



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0099201
(43) 공개일자 2020년08월21일

- | | |
|---|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>A61K 9/00</i> (2006.01) <i>A61K 35/12</i> (2020.01)
 <i>A61K 38/18</i> (2006.01) <i>A61P 1/04</i> (2006.01)
 <i>A61P 25/02</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>A61K 9/0014</i> (2013.01)
 <i>A61K 35/12</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2020-7022694
 (22) 출원일자(국제) 2019년01월08일
 심사청구일자 없음
 (85) 번역문제출일자 2020년08월05일
 (86) 국제출원번호 PCT/US2019/012726
 (87) 국제공개번호 WO 2019/136455
 국제공개일자 2019년07월11일
 (30) 우선권주장
 62/614,948 2018년01월08일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
 마이크로베스쿨러 티슈, 인코포레이티드
 미국, 캘리포니아 92121, 샌디에이고, 스위트
 109, 6199 코너스톤 코트 이스트</p> <p>(72) 발명자
 피터슨 데일 알.
 미국, 캘리포니아 92009, 칼즈배드, 7168 시티오
 코라존
 오하시 케빈 엘.
 미국, 매사추세츠 02130, 자메이카 플레인, 60 오
 차드 스트리트
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
 특허법인한얼</p> |
|---|---|

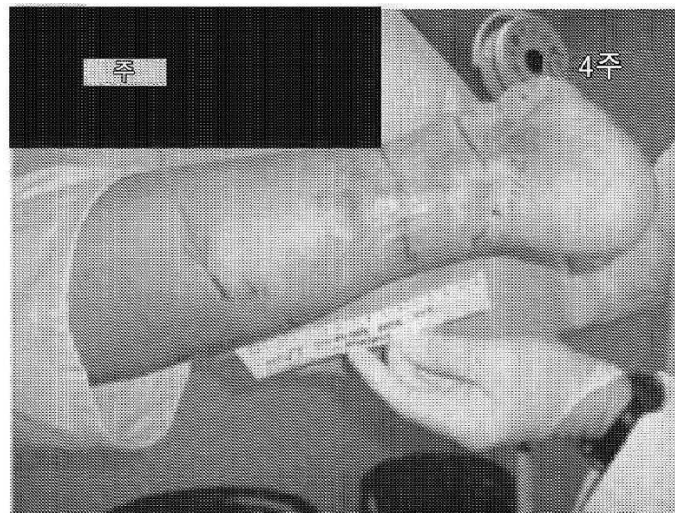
전체 청구항 수 : 총 49 항

(54) 발명의 명칭 **신경 손상을 치료하기 위한 조성물 및 방법**

(57) 요약

본원 개시내용은 신경병증의 치료를 위한 새로운 조성물에 관한 것이다. 본원 개시내용의 조성물은 당뇨병성 궤양에 국소적으로 적용되는 경우 당뇨병성 신경병증의 치료에서 증가된 효능을 제공한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 38/18 (2013.01)

A61K 38/1825 (2013.01)

A61K 38/1841 (2013.01)

A61K 38/185 (2013.01)

A61P 1/04 (2018.01)

A61P 25/02 (2018.01)

(72) 발명자

피켓 라엘 제이.

미국, 미네소타 55110, 화이트 베어 레이크, 유닛
120, 5200 패스웨이 애비뉴

공 글렌

미국, 캘리포니아 94070, 샌 카로스, 42 스탠포드
레인

엘-카레이 모하마드 에이.

미국, 캘리포니아 92011, 칼즈배드, 1616 뉴 크레
스트 코트

매턴, 칼프-하이코

미국, 캘리포니아 92065, 라모나, 24859 오아카나
로드

명세서

청구범위

청구항 1

말초 신경병증을 치료하거나, 예방하거나, 개선시키거나, 감소시킬 필요가 있는 대상체에서 말초 신경병증을 치료하거나, 예방하거나, 개선시키거나, 감소시키는 방법으로서,

치료제를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하고,

여기서, 상기 대상체는 환부 영역에서 적어도 하나의 손상된 신경을 갖고,

여기서, 상기 투여 단계는 상기 조성물을 상기 환부 영역에 국소적으로 투여함을 포함하는, 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 치료제는, 밀리리터 당 (per milliliter), 하기로부터 선택되는 하나 이상의 세포 또는 단백질을 포함하는, 방법:

- a) 적어도 약 1000개의 CFU-F 세포,
- b) 적어도 약 1000개의 CFU-F 세포의 함량,
- c) 적어도 약 10^5 개의 CD90 양성 세포,
- d) 적어도 약 10^5 개의 CD90 양성 세포의 함량,
- e) 적어도 약 10 피코그램 (pg)의 HDGF,
- f) 적어도 약 10 pg의 bFGF,
- g) 적어도 약 10 pg의 BDNF,
- h) 전체적으로 적어도 약 10 pg의 bFGF 및 BDNF, 및
- i) 최대 약 10 pg의 TGF- β_1 .

청구항 3

청구항 1 또는 2에 있어서, 상기 대상체는 당뇨병을 앓고 있거나, 말초 신경병증은 당뇨병성 신경병증을 포함하는, 방법.

청구항 4

청구항 1 내지 3 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체는 하나 이상의 당뇨병성 족부 궤양 (DFU)을 갖는, 방법.

청구항 5

청구항 1 내지 4 중 어느 한 항에 있어서, 상기 투여 단계는 상기 조성물을 3개월에 적어도 2회 대상체에게 국소적으로 투여함을 포함하는, 방법.

청구항 6

청구항 1 내지 5 중 어느 한 항에 있어서, 상기 투여 단계는 상기 조성물을 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20일 마다 대상체에게 국소적으로 투여함을 포함하는, 방법.

청구항 7

청구항 1 내지 6 중 어느 한 항에 있어서, 상기 환부 영역은 상처, 임의로 궤양을 포함하는 것인, 방법.

청구항 8

청구항 1 내지 7 중 어느 한 항에 있어서, 상기 치료제는 처리된 미세혈관 조직, 중간엽 줄기 세포 (MSC) 제제, 지방 조직으로부터의 기질 혈관 분획 (SVF), 골수 세포 제제 및 탭줄 줄기 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 다능성 세포 제제 (MCP)를 포함하는, 방법.

청구항 9

청구항 1 내지 7 중 어느 한 항에 있어서, 상기 치료제는 처리된 미세혈관 조직, 임의로 mVASC®를 포함하는, 방법.

청구항 10

청구항 1 내지 9 중 어느 한 항에 있어서, 상기 처리된 미세혈관 조직은 인간 지방 조직으로부터 유래되는 것인, 방법.

청구항 11

청구항 1 내지 10 중 어느 한 항에 있어서, 상기 처리된 미세혈관 조직은 하기로부터 선택된 하나 이상의 처리 (treatment)로 조치되는, 방법.

- a) 콜라게나제 처리,
- b) 중성 프로테아제 처리,
- c) 세포 용해, 임의로 염화암모늄 세포 용해,
- d) 건조, 임의로 냉동-건조 (freeze-drying), 공기 건조 또는 동결건조 (lyophilization),
- e) 동결, 임의로 냉동-건조 또는 급속 동결, 및
- f) 조사 (irradiation), 임의로 감마 조사 또는 전자-빔 조사.

청구항 12

청구항 1 내지 11 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 국소 투여를 위해 제형화되는, 방법.

청구항 13

청구항 1 내지 12 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 분말, 으깬 수 있는 케이크, 필름, 겔, 연고, 현탁제, 에멀전, 농축물, 코아세르베이트, 스캐폴드, 흡습성 분말, 또는 상처 드레싱 또는 커버링을 포함하는, 방법.

청구항 14

청구항 1 내지 13 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물의 대상체로의 투여는 상기 조성물의 환부 영역으로의 부착을 초래하는, 방법.

청구항 15

청구항 1 내지 14 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 개선된 신경 감각, 조직 치유, 상처 봉합, 궤양 치유, 상처 재발의 예방, 증가된 유연성 (flexibility) 또는 감소된 통증 중 하나 이상을 초래하는, 방법.

청구항 16

청구항 1 내지 15 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 궤양의 치유를 개선시키거나, 상기 영역에서 신경 감각을 개선시키거나, 상기 영역에서 새로운 궤양의 재발을 감소시키는, 방법.

청구항 17

청구항 1 내지 16 중 어느 한 항에 있어서, 상기 환부 영역은 5, 10, 15, 30 cm의 손상된 신경 내에 있는, 방법.

청구항 18

말초 신경병증을 치료하거나, 예방하거나, 개선시키거나, 감소시킬 필요가 있는 대상체에서 말초 신경병증을 치료하거나, 예방하거나, 개선시키거나, 감소시키기 위한 조성물로서, 여기서, 상기 치료제는, 밀리리터 당, 하기로부터 선택되는 하나 이상의 세포 또는 단백질을 포함하는, 조성물:

- a) 적어도 약 1000개의 CFU-F 세포,
- b) 적어도 약 1000개의 CFU-F 세포의 함량,
- c) 적어도 약 10^5 개의 CD90 양성 세포,
- d) 적어도 약 10^5 개의 CD90 양성 세포의 함량,
- e) 적어도 약 10 피코그램 (pg)의 HDGF,
- f) 적어도 약 10 pg의 bFGF,
- g) 적어도 약 10 pg의 BDNF,
- h) 전체적으로 적어도 약 10 pg의 bFGF 및 BDNF, 및
- i) 최대 약 10 pg의 TGF- β_1 .

청구항 19

청구항 18에 있어서, 상기 대상체는 당뇨병을 앓고 있거나, 말초 신경병증은 당뇨병성 신경병증을 포함하는, 조성물.

청구항 20

청구항 18 또는 19에 있어서, 상기 대상체는 하나 이상의 당뇨병성 족부 궤양 (DFU)을 갖는, 조성물.

청구항 21

청구항 18 내지 20 중 어느 한 항에 있어서, 상기 투여 단계는 상기 조성물을 3개월에 적어도 2회 대상체에게 국소적으로 투여함을 포함하는, 조성물.

청구항 22

청구항 18 내지 21 중 어느 한 항에 있어서, 상기 투여 단계는 상기 조성물을 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20일 마다 대상체에게 국소적으로 투여함을 포함하는, 조성물.

청구항 23

청구항 18 내지 22 중 어느 한 항에 있어서, 상기 환부 영역은 상처, 임의로 궤양을 포함하는, 조성물.

청구항 24

청구항 18 내지 23 중 어느 한 항에 있어서, 상기 치료제는 처리된 미세혈관 조직, 중간엽 줄기 세포 (MSC) 제제, 지방 조직으로부터의 기질 혈관 분획 (SVF), 골수 세포 제제 및 탯줄 줄기 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 다능성 세포 제제 (MCP)를 포함하는, 조성물.

청구항 25

청구항 18 내지 23 중 어느 한 항에 있어서, 상기 치료제는 처리된 미세혈관 조직, 임의로 mVASC®를 포함하는, 조성물.

청구항 26

청구항 18 내지 25 중 어느 한 항에 있어서, 상기 처리된 미세혈관 조직은 인간 지방 조직으로부터 유래되는 것인, 조성물.

청구항 27

청구항 18 내지 26 중 어느 한 항에 있어서, 상기 처리된 미세혈관 조직은 하기로부터 선택된 하나 이상의 처리로 조치되는, 조성물.

- g) 콜라게나제 처리,
- h) 중성 프로테아제 처리,
- i) 세포 용해, 임의로 염화암모늄 세포 용해,
- j) 건조, 임의로 냉동-건조, 공기 건조 또는 동결건조,
- k) 동결, 임의로 냉동-건조 또는 급속 동결, 및
- l) 조사, 임의로 감마 조사 또는 전자-빔 조사.

청구항 28

청구항 18 내지 27 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 국소 투여를 위해 제형화되는, 조성물.

청구항 29

청구항 18 내지 28 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 분말, 으깬 수 있는 케이크, 필름, 겔, 연고, 현탁제, 에멀전, 농축물, 코아세르베이트, 스캐폴드, 흡습성 분말, 또는 상처 드레싱 또는 커버링을 포함하는, 조성물.

청구항 30

청구항 18 내지 29 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물의 대상체로의 투여는 상기 조성물의 환부 영역으로의 부착을 초래하는, 조성물.

청구항 31

청구항 18 내지 30 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 개선된 신경 감각, 조직 치유, 상처 봉합, 궤양 치유, 상처 재발의 예방, 증가된 유연성 또는 감소된 통증 중 하나 이상을 유도하는, 조성물.

청구항 32

청구항 18 내지 31 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 궤양의 치유를 개선시키거나, 상기 영역에서 신경 감각을 개선시키거나, 상기 영역에서 새로운 궤양의 재발율을 감소시키는, 조성물.

청구항 33

말초 신경병증을 치료하거나, 예방하거나, 개선시키거나, 감소시킬 필요가 있는 대상체에서 말초 신경병증을 치료하거나, 예방하거나, 개선시키거나, 감소시키는 방법으로서,

치료제를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하고,

여기서, 상기 대상체는 환부 영역에 적어도 하나의 상처를 갖고,

여기서, 상기 투여 단계는 상기 조성물을 상기 환부 영역의 상처에 국소적으로 투여함을 포함하는, 방법.

청구항 34

청구항 33에 있어서, 상기 국소 투여는, 상처 cm^2 당, 하기로부터 선택되는 하나 이상의 세포 또는 단백질을 제공하는, 방법:

- j) 적어도 약 1000개의 CFU-F 세포,
- k) 적어도 약 1000개의 CFU-F 세포의 함량,
- l) 적어도 약 10^5 개의 CD90 양성 세포,

- m) 적어도 약 10^5 개의 CD90 양성 세포의 함량,
- n) 적어도 약 10 피코그램 (pg)의 HDGF,
- o) 적어도 약 10 pg의 bFGF,
- p) 적어도 약 10 pg의 BDNF,
- q) 전체적으로 적어도 약 10 pg의 bFGF 및 BDNF, 및
- r) 최대 약 10 pg의 TGF- β_1 .

청구항 35

청구항 33 또는 34에 있어서, 상기 대상체는 신경 손상, 손상된 신경, 당뇨병 또는 당뇨병성 신경병증을 앓고 있는, 방법.

청구항 36

청구항 33 내지 35 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 상처는 당뇨병성 족부 궤양 (DFU)을 포함하는, 방법.

청구항 37

청구항 33 내지 36 중 어느 한 항에 있어서, 상기 투여 단계는 상기 조성물을 3개월에 적어도 2회 대상체에게 국소적으로 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 38

청구항 33 내지 37 중 어느 한 항에 있어서, 상기 투여 단계는 상기 조성물을 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20일 마다 대상체에게 국소적으로 투여함을 포함하는, 방법.

청구항 39

청구항 33 내지 38 중 어느 한 항에 있어서, 상기 상처는 궤양을 포함하는, 방법.

청구항 40

청구항 33 내지 39 중 어느 한 항에 있어서, 상기 치료제는 처리된 미세혈관 조직, 중간엽 줄기 세포 (MSC) 제제, 지방 조직으로부터의 기질 혈관 분획 (SVF), 골수 세포 제제 및 탯줄 줄기 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 다능성 세포 제제 (MCP)를 포함하는, 방법.

청구항 41

청구항 33 내지 39 중 어느 한 항에 있어서, 상기 치료제는 신경 성장 인자 (NGF), 신경교 세포주 유래 신경영양 인자 (GDNF), J147, 커큐민, 및 인슐린-유사 성장 인자 1 (IGF-1) 또는 이들의 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 42

청구항 33 내지 39 중 어느 한 항에 있어서, 상기 치료제는 처리된 미세혈관 조직, 임의로 mVASC®를 포함하는, 방법.

청구항 43

청구항 42에 있어서, 상기 처리된 미세혈관 조직은 인간 지방 조직으로부터 유래되는 것인, 방법.

청구항 44

청구항 42 또는 43에 있어서, 상기 처리된 미세혈관 조직은 하기로부터 선택된 하나 이상의 처리로 조치되는, 방법:

- m) 콜라게나제 처리,
- n) 중성 프로테아제 처리,
- o) 세포 용해, 임의로 염화암모늄 세포 용해,
- p) 건조, 임의로 냉동-건조, 공기 건조 또는 동결건조,
- q) 동결, 임의로 냉동-건조 또는 급속 동결, 및
- r) 조사, 임의로 감마 조사 또는 전자-빔 조사.

청구항 45

청구항 33 내지 44 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 국소 투여를 위해 제형화되는, 방법.

청구항 46

청구항 33 내지 45 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 분말, 으깬 수 있는 케이크, 필름, 겔, 연고, 현탁제, 에멀전, 농축물, 코아세르베이트, 스캐폴드, 흡습성 분말, 또는 상처 드레싱 또는 커버링을 포함하는, 방법.

청구항 47

청구항 33 내지 46 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물의 대상체로의 투여는 상기 조성물의 환부 영역으로의 부착을 초래하는, 방법.

청구항 48

청구항 33 내지 47 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 개선된 신경 감각, 조직 치유, 상처 봉합, 궤양 치유, 상처 재발의 예방, 증가된 유연성 또는 감소된 통증 중 하나 이상을 유도하는, 방법.

청구항 49

청구항 33 내지 48 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 궤양의 치유를 개선시키거나, 상기 영역에서 신경 감각을 개선시키거나, 상기 영역에서 새로운 궤양의 재발율을 감소시키는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본원 개시내용은 말초 신경병증을 포함한 신경 손상을 치료하기 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다. 특히, 본원 개시내용은 신경 손상의 치료를 위한 국소 및 주사 가능한 미세혈관 조직 제제를 제공한다.

[0002] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0003] 본 출원은 2018년 1월 8일자로 출원된 미국 가특허 출원 제62/614,948호의 우선권의 이득을 주장한다.

배경 기술

[0004] 신경 손상은 관련된 중증도 및 신경에 따라 광범위한 증상군을 갖는 혼한 병태이다. 손상 및 재생 기전에 대한 많은 지식이 존재하지만, 완전한 기능 회복을 보장하는 신뢰할 수 있는 어떠한 치료도 알려져 있지 않다.

[0005] 가장 흔한 유형의 신경 손상 중에는 말초 신경병증을 포함한 소위 말초 신경 손상이 있다. 말초 신경병증은 말초 신경이 손상되거나 파괴되는 너무나 흔한 병태이다. 그 결과 신체 일부에 대한 느낌(feeling) 또는 운동 조절이 상실되거나, 영역에서의 통증 또는 따끔거림 감각이 상실된다. 자율 신경이 관련된 경우, 신체 영역에서 땀을 흘리거나 혈류를 조절하는 능력이 상실될 수 있다. 손상, 충돌, 염증, 알코올 남용, 약물 및 방사선을 포함한 많은 원인이 있지만, 지금까지 말초 신경병증의 가장 큰 원인은 당뇨병이다.

[0006] 말초 신경병증의 하나의 중요한 원인은 당뇨병이다. 전세계 당뇨병 환자는 3억 8900만명으로 추정되며 이들 중 최대 절반은 당뇨병성 말초 신경병증을 경험한다. 감각 상실은 종종 만성적인 상처를 유발하여, 치유하기 매우 어렵다. 치유되지 않으면, 이들 만성적인 상처는 감염, 괴저 및 절단 기회를 주게 될 것이다. 미국에서는 매

년 120만건의 당뇨병성 족부 궤양이 발생하여 51억불의 비용으로 70,000건의 절단을 유발한다.

[0007] 외상은 말초 신경병증을 포함한 신경 손상의 또 다른 원인이다. 절단되거나 부서진 신경은 가끔, 자발적으로 또는 외과적 중재의 도움을 받아 회복되며, 때로는 신경 이식 또는 신경 도관을 사용한다. 신경 손상의 또 다른 알려진 원인은 과도한 알코올 복용이다. 알코올 유래 신경병증은 단순히 알코올을 절제함으로써 치료될 수 있다. 집중적인 연구의 핵심임에도 불구하고 다른 형태의 신경병증에 대한 성공적인 치료법은 없다. 당뇨병성 신경병증의 진행은 혈당 수준을 주의깊게 조절하여 늦출 수 있지만 손상을 되돌릴 수 있는 어떠한 방법도 찾지 못했다. 신경병증의 많은 경우에서 통증 또는 따끔거림은 이를 지니고 살기가 매우 어려울 수 있고, 따라서, 많은 치료가 이들 증상을 완화시키는 것을 목표로 한다. 보다 흔한 일부 치료는 진통제, 항염증성 약물, 경피 전기 신경 자극 (TENS), 항우울제 및 항발작성 약물을 포함한다. 당뇨병성 족부 궤양 (DFU)의 경우, 감각은 일반적으로 부재하여 이들 치료는 가치가 거의 없다.

[0008] 당뇨병성 궤양은 주로 신경병증에 의해 유발된 감각 부재 때문에 발병하는 것으로 여겨진다. 환자는 종종 상처가 제때에 형성되어 환부에 대한 하중을 변화시키는 것을 느끼지 못할 수 있다. 상처가 형성된 경우, 당뇨병 환자에서 조직으로의 불량한 혈액 공급 때문에 치유하기가 어렵다. 불량한 혈액 공급은 치유를 위해 필요한 영양소 조직을 고갈시키고 감염이 상처에 발생하여 지속되도록 한다.

[0009] 당뇨병성 궤양에 대한 표준 치료는 상처의 괴사조직을 제거하여 (debride), 죽고 손상된 조직을 제거하고, 항생제를 사용하여 감염과 싸우고, 상처를 하이드로콜로이드 드레싱으로 덮은 다음, 그 드레싱을 폐쇄성 드레싱으로 덮어 상처를 제거하였다 (unload). 이러한 표준 실행은 그러한 상처의 24%에 불과한 치유를 유발한다. 표준 실행이 실패하는 경우, FDA가 승인한 치료가 몇개 더 있다. 성장 인자 PDGF-BB는 상처에 대한 혈액 공급을 개선하고 치유율을 증가시키기 위해 수년간 이용 가능했다. 혈액 공급 또한 반복적인 고압 산소 치료요법에 의해 개선될 수 있다. 이러한 확립된 치료 둘 다는 고가이고 여전히 많은 상처를 치유하는데 실패한다.

[0010] 다양한 조직 및 세포 기반 치료요법이 DFU를 치료하기 위해 사용되어 왔다. 제품 및 결과는 상당히 다양하다. 보다 통상의 조직 제품은 피부 이식편, 소장 점막하 (SIS) 및 양막을 포함하고, 가장 인기 있는 세포 치료요법은 혈소판 풍부 혈장 (PRP), 골수 흡인 농축물 (BMAC), 지방 기질 혈관 분획물 (SVF) 및 골수 또는 지방으로부터 배양된 중간엽 줄기 세포 (MSC)이다. 피부 이식편은 명백히 선호되는 것으로 보이지만 이들은 종종 허혈성 부위에 이식하는데 실패하고 공여부 부위에 상처를 남긴다. SIS는 상처 커버리지 뿐만 아니라 일부 유용한 성장 인자를 제공한다고 한다. 양막은 보다 우수한 상처 치유 결과를 제공한다. PRP는 환자의 혈액 일부를 원심 분리하여 혈소판을 3 내지 7배 농축시켜 준비한다. 유사하게, BMAC는 골수를 뽑아 이를 원심분리하여 골수 줄기 세포를 농축시켜 준비한다. 이들 2개의 원심분리된 제품은 측정하기 어려울 정도로 미미한 이득을 제공하였다. 대조적으로, SVF 및 MSC는 훨씬 더 많은 수의 다능성 세포를 제공하고 현저한 상처 역전 이득을 제공하는 것으로 보고되었다. 그러나, DFU에 대한 기존의 많은 치료 중 어느 것도 관련된 신경병증의 임의의 현저한 치유를 제공하지 않는다.

[0011] 따라서, 말초 신경병증을 포함한 신경 손상에 대해 효과적이고 적절한 치료에 대한 필요성이 남아 있다.

발명의 내용

[0012] 본원 개시내용은 말초 신경병증을 포함한 신경 손상을 치료하기 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다. 특히, 본원 개시내용은 신경 손상의 치료를 위한 국소 및 주사 가능한 미세혈관 조직 체제를 제공한다. 특히, 본 발명자는 본원에 기재된 조성물 및 방법이 말초 신경병증을 포함한 신경 손상을 치료하거나 예방한다는 것을 놀랍게도 발견하였다.

[0013] 본 발명의 구현에는 말초 신경 조직 손상의 회복 및/또는 재생에 유용한 조성물 및 방법을 포함한다.

[0014] 본원 개시내용의 구현에는 포유동물에서 말초 신경 손상을 치료 또는 예방하거나, 조직 재생을 촉진시키는 방법을 제공하고, 상기 방법은 상기 포유동물에게 본원 개시내용의 조성물을 제공하는 단계를 포함한다. 말초 신경 손상은 손상, 충돌, 염증, 알코올 남용, 약물, 방사선 또는 당뇨병으로 인한 것일 수 있다. 특정 구현예에서, 말초 신경 손상은 수술 상처, 화상, 손상, 이식 상처 또는 피부 병변의 결과로 존재한다. 일부 구현예에서, 말초 신경 손상은 당뇨병성 신경병증이다. 추가의 구현예에서, 당뇨병성 신경병증은 당뇨병성 족부 궤양 (DFU)과 같은 당뇨병성 궤양과 관련된다.

[0015] 본원 개시내용의 구현에는 말초 신경병증의 치료에서 유용한 치료제를 포함하는 조성물을 제공한다. 특정 구현예에서, 조성물은 국소적으로 적용된다. 다른 구현예에서, 조성물은 외과적으로 포유동물에 이식된다. 특정 구

현예에서, 조성물은 상기 포유동물에서 손상 또는 질환 부위내 이식되거나 이에 인접하게 이식된다. 관련 구현예에서, 조성물은 상기 포유동물에게 정맥내로 제공된다.

[0016] 본원 개시내용의 치료제는 자가이식편, 동종이식편, 이종이식편, 미세혈관 조직, 다능성 세포, 그러한 세포 또는 조직으로부터의 미세세포 및/또는 성장 인자를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 조성물은 멸균시키고/시키거나, 상기 조성물 내 바이러스는 불활성화시킨다. 특정 구현예에서, 치료제는 국소 투여용으로 제형화되고, 분말, 필름, 겔, 연고, 현탁제, 에멀전 또는 코아세르베이트 등을 포함할 수 있다. 일 구현예에서, 치료제는 건조된 흡습성 분말로서 제형화된다. 보다 특정 구현예에서, 조성물은 상처에 부착되도록 제형화된다. 조성물은 상처에 직접 적용되거나 환자의 감각이 있는 곳으로부터 약간의 거리에서 적용될 수 있다. 조성물은 3개월 시기에서 1회 초과 또는 적어도 2회 재적용될 수 있다. 조성물은 예를 들어, 약 3일 내지 약 15일의 간격으로 재적용될 수 있다.

[0017] 특정 구현예에서, 본원 개시내용의 미세혈관 조직 또는 다능성 세포는 농축될 수 있다. 본원 개시내용의 조성물은 약 10^5 개의 CD90+ 세포/cm² 초과와 용량을 제공하는 국소 적용을 위해 제형화된 다능성 세포를 포함할 수 있다. 다른 구현예에서, 본원 개시내용의 조성물은 약 1000개의 CFU-F/cm² 초과와 용량으로 다능성 세포를 포함할 수 있다.

[0018] 특정 구현예에서, 조성물은 성장 인자와 같은 인자를 포함한다. 본원 개시내용의 성장 인자는 형질전환 성장 인자- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), 간세포암-유래 성장 인자 (HDGF), 기본 섬유아세포 성장 인자 (bFGF), 및/또는 뇌-유래 신경영양 인자 (BDNF)일 수 있다. 성장 인자는 말초 신경의 재생 및/또는 상처 치유를 제공하는 양으로 존재할 수 있다. 양의 예는 제형 mg 당 10 pg 초과와 bFGF, BDNF 및/또는 HDGF 및/또는 약 10 pg 미만의 TGF- $\beta 1$ 을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 하나의 효과적인 조성물은 1 ng/mg 초과와 HDGF를 포함하였다.

[0019] 본원 개시내용의 구현예는 이를 필요로 하는 대상체에서 말초 신경 손상을 치료하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 말초 신경 손상을 갖는 대상체를 동정하는 단계; 및 국소 투여용으로 제형화된 치료학적 유효량의 치료제를 투여하는 단계를 포함한다. 조성물은 환부 영역에서 국소적으로 또는 환부 영역의 상처에 적용될 수 있다. 본원 개시내용의 치료 방법은 또한 신경병증 이외에 상처 치유를 도울 수 있다.

[0020] 본원 개시내용의 구현예는 이를 필요로 하는 대상체에서 당뇨병성 궤양을 치료하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 당뇨병성 궤양을 갖는 대상체를 동정하는 단계; 및 국소 투여용으로 제형화된 본원 개시내용의 치료제를 포함하는 치료학적 유효량의 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 본원 개시내용의 치료 방법은 또한 당뇨병성 궤양을 치유할 수 있다. 당뇨병성 궤양은 당뇨병성 족부 궤양일 수 있다. 본원 개시내용의 치료 방법은 당뇨병성 족부 궤양을 치유하고, 재발 DFU의 가능성을 감소시킨다.

[0021] 일 양상에서, 본원 개시내용은 이를 필요로 하는 대상체에서 말초 신경병증을 치료하거나, 예방하거나, 개선시키거나, 감소시키는 방법을 제공하고, 상기 방법은 치료제를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하고, 여기서, 대상체는 환부 영역에서 적어도 하나의 손상된 신경을 갖고, 여기서, 투여 단계는 조성물을 환부 영역에 국소적으로 투여하는 것을 포함한다.

[0022] 또 다른 양상에서, 본원 개시내용은 이를 필요로 하는 대상체에서 말초 신경병증을 치료하거나, 예방하거나, 개선시키거나, 감소시키기 위하여, 치료제를 포함하는 조성물을 제공한다.

[0023] 또 다른 양상에서, 본원 개시내용은 이를 필요로 하는 대상체에서 말초 신경병증을 치료하거나, 예방하거나, 개선시키거나, 감소시키는 방법을 제공하고, 상기 방법은 치료제를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하고, 여기서, 상기 대상체는 환부 영역에서 적어도 하나의 상처를 갖고, 여기서, 상기 투여 단계는 상기 조성물을 환부 영역에서의 상처에 국소적으로 투여함을 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1은 처리 후 발가락이 카메라로부터 멀리 떨어지도록 하여 환자 A의 아랫 다리를 보여준다. 환자 A는 하이드로콜로이드 드레싱으로 표준 치료를 했음에도 불구하고 치유되지 않은 발바닥에 당뇨병성 족부 궤양을 나타냈다. 괴사조직 제거 후, 궤양은 5.1 cm²로 측정되었고, 신경병증은 무릎까지 절반 연장되었다. 본원 개시내용에 기재된 바와 같이 제조된 다능성 세포 제제 (MCP)로 국소 치료한지 4주 후, DFU는 3.5 cm²로 측정되었고, 신경병증의 정도는 약 14 cm 감소하였다.

도 2는 처리 후 발가락이 카메라를 향하도록 하여 환자 B의 아랫 다리를 보여준다. 환자 B는 하이드로콜로이드 드레싱으로 표준 치료를 했음에도 불구하고 치유되지 않은 발 안쪽에 당뇨병성 족부 궤양을 나타냈다. 괴사조직 제거 후, 궤양은 6.1 cm^2 로 측정되었고, 신경병증은 무릎까지 절반 이상 연장되었다. MCP를 사용한 국소 치료 4주 후, DFU는 0.4 cm^2 로 측정되었고, 신경병증의 정도는 약 16 cm 감소하였다.

도 3은 비히클로 처리한 후 대조군 대상체의 아랫 다리를 보여준다. 환자 C는 하이드로콜로이드 드레싱으로 표준 치료를 했음에도 불구하고 치유되지 않은 발바닥에 당뇨병성 족부 궤양을 나타냈다. 괴사조직 제거 후, 궤양은 4.0 cm^2 로 측정되었고, 신경병증은 무릎까지 거리의 1/3 연장되었다. MCP 없이 환자 A 및 B를 치료하기 위해 사용된 동일한 비히클 용액으로 국소 치료한지 4주 후, DFU는 1.6 cm^2 로 측정되었지만 신경병증의 정도는 유의적으로 감소되지 않았다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0025] 본원 개시내용은 당뇨병성 신경병을 포함한 말초 신경병증 및 말초 신경 손상을 포함하는 신경 손상의 치료에 그리고 당뇨병성 족부 궤양 (DFU)을 포함한 당뇨병성 궤양의 치료에 유용한 조성물 및 방법에 관한 것이다.
- [0026] 정의
- [0027] 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용된 모든 기술 용어 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본원 개시내용의 목적상, 하기 용어는 아래에 정의되어 있다.
- [0028] "a" 및 "an"이란 단어는 특별히 언급되지 않는 한 하나 이상을 나타낸다.
- [0029] "약"이란, 기준 수량, 수준, 값, 수, 빈도, 백분율, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이에 대해 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1% 만큼 변하는 수량, 수준, 값, 수, 빈도, 백분율, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이를 의미한다. "약"이란 용어와 함께 사용되는 수치 값과 관련하여 논의된 임의의 구현예에서, 약이라는 용어는 생략될 수 있다는 것이 특히 고려된다.
- [0030] 문맥이 달리 요구되지 않는 한, 본 명세서 및 청구범위 전반에 걸쳐, "포함하다 (comprise)" 및 이의 변형어구, 예컨대 "포함하다 (comprises)" 및 "포함하는 (comprising)"은 개방적이고 포괄적인 의미로, 즉 "포함하지만 이에 제한되지 않는"으로서 해석되어야만 한다.
- [0031] "로 이루어진"이란, "로 이루어진"이란 문구에 이어지는 무엇이든 포함하고 이에 제한되는 것을 의미한다. 따라서, "로 이루어진"이란 문구는 열거된 요소가 필수적이거나 의무적이고, 다른 요소가 존재할 수 없음을 나타낸다.
- [0032] "필수적으로 이루어진"이란, 문구 뒤에 열거된 임의의 요소를 포함하는 것을 의미하고, 열거된 요소에 대해 본원 개시내용에서 특정된 활성 또는 작용을 방해하거나 이에 기여하지 않는 다른 요소로 제한된다. 따라서, "필수적으로 이루어진"이란 문구는 열거된 요소가 필수적이거나 의무적이지만, 다른 요소는 선택적이고, 열거된 요소의 활성 또는 작용에 영향을 미치는지 또는 미치지 않는지의 여부에 따라 존재할 수 있거나 존재하지 않을 수 있음을 나타낸다.
- [0033] 본 명세서 전반에 걸쳐 "일 구현예 (one embodiment)" 또는 "일 구현예 (an embodiment)" 라는 언급은, 구현예와 관련하여 기재된 특정한 특징, 구조 또는 특성이 본원 개시내용의 적어도 하나의 구현예에 포함된다는 것을 의미한다. 따라서, 본 명세서 전반에 걸쳐 다양한 곳에서 "일 구현예에서 (in one embodiment)" 또는 "일 구현예에서 (in an embodiment)"라는 문구의 출현은 반드시 전부 동일한 구현예를 언급하는 것은 아니다. 추가로, 특정한 특징, 구조 또는 특성은 하나 이상의 구현예에서 임의의 적합한 방식으로 조합될 수 있다.
- [0034] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "기능" 및 "기능성" 등은 생물학적, 효소적 또는 치료적 기능을 언급한다.
- [0035] "증가된" 또는 "증진된" 양은 전형적으로 "통계적으로 유의한" 양이고 본원에 기재된 양 또는 수준의 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 또는 50 배 이상 (예를 들어, 100, 500, 1000배) (이들 사이의 모든 정수 및 소수점 및 1 초과, 예를 들어, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4 등을 포함)인 증가를 포함할 수 있다.
- [0036] "감소된 (decreased)" 또는 "감소된 (reduced)" 또는 "보다 적은" 양은 전형적으로 "통계적으로 유의한"

양이고, 본원에 기재된 양 또는 수준의 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 또는 50배 이상 (예를 들어, 100, 500, 1000배) (이들 사이의 모든 정수 및 소수점 및 1 초과, 예를 들어, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8 등을 포함)인 감소를 포함할 수 있다.

[0037] "로부터 수득된"이란, 예를 들어, 세포 또는 조직과 같은 샘플이 특정 공급원, 예컨대 원하는 유기체 또는 원하는 유기체 내 특정 조직으로부터 분리되거나 이로부터 유래됨을 의미한다.

[0038] 본원에 사용된 바와 같이, 문맥이 달리 명백하게 나타내지 않는 한, "치료" 및 유사 용어, 예컨대 "치료된," "치료하는" 등은 임상 결과를 포함하여 이롭거나 원하는 결과를 수득하기 위한 접근법을 나타낸다. 치료는 임의로 손상, 질환 또는 병태의 증상의 감소 또는 개선, 또는 손상, 질환 또는 병태의 진행의 지연을 포함할 수 있다. 본원에 기재된 조성물의 투여는 일부 구현예에서 그러한 증상 중 하나 이상을 치료할 수 있다.

[0039] 본원에 사용된 바와 같이, 문맥이 달리 명백하게 나타내지 않는 한, "예방" 및 유사 용어, 예컨대 "예방된", "예방하는" 등은 손상, 질환 또는 병태를 예방하거나, 억제하거나, 이의 발병 또는 재발 가능성을 감소시키기 위한 접근법을 나타낸다. 이것은 또한 손상, 질환 또는 병태를 예방하거나, 억제하거나, 이의 하나 이상의 증상의 발병 또는 재발 가능성을 감소시킴을 지칭하거나, 임의로, 손상, 질환 또는 병태의 발병 또는 재발을 지연시키거나, 손상, 질환 또는 병태의 하나 이상의 증상의 발병 또는 재발을 지연시키기 위한 접근법을 지칭한다. 본원에 사용된 바와 같은 "예방" 및 유사 용어는 또한 손상, 질환 또는 병태의 강도, 효과, 증상 및/또는 부하를 감소시킴을 포함한다.

[0040] 본원에 사용된 바와 같이, "유효량" 또는 "치료학적 유효량"은 원하는 생물학적 효과, 예컨대 유리한 임상 결과에 영향을 미치기에 충분한 양이다.

[0041] 본원에 사용된 바와 같이, "당뇨병"은 신체의 세포가 글루코스를 제대로 대사할 수 없는 대사 질환이다. I형 당뇨병에서, 섬(islet) 세포는 췌장에서 파괴되어 신체에서의 인슐린 수준이 글루코스 대사에 부적합하다. II형 당뇨병에서, 환자의 세포는 인슐린에 내화성이 되어 글루코스를 제대로 사용하는 능력을 상실한다.

[0042] 본원에 사용된 바와 같이, "신경 손상"은 당뇨병, 알코올, 허혈 및 외상을 포함하지만 이에 제한되지 않는 임의의 원인으로부터 신경에 대한 손상 (damage), 질환, 기능부전 또는 손상 (injury)을 지칭한다. 외상의 유형은 둔기 외상, 자창 및 열상을 포함한다. 허혈은 부적당한 혈액 공급 또는 다른 인자들에 의해 유발될 수 있다. 따라서, 신경 손상은 일반적으로, 대상체의 신경이 건강한 대상체에서 신경 기능과 동일한 정도로 기능하지 못하도록 하는 임의의 의도적 또는 비의도적, 질환-관련 또는 질환-관련이 없는, 국소 또는 전신, 표면 또는 심층-조직 손상을 지칭한다. 본원에 사용된 바와 같은 "신경병증"은 신경 손상 또는 질환에 의해 유발되는 것과 같은 특정 형태의 신경 손상을 지칭한다. 신경병증은 대상체의 감각 (통증, 따끔거림, 찌르기, 저림), 운동 (근육 약화 또는 소모), 또는 기관 기능 (땀샘, 혈관 탄력)에 대한 영향에 의해 입증될 수 있다. 용어 "말초 신경병증"은 말초 신경에 영향을 미치는 신경병증의 형태를 지칭한다. 말초 신경병증은 당뇨병성 또는 비-당뇨병성 신경병증을 포함할 수 있다.

[0043] 본원에 사용된 바와 같이, "환부 영역"은 신경 손상으로 인한 자극에 대한 비정상적 감각 또는 반응을 경험하는 대상체의 신체의 영역을 언급한다. 환부 영역은 약 5, 10, 15, 20, 25, 또는 30 cm의 손상된 신경 내 영역일 수 있다. 환부 영역의 치수는 손상된 신경에 대한 손상 유형 또는 중증도에 의해 결정된다.

[0044] 본원에 사용된 바와 같이, "당뇨병성 신경병증"은 가장 흔한 형태의 말초 신경병증을 지칭한다. 이것은 당뇨병으로 인한 것이고, 일반적으로 원위 사지에 영향을 미친다. 이론에 의해 국한되는 것 없이, 당뇨병성 신경병증은 많은 경우에 신경으로의 감소된 혈류 때문에 기원하는 것으로 사료된다. 이것은 점진적 저림, 따끔거림 또는 통증으로 나타나고 환자의 다리와 팔을 위로 움직일 수 있다.

[0045] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "상처"는 피부를 통한 찢어진 틈 (break)을 지칭한다. 이것은 피부의 급격한 파열 (breach) 또는 피부에 의해 제공되는 장벽에서의 만성 결함 (궤양으로도 지칭됨)일 수 있다. 상처는 자창, 열상, 찰과상, 및 다른 기전에 의한 피부 열화를 포함한다. 상처는 의도적 (예를 들어, 외과적) 상처와, 질환에 의해 또는 우발적 손상에 의해 유발된 것과 같은 비의도적 손상을 포함한다.

[0046] 본원에 사용된 바와 같이, 예를 들어, 다능성 세포와 관련하여 "단리된"이란 용어는 이의 자연 환경으로부터 제거된 것을 의미한다. 예를 들어, 세포는 이것이 이의 자연 환경에서 공존하는 물질의 일부 또는 모두로부터 분리된 경우 단리된다.

[0047] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "처리된 미세혈관 조직"은 작은 단편으로 해리되는 미세혈관 조직을 지칭한다.

일부 구현예에서, 처리된 미세혈관 조직은 건조되거나, 조사 (irradiated)되거나, 제형화된다. 일부 구현예에서, 처리된 미세혈관 조직은 다능성 세포를 포함한다.

- [0048] 본원에 사용된 바와 같이, "다능성 세포"는 2개 이상의 상이한 특수화된 세포 유형으로 분화하는 능력을 유지하는 세포를 지칭한다. 다능성 세포는 줄기 세포 및 다능성 선조체 세포를 포함한다. 다능성 세포의 예는 중간엽 줄기 세포, 배아 줄기 세포, 신경 줄기 세포, 내피 전구 세포, 지방-유래 줄기 세포, 혈관 주위 세포 및 태줄 줄기 세포를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 본원에 기재된 방법에 따른 멸균 또는 보존 후, 다능성 세포는 성장, 증식 또는 분화 능력을 상실할 수 있는 것으로 이해된다. 용어 "다능성 세포 제제" 및 "MCP"는 자연 상태에서 발견된 공중 물질의 적어도 일부로부터 단리되고 효소적으로, 화학적으로, 물리적으로 또는 조사에 의해 이에 포함된 세포를 공급원 조직에서 그들의 상태로부터 변경시키거나 이들의 농도를 증가시키는 다능성 세포를 지칭한다.
- [0049] 본원에 사용된 바와 같이, "mVASC®"은 제조원 (Microvascular Tissues, Inc.)에 의해 공급된 다능성 세포 제제 제품을 지칭한다. mVASC®는 멸균된, 상용 기성품 (off-the-shelf) 인간 동종이식 미세혈관 조직이다.
- [0050] 용어 "자가 이식 (autologous transfer)", "자가 이식 (autologous transplantation)" 등은 조직 공여자가 또한 조직으로부터 생성된 조성물의 수용자인 치료를 지칭한다.
- [0051] 용어 "동종이계 이식 (allogeneic transfer)", "동종이계 이식 (allogeneic transplantation)" 등은 조직 공여자가 조직으로부터 생성된 조성물의 수용자와 동일한 종 기원이지만 동일한 개체가 아닌 처리를 지칭한다.
- [0052] 용어 "이종이계 이식 (xenogeneic transfer)", "이종이계 이식 (xenogeneic transplantation)" 등은 조직 공여자가 조직으로부터 생성된 조성물의 수용자 이외의 상이한 종 기원의 처리를 지칭한다.
- [0053] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "농축된"은 다능성 세포와 같은 표적의 혼합물에서 농도 또는 빈도를 증가시키는 과정을 지칭한다. 이것은 다능성 세포로부터 외인성 세포, 조직 또는 유체를 제거하고/하거나 이들을 세포 배양물에서 확장시킴으로써 달성될 수 있다.
- [0054] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "치료제"는 신경 손상, 예를 들어, 말초 신경병증의 치료를 위해 의도된 조성물을 지칭하고 이들은 약물, 생물학제, 조직 및/또는 세포를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 치료제는 MCP 또는 하나 이상의 약물, 생물학제, 조직 및/또는 세포와 조합된 MCP이다. 조성물은 또한 안정화제, 유화제, 접착제 및 다른 약제학적 제형을 함유할 수 있다.
- [0055] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "성장 인자"는 세포 성장, 증식, 치유 및 세포 분화를 자극할 수 있는 자연 발생 물질을 지칭한다. 일반적으로, 이것은 단백질 또는 스테로이드 호르몬이다. 성장 인자는 다양한 세포 과정을 조절하는데 중요하다. 성장 인자는 전형적으로 세포 간의 신호전달 분자로서 작용한다. 예는 이들의 표적 세포의 표면 상에 특이적 수용체에 결합하는 사이토카인 및 호르몬이다. 이들은 종종 성장 인자들 간에 다양한 세포 분화 및 성숙화를 촉진시킨다.
- [0056] 본원에 사용된 바와 같이, "뇌-유래 신경영양 인자" 또는 "BDNF"는 정규 신경 성장 인자와 관련된, 뉴로트로핀 계열의 성장 인자의 구성원이다. 신경영양 인자들은 뇌 및 말초에서 발견된다.
- [0057] 본원에 사용된 바와 같이, FGF2 또는 FGF- β 로도 알려져 있는 "기본 섬유아세포 성장 인자" 또는 "bFGF"는 섬유아세포 성장 인자 계열의 구성원이다. bFGF는 혈관형성을 매개하고, 인간 배아 줄기 세포 배양 배지의 중요한 성분이고; 성장 인자는 세포가 미분화된 상태로 유지되는데 필요하다.
- [0058] 본원에 사용된 바와 같이, "간세포암-유래 성장 인자" 또는 "HGDF"는 증식, 혈관형성 및 신경영양 활성을 나타내고, 기관 발달에 관여할 것으로 시사된 단백질을 지칭한다. 이것은 고이동성 군 단백질 1-유사 2 (HMG-1L2)로도 알려져 있다.
- [0059] 본원에 사용된 바와 같이, "형질전환 성장 인자 베타 1" 또는 "TGF- β 1"은 사이토카인의 형질전환 성장 인자 베타 슈퍼패밀리의 폴리펩타이드 구성원이다. 이것은 세포 성장, 세포 증식, 세포 분화 및 아포토시스의 조절을 포함한 많은 세포 기능을 수행하는 분비된 단백질이다.
- [0060] "약제학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제"는 제한 없이 임의의 보조제, 담체, 부형제, 활탁제, 감미제, 희석제, 보존제, 염료/착색제, 향 증진제, 계면활성제, 습윤제, 분산제, 현탁제, 안정화제, 등장화제, 용매 또는 유화제를 포함하고 이는 미국 식품 의약국에 의해 인간 또는 가축에 사용하기에 허용 가능한 것으로 승인되었다.

- [0061] "약제학적 조성물"은 포유동물, 예를 들어 인간에게 치료제를 전달하기 위해 본 발명의 조성물 및 당업계에서 일반적으로 허용되는 배지의 제형을 지칭한다. 따라서, 그러한 배지는 임의의 약제학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제를 포함한다.
- [0062] 일 양상에서, 본원 개시내용은 이를 필요로 하는 대상체에서 말초 신경병증을 치료하거나, 예방하거나, 개선시키거나, 감소시키는 방법을 제공하고, 상기 방법은 치료제를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하고, 여기서, 상기 대상체는 환부 영역에서 적어도 하나의 손상된 신경을 갖고, 여기서, 상기 투여 단계는 상기 조성물을 환부 영역에 국소적으로 투여함을 포함한다.
- [0063] 또 다른 양상에서, 본원 개시내용은 이를 필요로 하는 대상체에서 말초 신경병증을 치료하거나, 예방하거나, 개선시키거나, 감소시키기 위하여, 치료제를 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0064] 또 다른 양상에서, 본원 개시내용은 이를 필요로 하는 대상체에서 말초 신경병증을 치료하거나, 예방하거나, 개선시키거나, 감소시키는 방법을 제공하고, 상기 방법은 치료제를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하고, 여기서, 상기 대상체는 환부 영역에서 적어도 하나의 상처를 갖고, 여기서, 상기 투여 단계는 상기 조성물을 환부 영역에서의 상처에 국소적으로 투여함을 포함한다.
- [0065] 일부 구현예에서, 치료제는 밀리미터 당 적어도 약 1000개의 CFU-F 세포, 적어도 약 1000개의 CFU-F 세포의 함량, 적어도 약 10^5 개의 CD90 양성 세포, 적어도 약 10^5 개의 CD90 양성 세포의 함량, 적어도 약 10 피코그램 (pg)의 HDGF, 적어도 약 10 pg의 bFGF, 적어도 약 10 pg의 BDNF, 전체적으로 적어도 약 10 pg의 bFGF 및 BDNF, 및 최대 약 10 pg의 TGF- β 1로부터 선택되는 하나 이상의 세포 또는 단백질을 포함한다.
- [0066] 일부 구현예에서, 대상체는 당뇨병을 앓고 있거나, 말초 신경병증은 당뇨병성 신경병증을 포함한다.
- [0067] 일부 구현예에서, 대상체는 하나 이상의 당뇨병성 족부 궤양 (DFU)을 갖는다.
- [0068] 일부 구현예에서, 투여 단계는 조성물을 3개월에 적어도 2회 대상체에게 국소적으로 투여함을 포함한다.
- [0069] 일부 구현예에서, 투여 단계는 조성물을 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20일 마다 대상체에게 국소적으로 투여함을 포함한다.
- [0070] 일부 구현예에서, 환부 영역은 상처, 임의로 궤양을 포함한다.
- [0071] 일부 구현예에서, 치료제는 처리된 미세혈관 조직, 중간엽 줄기 세포 (MSC) 제제, 지방 조직으로부터의 기질 혈관 분획 (SVF), 골수 세포 제제 및 탯줄 줄기 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 다능성 세포 제제 (MCP)를 포함한다.
- [0072] 일부 구현예에서, 치료제는 처리된 미세혈관 조직, 임의로 mVASC®을 포함한다.
- [0073] 일부 구현예에서, 처리된 미세혈관 조직은 인간 지방 조직으로부터 유래한다.
- [0074] 일부 구현예에서, 처리된 미세혈관 조직은 콜라게나제 처리, 중성 프로테아제 처리, 세포 용해, 임의로 염화암모늄 세포 용해, 건조, 임의로 냉동-건조 (freeze-drying), 공기 건조 또는 동결건조 (lyophilization), 동결, 임의로 냉동-건조 또는 급속 동결, 및 조사, 임의로 감마 조사 또는 전자-빔 조사로부터 선택되는 하나 이상의 처리로 처리된다.
- [0075] 일부 구현예에서, 조성물은 국소 투여를 위해 제형화된다.
- [0076] 일부 구현예에서, 조성물은 분말, 으깬 수 있는 케이크, 필름, 젤, 연고, 현탁제, 에멀전, 농축물, 코아세르베이트, 스캐폴드, 흡습성 분말, 또는 상처 드레싱 또는 커버링을 포함한다.
- [0077] 일부 구현예에서, 조성물의 대상체로의 투여는 조성물의 환부 영역으로의 부착을 유도한다.
- [0078] 일부 구현예에서, 방법은 개선된 신경 감각, 조직 치유, 상처 봉합, 궤양 치유, 상처 재발의 예방, 증가된 유연성 또는 감소된 통증 중 하나 이상을 초래한다.
- [0079] 일부 구현예에서, 방법은 궤양의 치유를 개선시키거나, 영역에서 신경 감각을 개선시키거나, 영역에서 새로운 궤양의 재발율을 감소시킨다.
- [0080] 일부 구현예에서, 환부 영역은 5, 10, 15, 30 cm의 손상된 신경 내에 있다.
- [0081] 치료제 조성물

[0082] 본원 개시내용은 신경병증과 같은 신경 손상을 치료하고/하거나 예방하기 위한 치료제를 제공한다.

[0083] 다능성 세포의 많은 잠재적 공급원이 있다. 표 1은 공급원 조직 내 원하는 세포의 빈도와 함께 많은 통상적인 공급원을 열거한다.

표 1

다양한 조직 내 줄기 세포의 빈도

공급원	기재사항	핵화된 세포/gm 공급원	마커	# 마커 양성 세포/gm	CFU- F/그램
혈액	성인	NR	CD34	110	NR
	성인	$\sim 1 \times 10^6$	NR	NR	1
	태아	$\sim 1 \times 10^6$		NR	8 내지 9
양수	10 wk	4000	CD117	36	4
	만삭	7,300	CD117	22	1
양막	48 wk, 만삭	400,000	TRA1-60	4,000	NR
태반	만삭, 15 g 샘플	NR	NR	NR	20-33
탯줄	36wk, 만삭	$\sim 1 \times 10^6$	NR	NR	800
골수	29 공여자	8,600,000	NR	NR	666
	40 공여자	16,600,000	NR	NR	898
	6 공여자	55,000,000	NR	NR	1980
	6 공여자	27,000,000	CD34	5,500	NR
지방	66 공여자	350,000	NR	NR	7,000
	8 공여자	NR	CD34	300,000	NR
	18 공여자	400,000	NR	NR	NR
	5 공여자/4 장비	100,000 내지 500,000	NR	NR	4,000

[0084]

[0085] 다능성 세포는 이들의 본래의 조직의 나머지와 함께 빈번하게 사용되고, 때로는 이들은 조직으로부터 단리되고, 수회 이들을 배양하여 그들의 수를 확장시킨다. 다양한 조직으로부터 다능성 세포의 제조 방법은 당업계에서 공지되어 있다. 전형적으로, 중간엽 줄기 세포 (MSC)를 성장시키기 위한 프로토콜을 사용하여 다능성 세포의 수를 확장시킨다.

[0086] 다능성 세포 제품, 혈소판 풍부 혈장 (PRP) 또는 골수 흡인 농축물 (BMAC)을 사용하여 상처 베드로 또는 상처 주변에 주사함으로써 DFU를 치료하거나 피브린 글루를 적용하여 세포를 부위에 고정시켰다. 그러한 치료는 상처 치유를 개선시키는 것으로 보고되었다. PRP 및 BMAC의 그러한 적용은 신경병증에 어떠한 영향도 나타내지 않았다.

[0087] 다능성 세포는 손상된 신경에 인접한 조직에 주사되거나 신경병증에 대한 치료로서 전신으로 제공되었다. 신경 손상이 외과적으로 치료받는 경우, 다능성 세포는 신경의 회복을 돕기 위해 사용되는 신경 도관에 포함되었다. 그러한 치료를 사용한 성공이 일부 보고가 있지만 당뇨병성 신경병증 환자에서는 그렇지 않았다.

[0088] 냉동-건조된 및 멸균된 다능성 세포는 치료적 이득을 유지하거나 심지어 증진시킨다. 이러한 유형의 다능성 세포를 제조하기 위한 관련 방법은 미국 특허 출원 제15/633,311호; 미국 특허 출원 제14/429,511호; 및 국제 특허 출원 제PCT/US2013/060181호에 제공된다. 일부 경우에, 그러한 다능성 세포는 1) 실온에서 저장되는 경우

수년 동안 안정하고, 2) 1분 이내 사용 준비가 되고, 3) 동종이계 또는 심지어 이종이계 수용자에서 효과적이고, 4) 질환 전과 위험을 제공하지 않고, 5) 세포의 부적절한 분화 또는 확장 위험을 제공하지 않는다.

[0089]

본원 개시내용은 다능성 세포 체제를 사용한 놀라운 결과를 제공한다. 본 발명자들은 신경 손상 치료를 위한 다능성 세포의 국소 적용으로 예상치 않은 성공을 입증하였다. 일부 구현예에서, 본원 개시내용은 대용량의 다능성 세포를 손상된 신경 (예를 들어, 당뇨병성 상처)에 의해 영향을 받는 영역으로 국소적으로 적용하는 것과 관련된 방법을 제공한다. 본 발명자는 DFU의 치유에서 현저한 개선 및 놀랍게도 치료된 사지에서 말초 신경병증의 실질적 역전을 관찰하였다.

[0090]

다능성 세포의 용량을 결정하기 위한 다양한 방법이 본원 개시내용에 의해 제공된다. 일부 구현예에서, 본원 개시내용의 다능성 세포는 CD34+, CD90+, CD117+, 또는 CD271+인 대용량의 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 본원 개시내용의 다능성 세포는 마커 CD34, CD90, CD117, CD271, 또는 당업계에 공지된 줄기 세포에 대한 다른 마커를 사용하여 대용량의 이중, 삼중 또는 사중 양성 세포를 포함한다. 본 발명자들은 일부 경우에 이러한 방법을 사용하여 세포를 정량하는 것이 줄기 세포의 수를 과대 평가함을 관찰하였다. 따라서, 일부 구현예에서, 본원 개시내용의 방법은 형성된 섬유아세포 유사 콜로니 (CFU-F)의 수를 계수함으로써 제한 회석 검정에서 다능성 세포 체제 중 줄기 세포를 정량하는 단계를 포함한다. 그러나, 본 발명자들은 일부 경우에 이 CFU-F 방법이 일부가 배양 조건에서 성장할 수 없기 때문에 줄기 세포의 수를 과소 평가함을 관찰한다. 따라서, 일부 구현예에서, 방법은 CFU-F에 대한 그리고 CD90+ 세포에 대한 다능성 세포 체제를 검정하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 본원 개시내용의 조성물은 처리된 상처의 평방 cm당 적어도 1000개의 CFU-F 또는 10^5 개의 CD90⁺ 세포를 포함한다.

[0091]

본 발명자들이 이러한 처리된 상처의 평방 cm 당 1000개 초과 CFU-F 또는 10^5 개의 CD90⁺ 세포로 DFU에 이식된 다능성 세포를 적용하는 경우, 상기 처리된 사지에서 상처 치유의 극적인 개선 및 말초 신경병증에서의 역전이 관찰되었다. 치유 및 신경병증에서 최대 개선은 처리된 다능성 세포가 DFU에 직접 국소적으로 적용되는 경우 나타났다. 다른 경우에, 처리된 다능성 세포가 국소적으로 주사되는 경우 개선된다.

[0092]

일부 구현예에서, 치료제는 처리된 미세혈관 조직, 다능성 세포, 다능성 세포 체제 (MCP) 및 다른 성분, 예컨대, 제한 없이 사이토카인 및 성장 인자 중 하나 이상을 포함한다. 일부 구현예에서, 본원 개시내용의 조성물은 온전한 세포막을 갖는 다능성 세포 ("온전한 다능성 세포")를 포함한다. 일부 구현예에서, 본원 개시내용의 조성물은 온전한 다능성 세포를 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, 본원 개시내용의 조성물은 다능성 세포를 포함하고, 여기서, 다능성 세포의 최대 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 또는 약 70%는 온전한 세포막을 갖는다. 일부 구현예에서, 본원 개시내용의 조성물은 다능성 세포를 포함하고, 여기서, 다능성 세포의 최대 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 또는 약 70%는 생존성, 즉 "생존 다능성 세포"이다. 본원 개시내용의 조성물은 온전한 다능성 세포를 포함하거나 포함하지 않을 수 있다. 특정 구현예에서, 본원 개시내용의 조성물은 임의의 온전한 다능성 세포를 포함하지 않거나, 임의의 생존 다능성 세포를 포함하지 않거나, 임의의 생존 세포를 포함하지 않는다. 특정 구현예에서, 본원 개시내용의 조성물은 다능성 세포의 단편 또는 세포막을 포함한다. 본원 개시내용의 조성물은 생존 및/또는 죽은 다능성 세포를 포함할 수 있다.

[0093]

본원 개시내용의 조성물은 임의의 포유동물 조직, 예를 들어, 포유동물, 예컨대 인간, 비인간 영장류, 개, 고양이 또는 말로부터 수득된 조직으로부터 제조될 수 있다. 본원 개시내용의 조성물을 사용하여 자가, 동종이계 또는 이종이계 대상체를 치료할 수 있다. 따라서, 체제, 세포 또는 조직은 치료될 대상체로부터 또는 치료될 대상체 (예를 들어, 대상체가 인간인 경우, 공여자는 비인간 동물, 예를 들어, 영장류일 수 있다)와 동일하거나 상이한 종일 수 있는 상이한 공여자 대상체 (예를 들어, 인간 또는 다른 동물)로부터 수득될 수 있다. 특정 구현예에서, 체제, 세포 또는 조직은 치료될 대상체와 동일한 종의 동종이계 공여자, 예를 들어, 인간 또는 비인간 포유동물 공여자로부터 수득된다. 특정 구현예에서, 공여자 동물은 건강한 공여자이다. 일부 구현예에서, 조성물은 공급원 조직에서 관찰된 것 초과 농도에서 하나 이상의 성장 인자를 포함한다. 일부 구현예에서, 성장 인자는 조성물의 다른 성분과 동일한 공급원 조직으로부터 유래되지만 처리 (즉, 성장 인자는 공급원 조직에 내인성이다)에 의해 농축된다. 일부 구현예에서, 성장 인자는 외인성, 즉, 공급원 이슈 이외의 공급원으로부터 유래된다. 성장 인자는 상업적 공급원으로부터 수득될 수 있거나, 재조합적으로 제조될 수 있거나 (예를 들어, 세균, 곤충-세포, 또는 포유동물 발현 시스템에서), 천연 공급원 (예를 들어, 공여자)으로부터 단리될 수 있다. 조성물 중에 성장 인자 또는 다른 생물학제는 조직으로부터 단리될 수 있거나, 배양물 중에서 성장한 세포 또는 미생물로부터 수거될 수 있다.

- [0094] 다양한 구현예에서, 미세혈관 조직 조성물 또는 다능성 세포는 임의의 다수의 상이한 조직으로부터 제조된다. 특정 구현예에서, 조직은 비-배아 조직이다. 예를 들어, 특정 구현예에서, 본원 개시내용의 조성물을 제조하기 위해 사용되는 조직은 혈관 조직 또는 미세혈관 조직, 예컨대 지방 조직, 피부, 골, 힘줄 조직, 분만 후 조직, 골수 또는 근육 조직이다.
- [0095] 특정 구현예에서, 본원 개시내용의 조성물은 하나 이상의 다능성 세포, 분화 세포, 세포의 매트릭스의 성분, 성장 인자, 혈관형성제, 항염증 제제, 사이토카인, 케모카인, 성장 인자 및/또는 분화 제제를 포함한다. 세포의 매트릭스 성분은 세포의 매트릭스 단백질, 예컨대 다양한 콜라겐, 피브로넥틴, 비트로넥틴 및 트롬보스폰딘 및 본원에 기재된 다른 것들을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.
- [0096] 다양한 구현예에서, 조성물의 저장 수명은 하나 이상의 생물학적 활성을 유지하면서 실온에서 적어도 약 1주, 적어도 약 1개월, 적어도 약 2개월, 적어도 약 6개월 이상이다. 특정 구현예에서, 조성물은 적어도 약 1개월, 적어도 약 2개월, 적어도 약 4개월, 적어도 약 6개월 또는 적어도 약 1년 동안 대략 4℃에서 저장되는 경우, 측정 가능한 혈관형성, 항염증 및/또는 조직 치유 활성을 보유한다. 본원에 기재된 조성물의 특정 구현예에서, 조성물은 적어도 약 1개월, 적어도 약 2개월, 적어도 약 4개월, 적어도 약 6개월 또는 적어도 약 1년 동안 대략 -20℃에서 저장되는 경우, 측정 가능한 혈관형성, 항염증 또는 조직 치유 활성을 보유한다. 특정 구현예에서, 측정 가능한 혈관형성, 항염증 또는 조직 치유 활성은, 본원에 기재된 임의의 것들을 포함한 생체내 또는 시험관내 검정에서 측정되는 경우, 저장 전 활성의 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 또는 적어도 약 90%이다.
- [0097] 수득한 조성물을 포함한, 해리된 조직 또는 세포 및 이로부터 분리된 다른 조직 성분들을 임의로 멸균시켜 예를 들어, 세균, 바이러스 및 진균류 또는 프리온과 같은 미생물에 의한 오염을 감소시키거나 제거한다. 특정 구현예에서, 다능성 세포 및/또는 다른 조직 성분을 포함하는 조성물은 조사를 사용하여 멸균시킨다. 방사선, 예컨대 전자 빔, X-선, 감마선 또는 자외선 방사선을 사용하는 멸균 방법이 존재한다. 특정 구현예에서, 멸균은 해리된 조직, 또는 세포 및 이로부터 분리된 다른 조직 성분을 약 0.5 내지 약 5.0 Mrad, 또는 약 1.0 내지 약 3.0 Mrad, 또는 약 1.0 Mrad, 또는 약 1.5 Mrad, 또는 약 2.0 Mrad, 또는 약 2.5 Mrad, 또는 약 3.0 Mrad, 또는 약 3.5 Mrad, 또는 약 4.0 Mrad, 또는 약 4.5 Mrad, 또는 약 5.0 Mrad (또는 이들 값 사이의 임의의 양의 감마 방사선) 범위의 용량으로 감마 방사선에 노출시킴으로써 수행된다. 특정 구현예에서, 멸균은 해리된 조직, 또는 세포 및 이로부터 분리된 다른 조직 성분을 약 0.5 내지 약 5.0 Mrad, 또는 약 1.0 내지 약 3.0 Mrad, 또는 약 1.0 Mrad, 또는 약 1.5 Mrad, 또는 약 2.0 Mrad, 또는 약 2.5 Mrad, 또는 약 3.0 Mrad, 또는 약 3.5 Mrad, 또는 약 4.0 Mrad, 또는 약 4.5 Mrad, 또는 약 5.0 Mrad (또는 이들 값 사이의 임의의 양의 전자 빔) 범위의 용량으로 전자 빔 방사선에 노출시킴으로써 수행한다. 공급원에 의해 생성된 방사선의 양 보다, 조성물이 노출된 방사선 양을 측정하는 것이 종종 더 용이하다. 특정 구현예에서, 멸균을 위한 E-빔 또는 감마 조사 수준은 약 9 kGy 내지 약 50 kGy, 또는 약 9 kGy 내지 약 20 kGy, 또는 약 20 k 내지 약 30 kGy, 또는 약 30 kGy 내지 약 40 kGy (또는 이들 값 사이의 임의의 양의 방사선)이다. 일부 구현예에서, 멸균을 위한 E-빔 또는 감마 방사선 수준은 약 9 kGy 내지 약 17 kGy이다. 일부 구현예에서, 조성물은 멸균 조사에 의해 처리된 MCP를 포함한다. 일부 구현예에서, 조성물은 멸균 조사에 의해 처리된 미세혈관 조직을 포함한다.
- [0098] 추가로, 해리된 조직 또는 세포 및 이로부터 분리된 다른 조직 성분은 바이러스를 불활성화하기 위해 처리될 수 있다. 바이러스를 불활성화시키는 방법은 멸균에 대해 상기된 바와 같이 조사의 사용을 포함하여 당업계에 공지되어 있다. 산 또는 염기 처리, 표백, 알데하이드 또는 에틸렌 옥사이드 용액 또는 가열을 포함하는 바이러스를 불활성화시키는 다른 방법이 사용될 수 있다. 조성물을 동결건조시키거나 동결시키기 위해 사용되는 동결 보호제 및 다른 부형제가 또한 방사선으로부터 보호할 수 있는 것으로 이해된다. 예를 들어, 당 및 알부민 (또는 다른 안정화 단백질)은 낮은 온도와 함께 세포에 대한 방사선 손상으로부터 보호한다. 따라서, 특정 구현예에서, 멸균 또는 바이러스 불활성화는 동결건조 후 수행된다.
- [0099] 특정 구현예에서, 본원 개시내용의 조성물 중에 존재하는 세포의 약 50% 미만, 약 40% 미만, 약 30% 미만, 약 20% 미만, 약 10% 미만, 또는 약 5% 미만이 생존 가능하다. 여러 구현예에서, 실질적으로 모든 세포는 생존 가능하지 않다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "생존 가능한"은 이의 통상적인 의미로 주어져야 하고, 또한 예를 들어, 본원에 기재된 바와 같이 처리되지 않는 경우, 적절한 조건, 예를 들어, 동일한 세포 또는 동일한 유형의 세포가 증식할 것으로 예상되는 조건하에 배양되는 경우, 증식할 수 있는 세포를 지칭한다. 다른 구현예에서, 상기 조성물 중에 존재하는 세포의 약 2% 미만 또는 약 1% 미만이 생존 가능하다. 특정 구현예에서, 조성물에 존재하는 세포가 존재하지 않거나 또는 실질적으로 존재하지 않는다. 따라서, 용어 "비-생존 가능한"은, 예를 들어, 본원에 기재된 바와 같이 처리되지 않는 경우, 적절한 조건, 예를 들어, 동일한 세포가

증식할 것으로 예상되는 조건하에 배양되는 경우, 세포가 증식할 수 없음을 의미한다.

[0100] 본원 개시내용에 따르면, 본원에 기재된 조성물 내의 세포가 생존할 수 없고 대상체에 이식된 후 장기 지속할 수 없더라도, 조성물은 개선된 치유, 감소된 염증 또는 증가된 혈관형성을 유도하는, 대상체에서 일련의 반응을 촉발하는 것으로 이해된다. 본원 개시내용에 기재된 다능성 세포 제제 (MCP) 및 처리된 미세혈관 조직 조성물은 예를 들어, 신경 손상, 예컨대 말초 신경 조직과 같은 손상된 또는 환부 조직의 치유를 촉진시키거나 유도하기 위해 생존 가능한 또는 전체 줄기 세포를 유도할 필요는 없다. 추가로, 본원 개시내용의 조성물은 조성물을 제조하기 위해 사용되는 조직 샘플 내에 존재하거나 이와 결합되어 있는, 해리된 조직, 세포, 예컨대 다능성 세포 (예를 들어, 줄기 세포), 세포 막, 세포의 매트릭스 성분 및 다양한 성장 인자, 혈관형성 인자, 항염증 제제, 사이토카인, 분화제 등을 포함하는, 처리된 조직 및 이의 다양한 성분들을 포함할 수 있다. 조성물은 또한 다른 공급원으로부터 수득된 성분들로부터 제조될 수 있다.

[0101] 일부 구현예에서, 본원 개시내용의 방법에 의해 투여되는 조성물은 생존 다능성 세포, 약물 및/또는 생물학적 인자, 예컨대 성장 인자, 혈관형성제, 항염증 제제, 사이토카인 또는 분화제를 포함할 수 있다. 예를 들어, 성장 인자 또는 혈관형성제는 기본 섬유아세포 성장 인자, 다른 섬유아세포 성장 인자, 골 형태발생 단백질, 간세포 성장 인자, 각질세포 성장 인자, 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자, 혈소판-유래 성장 인자, 형질전환 성장 인자 $\beta 1$ 및/또는 $\beta 3$, 또는 혈관 내피 세포 성장 인자로부터 선택될 수 있다. 본원 개시내용의 조성물에 내인성으로 외인성으로 첨가된 추가의 치료제는 표 2에 열거된 임의의 것들을 포함한다. 본원 개시내용의 일 구현예에서, 치료제 조성물은 bFGF, BDNF, TGF- $\beta 1$, HDGF, 또는 이들의 조합을 포함한다.

표 2

주가의 치료제의 예시적 및 비제한적 목록

인자	활성
IL-1a	염증성 사이토카인
IL-1ra	염증성 억제제
HGF	혈관형성
HDGF	혈관형성, 신경발생
MMP-1	매트릭스 메탈로프로테이나제
MMP-3	매트릭스 메탈로프로테이나제
BDNF	신경발생
GDNF	신경발생
CNTF	신경발생
G-CSF	조혈, 염증
GM-CSF	조혈, 염증
OPG	
PLGF	혈관형성
ANG	혈관형성
ANGPT-2	혈관형성
MCP-1	세포 이동
SDF-1 α	세포 이동
PGE ₂	
ICAM	세포 이동
VCAM	세포 이동
PECAM	세포 이동
c-myc	
EGF	세포 증식
INF- α	염증
VEGF	혈관형성, 신경발생
PDGF	세포 증식, 혈관형성
FGF-1	세포 증식
BMP-2	골 형성
BMP-4	골 형성
BMP-13	골 및 연골
IL-4	염증
IL-6	염증
IL-8	염증
IL-10	염증
NGF	신경발생
MIP-1 α	세포 이동
MIP-1 β	세포 이동
OPN	골 형성

[0102]

[0103]

일부 구현예에서, 치료제는 신경 성장 인자 (NGF), 신경교 세포주 유래 신경영양 인자 (GDNF), J147, 커큐민, 및 인슐린-유사 성장 인자 1 (IGF-1) 또는 이들의 유도체로 이루어진 군으로부터 선택된다.

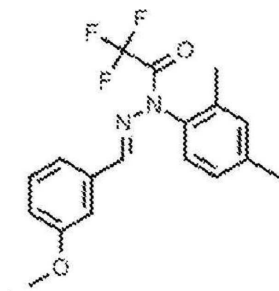
[0104]

본원에 사용된 바와 같이, "NGF"는 특정 표적 뉴런의 성장, 유지, 증식 및 생존의 조절에 주로 관여하는 신경영양 인자 및 신경펩타이드를 지칭한다. NGF는 처음에, proNGF로 불리는 3개의 단백질 (α -NGF, β -NGF, 및 γ -NGF)의 130-kDa 복합체에서 발현된다. 이 복합체의 감마 서브유닛은 세린 프로테아제로서 작용하여 베타 서브유닛의 N-말단을 절단하여, 단백질을 기능성 NFG로 활성화시킨다. 구현예에서, 치료제는 proNGF 또는 NGF이다.

[0105]

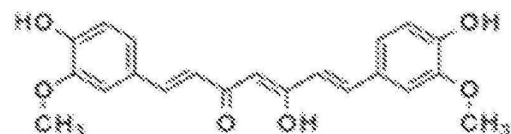
본원에 사용된 바와 같이, "GDNF"는 인간에서 *GDNF* 유전자에 의해 암호화된 단백질을 지칭한다. GDNF는 많은 유형의 뉴런의 생존을 강력하게 촉진시키는 소형 단백질이다. 이것은 GFR α 수용체, 특히 GFR $\alpha 1$ 을 통해 신호 전달한다.

[0106] J147은 가속화된 노화의 마우스 모델에서 알츠하이머 질환 및 노화 둘 다에 대해 보고된 효과를 갖는 실험 약물이다. J147은 하기 화학적 구조를 갖는다:



[0107]

[0108] 커큐민은 일부 식물에 의해 생성된 담황색 화합물이다. 이것은 강황의 주요 쿠르쿠미노이드이다. 커큐민은 하기 화학적 구조를 갖는다:



[0109]

[0110] 커큐민 및 이의 유도체는 알츠하이머 질환 (AD) 및 파킨슨 질환 (PD) 및 악성종양을 포함하는 신경변성 질환을 위한 치료제로서 제안되어 왔다. (Lee et al. *Curr Neuropharmacol*. 2013 Jul; 11(4): 338-378).

[0111]

본원에 사용된 바와 같이, "IGF-1"은 인간에서 *IGF1* 유전자에 의해 암호화된 단백질을 지칭한다. IGF-1은 분자 구조에서 인슐린과 유사한 호르몬이다. IGF-1은 적어도 2개의 세포 표면 수용체 티로신 키나제: IGF-1 수용체 (IGF1R) 및 인슐린 수용체에 결합한다. IGF-1은 AKT 신호전달 경로의 가장 강력한 천연 활성화인자, 세포 성장 및 증식의 자극인자, 및 프로그램화된 세포사의 강력한 억제인자 중 하나이다.

[0112]

일부 구현예에서 본원 개시내용의 조성물은 손상된 또는 환부 조직의 치유를 촉진시킨다. 일부 구현예에서, 본원 개시내용의 조성물은 조직 치유 활성을 갖는다. 본원에 사용된 바와 같이, 조성물의 "조직 치유 활성"은 유사하게 처리되었지만 조성물에 노출되지 않은 유사 조직과 비교하거나, 하나 이상의 치료제 (예컨대, MCP 또는 처리된 미세혈관 조직)가 없는 시험 조성물과 동일하거나 유사한 성분을 포함하는 대조군 조성물 (또는 "비히클")과 비교하여, 조성물에 노출된 손상된 또는 환부 조직 (예를 들어, 말초 신경 손상)의 개선된 치유 (예를 들어, 회복 또는 재생)를 촉진시키는 조성물의 능력이다. 개선된 치유는 치유 완료까지의 시간, 생성된 새로운 조직의 양, 생성된 치유된 조직의 강도 또는 생성된 치유된 조직의 기능성을 포함하지만 이에 제한되지 않는 임의의 적절한 수단을 사용하여 측정된다. 적절한 조치의 예는 사지 감각의 획득 또는 개선 또는 당뇨병성 궤양의 상처 회복을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 특정 구현예에서, 본원 개시내용의 조성물은 하나 이상의 생물학적 활성을 갖는다. 예를 들어, 특정 구현예에서, 조성물은 항염증 또는 혈관형성 활성을 갖는다. 특정 관련 구현예에서, 조성물은 혈관 형성 또는 조직 치유를 촉진시킨다. 이들 효과의 조합은 여러 구현예에서 달성된다.

[0113]

특정 구현예에서, 본원 개시내용의 조성물은 항염증 활성을 갖는다. 특정 구현예에서, 본원 개시내용의 조성물에 노출되거나 이와 접촉된 손상된 또는 환부 조직 (예를 들어, 염증 반응을 진행하는 손상된 또는 환부 조직)은 손상 또는 환부 조직이 유사하게 처리되었지만 본원 개시내용의 조성물에 노출되지 않거나 이와 접촉되지 않은 경우와 비교하여 감소된 염증을 나타낸다. 특정 구현예에서, 본원 개시내용의 조성물에 노출되거나 이와 접촉된 조직에서 염증의 양은 손상된 또는 환부 조직이 본원 개시내용의 조성물에 노출되거나 이와 접촉되지 않은 경우의 염증의 양과 비교하여 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 또는 적어도 약 90% 감소된다. 염증은, 예를 들어, 조직학적으로 관찰된 경우 환부 조직에서 관찰된 림프구의 수를 포함하지만 이에 제한되지 않는 당업계에서 가용한 임의의 수단에 의해 측정될 수 있다.

[0114]

특정 구현예에서, 본원 개시내용의 조성물은 시험관내 검정에서 측정될 수 있는 항염증 활성을 갖는다. 특정 구현예에서, 본원 개시내용의 조성물의 존재하에 시험관내 검정에서 측정된 염증의 양은 본원 개시내용의 조성물의 부재하에 또는 대조군 조성물의 존재하에 동일한 검정에서 측정되는 염증의 양의 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 또는

적어도 약 90% 미만이다. 특정 구현예에서, 시험관내 검정은 혼합된 림프구 반응이다.

[0115] 특정 구현예에서, 본원 개시내용의 조성물은 혈관형성 활성을 갖는다. 특정 구현예에서, 본원 개시내용의 조성물에 노출되거나 이와 접촉된 손상된 또는 환부 조직 (예를 들어, 염증 반응을 진행하는 손상 또는 환부 조직)은 손상 또는 환부 조직이 유사하게 처리되었지만 본원 개시내용의 조성물에 노출되지 않거나 이와 접촉되지 않은 경우와 비교하여 증가된 혈관형성을 나타낸다. 특정 구현예에서, 본원 개시내용의 조성물에 노출되거나 이와 접촉된 조직에서 혈관형성의 양은 손상된 또는 환부 조직이 본원 개시내용의 조성물에 노출되지 않거나 이와 접촉되지 않은 경우의 혈관형성의 양과 비교하여 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 100%, 적어도 약 150%, 적어도 약 200%, 적어도 약 300%, 적어도 약 400% 또는 적어도 약 500% 증가한다. 혈관형성은 예를 들어, 뒷다리 허혈 모델을 포함하지만 이에 제한되지 않는 당업계에서 가용한 임의의 수단에 의해 측정될 수 있다.

[0116] 특정 구현예에서, 본원 개시내용의 조성물은 생체내 또는 시험관내 검정에서 측정될 수 있는 혈관형성 활성을 갖는다. 특정 구현예에서, 본원 개시내용의 조성물의 존재하에 시험관내 혈관형성 검정에서 측정된 활성의 양은 본원 개시내용의 조성물의 부재하에 또는 대조군 조성물의 존재하에 동일한 검정에서 측정되는 활성의 양의 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 100%, 적어도 약 150%, 적어도 약 200%, 적어도 약 300%, 적어도 약 400% 또는 적어도 약 500% 초과이다. 특정 구현예에서, 생체내 검정은 마트리젤 이식 검정이다. 특정 구현예에서, 시험관내 검정은 내피 세포 이동 검정이다. 일부 구현예에서, 시험관내 검정은 튜브 형성 검정, 침윤 검정 또는 노드 검정 (node assay)이다.

[0117] 이를 필요로 하는 대상체에 본 발명의 조성물을 투여하기 위해, 상기 조성물은 약제학적 조성물로서 제형화될 수 있다. 본원 개시내용의 약제학적 조성물은 본원 개시내용의 조성물 및 약제학적으로 허용되는 부형제, 담체 및/또는 희석제를 포함한다. 본 발명의 조성물은 이를 필요로 하는 대상체에서 손상, 질환 또는 장애의 치료 또는 예방에 영향을 미치기에 충분한 양으로, 즉 치료학적 유효량으로 약제학적 조성물에 존재한다.

[0118] 약제학적으로 허용되는 부형제, 담체 및/또는 희석제는 당업자에게 친숙하다. 액체 용액으로서 제형화된 조성물의 경우, 허용되는 담체 및/또는 희석제는 식염수 및 멸균수를 포함하고, 임의로 항산화제, 완충제, 정균제 및 다른 통상의 첨가제를 포함할 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물은 본 발명의 조성물을 적절한 약제학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제와 조합함으로써 제조될 수 있고, 분말, 과립, 용액, 주사제, 흡입제 및 미소구체와 같은 고체, 반고체, 액체 또는 에어로졸 형태의 제제로 제형화될 수 있다. 이들 조성물은 또한 분산제 및 표면 활성제, 결합제 및 윤활제를 함유할 수 있다. 당업자는 적절한 방식으로 그리고 문헌 (Remington's Pharmaceutical Sciences, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA 1990)에 기재된 것들과 같이 허용되는 관행에 따라 본 발명의 조성물을 추가로 제형화할 수 있다. 일부 구현예에서, 조성물은 국소 투여를 위해, 예를 들어, 산제, 크림, 연고 또는 다른 국소 조성물로서 제형화된다.

[0119] 사용 방법

[0120] 본원 개시내용은 추가로, 본원 개시내용의 임의의 조성물 또는 치료제를 사용하여 신경병증과 같은 신경 손상을 치료하거나 예방하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 방법은 하나 이상의 치료제를 포함하는 조성물을 신경 손상을 앓고 있거나 앓을 것으로 의심되는 대상체에게 투여하는 단계 포함한다. 일부 구현예에서, 신경 손상은 말초 신경병증이다. 일부 구현예에서, 신경 손상은 당뇨병성 신경병증이다. 일부 구현예에서, 투여 단계는 조성물을 신경 손상 부위에서 또는 이 부위 근처에서 대상체에게 주사함을 포함한다. 일부 구현예에서, 투여 단계는 조성물을 신경 손상, 말초 신경 손상 또는 말초 신경병증의 영역에 또는 이 영역에서 국소적으로 적용함을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 조성물은 신경병증 영역에서 또는 신경병증에 의해 영향을 받은 영역에서 상처에 국소적으로 적용된다. 일부 구현예에서, 대상체는 DFU를 앓고 있고 조성물은 발에 주사된다. 일부 구현예에서, 대상체는 DFU를 앓고 있고 조성물은 발에 국소적으로 적용된다. 일부 구현예에서, 대상체는 DFU를 앓고 있고 조성물은 MCP 및 임의로 하나 이상의 다른 치료제를 포함하고, 조성물은 발의 궤양에 국소적으로 적용된다.

[0121] 본원 개시내용의 조성물을 투여하는 경로는 제한 없이 국소적으로, 근육내, 정맥내, 동맥내, 복막내, 피하, 경구, 비강, 이식 (transplantation), 주입 (implantation), 주사, 카테터를 통한 전달, 국소, 경피, 흡입, 비경구 및 비강내를 포함한다. 조성물은 매트릭스, 겔 또는 다른 스캐폴드로 투여될 수 있다. 본원에 사용된 "비경구"라는 용어는 피하 주사, 정맥내, 근육내, 흉골내 주사 또는 주입 기술을 포함한다. 추가로, 본 발명의 조

성물은 외과적으로 이식되거나, 주사되거나, 전달 (예를 들어, 카테터 또는 시린지에 의해)될 수 있거나, 달리 회복 또는 증강을 필요로 하는 부위에 직접적으로 또는 간접적으로 투여될 수 있다. 예를 들어, 본원 개시내용의 조성물은 대상체에서 손상 또는 질환 부위로 외과적으로 도입될 수 있거나 이에 인접할 수 있다. 일부 구현예에서, 투여는 정맥내이다. 조성물은 특정 투여 경로를 위해 제형화될 수 있다. 특정 구현예에서, 방법은 외과적으로 조직 회복, 정맥내로 허혈 치료, 관절 공간으로의 주사에 의한 통증 및 염증의 치료, 국소적으로 상처의 치료 및 근육내 주사로 말초 혈관 질환의 치료를 위한 것이다.

[0122] 본원 개시내용은 당뇨병성 족부 궤양과 같은 상처에 대한 국소 투여를 고려한다. 일부 구현예에서, 국소 투여는 동일하거나 유사한 조성물의 동일하거나 유사한 상처로의 주사와 비교하여 개선된 치료 및/또는 상처 치유를 초래한다. 일부 구현예에서, DFU로의 국소 투여는 동일하거나 유사한 조성물의 발로의 주사 보다 양호한 DFU의 치료를 초래한다. 그러나, 본 발명의 조성물이 많은 경로에 의해 투여될 수 있지만, 본 발명의 또 다른 중요한 양상은 신경병증에 의한 환부 영역 내 상처로의 치료제의 국소 전달이 다른 투여 경로 보다 신경병증을 치료하는데 훨씬 효과적이라는 발견이다. 국소 투여는 건강한 신경에 인접하거나 이로부터 원거리에서, 예를 들어, 가장 근접한 건강한 신경으로부터 30 센티미터 떨어져 수행될 수 있다.

[0123] 본원 개시내용의 조성물은 예를 들어, 국소 적용을 위해 하이드로겔 용액에 현탁될 수 있다. 적합한 하이드로겔의 예는 자가-어셈블리 펩타이드, 예컨대 RAD16을 포함한다. 대안적으로, 치료제를 함유하는 하이드로겔 용액은 적용 전 매트릭스를 형성하도록 경화될 수 있다. 하이드로겔은 공유 결합, 이온 결합 또는 수소 결합을 통해 가교결합되어 물 분자를 포획하여 겔을 형성하는 3차원 개방-격자 구조를 생성하는 유기 중합체 (천연 또는 합성)일 수 있다. 하이드로겔을 형성하기 위해 사용될 수 있는 물질의 예는 콜라겐, 히알루로네이트, 다당류, 예컨대, 알기네이트 및 이의 염, 펩타이드, 폴리포스파진 및 폴리아크릴레이트 (이들은 이온적으로 가교결합됨), 블록 중합체, 예컨대 각각 온도 또는 pH에 의해 가교결합되는, 폴리에틸렌 옥사이드-폴리프로필렌 글리콜 블록 공중합체, 또는 코아세르베이트를 포함한다.

[0124] 특정 구현예에서, 조성물은 상처, 예를 들어, 당뇨병성 족부 궤양에 동결건조된 흡습성 분말로서 국소적으로 적용된다. 이어서, 상처는 적절한 상처 드레싱으로 덮을 수 있다.

[0125] 본원 개시내용의 조성물은 또한 상처로의 적용을 촉진시키기 위해 드레싱 또는 스캐폴드에 포함될 수 있다. 조성물은 또한 상처 상에 분무되는 수용액일 수 있다.

[0126] 특정 구현예에서, 본원 개시내용의 조성물은 신경 손상, 예컨대 신경병증을 치료하거나 예방하기 위해 사용된다. 상처는 수술 상처, 피부 병변, 화상, 손상, 이식 상처 (graft wound) 또는 당뇨병성 상처를 포함하지만 이에 제한되지 않는 임의의 다수의 원인에 의한 것일 수 있다. 피부 병변은 정맥 궤양, 당뇨병성 궤양, 욕창, 화상 또는 의원성 이식 상처일 수 있다. 본원 개시내용의 치료제의 치유 활성으로부터 이룰 수 있는 신경병증 또는 다른 신경 손상은, 제한 없이 예를 들어, 당뇨병, 허혈 사건, 열상, 압궐 손상 (crush injury), HIV, 외과적 중재, 방사선 또는 화학치료요법으로부터 초래하는 것들을 포함한다.

[0127] 특정 구현예에서, 본원 개시내용의 조성물은 추가로 예를 들어, 손상 또는 조직 손상 부위에서 혈관형성 또는 재혈관형성을 촉진시키거나 자극하기 위해 사용된다.

[0128] 본원 개시내용의 조성물은 손상 또는 질환을 치료하거나 예방하기 위하여 단독으로 또는 하나 이상의 다른 치료제 또는 절차와 조합하여 사용될 수 있다. 예를 들어, 특정 구현예에서, 손상된 조직으로의 혈액 공급을 풍부하게 하고/하거나, 조직 재생을 촉진시키기 위해, 본원 개시내용의 조성물은 혈소판-풍부 혈장과 조합하여 사용될 수 있다. 하나 이상의 다른 치료제 또는 절차와 조합하여 사용되는 경우, 본원 개시내용의 조성물은 다른 치료제 또는 절차를 사용한 치료 전에, 동시에 또는 중복 기간 동안에 또는 이에 후속하여 제공되거나 사용될 수 있다.

[0129] 또 다른 치료제와 조합하여 사용되는 경우, 본원 개시내용의 조성물은 다른 제제와는 별도로 제공될 수 있거나, 또한 다른 치료제를 함유하는 약제학적 조성물에, 예를 들어, 하나가 본 발명의 조성물인 2개 이상의 치료제를 포함하는 공동-제형에 존재할 수 있다. 특정 구현예에서, 본원 개시내용의 조성물 및 추가의 치료제는 둘 다 동일한 이식체, 매트릭스 또는 스캐폴드와 조합되거나 연합된다.

[0130] 본 발명의 조성물은 치료학적 유효량으로 투여되고, 상기 치료학적 유효량은 사용되는 특정 조성물의 활성; 본 발명의 조성물이 투여되는 대상체의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이; 투여 방식 및 시간; 대상체에서 조성물의 배설, 삼출 또는 분해 속도; 및 치료될 손상, 질환 또는 병태의 유형, 크기 또는 중증도를 포함하지만 이에 제한되지 않는 다양한 인자에 따라 달라질 것이다. 본원 개시내용의 조성물은 일부 구현예에서 달리

비교 가능한 MCP 또는 처리된 미세혈관 조직 조성물에서 발견되는 것 보다 고농도의 특정 인자를 포함한다. 예를 들어, 조성물은 상처 cm^2 당 10^5 개 초과 CD90⁺ 세포 (또는 투여 전 세포막을 파열하기 위해 세포가 추가로 처리되는 경우 그러한 CD90⁺ 세포의 함량)를 전달한다. 특정 구현예에서, 조성물은 cm^2 당 1000개 초과 섬유아세포 콜로니-형성 단위 (CFU-F) (또는 1000개 CFU-F를 갖지만 추가로 처리되는 세포 조성물의 함량)를 전달한다. 여전히 다른 구현예에서, 조성물은 상처 cm^2 당 < 10 pg의 TGF- β_1 과 함께 >10 pg의 bFGF, BDNF 및/또는 HDGF의 전달을 허용한다.

[0131] 본원 개시내용의 방법은 치료제 또는 하나 이상의 치료제를 포함하는 조성물을 1개 또는 2개 이상의 용량으로 투여함으로써 실시될 수 있다. 예를 들어, 특정 구현예에서, 치료제 또는 하나 이상의 치료제를 포함하는 조성물은 일정 기간에 걸쳐 단일 용량, 다중 용량 또는 반복 용량으로서 투여된다. 치료제 또는 하나 이상의 치료제를 포함하는 조성물은 3시간 마다, 매일, 3일 마다, 7일 마다, 10일 마다, 14일 마다, 28일 마다 또는 환자가 요구하는 한 심지어 긴 간격으로 투여될 수 있다.

[0132] 상기 요약되고 아래에 더 상세히 기재된 방법은 수행자에 의해 취해진 특정 동작을 기재하지만 또 다른 당사자에 의한 그러한 동작 지침을 포함할 수 있는 것으로 이해되어야만 한다. 따라서, "미세혈관 조직을 투여하는" 것과 같은 동작은 "미세혈관 조직의 투여를 지시함"을 포함한다".

[0133] 실시예

[0134] 실시예 1: 다능성 세포 제제의 특징 분석

[0135] 이들 실험의 목적은 다능성 세포에 기초한 DFU를 치료하기 위한 간편한 새로운 제품을 개발하고 시험하는 것이었다. 본 발명자들은 평방 cm 당 적어도 1000개의 CFU-F 또는 10^5 개의 CD90⁺ 세포의 용량을 표적으로 하였다. 본 발명자들은 지방을 잘게 으깨어 다지고(mincing) 콜라게나제 및 중성 프로테아제로 분해시키고, 적혈구 세포를 염화암모늄으로 용해시킨 후 인간 지방 조직으로부터 분리된 다능성 세포를 사용하였다.

[0136] 다능성 세포 배치는 인간 지방 조직으로부터 제조되고 바이알링한 다음, 계약 연구소에서 표현형 및 관심 대상의 일부 성장 인자에 대해 특징 분석하였다. 세포 계수 및 표현형은 제조원 (INCELL, Inc.) (San Antonio, TX)에 의해 측정하였고, 성장 인자는 연구소 (AssayGate) (Ijamsville, MD)에서 ELISA에 의해 측정하였다. 표현형 결과는 5.5×10^5 개의 CD90⁺ 세포/바이알을 보여준다.

[0137] 적혈구 세포를 제거하기 위해, 샘플을 염화암모늄 용액에 적용하였다. 제제는 1 ml의 총 용적으로 ELISA에 의해 검정하였고 결과를 아래 표로 작성하였다. HDGF (간세포암 유래 성장 인자)는 연구소 (Proteomics Lab) (Colorado State Univ)에서 정량하였다.

표 3

성장 인자:	정량/바이알
bFGF	558 pg
BDNF	40 pg
TGF- β_1	<6.5 pg
HDGF	24 ng

[0138] 실시예 2: 신경병증을 갖는 사지에서 상처로의 국소 전달

[0140] 실시예 1에서 특징 분석된 바와 같이 다능성 세포의 제제를 동결건조시키고 감마 방사선으로 멸균시켰다. 생성된 케이크는 다공성이고 취성이고 분말로 쉽게 분쇄된다. 분말은 표준 상처 케어 실시 당 괴사조직 제거 및 세정 후 당뇨병성 족부 궤양에 뿌렸다 (국소적으로). 이어서, 상처를 스테리-스트립 (Steri-strip) (3M, St. Paul, MN)과 함께 유지된 폐쇄성 드레싱 (Adaptic Touch™, San Antonio, TX)으로 덮었다. 2명의 환자들에게 다능성 세포 제제를 투여하고 대조군 환자에게는 다능성 세포의 첨가 없이 동일한 치료를 받았다. DFU의 치유

는 다능성 세포 및 트레싱의 재적용 전에 매주 측정하였다. 환자의 말초 신경병증의 정도는 본 프레이 (Von Frey) 방법을 사용하여 측정하였고, 여기서, 보정된 힘으로 구부러진 모노필라멘트 섬유를 사지를 탐침하는데 사용하여 환자가 섬유를 감지할 수 있을 때까지 다리를 들어올린다.

[0141] 도 1은 하이드로콜로이드 트레싱으로 표준 치료했음에도 불구하고 치유되지 않은 발바닥에 당뇨병성 족부 궤양을 나타낸 환자 A에 대한 결과를 보여준다. 괴사조직 제거 후, 궤양은 5.1 cm^2 로 측정되었고, 신경병증은 무릎까지 절반 연장되었다. 4주 후, DFU는 3.5 cm^2 로 측정되었고, 신경병증의 정도는 약 14 cm 감소하였다. 이 환자에서 신경병증의 역전은 약물을 필요로 하는 다소 심한 통증을 동반하였다. 치료제의 매주 적용은 DFU가 완전히 치유되는 경우 중단하였지만, 신경병증은 계속 치유되었고 그후 관련 통증은 완전히 해소하였다.

[0142] 도 2는 하이드로콜로이드 트레싱으로 표준 치료했음에도 불구하고 치유되지 않은 발 안쪽에 당뇨병성 족부 궤양을 나타낸 환자 B에 대한 결과를 보여준다. 창상 절제 후, 궤양은 6.1 cm^2 로 측정되었고, 신경병증은 무릎까지 절반 이상 연장되었다. 4주 후, DFU는 0.4 cm^2 로 측정되었고, 신경병증의 정도는 약 16 cm 감소하였다. 그녀의 상처는 다능성 세포 제제를 사용한 치료 완료 후 완전히 치유되었고 신경병증에서의 개선은 지속되었다.

[0143] 도 3은 환자 C가 하이드로콜로이드 트레싱으로 표준 치료했음에도 불구하고 치유되지 않은 발바닥에 당뇨병성 족부 궤양을 나타내는 대조군 데이터를 보여준다. 괴사조직 제거 후, 궤양은 4.0 cm^2 로 측정되었고, 신경병증은 무릎까지 거리의 1/3 연장되었다. 4주 후, DFU는 1.6 cm^2 로 측정되었고, 신경병증의 정도는 약 1 cm 감소하였다. 12주에, DFU는 치유되지 않았고 신경병증에는 거의 변화가 없었다.

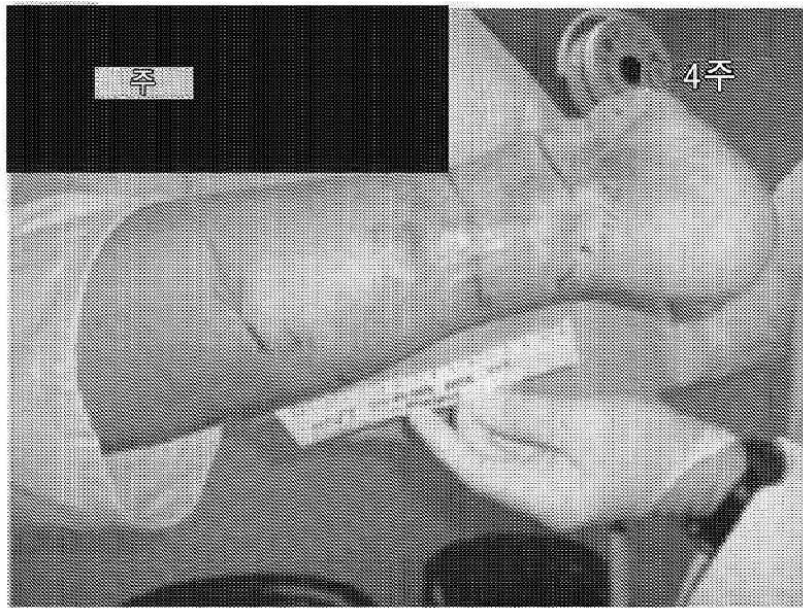
[0144] 도 1 및 2에 도시된 바와 같이, 다능성 세포 치료는 환자의 신경병증에 극적인 영향을 미쳤다. 5주까지, 환자 A 및 B 둘 다는 수년만에 처음으로 발 바닥에 약간의 느낌을 가졌다. 대조적으로, 도 3에 나타낸 바와 같이, 대조군 환자 C는 거의 효과를 보지 못했다.

[0145] **실시예 3: 신경병증을 가진 사지에서의 피하 주사**

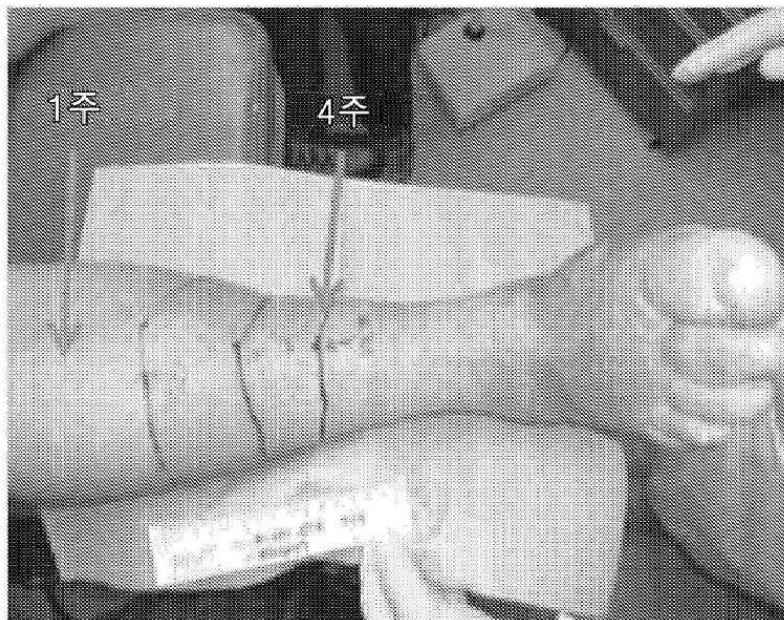
[0146] 당뇨병성 신경병증을 가진 성인 남성은 왼쪽 발목 아래에 많은 느낌을 상실하였다. 그는 1회 방문 동안에 실시예 2에 사용된 것과 동일한 제제의 4회 피하 주사로 치료받았다. 각 주사는 1 ml의 정상 식염수에 용해된 275,000개의 CD90^+ 세포로 이루어져 있다. 이후 환자는 왼발 감각에서 60% 개선이 보고되었으며 이러한 개선은 발목으로부터 주사 영역까지 확장되었다. 따라서, 제제는 신경병증에 이로운 영향을 미쳤지만, 제제가 이전에 기재된 환자에서 DFU에 국소적으로 적용된 경우에서 만큼 현저하지 않았다.

도면

도면1



도면2



도면3

