(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년09월12일
(11) 등록번호 10-2577698
(24) 등록일자 2023년09월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0775 (2010.01) *A61K 35/28* (2015.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0662 (2013.01)
A61K 35/28 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-7018459(분할)
(22) 출원일자(국제) 2015년04월07일
심사청구일자 2022년06월28일
(85) 번역문제출일자 2022년05월31일
(65) 공개번호 10-2022-0080023
(43) 공개일자 2022년06월14일
(62) 원출원 특허 10-2016-7031018
원출원일자(국제) 2015년04월07일
심사청구일자 2020년04월01일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2015/057521
(87) 국제공개번호 WO 2015/155187
국제공개일자 2015년10월15일
(30) 우선권주장
2014901247 2014년04월07일 오스트레일리아(AU)
(56) 선행기술조사문헌
KR1020160145066 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
메조블라스트 인터내셔널 에스에이알엘
스위스 메이린 1217 루트 드 프리-보아 20
(72) 발명자
이떼스쿠, 실비우
호주, 빅토리아 브이아이씨 3000, 멜버른, 55 콜린스가, 레벨 39
시몬스, 폴
호주, 빅토리아 브이아이씨 3000, 멜버른, 55 콜린스가, 레벨 39
(74) 대리인
이처영, 장제환

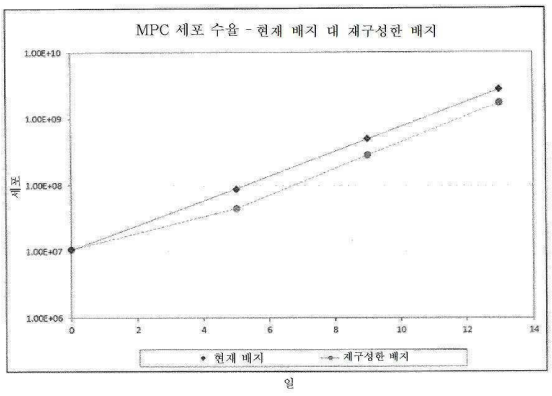
전체 청구항 수 : 총 18 항 심사관 : 김정태

(54) 발명의 명칭 **개선된 줄기 세포 조성물**

(57) 요 약

본 개시내용은 안지오포이에틴-1(Ang1)의 높은 수준을 발현하는 줄기 세포 및 이의 제조 방법을 제공한다. 이러한 줄기 세포는 치료학적 분야의 범위에서 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12N 2500/38 (2013.01)
C12N 2501/135 (2013.01)
C12N 2501/2301 (2013.01)
C12N 2501/25 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

배양 증식된 유전적으로 비변형된 줄기세포의 집단을 포함하는 조성물로서, 상기 유전적으로 비변형된 줄기세포는 2:1 내지 30:1의 비율 [Ang1:VEGF]로 안지오포이에틴-1(angiopoietin-1, Ang1) 및 혈관 내피 성장 인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)를 발현하고,

상기 줄기세포는 시험관 내 줄기세포 집단을 배양 증식(culture expanding)에 의해 생성되며,

상기 배양 증식(culture expanding)은 세포 배양 배지에서 줄기세포 집단을 배양하는 단계로,

상기 세포 배양 배지는 인간 혈청(human serum)이 보충되고; 또는 3%(v/v) 내지 9%(v/v) 비태아 혈청(non-fetal serum)이 보충되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 줄기세포는 5:1 내지 20:1의 비율로 Ang1:VEGF를 발현하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 줄기세포는 0.1㎍/10^6cells 내지 1.0㎍/10^6cells의 양으로 Ang1을 발현하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 줄기세포는 약 0.05㎍/10^6 cells 미만의 양으로 VEGF를 발현하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 줄기세포는 약 0.03㎍/10^6 cells 미만의 양으로 VEGF를 발현하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 줄기세포는 중간엽 줄기 세포(mesenchymal stem cells) 또는 중간엽 전구체 세포(mesenchymal precursor cells)인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 허용되는 약제학적 담체(carrier)를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 혈관화(vascularisation) 또는 혈관신생 촉진 또는 증가된 Ang1 발현이 바람직한 병태(condition)를 치료하는 방법에 사용하기 위한 조성물.

청구항 9

줄기세포에서 Ang1 발현을 유도하기 위한 시험관 내 방법으로서,

세포 배양 배지에서 줄기세포 집단을 배양하는 단계를 포함하고,

여기서 상기 세포 배양 배지는 3%(v/v) 내지 9%(v/v) 비태아 혈청(non-fetal serum) 또는 인간 혈청(human serum)이 보충되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, Ang1 및 VEGF 수준을 측정하여 Ang1 발현이 VEGF 발현에 비례하여 유도되는지를 결정하고, VEGF 발현에 비례하여 유도된 Ang1 발현을 갖는 세포를 선택하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 2:1 내지 30:1의 비율로 Ang1:VEGF를 발현하는 줄기세포를 선택하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

제9항에 있어서, 상기 세포 배양 배지는 다음으로 보충되는 것을 특징으로 하는 방법:

신생아 혈청(neo-natal serum);

인간 신생아 혈청(human neo-natal serum); 또는

인간 성인 혈청(human adult serum).

청구항 15

다음 단계를 포함하는, 혈관화(vascularisation) 또는 혈관신생(angiogenesis)을 촉진하는 데 사용하기에 적합한 유전적으로 비변형된 줄기세포를 수득하는 방법:

적어도 한 명의 공여자(donor)로부터 줄기세포를 포함하는 적어도 하나의 세포 집단을 수득하는 단계; 및

상기 줄기세포를 세포 배양 배지에서 배양하는 단계,

여기서, 상기 세포 배양 배지는 속효성(short acting) L-아스코르브산 유도체(L-ascorbic acid derivative)를 함유하지만, 실질적인 양의 지효성(long acting) L-아스코르브산 유도체를 함유하지 않고,

상기 세포 배양 배지는 3%(v/v) 내지 9%(v/v) 비태아 혈청(non-fetal serum)이 보충되고, 또는 인간 혈청(human serum)이 보충되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

제9항 또는 제15항에 있어서, 상기 줄기세포는 중간엽 줄기 세포(mesenchymal stem cells) 또는 중간엽 전구체 세포(mesenchymal precursor cells)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

제9항 또는 제15항에 있어서, 상기 세포 배양 배지는 적어도 5%(v/v) 인간 혈청을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 18

제9항 또는 제15항에 있어서, 상기 세포 배양 배지는 3%(v/v) 인간 혈청을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 19

제1항에 있어서, 상기 세포 배양 배지는 적어도 5%(v/v) 인간 혈청을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 20

제1항에 있어서, 상기 세포 배양 배지는 3%(v/v) 인간 혈청을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 개시내용은 안지오포이에틴-1(Angeopoetin-1: Ang1)의 높은 수준을 발현하는 줄기 세포 및 이의 제조 방법에 관한 것이다. 이러한 줄기 세포는 예를 들어 혈관화 및/또는 혈관신생을 촉진하기 위해 치료학적 분야의 범위에서 사용될 수 있다.

배 경 기 술

[0002] 안지오포이에틴은 배아 및 출생후 혈관신생에서 역할을 하는 혈관 성장 인자의 패밀리의 일부이다. Ang1은 내피 및 몇몇 비내피 세포, 예컨대 평활근 세포의 이동을 촉진한다. Ang1은 또한 세관으로의 내피 세포의 스프라우팅(sprouting) 및 재체계화를 유도한다. Ang1은 내피 세포에서 강력한 항염증성 효과를 나타내어, E-설렉틴, ICAM-1 및 VCAM-1의 혈관 내피 성장 인자(Vascular Endothelial Growth Factor: VEGF) 유도 상향조절을 억제하고, VEGF 및 TNF-α에 반응하여 백혈구 유착 및 이동을 저해한다(Kim et al. 2001a).

[0003] 많은 연구는 Ang1의 과발현, 또는 보충적 Ang1의 첨가가 허혈을 완화하고 사지, 뇌, 관절부, 신장 및 가장 중요하게는 심장을 포함하는 여러 장기의 기능을 회복시키는 데 있어서 유리한 효과를 발생시킨다는 것을 나타낸다. 다른 유리한 효과는 혈전증을 경감시키는 것을 포함한다(Kim et al. 2001b). 따라서, Ang1은 심혈관 질환에 대한 치료제로서의 이의 유용성을 제시하는 다수의 주요한 특성을 나타낸다.

[0004] 기능성 혈관계의 개발에 필요한 다수의 성장 인자 중에서, Ang1 및 VEGF는 중추적인 역할을 이행한다. 따라서, 허혈성 심근의 치료에서의 치료학적 혈관화를 위해, VEGF와 조합된 Ang1의 사용은 매우 유망한 후보물질인 것으로 또한 검토된다.

[0005] 이전에, 시험 동물에서의 심근경색 또는 경색주변 구역으로의 Ang1 및 VEGF-A의 병용 투여는 신생혈관화를 증가시키고 심근 아폽토시스를 감소시켜서, 주사 부위에서의 증가한 심근세포 재생, 및 개선된 혈관 관류 및 심장 기능을 발생시키는 것으로 나타났다. 약 20:1의 비율의 Ang1 및 VEGF의 준최대 용량은 이 효과를 증대시키고, 어느 인자 단독의 것보다 더 강력하다(Chae et al. 2000). 이 결과는 Ang1 및 VEGF의 병용 치료가 치료학적 혈관화를 생성하기 위해 사용될 수 있다는 것을 나타낸다.

[0006] 최근에, 줄기 세포 치료는 허혈성 심장 질환에 대한 잠재적 치료 중 하나로서 나타났다(Huang et al. 2011; Lijie et al. 2007).

[0007] 혈관신생을 촉진하는 데 단독으로서의 줄기 세포의 사용은 많은 유형의 줄기 세포에서의 혈관형성 인자의 불충분한 발현으로 인해 제한된 채 있다. Ang1을 코딩하는 핵산 분자에 의한 줄기 세포의 형질감염을 포함하는, 형질감염의 유전 변형은 이 제한을 해결하도록 이용되었다. 유전 변형된 줄기 세포의 사용은 그러나 기술에 의한 복잡함 및 가능하게는 유전 변형 과정에 의해 생긴 바람직하지 않은 효과로 인해 단점을 가진다.

발명의 내용

[0008] 본 개시내용은, Ang1을 발현하는 핵산에 의한 세포의 형질감염에 대한 필요 없이, 높은 수준에서 Ang1을 발현하는 줄기 세포의 집단의 예상치 못한 생성에 기초한다. 일례에서, 줄기 세포의 이 집단은 낮은 수준에서 VEGF를 또한 발현하고, 생성된 Ang1:VEGF의 비율은 혈관화를 증대시키는 데 있어서 특히 효과적인 Chae et al. (2000)에 의해 밝혀진 비율과 일치한다.

[0009] 따라서, 본 개시내용은 유전적으로 비변형된 줄기 세포를 포함하는 조성물을 제공하고, 상기 유전적으로 비변형된 줄기 세포는 적어도 0.1$\mu g/10^6$개의 세포의 양으로 Ang1을 발현한다.

[0010] 또 다른 예에서, 조성물은 적어도 0.5$\mu g/10^6$개의 세포의 양으로 Ang1을 발현하는 줄기 세포를 포함한다. 또 다

른 예에서, 줄기 세포는 적어도 0.7㎍/10^6개의 세포의 양으로 Ang1을 발현한다. 또 다른 예에서, 줄기 세포는 적어도 1㎍/10^6개의 세포의 양으로 Ang1을 발현한다.

[0011] 또 다른 예에서, 줄기 세포는 약 0.05㎍/10^6개 미만의 세포의 양으로 VEGF를 발현한다. 또 다른 예에서, 줄기 세포는 약 0.03㎍/10^6개 미만의 세포의 양으로 VEGF를 발현한다. 또 다른 예에서, 줄기 세포는 약 0.02㎍/10^6개 미만의 세포의 양으로 VEGF를 발현한다.

[0012] 또 다른 예에서, 유전적으로 비변형된 줄기 세포는 적어도 약 2:1의 비율로 Ang1:VEGF를 발현한다. 또 다른 예에서, 유전적으로 비변형된 줄기 세포는 적어도 약 10:1의 비율로 Ang1:VEGF를 발현한다. 또 다른 예에서, 줄기 세포는 적어도 약 20:1의 비율로 Ang1:VEGF를 발현한다. 또 다른 예에서, 줄기 세포는 적어도 약 30:1의 비율로 Ang1:VEGF를 발현한다. 또 다른 예에서, 줄기 세포는 적어도 약 50:1의 비율로 Ang1:VEGF를 발현한다.

[0013] 또 다른 예에서, 줄기 세포는 중간엽 줄기 세포이다. 또 다른 예에서, 줄기 세포는 중간엽 전구체 세포이다. 또 다른 예에서, 줄기 세포는 유도 만능 줄기 세포(induced pluripotent stem cell: iPS 세포)로부터 유래한다.

[0014] 또 다른 예에서, 조성물은 허용되는 약제학적 담체를 추가로 포함한다.

[0015] 또 다른 예에서, 조성물은 하기 기재된 방법에 따라 유전적으로 비변형된 줄기 세포를 배양함으로써 생성된다.

[0016] 본 개시내용은 줄기 세포에서 Ang1 발현을 유도하기 위한 시험관내 방법을 또한 제공하고, 상기 방법은 세포 배양 배지에서 줄기 세포의 집단을 배양하는 단계를 포함하고, 세포 배양 배지는

[0017] • 속효성(short acting) L-아스코르브산 유도체를 함유하지만, 실질적인 양의 지효성(long acting) L-아스코르브산 유도체를 함유하지 않고/않거나;

[0018] • 10%(v/v) 미만의 소 태아 혈청이 보충된다.

[0019] 본 개시내용은 줄기 세포에서 Ang1 발현을 유도하기 위한 시험관내 방법을 또한 제공하고, 상기 방법은 세포 배양 배지에서 줄기 세포의 집단을 배양하는 단계를 포함하고, 세포 배양 배지는

[0020] • 속효성 L-아스코르브산 유도체를 함유하지만, 실질적인 양의 지효성 L-아스코르브산 유도체를 함유하지 않고/않거나;

[0021] • 10%(v/v) 미만의 소 태아 혈청이 보충되고/되거나;

[0023] * • 비태아 혈청(non-fetal serum)이 보충된다.

[0024] 일례에서, 상기 방법은 Ang1 수준을 측정하여 Ang1 발현이 유도되는지를 결정하는 단계를 추가로 포함한다. 또 다른 예에서, Ang1 발현은 줄기 세포가 적어도 0.5㎍/10^6개의 세포의 양으로 Ang1을 발현할 때 유도된다. 또 다른 예에서, Ang1 발현은 줄기 세포가 적어도 0.7㎍/10^6개의 세포의 양으로 Ang1을 발현할 때 유도된다. 또 다른 예에서, Ang1 발현은 줄기 세포가 적어도 1㎍/10^6개의 세포의 양으로 Ang1을 발현할 때 유도된다.

[0025] 일례에서, 상기 방법은 유도된 Ang1 발현을 가지는 세포를 선택하는 단계를 추가로 포함한다. 일례에서, 적어도 0.5㎍/10^6개의 세포의 양으로 Ang1을 발현하는 세포가 선택된다. 또 다른 예에서, 적어도 0.7㎍/10^6개의 세포의 양으로 Ang1을 발현하는 세포가 선택된다. 또 다른 예에서, 적어도 1㎍/10^6개의 세포의 양으로 Ang1을 발현하는 세포가 선택된다.

[0026] 일례에서, 상기 방법은 Ang1 수준을 측정하여 Ang1 발현이 유도되는지를 결정하고 유도된 Ang1 발현을 가지는 세포를 선택하는 단계를 추가로 포함한다.

[0027] 일례에서, 속효성 아스코르브산 유도체는 L-아스코르브산 염이다.

[0028] 일례에서, 속효성 아스코르브산 유도체는 L-아스코르브산 나트륨염이다.

[0029] 일례에서, 세포 배양 배지는 10%(v/v) 미만의 소 태아 혈청(fetal calf serum: FCS)이 보충된다.

[0030] 일례에서, 세포 배양 배지는 8%(v/v) 미만의 소 태아 혈청(FCS)이 보충된다.

[0031] 일례에서, 세포 배양 배지는 7%(v/v) 미만의 소 태아 혈청(FCS)이 보충된다.

[0032] 일례에서, 세포 배양 배지는 6%(v/v) 미만의 소 태아 혈청(FCS)이 보충된다.

[0033] 일례에서, 세포 배양 배지는 5%(v/v) 미만의 소 태아 혈청이 보충된다.

[0034] 일례에서, 세포 배양 배지는 1α,25-다이하이이드록시비타민 D3(1,25D), 혈소판 유래 성장 인자(platelet derived growth factor: PDGF), 종양 괴사 인자 α(tumor necrosis factor α: TNF-α), 인터류킨-1β(IL-1β) 및 기질 유래 인자 1α(stromal derived factor 1α: SDF-1α)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 자극 인자가 보충된다.

[0035] 일례에서, 세포 배양 배지는 비태아 혈청이 보충된다.

[0036] 일례에서, 세포 배양 배지는 포유류 비태아 혈청이 보충된다.

[0037] 일례에서, 세포 배양 배지는 인간 비태아 혈청이 보충된다.

[0038] 일례에서, 세포 배양 배지는 신생아 혈청이 보충된다.

[0039] 일례에서, 세포 배양 배지는 포유류 신생아 혈청이 보충된다.

[0040] 일례에서, 세포 배양 배지는 신생 소 혈청(new born calf serum: NBCS)이 보충된다.

[0041] 일례에서, 세포 배양 배지는 인간 신생아 혈청이 보충된다.

[0042] 일례에서, 세포 배양 배지는 제대혈로부터 얻은 인간 신생아 혈청이 보충된다.

[0043] 또 다른 예에서, 세포 배양 배지는 성인 혈청이 보충된다.

[0044] 일례에서, 세포 배양 배지는 포유류 성인 혈청이 보충된다.

[0045] 일례에서, 세포 배양 배지는 성인 소 혈청이 보충된다.

[0046] 일례에서, 세포 배양 배지는 인간 성인 혈청이 보충된다.

[0047] 일례에서, 세포 배양 배지는 인간 AB 혈청이 보충된다.

[0048] 또 다른 예에서, 세포 배양 배지는 적어도 약 5%(v/v)의 NBCS가 보충된다.

[0049] 또 다른 예에서, 세포 배양 배지는 적어도 약 2%(v/v)의 NBCS가 보충된다.

[0050] 일례에서, 세포 배양 배지는 NBCS와 FCS의 혼합물이 보충된다. 예를 들어, NBCS 대 FCS의 비율은 약 1:1일 수 있다.

[0051] 일례에서, 세포 배양 배지는 적어도 약 5%(v/v)의 FCS 및 적어도 약 5%(v/v)의 NBCS가 보충된다.

[0052] 일례에서, 세포 배양 배지는 태아 혈청이 보충되지 않는다.

[0053] 본 개시내용은 혈관화 및/또는 혈관신생을 촉진하는 데 사용하기에 적합한 유전적으로 비변형된 줄기 세포를 얻는 방법을 또한 제공하고, 상기 방법은 적어도 하나의 공여자로부터의 줄기 세포를 포함하는 적어도 하나의 세포 집단을 얻는 단계; 줄기 세포를 배양하는 단계; 상기 적어도 하나의 세포 집단(들)의 각각에서 줄기 세포에 의해 발현된 Ang1의 양을 결정하는 단계; 및 적어도 0.1$\mu g/10^6$개의 세포의 양으로 Ang1을 발현하는 줄기 세포를 선택하는 단계를 포함한다.

[0054] 일례에서, 상기 방법은 상기 적어도 하나의 세포 집단(들)의 각각에서 줄기 세포에 의해 발현된 VEGF의 양을 결정하는 단계; 및 적어도 2:1의 비율, 또는 적어도 10:1의 비율, 또는 적어도 20:1의 비율, 또는 적어도 30:1의 비율, 또는 적어도 50:1의 비율로 Ang1:VEGF를 발현하는 줄기 세포를 선택하는 단계를 추가로 포함한다.

[0055] 본 개시내용은 혈관화 및/또는 혈관신생을 촉진하기 위한 본 명세서에 기재된 조성물의 용도를 또한 제공한다. 본 개시내용은 항혈전제로서의 본 명세서에 기재된 조성물의 용도를 또한 제공한다. 본 개시내용은 Ang1 발현 증가가 요망되는 병태를 치료하기 위한 본 명세서에 기재된 조성물의 용도를 또한 제공한다.

[0056] 본 개시내용은 대상체에서 혈관화 및/또는 혈관신생을 촉진하는 방법을 또한 제공하고, 상기 방법은 본 명세서

에 기재된 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 본 개시내용은 대상체에서 혈전 형성을 치료하는 방법을 또한 제공하고, 상기 방법은 본 명세서에 기재된 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 본 개시내용은 대상체에서 Ang1 발현 증가가 요망되는 병태를 치료하는 방법을 또한 제공하고, 상기 방법은 본 명세서에 기재된 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0057] 본 개시내용은 혈관화 및/또는 혈관신생을 촉진하기 위한 약제의 제조에서의 본 명세서에 기재된 조성물의 용도를 또한 제공한다. 본 개시내용은 혈전증 형성을 감소시키기 위한 약제의 제조에서의 본 명세서에 기재된 조성물의 용도를 또한 제공한다. 본 개시내용은 Ang1 발현 증가가 요망되는 병태를 치료하기 위한 약제의 제조에서의 본 명세서에 기재된 조성물의 용도를 또한 제공한다.

[0058] 본 개시내용의 기재된 줄기 세포는 임의의 포유류로부터 얻어질 수 있다. 예를 들어, 줄기 세포는 원시류, 소, 양, 말, 개, 고양이 또는 염소로부터 유래할 수 있다. 일례에서, 줄기 세포는 인간 줄기 세포이다.

[0059] 또 다른 예에서, 본 개시내용은 본 개시내용의 방법에 따라 배양되거나 본 개시내용의 방법에 의해 얻어진 줄기 세포의 집단에 관한 것이다.

[0060] 또 다른 예에서, 본 개시내용의 방법은 혈관화 및/또는 혈관신생을 촉진하기 위한 약제의 제조에서 사용된다.

[0061] 또 다른 예에서, 본 개시내용의 방법은 Ang1 발현 증가가 요망되는 병태를 치료하기 위한 약제의 제조에서 사용된다.

도면의 간단한 설명

[0062] **도 1: 과정 A 및 과정 B에 의한 MPC 성장.** Y 축은 세포수를 나타내고; X 축은 일 단위의 시간이다.

도 2: 과정 A 및 과정 B에 의한 MPC 배가 시간. 세포는 P3으로부터 P5로 계대배양되었다.

도 3: 과정 A 및 과정 B에 의한 MPC의 집단 배가 시간(PDL). MPC를 P3로부터 P5로 성장시켰다. 과정 A에 의해 성장한 MPC는 8 PDL를 거치고, 과정 B에 의해 성장한 MPC는 7.33 PDL을 거쳤다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0063] 일반 기법 및 정의

[0064] 본 명세서에 걸쳐, 달리 구체적으로 표시되지 않은 한 또는 문맥이 달리 요구하지 않는 한, 단일 단계, 물질의 조성물, 단계의 그룹 또는 물질의 조성물의 그룹의 언급은 하나 및 복수(즉, 하나 이상)의 이들 단계, 물질의 조성물, 단계의 그룹 또는 물질의 조성물의 그룹을 포함하도록 취해져야 한다.

[0065] 당해 분야의 당업자는 본 명세서에 기재된 본 개시내용이 구체적으로 기재된 것 이외의 변경 및 변형에 처리된다는 것을 이해할 것이다. 본 개시내용이 모든 이러한 변경 및 변형을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 본 개시내용은, 개별적으로 또는 총체적으로, 본 명세서에서 언급되거나 표시된 모든 단계, 특징, 조성물 및 화합물, 및 임의의 및 모든 조합 또는 임의의 2개 이상의 상기 단계 또는 특징을 또한 포함한다.

[0066] 본 개시내용은 오직 예시의 목적을 위해 의도되는 본 명세서에 기재된 구체적인 실시형태에 의해 범위에 의해 제한되지 않는다. 기능상 동등한 생성물, 조성물 및 방법은 본 명세서에 기재된 바대로 본 개시내용의 범위 내에 명확하다.

[0067] 본 명세서에 개시된 임의의 예는, 달리 구체적으로 표시되지 않은 한, 임의의 다른 예에 필요 부분만 수정하여 적용되도록 취해져야 한다.

[0068] 달리 구체적으로 정의되지 않은 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 (예를 들어 세포 배양, 분자 유전학, 줄기 세포 분화, 면역학, 면역조직화학, 단백질 화학, 및 생화학에서) 당해 분야의 당업자에 의해 흔히 이해되는 것과 동일한 의미를 가지도록 취해져야 한다.

[0069] 달리 표시되지 않은 한, 본 개시내용에서 사용된 줄기 세포, 세포 배양 및 면역 기법은 당해 분야의 당업자에게 널리 공지된 표준 절차이다. 이러한 기법은 소소에서의 문헌, 예컨대 문헌[J. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley and Sons (1984), J. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989), T.A. Brown (editor), Essential Molecular Biology: A Practical Approach, Volumes 1 and 2, IRL Press (1991), D.M. Glover and B.D. Hames (editors), and F.M. Ausubel et al. (editors), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and

Wiley-Interscience (1988, including all updates until present), Ed Harlow and David Lane (editors) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory, (1988), 및 J.E. Coligan et al. (editors) Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons(현재까지 모든 업데이트 포함)]에 걸쳐 기재되고 설명되어 있다.

[0070] 용어 "및/또는" 예를 들어 "X 및/또는 Y"는 "X 및 Y" 또는 "X 또는 Y" 중 어느 하나를 의미하는 것으로 이해되어야 하고, 의미 둘 다 또는 의미 중 어느 하나에 대한 분명한 지지를 제공하도록 취해져야 한다.

[0071] 본 명세서에 사용되는 바대로, 용어 약은, 반대로 표시되지 않은 한, 지정된 값의 ±10%, 더 바람직하게는 ±5%를 의미한다.

[0072] 용적 백분율(v/v%)은 [(용질의 용적)/(용액의 용적)] x 100%를 정의한다. 용적 백분율은 용액의 용적에 대한 것이다. 예를 들어, 5%(v/v)의 FCS가 보충된 세포 배양 배지는 매 100㎖의 세포 배양 배지에 대해 약 5㎖의 FCS가 존재한다는 것을 의미한다.

[0073] 본 명세서에 걸쳐, 단어 "포함한다" 또는 변형어, 예컨대 "포함" 또는 "포함하는"은, 임의의 다른 구성요소, 정수 또는 단계, 또는 구성요소, 정수 또는 단계의 그룹의 배제가 아니라, 기재된 구성요소, 정수 또는 단계, 또는 구성요소, 정수 또는 단계의 그룹의 포함을 시사하도록 의미할 것이다.

[0074] 줄기 세포

[0075] 본 명세서에 사용되는 바대로, 용어 "줄기 세포"는 표현형으로 및 유전자적으로 동일한 딸세포를 생성시킬 수 있는 자가 재생 세포, 및 적어도 하나의 다른 최종 세포 유형(예를 들어, 말단 분화 세포)를 의미한다. 용어 "줄기 세포"는 전능성, 다능성 및 다잠재성 세포, 및 이의 분화로부터 유래한 선조 및/또는 전구체 세포를 포함한다. 줄기 세포는 성인 또는 배아 줄기 세포일 수 있다.

[0076] 본 명세서에 사용되는 바대로, 용어 "전능 세포" 또는 "전능성 세포"는 완전한 배아(예를 들어, 배반포)를 형성할 수 있는 세포를 의미한다.

[0077] 본 명세서에 사용되는 바대로, 용어 "다능 세포" 또는 "다능성 세포"는 완전한 분화 다양성, 즉 임의의 포유류 신체의 대략 260개의 세포 유형으로 성장하는 능력을 가지는 세포를 의미한다. 다능 세포는 자가 재생하고, 조직 내에 휴먼 또는 정지로 있을 수 있다.

[0078] "다잠재성 세포" 또는 "다잠재 세포"란 임의의 몇몇 성숙 세포 유형을 생성시킬 수 있는 세포를 의미한다. 본 명세서에 사용되는 바대로, 이 구절은 이들 세포의 성인 선조 세포 및 다잠재성 자손을 포함한다. 다잠재성 세포와 달리, 다능성 세포는 모든 세포 유형을 형성하는 능력을 가지지 않는다.

[0079] 본 명세서에 사용되는 바대로, 용어 "중간엽 계열 전구체 또는 줄기 세포"는 중간엽 세포 유형으로 분화할 수 있는 세포를 의미한다. 예를 들어, 중간엽 계열 전구체 세포 및 중간엽 전구체 세포는 골, 연골, 근육 세포, 지방 세포 및 섬유성 연결 조직으로 분화할 수 있다.

[0080] 일례에서, 본 개시내용의 줄기 세포는 STRO-1+ 중간엽 전구체 세포이다.

[0081] STRO-1+ 다잠재성 세포는 골수, 혈액, 치수, 지방조직 조직, 피부, 비장, 췌장, 뇌, 신장, 간, 심장, 망막, 뇌, 모공, 장, 폐, 림프절, 흉선, 골, 인대, 힘줄, 골격근, 진피 및 골막에서 발견되는 세포이다. 따라서, STRO-1+ 다잠재성 세포는 지방조직, 골성, 연골성, 탄성 및 섬유성 연결 조직(이들로 제한되지는 않음)을 포함하는 다수의 세포 유형으로 분화할 수 있다. 이들 세포가 진입하는 특정한 계열 구속 및 분화 경로는 기계적 영향 및/또는 내인성 생물활성 인자, 예컨대 성장 인자, 사이토카인 및/또는 숙주 조직에 의해 확립된 국소 미세환경 조건으로부터의 다양한 영향에 의해 달라진다. 일 실시형태에서, STRO-1+ 다잠재성 세포는 표현형 세포를 생성하기 위해 시간에 맞춰 비가역적으로 분화하는 전구체 세포 또는 줄기 세포인 딸세포를 생성하도록 분화하는 비조혈 선조 세포이다.

[0082] 일례에서, STRO-1+ 세포는 (동일한 또는 상이한 종이든) 대상체, 예를 들어 치료되는 대상체 또는 관련 대상체 또는 비관련 대상체로부터 얻어진 샘플로부터 농후하다. 용어 "농후한", "농후" 또는 이의 변형어는 본 명세서에서 하나의 특정한 세포 유형의 비율 또는 다수의 특정한 세포 유형의 비율이 세포의 비치료 집단(예를 들어, 이의 네이티브 환경에서의 세포)과 비교할 때 증가하는 세포의 집단을 기술하도록 사용된다. 일례에서, STRO-1+ 세포에 농후화된 집단은 적어도 약 0.1% 또는 0.5% 또는 1% 또는 2% 또는 5% 또는 10% 또는 15% 또는 20% 또는 25% 또는 30% 또는 50% 또는 75% 또는 85% 또는 95% 또는 99%의 STRO-1+ 세포를 포함한다. 이와 관련하여, 용

어 "STRO-1+ 세포에 농후화된 세포의 집단"은 용어 "X%의 STRO-1+ 세포를 포함하는 세포의 집단"에 대한 명확한 지원을 제공하기 위해 취해질 것이고, 여기서 X%는 본 명세서에서 언급된 바대로 백분율이다. STRO-1+ 세포는 몇몇 예에서 클론형성 콜로니를 형성할 수 있고, 예를 들어 CFU-F(섬유아세포) 또는 이의 하위세트(예를 들어, 50% 또는 60% 또는 70% 또는 80% 또는 90% 또는 95%)는 이의 활성을 가질 수 있다.

[0083] 일례에서, 본 개시내용의 줄기 세포는 선택 가능한 형태로 STRO-1+ 세포를 포함하는 세포 제제로부터 농후화된다. 이와 관련하여, 용어 "선택 가능한 형태"는 세포가 STRO-1+ 세포의 선택을 허용하는 마커(예를 들어, 세포 표면 마커)를 발현한다는 것을 의미하는 것으로 이해될 것이다. 마커는 STRO-1일 수 있지만, 그럴 필요는 없다. 예를 들어, 본 명세서에서 기재되고/되거나 예시된 것처럼, STRO-2 및/또는 STRO-3(TNAP) 및/또는 STRO-4 및/또는 VCAM-1 및/또는 CD146 및/또는 3G5를 발현하는 세포(예를 들어, MPC)는 또한 STRO-1을 발현한다(그리고 STRO-1^{bright}일 수 있다). 따라서, 세포가 STRO-1+이라는 표시는 세포가 STRO-1 발현에 의해 선택된다는 것을 의미하지 않는다. 일례에서, 세포는 적어도 STRO-3 발현에 기초하여 선택되고, 예를 들어 이것은 STRO-3+(TNAP+)이다. 또 다른 예에서, 세포는 적어도 STRO-4 발현에 기초하여 선택되고, 예를 들어 이것은 STRO-4+이다.

[0084] 세포 또는 이의 집단의 선택의 언급은 반드시 특정한 조직 공급원으로부터의 선택을 요하지 않는다. 본 명세서에 기재된 바대로, STRO-1+ 세포는 매우 다양한 공급원으로부터 선택되거나 단리되거나 농후화될 수 있다. 그렇긴 하지만, 몇몇 예에서, 이들 용어는 STRO-1+ 세포(예를 들어, MPC)를 포함하는 임의의 조직, 또는 혈관화 조직, 또는 주피세포(예를 들어, STRO-1+ 주피세포)를 포함하는 조직, 또는 본 명세서에 기재된 임의의 하나 이상의 조직으로부터의 선택에 대한 지지를 제공한다.

[0085] 일례에서, 본 개시내용의 줄기 세포는 STRO-1+, TNAP+, VCAM-1+, THY-1+, STRO-2+, STRO-4+(HSP-90β), CD45+, CD146+, 3G5+, CC9 또는 임의의 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 마커를 개별적으로 또는 총체적으로 발현한다.

[0086] "개별적으로"란 본 개시내용이 별개로 언급된 마커 또는 마커의 집단을 포함하고, 개별 마커 또는 마커의 그룹은 본 명세서에서 별개로 기재되지 않을 수 있더라도, 수반된 청구항은 각각으로부터 별개로 그리고 분할하여 이러한 마커 또는 마커의 그룹을 한정할 수 있는 것을 의미한다.

[0087] "총체적으로"란 본 개시내용이 언급된 마커 또는 펩타이드의 그룹의 임의의 수 또는 조합을 포함하고, 마커 또는 마커의 그룹의 이러한 수 또는 조합이 본 명세서에서 구체적으로 기재되지 않을 수 있더라도, 수반된 청구항은 마커 또는 마커의 그룹의 임의의 다른 조합으로부터 별개로 그리고 분할하여 이러한 조합 또는 하위조합을 한정할 수 있는 것을 의미한다.

[0088] 일례에서, STRO-1+ 세포는 STRO-1^{bright}(syn. STRO-1^{bri})이다. 일례에서, STRO-1^{bri} 세포는 STRO-1^{dim} 또는 STRO-$1^{intermediate}$ 세포에 대해 우선적으로 농후화된다.

[0089] 일례에서, STRO-1^{bright} 세포는 추가적으로 TNAP+, VCAM-1+, THY-1+, STRO-2+, STRO-4+(HSP-90β) 및/또는 CD146+ 중 하나 이상이다. 예를 들어, 세포는 하나 이상의 상기 마커에 선택되고/되거나, 하나 이상의 상기 마커를 발현하는 것으로 나타났다. 이와 관련하여, 이전에 농후화된 또는 단리된 세포보다는, 구체적으로 시험될 필요가 없는 마커를 발현하는 것으로 나타난 세포는 시험될 수 있고, 후속하여 사용되거나, 단리되거나, 농후화된 세포는 또한 동일한 마커를 발현하는 것으로 합당하게 추정될 수 있다.

[0090] 일례에서, STRO-1^{bright}는 면역선택에 의해 단리된다. 일례에서, STRO-1^{bright} 세포는 TNAP를 발현하는 세포의 면역선택에 의해 단리된다. 본 명세서에 사용되는 바대로, 용어 "TNAP"는 조직 비특이적 알칼리 포스파타제의 모든 아이소폼을 포함하도록 의도된다. 예를 들어, 상기 용어는 간 아이소폼(liver isoform: LAP), 골 아이소폼(bone isoform: BAP) 및 신장 아이소폼(kidney isoform: KAP)을 포함한다. 일례에서, TNAP는 BAP이다. 일례에서, TNAP는 본 명세서에 사용되는 바대로 수탁 번호 PTA-7282 하에 부다페스트 조약의 조항 하에 2005년 12월 19일에 ATCC에 기탁된 하이브리도마 세포주에 의해 생성된 STRO-3 항체에 결합할 수 있는 분자를 의미한다.

[0091] 일례에서, 중간엽 전구체 또는 줄기 세포는 CD29+, CD54+, CD73+, CD90+, CD102+, CD105+, CD106+, CD166+, MHC1+ 중간엽 줄기 세포(예를 들어, 레메스템셀(remestemcel)-L)이다.

[0092] 일례에서, 중간엽 전구체 세포는 WO 2004/85630에 기재된 바대로 혈관주위 중간엽 전구체 세포이다. 예를 들어,

중간엽 전구체 세포는 혈관주위 세포의 마커를 발현하고, 예를 들어 세포는 STRO-1+ 또는 STRO-1b^{right} 및/또는 3G5+이다. 일례에서, 세포는 혈관화 조직 또는 장기 또는 이의 일부로부터 단리된 세포이거나 이전에 세포이었거나 이의 자손이다.

[0093] 소정의 마커가 세포 표면에 존재하는 정도에 따라 마커의 낮은(lo 또는 dim) 또는 높은(bright, bri) 수준을 발현할 수 있는, 마커에 대해 세포는 "양성"이라고 말해지고, 여기서 이 용어는 세포의 분류 과정에서 사용된 형광 또는 다른 마커의 강도에 관한 것이다. lo(또는 dim 또는 dull) 및 bri의 구별은 분류되는 특정한 세포 집단에 사용된 마커의 맥락에서 이해될 것이다. 소정의 마커에 대해 "음성"이라고 말해지는 세포는 반드시 그 세포로부터 완전히 부재하지는 않는다. 이 용어는 마커가 그 세포에 의해 비교적 매우 낮은 수준에서 발현되고, 이것이 검출 가능하게 표지될 때 매우 낮은 신호를 생성하고 배경 수준, 예를 들어 아이소타입 대조군 항체를 사용하여 검출된 수준 초과로 검출 불가능하다는 것을 의미하다.

[0094] 용어 "bright"는, 본 명세서에서 사용될 때, 검출 가능하게 표지될 때 비교적 높은 신호를 생성하는 세포 표면상의 마커를 의미한다. 이론에 구속되고자 하지 않으면서, "bright" 세포가 샘플에서의 다른 세포보다 더 많은 표적 마커 단백질(예를 들어, STRO-1에 의해 인식된 항원)을 발현한다는 것을 제안한다. 예를 들면, STRO-1^{bri} 세포는 형광 활성화 세포 분류(fluorescence activated cell sorting: FACS) 분석에 의해 결정될 때 FITC 접합 STRO-1 항체에 의해 표지될 때 비-bright 세포(STRO-1$^{dull/dim}$)보다 더 높은 형광 신호를 생성한다. 일례에서, "bright" 세포는 시작 샘플에 함유된 가장 밝게 표지된 골수 단핵 세포의 적어도 약 0.1%를 구성한다. 다른 예에서, "bright" 세포는 시작 샘플에 함유된 가장 밝게 표지된 골수 단핵 세포의 적어도 약 0.1%, 적어도 약 0.5%, 적어도 약 1%, 적어도 약 1.5%, 또는 적어도 약 2%를 구성한다. 예에서, STRO-1^{bright} 세포는 "배경", 즉 STRO-1-인 세포에 비해 STRO-1 표면 발현의 2 log 규모의 더 높은 발현을 가진다. 비교하면, STRO-1^{dim} 및/또는 STRO-1^{intermediate} 세포는 STRO-1 표면 발현의 2 log 미만 규모의 더 높은 발현, 통상적으로 약 1 log 또는 "배경" 미만을 가진다.

[0095] 일례에서, 상당한 비율의 STRO-1+ 다잠재성 세포는 적어도 2개의 상이한 생식계열로 분화할 수 있다. 다잠재성 세포가 구속될 수 있는 계열의 비제한적인 예는 골 전구체 세포; 담관 상피 세포 및 간세포에 다능성인 간세포 선조; 희돌기교세포 및 성상교세포로 진행하는 신경교 세포 전구체를 생성할 수 있는 신경 제한 세포; 뉴런으로 진행하는 뉴런 전구체; 심장 근육 및 심근세포에 대한 전구체, 글루코스 반응성 인슐린 분비 췌장 베타 세포주를 포함한다. 다른 계열은 상아아세포, 상아질 생성 세포 및 연골세포, 및 하기의 전구체 세포를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다: 망막 색소 상피 세포, 섬유아세포, 피부 세포, 예컨대 각질세포, 수지상 세포, 모공 세포, 신장관 상피 세포, 평활근 및 골격근 세포, 고환 선조, 혈관 내피 세포, 힘줄, 인대, 연골, 지방세포, 섬유아세포, 골수 기질, 심장 근육, 평활근, 골격근, 주피세포, 혈관, 상피, 신경교, 뉴런, 성상교세포 및 희돌기교세포 세포.

[0096] 또 다른 예에서, STRO-1+ 세포는 배양 시 조혈 세포를 생성시킬 수 없다.

[0097] 일례에서, 현재 기재된 줄기 세포는 중간엽 줄기 세포이다. 중간엽 줄기 세포(mesenchymal stem cell: MSC)는 균일한 조성물일 수 있거나, MSC에서 농후화된 혼합 세포 집단일 수 있다. 균일한 중간엽 줄기 세포 조성물은 유착 골수 또는 골막 세포를 배양함으로써 얻어질 수 있고, 중간엽 줄기 세포는 독특한 단일클론 항체에 의해 확인된 특이적 세포 표면 마커에 의해 확인될 수 있다. 중간엽 줄기 세포에서 농후화된 세포 집단을 얻는 방법은 예를 들어 미국 특허 제5,486,359호에 기재되어 있다. 중간엽 줄기 세포에 대안적인 공급원은 혈액, 피부, 제대혈, 근육, 지방, 골 및 연골막을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.

[0098] 상기 기재된 세포 표면 마커를 보유하는 줄기 세포의 인식, 선택 및 정제는 다수의 상이한 방법에 의해 실행될 수 있다. 예를 들어, 관여한 마커에 대한 결합제의 적용, 이어서 높은 수준 결합, 또는 낮은 수준 결합 또는 비결합인, 결합을 나타내는, 이들 세포의 분리.

[0099] 예를 들어, 결합제는 항체, 예컨대 단일클론 항체 또는 항체 기반 분자를 포함할 수 있다.

[0100] 항체 및 다른 결합 분자는 특정한 세포 표면 마커를 발현하는 줄기 세포를 선택하고 정제하기 위해 다양한 기법에서 사용될 수 있다.

[0101] 선택 및 정제를 위한 기법은 항체 코팅된 자기 비드를 이용한 자기 분리, 친화도 크로마토그래피 및 고체 매트릭스에 부착된 항체에 의한 "패닝(panning)", 형광 활성화 세포 분류(FACS)를 포함할 수 있지만, 이들로 제한되

지는 않는다.

[0102] 특정한 마커를 발현하는 본 개시내용의 줄기 세포는 양성 면역선택을 통해 세포 집단으로부터 선택되거나 정제될 수 있다. 예를 들어, 중간엽 전구체 세포는 STRO-1 항체의 세포 표면 발현에 기초하여 세포 집단으로부터 단리되고 농후화될 수 있다(예를 들어, 문헌[Gronthos and Simmons 1995] 참조).

[0103] 본 개시내용에 따른 단리된 줄기 세포를 배양에 의해 시험관내 증식시킬 수 있다. 당해 분야의 당업자에 의해 이해될 것처럼, 줄기 세포를 저온보존하고, 해동하고, 후속적으로 배양에 의해 시험관내 증식시킬 수 있다. 일례에서, 줄기 세포를 성장 배지에서 시딩하고, 밤새 37℃, 20% O_2에서 배양 용기에 부착되게 하였다. 성장 배지를 후속적으로 대체하고, 세포를 37℃, 5% O_2에서 추가로 68 내지 72시간 동안 배양한다.

[0104] 예에서, 단리된 줄기 세포를 혈청 보충 성장 배지에서 50,000개의 세포/㎠로 시딩하고, 밤새 37℃, 20% O_2에서 배양 용기에 부착되게 하였다. 성장 배지를 0.5%의 소 혈청 알부민(BSA)이 보충된 연골원 기본 배지(CBM; Lonza, Walkersville, MD)에 의해 후속적으로 대체하고, 세포를 37℃, 5% O_2에서 추가로 68 내지 72시간 동안 배양한다.

[0105] 1차 줄기 세포 배양의 다양한 다른 방법은 당해 분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 1차 줄기 세포 배양은 문헌[Gronthos and Simmons 1995]에 기재된 방법을 이용하여 수행될 수 있다.

[0106] 배양된 줄기 세포는 생체내 세포에 표현형으로 상이하다. 이것은 예를 들어 CD44를 발현할 수 있다.

[0107] 일 실시형태에서, 배양된 줄기 세포는 생체내 세포에 생물학적으로 상이하여서, 더 높은 비율의 재생을 가진다.

[0108] 배양된 줄기 세포는 대상체에게 투여 후 저온보존될 수 있다. 예를 들어, 중간엽 계열 전구체 세포는 대상체에게 투여 후 저온보존될 수 있다.

[0109] 유전적으로 비변형된 세포

[0110] 본 명세서에 사용되는 바대로, 용어 "유전적으로 비변형된"은 Ang1을 발현하거나 코딩하는 핵산에 의한 형질감염에 의해 변형되지 않은 세포를 의미한다. 의심을 피하기 위해, 본 개시내용의 맥락에서, Ang1을 코딩하는 핵산에 의해 형질감염된 줄기 세포는 유전적으로 변형되는 것으로 생각될 것이다. 본 개시내용의 맥락에서, "유전적으로 비변형된" 세포는 Ang1을 코딩하는 핵산에 의한 형질감염 없이 약간의 정도로 Ang1을 천연으로 발현한다.

[0111] Ang1 및/또는 VEGF의 발현

[0112] 본 개시내용의 줄기 세포는 유전적으로 비변형되고 적어도 0.1㎍/10^6개의 세포의 양으로 Ang1을 발현한다. 그러나, 다양한 실시형태에서, 본 개시내용의 줄기 세포가 적어도 0.2㎍/10^6개의 세포, 0.3㎍/10^6개의 세포, 0.4㎍/10^6개의 세포, 0.5㎍/10^6개의 세포, 0.6㎍/10^6개의 세포, 0.7㎍/10^6개의 세포, 0.8㎍/10^6개의 세포, 0.9㎍/10^6개의 세포, 1㎍/10^6개의 세포, 1.1㎍/10^6개의 세포, 1.2㎍/10^6개의 세포, 1.3㎍/10^6개의 세포, 1.4㎍/10^6개의 세포, 1.5㎍/10^6개의 세포의 양으로 Ang1을 발현할 수 있는 것으로 고안된다.

[0113] 또 다른 양태에서, 본 개시내용의 유전적으로 비변형된 줄기 세포는 약 0.05㎍/10^6개 미만의 세포의 양으로 VEGF를 발현한다. 그러나, 다양한 실시형태에서, 본 개시내용의 줄기 세포는 약 0.05㎍/10^6개 미만의 세포, 0.04㎍/10^6개의 세포, 0.03㎍/10^6개의 세포, 0.02㎍/10^6개의 세포, 0.01㎍/10^6개의 세포, 0.009㎍/10^6개의 세포, 0.008㎍/10^6개의 세포, 0.007㎍/10^6개의 세포, 0.006㎍/10^6개의 세포, 0.005㎍/10^6개의 세포, 0.004㎍/10^6개의 세포, 0.003㎍/10^6개의 세포, 0.002㎍/10^6개의 세포, 0.001㎍/10^6개의 세포의 양으로 VEGF를 발현할 수 있는 것으로 고안된다.

[0114] 조성물 또는 줄기 세포의 배양물에서 발현되는 세포 Ang1 및/또는 VEGF의 양은 당해 분야의 당업자에게 공지된 방법에 의해 결정될 수 있다. 이러한 방법은 정량적 검정, 예를 들어 정량적 ELISA 검정 등을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 그러나, 본 개시내용의 범위가 본 개시내용의 줄기 세포에서 발현된 Ang1 또는 VEGF의 양 또는 수준을 결정하기 위한 임의의 특정한 방법으로 제한되지 않는 것으로 이해되어야 한다.

[0115] 일례에서, 조성물 또는 줄기 세포의 배양에서 발현되는 Ang1 또는 VEGF의 수준은 ELISA 검정에 의해 결정된다. 이러한 검정에서, 줄기 세포의 배양물로부터의 세포 용해물을 ELISA 플레이트의 웰에 첨가한다. 웰을 Ang1 또는 VEGF에 대해, 단일클론 또는 다중클론 항체(들)인, 1차 항체에 의해 코팅할 수 있다. 이후, 웰을 세척하고, 이후 1차 항체에 대해, 단일클론 또는 다중클론 항체(들)인, 2차 항체와 접촉시킨다. 2차 항체를 예를 들어 적절한 효소, 예컨대 겨자무 과산화효소에 접합한다. 이후, 웰을 항온처리할 수 있고, 이후 항온처리 기간 후 세척한다. 이후, 웰을 하나 이상의 발색체와 같은 2차 항체에 접합된 효소에 대한 적절한 기질과 접촉시킨다. 사용될 수 있는 발색체는 과산화수소 및 테트라메틸벤지딘을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 기질(들)을 첨가한 후, 웰을 적절한 기간 동안 항온처리한다. 항온처리의 완료 시, "중지" 용액을 웰에 첨가하여 효소와 기질(들)과의 반응을 중지시킨다. 이후, 샘플의 광학 밀도(OD)를 측정한다. 샘플의 광학 밀도를 공지된 양의 Ang1 또는 VEGF를 함유하는 샘플의 광학 밀도와 상관시켜서 시험되는 줄기 세포의 배양에 의해 발현된 Ang1 또는 VEGF의 양을 결정한다.

[0116] 또 다른 양태에서, 본 개시내용의 유전적으로 비변형된 줄기 세포는 적어도 약 2:1의 비율로 Ang1:VEGF를 발현한다. 그러나, 다양한 실시형태에서, 본 개시내용의 줄기 세포가 적어도 약 10:1, 15:1, 20:1, 21:1, 22:1, 23:1, 24:1, 25:1, 26:1, 27:1, 28:1, 29:1, 30:1, 31:1, 32:1, 33:1, 34:1, 35:1, 50:1의 비유로 Ang1:VEGF를 발현할 수 있는 것으로 고안된다.

[0117] Ang1:VEGF 발현 비율을 결정하는 방법은 당해 분야의 당업자에게 명확할 것이다. Ang1 및 VEGF 발현의 비율을 결정하기 위한 방법의 예에서, Ang1 및 VEGF 발현 수준은 상기 기재된 바대로 정량적 ELISA를 통해 정량화된다. 이러한 예에서, Ang1 및 VEGF의 수준을 정량화한 후, Ang1 및 VEGF의 정량화된 수준에 기초한 비율은 (Ang1의 수준/VEGF의 수준) = Ang1:VEGF 비율로서 표시될 수 있다.

[0118] 세포 조성물

[0119] 본 개시내용의 일례에서, 줄기 세포는 조성물의 형태로 투여된다. 일례에서, 이러한 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 포함한다.

[0120] 용어 "담체" 및 "부형제"는 활성 화합물의 저장, 투여 및/또는 생물학적 활성을 수월하게 하도록 당해 분야에서 관습적으로 사용되는 물질의 조성물을 의미한다(예를 들어, 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Ed., Mac Publishing Company (1980)] 참조). 담체는 활성 화합물의 임의의 원치않는 부작용을 또한 감소시킬 수 있다. 적합한 담체는 예를 들어 안정하고, 예를 들어 담체에서의 다른 성분과 반응할 수 없다. 일례에서, 담체는 치료에 사용되는 투약량 및 농도에서 수혜자에서 상당한 국소 또는 전신 부작용을 생성하지 않는다.

[0121] 본 개시내용에 적합한 담체는 관습적으로 사용되는 것을 포함하고, 예를 들어 식염수, 수성 덱스트로스, 락토스, 링거액, 완충 용액, 히알우로난 및 글리콜은 특히 (등장성일 때) 용액에 대한 예시적인 액체 담체이다. 적합한 약제학적 담체 및 부형제는 전분, 셀룰로스, 글루코스, 락토스, 수크로스, 젤라틴, 옥수수, 쌀, 밀가루, 백악, 실리카 겔, 스테아르산마그네슘, 스테아르산나트륨, 글리세롤 모노스테아레이트, 염화나트륨, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 물, 에탄올 등을 포함한다.

[0122] 또 다른 예에서, 담체는 예를 들어 세포가 성장하거나 현탁되는 배지 조성물이다. 예를 들어, 이러한 배지 조성물은 투여되는 대상체에서 어떠한 부작용도 유도하지 않는다.

[0123] 예시적인 담체 및 부형제는 세포의 생존능력 및/또는 대사 증후군 및/또는 비만을 감소시키거나 예방하거나 지연시키는 세포의 능력에 불리하게 영향을 미치지 않는다.

[0124] 일례에서, 담체 또는 부형제는 적합한 pH에서 세포 및/또는 가용성 인자를 유지시켜서 생물학적 활성을 발휘하는 완충 활성을 제공하고, 예를 들어 담체 또는 부형제는 인산 염 완충 식염수(phosphate buffered saline: PBS)이다. PBS는 세포 및 인자와 최소로 상호작용하고 세포 및 인자의 신속한 방출을 허용하므로 매력적인 담체 또는 부형제를 나타내고, 이러한 경우에, 본 개시내용의 조성물은 예를 들어 주사에 의해 혈류로 또는 조직 또는 조직을 둘러싸거나 이에 인접한 구역으로 직접 적용하기 위한 액체로서 생성될 수 있다.

[0125] 줄기 세포 및/또는 이의 자손 세포는 또한 수혜자에게 적합하고 수혜자에게 해롭지 않은 생성물로 분해되는 스캐폴드 내에 혼입되거나 포함될 수 있다. 이 스캐폴드는 수혜자 대상체로 이식되는 세포에 대한 지지 및 보호를 제공한다. 천연 및/또는 합성 생분해성 스캐폴드는 이러한 스캐폴드의 예이다.

[0126] 다양한 상이한 스캐폴드는 본 개시내용의 실행에서 성공적으로 사용될 수 있다. 예시적인 스캐폴드는 생물학적, 분해성 스캐폴드를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 천연 생분해성 스캐폴드는 콜라겐, 피브로넥틴 및

라미닌 스캐폴드를 포함한다. 세포 이식 스캐폴드에 적합한 합성 물질은 광범위한 세포 성장 및 세포 기능을 지지할 수 있어야 한다. 이러한 스캐폴드는 또한 재흡수성일 수 있다. 적합한 스캐폴드는 예를 들어 문헌[Vacanti, et al. J. Ped. Surg. 23:3-9 1988; Cima, et al. Biotechnol. Bioeng. 38:145 1991; Vacanti, et al. Plast. Reconstr. Surg. 88:753-9 1991]에 기재된 바와 같은 폴리글리콜산 스캐폴드; 또는 합성 중합체, 예컨대 폴리언하이드라이드, 폴리오르토에스테르 및 폴리락트산을 포함한다.

[0127] 또 다른 예에서, 세포는 겔 스캐폴드(예컨대, 업죤 컴퍼니(Upjohn Company)사의 Gelfoam)에서 투여될 수 있다.

[0128] 본 명세서에 기재된 세포 조성물은 단독으로 또는 다른 세포와의 혼합물로서 투여될 수 있다. 상이한 유형의 세포는 투여 바로 직전에 본 개시내용의 조성물과 혼합될 수 있거나, 이것은 투여에 대한 시간의 기간에 걸쳐 함께 동시배양될 수 있다.

[0130] *일례에서, 조성물은 세포의 유효량 또는 치료학적 또는 예방학적 유효량을 포함한다. 예를 들어, 조성물은 약 $1x10^5$개의 상승한 Ang1 수준을 가지는 줄기 세포 내지 약 $1x10^7$개의 상승한 Ang1 수준을 가지는 줄기 세포 또는 약 $1x10^6$개의 줄기 세포 내지 약 $5x10^6$개의 줄기 세포/kg를 포함한다. 투여되는 세포의 정확한 양은 대상체의 연령, 체중 및 성별, 및 치료되는 장애의 정도 및 중등도를 포함하는 다양한 인자에 따라 달라진다.

[0131] 일례에서, 세포의 낮은 용량은 대상체에게 투여된다. 예시적인 투약량은 kg당 약 0.1×10^4 내지 약 0.5×10^6개의 세포, 예를 들어 kg당 약 0.1×10^5 내지 약 0.5×10^6개의 세포, 예컨대 kg당 약 0.5×10^5 내지 약 0.5×10^6개의 세포, 예를 들어 kg당 약 0.1×10^6 내지 약 0.5×10^6개의 세포, 예를 들어 kg당 약 0.2×10^6 또는 0.3×10^6 또는 0.4×10^6개의 세포를 포함한다.

[0132] 일례에서, 세포의 높은 용량은 대상체에게 투여된다. 예시적인 투약량은 적어도 약 1.5×10^6개의 세포/kg를 포함한다. 예를 들어, 높은 용량은 약 1.5×10^6 내지 약 6×10^6개의 세포/kg, 예컨대 약 1.5×10^6 내지 약 5×10^6개의 세포/kg, 예를 들어 약 1.5×10^6 내지 약 4×10^6개의 세포/kg, 예를 들어 약 1.5×10^6 내지 약 3×10^6개의 세포/kg를 포함한다. 예를 들어, 높은 용량은 약 1.5×10^6 또는 약 2×10^6개의 세포/kg를 포함한다.

[0133] 다른 예시적인 용량은 적어도 약 1×10^6개의 세포를 포함한다. 예를 들어, 용량은 약 1.0×10^6 내지 약 $1x10^{10}$개의 세포, 예를 들어 약 1.1×10^6 내지 약 $1x10^9$개의 세포, 예를 들어 약 1.2×10^6 내지 약 1×10^8개의 세포, 예를 들어 약 1.3×10^6 내지 약 1×10^7개의 세포, 예를 들어 약 1.4×10^6 내지 약 9×10^6개의 세포, 예를 들어 약 1.5×10^6 내지 약 8×10^6개의 세포, 예를 들어 약 1.6×10^6 내지 약 7×10^6개의 세포, 예를 들어 약 1.7×10^6 내지 약 6×10^6개의 세포, 예를 들어 약 1.8×10^6 내지 약 5×10^6개의 세포, 예를 들어 약 1.9×10^6 내지 약 4×10^6개의 세포, 예를 들어 약 2×10^6 내지 약 3×10^6개의 세포를 포함할 수 있다.

[0134] 일례에서, 용량은 약 5×10^5 내지 $2 x10^7$개의 세포, 예를 들어 약 6×10^6개의 세포 내지 약 1.8×10^7개의 세포를 포함한다. 용량은 예를 들어 약 6×10^6개의 세포 또는 약 1.8×10^7개의 세포일 수 있다.

[0135] 중간엽 계열 전구체 또는 줄기 세포는 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%의 조성물의 세포 집단을 포함한다.

[0136] 몇몇 예에서, 세포는, 세포가 대상체의 순환으로 배출되는 것을 허용하지 않지만, 세포에 의해 분비된 인자가 순환으로 진입하는 것을 허용하는 챔버 내에 함유된다. 이러한 방식으로, 가용성 인자는 대상체의 순환으로 세포가 인자를 분비하도록 허용함으로써 대상체에게 투여될 수 있다. 이러한 챔버는 예를 들어 심장에서 또는 심장 근처에서 이식된 가용성 인자의 국소 수준을 증가시키기 위해 대상체에서의 부위에 동등하게 이식될 수 있다.

[0137] 본 개시내용의 줄기 세포는 동물에서 질환 또는 장애를 치료하기에 효과적인 양으로 동물에게 투여된다. 동물은 포유류일 있고, 포유류는 인간 및 비인간 원시류를 포함하는 원시류일 수 있다. 줄기 세포는 전신으로, 예를 들

어 정맥내, 동맥내 또는 복강내 투여 등으로 투여될 수 있다. 투여되는 줄기 세포의 정확한 투약량은 환자의 연령, 체중 및 성별, 치료되는 질환(들) 또는 장애(들), 및 이의 정도 및 중증도(이들로 제한되지는 않음)를 포함하는 다양한 인자에 따라 달라진다.

[0138] 본 개시내용의 줄기 세포를 포함하는 조성물은 저온보존될 수 있다. 줄기 세포의 저온보존은 당해 분야에 공지된 저속 냉각 방법 또는 '빠른' 동결 프로토콜을 이용하여 수행될 수 있다. 바람직하게는, 저온보존의 방법은 비동결 세포와 비교하여 유사한 표현형, 세포 표면 마커 및 저온보존된 세포의 성장 속도를 유지시킨다.

[0139] 저온보존된 조성물은 저온보존 용액을 포함할 수 있다. 저온보존 용액의 pH는 통상적으로 6.5 내지 8, 바람직하게는 7.4이다.

[0140] 저온보존 용액은 무균, 비발열원 등장성 용액, 예를 들어 플라스말라이트 A(PlasmaLyte A)(등록상표) 등을 포함할 수 있다. 100㎖의 플라스말라이트 A(등록상표)는 526mg의 염화나트륨, USP(NaCl); 502mg의 글루콘산나트륨($C_6H_{11}NaO_7$); 368mg의 아세트산나트륨 3수화물, USP($C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$); 37mg의 염화칼륨, USP(KCl); 및 30mg의 염화마그네슘, USP($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)을 포함한다. 이것은 항균제를 함유하지 않는다. pH는 수산화나트륨에 의해 조정된다. pH는 7.4(6.5 내지 8.0)이다.

[0141] 동결을 수월하게 하기 위해, 저온보호제, 예를 들어 다이메틸설폭사이드(DMSO) 등을 보통 저온보존 용액에 첨가한다. 이상적으로는, 저온보호제는 세포 및 환자에게 비독성이고, 비항원성이고, 화학적으로 불활성이고, 해동 후 높은 생존율을 제공하고, 세척 없이 이식을 허용해야 한다. 그러나, 대부분의 흔히 사용되는 저온보호제인 DMSO는 약간의 세포독성을 나타낸다. 하이드록실에틸 전분(HES)은 치환물로서 또는 DMSO와 조합되어 사용되어 저온보존 용액의 세포독성을 감소시킬 수 있다.

[0142] 저온보존 용액은 DMSO, 하이드록시에틸 전분, 인간 혈청 성분 및 다른 단백질 벌크화제 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 일례에서, 저온보존된 용액은 약 5%의 인간 혈청 알부민(HSA) 및 약 10%의 DMSO를 포함한다. 저온보존 용액은 메틸셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈(PVP) 및 트레할로스 중 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다.

[0143] 저온보존된 조성물을 해동하고 대상체에게 직접적으로 투여할 수 있다. 대안적으로, 저온보존된 조성물을 해동하고, 중간엽 계열 전구체 또는 줄기 세포는 투여 전에 교대 용액 중에 재현탁시킬 수 있다.

[0144] 세포 배양 방법

[0145] 본 개시내용의 조성물은 다양한 세포 배양 방법을 통해 생성될 수 있다.

[0146] 따라서, 본 개시내용은 줄기 세포에서 Ang1 발현을 유도하기 위한 시험관내 방법을 또한 제공한다. 놀랍게도, 본 발명자들은 Ang1 발현이 줄기 세포에서 유도되는 세포 배양 배지 조건을 확인하였다. 이 조건은 VEGF 발현을 감소시키고 증가한 ANG1:VEGF 비율을 유도하는 것으로 또한 밝혀졌다.

[0147] 예를 들어, 이 조건은 세포 배양 배지에서 줄기 세포의 집단을 배양하는 단계를 포함하고, 세포 배양 배지는

[0148] i) 속효성 L-아스코르브산 유도체를 함유하지만, 실질적인 양의 지효성 L-아스코르브산 유도체를 포함하지 않고/않거나;

[0149] ii) 10%(v/v) 미만의 소 태아 혈청을 함유한다.

[0150] 또 다른 예에서, 이 조건은 세포 배양 배지에서 줄기 세포의 집단을 배양하는 것을 포함하고, 세포 배양 배지는

[0151] i) 속효성 L-아스코르브산 유도체를 함유하지만, 실질적인 양의 지효성 L-아스코르브산 유도체를 포함하지 않고/않거나;

[0152] ii) 10%(v/v) 미만의 소 태아 혈청을 함유하고/하거나;

[0153] iii) 비태아 혈청을 함유한다.

[0154] 따라서, 일 실시형태에서, 본 개시내용은 줄기 세포에서 Ang1 발현을 유도하기 위한 시험관내 방법에 관한 것이고, 상기 방법은 세포 배양 배지에서 줄기 세포의 집단을 배양하는 단계를 포함하고, 세포 배양 배지는 속효성 L-아스코르브산 유도체를 함유하지만, 실질적인 양의 지효성 L-아스코르브산 유도체를 함유하지 않고/않거나, 10%(v/v) 미만의 소 태아 혈청이 보충된다.

[0155] 또 다른 실시형태에서, 본 개시내용은 줄기 세포에서 Ang1 발현을 유도하기 위한 시험관내 방법에 관한 것이고,

상기 방법은 세포 배양 배지에서 줄기 세포의 집단을 배양하는 단계를 포함하고, 세포 배양 배지는 속효성 L-아스코르브산 유도체를 함유하지만, 실질적인 양의 지효성 L-아스코르브산 유도체를 함유하지 않고/않거나, 비태아 혈청이 보충된다.

[0156] 또 다른 실시형태에서, 본 개시내용은 줄기 세포에서 Ang1 발현을 유도하기 위한 시험관내 방법에 관한 것이고, 상기 방법은 세포 배양 배지에서 줄기 세포의 집단을 배양하는 단계를 포함하고, 세포 배양 배지는 세포의 성장을 지지하기에 충분한 양으로 인간 성인 혈청(예를 들어, 인간 AB 혈청)의 형태의 비태아 혈청 및 인간 혈소판 세포 용해물을 함유한다.

[0157] 용어 "배지" 또는 "배지들"은, 세포 배양의 언급에서 사용되는 바대로, 세포를 둘러싸는 환경의 성분을 포함한다. 배지가 Ang1 발현의 발현을 유도하기에 충분한 조건에 기여하고/하거나 이를 제공하는 것으로 고안된다. 배지는 고체, 액체, 가스 또는 상 및 물질의 혼합물일 수 있다. 배지는 액체 성장 배지, 및 세포 성장을 지속시키지 않는 액체 배지를 함유할 수 있다. 배지는 또한 젤라틴성 배지 예컨대 한천, 아가로스, 젤라틴 및 콜라겐 매트릭스를 포함한다. 예시적인 가스 배지는 페트리 접시에서 성장하는 세포 또는 다른 고체 또는 반고체 지지체가 노출되는 가스 상을 포함한다. 용어 "배지"는 또한 이것이 세포와 아직 접촉하지 않더라도 세포 배양에서 사용되도록 의도되는 물질을 의미한다.

[0158] 본 개시내용의 방법에서 사용된 배양 배지는 기준 배양 배지로서 줄기 세포의 배양에 사용된 배양 배지를 사용함으로써 제조될 수 있다. 기준 배양 배지는 예를 들어 이글 최소 필수(Eagle minimal essential: MEM) 배양 배지, 알파 변형된 MEM 배양 배지, 및 이들의 혼합 배양 배지를 포함하고, 이것이 줄기 세포의 배양에 사용될 수 있는 한 특별히 제한되지 않는다.

[0159] 추가로, 본 개시내용의 배양 배지는 임의의 성분, 예컨대 지방산 또는 지질, 비타민, 성장 인자, 사이토카인, 항산화제, 완충제, 무기염 등을 함유할 수 있다.

[0160] 본 개시내용에서 사용되는 세포 배양 배지는 모든 필수 아미노산을 함유하고, 비필수 아미노산을 또한 함유할 수 있다. 일반적으로, 아미노산은 필수 아미노산(Thr, Met, Val, Leu, Ile, Phe, Trp, Lys, His) 및 비필수 아미노산(Gly, Ala, Ser, Cys, Gln, Asn, Asp, Tyr, Arg, Pro)으로 분류된다.

[0161] 아스코르브산

[0162] 아스코르브산은 배양에서 다양한 종류의 세포의 성장 및 분화를 위한 필수 보충제이다. 특정한 아스코르브산 유도체는 특히 중성 pH 및 37℃의 일반 세포 배양 조건 하에 용액 중에 안정하지 않으므로 "속효성"인 것으로 이제 이해된다. 이 속효성 유도체는 옥살산 또는 트레온산으로 신속히 산화된다. 37℃에서의 배양 배지(pH 7)에서, 산화는 이 속효성 아스코르브산 유도체의 수준을 24시간에 대략 80 - 90%로 감소시킨다. 따라서, 속효성 아스코르브산 유도체는 다양한 세포 유형의 관습적인 세포 배양에서 더 안정한 "지효성" 아스코르브산 유도체로 대체된다.

[0163] 본 개시내용의 맥락에서, 용어 "속효성"은 중성 pH 및 37℃의 배양 조건 하에 세포 배양의 24시간 후 대략 80 - 90%로 산화되는 아스코르브산 유도체를 포함한다. 일례에서, 속효성 L-아스코르브산 유도체는 L-아스코르브산 염이다. 예를 들어, 본 개시내용의 맥락에서, L-아스코르브산 나트륨염은 "속효성" 아스코르브산 유도체이다.

[0164] 반대로, 용어 "지효성"은 중성 pH 및 37℃의 배양 조건 하에 세포 배양의 24시간 후 대략 80 - 90%로 산화되지 않는 아스코르브산 유도체를 포함한다. 일례에서, 본 개시내용의 맥락에서, L-아스코르브산-2-포스페이트는 "지효성" 아스코르브산 유도체이다. 지효성 아스코르브산 유도체의 다른 예는 테트라헥실데실 아스코르베이트 마그네슘 아스코르빌 포스페이트 및 2-O-α-D-글루코피라노실-L-아스코르브산을 포함한다.

[0165] 본 발명자들은 속효성 유도체에 의한 지효성 아스코르브산 유도체의 대체가 줄기 세포에서 Ang1 발현을 유도할 수 있다는 것을 놀랍게도 밝혀냈다. 따라서, 본 개시내용의 일 실시형태에서, 세포 배양 배지는 속효성 아스코르브산 유도체가 보충된다. 예를 들어, 세포 배양 배지는 적어도 약 0.005g/ℓ의 속효성 아스코르브산 유도체를 함유할 수 있다. 또 다른 예에서, 세포 배양 배지는 적어도 약 0.01g/ℓ의 속효성 아스코르브산 유도체를 함유할 수 있다. 예를 들어, 세포 배양 배지는 적어도 약 0.02g/ℓ의 속효성 아스코르브산 유도체를 함유할 수 있다. 또 다른 예에서, 세포 배양 배지는 적어도 약 0.03g/ℓ의 속효성 아스코르브산 유도체를 함유할 수 있다. 예를 들어, 세포 배양 배지는 적어도 약 0.04g/ℓ의 속효성 아스코르브산 유도체를 함유할 수 있다. 또 다른 예에서, 세포 배양 배지는 적어도 약 0.05g/ℓ의 속효성 아스코르브산 유도체를 함유할 수 있다. 또 다른 예에서, 세포 배양 배지는 적어도 약 0.06g/ℓ의 속효성 아스코르브산 유도체를 함유할 수 있다. 이 실시형태의 일례에

서, 세포 배양 배지는 L-아스코르베이트의 나트륨염이 보충된다.

[0166] 또 다른 예에서, 세포 배양 배지는 속효성 아스코르브산 유도체를 함유하지만, 실질적인 양의 지효성 아스코르브산 유도체를 함유하지 않는다. 예를 들어, 세포 배양 배지는 속효성 아스코르브산 유도체를 함유할 수 있지만, 0.04g/ℓ 초과의 지효성 아스코르브산 유도체가 아니다. 또 다른 예에서, 세포 배양 배지는 속효성 아스코르브산 유도체를 함유할 수 있지만, 0.03g/ℓ 초과의 지효성 아스코르브산 유도체가 아니다. 또 다른 예에서, 세포 배양 배지는 속효성 아스코르브산 유도체를 함유할 수 있지만, 0.02g/ℓ 초과의 지효성 아스코르브산 유도체가 아니다. 또 다른 예에서, 세포 배양 배지는 속효성 아스코르브산 유도체를 함유할 수 있지만, 0.01g/ℓ 초과의 지효성 아스코르브산 유도체가 아니다. 또 다른 예에서, 세포 배양 배지는 속효성 아스코르브산 유도체를 함유할 수 있지만, 0.005g/ℓ 초과의 지효성 아스코르브산 유도체가 아니다. 또 다른 예에서, 세포 배양 배지는 속효성 아스코르브산 유도체를 함유할 수 있지만, 지효성 아스코르브산 유도체가 아니다.

[0167] 또 다른 예에서, 세포 배양 배지는 L-아스코르베이트 나트륨염을 함유하지만, 실질적인 양의 L-아스코르브산-2-포스페이트를 함유하지 않는다.

[0168] 혈청

[0169] 본 개시내용의 배양 방법에서 사용된 배양 배지는 혈청 함유 배양 배지 또는 무혈청 배양 배지일 수 있다.

[0170] 본 개시내용의 배양 배지는 혈청 대체물을 함유하거나 함유하지 않을 수 있다. 혈청 대체물은 예를 들어 알부민(예를 들어, 지질 농후 알부민), 트랜스페린, 지방산, 인슐린, 콜라겐 전구체, 미량 원소, 2-머캅토에탄올 또는 3'-티올 글리세롤, 또는 혈청 등가물을 적절하게 함유하는 것일 수 있다. 이러한 혈청 대체물은 예를 들어 국제 공보 WO 93/30679에 기재된 방법에 의해 제조될 수 있고, 상업적으로 이용 가능한 생성물을 또한 사용할 수 있다.

[0171] 관습적으로, 줄기 세포는 적어도 약 10 - 15%(v/v)의 혈청, 일반적으로 소 태아 혈청(FCS)이 보충된 배지를 사용하여 세포 배양에서 유지된다. 그러나, 본 발명자들은 10%(v/v) 미만의 FCS가 보충된 세포 배양 배지에서 줄기 세포의 집단을 배양하는 것이 Ang1 발현을 또한 유도할 수 있다는 것을 발견하였다. 일 실시형태에서, 줄기 세포의 집단은 적어도 약 9%(v/v), 적어도 약 8%(v/v), 적어도 약 7%(v/v), 적어도 약 6%(v/v), 적어도 약 5%(v/v), 적어도 약 4%(v/v), 적어도 약 3%(v/v), 적어도 약 2%(v/v), 적어도 약 1%(v/v)의 FCS가 보충된 세포 배양 배지에서 배양된다. 용어 소 태아 혈청(FCS) 및 소 태아 혈청(FBS)이 본 개시내용의 맥락에서 상호교환적으로 사용될 수 있는 것으로 또한 고안된다.

[0172] 일 실시형태에서, 세포 배양 배지는 비태아 혈청이 보충된다. 배양 배지가 적어도 약 1%(v/v), 적어도 약 2%(v/v), 적어도 약 3%(v/v), 적어도 약 4%(v/v), 적어도 약 5%(v/v), 적어도 약 6%(v/v), 적어도 약 7%(v/v), 적어도 약 8%(v/v), 적어도 약 9%, 적어도 약 10%, 적어도 약 11%, 적어도 약 12%, 적어도 약 13%, 적어도 약 14%, 적어도 약 15%, 적어도 약 16%, 적어도 약 17%, 적어도 약 18%, 적어도 약 19%, 적어도 약 20%, 적어도 약 21%, 적어도 약 22%, 적어도 약 23%, 적어도 약 24%, 적어도 약 25%(v/v)의 비태아 혈청이 보충될 수 있는 것으로 고안된다.

[0173] 예를 들어, 배양 배지는 포유류 비태아 혈청이 보충될 수 있다.

[0174] 예를 들어, 배양 배지는 인간 비태아 혈청이 보충될 수 있다.

[0175] 예를 들어, 배양 배지는 신생아 혈청이 보충될 수 있다. 배양 배지가 적어도 약 1%(v/v), 적어도 약 2%(v/v), 적어도 약 3%(v/v), 적어도 약 4%(v/v), 적어도 약 5%(v/v), 적어도 약 6%(v/v), 적어도 약 7%(v/v), 적어도 약 8%(v/v), 적어도 약 9%, 적어도 약 10%, 적어도 약 11%, 적어도 약 12%, 적어도 약 13%, 적어도 약 14%, 적어도 약 15%, 적어도 약 16%, 적어도 약 17%, 적어도 약 18%, 적어도 약 19%, 적어도 약 20%, 적어도 약 21%, 적어도 약 22%, 적어도 약 23%, 적어도 약 24%, 적어도 약 25%(v/v)의 신생아 혈청이 보충될 수 있는 것으로 고안된다.

[0176] 일 실시형태에서, 세포 배양 배지는 포유류 신생아 혈청이 보충된다.

[0177] 예를 들어, 배양 배지는 신생 소 혈청(NBCS)이 보충될 수 있다. 배양 배지가 적어도 약 1%(v/v), 적어도 약 2%(v/v), 적어도 약 3%(v/v), 적어도 약 4%(v/v), 적어도 약 5%(v/v), 적어도 약 6%(v/v), 적어도 약 7%(v/v), 적어도 약 8%(v/v), 적어도 약 9%, 적어도 약 10%, 적어도 약 11%, 적어도 약 12%, 적어도 약 13%, 적어도 약 14%, 적어도 약 15%, 적어도 약 16%, 적어도 약 17%, 적어도 약 18%, 적어도 약 19%, 적어도 약 20%, 적어도 약 21%, 적어도 약 22%, 적어도 약 23%, 적어도 약 24%, 적어도 약 25%(v/v)의 NBCS가 보충될 수 있는 것으로

고안된다.

[0178] 일 실시형태에서, 세포 배양 배지는 인간 신생아 혈청이 보충된다.

[0179] 예를 들어, 세포 배양 배지는 적어도 약 1%(v/v), 적어도 약 2%(v/v), 적어도 약 3%(v/v), 적어도 약 4%(v/v), 적어도 약 5%(v/v), 적어도 약 6%(v/v), 적어도 약 7%(v/v), 적어도 약 8%(v/v), 적어도 약 9%(v/v)의 인간 신생아 혈청이 보충될 수 있다. 예를 들어, 인간 신생아 혈청은 제대혈 "제대혈"로부터 얻어진다.

[0180] 일 실시형태에서, 배양 배지는 성인 혈청이 보충된다. 배양 배지는 적어도 약 1%(v/v), 적어도 약 2%(v/v), 적어도 약 3%(v/v), 적어도 약 4%(v/v), 적어도 약 5%(v/v), 적어도 약 6%(v/v), 적어도 약 7%(v/v), 적어도 약 8%(v/v), 적어도 약 9%, 적어도 약 10%, 적어도 약 11%, 적어도 약 12%, 적어도 약 13%, 적어도 약 14%, 적어도 약 15%, 적어도 약 16%, 적어도 약 17%, 적어도 약 18%, 적어도 약 19%, 적어도 약 20%, 적어도 약 21%, 적어도 약 22%, 적어도 약 23%, 적어도 약 24%, 적어도 약 25%(v/v)의 성인 혈청이 보충될 수 있는 것으로 고안된다.

[0181] 일 실시형태에서, 세포 배양 배지는 포유류 성인 혈청이 보충된다.

[0182] 예를 들어, 세포 배양 배지는 적어도 약 1%(v/v), 적어도 약 2%(v/v), 적어도 약 3%(v/v), 적어도 약 4%(v/v), 적어도 약 5%(v/v), 적어도 약 6%(v/v), 적어도 약 7%(v/v), 적어도 약 8%(v/v), 적어도 약 9%, 적어도 약 10%, 적어도 약 11%, 적어도 약 12%, 적어도 약 13%, 적어도 약 14%, 적어도 약 15%, 적어도 약 16%, 적어도 약 17%, 적어도 약 18%, 적어도 약 19%, 적어도 약 20%, 적어도 약 21%, 적어도 약 22%, 적어도 약 23%, 적어도 약 24%, 적어도 약 25%(v/v)의 포유류 성인 혈청이 보충될 수 있다.

[0183] 예를 들어, 세포 배양 배지는 적어도 약 1%(v/v), 적어도 약 2%(v/v), 적어도 약 3%(v/v), 적어도 약 4%(v/v), 적어도 약 5%(v/v), 적어도 약 6%(v/v), 적어도 약 7%(v/v), 적어도 약 8%(v/v), 적어도 약 9%, 적어도 약 10%, 적어도 약 11%, 적어도 약 12%, 적어도 약 13%, 적어도 약 14%, 적어도 약 15%, 적어도 약 16%, 적어도 약 17%, 적어도 약 18%, 적어도 약 19%, 적어도 약 20%, 적어도 약 21%, 적어도 약 22%, 적어도 약 23%, 적어도 약 24%, 적어도 약 25%(v/v)의 성인 소 혈청이 보충될 수 있다.

[0184] 일 실시형태에서, 세포 배양 배지는 인간 성인 혈청이 보충된다.

[0185] 예를 들어, 세포 배양 배지는 적어도 약 1%(v/v), 적어도 약 2%(v/v), 적어도 약 3%(v/v), 적어도 약 4%(v/v), 적어도 약 5%(v/v), 적어도 약 6%(v/v), 적어도 약 7%(v/v), 적어도 약 8%(v/v), 적어도 약 9%(v/v)의 인간 성인 혈청이 보충될 수 있다.

[0186] 예를 들어, 세포 배양 배지는 적어도 약 1%(v/v), 적어도 약 2%(v/v), 적어도 약 3%(v/v), 적어도 약 4%(v/v), 적어도 약 5%(v/v), 적어도 약 6%(v/v), 적어도 약 7%(v/v), 적어도 약 8%(v/v), 적어도 약 9%(v/v)의 인간 AB 혈청이 보충될 수 있다.

[0187] 예에서, 세포 배양 배지는 적어도 약 3%의 인간 AB 혈청이 보충된다.

[0188] 일 실시형태에서, 배양 배지는 FCS와 NBCS의 혼합물이 보충된다.

[0189] 예를 들어, 배양 배지는, FCS:NBCS 비율이 적어도 약 0.4:1, 적어도 약 0.5:1, 적어도 약 0.6:1, 적어도 약 0.7:1, 적어도 약 0.8:1, 적어도 약 0.9:1, 적어도 약 1:1, 적어도 약 1.5:1, 적어도 약 2:1이도록 FCS와 NBCS의 혼합물이 보충될 수 있다.

[0190] 예를 들어, FCS와 NBCS의 혼합물이 적어도 약 1%(v/v), 적어도 약 2%(v/v), 적어도 약 3%(v/v), 적어도 약 4%(v/v), 적어도 약 5%(v/v), 적어도 약 6%(v/v), 적어도 약 7%(v/v), 적어도 약 8%(v/v), 적어도 약 9%, 적어도 약 10%, 적어도 약 11%, 적어도 약 12%, 적어도 약 13%, 적어도 약 14%, 적어도 약 15%, 적어도 약 16%, 적어도 약 17%, 적어도 약 18%, 적어도 약 19%, 적어도 약 20%, 적어도 약 21%, 적어도 약 22%, 적어도 약 23%, 적어도 약 24%, 적어도 약 25%(v/v)의 세포 배양 배지를 포함할 수 있는 것이 고안된다. 그러나, 이 예에서, 세포 배양 배지는 적어도 약 1%(v/v), 적어도 약 2%(v/v), 적어도 약 3%(v/v), 적어도 약 4%(v/v), 적어도 약 5%(v/v), 적어도 약 6%(v/v), 적어도 약 7%(v/v), 적어도 약 8%(v/v), 적어도 약 9%(v/v), 그러나 10%(v/v) 미만의 FCS가 보충된다.

[0191] 일 실시형태에서, 세포 배양 배지는 FCS 혈청 비함유이다.

[0192] 일 실시형태에서, 세포 배양 배지는 태아 혈청 비함유이다.

[0193] 일 실시형태에서, 세포 배양 배지는 비태아 혈청이 보충된다.

[0194] 일 실시형태에서, 배양 배지는 태아 혈청 비함유이고, 비태아 혈청이 보충된다.

[0195] 자극 인자

[0196] 또 다른 실시형태에서, 세포 배양 배지는 1α,25- 다이하이이드록시비타민 D3(1,25D), 혈소판 유래 성장 인자(PDGF) 예컨대 PDGF-BB, 종양 괴사 인자 α(TNF-α), 인터류킨-1β(IL-1β), 기질 유래 인자 1α(SDF-1α) 및 EGF로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 자극 인자가 보충된다.

[0197] 또 다른 실시형태에서, 세포를 세포의 성장을 지지하기에 충분한 양으로 적어도 하나의 사이토카인의 존재 하에 또한 배양할 수 있다.

[0198] 또 다른 실시형태에서, 세포를 세포의 성장을 지지하기에 충분한 양으로 혈소판 세포 용해물의 존재 하에 배양한다. 예를 들어, 세포를 세포의 성장을 지지하기에 충분한 양으로 인간 혈소판 세포 용해물 중에 배양할 수 있다.

[0199] 예에서, 세포를 세포의 성장을 지지하기에 충분한 양으로 인간 AB 혈청 및 인간 혈소판 세포 용해물과 배양한다.

[0200] 세포의 치료학적/예방학적 가능성의 평가

[0202] *장애를 치료하거나 예방하거나 이의 발생 또는 진행을 지연시키기 위한 본 개시내용의 세포의 능력을 결정하는 방법은 당해 분야의 당업자에게 명확할 것이다. 예를 들어, 본 줄기 세포는 Ang1 수준을 증가시키는 이의 능력에 대해 평가될 수 있다.

[0203] 일례에서, 적어도 0.1㎍/10^6개의 세포의 양으로 유전적으로 비변형된 Ang1을 발현하는 줄기 세포를, 심장 조직에서 시험관내 및/또는 생체내 Ang1 수준을 증가시키는 이의 능력에 대해 시험한다. 이 예에서, Ang1 수준은 현재 기재된 줄기 세포의 투여 후 세포 배양 배지 또는 조직에서 평가된다.

[0204] 본 개시내용이 장애의 치료, 예방 또는 지연을 위해 세포를 확인하거나 단리하는 방법을 또한 제공한다는 것이 상기로부터 당업자에게 명확할 것이고, 상기 방법은

[0205] (i) 연관된 장애를 겪는 시험 대상체에게 세포를 투여하고 대상체에서 장애의 증상을 평가하는 단계;

[0206] (ii) (i)에서의 대상체의 장애의 증상을, 세포가 투여되지 않은 장애를 겪는 대조군 대상체의 장애의 증상 또는 활성과 비교하는 단계, 여기서 대조군 대상체와 비교하여 시험 대상체에서의 증상의 개선은 줄기 세포가 장애를 치료한다는 것을 나타낸다. 세포는 임의의 예에 따른 본 명세서에 기재된 임의의 세포일 수 있다.

[0207] 본 개시내용의 광범위한 일반 범위로부터 벗어나지 않으면서 상기 기재된 실시형태에 다양한 변경 및/또는 변형이 이루어질 수 있는 것으로 당해 분야의 당업자에 의해 이해될 것이다. 본 실시형태는 따라서 모든 관점에서 예시적이고 제한이 아닌 것으로 고려되어야 한다.

[0208] **실시예**

[0209] 실시예 1: STRO-3^+ 세포의 선택에 의한 MPC의 면역선택

[0210] 골수(BM)를 건강한 정상 성인 지원자(20-35세)로부터 수확하였다. 간단히 말하면, 40㎖의 BM을 뒤장골능선(posterior iliac crest)으로부터 리튬-헤파린 항응고제 함유 관으로 흡입시켰다.

[0211] BMMNC를 이전에 기재된 바대로(Zannettino et al. 1998) 림포르렙(Lymphoprep)(상표명)(Nycomed Pharma(노르웨이 오슬로))을 사용하여 밀도 구배 분리에 의해 제조하였다. 4℃에서 30분 동안 400 x g에서 원심분리 후, 버피층(buffy layer)을 이동 피펫에 의해 제거하고, 5% 소 태아 혈청(FCS, CSL Limited(호주 빅토리아))을 함유하는 행크 균형 염 용액(HBSS; Life Technologies(메릴랜드주 게이터스부르그))으로 이루어진 "HHF" 중에 3회 세척하였다.

[0212] STRO-3^+(또는 $TNAP^+$) 세포를 후속하여 이전에 기재된 바대로(Gronthos et al. 2003; Gronthos and Simmons 1995) 자기 활성화 세포 분류에 의해 단리하였다. 간단히 말하면, 대략 1-3 x 10^8개의 BMMNC를 20분 동안 얼음에서 HHF 중의 10%(v/v)의 정상 토끼 혈청으로 이루어진 차단 완충제 중에 항온처리하였다. 세포를 1시간 동안 얼음에서 차단 완충제 중의 10㎍/㎖의 STRO-3 mAb의 용액의 200㎕와 항온처리하였다. 세포를 후속하여 400 x g

에서 원심분리에 의해 HHF 중에 2회 세척하였다. HHF 완충제 중의 염소 항마우스 g-비오틴(Southern Biotechnology Associates(영국 버밍엄))의 1/50 희석액을 첨가하고, 세포를 1시간 동안 얼음에서 항온처리하였다. 세포를 상기한 바대로 MACS 완충제(1% BSA, 5mM EDTA 및 0.01% 아지드화나트륨이 보충된 Ca^{2+} - 및 Mn^{2+} - 무 PBS) 중에 2회 세척하고, 0.9㎖의 MACS 완충제의 최종 용적 중에 재현탁시켰다.

[0213] 100㎕의 스트렙타비딘 마이크로비드(Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach(독일))를 세포 현탁액에 첨가하고, 15분 동안 얼음에서 항온처리하였다. 세포 현탁액을 2회 세척하고, 0.5㎖의 MACS 완충제 중에 재현탁시키고, 후속하여 미니 MACS 칼럼(MS Columns, Miltenyi Biotec)에 로딩하고, 0.5㎖의 MACS 완충제에 의해 3회 세척하여 STRO-3 mAb에 결합하지 않는 세포를 검색하였다(수탁 번호 PTA-7282 하에 미국 균주 은행(American Type Culture Collection: ATCC)에 의해 2005년 12월 19일에 기탁 - 국제 특허 WO 2006/108229 참조). 추가의 1㎖의 MACS 완충제의 첨가 후, 칼럼을 자석으로부터 제거하고, $TNAP^{+}$ 세포를 양압에 의해 단리하였다. 각각의 분획으로부터의 세포의 액적을 스트렙타비딘-FITC에 의해 염색하고, 순도를 유세포분석법에 의해 평가할 수 있다.

[0214] 이러한 방식으로 단리된 MPC는 $STRO\text{-}1^{bright}$ MPC이다.

[0215] 실시예 2: 시작 배양 배지 - 과정 A

[0216] 이글 알파 MEM이라 흔히 말해지는 이글 균형 염을 가지는 이글 최소 필수 배지(MEM)의 알파 변형은 비필수 아미노산, 피루브산나트륨, 및 추가적인 비타민을 함유한다. 이 변형은 우선 하이브리드 마우스 및 햄스터 세포를 성장시키는 데 있어서의 사용에 대해 기재되어 있다(Stanners et al. 1971).

[0217] 1차 줄기 세포를 배양하기에 적합한 이글 알파 MEM 배지는 라이프 테크놀로지스(Life Technologies) 및 시그마(Sigma)를 포함하는 다양한 공급원으로부터 얻어질 수 있다.

[0218] 예시된 공정에서 사용된 필요한 성장 인자를 포함하여 1차 줄기 세포 배양을 확립하기 위한 상세한 방법은 문헌 [Gronthos and Simmons 1995]에 기재되어 있다.

[0219] 과정 A에서, 10% 소 태아 혈청, L-아스코르베이트-2-포스페이트(100μM), 덱사메타손(10-7 M) 및/또는 무기 인산 염(3mM)이 보충된 이글 알파 MEM 배지를 줄기 세포를 배양하는 데 사용하였다.

[0220] 실시예 3: 변형된 배양 배지 - 과정 B

[0221] 과정 B에서, 과정 A에서 사용된 이글 알파 MEM 배양 배지를 하기에 의해 변형시켰다(변형된 알파 MEM):

[0222] - 속효성 아스코르브산 유도체 나트륨 L-아스코르베이트(50㎎/ℓ)에 의한 지효성 아스코르브산 유도체 L-아스코르브산-2-포스페이트의 대체;

[0223] - 10%(v/v)로부터 5%(v/v)로의 FCS의 감소;

[0224] - 비태아 혈청(5%(v/v))에 의한 보충.

표 1

과정 A와 과정 B 사이의 차이의 요약

과정 A	과정 B
배지(해동 공급, 계대배양에 이용 가능한 변화)	
알파 MEM 10%(v/v)의 FCS	변형 배지 50mg/ℓ의 나트륨 L-아스코르베이트는 L-아스코르브산-2-포스페이트를 대체한다 5%(v/v)의 FCS 5%(v/v)의 비태아 혈청
저온보존 제제(50% 알파-MEM/42.5%의 ProFreeze/7.5%의 DMSO)	
알파 MEM 10%(v/v)의 FCS	변형된 알파 MEM 50mg/ℓ의 나트륨 L-아스코르베이트는 L-아스코르브산-2-포스페이트를 대체한다 5%(v/v)의 FCS 5%(v/v)의 비태아 혈청

[0225]

[0226] 실시예 4: 세포 배양

[0227] 중간엽 전구체 세포(MPC)를 단일 공여자로부터 얻고, 저온보존 후 저장하였다.

[0228] 일반적인 조건에서, 세포 배양은 하기 단계를 포함한다:

[0229] 저온보존된 MPC를 해동하고, 10,000개의 세포/㎠로 시딩하고, 시작 배양 배지(과정 A; n=3) 또는 변형된 배양 배지(과정 B; n=3) 중에 20% O_2, 37℃에서 90% 포화도(confluence)까지 성장시켰다.

[0230] 조정 배지를 생성하기 위해, 성장 배지를 200㎕의 배지/㎠의 용적에서 FCS가 보충된 EBM-2 기본 배지(Lonza)에 의해 대체하였다. 세포를 배지가 수집된 후 추가적인 3일 동안 배양하고 원심분리하여 임의의 세포를 제거하고, 생성된 상청액을 수집하고 -80℃에서 저장하였다.

[0231] 성장 인자 농도를 상업적으로 이용 가능한 키트(Millipore)를 사용하여 루미넥스(Luminex) 플랫폼을 사용하여 측정하였다.

[0232] 세포 배양 후, MPC 성장 동역학을 평가하였다(도 1 내지 도 3 참조). 세포 성장, MPC 배가 시간 또는 집단 배가 시간의 상당한 변화가 세포 배양 과정 A 및 B 후 관찰되지 않았다.

[0233] MPC를 세포 마커 STRO-1, CC9 및 STRO-4, 및 전혈관형성 성장 인자 Ang1 및 VEGF의 이의 발현 수준의 면에서 또한 규명하였다.

[0234] STRO-1, CC9 및 STRO-4 수준은 세포 배양 과정 A 및 B 후 MPC에서 필적하였다.

[0235] 그러나, 배양 과정 B는

[0236] - Ang1 수준을 증가시키고;

[0237] - VEGF 수준을 감소시키고;

[0238] - 혈관화를 증대시키는 데 있어서 특히 효과적인 것으로 이전에 나타난 Ang1:VEGF 비율과 일치하는 Ang1:VEGF의 비율을 제공한다.

[0239] 과정 A 또는 B에서 배양된 MPC의 조정 배지에서의 Ang1 및 VEGF의 수준(㎍/10^6개의 세포)의 측정이 표 2에 기재되어 있다.

표 2

과정 A 및 B 후 단일 공여자(3 회 복제)로부터 얻은 MPC 의 특징규명.

배양 과정	반복 검증	Ang 1 수준 ug/10^6 세포	평균	VEGF 수준 ug/10^6 세포	평균	Ang1 수준/ VEGF 수준 비율	평균
A	1	0.048	0.045	0.134	0.14	0.358 : 1	0.328 : 1
A	2	0.059		0.172		0.343 : 1	
A	3	0.029		0.102		0.284 : 1	
B	1	0.733	0.72	0.027	0.025	27.1 : 1	29.6 : 1
B	2	0.717		0.020		35.9 : 1	
B	3	0.723		0.028		25.8 : 1	

[0240]

[0241] 실시예 5: 변형된 배양 조건 - 과정 C 및 D

[0242] 속효성 아스코르브산 유도체 나트륨 L-아스코르베이트에 의한 지효성 아스코르브산 유도체 L-아스코르브산-2-포스페이트의 대체를 조절하기 위해, 3개의 상이한 공여자로부터의 MPC를 연속하여 알파-MEM + 10%의 FCS + 50mg/ℓ의 나트륨 L-아스코르베이트(과정 C) 또는 알파-MEM + 3%의 인간 AB 혈청 + 50mg/ℓ의 나트륨 L-아스코르베이트(과정 D) + 성장 인자, 예컨대 PDGF 및 EGF에서 전파시켰다.

[0243] Ang1 및 VEGF 수준을 과정 C 및 D에서의 세포 배양 후 평가하였다. 과정 C 또는 D에서 배양된 MPC의 조정 배지에서의 Ang1 및 VEGF의 수준(㎍/㎖)이 표 3에 기재되어 있다.

[0244] 과정 C와 비교하여, 배양 과정 D는

[0245] - Ang1 수준을 증가시키고;

[0246] - VEGF 수준을 감소시키고;

[0247] - Ang1:VEGF의 비율을 증가시킨다.

[0248] 과정 A와 비교하여, 과정 C 및 D는 Ang1의 발현 수준을 점진적으로 증가시킨다. 이는 속효성 아스코르브산 유도체 및 비태아 혈청의 존재가 각각 독립적으로 Ang1 발현을 증가시키고 Ang1 발현을 증가시키는 데 있어서 함께 상승 효과를 나타낸다는 것을 제시한다.

표 3

과정 C 및 D 후의 3 명의 상이한 공여자로부터의 MPC 의 특징규명.

배양 과정	공여자 샘플	Ang 1 수준 ug/10^6 세포	평균	VEGF 수준 ug/10^6 세포	평균	Ang1 수준/ VEGF 수준 비율	평균
C	1	0.143	0.136	0.430	0.328	0.333:1	0.409 : 1
C	2	0.164		0.266		0.523:1	
C	3	0.102		0.287		0.370:1	
D	1	0.266	0.191	0.164	0.109	1.73:1	2.11 : 1
D	2	0.164		0.061		3.20:1	
D	3	0.143		0.102		1.40:1	

[0249]

[0250] 광범위하게 기재되면서, 본 개시내용의 정신 또는 범위로부터 벗어나지 않으면서, 구체적인 실시형태에 기재된 바대로, 본 개시내용에 다양한 변경 및/또는 변형이 이루어질 수 있는 것으로 당해 분야의 당업자에 의해 이해될 것이다. 본 실시형태는 따라서 모든 관점에서 예시적이고 제한이 아닌 것으로 고려되어야 한다.

[0251] 본원은 2014년 4월 7일에 출원된 AU 2014901247(이의 개시내용은 본 명세서에서 참조문헌으로 포함됨)로부터의 우선권을 주장한다.

[0252] 본 명세서에 기재되고/되거나 언급된 모든 공보는 본 명세서에서 그 전문이 참조문헌으로 포함된다.

[0253] 본 명세서에 포함된 문헌, 법률, 자료, 장치, 논문 등의 임의의 토의는 오직 본 개시내용의 상황을 제공할 목적이다. 임의의 또는 모든 이들 자료가 선행 기술 기본의 일부를 형성하거나, 본원의 각각의 청구항의 우선일 전에 존재하면서 본 개시내용과 관련한 분야에서 보통의 일반 지식인 것으로 취해져서는 안 된다.

[0254] **참고문헌**

1. Bongso et al. 1889, Improved quality of human embryos when co-cultured with human ampullary cells. Human Reprod., 4(6), 706 - 13.

2. Chae et al. 2000, Coadministration of angiopoietin-1 and vascular endothelial growth factor enhances collateral vascularization. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 20, 2573 - 2578.

3. Eisenberg & Bader, 1996, Establishment of the mesodermal cell line QCE-6. A model system for cardiac cell differentiation. Circ Res., 78(2), 205 - 16.

4. Gnecchi et al. 2008, Paracrine mechanisms in adult stem cell signalling and therapy. Circ Res., 103(11), 1204 - 1219.

5. Huang et al. 2011, Transplantation of Sendai Viral Angiopoietin-1-Modified Mesenchymal Stem Cells for Ischemic Heart Disease. Targets in Gene Therapy, Prof. Yongping You (Ed.), ISBN: 978-953-307-540-2, InTech, DOI: 10.5772/19590. Available from: http://www.intechopen.com/books/targets-in-gene-therapy/transplantation-of-sendai-viral-angiopoietin-1-modified-mesenchymal-stem-cells-for-ischemic-heart-di.

6. Gronthos and Simmons 1995, The growth factor requirements of STRO-1-positive human bone marrow derived stromal precursors under serum-deprived conditions *in vitro*. Blood, 85, 929-940.

7. Gronthos et al. (2003) Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. Journal of Cell Science 116: 1827-1835

8. Kanatsu-Shinohara et al. 2003, Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells, Biol. Reprod., 69(2), 612 - 616.

9. Kim et al. 2001a, Angiopoietin-1 reduces VEGF-stimulated leukocyte adhesion to endothelial cells by reducing ICAM-1, VCAM-1, and E-selectin expression. Circ Res., 89(6), 477-479.

10. Kim et al. 2001b, Angiopoietin-1 negatively regulates expression and activity of tissue factor in endothelial cells. FASEB J., 16(1), 126-128.

[0255]

11. Lijie et al. 2007, Mesenchymal stem cells modified with angiopoietin-1 improve remodelling in a rat model of acute myocardial infarction. Biochem Biophys Res Commun., 357(3), 779 - 84.
12. Matsui et al. 1992, Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. Cell, 70(5): 841 - 7.
13. Mummery et al. 2002, Cardiomyocyte differentiation of mouse and human embryonic stem cells. J Anat., 200(3), 233 - 242.
14. Passier R et al. 2005, Increased cardiomyocyte differentiation from human embryonic stem cells in serum-free cultures. Stem Cells, 23(6), pg 772 - 80.
15. Resnick et al. 1992, Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture. Nature, 359(6395), 550 - 551.
16. Reubinoff et al. 2000, Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation *in vitro*. Nat Biotechnol., 18(4), 399 - 404.
17. Shamblott et al. 1998, Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95(23), 13726 - 31.
18. Shinohara et al. 2004, Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis, Cell, 119(7), 1001 -1012.
19. Stanners et al., 1971, Two Types of Ribosome in Mouse-Hamster Hybrid Cells. Nat New Biol., 230, 52 - 54.
20. Takebayashi et al. 2008, Experimental Medicine, 26(5) (Suppl.), 41 -46, YODOSHA (Tokyo, Japan).
21. Thomson et al. 1995, Isolation of a primate embryonic stem cell line, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 92(17), 7844 - 8.
22. Thomson et al. 1996, Pluripotent cell lines derived from common marmoset (Callithrix jacchus) blastocysts. Biol. Reprod., 55(254), 254 - 9.
23. Thomson et al. 1998, Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science, 282, 1145 - 7.

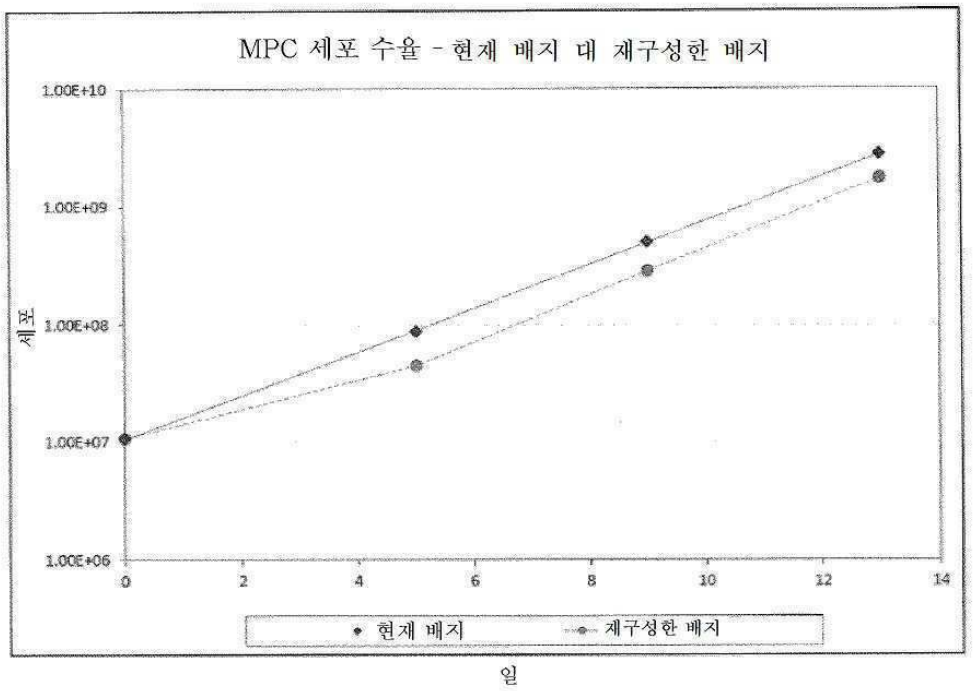
[0256]

24. Vacanti, et al. 1991, Synthetic polymers seeded with chondrocytes provide a template for new cartilage formation. Plast. Reconstr. Surg. 88, 753-9.
25. Yoshiaki et al. 2012, Human periodontal ligament fibroblasts are the optimal cell source for induced pluripotent stem cells. Histochemistry & Cell Biology, 137(6), 719 - 732.
26. Zannettino, A.C. et al. 1998, The Sialomucin CD164 (MGC-24v) Is an Adhesive Glycoprotein Expressed by Human Hematopoietic Progenitors and Bone Marrow Stromal Cells That Serves as a Potent Negative Regulator of Hematopoiesis. Blood 92: 2613-2628.

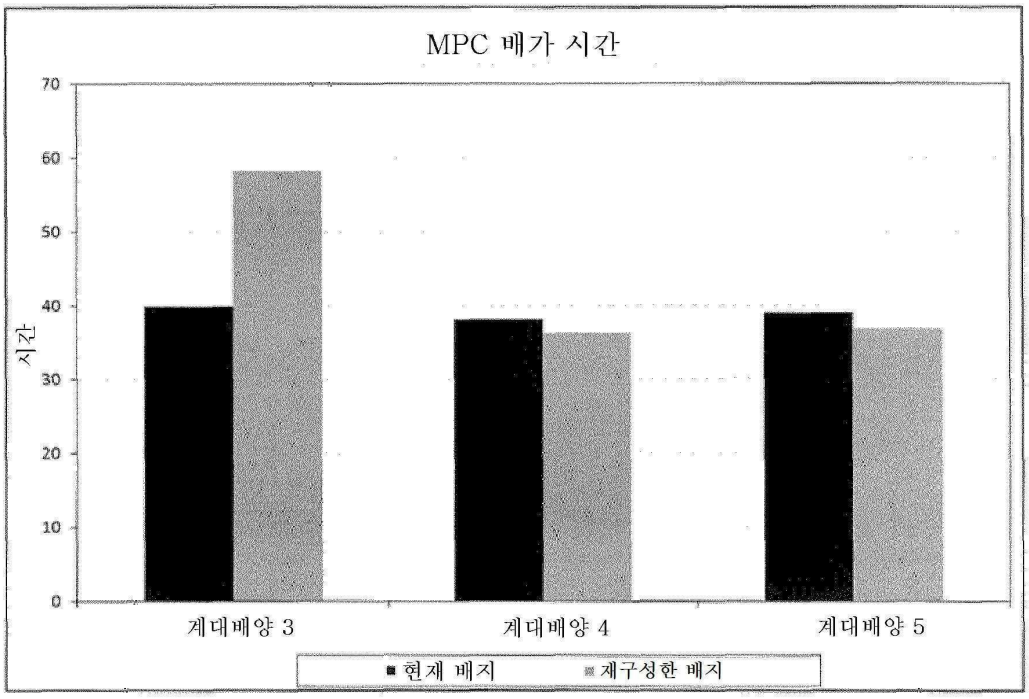
[0257]

도면

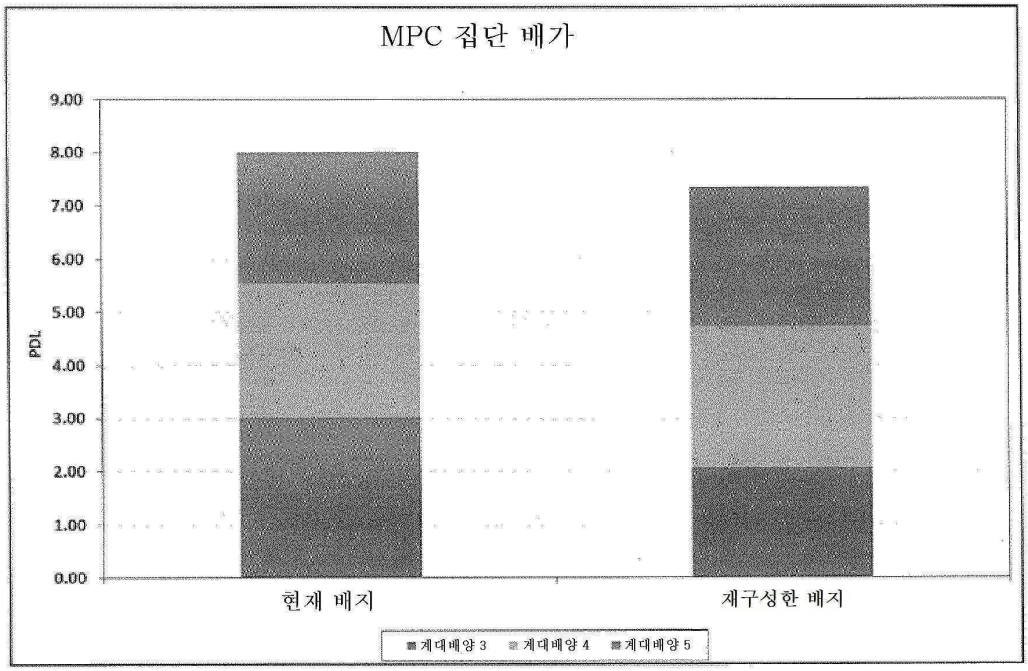
도면1


MPC 세포 수율 - 현재 배지 대 재구성한 배지
1.00E+10
1.00E+09
1.00E+08
1.00E+07
1.00E+06
세포
0
2
4
6
8
10
12
14
현재 배지
재구성한 배지
일

도면2


MPC 배가 시간
70
60
50
40
30
20
10
0
시간
계대배양 3
계대배양 4
계대배양 5
현재 배지
재구성한 배지

도면3


MPC 집단 배가
9.00
8.00
7.00
6.00
5.00
4.00
3.00
2.00
1.00
0.00
PDL
현재 배지
재구성한 배지
계대배양 3
계대배양 4
계대배양 5