



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0136588
(43) 공개일자 2018년12월24일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/071 (2010.01) A01N 1/02 (2006.01)
A61L 27/38 (2006.01) A61L 27/54 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 5/0625 (2013.01)
A01N 1/021 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-7036619(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2015년12월01일
심사청구일자 2018년12월17일
- (62) 원출원 특허 10-2017-7017887
원출원일자(국제) 2015년12월01일
심사청구일자 2017년07월18일
- (85) 번역문제출일자 2018년12월17일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2015/063114
- (87) 국제공개번호 WO 2016/089825
국제공개일자 2016년06월09일
- (30) 우선권주장
62/086,526 2014년12월02일 미국(US)
14/954,335 2015년11월30일 미국(US)

- (71) 출원인
플래티티티이, 인크.
미국 유타 84108 솔트 레이크 시티 스위트 102 아
라핀 드라이브 615
- (72) 발명자
로크 덴버 엠.
미국 21223 메릴랜드주 볼티모어 에스. 킬모어 스
트리트 106
- (74) 대리인
특허법인한성

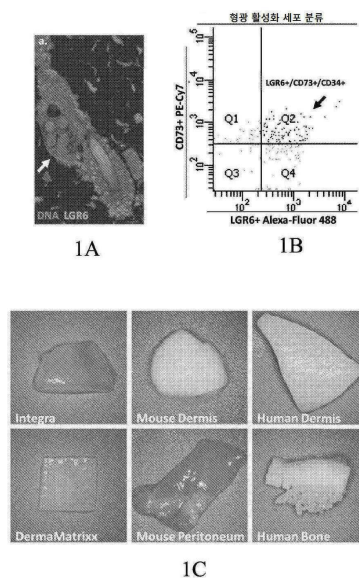
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 LGR4, LGR5 및 LGR6 발현 상피 줄기 세포를 사용한 조직 응용에서의 최소 극성화 기능 세포
미소응집체 유닛의 개발 및 사용 방법

(57) 요약

본 발명은 상처 치료 용도, 조직 공학적 처리, 세포 치료 용도, 재생 의학 용도, 의학/치료 용도, 조직 치유 용도, 면역 치료 용도 및 조직 이식 치료 용도를 위한, 바람직하게는 직접 적용을 위한 전달 벡터/기질/지지체/스캐폴드와 관련된 류신이 풍부한 반복체-함유 G-단백질 결합 수용체 (LGR) 발현 세포를 함유하는 미소응집체 다세포 최소 극성화 이식편의 구조물에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A01N 1/0221 (2013.01)

A61L 27/3813 (2013.01)

A61L 27/54 (2013.01)

A61L 2300/412 (2013.01)

A61L 2430/00 (2013.01)

C12N 2513/00 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

- a) 포유류 조직 표본의 진피 및 표피 구획에서 지방 및 피하 성분을 분리하여 부분적으로 처리된 포유류 조직 표본을 제공하는 단계; 및
- b) 상기 부분적으로 처리된 포유류 조직 표본의 나머지 피부 성분을 분리하는 단계를 포함하는, 여포성 벌지(follicular bulge)의 적어도 한 부분을 포함하는 적어도 하나의 최소로 극성화된 기능성 유닛을 포함하는 조성물의 제조 방법으로서, 상기 여포성 벌지의 부분이 LGR을 발현하는 줄기 세포를 포함하는 것인, 제조 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 조성물을 전달 기질(delivery substrate)에 첨가하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 제조 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 전달 기질이 스캐폴딩, 매트릭스, 입자, 세포, 콜라겐, 섬유, 또는 이들의 조합으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 제조 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 조성물에 증강(인헨싱) 인자 또는 분석물을 첨가하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 제조 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 방법에 의해 수득되는 조성물.

청구항 6

- a) 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 방법에 의해 수득되는 조성물,
- b) 항생제 및 항진균제로부터 선택되는 적어도 하나의 약제, 및
- c) 피브리노겐
- 을 포함하는 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 피브리노겐이 인간의 것이고, 조성물이 페니실린, 스트렙토마이신, 또는 이들의 조합, 및 암포테리신 B를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

우선권 주장

[0002]

본 PCT 국제 출원은 2014년 12월 2일자로 출원된 미국 임시출원 62/086,526호의 이익을 청구하는 2015년 11월 30일자로 출원된 U.S.S.N. 14/954335호를 우선권으로 주장하며, 이들은 본원에 참고로 인용된다.

[0003]

기술 분야

[0004]

본 발명은 상처 치료 용도, 조직 공학적 처리, 세포 치료 용도, 재생 의학 용도, 의학/치료 용도, 조직 치유 용도, 면역 치료 용도 및 조직 이식 치료 용도를 위한, 류신이 풍부한 반복체-함유 G-단백질 결합 수용체 (LGR)

발현 세포를 함유하는 미소응집체 다세포 이식편의 구조물에 관한 것이다.

[0005] 특히, 본 발명은 직접 적용을 위한 전달 벡터/기질/지지체/스캐폴드 상에 전달 가능한 미소응집체 다세포 LGR 구조물을 제공한다.

배경 기술

[0006] 수년에 걸쳐, 임상가와 연구원들은 미생물의 상처 부담을 감소시킬 뿐만 아니라 세포 독성 부작용도 덜한 항생제를 연구해 왔다. 화상에서 급성 및 만성 상처 모두에 이르기까지 자연적으로 발생하는 자기 유래 항균 펩티드의 조작 가능성이 있는데, 이는 이러한 작용제가 전형적으로 미생물 내성에 이를 가능성이 더 적은 메커니즘인 막 투과성을 통해 기능한다는 점에서 그렇다. 상처 감염의 지속적인 위험과 현재의 항생제 요법에 대한 세균 내성의 표피 진행으로, 피부 화상과 상처에 사용하기 위한 새로운 종류의 국소적 항균제 개발이 진정으로 요구된다.

[0007] 지난 세기 동안 기술된 상처 치유에는 본질적으로 4 단계가 있다: (1) 지혈, (2) 염증, (3) 증식 및 (4) 재형성. 이러한 순차적인 단계는 처음에 상처로 이동한 세포의 유형에 의해 정의되고, 나중에 조직 내에서 발현되는 사이토카인 및 성장 인자의 유형에 의해 정의된다.

[0008] 최근 간엽 및 지방-유래 줄기 세포 분리 및 이식의 발전에 따라, 연구원들은 이들 세포가 각 단계 내에서, 특히 후기 염증 단계에서 재형성 단계를 통해 어떻게 치유를 개선하고 발현을 변경시키는지 연구하기 시작하였다. 더 깊은 구획의 간엽 및 지방-유래 줄기 세포와 마찬가지로, 상피 줄기 세포는 원시 외배엽으로부터 발생하고, 나중에 더 많은 표피성 상피 구획을 형성하게 되고, 따라서 피부 상처 치유에 잠재적인 역할을 한다. 현재, 단리된 LGR4, LGR5 및 LGR6을 발현하는 상피 줄기 세포의 이식 및 적용이 상처 치유 유전자 발현을 어떻게 변화시키는지에 대한 연구는 제한적이다.

[0009] LGR4, LGR5 및 LGR6을 발현하는 상피 줄기 세포 집단은 피부에 심한 전층 손상을 입은 후 종종 파괴되어 조직이 생존이 가능하고 자활성인 상피 구획을 생성할 수 없는 피부를 남기도록 하는 것으로 알려져 있다. 상피 줄기 세포의 초점 자리 없이는 국소 염증에 의해 유도된 과립성 및 섬유성 노력과 다양한 세포 실체의 후속 주화성에도 불구하고, 남아있는 조직은 기능성 상피, 모낭, 땀샘 등의 형성을 위한 재생 가능성 없이 남겨진다.

[0010] 인간 및 포유동물 조직에 복합적인 전층 손상 및/또는 여러 조직 요소 (피부, 근육, 지방, 혈관, 신경 및 뼈)가 관련된 복합적 상처는 현실적으로 치유가 쉽지 않다. 이러한 손상과 결과로 생기는 상처도 또한 현재의 상처 관리 방법, 세포, 조직, 장치, 생물제, 약물 및/또는 성장 인자를 사용하는 현재 승인된 기술을 이용한 외과적 개입을 통해 치료하기가 어렵다. 이렇게 어려운 공통적인 이유는 상처를 입었거나 손상된 조직 기저부 내 또는 그 주위에 남아있는 조직이 전형적으로 상호의존적인 필수 구성 요소가 결여되어 있기 때문이다: 1) 세포 전구체 및/또는 줄기 세포 집단; 2) 세포 외 기질/스캐폴딩 요소 및 기질; 및 3) 세포 실체와 기질 사이와 그 중의 상호작용의 조합. 세포 자리, ECM (세포 외 기질) 스캐폴딩 및 관련 상호작용 인터페이스에서의 이러한 결핍은 이어서 세포 이동, 분화 및 조직 극성화에 필요한 필수적인 다차원 구조를 재생성하거나 생성하지 못하게 한다. 이러한 세포-세포 및 세포-기질 간 상호작용이 없다면 상처 기저부 내의 잔류 세포 실체는 그의 증식 또는 계통적 잠재력과 상관없이 인식할 수 있는 "기능"이 가능한 더 복잡한 다중 조직을 발생하기 보다는 주로 장벽 유용성을 제공한다. 결과적으로, 상처는 피부, 근육, 지방, 힘줄, 뼈를 포함하더라도 후속적으로 흉터를 남기고 조직이 파괴되고 기능이 저하된다.

[0011] 조직 공학 분야에서 배양된 피부, 연골, 뼈, 근육, 혈관, 신경, 림프관 및 관련 대체물의 현재 응용은 크게 3 부분의 전략에 기초한다: 1) 조직 공급원을 획득하고 그러한 조직으로부터 세포 현탁액을 수확; 2) 매트릭스 또는 스캐폴드에 이들 세포의 적용; 및 3) 구조물을 인간 또는 동물의 표적 부위 상 또는 그 안에 이식. 그러나, 위와 같은 상호의존성 필수 구성 요소의 부재하에서, 조직 공학 응용, 세포 치료 응용, 재생 의학 응용, 조직 치유 응용 및 조직 이식 요법 응용은 기능적 극성화 조직을 적절하게 조립하는데 필요한 자연적인 세포 미소응집체 구조를 소유하지 못한다. 따라서, 적절한 상호의존성의 부재로 인해, 전구 세포 매스 및 적절한 스캐폴딩은 이러한 구조물이 다중 구획 조직 재생 및/또는 뼈 및 근육 재건과 같은 치료적 적용에 유용하지 못하게 한다.

[0012] 그 결과, 부분적으로 앞의 이유로 해서, 산업계와 학계 모두 합성 조직 대체물,자가이식 구조물 및 환자 유래 상피 확장 자가이식편 (즉, Cambridge MA 소재 Vericel Corporation 제인 EPICEL®) 개발에 상당한 노력과 자원이 투자되고 있다. 이들 제품은 유익하기는 하지만 종종 비용이 많이 들고 환자에게 진정한 다중 구획 조직 구조물을 제공하지 못한다. 예를 들어, 배양 상피 자가이식편 (CEA)은 원 피부에서 볼 수 있는 상피 및 진피 구

획을 복원할 수 없는 채로 유지된다. 하지만, 상호의존적인 기능 구획이 없다는 것에 비추어, 배양된 세포는 국소 줄기 세포 집단 확장 및 진정한 피부를 정의하는 외피 -- 표피, 진피, 샘 및 털을 생성하는데 필요한 조직 극성화의 진행 없이 남아있다. 이러한 부전은 이어 단층 취약성, 상피 불안정성, 장벽 파괴 및 흉터로 이어진다.

[0013] 대안적으로 LifeCell Corporation제 ALLODERM®, Integra LifeSciences Corporation제 INTEGRA® 및 Musculoskeletal Transplant Foundation제 DERMAMATRIX®과 같은 보다 확고한 무세포 매트릭스는 뛰어난 재구성 옵션을 제공하지만 기능적인 고유 조직을 발생하는 데 필요한 적절한 계통 특이적 줄기 세포군이 부족하다.

[0014] 본 발명자는 이미 포유동물에서 장 및 표피 줄기 세포 둘 다의 표지자로서 LGR5 및 LGR6의 비교적 최근의 인식에 관해 기재하였다. [*Stimulation of the Follicular Bulge LGR5+ and LGR6+ Stem Cells with the Gut-Derived Human Alpha Defensin 5 Results in Decreased Bacterial Presence, Enhanced Wound Healing and Hair Growth from Tissue Devoid of Adnexal Structures*, Plast. Reconstr. Surg. 132: 1 159, 2013]에서, 류신이 풍부한 반복체-함유 G-단백질 결합 수용체 (LGR)는 난포 자극 호르몬, 갑상선 자극 호르몬 및 황체형성 호르몬 수용체 패밀리에 중요한 서열 및 구조 상동성을 갖는 7 회 막관통 단백질 수용체이다.

[0015] 상기 연구에서, 인간 알파 디펜신 5 펩티드는 인간 베타 디펜신 1 및 설파디아진과 비교하여 유의적으로 상처 치유를 향상시키고, 기저 세균 부하를 감소시키는 것으로 인식되었다. LGR 줄기 세포의 상처 부위로의 이동을 유도하는 유일한 치료법은 인간 알파 디펜신 5이다. 또한, 유전자 열 지도는 주요 상처 치유 및 Wnt1 및 Wisp1과 같은 Wnt 경로 전사체의 유의한 mRNA 상향 조절을 나타내었다. 그래서 인간 알파 디펜신 5는 주요 Wnt 및 상처 치유 전사체의 증가를 통해 상처 기저부의 LGR 줄기 세포 이동 증가 및 관련 박테리아 감소와 털 생산을 시킨 것으로 관찰되어 상처 치유 개선에 사용될 수 있다고 결론지었다. 간단히 말해서, 본 연구 및 다른 연구는 LGR4+, LGR5+ 및 LGR6+ 발현 상피 줄기 세포를 직접 생체 공학 연조직 구조물에 사용할 수 있다는 인식을 이끌어 냈다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0016] 발명의 개요

[0017] 본 발명은 제1 구체예에서 단리된 생 LGR 발현 세포 및 스캐폴딩, 콜라겐, 매트릭스, 입자 및 섬유로 이루어진 군으로부터 선택된 다차원 지지체를 포함하는 최소 극성화 미소응집체 다세포 조성물을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0018] 본 발명은 전술한 구체예에 대한 추가 구체예에서 단리된 생 LGR 발현 세포와 스캐폴딩, 콜라겐, 매트릭스, 입자, 및 섬유로 이루어진 군으로부터 선택되는 다차원 지지체를 포함하고 LGR 발현 세포에 성장 인자가 보충되고 LGR 발현 세포는 LGR4, LGR5 및 LGR6으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 최소 극성화 미소응집체 다세포 조성물을 제공한다.

[0019] 본 발명은 전술한 임의 구체예에 대한 추가 구체예에서 단리된 생 LGR 발현 세포와 스캐폴딩, 콜라겐, 매트릭스, 입자, 및 섬유로 이루어진 군으로부터 선택되는 다차원 지지체를 포함하고 LGR 발현 세포에 이동성/동원 분석물이 보충되고 LGR 발현 세포는 LGR4, LGR5 및 LGR6으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 최소 극성화 미소응집체 다세포 조성물을 제공한다.

[0020] 본 발명은 전술한 임의 구체예에 대한 추가 구체예에서 단리된 생 LGR 발현 세포와 스캐폴딩, 콜라겐, 매트릭스, 입자, 및 섬유로 이루어진 군으로부터 선택되는 다차원 지지체를 포함하고 LGR 발현 세포에 리간드 패밀리, R-스폰딘, EDGF, PDGF, Wnt, VEGF, 및 항균성 펩티드로 이루어진 군으로부터 선택되는 LGR 특이적 결합 요소가 보충되고 LGR 발현 세포는 LGR4, LGR5 및 LGR6으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 최소 극성화 미소응집체 다세포 조성물을 제공한다.

[0021] 본 발명은 전술한 임의 구체예에 대한 추가 구체예에서 단리된 생 LGR 발현 세포와 스캐폴딩, 콜라겐, 매트릭스, 입자, 및 섬유로 이루어진 군으로부터 선택되는 다차원 지지체를 포함하고, 주변 인접 조직 중 어느 하나를 변경하도록 조직 영역, 상처, 공동, 결손 조직, 또는 혈액으로 구성된 선택 표적에 대한 치료 구조물로서 사용되는 최소 극성화 미소응집체 다세포 조성물을 제공한다.

- [0022] 본 발명은 전술한 임의 구체예에 대한 추가 구체예에서 치유를 촉진하기 위해 손상된 조직에 이식된 단리된 생 LGR 발현 세포를 특징으로 하는 최소 극성화 미소응집체 다세포 조성물을 제공한다.
- [0023] 본 발명은 전술한 임의 구체예에 대한 추가 구체예에서 전신적으로 조직 시스템의 수복 또는 복구를 위한 단리된 LGR 함유 세포가 고정되어 있는 지지체 스캐폴딩을 포함하는 최소 극성화 미소응집체 다세포 조성물을 제공한다.
- [0024] 본 발명은 전술한 임의 구체예에 대한 추가 구체예에서 포유동물 전신에 걸쳐 외배엽, 중배엽 또는 내배엽-유래 조직 시스템에 적용하기 위한 조직 이식편을 제공한다.
- [0025] 본 발명의 또다른 구체예는 선택된 포유동물의 표적 조직에 이식하기 위해 생 LGR 발현 세포를 성장시키고 단리하는 단계를 특징으로 하는, 최소 극성화 미소응집체 다세포 조성물의 수득 방법을 특징으로 한다.
- [0026] 본 발명은 상기 방법의 추가 구체예에서 선택된 포유동물의 표적 조직에 이식하기 위해 생 LGR 발현 세포를 성장시키고 단리하는 단계를 특징으로 하고, 단리된 생 LGR 발현 세포를 스캐폴딩, 콜라겐, 매트릭스, 입자, 및 섬유로 이루어진 군으로부터 선택되는 다차원 지지체에 부착시키는 단계를 추가로 특징으로 하는, 최소 극성화 미소응집체 다세포 조성물의 수득 방법을 특징으로 한다.
- [0027] 본 발명은 또 다른 구체예에서 선택된 포유동물의 표적 조직에 이식하기 위해 생 LGR 발현 세포를 성장시키고 단리하는 단계를 특징으로 하고, LGR4, LGR5 및 LGR6으로 이루어진 군으로부터 선택되는 LGR 발현 세포를 선택하는 단계를 추가로 특징으로 하는, 최소 극성화 미소응집체 다세포 조성물의 수득 방법을 특징으로 한다.
- [0028] 본 발명은 전술한 임의의 방법 구체예에 대한 추가 구체예에서 발생, 재생, 증강 및 치유 세포 요소의 도포, 이식 (transplantation), 임플란트 (implantation), 유도 시딩, 유도 이동, 유도 추적, 인세팅 (in setting), 라미네이팅 및/또는 주입으로 이루어진 군으로부터 선택되는 기술에 의한 전달을 이용하여 최소 극성화 미소응집체 다세포를 상피 시스템, 샘, 털, 신경, 뼈, 근육, 지방, 힘줄, 혈관, 근막, 안 조직 및 켈티드 분비 세포 요소로 이루어진 군중 하나에 적용하는 단계를 제공한다.
- [0029] 본 발명은 전술한 방법 구체예에 대한 추가 구체예에서 선택된 포유동물의 표적 조직에 이식하기 위해 생 LGR 발현 세포를 성장시키고 단리하는 단계를 특징으로 하고, 조직 복구를 위해 최소 극성화 미소응집체 다세포 조성물을 생체 내에서 조직에 직접 적용하는 단계를 추가로 특징으로 하는, 최소 극성화 미소응집체 다세포 조성물의 수득 방법을 제공한다.
- [0030] 본 발명은 전술한 임의의 방법 구체예에 대한 추가 구체예에서 선택된 포유동물의 표적 조직에 이식하기 위해 생 LGR 발현 세포를 성장시키고 단리하는 단계를 특징으로 하고, 체내에서 조직 복구를 위해 최소 극성화 미소응집체 다세포 조성물을 혈류를 통해 간접적으로 적용하는 단계를 추가로 특징으로 하는, 최소 극성화 미소응집체 다세포 조성물의 수득 방법을 제공한다.
- [0031] 본 발명은 또 다른 구체예에서
- [0032] a) 조직 표본을 수득하는 단계;
- [0033] b) 상기 표본으로부터 LGR 발현 세포를 함유하는 최소 극성화 기능 유닛을 추출하는 단계;
- [0034] c) 적절한 공급원으로부터 진피 및 피하 지방 세포 성분을 처리하는 단계;
- [0035] d) 상기 처리된 진피 및 피하 지방 성분을 추출된 최소 극성화 기능 유닛에 첨가하여 상피 줄기 세포 특이성 유닛을 생성하는 단계;
- [0036] e) 상피 줄기 세포 특이성 유닛을 풍부화하는 단계;
- [0037] f) 상피 줄기 세포 특이성 유닛을 구조물 스캐폴드에 첨가하는 단계; 및
- [0038] g) 수득된 조성물의 최소 극성 유지를 검증하는 단계;
- [0039] 를 특징으로 하는, 최소 극성화 미소응집체 다세포 조성물의 생성 방법을 특징으로 한다.
- [0040] 본 발명은 전술한 임의의 구체예에 대한 추가 구체예에서 a) 상피 세포와 각질 세포의 혼합물; b) 페니실린, 스트렙토마이신, 및 암포테리신 B로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 약제; 및 c) 피브리노겐을 특징으로 하는, 조직의 수송 및 처리 동안 미생물의 생존성을 감소시키기 위한 세포 유지 배지 조성물을 사용하는, 최소 극성화 미소응집체 다세포 조성물을 수득하는 데 사용되는 배지 체제를 제공한다.

- [0041] 본 발명은 전술한 구체예에 대한 추가 구체예에서 a) 상피 세포와 각질 세포의 혼합물; b) 페니실린, 스트렙토마이신, 및 암포테리신 B로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 약제; 및 c) 피브리노겐을 특징으로 하고, 여기서 피브리노겐은 인간의 것이고 약제는 인간 조직의 안정화를 위해 항생제 및 항진균제를 모두 포함하는, 조직의 수송 및 처리 동안 미생물의 생존성을 감소시키기 위한 세포 유지 배지 조성물을 제공한다.
- [0042] 본 발명의 제1 양태와 관련하여, LGR 발현 세포를 스캐폴딩 매트릭스 및/또는 섬유에 적용하여 조직 공학적 용도, 세포 치료 용도, 재생 의학 용도, 의학/치료 용도를 위한 미소응집체 다세포 이식편을 확립하고, 여기서 이식편은 전신을 통해 상피 시스템의 개선 및/또는 변경을 위해 조직 또는 혈액에 직접 적용되는 것을 특징으로 한다.
- [0043] 본 발명의 제2 양태는 생체 내 상피 시스템의 개선 및/또는 변경을 위해 조직 또는 혈액에 적용하기 전 또는 후에 추가의 증강 인자 또는 분석물과 함께 또는 없이 스캐폴딩, 매트릭스, 및/또는 섬유에 적용되는 LGR 발현 세포를 특징으로 한다.
- [0044] 본 발명의 또 다른 양태는 신체에서 국소 또는 원거리 이동을 통해 상피 시스템을 개선 및/또는 변경하고/하거나, 샘 및 털 성장을 회복시키도록 신체, 조직 또는 혈액 내의 표적으로서 적용되는, 증강 인자 또는 분석물에 의해 변형된 LGR 발현 세포를 특징으로 한다.
- [0045] 본 발명의 제4 양태는 전신적으로 외배엽, 중배엽 또는 내배엽-유래 조직 시스템의 개선 및/또는 변경을 위해 조직 또는 혈액에 적용되기 전 또는 후에 주변 인접 조직 또는 원거리 조직을 변경시키도록 조직, 혈액 또는 배양물로부터 LGR 발현 세포를 이식하는 것을 특징으로 하나, 스캐폴딩, 매트릭스 및 섬유에 적용된 LGR 발현 세포는 포함하지 않는다.
- [0046] 본 발명의 제5 양태는 전신적으로 외배엽, 중배엽 또는 내배엽-유래 조직 시스템의 개선 및/또는 변경을 위해 조직 또는 혈액에 적용되기 전 또는 후에 추가의 증강 인자 또는 분석물과 함께 또는 없이, 스캐폴딩, 매트릭스, 및 섬유로 이루어진 군으로부터 선택된 전달 기질 비히클에 LGR 발현 세포를 직접 적용시키는 것을 특징으로 한다.
- [0047] 본 발명의 또 다른 양태는 전신적으로 국소 또는 원거리 이동을 통해 전신적으로 외배엽, 중배엽 또는 내배엽-유래 조직 시스템이 개선 및/또는 변경되도록, 증강 인자 또는 분석물에 의해 변경된 LGR 발현 세포를 신체, 조직 또는 혈액 내 표적으로서 전달 지지체 기질과 조합하는 것을 특징으로 한다.
- [0048] 본 발명의 또 다른 양태는 상피 시스템, 샘, 털, 신경, 뼈, 근육, 지방, 힘줄, 혈관, 근막, 안 조직 및 췌티드 분비 세포 요소를 발생, 재생, 증강 및/또는 치유하는 세포 요소의 전달, 도포, 이식, 임플란트, 유도 시딩, 유도 이동, 유도 추적, 인세팅, 라미네이팅 및/또는 주입을 위해 LGR 발현 세포를 지지체 기질에 부착하는 것을 특징으로 한다.
- [0049] 본 발명의 마지막 양태는 조직 발생, 재생, 증강 및/또는 치유를 증진 및 촉진하기 위해 포유동물 체, 조직 또는 혈액 내 표적에 이식 및 직접 적용되도록 최소 극성을 나타내는 미소응집체 다세포 기능 유닛으로서 LGR 발현 줄기 세포를 생성하는 것이다.
- [0050] 가장 일반적인 용어로, 본 발명은 본원에서 상피 시스템, 털, 샘 및 뼈의 생성, 재생, 동원 또는 증진을 위한 단리된 LGR 발현 세포 (류신-풍부 반복체-함유 G-단백질 결합 수용체)의 이식 및/또는 전달을 고려한다. 본 발명은 또한 성장 인자 이동/동원 분석물, 또는 리간드 패밀리: R-스폰딘, EDGF, PDGF, Wnt, VEGF, 항균성 췌티드를 포함하지만 이에 한정되지는 않는 LGR 특이적 결합 요소의 보충 또는 보충없이 스캐폴딩, 매트릭스 또는 섬유의 형태로 전달 비히클을 사용하는 임상 의학, 생체공학 및/또는 연구에서 구조물의 국소/근위 및 원거리/원격 조직 모두에의 적용을 고려한다.
- [0051] LGR 상피 줄기 세포를, 특히 형성된 스캐폴딩 기질과 결합하여 사용하면 상피 시스템 내 전층 상처 및/또는 공동에 줄기 세포가 풍부한 조직 대체물이 제공된다. 또한, 상피 세포에 이러한 최소 극성화 기능성 세포 유닛(MPFU)의 첨가는 모발, 샘, 분비된 항균 췌티드, 성장 인자, 및 상피 및 국소 주변 조직 요소의 건강과 생존 능력을 유지하고 촉진하는 데 일반적으로 필요한 분석물의 성장, 생성 또는 재생을 포함하는 상피의 상태를 증진/개선한다.
- [0052] LGR4+, LGR5+ 및 LGR6+ 줄기 세포 및 전구 세포 증식 동력학이 특히 기질 스캐폴딩과 접촉할 때 높게 유지된다는 것을 감안하면, 완전한 상피 전환 속도는 전형적으로 12 일 미만이다 (1 cm 집단 간 거리 간격). 충분한 조직 이중층 및 후속 장벽 기능을 재생할 수 있는 이러한 능력은 복잡한 전층 및 다조직 상처에 대한 발전적인 생

물학적 드레싱의 유형으로서 이들 세포의 역할을 암시한다.

- [0053] LGR4, LGR5 및 LGR6 줄기 세포의 전구체는 피부, 근육 및 뼈를 신속하게 재생할 수 있는 능력 외에도 상처 기저 부 내 미생물의 기저 수준을 감소시킬 뿐만 아니라 전구 세포의 증폭 및 분화를 증가시켜 상처 및 상처 주변 감염의 감소, 빠른 상처 봉합 및 모낭 발달을 유도하는 고유 항균 펩티드를 생성할 수도 있다
- [0054] 본 발명은 유능한 동반 자손과 함께 줄기 세포 콜로니 초점을 유지할 수 있는 즉각적이고 전달 가능한 생 조직 장벽을 제공하는데 있어서 LGR 발현 상피 줄기 세포가 시딩된 스캐폴드의 번역 적용성을 기술한다. 이 줄기 세포 증식소로부터 자손은 상피 조직 요소, 치유 및 이식편 통합을 자극하기 위해 이동성 증식 분화를 겪을 수 있다. LGR 상피 줄기 세포는 상피 치유 및 세포 재생 노력에 필요한 고유 조직 구조뿐만 아니라 스캐폴드 결합 집단의 극성화를 촉진시키는 스캐폴딩, 가용성 성장 인자 및/또는 추가 세포 계통을 가져 단독으로 적용될 수 있음이 밝혀졌다.
- [0055] 광범위하게 정의되는 본 발명의 프로토콜은 a) 생 인간/포유동물 조직을 수확하는 단계; b) 조직 요소를 처리하여 LGR 발현 세포를 함유하는 미소응집체 다세포 기능 유닛을 생성하는 단계; c) LGR 발현 세포 미소응집체 다세포 기능 유닛을 스캐폴딩, 매트릭스, 입자, 세포(들) 및 섬유로 이루어진 군으로부터 선택된 전달 비히클 기질에 적용하여 구조물을 생성하는 단계; d) 임의로, 선택된 추가의 증강 인자를 포함하는 단계; 및 e) 피부, 샘, 털, 신경, 뼈, 근육, 지방, 힘줄, 혈관, 근막, 안 조직, 골수, 폐, 심장, 손톱, 위장 조직, 구강 조직, 치아, 미뢰, 비노생식기 조직, 신장 조직, 생식 조직, 림프계 조직, 면역계 조직/요소 및 그의 관련 부속기관 및 단백질 세포 요소를 포함하나 이에 한정되지 않는 외배엽, 중배엽 및/또는 내배엽 기원 조직과 관련된 것을 포함하는 조직계를 생성, 재생, 증강 및/또는 치유하기 위해 상기 구조물을 조직에 적용하는 단계를 포함한다.
- [0056] 본 발명은 치료제, 장치, 생물체, 약물 및 생물공학에서 포유동물 조직(들)을 변경시키기 위해 세포 요소의 도포, 이식, 임플란트, 유도 시딩, 유도 이동, 유도 추적, 인쇄팅, 라미네이팅 및/또는 주입에 의해 지지된 LGR 발현 상피 줄기 세포의 직접 전달을 고려한다
- [0057] 정의
- [0058] 본 상세한 설명에서, "하나의 구체예", "일 구체예" 또는 "구체예들"에 대한 언급은 언급된 특징이 본 발명의 적어도 하나의 구체예에 포함됨을 의미한다. 또한, "하나의 구체예", "일 구체예" 또는 "구체예들"에 대한 별도의 언급이 반드시 동일한 구체예를 지칭하지는 않는다; 그러나, 언급되지 않는 한, 그리고 당업자에게 명백한 것을 제외하고는, 그러한 구체예들은 상호배타적이지 않다. 따라서, 본 발명은 본원에 설명된 구체예들의 임의의 다양한 조합 및/또는 통합을 포함할 수 있다. 본원에서 사용된 용어는 단지 특정 구체를 설명하기 위한 것이며, 본 발명을 제한하고자 하는 것은 아니다.
- [0059] 본원에서 사용된 단수 형태 "a", "an" 및 "the"는 문맥상 다르게 지시하지 않는 한 복수 형태를 포함하고자 한다. 또한, 본 명세서에 사용된 용어 "포함한다" 및/또는 "가지다"는 용어는 본 명세서에서 사용되는 경우, 명시된 특징, 단계, 동작, 요소 및/또는 성분의 존재를 나타내지만, 적어도 하나의 다른 특징, 단계, 동작, 요소, 성분 및/또는 그룹의 존재 또는 부가를 배제하지는 않는 것으로 이해해야 할 것이다.
- [0060] 본원에서 사용된 뼈는 광물화된 기저 물질 및 콜라겐 섬유의 매트릭스에 내입된 세포로 구성된 경결합 조직을 의미한다. 섬유는 X 선 회절을 사용하여 탄산칼슘 (10%) 및 마그네슘뿐만 아니라 수산화인회석 패턴 (인산칼슘이 85 중량%)으로 조직된 것으로 보이는 인산칼슘의 결정을 비롯한 무기 성분으로 함침되었으며; 뼈는 중량 기준으로 65-75%의 무기질 및 25-35%의 유기 물질로 구성되며; 한정된 모양과 크기의 골조직의 일부로서 동물 골격의 일부를 형성한다; 인간의 골격에는 약 200 개의 별개의 뼈가 있으며, 두 개의 슬개골 이외의 종자골 또는 고실의 청소골은 포함되지 않는다. 뼈는 관절 연결을 제외한 뼈의 전체 표면을 덮는 섬유막인 골막으로 둘러싸여 있다. 골막 아래에는 치밀한 층과 치밀뼈가 있으며 그 아래에 해면층, 해면골이 있다. 긴 뼈의 속은 골수로 가득 차 있다.
- [0061] 본원에서 사용된 "포함한다", "포함하는", "포함하다", "포함한", "가지다", "가지는" 또는 이의 임의의 다른 변형은 포괄적 포함을 포함하도록 의도된다. 예를 들어, 특징 리스트를 포함하는 처리, 방법, 물품 또는 장치는 반드시 그러한 특징들에만 한정되는 것이 아니라 그러한 처리, 방법, 물품 또는 장치에 명시적으로 리스트되지 않거나 고유한 다른 특징들을 포함할 수 있다.
- [0062] 본원에서 사용된 상피는 샘 및 그로부터 유래된 다른 구조물을 비롯해 모든 자유 표면, 피부, 점액 및 장액을 덮는 세포층을 의미한다.

- [0063] 본원에서 GMP는 제조관리 및 품질관리에 관한 기준 (good manufacturing processes)을 의미한다.
- [0064] 본원에서 사용되는 "외피"는 신체의 외투 막을 의미하며; 표피 및 진피 외에, 표피, 털, 손톱, 한선 및 피지선 및 유선의 모든 유도세포뿐만 아니라 피하 조직을 포함한다.
- [0065] 본원에서 사용되는 LGR4는 각종 생리적 기능에서 중요한 역할을 하는 G 단백질-결합 수용체 (G protein-coupled receptors; GPCR)인, 류신 풍부 반복체 함유 G 단백질-결합 수용체 4를 의미한다. GPR48과 같은 류신 풍부 GPCR (LGR) 패밀리의 구성원은 다중 N-말단 류신 풍부 반복체 (LRR) 및 7-막관통 도메인을 갖는다. LGR4 (류신 풍부 반복체 함유 G 단백질-결합 수용체 4)는 단백질 코딩 유전자이다.
- [0066] LGR4와 관련된 질병들은 뼈의 미네랄 밀도가 낮다. 그의 관련 경로 중에는 Wnt 신호 전달 경로 (KEGG)가 있다. 이 유전자와 관련된 GO 주석은 G-단백질 결합 수용체 활성화 및 막관통 신호전달 수용체 활성을 포함한다. 이 유전자의 중요한 패럴로그 (paralog)는 LGR6이다.
- [0067] R-스폰딘의 수용체는 표준 Wnt 신호전달 경로를 강화시키고 다양한 장기의 형성에 관여한다. R-스폰딘 (RSP01, RSP02, RSP03 또는 RSP04)과 결합 시에, 인산화된 LRP6과 세포 외 Wnt 수용체에 의해 활성화되는 프리즐드 수용체와의 결합으로 표적 유전자의 발현이 증가되도록 표준 Wnt 신호 전달 경로를 촉발시킨다.
- [0068] 전통적인 G-단백질 결합 수용체와 달리, LGR4는 신호를 전달하기 위해 이중 삼합체 G-단백질을 활성화시키지 않는다. 그의 기능은 간, 신장, 장, 뼈, 생식관 및 눈을 비롯한 다양한 기관의 발달에 필요한 Wnt 신호전달 경로의 활성화제로서이다. LGR4는 또한 노린 (norrin) (NDP)의 수용체 역할을 할 수도 있으며, 정자 형성 과정 동안 관주위 근육양 세포에서 Wnt 신호 전달 경로를 활성화시킨다. 마찬가지로, LGR4는 장내 줄기 세포의 유지 및 출생 후 창자음에서 파네트 (Paneth) 세포의 분화를 위해 필요하다. LGR4는 또한 신장 발생에 관여하는 것 외에도 뼈 형성 및 재형성 조절자로서의 역할을 하며; 이는 요관아를 미분화 상태로 유지하는 데 필요하다. LGR4는 적혈구 생성 과정에서 필요한 전안부 발달에 관여하며, TLR2/TLR4 관련 패턴 인식 및 프로염증성 사이토카인 생성을 억제함으로써 선천적 면역의 음성 조절자 역할을 한다. LGR은 부분적으로 MTTP의 리듬 발현을 조절함으로써 (유사성에 의해) 혈장 지질의 24 시간 주기 리듬 조절에 중요한 역할을 한다. LGR4의 일반적으로 알려진 별칭에는 GPR48; G 단백질-결합 수용체 48; BNMD17; 류신 풍부 반복체-함유 G-단백질 결합 수용체 4; 류신 풍부 반복체-함유 G-단백질 결합 수용체 4; 및 G-단백질 결합 수용체 48이 있다. LGR4의 외부 데이터베이스 식별자는 HGNC: 13299 Entrez Gene: 55366 Ensembl: ENSG00000205213 OMIM: 606666 및 UniProtKB: Q9BXB를 포함한다.
- [0069] 본원에 사용된 LGR5는 단백질 코딩 유전자인 류신 풍부 반복체-함유 G 단백질-결합 수용체 5를 의미한다. 그의 관련 경로 중에는 Wnt 신호전달 경로 (KEGG)가 있다. 이 유전자와 관련된 GO 주석은 G-단백질 결합 수용체 활성화 및 막관통 신호전달 수용체 활성을 포함한다. 이 유전자의 중요한 패럴로그는 LGR6이다. LGR5 수용체는 표준 Wnt 신호 전달 경로를 강화시키고 장 상피와 모낭의 줄기 세포 표지자 역할을 하는 R-스폰딘을 위한 것이다. R-스폰딘 (RSP01, RSP02, RSP03 또는 RSP04)과 결합 시에, 인산화된 LRP6과 세포 외 Wnt 수용체에 의해 활성화되는 프리즐드 수용체와의 결합으로 표적 유전자의 발현이 증가되도록 표준 Wnt 신호 전달 경로를 촉발시킨다. 전통적인 G 단백질 결합 수용체와 달리, LGR5는 신호를 전달하기 위해 이중 삼합체 G 단백질을 활성화시키지 않는다. 이는 후배 발생 동안 성인 장 줄기 세포의 발달 및/또는 유지에 관여한다. LGR5의 일반적으로 알려진 별칭에는 G-단백질 결합 수용체 HG38; G-단백질 결합 수용체 49; G-단백질 결합 수용체 67; GPR67; GPR49 및 류신 풍부 반복체-함유 G-단백질 결합 수용체 5가 있다. LGR5의 외부 데이터베이스 식별자는 HGNC: 4504 Entrez Gene: 8549 Ensembl: ENSG00000139292 OMIM: 606667 및 UniProtKB: 075473을 포함한다.
- [0070] 본원에 사용된 LGR6은 G 단백질-결합된 7-막관통 단백질 슈퍼패밀리의 류신 풍부 반복체-함유 아군 멤버를 코딩하는 단백질 코딩 유전자인 류신 풍부 반복체-함유 G 단백질-결합 수용체 6을 의미한다. 코딩된 단백질은 리간드 결합을 위한 말굽 모양의 상호작용 모티프 형성에 중요한 류신 풍부 반복체를 포함하는 대형 N-말단 세포 외 도메인을 가진 당단백질 호르몬 수용체이다. 이 유전자의 대안적인 스플라이싱으로 다중 전사 변이체가 초래된다. LGR6과 연관된 질병에는 점액수종 및 난소 낭선종이 있다. 그의 관련 경로는 Wnt 신호전달 경로 (KEGG) 및 GPCR이다. 이 유전자와 관련된 다른 주석은 G-단백질 결합 수용체 활성화 및 막관통 신호 수용체 활성을 포함한다. 이 유전자의 중요한 패럴로그는 TSHR이다. 표준 Wnt 신호전달 경로를 강화하고 표피에서 다능성 줄기 세포의 표지자 역할을 하는 R-스폰딘 수용체이다. R-스폰딘 (RSP01, RSP02, RSP03 또는 RSP04)과 결합 시에, 인산화된 LRP6과 세포 외 Wnt 수용체에 의해 활성화되는 프리즐드 수용체와의 결합으로 표적 유전자의 발현이 증가되도록 표준 Wnt 신호 전달 경로를 촉발시킨다. 전통적인 G 단백질 결합 수용체와 달리, LGR6은 신호를 전달하기 위해 이중 삼합체 G 단백질을 활성화시키지 않으며 중앙 억제 인자로서 작용할 수 있다. LGR6의 일반적으로 알려진 별칭에는 성선 자극 호르몬 수용체; VTS20631 및 GPCR이 있다. LGR6의 외부 데이터베이스 식별자는

HGNC: 19719 Entrez Gene: 59352 Ensembl: ENSG00000133067 OM IM: 606653 및 UniProtKB: Q9HBX8을 포함한다.

- [0071] 본원에서 사용된 간엽은 간엽 세포의 집합체를 의미한다. 층 간 (inter-laminar) 젤리에서 지지되는 형태로 간엽 세포, 일반적으로 정상 세포로 구성된 원시 배아 결합 조직이다.
- [0072] 본원에서 사용된 근육은 골격근, 심근 또는 평활근으로 분류될 수 있는 고도로 분화된 수축 세포로 주로 구성된 일차 조직을 의미하며; 미시적으로, 후자는 다른 두 유형의 특징인 횡단 줄무늬가 결합되어 있다; 각종 장기 및 부분의 움직임이 이행되는 신체의 수축 장기 중 하나로서; 전형적인 근육은 각 말단에서 힘줄에 의해 뼈 또는 다른 구조물에 부착된 근섬유 (배 또는 벨리) 덩어리이다. 보다 근위이거나 보다 고정적인 부착물은 기원 (q.v.)이라 하고, 보다 원위 또는 보다 이동성인 부착물은 삽입 (q.v.)이며; 기원의 힘줄에 붙어 있는 벨리의 좁은 부분을 두상 (caput) 또는 머리 (head)라고 한다.
- [0073] 본원에서 사용된 신경은 신경 세포 또는 그 과정으로 구성된 임의의 구조를 포함하거나, 또는 추가 발달 단계에서 신경 세포로 진화하는 것을 의미한다. 헤말 (hemal)과 반대로 척수가 위치하는 척추체 또는 그 전구체의 등쪽을 가리킨다.
- [0074] 본원에서 사용된 "또는"은 달리 명시되지 않는 한, "포괄적이고 배타적이지 않은 것"을 의미한다. 예를 들어 조건 A 또는 B는 다음 중 하나에 의해 충족된다. A는 참 (또는 존재함)이고 B는 거짓 (또는 존재하지 않음), A는 거짓 (또는 존재하지 않음)이고, B는 참 (또는 존재함), 및 A와 B는 모두 모두 참 (또는 존재함)이다.
- [0075] 본원에서 입자의 의미는 10 미크론 이하의 가장 큰 도메인을 의미하며, 세포 미세 응집체에 적합한 앵커로서 작용할 수 있는 나노입자, 거대분자의 회합체, 미셀, 세포 고스트, 텐드리머 등을 포함하지만 이에 한정되지는 않는다.
- [0076] 본원에서 사용된 극성은 세포, 조직(들) 및/또는 유기체가 축을 따라 차동적으로 발달하는 경향을 의미한다.
- [0077] 본원에서 사용된 PRM (Pulse Rescue Media)은 상피 세포와 각질 세포의 혼합물로 구성된 Keratinocyte-SFM (1X), 페니실린, 스트렙토마이신 및 암포테리신 B로 이루어진 군으로부터 선택된 항생제-항진균제 및 피브리노겐을 포함하는 세포 지속 매질 제제이다. 이 시약은 일차 조직을 안정화시키고 수송 및 처리 중에 미생물의 생존 가능성을 감소시키기 위해 사용된다.
- [0078] 본원에서 사용된 피부란 표피 및 진피 (corium)로 구성된 신체의 막성 보호 피복체를 의미한다.
- [0079] 본원에서 사용된 줄기 세포는 임의의 전구 세포; 다른 세포 유형으로 분화될 수 있는 딸 세포를 가진 세포; 자손을 하나 이상의 세포 계통으로 전하면서 그의 고유 수를 유지할 수 있는 세포를 의미한다.
- [0080] 본원에서 사용된 "실질적으로", "일반적으로" 및 다른 정도 (of degree)의 단어는 수식된 특성으로부터 허용 가능한 변동을 나타내도록 의도된 상대적 수식어이다. 이것은 수식한 절대 값 또는 특성으로 제한하려는 것이 아니라, 오히려 그 반대로 더 많은 물리적 또는 기능적 특성을 갖고, 바람직하게는 이러한 물리적 또는 기능적 특성에 접근하거나 근사하도록 의도된다.
- [0081] 본원에서 사용된 조직은 유사한 세포 및 그들을 둘러싸고 있는 세포 간 물질의 모임을 의미한다. 몸에는 4 가지 기본 종류의 조직이 있다: 상피 조직; 지방 조직, 혈액, 뼈 및 연골을 포함하는 결합 조직; 근육 조직; 및 신경 조직. 신체나 그 일부의 껍질, 피막 또는 외피.
- [0082] 다음의 설명에서, 예시를 위해 제공된 첨부 도면을 참조한다. 다음의 예시된 구체에는 당업자가 본 발명을 실시할 수 있을 정도로 충분히 상세하게 설명된다. 다른 구체예가 이용될 수 있고, 현재 공지된 구조적 및/또는 기능적 등가물에 기초한 구조적 변경이 본 발명의 범위를 벗어나지 않고 이루어질 수 있음을 이해해야 한다.

도면의 간단한 설명

- [0083] 도 1A는 피부 기원의 상기 LGR 발현 세포의 위치의 일례를 나타낸다.
- 도 1B는 형광 활성화 세포 분류 그래프이다.
- 도 1C는 본 발명과 관련하여 사용하기 위해 고려되는 일련의 다양한 무세포 지지체의 사진이다.
- 도 2A는 시딩에 사용할 수 있는 총 세포 구조물/탈세포 콜라겐 스캐폴드의 사진이다.
- 도 2B는 부분 소화된 세포의 응집체로 시딩한 후 콜라겐 구조물의 면역형광 현미경사진이다.

도 3A 내지 3F는 상이한 LGR6+ 상피 줄기세포 시딩 기질 어레이의 상이한 기술에 의한 다양한 이미지를 나타낸다.

도 4A는 대조군 및 LGR 시딩 매트릭스 일레의 경시적 생체 내 치유 진행을 나타낸다. 도 4B는 10 일째 시토크라틴-17 전자 발현의 그래픽 표현이다. 도 4C 내지 4E는 생물발광 이미징 및 스캐닝 전자 현미경법에 의한 대조군 및 LGR ESC로 시딩된 매트릭스를 도시한다.

도 5A 내지 E는 그래픽 비교와 함께 초기 극성화 형태를 나타내는 기질 혈관 분획 세포 단리물 집단 및 LGR ESC를 가지는 구조물의 일레를 도시한다.

도 6A 내지 B는 기질 혈관 분획 세포 실체가 존재 및 부재하는 LGR 세포를 포함하는 구조물의 일레 및 성장 인자의 상대적 생산을 도시한다.

도 7A 내지 H는 3도 상처 기저부 유도 및 LGR 기질 세포 여포 벌지 및 부속 구조물의 제거 증거를 도시한다.

도 8A 내지 Q는 세균 부착과 관련된 DEFA5를 가진 상처/손상/공동의 시간 진행을 도시한다.

도 9A 및 B는 부속 구조가 없는 치료된 화상 상처에서 증가된 치유, 조직 및 부속기 재생 및 후속적인 털 성장과 관련되는 상처 기저부 내 DEFA5 발현 세포 실체의 비교 사진이다.

도 10A 내지 L은 국소 증점제 치료 후 화상 조직으로의 LGR5 및 LGR6 줄기세포 이동 및 상처 기저부 치유 동력학의 정량화를 도시한다.

도 11A 및 B는 친-치유 경로의 증가와 관련된 DEFA5 - SD7로 처리된 상처/손상/조직 공동의 RT-PCR 정량화 및 유전자 열 지도 비교를 나타낸다.

도 12A 내지 I는 배양 확장을 위한 공발현 LGR6+, CD34+, CD73+, GFP 표지 세포의 형광 활성화 세포 분류 및 모낭 세포의 LGR6 발현을 나타낸다.

도 13A 내지 D는 초기 시딩 (seeding) 시점 및 1 일 후에 기능성 특이성 단위 (aFSU)의 생물 발광 및 공초점 현미경에 의한 현미경 사진이다.

도 13E는 콜라겐 스캐폴드의 현미경 사진이다.

도 14A 내지 E는 피부 조직 내의 위치, 표현형, 계면 및 극성과 관련된 위치 LGR 세포 다양성의 일레를 도시한다. 여포성 벌지로부터 LGR + ESC의 분리 및 배양.

도 15A 내지 E는 상처/손상/조직 공동 주위 및/또는 내에 배치를 통한 전달 방법과 관련된 LGR 발현 세포 증식소의 일레를 제공한다.

도 16A 내지 D는 전달 가능한 벡터와 조직 및 지지 구조의 후속 치유, 재생을 통한 상처 주위 및 그로의 전달과 관련한 LGR 함유 줄기 세포 증식소의 일레를 도시한다.

도 17A 내지 D는 이식 10 일후 전층 상처 기저부 내에서의 LGR6+ 상피 줄기 세포 이동 및 분화를 나타낸다.

도 18은 LGR 발현 세포 증식소를 가진 상처/손상/조직 공동의 RT-PCR 정량화 및 삼입 유전자 열 지도 비교를 제공한다.

도 19는 상처/손상/조직 공동 내 및/또는 주위로의 전달 및 상처 치유 인자의 증가에 관한 상기 LGR 발현 세포 증식소의 일레를 도시한다.

도 20A 내지 F는 골조직의 재생과 관련된 LGR 발현 세포 증식소의 일레를 도시한다. 단리된 LGR 증식소는 시딩된 뼈일 수 있고 생존 가능하게 유지된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0084] 상세한 설명

[0085] 도 1A 내지 C: 모낭 주위에 존재하는 세포 집단 및 그러한 세포가 시딩될 때 쉽게 부착되는 스캐폴드의 유세포 계측법의 예. 보다 구체적으로, 도 1A는 피부 기원의 상기 LGR 발현 세포의 위치의 일레를 나타낸다. 40배 배율의 면역형광 공초점 현미경 검사는 여포 벌지 (백색 화살표), LGR6+ (녹색), DNA (파란색)를 나타낸다. 도 1B는 예시적인 세포 마커를 나타내는 게이트 분석을 갖는 형광 활성화 세포 분류 그래프이다. 도 1C는 본 발명에 따

른 일련의 무세포 매트릭스/기질/스캐폴드/재료를 시드하기 위해 사용될 수 있는 세포 유형의 어레이를 도시한 것이다.

- [0086] 도 2A는 본 발명에 따른 LGR 발현 줄기 세포 증식소를 함유하는 미소응집체 다세포 기능 유닛이 없는 총 구조물의 예를 나타낸 사진이다. 도 2B는 부분 소화된 세포의 응집체로 기질을 시딩한 후의 구조물을 도시한다.
- [0087] 도 3A는 주상 형식으로, 서로 다른 소스로부터의 LGR 시딩 기질의 차등 간접 대비 (DIC) 공초점 현미경에 의한 이미지 시리즈이다. 도 3B는 LGR 발현 세포를 함유하는 각각의 구조물의 LGR6+ ESC 시딩 매트릭스의 20배 배율에서의 면역형광 공초점 현미경에 의한 대응 칼럼이다. 삽입된 흰 네모는 도 3D의 열에 표시된 초점 확대 영역을 나타내고, 도 3C는 매트릭스 윤곽 및 경계를 나타내는 도 3B의 면역형광과 도 3A의 각 이미지 (DIC)의 디지털 병합을 도시한 칼럼이다. 도 3E 및 3F의 칼럼은 각각 시딩 후 72 시간에서의 무세포 매트릭스 대조군 및 상응하는 LGR6+ ESC 시딩 매트릭스의 방사 효율로 측정된 생물 발광을 나타낸다.
- [0088] 도 4A 내지 E는 살아있는 포유류 시스템에 위치한 상기 LGR 함유 구조물의 예를 도시한다. LGR6+ GFP ESC 시딩 매트릭스의 배치는 치유 모낭 성장을 향상시킨다. 도 4A는 매트릭스 무함유 (화상 대조군), 매트릭스 (매트릭스 대조군) 및 LGR6+ GFP ESC를 함유하는 5, 8 및 10 일에 3 mm 완전 인간 탈세포화 진피 두께 화상 상처 기저부의 3x3 매트릭스 현미경 사진이다. 도 4B는 도 4A에 도시된 상처 기저부의 10 일째의 시토허라틴-17 전사 발현의 상대 발현을 그래프로 나타낸다. 치유된 상처 기저부의 퍼센트는 상처 기저부 치유율의 정량 분석을 사용하여 ImageJ NCBI 어플리케이션 내 면적 함수 퍼센트로서 결정되었다. 상처 대조군은 화상 상처 기저부 만을 함유한다. 매트릭스 대조군은 매트릭스만을 포함하며, LGR6+ GFP는 LGR6+ GFP ESC로 시딩된 ADM을 함유한다.
- [0089] 도 4C는 5 일째 무린 전층 화상 상처 기저부의 생체 내 생물발광 이미징 현미경 사진이다. 도 4D는 ESC로 시딩한 후와 12 시간 및 72 시간에 LGR6+ GFP 함유 진피 및 대조군의 100x에서의 인간 진피 현미경 사진이다. 백색 화살표는 진피 구멍의 존재를 나타낸다. 도 4E는 대조군 및 건조를 방지하기 위해 실리콘 보호 오버레이를 갖는 ESC로 시딩된 인간 진피를 함유하는 본 발명의 구조물의 이미지를 제공한다. LGR6+ GFP 매트릭스 이미지는 전층 Nu/Nu 무린 상처 기저부로부터의 초기 헤어 패치를 나타내는 작은 흑색 중복 화살표가 포함하고 있다.
- [0090] 도 5A 내지 E는 이중 격벽 피부양 시스템 및 조직 극성화를 촉진시키는 데 있어 LGR6+ ESC 시딩 매트릭스에 기질 혈관 분획 (SVF)의 첨가 효과를 갖는 상기 구조물의 예를 도시한다. 도 5A는 대표적인 아드레노메둘린 (ADM) (예컨대 Integra LifeSciences Corporation으로부터 INTEGRA®라는 이름으로 입수 가능)에 시딩하고 24 시간 후 5×10^5 RFP를 발현하는 기질 혈관 분획 세포 단리물 집단의 공초점 20 배율 이미지이다. 도 5B는 대표적인 ADM (INTEGRA®)에 시딩하고 24 시간 후 5×10^5 RFP를 발현하는 LGR6+ 세포 단리물 집단의 공초점 20 배율 이미지이다. 도 5C는 배양물에서 공시딩하고 24 시간 후 5×10^5 RFP를 발현하는 LGR6+ 단리물 집단 및 5×10^5 RFP를 발현하는 SVF를 갖는 이중 시딩된 대표적인 ADM (INTEGRA®)의 공초점 20 배율 이미지이다. 도 5D는 배양물에서 5 일 증식 후 5×10^5 RFP를 발현하는 LGR6⁺ 및 5×10^5 RFP를 발현하는 SVF^{RFP}를 함유하는 공시딩된 매트릭스의 것이다. 평행 점선은 ADM 기질의 가장자리에 축적된 상피 LGR6^{+GFP} 계통을 나타낸다. 작은 괄호와 큰 괄호는 LGR6^{+GFP} 및 SVF^{RFP}의 풍부성과 관련한 두 구획의 상대적 위치를 나타낸다. 화살표가 있는 "U" 모양의 실선은 32 게이지 멸균 바늘에 의해 유도된 사전 시딩된 기공을 포함하는 영역을 나타낸다. 도 5E는 녹색 LGR 발현 세포 및 적색 SVF 발현 세포와 함께 공시딩된 콜라겐 기질의 증식 동력학을 나타내는 그래프적 표현이다.
- [0091] 도 6A 및 6B는 지지 세포 실체가 있거나 없는 LGR 세포를 포함하는 구조물의 일례 및 성장 인자의 상대적인 생산을 도시한다. LGR6^{+GFP} ESC 및 SVF^{RFP}가 풍부한 스캐폴딩 배양 구조물로부터의 친-혈관신생 전사 및 단백질 분석물의 상관적인 발현 프로파일. 도 6A는 각각의 스캐폴드 기질 상에서 총 RNA로부터 표시된 유전자 요소의 상대 배수 전사 발현 ($\Delta\Delta CT$) 그래프이다: LGR6^{+GFP} ESC (흑색 막대), SVF^{RFP} (회색 막대), 및 공배양된 LGR6^{+GFP} ESC + SVF^{RFP} (백색 막대). x 축 위의 유의성 (LGR6 + SVF)은 표시된 스캐폴딩에서 공배양된 LGR6^{+GFP} ESC + SVF^{RFP} 발현 대 특이적 LGR6^{+GFP} ESC 및 SVF^{RFP} 발현의 상호 비교를 나타낸다. Ex. 공배양된 매트릭스에 대한 평균 FGF-2 유전자 발현은 공배양된 INTEGRA® (INTEGRA® + LGR6⁺ SVF)를 제외하고는 두 특이적 시스템 (스캐폴드 + LGR6 또는 스캐폴드 + SVF)의 평균 발현보다 높았다. x 축 (LGR6) 또는 (SVF) 아래의 유의성은 기질의 내부 비교를 나타내는데, 세포 독립성은 일정하게 유지된다. Ex. INTEGRA® + LGR6^{+GFP} ESC 단독 vs. DERMAMATRIX® + LGR6^{+GFP} ESC 단독에 대한 VEGF-A 유전자 발현은 유의적이지 않았다 (NS). 도 6B는 총 단백질 단리물로부터 표시

된 단백질 분석물의 상대 농도 유닛 (RDU)을 나타낸다: 각각의 스케폴드 기질 상에 LGR6^{+GFP} ESC (흑색 막대), SVF^{RFP} (회색 막대) 및 공배양된 LGR6^{+GFP} ESC + SVF^{RFP} (백색 네모). (*)는 (p 값 <0.05)의 삼중 (triplicates)으로 수행된 분석, GAPDH 하우스키핑 대조를 나타낸다.

[0092] 도 7A 내지 H는 상처로의 향상된 LGR 세포 이동, 증식 및 생존성의 치료 예를 받은 상처/손상/공동을 나타내며, 즉 3도 상처 기저부 유도 및 LGR 줄기 세포 여포 별지 및 부속 구조의 제거에 대한 입증을 나타낸다. 도 7A는 3mm 직경의 상처 기저부 템플릿 마크를 도시한다. 도 7B는 0 일에 상처 기저부 구조를 도시한다 (백색 스케일 바는 1 mm이다). 도 7C는 2x3 mm 상처 기저부 그리드의 일례를 도시한다. 도 7D는 상처 부위에서 재현된 펩티드의 국소 도포를 나타낸다. 도 7E는 모낭 및 부속 구조를 갖는 화상을 입지 않은 무손상 외피/피부의 H&E 염색의 현미경사진이다. 화살표는 흰 스케일 바가 500 μ m인 확대된 여포 (삽입된 이미지)의 위치를 나타낸다. 도 7F는 여포 별지를 포함하는 표피, 진피 및 피하 조직의 제거를 나타내는 고온 소작술 후 무린 등 피부의 H&E 염색이다. 도 7G는 모낭 및 부속 구조를 갖는 화상을 입지 않은 무손상 피부의 DAPI/DNA 염색 (4',6-디아미디노-2-페닐인돌)이다. 화살표는 각각 녹색 및 적색 면역형광 LGR5 및 LGR6 항체의 공동 표지를 가진 (삽입된 이미지) 확대된 여포를 나타낸다. 도 7H는 여포 별지를 포함하는 표피, 진피 및 피하 조직의 제거를 나타내는 고온 소작술 후 무린 등 피부의 DAPI/DNA 염색이며, 여기서 백색 스케일 바는 100 μ m이다.

[0093] 도 8A 내지 Q는 5 및 10 일의 기간에 걸쳐 항균 거동과 관련된 LGR을 가진 상처/손상/공동을 나타낸다. 16S rRNA 형광 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용한 인-시튜 하이브리드화 (in-situ hybridization)는 3도 화상 상처 기저부에서 세균 부착의 존재를 나타낸다. 도 8A는 SDZ로 매일 처리된 화상 유도 후 5 일에 3도 화상 상처 기저부의 DNA/DAPI 표지를 나타낸다. 도 8B에서, SDZ로 매일 처리된 화상 유도 후 5 일에 3도 화상 상처 기저부 세균 유기체 (황색 입자)의 5'-Cy3-EUB338로 표지된 16-rRNA가 도시되어 있다. 도 8C는 도 8A 및 도 8B의 디지털적으로 병합된 이미지이다. 도 8D는 10일째에 SDZ로 매일 처리된 3도 화상 상처를 DNA/DAPI로 표지화한 것을 제외하고는 도 8A에 상응한다. 그에 상응하여, 도 8E는 SDZ로 매일 처리된 화상 유도 후 10 일째에 3도 화상 상처 기저부 세균 유기체 (황색 입자)의 5'-Cy3-EUB338로 표지된 16s rRNA의 현미경 사진이다. 도 8F는 도 8D 및 E의 병합 이미지이다. 도 8G 내지 8L은 각각 도 8A 내지 F의 5 및 10 화상 후 기간에 상응하지만 SDZ가 아닌 디펜신, 알파 5 (DEFA5)를 사용하여 매일 치료를 받은 이미지이다. H에서 화살표는 DEFA5 치료 환경에서 박테리아가 더 적게 나타나는 섬유소 물질이 위에 있는 조직의 경계면을 나타낸다. 삽입된 8N을 가진 도 8M은 단위 면적당 더 많은 16s rRNA 표지를 포함하고 있고 SDZ로 처리된 상처 기저부의 Cy3 형광 흑백 변환 이미지의 백색 픽셀 강도 정량화를 보여준다. 도 8O 및 삽입된 8P는 단위 면적당 감소된 16s rRNA 표지를 함유하고 있고 DEFA5로 처리된 상처 기저부 (삽입된 이미지 p.)의 Cy3 형광 흑백 변환 이미지의 백색 픽셀 강도의 정량화를 상응하게 나타낸다. 삽입된 그래프는 흑백 이미징 소프트웨어를 사용하여 5 일째에 SDZ 및 DEFA5 모두로 처리된 화상 상처 기저부에서 발현된 16s rRNA의 평균 백색 픽셀 강도를 나타낸다. 마지막으로, 도 8Q는 5 일째 SDZ 및 DEFA5 모두로 처리된 화상 상처 기저부에서 발현된 16s rRNA의 평균 적색 채널 형광을 도시하는 그래프이다. 도 8H에서 백색 화살표는 DEFA5 처리된 상처 기저부에서 잠재적인 막을 나타내고, 도 8M에서 흑색 화살표는 백색 픽셀 강도를 나타낸다. 스케일 바는 100 μ m이다. (*)는 p 값이 <0.05임을 나타낸다.

[0094] 도 9A 및 B는 부속 구조가 없는 처리된 화상 상처에서 증가된 치유, 조직 및 부속기 재생 및 후속 털 성장, 상처 치유 동역학 및 초기 털 성장과 관련하여 상처 내 LGR 발현 세포 실체의 일례를 나타내는 일련의 시간 진행 사진이다. 도 9A를 포함하는 사진 시리즈는 제시된 약제 MQH20, DEFA5, DEFB1, SDZ로 치료되는 동안 10 일에 걸쳐 3도 화상 상처 기저부의 치유를 이미지화하기 위해 Leica Wild M680 외과 현미경을 사용한 전체 이미징이다. 백색 스케일바는 1 mm를 나타낸다. 도 9B의 제2 사진 시리즈는 또한 DEFA5 대 대조군 처리된 상처 기저부를 나란히 비교하여 16 일에 걸쳐 3도 화상 상처 기저부의 초기 털 성장을 추적하기 위한 Leica Wild M680을 사용한 전체 이미징을 포함한다. 백색 화살표는 새로운 털 성장을 나타낸다. 다시, 스케일바는 1 mm이다.

[0095] 도 10A 내지 L은 증가된 치유, 상피 실체의 증식과 관련하여, 상처/손상/조직 공동 내 상피 LGR 발현 세포 실체의 일례를 포함한다. 도 10K 및 10L을 포함하는 그래프는 국소 초점제로 처리한 후 상처 기저부 치유 동역학 및 LGR5 및 LGR6 줄기 세포의 화상 조직으로의 이동의 정량화 증거를 제공한다. 간단히 설명하면, 이러한 검사는 이미징 LGR5 및 LGR6으로부터 정량적 공초점 현미경 강도 패턴을 확인하기 위해 사용되었고, 화상 상처 조직에 대한 역전사 효소 중합효소 연쇄 반응에 기초한다. 그래프에 나타난 바와 같이, 인간 알파 디펜신 5 상처 기저부 내에 평균 LGR5 및 LGR6 mRNA 발현은 5 일째 설파디아진으로 처리된 상처에서 검출 불가능한 LGR5 및 LGR6의 수준과 비교하여 각각 95.8 ± 10.6 및 259.2 ± 20.2 인 것으로 나타났다 (도 4, 우측). 인간 알파 디펜신 5로 처리한 조직과 설파디아진으로 처리한 표본 내에서 이러한 배수 수준 비교의 크기는 배수 값을 정의하는 상처로

이동하는 LGR5 및 LGR6 발현 세포의 절대적인 존재 또는 결여를 제시한다.

- [0096] 특정 수치를 보면, 도 10A는 흑색에 상처 면적 계산 및 백색 스케일바가 1 mm를 나타내는 상처 영역의 사진을 나타낸다. 도 10B는 표시된 국소 초점 제제 적용의 10 일 기간 동안 잔존하는 상처 면적의 퍼센트 %로서 표현된 평균 상처 치유율을 그래프로 나타낸다. 별표 (*)는 p-값 <0.05를 나타낸다. 도 10C 내지 J는 5 일째에 DEFA5로 처리된 상처 기저부의 LGR5 및 LGR6 면역형광 항체 표지로서, 도 10C는 DNA/DAPI/청색이고, 도 10D는 LGR5/FITC/녹색이고, 도 10E는 LGR6/TRITC/적색이고, 도 10F는 10C 내지 10E의 병합이다. 도 10G 내지 I는 5 일째에 SDZ (설파디아진)로 처리된 상처 기저부의 상응하는 LGR5 및 LGR6 면역형광 항체 표지이다 (DNA/DAPI/청색, LGR5/FITC/녹색 및 LGR6/TRITC/적색). 도 10J는 10G 내지 10I의 병합 이미지이고, 5 일째에 상처 기저부 당 녹색 및 적색 형광 강도를 사용하여 평균을 낸 LGR5 및 LGR6 발현을 나타내는 삽입도를 포함한다. DEFA5 및 SDZ로 처리된 복제 상처 기저부로부터 추출한 RNA 배수 증가의 역전사효소 PCR 정량으로부터 얻은 비교값이 도示된다. 백색 스케일바는 50 μ m이고 다시 별표 (*)는 p-값 <0.05를 나타낸다.
- [0097] 도 11A 및 B는 켜-치유 경로의 증가와 관련된, 상처 내에 위치한 LGR 발현 세포 실체를 가진 상처/손상/조직 공동을 나타낸다. 도면은 각각 DEFA5로 처리된 상처 기저부의 SDZ에 대한 RT-PCR 정량화 및 유전자 열 지도 비교를 나타낸다. 이들 도면은 상처 내 주요 전사 발현을 증가시키는 데 있어 설파디아진에 대한 인간 알파 디펜신 5의 역할을 나타낸다. 결과는 설파디아진 치료법과 비교할 때 일부 유전자 서브세트가 인간 알파 디펜신 5를 투여받은 상처 기저부 내에서 현저히 상향 조절되며 특정 Wnt 경로 유전자 서브세트가 LGR 줄기 세포 시스템이 Wnt 리간드에 반응하여 장 및 피부 모두에서 상당히 상향 조절된다는 것을 보여준다.
- [0098] 도 11A는 평균 상처 치유 RT2-PCR 어레이 경로 열지도 및 DEFA5를 SDZ 처리된 시스템과 비교하는 상처 기저부에 대한 배수 조절을 가진 해당 유전자 지도를 나타낸다. 도 11B는 DEFA5를 SDZ 처리된 시스템과 비교하는 상처 기저부에 대한 배수 조절을 갖는 평균 Wnt RT2-PCR 어레이 치유 경로 열 지도 및 상응하는 유전자 지도를 나타낸다. 열지도의 색상은 DEFA5로 처리한 화상에서는 적색으로 더 많이 표시되고 SDZ로 처리한 화상에서는 녹색으로 더 많이 표시된다.
- [0099] 도 12A 내지 I는 위치, 집단 동일성 및 상처 치유능에 관련된 LGR 발현 줄기 세포 증식소를 함유하는 미소응집체 다세포 유닛의 일례를 나타낸다. 간단한 생체 외 상처 치유 분석법 및 형광 활성화 세포 분류법을 사용하여 LGR6+, CD34+ 및 CD73+ C57BL/6 (UBC-GFP) 유린 세포를 세포 배양 확장을 위해 단리하였다. 도 12A는 부분 표피 10 유닛/ μ l 디스파제 소화 후 모낭에 대한 세포의 LGR6 형광 항체 (녹색) 발현을 나타낸다. 서행 로커에서 37 °C에서 30 분동안 (Worthington Biochemical Corp., Lakewood, N.J.) 소화. 도 12B는 추가의 CD34 및 CD73 마커를 발현하는 LGR6+ 세포를 나타낸다 (화살표는 모든 세포의 약 1 내지 3%를 차지하는 단리된 집단을 나타낸다). 도 12C 내지 H는 C57BL/6 (UBC-GFP) 유린 세포, CD34+ PE/Cy7 발현, LGR6+ APC 발현 및 CD73+로부터의 주기적인 고유 GFP 발현을 각각 나타내는 시험관 내 상처 분석의 eFluor450 발현 막대그래프이다. 점선은 세포층이 파괴된 후 0, 6 및 12 시간에 분리 거리를 나타내며, 스케일바 50 μ m이다. 도 12I의 그래프는 형광 분류 후 초기 거리의 백분율로 표시되는 시간 경과에 따른 거리 선의 평균 감소를 나타내며, 여기서 별표 (*)는 p 값 <0.05를 나타낸다.
- [0100] 도 13A 내지 D는 초기 시당 시 및 1 일 후 활성화된 기능 특이성 단위 (aFSU)의 생물 발광 및 공초점 현미경에 의한 현미경 사진으로서, 콜라겐 매트릭스에서 초기 증식을 거치는 동안 LGR 발현 줄기 세포 증식소를 함유하는 미소응집체 다세포 유닛의 예를 나타낸다. 도 13E.
- [0101] 도 14A 내지 E는 피부 조직 내의 위치, 표현형, 계면 및 극성과 관련된 위치 LGR 세포 다양성의 일례를 도시한다. 도 14A는 면역형광 염색, LGR6 (녹색/플루오레세인 이소티오시아네이트 (FITC)) 및 LGR5 (적색/테트라메틸로다민 이소티오시아네이트 (TRITC)) 발현의 국소화 영역을 보여준다. 스케일 바는 20 μ m이다. 도 14B는 좌측에 LGR6+, CD34 및 CD73을 사용하여 최종 분류 게이트를 갖는 C57BL/6 (UBCGFP) 유린 피부 유래 LGR6⁺GFP 상피 줄기 세포의 형광 활성화 세포 분류 단리를 도시하고, 우측에 세포 GFP 발현 및 상관 항체-접합체 표지: CD73/PE-7, LGR6/Cy5, CD34/eFluor450을 나타내는 개별 막대그래프를 도시한다. 도 14C는 형광-활성화된 세포 분류 단리 후 플레이팅된 LGR6⁺GFP 상피 줄기 세포의 차등 간섭 대비 이미지를 나타낸다. 도 14D는 LGR6⁺GFP 상피 줄기 세포의 고유 GFP 발현을 도시하고, 도 14E는 도 14C 및 14D의 병합된 이미지이다. 스케일 바는 20 μ m를 나타낸다.
- [0102] 도 15A 내지 E는 상처/손상/조직 공동 주위 및/또는 내 배치를 통한 전달 방법과 관련된 LGR 발현 세포 증식소

의 일례를 제공한다. 도 15A의 세 이미지는 각각 초기 화상 템플릿을 나타낸다; Nu/Nu 마우스의 등쪽에 전층 화상; 및 상처 부위의 기부에 10^5 개의 LGR6^{+GFP} 상피 줄기 세포를 함유한 HYDROGEL®의 전달. 도 15A의 스케일바는 1 mm이다. 도 15B는 0 일째 주사 포켓 DNA DAPI-BLUE의 면역형광 이미지이다. 도 15B는 항-LGR6/TRITC 항체 표지의 면역형광 이미지이고, 도 15C는 LGR6^{+GFP} 상피 줄기 세포와 동일하다. 도 15E는 도 15B 내지 D의 병합된 이미지이고, 20 μ m의 스케일바를 갖는다. 도 15A 내지 E는 전층 화상 상처 기저부 유도 및 후속 연조직 결손으로의 LGR6+ 줄기 세포 생착의 확인을 나타낸다.

[0103] 도 16A 내지 D는 전달 가능한 벡터와 제한적이지 않은 혈관신생 및/또는 혈관형성을 포함한 조직 및 지지 구조의 후속 치유, 재생을 통한 상처 주위 및 내로의 전달과 관련된 LGR 함유 줄기 세포 증식소의 일례를 도시한다. 전층 상처로 LGR6+ 상피 줄기 세포 이식 후 상처 치유 진행. 상처 치유의 진행은 15 일에 걸쳐 도 16A의 BD Biosciences (캘리포니아 산호세 소재) 제품인 HYDROGEL® (대조군)의 주입 후가 도 16B, LGR6^{+GFP} 상피 줄기 세포 시딩된 HYDROGEL®과 비교하여 도시된다. 스케일 바는 1 mm이다. 15 일 후 임플란트 포켓을 보여주는 도 16C에서, 백색 화살표는 치유 상처 기저부 내에 위치하는 나머지 LGR6^{+GFP} 상피 줄기 세포 집단의 존재를 나타낸다. 도 16D에서, 흑색 화살표는 LGR6^{+GFP} 상피 줄기 세포가 없는 화상 상처 기저부의 위치를 나타낸다.

[0104] 도 17A 내지 D는 조직 및 예컨대 모낭 및 관련 지지 구조가 예시되나 이에 제한되지 않는 관련 부속기의 후속 치유 및 재생과 함께 상처 내 및/또는 부근에 전달 후 LGR 함유 줄기 세포 증식소의 일례를 도시한다. 도 17A는 10 일째 LGR6+ 상피 줄기 세포가 상처 기저부로 이식된 후 10 일에 면역형광 표지된 조직 표본의 공초점 이미지의 네 채널 매트릭스이다. 도 17A를 포함하는 이미지는 DNA/DAPI-BLUE; 항-LGR6/TRITC; LGR6^{+GFP} ESC의 GFP 발현을 포함한다.

[0105] 도 17B는 모든 채널의 차등 간섭 대비 이미지 병합이다. 적색 화살표는 초기 모낭 발생 영역을 나타낸다. (상단의 삽입된 이미지 참조). 점선은 초기 모낭을 덮고 있는 상피 극성을 나타내며, 백색 화살표는 이식편 주입 포켓의 위치를 나타낸다 (초기 주입 포켓 세포 집단의 이미지에 대한 하부 삽입된 이미지의 확대도 참조). 도 17B의 삽입 그래프는 대조군 및 LGR6+^{+GFP} 처리의 제시된 상처 기저부 내에서 비교된 KRT17/시토헤라틴 17 유전자 발현을 나타낸다.

[0106] 도 17C를 참조하면, 세 이미지는 모낭 연구 집단 화상 상처 기저부를 커버하기 위해 사용되는 이식 돔, 초기 모낭 (투명 화살표) 모낭포 형성을 가지는 10 일째의 LGR6+^{+GFP} ESC 처리된 상처 기저부 (실선 화살표) 및 10 일째의 대조군 상처 기저부에 대한 것이다. 도 17D를 포함하는 그래프는 WNT 리간드의 상대 유전자 배수 발현을 나타내는 RT-PCR로 10 일 상처 기저부를 정량화한 것이다. 양의 숫자는 LGR6^{+GFP} 상피 줄기 세포 상처 기저부에서 더 높은 발현을 나타내는 반면, 음의 숫자는 대조 상피 기저부에서 보다 높은 발현을 나타낸다.

[0107] 도 18은 대조군에 대한 LGR6+ 상피 줄기 세포를 투여한 상처의 비교 유전자 발현 및 친-치유 경로의 증가와 관련되기 때문에, 상처/손상/조직 공동 주변 및/또는 내로의 전달과 관련되는, LGR 발현 세포 증식소를 가진 상처/손상/조직 공동의 RT-PCR 정량화와 삽입된 유전자 열 지도 비교를 제공한다. 그래프는 혈관 신생, 상처 치유 및 표피 성장 인자에 대한 유전자의 상대 배수 발현을 나타낸다. LGR6+ 상피 줄기 세포 및 대조 요법을 받은 상처 기저부를 비교한 데이터의 상관 그래프 표현. 삽입된 열지도와 관련하여, 적색은 LGR6+ 상피 줄기 세포 상처 기저부 내에서 더 큰 발현을 나타내는 반면, 녹색은 대조군의 상처 기저부 내에서 더 큰 발현을 나타낸다. 막대 그래프에서 양의 숫자는 LGR6^{+GFP} 상피 줄기 세포 기저부에서 더 높은 발현을 나타내고 음의 숫자는 대조군의 상처 기저부에서 보다 높은 발현을 나타낸다. NCBI Unigene 용어는 각 정량 컬럼의 상단에 표시되며 별표 (*) P-값은 0.05 미만의 유의성을 나타낸다.

[0108] 도 19는 상처/손상/조직 공동 내 및/또는 주위로의 전달 및 상처 치유 인자의 증가에 관련된 LGR 발현 세포 증식소의 일례에 대한 상대적 단백질 농도를 그래프로 나타낸다. LGR6+ ESC를 받은 상처의 비교 혈관신생 분석물 발현. 혈관신생을 조절하고 증가시키는 일반적인 단백질들을 비교하는 프로테오믹 어레이 (Proteomic array). 회색 열은 대조 상처를 나타내고 흑색 열은 LGR6^{+GFP} ESC를 받은 상처를 나타낸다. 삽입된 이미지는 HRP 화학발광 전개 후 예시 프로테오믹 어레이 막을 보여준다. 밝은 색상은 더 높은 수준의 단백질 발현을 나타낸다.

[0109] 도 20A 내지 F는 골조직의 재생과 관련된 LGR 발현 세포 증식소의 일례를 도시한다. 단리된 LGR 증식소는 시딩

빼일 수 있고 생존 가능하게 유지된다. 도 20A는 배양을 위해 수확한 뼈의 전체 뼈 이미지이다. 도 20B는 시딩 7 일 후 LGR GFP를 포함하는 뼈의 DIC 이미지이다. 도 20C는 시딩 7 일 후 LGR6⁺GFP를 함유하는 뼈의 488 nm 녹색 레이저 공초점 이미지이다. LGR 증식소가 시험관 내에서 골 유도를 할 수 있다는 것이 주목할만 하다. 도 20D는 보충 매질로 1 주동안 골 유도한 후의 LGR 증식소를 나타낸다. 도 20E는 시험관 내에서 골 유도를 할 수 있고 주요 골형성 유전자를 상향 조절할 수 있는 골 유도 (osteo-induction) 후 LGR 증식소의 알리자린 (Alizarin) 적색 염색이다. 마지막으로, 도 20F는 상대 배수 유전자 발현을 나타내는 RT-PCR 데이터로서, 회색 열은 비-골 유도 LGR을 나타내고 (대조군), 흑색 열은 배양 7 일 후에 골 유도 배지를 받은 LGR을 나타낸다. GAPDH가 기준이 되는 표준 하우스키핑 유전자로 사용되었다.

[0110] 예시적 프로토콜

[0111] 다음은 본 발명의 일 구체예의 실시를 위한 구체적인 프로토콜 시퀀스를 제공하는 일련의 실시예이다.

[0112] 본 발명에 따른 최소로 극성화된 기능성 유닛을 생성하기 전에, 예시적인 3 차원 콜라겐 스캐폴드와 같은 젤라틴형 지지체가 다음과 같은 주지의 방법으로 생성될 수 있다:

[0113] i. 냉각 콜라겐 기반 용액 8 부에 10X 배양 배지의 냉각 10X PBS 1 부를 조심스럽게 저으면서 천천히 첨가한다. 현탁액에 ECM 및 생존 단백질을 첨가한다;

[0114] ii. 멸균 0.1M NaOH를 사용하여 혼합물의 pH를 7.2 내지 7.6으로 조정하고 주의하여 pH 조절을 모니터링한다.

[0115] iii. 멸균 분자 등급의 물로 최종 부피가 총 10 부가 되도록 조정한다;

[0116] iv. 겔화를 방지하기 위해 혼합물의 온도를 2 내지 10 °C로 유지한다;

[0117] v. 약 90 내지 120 분 동안 37 °C로 가온하여 겔을 형성한다;

[0118] vi. 멸균 마이크로-바늘 프레스로 스캐폴드를 천공한다 (스캐폴드는 보관을 위해 필요한 경우 동결건조 공정을 거칠 수 있다).

[0119] 또한 LGR 응집체 추출 절차를 이행하기 전에 PRM (Pulse Rescue Media)으로 불리는 추가 물질을 제조하여 제공하는 것이 권장된다.

[0120] 사람에게 관한 본 구체예에서, PRM은 Thermo Fisher Scientific으로부터 Keratinocyte-SFM (1X)으로 판매되는 소 뇌하수체 추출물 (BPE) (항생제-항진균제 페니실린, 스트렙토마이신 및 암포테리신 B가 GMP-피브리노겐: 인간과 함께 첨가) 및 별도로 포장된 예비정성화 재조합 인간 재조합 표피 성장 인자 1-53 (EGF 1-53)과 함께 공급된 L-글루타민을 함유하는 세포 유지, 무혈청 배지 혼합물 Keratinocyte-SFM이다. 일 구체예에서 사용되는 약제는 Thermo Fisher Scientific 제인 GIBCO® 항생제-항진균제로서, 10,000 units/mL의 페니실린, 10,000 µg/mL의 스트렙토마이신 및 25 µg/mL의 FUNGIZONE® 항진균제를 함유한 용액이다. PRM은 인체 조직을 운반하는 데 사용되기 때문에, 일차 조직을 안정화시키고 수송 및 처리 과정에서 미생물의 생존 가능성을 감소시키기 위해 보충 시약을 사용한다.

[0121] 다음은 구체적으로 본 발명의 일 구체예에 따른 LGR 발현 상피 세포를 함유하는 줄기 세포 미소응집 기능 유닛의 생성 및 보존에 관한 것이다.

[0123] 실시예 1

[0124] 실시예 1은 본 발명의 일 구체예에 따른 최소 극성화 기능성 유닛의 추출 방법에 관한 것이다. 표본을 얻은 후 표본은 관련 수송 컨테이너에서 제거되고 다음과 같이 처리된다:

[0125] i. 표본을 펄스 레스큐 배지 (pulse rescue media)를 함유한 멸균 50 ml 원뿔형 튜브에 넣어 5 분 동안 로커에 놓고, 이를 새로운 배지와 컨테이너로 총 3 회 반복한다.

[0126] ii. 표본을 제거하고 펄스 매질을 함유한 멸균 배양 접시에 넣고 조심스럽게 진피와 표피 구획에서 지방과 피하 성분을 절제한다. 여포 유닛은 제자리에 남기고 과도하게 절개하지 않는다;

[0127] iii. 절제된 피하 지방 성분들을 PRM이 들어있는 별도의 50 ml 원뿔형 튜브에 넣고, +4 °C에서 서행 로커에 놓는다;

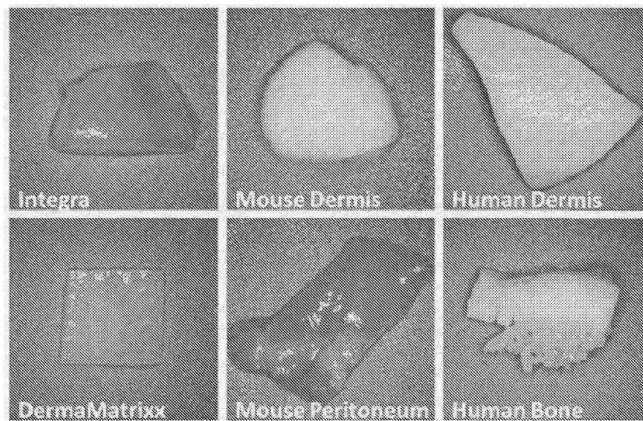
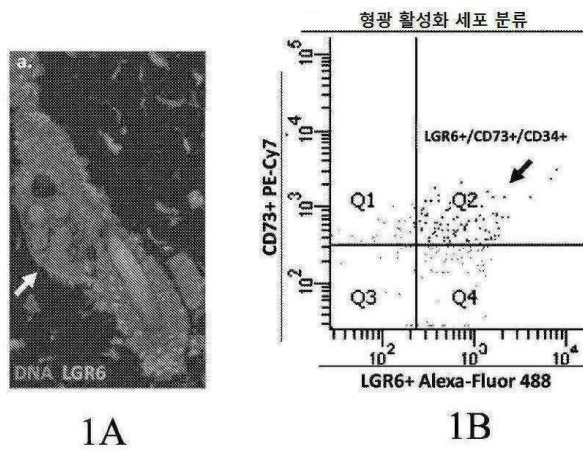
- [0128] iv. 초미세 WECPREP® 블레이드 또는 특정 형태의 마이크로-16 란셋 (micro-16 lancet)을 사용하여 표피, 여포 및 진피 구획을 포함하는 나머지 피부 요소를 최소 극성화 기능성 단위 (MPFU)로 분할한다;
- [0129] v. MPFU 성분을 펄스 매질을 함유한 별도의 50 ml 원뿔형 튜브에 넣고 +4 °C에 둔다.
- [0130] 다음은 일차 배양이 확립되고, 기능적 조직 요소가 FDA 및/또는 GMP 인증을 충족하는 기존 CLIA 장비 및 시약을 사용하여 효소 제제를 사용하여 제조되는 2차 처리에 관한 것이다.
- [0131] **실시예 2**
- [0132] 실시예 2는 하피 및 피하 지방 세포 성분의 처리에 관한 것이다. 실시예 2는 다음 단계로 열거된다:
- [0133] i. 조직 컨테이너의 외측에 70% 에탄올 (EtOH)을 분무하고, 조직 컨테이너를 층공기류 캐비닛에 놓는다.
- [0134] ii. 조직 또는 전달 매질의 시료를 미생물학적 검사를 위해 보낸다;
- [0135] iii. 미리 세척한 지방 및 피하 조직을 150 mm 무균 배양 접시에 놓는다;
- [0136] iv. 조직을 PRM으로 2회 세척한다;
- [0137] v. 조직을 무균 수술 도구를 이용하여 작은 (3 mm) 조각으로 절개하고, 절개가 완료되는 동안 펄스 매질을 함유한 멸균 배양물 보유 접시에 둔다;
- [0138] vi. 보유 접시에서 매질을 흡인하고, 멸균 스크프 또는 검자로 시료를 제거한 후, 시료를 (콜라게나제 및 디스파제-기반의) 사전 혼합된 소화 효소 용액인 MSC 효소 소화 매질을 포함하는 50 ml 원뿔형 튜브에 투입한 다음, 37 °C 수조 또는 건열 저속 진탕기에 넣고 30 분 또는 미립자 물질이 거의 남지 않을 때까지 진탕한다;
- [0139] vii. 37 °C 인산염 완충 염수 (PBS) 에틸렌디아민테트라아세트산 (EDTA) (동 부피의 PBS-EDTA)을 첨가하여 소화를 중지시킨다;
- [0140] viii. 현탁액을 10 분동안 원심분리하여 "연질" 펠렛을 생성한다;
- [0141] ix. 상부 액체 부분을 버리고, 멸균 피펫을 사용하여 저장된 매스에서 기질 혈관 분획 (SVF)으로부터 지방 집단을 분리한다;
- [0142] x. 인산염 완충액 염수/EDTA, PBS-EDTA (EDTA 1 mM)에 SVF를 재현탁시키고, 지방 세포 집단을 2 개의 별도 원뿔형 튜브에서 PRM에 재현탁한다.
- [0143] xi. 100 µm 멸균 필터를 사용하여 현탁액을 새로운 살균 원뿔형 튜브로 여과한다;
- [0144] xii. 필터를 PBS-EDTA로 세척한다;
- [0145] xiii. 현탁액을 실온에서 10 분간 스핀여과하고, 매질을 흡인한 후, 흡인 매질을 기저 부피의 신선한 매질로 대체한다;
- [0146] xiv. COUNTESS® 자동화 세포 계수기 (Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 세포 집단을 계수하여 생존력을 결정한다;
- [0147] xv. 동결보존을 위해 Thermo Fisher Scientific 제인 SYNTH-A-FREEZE® CTSTTM (Cell Therapy Systems)로 얻은 세포 집단 20%를 제거하고, 나머지 80% 집단을 구조물 어셈블리에 사용하였다.
- [0148] **실시예 3**
- [0149] 실시예 3은 본 발명의 일 구체예에 따른 구조물의 예에 하피 및 피하 지방 성분을 첨가하는 것에 관한 것이다. 예시적인 성분의 첨가 실시예는 다음을 포함한다:
- [0150] i. 어셈블 및 세척된 스캐폴드를 이미 포함하고 있는 멸균 NUNC® 피부 이식편 세포 배양 접시 또는 자동화 접시를 층류 후드에 넣고, 세포를 첨가하기 전에 스캐폴드를 펄스 매질로 다시 2 회 세척한다;
- [0151] ii. 추적 번호가 있는 각 배양 용기에 표지를 삽입한다;
- [0152] iii. 접시 시스템 당 약 5×10^5 내지 1×10^6 혼합 SVF 세포 및 접시 당 1×10^5 지방 세포를 전달한다;
- [0153] iv. 상황의 특정 요구 사항에 따라 자가 PRP가 있거나 없는 완전 배양 배지를 로딩 저장소에 첨가한다;

- [0154] v. 접시를 1 시간동안 저속 로커 상의 인큐베이터로 옮기고, 제거한 뒤, 별도의 센티넬 인큐베이터 (sentinel incubator)에서 48 시간 동안 반듯하게 정치시킨다;
- [0155] vi. 48 시간 후에 배양 배지를 세척하고, 비접착성 세포를 버리고 완전 배양 배지를 새로 교체한다. EVOS® (ThermoFisher Scientific)와 같은 세포 이미징 장치를 사용하여 이미지화하고 지정된 추적 번호를 달아 저장한다;
- [0156] vii. 배지를 72 시간마다 교체한다;
- [0157] viii. 합류점에서, 배지를 둘베코 인산염 완충 염수 (DPBS)로 세척하고, 배양 배지를 신선한 배지로 교체한다;
- [0158] ix. 중간엽 줄기 세포 (MSC) 구조물의 표면에 직접 상피 줄기 세포 기능 특이성 구조물 (ESC FSU)을 놓고, ESC 배지를 첨가하여 두 구조물을 덮은 뒤, 동일하게 이미징하고, 구조물을 인큐베이터에 다시 위치시킨다;
- [0159] x. 구조물 배지를 48 시간마다 변경/교체한다.
- [0160] **실시예 4**
- [0161] 실시예 4는 최소 극성화된 상피 줄기 세포 특이성 단위의 풍부화에 관한 것이다. 실시예 1에 따라, MPFU를 15 ml 원뿔형 튜브 내의 펄스 레스큐 매질에 넣고, 스핀/원심 분리하여 연결 펠렛을 만든다. 이어 물질은 다음 부분 소화 과정을 거친다:
- [0162] i. 사전 분액된 냉동 10 ml 소화 완충액 (콜라게나제 및 디스파제-기반)을 얻고, MPFU에 첨가하기 전에 실온으로 방치한다;
- [0163] ii. 소화 용액을 MPFU의 연결 펠렛에 첨가하고, 튜브를 MPFU가 용액 전체에 분산되도록 가볍게 쳐 부드럽게 혼합한다;
- [0164] iii. 튜브를 37 °C 수조 또는 건식 인큐베이터에 10 분간 놓아 둔다;
- [0165] iv. 수조/인큐베이터에서 튜브를 꺼내고, 튜브를 부드럽게 쳐 스트링에 대한 내용물을 조사한다;
- [0166] v. 스트링이 관찰되면, 내용물을 연결 펠렛으로 원심분리한다;
- [0167] vi. 세포 펠렛을 5 내지 10 mL의 완전 제한 각질 세포 SFM 배지 (ThermoFisher Scientific 제 Keratinocyte-SFM (1X))에서 세척하고 다시 연결 펠렛으로 원심분리한다;
- [0168] vii. 활성화된 기능 특이성 유닛의 펠렛을 완전 Keratinocyte-SFM 배지 5 mL에 재현탁한다;
- [0169] viii. COUNTESS® 자동화 세포 계수기 (ThermoFisher Scientific)를 사용하여 유닛의 세포 밀도를 결정한다.
- [0170] **실시예 5**
- [0171] 실시예 5는 실시예 4로부터 수득된 상피 줄기 세포 기능 특이성 (ESC aFSUs)을 구조물/스캐폴드에 첨가하는 것을 포함한다. 절차는 다음 단계를 포함한다:
- [0172] i. 어셈블 및 세척된 스캐폴드를 이미 함유한 UPCELL™ 표면 피부 이식편 세포 배양 접시를 배치하고, 생리 pH를 보장하기 위해 세포를 첨가하기 전에 스캐폴드를 펄스 매질로 2 회 재세척한다;
- [0173] ii. 각 배양 용기에 고유 추적 번호를 표시한다;
- [0174] iii. ESC aFSUs를 완전 제한 Keratinocyte-SFM 배지 (추가적인 자가 PRP는 임의적임)를 사용하여 일회용 전달 피펫을 통해 구조물에 전달한다;
- [0175] iv. 선택된 로딩 저장소에 완전 배양 배지를 첨가하고, 구조물이 완전 도포되도록 한다;
- [0176] v. 접시를 1 시간동안 저속 로커 상의 인큐베이터로 옮기고, 제거한 뒤, 별도의 센티넬 인큐베이터 (sentinel incubator)에서 48 시간 동안 반듯하게 정치시킨다;
- [0177] vi. 48 시간째에 배양 배지를 흡인하고 신선한 Keratinocyte-SFM 배양 배지를 첨가한다. 배양물을 EVOS로 이미지화하고 할당된 추적 번호를 달아 저장한다. 이 시기에 필요하면, 치은 섬유아세포 (GF) 집단 및 생존 단백질을 증가시키고/거나, PRP를 보충한다;
- [0178] vii. 배지를 48 내지 72 시간마다 교체한다;

- [0179] viii. 합류점에 도달하면, 배양물을 DPBS로 세척하고, 배지를 교체한다. 온도 기반 시스템을 사용하여 ESC 구조물 스캐폴딩의 온도를 낮춤으로써 접시에서 방출을 촉진한다;
- [0180] ix. MSC 구조물의 표면에 직접 ESC를 배치하고, 결합된 배지를 두 구조물을 모두 도포하도록 첨가한다. 구조물을 이미징하고 다시 인큐베이터에 넣은 후, 구조물 배지를 48 시간마다 교체한다.
- [0181] x. 극성 유지를 확인하기 위해, 구조물을 매일 이미징하고, 극성이 48 시간동안 유지되었음을 확인한 뒤 적절한 각화 (피 형성) 매질을 첨가한다;
- [0182] xi. 수확시 구조물을 펄스 매질을 사용하여 2 회 세척하고, 배지를 CTS™ STEMPRO® MSC SFM 베이스를 사용한 운반 배지로 교체한다.
- [0183] **실시예 6**
- [0184] 실시예 6은 세포 치료 응용에 대해 규정된 제조관리 및 품질관리에 관한 기준 (GMP)에 따라 선적을 위한 구조물의 제제화를 수반하는 냉동 보존을 비롯한 구조물의 완결 및 품질 보증에 대한 예시적인 프로토콜을 나타낸다:
- [0185] i. SYNTH-A-FREEZE® 저온 보존 배지 (Thermo Fisher Scientific)를 적당량 취해 2 내지 8 °C에서 사용할 때까지 보관한다;
- [0186] ii. 세포를 준비, 수확한 후, 소정량의 세포를 원심분리하기 전에 COUNTESS® 자동화 세포계수기를 사용하여 세포 밀도를 결정한다 (SYNTH-A-FREEZE® 배지와 저온 보존을 위한 전형적인 세포 밀도는 5×10^5 내지 3×10^6 입);
- [0187] iii. 예정 부피의 2 내지 8 °C SYNTH-A-FREEZE® 배지에 세포 펠렛을 재현탁한다;
- [0188] iv. 수득한 현탁액의 분취량을 제조자의 사양에 따라 냉동 바이알에 즉시 분배한다;
- [0189] v. 냉동 바이알을 냉동고 온도를 -80 °C로 유지하는 적절한 냉동 시스템, 예컨대 Thermo Fisher Scientific Inc.로부터 입수 가능한 MR. FROSTY™ 시스템에 넣는다;
- [0190] vi. 바이알을 -200 °C 내지 -125 °C에서 액체 질소 장기 증기상 저장소로 옮긴다.
- [0191] 상기 명세서에 본 발명의 서술된 구체예들이 제공되어 있다. 당업자는 본 발명에 관해서 상기 설명 및 관련 도면에 제시된 교시의 이점을 가지는 다수의 변경 및 구체예를 구상할 수 있음을 이해할 것이다. 따라서, 본 발명은 본원에 개시된 특정 구체예에 한정되지 않으며, 본 발명의 많은 변형 및 다른 구체예가 본 발명의 범위 내에 포함되는 것으로 이해되어야 한다. 또한, 본원에서 특정 용어가 사용되었지만, 이들은 발명을 제한하려는 목적이 아닌 일반적이고 설명적인 의미로만 사용된다.
- [0192] **산업상 이용 가능성**
- [0193] 본 발명은 상처 치료 용도, 조직 공학적 처리, 세포 치료 용도, 재생 의학 용도, 의학/치료 용도, 조직 치유 용도, 면역 치료 용도 및 조직 이식 치료 용도에 사용하기 위해, 상피 시스템, 샘, 털, 신경, 뼈, 근육, 지방, 힘줄, 혈관, 근막, 안 조직 및 펩티드 분비 세포 요소를 발생, 재생, 증강 및/또는 치유하는 세포 요소를 전달, 도포, 이식 (transplantation), 임플란트 (implantation), 유도 시딩, 유도 이동, 유도 추적, 인세팅 (in setting), 라미네이팅 및/또는 주입하기 위한 단리된 류신-풍부 반복체-함유 G-단백질 결합 수용체 (LGR) 발현 세포를 함유하는 미소응집체 다세포 이식편 구조물의 제조 방법 및 그의 사용 방법에 관한 것이다.

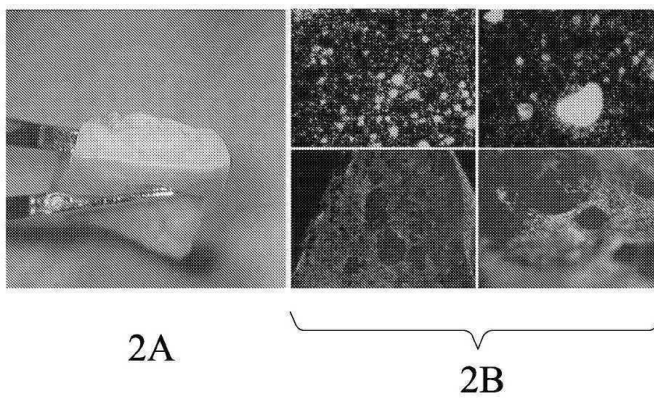
도면

도면1

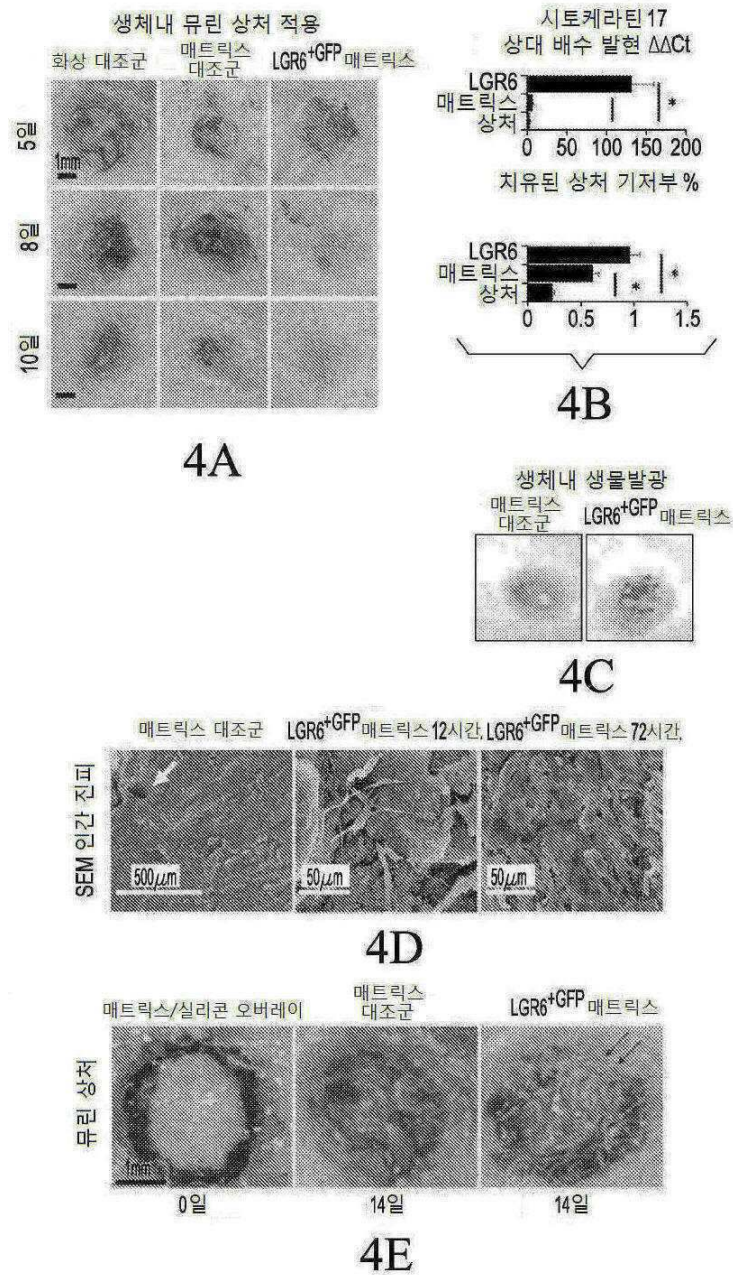


1C

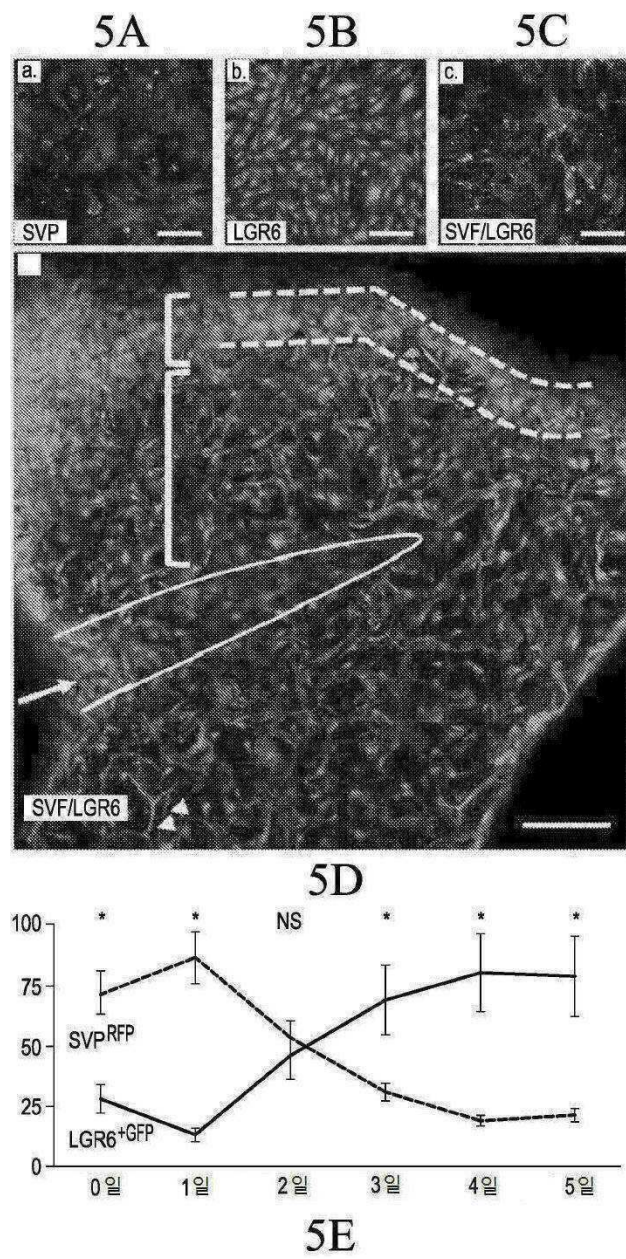
도면2



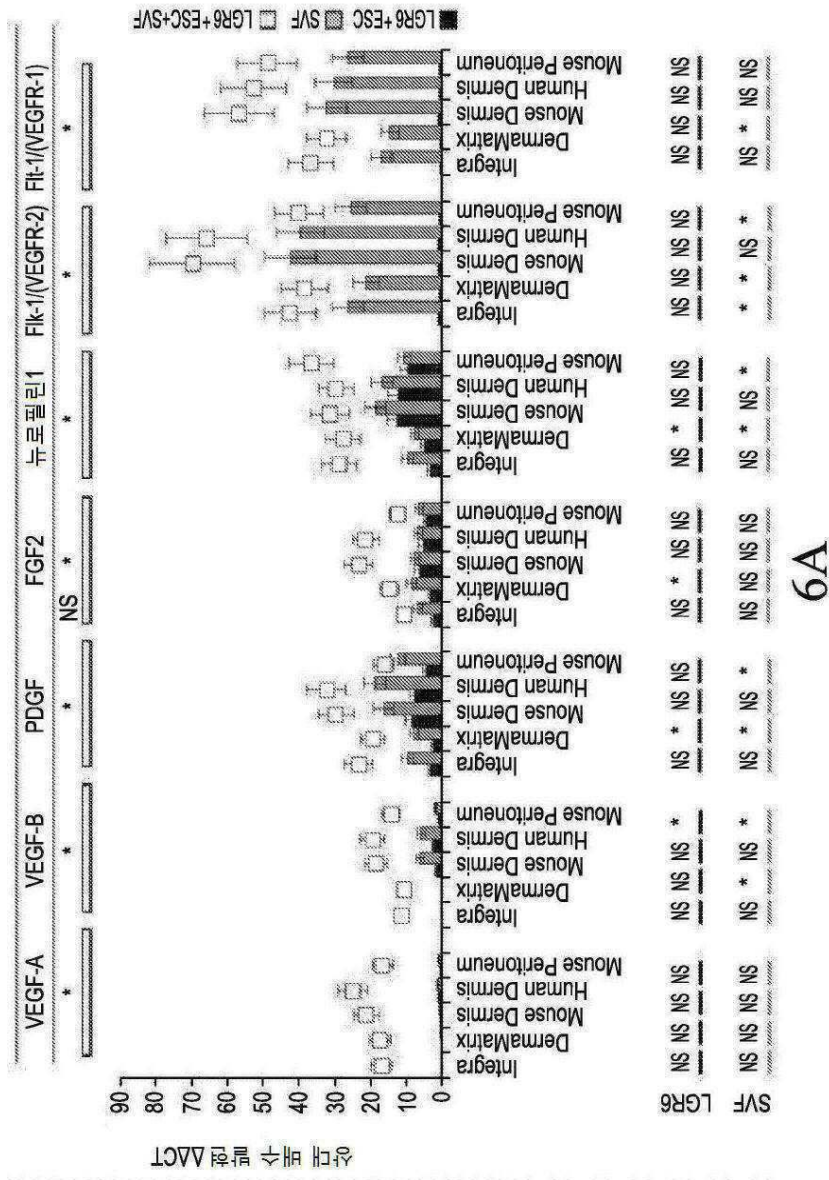
도면4



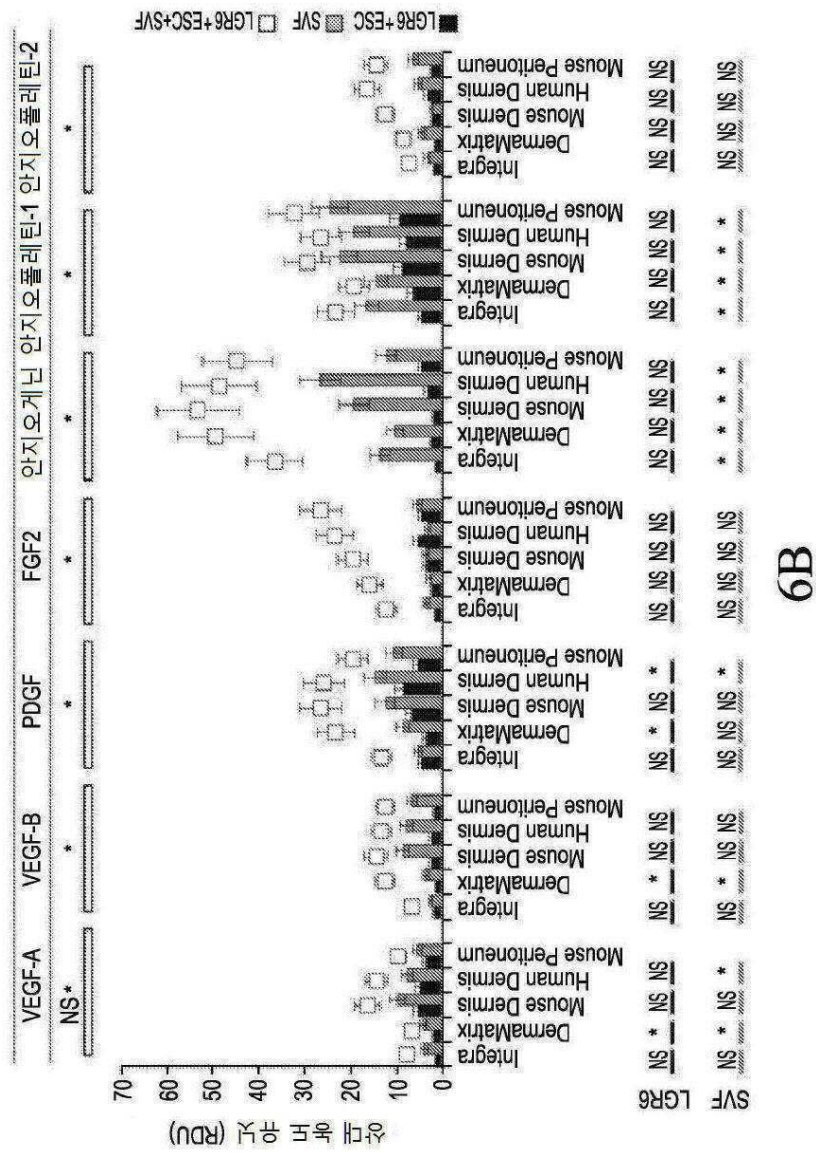
도면5



도면6a



도면69



도면7



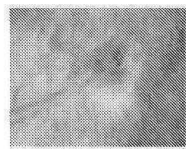
7A



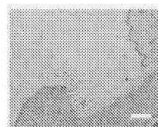
7B



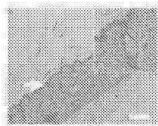
7C



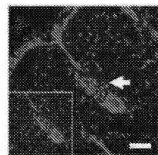
7D



7F



7E

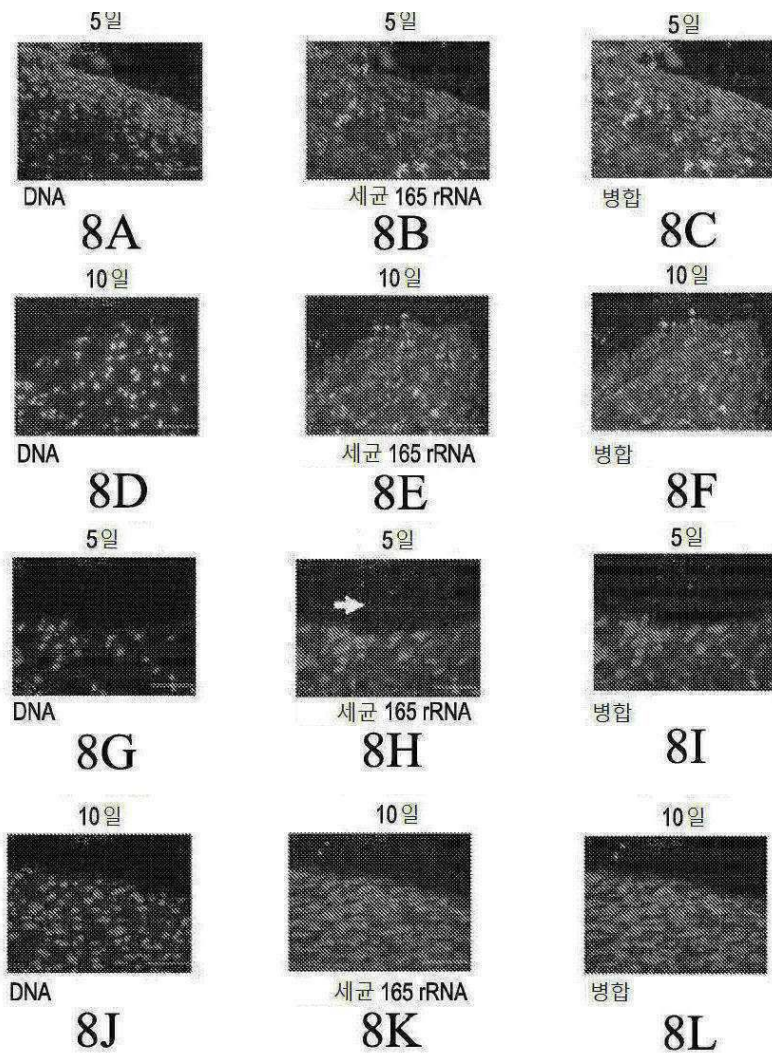


7G

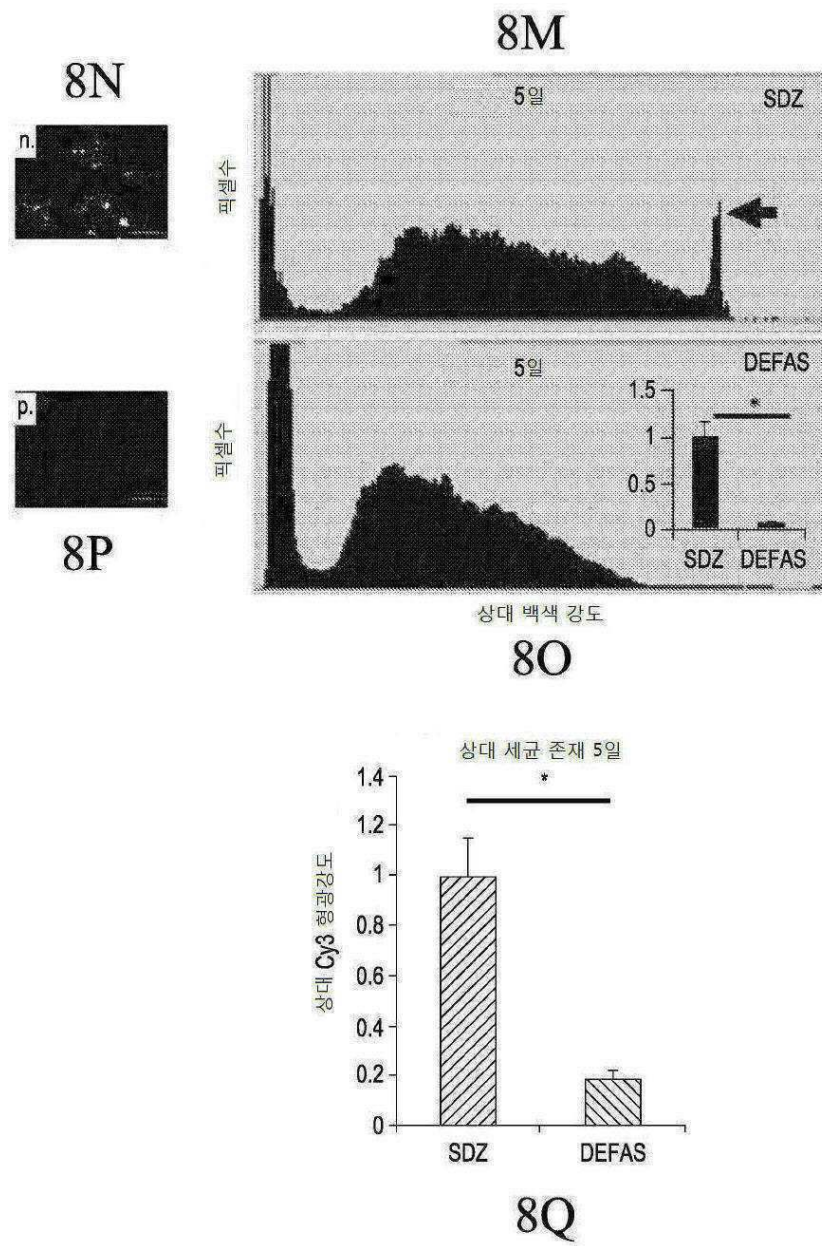


7H

도면8a

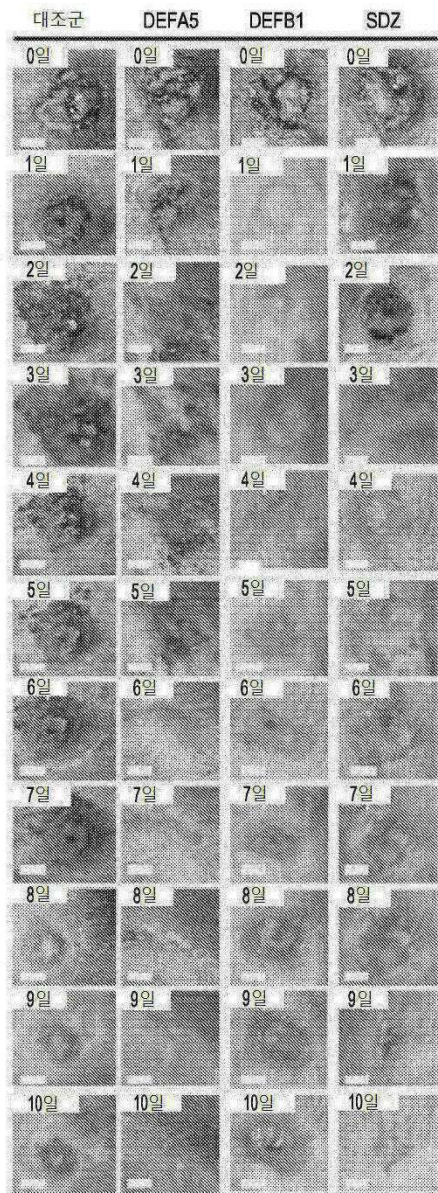


도면8b



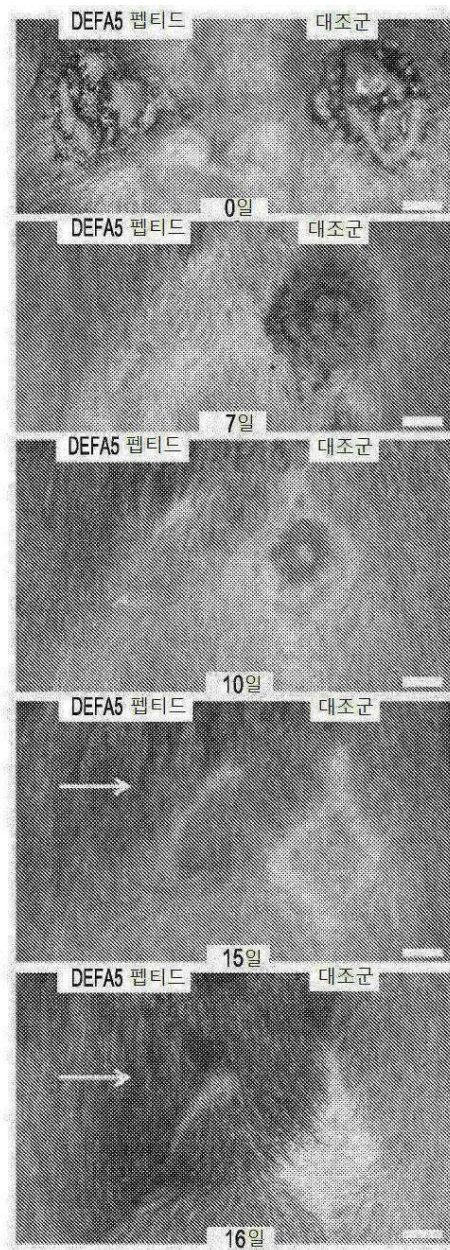
도면9a

9A

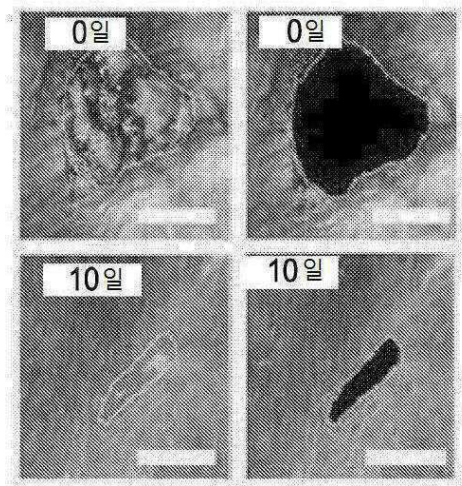


도면9b

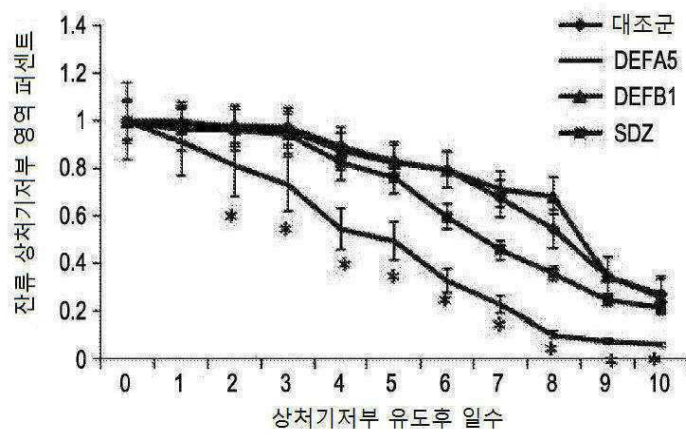
9B



도면10a

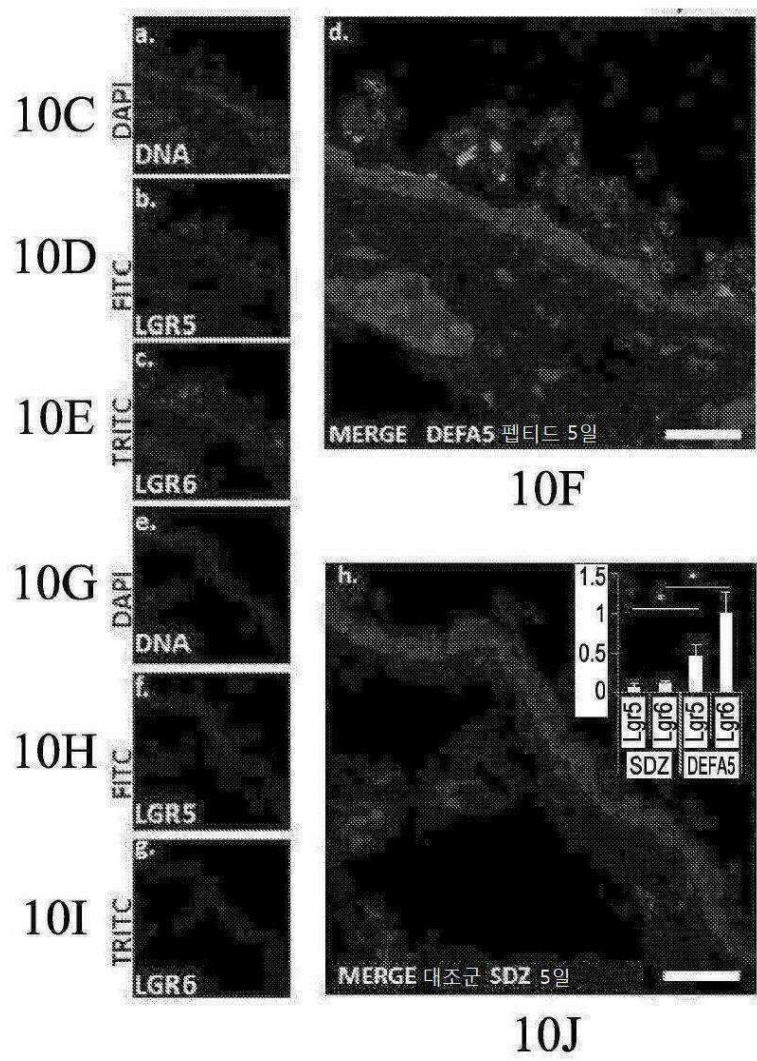


10A

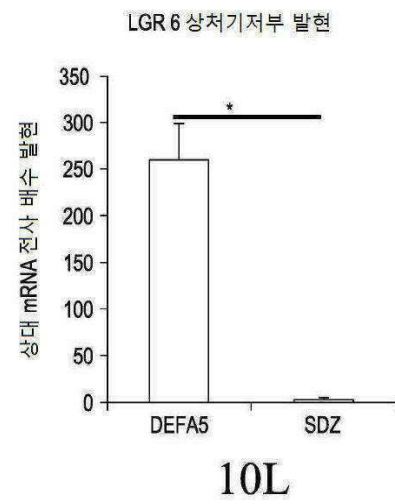
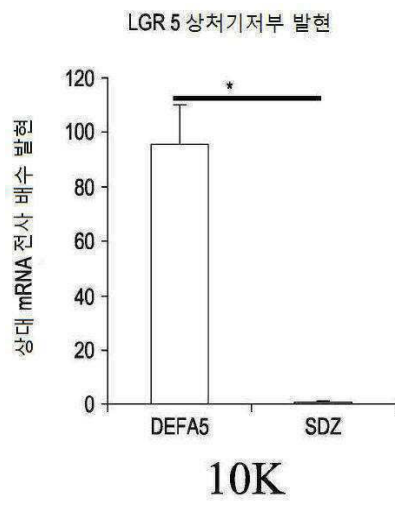


10B

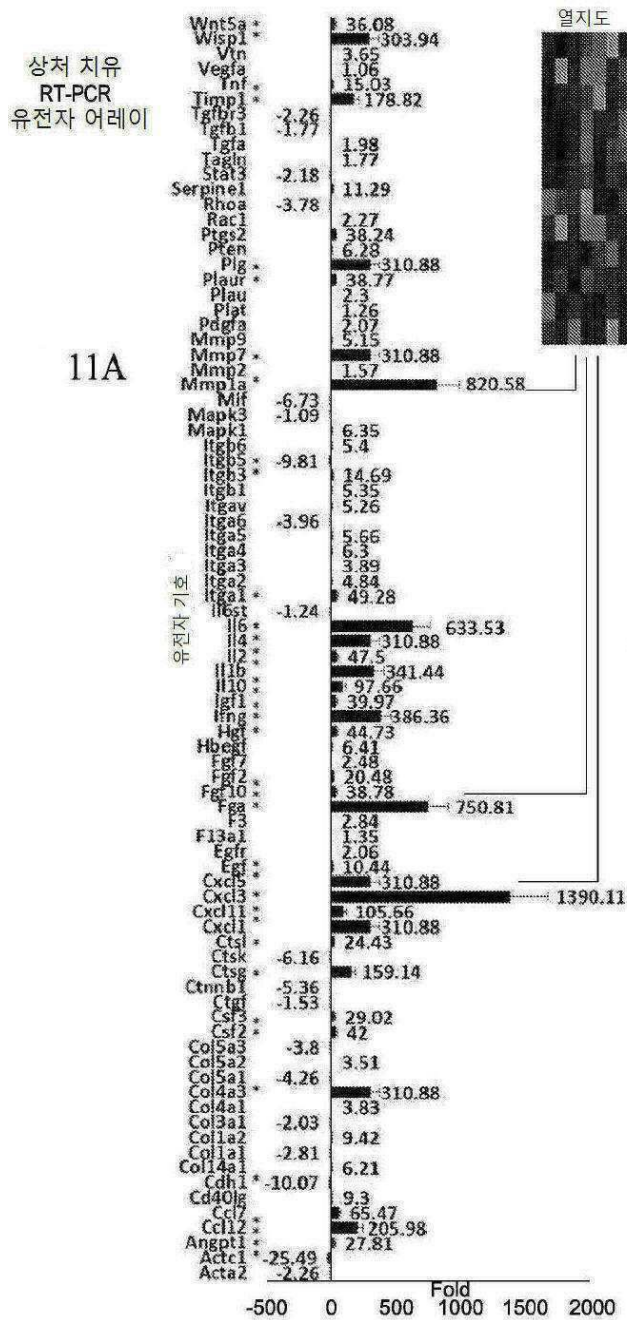
도면10b



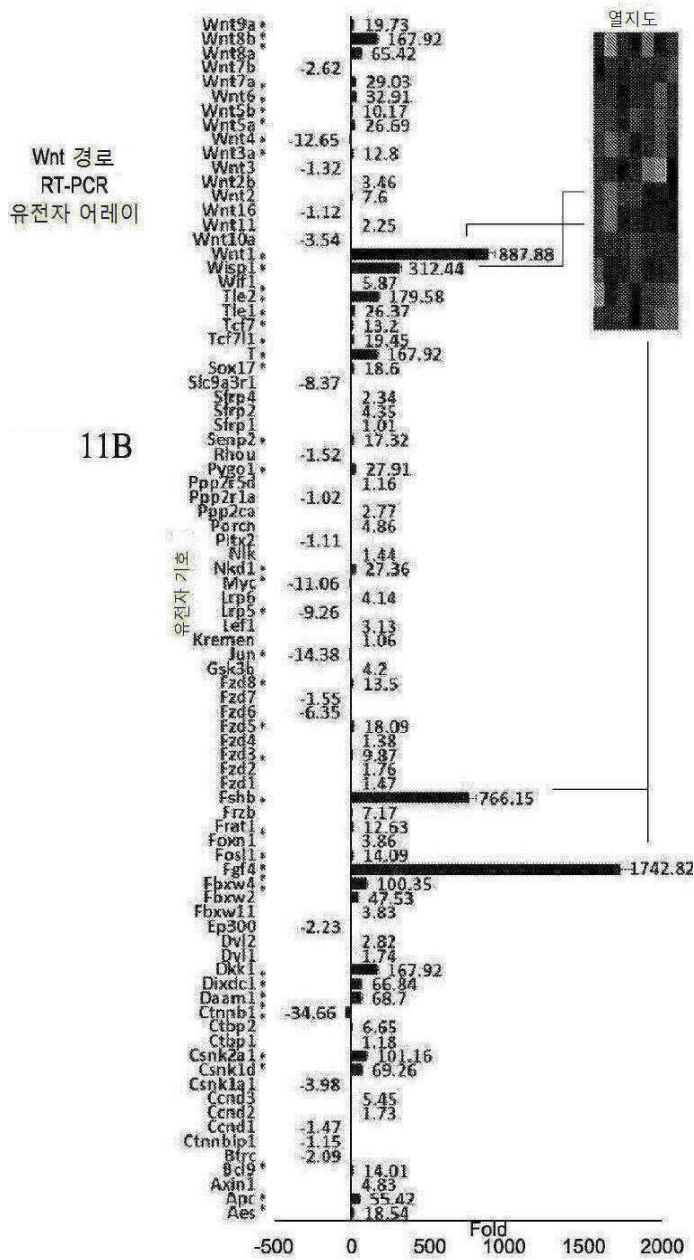
도면10c



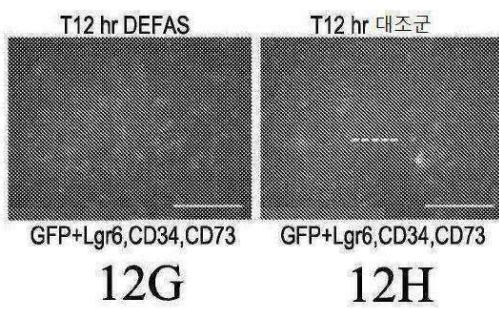
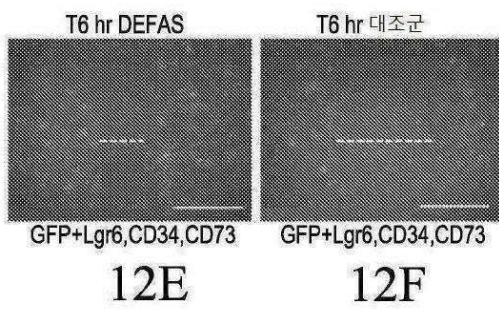
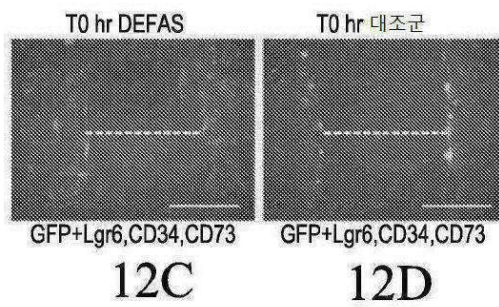
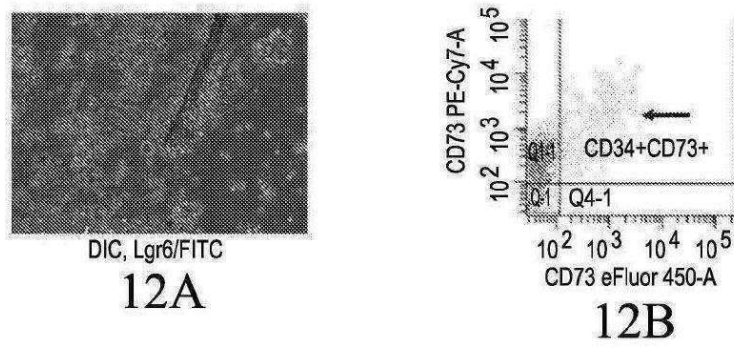
도면11a



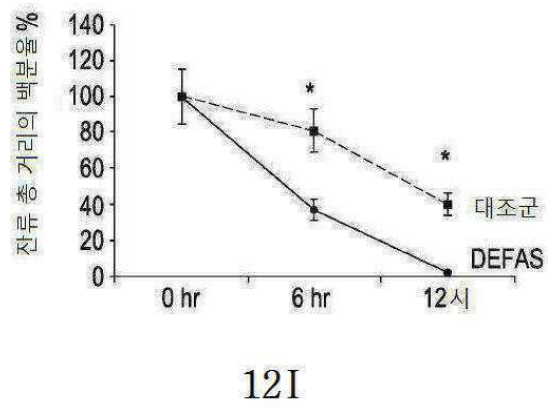
도면11b



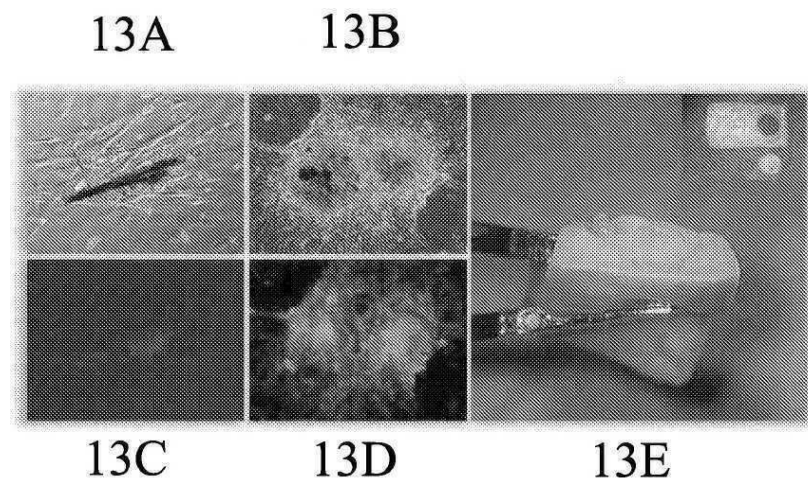
도면12a



도면12b

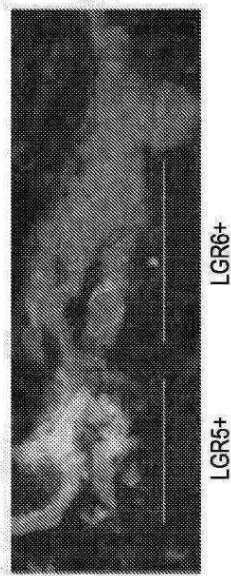


도면13

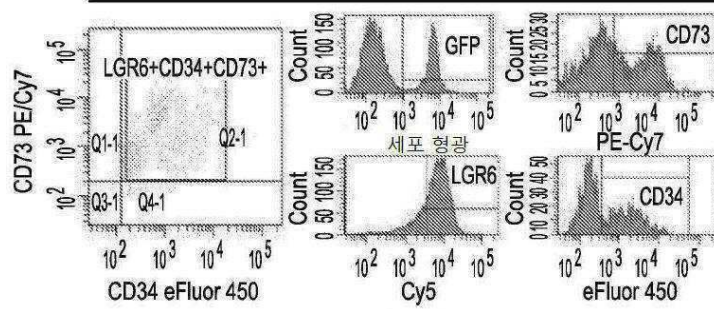


도면14

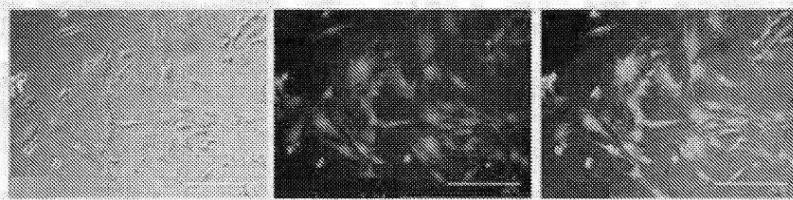
14A



최종 분류 게이트



14B



DIC

LGR6 +GFP ESC

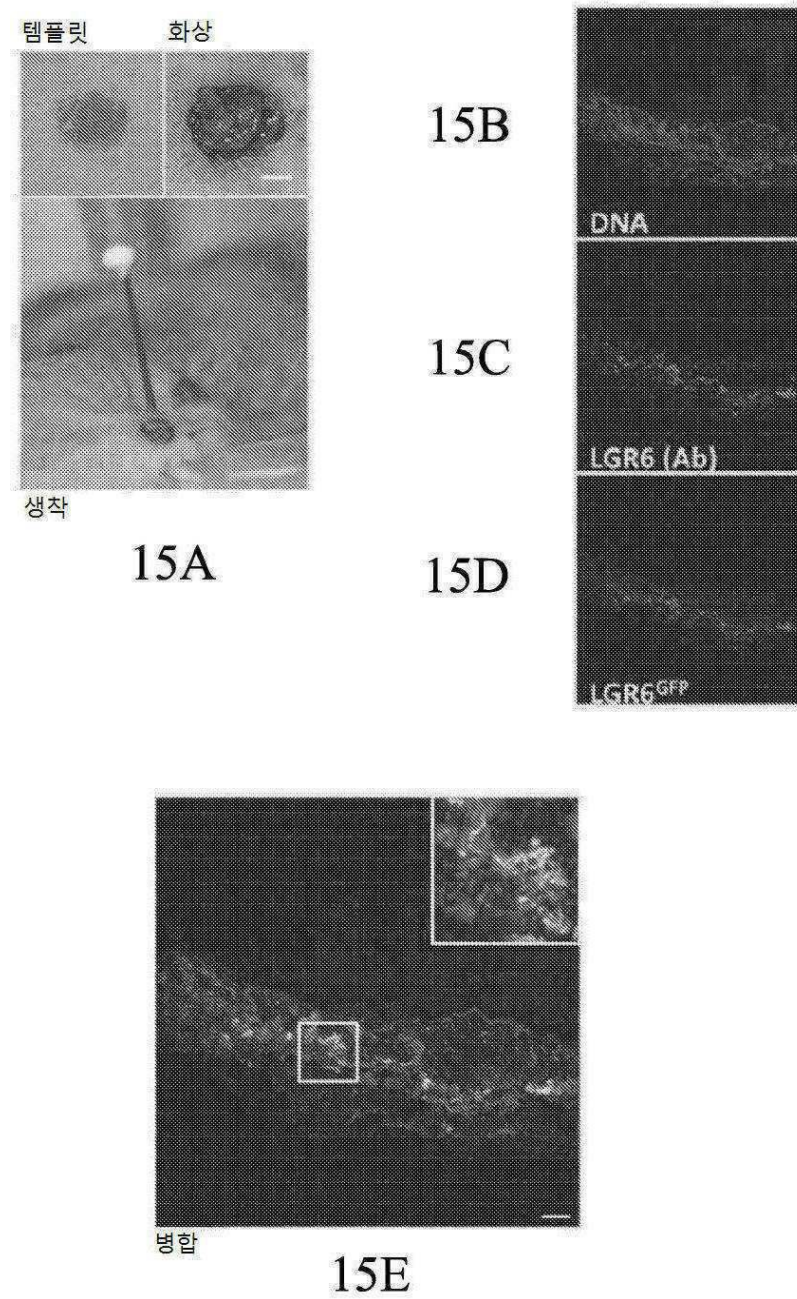
병합

14C

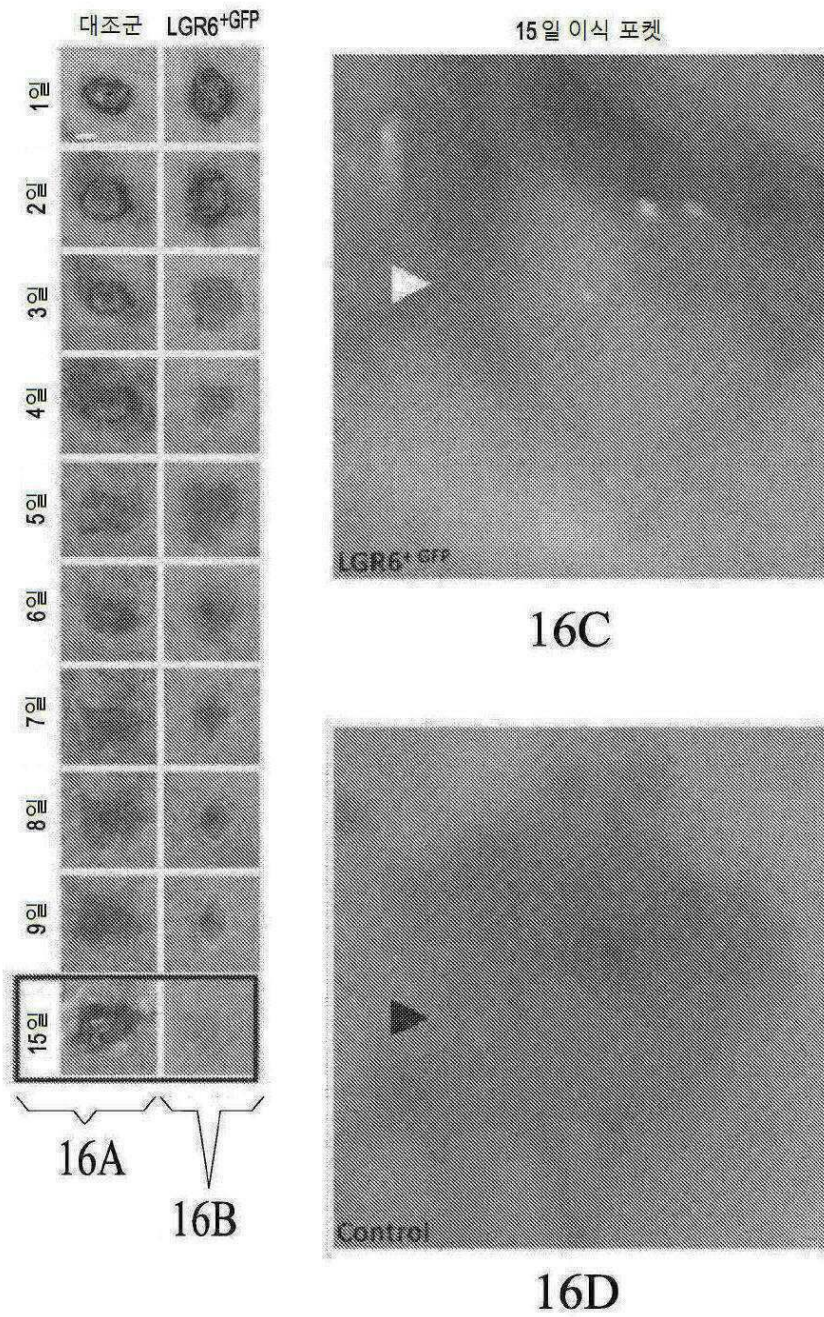
14D

14E

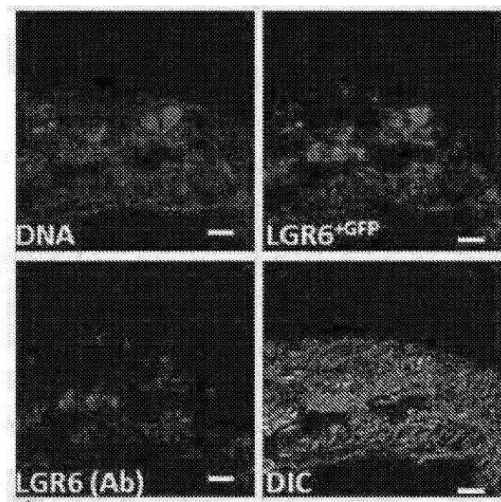
도면15



도면16

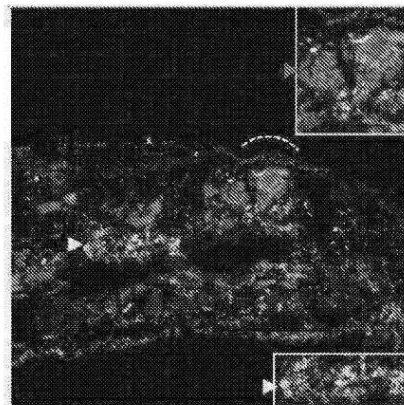
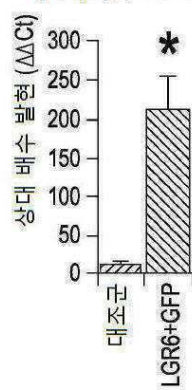


도면17a



17A

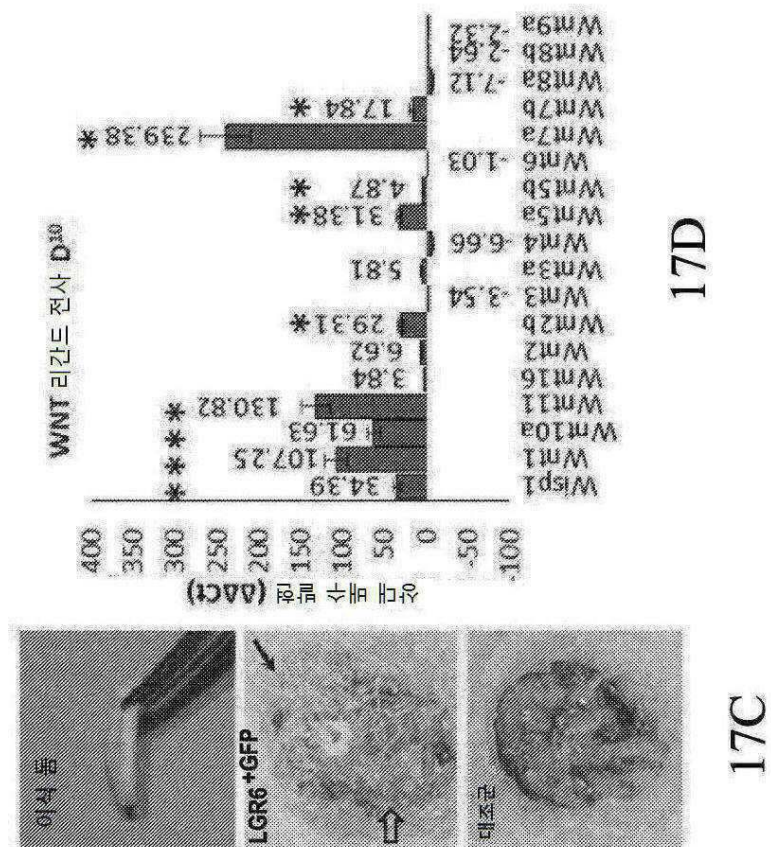
시토크라틴 KRT17



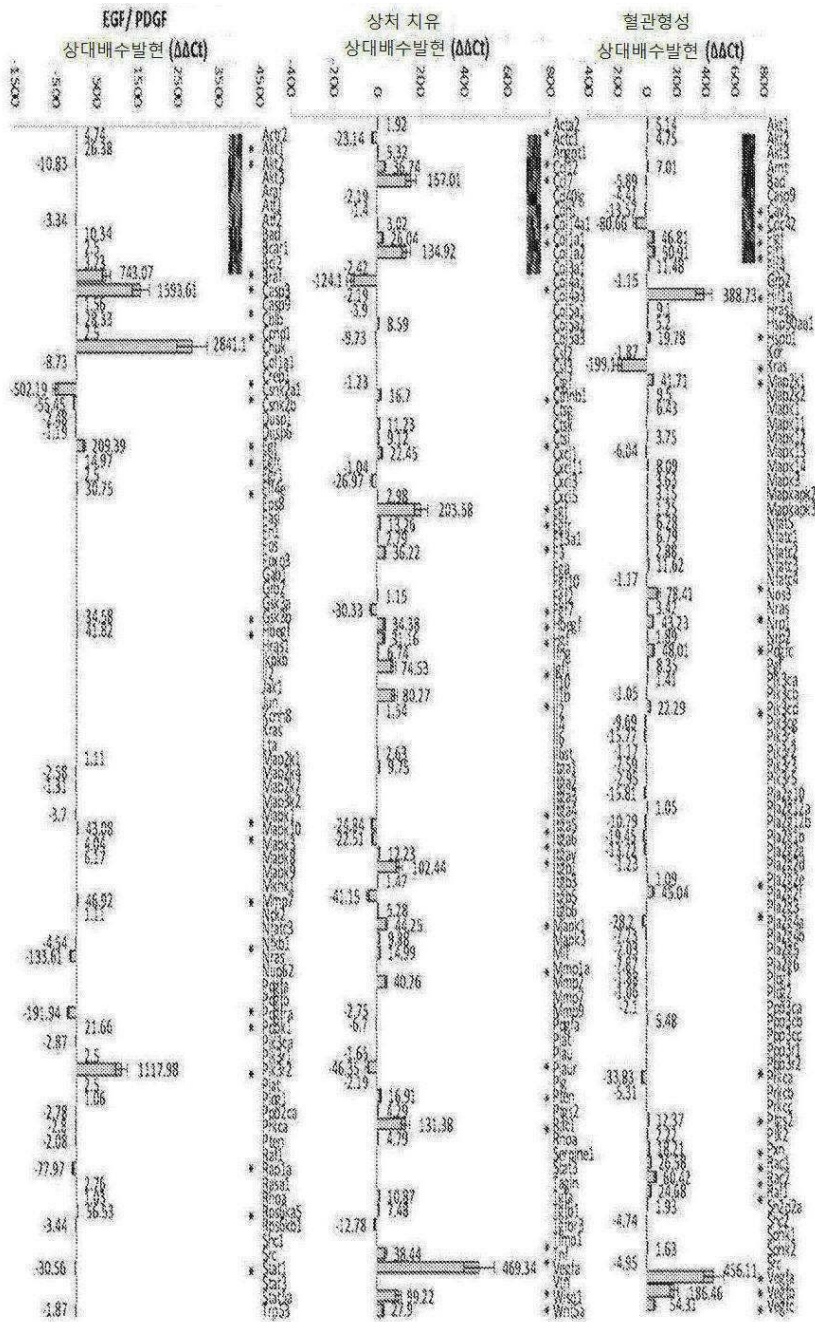
표본

17B

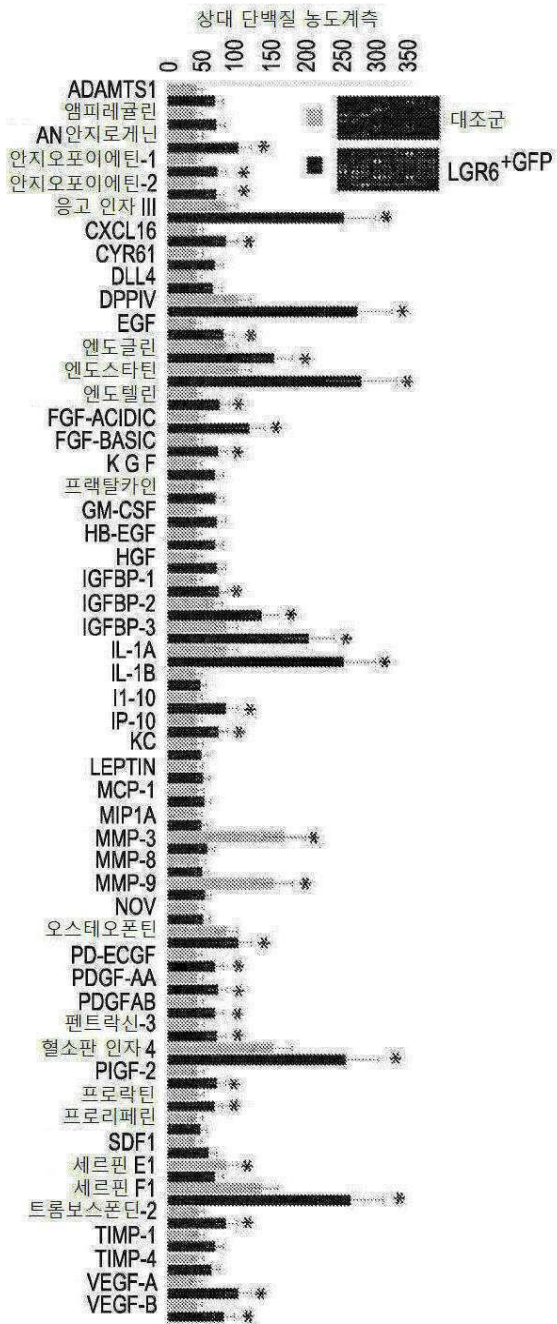
도면17b



도면18



도면19



도면20

