



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년02월22일

(11) 등록번호 10-2217962

(24) 등록일자 2021년02월15일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/28 (2015.01) A61K 31/737 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 35/28 (2013.01)
A61K 31/737 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2015-7017531
- (22) 출원일자(국제) 2013년12월12일
심사청구일자 2018년11월21일
- (85) 번역문제출일자 2015년06월30일
- (65) 공개번호 10-2015-0093732
- (43) 공개일자 2015년08월18일
- (86) 국제출원번호 PCT/AU2013/001452
- (87) 국제공개번호 WO 2014/089623
국제공개일자 2014년06월19일
- (30) 우선권주장
61/736,361 2012년12월12일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
WO2012162754 A1*
JP2008120800 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌
- (73) 특허권자
메소블라스트, 아이엔씨.
미국, 뉴욕 10017, 뉴욕, 3층, 505 5번 애비뉴
- (72) 발명자
킴프톤, 웨인 그레고리
호주, 빅토리아 3136, 크로이든 노스, 7 첼슨 코트
베일리, 사이몬 리브스
호주, 빅토리아 3031, 첼싱턴, 25 링컨 뮤스
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
이처영, 장제환

전체 청구항 수 : 총 14 항

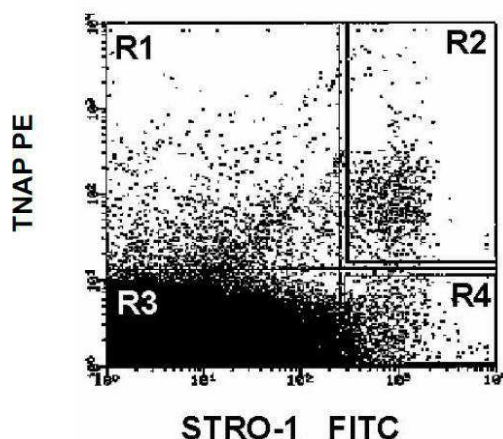
심사관 : 윤동준

(54) 발명의 명칭 내피 기능장애 및 염증 질환의 치료

(57) 요약

본 발명은 STRO-1⁺ 세포가 증가된(enriched) 세포집단 및/또는 이의 자손(progeny) 및/또는 이로부터 유래된 가용인자(soluble factor)를 치료 대상에 전신적으로(systemically) 투여하는 단계를 포함하는 내피 기능장애(vascular endothelial dysfunction) 또는 염증질환의 치료 또는 예방방법을 제공한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 9/0019 (2013.01)

C12N 5/0669 (2013.01)

(72) 발명자

이테스쿠, 실비우

호주, 빅토리아 3000, 멜버른, 55 콜린스가, 레벨
39

고쉬, 피터

호주, 뉴사우스웨일스 2094, 페어라이트, 69 로더
데일 애비뉴

명세서

청구범위

청구항 1

STRO-1^{bright} 또는 TNAP⁺ 간엽 전구세포(MPCs)가 증가된(enriched) 인간세포(human cell) 집단 또는 이의 자손(progeny)을 포함하는 치료 대상에 전신 투여하기 위한 혈관 내피 기능장애(vascular endothelial dysfunction) 질환의 치료 또는 예방용 조성물로서, 상기 혈관 내피 기능장애(vascular endothelial dysfunction) 질환은 고혈압(hypertension), 관상동맥 질환(coronary artery disease), 만성심부전(chronic heart failure) 및 말초동맥 질환(peripheral artery disease), 신장병(nephropathy) 및 만성신부전(chronic renal failure)으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 신장병은 당뇨병성 신장병(diabetic nephropathy)인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 조성물은 정맥 내 투여용인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

제1항에 있어서, 1kg 당 $0.1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ STRO-1^{bright} 또는 TNAP⁺ 간엽 전구세포(MPCs) 또는 이의 자손을 함유하는 조성물.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 집단의 투여량은 일정한 신체 투여량(constant body dose)인 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 집단의 투여량은 환자의 체중과 무관하게 1억 ~ 3억 STRO-1^{bright} 또는 TNAP⁺ 간엽 전구세포(MPCs) 또는 이의 자손을 포함하는 조성물.

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 집단의 투여량은 환자의 체중과 무관하게 1.5억 STRO-1^{bright} 또는 TNAP⁺ 간엽 전구세포(MPCs) 또는 이의 자손을 포함하는 조성물.

청구항 14

제1항에 있어서, 상기 조성물의 투여주기는 주 1회 또는 그 이하인 조성물.

청구항 15

제1항에 있어서, 상기 집단은 자가(autogeneic) 또는 타가(allogeneic)인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 16

제1항에 있어서, 상기 집단은 투여하기 전에 배양 팽창되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 17

삭제

청구항 18

제1항에 있어서, 펜토산 폴리설페이트(pentosan polysulfate, PPS) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 추가로 함유하는 조성물.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 PPS는 펜토산 폴리설페이트(pentosan polysulfate)의 나트륨 염인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 펜토산 폴리설페이트의 나트륨 염의 함량은 1 ~ 100mg인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 21

제1항에 있어서, 펜토산 폴리설페이트의 나트륨 염 및 담체 또는 부형제를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 우선권 세부 사항

[0002] 본 출원은 2012년 12월 12일에 출원된 “내피 기능장애 및 염증 질환 치료(Treatment of diseases of endothelial dysfunction and inflammation)”라는 제목의 미국 특허 가출원 No. 61/736,361에서 우선권을 주장하며, 그 전체 내용이 본원에 참고로 인용된다.

[0003] 본 발명은 내피 기능장애 또는 염증의 질환 및 이와 함께 연관된 병태(conditions)를 치료 또는 예방하기 위한 방법을 제공하는 것이다.

배경 기술

[0004] 내피 기능장애(endothelial dysfunction)는 내피(endothelium)의 혈관 확장, 전염증성 상태 및 프로트롬빅(prothrombic) 특성의 감소를 특징으로 한다. 내피 손상에 따른 기능장애가 동맥경화 현상을 유발한다는 것과 (Ross, *Nature* 362:801-9, 1993), 관상동맥 질환의 허혈성 증상에 중요한 역할을 한다는 것은 혈관 생물학자들이 의견을 같이하고 있다. 내피 기능장애는 또한 아테로마성 동맥 경화증의 물리적 존재에 선행된다(Reddy *et al*, *J Am Coll Cardiol* 23:833-843, 1994). 내피 기능장애는 또한 동맥경화 질환(예컨대, 고혈압, 관상동맥 질환, 만성심부전 및 말초동맥 질환), 당뇨병과 관련된 합병증(예컨대, 신장병(nephropathy)) 및 만성신부전의 대부분의 형태와 연관되어있다.

[0005] 내피 기능장애에서의 감소된 혈관 확장 반응(vasodilatory response)에 관여하는 메커니즘은 감소된 산화 질소의 생성, 과잉 산화 및 감소된 과다 분극 인자(hyperpolarizing factor)의 생성을 포함한다. 부착 분자(adhesion molecule)의 상향 조절, 대식세포 화학주성인자 펩티드-1(macrophage chemoattractant peptide-1)과 같은 케모카인(chemokine)의 생성, 및 PAI-1(plasminogen activator inhibitor-1)의 생성은 염증 반응에 관여하고 프로트롬빅(prothrombic) 상태의 원인이 된다. 엔지오텐신 II(angiotensin II) 및 엔도텔린-1(endothelin-1)과 같은 혈관 작용 펩티드(Vasoactive peptide); 비대칭 디메틸아르기닌(asymmetric dimethylarginine)의 축적, 내인성 산화 질소 억제제; 고콜레스테롤혈증(hypercholesterolemia); 고호모시스테인혈증(hyperhomocysteinemia); 변경된 인슐린 신호; 및 고혈당증(hyperglycemia)은 이러한 다른 메커니즘의 원인이 된다. 예를 들면, 엔지오텐신 II의 과잉은 내피 기능장애와 연관된 병태(conditions)에서 관찰된다. 엔지오텐신 II는 내피가 두꺼워지는 것을 억제하고, 내피의 생존을 증진시키고, 지지 혈관 주위 세포(perivascular cell)의 안정화 및 내피의 투과성을 억제하는 데 관여하는 엔지오텐신 I의 경쟁적 억제제로 간주된다. 엔지오텐신 II의 과도한 수준은 이러한 유익한 효과를 억제한다.

[0006] 내피 기능장애는 또한 플라크(plaque)의 개시와 진행에 기여하는, 아테로마성 동맥 경화증(atherosclerosis)의 발병 기전(pathogenesis)에 중요하고 초기에 발생하는 현상이다.

[0007] 내피 기능장애는 또한 패혈증과 같은 염증성 질환의 효과의 주요 원인이다. 패혈증의 발병 기전은 현상의 복잡한 네트워크의 결과이다. 그람 음성 세균의 세포벽(내독소(endotoxin))의 구성 요소는 패혈증을 개시하는 주된 (배타적이지 않은) 종이다. 다른 세균 분자에 더하여 내독소는 전(pro)- 및 항(anti)-염증성 매개체(inflammatory mediator)의 생성과 함께, 세포 및 체액 경로가 관여된 일반화된 반응을 유발한다. 이러한 매개체는 사이토카인, 응고 인자, 부착 분자, 심근 강하제 물질 및 열충격 단백질을 포함한다. 내피(endothelium)는

패혈증-유도 현상의 주요 표적이고, 내피 세포의 손상 및 기능장애가 패혈쇼크의 대부분의 병리 원인이 된다. 혈관 내피 세포(vascular endothelial cells)는 순환하는 세균성 분자와 접촉하는 체 내의 첫 번째 세포들 중 하나이다. 내피 세포는 세균성 병원체의 구조 패턴을 인식하고, 이어서 염증성 매개체(inflammatory mediators)의 발현을 개시하는 메커니즘을 갖는다.

[0008] 내피 기능장애의 치료를 위한 방법은 상기 내피의 기능 장애를 유발하는 질병 과정의 구성 요소를 해결하는 것이다. 예를 들면, 고호모시스테인혈증(hyperhomocysteinemia)에서의 호모시스테인의 감소는 염산을 보충하여 내피 기능장애를 개선할 수 있다. L-아르기닌과 테트라히드로바이오프테린(tetrahydrobiopterin, TMB)뿐만 아니라 테트라히드로바이오프테린 모방체(mimetics)는, 증가된 산화 질소 생체 이용률을 통해 내피 기능을 개선시킬 수 있다. 그러나, L-아르기닌 투여로 내피 기능장애를 개선시키는 것은 일부 연구에서는 밝혀지지 않았다.

[0009] 스타틴(statins)이 내피 기능장애에 유익한 효과를 나타내는 것이 입증되었고, 상기 결과는 부분적으로 지질의 감소뿐만 아니라 다면발현성의 항염증 효과(pleiotropic anti-inflammatory effect)로 인한 것일 수 있다. 그러나, 스타틴은 근육 통증 및 횡문근융해(rhabdomyolysis; 신부전 및 사망을 초래할 수 있음), 근육 약화, 신경 장애 및 기억 상실과 연관되어 있다. 또한, 스타틴은 비교적 짧은 반감기를 가지고 치료 효과를 제공하기 위해 정기적으로 투약을 필요로 한다. 예를 들면, 아토르바스타틴(atorvastatin)은 20~30시간 유효 반감기를 가지며, 지속성(long-acting) 스타틴으로 간주된다.

[0010] PPAR- γ (Peroxisome proliferator-activated receptor- γ)는 또한 내피 기능장애를 개선하는 것으로 나타났다. 그러나, 이들 화합물의 잠재적인 이점은 이들 화합물의 유체 유지(fluid retention) 및 울혈성 심부전(congestive heart failure)뿐만 아니라 가능성 있는 향상된 심혈관 위험성과 연관된 안정성 문제와 대조하여 신중하게 평가되어야 한다.

[0011] 내피 기능장애 또는 염증 질환을 치료 또는 예방하기 위한 기술 분야의 필요성은 전술된 바와 같이 명백할 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명의 목적은 치료 대상에서 내피 기능장애 또는 염증의 질환을 치료 또는 예방하기 위한 조성물 및 방법을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0013] 요약

[0014] 본 발명을 달성하기 위하여, 본 발명자들은 내피 기능장애로 고통받는 동물에게 STRO-1을 발현하는 MPCs(mesenchymal progenitor cells) 또는 이의 자손(progeny)을 전신적으로(systemically)(예를 들어, 정맥 내) 투여하면 내피-특이 확장기(endothelium-specific dilator)(브라디키닌(bradykinin) 및 카바콜(carbachol))에 대한 관상동맥 반응을 증가시키나, 평활근 확장기(smooth muscle dilator)인 나트륨 니트로프루시드(sodium nitroprusside)에 대해서는 증가하지 않았다. 예를 들면, 상기 MPCs 또는 이의 자손(progeny)은 내피-특이 확장기에 대해 최대 반응을 증가시켰고, 이는 상기 MPCs 또는 이의 자손(progeny)으로 처리(치료)되지 않은 동물에서의 결과에 비해 감소된 내피 기능장애를 나타낸 것이다. 이러한 데이터는 STRO-1을 발현하는 MPCs 또는 이의 자손(progeny) 또는 이로부터 분비된 하나 또는 그 이상의 인자들(factors)은 내피 기능장애의 형성을 치료 또는 예방하는 것으로 나타났다.

[0015] 발명자의 연구 결과에 기초하여, 본 발명은 STRO-1⁺ 세포가 증가된(enriched) 세포집단 및/또는 이의 자손(progeny) 및/또는 이로부터 유래된 가용인자(soluble factor)를 치료 대상에 전신적으로(systemically) 투여하는 단계를 포함하는 혈관 내피 기능장애(vascular endothelial dysfunction) 또는 염증질환의 치료 또는 예방 방법을 제공한다.

[0016] 일 실시예에서, 치료 대상은 내피 기능장애로 인한 병태(condition)로부터 통증을 앓는다.

- [0017] 일 실시예에서, 내피 기능장애는, 혈관 내에서 일어나고, 예를 들어, 이는 혈관 내피 기능장애이다.
- [0018] 일 실시예에서, 내피 기능장애로 인한 상기 병태는 패혈증, 고혈압, 관상동맥 질환, 만성심부전 및 말초동맥 질환, 신장병(nephropathy) 및 만성신부전으로 구성된 군에서 선택된다.
- [0019] 일 실시예에서, 내피 기능 장애로 인한 병태는 신장병(nephropathy)이다. 따라서, 일 실시예에서, 본 발명은 STRO-1⁺ 세포가 증가된(enriched) 세포집단 및/또는 이의 자손(progeny) 및/또는 이로부터 유래된 가용인자(soluble factor)를 치료 대상에 전신적으로(systemically) 투여하는 단계를 포함하는 신장병의 치료 또는 예방 방법을 제공한다.
- [0020] 일 실시예에서, 상기 신장병(nephropathy)은 당뇨병성 신장병(당뇨병성신장증, diabetic nephropathy)이다. 따라서, STRO-1⁺ 세포가 증가된(enriched) 세포집단 및/또는 이의 자손(progeny) 및/또는 이로부터 유래된 가용인자(soluble factor)를 치료 대상에 전신적으로(systemically) 투여하는 단계를 포함하는 당뇨병성 신장병의 치료 또는 예방방법을 제공한다.
- [0021] 다른 실시예에서, 상기 병태는 아테로마성 동맥 경화증(atherosclerosis)이다. 따라서, 일 실시예에서, 본 발명은 STRO-1⁺ 세포가 증가된(enriched) 세포집단 및/또는 이의 자손(progeny) 및/또는 이로부터 유래된 가용인자(soluble factor)를 치료 대상에 전신적으로(systemically) 투여하는 단계를 포함하는 아테로마성 동맥 경화증의 치료 또는 예방방법을 제공한다.
- [0022] 일 실시예에서, 상기 질환은 염증 질환이다. 상기 염증 질환은 패혈증, 패혈쇼크 또는 패혈증-유사 병태(sepsis-like condition)와 같은 전신성 염증 반응 증후군(systemic inflammatory response syndrome)일 수 있다. 다른 실시예에서, 상기 병태는 패혈증 또는 패혈쇼크이다. 따라서, 일 실시예에서, STRO-1⁺ 세포가 증가된(enriched) 세포집단 및/또는 이의 자손(progeny) 및/또는 이로부터 유래된 가용인자(soluble factor)를 치료 대상에 전신적으로(systemically) 투여하는 단계를 포함하는 패혈증 또는 패혈쇼크의 치료 또는 예방방법을 제공한다.
- [0023] 상기 패혈증, 패혈쇼크 또는 패혈증-유사 병태(sepsis-like condition)는 바이러스, 균류(fungus), 원생동물 또는 세균에 의해 발생될 수 있다.
- [0024] 일 실시예에서, 상기 방법은 STRO-1^{bright} 세포가 증가된(enriched) 세포집단 및/또는 이의 자손(progeny) 및/또는 이로부터 유래된 가용인자(soluble factor)를 투여하는 단계를 포함한다.
- [0025] 일 실시예에서, STRO-1⁺ 세포가 증가된(enriched) 상기 세포집단 및/또는 이의 자손(progeny) 및/또는 이로부터 유래된 가용인자(soluble factor)는 정맥 내 투여된다. 이러한 관점에서, 발명자들은 STRO-1⁺ 세포 및/또는 이의 자손(progeny)을 전신적으로(systemically) 투여하는 것으로 내피 기능장애를 향상시킬 수 있음을 보여주었다. 따라서, 본 발명은 치료 대상에서 STRO-1⁺ 세포 및/또는 그의 자손(progeny)을 내피 기능장애 부위로부터 떨어진 부위에 투여하는 것을 고려한다.
- [0026] 일 실시예에서, 상기 STRO-1⁺ 세포 및/또는 이의 자손(progeny) 및/또는 이로부터 유래된 가용인자(soluble factor)는 치료 대상에서 IL-6, TNF α 및/또는 IL-17을 감소시키기에 충분한 양으로 투여된다. 이들 염증성 사이토카인(inflammatory cytokines)의 수준을 감소시킴으로써, 본 발명의 상기 방법은 내피 기능장애를 예방한다.
- [0027] 일 실시예에서, 상기 STRO-1⁺ 세포 및/또는 이의 자손(progeny) 및/또는 이로부터 유래된 가용인자(soluble factor)는 치료 대상에서, 예를 들어, 치료 대상 환자의 내피에서, 안지오펙틴 I(angiotensin I)의 수준을 증가시키기에 충분한 양으로 투여된다. 전술한 바와 같이, 내피 기능장애로부터 고통을 받는 치료 대상은 안지오펙틴 II(angiotensin II)(안지오펙틴 I의 대항제(antagonist))의 수준이 증가된다. 발명자들은 STRO-1⁺ MPCs 및/또는 이의 자손(progeny)이 안지오펙틴 II를 분비하는 것을 보여주었고 이것이 상기 내피 기능장애를 치료하는데 도움이 될 것으로 추론하였다.
- [0028] 일 실시예에서, 상기 STRO-1⁺ 세포 및/또는 이의 자손(progeny) 및/또는 이로부터 유래된 가용인자(soluble factor)는 치료 대상에서 내피(예를 들어, 혈관 내피)의 확장(dilation)을 향상(예를 들어, 브라디키닌

(bradykinin) 및 카바콜(carbachol)과 같은 내피 확장기에 대한 반응에서)시키기에 충분한 양으로 투여된다.

- [0029] 일 실시예에서, STRO-1⁺ 세포 및/또는 이의 자손(progeny) 및/또는 이로부터 유래된 가용인자(soluble factor)는 치료 대상에서 평활근(예를 들어, 혈관 평활근)의 확장(예를 들어, 나트륨 니트로프루시드(sodium nitroprusside)와 같은 평활근 확장기에 대한 반응에서) 없이 내피(예를 들어, 혈관 내피)의 확장을 향상시키기에 충분한 양으로 투여된다
- [0030] 상기 세포의 전형적인 투여량은 1kg 당 0.1×10^6 내지 5×10^6 STRO-1⁺ 세포 및/또는 이의 자손(progeny)의 투여를 포함한다. 예를 들면, 1kg 당 0.3×10^6 내지 2×10^6 STRO-1⁺ 세포 및/또는 이의 자손(progeny)을 투여하는 단계를 포함하는 방법이다.
- [0031] 일 실시예에서, 상기 세포는, 약 0.3×10^6 세포/kg 내지 약 2×10^6 세포/kg과 같이, 약 0.3×10^6 세포/kg 내지 약 4×10^6 세포/kg의 투여량으로 투여된다.
- [0032] 상기 방법의 한 형태는 STRO-1⁺ 세포 및/또는 그의 자손(progeny)의 낮은 투여량으로 투여하는 것을 포함한다. 이러한 낮은 투여량은, 예를 들면, 약 0.3×10^6 STRO-1⁺ 세포/kg과 같이, 0.1×10^5 내지 약 0.5×10^6 STRO-1⁺ 세포/kg이다.
- [0033] 다른 실시예에서, 높은 투여량의 세포는 상기 치료 대상에게 투여된다. 전형적인 투여량은 적어도 약 1.5×10^6 세포/kg이다. 예를 들면, 높은 투여량은 약 1.5×10^6 내지 약 4×10^6 세포/kg을 포함한다. 예를 들면, 높은 투여량은 약 1.5×10^6 또는 약 2×10^6 세포/kg을 포함한다.
- [0034] 일 실시예에서, 상기 세포는, 즉 치료 대상의 체중과 무관하게, 일정한 신체 투여량(constant body dose)으로 투여된다.
- [0035] 일 실시예에서, 상기 세포는 치료 대상의 체중과 무관하게 약 1억 내지 3억 세포의 투여량으로 투여된다.
- [0036] 일 실시예에서, 상기 세포는 치료 대상의 체중과 무관하게 약 1억 내지 2억 세포의 투여량으로 투여된다.
- [0037] 일 실시예에서, 상기 세포는 치료 대상의 체중과 무관하게 약 1억 세포의 투여량으로 투여된다.
- [0038] 일 실시예에서, 상기 세포는 치료 대상의 체중과 무관하게 약 1.5억 세포의 투여량으로 투여된다.
- [0039] 일 실시예에서, 상기 세포는 환자의 체중과 무관하게 약 2억 세포의 투여량으로 투여된다.
- [0040] 일 실시예에서, 상기 세포는 환자의 체중과 무관하게 약 3억 세포의 투여량으로 투여된다.
- [0041] 일 실시예에서, 상기 STRO-1⁺ 세포 및/또는 이의 자손(progeny) 및/또는 이로부터 유래된 가용인자(soluble factor)는 폴리설페이트 다당류(polysulfated polysaccharide)와 조합으로 투여된다.
- [0042] 다른 실시예에서, 상기 폴리설페이트 다당류는 펜토산 폴리설페이트(pentosan polysulfate, PPS) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염이다. 예를 들면, 상기 PPS는 PPS의 나트륨 염(NaPPS, sodium salt of PPS) 또는 PPS의 칼슘 염(CaPPS, calcium salt of PPS)이다. 예를 들면, 상기 PPS의 염은 NaPPS이다.
- [0043] 일 실시예에서, 상기 PPS의 농도는 상기 조성물에서, STRO-1⁺ 세포 및/또는 이의 자손(progeny) 및/또는 이로부터 유래된 가용인자(soluble factor)의 수에 의존한다.
- [0044] 일 실시예에서, 상기 PPS의 농도는 약 5ng/ml/백만 세포~10mg/ml/백만 세포 또는 500ng/ml/백만 세포~10mg/ml/백만 세포, 500ng/ml/백만 세포~2000 µg/ml/백만 세포, 1 µg/ml/백만 세포~1000 µg/ml/백만 세포, 또는 1 µg/ml/백만 세포~500 µg/ml/백만 세포, 500ng~10 µg/ml/백만 세포, 1 µg~10 µg/ml/백만 세포, 1 µg~8 µg/ml/백만 세포, 1 µg~6 µg/ml/백만 세포, 1 µg~5 µg/ml/백만 세포, 1 µg~3 µg/ml/백만 세포, 2 µg~6 µg/ml/백만 세포, 2.5 µg~5 µg/ml/백만 세포, 또는 3 µg~5 µg/ml/백만 세포, 1 µg~100 µg/ml/백만 세포, 1 µg~50 µg/ml/백만 세포, 1 µg~20 µg/ml/백만 세포, 1 µg~15 µg/ml/백만 세포, 10 µg~100 µg/ml/백만 세포, 20 µg~100 µg/ml/백만 세포, 또는 50 µg~100 µg/ml/백만 세포, 1 µg~1000 µg/ml/백만 세포, 100 µg~800 µg/ml/백만 세포, 100 µg~600 µg/ml/백만 세포, 100 µg~500 µg/ml/백만 세포, 200 µg~500 µg/ml/백만

세포이다.

- [0045] 일 실시예에서, PPS의 용량은 약 1mg~100mg/7천 5백만 세포 사이에 있으며, 예를 들면, 약 25~75mg/7천 5백만 세포, 예를 들어, 약 75mg/7천 5백만 세포(예를 들어, 1mg/백만 세포)이다.
- [0046] 또 다른 실시예에서, 상기 PPS의 농도는 약 500ng, 1 μ g, 2 μ g, 2.5 μ g, 5 μ g, 10 μ g, 15 μ g, 20 μ g, 30 μ g, 40 μ g, 50 μ g, 60 μ g, 70 μ g, 80 μ g, 90 μ g, 100 μ g, 150 μ g, 200 μ g, 250 μ g, 300 μ g, 350 μ g, 400 μ g, 450 μ g, 500 μ g, 550 μ g, 600 μ g, 650 μ g, 700 μ g, 750 μ g, 800 μ g, 850 μ g, 900 μ g, 950 μ g, 1000 μ g, 1050 μ g, 1100 μ g, 1150 μ g, 1200 μ g, 1250 μ g, 1300 μ g, 1350 μ g, 1400 μ g, 1450 μ g, 1500 μ g, 1550 μ g, 1600 μ g, 1650 μ g, 1700 μ g, 1750 μ g, 1800 μ g, 1850 μ g, 1900 μ g, 1950 μ g, 또는 2000 μ g/ml/백만 세포이다.
- [0047] 예를 들어, 상기 투여된 PPS의 총용량은 약 1~100mg이다.
- [0048] 예를 들어, 상기 투여된 PPS의 총용량은 약 75mg이다.
- [0049] 또 다른 실시예에서, 상기 PPS는 치료 대상에 투여될 수 있는 조성물의 농도가 0.01~100 μ g/ml가 될 수 있는 용량으로 치료 대상에 투여될 수 있으며, 예를 들면 조성물의 0.1~50 μ g/ml, 조성물의 0.1~50 μ g/ml, 조성물의 0.1~10 μ g/ml, 조성물의 1~10 μ g/ml, 조성물의 2~8 μ g/ml, 조성물의 4~6 μ g/ml, 또는 조성물의 4, 5 또는 6 μ g/ml일 수 있다.
- [0050] 일 실시예에서, STRO-1⁺ 세포가 증가된(enriched) 상기 집단 및/또는 이의 자손(progeny) 및/또는 이로부터 유래된 가용인자(soluble factor)를, PPS와 함께하거나 또는 단독으로, 매주 1회 또는 덜 자주, 예컨대 4주에 1회 또는 덜 자주 투여된다.
- [0051] 본 발명은 또한 상기 세포 및/또는 가용인자의 다양한 투여를 고려한다. 예를 들면, 이러한 방법은 상기 세포를 투여하고 상기 치료 대상을 모니터링함으로써 언제 내피 기능장애의 하나 또는 그 이상의 증상이 발생 또는 재발하는지 확인하고 상기 세포 및/또는 가용인자의 추가 투여량을 투여할 수 있다. 내피 기능장애의 증상을 평가하기 위한 적합한 방법은 당업자에게 자명하고/하거나 본 명세서에 기재된 바와 같다.
- [0052] 또 다른 실시예에서, 세포 및/또는 가용인자는 고정된 일정에 따라 투여된다. 예를 들어, 매주 또는 2주 또는 3주 또는 4주 또는 5주 또는 6주 또는 그 이상의 주에 1회 투여된다.
- [0053] 일 실시예에서, STRO-1⁺ 세포가 증가된(enriched) 상기 집단 및/또는 이의 자손(progeny) 세포는 자가(autogeneic) 또는 타가(allogeneic)하고/하거나, 상기 가용인자(soluble factor)는 자가(autogeneic) 또는 타가(allogeneic) 세포 유래일 수 있다.
- [0054] 일 실시예에서, STRO-1⁺ 세포가 증가된(enriched) 상기 집단 및/또는 이의 자손(progeny) 세포는 투여하기 전 및/또는 가용인자(soluble factor)를 수득하기 전에 배양 팽창(culture expanded)된다.
- [0055] 일 실시예에서, STRO-1⁺ 세포가 증가된(enriched) 상기 집단은 STRO-1^{bnght}, 및/또는 조직 비-특이적 알칼라인 포스파타제(tissue non-specific alkaline phosphatase, TNAP) 발현 및/또는 STRO-1^{bright} 및/또는 TNAP 발현 STRO-1⁺ 세포로부터 유래된 상기 자손 세포 및/또는 가용인자를 포함한다.
- [0056] 일 실시예에서, 상기 STRO-1⁺ 세포 및/또는 이의 자손(progeny) 세포 및/또는 이로부터 유래된 가용인자(soluble factor)는 상기 STRO-1⁺ 세포 및/또는 이의 자손(progeny) 세포 및/또는 이로부터 유래된 가용인자(soluble factor) 및 담체 및/또는 부형제를 포함하는 조성물의 형태로 투여된다.
- [0057] 일 실시예에서, 상기 치료 대상은 포유동물로, 예를 들어, 인간과 같은 영장류이다. 다른 실시예에서, 상기 치료 대상은 비-인간 동물(예를 들어, 비-인간 포유동물)로 사육된 동물, 예컨대, 개 또는 고양이 또는 소 또는 양이다.
- [0058] 본 발명에서 치료 대상에서의 내피 기능장애 또는 내피 기능장애로 인한 병태의 치료 또는 예방 용도로 STRO-1⁺ 세포가 증가된(enriched) 세포집단 및/또는 이의 자손(progeny) 및/또는 이로부터 유래된 가용인자(soluble factor)를, 선택적으로, PPS(pentosan polysulfate)와 조합하여 추가적으로 제공한다.
- [0059] 본 발명은 치료 대상에서의 내피 기능장애 또는 내피 기능장애로 인한 병태의 치료 또는 예방 용도로 STRO-1⁺

세포가 증가된(enriched) 세포집단 및/또는 이의 자손(progeny) 및/또는 이로부터 유래된 가용인자(soluble factor)를, 선택적으로, 약제의 제조에서 PPS(pentosan polysulfate)와 조합하여 추가적으로 제공한다.

[0060] 본 발명은 임의의 실시예에 따라 본원에 기재된 용도 또는 방법에서 사용되는 의료 기기를 또한 제공한다. 예를 들면, 본 발명은 임의의 실시예에 따라 본원에 기재된 STRO-1⁺ 세포 및/또는 이의 자손 세포 및/또는 이로부터 유래한 가용인자 및/또는 조성물을 포함하는 주사기 또는 카테터(catheter) 또는 다른 적절한 운반 장치를 제공한다. 선택적으로, 상기 주사기 또는 카테터는 임의의 예에 따라 본원에 기재된 방법에서의 사용을 위한 지시사항과 함께 포장된다.

[0061] 다른 실시예에서, 본 발명은 임의의 예에 따라 본원에 기재된 STRO-1⁺ 세포 및/또는 이의 자손 세포 및/또는 이로부터 유래한 가용인자 및/또는 조성물을 포함하는 임플란트를 제공한다. 선택적으로, 상기 임플란트는 임의의 실시예에 따라 본원에 기재된 방법에서의 사용을 위한 지시사항과 함께 포장된다. 적합한 임플란트는, 예를 들어, 전술된 스캐폴드, 및 STRO-1⁺ 세포 및/또는 이의 자손 세포 및/또는 이로부터 유래한 가용인자와 함께 형성될 수 있다.

발명의 효과

[0062] STRO-1을 발현하는 MPCs 또는 이의 자손 또는 이로부터 분비된 하나 또는 그 이상의 인자들(factors)은 내피 기능장애의 형성을 치료 또는 예방하는 것으로 나타났다.

도면의 간단한 설명

[0063] 도 1은 성인 핵구조세포(morphonuclear cell, BMMNC)의 TNAP(STRO-3) 및 중간엽 전구체(Mesenchymal Precursor) 세포 마커인 STRO-1^{bright}의 공동발현(co-expression)을 나타낸 것이다. STRO-1 MACS-선택 BMMNC 및 FITC에 연결된 염소 항-뮤린 IgM 항체(x 축), 및 PE에 연결된 염소 항-뮤린(y 축)으로 간접적으로 표지된 STRO-3 mAb(뮤린 IgG1)를 처리(incubation)하여 듀얼-컬러 면역현광 및 유동세포분석(flow cytometry)이 수행되었다. 도트 플롯 히스토그램(dot plot histogram)은 리스트모드 데이터(listmode data)로서 수집된 5 x 10⁴ 현상을 나타낸 것이다. 상기 수직 및 수평 선은 같은 조건 하에서 처리된 아이소타입이 일치하는 대조군(control) 항체인 1B5(IgG) 및 1A6.12(IgM)로 획득한 평균 형광 1.0% 미만의 반응성 수준(reactivity level)으로 설정된 것이다. 상기 결과에 의하면 STRO-1^{bright} 세포의 소수 집단은 TNAP(사분면의 우측 상)를 공동발현하는 반면, 남은 STRO-1⁺ 세포는 상기 STRO-3 mAb와 반응하지 못한 것으로 나타났다.

도 2는 배양 및 팽창된 STRO-1^{bright} MPC의 STRO-1^{bright} 또는 STRO-1^{dim} 자손(progeny)의 유전자 발현 프로파일을 나타낸 것이다. (A) 생체 외(ex vivo) 팽창된 골수 MPC의 단일 세포 현탁액은 트립신/EDTA 처리하여 제조되었다. 세포는 상기 STRO-1 항체로 염색한 다음, 염소-항 뮤린 IgM-FITC(fluorescein isothiocyanate)로 처리하여 나타내었다. 총 세포 RNA는 FACS(fluorescence activated cell sorting)후에 STRO-1^{dim} 또는 STRO-1^{bright}을 발현하는 세포의 정제된 집단(population)으로부터 제조되었다. (B) RNAzolB 추출 방법, 및 표준 방법을 이용하여 총 RNA는 각각의 하위집단(subpopulation)으로부터 분리되었고(isolated) cDNA 합성을 위한 주형(template)으로 사용되었다. 다양한 전사체(transcript)는 전술한 표준 프로토콜(Gronthos *et al.*, *J Cell Sci.* 116:1827-1835, 2003)을 사용하여 PCR 증폭으로 평가되었다. 본 연구에서 사용된 프라이머 쌍은 표 2에 나타내었다. 증폭 후, 각각의 반응혼합물은 1.5% 아가로스 젤 전기영동으로 분석되었고, EtBR(ethidium bromide) 염색으로 가시화되었다. (C) 각각의 세포 마커에 대한 상대적 유전자 발현은 ImageQuant 소프트웨어를 사용하여 하우스-키퍼 유전자(house-keeping gene)인 GAPDH의 발현을 참조하여 평가되었다.

도 3은 배양 및 팽창된 STRO-1⁺ MPC의 STRO-1^{bright} 자손(progeny)은 높은 수준의 SDF-1를 발현하고 STRO-1^{dim} 자손은 그렇지 아니하였다. (A) STRO-1⁺ BMMNCs의 MACS-분리된 제제(preparation)는 FACS를 이용하여 STRO-1^{bright} 및 STRO-1^{dim/dull} 영역에 따라 STRO-1 서브세트(subsets)로 분할되었다. (B-C) 총 RNA는 각각의 STRO-1 하위집단

(subpopulation)으로부터 제조되었고 STRO-1^{bright} 감산 혼성화 라이브러리(subtraction hybridization library)를 구축하는데 사용되었다. STRO-1^{bright} 감산된(subtracted) cDNA로 형질전환된 박테리아 클론으로부터 증폭된 대표 PCR 산물이 도발(blot)된 니트로셀룰로오스 필터(nitrocellulose filter)를 복제하였다. 그 다음, 상기 필터는 [³²P]디옥시시티딘 트리포스페이트(deoxycytidine triphosphate, dCTP)-표지 STRO-1^{bright} (B) 또는 STRO-1^{dim/dull} (C) 감산 cDNA로 표지(probe)되었다. 화살표는 인간 SDF-1에 대응하는 cDNA 단편을 함유하는 한 클론(clone)을 나타낸 것이다. (D) 역전사효소(reverse transcriptase(RT))-PCR 분석은 배양 전 것 MACS/FACS-분리된 BMMNC STRO-1 집단으로부터 제조된 총 RNA에서의 SDF-1 및 글리세르알데히드-3-포스페이트 탈수소효소(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 전사체의 상대적 발현을 보여준 것이다. bp는 염기쌍을 나타낸다.

도 4는 간질 세포(stromal cell) 및 1차 장기배양물(primary long term cultures)에서의 CD146, CXCL12 및 안지오펙틴 1(Angiopoietin 1)의 발현을 나타내는 일련의 그래프를 도시한 것이다. (A) 아이소타입 대조군(isotype control)과 함께 CD146(MCAM)에 대한 간질 세포주 HS5 및 HS27a의 FACS 분석을 나타낸 것이다. (B) 아이소타입 대조군과 함께 CD146^{lo}에 대한 첫 번째 계대(passage)에서 1차 LTC의 FACS 분석을 나타낸 것이다. 상기 1차 LTCs는 FACS-에이디드 유동-선별(FACS-aided flow-sorting)에 의해 CD146^{hi} 및 CD146^{lo} 집단으로 선별되었다. hi 및 lo 집단에 대한 대략적인 게이트(approximate gates) 또한 나타내었다. (C) CD146^{hi} 및 CD146^{lo}로 선별된 9 LTC의 CXCL12의 수준은 RT-PCR로 정량(1000 계수를 곱한 베타-액틴과 비교)되었다. 같은 배양물로부터 쌍의 샘플은 선으로 연결되었다. (D) 동일한 9 LTC의 안지오펙틴 1(Angiopoietin 1)의 수준은 또한 (1000 계수를 곱한 베타-액틴에 대한) RT-PCR로 정량되었다. 패널 A에서의 실험은 3개의 독립적 실험으로 확인되었고, 패널 B, C 및 D의 실험들은 9개의 독립적 샘플에서 확인되었다. 패널 C 및 D에서의 데이터 세트의 윌콕슨의 매치 쌍 테스트(Wilcoxon's matched pair test)에 의한 통계분석은 두 경우 모두 0.01 미만의 P-값을 나타내었다.

도 5는 콜라겐의 투여에 의한 내피 기능장애를 유도한 다음, 2주 동안의 처리(treated) 및 무처리된(untreated) 양(sheep)의 혈장에서의 IL-10 수준(ng/mL)의 평균±SEM을 나타낸 것이다.

도 6은 콜라겐의 투여에 의한 내피 기능장애를 유도한 다음, 2주 동안의 처리(treated) 및 무처리된(untreated) 양(sheep)의 혈장에서의 피브리노겐(fibrinogen) 수준(g/L)의 평균±SEM을 나타낸 것이다.

도 7은 콜라겐의 투여에 의한 내피 기능장애를 유도한 다음, 2주 동안의 처리(treated) 및 무처리된(untreated) 양(sheep)의 혈장에서의 악티빈 A(Actvin A) 수준(pg/mL)의 평균±SEM을 나타낸 것이다.

도 8은 콜라겐의 투여에 의한 내피 기능장애를 유도한 다음, 2주 동안의 처리(treated) 및 무처리된(untreated) 양(sheep)의 혈장에서의 C-반응성 단백질(C-reactive protein) 수준(mg/L)의 평균±SEM을 나타낸 것이다.

도 9는 콜라겐의 투여에 의한 내피 기능장애를 유도한 다음, 2주 동안의 처리(treated) 및 무처리된(untreated) 양(sheep)의 혈장에서의 C-반응성 단백질(C-reactive protein) 수준의 % 변화율을 나타낸 것이다.

도 10은 MPCs("처리군(treated)") 또는 식염수("대조군(control)")가 투여된 양(sheep)으로부터 엔도텔린-1(endothelin-1)에 따른 수축과 브라디키닌(bradykinin)(A), 카바콜(carbachol)(C) 또는 나트륨 니트로프루시드(sodium nitroprusside)(B 및 D)에 따른 뒤이은 이완 후 양(sheep)의 관상동맥(A 및 C) 또는 디지털 동맥(B 및 D)의 이완률(percentage relaxation)을 나타내는 일련의 그래프를 도시한 것이다.

도 11은 콜라겐의 투여에 의한 내피 기능장애를 유도한 다음, 기준선(기준치, baseline)을 상대로 MPC+PPS 처리(treated) 및 무처리된(untreated) 양(sheep)의 혈장에서의 IL10 수준(ng/mL)의 피크에 대한 평균±SD를 나타내는 그래프를 도시한 것이다.

도 12는 콜라겐의 투여에 의한 내피 기능장애를 유도한 다음, 기준선을 상대로, 2주 동안의 MPC+PPS 처리(treated) 및 무처리된(untreated) 양(sheep)의 혈장에서의 피브리노겐(fibrinogen) 수준(g/L)의 변화에 대한 평균±SEM을 나타내는 그래프를 도시한 것이다.

도 13은 콜라겐의 투여에 의한 내피 기능장애를 유도한 다음, 2주 동안의 MPC+PPS 처리(treated) 및 무처리된(untreated) 양(sheep)의 혈장에서의 액틴 A(Actin A) 수준(pg/mL)에 대한 평균±SEM을 나타내는 그래프를 도시한 것이다.

도 14는 콜라겐의 투여에 의한 내피 기능장애를 유도한 다음, 기준선(baseline)을 상대로, 2주 동안의 MPC+PPS 처리(treated) 및 무처리된(untreated) 양(sheep)의 혈장에서의 C-반응성 단백질(C-reactive protein) 수준의 변화에 대한 평균±SEM을 나타내는 그래프를 도시한 것이다.

도 15는 MPC+PPS("처리군(treated)") 또는 식염수("대조군")가 투여된 양(sheep)으로부터 엔도텔린-1(endothelin-1)에 따른 수축과 브라디키닌(bradykinin)(A), 카바콜(carbachol)(C) 또는 나트륨 니트로프루시드(sodium nitroprusside)(B 및 D)에 따른 뒤틀은 이완 후 양(sheep)의 관상동맥(A 및 C) 또는 디지털 동맥(B 및 D)의 이완률(percentage relaxation)을 나타내는 일련의 그래프를 도시한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0064] 일반적 기술 및 선정된 정의

[0065] 본 명세서 전반에 걸쳐, 특별히 달리 언급되지 않거나 문맥상 달리 필요하지 않으면, 하나 또는 복수(즉, 하나 또는 그 이상)의 단계, 물질의 조성, 단계군 또는 물질의 조성군을 포함하도록 사용된 단일 단계, 물질의 조성, 단계군 또는 물질의 조성군을 참조한다.

[0066] 본원에 기재된 각 구현예(embodiment) 또는 실시예(example)는 특별히 다른 언급이 없는 한 필요한 변경을 가하여(*mutatis mutandis*) 각각 및 다른 모든 구현예에 적용된다.

[0067] 당업자는 본원에 기재된 발명이 구체적으로 설명되지 않은 다른 변형(variation) 및 변경(modification)에 대해 허용될 수 있음을 이해할 것이다. 본 발명은 이러한 모든 변형 및 변경을 포함하는 것으로 이해된다. 본 발명은 또한 본 명세서에서 참조하거나 지시되는 개별적으로 또는 집합적으로 모든 단계들, 특성들, 조성물 및 화합물, 및 임의의 모든 조합 또는 임의의 둘 또는 그 이상의 상기 단계들 또는 특성들을 포함한다.

[0068] 본 발명은 단지 예시의 목적으로 의도된 본원에 기재된 특정 구현예로 그 범위가 제한되지 않는다. 본원에 기술된 바와 같이, 기능적으로 동등한 생성물, 조성물 및 방법은 본 발명의 범위 내에서 명확하다.

[0069] 본 발명은 달리 언급하지 않는 한, 과도한 실험 없이, 분자생물학, 미생물학, 바이러스학, 재조합 DNA 기술, 용액에서의 펩티드 합성, 고상(solid phase) 펩티드 합성, 및 면역학의 통상적인 기법을 이용하여 수행된다. 이러한 방법은, 예를 들면, Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, New York, Second Edition (1989), Vols I, II, and III; *DNA Cloning: A Practical Approach*, Vols. I and II (D. N. Glover, ed., 1985)의 전체, IRL Press, Oxford의 텍스트 전체; *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach* (M. J. Gait, ed, 1984) IRL Press, Oxford의 텍스트 전체, 및 특히 Gait, pp1-22; Atkinson *et al*, pp35-81; Sproat *et al*, pp 83-115; 및 Wu *et al*, pp 135-151의 안에 있는 논문; 4. *Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach* (B. D. Hames & S. J. Higgins, eds., 1985) IRL Press, Oxford의 텍스트 전체; *Immobilized Cells and Enzymes: A Practical Approach* (1986) IRL Press, Oxford의 텍스트 전체; Perbal, B., *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984); *Methods In Enzymology* (S. Colowick and N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.)의 시리즈 전체; J.F. Ramalho Ortigao, "The Chemistry of Peptide Synthesis" In: Knowledge database of Access to Virtual Laboratory website (Interactiva, Germany); Sakakibara, D., Teichman, J., Lien, E. Land Fenichel, R.L. (1976). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 73 336-342; Merrifield, R.B. (1963). *J. Am. Chem. Soc.* 85, 2149-2154; Barany, G. and Merrifield, R.B. (1979) in *The Peptides* (Gross, E. and Meienhofer, J. eds.), vol. 2, pp. 1-284, Academic Press, New York. 12. Wunsch, E., ed. (1974) *Synthese von Peptiden in Houben-Weyls Methoden der Organischen Chemie* (Muler, E., ed.), vol. 15, 4th edn., Parts 1 and 2, Thieme, Stuttgart; Bodanszky, M. (1984) *Principles of Peptide Synthesis*, Springer-Verlag, Heidelberg; Bodanszky, M. & Bodanszky, A. (1984) *The Practice of Peptide Synthesis*, Springer-Verlag, Heidelberg; Bodanszky, M. (1985) *Int. J. Peptide Protein Res.* 25, 449-474; *Handbook of Experimental Immunology*, Vols. I-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds., 1986, Blackwell Scientific Publications); 및 *Animal Cell Culture: Practical Approach*, Third Edition (John R. W. Masters, ed., 2000), ISBN 0199637970의 텍스트 전체에 기재되어 있다.

[0070] 본 명세서 전반에 걸쳐, 문맥상 다른 의미를 요구하지 않는 한, 상기 단어 "포함한다(comprise)", 또는 "포함한다(comprises)" 또는 "포함하는(comprising)"과 같은 변형은 명시된 단계 또는 요소 또는 정수(integer) 또는 단계군, 요소군 또는 정수군의 포함을 의미하지만, 임의의 다른 단계 또는 요소 또는 정수 또는 요소군 또는 정

수준의 배제를 의미하지 않는 것으로 이해될 것이다.

- [0071] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "∼에서(∼로부터) 유래된(derived from)"은 특정된 정수(integer)를 특정 소스로부터 획득할 수 있으며 이는 반드시 직접 그러한 소스로부터 획득하지 않더라도 표시하도록 사용된다. 문맥상 줄기세포 및/또는 이의 자손(progeny) 세포로부터 유래된 가용인자(soluble factor)와 관련해서 이 용어는 줄기세포 및/또는 이의 자손(progeny) 세포의 생체 외(in vitro) 배양하는 동안 생성되는 하나 또는 그 이상의 인자, 예를 들어, 단백질, 펩티드, 탄수화물 등을 의미하도록 사용된다.
- [0072] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "내피 기능장애(endothelial dysfunction)"는 혈관을 확장(vasodilating)하고 혈관을 수축(vasoconstricting)시키는 물질들 간의 불균형을 특징으로 하고/하거나 혈관 확장 및/또는 전염증 상태(proinflammatory state) 및/또는 프로트롬빅(prothrombic) 특성이 감소되도록 내피의 행동이 전환되는 것을 특징으로 하는 치료 대상에서의 상태(예를 들어, 전신 상태(systemic state))를 의미하는 것으로 이해될 것이다. 내피 기능장애를 검출하는 방법은 당업자에게 자명하고/하거나 본 명세서에 기재된 바와 같다.
- [0073] 본원에서 사용된 상기 용어 "내피 기능장애로 인한 병태(condition)"는 내피 기능장애가 병리학적 역할을 하는 임의의 의학적 병태(질병, medical condition)를 의미하는 것으로 이해될 것이다. 일 실시예에서, 상기 병태는 혈관 병태(vascular condition)이다. 예를 들면, 상기 병태는 심혈관 질환(예컨대, 고혈압, 관상동맥 질환, 만성심부전 및 말초동맥 질환), 당뇨병의 혈관성 합병증(예컨대, 신장병(nephropathy)) 또는 만성신부전이다.
- [0074] 본원에서 사용된 상기 용어 "신장병(nephropathy)"은 신장 손상을 특징으로 하는 상태를 의미하고 비-염증 신장병(신장증(nephrosis)) 및 염증 신장병(신장염(nephritis))을 포함한다. 신장병의 원인은 사구체에서의 IgA 자가항체(autoantibody)의 침적(deposition), 진통제의 투여, 크산틴 산화효소의 결핍(xanthine oxidase deficiency) 및/또는 납 또는 이의 염에 장기간 노출을 포함한다. 신장병을 발생시킬 수 있는 만성 병태(chronic condition)는 SLE(systemic lupus erythematosus), 진성당뇨병(diabetes mellitus) 또는 고혈압을 포함하며, 이는 각각 당뇨병성 신장병 및 고혈압성 신장병(hypertensive nephropathy)으로 이어진다.
- [0075] 상기 용어 "당뇨병성 신장병(diabetic nephropathy)"(김멜스틸-윌슨증후군 (Kimmelstiel-Wilson syndrome) 또는 결절성 당뇨병성 사구체경화증(nodular diabetic glomerulosclerosis) 및 모세혈관간형 사구체신염(inter-capillary glomerulonephritis)이라고도 함)은 신장 사구체에서의 모세혈관의 혈관병증(angiopathy)으로 인한 진행성 신장 병태(progressive kidney condition)를 의미하는 것으로 이해될 것이다. 그것은 신장증후군(nephrotic syndrome) 및 확산 사구체 경화증(diffuse glomerulosclerosis)을 특징으로 한다. 이 병태에서 일반적으로 검출되는 제1 감식 이상(first laboratory abnormality)은 양성 미세단백뇨(microalbuminuria) 테스트를 나타내는 것이다. 당뇨병을 가진 사람의 일상 검뇨(urinalysis)시 소변에 너무 많은 단백질이 나타날 때(단백뇨(proteinuria)) 상기 진단이 의심되는 경우가 종종 있다. 상기 검뇨는 또한 상기 소변에 포도당을 나타낼 수 있으며, 특히 혈중 포도당이 제대로 조절되지 않은 경우 그렇다. 신장 손상의 진행되는 경우, 혈청 크레아티닌(serum creatinine)은 증가할 수 있다. 신장의 생체검사(biopsy)를 이용하여 진단을 확인할 수 있으나, 시간에 따른 단백질의 진행 및 눈의 망막 검사에서 당뇨병성 망막증(diabetic retinopathy)이 있는 경우와 같이 케이스가 간단한 경우 항상 필요한 것은 아니다.
- [0076] 상기 용어 "전신성 염증 반응 증후군(systemic inflammatory response syndrome)"(또는 "SIRS")은 감염원 없이 전신의 염증 상태를 의미하는 데, 통상의 의미에 따라 본원에서 사용된다. 4가지 주요 진단 증상이 있음에도, 이들 중 임의의 2가지만으로도 충분히 진단할 수 있다(예를 들어, Nystrom (1998) *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 41, Suppl A, 1-7 참조).
- [0077] 상기 용어 "패혈증(sepsis)"은 의심 또는 입증된 감염에 의해 발생하는 SIRS의 한 형태를 의미한다(예를 들어, Nystrom (1998) *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 41, Suppl. A, 1-7 참조). 패혈증을 일으키는 감염은 예를 들어, 바이러스, 균류(fungus), 원생동물 또는 박테리아에 의해 유발될 수 있다.
- [0078] 상기 용어 "패혈성 쇼크(septic shock)"는, 관류 이상(perfusion abnormalities)의 존재와 함께, 유체(fluid)로 적절한 소생을 시킴(내화성 저혈압(refractory hypotension))에도 불구하고 저혈압을 가지는 패혈증을 의미한다(예를 들어, Nystrom (1998) *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 41, Suppl. A, 1-7 참조).
- [0079] 상기 용어 "패혈증-유사 병태(sepsis-like condition)"는 환자에서 패혈증 또는 패혈쇼크와 유사한 증상을 나타내는 상태를 의미하지만 염증 매개체(inflammatory mediator)의 캐스케이드(cascade of inflammatory mediators) 및/또는 혈류역학적 매개변수(haemodynamic parameters)의 변화가 주로 또는 초기에 감염원에 의해 발생하지 않는 경우이다. 예를 들면, 급성 또는 만성 간부전 환자(Wasmuth H E, et al. *J Hepatol*. 2005

February; 42(2): 195-201 참조), 심장 마비 후 후-인공호흡 질환(post-resuscitation disease)으로 고통받는 환자(Adrie C *et al.* *Curr Opin Crit Care*. 2004 June; 10(3):208-12 참조), 암 화학요법 후 패혈증-유사 증상으로 고통받는 환자(Tsuji E *et al.* *Int J Cancer*. 2003 Nov. 1; 107(2):303-8 참조), 재조합 TNF-알파 또는 유사 치료로 인한 온열 분리된 사지 관류(hyperthermic isolated limb perfusion)를 겪고 있는 환자(Zwaveling J H *et al.* *Crit Care Med*. 1996 May; 24(5):765-70 참조) 또는 패혈-유사 질병을 앓는 신생아(Griffin M P *et al.* *Pediatr Res*. 2003 June; 53(6):920-6 참조)에서 패혈증-유사 병태를 볼 수 있다.

- [0080] 본원에서 사용되는, 용어 "유효량(effective amount)"은 줄기세포 및/또는 이의 자손 세포 및/또는 이로부터 유래된 가용인자를 치료 대상에서 혈관의 확장(dilation)(예를 들어, 브라디키닌(bradykinin) 또는 카바콜(carbachol)과 같은 내피 확장제 존재 하에서)을 현저하게 향상시키기에 충분한 양 및/또는 치료 대상에서의 내피에서 또는 치료 대상의 한 조직 또는 이의 영역(예를 들어, 기능장애가 있는 내피의 영역)에서의 안지오펙틴 I(angiotensin I)에서의 수준의 증가를 의미한다. 이러한 용어가 의미하는 바는 이러한 효과를 위해서 상기 "유효량(effective amount)"이 각각 및 매번 시험되어야 하는 것을 의미하지 않으며, 예비 연구에서 용량이 확립될 수 있으며, 상기 연구 결과에 기반하여 상기 용량은 대부분의 치료 대상에서 유사한 효과를 보일 것으로 간주될 수 있다.
- [0081] 본원에서 사용되는, 용어 "치료 유효량(therapeutically effective amount)"은 줄기세포 및/또는 이의 자손 세포 및/또는 이로부터 유래된 가용인자를 내피 기능장애로 인한 병태 또는 이의 증상 또는 이의 임상증상(clinical sign)을 치료하기 위해 충분한 양을 사용하는 것을 의미한다.
- [0082] 본원에서 사용되는, 용어 "예방학적 유효량(prophylactically effective amount)"은 줄기세포 및/또는 이의 자손 세포 및/또는 이로부터 유래된 가용인자를 내피 기능장애로 인한 병태 또는 이의 증상 또는 이의 임상증상(clinical sign)을 예방 또는 억제 또는 병태의 발생을 지연시키기 위해 충분한 양을 사용하는 것을 의미한다.
- [0083] 본원에서 사용되는, 용어 "저투여량(low dose)"은 줄기세포 및/또는 이의 자손의 용량이 1×10^6 이하임에도, 본원에 정의된 바와 같이 "유효량" 및/또는 본원에 정의된 바와 같이 "치료 유효량" 및/또는 "예방학적 유효량"으로서 충분하다. 예를 들면, 저투여량은 0.5×10^6 또는 그 이하의 세포, 또는 0.4×10^6 또는 그 이하의 세포 또는 0.3×10^6 또는 그 이하의 세포 또는 0.1×10^6 또는 그 이하의 세포를 포함한다.
- [0084] 본원에서 사용되는, 용어 "고투여량(high dose)"은 1.5×10^6 세포/kg 이상인 것으로 이해될 것이다. 예를 들면, 투여량은 약 1.5×10^6 및 약 4×10^6 세포/kg을 포함한다. 예를 들면, 고투여량은 약 1.5×10^6 또는 약 2×10^6 세포/kg을 포함한다.
- [0085] "고정 신체 투여량(fixed body dose)"과 관련하여, 상기 기재된 투여량이 치료 대상 또는 치료 대상 집단의 체중과 무관하게 투여되는 것을 의미한다.
- [0086] 본원에서 사용되는, 용어 "치료(treat)" 또는 "치료(treatment)" 또는 "치료하는(treating)"은 가용인자 및/또는 세포를 치료 유효량으로 투여하고, 내피 기능장애로 인한 병태의 증상(들)을 감소시키거나 억제시킴으로써 상기 치료 대상은 병태에 대해서 더 이상 임상적으로 진단되지 아니하거나 상기 병태의 수준 또는 심각성이 감소되는 것을 의미하는 것으로 이해될 것이다.
- [0087] 본원에서 사용되는, 용어 "예방(prevent)" 또는 "예방하는(preventing)" 또는 "예방(prevention)"은 가용인자 및/또는 세포의 예방학적 유효량을 투여하고, 내피 기능장애로 인한 병태의 발생과 진행을 중지 또는 억제 또는 지연시키는 것을 의미하도록 사용된다.
- [0088] 본원에서 사용되는, 용어 "가용인자(soluble factor)"는, 예를 들어, 단백질, 펩타이드, 당단백질, 글리코펩티드, 리포단백질, 리포펩타이드, 탄수화물 등과 같은 줄기세포 및/또는 이의 자손에 의해 생성되는 임의의 수용성 분자를 의미하도록 사용된다. 이러한 가용인자는 세포 내의 것 및/또는 세포에 의해 분비될 수 있다. 이러한 가용인자는 복합 혼합물(예를 들어, 상청액(supernatant)) 및/또는 이의 분획(fraction) 및/또는 정제된 인자(factor)일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서 가용인자는 상청액에 포함된다. 따라서, 본원에서 하나 또는 그 이상의 가용인자의 투여에 관한 임의의 실시예는 필요한 변경을 가하여(*mutatis mutandis*) 상청액의 투여에 대해 적용되도록 사용된다.
- [0089] 본원에서 사용되는, 용어 "상청액(상층액, supernatant)"은 액체 매체(액체 배지, liquid medium)와 같은 적합

한 매체(배지)에 줄기세포 및/또는 이의 자손을 생체 외(*in vitro*) 배양 후 생성된 상기 비-세포 물질(non-cellular material)을 의미한다. 일반적으로 상기 상청액은 적합한 조건 및 시간 하에서 매체(배지) 중에 상기 세포를 배양함으로써 상기 상청액 생성 후 원심분리와 같은 공정으로 상기 세포 물질(cellular material)을 제거한다. 상기 상청액은 투여 전에 추가 정제 단계를 실시하거나 그렇지 아니할 수 있다. 일 실시예에서, 상기 상청액은 10^5 이하, 예를 들면 10^4 이하, 10^3 이하와 같은, 예컨대, 살아있지 않은 세포를 포함할 수 있다.

[0090] 본원에서 사용되는 용어 "정상적인 또는 건강한 개인(normal or healthy individual)"은 당업계에 공지 및/또는 본원에 기재된 임의의 방법으로 평가된 바와 같이 내피 기능장애가 없는 치료 대상을 의미하도록 사용된다. 일 실시예에서, "정상적인 또는 건강한 개인"은 내피 기능장애로 인한 병태의 임의의 상기 증상으로부터 고통받지 않는다.

[0091] 내피 기능장애(Endothelial Dysfunction)

[0092] 내피 기능(endothelial function)을 평가하기 위한 다수의 테스트는 당업계에 공지 및/또는 후술되었고, 이들은 내피 기능장애를 검출하는 데 유용하다.

[0093] 내피 기능을 테스트할 때 평가되는 공통 매개변수(parameter)는 내피-의존성 혈관확장(endothelium-dependent vasodilation)이다. 관상동맥(coronary artery)에서, 이것은 도플러 유량계(Doppler flow measurements)에 의해 뇌혈관 조영술적으로(angiographically) 수행됨으로써 내피-의존성 아고니스트(agonist, 길항제)의, 주로 아세틸콜린(acetylcholine)의, 효과를 평가한다(Schachinger *et al.*, *Circulation* 101: 1899-1906, 2000).

[0094] 양전자 방사 단층 촬영 스캐닝(positron emission tomography scanning)에 의한 관상동맥 관류(coronary perfusion)의 측정으로 한랭승압시험(cold pressor test)은 내피 기능의 척도로서 또한 사용될 수 있다(Gokce *et al.*, *Am Coll Cardiol* 41: 1769-1775, 2003).

[0095] 전단 응력(sheer stress)은 NO 방출을 위한 내피(endothelium)에 대한 자극제(stimulus)이기 때문에, 비침습적(noninvasive) 기술은 초음파로 상완동맥(brachial artery)의 흐름-매개 혈관확장(flow-mediated vasodilation)을 평가하기 위해 반응적 충혈(reactive hyperemia) 동안 증가된 전단 응력을 유도하는 것으로 구성된다(Celermajer *et al.*, *Lancet* 340: 1111-1115, 1992).

[0096] 내피 기능장애는 동맥 염증과 병행되므로, 내피 기능장애의 마커는 ICAM-1, VCAM-1, 및 E-셀렉틴(E-selectin)의 가용 형태(soluble form)를 포함한다.

[0097] 미세알부민뇨(Microalbuminuria)는 오랜 시간 동안 내피 기능장애의 표현으로 간주되어 왔다. 미세알부민뇨는 대부분의 병리학적 병태(pathologic conditions)에서 알부민의 모세관 배출(transcapillary escape)을 보이는 사구체에서의 모세혈관 벽의 질환인 것으로 보인다. 당뇨병에서, 내피 기능장애는 미세알부민뇨와 관련이 있으며, 이의 발달에 선행할 수 있다. 미세알부민뇨는 또한 내피 기능장애의 마커와 상관 관계를 보였다.

[0098] 심근 혈류(myocardial blood flow) 및 대사 활성의 정량 평가는 양전자 방출 단층 촬영 스캐닝(positron emission tomography scanning)에 의해 이루어질 수 있다(Gould *et al.*, *Circulation* 89:1530-1538, 1994). 관동맥 혈류예비력(coronary flow reserve)을 계산하기 위해, 기초 흐름(basal flow) 및 충혈 흐름(hyperemic flow)(일반적으로 정맥 내 디피리다몰(intravenous dipyridamole))을 둘 다 측정할 수 있다. 심근 혈류(myocardial flow)의 증가는 아데노신-유도(adenosine-induced) 증가 및 유동-매개 혈관 확장(flow-mediated vasodilation)과 연관되기 때문에, 이는 부분적으로는 내피 기능의 척도이다. 이 기술은 비침습적이며 환자 당 여러 테스트가 가능한 잠재적 이점을 갖는다.

[0099] Hokanson *et al.*(*IEEE Trans Biomed Eng* 22:25-29, 1975)은 사지 혈류(limb blood flow)의 직접 측정을 위한 전기적으로 보정된 혈량측정법(plethysmography)을 설명하였다. 상기 장치는 내피 기능을 평가하기 위해 메타콜린(methacholine) 또는 아세틸콜린(acetylcholine)의 동맥 내의 직접 투입(direct intraarterial infusions) 때문에 상대적으로 저렴하며 다용도를 가진다. 팔뚝 혈관류(forearm blood flow(ml/분/100ml))가 측정되기 때문에, 정맥 폐색 혈량측정법(venous occlusion plethysmography)은 상기 팔뚝에서의 혈관기능의 저항(resistance vessel function)을 반영한다.

[0100] 줄기세포 또는 자손 세포, 및 상청액 또는 이로부터 유래한 하나 또는 그 이상의 가용인자

- [0101] 본원에 기재된 바와 같이, 상기 용어 "줄기세포(stem cell)"는 자기-갱신 세포(self-renewing cell)를 의미하는 것으로, 표현형 및 유전자형적으로 동일한 딸세포(daughter cell)뿐만 아니라 적어도 하나의 다른 최종 세포 유형(예를 들어, 말단 분화세포(terminally differentiated cell)를 제공할 수 있는 능력을 가진다. 상기 용어 "줄기세포"는 전능성(totipotential), 만능성(pluripotential) 및 다능성(multipotential)을 가지는 세포뿐만 아니라 이들로부터 유래한 선조세포(progenitor cell) 및/또는 전구세포(precursor cell)를 포함한다. 상기 줄기세포는 성체 줄기세포 또는 배아 줄기세포(embryonic stem cell)일 수 있거나, 유도된 만능 줄기세포(pluripotent cell, iPS)일 수 있다.
- [0102] 본원에 기재된 바와 같이, 상기 용어 "분화전능 세포(totipotent cell)" 또는 "분화전능성 세포(totipotential cell)"는 완전한 배아(예를 들어, 포배(blastocyst))를 형성할 수 있는 세포를 의미한다.
- [0103] 본원에 기재된 바와 같이, 상기 용어 "만능 세포(pluripotent cell)" 또는 "만능성 세포(pluripotential cell)"는 완전한 분화능(complete differentiation) 융통성(versatility)을 가지는, 즉, 포유동물 신체의 약 260 세포 유형으로 성장할 수 있는 능력을 보유하는, 세포를 의미한다. 만능 세포는 자기-갱신할 수 있으며, 조직 내에서 잠복(dormant) 또는 불활성(quiescent) 상태로 남아있을 수 있다.
- [0104] "다능성 세포(multipotential cell)" 또는 "다능 세포(multipotent cell)"란 임의의 여러 성숙한 세포 유형을 제공할 수 있는 능력을 가진다. 본원에 기재된 바와 같이, 이 문구는 간엽 전구세포(mesenchymal precursor cell, MPC) 및 이 세포의 다능성 자손과 같은 성체 줄기세포 또는 배아 줄기세포 및 선조세포를 포함한다. 만능 세포와 다르게 다능 세포는 모든 유형의 세포를 형성할 수 있는 역량을 가지지 않는다.
- [0105] 본원에 기재된 바와 같이, 상기 용어 "선조세포(progenitor cell)"는 특정 유형의 세포로 분화하거나 특정 유형의 조직을 형성하는 세포를 의미한다.
- [0106] 본원에 기재된 바와 같이, 상기 문구 "STRO-1⁺ 다능성 세포(STRO-1⁺ multipotential cell)"는 다능성 세포 콜로니를 형성할 수 있는 STRO-1⁺ 및/또는 TNAP⁺ 선조세포를 의미하도록 사용된다.
- [0107] STRO-1⁺ 다능성 세포는 골수, 혈액, 치수 세포(dental pulp cell), 지방 조직, 피부, 비장, 췌장, 뇌, 신장, 간, 심장, 망막, 뇌, 모낭, 창자(intestine), 폐, 림프절, 흉선, 뼈, 인대(ligament), 건(tendon), 골격근, 진피(dermis), 및 골막(periosteum)에서 발견되는 세포;이고 중배엽 및/또는 내배엽 및/또는 외배엽과 같은 생식 계열(발아 라인, germ lines)로 분화할 수 있다. 따라서, STRO-1⁺ 다능성 세포는, 이에 한정되는 것은 아니나, 지방(adipose), 골(osseous), 연골(cartilaginous), 탄성(elastic), 근육(muscular), 및 섬유성 결합 조직을 포함하는 많은 유형의 세포로 분화할 수 있다. 상기 세포가 진입하는 특정 계통-수입(specific lineage-commitment) 및 분화 경로는 기계적인 영향(mechanical influence) 및/또는 성장인자, 사이토카인과 같은 내인성 생체활성 인자, 및/또는 숙주 조직에 의해 확립된 미세환경 조건과 같은 다양한 영향에 따라 달라진다. 일 구현예에서, STRO-1⁺ 다능성 세포는 비-조혈 선조세포(non-hematopoietic progenitor)로, 분열하여 줄기세포 또는 전구세포인 딸세포를 수득하고 이윽고 비가역적 분화로 한 표현형을 가지는 세포를 수득할 수 있다.
- [0108] 일 실시예에서, 상기 STRO-1⁺ 세포는 대상(치료 대상, subject)으로부터 수득한 샘플, 예를 들어, 치료가 필요한 대상(치료 대상) 또는 관련된 대상 또는 관련 없는 대상(동일하거나 상이한 종)으로부터 증가(enriched)된다. 상기 용어 "증가(enriched)", "증가(enrichment)" 또는 이의 변형은 본원에 기재된 바와 같이, 무처리된 세포집단(population of cells)(예를 들어, 정상 환경에서의 세포)에 비해 한 가지 특정 세포 유형의 비율 또는 여러 특정 세포 유형들의 비율이 증가하는 것을 설명하는 것이다. 일 실시예에서, STRO-1⁺ 세포가 증가된(enriched) 집단은 적어도 약 0.1% 또는 0.5% 또는 1% 또는 2% 또는 5% 또는 10% 또는 15% 또는 20% 또는 25% 또는 30% 또는 50% 또는 75%의 STRO-1⁺ 세포를 포함한다. 이와 관련하여, 상기 용어 "STRO-1⁺ 세포에 대해 증가된(enriched) 세포집단"은 상기 용어 "% STRO-1⁺ 세포를 포함하는 세포집단"을 명백히 지지하는 것을 제공하며, 여기서 %란 본원에 인용된 백분율(percentage)이다. 상기 STRO-1⁺ 세포는, 일부 예에서, 클론원성 콜로니(clonogenic colonies), 예를 들어 CFU-F(섬유아세포)를 형성할 수 있거나 이의 서브세트(예를 들어, 50% 또는 60% 또는 70% 또는 70% 또는 90% 또는 95%)는 이러한 활성을 가질 수 있다.

- [0109] 일 실시예에서, 상기 세포집단은 선택 가능한 형태로 STRO-1⁺ 세포를 포함하는 세포 제제(cell preparation)로부터 증가(enriched)된다. 이와 관련하여, 상기 용어 "선택 가능한 형태(selectable form)"는 세포가 마커(예를 들어, 세포 표면 마커)를 발현하는 것으로 STRO-1⁺ 세포가 선택되는 것을 허용하는 의미로 이해될 것이다. 상기 마커는 STRO-1일 수 있으나, 그럴 필요는 없다. 예를 들면, 본원에 기재되고/되거나 예를 든 바와 같이, STRO-2 및/또는 STRO-3(TNAP) 및/또는 STRO-4 및/또는 VCAM-1 및/또는 CD146 및/또는 3G5를 발현하는 세포(예를 들어, MPCs)는 또한 STRO-1(및 STRO-1^{bright}일 수 있음)을 발현한다. 따라서, 세포가 STRO-1⁺을 표시한다고 해서 상기 세포가 STRO-1의 발현에 의해 선택되는 것을 의미하지는 않는다. 일 실시예에서, 상기 세포는 적어도 STRO-3 발현을 기반으로 선택되고, 예를 들어, 상기 세포는 STRO-3⁺(TNAP⁺)이다.
- [0110] 세포 또는 이의 세포집단의 선택에 관해서는 특정한 조직 소스로부터의 선택을 필요로 하지 않는다. 본원에 기재된 바와 같이, STRO-1⁺ 세포는 다양한 소스로부터 선택되거나 또는 분리될 수 있다. 그렇긴 하지만, 일부 예에서, 이러한 용어들은 STRO-1⁺ 세포(예컨대, MPCs)를 포함하는 임의의 조직 또는 혈관 조직(vascularized tissue) 또는 혈관주위세포(pericytes)(예컨대, STRO-1⁺ 혈관주위세포)를 포함하는 조직 또는 본원에 인용된 임의의 하나 또는 그 이상의 상기 조직에서의 선택을 지지하는 것을 제공한다.
- [0111] 일 실시예에서, 본원에 기재된 상기 세포는 TNAP⁺, VCAM-1⁺, THY-1⁺, STRO-2⁺, STRO-4⁺(HSP-90 β), CD45⁺, CD146⁺, 3G5⁺ 또는 이들의 임의의 조합으로 구성된 군에서 개별적으로 또는 집합적으로 선택되는 하나 또는 그 이상의 마커를 발현한다.
- [0112] "개별적으로(individually)"는 본원에서 인용된 마커들 또는 마커군을 별도로 포함하는 것을 의미하여, 개별적 마커들 또는 마커군이 본원에 첨부된 청구범위에 별도로 실려 있지 아님에도 불구하고 그러한 마커 또는 마커군을 별도 및, 서로 나눌 수 있게 정의할 수 있다.
- [0113] "집합적으로(collectively)"는 본원에서 인용된 마커들 또는 펩티드군을 임의의 개수 또는 조합으로 포함하는 것을 의미하며, 그러한 마커들의 개수 또는 마커들 또는 마커군의 조합이 본원에 첨부된 청구범위에 명확하게 실려 있지 아님에도 불구하고 그러한 조합 또는 하위조합(sub-combinations)을 마커들 또는 마커군의 임의의 다른 조합으로부터 서로 나눌 수 있게 정의할 수 있다.
- [0114] 예를 들면, 상기 STRO-1⁺ 세포는 STRO-1^{bright}(동의어, STRO-1^{bri})이다. 일 실시예에서, 상기 STRO-1^{bri} 세포는 STRO-1^{dim} 또는 STRO-1^{intermediate} 세포에 비해 우선적으로 증가된(enriched) 것이다.
- [0115] 예를 들면, 상기 STRO-1^{bright} 세포는 추가로 하나 또는 그 이상의 TNAP⁺, VCAM-1⁺, THY-1⁺, STRO-2⁺, STRO-4⁺(HSP-90 β) 및/또는 CD146⁺을 가진다. 예를 들어, 상기 세포는 전술한 하나 또는 그 이상의 마커로 선택되고/되거나 전술한 하나 또는 그 이상의 마커를 발현하는 것으로 나타났다. 이와 관련하여, 한 마커가 발현하는 것으로 나타난 세포는 특이적으로 테스트할 필요가 없고, 오히려 이전 증가된(enriched) 또는 분리된 세포는 테스트될 수 있으며, 후속적으로 사용되고, 분리되거나 증가된(enriched) 세포는 같은 마커를 또한 발현하는 것으로 합리적으로 추정할 수 있다.
- [0116] 일 실시예에서, 상기 간엽 전구세포(mesenchymal precursor cell)는 WO 2004/85630에 정의된 바와 같이 혈관주위 간엽 전구세포(perivascular mesenchymal precursor cell)이다. 예를 들면, 상기 간엽 전구세포는 혈관주위 세포의 마커를 발현하는, 예를 들어, STRO-1⁺ 또는 STRO-1^{bright} 및/또는 3G5⁺인 상기 세포이다. 일 실시예에서, 상기 세포들은 혈관성 조직(vascularized tissue) 또는 기관(organ) 또는 이의 일부분으로부터 분리된 세포 또는 이의 자손이다.
- [0117] 특정 마커에 대해서 "양성"이라고 하는 세포는 상기 세포의 표면에 상기 마커의 정도(degree)의 따라 그러한 마커의 낮은(lo 또는 dim) 또는 높은(bright, bri) 수준의 발현을 의미하며, 상기 용어는 상기 세포의 선별(sort) 과정에서 사용되는 현광의 강도 또는 다른 마커와 관련된다. lo(또는 dim 또는 dull) 및 bri의 구별은 선별되는 특정 세포집단에 사용되는 상기 마커의 맥락에서 이해될 것이다. 특정 마커에 대해서 "음성"이라고 하는 세포는 상기 마커가 완전히 존재하지 않는 것을 의미하지는 않는다. 상기 용어는 세포에 의해 상기 마커가 상대적으로 매우 낮은 수준으로 발현되는 것을 의미하고, 검출 가능하도록 표시할 경우 매우 낮은 신호를 생성하거나, 예를

들어 아이소타입(isotype) 대조군 항체를 사용하여 수준을 측정할 경우 배경 수준 이상으로 검출이 되지 않는다.

[0118] 본원에서 사용되는 상기 용어 "밝음(bright)"은 세포 표면 상의 마커를 검출 가능하도록 표지하는 경우 상대적으로 높은 신호를 생성하는 것을 의미한다. 이론에 한정되는 바는 아니나, "밝음" 세포란 상기 샘플에서 다른 세포들에 비해 표적 마커 단백질(예를 들어, STRO-1에 의해 인식되는 상기 항원)을 더 많이 발현하는 것임을 제시한다. STRO-1^{bri} 세포를 FITC-접합 STRO-1 항체로 표지할 경우, 비-밝음 세포(STRO-1^{dull/dim})보다 높은 형광 신호를 생성하는 것이 FACS(fluorescence activated cell sorting)분석으로 확인되었다. 일 실시예에서 "밝음" 세포는 개시하는 샘플(starting sample)에 포함된 가장 밝게 표지된 골수 단핵세포(mononuclear cell) 중 적어도 약 0.1%를 구성한다. 다른 실시예에서, "밝음" 세포는 개시하는 샘플에 포함된 가장 밝게 표지된 골수 단핵 세포(mononuclear cell) 중 적어도 약 0.1%, 적어도 약 0.5%, 적어도 약 1%, 적어도 약 1.5%, 또는 적어도 약 2%를 구성한다. 일 실시예에서, STRO-1^{bright} 세포는 "배경(background)", 즉 STRO-1⁻인 세포에 비해 STRO-1 표면 발현이 2log 규모의 높은 발현을 가진다. 이와 비교하여, STRO-1^{dim} 및/또는 STRO-1^{intermediate} 세포는 STRO-1 표면 발현이 2log 규모의 높은 발현보다 낮고, 일반적으로 약 1log 또는 "배경"보다 낮다.

[0119] 본원에 기재된 용어 "TNAP"는 조직 비-특이적 알칼라인 포스파타제(tissue non-specific alkaline phosphatase)의 모든 동형(isoform)을 포함한다. 예를 들며, 상기 용어는 상기 간 동형(Liver isoform, LAP), 상기 골 동형(bone isoform, BAP) 및 상기 신 장 동형(kidney isoform, KAP)를 포함한다. 일 실시예에서, 상기 TNAP는 BAP이다. 일 실시예에서, 본원에 기재된 TNAP는 부다페스트 조약의 규정하에 2005년 12월 19일자로 ATCC 에 기탁된 기탁 수납 번호(deposit accession number) PTA-7282 하에 하이브리도마 세포주에 의해 생성된 상기 STRO-3 항체에 결합할 수 있는 분자를 의미한다.

[0120] 또한, 일 실시예에서, 상기 STRO-1⁺ 세포는 클론원성 CFU-F(clonogenic CFU-F)를 생성시킬 수 있다.

[0121] 일 실시예에서, 상기 STRO-1⁺ 다능성 세포(multipotential cell)의 상당한 수가 적어도 2가지 생식 계열(germ line)로 분화할 수 있다. 상기 계열의 비-제한적인 예로서 다능성 세포는 골 전구세포; 담즙관 상피세포(bile duct epithelial cell) 및 간세포(hepatocyte)에 대해 다능을 가지는 간세포 선조세포(hepatocyte progenitor); 희돌기교세포(oligodendrocyte) 및 성상세포(astrocyte)로 진행되는 교질세포 전구세포(glial cell precursor)를 생성시킬 수 있는 신경 제한 세포(neural restricted cell); 뉴런으로 진행되는 뉴런 전구체(neuronal precursor); 심근(cardiac muscle) 및 심근세포(cardiomyocyte), 포도당-반응성 인슐린 분비 췌장 베타 세포주(glucose-responsive insulin secreting pancreatic beta cell lines)의 전구체를 포함한다. 다른 계통은, 이에 한정되는 것은 아니나, 상아 아세포(odontoblast), 상아질 생성 세포(dentin-producing cell) 및 연골 세포(chondrocyte), 및 망막 색소 상피 세포, 섬유아세포, 각화 세포(각질형성세포, keratinocytes)와 같은 피부세포, 수지상세포, 모낭 세포, 신장 관 상피 세포(renal duct epithelial cells), 평활근 및 골격근 세포, 정소 선조세포, 혈관 내피 세포, 건, 인대, 연골, 지방 세포, 섬유아세포, 골수 간질(marrow stroma), 심장 근육, 평활근, 골격근, 혈관주위세포(pericyte), 혈관세포(vascular cell), 상피세포, 교질세포(glial cell), 뉴런, 성상세포(astrocyte) 및 희돌기교세포(oligodendrocyte)의 전구세포를 포함한다.

[0122] 다른 실시예에서, 상기 STRO-1⁺ 세포는 배양시 조혈 세포를 생성할 수 없다.

[0123] 일 실시예에서, 치료 대상에게 자가(autologous) 또는 타가(allogeneic) 조성물로서 투여하기 위해 상기 세포는 상기 치료 대상으로부터 획득되었고, 생체 외(in vitro)에서 표준 기술을 사용하여 배양하여, 상청액 또는 가용 인자 또는 팽창된 세포는 획득되었다. 대안적인 예에서, 상기 확립된 인간 세포주의 하나 또는 그 이상의 세포가 사용되었다. 본원에 기재된 다른 유용한 예에서, 비-인간 동물(또는 상기 환자가 인간이 아닌 경우, 다른 종)의 세포가 사용되었다.

[0124] 본 발명에서는 또한 생체 외(in vitro) 배양을 통해서 STRO-1⁺ 세포 및/또는 이의 자손 세포(후자는 팽창된(expanded) 세포라고도 함)로부터 획득하거나 유래하는 상청액 또는 가용인자를 이용하는 것을 고려한다. 본 발명의 팽창된 세포는 상기 배양 조건에 따라서 매우 다양한 표현형을 가질 수 있고(배양 매체(배양 배지)에서의 자극 인자(stimulatory factors)의 개수 및/또는 유형 포함), 계대(passage)의 개수 및 그와 같은 것을 가질 수 있다. 일부 실시예들에서, 상기 자손 세포는 모체 집단(parental population)으로부터 약 2, 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 또는 약 10 계대 이후 획득될 수 있다. 그러나, 상기 자손 세포는 상기 모체 집단

으로부터 임의의 계대수 후 수득될 수 있다.

- [0125] 상기 자손 세포는 임의의 적합한 매체(배지)에서 배양함으로써 얻을 수 있다. 상기 용어 "매체(medium)"는 세포 배양과 관련하여 상기 세포를 둘러싸는 환경의 구성 요소를 포함한다. 매체는 고체, 액체, 기체 또는 상(phase)과 재료(materials)의 혼합물일 수 있다. 매체는 세포 성장을 유지하지 않는 액체 매체뿐만 아니라 액체 성장 매체를 포함한다. 매체는 또한 한천, 아가로스, 젤라틴 및 콜라겐 매트릭스와 같은 젤라틴 매체를 포함한다. 전형적인 가스 매체는 페트리 접시 또는 다른 고체 또는 반고체 지지체(support) 상에서 성장하는 세포에 노출되는 기체 상을 포함한다. 상기 용어 "매체"는 또한, 세포와 아직 접촉되지 않은 경우에도 세포 배양에 사용하기 위해 의도된 재료를 의미한다. 바꾸어 말하면, 매체는 세균의 배양을 위해 제조된 영양소 풍부한(증가한) 액체이다. 물 또는 다른 액체와 혼합할 때 세포 배양에 적합해지는 분말 혼합물을 "분말 매체(powdered medium)"라고 한다.
- [0126] 일 실시예에서, 본 발명의 방법에 유용한 자손 세포는 상기 STRO-3 항체가 표지된 자성 비드를 이용하여 TNAP⁺ STRO-1⁺ 세포를 골수로부터 분리시킴으로써 수득하고, 그 다음, 상기 분리된 세포를 배양하여 팽창한다(적합한 배양 조건의 예로 Gronthos *et al.* *Blood* 85: 929-940, 1995 참조).
- [0127] 일 실시예에서, 그러한 팽창된 세포들(자손)(예를 들면, 적어도 5 계대 이후)은 TNAP⁻, CC9⁺, HLA 클래스 I⁺, HLA 클래스 II⁻, CD14⁻, CD19⁻, CD3⁻, CD11a⁻c⁻, CD31⁻, CD86⁻, CD34⁻ 및/또는 CD80⁻일 수 있다. 그러나, 본원에 기재된 내용과 다른 배양 조건 하에서는 다른 마커들의 발현은 달라질 가능성이 있다. 또한, 이러한 표현형의 세포가 팽창된 세포집단에서 우세할 수 있으나, 상기 표현형(들)을 갖고 있지 않은 세포의 작은 비율이 있다는 것을 의미하는 것은 아니다(예를 들면, 상기 팽창된 세포들의 작은 비율은 CC9⁻일 수 있음). 일 실시예에서, 팽창된 세포들은 여전히 다른 세포 유형으로 분화할 수 있는 능력을 가지고 있다.
- [0128] 일 실시예에서, 상청액 또는 가용인자를 수득하기 위한 팽창된 세포집단, 또는 세포 자체(cells *per se*)는 상기 세포들의 적어도 25%, 예를 들면 적어도 50%가 CC9⁺인 상기 세포들을 포함한다.
- [0129] 다른 실시예에서, 상청액 또는 가용인자를 수득하기 위한 팽창된 세포집단, 또는 세포 자체(cells *per se*)는 상기 세포들의 적어도 40%, 예를 들면 적어도 45%가 STRO-1⁺인 상기 세포들을 포함한다.
- [0130] 또 다른 실시예에서, 상기 팽창된 세포집단은 LFA-3, THY-1, VCAM-1, ICAM-1, PECAM-1, P-셀렉틴(P-selectin), L-셀렉틴(L-selectin), 3G5, CD49a/CD49b/CD29, CD49c/CD29, CD49d/CD29, CD90, CD29, CD18, CD61, 인테그린 베타 6-19(integrin beta 6-19), 트롬보모듈린(thrombomodulin), CD10, CD13, SCF, PDGF-R, EGF-R, IGF1-R, NGF-R, FGF-R, 렙틴-R(Leptin-R)(STRO-2=Leptin-R), RANKL, STRO-4(HSP-90 β), STRO-1^{bright} 및 CD146 또는 이들 마커들의 임의의 조합으로 구성된 군에서 집합적으로 또는 개별적으로 선택되는 하나 또는 그 이상의 마커를 발현할 수 있다.
- [0131] 일 실시예에서, 상기 자손 세포는 WO 2006/032092에 정의 및/또는 기재된 바와 같이, 다능성 팽창된 STRO-1⁺ 다능성 세포 자손(Multipotential Expanded STRO-1⁺ Multipotential cells Progeny, MEMPs)이다. 자손이 유래될 수 있는 STRO-1⁺ 다능성 세포의 증가된(enriched) 세포집단을 제조하는 방법은 WO 01/04268 및 WO 2004/085630에 기재되어 있다. 생체 외(*in vitro*) 맥락에서 STRO-1⁺ 다능성 세포는 절대적으로 순수한 제제(preparation)로 드물게 존재할 것이고, 일반적으로 조직 특이 수임된 세포들(tissue specific committed cells, TSCCs)인 다른 세포들과 같이 존재한다. WO 01/04268은 그러한 세포들을 약 0.1%-90%의 순도(purity level)로 골수로부터 수확(harvest)하는 과정에 관한 것이다. 자손이 유래되는 MPCs를 포함하는 상기 세포집단은 조직 소스로부터 직접적으로 수확(harvest)될 수 있거나 대체적으로 생체 외(*ex vivo*)에서 이미 팽창된 세포집단일 수 있다.
- [0132] 예를 들어, 상기 자손은 실질적으로 순수화된 STRO-1⁺ 다능성 세포들의 수확(harvest)된, 비-팽창된 집단으로부터 수득될 수 있으며, 그들이 존재하는 상기 집단의 총 세포들의 적어도 약 0.1, 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 또는 95%를 포함한다. 상기 수준은, 예를 들면, TNAP, STRO-4(HSP-90 β), STRO-1^{bright}, 3G5⁺, VCAM-1, THY-1, CD146 및 STRO-2로 구성된 군에서 개별적으로 또는 집합적으로 선택되는 적어도 한 마커에 대해 양성인 세포들을 선택함으로써 달성할 수 있다.

- [0133] MEMPS는 상기 마커 STRO-1^{bri}에 대해 양성이고 알칼라인 포스파타제(Alkaline phosphatase, ALP)에 대해 음성인 것으로 갓 수확(harvest)된 STRO-1⁺ 다능성 세포로부터 구별될 수 있다. 반면에, 갓 분리된 STRO-1⁺ 다능성 세포는 STRO-1^{bri} 및 ALP 둘 다에서 양성이다. 본 발명의 일 실시예에서, 투여된 세포들의 적어도 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 95%는 STRO-1^{bri} 및 ALP⁻의 표현형을 가진다. 또 다른 실시예에서, 상기 MEMPS는 Ki67, CD44 및/또는 CD49c/CD29, VLA-3, α3β1의 하나 또는 그 이상의 마커들에 대해 양성이다. 또 다른 실시예에서, 상기 MEMPS는 TERT 활성을 나타내지 않고/않거나 상기 마커 CD18에 대해 음성이다.
- [0134] 상기 STRO-1⁺ 세포는 WO 01/04268 또는 WO 2004/085630에 규정된 임의의 하나 또는 그 이상의 조직 유형으로부터 유래할 수 있고, 즉 골수, 치수 세포(dental pulp cells), 지방조직과 피부, 또는 아마도 더 넓게 지방조직, 치아, 치아 펄프, 피부, 간, 신장, 심장, 망막, 뇌, 모낭, 창자(intestine), 폐, 비장, 림프절, 흉선, 췌장, 뼈, 인대, 골수, 건 및 골격근이다.
- [0135] 본 발명에 기재된 방법을 실시하는 것은, 주어진 임의의 세포 표면 마커를 가지는 세포를 분리하는 것은 다수의 다른 방법에 의해 영향을 받을 수 있으나, 일부 전형적인 방법들은 상기 해당되는 마커에 대한 결합제(binding agent)(예를 들어, 항체 또는 이의 항원 결합 단편)의 결합에 의존한 다음, 강한 수준의 결합, 또는 낮은 수준의 결합 또는 무결합에 따른 결합 여부로 분리된다. 가장 편리한 결합제는 항체 또는 항체-기반 분자이며, 예를 들면 단일클론 항체 또는 단일클론 항체에 기반(예를 들어, 이의 항원 결합 단편을 포함하는 단백질)이며, 이는 후자의 제제(agent)의 특이성 때문이다. 항체는 두 단계 모두에 사용될 수 있지만, 다른 제제 또한 사용될 수 있고, 따라서 이러한 마커들에 대한 리간드들은 상기 마커들을 가지거나 가지고 있지 않는 세포를 증가(enrich)시키는 데 이용될 수 있다.
- [0136] 조분리(crude separation)를 허용하도록 상기 항체 또는 리간드는 고체 지지체에 부착될 수 있다. 일부 실시예에서 상기 분리 기술은 수집할 분획(fraction)의 활성(viability)의 유지를 극대화한다. 상대적으로 조분리를 수득하기 위해 효험(efficacy)이 다른 다양한 기술이 사용될 수 있다. 상기 사용되는 특정한 기술은 분리의 효율성, 관련 세포독성, 성능의 편의성과 속도, 정교한 장치 및/또는 기술적 숙련도의 필요성에 따라 달라질 수 있다. 분리를 위한 방법은, 이에 한정되는 것은 아니나, 항체로 코팅된 자성 비드를 사용하는 자성 분리, 친화성 크로마토그래피(affinity chromatography) 및 고체 지지체에 부착된 항체와 함께하는 "패닝(panning)"을 포함할 수 있다. 정확한 분리를 제공하는 기술은 FACS를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. FACS를 수행하는 방법은 당업자에게 자명할 것이다.
- [0137] 본원에 기술된 상기 마커 각각에 대한 항체는 시판되며(예를 들어, STRO-1에 대한 단일클론 항체는 R&D 시스템, 미국 시판), ATCC 또는 기타 기관에서 입수 및/또는 당업자에게 자명한 기술로 제조될 수 있다.
- [0138] 일 실시예에서, STRO-1⁺ 세포를 분리하는 상기 방법은 고체상 선별(solid phase sorting) 단계인, 예를 들어 STRO-1의 높은 발현 수준을 인식하는 자성 활성화된 세포 선별(magnetic activated cell sorting, MACS)을 사용하는 단계를 첫 번째 단계로 포함한다. 원하는 경우, 두 번째 선별 단계가 그 다음으로 이어질 수 있으며, WO 01/14268 특허명세서 기재된 바와 같이, 전구체 세포의 발현이 높은 수준으로 나타나는 결과를 얻을 수 있다. 상기 두 번째 선별 단계는 두 개 또는 그 이상의 마커를 사용하는 것을 포함할 수 있다.
- [0139] STRO-1⁺ 세포를 수득하는 상기 방법은 공지된 기술을 사용하여 첫 번째 증가시키는(enrichment) 단계 이전에 세포의 소스를 수확(harvest)하는 단계를 또한 포함할 수 있다. 따라서, 상기 조직(tissue)은 수술로 제거될 것이다. 그 다음, 상기 소스 조직에 포함되는 세포는 이른바 단일 세포 현탁액으로 분리될 것이다. 상기 분리는 물리적 및/또는 효소적 수단에 의해 달성될 수 있다.
- [0140] 적합한 STRO-1⁺ 세포집단이 일단 수득되면, MEMPS를 수득하기 위한 임의의 적합한 수단으로 상기 세포집단의 배양 또는 팽창될 수 있다.
- [0141] 일 실시예에서, 상기 세포는 치료 대상으로부터 수득되고, 생체 외(in vitro)에서 표준 기술을 이용하여 배양되고, 자가(autologous) 또는 타가(allogeneic) 조성물로써 상기 치료 대상에 투여하기 위한 상청액 또는 가용인자 또는 팽창된 세포들을 수득하기 위해 사용된다. 대안적인 실시예에서, 상기 확립된 인간 세포주의 하나 또는 그 이상의 세포들이 사용되어 상기 상청액 또는 가용인자를 수득하는데 사용된다. 본 발명의 다른 유용한 실시예에서, 상기 비-인간 동물(또는, 상기 환자가 인간이 아니고, 다른 종 유래)의 세포들을 사용하여 상청액 또는

가용인자가 수득된다.

[0142] 본 발명의 방법 및 용도는 임의의 비-인간 동물 종으로부터 유래된 세포들을 사용하여 실행될 수 있고, 비-인간 유인원 세포에 한정되는 것은 아니나, 유제류(ungulate), 개과(canine), 고양이과(feline), 토끼목(lagomorphs), 설치류, 조류 및 어류의 세포를 포함한다. 본 발명에서 수행 가능한 유인원 세포는, 이에 한정되는 것은 아니나, 침팬지, 개코원숭이, 게막이원숭이(게잡이원숭이, cynomolgus monkeys), 및 임의의 기타 신세계 또는 구세계 원숭이의 세포를 포함한다. 본 발명에서 수행 가능한 유제류(ungulate) 세포는, 이에 한정되는 것은 아니나, 소, 돼지, 양, 염소, 말, 버팔로 및 들소(bison)의 세포를 포함한다. 본 발명에서 실시(perform) 가능한 설치류 세포는, 이에 한정되는 것은 아니나, 생쥐(mouse), 쥐(rat), 기니피그(guinea pig), 햄스터, 게르빌루스쥐(gerbil)의 세포를 포함한다. 본원에서 실시 가능한 토끼목 종은, 이에 한정되는 것은 아니나, 토끼, 잭 토끼(jack rabbit), 산토끼(hare), 솜꼬리토끼(cottontails), 눈신토끼(snowshoe rabbit) 및 새앙토끼(pikas)의 세포를 포함한다. 본 발명에서 실시 가능한 닭(*Gallus gallus*)은 조류 종의 한 예이다.

[0143] 일 실시예에서, 상기 세포는 인간 세포이다.

[0144] 본 발명의 상기 방법에 유용한 세포들은 사용하기 전에, 또는 상기 상청액 또는 가용인자를 수득하기 전에 저장될 수 있다. 진핵세포, 및 특히 포유동물 세포를 보존하고 저장하기 위한 방법 및 프로토콜은 당업자에게 자명하다(cf., 예를 들면, Pollard, J. W. and Walker, J. M. (1997) Basic Cell Culture Protocols, Second Edition, Humana Press, Totowa, N.J.; Freshney, R. I. (2000) Culture of Animal Cells, Fourth Edition, Wiley-Liss, Hoboken, N.J. 참조). 간엽 줄기/선조 세포(mesenchymal stem/progenitor cells), 또는 이의 자손과 같은 상기 분리된 줄기세포의 상기 생물학적 활성을 유지하는 임의의 방법은 본 발명과 연결하여 사용될 수 있다. 일 실시예에서, 상기 세포는 냉동보존(cryopreservation)을 사용함으로써 유지되고 저장된다.

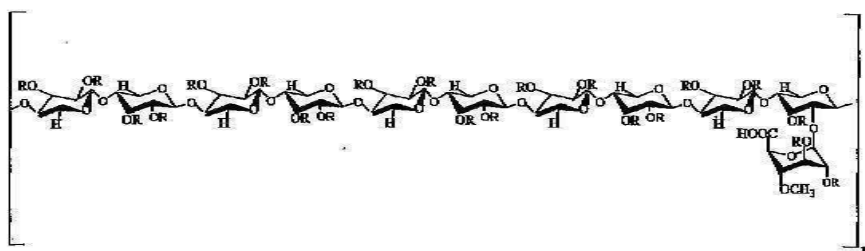
[0145] 폴리설페이트 다당류(polysulfated polysaccharides)

[0146] 폴리설페이트 다당류는, 헤파린 및 펜토산 폴리설페이트로 예시된 바와 같이, 하나 또는 그 이상의 설페이트(sulfate) 에스테르 기능기가 공유결합으로 부착된 둘 또는 그 이상의 당 환(ring) 또는 탄수화물 구조를 포함하는 임의의 천연 또는 준합성/합성(semi-synthetic/synthetic) 폴리설페이트 다당류 또는 이의 생물학적 활성을 가지는 단편이다.

[0147] 일 실시예에서, 상기 STRO-1⁺ 세포 및/또는 이들의 자손 및/또는 이들로부터 유래한 가용인자는 폴리설페이트 다당류와 조합하여 투여된다.

[0148] 다른 실시예에서, 상기 폴리설페이트 다당류는 PPS 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염이다.

[0149] 일 실시예에서, 상기 PPS는 펜토산 폴리설페이트의 선형 자일란(xylan)(펜토산(pentosan)) 백본에 자일로오스(xylose(펜토스(pentose)))환 10개마다 2-위치(position)에 평균적으로 하나의 4-O-메틸-글루쿠로네이트(4-O-methyl-glucuronate) 측쇄가 연결된 비치우드 헤미셀룰로오스(beechwood hemicellulose(*Fagus silvatica*))로부터 분리된다. 예를 들면, 상기 펜토산 폴리설페이트 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 다음과 같은 구조를 가진다:



[0150]

[0151] 일 실시예에서 상기 특정 착화 이온(complexing ions)(PPS의 염을 생성하기 위하여)은 상기 알칼리 금속, 예를

들어 Na^+ , 및 K^+ , 알칼라인 토금속, 예를 들면, Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} , 뿐만 아니라 Ag^+ , Au^+ , Pb^{2+} , Cu^{2+} , Au^{2+} , Pd^{2+} , Pd^{4+} , Pt^{4+} , Pt^{2+} , 3가 금속 이온(trivalent metal ions), 및 제4급 암모늄 화합물 복합체(quaternary ammonium compound complexes)로 구성된 군에서 선택될 수 있다. 상기 후자 화합물들의 예로는 피리디늄 클로라이드, 테트라알킬 암모늄 클로라이드, 콜린 클로라이드, 세틸피리디늄 클로라이드, N-세틸-N, N, N- 트리알킬암모늄 클로라이드 또는 이들의 유도체이다.

[0152] 예를 들면, 상기 착화 이온이 나트륨인 경우, 즉 상기 PPS는 NaPPS이다. 예를 들면 상기 NaPPS는 SP54이고, 베네 제약회사(Bene Pharmachem, 독일)에서 제조되었다.

[0153] 일 실시예에서, 상기 PPS는 선조세포(progenitor cell)의 생존능력을 향상시키고, 선조세포의 냉동보존을 향상시키고, 선조세포의 증식을 조절 및/또는 선조세포의 분화를 조절한다.

[0154] 유전적으로 변형된 세포(Genetically-Modified Cells)

[0155] 일 실시예에서, 상기 줄기 세포 및/또는 이의 자손 세포는, 예를 들어 목적 단백질의 발현 및/또는 분비를 위해서, 유전적으로 변형된다. 예를 들면, 상기 세포는 내피 기능장애의 치료에 유용한 단백질을 발현하도록 조작된다(예를 들어, 안지오펙티오텐 I(Angiopoietin I) 또는 산화질소 합성효소(nitric oxide synthase)(예컨대, eNOS 또는 iNOS).

[0156] 세포를 유전적으로 변형하는 방법은 당업자에게 자명하다. 예를 들면, 세포에서 발현될 핵산은 상기 세포에서의 발현을 유도하는 프로모터(promoter)에 작동 가능하게 연결된 것(operably-linked)이다. 예를 들면, 상기 핵산은 치료 대상의 다양한 세포에서 작동 가능한 프로모터, 예를 들면, 바이러스 프로모터(viral promoter), 예를 들어 CMV 프로모터(예컨대, CMV-IE 프로모터) 또는 SV-40 프로모터에 연결된다. 추가 적합한 프로모터는 당업계에 공지되어 있으며, 필요한 변경을 가하여(*mutatis mutandis*) 본 발명에 실시예에 적용되도록 사용된다.

[0157] 일 실시예에서, 상기 핵산은 발현 구성체(expression construct)의 형태로 제공된다. 본 발명에서 사용된 상기 용어 "발현 구성체(expression construct)"는 그것과 작동 가능하도록 연결된 핵산(예를 들어, 리포터 유전자 및/또는 카운터-선택성(counter-selectable) 리포터 유전자)의 세포에서의 발현을 부여하는 능력을 가지는 핵산을 의미한다. 본 발명의 문맥 내에서, 발현 구성체는 플라스미드, 박테리오파지, 파지미드, 코스미드, 바이러스 서브-게놈 또는 게놈 단편, 또는 발현 가능한 형태로 이중 기원(heterologous) DNA를 유지 및/또는 복제할 수 있는 다른 핵산을 포함하거나 그 자체일 수 있다.

[0158] 본 발명의 수행을 위해, 적합한 발현 구성체를 제조하는 방법은 당업자에게 자명한 것이고, 예를 들면 Ausubel *et al* (In: Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience, ISBN 047 150338, 1987) 또는 Sambrook *et al* (In: Molecular Cloning: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories, New York, Third Edition 2001)에 기재되어 있다. 예를 들면, 상기 발현 구성체의 각각의 상기 구성 성분은 적합한 주형(template) 핵산으로부터, 예를 들면, PCR로, 증폭되고, 이어서 플라스미드 또는 파지미드와 같은 적합한 발현 구성체 내로 클로닝된다.

[0159] 상기과 같은 발현 구성체에 적합한 벡터는 당업계에 공지 및/또는 본원에 기재된 바와 같다. 예를 들면, 포유동물 세포에서 본 발명의 방법에 적합한 발현 벡터(expression vector)는, 예를 들면, 인비트로젠(Invitrogen)의 pcDNA 벡터, 프로메가(Promega)의 pCI 벡터 스위트, 클론테크(Clontech)의 pCMV 벡터 스위트, 클론테크의 pM 벡터, 프로메가의 pSI 벡터, 클론테크의 VP16 벡터 또는 인비트로젠의 pcDNA 벡터 스위트가 있다.

[0160] 당업자는 추가 벡터 및 예를 들면 라이프 테크놀로지스 사(Life Technologies Corporation), 클론테크 또는 프로메가와 같은 그러한 벡터의 소스에 대해 인식하고 있다.

[0161] 상기 분리된 핵산 분자 및 이를 포함하는 유전자 구성체(gene construct)를 발현을 위해 세포에 도입하는 수단은 당업자에게 공지되어 있다. 정해진 유기체(organism)에 사용되는 상기 기술은 공지된 성공한 기술에 의존한다. 재조합 DNA를 세포에 도입하는 수단은, 미세주입(microinjection), DEAE-텍스트란 매개 형질감염(transfection), 리포펙타민(Gibco, MD, 미국) 및/또는 선택틴(Gibco, WI, 미국)을 이용하는 리포솜(liposome)을 매개로 하는 형질감염, PEG-매개 DNA 흡수, 전기 천공법(electroporation) 및 DNA-코팅된 텅스텐 또는 금 입자(Agracetus, WI, 미국)를 이용한 극미립자 포격(microparticle bombardment)(Agracetus Inc., WI, 미국) 등을 포함한다.

- [0162] 대안으로, 본 발명의 발현 구성체는 바이러스 벡터이다. 적합한 바이러스 벡터는 당업계에 공지된 것이고 시판된다. 핵산의 전달 및 상기 핵산의 숙주세포 계놈에서의 삽입을 위한 종래 바이러스-기반 시스템은, 예를 들면, 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 또는 아데노-연관 바이러스(adeno-associated virus) 벡터를 포함한다. 대안으로, 아데노바이러스 벡터는 숙주세포에서 에피조말(episomal)하게 남는 핵산을 도입하는데 유용하다. 바이러스 벡터는 표적 세포 및 조직에 유전자를 전달하는 효율적이고 다용도적인 방법이다. 추가로, 수많은 다른 세포 유형과 표적 조직에서 높은 형질도입(transduction) 효율이 관찰되었다.
- [0163] 예를 들어, 레트로바이러스 벡터는 외래 서열(foreign sequence) 6-10kb까지의 패키징 역량(packaging capacity)을 가지는 시스-작용(cis-acting) 롱 터미널 리피트(long terminal repeats, LTRs)를 일반적으로 포함한다. 벡터의 복제 및 패키징을 위해서는 상기 최소한의 시스-작용 롱 터미널 리피트로도 충분하고, 이를 이용하여 상기 발현 구성체를 상기 표적 세포에 도입함으로써 장기 발현을 제공한다. 널리 사용되는 레트로바이러스 벡터는, 뮤린 백혈병 바이러스(murine leukemia virus, MuLV), 긴팔 원숭이 백혈병 바이러스(gibbon ape leukemia virus, GaLV), 유인원 면역 결핍 바이러스(simian immunodeficiency virus, SRV), 인간 면역 결핍 바이러스(human immunodeficiency virus, HIV), 및 이들의 조합을 포함한다(예를 들어, Buchscher *et al.*, *J Virol.* 56:2731-2739 (1992); Johann *et al.*, *J. Virol.* 65:1635-1640 (1992); Sommerfelt *et al.*, *Virol.* 76:58-59 (1990); Wilson *et al.*, *J. Virol.* 63:274-2318 (1989); Miller *et al.*, *J. Virol.* 65:2220-2224 (1991); PCT/US94/05700; Miller and Rosman *BioTechniques* 7:980-990, 1989; Miller, A. D. *Human Gene Therapy* 7:5-14, 1990; Scarpa *et al. Virology* 75:849-852, 1991; Burns *et al. Proc. Natl. Acad. Sci USA* 90:8033-8037, 1993 참조).
- [0164] 다양한 아데노-관련 바이러스(adeno-associated virus, AAV) 벡터 시스템이 또한 핵산 전달을 위해 개발되어왔다. AAV 벡터는 당업계에 공지된 기술을 사용하여 구성될 수 있다. 예를 들어, 미국특허 Nos. 5,173,414 및 5,139,941; 국제 공개 Nos. WO 92/01070 및 WO 93/03769; Lebkowski *et al. Molec. Cell. Biol.* 5:3988-3996, 1988; Vincent *et al.* (1990) *Vaccines* 90 (Cold Spring Harbor Laboratory Press); Carter *Current Opinion in Biotechnology* 5:533-539, 1992; Muzyczka, *Current Topics in Microbiol. and Immunol.* 158:97-129, 1992; Kotin, *Human Gene Therapy* 5:793-801, 1994; Shelling and Smith *Gene Therapy* 7:165-169, 1994; 및 Zhou *et al. J Exp. Med.* 179:1867-1875, 1994 참조.
- [0165] 본 발명의 발현 구성체를 전달하기 위한 유용한 추가 바이러스 벡터는, 예를 들면, 우두바이러스(vaccinia virus) 및 조류 폭스바이러스(avian poxvirus)와 같은 폭스바이러스과 또는 알파바이러스(alphavirus)로부터 유래된 것이나 복합된 바이러스 벡터(conjugate virus vector)를 포함한다(예를 들어, Fisher-Hoch *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 56:317-321, 1989에 기재된 바와 같음).
- [0166] 세포 및 가용인자의 치료/예방 가능성 분석
- [0167] 내피 기능/기능장애를 연구하기 위한 다양한 모델은 당업계에 공지되어있다. 전형적인 생체 외(*in vitro*) 모델은 다음을 포함한다:
- [0168] ● 증식의 억제, 부착 분자(adhesion molecule)의 발현 증가, 및 세포사멸(apoptosis)의 증가를 초래하는 높은 포도당 매체(medium)에서의 내피 세포의 배양.
- [0169] ● 장간막동맥(mesenteric artery)의 기관(organ) 배양(예를 들어, Alm *et al.*, *BMC Cardiovascular Disorders*, 2:8, 2002에 기재된 바와 같음).
- [0170] 내피 기능/기능장애의 생체 내(*in vivo*) 모델은 다음을 포함한다:
- [0171] ● 과호모시스틴뇨증(hyperhomocystinemia)의 생쥐 모델로, Eberhardt *et al.*, *J Clin Invest* 106: 483-491, 2000에 기재됨;
- [0172] ● 2-신장 1-클립(2-kidney 1-clip) 모델 및 1-신장 1-클립(1-kidney 1-clip) 모델과 같은 고들블랫(goldblatt) 기법으로 제조된 고혈압 쥐 모델은 동맥 혈압, 총 말초 저항(total peripheral resistance, TPR)을 증가시키고 아세틸콜린(acetylcholine, Ach)에 대해 내피 의존성 이완(endothelium dependent relaxation)을 감소시키는 것으로 입증됨(Share *et al.*, *Clin. Exp. Hypertens.*, 4: 1261-1270, 1982; Sventek *et al.*,

Hypertensive, 27: 49-55, 1996).

- [0173] ● 설치류 동물에서의 단일신적출(Uninephrectomy)에 이어서 올리브 오일에서 DOCA 염(40mg kg⁻¹, s.c.)을 1% NaCl 및 0.5% KCl과 함께 2주에 한번씩 6주간 투여하면 혈관 내피 기능장애를 유발함(Shah and Singh, *Naun. Schmie. Arch. Pharmacol.*, 373: 221-229, 2006).
- [0174] ● 설치류 동물에 L-NAME(eNOS 억제제)(50mg kg⁻¹ 일(day)-1)를 6주간 투여하면 쥐에서 혈압을 증가시키고 내피 의존 이완(endothelium dependent relaxation)을 감소시키는 것으로 나타남(Kung *et al.*, *Hypertensive*, 26: 744-751, 1995).
- [0175] ● 설치류 동물에 안지오텐신 II(angiotensin-II)(0.7mg kg⁻¹ 일(day)-1)을 5일간 투입하면 수축 혈압(systolic blood pressure)을 증가시키고 과산화물 음이온(superoxide anion)을 생성시키고 Ach-유도 이완(Ach-induced relaxation)의 손상을 유발시키는 것으로 나타남(Rajagopalan *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 97: 1916-1923, 1996).
- [0176] ● 설치류 동물에 에티닐 에스트라디올(ethinyl estradiol)(1.5mg kg⁻¹ 일(day)-1)의 만성적 투여는 혈압을 증가시키고 결과적으로 내피 의존 이완(endothelium dependent relaxation)을 감소시키는 것으로 나타남(Thakre *et al.*, *Ind. J. Pharmacol.*, 32: 15-20, 2000).
- [0177] ● 10주 동안 적정 고지방식을 먹은 설치류 동물은 고혈압, 활성 산소 종(reactive oxygen species, ROS)의 증가 및 지질과산화(lipid peroxidation)를 특징으로 하는 혈관 내피 기능장애를 유발함(Dobrian *et al.*, *Hypertensive*, 37: 554-560, 2001).
- [0178] ● 쥐에서 스트렙토조토신(streptozotocin)(55mg kg⁻¹, i.p. 일회)의 투여로 당뇨를 유발시키고 결과적으로 혈관 내피 기능장애를 유도함(Shah and Singh, *Mol. Cell. Biochem.*, 283: 191-199, 2006).
- [0179] 내피 기능장애의 추가 모델은, 예를 들며, Balakumar *et al.*, *Trends in Medical Research*, 2: 12-20, 2007에 기재되어 있다.
- [0180] 세포 조성물(Cellular Compositions)
- [0181] 본 발명의 일 실시예에서 STRO-1⁺ 세포 및/또는 이의 자손 세포는 조성물의 형태로 투여된다. 예를 들면, 그러한 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체(carrier) 및/또는 부형제(excipient)를 포함한다.
- [0182] 상기 용어 "담체(carrier)"와 "부형제(excipient)"는 당업계의 통상적으로 사용되는 저장, 투여 및/또는 반응성 화합물(reactive compound)의 생물학적 활성을 용이하게 하기 위해 사용된다(예를 들어, Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Ed., Mac Publishing Company (1980) 참조). 담체는 상기 반응성 화합물의 바람직하지 않은 부작용을 또한 감소시킬 수 있다. 적합한 담체는, 예를 들면, 안정해서, 예를 들어, 상기 담체에 있는 다른 성분과 반응할 수 없는 것이다. 일 실시예에서, 상기 담체는 치료에 사용되는 상기 투여량 및 농도로 투여받는자(recipient)에게 상당한 국소적(local) 또는 전신적(systemic) 역효과(adverse effect)를 발생시키지 않는다.
- [0183] 본 발명의 적합한 담체는 종래 사용되는, 예를 들어, 물, 염수, 수성 텍스트로스, 락토스, 링거액, 완충용액, 히알루론산 및 글리콜은 특히 용액(등장(isotonic)일 경우)에 대해 전형적인 액체성 담체이다. 적합한 약학적 담체 및 부형제로는 전분, 셀룰로스, 글루코스, 락토스, 수크로스, 젤라틴, 맥아, 쌀, 밀가루, 초크, 실리카 겔, 마그네슘 스테아레이트, 나트륨 스테아레이트, 글리세롤 모노스테아레이트, 염화나트륨, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 물, 에탄올, 및 이와 같은 것을 포함할 수 있다.
- [0184] 다른 실시예에서, 담체는, 예를 들어, 세포를 성장시키거나 현탁시키는, 매체 조성물(media composition)이다. 예를 들면, 그러한 매체 조성물은 투여되는 치료 대상에서 아무런 역효과를 유도하지 않는다.
- [0185] 전형적인 담체 및 부형제는 세포의 생존력(viability) 및/또는 염증성 관절 질환(inflammatory joint diseases)을 감소, 방지 또는 지연시키는 역량에 역효과를 미치지 않는다.
- [0186] 일 실시예에서, 상기 담체 또는 부형제는 상기 세포 및/또는 가용인자가 생물학적 활성을 발휘하는 적합한 pH로 유지시키는 완충 활성(buffering activity)을 제공한다. 예를 들어, 상기 담체 또는 부형제는 PBS(phosphate

buffered saline)이다. PBS는 세포 및 인자(factor)와 최소한으로 상호작용하고, 상기 세포 및 인자의 신속한 방출을 가능하게 하기 때문에 매력적인 담체 또는 부형제이고, 그러한 경우, 본 발명의 상기 조성물은 혈액 또는 조직 내로 또는 조직의 주변 또는 인접한 부위에 직접 적용하기 위해 액체로 제조될 수 있다(예를 들어, 주입(injection)으로).

[0187] STRO-1⁺ 세포 및/또는 이의 자손 세포는 또한 투여받는자(recipient)에게 혼환성(recipient-compatible)이 있고, 상기 투여받는자에게 유해하지 않은 생성물로 분해되는 스캐폴드(scaffolds)에 통합(incorporate) 또는 삽입(embedded)시킬 수 있다. 이러한 스캐폴드는 상기 투여받는 치료 대상(recipient subject)에게 이식(transplant)될 세포의 지지체 및 보호기능을 제공한다. 천연 및/또는 합성 생분해성 스캐폴드는 그러한 스캐폴드의 예들이다.

[0188] 본 발명을 실행하는 데 있어서, 다양한 다른 스캐폴드가 사용될 수 있다. 전형적인 스캐폴드는, 이에 한정되는 것은 아니나, 분해성 스캐폴드를 포함한다. 천연 생분해성 스캐폴드는 콜라겐, 피브로넥틴 및 라미닌 스캐폴드를 포함한다. 세포 이식 스캐폴드(cell transplantation scaffold)에 적합한 합성 재료는 광범위한 세포 증식 및 세포 기능을 지지할 수 있어야 한다. 그러한 스캐폴드는 재흡수성(resorbable)일 수 있다. 적합한 스캐폴드는 폴리글리콜산 스캐폴드, 예를 들어, Vacanti, et al. J. Ped. Surg. 23:3-9 1988; Cima, et al. Biotechnol. Bioeng. 38:145 1991; Vacanti, et al. Plast. Reconstr. Surg. 88:753-9 1991에 기재됨; 폴리아나하이드라이드(polyanhydrides), 폴리오르토에스테르(polyorthoesters), 및 폴리락트산(polylactic acid)과 같은 합성 폴리머를 포함할 수 있다.

[0189] 다른 실시예에서, 상기 세포는 젤 스캐폴드(예를 들어, 젤폼(gelfoam), Upjohn사, 독일)로 투여될 수 있다.

[0190] 본원에 기재된 방법에 유용한 세포 조성물은 단독으로 또는 다른 세포들과 혼합제(admixtures)로 투여될 수 있다. 본 발명의 상기 조성물과 함께 투여될 수 있는 세포는, 이에 한정되는 것은 아니나, 다른 다능(multipotent) 또는 만능(pluripotent) 세포 또는 줄기세포, 또는 골수 세포를 포함한다. 다른 유형의 상기 세포들은 본 발명의 조성물과 곧 바로 또는 투여 직전에 혼합할 수 있거나, 투여 이전에 일정 기간 동안 같이 공동배양(co-culture) 할 수 있다.

[0191] 일 실시예에서, 상기 조성물은 세포의 유효량 또는 치료적 또는 예방적 유효량을 포함한다. 예를 들면, 상기 조성물은 약 1×10^5 STRO-1⁺ 세포/kg~약 1×10^7 STRO-1⁺ 세포/kg 또는 약 1×10^6 STRO-1⁺ 세포/kg~약 5×10^6 STRO-1⁺ 세포/kg을 포함한다. 투여되는 세포의 정확한 양은, 연령, 체중, 및 환자의 성별, 및 상기 염증성 관절 질환의 정도와 심각성을 포함하는 다양한 요인에 따라 다르다.

[0192] 일 실시예에서, 세포의 낮은 투여량이 상기 치료 대상에게 투여된다. 전형적인 투여량은 약 $0.1 \times 10^4 \sim 0.5 \times 10^6$ 세포/kg 사이, 예를 들면, 약 $0.5 \times 10^5 \sim 0.5 \times 10^6$ 세포/kg 사이, 예를 들면, 약 $0.1 \times 10^6 \sim 0.5 \times 10^6$ 세포/kg 사이, 예를 들면, 약 0.2×10^6 또는 0.3×10^6 또는 0.4×10^6 세포/kg와 같은 약 $0.1 \times 10^5 \sim 0.5 \times 10^6$ 세포/kg 사이를 포함한다.

[0193] 일 실시예에서, 세포의 높은 투여량이 상기 치료 대상에게 투여된다. 전형적인 투여량은 적어도 약 1.5×10^6 세포/kg을 포함한다. 예를 들면, 높은 투여량은 약 $1.5 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 세포/kg, 예를 들면, 약 $1.5 \times 10^6 \sim 4 \times 10^6$ 세포/kg 사이, 예를 들면, 약 $1.5 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6$ 세포/kg 사이와 같은, 예를 들면, 약 $1.5 \times 10^6 \sim 6 \times 10^6$ 세포/kg 사이를 포함한다. 예를 들면, 높은 투여량은 약 1.5×10^6 또는 약 2×10^6 세포/kg을 포함한다.

[0194] 일 실시예에서, 상기 세포는 총 세포 개수 투여량으로 상기 환자의 체중과 무관하게 투여된다.

[0195] 예를 들면, 일 실시예에서, 상기 세포는 환자의 체중과 무관하게 약 1억~3억 세포의 투여량으로 투여된다.

[0196] 예를 들면, 일 실시예에서, 상기 세포는 환자의 체중과 무관하게 약 1억~2억 세포의 투여량으로 투여된다.

[0197] 일 실시예에서, 상기 세포는 환자의 체중과 무관하게 약 1억 세포의 투여량으로 투여된다.

[0198] 일 실시예에서, 상기 세포는 환자의 체중과 무관하게 약 1.5억 세포의 투여량으로 투여된다.

- [0199] 일 실시예에서, 상기 세포는 환자의 체중과 무관하게 약 2억 세포의 투여량으로 투여된다.
- [0200] 일 실시예에서, 상기 세포는 환자의 체중과 무관하게 약 3억 세포의 투여량으로 투여된다.
- [0201] 몇 가지 실시예에서, 세포는 치료 대상의 순환계(circulation)로 배출되는 것을 허용하지 않은 챔버(chamber) 내에 포함되나, 상기 세포에 의해 분비되는 인자(factor)는 상기 순환계에 진입할 수 있도록 허용한다. 이와 같이, 상기 세포가 상기 인자를 상기 치료 대상의 순환계에 분비할 수 있도록 허용함으로써 치료 대상에 가용인자가 투여될 수 있다. 그러한 챔버는 가용인자의 국소 수준을 증가시키기 위해 치료 대상의 부위(site)에 동등하게, 예를 들어 체장 내 또는 체장과 인접하게, 임플란트(implant)시킬 수 있다.
- [0202] 본 발명의 몇가지 실시예에서, 세포 조성물에 의한 치료의 개시에 앞서 환자의 통상적 면역 반응을 억제(immunosuppress)시키는 것은 필요성이 없거나 바람직하지 않을 수 있다. 따라서, 타가(동종, allogeneic), 또는 이종(xenogeneic)도, STRO-1⁺ 세포 또는 이의 자손의 이식은 그 어떤 경우에는 허용될 수 있다.
- [0203] 그러나, 다른 실시예들에서는 세포 치료 개시 전에 약리학적으로 환자의 통상적 면역 반응을 억제(immunosuppress) 및/또는 치료 대상의 상기 세포 조성물에 대한 면역반응을 감소시키는 것이 바람직하거나 적절할 수 있다. 이는 전신적 또는 국소적 면역 억제제의 사용을 통해 달성될 수 있거나, 또는 캡슐화 디바이스(encapsulated device)로 상기 세포를 전달함으로써 달성될 수 있다. 상기 세포는 세포 및 치료인자가 필요로 하는 영양분과 산소에 대해 투과적이고, 체액성 면역 인자(immune humoral factor) 및 세포에 대해 비투과적인 캡슐로 캡슐화(encapsulate)될 수 있다. 예를 들면, 상기 캡슐재료(encapsulant)는 저자극성(hypoallergenic)이고, 표적 조직에 용이하며 안정적으로 위치하고, 상기 임플란트 구조(implanted structure)에 대해 추가 보호 기능을 제공한다. 이들과 상기 이식된 세포에 대해서 면역반응을 감소시키거나 제거하는 수단은 당해 분야에 공지되어 있다. 대안으로서, 상기 세포는 이들의 면역원성(immunogenicity)을 감소시키기 위해 유전적으로 변형될 수 있다.
- [0204] 가용인자의 조성물(Compositions of Soluble Factors)
- [0205] 본 발명의 일 실시예에서, STRO-1⁺ 세포-유래 및/또는 자손 세포-유래 상청액 또는 가용인자는, 예를 들어 적합한 담체 및/또는 부형제를 포함하는, 조성물의 형태로 투여된다. 예를 들면, 상기 담체 또는 부형제는 상기 가용인자 또는 상청액의 생물학적 효과에 역효과를 미치지 않는다.
- [0206] 일 실시예에서, 상기 조성물은 가용인자 또는 상청액의 성분을 안정시키기 위해 조성물의 물질을, 예를 들어 프로테아제 억제제(protease inhibitor)를 포함한다. 예를 들면, 상기 프로테아제 억제제는 치료 대상에 역효과를 미치는 충분한 양으로 포함되지 않는다.
- [0207] STRO-1⁺ 세포-유래 및/또는 자손 세포-유래 상청액 또는 가용인자가 포함된 조성물은 적합한 액체 현탁액, 예를 들어, 배양 매체(배양 배지, culture medium)에서 또는 안정된 담체, 또는 인산염 완충 식염수와 같은 완충액으로 제조될 수 있다. 적합한 담체는 본원에 기술되어 있다. 다른 실시예에서, 주입을 위한 오일성 현탁액은 STRO-1⁺ 세포-유래 및/또는 자손 세포-유래 상청액 또는 가용인자를 포함하는 현탁액이다. 적합한 친유성 용매 또는 비히클(vehicle)은 참기름과 같은 지방 오일; 또는 에틸 올레이트 또는 트리글리세라이드와 같은 합성 지방산 에스테르; 또는 리포솜을 포함한다. 주입에 사용될 현탁액은 나트륨 카르복시메틸 셀룰로스, 소르비톨, 또는 텍스트란과 같은 상기 현탁액의 점도를 증가시키는 물질을 포함할 수 있다. 선택적으로, 상기 현탁액은 매우 높은 농도의 용액 제조를 허용하는 상기 화합물의 용해도를 증가시키는 적합한 안정화제(stabilizers) 또는 제제(agents)를 포함할 수 있다.
- [0208] 멸균 주입 용액(sterile injectable solution)은 필요에 따라 전술한 구성요소를 하나 또는 조합으로 함께, 상기 상청액 또는 가용인자를 적절한 용매에 필요로 하는 양으로 포함시킴으로써 제조될 수 있고, 이후 멸균 여과(filtered sterilization)된다.
- [0209] 일반적으로, 분산액(dispersions)은 상기 상청액 또는 가용인자를 기본 분산액 매체(dispersion medium) 및 상기 열거한 필요로 하는 다른 구성 요소를 포함하는 멸균된 비히클(vehicle)에 도입함으로써 제조된다. 멸균된 주입용 용액의 제조를 위한 멸균된 분말의 경우, 전형적인 제조방법은 진공 건조 및 동결 건조로 생산된 활성 구성요소(active ingredient)의 분말과 함께 기존 멸균-여과(sterile-filtered)된 용액으로부터의 임의의 추가적이고, 바람직한 구성요소를 첨가하는 것이다. 본 발명의 다른 관점에 따르면, 상기 상청액 또는 가용인자는

용해도를 증진하는 하나 또는 그 이상의 추가 화합물과 함께 제제화(formulated)될 수 있다.

[0210] 다른 전형적인 담체 또는 부형제는, 예를 들면, Hardman, *et al.* (2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, N. Y.; Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams, and Wilkins, New York, N. Y.; Avis, *et al.* (eds.) (1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY; Lieberman, *et al.* (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY; Lieberman, *et al.* (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY; Weiner and Kotkoskie (2000) Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y.에 기재되어 있다.

[0211] 치료용 조성물(Therapeutic compositions)은 일반적으로 제조 및 보관 조건 하에서 무균 및 안정된 상태여야 한다. 상기 조성물은 용액, 마이크로에멀전(microemulsion), 리포솜(liposome), 또는 다른 정돈된 구조로 제제화될 수 있다. 상기 담체는 예를 들면, 물, 에탄올, 폴리올(예를 들면, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 액체 폴리 에틸렌 글리콜, 및 이와 같은 것) 및 이의 적합한 혼합물을 함유하는 용매, 또는 분산액 매체(dispersion medium)일 수 있다. 상기 적절한 유동성(fluidity)은, 예를 들면, 레시틴과 같은 코팅의 사용에 의해, 분산액(dispersion)의 경우 필요로 하는 입자 크기의 유지에 의해, 및 계면 활성제(surfactants)의 사용에 의해 유지될 수 있다. 많은 경우에, 상기 조성물에 만니톨, 소르비톨, 또는 염화나트륨과 같은 등자성 제제(isotonic agent)를 포함하는 것이 바람직할 것이다. 상기 주입용 조성물(injectable composition)의 연장된 흡수는 상기 조성물에, 예를 들어, 모노스테아레이트 염 및 젤라틴과 같은 흡수를 지연시키는 제제를 포함함으로써 초래될 수 있다. 또한, 상기 가용인자는, 예를 들면 지효성 폴리머(slow release polymer)를 포함하는 조성물에서, 지효성 제제(time release formulation)로 투여될 수 있다. 상기 활성 화합물은, 임플란트 및 마이크로캡슐화된 전달 시스템을 포함하는 지효성 제제(controlled release formulation)와 같이, 신속 방출(rapid release)에 대해 상기 화합물을 보호할 담체와 함께 제조될 수 있다. 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리안하이드라이드, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르, 폴리락트산 및 폴리락틱, 폴리글리콜 코폴리머(polyglycolic copolymer, PLG)와 같은, 생분해성, 생체 적합성 폴리머가 사용될 수 있다. 그러한 제제의 제조를 위한 많은 방법은 특허를 받았거나 당업자에게 일반적으로 공지되어 있다.

[0212] 상기 상청액 또는 가용인자는, 상기 가용인자의 지효성(slow release)을 제공하기 위해, 예를 들어, 적절한 매트릭스(matrix)와 조합으로 투여될 수 있다.

[0213] 조성물의 추가 구성 요소

[0214] 상기 STRO-1⁺ 세포-유래 상청액 또는 가용인자, STRO-1⁺ 세포 또는 이의 자손은 다른 유익한 약물 또는 생물학적 분자(성장인자, 영양인자(trophic factor))와 함께 투여될 수 있다. 다른 제제와 함께 투여되는 경우, 그들은 단일의 약제학적 조성물에, 또는 별도의 약제학적 조성물에, 또는 동시에 또는 순차적으로 다른 제제(다른 제제의 투여 전 또는 후에)와 함께 투여될 수 있다. 공동투여(co-administer)할 수 있는 생리활성 인자(bioactive factor)는 항-세포 사멸제(예를 들어, EPO, EPO의 미메티바디(mimetibody), TPO, IGF-I 및 IGF-II, HGF, 카스파제 억제제); 항-염증제(예를 들어, P38 MAPK 억제제, TGF-베타 억제제, 스타틴, IL-6 및 IL-1 억제제, 페미로라스트(PEMIROLAST), 트라닐라스트(TRANILAST), 레미케이드(REMICADE), 시롤리무스(SIROLIMUS) 및 NSAIDs(non-steroidal anti-inflammatory drugs, 비-스테로이드성 항-염증성 약물; 예를 들어, TEPOXALIN, TOLMETIN, SUPROFEN); 면역억제(immunosuppressive)/면역조절(immunomodulatory) 제제(예를 들어, 사이클로스포린, 타크로리무스와 같은 칼시뉴린 억제제; mTOR 억제제(예를 들어, SIROLIMUS, 에베롤리무스(EVEROLIMUS)); 항-증식제(예를 들어, 아자티오프린, 미코페놀레이트 모페틸); 코르티코스테로이드(예를 들어, 프레드니솔론, 하이드로코르티손); 단일클론 항-IL-2R알파 수용체 항체(예를 들어, basiliximab, daclizumab), 다클론 항-T-세포 항체(예를 들어, 항-흉선세포 글로불린(anti-thymocyte globulin, ATG)와 같은 항체; 항-림프구 글로불린(anti-lymphocyte globulin, ALG); 단일클론 항-T 세포 항체 OKT3)); 항-혈전제(anti-thrombogenic agents)(예를 들어, 헤파린, 헤파린 유도체, 유로키나제, PPACK(dextrophenylalanine proline arginine chloromethylketone), 항-트롬빈 화합물, 혈소판 수용체 길항제, 항-트롬빈 항체, 항-혈소판 수용체 항체, 아스피린, 디피리다몰, 프로타민, 히루딘, 프로스타글란딘 억제제, 및 혈소판 억제제); 및 항-산화제(예를 들어, 프로부콜, 비타민 A, 아스코르브산, 토코페롤, 코엔자임 Q-10, 글루타티온, L-시스테인, N-아세틸시스테인)뿐만 아니라 국소 마취제를 포함할 수 있다.

- [0215] 일 실시예에서, 상기 STRO-1⁺ 세포-유래 상청액 또는 가용인자, STRO-1⁺ 세포 또는 이의 자손은 안지오텐신 전환효소 억제제, 페록시좀 증식제-활성화 수용체-활성제(peroxisome proliferator-activated receptor-activators)(인슐린 증가제(insulin sensitizer), 예를 들어, 상기 글리타존 피오글리타존 및 로시글리타존) 및 페록시좀 증식제-활성화 수용체-활성제(피브레이트, 예를 들어, 페노 피브레이트), 항산화제(예를 들어, 아스코르브산 또는 비타민 E)와 같은 내피 기능장애 치료에 유용한 화합물 또는 호르몬 대체 요법과 함께 투여된다.
- [0216] 다른 실시예에서, 임의의 예에 따라 본원에 기재된 조성물은 혈관세포(vascular cell)로의 선조세포(progenitor cell)의 분화를 유도 또는 증진시키는 인자(factor)를 추가적으로 포함한다. 전형적인 인자는 혈관 내피 성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF), 혈소판 유래 성장인자(platelet derived growth factor, PDGF; 예를 들어, PDGF-BB) 및 FGF를 포함한다.
- [0217] 다른 실시예에서, 임의의 예에 따라 본원에 기재된 조성물은 조직 특이 수입된 세포(tissue specific committed cell, TSCC)를 추가적으로 포함한다. 이러한 관점에서, 국제 특허 출원 명세서 No. PCT/AU2005/001445에서 입증된 바와 같이, TSCC 및 STRO-1⁺ 세포의 투여가 상기 TSCC의 증진된 증식으로 이어질 수 있다. 일 실시예에서, 상기 TSCC는 혈관세포(vascular cell)이다. 상기와 같은 조성물을 치료 대상에 투여한 경우, 혈관(vasculature)의 증가된 생산으로 이어질 수 있으며, 이는 예를 들어, 상기의 영향을 받은 조직(affected tissue)에 증가된 영양소가 전달되는 것으로 이어진다.
- [0218] 의료 기기(Medical Devices)
- [0219] 본 발명은 임의의 실시예에 따라 본원에 기재된 용도 또는 방법에서 사용되는 의료 기기를 또한 제공한다. 예를 들면, 본 발명은 임의의 실시예에 따라 본원에 기재된 STRO-1⁺ 세포 및/또는 이의 자손 세포 및/또는 이로부터 유래한 가용인자 및/또는 조성물을 포함하는 주사기 또는 카테터(catheter) 또는 다른 적절한 운반 장치를 제공한다. 선택적으로, 상기 주사기 또는 카테터는 임의의 실시예에 따라 본원에 기재된 방법에서의 사용을 위한 지시사항과 함께 포장된다.
- [0220] 다른 실시예에서, 본 발명은 임의의 예에 따라 본원에 기재된 STRO-1⁺ 세포 및/또는 이의 자손 세포 및/또는 이로부터 유래한 가용인자 및/또는 조성물을 포함하는 임플란트를 제공한다. 선택적으로, 상기 임플란트는 임의의 실시예에 따라 본원에 기재된 방법에서의 사용을 위한 지시사항과 함께 포장된다. 적합한 임플란트는, 예를 들어, 전술된 스캐폴드, 및 STRO-1⁺ 세포 및/또는 이의 자손 세포 및/또는 이로부터 유래한 가용인자와 함께 형성될 수 있다.
- [0221] 투여 방법(Modes of Administration)
- [0222] STRO-1⁺ 세포-유래 상청액 또는 가용인자, STRO-1⁺ 세포 또는 이의 자손은 수술적 임플란트, 주입, 전달(예를 들어, 카테터 또는 주사기에 의해), 또는 그 밖에 방법으로 전신적으로 투여될 수 있다.
- [0223] 일 실시예에서, 상기 STRO-1⁺ 세포 유래 상청액 또는 가용인자, STRO-1⁺ 세포 또는 이의 자손은 치료 대상의 혈류에 전달된다. 예를 들어, 상기 STRO-1⁺ 세포-유래 상청액 또는 가용인자, STRO-1⁺ 세포 또는 이의 자손은 비경구적으로 전달된다. 비경구적 투여의 전형적인 경로는, 이에 한정되는 것은 아니나, 복막 내(intraperitoneal), 심실 내(intraventricular), 뇌실 내(intracerebroventricular), 척추강 내(intrathecal), 동맥 내(intra-arterial), 림프절 내(intranodal) 또는 정맥 내(intravenous)를 포함한다. 일 실시예에서, 상기 STRO-1⁺ 세포-유래 상청액 또는 가용인자, STRO-1⁺ 세포 또는 이의 자손은 동맥 내, 대동맥 내, 심장의 심방 또는 심실 내, 예를 들어, 정맥 내와 같은 혈관 내로 전달될 수 있다.
- [0224] 심장의 심방 또는 심실 내로 세포를 전달하는 경우, 폐(lung)로의 세포의 신속한 전달에 따른 합병증을 방지하기 위해서 세포는 좌측 심방 또는 심실로 투여될 수 있다.
- [0225] 일 실시예에서, 상기 STRO-1⁺ 세포-유래 상청액 또는 가용인자, STRO-1⁺ 세포 또는 이의 자손은 전달을 위한 부위에, 예를 들어, 주사기를 사용하거나 카테터 또는 중심선을 통해, 주입될 수 있다.

- [0226] 치료학적 제형(therapeutic formulation)을 위한 투여 요법(administration regimen)의 선택은 상기 혈청 또는 상기 개체(entity)의 조직 회전을, 증상의 정도, 및 개체의 면역원성(immunogenicity)을 포함하는 여러 요인에 따라 달라진다. 예를 들어, 투여 요법은 일관되게 부작용이 허용 가능한 수준으로 환자에게 전달되는 치료 화합물의 양을 최대화한다. 따라서, 상기 전달되는 제제의 양은 특정 개체(entity)에 부분적으로 의존하며, 치료되는 병태(condition)의 중증도에 따라 달라진다.
- [0227] 일 실시예에서, STRO-1⁺ 세포-유래 상청액 또는 가용인자, STRO-1⁺ 세포 또는 이의 자손은 단일 볼루스 투여량(single bolus dose)으로 전달된다. 대안으로서, STRO-1⁺ 세포-유래 상청액 또는 가용인자, STRO-1⁺ 세포 또는 이의 자손은 지속적인 투입으로, 또는 시간적 간격을 두고, 예를 들어 하루, 한 주, 또는 일주일에 1-7회 투여량으로 투여된다. 전형적인 투여량 프로토콜은 상당히 바람직하지 못한 부작용을 피하는 최대 투여량 또는 투여빈도를 포함하는 것이다. 총 주간 투여량은 사용되는 상기 화합물의 유형 및 활성에 따라 다르다. 적절한 투여량의 결정은, 예를 들어, 치료에 영향을 미치거나 치료에 영향을 미칠 것으로 예측되는 당업계에 공지되었거나 추정되는 파라미터 또는 인자를 이용하여, 임상의에 의해 이루어진다. 일반적으로, 상기 투여량은 최적의 투여량보다 약간 적은 양으로 시작하여, 임의의 음성 부작용(negative side effects)에 비해 바람직하거나 최적의 효과를 달성하기까지 소량의 증분으로 증가된다. 중요한 진단 방법은 당뇨병의 증상들을 포함한다.
- [0228] 일부 실시예에서는 상기 세포는 매주, 격주, 3주 또는 4주마다 한 번 투여된다.
- [0229] 염증성 관절 질환의 진행을 치료 또는 지연시키는 것과 관련해서는 본 발명의 실시예들에 준하여, 일 실시예에서, 상기 STRO-1⁺ 세포 및/또는 이의 자손 세포 및/또는 이로부터 유래한 가용인자를 상기 장애(disorder)의 진단 후, 예를 들어, 당업계에 공지된 표준 방법 및/또는 본원에 기재된것을 이용하여, 투여된다.
- [0230] **실시예들**
- [0231] 실시예 1: STRO-3⁺ 세포의 선택에 의한 MPC 세포의 면역선택(Immunoselection)
- [0232] 골수(Bone marrow, BM)는 건강한 정상 성인 자원봉사자(20-35세)로부터 수확되었다. 간단히 설명하면, 리튬-헤파린 항-응고제(lithium-heparin anticoagulant)-함유 튜브에 후방 장골(posterior iliac crest)로부터 40ml의 BM이 흡입되었다.
- [0233] BMMNC는, 전술된 바와 같이(Zannettino, A.C. *et al.*(1998) *Blood* 92: 2613-2628), Lymphoprep™(Nycomed Pharma, 오슬로, 노르웨이)을 사용하여 밀도 구배 분리(density gradient separation)에 의해 제조되었다. 4℃에서 30분간 400 x g로 원심분리한 다음, 버퍼층(buffy layer)은 전달 피펫(transfer pipette)으로 제거되고, HBSS(Hank's balanced salt solution, 라이프 테크놀로지스(Life Technologies), 게이터스버그, MD)로 구성된, 5% FCS(fetal calf serum, CSL Limited, 빅토리아, 호주)가 함유된 "HHF"로 3회 세척되었다.
- [0234] STRO-3⁺(또는 TNAP⁺) 세포는, 전술된 바와 같이(Gronthos *et al.* (2003) *Journal of Cell Science* 116: 1827-1835; Gronthos, S. and Simmons, P.J. (1995) *Blood* 85: 929-940), 이어서 자성 활성 세포 선별(magnetic activated cell sorting)에 의해 분리되었다. 간단히 설명하면, 약 1~3 x 10⁸ BMMNC는, HHF에 10%(v/v) 정상 토끼 혈청으로 구성된, 블로킹 버퍼에 얼음 위에서 20분간 처리되었다. 상기 세포는 얼음 위에서 1시간 동안 STRO-3 mAb 10 µg/mL의 용액 200 µl로 처리되었다. 상기 세포는 이어서 HHF로 400 x g에서 3회 세척되었다. HHF 버퍼에 1/50으로 희석된 염소 항-생쥐 γ-바이오틴(남부 생명 공학 어소시에이츠(Southern Biotechnology Associates), 머밍엄, 영국)을 첨가하고, 상기 세포는 얼음 위에서 1시간 동안 처리되었다. 세포는 상기와 같이 MACS 버퍼(1% BSA, 5mM EDTA 및 0.01% 아지드화 나트륨(sodium azide)으로 보충된 Ca²⁺- 및 Mn²⁺-프리(free) PBS)로 2회 세척되었고 최종 부피가 0.9mL이 되도록 MACS 버퍼에 현탁되었다.
- [0235] 100 µl 스트렙타비딘 마이크로비드(streptavidin microbeads)(Miltenyi 바이오텍; 베르기쉬 글라드바흐, 독일)가 상기 세포 현탁액에 첨가되고, 15분 동안 얼음 위에서 처리되었다. 상기 세포 현탁액은 2회 세척되고 0.5mL의 MACS 버퍼에 현탁되며, 이어서 미니 MACS 컬럼(MS Columns, Miltenyi 바이오텍)에 로딩되고, 상기 STRO-3 mAb(아메리칸 타입 컬처 콜렉션(American Type Culture Collection, ATCC)에 2005년 12월 19일에 수탁 번호 PTA-7282 하에 수탁됨-국제 공개 No.WO 2006/108229 참조)에 결합하지 않은 상기 세포를 회수하기 위해 0.5mL의 MACS 버퍼에 3회 세척되었다. 1mL MACS 버퍼가 추가로 첨가된 다음, 상기 컬럼은 상기 자석으로부터 분

리되고, 상기 TNAP⁺ 세포는 양압으로 분리되었다. 상기 각각의 분획(fraction)으로부터의 세포의 부분표본(aliquot)은 스트렙타아비딘-FITC로 염색될 수 있었고, 상기 순도는 유동세포분석(flow cytometry)으로 평가될 수 있었다.

[0236] 실시예 2: STRO-3 mAb에 의해 선택된 세포는 STRO-1^{bnght} 세포

[0237] 실험은 STRO-1^{bnght} 세포 분리용 단일 제제(single reagent)로서의 STRO-3 mAb의 가능성을 확인하기 위해 설계되었다.

[0238] STRO-3(IgG1)이 STRO-1(IgM)의 다른 아이소타입(isotype)임을 감안할 때, 클론원성(clonogenic) CFU-F를 검출할 수 있는 상기 STRO-3의 능력은 MACS 방법을 사용하여 분리된 STRO-1⁺ 세포와의 공동발현(co-expression)에 기반하여 Two-color FACS 분석으로 평가되었다(도 1). 상기 도트 플롯 히스토그램(dot plot histogram)은 리스트모드(listmode) 데이터로 수집되는 5×10^4 의 현상을 나타낸다. 상기 수직 및 수평 선은 같은 조건 하에서 처리된 아이소타입이 일치하는 대조군 항체인 1B5(IgG) 및 1A6.12(IgM)로 수득한 평균 형광 1.0% 미만의 반응성 수준(reactivity level)으로 설정된 것이다. 결과에 따르면, 소수의 STRO-1^{bright} 세포집단은 TNAP(사분면의 우측 상단)를 공동발현하는 반면, STRO-1⁺ 세포는 상기 STRO-3 mAb와 반응하는데 실패한 것으로 나타났다. FACS로 모든 사분면으로부터 분리된 세포는 이어서 CFU-F의 발생빈도에 대해 분석되었다(표 1).

[0239] 표 1: 상기 세포 표면 마커인 STRO-1 및 TNAP의 공동발현에 기반하여 이중-색(dual-color) FACS 분석에 의해 인간 골수 세포의 증가(enrichment)(도 1 참조). FACS 선별된(sorted) 세포는 20% FCS로 보충된 알파 MEM에서 표준 클론 원성(clonogenic)의 조건 하에서 배양되었다. 상기 데이터는 플레이팅된 10^5 세포 당 14일차 콜로니-형성 세포(colony-forming cells, CFU-F)의 평균 수 $\pm$ SE(n=3 서로 다른 골수 천자액(aspirates))을 나타내는 것이다. 이러한 데이터가 제시하는 것은 인간 MPC는 상기 STRO-1 항원을 밝게 공동발현하는 BM의 상기 TNAP 양성 분획에 독점적으로 제한된다는 것이다.

표 1

[0240]

골수 분획 (Bone Marrow Fraction)	CFU-F/ 10^5 세포의 빈도 (Frequency of CFU-F/ 10^5 Cells)	증가(배율) (Enrichment(Fold Increase))
비분획된 BMMNC	11.0 ± 2.2	1.0
TNAP ⁺ /STRO-1 ^{bright}	$4,511 \pm 185$	410
TNAP ⁺ /STRO-1 ^{dull}	0.0	0.0

[0241] 실시예 3: STRO-1^{dull} 및 STRO-1^{bright} 세포의 상대적 유전자 및 표면 단백질의 발현

[0242] 실험의 첫 번째 시리즈에서는, 현광 활성화 세포 소팅(fluorescence activated cell sorting)으로 분리된 STRO-1^{dull} 또는 STRO-1^{bright} 집단에 의해 발현되는 다양한 계통-연관된 유전자(lineage-associated genes)의 유전자 발현 프로파일을 조사하기 위해 반-정량적 RT-PCR(semi-quantitative RT-PCR) 분석이 이용되었다(도 2A). 실험

의 두 번째 시리즈에서는, 현광 활성 세포 소팅으로 분리된 STRO-1^{dull} 또는 STRO-1^{bright} 집단에 의해 발현되는 다양한 계통-연관된 단백질의 표면 단백질 발현 프로파일을 조사하기 위해 유동세포분석(flow cytometry) 및 평균 채널 현광 분석이 이용되었다.

[0243] 총 세포 유래 RNA는, 제조사의 권장사항에 따라, 2×10^6 STRO-1^{bright} 또는 STRO-1^{dull} 선별된(sorted) 1차 세포(primary cell), 연골세포 펠렛(chondrocyte pellet) 및 다른 유도된 배양물로부터 제조되었고, RNeasyLys RNeasyLys 추출법(Biotecx 랩사, 휴스턴, TX)을 사용하여 용해되었다. 각각의 하위집단(subpopulation)으로부터 분리된 RNA는 그다음, 첫 번째-가닥 cDNA 합성(first-strand cDNA synthesis) 키트(파마시아 바이오텍, 올살라, 스웨덴)를 사용하여 제조되는 cDNA 합성의 주형(template)으로 사용되었다. 상기 다양한 전사체(transcripts)의 발현은 PCR 증폭으로, 전술된 바와 같이 표준 프로토콜을 사용하여 평가되었다(Gronthos *et al.*, *J. Bone and Min. Res.* 14:48-57, 1999). 본 연구에서 사용된 프라이머 세트는 표 2에 나타난 바와 같다. 증폭한 다음, 각각의 혼합물은 1.5% 아가로오스 젤 전기영동으로 분석되었고, 에티디움 브로마이드(ethidium bromide) 염색으로 가시화되었다. RNA의 무결성(integrity)은 GAPDH의 발현으로 평가되었다.

[0244] 각 세포 마커에 대한 상대적 유전자 발현은 ImageQuant 소프트웨어(도 2B, C)를 사용하여 하우스-키퍼 유전자(house-keeping gene)인 GAPDH의 발현을 참조하여 평가하였다. 또한, 이중 색(dual-colour) 유동세포분석을 이용하여 상기 STRO-1 항체와 조합으로 세포 계보-관련 마커(cell lineage-associated markers)의 넓은 범위의 발현에 기반하여 생체 외(ex vivo) 팽창된(expanded) MPC의 발현 프로파일을 조사하였다. STRO-1^{dull} 및 STRO-1^{bri} 배양된 세포의 상기 유전자 및 단백질의 발현을 기반으로 하는 상기 일반 표현형의 요약은 표 3에 나타내었다. 상기 데이터에 의하면, 생체 외(ex vivo) 팽창된 STRO-1^{bright} MPC는 안지오포이에틴-1(angiotensin-1), VCAM-1, SDF-1, IL-1 β , TNF α 및 RANKL를 포함하는 혈관주위 세포(perivascular cell)와 연관된 마커의 차별적으로 높은 발현을 보이는 것으로 나타났다. STRO-1^{dull} 또는 STRO-1^{bright} 배양된 세포의 상기 단백질 및 유전자 발현 프로파일을 비교한 것은 표 3 및 4에 요약되어있다.

[0245] STRO-1^{bri} 세포에 의해 독특하게 발현되는 유전자를 확인하기 위해 감산 혼성화(subtraction hybridization) 연구가 또한 수행되었다. 간단히 설명하면, STRO-1^{dull} 및 STRO-1^{bri} 는 전술된 바와 같이 분리되었다(도 3A 참조). 총 RNA는 5가지 골수 샘플로부터 통합된(pooled) STRO-1^{dull} 및 STRO-1^{bright} 세포로부터 RNA STAT-60 시스템(TEL-TEST)을 사용하여 제조되었다. 첫 번째-가닥 합성은 SMART cDNA 합성 키트(클론테크 연구소)를 사용하여 수행되었다. 상기 결과로 나온 mRNA/단일-가닥 cDNA 하이브리드는 제조사의 사양에 따라 long-distance PCR(어드밴티지 2 PCR 키트, 클론테크)을 사용하여 초기 RT과정에서 형성되는 3' 및 5' 프라임 말단(prime end)에서의 특이적인 프라이머 부위를 이용하여 증폭되었다. 상기 STRO-1^{bright} cDNA의 RsaI 소화 후, 2개의 부분표본(aliquot)은 클론테크 PCR-선별 cDNA 감산 키트(Clontech PCR-Select cDNA Subtraction Kit)를 사용하여 서로 다른 특정 어댑터 올리고뉴클레오타이드를 라이게이션(결찰, ligation)하는데 사용되었다. 제조사의 프로토콜에 따라, 2회의 감산 혼성화는 STRO-1^{dull} (테스터) 및 STRO-1^{bright} (드라이버) cDNA의 사용, 및 반대로(vice versa)로 하여 수행되었다. 이 방법은 또한 STRO-1^{bright} 드라이버 cDNA에 대해 혼성화된 STRO-1^{dull} 테스터 cDNA를 사용하여 역으로 수행되었다.

[0246] STRO-1^{bright} 집단에 의해 독특하게 발현되는 유전자를 확인하기 위해, STRO-1^{bright}의 감산된 cDNAs(subtracted cDNAs)가 T/A 클로닝 벡터에 라이게이션된 것으로 형질전환된 200개의 무작위로 선택된 박테리아 클론을 포함하는 저-밀도 마이크로어레이 필터의 복제를 구성하는데 STRO-1^{bright} 감산된 cDNA를 사용되었다. 상기 마이크로어레이는 이어서 [³²P] dCTP-표지 STRO-1^{bright} 또는 STRO-1^{dull} 감산된 cDNA로 표지(probe)되었다(도 3B-C). 차등 스크리닝(differential screening)으로, 상기 STRO-1^{dull} 및 STRO-1^{bright} 하위집단(subpopulation) 간에 매우 차별적으로 발현되는 총 44 클론이 확인되었다. 차별적으로 발현되는 클론들을 모두 DNA 시퀀싱한 결과, 오직 한 클론만이 간질 세포 미토젠(stromal cell mitogen)의 대표, 즉, 다시 말해 혈소판-유래 성장인자(platelet-derived growth factor, PDGF)로 알려진 것이었다(Gronthos and Simmons, *Blood*. 85: 929-940, 1995). 흥미롭게도, 상기 44 클론 중 6개는 케모카인(chemokine)인 간질 세포-유래 인자-1(stromal-derived factor-1, SDF-1)에 대응되는 DNA 삽입체(DNA insert)를 함유하는 것으로 확인되었다. 인간 STRO-1^{bright} 세포에서의 상기 SDF-1 전사체의

높은 풍부함은 갖 선별된 STRO-1^{bright}, STRO-1^{dull}, 및 STRO-1^{negative} 골수 하위집단(subpopulation)으로부터 제조된 총 RNA의 반-정량적 RT-PCR(semiquantitative RT-PCR)으로 확인되었다(도 3D 및 표 3)

[0247] 표 2. 인간의 mRNA의 특정 증폭용 RT-PCR 프라이머 및 조건

표 2

[0248]

표적 유전자 (Target Gene)	센스(Sense)/안티센스(Antisense) (5'-3') 프라이머 서열	생성물 크기 (Product Size)
GAPDH	CACTGACACGTTGGCAGTGG (서열번호: 1) CATGGAGAAGGCTGGGGCTC (서열번호: 2)	417
SDF-1	GAGACCCGCGCTCGTCCGCC (서열번호: 3) GCTGGACTCCTACTGTAAGGG (서열번호: 4)	364
IL-1 β	AGGAAGATGCTGGTTCCTCTC (서열번호: 5) CAGTTCAGTGATCGTACAGGTGC (서열번호: 6)	151
LT-1	TCATATGGAAGATCTGATTCTTACAGT (서열번호: 7) GGTATAAATACATGTGCTTCTAG (서열번호: 8)	380
TNF- α	TCAGATCATCTTCTCGAACC (서열번호: 9) CAGATAGATGGGCTCATACC (서열번호: 10)	361
KDR	TATAGATGGTGTAACCCGGA (서열번호: 11) TTTGTCAGTGGAGACAGCTTGG (서열번호: 12)	450
RANKL	AACAGGCCTTTCAAGGAGCTG (서열번호: 13) TAAGGAGGGGTTGGAGACCTCG (서열번호: 14)	538
Leptin	ATGCATTGGGAACCTGTGC (서열번호: 15) GCACCCAGGGCTGAGGTCCA (서열번호: 16)	492
CBFA-1	GTGGACGAGGCAAGAGTTTCA (서열번호: 17) TGGCAGGTAGGTGTGGTAGTG (서열번호: 18)	632
PPAR γ 2	AACTGCGGGGAACTTGGGAGATTCTCC (서열번호: 18) AATAATAAGGTGGAGATGCAGGCTCC (서열번호: 19)	341
OCN	ATGAGAGCCCTCACACTCCTC (서열번호: 20) CGTAGAAGCGCCGATAGGC (서열번호: 21)	289
MyoD	AAGCGCCATCTCTTGAGGTA (서열번호: 22) GCGAGAAACGTGAACCTAGC (서열번호: 23)	270
SMMHC	CTGGGCAACGTAGTAAAC (서열번호: 24) TATAGCTCATTGCAGCCTCG (서열번호: 25)	150
GFAP	CTGTGCCAGAGATGGAGGTT (서열번호: 26) TCATCGCTCAGGAGGTCCTT (서열번호: 27)	370
Nestin	GGCAGCGTTGGAACAGAGGTTGGA (서열번호: 28) CTCTAAACTGGAGTGGTCAGGGCT (서열번호: 29)	460
SOX9	CTCTGCCTGTTTGGACTTTGT (서열번호: 30) CCTTTGCTTGCCTTTACCTC (서열번호: 31)	598
Collagen type X	AGCCAGGGTTGCCAGGACCA (서열번호: 32) TTTTCCCACTCCAGAGGGC (서열번호: 33)	387
Aggrecan	CACTGTTACCGCCACTCCC (서열번호: 34) ACCAGCGGAAGTCCCCTTCG (서열번호: 35)	184

[0249]

표 3. STRO-1^{Bright} 및 STRO-1^{Dull} 집단에서의 상대적 유전자 발현의 요약. 역전사-PCR로 STRO-1^{Bright} 및 STRO-1^{Dull} 집단 간에 측정 가능하고, 차별적인 발현을 보이는 유전자 목록을 나타냄. 값은 하우스-키핑 유전자인 GAPDH를 참조하여 상대적 유전자 발현을 나타냄.

표 3

		GAPDH에 대한 상대적 발현 (Gene Expression relative to GAPDH)	
조직(Tissue)	마커(Marker)	STRO-1 ^{Bright}	STRO-1 ^{Dull}
뉴런(Neurons)	<i>GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein)</i>	0.1	0.7
뼈(Bone)	<i>(Osteocalcin)</i>	1.1	2.5
	<i>OSX (Osterix)</i>	0.4	1.3
	<i>CBFA-1 (Core Factor Binding Protein-1)</i>	0.3	0.6
면역조절 (Immunoregulatory)	<i>RANKL (Receptor Activator of Nuclear Factor κ B)</i>	1.6	0.3
	<i>SDF-1-alpha (Stromal Derived factor-1-alpha)</i>	3.2	0.1
지방(Fat)	<i>Leptin</i>	3.1	4.2
심근세포 (Cardiomyocytes)	<i>GATA-4</i>	1.1	2.9
내피세포 (Endothelial cells)	<i>Ang-1 (Angiopoietin-1)</i>	1.5	0.8
연골세포 (Chondrocytes)	<i>Sox 9</i>	0.3	1.1
	<i>X (Collagen X)</i>	3.5	2.8
전-염증성 사이토카인 (Pro-inflammatory Cytokines)	<i>TNF-alpha (Tumor necrosis alpha)</i>	1.7	0.9

[0250]

[0251]

STRO-1 발현의 강도(밀도, density)와 함께 표면에서의 단백질 발현의 상관관계를 입증하기 위해 골수 MPC 유래의 생체 외(ex vivo) 팽창된 세포의 단일 세포 현탁물이 트립신/EDTA 분리(박리, detach)로 제조되고, 이어서 상기 STRO-1 항체와 넓은 범위의 세포 계통-연관 마커(cell lineage-associated markers)를 식별하는 항체와 조합으로 처리되었다. STRO-1은 염소 항-생쥐 IgG-FITC(fluorescein isothiocyanate)을 사용하여 확인되는 반면, 다른 마커들은 염소 항-생쥐 또는 항-토끼 IgG-피코에리트린(phycoerythrin) 중 어느 하나를 사용하여 확인되었다. 세포 내 항원을 확인하는 항체의 경우, 세포 체제(cell preparation)는 먼저 상기 STRO-1 항체로 표지되고, 세포막을 투과(permeabilize)시키기 위해 70% 에탄올로 고정되고 그다음, 세포 내 항원 특이적 항체로 처리되었다. 아이소타입이 일치하는 대조군 항체는 같은 조건에서 사용되었다. COULTER EPICS flow cytometer를 사용하여 이중-색(dual-color) 유동세포분석법(flow cytometric analysis)이 수행되었고, 리스트모드(listmode) 데이터가 수집되었다. 상기 도트 플롯(dot plots)은 5,000 리스트모드 현상을 나타내는 것으로 각각의 계통 세포 마커(y-축) 및 STRO-1(x-축)을 나타낸 것이다. 상기 수직 및 수평 사분면은 상기 아이소타입이 일치하는 음성 대조군 항체를 참조하여 확립되었다.

[0252]

표 4. STRO-1^{Bright} 및 STRO-1^{Dull} 집단에서의 상대적 단백질 발현의 요약. 유동세포분석(flow cytometry)으로 확인된 STRO-1^{Bri} 및 STRO-1^{Dull} 집단 간의 차별적인 발현을 나타내는 단백질의 목록. 값은 염색의 상대적 평균 형광 강도를 나타냄.

표 4

		평균 현광 강도(Mean Fluorescence Intensity)	
조직(Tissue)	마커(Marker)	STRO-1 ^{Bright}	STRO-1 ^{Dull}
뉴런(Neurons)	Neurofilament	1.7	20.5
뼈(Bone)	PHOS (Alkaline Phosphatase)	5.7	44.5
면역 조절(Immunoregulatory)	RANKL (Receptor Activator of Nuclear Factor κ B)	658.5	31.0
상피세포(Epithelial Cells)	CytoKeratin 10+13	1.2	23.3
	Cytokeratin 14	1.8	8.8
평활근(Smooth Muscle)	α -SMA (Alpha Smooth Muscle Actin)	318.0	286.0
연골세포(Chondrocytes)	Byglycan	84.4	65.9
기저 섬유아세포(Basal Fibroblast)	Tenascin C	22.2	6.9
심근세포(Cardiomyocyte)	Troponin C	2.5	15.0

[0253]

[0254] 실시예 4: 간질 세포(stromal cell)는 안지오텐신 I(Angiotensin I)을 발현

[0255] 인간 간질 세포주(stromal cell line)인 HS5 및 HS27A는 10% 태아 송아지 혈청(Fetal Calf Serum, FCS) 및 페니실린(100 U/mL) 및 스트렙토마이신(100 μ g/mL)으로 보충된 RPMI-1640에서 배양되었다. 1차 간질 섬유아세포(Primary stromal fibroblasts)는 전술 하 바와 같이(Pillai *et al.*, *Blood* 107: 3520-3526, 2006), 골수 단핵 세포(bone marrow mononuclear cells, BMMNC)로부터 배양되었다. 세포는 분석을 위해서 FITC-접합 항-CD146 항체(Ebiosciences, 샌디에이고, 캘리포니아)뿐만 아니라 적합한 아이소타입 대조군으로 염색되고, FACS Aria cell sorter(BD Biosciences, 산호세, 캘리포니아) 상에서 CD146^{hi} 및 CD146^{lo} 집단으로 선별(sort)되었다.

[0256] 정량적 RT-PCR의 경우, 총 RNA는 mirNEasy 키트(키아젠, 발렌시아, 캘리포니아)를 사용하여 제조사의 지침에 따라, 게놈 DNA로 인한 오염을 제거하기 위해, 온-칼럼 DNAase 소화가 수행되어 제조되었다. mRNA 수준은 역전사로 생성된 cDNA에 SYBR-GREEN 기반의 정량적 실시간-PCR(quantitative Real Time-Polymerase Chain Reaction, qRT-PCR)으로 정량되었다.

[0257] 상기 HS27a 간질 세포주(stromal cell line)는 CD146^{hi} 간질 전구체(stromal precursor)에 대해 보고된 기능 및 전사 프로파일과 공유하는 점이 있는 듯하다. 따라서, 이 세포주에서의 CD146의 발현은 평가되었다. CD146의 유동세포분석법(flow cytometric analysis)은 HS27a와 HS5 세포에 수행되었고, HS27a에 의해 CD146은 강력하게 발현되는 반면, HS5는 그렇지 아니한 것으로 나타났다(도 4A). 또한 정상 골수로부터 확립된 9개의 1차 배양물(primary culture)에서의 CD146 발현 평가가 이루어졌다. 도 4B에 나타난 예에서와 같이, 처음으로 2-3회 계대(passages) 내의 배양물(culture)의 경우, CD146^{hi} 세포(6-40%)의 가변 비율이 있는 것으로 입증되었다. 1차 배양물 유래 상기 CD146^{hi} 및 CD146^{lo} 세포는 그다음 2가지 유전자인 CXCL12 및 엔지오포이에틴 I(Angiopoietin I)의 발현에 대해 평가되었다. 도 3C 및 3D에 나타난 바와 같이, CD146^{lo} 세포와 비교하면, 상기 CD146^{hi} 집단은 CXCL12 및 엔지오포이에틴 I 모두에서 현저하게 높은 발현을 가지는 것으로 나타났다.

[0258] 이러한 데이터는 간질 전구 세포(stromal precursor cells)가 높은 수준의 CD146을 발현하는 것을 나타낸다. 예를 들어, STRO-1을 발현하는 MPCs는 또한 엔지오포이에틴 I을 발현한다.

[0259] 실시예 5: MPCs는 내피 기능장애를 치료 또는 예방

[0260] 방법(Methods)

- [0261] 소 타입 II 콜라겐(Bovine type II collagen, BColl-II)에 대해 양(sheep)이 민감해질 수 있도록 0일차에 완전 프로인트항원보강제(Freund's complete adjuvant)의 에멀전(emulsion)(1mL)과 BColl-II(5mg)가 피하 주사로 투여되고 이어서 14일차에 불완전프로인트항원보강제(Freund's incomplete adjuvant)(1mL)와 BColl-II(5mg)가 2차 주사되었다. 28일차에 전신 염증(systemic inflammation)을 동반하는 급성 관절염을 촉진하기 위해 100 µg의 BColl-II가 함유된 0.5mL의 등장성(isotonic) 식염수가 좌측 무릎 관절에 관절 내로 주사되었다. 29일차에, 식염수(n=8) 또는 PBS에 현탁된 1.5억 MPC(n=8)가 양(sheep)에게 정맥 내 주사되었다. 이어서, 13일에 걸쳐 혈액이 수집되고 혈장에서의 IL-10, 피브리노겐(fibrinogen), 악티빈 A(Activin A) 및 C-반응성 단백질(C-reactive protein, CRP)의 수준이 시판되는 ELISA 키트를 이용하여 측정되었다. 모든 동물은 42일차에 희생되었다.
- [0262] 조직(tissue)이 수집되고, 얼음처럼 차가운 변형된 크랩스-헨셀레이트 용액(Krebs-Henseleit solution, KHS)에 보관되었다. 좌측으로 하향하는 관상 동맥의 2차 가지(second order branches)는 주변 조직으로부터 절제 현미경(Stemi 2000 입체현미경(stereomicroscope), Carl Zeiss, 고팅겐, 독일)하에서 절제되고, 혈관 운동 기능 연구(vasomotor functional study)를 위해 ~1mm의 길이의 맥관 고리(vessel rings)는 물바나-헬퍼ن 와이어 근운동 기록(Mulvany-Halpern wire myograph)(데이니시 마이오 테크놀로지(Danish Myo Technologies), 덴마크)를 사용하여 제조되었다. 간단히 설명하면, 맥관 분절(vessel segment)은 와이어 근운동(wire myograph)의 턱에 부착된 2개의 평행한 스테인레스 스틸 와이어(직경 40 µm) 사이에 마운트(mount)되었다.
- [0263] 양의 디지털 동맥(Ovine digital arteries)은 같은 양의 상기 좌측 앞다리로부터 수득되었다. 손바닥측 디지털 동맥(palmar digital artery)의 첫 번째 가지로부터 1mm 분절(segment)이 수득되었고, 절술된 바와 같이, 상기 와이어 근운동(wire myograph)에 마운트되었다.
- [0264] *약물 및 용액(Drugs and solutions)*
- [0265] 상기 변형된 KHS는 다음의 조성(mM)을 갖는다. NaCl 118, KCl 4.57, CaCl₂ 1.27, KH₂PO₄ 1.19, MgSO₄ 1.19, NaHCO₃ 25 및 포도당 5.55. 모든 약물은 시그마-알드리치, 호주로부터 입수되었다. 모든 약물 및 상기 KHS 용액은 실험 당일 날 갓 제조되고, 증류수에 용해되었다. 모든 약물은 이어서 KHS에 희석되었다.
- [0266] *아이소메트릭 장력 기록(Isometric tension recording)*
- [0267] 상기 제제(preparation)는 5mL의 KHS를 함유하는 체임버에 넣고, 37°C 및 95% O₂ 및 5% CO₂ 에서 공기가 통하도록 유지되었다. 15분간의 평형화 기간 후, 상기 맥관 분절(vessel segment)이 Mulvany 및 Halpern *Circulation Res.* 41: 19-26, 1977에 의해 개발된 방법에 따라 정상화(normalized)되고, 정상화 과정 동안 상기 최적의 내부 둘레는 측정되었다. 정지 장력(resting tension)은 0.9의 조정인자(adjustment factor)와 함께 13.3kPa(100mgHg)에 대응하게 그들의 정상적 내부 둘레에 따라 혈관에 적용되었다. 정지 장력이 확립된 다음, 맥관은 KHS에서 30분간 추가 평형 기간(equilibration period)이 주어지고, 표준 탈분극 크랩스 용액(standard depolarizing Krebs solution)(DKS; 118mM KCl)에 대한 수축 반응이 이어졌다.
- [0268] *관상 동맥: 엔도텔린-1로 예-수축된(pre-constricted) 동맥의 브라디키닌 및 나트륨 니트로프루시드-유도에 의한 이완*
- [0269] 세척 및 재-평형화(15분)에 이어, 상기 같은 개체로부터 유래한 2개의 맥관 분절(vessel segment)은 브라디키닌의 임의의 프로스타글란딘-매개-효과를 제거하기 위해 이부프로펜(ibuprofen, 10 µM)를 함유하는 KHS와 처리되었다. 그다음, 그들은 그들의 최대 DKS 반응의 75%로 엔도텔린-1(endothelin-1)(3 x 10⁻⁸ M)을 사용하여 수축되었다. 일단 안정 상태의 수축이 달성되고 나면, 그다음 상기 내피-의존적 혈관확장제, 브라디키닌(bradykinin)(10⁻¹¹ M~10⁻⁵ M), 또는 상기 내피-비의존적 혈관확장제, 나트륨 니트로프루시드(sodium nitroprusside)(10⁻¹⁰ M~10⁻⁴ M)의 점증적으로 증가되는 농도에 대해 이완 반응이 수득되었다. 각 실험에서 인접한 2개의 분절(segment)의 사용과 함께, 각 분절(segment)에 대해 오직 하나의 농도-반응 곡선(concentration-response curve)이 수행되었다.

- [0270] 디지털 동맥(Digital arteries): 5-HT로 예-수축된(pre-constricted) 동맥의 카바콜 및 나트륨 니트로프루시드-유도에 의한 이완
- [0271] 세척 및 재-평형화(15분)에 이어, 상기 같은 개체로부터 유래한 2개의 맥관 분절(vessel segment)은 그들의 최대 DKS 반응의 75%로 5-HT(3×10^{-6} M)를 사용하여 수축되었다. 일단 안정 상태의 수축이 달성되고 나면, 그다음 상기 내피-의존적 혈관확장제, 카바콜(carbachol)(10^{-9} M~ 10^{-4} M), 또는 상기 내피-비의존적 혈관확장제, 나트륨 니트로프루시드(sodium nitroprusside)(10^{-10} M~ 10^{-4} M)의 점증적으로 증가되는 농도에 대해 이완 반응이 수득되었다. 각 실험에서 인접한 2개의 분절(segment)의 이용과 함께, 각 분절(segment)에 대해 오직 하나의 농도-반응 곡선이 수행되었다.
- [0272] 데이터 분석
- [0273] 장력(tension)은 컴퓨터화된 획득 시스템(computerized acquisition system)에 의해 연속적으로 기록되었고 결과는 별도의 제제로부터 각각 별도의 실험들(n)의 나타낸 수의 평균±표준오차(s.e.m.)로 나타내었다. 상기 데이터는 커브 피팅 소프트웨어(curve fitting software)(그래프 패드 프리즘 5.0)(GraphPad Prism 5.0)에 의해, EC₅₀(기하 평균(geometric mean) 및 95% 신뢰구간(confidence interval)으로 표현되는, 50%의 최대반응을 산출하는 길항제(agonist)의 농도)) 값 및 최대 반응(maximum responses)이 계산되고, 적절한 경우, 던넛 사후 검증(Dunnett's post-hoc test)과 함께 분산(variance)의 원-웨이(one-way) 또는 투-웨이(two-way) 분석을 이용한 통계적 비교를 수행하는 누적 농도-반응 곡선(cumulative concentration-response curves, CRC)을 구성하는데 사용되었다.
- [0274] 결과
- [0275] 상기 결과는 1.5억 타가(allogenic) MPCs의 단일 IV 투여(single IV administration)를 나타낸 것으로 투여 후 당일 IL-10 생산량의 수준에 스파이크(spike)를 일으키는 것으로 나타났다(도 5). IL-10은 호중구의 순환 수준(circulating levels)을 촉진시키는 염증성 사이토카인이고 그들의 전-염증성 상태(pro-inflammatory state)를 제한하는데 도움이 된다. 이것은 결국, 패렴과 같은 전신성 감염 질환(systemic infection disease)의 치료를 향상시키는 역할을 한다.
- [0276] 무처리된 양(sheep)에 비해 상기 MPCs의 단일 투여량은 혈장 피브리노겐(plasma fibrinogen), 악티빈 A(Activin A) 및 C-반응성 단백질(C-reactive protein, CRP)을 감소시키는데 또한 효과적이었다(도 6-9). 피브리노겐(fibrinogen), 악티빈 A(Activin A) 및 C-반응성 단백질(C-reactive protein, CRP)은 모두 패혈증의 마커들이고, 그들의 혈장 수준에서의 감소는 상기 MPCs의 투여 후 패혈증의 감소된 증세로 나타난다.
- [0277] MPCs로 처리된(treated) 양(sheep)은 무처리된(untreated) 양에 비해, 카바콜 또는 브래디키닌에 대한 현저하게 높은 최대 반응을 나타내었다($p<0.05$)(도 10A 및 10B). 나트륨 니트로프루시드에 대한 두 그룹에서 유래한 관상 동맥 또는 디지털 동맥의 반응에는 상당한 변화는 없었고(도 10C 및 10D), 이는 혈관 평활근(vascular smooth muscle) 기능은 치료에 의해 영향을 받지 않은 것을 나타낸 것이다. 상기 전임상적 연구(pre-clinical study)는 MPCs가 정맥 내로 제공될 경우, 전신성 내피 기능장애(systemic endothelial dysfunction)의 발생을 감소할 수 있음을 보여주었다.
- [0278] 실시예 6: PPS와 조합된 MPCs는 항-염증 효과 유도
- [0279] 방법
- [0280] 소 타입 II 콜라겐(Bovine type II collagen, BColl-II)에 대해 양(sheep)이 민감해질 수 있도록 0일차에 완전 프로인트항원보강제(Freund's complete adjuvant)의 에멀전(emulsion)(1mL)과 BColl-II(5mg)가 피하 주사로 투여되고 이어서 14일차에 불완전프로인트항원보강제(Freund's incomplete adjuvant)(1mL)와 BColl-II(5mg)가 2차 주사되었다. 28일차에 전신 염증(systemic inflammation)을 동반하는 급성 관절염을 촉진하기 위해 100 µg의

BColl-II가 함유된 0.5mL의 등장성(isotonic) 식염수가 좌측 무릎 관절에 관절 내로 주사되었다. 29일차에, 양(sheep)은 PBS에 현탁된 7천5백만 MPC(n=6) 또는 PBS에 현탁된 7천5백만 MPC(n=6) 및 75mg 펜토산 폴리설페이트(Pentosan Polysulfate, PPS)(n=6) 또는 75mg PPS가 양(sheep)에게 정맥 내 주사되었다. 13일에 걸쳐 혈액을 수집하고 혈장에서의 IL-10, 피브리노겐(fibrinogen), 악티빈 A(Activin A) 및 C-반응성 단백질(C-reactive protein, CRP)의 수준은 시판되는 ELISA 키트를 이용하여 측정되었다. 모든 동물은 42일차에 희생되었다.

[0281] 양의 디지털 동맥(Ovine digital arteries) 및 관상 동맥은 전술된 바와 같이 수득되었다. 또한, 아이소메트릭 장력 기록(isometric tension recording), 데이터 분석 및 디지털 및 관상 동맥 기능 분석은 전술된 바와 같이 수행되었다.

[0282] **결과**

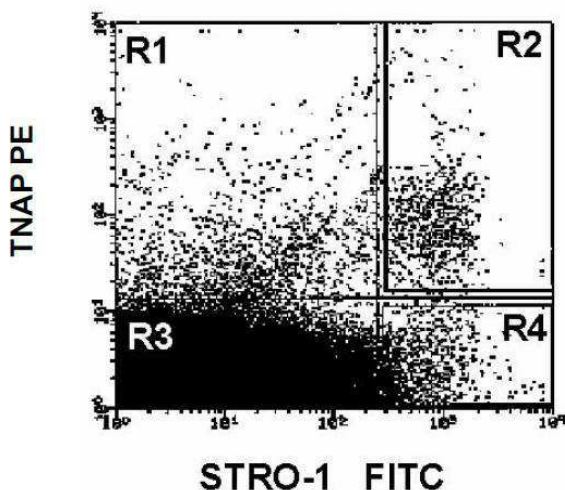
[0283] 상기 결과에 따르면 단독의 PPS에 비해 7천 500만 타가(allogenic) MPCs 및 PPS의 단일 IV 투여(single IV administration)가 혈장 IL-10 생산량의 수준을 (기준선(baseline)에 비해) 현저하게 상승시켰다(도 11). IL-10은 호중구의 순환 수준(circulating levels)을 촉진시키는 염증성 사이토카인이고 그들의 전-염증성 상태(pro-inflammantory state)를 제한하는데 도움이 된다. 이것은 결국, 폐렴과 같은 전신성 감염 질환(systemic infection disease)의 치료를 향상시키는 역할을 한다.

[0284] MPCs 또는 단독의 PPS에 비해 상기 MPCs 및 PPS의 단일 투여량은 36일로부터 혈장 피브리노겐(fibrinogen)을 감소시키는 데 효과적이었다(도 12). PPS 처리된 대조군에 비해 상기 MPC 처리된 그룹들(7천500백만 MPC±PPS) 모두에서의 악티빈 A(Activin A)의 단백질 수준이 감소되었다(도 13 및 14). 기준선에 비해 C-반응성 단백질(C-reactive protein, CRP)의 수준은 PPS 처리된 대조군에서는 그렇지 않았으나, 상기 MPC 처리된 그룹들(7천500백만 MPC±PPS) 모두에서 감소되었다. 피브리노겐(fibrinogen), 악티빈 A(Activin A) 및 C-반응성 단백질(C-reactive protein, CRP)은 모두 패혈증의 마커들이고, 상기 MPCs±PPS의 투여 후 그들의 혈장 수준에서의 감소는 패혈증의 감소된 증세로 나타난다.

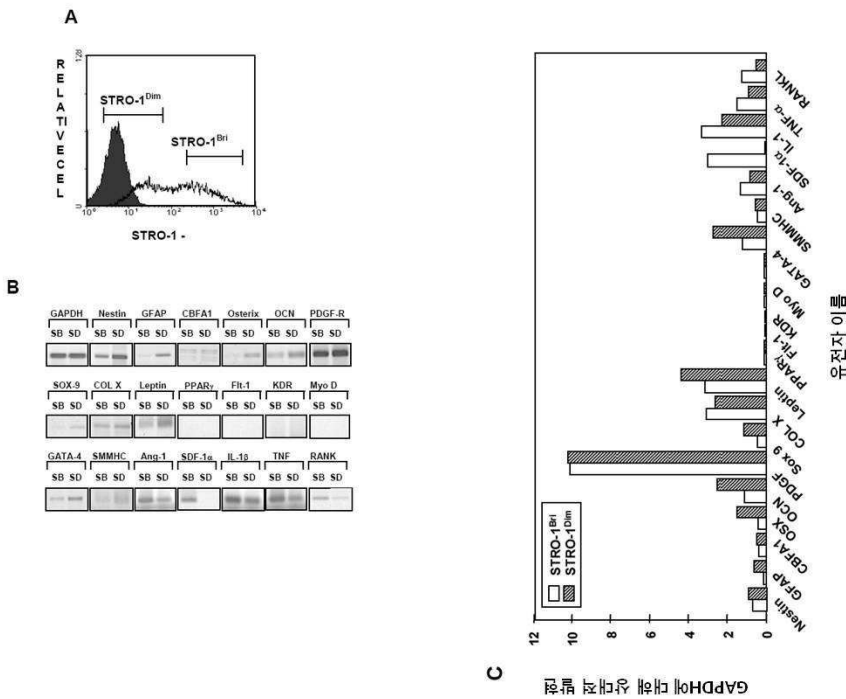
[0285] MPCs 및 PPS로 처리된(treated) 양(sheep)은 무처리된(untreated) 양에 비해, 브래디키닌에 대한 현저하게 높은 관상동맥의 최대 반응을 나타내는 것으로($p < 0.05$)(도 15A), 혈관 내피에 직접적인 유익한 효과가 있음을 나타내었다. MPC 및 PPS로 처리된 양(sheep)은 PPS로 단독 처리된 양에 비해 개선된 최대 내피-의존 이완 반응(endothelium-dependent relaxation response)을 보여주었다(도 15B). 나트륨 니트로프루시드에 대한 두 그룹에서 유래한 관상 동맥 또는 디지털 동맥의 반응에는 상당한 변화는 없었고(도 15C 및 15D), 이는 혈관 평활근(vascular smooth muscle) 기능은 처리(treatment)에 의해 영향을 받지 않은 것을 나타낸 것이다.

도면

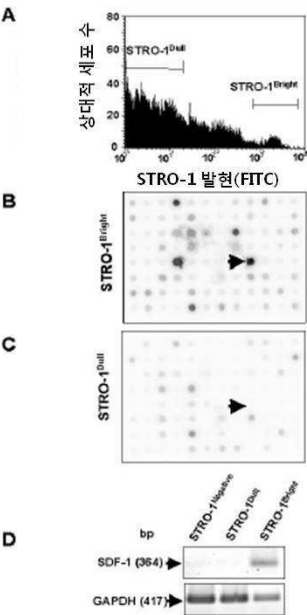
도면1



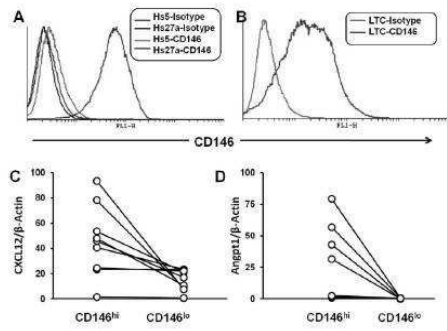
도면2



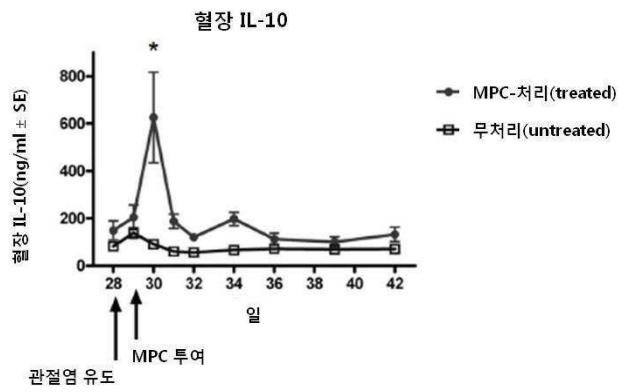
도면3



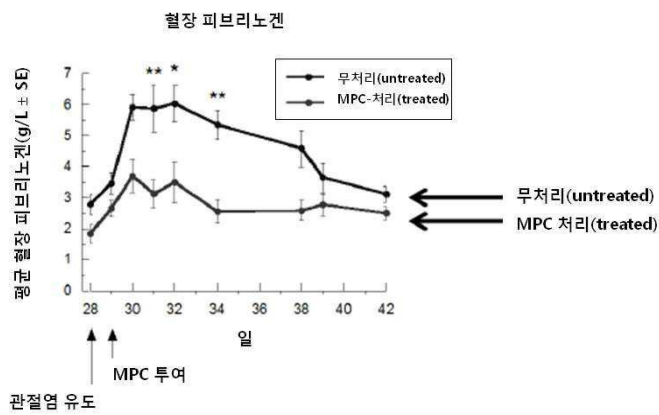
도면4



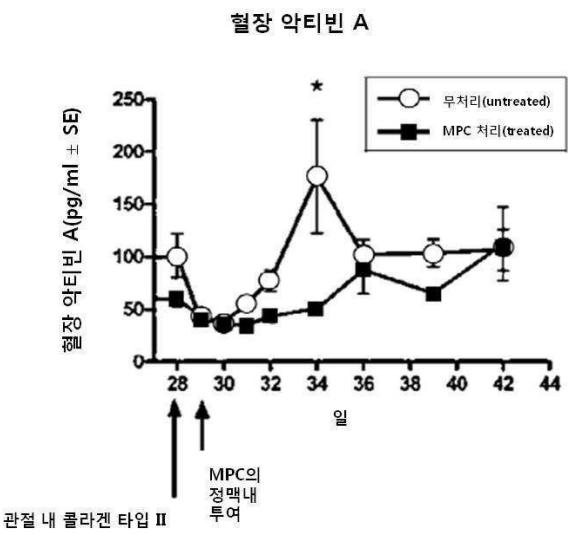
도면5



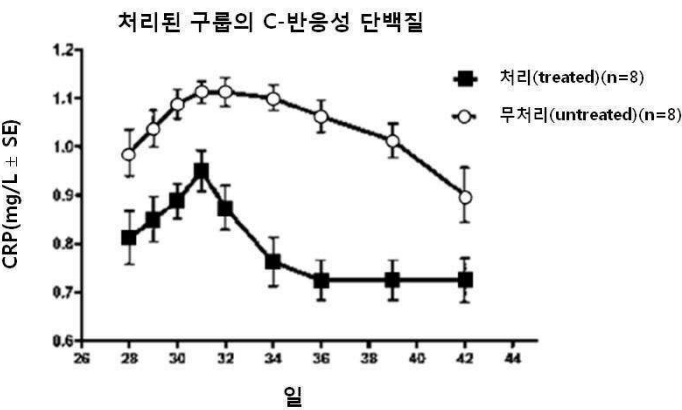
도면6



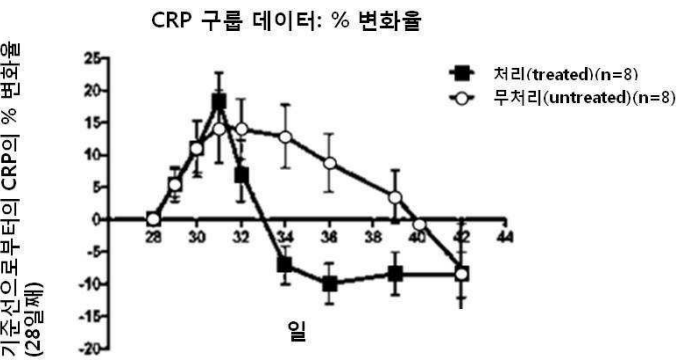
도면7



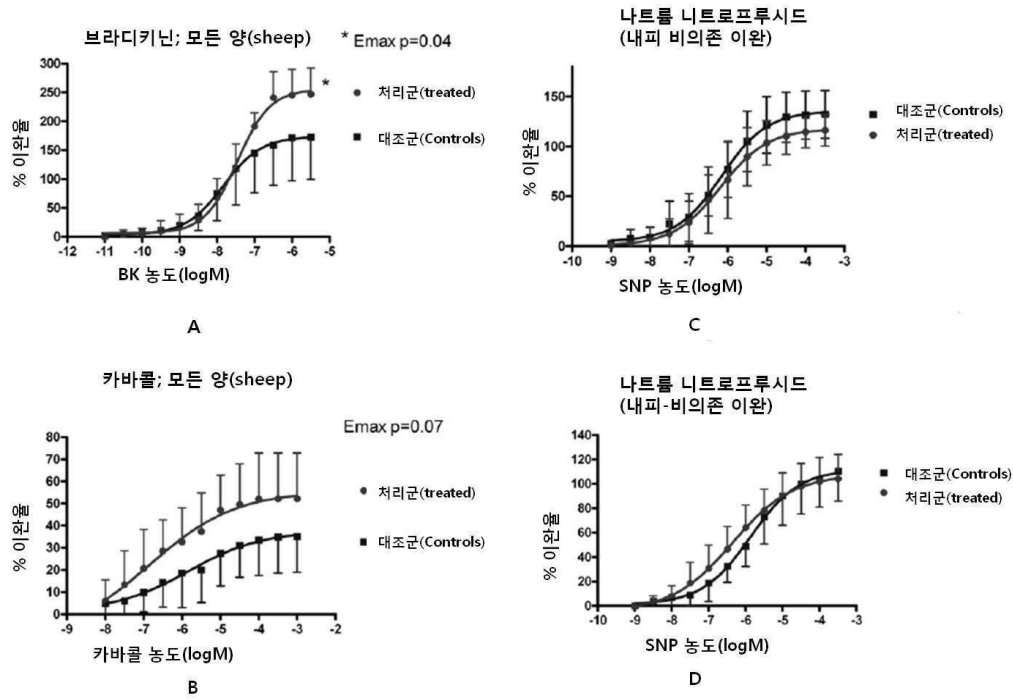
도면8



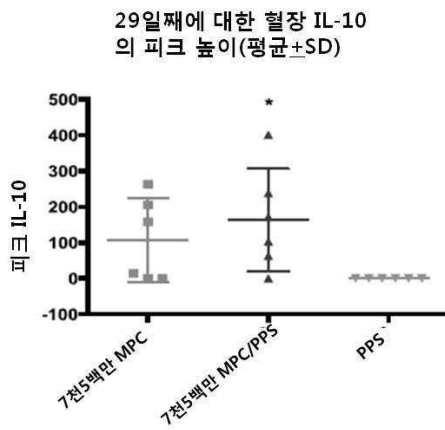
도면9



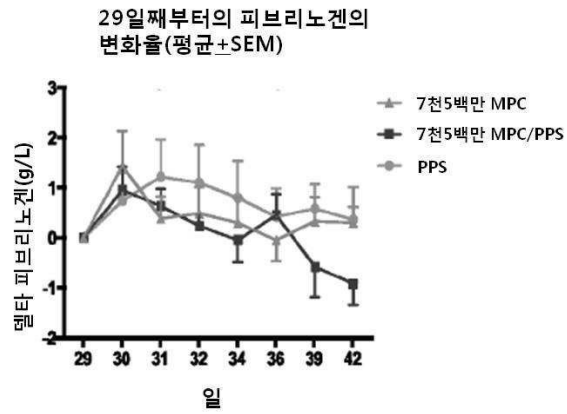
도면10



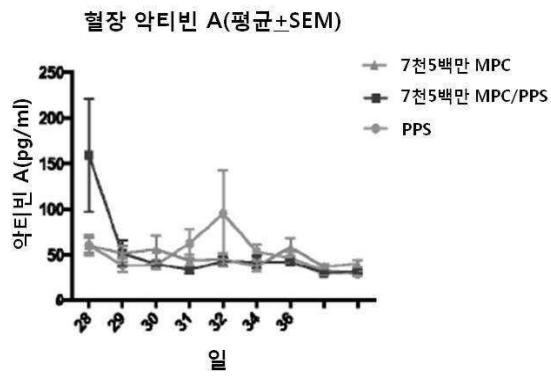
도면11



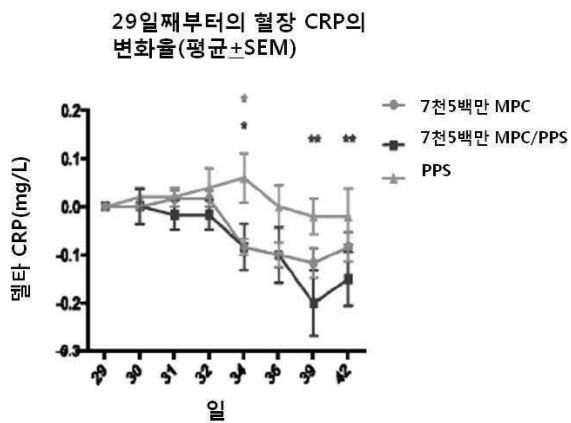
도면12



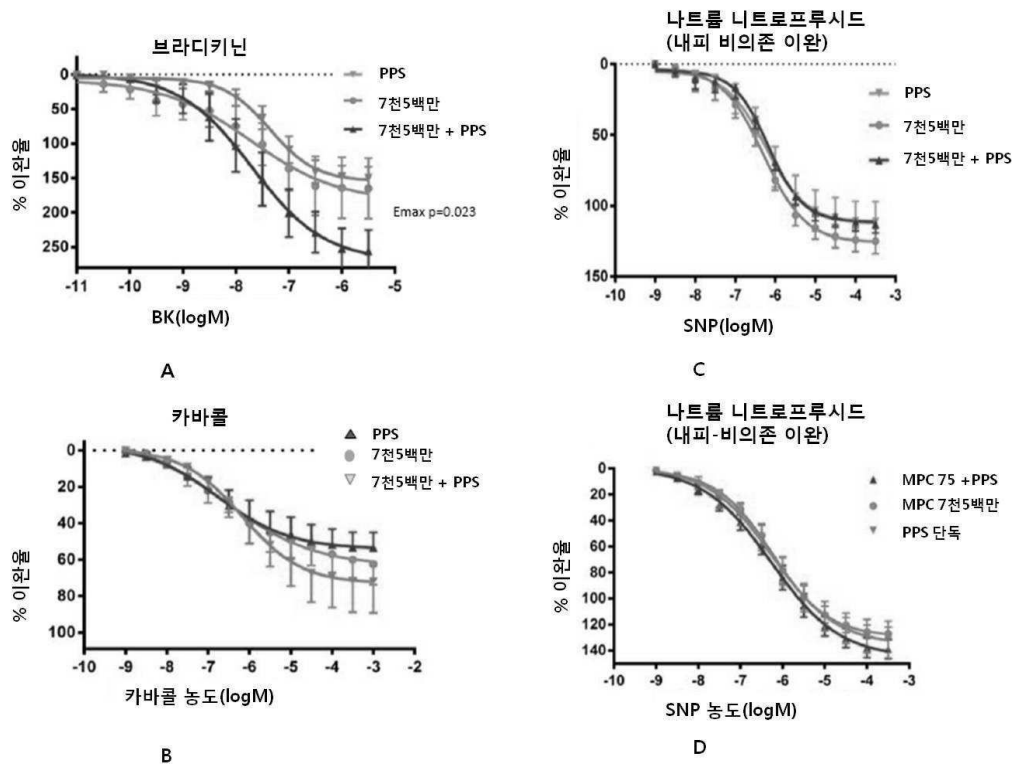
도면13



도면14



도면15



서열 목록

- <110> MESOBLAST, INC.
- <120> TREATMENT OF DISEASES OF ENDOTHELIAL DYSFUNCTION AND INFLAMMATION
- <130> PI15-B158
- <160> 36
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> GAPDH_F
- <400> 1
- cactgacacg ttggcagtgg
- <210> 2
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> GAPDH_R
- <400> 2

catggagaag gctggggctc	20
<210> 3	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> SDF-1_F	
<400> 3	
gagacccgcg ctgctccgcc	20
<210> 4	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> SDF-1_R	
<400> 4	
gctggactcc tactgtaagg g	21
<210> 5	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> IL-1 beta_F	
<400> 5	
aggaagatgc tggttccctc tc	22
<210> 6	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> IL-1 beta_R	
<400> 6	
cagttcagtg atcgtaagg tgc	23
<210> 7	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> LT-1_F
 <400> 7
 tcactatgga agatctgatt tcttacagt 29
 <210> 8
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LT-1_R
 <400> 8
 ggtataaata cacatgtgct tctag 25
 <210> 9
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TNF-alpha_F
 <400> 9
 tcagatcatc ttctcgaacc 20
 <210> 10
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TNF-alpha_R
 <400> 10
 cagatagatg ggctcatacc 20
 <210> 11
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> KDR_F
 <400> 11
 tatagatggt gtaaccgga 20
 <210> 12
 <211> 21

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> KDR_R
 <400> 12
 ttgtcactg agacagcttg g 21
 <210> 13
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> RANKL_F
 <400> 13
 aacaggcctt tcaaggagct g 21
 <210> 14
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> RANKL_R
 <400> 14
 taaggagggg ttggagacct cg 22

 <210> 15
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Leptin_F
 <400> 15
 atgcattggg aaccctgtgc 20
 <210> 16
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Leptin_R
 <400> 16
 gcacccaggg ctgaggtcca 20
 <210> 17

<211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CBFA-1_F
 <400> 17
 gtggacgagg caagagtttc a 21

<210> 18
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CBFA-1_R
 <400> 18
 tggcaggtag gtgtggtagt g 21

<210> 19
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PPARgamma2_F
 <400> 19
 aactgcgggg aaacttggga gattctcc 28

<210> 20
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PPARgamma2_R
 <400> 20
 aataataagg tggagatgca ggctcc 26

<210> 21
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> OCN_F
 <400> 21

atgagagccc tcacactcct c	21
<210> 22	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> OCN_R	
<400> 22	
cgtagaagcg ccgataggc	19
<210> 23	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> MyoD_F	
<400> 23	
aagcgccatc tcttgaggta	20
<210> 24	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> MyoD_R	
<400> 24	
gcgagaaacg tgaacctagc	20
<210> 25	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> SMMHC_F	
<400> 25	
ctgggcaacg tagtaaaacc	20
<210> 26	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> SMMHC_R	

<400>	26	
tatagctcat tgcagcctcg		20
<210>	27	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	GFAP_F	
<400>	27	
ctgttgccag agatggaggt t		21
<210>	28	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	GFAP_R	
<400>	28	
tcatcgctca ggaggtcctt		20
<210>	29	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Nestin_F	
<400>	29	
ggcagcgttg gaacagaggt tgga		24
<210>	30	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Nestin_R	
<400>	30	
ctctaaactg gagtggtcag ggct		24
<210>	31	
<211>	21	
<212>	DNA	

<213> Artificial Sequence
 <220><223> SOX9_F
 <400> 31
 ctctgcctgt ttggactttg t 21
 <210> 32
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SOX9_R
 <400> 32
 cctttgcttg ccttttacct c 21

 <210> 33
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Collagen type X_F
 <400> 33
 agccagggtt gccaggacca 20
 <210> 34
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Collagen type X_R
 <400> 34
 ttttccact ccaggagggc 20
 <210> 35
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> AggreCAN_F
 <400> 35

 cactgttacc gccacttccc 20
 <210> 36

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Aggrecan_R
 <400> 36

accagcggaa gtccccttcg

20