배제한 임의의 신체 기관, 조직 또는 부분으로의 혈액 공급의 임의의 감소 또는 중지를 말한다. 말초 혈관 질환 (PVD)은 심장 및 뇌 외측의 혈관의 질환을 말한다. 이는 종종 혈액을 팔다리로 운반하는 말초 혈관의 협착을 포함하며, 이는 2가지 유형의 순환 장애, 다시 말하면, (1) 혈관을 협착시키는 단기간 경련을 포함하는 기능적 말초 혈관 질환; 및 (2) 예를 들어, 염증 또는 지방 차단에 의해 야기되는 것과 같은 혈관의 구조적 변화를 포함하는 유기 말초 혈관 질환으로부터 야기된다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, PVD는 또한 레이노병, 간헐적 절뚝거림 및 중증 팔다리 허혈 (critical limb ischemia)을 포함한다.

약제학적으로 허용가능한 담체 또는 배지라는 용어는 생물학적 상용성 담체 또는 배지라는 용어와 상호교환가능하게 사용될 수 있으며, 치료적으로 투여할 세포 및 다른 작용제와 상용성일 뿐 아니라, 타당한 의학적 판단의 범위 내에서, 타당한 이익/위험 비에 상응하는 과도한 독성, 자극, 알러지 반응 또는 기타 합병증 없이, 인간 및 동물의 조직과의 접촉에 적절한 시약, 세포, 화합물, 물질, 조성물 및/또는 투여형을 말한다. 본 명세서에 더욱 상세히 기술되는 바와 같이, 본 발명에 사용하기에 적절한 약제학적으로 허용가능한 담체는 액체, 반고체 (예를 들어, 겔) 및 고체 물질 (예를 들어, 본 발명이 속하는 기술 분야에 공지되어 있으며, 본 명세서에 보다 상세히 기술되어 있는 세포 스캐폴드 및 매트릭스, 튜브 시트 및 기타 이러한 물질)을 포함한다. 이들 반고체 및 고체 물질은 체 내의 분해에 저항성이도록 설계되거나 (비-생분해성) 또는 이들은 체 내에서 분해되도록 설계될 수 있다 (생분해성, 생부식성 (bioerodable)). 생분해성 물질은 추가로 생흡수성 (bioresorbable 또는 bioabsorbable)일 수 있으며, 다시 말하면, 이는 용해되고 체액으로 흡수되거나 (수용성 임플란트가 일 예이다), 분해되고, 다른 물질로의 전환, 또는 천연 경로를 통한 분해 및 제거에 의해 궁극적으로 신체로부터 제거될 수 있다. 생분해율은 체 내에 이식되는 때의 원하는 방출률에 따라 달라질 수 있다. 매트릭스는 또한 바람직하게는 새로이 성장한 골격근, 혈관주위세포, 혈관평활근 또는 혈관 내피 조직에 의해 대체될 때까지 일시적 스캐폴드로 소용된다. 따라서, 일 실시형태에서, 매트릭스는 제대 조직-유래 세포와 함께 사용되는 다른 작용제의 지속적인 방출을 가능하게 하며, 환자에서 조직 성장을 발생시킬 구조를 제공할 수 있다. 다른 실시형태

에서, 매트릭스는 단순히 조직을 발생하기 위한 일시적 스캐폴드를 제공한다. 매트릭스는 미립자 형태이거나 (직경 10 마이크로미터 초과인 마크로입자 (macroparticle) 또는 직경 10 마이크로미터 이하인 마이크로입자 (microparticle)), 또는 구조적으로 안정한 3차원 이식물의 형태일 수 있다 (예를 들어, 스캐폴드). 이식물은 예를 들어, 정육면체, 원통, 튜브, 블록, 필름, 시트 또는 적절한 해부학적 형태일 수 있다.

몇몇 용어는 본 명세서에서 세포 또는 조직 이식과 관련하여 사용된다. 용어 자가 전달 (autologous transfer), 자가 이식, 자가이식편 등은 이식 공여자가 이식 수여자이기도 한 이식을 말한다. 용어 동종 전달 (allogeneic transfer), 동종 이식, 동종이식편 등은 이식 공여자가 이식 수여자와 동일한 종이나, 그 수여자는 아닌 이식을 말한다. 공여자 세포가 조직학적으로 수여자와 매치되는 세포 이식물은 때때로 동계 전달 (syngeneic transfer)로 지칭된다. 용어 이종 전달 (xenogeneic transfer), 이종 이식, 이종이식편 등은 이식 공여자가 이식 수여자와 상이한 종인 이식을 말한다.

본 명세서에 기술되는 이의 다양한 실시형태에서, 본 발명은 제대 조직으로부터 유래되는 세포 집단 및 선구 세포를 사용하는 말초 혈관 질환의 치료를 위한 방법 및 약제학적 조성물을 특징으로 한다. 이들 방법 및 약제학적 조성물은 혈관신생을 자극 및 지원하고, 혈류를 향상시키고, 말초 허혈 사건에 의해 손상된 골격근을 재생, 회복 및 개선시키고/거나, 허혈 손상으로부터 골격근을 보호하기 위해 설계된다. 본 발명의 약제학적 제제 및 방법에 사용되는 세포, 세포 집단, 및 세포 용해물, 조정 배지 등을 포함하는 제제는 미국 특허 출원 공개 제 2005/0058631호 및 제2005/0054098호, 및 또한 본 명세서에서 하기에 상세히 기술되어 있다.

본 발명의 일 실시형태는 본 명세서에 기술된 바와 같은 제대 조직-유래 세포를 사용한 말초 혈관 질환의 치료 방법이다. 본 발명의 일 실시형태에서, 세포는 약제학적 조성물의 일부로 제공된다.

본 발명의 다른 실시형태에서, 말초 혈관 질환의 치료 방법은 피브린 글루 (피브린 실란트 (fibrin sealant)로도 공지되어 있음)를 사용한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "피브린 글루"라는 용어는 피브린 응괴 (fibrin clot)를 생성하기 위해 사용되는 임의의 생물학적 또는 합성 물질을 포함할 것이다. 일 실시형태에서, 피브린 글루는 세포 이식을 위한 스캐폴드이다. 최적으로, 피브린 글루는 충분한 기간 동안 체 내에서 이의 분해를 견디는 능력을 갖는다. 일 실시형태에서, 피브린 글루는 피브리노겐 (인자 I), 예를 들어, 재조합 피브리노겐 또는 혈액으로부터 정제된 피브리노겐 및 트롬빈을 포함한다. 다른 실시형태에서, 피브린 글루는 피브리노겐, 트롬빈, 인자 XIII 및 임의로, 칼슘, 아프로티닌, 피브로넥틴 및 플라스미노겐 중 하나 이상을 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 피브린 글루는 피브리노겐, 트롬빈, 및 임의로, 인자 XIII 및 항-피브린용해제 (예를 들어, 트라넥삼산), 안정화제 (예를 들어, 아르기닌 하이드로클로라이드), 칼슘, 아프로티닌, 피브로넥틴 및 플라스미노겐 중 하나 이상을 포함한다. 대안적인 실시형태에서, 피브린 글루에는 첨가되는 프로테아제 저해제가 실질적으로 없다. 또 다른 실시형태에서, 피브린 글루는 BAC2 (피브리노겐) 및 트롬빈을 포함한다. 대안적인 실시형태에서, 피브린 글루는 에비셀 (EVICEL) (등록 상표) 피브린 글루 (에비셀 (등록 상표) 피브린 실란트 (인간), 옴릭스 파마슈티컬즈 (Omrix Pharmaceuticals)) (트롬빈 및 BAC2 (피브리노겐))이다. 일 실시형태에서, 피브린 글루는 사용 전에 피브린 (및 임의로 인자 XIII)을 포함하는 하나의 성분 및 트롬빈 (및 임의로 칼슘)을 포함하는 다른 성분과 혼합되는 다성분계로 제공될 수 있다. 다른 실시형태에서, 피브린 글루는 미국 가출원 제61/372,929호 (출원일: 2010년 8월 12일)에 기술된 바와 같은 스캐폴드이며, 이것이 피브린 스캐폴드의 설명, 특성화 및 용도에 관한 것임에 따라 이의 개시내용의 전문이 참조로 포함된다.

피브린 글루는 본 명세서에 기술된 바와 같은 제대 조직 유래 세포 (제대-유래 세포)와 동시에, 또는 그 전에, 또는 그 후에 투여될 수 있다. 일 실시형태에서, 피브린 글루 및 본 명세서에 기술된 바와 같은 제대-유래 세포는 조성물, 예를 들어, 약제학적 조성물의 형태로 제공된다. 일 실시형태에서, 조성물은 국소로 (예를 들어, 근육내 주사 또는 근육 내의 지방 데포로의 주사를 통해) 투여된다. 다른 실시형태에서, 피브린 글루 및 본 명세서에 기술된 바와 같은 제대-유래 세포는 국소로 (예를 들어, 근육내 주사 또는 근육 내의 지방 데포로의 주사를 통해) 투여된다. 다른 실시형태에서, 조성물, 또는 세포 및 피브린 글루는 혈액순환으로 직접 유입되지 않도록 사이 공간으로의 주사에 의해 투여된다. 다른 실시형태에서, 상기 방법은 트롬빈이 국소 전달 직전에 투여되는 피브리노겐 중의 세포를 제공하는 단계를 포함한다. 일 실시형태에서, 피브린 글루는 약 16 내지 약 24 IU/ml, 대안적으로 약 18 내지 22 IU/ml의 트롬빈 및 약 39.3 내지 약 60.7 mg/ml, 대안적으로 약 45 내지 약 60 mg/ml, 대안적으로, 약 40 내지 약 55 mg/ml, 대안적으로, 약 45 내지 약 55 mg/ml의 피브리노겐 (예를 들어, BAC2)을 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 피브린 글루는 약 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 또는 24 IU/ml의 트롬빈 및 약 40, 43, 45, 48, 50, 52, 53, 58 또는 60 mg/ml의 피브리노겐을 포함한다. 일 실시형태에서, 약 1×10^6 개 세포가 피브린 글루와 함께 사용된다.

본 명세서에 기술된 방법에 따르면, 포유류 제대는 만기 (full-term) 임신 또는 조기 (pre-term) 임신의 종료시에 또는 그 종료 직후에, 예를 들어 출산 후 만출 (expulsion) 이후에 포유류 제대가 회수된다. 제대 조직은 출산 위치에서 멸균 컨테이너, 예를 들어, 플라스크, 비커, 배양 접시 또는 백 (bag) 내에서 실험실로 수송될 수 있다. 컨테이너는 염 용액, 예를 들어, 돌베코 변형 이글 배지 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM) (돌베코 최소 필수 배지 (Dulbecco's Minimal Essential Medium)로도 공지되어 있음) 또는 인산염 완충 염수 (PBS) 또는 이식을 위해 사용되는 기관의 수송에 사용되는 임의의 용액, 예를 들어, 위스콘신 대학 용액 (University of Wisconsin solution) 또는 퍼플루오로화합물 용액 (perfluorochemical solution)을 포함하나 이들에 한정되지 않는 용액 또는 배지를 가질 수 있다. 하나 이상의 항생제 및/또는 항진균제, 예를 들어, 비제한적으로, 페니실린, 스트렙토마이신, 암포테리신 B, 젠타마이신 및 니스타틴이 배지 또는 완충제에 첨가될 수 있다. 조직은 항응고 (anticoagulant) 용액, 예를 들어, 헤파린-함유 용액으로 행굴 수 있다. 제대 조직-유래 세포의 추출 전에 약 4 내지 10℃에서 조직을 유지시키는 것이 바람직할 수 있다. 제대 조직-유래 세포의 추출 전에 조직이 동결되지 않는 것이 더욱 바람직할 수 있다.

제대-유래 세포의 단리는 바람직하게는 무균 환경에서 발생한다. 제대는 본 발명이 속하는 기술 분야에 공지되어 있는 수단에 의해 태반으로부터 분리될 수 있다. 혈액 및 데브리스는 바람직하게는 제대 조직-유래 세포의 단리 전에 조직으로부터 제거된다. 예를 들어, 제대 조직은 인산염 완충 염수를 포함하나 이에 한정되지 않는 완충 용액으로 세척될 수 있다. 세척 완충제는 또한 페니실린, 스트렙토마이신, 암포테리신 B, 젠타마이신 및 니스타틴을 포함하나 이들에 한정되지 않는 하나 이상의 항진균제 및/또는 항생제를 포함할 수 있다.

전체 제대 또는 이의 파편 또는 섹션을 포함하는 제대 조직은 기계력(다지는 (mincing) 힘 또는 전단력)에 의해 해체된다. 현재 바람직한 실시형태에서, 단리 절차는 또한 효소적 분해 과정을 사용한다. 복합 조직 매트릭스로부터의 개별 세포의 단리에 유용하여, 배양 중 성장을 용이하게 하는 많은 효소가 본 발명이 속하는 기술 분야에 알려져 있다. 분해 효소는 약한 분해성 (예를 들어, 데옥시리보뉴클레아제 및 중성 프로테아제, 디스파제 (dispace))으로부터 강한 분해성 (예를 들어, 파파인 및 트립신)에 이르며, 상업적으로 입수할 수 있다. 본 명세서에서 상용성인 효소의 불완전 목록은 점액용해 (mucolytic) 효소 활성화, 메탈로프로테아제 (metalloprotease), 중성 프로테아제, 세린 프로테아제 (예를 들어, 트립신, 키모트립신 또는 엘라스타제) 및 데옥시리보뉴클레아제를 포함한다. 현재 바람직한 것은 메탈로프로테아제, 중성 프로테아제 및 점액용해 활성화로부터 선택되는 효소 활성화이다. 예를 들어, 콜라게나제는 조직으로부터 다양한 세포를 단리하는데 유용한 것으로 공지되어 있다. 데옥시리보뉴클레아제는 단일 가닥 DNA를 분해시킬 수 있으며, 단리 동안 세포-클럼핑 (clumping)을 최소화시킬 수 있다. 바람직한 방법은 예를 들어, 콜라게나제 및 디스파제 또는 콜라게나제, 디스파제 및 히알루로니다제를 사용한 효소적 처리를 포함한다. 특정 실시형태에서, 콜라게나제 및 중성 프로테아제 디스파제의 혼합물이 해리 단계에 사용된다. 더욱 구체적인 실시형태는 클로스트리듐 히스톨리티쿰 (*Clostridium histolyticum*) 유래의 적어도 하나의 콜라게나제, 및 프로테아제 활성화 중 어느 하나, 디스파제 및 서몰리신 (thermolysin)의 존재 하의 분해를 사용한다. 또 다른 실시형태는 콜라게나제 및 디스파제 효소 활성화 모두를 사용한 분해를 사용한다. 또한, 콜라게나제 및 디스파제 활성화에 더하여, 히알루로니다제 활성을 사용한 분해를 포함하는 방법이 사용된다. 통상의 기술자라면, 많은 이러한 효소 처리가 다양한 조직 공급원으로부터의 세포 단리용으로 본 발명이 속하는 기술 분야에 공지되어 있음을 인지할 것이다. 예를 들어, 상표명 리베라제 (LIBERASE) (등록 상표) (미국 인디애나주 인디애나폴리스 소재의 로슈 (Roche)) 하에 시판되는 조직 해리를 위한 효소 배합물이 본 발명의 방법에 사용하기에 적절하다. 효소의 다른 공급원이 공지되어 있으며, 통상의 기술자라면 또한 이러한 효소를 그의 천연 공급원으로부터 직접적으로 획득할 수 있다. 또한 통상의 기술자라면 새로운 또는 추가의 효소 또는 효소 조합을 본 발명의 세포의 단리에 있어서의 그 유용성에 대하여 평가하는 데 준비가 잘 되어 있다. 바람직한 효소 처리는 0.5, 1, 1.5, 또는 2시간 걸리거나, 또는 이보다 더 길게 걸린다. 다른 바람직한 실시형태에서, 조직은 해리 단계의 효소 처리 동안 37℃에서 인큐베이션된다.

본 발명의 일부 실시형태에서, 제대 조직은 조직의 다양한 양상, 예를 들어, 신생아, 신생아/모계 및 예를 들어, 태반의 모계 양상을 포함하는 섹션으로 분리된다. 이어서, 분리된 섹션은 본 명세서에 기술된 방법에 따라 기계적 및/또는 효소적 해리에 의해 해리된다. 신생아 또는 모계 계통의 세포는 본 발명이 속하는 기술 분야에 공지되어 있는 임의의 수단에 의해, 예를 들어, Y 염색체에 대한 동소 혼성화 또는 핵형 분석에 의해 확인될 수 있다.

단리된 세포 또는 세포가 유래되는 제대 조직은 세포 배양을 개시하거나 접종하기 위해 사용될 수 있다. 단리된 세포를 세포의 매트릭스 또는 리간드, 예를 들어 라미닌, 콜라겐 (천연, 변성 또는 교차결합), 젤라틴, 피브로넥틴, 및 다른 세포의 매트릭스 단백질로 코팅되거나 비코팅된 살균 조직 배양 용기로 옮긴다. 제대 조직-유

래 세포는 DMEM (고농도 또는 저농도 글루코스), 고급 (advanced) DMEM, DMEM/MCDB 201, 이글 기본 배지 (Eagle's basal medium), 햄 F10 배지 (Ham's F10 medium; F10), 햄 F-12 배지 (F12), 이스코브 변형 돌베코 배지 (Iscove's modified Dulbecco's medium), 중간엽 줄기 세포 성장 배지 (MSCGM), DMEM/F12, RPMI 1640, 및 셀-그로-프리 (CELL-GRO-FREE) (등록 상표) (미국 버지니아주 헌든 소재의 메디아테크, 인코포레이티드 (Mediatech, Inc.)) 하에 시판되는 혈청 미함유 배지와 같은 그러나 이에 한정되지 않는, 세포의 성장을 지속시킬 수 있는 임의의 배양 배지에서 배양된다. 배양 배지에는 예를 들어 우태아혈청 (FBS), 바람직하게는 약 2 내지 15% (v/v); 말 혈청 (ES); 인간 혈청 (HS); 베타-메르캅토에탄올 (BME 또는 2-ME), 바람직하게는 약 0.001% (v/v); 하나 이상의 성장 인자, 예를 들어, 혈소판-유래 성장 인자 (PDGF), 상피 성장 인자 (EGF), 섬유모세포 성장 인자 (FGF), 혈관 내피 성장 인자 (VEGF), 인슐린-유사 성장 인자-1 (IGF-1), 백혈구 저해 인자 (LIF) 및 에리트로포이에틴 (EPO); L-발린을 포함하는 아미노산; 및 예를 들어 단독의 또는 조합된 페니실린 G, 스트렙토마이신 설페이트, 아포테리신 B, 젠타마이신 및 니스타틴과 같은 미생물 오염 제어를 위한 하나 이상의 항생제 및/또는 항진균제를 포함하는 하나 이상의 성분이 보충될 수 있다. 배양 배지는 바람직하게는 하기 실시예에 정의된 바와 같은 성장 배지를 포함한다.

세포는 세포 성장을 허용하는 밀도로 배양 용기에 접종된다. 바람직한 실시형태에서, 세포는 공기 중 약 0 내지 약 5 부피%의 CO₂에서 배양된다. 일부 바람직한 실시형태에서, 세포는 공기 중 약 2 내지 약 25%의 O₂, 바람직하게는 공기 중 약 5 내지 약 20%의 O₂에서 배양된다. 바람직하게는 세포는 약 25 내지 약 40 °C의 온도에서 배양되며, 더욱 바람직하게는 37°C에서 배양된다. 세포는 바람직하게는 인큐베이터에서 배양된다. 배양 용기 중 배지는 정지 상태이거나 또는 예를 들어 생물반응기를 이용하여 교반될 수 있다. 제대 조직-유래 세포는 바람직하게는 낮은 산화 스트레스 (예를 들어 글루타티온, 비타민 C, 카탈라제, 비타민 E, N-아세틸시스테인의 첨가에 의해) 하에 성장된다. 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "낮은 산화 스트레스"는 배양 세포에 대한 자유라디칼 손상이 전혀 없거나 또는 최소인 조건을 말한다.

가장 적절한 배양 배지, 배지 제제 및 세포 배양 기술의 선택 방법은 본 발명이 속하는 기술 분야에 널리 공지되어 있으며, 본 명세서에 참조로 포함되는 문헌 [Doyle *et al.*, (eds.), 1995, *Cell & Tissue Culture: Laboratory Procedures*, John Wiley & Sons, Chichester]; 및 문헌 [Ho and Wang (eds.), 1991, *Animal Cell Bioreactors*, Butterworth-Heinemann, Boston]을 포함하는 다양한 자료에 기술되어 있다.

충분한 기간 동안 단리된 세포 또는 조직 단편의 배양 후에, 제대 조직-유래 세포는 제대 조직으로부터의 이동 또는 세포 분열 또는 둘 모두의 결과로서 성장할 것이다. 본 발명의 일부 실시형태에서, 제대 조직-유래 세포는 처음에 사용된 것과 동일하거나 또는 상이한 유형의 신선한 배지를 함유하는 별도의 배양 용기로 계대되거나 또는 옮겨지며, 여기서, 세포 집단은 유사 분열에 의해 증량될 수 있다. 본 발명의 세포는 계대수 0 내지 노화의 임의의 시점에서 사용될 수 있다. 세포는 바람직하게는 약 3 내지 약 25회 계대되며, 더 바람직하게는 약 4 내지 약 12회 계대되며, 바람직하게는 10 또는 11회 계대된다. 클로닝 및/또는 서브클로닝을 수행하여 세포의 클론 집단이 단리되었음을 확인할 수 있다.

본 발명의 일부 태양에서, 제대 조직에 존재하는 상이한 세포 유형은 제대 조직-유래 세포가 단리될 수 있는 하위집단으로 분류된다. 분류 또는 선택은 제대 조직을 그의 성분 세포로 해리시키기 위한 효소적 처리를 포함하나 이에 한정되지 않는 세포 분리를 위한 표준 기술에 이어서, 클로닝, 및 형태적 및/또는 생화학적 마커; 요구되는 세포의 선택적 성장 (양성 선택), 원하지 않는 세포의 선택적 파괴 (음성 선택); 예를 들어 대두 응집소를 사용하는 것과 같이 혼합된 집단에서 차별적 세포 응집성을 기반으로 한 분리; 동결-해동 절차; 혼합된 집단에서의 세포의 차별적 유착 특성; 여과; 통상적인 락스원심분리; 원심 세정 (역류 원심분리 (counter-streaming centrifugation)); 단위 중력 분리 (unit gravity separation); 역류 분배; 전기영동; 및 형광-활성화 세포 분류 (fluorescence activated cell sorting, FACS)에 기초한 선택을 포함하나 이들에 한정되지 않는 특정 세포 유형의 선택을 사용하여 달성될 수 있다. 클론 선택 및 세포 분리 기술의 개요에 관해서는, 본 명세서에서 참조로 포함되는 문헌 [Freshney, 1994, *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Techniques*, 3rd Ed., Wiley-Liss, Inc., New York]을 참조한다.

배양 배지는 필요에 따라 예를 들어, 피펫 (pipette)을 사용하여 접시로부터 배지를 조심스럽게 흡인시키고, 신선한 배지를 보충함으로써 변경된다. 인큐베이션은 충분한 개수 또는 밀도의 세포가 접시에 축적될 때까지 계속된다. 원래의 외식된 조직 섹션이 제거될 수 있으며, 나머지 세포는 표준 기술을 사용하거나 셀 스크래퍼 (cell scraper)를 사용하여 트립신처리된다. 트립신처리 후에, 세포를 수집하고, 신선한 배지로 옮기고, 상기와 같이 인큐베이션시킨다. 일부 실시형태에서, 배지는 트립신을 처리하고 대략 24시간 후에 적어도 1회 교체

하여, 임의의 부유 세포를 제거한다. 배양 중 남아있는 세포는 제대 조직-유래 세포인 것으로 여겨진다.

제대 조직-유래 세포는 동결보존될 수 있다. 따라서, 하기에 더욱 상세히 기술된 바람직한 실시형태에서, 자가 전달 (어미 또는 아이 중 어느 하나)을 위한 제대 조직-유래 세포를 아이의 출산 후에 적절한 제대 조직으로부터 유래한 다음, 동결보존시켜 이들이 이후에 이식을 위해 필요한 사건에서 이용가능하게 할 수 있다.

제대 조직-유래 세포는 예를 들어 성장 특징 (예를 들어, 집단 배가 능력, 배가 시간, 노화까지의 계대), 핵형 분석 (예를 들어, 정상 핵형; 모계 또는 신생아 계통), 유세포 분석법 (예를 들어, FACS 분석법), 면역조직화학법 및/또는 면역세포화학법 (예를 들어, 에피토프 검출을 위한 것), 유전자 발현 프로파일링 (예를 들어, 유전자 칩 어레이 (array); 중합효소 연쇄 반응 (예를 들어, 역전사 효소 PCR, 실시간 PCR 및 통상적인 PCR)), 단백질 어레이, 단백질 분비 (예를 들어, 혈장 응고 검정 또는 PDC-조정 배지의 분석에 의해, 예를 들어 효소 결합된 면역흡착 검정 (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay; ELISA)에 의해), 혼합 림프구 반응 (예를 들어, PBMC의 자극의 척도로서), 및/또는 본 발명이 속하는 기술 분야에 공지된 다른 방법에 의해 특징지어질 수 있다.

제대 조직으로부터 유래된 예시적인 세포는 2004년 6월 10일자로 아메리칸 타입 컬처 콜렉션 (American Type Culture Collection, ATCC, 미국 버지니아주 머내서스 유니버시티 볼츠바르 10801 소재)에 기탁되었으며, 다음과 같이 ATCC 수탁 번호가 지정되었다: (1) 스트레인 (strain) 표기명 UMB 022803 (P7)은 수탁 번호 PTA-6067이 지정되었으며; (2) 스트레인 표기명 UMB 022803 (P17)은 수탁 번호 PTA-6068이 지정되었다.

다양한 실시형태에서, 제대 조직-유래 세포는 하기의 성장 특징 중 하나 이상을 갖는다: (1) 이들이 배양 중 성장을 위해 L-발린을 필요로 하는 특징; (2) 이들이 약 5% 내지 적어도 약 20%의 산소를 함유하는 분위기에서 성장할 수 있는 특징; (3) 이들이 노화에 도달하기 전 배양 중 적어도 약 40회 배가 능력을 갖는 특징; 및 (4) 이들이 코팅 또는 비코팅 조직 배양 용기 상에 부착되고 증량되는 특징으로서, 코팅 조직 배양 용기가 젤라틴, 라미닌, 콜라겐, 폴리오르니틴, 비트로넥틴 또는 피브로넥틴의 코팅을 포함하는 특징.

특정 실시형태에서, 제대 조직-유래 세포는 정상 핵형을 가지며 이는 세포가 계대됨에 따라 유지된다. 핵형 분석 (karyotyping)은 태반으로부터 유래된 모계 세포로부터 신생아 세포를 확인하고 구별하는 데 특히 유용하다. 핵형 분석 방법은 당업자가 이용가능하며, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 공지되어 있다.

다른 실시형태에서, 제대 조직-유래 세포는 (1) 조직 인자, 비멘틴 및 알파-평활근 액틴 중 적어도 하나의 생성; 및 (2) 유세포 분석법에 의해 검출시 CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-알파, PD-L2 및 HLA-A,B,C 세포 표면 마커 중 적어도 하나의 생성을 포함하는 특정 단백질의 생성을 특징으로 할 수 있다. 다른 실시형태에서, 제대 조직-유래 세포는 유세포 분석법에 의해 검출시, CD31, CD34, CD45, CD80, CD86, CD117, CD141, CD178, B7-H2, HLA-G 및 HLA-DR,DP,DQ 세포 표면 마커 중 적어도 하나의 생성의 결여를 특징으로 할 수 있다. 특히 바람직한 것은 조직 인자, 비멘틴 및 알파-평활근 액틴 중 적어도 2가지를 생성하는 세포이다. 더욱 바람직한 것은 모든 3가지의 단백질, 조직 인자, 비멘틴 및 알파-평활근 액틴을 생성하는 세포이다.

다른 실시형태에서, 제대 조직-유래 세포는 섬유모세포, 중간엽 줄기 세포, 또는 장골능 골수 세포인 인간 세포에 비하여, 인터류킨 8; 레티쿨론 1; 케모카인 (C-X-C 모티프) 리간드 1 (흑색종 성장 자극 활성, 알파); 케모카인 (C-X-C 모티프) 리간드 6 (과립구 주화성 단백질 2); 케모카인 (C-X-C 모티프) 리간드 3; 및 종양 괴사 인자, 알파-유도 단백질 3 중 적어도 하나를 암호화하는 유전자에 대한 증가된 유전자 발현을 특징으로 할 수 있다.

또 다른 실시형태에서, 제대 조직-유래 세포는 섬유모세포, 중간엽 줄기 세포 또는 장골능 골수 세포인 인간 세포에 비하여, 쇼트 스테처 호메오박스 2; 열충격 27 kDa 단백질 2; 케모카인 (C-X-C 모티프) 리간드 12 (기질 세포-유래 인자 1); 엘라스틴 (관상부대동맥협착증, 윌리엄스-보이렌 증후군); 호모 사피엔스 mRNA; cDNA DKFZp586M2022 (클론 DKFZp586M2022 유래); 중간엽 호메오 박스 2 (성장 정지-특이적 호메오 박스); 사인 오콜리스 호메오박스 상동체 1 (드로소필라); 크리스탈린, 알파 B; 디체벨트 어소시에이티드 액티베이터 오브 모토제네시스 2; DKFZP586B2420 단백질; 시밀러 투 뉴랄린 1; 테트라넥틴 (플라스미노겐 결합 단백질); src 호몰로지 3 (SH3) 및 시스테인 풍부 도메인; 콜레스테롤 25-하이드록실라제; runt-관련 전사 인자 3; 인터류킨 11 수용체, 알파; 프로콜라겐 C-엔도펩티다제 인핸서; 프리즐드 상동체 7 (드로소필라); 가상 유전자 BC008967; 콜라겐, 제VIII형, 알파 1; 테나신 C (헥사브라키온); 이로퀴스 호메오박스 단백질 5; 헤파에스틴; 인테그린, 베타 8; 시냅스 소포 당단백질 2; 신경모세포종, 종양 형성 억제 1; 인슐린-유사 성장 인자 결합 단백질 2, 36kDa; 호모 사피엔스 cDNA FLJ12280 fis, 클론 MAMMA1001744; 사이토카인 수용체-유사 인자 1; 칼륨 중간체/

작은 전도도의 칼슘-활성화 채널, 하위 패밀리 N, 구성원 4; 인테그린, 베타 7; PDZ-결합 모티프를 갖는 전사 동시 활성화자 (TAZ); 사인 오쿨리스 호메오박스 상동체 2 (드로소필라); KIAA1034 단백질; 소포-연관된 막 단백질 5 (미오브레빈); EGF-함유 피볼린-유사 세포외 매트릭스 단백질 1; 초기 성장 반응 3; 디스탈-레스 호메오박스 5; 가상 단백질 FLJ20373; 알도-케토 리덕타제 패밀리 1, 구성원 C3 (3-알파 하이드록시스테로이드 데하이드로게나제, 제 II형); 바이글리칸; PDZ-결합 모티프를 갖는 전사 동시 활성화자 (TAZ); 피브로넥틴 1; 프로엔케팔린; 인테그린, 베타-유사 1 (EGF-유사 반복 도메인을 포함함); 호모 사피엔스 mRNA 전장 인서트 cDNA 클론 유로 이미지 1968422; EphA3; KIAA0367 단백질; 나트륨이노 펩티드 수용체 C/구아닐레이트 사이클라제 C (심방 나트륨이노 펩티드 수용체 C); 가상 단백질 FLJ14054; 호모 사피엔스 mRNA; cDNA DKFZp564B222 (클론 DKFZp564B222 유래); BCL2/아데노바이러스 E1B 19kDa 상호작용 단백질 3-유사; AE 결합 단백질 1; 및 사이토크롬 c 옥시다아제 서브유닛 VIIa 폴리펩티드 1 (근육) 중 적어도 하나를 암호화하는 유전자에 대한 감소된 유전자 발현을 특징으로 할 수 있다.

다른 실시형태에서, 제대 조직-유래 세포는 MCP-1, IL-6, IL-8, GCP-2, HGF, KGF, FGF, HB-EGF, BDNF, TPO, MIP1b, RANTES 및 TIMP1 중 적어도 하나의 분비를 특징으로 할 수 있다. 일부 실시형태에서, 제대 조직-유래 세포는 ELISA에 의해 검출시, TGF-베타2, ANG2, PDGFbb, MIP1a 및 VEGF 중 적어도 하나의 분비의 결여를 특징으로 할 수 있다.

일부 바람직한 실시형태에서, 세포는 실질적으로 혈액이 없는 제대 조직으로부터 유래되고, 배양 중 자가-재생 및 증량이 가능하고, 성장을 위하여 L-발린을 필요로 하며, 적어도 약 5%의 산소에서 성장할 수 있고, 하기의 특징 중 적어도 하나를 포함한다: 배양 중 적어도 약 40회의 배가 잠재력; 젤라틴, 라미닌, 콜라겐, 폴리오르니틴, 비트로넥틴 또는 피브로넥틴의 코팅을 포함하는, 코팅 또는 비코팅 조직 배양 용기 상의 부착 및 증량; 비멘틴 및 알파-평활근 액틴의 생성; CD10, CD13, CD44, CD73 및 CD90의 생성; 및, 섬유모세포, 중간엽 줄기 세포, 또는 장골능 골수 세포인 인간 세포에 비해, 인터류킨 8 및 레티쿨론 1을 암호화하는 유전자에 대하여 증가된 유전자의 발현. 일부 구현예에서, 이러한 세포는 CD45 및 CD117을 생성하지 않는다. 이 단락에 기술된 바와 같은 세포는 말초 혈관 질환을 갖는 환자를 치료하기 위한 방법에 사용될 수 있으며, 말초 혈관 질환을 치료하기 위한 약제학적 조성물에 사용될 수 있고, 예를 들어, 여기서, 이러한 조성물은 이들 특징을 갖는 세포 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하며, 본 명세서에 기술되고 예시된 바와 같은 이러한 방법 및 약제학적 조성물을 제조하고, 사용하고 실시하기 위한 키트에 사용될 수 있다. 또한, 이 단락에 기술된 바와 같은 세포를 사용하여, 세포 배양 조정 배지를 생성하거나, 제제, 예를 들어, 본 명세서에 기술되고 예시된 바와 같은 이러한 방법 및 약제학적 조성물을 제조하고, 사용하고, 실시하기 위해 사용될 수 있는 세포 추출물 및 하위세포 분획을 제조할 수 있다.

바람직한 실시형태에서, 세포는 텔로머라제 (hTert)를 발현하지 않는다. 따라서, 본 발명의 일 실시형태는 텔로머라제 (hTert)를 발현하지 않고, 본 명세서에 개시된 하나 이상의 특징을 갖는 제대-유래 세포이다.

본 발명의 일 실시형태에서, 세포는 실질적으로 혈액이 없는 인간 제대 조직으로부터 단리되고, 배양 중 자가-재생 및 증량될 수 있으며, CD117 및/또는 텔로머라제의 생성이 결여된다. 세포는 임의로, (i) 산화된 저밀도 리포단백질 수용체 1, 레클론, 케코카인 수용체 리간드 3, 및/또는 과립구 주화성 단백질을 발현하고/거나; (ii) CD31, CD34 또는 CD45를 발현하지 않고/거나; (iii) 인간 섬유모세포, 중간엽 줄기 세포 또는 장골능 골수 세포에 비하여, 증가된 수준의 인터류킨 8 또는 레티쿨론 1을 발현하고/거나; (iv) 적어도 하나의 골격근, 혈관 평활근, 혈관주위세포 또는 혈관 내피 표현형의 세포로 분화하는 잠재력을 갖고/거나; (v) CD10, CD13, CD44, CD73 및 CD90을 발현한다. 본 발명의 다른 실시형태에서, 세포는 실질적으로 혈액이 없는 인간 제대 조직으로부터 단리되고, 배양 중 자가-재생 및 증량될 수 있으며, CD117, CD34, CD31 및/또는 텔로머라제의 생성이 결여된다. 본 발명의 또 다른 실시형태에서, 세포는 실질적으로 혈액이 없는 인간 제대 조직으로부터 단리되고, 배양 중 자가-재생 및 증량될 수 있으며, CD117, CD45, CD34, CD31 및/또는 텔로머라제의 생성이 결여된다.

본 발명의 몇몇 태양에서, 본 발명과 함께 사용하기에 현재 바람직한 세포 중에는 상기에 기술된 특징을 갖는 제대 조직-유래 세포가 있으며, 더욱 특히는 정상 핵형을 가지며 계대에 따라 정상 핵형을 유지하는 세포, 및 추가로 마커 CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-알파, 및 HLA-A,B,C 각각을 발현하는 세포가 있으며 여기서, 세포는 열거된 마커에 상응하는 면역학적으로 검출가능한 단백질을 생성한다. 또한 전술한 것에 더하여, 유세포 분석법에 의해 검출시 마커 CD31, CD34, CD45, CD117, CD141, 또는 HLA-DR,DP,DQ 중 임의의 것에 상응하는 단백질을 생성하지 않는 세포가 더욱 바람직하다.

다양한 표현형을 야기하는 계통을 따라 분화되는 잠재력을 갖는 소정 세포는 불안정하며, 따라서 자발적으로 분

화될 수 있다. 예를 들어, 근아세포, 골격근, 혈관평활근, 혈관주위세포, 혈관발생, 혈관신생, 맥관형성 (vasculogenic) 또는 혈관 내피 계통을 따라 자발적으로 분화하지 않는 세포가 본 발명에 사용하기에 현재 바람직하다. 성장 배지에서 성장시킬 때, 바람직한 세포는 그들의 표면 상에서 생성되는 세포 마커와 관련하여, 그리고 다양한 유전자의 발현 패턴과 관련하여 실질적으로 안정한데, 예를 들어 이는 상표명 진칩 (GENECHIP) (미국 캘리포니아주 산타 클라라 소재의 아피메트릭스, 인코포레이티드 (Affymetrix, Inc.)) 하에 시판되는 의료 진단 시험을 사용하여 결정되는 바와 같다. 세포는 다수의 집단 배가를 통한 계대 시에 예를 들어 그 표면 마커 특징이 실질적으로 불변 유지된다.

본 발명의 다른 태양은 상기 기술된 제대 조직-유래 세포 집단의 용도를 특징으로 한다. 일부 실시형태에서, 세포 집단은 비균질하다. 본 발명의 비균질한 세포 집단은 적어도 약 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 95%의 본 발명의 제대 조직-유래 세포를 포함할 수 있다. 본 발명의 비균질한 세포 집단은 줄기 세포 또는 다른 선구 세포, 예를 들어, 근아세포 또는 다른 근육 선구 세포, 혈관아세포 또는 혈관 선구 세포를 추가로 포함할 수 있거나, 이는 완전히 분화된 골격근 세포, 평활근 세포, 혈관주위세포 또는 혈관 내피 세포를 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 집단은 실질적으로 균질하며, 다시 말하면, 실질적으로 오직 제대 조직-유래 세포만을 포함한다 (바람직하게는 적어도 약 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 제대 조직-유래 세포). 본 발명의 균질한 세포 집단은 제대- 또는 태반-유래 세포를 포함할 수 있다. 제대-유래 세포의 균질한 집단에는 바람직하게는 모 계통의 세포가 없다. 태반-유래 세포의 균질한 집단은 신생아 또는 모 계통의 것일 수 있다. 세포 집단의 균질성은 본 발명이 속하는 기술 분야에 알려져 있는 임의의 방법에 의해, 예를 들어, 세포 분류 (cell sorting) (예를 들어, 유세포분석)에 의해, 또는 공지되어 있는 방법에 따른 클론 증량에 의해 달성될 수 있다. 따라서, 바람직한 균질한 세포 집단은 제대 조직-유래 세포의 클론 세포주를 포함할 수 있다. 이러한 집단은 고도의 요망되는 기능성을 지닌 세포 클론이 단리되는 경우 특히 유용하다.

또한, 하나 이상의 인자의 존재 하에, 또는 혈관평활근, 혈관 내피, 혈관주위세포 또는 골격근 경로를 따른 줄기 세포 분화를 자극하는 조건 하에 인큐베이션시킨 세포 집단의 용도가 본 명세서에 제공된다. 이러한 인자는 본 발명이 속하는 기술 분야에 알려져 있으며, 통상의 기술자는 분화에 적절한 조건의 결정이 통상의 실험으로 달성될 수 있음을 인식할 것이다. 이러한 조건의 최적화는 통계적 실험 설계 및 분석에 의해 달성될 수 있으며, 예를 들어, 반응 표면 방법 (response surface methodology)은 예를 들어, 생물학적 배양에서의 다수의 변수의 동시의 최적화를 가능하게 한다. 현재 바람직한 인자에는 성장 또는 영양적 인자, 케모카인, 사이토카인, 세포 산물, 탈메틸화제 (demethylating agent), 및 예를 들어, 혈관신생, 혈관형성, 맥관형성, 골격근, 혈관평활근, 혈관주위세포, 또는 혈관 내피 경로 또는 계통의 분화를 자극하는 것으로 현재 알려져 있거나, 이후에 결정되는 다른 자극이 포함되나 이들에 한정되지 않는다.

제대 조직-유래 세포는 또한 유전자적으로 변형되어, 치료적으로 유용한 유전자 산물을 생성하거나, 추가의 혈관 형성 또는 성장을 용이하게 하거나 지원하기 위한 혈관신생제 (angiogenic agent)를 생성하거나, 내피 선구 세포를 허혈 손상의 영역으로 동원하는 인자를 생성할 수 있다. 내피 선구 세포는 특히 허혈 사건 후에 맥관형성 및 혈류를 용이하게 한다 (문헌 [Urbich C and Dimmeler S (2004) *Circ. Res.* 95:343-53]). 내피 세포 동원의 역할을 수행하는 인자에는 VEGF, 기질 유래 인자-1 (SDF-1), 에리트로포이에틴 (EPO), G-CSF, 스타틴, 에스트로겐, PPAR γ , CXCR4, FGF 및 HGF가 포함되나 이들에 한정되지 않는다. 유전자 변형은 임의의 다양한 벡터를 사용하여 달성될 수 있으며, 상기 벡터는 통합 바이러스 벡터, 예를 들어 레트로바이러스 벡터 또는 아데노-관련 바이러스 벡터; 비통합 복제 벡터, 예를 들어 파필로마 바이러스 벡터, SV40 벡터, 아데노바이러스 벡터; 또는 복제-결합 바이러스 벡터를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. DNA를 세포 내로 도입하는 다른 방법은 리포솜의 사용, 전기천공, 입자 총 (particle gun) 또는 직접적 DNA 주입에 의한 것을 포함한다.

숙주 세포는 바람직하게는 선택가능 마커, 및 특히 프로모터 또는 인핸서 서열, 전사 터미네이터, 폴리아데닐화 부위와 같은 하나 이상의 적절한 발현 조절 요소에 의해 조절되는 또는 상기 발현 조절 요소와 작동적으로 회합된 DNA로 형질전환되거나 또는 트랜스펙션된다. 삽입된 유전자가 발현되게 하기 위하여 임의의 프로모터가 사용될 수 있다. 예를 들어, 바이러스 프로모터는 CMV 프로모터/인핸서, SV40, 파필로마바이러스, 엡스타인-바 (Epstein-Barr) 바이러스 또는 엘라스틴 유전자 프로모터를 포함하지만, 이들에 한정되지 않는다. 일부 실시형태에서, 대상 유전자의 발현의 조절에 사용되는 조절 요소는, 산물이 생체 내에서 필요할 때에만 합성되도록 유전자의 조절된 발현을 가능하게 할 수 있다. 일시적 발현이 요구될 경우, 바람직하게는 구성적 (constitutive) 프로모터가 비통합 및/또는 복제-결합 벡터에서 사용된다. 대안적으로, 필요할 경우, 삽입된 유전자가 발현되게 하기 위하여 유도성 프로모터가 사용될 수 있다. 유도성 프로모터는 메탈로티오네인 및 열충격 단백질과 연관된 것을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

외래 DNA의 도입 이후, 조작된 세포를 농축 배지에서 성장시키고, 그 후 선택 배지로 전환시킬 수 있다. 외래 DNA 내의 선택가능 마커는 선택에 대한 내성을 부여하며, 세포가 예를 들어 플라스미드 상에서와 같이 외래 DNA를 그의 염색체 내에 안정하게 통합시켜서 성장시켜 증식소 (foci)를 형성하게 하는데, 이는 다시 클로닝되고 세포주로 증량될 수 있다. 이러한 방법은 유전자 산물을 발현하는 세포주를 조작하기 위하여 유리하게 사용될 수 있다.

본 발명의 세포는 이식 부위에서 염증 또는 거부를 촉진하는 인자의 발현을 "넉아웃 (knock out)" 또는 "넉다운 (knock down)"시키도록 유전공학적으로 조작될 수 있다. 표적 유전자 발현 수준 또는 표적 유전자 산물 활성 수준을 감소시키는 음성 조정 기술은 하기에 논의되어 있다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "음성 조정"은 조정 처리의 부재 하에서의 표적 유전자 산물의 수준 및/또는 활성에 비하여 표적 유전자 산물의 수준 및/또는 활성의 감소를 말한다. 골격근 세포, 혈관평활근 세포, 혈관주위세포, 혈관 내피 세포 또는 이의 선구 세포의 고유의 유전자의 발현은 예를 들어, 상동성 재조합 기술을 사용한 유전자의 불활성화에 의한 발현의 저해를 포함하는 다수의 기술을 사용하여 감소되거나 넉아웃될 수 있다. 전형적으로, 단백질의 중요한 영역을 암호화하는 엑손 (exon) (또는 상기 영역에 대하여 5'인 엑손)은 양성 선택가능 마커, 예를 들어 neo가 개재되며, 이는 표적 유전자로부터의 정상 mRNA의 생성을 방지하여 이 유전자를 불활성화시킨다. 또한 유전자는 유전자의 일부에서의 결실의 생성에 의해 또는 전체 유전자의 결실에 의해 불활성화될 수 있다. 게놈 내에서 멀리 떨어져 있는, 표적 유전자에 대하여 상동성인 두 영역을 지닌 구축물을 사용함으로써, 상기 두 영역에 개재된 서열을 결실시킬 수 있다 (문헌[Mombaerts *et al.*, 1991, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 88:3084- 3087]). 또한, 안티센스, DNzyme, 리보자임, 작은 간섭 RNA (siRNA) 및 표적 유전자의 발현을 저해하는 기타 이러한 분자를 사용하여, 표적 유전자 활성의 수준을 감소시킬 수 있다. 예를 들어, 주요 조직적합성 유전자 복합체 (histocompatibility gene complexes; HLA)의 발현을 저해하는 안티센스 RNA 분자는 면역 응답과 관련하여 가장 다재다능한 것으로 밝혀졌다. 또한 추가로, 삼중 나선 분자가 표적 유전자 활성 수준의 감소에서 이용될 수 있다. 이들 기술은 문헌 [L. G. Davis *et al.* (eds), 1994, *Basic Methods in Molecular Biology*, 2nd ed., Appleton & Lange, Norwalk, CN]에 상세히 기술되어 있다.

다른 태양에서, 본 발명은 제대 조직-유래 세포 또는 제대 조직-유래 세포를 포함하는 비균질하거나 균질한 세포 집단뿐 아니라, 골격근, 혈관평활근, 혈관주위세포 또는 혈관 내피 경로를 따라 분화하도록 유전자적으로 변형되거나 자극된 제대 조직-유래 세포 또는 이의 집단으로부터 제조된 세포 용해물 및 세포 용해성 분획을 사용한다. 이러한 용해물 및 이의 분획은 다수의 효용을 갖는다. 예를 들어, 생체 내 세포 용해물 용해성 분획 (다시 말하면, 실질적으로 막이 없음)의 사용은 거부 또는 기타 불리한 면역 반응을 촉발시킬 것 같은 상당한 양의 세포 표면 단백질을 도입하지 않고, 환자에서 유익한 세포내 환경이 동종 간에 사용되게 한다. 세포의 용해 방법은 본 발명이 속한 기술 분야에 널리 공지되어 있으며, 기계적 파괴, 효소적 파괴 또는 화학적 파괴 또는 이들의 조합의 다양한 수단을 포함한다. 이러한 세포 용해물은 직접적으로 이들의 성장 배지 중 세포로부터 제조되어, 이에 따라, 분비된 성장 인자 등을 함유하거나, 배지가 없게 세척된, 예를 들어, PBS 또는 기타 용액 중 세포로부터 제조될 수 있다. 세척된 세포는 바람직한 경우, 원래 집단 밀도보다 더 큰 농도로 재현탁화될 수 있다.

일 실시형태에서, 전 세포 용해물은 예를 들어, 이후의 세포 분획의 분리 없이, 세포를 파괴시킴으로써 제조된다. 다른 실시형태에서, 세포막 분획은 본 발명이 속하는 기술 분야에 알려져 있는 통상적인 방법, 예를 들어, 원심분리, 여과 또는 유사 방법에 의해 세포의 용해성 분획으로부터 분리된다.

제대 조직-유래 세포 집단으로부터 제조된 세포 용해물 또는 세포 용해성 분획은 그대로 사용되거나, 예를 들어, 한외여과 또는 동결건조에 의해 추가로 농축되거나, 또는 심지어는 건조되거나, 부분 정제되거나, 본 발명이 속하는 기술 분야에 알려져 있는 바와 같은 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제와 조합되거나, 다른 화합물, 예를 들어, 생물물질, 예컨대 약제학적으로 유용한 단백질 조성물과 조합될 수 있다. 세포 용해물 또는 이의 분획은 시험관 내에서 또는 생체 내에서, 단독으로, 또는 예를 들어, 자가 또는 동계 생세포와 함께 사용될 수 있다. 생체 내에서 도입되는 경우, 용해물은 예를 들어, 필요한 세포 성장 인자를 환자에 제공하기 위해, 치료 부위에 국소로 또는 멀리서 도입될 수 있다.

추가 실시형태에서, 제대 조직-유래 세포는 시험관 내에서 배양되어, 생물학적 산물을 높은 수율로 생성할 수 있다. 특정 대상 생물학적 산물 (예를 들어, 영양적 인자)를 천연적으로 생성하거나 생물학적 산물을 생성하도록 유전공학적으로 조작된 제대 조직-유래 세포는 본 명세서에 기술된 배양 기술을 사용하여 클론이 증량될 수 있다. 대안적으로, 세포는 골격근, 혈관평활근, 혈관주위세포 또는 혈관 내피 계통으로의 분화를 유도하는 배지 중에서 증량될 수 있다. 각 경우에, 세포에 의해 생성되고, 배지로 분비되는 생물학적 산물은 몇가지 예를

들면, 표준 분리 기술, 예를 들어, 차등적 단백질 침전, 이온-교환 크로마토그래피, 겔 여과 크로마토그래피, 전기 영동 및 HPLC를 사용하여 조정 배지로부터 용이하게 분리될 수 있다. "생물반응기 (bioreactor)"를 사용하여, 유동 피딩 (feeding) 방법, 예를 들어, 시험관 내 3차원 배양을 이용할 수 있다. 본질적으로, 신선한 배지가 3차원 배양물을 통과함에 따라, 생물학적 산물이 배양물로부터 씻겨 나온 다음, 상기와 같이 유출물로부터 분리될 수 있다.

대안적으로, 대상 생물학적 산물은 세포 내에 보유될 수 있으며, 이에 따라, 이의 수집에는 상기 기술된 바와 같은 세포의 용해가 필요할 수 있다. 이어서, 생물학적 산물은 상기 열거된 기술 중 임의의 하나 이상을 사용하여 정제될 수 있다.

다른 실시형태에서, 본 발명은 하기에 기술되는 바와 같이, 시험관 내 및 생체 내에서 사용하기 위하여, 배양된 제대 조직-유래 세포에서 나온 조정 배지를 사용한다. 세포 조정 배지의 이용은 거부 또는 다른 불리한 면역 반응을 촉발시킬 수 있는 무손상 세포를 도입하지 않고, 제대 조직-유래 세포에 의해 분비되는 유익한 영양적 인자가 환자에서 동종 간에 사용되게 한다. 조정 배지는 세포를 배양 배지 중에서 배양한 다음, 세포를 배지로부터 제거함으로써 제조된다.

제대 조직-유래 세포 집단으로부터 제조된 조정 배지는 그대로 사용되거나, 예를 들어, 한외여과 또는 동결건조에 의해 추가로 농축되거나, 또는 심지어는 건조되거나, 부분 정제되거나, 본 발명이 속하는 기술 분야에 알려져 있는 바와 같이 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제와 조합되거나, 다른 화합물, 예를 들어, 생물물질, 예컨대 약제학적으로 유용한 단백질 조성물과 조합될 수 있다. 조정 배지는 시험관 내에서 또는 생체 내에서, 단독으로, 또는 예를 들어, 자가 또는 동계 생세포와 함께 사용될 수 있다. 생체 내에서 도입되는 경우 조정 배지는 예를 들어, 필요한 세포 성장 또는 영양적 인자를 환자에 제공하기 위해 치료 부위에 국소로 또는 멀리서 도입될 수 있다.

다른 실시형태에서, 제대 조직-유래 세포를 액체, 고체 또는 반고체 기재 상에서 배양함으로써 생성되는 세포의 매트릭스 (ECM)를 제조하고, 수집하고, 조직 회복 또는 대체를 필요로 하는 대상체로의 생세포의 이식에 대한 대안으로서 사용한다. 제대 조직-유래 세포는 본 명세서의 다른 곳에 기술된 바와 같은 3차원 프레임워크 상에서, 원하는 양의 ECM이 프레임워크 상으로 분비되게 하는 조건 하에서 시험관 내에서 배양한다. 신규한 조직을 포함하는 세포를 옮기고, 추가의 사용을 위해, 예를 들어, 주사가 가능한 제제로서 ECM을 처리한다. 이를 달성하기 위하여, 프레임워크 상의 세포를 사멸시키고, 프레임워크로부터 임의의 세포 debris를 제거한다. 이러한 과정은 수많은 상이한 방식으로 수행될 수 있다. 예를 들어, 생조직은 동결보존제 없이, 액체 질소 중에서 급속-동결시킬 수 있거나, 조직은 세포가 삼투압에 반응하여 파괴되도록 멸균 증류수에 침지시킬 수 있다.

일단 세포가 사멸되면, 세포막을 파괴하고, 세포 debris를 온건한 세제 행군제, 예를 들어, 에틸렌다이아민테트라아세트산 (EDTA), 3-[(3-콜라미도프로필)디메틸암모니오]-1-프로판설포네이트 (CHAPS) 또는 양쪽이온성 세제로의 처리에 의해 제거할 수 있다. 대안적으로, 조직은 효소적으로 분해되고/거나, 세포 막을 파괴하고 세포 내용물이 제거되게 하는 시약을 사용하여 추출될 수 있다. 이러한 효소의 예에는 히알루로니다제 (hyaluronidase), 디스파제, 프로테아제 및 뉴클레아제가 포함되나 이들에 한정되지 않는다. 세제의 예에는 비이온성 세제, 예를 들어, 알킬아릴 폴리에테르 알코올 (트리톤 (TRITON) X-100), 옥틸페녹시 폴리에테르-에탄올 (미국 펜실베이니아주 필라델피아 소재의 롬 앤드 하스), BRIJ-35, 폴리에테르-에탄올 라우릴 에테르 (미국 캘리포니아주 샌디에고 소재의 아틀라스 케미컬 컴퍼니 (Atlas Chemical Co.)), 폴리소르베이트 20 (트윈 (TWEEN) 20), 폴리에테르-에탄올 소르비탄 모노라우레이트 (미국 펜실베이니아주 필라델피아 소재의 롬 앤드 하스), 폴리에틸렌 라우릴 에테르 (미국 펜실베이니아주 필라델피아 소재의 롬 앤드 하스); 및 이온성 세제, 예를 들어, 나트륨 도데실 설페이트, 황산화 고급 지방족 알코올, 7 내지 22개의 탄소 원자를 분지쇄 또는 비분지쇄에 함유하는 설포화 알칸 및 설포화 알킬아렌이 포함된다.

ECM의 수집은 적어도 부분적으로, 신규한 조직이 생분해성인 3차원 프레임워크 상에서 형성되는지, 또는 금속의 경우와 같이 비-생분해성인 3차원 프레임워크 상에서 형성되는지에 따라 다양한 방식으로 달성될 수 있다. 예를 들어, 프레임워크가 비-생분해성이라면, ECM은 초음파분해, 고압 워터 젯 (high pressure water jet), 기계적 스크래핑, 또는 세제 또는 효소를 사용한 온건한 처리, 또는 상기의 임의의 조합에 의해 제거될 수 있다.

프레임워크가 생분해성이라면, ECM은 예를 들어, 프레임워크가 용액 중에서 분해되거나 용해되게 함으로써 수집될 수 있다. 대안적으로, 생분해성 프레임워크는 그 자체가 ECM과 함께 주사될 수 있는 물질로 구성된다면, 프레임워크 및 ECM은 이후의 주사를 위해 모두 포함하여 처리될 수 있다. 대안적으로, ECM은 비-생분해성 프레임워크로부터의 ECM의 수집을 위해 상기 기술된 방법 중 임의의 것에 의해 생분해성 프레임워크로부터 제거될 수

있다. 모든 수집 과정은 바람직하게는 ECM을 변형시키지 않도록 설계된다.

ECM이 수집된 후에, 이는 추가로 처리될 수 있다. 예를 들어, ECM은 본 발명이 속하는 기술 분야에 널리 알려져 있는 기술을 사용하여, 예를 들어, ECM이 수술 바늘을 통과할 수 있도록 초음파분해에 의해 미립자로 균질화될 수 있다. ECM의 성분은 또한 필요에 따라 감마선 조사에 의해 교차결합될 수도 있다. 바람직하게, ECM을 25만 내지 200만 라드로 조사하여, ECM을 살균하고 교차결합시킬 수 있다. 독성인 작용제, 예를 들어, 글루타르알데히드를 사용한 화학적 교차결합이 가능하지만 일반적으로는 바람직하지 않다.

ECM 중에 존재하는 다양한 유형의 콜라겐과 같은 단백질의 양 및/또는 비는 본 발명의 세포에 의해 생성되는 ECM을 하나 이상의 다른 세포 유형의 ECM과 혼합함으로써 조정될 수 있다. 또한, 생물학적 활성 물질, 예를 들어, 단백질, 성장 인자 및/또는 약물은 ECM 내로 혼입될 수 있다. 예시적인 생물학적 활성 물질은 주사 부위에서의 치유 및 조직 회복을 조장하는 조직 성장 인자, 예를 들어, TGF-베타 등을 포함한다. 이러한 추가의 작용제는 예를 들어, 전세포 용해물, 용해성 세포 분획 또는 추가로 정제된 성분 및 제대 조직-유래 세포에 의해 생성되는 산물과 함께, 본 명세서에서 상기에 기술된 임의의 실시형태에 사용될 수 있다.

다른 태양에서, 본 발명은 말초 허혈 에피소드에 의해 야기되는 상해 또는 손상의 치료를 위한 다양한 방법에서 제대 조직-유래 세포, 제대 조직-유래 세포 집단, 제대 조직-유래된 세포의 성분 및 산물을 사용하는 약제학적 조성물을 제공한다. 특정 실시형태는 생세포 (단독의 또는 다른 세포 유형과 혼합된 제대 조직-유래 세포)를 포함하는 약제학적 조성물을 포함한다. 다른 실시형태는 제대 조직-유래 세포 성분 (예를 들어, 세포 용해물, 용해성 세포 분획, 조정 배지, ECM 또는 상기의 것 중 임의의 것의 성분) 또는 산물 (예를 들어, 제대 조직-유래 세포에 의해 천연적으로, 또는 유전자 변형을 통해 생성되는 영양적 및 기타 생물학적 인자, 제대 조직-유래 세포 배양으로부터의 조정 배지)을 포함하는 약제학적 조성물을 포함한다. 어느 하나의 경우에, 약제학적 조성물은 다른 활성 작용제, 예를 들어, 본 발명이 속한 기술 분야에 알려져 있는 바와 같은 항염증제, 항세포사멸제, 항산화제, 성장 인자, 근육영양 인자 (myotrophic factor), 또는 근육재생 또는 근육보호 약물을 추가로 포함할 수 있다.

약제학적 조성물에 첨가될 수 있는 다른 성분의 예에는 (1) 다른 근육유익 (myobeneficial) 또는 근육보호 (myoprotective) 약물, 또는 혈관유익 (angiobeneficial) 또는 혈관보호 (angioprotective) 약물; (2) 선택된 세포외 매트릭스 성분, 예를 들어, 본 발명이 속한 기술 분야에 알려져 있는 콜라겐 및/또는 성장 인자, 혈소판-풍부 혈장 및 약물 중 하나 이상의 유형 (대안적으로, 제대 조직-유래 세포는 유전공학적으로 조작되어 성장 인자를 발현하고 생성할 수 있음); (3) 항세포사멸제 (예를 들어, 에리트로포이에틴 (EPO), EPO 미메티바디 (mimetibody), 트롬보포이에틴, 인슐린-유사 성장 인자 (IGF)-I, IGF-II, 간세포 성장 인자, 카스파제 (caspase) 저해제); (4) 항염증 화합물 (예를 들어, p38 MAP 키나제 저해제, TGF-베타 저해제, 스타틴, IL-6 및 IL-1 저해제, 페미롤라스트 (Pemirolast), 트라닐라스트 (Tranilast), 레미케이드 (Remicade) (등록 상표) (미국 펜실베이니아주 앨번 소재의 센토코, 인코포레이티드 (Centocor, Inc.)), 시롤리무스 (Sirolimus) 및 비스테로이드성 항-염증 약물 (NSAID) (예를 들어, 테폭살린 (Tepoxalin), 톨메틴 (Tolmetin) 및 수프라펜 (Suprafen)); (5) 면역억제 또는 면역조절제, 예를 들어, 칼시뉴린 (calcineurin) 저해제, mTOR 저해제, 항증식제, 코르티코스테로이드 및 각종 항제; (6) 항산화제, 예를 들어, 프로부콜 (probucol), 비타민 C 및 E, 코엔자임 Q-10, 글루타티온, L-시스테인 및 N-아세틸시스테인; (7) 국소 마취제; (8) 영양적 인자, 예를 들어, 아그린 (Agrin), VEGF, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, NEGF-1, NEGF-2, PDGF, GDF, IGF1, IGF2, EGF 및 FGF; 및 (9) 허혈 조직으로의 내피 선구 세포의 동원 및 혼입에서 작용하는 인자, 예컨대, 몇가지 예를 들면, VEGF, SDF-1, EPO, G-CSF, 스타틴, 에스트로겐, PPAR γ 및 CXCR4가 포함되나 이들에 한정되지 않는다.

본 발명의 약제학적 조성물은 제대 조직-유래 세포로부터 제조되고, 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 매질과 함께 제형화된 제제를 포함하여, 제대 조직-유래 세포, 이의 성분 또는 산물을 포함한다. 적절한 약제학적으로 허용가능한 담체는 물, 염 용액 (예를 들어, 링거액), 알코올, 오일, 젤라틴, 폴리비닐 피롤리돈, 탄수화물 (예를 들어, 락토스, 아밀로스 또는 전분, 지방산 에스테르) 및 하이드록시메틸셀룰로스를 포함한다. 이러한 제제는 살균될 수 있으며, 필요에 따라, 보조제 (auxiliary agent), 예를 들어, 윤활제 (lubricant), 보존제, 안정화제, 습윤화제, 에멀전화제, 삼투압에 영향을 가하기 위한 염, 완충제 및 착색제와 혼합될 수 있다. 본 발명에 사용하기에 적절한 약제학적 담체는 본 발명이 속한 기술 분야에 공지되어 있으며, 예를 들어, 문헌 [Pharmaceutical Sciences (17th Ed., Mack Pub. Co., Easton, PA)] 및 WO 96/05309호에 기술되어 있다.

전형적으로, 그러나 배타적이지 않게, 제대 조직-유래 세포 성분 또는 산물을 포함하나 생세포를 포함하지 않는 약제학적 조성물은 액체로 (또는 구강 전달이 적절한 경우 고체 정제, 캡슐 등으로) 제형화된다. 이들은 표적

골격근, 혈관평활근, 혈관주위세포 또는 혈관 내피 조직으로의 약물 및 생물학적 분자의 전달을 달성하기 위한, 구강, 비강, 안과, 및 정맥내를 비롯한 비경구를 포함하나 이들에 한정되지 않는 본 발명이 속하는 기술 분야에 공지되어 있는 임의의 허용가능한 경로에 의한 투여를 위해 제형화될 수 있다. 비경구 투여의 특정 경로는 근육내, 피하, 복강내, 척추강내, 낭내 (intracisternal), 또는 주사바늘이 있는 주사기 또는 펌프 장치가 있거나 이것이 없는 카테터를 통한 경로를 포함하나 이들에 한정되지 않는다.

제대 조직-유래 생세포를 포함하는 약제학적 조성물은 전형적으로, 액체, 반고체 (예를 들어, 겔 (피브린 글루 포함)) 또는 고체 (예를 들어, 혈관 또는 골격근 조직 공학에 적절한 바와 같은 매트릭스, 스캐폴드 등)로 제형화된다. 액체 조성물은 표적 혈관 또는 골격근 조직으로의 생세포의 전달을 달성하기 위해 본 발명이 속한 기술 분야에 알려져 있는 임의의 허용가능한 경로에 의한 투여를 위해 제형화된다. 전형적으로, 이들에는 확산 방식의, 또는 주사바늘이 있는 주사기 및/또는 펌프 장치가 있거나 이것이 없는 카테터를 통한 근육내, 정맥내 또는 동맥내 전달을 포함하나 이들에 한정되지 않는 투여 경로에 의한 말초 허혈 상해, 손상 또는 교통 부위에 표적화된 주사 또는 주입이 포함된다.

반고체 또는 고체 담체 중 생세포를 포함하는 약제학적 조성물은 전형적으로 허혈 상해, 손상 또는 교통의 부위에서의 수술에 의한 이식을 위해 제형화된다. 액체 조성물이 또한 수술 절차에 의해 투여될 수도 있음이 인식될 것이다. 특정 실시형태에서, 반고체 또는 고체 약제학적 조성물은 반투과성 겔, 격자 (lattice), 세포 스캐폴드 등을 포함할 수 있으며, 이는 비-생분해성이거나 생분해성일 수 있다. 예를 들어, 특정 실시형태에서, 외인성 세포를 그들의 주변으로부터 격리시켜, 생물학적 분자 (예를 들어, 근육영양 인자, 혈관영양적 (angiotrophic) 인자 또는 내피 선구 세포 동원 인자)가 주변 골격근 또는 혈관 세포로 분비되고 전달되게 하는 것이 바람직하거나 적절할 수 있다. 이들 실시형태에서, 세포는 이식된 세포를 숙주 조직으로부터 물리적으로 분리시키는, 비-분해성이며 선택적으로 투과성인 장벽 (barrier)에 의해 둘러싸인 제대 조직-유래 세포를 포함하는 세포 집단 또는 제대 조직-유래 생세포를 포함하는 자가 이식물로 제형화될 수 있다. 이러한 이식물은 때때로 "면역보호"로 지칭되는데, 이들이 약리학적으로 유도된 면역억제의 부재 하에 면역 세포 및 거대분자가 이식된 세포를 사멸시키는 것을 방지하는 능력을 갖기 때문이다 (이러한 장치 및 방법의 검토를 위하여 예를 들어, 문헌 [P.A. Tresco *et al.*, (2000) *Adv. Drug Delivery Rev.* 42:3-27]을 참조한다).

다른 실시형태에서, 상이한 종류의 분해성 겔 및 네트워크가 본 발명의 약제학적 조성물을 위해 사용된다. 예를 들어, 서방형 제형에 특히 적절한 분해성 물질은 생체적합성 (biocompatible) 폴리머, 예를 들어, 폴리(락트산), 폴리(락트산-코-글리콜산), 메틸셀룰로스, 히알루론산, 콜라겐 등을 포함한다. 약물 전달 비히클 내의 분해성 폴리머의 구조, 선택 및 사용은 문헌 [A. Domb *et al.*, 1992, *Polymers for Advanced Technologies* 3:279-292]을 비롯한 몇몇 문헌에 검토되어 있다.

다른 실시형태에서, 생분해성, 바람직하게는 생흡수성 스캐폴드 또는 매트릭스 상에서 또는 그 내에서 세포를 전달하는 것이 바람직하거나 적절할 수 있다. 이들 전형적인 3차원 바이오물질은 스캐폴드에 부착되거나, 스캐폴드 내에 분산되거나, 스캐폴드 내에 포획된 (entrapped) 세포의 매트릭스 내에 혼입된 생세포를 함유한다. 일단 신체의 표적 영역으로 이식되면, 이들 이식물은 숙주 조직에 통합되고, 여기서, 이식된 세포는 점차 자리를 잡게 된다 (예를 들어, 상기 문헌 [Tresco, PA, *et al.* (2000)]; 또한, 문헌 [Hutmacher, DW (2001) *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.* 12:107-174] 참조).

생체적합성 매트릭스는 호모폴리머, 코폴리머 및 블록 폴리머뿐 아니라 이들의 조합을 포함하는 천연, 변형된 천연 또는 합성 생분해성 폴리머를 포함할 수 있다. 폴리머는 일반적으로 폴리머가 합성되는 모노머에 기초하여 표기된다.

적절한 생분해성 폴리머 또는 폴리머 부류의 예에는 피브린, 콜라겐, 엘라스틴, 젤라틴, 비트로넥틴, 피브로넥틴, 라미닌, 트롬빈, 폴리(아미노산), 산화 셀룰로스, 트로포엘라스틴, 실크, 리보핵산, 데옥시리보핵산; 단백질, 폴리뉴클레오타이드, 재구성 기저막 매트릭스, 전분, 텍스트란, 알긴산염, 히알루론, 키틴, 키토산, 아가로스, 다당류, 히알루론산, 폴리(락트산), 폴리(글리콜산), 폴리에틸렌 글리콜, 탈세포화 (decellularized) 조직, 자가-조립 펩티드, 폴리펩티드, 글리코사미노글리칸, 이들의 유도체 및 이들의 혼합물이 포함된다. 글리콜산 및 락트산 둘 모두에 있어서, 전형적으로 중간체 사이클릭 다이머가 제조되며, 중합 전에 정제된다. 이들 중간체 다이머는 각각 글리콜리드 및 락티드로 지칭된다. 다른 유용한 생분해성 폴리머 또는 폴리머 부류에는 제한 없이, 지방족 폴리에스테르, 폴리(알킬렌 옥살레이트), 티로신 유래 폴리카보네이트, 폴리이미노카보네이트, 폴리오르토에스테르, 폴리옥사에스테르, 폴리아미도에스테르, 아민기를 함유하는 폴리옥사에스테르, 폴리(프로필렌 푸마레이트), 폴리다이옥사논, 폴리카보네이트, 폴리옥살레이트, 폴리(알파-하이드록시산), 폴리(에

스테르), 폴리우레탄, 폴리(에스테르 우레탄), 폴리(에테르 우레탄), 폴리무수물 (polyanhydride), 폴리아세테이트, 폴리카프로락톤, 폴리(오르토에스테르), 폴리아미노산, 폴리아미드 및 이들의 배합물 및 코폴리머가 포함된다. 추가의 유용한 생분해성 폴리머에는 제한 없이, L- 및 D-락트산의 스테레오폴리머 (stereopolymer), 비스(파라-카복시페녹시) 프로판 및 세바스산의 코폴리머, 세바스산 코폴리머, 카프로락톤의 코폴리머, 폴리(락트산)/폴리(글리콜산)/폴리에틸렌 글리콜 코폴리머, 폴리우레탄 및 폴리(락트산)의 코폴리머, 알파-아미노산의 코폴리머, 알파-아미노산 및 카프로산의 코폴리머, 알파-벤질 글루타메이트 및 폴리에틸렌 글리콜의 코폴리머, 석시네이트 및 폴리(글리콜)의 코폴리머, 폴리포스파젠, 폴리(하이드록시알카노에이트) 및 이들의 혼합물이 포함된다. 이원 및 삼원계도 또한 고려된다.

일반적으로, 매트릭스로 사용하기에 적절한 생분해성 폴리머는 바람직하게는 이것이 의도된 응용에 적절한 기계적 특성을 갖고, 조직이 성장되고 치유될 때까지 충분히 무손상으로 유지되고, 염증 또는 독성 반응을 일으키지 않고, 이의 목적이 달성된 후에 체 내에서 대사되고, 형성되어야 할 목적하는 최종 산물로 용이하게 처리되고, 허용가능한 저장 수명을 입증하고 용이하게 살균되도록 구성된다.

본 발명의 일 태양에서, 매트릭스를 형성하기 위해 사용되는 생적합성 폴리머는 하이드로겔의 형태로 존재한다. 본 발명의 일 실시형태에서, 하이드로겔은 피브린 글루를 포함한다. 일반적으로, 하이드로겔은 특유한 3차원 구조를 유지하면서 수 중에서 그의 중량의 20% 초과를 흡수할 수 있는 교차결합된 폴리머 물질이다. 이 정의는 수-팽윤된 물질 뿐만 아니라 수성 환경에서 팽윤된 건조 교차결합 폴리머도 포함한다. 친수성 폴리머의 호스트 (host)는, 상기 폴리머가 생물학적 기원의 것이든지, 반합성 폴리머이든지 또는 완전 합성 폴리머이든지 간에, 하이드로겔을 생성하도록 교차결합될 수 있다. 하이드로겔은 합성 폴리머 물질로부터 생성될 수 있다. 이러한 합성 폴리머는 다양한 특성 및 예측가능한 로트-투-로트 (lot-to-lot) 균일성이 되도록 맞추어질 수 있으며, 일반적으로 면역원성에 대한 염려가 없는 물질의 신뢰성 있는 공급원을 대표할 수 있다. 매트릭스는 미국 특허 제5,670,483호 및 제5,955,343호, 미국 특허 출원 공개 제2002/0160471호 및 PCT 공개 WO 02/062969호에 논의된 것들과 같이, 자가 조립 펩티드로부터 형성된 하이드로겔을 포함할 수 있다.

하이드로겔을 약물 전달 응용에서 가치 있게 만드는 특성은 평형 팽윤도, 흡착 동역학, 용질 투과도, 및 하이드로겔의 생체 내 성능 특징을 포함한다. 화합물에 대한 투과성은 부분적으로는 팽윤도 또는 수분 함량 및 생분해 속도에 따라 달라진다. 겔의 기계적 강도가 팽윤도에 직접적으로 비례하여 감소하기 때문에, 하이드로겔을 기재에 부착시킬 수 있어서 상기 복합 시스템이 기계적 강도를 향상시키도록 하는 것이 또한 충분히 본 발명에서 예상된다. 일부 실시형태에서, 하이드로겔은 하이드로겔의 유용한 전달 특성과 함께, 기재의 기계적 강도를 얻기 위하여, 다공성 기재 내에 함침될 수 있다.

본 발명에 사용될 수 있는 스캐폴드 또는 매트릭스 (때때로 집합적으로 "프레임워크"로 지칭)의 비제한적인 예에는 텍스타일 구조, 예를 들어, 위브 (weave), 니트, 브레이드 (braid), 메쉬 (mesh), 부직포 및 경편직물 (warped knit); 다공성 폼, 준-다공성 (semi-porous) 폼, 천공된 필름 또는 시트, 미립자, 비드 및 구체 및 상기 구조의 조합인 복합 구조가 포함된다. 부직 매트 (mat)는 예를 들어, 상표명 빅릴 (VICRYL) 봉합사 (미국 뉴저지주 섬머빌 소재의 에티콘, 인코포레이티드 (Ethicon, Inc.))로 시판되는 글리콜산 및 락트산 (PGA/PLA)의 합성 흡수성 코폴리머로 구성된 섬유를 사용하여 형성될 수 있다. 미국 특허 제6,355,699호에 논의된 바와 같이, 예를 들어, 냉동 건조 또는 동결 건조와 같은 과정에 의해 형성되는 폴리(엠티론-카프로락톤)/폴리(글리콜산) (PCL/PGA) 코폴리머로 구성된 폼도 또한 사용될 수 있다. 하이드로겔, 예를 들어, 자가-조립 펩티드 (예를 들어, RAD16)도 또한 사용될 수 있다. 동소 (*in situ*)-형성 분해성 네트워크도 또한 본 발명에 사용하기에 적절하다 (예를 들어, 문헌 [Anseth, KS *et al.* (2002) *J. Controlled Release* 78:199-209]; 문헌 [Wang, D. *et al.*, (2003) *Biomaterials* 24:3969-3980]; 헤 (He) 등의 미국 특허 출원 공개 제2002/0022676호 참조). 이들 동소 형성 물질은 주사에 적합한 유체로서 제형화되며, 그 후 다양한 수단, 예를 들어, 동소에서 또는 생체 내에서, 온도, pH의 변화, 광에의 노출에 의해 하이드로겔을 형성하도록 유도될 수 있다.

다른 실시형태에서, 프레임워크는 생흡수성 물질, 예를 들어 PGA, PLA, PCL 코폴리머 또는 배합물, 또는 히알루론산으로 만들어진 다중필라멘트 양으로 이루어질 수 있는 펠트 (felt)이다. 양은 권축, 절단, 카딩 (carding) 및 니들링 (needling)으로 이루어진 표준 텍스타일 가공 기술을 이용하여 펠트로 만들어진다. 다른 실시형태에서, 세포는 복합 구조일 수 있는 폼 스캐폴드 상에 집중된다.

상기 언급된 많은 실시형태에서, 프레임워크는 혈관의 형상과 같은 유용한 형상으로 몰딩될 수 있다. 추가로, 제대 조직-유래 세포가 사전-형성된, 비분해성 수술 또는 이식가능 장치 상에, 예를 들어, 섬유모세포-함유 GDC 혈관내 코일의 제조에 사용되는 것에 상응하는 방식으로 배양될 수 있는 것이 인식될 것이다 (문헌 [Marx, WF

et al., (2001) *Am. J. Neuroradiol.* 22:323-333]).

매트릭스, 스캐폴드 또는 장치는 세포 부착을 증진시키기 위해 세포의 접종 전에 처리될 수 있다. 예를 들어, 접종 전에, 나일론 매트릭스는 0.1 몰의 아세트산으로 처리되고, 폴리라이신, PBS, 및/또는 콜라겐 중에서 인큐베이션시켜 나일론을 코팅할 수 있다. 폴리스티렌을 황산을 이용하여 유사하게 처리할 수 있다. 프레임워크의 외부 표면은 또한 프레임워크의 플라스마 코팅 또는 하나 이상의 단백질 (예를 들어, 콜라겐, 탄성 섬유, 세망 섬유), 당단백질, 글리코사미노글리칸 (예를 들어, 헤파린 설페이트, 콘드로이틴-4-설페이트, 콘드로이틴-6-설페이트, 더마탄 설페이트, 케라틴 설페이트), 유전 물질, 예를 들어, 사이토카인 및 성장 인자, 세포 매트릭스 및/또는 세포 생존 및 분화에 영향을 미치는 다른 인자들 중 특히 젤라틴, 알기네이트, 한천, 아가로스, 식물성 검을 포함하나 이들에 한정되지 않는 다른 물질의 부가에 의한 것과 같이, 세포의 부착 또는 성장 및 조직의 분화가 향상되도록 변형될 수 있다.

hUTC-함유 프레임워크는 본 발명이 속한 기술 분야에 알려져 있는 방법에 따라 제조된다. 예를 들어, 세포를 배양 용기에서 자유롭게 서브-컨플루언시 (sub-confluency) 또는 컨플루언시까지 성장시키고, 배양으로부터 옮겨, 프레임워크로 접종시킬 수 있다. 성장 인자는 세포의 접종 전에, 그 동안 또는 그 후에 배양 배지에 첨가되어, 필요에 따라, 분화 및 조직 형성을 촉발시킬 수 있다. 대안적으로, 프레임워크 그 자체는 그 위에서의 세포의 성장이 향상되거나, 이식물의 거부 위험이 감소되도록 변형될 수 있다. 따라서, 항염증 화합물, 면역억제제 또는 성장 인자를 포함하나 이들에 한정되지 않는 하나 이상의 생물학적 활성 화합물을 국소 방출을 위하여 프레임워크에 첨가할 수 있다.

제대 조직-유래 세포, 제대 조직-유래 세포의 일부 또는 제대 조직-유래 세포를 포함하는 세포 집단, 또는 제대 조직-유래 세포의 성분 또는 제대 조직-유래 세포에 의해 생성되는 산물이 다양한 방식으로 사용되어, 특히, 말초 혈관 질환 환자에서 골격근 세포 및 조직의 회복, 재생 및 개선을 지원 및 촉진시키고, 혈류를 향상시키고, 혈관신생을 자극하고/거나 지원할 수 있다. 이러한 효용에는 시험관 내, 생체 외 및 생체 내 방법이 포함된다.

일 실시형태에서, 상기 논의된 바와 같이, 제대 조직-유래 세포는 시험관 내에서 배양되어, 세포에 의해 천연적으로 생성되거나, 골격근, 혈관평활근, 혈관주위세포 또는 혈관 내피 계통으로 분화되도록 유도되는 경우 세포에 의해 생성되거나, 유전자 변형을 통해 세포에 의해 형성되는 생물학적 산물을 생성할 수 있다. 예를 들어, TIMP1, TPO, KGF, HGF, FGF, HBEGF, BDNF, MIP1b, MCP1, RANTES, I309, TARC, MDC 및 IL-8이 성장 배지 중에 성장하는 제대-유래 세포로부터 분비되는 것이 관찰되었다. 또한, 내피 선구 세포 동원을 위한 인자, 예를 들어, VEGF, SDF-1, EPO, G-CSF, 스타틴, 에스트로겐, PPAR γ 및 CXCR4는 제대 조직-유래 세포에 의해 생성될 수 있으며, 성장 배지 내로 분비될 수 있다. 골격근 또는 혈관 회복 및 재생에 사용하기 위한, 아직 검출되거나 시험되지 않은 다른 영양적 인자가 제대 조직-유래 세포에 의해 생성되고 아마도 배지로 분비될 가능성이 있다.

이와 관련하여, 본 발명의 다른 실시형태는 미분화된 제대 조직-유래 세포로부터, 또는 골격근 또는 혈관 계통으로의 분화를 자극하는 조건에서 배양된 제대 조직-유래 세포로부터의, 조정 배지의 생성을 위한 제대 조직-유래 세포의 용도를 특징으로 한다. 이러한 조정 배지는 골격근, 혈관평활근, 혈관주위세포 또는 혈관 내피 선구 세포의 시험관 내 또는 생체 외 배양에서, 또는 생체 내에서 제대 조직-유래 세포의 균질한 집단 또는 제대 조직-유래 세포 및 골격근, 혈관평활근, 혈관주위세포 또는 혈관 내피 선구세포를 포함하는 비균질한 집단을 포함하는 이식된 세포를 지원하거나, 내피 선구 세포를 예를 들어, 허혈 상해 부위에 동원하기 위해 사용하기 위한 것으로 고려된다.

또 다른 실시형태는 다양한 목적을 위한 hUTC 세포 용해물, 용해성 세포 분획 또는 이의 성분, 또는 ECM 또는 이의 성분의 용도를 포함한다. 상기 언급된 바와 같이, 이들 성분 중 일부는 약제학적 조성물에 사용될 수 있다. 다른 실시형태에서, 세포 용해물 또는 ECM은 물질 또는 장치가 수술에, 또는 이식을 위해 사용되도록 코팅하거나 다르게 처리하기 위해, 또는 생체 외 목적을 위해, 이러한 처리의 과정 중에 접촉하는 세포 또는 조직의 치유 또는 생존을 조장하기 위해 사용된다. 일부 바람직한 실시형태에서, 제대 조직-유래 세포로부터 제조되는 이러한 제제는 FGF 및 HGF를 포함한다.

다른 실시형태에서, 제대 조직-유래 세포는 시험관 내 공동-배양 중에 유리하게 사용되어, 다른 세포, 특히, 골격근 세포, 골격근 선구 세포, 혈관평활근 세포, 혈관평활근 선구 세포, 혈관주위세포, 혈관 내피 세포 또는 혈관 내피 선구 세포에 영양적 지원을 제공한다. 일부 바람직한 실시형태에서, 영양적 지원은 세포의 증식이다. 공동-배양을 위하여, 제대 조직-유래 세포 및 목적하는 기타 세포는 2개의 세포 유형이 접촉 상태로 존재하는 조건 하에 공동-배양되는 것이 바람직할 수 있다. 이는 예를 들어 적합한 배양 기재 상에 또는 배양 배지 중에

비균질한 세포 집단으로서 세포를 집중함으로써 성취될 수 있다. 대안적으로, 제대 조직-유래 세포는 먼저 컨플루언스까지 성장된 다음, 배양 중 목적하는 제2 세포 유형을 위한 기재로 소용될 것이다. 이러한 후자의 실시형태에서, 세포는 예를 들어, 막 또는 유사 장치에 의해 추가로 물리적으로 분리되어, 다른 세포 유형이 공동-배양 기간 후에 제거되고 따로 사용되게 할 수 있다. 골격근 또는 혈관 세포 유형의 증량 및 분화를 조장하기 위한 공동-배양 중의 제대 조직-유래 세포의 용도는 연구에서, 그리고 임상/치료 영역에서 적용가능성을 찾을 수 있다. 예를 들어, 제대 조직-유래 세포 공동-배양은 기초 연구 목적을 위해, 또는 예를 들어, 약물 스크리닝 검정에 사용하기 위해, 배양 중의 골격근, 혈관평활근, 혈관주위세포 또는 혈관 내피 세포의 성장 및 분화를 촉진시키기 위해 사용될 수 있다. 또한, 제대 조직-유래 세포 공동-배양은 치료적 목적을 위한 이후의 투여를 위하여, 골격근, 혈관평활근, 혈관주위세포 또는 혈관 내피 선구세포의 생체 외 증량을 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 골격근, 혈관평활근, 혈관주위세포, 또는 혈관 내피 선구 세포를 개체로부터 수집하고, 제대 조직-유래 세포와의 공동-배양 중에 생체 외에서 증량시킨 다음, 상기 개체 (자가 전달) 또는 다른 개체 (동계 또는 동종 전달)로 복귀시킬 수 있다. 이들 실시형태에서, 생체 외 증량 후에, 제대 조직-유래 세포 및 골격근, 혈관평활근, 혈관주위세포 또는 혈관 내피 선구세포를 포함하는 혼합된 세포 집단이 치료를 필요로 하는 환자에게 투여될 수 있는 것이 인식될 것이다. 대안적으로, 자가 전달이 적절하거나 바람직한 상황에서, 공동-배양 세포 집단을 배양 중 물리적으로 분리시켜, 환자로서의 투여를 위하여 자가 골격근, 혈관평활근 또는 혈관 내피 선구세포가 제거되게 할 수 있다.

미국 특허 출원 공개 제2005/0058631호, 제2005/0054098호 및 제2005/0058630호에 기술된 바와 같이, 제대 조직-유래 세포는 수용된 동물 모델에서 체 내로 효율적으로 이식되고, 혈류를 향상시키고, 조직 피사를 줄이는 것으로 나타났다. 이들 발견은 본 발명에 기술된 발견과 함께, 본 발명의 바람직한 실시형태를 뒷받침하며, 여기서, 제대 조직-유래 세포는 말초 혈관 질환 환자에서 골격근 및/또는 혈관 조직을 회복시키거나 재생시킴으로써 또는 말초 혈관 질환 환자에서 혈류를 향상시키거나 혈관신생을 자극하고/거나 지원함으로써 허혈 상해 또는 손상을 치료하기 위한 세포 요법에 사용된다. 일 실시형태에서, 제대 조직-유래 세포는 체 내의 표적 위치에, 특히 허혈 에피소드의 위치에 또는 이에 인접하게 이식되며, 여기서, 제대 조직-유래 세포는 하나 이상의 골격근, 혈관 평활근, 혈관주위세포 또는 혈관 내피 표현형으로 분화할 수 있으며, 제대 조직-유래 세포는 골격근 세포, 혈관평활근 세포, 혈관주위세포 또는 혈관 내피 세포 선구세포 및/또는 동소에서 골격근 세포, 혈관 평활근 세포, 혈관 주위세포 또는 혈관 내피 세포를 위한 영양적 지원을 제공할 수 있으며, 제대 조직-유래 세포는 내피 선구 세포를 허혈 상해 부위에 동원하기 위한 인자를 생성할 수 있거나, 제대 조직-유래 세포는 특히, 이들 중 둘 이상의 방식으로 유익한 효과를 가할 수 있다. 제대 조직-유래 세포는 GFGFm, IL-6, IL-8, HGF, IGF-1, TPO 등을 포함하나 이들에 한정되지 않는 영양적 인자를 분비한다. 제대 조직-유래 세포는 혈관 선구 세포, 예를 들어, 혈관모세포의 동원을 보조하여, 새로운 혈관 형성을 자극할 수 있다.

제대 조직-유래 세포는 이들이 투여되는 환자의 체 내에서 영양적 효과를 가할 수 있다. 예를 들어, 제대 조직-유래 세포는 골격근 세포, 혈관평활근 세포, 혈관 내피 세포, 혈관주위세포 또는 이의 선구 세포에 영양적 효과를 가할 수 있다. 일부 바람직한 실시형태에서, 영양적 지원은 이러한 세포의 증식이다. 제대 조직-유래 세포는 또한 이들이 투여되는 환자의 체 내에서 세포의 이동을 유도할 수 있다. 이러한 이동은 말초 혈관 질환, 예를 들어, 말초 허혈의 회복, 재생 및 치료를 촉진시킬 수 있다. 예를 들어, 말초 혈관 질환의 부위에 또는 그 부위 근처에 투여되는 제대 조직-유래 세포는 말초 혈관 질환의 부위로의 세포의 이동을 유도하여, 이환 조직 및 이의 주변을 회복시키거나, 재생시키거나 다르게는 치료할 수 있다. 이렇게 투여되는 제대 조직-유래 세포는 골격근 세포, 혈관평활근 세포, 혈관 내피 세포, 혈관주위세포 또는 이의 선구 세포의 이동을 유도할 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 제대 조직-유래 세포는 말초 혈관 질환 부위로의 또는 적어도 그 부위 근처로의 혈관 내피 세포 및/또는 혈관 내피 선구 세포의 이동을 유도한다. 일부 실시형태에서, 이동은 FGF 및/또는 HGF, 바람직하게는 제대 조직-유래 세포에 의해 발현되는 FGF 및 HGF에 의해 유도되거나 지원된다. 또한, 세포 용해물, 세포하 분획 등을 포함하는 제대 조직-유래 세포로부터 제조되는 제제를 사용하여 말초 혈관 질환을 치료할 수 있다. 이러한 제제는 약제학적으로 허용가능한 담체, 예를 들어, 본 명세서에 기술되고 예시된 것들과 함께 제형화되고 말초 혈관 질환을 치료하기 위한 유효량으로 환자에게 투여될 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 제대 조직-유래 세포로부터 제조되는 이러한 제제는 FGF 및 HGF를 포함한다.

본 발명의 특정 실시형태는 말초 허혈 상해 또는 손상의 치료를 위한 혈관의 직접적인 회복, 재생 또는 대체, 또는 이의 회복, 재생 또는 대체의 지원에 관한 것이다.

제대 조직-유래 세포는 단독으로 (예를 들어, 실질적으로 균질한 집단으로) 또는 다른 세포와의 혼합물로 투여될 수 있다. 상기 기술된 바와 같이, 제대 조직-유래 세포는 매트릭스 또는 스캐폴드, 또는 통상적인 약제학적

으로 허용가능한 담체와 함께 약제학적 제제로 제형화된 것으로 투여될 수 있다. 제대 조직-유래 세포가 다른 세포와 함께 투여되는 경우, 이들은 다른 세포와 동시에 또는 순차적으로 (다른 세포 전에 또는 후에) 투여될 수 있다. 제대 조직-유래 세포와 함께 투여될 수 있는 세포에는 근세포, 골격근 세포, 골격근 선구 세포, 혈관 평활근 세포, 혈관평활근 선구 세포, 혈관주위세포, 혈관 내피 세포 또는 혈관 내피 선구 세포, 및/또는 기타 다능성 또는 만능성 줄기 세포가 포함되나 이들에 한정되지 않는다. 상이한 유형의 세포는 투여 직전에 제대 조직-유래된 세포와 혼합될 수 있거나, 또는 이들은 투여 전에 소정의 기간 동안 함께 공동-배양될 수 있다.

제대 조직-유래 세포는 본 발명이 속하는 기술 분야에 알려져 있는 바와 같은 다른 유익한 약물 또는 생물학적 분자 또는 다른 활성 작용제, 예를 들어, 항염증제, 항세포사멸제, 항산화제, 성장 인자, 혈관신생 인자 또는 근육재생 또는 근육보호 약물과 함께 투여될 수 있다. 제대 조직-유래 세포가 다른 작용제와 함께 투여되는 경우, 이들은 단일 약제학적 조성물 중에, 또는 개별 약제학적 조성물 중에 다른 작용제와 동시에 또는 순차적으로 (다른 작용제의 투여 전 또는 후) 함께 투여될 수 있다. 다른 작용제는 본 발명이 속하는 기술 분야의 숙련 의가 적절한 것으로 여기는 것과 같이, 이식 전에 시작하고 회복 과정 내내 지속되거나, 이식 시에 시작되거나 심지어 이식 후에 개시될 수 있는 치료 요법의 일부일 수 있다.

제대 조직-유래 세포와 함께 투여될 수 있는 다른 성분의 예에는 몇가지 예를 들면, (1) 기타 혈관신생 인자, 혈관신생 약물 또는 근육재생 또는 근육보호 인자 또는 약물; (2) 선택된 세포의 매트릭스 성분, 예를 들어, 본 발명이 속한 기술 분야에 알려져 있는 콜라겐 및/또는 성장 인자, 혈소판-풍부 혈장 및 약물 중 하나 이상의 유형 (대안적으로, 제대 조직-유래 세포는 유전공학적으로 조작되어 성장 인자를 발현하고 생성할 수 있음); (3) 항세포사멸제 (예를 들어, 에리트로포이에틴 (EPO), EPO 미메티바디, 트롬보포이에틴, 인슐린-유사 성장 인자 (IGF)-I, IGF-II, 간세포 성장 인자, 카스파제 저해제); (4) 항염증 화합물 (예를 들어, p38 MAP 키나제 저해제, TGF-베타 저해제, 스타틴, IL-6 및 IL-1 저해제, 페미롤라스트, 트라닐라스트, 레미케이드(등록 상표) (미국 펜실베이니아주 맥번 소재의 센토코, 인코포레이티드), 시롤리무스 및 비-스테로이드 항-염증 약물 (NSAID) (예를 들어, 테폭살린, 톨메틴 및 수프라펜); (5) 면역억제 또는 면역조절제, 예를 들어, 칼시뉴린 저해제, mTOR 저해제, 항증식제, 코르티코스테로이드 및 각종 항제; (6) 항산화제, 예를 들어, 프로부콜, 비타민 C 및 E, 코엔자임 Q-10, 글루타티온, L-시스테인 및 N-아세틸시스테인; 및 (6) 국소 마취제가 포함되나 이들에 한정되지 않는다.

일 실시형태에서, 제대 조직-유래 세포는 미분화 세포로서, 즉, 성장 배지 중 배양되는 것으로서 투여된다. 대안적으로, 제대 조직-유래 세포는 목적하는 골격근, 혈관평활근, 혈관주위세포 또는 혈관 내피 표현형으로의 분화를 자극하는 조건에 대한 배양 중의 노출 후에 투여될 수 있다.

본 발명의 세포는 수술에 의해 이식되거나, 주사되거나, 전달되거나 (예를 들어, 카테터, 주사기, 셉트, 스텐트, 마이크로카테터 또는 펌프에 의해), 다르게는 허혈 상해, 손상 또는 고통의 부위에 직접적으로 또는 간접적으로 투여될 수 있다. 본 발명의 세포 또는 이의 조성물의 투여 경로는 정맥내, 근육내, 피하, 비강내, 척추강내, 낭내, 또는 주사바늘이 있는 주사기 또는 펌프 장치가 있거나 이것이 없는 카테터를 통한 경로를 포함하나 이들에 한정되지 않는다.

세포가 반-고체 또는 고체 장치에서 투여되는 경우, 체 내의 정확한 위치로의 수술적 이식이 전형적으로 적합한 투여 수단이다. 그러나, 액체 또는 유체의 약제학적 조성물은 혈액을 통해 또는 직접적으로 이환 근육 조직으로 (예를 들어, 미만성 허혈 상해의 경우가 그러할 것과 같이 확산에 의해, 이환 영역의 도처에) 투여될 수 있다 제대 조직-유래 세포의 이동은 화학적 신호, 성장 인자 또는 칼파인에 의해 안내될 수 있다.

제대 조직-유래 세포 또는 제대 조직-유래 세포를 포함하는 조성물 및/또는 매트릭스는 마이크로 카테터, 내부 카테터법 (intracatheterization)을 통해 또는 미니-펌프를 통해 전달될 수 있다. 비히클 부형제 또는 담체는 환자에게, 특히 세포 분화가 유도되어야 할 부위에 국소적으로 투여하기에 약제학적으로 허용가능한 것으로 알려져 있는 것들 중 임의의 것일 수 있다. 예에는 액체 배지, 예를 들어, 돌베코 변형 이글 배지 (DMEM), 멸균 염수, 멸균 인산염 완충 염수, 레이보비츠 (Leibovitz's) 배지 (L15, 미국 캘리포니아주 칼스배드 소재의 인비트로겐), 멸균수 중의 텍스트로스 및 임의의 다른 생리학적으로 허용가능한 액체가 포함된다.

다른 실시형태는 약제학적으로 허용가능한 담체 및 제대 조직-유래 세포 성분 (예를 들어, 세포 용해물 또는 이의 성분) 또는 산물 (예를 들어, 제대 조직-유래 세포에 의해 천연적으로 생성되거나 유전자 변형을 통해 생성되는 영양적 및 다른 생물학적 인자, 제대 조직-유래 세포 배양 유래의 조정 배지), 또는 제대 조직-유래 세포 성장 배지 또는 성장 배지로부터 정제된 산물을 포함하는 치료적 조성물을 투여하는 단계에 의한 말초 허혈 상해 또는 손상의 치료 방법을 포함한다. 바람직한 실시형태에서, 생물학적 인자는 FGF 및 HGF이다. 이들 방법

은 다른 활성 작용제, 예를 들어 본 발명이 속하는 기술 분야에 알려져 있는 바와 같은 성장 인자, 혈관신생 인자 또는 근육재생 또는 근육보호 약물을 투여하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

제대 조직-유래 세포, 또는 본 명세서에 기술된 다른 치료적 또는 약제학적 조성물 중 임의의 것을 투여하기 위한 투여형 및 요법은 개별 환자의 증상, 예를 들어, 말초 허혈 사건으로부터의 상해 또는 손상의 특성 및 정도, 연령, 성별, 체중 및 일반 의학적 상태 및 의사에게 알려져 있는 다른 인자를 고려하여 우수한 의료 행위에 따라 변한다. 따라서, 환자에게 투여될 약제학적 조성물의 유효량은 본 발명이 속하는 기술 분야에 알려져 있는 이들 고려사항에 의해 결정된다.

제대 조직-유래 세포는 혼합림프구반응에서 동종 PBMC를 자극하는 것으로 보이지 않았다. 따라서, 동종 또는 심지어는 이종 제대 조직-유래 세포를 사용한 이식은 일부 경우에 허용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 제대 조직-유래 세포 그 자체는 면역억제 효과를 제공하여, 이에 의해, 이식된 제대 조직-유래 세포의 숙주 거부가 방지된다. 이러한 예에서, 세포 요법 동안의 약리학적 면역억제는 필요하지 않을 수 있다.

그러나, 다른 경우에, 세포 요법을 개시하기 전에 환자를 약리학적으로 면역억제시키는 것이 바람직하거나 적절할 수 있다. 상기 기술된 바와 같이, 이는 전신 또는 국소 면역억제제의 사용을 통하여 달성되거나, 이는 캡슐화된 장치에서 세포를 전달함으로써 달성될 수 있다. 이식된 세포에 대한 면역 반응을 감소시키거나 제거하기 위한 이들 및 다른 수단은 해당 분야에 알려져 있다. 대안으로서, 제대 조직-유래 세포를 상기 언급된 바와 같이 이들의 면역원성을 감소시키기 위해 유전자 변형시킬 수 있다.

살아있는 환자에서의 이식된 제대 조직-유래 세포의 생존은 다양한 스캐닝 기술, 예를 들어, 컴퓨터 단층 촬영 (CAT 또는 CT) 스캔, 자기 공명 영상화 (MRI) 또는 양전자 방출 단층촬영술 (PET) 스캔의 사용을 통해 결정될 수 있다. 이식물 생존의 결정은 또한 골격근 또는 혈관 조직을 제거하고, 이를 가시적으로 또는 현미경을 통해 시험함으로써 사후에 행해질 수 있다. 대안적으로, 세포는 골격근 세포, 혈관평활근 세포, 혈관주위세포 또는 혈관 내피 세포에 특이적인 스타틴으로 처리될 수 있다. 또한, 이식된 세포는 추적 염료, 예를 들어, 로다민-또는 플루오레세인-표지 미소구체, 패스트 블루 (fast blue), 페릭 (ferric) 미립자, 비스벤즈아미드 또는 유전자적 도입된 리포터 유전자 산물, 예를 들어, 베타-갈락토시다제 또는 베타-글루쿠로니다제의 이전의 혼입에 의해 확인될 수 있다.

다른 태양에서, 본 발명은 상기 기술된 바와 같이, 혈관신생을 자극하고/거나 지원하고, 혈류를 향상시키고, 말초 허혈 사건에 의해 상해를 입거나 또는 손상되는 골격근의 재생, 회복 및 개선을 위한 다양한 방법에서 제대 조직-유래 세포, 제대 조직-유래 세포 집단, 제대 조직-유래 세포의 성분 및 산물을 사용하는 키트를 제공한다. 키트는 허혈 사건에 의해 야기되는 손상 또는 상해의 치료 또는 다른 예정된 치료를 위해 사용되는 경우, 적어도 제대 조직-유래 세포를 포함하는 하나 이상의 세포 집단 및 약제학적으로 허용가능한 담체 (액체, 반고체 또는 고체)를 포함할 수 있다. 키트는 또한 임의로 예를 들어, 주사에 의한 세포의 투여 수단을 포함할 수 있다. 키트는 추가로 세포의 사용에 대한 설명서를 포함할 수 있다. 야전 병원, 예를 들어, 군용으로 제조된 키트는 조직 스캐폴드, 수술 봉합사 등을 비롯한 절차의 완전한 공급물을 포함할 수 있으며, 여기서, 세포는 급성 상해의 회복과 함께 사용되어야 한다. 본 명세서에 기술된 바와 같은 검정 및 시험관 내 방법을 위한 키트는 (1) 제대 조직-유래 세포, 또는 제대 조직-유래 세포의 성분 또는 산물, (2) 시험관 내 방법을 실시하기 위한 시약, (3) 적절한 다른 세포 또는 세포 집단, 및 (4) 시험관 내 방법을 행하기 위한 설명서 중 하나 이상을 포함할 수 있다.

하기 실시예에서는 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 이들 실시예는 본 명세서에 기술된 본 발명의 태양을 추가로 예시하지만 제한하지 않고자 한다.

실시예 1

젯과 (MURINE) 뒷다리 말초 허혈 모델에서의 제대-유래 세포의 효능

재료 및 방법

제대 세포 배양 및 단리. 제대-유래 세포 (UDC)를 미국 특허 출원 공개 제2005/0058631호 또는 제2005/0054098호에 기술된 바와 같이 제조하였다. 세포를 계대수 10 또는 11까지 배양한 다음 (대략 20 내지 25 회 집단 배가), 동결 보존시켰다.

허혈 모델 처리군:

그룹

- 1 PBS, 음성 대조군
- 2 혈관 내피 성장 인자를 위한 발현
플라스미드 (pVEGF), 양성 대조군
- 3 세포주 #1 세포, 총 5×10^5 개 세포
- 4 세포주 #1 세포, 총 1×10^6 개 세포
- 5 세포주 #2 세포, 총 1×10^6 개 세포
- 6 세포주 #1 세포, 배양, 총 1×10^6 개 세포

세포주 1: U120304 p10,

세포주 2: U072804A p11

주사용 시료 제제. 세포를 주사 직전에 해동시키거나 (그룹 3 내지 5), 24 내지 30 시간 동안 배양하였다 (그룹 6). 세포를 계수하고 생존력을 트립판 블루 염색 및 혈구계수기 상에서의 계수에 의해 결정하였다. 전체 용량의 세포 또는 플라스미드 ($100 \mu\text{g}$)를 $100 \mu\text{l}$ 의 PBS 중에 재현탁화시키고, 마우스로의 주사를 위해 27 게이지 주사바늘이 있는 $300 \mu\text{l}$ 의 튜버쿨린 주사기에 로딩하였다.

수술. 0일에, 급성 뒷다리 허혈을 좌측 장대퇴골 동맥의 편측 결찰 (ligation) 및 절제에 의해 무흉선 (athymic) 누드 마우스에서 수술에 의해 유도하였다. 마우스를 UDC로의 처리 또는 대조군을 위해 적어도 $n = 8$ 의 6개 그룹으로 분할하였다. 마우스를 그룹 1 내지 5에 대하여 처리군으로 무작위로 지정하였다. 그룹 6이 연구 마지막에 부가되었기 때문에, 무작위화가 일어나지 않았다. 또한, 일정 관리 상충은 원래 연구와 동시에 마이크로CT/PET를 수행하지 못하게 하였다. 이러한 분석을 21일 연구의 완료 후에 등록된 8마리의 추가의 동물 (4마리의 대조군 및 4마리의 배양된 세포 1)의 그룹에서 수행하였다.

세포 주사. 수술 1일 후에, 마우스를 발바닥 부위의 레이저 도플러 영상화 분석을 위해 마취시켰다. 마우스가 마취 하에 있는 동안, 세포를 좌측 (허혈) 다리 내의 5개의 부위에 주사하였다: (1) 전경골근으로 $20 \mu\text{l}$; (2) 장딴지근으로 $2 \times 20 \mu\text{l}$; 및 (3) 사두 다발의 대퇴직근으로 $2 \times 20 \mu\text{l}$.

분석. 레이저 도플러 영상화를 1, 4, 8, 14 및 21일에 수행하였다. 21일에, 마우스를 희생시키고, 전경골근 (TA), 장딴지근 및 사두근을 절개하고, 얇은 섹셔닝 (sectioning) 및 CD31 항체를 사용한 면역조직화학적 염색을 위해 동결고정시켰다. 근육의 관류 상태를 결정하기 위해 플루오로메탄 기체를 사용한 마이크로CT/PET 분석을 8일에 수행하였다. 이들 마우스를 바로 후에 희생시키고, 뒷다리 근육을 동결고정된 얇은 섹션 상에서 CD31 면역조직화학을 위해 처리하였다.

배제 기준 수술 후 1일에 중증의 발가락 괴사를 나타내는 마우스를 주사 전 연구로부터 배제시켰다. 또한, 중증의 괴사 (예를 들어, 전체 발의 괴사) 때문에 또는 심각한 체중 감소를 경험하거나 다르게는 극심한 고통의 징후를 나타낸다면, 연구 중 임의의 시간에 마우스를 배제시켰다.

결과

이들 실험의 목적은 UDC가 설치류 뒷다리 허혈 모델에서 상해로부터 조직을 보호하는지를 결정하려는 것이었다. 대퇴부 혈류에서 상해를 생성하고, 상해시키고 대략 24시간 후에 상기 영역에 세포를 주입함으로써 이러한 모델을 수행하였다. 이들 동물의 다리의 관류를 추산하고, 이를 상해를 입지 않은 반대쪽 다리와 비교함으로써 결과를 평가하였다. 또한 조직을 연구의 마지막에 이들 동물로부터 수집하여, 동물에서 혈관구조와 상해를 평가하였다. 또한 이러한 연구를 누드 마우스에서 인간 세포를 사용하여 수행하여, 이식된 세포의 이종 거부를 피하였다.

도 1에 제시된 결과는 4일 및 8일에 배양된 세포로 처리된 동물에서 향상된 관류가 있었으며, 혈류도 또한 8일에 주사 직전 해동된 120304 세포로 처리된 동물에서 향상되었기 때문에, UDC가 마우스에 이익을 부여하는 것을 보여준다. 072804A 세포는 임의의 시점에 이익을 나타내지 않았는데, 이는 이들 2개의 롯트 (lot)의 세포 간의 차이를 시사한다. 일반적으로, 동물은 시간이 지남에 따라 개선을 보였으며, 이는 이러한 동물 스트레인 (strain)이 어느 정도의 고유 회복능을 갖는 것을 나타낸다. 또한, 이들 동물은 상대적으로 어렸고, 이는 이들의 선천적 재생능의 요인일 수 있다.

TA 근육을 연구의 마지막에 수집하고, 섹션을 항 CD31 항체로 프로빙시켜, 혈관 내피 세포를 검출하였다. 대표적인 결과는 도 2에 나타나 있다. 결과는 PBS 대조군 동물이 허혈 다리에서 육안의 괴사 및 제한된 혈관구조를

나타내지만 (예를 들어, 마우스 #26 및 #43), UDC-처리 다리는 보다 높은 상대적 수준의 CD31 염색 및 감소된 수준의 괴사를 나타내는 것을 보여준다. 또한, 결과는 배양된 UDC로 처리된 동물이 대조군 - (PBS 대조군 및 일부 경우에, 정상 (상해를 입지 않은) 다리)에 비하여 개선된 혈관구조를 보이는 것을 시사한다. 정상 다리에 비하여 증가된 CD31 염색이 허혈이나 처리된 다리에서 관찰되었다. VEGF 플라스미드 및 Umb072804A로 처리된 동물은 PBS 대조군과 유사한 결과를 보였다.

요약

이들 결과는 제대-유래 세포가 설치류 뒷다리 허혈 모델에서 혈류를 향상시키고, 조직 괴사를 감소시키는데 유효할 수 있다는 증거를 제공한다. 연구는 주사 직전에 해동시킨 2가지의 상이한 림프의 제대 세포를 포함하였으며, 결과는 림프 간에 차이가 존재할 수 있음을 제시한다. 일부 활성을 갖는 것으로 보이는 세포를 또한 주사 전에 약 48시간 동안 배양하고, 다른 처리군에 포함시켰다. 이들 세포는 가장 효율적인 것으로 보이며, 이는 배양이 세포의 활성 프로파일을 변경시킴을 시사한다. 이러한 조직학 결과는 또한 처리가 보호 효과를 제공할 수 있다는 증거를 제공한다. 결과는 UDC가 이들의 효과를 가하는 메커니즘에 관한 충분한 정보를 제공하지 않는다. 임의의 특정 작용 이론 또는 메커니즘에 연관되고자 하지 않고, 세포가 새로운 혈관의 성장을 자극하거나 근육 조직을 손상의 진행으로부터 보호함으로써, 예를 들어, 세포사멸로부터의 보호 또는 내인성 활성 작용제의 동원에 의해, 이들의 효과를 가할 수 있는 것으로 여겨진다. 정밀한 활성의 메커니즘을 조사하기 위하여 추가의 연구가 필요하다.

참고 문헌

1) Rehman, J. *et al.* (2004) *Circulation* 109:1292-1298.

실시예 2

내피 네트워크 형성 검정

혈관신생 또는 새로운 혈관구조의 형성이 새로운 조직의 성장에 필요하다. 혈관신생의 유도는 많은 병리학적 증상에서 중요한 치료 목적이다. 시험관 내 검정, 상표명 매트리지겔 (MATRIGEL) (미국 매사추세츠주 베드포드 소재의 비디 디스커버리 랩웨어 (BD Discovery Labware)) 하에 널리 확립되어 있는 생물학적 세포 배양 기질이 코팅된 배양 플레이트 상으로의 내피 세포의 접종 방법에서 제대 조직-유래 세포의 잠재적 혈관신생 활성을 확인하기 위하여, 기저막 추출 (문헌 [Nicosia and Ottinetti (1990) *In Vitro Cell Dev. Biol.* 26(2):119-28])이 수행되었다. 매트리지겔 (미국 매사추세츠주 베드포드 소재의 비디 디스커버리 랩웨어) 상에서 내피 세포를 혈관신생 인자로 처리하는 것은 세포가 모세혈관과 유사한 네트워크를 형성하게 자극할 것이다. 이는 혈관 형성의 자극제 및 저해제를 시험하기 위한 통상적인 시험관 내 검정이다 (문헌 [Ito *et al.* (1996) *Int. J. Cancer* 67(1):148-52]). 실험은 제대 조직-유래 세포가 배양 웰 인서트 상으로 접종된 공동-배양 시스템을 이용한다. 이들 투과성 인서트는 내피 및 제대 조직-유래 세포 배양 배지 간의 배지 성분의 수동 교환을 가능하게 한다.

방법 및 재료

세포 배양

제대 및 태반 조직-유래 세포. 인간 제대 및 태반을 받고, 세포를 이전에 기술된 바와 같이 분리하였다 (실시예 1 참조). 세포를 젤라틴-코팅 조직 배양 플라스틱 플라스크 상에서 성장 배지 (둘베코 변형 필수 배지 (DMEM; 미국 캘리포니아주 칼스배드 소재의 인비트로젠), 15% (v/v) 우태아혈청 (미국 유타주 로건 소재의 하이클론 (Hyclone)), 100 유닛/밀리리터의 페니실린, 100 마이크로그램/밀리리터의 스트렙토마이신 (인비트로젠), 0.001 % (v/v)의 2-머캅토에탄올 (미국 미주리주 세인트 루이스 소재의 시그마)) 중에 배양하였다. 배양물을 5% CO₂를 이용하여 37°C에서 인큐베이션하였다. 실험을 위해 사용되는 세포는 계대수 4 내지 12이었다.

활성적으로 성장하는 세포를 트립신처리하고, 계수하고, 인서트당 15,000개 세포로, 코스타 트랜스웰 (COSTAR TRANSWELL) 6.5 밀리미터 직경의 조직 배양 인서트 (미국 뉴욕주 코닝 소재의 코닝 (Corning)) 상으로 접종하였다. 세포를 표준 성장 조건 하에서 37°C에서 성장 배지 중에 48 내지 72시간 동안 인서트 상에서 배양하였다.

인간 중간엽 줄기 세포 (hMSC). hMSC를 캄브렉스 (Cambrex) (미국 메릴랜드주 위커스빌 소재)로부터 구입하고, MSCGM (캄브렉스) 중에 배양하였다. 배양물을 표준 성장 조건 하에서 인큐베이션시켰다.

활성적으로 성장하는 MSC를 트립신처리하고, 계수하고, 인서트당 15,000개 세포로 코스타 트랜스웰 6.5 밀리미터

터 직경의 조직 배양 인서트 (미국 뉴욕주 코닝 소재의 코닝)상으로 접종하였다. 세포를 표준 성장 조건 하에서 성장 배지 중에 48 내지 72시간 동안 인서트 상에서 배양하였다.

인간 제대정맥 내피 세포 (HUVEC). HUVEC을 캄브렉스 (미국 메릴랜드주 워커스빌 소재)로부터 수득하였다. 세포를 EBM 또는 EGM 내피 세포 배지 (캄브렉스) 중 어느 하나에서 개별 배양물 중에 성장시켰다. 세포를 표준 성장 조건 하에서 표준 조직-배양 플라스틱 상에서 성장시켰다. 검정에 사용되는 세포는 계대수 4 내지 10이었다.

인간 관상동맥 내피 세포 (HCAEC). HCAEC를 캄브렉스 인코포레이티드 (Cambrex Incorporated) (미국 메릴랜드주 워커스빌 소재)로부터 구입하였다. 또한, 이들 세포를 EBM 또는 EGM 배지 포뮬레이션 (formulation)에서 개별 배양물 중에 유지시켰다. 세포를 표준 성장 조건 하에서 표준 조직 배양 플라스틱 상에서 성장시켰다. 실험을 위해 사용되는 세포는 계대수 4 내지 8이었다.

내피 네트워크 형성 (매트리젤) 검정. 배양 플레이트를 제조자의 지침에 따라 매트리젤 (미국 매사추세츠주 베드포드 소재의 비디 디스커버리 랩웨어)로 코팅하였다. 약술하면, 매트리젤 (미국 매사추세츠주 베드포드 소재의 비디 디스커버리 랩웨어)을 4℃에서 해동시키고, 약 250 마이크로리터를 분취하고, 냉각된 24-웰 배양 플레이트 (코닝)의 각 웰상에 균일하게 분배하였다. 이어서, 플레이트를 37℃에서 30분 동안 인큐베이션시켜, 물질이 고화되게 하였다. 활성적으로 성장하는 내피 세포 배양물을 트립신처리하고, 계수하였다. 세포를 원심분리, 재현탁화 및 상청액의 흡인에 의해 2% FBS가 있는 성장 배지 중에 2회 세척하였다. 세포를 2% (v/v) FBS가 있는 대략 0.5 밀리리터 성장 배지 중에 웰당 20,000개 세포로 코팅된 웰에 접종하였다. 이어서, 세포를 대략 30분 동안 인큐베이션시켜, 세포가 정착되게 하였다.

이어서, 내피 세포 배양물을 10 나노몰의 인간 bFGF (미국 뉴저지주 로키 힐 소재의 페프로테크 (Peprotech)) 또는 10 나노몰의 인간 VEGF (미국 뉴저지주 로키 힐 소재의 페프로테크) 중 어느 하나로 처리하여, 내피 세포 반응에 대한 양성 대조군으로 삼았다. 제대 조직-유래 세포가 접종된 트랜스웰 인서트를 인서트 챔버 내에 2% FBS가 있는 성장 배지를 지닌 적절한 웰에 첨가하였다. 배양물을 대략 24시간 동안 5% CO₂와 함께, 37℃에서 인큐베이션시켰다. 웰 플레이트를 인큐베이터로부터 제거하고, 내피 세포 배양물의 영상을 올림푸스 (Olympus) 도립 현미경 (미국 뉴욕주 멜빌 소재의 올림푸스)으로 수집하였다.

결과

태반-유래 세포 또는 제대-유래 세포를 사용한 공동-배양 시스템에서, HUVEC은 세포 네트워크를 형성한다 (데이터 미도시). HUVEC 세포는 hMSC 및 10 나노몰의 bFGF가 있는 공동-배양 실험에서 제한된 세포 네트워크를 형성한다 (데이터 미도시). HUVEC 세포는 임의의 처리 없이, 네트워크 형성을 보이지 않거나, 이를 거의 보이지 않았다 (데이터 미도시). 이들 결과는 제대 조직-유래 세포가 HUVEC을 자극하는 혈관신생 인자를 분비함을 시사한다.

태반-유래 세포 또는 제대-유래 세포를 사용한 공동-배양 시스템에서, CAEC는 세포 네트워크를 형성한다 (데이터 미도시).

표 2-1은 성장 배지 중의 태반- 및 제대 조직-유래 세포에 의해 분비되는 공지되어 있는 혈관신생 인자의 수준을 보여준다. 태반- 및 제대 조직-유래 세포를 상기 기술된 바와 같이 인서트 상에 접종하였다. 세포를 인서트 상에서 48시간 동안 대기 산소 중에 37℃에서 배양한 다음, 2% FBS 배지로 전환하고, 다시 24시간 동안 37℃로 복귀시켰다. 배지를 제거하고, 바로 동결시키고, -80℃에서 보관하고, 서치라이트 멀티플렉스 (SearchLight multiplex) ELISA 검정 (미국 일리노이스주 록포드 소재의 피어스 케미컬 컴퍼니 (Pierce Chemical Company))에 의해 분석하였다. 나타난 결과는 2별 측정의 평균이다. 결과는 제대-유래 세포 및 태반-유래 세포가 검출 가능한 수준의 혈소판-유래 성장 인자-bb (PDGF-bb) 또는 헤파린-결합 표피 성장 인자 (HBEGF)를 분비하지 않는 것을 보여준다. 세포는 측정가능한 양의 메탈리노프로테아제-1 (TIMP-1), 안지오포이에틴 2 (angiopoietin 2; ANG2), 트롬보포이에틴 (thrombopoietin; TPO), 각질세포 성장 인자 (KGF), 간세포 성장 인자 (HGF), 섬유모세포 성장 인자 (FGF) 및 혈관 내피 성장 인자 (VEGF)의 조직 저해제를 분비한다.

[표 2-1]

제대-유래 세포 및 태반-유래 세포로부터 분비되는 잠재적 혈관신생 인자

	TIMP1 (pg/ml)	ANG2 (pg/ml)	PDGFbb (pg/ml)	TPO (pg/ml)	KGF (pg/ml)	HGF (pg/ml)	FGF (pg/ml)	VEGF (pg/ml)	HBEGF (pg/ml)
Plac (P4)	91655.3	175.5	<2.0	275.5	3.0	58.3	7.5	644.6	<1.2
Plac (P11)	1592832.4	28.1	<2.0	1273.1	193.3	5960.3	34.8	12361.1	1.7
Umb cord (P4)	81831.7	<9.8	<2.0	365.9	14.1	200.2	5.8	<4.0	<1.2
단독의 배지	<9.8	25.1	<2.0	<6.4	<2.0	<3.2	<5.4	<4.0	<1.2

제대-유래 세포 및 태반-유래 세포를 대기중 산소 중에 2% FBS가 있는 배지에서 24시간 내에 배양하였다. 배지를 제거하고, 서치라이트 멀티플렉스 ELISA 검정 (피어스)에 의해 검정하였다. 결과는 2벌의 분석의 평균이다. 값은 배양 배지 밀리리터당 피코그램으로 보고된 배지 중의 농도이다. Plac: 태반 유래 세포; Umb cord: 제대 유래 세포.

표 2-2는 제대-유래 세포 및 태반-유래 세포에 의해 분비되는 공지되어 있는 혈관신생 인자의 수준을 보여준다. 태반- 및 제대-유래 세포를 상기 기술된 바와 같이 인서트 상에 접종하였다. 세포를 인서트 상에 48시간 동안 5% 산소에서 성장 배지 중에 배양한 다음, 2% FBS로 전환하고, 24시간 동안 5% O₂ 인큐베이션으로 복귀시켰다. 배지를 제거하고, 바로 동결시키고, -80℃에서 보관하고, 서치라이트 멀티플렉스 ELISA 검정 (미국 일리노이스 주 록포드 소재의 피어스 케미컬 컴퍼니)에 의해 분석하였다. 나타난 결과는 2벌 측정의 평균이다. 결과는 제대-유래 세포 및 태반-유래 세포가 검출가능한 수준의 혈소판-유래 성장 인자-bb (PDGF-BB) 또는 헤파린-결합 표피 성장 인자 (HBEGF)를 분비하지 않는 것을 보여준다. 세포는 측정가능한 양의 메탈리노프로테아제-1 (TIMP-1), 안지오프로테틴 2 (ANG2), 트롬보모이에틴 (TPO), 각질세포 성장 인자 (KGF), 간세포 성장 인자 (HGF), 섬유모세포 성장 인자 (FGF) 및 혈관 내피 성장 인자 (VEGF)의 조직 저해제를 분비한다.

[표 2-2]

제대-유래 세포 및 태반-유래 세포로부터 분비되는 잠재적 혈관신생 인자

	TIMP1 (pg/ml)	ANG2 (pg/ml)	PDGF- bb (pg/ml)	TPO (pg/ml)	KGF (pg/ml)	HGF (pg/ml)	FGF (pg/ml)	VEGF (pg/ml)	HB- EGF (pg/ml)
Plac (P4)	72972.5	253.6	<2.0	743.1	2.5	30.2	15.1	1495.1	<1.2
Plac (P11)	458023.1	55.1	<2.0	2562.2	114.2	2138.0	295.1	7521.3	1.8
Umb cord (P4)	50244.7	<9.8	<2.0	403.3	10.7	156.8	5.7	<4.0	<1.2
단독의 배지	<9.8	25.1	<2.0	<6.4	<2.0	<3.2	<5.4	<4.0	<1.2

제대-유래 세포 및 태반-유래 세포를 5% 산소 중에 2% FBS가 있는 배지에서 24시간 내에 배양하였다. 배지를 제거하고, 서치라이트 멀티플렉스 ELISA 검정 (피어스)에 의해 검정하였다. 결과는 2벌의 분석의 평균이다. 값은 배양 배지 밀리리터당 피코그램으로 보고된 배지 중의 농도이다. Plac: 태반 유래 세포; Umb cord: 제대 유래 세포.

요약

결과는 인간 제대-유래 세포 및 태반-유래 세포가 제정맥 및 관상동맥 내피 세포 둘 모두가 시험관 내 매트릭셀 (미국 매사추세츠주 베드포드 소재의 비디 디스커버리 랩웨어) 검정에서 네트워크를 형성하게 자극할 수 있음을 보여준다. 이러한 효과는 이러한 검정 시스템에서 공지되어 있는 혈관신생 인자와 함께 관찰되는 것과 유사하다. 이들 결과는 제- 및 태반-유래 세포가 생체 내에서 혈관신생을 자극하는데 유용한 것을 시사한다.

실시예 3

내피 세포의 시험관 내 증식 및 이동에 대한 hUTC의 효과

시험관 내에서 내피 세포의 증식 및 이동에 대한 인간 제대 조직-유래 세포 (hUTC)의 영향을 결정하기 위한 연

구를 수행하였다. hUTC 및 내피 세포를 공동-배양함으로써, 그리고 인간 제정맥 내피 세포 (HUVEC)의 배양물을 hUTC 용해물과 인큐베이션시킴으로써 이들 효과를 시험하였다. 본 실시예에서 제시된 결과는 hUTC가 내피 세포의 증식 및 이동의 증가를 유도함을 보여준다. 추가로, 데이터는 이들 효과가 부분적으로 섬유모세포 성장 인자 (FGF) 및 간세포 성장 인자 (HGF)에 의해 매개됨을 시사한다.

재료 및 방법

세포 배양

계대수 8 내지 9에서 동결보존된 인간 제대 조직-유래 세포 (hUTC) lot#120304를 해동시키고, 젤라틴-코팅된 플라스크 상에 접종하고, 헤이플릭 성장 배지 (DMEM - 저농도 글루코스 (집코, 카탈로그 번호11885-084), 15 v/v% 우태아혈청 (FBS, 하이클론, 카탈로그 번호 SH30070.03), 0.001 v/v% 베타-머캅토포탄올 (시그마, 카탈로그 번호 M7154) 및 50 U/ml의 페니실린 및 50 마이크로그램/ml의 스트렙토마이신 (집코, 카탈로그 번호 3810-74-0))에서 배양하였다. 본 실시예에 상세화된 연구를 위하여, 계대수 10 또는 11의 세포를 사용하였다. 인간 제대동맥 내피 세포 (HUVEC, 카탈로그 번호 C2517A), 인간 관상동맥 내피 세포 (HCAEC, 카탈로그 번호 CC2585) 및 인간 장골 동맥 내피 세포 (HIAEC, 카탈로그 번호 CC2545)를 캄브렉스로부터 획득하고, 제조처의 권고에 따라 내피 성장 배지 (EGM-2MV, 카탈로그 번호 3202)에서 배양하였다. 인간 중간엽 줄기 세포 (MSC, 카탈로그 번호 PT-2501)도 또한 캄브렉스로부터 구매하고, 제조처의 권고에 따라 중간엽 줄기 세포 성장 배지 (MSCGM, 카탈로그 번호 PT-3001)에서 유지하였다. 인간 피부 섬유모세포 (CCD9)는 ATCC로부터의 것이고, 10% FBS 및 1 U/ml 페니실린-스트렙토마이신을 함유하는 DMEM/F12 배지에서 유지시켰다.

통상적인 계대를 위하여, 세포를 인산염 완충 염수 (PBS, 인비트로젠, 카탈로그 번호 14190)로 1회 세척하고, 트립신처리에 의해 분리하였다 (0.25% 트립신-EDTA, 인비트로젠, 카탈로그 번호 25200-056). 구아바 (등록 상표) 기기 (미국 캘리포니아주 헤이워드 소재의 구아바 테크놀로지스 (Guava Technologies))를 사용하여 세포를 계수하고, 5000개 세포/cm²의 밀도로 접종하였다. 세포를 매 3 내지 4일마다 통상적으로 계대하였다.

성장 인자 및 항체

제조합 인간 염기성 섬유모세포 성장 인자 (bFGF, 카탈로그 번호 100-18B) 및 제조합 인간 간세포 성장 인자 (HGF, 카탈로그 번호 100-39)는 페프로테크로부터의 것이었으며, 제조합 인간 혈관 내피 성장 인자 (VEGF, 카탈로그 번호 293-VE)는 알앤디 시스템즈 (R and D Systems)로부터의 것이었다. bFGF (카탈로그 번호 ab11937), HGF (카탈로그 번호 ab10678) 및 VEGF (카탈로그 번호 ab9570)에 대한 항체를 아브캄 (Abcam) (미국 매사추세츠주 캠브리지 소재)으로부터 구입하였다.

세포 용해물의 제제

세포 용해물을 이전의 성장물 유래의 동결된 hUTC lot#120304 세포 펠렛으로부터 제조하였다. 약술하면, hUTC lot#120304를 4일 동안 배양하고, 트립신처리에 의해 수집하고, 원심분리에 의해 펠렛화하였다. 이어서, 세포를 PBS로 3회 세척하고, PBS 중에 1×10^7 개 세포/ml로 재현탁화시켰다. 1 ml 현탁액의 분취물을 1.5 ml 멸균 실리콘처리 마이크로원심분리 튜브에 넣고 300 rcf에서 5분 동안 원심분리하였다. PBS를 흡인시키고, 세포 펠렛을 사용시까지 -80°C에서 보관하였다.

세포 용해물을 제조하기 위하여, 세포 펠렛을 함유하는 튜브를 액체 질소 (LN2)에서 60초 동안 침지시킨 다음, 즉시 37°C 수조에서 60초 동안 또는 3분 이하로, 용해될 때까지 침지시켰다. 이러한 단계를 3회 반복하였다. 이러한 단계 후에, 동결-해동된 시료를 13000 rcf에서 4°C에서 10분 동안 원심분리한 다음, 얼음 위에 두었다. 상청액을 조심스레 제거하고, 새로운 멸균 실리콘처리 1.5 ml 튜브로 옮겼다. 원심분리 단계를 3회 반복하고, 생성된 상청액을 풀링시켰다 (pooled). 단백질 농도를 퀵스타트 브래드포드 (Quickstart Bradford) 단백질 검정 키트 (바이오-라드(Bio-rad), 카탈로그 번호 500-0201)의 마이크로어레이 프로토콜을 사용하여 결정하였다.

세포 증식의 측정

세포를 수집하고, 5000개 세포/cm²의 농도로 지정된 배지 포물레이션에 직접 플레이팅하였다. 공동-배양 실험을 위하여, 내피 세포는 웰의 저부에 플레이팅하고 (10,000개 세포/웰), hUTC, MSC 또는 섬유모세포를 트랜스웰 인서트 내측에 플레이팅하여 (1650개 세포/트랜스웰 인서트), 24-웰 트랜스웰 (코닝 카탈로그 번호 3413)을 사용하였다. 지정된 기간에, hUTC, MSC 또는 섬유모세포를 함유하는 인서트를 제거하고 폐기하였다. 90 µl의 트립신을 각 웰에 첨가함으로써 내피 세포를 수집하였다. 세포를 위아래로 피펫팅 (pipetting)시킴으로써 방출시킨 다음, 깨끗한 96-웰 플레이트로 옮겼다. 90 µl의 배지의 첨가에 의해 트립신을 저해하였다. 세포를 20 µl

의 염색 용액 (18 μl 의 배지 + 1 μl 구아바 비아카운트 플렉스 리젠트 (Guava Viacount Flex Reagent) + 1 μl 의 DMSO)의 첨가에 의해 염색하고, 구아바 (등록 상표) 기기 (미국 캘리포니아주 헤이워드 소재의 구아바 테크놀로지스)를 사용하여 정량화하였다.

HUVEC의 증식에 대한 hUTC lot#120304 세포 용해물의 영향에 대한 연구를 위하여, HUVEC를 EGM-2MV 배지 중에 10,000개 세포/웰의 밀도로 8시간 동안 24-웰 조직 배양 접시 상으로 접종하였다. 이어서, 세포를 0.5% FBS를 함유하며 성장 인자가 없는 0.5 ml의 EGM-2MV 배지 중에서의 하룻밤 인큐베이션에 의해 혈청-기아처리하였다. 이후에, FBS, 62.5 μg 또는 125 μg 의 단백질을 함유하는 신선하게 제조된 hUTC lot#120304 세포 용해물 및 FGF에 대한 중화 항체 (7 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 또는 HGF에 대한 중화 항체 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 첨가하였다. 4일의 배양 후에, 세포를 수집하고, 구아바 (등록 상표) 기기를 사용하여 계수하였다.

hUTC-매개의 내피 세포 증식의 증가의 잠재적 메카니즘에 대한 연구를 위하여, FGF에 대한 중화 항체 (7 $\mu\text{g}/\text{ml}$), HGF에 대한 중화 항체 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 및 VEGF에 대한 중화 항체 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 HUVEC 및 HCAEC와 hUTC의 공동-배양물에 포함시켰다. 세포를 처음에 플레이팅할 때 항체를 세포 배양 배지에 첨가하였다. 7일의 공동-배양 후에, 세포를 수집하고, 구아바 (등록 상표) 기기를 사용하여 계수하였다.

세포 이동의 평가

세포 이동의 측정을 위하여, 6-웰 트랜스웰 (코닝 카탈로그 번호 3428) 구성을 사용하였다. 세포를 5000개 세포/ cm^2 의 밀도로 지정된 배지 포물레이션으로 직접 접종하였다. 내피 세포를 트랜스웰 인서트 (23,000개 세포/트랜스웰 인서트) 내측에 접종하고, hUTC lot#120304 또는 MSC를 웰의 저부에 플레이팅하였다 (48,000개 세포/웰). 트랜스웰의 아래측 상의 세포의 개수를 계수함으로써 공동-배양 7일 후에 이동을 평가하였다. 약술하면, 트랜스웰을 깨끗한 웰로 옮기고, PBS로 1회 세척하였다. 트립신을 웰의 저부에 첨가함으로써 웰의 아래측으로부터의 세포를 수집하였다. 완전 성장 배지의 첨가에 의해 트립신을 저해시키고, 세포를 원심분리에 의해 수집하였다. 이어서, 세포를 25 μl 의 배지에 재현탁화시키고, 구아바 (등록 상표) 기기를 사용하여 세포 계수를 얻기 위해 이의 20 μl 를 사용하였다.

hUTC-매개의 내피 세포 이동 증가의 잠재적 메카니즘에 대한 연구를 위하여, FGF에 대한 중화 항체 (7 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 및 HGF에 대한 중화 항체 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 HUVEC 및 HCAEC와 hUTC lot#120304의 공동-배양물에 포함시켰다. 세포를 처음에 플레이팅할 때 항체를 세포 배양 배지에 첨가하였다. 7일의 공동-배양 후에, 트랜스웰 인서트의 아래쪽에 존재하는 세포를 수집하고, 구아바 (등록 상표) 기기를 사용하여 계수하였다.

결과

내피 세포의 증식에 대한 hUTC의 영향

공동-배양 시스템을 사용하여, 내피 세포의 증식에 대한 hUTC의 영향을 연구하였다. 이는 내피 세포를 24-웰 조직 배양 접시의 저부에 플레이팅하고, hUTC를 트랜스웰 인서트 내측에 플레이팅하여, 트랜스웰 구성을 사용하여 수행하였다. 이들 실험에서, 2가지 상이한 배지 포물레이션을 사용하였다 (재료 및 방법에 상세화된 배지 조성): (1) 헤이플릭 80% + EGM-2MV 20% (H80) 또는 (2) 헤이플릭 50% + EGM-2MV 50% (H50). 6 또는 7일의 공동-배양 후에, 트랜스웰 인서트를 제거하고, 내피 세포를 트립신처리에 의해 수집하고, 구아바 (등록 상표) 기기를 사용하여 계수하였다.

H50에 비하여 H80에 배양된 내피 세포의 증식에 대한 hUTC lot#120304의 영향은 도 1에 나타나 있다. H50에 유지된 HUVEC의 증식은 H80에 유지된 것보다 더 높은 한편 (도 1a), HCAEC 및 HIAEC는 이들 공동-배양 배지 포물레이션에서 유사한 성장을 나타내었다 (도 1b 및 도 1c). 둘 모두의 배지 포물레이션에서, 내피 세포와 hUTC lot#120304의 공동-배양에 의해 7일 후에 유의미한 세포 개수의 증가가 야기되었다. hUTC 및 내피 세포의 모든 이후의 공동-배양 연구를 헤이플릭 50% + EGM-2MV 50% (H50) 배지 포물레이션에서 수행하였다.

MSC 및 섬유모세포를 또한 내피 세포와의 공동-배양에서 시험하여, 다른 세포 유형이 내피 세포의 증식에 영향을 미치는 능력을 갖는지 여부를 결정하였다. 도 1a에 나타난 바와 같이, 공동-배양 배지 (H50 또는 H80) 중 HUVEC, 및 MSC와 또는 섬유모세포와 공동-배양된 세포의 증식에는 차이가 존재하지 않았다. HCAEC (도 1b) 및 HIAEC (도 1c)도 마찬가지였으며, 여기서, hUTC lot#120304와의 공동-배양이 증가된 세포 증식을 야기하는 한편, 공동-배양 배지 (H50 또는 H80) 중의 세포와, MSC와 공동-배양된 세포 간의 세포 차이가 관찰되지 않았다.

hUTC-매개의 내피 세포 증식의 증가의 잠재적 메카니즘을 조사하기 위하여, FGF에 대한 중화 항체 (7 $\mu\text{g}/\text{ml}$),

HGF에 대한 중화 항체 ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) 및 VEGF에 대한 중화 항체 ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$)를 HUVEC 및 HCAEC와 hUTC의 공동-배양물에 포함시켰다. 도 2a 내지 2d의 결과는 HUVEC 및 HCAEC 둘 모두에서, FGF에 대한 중화 항체 및 HGF에 대한 중화 항체의 첨가가 hUTC lot#120304에 의해 유도되는 세포 개수의 증가를 감소시키는 것을 보여준다. 이들 연구에 사용되었던 농도에서, 이들 중화 항체는 성장 인자에 의해 유도되는 HUVEC의 증식을 차단하였다 (도 2a 및 도 2b). VEGF에 대한 중화 항체가 둘 모두의 HUVEC (도 2a 및 2b) 및 HCAEC (도 2c 및 2d)와, hUTC lot#120304의 공동-배양에 의해 유도되는 세포 증식에 대한 유의미한 효과를 갖지 않았음을 언급하는 것이 흥미롭다. 개별 연구에서, hUTC lot#120304의 증식은 배양 배지로의 FGF 및 VEGF에 대한 중화 항체의 첨가에 의해 영향을 받지 않았다 (데이터 미도시).

HUVEC의 증식에 대한 hUTC lot#120304 세포 용해물의 영향

또한, HUVEC의 증식에 대한 세포 용해물의 영향을 결정하기 위한 연구를 행하였다. HUVEC를 5000개 세포/ cm^2 의 밀도로 8시간 동안 EGM-2MV 배지 중에 24-웰 플레이트 상으로 접종하였다. 이어서, 세포를 0.5% 우태아혈청 (FBS)을 함유하고 성장 인자가 없는 0.5 ml의 EGM-2MV 배지 중에서의 밤샘 인큐베이션에 의해 혈청 기아처리하였다. 인큐베이션 후에, 다양한 농도의 신선하게 제조된 hUTC lot#120304 세포 용해물을 첨가하였다. 일부 경우에, FGF, HGF 및 중화 항체도 또한 포함시켰다. 4일의 배양 후에, HUVEC를 수집하고, 구아바 (등록 상표) 기기를 사용하여 계수하였다.

도 3은 세포 용해물의 첨가가 저농도 혈청 (0.5% FBS)에서 유지한 세포에 비하여 HUVEC 세포 개수의 증가를 야기하며, 세포 개수의 증가가 첨가되는 세포 용해물의 양에 비례하였음을 보여준다. 사용된 보다 낮은 농도의 세포 용해물 ($62.5 \mu\text{g}/\text{ml}$)은 최적의 배지 조건 (10% FBS)에서 인큐베이션시킨 세포와 유사한 세포 개수를 야기하였다. 추가로, FGF 또는 HGF 중 어느 하나에 대한 중화 항체의 첨가는 2개의 상이한 농도의 세포 용해물에 의해 유도되는 세포 개수의 증가를 완화시켰다. 이들 결과는 HUVEC과 hUTC lot#120304의 공동-배양에서 수득된 결과와 일치한다.

내피 세포의 이동에 대한 hUTC의 영향

트랜스웰 막 (포어 크기 = 8 미크론)을 통해 이동한 세포 개수를 결정함으로써 내피 세포의 이동을 평가하였다. 응답 세포, 즉, 내피 세포를 6-웰 트랜스웰 인서트 상으로 접종하고, hUTC를 웰의 저부에 플레이팅하였다. 공동-배양의 기간 후에, 트랜스웰의 아래측 상에 존재하였던 세포를 수집하고 계수하였다. 도 4a는 hUTC 및 MSC와 공동-배양하였던 HUVEC의 이동을 보여준다. hUTC lot#120304는 트랜스웰의 아래측으로의 HUVEC의 이동을 유도하는 한편, MSC는 그렇지 않았다 (도 4a). 동일한 결과가 HCAEC와 함께 관찰되었으며, 여기서, hUTC lot#120304와의 공동-배양은 배지 대조군에 비하여 세포가 트랜스웰을 통해 더 많이 이동하게 하였다 (도 4b).

HUVEC 및 HCAEC의 이동 거동에 대한 hUTC lot#120304의 영향을 FGF 및 HGF에 대한 중화 항체를 사용하여 추가로 시험하였다. 도 5a에 나타난 바와 같이, 이들 항체는 hUTC lot#120304에 의해 유도되는 HUVEC의 이동을 감소시켰다. HCAEC와 hUTC lot#120304의 공동-배양에 있어서, HGF에 대한 중화 항체는 hUTC lot#120304-매개의 세포 이동의 증가를 차단하는 한편, FGF에 대한 중화 항체는 그렇지 않았다 (도 5b).

요약

본 실시예에 요약된 결과는 시험관 내에서 내피 세포의 증식 및 이동 거동에 대한 hUTC의 영향을 설명한다. hUTC lot#120304와 내피 세포의 공동-배양, 또는 내피 세포와 hUTC lot#120304로부터 제조된 세포 용해물의 직접적인 인큐베이션을 사용한 연구를 수행하였다.

증식의 연구를 위하여, hUTC lot#120304의 영향을 시험하고, 상이한 혈관 베드로부터의 3개의 내피 세포 유형을 응답 세포로 사용하였다. hUTC와의 공동-배양에 의해, 내피 세포 증식의 증가가 야기되었다. MSC 또는 섬유모세포와의 공동-배양에 의해, 배지 대조군과 유사한 세포 개수가 야기되었다. hUTC lot#120304에 대한 HUVEC의 증식 응답이 FGF 및 HGF에 대한 중화 항체의 첨가에 의해 약화되었으나, VEGF에 대한 중화 항체에 의해서는 약화되지 않았다. 이는 hUTC lot#120304에 의한 증식의 유도가 FGF 및 HGF에 의해 매개되는 것을 암시한다. HUVEC와 hUTC lot#120304 용해물의 인큐베이션이 공동-배양으로 관찰되는 영향을 반영하는 점이 주목할만하다.

트랜스웰의 아래측에 존재하였던 세포의 개수를 계수함으로써 이동을 정량화하고, HUVEC 및 HCAEC 둘 모두를 응답 세포로 사용하였다. 증식을 사용한 연구와 달리, 이들 세포의 이동 반응은 약간 상이하다. hUTC lot#120304는 HUVEC 및 HCAEC 둘 모두의 이동을 유도하였다. MSC는 HUVEC의 이동을 유도하지 않았으며, 이는 hUTC에 대한 이러한 반응의 특이성을 시사한다. FGF 및 HGF에 대한 항체는 HUVEC의 이동에 대한 hUTC lot#120304의 영향을 무효화시킨 한편, HGF에 대한 항체만이 HCAEC의 이동에 영향을 미쳤으며, 이는 2가지 내피

세포 유형 간의 차이를 시사한다.

약술하면, 데이터는 hUTC가 시험관 내에서 내피 세포의 증식 및 이동을 유도하는 것을 보여준다. 중화 항체의 이용은 이들 관찰된 영향에 FGF 및 HGF 둘 모두가 연루됨을 시사한다. 그러나, 다른 인자도 또한 내피 세포의 증식 및 이동 거동에 수반될 수 있다.

실시예 4

제대-유래된 세포에서의 텔로머라제 발현

텔로머라제는 염색체의 온전성을 보호하고 세포의 복제 수명을 연장시키는 역할을 하는 말단 소립 반복체를 합성하는 기능을 한다 (문헌[Liu, K, *et al.*, *PNAS*, 1999; 96:5147-5152]). 텔로머라제는 2개의 구성요소, 텔로머라제 RNA 주형 (hTER) 및 텔로머라제 역전사효소 (hTERT)로 이루어진다. 텔로머라제의 조절은 hTER이 아닌 hTERT의 전사에 의해 결정된다. 따라서 hTERT mRNA를 위한 리얼-타임 중합효소 연쇄 반응(PCR)은 세포의 텔로머라제 활성을 결정하는 용인된 방법이다.

세포 단리. 리얼-타임 PCR 실험을 수행하여 인간 제대 조직-유래 세포의 텔로머라제 생성량을 결정하였다. 인간 제대 조직-유래 세포를 상기에 기술한 실시예에 따라 준비하였다. 일반적으로, 정상 분만 후 NDRI (미국 펜실베이니아주 필라델피아 소재)로부터 획득한 제대를 세척하여 혈액 및 debris를 제거하고, 기계적으로 해리시켰다. 그 후, 조직을 37°C에서 배양 배지 중에서 콜라게나제, 디스파제 및 히알루로니다제를 포함하는 소화 효소와 함께 인큐베이션하였다. 인간 제대 조직-유래 세포를 상기 실시예에 기술한 방법에 따라 배양하였다. 중간엽 줄기 세포 및 정상 피부 섬유모세포 (cc-2509 로트 번호 9F0844)를 미국 메릴랜드주 위커스빌 소재의 캄브렉스로부터 획득하였다. 만능성 인간 고환 배아 암종 (기형종) 세포주 nTera-2 세포 (NTERA-2 cl.D1), (문헌 [Plaia *et al.*, *Stem Cells*, 2006; 24(3):531-546] 참조)를 ATCC (미국 버지니아주 매너서스 소재)로부터 구매하고, 상기에 기술한 방법에 따라 배양하였다.

전체 RNA 단리. RNA를 알엔이지 (RNeasy) (등록상표) 키트 (미국 캘리포니아주 발렌시아 소재의 퀴아젠)를 사용하여 세포로부터 추출하였다. RNA를 50 마이크로리터의 DEPC-처리 물로 용출시키고, -80°C에서 보관하였다. RNA를 탁맨 (TaqMan) (등록상표) 역전사 시약 (미국 캘리포니아주 포스터 시티 소재의 어플라이드 바이오시스템즈)을 이용하여 25°C, 10분; 37°C, 60분; 및 95°C, 10분에서 랜덤 헥사머를 사용하여 역전사시켰다. 시료를 -20°C에서 보관하였다.

리얼-타임 PCR. 제조처의 설명 (어플라이드 바이오시스템즈)에 따라, 어플라이드 바이오시스템즈 어세이즈-온-디맨드 (상표명) (탁맨 (등록상표) 진 익스프레스션 어세이즈 (Gene Expression Assays)로도 공지됨)를 사용하여 cDNA 시료에서 PCR을 수행하였다. 이 상업적 키트는 인간 세포에 있어서 텔로머라제에 대하여 분석하는 데 널리 사용된다. 간략하게는, hTert (인간 텔로머라제 유전자) (Hs00162669) 및 인간 GAPDH (내부 대조군)를 cDNA 및 탁맨 (등록상표) 범용 PCR 마스터 믹스와 혼합하였는데, 이는 ABI 프리즘 7000 SDS 소프트웨어 (어플라이드 바이오시스템즈)를 갖춘 7000 서열 검출 시스템을 이용하였다. 서열 사이클 (Thermal cycle) 조건은 처음에 50°C, 2분 및 95°C, 10분, 이어서 95°C, 15초 및 60°C, 1분의 40 사이클이었다. PCR 데이터를 제조업자의 설명서에 따라 분석하였다.

인간 제대 조직-유래 세포 (ATCC 수탁 번호 PTA-6067), 섬유모세포, 및 중간엽 줄기 세포를 hTert 및 18S RNA에 대해 분석하였다. 표 4-1에 나타낸 바와 같이, hTert 및 이에 따라 텔로머라제는 인간 제대 조직-유래된 세포에서 검출되지 않았다.

[표 4-1]

	hTERT	18S RNA
제대 세포 (022803)	ND	+
섬유모세포	ND	+
ND- 검출되지 않음; + 신호가 검출됨		

인간 제대 조직-유래 세포 (분리주 022803, ATCC 수탁 번호 PTA-6067) 및 nTera-2 세포를 분석하였고, 그 결과는 2 로트의 인간 제대 조직-유래 세포에서 텔로머라제의 발현을 나타내지 않았지만, 기형종 세포주는 높은 수준의 발현을 나타내었다 (표 4-2).

[표 4-2]

세포 유형	hTERT		GAPDH		hTERT 정규화
	실험 1	실험 2	실험 1	실험 2	
nTera2	25.85	27.31	16.41	16.31	0.61
022803	-	-	22.97	22.79	-

그러므로, 본 발명의 인간 체대 조직-유래된 세포는 텔로머라제를 발현하지 않는 것으로 결론지을 수 있다.

실시예 5

뒷다리 허혈의 쥐와 모델에서의 hUTC 이식의 효능

이전의 데이터는 hUTC의 전신 투여가 한쪽 뒷다리 허혈이 있는 마우스에서 처리 후 5일 및 10일에 혈류를 유의하게 향상시켰음을 입증한다. 또한, 병행의 비교 연구에 의해, hUTC의 전신 (정맥내) 주사가 국소 (근육내) 주사에 비하여 더욱 유의미한 혈류의 복구를 야기하는 것이 나타났다.

이러한 실시예는 말초 뒷다리 허혈의 마우스 모델 (한쪽 뒷다리 허혈 모델)에서 피브린 글루 중 hUTC 및 hUTC의 근육내 주사의 효과를 평가하였다. 면역손상된 (immunocompromised) 누드 및 NOD/scid IL2r $\gamma^{-/-}$ (NSG) 스트레인의 마우스를 사용하였다.

동물 모델 및 설명

이러한 실시예에서의 연구를 위하여, 누드 마우스와 NSG 마우스 간의 비교를 행하였다.

NSG 마우스 스트레인은 성숙 림프구, T 세포, B 세포 및 NK 세포의 부재를 포함하는 이의 다수의 면역학적 결함 때문에 이종이식 연구에 대한 관심이 생겼다. 이들 동물은 6개월 넘게 생존하며, 심지어 아치사 조사 후에도 흉선 림프종이 발생하지 않는다 (문헌 [Ito M. *et al.* (2002) *Blood*.100:3175-82]).

한쪽 뒷다리 허혈을 이들 마우스에서 생성하였다. 약술하면, 동물을 아이소플루란 흡입에 의해 마취시켰다. 절개를 좌측 뒷다리의 중간선에서 행하였다. 대퇴동맥 및 이의 분지를 서혜인대 (inguinal ligament)로부터 복재 동맥 및 슬와 동맥의 분기점까지 절찰시켰다. 분기점 사이의 영역을 절개하고, 절개부를 5-0 실크 비크릴 봉합사 (에티콘)로 폐쇄시켰다.

세포 및 피브린 글루

동결된 세포 현탁액을 드라이 쉬퍼 (dry shipper)에서의 운송에 의해 제공하였다. 일단 받으면, 세포를 장기간 보관을 위해 액체 질소로 옮겼다. 세포를 주입 직전 해동시켰다. 세포를 계수하고 생존력을 트립판 블루 염색 및 혈구계수기 상에서의 계수에 의해 결정하였다. 전체 용량을 PBS 중에 재현탁화시키고, 주사를 위한 28 게이지 주사바늘이 있는 0.3 ml의 투베르쿨린 주사기에 로딩하였다.

피브린 글루 (에비셀 (등록 상표) 피브린 실란트 (인간), 움릭스 파마슈티컬즈)를 이들 연구를 위해 사용하였다. 성분을 사용 전에 해동시키고, 16 내지 24 IU/ml의 트롬빈 및 39.3 내지 60.7 mg/ml의 BAC2 (피브리노젠)의 최종 농도로 희석시켰다. 트롬빈 스톡 용액 (대략 800 내지 1200 IU/ml의 스톡 농도) 및 BAC2 스톡 용액 (피브리노젠) (대략 55 내지 85 mg/ml의 스톡 농도)을 각각 트롬빈에 대하여 1:50 및 BAC2에 대하여 1:1.4로 희석시켰다.

연구 디자인

총 사십팔 (48) 마리의 누드 마우스 (6 내지 8주령) 및 사십팔 (48) 마리의 NOG/SCID (NSG) 마우스 (6 내지 11주령)를 출생일에 의해 매치시켜, 하기 표 5-1에 상세화된 바와 같은 그룹으로 무작위화시켰다.

[표 5-1]

그룹 번호	시험 동물	동물 수	시험 물질	세포 용량	종점 시험 (상해 후 일수)		
					괴사	LDI에 의한 혈류	모세혈관 밀도
1	누드	12	hUTC 비히클	N/A	1-7	1, 7, 14, 21 및 28	7 및 28
2	누드	12	hUTC	1×10^6	1-7	1, 7, 14, 21 및 28	7 및 28
3	누드	12	염수 + 피브린	N/A	1-7	1, 7, 14, 21 및 28	7 및 28
4	누드	12	염수 + 피브린 + hUTC	1×10^6	1-7	1, 7, 14, 21 및 28	7 및 28
5	NSG	12	hUTC 비히클	N/A	1-7	1, 7, 14, 21 및 28	7 및 28
6	NSG	12	hUTC	1×10^6	1-7	1, 7, 14, 21 및 28	7 및 28
7	NSG	12	염수 + 피브린	N/A	1-7	1, 7, 14, 21 및 28	7 및 28
8	NSG	12	염수 + 피브린 + hUTC	1×10^6	1-7	1, 7, 14, 21 및 28	7 및 28

종점 시험을 하기의 파라미터를 측정함으로써 행하였다:

1, 7, 14, 21 및 28일에 레이저 도플러 영상화에 의한 혈류의 평가; 7일 (각 그룹에서 3마리) 및 28일에 CD31 염색에 의한 모세혈관 밀도의 평가.

방법

한쪽 뒷다리 허혈의 생성 1일 후에, 비히클, 비히클 중 hUTC, 피브린 글루 또는 피브린 글루 중 hUTC를 허혈 뒷다리 근육에 주사하였다.

hUTC 주사에 있어서, 특정 개수의 비히클 중 hUTC 또는 피브린 글루 중 hUTC를 허혈 뒷다리 근육에 주사하였다. 총 100 μ l의 용량에 대하여, 앞다리로의 3회의 주사 ($3 \times 20 \mu$ l) 및 뒷다리로의 2회의 주사 ($2 \times 20 \mu$ l)가 있었다. 대조군 동물에는 세포와 동일한 방식으로 비히클을 제공하였다.

피브린 글루 중의 hUTC의 각각의 주사에 있어서, 세포를 트롬빈 중에 재현탁화시켰다 (16 내지 24 IU/ml의 최종 농도). BAC2 (피브리노겐; 39.3 내지 60.7 mg/ml의 최종 농도)를 개별 에펜도르프 튜브에 분취하였다.

주사 직전에, 트롬빈 중의 hUTC를 BAC2를 함유하는 튜브로 옮기고, 혼합하고, 0.3 ml 투베르쿨린 주사기 (28 게이지 주사바늘이 있음)로 빼내고, 마우스 뒷다리에 주사하였다. 100 μ l를 5회의 20 μ l 근육내 (IM) 주사로 전달하였으며, 앞다리에 3회 주사하고, 뒷다리에 2회 주사하였다. 대조군 동물에는 세포와 동일한 방식으로 피브린 글루를 제공하였다.

통계 분석

데이터는 평균 $\pm$ 평균 표준 오차로 표현된다. 그룹들 간의 비교는 양측 스튜던츠 t 검정 (two-tailed Student's t test)으로 수행하였다.

혈류의 평가

마우스 뒷다리에서의 혈액 관류를 무어 (Moor) LDI 장치와 함께 레이저 도플러 영상화를 사용하여 평가하였다. 동물을 아이소플루란 흡입에 의해 마취시키고, 37°C로 설정된 가열 패드 상에 놓을 것이다. 기준선 허혈을 확립하기 위하여, 양쪽 뒷다리의 발바닥 영역에서의 혈액 관류 데이터를 상해의 생성 후 24시간에 수집하였다. 연속 관류 평가를 7, 14, 21 및 28일에 수행하였다. 데이터를 좌측 (허혈) 대 우측 (비-허혈) 다리의 관류 점수의 비로 기록한다.

결과 및 분석

레이저 도플러 관류 영상화

NSG 마우스에 대한 레이저 도플러 관류 데이터 (비-허혈 대조군 우측 다리에 비한 허혈 좌측 다리에서의 관류의 백분율로 표현)를 도 6 및 표 5-2 (하기)에 나타내었다. 가장 큰 치료 효과가 피브린 매트릭스 중에 전달되는 hUTC와 함께 관찰되었으며; 이들 마우스에서의 상대적 관류는 21일까지 피브린 대조군의 거의 2배였다 (40.3 ± 2.43 대 22.6 ± 2.34). 21 및 28일에, 이러한 효과는 둘 모두의 대조군 ($P < 0.001$)뿐 아니라 단독의 비히클 중에 전달되는 hUTC를 제공한 그룹 ($P < 0.05$) 둘 모두보다 유의미하게 더 컸다. 상대적 관류에서 비히클 중에 전달되는 hUTC의 영향은 28일에 대조군보다 27% 더 컸다 ($P < 0.05$). 이 때, 단독으로 비히클 중의 hUTC로 처리된 NSG 마우스의 허혈 다리의 상대적 관류는 30.0 ± 2.3 이었으며, 이에 비해 오직 비히클만으로 처리된 마우스에 대해서는 23.7 ± 1.6 이었다.

[표 5-2]

NSG 마우스에서 상대적 관류 값에 대한 평균 $\pm$ sem					
	일수				
작용제	1	7	14	21	28
비히클	16.5 ± 0.9	25.4 ± 1.7	27.5 ± 1.9	25.6 ± 1.8	23.7 ± 1.3
hUTC	15.7 ± 1.1	30.8 ± 3.3	30.6 ± 3.1	31.7 ± 3.1	30.0 ± 2.3
염수 + 피브린	17.0 ± 1.1	26.5 ± 2.4	24.6 ± 2.3	22.6 ± 2.3	22.5 ± 2.0
피브린 + hUTC	14.9 ± 1.2	29.9 ± 3.4	39.6 ± 7.5	40.3 ± 2.4	41.8 ± 4.3

평균 $\pm$ sem

누드 마우스에 대한 관류 데이터는 도 7 및 표 5-3에 나타나 있다. 피브린 중의 hUTC로의 처리는 피브린만으로 처리된 대조군 (각각 39.2 ± 1.7 및 40.9 ± 3.7)에 비해, 14일 (53.9 ± 4.7) 및 21일 (53.4 ± 3.2)에 허혈 다리에서 관류를 유의미하게 ($P < 0.05$) 증가시켰다. 피브린 중의 세포의 영향은 대조군 (40.8 ± 4.3)에 비해 28일 (52.0 ± 5.8)에 보다 더 높은 경향이 있었으나, 동물 간의 측정 편차가 크기 때문에 유의미하지 않았다. 단독의 비히클 중의 hUTC의 국소 전달은 21일에 향상된 관류 (64.0 ± 6.3 대 대조군에 대한 43.7 ± 7.4) 및 28일까지 유의미하게 ($P < 0.05$) 향상된 관류 (52.0 ± 3.5 대 40.8 ± 4.3)의 경향이 있었다. 피브린 또는 단독의 비히클 중에 전달되는 hUTC를 사용한 효과 간에는 유의미한 차이가 존재하지 않았다.

[표 5-3]

누드 마우스에서 상대적 관류 값에 대한 평균 $\pm$ sem					
	일수				
작용제	1	7	14	21	28
비히클	13.9 ± 1.1	32.0 ± 5.1	40.6 ± 1.7	43.7 ± 7.4	47.1 ± 4.9
hUTC	13.7 ± 0.6	38.4 ± 5.1	46.1 ± 3.0	64.0 ± 6.3	57.0 ± 3.5
염수 + 피브린	14.5 ± 0.84	29.9 ± 3.5	39.2 ± 2.7	40.1 ± 3.7	40.8 ± 4.3
피브린 + hUTC	13.4 ± 0.69	33.0 ± 3.7	54.9 ± 4.7	53.4 ± 3.2	52.0 ± 5.8

평균 $\pm$ sem

이들 데이터는 NSG 및 누드 마우스 스트레인 둘 모두에서, 근육내 주사에 의해 국소로 전달되는 hUTC가 피브린 담체와 혼합되는 경우 조기의 효과를 갖는 것을 나타낸다. NSG 마우스에서 단독의 비히클 중의 세포의 전달보다 지속적인 효과가 유의미하게 더욱 확연하였다.

결론

허혈을 생성하고 1일 후의 hUTC의 직접적인 근육내 투여에 의해, NSG 및 누드 마우스 둘 모두에서 허혈 근육의 재관류가 향상되었다. 피브린 매트릭스 중의 세포의 NSG 마우스로의 전달에 의해, 단독의 비히클 중의 세포의 전달을 뛰어넘는 반응이 생성되는 것으로 나타났다. 말초 허혈의 족과 뒷다리 모델에서 hUTC의 직접적인 근육내 투여로 처리된 동물은 NSG 및 누드 마우스 둘 모두에서 허혈 다리의 향상된 재관류를 보였다. 그러나, 피브린 글루 중의 hUTC로 처리된 동물은, NSG 마우스에서의 단독의 비히클 중의 세포의 전달에 비하여, 보다 유의미하고 지속적인 반응을 나타내었다.

실시예 6

말초 다리 허혈의 NOD/scid IL2r $\gamma^{-/-}$ 마우스 모델에서의 hUTC 이식의 효능: 용량 및 투여 경로 연구

이러한 연구에서는 말초 뒷다리 허혈의 마우스 모델 (한쪽 뒷다리 허혈 모델)에서 hUTC의 효능을 평가하였다. 이러한 연구를 위하여, NOD/scid IL2r $\gamma^{-/-}$ (NSG) 마우스 스트레인을 사용하였다. hUTC가 (1) 비히클을 사용하여 국소로 (근육내), (2) 피브린 글루를 사용하여 국소로 (근육내) 또는 (3) 전신으로 (정맥내) 전달되는 경우 혈류의 복구에 대한 영향을 평가하였다. 또한, 연구에서는 피브린 글루와 함께 또는 이것 없이, 상이한 용량에서 근육내 투여되는 hUTC의 혈류의 복구에 대한 영향을 평가하였다.

재료 및 방법

동물 모델 및 설명

NSG 마우스를 사용하였다. NSG 마우스 스트레인은 성숙 림프구, T 세포, B 세포 및 NK 세포의 부재를 포함하는 이의 다수의 면역학적 결함 때문에 이종이식 연구에 대한 관심이 생겼다. 이들 동물은 6개월 넘게 생존하며, 심지어 아치사 조사 후에도 흉선 림프종이 발생하지 않는다 (문헌 [Ito M. *et al.* (2002) *Blood*. 100: 3175-82]).

한쪽 뒷다리 허혈을 이들 마우스에서 생성하였다. 약술하면, 동물을 아이소플루란 흡입에 의해 마취시켰다. 절개를 좌측 뒷다리의 중간선에서 행하였다. 대퇴동맥 및 이의 분지를 서혜인대로부터 복재 동맥 및 슬와 동맥의 분기점까지 절찰시켰다. 분기점 사이의 영역을 절개하고, 절개부를 5-0 실크 비크릴 봉합사로 폐쇄시켰다.

세포 및 피브린 글루

동결건조된 hUTC를 주입 직전 해동시켰다. 세포를 계수하고 생존력을 트립판 블루 염색 및 혈구계수기 상에서의 계수에 의해 결정하였다. 전체 용량을 비히클 또는 피브린 글루 중 어느 하나 중에 재현탁화시키고, 주사용 28 게이지 주사바늘이 있는 0.3 ml의 투베르쿨린 주사기에 로딩하였다.

피브린 글루 (에비셀 (등록 상표) 피브린 실란트 [인간], 움릭스 파마슈티컬즈)를 사용하였다. 성분을 사용 전에 해동시키고, 16 내지 24 IU/ml의 트롬빈 및 39.3 내지 60.7 mg/ml의 BAC2의 최종 농도로 희석시켰다. 트롬빈 스톡 용액 (대략 800 내지 1200 IU/ml의 스톡 농도) 및 BAC2 스톡 용액 (피브리노겐) (대략 55 내지 85 mg/ml의 스톡 농도)을 제공하고, 각각 트롬빈에 대하여 1:50 및 BAC2에 대하여 1:1.4로 희석시켰다.

연구 디자인

NSG 마우스 (6 내지 11주령)를 출생일에 의해 매치시켜, 하기 표 6-1에 상세화된 바와 같은 그룹으로 무작위화시켰다:

[표 6-1]

그룹	그룹 번호	시험 물질	전달되는 전체 세포	투여 경로	LDI에 의한 혈류
1	12	비히클	N/A	근육내	1, 7, 14, 21 및 28
2	12	hUTC	1×10^6	근육내	1, 7, 14, 21 및 28
3	12	hUTC	0.5×10^6	근육내	1, 7, 14, 21 및 28
4	12	비히클 + 피브린	N/A	근육내	1, 7, 14, 21 및 28
5	12	비히클 + 피브린 + hUTC	1×10^6	근육내	1, 7, 14, 21 및 28
6	12	비히클 + 피브린 + hUTC	0.5×10^6	근육내	1, 7, 14, 21 및 28
7	12	비히클 + 피브린 + hUTC	0.25×10^6	근육내	1, 7, 14, 21 및 28
8	12	비히클 + 피브린 + hUTC	0.125×10^6	근육내	1, 7, 14, 21 및 28
9	12	비히클	N/A	정맥내	1, 7, 14, 21 및 28
10	12	hUTC	1×10^6	정맥내	1, 7, 14, 21 및 28

한쪽 뒷다리 허혈 생성 1일 후에 hUTC를 전신 또는 국소로 주사하였다. 전신 주사에 있어서, 100 μ l의 비히클 중의 특정 개수의 hUTC를 0.3 cc 인슐린 주사기 및 28-게이지 주사바늘을 사용하여 꼬리 정맥을 통해 투여하였다. 세포 주사를 대략 1분의 기간에 걸쳐 수행하였다. 대조군 동물에는 오직 비히클만을 제공하였다.

국소 주사에 있어서, 특정 개수의, 비히클 중의 hUTC, 또는 피브린 글루 중의 hUTC를 허혈 뒷다리 근육에 주사하였다. 주사는 5개 부위에서 이루어졌으며; 각각은 20 μ l의 근육내 (IM) 주사를 전달하였다. 총 100 μ l의 용량에 대하여, 앞다리로의 3회의 주사 ($3 \times 20 \mu$ l) 및 뒷다리로의 2회의 주사 ($2 \times 20 \mu$ l)가 있었다. 대조군 동물은 세포와 유사한 방식으로 비히클을 제공하였다.

피브린 글루 중의 hUTC의 각각의 주사에 있어서, 세포를 트롬빈 중에 재현탁화시켰다 (16 내지 24 IU/ml의 최종 농도). BAC2 (피브리노겐; 39.3 내지 60.7 mg/ml의 최종 농도)를 개별 에펜도르프 튜브에 분취하였다. 주사 직전에, 트롬빈 중의 hUTC를 BAC2를 함유하는 튜브로 옮기고, 혼합하고, 0.3 ml 투베르쿨린 주사기 (28 게이지 주사바늘이 있음)로 빼내고, 마우스 뒷다리에 주사하였다. 100 μ l 용량을 5회의 20 μ l 근육내 (IM) 주사로 전달하였으며, 앞다리에 3회 주사하고, 뒷다리에 2회 주사하였다. 대조군 동물에는 세포와 동일한 방식으로 전달되는 피브린 글루를 제공하였다.

혈류의 평가

마우스 뒷다리에서의 혈액 관류를 무어 LDI 장치와 함께 레이저 도플러 영상화를 사용하여 평가하였다. 동물을 아이스폴루란 흡입에 의해 마취시키고, 37°C로 설정된 가열 패드 상에 두었다. 기준선 허혈을 확립하기 위하여, 양쪽 뒷다리의 발바닥 영역에서의 혈액 관류 데이터를 상해의 생성 24시간 후에 수집하였다. 연속 관류 평가를 상해 후 7, 14, 21 및 28일에 수행하였다. 데이터를 좌측 (허혈) 대 우측 (비-허혈) 다리의 관류 점수의 비로 기록한다.

결과

각 그룹에 대한 허혈 다리에서의 상대적 관류에 대한 평균 ($\pm$ sem) 값은 표 6-2에 나타나 있다(하기 나타냄). 이원 ANOVA 통계적 분석을 5% 유의성 수준을 사용하여 3개의 세트의 데이터 (예를 들어, 근육내 (피브린 부재), 근육내 (피브린 존재) 및 정맥내 (피브린 부재)) 상에서 수행하였다. 전체 시간 및 처리의 영향을 평가하였다. 모든 그룹에서 처리 및 시간의 유의미한 효과 ($P < 0.01$)가 존재하였다. 본페로니 (Bonferroni) 사후 시험을 수행하여, 모든 그룹을 대조군과 비교하고 각 세트 내에서 서로 비교하였다 (예를 들어, 근육내, 근육내 (피브린 존재) 및 정맥내).

[표 6-2]

레이저 도플러 영상화 데이터의 요약. 특정 입수(상해후)에 대한 측정치에 대한 평균 $\pm$ 표준오차 (sem)를 나타내었다.

그룹	처리	세포 용량	투여 경로	일수									
				1		7		14		21		28	
				평균	SEM	평균	SEM	평균	SEM	평균	SEM	평균	SEM
1	비히클	N/A	근육내	11.4	1.0	22.8	2.2	25.4	1.9	26.8	2.8	28.1	3.3
2	hUTC	1×10^6	근육내	11.9	0.9	24.4	2.0	35.1	5.4	39.1	5.3	40.6	5.8
3	hUTC	0.5×10^6	근육내	12.4	1.3	26.7	2.4	26.7	2.0	35.3	4.0	36.7	3.1
4	비히클 + 피브린	N/A	근육내	11.8	1.8	25.3	1.9	23.7	2.7	17.8	1.4	24.1	3.7
5	비히클 + 피브린 + hUTC	1×10^6	근육내	11.1	1.0	26.7	2.4	35.8	6.0	34.4	1.8	43.4	7.6
6	비히클 + 피브린 + hUTC	0.5×10^6	근육내	11.8	0.8	28.1	3.6	34.8	2.8	40.4	6.1	38.5	6.5
7	비히클 + 피브린 + hUTC	0.25×10^6	근육내	10.3	0.8	25.5	1.7	32.1	3.7	38.8	7.3	35.4	6.3
8	비히클 + 피브린 + hUTC	0.125×10^6	근육내	11.6	1.2	28.6	1.6	28.7	2.6	35.8	5.7	39.8	11.4
9	비히클	N/A	정맥내	11.7	1.0	25.5	2.7	25.2	2.3	22.9	2.4	23.3	1.5
10	hUTC	1×10^6	정맥내	11.9	1.1	28.1	2.3	33.9	2.3	37.1	3.0	35.6	3.4

굵은 기울임꼴의 숫자는 대조군에 비해 통계적 유의성을 나타낸다.

3가지 상이한 전달 양식을 사용한 효과의 강도에서는 명백한 차이가 없었다. 피브린 중의 1×10^6 개 hUTC를 사용하여, 상해 후 28일에 대략 43.4%의 상대적 관류가 야기된 한편, 단독의 hUTC는 40.6%의 최대의 상대적 관류를 야기하였다 (도 8 참조). 전신으로 전달되는 세포에 있어서, hUTC를 제공한 마우스의 허혈 다리에서의 상대적 관류는 상해 후 21일 및 28일에 대조군보다 유의미하게 더 높았다 ($P < 0.01$).

2가지 용량의 세포를 국소 (IM) 투여를 사용하여 시험하였다. 보다 높은 용량은 상해 후 21일 및 28일에 대조

군과 유의미하게 상이하였다 ($P<0.05$). 저 용량 그룹은 어떠한 날에도 대조군과 유의미하게 상이하지 않았다. 고 및 저 용량 그룹은 어떠한 시점에도 서로 유의미하게 상이하지 않았다 (표 6-2).

피브린 글루 중의 4가지 상이한 용량의 hUTC를 국소 (IM) 투여를 사용하여 시험하였다. 1×10^6 개 세포를 제공한 그룹에서, 허혈 다리에서의 상대적 관류는 상해 후 21일 ($P<0.05$) 및 28일 ($P<0.01$)에 대조군보다 유의미하게 더 높았다. 0.5, 0.25 및 0.125×10^6 개 용량의 세포를 제공한 그룹에서 상대적 재관류는 전부, 상해 후 오직 21일 (각각 $P<0.001$, $P<0.01$ 및 $P<0.05$)에 대조군보다 유의미하게 더 컸다. 임의의 용량 그룹 간의 차이가 존재하지 않았다 (도 9).

용량의 증가에 따라 보다 큰 재관류의 경향이 약하게 존재하였으며, 이는 특히 상해 후 14일에 명백하다 (도 10에서 명료성을 위하여 데이터를 오차 막대 없이 나타냄).

약술하면, 모든 3가지 방법에 의해 전달되는 hUTC로 처리된 동물은 허혈 다리의 증가된 재관류를 보였다. 이러한 연구에서, 전달 양식을 사용한 효과의 강도에서는 명백한 차이가 없었다. 상대적 관류는 전달 경로 또는 세포 개수와 무관하게, 가장 높은 용량의 그룹에 대하여 상해 후 28일에 유의미하게 더 높았음이 주목할만하다.

실시예 7

말초 다리 허혈의 마우스 모델에서 hUTC 세포 이식의 효능의 평가: 투여 경로 연구

이러한 연구의 목적은 hUTC 세포 전달이 말초 다리 허혈의 마우스 모델 (한쪽 뒷다리 허혈 모델)에서 혈류를 복구시키는지를 평가하는 것이었다. 2가지 투여 경로 - 정맥내 및 근육내 전달 간에 비교가 이루어졌으며; 후자는 또한 피브린 매트릭스 중의 세포의 현탁액을 포함하였다.

방법

처리군은 하기 표 7-1에 나타나 있다:

[표 7-1]

처리군

그룹 번호	시험 동물	동물 수	시험 물질	투여 경로	세포 용량
1	누드	12	염수	정맥내	N/A
2	누드	12	hUTC	정맥내	1×10^6
3	누드	12	염수	근육내	N/A
4	누드	12	염수 + hUTC	근육내	1×10^6
5	누드	12	염수 + 피브린	근육내	N/A
6	누드	12	염수 + 피브린 + hUTC	근육내	1×10^6

그룹 5 및 6, IM 투여를 위한 피브린 글루 형성은 하기 표 7-2에 나타나 있다:

[표 7-2]

그룹 5 및 6, IM 투여를 위한 피브린 글루 형성

	그룹 5	그룹 6
세포	없음	1×10^6
염수 (PBS)	0.075 mL	0.075 mL
용액 A (트롬빈)	0.0125 mL	0.0125 mL
용액 B (피브리노겐)	0.0125 mL	0.0125 mL
모든 양은 동물마다로 나타낸다(동물마다 0.1 mL) 트롬빈 = 스톡 용액의 1:5000 최종 희석 (용액은 1.6 μ L의 트롬빈 (800 내지 1200 IU/mL) + 998.4 μ L의 PBS를 포함한다) 피브리노겐 = 1:8 희석 (스톡 용액은 55 내지 85 mg/mL이다)		

수컷 면역관용 누드 마우스 (8 내지 10주령)에는 수술로 유도된 한쪽 뒷다리 허혈을 겪게 하였다. 수술 후 1일에, 양쪽 뒷다리에서의 혈류를 레이저 도플러 관류 영상화 (LDPI)에 의해 평가하였다. 단일 용량 (10^6 개)의 hUTC 세포 또는 비히클 대조군을 표 7-1에 나타난 바와 같이, 6개 그룹의 마우스 ($N = 15$ /그룹)에 투여하였다. 투여 경로는 꼬리 정맥을 통한 100 μ L의 정맥내 주사 또는 허혈 다리에서 앞다리 (3개 부위) 및 뒷다리 (2개 부위) 골격근으로의 20 μ L 근육내 주사를 통한 동일한 누적 용량 중 어느 하나였다. 근육내 주사를 제공한 2개 그룹에서, 피브린 매트릭스도 또한 포함시켰다.

연속 LDPI를 1, 3, 7, 10, 14 및 21일에 수행하였으며; 후자는 연구의 마지막 날이었다. 수술 3일 전, 및 수술 10일 후에 다시 수영 인내력을 평가하였다. 마우스는 침수 5초 내에 수면으로 떠오르지 못하는 경우 수영 인내력에 대한 그의 한계에 도달한 것으로 판단하였다. 허혈 후 수영 인내 시간 대 허혈 전 평균 인내의 비를 비교하였다. 21일의 연구에 도달한 각 그룹으로부터의 5마리 마우스의 허혈 및 정상 다리로부터 수득된 사후 장편 지근 조직 시료를 모세혈관 (CD31 /PECAM-1) 및 동맥 (평활근 α 액틴)의 조직학적 염색을 위해 처리하였다. 혈관 밀도를 면역-염색된 슬라이드의 디지털화 이미지로부터 정량화하였다.

7일에 수집한 조직에서의 세포 생착 (engraftment) 및 혈관 밀도를 평가하였다. 정맥내 세포 처리 및 대조군에 대한 상대적 평균 관류 값의 분리가 21일에 통계적으로 상이하였음을 고려하여, 7일의 혈관 밀도 분석은 유용하지 않은 것으로 여겼다. 세포 생착 검정을 세포 검출 방법의 기술적 어려움 때문에 수행하지 않았다.

혈류의 평가

마우스 뒷다리에서의 혈류를 무어 LDI 장치와 함께 레이저 도플러 영상화를 사용하여 평가하였다. 동물을 아이소플루란 흡입에 의해 마취시키고, 37°C로 설정된 가열 패드 상에 둘 것이다. 기준선 허혈을 확립하기 위하여, 양쪽 뒷다리의 발바닥 영역에서의 혈액 관류 데이터를 상해의 생성 24시간 후에 수집할 것이다. 연속 관류 평가를 5, 10, 15 및 20일에 수행하였다. 데이터를 좌측 (허혈) 대 우측 (비-허혈) 다리의 관류 점수의 비로 기록한다.

수영 인내 시험

또한, 마우스를 수영 챔버 내에서 수영하거나 계속 부유해 있는 능력에 대하여 모니터링하였다. 이를 행하기 위하여, 마우스가 수영 챔버 내에서 계속 부유해 있도록 훈련시켰다. 마우스를 3일 동안 매일 훈련시켰다. 이러한 기간의 마지막에, 7 내지 10초 내에 호흡하기 위하여 수면으로 떠오르지 못하는 것으로 정의되는 피로 (fatigue) 시까지 이들이 계속 부유하는 시간에 따라 마우스를 평가하였다. 0일에, 마우스에 한쪽 뒷다리 상해를 처리하였으며, 세포를 손상 24시간 후에 투여하였다. 이어서, 동물을 10일 및 15일에 이들의 수영 능력/부유 인내력에 대하여 평가하였다.

결과 및 분석

다리 피사로 인한 동물의 감소는 모든 그룹에서 낮았다. 모든 감소는 1주까지 발생하였다. 연구로부터 제거하였던 각 그룹 내의 마우스의 수는 다음과 같았다 (괄호 안에 나타냄): 그룹 1 (2); 그룹 2 (1); 그룹 3 (2); 그룹 4 (2); 그룹 5 (1); 및 그룹 6 (2).

레이저 도플러 관류 영상화

레이저 도플러 관류 데이터 (비-허혈 대조군 우측 다리에 비한 허혈 좌측 다리에서의 관류의 백분율로 표현)를 도 11 및 표 7-3에 나타내었다. 정맥내 주입에 의해 염수를 제공한 대조군에 비하여 hUTC 세포의 정맥내 주입으로 처리된 마우스에서 상대적 재관류가 증진되었다. 이러한 효과는 7일, 10일 및 21일에 유의미하였다. 다른 임의의 처리군과 적절한 대조군 사이에는 유의미한 차이가 없었다. 모든 대조군 동물에서 상대적 관류의 설명되지 않는 최대값이 14일에 발생하였다. 21일까지 대조군 동물에서 값이 감소하였다. 정맥내 대조군에서 2마리 마우스의 14일의 상대적 관류 값을 100% 초과였던 상대값에 기초하여 배제하였다. 이들 배제에도, 이러한 시점에 정맥내 세포 그룹과 대조군 간에 차이가 존재하지 않았다.

[표 7-3]

관류 상대값에 대한 평균 $\pm$ sem						
용량	일수					
	1	3	7	10	14	21
염수, 정맥내	14.41 $\pm$ 0.85	1363 $\pm$ 1.16	23.57 $\pm$ 3.39	32.07 $\pm$ 2.80	57.29 $\pm$ 6.64*	49.53 $\pm$ 2.86
세포, 정맥내	14.19 $\pm$ 2.18	16.63 $\pm$ 2.18	41.07 $\pm$ 3.34	59.46 $\pm$ 5.10	59.92 $\pm$ 3.93	67.24 $\pm$ 3.18
염수, 근육내	14.22 $\pm$ 1.39	16.98 $\pm$ 2.39	28.82 $\pm$ 3.99	33.66 $\pm$ 5.29	39.34 $\pm$ 8.14	36.21 $\pm$ 6.14
세포, 근육내	12.98 $\pm$ 0.71	25.32 $\pm$ 4.33	31.13 $\pm$ 2.58	42.95 $\pm$ 2.00	46.34 $\pm$ 1.66	55.43 $\pm$ 9.84
피브린, 근육내	13.15 $\pm$ 1.01	15.16 $\pm$ 2.08	25.64 $\pm$ 2.82	35.99 $\pm$ 2.51	50.35 $\pm$ 3.03	44.20 $\pm$ 3.4
피브린 + 세포 근육내	12.47 $\pm$ 0.70	16.34 $\pm$ 1.73	27.49 $\pm$ 1.73	43.76 $\pm$ 5.84	44.73 $\pm$ 3.12	52.84 $\pm$ 3.9

* 허혈 다리 값에 기초하여 배제된 2마리 마우스에 대한 값 > 100% 대조군 다리

양쪽 뒷다리에서의 모세혈관 및 동맥 밀도를 21일에 수집한 면역조직화학적 염색된 얇은 섹션에서 결정하였

다. 미세혈관 밀도와 관류 간에는 상관관계가 없었다. 모세혈관의 상대 밀도는 대조군과 처리군 간에 유의미하게 상이하지 않았다 (도 12).

대조군 및 처리 동물의 동맥 밀도에는 차이가 없었다 (도 13). 피브린을 직접 주사한 근육에서 동맥의 밀도 감소의 경향이 있었다.

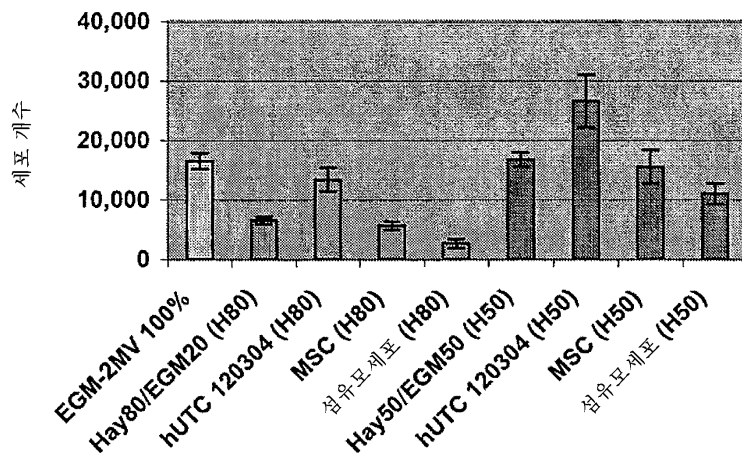
충류 흐름에 대하여 수영하는 마우스의 능력을 수술 전에, 그리고 수술 10일 후에 다시 평가하였다. 각 세션에, 허혈의 유도 전, 총 수영 시간을 기록하고, 비교하였다. 기능 평가에서 대조군과 처리군에는 유의미한 차이가 없었다.

약술하면, 결과는 hUTC의 정맥내 투여가 상해 후 3일, 10일 및 21일에 허혈 근육에서의 혈류의 복구를 야기하는 것을 보여준다. 특히, 허혈의 생성 1일 후에 hUTC의 정맥내 투여는 실험의 종료 시에 (21일), 허혈 근육의 가속화된 재관류 및 보다 큰 상대 관류의 수준을 야기하였다. 다른 처리는 본 연구에 사용된 임의의 측정에 의해 명백한 영향을 갖지 않았다. 정맥내 전달된 hUTC가 재관류를 향상시키는 메카니즘은 허혈 영역에서의 혈관 재생장의 분석에 기초하여 분명하지 않았다. 다른 메카니즘이 관찰된 효과를 설명할 수 있음이 가능하다. 최근에, 전신으로 전달된 골수-유래 중간엽 줄기 세포가 폐에 포획되며, 여기서, 이들은 항염증 인자의 분비를 통해 소정의 거리에서 보호를 촉진시키며, 이는 조직에 대한 보다 조기의 상해 정도를 감소시킬 수 있는 것으로 나타났다 (문헌 [Lee et al. (2009) *Stem Cell*. 5(1):54-63]).

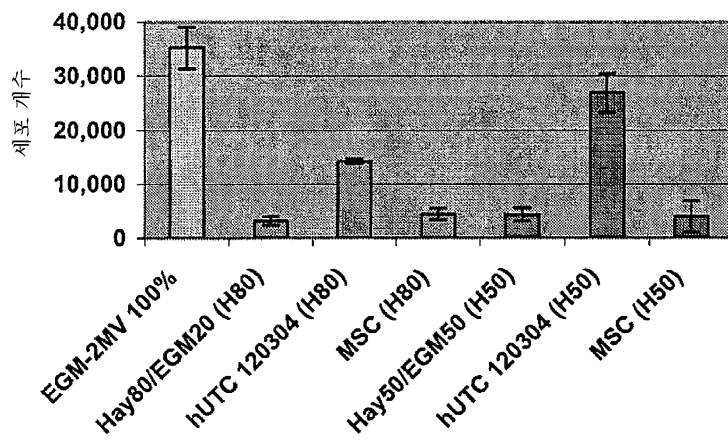
본 발명은 상기 기술되고 예시된 실시형태에 제한되지 않는다. 첨부된 특허청구범위의 범주 내에서 변이 및 변형이 가능하다.

도면

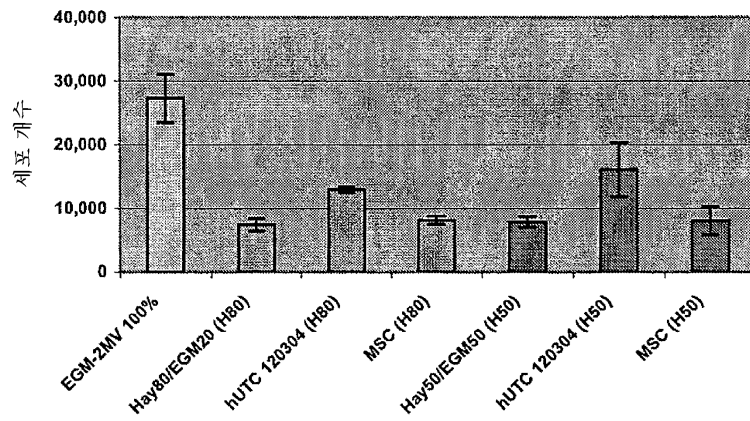
도면1a



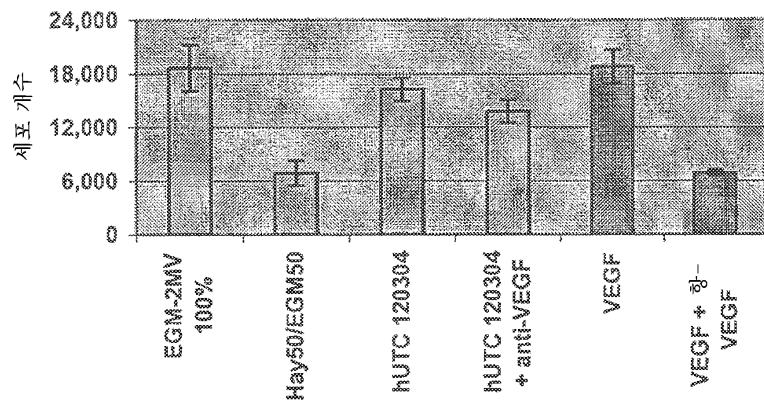
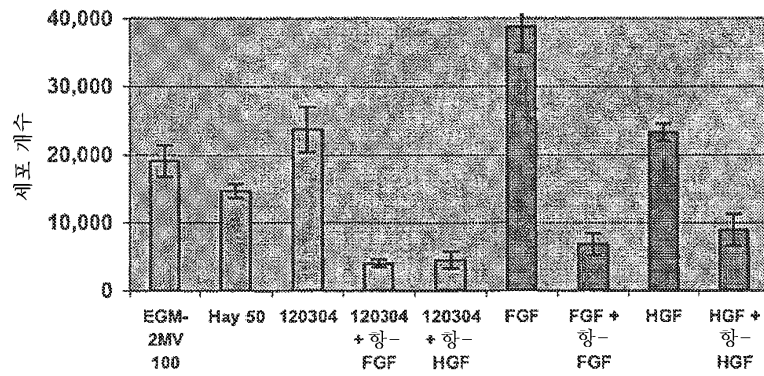
도면1b



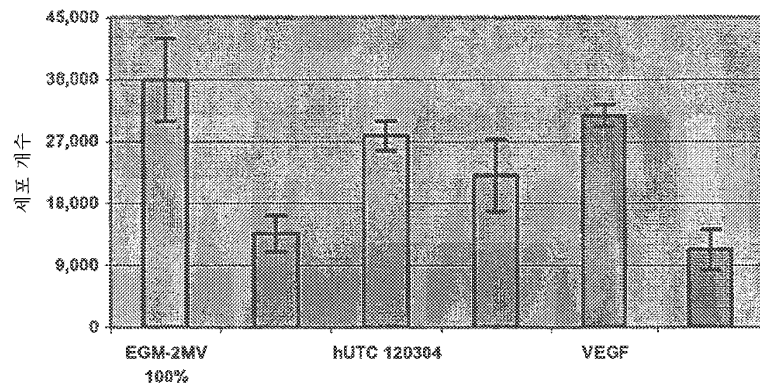
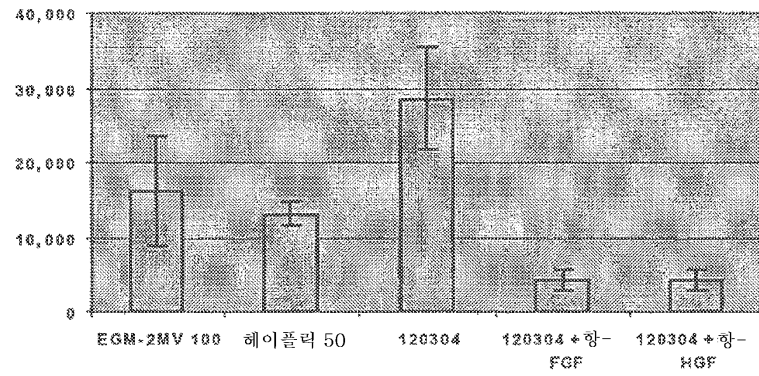
도면1c



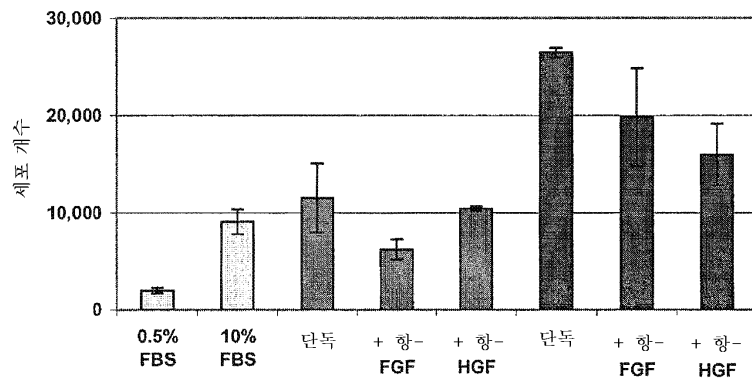
도면2a



도면2b

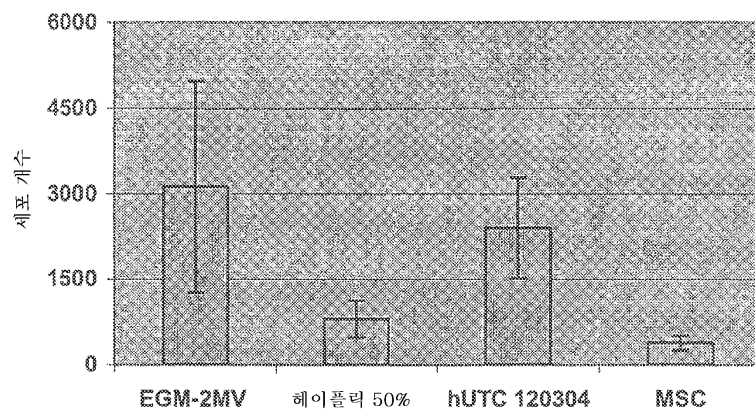


도면3

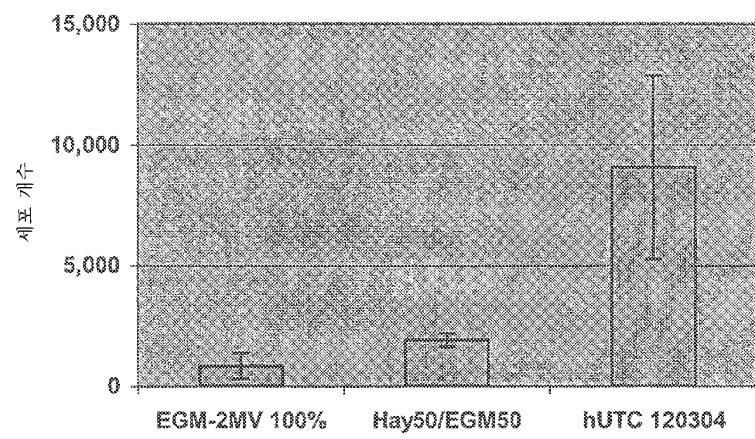


도면4

a.

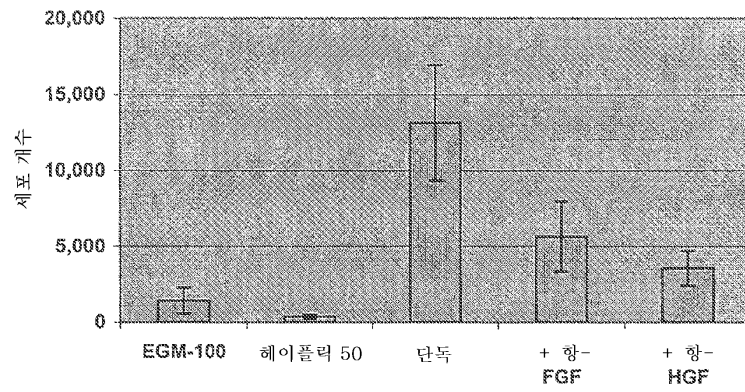


b.

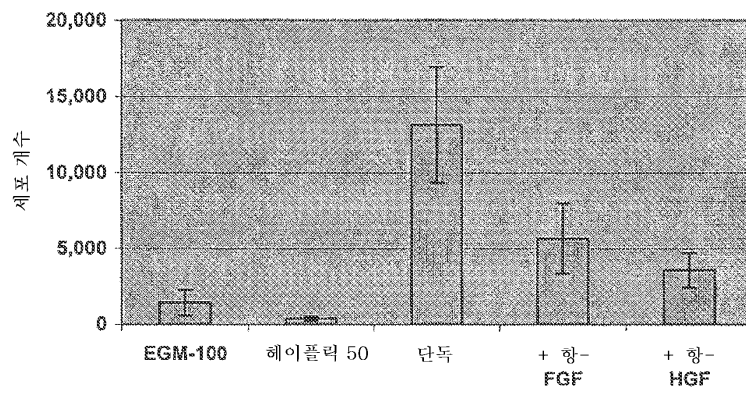


도면5

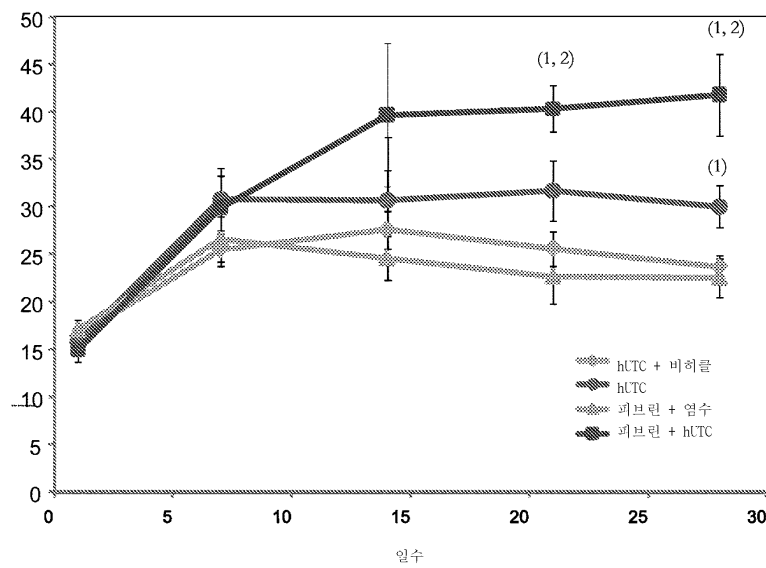
a.



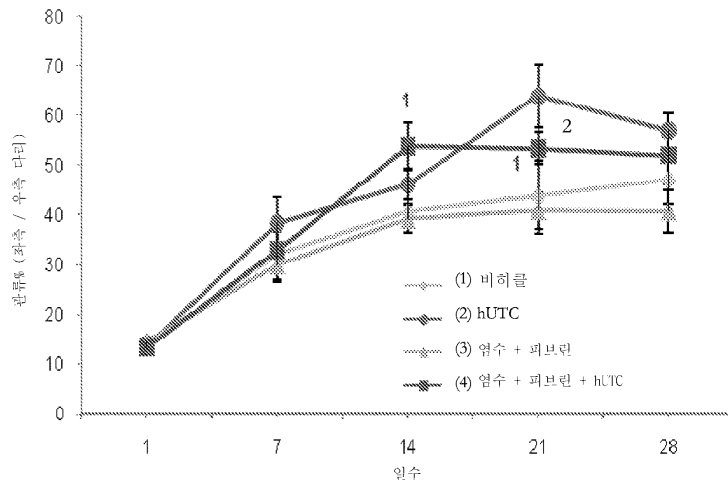
b.



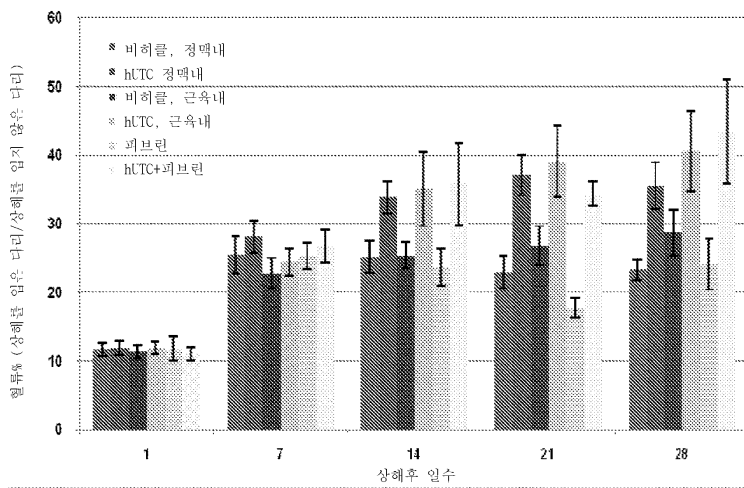
도면6



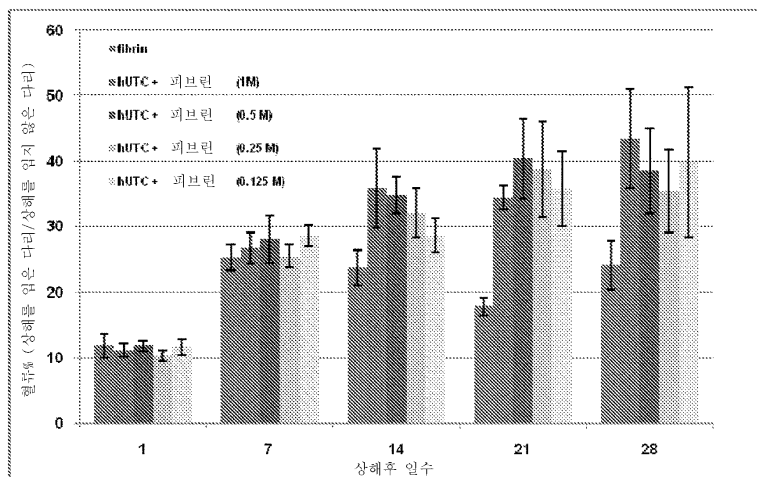
도면7



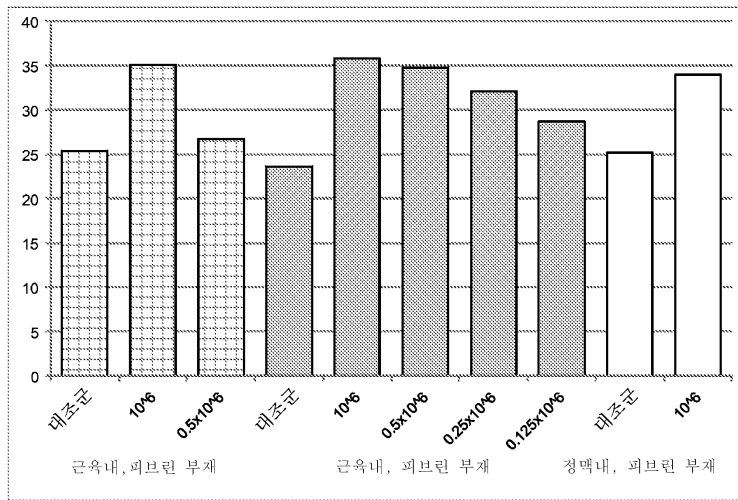
도면8



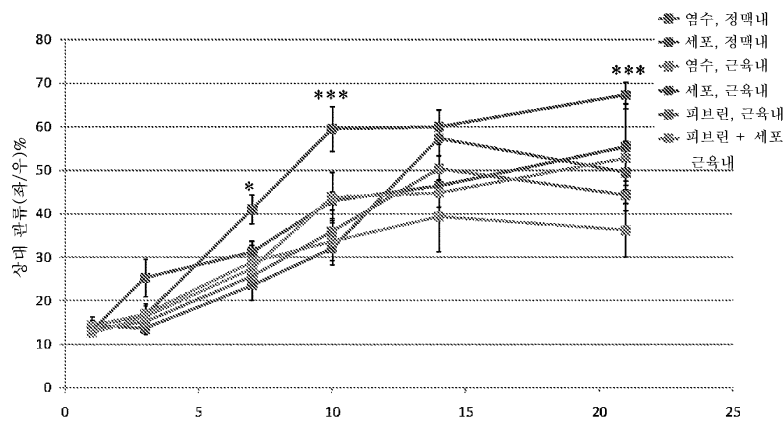
도면9



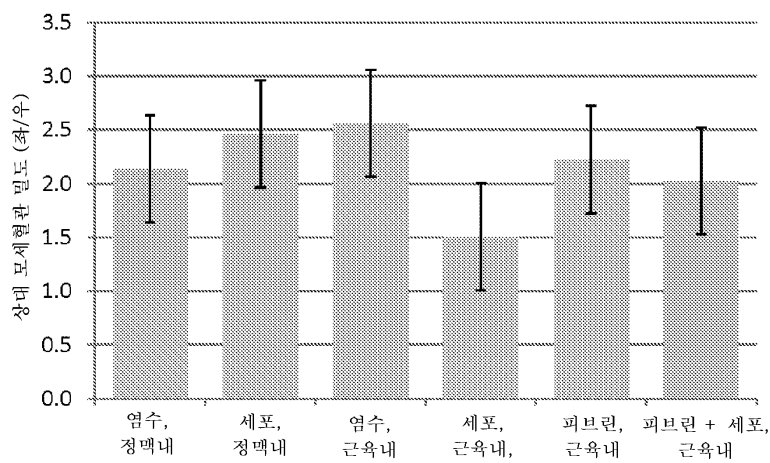
도면10



도면11



도면12



도면13

