



(19)대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.

C12N 5/00 (2006.01)  
C12N 5/02 (2006.01)  
C12M 1/00 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2007-0047758  
(43) 공개일자 2007년05월07일

(21) 출원번호 10-2007-7000060

(22) 출원일자 2007년01월02일

심사청구일자 없음

번역문 제출일자 2007년01월02일

(86) 국제출원번호 PCT/IL2005/000571

(87) 국제공개번호 WO 2005/120090

국제출원일자 2005년06월01일

국제공개일자 2005년12월15일

(30) 우선권주장 60/576,266 2004년06월01일 미국(US)  
60/588,520 2004년07월15일 미국(US)

(71) 출원인 인 모션 인베스트먼트, 리미티드  
중국 홍콩 카울룬 라이치콕 타이남 웨스트 스트리트 1016-8 쉹 룡 타이 빌딩 베이스먼트

(72) 발명자 폴가 발렌틴  
이스라엘 62996 텔 아비브 헬신키 스트리트 7  
포라트 야엘  
이스라엘 45283 호드 하샤론 헤르즐 스트리트 47  
벨킨 다니  
이스라엘 54044 기바트 슈무엘 알로님 스트리트 4  
쉬모니-잘크 다프나  
이스라엘 74033 네스 지오나 고돈 스트리트 3  
포르조브 스베틀라나  
이스라엘 76251 레호보트 바-샤울 스트리트 4

(74) 대리인 박종혁  
송봉식  
김정옥  
정삼영

전체 청구항 수 : 총 176 항

(54) 줄기세포를 사용한 시험관내 기술

(57) 요약

본 방법은 (a) 혈액을 1.077 g/ml 미만의 밀도를 가진 1차 통과 세포를 선택하기에 적합한 첫 번째 구배에 적용하는 단계;  
(b) 1차 통과 세포를 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 2차 통과 세포를 선택하기에 적합한 두 번째 구배에 적용하는

단계; (c) 3 내지 30일 지속하는 기간 동안 2차 통과 세포를 배양함으로써 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 세포의 수를 증가시키는 단계; 및 (d) 배양된 세포에서 내피 전구 세포를 확인하는 단계를 포함하는 추출된 혈액을 통한 사용을 제공한다. 또한 다른 구체예들이 설명된다.

### 특허청구의 범위

#### 청구항 1.

추출된 혈액을 사용하는 방법으로서,

혈액을 1.077 g/ml 미만의 밀도를 가진 1차 통과 세포를 선택하기에 적합한 첫 번째 구배에 적용하는 단계;

1차 통과 세포를 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 2차 통과 세포를 선택하기에 적합한 두 번째 구배에 적용하는 단계;

3 내지 30일 지속하는 기간 동안 2차 통과 세포를 배양함으로써 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 세포의 수를 증가시키는 단계; 및

배양된 세포에서 내피 전구 세포를 확인하는 단계

를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 2.

제1항에 있어서, 혈액을 첫 번째 구배에 적용하는 단계는 혈액을 수크로스 및 에피클로로히드린의 코폴리머를 포함한 용액에 적용하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 3.

제1항에 있어서, 1차 통과 세포를 두 번째 구배에 적용하는 단계는 1차 통과 세포를 아이오디사놀의 수용액에 적용하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 4.

제1항에 있어서, 1차 통과 세포를 두 번째 구배에 적용하는 단계는 1차 통과 세포를 폴리비닐피롤리돈-코팅된 실리카 콜로이드를 포함한 점진적 밀도 용액에 적용하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 5.

제1항에 있어서, 혈액 세포를 첫 번째 구배에 적용하는 단계는 혈액 세포를 Ficoll-유사 구배에 적용하는 단계를 포함한다.

#### 청구항 6.

제1항에 있어서, 1차 통과 세포를 두 번째 구배에 적용하는 단계는 1차 통과 세포를 OptiPrep-유사 구배에 적용하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 7.

제1항에 있어서, 1차 통과 세포를 두 번째 구배에 적용하는 단계는 1차 통과 세포를 Percoll-유사 구배에 적용하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 8.

추출된 혈액을 사용하는 방법으로서,

줄기세포를 포함한 조직을 1.077 g/ml 미만의 밀도를 가진 1차 통과 세포를 선택하기에 적합한 첫 번째 구배에 적용하는 단계;

1차 통과 세포를 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 2차 통과 세포를 선택하기에 적합한 두 번째 구배에 적용하는 단계;

2차 통과 세포를 1.055 내지 1.068 g/ml의 밀도를 가진 3차 통과 세포를 선택하기에 적합한 세 번째 구배에 적용하는 단계;

3 내지 30일 지속하는 기간 동안 3차 통과 세포를 배양함으로써 1.055 내지 1.068 g/ml의 밀도를 가진 세포의 수를 증가시키는 단계; 및

배양된 세포에서 내피 전구 세포를 확인하는 단계

를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 9.

제8항에 있어서, 세 번째 구배는 1.059 내지 1.068 g/ml의 밀도를 가진 세포를 선택하기에 적합하고, 2차 통과 세포를 세 번째 구배에 적용하는 단계는 1.059 내지 1.068 g/ml의 밀도를 가진 세포를 선택하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 10.

추출된 혈액을 사용하는 방법으로서,

혈액을 1.077 g/ml 미만의 밀도를 가진 1차 통과 세포를 선택하기에 적합한 첫 번째 구배에 적용하는 단계;

1차 통과 세포를 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 2차 통과 세포를 선택하기에 적합한 두 번째 구배에 적용하는 단계;

혈장을 포함한 표면에 2차 통과 세포를 배양하는 단계; 및

배양된 세포에서 전구 세포를 확인하는 단계

를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 11.

제10항에 있어서, 배양하는 단계는 표면이 자가 혈장으로 코팅될 때 표면에 2차 통과 세포를 배양하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 12.

제10항에 있어서, 배양하는 단계는 표면이 동종이계 혈장 및 이종 혈장으로 구성된 목록에서 선택된 하나 이상의 혈장으로 코팅될 때 표면에 2차 통과 세포를 배양하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 13.

조직을 이용한 방법으로서, 혈장을 포함한 표면에 조직을 배양하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 14.

제13항에 있어서, 조직은 혈액을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 15.

제13항에 있어서, 혈장은 자가 혈장을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 16.

추출된 혈액을 사용하는 방법으로서,

혈액을 1.077 g/ml 미만의 밀도를 가진 1차 통과 세포를 선택하기에 적합한 첫 번째 구배에 적용하는 단계;

1차 통과 세포를 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 2차 통과 세포를 선택하기에 적합한 두 번째 구배에 적용하는 단계;

항체를 포함한 표면에 2차 통과 세포를 배양하는 단계; 및

배양된 세포에서 전구 세포를 확인하는 단계

를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 17.

제16항에 있어서, 전구 세포는 내피 전구 세포(EPC)를 포함하고, 전구 세포를 확인하는 단계는 EPC를 확인하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 18.

제16항에 있어서, 배양하는 단계는 표면이 자가 혈장으로 코팅될 때 표면에 2차 통과 세포를 배양하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 19.

제16항에 있어서, 배양하는 단계는 표면이 동종이계 혈장 및 이종 혈장으로 구성된 목록에서 선택된 하나 이상의 혈장으로 코팅될 때 표면에 2차 통과 세포를 배양하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 20.

추출된 혈액을 사용하는 방법으로서,

혈액을 1.077 g/ml 미만의 밀도를 가진 1차 통과 세포를 선택하기에 적합한 첫 번째 구배에 적용하는 단계;

1차 통과 세포를 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 2차 통과 세포를 선택하기에 적합한 두 번째 구배에 적용하는 단계;

콜라겐 또는 피브로넥틴 이외에 성장-중대 분자를 포함한 표면에 2차 통과 세포를 배양하는 단계; 및

배양된 세포에서 전구 세포를 확인하는 단계

를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 21.

제20항에 있어서, 전구 세포는 내피 전구 세포(EPC)를 포함하고, 전구 세포를 확인하는 단계는 EPC를 확인하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 22.

제20항에 있어서, 2차 통과 세포를 배양하는 단계는 성장-중대 분자뿐만 아니라 콜라겐 및 피브로넥틴 중 하나 이상을 포함한 표면에 2차 통과 세포를 배양하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 23.

추출된 혈액을 사용하는 방법으로서,

혈액을 1.077 g/ml 미만의 밀도를 가진 1차 통과 세포를 선택하기에 적합한 첫 번째 구배에 적용하는 단계;

1차 통과 세포를 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 2차 통과 세포를 선택하기에 적합한 두 번째 구배에 적용하는 단계;

1 내지 5일 지속하는 기간 동안 5% 이하의 혈청을 포함한 배양 배지에 2차 통과 세포를 배양하는 단계; 및

배양된 세포에서 전구 세포를 확인하는 단계

를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 24.

제23항에 있어서, 전구 세포는 내피 전구 세포(EPC)를 포함하고, 전구 세포를 확인하는 단계는 EPC를 확인하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 25.

추출된 혈액을 사용하는 방법으로서,

혈액을 1.077 g/ml 미만의 밀도를 가진 1차 통과 세포를 선택하기에 적합한 첫 번째 구배에 적용하는 단계;

1차 통과 세포를 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 2차 통과 세포를 선택하기에 적합한 두 번째 구배에 적용하는 단계;

1 내지 5일 지속하는 기간 동안 10%를 넘는 혈청을 포함한 배양 배지에 2차 통과 세포를 배양하는 단계; 및

배양된 세포에서 전구 세포를 확인하는 단계

를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 26.

제25항에 있어서, 전구 세포는 내피 전구 세포(EPC)를 포함하고, 전구 세포를 확인하는 단계는 EPC를 확인하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 27.

제25항에 있어서, 2차 통과 세포를 배양하는 단계는 2차 통과 세포를 20% 미만의 혈청을 포함한 배양 배지에 배양하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 28.

추출된 혈액을 사용하는 방법으로서,

혈액을 1.077 g/ml 미만의 밀도를 가진 1차 통과 세포를 선택하기에 적합한 첫 번째 구배에 적용하는 단계;

1차 통과 세포를 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 2차 통과 세포를 선택하기에 적합한 두 번째 구배에 적용하는 단계;

저혈청 시간 기간 동안, 10% 미만의 혈청을 포함한 배양 배지에 2차 통과 세포를 배양하는 단계;

고혈청 시간 기간 동안, 10% 이상의 혈청을 포함한 배양 배지에 2차 통과 세포를 배양하는 단계; 및

배양된 세포에서 전구 세포를 확인하는 단계

를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 29.

제28항에 있어서, 전구 세포는 내피 전구 세포(EPC)를 포함하고, 전구 세포를 확인하는 단계는 EPC를 확인하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 30.

제28항에 있어서, 저혈청 시간 기간 동안 2차 통과 세포를 배양하는 단계는 5% 이하의 혈청을 포함한 배양 배지에 2차 통과 세포를 배양하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 31.

제28항에 있어서, 저혈청 시간 기간 동안 2차 통과 세포를 배양하는 단계는 무혈청 배양 배지에 2차 통과 세포를 배양하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 32.

제28항에 있어서, 저혈청 시간 기간 동안 2차 통과 세포를 배양하는 단계는 1 내지 5일의 기간 동안 2차 통과 세포를 배양하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 33.

제28항에 있어서, 고혈청 시간 기간 동안 2차 통과 세포를 배양하는 단계는 1 내지 30일의 기간 동안 2차 통과 세포를 배양하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 34.

제28항에 있어서, 저혈청 시간 기간 동안 2차 통과 세포를 배양하는 단계는 고혈청 시간 기간 동안 2차 통과 세포를 배양하는 단계 전에 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 35.

제28항에 있어서, 저혈청 시간 기간 동안 2차 통과 세포를 배양하는 단계는 고혈청 시간 기간 동안 2차 통과 세포를 배양하는 단계 후에 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 36.

추출된 혈액을 사용하는 방법으로서,

혈액을 1.077 g/ml 미만의 밀도를 가진 1차 통과 세포를 선택하기에 적합한 첫 번째 구배에 적용하는 단계;

1차 통과 세포를 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 2차 통과 세포를 선택하기에 적합한 두 번째 구배에 적용하는 단계;

2시간 이상 지속하는 저산소 시간 기간 동안, 저산소 상태 하에 2차 통과 세포를 배양하는 단계;

1일 이상 지속하는 비-저산소 시간 기간 동안, 비-저산소 상태 하에 2차 통과 세포를 배양하는 단계; 및  
배양된 세포에서 전구 세포를 확인하는 단계  
를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 37.

제36항에 있어서, 전구 세포는 내피 전구 세포(EPC)를 포함하고, 전구 세포를 확인하는 단계는 EPC를 확인하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 38.

제36항에 있어서, 저산소 및 비-저산소 시간 기간은 30일 미만 지속하는 배양 시간 기간 내에 있고, 저산소 상태 하에 2차 통과 세포를 배양하는 단계는 배양 시간 기간의 첫 번째 2일 동안 저산소 상태 하에 2차 통과 세포를 배양하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 39.

제36항에 있어서, 저산소 및 비-저산소 시간 기간은 30일 미만 지속하는 배양 시간 기간 내에 있고, 저산소 상태 하에 2차 통과 세포를 배양하는 단계는 배양 시간 기간의 마지막 2일 동안 저산소 상태 하에 2차 통과 세포를 배양하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 40.

제36항에 있어서, 저산소 및 비-저산소 시간 기간은 30일 미만 지속하는 배양 시간 기간 내에 있고, 저산소 상태 하에 2차 통과 세포를 배양하는 단계는 배양 시간 기간의 첫 번째 2일과 마지막 2일 사이에 2시간 이상 동안 저산소 상태 하에 2차 통과 세포를 배양하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 41.

제36항에 있어서, 저산소 상태 하에 2차 통과 세포를 배양하는 단계는 비-저산소 상태 하에 2차 통과 세포를 배양하는 단계 전에 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 42.

제36항에 있어서, 저산소 상태 하에 2차 통과 세포를 배양하는 단계는 비-저산소 상태 하에 2차 통과 세포를 배양하는 단계 후에 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 43.

추출된 혈액을 사용하는 방법으로서,

혈액을 첫 번째 원하는 밀도 범위를 가진 세포를 선택하기 위한 구배에 적용하는 단계;



에스트로겐을 포함한 배지 및 이어서 프로게스틴을 포함한 배지에 선택된 세포를 배양함으로써 두 번째 원하는 밀도 범위를 가진 세포의 수를 증가시키는 단계; 및

배양된 세포에서 전구 세포를 확인하는 단계

를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 44.

추출된 혈액을 사용하는 방법으로서,

혈액을 첫 번째 원하는 밀도 범위를 가진 세포를 선택하기 위한 구배에 적용하는 단계;

프로게스틴을 포함한 배지 및 이어서 에스트로겐을 포함한 배지에 선택된 세포를 배양함으로써 두 번째 원하는 밀도 범위를 가진 세포의 수를 증가시키는 단계; 및

배양된 세포에서 전구 세포를 확인하는 단계

를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 45.

추출된 혈액을 사용하는 방법으로서,

혈액을 첫 번째 원하는 밀도 범위를 가진 세포를 선택하기 위한 구배에 적용하는 단계;

에스트로겐 및 프로게스틴을 포함한 배지에 선택된 세포를 배양함으로써 두 번째 원하는 밀도 범위를 가진 세포의 수를 증가시키는 단계; 및

배양된 세포에서 전구 세포를 확인하는 단계

를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 46.

제43항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 전구 세포는 내피 전구 세포(EPC)를 포함하고, 전구 세포를 확인하는 단계는 EPC를 확인하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 47.

제43항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 프로게스틴은 프로게스테론을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 48.

제43항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 에스트로겐은 에스트라디올을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 49.**

제43항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 배양하는 단계는 3 내지 30일 지속하는 기간 동안 배양하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 50.**

추출된 혈액을 사용하는 방법으로서,

혈액을 1.077 g/ml 미만의 밀도를 가진 1차 통과 세포를 선택하기에 적합한 첫 번째 구배에 적용하는 단계;

1차 통과 세포를 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 2차 통과 세포를 선택하기에 적합한 두 번째 구배에 적용하는 단계;

5%를 넘는 CO<sub>2</sub> 수준을 특징으로 하는, 2시간 이상 지속하는 고탄산가스 시간 기간 동안, 고탄산가스 상태 하에 2차 통과 세포를 배양하는 단계;

5% 이하의 CO<sub>2</sub> 수준을 특징으로 하는, 1일 이상 지속하는 비-고탄산가스 시간 기간 동안, 비-고탄산가스 상태 하에 2차 통과 세포를 배양하는 단계; 및

배양된 세포에서 전구 세포를 확인하는 단계

를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 51.**

제50항에 있어서, 전구 세포는 내피 전구 세포(EPC)를 포함하고, 전구 세포를 확인하는 단계는 EPC를 확인하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 52.**

제50항에 있어서, 고탄산가스 시간 기간 동안 CO<sub>2</sub> 수준이 6% 이상이 되도록 설정하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 53.**

제50항에 있어서, 고탄산가스 및 비-고탄산가스 시간 기간은 30일 미만 지속하는 배양 시간 기간 내에 있고, 고탄산가스 상태 하에 2차 통과 세포를 배양하는 단계는 배양 시간 기간의 첫 번째 2일 동안 고탄산가스 상태 하에 2차 통과 세포를 배양하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 54.**

제50항에 있어서, 고탄산가스 및 비-고탄산가스 시간 기간은 30일 미만 지속하는 배양 시간 기간 내에 있고, 고탄산가스 상태 하에 2차 통과 세포를 배양하는 단계는 배양 시간 기간의 마지막 2일 동안 고탄산가스 상태 하에 2차 통과 세포를 배양하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 55.

제50항에 있어서, 고탄산가스 및 비-고탄산가스 시간 기간은 30일 미만 지속하는 배양 시간 기간 내에 있고, 고탄산가스 상태 하에 2차 통과 세포를 배양하는 단계는 배양 시간 기간의 첫 번째 2일과 마지막 2일 사이에 2시간 이상 동안 고탄산가스 상태 하에 2차 통과 세포를 배양하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 56.

제50항에 있어서, 고탄산가스 상태 하에 2차 통과 세포를 배양하는 단계는 비-고탄산가스 상태 하에 2차 통과 세포를 배양하는 단계 전에 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 57.

제50항에 있어서, 고탄산가스 상태 하에 2차 통과 세포를 배양하는 단계는 비-고탄산가스 상태 하에 2차 통과 세포를 배양하는 단계 후에 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 58.

추출된 혈액을 사용하는 방법으로서,

혈액을 1.077 g/ml 미만의 밀도를 가진 1차 통과 세포를 선택하기에 적합한 첫 번째 구배에 적용하는 단계;

1차 통과 세포를 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 2차 통과 세포를 선택하기에 적합한 두 번째 구배에 적용하는 단계;

에리트로포이에틴, VEGF, IGF, FGF, 에스트로젠, 17- $\beta$ -에스트라디올, 에스트론, 에스트리올, 에스트라디올 유도체, 에스트라디올 길초산, 에스트라디올 사이피오네이트, 메스트라놀, 퀴네스톨, 프로게스틴, 프로게스틴-페밀리 분자, 프로게스테론, 합성 프로게스테론, 히드록시프로게스테론 카로에이트, 메드록시프로게스테론 아세트산, 스타틴, 심바스타틴, 아토바스타틴, 항당뇨병제, 및 로시글리타존; 및

배양된 세포에서 전구 세포를 확인하는 단계

를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 59.

제58항에 있어서, 전구 세포는 내피 전구 세포(EPC)를 포함하고, 전구 세포를 확인하는 단계는 EPC를 확인하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 60.

추출된 혈액을 사용하는 방법으로서,

줄기세포를 포함한 조직을 1.077 g/ml 미만의 밀도를 가진 1차 통과 세포를 선택하기에 적합한 첫 번째 구배에 적용하는 단계;

1차 통과 세포를 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 2차 통과 세포를 선택하기에 적합한 두 번째 구배에 적용하는 단계;

3 내지 30일 지속하는 기간 동안 2차 통과 세포를 배양함으로써 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 세포의 수를 증가시키는 단계; 및

배양된 세포에서 전구 세포를 확인하는 단계

를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 61.

제60항에 있어서, 전구 세포는 내피 전구 세포(EPC)를 포함하고, 전구 세포를 확인하는 단계는 EPC를 확인하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 62.

제60항에 있어서, 조직을 적용하는 단계는 제대혈을 첫 번째 구매에 적용하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 63.

제60항에 있어서, 조직을 적용하는 단계는 배아 세포를 첫 번째 구매에 적용하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 64.

제60항에 있어서, 조직을 적용하는 단계는 태반 세포를 첫 번째 구매에 적용하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 65.

제60항에 있어서, 조직을 적용하는 단계는 태아 세포를 첫 번째 구매에 적용하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 66.

제60항에 있어서, 골수로부터 줄기세포를 추출하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 67.

제60항에 있어서, 줄기세포의 추출을 촉진하기 위해서 골수로부터 줄기세포를 이동하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 68.

제60항에 있어서, 말초 혈액으로부터 줄기세포를 추출하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 69.

제60항에 있어서, 2차 통과 세포를 배양하는 단계는

첫 번째 부분의 기간 동안 첫 번째 용기에 2차 통과 세포를 배양하는 단계;

첫 번째 부분의 기간의 말에 첫 번째 용기로부터 2차 통과 세포 중 적어도 일부를 제거하는 단계; 및

두 번째 부분의 기간 동안 두 번째 용기에서 첫 번째 용기로부터 제거된 세포를 배양하는 단계

를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 70.

제69항에 있어서, 2차 통과 세포의 적어도 일부를 제거하는 단계는 첫 번째 용기의 표면에 부착된 세포를 제거하기 위해서 선택하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 71.

제69항에 있어서, 2차 통과 세포의 적어도 일부를 제거하는 단계는 첫 번째 용기의 표면에 부착되지 않은 세포를 제거하기 위해서 선택하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 72.

제69항에 있어서, 첫 번째 용기는 그것의 표면에 성장-증대 분자를 포함하고, 첫 번째 용기에 세포를 배양하는 단계는 성장-증대 분자를 포함한 첫 번째 용기에 세포를 배양하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 73.

제72항에 있어서, 성장-증대 분자는 혈장, 콜라겐, 피브로넥틴, 성장 인자 및 줄기세포 표면 수용체에 대한 항체로 구성된 목록에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 74.

제69항에 있어서, 두 번째 용기는 그것의 표면에 성장-증대 분자를 포함하고, 두 번째 용기에 세포를 배양하는 단계는 성장-증대 분자를 포함한 두 번째 용기에 세포를 배양하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 75.

제74항에 있어서, 성장-증대 분자는 혈장, 콜라겐, 피브로넥틴, 성장 인자 및 줄기세포 표면 수용체에 대한 항체로 구성된 목록에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 76.

상태를 치료하는 방법으로서, 피험체의 말초 신경의 조직, 피험체의 중추신경계 신경의 조직, 피험체의 시신경, 피험체의 맥락막 조직, 피험체의 망막 조직, 피험체의 하위-망막 공간, 피험체의 각막 조직, 피험체의 신장 조직, 피험체의 손상된 뼈의 조직, 피험체의 골절된 뼈의 조직, 피험체의 염증이 있는 조직, 피험체의 감염된 조직, 피험체의 멍든 조직, 피험체의 피부의 손상된, 궤양 또는 상처입은 조직, 피험체의 뇌 조직, 피험체의 사지의 조직, 피부 이식의 조직 및 피험체의 재부착된 중증 사지의 조직으로 구성된 목록에서 선택된 피험체의 조직 또는 공간 부근에 내피 전구 세포(EPC)를 적용하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 77.

제76항에 있어서,

혈액을 1.077 g/ml 미만의 밀도를 가진 1차 통과 세포를 선택하기에 적합한 첫 번째 구배에 적용하는 단계;

1차 통과 세포를 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 2차 통과 세포를 선택하기에 적합한 두 번째 구배에 적용하는 단계; 및

3 내지 30일 지속하는 기간 동안 2차 통과 세포를 배양함으로써 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 세포의 수를 증가시키는 단계

에 의하여 EPC를 생성하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 78.

제76항에 있어서,

줄기세포를 포함한 조직을 1.077 g/ml 미만의 밀도를 가진 1차 통과 세포를 선택하기에 적합한 첫 번째 구배에 적용하는 단계;

1차 통과 세포를 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 2차 통과 세포를 선택하기에 적합한 두 번째 구배에 적용하는 단계;

2차 통과 세포를 1.055 내지 1.068 g/ml의 밀도를 가진 3차 통과 세포를 선택하기에 적합한 세 번째 구배에 적용하는 단계; 및

3 내지 30일 지속하는 기간 동안 3차 통과 세포를 배양함으로써 1.055 내지 1.068 g/ml의 밀도를 가진 세포의 수를 증가시키는 단계

에 의하여 EPC를 생성하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 79.

제76항에 있어서,

혈액을 1.077 g/ml 미만의 밀도를 가진 1차 통과 세포를 선택하기에 적합한 첫 번째 구배에 적용하는 단계;

1차 통과 세포를 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 2차 통과 세포를 선택하기에 적합한 두 번째 구배에 적용하는 단계; 및

2차 통과 세포를 항체를 포함한 표면에 배양하는 단계

에 의하여 EPC를 생성하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 80.

제76항에 있어서,

혈액을 1.077 g/ml 미만의 밀도를 가진 1차 통과 세포를 선택하기에 적합한 첫 번째 구배에 적용하는 단계;

1차 통과 세포를 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 2차 통과 세포를 선택하기에 적합한 두 번째 구배에 적용하는 단계; 및

2차 통과 세포를 콜라겐 또는 피브로넥틴 이외에 성장-증대 분자를 포함한 표면에 배양하는 단계

에 의하여 EPC를 생성하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 81.

제76항에 있어서,

혈액을 1.077 g/ml 미만의 밀도를 가진 1차 통과 세포를 선택하기에 적합한 첫 번째 구배에 적용하는 단계;

1차 통과 세포를 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 2차 통과 세포를 선택하기에 적합한 두 번째 구배에 적용하는 단계; 및

2차 통과 세포를 5% 이하의 혈청을 포함한 배양 배지에 1 내지 5일 지속하는 기간 동안 배양하는 단계

에 의하여 EPC를 생성하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 82.

제76항에 있어서,

혈액을 1.077 g/ml 미만의 밀도를 가진 1차 통과 세포를 선택하기에 적합한 첫 번째 구배에 적용하는 단계;

1차 통과 세포를 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 2차 통과 세포를 선택하기에 적합한 두 번째 구배에 적용하는 단계; 및

2차 통과 세포를 10%를 넘는 혈청을 포함한 배양 배지에 1 내지 5일 지속하는 기간 동안 배양하는 단계

에 의하여 EPC를 생성하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 83.

제76항에 있어서,

혈액을 1.077 g/ml 미만의 밀도를 가진 1차 통과 세포를 선택하기에 적합한 첫 번째 구배에 적용하는 단계;

1차 통과 세포를 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 2차 통과 세포를 선택하기에 적합한 두 번째 구배에 적용하는 단계;

저혈청 시간 기간 동안, 2차 통과 세포를 10% 미만의 혈청을 포함한 배양 배지에 배양하는 단계; 및

고혈청 시간 기간 동안, 2차 통과 세포를 10% 이상의 혈청을 포함한 배양 배지에 배양하는 단계

에 의하여 EPC를 생성하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 84.

제76항에 있어서,

혈액을 1.077 g/ml 미만의 밀도를 가진 1차 통과 세포를 선택하기에 적합한 첫 번째 구배에 적용하는 단계;

1차 통과 세포를 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 2차 통과 세포를 선택하기에 적합한 두 번째 구배에 적용하는 단계;

2시간 이상 지속하는 저산소 시간 기간 동안, 저산소 상태 하에 2차 통과 세포를 배양하는 단계; 및

1일 이상 지속하는 비-저산소 시간 기간 동안, 비-저산소 상태 하에 2차 통과 세포를 배양하는 단계

에 의하여 EPC를 생성하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 85.

제76항에 있어서,

혈액을 1.077 g/ml 미만의 밀도를 가진 1차 통과 세포를 선택하기에 적합한 첫 번째 구배에 적용하는 단계;

1차 통과 세포를 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 2차 통과 세포를 선택하기에 적합한 두 번째 구배에 적용하는 단계;

5%를 넘는 CO<sub>2</sub> 수준을 특징으로 하는, 2시간 이상 지속하는 고탄산가스 시간 기간 동안, 고탄산가스 상태 하에 2차 통과 세포를 배양하는 단계; 및

5% 이하의 CO<sub>2</sub> 수준을 특징으로 하는, 1일 이상 지속하는 비-고탄산가스 시간 기간 동안, 비-고탄산가스 상태 하에 2차 통과 세포를 배양하는 단계

에 의하여 EPC를 생성하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 86.

제76항에 있어서,

혈액을 1.077 g/ml 미만의 밀도를 가진 1차 통과 세포를 선택하기에 적합한 첫 번째 구배에 적용하는 단계;



1차 통과 세포를 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 2차 통과 세포를 선택하기에 적합한 두 번째 구배에 적용하는 단계;

에리트로포이에틴, 에스트로겐, 에스트로겐 패밀리 분자, 17- $\beta$ -에스트라디올, 에스트론, 에스트리올, 에스트라디올 유도체, 에스트라디올 길초산, 에스트라디올 사이피오네이트, 메스트라놀, 퀴네스톨, 프로게스틴, 프로게스틴-패밀리 분자, 프로게스테론, 합성 프로게스테론, 히드록시프로게스테론 카로에이트, 메드록시프로게스테론 아세트산, 스타틴, 심바스타틴, 아토바스타틴, 항당뇨병제, 및 로시글리타존;

줄기세포를 포함한 조직을 1.077 g/ml 미만의 밀도를 가진 1차 통과 세포를 선택하기에 적합한 첫 번째 구배에 적용하는 단계;

1차 통과 세포를 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 2차 통과 세포를 선택하기에 적합한 두 번째 구배에 적용하는 단계; 및

3 내지 30일 지속하는 기간 동안 2차 통과 세포를 배양함으로써 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 세포의 수를 증가시키는 단계

에 의하여 EPC를 생성하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 87.

추출된 혈액을 사용하는 방법으로서,

혈액을 1.077 g/ml 미만의 밀도를 가진 1차 통과 세포를 선택하기에 적합한 첫 번째 구배에 적용하는 단계;

1차 통과 세포를 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 2차 통과 세포를 선택하기에 적합한 두 번째 구배에 적용하는 단계;

1 내지 30일 지속하는 기간 동안 2차 통과 세포를 배양함으로써 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 세포의 수를 증가시키는 단계; 및

배양된 세포에서 전구 세포를 확인하는 단계

를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 88.

제87항에 있어서, 전구 세포는 내피 전구 세포(EPC)를 포함하고, 전구 세포를 확인하는 단계는 EPC를 확인하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 89.

추출된 혈액을 사용하는 방법으로서,

혈액을 1.077 g/ml 미만의 밀도를 가진 1차 통과 세포를 선택하기에 적합한 첫 번째 구배에 적용하는 단계;

1차 통과 세포를 각각 그것의 첫 번째 및 두 번째 부분으로 나누는 단계;

1차 통과 세포의 첫 번째 부분을 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 2차 통과 세포를 선택하기에 적합한 두 번째 구배에 적용하는 단계;

1차 통과 세포의 두 번째 부분을 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 세포와 혼합하는 단계;

3 내지 30일 지속하는 기간 동안 2차 통과 세포를 배양함으로써 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 세포의 수를 증가시키는 단계; 및

배양된 세포에서 전구 세포를 확인하는 단계

를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 90.

제89항에 있어서, 전구 세포는 내피 전구 세포(EPC)를 포함하고, 전구 세포를 확인하는 단계는 EPC를 확인하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 91.

제89항에 있어서, 1차 통과 세포를 나누는 단계는 첫 번째 부분이 두 번째 부분 보다 크도록 설정하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 92.

제89항에 있어서, 1차 통과 세포를 나누는 단계는 첫 번째 부분이 두 번째 부분 보다 작도록 설정하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 93.

추출된 혈액을 사용하는 방법으로서,

혈액을 첫 번째 원하는 밀도 범위를 가진 세포를 선택하기 위한 구배에 적용하는 단계;

3 내지 30일 지속하는 기간 동안 선택된 세포를 배양함으로써 두 번째 원하는 밀도 범위를 가진 세포의 수를 증가시키는 단계; 및

배양된 세포에서 전구 세포를 확인하는 단계

를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 94.

제93항에 있어서, 전구 세포는 내피 전구 세포(EPC)를 포함하고, 전구 세포를 확인하는 단계는 EPC를 확인하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 95.

제93항에 있어서, 혈액을 구배에 적용하는 단계는 혈액을 1.077 g/ml 미만의 밀도를 가진 세포를 선택하기에 적합한 구배에 적용하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 96.

제93항에 있어서, 혈액을 구배에 적용하는 단계는 혈액을 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 세포를 선택하기에 적합한 구배에 적용하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 97.

제93항에 있어서, 세포의 수를 증가시키는 단계는 4 내지 8일 지속하는 기간 동안 세포를 배양하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 98.

제93항에 있어서, 혈액을 구배에 적용하는 단계는 혈액을 수크로스 및 에피클로로히드린의 코폴리머를 포함한 용액에 적용하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 99.

제93항에 있어서, 혈액을 구배에 적용하는 단계는 혈액을 폴리비닐피롤리돈-코팅된 실리카 콜로이드를 포함한 점진적 밀도 용액에 적용하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 100.

제93항에 있어서, 혈액을 구배에 적용하는 단계는 혈액을 아이오디사놀의 수용액에 적용하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 101.

제93항에 있어서, 혈액을 구배에 적용하는 단계는 혈액을 Ficoll-유사 구배에 적용하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 102.

제93항에 있어서, 혈액을 구배에 적용하는 단계는 혈액을 OptiPrep-유사 구배에 적용하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 103.

제93항에 있어서, 혈액을 구배에 적용하는 단계는 혈액을 Percoll-유사 구배에 적용하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 104.

추출된 혈액을 사용하는 방법으로서,

혈액을 원하는 밀도 범위를 가진 세포를 선택하기 위한 구배에 적용하는 단계;

자가 혈장을 포함한 표면에 3 내지 30일 지속하는 기간 동안 선택된 세포를 배양하는 단계; 및

배양된 세포에서 전구 세포를 확인하는 단계

를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 105.

제104항에 있어서, 전구 세포는 내피 전구 세포(EPC)를 포함하고, 전구 세포를 확인하는 단계는 EPC를 확인하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 106.

추출된 혈액을 사용하는 방법으로서,

혈액을 원하는 밀도 범위를 가진 세포를 선택하기 위한 구배에 적용하는 단계;

항체를 포함한 표면에 선택된 세포를 배양하는 단계; 및

배양된 세포에서 전구 세포를 확인하는 단계

를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 107.

제106항에 있어서, 전구 세포는 내피 전구 세포(EPC)를 포함하고, 전구 세포를 확인하는 단계는 EPC를 확인하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 108.

제104항 또는 제106항에 있어서, 혈액을 구배에 적용하는 단계는 혈액을 1.077 g/ml 미만의 밀도를 가진 세포를 선택하기에 적합한 구배에 적용하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 109.

제104항 또는 제106항에 있어서, 혈액을 구배에 적용하는 단계는 혈액을 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 세포를 선택하기에 적합한 구배에 적용하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 110.**

제106항에 있어서, 배양하는 단계는 표면이 자가 혈장으로 코팅될 때 표면에 세포를 배양하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 111.**

제106항에 있어서, 배양하는 단계는 표면이 동종이계 혈장 및 이종 혈장으로 구성된 목록에서 선택된 하나 이상의 혈장으로 코팅될 때 표면에 세포를 배양하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 112.**

추출된 혈액을 사용하는 방법으로서,

혈액을 원하는 밀도 범위를 가진 세포를 선택하기 위한 구배에 적용하는 단계;

콜라겐 또는 피브로넥틴 이외에 성장-증대 분자를 포함한 표면에 선택된 세포를 배양하는 단계; 및

배양된 세포에서 전구 세포를 확인하는 단계

를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 113.**

제112항에 있어서, 전구 세포는 내피 전구 세포(EPC)를 포함하고, 전구 세포를 확인하는 단계는 EPC를 확인하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 114.**

제112항에 있어서, 혈액을 구배에 적용하는 단계는 혈액을 1.077 g/ml 미만의 밀도를 가진 세포를 선택하기에 적합한 구배에 적용하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 115.**

제112항에 있어서, 혈액을 구배에 적용하는 단계는 혈액을 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 세포를 선택하기에 적합한 구배에 적용하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 116.**

제112항에 있어서, 세포를 배양하는 단계는 성장-증대 분자뿐만 아니라 콜라겐 및 피브로넥틴 중 하나 이상을 포함하는 표면에 세포를 배양하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 117.**

추출된 혈액을 사용하는 방법으로서,

혈액을 원하는 밀도 범위를 가진 세포를 선택하기 위한 구배에 적용하는 단계;

5% 이하의 혈청을 포함한 배양 배지에 1 내지 5일 지속하는 기간 동안 선택된 세포를 배양하는 단계; 및

배양된 세포에서 전구 세포를 확인하는 단계

를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 118.

제117항에 있어서, 전구 세포는 내피 전구 세포(EPC)를 포함하고, 전구 세포를 확인하는 단계는 EPC를 확인하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 119.

제117항에 있어서, 혈액을 구배에 적용하는 단계는 혈액을 1.077 g/ml 미만의 밀도를 가진 세포를 선택하기에 적합한 구배에 적용하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 120.

제117항에 있어서, 혈액을 구배에 적용하는 단계는 혈액을 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 세포를 선택하기에 적합한 구배에 적용하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 121.

추출된 혈액을 사용하는 방법으로서,

혈액을 원하는 밀도 범위를 가진 세포를 선택하기 위한 구배에 적용하는 단계;

10%를 넘는 혈청을 포함한 배양 배지에 1 내지 5일 지속하는 기간 동안 선택된 세포를 배양하는 단계; 및

배양된 세포에서 전구 세포를 확인하는 단계

를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 122.

제121항에 있어서, 전구 세포는 내피 전구 세포(EPC)를 포함하고, 전구 세포를 확인하는 단계는 EPC를 확인하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 123.

제121항에 있어서, 혈액을 구배에 적용하는 단계는 혈액을 1.077 g/ml 미만의 밀도를 가진 세포를 선택하기에 적합한 구배에 적용하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 124.**

제121항에 있어서, 혈액을 구배에 적용하는 단계는 혈액을 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 세포를 선택하기에 적합한 구배에 적용하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 125.**

제121항에 있어서, 세포를 배양하는 단계는 20% 미만의 혈청을 포함한 배양 배지에 세포를 배양하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 126.**

추출된 혈액을 사용하는 방법으로서,

혈액을 원하는 밀도 범위를 가진 세포를 선택하기 위한 구배에 적용하는 단계;

저혈청 시간 기간 동안, 10% 미만의 혈청을 포함한 배양 배지에 선택된 세포를 배양하는 단계;

고혈청 시간 기간 동안, 10% 이상의 혈청을 포함한 배양 배지에 선택된 세포를 배양하는 단계; 및

배양된 세포에서 전구 세포를 확인하는 단계

를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 127.**

제126항에 있어서, 전구 세포는 내피 전구 세포(EPC)를 포함하고, 전구 세포를 확인하는 단계는 EPC를 확인하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 128.**

제126항에 있어서, 혈액을 구배에 적용하는 단계는 혈액을 1.077 g/ml 미만의 밀도를 가진 세포를 선택하기에 적합한 구배에 적용하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 129.**

제126항에 있어서, 혈액을 구배에 적용하는 단계는 혈액을 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 세포를 선택하기에 적합한 구배에 적용하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 130.**

제126항에 있어서, 저혈청 시간 기간 동안 세포를 배양하는 단계는 5% 이하의 혈청을 포함한 배양 배지에 세포를 배양하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 131.**

제126항에 있어서, 저혈청 시간 기간 동안 세포를 배양하는 단계는 무혈청 배양 배지에 세포를 배양하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 132.

제126항에 있어서, 저혈청 시간 기간 동안 세포를 배양하는 단계는 1 내지 5일 기간 동안 세포를 배양하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 133.

제126항에 있어서, 고혈청 시간 기간 동안 세포를 배양하는 단계는 1 내지 30일 기간 동안 세포를 배양하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 134.

제126항에 있어서, 저혈청 시간 기간 동안 세포를 배양하는 단계는 고혈청 시간 기간 동안 세포를 배양하는 단계 전에 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 135.

제126항에 있어서, 저혈청 시간 기간 동안 세포를 배양하는 단계는 고혈청 시간 기간 동안 세포를 배양하는 단계 후에 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 136.

추출된 혈액을 사용하는 방법으로서,

혈액을 원하는 밀도 범위를 가진 세포를 선택하기 위한 구배에 적용하는 단계;

2시간 이상 지속하는 저산소 시간 기간 동안, 저산소 상태 하에 선택된 세포를 배양하는 단계;

1일 이상 지속하는 비-저산소 시간 기간 동안, 비-저산소 상태 하에 선택된 세포를 배양하는 단계; 및

배양된 세포에서 전구 세포를 확인하는 단계

를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 137.

제136항에 있어서, 전구 세포는 내피 전구 세포(EPC)를 포함하고, 전구 세포를 확인하는 단계는 EPC를 확인하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 138.



제136항에 있어서, 혈액을 구배에 적용하는 단계는 혈액을 1.077 g/ml 미만의 밀도를 가진 세포를 선택하기에 적합한 구배에 적용하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 139.

제136항에 있어서, 혈액을 구배에 적용하는 단계는 혈액을 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 세포를 선택하기에 적합한 구배에 적용하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 140.

제136항에 있어서, 저산소 및 비-저산소 시간 기간은 30일 미만 지속하는 배양 시간 기간 내에 있고, 저산소 상태 하에 세포를 배양하는 단계는 배양 시간 기간의 첫 번째 2일 동안 저산소 상태 하에 세포를 배양하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 141.

제136항에 있어서, 저산소 및 비-저산소 시간 기간은 30일 미만 지속하는 배양 시간 기간 내에 있고, 저산소 상태 하에 세포를 배양하는 단계는 배양 시간 기간의 마지막 2일 동안 저산소 상태 하에 세포를 배양하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 142.

제136항에 있어서, 저산소 및 비-저산소 시간 기간은 30일 미만 지속하는 배양 시간 기간 내에 있고, 저산소 상태 하에 세포를 배양하는 단계는 배양 시간 기간의 첫 번째 2일과 마지막 2일 사이에 2시간 이상 동안 저산소 상태 하에 세포를 배양하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 143.

제136항에 있어서, 저산소 상태 하에 세포를 배양하는 단계는 비-저산소 상태 하에 세포를 배양하는 단계 전에 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 144.

제136항에 있어서, 저산소 상태 하에 세포를 배양하는 단계는 비-저산소 상태 하에 세포를 배양하는 단계 후에 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 145.

추출된 혈액을 사용하는 방법으로서,

혈액을 원하는 밀도 범위를 가진 세포를 선택하기 위한 구배에 적용하는 단계;

5%를 넘는 CO<sub>2</sub> 수준을 특징으로 하는, 2시간 이상 지속하는 고탄산가스 시간 기간 동안, 고탄산가스 상태 하에 선택된 세포를 배양하는 단계;

5% 이하의 CO<sub>2</sub> 수준을 특징으로 하는, 1일 이상 지속하는 비-고탄산가스 시간 기간 동안, 비-고탄산가스 상태 하에 선택된 세포를 배양하는 단계; 및

배양된 세포에서 전구 세포를 확인하는 단계

를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 146.

제145항에 있어서, 전구 세포는 내피 전구 세포(EPC)를 포함하고, 전구 세포를 확인하는 단계는 EPC를 확인하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 147.

제145항에 있어서, 혈액을 구배에 적용하는 단계는 혈액을 1.077 g/ml 미만의 밀도를 가진 세포를 선택하기에 적합한 구배에 적용하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 148.

제145항에 있어서, 혈액을 구배에 적용하는 단계는 혈액을 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 세포를 선택하기에 적합한 구배에 적용하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 149.

제145항에 있어서, 고탄산가스 시간 기간 동안 CO<sub>2</sub> 수준이 6% 이상이 되도록 설정하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 150.

제145항에 있어서, 고탄산가스 및 비-고탄산가스 시간 기간은 30일 미만 지속하는 배양 시간 기간 내에 있고, 고탄산가스 상태 하에 세포를 배양하는 단계는 배양 시간 기간의 첫 번째 2일 동안 고탄산가스 상태 하에 세포를 배양하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 151.

제145항에 있어서, 고탄산가스 및 비-고탄산가스 시간 기간은 30일 미만 지속하는 배양 시간 기간 내에 있고, 고탄산가스 상태 하에 세포를 배양하는 단계는 배양 시간 기간의 마지막 2일 동안 고탄산가스 상태 하에 세포를 배양하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 152.

제145항에 있어서, 고탄산가스 및 비-고탄산가스 시간 기간은 30일 미만 지속하는 배양 시간 기간 내에 있고, 고탄산가스 상태 하에 세포를 배양하는 단계는 배양 시간 기간의 첫 번째 2일과 마지막 2일 사이에 2시간 이상 동안 고탄산가스 상태 하에 세포를 배양하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 153.

제145항에 있어서, 고탄산가스 상태 하에 세포를 배양하는 단계는 비-고탄산가스 상태 하에 세포를 배양하는 단계 전에 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 154.

제145항에 있어서, 고탄산가스 상태 하에 세포를 배양하는 단계는 비-고탄산가스 상태 하에 세포를 배양하는 단계 후에 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 155.

추출된 혈액을 사용하는 방법으로서,

혈액을 첫 번째 원하는 밀도 범위를 가진 세포를 선택하기 위한 구배에 적용하는 단계;

VEGF, IGF, FGF, 에리트로포이에틴, 에스트로젠, 에스트로젠-패밀리 분자, 17- $\beta$ -에스트라디올, 에스트론, 에스트리올, 에스트라디올 유도체, 에스트라디올 길초산, 에스트라디올 사이피오네이트, 메스트라놀, 퀴네스톨, 프로게스틴, 프로게스틴-패밀리 분자, 프로게스테론, 합성 프로게스테론, 히드록시프로게스테론 카로에이트, 메드록시프로게스테론 아세트산, 스타틴, 심바스타틴, 아토바스타틴, 항당뇨병제, 및 로시글리타존; 및

배양된 세포에서 전구 세포를 확인하는 단계

를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 156.

제155항에 있어서, 전구 세포는 내피 전구 세포(EPC)를 포함하고, 전구 세포를 확인하는 단계는 EPC를 확인하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 157.

제155항에 있어서, 혈액을 구배에 적용하는 단계는 혈액을 1.077 g/ml 미만의 밀도를 가진 세포를 선택하기에 적합한 구배에 적용하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 158.

제155항에 있어서, 혈액을 구배에 적용하는 단계는 혈액을 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 세포를 선택하기에 적합한 구배에 적용하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 159.

추출된 혈액을 사용하는 방법으로서,

혈액을 첫 번째 원하는 밀도 범위를 가진 세포를 선택하기 위한 구배에 적용하는 단계;

3 내지 30일 지속하는 기간 동안 선택된 세포를 배양함으로써 두 번째 원하는 밀도 범위를 가진 세포의 수를 증가시키는 단계; 및

배양된 세포에서 전구 세포를 확인하는 단계

를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 160.

제159항에 있어서, 전구 세포는 내피 전구 세포(EPC)를 포함하고, 전구 세포를 확인하는 단계는 EPC를 확인하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 161.

제159항에 있어서, 혈액을 구배에 적용하는 단계는 혈액을 1.077 g/ml 미만의 밀도를 가진 세포를 선택하기에 적합한 구배에 적용하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 162.

제159항에 있어서, 혈액을 구배에 적용하는 단계는 혈액을 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 세포를 선택하기에 적합한 구배에 적용하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 163.

제159항에 있어서, 조직을 적용하는 단계는 제대혈을 구배에 적용하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 164.

제159항에 있어서, 조직을 적용하는 단계는 배아 세포를 구배에 적용하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 165.

제159항에 있어서, 조직을 적용하는 단계는 태아 세포를 첫 번째 구배에 적용하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 166.

제159항에 있어서, 조직을 적용하는 단계는 태반 세포를 첫 번째 구배에 적용하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 167.

제159항에 있어서, 골수로부터 줄기세포를 추출하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 168.**

제159항에 있어서, 줄기세포의 추출을 촉진하기 위해서 골수로부터 줄기세포를 이동하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 169.**

제159항에 있어서, 혈액으로부터 줄기세포를 추출하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 170.**

제159항에 있어서, 세포를 배양하는 단계는

첫 번째 부분의 기간 동안 첫 번째 용기에 세포를 배양하는 단계;

첫 번째 부분의 기간의 말에 첫 번째 용기로부터 세포의 적어도 일부를 제거하는 단계; 및

두 번째 부분의 기간 동안 두 번째 용기에서 첫 번째 용기로부터 제거된 세포를 배양하는 단계

를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 171.**

제170항에 있어서, 세포의 적어도 일부를 제거하는 단계는 첫 번째 용기의 표면에 부착된 세포를 제거하기 위해서 선택하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 172.**

제170항에 있어서, 세포의 적어도 일부를 제거하는 단계는 첫 번째 용기의 표면에 부착되지 않은 세포를 제거하기 위해서 선택하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 173.**

제170항에 있어서, 첫 번째 용기는 그것의 표면에 성장-증대 분자를 포함하고, 첫 번째 용기에 세포를 배양하는 단계는 성장-증대 분자를 포함한 첫 번째 용기에 세포를 배양하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 174.**

제173항에 있어서, 성장-증대 분자는 혈장, 콜라겐, 피브로넥틴, 성장 인자 및 줄기세포 표면 수용체에 대한 항체로 구성된 목록에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

## 청구항 175.

제170항에 있어서, 두 번째 용기는 그것의 표면에 성장-중대 분자를 포함하고, 두 번째 용기에 세포를 배양하는 단계는 성장-중대 분자를 포함한 두 번째 용기에 세포를 배양하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

## 청구항 176.

제175항에 있어서, 성장-중대 분자는 혈장, 콜라겐, 피브로넥틴, 성장 인자 및 줄기세포 표면 수용체에 대한 항체로 구성된 목록에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

### 명세서

#### 기술분야

#### 관련 출원과의 상호-참조

본 출원은 (a) 2004년 6월 1일 출원되고 발명의 명칭이 "In vitro techniques for use with stem cells"인 미국 가특허출원 제60/576,266호 및 (b) 2004년 7월 15일 출원되고 발명의 명칭이 "Indications for stem cell use"인 미국 가특허출원 제60/588,520호로부터 우선권을 주장한다.

이들 두 출원은 본 특허출원의 양수인에게 양도되고, 본원에 참고 인용된다.

#### 발명의 분야

본 발명은 대체로 혈관 장애가 있는 사람 환자의 치료를 위한 방법 및 장치에 관한 것이고 구체적으로는 혈관신생 및/또는 신혈관형성 및/또는 혈관생성을 위한 방법 및 장치에 관한 것이다.

#### 배경기술

일부 동맥 기능장애는 지방 저장소 또는 다른 혈관 이상에 의한 동맥의 폭이 좁아짐으로써 발생한다. 이것은 혈류를 방해 하고/거나 조직 및 기관이 충분한 영양소 및 산소가 공급되는 것을 막을 수 있다.

혈관 장애는 통상의 상태이고, 환자의 삶의 질을 심각하게 악화시킬 수 있다. 의학 치료에서의 상당한 발전 및 동맥 기능장애에 대한 혈관이식 과정, 예를 들면 관상동맥 이식, 기구 혈관 형성 및 관상 혈관의 스텐트의 개선에도 불구하고, 환자의 실질적 비율은 동맥 기능장애-유래된 질병으로 고생한다.

내피 전구 세포(EPC)는 혈관질환으로 고생하는 환자를 치료하는 데 사용되어 왔다. 이러한 중증의 경우에는, 약물 또는 직접적 혈관이식 과정이 더 이상 효과적이지 않거나 사용될 수 없을 때, 대안적 치료법이 필요하다. EPC는 허혈성 조직에 적용되어 왔다. EPC는 혈관을 형성하는 세포층인 내피를 형성하기 위해서 분화하는 능력을 가진다. 이들 세포는 재-내피화, 신혈관형성, 혈관생성 및 혈관신생 과정에 관여한다. 이식된 EPC가 치유 과정의 일부가 될 수 있는 메커니즘은 자기-재증식, 손상된 조직의 세포와의 융합 및 사이토카인 및 성장 인자의 분비를 포함한다. EPC의 재증식 및 이들이 성숙한 내피 세포로 분화하는 것은 재-내피화, 신혈관형성, 혈관생성 및 혈관신생 과정에서 이들의 기능을 가능케 한다. 최근의 증거들은 EPC를 손상된 조직의 세포와 융합하면 조직 기능 재생이 증가한다는 것을 제시한다. 더욱이, 사이토카인 및 성장인자 분비 후, EPC는 조직에서 유래한 세포들의 세포 생존에 영향을 미칠 수 있고, 줄기세포가 손상된 조직으로 이동하도록 도울 수 있다.

공동 조상 세포, 혈관모세포는 내피 및 조혈(혈액 세포) 전구체 모두를 야기한다. 이 조상 세포는 내피 전구체로 분화하는 중배엽 전구 세포인 조혈 줄기세포 및 혈관모세포로 분화한다. 이들 세포는 내피 세포로 증식, 이동 및 분화하는 능력을 가지지만, 특정 성숙한 내피 마커를 획득하지 않았다. 내피 계통으로 결정된 후, 혈관모세포는 혈관생성이라는 과정에서 정맥 및 동맥의 원시적 혈관층으로 만들어진다. 이 원시적 맥관구조는 이어서 혈관신생 및 새롭게 형성된 관의 재구성 및 동맥형성에 의하여 기능적 네트워크로 정돈된다. EPC는 혈관 외상 또는 심근경색증(AMI)이 있는 환자에서 이동하는 것으로 나타났다(즉, 증가된 수로 골수(BM)로부터 순환계로 이동한다)(예를 들면, 본원에 참고 인용되는 하기 두 문헌을 참조하

라: (a) Gill, M., S. Dias, et al. (2001), "Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(+) AC133(+) endothelial precursor cells," *Circ Res* 88(2); 및 (b) Shintani, S., T. Murohara, et al. (2001), "Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction," *Circulation* 103 (23):2776-9.). 대체로, EPC의 사용은 허혈 또는 손상된 조직 내에 천연 바이페스의 형성을 촉진함으로써 이들 환자의 임상 상태를 완화하는 것을 목적으로 한다.

많은 동물 실험 및 임상 시험을 통하여 혈류를 증가시키고 허혈 징후의 연관된 경감을 산출해내는 이 치료법의 잠재력을 조사하였는데, 신체적 기능면에서 환자의 개선에 의하여 명백해졌다.

골수(BM) 및 BM-유래된 말초 혈액 줄기세포로부터 직접 흡인된 줄기세포를 포함한, 이식을 위한 자가 EPC의 다양한 공급원은 설명되었다.

전구 세포 또는 줄기 세포는 증식하고 이동하고 다양한 세포 유형으로 분화할 수 있는 골수 세포를 포함한다. 골수 조혈 줄기세포는 즉 CD34 마커를 발현하는 "CD34 양성"(CD34+)인 것을 특징으로 한다.

조혈 전구체의 잘 한정된 집단의 유연성 때문에 이들은 표적 기관에 존재하는 환경적 신호에 반응하여 분화전환, 더 구체적으로는 내피 세포로 전환될 수 있는 것으로 추측된다.

골수의 이식은 의료 과정의 상대적 단순성 때문에 임상적으로 매력적이다. 이것은 장골능으로부터 골수를 흡입하는 것과 흡입 또는 선택된 세포를 검색 후 상처에 즉각적 재주입하는 것을 포함한다.

성인 순환계에서 EPC의 존재를 나타내는 첫 번째 증거는 건강한 사람 자원자로부터의 단핵 혈액 세포가 시험관내에서 내피 세포-유사 표현형을 나타내고, 시험관내에서 모세혈관으로 혼입되는 것으로 나타났을 때 확인되었다. (예를 들면, 본원에 참고 인용된 문헌(Asahara, T., T. Murohara, et al. (1997), "Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis," *Science* 275(5302):964-7)을 참조하라). 이들 추정 EPC는 CD34 및 혈관 내피 성장 인자 수용체-2 (VEGFR-2/KDR), 배아 내피 전구체에 의하여 공유된 두 항원, 및 조혈 줄기세포(HSC)의 발현을 통하여 특성화되었다. CD34 뿐만 아니라, 초기 조혈 전구 세포는 분화 후에는 발현되지 않는 CD133(AC133)을 발현한다. 최근에, 순환계에서 널리 받아들여지는 EPC의 정의는 실질적 목적상 CD34+ /VEGFR-2+ 또는 CD133+ /VEGFR-2+ 세포이다.

말초 혈액 EPC는 치료받지 않은 환자의 혈액으로부터, 또는 사이토카인, 예를 들면 과립구-콜로니 자극 인자(G-CSF), 과립구 단핵구 콜로니-자극 인자(GM-CSF), 혈관 내피 성장 인자(VEGF), 및 섬유아세포 성장 인자(FGF)를 사용하여 EPC 이동을 증가시키기 위해서 치료받은 환자로부터 얻을 수 있다. 이동 치료는 통상적으로 혈액학적 장애 및 동맥 유래 장애로 고생하는 환자의 경우에는 피한다. HMG CoA 환원효소 저해제(스타틴)와 같은 치료는 또한 순환계에서 EPC의 수를 증가시키는 것으로 보고되었다. 예를 들면, 하기 문헌을 참조하라:

1. Dimmeler S., et al. (2001), "HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway," *J. Clin. Invest.* 108:391-397.
2. Hyun-Jae, Hyo-Soo Kim, et al. (2003), "Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem-cells mobilized with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomized clinical trial," *The Lancet* 363:751-756.
3. Brigit.Assmus, Volker Schachinger et al., (2002), "Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI)," *Circulation* 106:3009-3017.
4. Alexandra Aicher, Winfreid Brenner, et al., (2003), "Assessment of the tissue distribution of transplanted human endothelial progenitor cells by radioactive labeling," *Circulation* 107:2134-2139.

이들 문헌 각각은 본원에 참고 인용된다.

말초 혈액은 제거하기 위한 과정은 BM 제거보다 환자에게 더 간단하고 더 편리하다. EPC가 말초 혈액으로부터 분리될 수 있다는 사실은 치료를 위한 이들 세포의 사용의 선택에서 또 다른 중요한 인자이다. 많은 다른 세포 유형을 함유하는 BM 으로부터 전구 세포를 분리하는 것은 또한 기술적으로 더욱 도전적인 일이다.

EPC 및 BMC 치료로부터의 결과는 개선된 심장 기능, 더 증가한 모세혈관 밀도, 측부 혈관의 수의 현저한 증가, 심장초음파 좌심실 박출율의 향상, 심근 경색증의 레트 모델에서 허혈 지역 상처의 감소 및 심근아세포 아포프토시스의 방지를 나타낸다. 더욱이, 개선된 혈류 및 모세혈관 밀도 및 후지(後肢)에서의 사지 손실의 감소된 속도는 누드 마우스의 허혈 모델에서 나타났다.

본원에 참고 인용된 하기 문헌은 본원에 설명된 기술과 조합하여 사용될 수 있는 기술들을 설명한다:

- (1) Kalka, C., H. Masuda, et al. (2000). "Vascular endothelial growth factor(165) gene transfer augments circulating endothelial progenitor cells in human subjects." *Circ Res* 86(12):1198-202.
- (2) Kawamoto, A., H. C. Gwon, et al. (2001). "Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia." *Circulation* 103(5):634-7.
- (3) Kawamoto, A., T. Tkebuchava, et al. (2003). "Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia." *Circulation* 107(3):461-8
- (4) Kamihata, H., H. Matsubara, et al. (2001). "Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines. " *Circulation* 104(9):1046-52.
- (5) Kocher, A. A., M. D. Schuster, et al. (2001). "Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function." *Nat Med* 7(4):430-6.

본원에 또한 참고 인용된 하기 문헌 및 책의 장은 본원에 설명된 기술과 조합하여 사용될 수 있는 기술들을 설명한다:

- Flammera J et al. (2002). "The impact of ocular blood flow in glaucoma." *Progress in Retinal and Eye Research* 21:359-393.
- Zarbin MA (2004). "Current concepts in the pathogenesis of age-related macular degeneration." *Arch Ophthalmol.* 122 (4):598-614.
- Frank RN (2004). "Diabetic retinopathy." *N Engl J Med* 350:48-58.
- Singleton JR (2003). "Microvascular complications of impaired glucose tolerance." *Diabetes* 52:2867-2873.
- Bahlmann FH et. (2004). "Erythropoietin regulates endothelial progenitor cells." *Blood* 103(3):921-6.
- Greenfield, Ed. (2001). "Surgery: scientific principles and practice." Lippincot: Philadelphia, chapter 107.
- Kouwenhoven EA et al. (2000). "Etiology and pathophysiology of chronic transplant dysfunction." *Transplant Internal* 13(6):385-401.
- Browne EZ et al. (1986). "Complications of skin grafts and pedicle flaps." *Hand Clin.*2:353-9.
- Chen et al. (1991). "Four types of venous flaps for wound coverage: a clinical appraisal." *J. Trauma*31(9):1286-93.
- Beatrice et al. (2004) *Dermatol. Surg.* 30(3):399.
- Ferretti et al. (2003). "Angiogenesis and nerve regeneration in a model of human skin equivalent transplant." *Life Sci.* 73:1985-94.



Schechner et al. (2003). "Engraftment of a vascularized human skin equivalent." *FASEB J.* 17(15):2250-60.

심근 장애를 치료하기 위해서 EPC 및 다른 골수 유래 세포를 사용하는 잠재적 이점을 검사하기 위해서 지난 수년 동안 사람에서 연구가 수행되었다. 최근 연구는 급성 심근 경색 후 자가 전구 세포의 이식이 경색 후 손상을 제한하는 것처럼 보인다고 입증하였다. 하기 임상 시험은 심장 장애가 있는 환자에 투여된 골수-유래 또는 혈액-유래 세포의 안정성 및 효율성을 평가하는 연구에 초점을 맞추고 있다.

Perin et al.은 자가 단핵 BMC의 심장내관통 주사를 수용한 21명의 환자(치료군에 14명, 대조군에 7명)를 포함한 임상 시험을 수행하였다. (본원에 참고 인용된 문헌(Perin, E. C., H. F. Dohmann, et al. (2003), "Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure," *Circulation* 107(18):2294-302)를 참조하라). 4 개월째에, 치료받은 환자에게서 방출 단편의 개선, 마지막-시토졸 양의 감소, 및 주입된 단편의 현저한 기계적 개선이 있었다.

다른 군은 심근경색으로 고생하고 관상동맥 바이패스 이식을 받은 6명의 환자에서 자가 EPC를 경색 경계 지역에 주사하였다. 수술 후 3 내지 9 개월째에, 모든 환자들은 살아있고 건강했으며, 전체적 좌심실 기능은 4명의 환자에서 증진되었다. 6명의 모든 환자는 운동 능력에서 두드러진 개선을 보고하였다. 심근 관류 스캔은 6명의 환자 중 5명에서 정성 분석에 의하여 현저히 개선된 것으로 보고되었다. 이 연구의 결과는 EPC를 심장에 이식하는 것이 아마도 혈관신생을 유도함으로써, 경색된 심근의 관류를 개선한다는 것을 나타낸다. (본원에 참고 인용된 문헌(Stamm, C., B. Westphal, et al. (2003), "Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration," *Lancet* 361(9351):45-6)을 참조하라).

급성 심근 경색에서 전구 세포의 이식 및 재생 증진(TOPCARE-AMI) 연구는 재관류된 급성 심근 경색이 있는 환자의 경색 후 순환하는 내피 전구 세포 또는 골수 세포를 관상 동맥 내로 직접 전달하는 것을 포함한다(본원에 참고 인용된 문헌(Assmus, B., V. Schachinger, et al. (2002), "Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction(TOPCARE-AMI)," *Circulation* 106(24):3009-17)을 참조하라). 첫 번째 20명의 환자의 경우, 11명은 EPC를 수용하였고, 9명은 BMC를 수용하였다. 4개월째에, 전구 세포의 이식은 전체 좌심실 방출 파편의 현저한 증가를 야기하였고, 심장초음파검사는 무작위가 아닌, 맞춤의 기준 그룹과 비교하여 경색 부분에서의 개선된 국부적 벽 움직임, 감소된 마지막-수축기 좌심실 부피, 및 경색부위의 증가된 심근 생존력을 나타냈다. 부정맥 또는 크레아틴 키나제 및 트로포닌의 증가와 같은 임의의 환자에서의 치료의 유해 사례는 없었다. BM- 과 말초 혈액-유래 세포 간에는 차이가 없었다.

피츠버그 대학교의 Amit Patel이 이끌고 있는 팀에 의하여 수행된 연구는 중증 심부전이 있는 20명의 환자에 관한 것이었는데, 그 중 10명은 BM 유래 EPC를 관상 혈관에 주사하였다. 1개월, 3개월 및 6개월 추적관찰에서, 줄기세포 환자에 대한 방출 파편 비율은 다른 환자들에 비해서 현저히 개선되었다. (American Association for Thoracic Surgery(Toronto, 2004년 5월)의 요약 참조하라).

본원에 참고 인용된 하기 문헌 역시 관심대상이 될 수 있다:

J. Folkman, Y. Shing, *J. Biol. Chem.* 267, 10931 (1992)

W. Brugger, S. Heimfeld, R. J. Berenson, R. Mertelsmann, L. Kanz, *N. Engl J. Med.* 333, 283 (1995)

F. Katz, R. W. Tindle, D. R. Sutherland, M. D. Greaves, *Leuk. Res.* 9, 191 (1985)

R. G. Andrews, J. W. Singer, I. D. Bernstein, *Blood* 67, 842 (1986)

B. I. Terman, M. Dougher-Vermazen, M. E. Carrion, D. Dimitrov, D. C. Armellino, et al, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187, 1579 (1992)

B. Millauer, S. Witzigmann-Voos, H. Schnurch, R. Martinez, N. P. H. Moller, et al, *Cell* 72, 835 (1993)

J. C. Voyta, D. P. Via, C. E. Butterfield, B. R. Zetter, *J. Cell Biol.* 99, 2034 (1984)

- P. J. Newman, M. C. Berndt, J. Gorski, G. C. White, S. Lyman, et al, *Science* 247, 1219 (1990)
- T. N. Sato, Y. Tozawa, U. Deutsch, K. Wolburg-Buchholz, Y. Fujiwara, et al, *Nature* 376, 70 (1995)
- H. Schnurch, W. Risau, *Development* 119, 957 (1993)
- J. L. Liesveld, K. E. Frediani, A. W. Harbol, J. F. DiPersio, C. N. Abboud, *Leukemia* 8, 2111 (1994).
- S. Takeshita, L. P. Zheng, E. Brogi, M. Kearney, L. Q. Pu, et al, *J. Clin. Invest.* 93, 662 (1994)
- R. Baffour, J. Berman, J. L. Garb, S. W. Rhee, J. Kaufman, et al, *J. Vase. Surg.* 16, 181 (1992)
- J. M. Isner, A. Pieczek, R. Schainfeld, R. Blair, L. Haley, et al, *Lancet* 348, 370 (1996)
- Y. Sato, K. Okamura, A. Morimoto, R. Hamanaka, K. Hamanaguchi, et al, *Exp. Cell Res.* 204, 223 (1993)

본원에 또한 참고 인용된 하기 문헌 역시 관심대상이 될 수 있다:

- Badorff, C, R. P. Brandes, et al. (2003). "Transdifferentiation of blood-derived human adult endothelial progenitor cells into functionally active cardiomyocytes." *Circulation* 107(7): 1024-32.
- Bhattacharya, V., P. A. McSweeney, et al. (2000). "Enhanced endothelialization and microvessel formation in polyester grafts seeded with CD34(+) bone marrow cells." *Blood* 95(2): 581-5.
- Grant, M. B., W. S. May, et al. (2002). "Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization." *Nat Med* 8(6): 607-12.
- Hirata, K., T. S. Li, et al. (2003). "Autologous bone marrow cell implantation as therapeutic angiogenesis for ischemic hindlimb in diabetic rat model." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284(1): H66-70.
- Ikenaga, S., K. Hamano, et al. (2001). "Autologous bone marrow implantation induced angiogenesis and improved deteriorated exercise capacity in a rat ischemic hindlimb model." *J Surg Res* 96(2): 277-83.
- Kalka, C, H. Masuda, et al. (2000). "Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization." *Proc Natl Acad Sci USA* 97(7): 3422-7.
- Kaushal, S., G. E. Amiel, et al. (2001). "Functional small-diameter neovessels created using endothelial progenitor cells expanded ex vivo." *Nat Med* 7(9): 1035-40.
- Kornowski, R., M. B. Leon, et al. (2000). "Electromagnetic guidance for catheter-based transendocardial injection: a platform for intramyocardial angiogenesis therapy. Results in normal and ischemic porcine models." *J Am Coll Cardiol* 35(4): 1031-9.
- Li, R. K., Z. Q. Jia, et al. (1996). "Cardiomyocyte transplantation improves heart function." *Ann Thorac Surg* 62(3) : 654-60; discussion 660-1.
- Rajnoch, C, J. C. Chachques, et al. (2001). "Cellular therapy reverses myocardial dysfunction." *J Thorac Cardiovasc Surg* 121(5): 871-8.
- Schattman, G. C, H. D. Hanlon, et al. (2000). "Blood-derived angioblasts accelerate blood-flow restoration in diabetic mice." *J Clin Invest* 106(4): 571-8.

- Shintani, S., T. Murohara, et al. (2001). "Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation." *Circulation* 103(6): 897-903.
- Strauer, B. E., M. Brehm, et al. (2002). "Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans." *Circulation* 106(15): 1913-8.
- Taylor, D. A., B. Z. Atkins, et al. (1998). "Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation." *Nat Med* 4(8): 929-33.
- Thompson, C. A., B. A. Nasser, et al. (2003). "Percutaneous transvenous cellular cardiomyoplasty. A novel nonsurgical approach for myocardial cell transplantation." *J Am Coll Cardiol* 41(11): 1964-71.
- Tomita, S., R. K. Li, et al. (1999). "Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function." *Circulation* 100(19 Suppl): II247-56.
- Tomita, S., D. A. Mickle, et al. (2002). "Improved heart function with myogenesis and angiogenesis after autologous porcine bone marrow stromal cell transplantation." *J Thorac Cardiovasc Surg* 123(6): 1132-40.
- Wang et al. (2004). "Rosiglitazone facilitates angiogenic progenitor cell differentiation toward endothelial lineage: a new paradigm in glitazone pleiotropy." *Circulation* 109(11): 1392-400.
- Rupp et al. (2004). "Statin therapy in patients with coronary artery disease improves the impaired endothelial progenitor cell differentiation into cardiomyogenic cells." *Basic Res Cardiol*. 99(1): 61-8.
- Quirici et al. (2001). "Differentiation and expansion of endothelial cells from human bone marrow CD133(+) cells." *Br J Haematol*. 115(1): 186-94.
- Di Stefano et al. (2002) "Different growth conditions for peripheral blood endothelial progenitors." *Cardiovasc Radiat Med*. 3(3-4): 172-5.
- Akita et al. (2003). "Hypoxic preconditioning augments efficacy of human endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization." *Lab Invest*. 83(1): 65- 73.
- Wang et al. (2004). "Mechanical, cellular, and molecular factors interact to modulate circulating endothelial cell progenitors." *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 286(5): H1985-93.
- Bahlmann et al. (2003). "Endothelial progenitor cell proliferation and differentiation is regulated by erythropoietin." *Kidney Int*. 64(5): 1648-52.
- Heeschen et al. (2003). "Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization." *Blood*. 102(4): 1340-6.
- Verma et al. (2004). "C-reactive protein attenuates endothelial progenitor cell survival, differentiation, and function: Further evidence of a mechanistic link between C-reactive protein and cardiovascular disease." *Circulation*. 109(17): 2058-67.

본원에 참고 인용된 Isner et al.의 미국 특허 제5,980,887호, 제6,569,428호 및 제6,676,937호는 대체로 선택된 환자 및 특정 지역에 대한 혈관신생 조절자를 표적화하기 위한 일부 바람직한 구체예에서 혈관신생을 조절, 즉 혈관 형성을 증진 또는 저해하기 위한 방법에 사용하기 위한 EC 전구체를 포함한 약학적 생성물을 설명한다. 예를 들면, EC 전구체는 병적 또는 실용적 혈관신생의 부위에 각각 혈관신생을 증대시키거나 혈관신생 조절자, 예를 들면 항- 또는 항-혈관신생 인자를 전달하는 데 사용될 수 있다. 추가적으로, 다른 구체예에서, EC 전구체는 손상된 혈관의 재-내피화를 유도하여, 평활근 세포 증식을 간접적으로 저해함으로써 재협착을 감소시키는 데 사용될 수 있다.

본원에 참고 인용된 Kanz et al.의 미국 특허 제5,541,103호는 특정 유형의 암으로 고생하는 환자의 고용량 화학요법 치료를 설명한다. 회복을 촉진하기 위해서, 생체의 증량된 말초 혈액 전구 세포는 화학치료 후 암 환자에게 투여될 수 있다.

본원에 참고 인용된 미국 특허출원 공개 제2003/0199464호는 심근아세포의 손실을 포함한 피험체의 심장의 장애를 치료하기 위한 방법을 설명한다. 상기 방법은 장애를 치료하기 위해서 피험체의 심장 내의 심근아세포 증식을 야기하기에 효과적인 것으로 설명된 제제의 양을 피험체에게 투여하는 것을 포함한다. 한 구체예에서, 제제는 사람 내피 전구 세포이다. 본출원은 또한 환자의 심근아세포의 아포프토시스에 대한 감수성을 결정하기 위한 방법을 설명한다.

본원에 참고 인용된 Itescu의 PCT 특허공보 WO 01/94420호는 (a) 피험체의 위치에서 줄기세포를 제거하는 단계; (b) 줄기세포로부터 내피 전구 세포를 회수하는 단계; (c) 전구체가 이동하여 조직의 혈관 재생을 자극하도록 (b) 단계로부터의 내피 전구 세포를 피험체의 다른 위치로 도입하는 단계를 포함하는 피험체의 심근 경색 손상된 조직의 혈관생성을 자극하는 방법을 설명한다. 줄기세포는 직접 또는 이동시킴으로써 제거될 수 있다. 내피 전구 세포는 피험체 내로 도입하기 전에 증량될 수 있다. 경색 주변 조직에서 혈관신생을 유도하는 방법이 설명된다. 상기 방법은 또한 (a) 피험체에게 내피 전구 세포를 투여하는 단계; (b) 피험체에게 케모카인을 투여하여 내피 세포 전구체를 허혈 조직으로 유인하는 단계를 포함한 허혈 상해에 의하여 손상된 조직 부위에 사람 골수-유래 내피 세포 전구체의 트래피킹을 선택적으로 증가시키는 단계에 대하여 설명된다. 상기 방법은 또한 동종이계 줄기 세포를 피험체에 주입하는 단계를 포함한 피험체에 심근 경색 손상된 조직의 혈관생성 또는 혈관신생을 자극하는 단계에 대하여 설명된다. 상기 방법은 또한 임의의 인스턴트 방법을 포함한 심근 경색으로 고생하는 피험체에서의 심근 기능을 향상시키는 단계에 대하여 설명된다. 상기 방법은 또한 내피 전구 세포를 이동시키기 위해서 G-CSF 또는 항-CXCR4 항체를 피험체 내에 주입하는 단계를 포함한 심근 경색으로 고생하는 피험체에서의 심근 기능을 향상하는 단계에 대하여 설명된다.

Gillis의 미국 특허 제5,199,942호는 (1) 종양감축 치료 전에 골수로부터 조혈 전구 세포 또는 환자로부터 말초 혈액을 얻는 과정; (2) 전구 세포의 집단을 증량하는 단계를 포함한 세포성 제제를 제공하는 인터루킨-3(IL-3), 강철 인자(SF), 과립구 대식세포-콜로니 자극 인자(GM-CSF), 인터루킨-1(IL-1), GM-CSF/IL-3 융합 단백질 및 이들의 조합으로 구성된 군 중에서 선택된 생체의 성장 인자로 조혈 전구 세포를 생체외에서 증량하는 단계; 및 (3) 세포성 제제를 환자에게 종양감축 치료와 병행해서 투여하거나 또는 그 후에 종양감축 치료를 하는 단계를 포함한, 종양감축 치료를 받은 환자의 자가 조혈 세포 이식을 위한 방법을 설명한다. 상기 방법은 선택적으로 조혈 전구 세포를 말초 혈액 내로 모으는 모집 성장 인자를 통한 예비 치료 및 세포성 제제로 투여된 조혈 전구 세포의 접목 및 증식을 촉진하는 접목 성장 인자를 통한 연속적 치료를 포함한다. 상기 특허는 또한 세포 배지 및 생체의 성장 인자 및 자기 혈청을 포함한 조혈 전구 세포 증량 배지 조성물을 설명한다.

본원에 참고 인용된 Shoshan의 미국 특허 제4,656,130호는 콜라겐 피브릴의 저장 안정 코팅으로 코팅된 기질을 포함한 콜라겐 코팅된 세포 성장 플레이트를 설명한다. 콜라겐 코팅된 세포 성장 플레이트를 제조하는 방법은 조직 배양 디쉬 상의 층류수에 현탁된 생물학적 활성 콜라겐 피브릴을 분배하는 단계를 포함한다. 그 후, 콜라겐 피브릴 현탁액을 함유한 디쉬를 무균 기류 및 자외선이 제공되는 층류 후드에 놓는다. 피브릴은 침전하여 디쉬의 바닥에 부착되고, 물은 무균 기류에서 증발하여 층류 후드 배기에서 제거되며, 자외선은 콜라겐 피브릴의 생성물인 얇은 층이 무균이고 살아있는 세포의 접종을 위해 준비되었음을 확실시한다. 상기 방법은 세포 성장 지지 특성에 어떤 유의한 감소 없이 실온에서 유지될 때 합리적인 저장 수명을 유지할 수 있는 편리한 사전코팅된 세포 성장 플레이트를 생산하는 단계를 설명한다.

본원에 참고 인용된 Swiderek et al.의 미국 특허 제5,932,473호는 염 용액에 세포 부착 프로모터를 함유한 조성물로 코팅된 세포 배양 기질을 설명한다. 플라스틱, 유리 또는 미소공성 섬유와 같은 기질은 기질의 cm<sup>2</sup>당 조성물의 약 50 - 500 ul을 제공하기 위해서, 0.005 - 0.5 M 시트르산염 또는 황산염 용액에 약 5 - 1000 ug/ml의 폴리-D-리신을 함유한 조성물로 코팅된다. 코팅된 기질을 세척하여 외래 물질을 제거하고, 건조하여 증가된 저장 수명 및/또는 안정성을 가진 코팅된 기질을 얻는다. 코팅된 기질은 에탄올과 같은 멸균된 배지로 세척함으로써 멸균화될 수 있다.

본원에 참고 인용된 Septak의 미국 특허 제6,040,182호는 예를 들면 폴리스티렌 분석 플레이트와 같은 조직 배양-처리된 플라스틱 표면에 고단백질-결합 능력의 촉진을 위한 방법 및 재료를 설명한다.

본원에 참고 인용된 Ozkan의 미국 특허 제4,450,231호는 면역 복합체를 결정하기 위해서 혈청 등의 표본의 면역분석을 설명한다. 플라스틱 바닥에 부착되고, 표본의 면역 복합체를 흡수하고, 표본을 층에 놓으며, 면역 복합체의 양의 징후를 만드는 층을 처리하는 능력을 가지는 비-단백질성, 비-이온성 폴리머 층을 플라스틱 바닥에 생성하는 단계를 포함하는 방법이 설명된다. 폴리머는 폴리에틸렌 글리콜, 텍스트란, 폴리비닐 클로리드, 폴리머성 폴리올, 또는 폴리에틸렌 글리콜의 부

산물일 수 있다. 이러한 분석에 사용하기 위한 생성물은 이러한 비-단백질성 층, 플레이트 웰 또는 테스트 튜브의 공동의 비-이온성 층을 가진, 바람직하게는 플라스틱, 폴리스티렌 및 폴리비닐 클로리드로 만들어진 웰 또는 테스트 튜브를 가진 플레이트이다.

본원에 참고 인용된 Kutryk et al.의 미국 특허출원 공보 제2003/0229393호는 장치의 표면에 세포를 이동시키기 위하여 전구 세포 표면 항원을 인식, 결합 및/또는 상호작용하는 항체, 항체 단편 또는 소분자를 혼입하는 생체친화성 매트릭스로 코팅된 스텐트, 스텐트 이식, 합성 혈관 이식, 또는 심장 밸브와 같은 의료 장치를 생산하기 위한 조성물 및 방법을 설명한다. 장치의 코팅은 또한 결합한 세포를 내막의 증식을 막는 장치의 표면에 성숙하고 기능적인 내피 세포로 부착, 성장 및 분화시키는 것을 가속시키기 위하여 전구체 내피 세포를 촉진하기 위한 화합물 또는 성장 인자를 함유할 수 있다. 이러한 의료 장치, 조성물을 제조하기 위한 방법 및 재협착, 아테롬성 동맥경화증 또는 다른 유형의 혈관 폐색과 같은 혈관 질환이 있는 포유동물을 치료하기 위한 방법이 설명된다.

## 발명의 상세한 설명

### 발명의 개요

본 특허출원은 조직으로부터 줄기세포의 분리, 분화 및 증량을 위한 방법을 상세하게 설명한다. 예를 들면, 줄기세포는 내피 전구 세포(EPC)를 포함할 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 조직은 사람 말초 혈액을 포함할 수 있다. 전형적으로, 줄기세포는 (예를 들면, 혈관생성 및/또는 혈관신생 및/또는 신혈관형성을 증대시키기 위해서) 기증자 또는 다른 개체에게 이식된다. 본 특허출원은 적합한 수의 기능적 EPC를 함유한 생성물을 얻기 위한 프로토콜을 제공한다. 설명된 방법은 (a) 조직으로부터 세포의 하위-집단의 추출; (b) 풍부한 배양 배지에 1-30일(또는 3-30, 또는 4, 5, 6, 7 또는 8일) 동안 배양물 중의 EPC의 증량 및 분화; 및/또는 (c) 배양물의 세포 성분의 확인; (d) 환자 내에 적합한 수의 EPC의 이식을 포함한다. 본원에 설명된 일부 구체예는 특이적으로 혈액으로부터 유래된 EPC에 관한 것이지만, 본 발명의 범주는 필요한 변경을 가하여 다양한 체조직으로부터 유래된 줄기세포를 사용하는 기술을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

일부 출원의 경우, 상기 방법은 기증자 및/또는 환자로부터 혈액 샘플을 수집하는 단계, 단핵 세포 단편으로부터 CD31이 풍부한 세포 집단 및 전구 세포를 분리하는 단계, 및 EPC로 분화하고 증식하는 세포의 혼합물에 존재하는 조혈 전구 세포를 야기하는 조건 하에서 이들 세포를 성장시키는 단계를 포함한다. 순환하는 EPC의 수가 0.1% 이하이기 때문에 이 생체의 증량 단계가 통상적으로 이용된다. 이 증량 단계 후, 세포는 관상 혈관과 같은 표적 기관의 혈관 내에, 또는 환자의 심근 내에 주입함으로써 이식될 수 있다.

그러므로 혈액을 1.077 g/ml 미만의 밀도를 가진 1차 통과 세포를 선택하기에 적합한 첫 번째 구배에 적용하는 단계;

1차 통과 세포를 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 2차 통과 세포를 선택하기에 적합한 두 번째 구배에 적용하는 단계; 및

3 내지 30일 지속하는 기간 동안 2차 통과 세포를 배양함으로써 1.055 내지 1.068 g/ml의 밀도를 가진 세포의 수를 증가시키는 단계

를 포함한, 본 출원의 구체예에 따라서 추출된 혈액을 사용하는 방법이 제공된다.

한 구체예에서, 혈액 세포를 첫 번째 구배에 적용하는 단계는 혈액 세포를 Ficoll-Paque Plus(TM)(Amersham Biosciences, 스웨덴 읍살라 소재) 또는 Lymphoprep(TM)(Axis-Shield PoC AS, 노르웨이 오슬로 소재) 또는 다른 공급원으로부터 얻을 수 있는 것과 같은 수크로스 및 에피클로로히드린의 코폴리머를 포함한 구배에 적용하는 단계를 포함한다. 한 구체예에서, 밀도 구배는 그 분야의 기술자에 의하여 준비된다.

한 구체예에서, 1차 통과 세포를 두 번째 구배에 적용하는 단계는 OptiPrep(TM) 또는 Nycodenz(TM)(Axis-Shield PoC AS, 노르웨이 오슬로 소재)와 같은 아이오디사놀의 수용액을 포함한 구배에 적용하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 1차 통과 세포를 두 번째 구배에 적용하는 단계는 Percoll(TM)(Amersham Biosciences, 스웨덴 읍살라 소재)와 같은 폴리비닐피리리돈-코팅된 실리카 콜리드를 포함한 구배에 적용하는 단계를 포함한다.

줄기세포를 포함한 조직을 1.077 g/ml 미만의 밀도를 가진 1차 통과 세포를 선택하기에 적합한 첫 번째 구배에 적용하는 단계;

1차 통과 세포를 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 2차 통과 세포를 선택하기에 적합한 두 번째 구배에 적용하는 단계;

2차 통과 세포 1.055 내지 1.068 g/ml의 밀도를 가진 3차 통과 세포를 선택하기에 적합한 세 번째 구배에 적용하는 단계; 및

3 내지 30 일이 지속하는 기간 동안 3차 통과 세포를 배양함으로써 1.055 내지 1.068 g/ml의 밀도를 가진 세포의 수를 증가시키는 단계

를 포함한, 본 발명의 구체예에 따라서 추출된 줄기세포를 사용하는 방법이 또한 제공된다.

한 구체예에서, 세 번째 구배는 1.059 내지 1.068 g/ml의 밀도를 가진 세포를 선택하기에 적합하고, 이때 2차 통과 세포를 세 번째 구배에 적용하는 단계는 1.059 내지 1.068 g/ml의 밀도를 가진 세포를 선택하는 단계를 포함한다.

혈액을 1.077 g/ml 미만의 밀도를 가진 1차 통과 세포를 선택하기에 적합한 첫 번째 구배에 적용하는 단계;

1차 통과 세포를 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 2차 통과 세포를 선택하기에 적합한 두 번째 구배에 적용하는 단계; 및

2차 통과 세포를 혈장 및/또는 항체를 포함한(예를 들면, 코팅된) 표면에 인큐베이션하는 단계

를 포함한, 본 발명의 구체예에 따라서 추출된 혈액을 사용하는 방법이 또한 제공된다.

혈액을 1.077 g/ml 미만의 밀도를 가진 1차 통과 세포를 선택하기에 적합한 첫 번째 구배에 적용하는 단계;

1차 통과 세포를 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 2차 통과 세포를 선택하기에 적합한 두 번째 구배에 적용하는 단계; 및

2차 통과 세포를 콜라겐 또는 피브로넥틴 이외의 성장-증대 분자를 포함한 표면에 인큐베이션하는 단계

를 포함한, 본 발명의 구체예에 따라서 추출된 혈액을 사용하는 방법이 추가로 제공된다.

한 구체예에서, 2차 통과 세포를 인큐베이션하는 단계는 성장-증대 분자뿐만 아니라 콜라겐 및 피브로넥틴 중 하나 이상을 포함한 표면에 2차 통과 세포를 인큐베이션하는 단계를 포함한다.

혈액을 1.077 g/ml 미만의 밀도를 가진 1차 통과 세포를 선택하기에 적합한 첫 번째 구배에 적용하는 단계;

1차 통과 세포를 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 2차 통과 세포를 선택하기에 적합한 두 번째 구배에 적용하는 단계; 및

5% 이하의 혈청(예를 들면, 무혈청, 1% 미만의 혈청 또는 1 내지 5%의 혈청)을 포함한 배양 배지에 1 내지 5일이 지속하는 기간 동안 2차 통과 세포를 배양하는 단계

를 포함한, 본 발명의 구체예에 따라서 추출된 혈액을 사용하는 방법이 또한 추가로 제공된다.

혈액을 1.077 g/ml 미만의 밀도를 가진 1차 통과 세포를 선택하기에 적합한 첫 번째 구배에 적용하는 단계;

1차 통과 세포를 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 2차 통과 세포를 선택하기에 적합한 두 번째 구배에 적용하는 단계; 및

10% 이상의 혈청을 포함한 배양 배지에 1 내지 5일 지속하는 기간 동안 2차 통과 세포를 배양하는 단계를 포함한다, 본 발명의 구체예에 따라서 추출된 혈액을 사용하는 방법이 또한 추가로 제공된다.

한 구체예에서, 2차 통과 세포를 배양하는 단계는 20% 미만의 혈청을 포함한 배양 배지에 2차 통과 세포를 배양하는 단계를 포함한다.

혈액을 1.077 g/ml 미만의 밀도를 가진 1차 통과 세포를 선택하기에 적합한 첫 번째 구배에 적용하는 단계;

1차 통과 세포를 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 2차 통과 세포를 선택하기에 적합한 두 번째 구배에 적용하는 단계;

저혈청 시간 기간 동안, 10% 미만의 혈청을 포함한 배양 배지에 2차 통과 세포를 배양하는 단계; 및

고혈청 시간 기간 동안, 10% 이상의 혈청을 포함한 배양 배지에 2차 통과 세포를 배양하는 단계

를 포함한다, 본 발명의 구체예에 따라서 추출된 혈액을 사용하는 방법이 또한 추가로 제공된다.

한 구체예에서, 저혈청 시간 기간 동안 2차 통과 세포를 배양하는 단계는 1 내지 5일의 기간 동안 2차 통과 세포를 배양하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 고혈청 시간 기간 동안 2차 통과 세포를 배양하는 단계는 1 내지 30일의 기간 동안 2차 통과 세포를 배양하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 저혈청 시간 기간 동안 2차 통과 세포를 배양하는 단계는 고혈청 시간 기간 동안 2차 통과 세포를 배양하는 단계 전에 수행된다.

한 구체예에서, 저혈청 시간 기간 동안 2차 통과 세포를 배양하는 단계는 고혈청 시간 기간 동안 2차 통과 세포를 배양하는 단계 후에 수행된다.

혈액을 1.077 g/ml 미만의 밀도를 가진 1차 통과 세포를 선택하기에 적합한 첫 번째 구배에 적용하는 단계;

1차 통과 세포를 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 2차 통과 세포를 선택하기에 적합한 두 번째 구배에 적용하는 단계;

2시간 이상 지속하는 무산소 및/또는 고탄산가스(H/H) 시간 기간 동안, H/H 상태 하에 2차 통과 세포를 배양하는 단계; 및

1일 이상 지속하는 비-H/H 시간 기간 동안, 비-H/H 상태 하에 2차 통과 세포를 배양하는 단계

를 포함한다, 본 발명의 구체예에 따라서 추출된 혈액을 사용하는 방법이 또한 제공된다.

본 특허출원의 문맥 및 청구의 범위에서, 용어 고탄산가스는 5%를 넘는 CO<sub>2</sub> 농도를 말한다.

한 구체예에서, H/H 및 비-H/H 시간-기간은 30일 미만 지속하는 배양 시간 기간 내에 있고, H/H 상태 하에 2차 통과 세포를 배양하는 단계는 배양 시간 기간의 첫 번째 2일 동안 H/H 상태 하에서 2차 통과 세포를 배양하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, H/H 및 비-H/H 시간-기간은 30일 미만 지속하는 배양 시간 기간 내에 있고, H/H 상태 하에 2차 통과 세포를 배양하는 단계는 배양 시간 기간의 마지막 2일 동안 H/H 상태 하에서 2차 통과 세포를 배양하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, H/H 및 비-H/H 시간-기간은 30일 미만 지속하는 배양 시간 기간 내에 있고, H/H 상태 하에 2차 통과 세포를 배양하는 단계는 배양 시간 기간의 첫 번째 2일과 마지막 2일 사이의 2시간 이상 동안 H/H 상태 하에서 2차 통과 세포를 배양하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, H/H 상태 하에서 2차 통과 세포를 배양하는 단계는 비-H/H 상태 하에서 2차 통과 세포를 배양하는 단계 전에 수행된다.

한 구체예에서, H/H 상태 하에서 2차 통과 세포를 배양하는 단계는 비-H/H 상태 하에서 2차 통과 세포를 배양하는 단계 후에 수행된다.

혈액을 1.077 g/ml 미만의 밀도를 가진 1차 통과 세포를 선택하기에 적합한 첫 번째 구배에 적용하는 단계;

1차 통과 세포를 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 2차 통과 세포를 선택하기에 적합한 두 번째 구배에 적용하는 단계; 및

에리트로포이에틴, VEGF, IGF, FGF, 에스트로겐 패밀리의 분자(예를 들면, 17-β-에스트라디올, 에스트론, 에스트리올, 에스트라디올 유도체, 에스트라디올 길초산, 에스트라디올 사이피오네이트, 메스트라놀, 퀴네스트롤), 프로게스테론 패밀리의 분자(예를 들면, 프로게스테론, 히드록시프로게스테론 카로에이트, 메드록시프로게스테론 아세테이트), 스타틴(예를 들면, 심바스타틴, 아토바스타틴), 및 항당뇨병제(예를 들면, 로시글리타존) 중 하나 이상을 포함한 배양 배지에 2차 통과 세포를 배양하는 단계

를 포함한, 본 발명의 구체예에 따라서 추출된 혈액을 사용하는 방법이 또한 제공된다.

한 구체예에서, 항당뇨병제는 로시글리타존을 포함하고, 2차 통과 세포를 배양하는 단계는 로시글리타존을 포함한 배양 배지에 2차 통과 세포를 배양하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 스타틴은 심바스타틴 또는 아토바스타틴을 포함하고, 2차 통과 세포를 배양하는 단계는 심바스타틴 또는 아토바스타틴을 포함한 배양 배지에 2차 통과 세포를 배양하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 에스트로겐 및 프로게스틴 패밀리의 호르몬 분자는 17-β-에스트라디올 및 프로게스테론을 포함하고, 2차 통과 세포를 배양하는 단계는 17-β-에스트라디올 및/또는 프로게스테론을 포함한 배양 배지에 2차 통과 세포를 배양하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 에스트로겐 및 프로게스틴 패밀리의 호르몬 분자는 17-β-에스트라디올 및 프로게스테론을 포함하고, 2차 통과 세포를 배양하는 단계는 17-β-에스트라디올을 포함하고 특정 기간 후에 프로게스테론이 첨가되는 배양 배지에 2차 통과 세포를 배양하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 에스트로겐 및 프로게스틴 패밀리의 호르몬 분자는 17-β-에스트라디올 및 프로게스테론을 포함하고, 2차 통과 세포를 배양하는 단계는 프로게스테론을 포함하고 특정 기간 후에 17-β-에스트라디올이 첨가되는 배양 배지에 2차 통과 세포를 배양하는 단계를 포함한다.

줄기세포를 포함한 조직을 1.077 g/ml 미만의 밀도를 가진 1차 통과 세포를 선택하기에 적합한 첫 번째 구배에 적용하는 단계;

1차 통과 세포를 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 2차 통과 세포를 선택하기에 적합한 두 번째 구배에 적용하는 단계; 및

3 내지 30일 지속하는 기간 동안 2차 통과 세포를 배양함으로써 1.059 내지 1.068 g/ml의 밀도를 가진 세포의 수를 증가시키는 단계

를 포함한, 본 발명의 구체예에 따라서 추출된 줄기세포를 사용하는 방법이 또한 제공된다.

한 구체예에서, 상기 방법은 골수에서 줄기세포를 추출하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 상기 방법은 줄기세포의 추출을 촉진하기 위해서 골수에서 줄기세포를 이동시키는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 상기 방법은 혈액, 제대혈, 배아, 태아 또는 태반에서 줄기세포를 추출하는 단계를 포함한다.



한 구체예에서, 2차 통과 세포를 배양하는 단계는

첫 번째 부분의 기간 동안 첫 번째 용기에 2차 통과 세포를 배양하는 단계;

첫 번째 부분의 기간의 말에 첫 번째 용기에서 2차 통과 세포의 적어도 일부를 제거하는 단계; 및

두 번째 부분의 기간 동안 두 번째 용기에서 첫 번째 용기에서 제거한 세포를 배양하는 단계

를 포함한다.

한 구체예에서, 2차 통과 세포의 적어도 일부를 제거하는 단계는 첫 번째 용기의 표면에 부착된 세포를 제거하기 위하여 선택하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 2차 통과 세포의 적어도 일부를 제거하는 단계는 첫 번째 용기의 표면에 부착되지 않은 세포를 제거하기 위하여 선택하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 첫 번째 용기는 그것의 표면에 성장-중대 분자를 포함하고, 첫 번째 용기에 세포를 배양하는 단계는 성장-중대 분자를 포함하는 첫 번째 용기에 세포를 배양하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 두 번째 용기는 그것의 표면에 성장-중대 분자를 포함하고, 두 번째 용기에 세포를 배양하는 단계는 성장-중대 분자를 포함하는 두 번째 용기에 세포를 배양하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 성장-중대 분자는 혈장(자가, 동종이계 또는 이종일 수 있다), 콜라겐, 피브로넥틴, 성장 인자, 및 줄기세포 표면 수용체에 대한 항체로 구성된 목록에서 선택된다.

그러므로, 혈액을 1.077 g/ml 미만의 밀도를 가진 1차 통과 세포를 선택하기에 적합한 첫 번째 구배에 적용하는 단계;

1차 통과 세포를 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 2차 통과 세포를 선택하기에 적합한 두 번째 구배에 적용하는 단계;

3 내지 30일 지속하는 기간 동안 2차 통과 세포를 배양함으로써 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 세포의 수를 증가시키는 단계; 및

배양된 세포에 내피 전구 세포를 확인하는 단계

를 포함한, 본 발명의 구체예에 따라서 추출된 혈액을 사용하는 방법이 제공된다.

한 구체예에서, 혈액을 첫 번째 구배에 적용하는 단계는 혈액을 수크로스 및 에피클로로히드린의 코폴리머를 포함한 용액에 적용하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 1차 통과 세포를 두 번째 구배에 적용하는 단계는 1차 통과 세포를 아이오디사놀의 수용액에 적용하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 1차 통과 세포를 두 번째 구배에 적용하는 단계는 1차 통과 세포를 폴리비닐피롤리돈-코팅된 실리카 콜리드를 포함한 점진적 밀도 용액에 적용하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 혈액 세포를 첫 번째 구배에 적용하는 단계는 혈액 세포를 Ficoll-유사 구배에 적용하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 1차 통과 세포를 두 번째 구배에 적용하는 단계는 OptiPrep-유사 구배에 적용하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 1차 통과 세포를 두 번째 구배에 적용하는 단계는 1차 통과 세포를 Percoll-유사 구배에 적용하는 단계를 포함한다.

줄기세포를 포함한 조직을 1.077 g/ml 미만의 밀도를 가진 1차 통과 세포를 선택하기에 적합한 첫 번째 구배에 적용하는 단계;

1차 통과 세포를 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 2차 통과 세포를 선택하기에 적합한 두 번째 구배에 적용하는 단계;

2차 통과 세포를 1.055 내지 1.068 g/ml의 밀도를 가진 3차 통과 세포를 선택하기에 적합한 세 번째 구배에 적용하는 단계;

3 내지 30일 지속하는 기간 동안 3차 통과 세포를 배양함으로써 1.055 내지 1.068 g/ml의 밀도를 가진 세포의 수를 증가시키는 단계; 및

배양된 세포에 내피 전구 세포를 확인하는 단계

를 포함한, 본 발명의 구체예에 따라서 추출된 줄기세포를 사용하는 방법이 또한 제공된다.

한 구체예에서, 세 번째 구배는 1.059 내지 1.068 g/ml의 밀도를 가진 세포를 선택하기에 적합하고, 2차 통과 세포를 세 번째 구배에 적용하는 단계는 1.059 내지 1.068 g/ml의 밀도를 가진 세포를 선택하는 단계를 포함한다.

혈액을 1.077 g/ml 미만의 밀도를 가진 1차 통과 세포를 선택하기에 적합한 첫 번째 구배에 적용하는 단계;

1차 통과 세포를 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 2차 통과 세포를 선택하기에 적합한 두 번째 구배에 적용하는 단계;

2차 통과 세포를 혈장을 포함한 표면에 배양하는 단계; 및

배양된 세포에서 전구 세포를 확인하는 단계

를 포함한, 본 발명의 구체예에 따라서 추출된 혈액을 사용하는 방법이 또한 제공된다.

한 구체예에서, 배양하는 단계는 표면이 자가 혈장으로 코팅되었을 때 표면에 2차 통과 세포를 배양하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 배양하는 단계는 표면이 동종이계 혈장 및 이종 혈장으로 구성된 목록에서 선택된 하나 이상의 혈장으로 코팅되었을 때 표면에 2차 통과 세포를 배양하는 단계를 포함한다.

혈장을 포함한 표면에 조직을 배양하는 단계

를 포함한, 본 발명의 구체예에 따라서 추출된 조직을 사용하는 방법이 또한 제공된다.

한 구체예에서, 조직은 혈액을 포함한다.

한 구체예에서, 혈장은 자가 혈장을 포함한다.

혈액을 1.077 g/ml 미만의 밀도를 가진 1차 통과 세포를 선택하기에 적합한 첫 번째 구배에 적용하는 단계;

1차 통과 세포를 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 2차 통과 세포를 선택하기에 적합한 두 번째 구배에 적용하는 단계;

2차 통과 세포를 항체를 포함한 표면에 배양하는 단계; 및

배양된 세포에서 전구 세포를 확인하는 단계

를 포함한, 본 발명의 구체예에 따라서 조직을 사용하는 방법이 또한 제공된다.

한 구체예에서, 전구 세포는 내피 전구 세포(EPC)를 포함하고, 전구 세포를 확인하는 단계는 EPC를 확인하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 배양하는 단계는 표면이 자가 혈장으로 코팅되어 있을 때 표면에 2차 통과 세포를 배양하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 배양하는 단계는 표면이 동종이계 혈장 및 이종 혈장으로 구성된 목록에서 선택된 하나 이상의 혈장으로 코팅되었을 때 표면에 2차 통과 세포를 배양하는 단계를 포함한다.

혈액을 1.077 g/ml 미만의 밀도를 가진 1차 통과 세포를 선택하기에 적합한 첫 번째 구배에 적용하는 단계;

1차 통과 세포를 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 2차 통과 세포를 선택하기에 적합한 두 번째 구배에 적용하는 단계;

2차 통과 세포를 콜라겐 또는 피브로넥틴 이외에 성장-증대 분자를 포함한 표면에 배양하는 단계; 및

배양된 세포에서 전구 세포를 확인하는 단계

를 포함, 본 발명의 구체예에 따라서 추출된 혈액을 사용하는 방법이 또한 제공된다.

한 구체예에서, 전구 세포는 내피 전구 세포(EPC)를 포함하고, 전구 세포를 확인하는 단계는 EPC를 확인하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 2차 통과 세포를 배양하는 단계는 2차 통과 세포를 성장-증대 분자뿐만 아니라 콜라겐 및 피브로넥틴 중 하나 이상을 포함한 표면에 배양하는 단계를 포함한다.

혈액을 1.077 g/ml 미만의 밀도를 가진 1차 통과 세포를 선택하기에 적합한 첫 번째 구배에 적용하는 단계;

1차 통과 세포를 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 2차 통과 세포를 선택하기에 적합한 두 번째 구배에 적용하는 단계;

2차 통과 세포를 5% 이하의 혈청을 포함한 배양 배지에 1 내지 5일 지속하는 기간 동안 배양하는 단계; 및

배양된 세포에서 전구 세포를 확인하는 단계

를 포함, 본 발명의 구체예에 따라서 추출된 혈액을 사용하는 방법이 또한 제공된다.

한 구체예에서, 전구 세포는 내피 전구 세포(EPC)를 포함하고, 전구 세포를 확인하는 단계는 EPC를 확인하는 단계를 포함한다.

혈액을 1.077 g/ml 미만의 밀도를 가진 1차 통과 세포를 선택하기에 적합한 첫 번째 구배에 적용하는 단계;

1차 통과 세포를 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 2차 통과 세포를 선택하기에 적합한 두 번째 구배에 적용하는 단계;

2차 통과 세포를 10% 이상의 혈청을 포함한 배양 배지에 1 내지 5일 지속하는 기간 동안 배양하는 단계; 및

배양된 세포에서 전구 세포를 확인하는 단계

를 포함, 본 발명의 구체예에 따라서 추출된 혈액을 사용하는 방법이 또한 제공된다.

한 구체예에서, 2차 통과 세포를 배양하는 단계는 2차 통과 세포를 20% 미만의 혈청을 포함한 배양 배지에 배양하는 단계를 포함한다.

혈액을 1.077 g/ml 미만의 밀도를 가진 1차 통과 세포를 선택하기에 적합한 첫 번째 구배에 적용하는 단계;

1차 통과 세포를 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 2차 통과 세포를 선택하기에 적합한 두 번째 구배에 적용하는 단계;

저혈청 시간 기간 동안, 2차 통과 세포를 10% 미만의 혈청을 포함한 배양 배지에 배양하는 단계;

고혈청 시간 기간 동안, 2차 통과 세포를 10% 이상의 혈청을 포함한 배양 배지에 배양하는 단계;

배양된 세포에서 전구 세포를 확인하는 단계

를 포함한, 본 발명의 구체예에 따라서 추출된 혈액을 사용하는 방법이 또한 제공된다.

한 구체예에서, 저혈청 시간 기간 동안 2차 통과 세포를 배양하는 단계는 5% 이하의 혈청을 포함한 배양 배지에 2차 통과 세포를 배양하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 2차 통과 세포를 배양하는 단계는 무혈청 배양 배지에 2차 통과 세포를 배양하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 저혈청 시간 기간 동안 2차 통과 세포는 1 내지 5일 기간 동안 2차 통과 세포를 배양하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 고혈청 시간 기간 동안 2차 통과 세포를 배양하는 단계는 1 내지 30일 동안 2차 통과 세포를 배양하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 저혈청 시간 기간 동안 2차 통과 세포를 배양하는 단계는 고혈청 시간 기간 동안 2차 통과 세포를 배양하는 단계 전에 수행된다.

한 구체예에서, 저혈청 시간 기간 동안 2차 통과 세포를 배양하는 단계는 고혈청 시간 기간 동안 2차 통과 세포를 배양하는 단계 후에 수행된다.

혈액을 1.077 g/ml 미만의 밀도를 가진 1차 통과 세포를 선택하기에 적합한 첫 번째 구배에 적용하는 단계;

1차 통과 세포를 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 2차 통과 세포를 선택하기에 적합한 두 번째 구배에 적용하는 단계;

2시간 이상 지속하는 저산소 시간 기간 동안, 2차 통과 세포를 저산소 상태 하에 배양하는 단계;

1일 이상 지속하는 비-저산소 시간 기간 동안, 2차 통과 세포를 비-저산소 상태 하에 배양하는 단계; 및

배양된 세포에서 전구 세포를 확인하는 단계

를 포함한, 본 발명의 구체예에 따라서 추출된 혈액을 사용하는 방법이 또한 제공된다.

한 구체예에서, 전구 세포는 내피 전구 세포(EPC)를 포함하고, 전구 세포를 확인하는 단계는 EPC를 확인하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 저산소 및 비-저산소 시간 기간은 30일 미만 지속하는 배양 시간 기간 내에 있고, 저산소 상태 하에 2차 통과 세포를 배양하는 단계는 배양 시간 기간의 첫 번째 2일 동안 저산소 상태 하에 2차 통과 세포를 배양하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 저산소 및 비-저산소 시간 기간은 30일 미만 지속하는 배양 시간 기간 내에 있고, 저산소 상태 하에 2차 통과 세포를 배양하는 단계는 배양 시간 기간의 마지막 2일 동안 저산소 상태 하에 2차 통과 세포를 배양하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 저산소 및 비-저산소 시간 기간은 30일 미만 지속하는 배양 시간 기간 내에 있고, 저산소 상태 하에 2차 통과 세포를 배양하는 단계는 배양 시간 기간의 첫 번째 2일과 마지막 2일 사이의 2시간 이상 동안 저산소 상태 하에 2차 통과 세포를 배양하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 저산소 상태 하에 2차 통과 세포를 배양하는 단계는 비-저산소 상태 하에 2차 통과 세포를 배양하는 단계 전에 수행된다.

한 구체예에서, 저산소 상태 하에 2차 통과 세포를 배양하는 단계는 비-저산소 상태 하에 2차 통과 세포를 배양하는 단계 후에 수행된다.

혈액을 첫 번째 원하는 밀도 범위를 가진 세포를 선택하기 위한 구매에 적용하는 단계;

에스트로젠을 포함한 배지 및 그 후 프로게스틴을 포함한 배지에 선택된 세포를 배양함으로써 두 번째 원하는 밀도 범위를 가진 세포의 수를 증가시키는 단계; 및

배양된 세포에서 전구 세포를 확인하는 단계

를 포함한, 본 발명의 구체예에 따라서 추출된 혈액을 사용하는 방법이 또한 제공된다.

혈액을 첫 번째 원하는 밀도 범위를 가진 세포를 선택하기 위한 구매에 적용하는 단계;

프로게스틴을 포함한 배지 및 그 후 에스트로젠을 포함한 배지에 선택된 세포를 배양함으로써 두 번째 원하는 밀도 범위를 가진 세포의 수를 증가시키는 단계; 및

배양된 세포에서 전구 세포를 확인하는 단계

를 포함한, 본 발명의 구체예에 따라서 추출된 혈액을 사용하는 방법이 또한 제공된다.

혈액을 첫 번째 원하는 밀도 범위를 가진 세포를 선택하기 위한 구매에 적용하는 단계;

에스트로젠 및 프로게스틴을 포함한 배지에 선택된 세포를 배양함으로써 두 번째 원하는 밀도 범위를 가진 세포의 수를 증가시키는 단계; 및

배양된 세포에서 전구 세포를 확인하는 단계

를 포함한, 본 발명의 구체예에 따라서 추출된 혈액을 사용하는 방법이 또한 제공된다.

한 구체예에서, 프로게스틴은 프로게스테론을 포함한다.

한 구체예에서, 에스트로젠은 에스트라디올을 포함한다.

한 구체예에서, 배양하는 단계는 3 내지 30일 지속하는 기간 동안 배양하는 단계를 포함한다.

혈액을 1.077 g/ml 미만의 밀도를 가진 1차 통과 세포를 선택하기에 적합한 첫 번째 구매에 적용하는 단계;

1차 통과 세포를 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 2차 통과 세포를 선택하기에 적합한 두 번째 구매에 적용하는 단계;

2 시간 이상 지속하는 탄산가스 시간 기간 동안, 2차 통과 세포를 5%를 넘는 CO<sub>2</sub> 수준을 특징으로 하는 고탄산가스 상태 하에 배양하는 단계;

1일 이상 지속하는 비-탄산가스 시간 기간 동안, 2차 통과 세포를 5% 이하의 CO<sub>2</sub> 수준을 특징으로 하는 비-고탄산가스 상태 하에 배양하는 단계; 및

배양된 세포에서 전구 세포를 확인하는 단계

를 포함한, 본 발명의 구체예에 따라서 추출된 혈액을 사용하는 방법이 또한 제공된다.

한 구체예에서, 고탄산가스 시간 기간 동안 CO<sub>2</sub> 수준이 6%가 되도록 설정한다.

한 구체예에서, 고탄산가스 및 비-고탄산가스 시간 기간은 30일 미만 지속하는 배양 시간 기간 내에 있고, 고탄산가스 상태 하에 2차 통과 세포를 배양하는 단계는 배양 시간 기간의 첫 번째 2일 동안 고탄산가스 상태 하에 2차 통과 세포를 배양하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 고탄산가스 및 비-고탄산가스 시간 기간은 30일 미만 지속하는 배양 시간 기간 내에 있고, 고탄산가스 상태 하에 2차 통과 세포를 배양하는 단계는 배양 시간 기간의 마지막 2일 동안 고탄산가스 상태 하에 2차 통과 세포를 배양하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 고탄산가스 및 비-고탄산가스 시간 기간은 30일 미만 지속하는 배양 시간 기간 내에 있고, 고탄산가스 상태 하에 2차 통과 세포를 배양하는 단계는 배양 시간 기간의 첫 번째 2일과 마지막 2일 사이의 2시간 이상 동안 고탄산가스 상태 하에 2차 통과 세포를 배양하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 고탄산가스 상태 하에 2차 통과 세포를 배양하는 단계는 비-고탄산가스 상태 하에 2차 통과 세포를 배양하는 단계 전에 수행된다.

한 구체예에서, 고탄산가스 상태 하에 2차 통과 세포를 배양하는 단계는 비-고탄산가스 상태 하에 2차 통과 세포를 배양하는 단계 전에 수행된다.

혈액을 1.077 g/ml 미만의 밀도를 가진 1차 통과 세포를 선택하기에 적합한 첫 번째 구배에 적용하는 단계;

1차 통과 세포를 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 2차 통과 세포를 선택하기에 적합한 두 번째 구배에 적용하는 단계;

에리트르포이에틴, VEGF, IGF, FGF, 에스트로젠, 17-β-에스트라디올, 에스트론, 에스트리올, 에스트라디올 유도체, 에스트라디올 길초산, 에스트라디올 사이피오네이트, 메스트라놀, 퀴네스트롤, 프로게스틴, 프로게스틴 패밀리의 분자, 프로게스테론, 합성 프로게스테론, 히드록시프로게스테론 카로에이트, 메드록시프로게스테론 아세테이트, 스타틴, 심바스타틴, 아토바스타틴, 및 항당뇨병제, 및 로시글리타존으로 구성된 목록에서 선택된 하나 이상을 포함한 배양 배지에 2차 통과 세포를 배양하는 단계; 및

배양된 세포에서 전구 세포를 확인하는 단계

를 포함한, 본 발명의 구체예에 따라서 추출된 혈액을 사용하는 방법이 또한 제공된다.

줄기세포를 포함한 조직을 1.077 g/ml 미만의 밀도를 가진 1차 통과 세포를 선택하기에 적합한 첫 번째 구배에 적용하는 단계;

1차 통과 세포를 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 2차 통과 세포를 선택하기에 적합한 두 번째 구배에 적용하는 단계;

3 내지 30일 지속하는 기간 동안 2차 통과 세포를 배양함으로써 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 세포의 수를 증가시키는 단계; 및

배양된 세포에서 전구 세포를 확인하는 단계

를 포함한, 본 발명의 구체예에 따라서 추출된 줄기세포를 사용하는 방법이 또한 제공된다.

한 구체예에서, 조직을 적용하는 단계는 제대혈을 첫 번째 구배에 적용하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 조직을 적용하는 단계는 배아 세포를 첫 번째 구배에 적용하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 조직을 적용하는 단계는 태반 세포를 첫 번째 구배에 적용하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 조직을 적용하는 단계는 태아 세포를 첫 번째 구배에 적용하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 골수로부터 줄기세포를 추출하는 것.

한 구체예에서, 줄기세포의 추출을 촉진하기 위해서 골수로부터 줄기세포를 이동시키는 것.

한 구체예에서, 말초 혈액으로부터 줄기세포를 추출하는 것.

한 구체예에서, 2차 통과 세포를 배양하는 단계는

첫 번째 부분의 기간 동안 첫 번째 용기에 2차 통과 세포를 배양하는 단계;

첫 번째 부분의 기간의 말에 첫 번째 용기로부터 2차 통과 세포의 적어도 일부를 제거하는 단계; 및

두 번째 부분의 기간 동안 두 번째 용기에 첫 번째 용기로부터 제거된 세포를 배양하는 단계

를 포함한다.

한 구체예에서, 2차 통과 세포의 적어도 일부를 제거하는 단계는 첫 번째 용기의 표면에 부착된 세포를 제거하기 위하여 선택하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 2차 통과 세포 중 적어도 일부를 제거하는 단계는 첫 번째 용기의 표면에 부착하지 않은 세포를 제거하기 위하여 선택하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 첫 번째 용기는 그것의 표면에 성장-증대 분자를 포함하고, 첫 번째 용기에 세포를 배양하는 단계는 성장-증대 분자를 포함하는 첫 번째 용기에 세포를 배양하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 성장-증대 분자는 혈장, 콜라겐, 피브로넥틴, 성장 인자 및 줄기세포 표면 수용체에 대한 항체로 구성된 목록 중에서 선택된다.

한 구체예에서, 두 번째 용기는 그것의 표면에 성장-증대 분자를 포함하고, 두 번째 용기에 세포를 배양하는 단계는 성장-증대 분자를 포함하는 두 번째 용기에 세포를 배양하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 성장-증대 분자는 혈장, 콜라겐, 피브로넥틴, 성장 인자 및 줄기세포 표면 수용체에 대한 항체로 구성된 목록 중에서 선택된다.

피험체의 말초 신경의 조직, 피험체의 중추신경계 신경의 조직, 피험체의 시신경, 피험체의 맥락막 조직, 피험체의 망막 조직, 피험체의 하위-망막 공간, 피험체의 각막 조직, 피험체의 신장 조직, 피험체의 손상된 뼈의 조직, 피험체의 골절된 뼈의 조직, 피험체의 염증이 있는 조직, 피험체의 감염된 조직, 피험체의 멍든 조직, 피험체의 피부, 뇌 조직의 궤양 또는 상처입은 조직, 피험체의 사지의 조직, 피부 이식의 조직 및 피험체의 재부착된 중증 사지의 조직으로 구성된 목록에서 선택된 피험체의 조직 또는 공간 부근에 내피 전구 세포(EPC)를 적용하는 단계를 포함한, 본 발명의 구체예에 따라서 상태를 치료하는 방법이 또한 제공된다.

한 구체예에서, 상기 방법은

혈액을 1.077 g/ml 미만의 밀도를 가진 1차 통과 세포를 선택하기에 적합한 첫 번째 구배에 적용하는 단계;

1차 통과 세포를 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 2차 통과 세포를 선택하기에 적합한 두 번째 구배에 적용하는 단계; 및

3 내지 30일 지속하는 기간 동안 2차 통과 세포를 배양함으로써 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 세포의 수를 증가시키는 단계

에 의하여 EPC를 생성하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 상기 방법은

줄기세포를 포함한 조직을 1.077 g/ml 미만의 밀도를 가진 1차 통과 세포를 선택하기에 적합한 첫 번째 구배에 적용하는 단계;

1차 통과 세포를 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 2차 통과 세포를 선택하기에 적합한 두 번째 구배에 적용하는 단계;

2차 통과 세포를 1.055 내지 1.068 g/ml의 밀도를 가진 3차 통과 세포를 선택하기에 적합한 세 번째 구배에 적용하는 단계; 및

3 내지 30일 지속하는 기간 동안 3차 통과 세포를 배양함으로써 1.055 내지 1.068 g/ml의 밀도를 가진 세포의 수를 증가시키는 단계

에 의하여 EPC를 생성하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 상기 방법은

혈액을 1.077 g/ml 미만의 밀도를 가진 1차 통과 세포를 선택하기에 적합한 첫 번째 구배에 적용하는 단계;

1차 통과 세포를 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 2차 통과 세포를 선택하기에 적합한 두 번째 구배에 적용하는 단계; 및

항체를 포함한 표면에 2차 통과 세포를 배양하는 단계

에 의하여 EPC를 생성하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 상기 방법은

혈액을 1.077 g/ml 미만의 밀도를 가진 1차 통과 세포를 선택하기에 적합한 첫 번째 구배에 적용하는 단계;

1차 통과 세포를 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 2차 통과 세포를 선택하기에 적합한 두 번째 구배에 적용하는 단계; 및

콜라겐 또는 피브로넥틴 이외에 성장-증대 분자를 포함한 표면에 2차 통과 세포를 배양하는 단계

에 의하여 EPC를 생성하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 상기 방법은

혈액을 1.077 g/ml 미만의 밀도를 가진 1차 통과 세포를 선택하기에 적합한 첫 번째 구배에 적용하는 단계;



1차 통과 세포를 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 2차 통과 세포를 선택하기에 적합한 두 번째 구배에 적용하는 단계; 및

5% 이하의 혈청을 포함한 배양 배지에 1 내지 5일 지속하는 기간 동안 2차 통과 세포를 배양하는 단계에 의하여 EPC를 생성하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 상기 방법은

혈액을 1.077 g/ml 미만의 밀도를 가진 1차 통과 세포를 선택하기에 적합한 첫 번째 구배에 적용하는 단계;

1차 통과 세포를 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 2차 통과 세포를 선택하기에 적합한 두 번째 구배에 적용하는 단계; 및

10%를 넘는 혈청을 포함한 배양 배지에 1 내지 5일 지속하는 기간 동안 2차 통과 세포를 배양하는 단계에 의하여 EPC를 생성하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 상기 방법은

혈액을 1.077 g/ml 미만의 밀도를 가진 1차 통과 세포를 선택하기에 적합한 첫 번째 구배에 적용하는 단계;

1차 통과 세포를 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 2차 통과 세포를 선택하기에 적합한 두 번째 구배에 적용하는 단계;

저혈청 시간 기간 동안, 10% 미만의 혈청을 포함한 배양 배지에 2차 통과 세포를 배양하는 단계; 및

고혈청 시간 기간 동안, 10% 이상의 혈청을 포함한 배양 배지에 2차 통과 세포를 배양하는 단계에 의하여 EPC를 생성하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 상기 방법은

혈액을 1.077 g/ml 미만의 밀도를 가진 1차 통과 세포를 선택하기에 적합한 첫 번째 구배에 적용하는 단계;

1차 통과 세포를 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 2차 통과 세포를 선택하기에 적합한 두 번째 구배에 적용하는 단계;

2시간 이상 지속하는 저산소 시간 기간 동안, 저산소 상태 하에 2차 통과 세포를 배양하는 단계; 및

1일 이상 지속하는 비-저산소 시간 기간 동안, 비-저산소 상태 하에 2차 통과 세포를 배양하는 단계에 의하여 EPC를 생성하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 상기 방법은

혈액을 1.077 g/ml 미만의 밀도를 가진 1차 통과 세포를 선택하기에 적합한 첫 번째 구배에 적용하는 단계;

1차 통과 세포를 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 2차 통과 세포를 선택하기에 적합한 두 번째 구배에 적용하는 단계;

2시간 이상 지속하는 고탄산가스 시간 기간 동안, 5%를 넘는 CO<sub>2</sub> 수준을 특징으로 하는 고탄산가스 상태 하에 2차 통과 세포를 배양하는 단계; 및

1일 이상 지속하는 비-고탄산가스 시간 기간 동안, 5% 이하의 CO<sub>2</sub> 수준을 특징으로 하는 비-고탄산가스 상태 하에 2차 통과 세포를 배양하는 단계

에 의하여 EPC를 생성하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 상기 방법은

혈액을 1.077 g/ml 미만의 밀도를 가진 1차 통과 세포를 선택하기에 적합한 첫 번째 구배에 적용하는 단계;

1차 통과 세포를 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 2차 통과 세포를 선택하기에 적합한 두 번째 구배에 적용하는 단계;

에리트르포이에틴, 에스트로젠, 에스트로젠-페밀리 분자, 17-β-에스트라디올, 에스트론, 에스트리올, 에스트라디올 유도체, 에스트라디올 길초산, 에스트라디올 사이피오네이트, 메스트라놀, 퀴네스트롤, 프로게스틴, 프로게스틴-페밀리 분자, 프로게스테론, 합성 프로게스테론, 히드록시프로게스테론 카로에이트, 메드록시프로게스테론 아세테이트, 스타틴, 심바스타틴, 아토바스타틴, 항당뇨병제, 및 로시글리타존으로 구성된 목록에서 선택된 하나 이상의 제제를 포함한 배양 배지에 2차 통과 세포를 배양하는 단계;

줄기세포를 포함한 조직을 1.077 g/ml 미만의 밀도를 가진 1차 통과 세포를 선택하기에 적합한 첫 번째 구배에 적용하는 단계;

1차 통과 세포를 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 2차 통과 세포를 선택하기에 적합한 두 번째 구배에 적용하는 단계; 및

3 내지 30일 지속하는 기간 동안 2차 통과 세포를 배양함으로써 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 세포의 수를 증가시키는 단계

에 의하여 EPC를 생성하는 단계를 포함한다.

혈액을 1.077 g/ml 미만의 밀도를 가진 1차 통과 세포를 선택하기에 적합한 첫 번째 구배에 적용하는 단계;

1차 통과 세포를 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 2차 통과 세포를 선택하기에 적합한 두 번째 구배에 적용하는 단계;

1 내지 30일 지속하는 기간 동안 2차 통과 세포를 배양함으로써 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 세포의 수를 증가시키는 단계; 및

배양된 세포에서 전구 세포를 확인하는 단계

를 포함한, 본 발명의 구체예에 따라서 추출된 혈액을 사용하는 방법이 또한 제공된다.

한 구체예에서, 전구 세포는 내피 전구 세포(EPC)를 포함하고, 전구 세포를 확인하는 단계는 EPC를 확인하는 단계를 포함한다.

혈액을 1.077 g/ml 미만의 밀도를 가진 1차 통과 세포를 선택하기에 적합한 첫 번째 구배에 적용하는 단계;

1차 통과 세포를 그것의 첫 번째 및 두 번째 부분으로 각각 나누는 단계;

1차 통과 세포의 첫 번째 부분을 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 2차 통과 세포를 선택하기에 적합한 두 번째 구배에 적용하는 단계;

1차 통과 세포의 두 번째 부분을 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 세포와 혼합하는 단계;

3 내지 30일 지속하는 기간 동안 2차 통과 세포를 배양함으로써 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 세포의 수를 증가시키는 단계; 및

배양된 세포에서 전구 세포를 확인하는 단계

를 포함한, 본 발명의 구체예에 따라서 추출된 혈액을 사용하는 방법이 또한 제공된다.

한 구체예에서, 1차 통과 세포를 나누는 단계는 첫 번째 부분이 두 번째 부분보다 크게 되도록 설정하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 1차 통과 세포를 나누는 단계는 첫 번째 부분이 두 번째 부분보다 작게 되도록 설정하는 단계를 포함한다.

혈액을 첫 번째 원하는 밀도 범위를 가진 세포를 선택하기 위한 구배에 적용하는 단계;

3 내지 30일 지속하는 기간 동안 선택된 세포를 배양함으로써 두 번째 원하는 밀도 범위를 가진 세포의 수를 증가시키는 단계; 및

배양된 세포에서 전구 세포를 확인하는 단계

를 포함한, 본 발명의 구체예에 따라서 추출된 혈액을 사용하는 방법이 또한 제공된다.

한 구체예에서, 혈액을 구배에 적용하는 단계는 혈액을 1.077 g/ml 미만의 밀도를 가진 세포를 선택하기에 적합한 구배에 적용하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 혈액을 구배에 적용하는 단계는 혈액을 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 세포를 선택하기에 적합한 구배에 적용하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 세포의 수를 증가시키는 단계는 4 내지 8일 지속하는 기간 동안 배양하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 혈액을 구배에 적용하는 단계는 혈액을 수크로스 및 에피클로로히드린의 코폴리머를 포함한 용액에 적용하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 혈액을 구배에 적용하는 단계는 혈액을 폴리비닐피롤리돈-코팅된 실리카 콜리드를 포함한 점진적 밀도 용액에 적용하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 혈액을 구배에 적용하는 단계는 혈액을 아이오디사놀의 수용액에 적용하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 혈액을 구배에 적용하는 단계는 혈액을 Ficoll-유사 구배에 적용하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 혈액을 구배에 적용하는 단계는 혈액을 OptiPrep-유사 구배에 적용하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 혈액을 구배에 적용하는 단계는 혈액을 Percoll-유사 구배에 적용하는 단계를 포함한다.

혈액을 원하는 밀도 범위를 가진 세포를 선택하기 위한 구배에 적용하는 단계;

자가 혈장을 포함한 표면에 3 내지 30일 지속하는 기간 동안 선택된 세포를 배양하는 단계;

배양된 세포에서 전구 세포를 확인하는 단계

를 포함한, 본 발명의 구체예에 따라서 추출된 혈액을 사용하는 방법이 또한 제공된다.

혈액을 원하는 밀도 범위를 가진 세포를 선택하기 위한 구배에 적용하는 단계;

항체를 포함한 표면에 선택된 세포를 배양하는 단계; 및

배양된 세포에서 전구 세포를 확인하는 단계

를 포함한, 본 발명의 구체예에 따라서 추출된 혈액을 사용하는 방법이 또한 제공된다.

한 구체예에서, 배양하는 단계는 표면이 자가 혈장으로 코팅될 때 표면에 세포를 배양하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 배양하는 단계는 표면이 동종이계 혈장 및 이종 혈장으로 구성된 목록에서 선택된 하나 이상의 혈장으로 코팅될 때 표면에 세포를 배양하는 단계를 포함한다.

혈액을 원하는 밀도 범위를 가진 세포를 선택하기 위한 구배에 적용하는 단계;

콜라겐 또는 피브로넥틴 이외에 성장-증대 분자를 포함한 표면에 선택된 세포를 배양하는 단계; 및

배양된 세포에서 전구 세포를 확인하는 단계

를 포함한, 본 발명의 구체예에 따라서 추출된 혈액을 사용하는 방법이 또한 제공된다.

한 구체예에서, 배양하는 단계는 성장-증대 분자뿐만 아니라 콜라겐 및 피브로넥틴 중 하나 이상을 포함하는 표면에 세포를 배양하는 단계를 포함한다.

혈액을 원하는 밀도 범위를 가진 세포를 선택하기 위한 구배에 적용하는 단계;

선택된 세포를 5% 이하의 혈청을 포함한 배양 배지에 1 내지 5일 지속하는 기간 동안 배양하는 단계; 및

배양된 세포에서 전구 세포를 확인하는 단계

를 포함한, 본 발명의 구체예에 따라서 추출된 혈액을 사용하는 방법이 또한 제공된다.

혈액을 원하는 밀도 범위를 가진 세포를 선택하기 위한 구배에 적용하는 단계;

선택된 세포를 10%를 넘는 혈청을 포함한 배양 배지에 1 내지 5일 지속하는 기간 동안 배양하는 단계; 및

배양된 세포에서 전구 세포를 확인하는 단계

를 포함한, 본 발명의 구체예에 따라서 추출된 혈액을 사용하는 방법이 또한 제공된다.

한 구체예에서, 세포를 배양하는 단계는 20% 미만의 혈청을 포함한 배양 배지에 세포를 배양하는 단계를 포함한다.

혈액을 원하는 밀도 범위를 가진 세포를 선택하기 위한 구배에 적용하는 단계;

저혈청 시간 기간 동안, 선택된 세포를 10% 미만의 혈청을 포함한 배양 배지에 배양하는 단계;

고혈청 시간 기간 동안, 선택된 세포를 10% 이상의 혈청을 포함한 배양 배지에 배양하는 단계;

배양된 세포에서 전구 세포를 확인하는 단계

를 포함한, 본 발명의 구체예에 따라서 추출된 혈액을 사용하는 방법이 또한 제공된다.

한 구체예에서, 저혈청 시간 기간 동안 세포를 배양하는 단계는 5% 이하의 혈청을 포함한 배양 배지에 세포를 배양하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 저혈청 시간 기간 동안 세포를 배양하는 단계는 무혈청 배양 배지에 세포를 배양하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 저혈청 시간 기간 동안 세포를 배양하는 단계는 1 내지 5일의 기간 동안 세포를 배양하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 고혈청 시간 기간 동안 세포를 배양하는 단계는 1 내지 30일의 기간 동안 세포를 배양하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 저혈청 시간 기간 동안 세포를 배양하는 단계는 고혈청 시간 기간 동안 세포를 배양하는 단계 전에 수행된다.

한 구체예에서, 저혈청 시간 기간 동안 세포를 배양하는 단계는 고혈청 시간 기간 동안 세포를 배양하는 단계 후에 수행된다.

혈액을 원하는 밀도 범위를 가진 세포를 선택하기 위한 구배에 적용하는 단계;

2 시간 이상 지속하는 저산소 시간 기간 동안, 선택된 세포를 저산소 상태 하에 배양하는 단계;

1일 이상 지속하는 비-저산소 시간 기간 동안, 선택된 세포를 비-저산소 상태 하에 배양하는 단계; 및

배양된 세포에서 전구 세포를 확인하는 단계

를 포함한, 본 발명의 구체예에 따라서 추출된 혈액을 사용하는 방법이 또한 제공된다.

한 구체예에서, 저산소 및 비-저산소 시간 기간은 30일 미만 지속하는 배양 시간 기간 내에 있고, 저산소 상태하에 세포를 배양하는 단계는 배양 시간 기간의 첫 번째 2일 동안 저산소 상태 하에 세포를 배양하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 저산소 및 비-저산소 시간 기간은 30일 미만 지속하는 배양 시간 기간 내에 있고, 저산소 상태하에 세포를 배양하는 단계는 배양 시간 기간의 마지막 2일 동안 저산소 상태 하에 세포를 배양하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 저산소 및 비-저산소 시간 기간은 30일 미만 지속하는 배양 시간 기간 내에 있고, 저산소 상태하에 세포를 배양하는 단계는 배양 시간 기간의 첫 번째 2일과 마지막 2일 사이에 2시간 이상 동안 저산소 상태 하에 세포를 배양하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 저산소 상태 하에 세포를 배양하는 단계는 비-저산소 상태 하에 세포를 배양하는 단계 전에 수행된다.

한 구체예에서, 저산소 상태 하에 세포를 배양하는 단계는 비-저산소 상태 하에 세포를 배양하는 단계 후에 수행된다.

혈액을 원하는 밀도 범위를 가진 세포를 선택하기 위한 구배에 적용하는 단계;

2 시간 이상 지속하는 고탄산가스 시간 기간 동안, 5%를 넘는 CO<sub>2</sub> 수준을 특징으로 하는 고탄산가스 상태 하에 선택된 세포를 배양하는 단계;

1일 이상 지속하는 비-고탄산가스 시간 기간 동안, 5% 이하의 CO<sub>2</sub> 수준을 특징으로 하는 비-고탄산가스 상태 하에 선택된 세포를 배양하는 단계;

배양된 세포에서 전구 세포를 확인하는 단계

를 포함한, 본 발명의 구체예에 따라서 추출된 혈액을 사용하는 방법이 또한 제공된다.

한 구체예에서, 상기 방법은 고탄산가스 시간 기간 동안 CO<sub>2</sub> 수준이 6% 이상 되도록 설정하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 고탄산가스 및 비-고탄산가스 시간 기간은 30일 미만 지속하는 배양 시간 기간 내에 있고, 고탄산가스 상태 하에 세포를 배양하는 단계는 배양 시간 기간의 첫 번째 2일 동안 고탄산가스 상태 하에 세포를 배양하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 고탄산가스 및 비-고탄산가스 시간 기간은 30일 미만 지속하는 배양 시간 기간 내에 있고, 고탄산가스 상태 하에 세포를 배양하는 단계는 배양 시간 기간의 마지막 2일 동안 고탄산가스 상태 하에 세포를 배양하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 고탄산가스 및 비-고탄산가스 시간 기간은 30일 미만 지속하는 배양 시간 기간 내에 있고, 고탄산가스 상태 하에 세포를 배양하는 단계는 배양 시간 기간의 첫 번째 2일과 마지막 2일 사이에 2시간 이상 동안 고탄산가스 상태 하에 세포를 배양하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 고탄산가스 상태 하에 세포를 배양하는 단계는 비-고탄산가스 상태 하에 세포를 배양하는 단계 전에 수행된다.

한 구체예에서, 고탄산가스 상태 하에 세포를 배양하는 단계는 비-고탄산가스 상태 하에 세포를 배양하는 단계 후에 수행된다.

혈액을 첫 번째 원하는 밀도 범위를 가진 세포를 선택하기 위한 구배에 적용하는 단계;

VEGF, IGF, FGF, 에리트로포이에틴, 에스트로젠, 에스트로젠-패밀리 분자, 17-β-에스트라디올, 에스트론, 에스트리올, 에스트라디올 유도체, 에스트라디올 길초산, 에스트라디올 사이피오네이트, 메스트라놀, 퀴네스톨, 프로게스틴, 프로게스틴-패밀리 분자, 프로게스테론, 합성 프로게스테론, 히드록시프로게스테론 카로에이트, 메드록시프로게스테론 아세트산, 스타틴, 심바스타틴, 아토바스타틴, 항당뇨병제, 및 로시글리타존; 및

배양된 세포에서 전구 세포를 확인하는 단계

를 포함한, 본 발명의 구체예에 따라서 추출된 혈액을 사용하는 방법이 또한 제공된다.

한 구체예에서, 전구 세포는 내피 전구 세포(EPC)를 포함하고, 전구 세포를 확인하는 단계는 EPC를 확인하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 혈액을 구배에 적용하는 단계는 혈액을 1.077 g/ml 미만의 밀도를 가진 세포를 선택하기에 적합한 구배에 적용하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 혈액을 구배에 적용하는 단계는 혈액을 1.055 내지 1.074 g/ml의 밀도를 가진 세포를 선택하기에 적합한 구배에 적용하는 단계를 포함한다.

줄기세포를 포함한 조직을 첫 번째 원하는 밀도 범위를 가진 세포를 선택하기 위한 구배에 적용하는 단계;

3 내지 30일 지속하는 기간 동안 선택된 세포를 배양함으로써 두 번째 원하는 밀도 범위를 가진 세포의 수를 증가시키는 단계; 및

배양된 세포에서 전구 세포를 확인하는 단계

를 포함한, 본 발명의 구체예에 따라서 추출된 혈액을 사용하는 방법이 또한 제공된다.

한 구체예에서, 조직을 적용하는 단계는 제대혈을 구배에 적용하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 조직을 적용하는 단계는 배아 세포를 구배에 적용하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 조직을 적용하는 단계는 태아 세포를 구배에 적용하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 조직을 적용하는 단계는 태반 세포를 구배에 적용하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 상기 방법은 골수로부터 줄기세포를 추출하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 상기 방법은 줄기세포의 추출을 촉진하기 위해서 골수로부터 줄기세포를 이동하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 상기 방법은 혈액으로부터 줄기세포를 추출하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 상기 방법은

첫 번째 부분의 기간 동안 첫 번째 용기에 세포를 배양하는 단계;

첫 번째 부분의 기간의 말에 첫 번째 용기로부터 세포의 적어도 일부를 제거하는 단계; 및

두 번째 부분의 기간 동안 두 번째 용기에 첫 번째 용기로부터 제거된 세포를 배양하는 단계

를 포함, 세포를 배양하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 상기 방법은 첫 번째 용기의 표면에 부착된 세포를 제거하기 위하여 선택하는 단계를 포함한 세포의 적어도 일부를 제거하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 세포의 적어도 일부를 제거하는 단계는 첫 번째 용기의 표면에 부착되지 않은 세포를 제거하기 위하여 선택하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 첫 번째 용기는 그것의 표면에 성장-중대 분자를 포함하고, 첫 번째 용기에 세포를 배양하는 단계는 성장-중대 분자를 포함한 첫 번째 용기에 세포를 배양하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 성장-중대 분자는 혈장, 콜라겐, 피브로넥틴, 성장 인자 및 줄기세포 표면 수용체에 대한 항체로 구성된 목록에서 선택된다.

한 구체예에서, 두 번째 용기는 그것의 표면에 성장-중대 분자를 포함하고, 두 번째 용기에 세포를 배양하는 단계는 성장-중대 분자를 포함한 두 번째 용기에 세포를 배양하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 성장-중대 분자는 혈장, 콜라겐, 피브로넥틴, 성장 인자 및 줄기세포 표면 수용체에 대한 항체로 구성된 목록에서 선택된다.

## 실시예

### 실시예 1: T-75 플라스크를 자가 혈장으로 코팅

20 T-75 플라스크의 경우: 세포 제조 당일에 제조한다.

T-75 플라스크 표면을 혈장으로 코팅하는 단계는 원심분리된 조직 샘플로부터 제거된 자가 혈장을 사용하여 실시될 수 있거나, 또는 예를 들면 미국 캘리포니아주 Temecula의 Chemicon으로부터 상업적으로 입수가 가능한 혈장과 같은 상이한 공급원으로부터 얻어지는 혈장으로 실시될 수 있다.

Ficoll 튜브의 상위 부분으로부터 혈장을 수집한다.

2-5 ml의 혈장으로 각 플라스크를 채운다.

37°C에서 적어도 30분간 인큐베이션한다.

혈장을 버린다.

10 ml의 PBS로 플라스크를 2회 세척한다.

플라스크는 사용할 준비가 된다.

**실시예 2: T-75 플라스크를 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 피브로넥틴으로 코팅**

20 T-75의 경우: (a) 세포 제조 당일, 또는 (b) 세포 제조의 1일 전에 제조

PBS에서 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 인 피브로넥틴의 50ml를 제조한다.

5 mg/ml인 피브로넥틴의 250 $\mu\text{l}$ 를 PBS 50 ml에 첨가한다,

37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 적어도 30분간 인큐베이션한다.

피브로넥틴 용액을 수집한다.

살균된 50 ml 튜브에 전형적으로 1주 이내에 4 $^{\circ}\text{C}$ 로 보관된다면, 피브로넥틴 용액은 재사용될 수 있다.

PBS에서 플라스크를 2회 세척한다.

플라스크를 실온에서 건조한다

건조된 플라스크는 실온(RT)에 1주일간 보관할 수 있다.

**실시예 3: T-75 플라스크를 피브로넥틴 및 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  항 CD34로 코팅**

20 T-75 플라스크의 경우: (a) 세포 제조 당일, 또는 (b) 세포 제조 1일 전에 제조한다.

실시예 1에 기재된 바와 같이 피브로넥틴으로 플라스크를 코팅한다.

PBS에서 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 인 항-CD34 용액의 25 ml를 제조한다.

1 mg/ml인 항-CD34의 125  $\mu\text{l}$ 를 PBS 25 ml에 첨가한다.

각 플라스크를 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 인 항-CD34의 5ml로 채운다.

37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 2시간 동안 또는 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 밤새 인큐베이션한다.

항체 용액을 비운다.

PBS에서 플라스크를 2회 세척한다.

플라스크는 사용할 준비가 된다.

**세포 제조**

혈액 백을 부드럽게 위 아래로 뒤집음으로써 혈액을 혼합한다.

혈액을 백으로부터 50 0ml 멸균 병에 옮긴다.

혈액을 Ficoll 구배에 로딩한다.



튜브를 50 ml이하의 혈액으로 채운다.

튜브를 중단없이 실온에서 1050g로 20분 동안 회전시킨다.

상부층으로부터의 혈장 대부분을 비어있는 50 ml 튜브에 수집한다.

각 튜브로부터 백혈구 환(예를 들면, PBMC) 부분을 수집한다.

각 PBMC를 PBS의 15-20 ml이 사전에 채워진 새로운 50 ml 튜브에 옮긴다.

PBS를 사용하여 튜브당 30 ml로 부피를 조절한다.

튜브를 실온에서 580g로 150분 동안 회전하고, 상청액을 버린다.

세포 침전물을 부드럽게 혼합하고, 1-5 ml PBS로 재-현탁시킨다.

4개 튜브 모두의 내용물을 50 ml 튜브 하나에 모으고, 그 튜브를 PBS로 50 ml까지 채운다.

예를 들면:

(1) 1.072 g/ml의 OptiPrep 구배를 제조한다.

1.072 g/ml의 OptiPrep 구배 36 ml의 경우

(i) 0.5 % 사람 또는 소 혈청 알부민의 25 ml 용액, 0.8% NaCl, 10mM Hepes, 1mM EDTA(pH 7.4로 완충됨)를 (ii)10 ml OptiPrep 용액 + 0.5% 사람 또는 소 혈청 알부민의 용액 5 ml, 0.8% NaCl, 10 mM Hepes, 1 mM EDTA(pH 7.4로 완충됨)의 혼합물 11 ml에 함께 혼합함으로써 1.072 g/ml의 구배를 제조한다.

(a) 상기 세포 제조 단계로부터 유도된 세포 10 ml를 (b) 10 ml OptiPrep 용액 + 0.5% 사람 또는 소 혈청 알부민의 용액 5 ml, 0.8% NaCl, 10 mM Hepes, 1 mM EDTA(pH 7.4로 완충됨)의 혼합물 10 ml과 함께 혼합한다.

(a) 및 (b)의 혼합물 위에 단계 (i) 및 (ii)에서 제조된 1.072 g/ml인 OptiPrep 구배 20 ml를 넣고, 이것의 위에 0.5% 사람 또는 소 혈청 알부민의 용액 1.5 ml, 0.8% NaCl, 10 mM Hepes, 1 mM EDTA(pH 7.4로 완충됨)를 놓는다.

중단없이, 예를 들면 실온 또는 4°C에서, 700g로 30분간 원심 분리한다.

0.5% 소 혈청 알부민, 0.8% NaCl, 10 mM Hepes, 1 mM EDTA, pH 7.4의 구배와 용액 사이의 경계면으로부터 분리된 세포를 수집한다.

실온에서 395g로 10분간 원심 분리한다.

상청액을 버리고, 10 ml 배양 배지에서 침전물을 재현탁시킨다.

(2) 1.060-1.068 g/ml의 세포 밀도를 위한 Percoll 구배를 제조한다.

예를 들면, 30 ml의 연속적 Percoll 구배 제조를 위하여 50 ml 튜브에 혼합한다.

13.5 ml Percoll (Amersham)

15.0 ml MEM 스피너 변형

1.5 ml 10x Earle's 염 용액:

고정각 로터에서 중단 없이 14000 x g로 10분간 원심 분리한다.

로터로부터 구배를 조심스럽게 꺼낸다. 이제 구배가 사용 준비된다.

튜브는 14000 x g에서 원심 분리에 저항할 수 있어야 한다. Percoll 구배 상에 모든 세포를 적용한다.

중단없이 400 x g로 30분간 원심분리한다.

PBS로 튜브를 채우고, 300 x g로 10분간 원심분리한다.

50 ml PBS에서 재현탁시키고, 200 x g로 10분간 원심 분리한다.

50 ml PBS에서 재현탁시키고, 200 x g로 10분간 원심 분리한다.

세포 수 계산을 위하여 50  $\mu$ l 샘플을 수거한다.

### 혈청 제조

혈청은 환자의 응고된 혈장으로부터 직접 얻거나("오프 더 클롯(off the clot)" 혈청) 또는 항응고제로 사전-처리된 혈액으로부터 생성된 혈장으로부터 제조될 수 있다.

예를 들면, 항응고제로 사전-처리된 혈액으로부터의 혈청 제조를 위하여:

Ficoll 튜브의 상부로부터 수집된 혈장을 수거한다.

응고 메커니즘을 촉매화하기 위하여, 각 50 ml 혈장 당 0.8M인  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1.2 ml 또는 염화칼슘, 트롬보플라스틴, 트롬빈 작용 펩티드 등과 같은 임의의 다른 화학적/생물학적 응고 유도제를 첨가한다.

37 °C에서 0.5-4 시간 동안 인큐베이션한다.

응고된 혈장을 3500g에서 10분간 회전시킨다.

새로운 튜브에 혈청을 수집한다. 응고물이 혈청과 혼합되지 않도록 한다.

배지 제조를 위하여 수집된 혈청을 사용하거나, 분할한 후 사용시까지 -20°C에 보관한다.

### 세포 계수

4개의 96w 플레이트를 각각 50  $\mu$ l 트립판 블루(TB)로 사전에 채운다.

세포 샘플의 20  $\mu$ l를 하나의 TB 함유 웰에 옮겨서 1:5 희석화를 하고, 위 아래로 피펫팅하여 부드럽게 혼합한다.

희석된 세포 10  $\mu$ l를 혈구 계산기의 두 챔버 각각에 로딩한다.

상위 및 하위 챔버의 25 스퀘어에 있는 맑은(생존) 세포 및 청색(죽은) 세포를 계수한다.

10개 미만의 세포가 계수되면, 세포 샘플 50  $\mu$ l를 TB 50  $\mu$ l에 옮겨서 1:2 희석화를 한다.

200개를 초과하는 세포가 계수되면, 1:5 현탁액의 20  $\mu$ l를 하나의 TB-함유 웰에 옮김으로써 1:25 희석화를 하고, 위 아래로 피펫팅하여 부드럽게 혼합한다.

하기식에 따라 각 챔버의 세포수를 계산한다:

생존 세포 수  $\times$  10,000  $\times$  희석 인자 = 생존 세포 수 / ml

죽은 세포 수  $\times$  10,000  $\times$  희석 인자 = 죽은 세포 수 / ml

죽은 세포 % = 죽은 세포 수 / (생존 세포 수 + 죽은 세포 수)  $\times$  100

죽은 세포의 %는 전형적으로는 30%를 초과하지 않아야 한다.

평균 세포 수 계산한다.

계수 결과를 기록한다.

최종 세포 수 및 세포/혈액 ml의 수율을 정리한다.

### **배지 제조**

원하는 배지의 부피를 계산한다.

배양 배지를 제조한다.

배지는 자가 혈청의 1-20%를 함유하여야 한다.

배지는 0.5 pg/ml-1 ng/ml, 또는 1 ng/ml-100  $\mu$ g/ml의 다양한 농도에서 하기 첨가제, 예를 들면 EPO(0.01-10 IU/ml), IGF(1-100 ng/ml), FGF 10-100 ng/ml, VEGF(0.5-20 ng/ml); 헤파린 5-100 IU/ml; 상이한 분자는 이들의 무게에 의존하고, 원하는 몰수는 pg 내지  $\mu$ g, 또는 상응하는 몰수의 범위일 수 있다: 스타틴 분자(예를 들면, 심바스타틴 5-500  $\mu$ g/ml), 당뇨병약(예를 들면, 로시글리타존 5-500  $\mu$ g/ml), 및/또는 에스트로젠과 같은 스테로이드 호르몬(예를 들면, 17- $\beta$ -에스트라디올(2-2000 ng/ml)) 및 프로게스틴(예를 들면, 프로게스테론 2-2000 ng/ml) 및 이들의 조합을 함유할 수 있다.

스테로이드 생식계 호르몬(예를 들면, 에스트로젠 및 프로게스틴)은 EPC 혈액 수준을 상승시킴으로써 그 효과를 나타내는 것으로 가정된다. 따라서, 이러한 분자 또는 이들의 임의의 조합을 적용하는 것은 전구체의 생성 또는 전구체의 EPC로의 시험관내 분화에 관한 수율을 증가시킬 수 있는 데, 특히 말초 혈액으로부터의 세포가 이런 효과를 받을 때이다.

#### *낮은 % 혈청 배지의 실시예*

100 ml 배지를 위한 첨가:

100  $\mu$ g/ml인 VEGF의 2  $\mu$ l(10  $\mu$ g/ml의 최종 농도)

5000 U/ml인 헤파린의 100  $\mu$ l(5 U/ml의 최종 농도)

5 ml 자가 혈청

94.9 ml 무혈청 배지

#### *높은 % 혈청 배지의 실시예*

100 ml 배지를 위한 첨가:

100  $\mu$ g/ml인 VEGF의 2  $\mu$ l(10 $\mu$ g/ml의 최종 농도)

5000 U/ml인 헤파린의 100  $\mu$ l(5 U/ml의 최종 농도)

20 ml 자가 혈청

79.9 ml 무혈청 배지

*높은 % 혈청 배지의 실시예 2*

100 ml 배지를 위한 첨가:

100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 인 VEGF의 5  $\mu\text{l}$ (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 최종 농도)

5000 U/ml인 헤파린의 100  $\mu\text{l}$ (5 U/ml의 최종 농도)

5 mg/ml인 프로게스테론의 4  $\mu\text{l}$ (0.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 최종 농도)

10 ml 자가 혈청

89.9 ml 무혈청 배지

*높은 % 혈청 배지의 실시예 3*

100 ml 배지를 위한 첨가:

100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 인 VEGF의 5  $\mu\text{l}$ (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 최종 농도)

5000 U/ml인 헤파린의 100  $\mu\text{l}$ (5 U/ml의 최종 농도)

0.05 mg/ml인 17- $\beta$ -에스트라디올의 4  $\mu\text{l}$ (0.002  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 최종 농도)

10 ml 자가 혈청

89.9 ml 무혈청 배지

*높은 % 혈청 배지의 실시예 3*

100 ml 배지를 위한 첨가:

100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 인 VEGF의 5  $\mu\text{l}$ (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 최종 농도)

5000 U/ml인 헤파린의 100  $\mu\text{l}$ (5 U/ml의 최종 농도)

0.05 mg/ml인 프로게스테론의 4  $\mu\text{l}$ (0.002  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 최종 농도)

0.005 mg/ml인 17- $\beta$ -에스트라디올의 4  $\mu\text{l}$ (0.0002  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 최종 농도)

10 ml 자가 혈청

89.9 ml 무혈청 배지

*높은 % 혈청 배지의 실시예 4*

100 ml 배지를 위한 첨가:

100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 인 VEGF의 2  $\mu\text{l}$ (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 최종 농도)

5000 U/ml인 헤파린의 100  $\mu\text{l}$ (5 U/ml의 최종 농도)

570 $\mu$ M인 심바스타틴의 330  $\mu$ l(0.95  $\mu$ M의 최종 농도)

10 ml 자가 혈청

89.6 ml 무혈청 배지

### 배양

결합된 세포 현탁물로부터 세포를 분할한다.

실온에서 500g로 15분간 회전시키고, 상청액을 버린다.

세포 침전물을 부드럽게 혼합하고, 세포를 5-50 x 10<sup>6</sup>/ml가 되도록 재-현탁시킨다.

세포 1-5 x 10<sup>6</sup>/ml를 접종한다.

37°C, 5% CO<sub>2</sub> 에 플라스크를 인큐베이션한다.

낮은 혈청 수준(예를 들면, 5% 이하)을 함유하는 배지에서 세포를 인큐베이션한다. 대안적으로 또는 추가적으로, 높은 (>10%) 혈청 수준을 사용한다.

본 발명의 구체예에 따르면, 세포를 고-혈청 배지에서 인큐베이션하기 전에 저-혈청 배지에서 인큐베이션한다.

대안으로, 세포를 고-혈청 배지에서 인큐게이트한 후, 저-혈청 배지에서 인큐베이션한다.

구체예에 따르면, (a) 0.5%-5% 혈청을 포함하는 배지에서 인큐베이션은 고-혈청 배지(>10% 혈청)에서의 인큐베이션 전에 수행하고, (b) 무-혈청 배지에서의 인큐베이션은 (i) 0.5%-5% 혈청 배지에서의 인큐베이션 전, (ii) 0.5%-5% 혈청을 함유하는 배지에서의 인큐베이션과 고-혈청 배지에서의 인큐베이션 사이에, 그리고/또는 (iii) 고-혈청 배지에서의 인큐베이션 후에 수행한다.

대안으로, (a) 0.5%-5% 혈청을 포함하는 배지에서의 인큐베이션은 고-혈청 배지(>10% 혈청)에서의 인큐베이션 이후에 수행하고, (b) 무-혈청 배지에서의 인큐베이션은 (i) 0.5%-5% 혈청 배지에서의 인큐베이션 후에, (ii) 고-혈청 배지에서의 인큐베이션과 0.5%-5% 혈청을 함유하는 배지에서의 인큐베이션 사이에, 그리고/또는 (iii) 고-혈청 배지에서의 인큐베이션 이전에 수행한다.

한 구체예에서, 저-혈청 배지에 관하여 본원에 설명된 기술은 무-혈청 배지를 사용하여 수행된다.

세포 증식 및 분화의 증가는 배양 세포를 저산소 및/또는 고탄산가스(H/H)에 2-12시간, 12-24시간, 24-36시간, 또는 36-48시간 동안 노출시킴으로써 얻을 수 있다. 이것은 세포 배양 과정 중 상이한 점에서 1회 이상 수행된다. (저산소 프로토콜이 적용된 하기 실시예를 참조하라)

본 특허 출원서의 내용 및 청구항에서, 용어 고탄산가스는 5%를 넘는 CO<sub>2</sub>의 농도를 의미한다.

배양의 첫 3일 이후, 세포는 혈청의 높은 수준(예를 들면, >10%)을 함유하는 배지에서 성장한다.

배양 형태에 관한 조사를 수행한다.

배지의 교체를 2-3일마다 수행한다.

예를 들면, T-75 플라스크에서 세포를 배양할 때:

1. 50 ml 튜브에 세포를 수집한다.
2. 각 플라스크에 5 ml의 신선한 배지를 채운다.
3. 실온에서 450g로 10분간 튜브를 회전시키고, 상청액을 버린다.
4. 세포 침전물을 부드럽게 혼합하고, 플라스크당 5 ml 신선한 배지에 세포를 재현탁시킨다.
5. 세포 현탁물의 5 ml을 각 플라스크로 돌려보낸다.
6. 형광혼분세포분리(FACS) 및/또는 면역조직학적 분석을 위하여 며칠마다 세포를 샘플링한다.(예를 들면, 6, 9, 13, 16, 20, 24, 및 30일)
7. 세포를 처리할 때마다 세포 형태를 추적하고 기록한다.
8. 과정의 시작 및 종료시, 및 배양기간 중 10일마다, 무균 검사를 위하여 성장 디쉬로부터 배양 배지를 샘플링한다.
9. 모든 배양된 세포를 수집한다.(하기의 "FACS 염색을 위한 세포의 수집" 부분을 참조)

#### 적용된 저산소 및/또는 고탄산가스

어떤 용도를 위하여, 세포 증식 및 분화의 증가는 세포 배양물을 2-48시간 동안 저산소 상태(예를 들면, 1-5% 또는 5-15% 산소) 및/또는 고탄산가스 상태(예를 들면, 6-10% CO<sub>2</sub>)에 노출시킴으로써 얻을 수 있다. 이것은 전형적으로 세포 배양 과정 중 상이한 점에서 1회 이상 수행된다.

예를 들면:

배양의 제1일에, T-75 플라스크를 산소 조절된 인큐베이터에서 인큐베이션한다. 5%로 산소 압력을 맞추고, 그리고/또는 CO<sub>2</sub> 농도가 5%를 넘도록(예를 들면, 6%-8%, 또는 8%-10%) 맞추며, 그리고 이 수준에서 6시간 동안 유지한다. 플라스크를 인큐베이터로부터 제거하고, 배양물을 조사한다. 세포의 샘플을 취하여, 트립판 블루 제외법으로 생존성을 검사한다. 인큐베이터의 산소 압력을 21%로 맞추고 그리고/또는 CO<sub>2</sub> 농도를 5%로 맞춘다. 플라스크를 인큐베이터에 재삽입하여 나머지 기간 동안 인큐베이션을 지속한다. 이 과정을 반복할 수 있는데, 예를 들면 배양기간 중 주 1회 및/또는 배양의 종료 전 24, 48, 또는 72시간 내에서도이다.

한 구체예에서, 세포를 5% CO<sub>2</sub> 이하의 환경에서 배양하기 전에 고탄산가스 조건에서 배양한다. 대신하여 또는 추가적으로, 5% 이하의 환경에서 배양한 후 세포를 고탄산가스 상태에서 배양한다.

#### 접착 및/또는 탈착 및/또는 유동 세포의 재접종

예를 들면:

어떤 용도에서, 세포 증식 및 분화의 증가는 배양 배지에서 새로이 사전-코팅된 디쉬 상에 수집된 세포를 재접종함으로써 달성할 수 있다.

배양 3 또는 4일에, 모든 배양된 세포를 수집한다.(하기의 "FACS 염색을 위한 세포의 수집" 부분을 참조) 튜브를 실온에서 450g로 10분간 회전시킨다. 상청액을 버린다. 다음에, 침전물을 부드럽게 혼합하고, 세포를 플라스크마다 10 ml인 새로운 배지에서 세포를 재-현탁시킨다. 마지막으로, 현탁 세포를 새로이 사전-코팅된 T-75 플라스크에 접종한다. 세포 배양을 지속하고, 본 명세서에 기재된 바와 같이 적절한, 모든 다른 조치를 수행한다(예를 들면, 배지 교체, 시각 검사, 및/또는 유동 세포측정).

이 과정을 배양기간 중 주 단위로, 그리고/또는 배양의 종료 전 24, 48, 또는 72시간 이내에 수행할 수 있다.

**세포 보존**

세포는 예를 들면 환자에게 이식하는 것과 같은 사용시까지 보존 배지에 보관되거나, 냉동 완충액에 냉동될 수 있다.

**FACS 염색을 위한 세포의 수집**

50 ml 튜브에서 세포를 수집한다.

차가운 PBS로 피펫팅함으로써 플라스크 표면을 부드럽게 세척하고, 접착 세포를 떨어뜨린다.

50 ml 튜브에서 세척된 접착 세포를 수집한다.

차가운 PBS의 5 ml를 첨가한다.

세포 스크레이퍼로 부드러운 원형 운동을 하면서, 나머지 접착 세포를 떨어뜨린다.

떨어뜨린 세포를 수집하여 튜브에 첨가한다.

적절하다면, 5 ml EDTA를 첨가하고, 37°C에서 5분간 인큐베이션한다. 떨어뜨린 세포를 수집하여 튜브에 첨가한다.

튜브를 실온에서 450g로 5분간 회전시킨다. 침전물을 2-5 ml PBS에서 재-현탁시킨다.

세포 계수하고, 계수 결과를 기록한다.

매 실시일에 대한 최종 세포 수 및 접종 세포수 당의 수율을 정리한다.

세포의 동일 부피를 FACS로 분할한다.

**FACS 염색**

세포를 PBS로 세척한다.

튜브를 4-8°C에서 450g로 5분간 회전시킨다.

완충액을 붓고, 조직상의 잔류물을 흡수시킴으로써 상청액을 전부 버린다.

세포 침전물을 부드럽게 혼합한다.

염색 시약(염색 표에 따른다)을 첨가하고, 세포 침전물을 혼합한다.

튜브를 암실에서 15-30분간 얼음물에 인큐베이션한다.

세포를 PBS로 세척한다.

튜브를 4-8°C에서 450g로 5분간 회전시킨다.

완충액을 붓고, 조직상의 잔류물을 흡수시킴으로써 상청액을 전부 버린다.

세포 침전물을 부드럽게 혼합한다.

튜브당 0.5 ml PBS를 첨가한다(만약 튜브가  $1 \times 10^6$  미만의 세포를 함유한다면, 이보다 적게 첨가한다).

응집물을 볼 수 있다면, 세포 현탁물을 200  $\mu$ m 메쉬로 통과시킨다.

FACS 기계를 사용하여 염색 결과를 읽는다.

FACS 결과를 정리하고 기록한다.

### 콜로니 형성 검사

1. 배양된 세포를 수집한다. (하기의 "FACS 염색을 위한 세포의 수집" 부분을 참조)
2.  $100 \times 10^3$  세포를, 50 ng/ml SCF, 2 IU/ml EPO, 5 ng/ml IL-3 및 M199에서 25 mg/ml BTI-내피 세포 성장 보체 (ECGS)를 함유하는 농축 배지 0.7ml에 현탁시킨다.
3. 등근밀 튜브에 하기 성분을 첨가하고 부드럽게 혼합한다;
  - 3.1. 메틸셀룰로스 2% - 1.4 ml
  - 3.2. FCS - 0.9 ml
  - 3.3. 세포 현탁물 0.7 ml
4. 35 ml 페트리 디쉬 두 개에 3 ml 혼합물 각각을 접종한다(각각 1.5 ml).
5. ddH<sub>2</sub>O로 사전-채워진 또 다른 35 mm 페트리 디쉬를 함유하는 100 mm 페트리 디쉬에 35 mm 디쉬 두개를 놓는다
6. 37°C에서 5% CO<sub>2</sub>, 97% 습도로 인큐베이션한다.
7. 10-14일 후 도립 현미경을 사용하여 콜로니 수를 기록한다.

### 튜브 형성 검사

1. 밤새 4 C에서 ECMatrix를 녹인다.
2. 10X 묽은 완충액의 100 마이크로리터를 멸균된 미세원심분리 튜브에서 ECMatrix 용액의 900 마이크로리터에 첨가한다.
3. 부드럽게 혼합하고; 공기를 용액에 피펫하지 않아야한다. 용액을 얼음에 유지하여 응고를 피한다.
4. 완충된 ECMatrix 용액 40마이크로리터를 밤새 4°C에서 사전-냉각된 96-웰의 조직 배양 플레이트 각 웰에 옮긴다.
5. 37 C에서 적어도 1시간을 인큐베이션하여 매트릭스 용액이 응고될 수 있게 한다.
6. 배양된 세포를 수집한다. (하기의 "FACS 염색을 위한 세포의 수집" 부분을 참조)
7. 10% 사람 혈청, 25 마이크로그램/ml BTI-내피 세포 성장 보체(ECGS) 및 M199에서 5 IU/ml 헤파린을 함유하는 농축 배지에서, 세포를  $0.15 \times 10^6$ /ml로 현탁시킨다.
8. 웰 당 세포 현탁물 150 마이크로리터를 중합된 ECMatrix의 표면에 피펫한다.
9. 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 97% 습도에서 밤새 인큐베이션한다.
10. 도립 광 현미경을 40X-200X 배율로 하여 튜브 형성을 조사한다.



**세포 조건**

만약 세포가 사람에게 이식되어야한다면, 세포는 하기 조건을 만족하여 한다.

(I) 세포는 일반적으로 어떠한 박테리아나 바이러스 오염이 없어야한다.

(II) 형태학적으로 세포는 (a) 크기가 펌프구보다 크며, 그리고/또는 (b) 길쭉한, 방추형 또는 불규칙형이며, 그리고/또는 (c) 과립화된 또는 어둡게 핵 형성되었으며, 그리고/또는 (d) 섬모 유사 구조 또는 위족을 가지며, 그리고/또는 (e) 섬유아 세포 또는 다각형을 가져야한다.

(III) 최종 세포 현탁물은 일반적으로 하나 이상의 마커를 발현하는 적어도  $1 \times 10^6$ 의 세포를 함유하여야 한다: CD31, 및/또는 CD34, 및/또는 CD133 및/또는 CD34+ CD133, 및/또는 KDR, 및/또는 CD34+ KDR, 및/또는 CD144, 및/또는 빌러브란트씨(von Willerbrand) 인자, 및/또는 SH2(CD105), 및/또는 SH3, 및/또는 피브로넥틴, 및/또는 콜라겐(I, III 및 IV 형), 및/또는 ICAM(1 또는 2형) 및/또는 VCAM1 및/또는 비멘틴, 및/또는 BMP-RIA, 및/또는 BMP-RII, 및/또는 CD44, 및/또는 인테그린 b1 및/또는 aSM-액틴, 및/또는 MUC18, 및/또는 Dil-Ac-LDL 효소 반응에 양성인 물질이다.

**본 발명의 구체예에 따라 얻어진 결과**

실시에 1. EPC의 2단계-통과 분리를 상술한 바와 같이 Ficoll(1차 통과) 및 OptiPrep(2차 통과)을 사용하여 7회의 독립된 실험에서 실시하였다. 표 1의 결과는 제 2차 통과에서 CD34+ 세포의 농축 퍼센트를 보여준다. 농축은 2차 통과에 따른 CD34 세포의 퍼센트를, OptiPrep을 사용한 1차 통과를 따른 CD34+ 세포의 퍼센트로 나눈 값으로 정의된다.

**[표 1]**

2차 통과 세포에서 %CD 34의 농축

실험 번호	% CD34+ 세포		농축 인자
	1차 통과	2차 통과	
1	0.2	0.49	2.5
2	<0.2	0.34	>1.7
3	<0.2	0.69	>3.5
4	<0.2	0.65	>3.3
5	<0.2	0.58	>2.9
6	<0.2	<0.2	-
7	<0.2	0.46	>2.3

실시에 1. 별개의 실험 세트에서, 높은 혈청 수준(>10% 자가 혈청 또는 비-자가 혈청), 1, 2, 10 또는 20 ng/ml VEGF, 및 5-25 IU/ml 헤파린을 함유하는 배지의 존재 하에서, 피브로넥틴이 코팅된 T-75플라스크 상에서 시험관내 성장에 따른 튜브-형성 검사를 사용하여, 1차 통과 농축 EPC의 튜브 생성 능력을 측정하였다. 전형적인 튜브 형성 형상은 도 1에 나타낸다. 사람의 혈액으로 수행한 이들 실험에서, 상기 프로토콜을 사용하여, 독립 현미경(Nikon ECLIPSE TS100)을 배율 x4 및 x20으로 사용하여 형상을 찍었다.

도 1은 배양에서 1차 통과 EPC 농축으로부터의 튜브 형성 검사를 나타낸다.

실시에 2. 별개의 실험 세트에서, 자가 혈청, VEGF, b-FGF, IGF, 및 헤파린을 함유하는 배지의 존재 하에서, 피브로넥틴이 코팅된 T-75 플라스크 상에서 시험관내 성장에 따른 2차 통과 세포로부터의 EPCs의 농축을 측정하였다. 20회의 독립된 실험으로부터의 유동 세포측정 염색 퍼센트 결과를 실시에 2를 위한 표2에 정리하였다. 사람의 혈액으로 수행한 이들 실험에서, 상기 프로토콜을 사용하여, 혈청 수준(>10%) 및 1, 2, 10, 또는 20 ng/ml VEGF를 함유하는 배지에서 배양된 세포의 FACS 염색 결과는 0일부터 13일까지 염색 수준에서 하기와 같은 변화를 산출하였다.

[표 2]

실시에 2를 위한 표. 배양 13일에 따른 2차 통과 EPC의 농축

마커	0일째의 염색된 세포%	13일째의 염색된 세포%
CD45	85% - 98%	7.0% - 39.0%
CD34	검출불가 (<1%)	이하 17.7%
CD133	검출불가 (<1%)	이하 6.5%
KDR	검출불가 (<0.5%)	이하 7.3%

실시에 3. 별개의 실험 세트에서, 자가 혈청 VEGF, 및 헤파린을 함유하는 배지의 존재 하에서, 피브로넥틴으로 코팅된 T-75 플라스크 상에서 시험관내 성장에 따른 1차 통과 세포로부터의 EPC의 농축을 측정하였다. 독립된 실험으로부터의 유동 세포측정 염색 결과를 실시예 3을 위한 표3에 정리하였다. 사람의 혈액으로 수행한 이들 실험에서, 상기 프로토콜을 사용하였다. 인큐베이션 전에 세포는 1% 미만의 CD34를 나타내었다. 5-20% 자가 혈청(전형적으로는 10%); 1, 2, 10 또는 20 ng/ml VEGF, 및 5-25 IU/ml 헤파린을 함유하는 배지에서 배양된 세포의 FACS 염색결과를 정리하였다. 하기 표면 마커를 분석하였다: CD45(판-립프구 마커), 줄기/전구 세포 마커 CD34 및 CD117, 및 EPC/내피 세포 마커 CD133, KDR (VEGF-R), CD144, 및 Dil-Ac-LDL.

[표 3]

실시에3의 표. VEGF 존재하에서 피브로넥틴이 사전 코팅된 플라스크상에서 배양된 1차 통과 EPC의 특성 분석

마커	평균 (%)	표준 오차	N
CD45	89.36	0.85	83
CD34	11.62	1.11	87
CD117	7.01	1.09	45
CD133	2.85	0.46	41
KDR	1.79	0.38	85
CD144	10.33	1.50	3
DIL-Ac-LDL	7.97	0.42	3

실시에 4. 별개의 실험 세트에서, 자가 혈청, VEGF, 및 헤파린을 함유하는 배지의 존재 하에서, 자가 혈장이 코팅된 T-75 플라스크 상에서 시험관내 성장에 따른 1차 통과 세포로부터의 EPC의 농축을 측정하였다. 17회의 독립된 실험으로부터의 유동 세포측정 염색 결과를 실시예 4를 위한 표4에 정리하였다. 사람의 혈액으로 수행한 이들 실험에서, 상기 프로토콜을 사용하였다. 인큐베이션 전에 세포는 1% 미만의 CD34를 나타내었다. 5-20% 자가 혈청(전형적으로는 10%); 1, 2, 10 또는 20 ng/ml VEGF, 및 5-25 IU/ml 헤파린을 함유하는 배지에서 배양된 세포의 FACS 염색결과를 정리하였다. 하기 표면 마커를 분석하였다: CD45(판-립프구 마커), 줄기/전구 세포 마커 CD34 및 CD117, 및 EPC/내피 세포 마커 CD133, KDR (VEGF-R).

**[표 4]**

실시에 4의 표. 혈장-코팅 플라스크 상에서 배양된 1차 통과 EPC의 특성 분석

마커	평균	표준오차
<b>CD45</b>	89.46	1.75
<b>CD34</b>	6.94	1.29
<b>CD117</b>	4.25	0.72
<b>CD133</b>	2.03	0.57
<b>KDR</b>	1.31	0.39

실시에 5. 별개의 실험의 세트에서, 자가 혈청, VEGF, 프로게스테론 및 헤파린을 함유하는 배지의 존재 하에서, 자가 혈장으로 코팅된 T-75 플라스크 상에서 시험관내 성장에 따른 1차 통과 세포로부터의 EPC의 농축을 측정하였다. 3회의 독립된 실험으로부터의 유동 세포측정 염색 결과를 실시예 5를 위한 표5에 정리하였다. 사람의 혈액으로 수행한 이들 실험에서, 상기 프로토콜을 사용하였다. 인큐베이션 전에 세포는 1% 미만의 CD34를 나타내었다. 5-20% 자가 혈청(전형적으로는 10%); 1, 2, 10 또는 20 ng/ml VEGF, 0.02-2 마이크로그램/ml 프로게스테론 및 5-25 IU/ml 헤파린을 함유하는 배지에서 배양된 세포의 FACS 염색결과를 정리하였다. 하기 표면 마커를 분석하였다: CD45(판-림프구 마커), 줄기/전구 세포 마커 CD34 및 CD117, 및 EPC/내피 세포 마커 CD133 및 KDR(VEGF-R).

**[표 5]**

실시에 5의 표. 프로게스테론의 존재하에서 혈장이 사전-코팅된 플라스크 상에서 배양된 1차 통과 EPC의 특성 분석

마커	평균	표준 오차
<b>CD45</b>	94.82	2.31
<b>CD34</b>	21.22	3.47
<b>CD117</b>	5.54	2.08
<b>CD133</b>	5.72	0.47
<b>KDR</b>	1.05	0.12

실시에 6. 별개의 실험 세트에서, 자가 혈청, VEGF, 15-베타-에스트라디올 및 헤파린을 함유하는 배지의 존재 하에서, 자가 혈장으로 코팅된 T-75 플라스크 상에서 시험관내 성장에 따른 1차 통과 세포로부터의 EPC의 농축을 측정하였다. 3회의 독립된 실험으로부터의 유동 세포측정 염색 결과를 실시예 6을 위한 표6에 정리하였다. 사람의 혈액으로 수행한 이들 실험에서, 상기 프로토콜을 사용하였다. 인큐베이션 전에 세포는 1% 미만의 CD34를 나타내었다. 5-20% 자가 혈청(전형적으로는 10%); 1, 2, 10 또는 20 ng/ml VEGF, 및 0.002-2 마이크로그램/ml 17-β-에스트라디올 및 5-25 IU/ml 헤파린을 함유하는 배지에서 배양된 세포의 FACS 염색결과를 정리하였다. 하기 표면 마커를 분석하였다: CD45(판-림프구 마커), 줄기/전구 세포 마커 CD34 및 CD117, 및 EPC/내피 세포 마커 CD133, 및 KDR(VEGF-R).

**[표 6]**

실시에 6의 표. 17-베타-에스트라디올의 존재하에서 혈장이 사전-코팅된 플라스크 상에서 배양된 1차 통과 EPC의 특성 분석

마커	평균	표준오차
<b>CD45</b>	96.14	0.38
<b>CD34</b>	4.12	0.05
<b>CD117</b>	1.41	0.27
<b>CD133</b>	1.77	0.88
<b>KDR</b>	0.28	0.20

실시에 7. 별개의 실험 세트에서, 자가 혈청, VEGF, 및 헤파린을 함유하는 배지의 존재 하에서, 혈장 및 항-CD34 항체로 코팅된 T-75 플라스크 상에서 시험관내 성장에 따른 1차 통과 세포로부터의 EPC의 농축을 측정하였다. 2회의 독립된 실험으로부터의 유동 세포측정 염색 결과를 실시예 7을 위한 표7에 정리하였다. 사람의 혈액으로 수행한 이들 실험에서, 상

기 프로토콜을 사용하였다. 인큐베이션 전에 세포는 1% 미만의 CD34를 나타내었다. 5-20% 자가 혈청(전형적으로는 10%), 1, 2, 10 또는 20 ng/ml VEGF, 5-25 IU/ml 헤파린을 함유하는 배지에서, 5 ml 자가 혈장 및 0.5-10 마이크로그램/ml인 항-사람 CD34로 코팅된 T-75 플라스크 상에서 배양된 세포의 FACS 염색 결과를 함유한 배지에서 배양된 세포의 FACS 염색 결과가 제시된다. 하기 표면 마커를 분석하였다: CD45(판-림프구 마커), 줄기/전구 세포 마커 CD34와 CD117, 및 EPC/내피 세포 마커 CD133 및 KDR(VEGF-R).

**[표 7]**

실시에 7의 표. 혈장 및 항-CD34가 코팅된 플라스크 상에서 배양된 1차 통과 EPC의 특성 분석

마커	실험 #1	실험 #2
CD45	85.34	97.10
CD34	1.96	1.50
CD117	0.64	0.83
CD133	0.57	3.88
KDR	0.24	0.54

실시에 8. 별개의 실험 세트에서, 자가 혈청, VEGF, 및 헤파린을 함유하는 배지 및 높은 %CO<sub>2</sub>의 습윤화된 환경에서, 피브로넥틴으로 코팅된 T-75 플라스크 상에서 시험관내 성장에 따른 1차 통과 세포로부터의 EPC의 농축을 측정하였다. 3회의 독립된 실험으로부터의 유동 세포측정 염색 결과를 실시에 8을 위한 표 8에 정리하였다. 사람의 혈액으로 수행한 이들 실험에서, 상기 프로토콜을 사용하였다. 인큐베이션 전에 세포는 1% 미만의 CD34를 나타내었다. 5-20% 자가 혈청(전형적으로는 10%), 1, 2, 10 또는 20 ng/ml VEGF, 및 0.002-2 마이크로그램/ml의 17-β-에스트라디올 및 37°C에서 인큐베이션된 5-25 IU/ml 헤파린을 함유하며, 6.5%-12.5% CO<sub>2</sub> 및 97% 습도가 제시된다. 하기 표면 마커를 분석하였다: CD45(판-림프구 마커), 줄기/전구 세포 마커 CD34, 및 EPC/내피 세포 마커 CD133.

**[표 8]**

실시에 8의 표. 고탄산가스상태를 함유하는 습식 환경에서 배양된 1차 통과 EPC의 특성 분석

마커	평균	표준 오차
CD45	90.47	4.53
CD34	23.77	17.93
CD133	4.48	2.10

체 조직으로의 혈액 공급의 전부 또는 일부 상실(허혈)은 많은 질병에 있어 그 원인이 되거나, 또는 질병의 결과를 초래하는 중간 단계인 일반적 메커니즘이다. 이러한 공급 결핍은 감염된 조직이 점진적으로 이들의 기능을 수행할 수 없도록 하며, 영양분, 주로 산소의 손실뿐만 아니라 CO<sub>2</sub>와 같은 신진 대사 물질의 축적으로부터 기인하는 병리학적 발병의 진행을 초래한다. 이러한 진행이 심각하다면, 이것은 세포 및 조직의 죽음에 이르게 된다.

새로운 혈관 형성을 유도하여 감소된 혈액 공급을 증대 또는 교체하는 것은 감염된 조직 또는 기관의 기능 회복을 가져오며, 감염된 세포의 죽음을 방지한다. 결핍된 조직으로의 혈액 공급을 회복하는 원리는, 심장병학자들에 의하여 심장의 기능을 회복하고 더 이상의 손상을 방지하기 위하여 수행된다(예를 들면, 심장 혈관 이식 수술 및 풍선 혈관 성형술).

이러한 침습적 접근은 일반적으로 크거나, 중간 크기의 혈관이 폐색될 때만 가능하다. 그러나, 혈관 신생의 감소와 연관된 많은 질병에서, 폐색은 이런 종류의 개입을 따를 수 없는 작은 혈관에서 일어난다.

본 발명의 구체예에서, EPC는 혈액-결핍 기관 또는 조직에 공급되는 데, 이는 직접 허혈 조직에 또는 허혈 조직에 근접한 환자의 혈관 세포에 주입되는 자가 또는 비-자가 내피 전구/줄기세포를 사용하여 결핍된 기관에서 새로운 혈관을 생성함

으로써 모자라는 혈관신생을 증가하거나 또는 교체하기 위해서이다. 이러한 맥관구조의 성공적인 생성은 일반적으로 기능을 회복하고, 더 이상의 악화를 방지하며, 혈액공급의 결핍으로의 병리학적인 2차 진행의 형성에 대하여 미리 손을 쓰게 되며, 그리고/또는 감염된 기관에서 세포의 죽음을 피한다. 더 나아가, 어떤 경우에는, 기관의 어떤 영역에서 조절된 혈관 형성은 기관의 기능을 감소시킬 수 있는 기관 내 다른 영역에서의 병리학적 혈관 형성을 감소시킨다.

본 발명의 구체예에서, EPC를 기관 또는 조직에 공급하는 것은 하기의 허혈-연관된 상태의 하나 이상을 치료한다. 약화된 혈액 공급의 결과적 회복은 일반적으로 질병을 완전히 또는 부분적으로 치료하거나, 상태의 진행을 멈추게 하거나 늦춘다.

- **녹내장.** 이 병은 시각 신경 머리의 허혈에 연관된 시각 신경 섬유의 급속한 죽음으로 이루어진다. 시각 신경 머리의 혈관 신생 회복을 가져오는 치료는 일반적으로 병의 진행을 저지하고, 시각 신경의 어떤 기능을 회복한다(신경 머리에서 축색 돌기가 약화되었음에도 불구하고, 적어도 세포체가 아직 죽지 않은 이들 시각 신경 섬유에서). 본 발명의 구체예에서, EPC를 신경 세포 머리 및/또는 그 주위로 주입하는 것은 일반적으로 원하는 혈관 신생의 유도 효과를 낳는다.(Flammera J et al.에 의한 상기 논문을 참조)

- **노화-연관 황반 변성.** 이 병은 망막의 외층에 이것의 물질대사 요구량을 공급하는 혈관인 맥락막에서의 순환 장애와 연관된다. 이들 장애는 망막의 기능을 약화시키며, 이것의 급속한 죽음과 함께 결과적으로 시각 기능의 악화를 초래한다. 본 발명의 구체예에서, EPC를 맥락막으로의 주입은 일반적으로 병의 진행을 저지하고, 시각 상실을 방지한다.

- **당뇨병성 망막증.** 이 병은 망막에서 국소 허혈 및 따라서 시각을 약화시키는 부종을 초래하는 작은 혈관 질병이다. 비록 혈관 신생이 일어나지만, 이는 허혈의 결과이며, 정확한 시각에 가장 중요한 영역인-황반에서 일어남으로써 시각을 약화시킨다. 본 발명의 구체예에서, EPC의 황반의 주변 영역-하지만, 황반 내는 아님-으로의 투여에 의한 혈관 성장의 억제 유도는 혈관 성장 및 황반 영역에서의 부종 생성을 감소 또는 제거한다. 이런 EPC-유도성 혈관 생성의 억제 유도는 전형적으로 충분한 혈액을 공급하여, 망막에서 황반 영역의 혈관 신생에 대한 필요성을 제거한다.(Frank RN에 의한 상기 인용된 논문 및 Singleton JR et al에 의한 상기 인용된 논문을 참조)

- **당뇨병성 신장병증.** 이 병은 신장 혈관의 동맥경화 막힘 및 신장의 혈액-여과 구조의 파괴와 이에 따른 투석이 필요한 신장 기능의 상실을 포함한다. 본 발명의 구체예에서, EPC의 신장으로의 주입에 의한 혈관 교체의 유도는 진행을 저지한다.(Bahlmann FH et al.(2004)에 의한 상기 인용된 논문을 참조)

- **뼈의 불유합.** 외상 및 수술 이후 이것의 발병은 보통 골절/감염된 뼈의 외과적 절개에서 불충분한 혈액 공급에 기인한다. 본 발명의 구체예에서, EPC를 골절/감염된 뼈의 외과적 절개에 응용하는 것은 혈관 신생을 회복시키고 장애의 치유를 가능하게 한다.

- **만성 피부 궤양:** 이 병변은 연관된 피부 영역으로의 혈액 공급의 약화의 결과이다. 본 발명의 구체예에서, EPC를 만성 피부 궤양에 국소적으로 적용하는 것은 혈액 공급을 회복하고, 일반적으로 상처의 치유를 가져다준다.

- **혈관 치매, 후 뇌중풍.** 이 상태는 뇌에서 혈관의 진행성인 비가역적 폐쇄에 기인한다. 본 발명의 구체예에서, 뇌에 EPC를 공급하는 것은 약화된 순환의 적어도 일부를 회복하고, 따라서 뇌 기능을 회복하며, 그리고/또는 뇌 기능의 악화를 늦춘다.

- **당뇨병성 혈관병증.** 팔 다리에서 작은 혈관의 이 진행성 폐색은 외과적 절단의 일반적인 원인이다. 본 발명의 구체예에서, 이러한 절단은 EPC의 국소 주입에 의하여 감염된 팔 다리에서의 순환을 회복함으로써 예방된다.

모든 이식과 유사하게, 피부 이식에 있어 그 생존은 혈액 순환에 의존한다(예를 들면 Greenfield에 의하여 편집된 상기 인용된 책, 및 Kouwenhoven EA et al.에 의한 상기 인용된 논문을 참조). 부적절한 혈관신생 때문에, 유리된 이식 및 피부판 모두 실패할 수 있다. 유리 이식은 바탕에서 적절한 혈관신생을 요구하며, 피부판은 국소 문합이 이루어질 때까지 이것 자체에서의 혈액 공급의 유지가 필요하다(예를 들면, Browne EZ et al., Chen et al., 및 Beatrice et al.,에 의한 상기 인용된 논문 참조). 이것은 인공 피부로 이루어진 이식에 대하여도 그러하다(예를 들면, Ferretti et al에 의한 상기 인용된 논문 참조). 이들 경우에서, 양호한 혈관 신생은 이식편의 선택적 신경재분포의 선결 조건이다.

본 발명의 한 구체예에서, EPC를 피부 이식편으로 접종함으로써 혈관 신생이 유도된다. 이러한 EPC-유도성 혈관 신생을 일반적으로 피부 이식 생존 가능성을 증가시킨다. 어떤 용도에 있어, 이 EPC 접종 기술은 Schechnner et al.의 상기 인용된 논문에 기재된 내피 세포 이식 기술과 결합하여, 필요한 경우 변형을 가하여, 사용된다.

본 발명의 한 구체예에서, 분리된 팔 다리의 재봉합 도중 EPC로 봉합 부위를 접종함으로써 혈관 신생이 유도된다. 본 발명의 다른 구체예에서, 혈액 순환이 약화된 다른 상태는 혈관이 불충분하거나 없는 국소 부위에 EPC를 적절히 적용함으로써 치료된다.

본 명세서에서 기재된 심장병 환자에게 투여되기 전 줄기세포 집단을 증가시키는 기술은 임의의 상기 상태를 가지는 환자에 대하여 사용되도록 또한 변경될 수 있다.

본 발명의 한 구체예는 하기 가특허출원의 하나 또는 둘 다에 기재된 기술의 실시를 포함한다(선택적으로는 본 명세서에서 기재된 기술과 조합하여).

(a) 미국 가특허출원 60/576,266, 출원일 2004년 6월 1일, 발명의 명칭 "In vitro techniques for use with stem cells," 및

(b) 미국 가특허출원 60/522,520, 출원일 2004년 7월 15일, 발명의 명칭 "Indications for stem cell use."

이들 출원 모두는 본 특허출원의 출원인에게 양도되었으며, 본 명세서에 참고 인용된다.

1차 통과 세포로부터 농축된 EPC의 안전성 및 효능을 현재 진행되는 임상 연구에서 평가하였다. 이들 실험은 상기 기술된 프로토콜을 사용하여 환자의 자가 혈액으로 수행하였다.

중증의 협심증을 겪고 있으며, 최대 약물 요법을 받는 16명의 환자가 Thera Vitae에 의하여 개시되었으며, 본 발명의 구체예에 따라 수행된 임상 시험에 가입하였다. 심장혈관의 임상 시험에서 보통 행하여지는 바와 같이 환자에 대하여 6개월 간 추적하였다. 각 환자는 치료 전 상태와 비교되는 치료 후 상태로써 그/그녀 자신의 대조 결과를 만들었다. 적어도 3개월 간 추적된 첫 번째 10명의 환자에 대한 몇몇 결과가 하기에 제시된다. 본 명세서에서 제시되는 결과는 완전한 것이 아니며, 데이터의 철저한 분석은 임상 시험의 완료와 함께 수행될 것이라는 점을 주목하여야 한다.

**안전성**-치료법은 높은 안전성 프로파일을 보여준다. 한정된 수의 환자에게서 아마도 치료법과 연관된 것으로 보이는 작은 부작용이 발생하였다 (상승한 적혈구 침강속도, 혈관 조영술 도중 가슴 통증). 이런 증상들은 짧은 기간 이후 환자의 임상 상태에 영향을 주지 않으면서 사라졌다.

**효능**(표 1, 2 및 3 참조)-협심증에 대한 캐나다 심장혈관 학회 등급 척도(CCS)에서의 개선에 의하여 나타낸 바와 같이, 모든 환자의 일반적인 임상 상태는 개선되어 더 좋은 운동 능력을 보여준다. 모든 환자들은 심장병 증상 없이 그들의 걷는 능력이 향상되었다. 이런 발견은 또한 예측된 표준 작업량에서의 증가, 세스타미비 스캔에 의하여 운동 능력의 객관적 측정에 의하여 뒷받침된다. 두 결과 모두 높은 통계적 중요성을 보인다.

[표 1]

표 1: 협심증에 대한 캐나다 심장 혈관 학회의 등급 척도에의하여 증명되는 환자의 임상 개선

	치료전 평균값	치료후 평균값	평균 개선 퍼센트
CCS 점수	1.92	1.00	52%
P 값	0.0029		

**[표 II]**

6분간의 보행 검사에 의하여 증명되는 3개월때의 환자의 임상적 개선

	절대값	퍼센트
개선된 환자의 전체 수	10	100%
개선-평균(미터)	84	25%
P 값	0.0003	

**[표 III]**

예측 작업량(METs)에 의하여 증명되는 3개월때의 환자 개선

	절대값	퍼센트
개선된 환자 수	7	78%
개선-평균	1.42	20%
P-값	0.02	

한 구체예에서, 임의의 하기 청구항에 인용된 임의의 기술에 의하여 생성된 EPC를 사람 또는 동물에 투여한다.

한 구체예에서, 임의의 하기 청구항에 인용된 임의의 기술에 의하여 생성된 EPC를 혈관 및/또는 심장 질환, 노화의 치료, 또는 전신 질환의 치료, 또는 다발 계통 질환을 치료하기 위하여 사용한다.

어떤 용도에서는, 본 명세서에서 기재된 기술은 동물 조직에 응용된다.

당업자는 본 발명이 상기 구체적으로 나타내고 설명된 바에 제한되지 않는다는 것을 인식할 것이다. 오히려, 본 발명의 범위는 다양한 상기 특징의 조합 및 하위 조합 둘 다뿐만 아니라, 선행기술이 아닌 이것의 변형 또는 변경을 포함하며, 이는 앞서 말한 설명을 읽음으로써 당업자에게 인식될 것이다.

### 도면의 간단한 설명

도 1은 배양에서 1차 통과 EPC 농축으로부터의 튜브 형성 검사를 나타낸다.

#### 발명의 상세한 설명

본 발명의 구체예에 따르면, 사람 말초 혈액으로부터 내피 전구 세포(EPC)를 분리, 분화 및 성장시키기 위한 방법이 제공된다. EPC는 전형적으로 환자에게 이식되어 혈관 생성 및/또는 혈관 신생 및/또는 신혈관형성을 유도한다. 전형적으로, Ficoll과 같은 농도 구배에 의하여 분리된 말초 혈액의 단핵 세포(PBMC)는 하나 이상의 다른 농도 구배(Percoll, OptiPrep, 또는 Nycodenz)에 의하여 더 농축되고, 그 후 조직 배양 디쉬에 부착하게 된다. 세포는 전형적으로 농축된 배양 배지에서 3-30일 동안 성장한다. 배양 기간 중 몇몇 시점에서, 표현형 분석을 위하여 샘플을 채취하였다. 증량된 세포를 수거하여 환자에게 이식할 때까지 보관하였다.

하기 설명되는 일련의 프로토콜은 본 발명의 구체예에 따라서 단독으로 또는 필요하다면 조합하여 사용될 수 있다. 제공되는 수치는 예시적일 뿐 한정적이지 않은 것으로 인식되어야 한다. 전형적으로, 반드시 그러하지는 않지만, 나타내는 각 수치는 나타내는 수치의 25% 이내의 수치 범위로부터 선택되는 예이다. 유사하게, 어떤 단계는 높은 수준의 정확도로 설명되지만, 당업자는 다른 단계가 필요한 변경과 함께 수행될 수 있다는 것을 인식할 것이다.

#### 조직 배양 디쉬 코팅의 프로토콜

배양 디쉬와 같은 적합한 용기는 EPC-성장-촉진 분자의 하나 또는 조합에 의해 코팅될 수 있다. 분자는 CD34, CD133, Tie-2, VEGFR-2(KDR), CD144 또는 LDL, VEGF, FGF, IGF와 같은 분자, 또는 혈소판-유래 성장 인자(PDGF)와 같은 전구 세포 표면 수용체에 대한 항체를 포함할 수 있다.

도면

도면1

