



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년03월26일
(11) 등록번호 10-1962477
(24) 등록일자 2019년03월20일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/071 (2010.01) **A61K 35/12** (2015.01)
C12N 5/074 (2010.01)
- (21) 출원번호 10-2012-7004539
- (22) 출원일자(국제) 2010년07월21일
 심사청구일자 2015년07월21일
- (85) 번역문제출일자 2012년02월21일
- (65) 공개번호 10-2012-0098997
- (43) 공개일자 2012년09월06일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2010/042726
- (87) 국제공개번호 WO 2011/011500
 국제공개일자 2011년01월27일
- (30) 우선권주장
 61/227,309 2009년07월21일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문현
 WO2002064748 A2*
 KR1020080092336 A*

*는 심사관에 의하여 인용된 문현

전체 청구항 수 : 총 54 항

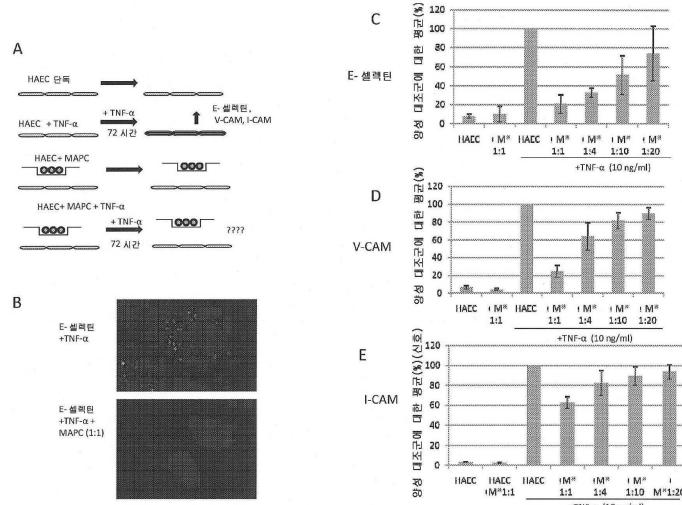
심사관 : 이효진

(54) 발명의 명칭 **백혈구 혈관외유출을 감소시키기 위한 줄기 세포의 용도**

(57) 요약

본 발명은 일반적으로 백혈구 혈관외유출을 감소시키는 인자를 분비하는 세포에 의한 염증 감소에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 혈관 내피 세포에서 세포 부착 분자의 발현을 하향조절하는 인자를 분비하는 세포를 사용하는 방법에 관한 것이다. 혈관 부착 분자의 발현의 하향조절은 내피 세포에의 백혈구 부착을 감소시켜 혈관외유출이 감소되게 한다. 최종 결과는 염증 감소이다. 본 세포는 만능성 특징을 갖는 비배아 비생식 세포이다. 이는 만능성 마커의 발현 및 광범위한 분화능을 포함할 수 있다.

대 표 도



명세서

청구범위

청구항 1

(1) 백혈구 혈관외유출을 감소시키는 것, (2) 혈관 내피 또는 단리된 내피 세포에의 백혈구 부착을 감소시키는 것, (3) 사이토카인에 의해 매개되는 내피 세포 활성화를 감소시키는 것, (4) 내피 세포 상에서의 하나 이상의 세포 부착 분자의 발현을 감소시키는 것 중 하나 이상에 대해 세포(I)를 평가하는 것을 포함하는 세포(I)의 시험관내 평가 방법으로서, 상기 세포(I)는 oct4, 텔로머라제, rex-1 또는 rox-1 중 하나 이상을 발현하거나; 또는 내배엽, 외배엽 및 중배엽 중 2종 이상의 세포 유형으로 분화될 수 있거나; 또는 oct4, 텔로머라제, rex-1 또는 rox-1 중 하나 이상을 발현하고 내배엽, 외배엽 및 중배엽 중 2종 이상의 세포 유형으로 분화될 수 있는 비배아의 비생식 세포로서 다능성 성체 선구세포(MAPC)인 것인 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 세포(I)가 동종(allogeneic)인 방법.

청구항 3

삭제

청구항 4

(1) 백혈구 혈관외유출을 감소시키는 것, (2) 혈관 내피 또는 단리된 내피 세포에의 백혈구 부착을 감소시키는 것, (3) 사이토카인에 의해 매개되는 내피 세포 활성화를 감소시키는 것, (4) 내피 세포 상에서의 하나 이상의 세포 부착 분자의 발현을 감소시키는 것 중 하나 이상을 갖는 세포(I)를 장래에 대상체에게 투여하기 위해 증식시키고 보존하는 것을 포함하는, 세포 은행 구축 방법으로서, 상기 세포(I)는 oct4, 텔로머라제, rex-1 또는 rox-1 중 하나 이상을 발현하거나; 또는 내배엽, 외배엽 및 중배엽 중 2종 이상의 세포 유형으로 분화될 수 있거나; 또는 oct4, 텔로머라제, rex-1 또는 rox-1 중 하나 이상을 발현하고 내배엽, 외배엽 및 중배엽 중 2종 이상의 세포 유형으로 분화될 수 있는 비배아의 비생식 세포로서 다능성 성체 선구세포(MAPC)이고, 상기 방법은 (1) ~ (4) 중 하나 이상에 대해 세포(I)를 평가하는 것을 포함하는 것인 세포 은행 구축 방법.

청구항 5

(1) 백혈구 혈관외유출을 감소시키는 것, (2) 혈관 내피 또는 단리된 내피 세포에의 백혈구 부착을 감소시키는 것, (3) 사이토카인에 의해 매개되는 내피 세포 활성화를 감소시키는 것, (4) 내피 세포 상에서의 하나 이상의 세포 부착 분자의 발현을 감소시키는 것 중 하나 이상에 대해 세포(I)를 분석하는 단계 및 상기 세포(I)를 작용물질(agent)에 노출시켜, (1)~(4) 중 하나 이상을 달성할 수 있는 상기 세포의 능력에 상기 작용 물질이 미치는 영향을 평가하는 단계를 포함하는 약물 개발 방법으로서, 상기 세포(I)는 oct4, 텔로머라제, rex-1 또는 rox-1 중 하나 이상을 발현하거나; 또는 내배엽, 외배엽 및 중배엽 중 2종 이상의 세포 유형으로 분화될 수 있거나; 또는 oct4, 텔로머라제, rex-1 또는 rox-1 중 하나 이상을 발현하고 내배엽, 외배엽 및 중배엽 중 2종 이상의 세포 유형으로 분화될 수 있는 비배아의 비생식 세포로서 다능성 성체 선구세포(MAPC)인 것인 약물 개발 방법.

청구항 6

삭제

청구항 7

제4항에 있어서, 사이토카인은 TNF- α 및 IL-1로 이루어진 군에서 선택되는 것인 방법.

청구항 8

제4항에 있어서, 사이토카인에 의해 매개되는 내피 세포 활성화는 내피 세포에서 E-셀렉틴, P-셀렉틴, VCAM-1,

ICAM 및 VCAM-2 중 하나 이상의 발현의 증가를 가져오는 것인 방법.

청구항 9

제4항에 있어서, 내피 세포에서 발현이 감소되는 세포 부착 분자는 E-셀렉틴, P-셀렉틴, VCAM-1, ICAM 및 VCAM-2 중 하나 이상인 것인 방법.

청구항 10

(1) 백혈구 혈관외유출을 감소시키는 것, (2) 혈관 내피 또는 단리된 내피 세포에의 백혈구 부착을 감소시키는 것, (3) 사이토카인에 의해 매개되는 내피 세포 활성화를 감소시키는 것, (4) 내피 세포 상에서의 하나 이상의 세포 부착 분자의 발현을 감소시키는 것 중 하나 이상을 달성하기 위한 세포(I)의 효력을 증가시키는 시험관내 (*in vitro*) 방법으로서, 상기 세포(I)를 IFN- γ , IL-1 β 및 TNF- α 와 접촉시키는 것을 포함하며, 상기 세포(I)는 oct4, 텔로머라제, rex-1 또는 rox-1 중 하나 이상을 발현하거나; 또는 내배엽, 외배엽 및 중배엽 중 2종 이상의 세포 유형으로 분화될 수 있거나; 또는 oct4, 텔로머라제, rex-1 또는 rox-1 중 하나 이상을 발현하고 내배엽, 외배엽 및 중배엽 중 2종 이상의 세포 유형으로 분화될 수 있는 비배아의 비생식 세포로서 다능성 성체 선구세포(MAPC)인 것인 시험관내 방법.

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

제4항에 있어서, 대상체가 인간인 방법.

청구항 14

제1항에 있어서, 상기 세포(I)가 텔로머라제를 발현하는 것인 방법.

청구항 15

제1항에 있어서, 상기 세포(I)가 oct4를 발현하는 것인 방법.

청구항 16

제1항에 있어서, 상기 세포(I)가 텔로머라제 및 oct4를 발현하는 것인 방법.

청구항 17

제1항에 있어서, 상기 세포(I)가 내배엽, 외배엽 및 중배엽 중 2종 이상의 세포 유형으로 분화될 수 있는 것인 방법.

청구항 18

제1항에 있어서, 상기 세포(I)가 텔로머라제 및 oct4를 발현하고, 내배엽, 외배엽 및 중배엽 중 2종 이상의 세포 유형으로 분화될 수 있는 것인 방법.

청구항 19

삭제

청구항 20

제5항에 있어서, 사이토카인은 TNF- α 및 IL-1로 이루어진 군에서 선택되는 것인 방법.

청구항 21

제5항에 있어서, 사이토카인에 의해 매개되는 내피 세포 활성화는 내피 세포에서 E-셀렉틴, P-셀렉틴, VCAM-1, ICAM 및 VCAM-2 중 하나 이상의 발현의 증가를 가져오는 것인 방법.

청구항 22

제5항에 있어서, 내피 세포에서 발현이 감소되는 세포 부착 분자는 E-셀렉틴, P-셀렉틴, VCAM-1, ICAM 및 VCAM-2 중 하나 이상인 것인 방법.

청구항 23

제4항에 있어서, 상기 세포(I)가 텔로머라제를 발현하는 것인 방법.

청구항 24

제4항에 있어서, 상기 세포(I)가 oct4를 발현하는 것인 방법.

청구항 25

제4항에 있어서, 상기 세포(I)가 텔로머라제 및 oct4를 발현하는 것인 방법.

청구항 26

제4항에 있어서, 상기 세포(I)가 내배엽, 외배엽 및 중배엽 중 2종 이상의 세포 유형으로 분화될 수 있는 것인 방법.

청구항 27

제4항에 있어서, 상기 세포(I)가 텔로머라제 및 oct4를 발현하고, 내배엽, 외배엽 및 중배엽 중 2종 이상의 세포 유형으로 분화될 수 있는 것인 방법.

청구항 28

제5항에 있어서, 상기 세포(I)가 텔로머라제를 발현하는 것인 방법.

청구항 29

제5항에 있어서, 상기 세포(I)가 oct4를 발현하는 것인 방법.

청구항 30

제5항에 있어서, 상기 세포(I)가 텔로머라제 및 oct4를 발현하는 것인 방법.

청구항 31

제5항에 있어서, 상기 세포(I)가 내배엽, 외배엽 및 중배엽 중 2종 이상의 세포 유형으로 분화될 수 있는 것인 방법.

청구항 32

제5항에 있어서, 상기 세포(I)가 텔로머라제 및 oct4를 발현하고, 내배엽, 외배엽 및 중배엽 중 2종 이상의 세포 유형으로 분화될 수 있는 것인 방법.

청구항 33

제10항에 있어서, 상기 세포(I)가 텔로머라제를 발현하는 것인 방법.

청구항 34

제10항에 있어서, 상기 세포(I)가 oct4를 발현하는 것인 방법.

청구항 35

제10항에 있어서, 상기 세포(I)가 텔로머라제 및 oct4를 발현하는 것인 방법.

청구항 36

제10항에 있어서, 상기 세포(I)가 내배엽, 외배엽 및 중배엽 중 2종 이상의 세포 유형으로 분화될 수 있는 것인 방법.

청구항 37

제10항에 있어서, 상기 세포(I)가 텔로머라제 및 oct4를 발현하고, 내배엽, 외배엽 및 중배엽 중 2종 이상의 세포 유형으로 분화될 수 있는 것인 방법.

청구항 38

제14항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포(I)가 내배엽, 외배엽 및 중배엽 중 2종 이상의 세포 유형으로 분화될 수 있는 것인 방법.

청구항 39

제14항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포(I)가 내배엽, 외배엽 및 중배엽의 세포 유형으로 분화될 수 있는 것인 방법.

청구항 40

제14항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포(I)가 인간 세포인 것인 방법.

청구항 41

제40항에 있어서, 상기 세포(I)가 골수로부터 유래되는 것인 방법.

청구항 42

제23항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포(I)가 내배엽, 외배엽 및 중배엽 중 2종 이상의 세포 유형으로 분화될 수 있는 것인 방법.

청구항 43

제23항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포(I)가 내배엽, 외배엽 및 중배엽의 세포 유형으로 분화될 수 있는 것인 방법.

청구항 44

제23항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포(I)가 인간 세포인 것인 방법.

청구항 45

제44항에 있어서, 상기 세포(I)가 골수로부터 유래되는 것인 방법.

청구항 46

제28항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포(I)가 내배엽, 외배엽 및 중배엽 중 2종 이상의 세포 유형으로 분화될 수 있는 것인 방법.

청구항 47

제28항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포(I)가 내배엽, 외배엽 및 중배엽의 세포 유형으로 분화될 수 있는 것인 방법.

청구항 48

제28항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포(I)가 인간 세포인 것인 방법.

청구항 49

제48항에 있어서, 상기 세포(I)가 골수로부터 유래되는 것인 방법.

청구항 50

제33항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포(I)가 내배엽, 외배엽 및 중배엽 중 2종 이상의 세포 유형으로 분화될 수 있는 것인 방법.

청구항 51

제33항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포(I)가 내배엽, 외배엽 및 중배엽의 세포 유형으로 분화될 수 있는 것인 방법.

청구항 52

제33항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포(I)가 인간 세포인 것인 방법.

청구항 53

제52항에 있어서, 상기 세포(I)가 골수로부터 유래되는 것인 방법.

청구항 54

제38항에 있어서, 상기 세포(I)가 인간 세포인 것인 방법.

청구항 55

제39항에 있어서, 상기 세포(I)가 인간 세포인 것인 방법.

청구항 56

제42항에 있어서, 상기 세포(I)가 인간 세포인 것인 방법.

청구항 57

제43항에 있어서, 상기 세포(I)가 인간 세포인 것인 방법.

청구항 58

제50항에 있어서, 상기 세포(I)가 인간 세포인 것인 방법.

청구항 59

제51항에 있어서, 상기 세포(I)가 인간 세포인 것인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 일반적으로 백혈구 혈관외유출을 감소시키는 인자를 분비하는 세포에 의한 염증 감소에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 혈관 내피 세포에서 세포 부착 분자의 발현을 하향조절하는 인자를 분비하는 세포를 사용하는 방법에 관한 것이다. 혈관 부착 분자의 발현의 하향조절은 내피 세포에의 백혈구 부착을 감소시켜서 혈관외유출이 감소되게 한다. 최종 결과는 염증 감소이다. 따라서, 본 발명은 심혈관 질환을 포함하여 바람직하지 못한 염증성 성분과 관련된 병리학적 병태를 치료하는 방법을 제공한다. 또한 본 발명은 내피 세포에서 세포 부착 분자의 발현을 하향조절하는 세포의 능력을 조정하는 작용 물질(agent)에 대해 스크리닝하는 약물 개발 방법에 관한 것이다. 또한 본 발명은 대상체에게 투여하기 위한 세포를 제공하기 위하여 사용될 수 있는 세포 은행에 관한 것으로서, 세포 은행은 내피 세포에서 세포 부착 분자의 발현을 하향조절하는 것에 대해 원하는 효력을 갖고 백혈구 부착 및 혈관외유출을 감소시키는 세포를 포함한다. 또한 본 발명은 특정한 원하는 효력의 세포를 함유하는 조성물에 관한 것이다. 또한 본 발명은 투여될 세포의 원하는 효력을 평가하는 분석법을 포함하여 세포 투여 이전에 행해지는 진단 방법에 관한 것이다. 추가로 본 발명은 처리되는 대상체에 대한 세포의 영향을 평가하는 처리 후 진단 분석법에 관한 것이다. 또한 본 발명은 제약 조성물 형태의 원하는 효력의 세포에 관한 것이다.

것이다. 본 세포는 만능적 특징을 갖는 비배아 비생식 세포이다. 본 세포는 만능성 마커의 발현 및 광범위한 분화능을 포함할 수 있다.

배경 기술

[0002] 염증

급성 염증 과정은 주변 조직 내로의 혈장 단백질 및 백혈구의 혈관외유출을 허용하도록 변경된, 상해를 입은 조직에 대해 국소적인 혈관에 의해 개시된다. 조직 내로의 유체의 증가된 유동은 염증과 결부된 특징적인 팽윤을 야기한다. 혈관은 혈관 확장, 증가된 투과성, 및 혈류의 느려짐을 포함하여 두드러진 혈관 변화를 겪는데, 이는 다양한 염증성 매개자의 작용에 의해 유도된다. 혈관의 증가된 투과성에 의해 혈장이 조직 내로 이동하게 되며, 이때 울혈이 혈액 내의 세포의 농도 증가로 인해 생긴다. 울혈은 백혈구가 내피를 따라 변연화되게 하는데, 이는 조직 내로의 백혈구의 점증에 대해 결정적인 과정이다. 정상 유동 혈액은 이를 방지하며, 그 이유는 혈관의 주변부를 따라 있는 전단력이 혈액 내의 세포를 혈관의 중심부 내로 이동시키기 때문이다. 따라서, 상기 변화는 혈관을 구성하는 기저막 및 내피를 통한 백혈구의 혈관외유출을 가능케 한다. 일단 조직 내에 있으면, 세포는 주화성 구배를 따라 이주하여 상해 부위에 도달하는데, 상기 상해 부위에서 세포는 자극을 제거하여 조직을 복구하려는 시도를 할 수 있다.

[0004] 혈관을 통하여 혈액으로부터 조직으로 백혈구가 이동하는 것은 혈관외유출로서 알려져 있으며, 다수의 광범위한 단계로 분할될 수 있다:

[0005] (1) 염증 수반 변연화 부위에 대해 국소적인 내피로의 백혈구의 국소화 및 점증과 내피 세포에의 부착: 백혈구의 동원은 수용체 매개이다. 염증의 산물, 예를 들어 히스타민은 내피 세포 표면 상에서의 P-셀렉틴(selectin)의 즉각적인 발현을 촉진한다. 이 수용체는 백혈구 표면 상에서 탄수화물 리간드에 약하게 결합하고, 상기 리간드가 결합이 만들어지고 파괴됨에 따라 내피 표면을 따라 "롤링(roll)"하도록 한다. 상해를 입은 세포로부터의 사이토카인은 내피 세포 상에서의 E-셀렉틴의 발현을 유도하는데, 상기 E-셀렉틴은 P-셀렉틴과 유사한 기능을 한다. 사이토카인은 내피 세포 상에서의 인테그린 리간드의 발현을 또한 유도하며, 이는 백혈구를 추가로 늦춘다. 이들 약하게 결합된 백혈구는 상해를 입은 조직에서 생성된 케모카인에 의해 활성화되지 않을 경우 자유롭게 탈리된다. 활성화는 내피 세포 표면 상에서 리간드에 대한 결합 인테그린 수용체의 친화도를 증가시켜서, 백혈구가 내피에 단단히 결합되게 한다.

[0006] (2) 혈구누출 과정을 통한, 이행으로 공지된, 내피를 가로지르는 이주: 케모카인 구배는 부착된 백혈구가 내피 세포들 사이를 이동하여 기저막을 통과하여 조직 내로 들어가는 것을 자극한다.

[0007] (3) 주화작용을 통한 조직 내에서의 백혈구의 이동: 조직 간질에 도달한 백혈구는 발현된 인테그린 및 CD44를 통하여 세포외 매트릭스 단백질에 결합하여 당해 부위로부터의 그의 손실을 방지한다. 화학유인물질(chemoattractant)은 백혈구가 주화성 구배를 따라 염증원쪽으로 이동하게 한다.

[0008] 백혈구 혈관외유출은 순환계로부터 조직 손상 또는 감염 부위쪽으로 백혈구가 이동하는 것이다. 이 과정은 선천성 면역 반응의 일부를 형성하며, 이는 비-특이적 백혈구의 점증을 수반한다. 단핵구는 대식세포로의 그의 발달 동안 감염 또는 조직 손상의 부재 하에서 이 과정을 또한 이용한다.

[0009] 백혈구 혈관외유출은 후모세혈관 세정맥에서 주로 일어나며, 상기 세정맥에서 혈역학적 전단력이 최소화된다. 이 과정은 하기에서 "화학유인작용", "롤링 부착", "단단한 부착", "(내피) 이행"으로 약술되는 몇몇 단계에서 이해될 수 있다. 백혈구 점증은 이들 단계 중 임의의 것이 억제될 때에는 언제나 중단됨이 입증되었다.

[0010] 화학유인작용

[0011] 병원체의 인식 및 병원체에 의한 활성화 시에, 영향을 받은 조직 내의 상주 대식세포는 사이토카인, 예를 들어 IL-1, TNF- α 및 케모카인을 방출한다. IL-1 및 TNF- α 는 감염 부위 근처의 혈관의 내피 세포가 셀렉틴을 포함하는 세포 부착 분자를 발현하도록 한다. 순환 백혈구는 케모카인의 존재로 인하여 상해 또는 감염 부위쪽으로 국소화된다.

[0012] 롤링 부착

[0013] 벨크로(velcro)와 같이, 순환 백혈구 상의 탄수화물 리간드는 혈관의 내벽 상의 셀렉틴 분자에 최저한의 친화도로 결합한다. 이는 백혈구가 혈관벽의 내부 표면을 따라서 롤링하는 것을 늦추고 시작하게 한다. 이러한 롤링 운동 동안, 일시적인 결합이 셀렉틴과 그의 리간드 사이에 형성 및 파괴된다.

[0014]

단단한 부착

[0015]

이와 동시에, 대식세포에 의해 방출된 케모카인은 롤링 백혈구를 활성화시키고, 표면 인테그린 분자가 디폴트 저친화도 상태로부터 고친화도 상태로 스위칭되게 한다. 이는 내피 세포에 의해 방출되는 용해성 인자 및 케모카인에 의한 인테그린의 근접분비(juxtacrine) 활성화를 통하여 보조된다. 활성화된 상태에서 인테그린은 내피 세포 상에서 발현된 상보성 수용체에 고친화도로 단단히 결합한다. 이는 진행 중인 혈액 유동의 전단력에도 불구하고 백혈구의 고정을 야기한다.

[0016]

이행

[0017]

백혈구의 세포골격은 백혈구가 내피 세포 위에 펼쳐지게 하는 그러한 방식으로 재조직화된다. 이러한 형태에서 백혈구는 위족을 연장시켜서 내피 세포들 사이의 갭을 통과한다. 백혈구의 이행은 백혈구 및 내피 세포 표면 상에서 발견되는 PECAM 단백질이 내피를 관통하여 상기 세포와 상호작용하여 그를 효과적으로 끌어당길 때 일어난다. 백혈구는 기저막을 분해시키는 프로테아제를 분비하여 백혈구가 혈관을 탈출하게 하며, 이는 혈구누출로 공지된 과정이다. 일단 간질액 중에 있으면, 백혈구는 주화성 구배를 따라 상해 또는 감염 부위쪽으로 이주한다.

[0018]

염증 부위에서의 호중구 축적은 셀렉틴(내피 상의 P- 및 E-셀렉틴과 백혈구 상의 L-셀렉틴) 및 백혈구 상의 CD18 인테그린을 포함하는 세포 부착 분자의 특정 군에 의해 매개된다. 이는 백혈구가 CD18 또는 셀렉틴 탄수화물 리간드의 발현에 있어서 유전자 결합이 있는 백혈구 부착 결합 중후군(예를 들어, 제II형 백혈구 부착 결합)을 갖는 환자의 연구에 의해 지지된다.

[0019]

셀렉틴

[0020]

셀렉틴은 조직 대식세포에 의한 내피 세포의 사이토카인 활성화 직후 발현된다. 활성화된 내피 세포는 처음에 P-셀렉틴 분자를 발현하지만, 활성화 후 2시간 이내에 E-셀렉틴 발현이 유리해진다. 내피 셀렉틴은 시알릴-루이스^X(sialyl-Lewis^X)를 포함하여 백혈구 막관통 당단백질 상의 탄수화물에 결합한다.

[0021]

P-셀렉틴: P-셀렉틴은 활성화된 내피 세포 및 혈소판 상에서 발현된다. P-셀렉틴의 합성은 트롬빈, 뉴코트리엔 B4, 보체 단편 C5a, 히스타민, TNF- α 또는 LPS에 의해 유도될 수 있다. 이들 사이토카인은 내피 세포에서 바이넬 펠라드 소체(Weibel-Palade body)의 외재화(externalization)를 유도하여 내피 세포 표면 상에 사전-형성 P-셀렉틴을 제시한다. P-셀렉틴은 리간드로서 PSGL-1에 결합한다.

[0022]

E-셀렉틴: 내피 백혈구 부착 분자-1은 사이토카인 자극 내피 세포에 의해 발현된다. 이것은 세포가 혈관 라이닝에 부착되는 것을 매개함으로써 염증 부위에서의 혈액 백혈구 축적에 책임이 있는 것으로 생각된다. 이것은 렉틴 및 EGF 유사 도메인, 이어서 6개의 보존된 시스테인 잔기를 포함하는 짧은 콘센서스 반복체(short consensus repeat, SCR)의 존재를 포함하는, LYAM1의 것과 상동성인 구조적 특징을 나타낸다. 이들 단백질은 세포 부착 분자의 셀렉틴 패밀리의 일부이다(문헌[Watson et al., J. Exp. Med. 172: 263-272 (1990)]; 문헌[Collins et al., J. Biol. Chem. 266: 2466-2473 (1991)]). E-셀렉틴의 합성은 IL-1 및 TNF- α 와 같은 사이토카인에 의해 유도된 P-셀렉틴 합성 직후에 뒤따른다. E-셀렉틴은 PSGL-1 및 ESL-1에 결합한다.

[0023]

L-셀렉틴: L-셀렉틴은 일부 백혈구 상에서 항시적으로 발현되며, 리간드로서 GlyCAM-1, MadCAM-1 및 CD34에 결합하는 것으로 알려져 있다.

[0024]

일부 셀렉틴의 억제된 발현은 면역 반응이 더 느려지게 한다. L-셀렉틴이 생성되지 않을 경우, 면역 반응은 10 배 더 느려질 수 있으며, 이는 P-셀렉틴(백혈구에 의해 또한 생성될 수 있음)이 서로에게 결합하기 때문이다. P-셀렉틴은 고친화도로 서로에게 결합할 수 있지만, 수용체 부위 밀도가 더욱 작은 E-셀렉틴 분자보다 더 낮기 때문에 덜 빈번하게 나타난다. 이는 초기 백혈구 롤링 속도를 증가시켜서 느린 롤링 시기를 연장시킨다.

[0025]

인테그린

[0026]

세포 부착에 관련된 인테그린은 주로 백혈구 상에서 발현된다. 롤링 백혈구 상의 β 2 인테그린은 내피 세포 부착 분자에 결합하여 세포 이동을 저지한다.

[0027]

LFA-1은 순환 백혈구 상에서 발견되며, 내피 세포 상의 ICAM-1 및 ICAM-2에 결합한다.

[0028]

Mac-1은 순환 백혈구 상에서 발견되며, 내피 세포 상의 ICAM-1에 결합한다.

[0029]

VLA-4는 백혈구 및 내피 세포 상에서 발견되며, 주화작용을 도우며, 이것은 또한 VCAM-1에 결합한다.

[0030]

세포외 케모카인을 통한 세포 활성화는 사전 형성된 β 2 인테그린이 세포 저장체(cellular store)로부터 방출되

게 한다. 인테그린 분자는 세포 표면으로 이주하며, 고친화력 폐치로 집합된다. 세포내 인테그린 도메인은 탈린, α -악티닌 및 빈콜린과 같은 세포질 인자에 의한 매개를 통하여 백혈구 세포골격과 회합된다. 이 회합은 인테그린 3차 구조의 배좌 변화를 야기하여서 결합 부위로의 리간드 접근을 허용한다. 2가 양이온(예를 들어, Mg^{2+})이 인테그린-리간드 결합에 또한 필요하다.

[0031] 인테그린 리간드 ICAM-1 및 VCAM-1은 염증성 사이토카인에 의해 활성화되는 반면, ICAM-2는 일부 내피 세포에 의해 항시적으로 발현되지만 염증성 사이토카인에 의해서는 하향조절된다. ICAM-1 및 ICAM-2는 2개의 상동성 N-말단 도메인을 공유하며, 둘 모두는 LFA-1에 결합할 수 있다.

[0032] 주화 작용 동안, 세포 이동은 세포외 매트릭스 성분에의 $\beta 1$ 인테그린의 결합, 즉 피브로넥틴에의 VLA-3, VLA-4 및 VLA-5의 결합과 콜라겐 및 기타 세포외 매트릭스 성분에의 VLA-2 및 VLA-3의 결합에 의해 도움을 받는다.

사이토카인

[0034] 혈관외유출은 염증 반응에 의해 생성된 배경 사이토카인 환경에 의해 조절되며, 특정 세포 항원과는 관계가 없다. 초기 면역 반응에서 방출된 사이토카인은 혈관의 표면을 따라 전하를 낮추고 혈관 확장을 유도한다. 혈액 유동은 느려져서 분자 간 결합을 돋는다.

[0035] IL-1은 상주 림프구 및 혈관 내피를 활성화시킨다.

[0036] TNF- α 는 혈관 투과성을 증가시키며, 혈관 내피를 활성화시킨다.

[0037] CXCL8(IL-8)은 조직 상해/감염 부위쪽으로 백혈구를 유도하는 주화성 구배를 형성하며(CCL2는 CXCL8과 기능이 유사하여서 단핵구의 혈관외유출 및 대식세포로의 발달을 유도함), 백혈구 인테그린을 또한 활성화시킨다.

[0038] 염증에 있어서의 혈관외유출 과정을 요약한 종설이 입수 가능하다. 문헌[Steeber, D. and Tedder, T., Immunologic Research, 22/2-3:299-317 (2000)]; 문헌[Steeber et al., FSAEB J, 9:866-873 (1995)]; 및 문헌[Wagner, D. and Frenette, P., Blood, 111 :5271-5281 (2008)]을 참조한다.

[0039] CD15(3-푸코실-N-아세틸-락토스아민)는 분화 항원 - 면역학적으로 의미있는 분자의 클러스터(cluster)이다. CD15는 당단백질, 당지질 및 프로테오글리칸 상에서 발현될 수 있는 탄수화물 부착 분자(단백질이 아님)이다.

[0040] CD15는 식균작용 및 주화작용을 매개하며, 호중구 상에서 발견되고, 호지킨병(Hodgkin disease), 일부 B-세포 만성 림프구성 백혈병, 급성 림프아구성 백혈병, 및 가장 급성인 비림프구성 백혈병에 걸린 환자에서 발현된다. 이것은 또한 루이스(Lewis) x 및 발생 단계 특이적 배아 항원 1(stage specific embryonic antigen 1, SSEA-1)로 칭해지며 쥐과 만능 줄기 세포의 마커를 나타내는데, 여기서 이것은 착상전 배아에 있어서 세포의 부착 및 이주에서 중요한 역할을 한다. 이것은 푸코실트랜스퍼라제 4(fucosyltransferase 4, FUT4) 및 FUT9에 의해 합성된다.

CD15

[0042] 시알릴 루이스 x 올리고당 결정자는 백혈구의 E-셀렉틴 및 P-셀렉틴 매개된 부착에 있어서 백혈구 대응 수용체 (counter-receptor)의 필수 구성요소이다. 이 올리고당 분자는 과립구, 단핵구 및 자연 살해 세포의 표면 상에서 디스플레이된다. 이들 셀렉틴에의 백혈구의 부착의 형성은 궁극적으로 백혈구가 혈관 트리(vascular tree)를 떠나서 림프양 조직 및 염증 부위 내로 점증되게 하는 과정에서 초기의 중요한 단계이다. 문헌[Natsuka et al., J. Biol. Chem. 269: 16789-16794 (1994)] 및 문헌[Sasaki et al., J. Biol. Chem. 269: 14730-14737 (1994)]에서는 인간 백혈구 알파-1,3-푸코실트랜스퍼라제, FUT7 - 시알릴 루이스 x 결정자를 합성할 수 있음 - 을 코딩하는 cDNA가 단리되었다.

[0043] 나츠카(Natsuka) 등은 FUT7이 포유류 세포에서 발현될 때, 상기 cDNA가 세포 표면 시알릴 루이스 x 모이어티 (moiety)의 합성을 유도하지만 루이스 x, 루이스 A, 시알릴 루이스 a, 또는 VIM-2 결정자는 그렇게 하지 않음을 발견하였다. 사사키(Sasaki) 등은 E-셀렉틴에 결합하는 시알릴 루이스 x 모이어티를 합성하는 FUT7의 생체내에서의 능력을 입증하였으며 백혈구에서의 FUT7의 제한된 발현을 보고하였다.

[0044] 문헌[Chen et al., Proc. Nat. Acad. Sci. 103:16894-16899 (2006)]은 활성화된 T 세포, 특히 Th1 세포가 시알릴 루이스 x를 발현하지만 휴지기 세포는 그렇지 않음을 나타냈다. 리포터 분석법을 이용하여 첸(Chen) 등은 TBET가 FUT7의 전사를 촉진하고 GATA3이 FUT7의 전사를 억제함을 보여주었다. TBET는 GATA3가 그의 표적 DNA에 결합하는 것을 방해하였지만, GATA3는 TBET가 FUT7 프로모터에 결합하는 것을 또한 방해하였다. GATA3은 인산화 의존적인 방식으로 히스톤 데아세틸라제-3 및 HDAC5를 점증시킴으로써 그리고 TBET의 N 말단에의 결합에 있어서

CBP/p300과 경쟁함으로써 FUT7 전사를 조절하였다. T 세포에서의 FUT7 및 시알릴 루이스 x의 최대 발현은 GATA3의 ROG 매개된 억제에 의해 수득되었다. 문헌[Chen et al. (2006)]에서는 GATA3/TBET 전사 인자 복합체가 림프 구 귀소 수용체 (homing receptor)의 세포 계통-특이적 발현을 조절하며 복합당질(glycoconjugate)은 Th1 및 Th2 림프구 하위세트의 세포 계통-특이적 발현을 달성하도록 이 복합체에 의해 조절된다는 결론이 내려졌다.

[0045] 셀렉틴 P 리간드, 또는 P-셀렉틴 당단백질 리간드(P-selectin glycoprotein ligand, PSGL1)는 골수 세포 및 자극된 T 림프구 상에서의 P-셀렉틴에 대한 고친화도 대응 수용체이다. 그와 같이, 이것은 P-셀렉틴을 발현하는 활성화된 혈소판 또는 내피에의 이들 세포의 테더링(tethering)에서 중요한 역할을 한다.

[0046] 유세포 분석법, 면역블롯(immunoblot) 및 유동 챔버 분석법을 기반으로 하여 문헌[Fuhlbrigge et al., *Nature* 389: 978-981 (1997)]에서는 푸코실트랜스퍼라제-7에 의해 매개되는 PSGL1의 차별적 번역후 변형이 T 세포에서 P-셀렉틴 및 E-셀렉틴 둘 모두에 결합하는 피부 림프구 관련 항원(cutaneous lymphocyte-associated antigen, CLA)의 발현을 조절함이 제안되었다. CLA 양성 T 세포는 단클론 항체 HECA-452와의 그의 반응성에 의해 규정되는 피부 귀소 기억 T 세포이다. CLA 양성 T 세포는 건선을 포함하는 다수의 염증성 피부 장애에서 피부 병변에 침윤된다.

발명의 내용

[0047] 본 발명은 대체로 염증을 감소시키는 방법에 관한 것이다.

[0048] 본 발명은 더욱 구체적으로는 백혈구(호중구, 림프구 및 단핵구)의 혈관외유출을 감소시키는 방법에 관한 것이다.

[0049] 본 발명은 더욱 구체적으로는 순환계로부터 주변 조직 내로의 백혈구 침윤을 감소시키는 방법에 관한 것이다.

[0050] 또한 본 발명은 혈관에의 백혈구 부착을 감소시키는 방법에 관한 것이다.

[0051] 또한 본 발명은 혈관 내피에의 백혈구 부착을 감소시키는 방법에 관한 것이다.

[0052] 또한 본 발명은 혈관벽에서의 내피 세포에의 백혈구 부착을 감소시키는 방법에 관한 것이다.

[0053] 또한 본 발명은 내피 세포에서 부착 분자의 발현을 하향조절하는 방법에 관한 것이다.

[0054] 또한 본 발명은 내피 세포 활성화를 감소시키는 방법에 관한 것이다.

[0055] 또한 본 발명은 혈관 내피에서 내피 세포 활성화를 감소시키는 방법에 관한 것이다.

[0056] 내피 세포 활성화는 염증성 사이토카인에의 노출에서 생길 수 있다. 사이토카인은 종양 고사 인자- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 인터루킨-1(IL-1), 암페레귤린, LPS 및 기타 Toll 유사 수용체 리간드(병원성 펩티드, 예컨대 fMLP, 손상된 조직으로부터의 펩티드, 예컨대 피브로넥틴 단편) 트롬빈, 히스타민, 산소 라디칼 및 IFN- γ 를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 맥락에서, 활성화는 혈관 내피 세포에서의 세포 부착 분자의 상향조절을 포함한다.

[0057] 또한 본 발명은 혈관벽의 내피 세포가 백혈구 상의 부착 리간드 또는 모이어티에 결합하는 능력을 감소시키는 방법에 관한 것이다. 이들은 PSGL-1, ESL-1, CD 15, α 4-인테그린, CD44, β 2-인테그린, L-셀렉틴, CD99, 및 JAM을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0058] 백혈구는 호중구, 단핵구 및 림프구를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 림프구는 B-세포 및 T-세포를 포함한다. T 세포는 CD4 $^+$, CD8 $^+$, γ 8T 세포, 자연 살해 세포를 포함한다.

[0059] 내피 세포에서 발현되고 하향조절되는 세포 부착 분자는 E-셀렉틴 VCAM, ICAM(1, 2), P-셀렉틴, CD99, PECAM-1, JAM, ESAM, 및 오스테오폰틴(VCAM에 대한 공동수용체)을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0060] 일 실시양태에서, I-CAM 및 P-셀렉틴은 외상성 뇌손상을 갖는 대상체에서 내피 세포 상에서 상향조절된다.

[0061] 본 발명은 세포 부착 분자 발현을 감소시키는 것에 관한 것이다. 발현은 세포내 및 세포외, 예컨대 내피 세포 표면 상에서의 발현일 수 있다. 따라서, 발현은 내피 세포가 배양될 때 세포 배양 배지 내로의 이들 분자의 분비의 감소가 있도록 감소될 수 있다. 세포외 및 세포 표면 발현은 단백질 수준에서의 발현 감소를 포함한다. 세포내 발현은 세포 내에서의 전사 및 번역 둘 모두의 감소를 포함한다.

[0062] 본 발명에 따르면, 상기 효과들(즉, 염증, 혈관외유출, 내피 세포에의 백혈구의 부착, 부착 분자의 발현 등) 모

두의 감소는 배아 줄기 세포의 만능성 특징들 중 일부를 갖지만 비배아 조직으로부터 유래된 비배아 비생식 세포에 백혈구 및/또는 내피 세포를 노출시킴에 의해 달성된다.

[0063] 본 발명에 따르면, 상기 효과를 모두는 세포 또는 세포에 의해 컨디셔닝된 배지를 투여함으로써 달성될 수 있다. 세포는 배아 줄기 세포의 특징을 갖지만 비배아 조직으로부터 유래된 비배아 비생식 세포를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 그러한 세포는 만능성이며, 만능성 마커, 예컨대 oct4, 텔로머라제, rex-1, rox-1, sox-2, nanog, SSEA-1 및 SSEA-4 중 하나 이상을 발현할 수 있다. 만능성의 다른 특징은 2개 또는 3개의 외배엽, 내배엽 및 중배엽 배아 배엽층과 같은 하나 초파의 배엽층의 세포 유형으로 분화되는 능력을 포함할 수 있다. 그러한 세포는 배양에서 불멸화 또는 형질전환될 수 있기도 하고 그렇지 않을 수도 있다. 그러한 세포는 형질전환되지 않고서 고도로 증식되고 또한 정상적인 핵형을 유지할 수 있다. 예를 들어, 일 실시양태에서, 비배아 비생식 세포는 적어도 10-40회, 예컨대 30회, 40회, 50회, 60회 또는 그 초파의 세포 배가를 겪었을 수 있다. 상기 세포는 텔로머라제 활성을 발현할 수 있어서 30회 초파, 예컨대 35회, 40회, 45회, 50회 또는 그 초파의 집단 배가(세포 배가)를 달성하는 것이 가능할 수 있다. 그러나, 상기에 나타낸 바와 같이, 상기 세포는 oct4, 텔로머라제, rex-1, rox-1, sox-2, nanog, SSEA1, 또는 SSEA4 중 하나 이상을 추가로 발현할 수 있다. 그러한 세포는 각각의 내배엽, 외배엽 및 중배엽 배아 계통 중 둘의 적어도 하나의 세포 유형으로 분화될 수 있으며, 셋 모두로의 분화를 포함할 수 있다. 또한, 상기 세포는 종양 형성성일 수도 있고 그렇지 않을 수도 있으며, 예컨대 기형종을 생성하지 않을 수 있다. 세포가 형질전환되거나 종양 형성성일 경우, 그리고 세포를 주입용으로 사용하는 것이 바람직할 경우, 세포가 종양으로 분화되는 것을 방지하는 처리에 의한 것과 같이 그러한 세포는 무능화될 수 있어서 세포는 생체내에서 종양을 형성할 수 없게 될 수 있다. 그러한 처리는 당업계에 공지되어 있다. 그러한 세포는 본원의 효과를 자연스럽게 달성할 수 있다(즉, 이를 행하기 위하여 유전자 변형되거나 제약적으로 변형되지 않음). 그러나, 천연 발현자는 효력이 증가되도록 유전자 변형되거나 제약적으로 변형될 수 있다.

[0064] 상기 효과를 달성하는 이들 세포의 특성을 고려하면, 세포는 세포가 임의의 상기 효과를 달성하는 능력을 조정하는 작용 물질에 대해 스크리닝하는 약물 개발 방법에서 사용될 수 있다. 그러한 작용 물질은 작은 유기 분자, 안티센스 핵산, siRNA DNA 암타머(aptamer), 펩티드, 항체, 비항체 단백질, 사이토카인, 케모카인 및 화학유인 물질을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 그 후 작용 물질은 임의의 상기 효과를 달성하기 위하여 세포의 효력을 증가시키기 위하여 사용될 수 있다.

[0065] 일례로서, 내피 세포 분자의 상향조절을 저해하거나 이들 분자의 발현을 하향조절하는 세포를 생성하기 위하여 TNF- α , IFN- γ , 또는 IL-1 β , 또는 그의 조합을 이용한 세포의 사전 처리를 확인하기 위하여 이 분석법이 이용되었다. 일부 세포는 부착 분자의 발현을 하향조절하는(또는 상향조절을 저해하는) 인자를 생성하기 위하여 활성화 내피 세포와 함께 공동배양되어야 한다. 따라서, 나이브(naive) 세포(활성화된 내피 세포에 노출되지 않음)는 소정의 작용 물질에 노출되고 그 후 내피 세포 활성화, 부착 모이어티의 발현, 또는 임의의 상기 효과에 대한 그의 영향에 대해 분석될 수 있다.

[0066] 본 출원에 기술된 효과는 세포로부터 분비된 인자에 의해 야기될 수 있기 때문에, 상기 세포뿐만 아니라 상기 세포의 배양에 의해 생성된 컨디셔닝된 배지도 상기 효과의 달성을 유용하다. 그러한 배지는 분비된 인자를 함유하며, 따라서 세포 대신 사용될 수 있거나 세포에 첨가될 수 있다. 그래서, 세포가 사용될 수 있을 경우, 배지가 또한 효과적이며 배지는 대용 또는 첨가될 수 있음이 이해되어야 한다.

[0067] 상기 효과를 달성하는 이들 세포의 특성을 고려하여, 세포 은행이 확립될 수 있으며, 이는 상기 효과의 달성에 있어서 원하는 효력을 갖는 것에 대해 선발된 세포를 포함한다. 따라서, 본 발명은 임의의 상기 효과를 달성하는 능력에 대해 그러한 세포를 분석하고 원하는 효력을 갖는 세포에 대해 선발하고 원하는 효력을 갖는 세포를 은행 구축하는 것을 포함한다. 세포 은행은 대상체에 투여하기 위한 제약 조성물의 제조용의 공급원을 제공한다. 세포는 은행으로부터 직접적으로 사용될 수 있거나 사용 전에 증식될 수 있다.

[0068] 따라서, 또한 본 발명은 이들 세포를 대상체에 투여하기 전에 행해지는 진단 절차에 관한 것이며, 진단 전 절차는 하나 이상의 상기 효과를 달성하는 세포의 효력의 평가를 포함한다. 세포는 세포 은행으로부터 취해져서 직접적으로 사용되거나 투여 전에 증식될 수 있다. 어떠한 경우에서도 세포는 원하는 효력에 대해 평가된다. 또는 세포는 대상체로부터 유래될 수 있으며 투여 전에 증식될 수 있다. 이 경우에서도, 세포는 투여 전에 원하는 효력에 대해 평가된다.

[0069] 유효성에 대해 선발된 세포는 선발 절차 동안 반드시 분석될 필요가 있지만, 세포가 원하는 수준에서 여전히 유효한 것을 보장하는 처리를 위하여 대상체에게 투여하기 전에 세포를 다시 분석하는 것이 바람직하고 현명할 수

있다. 이는 세포가 보존 중에 냉동될 가능성이 가장 큰 세포 은행에서와 같이 임의의 길이의 시간 동안 세포가 보존되었을 경우 특히 바람직하다.

[0070] 세포를 이용한 처리 방법과 관련하여, 세포의 원래 단리와 대상체에의 투여 사이에 조정을 위한 다수의(즉, 순차적인) 분석이 있을 수 있다. 이는 세포가 이 시간틀 내에서 일어나는 조작 후 원하는 수준의 효과를 여전히 달성할 수 있음을 보장하기 위한 것이다. 예를 들어, 분석은 각각의 세포 증식 후 수행될 수 있다. 세포가 세포 은행에 보존되는 경우, 세포는 보존으로부터 해제된 후 분석될 수 있다. 세포가 냉동된 경우, 세포는 해동 후 분석될 수 있다. 세포 은행으로부터의 세포가 증식되는 경우, 세포는 증식 후 분석될 수 있다. 바람직하게는, 최종 세포 생성물(즉, 대상체에게 전신 투여됨)의 일부분이 분석될 수 있다.

[0071] 또한 본 발명은 하나 이상의 상기 효과를 달성하는 세포의 효력의 평가에 의해 그러한 세포의 투여량을 확립하는 방법에 관한 것이다.

[0072] 본 발명은 추가로 효능을 평가하기 위하여 세포의 투여 이후, 처리 후 진단 분석을 포함한다. 진단 분석은 대상체로부터의 분석에 따르는 본원에 기술된 임의의 효과를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0073] 또한 본 발명은 원하는 효력을 갖는 세포의 집단을 함유하는 조성물에 관한 것이다. 그러한 집단은 대상체에의 투여에 적합한 제약 조성물로서 및/또는 세포를 대상체에의 투여에 직접적으로 사용할 수 있는 또는 투여 전에 증식할 수 있는 세포 은행에서 발견될 수 있다.

[0074] 본 발명의 방법 및 조성물은 염증을 포함하는 임의의 질환의 치료에 유용하며, 여기서, 상기 염증의 구성요소는 세포 부착 분자에 의한 혈관 내피 세포에의 백혈구 부착을 포함한다. 이는 심혈관계에서의 급성 및 만성 병태, 예를 들어, 급성 심근 경색; 중추 신경계 손상, 예를 들어, 뇌출증, 외상성 뇌손상, 척수 손상; 말초 혈관 질환; 폐질환, 예를 들어, 천식, ARDS; 자가면역 질환, 예를 들어, 류마티스 관절염, 다발성 경화증, 루푸스, 경피증; 건선; 위장 질환, 예를 들어, 이식편 대 숙주 질환, 크론병(Crohn's disease)을 포함한다.

[0075] 그러나, 임의의 상기 병태의 치료에 있어서 그러한 세포, 즉, 본원에 기술된 효과들 중 하나 이상에 대해 평가된 그리고 병태의 치료를 위한 투여 전에 원하는 수준의 유효성에 대해 선발된 것을 사용하는 것이 상책일 수 있음이 이해된다.

도면의 간단한 설명

도 1: 멀티스템(MultiStem)은 인간 대동맥 내피 세포(Human Aortic Endothelial Cell, HAEC)에서 TNF- α 에 의한 E-셀렉틴, V-CAM 및 I-CAM 상향조절을 조정한다. (A) 세포를 융합성 근처까지 성장시킨 후, 내피 세포를 TNF- α 를 이용하여 72시간 동안 단독으로 또는 멀티스템과 공동배양하여 활성화시켰다. 그 후 세포를 E-셀렉틴, V-CAM 또는 I-CAM의 발현에 대해 PCR에 의해 또는 유세포 분석법에 의해 분석하였다. (B-E) TNF- α 유도된 내피 세포 부착 분자 표면 발현은 세포 용량 의존적인 방식으로 멀티스템의 존재 하에 감소된다. HAEC는 TNF- α (10 ng/ml)의 존재 하에 72시간 동안 멀티스템과 함께 공동배양될 때 E-셀렉틴(B, C), V-CAM(D) 및 I-CAM(E)의 발현의 감소된 세포 표면 상향조절을 나타낸다. E-셀렉틴 및 V-CAM을 발현하는 세포의 수를 결정하고, TNF- α 에 의해 이들 마커를 발현하도록 유도된 세포의 총수의 백분율로서 표현하였다. I-CAM에 있어서, 모든 세포는 심지어 활성화 이전에도 약간의 수준의 발현을 가졌다. 따라서, 세포당 신호의 강도를 계산하였으며, 데이터는 TNF- α 유도된 신호의 백분율로서 표현한다.

도 2: 멀티스템은 인간 폐 내피 세포(human pulmonary endothelial cell, HPMEC)에서의 또는 IL-1 β 에 의한 세포 표면 부착 분자 상향조절을 저해한다. (A) HPMEC는 TNF- α (10 ng/ml)의 존재 하에 72시간 동안 멀티스템과 함께 공동배양될 때 E-셀렉틴, V-CAM 및 I-CAM 발현의 감소된 세포 표면 상향조절을 나타내며, 이는 HAEC와 유사하다. 세포 표면 발현을 FACS로 측정하였다. (B) 또한 또 다른 항염증성 사이토카인, IL-1 β 에 의한 세포 표면 마커의 유도가 멀티스템과 함께 공동배양함에 의해 HAEC에서 감소되었다.

도 3: 멀티스템은 전사 수준에서 세포 부착 분자 상향조절을 조절한다. (A) 용해성 E-셀렉틴(sE-셀렉틴)의 수준을 ELISA에 의해 멀티스템 및 내피 세포(HAEC 또는 HPMEC)의 공동배양물로부터의 배지에서 측정하였다. (B) 멀티스템의 세포 용량을 상이하게 하여 TNF- α 의 부재 또는 존재 하에 72시간 동안 공동배양한 후 mRNA를 HAEC로부터 단리하였다. 정량적 RT-PCR을 E-셀렉틴, V-CAM, I-CAM 및 GAPDH에 대해 수행하였다. 멀티스템은 미처리 대조 세포와 비교하여 TNF- α 유도된 E-셀렉틴, V-CAM 및 I-CAM의 mRNA 발현을 감소시켰다.

도 4: 멀티스템과는 달리, MSC는 TNF- α 에 의한 활성화 시 내피 세포에서의 부착 분자의 세포 표면 발현을 저해하지 않는다. (A-C) TNF- α 유도된 내피 세포 부착 분자 표면 발현은 MSC의 존재 하에서 변화되지 않으며, 반면

에 멀티스텝과의 공동배양은 부착 분자 발현을 감소시킨다. HAE는 TNF- α (10 ng/ml)의 존재 하에 72시간 동안 MSC와 함께 공동배양될 때 E-셀렉틴, V-CAM 및 I-CAM 발현의 세포 표면에서의 상향조절의 변화를 전혀 나타내지 않는다.

도 5: TNF- α 및 멀티스텝의 존재 하에 공동배양된 내피 세포에의 호중구의 부착은 단독의 TNF- α 와 함께 인큐베이션된 내피 세포에의 결합과 비교하여 감소된다. (A) 단독으로 또는 멀티스텝과 함께 72시간 동안 인큐베이션한 후, 활성화 및 불활성화 내피 세포를 활성화 호중구와 함께 1분 동안 인큐베이션하였다. 그 후 세로를 세척하고, 사진을 촬영하였다. 결합된 호중구의 수는 각각의 상태를 삼중으로 사진 촬영하고 각각의 고배율 시야 (10X)에서 결합된 호중구의 수를 카운팅함으로써 결정하였다. (B) 멀티스텝과 공동배양된 내피 세포에 결합된 호중구의 수는 대조 내피 세포와 비교하여 유의하게 감소하였다. (C) 멀티스텝 공동배양 내피 세포에의 호중구 결합 감소를 예시하는 대표적인 사진.

도 6: 호중구 침윤은 AMI 후 3일에 비히를 처리 심장과 비교하여 멀티스텝 처리 심장에서 유의하게 감소한다. (A) 급성 심근 경색을 영구적인 LAD 결찰에 의해 유도하였다. 모든 래트는 AMI를 받고, 이어서 비히를 대조군 (PBS) 또는 래트 멀티스텝(1000만개의 세포) 중 어느 하나를 직접적으로 주사하였다. 호중구 침윤은 처리 및 미처리 동물로부터의 심장 섹션에서 엘라스타제 염색을 나타내는 세포에 의해 측정하였다. 표 1은 각각의 동물로부터의 엘라스타제 양성 세포의 평균 수를 나타낸다(동물당 4개의 섹션을 조사하였음). (B) 호중구 침윤을 엘라스타제 염색에 의해 측정하였다. 대조군은 수술한 지 3일 후 멀티스텝 처리 동물(12.185 PMN/hpf)과 비교하여 엘라스타제 염색 수준이 유의하게 더 높았다(35.25 PMN/hpf)(p=0.005823). (C) 멀티스텝 처리 동물 및 미처리 동물에서의 호중구 수준 (엘라스타제 염색에 의해 측정할 경우)의 대표적인 도면.

도 7: 염증 동안 백혈구 접종을 매개하는 다수의 순차적인 단계. 백혈구는 포획되고 P- 및 E-셀렉틴과 그의 리간드인 P-셀렉틴 당단백질 리간드-1(P-selectin glycoprotein ligand-1, PSGL-1) 및 E-셀렉틴 리간드-1(E-selectin ligand-1, ESL-1) 상에서 롤링되기 시작한다. 일부 백혈구, 예컨대 림프구 또는 조혈 줄기 세포 및 선구 세포가 또한 α 4 인테그린 및 그의 내피 수용체 혈관 세포 부착 분자-1(VCAM-1) 상에서 롤링한다. L-셀렉틴은 림프양 조직에서 HEV 상에서의 림프구 롤링에 있어서 결정적이다. 염증 진행으로서 백혈구 롤링 속도는 감소되어, 셀렉틴 리간드 및 G-단백질 커플링된 수용체(G-protein-coupled receptor, GPCR)로부터의 활성화 신호가 통합되게 한다. 이를 활성화 신호는 서서히 롤링하는 백혈구의 분극화와, L-셀렉틴 및 PSGL-1의 주극(major pole)으로의 클러스터링에 이르게 하는데, 이는 백혈구-백혈구 상호작용을 통한 이차 테더를 통하여 백혈구가 추가로 접증되게 한다. 백혈구 활성화는 인테그린 친화성 및 친화력을 향상시켜서 내피 세포 상에서 발현되는 세포간 부착 분자-1-(ICAM-1) 상에 단단히 부착되게 한다. 부착성 백혈구는 계속하여 측면으로 이주하여 미세혈관을 조사하여 이행을 위한 가능한 부위를 탐색한다. 백혈구는 고전적으로는 연접 부착 분자(junctional adhesion molecule, JAM), CD99 및 혈소판/내피 세포 부착 분자-1(platelet/endothelial-cell adhesion molecule-1, PECAM-1), 내피 세포-선택적 부착 분자(endothelial cell-selective adhesion molecule, ESAM) 사이의 상호작용을 통한 연접(세포 주위(paracellular)) 경로를 통하여 또는 대안적으로는 내피 세포를 통하여(세포 횡단(transcellular) 경로) 이행할 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0077]

본 발명은 본원에 기술된 특정 방법, 프로토콜 및 시약 등에 한정되지 않으며, 따라서 변할 수 있음이 이해되어야 한다. 본원에서 사용되는 용어는 특정한 실시양태를 단지 기술하기 위한 것이며, 개시된 발명의 범주를 한정하고자 하는 것이 아니고, 본 발명의 범주는 특허청구범위에 의해서만 규정된다.

[0078]

본원에서 섹션 표제는 단지 조직 목적으로 사용되며, 어떠한 방식으로든 기술된 주제를 한정하는 것으로 파악되어서는 안 된다.

[0079]

일반적으로 본 출원의 방법 및 기술은 달리 나타내지 않으면 당업계에 공지된 통상적인 방법에 따라 그리고 본 명세서 전체에 걸쳐 인용되고 논의된 다양한 일반적인 그리고 더욱 구체적인 참고문헌에 기술된 바와 같이 수행된다. 예를 들어, 문헌[Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001)] 및 문헌[Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates (1992)], 및 문헌[Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990)]을 참조한다.

[0080]

정의

[0081]

본원에서 단수의 표현은 하나 또는 하나 초과; 적어도 하나를 의미한다. 복수의 표현이 본원에서 사용될 경우,

이것은 일반적으로 단수의 표현을 포함한다.

[0082]

본원에서 사용되는 바와 같이, "부착하는, 유착, 부착" 등의 용어는 생체내일 경우 혈관외유출을 생성하기에 충분한 백혈구 및 내피 세포의 회합을 나타낸다. 본 발명의 맥락 내에서, 본 발명의 시약에 의해 감소되거나 방지된 부착은 그렇게 충분하게 나타나는 것이다. 시험관내 응용에서, 유착 정도(친화력)는 반드시 그 수준일 필요는 없을 수도 있다. 예를 들어, 약물 개발의 맥락에서, 더욱 적은 정도인 친화력에 의한 부착(결합)을 탐지하기를 요망할 수 있다.

[0083]

"세포 은행"은 배양하여 향후 사용을 위해 보존한 세포의 상업적 명명법이다. 세포는 분액으로 보존될 수 있다. 세포는 저장소에 꺼내 바로 사용할 수도 있고 저장소에서 꺼내 증식시켜 사용할 수도 있다. 이는 투여용으로 이용 가능한 "재고" 세포가 있기만 하다면 편리하다. 세포는 제약적으로 허용 가능한 부형제 중에 이미 보존된 것일 수 있어서 세포는 직접적으로 투여될 수 있거나 세포는 이것이 보존으로부터 해제될 경우 적절한 부형제와 혼합될 수 있다. 세포는 냉동되거나 다르게는 생육성을 보존하는 형태로 보존될 수 있다. 본 발명의 일 실시양태에서, 세포 은행이 생성되며, 여기서, 세포는 하나 이상의 부착 분자의 발현의 감소와 같은 효과들 중 하나 이상을 달성하는 향상된 효력에 대해 선발되었다. 보존으로부터의 해제 이후, 그리고 대상체에 투여하기 전에, 효력에 대해 세포를 다시 분석하는 것이 바람직할 수 있다. 이는 본 출원에 기술된 또는 다르게는 당업계에 공지된 직접적이거나 간접적인 분석법들 중 임의의 것을 사용하여 행해질 수 있다. 그 후 원하는 효력을 갖는 세포는 그 후 처리용 대상체에 투여될 수 있다.

[0084]

"공동투여"는 2종 이상의 작용 물질의 동시 투여 또는 순차적 투여를 포함하여 서로와 연합되어, 함께, 대등하게 투여하는 것을 의미한다.

[0085]

"포함하는"은 다른 한정 없이, 필연적으로 다른 것이 포함될 수도 있다는 임의의 필요 조건 또는 배제 없이 지시 대상을 반드시 포함함을 의미한다. 예를 들어, "x 및 y를 포함하는 조성물"이라는 용어는 설사 어떤 다른 성분이 조성물에 존재한다 하더라도 x 및 y를 함유하는 임의의 조성물을 포함한다. 이와 마찬가지로, "x의 단계를 포함하는 방법"은 x가 당해 방법에서 유일한 단계이든지 이것이 단지 단계들 중 하나이든지 간에 설사 많은 다른 단계가 있을 수 있더라도 그리고 설사 단순하거나 복잡한 x가 다른 단계와 비교되더라도 x가 실시되는 임의의 방법을 포함한다. 본원에서 "이루어진" 및 "포함하는"이라는 어근의 용어를 사용한 유사한 어구는 "포함하는"의 동의어로 사용되며, 동일한 의미를 갖는다.

[0086]

"이루어진"은 "포함하는"의 동의어이다(상기 참조).

[0087]

"컨디셔닝된 세포 배양 배지"는 당업계에 공지된 용어이며, 세포를 성장시킨 배지를 나타낸다. 본원에서 이것은 세포 부착 분자 발현의 감소; 내피 세포에의 백혈구의 부착의 감소; 혈관외유출 감소 등을 포함하여 본 출원에 기술된 결과들 중 임의의 것을 달성하기에 효과적인 인자를 분비하기에 충분한 시간 동안 세포를 성장시킴을 의미한다.

[0088]

컨디셔닝된 세포 배양 배지는 세포를 배양하여 인자가 배지 내로 분비되게 한 배지를 나타낸다. 본 발명의 목적상, 세포는 충분한 수의 세포 분열을 통하여 성장시켜서 유효량의 그러한 인자를 생성하여 배지가 세포 부착 분자의 발현을 감소시켜 백혈구의 부착을 감소시키고 그에 따라 혈관외유출 등이 감소되게 할 수 있다. 세포는 당업계에 공지된 방법들 중 임의의 것에 의해 배지로부터 제거되며, 상기 방법은 원심분리, 여과, 면역불능(immunodepletion)(예를 들어, 태그된 항체 및 자성 컬럼), 및 FACS 분류를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0089]

"감소시키다" 또는 "저하시키다"는 백혈구 혈관외유출, 부착, 부착 모이어티의 발현의 감소, 또는 본원에 기술된 효과들 중 임의의 것과 같이 효과를 낮추거나 그를 전적으로 방지함을 의미한다.

[0090]

"EC 세포"는 기형암종으로 칭해지는 유형의 암의 분석에 의해 발견되었다. 1964년에, 연구자들은 기형암종에서 단일 세포가 단리될 수 있고 배양 중에 분화되지 않은 채 남아있을 수 있음을 알게 되었다. 이러한 유형의 줄기 세포는 배아 암종 세포(embryonic carcinoma cell, EC 세포)로 공지되게 되었다.

[0091]

일반적으로 "유효량"은 원하는 국소적 또는 전신적 효과를 제공하는 양을 의미하며, 예를 들어 혈관외유출에 이르게 되는 부착에 영향을 줌으로써 염증의 바람직하지 못한 효과를 개선시키기에 효과적인 양을 의미한다. 예를 들어, 유효량은 유익한 또는 원하는 임상 결과를 이루기에 충분한 양이다. 유효량은 모두를 한꺼번에 단회 투여로 또는 수회 투여로 유효량을 제공하는 분할된 양으로 제공될 수 있다. 어떤 것이 유효량으로 간주되는지에 대한 정확한 결정은 각각의 대상체에 대해 개별적인 인자들을 기반으로 할 수 있으며, 이는 대상체의 크기, 연령, 상해 및/또는 치료되는 질환 또는 상해, 및 상해가 일어나거나 질환이 시작된 이래의 시간의 양을 포함한다. 당

업계의 숙련자라면 당업계에서 일상적인 이들 고려사항을 기반으로 하여 주어진 대상체에 대한 유효량을 결정할 수 있다. 본원에서 사용될 때, "유효 용량"은 "유효량"과 동일한 것을 의미한다.

[0092] 일반적으로 "효과적인 경로"는 작용 물질을 원하는 구획, 시스템 또는 위치로 전달하는 것을 제공하는 경로를 의미한다. 예를 들어, 효과적인 경로는 작용 물질을 투여하여 원하는 작용 부위에서 유익한 또는 원하는 임상 결과를 이루기에 충분한 양의 작용 물질을 제공할 수 있는 것이다.

[0093] "배아 줄기 세포(ESC)"는 당업계에 공지되어 있으며, 이는 많은 상이한 포유류 종으로부터 제조되었다. 배아 줄기 세포는 배반포로 공지된 초기 단계 배엽의 내세포 덩어리(inner cell mass)로부터 유래된 줄기 세포이다. 배아 줄기 세포는 3가지의 일차 배엽층, 외배엽, 내배엽 및 중배엽의 모든 유도체로 분화될 수 있다. 이들은 성체 중에 220가지 초파의 세포 유형 각각을 포함한다. EC 세포는 태반을 제외하고서 체내의 임의의 조직이 될 수 있다. 단지 상실배 세포가 전능성이며, 이는 모든 조직 및 태반이 될 수 있다. ESC와 유사한 일부 세포는 체세포 핵을 핵체거 수정란 내로 핵이전함으로써 생성될 수 있다.

[0094] "혈관외유출"은 유체가 그의 컨테이너 외부로 누출되는 것을 나타낸다. 염증의 경우, 이것은 백혈구 세포가 모세혈관으로부터 그를 둘러싸고 있는 조직으로 이동하는 것을 나타낸다. 이는 또한 배경기술에 논의되어 있다.

[0095] "포함하다"라는 용어의 사용은 한정하고자 하는 것이 아니다.

[0096] "증가시키다" 또는 "증가시키는"은 백혈구 혈관외유출, 부착, 부착 모이어티의 발현, 또는 본원에 기술된 효과들 중 임의의 것과 같은 효과의 정도를 증가시키거나 전적으로 기존의 효과가 전혀 없는 경우를 유도함을 의미한다.

[0097] "유도된 만능 줄기 세포(IPSC 또는 iPS 세포)"는 예를 들어 체세포에 덜 분화된 표현형을 부여하는 외인성 유전자를 도입함으로써 재프로그래밍된 체세포이다. 그 후 이들 세포는 덜 분화된 자손으로 분화되도록 유도될 수 있다. iPS 세포는 2006년에 처음에 발견된 접근법의 변형을 이용하여 유도되었다(문헌[Yamanaka, S. et al., Cell Stem Cell, 1:39-49 (2007)]). 예를 들어, 한 가지 예에서, iPS 세포를 생성하기 위하여 과학자들은 피부 세포에서 출발하였으며, 상기 피부 세포는 그 후 세포 DNA 내로 유전자를 삽입하기 위하여 레트로바이러스를 이용한 표준 실험실 기술에 의해 변형되었다. 한 가지 예에서, 삽입된 유전자는 세포를 배아 줄기 세포 유사 상태로 유지하기 위하여 천연 조절자로서 함께 작용하는 것으로 공지된 Oct4, Sox2, Lef1, 및 c-myc이었다. 이들 세포는 문헌에 기술되었다. 예를 들어, 문헌[Wernig et al., PNAS, 105:5856-5861 (2008)]; 문헌[Jaenisch et al., Cell, 132:567-582 (2008)]; 문헌[Hanna et al., Cell, 133:250-264 (2008)]; 및 문헌[Brambrink et al., Cell Stem Cell, 2: 151-159 (2008)]을 참조한다. 이들 참고문헌은 IPSC 및 그의 제조 방법의 교시를 위한 참고문헌으로 포함된다. 그러한 세포는 특정 배양 조건 (특정 작용 물질에 노출시킴)에 의해 생성될 수 있음이 또한 가능하다.

[0098] "단리된"이라는 용어는 생체내에서 세포 또는 세포들과 회합된 하나 이상의 세포 구성요소 또는 하나 이상의 세포와 결부되지 않은 세포 또는 세포들을 나타낸다. "풍부화 집단"은 원하는 세포의 수가 생체내에서 또는 일차 배양에서 하나 이상의 다른 세포 유형에 비하여 상대적으로 증가함을 의미한다.

[0099] 그러나, 본원에서 사용될 때, "단리된"이라는 용어는 줄기 세포만의 존재를 나타내는 것은 아니다. 오히려, "단리된"이라는 용어는 세포가 그의 천연 조직 환경으로부터 떠나져 정상적인 조직 환경과 비교하여 더 높은 농도로 존재함을 나타낸다. 따라서, "단리된" 세포 집단은 줄기 세포에 더하여 세포 유형들을 추가로 포함할 수 있으며 추가의 조직 구성요소를 포함할 수 있다. 이는 또한 예를 들어 세포 배가의 견지에서 표현될 수 있다. 세포는 생체내에서 또는 생체외에서 10회, 20회, 30회, 40회 또는 그 초파의 배가를 겪었을 수도 있어서 이것은 생체내에서 또는 그의 원래 조직 환경에서(예를 들어, 골수, 말초 혈액, 지방 조직 등) 그의 원래 수와 비교하여 풍부화된다.

[0100] "MAPC"는 "다능성 성체 선구 세포(multipotent adult progenitor cell)의 두문자어이다. 본 출원에서, 상기 용어는 배아 줄기 세포의 특징을 갖는 세포 유형, 즉, 비배아 줄기 세포를 표기하기 위하여 사용된다. 이것은 분화시에 하나 초파의 배엽층, 예컨대 둘의 또는 셋 모두의 배엽층(즉, 내배엽, 중배엽 및 외배엽)의 세포 계통이 생기게 할 수 있다. MAPC는 텔로머라제, Oct 3/4(즉, Oct 3A), rex-1, rox-1 및 sox-2, 및 SSEA-4 중 하나 이상을 발현할 수 있다. MAPC에 있어서 "성체"라는 용어는 비-체한적이다. 이것은 비배아 체세포를 나타낸다. MAPC는 핵형이 정상적인 것이며, 생체내에서 기형종을 형성하지 않는다. 이러한 두문자어는 골수로부터 단리된 만능성 세포를 기술하기 위하여 국제 특허 출원 제PCT/US2000/21387호에서 먼저 사용되었다. 그러나, 골수로부터의 이러한 세포의 단리 후에, 만능성 마커 및/또는 분화능을 갖는 다른 세포가 발견되었으며, 본 발명의 목적

상, 이는 본원에 기술된 효과와 관련하여 "MAPC"로 처음에 표기된 세포와 기능적으로 등가일 수 있다.

[0101] "멀티스텝(MultiStem)(등록상표)"이라는 용어는 고도로 증식이 가능하고, 핵형이 정상적이며, 생체내에서 기형 종을 형성하지 않는 비배아 비생식 세포의 상표명이다. 이것은 하나 초파의 배엽층의 세포 계통으로 분화될 수 있다. 상기 세포는 텔로마라제, oct3/4, rex-1, rox-1, sox-2, 및 SSEA4 중 하나 이상을 발현할 수 있다. 멀티스텝(등록상표)은 특히 더욱 낮은 산소 및 더욱 높은 혈청의, 이 특히 출원에 개시된 세포 배양 방법에 따라 제조된다.

[0102] "제약적으로 허용 가능한 담체"는 본 발명에서 사용되는 세포를 위한 임의의 제약적으로 허용 가능한 배지이다. 그러한 배지는 등장성, 세포 대사, pH 등을 유지할 수 있다. 이것은 생체내에서 대상체에의 투여와 양립가능하며, 따라서 세포 전달 및 처리에 사용될 수 있다.

[0103] "효력(potency)"이라는 용어는 본 출원에 기술된 다양한 효과를 달성하는 세포(또는 세포로부터의 전디셔닝된 배지)의 능력을 나타낸다. 따라서, 효력은 다양한 수준의 효과를 의미하며, 이는 (1) 염증 감소; (2) 백혈구 침윤 감소(호중구, 림프구 또는 단핵구); (3) CD4⁺ 및 CD8⁺ 림프구를 포함하지만 이에 한정되는 것은 아닌 백혈구 상의 시알릴화 루이스 항원 x에의 셀렉틴의 부착 감소; 및 (4) ICAM, VCAM, E-셀렉틴, 및 P-셀렉틴을 포함하지만 이에 한정되는 것은 아닌, 내피 세포 상의 세포 부착 분자의 발현의 감소를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0104] "원생 배아 생식 세포(primitive embryonic germ cell)"(PG 또는 EG 세포)는 많은 덜 분화된 세포 유형을 생성하도록 배양 및 자극될 수 있다.

[0105] "선구 세포"는 그의 최종 분화된 자손의 특징들 중 일부를 갖지만 상기 특징 모두를 갖는 것은 아닌, 줄기 세포의 분화 동안 생성된 세포이다. 규정된 선구 세포, 예컨대 "심장 선구 세포"는 계통으로 결정되지만 특정한 또는 최종적으로 분화된 세포 유형으로는 결정되지 않는다. 두문자어 "MAPC"에서 사용되는 바와 같이 "선구체"라는 용어는 이를 세포를 특정 계통에 한정하지 않는다. 선구 세포는 선구 세포보다 더욱 고도로 분화된 자손 세포를 형성할 수 있다.

[0106] 본원에서 사용될 때 "감소시키다"라는 용어는 감소뿐만 아니라 방지도 의미한다. 치료의 맥락에서, "감소"는 하나 이상의 임상적 증상을 예방하거나 개선시키는 것이다. 임상적 증상은 치료되지 않은 채 둘 경우 대상체의 삶(건강)의 질에 부정적인 영향을 주거나 줄 하나의(또는 그 초파의) 증상이다. 이는 또한 혈관의 유출 감소, 내피 세포 상에서의 부착 분자의 하향조절, 내피 세포에의 백혈구의 부착의 감소, 주변 조직 내로의 백혈구 침윤의 감소, 백혈구 결합 감소 등과 같은 생물학적 효과에 적용되는데, 이의 마지막 결과는 염증의 해로운 영향을 개선시키는 것이다.

[0107] 원하는 수준의 효력(예를 들어, 하나 이상의 부착 분자의 발현을 감소시키는 효력)을 갖는 세포를 "선발"하는 것은 세포를 확인(분석법에 의한 것과 같음), 단리 및 증식함을 의미할 수 있다. 이는 세포를 단리한 모세포 집단보다 더 높은 효력을 갖는 집단을 생성할 수 있다.

[0108] 세포 선발은 원하는 효과가 있는지를 결정하는 그리고 또한 그 세포를 수득하는 것을 포함하는 분석법을 포함한다. 세포는 세포가 당해 효과를 유도하는 작용 물질과 함께 인큐베이션되지 않았거나 상기 작용 물질에 노출되지 않았다는 점에서 자연적으로 당해 효과를 가질 수 있다. 세포는 당해 분석법을 행하기 전에 효과를 갖는 것으로 공지된 것일 수는 없다. 당해 효과는 유전자 발현 및/또는 분비에 의존적일 수 있기 때문에, 당해 효과를 야기하는 유전자들 중 하나 이상을 기반으로 하여 또한 선발할 수 있다.

[0109] 선발은 조직 내의 세포로부터의 것일 수 있다. 예를 들어, 이 경우, 세포는 배양하여 증식되고, 원하는 효과에 대해 선발된 원하는 조직으로부터 단리되며, 선발된 세포는 추가로 증식된다.

[0110] 또한 선발은 배양 중인 세포와 같은 생체외 세포로부터의 것일 수 있다. 이 경우, 배양 중인 세포 중 하나 이상은 당해 효과에 대해 분석되며, 당해 효과를 갖는 수득된 세포는 추가로 증식될 수 있다.

[0111] 또한 세포는 향상된 효과에 대해 선발될 수 있다. 이 경우, 향상된 세포를 이미 수득한 세포 집단은 이미 당해 효과를 갖는다. 향상된 유효성은 모집단에서보다 세포당 효과의 더욱 큰 평균 양을 의미한다.

[0112] 향상된 세포가 선발되는 모집단은 실질적으로 균질할 수 있다(동일한 세포 유형). 이 집단으로부터 그러한 향상된 세포를 수득하는 한 가지 방법은 (당해 효과의 조정자를 이용하여 세포를 처리하는 것과는 반대로) 자연적으로 당해 효과를 갖는 클론을 수득하기 위하여 단일 세포 또는 세포 풀을 생성하고 그 세포 또는 세포 풀을 당해

효과에 대해 분석하고, 그 후 자연적으로 향상된 세포를 증식시키는 것이다.

[0113] 그러나, 세포는 내인성 세포 경로의 효과를 향상시킬 하나 이상의 작용 물질로 처리될 수 있다. 따라서, 실질적으로 균질한 집단을 처리하여 조정을 향상시킬 수 있다.

[0114] 집단이 실질적으로 균질하지 않다면, 처리할 모세포 집단은 향상된 효과가 추구되는 유효한 세포 유형을 100개 이상, 더 바람직하게는 상기 세포를 1,000개 이상, 더욱 더 바람직하게는 상기 세포를 10,000개 이상 포함하는 것이 바람직하다. 처리 후, 이러한 하위 집단은 공지된 세포 선발 기술에 의해 불균질 집단으로부터 회수될 수 있으며, 요망될 경우 추가로 증식될 수 있다.

[0115] 따라서, 당해 효과의 원하는 수준은 주어진 이전 집단에서의 수준보다 더 높은 것일 수 있다. 예를 들어, 조직으로부터 일차 배양하게 되고, 당해 효과를 갖도록 특정적으로 디자인된 것은 아닌 배양 조건에 의해 증식 및 단리된 세포는 모집단을 제공할 수 있다. 그러한 모집단은 세포당 평균 효과가 향상되도록 처리되거나 더 높은 효과를 발현하는 집단 내의 세포 또는 세포들에 대해 스크리닝될 수 있다. 그 후 그러한 세포는 더욱 높은(원하는) 효과를 갖는 집단을 제공하도록 증식될 수 있다.

[0116] "자기 재생"은 복제 딸 줄기 세포를 생성하는 능력을 나타내며, 상기 세포는 그를 생기게 한 것과 동일한 분화능을 갖는다. 이러한 맥락에서 사용되는 유사한 용어는 "분화"이다.

[0117] "줄기 세포"는 자기 재생을 겪을 수 있고(즉, 동일한 분화능을 갖는 자손), 또한 분화능이 더욱 제한된 자손 세포를 생성할 수 있는 세포를 의미한다. 본 발명의 맥락 내에서, 줄기 세포는 예를 들어 핵이전에 의해, 더욱 원시적인 줄기 세포와의 융합에 의해, 특정 전사 인자의 도입에 의해, 또는 특정 조건하에서의 배양에 의해 탈분화된 더욱 분화된 세포를 또한 포함한다. 예를 들어, 문헌[Wilmut et al., *Nature*, 385:810-813 (1997)]; 문헌[Ying et al., *Nature*, 416:545-548 (2002)]; 문헌[Guan et al., *Nature*, 440:1199-1203 (2006)]; 문헌[Takahashi et al., *Cell*, 126:663-676 (2006)]; 문헌[Okita et al., *Nature*, 448:313-317 (2007)]; 및 문헌[Takahashi et al., *Cell*, 131 :861-872 (2007)]을 참조한다.

[0118] 탈분화는 또한 탈분화를 야기하는 시험관내 또는 생체내의 물리적 환경에의 노출 또는 특정한 화합물의 투여에 의해 야기될 수 있다. 줄기 세포는 또한 비정상적인 조직, 예컨대 기형암종 및 일부 다른 공급원, 예컨대 배상체(비록 이것이 내세포 덩어리로부터 직접적으로 유래된 것은 아니지만 배아 조직으로부터 유래된다는 점에서 이는 배아 줄기 세포로 간주될 수 있다 하더라도)로부터 유도될 수 있다. 또한 줄기 세포는 유도된 만능 중기 세포와 같이 줄기 세포 기능과 결부된 유전자를 비-줄기 세포 내로 도입함으로써 생성될 수 있다.

[0119] "대상체"는 척추 동물, 예컨대 포유류, 예컨대 인간을 의미한다. 포유류는 인간, 개, 고양이, 말, 소 및 돼지를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0120] "치료적 유효량"이라는 용어는 포유류에서 임의의 치료적 반응을 생성하는 것으로 결정된 작용 물질의 양을 나타낸다. 예를 들어, 유효한 소염 치료제는 환자의 생존성을 연장시키고/시키거나 공공연한 임상적 증상을 저해할 수 있다. 본원에서 사용되는 용어의 의미 내에서 치료적으로 유효한 치료는 심지어 치료가 질환 결과 그 자체를 개선시키지 않는 경우에도 대상체의 삶의 질을 개선시키는 치료를 포함한다. 그러한 치료적 유효량은 당업계의 숙련자에 의해 쉽게 확정된다. 따라서, "치료"는 그러한 양을 전달하는 것을 의미한다. 따라서, 치료는 염증의 임의의 병리학적 증상을 예방하거나 개선시킬 수 있다.

[0121] "치료하다", "치료하는" 또는 "치료"는 본 발명과 관련하여 널리 사용되며, 각각의 그러한 용어는 특히 요법을 방해하고/하거나 요법으로부터의 결과를 방해하는 것을 포함하여 결핍증, 기능 이상, 질환, 또는 기타 해로운 과정을 예방하거나, 개선시키거나, 저해하거나, 치유하는 것을 포함한다.

줄기 세포

[0123] 본 발명은 바람직하게는 척추 동물 종, 예컨대 인간, 비인간 영장류, 사육 동물, 가축, 및 기타 비인간 포유류의 줄기 세포를 사용하여 수행될 수 있다. 이는 하기에 기술된 세포를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

배아 줄기 세포

[0125] 가장 잘 연구된 줄기 세포는 배아 줄기 세포(ESC)이며, 그 이유는 이것이 무제한적인 자가-재생 및 다능성 분화능을 갖기 때문이다. 이 세포는 배반포의 내세포 덩어리로부터 유래되거나 임플란트 후 배(배아 생식 세포 또는 EG 세포)의 원시 생식 세포로부터 유래될 수 있다. ES 및 EG 세포는 먼저 마우스로부터, 그리고 그 후에 다수의 상이한 동물로부터, 더욱 최근에는 또한 비인간 영장류 및 인간으로부터 유래되었다. 마우스 배반포 또는 기타

동물의 배반포 내로 도입될 경우, ESC는 동물의 모든 조직에 기여할 수 있다. ES 및 EG 세포는 SSEA1(마우스) 및 SSEA4(인간)에 대한 항체에 의한 양성 염색에 의해 확인될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 제5,453,357호; 미국 특허 제5,656,479호; 미국 특허 제5,670,372호; 미국 특허 제5,843,780호; 미국 특허 제5,874,301호; 미국 특허 제5,914,268호; 미국 특허 제6,110,739호; 미국 특허 제6,190,910호; 미국 특허 제6,200,806호; 미국 특허 제6,432,711호; 미국 특허 제6,436,701호, 미국 특허 제6,500,668호; 미국 특허 제6,703,279호; 미국 특허 제6,875,607호; 미국 특허 제7,029,913호; 미국 특허 제7,112,437호; 미국 특허 제7,145,057호; 미국 특허 제7,153,684호; 및 미국 특허 제7,294,508호를 참조하는데, 상기 미국 특허 각각은 배아 줄기 세포 및 그의 제조 및 증식 방법의 교시를 위하여 참고로 포함된다. 따라서, ESC 및 그의 단리 및 증식 방법은 당업계에 공지되어 있다.

[0126]

다수의 전사 인자 및 외인성 사이토카인이 확인되었는데, 이는 생체내에서 배아 줄기 세포의 효력 상태에 영향을 준다. 줄기 세포 만능성에 연루된, 기술될 제1 전사 인자는 Oct4이다. Oct4는 POU(Pit-Oct-Unc) 패밀리의 전사 인자에 속하며, 프로모터 또는 인핸서 영역 내에 "옥타머(octamer) 모티프"로 칭해지는 옥타머 서열을 포함하는 유전자의 전사를 활성화시킬 수 있는 DNA 결합 단백질이다. Oct4는 난통(egg cylinder)이 형성될 때까지 수정된 접합자의 난할 단계의 순간에 발현된다. Oct3/4의 기능은 분화 유도 유전자(즉, FoxaD3, hCG)를 억제하고 다능성을 촉진하는 유전자(FGF4, Utf1, Rex1)를 활성화시키는 것이다. 고 이동도 군(high mobility group, HMG) 박스 전사 이자의 구성원인 Sox2는 Oct4와 협력하여 내세포 덩어리에서 발현되는 유전자의 전사를 활성화시킨다. 배아 줄기 세포에서의 Oct3/4 발현은 특정 수준들 사이에서 유지되는 것이 필수적이다. >50%의 Oct4의 발현 수준의 하향조절 또는 과발현은 배아 줄기 세포의 운명을 변경시키며, 이때 원시 내배엽/중배엽 또는 영양외배엽이 각각 형성된다. 생체내에서, Oct4 결합 배는 배반포 단계로 발달하지만, 내세포 덩어리 세포는 만능성이 아니다. 대신, 이것은 배의 영양막(extraembryonic trophoblast) 계통을 따라 분화된다. 포유류 Spalt 전사 인자인 Sa114는 Oct4의 상류 조절자이며, 따라서 배발생의 초기 동안 Oct4의 적절한 수준을 유지하는 데 중요하다. Sa114 수준이 특정한 역치 미만으로 강하되될 경우, 영양외배엽 세포는 내세포 덩어리로 이소성으로 증식된다. 만능성에 필요한 또 다른 전사 인자는 Nanog로서, 이는 켈트족의 "Tir Nan Og"(영원히 젊은 땅)를 따라 명명된 것이다. 생체내에서, Nanog는 조밀한 상실배 단계로부터 발현되며, 후속적으로 내세포 덩어리에 한정되고, 임플란트 단계에 의해 하향조절된다. Nanog의 하향조절은 원장형성 동안 다중계통 분화를 허용하는 데 중요하고 만능성 세포의 제어되지 않은 증식을 피하는 데 중요하다. 5.5일에 단리된 Nanog 널(null) 배는 배의 내배엽을 주로 포함하고 식별가능한 배반엽 상충을 포함하지 않는 무질서한 배반포로 이루어진다.

[0127]

비배아 줄기 세포

[0128]

줄기 세포가 대부분의 조직에서 확인되었다. 아마도 가장 잘 특성화된 것은 조혈 줄기 세포(HSC)일 것이다. HSC는 세포 표면 마커 및 기능적 특징을 이용하여 정체될 수 있는 중배엽 유래 세포이다. HSC는 골수, 말초 혈액, 제대혈, 태아 간, 및 난황낭으로부터 단리되었다. HSC는 조혈을 개시하며, 다수의 조혈 계통을 생성한다. 치명적으로 조사된 동물 내로 이식될 경우, HSC는 적혈구 호중구-대식세포, 거핵구, 및 림프양 조혈 세포 풀을 재집단화할 수 있다. HSC는 또한 일부 자기 재생 세포 분열을 겪도록 유도될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 제5,635,387호; 미국 특허 제5,460,964호; 미국 특허 제5,677,136호; 미국 특허 제5,750,397호; 미국 특허 제5,681,599호; 및 미국 특허 제5,716,827호를 참조한다. 미국 특허 제5,192,553호에는 인간 신생 또는 태아 조혈 줄기 또는 선구 세포의 단리 방법이 보고되어 있다. 미국 특허 제5,716,827호에는 Thy-1⁺ 선구체인 인간 조혈세포, 및 이를 시험관내에서 재생시키기에 적절한 성장 배지가 보고되어 있다. 미국 특허 제5,635,387호에는 인간 조혈 세포 및 그의 전구체의 배양을 위한 방법 및 장치가 보고되어 있다. 미국 특허 제6,015,554호에는 인간 림프양 및 수지상 세포의 재구성 방법이 기술되어 있다. 따라서, HSC 및 그의 단리 및 증식 방법은 당업계에 공지되어 있다.

[0129]

당업계에 공지된 또 다른 줄기 세포는 신경 줄기 세포(neural stem cell, NSC)이다. 이 세포는 생체내에서 증식하고 적어도 일부의 신경 세포에서 계속 재생될 수 있다. 생체외에서 배양될 경우, 신경 줄기 세포는 상이한 유형의 뉴런 및 신경교 세포로 증식 및 분화되도록 유도될 수 있다. 뇌 내로 이식될 경우, 신경 줄기 세포는 생착되어 신경 및 신경교 세포를 생성할 수 있다. 예를 들어, 문헌[Gage F.H., Science, 287: 1433-1438 (2000)], 문헌[Svendsen S.N. et al., Brain Pathology, 9:499-513 (1999)], 및 문헌[Okabe S. et al., Mech Development, 59:89-102 (1996)]을 참조한다. 미국 특허 제5,851,832호에는 뇌조직으로부터 수득된 다능성 신경 줄기 세포가 보고되어 있다. 미국 특허 제5,766,948호에는 신생 대뇌 반구로부터 신경모세포를 생성하는 것이 보고되어 있다. 미국 특허 제5,564,183호 및 미국 특허 제5,849,553호에는 포유류 신경 능선 줄기 세포의 사용이 보고되어 있다. 미국 특허 제6,040,180호에는 포유류 다능성 CNS 줄기 세포의 배양에 의한 분화 뉴런의 시

험관내 생성이 보고되어 있다. 국제 특허 공개 제WO 98/50526호 및 국제 특허 공개 제WO 99/01159호에는 신경상피 줄기 세포, 올리고수지상세포-성상세포 전구체, 및 계통-제한된 뉴런 전구체의 생성 및 단리가 보고되어 있다. 미국 특허 제5,968,829호에는 배아 전뇌로부터 수득된 신경 줄기 세포가 보고되어 있다. 따라서, 신경 줄기 세포와 그의 제조 및 증식 방법은 당업계에 공지되어 있다.

[0130] 당업계에서 광범위하게 연구된 또 다른 줄기 세포로는 중간엽 줄기 세포(mesenchymal stem cell, MSC)가 있다. MSC 배아 중배엽으로부터 유래되며, 특히 성체 골수, 말초 혈액, 지방, 태반 및 제대혈을 포함하는 많은 공급원으로부터 단리될 수 있다. MSC는 근육, 뼈, 연골, 지방 및 힘줄을 포함하는 많은 중배엽 조직으로 분화될 수 있다. 이 세포에 대한 상당한 문헌이 있다. 예를 들어, 미국 특허 제5,486,389호; 미국 특허 제5,827,735호; 미국 특허 제5,811,094호; 미국 특허 제5,736,396호; 미국 특허 제5,837,539호; 미국 특허 제5,837,670호; 및 미국 특허 제5,827,740호를 참조한다. 또한 문헌[Pittenger, M. et al., *Science*, 284: 143-147 (1999)]을 참조한다.

[0131] 성체 줄기 세포의 또 다른 예로는 지방 유래 성체 줄기 세포(adipose-derived adult stem cell, ADSC)가 있으며, 이는 전형적으로 지방흡인술, 이어서 콜라게나제를 사용한 ADSC의 방출에 의해 지방으로부터 단리되었다. ADSC는 지방으로부터 더욱 많은 세포가 단리될 수 있다는 것을 제외하고는 골수로부터 유래된 MSC와 많은 점에서 유사하다. 이 세포는 뼈, 지방, 근육, 연골 및 뉴런으로 분화되는 것으로 보고되었다. 단리 방법이 미국 특허 공개 제2005/0153442호에 기술되었다.

[0132] 당업계에 공지된 다른 줄기 세포는 위장 줄기 세포, 표피 줄기 세포 및 간 줄기 세포 - 이는 또한 "난원 세포"로 칭해졌음 - 를 포함한다(문헌[Potten, C. et al., *Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 353:821-830 (1998)], 문헌[Watt, F., *Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 353:831 (1997)]; 문헌[Alison et al., *Hepatology*, 29:678-683 (1998)]).

[0133] 하나 초파의 배아 배엽층의 세포 유형으로 분화될 수 있는 것으로 보고된 다른 비배아 세포는 제대혈(미국 특허 공개 제2002/0164794호 참조), 태반(미국 특허 공개 제2003/0181269호 참조), 제대 기질(umbilical cord matrix)(문헌[Mitchell, K.E. et al., *Stem Cells*, 21 :50-60 (2003)]), 작은 배아 유사 줄기 세포(문헌[Kucia, M. et al., *J Physiol Pharmacol*, 57 Suppl 5:5-18 (2006)]), 양수 줄기 세포(문헌[Atala, A., *J Tissue Regen Med*, 1 :83-96 (2007)]), 피부 유래 전구체(문헌[Toma et al., *Nat Cell Biol*, 3:778-784 (2001)]), 및 골수(미국 특허 공개 제2003/0059414호 및 미국 특허 공개 제2006/0147246호 참조) 유래의 세포를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아닌데, 상기 미국 특허 공개 및 문헌 각각은 이를 세포의 교시를 위하여 참고로 포함된다.

체세포의 재프로그래밍 방법

[0134] 핵이식, 세포 융합, 및 배양 유도된 재프로그래밍과 같은 몇몇 상이한 방법을 이용하여 분화 세포의 배아 상태로의 전환을 유도하였다. 핵이전은 체세포 핵을 핵제거 난모 세포 내로 주입하는 것을 포함하며, 상기 난모 세포는 대리로 내로의 이전시에 클론을 생성할 수 있거나("생식적 클로닝"), 또는 배양물 형태로 외식시에 유전자 매칭된 배아 줄기(ES) 세포를 생성할 수 있다("체세포 핵이전(somatic cell nuclear transfer, SCNT)"). 체세포와 ES 세포의 세포 융합은 만능성 ES 세포의 모든 특징을 나타내는 하이브리드를 생성한다. 배양물 형태의 체세포의 외식은 만능성 또는 다능성일 수 있는 불사 세포주를 선발한다. 현재, 정원 줄기 세포가 출생 후 동물로부터 유래될 수 있는 유일한 만능성 세포원이다. 규정된 인자를 이용한 체세포의 트랜스덕션(transduction)은 만능 상태로의 재프로그래밍을 개시할 수 있다. 이들 실험적 접근법이 광범위하게 개관되었다(문헌[Hochdlinger and Jaenisch, *Nature*, 441 : 1061 - 1067 (2006)] 및 문헌[Yamanaka, S., *Cell Stem Cell*, 1:39-49 (2007)]).

핵이전

[0135] 체세포 핵이전(somatic cell nuclear transfer, SCNT)으로도 칭해지는 핵이식 (nuclear transplantation, NT)은 공여 체세포 유래의 핵을 핵제거 난모 세포 내로 도입하여 클로닝된 동물, 예컨대 양 돌리(Dolly)를 생성하는 것을 나타낸다(문헌[Wilmut et al., *Nature*, 385:810-813 (1997)]). NT에 의한 살아있는 동물의 생성은 최종적으로 분화된 세포의 것을 포함하는 체세포의 후성적 상태가 안정한 반면 비가역적으로 고정된 것은 아니며 새로운 유기체의 발달을 인도할 수 있는 배아 상태로 재프로그래밍될 수 있음을 보여주었다. 배아 발달 및 질환에 연루된 기본본적인 후성적 기작을 밝히는 재미있는 실험적 접근법을 제공하는 것에 더하여, 핵 클로닝 기술은 환자-특이적 이식 의학에 있어서 잠재적으로 흥미롭다.

체세포와 배아 줄기 세포의 융합

[0139] 체세포 핵을 미분화 상태로 후성적으로 재프로그래밍하는 것은 배아 세포와 체세포의 융합에 의해 생성된 쥐과 하이브리드에서 입증되었다. 다양한 체세포와 배아 암종 세포(문헌[Solter, D., Nat Rev Genet, 7:319-327 (2006)], 배아 생식 세포(EG 세포) 또는 ES 세포(문헌[Zwaka and Thomson, Development, 132:227-233 (2005)]) 사이의 하이브리드는 많은 특징을 모 배아 세포와 공유하며, 이는 만능성 표현형이 그러한 융합 생성물에서 우성 형질임을 나타낸다. 마우스에서와 같이(문헌[Tada et al., Curr Biol, 11 : 1553-1558 (2001)]), 인간 ES 세포는 융합 후 체세포 핵을 재프로그래밍하는 효력을 갖는다(문헌[Cowan et al., Science, 309: 1369-1373(2005)]; 문헌[Yu et al., Science, 318: 1917-1920 (2006)]). 사일런트(silent) 만능성 마커, 예컨대 Oct4의 활성화 또는 불활성 체세포 X 염색체의 재활성화는 하이브리드 세포에서의 체세포 계놈의 재프로그래밍에 대한 분자적 증거를 제공하였다. 융합한지 2일 후 처음에 관찰된 다능성 마커의 활성화에 있어서 DNA 복제가 필수적이며(문헌[Do and Scholer, Stem Cells, 22:941-949 (2004)]), ES 세포에서의 Nanog의 강요된 과발현은 신경 줄기 세포와 융합될 때 만능성을 촉진한다(문헌[Silva et al., Nature, 441 :997-1001 (2006)])는 것이 제안되었다.

[0140] 배양에 의해 유도된 재프로그래밍

[0141] 다능성 세포가 배아 공급원, 예컨대 배반포(ES 세포), 배반엽 상충(EpiSC 세포), 원시 생식 세포(EG 세포), 및 출생 후 정원 줄기 세포("maGSCsm" "ES 유사" 세포)의 내세포 덩어리(ICM) 및 할구로부터 유래되었다. 하기 만능성 세포는 그의 공여 세포/조직과 함께 하기와 같다: 파르토제네틱(parthenogenetic) ES 세포는 쥐과 난모 세포로부터 유래되며(문헌[Narasimha et al., Curr Biol, 7:881-884 (1997)]); 배아 줄기 세포는 할구(문헌[Wakayama et al., Stem Cells, 25:986-993 (2007)]); 내세포 덩어리 세포(공급원은 적용가능하지 않음)(문헌[Eggan et al., Nature, 428:44-49 (2004)])로부터 유래되었으며; 배아 생식 세포 및 배아 암종 세포는 원시 생식 세포로부터 유래되었으며(문헌[Matsui et al., Cell, 70:841-847 (1992)]); GMCS, maSSC, 및 MASC는 정원 줄기 세포로부터 유래되었으며(문헌[Guan et al., Nature, 440: 1199-1203 (2006)]; 문헌[Kanatsu-Shinohara et al., Cell, 119: 1001-1012 (2004)]; 및 문헌[Seandel et al., Nature, 449:346-350 (2007)]); EpiSC 세포는 배반엽 상충으로부터 유래되며(문헌[Brons et al., Nature, 448:191-195 (2007)]; 문헌[Tesar et al., Nature, 448:196-199(2007)]); 파르토제네틱 ES 세포는 인간 난모 세포로부터 유래되었으며(문헌[Cibelli et al., Science, 295L819 (2002)]; 문헌[Revazova et al., Cloning Stem Cells, 9:432-449 (2007)]); 인간 ES 세포는 인간 배반포로부터 유래되었으며(문헌[Thomson et al., Science, 282: 1145-1147 (1998)]); MAPC는 골수(문헌[Jiang et al., Nature, 418:41-49 (2002)]; 문헌[Phinney and Prockop, Stem Cells, 25:2896-2902 (2007)]); 대혈 세포(대혈로부터 유래됨)(문헌[van de Ven et al., Exp Hematol, 35: 1753-1765 (2007)])로부터 유래되었으며; 신경구 유래 세포는 신경 세포로부터 유래되었다(문헌[Clarke et al., Science, 288: 1660-1663 (2000)]). 정원 줄기 세포 또는 PGS와 같은 생식 세포 계통 유래의 공여 세포는 생체내에서 단능성인 것으로 공지되어 있지만, 만능성 ES 유사 세포(문헌[Kanatsu-Shinohara et al., Cell, 119:1001-1012 (2004)] 또는 maGSC(문헌[Guan et al., Nature, 440: 1199-1203 (2006)])는 장기간 시험관내 배양 후 단리될 수 있음이 밝혀졌다. 이러한 만능성 세포 유형 대부분은 시험관내 분화 및 기형종 형성이 가능하였지만, 단지 ES, EG, EC, 및 정원 줄기 세포 유래 maGCS 또는 ES 유사 세포는 더욱 엄격한 기준에 의해 만능성이었으며, 그 이유는 이들이 출생후 키메라를 형성하여 생식 세포계에 기여할 수 있었기 때문이다. 최근, 다능성 성체 정원 줄기 세포(multipotent adult spermatogonial stem cell, MASC)가 성체 마우스의 고환 정원 줄기 세포로부터 유래되었으며, 이 세포는 ES 세포의 것과는 상이하지만(문헌[Seandel et al., Nature, 449:346-350 (2007)]) 임플란트 후 마우스 배의 배반엽 상충으로부터 유래된 EpiSC 세포와는 유사한(문헌[Brons et al., Nature, 448:191-195 (2007)]; 문헌[Tesar et al., Nature, 448:196-199 (2007)]) 발현 프로필을 가졌다.

[0142] 규정된 전사 인자에 의한 재프로그래밍

[0143] 타카하시(Takahashi) 및 야마나카(Yamanaka)는 다시 ES 유사 상태로 체세포를 재프로그래밍하는 것을 보고하였다(문헌[Takahashi and Yamanaka, Cell, 126:663-676 (2006)]). 이들은 4가지 전사 인자 Oct4, Sox2, c-myc, 및 Klf4의 바이러스 매개 트랜스덕션, 이어서 Oct4 표적 유전자 Fbxl5의 활성화에 대한 선발 후 마우스 배아 섬유모세포(mouse embryonic fibroblast, MEF) 및 성체 섬유모세포를 만능성 ES 유사 세포로 성공적으로 재프로그래밍하였다(도 2A). Fbxl5가 활성화된 세포는 만들어진 iPS(유도된 만능 줄기(induced pluripotent stem)) 세포였으며, 이는 살아있는 키메라를 생성할 수는 없다 할지라도 기형종을 형성하는 그의 능력에 의해서는 만능성인 것으로 밝혀졌다. 이러한 만능성 상태는 트랜스덕션된 Oct4 및 Sox2 유전자의 계속적인 바이러스 발현에 의존적이었으며, 반면에 내인성 Oct4 및 Nanog 유전자는 ES 세포에서 더 낮은 수준으로 발현되거나 발현되지 않았으며, 그의 각각의 프로모터는 대부분 메틸화된 것으로 밝혀졌다. 이는 Fbxl5-iPS 세포가 ES 세포에 상응하지

않았지만 불완전한 상태의 재프로그래밍을 나타냈을 수도 있다는 결론과 일치한다. 유전자 실험에 의해 Oct4 및 Sox2가 만능성에 필수적임이 확립되었지만(문헌[Chambers and Smith, *Oncogene*, 23:7150-7160 (2004)]; 문헌[Ivanona et al., *Nature*, 442:5330538 (2006)]; 문헌[Masui et al., *Nat Cell Biol*, 9:625-635 (2007)]), 재프로그래밍에 있어서 두 발암 유전자, c-myc 및 Klf4의 역할은 덜 명백하다. 이를 발암 유전자 중 일부는 사실상 리프로그래밍에 있어서 없어도 될 수 있으며, 그 이유는 마우스 및 인간 iPS 세포 둘 모두가 효율이 낮기는 하지만 c-myc 트랜스덕션의 부재 하에서 수득되었기 때문이다(문헌[Nakagawa et al., *Nat Biotechnol*, 26: 191-106 (2008)]; 문헌[Werning et al., *Nature*, 448:318-324 (2008)]; 문헌[Yu et al., *Science*, 318: 1917-1920 (2007)]).

[0144] MAPC

[0145] MAPC는 "다능성 성체 선구 세포(multipotent adult progenitor cell)"(비-ES, 비-EG, 비생식 세포)의 두문자어이다. MAPC는 적어도 2개의, 예컨대 모든 3개의 원생 배엽층(외배엽, 중배엽 및 내배엽)의 세포 유형으로 분화하는 능력을 갖는다. ES 세포에서 발견되는 유전자는 MAPC에서 또한 발견될 수 있다(예를 들어, 텔로미라제, Oct 3/4, rex-1, rox-1, sox-2). Oct 3/4(인간에 있어서 Oct 3A)는 ES 및 생식 세포에 특이적인 것으로 보인다. MAPC는 MSC보다 더욱 원생의 선구 세포 집단을 대표한다(문헌[Verfaillie, CM., *Trends Cell Biol* 12:502-8 (2002)], 문헌[Jahagirdar, B.N., et al., *Exp Hematol*, 29:543-56 (2001)]; 문헌[Reyes, M. and CM. Verfaillie, *Ann N Y Acad Sci*, 938:231-233 (2001)]; 문헌[Jiang, Y. et al., *Exp Hematol*, 30:896-904 (2002)]; 및 문헌[Jiang, Y. et al., *Nature*, 418:41-9. (2002)]).

[0146] 인간 MAPC가 미국 특허 제7,015,037호 및 미국 특허 출원 제10/467,963호에 기술되어 있다. MAPC는 다른 포유류에서 확인되었다. 예를 들어 쥐과 MAPC가 미국 특허 제7,015,037호 및 미국 특허 출원 제10/467,963호에 또한 기술되어 있다. 래트 MAPC가 미국 특허 출원 제10/467,963호에 또한 기술되어 있다.

[0147] 이를 참고 문헌이 카테린 베르파일리에(Catherine Verfaillie)에 의해 처음에 단리된 MAPC를 기술하기 위하여 참고로 포함된다.

[0148] MAPC의 단리 및 성장

[0149] MAPC의 단리 방법이 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 미국 특허 제7,015,037호 및 미국 특허 출원 제10/467,963호를 참조하며, 이를 방법은 MAPC의 특성화(표현형)와 함께 본원에 참고로 포함된다. MAPC는 골수, 태반, 제대혈 및 대혈, 근육, 뇌, 간, 척수, 혈액 또는 피부를 포함하지만 이에 한정되는 것은 아닌 다수의 공급원으로부터 단리될 수 있다. 따라서, 골수 흡인물, 뇌 또는 간 생검체, 및 기타 기관을 수득하고(예를 들어, 본원에 참고로 포함된 상기 특허 출원에 개시된 것과 같은 기능적 또는 형태적 분석법에 의해) 이를 세포에서 발현되는(또는 발현되지 않는) 유전자에 의존하여 당업계의 숙련자가 이용가능한 양성 또는 음성 선별 기술을 이용하여 세포를 단리하는 것이 가능하다.

[0150] 미국 특허 제7,015,037호에 기술된 인간 골수 유래의 MAPC

[0151] MAPC는 공통적인 백혈구 항원 CD45 또는 적혈구 모세포 특이적 글리코포린-A(Gly-A)를 발현하지 않는다. 혼합된 세포 집단은 피콜 하이파크(Ficoll Hypaque) 분리에 처해졌다. 그 후 세포를 항-CD45 및 항-Gly-A 항체를 이용하여 음성 선별에 처하여 CD45⁺ 및 Gly-A⁺ 세포의 집단을 고갈시키고, 그 후 남아있는 대략 0.1%의 골수 단핵 세포를 회수하였다. 또한 세포를 피브로넥틴-코팅된 웰에 도말하고 하기전에 기술된 바와 같이 2-4주 동안 배양하여 CD45⁺ 및 Gly-A⁺ 세포의 세포를 고갈시켰다. 부착성 골수 세포의 배양에서, 다수의 부착성 기질 세포가 대략 30의 세포 배가에서 복제 노화를 겪으며, 더욱 균질한 세포 집단이 계속하여 증식되고 긴 텔로미어를 유지한다.

[0152] 대안적으로, 양성 선별은 세포 특이적 마커들의 조합을 통하여 세포를 단리하기 위하여 사용될 수 있다. 양성 및 음성 선별 기술 둘 모두는 당업계의 숙련자가 이용가능하며, 음성 선별 목적에 적합한 다수의 단클론 및 다클론 항체가 또한 당업계에서 입수가능하고(예를 들어, 문헌[Leukocyte Typing V, Schlossman, et al., Eds. (1995) Oxford University Press] 참조) 다수의 공급처로부터 구매가능하다.

[0153] 세포 집단 혼합물로부터의 포유류 세포 분리 기술이 또한 슈바르츠(Schwartz) 등의 미국 특허 제5,759,793호(자성 분리법), 문헌[Basch et al., 1983](면역친화성 크로마토그래피) 및 문헌[Wysocki and Sato, 1978](형광-활성화 세포 분류법)에 기술되었다.

[0154] 미국 특허 제7,015,037호에 기술된 MAPC의 배양

- [0155] 본원에 기술된 바와 같이 단리된 MAPC는 본원 및 미국 특허 제7,015,037호에 개시된 방법을 이용하여 배양될 수 있는데, 상기 미국 특허는 이들 방법에 대한 참고로 포함된다.
- [0156] 세포는 저혈청 또는 무혈청 배양 배지에서 배양될 수 있다. MAPC 배양에 사용되는 무혈청 배지는 미국 특허 제7,015,037호에 기술되어 있다. 다수의 세포는 무혈청 또는 저-혈청 배지에서 성장시켰다. 이 경우, 배지는 하나 이상의 성장 배지로 보충된다. 일반적으로 사용되는 성장 배지는 뼈 형태형성 단백질, 염기성 섬유모세포 성장 인자, 혈소판 유래된 성장 인자 및 표피 성장 인자를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 예를 들어, 미국 특허 제7,169,610호; 미국 특허 제7,109,032호; 미국 특허 제7,037,721호; 미국 특허 제6,617,161호; 미국 특허 제6,617,159호; 미국 특허 제6,372,210호; 미국 특허 제6,224,860호; 미국 특허 제6,037,174호; 미국 특허 제5,908,782호; 미국 특허 제5,766,951호; 미국 특허 제5,397,706호; 및 미국 특허 제4,657,866호를 참조하는데, 이들 모두는 무혈청 배지에서의 세포의 성장의 교시를 위하여 참고로 포함된다.
- [0157] 추가의 배양 방법
- [0158] 추가의 실험에서, MAPC가 배양되는 밀도는 약 100개 세포/cm² 또는 약 150개 세포/cm²로부터 약 10,000개 세포/cm²까지 변할 수 있으며, 이는 약 200개 세포/cm²에서 약 1500개 세포/cm² ~ 약 2000개의 세포/cm²까지를 포함한다. 상기 밀도는 종들 사이에서 변할 수 있다. 추가로, 최적 밀도는 배양 조건 및 세포원에 따라 변할 수 있다. 주어진 세트의 배양 조건 및 세포에 최적인 밀도를 결정하는 것은 당업자의 기술 이내이다.
- [0159] 또한, 약 1-5%, 특히 3-5%를 포함하는 약 10% 미만의 유효한 대기중 산소 농도가 배양 중인 MAPC의 단리, 성장 및 분화 동안 임의의 시점에서 사용될 수 있다.
- [0160] 세포는 다양한 혈청 농도, 예를 들어 약 2-20% 하에 배양될 수 있다. 소 태아 혈청이 사용될 수 있다. 더욱 높은 혈청이 더욱 낮은 산소 장력, 예를 들어 약 15-20%와 조합되어 사용될 수 있다. 세포는 배양 디쉬에의 부착 이전에 선발될 필요는 없다. 예를 들어, 피콜 구배 후, 세포는 예를 들어 250,000-500,000개/cm²로 직접적으로 도말될 수 있다. 부착성 콜로니를 고르고, 아마도 풀링하고, 증식시킬 수 있다.
- [0161] 일 실시양태에서, 실시예에서 실험 절차에서 사용될 경우 고 혈청(대략 15-20%) 및 저 산소(대략 3-5%) 조건이 세포 배양에 사용되었다. 구체적으로, 콜로니로부터의 부착성 세포는 18% 혈청 및 3% 산소(PDGF 및 EGF를 이용함)에서 약 1700-2300개의 세포/cm²의 밀도로 도말 및 계대되었다.
- [0162] MAPC에 특이적인 실시양태에서, 보충제는 MAPC가 모든 3가지 계통으로 분화되는 능력을 유지하도록 하는 세포 인자 또는 구성요소이다. 이는 미분화 상태의 특이적 마커의 발현에 의해 지시될 수 있다. 예를 들어 MAPC는 Oct 3/4(Oct 3A)를 항시적으로 발현하며 높은 수준의 텔로머라제를 유지한다.
- [0163] 세포 배양
- [0164] 하기에 열거된 모든 구성요소에 있어서, 이들 구성요소를 교시하기 위하여 참고로 포함된 미국 특허 제7,015,037호를 참조한다.
- [0165] 일반적으로, 본 발명에 유용한 세포는 당업계에서 입수가능하고 공지된 배양 배지에서 유지 및 증식될 수 있다. 또한 고려되는 것은 포유류 혈청을 이용한 세포 배양 배지의 보충이다. 최적의 성장 및 증식에 필요한 미량 원소를 세포에 공급하기 위하여 추가의 보충제를 사용하는 것이 또한 유리할 수 있다. 호르몬이 또한 유리하게 세포 배양에서 사용될 수 있다. 지질 및 지질 담체가 세포의 유형 및 분화된 세포의 운명에 따라 세포 배양 배지를 보충하기 위하여 또한 사용될 수 있다. 또한 고려되는 것은 영양 세포층의 사용이다.
- [0166] 세포는 또한 "3D"(웅집) 배양물 형태로 성장시킬 수 있다. 일례로는 2009년 1월 21일에 출원된 국제 특허 출원 제PCT/US2009/31528호가 있다.
- [0167] 배양물 형태로 일단 확립되면, 세포는 신선하게 사용되거나, 또는 예를 들어 40% FCS 및 10% DMSO를 포함하는 DMEM을 사용하여 냉동 원액으로 냉동 및 보존될 수 있다. 당업계의 숙련자라면 배양된 세포를 위한 냉동 원액을 제조하는 다른 방법을 또한 이용할 수 있다.
- [0168] 약학 제제
- [0169] 미국 특허 제7,015,037호가 약학 제제의 교시를 위하여 참고로 포함된다. 특정 실시양태에서, 세포 집단은 전달 용으로 바꾼 그리고 전달에 적합한, 즉 생리학적으로 양립가능한 조성물 내에 존재한다.

- [0170] 일부 실시양태에서, 대상체에게 투여하기 위한 세포(또는 컨디셔닝된 배지)의 순도는 약 100%이다(실질적으로 균질함). 다른 실시양태에서, 이것은 95%~100%이다. 일부 실시양태에서, 이것은 85%~95%이다. 특히, 다른 세포와의 혼합물의 경우, 상기 백분율은 약 10%-15%, 15%-20%, 20%-25%, 25%-30%, 30%-35%, 35%-40%, 40%-45%, 45%-50%, 60%-70%, 70%-80%, 80%-90%, 또는 90%-95%일 수 있다. 또는 단리/순도는 세포 배가의 견지에서 표현될 수 있으며, 여기서, 세포는 예를 들어 10-20회, 20-30회, 30-40회, 40-50회 또는 그 초과의 세포 배가를 겪었다.
- [0171] 특정 용도에 있어서 세포 투여를 위한 제제의 선택은 다양한 인자에 따라 달라진다. 이들 중 두드러진 것은 대상체의 종, 치료 대상 병태의 성질, 대상체에서의 그의 상태 및 분포, 투여되는 다른 치료제 및 작용제의 성질, 최적 투여 경로, 상기 경로를 통한 생존성, 투약법, 및 당업계의 숙련자에게 명백한 기타 인자이다. 예를 들어, 적합한 담체 및 기타 첨가제의 선택은 정확한 투여 경로 및 특정 투여 형태의 성질에 따라 달라진다.
- [0172] 세포/배지의 수성 혼탁물의 최종 제제는 전형적으로 혼탁물의 이온 강도를 등장성으로 조정하고(즉, 약 0.1~0.2) 생리학적 pH(즉, pH 6.8~7.5)로 조정하는 것을 포함한다. 전형적으로 최종 제제는 또한 유체 윤활제를 포함한다.
- [0173] 일부 실시양태에서, 세포/배지는 단위 투여형의 주사가능 형태, 예컨대 용액, 혼탁액 또는 에멀션으로 제제화된다. 전형적으로 세포/배지의 주사에 적합한 약학 제제는 살균 수성 용액 및 분산액이다. 주사 가능한 제제를 위한 담체는 예를 들어 물, 염수, 인산염 완충 염수, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 액상 폴리에틸렌 글리콜 등) 및 적합한 그의 혼합물을 포함하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다.
- [0174] 당업자라면 본 발명의 방법에서 투여될 조성물 중의 세포 및 선택적 첨가제, 비히클 및/또는 담체의 양을 쉽게 결정할 수 있다. 전형적으로, (세포에 더하여) 임의의 첨가제는 용액, 예컨대 인산염 완충 염수 중에 0.001~50 중량%의 양으로 존재한다. 활성 성분은 대략 마이크로그램 내지 밀리그램, 예컨대 약 0.0001~약 5 중량%, 바람직하게는 약 0.0001~약 1 중량%, 가장 바람직하게는 약 0.0001~약 0.05 중량% 또는 약 0.001~약 20 중량%, 바람직하게는 약 0.01~약 10 중량%, 가장 바람직하게는 약 0.05~약 5 중량%로 존재한다.
- [0175] 세포의 투여량은 넓은 한계치 이내에서 변하며, 각각의 특정한 경우에서의 개개의 요건에 맞추어진다. 일반적으로, 비경구 투여의 경우, 수여체 체중 1 kg당 약 10000개~약 2000만개의 세포를 투여하는 것이 통상적이다. 세포수는 수여체의 체중 및 상태, 투여 횟수 또는 투여 빈도, 및 당업계의 숙련자에게 공지된 기타 변수에 따라 달라진다. 세포는 조직 또는 기관에 적합한 경로에 의해 투여될 수 있다. 예를 들어, 세포는 전신적으로, 즉, 비경구적으로, 정맥내 투여에 의해 투여될 수 있거나, 특정 조직 또는 기관에 표적화될 수 있으며, 세포는 피하 투여를 통하여 또는 특정한 요망되는 조직 내로의 투여에 의해 투여될 수 있다.
- [0176] 세포는 적절한 부형제 중에 약 0.01~약 5×10^6 개의 세포/ml의 농도로 혼탁될 수 있다. 주사액에 적합한 부형제는 생물학적으로 그리고 생리학적으로 세포와 그리고 수여체와 양립가능한 것, 예컨대 완충 염수액 또는 기타 적합한 부형제이다. 투여용 조성물은 표준 방법에 따라 제제화되고, 생성되고, 보존되어 적당한 살균성 및 안정성에 응할 수 있다.
- [0177] 립프조혈 조직 내로의 투여
- [0178] 이들 조직 내로의 투여 기술은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 골수간 주사는 전형적으로 후장골릉의 골수강 내로 세포를 직접적으로 주사하는 것을 포함할 수 있지만, 상기 후장골릉, 대퇴골, 경골, 상완골 또는 척골내의 다른 부위를 포함할 수도 있으며, 비장 주사는 복강경 또는 개복술을 통한 비장의 외과적 노출 또는 방사선 사진 유도된 비장 내로의 주사를 포함할 수 있으며, 페이어 패치(Peyer's patch), GALT, 또는 BALT 주사는 개복술 또는 복강경 주사 절차를 필요로 할 수 있다.
- [0179] 투약
- [0180] 인간 또는 기타 포유류를 위한 용량은 당업자에 의한 과도한 실험 없이 본 개시내용, 본원에 인용된 문서, 및 당업계의 지식으로부터 결정될 수 있다. 본 발명의 다양한 실시양태에 따라 사용하기에 적절한 세포/배지의 용량은 다수의 인자에 따라 달라진다. 일차 및 보조 요법용으로 투여되는 최적 용량을 결정하는 파라미터는 일반적으로 하기 중 일부 또는 그 모두를 포함한다: 치료되는 질환 및 그의 상태; 대상체의 종, 그의 건강, 성별, 연령, 체중 및 대사율; 대상체의 면역적격성; 투여되는 기타 치료제; 및 대상체의 병력 또는 유전자형으로부터의 기대되는 잠재적인 합병증. 상기 파라미터는 또한 하기를 포함할 수 있다: 세포가 동계인지, 자가 이식성인지, 동종인지 또는 이종인지; 그의 효력(비활성); 세포/배지가 유효하게 되는 것에 대해 표적화되어야 하는 부

위 및/또는 분포; 및 세포의 생착 및/또는 세포/배지에의 접근성과 같은 당해 부위의 그러한 특징. 추가의 파라미터는 다른 인자(예컨대 성장 인자 및 사이토카인)와 함께 공동투여하는 것을 포함한다. 주어진 상황에서의 최적 용량은 또한 세포/배지가 제제화되는 방법, 이것이 투여되는 방식, 및 세포/배지가 투여 후 표적 부위에서 국소화되는 정도를 고려한다.

[0181] 세포의 최적 용량은 자가 이식성, 단핵 골수 이식에 사용되는 용량의 범위 내일 수 있다. 세포의 상당히 순수한 체제에 있어서, 다양한 실시양태에서의 최적 용량은 투여당 1 kg의 수여체 질량당 $10^4 \sim 10^8$ 개의 세포의 범위이다. 일부 실시양태에서, 투여당 최적 용량은 $10^5 \sim 10^7$ 개의 세포/kg이다. 다수의 실시양태에서, 투여당 최적 용량은 $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$ 개의 세포/kg이다. 참고로서, 전술한 것에서의 더 높은 용량은 자가 이식성 단핵 골수 이식에 사용되는 핵화 세포의 용량과 유사하다. 더 적은 용량들 중 일부는 자가 이식성 단핵 골수 이식에서 사용되는 CD34⁺ 세포의 수/kg과 유사하다.

[0182] 다양한 실시양태에서, 세포/배지는 초기 용량으로 투여되고 그 후 추가의 투여에 의해 유지될 수 있다. 세포/배지는 처음에 하나의 방법에 의해 투여되고 그 후 동일한 방법 또는 하나 이상의 상이한 방법에 의해 투여될 수 있다. 당해 수준은 진행 중인 세포/배지의 투여에 의해 유지될 수 있다. 다양한 실시양태에서는 정맥내 주사에 의해 세포/배지가 처음에 투여되거나 대상체 내에서 그 수준이 유지되도록 투여되거나 또는 그 둘 모두이다. 다양한 실시양태에서, 환자의 상태 및 기타 인자 - 본원의 다른 곳에서 논의됨 -에 따라 다른 투여 형태가 사용된다.

[0183] 세포/배지는 넓은 시간 범위에 걸쳐 다수의 빈도로 투여될 수 있다. 일반적으로 처리 길이는 질환 과정의 길이, 적용되는 요법의 유효성, 및 처리되는 대상체의 상태 및 반응에 비례한다.

용도

[0185] 본 발명의 세포는 본 출원에 기술된 다양한 생물학적 기작을 통하여 염증을 궁극적으로 감소시키는 하나 이상의 인자를 분비하기 때문에, 세포 투여는 상기에 열거된 바와 같이 다수의 병상에서 바람직하지 못한 염증을 감소시키는 데 유용하다.

[0186] 게다가, 본 출원에 기술된 생물학적 기작에 대한 지식에 의해 다른 용도가 제공된다. 이들 중 하나는 약물 개발을 포함한다. 이는 면역 조절을 조정하는 능력에 대해 하나 이상의 화합물을 스크리닝하는 것을 포함한다. 이는 먼저 하기 중 임의의 것을 감소시키는 세포의 능력에 대한 분석법을 개발하는 것을 포함한다: (1) 염증, (2) 혈관외유출, (3) 내피 세포-백혈구 결합, (4) 내피 세포에서의 부착 분자의 발현 (RNA 및/또는 단백질), (5) 부착 세포 분자에 결합하는 동계 리간드 (백혈구 상에 위치함)의 발현이 내피 세포에 의해 조정될 경우, 이 리간드의 발현, 및 (6) 내피 세포에 의한 사이토카인의 생성. 따라서, 당해 분석법은 생체내에서 또는 시험관내에서 행해지도록 디자인될 수 있다. 조정 분석에서는 임의의 원하는 수준, 예를 들어 형태학적 수준, 유전자 발현 수준, 또는 기능적 수준의 활성화 상태가 평가될 수 있다. 이것은 혈관 내피를 포함할 수 있다. 대안적으로, 이것은 천연 및 재조합 내피 세포 스트레인 및 내피 세포주를 포함하여 내피로부터 부분적으로 또는 전적으로 제거된 혈관 내피 세포를 포함할 수 있다. 그러나, 이것은 내피 세포 상에서 발현되는 부착 분자 및 백혈구 상에서 발견되는 그의 동계 결합 리간드와 같이 결합 친화도를 갖는 것으로 공지된 단리된 세포 구성요소를 또한 포함할 수 있다. 따라서, 세포 부착 분자 및 동계 백혈구 리간드를 발현 또는 분비하는 재조합 세포를 사용하여 결합을 분석할 수 있다. 또는, 단리된 림프구 결합 파트너가 내피 부착 분자, 예컨대 P-셀렉틴 또는 E-셀렉틴 및 CD 15; ICAM-1 또는 ICAM-2 및 LFA-1; ICAM 및 Mac-1; VCAM-1 및 VLA-4를 발현하는 세포와 함께 사용될 수 있다.

[0187] 본 분석법은 활성화 사이토카인, 예컨대 TNF- α , 또는 IL-1 β 를 포함할 수 있다. 사이토카인 단독은 분석을 위한 기반을 형성할 수 있다. 예를 들어, 세포/배지는 TNF- α 에 결합하는 능력 또는 세포 기반 수용체 분석법에서 TNF- α 의 경쟁적 저해제로서 작용하는 능력 또는 용해성 수용체에서 경쟁적인 저해제로서 작용하는 능력에 대해 분석될 수 있다. 미결합 TNF- α 는 직접적으로 검출될 수 있거나, 미결합 TNF- α 에 대한 분석은 TNF- α 의 임의의 생물학적 효과에 대한 분석을 포함할 수 있다. 이는 또한 임의의 기타 활성화 사이토카인, 예를 들어 IL-1에 적용된다.

[0188] 또는 본 분석법은 NF κ B에 의해 제어되는 프로모터에 작동가능하게 연결된 리포터 유전자를 이용하여 수용체 기반 분석법에서 NF κ B를 조정하는(증가, 감소시키는) 세포/배지의 능력을 포함할 수 있다. 그 후 이 분석법을 이용하여 세포/배지의 효과를 증가 또는 감소시키는 화합물/작용 물질에 대해 스크리닝한다.

- [0189] 유전자 발현은 단백질 또는 RNA를 직접적으로 분석함으로써 평가될 수 있다. 이는 당업계에서 이용가능한 공지된 기술들 중 임의의 것을 통하여, 예컨대 FACS 및 기타 항체 기반 검출법 및 PCR과 기타 혼성화 기반 검출법에 의해 행해질 수 있다. 간접적인 분석법, 예컨대 임의의 공지된 결합 파트너에의 결합이 또한 발현에 사용될 수 있다.
- [0190] 발현/분비에 대한 분석법은 ELISA, 루미넥스(Luminex), qRT-PCR, 항-인자 웨스턴 블로트(western blot), 및 조직 샘플 또는 세포에서의 인자 면역조직화학적 방법을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0191] 세포 및 컨디셔닝된 배지에서의 조정 인자의 정량적 측정은 상업적으로 입수 가능한 분석 키트(예를 들어, 2단계의 감별적 항체 기반 분석법에 의존하는 알앤디 시스템즈(R&D Systems))를 사용하여 수행될 수 있다.
- [0192] 본 발명은 본원에 기술된 바와 같이 효력이 증가된 세포를 생성하는 방법을 포함한다. 따라서, 본 발명은 본원에 기술된 임의의 효과를 갖는 세포의 능력을 증가시키는 화합물을 확인하는 방법을 포함하며, 이는 세포를 화합물에 노출시키는 단계 및 세포가 임의의 원하는 수준의 효과를 달성하는 능력에 대해 분석하는 단계에 의한 것이다. 일 실시양태에서, 일부 세포는 본원에 기술된 효과를 갖는 인자를 생성하기 전에 활성화 내피 세포와의 접촉을 필요로 할 수 있다. 이러한 세포는 "나이브" 세포로 표기될 수 있다. 따라서, 일 실시양태에서, 본 출원에 기술된 약물 개발에 관련된 화합물의 사용에 의한 활성화 내피 세포의 효과를 치환하는 것이 가능하다. 일 실시양태에서, 예를 들어 본 발명자는 IL-1 β , TNF- α , 및 IFN- γ 의 조합이 예시적인 섹션에 간략하게 기술된 바와 같이 활성화 내피 세포와의 접촉을 치환할 수 있음을 밝혀냈다. 따라서, 세포는 이러한 치환을 허용하는 화합물의 확인을 위하여 다수의 화합물을 이용하여 스크리닝될 수 있다. 그 후 이들 화합물은 임상적, 치료적 및 진단적 응용과 세포 은행 구축에 유용한 조성물의 생성뿐만 아니라 본 출원에 기술된 치료 용도들 중 임의의 것을 위하여 나이브 세포를 전처리하는 데 사용될 수 있다.
- [0193] 특정 분석법의 예
- [0194] 1. MAPC와의 공동배양 후 또는 MAPC로부터의 컨디셔닝된 배지와 함께 인큐베이션된 후 부착 분자의 존재를 조사하기 위한 내피 세포의 FACS 분석법.
- [0195] 2. MAPC와 함께 공동배양된 또는 MAPC로부터의 컨디셔닝된 배지와 함께 인큐베이션된 내피 세포에의 호중구 결합의 정량화.
- [0196] 3. MAPC와의 공동배양 후 또는 MAPC로부터의 컨디셔닝된 배지와 함께 인큐베이션된 후 프로모터 기반 시스템을 이용한 NF- κ B 활성의 정량화.
- [0197] 4. 내피층을 MAPC와 함께 공동배양한 후 또는 MAPC로부터의 컨디셔닝된 배지와 함께 인큐베이션한 후 ECIS 기반 시스템 또는 유사 시스템을 사용한 내피층을 통한 백혈구 혈관외유출의 정량화.
- [0198] 효력에 대한 분석은 또한 세포에 의해 분비되는 활성 인자를 검출함으로써 수행될 수 있다. 이들은 글루코코르티코이드, HB-EGF, IL-10, 프로스타글란дин(Prostaglandin) A1, IL-13, IL-1R, IL-18R, IFN-R, TNF-R1, TNF-R2, IL-4, IL-11, IFN- β , TGF- β 1, β 2, β 3, 프로스타글란дин E2, SPP1, CYLD, 엘라스타제, VEGF, IL-33, 티모신 B4, 및 TGF- β 아드레노메틸린을 포함할 수 있다. 검출은 예를 들어 RNA 또는 단백질 분석법을 통한 직접적인 것, 또는 간접적인, 예를 들어 이들 인자의 하나 이상의 생물학적 효과에 대한 생물학적인 분석일 수 있다.
- [0199] 본 발명의 추가의 용도는 임상 투여용 세포를 제공하기 위하여 세포 은행을 확립하는 것이다. 일반적으로, 이 절차의 근본적인 부분은 다양한 치료적 임상 세팅에서 투여에 대해 원하는 효력을 갖는 세포를 제공하는 것이다.
- [0200] 또한 약물 개발에 유용한 상기 분석법들 중 임의의 것을 적용하여 투여용 은행으로부터뿐만 아니라 은행용의 세포도 선발할 수 있다.
- [0201] 따라서, 은행 구축 절차에서, 세포(또는 배지)는 임의의 상기 효과를 달성하는 능력에 대해 분석된다. 그 후, 세포는 임의의 상기 효과에 대해 원하는 효력을 갖는 것이 선발되며, 이러한 세포는 세포 은행 구축을 위한 기반을 형성한다.
- [0202] 또한 효력은 외인성 화합물, 예컨대 다수의 조합 라이브러리를 이용한 세포의 스크리닝을 통하여 발견된 화합물을 이용한 처리에 의해 증가될 수 있음이 고려된다. 이들 화합물 라이브러리는 작은 유기 분자, 안티센스 핵산, siRNA DNA 압타머, 웹티드, 항체, 비-항체 단백질, 사이토카인, 케모카인 및 화학유인물질을 포함하지만 이에 한정되는 것은 아닌 작용 물질의 라이브러리일 수 있다. 예를 들어, 세포는 성장 및 제조 절차 동안 임의의 시

점에 그러한 작용 물질에 노출될 수 있다. 유일한 요건은 작용 물질이 효력을 증가시키는지의 여부를 평가하기 위하여 행해지는 소정의 분석법에 충분한 수가 있어야 한다는 것이다. 상기에 기술된 일반적인 약물 개발 과정 동안 발견된 그러한 작용 물질은 더욱 유리하게는 은행 구축 전에 마지막 계대 동안 적용될 수 있다.

[0203] 세포를 특정 시험 요건을 겪은 조건부 골수 공여체로부터 단리하여 이 공여체로부터 수득된 세포 생성물이 임상 세팅에 사용하기에 안전함을 결정한다. 단핵 세포는 수동 또는 자동 절차를 이용하여 단리된다. 이러한 단핵 세포는 배양물 중에 두어져서 세포가 세포 배양 용기의 처리 표면에 부착되게 한다. MAPC 세포는 처리 표면 상에서 증식시키며, 이때 배지 교환은 2일 및 4일에 일어난다. 6일에, 세포는 기계적 또는 효소적 수단에 의해 처리 기재로부터 제거되며, 세포 배양 용기의 또 다른 처리 표면 상에 재도말된다. 8일 및 10일에, 세포는 이전과 같이 처리 표면으로부터 제거되어 재도말된다. 13일에, 세포는 처리 표면으로부터 제거되며, 세척되며, 저온보호 제 물질과 조합되며, 궁극적으로 액체 질소 내에서 냉동된다. 세포는 적어도 1주일 동안 냉동된 후, 세포의 분액을 꺼내고, 효력, 아이덴티티(identity), 살균성 및 기타 검사에 대해 시험하여 세포 은행의 유용성을 결정한다. 그 후 이 은행 내의 이러한 세포는 이를 해동시키거나, 이를 배양물 중에 넣거나 이를 냉동고로부터 꺼내어 사용하여 잠재적인 지시를 처리함으로써 사용될 수 있다.

[0204] 또 다른 용도로는 세포 투여 후 효율 및 유익한 임상 효과에 대한 진단 분석이 있다. 지시에 따라, 평가에 이용 가능한 바이오마커가 있을 수 있다. 예를 들어, 높은 수준의 C-반응성 단백질은 급성 염증 반응과 결부된다. CRP의 수준을 모니터링하여 유익한 임상 효과를 결정할 수 있다.

[0205] 추가의 용도로는 세포를 대상체에게 투여하는 것에 선행하는 진단적 전처리로서 임의의 상기 결과를 달성하는 세포의 효능을 평가하는 것이다.

조성물

[0207] 또한 본 발명은 본원에 기술된 임의의 효과(즉, 염증, 혈관외유출, 부착, 내피 활성화 감소 등)를 달성함에 있어서 특정 효력을 갖는 세포 집단에 관한 것이다. 상기에 기술된 바와 같이, 이러한 집단은 원하는 효력을 갖는 세포를 선발함으로써 확립된다. 이러한 집단을 사용하여 다른 조성물, 예를 들어 특정한 원하는 효력을 갖는 집단을 포함하는 세포 은행 및 특정한 원하는 효력을 갖는 세포 집단을 함유하는 제약 조성물을 만든다.

[실시예]

실시예 1

[0210] 멀티스템(등록상표)은 본 실시예에 기술된 실험 절차에서 사용한 MAPC 세포 제제의 상표명이다.

[0211] 다능성 성체 선구 세포는 활성화 후 내피 세포 부착 분자 표면 발현을 조정하여 AMI 후 염증을 감소시킨다.

이론적 설명/배경

[0213] 염증 부위로의 면역 세포의 국소화는 상해 및 감염에 대한 면역 반응의 중요한 부분이다. 염증에 반응하여 백혈구, 림프구 및 단핵구를 포함하는 면역 세포는 내피 세포층에 결합하여 그를 가로질러 상해 부위로 이행한다^{1,2}. 내피 세포는 트롬빈, 히스타민, 향염증성 사이토카인(예를 들어, TNF- α , 인터루킨 1 β) 및 산소 라디칼에 의해 활성화되며 이는 E-셀렉틴, V-CAM 및 I-CAM-1을 포함하는 부착 분자를 상향조절하게 된다³⁻⁵. 내피 세포의 세포 표면 상에서의 세포 부착 분자의 상향조절은 활성화된 면역 세포가 내피 세포 장벽에 부착하게 하고, 롤링하게 하고 그를 가로질러 이행하게 한다⁴.

[0214] 면역계의 이동은 감염에 대한 그리고 창상 치유에 대한 면역 반응의 결정적인 부분이지만, 허혈성 상해 후 염증은 세포 독성 및 사멸에 기여할 수 있다. 예를 들어, 급성 심근 경색 후, 호중구 침윤의 증가는 혈전용해 요법 및 초회 혈관 성형술로 치료된 환자에 있어서 유해 이벤트의 위험성 증가와 결부된다⁶⁻⁸. 심근 경색에 대한 염증 반응의 정도는 경색 크기의 결정 및 후속적인 좌심실(LV) 리모델링에 있어서 중요한 역할을 한다^{9,10}. 심장으로의 호중구의 국소화는 좌심실 리모델링에 기여하는 반응성 산소 화학종(reactive oxygen species, ROS) 및 프로테이제를 방출함으로써 심근 상해에 기여한다. 추가로, 호중구는 "재유동 없음"으로 기술되는 현상에서 모세혈관을 차단함으로써 미세혈관 및 모세혈관 상해에 기여한다¹¹. T 헬퍼 1(Th1) 세포쪽으로의 향염증성 불균형은 좌심실 확장, 수축 기능 이상 및 기능 감소에 기여한다¹². 따라서, AMI 후 염증성 세포 반응 및 호중구의 조정은 심근에 대한 상해를 감소시키는 것을 돋는다.

- [0215] 멀티스템(등록상표)은 전임상 모델에서 AMI 후 심장 기능을 개선시키는 것으로 밝혀졌고 현재 제I기 임상 실험 중인 중식된 인간 임상 등급의 동종성 다능성 성체 선구 세포이다¹³⁻¹⁵. 직접적 좌전 하행 결찰에 의한 심근 경색의 유도 후 경색 주변 부위 내로 멀티스템을 전달하면 동물 모델에서 심장 기능이 개선된다. 비히를 대조와 비교하면, 이들 연구에서 멀티스템 처리된 동물은 개선된 좌심실 수축 기능, 감소된 흉터 영역, 증가된 혈관 밀도, 및 개선된 심근 활동 특징을 나타냈다^{14, 16, 17}. 심근 또는 내피 세포로의 멀티스템의 최소 분화 및 멀티스템의 생착의 낮은 수준으로 인하여, AMI 동안의 멀티스템의 이득은 방분비(paracrine) 효과로부터 유래되는 것으로 여겨진다.
- [0216] 이전 연구에 의하면 설치류 및 인간 멀티스템이 강력한 면역억제 특성을 디스플레이함이 문서에 기록되었으며, 멀티스템 배양물이 시험관내에서 비-면역원성이고 항체 활성화 T-세포 증식을 억제할 수 있음이 입증되었다^{13,15}. 멀티스템의 면역억제 도는 소염 특성은 내피 세포까지 확장되고 멀티스템은 부분적으로는 호중구 침윤을 감소시키는 면역 세포 부착 및 내피 세포 활성화의 면역조정을 통하여 AMI 동안 이득을 부여할 수 있다고 가정하였다.
- [0217] 이 연구에서, 멀티스템은 세포 표면에 대한 세포 부착 분자의 상향조절을 조사함으로써 이것이 내피 세포 활성화를 조정할 수 있는지를 결정하기 위하여 조사하였다. 멀티스템과 대동맥 또는 폐 내피 세포와의 공동배양물은 TNF- α 를 이용한 활성화 시에 내피 세포의 세포 표면에 대한 E-셀렉틴, V-CAM, 및 더욱 적은 정도로는 I-CAM의 상향조절을 방지하는 것으로 밝혀졌다. E-셀렉틴의 상향조절은 세포 표면으로부터의 절단 증가의 결과가 아닌 것으로 보였다. 대신, 멀티스템은 V-CAM, I-CAM, 및 E-셀렉틴의 전사 감소를 통하여 세포 표면 상향조절을 조정하였다. 멀티스템과의 공동배양시에 관찰된 세포 표면 부착 분자 발현의 감소는 미처리 대조와 비교하여 내피 세포에의 호중구 결합을 감소시켰다. 이 활성은 모든 골수 유래 부착성 줄기 세포에 공통적인 것이 아니며, 그 이유는 MSC가 TNF- α 에 의한 활성화 시에 V-CAM, E-셀렉틴 또는 I-CAM 세포 표면 상향조절을 조정할 수 없기 때문이다. 이러한 결과는 MSC 및 멀티스템이 염증성 신호에 반응하는 독특한 분비 프로필을 가짐을 시사한다. 급성 심근 경색 후 감소된 내피 세포 활성화가 염증 및 호중구 침윤을 감소시킬 수 있는지를 결정하기 위하여, 허혈성 이벤트에 의해 유도되는 염증성 반응의 감소에 대한 멀티스템의 영향을 AMI의 래트 모델에서 조사하였다. 비히를 처리 대조와 비교하여 영구적인 LAD 결찰 후 멀티스템 처리 심장에서 호중구 조직 엘라스타제의 수준 감소와 상관관계가 있는 호중구 침윤 수준 감소가 발견되었다.
- [0218] 재료 및 방법
- [0219] 세포 배양
- [0220] 인간 대동맥 내피 세포(HAEC)를 론자(Lonza, 미국 메릴랜드주 워커스빌, <http://www.lonza.com>)로부터 구매하고, 론자로부터의 내피 성장 배지-2(Endothelial Growth Medium-2, EGM-2)를 사용하여 계대 7까지 제조업자의 지시에 따라 배양하였다. 인간 폐 미세혈관 내피 세포(HPMEC)를 사이언셀(ScienCell, 미국 캘리포니아주 칼스배드, www.scientellonline.com)로부터 구매하고, 사이언셀로부터의 내피 세포용 배지(Endothelial Cell Medium, ECM)를 사용하여 계대 4까지 제조업자의 지시에 따라 배양하였다. 인간 중간엽 줄기 세포(MSC)를 론자로부터 구매하고, 론자로부터의 중간엽 줄기 세포 성장 배지(Mesenchymal Stem Cell Growth Medium, MSCGM)를 사용하여 계대 6까지 제조업자의 지시에 따라 배양하였다. 인간 멀티스템을 기술된 바와 같이 배양하였다¹⁸.
- [0221] 내피 공동배양물 분석
- [0222] HAEC 또는 HPMEC를 그의 각각의 성장 배지 중 1×10^5 개의 세포/cm²로 6월 0.4 μm 막 트렌스웰(Transwell) 플레이트(서모 피셔 사이언티픽(Thermo Fisher Scientific, 미국 매사추세츠주 월팀, <http://www.fishersci.com>)의 기저부에 도말하고, 가습된 5% CO₂, 37°C 분위기에서 3일 동안 인큐베이션하였다. 배지를 흡인하고, 세포를 PBS로 헹구었다. 2 ml의 멀티스템(등록상표) 배지를 웰당 첨가하고, 인서트는 1:1, 1:4, 1:10, 또는 1:20(HAEC:멀티스템)을 포함하였다. 1 ml의 멀티스템 배지 중 멀티스템을 웰 내에 넣었다. 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich, 미국 미주리주 세인트 루이스, <http://www.sigmaldrich.com>)로부터의 10 ng/ml의 재조합 인간 종양 고사 인자 알파(rhTNF α)를 각각의 웰에 첨가하였다. 내피 세포 단독(- rhTNF α), 내피 세포 단독 + 10 ng/ml의 rhTNF α , 및 1:1의 공동배양물(-rhTNF α)로 이루어진 대조를 또한 셋업하였다. 대조는 3 ml 멀티스템 배지에서 수행하였다. 그 후 샘플을 가습된 5% CO₂, 37°C 분위기에서 3일 동안 인큐베이션하였다. 대안적으로, MSC 및 MSCGM을 비교 연구용으로 멀티스템 및 멀티스템 배지 대신 사용하였다. 이 분석은 또한 rhTNF α 대신 시그마-알드리치로부터의 10 ng/ml의 재조합 인간 인터루킨 1 β (rhIL-1 β)를 사용하여 수행하였다.

[0223] 유세포 분석법적 분석

세포를 50/50의 PBS/무효소(밀리포어(Millipore, 미국 매사추세츠주 빌레리카, <http://www.millipore.com>))를 이용하여 6웰 플레이트로부터 탈리시키고, 1600 rpm에서 5분 동안 스핀시켜 가라앉게 하고, 600 μl 의 PBS에 재현탁시켰다. 각각의 샘플을 유세포 분석법적 염색을 위하여 3개의 퓨브 내로 동일하게 분할하였다. 세포는 암소에서 4°C에서 40분 동안 비디 파밍겐(BD Pharmingen, 미국 캘리포니아주 새너제이, <http://www.bd-biosciences.com>)으로부터의 CD106 - FITC 콘쥬게이션됨 -(V-CAM1), CD54 - PE 콘쥬게이션됨 -(I-CAM1), 또는 CD62E - PE 콘쥬게이션됨 -(E-셀렉틴)에 대한 항체 20 μl 와 함께 인큐베이션하였다. 추가로, FITC 마우스 IgG1 κ 또는 PE 마우스 IgG1 κ(비디 파밍겐)를 사용하여 이소형 대조를 진행시켰다. 세포를 2 ml의 PBS로 세척하고, 1600 rpm에서 5분 동안 스핀하여 가라앉게 하였다. 상청액을 버리고, 세포를 200 μl 의 PBS + 1% 파라포름알데히드(일렉트론 마이크로스코피 사이언시즈(Electron Microscopy Sciences, 미국 웬실베이니아주 햅필드, <http://www.electronmicroscopiesciences.com>))에 재현탁시켰다. 488 nm 아르곤 레이저를 갖춘 FACS Vantage SE 유세포 분석기(베톤 디킨슨 이뮤노사이토메트리 시스템즈(Becton Dickinson Immunocytometry Systems, 미국 캘리포니아주 새너제이))에서 유세포 분석법적 분석을 수행하였다. PE(FL2) 형광으로부터의 방출을 585/42 밴드 패스(band pass) 필터를 사용하여 검출하였다. 데이터 획득 및 분석을 셀퀘스트(CellQuestTM) 소프트웨어(베톤 디킨슨)를 사용하여 수행하였다.

[0225] 면역형광

12 mm 현미경 커버 글래스(피셔 사이언티픽)를 6웰 트랜스웰 플레이트의 기저부 내에 넣은 후 HAE를 공동배양물 분석을 위하여 도말하였다. 세포는 실온에서 1시간 동안 10% 당나귀 혈청(잭슨 이뮤노리서치 래보러토리즈(Jackson ImmunoResearch Laboratories, 미국 웬실베이니아주 웨스트 그로브, <http://www.jacksonimmuno.com>))으로 차단시키고, 이어서 온화하게 교반하면서 4°C에서 1:50으로 희석시킨 마우스 항-인간 E-셀렉틴 단클론 항체(샌터크루즈 바이오테크놀로지(Santa Cruz Biotechnology, 미국 캘리포니아주 샌터크루즈, <http://www.scbt.com>))와 함께 하룻밤 인큐베이션하였다. 그 후 세포를 각각 PBS-T를 이용하여 5분 동안 4회 세척하고, 이어서 실온에서 1시간 동안 1:400으로 희석시킨 당나귀 항-마우스 알렉사플루오르(AlexaFluor) 488(인비트로겐(Invitrogen, 미국 캘리포니아주 칼스배드, <http://www.invitrogen.com>))과 함께 인큐베이션하였다. 그 후 세포를 각각 PBS-T를 이용하여 5분 동안 4회 세척하였다. 라이카(Leica) 현미경(라이카, 마이크로시스템즈(Leica, Microsystems), 미국 일리노이주 바노크번, <http://www.leica-microsystems.com>), 옵트로닉스(Optronics) 카메라 및 매그나파이어(Magnafire) 소프트웨어(옵트로닉스, 미국 캘리포니아주 콜레타, <http://www.optronics.com>)를 사용하여 100배 배율에서 이미지를 획득하였다.

[0227] ELISA

배지를 공동배양물 분석 후 수집하고, 2배로 희석한 샘플을 제조업자의 지시에 따라 용해성 E-셀렉틴에 대한 ELISA(알앤디 시스템즈, 미국 미네소타주 미니애폴리스, <http://www.rndsystems.com>)에서 사용하였다.

[0229] RT-PCR

세포를 0.25% 트립신-EDTA(인비트로겐)를 사용하여 6웰 트랜스웰 플레이트로부터 탈리시키고, 원심분리하고, 1.8 ml 용해 완충액에 재현탁시켰다. 제조업자의 지시에 따라 앱솔루틀리 RNA 미니프렙 키트(Absolutely RNA Miniprep kit)(스트라타진(Stratagene, 미국 캘리포니아주 라졸라, <http://www.stratagene.com>))를 사용하여 RNA를 추출하였다. RNA를 제공된 용출 완충액 65 μl 에 용출시켰다. 100 pmol 랜덤 프라이머(프로메가(Promega), 미국 위스콘신주 매디슨, <http://www.promega.com>)를 사용하여 RT-PCR을 수행하였다. RT 양성 및 RT 음성과물을 96웰 플레이트에서 진행시켰다.

[0231] 호중구 결합 분석

호중구를 건강한 지원자로부터의 말초 혈액으로부터 단리하였다. 단리 후, 호중구는 37°C에서 10분 동안 LPS(0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)의 첨가에 의해 10분 동안 활성화시켰다. HAE는 72시간 동안 상기에 기술한 바와 같이 TNF-, 멀티스텝 또는 MSC를 사용하거나 사용하지 않고서 인큐베이션하였다. 그 후 배지를 제거하고, 세포를 세척하고, 그 후 내피 세포를 활성화된 호중구와 함께 1분 동안 인큐베이션하였다. 그 후 내피 세포를 PBS로 4회 세척하여 임의의 비-결합 호중구를 제거하였다. 다수의 세척 후, 내피 세포에의 호중구 결합을 현미경 검사(20x 대물)에 의해 조사하고 사진을 촬영하였다. 내피층에 결합한 호중구를 각각의 시야에서 카운팅하였다. 각각의 컨디셔닝된 것은 삼중으로 수행하고, 웨일당 3개의 시야의 사진을 촬영하였다.

[0233] 동물 연구

[0234] 세포 제제 - 세포 주사의 각각의 날에, 멀티스템을 해동시키고, 생육성에 대해 시험하였다. >90%의 생육성을 나타내는 세포를 5000만개의 세포/mL로 PBS에 재현탁시켰다. 이전의 해동 실험은 멀티스템 세포가 최대 8시간까지 이를 조건 하에서 95% 초과로 생육가능하게 남아있음을 나타냈다.

[0235] 동물 수술 - 이 연구에서 기술한 모든 동물 실험 절차는 미국 클레블랜드 임상 재단의 동물 연구 위원회(Animal Research Committee of the Cleveland Clinic Foundation, 미국 오하이오주 클레블랜드)에 의해 승인된 프로토콜 하에 수행하였다. 중량이 150-175 g인 수컷 루이스 래트를 케타민(100 mg/kg)과 자일라진(5 mg/kg)의 혼합물의 i.p. 주사에 의해 마취시키고, 80회 호흡/분으로 실 공기를 이용하여 통기시켰다(RSP 1002, 켄트 사이언티픽 코포레이션(Kent Scientific Corp, 미국 코네티컷주 토링تون)). 전벽 심근 경색은 흉골 절개 및 좌전하행 동맥의 외과적 결찰에 의해 25마리의 래트에서 유도하였다. LAD의 결찰은 봉합부로부터 원위의 조직의 희어짐에 의해 확인하였다. LAD 결찰 후, 경색된 영역을 둘러싸고 있는 영역의 심장 내로 1000만개의 루이스 래트 멀티스템 세포(5000만개의 세포/mL) 또는 PBS 단독을 주사하였다. 동물을 수술 3일 후 희생시켰다. 10마리의 동물(5마리는 비히를 처리하고, 5마리는 멀티스템 처리함)로부터의 심장을 OCT에 매립시키고, 냉동된 얇은 섹션용으로 사용하였다. 후속적으로 섹션을(호중구 카운트 결정을 위하여) 엘라스타제에 대해 염색하였다.

[0236] 통계분석

[0237] 통계적으로 유의한 것으로 인정된 $p<0.05$ 를 이용하여 적절할 경우 사후 분석(post-hoc analysis)을 이용하여 스튜던트 T-검정(Student T-test) 또는 ANOVA를 사용하여 통계 분석을 수행하였다. 오차 막대는 표준 편차로서 표현하였다.

[0238] 결과[0239] 멀티스템은 활성화 시에 세포 부착 분자의 상향조절을 방지한다

[0240] 부착 분자의 발현은 향염증성 사이토카인, 예컨대 TNF- α 에 노출시에 내피 세포의 세포 표면 상에서 극적으로 증가하였다. 멀티스템이 이 반응을 조정할 수 있는지를 시험하기 위하여 멀티스템을 TNF- α 의 존재 또는 부재 하에 3일 동안 인간 대동맥 내피 세포(HAEC)와 함께 트랜스웰에서 공동배양하였다. 후속적으로, E-셀렉틴, V-CAM 및 I-CAM의 세포 표면 발현을 FACs 분석 또는 면역염색에 의해 측정하였다(도 1A). 72시간 후, TNF- α 는 활성화되지 않은 대조와 비교하여 멀티스템의 부재 하에 높은 수준의 모든 3가지 마커를 유도하였다. 그러나, 멀티스템의 존재 하에 E-셀렉틴(도 1B)($p=0.0149$) 및 V-CAM($p=0.0037$)이 표면에서 발현되는 세포의 수가 유의하게 감소하였다(도 1B). 추가로, I-CAM($p=0.001$)의 세포 표면 발현 수준은 최고 용량의 멀티스템에서 감소하였다(도 1C). 멀티스템에 의한 세포 표면 부착 분자 상향조절의 조정은 세포 용량의존성이며, 멀티스템의 농도가 감소하면 감소하고, 상이한 공여체로부터 유래된 멀티스템을 이용하여 재현가능하였다(데이터는 예시하지 않음). 이 효과가 TNF- α 에 특이적인지를 조사하기 위하여, 이 실험을 인터루킨 1 β (IL-1 β)를 이용하여 반복하였다. TNF- α 에서의 결과와 유사하게, 멀티스템을 포함하는 공동배양물은 대조와 비교하여 IL-1 β 로 활성화될 때 세포 표면에의 부착 분자(E-셀렉틴, V-CAM 및 I-CAM)의 상향조절을 저해하였다(도 2B).

[0241] 다음, 멀티스템의 존재 하에서의 세포 부착 분자의 표면 발현의 하향조절이 대동맥 내피 특이적 반응인지 또는 다른 내피 세포주가 유사한 방식으로 멀티스템에 또한 반응하는지를 결정하였다. 인간 폐 미세혈관 내피 세포(HPMEC)는 이 세포가 HAEC와 유사한 방식으로 멀티스템에 반응하여 TNF- α 유도된 세포 부착 분자 세포 표면 발현을 하향조절하는지를 알기 위하여 시험하였다(도 2A). 세포 표면 상에서 TNF- α 유도된 E-셀렉틴($p<0.0001$) 및 V-CAM($p<0.0001$)을 발현하는 HPMEC의 수는 멀티스템과의 공동배양 후 감소하였다. 이와 유사하게, I-CAM 세포 표면 발현은 또한 최고 용량의 멀티스템과 공동배양한 세포에서 유의하게 감소하였다($p=0.028$)(도 2A). 이들 실험은 트랜스웰에서 수행하였기 때문에, 멀티스템과 내피 세포 사이의 직접적인 상호작용은 멀티스템이 내피 세포 부착 마커 활성화를 조정하는 데 필요하지 않았다. 따라서 이들 데이터는 멀티스템으로부터 분비된 용해성 인자가 방분비적 방식으로 작용하여 내피 표면 부착 분자 발현을 감소시킴을 시사한다.

[0242] 멀티스템은 부착 분자의 쇄딩(shedding)을 증가시키지 않으며 오히려 부착 분자 RNA 발현의 유도의 방지에 기능한다

[0243] 멀티스템이 E-셀렉틴과 같은 부착 분자의 세포 표면 발현을 감소시킬 수 있는 한 가지 가능한 기작은 세포 표면으로부터의 상기 분자의 절단을 증가시키는 것이다. 세포 표면으로부터의 부착 분자의 절단은 메탈로프로테아제를 포함하는 상이한 프로테아제, 예컨대 TACE/ADAM17에 의해 매개된다. 이전의 연구는 용해성 부착 분자가 병적

인 것일 수도 있으며 호중구 활성화에 기여할 수 있음을 시사하였다^{19, 20}. 멀티스템을 이용한 처리를 조사하여 이것이 E-셀렉틴 표면 쉘딩 증가에 의해 E-셀렉틴 표면 발현을 감소시키는지를 결정하였다. 멀티스템의 존재 또는 부재 하에 내피 세포에 의해 컨디셔닝 배지 내로 분비되는 용해성 E-셀렉틴의 수준을 ELISA에 의해 측정하였다. 멀티스템과 HAEC 또는 HPMEC와의 공동배양물로부터 수집한 컨디셔닝된 배지 중의 sE-셀렉틴 농도의 증가는 발견되지 않았다(도 3A, 데이터는 예시하지 않음). 거꾸로, 최고의 비로 멀티스템과 공동배양한 TNF- α 활성화 HAEC($p<0.001$) 및 HPMEC($p<0.001$)로부터의 배지에서 용해성 E-셀렉틴의 감소가 발견되었는데, 이는 E-셀렉틴의 표면 발현 감소가 용해성 E-셀렉틴의 쉘딩의 후속적인 감소에 의한 감소된 표면 발현의 결과임을 시사한다(도 3A). 따라서, E-셀렉틴의 표면 발현의 감소는 세포 표면으로부터의 이 분자의 증가된 절단으로 인한 것이 아니며, 이는 내피 세포의 표면 상에서의 세포 부착 분자의 감소가 이들 분자의 단백질 분해적 절단의 결과가 아님을 내포한다.

[0244] 세포 표면 부착 분자 E-셀렉틴, V-CAM 및 I-CAM은 모두 향염증성 사이토카인, 예컨대 TNF- α 로 처리되 경우 내피 세포에서 전사 활성화되기 때문에, 멀티스템이 전사 수준에서 이들 부착 분자의 조절을 조정할 수 있는지를 결정하였다(도 3). 내피 세포(HAECS)를 TNF- α 의 존재 또는 부재 하에 72시간 동안 멀티스템과 함께 공동배양하였다. 후속적으로 RNA를 내피 세포로부터 단리하고, cDNA로 역전사시켰다. 그 후 정량적 PCR을 E-셀렉틴, V-CAM, I-CAM 및 GAPDH에 대한 프라이머를 이용하여 수행하였다. mRNA의 발현 수준은 모두 GAPDH 수준에 대해 정규화하였다(도 3B). 이들 결과는 E-셀렉틴, V-CAM, 및 I-CAM mRNA 수준이 멀티스템의 존재 하에서는 감소함을 나타내며, 이는 멀티스템이 이들 유전자의 TNF- α 상향조절을 저해함을 시사한다. 멀티스템을 폐 내피 세포 (HPMEC, 데이터는 예시하지 않음)와 함께 공동배양할 경우 유사한 결과가 관찰되었다. TNF- α 에 의한 V-CAM, I-CAM 및 E-셀렉틴 전사 활성화는 NF-B 의존성이며, 이는 멀티스템이 약간의 수준에서 NF-B 신호전달을 조정할 수 있음을 시사한다.

[0245] 멀티스템과는 달리, MSC는 세포 부착 분자 발현을 유의하게 조정하지 않는다

[0246] 또한 다른 골수 유래 줄기 세포가 동물 모델에서 T-세포 증식의 방지, 자연 살해 세포 기능의 억제 및 면역 장애, 예컨대 크론병 및 GVHD의 조정에 의해 면역 기능을 조정하는 것으로 밝혀졌다. 내피 세포 활성화에 대한 멀티스템의 면역조정 효과가 다른 줄기 세포주에 의해 또한 생성되는지를 평가하기 위하여, 내피 세포를 TNF- α 의 존재 하에 72시간 동안 MSC와 함께 공동배양하고, 세포 부착 분자 세포 표면 발현을 후속적으로 조사하였다. 놀랍게도, 미처리 대조와 비교하여 MSC의 존재 하에서는 TNF- α 유도된 내피 세포 부착 분자 표면 발현이 변화되지 않았으며, 반면에 멀티스템은 부착 분자 발현을 유의하게 감소시켰다(도 4A-4C). E-셀렉틴 표면 발현의 약간의 감소가 최고 용량의 MSC에서 관찰되었지만, 이 변화는 멀티스템의 존재 하에 관찰된 감소보다 유의하게 더 적었다(도 4A). 따라서, MSC는 TNF- α 에 의한 부착 분자 상향조절을 조정하지 않았다. 이들 결과는 멀티스템이 MSC와는 기능적으로 상이한 분비 프로필을 가짐을 나타내는데, 이는 이들의 생물 활성화에서의 차이에 반영된다.

[0247] 활성화된 내피 세포와 다중스템과의 공동배양물은 호중구 결합을 방지한다

[0248] 내피 세포의 세포 표면 상의 세포 부착 분자의 상향조절은 호중구와 같은 면역 세포의 롤링 및 단단한 부착에 대해 결정적임이 밝혀졌다⁴. 멀티스템에 의한 세포 표면에 대한 부착 분자 상향조절의 조정은 내피 세포에의 호중구 결합에 영향을 주기에 충분한지를 결정하기 위하여, 멀티스템 처리된 내피 세포에의 호중구 결합을 미처리 내피 세포와 비교하였다. 내피 세포를 용합성 단층까지 성장시키고, 멀티스템의 존재 또는 부재 하에 TNF- α 로 72시간 동안 처리하였다. 호중구를 적어도 2가지의 상이한 공여체로부터 단리하고, LPS(0.1 μ g/ml)의 첨가에 의해 활성화시키고, 1분 동안 내피 세포와 함께 인큐베이션하였다. 다수의 세척 후, 내피 세포 및 호중구 결합을 미생물 검사법(10x 대물)에 의해 조사하고 사진을 촬영하였다. 내피층에 결합한 호중구를 각각의 시야에서 카운팅하였다(도 5A). 단지 낮은 수준의 활성화된 또는 활성화되지 않은 호중구가 활성화되지 않은 내피 세포에 결합하였다. 그러나, TNF- α 를 이용한 활성화 시에, 유의한 증가가 결합 호중구에서 관찰되었으며, 이는 기대된 바와 같았다(도 5B). 내피 세포를 멀티스템과 함께 사전 인큐베이션할 경우, 호중구 결합은 유의하게 감소하였다($p < .0001$). 이들 결과는 내피 세포 상에서의 부착 분자 발현의 변화가 호중구에의 내피 세포층의 결합의 특징을 변화시키기에 충분함을 입증하였다. 이와는 대조적으로, TNF- α 활성화 동안 MSC와 내피 세포와의 공동배양물은 호중구 결합을 변경시키지 않았다. 추가로, 단독의 또는 MSC와 함께 공동배양한 TNF- α 활성화 내피 세포를 호중구에 노출시킬 경우, 내피 세포 형태가 더욱 길고 더욱 얇은 세포 유형으로 유의하게 변화되었고 세포-세포 접촉이 감소하였다(도 5C). TNF- α 활성화될 경우 멀티스템과 함께 공동배양한 내피 세포에서, 세포 형태는 많이 변화되지 않으며, 세포-세포 접촉은 유지되었다. 이들 데이터는 멀티스템이 활성화 내피 세포를 기능적으로 변경시킴을 시사한다. 따라서, 멀티스템이 생체내에서 호중구 이주에 영향을 줄 수 있는지를 결정하기 위

하여 멀티스템을 시험하였다.

[0249] 멀티스템을 이용한 처리는 LAD-유도된 급성 심근 경색 후 호중구 침윤을 감소시킨다

[0250] 이전의 동물 연구에 의하면 직접적인 좌전하행 결찰에 의해 유도된 심근 경색 후 경색 주위 부위 내로 멀티스템을 직접적으로 주사하면 심장 기능이 개선됨이 밝혀졌다^{14, 16}. 이 보고서에서의 결과는 멀티스템이 TNF- α 의 존재 하에 부착 분자(E-셀렉틴, V-CAM 및 I-CAM)의 세포 표면 발현을 하향조절할 수 있음을 나타낸다. 이들 분자는 호중구 부착 및 내피를 통한 혈관외유출에 있어서 결정적이다. 허혈 후 심장 내로의 호중구 침윤은 해로울 수 있고 허혈성 상해 후 심장 기능을 감소시킬 수 있기 때문에^{10, 11}, 멀티스템 처리 후 심장 기능의 개선은 부분적으로는 AMI 후 경색 주변 구역 내로의 호중구 침윤 및 염증 감소로 인한 것이라고 가정하였다. 이 가설을 시험하기 위하여, 심장에 존재하는 호중구의 수준을 래트에서의 심근 경색 유도 후 조사하였다.

[0251] 전벽 심근 경색은 좌전 하행 동맥의 결찰(LAD 결찰)에 의해 래트에서 유도하였다. LAD 결찰 후 1000만개의 루이스 래트 멀티스템 세포 또는 PBS 단독을 경색된 영역을 둘러싸고 있는 영역의 심장 내에 주사하였다. 염증 반응이 그의 최고치에 있을 때 동물을 수술 3일 후 희생시켰다. 10마리의 동물(5마리는 비히를 처리하고 5마리는 멀티스템 처리함)로부터의 심장을 섹션화하고, 엘라스스타제에 대해 염색하여 호중구 침윤 정도를 결정하였다. 처리 및 미처리 동물 모두에 있어서 경색 주위 구역(경색 조직의 0.25-0.5 cm 이내) 내에서 호중구 침윤을 조사하였다(도 6).

[0252] AMI 및 세포 처리 후 3일에, 멀티스템 처리 동물은 비히를 처리 대조와 비교하여 경색 주변 영역 내로의 호중구 침윤이 유의하게 덜함을 나타냈다(12.185개의 호중구/고배율 시야(hight powered field, Hpf) 대 35.25개의 호중구/Hpf, $p=0.005823$)(도 6A-6C). 동물당 4개의 고배율 시야에서 엘라스스타제 양성 세포를 카운팅하고, 평균하였다(도 6B, 6C). 이들 결과는 멀티스템이 AMI 후 심장에 대해 소염 효과를 가짐을 확인해준다. 이들 데이터는 또한 배양 중에 TNF- α 활성화 시에 내피 세포 부착 분자 상향조절에 있어서 관찰된 감소가 멀티스템의 존재 하에서의 내피 세포 장벽의 기능적 변화로 생체내에서 번역될 수 있음을 시사한다.

결론

[0254] 이 연구에서, 염증성 자극에 반응하여 내피 세포의 활성화를 멀티스템이 조정할 수 있는지를 결정하기 위하여 멀티스템을 조사하였다. 멀티스템은 대규모로 증식시킨 임상 등급의 다능성 선구 세포(MAPC)이다. 결과에 의하면 대동맥 및 폐 내피 세포 둘 모두는 미처리 대조와 비교하여 멀티스템과 함께 공동배양될 때 TNF- α 또는 IL-1 β 로 활성화될 때 부착 분자 E-셀렉틴, V-CAM 및 I-CAM의 세포 표면 발현이 감소되었음이 나타났다. 추가로, 실험에 의하면 E-셀렉틴 발현 감소가 세포 표면으로부터의 이 분자의 감소된 셰딩으로 인한 것이 아님이 입증되었다. 오히려, V-CAM, E-셀렉틴 및 I-CAM mRNA 발현은 TNF- α 처리된 내피 세포 단독과 비교하여 감소하며, 이는 멀티스템이 염증성 신호에 반응하여 이를 단백질의 증가된 전사를 조정하고 있음을 시사한다. 더욱이, TNF- α 활성화 동안 내피 세포를 멀티스템과 함께 인큐베이션할 경우 활성화 내피 세포에의 호중구 부착이 또한 감소함이 관찰되었다. 생체내에서 이들 변화가 관련있는지를 연구하기 위하여, 멀티스템을 이용한 처리가 허혈성 상해 후 염증을 조정하는지를 결정하기 위하여 멀티스템을 이용한 처리를 조사하였다. 실제, 호중구 침윤은 비히를 대조와 비교하여 래트에서 AMI 3일 후 멀티스템 처리 동물에서 경색 주변부에서 감소하였다.

[0255] 멀티스템의 존재 하에서의 활성화 내피 세포 상에서의 세포 부착 분자의 하향조절에 책임이 있는 분자적 기작은 아직 특성화되지 않았다. 그러나, 공동배양 연구를 트렌스웰에서 수행하였기 때문에, 멀티스템은 하나 이상의 용해성 인자를 배지 내로 분비하고 있어야 하는데, 상기 배지는 후속적으로 내피 세포에 작용하여 이를 인테그린 및 셀렉틴의 전사를 방지 또는 하향조절한다. TNF- α 또는 IL-1 β 와같은 사이토카인의 그의 수용체에의 결합 시에, 내부 신호전달 개시는 NF- κ B 신호전달 의존성 전사로 이어진다. E-셀렉틴, I-CAM 및 V-CAM의 전사는 모두 NF- κ B 의존성이며, 이는 멀티스템이 NF- κ B 신호전달을 조정할 수 있음을 시사한다.

[0256] MSC는 다른 세팅에서 면역조정 특성을 갖는 것으로 밝혀졌지만, MSC는 활성화된 내피 세포에 있어서 이를 세포와 함께 공동배양될 경우 세포 부착 분자 상향조절을 방지하지 못하였다. V-CAM 및 I-CAM 발현은 임의의 용량의 MSC와의 공동배양시에 어떠한 하향조절도 나타내지 않았다. MSC의 최고 용량에서, E-셀렉틴은 미처리 대조와 비교하여 세포 표면으로부터 적당히 감소하였다. 그러나, E-셀렉틴 표면 발현은 내피 세포를 멀티스템과 함께 공동배양할 경우보다 유의하게 더 높았다. 추가로, 활성화된 내피 세포를 더욱 낮은 용량의 MSC와 함께 공동배양 할 경우 E-셀렉틴에 대해 어떠한 영향도 관찰되지 않았다. 이들 결과는 약간의 암시를 갖는다. 첫째, T-세포 증식의 조정을 위하여 MSC가 이용하는 기작은 내피 세포 표면 마커를 하향조절하기 위하여 멀티스템이 이용하는 기작과는 상이하며, 이는 줄기 세포가 다수의 경로를 통하여 면역 기능을 조정할 수 있음을 시사한다. 둘째, 이

들 결과는 멀티스템 및 MSC가 독특한 분비 프로필을 가지며 이는 이들 두 세포 유형의 기능적 활성에서의 차이에 반영됨을 함축하고 있다. 이들 차이는 어느 세포 유형이 다양한 임상 징후를 최상으로 잠재적으로 치료할 수 있는지를 알려줄 수 있으며, 이때 각각의 세포 유형은 상이한 부류의 징후에서의 사용에 가장 적합하다. 이를 줄기 세포 유형과 그의 작용 기작 사이의 차이를 추가로 연구하면 이들 쟁점을 명백하는 데 도움이 된다.

[0257]

내피 세포에 대한 멀티스템의 영향이 AMI의 맥락에서 조사되었지만, 내피에의 립프구 및 백혈구의 부착은 염증성 과정의 결정적인 부분이며, 따라서, 기타 허혈성 상해, 예컨대 뇌출증과, 면역 장애, 예컨대 GVHD, 급성 호흡 촉박 증후군(acute respiratory distress syndrome, ARDS), 및 다발성 경화증을 포함하는 다수의 장애에서 해롭다. 결과에 의하면 2가지의 상이한 사이토카인, TNF- α 및 IL-1 β 에 의한 활성화 시에 적어도 2가지의 내피 세포 유형, 대동맥 및 폐 내피 세포에서의 세포 부착 분자 상향조절을 멀티스템이 조정함이 나타났다. 이 연구는 멀티스템의 면역조정 활성이 다수의 내피 세포 및 염증성 신호까지 연장함을 시사한다. 따라서, 멀티스템을 이용한 처리는 내피를 통한 면역 세포의 침윤이 상해 및 손상을 증가시키는 장애에서 이득을 부여할 수 있다.

참고 문헌

1. Wagner et al. The vessel wall and its interactions. *Blood*. Jun 1 2008;111(11):5271-5281.
2. Golias C, Tsoutsi E, Matziridis A, Makridis P, Batistatou A, Charalabopoulos K. Review. Leukocyte and endothelial cell adhesion molecules in inflammation focusing on inflammatory heart disease. *In vivo (Athens, Greece)*. Sep-Oct 2007;21(5):757-769.
3. Bullard et al., Infectious susceptibility and severe deficiency of leukocyte rolling and recruitment in E-selectin and P-selectin double mutant mice. *The Journal of experimental medicine*. May 1 1996;183(5):2329-2336.
4. Rao et al., Endothelial-dependent mechanisms of leukocyte recruitment to the vascular wall. *Circulation research*. Aug 3 2007;101(3):234-247.
5. Frenette et al., Susceptibility to infection and altered hematopoiesis in mice deficient in both P- and E-selectins. *Cell*. Feb 23 1996;84(4):563-574.
6. Furman et al., Effect of elevated leukocyte count on in-hospital mortality following acute myocardial infarction. *The American journal of cardiology*. Oct 15 1996;78(8):945-948.
7. Menon et al., Leukocytosis and adverse hospital outcomes after acute myocardial infarction. *The American journal of cardiology*. Aug 15 2003;92(4):368-372.
8. Takahashi et al., Relationship of admission neutrophil count to microvascular injury, left ventricular dilation, and long-term outcome in patients treated with primary angioplasty for acute myocardial infarction. *Circ J*. Jun 2008;72(6):867-872.
9. Gonon et al., Limitation of infarct size and attenuation of myeloperoxidase activity by an endothelin A receptor antagonist following ischaemia and reperfusion. *Basic Res Cardiol*. Sep 2001;96(5):454-462.
10. Vasilyev et al., Myeloperoxidase-generated oxidants modulate left ventricular remodeling but not infarct size after myocardial infarction. *Circulation*. Nov 1 2005;112(18):2812-2820.
11. Vinten-Johansen J., Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Res*. Feb 15 2004;61(3):481-497.
12. Cheng et al., TH1/TH2 functional imbalance after acute myocardial infarction: coronary arterial inflammation or myocardial inflammation. *Journal of clinical immunology*. May 2005;25(3):246-253.
13. Kovacsics-Bankowski et al., Clinical scale expanded adult pluripotent stem cells prevent graft-versus-host disease. *Cellular immunology*. 2009;255(1-2):55-60.
14. Van't Hof et al., Direct delivery of syngeneic and allogeneic large-scale expanded multipotent adult progenitor cells improves cardiac function after myocardial infarct. *Cyotherapy*. 2007;9(5):477-487.
15. Kovacsics-Bankowski et al., Pre-clinical safety testing supporting clinical use of allogeneic multipotent adult progenitor cells. *Cyotherapy*. 2008;10(7):730-742.
16. Pelacho et al., Multipotent adult progenitor cell transplantation increases vascularity and improves left ventricular function after myocardial infarction. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*. Jan-Feb 2007;1(1):51-59.
17. Zeng et al., Bioenergetic and functional consequences of bone marrow derived multipotent progenitor cell transplantation in hearts with postinfarction LV remodeling. *Circulation*. 2007;In press.
18. Perry et al., Clinical Scale Expansion of Human Pluripotent Stem Cells. *ASH Annual Meeting Abstracts*. November 16, 2005 2005;106(11):1060-.

[0258]

19. Vainerc et al., Serum Concentration and Chemotactic Activity of E-selectin (CD62E) in Inflammatory Bowel Disease. *Mediators of inflammation*. 1994;3(3):215-218.
20. Zeitler et al., Elevated serum concentrations of soluble adhesion molecules in coronary artery disease and acute myocardial infarction. *European journal of medical research*. Sep 29 1997;2(9):389-394.
21. Lloyd-Jones et al., Heart Disease and Stroke Statistics--2010 Update. A Report From the American Heart Association. *Circulation*. Dec 17 2009.
22. Aranguren et al., Multipotent adult progenitor cells sustain function of ischemic limbs by stimulating vessel and muscle regeneration. 2007.
23. Wragg et al., VEGFR1/CXCR4 positive progenitor cells modulate local inflammation and augment tissue perfusion by a SDF1 dependent mechanism. *The Journal of clinical investigation*. 2006.
24. Hare et al., A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (prochymal) after acute myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*. Dec 8 2009;54(24):2277-2286.
25. Brenneman et al., Autologous bone marrow mononuclear cells enhance recovery after acute ischemic stroke in young and middle-aged rats. *J Cereb Blood Flow Metab*. Jan;30(1):140-149.
26. Halkos et al., Intravenous infusion of mesenchymal stem cells enhances regional perfusion and improves ventricular function in a porcine model of myocardial infarction. *Basic Res Cardiol*. Nov 2008;103(6):525-536.
27. Tang et al., Mesenchymal stem cells participate in angiogenesis and improve heart function in rat model of myocardial ischemia with reperfusion. *Eur J Cardiothorac Surg*. Aug 2006;30(2):353-361.
28. Ringden et al., Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation*. May 27 2006;81(10):1390-1397.
29. Ringden et al., Mesenchymal stem cells combined with cyclosporine inhibits cytotoxic T cells. *Biol Blood Marrow Transplant*. Jun 2006;12(6):693-694.
30. Highfill et al., Multipotent adult progenitor cells (MAPC) can suppress graft-versus-host disease via prostaglandin E2 synthesis and only if localized to sites of allopriming. *Blood*. May 20 2009.

[0259]

[0260] 실시예 2[0261] 하향조절 효력의 증가

[0262]

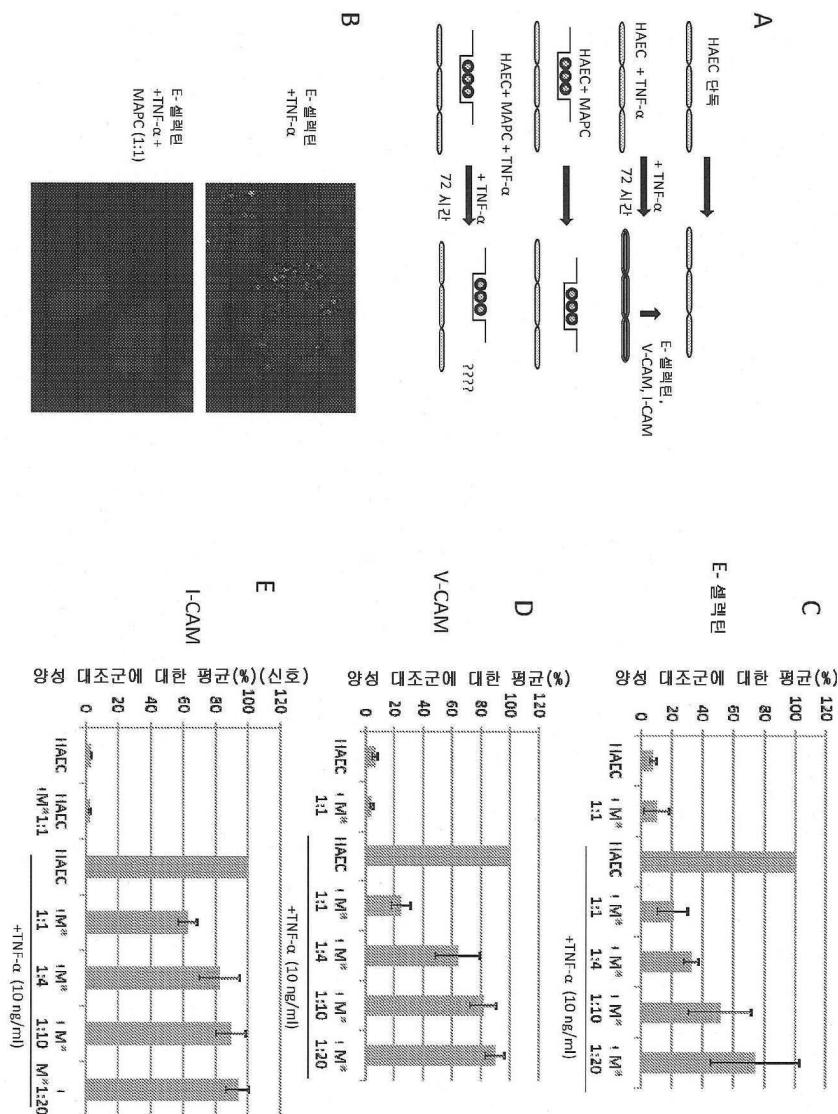
멀티스템과 활성화된 내피 세포 또는 활성화된 T-세포와의 공동배양물을 모방하는 멀티스템의 처리 섭생법을 확인하기 위하여 내피 세포 분석법을 이용하였다. 이전에, 본 발명자는 내피 세포 분석법에서 멀티스템의 소염 활성을 유도하기 위하여 멀티스템과 활성화 내피 세포와의 공동배양이 필요함을 밝혔다(E-셀렉틴, I-CAM 및 V-CAM의 하향조절). 확인하면, 정상적인 배양 조건 하에 성장시킨 멀티스템으로부터 수집한 컨디셔닝된 배지는 TNF- α 또는 사이토믹스(cytomix)를 이용한 활성화 후 내피 세포 부착 분자를 하향조절하기에 불충분하였다. 그러나, 본 발명자는 멀티스템을 3일 동안 "사이토믹스"(10 ng/ml의 각각의 TNF- α , 인터페론-감마 및 인터루킨 1 베타의 혼합물)로 처리한 실험을 수행하였다. 본 발명자는 후속적으로 이러한 처리 후 멀티스템으로부터 컨디셔닝된 배지를 수집하였다. 그 후 이러한 컨디셔닝된 배지를 내피 세포 분석에서 멀티스템에 대한 대용물로 사용하였다(이것은 TNF- α 또는 사이토믹스에 의한 활성화 내피 세포에 첨가하고, 2 또는 3일 동안 배양하였다). 본 발명자는 컨디셔닝되지 않은 기본 배지 또는 정상 조건 하에 배양한 멀티스템으로부터 수집한 배지와는 달리, 이러한 "사이토믹스" 처리된 배지가 내피 세포 부착 분자 상향조절 방지에 충분함을 밝혔다. 이 배지는 멀티스템과 활성화 내피 세포와의 공동배양물을 대체할 수 있었다. 본 발명자는 후속적으로 이 배지를 이용하여 T-세포 증식 분석에서 이것이 멀티스템과 T-세포와의 공동배양물을 대체할 수 있는지를 시험하였으며, 미처리 멀티스템으로부터의 컨디셔닝된 배지와는 달리 이것이 CD3/CD28에 의해 유도된 T-세포 증식을 방지하기에 충분함을 밝혔다.

[0263]

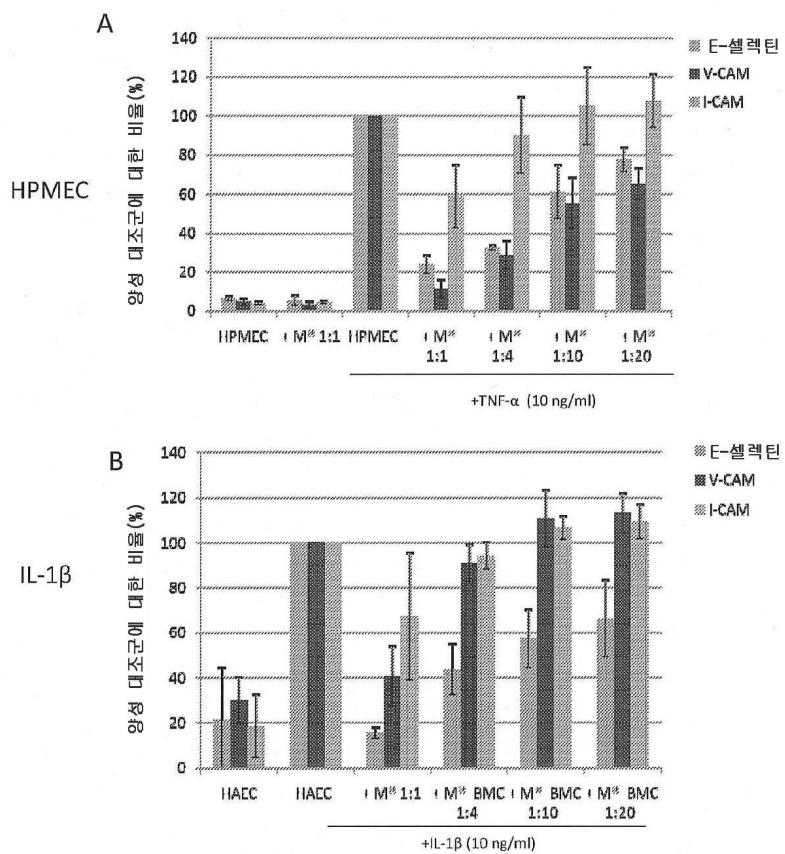
따라서, 본 발명자는 사이토믹스를 이용한 멀티스템의 처리가 T-세포 활성화 및 내피 세포 부착 분자 상향조절의 방지에 필요한 멀티스템의 소염 활성 유도에 충분하다는 결론을 내렸다. 이는 내피 세포 분석법을 이용하여 발견하였다.

도면

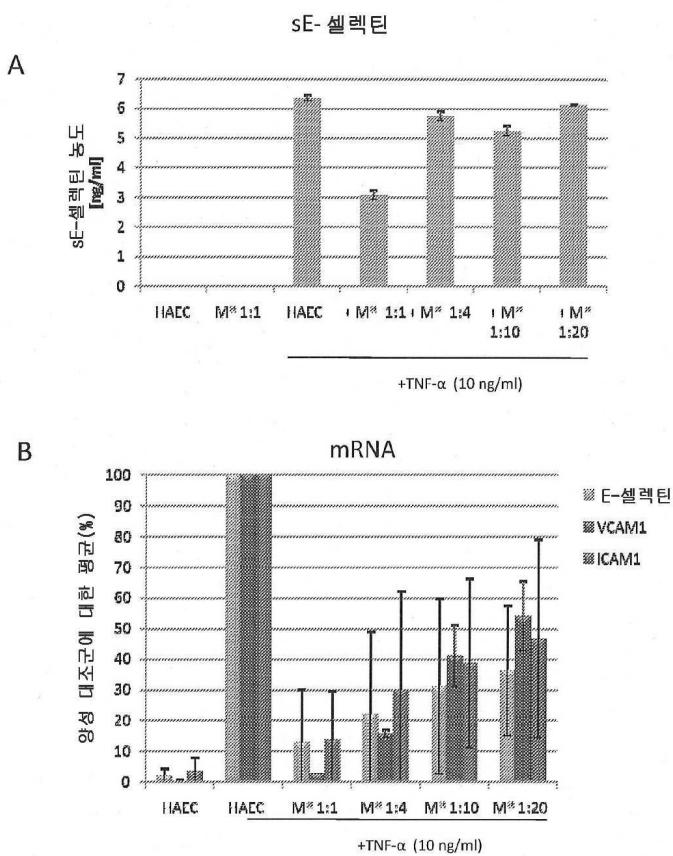
도면1



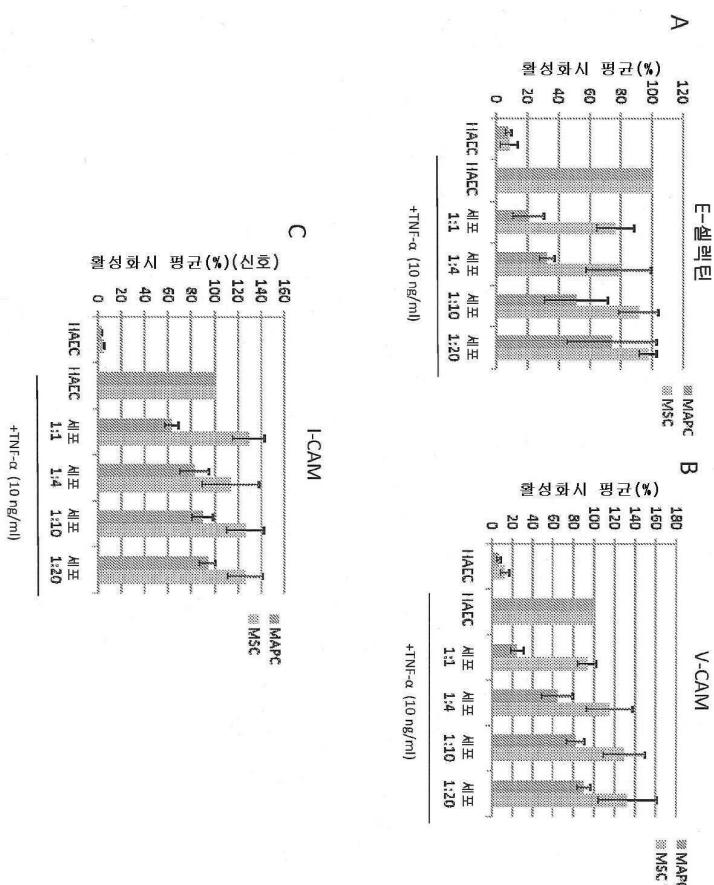
도면2



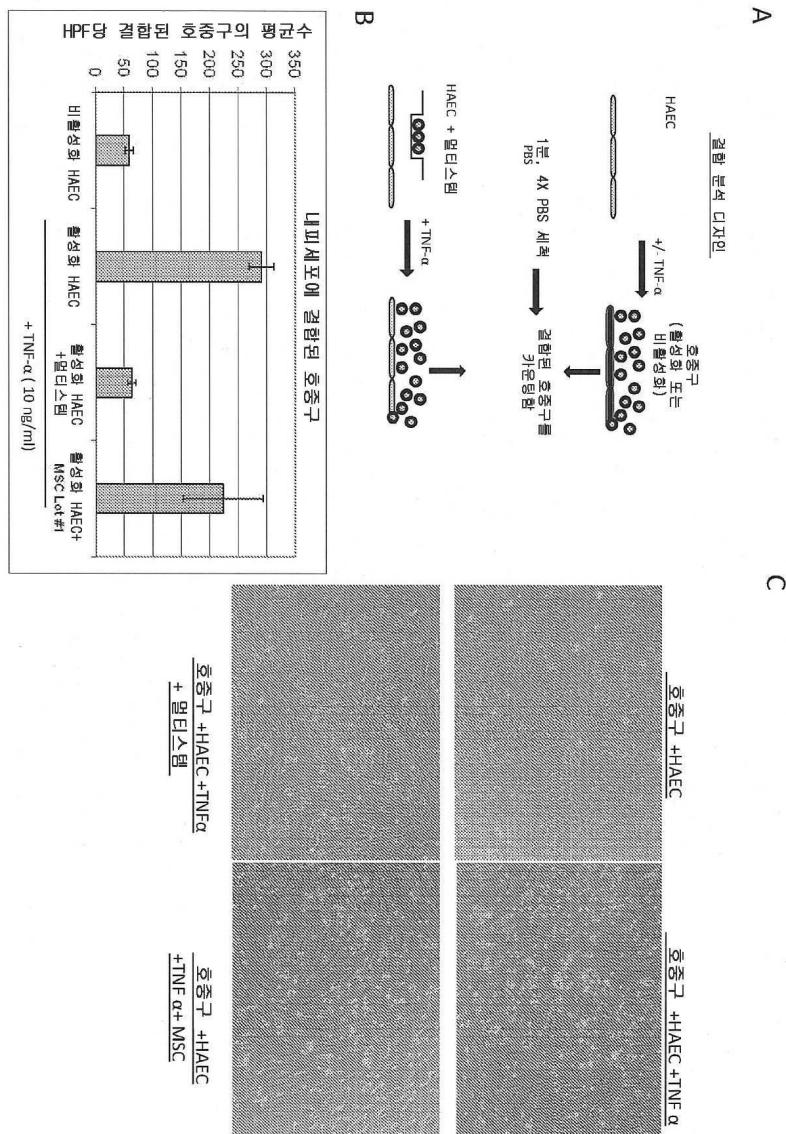
도면3



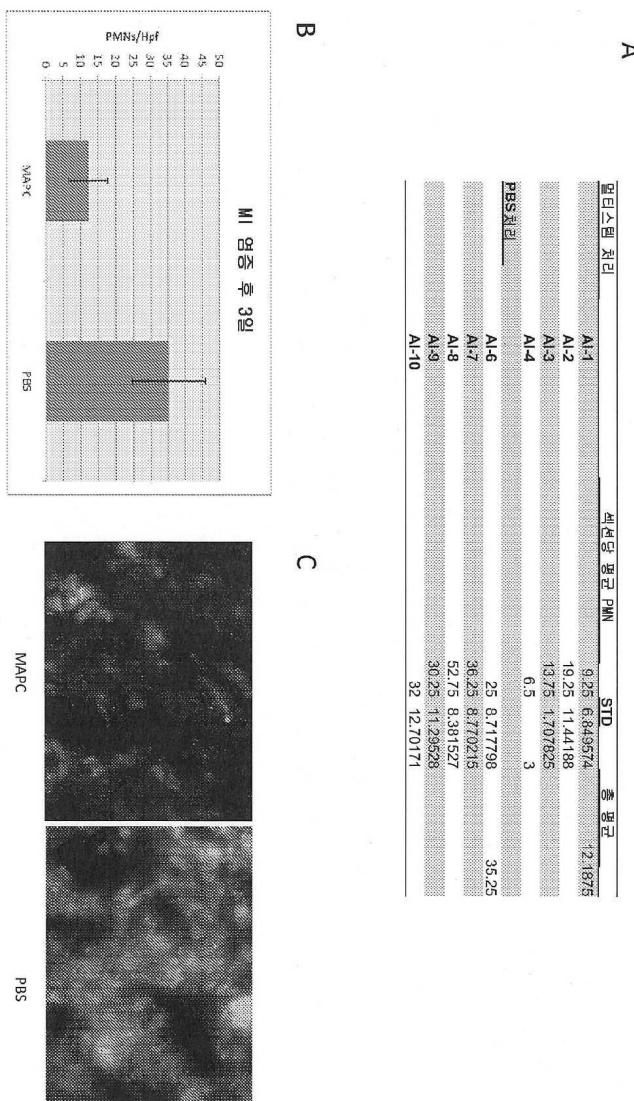
도면4



도면5



도면6



도면7

Free →

Steps	Cell capture Nanobead	Stem celling	Activation Polarization	Neutrophil's maturation assessment	First adhesion Lateral migration	Transmigration tracheobronchial percentage
Preparation PBS, EGF-1 and rhIFN- γ	250 μ g	100 μ g	100 μ g	PE380-1 1.5nmol	1.2 \times 10 ⁶ 10 μ g	1.2 \times 10 ⁶ 10 μ g 3400
Process Eosinophil 250 μ g	10 μ g	10 μ g	10 μ g	10 μ g-1.2 10 μ g-1	10 μ g	10 μ g PE380-1 10 μ g 10 μ g