



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0049618  
(43) 공개일자 2022년04월21일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 5/071 (2010.01) A61K 35/44 (2015.01)  
A61P 9/10 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
C12N 5/0692 (2013.01)  
A61K 35/44 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2022-7010049
- (22) 출원일자(국제) 2020년08월27일  
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2022년03월25일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2020/048076
- (87) 국제공개번호 WO 2021/041591  
국제공개일자 2021년03월04일
- (30) 우선권주장  
62/892,724 2019년08월28일 미국(US)

- (71) 출원인  
아스텔라스 인스티튜트 포 리제너러티브 메디슨  
미국, 매사추세츠 (우편번호 01581), 웨스트버러,  
테크놀로지 드라이브 9
- (72) 발명자  
미로츠오우, 마리아  
미국, 매사추세츠 01581, 웨스트버러, 테크놀로지  
드라이브 9  
프라세인, 누탄  
미국, 매사추세츠 01581, 웨스트버러, 테크놀로지  
드라이브 9  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
청운특허법인

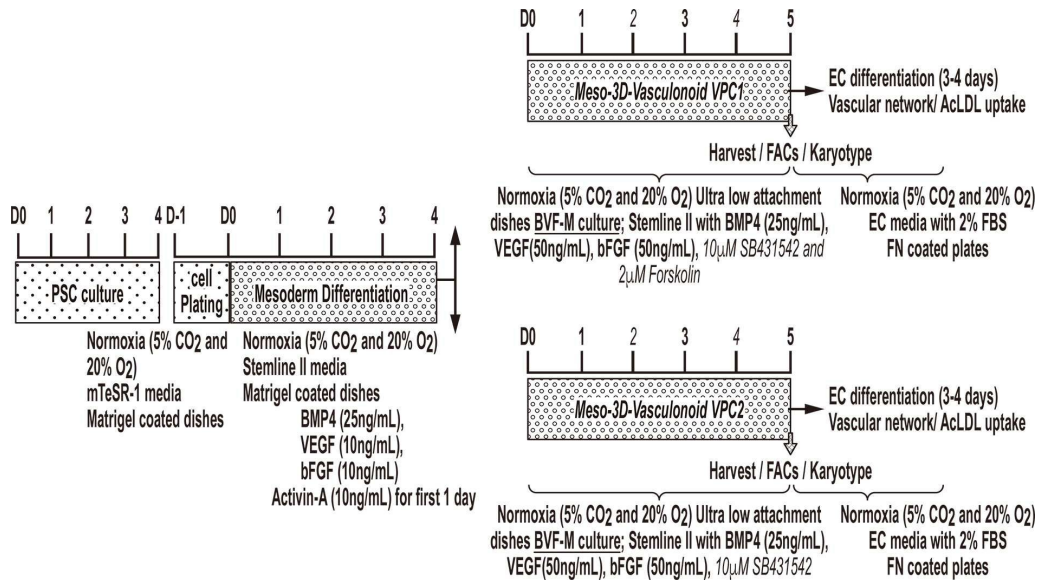
전체 청구항 수 : 총 99 항

(54) 발명의 명칭 혈관 질환 치료 조성물 및 방법

(57) 요약

본 발명은 일반적으로 새로운 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs) 및 상기 meso-VPCs의 생성 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한, 피험자에게 meso-VPCs를 투여시켜, 중증 사지 허혈과 같은, 혈관 질환을 치료하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

**A61P 9/10** (2018.01)  
*C12N 2501/115* (2013.01)  
*C12N 2501/15* (2013.01)  
*C12N 2501/155* (2013.01)  
*C12N 2501/16* (2013.01)  
*C12N 2501/165* (2013.01)  
*C12N 2506/45* (2013.01)  
*C12N 2513/00* (2013.01)

(72) 발명자

**싱, 암리타**

미국, 매사추세츠 01581, 웨스트버러, 테크놀로지  
드라이브 9

**란자, 로버트**

미국, 매사추세츠 01581, 웨스트버러, 테크놀로지  
드라이브 9

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

다능성 줄기 세포로부터 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)의 개체군을 생성시키는 방법으로서, 상기 방법은:

혈관 내피 성장 인자(VEGF), 섬유아세포 성장 인자(FGF), 골형성 단백질 4(BMP4), 및 전환 성장 인자-베타(TGF- $\beta$ ) 타입 I 수용체의 소분자 억제제로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 인자를 포함하는 배지에서, 비-접착 또는 저접착 조건하에서 다능성 줄기 세포로부터 유래된 중배엽 세포를 배양하는 단계를 포함하고, 이에 의해 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)의 개체군을 생성시키는, 다능성 줄기 세포로부터 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)의 개체군을 생성시키는 방법.

#### 청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 중배엽 세포는, 액티빈-A, 혈관 내피 성장 인자(VEGF), 섬유아세포 성장 인자(FGF), 및 골형성 단백질 4(BMP4)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 중배엽 유도 성장 인자를 포함하는 배지에서 다능성 줄기 세포를 배양시켜 다능성 줄기 세포로부터 유래되는, 다능성 줄기 세포로부터 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)의 개체군을 생성시키는 방법.

#### 청구항 3

청구항 1 또는 2에 있어서,

상기 meso-VPCs는, 바스큘로노이드로서 생성되는, 다능성 줄기 세포로부터 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)의 개체군을 생성시키는 방법.

#### 청구항 4

청구항 3에 있어서,

상기 바스큘로노이드에 meso-VPCs를 단일 세포로 분리시키는 단계를 더욱 포함하는, 다능성 줄기 세포로부터 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)의 개체군을 생성시키는 방법.

#### 청구항 5

청구항 2 내지 4 중 어느 한 항에 있어서,

상기 중배엽 유도 성장 인자는, 액티빈-A, VEGF165, FGF-2 및 BMP4를 포함하는, 다능성 줄기 세포로부터 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)의 개체군을 생성시키는 방법.

#### 청구항 6

청구항 5에 있어서,

상기 액티빈-A는 약 5-15 ng/ml의 농도로 사용되는, 다능성 줄기 세포로부터 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)의 개체군을 생성시키는 방법.

#### 청구항 7

청구항 5에 있어서,

상기 VEGF165는, 약 5-25 ng/ml의 농도로 사용되는, 다능성 줄기 세포로부터 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)의 개체군을 생성시키는 방법.

**청구항 8**

청구항 5에 있어서,

상기 FGF-2는 5-25 ng/ml의 농도로 사용되는, 다능성 줄기 세포로부터 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)의 개체군을 생성시키는 방법.

**청구항 9**

청구항 5에 있어서,

상기 BMP4는 약 5-50 ng/ml의 농도로 사용되는, 다능성 줄기 세포로부터 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)의 개체군을 생성시키는 방법.

**청구항 10**

청구항 2-9 중 어느 한 항에 있어서,

약 24시간의 배양 후에 배양 배지로부터 액티빈-A를 제거하는 단계를 더욱 포함하는, 다능성 줄기 세포로부터 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)의 개체군을 생성시키는 방법.

**청구항 11**

청구항 2-10 중 어느 한 항에 있어서,

상기 다능성 줄기 세포는 세포의 기질 표면 상에서 배양되는, 다능성 줄기 세포로부터 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)의 개체군을 생성시키는 방법.

**청구항 12**

청구항 11에 있어서,

상기 세포의 기질 표면은 매트릭셀-코팅 표면인, 다능성 줄기 세포로부터 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)의 개체군을 생성시키는 방법.

**청구항 13**

청구항 2-12 중 어느 한 항에 있어서,

상기 다능성 줄기 세포는 약 3일 내지 약 5일 동안 배양되는, 다능성 줄기 세포로부터 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)의 개체군을 생성시키는 방법.

**청구항 14**

청구항 1-13 중 어느 한 항에 있어서,

상기 전환 성장 인자-베타(TGF- $\beta$ ) 타입 I 수용체의 소분자 억제제는 SB431542인, 다능성 줄기 세포로부터 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)의 개체군을 생성시키는 방법.

**청구항 15**

청구항 1-14 중 어느 한 항에 있어서,

상기 하나 이상의 인자는, VEGF165, FGF-2, BMP4, 및 SB431542를 포함하는, 다능성 줄기 세포로부터 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)의 개체군을 생성시키는 방법.

**청구항 16**

청구항 1-15 중 어느 한 항에 있어서,

상기 하나 이상의 인자는 포스콜린을 더욱 포함하는, 다능성 줄기 세포로부터 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)의 개체군을 생성시키는 방법.

**청구항 17**

청구항 16에 있어서,

상기 포스폴린은 약 2-10  $\mu\text{M}$ 의 농도로 사용되는, 다능성 줄기 세포로부터 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)의 개체군을 생성시키는 방법.

**청구항 18**

청구항 15-17 중 어느 한 항에 있어서,

상기 VEGF165는 약 10-50 ng/ml의 농도로 사용되는, 다능성 줄기 세포로부터 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)의 개체군을 생성시키는 방법.

**청구항 19**

청구항 15-17 중 어느 한 항에 있어서,

상기 FGF-2는 약 10-50 ng/ml의 농도로 사용되는, 다능성 줄기 세포로부터 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)의 개체군을 생성시키는 방법.

**청구항 20**

청구항 15-17 중 어느 한 항에 있어서,

상기 BMP4는 약 10-50 ng/ml의 농도로 사용되는, 다능성 줄기 세포로부터 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)의 개체군을 생성시키는 방법.

**청구항 21**

청구항 14-20 중 어느 한 항에 있어서,

상기 SB431542는 약 5-20  $\mu\text{M}$ 의 농도로 사용되는, 다능성 줄기 세포로부터 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)의 개체군을 생성시키는 방법.

**청구항 22**

청구항 1-21 중 어느 한 항에 있어서,

상기 중배엽 세포를 배양하는 단계는 약 3일 내지 약 7일 동안 수행되는, 다능성 줄기 세포로부터 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)의 개체군을 생성시키는 방법.

**청구항 23**

청구항 1-22 중 어느 한 항에 있어서,

상기 중배엽 세포를 배양하는 단계는 5% CO<sub>2</sub> 및 20% O<sub>2</sub>의 정상산소 조건하에서 수행되는, 다능성 줄기 세포로부터 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)의 개체군을 생성시키는 방법.

**청구항 24**

청구항 2-23 중 어느 한 항에 있어서,

상기 다능성 줄기 세포의 배양은 5% CO<sub>2</sub> 및 20% O<sub>2</sub>의 정상산소 조건하에서 수행되는, 다능성 줄기 세포로부터 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)의 개체군을 생성시키는 방법.

**청구항 25**

청구항 1-24 중 어느 한 항에 있어서,

상기 비-접착 또는 저접착 조건은 초-저 부착 표면 상에 있는, 다능성 줄기 세포로부터 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)의 개체군을 생성시키는 방법.

**청구항 26**

다능성 줄기 세포로부터 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)의 개체군을 생성시키는 방법으로서, 상기 방법은:

(a) 혈관 내피 성장 인자(VEGF), 섬유아세포 성장 인자(FGF), 및 골형성 단백질 4(BMP4)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 인자를 포함하는 배지에서, 세포의 기질 표면 상에서 다능성 줄기 세포로부터 유래된 중배엽 세포를 배양하는 단계; 및

(b) 단계 (a)에서 생성된 세포를, 혈관 내피 성장 인자(VEGF), 섬유아세포 성장 인자(FGF), 골형성 단백질 4(BMP4), 및 전환 성장 인자-베타(TGF-β) 타입 I 수용체의 소분자 억제제로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 인자를 포함하는 배지에서, 세포의 기질 표면 상에서 배양하는 단계를 포함하고,

이에 의해 중배엽-유래 혈관 전구 세포의 개체군을 생성시키는, 다능성 줄기 세포로부터 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)의 개체군을 생성시키는 방법.

**청구항 27**

청구항 26에 있어서,

상기 중배엽 세포는, 액티빈-A, 혈관 내피 성장 인자(VEGF), 섬유아세포 성장 인자(FGF), 및 골형성 단백질 4(BMP4)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 중배엽 유도 성장 인자를 포함하는 배지에서 다능성 줄기 세포를 배양시켜 다능성 줄기 세포로부터 유래되는, 다능성 줄기 세포로부터 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)의 개체군을 생성시키는 방법.

**청구항 28**

청구항 26 또는 27에 있어서,

상기 방법은 meso-VPCs의 개체군을 단일 세포로 분리시키는 단계를 더욱 포함하는, 다능성 줄기 세포로부터 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)의 개체군을 생성시키는 방법.

**청구항 29**

청구항 27 또는 28에 있어서,

상기 중배엽 유도 성장 인자는 액티빈-A, VEGF165, FGF-2 및 BMP4를 포함하는, 다능성 줄기 세포로부터 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)의 개체군을 생성시키는 방법.

**청구항 30**

청구항 29에 있어서,

상기 액티빈-A는 약 5-15 ng/ml의 농도로 사용되는, 다능성 줄기 세포로부터 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)의 개체군을 생성시키는 방법.

**청구항 31**

청구항 29에 있어서,

상기 VEGF165는 약 5-25 ng/ml의 농도로 사용되는, 다능성 줄기 세포로부터 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)의 개체군을 생성시키는 방법.

**청구항 32**

청구항 29에 있어서,

상기 FGF-2는 약 5-25 ng/ml의 농도로 사용되는, 다능성 줄기 세포로부터 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)의 개체군을 생성시키는 방법.

**청구항 33**

청구항 29에 있어서,

상기 BMP4는 약 5-50 ng/ml의 농도로 사용되는, 다능성 줄기 세포로부터 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)의 개체군을 생성시키는 방법.

**청구항 34**

청구항 29-33 중 어느 한 항에 있어서,

약 24시간의 배양 후에 배양 배지로부터 액티빈-A를 제거하는 단계를 더욱 포함하는, 다능성 줄기 세포로부터 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)의 개체군을 생성시키는 방법.

**청구항 35**

청구항 26-34 중 어느 한 항에 있어서,

단계 (a)에서 세포의 기질 표면은 콜라겐 IV-코팅 표면인, 다능성 줄기 세포로부터 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)의 개체군을 생성시키는 방법.

**청구항 36**

청구항 27-35 중 어느 한 항에 있어서,

상기 다능성 줄기 세포는 약 3일 내지 약 5일 동안 배양되는, 다능성 줄기 세포로부터 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)의 개체군을 생성시키는 방법.

**청구항 37**

청구항 26-36 중 어느 한 항에 있어서,

단계 (a)의 하나 이상의 인자는 VEGF165, FGF-2, 및 BMP4를 포함하는, 다능성 줄기 세포로부터 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)의 개체군을 생성시키는 방법.

**청구항 38**

청구항 26-37 중 어느 한 항에 있어서,

상기 전환 성장 인자-베타(TGF-β) 타입 I 수용체의 소분자 억제제는 SB431542인, 다능성 줄기 세포로부터 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)의 개체군을 생성시키는 방법.

**청구항 39**

청구항 26-38 중 어느 한 항에 있어서,

단계 (b)에서 하나 이상의 인자는 VEGF165, FGF-2, BMP4, 및 SB431542를 포함하는, 다능성 줄기 세포로부터 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)의 개체군을 생성시키는 방법.

**청구항 40**

청구항 26-39 중 어느 한 항에 있어서,

단계 (a)에서 하나 이상의 인자는 포스콜린을 더욱 포함하는, 다능성 줄기 세포로부터 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)의 개체군을 생성시키는 방법.

**청구항 41**

청구항 26-40 중 어느 한 항에 있어서,

단계 (b)에서 하나 이상의 인자는 포스콜린을 더욱 포함하는, 다능성 줄기 세포로부터 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)의 개체군을 생성시키는 방법.

**청구항 42**

청구항 40 또는 41에 있어서,

상기 포스폴린은 약 2-10  $\mu\text{M}$ 의 농도로 사용되는, 다능성 줄기 세포로부터 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)의 개체군을 생성시키는 방법.

#### 청구항 43

청구항 37-42 중 어느 한 항에 있어서,

상기 VEGF165는 약 10-50 ng/ml의 농도로 사용되는, 다능성 줄기 세포로부터 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)의 개체군을 생성시키는 방법.

#### 청구항 44

청구항 37-42 중 어느 한 항에 있어서,

상기 FGF-2는 약 10-50 ng/ml의 농도로 사용되는, 다능성 줄기 세포로부터 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)의 개체군을 생성시키는 방법.

#### 청구항 45

청구항 37-42 중 어느 한 항에 있어서,

상기 BMP4는 약 10-50 ng/ml의 농도로 사용되는, 다능성 줄기 세포로부터 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)의 개체군을 생성시키는 방법.

#### 청구항 46

청구항 38 또는 39에 있어서,

상기 SB431542는 약 5-20  $\mu\text{M}$ 의 농도로 사용되는, 다능성 줄기 세포로부터 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)의 개체군을 생성시키는 방법.

#### 청구항 47

청구항 26-46 중 어느 한 항에 있어서,

단계 (a) 및 (b)에서 세포의 기질 표면은 콜라겐-IV-코팅 표면인, 다능성 줄기 세포로부터 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)의 개체군을 생성시키는 방법.

#### 청구항 48

청구항 26-47 중 어느 한 항에 있어서,

단계 (a)에서 배양하는 단계는 약 1일 동안 수행되는, 다능성 줄기 세포로부터 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)의 개체군을 생성시키는 방법.

#### 청구항 49

청구항 26-48 중 어느 한 항에 있어서,

단계 (b)에서 배양하는 단계는 약 4일 내지 약 7일 동안 수행되는, 다능성 줄기 세포로부터 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)의 개체군을 생성시키는 방법.

#### 청구항 50

청구항 26-49 중 어느 한 항에 있어서,

단계 (a)에서 배양하는 단계는 5%  $\text{CO}_2$  및 20%  $\text{O}_2$ 의 정상산소 조건하에서 수행되는, 다능성 줄기 세포로부터 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)의 개체군을 생성시키는 방법.

#### 청구항 51

청구항 26-50 중 어느 한 항에 있어서,

단계 (b)에서 배양하는 단계는 5% CO<sub>2</sub> 및 5% O<sub>2</sub>의 저산소 조건하에서 수행되는, 다능성 줄기 세포로부터 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)의 개체군을 생성시키는 방법.

**청구항 52**

청구항 27-51 중 어느 한 항에 있어서,

상기 다능성 줄기 세포의 배양은 5% CO<sub>2</sub> 및 20% O<sub>2</sub>의 정상산소 조건하에서 수행되는, 다능성 줄기 세포로부터 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)의 개체군을 생성시키는 방법.

**청구항 53**

청구항 1-52 중 어느 한 항에 있어서,

상기 다능성 줄기 세포는 인간 배아 줄기 세포인, 다능성 줄기 세포로부터 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)의 개체군을 생성시키는 방법.

**청구항 54**

청구항 1-52 중 어느 한 항에 있어서,

상기 다능성 줄기 세포는 인간 유도 다능성 줄기 세포인, 다능성 줄기 세포로부터 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)의 개체군을 생성시키는 방법.

**청구항 55**

청구항 1-54 중 어느 한 항에 있어서,

상기 meso-VPCs의 개체군은 CD31/PECAM1, CD309/KDR, CD43, CD144, CD34, CD184/CXCR4, CD146, 및 PDGFRb로 이루어진 군으로부터 선택된 세포-표면 마커의 적어도 하나를 발현시키는, 다능성 줄기 세포로부터 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)의 개체군을 생성시키는 방법.

**청구항 56**

청구항 55에 있어서,

상기 meso-VPC의 개체군은, 세포-표면 마커인 (a) CD146, CD31/PECAM1, 및 CD309/KDR; 또는 (b) CD31/PECAM1, CD309/KDR, CD146, 및 (i) CD144, CD34, CD184/CXCR4, CD43, 또는 PDGFRb 중 적어도 하나; (ii) CD34, CD184/CXCR4, 및 PDGFRb; (iii) CD184/CXCR4; (iv) PDGFRb; (v) CD144 및 CD184/CXCR4; (vi) CD184/CXCR4 및 CD43; 또는 (vii) CC184/CXCFR4를 발현시키는, 다능성 줄기 세포로부터 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)의 개체군을 생성시키는 방법.

**청구항 57**

청구항 1-56 중 어느 한 항에 있어서,

상기 meso-VPC의 개체군은, (a) CXCR7, CD45, 및 NG2로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 세포-표면 마커; (b) CXCR7, CD45, 및 NG2; 또는 (c) CD144, CD34, CD184/CXCR4, CXCR7, CD43, CD45, PDGFRb, 및 NG2로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 세포-표면 마커의 제한적이거나 전혀 없는 검출을 나타내는, 다능성 줄기 세포로부터 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)의 개체군을 생성시키는 방법.

**청구항 58**

청구항 1-57 중 어느 한 항에 있어서,

상기 meso-VPCs의 개체군은, hsa-miR-3917, hsa-miR-450a-2-3p, hsa-miR-542-5p, hsa-miR-126-5p, hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-24-3p, hsa-let-7e-5p, hsa-miR-99a-5p, hsa-miR-223-5p, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-483-5p, hsa-miR-483-3p, miR 214, miR 335-3p, 및 miR-199a-3p로부터 선택된 적어도 하나의 miRNA 마커를 발현시키는, 다능성 줄기 세포로부터 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)의 개체군을 생성시키는 방법.

**청구항 59**

청구항 1-58 중 어느 한 항에 있어서,

상기 meso-VPCs의 개체군은, hsa-let-7e-3p, hsa-miR-99a-3p, hsa-miR-133a-5p, hsa-miR-11399, hsa-miR-196b-3p, hsa-miR-5690, 및 hsa-miR-7151-3p로부터 선택된 적어도 하나의 miRNA 마커의 제한적이거나 전혀 없는 발현을 나타내는, 다능성 줄기 세포로부터 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)의 개체군을 생성시키는 방법.

**청구항 60**

청구항 1-59 중 어느 한 항에 있어서,

상기 meso-VPCs의 개체군은 hsa-miR-3917, hsa-miR-450a-2-3p, 및 hsa-miR-542-5p를 발현시키는, 다능성 줄기 세포로부터 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)의 개체군을 생성시키는 방법.

**청구항 61**

청구항 1-60 중 어느 한 항에 있어서,

상기 meso-VPCs의 개체군은, mir126, mir125a-5p, mir24, 및 mir483-5p로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 miRNA 마커에 대해 양성인 적어도 하나의 meso-VPC를 포함하는, 다능성 줄기 세포로부터 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)의 개체군을 생성시키는 방법.

**청구항 62**

청구항 61에 있어서,

상기 miRNA 마커는 mir483-5p인, 다능성 줄기 세포로부터 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)의 개체군을 생성시키는 방법.

**청구항 63**

청구항 1-62 중 어느 한 항에 있어서,

상기 meso-VPCs의 개체군은, mir367, mir302a, mir302b, mir302c, mirLet7-e, mir223, mir99a, mir142-3p, 및 mir133a로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 miRNA 마커에 대해 제한적이거나 전혀 없는 발현을 나타내는 적어도 하나의 meso-VPC를 포함하는, 다능성 줄기 세포로부터 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)의 개체군을 생성시키는 방법.

**청구항 64**

청구항 1-63 중 어느 한 항에 있어서,

상기 meso-VPC의 분화에 의해 혈관 내피 세포를 생성시키는 단계를 더욱 포함하는, 다능성 줄기 세포로부터 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)의 개체군을 생성시키는 방법.

**청구항 65**

청구항 64에 있어서,

상기 분화는 피브로블라스트-코팅 표면에서 수행되는, 다능성 줄기 세포로부터 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)의 개체군을 생성시키는 방법.

**청구항 66**

청구항 1-63 중 어느 한 항의 방법에 의해 생성된 meso-VPC의 개체군을 포함하는 조성물.

**청구항 67**

다능성 줄기 세포로부터 유래된 중배엽 세포의 시험관내 분화에 의해 생성된 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)의 개체군을 포함하는 조성물로서, 여기서, 상기 meso-VPCs의 개체군은, CD31/PECAM1, CD309/KDR, CD43,

CD144, CD34, CD184/CXCR4, CD146, 및 PDGFRb로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 세포-표면 마커를 발현시키는 조성물.

**청구항 68**

청구항 67에 있어서,

상기 meso-VPCs의 개체군은, CD31/PECAM1, CD309/KDR, CD43, CD144, CD34, CD184/CXCR4, CD146, 및 PDGFRb로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 2개의 세포-표면 마커를 발현시키는, 조성물.

**청구항 69**

청구항 67-68 중 어느 한 항에 있어서,

상기 meso-VPCs의 개체군은 세포-표면 마커인 CD146, CD31/PECAM1, 및 CD309/KDR을 발현시키는, 조성물.

**청구항 70**

청구항 67-69 중 어느 한 항에 있어서,

상기 meso-VPC의 개체군은, 세포-표면 마커인 CD31/PECAM1, CD309/KDR, CD146, 및 (i) CD144, CD34, CD184/CXCR4, CD43, 또는 PDGFRb 중 적어도 하나; (ii) CD34, CD184/CXCR4, 및 PDGFRb; (iii) CD184/CXCR4; (iv) PDGFRb; (v) CD144 및 CD184/CXCR4; (vi) CD184/CXCR4 및 CD43; 또는 (vii) CC184/CXCFR4를 발현시키는, 조성물.

**청구항 71**

청구항 67-70 중 어느 한 항에 있어서,

상기 meso-VPCs의 개체군은, (a) CXCR7, CD45, 및 NG2로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 세포-표면 마커; (b) CXCR7, CD45 및 NG2; 또는 (c) CD144, CD34, CD184/CXCR4, CXCR7, CD43, CD45, PDGFRb, 및 NG2로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 세포-표면 마커의 제한적이거나 전혀 없는 검출을 나타내는, 조성물.

**청구항 72**

청구항 67-71 중 어느 한 항에 있어서,

상기 meso-VPCs의 개체군은, hsa-miR-3917, hsa-miR-450a-2-3p, hsa-miR-542-5p, hsa-miR-126-5p, hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-24-3p, hsa-let-7e-5p, hsa-miR-99a-5p, hsa-miR-223-5p, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-483-5p, hsa-miR-483-3p, miR 214, miR 335-3p, 및 miR-199a-3p로부터 선택된 적어도 하나의 miRNA 마커를 발현시키는, 조성물.

**청구항 73**

청구항 67-72 중 어느 한 항에 있어서,

상기 meso-VPCs의 개체군은, hsa-let-7e-3p, hsa-miR-99a-3p, hsa-miR-133a-5p, hsa-miR-11399, hsa-miR-196b-3p, hsa-miR-5690, 및 hsa-miR-7151-3p로부터 선택되는 적어도 하나의 miRNA 마커의 제한적이거나 전혀 없는 발현을 나타내는, 조성물.

**청구항 74**

청구항 67-73 중 어느 한 항에 있어서,

상기 meso-VPCs의 개체군은 hsa-miR-3917, hsa-miR-450a-2-3p, 및 hsa-miR-542-5p를 발현시키는, 조성물.

**청구항 75**

청구항 67-74 중 어느 한 항에 있어서,

상기 meso-VPCs의 개체군은 meso-VPCs의 바스쿨로노이드를 포함하는, 조성물.

**청구항 76**

청구항 67-74 중 어느 한 항에 있어서,  
 상기 meso-VPCs의 개체군은 meso-VPCs의 단일 세포를 포함하는, 조성물.

**청구항 77**

다능성 줄기 세포로부터 유래된 중배엽 세포의 시험관내 분화에 의해 생성된 meso-VPC로서, 여기서, 상기 meso-VPC는 mir126, mir125a-5p, mir24, 및 mir483-5p로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나의 miRNA 마커에 대해 양성인, meso-VPC.

**청구항 78**

청구항 77에 있어서,  
 상기 meso-VPC는 miRNA 마커인 mir483-5p에 대해 양성인, meso-VPC.

**청구항 79**

청구항 77 또는 78에 있어서,  
 상기 meso-VPC는, mir367, mir302a, mir302b, mir302c, mirLet7-e, mir223, mir99a, mir142-3p, 및 mir133a로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 miRNA 마커에 대해 음성인, meso-VPC.

**청구항 80**

청구항 66-79 중 어느 한 항에 있어서,  
 상기 다능성 줄기 세포는 인간 다능성 줄기 세포인, 조성물 또는 meso-VPC.

**청구항 81**

청구항 80에 있어서,  
 상기 다능성 줄기 세포는 인간 배아 줄기 세포(hESC)인, 조성물 또는 meso-VPC.

**청구항 82**

청구항 80에 있어서,  
 상기 다능성 줄기 세포는 인간 유도 다능성 줄기 세포(hiPSC)인, 조성물 또는 meso-VPC.

**청구항 83**

청구항 66-82 중 어느 한 항에 있어서,  
 상기 다능성 줄기 세포는 먼저 중배엽 세포로 분화되고, 결과적으로, meso-VPC로 분화되는, 조성물 또는 meso-VPC.

**청구항 84**

청구항 66-83 중 어느 한 항의 조성물 또는 meso-VPC를 포함하는, 약학 조성물.

**청구항 85**

유효량의 청구항 66-83 중 어느 한 항의 조성물 또는 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs), 또는 청구항 84의 약학 조성물을 피험자에서 투여하는 단계를 포함하고, 이에 의해 피험자에서 혈관 질병 또는 장애를 치료하는, 피험자에서 혈관 질병 또는 장애를 치료하는 방법.

**청구항 86**

청구항 85에 있어서,

상기 혈관 질병 또는 장애는, 죽상동맥경화증, 말초 동맥 질환(PAD), 경동맥 질병, 정맥 질병, 혈전, 대동맥류, 섬유근 형성이상, 림프부종, 및 혈관 손상으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 피험자에서 혈관 질병 또는 장애를 치료하는 방법.

**청구항 87**

청구항 86에 있어서,

상기 말초 동맥 질환은, 중증 사지 허혈, 장 허혈 증후군, 신장 동맥 질병, 슬와 포착 증후군, 레이노 현상, 버거병으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 피험자에서 혈관 질병 또는 장애를 치료하는 방법.

**청구항 88**

청구항 87에 있어서,

상기 말초 동맥 질환은 중증 사지 허혈인, 피험자에서 혈관 질병 또는 장애를 치료하는 방법.

**청구항 89**

청구항 85-88 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물, meso-VPC, 또는 약학 조성물은 근육내로 또는 전신적으로 투여되는, 피험자에서 혈관 질병 또는 장애를 치료하는 방법.

**청구항 90**

청구항 85-89 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물, meso-VPC, 또는 약학 조성물의 투여는 피험자에서 혈류를 증가시키는, 피험자에서 혈관 질병 또는 장애를 치료하는 방법.

**청구항 91**

청구항 85-90 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물, meso-VPC, 또는 약학 조성물의 투여는 피험자에서 혈관신생 및/또는 혈관형성을 촉진시키는, 피험자에서 혈관 질병 또는 장애를 치료하는 방법.

**청구항 92**

청구항 85-91 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물, meso-VPC, 또는 약학 조성물의 투여는 피험자에서 허혈성 증증도를 감소시키는, 피험자에서 혈관 질병 또는 장애를 치료하는 방법.

**청구항 93**

청구항 85-92 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물, meso-VPC, 또는 약학 조성물의 투여는 피험자에서 사지의 피사 면적을 감소시키는, 피험자에서 혈관 질병 또는 장애를 치료하는 방법.

**청구항 94**

청구항 85-93 중 어느 한 항에 있어서,

상기 피험자에게 약  $1 \times 10^4$  내지 약  $1 \times 10^{13}$  meso-VPCs가 투여되는, 피험자에서 혈관 질병 또는 장애를 치료하는 방법.

**청구항 95**

청구항 85-94 중 어느 한 항에 있어서,

상기 meso-VPC는 약학 조성물에 투여되는, 피험자에서 혈관 질병 또는 장애를 치료하는 방법.

**청구항 96**

청구항 95에 있어서,

상기 약학 조성물은:

(a) 생리학적 pH에서 용액을 유지하는, 버퍼;

(b) 적어도 5%(w/v) 글루코스; 및

(c) 생리학적 삼투질 농도에서 용액을 유지하는 삼투 활성제를 포함하는, 피험자에서 혈관 질병 또는 장애를 치료하는 방법.

**청구항 97**

청구항 96에 있어서,

상기 글루코스는 D-글루코스(덱스트로스)인, 피험자에서 혈관 질병 또는 장애를 치료하는 방법.

**청구항 98**

청구항 96에 있어서,

상기 삼투 활성제는 염인, 피험자에서 혈관 질병 또는 장애를 치료하는 방법.

**청구항 99**

청구항 96에 있어서,

상기 염은 염화나트륨인, 피험자에서 혈관 질병 또는 장애를 치료하는 방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 출원은, 2019년 8월 28일자로 출원된, 미국 가출원 제62/892,724호의 우선권을 주장하며, 이의 전체적인 내용은 참조로서 여기에 혼입된다.

[0002] 본 발명은 새로운 중배엽-유래 혈관 전구 세포(mesoderm-derived vascular progenitor cells: meso-VPCs) 및 meso-VPCs의 생성 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 상기 meso-VPCs를 사용하여, 허혈(ischemia)과 같은, 혈관 질병을 치료하는 방법에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0003] 혈관 질병은 신체의 혈관(blood vessels) 네트워크에 영향을 미치는 상태이다. 7,800만 명 이상의 미국인은 가장 흔한 형태의 혈관 질병인, 고혈압을 앓고 있다. 부가하여, 말초 동맥 질환(PAD)은, 훨씬 더 많은 수의 진단되지 않은 사례와 함께, 미국에서 1200-1500만 명에 영향을 미친다.

[0004] 말초 동맥 질환(PAD)은, 심장에서 다른 기관 및 조직으로 혈액을 운반하는 혈관이 좁아지거나 막히는 것이다. 이것은 주로 동맥에 지방 플라크(fatty plaque)의 축적에 의해 발생되며, 이를 죽상경화증(atherosclerosis)이라고 한다. PAD는 모든 혈관에서 발생할 수 있지만, 팔보다 다리에서 더 흔하다.

[0005] 허혈은, 치료하지 않으면, 조직사(tissue death)로 이어질 수 있는, 조직, 기관, 또는 팔다리에 대한 동맥혈 공급에서 중단을 포함하는 말초 동맥 질환에 의해 발생된 상태이다. 이것은, 색전증, 죽상경화 동맥의 혈전증 또는 외상으로 인해 발생할 수 있다. 정맥 유출 폐색 및 저-혈류 상태와 같은, 정맥 문제는 급성 동맥 허혈을 유발할 수 있다. 다리에서 허혈은 활동시 다리 통증 또는 경련(파행), 피부색에서 변화, 종기 또는 궤양 및 다리 피로감으로 이어질 수 있다. 혈액순환의 총 소실은 괴저 및 사지(limb)의 소실로 이어질 수 있다.

[0006] 허혈과 같은 혈관 질병에 대한 치료는 제한적이다. 대부분의 치료 방법은 침습적 수술 절차를 포함하지만, 다른 방법은 기존 상태의 진행의 방지에 중점을 둔다. 따라서, 허혈과 같은 혈관 질병에 대한 개선된 치료를 위한 당

업계에 요구가 여전히 있다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 다능성 줄기 세포의 시험관내 분화에 의해 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)를 생성시키는 새로운 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한, 본 발명에 따른 meso-VPCs를 사용하여, 혈관 질병, 예를 들어, 중증 사지 허혈을 치료하는 방법을 더욱 제공한다.

### 과제의 해결 수단

[0008] 따라서, 하나의 관점에서, 본 발명은, 다능성 줄기 세포로부터 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)의 개체군을 생성시키는 방법을 제공하며, 여기서, 상기 방법은, 혈관 내피 성장 인자(VEGF), 섬유아세포 성장 인자(FGF), 골형성 단백질 4(BMP4), 및 전환 성장 인자-베타(TGF-β) 타입 I 수용체의 소분자 억제제로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 인자(factors)를 포함하는 배지에서, 비-접착(non-adherent) 또는 저접착 조건하에서 다능성 줄기 세포로부터 유래된 중배엽 세포를 배양하는 단계를 포함하고, 이에 의해 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)의 개체군을 생성시킨다.

[0009] 하나의 구현예에서, 중배엽 세포는, 액티빈-A(Activin-A), 혈관 내피 성장 인자(VEGF), 섬유아세포 성장 인자(FGF), 및 골형성 단백질 4(BMP4)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 중배엽 유도 성장 인자를 포함하는 배지에서 다능성 줄기 세포를 배양시켜 다능성 줄기 세포로부터 유래된다.

[0010] 하나의 구현예에서, meso-VPCs는 바스쿨로노이드(vasculonoid)로서 생성된다. 또 다른 구현예에서, meso-VPC는 단일 세포로 분리된다.

[0011] 하나의 구현예에서, 중배엽 유도 성장 인자는 액티빈-A, VEGF165, FGF-2 및 BMP4를 포함한다. 하나의 구현예에서, 액티빈-A는 약 5-15 ng/ml의 농도로 사용된다. 하나의 구현예에서, VEGF165는 약 5-25 ng/ml의 농도로 사용된다. 하나의 구현예에서, FGF-2는 약 5-25 ng/ml의 농도로 사용된다. 하나의 구현예에서, BMP4는 약 5-50 ng/ml의 농도로 사용된다. 하나의 구현예에서, 상기 방법은 약 24시간의 배양 후에 배양 배지로부터 액티빈-A를 제거하는 단계를 더욱 포함한다.

[0012] 하나의 구현예에서, 다능성 줄기 세포는 세포의 기질 표면(extracellular matrix surface) 상에서 배양된다. 하나의 구현예에서, 세포의 기질 표면은 매트릭셀-코팅된(Matrigel-coated) 표면이다. 하나의 구현예에서, 다능성 줄기 세포는 약 3일 내지 약 5일 동안 배양된다.

[0013] 하나의 구현예에서, 전환 성장 인자-베타(TGF-β) 타입 I 수용체의 소분자 억제제는 SB431542이다. 또 다른 구현예에서, 하나 이상의 인자는, VEGF165, FGF-2, BMP4, 및 SB431542를 포함한다. 하나의 구현예에서, 하나 이상의 인자는 포스콜린(Forskolin)을 더욱 포함한다. 하나의 구현예에서, 포스콜린은 약 2-10 μM의 농도로 사용된다. 하나의 구현예에서, VEGF165는 약 10-50 ng/ml의 농도로 사용된다. 하나의 구현예에서, FGF-2는 약 10-50 ng/ml의 농도로 사용된다. 하나의 구현예에서, BMP4는 약 10-50 ng/ml의 농도로 사용된다. 하나의 구현예에서, SB431542는 약 5-20 μM의 농도로 사용된다.

[0014] 하나의 구현예에서, 중배엽 세포를 배양하는 단계는 약 3일 내지 약 7일 동안 수행된다.

[0015] 하나의 구현예에서, 중배엽 세포를 배양하는 단계는 5% CO<sub>2</sub> 및 20% O<sub>2</sub>의 정상산소 조건(normoxia condition)하에서 수행된다.

[0016] 하나의 구현예에서, 다능성 줄기 세포의 배양은 5% CO<sub>2</sub> 및 20% O<sub>2</sub>의 정상산소 조건하에서 수행된다.

[0017] 하나의 구현예에서, 비-접착 또는 저접착 조건은 초-저 부착 표면 상에 있다.

[0018] 하나의 관점에서, 본 발명은, 다능성 줄기 세포로부터 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)의 개체군을 생성시키는 방법을 제공하며, 여기서, 상기 방법은, (a) 혈관 내피 성장 인자(VEGF), 섬유아세포 성장 인자(FGF), 및 골형성 단백질 4(BMP4)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 인자를 포함하는 배지에서, 세포의 기질 표면 상에서 다능성 줄기 세포로부터 유래된 중배엽 세포를 배양하는 단계; 및 (b) 단계 (a)에서 생성된 세포를, 혈관 내피 성장 인자(VEGF), 섬유아세포 성장 인자(FGF), 골형성 단백질 4(BMP4), 및 전환 성장 인자-베타(TGF-β) 타입 I 수용체의 소분자 억제제로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 인자를 포함하는 배지

에서, 세포의 기질 표면 상에서 배양하는 단계를 포함하고, 이에 의해 중배엽-유래 혈관 전구 세포의 개체군을 생성시킨다.

- [0019] 하나의 구현예에서, 중배엽 세포는, 액티빈-A, 혈관 내피 성장 인자(VEGF), 섬유아세포 성장 인자(FGF), 및 골형성 단백질 4(BMP4)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 중배엽 유도 성장 인자를 포함하는 배지에서 다능성 줄기 세포를 배양시켜 다능성 줄기 세포로부터 유래된다.
- [0020] 하나의 구현예에서, 상기 방법은 meso-VPCs의 개체군을 단일 세포로 분리시키는 단계를 더욱 포함한다.
- [0021] 하나의 구현예에서, 중배엽 유도 성장 인자는, 액티빈-A, VEGF165, FGF-2 및 BMP4를 포함한다. 하나의 구현예에서, 액티빈-A는 약 5-15 ng/ml의 농도로 사용된다. 하나의 구현예에서, VEGF165는 약 5-25 ng/ml의 농도로 사용된다. 하나의 구현예에서, FGF-2는 약 5-25 ng/ml의 농도로 사용된다. 하나의 구현예에서, BMP4는 약 5-50 ng/ml의 농도로 사용된다. 하나의 구현예에서, 상기 방법은 약 24시간의 배양 후에 배양 배지로부터 액티빈-A를 제거하는 단계를 더욱 포함한다.
- [0022] 하나의 구현예에서, 단계 (a)에서 세포의 기질 표면은 콜라겐 IV-코팅 표면이다.
- [0023] 하나의 구현예에서, 다능성 줄기 세포는 약 3일 내지 약 5일 동안 배양된다.
- [0024] 하나의 구현예에서, 단계 (a)에서 하나 이상의 인자는, VEGF165, FGF-2, 및 BMP4를 포함한다.
- [0025] 하나의 구현예에서, 전환 성장 인자-베타(TGF-β) 타입 I 수용체의 소분자 억제제는 SB431542이다. 또 다른 구현예에서, 단계 (b)에서 하나 이상의 인자는, VEGF165, FGF-2, BMP4, 및 SB431542를 포함한다.
- [0026] 하나의 구현예에서, 단계 (a)에서 하나 이상의 인자는 포스콜린을 더욱 포함한다.
- [0027] 하나의 구현예에서, 단계 (b)에서 하나 이상의 인자는 포스콜린을 더욱 포함한다.
- [0028] 하나의 구현예에서, 상기 포스콜린은 약 2-10 μM의 농도로 사용된다.
- [0029] 하나의 구현예에서, VEGF165는 약 10-50 ng/ml의 농도로 사용된다.
- [0030] 하나의 구현예에서, FGF-2는 약 10-50 ng/ml의 농도로 사용된다.
- [0031] 하나의 구현예에서, BMP4는 약 10-50 ng/ml의 농도로 사용된다.
- [0032] 하나의 구현예에서, SB431542는 약 5-20 μM의 농도로 사용된다.
- [0033] 하나의 구현예에서, 단계 (a) 및 (b)에서 세포의 기질 표면은 콜라겐-IV-코팅 표면이다.
- [0034] 하나의 구현예에서, 단계 (a)에서 배양하는 단계는 약 1일 동안 수행된다.
- [0035] 하나의 구현예에서, 단계 (b)에서 배양하는 단계는 약 4일 내지 약 7일 동안 수행된다.
- [0036] 하나의 구현예에서, 단계 (a)에서 배양하는 단계는 5% CO<sub>2</sub> 및 20% O<sub>2</sub>의 정상산소 조건하에서 수행된다.
- [0037] 하나의 구현예에서, 단계 (b)에서 배양하는 단계는 5% CO<sub>2</sub> 및 5% O<sub>2</sub>의 저산소 조건(hypoxia condition)하에서 수행된다.
- [0038] 하나의 구현예에서, 다능성 줄기 세포의 배양은 5% CO<sub>2</sub> 및 20% O<sub>2</sub>의 정상산소 조건하에서 수행된다.
- [0039] 하나의 구현예에서, 다능성 줄기 세포는 인간 배아 줄기 세포이다.
- [0040] 하나의 구현예에서, 다능성 줄기 세포는 인간 유도 다능성 줄기 세포이다.
- [0041] 하나의 구현예에서, 본 발명의 방법 중 어느 하나에 따라 생성된 meso-VPCs의 개체군은, CD31/PECAM1, CD309/KDR, CD43, CD144, CD34, CD184/CXCR4, CD146, 및 PDGFRb로 이루어진 군으로부터 선택된 세포-표면 마커(markers)의 적어도 하나를 발현시킨다.
- [0042] 하나의 구현예에서, 본 발명의 방법 중 어느 하나에 따라 생성된 meso-VPCs의 개체군은, 세포-표면 마커인 (a) CD146, CD31/PECAM1, 및 CD309/KDR; 또는 (b) CD31/PECAM1, CD309/KDR, CD146, 및 (i) CD144, CD34, CD184/CXCR4, CD43, 또는 PDGFRb 중 적어도 하나; (ii) CD34, CD184/CXCR4, 및 PDGFRb; (iii) CD184/CXCR4; (iv) PDGFRb; (v) CD144 및 CD184/CXCR4; (vi) CD184/CXCR4 및 CD43; 또는 (vii) CD184/CXCR4를 발현시킨다.

- [0043] 하나의 구현예에서, 본 발명의 방법 중 어느 하나에 따라 생성된 meso-VPCs의 개체군은, (a) CXCR7, CD45, 및 NG2로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 세포-표면 마커; (b) CXCR7, CD45, 및 NG2; 또는 (c) CD144, CD34, CD184/CXCR4, CXCR7, CD43, CD45, PDGFRb, 및 NG2로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 세포-표면 마커의 제한적이거나 전혀 없는 검출을 나타낸다.
- [0044] 하나의 구현예에서, 본 발명의 방법 중 어느 하나에 따라 생성된 meso-VPCs의 개체군은, hsa-miR-3917, hsa-miR-450a-2-3p, hsa-miR-542-5p, hsa-miR-126-5p, hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-24-3p, hsa-let-7e-5p, hsa-miR-99a-5p, hsa-miR-223-5p, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-483-5p, hsa-miR-483-3p, miR 214, miR 335-3p, 및 miR-199a-3p로부터 선택된 적어도 하나의 miRNA 마커를 발현시킨다.
- [0045] 하나의 구현예에서, 본 발명의 방법 중 어느 하나에 따라 생성된 meso-VPCs의 개체군은, hsa-let-7e-3p, hsa-miR-99a-3p, hsa-miR-133a-5p, hsa-miR-11399, hsa-miR-196b-3p, hsa-miR-5690, 및 hsa-miR-7151-3p로부터 선택된 적어도 하나의 miRNA 마커의 제한적이거나 전혀 없는 발현을 나타낸다.
- [0046] 하나의 구현예에서, 본 발명의 방법 중 어느 하나에 따라 생성된 meso-VPCs의 개체군은, hsa-miR-3917, hsa-miR-450a-2-3p, 및 hsa-miR-542-5p를 발현시킨다.
- [0047] 하나의 구현예에서, 본 발명의 방법 중 어느 하나에 따라 생성된 meso-VPCs의 개체군은, mir126, mir125a-5p, mir24, 및 mir483-5p로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 miRNA 마커에 대해 양성인 적어도 하나의 meso-VPC를 포함한다. 하나의 구현예에서, miRNA 마커는 mir483-5p이다.
- [0048] 하나의 구현예에서, 본 발명의 방법 중 어느 하나에 따라 생성된 meso-VPCs의 개체군은, mir367, mir302a, mir302b, mir302c, mirLet7-e, mir223, mir99a, mir142-3p, 및 mir133a로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 miRNA 마커에 대해 제한적이거나 전혀 없는 발현을 나타내는 적어도 하나의 meso-VPC를 포함한다.
- [0049] 하나의 구현예에서, 본 발명의 방법은, meso-VPC의 분화에 의해 혈관 내피 세포를 생성시키는 단계를 더욱 포함한다.
- [0050] 하나의 구현예에서, 분화는 피브로넥틴-코팅된(fibronectin-coated) 표면 상에서 수행된다.
- [0051] 하나의 관점에서, 본 발명은, 본 발명의 방법 중 어느 하나에 의해 생성된 meso-VPCs의 개체군을 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0052] 하나의 관점에서, 본 발명은, 다능성 줄기 세포로부터 유래된 증배업 세포의 시험관내 분화에 의해 생성된 증배업-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)의 개체군을 포함하는 조성물을 제공하며, 여기서, 상기 meso-VPCs의 개체군은, CD31/PECAM1, CD309/KDR, CD43, CD144, CD34, CD184/CXCR4, CD146, 및 PDGFRb로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 세포-표면 마커를 발현시킨다.
- [0053] 하나의 구현예에서, meso-VPCs의 개체군을 포함하는 조성물은, CD31/PECAM1, CD309/KDR, CD43, CD144, CD34, CD184/CXCR4, CD146, 및 PDGFRb로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 2개의 세포-표면 마커를 발현시킨다.
- [0054] 하나의 구현예에서, meso-VPCs의 개체군을 포함하는 조성물은, 세포-표면 마커인 CD146, CD31/PECAM1, 및 CD309/KDR을 발현시킨다.
- [0055] 하나의 구현예에서, meso-VPCs의 개체군을 포함하는 조성물은, 세포-표면 마커인 CD31/PECAM1, CD309/KDR, CD146, 및 (i) CD144, CD34, CD184/CXCR4, CD43, 또는 PDGFRb 중 적어도 하나; (ii) CD34, CD184/CXCR4, 및 PDGFRb; (iii) CD184/CXCR4; (iv) PDGFRb; (v) CD144 및 CD184/CXCR4; (vi) CD184/CXCR4 및 CD43; 또는 (vii) CC184/CXCFR4를 발현시킨다.
- [0056] 하나의 구현예에서, meso-VPCs의 개체군을 포함하는 조성물은, (a) CXCR7, CD45, 및 NG2로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 세포 표면 마커; (b) CXCR7, CD45 및 NG2; 또는 (c) CD144, CD34, CD184/CXCR4, CXCR7, CD43, CD45, PDGFRb, 및 NG2로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 세포 표면 마커의 제한적이거나 전혀 없는 검출을 나타낸다.
- [0057] 하나의 구현예에서, meso-VPCs의 개체군을 포함하는 조성물은, hsa-miR-3917, hsa-miR-450a-2-3p, hsa-miR-542-5p, hsa-miR-126-5p, hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-24-3p, hsa-let-7e-5p, hsa-miR-99a-5p, hsa-miR-223-5p, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-483-5p, hsa-miR-483-3p, miR 214, miR 335-3p, 및 miR-199a-3p로부터 선택된 적어도 하나의 miRNA 마커를 발현시킨다.

- [0058] 하나의 구현예에서, meso-VPCs의 개체군을 포함하는 조성물은, hsa-let-7e-3p, hsa-miR-99a-3p, hsa-miR-133a-5p, hsa-miR-11399, hsa-miR-196b-3p, hsa-miR-5690, 및 hsa-miR-7151-3p로부터 선택된 적어도 하나의 miRNA 마커의 제한적이거나 전혀 없는 발현을 나타낸다.
- [0059] 하나의 구현예에서, meso-VPCs의 개체군을 포함하는 조성물은, hsa-miR-3917, hsa-miR-450a-2-3p, 및 hsa-miR-542-5p를 발현시킨다.
- [0060] 하나의 구현예에서, meso-VPCs의 개체군은 meso-VPCs의 바스칼로노이드를 포함한다.
- [0061] 하나의 구현예에서, meso-VPCs의 개체군은 meso-VPCs의 단일 세포를 포함한다.
- [0062] 하나의 구현예에서, 본 발명은, 다능성 줄기 세포로부터 유래된 중배엽 세포의 시험관내 분화에 의해 생성된 meso-VPC를 제공하며, 여기서, 상기 meso-VPC는 mir126, mir125a-5p, mir24, 및 mir483-5p로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나의 miRNA 마커에 대해 양성이다.
- [0063] 하나의 구현예에서, meso-VPC는 miRNA 마커인 mir483-5p에 대해 양성이다.
- [0064] 하나의 구현예에서, meso-VPC는, mir367, mir302a, mir302b, mir302c, mirLet7-e, mir223, mir99a, mir142-3p, 및 mir133a로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 miRNA 마커에 대해 음성이다.
- [0065] 하나의 구현예에서, 다능성 줄기 세포는 인간 다능성 줄기 세포이다.
- [0066] 하나의 구현예에서, 다능성 줄기 세포는 인간 배아 줄기 세포(hESC)이다.
- [0067] 하나의 구현예에서, 다능성 줄기 세포는 인간 유도 다능성 줄기 세포(hiPSC)이다.
- [0068] 하나의 구현예에서, 다능성 줄기 세포는, 먼저 중배엽 세포로 분화되고, 결과적으로, meso-VPC로 분화된다.
- [0069] 하나의 관점에서, 본 발명은, 본 발명의 meso-VPCs의 개체군 또는 상기 meso-VPCs 중 어느 하나를 포함하는 조성물을 포함하는 약학 조성물을 제공한다.
- [0070] 하나의 관점에서, 본 발명은, 피험자에서 혈관 질병 또는 장애를 치료하는 방법을 제공하며, 상기 방법은, 유효량의 본 발명의 meso-VPCs의 개체군 또는 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)를 포함하는 조성물 중 어느 하나, 또는 본 발명의 약학 조성물 중 어느 하나를 피험자에서 투여하는 단계를 포함하고, 이에 의해 피험자에서 혈관 질병 또는 장애를 치료한다.
- [0071] 하나의 구현예에서, 혈관 질병 또는 장애는, 죽상동맥경화증, 말초 동맥 질환(PAD), 경동맥 질병, 정맥 질병, 혈전, 대동맥류, 섬유근 형성이상, 림프부종, 및 혈관 손상으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0072] 하나의 구현예에서, 말초 동맥 질환은, 중증 사지 허혈, 장 허혈 증후군, 신장 동맥 질병, 슬와 포착 증후군, 레이노 현상(Raynaud's phenomenon), 버거병(Buerger's disease)으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0073] 하나의 구현예에서, 말초 동맥 질환은 중증 사지 허혈이다.
- [0074] 하나의 구현예에서, meso-VPCs의 개체군을 포함하는 조성물, meso-VPC, 또는 약학 조성물은 근육내로 또는 전신적으로 투여된다.
- [0075] 하나의 구현예에서, meso-VPCs의 개체군을 포함하는 조성물, meso-VPC, 또는 약학 조성물의 투여는 피험자에서 혈류를 증가시킨다.
- [0076] 하나의 구현예에서, meso-VPCs의 개체군을 포함하는 조성물, meso-VPC, 또는 약학 조성물의 투여는 피험자에서 혈관신생 및/또는 혈관형성(vasculogenesis)을 촉진시킨다.
- [0077] 하나의 구현예에서, meso-VPCs의 개체군을 포함하는 조성물, meso-VPC, 또는 약학 조성물의 투여는 피험자에서 허혈성 중증도(ischemic severity)를 감소시킨다.
- [0078] 하나의 구현예에서, meso-VPCs의 개체군을 포함하는 조성물, meso-VPC, 또는 약학 조성물의 투여는 피험자에서 사지의 괴사 면적(necrosis area)을 감소시킨다.
- [0079] 하나의 구현예에서, 피험자에게 약  $1 \times 10^4$  내지 약  $1 \times 10^{13}$  meso-VPCs는 투여된다.
- [0080] 하나의 구현예에서, meso-VPC는 약학 조성물에 투여된다.
- [0081] 하나의 구현예에서, 약학 조성물은, (a) 생리학적 pH에서 용액을 유지하는, 버퍼; (b) 적어도 5%(w/v)

글루코스; 및 (c) 생리학적 삼투질 농도(physiologically osmolality)에서 용액을 유지하는 삼투 활성제 (osmotically active agent)를 포함한다.

[0082] 하나의 구현예에서, 글루코스는 D-글루코스(덱스트로스)이다.

[0083] 하나의 구현예에서, 삼투 활성제는 염이다.

[0084] 하나의 구현예에서, 염은 염화나트륨이다.

### 도면의 간단한 설명

[0085] 도 1은, 인간 다능성 줄기 세포를 중배엽 세포로 시험관내 분화시키는 절차의 개략도이다.

도 2a는, 중배엽 계통(mesoderm lineage)으로의 분화를 확인하는, 인간 유도 다능성 줄기 세포주 GMP1에서 분화된 중배엽 세포에서 세포-표면 마커인 KDR, CD56/NCAM1, APLNR/APJ, GARP, 또는 CD13의 발현을 나타내는 그래프이다.

도 2b는, 중배엽 계통으로의 분화를 확인하는, 인간 유도 다능성 줄기 세포주 GMP1로부터 분화된 중배엽 세포에서 다능성, 내배엽, 외배엽, 및 혈액혈관(hematovascular) 세포-표면 마커들의 제한적이거나 전혀 없는 발현을 나타내는 그래프이다.

도 3은, 중배엽 세포로 인간 다능성 줄기 세포의 시험관내 분화(좌측), 및 Meso-3D-Vasculonoid VPC1 프로토콜(우측 위), 또는 Meso-3D-Vasculonoid VPC2 프로토콜(우측 아래)를 사용하여 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)로 중배엽 세포의 시험관내 분화에 대한 절차의 개략도이다.

도 4는, 중배엽 세포로 인간 다능성 줄기 세포의 시험관내 분화(좌측), 및 Meso-2D VPC2 프로토콜(우측 위), 또는 Meso-2D VPC3 프로토콜(우측 아래)를 사용하여 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)로 중배엽 세포의 시험관내 분화에 대한 절차의 개략도이다.

도 5는, 내피 계통(endothelial lineage)으로 추가 분화를 겪는 Meso-3D-Vasculonoid 프로토콜에 의해 생성된 meso-VPCs의 능력을 나타내는 현미경 이미지의 패널이다. 상단 패널은, 수확 전 5일째 meso-VPCs의 모폴로지(morphology)를 나타낸다. 중간 패널은, 피브로넥틴-코팅된 플레이트 및 내피 분화를 촉진하는 배지를 사용하여 meso-VPCs의 내피 분화를 나타낸다. 하단 패널은, meso-VPCs에 의해 형성된 모세관-유사(capillary-like) 매트릭스 네트워크를 나타낸다.

도 6a는, Meso-3D-Vasculonoid-VPC1, Meso-3D-Vasculonoid-VPC2, Meso-2D-VPC2, 또는 Meso-2D-VPC3 프로토콜을 사용하여 생성된 meso-VPCs에서 세포-표면 마커인 CD31/PECAM1, CD309/KDR, CXCR4/CD184, CD43, CD146, 및 PDGFRb의 발현을 나타낸 그래프이다.

도 6b는, 선택된 세포-표면 마커에 대해 양성인 비교 헤모제닉 내피 세포(hemogenic endothelial cells: HE) 또는 혈관모세포(HB) 및 meso-VPCs의 분획(fractions)을 나타내는 히트-맵(heat-map)이다. 미분화된 다능성 줄기 세포(J1 및 GMP1) 및 인간 제대 정맥 내피 세포(HUVECs)와의 비교는 또한 나타낸다.

도 6c는, 비교 헤모제닉 내피 세포(HE), 비교 혈관모세포(HB), 미분화된 다능성 줄기 세포(J1 및 GMP1), 인간 제대 정맥 내피 세포(HUVECs), 또는 Meso-3D-Vasculonoid 프로토콜 또는 Meso-2D 프로토콜에 의해 생성된 meso-VPCs의 혈관 세포-표면 마커 발현 프로파일들을 나타내는 주성분 분석(PCA) 플롯이다.

도 7은, 내피 계통으로 추가 분화를 겪는 Meso-2D 프로토콜에 의해 생성된 meso-VPCs의 능력을 나타내는 현미경 이미지의 패널이다. 상단 패널은, 수확 전 7일째에 meso-VPCs의 모폴로지를 나타낸다. 중간 패널은, 피브로넥틴-코팅된 플레이트 및 내피 분화를 촉진하는 배지를 사용하여 meso-VPCs의 내피 분화를 나타낸다. 하단 패널은, meso-VPCs에 의해 형성된 모세관-유사 매트릭스 네트워크를 나타낸다.

도 8은, 실시예 9에 기재된 대로 meso-VPCs로 처리된 동물에서 증가된 혈류를 나타내는 그래프이다. 구체적으로, 동물은 모의-수술(1M)되거나, 또는 비히클 대조군(2M), J1-HDF Meso-2D VPC2(3M), J-HDF Meso-3D Vasculonoid VPC2(4M), GMP1HDF Meso-2D VPC2(5M), GMP1-HDF Meso-3D Vasculonoid VPC2(6M) 또는 GMP1-HDF Meso-3D Vasculonoid VPC1(7M)로 처리된다.

도 9는, 실시예 9에 기재된 대로 meso-VPCs로 처리된 동물에서 혈관 밀도에서 변화를 나타내는 그래프이다. 구체적으로, 동물은, 비히클 대조군(2M), J1-HDF Meso-2D VPC2(3M TI1), J-HDF Meso-3D Vasculonoid VPC2(4M TI2), GMP1HDF Meso-2D VPC2(5M TI3), GMP1-HDF Meso-3D Vasculonoid VPC2(6M TI4) 또는 GMP1-HDF Meso-3D

Vasculonoid VPC1(7M TI5)로 처리된다.

도 10은, meso-VPCs로 처리된 동물에서 작은 모세혈관 형성, 총 혈관 수, 및 혈류 시험에 대한 지표인, CD34<sup>+</sup> 염색의 조합된 정량적 결과를 나타내는 그래프이다. 구체적으로, 동물은, 모의-수술(1M)되거나, 또는 비히클 대조군(2M), J1-HDF Meso-2D VPC2(3M TI1), J-HDF Meso-3D Vasculonoid VPC2(4M TI2), GMP1HDF Meso-2D VPC2(5M TI3), GMP1-HDF Meso-3D Vasculonoid VPC2(6M TI4) 또는 GMP1-HDF Meso-3D Vasculonoid VPC1(7M TI5)로 처리된다.

도 11은, 레이저 도플러(Laser Doppler)에 의해 측정된 혈류와 meso-VPCs로 처리된 동물의 각 그룹의 평균 모세혈관 밀도 사이에 강력하고 통계적으로 유의한 상관관계를 나타낸다.

도 12a는, J1 세포의 개체군 및 J1-유래 HE 세포의 개체군과 비교하는, hsa-miR-3917, hsa-miR-450a-2-3p, 및 hsa-miR-542-5p를 포함하는, 3개의 복제물로부터 J1-유래 Meso-3D Vasculonoid VPC2 세포의 개체군에서 발견된 고유(unique) 인간 miRNAs를 나타내는 플롯 및 그래프를 제공한다. 도 12a는 또한, hsa-miR-11399, hsa-miR-196b-3p, hsa-miR-5690, 및 hsa-miR-7151-3p를 포함하는, J1-유래 HE 세포의 개체군에서 발견되는 고유 인간 miRNAs를 나타낸다. "발현된"는 3개의 복제물 모두에서 0보다 큰 정규화된 발현이다.

도 12b는, 단일 세포에서 이전에 분석된 J1-유래 Meso-3D Vasculonoid VPC2 세포의 개체군에서 miRNA의 발현 수준을 나타낸 그래프로서, hsa-miR-126-5p, hsa-miR-125a-5p, 및 hsa-miR-24-3p가 J1 세포의 개체군 및 J1-유래 Meso-3D Vasculonoid VPC2 세포의 개체군 모두에서 발현되는 것을 나타낸다.

도 12c는, J1-유래 Meso-3D Vasculonoid VPC2 세포의 개체군이 hsa-let-7e-5p, hsa-miR-99a-5p, hsa-miR-223-5p, 및 hsa-miR-142-3p를 발현시키지만, hsa-let-7e-3p, hsa-miR-99a-3p, 및 hsa-miR-133a-5p를 발현시키지 않거나 낮은 발현을 갖는 것을 나타내는 그래프이다.

도 12d는, J1-유래 Meso-3D Vasculonoid VPC2 세포의 개체군이 hsa-miR-483-5p 및 hsa-miR-483-3p를 발현시키는 것을 나타내는 그래프이다.

도 13은, 단일 세포 RNA-seq 분석에서 단일 J1 또는 HUVEC 세포와 비교하여 J1-유래 Meso-3D Vasculonoid VPC2 세포 샘플에서 가장 상향- 또는 하향-조절된(down-regulated) 유전자의 발현을 나타낸 그래프이다.

도 14a는, 14일 후에 DAPI 및 UAE1 염색에 의한 J1-유래 Meso-3D Vasculonoid VPC2 바스쿨로노이드들의 포매된 응집체(embedded aggregates)로부터 확장된 광범위한 혈관 네트워크를 나타내는 저배율(10x 대물렌즈)의 이미지이다.

도 14b는, 단일 세포("단일 세포")로 분리된 J1-유래 Meso-3D Vasculonoid VPC2 바스쿨로노이드들("복수") 또는 J1-유래 Meso-3D Vasculonoid VPC2 세포들이 해동 후 정상산소(20% O<sub>2</sub>)(좌측 패널) 또는 저산소(5% O<sub>2</sub>)(우측 패널)하에서 시험관내 CLI-모방 조건(CLI-mimicking conditions)에서 배양된 경우, 바스쿨로노이드들이 단일 세포로 동결보존된 J1-유래 Meso-3D Vasculonoid VPC2 세포에 비해 더 나은 세포 생존률을 나타내는 것을 보여주는 그래프이다.

도 14c는, 비히클 처리 그룹(GS2 배지만)과 비교된 연구 전반에 걸쳐 J1-유래 Meso-3D Vasculonoid VPC2 단일 세포("sc") 또는 바스쿨로노이드들의 투여 후 혈류에서 통계적으로 유의한 개선을 나타내는 그래프이다; 이-원 분산분석(two-way ANOVA) 후 투키 검정(Tukey's test).

도 15a는, Meso-3D Vasculonoid VPC2 세포로 처리된 동물이 HE 및 HB 세포와 비교하여 21일째에 더 나은 평균 피사(좌측 패널) 및 기능 점수(우측 패널)를 가짐을 나타내는 그래프이다. 일-원 분산분석 후 던넛트 검증(Dunnett's test). 평균 +/- SEM.

도 15b는, 비히클과 비교하여, Meso-3D Vasculonoid VPC2 세포, HE, 및 HB 세포들로 처리된 동물에서 63일째의 혈류 개선을 나타내는 그래프이다. \*p<0.05 대 비히클. 평균 +/- s.d. 이-원 분산분석 후 투키 검정.

도 15c는, Meso-3D Vasculonoid VPC2 세포, HE, 및 HB 세포들로 처리된 동물의 대퇴사두근(quadriceps)에서 CD34<sup>+</sup> 혈관 성장을 나타내는 그래프이다. \*p<0.05 대 비히클. 평균 +/- SEM. 이-원 분산분석 후 수정되지 않은 피셔 LSD 검정(Fisher's LSD test).

도 15d는, Meso-3D Vasculonoid VPC2 세포, HE, 및 HB 세포들의 투여 후 비복근(gastrocnemius)에서 개선을 나타내는 그래프이다. \*p<0.05 대 비히클. 평균 +/- SEM. 이-원 분산분석 후 수정되지 않은 피셔 LSD 검정.

도 16a는, 세포의 장-기간 생착(engraftment)을 나타내는, 처리 후 63일 및 180일차에 Ku80+ 염색에 의한 생착된 공여자 GMP1-Meso3D Vasculonoid VPC2 세포를 나타내는 그래프이다.

도 16b는, 35일 및 63일까지, Meso-3D Vasculonoid VPC2 세포가 Ku80+ 염색에 의해 생착을 나타내는 그래프이다.

도 16c는, Balb/c 누드 마우스(nude mice)에서 HLI 수술 63일 후, 장-기간 생착(Ku80+), 인간 맥관구조(vasculature)의 형성(UEA1+ 혈관), 및 측분비 숙주 혈관 성장의 촉진(IB4+ 및 SMA+ 혈관)을 보여주는 주사된 Meso-3D Vasculonoid VPC2s의 형광 이미지이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0086] I. 정의
- [0087] 본 발명이 좀 더 쉽게 이해될 수 있도록, 특정 용어는 먼저 정의된다. 파라미터의 값 또는 값의 범위가 인용될 때마다, 인용된 값에 대한 중간 값 및 범위도 본 발명의 일부인 것으로 의도된다는 점에 또한 유의되어야 한다.
- [0088] 하기 상세한 설명에서, 설명의 목적을 위해, 특정 번호, 물질, 및 구성은, 본 발명의 완전한 이해를 제공하기 위해 서술된다. 그러나, 본 발명이 이러한 특정 세부사항 없이 실시될 수 있다는 점은 기술분야의 당업자에게 명백할 것이다. 몇몇 사례에서, 잘-알려진 특색(features)은 본 발명을 모호하게 하지 않도록 생략되거나 단순화될 수 있다. 더군다나, 본 명세서에서 "하나의 구현예" 또는 "일 구현예"와 같은, 문구에 대한 언급은, 구현예와 관련하여 기재된 특정 특색, 구조, 또는 특징이 본 발명의 적어도 하나의 구현예에 포함된다는 것을 의미한다. 본 명세서에 다양한 위치에서 "하나의 구현예에서"와 같은, 문구의 출현은 반드시 동일한 구현예를 모두 지칭하는 것은 아니다.
- [0089] 여기에 사용된 용어들의 단수 형태는, 별도의 언급이 없는 한, 대상의 하나 또는 하나 초과(즉, 적어도 하나)를 지칭하는 것으로 여기에서 사용된다. 예로서, "요소(element)"는 하나의 요소 또는 하나를 초과하는 요소를 지칭한다.
- [0090] 용어 "포함한" 또는 "포함하는"은, 본 개시에 필수적이지만, 불특정 요소를, 필수 여부에 관계없이, 포함할 수 있는, 조성물, 방법, 및 이들의 각각의 구성요소(들)와 관련하여 여기에서 사용된다.
- [0091] 여기에 사용된 바와 같은 "다능성 세포", "다능성 줄기 세포", 및 "PSCs"는, 세포들이 미분화 상태를 유지하면서 시험관내에서 장기적이거나 사실상 무기한 증식할 수 있고, 안정한(바람직하게는, 정상) 핵형(karyotype)을 나타내며, 적절한 조건하에서 3가지 배엽층(germ layers) 모두(즉, 외배엽, 중배엽 및 내배엽)로 분화하는 능력을 갖는 세포를 광범위하게 지칭한다. 통상적으로, 다능성 세포들은, (a) 면역결핍(SCID) 마우스에 이식될 때 기형종(teratomas)을 유도할 수 있고; (b) 3가지 배엽층 모두의 세포 타입(예를 들어, 외배엽, 중배엽 및 내배엽 세포 타입)으로 분화할 수 있으며, 그리고 (c) 적어도 하나의 hES 세포 마커(예컨대, Oct-4, 알칼리성 포스파타제(alkaline phosphatase), SSEA 3 표면 항원(SSEA 3 surface antigen), SSEA 4 표면 항원, NANOG, TRA 1 60, TRA 1 81, SOX2, REX1)를 발현시킨다. 대표적인 다능성 세포는, Oct-4, 알칼리성 포스파타제, SSEA 3 표면 항원, SSEA 4 표면 항원, TRA 1 60, 및/또는 TRA 1 81을 발현시킬 수 있다. 부가적인 대표 다능성 세포는, 배아 줄기 세포, 유도 다능성 줄기(iPS) 세포, 배아-유래 세포, 배아 생식(EG) 세포로부터 (예를 들어, FGF-2, LIF 및 SCF의 존재하에 배양시켜) 생성된 다능성 세포, 단위생식 ES 세포, 배양된 내세포괴 세포(ICM)로부터 생성된 ES 세포, 할구(blastomere)로부터 생성된 ES 세포, 및 핵 이식에 의해 생성된 ES 세포(예를 들어, 수용 난모세포로 이식된 체세포 핵)를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 대표적인 다능성 세포는, 배아의 파괴 없이 생성될 수 있다. 예를 들어, 유도 다능성 세포는 배아 파괴 없이 얻어진 세포로부터 생성될 수 있다. 또 다른 예로서, 다능성 세포는, (잔여 배아에 해를 끼치지 않고 달성될 수 있는) 생검된 할구로부터 생성될 수 있고; 선택적으로, 잔여 배아는 냉동보존, 배양, 및/또는 적절한 숙주에 이식될 수 있다. (공급원에 관계없이) 다능성 세포는, 유전적으로 변형되거나 달리 변형될 수 있다.
- [0092] 여기에 사용된 바와 같은, "배아" 또는 "배아의"는, 모계 숙주(maternal host)의 자궁막에 이식되지 않은 발달 중인 세포괴를 광범위하게 지칭한다. "배아 세포"는, 배아로부터 단리되거나 배아에 함유된 세포이다. 이것은 또한 2-세포기(cell stage)에서 일찍이 얻어진 할구, 및 응집된 할구를 포함한다.
- [0093] "배아 줄기 세포"(ES 세포 또는 ESC)는, 배아 세포(예컨대, 배양된 내세포괴 세포 또는 배양된 할구)로부터 생성된 다능성 세포를 포괄한다. 종종, 이러한 세포들은 세포주로서 연속 계대되거나 계대되었다. 배아 줄기 세포는, 여기에 기재된 바와 같이 중배엽 세포 및 meso-VPCs를 생성시키는 절차에서 다능성 줄기 세포로 사용될 수

있다. 예를 들어, ES 세포는, 정자 또는 정자 DNA로 난자의 수정, 핵 이식(체세포 핵 이식 포함), 또는 단위생식과 같은, (생식 또는 무생식 수단에 의한 것을 포함하는) 임의의 방법에 의해 생성된 배아로부터의 유도를 포함하는 당업계에 알려진 방법에 의해 생성될 수 있다. 또 다른 예로서, 배아 줄기 세포는 또한, 비-배아 세포가 절차에서 사용되는 경우에도, 체세포 핵 이식에 의해 생성된 세포를 포함한다. 예를 들어, ES 세포는, 배반포 단계 배아의 ICM, 뿐만 아니라 하나 이상의 할구로부터 유래된 배아 줄기 세포로부터 유래될 수 있다. 이러한 배아 줄기 세포는, 체세포 핵 이식(SCNT), 단위생식, 및 동정생식(androgenesis)을 포함하는 무생식 수단에 의해, 또는 수정에 의해 생성된 배아 물질로부터 발생될 수 있다. 위에서 더욱 논의된 바와 같이, ES 세포들은, 유전적으로 변형되거나 달리 변형될 수 있다.

[0094] ES 세포들은, 예를 들어, 유전자 조작, 자발적 이형 접합성 상실에 대한 스크리닝, 등을 통해 하나 이상의 HLA 유전자에서 동형접합 또는 이형접합으로 발생될 수 있다. 배아 줄기 세포는, 이들의 공급원 또는 이들을 생성하는데 사용된 특정 방법에 관계없이, 통상적으로 다음 속성 중 하나 이상을 보유한다: (i) 3가지 배엽층 모두의 세포로 분화하는 능력, (ii) 적어도 Oct-4 및 알칼리성 포스파타제의 발현, 및 (iii) 면역저하 동물로 이식된 경우 기형종을 생성하는 능력. 본 발명의 구현예에서 사용될 수 있는 배아 줄기 세포는, CT2, MA01, MA09, ACT-4, No. 3, J1, H1, H7, H9, H14 및 ACT30 배아 줄기 세포와 같은, 인간 ES 세포("hESC" 또는 "hES 세포")를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 부가적인 대표적인 세포주는, NED1, NED2, NED3, NED4, NED5, 및 NED7 을 포함한다. 또한, NIH 인간 배아 줄기 세포 등록(Human Embryonic Stem Cell Registry)를 참조. 사용될 수 있는 대표적인 인간 배아 줄기 세포주는 J1 세포이다.

[0095] 대표적인 인간 배아 줄기 세포(hESC) 마커는, 알칼리성 포스파타제, Oct-4, Nanog, 단계-특이적 배아 항원-3(SSEA-3), 단계-특이적 배아 항원-4(SSEA-4), TRA-1-60, TRA-1-81, TRA-2-49/6E, Sox2, 성장 및 분화 인자 3(GDF3), 감소된 발현 1(REX1), 섬유아세포 성장 인자 4(FGF4), 배아 세포-특이적 유전자 1(ESG1), 발달 다능성-연관 유전자 2(DPPA2), DPPA4, 텔로머라제 역전사효소(hTERT), SALL4, E-CADHERIN, 클러스터 지정 30(CD30), Cripto(TGDF-1), GCTM-2, 제네시스(Genesis), 생식 세포 핵 인자, 및 줄기 세포 인자(SCF 또는 c-Kit 리간드)를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 부가적으로, 배아 줄기 세포는, Oct-4, 알칼리성 포스파타제, SSEA 3 표면 항원, SSEA 4 표면 항원, TRA 1 60, 및/또는 TRA 1 81을 발현시킬 수 있다.

[0096] ESCs는 초기에, 무린(murine) 배아 피더 세포(embryonic feeder cells: MEF)와 같은, 피더 세포 또는 인간 진피 섬유아세포(HDF)와 같은, 인간 피더 세포의 존재 또는 부재하에, ESCs의 다능성을 유지하는 당업계에 알려진 임의의 배양 배지로 배양될 수 있다. MEF 세포들 또는 인간 피더 세포들은, 공동-배양에서 ESCs를 시딩(seeding)하기 전에, 예를 들어, 미토마이신 C(mitomycin C)에 노출, 감마 조사, 또는 임의의 기타 알려진 방법에 의해, 유사분열적으로 비활성화될 수 있으며, 따라서, MEFs는 배양에서 증식하지 않는다. 부가적으로, ESC 세포 배양물은 현미경으로 검사될 수 있고, 비 ESC 세포 모폴로지를 함유하는 콜로니는 선택될 수 있고, 예를 들어, 줄기 세포 절단 도구를 사용하여, 레이저 절제(laser ablation)에 의해, 또는 기타 수단을 사용하여 폐기될 수 있다. 통상적으로, 배아체 형성(embryoid body formation)을 위한 시딩을 위한 ESCs의 수확의 시점 이후에, 부가적인 MEF 세포 또는 인간 피더 세포들은 사용되지 않는다.

[0097] 선택적으로, hES 세포들은, 세포외 기질(예를 들어, Matrigel®, 라미닌(laminin), 또는 iMatrix-511 또는 여기에 개시되거나 당업계에 알려진 임의의 다른 세포외 기질)과 같은, 고체 표면 상에서 피더가 없는 조건(feeder-free conditions)하에서 당업계에 알려진 임의의 방법, 예를 들어, Klimanskaya et al., Lancet 365:1636-1641 (2005)에 의해 배양될 수 있다. 따라서, 여기에 기재된 방법에 사용된 hES 세포들은, 피더가 없는 배양물 상에서 배양될 수 있다.

[0098] 여기에서 사용된 바와 같은, "배아-유래 세포"(EDC)는, 다능성 상실배-유래 세포, 내세포피, 배순(embryonic shield), 또는 배반엽상층(epiblast)의 것을 포함하는 배반포-유래 세포, 또는 원시 내배엽, 외배엽, 및 중배엽을 포함하는 초기 배아의 다른 다능성 줄기 세포 및 이들의 파생물을 광범위하게 지칭한다. "EDC"는 또한 다양한 발달의 단계로부터 응집된 단일 할구 또는 배아로부터 할구 및 세포피를 포함하지만, 세포주로서 계대된 인간 배아 줄기 세포는 제외한다.

[0099] 여기에 사용된 바와 같은 "유도된 다능성 줄기 세포" 또는 "iPSCs" 또는 "iPS 세포"는, 체세포를 재프로그래밍하여 발생된 다능성 줄기 세포를 지칭한다. iPSCs는 인자의 조합("재프로그래밍 인자")을 발현시키거나 발현을 유도하여 발생될 수 있다. iPS 세포는, 태아, 출생후, 신생아, 청소년, 또는 성인 체세포들을 사용하여 발생될 수 있다. iPS 세포들은 세포 은행에서 얻어질 수 있다. 선택적으로, iPS 세포는, 혈관 전구 세포(VPCs) 또는 또 다른 세포 타입으로의 분화를 시작하기 전에 (당업계에 알려진 절차에 의해) 새로이 발생될 수 있다. iPS 세포

의 생성은, 분화된 세포의 생성에서 초기 단계일 수 있다. iPS 세포들은, 조직-일치 VPCs(tissue-matched VPCs)를 발생시킬 목표로 특정 환자 또는 일치된 공여자 유래의 물질을 사용하여 구체적으로 발생될 수 있다. iPS 세포들은, 의도된 수용자에서 실질적으로 면역원성이 아닌 세포, 예를 들어, 자가 세포 또는 의도된 수용자에 조직적합성이 있는 세포로부터 생성될 수 있다. 위에서 더욱 논의된 바와 같이("다능성 세포" 참조), iPS 세포를 포함하는 다능성 세포는, 유전적으로 변형되거나 달리 변형될 수 있다. 사용될 수 있는 대표적인 인간 iPS 세포주는 GMP1 세포이다.

[0100] 또 다른 실시예로서, 유도 다능성 줄기 세포는, 세포를 하나 이상의 재프로그래밍 인자와 접촉시켜 체세포 또는 다른 세포를 재프로그래밍하여 발생될 수 있다. 예를 들어, 재프로그래밍 인자(들)는, 세포에 의해, 예를 들어, 세포에 첨가된 외인성 핵산으로부터, 또는 소분자, microRNA, 또는 해당 유전자의 발현을 촉진하거나 유도하는 이와 유사한 것과 같은 인자에 반응하여 내인성 유전자로부터 발현될 수 있다(Suh and Blaloch, *Development* 138, 1653-1661 (2011); Miyoshi *et al.*, *Cell Stem Cell* (2011), doi:10.1016/j.stem.2011.05.001; Sancho-Martinez *et al.*, *Journal of Molecular Cell Biology* (2011) 1-3; Anokye-Danso *et al.*, *Cell Stem Cell* 8, 376-388, April 8, 2011; Orkin and Hochedlinger, *Cell* 145, 835-850, June 10, 2011, 또는 Warren *et al.*, *Scientific Reports*, 10.1038/srep00657, September 14, 2012, 참조, 이들 각각은 전체적으로 여기에 참조로서 혼입됨). 재프로그래밍 인자는, 예를 들어, 배양 배지에 첨가시켜 외인성 공급원으로부터 제공될 수 있고, 세포 진입 펩티드(cell entry peptides), 단백질 또는 핵산 형질감염제(transfection agents), 리포펙션(lipofection), 전기천공, 생물학적 입자 전달 시스템(유전자 총), 미세주입, 및 이와 유사한 것에 대한 커플링(coupling)을 통한 것과 같은 당업계에 알려진 방법에 의해 세포 내로 도입될 수 있다. 특정 구현예에서, 체세포를 다능성 줄기 세포로 재프로그래밍하는데 사용될 수 있는 인자는, 예를 들어, Oct4(때때로 Oct 3/4로 지칭됨), Sox2, c-Myc, 및 Klf4의 조합을 포함한다. 다른 구현예에서, 체세포를 다능성 줄기 세포로 재프로그래밍하는데 사용될 수 있는 인자는, 예를 들어, Oct-4, Sox2, Nanog, 및 Lin28의 조합을 포함한다. 다른 구현예에서, 체세포는 적어도 2개의 재프로그래밍 인자, 적어도 3개의 재프로그래밍 인자, 또는 4개의 재프로그래밍 인자를 발현시켜 재프로그래밍된다. 다른 구현예에서, 체세포는, Oct4, Sox2, MYC, Klf4, Nanog, 및 Lin28을 발현시켜 재프로그래밍된다. 다른 구현예에서, 부가적인 재프로그래밍 인자는 동정되고, 단독으로 또는 하나 이상의 공지된 재프로그래밍 인자와 조합하여 체세포를 다능성 줄기 세포로 재프로그래밍하는데 사용된다. iPS 세포들은 통상적으로 배아 줄기 세포와 동일한 마커의 발현에 의해 동정될 수 있지만, 특정 iPS 세포주는 이의 발현 프로파일에서 다를 수 있다.

[0101] 유도 다능성 줄기 세포는 체세포에서 하나 이상의 재프로그래밍 인자의 발현 또는 발현을 유도하여 생성될 수 있다. 구현예에서, 체세포는, 섬유아세포, 예컨대, 진피 섬유아세포, 활액 섬유아세포, 또는 폐 섬유아세포, 또는 비-섬유아세포 체세포이다. 하나의 구현예에서, 체세포는, 전술된 바와 같이 적어도 1, 2, 3, 4, 5개의 재프로그래밍 인자를 발현시켜 재프로그래밍된다. 또 다른 구현예에서, 재프로그래밍 인자의 발현은, 재프로그래밍 인자의 발현을 유도하는, 소 유기 분자 작용제(small organic molecule agents)와 같은, 적어도 하나의 작용제를 체세포와 접촉시켜 유도될 수 있다.

[0102] 체세포는 또한 조합적 접근법(combinatorial approach)을 사용하여 재프로그래밍될 수 있고, 여기서, 재프로그래밍 인자는 (예를 들어, 바이러스 벡터, 플라스미드, 및 이와 유사한 것을 사용하여) 발현되고, 재프로그래밍 인자의 발현은 (예를 들어, 소 유기 분자를 사용하여) 유도된다. 예를 들어, 재프로그래밍 인자는, 레트로바이러스 벡터 또는 렌티바이러스 벡터와 같은, 바이러스 벡터를 사용한 감염에 의해 체세포에서 발현될 수 있다. 또한, 재프로그래밍 인자는, 에피솜 플라스미드 또는 mRNA와 같은, 비-결합 벡터(non-integrative vector)를 사용하여 체세포에서 발현될 수 있다. 예를 들어, Yu *et al.*, *Science*. 2009 May 8;324(5928):797-801, 참조, 이의 전체적인 내용은 참조로서 여기에 혼입된다. 재프로그래밍 인자가 비-결합 벡터를 사용하여 발현되는 경우, 인자는, 전기천공, 형질감염, 또는 벡터로 체세포의 형질전환을 사용하여 세포에서 발현될 수 있다.

[0103] 일단 재프로그래밍 인자가 세포에서 발현되면, 세포는 당업계에 알려진 임의의 방법에 의해 배양될 수 있다. 시간이 지남에 따라, ES 특징을 갖는 세포는 배양 접시에 나타난다. 세포는, 예를 들어, ES 모폴로지에 기초하여, 또는 선택 가능하거나 검출 가능한 마커의 발현에 기초하여 선택되고 계대배양될 수 있다. 세포는 배양되어 ES 세포와 유사한 세포의 배양물을 생성할 수 있다-이들은 추정 iPS 세포(putative iPS cells)이다. iPS 세포들은 통상적으로 다른 배아 줄기 세포와 동일한 마커의 발현에 의해 동정될 수 있지만, 특정 iPS 세포주는 발현 프로파일에서 다를 수 있다. 대표적인 iPS 세포들은, Oct-4, 알칼리성 포스파타제, SSEA 3 표면 항원, SSEA 4 표면 항원, TRA 1 60, 및/또는 TRA 1 81을 발현시킬 수 있다.

[0104] iPS 세포의 다능성을 확인하기 위해, 세포는 하나 이상의 다능성 분석에서 시험될 수 있다. 예를 들어, 세포는

ES 세포 마커의 발현에 대해 시험될 수 있으며; 세포는 SCID 마우스에 이식된 경우 기형종을 생성하는 능력에 대해 평가될 수 있고; 세포는 3개의 모든 배엽층의 세포 타입을 생성하도록 분화하는 능력에 대해 평가될 수 있다. 일단 다능성 iPS 세포가 얻어지면, 이것은 중배엽 세포 및 혈관 전구 세포, 예를 들어, 중배엽-유래 혈관 전구 세포를 생성시키는데 사용될 수 있다.

[0105] 여기에 사용된 바와 같은, "중배엽"은 모든 좌우대칭 동물의 아주 초기 배아에서 3개의 기본 배엽층 중 하나를 지칭한다. 중배엽은 간엽, 중피, 비-상피 혈구(non-epithelial blood cells) 및 체강소체(coelomocytes)를 형성한다. 초기 중배엽 개입(commitment)은 상피에서 간엽으로의 전이에서 발생하며, 그 후 지정된 중배엽 계통 세포는 장배형성(gastrulation)이 진행됨에 따라 안쪽으로 이동한다. 중배엽 계통의 세포는, 여러 지정된 세포 타입으로 분화할 수 있는 혈관모세포 및 다분화성(multipotent) 중간엽 줄기 세포를 포함하는, 혈관계 및 림프계를 형성하도록 미리 정해진다. 중배엽은 배아의 중배엽 및 그 다음 배아 내장 중배엽의 형성을 통해 혈관형성을 일으킨다. 혈관 내피 성장 인자(VEGF) 및 태반 성장 인자(PIGF 또는 PGF)와 같은, 성장 인자는, 새로운 혈관의 성장 및 발달을 자극시킨다. 하나의 구현예에서, 중배엽 계통의 세포는 혈관 전구체 세포 또는 혈관 전구 세포로 미리 정해진다. 하나의 구현예에서, 다능성 줄기 세포, 예를 들어, hESCs 또는 iPSCs, 예를 들어, hiPSCs 는 중배엽 계통 세포, 예를 들어, 중배엽 전구체 세포로 분화될 수 있다. 따라서, 용어 "중배엽"은, 세포의 성숙도와 상관없이, 다능성 줄기 세포로부터 유래된 중배엽 계통 세포도 포함하고, 따라서 상기 용어는, 중배엽 전구체 세포를 포함하는, 다양한 수준의 성숙도의 중배엽 세포를 포괄한다.

[0106] 대표적인 중배엽 마커는, CD309/KDR, CD56/NCAM1, APLNR/APJ, GARP, CD13, N-카드헤린, 액티빈 A, 액티빈 AB, 액티빈 AC, 액티빈 B, 액티빈 C, BMP 및 기타 액티빈 수용체 활성화제들(activators), BMP 및 기타 액티빈 수용체 억제제들, BMP-2, BMP-2/BMP-4, BMP-2/BMP-6 이종이량체(Heterodimer), BMP-2/BMP-7 이종이량체, BMP-2a, BMP-4, BMP-6, BMP-7, 크립틱(Cryptic), FABP4/A-FABP, FGF-5, GDF-1, GDF-3, INHBA, INHBB, 노달(Nodal), TGF-베타, TGF-베타 1, TGF-베타 1, 2, 3, TGF-베타 1.2, TGF-베타 1/1.2, TGF-베타 2, TGF-베타 2/1.2, TGF-베타 3, TGF-베타 수용체 억제제, Wnt-3a, Wnt-8a, MESDC2, Nicalin, Brachyury, EOMES, FoxC1, FoxF1, Gooseoid, HAND1, MIXL1, Slug, Snail, TBX6, Twist-1, 및 Twist-2를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 하나의 구현예에서, 중배엽 세포는, CD309/KDR, CD56/NCAM1, APLNR/APJ, GARP, 및 CD13으로부터 선택된 하나 이상의 마커에 대해 양성인, 중배엽 전구체 세포이다.

[0107] 여기에 사용된 바와 같은, "혈관형성"은 새로운 혈관의 형성을 지칭한다. 혈관형성은, 중배엽으로부터 유래된 내피의 형성을 포함한다. 여기에 사용된 바와 같은, "혈관신생"은, 기-존 혈관으로부터 혈관의 형성을 지칭한다. 예를 들어, *Developmental Biology* by Gilbert, Scott F. Sunderland (MA): Sinauer Associates, Inc.; c2000, and *Molecular Biology of the Cell* 4th ed. Alberts, Bruce; Johnson, Alexander; Lewis, Julian; Raff, Martin; Roberts, Keith; Walter, Peter New York and London: Garland Science; c2002, 참조.

[0108] 여기에 사용된 바와 같은, "혈관 전구 세포"(VPCs)는, 다른 혈액-혈관 세포 계통 중에서, 내피 세포, 평활근 세포, 및 혈관주위세포(pericytes)로 분화할 수 있는 능력을 갖는 세포를 지칭한다. 하나의 구현예에서, 혈관 전구 세포는 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)이다.

[0109] 여기에 사용된 바와 같은, "중배엽-유래 혈관 전구 세포"(meso-VPCs)는, 다능성 줄기 세포, 예를 들어, ESCs 또는 iPSCs의 시험관내 분화에 의해 유래된 중배엽 세포로부터 발생된 VPCs를 지칭한다. Meso-VPCs는, 여기에서 더욱 기재된 바와 같이, 하나 이상의 세포-표면 마커의 발현에 의해 동정될 수 있다. 하나의 구현예에서, 중배엽-유래 혈관 전구 세포는, 결과적으로, meso-VPCs로 분화되는, 중배엽 세포로 다능성 줄기 세포, 예를 들어, ESCs 또는 iPSCs의 시험관내 분화로부터 발생된다.

[0110] Meso-VPCs는, 마우스 PSCs 및 인간 PSCs 모두에서 시험관내에서 유래될 수 있다. Meso-VPCs는, 조혈(hematopoietic) 및 내피 세포 계통으로 분화할 수 있으며 평활근 세포가 될 수도 있다. 본 발명의 meso-VPCs의 개체군은, CD31/PECAM1, CD309/KDR, CD43, CD144, CD34, CD184/CXCR4, CD146, 및 PDGFRb와 같은, 적어도 하나의 마커에 대해 양성일 수 있다. 하나의 구현예에서, meso-VPC의 개체군은, 상기-동정된 마커 중들 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8개에 대해 양성이다. 하나의 구현예에서, meso-VPC의 개체군은, CD146, CD31/PECAM1, 및 CD309/KDR에 대해 양성이다. 또 다른 구현예에서, meso-VPCs의 개체군은, CD31/PECAM1, CD309/KDR, CD146, 및 (i) CD144, CD34, CD184/CXCR4, CD43, 또는 PDGFRb 중 적어도 하나, (ii) CD34, CD184/CXCR4, 및 PDGFRb; (iii) CD184/CXCR4; (iv) PDGFRb; (v) CD144 및 CD184/CXCR4; (vi) CD184/CXCR4 및 CD43; 또는 (vii) CC184/CXCFR4를 발현시킨다. 구현예에서, meso-VPCs의 개체군은, hsa-miR-3917, hsa-miR-450a-2-3p, hsa-miR-542-5p, hsa-miR-126-5p, hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-24-3p, hsa-let-7e-5p, hsa-miR-99a-5p, hsa-miR-223-5p, hsa-miR-142-3p,

hsa-miR-483-5p, hsa-miR-483-3p, miR 214, miR 335-3p, 및 miR-199a-3p로부터 선택된 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 11, 적어도 12, 적어도 13, 적어도 14, 또는 적어도 15 miRNA 마커들을 발현시킨다. 하나의 구현예에서, meso-VPCs의 개체군은, hsa-miR-3917, hsa-miR-450a-2-3p, 및 hsa-miR-542-5p를 발현시킨다. 구현예에서, meso-VPCs의 개체군은, 조성물에서 meso-VPCs의 적어도 약 20%가 마커를 발현시키는 경우, 특정 마커를 발현시키는 것으로 간주된다. 하나의 구현예에서, 본 발명의 meso-VPC는, mir125a-5p, mir24, 및 mir483-5p로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 또는 적어도 4개의 miRNA 마커에 대해 양성이다. 하나의 구현예에서, miRNA 마커는 mir483-5p이다. 하나의 구현예에서, meso-VPCs의 개체군은, mir126, mir125a-5p, mir24, 및 mir483-5p로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 또는 적어도 4개의 miRNA 마커에 대해 양성인 적어도 하나의 meso-VPC를 포함한다. 하나의 구현예에서, miRNA 마커는 mir483-5p이다. 하나의 구현예에서, meso-VPCs의 개체군은, HE 세포의 개체군보다 더 높은 수준으로 CD31 및 KDR을 발현시킨다. 또 다른 구현예에서, meso-VPCs의 개체군은, HE 세포의 개체군보다 더 낮은 수준으로 CD146을 발현시킨다. 또 다른 구현예에서, meso-VPCs의 개체군은, HE 세포의 개체군보다 낮은 수준으로 CD184/CXCR4를 발현시킨다.

[0111] 구현예들 중 어느 하나에서, meso-VPCs의 개체군은, CXCR7, CD45, 및 NG2 중 1개, 2개 또는 3개의 제한적이거나 전혀 없는 검출을 나타낸다. 구현예들 중 어느 하나에서, meso-VPCs의 개체군은, CXCR7, CD45, 및 NG2 모두의 제한적이거나 전혀 없는 검출을 나타낸다. 구현예들 중 어느 하나에서, meso-VPCs의 개체군은, CD144, CD34, CD184/CXCR4, CXCR7, CD43, CD45, PDGFRb, 또는 NG2 중 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 또는 적어도 8개의 제한적이거나 전혀 없는 검출을 나타낸다. 구현예에서, meso-VPCs의 개체군은, hsa-let-7e-3p, hsa-miR-99a-3p, hsa-miR-133a-5p, hsa-miR-11399, hsa-miR-196b-3p, hsa-miR-5690, 및 hsa-miR-7151-3p로부터 선택된 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 또는 적어도 7개의 miRNA 마커들의 제한적이거나 전혀 없는 발현을 나타낸다. 하나의 구현예에서, 조성물에서 meso-VPCs의 약 20% 미만이 마커를 발현시키는 경우, meso-VPCs의 개체군은 마커의 제한적이거나 전혀 없는 검출을 나타내는 것으로 간주된다. 하나의 구현예에서, 본 발명의 meso-VPC는, mir367, mir302a, mir302b, mir302c, mirLet7-e, mir223, mir99a, mir142-3p, 및 mir133a로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 또는 적어도 9개의 miRNA 마커들에 대해 제한적이거나 전혀 없는 발현을 나타낸다. 본 발명의 구현예에서, meso-VPCs의 개체군은, mir367, mir302a, mir302b, mir302c, mirLet7-e, mir223, mir99a, mir142-3p, 및 mir133a로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 또는 적어도 9개의 miRNA 마커들에 대해 제한적이거나 전혀 없는 발현을 나타내는 적어도 하나의 meso-VPC를 포함한다.

[0112] 여기에 사용된 바와 같은, "바스쿨로이드"는, 세포, 예를 들어, 세포 배양 동안 형성된 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)의 콜로니-유사 응집체(colony-like aggregate)를 지칭한다. 하나의 구현예에서, 바스쿨로이드는, 3D-바스쿨로이드 분화 플랫폼(platform)을 사용하여 생성된 meso-VPCs에 의해 형성된다.

[0113] 여기에 사용된 바와 같은, "치료법", "치료적", "치료하는", "치료하다" 또는 "치료"는, 질병을 치료하고, 질병 또는 이의 임상 증상의 발달을 정지 또는 감소시키며, 및/또는 질병을 경감시켜, 질병 또는 이의 임상 증상의 퇴행을 유발하는 것을 광범위하게 지칭한다. "치료법", "치료적", "치료하는", "치료하다" 또는 "치료"는, 질병, 질병의 징후, 및/또는 질병의 증상의 예방, 방지, 치료, 치유, 구제, 감소, 완화, 및/또는 경감의 제공을 포괄한다. "치료법", "치료적", "치료하는", "치료하다" 또는 "치료"는, 진행중인 질병 징후 및/또는 증상이 있는 환자에서 징후 및/또는 증상의 완화를 포괄한다. "치료법", "치료적", "치료하는", "치료하다" 또는 "치료"는 또한 "예방" 및 "방지"를 포괄한다. 예방은, 환자에서 질병의 치료 이후에 발생하는 질병을 방지하거나 또는 환자에서 질병의 발생률 또는 증증도를 감소시키는 것을 포함한다. 치료의 목적을 위해, 용어 "감소된", "치료적", "치료하는", "치료하다" 또는 "치료"는, 징후 및/또는 증상의 임상적으로 유의한 감소를 광범위하게 지칭한다. "치료법", "치료적", "치료하는", "치료하다" 또는 "치료"는, 도지거나 또는 재발하는 징후 및/또는 증상을 치료하는 것을 포함한다. "치료법", "치료적", "치료하는", "치료하다" 또는 "치료"는, 언제든지 징후 및/또는 증상의 출현을 배제할 뿐만 아니라 기존 징후 및/또는 증상을 감소 및 기존 징후 및/또는 증상을 제거하는 것을 포괄하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. "치료법", "치료적", "치료하는", "치료하다" 또는 "치료"는, 만성 질병("유지") 및 급성 질병을 치료하는 것을 포함한다. 예를 들어, 치료는 징후 및/또는 증상의 도짐 또는 재발을 치료하거나 방지하는 것을 포함한다. 하나의 구현예에서, 치료는, 중증 사지 허혈과 같은, 혈관 질병의 징후 및/또는 증상에서 임상적으로 유의한 감소를 포함한다.

[0114] 여기에 사용된 바와 같은, "병리의 정상화"는, 질병으로부터 결과하는 비정상적인 구조 및/또는 기능을 보다 정

상적인 상태로 되돌리는 것을 지칭한다. 정상화는, 질병으로부터 결과하는 조직, 기관, 또는 세포 타입의 구조 및/또는 기능에서 비정상적인 것을 고쳐서, 병리의 진행이 제어되고 개선될 수 있음을 시사한다. 예를 들어, 본 발명의 meso-VPCs로 치료한 후, 혈관 질병, 예를 들어, 중증 사지 허혈의 결과로서 하지의 비정상은 개선, 교정, 및/또는 전환될 수 있다.

[0115] 여기에서 사용된 바와 같은, "혈관 질병"은, 혈관(동맥 및 정맥)의 모든 비정상적인 상태를 지칭한다. 심장 밖의 혈관 질병은 어디에서나 나타날 수 있다. 가장 흔한 혈관 질병은, 뇌졸중, 말초 동맥 질환(PAD), 복부 대동맥류(AAA), 경동맥 질병(CAD), 동정맥 기형(AVM), 중증 사지 허혈(CLI), 폐색전증(혈전), 심부 정맥 혈전증(DVT), 만성 정맥 부전증(CVI), 및 정맥류이다. 하나의 구현예에서, 혈관 질병은 말초 동맥 질환(PAD)이다. 하나의 구현예에서, 혈관 질병은, 중증 사지 허혈(CLI)과 같은, 허혈성 질병이다. 하나의 구현예에서, 혈관 질병은, 죽상동맥경화증, 말초 동맥 질환(PAD), 경동맥 질병, 정맥 질병, 혈전, 대동맥류, 섬유근 이형성증, 림프부종, 또는 혈관 손상이다. 하나의 구현예에서, 혈관 질병은, 말초 동맥 질환, 예컨대, 중증 사지 허혈(CLI), 장 허혈 증후군, 신장 동맥 질병, 슬와 포착 증후군, 레이노 현상, 또는 버거병이다.

[0116] II. 중배엽-유래 혈관 전구 세포(Meso-VPCs)의 시험관내 발생

[0117] 본 발명은, 다능성 줄기 세포로부터 유래된 중배엽 세포로부터 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)를 생성시키는 방법을 제공한다. 상기 방법은, 하나 이상의 중배엽 유도 성장 인자를 함유하는 배지에서 다능성 줄기 세포를 배양하여 중배엽 세포를 생성시키는, 배양 단계, 및 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)로 중배엽 세포의 분화를 지시하는 하나 이상의 인자를 함유하는 배지에서, 적절한 표면에서 중배엽 세포를 배양하는 단계를 포함한다. 몇몇 구현예에서, 상기 방법은 복수의 meso-VPCs를 단일 세포로 분리시키는 단계를 더욱 포함한다.

[0118] 본 발명에 사용되는 다능성 줄기 세포는, 위에서 제시된 방법들 중 어느 하나에 의해 얻어지고 배양될 수 있다. 하나의 구현예에서, 다능성 줄기 세포, 예를 들어, 인간 배아 줄기 세포(hESCs) 또는 인간 유도 다능성 줄기 세포(hiPSCs)는, 피더가 없는(FF) 조건에서 배양되고 세포외 기질 상에 플레이팅된다. 하나의 구현예에서, 다능성 줄기 세포는, 피더 배양 조건에서 배양되고 세포외 기질 상에 플레이팅된다.

[0119] 몇몇 구현예에서, 세포외 기질은, 라미닌, 피브로넥틴, 비트로넥틴, 프로테오글리칸, 엔탁틴, 콜라겐, 콜라겐 I, 콜라겐 IV, 헤파란 설페이트, EHS(Engelbreth-Holm-Swarm) 마우스 육종 세포로부터의 가용성 제제, Matrigel®(Corning), 젤라틴, 및 인간 기저막 추출물로 이루어진 군으로부터 선택된다. 하나의 구현예에서, 세포외 기질은, 인간을 포함하는, 임의의 포유동물 기원으로부터 유래될 수 있다. 하나의 구현예에서, 다능성 줄기 세포를 배양하기 위한 세포외 기질 표면은 매트릭셀-코팅 표면이다.

[0120] 몇몇 구현예에서, 다능성 줄기 세포는, 전분화능을 지원하는데 적합한 배지에서 배양되고, 임의의 이러한 배지는 당업계에 공지되어 있다. 몇몇 구현예에서, 전분화능을 지원하는 배지는 Nutristem™이다. 몇몇 구현예에서, 전분화능을 지원하는 배지는 TeSR™이다. 몇몇 구현예에서, 전분화능을 지원하는 배지는 StemFit™이다. 다른 구현예에서, 전분화능을 지원하는 배지는, Knockout™ 혈청 대체물(Gibco), LIF, bFGF, 또는 임의의 다른 인자로 보충될 수 있는, Knockout™ DMEM(Gibco)이다. 이들 대표적인 배지 각각은, 당업계에 공지되어 있고, 상업적으로 이용 가능하다. 또 다른 구현예에서, 전분화능을 지원하는 배지는, bFGF 또는 임의의 다른 인자로 보충될 수 있다. 하나의 구현예에서, bFGF는, 저농도(예를 들어, 4 ng/ml)로 보충될 수 있다. 다른 구현예에서, bFGF는 더 높은 농도(예를 들어, 100 ng/ml)로 보충될 수 있다. 하나의 구현예에서, 배지는 무-혈청이다. 또 다른 구현예에서, 배지는 혈청을 포함한다.

[0121] 다능성 줄기 세포는 당업계에 알려진 임의의 적합한 용기에서 배양, 계대 또는 수확될 수 있다. 대표적인 조직 배양 용기는, 15 cm 조직 배양 플레이트, 10 cm 조직 배양 플레이트, 3 cm 조직 배양 플레이트, 6-웰 조직 배양 플레이트, 12-웰 조직 배양 플레이트, 24-웰 조직 배양 플레이트, 48-웰 조직 배양 플레이트, 96-웰 조직 배양 플레이트, T-25 조직 배양 플라스크, T-75 조직 배양 플라스크를 포함한다. 하나의 구현예에서, 다능성 줄기 세포는 6-웰 조직 배양 플레이트에서 배양된다.

[0122] 몇몇 구현예에서, 배지 교환은, 다능성 줄기 세포의 최적 조건을 유지하기 위해 배양의 약 1, 2, 3, 4, 5 또는 6일 후에 수행된다. 배지 교환을 위해, 출발 조건과 동일한 배양 배지는 사용될 수 있거나, 또는 배지는 배양 필요에 따라 조정될 수 있다. 몇몇 구현예에서, 다능성 줄기 세포는, 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 또는 9일 후, 또는 세포 배양물이 약 60-90% 컨플루언시(confluency)에 도달할 때, 분할 및 계대된다. 세포 계대를 위해, 출발 조건과 동일한 배양 배지는 사용될 수 있거나, 또는 배지는 배양 필요에 따라 조정될 수 있다. 세포는, 1:1,

1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:11, 1:12, 1:13, 1:14, 1:15, 1:16, 1:17, 1:18, 1:19, 또는 1:20의 희석 비율로 분할 및 계대될 수 있다. 하나의 구현예에서, 다능성 줄기 세포는 1:3의 희석 비율로 계대된다.

[0123] 몇몇 구현예에서, 다능성 줄기 세포는, 약 5% CO<sub>2</sub> 및 약 20% O<sub>2</sub>의 정상산소 조건, 또는 다능성 줄기 세포의 성장에 적합한 기타 알려진 조건하에서 배양될 수 있다.

[0124] 몇몇 구현예에서, 다능성 줄기 세포는, 세포의 피더층(feeder layer)이 배양물에 함유되지 않는, 피더가 없는 조건하에 배양 배지에서 배양, 계대 또는 수확된다. 몇몇 구현예에서, 다능성 줄기 세포는, 피더 배양 조건하에 배양 배지에서 배양, 계대 또는 수확되며, 여기서, 피더 세포의 층, 예컨대, 인간 진피 섬유아세포(HDFs), 또는 당업자에게 공지된 다른 세포 타입들은 배양물에 함유된다.

[0125] 다능성 줄기 세포의 시험관내 분화에 의해 중배엽 세포를 생성하기 위해, 다능성 줄기 세포, 예를 들어, hESCs 또는 hiPSCs는, 적합한 표면, 예를 들어, 세포의 기질 표면에서 배양된다. 몇몇 구현예에서, 세포의 기질은, 라미닌, 피브로넥틴, 비트로넥틴, 프로테오글리칸, 엔탁틴, 콜라겐, 콜라겐 I, 콜라겐 IV, 헤파란 설페이트, EHS(Engelbreth-Holm-Swarm) 마우스 육종 세포로부터의 가용성 제제, 매트릭겔, 젤라틴, 및 인간 기저막 추출물로 이루어진 군으로부터 선택된다. 하나의 구현예에서, 세포의 기질은, 인간을 포함하는, 임의의 포유동물 기원으로부터 유래될 수 있다. 하나의 구현예에서, 중배엽 세포로 다능성 줄기 세포의 시험관내 분화를 위한 세포의 기질 표면은 매트릭겔-코팅 표면이다.

[0126] 하나의 구현예에서, 다능성 줄기 세포는, 분화를 유도하기 전에 세포가 정착되도록 배양 배지에서 약 1시간 내지 약 24시간 동안 플레이팅되고 배양된다. 중배엽 세포로 다능성 줄기 세포의 분화를 유도하기 위해, 다능성 줄기 세포는, 전술한 바와 같이 적절한 표면, 예를 들어, 세포의 기질 표면 상에 배양 배지에서 배양된다.

[0127] 중배엽 세포로 다능성 줄기 세포의 분화를 유도하기 위한 배양 배지는, 분화를 지원하는 임의의 배지일 수 있고, 당업계에 알려진 배양 배지일 수 있다. 몇몇 구현예에서, 배양 배지는, 혈액-혈관 배양 및/또는 확장(expansion)을 지원하는 임의의 배지일 수 있으며, Stemline® II(Sigma), StemSpan™ SFEMII(StemCell Technologies), StemSpan™ AFC(StemCell Technologies), Minimal Essential Media(MEM)(Gibco), 및 aMEM을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 하나의 구현예에서, 배양 배지는 무-혈청이다. 또 다른 구현예에서, 배양 배지는 혈청을 포함한다. 배양 배지는, 하나 이상의 중배엽 유도 성장 인자, 예컨대, 액티빈-A, 혈관 내피 성장 인자(VEGF), 섬유아세포 성장 인자(FGF), 및 골형성 단백질 4(BMP4)를 더욱 포함할 수 있다. 하나의 구현예에서, 상기 방법에 사용된 VEGF는 VEGF165이다. 하나의 구현예에서, 상기 방법에 사용된 FGF는 염기성 FGF(bFGF)이다. 하나의 구현예에서, 다능성 줄기 세포는, 액티빈-A, VEGF165, bFGF 및 BMP4를 포함하는 배양 배지에서 배양된다. 하나의 구현예에서, 배양 기간은 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 또는 7일이다. 하나의 구현예에서, 배양 기간은 약 4일이다. 하나의 구현예에서, 배양 배지는 약 24시간의 배양 후에 교체되고, 액티빈-A가 없는 배양 배지로 교체된다.

[0128] VEGF, 예를 들어, VEGF165는, 약 1 ng/ml 내지 약 100 ng/ml, 또는 좀더 바람직하게는, 약 5 ng/ml 내지 약 20 ng/ml의 농도로 사용될 수 있다. 하나의 구현예에서, VEGF는, 약 1 ng/ml, 약 2 ng/ml, 약 3 ng/ml, 약 4 ng/ml, 약 5 ng/ml, 약 10 ng/ml, 약 15 ng/ml, 또는 약 20 ng/ml의 농도로 사용된다. 액티빈-A는, 약 1 ng/ml 내지 약 100 ng/ml, 좀더 바람직하게는, 약 5 ng/ml 내지 약 20 ng/ml의 농도로 사용될 수 있다. 하나의 구현예에서, 액티빈-A는, 약 1 ng/ml, 약 2 ng/ml, 약 3 ng/ml, 약 4 ng/ml, 약 5 ng/ml, 약 10 ng/ml, 약 15 ng/ml, 또는 약 20 ng/ml의 농도로 사용된다. FGF, 예를 들어, bFGF는, 약 1 ng/ml 내지 약 100 ng/ml, 또는 좀더 바람직하게는, 약 5 ng/ml 내지 약 20 ng/ml의 농도로 사용될 수 있다. 하나의 구현예에서, FGF는, 약 1 ng/ml, 약 2 ng/ml, 약 3 ng/ml, 약 4 ng/ml, 약 5 ng/ml, 약 10 ng/ml, 약 15 ng/ml, 또는 약 20 ng/ml의 농도로 사용된다. BMP4는, 약 1 ng/ml 내지 약 100 ng/ml, 또는 좀더 바람직하게는, 약 5 ng/ml 내지 약 35 ng/ml의 농도로 사용될 수 있다. 하나의 구현예에서, BMP4는, 약 1 ng/ml, 약 2 ng/ml, 약 3 ng/ml, 약 4 ng/ml, 약 5 ng/ml, 약 10 ng/ml, 약 15 ng/ml, 약 20 ng/ml, 약 25 ng/ml, 약 30 ng/ml, 또는 약 35 ng/ml의 농도로 사용된다. 하나의 구현예에서, VEGF는 10 ng/ml의 농도로 사용되고, 액티빈-A는 10 ng/ml의 농도로 사용되며, FGF는 10 ng/ml의 농도로 사용되고, BMP4는 25 ng/ml의 농도로 사용된다.

[0129] 중배엽 세포로 다능성 줄기 세포의 분화는, 약 5% CO<sub>2</sub> 및 약 20% O<sub>2</sub>의 정상산소 조건, 또는 다능성 줄기 세포의 분화에 적합한 다른 공지된 조건하에서 수행될 수 있다.

[0130] 중배엽 세포로 다능성 줄기 세포의 분화는 당업계에 알려진 임의의 적합한 용기에서 수행될 수 있다. 대표적인

조직 배양 용기는, 15 cm 조직 배양 플레이트, 10 cm 조직 배양 플레이트, 3 cm 조직 배양 플레이트, 6-웰 조직 배양 플레이트, 12-웰 조직 배양 플레이트, 24-웰 조직 배양 플레이트, 48-웰 조직 배양 플레이트, 96-웰 조직 배양 플레이트, T-25 조직 배양 플라스크, 및 T-75 조직 배양 플라스크를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 하나의 구현예에서, 중배엽 세포로 다능성 줄기 세포의 분화는, 10 cm 조직 배양 플레이트에서 수행된다.

- [0131] 중배엽 세포는 추가 사용을 위해 단일 세포로 더욱 분리될 수 있다. 하나의 구현예에서, 다능성 줄기 세포의 시험관내 분화에 의해 생성된 중배엽 세포는, 효소 처리에 의해 단일 세포로 분리된다.
- [0132] 하나의 구현예에서, 중배엽 세포는, CD309/KDR, CD56/NCAM1, APLNR/APJ, GARP, 및 CD13을 포함하는 군으로부터 선택된 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 또는 적어도 5개의 마커를 발현시킨다.
- [0133] 중배엽 세포는 또한 N-카드헤린, 액티빈 A, 액티빈 AB, 액티빈 AC, 액티빈 B, 액티빈 C, BMP 및 기타 액티빈 수용체 활성화제들, BMP 및 기타 액티빈 수용체 억제제들, BMP-2, BMP-2/BMP-4, BMP-2/BMP-6 이중이량체, BMP-2/BMP-7 이중이량체, BMP-2a, BMP-4, BMP-6, BMP-7, 크립틱, FABP4/A-FABP, FGF-5, GDF-1, GDF-3, INHBA, INHBB, 노달, TGF-베타, TGF-베타 1, TGF-베타 1, 2, 3, TGF-베타 1.2, TGF-베타 1/1.2, TGF-베타 2, TGF-베타 2/1.2, TGF-베타 3, TGF-베타 수용체 억제제, Wnt-3a, Wnt-8a, MESDC2, Nicalin, Brachyury, EOMES, FoxC1, FoxF1, Goosecoid, HAND1, MIXL1, Slug, Snail, TBX6, Twist-1, 및 Twist-2로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 다른 중배엽 마커를 발현시킬 수 있다.
- [0134] 본 발명의 방법에 의해 생성된 중배엽 세포는, 여기에 개시된 2개의 플랫폼: 3D-바스쿨로노이드 분화 플랫폼 또는 2D 분화 플랫폼 중 하나를 사용하여 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)로 더욱 분화된다.
- [0135] 3D-바스쿨로노이드 분화 플랫폼은, meso-VPCs로, 다능성 줄기 세포, 예를 들어, hESCs 또는 hiPSCs로부터 생성된 중배엽 세포의 시험관내 분화를 위한 방법을 제공한다.
- [0136] 3D-바스쿨로노이드 분화 플랫폼의 방법은, 비-접착 또는 저접착 조건하에 배양 배지, 예를 들어, 초-저 부착 표면 또는 현탁 배양(suspension culture)에서 중배엽 세포를 배양시켜 수행되며, 여기서, 상기 배양 배지는 분화를 지원하는 임의의 배양 배지일 수 있고, 당업계에 알려진 배양 배지일 수 있다. 몇몇 구현예에서, 배양 배지는 혈액-혈관 배양 및/또는 확장을 지원하는 임의의 배지일 수 있으며, Stemline® II (Sigma), StemSpan™ SFEMII (StemCell Technologies), StemSpan™ AFC (StemCell Technologies), Minimal Essential Media (MEM) (Gibco), 및 aMEM을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 하나의 구현예에서, 배양 배지는 무혈청이다. 또 다른 구현예에서, 배양 배지는 혈청을 포함한다. 배양 배지는, meso-VPCs로 중배엽 세포의 분화를 유도하는 하나 이상의 인자, 예를 들어, 혈관 내피 성장 인자(VEGF), 섬유아세포 성장 인자(FGF), 골형성 단백질 4(BMP4), 전환 성장 인자-베타(TGF-β) 타입 I 수용체의 소분자 억제제, 및 포스폴린을 더욱 포함할 수 있다. 하나의 구현예에서, 상기 방법에 사용된 VEGF는 VEGF165이다. 하나의 구현예에서, 상기 방법에 사용된 FGF는 염기성 FGF(bFGF)이다. 하나의 구현예에서, 전환 성장 인자-베타(TGF-β) 타입 I 수용체의 소분자 억제제는 SB431542이다. 하나의 구현예에서, 다능성 줄기 세포는, VEGF165, bFGF, BMP4, 및 SB431542를 포함하는 배양 배지에서 배양된다. 하나의 구현예에서, 다능성 줄기 세포는, VEGF165, bFGF, BMP4, SB431542, 및 포스폴린을 포함하는 배양 배지에서 배양된다. 하나의 구현예에서, 배양 기간은, 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10일이다. 하나의 구현예에서, 배양 기간은 약 5일이다. 하나의 구현예에서, 배양 배지는, 분화의 개시 약 2일 후 및 약 4일 후에 교체된다.
- [0137] VEGF, 예를 들어, VEGF165는, 약 1 ng/ml 내지 약 100 ng/ml, 또는 좀더 바람직하게는, 약 10 ng/ml 내지 약 100 ng/ml의 농도로 사용될 수 있다. 하나의 구현예에서, VEGF는, 약 1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 15 ng/ml, 20 ng/ml, 25 ng/ml, 30 ng/ml, 35 ng/ml, 40 ng/ml, 45 ng/ml, 50 ng/ml, 55 ng/ml, 60 ng/ml, 65 ng/ml, 70 ng/ml, 75 ng/ml, 80 ng/ml, 85 ng/ml, 90 ng/ml, 95 ng/ml, 또는 100 ng/ml의 농도로 사용된다. FGF, 예를 들어, bFGF는, 약 1 ng/ml 내지 약 100 ng/ml, 또는 좀더 바람직하게는, 약 10 ng/ml 내지 약 100 ng/ml의 농도로 사용될 수 있다. 하나의 구현예에서, FGF는, 약 1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 15 ng/ml, 20 ng/ml, 25 ng/ml, 30 ng/ml, 35 ng/ml, 40 ng/ml, 45 ng/ml, 50 ng/ml, 55 ng/ml, 60 ng/ml, 65 ng/ml, 70 ng/ml, 75 ng/ml, 80 ng/ml, 85 ng/ml, 90 ng/ml, 95 ng/ml, 또는 100 ng/ml의 농도로 사용된다. BMP4는, 약 1 ng/ml 내지 약 100 ng/ml, 좀더 바람직하게는, 약 10 ng/ml 내지 약 100 ng/ml의 농도로 사용될 수 있다. 하나의 구현예에서, BMP4는, 약 1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 15 ng/ml, 20 ng/ml, 25 ng/ml, 30 ng/ml, 35 ng/ml, 40 ng/ml, 45 ng/ml, 50 ng/ml, 55 ng/ml, 60 ng/ml, 65 ng/ml, 70 ng/ml, 75 ng/ml, 80 ng/ml, 85 ng/ml, 90 ng/ml, 95 ng/ml, 또는 100 ng/ml의 농도로 사용된다. 전환 성장 인자-베타(TGF-β) 타입 I 수용체의 소분자 억제제, 예를 들어, SB431542는, 약 0.1 μM 내지 약 100 μM, 또는 좀더 바람직하게는, 약 1 μM 내지 약 100 μM의 농도로

사용될 수 있다. 하나의 구현예에서, 전환 성장 인자-베타(TGF-β) 타입 I 수용체의 소분자 억제제는, 약 0.1 μM, 1 μM, 2 μM, 3 μM, 4 μM, 5 μM, 6 μM, 7 μM, 8 μM, 9 μM, 10 μM, 15 μM, 20 μM, 25 μM, 30 μM, 35 μM, 40 μM, 45 μM, 50 μM, 55 μM, 60 μM, 65 μM, 70 μM, 75 μM, 80 μM, 85 μM, 90 μM, 95 μM, 또는 100 μM의 농도로 사용된다. 포스콜린은 약 0.1 μM 내지 약 10 μM의 농도로 사용될 수 있다. 하나의 구현예에서, 포스콜린은, 약 0.1 μM, 0.5 μM, 1 μM, 1.5 μM, 2 μM, 2.5 μM, 3 μM, 3.5 μM, 4 μM, 4.5 μM, 5 μM, 5.5 μM, 6 μM, 6.5 μM, 7 μM, 7.5 μM, 8 μM, 8.5 μM, 9 μM, 9.5 μM, 또는 10 μM의 농도로 사용된다.

[0138] 하나의 구현예에서, VEGF는 약 50 ng/ml의 농도로 사용되며, FGF는 약 50 ng/ml의 농도로 사용되고, BMP4는 약 25 ng/ml의 농도로 사용되며, 소분자 억제제는 약 10 μM의 농도로 사용되고, 포스콜린은 약 2 μM의 농도로 사용된다.

[0139] 3D-바스쿨로노이드 분화 플랫폼을 사용한 meso-VPCs로 중배엽 세포의 분화는, 약 5% CO<sub>2</sub> 및 약 20% O<sub>2</sub>의 정상산소 조건, 또는 다능성 줄기 세포의 분화에 적합한 다른 공지된 조건하에서 수행될 수 있다.

[0140] 3D-바스쿨로노이드 분화 플랫폼을 사용한 meso-VPCs로 중배엽 세포의 분화는 당업계에 알려진 임의의 적합한 용기에서 수행될 수 있다. 대표적인 조직 배양 용기는, 15 cm 조직 배양 플레이트, 10 cm 조직 배양 플레이트, 3 cm 조직 배양 플레이트, 6-웰 조직 배양 플레이트, 12-웰 조직 배양 플레이트, 24-웰 조직 배양 플레이트, 48-웰 조직 배양 플레이트, 96-웰 조직 배양 플레이트, T-25 조직 배양 플라스크, 및 T-75 조직 배양 플라스크를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 하나의 구현예에서, 3D-바스쿨로노이드 분화 플랫폼을 사용한 meso-VPCs로 중배엽 세포의 분화는 10 cm 조직 배양 플레이트에서 수행된다.

[0141] 3D-바스쿨로노이드 분화 플랫폼을 사용한 meso-VPCs로 중배엽 세포의 분화는, 세포가 배양 용기에 최소한으로 접촉되는 비-접촉 또는 저접촉 조건하에서 수행될 수 있다. 하나의 구현예에서, 3D-바스쿨로노이드 분화 플랫폼을 사용한 meso-VPCs로 중배엽 세포의 분화는 초-저 부착 표면 또는 현탁 배양 상에서 수행된다.

[0142] 몇몇 구현예에서, 3D-바스쿨로노이드 분화 플랫폼에 의해 생성된 meso-VPCs는 바스쿨로노이드를 형성한다. 여기에서 사용된 바와 같은, 바스쿨로노이드는, 세포 응집체, 예를 들어, 혈관 세포 계통, 예를 들어, meso-VPCs에 의해 형성된 콜로니-유사 응집체를 지칭한다. 바스쿨로노이드의 모폴로지는, 혈관 세포를 생성시키는데 사용되는 방법에 따라 다를 수 있다. 본 발명은 단일 세포를 얻기 위해 바스쿨로노이드에서 복수의 세포를 분리시키는 방법을 더욱 제공한다. 하나의 구현예에서, 3D-바스쿨로노이드 분화 플랫폼에 의해 생성된 meso-VPCs는 단일 세포들로 더욱 분리될 수 있다. 하나의 구현예에서, 바스쿨로노이드에서 복수의 meso-VPCs는 효소 처리에 의해 단일 세포로 분리된다.

[0143] 2D 분화 플랫폼은, meso-VPCs로, 다능성 줄기 세포, 예를 들어, hESCs 또는 hiPSCs로부터 생성된 중배엽 세포의 시험관내 분화를 위한 방법을 제공한다.

[0144] 2D 분화 플랫폼의 방법들은, 적절한 표면, 예를 들어, 세포의 기질 표면상에 배양 배지에서 중배엽 세포를 배양시켜 수행된다. 몇몇 구현예에서, 세포의 기질은, 라미닌, 피브로넥틴, 비트로넥틴, 프로테오글리칸, 엔탁틴, 콜라겐, 콜라겐 I, 콜라겐 IV, 헤파란 설페이트, EHS(Engelbreth-Holm-Swarm) 마우스 육종 세포로부터의 가용성 제제, 매트릭셀, 젤라틴, 및 인간 기저막 추출물로 이루어진 균으로부터 선택된다. 하나의 구현예에서, 세포의 기질은, 인간을 포함하는, 임의의 포유동물 기원으로부터 유래될 수 있다. 하나의 구현예에서, 중배엽 세포의 시험관내 분화를 위한 세포의 기질 표면은 콜라겐 IV-코팅 표면이다.

[0145] 배양 배지는, 분화를 지원하는 임의의 배양 배지일 수 있고, 당업계에 알려진 배양 배지일 수 있다. 몇몇 구현예에서, 배양 배지는 혈액-혈관 배양 및/또는 확장을 지원하는 임의의 배지일 수 있으며, Stemline® II (Sigma), StemSpan™ SFEMII(StemCell Technologies), StemSpan™ AFC(StemCell Technologies), Minimal Essential Media(MEM)(Gibco), 및 αMEM을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 하나의 구현예에서, 배양 배지는 무-혈청이다. 또 다른 구현예에서, 배양 배지는 혈청을 포함한다. 배양 배지는, meso-VPCs로 중배엽 세포의 분화를 유도하는 하나 이상의 인자를 더욱 포함할 수 있다. 상기 인자는, 혈관 내피 성장 인자(VEGF), 섬유아세포 성장 인자(FGF), 골형성 단백질 4(BMP4), 전환 성장 인자-베타(TGF-β) 타입 I 수용체의 소분자 억제제, 및 포스콜린으로부터 선택된다. 하나의 구현예에서, 상기 방법에 사용된 VEGF는 VEGF165이다. 하나의 구현예에서, 상기 방법에 사용된 FGF는 염기성 FGF(bFGF)이다. 하나의 구현예에서, 전환 성장 인자-베타(TGF-β) 타입 I 수용체의 소분자 억제제는 SB431542이다.

[0146] 하나의 구현예에서, 중배엽 세포를 분화시켜 meso-VPCs를 얻기 위한 2D 분화 플랫폼의 방법들은 2단계를 포함한

다. 중배엽 세포는, 당업계에 알려진 배양 배지일 수 있고 분화를 지원하는 배양 배지에서 먼저 분화된다. 몇몇 구현예에서, 배양 배지는, 혈액-혈관 배양 및/또는 확장을 지원하는 임의의 배지일 수 있으며, Stemline® II (Sigma), StemSpan™ SFEMII(StemCell Technologies), StemSpan™ AFC(StemCell Technologies), Minimal Essential Media(MEM)(Gibco), 및 αMEM을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 하나의 구현예에서, 배양 배지는 무-혈청이다. 또 다른 구현예에서, 배양 배지는 혈청을 포함한다. 배양 배지는, 혈관 내피 성장 인자(VEGF), 섬유아세포 성장 인자(FGF), 골형성 단백질 4(BMP4), 및 포스콜린으로부터 선택된 하나 이상의 인자를 더욱 포함할 수 있다. 하나의 구현예에서, 배양 배지는, VEGF165, bFGF, 및 BMP4를 포함한다. 하나의 구현예에서, 배양 배지는, VEGF165, bFGF, BMP4, 및 포스콜린을 포함한다. 이러한 단계에서 배양은 약 12시간 내지 약 2 일 동안 수행된다. 하나의 구현예에서, 중배엽 세포를 meso-VPC로 분화시키기 위한 2D 분화 플랫폼의 제1 단계는 약 1일 동안 수행된다.

[0147] VEGF, 예를 들어, VEGF165는, 약 1 ng/ml 내지 약 100 ng/ml, 또는 좀더 바람직하게는, 10 ng/ml 내지 약 100 ng/ml의 농도로 사용될 수 있다. 하나의 구현예에서, VEGF는, 약 1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 15 ng/ml, 20 ng/ml, 25 ng/ml, 30 ng/ml, 35 ng/ml, 40 ng/ml, 45 ng/ml, 50 ng/ml, 55 ng/ml, 60 ng/ml, 65 ng/ml, 70 ng/ml, 75 ng/ml, 80 ng/ml, 85 ng/ml, 90 ng/ml, 95 ng/ml, 또는 100 ng/ml의 농도로 사용된다. FGF, 예를 들어, bFGF는, 약 1 ng/ml 내지 약 100 ng/ml, 또는 좀더 바람직하게는, 약 10 ng/ml 내지 약 100 ng/ml의 농도로 사용될 수 있다. 하나의 구현예에서, FGF는, 약 1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 15 ng/ml, 20 ng/ml, 25 ng/ml, 30 ng/ml, 35 ng/ml, 40 ng/ml, 45 ng/ml, 50 ng/ml, 55 ng/ml, 60 ng/ml, 65 ng/ml, 70 ng/ml, 75 ng/ml, 80 ng/ml, 85 ng/ml, 90 ng/ml, 95 ng/ml, 또는 100 ng/ml의 농도로 사용된다. 하나의 구현예에서, BMP4는, 약 1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 15 ng/ml, 20 ng/ml, 25 ng/ml, 30 ng/ml, 35 ng/ml, 40 ng/ml, 45 ng/ml, 50 ng/ml, 55 ng/ml, 60 ng/ml, 65 ng/ml, 70 ng/ml, 75 ng/ml, 80 ng/ml, 85 ng/ml, 90 ng/ml, 95 ng/ml, 또는 100 ng/ml의 농도로 사용된다. 포스콜린은, 약 0.1 μM 내지 약 10 μM의 농도로 사용될 수 있다. 하나의 구현예에서, 포스콜린은, 약 0.1 μM, 0.5 μM, 1 μM, 1.5 μM, 2 μM, 2.5 μM, 3 μM, 3.5 μM, 4 μM, 4.5 μM, 5 μM, 5.5 μM, 6 μM, 6.5 μM, 7 μM, 7.5 μM, 8 μM, 8.5 μM, 9 μM, 9.5 μM, 또는 10 μM의 농도로 사용된다.

[0148] 하나의 구현예에서, VEGF는 약 50 ng/ml의 농도로 사용되고, FGF는 약 50 ng/ml의 농도로 사용되며, BMP4는 약 25 ng/ml의 농도로 사용되고, 포스콜린은 약 2 μM의 농도로 사용된다.

[0149] 2D 분화 플랫폼을 사용한 meso-VPCs로 중배엽 세포의 분화의 제1 단계는, 약 5% CO<sub>2</sub> 및 약 20% O<sub>2</sub>의 정상산소 조건, 또는 중배엽 세포의 분화에 적합한 다른 공지된 조건하에서 수행될 수 있다.

[0150] 2D 분화 플랫폼의 제2 단계는, 분화를 지원하는 배양 배지에서, 제1 단계에서 얻은 세포를 meso-VPCs로 더욱 분화시킨다. 몇몇 구현예에서, 배양 배지는 혈액-혈관 배양 및/또는 확장을 지원하는 임의의 배지일 수 있으며, Stemline® II (Sigma), StemSpan™ SFEMII(StemCell Technologies), StemSpan™ AFC(StemCell Technologies), Minimal Essential Media(MEM)(Gibco), 및 αMEM을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 하나의 구현예에서, 배양 배지는 무-혈청이다. 또 다른 구현예에서, 배양 배지는 혈청을 포함한다. 배양 배지는, 혈관 내피 성장 인자(VEGF), 섬유아세포 성장 인자(FGF), 골형성 단백질 4(BMP4), 전환 성장 인자-베타(TGF-β) 타입 I 수용체의 소분자 억제제, 및/또는 포스콜린과 같은, 하나 이상의 인자를 더욱 포함할 수 있다. 하나의 구현예에서, 배양 배지는, VEGF165, bFGF, BMP4, 및 SB431542를 포함한다. 하나의 구현예에서, 배양 배지는, VEGF165, bFGF, BMP4, SB431542, 및 포스콜린을 포함한다. 이러한 단계에서 배양은 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10일 동안 수행된다. 하나의 구현예에서, 중배엽 세포를 meso-VPCs로 분화시키기 위한 2D 분화 플랫폼의 제2 단계는 약 6일 동안 수행된다. 하나의 구현예에서, 배양 배지는 2D 분화 플랫폼의 제2 단계의 시작 약 2일 후 및 약 4일 후에 교체된다.

[0151] VEGF, 예를 들어, VEGF165는, 약 1 ng/ml 내지 약 100 ng/ml, 또는 좀더 바람직하게는, 10 ng/ml 내지 약 100 ng/ml의 농도로 사용될 수 있다. 하나의 구현예에서, VEGF는, 약 1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 15 ng/ml, 20 ng/ml, 25 ng/ml, 30 ng/ml, 35 ng/ml, 40 ng/ml, 45 ng/ml, 50 ng/ml, 55 ng/ml, 60 ng/ml, 65 ng/ml, 70 ng/ml, 75 ng/ml, 80 ng/ml, 85 ng/ml, 90 ng/ml, 95 ng/ml, 또는 100 ng/ml의 농도로 사용된다. FGF, 예를 들어, bFGF는, 약 1 ng/ml 내지 약 100 ng/ml, 또는 좀더 바람직하게는, 약 10 ng/ml 내지 약 100 ng/ml의 농도로 사용될 수 있다. 하나의 구현예에서, FGF는, 약 1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 15 ng/ml, 20 ng/ml, 25 ng/ml, 30 ng/ml, 35 ng/ml, 40 ng/ml, 45 ng/ml, 50 ng/ml, 55 ng/ml, 60 ng/ml, 65 ng/ml, 70 ng/ml, 75 ng/ml, 80 ng/ml, 85 ng/ml, 90 ng/ml, 95 ng/ml, 또는 100 ng/ml의 농도로 사용된다. BMP4는, 약 1 ng/ml 내지 약

100 ng/ml, 좀더 바람직하게는, 약 10 ng/ml 내지 약 100 ng/ml의 농도로 사용될 수 있다. 하나의 구현예에서, BMP4는, 약 1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 15 ng/ml, 20 ng/ml, 25 ng/ml, 30 ng/ml, 35 ng/ml, 40 ng/ml, 45 ng/ml, 50 ng/ml, 55 ng/ml, 60 ng/ml, 65 ng/ml, 70 ng/ml, 75 ng/ml, 80 ng/ml, 85 ng/ml, 90 ng/ml, 95 ng/ml, 또는 100 ng/ml의 농도로 사용된다. 전환 성장 인자-베타(TGF-β) 타입 I 수용체의 소분자 억제제, 예를 들어, SB431542는, 약 0.1 μM 내지 약 100 μM, 또는 좀더 바람직하게는, 약 1 μM 내지 약 100 μM의 농도로 사용될 수 있다. 하나의 구현예에서, 전환 성장 인자-베타(TGF-β) 타입 I 수용체의 소분자 억제제는, 약 0.1 μM, 1 μM, 2 μM, 3 μM, 4 μM, 5 μM, 6 μM, 7 μM, 8 μM, 9 μM, 10 μM, 15 μM, 20 μM, 25 μM, 30 μM, 35 μM, 40 μM, 45 μM, 50 μM, 55 μM, 60 μM, 65 μM, 70 μM, 75 μM, 80 μM, 85 μM, 90 μM, 95 μM, 또는 100 μM의 농도로 사용된다. 포스콜린은, 약 0.1 μM 내지 약 10 μM의 농도로 사용될 수 있다. 하나의 구현예에서, 포스콜린은, 약 0.1 μM, 0.5 μM, 1 μM, 1.5 μM, 2 μM, 2.5 μM, 3 μM, 3.5 μM, 4 μM, 4.5 μM, 5 μM, 5.5 μM, 6 μM, 6.5 μM, 7 μM, 7.5 μM, 8 μM, 8.5 μM, 9 μM, 9.5 μM, 또는 10 μM의 농도로 사용된다.

[0152] 하나의 구현예에서, VEGF는 약 50 ng/ml의 농도로 사용되며, FGF는 약 50 ng/ml의 농도로 사용되고, BMP4는 약 25 ng/ml의 농도로 사용되며, 소분자 억제제는 약 10 μM의 농도로 사용되고, 포스콜린은 약 2 μM의 농도로 사용된다.

[0153] 2D 분화 플랫폼을 사용한 meso-VPCs로 중배엽 세포의 분화의 제2 단계는, 약 5% CO<sub>2</sub> and 약 5% O<sub>2</sub>의 저산소 조건, 또는 혈관 전구 세포로의 분화에 적합한 다른 공지된 조건하에서 수행될 수 있다.

[0154] 2D 분화 플랫폼을 사용한 meso-VPCs로 중배엽 세포의 2-단계 분화는 당업계에 알려진 임의의 적합한 용기에서 수행될 수 있다. 대표적인 조직 배양 용기는, 15 cm 조직 배양 플레이트, 10 cm 조직 배양 플레이트, 3 cm 조직 배양 플레이트, 6-웰 조직 배양 플레이트, 12-웰 조직 배양 플레이트, 24-웰 조직 배양 플레이트, 48-웰 조직 배양 플레이트, 96-웰 조직 배양 플레이트, T-25 조직 배양 플라스크, 및 T-75 조직 배양 플라스크를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 하나의 구현예에서, 2D 분화 플랫폼을 사용한 meso-VPCs로 중배엽 세포의 분화는 T-75 조직 배양 플라스크에서 수행된다.

[0155] 2D 분화 플랫폼을 사용한 meso-VPCs로 중배엽 세포의 분화는 임의의 적합한 표면에서 수행될 수 있다. 하나의 구현예에서, 2D 분화 플랫폼을 사용한 meso-VPCs로 중배엽 세포의 분화는 세포외 기질 표면에서 수행된다. 하나의 구현예에서, 세포외 기질 표면은 콜라겐 IV-코팅 표면이다.

[0156] 하나의 구현예에서, 2D 분화 플랫폼에 의해 생성된 meso-VPCs는 효소 처리에 의해 단일 세포로 더욱 분리될 수 있다.

[0157] 본 발명의 몇몇 구현예에서, 각 단계에서 생성된 중배엽 세포 또는 meso-VPCs는, 분자 마커, 예를 들어, 세포-표면 마커 또는 miRNA 마커의 특정 발현 프로파일을 갖는 세포를 선택하기 위해, 당업계에 알려진 방법, 예를 들어, 유세포 분석법에 의해 더욱 분류될 수 있다. 본 발명의 방법에 의해 생성된 세포를 특징화하는 방법은 이하 더욱 제공된다.

[0158] III. Meso-VPCs의 특징 및 조성

[0159] 본 발명은, 여기에 개시된 방법을 사용하여 다능성 줄기 세포로부터 유래된 중배엽 세포의 시험관내 분화에 의해 얻어진 중배엽-유래 혈관 전구 세포(meso-VPCs)를 제공한다. 하나의 구현예에서, 다능성 줄기 세포는 먼저 중배엽 세포로 분화되고, 결과적으로, meso-VPCs로 분화된다. 특정 표현형 마커의 발현 수준은, 유세포 분석/형광-활성화 세포 분류(FACS), 단일 세포 mRNA 프로파일링, 또는 면역조직화학과 같은, 당업계에 알려진 임의의 방법에 의해 결정될 수 있다. 특정 유전자의 발현은, RT-PCR 및 RNA-Seq와 같은, 당업계에 알려진 임의의 방법에 의해 결정될 수 있다.

[0160] 하나의 구현예에서, 본 발명의 meso-VPCs의 개체군은, CD31/PECAM1, CD309/KDR, CD43, CD144, CD34, CD184/CXCR4, CD146, 및 PDGFRb로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 또는 적어도 8개의 마커를 발현시킨다. 하나의 구현예에서, meso-VPCs의 개체군은 CD31/PECAM1, CD309/KDR 및 CD146을 발현시킨다. 또 다른 구현예에서, meso-VPCs의 개체군은, CD31/PECAM1, CD309/KDR, CD146, 및 (i) CD144, CD34, CD184/CXCR4, CD43, 또는 PDGFRb 중 적어도 하나, (ii) CD34, CD184/CXCR4, 및 PDGFRb; (iii) CD184/CXCR4; (iv) PDGFRb; (v) CD144 및 CD184/CXCR4; (vi) CD184/CXCR4 및 CD43; 또는 (vii) CC184/CXCFR4를 발현시킨다. 구현예에서, meso-VPCs의 개체군은, 조성물에서 meso-VPCs의 적

어도 약 20%가 마커를 발현시키는 경우, 특정 마커를 발현시키는 것으로 간주된다.

- [0161] 구현예들 중 어느 하나에서, meso-VPCs의 개체군은, CXCR7, CD45, 및 NG2 중 하나 이상의 제한적이거나 전혀 없는 검출을 나타낸다. 구현예들 중 어느 하나에서, meso-VPCs의 개체군은, CXCR7, CD45, 및 NG2 모두의 제한적이거나 전혀 없는 검출을 나타낸다. 구현예들 중 어느 하나에서, meso-VPCs의 개체군은, CD144, CD34, CD184/CXCR4, CXCR7, CD43, CD45, PDGFRb, 또는 NG2 중 하나 이상의 제한적이거나 전혀 없는 검출을 나타낸다. 하나의 구현예에서, 조성물에서 meso-VPCs의 약 20% 미만이 마커를 발현시키는 경우, meso-VPCs의 개체군은 마커의 제한적이거나 전혀 없는 검출을 나타내는 것으로 간주된다.
- [0162] 하나의 구현예에서, 조성물에서 meso-VPCs의 적어도 약 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 또는 100%는, CD31/PECAM1, CD309/KDR, CD43, CD144, CD34, CD184/CXCR4, CD146, 및 PDGFRb로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 또는 적어도 8개의 마커를 발현시킨다. 본 발명의 하나의 구현예에서, 본 발명의 조성물에서 meso-VPCs의 적어도 약 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 또는 100%는 CD31/PECAM1, CD309/KDR, 및 CD146을 발현시킨다. 본 발명의 하나의 구현예에서, 본 발명의 조성물에서 meso-VPCs의 적어도 약 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 또는 100%는, CD31/PECAM1, CD309/KDR, CD146, 및 (i) CD144, CD34, CD184/CXCR4, CD43, 또는 PDGFRb 중 적어도 하나; (ii) CD34, CD184/CXCR4, 및 PDGFRb; (iii) CD184/CXCR4; (iv) PDGFRb; (v) CD144 및 CD184/CXCR4; (vi) CD184/CXCR4 및 CD43; 또는 (vii) CC184/CXCFR4를 발현시킨다.
- [0163] 구현예들 중 어느 하나에서, 본 발명의 조성물에서 meso-VPCs의 약 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 또는 1%는 CXCR7, CD45, 및 NG2 중 하나 이상을 발현시킨다. 구현예들 중 어느 하나에서, 본 발명의 조성물에서 meso-VPCs의 약 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 또는 1% 미만은 CXCR7, CD45, 및 NG2 모두를 발현시킨다. 구현예들 중 어느 하나에서, 본 발명의 조성물에서 meso-VPCs의 약 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 또는 1% 미만은 CD144, CD34, CD184/CXCR4, CXCR7, CD43, CD45, PDGFRb, 또는 NG2 중 하나 이상을 발현시킨다.
- [0164] 본 발명의 meso-VPCs는 단일 세포 miRNA 프로파일을 더욱 특징으로 할 수 있다. 하나의 구현예에서, 본 발명의 meso-VPCs는, mir126, mir125a-5p, mir24, 및 mir483-5p로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 또는 적어도 4개의 miRNA 마커에 대해 양성이다. 구현예들 중 어느 하나에서, meso-VPCs는, mir367, mir302a, mir302b, mir302c, mirLet7-e, mir223, mir99a, mir142-3p, 및 mir133a로 이루어진 군으로부터 선택된 마커의 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 또는 적어도 9개에 대해 음성이다. 하나의 구현예에서, meso-VPCs는, mir126, mir125a-5p, mir24, 및 mir483-5p에 대해 양성이다. 또 다른 구현예에서, meso-VPCs는 mir483-5p에 대해 양성이다.
- [0165] 하나의 구현예에서, 조성물에서 meso-VPCs의 약 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 또는 100%는, mir126, mir125a-5p, mir24, 및 mir483-5p로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 또는 적어도 4개의 miRNA 마커에 대해 양성이다. 본 발명의 하나의 구현예에서, 조성물에서 meso-VPCs의 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 또는 100%는, mir126, mir125a-5p, mir24, 및 mir483-5p로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 또는 적어도 4개의 마커에 대해 양성이다. 구현예들 중 어느 하나에서, 조성물에서 meso-VPCs의 약 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 또는 1% 미만은, mir367, mir302a, mir302b, mir302c, mirLet7-e, mir223, mir99a, mir142-3p, 및 mir133a로 이루어진 군으로부터 선택된 마커의 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 또는 적어도 9개를 발현시킨다. 본 발명의 하나의 구현예에서, 조성물에서 meso-VPCs의 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 또는 100%는, mir126, mir125a-5p, mir24, 및 mir483-5p에 대해 양성이다. 또 다른 구현예에서, 조성물에서 meso-VPCs의 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 또는 100%는 mir483-5p에 대해 양성이다.
- [0166] 하나의 구현예에서, meso-VPCs의 개체군은, hsa-miR-3917, hsa-miR-450a-2-3p, hsa-miR-542-5p, hsa-miR-126-5p, hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-24-3p, hsa-let-7e-5p, hsa-miR-99a-5p, hsa-miR-223-5p, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-483-5p, hsa-miR-483-3p, miR 214, miR 335-3p, 및 miR-199a-3p로부터 선택된 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 11, 적어도 12, 적어도 13, 적어도 14, 또는 적어도 15개의 miRNA 마커를 발현시킨다. 하나의 구현예에서, meso-VPCs의 개체군은, hsa-miR-3917, hsa-miR-450a-2-3p, 및 hsa-miR-542-5p를 발현시킨다. 구현예에서, meso-VPCs의 개체군은, 조성

물에서 meso-VPCs의 적어도 약 20%가 마커를 발현시키는 경우, 특정 마커를 발현시키는 것으로 간주된다.

- [0167] 하나의 구현예에서, 조성물에서 meso-VPCs의 약 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 또는 100%는, hsa-miR-3917, hsa-miR-450a-2-3p, hsa-miR-542-5p, hsa-miR-126-5p, hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-24-3p, hsa-let-7e-5p, hsa-miR-99a-5p, hsa-miR-223-5p, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-483-5p, hsa-miR-483-3p, miR 214, miR 335-3p, 및 miR-199a-3p로부터 선택된 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 11, 적어도 12, 적어도 13, 적어도 14, 또는 적어도 15개의 miRNA 마커를 발현시킨다. 본 발명의 하나의 구현예에서, 조성물에서 meso-VPCs의 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 또는 100%는, hsa-miR-3917, hsa-miR-450a-2-3p, hsa-miR-542-5p, hsa-miR-126-5p, hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-24-3p, hsa-let-7e-5p, hsa-miR-99a-5p, hsa-miR-223-5p, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-483-5p, hsa-miR-483-3p, miR 214, miR 335-3p, 및 miR-199a-3p로부터 선택된 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 11, 적어도 12, 적어도 13, 적어도 14, 또는 적어도 15개의 miRNA 마커를 발현시킨다. 하나의 구현예에서, 조성물에서 meso-VPCs의 약 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 또는 100%는, hsa-miR-3917, hsa-miR-450a-2-3p, 및 hsa-miR-542-5p를 발현시킨다. 하나의 구현예에서, 조성물에서 meso-VPCs의 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 또는 100%는, hsa-miR-3917, hsa-miR-450a-2-3p, 및 hsa-miR-542-5p를 발현시킨다.
- [0168] 하나의 구현예에서, meso-VPCs의 개체군은, hsa-let-7e-3p, hsa-miR-99a-3p, hsa-miR-133a-5p, hsa-miR-11399, hsa-miR-196b-3p, hsa-miR-5690, 및 hsa-miR-7151-3p로부터 선택된 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 또는 적어도 7개의 miRNA 마커의 제한적이거나 전혀 없는 발현을 나타낸다. 하나의 구현예에서, meso-VPCs의 개체군은, hsa-let-7e-3p, hsa-miR-99a-3p, 및 hsa-miR-133a-5p의 제한적이거나 전혀 없는 발현을 나타낸다. 구현예에서, meso-VPCs의 개체군은, hsa-miR-11399, hsa-miR-196b-3p, hsa-miR-5690, 및 hsa-miR-7151-3p의 제한적이거나 전혀 없는 발현을 나타낸다. 구현예에서, meso-VPCs의 개체군은, 조성물에서 meso-VPCs의 약 20% 미만이 마커를 발현시키는 경우, 마커의 제한적이거나 전혀 없는 검출을 나타내는 것으로 간주된다.
- [0169] 하나의 구현예에서, 조성물에서 meso-VPCs의 약 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 또는 100%는, hsa-let-7e-3p, hsa-miR-99a-3p, 및 hsa-miR-133a-5p로부터 선택된 적어도 1, 적어도 2, 또는 적어도 3개의 miRNA 마커의 제한적이거나 전혀 없는 발현을 나타낸다. 하나의 구현예에서, 조성물에서 meso-VPCs의 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 또는 100%는, hsa-let-7e-3p, hsa-miR-99a-3p, 및 hsa-miR-133a-5p로부터 선택된 적어도 1, 적어도 2, 또는 적어도 3개의 miRNA 마커의 제한적이거나 전혀 없는 발현을 나타낸다.
- [0170] 전술된 특징에 부가하여, 본 발명의 meso-VPCs는, 혈관 전구 세포의 기타 특성, 예를 들어, 내피 세포, 평활근 세포, 및 조혈 세포와 같은, 혈관 세포로 분화하는 효능을 보유한다. 하나의 구현예에서, 본 발명의 meso-VPCs는, 혈관 내피 세포로 분화하는 효능을 보유한다. meso-VPCs의 다른 혈관 세포 특성은, 예를 들어, 매트릭스 젤 및 AcLDL 흡수 분석(uptake assays)에 의해 결정될 수 있다.
- [0171] 하나의 구현예에서, 본 발명의 meso-VPCs는, 조약돌(cobblestone) 내피-유사 모폴로지와 같은 혈관 세포의 모폴로지를 갖는다. 본 발명의 meso-VPCs를 특징화하는 다른 방법들은, 염색체 무결성(chromosomal integrity)을 결정하기 위한 핵형 분석(karyotyping)을 포함한다.
- [0172] 하나의 구현예에서, 본 발명의 meso-VPCs는, 다능성 줄기 세포 및 증배업 세포에 대하여 실질적으로 정제된다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 meso-VPCs는, 다능성 줄기 세포 및 증배업 세포에 대하여 실질적으로 정제되어 상기 세포들이 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 meso-VPCs를 포함한다. 다능성 줄기 세포는 여기에 기재된 임의의 다능성 줄기 세포일 수 있다.
- [0173] meso-VPCs는, 약 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.9%, 0.8%, 0.7%, 0.6%, 0.5%, 0.4%, 0.3%, 0.2%, 0.1%, 0.09%, 0.08%, 0.07%, 0.06%, 0.05%, 0.04%, 0.03%, 0.02%, 0.01%, 0.009%, 0.008%, 0.007%, 0.006%, 0.005%, 0.004%, 0.003%, 0.002%, 0.001%, 0.0009%, 0.0008%, 0.0007%, 0.0006%, 0.0005%, 0.0004%, 0.0003%, 0.0002%, 또는 0.0001% 미만으로 다능성 줄기 세포 및 증배업 세포를 포함할 수 있다. 조성물은 다능성 줄기 세포 및 증배업 세포가 없을 수 있다.
- [0174] IV. Meso-VPCs를 포함하는 약학 조성물

- [0175] 본 발명은 여기에 기재된 meso-VPCs 중 어느 하나를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 본 발명의 meso-VPCs를 포함하는 약학 조성물은, 약학적으로 허용가능한 담체와 함께 제형화될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 meso-VPCs는, 단독으로 또는 약학 제형의 성분으로서 투여될 수 있으며, 여기서, 상기 meso-VPCs는 의약에서 사용하기 위한 임의의 편리한 방식으로 투여를 위해 제형화될 수 있다. 본 개시에 적합한 담체는 전통적으로 사용되는 것들, 예를 들어, 특히 용액용(등장성인 경우) 대표적인 액체 담체인, 물, 염수, 수성 텍스트로스, 락토오스, 링거 용액, 버퍼 용액, 히알루로난(hyaluronan) 및 글리콜을 포함한다.
- [0176] 다른 대표적인 담체 또는 부형제는, 예를 들어, Hardman, *et al.* (2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, N. Y.; Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams, and Wilkins, New York, N. Y.; Avis, *et al.* (eds.) (1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY; Lieberman, *et al.* (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY; Lieberman, *et al.* (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY; and Weiner and Kotkoskie (2000) Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y.에 기재되어 있다.
- [0177] meso-VPCs를 포함하는 약학 조성물은, 분산액, 현탁액, 에멀전, 사용하기 바로 전에 멸균 주사액 또는 분산액으로 선택적으로 재구성된 멸균 분말, 항산화제, 버퍼, 살균제, 용질 또는 현탁 및 증점제로 이루어진 균으로부터 선택되는 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 멸균 등장성 수용액 또는 비-수성 용액과 조합하여 제형화될 수 있다.
- [0178] 본 개시의 대표적인 약학 조성물은, 혈관 질병 또는 장애를 앓고 있는 환자와 같은, 인간 환자를 치료하는데 사용하기에 적합한 임의의 제형일 수 있다. 하나의 구현예에서, meso-VPCs를 포함하는 약학 조성물은, 주사가 가능한 물질, 예를 들어, 근육내 주사에 적합한 물질로서 제형화된다. meso-VPCs를 포함하는 약학 조성물은, 생리학적 삼투질 농도에서 용액을 유지하는 삼투 활성제를 더욱 함유하는, 생리학적 pH의 버퍼 용액에 투여될 수 있다. 하나의 구현예에서, meso-VPCs를 포함하는 약학 조성물은, 적어도 5%(w/v) 글루코스를 포함하는 버퍼에 투여될 수 있다. 하나의 구현예에서, meso-VPCs를 포함하는 약학 조성물은 염화나트륨을 포함하는 버퍼에 투여될 수 있다. 당업계에 알려진 다른 시약은 또한 약학 조성물을 제형화하기 위해 사용될 수 있다. 하나의 구현예에서, 약학 조성물을 제형화하기 위해 사용되는 버퍼 또는 용액은 사용 전에 멸균된다.
- [0179] 여기에 기재된 방법들에 사용된 meso-VPCs를 포함하는 약학 조성물은, 현탁액, 겔, 콜로이드, 슬러리, 또는 혼합물로 전달될 수 있다. 또한, 전달시, 냉동보존된 meso-VPCs는, 상업적으로 이용 가능한 균형잡힌 염용액 (balanced salt solution)으로 재현탁되어 주사(예를 들어, 일회분 또는 정맥내)로 투여를 위한 원하는 삼투질 농도 및 농도를 달성할 수 있다. meso-VPCs를 포함하는 약학 조성물은, 예를 들어, 하나 이상의 주사를 통해, 내구성 불활성 매트릭스(inert matrix)와의 혼합물로 피험자에게 전달될 수 있다. 천연 또는 합성 수-불용성 중합체인, 히드로겔과 같은 내구성 불활성 매트릭스는, 투여의 부위에서 세포의 성장 및 증식을 위한 스캐폴드(scaffolds)를 제공할 수 있다. 하나의 구현예에서, meso-VPCs를 포함하는 약학 조성물은 히알루로난 히드로겔로 투여된다. 하나의 구현예에서, meso-VPCs를 포함하는 약학 조성물은, 메틸셀룰로스 히드로겔로 투여된다. 세포 성장 및 증식을 위한 내구성 불활성 매트릭스 스캐폴드를 제공하는 당업계에 알려진 다른 적합한 물질은 또한 여기에 기재된 방법에 사용될 수 있다.
- [0180] meso-VPCs를 포함하는 약학 조성물은, 예를 들어, 주사기를 통한 하나 이상의 주사에 의해 전달될 수 있다. 선택적으로, meso-VPCs를 포함하는 약학 조성물은, 당업계에 알려진 다른 적합한 방법에 의해 전달될 수 있다. 적절한 전달 방법들은, meso-VPCs의 성장과 생존을 더욱 촉진하고, 투여의 부위에서 세포 소실을 방지할 수 있다. 특정 구현예에서, 적절한 전달 방법은, 투여의 부위에서 meso-VPCs를 유지하는 것을 돕고, 세포 성장을 위한 최적의 환경을 제공하는 것을 돕는다. 따라서, meso-VPCs를 포함하는 약학 조성물은 또한, 약학 조성물에서 meso-VPCs에 대한 충분한 지지를 제공하는, 예를 들어, 히드로겔 튜브(hydrogel tube), 히드로겔 시트, 천연 또는 인공 물질로 제조된 생물공학적 패치, 또는 세포 시트로 제형화될 수 있다. 하나의 구현예에서, meso-VPCs를 포함하는 약학 조성물은 히드로겔 튜브의 형태로 전달된다. 하나의 구현예에서, meso-VPCs를 포함하는 약학 조성물은, 히드로겔 시트의 형태로 전달된다. 하나의 구현예에서, meso-VPCs를 포함하는 약학 조성물은, 생물공학적 패치의 형태로 전달된다. 하나의 구현예에서, meso-VPCs를 포함하는 약학 조성물은, 세포 시트의 형태로 전달된다. 당업계에 알려진 임의의 다른 적합한 방법은 또한 여기에 기재된 약학 조성물의 전달에 사용될 수 있다.
- [0181] 약학 조성물은 통상적으로 제조 및 보관의 조건하에서 무균 및 안정해야 한다. 조성물은, 용액, 마이크로에멀전, 리포솜, 또는 다른 규칙적인 구조(ordered structure)로 제형화될 수 있다. 담체는, 예를

들어, 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜, 및 이와 유사한 것), 및 이들의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산매(dispersion medium)일 수 있다. 적절한 유동성은, 예를 들어, 레시틴(lecithin)과 같은 코팅의 사용에 의해, 분산의 경우에 필요한 입자 크기의 유지에 의해 및 계면활성제의 사용에 의해, 유지될 수 있다. 많은 경우에, 등장화제(isotonic agents), 예를 들어, 당, 폴리알코올, 예컨대 만니톨, 솔비톨, 또는 염화나트륨을 조성물에 포함시키는 것은 바람직할 것이다. 주사가 가능한 조성물의 연장된 흡수(Prolonged absorption)는, 조성물에 흡수를 지연시키는 작용제, 예를 들어, 모노스테아레이트 염 및 젤라틴을 포함시켜 야기될 수 있다. 게다가, 가용성 인자는, 시간 방출 제형(time release formulation), 예를 들어, 서방성 중합체를 포함하는 조성물로 투여될 수 있다. 활성 화합물은, 임플란트(implants) 및 마이크로캡슐화된 전달 시스템을 포함하는, 제어된 방출 제형과 같이, 빠른 방출로부터 화합물을 보호할 담체와 함께 제조될 수 있다. 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리무수물, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르, 폴리락트산 및 폴리락틱(poly-lactic), 폴리글리콜 공중합체(PLG)와 같은, 생분해성, 생체적합성 중합체는 사용될 수 있다. 이러한 제형의 제조를 위한 많은 방법들은 특허를 받았거나 일반적으로 당업자에게 알려져 있다.

[0182] 본 발명의 하나의 관점은, 적어도  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$ ,  $10^{11}$ ,  $10^{12}$ , 또는  $10^{13}$ 의 meso-VPCs 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는, 포유동물 환자, 예를 들어, 인간 환자에 사용하는데 적합한 약학 조성물에 관한 것이다. meso-VPCs의 약학적 제제의 투여를 위한 농도는, 효과적인 임의의 양일 수 있고, 예를 들어, PSCs가 실질적으로 없을 수 있다. 예를 들어, 약학 조성물은 여기에 기재된 meso-VPCs의 수 및 타입을 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, meso-VPCs의 약학 조성물은, 이를 필요로 하는 숙주에 전신 투여를 위해 meso-VPCs의 약  $1 \times 10^4$  내지 약  $1 \times 10^5$ , 약  $1 \times 10^5$  내지 약  $1 \times 10^6$ , 약  $1 \times 10^6$  내지 약  $1 \times 10^7$ , 약  $1 \times 10^7$  내지 약  $1 \times 10^8$ , 약  $1 \times 10^8$  내지 약  $1 \times 10^9$ , 약  $1 \times 10^9$  내지 약  $1 \times 10^{10}$ , 약  $1 \times 10^{10}$  내지 약  $1 \times 10^{11}$ , 약  $1 \times 10^{11}$  내지 약  $1 \times 10^{12}$ , 또는 약  $1 \times 10^{12}$  내지 약  $1 \times 10^{13}$  또는 이를 필요로 하는 숙주에 국소 투여를 위해 상기 meso-VPCs의 약  $1 \times 10^4$  내지 약  $1 \times 10^5$ , 약  $1 \times 10^5$  내지 약  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^6$  내지 약  $1 \times 10^7$ , 약  $1 \times 10^7$  내지 약  $1 \times 10^8$ , 약  $1 \times 10^8$  내지 약  $1 \times 10^9$ , 약  $1 \times 10^9$  내지 약  $1 \times 10^{10}$ , 약  $1 \times 10^{10}$  내지 약  $1 \times 10^{11}$ , 약  $1 \times 10^{11}$  내지 약  $1 \times 10^{12}$ , 또는 약  $1 \times 10^{12}$  내지 약  $1 \times 10^{13}$ 를 포함한다.

[0183] V. 혈관 질병의 치료 방법

[0184] 여기에 기재된 meso-VPCs 및 meso-VPCs를 포함하는 약학 조성물은, 세포-기반 치료를 위해 사용될 수 있다. 특히, 본 발명은, 혈관 질병, 예를 들어, 중증 사지 허혈을 치료하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 이를 필요로 하는 피험자에게 유효량의 meso-VPCs를 투여하는 단계를 포함하며, 여기서, 상기 meso-VPCs는 다능성 줄기 세포로부터 유래된 중배엽 세포의 시험관내 분화에 의해 얻어진다. 하나의 구현예에서, 다능성 줄기 세포는 중배엽 세포로 분화되고, 결과적으로, meso-VPCs로 분화된다.

[0185] 혈관 질병은, 혈관(동맥 및 정맥)의 비정상적인 상태를 지칭한다. 심장 밖의 혈관 질병은 어디에서나 나타날 수 있다. 가장 흔한 혈관 질병은, 뇌졸중, 말초 동맥 질환(PAD), 복부 대동맥류(AAA), 경동맥 질병(CAD), 동정맥 기형(AVM), 중증 사지 허혈(CLI), 폐색전증(혈전), 심부 정맥 혈전증(DVT), 만성 정맥 부전증(CVI), 및 정맥류이다. 하나의 구현예에서, 혈관 질병은 말초 동맥 질환(PAD)이다. 하나의 구현예에서, 혈관 질병은, 중증 사지 허혈(CLI)과 같은, 허혈성 질병이다. 하나의 구현예에서, 혈관 질병은, 죽상동맥경화증, 말초 동맥 질환(PAD), 경동맥 질병, 정맥 질병, 혈전, 대동맥류, 섬유근 이형성증, 림프부종, 또는 혈관 손상이다. 하나의 구현예에서, 혈관 질병은, 말초 동맥 질환, 예컨대, 중증 사지 허혈(CLI), 장 허혈 증후군, 신장 동맥 질병, 슬와 포착 증후군, 레이노 현상, 또는 버거병이다.

[0186] meso-VPCs 또는 약학 조성물은, 피험자에서 임의의 혈관 질병을 치료하는데 사용될 수 있다. 하나의 구현예에서, meso-VPCs 또는 약학 조성물은 말초 동맥 질환을 치료하는데 사용된다. 하나의 구현예에서, meso-VPCs 또는 약학 조성물은, 중증 사지 허혈(CLI), 장 허혈 증후군, 신장 동맥 질병, 슬와 포착 증후군, 레이노 현상, 및 버거병을 포함하는, 말초 동맥 질환을 치료하는데 사용된다. 하나의 구현예에서, meso-VPCs 또는 약학 조성물은 중증 사지 허혈(CLI)을 치료하는데 사용된다.

[0187] 본 발명의 meso-VPCs 또는 약학 조성물은 전신적으로 또는 국소적으로 투여될 수 있다. 상기 meso-VPCs 또는 약학 조성물은, 치료될 특정 병리에 따라, 정맥내, 두개내(intracranial), 근육내, 복강내, 또는 기타 투여의 경로를 통한 주사, 또는 국소 이식을 포함하지만, 이에 제한되지 않는, 당업계에 알려진 방식을 사용하여 투여될

수 있다. 하나의 구현예에서, 상기 meso-VPCs 또는 약학 조성물은 근육내 투여된다.

[0188] 본 발명의 meso-VPCs 또는 약학 조성물은, 전달 장치가 활용되는, 국소 이식을 통해 투여될 수 있다. 본 발명의 전달 장치는 생체적합성 및 생분해성이다. 본 발명의 전달 장치는, 생체적합성 섬유, 생체적합성 안(yarns), 생체적합성 발포체, 지방족 폴리에스테르, 폴리(아미노산), 코폴리(에테르-에스테르), 폴리알킬렌 옥살레이트, 폴리아미드, 티로신 유래 폴리카보네이트, 폴리(이미노카보네이트), 폴리오르토에스테르, 폴리옥사에스테르, 폴리아미도에스테르, 아민기를 함유하는 폴리옥사에스테르, 폴리(무수물), 폴리포스파젠, 바이오중합체; 락티드, 글리콜리드, 엡실론-카프로락톤, 파라-디옥사논, 트리메틸렌 카보네이트의 단독중합체 및 공중합체; 원섬유 콜라겐(fibrillar collagen), 비-원섬유 콜라겐, 펩신으로 처리되지 않은 콜라겐, 다른 중합체와 조합된 콜라겐, 성장 인자, 세포외 기질 단백질, 생물학적으로 관련된 펩티드 단편, 간세포 성장 인자, 혈소판-유래 성장 인자, 혈소판 풍부 혈장, 인슐린 성장 인자, 성장 분화 인자, 혈관 내피 세포-유래 성장 인자, 니코틴아미드, 글루카곤 유사 펩타이드, 테나신-C(tenascin-C), 라미닌, 항-거부제(anti-rejection agents), 진통제, 항-산화제, 항-아포토시스제(anti-apoptotic agents), 항-염증제 및 세포증식억제제로 이루어진 군으로부터 선택된 물질을 사용하여 제조될 수 있다.

[0189] 특정 치료 요법, 투여의 경로, 및 보조 요법은, 특정 병리, 병리의 중증도, 및 환자의 전반적인 건강에 기초하여 조정될 수 있다. 상기 meso-VPCs 또는 약학 조성물의 투여는, 병리의 징후의 중증도를 감소시키거나 및/또는 병리의 징후의 추가 퇴화를 방지하는데 효과적일 수 있다.

[0190] 본 발명의 치료 방식은, 단일 용량의 meso-VPCs 또는 약학 조성물의 투여를 포함할 수 있다. 선택적으로, 여기에 기재된 치료 방식은, meso-VPCs 또는 약학 조성물이 일정 기간에 걸쳐 여러 번 투여되는 치료의 과정을 포함할 수 있다. 대표적인 치료의 과정은, 매주, 격주로, 매일, 분기별로, 격년으로, 또는 매년 치료를 포함할 수 있다. 선택적으로, 치료는 단계적으로 진행될 수 있고, 이에 의해 다중 투여량이 초기에 요구되고(예를 들어, 첫 주 동안 매일 투여량), 이후에 더 적은 빈도의 투여량이 요구된다.

[0191] 하나의 구현예에서, meso-VPCs 또는 약학 조성물은, 환자의 일생에 걸쳐 주기적으로 1회 이상 환자에게 투여된다. 본 발명의 또 다른 구현예에서, meso-VPCs 또는 약학 조성물은, 1년에 1회, 6-12개월마다 1회, 3-6개월마다 1회, 1-3개월마다 1회, 또는 1-4주마다 1회 투여된다. 선택적으로, 좀더 빈번한 투여는 특정 상태 또는 장애에 대해 바람직할 수 있다. 하나의 구현예에서, meso-VPCs 또는 약학 조성물은, 장치를 통해 환자의 일생에 걸쳐 1회, 1회를 초과하여 주기적으로 투여되거나, 또는 치료될 특정 환자 및 환자의 병리에 대해 필요에 따라 투여된다. 유사하게, 시간 경과에 따라 변화하는 치료 요법은 고려된다. 예를 들어, 좀더 빈번한 치료는 처음에 요구될 수 있다(예를 들어, 매일 또는 매주 치료). 시간이 지남에 따라, 환자의 상태가 개선됨에 따라, 덜 빈번한 치료가 요구되거나 또는 심지어 더 이상의 치료는 요구되지 않을 수 있다.

[0192] 몇몇 구현예에서, 약  $1 \times 10^4$ , 약  $1 \times 10^5$ , 약  $1.5 \times 10^5$ , 약  $2 \times 10^5$ , 약  $5 \times 10^5$ , 약  $1 \times 10^6$ , 약  $5 \times 10^6$ , 약 10 million, 약 20 million, 약 40 million, 약 60 million, 약 80 million, 약 100 million, 약 120 million, 약 140 million, 약 160 million, 약 180 million, 약 200 million, 약 220 million, 약 240 million, 약 260 million, 약 280 million, 약 300 million, 약 320 million, 약 340 million, 약 360 million, 약 380 million, 약 400 million, 약 420 million, 약 440 million, 약 460 million, 약 480 million, 약 500 million, 약 520 million, 약 540 million, 약 560 million, 약 580 million, 약 600 million, 약 620 million, 약 640 million, 약 660 million, 약 680 million, 약 700 million, 약 720 million, 약 740 million, 약 760 million, 약 780 million, 약 800 million, 약 820 million, 약 840 million, 약 860 million, 약 880 million, 약 900 million, 약 920 million, 약 940 million, 약 960 million, 또는 약 980 million의 meso-VPCs는 피험자에 투여된다. 몇몇 구현예에서, 약 1 billion, 약 2 billion, 약 3 billion, 약 4 billion 또는 약 5 billion 이상의 meso-VPCs는 투여된다. 몇몇 구현예에서, meso-VPCs의 수는, 약 20 million 내지 약 4 billion의 meso-VPCs, 약 40 million 내지 약 1 billion의 meso-VPCs, 약 60 million 내지 약 750 million의 meso-VPCs, 약 80 million 내지 약 400 million의 meso-VPCs, 약 100 million 내지 약 350 million의 meso-VPCs, 및 약 175 million 내지 약 250 million의 meso-VPCs의 범위이다.

[0193] 여기에 기재된 방법들은, 당업계에 알려진 방법을 사용하여 치료 또는 예방의 효능을 모니터링하는 단계를 더욱 포함할 수 있다. 하나의 구현예에서, meso-VPCs 또는 약학 조성물의 투여는, 피험자에서 혈류를 증가시킨다. 하나의 구현예에서, meso-VPCs 또는 약학 조성물의 투여는, 피험자에서 혈관신생 및 혈관형성과 같은 혈관화(vascularization)를 촉진한다. 하나의 구현예에서, meso-VPCs 또는 약학 조성물의 투여는, 피험자에서 허혈성 중증도를 감소시킨다. 하나의 구현예에서, meso-VPCs 또는 약학 조성물의 투여는, 피험자에서 괴사 면적을 감소

시킨다. 피험자에서 다른 신체적 및 기능적 변화는 또한 혈관 질병의 치료 방법의 효능을 결정하기 위해 측정 및 정량화될 수 있다.

[0194] VI. 키트

[0195] 몇몇 구현예에서, 본 발명은, 하나 이상의 개별 구현예, 본 발명의 meso-VPs 또는 약학 조성물을 포함하는 키트를 제공한다. 키트는, 부가적인 성분, 예를 들어, 겔화제, 연화제, 계면활성제, 습윤제, 점도 향상제, 유화제를 하나 이상의 구현예에 더욱 포함할 수 있다. 키트는, 진단 또는 치료 적용들을 위한 meso-VPs 또는 약학 조성물을 제형화하기 위한 설명서를 선택적으로 포함할 수 있다. 키트는 또한, 혈관 장애 및/또는 질병의 치료에서, 성분을 개별적으로 또는 함께, 사용하기 위한 설명서를 포함할 수 있다. 하나의 구현예에서, 본 발명의 키트는, meso-VPs를 포함하는 약학 조성물의 주사를 위한 주사기를 포함한다.

[0196] 몇몇 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 meso-VPs를 선별, 배양, 증식, 유지, 및/또는 이식하기 위한 시약과 함께 상기 meso-VPs를 포함하는 키트를 제공한다. 세포 선별 키트, 배양 키트, 증식 키트, 이식 키트의 대표적인 예로는 당업계에 알려져 있다. 세포는 또한 이의 유전자 생성물의 발현을 위해 양성 선택, 음성 선택, 또는 이들의 조합을 사용하여 샘플에서 농축될 수 있다.

[0197] 본 발명은, 하기 실시예에 의해 더욱 예시되지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 출원 전반에 걸쳐 인용된 모든 참고문헌, 특허 및 공개된 특허 출원의 전체 내용, 뿐만 아니라 도면은, 참조로서 여기에 혼입된다.

[0198] 실시예

[0199] 실시예 1: 인간 다능성 줄기 세포의 배양 및 증배엽 세포로의 분화

[0200] 독점적인 인간 배아 줄기 세포(hES)주인, J1, 및 인간 유도 다능성 줄기 세포(hiPS)주인, GMP1은 본 연구에서 사용된다. 세포는, 세포는, 5% CO<sub>2</sub> + 20% O<sub>2</sub> 정상산소 조건하의 37°C에서 피더 배양 조건(이하 "HDF"라고 함)을 위해 매트릭셀(Corning) + 인간 진피 섬유아세포 또는 HDF로 또는 피더가 없는 배양 조건(이하 "FF"라고 함)을 위해 매트릭셀로 사전-코팅된 6웰 조직 배양 플레이트의 mTeSR1 완전 배지(Stem Cell Technologies)에서 유지된다(도 1). 배지 교체는 세포의 플레이팅(0일) 후 1일, 2일 및 3일에 수행된다. 세포는 4일째 또는 세포 컨플루언시가 60-70%에 도달했을 때 계대된다. 계대를 위해, 1 ml/well의 디스파제(Dispase)(1 U/ml, STEMCELL Technologies)는 FF-배양된 인간 다능성 줄기 세포에 대해 사용되거나 또는 1 ml/well의 세포 분리 버퍼(CDB)(Gibco)는 HDF-배양된 인간 다능성 줄기 세포에 대해 사용된다. 세포는, 콜로니의 가장자리가 플레이트에서 들어올릴 때까지 또는 37°C에서 5-7분 동안 인큐베이션된다. 디스파제 또는 CDB-함유 배지는 플레이트로부터 조심스럽게 흡인되고, 세포는 효소 또는 버퍼의 잔류량을 제거하기 위해 DMEM-F12(Gibco)로 조심스럽게 세척된다. 신선한 mTeSR1 완전 배지는 그 다음 강력한 세척을 사용하고 주의하면서 일회용 세포 스크레이퍼(cell scraper)로 긁어내어 공기 방울의 형성을 방지하면서 플레이트에서 콜로니를 수집한 다음, 실온(RT)에서 5분 동안 300 x g에서 원심분리하여 세포 펠렛(pellet)을 얻는데 사용된다. 상청액(supernatant)의 제거 후, 세포 펠렛은 mTeSR1 완전 배지에 재-현탁되고, 1 ml의 이러한 균일하게 혼합된 세포 현탁액은, 2 ml의 mTeSR1 완전 배지를 함유하는 (FF 배양을 위해 매트릭셀로 또는 전술된 바와 같이 매트릭셀 + HDF로 사전 코팅된) 6웰 조직 배양 플레이트의 각 웰에 첨가된다. FF 배양의 경우 소 세포 덩어리(small cell clumps)로 대략 50만 세포 또는 HDF 배양의 경우 소 세포 덩어리로 250만 세포는 각 웰에 고르게 분포된다. 세포는 그 다음 임의의 스월링(swirling)을 피하면서 복합적인 좌-우 흔들림 동작을 사용하여 웰 내에서 펼쳐진다. 배양물은 성장 품질 및 모폴로지에 대해 매일 점검된다.

[0201] 다능성 줄기 세포를 증배엽 세포로 분화시키기 위해, 5 ml 매트릭셀/dish를 첨가하여 매트릭셀 사전-코팅된 10 cm 조직 배양 접시(Corning)은 준비된다. 10 ml의 mTeSR1 완전 배지/10-cm 접시는, 매트릭셀 코팅 표면이 건조되는 것을 방지하기 위해 각 접시에서 부착되지 않은 매트릭셀을 제거한 후에 바로 첨가된다. 각 매트릭셀 사전-코팅된 10-cm 접시는, 10 ml의 TeSR1 완전 배지에 고르게 분포된 FF 또는 HDF-배양된 GMP1 세포 배양물 유래의 소 세포 덩어리로 대략 150만 세포(또는 HDF-배양된 J1 세포 배양물 유래의 소 세포 덩어리로 대략 300,000 세포/10-cm 접시)가 시딩된다. 세포는 그 다음 스월링을 피하면서 복합적인 좌-우 흔들림 동작을 사용하여 접시 내에서 펼쳐지고, 플레이트는 다음 24시간(D-1) 동안 5% CO<sub>2</sub> + 20% O<sub>2</sub> 정상산소 조건하의 37°C에서 인큐베이션된다(도 1). 분화의 D0에서, mTeSR1 완전 배지는, 증배엽 유도 성장 인자, 액티빈 A(10 ng/ml; Humanzyme), FGF-2(10 ng/ml; Humanzyme), VEGF165(10 ng/ml, Humanzyme), 및 BMP4(25 ng/ml, Humanzyme)의 콕테일(cocktail)을 함유하는 12 ml/10-cm 접시 Stemline II 배지(Sigma)로 교체된다. 분화의 D1에서, 액티빈-A는 증배엽 콕테일로부터 제거되고, 배지는, 증배엽 세포의 발생 및 증식을 촉진하기 위해 FGF-2(10 ng/ml), VEGF165(10 ng/ml),

및 BMP4(25 ng/ml)을 함유하는 12 ml/dish의 신선한 Stemline II 배지로 교체된다. 최종 배지 교체는, FGF-2(10 ng/ml), VEGF165(10 ng/ml), 및 BMP4(25 ng/ml)를 함유하는 15 ml/dish의 신선한 Stemline II 배지를 첨가시켜 분화의 D3에 이루어진다. 배양은, 항상 37°C에서 5% CO<sub>2</sub> + 20% O<sub>2</sub> 정상산소 조건하에서, 4일째까지 계속된다(도 1). 세포들은 그 다음 Stempro Acutase 효소(Gibco)를 사용하여 이들을 단일 세포로 분리시켜 수확된다. (FACS 및 q-PCR 분석에 의한) 세포 특징화는, D4 수확된 세포의 중배엽 특징의 존재를 확인하기 위해 수행된다(도 2a-b).

[0202] 실시예 2: 3D-바스쿨로노이드 분화 플랫폼을 통한 인간 중배엽 세포의 혈관 전구 세포(MESO-VPCs)로의 분화

[0203] 새로운 3D 바스쿨로노이드 분화 플랫폼은, 혈관 전구 세포의 발생 및 증식을 촉진하는 인자의 존재하에 초-저접착 조직 배양 접시(Corning)를 사용하는 VPC 분화 배지에 실시예 1에서 얻은 중배엽 세포를 현탁시켜 개발된다(도 3). D0에서, 100만 개의 미분류된(unsorted) D4 중배엽 세포는, 초-저 부착 6웰 플레이트의 각 웰에서 현탁되고, 정상산소 상태(37°C, 5% CO<sub>2</sub> 및 20% O<sub>2</sub>)에서 VPC 3D 분화 배지(50 ng/ml VEGF165, 50 ng/ml FGF-2, 25 ng/ml BMP4, 10 μM SB431542 및 2 μM 포스콜린 포함("Meso-3D Vasculonoid VPC1" 프로토콜) 또는 포스콜린 미포함("Meso-3D Vasculonoid VPC2" 프로토콜)를 함유하는 Stemline II 배지)에서 분화된다. 각각의 배지는 D2 및 D4에 교체되고, 5일째에 분화 배양은 완료된다. 분화의 5일 후, 두 프로토콜로부터의 MESO-VPCs는, Stempro Acutase 효소를 사용하여 이들을 단일 세포로 분리시켜 수확된다. 세포들은 그 다음 계수되고, 생존력은 측정된 후 동결보존된다.

[0204] 실시예 3: 2D-분화 플랫폼을 통한 인간 중배엽 세포의 혈관 전구 세포(MESO-VPCs)로의 분화

[0205] 새로운 2D-기반 VPC 분화 플랫폼은 또한 실시예 1에 따라 생성된 중배엽 세포를 부착성 인간 세포의 기질(콜라겐 IV 코팅된 조직 배양 접시) 상에 시딩하여 개발된다. D0에서, (위로부터의) 120만 개의 미분류된 D4 중배엽 세포는, 인간 콜라겐 IV-코팅된(5 mg/cm<sup>2</sup>) T-175 플라스크(Corning) 상에 시딩되고, 2개의 다른(Meso-2D VPC2 및 Meso-2D VPC3) 분화 프로토콜을 사용하여 VPC 2D 분화 배지에서 분화된다(도 4). Meso-2D VPC2 프로토콜의 경우, 50 ng/ml VEGF165, 50 ng/ml FGF-2 및 25 ng/ml BMP4를 함유하는 Stemline II 배지는 D0(40 ml/flask)에서 사용되고, 50 ng/ml VEGF165, 50 ng/ml FGF-2, 25 ng/ml BMP4 + 10 μM SB431542를 함유하는 Stemline II 배지는 D1(45 ml/flask)으로부터 D7까지 사용된다. Meso-2D VPC3 프로토콜의 경우, 50 ng/ml VEGF165, 50 ng/ml FGF-2, 25 ng/ml BMP4 및 2 μM 포스콜린을 함유하는 Stemline II 배지는 D0에서 사용되고, 50 ng/ml VEGF165, 50 ng/ml FGF-2, 25 ng/ml BMP4 및 2 μM 포스콜린 + 10 μM SB431542를 함유하는 Stemline II 배지는 D1으로부터 D7까지 사용된다. D0 세포들은, 정상산소 조건(37°C, 5% CO<sub>2</sub> 및 20% O<sub>2</sub>)에서 배양된다. D1-D7 세포들은, 분화의 D3(50 ml/flask) 및 D5(60 ml/flask)에서 수행된 배지 변화와 함께 저산소 조건(37°C, 5% CO<sub>2</sub> 및 5% O<sub>2</sub>)에서 배양된다. 분화의 7일 후, Meso-2D VPC2 및 Meso-2D VPC3 프로토콜로부터의 MESO-VPCs는, Stempro Acutase 효소를 사용한 효소적 분리에 의해 단일 세포로 수확된다. 세포들은 그 다음 계수되고, 생존력을 측정 후 실시예 2에 기재된 바와 같이 동결보존된다.

[0206] 실시예 4: 매트릭셀/AcLDL 분석

[0207] 실시예 2-3로부터의 동결보존된 Meso-VPCs는, 37°C 수조(2-3분)에서 신속하게 해동된다. 세포는 그 다음 10 ml의 내피 세포 또는 EC 배지(LifeLine Cell Technology의 Vasculife® VEGF 배지)를 갖는 15 ml 원뿔형 튜브로 옮겨지고, 5분 동안 300 x g에서 원심분리된다. 원심분리 후, 상청액은 제거되고, 세포는 세포 계수를 위해 1 ml의 신선한 EC 배지에 재현탁된다. 세포들은, Nexcelom Bioscience의 Trypan blue 및 K2 Cellometer를 사용하여 계수된다. 총 18 ml의 세포 현탁액은, EC 배지를 사용하여 10,000-20,000 살아있는 MESO-VPCs/ml의 농도로 준비된다. 3 ml/well의 이러한 세포 현탁액은, 매트릭셀 및 AcLDL 흡수 분석을 위한 세포를 준비하기 위해 정상산소 조건(37°C, 5% CO<sub>2</sub> 및 20% O<sub>2</sub>)에서 3-4일 동안 피브로넥틴(FN) 코팅된 6웰 플레이트 상에 플레이팅된다.

[0208] 매트릭셀/AcLDL 분석의 경우, 250 μl의 기저막 매트릭셀(Corning)은, Nunc™ 4웰 플레이트(Thermo Scientific)의 각 웰에 첨가되고, 플레이트는 실온에서 30분 동안 인큐베이션된다. 플레이트가 코팅되면, 세포는 웰당 250 μl의 EC 배지에 5.0×10<sup>4</sup> 세포의 밀도로 시딩된다. 플레이팅의 2-3시간 후, 배지는 AcLDL(Molecular Probes)을 함유하는 신선한 250 μl의 EC 배지(5 μl의 AcLDL + 245 μl의 EC 배지)로 교체된다. 플레이트는 정상산소 조건하에서 밤새 인큐베이션된다. 24시간의 인큐베이션 후, AcLDL-함유 배지는 제거되고, 플레이트는 D-PBS로 3회 세척되며, 신선한 250 μl의 EC 배지/웰은 첨가된다. 마지막으로, 현미경 사진은 Keyence Microscope를 사용하여 4배의 배율로 각 웰에서 촬영된다.

[0209] 실시예 5: 유세포분석기 분석

[0210] 5일째 수확된 Meso-3D Vasculonoid VPC 및 7일째 수확된 Meso-2D VPC(상기 실시예 2-3)의 냉동보존된 바이알(vials)은, 해동되고, 세포 계수를 위해 EC 배지에서 단일 세포 현탁액으로 제조된다. 세포 계수가 수행된 후, 세포들은 FACS 버퍼(2% FBS를 함유하는 D-PBS)에서 재현탁된다. 세포의 분취량(100,000-200,000 세포/FACS 분석 샘플)은, 표면 마커 항체 염색을 위해 100  $\mu$ l의 FACS 버퍼에서 제조된다. 항-인간 CD31/PECAM1(BioLegend), CD34(BD Biosciences), CD144/VE-Cadh(BioLegend), CD309/KDR(BioLegend), CD43(BD Biosciences), CD45(BD Biosciences), CD184/CXCR4(BD Biosciences), CXCR7(BioLegend), CD146(BioLegend), NG2(BD Biosciences), 및 PDGFRb(BioLegend) 단일클론 항체는, 100  $\mu$ l의 총 부피에서 5  $\mu$ l/샘플로 사용된다. 세포들은 얼음 상에서 20-30 분 동안 항체와 함께 인큐베이션된다. 인큐베이션 후, 세포들은 1 ml의 FACS 버퍼로 결합되지 않은 항체를 제거하기 위해 세척된다. 세포들은 그 다음 300 x g에서 5분 동안 원심분리되고, 상청액은 제거된 다음, 1:1000 희석도로 프로피디움 요오드화물(PI, Sigma)을 포함하는 신선한 100  $\mu$ l의 FACS 버퍼에서 재현탁된다. PI는 세포 현탁액에 첨가되고, FACS 분석 동안 사멸된 세포의 배제를 위해 사용된다. SONY SA3800 스펙트럼 분석기는 분석에 사용된다. 보상(Compensation)은, 양성(HUVECs) 및 음성(미분화된 J1 또는 GMP1 세포들) 대조군을 사용하여 설정된다.

[0211] 실시예 6: 비교 세포

[0212] 본 발명의 Meso-VPCs와 비교하기 위해, 헤모제닉 내피 세포(HE) 및 혈관모세포(HB)는, 예를 들어, 미국 특허 제 9,938,500호; 미국 특허 제 9,410,123호; WO 2013/082543; WO 2014/100779; 미국 특허 제 9,993,503호; 및 미국 가출원 제 62/892,712호(2019년 8월 28일 출원) 및 이의 우선권을 주장하는 PCT 출원에서, 이전에 설명된 바와 같이 HE 및 HB 프로토콜을 사용하는 인간 배아 줄기 세포(예를 들어, J1 hESCs) 또는 인간 유도 다능성 줄기 세포(예를 들어, GMP-1 iPSCs)로부터 발생되며, 상기 특허들의 전체적인 내용들은 참조로서 여기에 혼입된다. 간단히 말해서, HE 발생을 위해, hESCs 또는 iPSCs는, 단일 세포 응집체를 얻기 위해 Gibco® Cell Dissociation Buffer(CDB)로 분리된다. 세포는 10  $\mu$ M의 최종 농도로 Y-27632(Stemgent)를 함유하는 mTeSR™1 배지(STEMCELL Technologies)에서 400,000 cells/10ml의 최종 밀도로 재현탁된다. 10ml의 세포 현탁액은 콜라겐 IV-코팅된 10 cm 플레이트에 옮겨진다(-1일). 플레이트는 정상산소 인큐베이터에 밤새 놓아둔다. 다음날(0일), mTeSR™1/Y-27632 배지는, 각 10 cm 플레이트로부터 조심스럽게 제거되고, 10ml의 BVF-M 배지[Stemline® II Hematopoietic Stem Cell Expansion Medium(Sigma); 25 ng/ml BMP4(Humanzyme); 50 ng/ml VEGF165(Humanzyme); 50 ng/ml FGF2(Humanzyme)]로 대체된다. 플레이트는 저산소 챔버(5% CO<sub>2</sub>/5% O<sub>2</sub>)에서 2일 동안 인큐베이션된다. 2일차에, 배지는 흡인되고, 새로운 10-12ml의 BVF-M은 각 10 cm 플레이트에 첨가된다. 4일차에, 배지는 다시 흡인되고, 새로운 10-15ml의 BVF-M은 각 10 cm 플레이트에 첨가된다. 6일차에, 세포들은 이식 및/또는 추가 시험을 위해 수확된다. 배지는 각 플레이트로부터 흡인되고, 플레이트는 10ml의 D-PBS(Gibco)를 첨가하고 D-PBS를 흡인하여 세척된다. 5ml의 StemPro Accutase(Gibco)는, 각 10 cm 플레이트에 첨가되고, 정상산소 CO<sub>2</sub> 인큐베이터(5% CO<sub>2</sub>/20% O<sub>2</sub>)에서 3-5분 동안 인큐베이션된다. 세포는 5ml 피펫으로 5회 피펫팅된 후, P1000 피펫으로 약 5회 피펫팅된다. 세포들은 그 다음 30  $\mu$ m 세포 여과기(cell strainer)를 통해 걸러지고 수집 튜브로 옮겨진다. 각각의 10 cm 플레이트는, 10ml의 EGM-2 배지(Lonza) 또는 Stemline® II Hematopoietic Stem Cell Expansion Medium(Sigma)로 다시 행구어지고, 세포는 30  $\mu$ m 세포 여과기를 통해 통과되며 수집 튜브에서 수집된다. 튜브는 5분 동안 120-250 x g에서 원심분리된다. 세포는 그 다음 EGM-2 배지 또는 Stemline® II Hematopoietic Stem Cell Expansion Medium(Sigma)로 재현탁되고 계수된다. 계수 후, 세포는 하향 회전(5분 동안 250 x g)되고, 3x10<sup>6</sup> cells/ml의 농도에서 동결 배지(10% DMSO + 얼 불활성화된 FBS)로 재현탁된다. 냉동 스톡(stocks)을 생성시키기 위해, 세포 현탁액은 냉동바이알(cryovial)당 2ml의 FBS(Hyclone) 및 DMSO(Sigma)에 분취된다(6x10<sup>6</sup> cells/2ml/vial).

[0213] 혈관모세포(HB) 발생을 위해, hESCs 또는 iPSCs는 4mg/ml 콜라게나제 IV(Gibco)로 분리되어 세포 덩어리를 얻은 다음, BV-M 배지[Stemline® II Hematopoietic Stem Cell Expansion Medium(Sigma); 25 ng/ml BMP4(Humanzyme); 50 ng/ml VEGF165(Humanzyme)]에서 재현탁되고, 웰당 약 750,000 - 1,200,000 세포의 밀도로 초-저 부착 표면 6 웰 플레이트(Corning) 상으로 플레이트된다. 플레이트는 정상산소 CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 48시간 동안 인큐베이터에 놓아두어 배아체 형성을 가능하게 한다(0-2일). 각 웰에서 배지 및 세포는 그 다음 수집되고, 120-300g에서 3분 동안 원심분리된다. 상청액의 절반은 제거되고, 50 ng/ml bFGF를 함유하는 2ml의 BV-M으로 교체된다. 따라서, 세포 현탁액에서 bFGF의 최종 농도는 약 25mg/ml이며, 4ml의 세포 현탁액은 초-저 부

착 표면 6 웰 플레이트의 각 웰 상으로 플레이팅되고, 다시 48시간(Days 2-4일) 동안 정상산소 CO<sub>2</sub> 인큐베이터에 놓아두어 지속적인 배아체 형성을 가능하게 한다. 4일째에, 배아체는 15ml 튜브에 수집되고, 120-300 x g에서 2분 동안 원심분리되며, D-PBS로 세척되고, StemPro Accutase(Gibco)를 사용하여 단일 세포 현탁액으로 나누어진다. FBS(Hyclone)는 아큐타제(Accutase)를 불활성화시키기 위해 사용되고, 단일 세포는 세포 여과기 통해 통과되며, 원심분리되고, 약 1 x 10<sup>6</sup> cells/ml로 Stemline II 배지(Sigma)에서 재현탁된다. 약 3 x 10<sup>6</sup> 세포는, 30ml의 Methocult BGM 배지[MethoCult™ SF H4536 (no EPO)(StemCell Technologies); penicillin/streptomycin(Gibco); ExCyte Cell Growth Supplement (1:100) (Millipore); 50 ng/ml Flt3 ligand(PeproTech); 50ngm/ml VEGF(Humanzyme); 50 ng/ml TPO(PeproTech); 30 ng/ml bFGF(Humanzyme)]에서 혼합되고, 초-저 부착 표면 10 cm 접시(Corning) 상에 플레이팅되며, 정상산소 CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 7일(4-11일) 동안 인큐베이션되어 혈관모세포의 형성을 가능하게 한다. 11일째에, 혈관모세포는 이식 및/또는 추가 시험을 위해 수확된다. 혈관모세포는 메틸셀룰로오스를 D-PBS(Gibco)로 희석시켜 수집된다. 세포 혼합물은 300 x g에서 15분 동안 2회 원심분리되고, 30ml의 EGM2 BulletKit 배지(Lonza) 또는 Stemline II에 재현탁되며, 세포는 전술된 바와 같이 계수되고 동결된다.

[0214] 실시예 7A: 3D 바스큘로노이드 분화 플랫폼은 혈관 전구 특성을 갖는 세포를 발생

[0215] 실시예 2에 기재된 바와 같이, Meso-VPCs는 5일 동안 정상산소 조건(37°C, 5% CO<sub>2</sub> 및 20% O<sub>2</sub>)하에서 2개의 다른 3D 분화 프로토콜(Meso-3D Vasculonoid VPC1 및 Meso-3D Vasculonoid VPC2)을 사용하여 발생된다(도 3). 시딩된 중배엽 세포는, 생존 가능한 상태로 유지되고, 빠르면 1일째에 세포 응집체를 형성한다(데이터는 나타내지 않음). 이들 세포 응집체(이하 "바스큘로노이드"라고 함)는, 5일째에 크기가 증가하고(도 5; 상단 패널), 이 시점에서 수확된다. Meso-3D Vasculonoid VPC1 프로토콜은, Meso-3D Vasculonoid VPC2 프로토콜에 비해 더 큰 바스큘로노이드 응집체를 생성시킨다. 세포 수확 후, 세포는, 내피 계통으로의 추가 분화를 겪을 수 있는 이들의 능력을 결정하기 위해 FN 코팅된 플레이트에 재-플레이팅된다. 도 5의 중간 패널에서 나타난 바와 같이, 세포가 내피 분화를 촉진하는 배지에서 FN 코팅된 플레이트에서 배양되는 경우, 이들은 내피 세포의 통상적인 조약돌 모폴로지를 획득한다. Meso-3D VPCs는 또한 매트릭셀에 대해 네트워크와 같은 모세관의 형성을 위한 강력한 능력을 나타내고, AcLDL 흡수를 나타냈다(도 5, 하단 패널). VPC2 세포는 VPC1 세포에 비해 더 높은 관 형성(tube formation)에 대한 능력을 나타냈다(도 5; 하단 패널).

[0216] 부가하여, 혈관 마커에 대한 FACS 분석은, J1 및 GMP1-유래 Meso-3D Vasculonoid VPC1 및 VPC2 세포 모두가 내피 마커 KDR, CD31 뿐만 아니라 내피/혈관주위세포(CD146)의 강력한 발현(>20%)(도 6a) 및 조혈 마커 CD43의 낮은 발현을 나타냄을 보여준다. 이들의 광범위한 혈관 마커 발현 프로파일은, 미분화된 다능성 줄기 세포(GMP1 및 J1) 또는 HUVEC 세포에서 관찰된 발현 프로파일 및 다른 PSC 유래 세포(예를 들어, HB 및 HE)에서 관찰된 발현 프로파일과 구별된다(도 6b-c). 이러한 분화된 세포의 염색체 안정성은, G-밴딩 핵형 분석(G-banding karyotype analysis)에 의해 수행되며, 세포는 Meso-3D Vasculonoid VPC1 및 Meso-3D Vasculonoid VPC2 프로토콜을 통한 hES 및 hiPS 세포의 분화가 분화 동안에 염색체 안정성을 변경하지 않음을 나타내는 정상 핵형을 나타낸다(데이터는 나타내지 않음).

[0217] 실시예 7B: 2D 분화 플랫폼은 혈관 전구 특성을 갖는 세포를 발생

[0218] 실시예 3에 기재된 바와 같이, Meso-VPCs는, 총 7일 동안 정상산소 및 저산소증 배양 조건하에서 iPS 세포(GMP1) 및 hES 세포(J1)로부터 2개의 다른 2D 분화 프로토콜(Meso-2D VPC2 및 Meso-2D VPC3)을 사용하여 발생된다(도 4). 콜라겐 IV 코팅된 표면에 부착된 시딩된 중배엽 세포는, 2D 분화된 부착 세포 배양물로서 7일(수확일)까지 더 크게 밀집된 세포 콜로니로 성장 및 증식된다(도 7 상단 패널). Meso-2D VPC2 프로토콜은, J1 및 GMP1-유래 세포 모두에 대해 Meso-2D VPC3 프로토콜에 비해 더 밀집된 세포 콜로니를 발생시킨다(콜로니는 더 "뽀족뽀족하거나" 또는 "뒤엉킴"). 7일째에 세포 수확 후 및 FN-코팅된 플레이트 상에서 추가 배양 및 내피 배양 배지에 노출시, 세포는, 조약돌 내피-유사 모폴로지(도 7; 중간 패널) 및 매트릭셀 및 AcLDL 흡수에 대한 모세관 유사 네트워크의 형성에 대한 능력(도 7; 하단 패널)을 포함하지만, 그러나, Meso-3D 세포보다 더 낮은 스케일(도 5 및 도 7 하단 패널들의 비교)로, 통상적인 혈관 전구 특성을 나타낸다.

[0219] 부가하여, 혈관 마커에 대한 FACS 분석은, J1 및 GMP1-유래 Meso-2D VPC1 및 VPC2 세포 모두가 CD146의 높은 발현, 내피 마커들 KDR, CD31의 강력한 발현(>20%) 및 PDGFRβ의 검출가능한(10-40%) 발현을 나타내는 것을 보여준다. 이러한 발현 프로파일은, 미분화된 다능성 줄기 세포 또는 HUVEC 세포에서 관찰된 발현 프로파일 및 다른 PSC 유래 혈관 전구 세포(예를 들어, HB & HE)에서 관찰된 발현 프로파일과 구별된다(도 6b 및 6c). Meso-3D 세

포와 비교하여, Meso-2D VPCs는, 더 높은 수준의 CD146 및 고유 발현의 PDGFR을 발현시켜 혈관주위세포 분화에 대한 더 높은 경향을 시사한다(도 6a-b). 게다가, Meso-3Ds와 달리, Meso-2D VPCs는, 혈액 마커 CD45 또는 CD43 중 어느 하나를 발현시키지 않는다.

[0220] 실시예 8: 단일 세포 miRNA 프로파일

[0221] 다능성 또는 혈관 세포 동일성과 관련된 96 microRNA의 발현의 수준을 평가하기 위해 단일 세포 qRT-PCR 분석을 사용한 부가적인 분석은 하기에 기재된 대로 수행된다. TaqMan 유전자 발현 분석(Applied Biosystems)은 96개의 인간 miRNAs에 대해 주문된다. 10X 분석은 25  $\mu$ l의 20X Taqman 분석을 25  $\mu$ l의 2X 분석 로딩 시약(Fluidigm)과 혼합하여 50  $\mu$ l 부피의 최종 스톱에 대해 준비된다. 66,000 내지 250,000 cells/ml의 범위에서 (동결 또는 새로 이 수확된) 세포의 분취량은 준비된다. 세포들은 실온에서 10분 동안 LIVE/DEAD 염색 용액(LIVE/DEAD 생존력/세포독성 키트)과 함께 인큐베이션된다. 세포는 그 다음 세척되고, 배지에 현탁되며, 40  $\mu$ m 필터를 통해 여과된다. 세포 계수는 세포 계수기를 사용하여 생존력 및 세포 농도에 대해 수행된다. 세포 혼합물은 세포(60  $\mu$ l)와 현탁액 시약(40  $\mu$ l)(Fluidigm)을 3:2의 비율로 혼합시켜 제조된다. 6  $\mu$ l의 세포 현탁액 혼합물은, 중간 세포(10-17  $\mu$ m) 또는 대형 세포(17-25  $\mu$ m)에 대한 프라이밍된 C1 Single-Cell Autoprep IFC 미세유체 칩 상에 로딩된 다음, 상기 칩은 "STA: Cell Load(1782x/1783x/1784x)" 스크립트(script)를 사용하여 Fluidigm C1 기기에서 처리된다. 본 단계에서는 96개의 캡처 챔버(capture chambers) 각각에서 하나의 세포를 캡처한다. 상기 칩은 그 다음 Keyence Microscope로 옮겨지고, 각 챔버는 스캔되어 세포의 생/사 상태, 캡처된 이중(doublet)/세포 응집체 및 단일 세포 캡처의 수가 기록된다. C1에 대한 세포 용해, 역전사, 및 전증폭을 위해, Harvest 시약, Lysis 최종 혼합물, RT 최종 혼합물 및 Preamp 혼합물은, 제조업체의 프로토콜에 따라 C1 칩의 지정된 웰에 첨가된다. IFC는 그 다음 C1에 배치되고, "STA:miRNA Preamp(1782x/1783x/1784x)" 스크립트는 사용된다. cDNA 수확은 다음날 아침에 완료되도록 프로그래밍된다. cDNA는 C1 칩의 각 챔버에서 12.5  $\mu$ l의 C1DNA 희석 시약이 사전-로딩된 새로운 96웰 플레이트로 옮겨진다. 음성(no template) 대조군 및 양성 대조군과 같은 튜브 대조군은, 제조업체의 설명서에 따라 각 실험에 대해 준비된다. 사전증폭된 cDNA 샘플은, 96.96 Dynamic Array™ IFC 및 BioMark™ HD 시스템을 사용하여 qPCR에 의해 분석된다. JUNO 기기에서 IFC 프라이밍 처리 후 cDNA 샘플 혼합물의 로딩 및 10X 분석은 제조업체의 프로토콜에 따라 수행된다. IFC는 그 다음 Biomark™ HD 시스템에 배치되고, PCR은 프로토콜 "GE96x96 miRNA Standard v1.pcl"을 사용하여 수행된다. 데이터 분석은, Fluidigm에서 제공하는 실시간 PCR Analysis 소프트웨어를 사용하여 수행된다. 사멸 세포, 복제물 등은, 분석에서 제거되고, 선형 파생 기준선(Linear Derivative Baseline) 및 사용자 검출기 Ct 임계값(User Detector Ct Threshold) 기반 방법들은 분석을 위해 사용된다. 데이터는 히트맵 뷰에서 보고, CSV 파일로 이출된다(exported). "R" 소프트웨어는 그 다음 "FSO" 파일을 결과하는 "Outlier Identification" 분석을 수행하기 위해 사용된 다음, "Automatic Analysis"에 대한 설명서를 따른다.

[0222] 결과

**표 1**

miRNA 프로파일

[0223]

	J1	HB	HE	2D VPC2	2D VPC3	3D VPC1	3D VPC2	HUVEC
다능성								
367	+	-	-	-	-	-	-	-
302 a	+	-	-	-	-	-	-	-
302 b	+	-	-	-	-	-	-	-
302 c	+	-	-	-	-	-	-	-
혈관								
126	-	+	+	+	+	+	+	+
125a-5p	-	-	+	+	+	+/-	+/-	+
24	-	+	+	+	+	+	+	+
99a	-	-	-	-	-	-	-	+
Let 7b,d,e	-	-	-	-	-	-	-	+
고유								
223	-	+	-	-	-	+/-	+/-	-
142-3p	-	+	-	-	-	-	-	-
133a			+					

483-5p	-	-	-	+	+	+	+	-
--------	---	---	---	---	---	---	---	---

[0224] 표 1에 나타난 바와 같이, MESO-VPCs(3D 또는 2D)는, 다능성 줄기 세포 miRNA 마커(mir376, mir302a, mir302b 및 mir 302c)에 대해 음성이고, mir126, mir125a-5p 및 mir24와 같은 HUVEC에서 발현되는 내피 miRNA 마커에 대해 양성이다. 여전히, MESO-VPCs는 HUVEC 특이적 miRNA(mirLet7-e, mir223 및 mir99a)에 대해 음성이다. 마지막으로, MESO-VPCs는, miRNA 483-5P의 고유 발현을 나타내고, HB 및 HE 고유 miRNA인 mir142-3p 및 133a에 대해 각각 음성이다.

[0225] 실시예 9: 뒷-다리 허혈 모델에서 생체내 연구

[0226] 말초 동맥 질환(PAD)은, 사지, 보통 다리에 혈액 공급이 부분적으로 또는 전체적으로 차단되어 조직의 혈류 장애 및 저산소증으로 이어지는, 말초 혈관 질환(PVD)의 한 형태이다. PAD가 진행되는 경우, 이것은 피부 궤양, 괴저, 및 불가피한 절단이 있는 중증 사지 허혈(CLI)의 단계에 도달한다. 뒷다리 허혈 동물 모델은, 다양한 치료 접근법을 평가하는데 사용된다. 본 연구에서, 안정적인 중증 허혈성 모델(Ishikane et al. (2008) Stem Cells, 16:2625-2633)은, meso-VPCs의 효능을 평가하고, 허혈성 사지에서 혈류 회복 및 공여 세포 통합(cell incorporation)의 징후에서 개선을 입증하기 위해 사용된다. 마우스에서 뒷다리 허혈의 유도는, 장골 및 대퇴 동맥의 근위 말단의 두 결찰(ligations) 및 두 결찰들 사이에 이의 절개를 포함한다. 수술은 혈류를 방해하고 결과적으로 중증 허혈성 손상을 일으킨다.

[0227] 종(Species)

[0228] 그룹 평균 체중의 +/- 20%의 범위 내에 최소 및 최대 체중을 갖는 연구 개시 시점에서 6-8주령의 마우스 /Balb/c01aHsd-Foxn1<sup>tm</sup> (Charles River Laboratories)

[0229] 시험 물질(Test Articles)

[0230] 시험 항목 1 = 실시예 3에 따라 제조된 J1-HDF Meso-2D VPC2

[0231] 시험 물질 2 = 실시예 2에 따라 제조된 J1-HDF Meso-3D Vasculonoid VPC2

[0232] 시험 물질 3 = 실시예 3에 따라 제조된 GMP-1-HDF Meso-2D VPC2

[0233] 시험 물질 4 = 실시예 2에 따라 제조된 GMP1-HDF Meso-3D Vasculonoid VPC2

[0234] 시험 물질 5 = 실시예 2에 따라 제조된 GMP1-HDF Meso-3D Vasculonoid VPC1

[0235] 비히클(음성 대조군)

[0236] GS2(WO 2017/031312호에 기재된 무-세포 배지, 이의 전체적인 내용은 여기에 참조로서 혼입됨)[GS2 552.2ml의 경우: 0.9% Sodium Chloride Irrigation USP(Baxter Healthcare 또는 Hospira)(408.6ml); 5% 글루코스/0.9% 염화나트륨, 주사제 USP(Baxter 또는 Braun)(33.2ml), 및 BSS Irrigation Solution(Alcon)(110.4ml)]

[0237] 연구 설계 및 시각표

[0238] 연구는 하기 연구 설계(표 2) 및 시각표(표 3)에 따라 수행된다.

**표 2**

연구 설계

[0239]

그룹	치료	투여량	투여의 경로	동물의 수(동물 번호)	종료
----	----	-----	--------	--------------	----

1M	모조-수술	N/A	N/A	(19, 20, 39, 40, 59, 60, 79, 80, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105)	36일
2M	비히클	100 $\mu$ l	IM	(13, 14, 15, 16, 17, 18, 54, 55, 56, 57, 58, 77, 78, 97, 98)	
3M	시험 물질 1		IM	(61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 76, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96)	
4M	시험 물질 2		IM	(69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 81, 82, 83, 84, 85, 87, 88, 89)	
5M	시험 물질 3		IM	(1, 2, 3, 4, 5, 9, 10, 11, 12, 21, 22, 23, 24, 25, 26)	
6M	시험 물질 4		IM	(6, 7, 8, 36, 37, 38, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53)	
7M	시험 물질 5		IM	(27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 41, 42, 43, 44)	

[0240] IM = 허혈성 사지에 국소 근육내 주사

**표 3**

[0241] 시각표

연구일	절차	희생
치료 전 및 그 후 일주일에 한 번	체중	
0일	HLI 수술	
0일	시험 물질 IM 주사	
HLI 수술 전후 및 7, 14, 21, 28 및 35일차	혈류 측정	
7일, 21일 및 35일차	혈관 이미징(imaging)	
7일, 14일, 21일, 28일 및 35일차	사지 기능 및 사지 괴사 평가	
주 2회	임상 점수	
35일차	사지 괴사의 임상 평가(규모별)	
36일차		비복근 채취

[0242] 실험 절차

[0243] 질병률(Morbidity) 및 사망률 관찰

[0244] 동물은 수술 당일 및 그 후 하루에 두 번(주말 동안 하루에 한 번) 지속적으로 모니터링된다.

[0245] 체중

[0246] 체중은 치료 전 및 치료 후 일주일에 한 번 기록된다.

[0247] HLI 수술 절차

[0248] 마취 및 무통 하에, 마우스는 복부 쪽이 위로 향하도록 놓인다.

[0249] 수술 당일(0일)에, 우측 뒷-다리의 사타구니 부위의 피부는 절개된다. 대퇴 동맥은 6-0 실크 실로 두 번 결찰되고, 두 결찰들 사이에서 절단된다. 상처는 5-0 비크릴(Vicryl) 흡수성 실로 봉합되고 마우스는 회복된다.

[0250] 시험 물질 관리 절차

[0251] 수술 직후 0일에, 각 동물은 수술 상처의 근위측 및 원위측의 2개 부위에 근육내 주사된다. 동물은 각 부위에 50 $\mu$ l, 동물당 총 100 $\mu$ l가 주사된다. 마우스당 총량은 1 M cells/mouse이다.

[0252] 혈류 측정 절차

[0253] 각 마우스에 대한 양 다리에서 혈류는 선정 기준으로 수술 전, 수술 직후, 및 치료 직전에 비-접촉 Peri-Med LASER Doppler로 측정됨(혈류가 손상되지 않은 다리와 비교하여 적어도 30% 감소된 동물만 포함됨) 및 연구 일 수: 수술 후 7, 14, 21, 28 및 35일. 혈류 측정은 수술 후 허혈성 사지에서 혈류 대 정상 사지의 혈류의 비 및 우측 사지의 혈류 대 좌측 사지의 혈류의 비로 표현된다.

[0254] 혈관 이미징 절차

[0255] 3개의 시점(수술 후 7, 21 및 35일) 동안 그룹당 3마리의 마우스에 대한 양 다리(대퇴부 및 경골 부위)의 혈관 이미징은 RSOM Explorer P50"(i-Thera Medical) 이미징 시스템으로 측정된다. RSOM(Raster Scanning Optoacoustic Mesoscopy) Explorer P50은, 구형으로 초점이 맞춰진 50 MHz 검출기 및 532 nm에서 나노초 레이저 펄스를 이용한 조명으로 작동한다. 80초의 획득 시간은, 5x5mm의 시야, 3mm의 침투(penetration) 및 40µm/10µm의 축방향/외측 해상도의 이미징을 가능하게 한다.

[0256] 허혈 중증도 절차의 육안 평가

[0257] 허혈성 사지의 육안 평가는, 표 4에 따른 괴사 면적에 대한 형태학적 등급을 사용하여 수술 후 7일부터 시작하여 매주 수행된다(Goto et al. Tokai J. Exp. Clin. Med. 2006. 31:128-132, 참조).

**표 4**

[0258] 괴사 부위의 형태학적 등급

등급	설명
0	괴사의 부재
1	발가락에 국한된 괴사(발가락 소실)
2	발등까지 확장되는 괴사(발 소실)
3	다리까지 확장되는 괴사(무릎 소실)
4	허벅지까지 확장되는 괴사(뒷-다리 전체 소실)

[0259] 사지 기능 절차(limb function procedure)의 생체내 평가

[0260] 허혈성 사지의 손상된 사용에 대한 반-정량적 평가는, 표 5에서의 다음의 척도를 사용하여 수술 후 7일부터 시작하여 매주 수행된다(Stabile et al. Circulation. 2003. 108:205-210, 참조).

**표 5**

[0261] 사지 기능의 평가

등급	설명
0	꼬리의 부드러운 견인에 저항하기 위해 발가락을 굽힘
1	발바닥 굽힘
2	끌기 없고 발바닥 굽힘 없음
3	발 끌기

[0262] 사지 기능은 부분 또는 전체 사지 절단의 경우에 "해당 없음" 또는 "N/A"로 등급이 매겨진다. 이러한 경우에, 혈류 측정은 통계 분석에 포함되지 않는다.

[0263] 동물 희생 및 조직 고정(tissue fixation)

[0264] 36일째에, 마우스는 희생된다. 양쪽 뒷-다리의 비복근은 수집되고, 포르말린에 고정되며, 파라핀에 포매된다(그룹당 5마리 동물). 그룹당 3마리의 동물로부터, 근육은 OCT 포매되고, 냉동되며, 추가 배송(shipment)을 위해 저장된다. 포매된 근육 샘플은 절단되고, H&E + IHC Isolectin B4-HRP 접합으로 염색되며 병리학자에 의해 평가된다. 인간 특이적 항체(Stem 121)에 대한 IHC는, 조직에서 인간 세포의 존재에 대해 수행된다. CD34에 대한 ICH 염색 및 혈관 밀도 평가는 수행된다.

[0265] 결과

[0266] 사망률

[0267] 연구 기간 동안 14마리의 동물은 사망했다. 그 중: 한 마리의 마우스는 수술 동안에 사망했다. HLI 수술 후 11일 이내에 13마리의 마우스는 이들의 케이지에서 사망한 채로 발견된다. 그 중: 그룹 1M으로부터 마우스 번호: 19, 40, 99, 100 및 101; 그룹 2M으로부터 마우스 번호 97; 그룹 4M으로부터 마우스 번호: 69, 72, 88 및 89; 그룹 6M으로부터 마우스 번호: 38 및 50; 그룹 7M으로부터 마우스 번호 28. 20마리의 마우스는 다리 절단으로 인한 인본주의적 이유로 안락사되었다(그룹 2M으로부터 마우스 번호: 58 및 98; 그룹 3M으로부터 마우스 번호: 61, 63, 64, 90, 91, 92, 93 및 95; 그룹 4M으로부터 마우스 번호: 81; 그룹 5M으로부터 마우스 번호 21, 그룹

6M으로부터 마우스 번호: 36, 37, 47 및 53, 그룹 7M으로부터 마우스 번호: 29, 30, 32 및 34. 각 시점에서 생존한 모든 동물은 그 시점에서 평가된다.

[0268]

체중

[0269]

체중은 연구 35일까지 모니터링된다. 체중은 수술 후 첫 주 동안에 감소했지만, 2 주 동안에 회복되기 시작하여 마지막 주에는 거의 완전한 회복에 도달했다. 모든 동물 그룹은 동시에 회수된다. GraphPad Prism 5 소프트웨어를 사용하여 수행된 Bonferroni 사-후 비교가 수반되는 이-원 분산분석(ANOVA)은 모든 그룹 사이에 체중에서 통계적으로 유의한 차이를 나타내지 않는다.

[0270]

혈류 측정

[0271]

혈류는 시험 항목 처리 전에 평가되며, 현저한 변화는 그 후 모든 수술된 동물에서 관찰된다. 혈류에서 상당한 개선은, 비히클 처리된 그룹(2M)과 비교하여 모든 처리된 그룹(3-7M)에서 연구 전반에 걸쳐 관찰된다. 이러한 개선은 그룹 3M의 경우 21일째부터 및 다른 처리된 그룹의 경우 28일부터 35일까지 우측 수술된 다리에 대해 통계적으로 유의하다(이-원 ANOVA에 이은 Bonferroni 다중 비교)(도 8).

[0272]

혈관 이미징

[0273]

3개의 시점(수술 후 7, 21 및 35일) 동안 그룹당 3마리의 마우스에 대해 양쪽 다리(대퇴부 및 경골 부위)에서 혈관 이미징은 RSOM Explorer P50(i-Thera Medical) 이미징 시스템을 사용하여 측정된다.

[0274]

여러 분석 방법들은 허혈성 뒷다리에서 소혈관 밀도에서 가능한 증가를 평가하기 위해 사용된다. 마지막으로, 100개의 최고 섹션(highest section)의 통합은 혈관 신생을 보다 안정적으로 보기 위해 사용된다. 결과는 7일의 퍼센트로서 35일의 요약으로 제시된다. 데이터를 보다 명확하게 하기 위해, 모든 그룹의 평균은 비히클 그룹으로부터의 증가 또는 감소와 비교하여 제시된다. 비히클 처리 그룹(2M)과 비교하여, 소혈관 밀도에서 개선은 처리 그룹(3, 4, 6 및 7M)에서 연구 전반에 걸쳐 관찰된다(도 9).

[0275]

허혈성 중증도의 육안 평가

[0276]

허혈성 사지는 괴사 면적에 대한 등급 형태학적 척도(graded morphological scale)를 사용하여 7일부터 35일까지 육안으로 평가된다. 발 절단은 모든 그룹의 동물에서 관찰되며, 그룹 4M 및 5M에서 가장 낮았다(표 6 및 7 참조).

**표 6**

[0277]

7일째에 사지 괴사 점수 0, 1 및 2인 마우스의 발생률

그룹	사지 괴사 점수 0인 마우스의 퍼센트	사지 괴사 점수 1인 마우스의 퍼센트	사지 괴사 점수 2인 마우스의 퍼센트
2M 비히클	64.3	35.7	0
3M TI1	37.5	37.5	25.0
4M TI2	36.4	63.6	0
5M TI3	86.6	6.7	6.7
6M TI4	64.3	35.7	0
7M TI5	91.7	8.3	0

**표 7**

[0278]

35일째에 사지 괴사 점수 0, 1 및 2인 마우스의 발생률

그룹	사지 괴사 점수 0인 마우스의 퍼센트	사지 괴사 점수 1인 마우스의 퍼센트	사지 괴사 점수 2인 마우스의 퍼센트
2M 비히클	35.8	50.0	14.2
3M TI1	25.0	25.0	50.0
4M TI2	27.3	63.6	9.1
5M TI3	60.0	33.3	6.7
6M TI4	23.0	38.5	38.5
7M TI5	16.7	50.0	33.3

[0279] 사지 기능의 평가

[0280] 허혈성 사지의 사용 장애에 대한 반-정량적 평가는, 등급 기능 척도(graded functional scale)를 사용하여 7일부터 35일까지 수행된다. 사지 기능에서 자발적인 개선은 모든 동물 그룹에서 발견된다. 그럼에도 불구하고, 그룹 4M 및 5M에서 시험 항목으로 처리된 동물은, 비히클 처리된(2M) 대조군에 비해 더 나은 기능 개선을 나타냈다(표 8 및 9 참조).

**표 8**

[0281] 7일째에 사지 기능 점수 0, 1, 2 및 3인 마우스의 발생률

그룹	사지 기능 점수 0인 마우스의 퍼센트	사지 기능 점수 1인 마우스의 퍼센트	사지 기능 점수 2인 마우스의 퍼센트	사지 기능 점수 3인 마우스의 퍼센트
2M 비히클	0	0	71.4	28.6
3M TI1	0	8.3	25.0	66.7
4M TI2	0	0	18.2	81.8
5M TI3	0	14.3	50.0	35.7
6M TI4	0	7.1	78.6	14.3
7M TI5	0	0	66.7	33.3

**표 9**

[0282] 35일째에 사지 기능 점수 0, 1, 2 및 3인 마우스의 발생률

그룹	사지 기능 점수 0인 마우스의 퍼센트	사지 기능 점수 1인 마우스의 퍼센트	사지 기능 점수 2인 마우스의 퍼센트	사지 기능 점수 3인 마우스의 퍼센트
2M 비히클	33.3	41.7	25.0	0
3M TI1	44.4	44.4	11.2	0
4M TI2	20.0	70.0	10.0	0
5M TI3	64.3	35.7	0	0
6M TI4	40.0	50.0	10.0	0
7M TI5	25.0	37.5	37.5	0

[0283] 조직학 결과

[0284] 모든 슬라이드는 H&E 및 Masson Trichrome 염색으로 염색되며, 한명의 병리학자에 의해 검사된다. 이러한 평가는 반-정량적 분석으로 수행된다(아래 등급 참조). CD34<sup>+</sup> 고-해상도 조직학 사진은 정량적 이미지 분석을 위해 전송된다.

[0285] 근육 위축 등급:

[0286] 0 = 위축이 전혀 없음.

[0287] 1 = 매우 약한 위축(근육 섬유율의 최대 10%)

[0288] 2 = 가벼운 위축(근육 섬유율의 >10% 및 <25%)

[0289] 3 = 중등도 위축(근육 섬유율의 >25% 및 <75%)

[0290] 4 = 중증도 위축(근육 섬유율의 >75% 및 <100%)

[0291] 염증(대식세포 및 위성 세포(Satellite cells)) 등급:

[0292] 0 = 염증성 침윤(inflammatory infiltration)이 전혀 없다.

[0293] 1 = X20 HPF당 최대 10개 세포의 증가와 함께 약한 세포 침윤.

[0294] 2 = X20 HPF당 10-20개 세포의 증가로 중간 정도의 세포 침윤.

- [0295] 3 = X20 HPF당 20-50개 세포의 증가로 높은 세포 침윤.
- [0296] 4 = X20 HPF당 >50개 세포의 증가로 매우 높은 세포 침윤.
- [0297] 모든 동물 그룹에서, 근육 섬유에서 중등도 내지 중증도 위축은 관찰된다. 근세포의 퇴행성 지방 변화와 위성 세포 및 대식세포의 증가는 관찰된다. 몇몇 경우에, 섬유 조직 및 림프구 침윤의 현저한 증가가 있다. 몇몇 동물은 또한 약간의 영양실조 무기질 침착(dystrophic mineralization)을 나타냈다. 그룹 2M 및 3M은 그룹 4M, 5M 및 6M에 비해 일반적으로 더 심각한 변화를 나타냈다. 그룹 7M은 중간 변화를 나타냈다.
- [0298] 면역조직화학 및 모세혈관 밀도의 분석
- [0299] 염색된 부분은 평가되고, CCD 카메라(DMX1200F, Nikon)에 연결된 Plan Fluor 대물렌즈가 장착된 형광 현미경(E600; Nikon, Tokyo, Japan)으로 사진이 촬영된다. Cy3은 밝은 적색 형광: Ex(max): 543nm; Em(max): 570nm를 나타내는 반면, 플루오레세인 Dextran은 강렬한 녹색 형광(Ex(max): 488nm; Em(max): 530nm)을 나타낸다. 디지털 이미지는 수집되고, Image Pro+ 소프트웨어를 사용하여 분석된다. 근육 샘플의 두 부분은, 그룹 1M 및 7M으로부터의 5마리 동물에서 동일한 부위에서 채취된다. 혈관의 면적은 측정된다. 밀도는 시야당 평균 모세관의 수로 표현된다. 총 혈관은 측정 면적에서 모든 혈관을 나타낸다. CD-34 양성 모세혈관의 수는, 연구의 36일째에 대조군 2M에 비해 모든 처리된 그룹에서 더 많았다. CD-34 양성 염색은, 작은 모세혈관 형성에 대한 징후로 간주되며, 따라서 얻어진 결과는 세포로 처리된 동물 그룹에서 관찰된 혈류 개선을 뒷받침한다. 레이저 도플러로 측정된 혈류와 모세혈관 밀도 사이에는 통계적으로 유의한 강한 상관관계가 있다(도 10 및 11 참조).
- [0300] 논의
- [0301] 허혈성 사지에 대한 시험 물질의 IM 투여는, 주로 치료된 그룹 4M 및 5M에서, 사지 기능의 약간의 개선, 혈류에서 개선(레이저 도플러를 통해 모니터링), RSOM 이미징에서 개선 및 혈관의 정량적 조직학에서 개선을 나타냈다. 치료는 비허혈 치료된 대조군과 비교하여 모든 치료된 그룹에서 연구의 종료일(36일째)까지 혈액 관류를 회복시켰다(최고의 그룹 - 4M - 정상 값의 최대 78%). 이러한 혈액 관류 회복은, RSOM 이미징 분석의 결과 및 수술된 뒷-다리에서 모세혈관 밀도에 대한 면역조직화학 결과와 매우 상관관계가 있다. 그룹에 대한 평가는 4M이 최고임을 나타내며, 6M과 7M이 그 뒤에 근접한다. 비복근 파라핀-포매된 슬라이드의 STEM 121 염색은, 인간 줄기-세포를 나타내지 못했지만, 이들은 주사 부위에 더 가까운 대퇴사두근에서 가시화된다.
- [0302] 실시예 10: Meso-3D Vasculonoid VPC2 세포의 벌크 소형 RNA-seq 분석
- [0303] Meso-3D Vasculonoid VPC2 세포는 실시예 2에 따라 발생된다. 약 1-2백만 세포의 펠렛은 용해되고, RNA를 분리하고, 시퀀싱하며, 생물정보학적으로 정렬되고, 알려진 인간 전사체(약 2000 miRNAs)에 걸쳐 소형 RNA 발현에 대해 분석된다. 도 12a는, J1 세포의 개체군 및 J1-유래 HE 세포의 개체군과 비교한, hsa-miR-3917, hsa-miR-450a-2-3p, 및 hsa-miR-542-5p를 포함한, 3개의 복제물로부터의 J1-유래 Meso-3D Vasculonoid VPC2 세포의 개체군에서 발견되는 고유 인간 miRNAs를 나타낸다. 도 12a는 또한, hsa-miR-11399, hsa-miR-196b-3p, hsa-miR-5690, 및 hsa-miR-7151-3p를 포함하는, J1-유래 HE 세포의 개체군에서 발견되는 고유 인간 miRNAs를 나타낸다.
- [0304] 부가적으로, 벌크 소형 RNA-seq 분석은, miR 214가 J1-유래 HE 및 Meso-3D Vasculonoid VPC2 세포 모두에서 높은 수준으로 발현되고, miR 335-5p가 J1 및 J1-유래 HE 세포에서 높은 수준으로 발현되는 반면, miR 335-3p는 J1-유래 HE 및 Meso-3D Vasculonoid VPC2 세포에서 높은 수준으로 발현되는 것을 나타낸다. 유사하게, miR 199a-3p는, J1-유래 HE 및 Meso-3D Vasculonoid VPC2 세포 모두에서 더 높은 수준으로 발현된다(데이터는 나타내지 않음).
- [0305] 도 12b는, 단일 세포에 대해 이전에 분석된 J1-유래 Meso-3D Vasculonoid VPC2 세포의 개체군에서 miRNAs의 발현 수준을 나타낸다. 도 12b는, hsa-miR-126-5p, hsa-miR-125a-5p, 및 hsa-miR-24-3p가 J1 세포의 개체군 및 J1-유래 Meso-3D Vasculonoid VPC2 세포의 개체군 모두에서 발현되는 것을 나타낸다. 도 12c는, J1-유래 Meso-3D Vasculonoid VPC2 세포의 개체군이 hsa-let-7e-5p, hsa-miR-99a-5p, hsa-miR-223-5p, 및 hsa-miR-142-3p를 발현시키고, hsa-let-7e-3p, hsa-miR-99a-3p, 및 hsa-miR-133a-5p를 발현시키지 않거나 낮은 발현을 갖는 것을 나타낸다. 도 12d는 또한 J1-유래 Meso-3D Vasculonoid VPC2 세포의 개체군이 hsa-miR-483-5p 및 hsa-miR-483-3p를 발현시키는 것을 나타낸다.
- [0306] 실시예 11: Meso-3D Vasculonoid VPC2 세포의 단일 세포 RNA-seq 분석
- [0307] 단일 세포 RNA-seq 분석은 또한 실시예 2에 따라 발생된 J1-유래 Meso-3D Vasculonoid VPC2 세포에 대해 수행된다. 각 세포 타입(J1 세포, J1-유래 Meso-3D Vasculonoid VPC2 세포 및 HUVEC)에 대해 약 3,700-8,000개의

단일 세포는, 10X Genomics(Pleasanton, CA) 플랫폼 및 이의 Cell Ranger 분석 파이프라인을 사용한 단일 세포 시퀀싱을 위해 캡처되고, 처리되며, 분석된다. 추가 데이터 QC 및 분석은, R 패키지 Seurat를 사용하여 수행된다(Butler et al., Nature Biotechnology 36:411-420 (2018); Stuart et al., Cell 177:1888-1902 (2019)). 이러한 분석 중 하나는, J1 세포, J1-유래 Meso-3D Vasculonoid VPC2 세포 및 HUVEC의 통합 분석을 수행하여 3개의 샘플 중 상위 차등 발현 유전자를 동정하는 것이다. 이러한 분석은, Stuart et al., Cell 177:1888-1902 (2019) 및 또한 [https://satijalab.org/seurat/v3.0/pancreas\\_integration\\_label\\_transfer.html](https://satijalab.org/seurat/v3.0/pancreas_integration_label_transfer.html)에 기재된 지침을 따른다. 10개 이상의 세포에서 발현된 유전자 및 적어도 200개의 검출된 유전자가 있는 세포만이 분석에서 유지된다. 도 13은, 단일 J1 또는 HUVEC 세포와 비교하여 J1-유래 Meso-3D Vasculonoid VPC2 세포 샘플에서 가장 상향- 또는 하향-조절된 유전자의 발현을 나타낸다.

[0308] 실시예 12: 바스쿨로노이드는 시험관내에서 증가된 세포 생존율을 나타내고 생체내에서 효능을 나타냄

[0309] J1-유래 Meso-3D Vasculonoid VPC2 세포의 바스쿨로노이드는 실시예 2에 따라 발생되지만, 세포가 단일 세포로 분리되지 않고 동결보존되어 세포가 응집된 형태를 유지한다.

[0310] 약 150개의 분리되지 않은 Meso-3D Vasculonoid VPC2(약 1,500,000개의 분리된 단일 세포에 해당)는 1:1 비의 콜라겐 I 및 성장 인자-감소된 매트릭스에서 혼합되고, 96-웰 플레이트의 4개 웰에 플레이팅된다. 웰은 37°C에서 30분 동안 응고시킨 다음, 20 ng/ml FGF, 25 ng/ml BMP4, 45 ng/ml VEGF, 및 10 μM SB431542가 보충된 50 μl 완전 VasuLife® 기본 배지(Lifeline® Cell Technology, Frederick, MD)로 덮여진다. 바스쿨로노이드는 14일 동안 배양된다. 웰은 4% PFA로 고정되고, 0.05% Triton-X로 최대 4시간 동안 투과되며, 인간 특이적 내피 세포 마커인, 로다민 접합 Ulex europaeus I(UEA1)로 밤새 염색된다. 웰은 철저히 세척되고 핵 마커인, DAPI로 대조염색된다(counterstained). 웰은 Leica SP8 공초점 현미경으로 이미지화된다. 도 14a는, 14일 후 J1-유래된 Meso-3D Vasculonoid VPC2 바스쿨로노이드들의 포매된 응집체로부터 연장되는 광범위한 혈관 네트워크를 저배율(10x 대물렌즈)에서 나타낸다.

[0311] 다음으로, 분리된(또는 "단일") 및 분리되지 않은(또는 바스쿨로노이드 또는 "복수") Meso-3D Vasculonoid VPC2 세포들은, 100 μl 배지에 조직 배양 처리된 96-웰 플레이트(웰당 약 14,000개의 단일 세포) 또는 초-저 부착 96-웰 플레이트(웰당 약 70개의 복수 세포 또는 바스쿨로노이드, 웰당 약 14,000개의 단일 세포에 해당)에 시딩된다. CLI-모방 조건(즉, 고혈당 및/또는 저산소증)을 시험하기 위해, 세포는, 대조군으로 5.5mM D-글루코스를 갖는 완전 VasuLife® 기본 배지(Lifeline® Cell Technology, Frederick, MD) 또는 고농도 글루코스(30mM)를 갖는 완전 VasuLife® 기본 배지로 72시간 동안 정상(20% O<sub>2</sub>) 또는 저산소(5% O<sub>2</sub>) 산소 조건에서 배양된다. 72시간 후, 상대 세포 생존율은, 제조사의 지시에 따라 45분 동안 100 μl의 CellTiter-Glo® 시약(Promega, Madison, WI)으로 각 웰을 인큐베이션하여 측정된다. 발광은 측정되고, 세포 생존율의 관독으로서 각 산소 조건에서 단일 세포 및 복수 세포 모두에 대해 5.5mM 대조군으로 정규화된다. 도 14b는, 이러한 바스쿨로노이드가 전술된 대로 해동 후 정상산소 상태(20% O<sub>2</sub>) 또는 저산소상태(5% O<sub>2</sub>) 하에 시험관내 CLI-모방 조건에서 배양된 경우, 바스쿨로노이드가 단일 세포로 냉동보존되었던 J1-유래 Meso-3D Vasculonoid VPC2 세포에 비해 더 나은 세포 생존율을 나타냄을 보여준다.

[0312] 생체내 효능을 시험하기 위해, GMP1-Meso3D VPCs는, 단일 세포(Meso3D sc; 동물당 총 100만개의 단일 세포)로서 또는 분리되지 않은 복수 세포 또는 바스쿨로노이드(Meso3D vasculonoid; 동물당 25,000개, 대략 동물당 총 100만개의 단일 세포에 해당)로서 실시예 9에 상세히 설명된 바와 같이 뒷다리 허혈을 유도한 후 Balb/c 누드 마우스(그룹당 n = 15)의 대퇴사두근으로 주사된다. 혈류는 수술 직후 및 그 후 64일차까지 매주 레이저 도플러 관류 이미징(LDPI)으로 평가된다. 도 14c는, 비히클 처리 그룹(GS2 배지만)과 비교된 연구 전반에 걸쳐 단일 세포 또는 바스쿨로노이드들의 투여 후 혈류에서 통계적으로 유의한 개선을 나타낸다; 이-원 분산분석 후 투키 검정.

[0313] 실시예 13: HLI 모델에서 Meso-3D Vasculonoid VPC2 세포의 장기간 효과

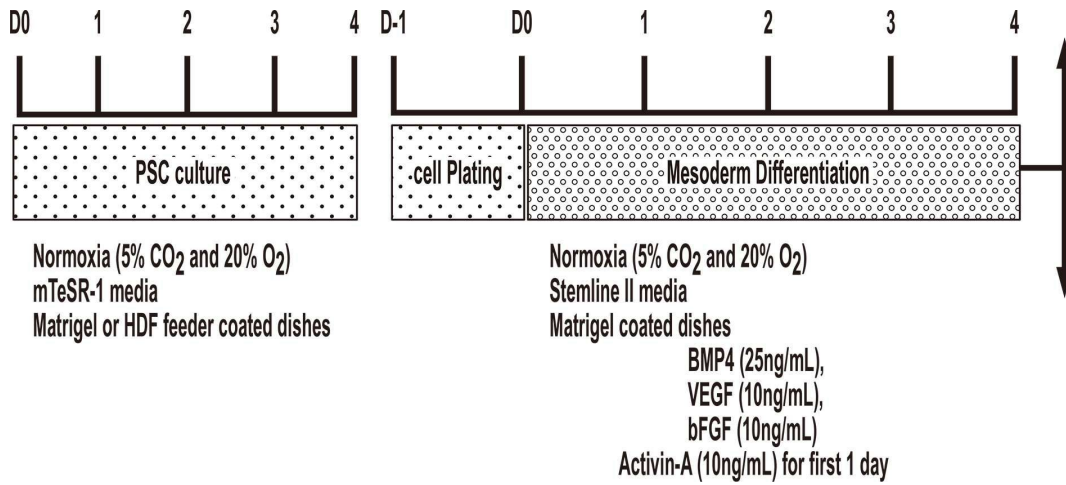
[0314] Meso-3D Vasculonoid VPC2 세포는 실시예 2에 따라 (분리된 단일 세포로서) 발생되고, 실시예 9에 기재된 HLI 동물 모델에 투여되며, 장기간 효과에 대해 관찰된다. 본 연구에서, 1백만개의 GMP1-유래 세포(GMP1 Meso3D vasculonoid VPC2, GMP1-HE, 및 GMP1-HB)는 HLI 수술 후 우측 대퇴사두근 내로 GS2 배지 또는 GS2 배지 단독(비히클)에 동물에 대해 주사된다(n = 12-19마리 mice/grpup). 사지 괴사 및 기능적 점수는 실시예 9에 기재된 대로 수행된다. 몇몇 세포 타입의 경우, 독립적인 분화 실험으로부터 생성된 하나를 초과하는 세포의 로트(lot)가 사용되었으므로, 하나를 초과하는 로트의 동일한 세포 타입에서 얻은 데이터가 조합된 경우, 더 많은 동물 수를 볼 수 있다. 데이터는, 2개의 독립적이고 반복적인 연구에 대해 평균을 낸, 평균 ± sem이다. \*p<0.05 대

비히클 대조군(GS2 배지), 일-원 ANOVA 후 던네트 검증에 의함.

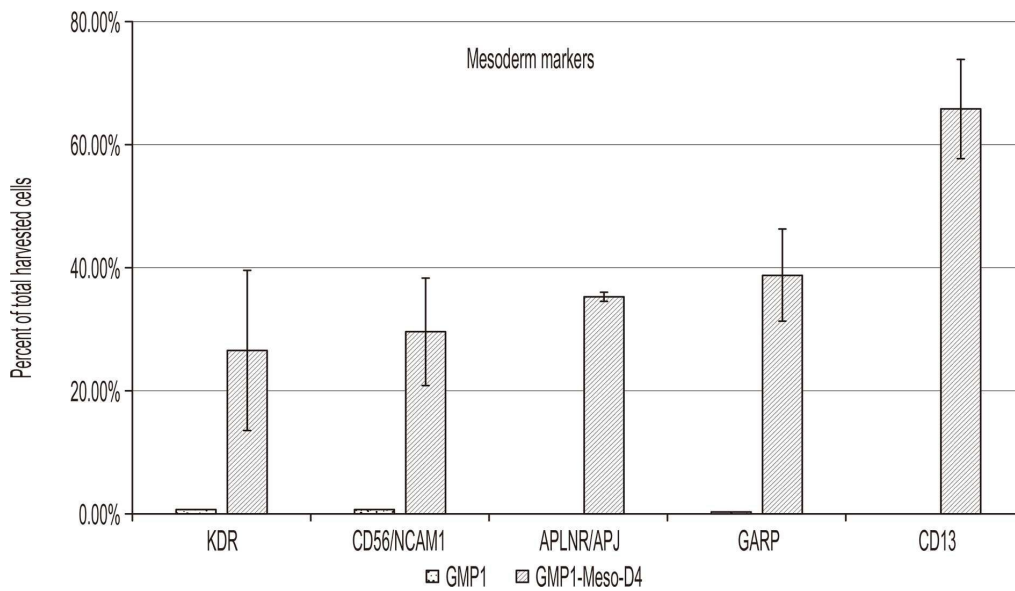
- [0315] 도 15a는, meso-3D 바스쿨로노이드 VPC2 세포로 처리된 동물이 HE 및 HB 세포와 비교하여 21일째에 더 나은 평균 피사 및 기능 점수를 가졌음을 나타낸다. 도 15b는, 비히클과 비교하여, meso-3D 바스쿨로노이드 VPC2 세포, HE, 및 HB 세포로 처리된 동물에서 63일째에 혈류 개선을 나타낸다. 대퇴사두근(도 15c) 및 비복근(도 15d)에서 CD34 혈관 성장은, 3가지 세포 타입 모두에서 개선을 나타내었고, HBs는 약 35일째에 더 나은 성장을 나타냈다. 그러나, 63일까지, 3가지 세포 타입 모두는, 유사하게 성장을 촉진하는 것으로 나타났으며, meso-3D 바스쿨로노이드 VPC2 세포는 HEs 및 HBs보다 비복근에서 성장을 약간 더 잘 촉진시킨다.
- [0316] Meso-3D 바스쿨로노이드 VPC2 세포는 또한 처리 후 63일을 초과하는 장기간의 생착을 나타냈다(도 16a). 본 연구에서, GS2 배지 또는 GS2 배지 단독(비히클)에 동물당 100만개의 세포는 HLI 수술 후 우측 대퇴사두근 내로 주사된다(비히클 = 18마리 마우스, GMP1-Meso3D Lot #1 = 19마리 마우스, GMP1-Meso3D Lot #2 = 18마리 마우스, GMP1-Meso3D Lot #3 = 19마리 마우스, GMP1-HE = 19마리 마우스 및 J1-HE = 19마리 마우스). 주사 부위는 그 다음 문신으로 표시된다. 14일, 35일, 63일, 180일째에, 수술한 우측 뒷-다리의 대퇴사두근은 수집되고, PFA에 고정되며, 파라핀에 포매되고, 인간-특이적 마커인, Ku80에 대해 염색된다. 동물당 2개의 이미지(20x 배율)는, 각 그룹에서 n=1만 있었던 14일째 J1-HE를 제외하고, 각 그룹에서 적어도 n=3로, 분석된다. 데이터는 다음의 반-정량적 척도를 사용하여 블라인드된(blinded), 독립적인 조직병리학자에 의해 평균  $\pm$  s.e.m.을 나타낸다: 0 = 양성 Ku-80 세포가 존재하지 않음; 1 = <5개의 양성 Ku-80 세포 존재; 2 = >5 및 <15개의 양성 Ku-80 세포 존재; 3 = >15 및 <50 양성 Ku-80 세포 존재; 4 = >50개의 양성 Ku-80 세포 존재. 도 16a는, 처리 후 63일 및 180일째에 이식된 공여자 GMP1-Meso3D 바스쿨로노이드 VPC2 세포를 나타내어, 비록 GMP-1-유래 HEs가 180일째에 더 나은 생착을 나타낼지라도, 이는 세포의 장-기간 생착을 보여준다.
- [0317] 제2 연구(도 16b)에서, GS2 배지에 동물당 100만개의 세포는 HLI 수술 후 우측 대퇴사두근 내로 주사된다(GMP1-Meso3D 바스쿨로노이드 VPC2 세포 = 16마리 마우스, GMP1-HE Lot #1 = 16마리 마우스, GMP1-HE Lot #2 = 17마리 마우스, GMP1-HB Lot #1 = 16마리 마우스, GMP1-HB Lot #2 = 16마리 마우스). 주사 부위는 그 다음 문신으로 표시된다. 14일, 35일, 63일째에, 수술한 우측 뒷-다리의 대퇴사두근은 수집되고, PFA에 고정되며, 파라핀에 포매되고, 인간-특이적 마커인, Ku80에 대해 염색된다. Olympus BX60 광학 현미경을 사용하여 촬영된, 2개의 이미지(20x 배율)는, 각 그룹에서 적어도 n=2로, 동물에 대해 분석된다. Ku80+ 세포는 블라인드된, 독립적인 조직병리학자에 의해 정량화된다. 데이터는 평균  $\pm$  s.e.m.을 나타낸다. 도 16b는, 35일 및 63일까지, GMP-1 유래 HEs의 1개 로트가 63일에 더 나은 생착을 나타내지만, meso-3D 바스쿨로노이드 VPC2 세포가 생착을 나타내는 것을 보여준다.
- [0318] 또 다른 연구(도 16c)에서, GS2 배지에서 동물당 100만 세포는, HLI 수술 후 우측 대퇴사두근에 주사된다(GMP1-Meso3D Vasculonoid VPC2 세포 = 2개 로트로부터 24-25마리 마우스). 63일째에, 수술된 우측 뒷-다리의 대퇴사두근은 수집되고, PFA에 고정되며, 파라핀에 포매된다. 섹션들은 그 다음 isolectin-B4(마우스 내피 세포의 마커) 및 Ulex europaeus I(UEA1, 인간 내피 세포의 마커) 또는 Ku80(범 인간(pan human) 특이적 마커), UEA1, 및 평활근  $\alpha$ -액틴(SMA, 마우스와 인간 모두에 대한 평활근 마커)으로 염색된다. DAPI는 사용하여 핵을 카운터-라벨(counter-label)하는데 사용된다. 도 16c는, Balb/c 누드 마우스에서 HLI 수술 63일 후 장-기간 생착 (Ku80+), 인간 맥관구조의 형성(UEA1+ 혈관), 및 측분비 숙주 혈관 성장의 촉진(IB4+ 및 SMA+ 혈관)을 나타내는 주사된 Meso3D 바스쿨로노이드 VPC2s의 형광 이미지를 나타낸다.
- [0319] 균등물
- [0320] 당업자는 일상적인 실험을 사용하여 여기에 기재된 본 발명의 특정 구현예에 대한 많은 균등물을 인식하거나 확인할 수 있을 것이다. 이러한 균등물은 다음의 청구범위에 의해 포괄되는 것으로 의도된다. 본 출원 전반에 걸쳐 인용된 모든 참고 문헌, 특허 및 공개된 특허 출원의 내용은 참조로서 여기에 혼입된다.

도면

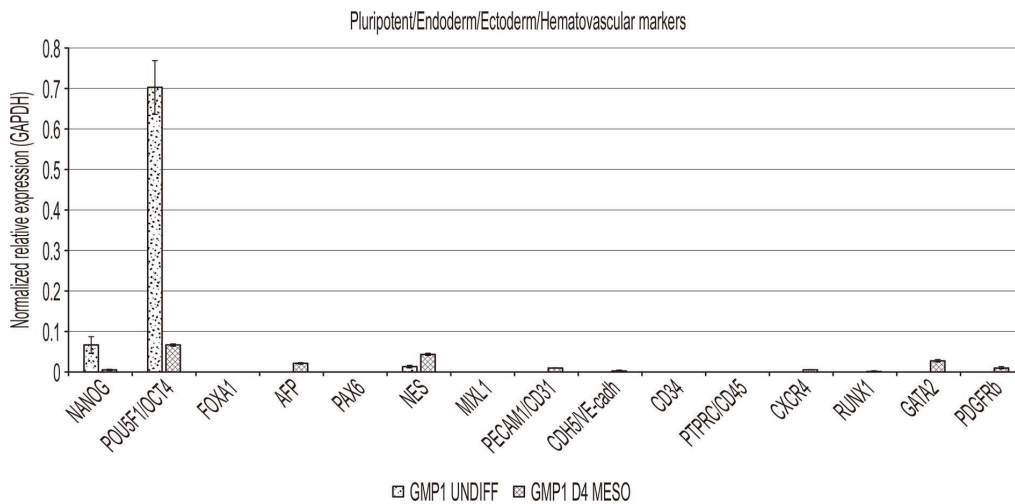
도면1



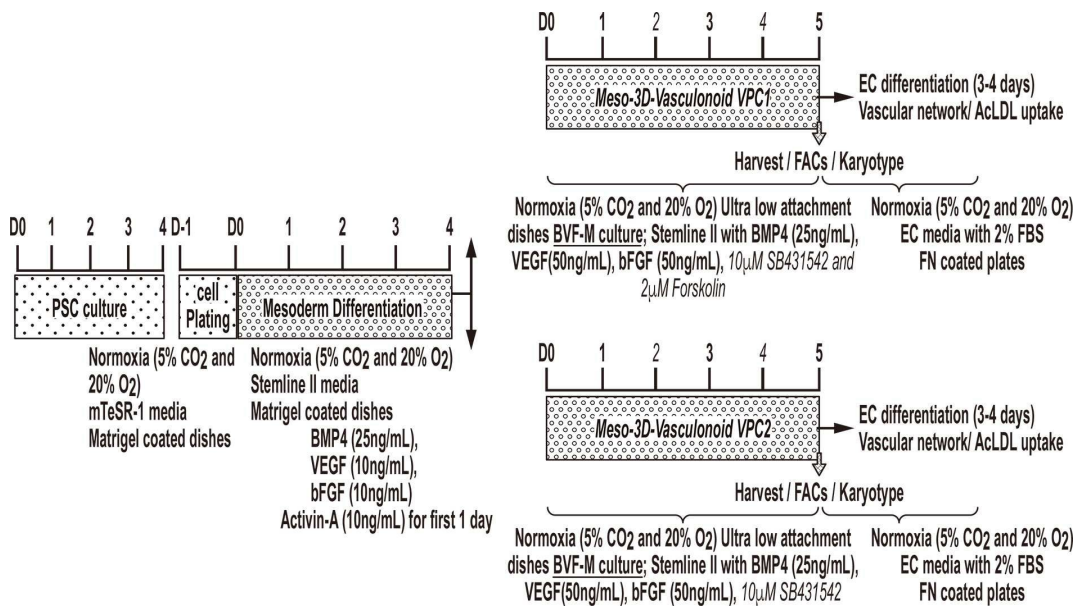
도면2a



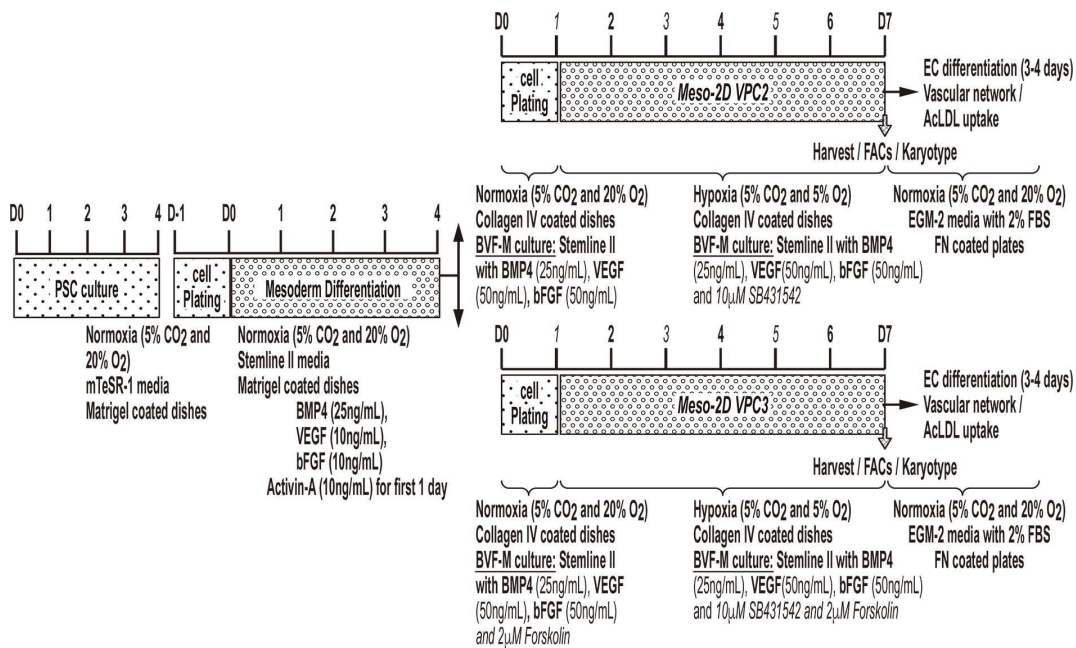
도면2b



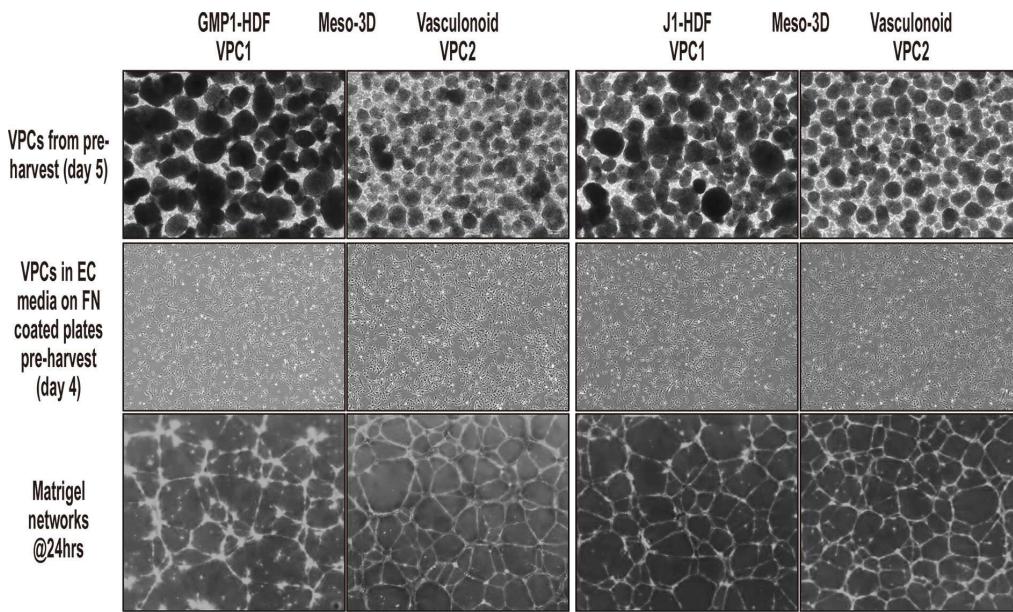
도면3



도면4

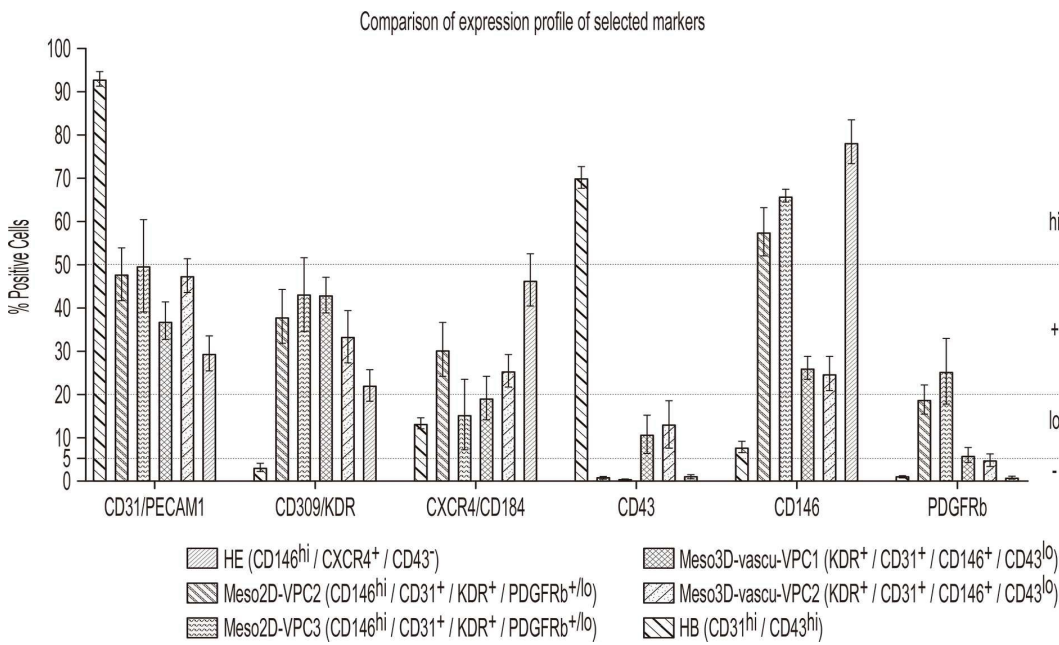


도면5



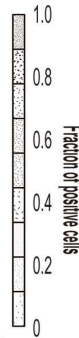
Keyence, 4X, Alexa Fluor™ 488 AcLDL

도면6a

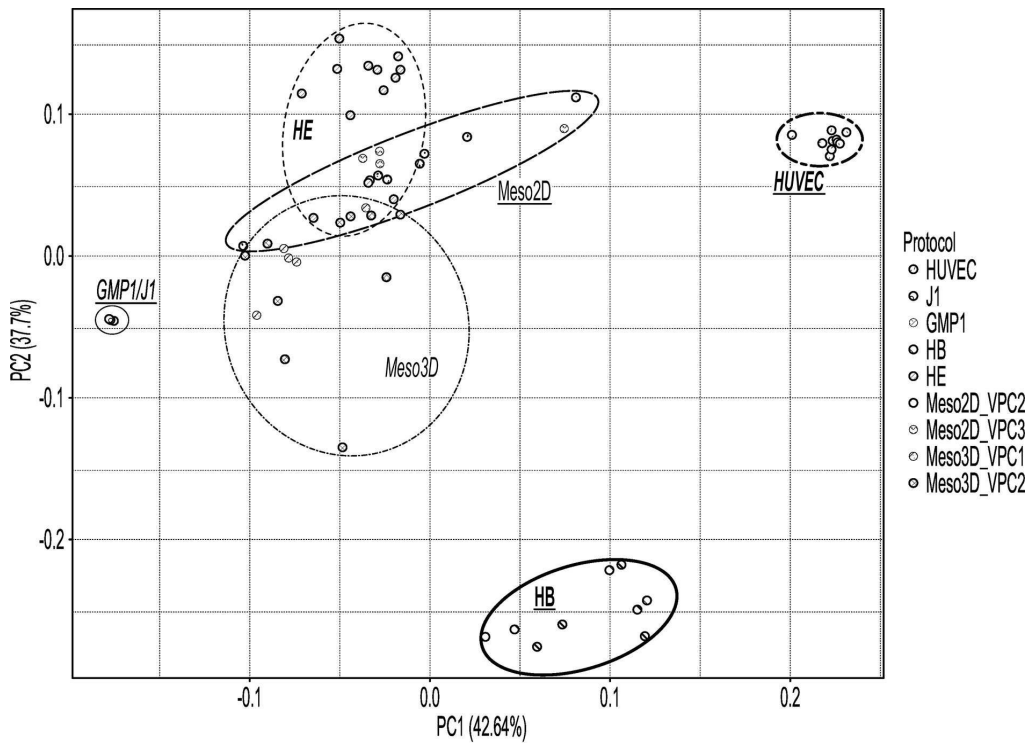


도면6b

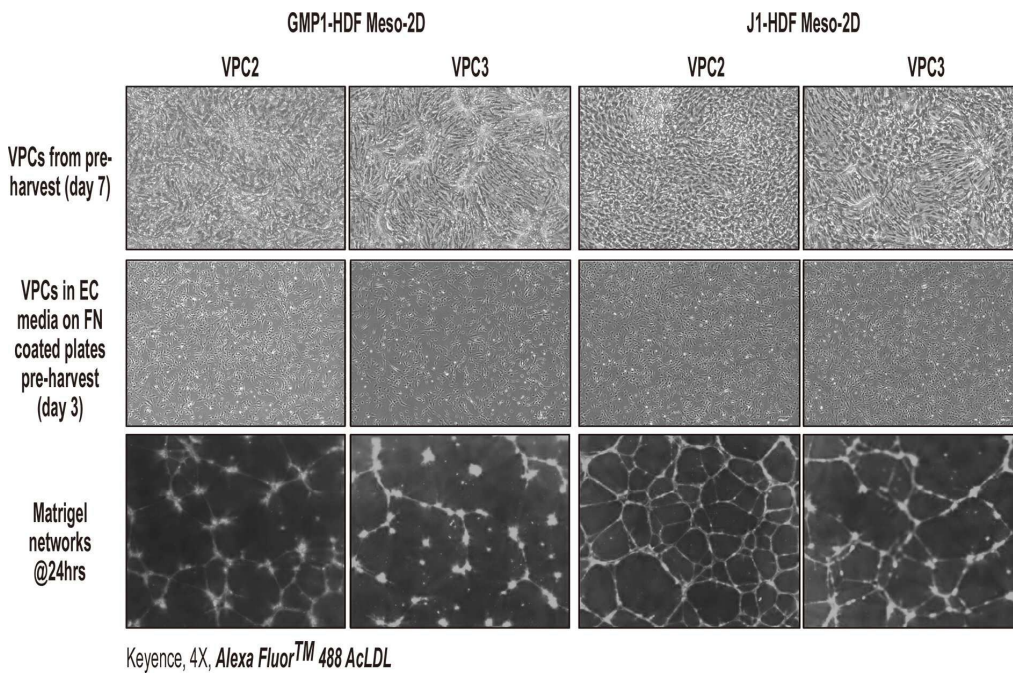
GMP1		J1		HUVEC		HB		HE		Meso2D_VPC2		Meso2D_VPC3		Meso3D_VPC1		Meso3D_VPC2		Protocol
J1	GMP1	J1	GMP1	J1	GMP1	J1	GMP1	J1	GMP1	J1	GMP1	J1	GMP1	J1	GMP1	J1	GMP1	
0.00	0.01	0.99	0.96	0.89	0.33	0.25	0.46	0.52	0.40	0.59	0.29	0.42	0.51	0.42	CD31			
0.00	0.01	0.24	0.04	0.02	0.22	0.32	0.40	0.33	0.35	0.51	0.35	0.48	0.26	0.44	KDR			
0.00	0.01	0.94	0.56	0.24	0.08	0.08	0.16	0.18	0.09	0.23	0.07	0.09	0.10	0.08	CD144			
0.00	0.00	0.27	0.25	0.13	0.06	0.02	0.22	0.06	0.07	0.01	0.09	0.04	0.14	0.03	CD34			
0.00	0.00	0.07	0.12	0.15	0.46	0.63	0.30	0.31	0.07	0.23	0.20	0.18	0.25	0.26	CXCR4			
0.01	0.01	0.04	0.02	0.00	0.09	0.04	0.13	0.08	0.04	0.06	0.08	0.17	0.09	0.14	CXCR7			
0.00	0.00	0.01	0.72	0.66	0.01	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.21	0.04	0.21	0.01	CD43			
0.00	0.00	0.00	0.65	0.89	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.06	0.02	0.03	0.00	CD45			
0.00	0.00	1.00	0.10	0.05	0.80	0.85	0.58	0.58	0.64	0.68	0.23	0.28	0.24	0.26	CD146			
0.01	0.01	0.18	0.01	0.01	0.05	0.06	0.21	0.11	0.38	0.12	0.04	0.07	0.04	0.06	PDGFRb			
0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.08	0.04	0.01	0.02	0.00	0.00	0.02	0.02	NG2			



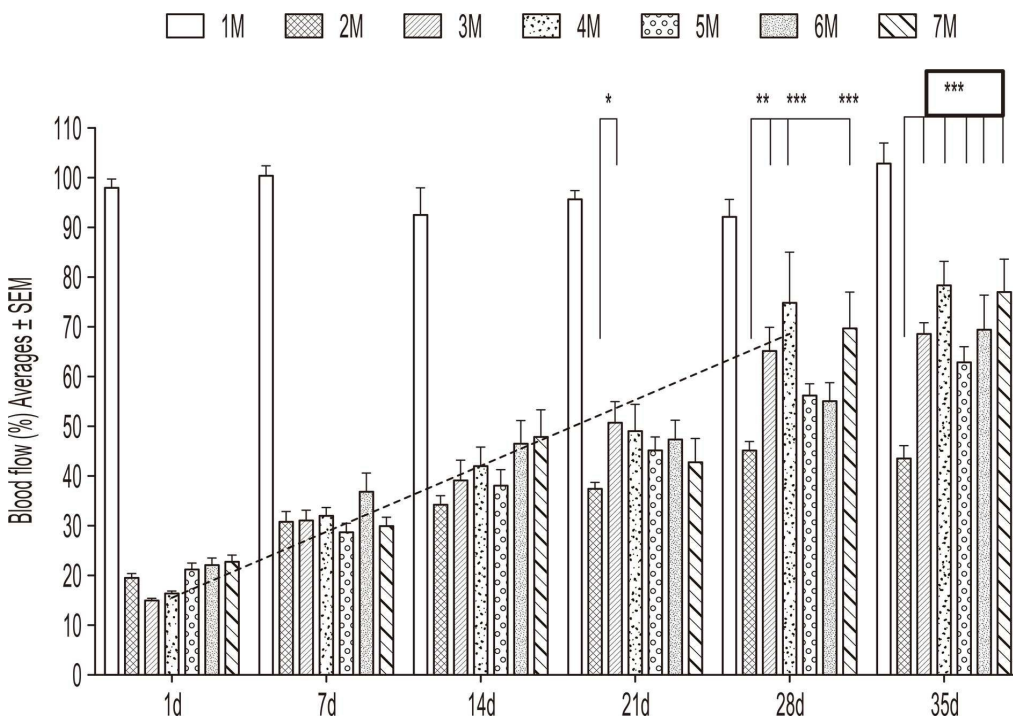
도면6c



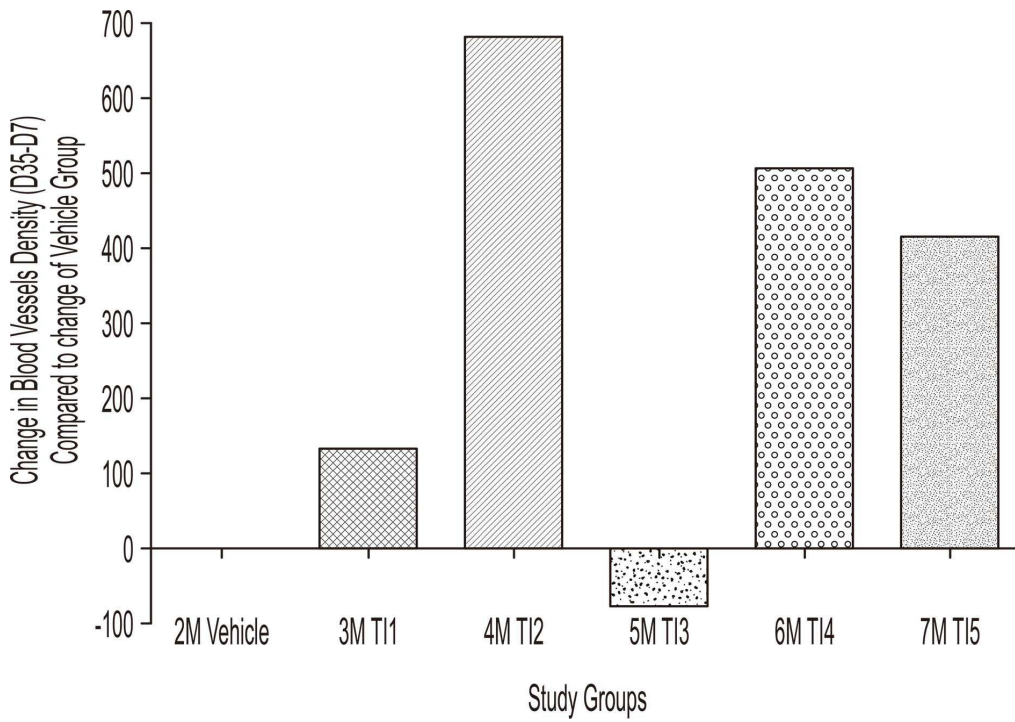
도면7



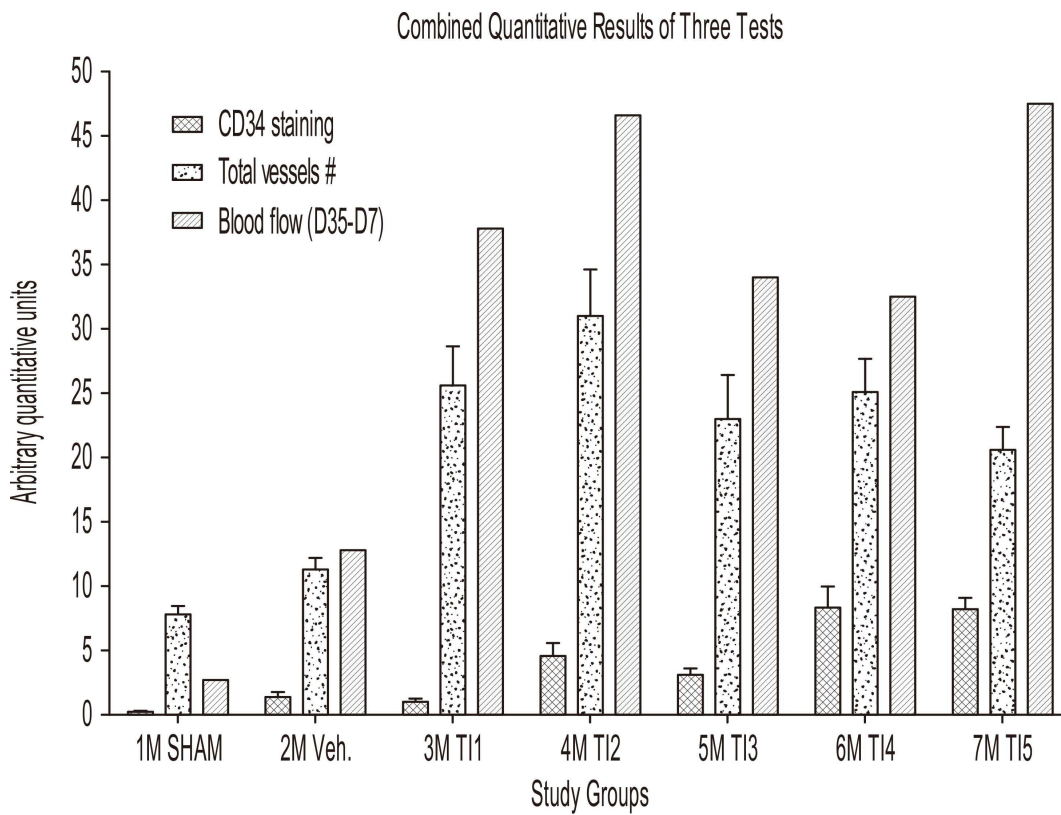
도면8



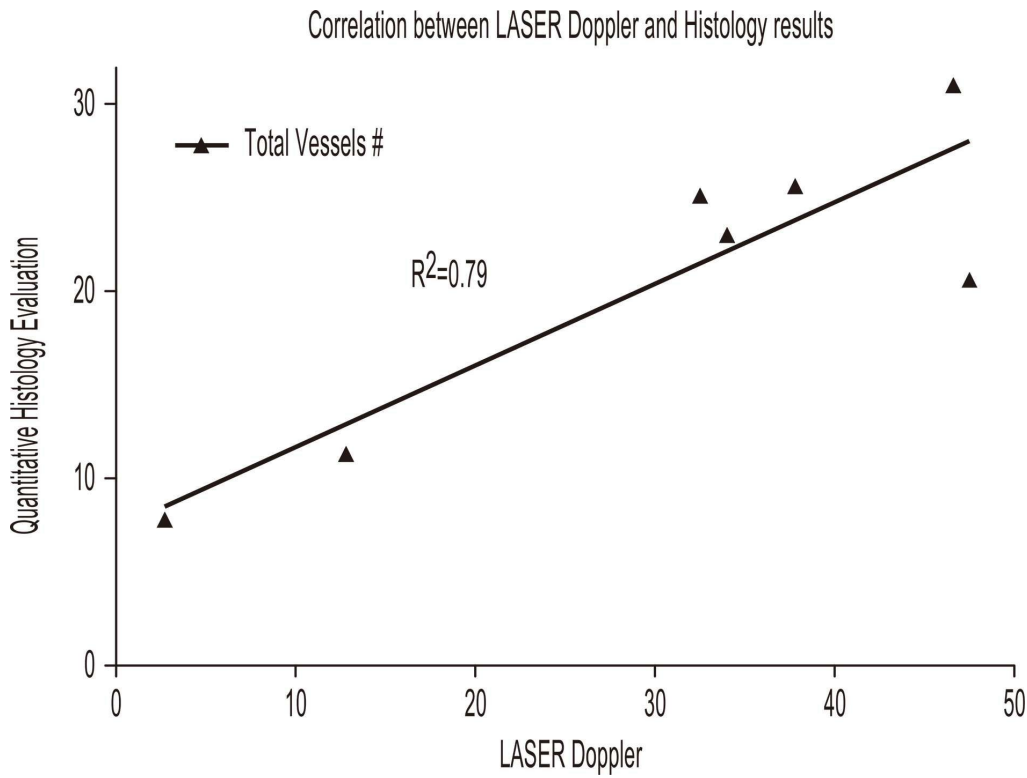
도면9



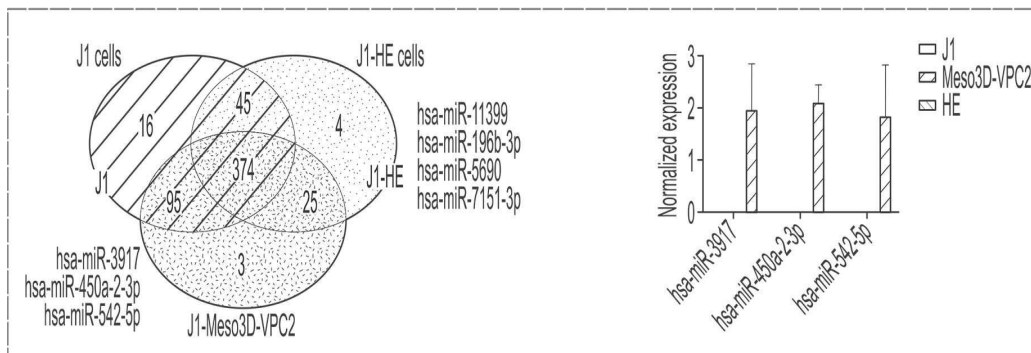
도면10



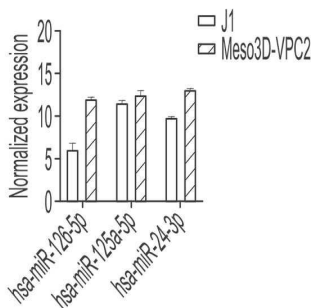
도면11



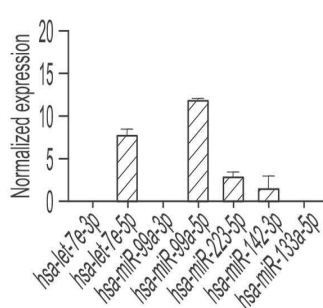
도면12



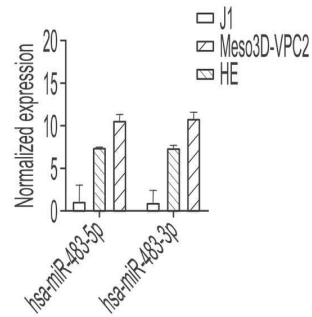
도 12a



도 12b

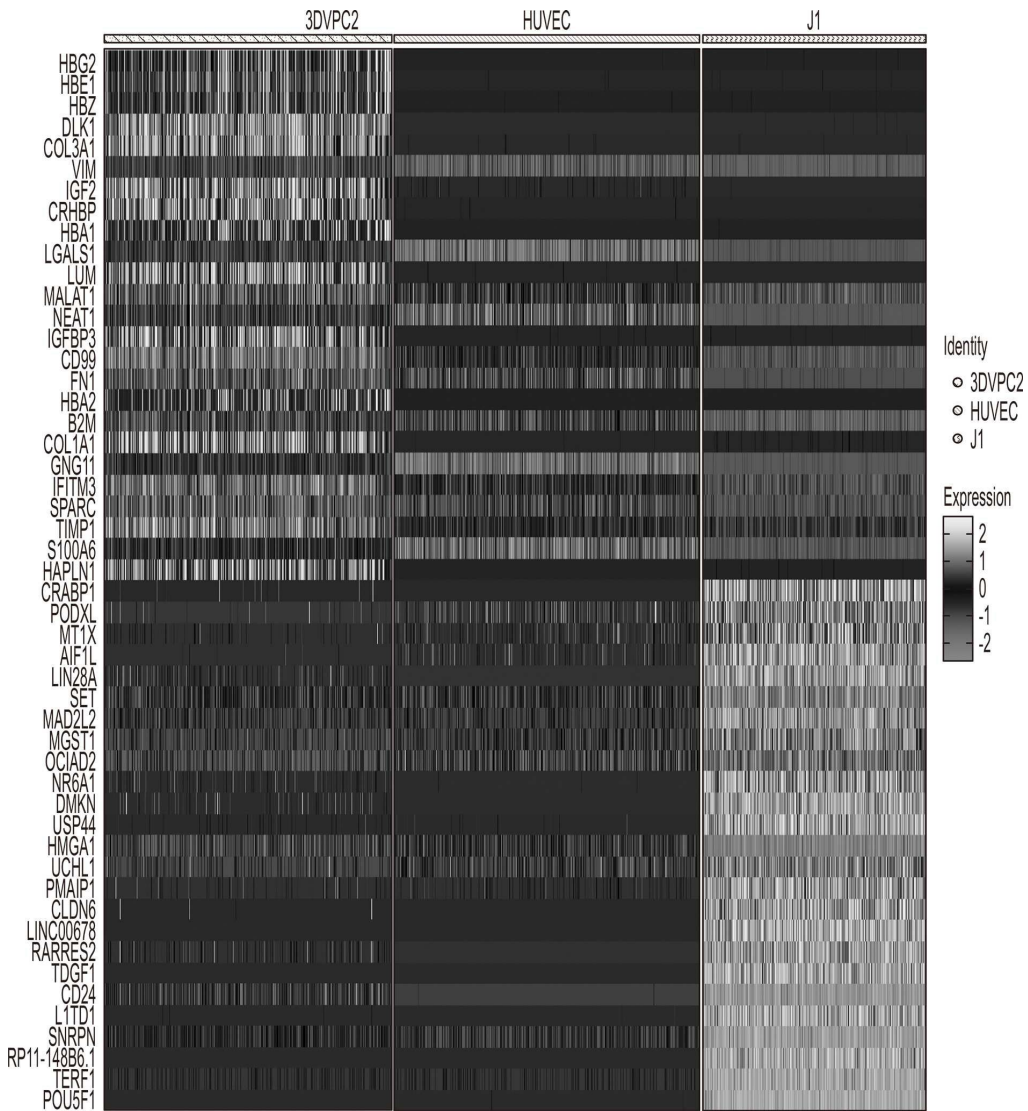


도 12c

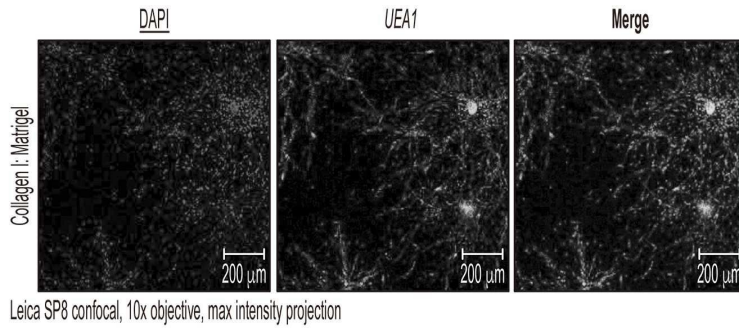


도 12d

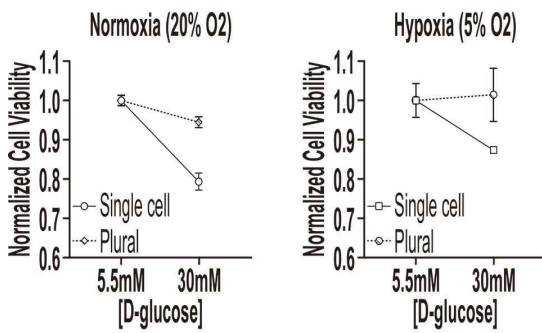
도면13



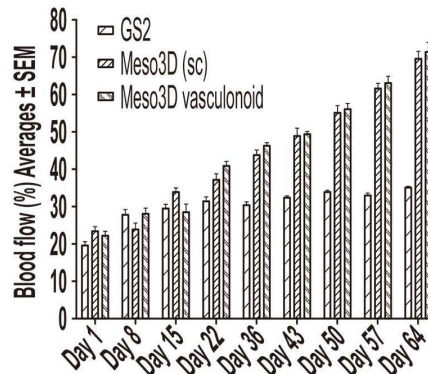
도면14



도 14a

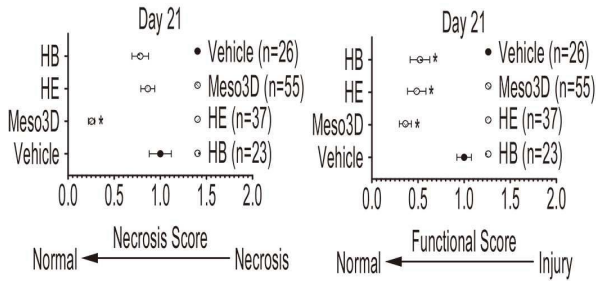


도 14b

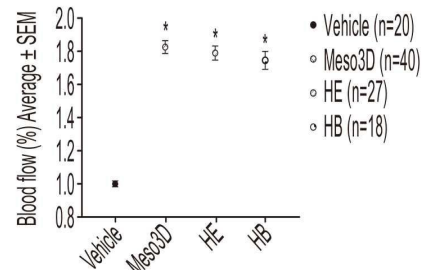


도 14c

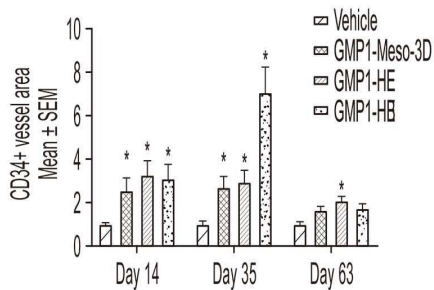
도면15



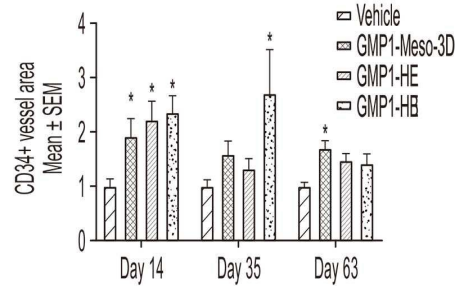
도 15a



도 15b

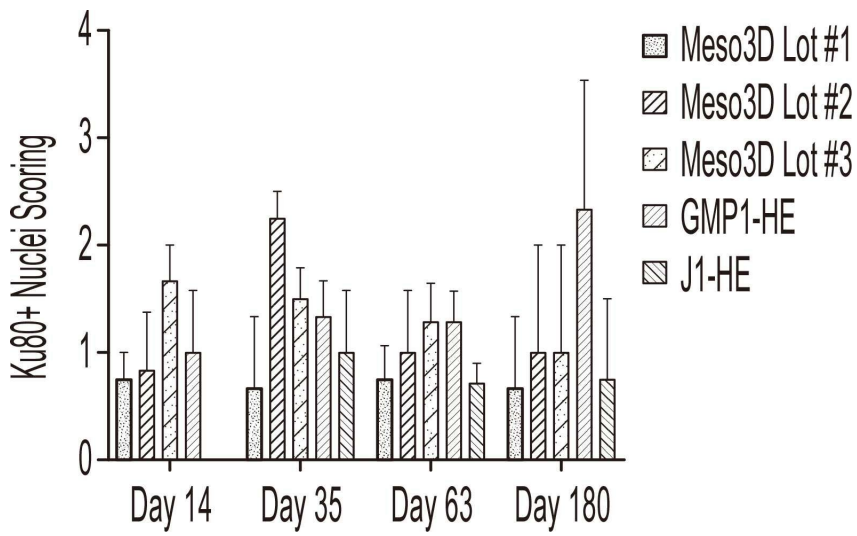


도 15c

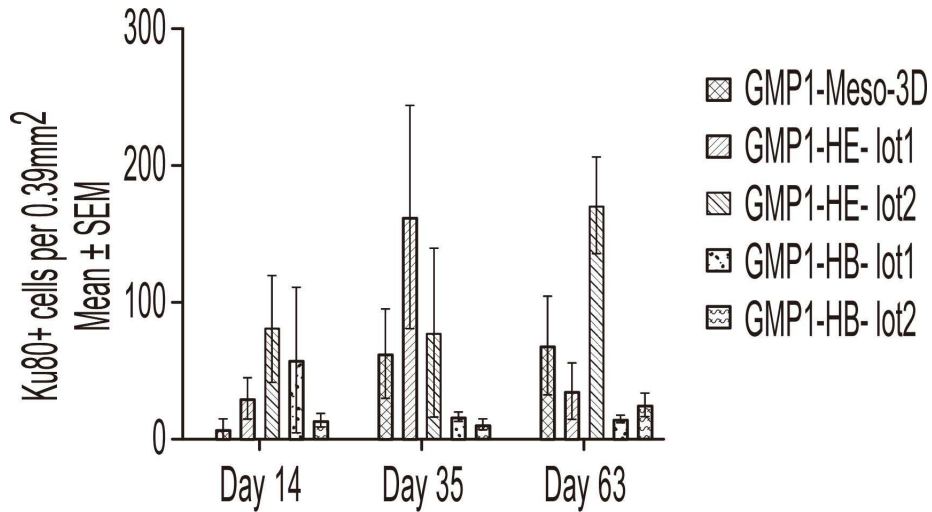


도 15d

도면16a



도면16b



도면16c

