(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0054359
(43) 공개일자 2022년05월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/44 (2015.01) *A61K 35/545* (2014.01)
A61P 11/00 (2006.01) *A61P 9/00* (2006.01)
A61P 9/12 (2006.01) *C12N 5/071* (2010.01)
C12N 5/0789 (2010.01)
(52) CPC특허분류
A61K 35/44 (2013.01)
A61K 35/545 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-7010117
(22) 출원일자(국제) 2020년08월27일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년03월25일
(86) 국제출원번호 PCT/US2020/048080
(87) 국제공개번호 WO 2021/041592
국제공개일자 2021년03월04일
(30) 우선권주장
62/892,712 2019년08월28일 미국(US)

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

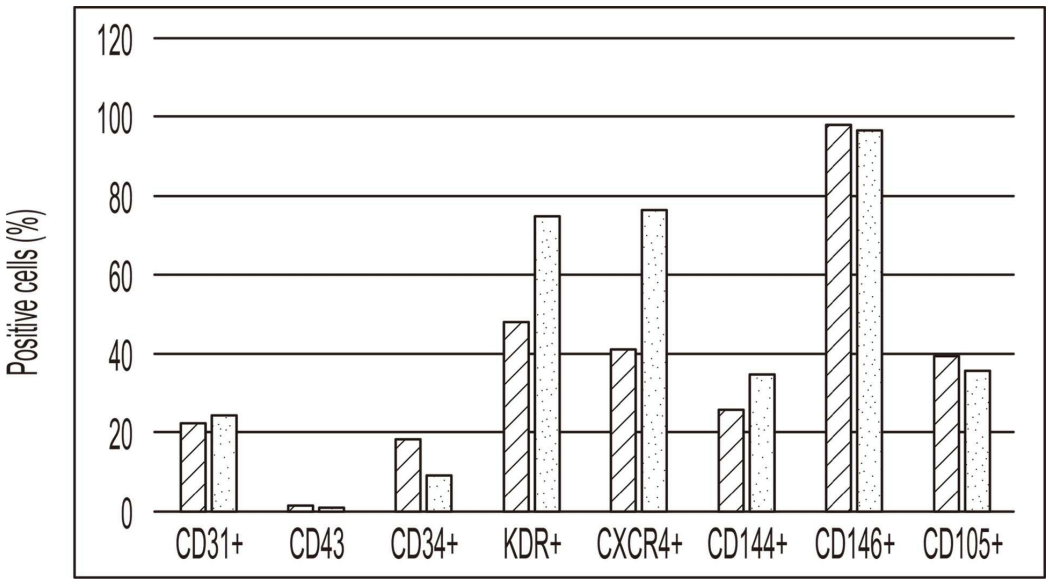
전체 청구항 수 : 총 75 항

(54) 발명의 명칭 **혈관 질병을 치료하는 방법**

(57) 요 약

본 발명은 다능성 줄기 세포로부터 시험관내에서 얻어진 혜모제닉 내피 세포(HEs)로 혈관 질병을 치료하는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 HEs를 생성하는 조성물 및 방법을 제공한다.

대 표 도 - 도4a



(52) CPC특허분류
A61P 11/00 (2018.01)
A61P 9/00 (2018.01)
A61P 9/12 (2018.01)
C12N 5/0647 (2013.01)
C12N 5/069 (2013.01)
C12N 2501/115 (2013.01)
C12N 2501/165 (2013.01)
C12N 2506/02 (2013.01)
C12N 2506/45 (2013.01)
(72) 발명자
프라세인, 누탄
미국, 매사추세츠 01581, 웨스트버러, 테크놀로지 드라이브 9
싱, 암리타
미국, 매사추세츠 01581, 웨스트버러, 테크놀로지 드라이브 9
란자, 로버트
미국, 매사추세츠 01581, 웨스트버러, 테크놀로지 드라이브 9

명 세 서

청구범위

청구항 1

다능성 줄기 세포의 시험관내 분화에 의해 얻어진 혜모제닉 내피 세포(HEs)를 포함하는 조성물을 피험자에게 투여하는 단계를 포함하는, 혈관 질병을 앓거나 앓는 것으로 의심되는 피험자에서 혈관 질병을 치료하는 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 혈관 질병은, 관상 동맥 질병(예를 들어, 동맥경화증, 죽상동맥경화증, 및 동맥, 세동맥 및 모세혈관의 기타 질병 또는 손상 또는 관련 질환), 심근경색증(예를 들어, 급성 심근경색증), 조직화 심근경색증, 허혈성 심장 질병, 부정맥, 좌심실 확장, 색전, 심부전, 울혈성 심부전, 심내막하 섬유증, 좌심실 또는 우심실 비대, 심근염, 만성 관상 허혈, 확장성 심근병증, 재협착증, 부정맥, 협심증, 고혈압(예를 들어, 폐 고혈압, 사구체 고혈압, 문맥 고혈압), 심근 비대, 중증 사지 허혈을 포함한 말초 동맥 질환, 뇌혈관 질병, 신동맥 협착증, 대동맥류, 폐심장 질병, 심부정맥, 염증성 심장병, 선천성 심장병 , 류마티스성 심장병, 당뇨병성 혈관 질병, 및 내피 폐 손상 질병(예를 들어, 급성 폐 손상(ALI), 및 급성 호흡 곤란 증후군(ARDS))으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 혈관 질병은 폐 고혈압인, 방법.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 혈관 질병은 폐동맥 고혈압인, 방법.

청구항 5

청구항 1-4 중 어느 한 항에 있어서,

평균 폐(동맥) 압력은 피험자에서 감소되는, 방법.

청구항 6

다능성 줄기 세포의 시험관내 분화에 의해 얻어진 HEs를 포함하는 조성물을 피험자에게 투여하는 단계를 포함하는, 혈관 질병을 앓거나 앓는 것으로 의심되는 피험자의 폐동맥에서 혈류를 증가시키는 방법.

청구항 7

청구항 6에 있어서,

상기 피험자는 폐 고혈압에 걸린 것인, 방법.

청구항 8

청구항 6에 있어서,

상기 피험자는 폐동맥 고혈압에 걸린 것인, 방법.

청구항 9

다능성 줄기 세포의 시험관내 분화에 의해 얻어진 HEs를 포함하는 조성물을 피험자에게 투여하는 단계를 포함하

는, 혈관 질병을 앓거나 앓는 것으로 의심되는 피험자에서 혈압을 감소시키는 방법.

청구항 10

청구항 9에 있어서,

상기 피험자는 폐 고혈압에 걸린 것인, 방법.

청구항 11

청구항 9에 있어서,

상기 피험자는 폐동맥 고혈압에 걸린 것인, 방법.

청구항 12

청구항 9에 있어서,

상기 혈압은 이완기압인, 방법.

청구항 13

청구항 9에 있어서,

상기 혈압은 수축기압인, 방법.

청구항 14

청구항 9에 있어서,

상기 혈압은 평균 폐(동맥)압인, 방법.

청구항 15

청구항 9-14 중 어느 한 항에 있어서,

상기 혈압은 피험자에서 20% 이상 감소되는, 방법.

청구항 16

청구항 1-15 중 어느 한 항에 있어서,

상기 HEs는, miRNA-126, miRNA-24, miRNA-196-b, miRNA-214, miRNA-199a-3p, miRNA-335, hsa-miR-11399, hsa-miR-196b-3p, hsa-miR-5690, 및 hsa-miR-7151-3p로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 microRNA(miRNA)에 대해 양성인, 방법.

청구항 17

청구항 16에 있어서,

상기 HEs는, (i) miRNA-214, miRNA-199a-3p, 및 miRNA-335, 및/또는 (ii) hsa-miR-11399, hsa-miR-196b-3p, hsa-miR-5690, 및 hsa-miR-7151-3p에 대해 양성인, 방법.

청구항 18

청구항 16에 있어서,

상기 HEs는, (i) miRNA-126, miRNA-24, miRNA-196-b, miRNA-214, miRNA-199a-3p, 및 miRNA-335 및/또는 (ii) hsa-miR-11399, hsa-miR-196b-3p, hsa-miR-5690, 및 hsa-miR-7151-3p에 대해 양성인, 방법.

청구항 19

청구항 16에 있어서,

상기 HEs는 miRNA-214에 대해 양성인, 방법.

청구항 20

청구항 1-19 중 어느 한 항에 있어서,

상기 HEs는, miRNA-367, miRNA-302a, miRNA-302b, miRNA-302c, miRNA-223, 및 miRNA-142-3p로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 miRNAs에 대해 음성인, 방법.

청구항 21

청구항 20에 있어서,

상기 HEs는 miRNA-223, 및 miRNA-142-3p에 대해 음성인, 방법.

청구항 22

청구항 20에 있어서,

상기 HEs는, miRNA-367, miRNA-302a, miRNA-302b, miRNA-302c, miRNA-223, 및 miRNA-142-3p에 대해 음성인, 방법.

청구항 23

청구항 1-22 중 어느 한 항에 있어서,

상기 HEs는, CD31/PECAM1, CD309/KDR, CD144, CD34, CXCR4, CD146, Tie2, CD140b, CD90, CD271, 및 CD105로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 세포 표면 마커를 발현시키는, 방법.

청구항 24

청구항 23에 있어서,

상기 HEs는, CD146, CXCR4, CD309/KDR, CD90, 및 CD271을 발현시키는, 방법.

청구항 25

청구항 23에 있어서,

상기 HEs는 CD146을 발현시키는, 방법.

청구항 26

청구항 23에 있어서,

상기 HEs는 CD144(VECAD)를 발현시키는, 방법.

청구항 27

청구항 26에 있어서,

상기 HEs는, CD31, CD309/KDR (FLK-1), PLVAP, GJA4, ESAM, EGFL7, KDR/VEGFR2, 및 ESAM으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 세포 마커를 발현시키는, 방법.

청구항 28

청구항 26 또는 27에 있어서,

상기 HEs는, SOX9, PDGFRA, 및 EGFRA로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 세포 마커를 더욱 발현시키는, 방법.

청구항 29

청구항 26-28 중 어느 한 항에 있어서,

상기 HEs는, KDR/VEGFR2, NOTCH4, 콜라겐 I, 및 콜라겐 IV로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 세포

마커를 더욱 발현시키는, 방법.

청구항 30

청구항 23에 있어서,

상기 HEs는, CD31/PECAM1, CD309/KDR, CD144, CD34, 및 CD105를 발현시키는, 방법.

청구항 31

청구항 1-29 중 어느 한 항에 있어서,

상기 HEs는, CD34, CXCR7, CD43 및 CD45로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 세포 표면 마커의 제한되거나 전혀 없는 검출을 나타내는, 방법.

청구항 32

청구항 1-31 중 어느 한 항에 있어서,

상기 HEs는 CXCR7, CD43, 및 CD45의 제한되거나 전혀 없는 검출을 나타내는, 방법.

청구항 33

청구항 1-31 중 어느 한 항에 있어서,

상기 HEs는 CD43 및 CD45의 제한되거나 전혀 없는 검출을 나타내는, 방법.

청구항 34

청구항 1-33 중 어느 한 항에 있어서,

상기 HEs는 CD43(-), CD45(-), 및 CD146(+)인, 방법.

청구항 35

청구항 1-34 중 어느 한 항에 있어서,

상기 다능성 줄기 세포는 배아 줄기 세포인, 방법.

청구항 36

청구항 1-34 중 어느 한 항에 있어서,

상기 다능성 줄기 세포는 유도 다능성 줄기 세포인, 방법.

청구항 37

청구항 1-36 중 어느 한 항에 있어서,

상기 HEs는, 메틸셀룰로오스의 부재하에 분화 배지에서 접착 조건하에 다능성 줄기 세포를 배양시켜 얻어지는, 방법.

청구항 38

청구항 1-37 중 어느 한 항에 있어서,

상기 HEs는 배상체 형성 없이 다능성 줄기 세포의 시험관내 분화에 의해 얻어지는, 방법.

청구항 39

청구항 1-38 중 어느 한 항에 있어서,

상기 피험자는 인간인, 방법.

청구항 40

청구항 1-39 중 어느 한 항에 있어서,

상기 다능성 줄기 세포는 인간 다능성 줄기 세포인, 방법.

청구항 41

청구항 1-40 중 어느 한 항에 있어서,

상기 HEs는 인간 HEs인, 방법.

청구항 42

다능성 줄기 세포의 시험관내 분화에 의해 얻어진 HEs를 포함하는 조성물로서, 여기서, 상기 HEs는 CD43(-), CD45(-), 및 CD146(+)인, 조성물.

청구항 43

다능성 줄기 세포의 시험관내 분화에 의해 얻어진 HEs를 포함하는 조성물로서, 여기서, 상기 HEs는 miRNA-126, mi-RNA-24, miRNA-196-b, miRNA-214, miRNA-199a-3p, miRNA-335, hsa-miR-11399, hsa-miR-196b-3p, hsa-miR-5690, 및 hsa-miR-7151-3p로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 microRNA(miRNA)에 대해 양성인, 조성물.

청구항 44

청구항 43에 있어서,

상기 HEs는, (i) miRNA-214, miRNA-199a-3p, 및 miRNA-335, 및/또는 (ii) hsa-miR-11399, hsa-miR-196b-3p, hsa-miR-5690, 및 hsa-miR-7151-3p에 대해 양성인, 조성물.

청구항 45

청구항 43에 있어서,

상기 HEs는, (i) miRNA-126, mi-RNA-24, miRNA-196-b, miRNA-214, miRNA-199a-3p, 및 miRNA-335, 및/또는 (ii) hsa-miR-11399, hsa-miR-196b-3p, hsa-miR-5690, 및 hsa-miR-7151-3p에 대해 양성인, 조성물.

청구항 46

청구항 43에 있어서,

상기 HEs는 miRNA-214에 대해 양성인, 조성물.

청구항 47

청구항 42-46 중 어느 한 항에 있어서,

상기 HEs는 miRNA-367, miRNA-302a, miRNA-302b, miRNA-302c, miRNA-223, 및 miRNA-142-3p로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 miRNAs에 대해 음성인, 조성물.

청구항 48

청구항 47에 있어서,

상기 HEs는 miRNA-223, 및 miRNA-142-3p에 대해 음성인, 조성물.

청구항 49

청구항 47에 있어서,

상기 HEs는, miRNA-367, miRNA-302a, miRNA-302b, miRNA-302c, miRNA-223, 및 miRNA-142-3p에 대해 음성인, 조성물.

청구항 50

청구항 43-49 중 어느 한 항에 있어서,

상기 HEs는, CD43(-), CD45(-), 및 CD146(+)인, 조성물.

청구항 51

다능성 줄기 세포의 시험관내 분화에 의해 얻어진 HEs를 포함하는 조성물로서, 여기서, 상기 HEs는 CD144(VECAD)를 발현시키는 조성물.

청구항 52

청구항 51에 있어서,

상기 HEs는, CD31, CD309/KDR (FLK-1), PLVAP, GJA4, ESAM, EGFL7, KDR/VEGFR2, 및 ESAM으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 세포 마커를 더욱 발현시키는, 조성물.

청구항 53

청구항 51 또는 52에 있어서,

상기 HEs는, SOX9, PDGFRA, 및 EGFRA로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 세포 마커를 더욱 발현시키는, 조성물.

청구항 54

청구항 51-53 중 어느 한 항에 있어서,

상기 HEs는, KDR/VEGFR2, NOTCH4, 콜라겐 I, 및 콜라겐 IV로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 세포 마커를 더욱 발현시키는, 조성물.

청구항 55

청구항 51-54 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물은, CD144(VECAD)-음성 HE 세포가 실질적으로 결여된, 조성물.

청구항 56

다능성 줄기 세포의 시험관내 분화에 의해 얻어진 HEs 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학 조성물로서, 여기서, 상기 HEs는 CD43(-), CD45(-), 및 CD146(+)인, 약학 조성물.

청구항 57

다능성 줄기 세포의 시험관내 분화에 의해 얻어진 HEs 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학 조성물로서, 여기서, 상기 HEs는 miRNA-126, mi-RNA-24, miRNA-196-b, miRNA-214, miRNA-199a-3p, miRNA-335, hsa-miR-11399, hsa-miR-196b-3p, hsa-miR-5690, 및 hsa-miR-7151-3p로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 microRNA(miRNA)에 대해 양성인, 약학 조성물.

청구항 58

청구항 57에 있어서,

상기 HEs는, (i) miRNA-214, miRNA-199a-3p, 및 miRNA-335, 및/또는 (ii) hsa-miR-11399, hsa-miR-196b-3p, hsa-miR-5690, 및 hsa-miR-7151-3p에 대해 양성인, 약학 조성물.

청구항 59

청구항 57에 있어서,

상기 HEs는, (i) miRNA-126, mi-RNA-24, miRNA-196-b, miRNA-214, miRNA-199a-3p, 및 miRNA-335, 및/또는 (ii) hsa-miR-11399, hsa-miR-196b-3p, hsa-miR-5690, 및 hsa-miR-7151-3p에 대해 양성인, 약학 조성물.

청구항 60

청구항 57에 있어서,

상기 HEs는 miRNA-214에 대해 양성인, 약학 조성물.

청구항 61

청구항 57-60 중 어느 한 항에 있어서,

상기 HEs는, miRNA-367, miRNA-302a, miRNA-302b, miRNA-302c, miRNA-223, 및 miRNA-142-3p로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 miRNAs에 대해 음성인, 약학 조성물.

청구항 62

청구항 61에 있어서,

상기 HEs는 miRNA-223, 및 miRNA-142-3p에 대해 음성인, 약학 조성물.

청구항 63

청구항 61에 있어서,

상기 HEs는, miRNA-367, miRNA-302a, miRNA-302b, miRNA-302c, miRNA-223, 및 miRNA-142-3p에 대해 음성인, 약학 조성물.

청구항 64

청구항 57-63 중 어느 한 항에 있어서,

상기 HEs는, CD43(-), CD45(-), 및 CD146(+)인, 약학 조성물.

청구항 65

다능성 줄기 세포의 시험관내 분화에 의해 얻어진 HEs 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하고, 여기서, 상기 HEs는 CD144(VECAD), CD31, 및 CD309/KDR(FLK-1)을 발현시키는, 약학 조성물.

청구항 66

청구항 65에 있어서,

상기 HEs는, CD31, CD309/KDR (FLK-1), PLVAP, GJA4, ESAM, EGFL7, KDR/VEGFR2, 및 ESAM으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 세포 마커를 더욱 발현시키는, 약학 조성물.

청구항 67

청구항 65 또는 66에 있어서,

상기 HEs는, SOX9, PDGFRA, 및 EGFRA로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 세포 마커를 더욱 발현시키는, 약학 조성물.

청구항 68

청구항 65-67 중 어느 한 항에 있어서,

상기 HEs는, KDR/VEGFR2, NOTCH4, 콜라겐 I, 및 콜라겐 IV로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 세포 마커를 더욱 발현시키는, 약학 조성물.

청구항 69

청구항 65-68 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물은 CD144(VECAD)-음성 HE 세포가 실질적으로 결여된, 약학 조성물.

청구항 70

청구항 26-41 중 어느 한 항에 있어서,

상기 HEs는, (i) CD144(VECAD) 및 (ii) CD31 및/또는 CD309/KDR(FLK-1)을 발현시키는, 방법.

청구항 71

청구항 26-41 또는 70 중 어느 한 항에 있어서,

상기 HEs는 표 22 및 표 23에 열거된 적어도 하나의 유전자를 발현시키는, 방법.

청구항 72

청구항 51-54 중 어느 한 항에 있어서,

상기 HEs는, (i) CD144(VECAD) 및 (ii) CD31 및/또는 CD309/KDR(FLK-1)을 발현시키는, 조성물.

청구항 73

청구항 51-54 또는 72 중 어느 한 항에 있어서,

상기 HEs는, 표 22 및 표 23에 열거된 적어도 하나의 유전자를 발현시키는, 조성물.

청구항 74

청구항 65-69 중 어느 한 항에 있어서,

상기 HEs는, (i) CD144(VECAD) 및 (ii) CD31 및/또는 CD309/KDR(FLK-1)을 발현시키는, 약학 조성물.

청구항 75

청구항 65-69 또는 74 중 어느 한 항에 있어서,

상기 HEs는, 표 22 및 표 23에 열거된 적어도 하나의 유전자를 발현시키는, 약학 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 출원은 2019년 8월 28일자로 출원된 미국 가출원 제62/892,712호의 우선권을 주장하며, 이의 전체적인 내용은 참조로서 여기에 혼입된다.

[0002] 본 발명은 다능성 줄기 세포(pluripotent stem cells)의 시험관내 분화에 의해 얻어진 헤모제닉 내피 세포(hemogenic endothelial cells)를 이용하여 혈관 질병을 치료하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 심혈관 질병은 심장이나 혈관을 포함하는 질병의 일종으로 전 세계적으로 주요 사망 원인이다. 미국에서만, 대략 8,400만 명이 심혈관 질병으로 고통받고 있으며, 거의 3분의 1이 심혈관 질병으로 사망한다.

[0004] 폐 고혈압(PH)은 주요 폐동맥(pulmonary arteries)에서 압력 증가를 특징으로 하는 상태이다. 치명적인 형태의 PH는, 폐동맥 고혈압(PAH)이며, 통상적으로 진단 후 평균 2.8년 이내에 사망에 이른다. PAH는 폐혈관(pulmonary vessels)의 혈관수축(vasoconstriction) 및 재형성(remodeling)을 특징으로 한다. 표준 이용가능한 치료법은, 환자의 삶의 질과 예후를 개선시킬 수 있지만, 통상적으로 병원성 재형성 과정을 직접적으로 방지하지 못하고, 때때로 심각한 부작용을 일으킬 수 있다.

[0005] 말초 동맥 질환(PAD)은, 대뇌 및 관상동맥 순환 이외의 동맥이 비정상적으로 협착 및 폐쇄되는 질병이다. 중증 사지 허혈(CLI)은 하지의 동맥에서 심각한 폐색을 결과하는 심각한 형태의 PAD이다. CLI는 주요 사지 소실, 심근 경색, 뇌졸중, 및 사망과 관련이 있다. 현재까지, CLI에 대한 효과적인 치료법은 없다.

[0006] 관상 동맥 질병은 가장 흔한 형태의 심혈관 질병으로, 심장의 동맥의 동맥경화로 인해 심장 근육으로 가는 혈류와 산소량이 감소하여 발생된다. 관상 동맥 질병이 있는 환자는 종종 폐색된 동맥을 제거하기 위해 풍선 혈관성형술이나 스텐트(stents)를 받는다. 몇몇은 고비용 및 위험 부담으로 관상 동맥 우회 수술을 받는다.

[0007] 따라서, 혈관 질병을 치료 및 예방하기 위한 보다 나은 방법은 요구된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은, 다능성 줄기 세포의 시험관내 분화에 의해 얻어진 혜모제닉 내피 세포(HEs)를 포함하는 조성물을 피험자에게 투여하는 단계를 포함하는 혈관 질병을 치료하는 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0009] 구현예에서, 상기 혈관 질병은, 관상 동맥 질병(예를 들어, 동맥경화증, 죽상동맥경화증, 및 동맥, 세동맥 및 모세혈관의 기타 질병 또는 손상 또는 관련 질환), 심근경색증(예를 들어, 급성 심근경색증), 조직화 심근경색증, 허혈성 심장 질병, 부정맥, 좌심실 확장, 색전, 심부전, 울혈성 심부전, 심내막하 섬유증, 좌심실 또는 우심실 비대, 심근염, 만성 관상 허혈, 확장성 심근병증, 재협착증, 부정맥, 협심증, 고혈압(예를 들어, 폐 고혈압, 사구체 고혈압, 문맥 고혈압), 심근 비대, 중증 사지 허혈을 포함한 말초 동맥 질환, 뇌혈관 질병, 신동맥 협착증, 대동맥류, 폐심장 질병, 심부정맥, 염증성 심장병, 선천성 심장병 , 류마티스성 심장병, 당뇨병성 혈관 질병, 및 내피 폐 손상 질병(예를 들어, 급성 폐 손상(ALI), 및 급성 호흡 곤란 증후군(ARDS))으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 특정 구현예에서, 혈관 질병은 폐 고혈압이다. 또 다른 구현예에서, 혈관 질병은 폐동맥 고혈압이다.

[0010] 여기에 개시된 방법 중 어느 하나의 구현예에서, 평균 폐(동맥) 압력은 피험자에서 감소된다.

[0011] 본 발명은 또한 다능성 줄기 세포의 시험관내 분화에 의해 얻어진 HEs를 포함하는 조성물을 피험자에게 투여하는 단계를 포함하는, 폐동맥에서 혈류를 증가시키는 방법을 제공한다. 하나의 구현예에서, 피험자는 폐 고혈압을 갖는다. 특정 구현예에서, 피험자는 폐동맥 고혈압을 갖는다.

[0012] 본 발명은, 다능성 줄기 세포의 시험관내 분화에 의해 얻어진 HEs를 포함하는 조성물을 피험자에게 투여하는 단계를 포함하는, 피험자에서 혈압을 감소시키는 방법을 더욱 제공한다. 하나의 구현예에서, 피험자는 폐 고혈압을 갖는다. 특정 구현예에서, 피험자는 폐동맥 고혈압을 갖는다. 또 다른 구현예에서, 혈압은 이완기압(diastolic pressure)이다. 또 다른 구현예에서, 혈압은 수축기압이다. 또 다른 구현예에서, 혈압은 평균 폐(동맥)압이다. 게다가, 혈압은 본 발명의 방법 중 어느 하나에 의해 피험자에서 적어도 20% 만큼 감소될 수 있다.

[0013] 하나의 구현예에서, 여기에 개시된 다능성 줄기 세포는 배아 줄기 세포이다. 또 다른 구현예에서, 여기에 개시된 다능성 줄기 세포는 유도된 다능성 줄기 세포이다.

[0014] 또 다른 구현예에서, 여기에 개시된 HEs는 메틸셀룰로오스의 부재하에 분화 배지에서 접착 조건하에 다능성 줄기 세포를 배양시켜 얻어진다. 또 다른 구현예에서, 여기에 개시된 HEs는 배상체 형성 없이 다능성 줄기 세포의 시험관내 분화에 의해 얻어진다.

[0015] 여기에 제공된 방법 중 어느 하나에서, 피험자는 인간일 수 있다. 부가적으로, 여기에 개시된 다능성 줄기 세포는 인간 다능성 줄기 세포일 수 있다. 더군다나, 여기에 개시된 HEs는 인간 HEs일 수 있다.

[0016] 여기에 개시된 HEs는, miRNA-126, miRNA-24, miRNA-196-b, miRNA-214, miRNA-199a-3p, miRNA-335, hsa-miR-11399, hsa-miR-196b-3p, hsa-miR-5690, 및 hsa-miR-7151-3p로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 microRNA(miRNA)에 대해 양성일 수 있다. 구현예에서, HEs는, (i) miRNA-214, miRNA-199a-3p, 및 miRNA-335 및/또는 (ii) hsa-miR-11399, hsa-miR-196b-3p, hsa-miR-5690, 및 hsa-miR-7151-3p에 대해 양성이다. 또 다른 구현예에서, HEs는, (i) miRNA-126, miRNA-24, miRNA-196-b, miRNA-214, miRNA-199a-3p, 및 miRNA-335 및/또는 (ii) hsa-miR-11399, hsa-miR-196b-3p, hsa-miR-5690, 및 hsa-miR-7151-3p에 대해 양성이다. 구현예에서, HEs는 miRNA-214에 대해 양성이다.

[0017] 구현예들 중 어느 하나에서, 여기에 개시된 HEs는, miRNA-367, miRNA-302a, miRNA-302b, miRNA-302c, miRNA-223, 및 miRNA-142-3p로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 miRNAs에 대해 음성일 수 있다. 구현예에서, HEs는 miRNA-223, 및 miRNA-142-3p에 대해 음성이다. 또 다른 구현예에서, HEs는, miRNA-367, miRNA-302a, miRNA-302b, miRNA-302c, miRNA-223, 및 miRNA-142-3p에 대해 음성이다.

[0018] 구현예에서, HEs는, miRNA-214, miRNA-199a-3p, 및 miRNA-335, and negative for miRNA-223, 및 miRNA-142-3p

에 대해 음성이다.

[0019] 하나의 구현예에서, 여기에 개시된 HEs 중 어느 하나는, CD31/PECAM1, CD309/KDR, CD144, CD34, CXCR4, CD146, Tie2, CD140b, CD90, CD271, 및 CD105로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 세포 표면 마커를 발현시킨다. 하나의 구현예에서, 본 발명의 HEs는, CD146, CXCR4, CD309/KDR, CD90, 및 CD271을 발현시킨다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 HEs는 CD146을 발현시킨다. 하나의 구현예에서, 본 발명의 HEs는, CD31/PECAM1, CD309/KDR, CD144, CD34, 및 CD105를 발현시킨다.

[0020] 하나의 구현예에서, HEs는, CD34, CXCR7, CD43 및 CD45로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 세포 표면 마커의 제한되거나 전혀 없는 검출을 나타낸다. 또 다른 구현예에서, HEs는, CXCR7, CD43, 및 CD45의 제한되거나 전혀 없는 검출을 나타낸다. 또 다른 구현예에서, HEs는, CD43 및 CD45의 제한되거나 전혀 없는 검출을 나타낸다.

[0021] 하나의 구현예에서, 본 발명의 HEs는, CD43(-), CD45(-), 및/또는 CD146(+)이다. 또 다른 구현예에서, HEs는, CD31, 칼포닌(Calponin)(CNN1) 및 NG2를 발현시키고, 따라서 내피(CD31+), 평활근(칼포닌+) 및/또는 혈관주위 세포(NG2+) 세포들로 분화될 가능성을 갖는다.

[0022] 하나의 구현예에서, CD144(VECAD)-발현 HEs는, 본 발명의 HEs로부터 단리된다. 하나의 구현예에서, 단리된 CD144(VECAD)-발현 HE 세포는, CD31 및/또는 CD309/KDR(FLK-1)을 더욱 발현시킨다. 또 다른 구현예에서, 단리된 CD144(VECAD)-발현 HE 세포는, 표 22 및 표 23에 열거된 적어도 하나의 유전자를 더욱 발현시킨다. 또 다른 구현예에서, 단리된 CD144(VECAD)-발현 HE 세포는, PLVAP, GJA4, ESAM, EGFL7, KDR/VEGFR2, 및 ESAM으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 세포 마커를 더욱 발현시킨다. 하나의 구현예에서, 단리된 CD144(VECAD)-발현 HE 세포는, SOX9, PDGFRA, 및 EGFRA로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 세포 마커를 더욱 발현시킨다. 또 다른 구현예에서, 단리된 CD144(VECAD)-발현 HE 세포는, KDR/VEGFR2, NOTCH4, 콜라겐 I, 및 콜라겐 IV로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 세포 마커를 더욱 발현시킨다. 하나의 구현예에서, 본 발명의 HEs로부터 단리된 CD144(VECAD)-발현 HEs를 포함하는 조성물은, CD144(VECAD)-음성 HEs가 실질적으로 결여되어 있다.

[0023] 따라서, 본 발명은 또한 여기에 개시된 다능성 줄기 세포의 시험관내 분화에 의해 얻어진 HEs를 포함하는 조성물을 제공한다. 본 발명은 여기에 개시된 다능성 줄기 세포의 시험관내 분화에 의해 얻어진 HEs 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학 조성물을 더욱 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1은, HEs를 생성하기 위한 대표적인 방법의 개요이다.

도 2는, 혈관모세포(HBs)를 생성시키기 위한 대표적인 방법의 개요이다.

도 3은, ES 세포들로부터의 분화 과정(-1일)에 걸친 세포에서 PDGFRa, HAND1, FOXF1, APLNR, PECAM/CD31 발현의 막대 그래프이다. 시험된 시점은, -1일(ES 세포), 2일(D2), 4일(D4), 및 6일(D6)이다.

도 4a는, 분화 과정의 6일차에 얻은 J1-HE 세포(적색, 좌측 막대) 및 GMP1-HE 세포(청색, 우측 막대)에서 CD31, CD43, CD34, KDR, CXCR4, CD144, CD146, 및 CD105 발현의 그래프를 나타낸다.

도 4b는, 분화 과정의 6일차에 얻은 J1-HE 세포 및 GMP1-HE 세포에서 CD31, VECAD, CD34, FLK1 (KDR), CD105, CD146, CD43, CXCR4, CD140b (PDGFRb), 및 NG2의 그래프를 나타낸다. 적색은 염색된 것이고, 회색은 염색되지 않은 대조군이다.

도 5는, CD31 양성(적색) 및 음성(청색) 세포에 대해 게이팅된(gated) J1-HE 및 GMP1-HE 개체군 및 이들 각각의 FLK1/CD309, CD144/VECAD, CD34, CD105, 및 CD43의 발현의 그래프를 나타낸다.

도 6은, CD31, NG2, 또는 CNN1 항체로 염색된 GMP-1-유래 HEs의 대표적인 이미지를 나타낸다(하단 패널). HUVEC 세포는 비교를 위해 사용된다(상단 패널).

도 7은, HUVEC 세포, J1 hESCs, J1-HEs, 또는 J1-HBs 유래의 miRNAs의 TSNE 플롯이다.

도 8은, 슈겐-저산소증 유발 PAH 랫트(sugen-hypoxia induced PAH rat)의 생존율에 대한 HB(VPC1) 및 HE(VPC2)의 영향을 나타낸다.

도 9a는, HUVEC, iPSC(GMP1), 및 GMP1-HEs의 비지도 클러스터링(unsupervised clustering)에 의한 9개의 클러

스터를 나타낸다.

도 9b는, 9개의 클러스터 각각에서 HUVEC, iPSC(GMP1) 및 GMP1-HE("VPC-피더 활성(feeder Active)")의 퍼센트를 나타낸다.

도 9c는, HUVEC, iPSC(GMP1) 및 GMP1-HE("VPC-피더 활성")의 뚜렷한 클러스터링을 나타낸다.

도 10은, VECAD/CDH5의 발현에 의해 동정된 3개의 클러스터를 나타낸다.

도 11a는, 비히클(대조군 배지), 실데나필(sildenafil)(양성 대조군), J1-HE($2.5x10^6$ 세포), 및 GMP1-HE($2.5x10^6$ 세포)로 처리된 MCT 랫트에서, 뿐만 아니라 MCT 처리되지 않은 대조군(Cont(Nx))에서, 우심실 수축기압(RVSP)을 나타낸다.

도 11b는, 비히클(대조군 배지), 실데나필(양성 대조군), J1-HE($2.5x10^6$ 세포) 및 GMP1-HE($2.5x10^6$ 세포)로 처리된 MCT 랫트에서, 뿐만 아니라 MCT 처리되지 않은 대조군(Cont(Nx))에서, 폴턴 지수(Fulton's Index)(RV/LV+S)를 나타낸다.

도 11c는, 비히클(대조군 배지), 실데나필(양성 대조군), J1-HE($2.5x10^6$ 세포), 및 GMP1-HE($2.5x10^6$ 세포)로 처리된 MCT 랫트에서, 뿐만 아니라 MCT 처리되지 않은 대조군(Cont(Nx))에서, 폐혈관 저항 지수(PVR Index)를 나타낸다.

도 11d는, 비히클(대조군 배지), 실데나필(양성 대조군), J1-HE($2.5x10^6$ 세포), 및 GMP1-HE($2.5x10^6$ 세포)로 처리된 MCT 랫트에서, 뿐만 아니라 MCT 처리되지 않은 대조군(Cont(Nx))에서, 비후된 소형 혈관(thickened small vessels)의 수를 나타낸다.

도 12a는, 비히클(음성 대조군), J1-HE(250만 세포), 및 GMP1-HE(250만 세포)로 처리된 슈겐-처리된 랫트에서, 뿐만 아니라 슈겐 처리되지 않은 대조군(Nx)에서, 평균 폐동맥압(mPAP)을 나타낸다.

도 12b는, 비히클(음성 대조군), J1-HE(250만 세포), 및 GMP1-HE(250만 세포)로 처리된 슈겐-처리된 랫트에서, 뿐만 아니라 슈겐 처리되지 않은 대조군(Nx)에서, 우심실 수축기압(RVSP)을 나타낸다.

도 12c는, 비히클(음성 대조군), J1-HE(250만 세포), 및 GMP1-HE(250만 세포)로 처리된 슈겐-처리된 랫트에서, 뿐만 아니라 슈겐 처리되지 않은 대조군(Nx)에서, 폴턴 지수(RV/LV+S)를 나타낸다.

도 12d는, 비히클(음성 대조군), J1-HE(250만 세포), 및 GMP1-HE(250만 세포)로 처리된 슈겐-처리된 랫트에서, 뿐만 아니라 슈겐 처리되지 않은 대조군(Nx)에서, 심박출량(cardiac output)을 나타낸다.

도 13a는, 비히클(음성 대조군), GMP1-HE(1백만 세포), GMP1-HE(250만 세포), GMP1-HE(5백만 세포), 및 실데나필(양성 대조군)로 처리된 슈겐-처리된 랫트에서, 뿐만 아니라 슈겐 처리되지 않은 대조군(Nx)에서, 평균 폐동맥압(mPAP)을 나타낸다.

도 13b는, 비히클(음성 대조군), GMP1-HE(1백만 세포), GMP1-HE(250만 세포), GMP1-HE(5백만 세포), 및 실데나필(양성 대조군)로 처리된 슈겐-처리된 랫트에서, 뿐만 아니라 슈겐 처리되지 않은 대조군(Nx)에서, 우심실 수축기압(RVSP)을 나타낸다.

도 13c는, 비히클(음성 대조군), GMP1-HE(1백만 세포), GMP1-HE(250만 세포), GMP1-HE(5백만 세포), 및 실데나필(양성 대조군)로 처리된 슈겐-처리된 랫트에서, 뿐만 아니라 슈겐 처리되지 않은 대조군(Nx)에서, 폴턴 지수(RV/LV+S)를 나타낸다.

도 13d는, 비히클(음성 대조군), GMP1-HE(1백만 세포), GMP1-HE(250만 세포), GMP1-HE(5백만 세포), 및 실데나필(양성 대조군)로 처리된 슈겐-처리된 랫트에서, 뿐만 아니라 슈겐 처리되지 않은 대조군(Nx)에서, 심박출량을 나타낸다.

도 14a는, 비히클(음성 대조군), GMP1-HE(1백만 세포), GMP1-HE(250만 세포), 및 GMP1-HE(5백만 세포)로 처리된 슈겐-처리된 랫트에서, 뿐만 아니라 슈겐 처리되지 않은 대조군(Nx)에서, 폐 조직의 조직학적 이미지를 나타낸다.

도 14b는, 비히클(음성 대조군), GMP1-HE(1백만 세포), GMP1-HE(250만 세포), GMP1-HE(5백만 세포), 및 실데나필(양성 대조군)로 처리된 슈겐-처리된 랫트에서, 뿐만 아니라 슈겐 처리되지 않은 대조군(Nx)에서, 폐 혈관 벽

두께를 나타낸다.

도 14c는, 비히클(음성 대조군), GMP1-HE(1백만 세포), GMP1-HE(250만 세포), GMP1-HE(5백만 세포), 및 실데나필(양성 대조군)로 처리된 슈겐-처리된 랫트에서, 뿐만 아니라 슈겐 처리되지 않은 대조군(Nx)에서, 근육, 반-근육 및 비-근육 폐 혈관의 퍼센트를 나타낸다.

도 15a는, 비히클(음성 대조군), J1-HE(250만 세포), 및 GMP1-HE(250만 세포)로 처리된 슈겐-처리된 랫트에서, 뿐만 아니라 슈겐 처리되지 않은 대조군(Nx)에서, 폐 조직의 조직학적 이미지를 나타낸다.

도 15b는, 비히클(음성 대조군), J1-HE(250만 세포), 및 GMP1-HE(250만 세포)로 처리된 슈겐-처리된 랫트에서, 뿐만 아니라 슈겐 처리되지 않은 대조군(Nx)에서, 폐 혈관 벽 두께를 나타낸다.

도 15c는, 비히클(음성 대조군), J1-HE(250만 세포), 및 GMP1-HE(250만 세포)로 처리된 슈겐-처리된 랫트에서, 뿐만 아니라 슈겐 처리되지 않은 대조군(Nx)에서, 근육, 반-근육 및 비-근육 폐 혈관의 퍼센트를 나타낸다.

도 16a는, 슈겐 처리되지 않은 렛트(Nx 대조군)에서 정상 폐의 microCT-스캔 이미지를 나타낸다.

도 16b는, 비히클(음성 대조군)로 처리된 SuHx 랫트에서 폐의 microCT-스캔 이미지를 나타낸다.

도 16c는, 100만 GMP-1 HE 세포로 처리된 SuHx 랫트에서 폐의 microCT-스캔 이미지를 나타낸다.

도 16d는, 5백만 GMP-1 HE 세포로 처리된 SuHx 랫트에서 폐의 microCT-스캔 이미지를 나타낸다.

도 16e는, 실데나필로 처리된 SuHx 랫트에서 폐의 microCT-스캔 이미지를 나타낸다.

도 17은, VECAD 발현에 대해 분류 후, 미분류된 HE 세포("unsorted") 및 VECAD 음성(-Fraction) 및 VECAD 양성(+Fraction) 세포들에서 CD31 및 VECAD의 발현을 나타낸다.

도 18a는, 비히클(음성 대조군), 미분류된 GMP1-HE, 및 분류된 VECAD+ GMP1-HE로 처리된 슈겐-처리된 랫트에서, 뿐만 아니라 슈겐 처리되지 않은 대조군(Nx)에서, 평균 폐동맥압(mPAP)을 나타낸다.

도 18b는, 비히클(음성 대조군), 미분류된 GMP1-HE, 및 분류된 VECAD+ GMP1-HE로 처리된 슈겐-처리된 랫트에서, 뿐만 아니라 슈겐 처리되지 않은 대조군(Nx)에서, 우심실 수축기압(RVSP)을 나타낸다.

도 18c는, 비히클(음성 대조군), 미분류된 GMP1-HE, 및 분류된 VECAD+ GMP1-HE로 처리된 슈겐-처리된 랫트에서, 뿐만 아니라 슈겐 처리되지 않은 대조군(Nx)에서, 폴턴 지수(RV/LV+S)를 나타낸다.

도 18d는, 비히클(음성 대조군), 미분류된 GMP1-HE, 및 분류된 VECAD+ GMP1-HE로 처리된 슈겐-처리된 랫트에서, 뿐만 아니라 슈겐 처리되지 않은 대조군(Nx)에서, 심박출량을 나타낸다.

도 18e는, 비히클(음성 대조군), 미분류된 GMP1-HE, 및 분류된 VECAD+ GMP1-HE로 처리된 슈겐-처리된 랫트에서, 뿐만 아니라 슈겐 처리되지 않은 대조군(Nx)에서, 폐 조직의 조직학적 이미지를 나타낸다.

도 18f는, 비히클(음성 대조군), 미분류된 GMP1-HE, 및 분류된 VECAD+ GMP1-HE로 처리된 슈겐-처리된 랫트에서, 뿐만 아니라 슈겐 처리되지 않은 대조군(Nx)에서, 폐 혈관 벽 두께를 나타낸다.

도 18g는, 비히클(음성 대조군), 미분류된 GMP1-HE, 및 분류된 VECAD+ GMP1-HE로 처리된 슈겐-처리된 랫트에서, 뿐만 아니라 슈겐 처리되지 않은 대조군(Nx)에서, 근육, 반-근육 및 비-근육 폐 혈관의 퍼센트를 나타낸다.

도 19는, J1-HEs, GMP1-HEs, 및 HUVEC 세포에서 CD31+/VECAD+ 개체군의 FLK1/KDR 발현을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 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.

[0026] 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.

[0027] 여기에 사용된 용어들의 단수 형태는, 별도의 언급이 없는 한, 피험자의 하나 또는 하나 초과(즉, 적어도 하나)를 지칭하는 것으로 여기에서 사용된다. 예로서, "요소(element)"는 하나의 요소 또는 하나를 초과하는 요소를 지칭한다.

[0028] 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.

[0029] 여기에 사용된 바와 같은, "다능성 줄기 세포"는, 세포들이 미분화 상태를 유지하면서 시험관내에서 장기적이거나 사실상 무기한 증식할 수 있고, 정상 핵형(예를 들어, 염색체)을 나타내며, 적절한 조건하에서 3가지 배엽층(germ layers) 모두(즉, 외배엽, 중배엽 및 내배엽)로 분화하는 능력을 갖는 세포를 광범위하게 지칭한다. 다능성 세포들은 통상적으로: (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) 배아 줄기 세포의 하나 이상의 마커(예를 들어, 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, 등)를 발현시키는, 줄기 세포로 기능적으로 정의된다. 특정 구현예에서, 다능성 세포는: Oct-4, 알칼리성 포스파타제, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, 및 TRA-1-81로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 마커를 발현시킨다. 대표적인 다능성 줄기 세포는, 예를 들어, 당업계에 공지된 방법을 사용하여 발생될 수 있다.

[0030] 다능성 줄기 세포는, 배아 줄기 세포, 유도 다능성 줄기(iPS) 세포, 배아-유래 세포(EDC), 성체 줄기 세포, 조혈 세포, 태아 줄기 세포, 중간엽 줄기 세포, 산후 줄기 세포, 또는 배아 생식 세포를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 하나의 구현예에서, 다능성 줄기 세포는 포유동물 다능성 줄기 세포이다. 또 다른 구현예에서, 다능성 줄기 세포는, 인간 배아 줄기(hES) 세포, 인간 유도 다능성 줄기(iPS) 세포, 인간 성체 줄기 세포, 인간 조혈 줄기 세포, 인간 태아 줄기 세포, 인간 산후 줄기 세포, 인간 전능성 줄기 세포, 또는 인간 배아 생식 세포를 포함하지만, 이에 제한되지 않는, 인간 다능성 줄기 세포이다. 하나의 구현예에서, 다능성 줄기 세포는 인간 배아 줄기 세포이다. 또 다른 구현예에서, 다능성 줄기 세포는 인간 유도 다능성 줄기 세포이다. 또 다른 구현예에서, 다능성 줄기 세포는 인간 다능성 줄기 세포 등록부(hPSCreg)에 열거된 다능성 줄기 세포일 수 있다. 다능성 줄기 세포는, 수명, 효능, 귀소성(homing)를 증가시키거나, 동종면역 반응을 예방 또는 감소시키거나, 또는 이러한 다능성 세포로부터 분화된 세포에서 원하는 인자를 전달하기 위해 유전적으로 변형되거나 달리 변형될 수 있다.

[0031] 다능성 줄기 세포는 모든 종에서 유래될 수 있다. 배아 줄기 세포는, 예를 들어, 마우스, 여러 종의 비-인간 영장류, 및 인간으로부터 성공적으로 유래되며, 배아 줄기-유사 세포는 수많은 부가적인 종으로부터 발생된다. 따라서, 기술분야의 당업자는, 인간, 비-인간 영장류, 설치류(마우스, 렛트), 유제류(소, 양, 등), 개(집개 및 들개), 고양이(집고양이 및 사자, 호랑이, 치타와 같은 야생 고양이), 토끼, 햄스터, 저빌(gerbils), 다람쥐, 기니피그, 염소, 코끼리, 판다(자이언트 판다 포함), 돼지, 너구리, 말, 얼룩말, 해양 포유류(돌고래, 고래, 등) 및 이와 유사한 것을 포함하지만, 이에 제한되지 않는 임의의 종으로부터 배아 줄기 세포 및 배아-유래 줄기 세포를 발생시킬 수 있다.

[0032] 여기에 사용된 바와 같은, "배아" 또는 "배아의"는, 모계 숙주(maternal host)의 자궁막에 이식되지 않은 발달중인 세포괴(cell mass)를 광범위하게 지칭한다. "배아 세포"는, 배아로부터 단리되거나 배아에 함유된 세포이다. 이것은 또한 2-세포기(cell stage)에서 일찍이 얻어진 할구, 및 응집된 할구를 포함한다.

[0033] 여기에 사용된 바와 같은, "배아 줄기 세포"(ES 세포)는 세포주로서 연속적으로 계대된 배반포 또는 상실배의 내부 세포괴로부터 유래된 세포를 광범위하게 지칭한다. ES 세포는, 정자 또는 DNA로 난세포의 수정, 핵 이식, 단위생식으로부터 유래되거나, 또는 HLA 영역에서 동형접합성(homozygosity)을 갖는 ES 세포를 발생시키는 수단에 의해 유래될 수 있다. ES 세포는 또한 정자와 난자 세포의 융합, 핵 이식, 단위생식, 또는 염색질(chromatin)의 재프로그래밍 및 상기 재프로그래밍된 염색질을, 선택적으로 배아의 나머지 부분을 파괴하지 않고, 세포를 생성시키기 위한 원형질막으로 후속 혼입에 의해 생성된, 접합자(zygote), 할구, 또는 배반포-단계 포유동물 배아로부터 유래된 세포를 지칭할 수 있다. 배아줄기 세포는, 이들의 공급원 또는 이들을 생성하는데 사용된 특정 방법에 관계없이, 다음 특색 중 하나 이상을 기반으로 동정될 수 있다: (i) 3개의 배엽층 모두의 세포로 분화하는 능력, (ii) 적어도 Oct-4 및 알칼리성 포스파타제의 발현, 및 (iii) 면역손상된 동물로 이식되는 경우 기형종을 생성하는 능력.

[0034] 여기에 사용된 바와 같은, "배아-유래 세포"(EDC)는, 상실배-유래 세포, 내부 세포괴, 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 세포괴를 포함하지만, 세포주로서 계대된 인간 배아 줄기 세포는 제외한다.

[0035] 여기에 사용된 바와 같은 "유도된 다능성 줄기 세포" 또는 "iPS 세포"는, 일반적으로 체세포를 재프로그래밍시켜 얻은 다능성 줄기 세포를 지칭한다. iPS 세포는, 체세포에서 인자들, 예를 들어, Oct 4(때로는 Oct 3/4로 지칭됨), Sox2, Myc(예를 들어, c-Myc 또는 임의의 Myc 변이체), Nanog, Lin28, 및 Klf4의 조합("재프로그래밍 인자")을 발현시키거나 발현을 유도하여 발생될 수 있다. 하나의 구현예에서, 재프로그래밍 인자는, Oct 4, Sox2, c-Myc, 및 Klf4를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 재프로그래밍 인자는, Oct 4, Sox2, Nanog, 및 Lin28을 포함한다. 특정 구현예에서, 적어도 2개의 재프로그래밍 인자는 체세포를 성공적으로 재프로그래밍하기 위해 체세포에서 발현된다. 다른 구현예에서, 적어도 3개의 재프로그래밍 인자는 체세포를 성공적으로 재프로그래밍하기 위해 체세포에서 발현된다. 다른 구현예에서, 적어도 4개의 재프로그래밍 인자는 체세포를 성공적으로 재프로그래밍하기 위해 체세포에서 발현된다. 다른 구현예에서, 적어도 5개의 재프로그래밍 인자는 체세포를 성공적으로 재프로그래밍하기 위해 체세포에서 발현된다. 또 다른 구현예에서, 적어도 6개의 재프로그래밍 인자, 예를 들어, Oct 4, Sox2, c-Myc, Nanog, Lin28, 및 Klf4는 체세포에서 발현된다. 다른 구현예에서, 부가적인 재프로그래밍 인자는 확인되고, 단독으로 또는 하나 이상의 공지된 재프로그래밍 인자와 조합하여 체세포를 다능성 줄기 세포로 재프로그래밍하는데 사용된다.

[0036] iPS 세포는, 태아, 출생후, 신생아, 청소년, 또는 성인 체세포들을 사용하여 발생될 수 있다. 체세포는, 섬유아세포, 각질세포, 지방세포, 근육 세포, 기관 및 조직 세포, 및 조혈 세포(예를 들어, 조혈 줄기 세포)를 포함하나 이에 제한되지 않는, 다양한 혈액 세포를 포함할 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 구현예에서, 체세포는, 섬유아세포, 예컨대, 진피 섬유아세포, 활액 섬유아세포, 또는 폐 섬유아세포, 또는 비-섬유아세포 체세포이다.

[0037] iPS 세포들은 세포 은행에서 얻어질 수 있다. 선택적으로, IPS 세포는 당업계에 알려진 방법에 의해 새로 발생될 수 있다. iPS 세포들은, 조직-일치 세포를 발생시킬 목표로 특정 환자 또는 일치된 공여자 유래의, 물질을 사용하여 구체적으로 발생될 수 있다. 하나의 구현예에서, iPS 세포는 실질적으로 면역원성이 아닌 보편적인 공여자 세포일 수 있다.

[0038] 유도 다능성 줄기 세포는 체세포에서 하나 이상의 재프로그래밍 인자의 발현 또는 발현을 유도시켜 생성될 수 있다. 재프로그래밍 인자는, 레트로바이러스 벡터(retroviral vector) 또는 렌티바이러스 벡터와 같은, 바이러스 벡터를 사용한 감염에 의해 체세포에서 발현될 수 있다. CRISPR/Talen/아연-핑거 뉴클레아제(XFNs)는 또한 사용될 수 있다. 또한, 재프로그래밍 인자는, 에피솜 플라스미드, 또는 RNA와 같은, 비-삽입성 벡터(non-integrative vector)를 사용하여 체세포에서 발현될 수 있다. 재프로그래밍 인자가 비-삽입성 벡터를 사용하여 발현되는 경우, 인자는, 벡터로 체세포의 형질전환, 형질감염, 또는 전기천공을 사용하여 세포에서 발현될 수 있다. 예를 들어, 마우스 세포에서, 삽입성 바이러스 벡터를 사용한 4가지 인자(Oct3/4, Sox2, c-myc, 및 Klf4)의 발현은 체세포를 재프로그래밍하기에 충분한다. 인간 세포에서, 삽입성 바이러스 벡터를 사용한 4가지 인자(Oct3/4, Sox2, NANOG, 및 Lin28)의 발현은 체세포를 재프로그래밍하기에 충분한다.

[0039] 재프로그래밍 인자의 발현은, 재프로그래밍 인자의 발현을 유도하는, 소유기 분자 작용제(small organic molecule agents)와 같은, 적어도 하나의 작용제와 체세포를 접촉시켜 유도될 수 있다.

[0040] 체세포는 또한 조합적 접근법을 사용하여 재프로그래밍될 수 있으며, 여기서, 재프로그래밍 인자는 (예를 들어, 바이러스 벡터, 플라스미드, 및 이와 유사한 것을 사용하여) 발현되고, 재프로그래밍 인자의 발현은 (예를 들어, 소유기 분자를 사용하여) 유도된다.

[0041] 일단 재프로그래밍 인자가 세포에서 발현되거나 유도되면, 세포는 배양될 수 있다. 시간이 지남에 따라, ES 특징을 갖는 세포는 배양 접시에 나타난다. 세포는, 예를 들어, ES 세포 모폴로지(morphology)에 기초하여, 또는 선택가능하거나 검출가능한 마커의 발현에 기초하여 선택되고 계대배양될 수 있다. 세포는 ES 세포와 유사한 세포의 배양물을 생성시키기 위해 배양될 수 있다.

[0042] iPS 세포의 다능성을 확인하기 위해, 세포는 하나 이상의 다능성의 분석에서 시험될 수 있다. 예를 들어, 세포는 ES 세포 마커의 발현에 대해 시험될 수 있으며; 세포는 SCID 마우스에 이식된 경우 기형종을 생성하는 능력

에 대해 평가될 수 있고; 세포는 3개의 모든 배엽층의 세포 타입을 생성하도록 분화하는 능력에 대해 평가될 수 있다.

[0043] iPS 세포는 임의의 종에서 유래될 수 있다. 이러한 iPS 세포는 마우스 및 인간 세포를 사용하여 성공적으로 발생된다. 더군다나, iPS 세포는, 배아, 태아, 신생아, 및 성인 조직을 사용하여 성공적으로 발생된다. 따라서, iPS 세포는 모든 종들 유래의 공여자 세포를 사용하여 쉽게 발생될 수 있다. 따라서, iPS 세포는, 인간, 비-인간 영장류, 설치류(마우스, 렛트), 유제류(소, 양, 등), 개(집개 및 들개), 고양이(집고양이 및 사자, 호랑이, 치타와 같은 야생 고양이), 토끼, 햄스터, 염소, 코끼리, 판다(자이언트 판다 포함), 돼지, 너구리, 말, 얼룩말, 해양 포유류(돌고래, 고래, 등) 및 이와 유사한 것을 포함하지만, 이에 제한되지 않는 임의의 종으로부터 발생될 수 있다.

[0044] 세포가 주어진 마커에 대해 "양성" 또는 "+"인 것으로 특징지어지는 경우, 마커가 세포의 세포 표면 또는 세포의 개체군 내에 존재하는 정도에 따라 해당 마커의 낮은(lo), 중간(int), 및/또는 높은(hi) 발현자(expresser)가 될 수 있고, 여기서, 상기 용어는 세포의 색상 분류 과정(color sorting process)에 사용되는 형광 또는 기타 색상의 강도와 관련된다. lo, int, 및 hi의 구별은, 분류되는 특정 세포 개체군에 사용되는 마커의 맥락에서 이해될 것이다. 세포가 주어진 마커에 대해 "음성" 또는 "-"인 것으로 특징지어지는 경우, 이는 세포 또는 세포의 개체군이 해당 마커를 발현시키지 않을 수 있거나 또는 마커가 해당 세포 또는 세포의 개체군에 의해 상대적으로 매우 낮은 수준으로 발현될 수 있고, 이것이 검출 가능하게 표지된 경우 매우 낮은 신호를 발생시킨다는 것을 의미한다.

[0045] 본 발명의 구현예에서, 마커의 발현 수준이 대조군에 비해 60%, 70%, 80%, 또는 90%를 초과하는 경우, 세포 또는 세포의 개체군은 마커의 높은(hi) 수준을 발현시키는 것으로 특징지어진다. 또 다른 구현예에서, 마커의 발현 수준이 대조군에 비해 약 20%, 30%, 40%, 50% 내지 약 60%인 경우, 세포 또는 세포의 개체군은 마커의 중간(int) 수준을 발현시키는 것으로 특징지어진다. 또 다른 구현예에서, 마커의 발현 수준이 대조군에 비해 약 2%, 5%, 10%, 또는 15% 내지 약 20%인 경우, 세포 또는 세포의 개체군은 마커의 낮은(lo) 수준을 발현시키는 것으로 특징지어진다. 또 다른 구현예에서, 마커의 발현 수준이 대조군에 비해 약 2%, 1.5%, 1%, 또는 0.5% 미만인 경우, 세포 또는 세포의 개체군은 마커에 대해 음성인 것으로 특징지어진다. 또 다른 구현예에서, 마커의 발현 수준이 대조군에 비해 낮(lo)거나 약 2%, 1.5%, 1%, 또는 0.5% 미만인 경우, 세포 또는 세포의 개체군은 마커에 대해 음성인 것으로 특징지어진다. "대조군"은 비교 목적에 유용한 기술분야의 당업자에게 친숙한 임의의 대조군 또는 표준일 수 있으며, 음성 대조군 또는 양성 대조군을 포함할 수 있다.

[0046] 여기에 사용된 바와 같은, "치료" 또는 "치료하다"는, 질병 또는 장애의 발병, 또는 질병 또는 장애의 증상을 치료, 치유, 완화, 경감, 변경, 구제, 향상, 개선, 영향, 예방, 또는 지연시키는 것을 지칭한다. 혈관 복구의 맥락에서, 용어 "치료" 또는 "치료하는"는, 혈관 조직을 복구, 대체, 증대, 개선, 구조, 재증식 또는 재생시키는 것을 포함한다.

[0047] 여기에 사용된 바와 같은, "혈관모세포" 또는 "HB"는, 적어도 조혈 세포 및 내피 세포로 분화할 수 있는 다능성 줄기 세포의 시험관내 분화에 의해 얻어진 세포를 지칭한다. 구현예에서, 혈관모세포는, 예를 들어, 미국 특허 제9,938,500호; 미국 특허 제9,410,123호; 및 WO 2013/082543호에 기재된 방법들에 따른 다능성 줄기 세포로부터 시험관내에서 발생될 수 있으며, 이들 모두는 그 전체가 참조로 여기에 혼입된다. 더욱이, 혈관모세포는 하기 실시예 2에 기재된 방법에 따른 다능성 줄기 세포로부터 시험관내에서 발생될 수 있다. 특정 구현예에서, 혈관모세포는, 낮은 접착 또는 비-접착 조건하에 다능성 줄기 세포로부터 배상체를 먼저 얻고, 상기 배상체를 메틸셀룰로오스를 포함하는 배양 시스템에서 배양시켜 다능성 줄기 세포로부터 시험관내에서 발생되어 세포가 아세포(blast cells)를 형성시키는 3차원 환경을 생성시킨다. 하나의 구현예에서, 혈관모세포는 정상산소 조건(예를 들어, 5% CO_2 및 20% O_2)하에 다능성 줄기 세포로부터 발생될 수 있다. 혈관모세포는 또한 특정 DNA, RNA, microRNA 또는 단백질의 발현 또는 발현의 결여를 포함하지만, 이에 제한되지 않는, 다른 구조적 및 기능적 특성에 기초하여 특징화될 수 있다.

[0048] 하나의 구현예에서, 혈관모세포는, CD31/PECAM1, CD144/VE-cadh, CD34, CD43, 및 CD45로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 또는 적어도 5개의 세포 표면 마커에 대해 양성이다. 하나의 구현예에서, HBs는, CD31, CD43 및 CD45에 대해 양성이다. 또 다른 구현예에서, HBs는, CD43 및 CD45에 대해 양성이다. 또 다른 구현예에서, HBs는, CD309/KDR, CXCR4, CXCR7, CD146, Tie2, CD140b, CD90, 및 CD271로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 또는 적어도 8개의 세포 표면 마커에 대해 낮은 수준을 발현하거나 음성이다. 또 다른 구현예에서,

HBs는 CD146에 대해 낮은 수준을 발현하거나 음성이다. 또 다른 구현예에서, HBs는, Tie2, CD140b, CD90, 및 CD271에 대해 낮은 수준을 발현하거나 음성이다. 또 다른 구현예에서, HBs는 CD146, Tie2, CD140b, CD90, 및 CD271에 대해 낮은 수준을 발현하거나 음성이다. 하나의 구현예에서, HBs는, CD43 및 CD45에 대해 양성이고, CD146, Tie2, CD140b, CD90, 및 CD271에 대해 낮은 수준을 발현하거나 음성이다.

[0049] 또 다른 구현예에서, 혈관모세포는, miRNA-126, miRNA-24, miRNA-223, 및 miRNA-142-3p로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개, 또는 적어도 4개의 miRNAs에 대해 양성이다. 구현예에서, 혈관모세포는, miRNA-126, miRNA-24, miRNA-223, 및 miRNA-142-3p에 대해 양성이다. 또 다른 구현예에서, 혈관모세포는, miRNA-367, miRNA-302a, miRNA-302b, miRNA-302c, miRNA-196-b, miRNA-214, miRNA-199a-3p, 및 mi-RNA-335로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 또는 적어도 8개의 miRNAs에 대해 음성이다. 구현예에서, 혈관모세포는, miRNA-367, miRNA-302a, miRNA-302b, miRNA-302c, miRNA-196-b, miRNA-214, miRNA-199a-3p, 및 mi-RNA-335에 대해 음성이다. 또 다른 구현예에서, 혈관모세포는, miRNA-126, miRNA-24, miRNA-223, 및 miRNA-142-3p에 대해 양성이고, miRNA-367, miRNA-302a, miRNA-302b, miRNA-302c, miRNA-196-b, miRNA-214, miRNA-199a-3p, 및 mi-RNA-335에 대해 음성이다.

[0050] 여기에 사용된 바와 같은, "혜모제닉 내피 세포" 또는 "HEs"는, 다능성 줄기 세포의 시험관내 분화에 의해 얻어지고, 내피, 평활근, 혈관주위세포, 조혈 세포 및 중간엽 세포 계통으로 분화하는 능력을 갖는 세포를 지칭한다. HEs는 여기에서 정의된 바와 같은 혈관 질병을 치료하는데 유용할 수 있다. 하나의 구현예에서, HEs는, WO 2014/100779호 및 미국 특허 제9,993,503호에 기재된 방법들에 따른 다능성 줄기 세포로부터 시험관내에서 발생될 수 있으며, 이들 모두는 그 전체가 참조로 여기에 혼입된다. 또 다른 구현예에서, HEs는, 하기 실시예 1에 기재되고, 도 1에 나타낸 방법에 따라 다능성 줄기 세포로부터 시험관내에서 발생될 수 있다.

[0051] 특정 구현예에서, HEs는, 배상체 형성 없이 또는 메틸셀룰로오스를 포함하는 배양 시스템의 사용 없이, 다능성 줄기 세포로부터 시험관내에서 발생될 수 있다. 하나의 구현예에서, 다능성 줄기 세포는 iPS 또는 ES 세포이다. 다능성 줄기 세포는, 피더 세포층(feeder cell layer), 바람직하게는, 인간 피더 세포층에서 배양될 수 있거나, 또는 예를 들어, 마트리겔(Matrigel®)과 같은 세포외 기질 상에서 피더가 없이 배양될 수 있다. 다능성 줄기 세포는 정상산소 조건(예를 들어, 5% CO_2 및 20% O_2)하에서 배양될 수 있다. HEs로의 분화를 위해, 다능성 줄기 세포는, 저산소 조건(예를 들어, 5% CO_2 및 5% O_2) 및 접착 조건하에 분화 배지에서 배양될 수 있다. 접착 조건은, Matrigel®, 피브로넥틴, 젤라틴, 및 콜라겐 IV와 같은, 세포외 기질에서 세포를 배양하는 단계를 포함할 수 있다. 분화 배지는, 기본 배지, 예컨대, Stemline® Ⅱ Hematopoietic Stem Cell Expansion Medium(Sigma), Iscove's Modified Dulbecco's Medium(IMDM), Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM), 또는 임의의 다른 공지된 기본 배지를 포함할 수 있다. 분화 배지는, 골형성 단백질 4(BMP4), 혈관 내피 성장 인자(VEGF), 및 섬유아세포 성장 인자(FGF)와 같은, 다능성 줄기 세포의 HEs로의 분화를 유도하는 인자를 더욱 포함할 수 있다. 다능성 줄기 세포는, 분화 배지에서 약 1-12일, 또는 약 2-10일, 또는 약 3-8일, 또는 약 4, 5, 6, 7, 또는 8일 동안, 또는 다능성 줄기 세포가 HEs로 분화될 때까지 배양될 수 있다. 특정 구현예에서, 다능성 줄기 세포는, 약 6일 이상 동안 분화 배지에서 배양된다.

[0052] 구현예에서, HEs는, 특정 DNA, RNA, microRNA, 또는 단백질의 발현 또는 발현의 결여를 포함하지만, 이에 제한되지 않는, 특정 구조적 및 기능적 특성에 기초하여 특징화될 수 있다. 구현예에서, 여기에 개시된 HEs 중 어느 하나는, CD31/PECAM1, CD309/KDR, CD144, CD34, CXCR4, CD146, Tie2, CD140b, CD90, CD271, 및 CD105로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 또는 적어도 11개의 세포 표면 마커를 발현시킨다. 구현예에서, 본 발명의 HEs는, CD146, CXCR4, CD309/KDR, CD90, 및 CD271을 발현시킨다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 HEs는 CD146을 발현시킨다. 또 다른 구현예에서, HEs는, CD31/PECAM1, CD309/KDR, CD144, CD34, 및 CD105를 발현시킨다.

[0053] 하나의 구현예에서, HEs는, CD34, CXCR7, CD43 및 CD45로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개, 또는 적어도 4개의 세포 표면 마커의 제한되거나 전혀 없는 검출을 나타낸다. 또 다른 구현예에서, HEs는, CXCR7, CD43, 및 CD45의 제한되거나 전혀 없는 검출을 나타낸다. 또 다른 구현예에서, HEs는, CD43 및 CD45의 제한되거나 전혀 없는 검출을 나타낸다.

[0054] 하나의 구현예에서, 본 발명의 HEs는, CD43(-), CD45(-), 및/또는 CD146(+)이다. 또 다른 구현예에서, HEs는, CD31, 칼포닌(CNN1) 및 NG2를 발현시키고, 따라서, 내피(CD31+), 평활근(칼포닌+) 및/또는 혈관주위세포(NG2+)

세포들로 더욱 분화될 가능성을 갖는다.

[0055] 하나의 구현예에서, CD144(VECAD)-발현 HEs는, 본 발명의 HEs로부터 단리된다. 하나의 구현예에서, 단리된 CD144(VECAD)-발현 HE 세포는, CD31 및/또는 CD309/KDR(FLK-1)을 더욱 발현시킨다. 또 다른 구현예에서, 단리된 CD144(VECAD)-발현 HE 세포는, 표 22 또는 표 23에 열거된 세포 마커로부터 선택된 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 11, 또는 적어도 12개의 세포 마커를 더욱 발현시킨다. 본 발명의 구현예에서, 단리된 CD144(VECAD)-발현 HE 세포는, PLVAP, GJA4, ESAM, EGFL7, KDR/VEGFR2, 및 ESAM으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 또는 적어도 5개의 세포 마커를 발현시킨다. 구현예에서, 단리된 CD144(VECAD)-발현 HE 세포는, SOX9, PDGFRA, 및 EGFRA로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1개, 적어도 2개, 또는 적어도 3개의 세포 마커를 더욱 발현시킨다. 또 다른 구현예에서, 단리된 CD144(VECAD)-발현 HE 세포는, KDR/VEGFR2, NOTCH4, 콜라겐 I, 및 콜라겐 IV로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 또는 적어도 4개의 세포 마커를 더욱 발현시킨다. 구현예에서, 본 발명의 HEs로부터 단리된 CD144(VECAD)-발현 HEs를 포함하는 조성물은, CD144(VECAD)-음성 HEs가 실질적으로 결여되어 있다. 하나의 구현예에서, CD144(VECAD)-발현 HEs를 포함하는 조성물은, 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 또는 20%의 CD144(VECAD)-발현 HEs를 포함한다. 구현예에서, CD144(VECAD)-발현 HEs를 포함하는 조성물은, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 또는 80% 미만의 CD144(VECAD)-음성 HEs를 포함한다.

[0056] 또 다른 구현예에서, 본 발명의 HEs는, miRNA-126, mi-RNA-24, miRNA-196-b, miRNA-214, miRNA-199a-3p, miRNA-335(miRNA-335-5p 및/또는 miRNA-335-3p), hsa-miR-11399, hsa-miR-196b-3p, hsa-miR-5690, 및 hsa-miR-7151-3p로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 또는 적어도 10개의 microRNAs(miRNAs)에 대해 양성이다. 구현예에서, HEs는, miRNA-214, miRNA-199a-3p, 및 miRNA-335(miRNA-335-5p 및/또는 miRNA-335-3p)에 대해 양성이다. 또 다른 구현예에서, HEs는, miRNA-126, mi-RNA-24, miRNA-196-b, miRNA-214, miRNA-199a-3p, 및 miRNA-335(miRNA-335-5p 및/또는 miRNA- 335-3p)에 대해 양성이다. 구현예에서, HEs는, miRNA-214에 대해 양성이다. 또 다른 구현예에서, HEs는, hsa-miR-11399, hsa-miR-196b-3p, hsa-miR-5690, 및 hsa-miR-7151-3p에 대해 양성이다. hsa-miR-11399, hsa-miR-196b-3p, hsa-miR-5690, 및 hsa-miR-7151-3p는, 미국 가출원 제62/892,724호 및 이의 PCT 출원에 기재된 J1 및 meso 3D VPC2 세포와 비교할 때 HEs의 개체군에서 고유하게 발현되는 것으로 동정되고, 이들 출원들 모두는 여기에 참조로서 혼입된다.

[0057] 구현예들 중 어느 하나에서, 여기에 개시된 HEs는, miRNA-367, miRNA-302a, miRNA-302b, miRNA-302c, miRNA-223, 및 miRNA-142-3p로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 또는 적어도 6개의 miRNAs에 대해 음성일 수 있다. 구현예에서, HEs는 miRNA-223, 및 miRNA-142-3p에 대해 음성이다. 또 다른 구현예에서, HEs는, miRNA-367, miRNA-302a, miRNA-302b, miRNA-302c, miRNA-223, 및 miRNA-142-3p에 대해 음성이다.

[0058] 구현예에서, HEs는 miRNA-214, miRNA-199a-3p, 및 miRNA-335(miRNA-335-5p 및/또는 miRNA-335-3p)에 대해 양성이고, miRNA-223, 및 miRNA-142-3p에 대해 음성이다.

[0059] 하나의 구현예에서, HEs는 유전적으로 변형된다. HEs는, 이들이 세포에 의해 제공되는 치료적 반응(들)을 촉진하는 것으로 믿어지거나 의도되는 유전자 생성물을 발현하도록, 유전적으로 변형될 수 있다. 예를 들어, HEs는, 혈관 내피 성장 인자(VEGF) 및 이의 이소형(isoforms), 섬유아세포 성장 인자(FGF, 산성 및 염기성), 안지오포이에틴-1(angiopoietin-1) 및 다른 안지오포이에틴, 에리트로포이에틴, 헤목시게나제(hemoxygenase), 전환 성장 인자-α(TGF-α), 전환 성장 인자-β(TGF-β) 또는 BMPs 1, 2, 4, 7 및 이들의 수용체 MBPR2 또는 MBPR1를 포함하는 TGF-β 상과(super family)의 다른 구성원, 간 성장 인자(산란 인자), 저산소증 유도 인자(HIF), 내피 산화질소 합성효소, 프로스타글란딘 I 합성효소(prostaglandin I synthase), 크루플-유사(Krupple-like) 인자(KLF-2, 4, 등)와 같은 세포 유래의 이종 단백질, 및 혈관 질병에 대해 치료적 반응을 촉진하는데 유용한 임의의 이종 단백질을 발현하도록 유전적으로 변형될 수 있다.

[0060] 여기에 사용된 바와 같은, "혈관 질병"은, 심장, 폐, 및/또는 혈관(동맥, 정맥, 및 모세혈관)의 임의의 비정상적인 상태 또는 손상을 지칭한다. 혈관 질병은, 심낭(즉, 심막), 심장 판막(예를 들어, 판막 부전, 판막 협착, 류마티스성 심장 질병, 승모판 탈출증, 대동맥판 역류), 심근(관상 동맥 질병, 심근경색증, 심부전, 허혈성 심장병, 협심증), 혈관(예를 들어, 동맥경화증, 동맥류) 또는 정맥(예를 들어, 정맥류, 치질)의 질병, 장애 및/또

는 손상을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 여기에 사용된 바와 같은, 혈관 질병은 또한, 관상 동맥 질병(예를 들어, 동맥경화증, 죽상동맥경화증, 및 동맥, 세동맥 및 모세혈관의 기타 질병 또는 손상 또는 관련 질환), 심근경색증(예를 들어, 급성 심근경색증), 조직화 심근경색증, 허혈성 심장 질병, 부정맥, 좌심실 확장, 색전, 심부전, 울혈성 심부전, 심내막하 섬유증, 좌심실 또는 우심실 비대, 심근염, 만성 관상 허혈, 확장성 심근병증, 재협착증, 부정맥, 협심증, 고혈압(예를 들어, 폐 고혈압, 사구체 고혈압, 문맥 고혈압), 심근 비대, 중증 사지 허혈을 포함한 말초 동맥 질환, 뇌혈관 질병, 신동맥 협착증, 대동맥류, 폐심장 질병, 심부정맥, 염증성 심장병, 선천성 심장병 , 류마티스성 심장병, 당뇨병성 혈관 질병, 및 내피 폐 손상 질병(예를 들어, 급성 폐 손상(ALI), 및 급성 호흡 곤란 증후군(ARDS))을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 혈관 질병은, 선천적 결함, 유전적 결함, 환경적 영향(예를 들어, 식이 영향, 생활 방식, 스트레스, 등) 및 기타 결함 또는 영향으로부터 결과할 수 있다.

[0061] 하나의 구현예에서, 혈관 질병은 폐 고혈압(PH)이다. 폐 고혈압은, 폐동맥 고혈압(PAH), 좌심장 질병을 동반한 폐 고혈압, 폐질병 및/또는 만성 저산소증을 동반한 폐 고혈압, 만성 동맥 폐색, 및 유육종증, 조직구증 X, 림프관종증, 및 폐혈관의 압박과 같은, 불분명하거나 다인자적 기전을 동반한 폐 고혈압을 포함한다. Galie et al. European Heart Journal 2016; 37(1):67-119, 참조. 특정 구현예에서, 혈관 질병은 PAH이다.

[0062] 대표적인 치료적 용도

[0063] 본 발명의 HEs는 혈관 질병을 치료하는데 유용하다. 따라서, 본 발명은, 본 발명의 HEs를 포함하는 조성물을 피험자에게 투여하는 단계에 의해 피험자에서 혈관 질병을 치료하는 방법을 제공한다. 하나의 구현예에서, 혈관 질병은, 심낭(즉, 심막), 심장 판막(즉, 판막 부전, 판막 협착, 류마티스성 심장 질병, 승모판 탈출증, 대동맥판 역류), 심근(관상 동맥 질병, 심근경색증, 심부전, 허혈성 심장병, 협심증), 혈관(즉, 동맥경화증, 동맥류) 또는 정맥(예를 들어, 정맥류, 치질)의 질병, 장애 및/또는 손상을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 다른 구현예에서, 혈관 질병은, 관상 동맥 질병(즉, 동맥경화증, 죽상동맥경화증, 및 동맥, 세동맥 및 모세혈관의 기타 질병 또는 손상 또는 관련 질환), 심근경색증(예를 들어, 급성 심근경색증), 조직화 심근경색증, 허혈성 심장 질병, 부정맥, 좌심실 확장, 색전, 심부전, 울혈성 심부전, 심내막하 섬유증, 좌심실 또는 우심실 비대, 심근염, 만성 관상 허혈, 확장성 심근병증, 재협착증, 부정맥, 협심증, 고혈압(예를 들어, 폐 고혈압, 사구체 고혈압, 문맥 고혈압), 심근 비대, 중증 사지 허혈을 포함한 말초 동맥 질환, 뇌혈관 질병, 신동맥 협착증, 대동맥류, 폐심장 질병, 심부정맥, 염증성 심장병, 선천성 심장병 , 류마티스성 심장병, 당뇨병성 혈관 질병, 및 내피 폐 손상 질병(예를 들어, 급성 폐 손상(ALI), 및 급성 호흡 곤란 증후군(ARDS))을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0064] 하나의 구현예에서, 혈관 질병은 폐 고혈압(PH)이다. 특정 구현예에서, 혈관 질병은 PAH이다.

[0065] 본 발명의 HEs는 또한 혈관 질병의 증상을 치료하는데 유용할 수 있다. 예를 들어, HEs는, 심근경색증, 만성 관상동맥 허혈, 동맥경화증, 울혈성 심부전, 확장성 심근병증, 재협착증, 관상 동맥 질병, 심부전, 부정맥, 협심증, 죽상동맥경화증, 고혈압, 중증 사지 허혈, 말초 혈관 질병, 폐 고혈압, 또는 심근 비대의 증상을 치료하는데 사용할 수 있다. 혈관 질병의 하나 이상의 증상의 치료는, 다음 증상 중 하나 이상의 감소와 같은, 임상적 이점을 제공할 수 있다: 숨가쁨, 체액 저류, 두통, 현기증, 흉통, 좌측 어깨 또는 팔 통증, 및 심실 기능 장애.

[0066] 본 발명의 HEs는 손상을 감소 및/또는 최소화하고, 손상 후 혈관 복구 및 재생을 촉진하는데 기여하는 특정 특성을 나타낼 수 있다. 이들은, 무엇보다도, 새로운 혈관 형성을 자극하는 성장 인자를 합성 및 분비하는 능력, 세포 생존 및 증식을 자극하는 성장 인자를 합성 및 분비하는 능력, 새로운 혈관 형성에 직접 참여하는 세포로 증식 및 분화하는 능력, 손상된 심근을 이식하고 흉터 형성(콜라겐 침착 및 가교)을 억제하는 능력, 및 혈관 계통의 세포로 증식 및 분화하는 능력을 포함한다. 하나의 구현예에서, 본 발명의 HEs는 혈관 복구가 가능할 수 있다. 하나의 구현예에서, HEs는 정상 조건하에 손상-후 전구 세포(progenitor cell) 보충에 기여한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 HEs는, 혈관 손상의 부위로 귀소할 수 있고, 재-내피화를 촉진하며 신생내막 형성을 방지할 수 있다. 따라서, 본 발명의 HEs는, 부상, 염증 또는 질병으로 인해 손상된 혈관 조직을 치료하는데 사용될 수 있다.

[0067] 본 발명의 HEs를 사용한 치료의 효과는, 다음 임상 측정 중 하나에 의해 입증될 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다: 증가된 심장 구출률(heart ejection fraction), 감소된 심부전 비율, 감소된 경색 크기, 감소된 관련 질병률(폐부종, 신부전 , 부정맥), 감소된 운동 내성 또는 기타 삶의 질 측정, 감소된 사망률. 세포 요법의 효과는, 수술 후 며칠에서 몇 주 동안에 명백할 수 있다. 그러나, 유익한 효과는, 수술 후 몇 시간 이내에 관찰될 수 있으며, 몇 년 동안 지속될 수 있다.

[0068] 여기에 기재된 방법에 따라 본 발명의 HEs로 치료되는 피험자는 보통, 혈관 질병을 갖거나, 가질 것으로 의심되거나, 또는 이에 대한 위험이 있는 것으로 진단될 것이다. 혈관 질병은, 통상적으로 표준 방법론을 사용하여 의사에 의해 진단 및/또는 모니터링될 수 있다. "피험자" 및 "환자"는, 여기에서 상호교환가능하게 사용되며, 포유동물, 설치류, 및 비-포유동물, 예컨대, 비-인간 영장류, 양, 개, 소, 닭, 양서류, 파충류, 등을 포함하는, 임의의 척추동물을 지칭한다. 특정 구현예에서, 피험자는 영장류이다. 다른 구현예에서, 피험자는 인간이다.

[0069] 하나의 구현예에서, 본 발명의 방법은, 혈관 질병을 효과적으로 치료하기 위해 기존의 혈관 요법과 함께 실시될 수 있다. 본 발명의 방법 및 조성물은, 비-생물학적 및/또는 생물학적 약물을 사용한 동시 또는 순차적 치료를 포함한다. 비-생물학적 및/또는 생물학적 약물의 비-제한적인 예로는, 진통제, 예컨대, 비스테로이드성 항-염증제, 아편류 작용제 및 살리실산염; 항-감염제, 예컨대, 구충제, 항혐기제, 항생제, 아미노글리코사이드계 항생제, 항진균성 항생제, 세팔로스포린계 항생제, 마크롤라이드계 항생제, 기타 β-락탐계 항생제, 페니실린계 항생제, 퀴놀론계 항생제, 설폰아마이드계 항생제, 테트라사이클린계 항생제, 항진균제, 항결핵 항진균제, 항원충제, 항말라리아 항원충제, 항바이러스제, 항-레트로바이러스제, 옴 치료제, 항-염증제, 코르티코스테로이드 항-염증제, 항소양제/국소 마취제, 국소 항-감염제, 항진균 국소 항-감염제, 항바이러스 국소 항-감염제; 전해질 및 신장 작용제, 예컨대, 산성화제, 알칼리화제, 이뇨제, 탄산 탈수효소 억제제 이뇨제, 루프 이뇨제, 삼투성 이뇨제, 칼륨-보존성 이뇨제, 티아지드 이뇨제, 전해질 대체제, 및 요산뇨제; 효소, 예컨대, 췌장 효소 및 혈전용해 효소; 위장 작용제, 예컨대, 지사제, 위장 항-염증제, 제산성 항-궤양제, 위산-펌프 억제제 항-궤양제, 위점막 항-궤양제, H2-차단제 항-궤양제, 담석 용해제, 소화제, 구토제, 완하제 및 대변 연화제, 및 위장관운동촉진제; 전신 마취제, 예컨대, 흡입 마취제, 할로겐화 흡입 마취제, 정맥 마취제, 바르비투르산염 정맥 마취제, 벤조디아제핀 정맥 마취제, 및 아편류 작용 물질 정맥 마취제; 호르몬 및 호르몬 조절제, 예컨대, 낙태제, 부신 작용제, 코르티코스테로이드 부신 작용제, 안드로겐, 항-안드로겐, 면역생물학제, 예컨대, 면역글로불린, 면역억제제, 톡소이드, 및 백신; 국소마취제, 예컨대, 아미드 국소 마취제 및 에스테르 국소 마취제; 근골격계 작용제, 예컨대, 항-통풍 항-염증제, 코르티코스테로이드 항-염증제, 금 화합물 항-염증제, 면역억제성 항-염증제, 비스테로이드성 항-염증제(NSAIDs), 살리실산 항-염증제, 미네랄; 및 비타민, 예컨대, 비타민 A, 비타민 B, 비타민 C, 비타민 D, 비타민 E, 및 비타민 K를 포함한다.

[0070] 투여

[0071] 여기에 개시된 바와 같이, 본 발명의 HEs는, 심장 또는 말초 조직으로의 직접 주사에 의한 또는 정맥 또는 동맥 주입(역류성 혈류 주입 포함)에 의한 전신 투여를 포함하는 여러 경로에 의해 투여될 수 있다. 특히, 말초 정맥 접근에 의한, 전신 투여는, 심장의 자연적인 관류 및 손상의 부위를 표적으로 하는 혈관 내피 전구 세포의 능력에 의존하여 최소로 침습적이라는 장점을 갖는다. 세포는, 단일 볼루스(bolus)로, 느린 주입을 통해, 또는 몇 시간으로 분리된 엇갈린 일련의 적용을 통해, 또는 세포가 적절하게 보관된 경우, 며칠 또는 몇 주 동안 주사될 수 있다. 세포는 또한, 심근 혈류를 관리하기 위해 심장을 통한 세포의 1차 통과가 풍선을 사용하여 향상되도록 카테터의 설치의 사용에 의해 적용될 수 있다. 말초 정맥 접근과 마찬가지로, 세포는 카테터를 통해 단일 볼루스 또는 여러 개의 더 작은 분취량으로 주사될 수 있다. 세포는 또한 심외막 주사에 의해 심근에 직접 적용될 수 있다. 이것은, 심장-절개술(예를 들어, 관상 동맥 우회 이식 수술) 또는 심실 보조 장치의 배치의 맥락에서 직접 시각화하에 사용될 수 있다. 바늘이 장착된 카테터는, 직접 적용의 덜 침습적인 수단을 가능하게 하는 심장내막 방식(endocardial fashion)으로 심근으로 직접 세포를 전달하는데 사용될 수 있다.

[0072] 하나의 구현예에서, 전달의 경로는, 표준 말초 정맥내 카테터, 중심 정맥 카테터, 또는 폐동맥 카테터를 통한 정맥내 전달을 포함한다. 다른 구현예에서, 세포는 현재 허용되는 방법을 통해 접근되는 관상동맥내 경로를 통해 전달될 수 있다. 세포의 흐름은, 환자의 맥관구조(vasculature) 내에 위치된 원위 및 근위 풍선의 연속 팽창/수축에 의해 제어될 수 있으며, 이에 의해 세포 생착 또는 세포 치료 작용을 촉진하는 일시적인 흐름-없는 존을 생성할 수 있다. 또 다른 구현예에서, 세포는, 의도된 표적 조직을 이미지화하거나 검출하는 능력뿐만 아니라 호환가능한 카테터의 사용을 요구할 수 있는 심장내막(심실의 내부 표면) 방법을 통해 전달될 수 있다. 선택적으로, 세포는 심장외막(심장의 외부 표면) 방법을 통해 전달될 수 있다. 이러한 전달은, 심장-절개술의 시점에서 직접 시각화를 통해 또는 특화된 세포 전달 기기를 필요로 하는 흉강경 접근을 통해 달성될 수 있다. 더군다나, 세포는, 다음의 경로를 통해, 단독으로, 또는 위에서 확인된 접근법 중 하나 이상과 조합하여 전달될 수 있다: 피하, 근육내, 기관-내(intra-tracheal), 설하, 역류 관상 관류, 관상 우회 기계, 체외 막 산소화(ECMO) 장비 및 심낭 창(pericardial window).

[0073] 하나의 구현예에서, 세포는 혈관-내 볼루스 또는 시한 주입으로서 환자에게 투여된다.

[0074] 조성물

[0075] 본 발명은 HEs를 포함하는 조성물을 제공한다. 특정 구현예에서, 조성물은 적어도 $1x10^3$개의 HEs를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 조성물은 적어도 $1x10^4$개의 HEs를 포함한다. 다른 구현예에서, 조성물은 적어도 1×10^5, 적어도 1×10^6, 적어도 1×10^7, 또는 적어도 1×10^8개의 HEs를 포함한다. 조성물은 의도된 치료 효과를 향상, 제어, 또는 달리 감독하기 위해 당업계에 알려진 첨가제를 부가적으로 포함할 수 있다.

[0076] 구현예에서, 본 발명의 조성물은, 고체 지지체 매트릭스, 생물학적 접착제 또는 드레싱(dressings), 또는 생물학적 스캐폴드(scaffolds), 또는 3D 바이오-프린팅(bio-printing)에 사용되는 바이오-잉크와 같은, 생체적합성 매트릭스를 더욱 포함한다. 생체적합성 매트릭스는, 이식된 세포의 운명을 지지 및/또는 감독하여 생체내 조직 공학을 용이하게 할 수 있다. 생체적합성 매트릭스의 비-제한적 예로는, 소장 점막하 조직(SIS), 예를 들어, 돼지-유래(및 기타 SIS 공급원); 가교 또는 비-가교 알기네이트, 하이드로콜로이드, 폼, 콜라겐 겔, 콜라겐 스폰지, 폴리글리콜산(PGA) 메쉬, 폴리글락틴(PGL) 메쉬, 플리스(fleeces), 폼 드레싱, 생체접착제(예를 들어, 피브린 글루 및 피브린 겔), 죽은 표피-제거 피부 등가물(dead de-epidermized skin equivalents), 하이드로겔, 알부민, 다당류, 폴리락트산(PLA), 폴리글리콜산(PGA), 폴리락트산-글리콜산(PLGA), 폴리오르토에스테르, 폴리무수물, 폴리포스파젠, 폴리아크릴레이트, 폴리메타크릴레이트, 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리비닐 알코올, 및 이와 유사한 것과 같은, 흡수성 및/또는 비-흡수성 고체 매트릭스 물질을 포함한다.

[0077] 본 발명의 HEs는 HEs 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학 조성물로 제형화될 수 있다. 약학적으로 허용가능한 담체는 당업계에 잘 알려져 있으며, 염수, 수성 버퍼 용액, 용매, 분산 매질, 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다. 약학적으로 허용가능한 담체의 비-제한적인 예로는, 당, 예컨대, 락토오스, 글루코오스 및 수크로오스; 전분, 예컨대, 옥수수 전분 및 감자 전분; 셀룰로오스 및 이의 유도체, 예컨대, 나트륨 카르복시메틸 셀룰로오스, 에틸 셀룰로오스 및 셀룰로오스 아세테이트; 분말 트라가칸트; 맥아; 젤라틴; 활석; 부형제, 예컨대, 코코아 버터 및 좌약 왁스; 오일, 예컨대, 땅콩유, 면실유, 홍화유, 참기름, 올리브유, 옥수수유 및 대두유; 글리콜, 예컨대, 프로파일렌 글리콜; 폴리올, 예컨대, 글리세린, 솔비톨, 만니톨 및 폴리에틸렌 글리콜; 에스테르, 예컨대, 에틸 올레이트 및 에틸 라우레이트; 한천; 버퍼제, 예컨대, 수산화마그네슘 및 수산화알루미늄; 알긴산; 발열원-없는 물; 등장 식염수; 링거 용액; 에틸 알코올; pH 버퍼 용액; 폴리에스테르, 폴리카보네이트 및/또는 폴리무수물; 및 약학적 제형에 사용되는 기타 무-독성 상용성 물질을 포함한다. 하나의 구현예에서, 약학적으로 허용가능한 담체는, 제조 및 보관의 조건하에서 안정하다. 하나의 구현예에서, 본 발명의 HEs는 WO 2017/031312호에 기재된 GS2 배지에서 제형화되며, 이의 전체적인 내용은 여기에 참조로서 혼입된다.

[0078] 본 발명은 HEs를 포함하는 동결보존된 조성물을 더욱 제공한다. 동결보존된 조성물은 동결보존제를 더욱 포함할 수 있다. 동결보존제는 당업계에 공지되어 있으며, 디메틸 설폭사이드(DMSO), 글리세롤, 등을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 동결보존된 조성물은 또한, 세포 배양 배지와 같은, 등장성 용액을 포함할 수 있다.

[0079] 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.

[0080] 실시예

[0081] 실시예 1: 헤모제닉 내피 세포(HEs)의 발생

[0082] 헤모제닉 내피 세포는, 도 1에 나타낸 바와 같이, 인간 배아 줄기 세포(hESCs) 또는 인간 유도 다능성 줄기 세포(iPSCs)로부터 발생된다. hESCs(예를 들어, J1 hESCs) 또는 iPSCs(예를 들어, GMP-1 iPSCs)는, 6웰 플레이트에 인간 진피 섬유아세포 피더 세포 상에 mTeSR1(Stemcell Technology) + 1% 페니실린/스트렙토마이신에서 4일 동안 배양되고, 배지는 매일 교환된다. 분화를 위해 hESCs 또는 iPSCs를 플레이팅하기 위해(-1일), mTeSR1 배지는 6웰 플레이트의 각 웰로부터 제거된다. 각 웰은 2㎖의 DMEM/F12(Gibco) 또는 D-PBS로 세척되고, DMEM/F12 또는 D-PBS는 흡인되며, 1㎖의 무-효소 Gibco® Cell Dissociation Buffer(CDB)는 각 웰에 첨가된다. 플레이트는, 세포가 분리된 모폴로지를 나타낼 때까지, 정상산소 CO_2 인큐베이터(5% CO_2/20% O_2) 내에서 약 5-8분 동안 인큐베이션된다. CDB는 그 다음 느슨하게 부착된 세포에 충격을 주지 않고 피펫팅하여 조심스럽게 제거된다. 세포는 각 웰에 2㎖의 mTeSR1을 첨가시켜 수집되고, 수집 튜브에 수집된다. 웰에서 나머지 세포는 부가적인 2㎖의 mTeSR1로 부드럽게 세척되고, 수집 튜브로 옮겨진다. 튜브는 120 x g에서 3분 동안 원심분리되고, 배양 배지는 제거된다. 세포는 10 μM의 최종 농도에서 Y-27632(Stemgent)를 함유하는 mTeSR1 배지에서 400,000개 세포/10

㎖의 최종 밀도로 재현탁된다. 10㎖의 세포 현탁액은 콜라겐 IV-코팅된 10 ㎝ 플레이트에 옮겨진다. 플레이트는 정상산소 인큐베이터에 밤새 놓아둔다.

[0083] 다음날(0일), mTeSR1/Y-27632 배지는, 각 10 ㎝ 플레이트로부터 부드럽게 제거되고, 10㎖의 BVF-M 배지[Stemline® Ⅱ Hematopoietic Stem Cell Expansion Medium(Sigma); 25ng/㎖ BMP4(Humanzyme); 50ng/㎖ VEGF165(Humanzyme); 50ng/㎖ FGF2(Humanzyme)]로 대체된다. 플레이트는 저산소 챔버(5% CO_2/5% O_2)에서 2일 동안 인큐베이션된다.

[0084] 2일차에, 배지는 흡인되고, 신선한 10-12㎖의 BVF-M은 각 10 ㎝ 플레이트에 첨가된다.

[0085] 4일차에, 배지는 다시 흡인되고, 신선한 10-15㎖의 BVF-M는 각 10 ㎝ 플레이트에 첨가된다.

[0086] 6일차에, 세포는 이식 및/또는 추가 시험을 위해 수확된다. 배지는 각 플레이트로부터 흡인되고, 플레이트는 10㎖의 D-PBS(Gibco)를 첨가하고 D-PBS를 흡인시켜 세척된다. 5㎖의 StemPro Accutase(Gibco)는 각 10 ㎝ 플레이트에 첨가되고, 정상산소 CO_2 인큐베이터(5% CO_2/20% O_2)에서 3-5분 동안 인큐베이션된다. 세포는 5㎖ 피펫으로 5회 피펫팅된 다음, P1000 피펫으로 약 5회 피펫팅된다. 세포는 그 다음 30 μM 세포 여과기(strainer)를 통해 걸러내고, 수집 튜브로 옮겨진다. 각각의 10 ㎝ 플레이트는, 10㎖의 EGM2 배지(Lonza) 또는 Stemline® Ⅱ Hematopoietic Stem Cell Expansion Medium(Sigma)로 다시 헹궈지고, 세포는 30 μM 세포 여과기를 통해 통과되고, 수집 튜브에 수집된다. 튜브는 120-250 x g에서 5분 동안 원심분리된다. 세포는 그 다음 EGM2 배지 또는 또는 Stemline® Ⅱ Hematopoietic Stem Cell Expansion Medium(Sigma)로 재현탁되고, 계수된다. 계수 후, 세포는 하향 회전(5분 동안 250xg)되고, $3x10^6$개 cells/㎖ 농도에서 동결 배지(10% DMSO + 열 불활성화된 FBS)로 재현탁된다. 냉동 스톡(stocks)을 생성시키기 위해, 세포 현탁액은 냉동바이알(cryovial)당 2㎖ FBS(Hyclone) 및 DMSO(Sigma)에 분취된다($6x10^6$ cells/2㎖/vial).

[0087] 실시예 2: 혈관모세포(HB)의 발생

[0088] 혈관모세포는, 도 2에 나타난 바와 같이, 인간 배아 줄기 세포(예를 들어, J1 hESCs) 또는 인간 유도 다능성 줄기 세포(예를 들어, GMP-1 iPSCs)로부터 발생된다. 6웰 플레이트에 인간 진피 섬유아세포 피더 세포 상에 mTeSR1(Stemcell Technology) + 1% 페니실린/스트렙토마이신에서 배양된 hESCs 또는 iPSCs는, 세포가 플레이트에서 분리될 때까지 인큐베이터에서 37℃(5% CO_2/20% O_2)로 약 10분 동안 4㎎/㎖ 콜라게나제 IV(Gibco)를 함유하는 DMEM/F12(Gibco)와 함께 각 웰을 인큐베이션시켜 웰로부터 들어 옮겨진다. 콜라게나아제 IV를 함유하는 DMEM/F12는, 각 웰로부터 제거되고, DMEM/F12로 세척되며, 2㎖ mTeSR1는 각 웰에 첨가되고, 필요시, 세포 스크레이퍼(cell scraper)는 웰로부터 세포를 분리하는데 사용된다. 세포 현탁액은 원추형 튜브로 옮겨지고, 각 웰은 2㎖의 mTeSR1으로 다시 세척되며, 원추형 튜브로 옮겨진다. 튜브는 300xg에서 2분 동안 원심분리되고 상층액은 제거된다. 세포 펠렛(pellet)은, BV-M 배지[Stemline® Ⅱ Hematopoietic Stem Cell Expansion Medium(Sigma); 25ng/㎖ BMP4(Humanzyme); 50ng/㎖ VEGF165(Humanzyme)]에서 재현탁되고, 웰당 약 750,000 - 1,200,000 세포의 밀도로 Ultra Low Attachment Surface 6웰 플레이트(Corning) 상으로 플레이팅된다. 플레이트는 정상산소 CO_2 인큐베이터에서 48시간 동안 인큐베이터에 배치시켜 배상체 형성을 가능하게 한다(0-2일). 각 웰에서 배지와 세포는 그 다음 수집되고, 120-300 x g에서 3분 동안 원심분리된다. 상청액의 절반은 제거되고, 50ng/㎖ bFGF를 함유하는 2㎖ BV-M으로 교체된다. 따라서, 세포 현탁액에서 bFGF의 최종 농도는 약 25㎎/㎖이다. 4㎖의 세포 현탁액은 Ultra Low Attachment Surface 6 웰 플레이트의 각 웰 상으로 플레이팅되고, 또 다른 48시간(2-4일) 동안 정상산소 CO_2 인큐베이터 내에 배치되어 지속적인 배상체 형성을 가능하게 한다.

[0089] 4일차에, 배상체는, 15㎖ 튜브로 수집되고, 120-300xg에서 2분 동안 원심분리되며, D-PBS로 세척되고, StemPro Accutase(Gibco)를 사용하여 단일 세포 현탁액으로 분해된다. FBS(Hyclone)는, 아큐타제(Accutase)를 비활성화시키기 위해 사용되고, 단일 세포는 세포 여과기를 통해 통과되며, 원심분리되고, Stemline Ⅱ 배지(Sigma)에서 약 1 x 10^6 cells/㎖로 재현탁된다. 약 $3x10^6$ 세포는, 30㎖ Methocult BGM 배지[MethoCult™ SF H4536(no EPO)(StemCell Technologies); 페니실린/스트렙토마이신(Gibco); ExCyte Cell Growth Supplement(1:100)(Millipore); 50ng/㎖ Flt3 리간드(PeproTech); 50ng/㎖ VEGF(Humanzyme); 50ng/㎖ TPO(PeproTech); 30ng/㎖ bFGF(Humanzyme)]에서 혼합되고, Ultra Low Attachment Surface 10 ㎝ 접시(Corning)상에 재플레이팅되며, 정상산소 CO_2 인큐베이터에서 7일(4-11일) 동안 배양하여 혈관모세포 형성을 가능하게 한다.

[0090] 11일차에, 혈관모세포는 이식 및/또는 추가 시험을 위해 수확된다. 혈관모세포는 D-PBS(Gibco)로 메틸셀룰로오스를 희석시켜 수집된다. 세포 혼합물은, 300xg에서 15분 동안 2회 원심분리되고, 30㎖의 EGM2 BulletKit 배지(Lonza) 또는 StemlineⅡ에 재현탁되며, 세포는 계수되고 전술된 대로 동결된다.

[0091] 실시예 3: 세포 마커 분석

[0092] 실시예 1에 따라 6일차에 수확된 HEs 및 실시예 2에 따라 11일차에 수확된 혈관모세포(HB)는, FACS 분석에 의해 내피 세포 마커, 혈액/혜모제닉 마커, 및 혈관주위세포 마커에 대해 분석된다. 간단히 말해서, 수확된 세포는 100k/tube의 밀도로 50㎕의 FACS 버퍼(2% FBS/PBS)에서 재현탁된다. 유세포 분석 항체는 표 1에 따라 첨가되고, 4℃에서 20분 동안 인큐베이션된다. 1㎖의 FACS 버퍼는 그 다음 각 튜브에 첨가되고 250xg에서 5분 동안 원심분리된다. 세포는 튜브당 프로피디움 요오다이드(PI)가 없는 200㎕의 FACS 버퍼에서 재현탁된다. 샘플은 MACS Quant Analyzer 10(Miltenyi Biotec: 130-096-343)에서 분석된다. HUVEC는 양성 대조군으로 사용되었고, HDF 또는 미분화된 hESCs는 음성 대조군으로 사용된다. 부가하여, HUVEC는 보상을 위한 단일 염색(SS) 대조군으로 사용된다.

표 1

[0093] MACS Quant Analyzer 10에 대한 항체 염색표

	FITC/ AF488	PE	APC	APC-Vio770	Vio Blue
Stain1	CD43 (1:50)	CD34 (1:50)	FLK1 (1:50)	CXCR4 (1:50)	CD31 (1:100)
Stain2	CD146(1:50)	cKit (1:50)	CD144 (1:50)	Tie2 (1:50)	CD31 (1:100)
Stain3	CD105(1:50)	CD31 (1:100)	CD271 (1:100)	CD44 (1:50)	CD274 (1:50)
Stain4	CD90(1:50)	NG2 (1:25)	CD140b (1:50)	VCAM1 (1:50)	CD31 (1:100)
SS-1	CD31(1:100)				
SS-2		CD31(1:100)			
SS-3			CD31(1:100)		
SS-4				CD31(1:100)	
SS-5					CD31(1:100)
염색되지 않음					

[0094] 선택적으로, FACs 분석은 SONY SA3800 스펙트럼 분석기를 사용하여 수행된다. 간단히 말해서, 수확된 세포는 100-200k/tube의 밀도로 100㎕의 FACS 버퍼(2% FBS/PBS)에서 재현탁된다. 유세포 분석 항체는, 표 2에 따라 첨가되고, 4℃에서 20분 동안 인큐베이션된다. 1㎖의 FACS 버퍼는 그 다음 각 튜브에 첨가되고, 300xg에서 5분 동안 원심분리된다. 세포는 튜브당 PI가 있거나 없는 100㎕ FACS 버퍼(FACS 버퍼로 1:1000 희석)에서 재현탁된다. 샘플은 SONY SA3800 스펙트럼 분석기에서 분석된다. HUVEC 세포는 양성 대조군으로 사용되고, 미분화된 hESCs는 음성 대조군으로 사용된다.

표 2

[0095] SONY SA3800 스펙트럼 분석기에 대한 항체 염색표

튜브 #		FITC	PE	APC	PI
1	염색되지 않음	-	-	-	-
2	오직 PI	-	-	-	+
3	CD31 FITC	+	-	-	-
4	CD31 PE	-	+	-	-
5	CD31 APC	-	-	+	-
6	Staining 1	CD34	CD31	CD144	+
7	Staining 2	CD43	CD45	CD184	+
8	Staining 3	CD146	NG2	PDGFRb	+
9	Staining 4	CD146	CXCR7	CD309	+

[0096] 결과

[0097] 표 3-4에 나타난 바와 같이, HBs는, 혈액 마커 CD43 및 CD45 및 내피 세포 마커 CD31, CD144 및 CD34 모두에 대해 양성이지만, Tie2, CD140b, CD90, 및 CD271의 낮은 수준 또는 불검출 수준을 발현시킨다.

[0098] 대조적으로, 표 3-4에 나타낸 바와 같이, HEs는, CD146, CXCR4 및 Flk1(CD309/KDR) 뿐만 아니라 혈관주위세포/간엽 마커 CD90 및 CD271에 대해 양성이지만, 혈액/헤모제닉 마커 CD43 및 CD45에 대해 음성이다.

표 3

[0099] J1 및 GMP1 계통에서 유래되고, MACS Quant Analyzer 10 및/또는 SONY SA3800 Spectral Analyzer에서 분석된 HBs 및 HEs에 대한 세포 표면 마커의 요약.

	마커	HE	HB
내피 마커	CD31/PECAM1	20-50% (n=12)	75-99% (n=17)
	CD309/KDR	10-50% (n=9)	1-15% (n=10)
	CD144/VE-cadh	5-40% (n=12)	15-60% (n=17)
	CD34	5-20%(n=12)	10-50% (n=17)
케모카인 수용체	CXCR4/CD184	20-60% (n=12)	10-20% (n=17)
케모카인 수용체	CXCR7	4-10% (n=9)	5% 미만 (n=10)
혈액 마커	CD43	Less than 10% (n=12)	70-95% (n=17)
혈액 마커	CD45	Less than 5% (n=9)	50-90% (n=10)
혈관주위세포 마커	CD146	50-95%(n=9)	5-20% (n=10)

표 4

[0100] MACS Quant Analyzer 10에서 분석된 J1-유래 HB 및 HE에 대한 세포 표면 마커의 요약.

	J1-HE (n=3)		J1-HB (n=7)	
	빈도 (%)	SD (%)	빈도 (%)	SD (%)
Tie2	35.0	0.76	0.9	0.50
CD140b	27.7	9.42	0.3	0.14
CD90	37.5	9.09	0.7	0.21
CD271	30.2	12.62	0.1	0

[0101] 분화 과정 동안에 다양한 세포에서 세포 마커 발현의 시간 경과는, PDGFRA 및 APLNR의 표면 발현이 2일차에 최고조에 이르면서, 세포가 중배엽 계통의 마커를 상향 조절하는 것으로 나타났다. 그 후, 이들 마커의 발현은 감소하며, 이는, 6일차에, 혈관 세포의 마커인, CD31에서 증가와 상관관계가 있다(도 3). 광학현미경에 의한 검사는, 내피 또는 중간엽 모폴로지를 나타내는 세포와 함께, 분화 방법이 세포의 혼합물을 발생시켰음을 시사한다.

[0102] 6일차에 생성된 HE 세포의 추가 특징화는, 대부분의 세포가 조혈 마커 CD43 및 CD45아닌, VECAD+(CD144+) 또는 CD140B+(PDGFRB+)를 발현시키는 CD146+인 것을 나타내어서, 이는 본 프로토콜이 뚜렷한 혈관 및 혈관주위 세포(perivascular cells)를 생성시켰음을 보여준다. 6일차에 생성된 HE 세포의 부가적인 특징화는, CD31, CD43, CD34, KDR(FLK1), CXCR4, CD144, CD146, CD105, CD140b(PDGFRb), 및 NG2에 대해 수행되고, 도 4a 및 4b에 나타낸다.

[0103] CD31 발현에 의해 확인된, 추정 혈관 내피 분획(vascular endothelial fraction)은, FLK1/CD309[또한, VEGFR2로 알려짐], VECAD, CD34, 및 CD105에 대해 양성이다(도 5). 6일차에 HE 세포가 정상산소 조건에서 부가적인 5-7일 동안 혈관 내피 세포 성장을 지원하는 배지로 옮겨진 경우, CD31, CD34, 및 FLK1/CD309(VEGFR2) 발현은 유지되거나 증가된다.

[0104] 실시예 4: HEs는 내피, 평활근, 및 혈관주위세포 마커를 발현

[0105] 면역세포화학(ICC)을 사용한 부가적인 분석은, 대조군으로 HUVEC를 사용하여 하기에 기재된 바와 같이 수행된다. HEs는, 적어도 24시간 동안 플레이팅된 다음, Ca^{2+} 및 Mg^{2+}가 포함된 D-PBS(Gibco)로 2번 세척된다. 그 다음, 세포는 실온에서 10분 동안 4% PFA(Electron Microscopy Science)로 고정된다. 고정 후, 세포는 Ca^{2+} 및 Mg^{2+}가 포함된 D-PBS로 5분 동안 3회 세척된다. 세포는 그 다음 5% 정상 염소 혈청(Cell Signaling Technology)을 함유하는 1x Perm/Wash 버퍼(BD)로 1시간 동안 처리된다. Perm/Wash/Blocking 버퍼의 흡인 후, 세포는 Perm/Wash/Blocking 버퍼를 함유하는 1차 항체(primary antibody)(인간 CD31, 1:50, Invitrogen; 인간 NG2, 1:50, PD Pharmagen; 인간 칼포닌, 1:100, Millipore)로 밤새 처리된다. 다음날, 세포는 Perm/Wash 버퍼로 5분 동안 3회 세척된다. 세포는 그 다음 실온에서 1시간 동안 Perm/Wash/Blocking 버퍼를 함유하는 2차 및 DAPI(DAPI, 1:1000, Invitrogen; Goat-anti Ms-Cy3, Goat-anti Rb-Alexaflour488)로 처리된다. 세포는 Perm/Wash 버퍼로 5분 동안 3회 세척되고, 이미지는 Keyence BZ-X710(Keyence)으로 캡처된다. 도 6에 나타낸 바와 같이, HEs는 내피(CD31), 평활근(Calponin) 및 혈관주위세포 마커(NG2)를 발현시키며, 따라서, 내피 세포, 평활근 세포, 및 혈관주위세포로 분화할 수 있는 능력을 갖는다. 부가적으로, 6일차에 HE 세포가 세포주위세포 성장을 지원하는 배지로 옮겨진 경우, CD140B 발현은 약간 감소했고, NG2, CD90, CD73, CD44, 및 CD274 발현은 유지되거나 증가되었다(데이터는 나타내지 않음).

[0106] 실시예 5: 단일 세포 miRNA 프로파일

[0107] 다능성 또는 혈관 세포 동일성과 관련된 96 microRNA의 발현의 수준을 평가하기 위해 단일 세포 qRT-PCR 분석을 사용한 부가적인 분석은, J1-유래 HB 및 HE에 대해 아래에 기재된 대로 수행된다. TaqMan 유전자 발현 분석(Applied Biosystems)은, 96개의 인간 miRNAs에 대해 주문되었다. 10X 분석은, 25 ㎕의 20X Taqman 분석을 25 ㎕의 2X 분석 로딩 시약(Fluidigm)과 혼합하여 50 ㎕ 부피의 최종 스톡에 대해 준비된다. 66,000 내지 250,000개 cells/㎖의 범위에서 (동결된 또는 새로이 수확된) 세포의 분취량은 준비된다. 세포는 실온에서 10분 동안 LIVE/DEAD 염색 용액(LIVE/DEAD 생존력/세포독성 키트)으로 인큐베이션된다. 세포는 그 다음 세척되고, 배지에서 현탁되며, 40 ㎛ 필터를 통해 여과된다. 세포 계수는, 세포 계수기를 사용하여 생존력 및 세포 농도에 대해 수행된다. 세포 혼합물은 세포(60 ㎕)와 현탁 시약(40 ㎕)(Fluidigm)을 3:2의 비로 혼합시켜 제조된다. 6 ㎕의 세포 현탁액 혼합물은 중형 세포(10-17 ㎛) 또는 대형 세포(17-25 ㎛)에 대해 프라이밍된 C1 Single-Cell Autoprep IFC 미세유동 칩(microfluidic chip) 상에 로딩된 다음, 상기 칩은 "STA: Cell Load(1782x/1783x/1784x)" 스크립트를 사용하여 Fluidigm C1 기기에서 처리된다. 이러한 단계에서는, 96개의 캡처 챔버 각각에서 하나의 세포를 캡처한다. 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 ㎕의 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 뷰(Heatmap view)에서 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.

표 5

[0108] miRNA 마커 프로파일

	J1	J1-HE	J1-HB	HUVEC
만능 miRNA				

367	+	-	-	-
302 a	+	-	-	-
302 b	+	-	-	-
302 c	+	-	-	-
혈관 miRNA				
126	-	+	+	+
24	-	+	+	+
196-b	-	+	-	+
고유 miRNA				
223	-	-	+	-
142-3p	-	-	+	-
214	-	+	-	-
199a-3p	-	+	-	-
335	-	+	-	-

[0109] 결과

[0110] 도 7에 나타낸 바와 같이, J1-HE 세포는 미분화된 배아 줄기 세포(J1), 인간 혈관 세포(HUVEC) 및 J1-유래 HB 세포와 비교하여 뚜렷한 miRNA 발현 프로파일을 갖는다. miRNA 마커의 구체적인 예는 표 5에 나타낸다.

[0111] 실시예 6: 내피 세포로 시험관내 분화 및 혈관 형성(vascular tube formation)

[0112] J1 및 GMP-1에서 유래된 HEs 및 HBs는, 내피 세포로 분화하는 능력에 대해 시험관내에서 더욱 시험된다. 대략 300k의 HE 세포 및 500-600k의 HBs는, 18㎖의 EGM2 또는 Vasculife VEGF 배지 키트(Lifeline Cell Tech)에서 재현탁되고, 3㎖의 재현탁액은 피브로넥틴-코팅 6웰 플레이트(Corning)의 각 웰에 분취된다. 배양 이틀 후, 배지는 교체되고, 신선한 EGM2 또는 Vasculife VEGF 배지는 첨가된다. 세포가 약 60-90% 컨플루언시(confluency)에 도달할 때, 사진은 촬영된다. HBs(5일차) 및 HEs(3일차)는, 피브로넥틴-코팅 플레이트에서 내피 계통으로 분화되며, 둘 다 특징적인 내피 조약돌(cobblestone) 모폴로지를 나타낸다(데이터는 나타내지 않음).

[0113] 혈관 형성을 시험하기 위해, 세포는 사진을 찍은 후 수확된다. 간단히 말해서, 각 웰은 D-PBS로 세척되고, 1㎖의 StemPro Accutase(Gibco)는 각 웰에 첨가되며, 37℃에서 3-5분 동안 인큐베이션된다. 단일 세포 현탁액은 배양액을 몇 번 피펫팅하여 발생된다. 플레이트는 EGM2 배지 또는 Vasculife VEGF 배지로 세척되고, 원뿔형 튜브로 옮겨지며, 250 x g에서 5분 동안 원심분리된다. 세포 계수는 Nexcelom Cellometer K2를 사용하여 수행된다.

[0114] 250 ㎕의 기저막 Matrigel(Corning)은, NuncTM 4웰 플레이트(Thermo Scientific)의 각 웰에 첨가되고, 플레이트는 실온에서 30분 동안 인큐베이션된다. 수확된 HBs 및 HEs는, 웰당 250 ㎕의 EGM2 배지 또는 Vasculife VEGF 배지에 약 5.0×10^4 세포의 밀도로 시딩된다. 플레이팅 2-3시간 후, 배지는, AcLDL(Molecular Probes)을 함유하는 신선한 250 ㎕ 배지(5 ㎕ AcLDL + 245 ㎕ 배지)로 교체된다. 플레이트느 그 다음 정상산소 조건에서 밤새 인큐베이션된다. 24시간의 인큐베이션 후, AcLDL-함유 배지는 제거되고, 플레이트는 D-PBS로 3회 세척되며, 웰당 새로운 250 ㎕의 EGM2 배지 또는 Vasculife VEGF 배지는 첨가된다. 마지막으로, 현미경 사진은 Keyence Microscope를 사용하여 4X 배율로 각 웰로부터 촬영된다. HBs 및 HEs 모두는, Matrigel에서 혈관-유사 네트워크를 형성했다(데이터는 나타내지 않음).

[0115] 실시예 7: 폐동맥 고혈압 모델에서 생체내 연구

[0116] 본 연구의 목적은 렛트에서 슈겐-저산소증(SuHx)-유발 폐동맥 고혈압 (PAH)에 대한 헤모제닉 내피 세포의 영향을 평가하는데 있다. 본 연구는 또한 누드 렛트에서 SuHx 유발 폐 고혈압(PAH)의 치료를 위한 헤모제닉 내피 세포의 잠재적 효능을 평가했다. 렛트에서 SuHx-유발 폐 고혈압은, 문서에 의해 충분히 입증된 모델이며, 폐동맥 고혈압이 있는 렛트에서 폐동맥압 및 우심실 재형성에 대한 항고혈압제의 영향을 조사하는데 유용하다.

[0117] 종

[0118] 연구에서 등록 당시 체중이 200 내지 250g인 수컷 누드(RNU) 렛트(Charles River Laboratories).

[0119] 시험 물질(Test Articles)

[0120] VPC1 = 상기 실시예 2에서 제조된 바와 같은 J1-HBs

[0121] VPC2 = 상기 실시예 1에서 제조된 바와 같은 J1-HEs

[0122] 비히클(음성 대조군)

[0123] 증류된 멸균수

[0124] 슈겐 용액의 제조

[0125] DMSO 중 10mg/㎖의 슈겐 용액은 0일차 투여를 위해 준비된다.

[0126] 실험 절차

[0127] 동물은, 이들의 체중에 기초한 치료 그룹들 사이에 균일한 분포의 측면에서 무작위화된다.

[0128] 그룹 2 내지 8의 동물(표 6 참조)은, 21일 동안 슈겐/저산소증/정상산소증 프로토콜에 적용된다. 그룹 1의 동물은 DMSO(슈겐용 비히클)의 주사를 받았고, 동일한 프로토콜을 사용하여 저산소증/정상산소증에 적용된다. 동물은, 이들의 거동 및 전반적인 건강 상태에서 임의의 변화에 대해 매일 관찰된다.

[0129] 시험 물질 또는 비히클을 이용한 치료는, 표 6에 계획되고 기재된 바와 같이 1일 또는 9일차에 투여된다. 음식과 물은 임의로 제공된다. 동물의 거동 및 일반적인 건강 상태의 매일 관찰은 수행된다. 주간 체중은 기록된다.

[0130] 수술 당일, 렛트는 산소에 2 내지 2.5% 이소플루란 USP(Abbot Laboratories, Montreal Canada)의 혼합물로 마취된다. 혈역학적 및 기능적 파라미터(전신 동맥 혈압, 우심실 혈압, 폐동맥 혈압, 산소 포화도 및 심박수)는, 5분 동안 또는 폐동맥압 신호가 소실될 때까지 중, 먼저 도래하는 시점까지, 계속 기록된다.

[0131] 렛트는 그 다음 방혈되고, 폐 순환계는 0.9% NaCl로 씻어낸다. 폐 및 심장은 흉강에서 모두 함께 제거된다. 폐(좌엽)는 10% NBF로 팽창된다. 좌측 엽은 조직병리학 분석을 위해 슬라이드 상에 준비된다. 심장은, 풀턴 지수의 일부로서 격막을 포함하는 우심실 및 좌심실의 습윤 중량을 측정하기 위해 절제된다.

표 6

[0132] 치료 그룹 배정 및 치료 정보

그룹 #	그룹 설명	치료 투여량	투여의 경로	치료 주사일	수술일	그룹 크기 (n=)
1	노목식 대조군	n/a	n/a	n/a	21일	5
2	SuHx + 비히클	n/a	i.v. 경정맥 주사	1일	21일	8
3	SuHx + VPC1	2.5 M 세포	i.v. 경정맥 주사	1일	21일	8
4	SuHx + VPC2	2.5 M 세포	i.v. 경정맥 주사	1일	21일	8
5	SuHx+ VPC1	5.0 M 세포	i.v. 경정맥 주사	1일	21일	8
6	SuHx + VPC1	2.5 M 세포	i.v. 경정맥 주사	9일	21일	8
7	SuHx + VPC2	2.5 M 세포	i.v. 경정맥 주사	9일	21일	8
8	SuHx + VPC1	5.0 M 세포	i.v. 경정맥 주사	9일	21일	8

[0133] 데이터 분석

[0134] 심박수. 심박수는, 동물의 좌측 앞발에 부착된 N-595 맥박 산소측정기(Nonin, Plymouth, MN)를 통해 측정된다. 맥박 산소측정기로부터 유래된 심박수 값은 Clampfit 10.2.0.14(Axon Instrument Inc., Foster City, California, USA, [현재 Molecular Devices Inc])의 커서 판독값(cursor readings)을 사용하여 분당 비트수(bpm)로 측정된다.

[0135] 포화도(SO_2). 혈액 산소 포화도(SO_2)는, 동물의 좌측 앞발에 부착된 맥박 산소측정기(Nonin, Plymouth, MN) 신호로부터 판독된다. 포화도 값은, Clampfit 10.2.0.14에서 커서 판독값을 사용하여 퍼센트(%)로 측정된다.

[0136] 동맥 혈압. 동맥 혈압은, 동맥-내 유체로-채워진 카테터(AD Instruments, Colorado Springs, CO, USA)를 통해 실험 내내 지속적으로 기록된다. 이완기 및 수축기압 값은, Clampfit 10.2.0.14의 커서 판독값을 사용하여 mmHg 단위로 측정된다. 평균 동맥 혈압 값은 하기 수학식을 사용하여 계산된다:

[0137] 평균 동맥압 = 이완기압 + (수축기압 - 이완기압)/3

[0138] 맥압은, 수축기와 이완기 판독값들 사이에 차이로 계산된다.

[0139] 심실 및 폐 혈압. 우심실 및 폐 혈압은, 심실-내 유체로-채워진 카테터(AD Instruments, Colorado Springs, CO, USA)를 통해 기록된다. 이완기 및 수축기압 값들은, Clampfit 10.2.0.14의 커서 판독값을 사용하여 mmHg 단위로 측정된다. 평균 심실 및 폐 혈압 값들은 하기 수학식을 사용하여 계산된다:

[0140] 평균 심실 또는 폐압 = 이완기압 + (맥박압/3)

[0141] 풀턴 지수. 생리학적 기록의 종료시, 각 동물의 폐 및 심장은 제거된다. 심장은 절개되어 격막이 있는 좌심실에서 우심실을 분리시키고, 별도로 무게가 측정된다. 풀턴 지수는 그 다음 하기 수학식을 사용하여 계산된다:

[0142] $$\text{풀턴 지수} = \frac{\text{우심실 무게}}{\text{좌심실+격막 무게}}$$

[0143] 통계 분석. 값은 평균 ± SEM(평균의 표준 오차)으로 제시된다. 단일-요인 ANOVAs 및 반복 독립표본 스튜던트 t-검정(repeat unpaired Student's t-tests)은, 처리 그룹을 대조군, 건강한 동물, 또는 슈겐-저산소증 동물(비히클)과 비교하여, 모든 실험 조건에 대해 Microsoft Excel 2007에서 수행된다. 차이는, $p \leq 0.05$일 때, 유의미한 것으로 간주된다.

[0144] 전반적인 결과에서, *는 값이 정상산소 대조군(그룹 1)과 유의미한 차이가 있음을 보여주는 반면, **는 값이 SuHx 대조군(그룹 2)과 유의미한 차이가 있음을 보여주다. 다시 말하면, *는 동물이 건강한 동물과 유의미한 차이가 있음을 보여주는 반면, **는 동물이 임의의 치료적 처우를 받지 않은 완전히 아픈 동물과 유의미한 차이가 있음을 보여주다.

[0145] 결과

[0146] 슈겐 + 저산소증(SuHx)-유발 PAH 렛트 모델은 폐동맥 고혈압을 연구하는데 널리 사용되는 모델이다. 슈겐은 폐 내피 병변을 유발하는 것으로 알려진 VEGF-수용체 길항제로서, 초기에 본 연구에 사용된 노출 수준(20 mg/kg의 단일 투여량)으로 폐 맥관구조에서 내피 세포의 대략 50%를 손상시킨다. 손상된 내피 및 혈관 세포의 재형성 뿐만 아니라 혈관수축은 일어나고 폐 세동맥을 막아, 폐동맥을 통한 혈류를 제한하며 폐동맥압을 증가시킨다. 폐동맥을 통한 혈류에서 감소 및 폐동맥압의 증가는, 우심실 후부하를 증가시켜, PAH로 고통받는 임상 환자에서 관찰되고, SuHx-처리된 렛트의 현저한 우심실 비대 특징의 발달로 이어진다.

[0147] 본 연구에서, 모든 SuHx + 비히클 단독 동물은 예상대로 중간 내지 중증 PAH를 발생시킨다. 질병에 걸린 동물은 PAH 모델의 모든 특징을 나타내고; 폐압(수축기, 이완기 및 평균)은 건강한 동물에 비해 SuHx 동물에서 통계적으로 더 높았다(표 7, 8 및 9). 41.2 mmHg의 값(표 9)으로, 평균 폐압은 건강한 동물보다 SuHx + 비히클 동물에서 3-배 더 높았으며, 이는 더 넓은 범위의 중간/중증 폐동맥 고혈압에 상응한다.

표 7

[0148] 슈겐-저산소증 유발 PAH 렛트의 수축기 폐압에 대한 VPC1 및 VPC2의 영향.

치료	수축기 폐압(mmHg)	SEM	p 값	n =
노목식 대조군	24.0	1.55	n/a	5
비히클	66.6*	6.01	0.000	8
VPC1, 1일차에 주사된 2.5 M 세포	55.3	5.45	0.183	8
VPC2, 1일차에 주사된 2.5 M 세포	51.7	5.33	0.090	7
VPC1, 1일차에 주사된 5 M 세포	59.9	4.75	0.388	9
VPC1, 9일차에 주사된 2.5 M 세포	62.5	5.03	0.625	6
VPC2, 9일차에 주사된 2.5 M 세포	60.2	4.80	0.410	10
VPC1, 9일차에 주사된 5 M 세포	62.4	3.69	0.540	10

표 8

[0149] 슈겐-저산소증 유발 PAH 렛트의 이완기 폐압에 대한 VPC1 및 VPC2의 영향.

치료	이완기 폐압(mmHg)	SEM	p 값	n =
노목식 대조군	8.6	0.60	n/a	5
비히클	28.5*	2.35	0.000	8
VPC1, 1일차에 주사된 2.5 M 세포	23.5	2.64	0.179	8

VPC2, 1일차에 주사된 2.5 M 세포	21.6**	0.90	0.022	7
VPC1, 1일차에 주사된 5 M 세포	28.6	1.91	0.985	9
VPC1, 9일차에 주사된 2.5 M 세포	25.5	0.85	0.310	6
VPC2, 9일차에 주사된 2.5 M 세포	26.2	1.93	0.455	10
VPC1, 9일차에 주사된 5 M 세포	26.5	1.38	0.452	10

표 9

[0150] 슈겐-저산소증 유발 PAH 렛트의 평균 폐압에 대한 VPC1 및 VPC2의 영향.

치료	평균 폐압(mmHg)	SEM	p 값	n =
노목식 대조군	13.7	0.64	n/a	5
비히클	41.2*	3.34	0.000	8
VPC1, 1일차에 주사된 2.5 M 세포	34.1	3.55	0.166	8
VPC2, 1일차에 주사된 2.5 M 세포	31.6**	2.12	0.036	7
VPC1, 1일차에 주사된 5 M 세포	39.0	2.82	0.619	9
VPC1, 9일차에 주사된 2.5 M 세포	37.8	1.86	0.439	6
VPC2, 9일차에 주사된 2.5 M 세포	37.5	2.78	0.406	10
VPC1, 9일차에 주사된 5 M 세포	38.5	2.10	0.481	10

[0151] 폐압에서 증가는 우심실 후부하에서 증가를 유발했고, 이는 정상산소 건강한 그룹(그룹 1)보다 SuHx 비히클 그룹에서 2.7배 더 높은 풀턴 지수(우심실 대 좌심실 비)에 의해 직접 나타낸 바와 같이, 우심실(RV) 비대로 이어진다(표 10). PAH는 심근 두께가 현저하게 증가하는 단-기 우심실 비대를 특징으로 하며, 우심실의 섬유증과 함께, 우심실의 장-기간 팽창이 수반된다. 21일의 연구 기간 내에서, 렛트 모델은 일반적으로 상당한 우심실 팽창을 관찰할 만큼 충분히 길지 않다. 본 연구에서, 풀턴 지수에서 증가는 우심실의 상당한 비대를 명확히 보여준다. 이러한 데이터는 또한 세포 주사에 의해 우심장 비대의 발달에서 영향이 없음을 나타낸다.

표 10

[0152] 슈겐-저산소증 유발 PAH 렛트의 풀턴 지수에 대한 VPC1 및 VPC2의 영향.

치료	풀턴 지수	SEM	p 값	n =
노목식 대조군	0.219	0.06	n/a	5
비히클	0.586*	0.05	0.000	8
VPC1, 1일차에 주사된 2.5 M 세포	0.602	0.04	0.470	10
VPC2, 1일차에 주사된 2.5 M 세포	0.608	0.03	0.373	10
VPC1, 1일차에 주사된 5 M 세포	0.568	0.03	0.849	9
VPC1, 9일차에 주사된 2.5 M 세포	0.568	0.03	0.858	8
VPC2, 9일차에 주사된 2.5 M 세포	0.585	0.03	0.630	10
VPC1, 9일차에 주사된 5 M 세포	0.657	0.02	0.072	10

[0153] 맥압은 수축기압의 25%를 초과할 때 정상으로 간주된다. 정상 그룹의 경우, 맥압은 수축기압의 26%이다(표 11). SuHx + 비히클 동물의 경우, 맥압은 수축기압의 22%로 떨어졌다. 슈겐 저산소증-유발 PAH는 심근 수축력에 영향을 미치는 것으로 간주되지 않으나; PAH로 인한 열악한 가스 교환은 좌-심실에 이상성(biphasic) 저산소 효과를 일으키고, 이는 결국 만성적으로 저산소 상태가 되고 수축력(contractility strength)을 잃어 버린다.

표 11

[0154] 슈겐-저산소증 유발 PAH 렛트의 맥압에 대한 VPC1 및 VPC2의 영향.

치료	맥박압 (mmHg)	SEM	p 값	n =
노목식 대조군	38.5	1.50	n/a	4
비히클	25.4*	2.71	0.008	7
VPC1, 1일차에 주사된 2.5M 세포	28.4	3.16	0.498	8
VPC2, 1일차에 주사된 2.5 M 세포	29.7	1.43	0.215	6
VPC1, 1일차에 주사된 5 M 세포	24.3	2.10	0.750	9

VPC1, 9일차에 주사된 2.5 M 세포	25.3	4.42	0.978	7
VPC2, 9일차에 주사된 2.5 M 세포	28.3	1.68	0.357	9
VPC1, 9일차에 주사된 5 M 세포	27.2	1.98	0.596	9

[0155] 산소 포화도(SO_2)는, 95 내지 100%에서 정상으로 간주된다. 대조군에서, SO_2는 98.6%이고; 이것은 비히클 그룹에서 88.4%로 떨어져(표 12), 폐에 생긴 고혈압이 전신 산소화에 영향을 미침을 확인했다.

표 12

[0156] 슈겐-저산소증 유발 PAH 렛트의 SO_2에 대한 VPC1 및 VPC2의 영향

치료	SO_2 (%)	SEM	p 값	n =
노목식 대조군	98.6	0.75	n/a	5
비히클	88.4*	2.09	0.002	5
VPC1, 1일차에 주사된 2.5 M 세포	93.0	3.00	0.284	2
VPC2, 1일차에 주사된 2.5 M 세포	95.7**	0.33	0.041	3
VPC1, 1일차에 주사된 5 M 세포	92.7	1.57	0.122	7
VPC1, 9일차에 주사된 2.5 M 세포	92.3	3.33	0.340	4
VPC2, 9일차에 주사된 2.5 M 세포	91.3	2.55	0.455	9
VPC1, 9일차에 주사된 5 M 세포	94.6**	0.61	0.008	9

[0157] 연구 21일 동안, 정상적인 건강한 렛트는 68g이 증가한 반면, SuHx-비히클 동물은 평균 21g이 증가했다(표 13). 체중에서 더 느린 증가가 장기 중량(organ weight)에서 상대적으로 더 작은 증가이어야 하지만; 재형성 및 염증/부종은 장기 중량 증가에 기여하므로, 폐 중량을 측정하는 것은 재형성뿐만 아니라 염증/부종을 추정하는 기본적이지만, 신속한 수단이다. 비히클 처리된 랫트의 폐는 정상 랫트보다 1.8배 더 무거웠다(표 14). 폐 중량에서 현저한 증가는 중요한 폐 부종, 색전증, 또는 섬유증을 시사하며, 이들 모두는 또한 PAH의 특징이다. SuHx-유발 PAH는, 폐 맥관구조의 초기 혈관수축을 특징으로 하며, 이는 폐 중량에서 약간의 증가에 원인이 될 수 있다(혈관 평활근 비대).

표 13

[0158] 슈겐-저산소증 유발 PAH의 체중 증가에 대한 VPC1 및 VPC2의 영향

치료	증체량 (g)	SEM	p 값	n =
노목식 대조군	68.0	19.53	n/a	5
비히클	20.6*	6.47	0.019	8
VPC1, 1일차에 주사된 2.5 M 세포	25.1	4.42	0.442	10
VPC2, 1일차에 주사된 2.5 M 세포	15.4	8.94	0.720	10
VPC1, 1일차에 주사된 5 M 세포	26.7	5.84	0.389	9
VPC1, 9일차에 주사된 2.5 M 세포	17.6	4.39	0.831	8
VPC2, 9일차에 주사된 2.5 M 세포	23.1	4.26	0.608	10
VPC1, 9일차에 주사된 5 M 세포	10.6	4.73	0.265	10

표 14

[0159] 슈겐-저산소증 유발 PAH의 폐 중량에 대한 VPC1 및 VPC2의 영향

치료	상대 폐 중량 (%)	SEM	p 값	n =
노목식 대조군	0.589	0.02	n/a	5
비히클	1.063*	0.07	0.000	8
VPC1, 1일차에 주사된 2.5 M 세포	1.095	0.08	0.901	10
VPC2, 1일차에 주사된 2.5 M 세포	1.227	0.08	0.179	10
VPC1, 1일차에 주사된 5 M 세포	1.128	0.07	0.615	9
VPC1, 9일차에 주사된 2.5 M 세포	1.130	0.08	0.647	8
VPC2, 9일차에 주사된 2.5 M 세포	0.967	0.06	0.196	10
VPC1, 9일차에 주사된 5 M 세포	1.270	0.07	0.054	10

[0160] SuHx + 비히클의 생존율은 80%에서 측정되고; 10마리 동물 중 2마리가 수술일 전에 사망했다(도 8). 이것은 이러한 모델에서 RNU 렛트에서 내부 과거 사망률과 양립할 수 있다.

[0161] VPC1. VPC1은 2가지 다른 투여량; 250만(2.5 M) 개의 세포 및 500만 개의 세포로 시험된다. 각 투여량은 1일차에 동물의 한 그룹(각각 그룹 3 및 5) 및 9일차에 한 그룹(각각 그룹 6 및 8)에 주사된다. 시험된 투여량 중 어느 것도, SuHx 비-처리 그룹과 비교할 때 폐압(수축기, 이완기 및 평균)에서 통계적으로 유의미한 변화를 일으키지 않았다(표 7, 8 및 9). 결과적으로, VPC1 투여량 중 어느 것도, 풀턴 지수에서 증가를 유의미하게 방지하지 못했으며(표 10), 이는 VPC1이 PAH와 관련된 우심실(RV) 비대를 예방하지 못할 수 있음을 시사한다.

[0162] 맥압, 평균 동맥압 및 심박수는, 비히클 그룹과 비교할 때 VPC1 처리에 의해 변화되지 않았다(표 11, 9 및 15).

표 15

[0163] 슈겐-저산소증 유발 PAH 렛트의 심박수에 대한 VPC1 및 VPC2의 영향

치료	심박동수 (bpm)	SEM	p 값	n =
노목식 대조군	376.0	14.97	n/a	4
비히클	299.4*	14.30	0.007	7
VPC1, 1일차에 주사된 2.5 M 세포	326.4	13.03	0.186	8
VPC2, 1일차에 주사된 2.5 M 세포	325.8	22.92	0.335	6
VPC1, 1일차에 주사된 5 M 세포	317.8	9.90	0.294	9
VPC1, 9일차에 주사된 2.5 M 세포	334.7	16.37	0.132	6
VPC2, 9일차에 주사된 2.5 M 세포	296.4	13.89	0.884	10
VPC1, 9일차에 주사된 5 M 세포	311.6	12.30	0.531	10

[0164] 음성 대조군 SuHx 그룹에서 SO_2는, 정상 포화 범위(95 내지 100%) 미만인 값인, 88%이다(표 12). 1일차에 250만 및 500만 세포에서 VPC1로 처리된 그룹에서 SO_2는, 음성 대조군보다 약간 더 높은, 각각 93% 및 92%이다(표 12). 9일차에 500만 세포에서 VPC1으로 처리된 그룹에서, SO_2는, 정상 및 건강한 동물로 간주되는 범위 내인, 95%이다(표 12).

[0165] 상대적 폐 중량은, 비히클 그룹과 비교하여 VPC1 처리 그룹에서 변경되지 않아(표 14), 이는 VPC1이 폐 섬유증 및/또는 관련 부종을 예방하지 못할 수 있음을 시사한다.

[0166] 연구 21일 동안, 정상적인 건강한 렛트는 68g이 증가한 반면, SuHx만 있는(비히클 그룹) 동물은 평균 21g이 증가했다(표 13). VPC1 처리를 받은 동물은 비히클 그룹보다 더 많은 중량 증가가 없었다(표 13).

[0167] 비히클로 처리된 그룹에서 생존율은 80%인 반면, 이것은 1일차에 250만 세포 및 9일차에 500만 세포에서 VPC1로 처리된 그룹에서 100%이다(도 8).

[0168] 동물의 일반적인 웰-빙 및 생리학적 파라미터들과 함께 생존율은, 1일 또는 9일차에 주사된 250만 세포의 투여량에서, VPC1이 렛트에서 SuHx-유발 PAH에 유의미한 영향을 미치지 않았음을 시사한다. 9일차에 주사된 5백만 세포의 투여량은, 헤모글로빈의 증가된 산소 포화도 및 동물의 생존율 증가에 의해 나타난 바와 같이, 작은 이점을 제공하는 것으로 나타났다.

[0169] 동물은 VPC1 주사의 결과로 어떤 과민증 또는 부작용도 나타내지 않았다는 점에 유의해야 한다. 케이지에서 관찰(cage side observation)은, PAH와 관련된 증상 외에, 동물에서 어떠한 불편함도 나타내지 않았다.

[0170] VPC2. VPC2는 250만 세포의 투여량으로 시험된다. 세포는 1일차에 동물의 한 그룹(그룹 4) 및 9일차에 한 그룹(그룹 7)에 주사된다.

[0171] 1일차에 VPC2로 처리된 그룹에서 수축기, 이완기, 및 평균 폐압은, 비히클 동물과 비교할 때 통계적으로 더 낮았다(각각 22%, 24%, 및 23%)(표 7, 8 및 9). 이것은, 1일차에 주사된 250만 세포에서, VPC2가 조직의 재형성을 방지하고 및/또는 내피 세포의 슈겐-저산소증 및 이의 손상에 의해 유발된 폐동맥의 혈관수축을 방지하여 폐동맥을 통한 더 나은 혈류를 가능하게 했음을 시사한다.

[0172] 그러나, 풀턴 지수의 증가(표 10)는, 동물의 혈역학에 대한 VPC2의 영향이 PAH와 관련된 우심실(RV) 비대를 예

방하기에 불충분함을 시사한다. 더군다나, 맥압, 평균 동맥압 및 심박수는, 비히클 만으로 처리된 그룹과 비교하여 (1일차 또는 9일차에) VPC2에 의해 처리된 그룹에서 통계적으로 차이가 없었다(표 11, 9 및 15).

[0173] 음성 대조군 SuHx 그룹에서 SO_2는, 정상 포화 범위(95 내지 100%) 미만인 값인, 88%이다. 1일차에 250만에서 VPC2로 처리된 그룹의 SO_2는, 통계적으로 및 임상적으로 유의미한 이점인, 정상 값 범위로 돌아갔다(표 12).

[0174] 상대 폐 중량은 비히클 그룹과 비교하여 VPC2로 처리된 그룹에서 통계적으로 유의미하지 않았다(표 14).

[0175] VPC2를 투여받은 동물의 체중 증가는, 비히클을 투여받은 동물의 체중 증가와 차이가 없었다(표 13). 비히클 만으로 처리된 그룹의 생존율은 80%인 반면, 1일 또는 9일차에 250만 세포에서 VPC2 처리 그룹에서는 100%(도 8)로, VPC2가 PAH로 고통받는 동물을 어느 정도 보호함을 시사한다.

[0176] 폐압의 감소, 동물의 더 높은 생존율과 함께 더 나은 포화도는, VPC2가 렛트에서 SuHx-유발 PAH에서 일부 이점을 제공함을 시사한다.

[0177] 논의

[0178] 이러한 폐동맥 고혈압 연구는, 이러한 실험 조건에서 매우 중증도이고 빠른 형태의 PAH를 발달시키는 것으로 밝혀진, RNU 렛트를 포함한다. 본 연구에 사용된 최종 실험 조건은, 21일 동안 사망률을 20% 미만으로 유지하면서 동물에서 중증 폐 혈역학적 손상을 일으키는 것으로 밝혀졌다.

[0179] 질병의 진행의 속도, 및 불과 3주 후의 증상의 중증도는, 질병이 매우 빠르게 진행되어, 동물에게 어떤 치료적 이점을 생성시키는 것이 심각한 문제를 나타내는, 우려를 나타냈다. 강력한 혈관확장제(vasodilator)가 질병의 발병과 이의 초기 진행을 예방할 수 있었다고 생각할 수 있지만, 본 연구에서 시험 물질의 작용 기전은 그러한 빠른 연구에 의해 지지되지 않는다.

[0180] 그럼에도 불구하고, 1일차에 250만 개의 VPC2 세포의 주사는, 수축기, 이완기, 및 평균 폐압을 낮추며, 후자는 41.2mmHg에서 31.6mmHg로 낮아져, 통계적으로 유의미한 이점이 있었으며, 더 중요하게는, 동물의 평균 폐압이 정상적인 신체 활동의 유지가 가능한 범위(25 내지 35mmHg)로 되돌아간다. 산소 포화도에서 증가와 조합하여, 이것은 1일차에 투여된 250만 VPC2 세포가 폐 혈역학을 유의미하게 개선시킬 수 있고, 임상 PAH 환자에서 만성 허혈 및 폐 재형성으로 이어지는 지속적인 저산소증을 제거할 수 있음을 시사한다.

[0181] 더군다나, 연구의 기능적 종료점(functional endpoints)의 조사는, VPC1과 VPC2 사이에 차이점을 드러냈고: 모든 경우에, 1일차에 250만의 밀도로 주사된 VPC2 세포는, 동일자에 250만 VPC1 세포의 주사보다 우수한 결과를 생성했다. 이것은 HBs가 이전에 뮤린의 뒷다리 허혈 모델과 뮤린의 심근 경색 모델에서 효과가 있는 것으로 나타났기 때문에 놀라운 것이다. 미국 특허 제9,938,500호 참조. 더군다나, 측정된 폐 혈역학 및 기타 모든 기능 파라미터를 고려할 때, 1일차에 250만 개의 VPC2 세포를 주사하는 것은 9일차에 250만 개의 VPC2 세포를 주사하는 것보다 더 나은 결과를 생성했다.

[0182] 전체적으로, 본 연구는 RNU 렛트와 관련된 극도로 공격적이고 급속하게 유발된 PAH 증후군에서 VPC2(HEs) 세포의 효능을 입증했다. 면역결핍 환자에서 PAH의 중증도가 더 크다는 일부 보고가 있지만, 본 연구에서 유발된 PAH만큼 빠르고 중증 진행은 임상에서 전례가 없다. 더 많은 시간 및 덜 극단적인 폐동맥 고혈압이 제공되면, 이것은 VPC2 세포(HEs)의 단일 I.V. 주사와 관련된 기능적 이점이 현재 데이터 세트에 의해 제안된 것보다 더 유리할 것으로 기대된다.

[0183] 실시예 8: 조직병리학적 분석

[0184] 폐동맥 고혈압(PAH)은, 현저하고 지속적인 폐동맥압의 상승을 특징으로 한다. 동물 모델에서 폐 질병 또는 감소된 산소 가용성의 기타 원인으로 인한, 만성 폐포 저산소증은, 폐혈관 저항 및 폐 고혈압에서 지속적인 증가로 이어진다. 여러 요인들이 PAH의 병리생물학에 관련되어 있으며, 여기서, 폐혈관 벽의 지속적인 혈관수축 및 재형성은 가장 중요한 것으로 보이다. 혈관수축이 다양한 자극에 대한 평활근 세포의 가역적 반응이지만, 이것은 혈관 벽의 모든 층에서 발생하는, 재형성을 유지하는데 필요하며, 결국, 내강 직경의 보다 영구적인 제한으로 이어진다.

[0185] 본 연구에서, 다양한 파라미터들은, 시험된 헤모제닉 내피 세포가 PAH 모델에서 폐혈관 변화를 특징짓는 구조적 병변의 발달을 방해하는지 여부를 결정하기 위해 실시예 7에서 시험된 동물에서 분석된다.

[0186] 물질 및 방법

[0187] (표 6에 나타낸) 모든 실험 그룹에서 모든 렛트로부터 수확된 폐의 좌측 엽은 관류되고, 10% 포르말린으로 고정된 후, 조직병리학적 분석을 위한 슬라이드를 만들기 위해 IRIC(The Institute for Research in Immunology and Cancer in Montreal, Quebec, Canada)로 보내진다.

[0188] 좌중엽의 횡단면은 절단되어 파라핀에 포매되고, 5 ㎛ 두께로 슬라이스되며, 장착되고, Hematoxylin 및 Eosin(H&E)으로 염색된다.

[0189] 각 슬라이스는 Nikon Eclipse T100 현미경에서 200X 배율로 시각화된다. 폐당 최소 10개의 비-중첩 시야영역(non-overlapping viewfields)은 무작위로 선택된다. 현미경사진은 Nikon NIS Elements 4.30을 사용하는 Nikon DS-Fi1 디지털 카메라를 사용하여 촬영된다. 사진사는, 관심의 특색들 및 렛트를 고려하여 치료에 대해 블라인딩된다. 10개의 시야영역에 대해, 각 구역의 초점이 잘 맞는 단일 현미경사진은 촬영되고 저장된다. 각 시야영역에서 발견된 모든 혈관은, 혈관 크기에서 임계값이나 제한 없이, 가장 큰 것부터 가장 작은 것까지 분석된다.

[0190] 선포-내(Intra-acinar) 혈관, 즉, 폐포, 폐포관 및 호흡 세기관지와 관련된, 폐의 가스 교환 영역 내의 혈관은 확인된다. 말단 세기관지 및 모든 더 큰 기도와 관련된 모든 혈관은 제외된다.

[0191] 혈관은 내강 직경(lumen diameter)에 기초하여 3가지 크기 그룹; 절단된 내강의 가장 긴 축을 측정하여 소형(10-50 microns), 중형(50-100 microns) 또는 대형(>100 microns)으로 나누어진다. 직경은, "Infinity Analyze 5.0.3"을 사용하여 혈관의 장축에 수직으로 측정된, 내강의 가장 넓은 지점에서 측정된다. 내강은 내부 탄력판(elastic lamina)의 내부 가장자리들 사이에 놓여 있다, 즉, 내부 탄력판은 내강의 일부를 형성하지 않지만, 혈관 벽의 일부로 간주된다.

[0192] 각 혈관은 또한 비-근육질, 반-근육질 또는 근육질로 분류된다.

[0193] 완전 근육질. 내부 및 외부 탄력판에 의해 및 염색으로 확인된 바와 같은 평활근 층에 의해 완전히 둘러싸여 있다(>90% 둘레). 근육화된 혈관에서, 외경은 비-근육질 혈관에서 측정된 내경과 동일한 지점에서 측정되며, 외부 탄력판의 외부 가장자리로부터 반대쪽 외부 가장자리까지 이어진다.

[0194] 부분적인 근육질: 평활근의 초승달 모양 및 둘레의 일부에 대한 1개의 탄력판으로 불완전하게 둘러싸여 있다(10-90% 둘레). 부분적으로 근육화된 혈관에서, 외경은, 비-근육질 혈관에서 측정된 내경과 동일한 지점에서 측정되며, 그 지점(이것이 내부 또는 외부 탄력판인 경우)에서 가장 바깥쪽 탄력판의 외부 가장자리로부터 반대쪽 외부 가장자리까지 이어진다.

[0195] 비-근육질: 명백한 평활근층이 없는 혈관의 전체 둘레에 대한 단일 탄력판(<10%).

[0196] 분석

[0197] 값은 평균 ± SEM(평균의 표준 오차)으로 제시된다. 반복 독립표본 스튜던트 t-검정은, 다음의 그룹과 비교하여, 모든 실험 조건에 대해 수행된다:

[0198] SuHx 그룹(음성 대조군) 동물은 질병의 성공적인 유발을 확인하기 위해 건강한 동물(노목식 대조군)과 비교된다. 음성 대조군 동물(SuHx)을 이용한 치료 그룹. 차이는 $p \leq 0.05$일 때 유의미한 것으로 간주된다.

[0199] 전체적으로, *는 값이 대조군(SuHx 없음) 그룹과 유의미한 차이가 있음을 나타내는 반면, **는 값이 음성 대조군(SuHx) 그룹과 유의미한 차이가 있음을 나타낸다.

[0200] 결과

[0201] 슈겐의 효과

[0202] 슈겐의 주입은, 동심 신생내막 및 복합 총상-형 병변(complex plexiform-like lesions)을 포함하여, 작은 폐내측 및 외막 비후 및 중증 동맥병증의 조합을 야기했다. 복합 병변 형성의 2가지 패턴은 관찰된다: 하나는 혈관 내강 내에 병변이 형성되고, 다른 하나는 혈관 외부로 돌출되어 있다(동맥류-유사). PAH의 슈겐-유발의 세 번째 구조적 결과는, 질병의 진행에서 훨씬 나중에 발생했으며, 폐 실질 내에 섬유증의 출현으로 이루어진다. 전임상 슈겐-유발 PAH는 말 그대로 섬유증 모델이 아니지만, 말기-단계의 포매 및 염색된 조직의 면밀한 조사는 섬유증으로 신뢰할 수 있게 한다. 섬유증의 출현은, 오래-고통받은 환자에서 관찰되는 것과 같이, 비가역적 PAH를 나타낸다. 슬프게도, 이들 환자들은 PAH에 대한 현재의 혈관 확장제 요법에 반응하지 않는 경향이 있다.

[0203] 소형 폐동맥 및 세동맥의 벽 두께, 혈관의 분류, 이러한 동맥을 둘러싼 증식 세포(전구 세포)의 개체군, 및 동맥의 내강의 상대 직경은, 건강한 폐와 PAH 폐 사이에서 관찰 가능한 형태학적 변화의 중증도를 결정하기 위해

선택된다. 폐에서 단핵 염증 세포(폐포 대식세포) 및 백혈구(림프구-유사 세포 및 호산구의 클러스터)의 침윤, 폐에서 간질/폐포 부종 및 섬유증, 뿐만 아니라 총상-형 병변은 또한 폐의 병태생리학적 상태의 지표로 사용된다.

[0204] 내측 동맥의 비후, 소형 동맥의 외막에서 "전구" 세포의 침윤 및 폐 실질(lung parenchyma)에서 폐포 대식세포의 침윤, 폐포 부종 및 섬유증 및 총상-형 병변 형성과 같은, 조직병리학적 변화의 중증도는 0에서 3까지 점수를 매겼고, 여기서, 0 = 없음, 1 = 경증도, 2 = 중등도, 3 = 중증도이다.

[0205] 동맥 크기, 내강 직경, 세동맥의 근육화의 유무는, 표 6에 나타낸 음성 대조군 동물뿐만 아니라 VPC1 및 VPC2로 처리된 SuHx-유발 PAH 렛트의 폐로부터 수집된다.

[0206] 음성 대조군 렛트

[0207] 예상된 바와 같이, 대조군(노목식) 동물의 폐 조직은 주로 비근육질 세동맥으로 구성된다(88.3%)(표 16, 17, 18). 대조적으로, 음성 대조군(SuHx) 동물의 폐 조직은, 주로 근육질 세동맥으로 구성된다(83.9%)(표 16, 17 및 18). 이러한 관찰은, Sprague-Dawley 렛트의 슈겐-저산소증 모델에서 56일 동안 관찰된 증생(hyperplasia)과 일치한다. 슈겐 주사 후 17% 산소에서 11일간의 저산소증은, 일정한 폐혈관 평활근(VSM) 비대 및 증생으로 이어지는 VSM 수축을 유발하기에 충분했으며, VSM 세포의 번식(multiplication)이 정상적으로 비-근육질 세동맥을 부분적인 또는 완전한 근육화된 세동맥으로 변화시킨다. 이것은 벽 두께를 증가시키고, 이들 혈관에서 내강 공간을 감소시킨다. 부가하여, 그럼에도 불구하고, 정상산소 환경에서 다음 10일 동안은, 폐 평활근 재형성으로 인해 폐 내에 저산소 상태를 유지한다. 연구의 저산소 단계는, 다양한 등급의 총상 병변을 일으키는, 급속한 내피 증식을 특징으로 한다. 21일자의 종료시, 이들 병변은 종종 소형-직경의 세동맥을 완전히 없애기에 충분히 크다.

표 16

[0208] SuHx-유발 PAH 렛트의 비-근육질 혈관의 퍼센트에 대한 VPC1 및 VPC2의 영향

치료	비 근육질 혈관 (%)	SEM	p 값	n =
노목식 대조군	88.32	1.99	n/a	5
비히클	7.45*	1.07	0.000	10
VPC1, 1일차에 주사된 2.5 M 세포	25.45**	5.36	0.004	10
VPC2, 1일차에 주사된 2.5 M 세포	46.43**	4.88	0.000	10
VPC1, 1일차에 주사된 5 M 세포	20.21**	5.48	0.028	9
VPC1, 9일차에 주사된 2.5 M 세포	14.52**	2.62	0.016	8
VPC2, 9일차에 주사된 2.5 M 세포	14.75**	2.01	0.005	10
VPC1, 9일차에 주사된 5 M 세포	14.94**	1.99	0.004	10

표 17

[0209] SuHx-유발 PAH 렛트의 근육질 혈관의 퍼센트에 대한 VPC1 및 VPC2의 영향

치료	근육질 혈관 (%)	SEM	p 값	n =
노목식 대조군	4.78	1.58	n/a	5
비히클	83.93*	2.55	0.000	10
VPC1, 1일차에 주사된 2.5 M 세포	63.73**	5.09	0.002	10
VPC2, 1일차에 주사된 2.5 M 세포	44.99**	5.11	0.000	10
VPC1, 1일차에 주사된 5 M 세포	69.00**	6.38	0.037	9
VPC1, 9일차에 주사된 2.5 M 세포	78.38	3.37	0.199	8
VPC2, 9일차에 주사된 2.5 M 세포	77.14	2.08	0.054	10
VPC1, 9일차에 주사된 5 M 세포	77.26	2.53	0.080	10

표 18

[0210] SuHx-유발 PAH 렛트의 반-근육질 혈관의 퍼센트에 대한 VPC1 및 VPC2의 영향

치료	반-근육질 혈관 (%)	SEM	p 값	n =
노목식 대조군	6.91	1.29	1.29	5

비히클	8.62	1.85	1.85	10
VPC1, 1일차에 주사된 2.5 M 세포	10.82	1.44	1.44	10
VPC2, 1일차에 주사된 2.5 M 세포	8.57	1.86	1.86	10
VPC1, 1일차에 주사된 5 M 세포	10.78	1.54	1.54	9
VPC1, 9일차에 주사된 2.5 M 세포	7.10	1.23	1.23	8
VPC2, 9일차에 주사된 2.5 M 세포	8.11	0.58	0.58	10
VPC1, 9일차에 주사된 5 M 세포	7.80	0.78	0.78	10

[0211] 대조군(노목식) 그룹에서, 대부분의 혈관(≒ 88%)은 "소형" 크기(직경이 50 microns 미만)를 특징으로 하며, 주로 비-근육질이다(표 16, 17 및 18). 혈관의 거의 12%가 "중형" 크기로 기재되는 반면, 나머지 매우 소수의 혈관은 "대형"으로 간주된다. SuHx에 의한 PAH 유발은, 혈관의 두께를 변경하여, 크기에 기초한 혈관의 분포에서 변화(연구의 종료시 ≒ 60% - 소형, 38%는 중형, 나머지는 대형 혈관을 특징으로 함)로 이어진다. SuHx에 의해 유발된 변화는, (표 19, 20, 및 21에 나타낸 바와 같이) 혈관 내에 두꺼워진 근육층에서 분명했고; 소형-크기 및 중형-크기의 폐혈관은 대조군(노목식) 동물에 비해 이들의 근육조직이 각각 16 내지 42% 및 20 내지 33%로 증가했다. 대형 혈관의 벽 두께는 크게 변하지 않았다.

표 19

[0212] SuHx-유발 PAH 렛트의 소형 혈관 벽 두께에 대한 VPC1 및 VPC2의 영향

치료	소형 혈관 - 벽 두께 (%)	SEM	p 값	n =
노목식 대조군	16.35	0.97	n/a	5
비히클	41.92*	1.98	0.000	10
VPC1, 1일차에 주사된 2.5 M 세포	31.78**	2.36	0.004	10
VPC2, 1일차에 주사된 2.5 M 세포	25.68**	1.73	0.000	10
VPC1, 1일차에 주사된 5 M 세포	34.81**	2.69	0.045	9
VPC1, 9일차에 주사된 2.5 M 세포	39.16	1.98	0.344	8
VPC2, 9일차에 주사된 2.5 M 세포	40.03	1.33	0.439	10
VPC1, 9일차에 주사된 5 M 세포	38.70	1.45	0.206	10

표 20

[0213] SuHx-유발 PAH 렛트의 중형 혈관 벽 두께에 대한 VPC1 및 VPC2의 영향

치료	중형 혈관 - 벽 두께 (%)	SEM	p 값	n =
노목식 대조군	20.06	0.96	n/a	5
비히클	33.18*	1.08	0.000	10
VPC1, 1일차에 주사된 2.5 M 세포	32.24	1.35	0.594	10
VPC2, 1일차에 주사된 2.5 M 세포	28.58	1.96	0.055	10
VPC1, 1일차에 주사된 5 M 세포	31.08	1.75	0.311	9
VPC1, 9일차에 주사된 2.5 M 세포	32.42	1.75	0.657	8
VPC2, 9일차에 주사된 2.5 M 세포	34.14	1.28	0.577	10
VPC1, 9일차에 주사된 5 M 세포	34.97	0.94	0.228	10

표 21

[0214] SuHx-유발 PAH 렛트의 대형 혈관 벽 두께에 대한 VPC1 및 VPC2의 영향

치료	대형 혈관 - 벽 두께 (%)	SEM	p 값	n =
노목식 대조군	n/a	n/a	n/a	5
비히클	23.42	2.10	n/a	10
VPC1, 1일차에 주사된 2.5 M 세포	17.74	2.87	0.149	10
VPC2, 1일차에 주사된 2.5 M 세포	19.07	1.67	0.143	10
VPC1, 1일차에 주사된 5 M 세포	21.44	5.29	0.715	9
VPC1, 9일차에 주사된 2.5 M 세포	22.55	1.58	0.762	8
VPC2, 9일차에 주사된 2.5 M 세포	20.74	3.38	0.520	10

VPC1, 9일차에 주사된 5 M 세포	25.98	2.13	0.427	10

[0215] 벽 두께에서 증가는 동맥의 내강 직경을 감소시켜, 우심실이 펌핑해야 하는 폐동맥압을 증가시킨다(우심실 후부하).

[0216] 총상 병변은 비-유발된, 건강한 동물에서 관찰되지 않았다. 대조적으로, 슈겐으로 유도발되지만, 어떤 치료로부터 혜택을 받지 못한 동물은, 혈관 내강의 일부 완전한 제거(등급 3)와 함께 중등도(등급 2) 내지 중증 내피 과성장에 상응하는, 등급 2 및 3의 총상 병변을 나타냈다. 인간 PAH의 특징인 총상 병변에 부가하여, 치료로부터 혜택을 받지 못한 동물은 또한 섬유증 및 간질/폐포 부종의 징후를 나타냈다.

[0217] VPC1

[0218] VPC1은 2가지 다른 투여량; 250만 개의 세포 및 500만 개의 세포로 시험된다. 각 투여량은 1일차에 한 그룹의 동물에 주사되고, 9일차에 한 그룹에 주사된다.

[0219] PAH 유발이 크기에 기초하여 혈관의 분포를 변경시키는 것처럼, VPC1을 이용한 치료는 또한 크기에 기초하여 혈관의 분포를 변경시킨다. VPC1은, 오직 SuHx 렛트와 비교하여 "소형" 크기의 혈관이 약간 증가했고, "중형" 크기의 혈관이 감소했다(데이터는 나타내지 않음).

[0220] 1일차에 2.5M 및 5M 세포에서 VPC1으로 처리된 렛트의, 소형 폐 혈관의 벽 두께(대부분 평활근층의 두께에 의해 결정됨)는, 비히클 처리된 렛트에 비해 통계적으로 더 낮았다. 중형 및 대형 혈관의 벽 두께는 크게 변하지 않았다(표 19, 20, 및 21). 9일차에 VPC1을 이용한 치료는 혈관 벽 두께에 어떠한 영향을 미치지 않았다.

[0221] 근육질 혈관의 퍼센트는, 1일차에 2.5 M 및 5 M개의 세포에서; 음성 대조군 SuHx 처리 동물에서 83.9%으로부터 VPC1-처리 동물에서 각각 64% 및 69%로, VPC1-처리 동물에서 유의미하게 낮았다(표 16, 17, 및 18).

[0222] 9일차에 주사된 동일한 투여량의 VPC1은, 폐 조직에서 근육질 혈관의 퍼센트에 통계적으로 유의미한 영향을 미치지 않았다.

[0223] 게다가, 1일차에 VPC1으로 처리된 그룹에서 관찰된 폐포 대식세포 침윤, 부종/섬유증 및 폐동맥 병변은 비히클 동물보다 낮았다. 1일차에 VPC1로 처리된 그룹의 총상 병변은 경증/중등도(점수 1 내지 2점)로 분류된다.

[0224] VPC2

[0225] VPC2는 250만 세포의 투여량으로 시험된다. 세포는 1일차에 한 그룹의 동물에 주사되고, 9일차에 한 그룹에 주사된다.

[0226] PAH 유발이 크기에 기초하여 혈관의 분포를 변경시키는 것처럼, 1일차에 VPC2를 이용한 치료는, 크기에 기초하여 혈관의 분포를 또한 변경시킨다. 1일차에 주사된 VPC2는, SuHx 렛트에 비해 "소형" 크기의 혈관 수가 증가했고, "중형" 크기의 혈관이 감소했다. 1일차에 VPC2를 이용한 치료는, "소형" 크기의 혈관 대 "중형" 크기 및 "대형" 크기의 혈관의 비율을 정상산소의 완전 건강한 렛트에서 관찰된 것과 매우 근접하게 만든다.

[0227] 1일차에 2.5 M개의 세포에서 VPC2로 처리된 렛트의 소형 폐 혈관의 벽 두께는 비히클 처리된 렛트에 비해 통계적으로 더 작았다. 9일차에 투여된 VPC2는, 혈관 벽 두께에 어떠한 영향도 미치지 않았다. 중형 및 대형 혈관의 벽 두께는 크게 변하지 않았다(표 19, 20, 및 21). 9일차에 VPC2를 이용한 치료는, 혈관 벽 두께에 어떠한 영향도 미치지 않았다.

[0228] 근육질 혈관의 퍼센트는, 1일차에 비히클-처리 동물에서 83.9%로부터 VPC2-처리 동물에서 45%로, VPC2로 처리된 동물에서 유의미하게 더 낮았다. 결과적으로, 비-근육질 혈관의 퍼센트는 7%로부터 46%로 증가했다. 9일차에 VPC2는, 근육질 혈관에 유의미한 영향을 미치지 않았다. 표 16, 17, 및 18을 참조.

[0229] 이러한 결과는, SuHx-유발 동물에서 PAH의 증상이 VPC2로 처리된 동물에서 훨씬 덜한 중증도를 나타내는, 기능적 소견(functional findings)을 확인한다. VPC2는 SuHx-유발 PAH 렛트 모델에서 폐혈관의 재형성을 방지했다.

[0230] 게다가, VPC2-처리 동물에서 관찰된 폐포 대식세포 침윤, 부종/섬유증 및 폐동맥 병변은, 음성 대조군 SuHx 동물보다 훨씬 낮았으며, 이는 없음/경증도(점수 0 내지 1)으로 분류되어, VPC2가 PAH와 관련된 폐 변화의 발병을 예방함을 시사한다.

[0231] 본 연구는 RNU 렛트에서 극도로 공격적이고 빠르게 유발된 PAH 증후군에 기능적 뿐만 아니라 구조적 소견에 대

한 VPC2(HEs)의 높은 효능을 입증했다.

[0232] 실시예 9: HE는 VECAD+인 뚜렷한 혈관 내피 분획을 함유

[0233] 위에서 유세포 분석 및 전사체 분석은, HE 분화 프로토콜에 의해 발생된 상당한 혈관 내피 성분이 있을 가능성이 있음을 보여준다. PSC-유래 EC-유사 세포와 성숙한 ECs 사이에 유사점과 차이점을 더 잘 정의하기 위해, 본 발명자들은 HE, HUVEC, 및 미분화된 iPSCs(GMP1)를 비교하는 단일 세포 RNA-시퀀싱을 수행했다.

[0234] 비지도 클러스터링은 시험된 세포 타입 중에서 9개의 클러스터를 나타냈다(도 9a). 예상대로, 미분화된 iPSCs는, HE 세포("VPC-피더 활성") 및 HUVEC(도 9b 및 9c)와 뚜렷하게 클러스터링된다. HE는, 여러 클러스터로 조직화되지만, 전반적으로, iPSCs 및 HUVECs으로부터 대체로 분리 가능한 개체군에서 조직화된다. 혈관 내피 세포의 특정 마커의 발현이 미심쩍은 경우, VECAD/CDH5의 존재에 의해 3개의 클러스터(클러스터 2, 4, 및 5)는 동정된다(도 10). 클러스터 2 및 4는 주로 HUVEC로 구성된 반면, 클러스터 5는 HE 세포로 구성된다(도 9b). 클러스터 5가 VECAD+ 세포로 구성된 것으로 보임을 고려하여, 차등 유전자 발현 분석은, 클러스터 5 유래의 VECAD+ HE 세포를 다른 클러스터 유래의 세포와 비교하여 수행되고, 클러스터 5가 가장 많은 차등적으로 발현된 유전자의 기능에 의해 나타난 바와 같이, 강력한 혈관 내피 특징을 가짐을 발견했다(표 22). 클러스터 5에서 가장 유의미하게 상향조절된 50개의 유전자 중 다수는, 알려진 혈관 발현 및 활성을 갖는 유전자였으며, PLVAP, GJA4, ESAM, EGFL7, KDR/VEGFR2, ESAM, 및 VECAD(CDH5)를 포함한다(표 22). 유전자 온톨로지 분석(Gene ontology analysis)은, 가장 풍부한 경로 중에서 EC 이동(EC migration), 내피 발달, 발아 혈관신생, 및 기타 EC-관련 과정이 있음을 나타낸다. 유사하게, 유전자 집합 농축도 분석(gene set enrichment analysis)은, TGF 베타 신호전달 및 저산소증을 포함하여, 내피 발달 및 기능에 중요한 경로를 밝혀냈다.

[0235] 클러스터링 분석은 또한 HE 세포가 HUVECs와 크게 구별됨을 나타낸다. 클러스터 5는 최소이지만 0이 아닌 HUVEC 기여(contribution)를 가졌고, 클러스터 2 및 4는 주로 소형(<15%) HE 표현(representation)을 갖는 HUVEC로 구성된다(도 9b). 주로 HUVEC로 구성된 클러스터와 클러스터 5를 비교하는 차등 유전자 발현 분석은, 클러스터 5에서 VECAD+ HE 세포가 미성숙 또는 전구 ECs임을 밝혀냈다(표 23). VECAD+ HE 세포에서 더 많이 발현되는 유전자 중에는, SOX9, PDGFRA, 및 EGFR이 있으며, 이들은 최종적으로 분화된 ECs의 선행인자인 복제 혈관-매개(vessel-borne) 전구 혈관 세포의 마커이다. 내피 콜로니-형성 세포(ECFCs)와 성숙한 혈관-매개 내피 세포(ECs)를 비교한 최근 연구(Kutikhin, AG et al. Cells 9:876 (2020))는, ECFC-농축 인자(ECFC-enriched factors)로서 KDR/VEGFR2, NOTCH4, 콜라겐 I 및 IV 서브유닛을 확인했고, 이러한 전사물(transcripts)은, CD34와 같은 다른 ECFC-농축 유전자가 HE 세포에서 더 많지 않을지라도, HUVEC와 비교하여 클러스터 5의 VECAD+ HE 세포에서 유사하게 상향조절된다. HE 세포 및 HUVEC가 VECAD/CDH5 및 PECAM1/CD31을 발현시키는 동안, HUVEC 수준은 더 높으며, 이는 HE 세포가 더 미성숙하거나 전구 EC-유사 세포인 것과 다시 일치한다. VECAD+ HE 세포와 HUVEC 사이에 차등적으로 발현되는 유전자의 집합을 사용한 유전자 온톨로지 분석은, 가장 풍부한 경로가 스테롤 생합성, 단백질 키나아제 A 신호전달, 소화관 및 심실 발달임을 보여준다. iPSC와 비교한 경우, 유전자 집합 농축도 분석은, 차등적으로 발현된 유전자가, MTORC1, WNT, 및 TGF 베타 신호와 같은, 내피 발달 및 항상성(homeostasis)에 중요한 경로와 연관되어 있음을 보여준다. 종합하면, 단일 세포 RNA 시퀀싱은, 진정한 EC의 특질(qualities)을 보유하지만, 미성숙 또는 전구 표현형(phenotype)을 암시하는 독특한 특징도 보유하는, HUVEC와 유사한 HE의 클러스터를 밝혀냈다.

표 22

[0236] 다른 클러스터에서의 세포와 비교하여 클러스터 5에서 가장 크게 상향 조절된 50개의 유전자

유전자	p_val	p_val_adj	avg_logFC	pct.1	pct.2
GJA4	0.00E+00	0.00E+00	1.739765	0.751	0.171
PLVAP	0.00E+00	0.00E+00	1.710396	0.96	0.497
IGFBP4	0.00E+00	0.00E+00	1.483074	0.987	0.675
FCN3	0.00E+00	0.00E+00	1.425734	0.581	0.1
GNG11	0.00E+00	0.00E+00	1.184349	0.973	0.682
ESAM	0.00E+00	0.00E+00	1.128435	0.898	0.389
SLC9A3R2	0.00E+00	0.00E+00	1.100179	0.805	0.394
CDH5	0.00E+00	0.00E+00	1.046682	0.738	0.164
IGFBP5	0.00E+00	0.00E+00	1.044824	0.455	0.221
SOX18	0.00E+00	0.00E+00	1.014948	0.682	0.161
KDR	0.00E+00	0.00E+00	0.980832	0.949	0.669

GMFG	0.00E+00	0.00E+00	0.97714	0.835	0.269
HLA-E	0.00E+00	0.00E+00	0.959084	0.891	0.491
MMRN2	0.00E+00	0.00E+00	0.938295	0.666	0.121
VAMP5	0.00E+00	0.00E+00	0.914077	0.921	0.612
ARHGDIB	0.00E+00	0.00E+00	0.887378	0.825	0.394
ADGRL4	0.00E+00	0.00E+00	0.883791	0.703	0.231
GJA5	0.00E+00	0.00E+00	0.862907	0.524	0.132
EFNB2	0.00E+00	0.00E+00	0.862327	0.674	0.377
PECAM1	0	0	0.846013	0.654	0.17
RNASE1	0.00E+00	0.00E+00	0.829217	0.518	0.226
ECSCR	0.00E+00	0.00E+00	0.79933	0.687	0.176
ABHD17A	0.00E+00	0.00E+00	0.769739	0.854	0.568
HSPG2	0.00E+00	0.00E+00	0.760038	0.65	0.323
FAM107B	0.00E+00	0.00E+00	0.758576	0.682	0.309
EGFL7	0.00E+00	0.00E+00	0.754544	0.991	0.91
MEF2C	0.00E+00	0.00E+00	0.747243	0.745	0.343
ARGLU1	0.00E+00	0.00E+00	0.743373	0.794	0.693
FLT1	0.00E+00	0.00E+00	0.737392	0.968	0.891
S100A16	0.00E+00	0.00E+00	0.728981	0.967	0.819
CFLAR	0.00E+00	0.00E+00	0.726916	0.783	0.423
COTL1	0.00E+00	0.00E+00	0.725018	0.918	0.741
SOX17	0.00E+00	0.00E+00	0.72092	0.486	0.153
DLL4	0	0	0.709932	0.483	0.079
PLK2	0.00E+00	0.00E+00	0.709154	0.862	0.584
SLC2A1	0.00E+00	0.00E+00	0.699951	0.759	0.614
ITM2B	0.00E+00	0.00E+00	0.696128	0.982	0.942
CXCR4	0.00E+00	0.00E+00	0.68996	0.513	0.36
RAMP2	0.00E+00	0.00E+00	0.686508	0.704	0.488
FAM69B	0.00E+00	0.00E+00	0.681908	0.89	0.622
FKBP1A	0.00E+00	0.00E+00	0.681477	0.959	0.874
PTP4A3	0.00E+00	0.00E+00	0.680399	0.65	0.376
SERPINB6	0.00E+00	0.00E+00	0.676227	0.91	0.792
CD9	0.00E+00	0.00E+00	0.673737	0.783	0.543
PLXND1	0.00E+00	0.00E+00	0.672561	0.728	0.443
CAVIN1	0.00E+00	0.00E+00	0.671818	0.779	0.476
ENG	0.00E+00	0.00E+00	0.671153	0.575	0.205
THY1	0.00E+00	0.00E+00	0.6667	0.765	0.53
RASIP1	0.00E+00	0.00E+00	0.665168	0.66	0.248
HEY1	0.00E+00	0.00E+00	0.662962	0.746	0.45

표 23

[0237] HUVEC 세포와 비교하여 클러스터 5에서 가장 크게 상향 조절된 100개의 유전자

gene	p_val	p_val_adj	avg_logFC	pct.1	pct.2
CRHBP	0	0	3.333906	0.983	0.005
PLVAP	0	0	2.660275	0.96	0.105
HAPLN1	0	0	2.582318	0.979	0.004
CD24	0	0	2.117768	0.895	0.011
FLT1	0	0	2.095663	0.968	0.366
IGFBP2	0	0	2.040781	0.997	0.702
CKB	0	0	2.020425	0.941	0.027
GJA4	0	0	1.891513	0.751	0.172
SLC2A3	0	0	1.787711	0.903	0.118
S100A4	0	0	1.737065	0.75	0.02
KRT8	0	0	1.687879	0.973	0.617
FCN3	0	0	1.686621	0.581	0.004
IGFBP5	0	0	1.620931	0.455	0

LAPTM4B	0	0	1.544365	0.966	0.497
BNIP3	0	0	1.531254	0.967	0.661
KRT19	0	0	1.512069	0.89	0.271
ITM2C	0	0	1.506945	0.879	0.033
SLC2A1	0	0	1.503243	0.759	0.119
TUBB2B	0	0	1.4743	0.841	0.005
KDR	0	0	1.443674	0.949	0.512
LDHA	0	0	1.41049	0.997	0.843
APOE	0	0	1.407249	0.726	0.029
THY1	0	0	1.388232	0.765	0.009
FAM162A	0	0	1.381927	0.908	0.519
CRABP2	0	0	1.351647	0.723	0.003
ID1	0	0	1.323672	0.977	0.659
COL3A1	0	0	1.298193	0.694	0.027
NTS	0	0	1.290051	0.536	0.002
TXNIP	0	0	1.254997	0.75	0.323
QPRT	0	0	1.25253	0.756	0.003
SLC16A3	0	0	1.225941	0.91	0.402
ENO1	0	0	1.207866	1	0.969
TIMP3	0	0	1.196902	0.737	0.084
GYPC	0	0	1.193327	0.835	0.185
HEY1	0	0	1.193009	0.746	0.095
TMEM141	0	0	1.18403	0.887	0.621
COL6A2	0	0	1.181263	0.756	0.026
HES4	0	0	1.17592	0.805	0.402
CD44	0	0	1.170072	0.799	0.217
PGK1	0	0	1.169827	0.98	0.824
BST2	0	0	1.162566	0.807	0.555
CLEC11A	0	0	1.16185	0.822	0.25
SLC9A3R2	0	0	1.156233	0.805	0.533
KRT18	0	0	1.136732	0.994	0.892
FBLN1	0	0	1.116144	0.739	0.006
PCAT14	0	0	1.113903	0.629	0
MSMO1	0	0	1.108676	0.849	0.418
HMGCS1	0	0	1.094925	0.791	0.274
CXCR4	0	0	1.086418	0.513	0.104
TPI1	0	0	1.079699	0.999	0.973
PTP4A3	0	0	1.071418	0.65	0.054
ITM2B	0	0	1.05799	0.982	0.911
TMEM100	0	0	1.05409	0.569	0.001
MVD	0	0	1.049627	0.797	0.343
GJA5	0	0	1.03821	0.524	0.013
BAMBI	0	0	1.031801	0.658	0.043
HOPX	0	0	1.026231	0.681	0.174
APOC1	0	0	1.024475	0.704	0.128
SERPINB1	0	0	1.021549	0.799	0.435
PGAM1	0	0	1.01222	0.986	0.887
POMP	0	0	1.010744	0.989	0.966
TUBA1A	0	0	1.007929	0.956	0.901
ACAT2	0	0	1.007418	0.831	0.507
BEX1	0	0	0.998364	0.615	0.009
PRTG	0	0	0.995446	0.682	0.108
P4HA1	0	0	0.991764	0.731	0.207
SERPINE2	0	0	0.977086	0.666	0.073
ID3	0	0	0.97512	0.988	0.923
CYBA	0	0	0.970771	0.925	0.669
EFNB2	0	0	0.964464	0.674	0.362
PKM	0	0	0.9469	0.995	0.911

UNC5B	0	0	0.927982	0.571	0.012
COL4A1	0	0	0.925096	0.926	0.711
IGDCC3	0	0	0.921767	0.578	0
ARGLU1	0	0	0.915778	0.794	0.67
GJA1	0	0	0.909177	0.805	0.616
LIMD2	0	0	0.908494	0.866	0.562
GMFG	0	0	0.90607	0.835	0.453
FDX1	0	0	0.904597	0.784	0.479
FDFT1	0	0	0.895682	0.884	0.648
JUND	0	0	0.887796	0.908	0.638
SERPING1	0	0	0.875879	0.592	0.002
BEX3	0	0	0.875878	0.977	0.633
ANGPTL4	0	0	0.869906	0.548	0.041
PLK2	0	0	0.867144	0.862	0.556
CA2	0	0	0.865318	0.512	0
HLA-DRB1	0	0	0.85335	0.545	0
PLIN2	0	0	0.843637	0.711	0.348
COTL1	0	0	0.841217	0.918	0.775
ABHD17A	0	0	0.840353	0.854	0.601
IGFBP4	0	0	0.836	0.987	0.956
SERPINH1	0	0	0.832031	0.923	0.818
C4orf3	0	0	0.829329	0.947	0.852
IER2	0	0	0.826343	0.848	0.569
S100A11	0	0	0.825409	0.995	0.992
FURIN	0	0	0.824346	0.724	0.369
CSRP2	0	0	0.820907	0.665	0.17
TIMP1	0	0	0.819248	0.973	0.904
TCEAL9	0	0	0.816856	0.904	0.546
FSCN1	0	0	0.811547	0.963	0.879

[0238] 실시예 10: HEs는 폐동맥 고혈압의 렛트 모델에서 혈역학적 파라미터 및 혈관 재형성을 약화

[0239] 모노크로탈린(MCT)으로 설치류의 치료는, 혈관 저항 및 심장 기능 장애를 유발하고(Rabinovitch, M. *Toxicol Pathol* 19, 458-469 (1991)), 슈겐/저산소증 모델은 전술된 임상 마커 뿐만 아니라 인간에서 진행성 질병의 임상적 특질인, 총상 병변의 형성을 유도한다(Ciuclan, L. *et al. Am J Respir Crit Care Med* 184, 1171-1182 (2011)).

[0240] MCT 렛트에서, J1-ESC 및 GMP-1 iPSC로부터 유래된 HE로 치료는, PAH의 증상을 약화시킨다. 간단히 말해서, rnu/rnu 렛트는, 0일차에 단일 투여량의 MCT(50mg/kg, ip)가 제공된다. 3일 후, 렛트는, 비히클, J1-HE, 및 GMP-1 HE 그룹으로 나누고, 정맥 주사를 통해 대조군 배지 또는 세포($2.5x10^6$)가 투여된다. 양성 대조군으로, 또 다른 그룹은, 이들의 식수에 높은 투여량의 실데나필(~15 mg/kg/일)이 제공된다. 28일차에, 혈역학적 분석은 좌우 심장 도관을 통해 수행된다. 예상대로, 비히클-처리된 랫트는, 증가된 우심실 수축기압(RVSP), 풀턴 지수, 및 폐혈관 저항 지수(PVR 지수)를 나타낸다(도 11a-c). RVSP 및 PVR 지수 값은, J1-HE로 처리된 랫트에서 더 낮았다(도 11a 및 11c). RVSP, 풀턴 지수, 및 PVR 지수 값은, GMP-1-HE로 처리된 랫트에서 더 낮았다(도 11a-c). 조직학적 분석은, J1-HE 및 GMP-1-HE 그룹 유래의 랫트가 비히클-처리된 랫트와 비교하여 덜 두꺼워진 혈관을 갖는 것으로 나타났으며, 이는 정량화에 의해 확증된다(도 11D).

[0241] 다음으로, PSC-유래 HEs는 PAH의 슈겐/저산소증 모델에서 다시 시험된다. 이들 연구에서, rnu/rnu 렛트는 21일 동안 슈겐/저산소/정상산소 조건에 적용된다. 렛트는 0일차에 단일 투여량의 슈겐이 제공된 다음, 1일차에 100만, 250만, 또는 500만 세포로 비히클, J1-HE, 또는 GMP-1-HE의 정맥 주사가 수반된다. 부가적인 대조군으로서, 또 다른 그룹은, 실데나필(50 mg/kg)을 1일 2회 경구 위관영양법(oral gavage)으로 제공된다. 주사당 250만에서 J1-HE 및 GMP-1-HEs로 처리된 랫트는, 비히클-처리와 비교하여, 감소된 mPAP, RVSP, 및 풀턴 지수 및 일회 박출량(stroke volume) 및 심박출량과 같은 개선된 심장 기능을 나타낸다(도 12a-d). 더군다나, GMP-1-H는, 폐 혈역학, RV 재형성, 심장 기능에서 투여량 의존적 방식으로 이의 효능을 개선시켰다(도 13a-d). 폐 조직의 조직학적 분석은, 슈겐/저산소증 모델에서 대조군과 J1-HE 또는 GMP-1-HE-처리된 랫트 사이에 차이를 보여준다(도 14a-c

및 도 15a-c). 더 적은 총상 병변은, 비히클-처리된 동물과 비교하여 HE-처리된 동물에서 관찰될 수 있다(도 14a 및 15a). HE-처리된 동물에서 폐 혈관 벽 두께는 또한 비히클-처리된 동물과 비교하여 감소된다(도 14b 및 15b). HE-처리된 그룹에서 동물에 대해 근육질 및 반-근육질로 분류된 폐 혈관의 퍼센트는 비히클-처리된 것보다 낮았다(도 14c 및 15c). 마지막으로, HE-처리된 폐는, 비히클-처리된 동물에 비해 면역 세포 침윤이 적었다(데이터는 나타내지 않음).

[0242] 슈겐/저산소증 모델로부터 HE- 및 비히클-처리된 렛트 폐의 전체 전사체 분석은, HE-치료가 병리학적 혈관 재형성을 약화시켰음을 시사하는 생리학적 데이터를 뒷받침한다. 렛트의 폐에서 RNA는 21일차에 수집되고, 차등 유전자 발현 분석은 수행된다. 세포 치료에 의해 ≥1.25 배 만큼 하향조절된 유전자의 경로 분석은, 특히, 평활근 세포 발달, 면역 세포 시스템 침윤, 및 염증과 관련된 유전자가 감소된 것으로 나타났다. 반대로, 세포 치료에 의해 ≥1.25 배 만큼 상향조절된 유전자는, 유리한 대사 상태, 즉, 산화적 인산화를 선호하는 것과 관련이 있으며, 이의 섭동(perturbation)은 PAH 질병 상태와 관련이 있다. 종합하면, 이들 데이터는, HE가 주사당 250만에서 500만까지의 투여량 범위에서 혈관 저항, 혈관 재형성, 및 심장 비대를 감소시켜 PAH의 모델에서 렛트를 보호함을 시사한다.

[0243] 실시예 11: HEs는 폐에서 미세혈관을 복원

[0244] 내피 전구 세포는, MCT 처리된 폐에서 미세혈관을 보존하는 것으로 보고되어 있다(Zhao et al. Cir. Res. 96:442-450 (2005)). 따라서, MicroCT 스캔은, Nx 대조군, 비히클, 실데나필, 및 100만 및 500만 GMP1-HE 세포들로 처리된 SuHx 모델 유래의 폐에 대해 수행된다. MicroCT 스캐닝은, 정상 폐에서 모세관 관류의 균일한 패턴 및 원위 세동맥상(arteriolar bed)의 균일한 충만(filling)을 보여준다(도 16a). 대조적으로, 비히클로 처리된 SuHx 폐는, 좁아진 원위 세동맥상 및 모세관 폐색을 나타낸다(도 16b). 1백만 HE 세포가 아닌(도 16c), 5백만 HE 세포로의 치료(도 16d)는, 조영제 주사에 의해 가시화된 미세혈관 구조를 보존했다. 500만 HE 세포로 향상된 모세관 관류 및 세동맥 연속성의 보존과 함께 폐 미세맥관구조(microvasculature)의 외관에서 현저한 개선이 있었다(도 16d). 실데나필의 치료는, 모세관 관류에서 완만한 개선을 나타낸다(도 16e).

[0245] 실시예 12: HEs는 치료적으로 활성인 별개의 혈관 내피 분획을 함유

[0246] 전술된 VECAD+ HE 분획과 HUVEC 사이에 유사성 및 HE의 단일 세포 프로파일링은, 아마도 이러한 서브개체군이 PAH에서 이의 치료 효과를 HE에 부여하는 활성 성분일 수 있음을 시사한다. 이를 시험하기 위해, 슈겐/저산소증 모델을 사용하는 또 다른 연구는, VECAD+ 세포에 대한 자기 분류(magnetic sorting)에 의해 "벌크" HE 세포로부터 정제된 250만 개의 "벌크" 또는 미분류된 HE 세포 및 250만 개의 VECAD+ HE 세포를 사용하여 수행된다(도 17). VECAD+ 세포에 대해 분류된 분획은, 대다수가 또한 CD31을 발현시킴을 나타낸다(도 17). 비히클-처리된 동물과 비교하여, VECAD+ HE는 임상 측정치: mPAP(도 18a), RVSP(도 18b), RV 재형성(도 18c) 및 심박출량(도 18d)을 개선시켰다. 폐 맥관구조는 또한 비히클-처리된 것과 비교하여, 더 적은 총상 병변(도 18e), 감소된 벽 두께(도 18f), 및 감소된 혈관 근육화(도 18g)로 유지된다. 유사한 결과는 진정한 성숙 내피 세포인, HUVEC의 전달에 의해 얻어진다.

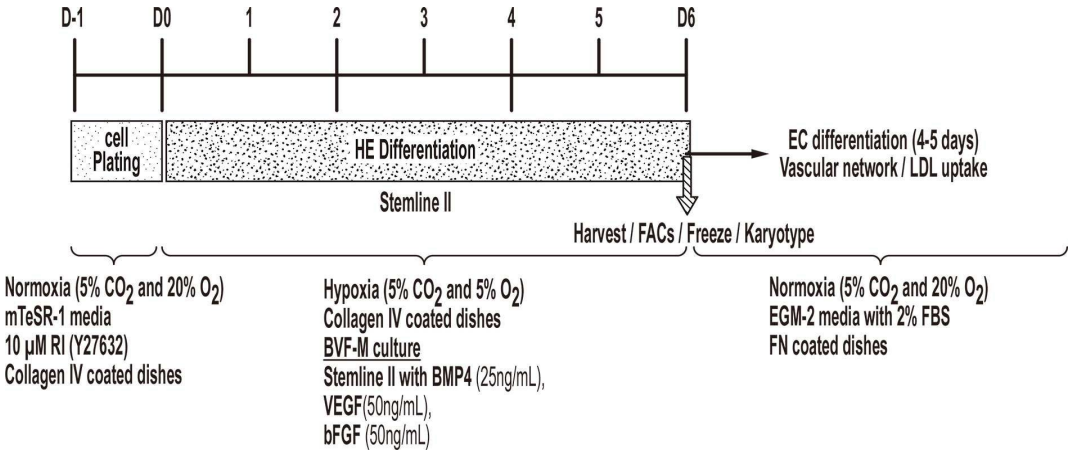
[0247] J1-HEs 및 GMP1-HEs에서 VECAD+/CD31+ 개체군이 FLK1/KDR 발현에 대해 분석된 경우, HEs는 CD31+/VECAD+/FLK1+인 개체군을 포함하는 것으로 나타났다(도 19).

[0248] 균등물

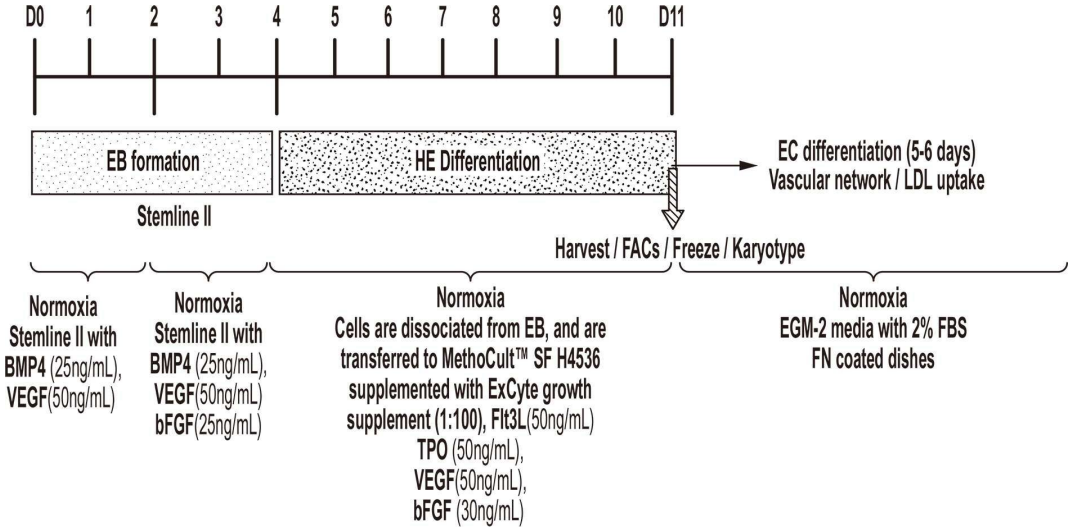
[0249] 당업자는 일상적인 실험을 사용하여 여기에 기재된 본 발명의 특정 구현예에 대한 많은 균등물을 인식하거나 확인할 수 있을 것이다. 이러한 균등물은 다음의 청구범위에 의해 포괄되는 것으로 의도된다. 본 출원 전반에 걸쳐 인용된 모든 참고 문헌, 특허 및 공개된 특허 출원의 내용은 참조로서 여기에 혼입된다.

도면

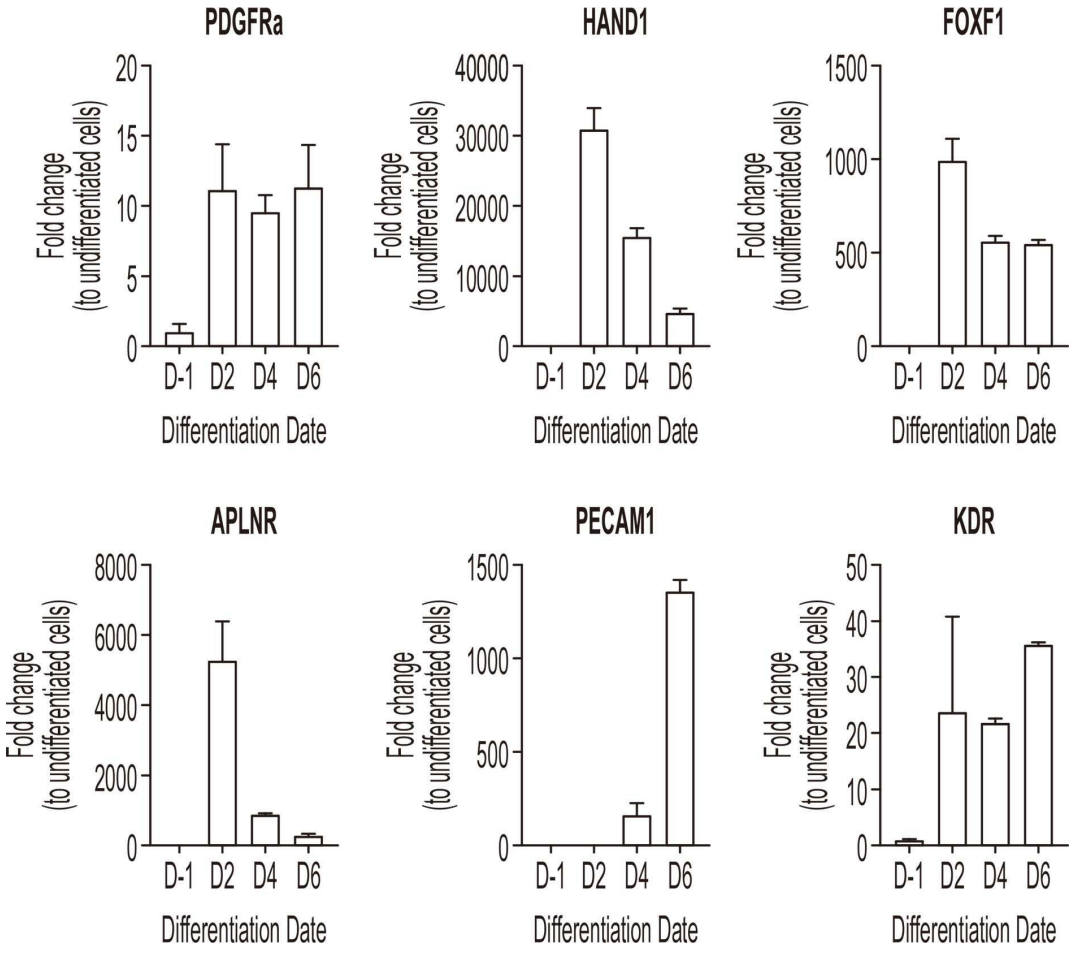
도면1


D-1
D0
1
2
3
4
5
D6
cell Plating
HE Differentiation
Stemline II
EC differentiation (4-5 days)
Vascular network / LDL uptake
Harvest / FACs / Freeze / Karyotype
Normoxia (5% CO2 and 20% O2)
mTeSR-1 media
10 μM RI (Y27632)
Collagen IV coated dishes
Hypoxia (5% CO2 and 5% O2)
Collagen IV coated dishes
BVF-M culture
Stemline II with BMP4 (25ng/mL),
VEGF(50ng/mL),
bFGF (50ng/mL)
Normoxia (5% CO2 and 20% O2)
EGM-2 media with 2% FBS
FN coated dishes

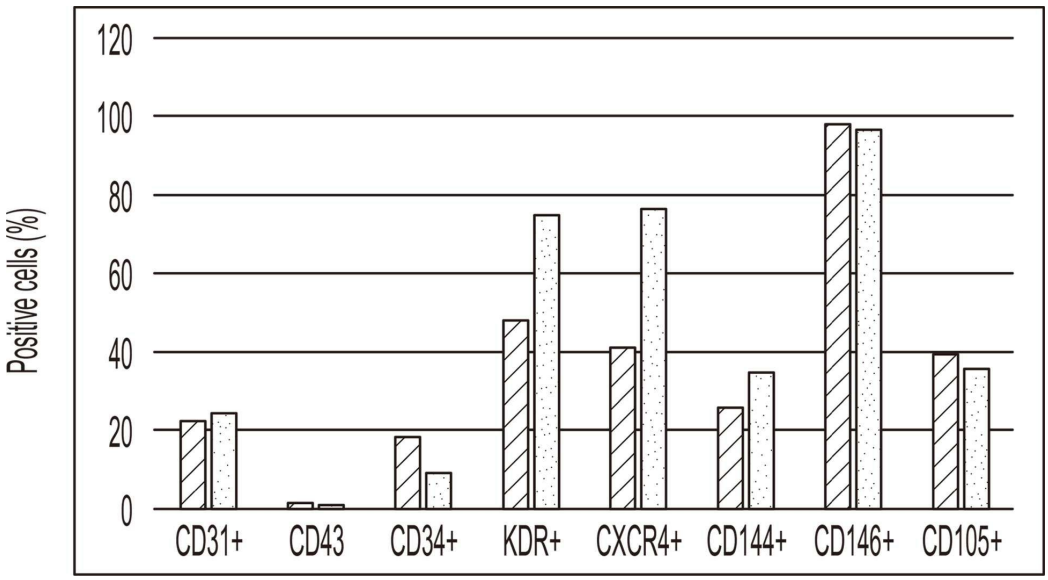
도면2


D0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
D11
EB formation
HE Differentiation
Stemline II
EC differentiation (5-6 days)
Vascular network / LDL uptake
Harvest / FACs / Freeze / Karyotype
Normoxia
Stemline II with
BMP4 (25ng/mL),
VEGF(50ng/mL)
Normoxia
Stemline II with
BMP4 (25ng/mL),
VEGF(50ng/mL)
bFGF(25ng/mL)
Normoxia
Cells are dissociated from EB, and are
transferred to MethoCult™ SF H4536
supplemented with ExCyte growth
supplement (1:100), Flt3L(50ng/mL)
TPO (50ng/mL),
VEGF(50ng/mL),
bFGF (30ng/mL)
Normoxia
EGM-2 media with 2% FBS
FN coated dishes

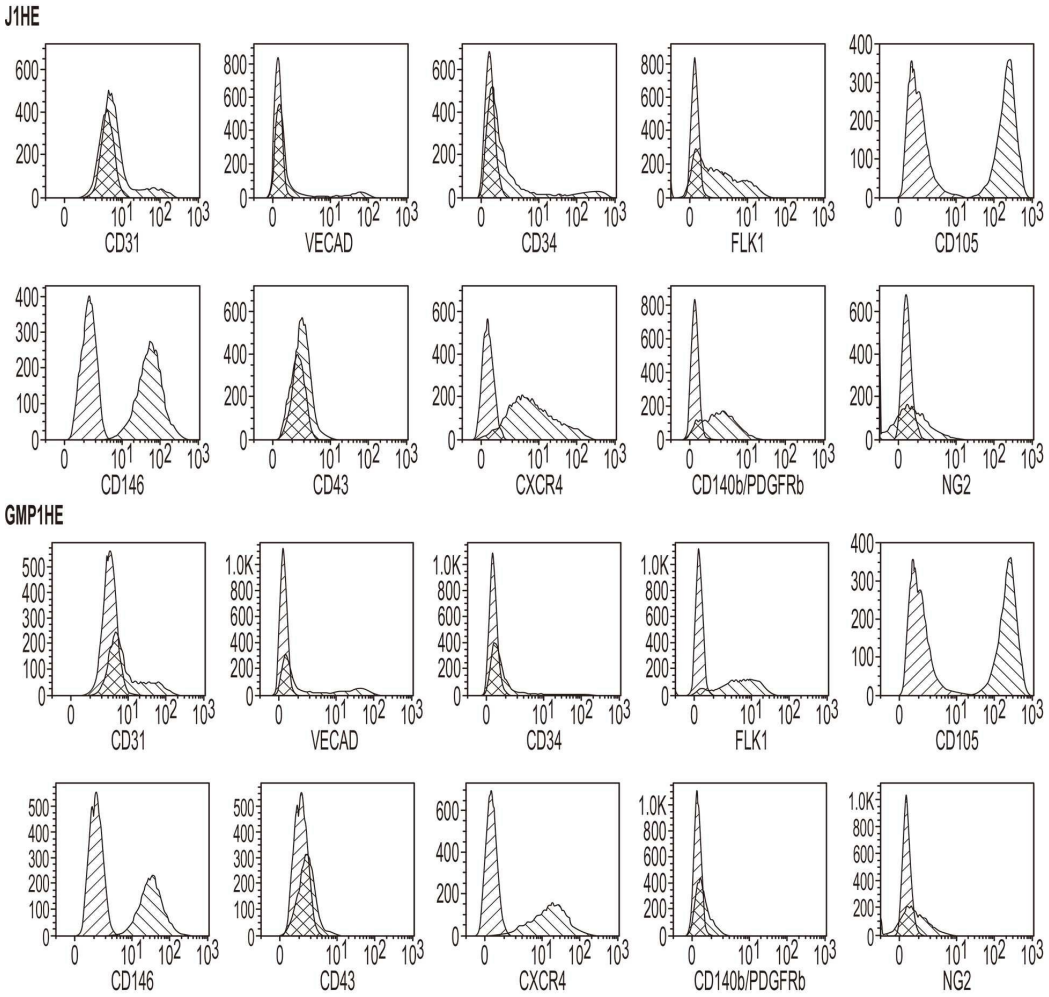
도면3


PDGFRa
HAND1
FOXF1
APLNR
PECAM1
KDR
Fold change (to undifferentiated cells)
Differentiation Date
D-1 D2 D4 D6
0 5 10 15 20
0 10000 20000 30000 40000
0 500 1000 1500
0 2000 4000 6000 8000
0 10 20 30 40 50

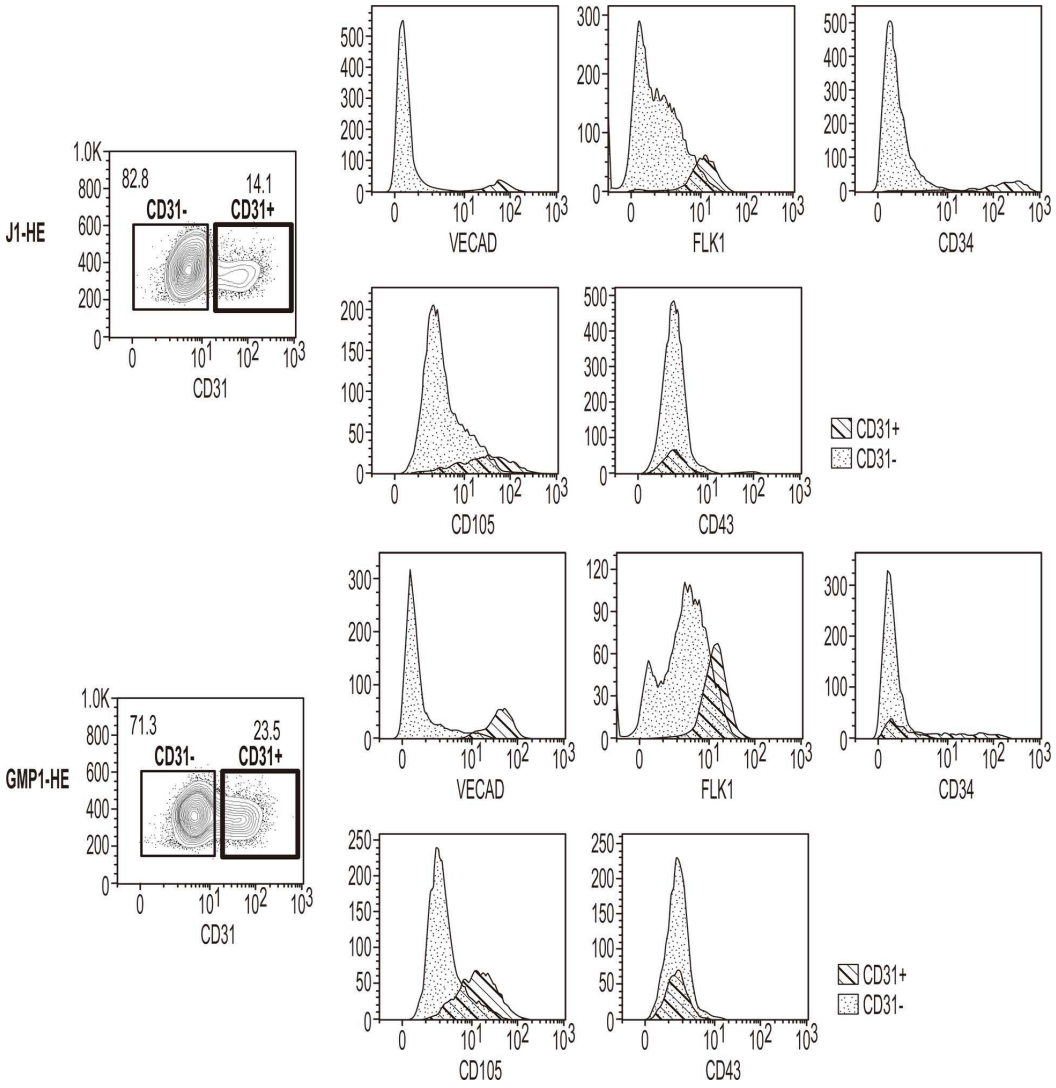
도면4a


Positive cells (%)
0 20 40 60 80 100 120
CD31+
CD43
CD34+
KDR+
CXCR4+
CD144+
CD146+
CD105+

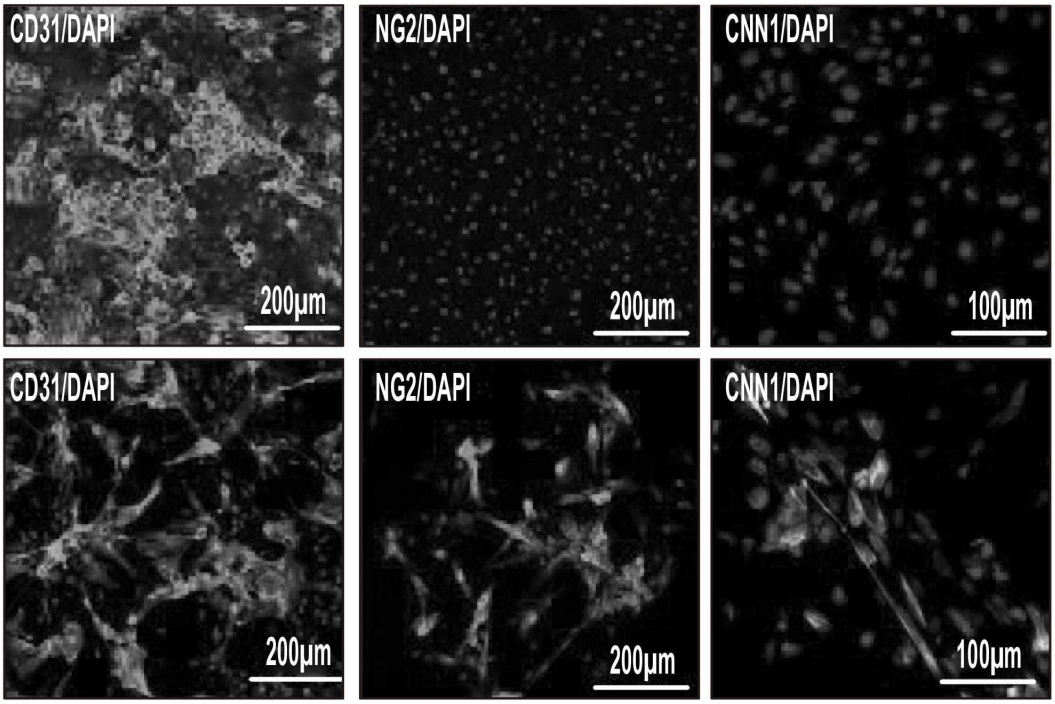
도면4b


J1HE
CD31
VECAD
CD34
FLK1
CD105
CD146
CD43
CXCR4
CD140b/PDGFRb
NG2
GMP1HE
CD31
VECAD
CD34
FLK1
CD105
CD146
CD43
CXCR4
CD140b/PDGFRb
NG2

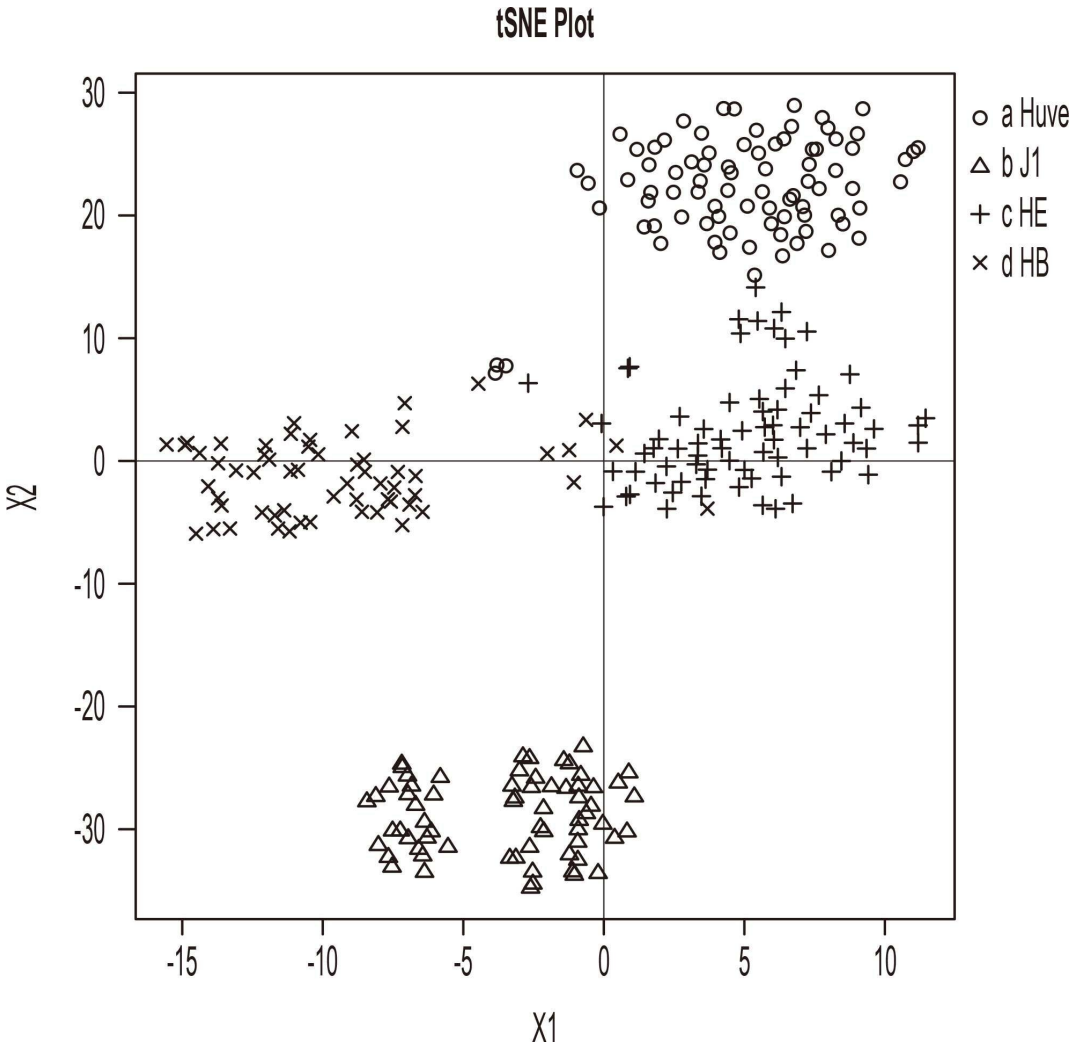
도면5


J1-HE
82.8
CD31-
14.1
CD31+
CD31
VECAD
FLK1
CD34
CD105
CD43
CD31+
CD31-
GMP1-HE
71.3
CD31-
23.5
CD31+
CD31
VECAD
FLK1
CD34
CD105
CD43
CD31+
CD31-

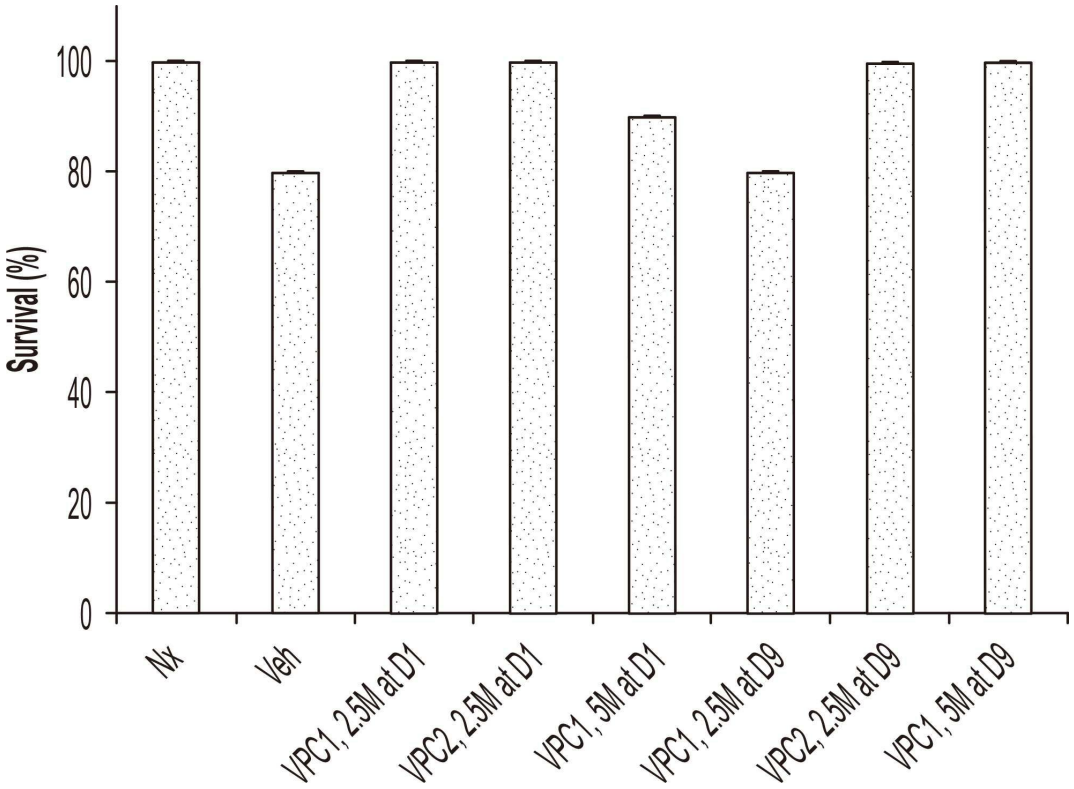
도면6


CD31/DAPI
200μm
NG2/DAPI
200μm
CNN1/DAPI
100μm
CD31/DAPI
200μm
NG2/DAPI
200μm
CNN1/DAPI
100μm

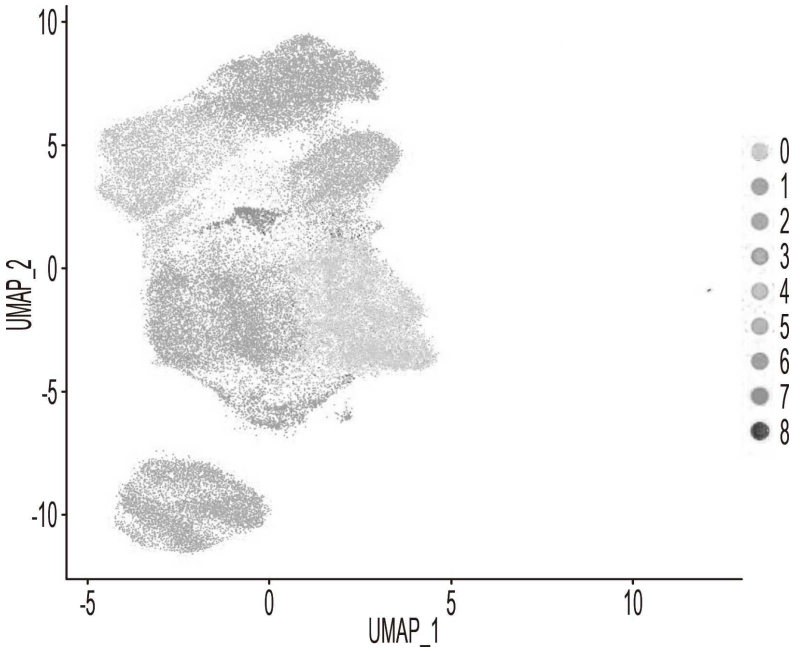
도면7



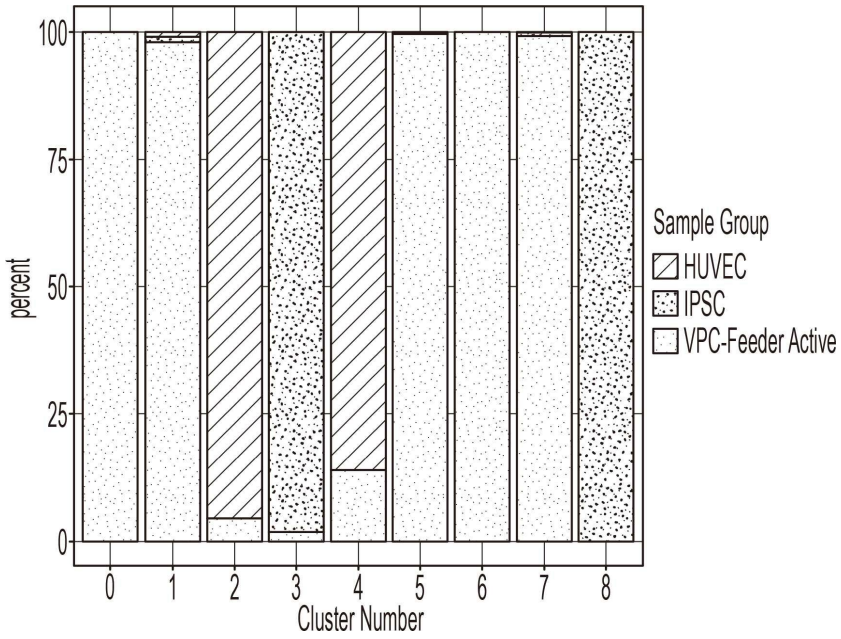
도면8


Survival (%)
100
80
60
40
20
0
Nx
Veh
VPC1, 2.5M at D1
VPC2, 2.5M at D1
VPC1, 5M at D1
VPC1, 2.5M at D9
VPC2, 2.5M at D9
VPC1, 5M at D9

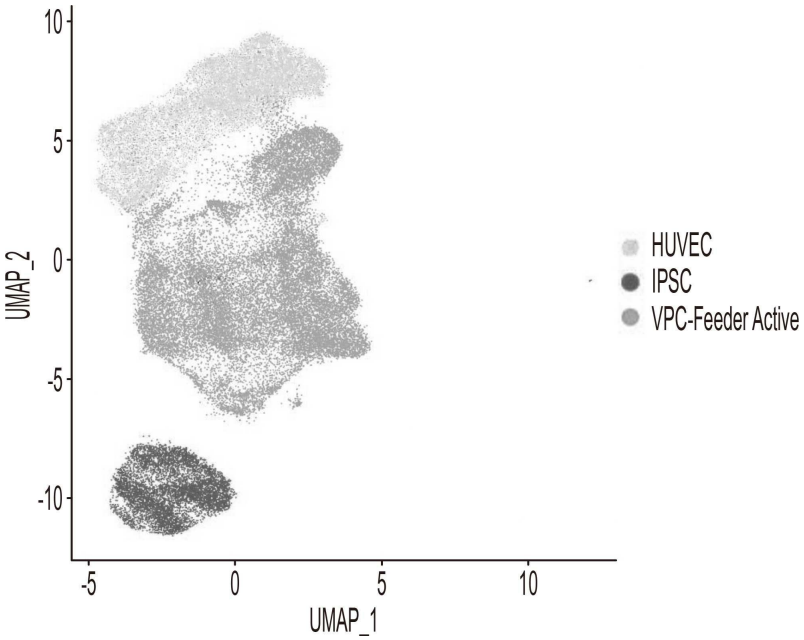
도면9a


UMAP_2
10
5
0
-5
-10
-5
0
5
10
UMAP_1
0
1
2
3
4
5
6
7
8

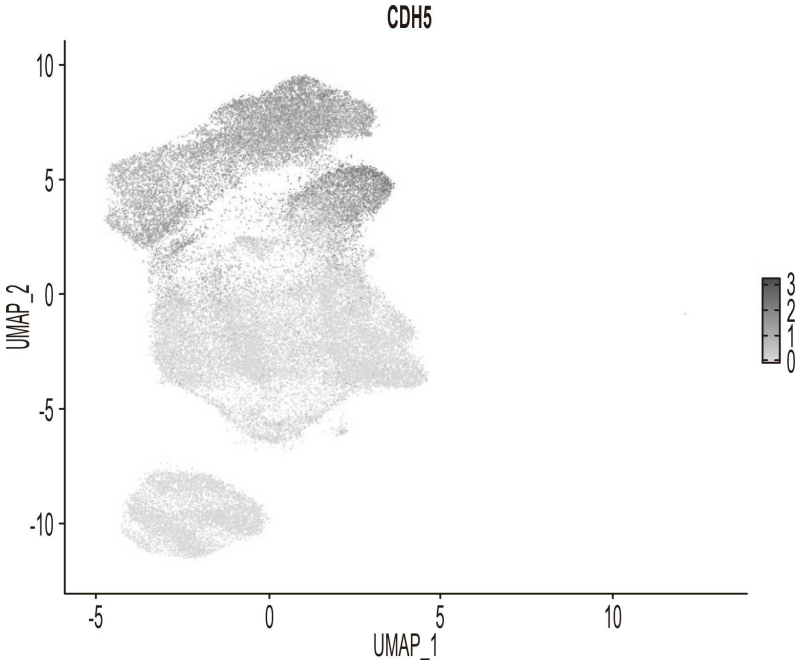
도면9b


100
75
50
25
0
percent
0
1
2
3
4
5
6
7
8
Cluster Number
Sample Group
HUVEC
IPSC
VPC-Feeder Active

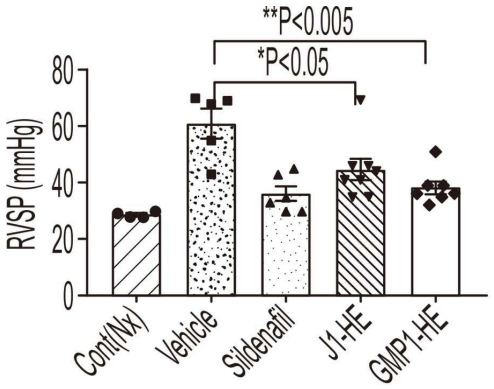
도면9c


10
5
0
-5
-10
UMAP_2
-5
0
5
10
UMAP_1
HUVEC
IPSC
VPC-Feeder Active

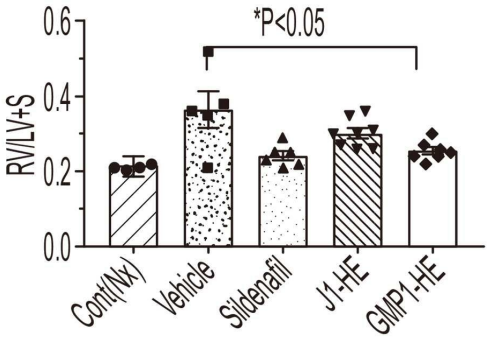
도면10



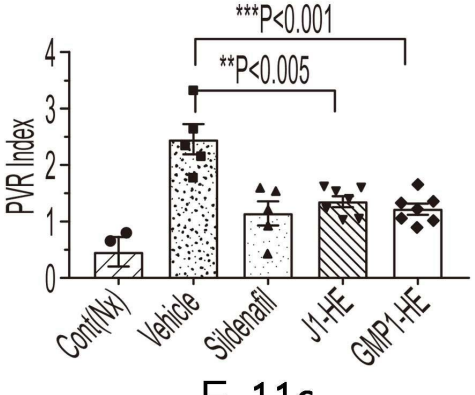
도면11



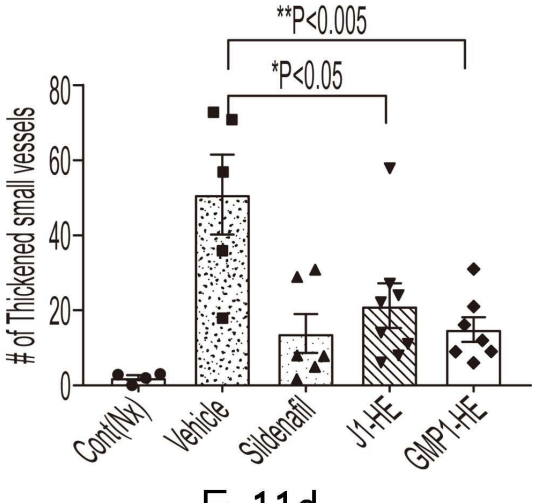
도 11a



도 11b

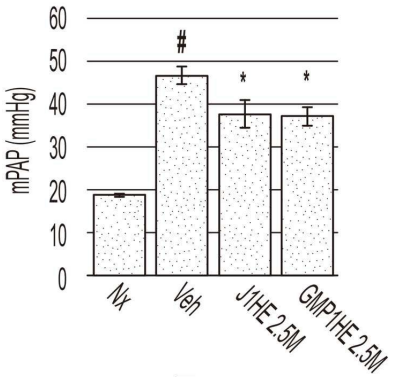


도 11c

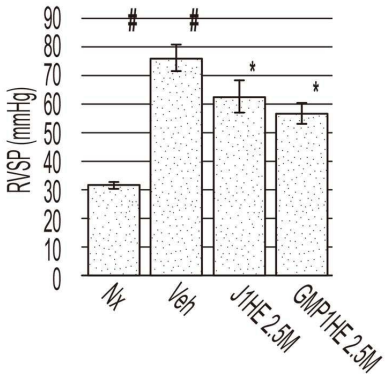


도 11d

도면12

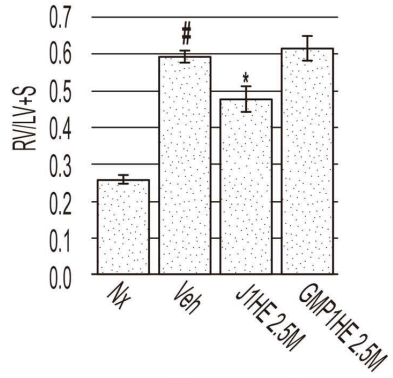


도 12a

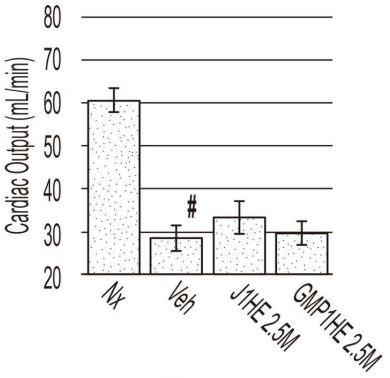


도 12b

#: p<0.05 compared to Nx
*: p<0.05 compared to Vehicle

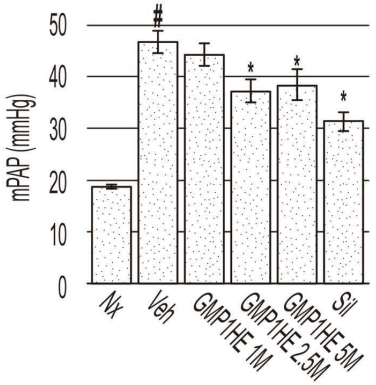


도 12c

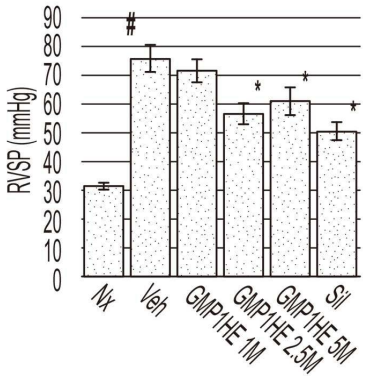


도 12d

도면13



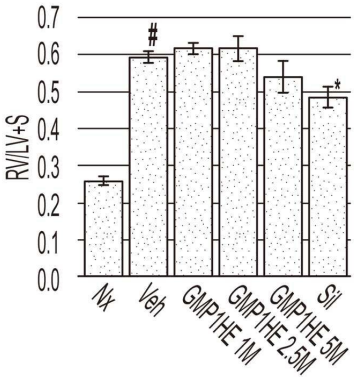
도 13a



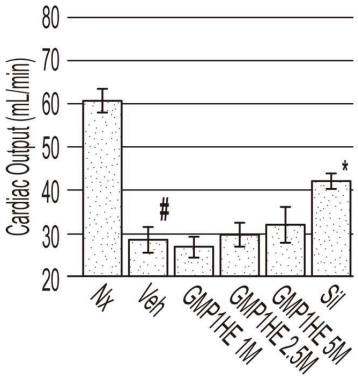
도 13b

#: p<0.05 compared to Nx

*: p<0.05 compared to Vehicle

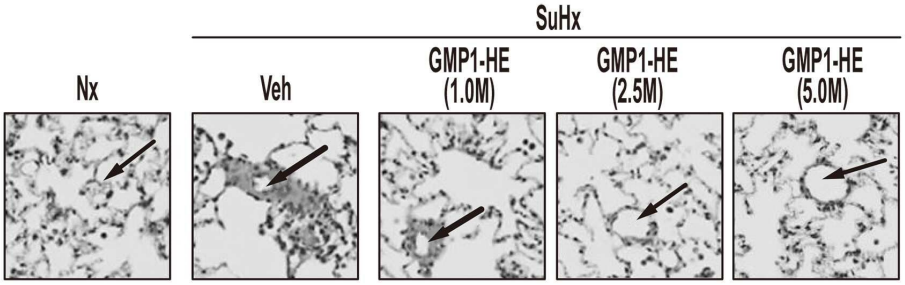


도 13c

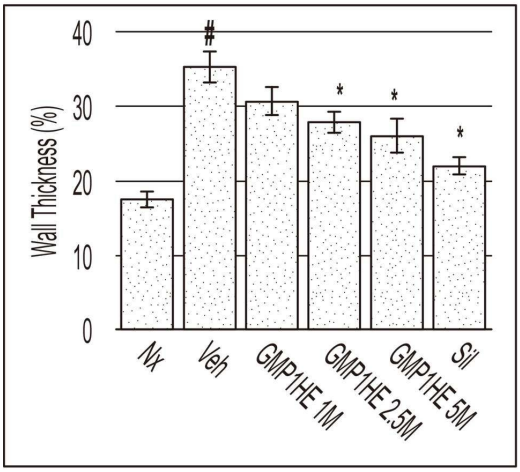


도 13d

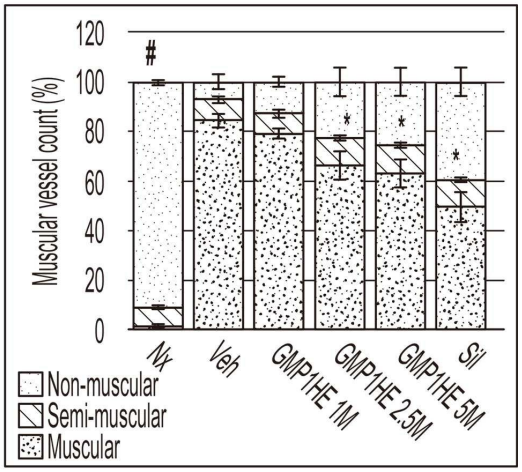
도면14



도 14a

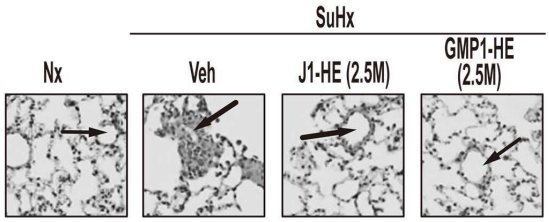


도 14b

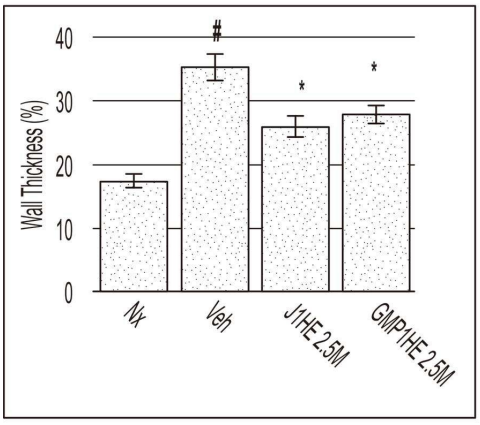


도 14c

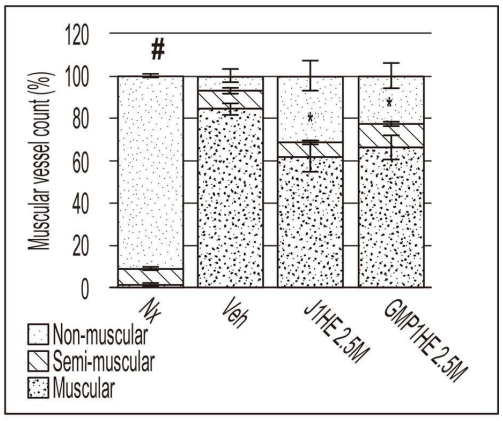
도면15



도 15a

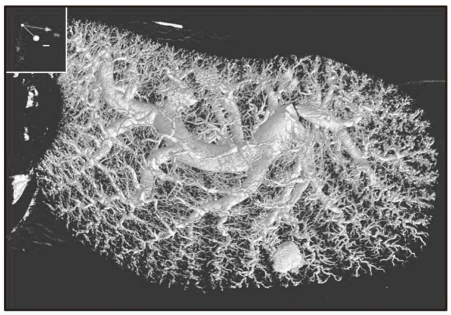


도 15b

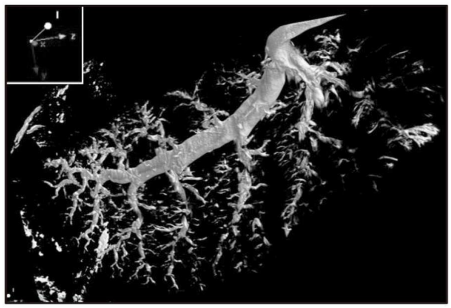


도 15c

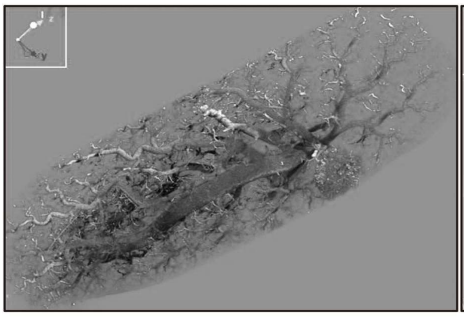
도면16



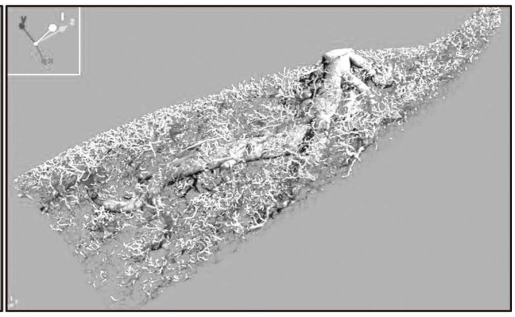
도 16a



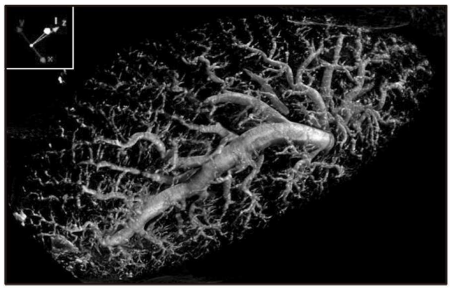
도 16b



도 16c

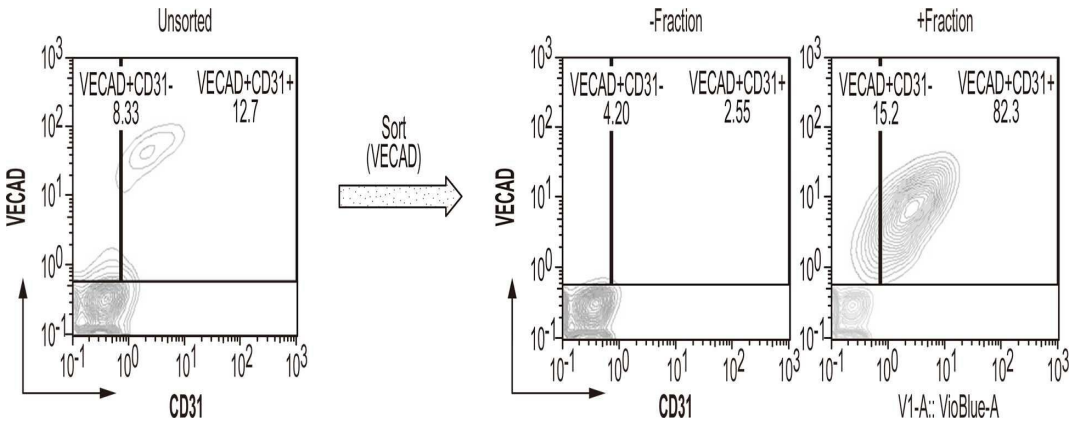


도 16d

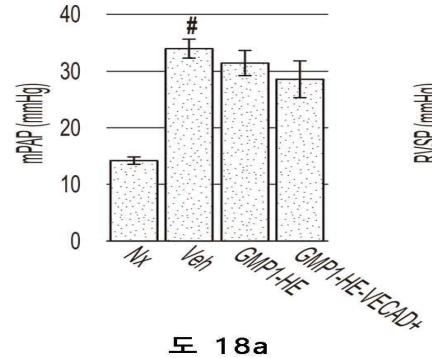


도 16e

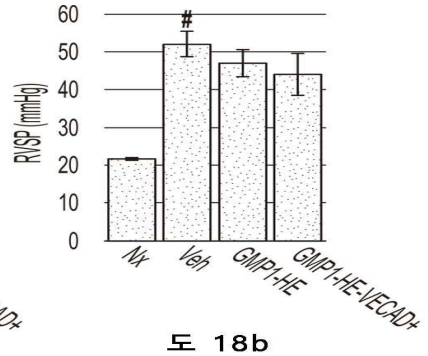
도면17



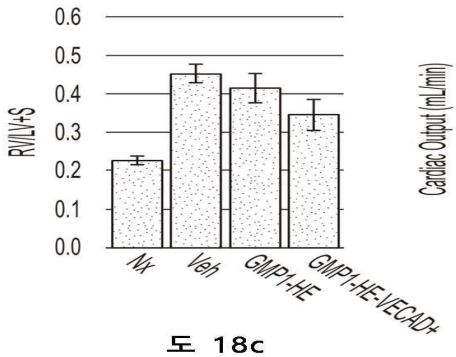
도면18



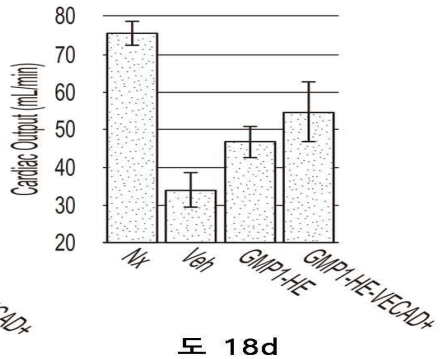
도 18a



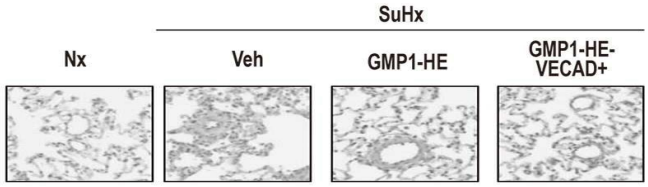
도 18b



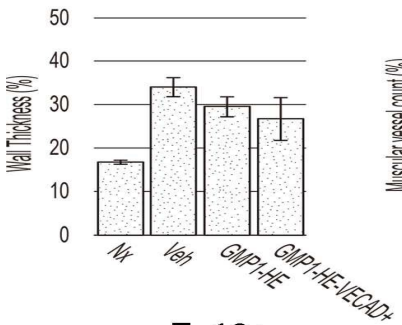
도 18c



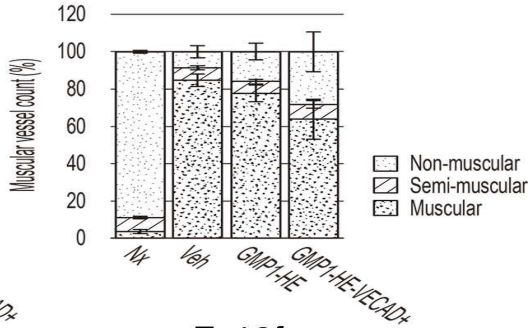
도 18d



도 18e

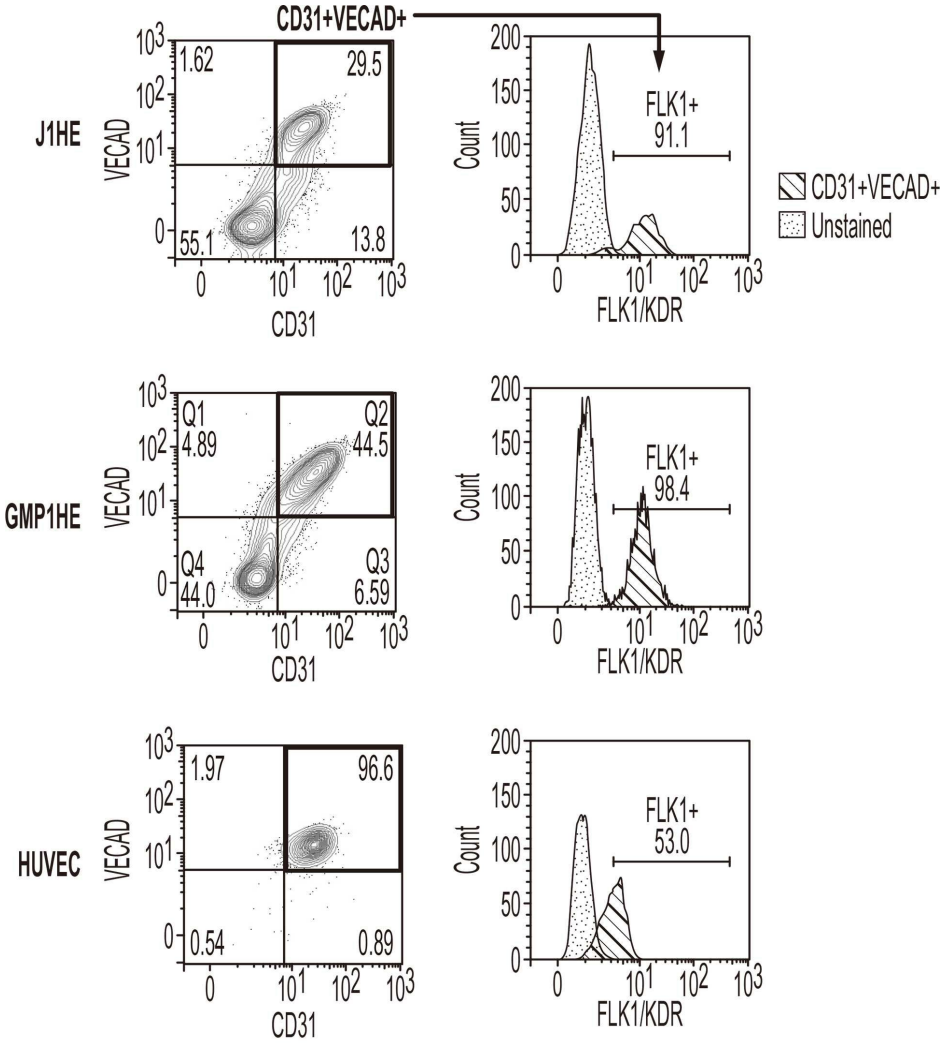


도 18e



도 18f

도면19



	CD31+VECAD+FLK1+
J1HE	26.8%
GMP1HE	43.8%
HUVEC	51.2%