



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년09월19일  
(11) 등록번호 10-1900507  
(24) 등록일자 2018년09월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 5/074 (2010.01) A61K 35/545 (2014.01)  
G01N 33/50 (2017.01)  
(21) 출원번호 10-2012-7024595  
(22) 출원일자(국제) 2011년02월23일  
심사청구일자 2016년01월29일  
(85) 번역문제출일자 2012년09월20일  
(65) 공개번호 10-2013-0001249  
(43) 공개일자 2013년01월03일  
(86) 국제출원번호 PCT/US2011/025846  
(87) 국제공개번호 WO 2011/106365  
국제공개일자 2011년09월01일  
(30) 우선권주장  
61/308,103 2010년02월25일 미국(US)  
(56) 선행기술조사문헌  
JP2008044965 A\*  
Osteoarthritis Cartilage. 12(9):683-91  
(2004.09.)\*  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
에이비티 홀딩 컴퍼니  
미국 44115 오하이오주 클리블랜드 카네기 애비뉴  
3201  
(72) 발명자  
우다 줄리아나 메간  
미국 오하이오주 44120 웨이커 하이츠 온어웨이  
로드 3193  
팅 안토니 이.  
미국 오하이오주 44122 웨이커 하이츠 페튼웨이  
로드 18019  
레만 니콜라스 에이.  
미국 오하이오주 44139 솔론 페티본 로드 35510  
(74) 대리인  
김진희

전체 청구항 수 : 총 14 항

심사관 : 유성전

(54) 발명의 명칭 혈관신생의 조절

(57) 요약

본 발명은 혈관신생의 제공에 의해 개선될 수 있는 병적 상태의 치료 방법을 제공한다. 일반적으로 본 발명은 하나 이상의 혈관신생 촉진 인자를 발현하고/하거나 분비하는 세포의 투여에 의한 혈관신생의 제공에 관한 것이다. 또한 본 발명은 세포가 하나 이상의 혈관신생 촉진 인자를 발현하고/하거나 분비하는 능력을 조절하는 제제에 대하여 스크리닝하는 약물 발견 방법에 관한 것이다. 또한 본 발명은 대상체에 투여하기 위한 세포를 제공하는 데 사용될 수 있는 세포 은행에 관한 것이며, 이 은행은 하나 이상의 혈관신생 촉진 인자의 요망되는 발현 및/또는 분비 수준을 갖는 세포를 포함한다.

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

삭제

#### 청구항 2

삭제

#### 청구항 3

삭제

#### 청구항 4

삭제

#### 청구항 5

삭제

#### 청구항 6

대상체에게 혈관신생을 제공하기 위한 세포 은행을 구축하는 방법으로서, VEGF, IL-8 및 CXCL5를 발현 및/또는 분비하는 세포를 필요로 하는 대상체로의 미래 투여용으로 확장하고 보관하는 단계를 포함하고, 상기 세포는 비배아 줄기 및 비생식 세포로서, oct4, 텔로머라아제, rex-1, 또는 rox-1 중 하나 이상을 발현하고/하거나 내배엽, 외배엽, 및 중배엽 중 2 이상의 세포 유형으로 분화될 수 있고, 상기 세포는 VEGF, IL-8 및 CXCL5의 발현 및/또는 분비에 대해 분석되는 것인 구축 방법.

#### 청구항 7

삭제

#### 청구항 8

대상체에게 혈관신생을 제공하기 위한 약물 발견 방법으로서, VEGF, IL-8 및 CXCL5를 발현 및/또는 분비하는 세포를 제제(agent)에 노출시켜 VEGF, IL-8 및 CXCL5를 발현 및/또는 분비하는 세포의 능력에 대한 제제의 영향을 평가하는 단계를 포함하고, 상기 세포는 비배아 줄기 및 비생식 세포로서, oct4, 텔로머라아제, rex-1, 또는 rox-1 중 하나 이상을 발현하고/하거나 내배엽, 외배엽, 및 중배엽 중 2 이상의 세포 유형으로 분화될 수 있고, 상기 세포는 VEGF, IL-8 및 CXCL5의 발현 및/또는 분비에 대해 분석되는 것인 약물 발견 방법.

#### 청구항 9

삭제

#### 청구항 10

삭제

#### 청구항 11

대상체에게 혈관신생을 제공하기 위해 세포에서 VEGF, IL-8 및 CXCL5의 발현을 증가시키는 시험관내 방법으로서, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , 및 IFN $\gamma$ 의 조합, 또는 프로스타글란딘 F 유사체의 조합에 세포를 노출시키는 단계를 포함하고, 상기 세포는 비배아 줄기 및 비생식 세포로서, oct4, 텔로머라아제, rex-1, 또는 rox-1 중 하나 이상을 발현하고/하거나 내배엽, 외배엽, 및 중배엽 중 2 이상의 세포 유형으로 분화될 수 있는 것인 시험관내 방법.

#### 청구항 12

제11항에 있어서, 프로스타글란딘 F 유사체는 라타노프로스트인 방법.

#### 청구항 13

대상체에게 혈관신생을 제공하기 위한 세포를 선발하기 위한 시험관내 방법으로서, 상기 방법은 VEGF, IL-8 및 CXCL5의 발현 및/또는 분비에 대해 세포를 분석하는 단계를 포함하고, 분석되는 세포는 비배아 줄기 및 비생식 세포로서, oct4, 텔로머라아제, rex-1, 또는 rox-1 중 하나 이상을 발현하고/하거나 내배엽, 외배엽, 및 중배엽 중 2 이상의 세포 유형으로 분화될 수 있는 것인 시험관내 방법.

#### 청구항 14

제6항, 제8항, 제11항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 골수에서 유래하는 것인 방법.

#### 청구항 15

제6항, 제8항, 제11항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 인간 세포인 방법.

#### 청구항 16

제6항, 제8항, 제11항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 텔로머라제를 발현하는 것인 방법.

#### 청구항 17

제6항, 제8항, 제11항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 oct4를 발현하는 것인 방법.

#### 청구항 18

제6항, 제8항, 제11항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 내배엽, 외배엽, 및 중배엽의 세포 유형으로 분화될 수 있는 것인 방법.

#### 청구항 19

제6항, 제8항, 제11항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 텔로머라제 및 oct4를 발현하는 것인 방법.

#### 청구항 20

제6항, 제8항, 제11항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 텔로머라제를 발현하고, 내배엽, 외배엽, 및 중배엽의 세포 유형으로 분화될 수 있는 것인 방법.

#### 청구항 21

제6항, 제8항, 제11항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 oct4를 발현하고, 내배엽, 외배엽, 및 중배엽의 세포 유형으로 분화될 수 있는 것인 방법.

#### 청구항 22

제6항, 제8항, 제11항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 텔로머라제 및 oct4를 발현하고, 내배엽, 외배엽, 및 중배엽의 세포 유형으로 분화될 수 있는 것인 방법.

### 발명의 설명

### 기술 분야

[0001]

본 발명은 혈관신생의 제공에 의해 개선될 수 있는 병적 상태의 치료 방법을 제공한다. 일반적으로 본 발명은 하나 이상의 혈관신생 촉진(pro-angiogenic) 인자를 발현하고/하거나 분비하는 세포의 투여에 의한 혈관신생의 제공에 관한 것이다. 또한 본 발명은 세포가 하나 이상의 혈관신생 촉진 인자를 발현하고/하거나 분비하는 능력을 조절하는 제제(agent)에 대하여 스크리닝하는 약물 발견 방법에 관한 것이다. 또한 본 발명은 대상체에 투여하기 위한 세포를 제공하는 데 사용될 수 있는 세포 은행에 관한 것이며, 이 은행은 하나 이상의 혈관신생 촉진

인자의 요망되는 발현 및/또는 분비 수준을 갖는 세포를 포함한다. 또한 본 발명은 하나 이상의 혈관신생 촉진 인자의 특정한 요망되는 발현 및/또는 분비 수준을 갖는 세포를 포함하는 조성물, 예컨대 약학 조성물에 관한 것이다. 또한 본 발명은 투여되는 세포의 요망되는 효능을 평가하는 분석법을 비롯하여, 치료할 대상체에 세포를 투여하기 이전에 행해지는 진단 방법에 관한 것이다. 추가로 본 발명은 치료할 대상체에 대한 세포의 영향을 평가하는 치료 후 진단 분석법에 관한 것이다. 세포는 형질전환되지 않고서, 하기 중 하나 이상을 특징으로 할 수 있는 비배아 줄기(non-embryonic stem), 비생식(non-germ) 세포이다: 배양 중 장기간 복제 및 장기간 복제의 발현 마커, 예컨대 텔로머라아제, 만능성의 마커, 및 광범위한 분화 잠재성.

## 발명의 내용

## 해결하려는 과제

## 과제의 해결 수단

- [0002] 발명의 개요
- [0003] 본 발명은 대략적으로 혈관신생의 제공 방법에 관한 것이다.
- [0004] 또한 본 발명은 혈관신생을 제공하기 위하여 하나 이상의 혈관신생 촉진 인자를 제공하는 방법에 관한 것이다.
- [0005] 혈관신생 촉진 인자는 FGF, VEGF, VEGFR, NRP-1, Ang1, Ang2, PDGF (BB-호모이량체(homodimer)), PDGFR, TGF- $\beta$ , 엔도글린, TGF- $\beta$  수용체, MCP-1, 인테그린  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_5\beta_1$ , VE-카드헤린(Cadherin), CD31, 에프린, 플라스미노겐 활성화자, 플라스미노겐 활성화자 억제자-1, eNOS, COX-2, AC133, Id1/Id3, 안지오게닌(Angiogenin), HGF, Vegf, Il-1 알파, Il-8, Il-6, Cxcl5, Fgf  $\alpha$ , Fgf  $\beta$ , Tgf  $\alpha$ , Tgf  $\beta$ , MMP (mmp9을 포함함), 플라스미노겐 활성화자 억제자-1, 트롬보스폰딘(Thrombospondin), 안지오포이에틴(Angiopoietin) 1, 안지오포이에틴 2, 암피레굴린(Amphiregulin), 렙틴(Leptin), 엔도텔린(Endothelin)-1, AAMP, AGGF1, AMOT, ANGLPTL3, ANGPTL4, BTG1, IL-1 $\beta$ , NOS3, TNFSF12, 및 VASH2를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0006] 본 발명에 따르면, 혈관신생의 제공은 하나 이상의 혈관신생 촉진 인자를 자연적으로(즉, 비재조합적으로(non-recombinantly)) 발현하고/하거나 분비하는 세포 또는 그 세포에 의해 조건(conditioned) 배지를 투여함으로써 달성될 수 있다. 세포는 배아 줄기 세포의 일부 특성을 갖지만 비배아 조직으로부터 유래되며, 하나 이상의 혈관신생 촉진 인자를 발현하고/하거나 분비하는, 배아 줄기 세포가 아닌 그리고 생식 세포가 아닌 세포를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 세포는 하나 이상의 혈관신생 촉진 인자를 자연적으로 발현/분비할 수 있다(즉, 발현 및/또는 분비가 활성화되도록 유전적으로 또는 약학적으로 변형되지 않음). 그러나, 천연 발현자는 효능이 증가되도록 유전적으로 또는 약학적으로 변형될 수 있다.
- [0007] 본 세포는 만능성 마커, 예컨대 oct4를 발현할 수 있다. 본 세포는 텔로머라아제와 같이 장기간 복제 능력과 결부된 마커를 또한 발현할 수 있다. 만능성의 다른 특성은 외배엽, 내배엽 및 중배엽성 배아 배엽(embryonic germ layers) 중 2가지 또는 3가지와 같이 1개 초과 배엽의 세포 유형으로 분화하는 능력을 포함할 수 있다. 그러한 세포는 배양 중 불사화 또는 형질전환될 수도 있고 그렇지 않을 수도 있다. 본 세포는 형질전환되지 않고서 고도로 확장될 수 있으며, 또한 정상 핵형을 유지할 수 있다. 예를 들어, 일 실시양태에서, 비배아 줄기, 비생식 세포는 배양 중 적어도 10-40회의 세포 배증, 예컨대 50회, 60회 또는 그보다 더 많은 세포 배증을 겪을 수 있으며, 여기서 세포는 형질전환되지 않고, 정상 핵형을 갖는다. 세포는 내배엽, 외배엽 및 중배엽 배아 계통(lineages) 중 2가지의 각각의 적어도 하나의 세포 유형으로 분화될 수 있으며, 3가지 모두로의 분화를 포함할 수 있다. 또한, 본 세포는 종양발생성이지 않을 수 있으며, 예컨대 기형종을 생성하지 않을 수 있다. 세포가 형질전환되거나 종양발생성이며, 이를 주입용으로 사용하는 것이 바람직할 경우, 그러한 세포는 사용불가능하게 될 수도 있어서 상기 세포는 종양으로의 세포 분화를 방지하는 처리에 의한 것과 같이 생체 내에서 종양을 형성할 수 없게 된다. 그러한 처리는 당업계에 공지되어 있다.
- [0008] 세포는 하기의 번호를 매긴 실시양태를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다:
- [0009] 1. 배양 중 적어도 10-40회의 세포 배증을 겪었으며, oct4를 발현하고, 형질전환되지 않으며, 정상 핵형을 갖는, 단리된 확장 비배아 줄기, 배생식 세포.
- [0010] 2. 텔로머라아제, rex-1, rox-1, 또는 sox-2 중 하나 이상을 추가로 발현하는 상기 1의 비배아 줄기, 비생식 세

포.

- [0011] 3. 내배엽, 외배엽 및 중배엽 배아 계통 중 적어도 2가지의 적어도 하나의 세포 유형으로 분화될 수 있는 상기 1의 비배아 줄기, 비생식 세포.
- [0012] 4. 텔로머라아제, rex-1, rox-1, 또는 sox-2 중 하나 이상을 추가로 발현하는 상기 3의 비배아 줄기, 비생식 세포.
- [0013] 5. 내배엽, 외배엽 및 중배엽 배아 계통 각각의 적어도 하나의 세포 유형으로 분화될 수 있는 상기 3의 비배아 줄기, 비생식 세포.
- [0014] 6. 텔로머라아제, rex-1, rox-1, 또는 sox-2 중 하나 이상을 추가로 발현하는 상기 5의 비배아 줄기, 비생식 세포.
- [0015] 7. 비배아, 비생식 조직의 배양에 의해 수득되며, 배양 중 40회 이상의 세포 배증을 겪었고, 형질전환되지 않으며, 정상 핵형을 갖는, 단리된 확장 비배아 줄기, 비생식 세포.
- [0016] 8. oct4, 텔로머라아제, rex-1, rox-1, 또는 sox-2 중 하나 이상을 발현하는 상기 7의 비배아 줄기, 비생식 세포.
- [0017] 9. 내배엽, 외배엽 및 중배엽 배아 계통 중 적어도 2가지의 적어도 하나의 세포 유형으로 분화될 수 있는 상기 7의 비배아 줄기, 비생식 세포.
- [0018] 10. oct4, 텔로머라아제, rex-1, rox-1, 또는 sox-2 중 하나 이상을 발현하는 상기 9의 비배아 줄기, 비생식 세포.
- [0019] 11. 내배엽, 외배엽 및 중배엽 배아 계통 각각의 적어도 하나의 세포 유형으로 분화될 수 있는 상기 9의 비배아 줄기, 비생식 세포.
- [0020] 12. oct4, 텔로머라아제, rex-1, rox-1, 또는 sox-2 중 하나 이상을 발현하는 상기 11의 비배아 줄기, 비생식 세포.
- [0021] 13. 배양 중 적어도 10-40회의 세포 배증을 겪었으며, 텔로머라아제를 발현하고, 형질전환되지 않으며, 정상 핵형을 갖는 단리된 확장 비배아 줄기, 비생식 세포.
- [0022] 14. oct4, rex-1, rox-1, 또는 sox-2 중 하나 이상을 추가로 발현하는 상기 13의 비배아 줄기, 비생식 세포.
- [0023] 15. 내배엽, 외배엽, 및 중배엽 배아 계통 중 적어도 2가지의 적어도 하나의 세포 유형으로 분화될 수 있는 상기 13의 비배아 줄기, 비생식 세포.
- [0024] 16. oct4, rex-1, rox-1, 또는 sox-2 중 하나 이상을 추가로 발현하는 상기 15의 비배아 줄기, 비생식 세포.
- [0025] 17. 내배엽, 외배엽, 및 중배엽 배아 계통 각각의 적어도 하나의 세포 유형으로 분화될 수 있는 상기 15의 비배아 줄기, 비생식 세포.
- [0026] 18. oct4, rex-1, rox-1, 또는 sox-2 중 하나 이상을 추가로 발현하는 상기 17의 비배아 줄기, 비생식 세포.
- [0027] 19. 내배엽, 외배엽, 및 중배엽 배아 계통 중 적어도 2가지의 적어도 하나의 세포 유형으로 분화될 수 있으며, 배양 중 적어도 10-40회의 세포 배증을 겪은 단리된 확장 비배아 줄기, 비생식 세포.
- [0028] 20. oct4, 텔로머라아제, rex-1, rox-1, 또는 sox-2 중 하나 이상을 발현하는 상기 19의 비배아 줄기, 비생식 세포.
- [0029] 21. 내배엽, 외배엽, 및 중배엽 배아 계통 각각의 적어도 하나의 세포 유형으로 분화될 수 있는 상기 19의 비배아 줄기, 비생식 세포.
- [0030] 22. oct4, 텔로머라아제, rex-1, rox-1, 또는 sox-2 중 하나 이상을 발현하는 상기 21의 비배아 줄기, 비생식 세포.
- [0031] 일 실시양태에서, 대상체는 인간이다.
- [0032] 하나 이상의 혈관신생 촉진 인자를 발현하고/하거나 분비하는 세포를 약물 발견 방법에서 사용하여, 하나 이상의 혈관신생 촉진 인자를 발현하고/하거나 분비하는 세포의 능력을 조절하여 혈관신생을 제공할 수 있는 제제에 대하여 스크리닝할 수 있다. 그러한 제제는 작은 유기 분자, 안티센스 핵산, siRNA, DNA 압타머(aptamer), 펩티

드, 항체, 비항체 단백질, 사이토카인, 케모카인 및 화학 유인 물질을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0033] 예시된 특정 실시양태에서, 효능은 세포를  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ , 및  $\text{IFN-}\gamma$ 의 조합에 노출시킴으로써 향상된다. 다른 실시양태에서, 이들 성분들 중 임의의 것을 개별적으로 사용할 수 있다. 추가의 실시양태에서, 다른 전염증성 분자가 사용될 수 있으며, 이는 다른 인터류킨 또는 인터페론, 예컨대  $\text{IL-1}\alpha$ ,  $\text{IL-6}$ ,  $\text{TGF-}\beta$ ,  $\text{GM-CSF}$ ,  $\text{IL11}$ ,  $\text{IL12}$ ,  $\text{IL17}$ ,  $\text{IL18}$ ,  $\text{IL8}$ , LPS를 포함하는  $\text{toll}$ -유사 수용체 리간드, 폴리(1:C), CPGN-ODN, 및 자이모산을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 또 다른 예시적인 특정 실시양태에서, 효능은 세포를 프로스타글란딘 F 유사체인 라타노프로스트에 노출시킴으로써 향상된다. 또 다른 실시양태에서, 세포는 프로스타글란딘 F, 임의의 다른 프로스타글란딘 F2 알파 수용체 유사체, E-타입 프로스타글란딘 또는 유사체에 노출될 수 있다.

[0034] 본 출원에 기재된 혈관신생 효과는 분비 인자에 의해 야기될 수 있기 때문에, 세포뿐만 아니라 세포 배양에 의해 생성된 조건 배지 (또는 이의 추출물)도 이 효과를 달성하는 데 유용하다. 그러한 배지는 분비 인자를 함유하며, 따라서 세포 대신 사용되거나 또는 세포에 첨가될 수 있다. 그래서, 세포가 사용될 수 있을 경우, 조건 배지 (또는 이의 추출물)가 또한 효과적이며 이는 치환되거나 또는 첨가될 수 있음이 이해되어야 한다.

[0035] 혈관신생 효과를 달성하기 위한 세포의 특성 측면에서, 혈관신생을 제공하도록 하나 이상의 혈관신생 촉진 인자를 발현 및 분비하는 요망되는 효능을 갖는 것에 대해 선발된 세포를 함유하는 세포 은행을 확립할 수 있다. 따라서, 본 발명은 하나 이상의 혈관신생 촉진 인자를 발현하고/하거나 분비하는 능력에 대하여 세포를 분석하고, 요망되는 효능을 갖는 세포를 은행화하는 것을 포함한다. 은행은 대상체에 투여하기 위한 약학 조성물 제조용 공급원을 제공할 수 있다. 세포는 은행으로부터 직접적으로 사용되거나 또는 확장된 후 사용될 수 있다. 특히 세포를 추가로 확장시키는 경우에, 확장 후 세포는 여전히 요망되는 효능을 가지는 것에 대해 검증하는 것이 바람직하다. 은행은 대상체에 대하여 동종(allogeneic)인 세포를 "당장(off the shelf)" 사용할 수 있게 한다.

[0036] 따라서, 본 발명은 또한 세포를 대상체에 투여하기 이전에 행해지는 진단 절차에 관한 것이다. 이 절차는 혈관신생을 제공할 수 있도록 하나 이상의 혈관신생 촉진 인자를 발현하고/하거나 분비하는 세포의 효능을 평가하는 것을 포함한다. 세포는 세포 은행으로부터 취하여 직접적으로 사용하거나 또는 확장시킨 후 투여할 수 있다. 어느 경우이나, 세포는 요망되는 효능에 대하여 평가될 수 있다. 특히, 세포가 추가로 확장되는 경우에, 확장 후 세포가 여전히 요망되는 효능을 가지는 것에 대해 검증하는 것이 바람직하다. 또는, 상기 세포는 대상체로부터 유래되고 확장된 후 투여될 수 있다. 이 경우, 또한 세포는 (자가) 대상체에 다시 투여되기 전에 요망되는 효능에 대하여 평가될 수 있다.

[0037] 하나 이상의 혈관신생 촉진 인자의 발현에 대하여 선발되는 세포는 선발 절차 동안 반드시 분석되지만, 세포가 여전히 요망되는 수준의 상기 인자를 발현하는지를 확인하기 위하여 처리를 위한 대상체로의 투여 이전에 세포를 다시 분석하는 것이 바람직하고 신중할 수 있다. 이는 발현자 세포가 확장되었거나, 또는 세포가 보관 동안 냉동될 가능성이 가장 큰 세포 은행에서와 같이 긴 시간 보관되었을 경우 특히 바람직하다.

[0038] 하나 이상의 혈관신생 촉진 인자를 발현/분비하는 세포를 이용한 치료 방법과 관련하여, 세포의 원래의 단리와 대상체로의 투여 사이에는 인자(들) 발현에 대한 다수의(즉, 순차적인) 분석이 있을 수 있다. 이는 이러한 시간들 내에서 일어나는 조작 후 세포가 하나 이상의 혈관신생 촉진 인자를 여전히 발현/분비하는지를 확인하기 위한 것이다. 예를 들어, 분석은 세포의 각각의 확장 후 수행될 수 있다. 세포가 세포 은행에 보관될 경우, 세포는 보관으로부터 해체된 후 분석될 수 있다. 세포가 냉동될 경우, 세포는 해동 후 분석될 수 있다. 세포 은행으로부터의 세포가 확장될 경우, 세포는 확장 후 분석될 수 있다. 바람직하게는, 최종 세포 생성물(즉, 대상체에 물리적으로 투여되는 세포 조제물)의 일부분이 분석될 수 있다.

[0039] 본 발명은 추가로, 효능을 평가하기 위하여 세포의 투여 이후의 처리 후 진단 분석을 포함한다. 진단 분석은 임상 증상에 의해, 형태적으로(예를 들어, 맥관의 존재) 또는 하나 이상의 혈관신생 바이오마커에 의해 혈관신생을 분석하는 것을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0040] 또한 본 발명은 혈관신생을 제공하도록 하나 이상의 혈관신생 촉진 인자를 발현하고/하거나 분비하는 세포의 효능을 평가함으로써 세포의 투여량을 확립하는 방법에 관한 것이다. 이 경우, 효능이 결정되며 그에 따라 투여량이 조절된다.

[0041] 효능은 인자들 그 자신의 양의 측정에 의해 평가될 수 있다. 또한 이것은 생체 내 또는 시험관 내 혈관신생과 같이, 인자가 제공하는 효과를 분석함으로써 평가될 수 있다.

[0042] 또한 본 발명은 요망되는 효능, 특히 요망되는 양의 하나 이상의 혈관신생 촉진 인자의 발현 및/또는 분비를 갖



는 세포의 집단을 포함하는 조성물에 관한 것이다. 그러한 집단은 대상체에 투여하는 것에 적합한 약학 조성물로서 및/또는 세포가 대상체로의 투여를 위하여 직접적으로 사용되거나 또는 확장된 후 투여될 수 있는 세포 은행 형태로 발견될 수 있다. 일 실시양태에서, 세포는 이전의(모(parent)) 세포 집단과 비교하여 향상된(증가된) 효능을 갖는다. 모 세포는 본원에 정의된 바와 같다. 향상은 천연 발현자의 선발에 의하거나 또는 세포 상에 작용하는 외부 인자에 의한 것일 수 있다.

[0043] 본 발명의 방법 및 조성물은 혈관신생이 유익한 임의의 질환의 치료에 유용하다. 이는 임의의 허혈성 병태, 예를 들어 급성 심근 경색, 만성 심부전, 말초 혈관 질환, 뇌졸중, 만성 완전 폐쇄증, 신허혈 및 급성 신장 손상을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0044] 이러한 치료에 있어서, 하나 이상의 혈관신생 촉진 인자를 발현하는 세포를 투여한다. 그러한 세포는 그가 발현하고/하거나 분비하는 인자(들)의 양에 대하여 평가되고 요망되는 양의 인자(들) 발현 및/또는 분비에 대하여 선별되었을 수 있다.

[0045] 상기 질환들 중 임의의 질환의 치료에 있어서, 그러한 세포, 즉, 병태의 치료를 위한 투여 이전에 인자(들)의 발현 및/또는 분비에 대하여 평가되고 요망되는 수준의 발현 및/또는 분비에 대하여 선별되어진 세포를 사용하는 것이 적절할 수 있는 것으로 이해된다.

### 도면의 간단한 설명

[0046] 도 1 - 멀티스템(MultiStem)은 시험관 내에서 혈관신생을 유도하며, 다수의 혈관신생 촉진 인자를 분비한다. (A) 배양된 HUVEC를 포함하는 멀티스템 조건 배지(conditioned media, CM)에 의해 유도되는 시험관 내 혈관신생의 사진. (B) 각각의 조건에서 시야당 형성되는 관의 평균 수. (C) 멀티스템 4일 조건 배지와 함께 인큐베이션된 혈관신생 항체 어레이(array). VEGF, IL-8 및 CXCL5가 멀티스템에 의해 분비된다. 4가지의 별도의 배양물로부터의 3일 보낸 배지 중 CXCL5 (D) VEGF (E) 및 IL-8 (F) 단백질 농도는 멀티스템이 표준 배양 조건 하에서 이들 단백질을 일관되게 발현함을 예시한다.

도 2 - VEGF는 멀티스템 유도 혈관신생에 필요하다. 조건 배지로부터의 VEGF의 제거는 IL-8(B) 및 CXCL5(C) 수준에 영향을 주지 않으면서 혈관신생(A) 완전 VEGF 면역불능(immunodepletion) 및 항체 특이성을 방지한다. (D, E) VEGF의 면역불능은 멀티스템 조건 배지에 의해 유도되는 혈관신생을 감소시킨다. 적어도 250 pg/ml의 VEGF165 또는 50 pg/ml의 VEGF121의 첨가가, 활성을 완전히 회복시키는 것은 아니지만 약간의 혈관신생 수준의 회복에 필요하다.

도 3 - IL-8은 필요한 멀티스템 유도 혈관신생이다. 조건 배지로부터의 IL-8의 면역불능은 혈관신생을 감소시켰지만, 기본 배지에의 IL-8의 첨가는 혈관신생을 유도하기에는 불충분하였다. (A) HUVEC를 (a) 내피 성장 인자 배지(endothelial growth factor media; EGM), (b) 무혈청 기본 멀티스템 배지, (c) 4-일, 무혈청 멀티스템 CM, (d) 토끼 IgG 이소타입 대조군, 및 (e) IL-8의 면역불능화 4일 무혈청 멀티스템 CM과 함께 18시간 동안 인큐베이션시켰다. (B) IL-8은 면역불능에 의해 감소되며(C, D) VEGF 및 CXCL5 수준은 변화되지 않았다.

도 4 - CXCL5는 멀티스템 유도 혈관신생에 필요하다. 그러나, IL-8 및 CXCL5는 혈관신생 개시에 불충분하다. (A) HUVEC를 (a) 내피 성장 인자 배지(EGM), (b) EGM + IgG 이소타입 대조군, (c) EGM + 10 µg/ml의 CXCL5 중화 항체, (d) 무혈청 기본 멀티스템 배지, (e) 4일, 무혈청 멀티스템 조건 배지 단독(CM), (f) CM + IgG 이소타입 대조군, (g) CM + CXCL5 중화 항체 (10 µg/ml)와 함께 18시간 동안 인큐베이션하였다. (B,C) 멀티스템 기본 배지에 IL-8 (4000 pg/ml) 또는 CXCL5 (150 pg/ml)을 단독으로 또는 함께 첨가하는 것은 혈관신생 유도에 불충분하였다.

도 5 - 멀티스템과는 달리, MSC는 시험관 내에서 혈관신생을 유도하지 않는다. (A) 내피 세포 관 형성에 대한 MSC 및 멀티스템 조건 배지(CM)의 영향에 있어서의 차이를 예시하는 시험관 내 혈관신생 분석 (B). 6시간 및 24 시간 후 내피 세포 관 형성에 대한 MSC 및 멀티스템 CM의 영향을 보여주는 시험관 내 혈관신생 분석으로부터의 사진. (C-E) MSC 및 멀티스템에 의해 분비되는 CXCL5, VEGF, 및 IL-8의 농도.

도 6 - 멀티스템 및 MSC는 특유한 분비 프로필을 갖는다. 혈관신생 특이적 항체 어레이에서의 동일한 공여체(3가지의 공여체 샘플 세트를 분석함)로부터 유래된 멀티스템 및 MSC로부터의 조건 배지의 분석. (A) 현상된 막의 사진은 멀티스템의 분비 프로필이 다른 공여체로부터의 멀티스템과 유사함을 예시하지만, 심지어 동일한 공여체로부터의 MSC의 분비 프로필과 비교할 때 유의한 차이를 보여준다. (B) 멀티스템에 의한 IL-8의 배타적인 발현을 포함하는, MSC 대 멀티스템의 특유한 분비 프로필을 보여주는 어레이의 반정량적 분석. 데이터는 양

성 대조군의 퍼센트로서의 평균 스폿 강도로 표현되는데, 이는 다시 전체 단백질 함량에 대하여 정규화된다.

도 7 - 사이토믹스(Cytomix)를 이용한 멀티스텝의 처리는 시험관 내에서 혈관신생 촉진 분자의 발현을 증가시킨다. 멀티스텝을 3일 동안 성장시키고, 그 후 사이토믹스(10 ng/mL의 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IFN $\gamma$ )로 24, 48, 72시간 동안 처리하였다. 후속적으로 세포를 혈관신생 촉진 유전자 발현에 대한 RT-PCR 분석용으로 수집하였다. CXCL5, FGF2 및 HGF 유전자 발현은 사이토믹스 처리에 의해 모두 기저선보다 많이 증가하였다. 부가적으로, IL-8도 이들 조건에서 증가한다.

도 8 - 마이크로어레이 분석은 사이토믹스로 처리된(48시간) 멀티스텝에서 혈관신생 유전자의 발현의 상향조절을 또한 보여준다. 본 도면은 조절되는 혈관신생 인자의 샘플을 보여준다. 마이크로어레이 분석은 사이토믹스로 6 또는 48시간 동안 처리된 멀티스텝에서의 혈관신생 촉진 인자의 증가를 보여준다. 사이토믹스로 처리된 멀티스텝(시점당 n=6) 또는 미처리 멀티스텝(시점당 n=6)으로부터의 RNA를 일루미나(Illumina) 마이크로어레이 칩(HumanHT-12\_V4)에서 분석하였다. 두 멀티스텝 은행을 조사하였다. 이 도면은 상향조절되는 혈관신생 촉진 유전자의 샘플에 있어서의 증가 배수의 예를 제공한다. qPCR에 의한 추가의 확인이 필요하며, 이는 현재 진행 중에 있다.

도 9 - 사이토믹스 처리는 HUVEC 관 형성 분석에서 멀티스텝의 혈관신생 잠재력을 증가시킨다. 본 도면은 혈관신생 스코어링을 보여준다. 사이토믹스를 이용한 멀티스텝의 처리는 HUVEC 관 형성 분석에서 혈관신생을 증가시킨다. 3일 후 세포로부터 수집된 무혈청 조건 배지는 미처리 멀티스텝으로부터의 조건 배지가 강한 HUVEC 관 형성을 제공하였지만, 사이토믹스로 세포를 처리하면 혈관신생 잠재력을 증가시켰음을 보여준다. 론자(Lonza) MSC로부터의 무혈청 조건 배지는 유의한 HUVEC 관 형성을 유도하지 못하였다. MSC의 처리는 혈관신생 잠재력을 단지 약간 증가시켰다. EGM= 내피 성장 배지(양성 대조군). EBM= 무혈청 기본 내피용 배지(음성 대조군).

도 10a 내지 10c - 프로스타글란딘 F 또는 라타노프로스트(프로스타글란딘 F 작용제)를 이용한 멀티스텝의 전처리 시험관 내에서 멀티스텝에 의한 혈관신생 인자의 발현을 증가시킨다. 프로스타글란딘 F 유사체, 라타노프로스트를 이용한 멀티스텝의 처리는 또한 혈관신생 촉진 인자의 발현을 증가시켰다. 멀티스텝을 소정 용량 범위의 라타노프로스트로 24, 48 또는 72시간 동안 처리하였다. 그 후 혈관신생 촉진 인자의 유전자 발현을 RT-PCR에 의해 분석하였다. KITLG (A), HGF 및 VEGF (B), 및 I1-8 (C)의 발현이 모두 증가되었다. 생물학적 프로스타글란딘 F는 또한 VEGF A 수준을 증가시켰다(B).

도 11 - 라타노프로스트(1  $\mu$ M) 처리된 멀티스텝의 혈관신생 잠재력을 테스트하기 위한 HUVEC 관 형성 분석. HUVEC 튜브 형성은 미처리 세포로부터의 조건 배지와 비교하여 라타노프로스트 처리 세포로부터의 조건 배지에 의해 보통 정도로 증가하였다. 무혈청 배지는 라타노프로스트(1  $\mu$ M)의 존재 하에 또는 단독으로 배양한 멀티스텝으로부터 3일째에 수집하였다. 기본 배지 또는 라타노프로스트를 첨가한 기본 배지는 유의한 관 형성을 유도하지 못하였다. 이와는 대조적으로, 미처리 세포 단독으로부터의 조건 배지 또는 수집 후 상기 배지에 라타노프로스트(1  $\mu$ M)를 첨가한 것은 혈관신생을 동일한 수준으로 유도하였다. 3일 동안 라타노프로스트로 처리된 세포로부터 수집된 무혈청 조건 배지는, 이러한 시험관 내 분석에 의해 측정할 때 혈관신생 잠재력을 보통 정도로 증가시켰다. EGM 및 혈청 함유 멀티스텝 배지는 양성 대조군으로서의 역할을 하였다. EBM 및 기본 무혈청 배지는 음성 대조군이었다.

도 12 - 시험관 내 혈관신생 분석을 이용하여 상이한 세포 로트들의 효능 및 프로세싱 프로토콜을 조사할 수 있다. HUVEC 관 형성 분석의 이용에 의한 혈관신생 효능의 측정을 이용하여 상이한 세포 로트들 (해동 a-f) 또는 조절 상이한 프로세싱 (해동-f 대 24시간 A-F)으로부터의 세포의 기능적 효능을 평가할 수 있다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0047] 본 발명은 본원에 기술된 특정 방법, 프로토콜 및 시약 등에 한정되지 않으며, 따라서 변화될 수 있음이 이해되어야 한다. 본원에 사용되는 용어는 단지 특정 실시를 기술하기 위한 것이며, 단지 특허청구범위에 의해 규정되는 개시된 본 발명의 범주를 한정하고자 하는 것이 아니다.
- [0048] 본원에서 섹션의 표제는 조직 목적만을 위하여 사용되며, 어떠한 방식으로든 기술된 주제를 한정하는 것으로 해석되어서는 안된다.
- [0049] 일반적으로 본 출원의 방법 및 기술은 달리 나타내지 않으면 본 명세서 전체에 걸쳐 인용되고 논의되는 다양한 일반적인 그리고 더욱 특정한 참고문헌에 기술된 바와 같이 그리고 당업계에 공지된 통상적인 방법에 따라 수행된다. 예를 들어, 문헌[Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring



Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001)] 및 문헌[Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates (1992)], 및 문헌[Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990)]을 참조한다.

[0050] 정의

[0051] 본원에서 단수형("a" 또는 "an")은 하나 또는 하나 초과; 적어도 하나를 의미한다. 복수형이 본원에서 사용될 경우, 이것은 일반적으로 단수형을 포함한다.

[0052] "세포 은행"은 미래에 사용하기 위하여 성장시켜서 보관한 세포의 공업적 명칭이다. 세포는 분취물로 보관될 수 있다. 세포는 보관물로부터 직접적으로 사용될 수 있거나 또는 보관 후 확장될 수도 있다. 이는 편리하여서 투여에 이용가능한 "당장 사용될 수 있는" 세포가 존재하게 된다. 세포는 약학적으로 허용되는 부형제 중에 보관된 것일 수 있어서 세포는 직접적으로 투여될 수 있거나 또는 세포는 세포가 보관으로부터 해제될 때 적절한 부형제와 혼합될 수 있다. 세포는 냉동되거나 또는 다르게는 생육성을 보존하는 형태로 보관될 수 있다. 본 발명의 일 실시양태에서, 세포가 하나 이상의 혈관신생 촉진 인자의 향상된 발현에 대하여 선발된 세포 은행이 생성된다. 보관으로부터의 해제 후, 그리고 대상체로의 투여 이전에, 세포를 효능, 즉, 하나 이상의 혈관신생 촉진 인자의 발현 수준에 대하여 다시 분석하는 것이 바람직할 수 있다. 이는 본 출원에 기술된 또는 다르게는 당업계에 공지된 직접적인 또는 간접적인 임의의 분석법을 이용하여 행해질 수 있다. 그 후, 요망되는 효능을 갖는 세포는 그 후 치료를 위하여 대상체에 투여될 수 있다. 은행은 치료될 개체로부터 유래된 (그의 출생전 조직, 예컨대 태반, 제대혈, 또는 제대 매트릭스 유래의 또는 출생 후 임의의 시점에서 개체로부터 확장시킨) 세포를 사용하여 만들어질 수 있다. 또는 은행은 동종(allogeneic) 용도를 위한 세포를 함유할 수 있다.

[0053] "동시 투여"는 2가지 이상의 제제의 동시 투여 또는 순차적 투여를 포함하여 서로와 함께, 함께, 대등하게 투여하는 것을 의미한다.

[0054] "포함하는"은 다른 한정 없이, 그 밖에 어떤 것이 포함될 수도 있다는 것에 대한 어떠한 자격 또는 배제도 없이, 지시 대상을 반드시 포함함을 의미한다. 예를 들어, "x 및 y를 포함하는 조성물"은 비록 다른 성분들이 조성물에 존재할 수도 있을지라도, x 및 y를 함유하는 임의의 조성물을 포함한다. 이와 마찬가지로, "x의 단계를 포함하는 방법"은, 비록 많은 단계가 존재할 수 있을지라도, 그리고 x가 그와 비교하여 간단하거나 또는 복잡할지라도, x가 그 방법에서 유일한 단계이든지 이것이 단계들 중의 유일한 하나이든지 간에, x가 실시되는 임의의 방법을 포함한다. "~로 이루어진" 및 "포함하다"라는 어근의 단어를 사용하는 유사한 어구는 본원에서 "포함하는"의 동의어로 사용되며, 이들은 동일한 의미를 갖는다.

[0055] "~로 이루어진"은 "포함하는"의 동의어이다 (상기 참조).

[0056] "세포 배양용 조건 배지"는 당업계에 공지된 용어이며, 세포가 성장된 배지를 나타낸다. 본원에서 이는 혈관 신생 제공 또는 하나 이상의 혈관신생 촉진 인자의 제공을 포함하는 본 출원에 기술된 임의의 결과의 달성에 효과적인 인자를 분비하기에 충분한 시간 동안 세포를 성장시킴을 의미한다.

[0057] 세포 배양용 조건 배지는 인자들을 배지 내로 분비하도록 세포가 배양된 배지를 나타낸다. 본 발명의 목적상, 세포는 유효량의 그러한 인자를 생성하여 배지가 혈관신생의 제공 또는 하나 이상의 혈관신생 촉진 인자의 제공을 포함하는 효과를 갖도록 충분한 횟수의 세포 분열을 통하여 성장시킬 수 있다. 세포는 당업계에 공지된 방법들 중 임의의 것에 의해 배지로부터 제거되는데, 상기 방법은 원심분리, 여과, 면역불능(예를 들어, 태그된 항체 및 자성 컬럼을 통하여), 및 FACS 분류를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0058] "EC 세포"는 기형암종으로 불리우는 유형의 암의 분석에 의해 발견되었다. 1964년에, 연구자들은 기형암종에서 단일 세포가 단리될 수 있으며 이는 배양 중 미분화된 채 남아있을 수 있음을 주목하였다. 이러한 유형의 줄기 세포는 배아 암종 세포(embryonic carcinoma cell; EC 세포)로 공지되게 되었다.

[0059] 일반적으로 "유효량"은 혈관신생 제공에서 생기는 요망되는 국소적 또는 전신적 효과를 제공하는 양을 의미한다. 예를 들어, 유효량은 유익한 또는 요망되는 임상 결과를 유발하기에 충분한 양이다. 유효량은 유효량을 단위 투여로 한꺼번에 또는 유효량을 여러 회의 투여로 제공하는 분할된 양으로 제공될 수 있다. 어떤 것이 유효량으로 간주될지에 대한 정확한 결정은 각각의 대상체에 대하여 개별적인 인자들을 기반으로 할 수 있는데, 이는 그의 크기, 연령, 손상, 및/또는 치료되는 질환 또는 손상, 및 그 손상이 일어났거나 또는 그 질환이 시작된 때로부터의 시간의 양을 포함한다. 당업계의 숙련자라면 당업계에서 일상적인 이들 고려사항을 기반으로 하여 주어진 대상체에 있어서의 유효량을 결정할 수 있을 것이다. 본원에서 사용될 때, 치료와 관련하여, "유효

용량"은 "유효량"과 동일한 것을 의미한다.

- [0060] "유효 경로"는 일반적으로 요망되는 구획, 시스템 또는 장소로의 제제의 전달을 제공하는 경로를 의미한다. 예를 들어, 유효 경로는 제제를 투여하여 요망되는 작용 부위에서 유익한 또는 요망되는 임상 결과를 유발하기에 충분한 양의 제제를 제공할 수 있는 것이다.
- [0061] "배아 줄기 세포(Embryonic Stem Cell; ESC)"는 당업계에 공지되어 있으며, 많은 상이한 포유류 종으로부터 준비되었다. 배아 줄기 세포는 배반포로 공지된 초기 단계 배아의 내세포괴로부터 유래되는 줄기 세포이다. 배아 줄기 세포는 원시 삼배엽: 외배엽, 내배엽 및 중배엽의 모든 유도체로 분화될 수 있다. 이는 성체에서 220가지 초과 세포 유형 각각을 포함한다. ES 세포는 태반을 배제하고서, 체내에서 임의의 조직이 될 수 있다. 단지 상실배 세포가 전능성이며, 이는 모든 조직 및 태반이 될 수 있다. ECS와 유사한 일부 세포는 체세포 핵을 핵제거 수정란 내로 핵전이시켜 생성될 수 있다.
- [0062] "포함하다"라는 용어의 사용은 한정적인 의도가 아니다.
- [0063] "증가하다" 또는 "증가하는"은 전적으로 생물학적 이벤트(event)를 유도하거나 또는 그 이벤트의 정도를 증가시키는 것을 의미한다.
- [0064] "유도된 만능성 줄기 세포(Induced pluripotent stem cell; iPSC 또는 IPS 세포)"는 예를 들어 덜 분화된 표현형을 체세포에 부여하는 외인성 유전자의 도입에 의해 재프로그래밍된 체세포이다. 그 후 이들 세포는 덜 분화된 자손으로 분화되도록 유도될 수 있다. IPS 세포는 원래 2006년에 발견된 접근법을 변형시킨 것을 사용하여 유래시켰다 (문헌[Yamanaka, S. et al., Cell Stem Cell, 1:39-49 (2007)]). 예를 들어, 일례에서, IPS 세포를 생성하기 위하여, 과학자들은 피부 세포로 출발하였으며, 상기 피부 세포는 그 후 세포 DNA 내로 유전자를 삽입하기 위하여 레트로바이러스를 사용하여 표준 실험실 기술에 의해 변형되었다. 일례에서, 삽입된 유전자는 세포를 배아 줄기 세포 유사 상태로 유지하는 천연 조절자로서 함께 작용하는 것으로 공지된 Oct4, Sox2, Lif4, 및 c-myc이었다. 이들 세포는 문헌에 기술되어 있다. 예를 들어, 문헌[Wernig et al., PNAS, 105:5856-5861 (2008)]; 문헌[Jaenisch et al., Cell, 132:567-582 (2008)]; 문헌[Hanna et al., Cell, 133:250-264 (2008)]; 및 문헌[Brambrink et al., Cell Stem Cell, 2: 151-159 (2008)]을 참조한다. 이들 참고문헌은 iPSC 및 그의 제조 방법의 교시를 위하여 참고로 포함된다. 그러한 세포는 특정 배양 조건(특정 제제에 노출)에 의해 생성될 수 있음이 또한 가능하다.
- [0065] "단리되다"라는 용어는 하나 이상의 세포 또는 그 세포와 결부된 하나 이상의 세포 성분 또는 생체 내 세포와 결부되지 않는 세포 또는 세포들을 나타낸다. "농축(enriched) 집단"은 생체 내에서 또는 일차 배양물에서 하나 이상의 다른 세포 유형에 비하여 요망되는 세포의 수가 상대적으로 증가함을 의미한다.
- [0066] 그러나, 본원에서 사용될 때, "단리되다"라는 용어는 단지 줄기 세포의 존재를 나타내는 것은 아니다. 오히려, "단리되다"라는 용어는 세포가 그의 천연 조직 환경으로부터 꺼내어져서 정상 조직 환경과 비교할 때 더 높은 농도로 존재함을 나타낸다. 따라서, "단리된" 세포 집단은 줄기 세포에 더하여 세포 유형들을 추가로 포함할 수 있으며, 추가의 조직 구성요소를 포함할 수 있다. 이는 또한 예를 들어 세포 배양의 건지에서 표현될 수 있다. 세포는 생체 내에서 또는 그의 원래 조직 환경에서(예를 들어, 골수, 말초 혈액, 태반, 제대, 제대혈, 지방 조직 등) 그의 원래 수와 비교할 때 농축되도록 시험관 내에서 또는 생체 외에서 10, 20, 30 또는 40회 또는 그보다 많은 배증을 겪었을 수 있다.
- [0067] "MAPC"는 "다능성 성체 선구 세포(multipotent adult progenitor cell)"의 두문자어이다. 이것은 배아 줄기 세포 또는 생식 세포가 아니지만 이들의 일부 특성을 갖는 세포를 나타낸다. MAPC는 다수의 대안적인 설명으로 특성화될 수 있으며, 이들 각각은 세포가 발견되었을 때 세포에 신규성을 부여하였다. 따라서, 이는 그러한 설명들 중 하나 이상에 의해 특성화될 수 있다. 첫째, 이는 형질전환(종양형성성) 없이 그리고 정상 핵형을 갖고서 배양 중 장기간 복제 능력을 갖는다. 둘째, 이는 분화시에 하나 초과 배엽, 예컨대 2가지의 또는 모든 세 배엽(즉, 내배엽, 중배엽 및 외배엽)의 세포 자손을 야기할 수 있다. 셋째, 이는 배아 줄기 세포 또는 생식 세포가 아니지만, 이는 이들 원시 세포 유형의 마커를 발현할 수 있어서 MAPC는 Oct 3/4(즉, Oct 3A), rex-1, 및 rox-1 중 하나 이상을 발현할 수 있다. 이는 또한 sox-2 및 SSEA-4 중 하나 이상을 발현할 수 있다. 넷째, 줄기 세포와 같이, 이는 자가 재생될 수 있으며, 즉, 형질전환 없이 장기간 복제 능력을 갖는다. 이는 이들 세포가 텔로머라아제를 발현함(즉, 텔로머라아제 활성을 가짐을) 의미한다. 따라서, "MAPC"로 표기된 세포 유형은 그의 신규한 특성들 중 일부를 통하여 세포를 설명하는 대안적인 기본 특성을 특징으로 할 수 있다.
- [0068] MAPC에 있어서 "성체"라는 용어는 비제한적이다. 이것은 비배아 체세포를 나타낸다. MAPC는 핵형이 정상이며,

생체 내에서 기형종을 형성하지 않는다. 이 두문자어는 먼저 골수로부터 단리된 만능성 세포를 설명하기 위하여 미국 특허 제7,015,037호에서 사용되었다. 그러나, 만능성 마커 및/또는 분화 잠재력을 갖는 세포가 후속적으로 발견되었으며, 이는 본 발명의 목적상 처음에 "MAPC"로 표기된 세포와 동등할 수 있다. MAPC 유형의 세포에 대한 본질적인 설명이 상기 발명의 개요에 제공되어 있다.

- [0069] MAPC는 MSC보다 더 원시적인 선구 세포 집단을 나타낸다 (문헌[Verfaillie, CM., Trends Cell Biol 12:502-8 (2002)], 문헌[Jahagirdar, B.N., et al., Exp Hematol, 29:543-56 (2001)]; 문헌[Reyes, M. and CM. Verfaillie, Ann N Y Acad Sci, 938:231-233 (2001)]; 문헌[Jiang, Y. et al., Exp Hematol, 30:896-904 (2002)]; 및 문헌[Jiang, Y. et al., Nature, 418:41-9. (2002)]).
- [0070] "멀티스텝®"이라는 용어는 미국 특허 제7,015,037호의 MAPC를 기반으로 한 세포 조제물의 상표명이며, 즉, 상기에 기술한 바와 같이 비배아 줄기, 비생식 세포이다. 멀티스텝®은 이 특허 출원에 개시된 세포 배양 방법에 따라, 특히 더욱 낮은 산소 및 더욱 높은 혈청에 의해 제조된다.
- [0071] "약학적으로 허용되는 담체"는 본 발명에서 사용되는 세포를 위한 임의의 약학적으로 허용되는 배지이다. 그러한 배지는 등장성, 세포 대사, pH 등을 유지할 수 있다. 이것은 생체 내에서 대상체로의 투여와 양립가능하며, 따라서 세포 전달 및 치료에 사용될 수 있다.
- [0072] "효능(potency)"이라는 용어는 본 출원에 기술된 다양한 효과를 성취하는 세포(또는 세포로부터의 조건 배지)의 유효성 정도를 나타낸다. 따라서, 효능은 (1) 혈관신생 제공, (2) 하나 이상의 혈관신생 촉진 인자의 발현 및/또는 분비, 또는 (3) 임상 증상이 감소되도록(예를 포함함) 부적당한 혈관신생과 결부된 임상 증상의 치료를 포함하지만 이에 한정되지 않는, 다양한 수준의 효과를 나타낸다.
- [0073] "원시 배아 생식 세포(Primordial embryonic germ cells; PG 또는 EG 세포)"를 배양하고 자극하여 많은 덜 분화된 세포 유형을 생성할 수 있다.
- [0074] "선구 세포(progenitor cells)"는 최종 분화된 자손의 특성들 중 일부를 갖지만 그 전부를 갖는 것은 아닌, 줄기 세포의 분화 동안 생성된 세포이다. 규정된 선구 세포, 예컨대 "심장 선구 세포"는 계통으로 되지만, 특정한 또는 최종적으로 분화된 세포 유형으로 되는 것은 아니다. 두문자어 "MAPC"에서 사용될 때 "선구자"라는 용어는 이들 세포를 특정 계통에 한정시키는 것은 아니다. 선구 세포는 선구 세포보다 더 고도로 분화된 자손 세포를 형성할 수 있다.
- [0075] 본원에서 사용될 때 "감소하다"라는 용어는 감소뿐만 아니라 방지도 의미한다. 치료의 맥락에서, "감소시키는" 것은 하나 이상의 임상 증상을 예방하거나 또는 개선하는 것이다. 임상 증상은, 치료되지 않은 채로 둘 때, 대상체의 생활(건강)의 질에 부정적인 영향을 주거나 또는 줄 것인 하나의(또는 그보다 많은) 것이다. 이는 또한 근본적인 생물학적 효과에 또한 적용되는데, 이것의 최종 결과는 부적절한 혈관신생의 해로운 영향을 개선시키는 것이다.
- [0076] 요망되는 수준의 효능(예를 들어, 하나 이상의 혈관신생 촉진 인자의 발현 및/또는 분비에 대한 것)을 갖는 세포의 "선발"은 세포의 동정(분석에 의한 것과 같이), 단리 및 확장을 의미할 수 있다. 이는 세포를 단리한 모 세포 집단보다 더 높은 효능을 갖는 집단을 생성할 수 있다. "모" 세포 집단은 선발된 세포가 분할된 모 세포를 나타낸다. "모"는 실제 P1 --> F1의 관계(즉, 자손 세포)를 나타낸다. 그래서, 세포 X가 세포 X 및 Y의 혼합 집단으로부터 단리될 경우(여기서, X는 발현자이며 Y는 아님), 단순히 X의 단리체를 발현이 향상된 것으로 분류하지는 못한다. 그러나, X의 자손 세포가 더욱 높은 발현자일 경우, 이 자손 세포는 발현이 향상된 것으로 분류한다.
- [0077] 하나 이상의 혈관신생 촉진 인자를 발현하는 세포를 선발하기 위하여, 둘 모두는 하나 이상의 혈관신생 촉진 인자의 발현/분비가 있는지를 결정하는 분석법을 포함하며 또한 발현자(expressor) 세포를 수득하는 것을 포함한다. 발현자 세포는 세포가 재조합적 수단에 의해 인자(들)를 발현하는 것은 아니라는 점에서 하나 이상의 혈관신생 촉진 인자를 자연적으로 발현할 수 있다. 그러나, 발현자는 인자 발현을 증가시키는 제제와 함께 인큐베이션되거나 또는 상기 제제에 노출됨으로써 개선될 수 있다. 발현자 세포를 선발한 세포 집단은 당해 분석을 행하기 전에는 하나 이상의 혈관신생 촉진 인자를 발현하는 것으로 공지될 수 없다.
- [0078] 선발은 조직 중 세포로부터 이루어질 수 있다. 예를 들어, 이 경우, 세포는 요망되는 조직으로부터 단리되고, 배양 중 확장되고, 하나 이상의 혈관신생 촉진 인자를 발현/분비하는 것에 대하여 선발되고, 선발된 세포는 추가로 확장된다.

- [0079] 선발은 또한 생체 외에서 세포로부터 이루어질 수 있으며, 예컨대 배양 중 세포로부터 이루어질 수 있다. 이 경우, 배양 중 세포들 중 하나 이상은 하나 이상의 혈관신생 촉진 인자의 발현/분비에 대하여 분석되고, 하나 이상의 혈관신생 촉진 인자를 발현/분비하는 수득된 세포는 추가로 확장될 수 있다.
- [0080] 또한 세포는 하나 이상의 혈관신생 촉진 인자의 향상된 발현/분비에 대하여 선발될 수 있다. 이 경우, 향상된 발현자를 수득한 세포 집단은 이미 하나 이상의 혈관신생 촉진 인자를 발현/분비할 수 있다. 향상된 발현/분비는 모 발현자 집단에서보다 더 많은 평균 양(발현 및/또는 분비)의 세포당 하나 이상의 혈관신생 촉진 인자를 의미한다.
- [0081] 더욱 높은 발현자를 선발한 모 집단은 실질적으로 동질적(homogeneous)일 수 있다(동일한 세포 유형). 이 집단으로부터 더욱 높은 발현자를 수득하는 한 가지 방법은 단일 세포 또는 세포 풀을 생성하고, 이 세포 또는 세포 풀을 하나 이상의 혈관신생 촉진 인자의 발현/분비에 대하여 분석하여 향상된 수준의 하나 이상의 혈관신생 촉진 인자 (하나 이상의 혈관신생 촉진 인자의 유도자를 이용한 세포의 처리와는 대조적임)를 자연적으로 발현/분비하는 클론을 수득하고, 그 후 자연적으로 더욱 높은 발현자인 세포를 확장시키는 것이다.
- [0082] 그러나, 세포는 인자의 내인성 세포 유전자의 인자 발현을 향상시킬 하나 이상의 제제로 처리될 수 있다. 따라서, 실질적으로 동질 집단을 처리하여 발현을 향상시킬 수 있다.
- [0083] 집단이 실질적으로 동질하지 않다면, 처리될 모 세포 집단이, 향상된 발현이 추구되는 발현자 세포 유형 100개 이상, 더 바람직하게는 상기 세포 1,000개 이상, 더욱 더 바람직하게는 상기 세포 10,000개 이상을 함유하는 것이 바람직하다. 처리 후, 이 하위 집단을 공지된 세포 선발 기술에 의해 이종(heterogeneous) 집단으로부터 회수하고, 요망될 경우 추가로 확장시킬 수 있다.
- [0084] 따라서, 인자 발현의 요망되는 수준은 주어진 선행 집단에서의 수준보다 더 높은 것일 수 있다. 예를 들어, 조직으로부터 일차 배양하고, 인자 발현을 촉진하도록 특정하게 설계된 것은 아닌 배양 조건에 의해 확장 및 단리된 세포는 모 집단을 제공할 수 있다. 그러한 모 집단은 세포당 평균 인자 발현이 향상되도록 처리될 수 있거나, 또는 신중한 처리 없이 더욱 높은 수준을 발현하는 집단 내의 세포 또는 세포들에 대하여 스크리닝될 수 있다. 그러한 세포는 그 후 확장되어 더욱 높은(요망되는) 발현을 갖는 집단을 제공할 수 있다.
- [0085] "자가 재생(self-renewal)"은 복제 딸 줄기 세포가 생겨난 것과 동일한 분화 잠재력을 갖는 복제 딸 줄기 세포를 생성하는 능력을 나타낸다. 이와 관련하여 사용되는 유사한 용어는 "증식"이다.
- [0086] "줄기 세포"는 자가 재생을 겪을 수 있는(즉, 동일한 분화 잠재력을 갖는 자손) 그리고 또한 분화 잠재력이 더욱 제한된 자손 세포를 생성할 수 있는 세포를 의미한다. 본 발명의 맥락 내에서, 줄기 세포는 예를 들어 핵전이에 의해, 더욱 원시적인 줄기 세포와의 융합에 의해, 특정 전사 인자의 도입에 의해, 또는 특정 조건 하에서의 배양에 의해 탈분화된 더욱 분화된 세포를 또한 포함한다. 예를 들어, 문헌[Wilmot et al., Nature, 385:810-813 (1997)]; 문헌[Ying et al., Nature, 416:545-548 (2002)]; 문헌[Guan et al., Nature, 440:1199-1203 (2006)]; 문헌[Takahashi et al., Cell, 126:663-676 (2006)]; 문헌[Okita et al., Nature, 448:313-317 (2007)]; 및 문헌[Takahashi et al., Cell, 131:861-872 (2007)]을 참조한다.
- [0087] 또한 탈분화는 특정 화합물의 투여 또는 탈분화를 야기하는 시험관내 또는 생체 내의 물리적 환경에의 노출에 의해 야기될 수 있다. 또한 줄기 세포는 비정상 조직, 예컨대 기형암종 및 일부 다른 공급원, 예컨대 배상체(비록 이것이 내세포피로부터 직접적으로 그러한 것은 아니지만 배아 조직으로부터 유래된다는 점에서 이것은 배아 줄기 세포로 간주될 수 있다 할지라도)로부터 유래될 수 있다. 줄기 세포는 또한 줄기 세포 기능과 결부된 유전자를 비줄기 세포, 예컨대 유도된 만능성 줄기 세포 내로 도입함으로써 생성될 수 있다.
- [0088] "대상체"는 척추 동물, 예컨대 포유류, 예컨대 인간을 의미한다. 포유류는 인간, 개, 고양이, 말, 소 및 돼지를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0089] "치료적 유효량"이라는 용어는 포유류에서 임의의 치료적 응답을 생성하는 것으로 결정된 제제의 양을 나타낸다. 예를 들어, 유효한 치료제는 환자의 생존성을 연장시키고/시키거나 명백한 임상 증상을 억제할 수 있다. 본원에서 사용되는 이 용어의 의미 내의 치료적으로 유효한 치료는 심지어 치료가 질환 결과 그 자체를 개선시키지는 못한다 할지라도 대상체의 생활의 질을 개선시키는 치료를 포함한다. 그러한 치료적 유효량은 당업계의 숙련자에 의해 쉽게 확정된다. 따라서, "치료하는"이라는 것은 그러한 양을 전달하는 것을 의미한다. 따라서, 치료는 부적절한 혈관신생의 병리학적 증상을 예방하거나 또는 개선시킬 수 있다.
- [0090] "치료하다", "치료하는" 또는 "치료"는 본 발명과 관련하여 널리 사용되며, 각각의 그러한 용어는 특히 결합,



기능장애, 질환, 또는 기타 해로운 과정의 예방, 개선, 억제 또는 치유를 포함하는데, 이는 치료법에 의해 방해되고/되거나 그에 의해 생기는 것을 포함한다.

[0091] "검증하다(validate)"는 확인(confirm)하는 것을 의미한다. 본 발명의 맥락에서, 세포가 요망되는 효능을 갖는 발현자임을 확인한다. 이는 그 후 효능을 합리적으로 기대하면서 그 세포를 사용할 수 있도록 하는 것이다(치료, 은행화, 약물 스크리닝 등). 따라서, 검증은 원래 혈관신생 촉진 활성을 갖는 것으로 밝혀진/확립된 세포가 사실상 그 활성을 유지함을 확인하는 것을 의미한다. 따라서, 검증은 원래의 결정 및 추적 결정을 포함하는 두 이벤트의 과정의 확인 이벤트이다. 두 번째 이벤트가 본원에서 "검증(validation)"으로 지칭된다.

[0092] 줄기 세포

[0093] 본 발명은 바람직하게는 척추 동물 중, 예컨대 인간, 인간외 영장류, 가축 동물, 가축 및 기타 인간외 포유류의 줄기 세포를 사용하여 실행될 수 있다. 이들은 하기에 기술된 세포를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0094] 배아 줄기 세포

[0095] 가장 잘 연구된 줄기 세포는 배아 줄기 세포(ESC)이며, 그 이유는 이것이 무제한적인 자가 재생성 및 다능성 분화 잠재력을 갖기 때문이다. 이들 세포는 배반포의 내세포괴로부터 유래되거나, 또는 임플란트 후 배아의 원시 생식 세포(태생성 생식 세포 또는 EG 세포)로부터 유래될 수 있다. ES 및 EG 세포는 먼저 마우스로부터, 그리고 이후에는 많은 상이한 동물들로부터, 그리고 더욱 최근에는 또한 인간의 영장류 및 인간으로부터 유래되었다. 마우스 배반포 또는 기타 동물의 배반포 내로 도입될 때, ESC는 동물의 모든 조직에 기여할 수 있다. ES 및 EG 세포는 SSEA1(마우스) 및 SSEA4(인간)에 대한 항체를 이용한 양성 염색에 의해 확인될 수 있다. 예를 들어, 각각이 배아 줄기 세포 및 그의 제조 및 확장 방법의 교시를 위하여 참고로 포함된 미국 특허 제5,453,357호; 미국 특허 제5,656,479호; 미국 특허 제5,670,372호; 미국 특허 제5,843,780호; 미국 특허 제5,874,301호; 미국 특허 제5,914,268호; 미국 특허 제6,110,739호; 미국 특허 제6,190,910호; 미국 특허 제6,200,806호; 미국 특허 제6,432,711호; 미국 특허 제6,436,701호; 미국 특허 제6,500,668호; 미국 특허 제6,703,279호; 미국 특허 제6,875,607호; 미국 특허 제7,029,913호; 미국 특허 제7,112,437호; 미국 특허 제7,145,057호; 미국 특허 제7,153,684호; 및 미국 특허 제7,294,508호를 참조한다. 따라서, ESC 및 그의 단리 및 확장 방법은 당업계에 공지되어 있다.

[0096] 다수의 전사 인자 및 외인성 사이토카인이 동정되었으며, 이는 생체 내에서 배아 줄기 세포의 효능 상태에 영향을 준다. 줄기 세포 만능성에 연루된, 기술된 제1 전사 인자는 Oct4이다. Oct4는 POU(Pit-Oct-Unc) 패밀리의 전사 인자에 속하며, 프로모터 또는 인핸서 영역 내의 "옥타머 모티프"로 불리우는 옥타머 서열을 함유하는 유전자의 전사를 활성화시킬 수 있는 DNA 결합 단백질이다. Oct4는 난통이 형성될 때까지 수정 접합체의 분할 단계의 순간에 발현된다. Oct3/4의 기능은 분화 유도 유전자(즉, FoxaD3, hCG)를 억제하고 만능성을 촉진하는 유전자(FGF4, Utf1, Rex1)를 활성화하는 것이다. 고 이동 그룹(high mobility group; HMG) 박스 전사 인자의 구성원인 Sox2는 Oct4와 협력하여 내세포괴에서 발현되는 유전자의 전사를 활성화시킨다. 배아 줄기 세포에서의 Oct3/4 발현은 특정 수준들 사이에서 유지되는 것이 필수적이다. Oct4 발현 수준의 >50%의 과다발현 또는 하향조절은 배아 줄기 세포의 운명을 변경할 것이며, 이때 각각 원시 내배엽/중배엽 또는 영양외배엽이 형성된다. 생체 내에서, Oct4 결합 배아는 배반포기로 발달하지만, 내세포괴 세포는 만능성이 아니다. 대신, 이는 배아밖 영양막 계통을 따라 분화한다. 포유류 Spalt 전사 인자인 Sal14는 Oct4의 상류 조절자이며, 따라서 초기 배발생기 동안 Oct4의 적절한 수준을 유지하는 데 중요하다. Sal14 수준이 특정 역치 미만으로 강해질 때, 영양외배엽 세포는 내세포괴로 이소성적으로 확장될 것이다. 만능성에 필요한 또 다른 전사 인자는 켈트족의 "Tir Nan Og": 영원히 젊은 땅을 따라 명명한 Nanog이다. 생체 내에서, Nanog는 후기상실배기로부터 발현되며, 후속적으로 내세포괴에 대하여 규정되며, 임플란트기에 의해 하향조절된다. Nanog의 하향조절은 만능성 세포의 제어되지 않은 확장을 피하기 위하여 그리고 장배 형성 동안 다중계통 분화를 허용하기 위하여 중요할 수 있다. 5.5일에 단리된 Nanog 널(null) 배아는 주로 배아밖 내배엽을 함유하고 판별가능한 외배엽은 전혀 함유하지 않는, 와해된 배반포로 이루어진다.

[0097] 비배아 줄기 세포

[0098] 줄기 세포가 대부분의 조직에서 동정되었다. 아마도 가장 잘 특성화된 것은 조혈모세포(hematopoietic stem cell; HSC)일 것이다. HSC는 세포 표면 마커 및 기능적 특성을 이용하여 정제될 수 있는 중배엽 유래 세포이다. 이는 골수, 말초 혈액, 제대혈, 태아 간 및 난황낭으로부터 단리되었다. 이는 조혈을 개시하며, 다수의 조혈 계통을 생성한다. 치사성이 되도록 조사된 동물 내로 이식될 때, 이는 적혈구계 호중구-대식세포, 거핵구 및 림프



양 조혈 세포 풀이 다시 생기게 할 수 있다. 또한 이는 일부 자가 재생 세포 분열을 겪도록 유도될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 제5,635,387호; 미국 특허 제5,460,964호; 미국 특허 제5,677,136호; 미국 특허 제5,750,397호; 미국 특허 제5,681,599호; 및 미국 특허 제5,716,827호를 참조한다. 미국 특허 제5,192,553호에는 인간 신생아 또는 태아 조혈 모세포 또는 선구 세포의 단리 방법이 보고되어 있다. 미국 특허 제5,716,827호에는 Thy-1<sup>+</sup> 선구자인 인간 조혈 세포 및 시험관 내에서 그를 재생시키는 적절한 성장 배지가 보고되어 있다. 미국 특허 제5,635,387호에는 인간 조혈 세포 및 그 전구체의 배양을 위한 방법 및 장치가 보고되어 있다. 미국 특허 제6,015,554호에는 인간 림프계 및 수지상 세포의 재구성 방법이 기술되어 있다. 따라서, HSC 및 그의 단리 및 확장 방법은 당업계에 공지되어 있다.

[0099] 당업계에 공지된 또 다른 줄기 세포로는 신경 줄기 세포(NSC)가 있다. 이들 세포는 생체 내에서 증식할 수 있으며, 적어도 약간의 뉴런 세포를 계속하여 재생시킬 수 있다. 생체 외에서 배양될 때, 신경 줄기 세포는 상이한 유형의 뉴런 및 신경교 세포로 증식되도록 그리고 이외에도 그렇게 분화되도록 유도될 수 있다. 뇌 내로 이식될 때, 신경 줄기 세포는 생착되어 신경 및 신경교 세포를 생성할 수 있다. 예를 들어, 문헌[Gage F.H., Science, 287: 1433-1438 (2000)], 문헌[Svendsen S.N. et al, Brain Pathology, 9:499-513 (1999)], 및 문헌[Okabe S. et al., Mech Development, 59:89-102 (1996)]을 참조한다. 미국 특허 제5,851,832호에는 뇌조직으로부터 수득된 다능성 신경 줄기 세포가 보고되어 있다. 미국 특허 제5,766,948호에는 신생 대뇌 반구로부터 신경모세포를 생성하는 것이 보고되어 있다. 미국 특허 제5,564,183호 및 미국 특허 제5,849,553호에는 포유류 신경 능선 줄기 세포의 사용이 보고되어 있다. 미국 특허 제6,040,180호에는 포유류 다능성 CNS 줄기 세포의 배양물로부터의 분화된 뉴런의 시험관 내 생성이 보고되어 있다. 국제 특허 공개 제WO 98/50526호 및 국제 특허 공개 제WO 99/01159호에는 신경상피 줄기 세포, 올리고수지상세포-성상세포 전구체, 및 계통 제한된 뉴런 전구체의 생성 및 단리가 보고되어 있다. 미국 특허 제5,968,829호에는 배아 전뇌로부터 수득된 신경 줄기 세포가 보고되어 있다. 따라서, 신경 줄기 세포 및 그의 제조 및 확장 방법이 당업계에 공지되어 있다.

[0100] 당업계에서 광범위하게 연구된 또 다른 줄기 세포로는 간엽 줄기 세포(mesenchymal stem cell; MSC)가 있다. MSC는 태생성 중배엽으로부터 유래되며, 특히 성체 골수, 말초 혈액, 지방, 태반 및 제대혈을 비롯한 다수의 공급원으로부터 단리될 수 있다. MSC는 근육, 뼈, 연골, 지방 및 건을 비롯한 다수의 중배엽 조직으로 분화될 수 있다. 이들 세포에 대한 상당한 문헌이 있다. 예를 들어, 미국 특허 제5,486,389호; 미국 특허 제5,827,735호; 미국 특허 제5,811,094호; 미국 특허 제5,736,396호; 미국 특허 제5,837,539호; 미국 특허 제5,837,670호; 및 미국 특허 제5,827,740호를 참조한다. 또한, 문헌[Pittenger, M. et al, Science, 284: 143-147 (1999)]을 참조한다.

[0101] 성체 줄기 세포의 또 다른 예로는 지방 유래된 성체 줄기 세포(adipose-derived adult stem cell; ADSC)가 있으며, 이는 전형적으로 지방 흡인, 이어서 콜라게나아제를 사용한 ADSC의 방출에 의해 지방으로부터 단리되었다. ADSC는, 다수의 더 많은 세포를 지방으로부터 단리할 수 있다는 것을 제외하고는, 골수로부터 유래된 MSC와 많은 방식으로 유사하다. 이들 세포는 뼈, 지방, 근육, 연골 및 뉴런으로 분화되는 것으로 보고되었다. 단리 방법은 미국 특허 공개 제2005/0153442호에 기술되었다.

[0102] 당업계에 공지된 다른 줄기 세포는 위장 줄기 세포, 표피 줄기 세포, 및 간 줄기 세포를 포함하며, 이는 "난형 세포"로도 칭해졌다 (문헌[Potten, C, et al., Trans R Soc Lond B Biol Sci, 353:821-830 (1998)], 문헌[Watt, F., Trans R Soc Lond B Biol Sci, 353:831 (1997)]; 문헌[Alison et al., Hematology, 29:678-683 (1998)]).

[0103] 하나 초과와 배아 배엽의 세포 유형으로 분화될 수 있는 것으로 보고된 다른 비배아 세포는 제대혈(미국 특허 공개 제2002/0164794호 참조), 태반(미국 특허 공개 제2003/0181269호 참조), 제대 매트릭스(문헌[Mitchell, K.E. et al., Stem Cells, 21 :50-60 (2003)]), 작은 배아 유사 줄기 세포(문헌[Kucia, M. et al., Physiol Pharmacol, 57 Suppl 5:5-18 (2006)]), 양수 줄기 세포(문헌[Atala, A., Tissue Regen Med, 1 :83-96 (2007)]), 피부 유래 전구체(문헌[Toma et al., Nat Cell Biol, 3:778-784 (2001)]), 골수(미국 특허 공개 제2003/0059414호 및 미국 특허 공개 제2006/0147246호 참조) 유래의 세포를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니며, 이들 각각은 이들 세포의 교시를 위하여 참고로 포함된다.

[0104] 체세포 재프로그래밍 전략

[0105] 몇몇 상이한 전략, 예컨대 핵전이, 세포 융합, 및 배양 유도 재프로그래밍을 이용하여 분화 세포를 배아 상태로 전환시키는 것을 유도하였다. 핵전이는 체세포 핵을 핵 제거 난모세포 내로 주입하는 것을 포함하며, 상기 난모세포는 대리모 내로의 이식시에, 클론을 발생시킬 수 있거나("생식형 클로닝"), 또는 배양 중 외식시에 유전자

매칭 배아 줄기(ES) 세포를 발생시킬 수 있다("체세포 핵전이(somatic cell nuclear transfer; SCNT)). 체세포를 ES 세포와 세포 융합시키면 만능성 ES 세포의 모든 특징을 보여주는 하이브리드가 생성된다. 배양 중 체세포의 외식은 만능성 또는 다능성일 수 있는 불사 세포주에 대하여 선발한다. 현재, 정원 줄기 세포가 출생후 동물로부터 유래될 수 있는 유일한 만능성 세포원이다. 정의된 인자를 이용한 체세포의 형질감염은 만능성 상태로의 재프로그래밍을 개시할 수 있다. 이러한 실험적 접근법이 광범위하게 개관되었다 (문헌[Hochedlinger and Jaenisch, Nature, 441: 1061-1067 (2006)] 및 문헌[Yamanaka, S., Cell Stem Cell, 1:39-49 (2007)]).

[0106] 핵전이

[0107] 체세포 핵전이(somatic cell nuclear transfer; SCNT)으로도 지칭되는 핵이식(NT)은 양인 돌리(Dolly)와 같은 클로닝된 동물을 생성하기 위하여 공여자 체세포로부터 핵제거 난모세포 내로 핵을 도입하는 것을 나타낸다 (문헌[Wilmot et al., Nature, 385:810-813 (1997)]). NT에 의한 살아있는 동물의 생성은 마지막으로 분화된 세포의 것을 포함하는 체세포의 후성적 상태가, 안정하기는 하지만 비가역적으로 고정된 것이 아니며, 새로운 유기체의 발생을 지시할 수 있는 배아 상태로 재프로그래밍될 수 있음을 입증하였다. 배아 발생 및 질환에 연루된 기본적인 후성적 기작을 설명하는 흥분되는 실험적 접근법을 제공하는 것에 더하여, 핵 클로닝 기술은 환자 특이적 이식 의술에 있어서 잠재적으로 흥미롭다.

[0108] 체세포와 배아 줄기 세포의 융합

[0109] 체세포 핵의 미분화 상태로의 후성적 재프로그래밍이 배아 세포와 체세포의 융합에 의해 생성된 쥐과 하이브리드에서 입증되었다. 다양한 체세포와 배아 암종 세포 (문헌[Solter, D., Nat Rev Genet, 7:319-327 (2006)]), 배아 생식(embryonic germ; EG), 또는 ES 세포 (문헌[Zwaka and Thomson, Development, 132:227-233 (2005)]) 사이의 하이브리드는 모 배아 세포와 많은 특징을 공유하며, 이는 만능성 표현형이 그러한 융합 생성물에서 우성임을 나타낸다. 마우스에서와 같이 (문헌[Tada et al., Curr Biol, 11 : 1553-1558 (2001)]), 인간 ES 세포는 융합 후 체세포 핵을 재프로그래밍하는 잠재력을 갖는다 (문헌[Cowan et al., Science, 309: 1369-1373(2005)]; 문헌[Yu et al., Science, 318: 1917-1920 (2006)]). 휴면 만능성 마커, 예컨대 Oct4의 활성화 또는 불활성 체세포 X 염색체의 재활성화는 하이브리드 세포에 있어서 체세포 계통의 재프로그래밍에 대한 분자적 증거를 제공하였다. DNA 복제는 융합한지 2일 후에 처음으로 관찰되는 만능성 마커의 활성화에 필수적이며 (문헌[Do and Scholer, Stem Cells, 22:941-949 (2004)]), ES 세포에서 Nanog의 강요된 과다발현은 신경 줄기 세포와 융합될 때 만능성을 촉진하는 것으로 제안되었다 (문헌[Silva et al., Nature, 441 :997-1001 (2006)]).

[0110] 배양 유도된 재프로그래밍

[0111] 만능성 세포는 출생후 정원 줄기 세포("maGSCsm" "ES 유사" 세포), 원시 생식 세포(EG 세포), 외배엽(EpiSC 세포), 및 배반포(ES 세포)의 내세포괴(ICM) 및 할구와 같은 배아원으로부터 유래되었다. 하기 만능성 세포는, 그의 공여자 세포/조직과 함께, 다음과 같다: 단위생식(parthenogenetic) ES 세포는 쥐과 난모세포로부터 유래되며 (문헌[Narasimha et al., Curr Biol, 7:881-884 (1997)]); 배아 줄기 세포는 할구로부터 유래되었으며 (문헌[Wakayama et al., Stem Cells, 25:986-993 (2007)]); 내세포괴 세포 (공급원은 적용가능하지 않음) (문헌[Eggan et al., Nature, 428:44-49 (2004)]); 배아 생식 및 태생성 암종 세포는 원시 생식 세포로부터 유래되었으며 (문헌[Matsui et al., Cell, 70:841-847 (1992)]); GMCS, maSSC, 및 MASC는 정원 줄기 세포로부터 유래되었으며 (문헌[Guan et al., Nature, 440: 1199-1203 (2006)]); 문헌[Kanatsu-Shinohara et al., Cell, 119: 1001-1012 (2004)]; 및 문헌[Seandel et al., Nature, 449:346-350 (2007)]); EpiSC 세포는 외배엽으로부터 유래되며 (문헌[Brons et al., Nature, 448: 191-195 (2007)]); 문헌[Tesar et al., Nature, 448: 196-199(2007)]); 단위생식 ES 세포는 인간 난모세포로부터 유래되었으며 (문헌[Cibelli et al., Science, 295L819 (2002)]); 문헌[Revazova et al., Cloning Stem Cells, 9:432-449 (2007)]); 인간 ES 세포는 인간 배반포로부터 유래되었으며 (문헌[Thomson et al., Science, 282: 1145-1147 (1998)]); MAPC는 골수 (문헌[Jiang et al., Nature, 418:41-49 (2002)]); 문헌[Phinney and Prockop, Stem Cells, 25:2896-2902 (2007)]); 체대혈 세포 (체대혈로부터 유래됨) (문헌[van de Ven et al., Exp Hematol, 35: 1753-1765 (2007)]); 신경 세포로부터 유래된 신경구 유래 세포 (문헌[Clarke et al., Science, 288: 1660-1663 (2000)])으로부터 유래되었다. 정원 줄기 세포 또는 PGC와 같은 생식 세포 계통 유래의 공여자 세포는 생체 내에서 단능성인 것으로 공지되어 있지만, 만능성 ES 유사 세포 (문헌[Kanatsu-Shinohara et al., Cell, 119:1001-1012 (2004)] 또는 maGSC (문헌[Guan et al., Nature, 440: 1199-1203 (2006)])는 장기간의 시험관 내 배양 후 단리될 수 있음이 밝혀졌다. 대부분의 이들 만능성 세포 유형은 시험관 내 분화 및 기형종 형성이 가능하였지만, 단지 ES, EG, EC, 및 정원 줄기 세포

유래된 maGCS 또는 ES 유사 세포는 더욱 엄격한 기준에 의하면 만능성이었으며, 그 이유는 상기 세포가 출생후 키메라를 형성하여 생식 세포 계열에 기여할 수 있기 때문이었다. 최근에는, 다능성 성체 정원 줄기 세포(MASC)가 성체 마우스의 고환 정원 줄기 세포로부터 유래되었으며, 이들 세포는 발현 프로파일 ES 세포의 것과는 상이하였지만 (문헌[(Seandel et al., Nature, 449:346-350 (2007))] 임플란트 후 마우스 배아의 외배엽으로부터 유래한 EpiSC 세포와는 유사하였다 (문헌[Brons et al., Nature, 448: 191-195 (2007)]; 문헌[Tesar et al., Nature, 448:196-199 (2007)]).

[0112] 규정된 전사 인자에 의한 재프로그래밍

[0113] 타카하시(Takahashi) 및 야마나카(Yamanaka)는 체세포를 ES 유사 상태로 재프로그래밍하는 것을 보고하였다 (문헌[Takahashi and Yamanaka, Cell, 126:663-676 (2006)]). 이들은 4가지 전사 인자, Oct4, Sox2, c-myc, 및 Klf4의 바이러스 매개 형질도입, 이어서 Oct4 표적 유전자 Fbx15의 활성화에 대한 선발 (도 2A) 후 마우스 배아 섬유아세포(mouse embryonic fibroblast; MEF) 및 성체 섬유아세포를 만능성 ES 유사 세포로 성공적으로 재프로그래밍하였다. Fbx15를 활성화시킨 세포는 만들어진(coined) iPS (유도된 만능성 줄기(induced pluripotent stem)) 세포였으며, 이는 살아있는 키메라를 생성할 수는 없지만 기형종을 형성하는 그의 능력에 의해 만능성인 것으로 밝혀졌다. 이러한 만능성 상태는 형질도입된 Oct4 및 Sox2 유전자의 지속적인 바이러스에 의한 발현에 의존적이었으며, 반면, 내인성 Oct4 및 Nanog 유전자는 발현되지 않거나 또는 ES 세포에서보다 더 낮은 수준으로 발현되었고, 그의 각각의 프로모터는 대부분 메틸화되는 것으로 밝혀졌다. 이는 Fbx15-iPS 세포가 ES 세포에 상응하지 않았지만 불완전한 재프로그래밍 상태를 나타낼 수도 있다는 결론과 일치한다. 유전자 실험에 의해 Oct4 및 Sox2가 만능성에 필수적임이 확립되었지만 (문헌[Chambers and Smith, Oncogene, 23:7150-7160 (2004)]; 문헌[Ivanona et al., Nature, 442:5330538 (2006)]; 문헌[Masui et al., Nat Cell Biol, 9:625-635 (2007)]), 재프로그래밍에 있어서 두 발암유전자 c-myc 및 Klf4의 역할은 덜 명백하다. 이들 발암유전자 중 일부는, 사실은 재프로그래밍에 있어서 불필요할 수 있으며, 그 이유는 마우스 및 인간 iPS 세포 둘 모두가, 낮은 효율이기는 하지만 c-myc 형질도입의 부재 하에 얻어졌기 때문이다 (문헌[Nakagawa et al., Nat Biotechnol, 26: 191-106 (2008)]; 문헌[Werning et al., Nature, 448:318-324 (2008)]; 문헌[Yu et al., Science, 318: 1917-1920 (2007)]).

[0114] MAPC

[0115] 인간 MAPC가 미국 특허 제7,015,037호에 기술되어 있다. MAPC는 다른 포유류에서 확인되었다. 예를 들어 쥐와 MAPC가 미국 특허 제7,015,037호에 또한 기술되어 있다. 래트 MAPC가 미국 특허 제7,838,289호에 또한 기술되어 있다.

[0116] 이들 참고문헌은 처음에 캐서린 베르파일리에(Catherine Verfaillie)에 의해 단리된 MAPC를 설명하기 위하여 참고로 포함된다.

[0117] MAPC의 단리 및 성장

[0118] MAPC 단리 방법은 당업계에서 공지되어 있다. 예를 들어, 미국 특허 제7,015,037호를 참조하며, 이들 방법은 MAPC의 특성화(표현형)와 함께 본원에 참고로 포함된다. MAPC는 다수의 공급원으로부터 단리될 수 있으며, 상기 공급원은 골수, 태반, 제대 및 제대혈, 근육, 뇌, 간, 척수, 혈액 또는 피부를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 따라서, 골수 흡인물, 뇌 또는 간 생검체를 수득하고, (예를 들어, 기능적 또는 형태적 분석법, 예컨대 본원에 참고로 포함된 상기 특허 출원에 개시된 것에 의해) 세포에서 발현되는 (또는 발현되지 않는) 유전자에 의존하여 당업계의 숙련자가 이용가능한 양성 또는 음성 선발 기술을 이용하여 이들 세포를 단리하는 것이 가능하다.

[0119] 또한 MAPC는 이들 방법에 대하여 참고로 포함된 문헌[Breyer et al., Experimental Hematology, 34: 1596-1601 (2006)] 및 문헌[Subramanian et al., Cellular Programming and Reprogramming: Methods and Protocols; S. Ding (ed.), Methods in Molecular Biology, 636:55-78 (2010)]에 기술된 변형된 방법에 의해 수득되었다.

[0120] 미국 특허 제7,015,037호에 기술된 인간 골수 유래의 MAPC

[0121] MAPC는 공통 백혈구 항원 CD45 또는 적아구 특이적 글리코포린-A(Gly-A)를 발현하지 않는다. 혼합된 세포 집단은 피콜 하이파크(Ficoll Hypaque) 분리에 처해졌다. 상기 세포는 그 후 항-CD45 및 항-Gly-A 항체를 이용하여 음성 선발에 처하여서, CD45<sup>+</sup> 및 Gly-A<sup>+</sup> 세포의 집단을 고갈시키고, 그 후 남아있는 대략 0.1%의 골수 단핵 세포를 회수하였다. 또한 세포를 피브로넥틴 코팅된 웰에 도말하고, 2-4주 동안 하기에 기술된 바와 같이 배양하여

CD45<sup>+</sup> 세포 및 Gly-A<sup>+</sup> 세포를 고갈시킬 수 있다. 유착성 골수 세포의 배양에 있어서, 많은 유착성 기질 세포는 30회의 세포 배증 부근에서 복제 노화를 겪으며, 더욱 동질적인 세포 집단은 계속하여 확장되고 긴 텔로머(telomer)를 유지한다.

[0122] 대안적으로, 양성 선별은 세포 특이적 마커들의 조합을 통하여 세포를 분리하는 데 사용될 수 있다. 양성 및 음성 선별 기술 둘 모두를 당업계 숙련자가 이용가능하며, 음성 선별 목적에 적합한 다수의 모노클로날 및 폴리클로날 항체를 당업계에서 또한 입수가능하고 (예를 들어, 문헌[Leukocyte Typing V, Schlossman, et al., Eds. (1995) Oxford University Press] 참조) 다수의 공급처로부터 상업적으로 입수가능하다.

[0123] 세포 집단들의 혼합물로부터의 포유류 세포 분리 기술이 또한 슈바르츠(Schwartz) 등에 의해 미국 특허 제 5,759,793호 (자성 분리), 문헌[Basch et al., 1983] (면역친화성 크로마토그래피) 및 문헌[Wysocki and Sato, 1978] (형광 활성화 세포 분류)에 기술되었다.

[0124] 세포는 저혈청 또는 무혈청 배양 배지에서 배양될 수 있다. MAPC 배양에 사용되는 무혈청 배지가 미국 특허 제 7,015,037호에 기술되어 있다. 일반적으로 사용되는 성장 인자는 혈소판 유래 성장 인자 및 상피 성장 인자를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 예를 들어, 미국 특허 제 7,169,610호; 미국 특허 제 7,109,032호; 미국 특허 제 7,037,721호; 미국 특허 제 6,617,161호; 미국 특허 제 6,617,159호; 미국 특허 제 6,372,210호; 미국 특허 제 6,224,860호; 미국 특허 제 6,037,174호; 미국 특허 제 5,908,782호; 미국 특허 제 5,766,951호; 미국 특허 제 5,397,706호; 및 미국 특허 제 4,657,866호를 참조하는데, 이들 모두는 무혈청 배지에서의 세포의 성장을 교시하기 위하여 참고로 포함된다.

[0125] 추가 배양 방법

[0126] 추가 실험에서, MAPC가 배양되는 밀도는 약 100개의 세포/cm<sup>2</sup> 또는 약 150개의 세포/cm<sup>2</sup>로부터 약 10,000개의 세포/cm<sup>2</sup>까지 변할 수 있는데, 이는 약 200개의 세포/cm<sup>2</sup>에서 약 1500개의 세포/cm<sup>2</sup> 내지 약 2000개의 세포/cm<sup>2</sup>까지를 포함한다. 상기 밀도는 종들 간에 변할 수 있다. 부가적으로, 최적 밀도는 세포의 공급원 및 배양 조건에 따라 달라질 수 있다. 주어진 세트의 배양 조건 및 세포에 있어서의 최적 밀도를 결정하는 것은 당업자의 기술 이내이다.

[0127] 또한, 약 1-5%, 특히 3-5%를 포함하는 약 10% 미만의 유효한 대기중 산소 농도가 배양 중 MAPC의 분리, 성장 및 분화 동안 임의의 시점에서 사용될 수 있다.

[0128] 세포는 다양한 혈청 농도, 예를 들어 약 2-20% 하에 배양될 수 있다. 소 태아 혈청이 사용될 수 있다. 더욱 높은 혈청이 더욱 낮은 산소 장력, 예를 들어 약 15-20%와 조합되어 사용될 수 있다. 세포는 배양 디쉬로의 유착 이전에 선별될 필요는 없다. 예를 들어, 피콜(Ficoll) 구배 후, 세포는 예를 들어 250,000-500,000/cm<sup>2</sup>로 직접적으로 도말될 수 있다. 유착성 콜로니를 골라내고, 가능하게는 풀링하고(pooled), 확장시킬 수 있다.

[0129] 일 실시양태에서, 실시예에서 실험 절차에서 사용될 경우, 고혈청(대략 15-20%) 및 저산소(대략 3-5%) 조건이 세포 배양에 이용되었다. 구체적으로, 콜로니로부터의 유착성 세포를 18% 혈청 및 3% 산소 (PDGF 및 EGF를 포함함)에서 약 1700-2300개의 세포/cm<sup>2</sup>의 밀도로 도말 및 계대하였다.

[0130] MAPC에 특이적인 실시양태에서, 보충물은 MAPC가 하나 초과와 배아 계통, 예를 들어 모든 3가지의 계통의 세포 유형으로의 분화 능력을 유지하게 하는 세포 인자 또는 성분이다. 이는 텔로머라아제와 같이 높은 확장 능력의 마커 및/또는 Oct 3/4 (Oct 3A)와 같은 미분화 상태의 특정 마커의 발현에 의해 나타날 수 있다.

[0131] 세포 배양

[0132] 하기에 열거된 모든 성분에 있어서, 이들 성분의 교시를 위하여 참고로 포함된 미국 특허 제 7,015,037호를 참조한다.

[0133] 일반적으로, 본 발명에 유용한 세포는 당업계에 공지되어 있고 입수가능한 배양 배지에서 유지되고 확장될 수 있다. 또한 고려되는 것은 포유류 혈청을 포함하는 세포 배양 배지의 보충이다. 추가의 보충물이 최적 성장 및 확장에 필요한 미량 원소를 세포에게 공급하기 위하여 또한 유리하게 사용될 수 있다. 호르몬이 세포 배양에서 또한 유리하게 사용될 수 있다. 지질 및 지질 담체가 세포의 유형 및 분화된 세포의 운명에 따라 세포 배양 배지의 보충에 또한 사용될 수 있다. 또한 고려되는 것은 영양 세포층(feeder cell layer)의 사용이다.

[0134] 배양 중 세포는 현탁물 형태로 유지되거나 또는 고형 지지체, 예컨대 세포의 매트릭스 성분에 부착될 수 있다. 줄기 세포는 흔히 제I형 및 제II형 콜라겐, 콘드로이틴 술페이트, 피브로넥틴, "수퍼피브로넥틴" 및 피브로넥틴



유사 중합체, 젤라틴, 폴리-D 및 폴리-L 라이신, 트롬보스폰딘 및 비트로넥틴과 같은 고형 지지체에의 그의 부착을 장려하는 추가의 인자를 필요로 한다. 본 발명의 일 실시양태는 피브로넥틴을 이용한다. 예를 들어, 문헌 [Ohashi et al., Nature Medicine, 13:880-885 (2007)]; 문헌[Matsumoto et al., J Bioscience and Bioengineering, 105:350- 354 (2008)]; 문헌[Kirouac et al., Cell Stem Cell, 3:369-381 (2008)]; 문헌 [Chua et al., Biomaterials, 26:2537-2547 (2005)]; 문헌[Drobinskaya et al., Stem Cells, 26:2245-2256 (2008)]; 문헌[Dvir-Ginzberg et al., FASEB J, 22: 1440- 1449 (2008)]; 문헌[Turner et al., Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater, 82B: 156-168 (2007)]; 및 문헌[Miyazawa et al., Journal of Gastroenterology and Hematology, 22: 1959-1964 (2007)]을 참조한다.

- [0135] 세포는 또한 "3D"(응집) 배양물 형태로 성장시킬 수 있다. 일례로는 2009년 1월 21일에 출원된 국제 특허 출원 제PCT/US2009/31528호가 있다.
- [0136] 일단 배양물 형태로 확립되면, 세포는 예를 들어 40% FCS 및 10% DMSO를 포함하는 DMEM을 사용하여 냉동 스톱으로서 냉동하고 보관하거나 신선하게 사용할 수 있다. 배양 세포를 위한 냉동 스톱의 다른 제조 방법을 당업계의 숙련자가 또한 이용할 수 있다.
- [0137] 약학 제제
- [0138] 미국 특허 제7,015,037호는 약학 제제의 교시를 위하여 참고로 포함된다. 특정 실시양태에서, 세포 집단은 전달 용으로 개조된 그리고 전달에 적합한, 즉 생리학적으로 양립가능한 조성물 내에 존재한다.
- [0139] 일부 실시양태에서, 대상체로의 투여용의 세포(또는 조건 배지)의 순도는 약 100%이다(사실상 동질적임). 다른 실시양태에서, 이것은 95% 내지 100%이다. 일부 실시양태에서, 이것은 85% 내지 95%이다. 특히, 다른 세포와의 혼합물의 경우에, 이 백분율은 약 10%-15%, 15%-20%, 20%-25%, 25%-30%, 30%-35%, 35%-40%, 40%-45%, 45%-50%, 60%-70%, 70%-80%, 80%-90%, 또는 90%-95%일 수 있다. 또는 단리/순도는 세포 배증으로 표현될 수 있으며, 여기서, 세포는 예를 들어 10-20, 20-30, 30-40, 40-50회 또는 그보다 많은 횟수의 세포 배증을 겪었다.
- [0140] 주어진 응용을 위한 세포 투여용 제형의 선택은 다양한 인자에 의존적이다. 이들 중 두드러진 것은 대상체의 종, 치료되는 병태의 성질, 대상체에서의 그의 상태 및 분포, 다른 치료법 및 투여되는 제제의 성질, 최적 투여 경로, 그 경로를 통한 생존성, 투약 요법, 및 당업계의 숙련자에게 자명한 기타 인자이다. 예를 들어, 적합한 담체 및 다른 첨가제의 선택은 특정 투여 형태의 성질 및 정확한 투여 경로에 의존적이다.
- [0141] 세포/배지의 수성 현탁물의 최종 제형은 전형적으로 현탁물의 이온 강도를 등장으로(즉, 약 0.1 내지 0.2) 그리고 생리학적 pH로(즉, 대략 pH 6.8 내지 7.5) 조정하는 것을 포함한다. 최종 제형은 또한 전형적으로 유체 운환제를 함유한다.
- [0142] 일부 실시양태에서, 세포/배지는 주사가 가능한 단위 투여 형태, 예컨대 용액, 현탁액 또는 에멀전으로 제형화된다. 세포/배지의 주사에 적합한 약학 제제는 전형적으로 살균 수성 용액 및 분산액이다. 주사가 가능한 제형용의 담체는 예를 들어 물, 염수, 인산염 완충 염수, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 및 이들의 적합한 혼합물을 함유하는 분산 매질 또는 용매일 수 있다.
- [0143] 당업자는 본 발명의 방법에서 투여될 조성물 중 임의의 첨가제, 비히클 및/또는 담체 및 세포의 양을 쉽게 결정할 수 있다. 전형적으로, 임의의 첨가제(세포에 더하여)는 인산염 완충 염수 중의 것과 같은 용액 중의 0.001 내지 50 wt%의 양으로 존재한다. 활성 성분은 마이크로그램 내지 밀리그램의 크기로, 예컨대 약 0.0001 내지 약 5 wt%, 바람직하게는 약 0.0001 내지 약 1 wt%, 가장 바람직하게는 약 0.0001 내지 약 0.05 wt% 또는 약 0.001 내지 약 20 wt%, 바람직하게는 약 0.01 내지 약 10 wt%, 가장 바람직하게는 약 0.05 내지 약 5 wt%의 크기로 존재한다.
- [0144] 일부 실시양태에서, 세포는 특히 캡슐화가 당해 치료법의 유효성을 향상시키거나, 또는 취급 및/또는 보관 수명에서 이점을 제공할 경우 투여용으로 캡슐화된다. 세포는 임플란트 전에 캡슐뿐만 아니라 막에 의해서도 캡슐화될 수 있다. 이용가능한 많은 세포 캡슐화 방법들 중 임의의 것이 이용될 수 있음이 고려된다.
- [0145] 광범위하게 다양한 물질이 세포의 마이크로캡슐화에 있어서 다양한 실시양태에서 사용될 수 있다. 그러한 물질은 예를 들어 중합체 캡슐, 알기네이트-폴리-L-라이신-알기네이트 마이크로캡슐, 바륨 폴리-L-라이신 알기네이트 캡슐, 바륨 알기네이트 캡슐, 폴리아크릴로니트릴/폴리비닐클로라이드(PAN/PVC) 중공 섬유, 및 폴리에테르술폰(PES) 중공 섬유를 포함한다.
- [0146] 세포 투여에 사용될 수 있는 세포의 마이크로캡슐화 기술은 당업계의 숙련자에게 공지되어 있으며, 예를 들어



문헌[Chang, P., et al., 1999]; 문헌[Matthew, H.W., et al., 1991]; 문헌[Yanagi, K., et al., 1989]; 문헌[Cai Z.H., et al., 1988]; 문헌[Chang, T.M., 1992] 및 미국 특허 제5,639,275호(이는 예를 들어 생물학적 활성 분자를 안정하게 발현하는 세포의 장시간 유지를 위한 생체적합성 캡슐을 개시함)에 기술되어 있다. 추가의 캡슐화 방법이 유럽 특허 공보 제301,777호 및 미국 특허 제4,353,888호; 미국 특허 제4,744,933호; 미국 특허 제4,749,620호; 미국 특허 제4,814,274호; 미국 특허 제5,084,350호; 미국 특허 제5,089,272호; 미국 특허 제5,578,442호; 미국 특허 제5,639,275호; 및 미국 특허 제5,676,943호에 있다. 전술한 것 모두는 세포 캡슐화에 관한 파트에서 본원에 참고로 포함된다.

[0147] 특정 실시양태는 세포를 중합체, 예컨대 생물고분자 또는 합성 중합체 내로 혼입시킨다. 생물고분자의 예는 피브로넥틴, 피브린, 피브리노겐, 트롬빈, 콜라겐 및 프로테오글리칸을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기에 논의된 사이토카인과 같은 다른 인자가 또한 중합체 내로 혼입될 수 있다. 본 발명의 다른 실시양태에서, 세포는 3차원 겔의 틈새에 혼입될 수 있다. 전형적으로, 큰 중합체 또는 겔은 외과적으로 임플란트된다. 충분히 작은 입자 또는 섬유 내에 제형화될 수 있는 중합체 또는 겔은 다른 일반적인, 더욱 편리한 비외과적 경로에 의해 투여될 수 있다.

[0148] 세포의 투여량은 넓은 한계치 내에서 변하며, 각각의 특정한 경우에 있어서 개개의 요구에 맞추어진다. 일반적으로, 비경구 투여의 경우, 수령체의 체중 1 kg당 약 10000개 내지 약 2000만개의 세포를 투여하는 것이 통상적이다. 세포수는 수령체의 중량 및 상태, 투여 횟수 또는 빈도, 및 당업계의 숙련자에게 공지된 기타 변수에 따라 달라진다. 세포는 조직 또는 기관에 적합한 경로에 의해 투여될 수 있다. 예를 들어, 세포는 전신적으로, 즉, 비경구적으로, 정맥내 투여에 의해 투여될 수 있거나, 또는 특정 조직 또는 기관에 표적화될 수 있고, 세포는 피하 투여를 통하여 또는 특정한 요망되는 조직 내로의 투여에 의해 투여될 수 있다.

[0149] 세포는 적절한 부형제 중에 약 0.01 내지 약  $5 \times 10^6$  개의 세포/ml의 농도로 현탁될 수 있다. 주사 용액에 적합한 부형제는 생물학적으로 그리고 생리학적으로 세포와 그리고 수령체와 양립가능한 것, 예컨대 완충 염수액 또는 기타 적합한 부형제이다. 투여용 조성물은 적당한 살균성 및 안정성에 따르는 표준 방법에 따라 제형화되고, 생성되고 보관될 수 있다.

[0150] 림프조직으로 투여

[0151] 이들 조직 내로의 투여 기술은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어 골수내 주사는 세포를 전형적으로 후장골공의 골수강 내로 직접적으로 주사하는 것을 포함할 수 있지만, 후장골공, 대퇴골, 경골, 상박골, 또는 척골의 다른 장소를 포함할 수도 있으며; 비장 주사는 비장 내로의 방사선 사진술 인도된 주사 또는 복강경 또는 개복 수술을 통한 비장의 외과적 노출을 포함할 수 있으며; 페이어 패치(Peyer's patch), GALT, 또는 BALT 주사는 개복 수술 또는 복강경 주사 절차를 필요로 할 수 있다.

[0152] 투약

[0153] 인간 또는 기타 포유류에 대한 용량은 본 개시내용, 본원에 인용된 문서, 및 당업계의 지식으로부터 숙련자에 의해 부당한 실험 없이 결정될 수 있다. 본 발명의 다양한 실시양태에 따라 사용하기에 적절한 세포/배지의 용량은 다수의 인자에 의존적이다. 일차 및 보조 치료법에 있어서 투여될 최적 용량을 결정하는 파라미터는 일반적으로 하기 중 일부 또는 그 모두를 포함한다: 치료되는 질환 및 그 상태; 대상체의 종, 그의 건강, 성별, 연령, 중량 및 대사 속도; 대상체의 면역적격성; 투여되는 기타 치료제; 및 대상체의 병력 또는 유전자형으로부터 기대되는 잠재적인 합병증. 파라미터는 또한 세포가 동계인지, 자가이식성인지, 동종인지 또는 이종인지를 포함하고; 그의 효능(비활성); 효과적이어야 하는 세포/배지에 대하여 표적화되어야 하는 부위 및/또는 분포; 및 세포의 생착 및/또는 세포/배지에의 접근성과 같은 그 부위의 특성을 포함할 수 있다. 추가의 파라미터는 다른 인자들(예컨대 성장 인자 및 사이토카인)와의 동시 투여를 포함한다. 주어진 상황에서의 최적 용량이 또한 고려되며, 여기서 이는 세포/배지가 제형화되는 방식, 그가 투여되는 방식 및 세포/배지가 투여 후 표적 부위에 국소화되는 정도이다.

[0154] 세포의 최적 용량은 단핵 골수 자가 이식에 사용되는 용량의 범위일 수 있다. 상당히 순수한 세포 제제에 있어서, 다양한 실시양태에서의 최적 용량은 투여당 수령체 질량 1 kg당  $10^4$  내지  $10^8$  개의 세포의 범위이다. 일부 실시양태에서, 투여당 최적 용량은  $10^5$  내지  $10^7$  개의 세포/kg이다. 많은 실시양태에서, 투여당 최적 용량은  $5 \times 10^5$  내지  $5 \times 10^6$  개의 세포/kg이다. 참조에 의하면, 전술한 것에서의 더욱 높은 용량은 단핵 골수 자가 이식에서 사용되는 핵화 세포의 용량과 유사하다. 더욱 낮은 용량들 중 일부는 단핵 골수 자가 이식에서 사용되는 kg당

CD34<sup>+</sup> 세포의 수와 유사하다.

- [0155] 다양한 실시양태에서, 세포/배지는 처음 용량으로 투여될 수 있으며, 그 후 추가의 투여에 의해 유지될 수 있다. 세포/배지는 처음에 하나의 방법으로 투여될 수 있으며, 그 후 동일한 방법에 의해 또는 하나 이상의 상이한 방법에 의해 투여될 수 있다. 그 수준은 세포/배지의 진행중인 투여에 의해 유지될 수 있다. 다양한 실시양태는 세포/배지를 처음에 투여하거나 또는 대상체에서 그 수준을 유지하기 위하여 투여하거나 또는 정맥내 주사에 의해 둘 모두를 한다. 다양한 실시양태에서, 환자의 병태 및 기타 인자에 따라 다른 형태의 투여가 이용되며, 이는 본원의 다른 곳에 논의되어 있다.
- [0156] 세포/배지는 광범위한 범위의 시간에 걸쳐 많은 빈도로 투여될 수 있다. 일반적으로, 치료 길이는 질환 과정의 길이, 적용되는 치료법의 유효성, 및 치료되는 대상체의 병태 및 응답에 비례한다.
- [0157] 용도
- [0158] 세포 투여는 다수의 병상에서 혈관신생을 제공하는 데 유용하며, 상기 병상은 임의의 허혈성 병태, 예를 들어 급성 심근 경색, 만성 심부전, 말초 혈관 질환, 뇌졸중, 만성 완전 폐쇄증, 신허혈 및 급성 신장 손상을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0159] 하나 이상의 혈관신생 촉진 인자의 유도자는 투여 전에 투여될 세포와 혼합될 수 있거나 또는 상기 세포와 함께 동시 투여될 수 있다(동시적 또는 순차적).
- [0160] 게다가, 다른 용도는 본 출원에 기술된 생물학적 기작에 대한 지식에 의해 제공된다. 이들 중 하나는 약물 발견을 포함한다. 이 측면은 하나 이상의 화합물을 세포에 의해 분비되는 하나 이상의 혈관신생 촉진 인자의 혈관신생 효과 및/또는 하나 이상의 혈관신생 촉진 인자의 발현 및/또는 분비의 조정 능력에 대하여 스크리닝하는 것을 포함한다. 이는 하나 이상의 혈관신생 촉진 인자의 혈관신생 효과 및/또는 하나 이상의 혈관신생 촉진 인자를 발현 및/또는 분비하는 세포의 능력에 대한 분석을 포함한다. 따라서, 당해 분석은 생체 내에서 또는 시험관 내에서 행해지도록 설계될 수 있다.
- [0161] 세포(또는 배지)는 인자의 단백질 또는 RNA를 직접적으로 분석함으로써 선발될 수 있다. 이는 당업계에서 이용가능한 공지된 기술들 중 임의의 것을 통하여, 예컨대 FACS 및 기타 항체 기반 검출 방법 및 PCR 및 기타 혼성화 기반의 검출 방법에 의해 행해질 수 있다. 간접적 분석, 예컨대 공지된 수용체들 중 임의의 것에의 결합을 인자 발현에 대하여 또한 이용할 수 있다. 간접적인 효과는 인자가 그의 수용체들 중 임의의 것에 결합함으로써 트리거링되는 특정한 생물학적 신호전달 단계/이벤트 중 임의의 것에 대한 분석을 또한 포함한다. 따라서, 세포 기반 분석법이 또한 이용될 수 있다. 하류 표적이 상기 하나 이상의 혈관신생 촉진 인자의 발현/분비에 대한 분석에 또한 이용될 수 있다. 검출은 예를 들어 RNA 또는 단백질 분석을 통한 직접적인 것, 또는 예를 들어 이들 인자의 하나 이상의 생물학적 효과에 대한 생물학적 분석을 통한 간접적인 것일 수 있다.
- [0162] 따라서, 대리모 마커는, 이것이 세포가 하나 이상의 혈관신생 촉진 인자를 발현/분비한다는 지시자로서의 역할을 하기만 한다면, 사용될 수 있다.
- [0163] 발현/분비에 대한 분석은 조직 샘플 또는 세포에서의 인자 면역조직화학, 항-인자 웨스턴 블롯(western blot), qRT-PCR, 루미넥스(Luminex), 및 ELISA를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0164] 세포 및 조건 배지 중 인자(들)의 정량적 결정은 상업적으로 입수가능한 분석 키트(예를 들어, 2단계 공제식 항체 기반 분석에 의존적인 알앤디 시스템즈(R&D Systems))를 이용하여 수행할 수 있다.
- [0165] 시험관 내 혈관신생 분석이 인자들의 발현/분비 평가에 또한 이용될 수 있다. 그러한 시험관 내 혈관신생 분석은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 본 출원에 기술된 HUVEC 관 형성 분석, 내피 세포 증식 또는 이동 분석, 대동맥류 분석, 및 병아리 용모요막 분석(CAM)을 참조한다. 또한 생체 내에서의 혈관신생에 대한 분석은 매트릭셀(matrigel) 플러그 분석, 병아리 대동맥류 분석, 및 매트릭셀 스펀지 분석과 같이 생체 내 혈관신생을 결정하는 공지된 분석법들 중 임의의 것을 사용하여 적용될 수 있다.
- [0166] 본 발명에 있어서의 추가의 용도는 임상적 투여용 세포의 제공을 위한 세포 은행의 확립이다. 일반적으로, 이 절차의 근본적인 파트는 다양한 치료적 임상 환경에서 요망되는 투여 효능을 갖는 세포를 제공하는 것이다.
- [0167] 약물 발견에 유용한 상기 분석법들 중 임의의 것을 투여용 은행으로부터의 것뿐만 아니라 은행용 세포도 선발하는 데 또한 적용될 수 있다.
- [0168] 따라서, 은행화(banking) 과정에서, 세포(또는 배지)는 상기 효과들 중 임의의 것을 달성하는 능력에 대하여 분

석된다. 따라서, 상기 효과들 중 임의의 것에 대하여 요망되는 효능을 갖는 세포가 선발되며, 이들 세포는 세포 은행 생성의 토대를 형성한다.

[0169] 효능은 외인성 화합물, 예컨대 큰 조합적 라이브러리를 이용한 세포 스크리닝을 통하여 발견된 화합물로 처리함으로써 증가될 수 있음이 또한 고려된다. 이들 화합물 라이브러리는 작은 유기 분자, 안티센스 핵산, siRNA DNA 압타머(aptamer), 펩티드, 항체, 비항체 단백질, 사이토카인, 케모카인 및 화학 유인 물질을 포함하지만 이에 한정되는 것은 아닌 제제들의 라이브러리일 수 있다. 예를 들어, 세포는 성장 및 제조 절차 동안 임의의 시점에 그러한 제제에 노출될 수 있다. 유일한 요건은 제제가 효능을 증가시키는지의 여부를 평가하기 위하여 행해지는 요망되는 분석에 충분한 수가 있어야 한다는 것이다. 상기에 기술된 일반적인 약물 발견 공정 동안 발견된 그러한 제제는 은행화 전의 마지막 계대 동안 더욱 유리하게 적용될 수 있다.

[0170] 멀티시스템에 성공적으로 적용된 일 실시양태는 하기와 같다. 세포는 자격이 있는 골수 공여자로부터 단리될 수 있으며, 상기 공여체는 이 공여자로부터 수득된 세포 생성물이 임상 환경에서 사용하기에 안전한지를 결정하기 위하여 특정 테스트 요건을 겪었다. 단핵 세포는 수동 또는 자동 절차를 이용하여 단리된다. 이들 단핵 세포는 배양물 내에 넣어서 세포가 세포 배양 용기의 처리된 표면에 유착하도록 한다. MAPC 세포를 2일 및 4일째에 배지 교환이 일어나게 하여 처리 표면상에서 확장시킨다. 6일째에, 세포를 기계적 또는 효소적 수단에 의해 처리 기계로부터 제거하고, 세포 배양 용기의 또 다른 처리 표면상에 재도말한다. 8일 및 10일째에, 세포는 이전과 같이 처리 표면으로부터 제거되고, 재도말된다. 13일째에, 세포는 처리 표면으로부터 제거되고, 세척되고, 항동결제 물질과 조합되고, 궁극적으로 액체 질소에서 냉동된다. 세포가 적어도 1주일 동안 냉동된 후, 세포의 분취 물을 꺼내고, 효능, 신원, 살균 및 기타 테스트를 위하여 테스트하여 세포 은행의 유용성을 결정한다. 이러한 은행 내의 이들 세포는 그 후 이를 해동시키고, 이를 배양물 중에 넣거나 또는 이를 냉동물로부터 꺼내어 사용하여 잠재적인 징후를 치료할 수 있다.

[0171] 또 다른 용도는 세포의 투여 후 효능 및 유익한 임상 효과에 대한 진단적 분석이다. 징후에 따라, 평가할 수 있는 바이오마커가 존재할 수 있다. 세포의 투여량은 효과에 따라 치료 동안 조절될 수 있다.

[0172] 추가의 용도는 세포를 대상체에 투여하는 것에 선행하는 전처리 진단으로서 상기 결과들 중 임의의 것을 달성하기 위하여 세포의 효능을 평가하는 것이다. 더욱이, 투여량은 투여되는 세포의 효능에 의존적일 수 있다. 따라서, 효능에 대한 전처리 진단 분석은 환자에게 처음에 투여되는 그리고 가능하게는 임상 효과의 실시간 평가를 기반으로 하여 치료 동안 추가로 투여되는 세포의 용량의 결정에 유용할 수 있다.

[0173] 본 발명의 세포를 이용하여 치료 목적뿐만 아니라 생체 내 및 시험관 내 둘 모두의 연구 목적을 위해서도 혈관 신생을 제공하여 정상적으로 그리고 질환에 걸린 모델에서 혈관신생에 연루된 기작을 이해할 수 있음이 또한 이해되어야 한다. 일 실시양태에서, 생체 내 또는 시험관 내 혈관신생 분석은 혈관신생에 연루된 것으로 공지된 제제의 존재 하에 행해질 수 있다. 그러한 제제의 효과를 그 후에 평가할 수 있다. 이러한 유형의 분석은 본 발명의 세포에 의해 촉진되는 혈관신생에 대하여 영향을 미치는 제제에 대하여 스크리닝하는 데 또한 사용될 수 있다. 따라서, 일 실시양태에서, 부정적인 효과를 역전시키고/시키거나 긍정적인 효과를 촉진하는 질환 모델에서의 제제에 대하여 스크리닝할 수 있다. 역으로, 정상 혈관신생 모델에서 부정적인 영향을 미치는 제제에 대하여 스크리닝할 수 있다.

#### [0174] 조성물

[0175] 본 발명은 또한 본원에서 설명되는 임의의 효과를 달성하기 위한 특정한 효능을 갖는 세포 집단에 관한 것이다. 상기 설명된 바와 같이, 이들 집단은 요망되는 효능을 갖는 세포를 선발함으로써 확립된다. 이들 집단은 다른 조성물, 예를 들어 특정한 요망되는 효능을 갖는 집단을 포함하는 세포 은행 및 특정한 요망되는 효능을 갖는 세포 집단을 함유하는 약학 조성물을 제조하기 위해 사용된다.

[0176] 일 실시양태에서, 세포의 혈관신생 잠재력은 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , 및 IFN- $\gamma$ 의 조합에 의해 증가될 수 있다. 인자들의 이러한 조합에 대한 세포의 노출은 CXCL5, FGF2, 및 HGF와 같은 혈관신생 촉진 유전자 발현을 증가시킨다. 이들 조건에 의해 IL-8이 또한 증가될 수 있다.

[0177] 혈관신생 촉진 분자의 분비는 프로스타글란딘-F 유사체 라타노프로스트로 세포를 처리함으로써 또한 증가될 수 있다. RT-PCR에 의해 분석한 혈관신생 촉진 인자의 유전자 발현은 HGF, VEGF, KITLG, 및 IL-8의 증가를 보여준다. 생물학적 프로스타글란딘-F는 또한 VEGF A 수준을 증가시켰다.

#### [0178] 실시예

- [0179] 실시예 1
- [0180] 목적
- [0181] 허혈 손상 후 외인성 줄기 세포의 전달은 면역 및 염증 세포를 조절하고, 아포토시스(apoptosis)를 제한하고, 신-혈관신생을 자극하고, 회복을 위해 숙주 조직을 동원함으로써 손상된 조직에 대한 세포친화성 지원(trophic support)을 통하여 치료적 유익성을 제공하는 것으로 나타났다. 이전의 결과는 허혈 손상에서 멀티스템의 유익성 기작이 부분적으로, 혈관신생을 촉진함으로써 신혈관형성을 유도하는 멀티스템의 능력의 결과일 수 있음을 시사한다. 따라서, 본 연구는 멀티스템이 혈관신생을 유도할 수 있음을 테스트하고 상기 활성을 일으키는 인자를 확인할 뿐만 아니라 멀티스템의 혈관신생 활성을 MSC에 비교하는 것을 목적으로 한다.
- [0182] 방법 및 결과
- [0183] 잘 확립된 시험관 내 인간 제대 정맥 내피 세포 (HUVEC) 혈관신생 분석을 이용하여, 본 발명자들은 4일 후 멀티스템으로부터 수집한 조건 배지가 시험관 내에서 혈관신생을 유도함을 발견하였다. 본 발명자들은 VEGF, CXCL5, 및 IL-8을 비롯한, 멀티스템에 의해 분비된 다수의 혈관신생 촉진 인자를 동정하고, 멀티스템 유도된 혈관신생을 위해 3가지의 모든 인자가 필요함을 발견하였다. 흥미롭게도, CXCL5 및 IL-8은 배양된 골수 유래 중배엽 기질 세포(MSC)에 의해 발현되는 것으로 밝혀지지 않았다. 멀티스템과 대조적으로, MSC로부터의 조건 배지는 단독으로 상기 시험관 내 시스템에서 혈관신생을 유도할 수 없었다.
- [0184] 결론
- [0185] 멀티스템은 부분적으로 IL-8, VEGF 및 CXCL5의 발현을 통하여 혈관신생을 유도할 수 있다. 상기 분비 프로파일은 MSC와 다르고, 이들 차이는 그의 기능적 활성에 반영된다.
- [0186] 압축 요약
- [0187] 잘 확립된 혈관신생 분석을 이용하여, 본 발명자들은 멀티스템으로부터 수집한 조건 배지가 시험관 내에서 혈관신생을 유도함을 발견하였다. 본 발명자들은 VEGF, CXCL5 및 IL-8을 비롯한, 멀티스템에 의해 분비된 다수의 혈관신생 촉진 인자를 동정하고, 멀티스템 유도된 혈관신생을 위해 3가지의 모든 인자가 필요함을 발견하였다. 흥미롭게도, CXCL5 및 IL-8은 배양된 골수 유래 중배엽 기질 세포(MSC)에 의해 발현되지 않았다. 멀티스템과 대조적으로, MSC로부터의 조건 배지는 상기 시험관 내 시스템에서 혈관신생을 유도할 수 없었다.
- [0188] 조직 또는 기관으로의 혈류의 손실을 특징으로 하는 허혈 손상은 허혈 영역으로의 영양분 및 산소의 손실에 의해 유도된 조직 손상 및 세포 사멸의 결과로서 끔찍한 결과를 일으킬 수 있다<sup>1</sup>. 급성 심근 경색(AMI), 말초 혈관 질환(PVD) 및 뇌졸중은 각각 심장, 사지 및 뇌로의 혈류의 손실에서 발생하는 허혈 손상의 3가지 일반적인 예이다. 이들 병태는 산소 및 영양분 결핍으로 인해 중증의 장기간 기관 손상, 사지 절단 및 심지어 사망을 일으킬 수 있다. 이들 병태의 치료는 추가의 조직 손상, 세포 사멸을 방지하고 염증을 감소시키기 위해 흔히 손상된 영역으로의 혈류의 신속한 복구에 집중한다<sup>2</sup>.
- [0189] 멀티스템® (골수로부터 유래된 대규모 확장 유착성 다능성 선구 세포 집단)은 AMI 및 PVD와 같은 허혈 손상 후 전달될 때 동물 모델에서 유익한 것으로 나타났다<sup>3-6</sup>. 예를 들어, 비히클 대조군에 비해, 직접적인 좌측 전방 하행 동맥 결찰에 의한 심근 경색의 유도 후 경색주위 부위 내로 멀티스템을 전달하면 좌심실 수축 성능을 개선시키고, 반흔 면적을 감소시키고, 혈관 밀도를 증가시키고, 심근의 활동적인 특징을 개선시켰다<sup>7</sup>. 마우스 및 인간 멀티스템은 또한 사지 허혈의 모델에서 사지 운동을 개선하고, 혈류 및 모세혈관 밀도를 증가시키고, 괴사를 감소시키는 것으로 나타났다<sup>5</sup>. 멀티스템의 낮은 수준의 접착 및 멀티스템의 심근 또는 내피 세포로의 최소의 분화 때문에, AMI 및 PVD에 대한 멀티스템의 유익성은 주변분비 (paracrine) 효과로부터 유래하는 것으로 생각된다.
- [0190] 비히클 처리 대조군에 비해 멀티스템으로 처리한 AMI 및 PVD 동물에서 관찰된 증가된 혈관 밀도는 멀티스템이 혈관신생을 촉진함으로써 신혈관형성을 유도할 수 있음을 시사한다. 상기 활성은 AMI 및 PVD의 치료에서 중요한 유익성 기작일 수 있다. 증가된 혈관 밀도는 궁극적으로 혈류를 증가시키고, 따라서 손상 부위로 산소 및 영양분 전달을 증가시킨다<sup>8-9</sup>.
- [0191] 다수의 연구에서는 줄기 세포가 VEGF와 같은 혈관신생 촉진 인자를 분비함으로써 혈관신생 및 신혈관형성을 촉진 또는 향상시킬 수 있음을 보여주었다<sup>10-11</sup>. 이들 연구에 기반하여, 본 발명자들은 멀티스템이 또한 혈관신생을



유도하는 능력을 가질 것으로 가설을 세웠다. 따라서, 멀티스텝이 혈관신생을 촉진시킬 수 있는 인자를 분비하는지를 결정하기 위해 조사하였다. 혈관신생 인자 면역블롯 (immunoblot) 어레이를 사용하여 공통 공여자로부터 확립된 멀티스텝 및 MSC 배양물로부터의 조건 배지를 테스트하였으며, 이는 2가지 배양 조건 사이에서 일관적인 혈관신생 인자 발현 패턴을 나타냈다.

[0192] 멀티스텝으로부터 수집한 무혈청 조건 배지는 시험관 내에서 혈관신생을 유도한다. VEGF, CXCL5 및 IL-8을 비롯한, 멀티스텝에 의해 분비된 다수의 혈관신생 촉진 인자가 확인되었고; 면역블롯 연구에서는 멀티스텝 유도된 혈관신생을 위해 3가지의 모든 인자가 필요함이 입증되었다. 그러나, 이들 인자는 단독으로는 어느 것도 혈관신생을 유도하기에 충분하지 않다.

[0193] CXCL5 및 IL-8은 배양된 골수 유래 중배엽 기질 세포(MSC)에 의해 발현되지 않았다. 멀티스텝과 대조적으로, MSC로부터의 조건 배지는 상기 시험관 내 시스템에서 혈관신생을 유도할 수 없었다. 이전 연구에서는 MSC가 시험관 내에서 혈관 형성을 안정화시키고 허혈 동물 모델에서 혈관 밀도를 증가시킬 수 있음을 입증하였지만, 최근의 연구에서는 특정 조건 하에 MSC가 혈관신생을 억제하고 내피 세포 사멸을 일으킬 수 있음을 제안한다<sup>11-13</sup>. 그 결과는 MSC가 내피 세포와의 동시배양의 부재 하에 혈관신생을 유지하기에 충분한 가용성 인자를 분비하지 않음을 제안한다. 함께 살펴보면, 이들 결과는 멀티스텝 및 MSC가 다른 분비 프로필을 갖고, 이들 차이는 다양한 조건 및 환경 하에 그들의 주변분비 활성화에 반영됨을 제안한다.

[0194] 재료 및 방법

[0195] 세포 배양

[0196] 인간 멀티스텝을 이전에 설명된 바와 같이 유지하였다<sup>7</sup>. MSC를 론자 (Lonza, 미국 메릴랜드주 위커스 빌)로부터 구입하고, 공급자의 프로토콜에서 설명된 바와 같이 배양물에서 확장시켰다. 동일한 공여자의 멀티스텝 및 MSC 제조를 위해서, 각각의 세포주에 대해 이전에 설명된 조건을 사용하여 신선한 골수로부터 유착성 세포를 분리하고 배양하였다<sup>14</sup>. 인간 제대 정맥 내피 세포(HUVEC) (론자)를 제조자의 지시에 따라 배양물 중 2500개의 세포/ $\text{cm}^2$ 의 농도로 확장시켰다. HUVEC를 계대배양 3과 5 사이에서 사용하여, 3000개의 세포/ $\text{cm}^2$ 로 집중하고 3일 동안 배양하였고, 이때 혈관신생 분석에서 사용 전에 융합성(confluence)은 약 70-80%이었다.

[0197] 무혈청 조건 배지(CM)의 제조

[0198] 멀티스텝을 멀티스텝 배양 배지가 담긴 조직 배양 플라스크 내로 도말하였다. 24시간 후에, 혈청 함유 배지를 제거하고, 세포를 1X PBS로 세척하고, 성장 인자를 함유하지만 혈청이 결여된 인간 멀티스텝 배양 배지를 첨가하였다. 배지를 교환하지 않으면서 세포를 4일 동안 배양하고, 4일째에 무혈청 조건 배지를 수집하고, 1900 rpm에서 5 min 동안 4°C에서 원심분리하고, 분취하여 -80°C에서 보관하였다.

[0199] 파노믹스(Panomics) 어레이

[0200] 파노믹스(Panomics, 미국 캘리포니아주 프레몬트) 인간 혈관신생 항체 어레이를 제조자의 지시에 따라 2배 희석한 4일 무혈청 멀티스텝 조건 배지 샘플 2 ml을 사용하여 수행하였다.

[0201] 혈관신생 어레이

[0202] 혈관신생 항체 어레이 (알앤디 시스템즈, 미국 미네소타주 미니애폴리스)를 제조자의 지시에 따라 동일한 공여자로부터 유래된 멀티스텝 및 MSC로부터의 2배 희석한 3일 조건 배지 샘플 2 ml을 사용하여 수행하였다.

[0203] ELISA

[0204] IL-8, VEGF 및 CXCL5의 단백질 수준을 ELISA(알앤디 시스템즈)에 의해 결정하였다. VEGF의 모든 이소타입이 검출된다. 오차 막대는 +/- 표준 편차로서 표현한다.

[0205] VEGF 및 CXCL8/IL-8 면역블롯

[0206] 단백질 A-아가로스 비드 (산타 크루즈(Santa Cruz, 미국 캘리포니아주 산타 크루즈))를 1 ml의 CM당 75 l의 50% 슬러리의 농도에서 사용하였다. 마우스 항-인간 VEGF 모노클로날 항체 (산타 크루즈)를 4  $\mu\text{g/ml}$  (CM)의 농도로 사용하고, 토끼 항-인간 IL-8 폴리클로날 항체(밀리포어 (Millipore, 미국 매사추세츠주 빌러리카))를 2  $\mu\text{g/ml}$  (CM)로 사용하였다. 정상 마우스 IgG (산타 크루즈) 및 크롬퓨어(ChromPure) 토끼 IgG (잭슨 이뮤노리써치 (Jackson ImmunoResearch, 미국 펜실베이니아주 웨스트 그로브))를 이소타입 대조군으로서 사용하였다.



- [0207] 단백질 A-아가로스 비드를 회전시키면서 항-VEGF, 항-IL-8 항체 또는 이소타입 대조군과 함께 4℃에서 밤새 예비인큐베이팅한 후, 빙냉 1X PBS로 4회 세척하고, 2500 rpm에서 2분 동안 4℃에서 스피닝하였다. CM을 6 ml 분취물로 회전시키면서 4℃에서 2시간 동안 면역불능시킨 후, 임의의 잔여 비드를 제거하기 위해 0.45 M 필터를 통하여 여과하였다. 마우스 IgG-AC로 처리한 CM을 이소타입 대조군으로서 사용하였다. 제조업 인간 VEGF121 (이 바이오사이언스(eBioscience, 미국 캘리포니아주 샌 디에고)) 및/또는 VEGF165 (알앤디 시스템즈) 이소타입을 면역불능된 CM 내로 다시 50 내지 1000 pg/ml의 농도로 첨가하였다.
- [0208] CXCL5/ENA-78 중화
- [0209] CXCL5를 회전시키면서 2시간 동안 4℃에서 10  $\mu$ g/ml CM의 농도로 인간 CXCL5/ENA-78 항체(알앤디 시스템즈)를 사용하여 중화시켰다. 10  $\mu$ g/ml CM의 농도의 정상적인 총 염소 IgG (잭슨 이뮤노리써치)를 이소타입 대조군으로서 사용하였다. 사용된 추가의 대조군은 10  $\mu$ g/ml의 농도의 인간 ENA-78 중화 항체 또는 정상적인 총 염소 IgG 로 스파이킹한 내피 성장 배지(EGM, 론자)이었다.
- [0210] 혈관신생 분석
- [0211] 성장 인자 감소 매트릭젤 (비디 바이오사이언스 (BD Bioscience, 미국 캘리포니아주 새너제이))을 빙상에서 4℃에서 밤새 해동하고, 빙냉 1X PBS를 사용하여 빙상에서 희석된 6.0-6.5 mg/ml의 농도로 사용하였다. 400 마이크로리터의 매트릭젤을 24웰 조직 배양 플레이트의 내벽 내로 분배하고, 37℃에서 1시간 동안 고화시켰다. 매트릭젤 첨가를 빙상에서 수행하고, 플레이트의 외벽에 1 ml의 1X PBS를 충전하였다.
- [0212] HUVEC를 다음 프로토콜에 따라 수확하였다: 세포를 1X PBS로 세척한 후, 0.25X 트립신-EDTA로 짧게 세정하고, 이어서 1X PBS (잔류 혈청이 있는) 세척을 사용하여 캔칭하였다. 세포를 내피 세포 기본 배지(EBM)에 재현탁하고, 계수하였다. HUVEC를 CM, 다른 실험 조건 및 대조군에 55,000개의 세포/ml/웰의 농도로 첨가하였다. 각각의 샘플 및 대조군을 삼중으로 분석하였다. 관이 형성되도록 플레이트를 6시간 또는 18시간 동안 5% CO<sub>2</sub> 및 37℃에서 인큐베이팅하였다. 총 12개의 영역에 대해 웰당 4개의 영역을 분석하였다. 10X 대물렌즈를 사용하여 사진을 찍었다. 혈관신생은 세포 사이에 형성된 관의 수를 계수함으로써 평가하였다. 그 결과를 영역당 형성된 평균 관 +/- SEM으로 표현한다.
- [0213] 결과
- [0214] 멀티스템은 시험관 내에서 혈관신생을 촉진하는 인자를 분비한다
- [0215] 이전 연구에서는 멀티스템을 사용한 허혈 손상의 치료가 비히클 처리 대조군에 비해 손상 영역에 접하는 혈관 밀도를 증가시키는 밝혀졌고, 이것은 멀티스템이 신혈관형성 및 혈관신생을 유도함을 시사한다. 멀티스템이 혈관신생을 촉진하는 인자를 분비하는지를 테스트하기 위해서, 멀티스템으로부터의 조건 배지를 사용하는 시험관 내 혈관신생 분석을 이용하였다. 멀티스템을 정상 조건 하에 24시간 동안 도말하였다. 그 후, 세포를 4일 동안 조건 배지를 생성하기 위해 무혈청 조건으로 이송하였다. 그 후, 상기 배지를 시험관 내 관 형성 분석에서 혈관신생 활성화에 대해 시험하였다. HUVEC를 임의의 자발적 혈관신생을 유도하지 않는 농도로 무혈청 기초 멀티스템 배지 또는 무혈청 내피 세포 배지로 추가로 희석된 감소된 성장 인자 매트릭젤 상에 도말하였다. HUVEC을 조건 배지, 기본 배지 또는 내피 성장 배지에 18시간 동안 도말하였다. 혈관신생은 각각의 조건에 대해 시야당 형성된 관의 평균 수로서 측정하였다. 임의의 추가의 인자의 부재 하에, 기본 배지 내의 혈청 단독의 존재는 혈관신생을 유도할 수 있다. 따라서, 모든 실험에 대해 무혈청 배지를 사용하였다. 강력하고 복잡한 관 형성이 혈청 함유 내피 세포 배지에서 관찰된 반면, 무혈청 내피 세포 배지 또는 무혈청 기초 멀티스템 배지는 실질적으로 관 형성의 유도를 보이지 않았다. 본 발명자들은 기본 배지에 비해 멀티스템의 4일 배양 무혈청 조건 배지가 혈관신생을 유도함을 발견하였다 (도 1A, 1B).
- [0216] 혈관신생 및 신혈관형성을 촉진하는, 멀티스템에 의해 분비된 인자를 동정하기 위해서, 멀티스템 무혈청 조건 배지를 혈관신생 항체 어레이 상에서 분석하였다 (도 1C). 많은 혈관신생 촉진 인자, 및 일부의 혈관억제(angiostatic) 인자가 멀티스템에 의해 배지 내로 분비된다. 가장 주목되는 사실은, 인터류킨 8(IL-8)과 같이 VEGF가 멀티스템에 의해 분비되었다는 것이고, 그 둘은 모두 강력한 혈관신생 분자이다<sup>15-17</sup>. 또한, 또 다른 강력한 혈관신생 사이토카인인 CXCL5가 멀티스템에 의해 분비된다 (도 1D)<sup>18</sup>. VEGF, CXCL5 및 IL-8은 4일 멀티스템 조건 배지에서 생리학적 활성 수준으로 발현된다 (도 D-F).
- [0217] 혈관신생의 유도에 연루된 핵심 인자로서의 VEGF의 역할 때문에, 본 발명자들은 VEGF가 멀티스템의 혈관신생 촉진

진 활성을 위해 필요한지를 조사하였다<sup>19-20</sup>. VEGF 항체를 사용하여, VEGF를 멀티스텝 조건 배지로부터 면역불능화하였다. VEGF가 배지로부터 실제로 고갈되었음을 보장하기 위해서, 면역불능된 배지로부터 VEGF의 수준을 VEGF ELISA를 사용하여 결정하였다. VEGF의 수준은 조건 배지 및 IgG 단독 고갈 배지에 비해 면역불능된 배지에서 95% 초과로 감소하였다 (도 2A). CXCL5 수준 및 IL-8 수준은 VEGF 면역불능에 영향을 받지 않았다 (도 2B, 2C). VEGF의 부재 하에, 멀티스텝 조건 배지에 의한 혈관신생의 유도는 감소하였다 (도 2, 보충 도 1). 이들 결과는 VEGF가 혈관신생을 유도하기 위해 멀티스텝 조건 배지 내에 필요함을 입증한다.

[0218] 혈관신생 활성을 유지하기 위해 멀티스텝 조건 배지에 필요한 최소 수준의 VEGF를 확립하기 위해서, 증가량의 VEGF를 면역불능된 배지에 다시 첨가하였다. VEGF의 가장 연구된 형태인, 통상 VEGF로서 언급되는 VEGF-A는 VEGF 121 및 VEGF 165를 비롯하여 여러 이소타입을 갖는다. 혈관신생의 유도를 위해 필요한 VEGF의 최소량을 결정하기 위해 상기 2개의 이소타입을 별개로 면역불능된 멀티스텝 조건 배지에 다시 첨가할 때 (도 2A, 2C), 본 발명자들은 어느 이소타입도 단독으로는 멀티스텝 조건 배지를 사용하여 앞서 관찰된 혈관신생의 수준을 완전히 회복시키기에는 충분하지 않지만, 250 pg/ml의 VEGF 121이 일부 혈관신생의 회복에 충분함을 밝혀내었다 (도 2C). VEGF 165의 경우, 50 pg/ml이 일부 수준의 혈관신생의 회복에 충분하고, 보다 많은 VEGF 165의 첨가는 혈관신생의 수준을 임의의 평가가능한 양으로 증가시키지 않았다 (도 2D).

[0219] CXCL5 및 IL-8은 둘 모두 정상 수준의 멀티스텝 유도된 혈관신생을 위해 필요하지만, 혈관신생을 유도하기에 충분하지는 않다

[0220] VEGF가 혈관신생을 위해 요구되기는 하지만, VEGF 단독은 조건 배지에 존재하는 농도에서 강력한 혈관신생을 유도하기에는 충분하지 않다<sup>22-24</sup>. 멀티스텝에 의해 분비된 추가의 혈관신생 인자의 확인 후에, 본 발명자들은 CXCL5 및 IL-8이 멀티스텝의 혈관신생 활성화에 필요한지를 조사하였다. 상기 가설을 테스트하기 위해서, IL-8을 멀티스텝 조건 배지로부터 면역불능시켰으며, 이는 95% 감소되는 것으로 밝혀졌다 (도 3). ELISA에 의해 측정된 VEGF 및 CXCL5 수준은 IL-8 면역불능된 배지에서 영향받지 않은 상태로 유지되었다. IL-8의 부재 하에, 멀티스텝 조건 배지를 사용한 HUVEC의 시험관 내 관 형성은 대략 60% 감소하였다 (도 3, 보충 도 II). 이들 결과는 멀티스텝 조건 배지가 IL-8의 부재시에도 일부 수준의 혈관신생 활성을 계속 유지하지만, IL-8이 멀티스텝 조건 배지에 의한 혈관신생의 유도를 위해 요구됨을 시사한다. 이와 유사하게, CXCL5 차단 항체를 배지 내로 첨가함으로써 CXCL5 활성을 차단하면 HUVEC 혈관신생 분석에서 관 형성이 유의하게 감소하였다 (도 4A). CXCL5 수준은 차단 항체가 존재하는 배지에서 감소되었지만, VEGF 및 IL-8 수준은 변하지 않은 상태로 유지되었다 (보충 도 III). 흥미롭게도, CXCL5 단독, IL-8 단독 또는 둘 모두의 첨가는 기본 배지에서 혈관신생의 유도에 충분하지 않았고, 이것은 이들 인자가 멀티스텝 유도된 혈관신생을 위해 필요하지만 혈관신생을 유도하기에 충분하지는 않음을 시사한다 (도 4B, 4C).

[0221] MSC는 VEGF를 발현하지만, HUVEC 시험관 내 분석에서 혈관신생을 개시할 수 없다.

[0222] 멀티스텝에 의해 유도된 혈관신생의 수준이 다른 줄기 세포주에 의해 유도된 것과 유사한지를 평가하기 위해서, MSC로부터의 무혈청 조건 배지를 수집하고, 멀티스텝에 비해 배양 중 혈관신생을 유도하는 그의 능력에 대해 테스트하였다. MSC 조건 배지는 여러 공여자로부터의 MSC로 반복한 경우에도 상기 분석에서 혈관신생을 유도하지 않았다 (도 6A, 보충 도 III). 다른 보고서는 MSC가 시험관 내 HUVEC 분석에서 혈관신생을 유도할 수 있다고 제시하였지만, 이들 분석은 도말 4-6시간 후에 분석되었고, 불완전 혈관신생을 보이거나, 또는 상이한 조건을 사용하였다<sup>25-27</sup>. 혈관신생 관 형성을 6시간 시점에 조사할 때, MSC 및 멀티스텝 조건 배지 둘 모두는 일부 관 형성을 유도하였다. 그러나, 24시간 시점에, MSC 조건 배지를 사용한 혈관신생은 붕괴되었지만, 멀티스텝 조건 배지에서는 유지되었다 (도 5).

[0223] MSC 조건 배지에서 VEGF, CXCL5 및 IL-8의 발현을 조사하였고, VEGF는 멀티스텝 조건 배지에서보다 더 높은 수준으로 발현되는 것으로 밝혀졌고, CXCL5 및 IL-8은 MSC 조건 배지에서 검출가능한 수준으로 발현되지 않았다. 상기 결과가 무혈청 배양에 의해 유도된 인공물이라기보다는 오히려 MSC의 분비 프로필을 나타내는지 확인하기 위해서, MSC에 의해 발현된 VEGF, IL-8 및 CXCL5의 수준을 그의 정상 배양 조건 하에서 조사하고, 멀티스텝의 배양 조건 하에 멀티스텝 조건 배지 하에 발견된 이들 인자의 단백질 수준과 비교하였다. 이들 세포주에 대해, 본 발명자들은 두 세포주 사이의 임의의 유전적 변이를 제거하기 위해 동일한 공여자로부터 MSC 및 멀티스텝을 유도하였다. 이들 세포 종류가 동일한 공여자로부터 유도된 경우에도, CXCL5 및 IL-8 수준은 MSC 조건 배지에서 검출될 수 없었지만, 멀티스텝 배지에서 생리학적 활성 수준으로 발현되었다 (도 5B). 이들 세포주의 분비 프로필을 추가로 조사하기 위해서, 본 발명자들은 멀티스텝 조건 배지의 분비 프로필을 동일한 공여자로부터 유래하

는 세포로부터의 혈관신생 항체 어레이 (도 6A) 상의 MSC 조건 배지의 분비 프로파일과 비교하였다 (도 6, 보충 데이터 1). 데이터는 안지오키톤, HGF, IL-8, 렙틴, TIMP-4, 및 IGFBP-1을 포함하는, MSC에 의해 분비되지 않는, 멀티스텝에 의해 분비된 다수의 혈관신생 및 혈관억제 인자가 존재함을 보여주었다. 이와는 대조적으로, TIMP-1 (25배 더 높음) 및 IGFBP-2 (16배 더 높음) 둘 모두는 멀티스텝에 비해 MSC에서 훨씬 더 높은 수준으로 발현되었다. VEGF 및 IGFBP-3 둘 모두는 또한 단지 3-4배 더 높았지만 멀티스텝보다 MSC에서 일관되게 더 높은 수준으로 발현되었다. 함께 살펴보면, 이들 결과는 동일한 공여자로부터 유도된 경우에도 멀티스텝 및 MSC가 상이한 분비 프로파일을 갖는다는 것을 나타내고, 이들 차이는 세포주들 사이의 기능적 차이에 반영된다.

[0224] 논의

[0225] 허혈 손상, 예를 들어 급성 심근 경색, 뇌졸중 및 말초 혈관 질환을 치료하기 위해서, 골수, 제대혈 및 지방 조직을 포함하여 다양한 조직으로부터 단리된 성체 줄기 세포가 현재 개발되고 있다<sup>28-30</sup>. 이들 손상은 이화된 조직에서 산소 및 영양분의 초기 손실에 의해 그리고 또한 그 영역에서의 후속적인 염증에 의해 세포 및 조직 손상을 유발한다. 신속하고 지속적인 혈류의 회복은 허혈 영역 내의 손상 및 염증을 감소시킬 수 있다. 세포 기반 요법의 본래의 의도는 외인성 줄기 세포의 전달 및 후속적인 분화를 통하여 손상 후에 손실되고 손상된 조직의 재생 및 회복이었다. 그러나, 줄기 세포 치료법을 위한 유익성 기작을 조사하는 후속 연구에서, 많은 세포 유형이 전달 수일 후에 더 이상 검출가능하지 않기 때문에, 많은 줄기 세포는 재생보다는 주로 주변분비 효과를 통하여 기능하는 것으로 밝혀졌다<sup>31-33</sup>. 치료 가설은 이들 세포 집단이 면역 및 염증 세포를 조절하고, 아포토시스를 제한하고, 신-혈관신생을 자극하고, 회복을 위해 숙주 조직을 동원함으로써 손상된 조직에 세포친화성 지원을 제공할 수 있다는 것이다. 유익성은 상기 경로의 활발한 캐스케이드로부터 유래하는 것으로 보이고, 상이한 세포 집단은 특정 경로에 대해 보다 강력한 영향을 줄 수 있다. 치료에 가장 적절한 유착성 줄기 세포 집단의 선택은 핵심 경로에 대한 제시된 집단의 효능, 및 응답을 효과적으로 매개하는 전달 시간을 모두 반영할 수 있다. 따라서, 비교 데이터를 제공하기 위해 상기 경로에 대한 표준화된 분석을 확립하고 이들 시험관 내 활성 대리물을 손상 및 회복에 연관시키는 것이 중요하다.

[0226] 다능성 성체 선구 세포는 골수 배양물로부터 유래된 유착성 성체 줄기 세포 집단이다. 이전의 생체 내 연구에서는 허혈 손상 후에 멀티스텝으로 치료된 동물에서 혈관 밀도의 증가를 보여주었다<sup>4, 7</sup>. 본 연구에서, 본 발명자들은 멀티스텝이 시험관 내 관 형성 분석에서 혈관신생을 유도할 수 있는 인자들을 분비함을 밝혀내었다. 추가의 분석은 멀티스텝이 VEGF, IL-8, 및 CXCL5를 비롯한 다양한 혈관신생 촉진 인자를 분비함을 보여주었다. 이들 인자 중 2가지, 즉, CXCL5 및 IL-8은 있더라도 매우 적은 CXCL5 및 IL-8을 분비하는 MSC에 비해, 멀티스텝에 의해 고도로 차별적으로 분비된다. VEGF, CXCL5, 및 IL-8은 모두 멀티스텝 유도된 혈관신생을 위해 요구된다. 임의의 이들 인자의 제거 또는 억제 는 혈관신생을 촉진하는 멀티스텝 조건 배지의 능력을 크게 감소시킨다. VEGF 165는 혈관신생에 연루된 주요 이소타입이다. 그러나, 여러 VEGF 이소타입이 멀티스텝 유도된 혈관신생을 담당할 수 있고, 그 이유는 관 형성이 VEGF 면역불능된 멀티스텝 조건 배지에서 VEGF121 또는 VEGF165 이소타입을 독립적으로 사용할 때 100%로 회복될 수 없기 때문이다.

[0227] 다른 군은 동물에서 일부 유익한 효과를 제공하기 위해서 단일 혈관신생 촉진 인자, 예를 들어 VEGF를 허혈 손상 모델에 전달하였지만, 그 결과는 임상 적응증, 예를 들어 AMI 및 PVD에 대해 혼합되었다<sup>34, 35</sup>. 혈관신생 인자의 제어되지 않은 발현은 쥐 AMI 모델에서 혈관종 형성, 관절염 및 망막병증, 및 심각한 흉막 삼출 및 심낭 삼출과 같은 심각한 부작용을 유도할 수 있다<sup>34, 36, 37</sup>. 유전자 또는 단백질 전달에 의한 단일 혈관신생 인자에 대한 임상 시험의 결과는 가장 가능한 이유로서, 장기간의 유익성에 필요한 현재 테스트된 인자의 불안정성, 전달 복잡성, 허혈 조직의 낮은 흡수 및 응답 및 기능적 재혈관형성 달성을 위한 여러 개의 협력 분자의 필요성을 포함하는 여러 인자 때문에 PVD에 대해 실망스러웠다. 이와는 대조적으로, 줄기 세포를 사용한 허혈 손상의 치료는 단일 단백질 또는 유전자 치료에 대한 매력적인 대안을 제공할 수 있다. 허혈 손상을 치료하기 위한 줄기 세포의 사용은 저산소성 및 염증성 미세환경에 응답하고 귀소하여 적절한 혈관신생 반응을 자극하기 위한 동적 균형을 달성하는 세포에 의해 손상 부위에 대한 다수의 혈관신생 인자의 직접적인 전달을 야기할 수 있다. 추가로, 멀티스텝과 같은 줄기 세포는 또한 면역조정 및 항-아포토시스 기작을 통하여 동시에 조직 손상을 예방할 수 있다. 본 연구에서, 본 발명자들은 멀티스텝이 실제로, 적어도 3가지의 혈관신생 촉진 인자의 발현을 통하여 직접적으로 혈관신생을 유도할 수 있음을 입증한다.

[0228] MSC가 높은 수준의 VEGF를 발현하고 분비하지만, MSC의 조건 배지는 상기 시험관 내 분석 시스템에서 혈관신생을 유도하기에는 불충분하였다. MSC는 이전 연구에서 시험관 내에서 혈관 형성을 안정화시키는 것으로



밝혀졌다. 그러나, 이들 연구 중 많은 연구는 보다 이른 시점, 예를 들어 4-6시간의 시점에서 또는 상이한 조건 하에서 혈관 형성을 조사한다<sup>25-27, 38</sup>. 본 발명자들은 상기 보다 이른 시점에, 24시간에서 안정하지 않은 음성 대조군에서 혈관신생의 배경보다 더 높은 수준이 존재함을 밝혀내었다. 이와 유사하게, 본 발명자들은 6시간의 시점에서 MSC가 일부 수준의 혈관신생을 유도할 수 있고, 그 후 24시간의 시점까지 손실됨을 밝혀내었다. 이와는 대조적으로, 멀티스템은 24시간에서 안정한 상태로 유지되는 관 형성을 유도한다. 이들 결과는 MSC가 다른 인자의 부재 하에 단기간에 혈관신생을 지원할 수 있지만, 상기 혈관 형성은 안정하지 않음을 시사한다. 이러한 결과는 VEGF가 단독으로는 이들 세포에 의해 발현된 수준에서 안정한 혈관 형성을 개시하기 위해 충분하지 않다는 이전의 연구로부터의 데이터를 반영한다<sup>24</sup>. MSC로 치료된 허혈 손상에서 증가된 혈관 밀도를 보여주는 이전의 생체 내 실험의 맥락에서, MSC는 혈관신생을 촉진하기 위해 내인성 염증 세포 또는 조직 선구자를 유도함으로써 혈관 밀도를 증가시킬 수 있다.

#### [0229] 참고문헌

1. Rosamond, W. et al., "Heart disease and stroke statistics--2007 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee" *Circulation*, Feb 6 2007;115(5):e69-171.
2. Molin, D and Post, MJ., "Therapeutic angiogenesis in the heart: protect and serve" *Current opinion in pharmacology*, Apr 2007;7(2):158-163.
3. Kovacsics-Bankowski, M. et al. "Clinical scale expanded adult pluripotent stem cells prevent graft-versus-host disease" *Cellular immunology*, 2009;255(1-2):55-60.
4. Pelacho, B. et al., "Multipotent adult progenitor cell transplantation increases vascularity and improves left ventricular function after myocardial infarction" *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, Jan-Feb 2007;1(1):51-59.
5. Aranguren, XLM et al., "Multipotent adult progenitor cells sustain function of ischemic limbs by stimulating vessel and muscle regeneration" 2007.
6. Kovacsics-Bankowski, M. et al., "Pre-clinical safety testing supporting clinical use of allogeneic multipotent adult progenitor cells" *Cytotherapy*, 2008;10(7):730-742.
7. Van't Hof, W. et al., "Direct delivery of syngeneic and allogeneic large-scale expanded multipotent adult progenitor cells improves cardiac function after myocardial infarct" *Cytotherapy*, 2007;9(5):477-487.
8. van der Laan, A.M. et al., "Targeting angiogenesis to restore the microcirculation after reperfused MI" *Nat Rev Cardiol*, Jun 16 2009.
9. Idris, N.M. et al., "Therapeutic angiogenesis for treatment of peripheral vascular disease" *Growth factors (Chur, Switzerland)*, Dec 2004;22(4):269-279.
10. Markel, T.A. et al., "VEGF is critical for stem cell-mediated cardioprotection and a crucial paracrine factor for defining the age threshold in adult and neonatal stem cell function" *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, Dec 2008;295(6):H2308-2314.
11. Payne, T.R. et al., "A relationship between vascular endothelial growth factor, angiogenesis, and cardiac repair after muscle stem cell transplantation into ischemic hearts" *J Am Coll Cardiol*, Oct 23 2007;50(17):1677-1684.
12. Kinnaird, T., et al. "Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms" *Circulation*, Mar 30 2004;109(12):1543-1549.
13. Tang, Y.L. et al., "Paracrine action enhances the effects of autologous mesenchymal stem cell transplantation on vascular regeneration in rat model of myocardial infarction" *Ann Thorac Surg*, Jul 2005;80(1):229-236; discussion 236-227.
14. Boozer, S. et al., "Global Characterization and Genomic Stability of MultiStem, a Multipotent Adult Progenitor Cell" *Journal of Stem Cells*, 2009;4(1):17-28.

15. Koch, A.E. et al., "Regulation of angiogenesis by the C-X-C chemokines interleukin-8 and epithelial neutrophil activating peptide 78 in the rheumatoid joint" *Arthritis and rheumatism*. Jan 2001;44(1):31-40.
16. Strieter, R.M. et al., "Interleukin-8. A corneal factor that induces neovascularization" *The American journal of pathology*. Dec 1992;141(6):1279-1284.
17. Keeley, E.C. et al., "Chemokines as mediators of neovascularization" *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Nov 2008;28(11):1928-1936.
18. Keane, M.P. et al., "ENA-78 is an important angiogenic factor in idiopathic pulmonary fibrosis" *American journal of respiratory and critical care medicine*. Dec 15 2001;164(12):2239-2242.
19. Carmeliet, P., "Angiogenesis in health and disease" *Nature medicine*. Jun 2003;9(6):653-660.
20. Carmeliet, P., "Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis" *Nature medicine*. Apr 2000;6(4):389-395.
21. Neufeld, G. et al., "Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors" *Faseb J*. Jan 1999;13(1):9-22.
22. Kinnunen, K. et al., "Overexpression of VEGF-A induces neovascularization and increased vascular leakage in rabbit eye after intravitreal adenoviral gene transfer" *Acta physiologica (Oxford, England)*. Aug 2006;187(4):447-457.
23. Milkiewicz, M. et al., "Vascular endothelial growth factor mRNA and protein do not change in parallel during non-inflammatory skeletal muscle ischaemia in rat" *The Journal of physiology*. Dec 1 2006;577(Pt 2):671-678.
24. Loffredo, F. and Lee, R.T., "Therapeutic vasculogenesis: it takes two" *Circulation research*. Jul 18 2008;103(2):128-130.
25. Iwase, T. et al., "Comparison of angiogenic potency between mesenchymal stem cells and mononuclear cells in a rat model of hindlimb ischemia" *Cardiovasc Res*. Jun 1 2005;66(3):543-551.
26. Zacharek, A. et al., "Angiopoietin1/Tie2 and VEGF/Fikl induced by MSC treatment amplifies angiogenesis and vascular stabilization after stroke" *J Cereb Blood Flow Metab*. Oct 2007;27(10):1684-1691.
27. Hung, S.C. et al., "Angiogenic effects of human multipotent stromal cell conditioned medium activate the PI3K-Akt pathway in hypoxic endothelial cells to inhibit apoptosis, increase survival, and stimulate angiogenesis" *Stem cells (Dayton, Ohio)*. Sep 2007;25(9):2363-2370.
28. Burns, T.C. and Verfaillie, C.M., "Low WC. Stem cells for ischemic brain injury: a critical review" *The Journal of comparative neurology*. Jul 1 2009;515(1):125-144.
29. Singh, S. et al., "Stem cells improve left ventricular-function in acute myocardial infarction" *Clinical cardiology*. Apr 2009;32(4):176-180.



30. Aranguren, X.L. et al., "Emerging hurdles in stem cell therapy for peripheral vascular disease" *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*. Jan 2009;87(1):3-16.
31. Zhang, M. et al., "SDF-1 expression by mesenchymal stem cells results in trophic support of cardiac myocytes after myocardial infarction" *Faseb J.* Oct 2007; 21(12):3197-3207.
32. Block, G.J. et al., "Multipotent Stromal Cells (MSCs) are Activated to Reduce Apoptosis in Part by Upregulation and Secretion of Stanniocalcin-1 (STC-1)" *Stem cells (Dayton, Ohio)*. Dec 18 2008.
33. Gneccchi, M. et al., "Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy" *Circulation research*. Nov 21 2008;103(11):1204-1219.
34. Makinen, K. et al., "Increased vascularity detected by digital subtraction angiography after VEGF gene transfer to human lower limb artery: a randomized, placebo-controlled, double-blinded phase II study" *Mol Ther.* Jul 2002;6(1):127-133.
35. Rajagopalan, S. et al., "Regional angiogenesis with vascular endothelial growth factor in peripheral arterial disease: a phase II randomized, double-blind, controlled study of adenoviral delivery of vascular endothelial growth factor 121 in patients with disabling intermittent claudication" *Circulation*. Oct 21 2003;108(16):1933-1938.
36. Su, H. et al., "Adeno-associated viral vector-mediated hypoxia response element-regulated gene expression in mouse ischemic heart model" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Jul 9 2002;99(14):9480-9485.
37. Schwarz, E.R. et al., "Evaluation of the effects of intramyocardial injection of DNA expressing vascular endothelial growth factor (VEGF) in a myocardial infarction model in the rat--angiogenesis and angioma formation" *J Am Coll Cardiol*. Apr 2000;35(5):1323-1330.
38. Oswald, J. et al., "Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro" *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 2004;22(3):377-384.

보충 데이터 I: 멀티스템 및 MSC에 의해 발현되는 혈관신생 인자들의 비교

	평균 MSC 신호: 단백질 1 $\mu$ g당 양성 대조군의 %	평균 멀티스템 신 호: 단백질 1 $\mu$ g 당 양성 대조군 의 %	표준 편차 MSC	표준 편차 멀티스템
안지오키펜	0.00000	0.03081	0.00000	0.00400
엔도텔린-1	0.00317	0.03469	0.00550	0.00524
HGF	0.00000	0.04639	0.00000	0.00737
IGFBP-1	0.00000	0.00148	0.00000	0.00038
IGFBP-2	0.02350	0.00145	0.03394	0.00251
IGFBP-3	0.06941	0.02018	0.01728	0.00374
IL-8	0.00000	0.02004	0.00000	0.00834
렙틴	0.00000	0.01607	0.00000	0.00585
트롬보스폰딘-1	0.00401	0.00334	0.00694	0.00307
VEGF	0.08976	0.03124	0.04583	0.00485

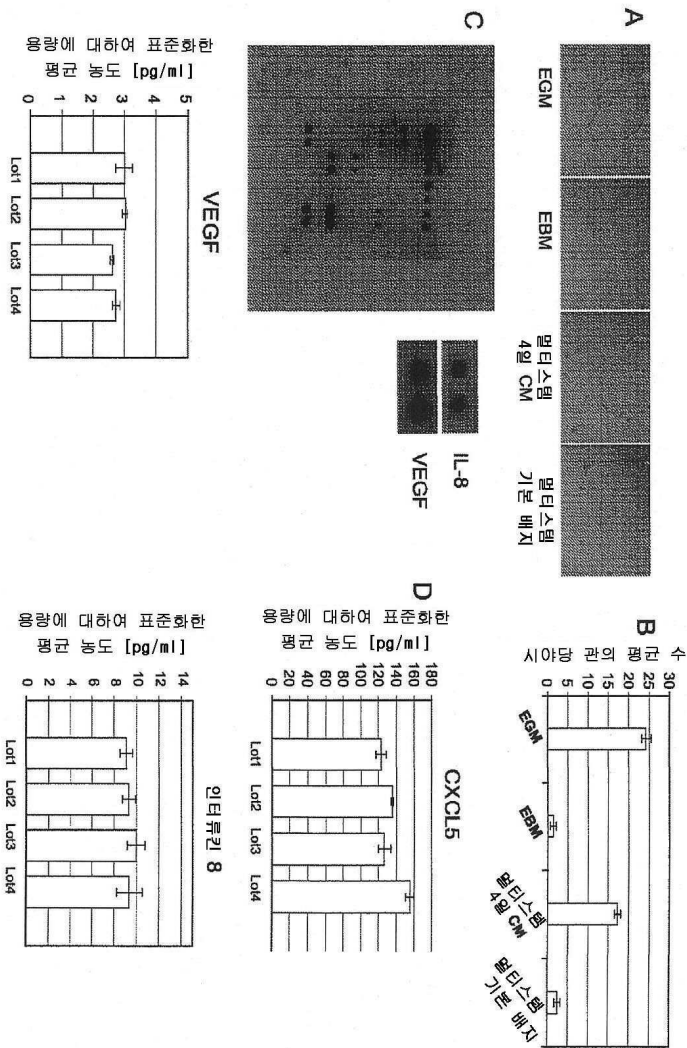
실시예 2

멀티스템에서의 혈관신생 인자의 향상된 발현

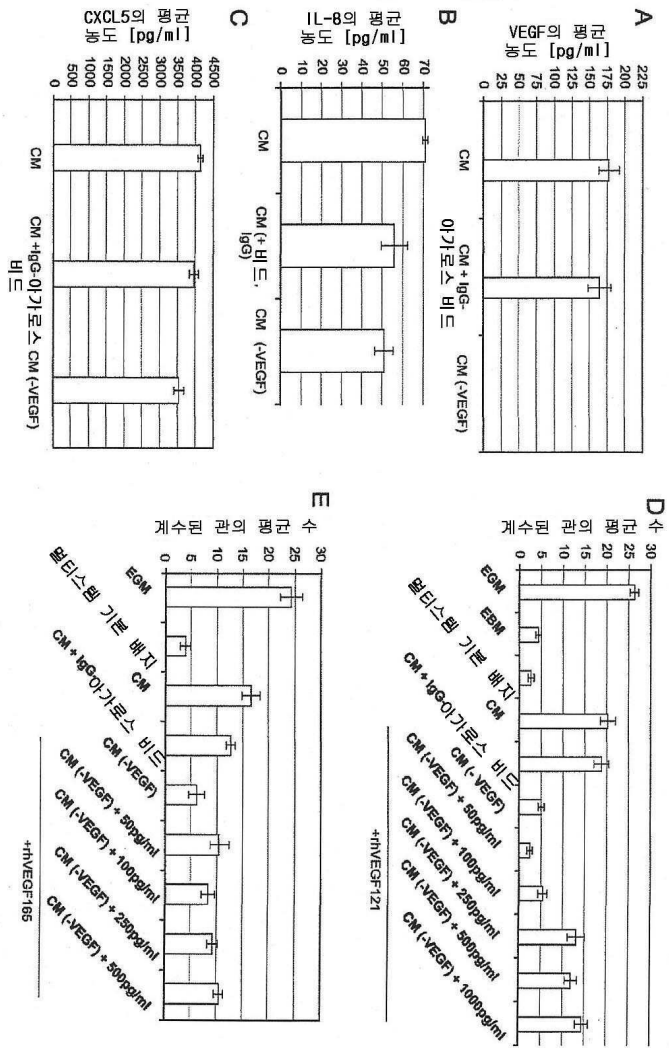
도 7 내지 도 12는 멀티스템(MAPC) 제제에서 혈관신생 인자 발현이 증가될 수 있음을 보여준다.

도면

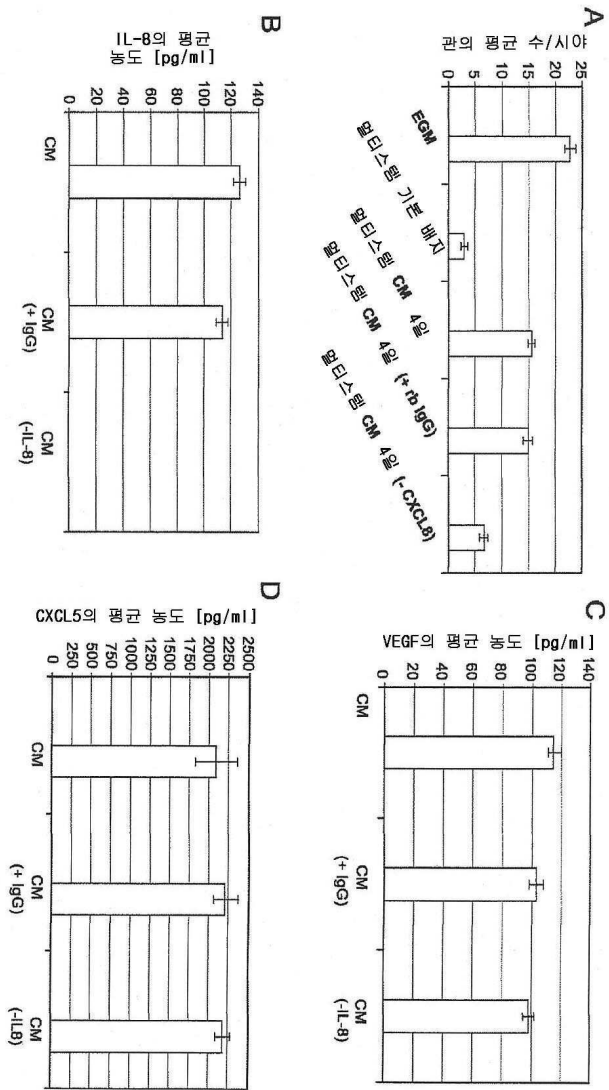
도면1



도면2

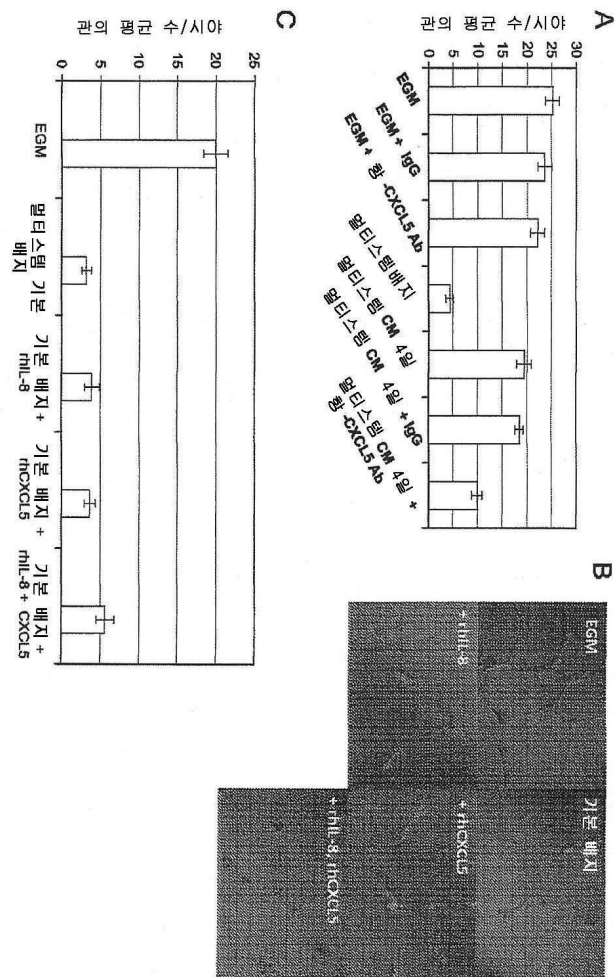


도면3

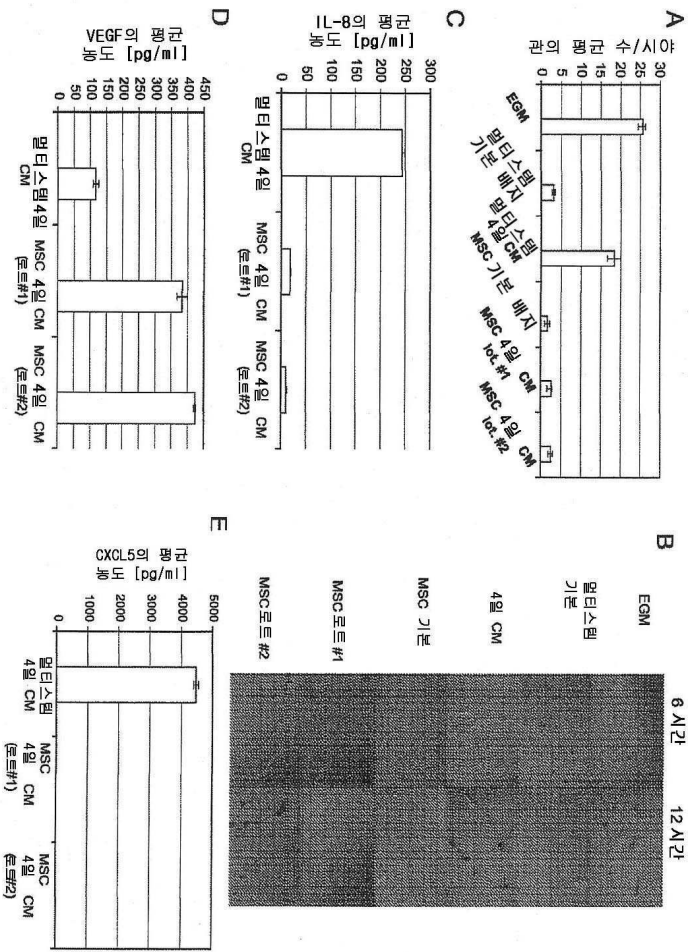




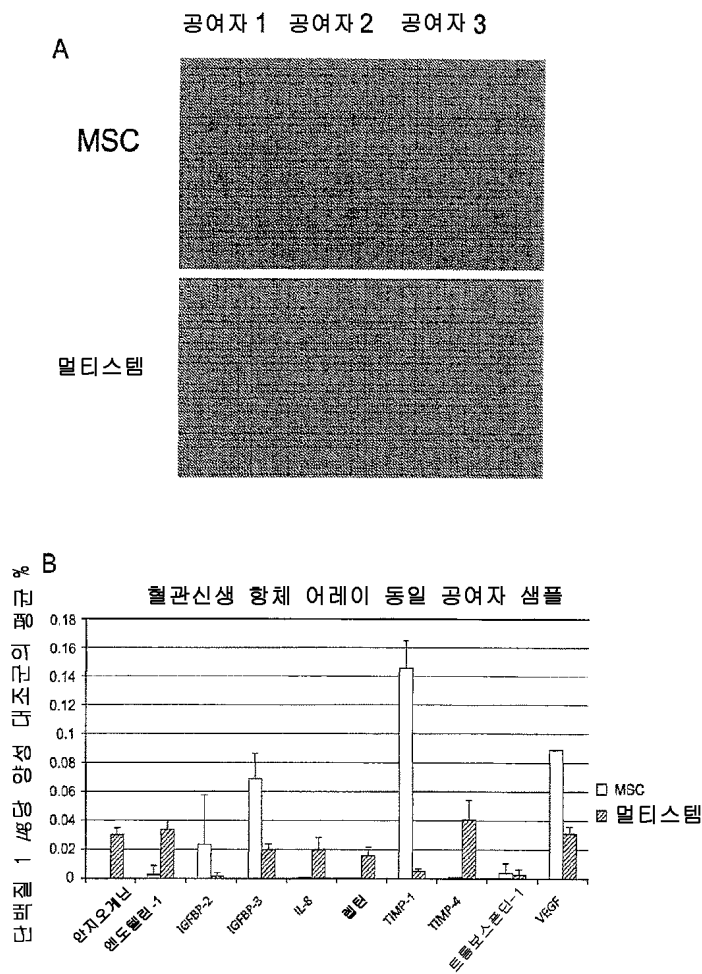
도면4



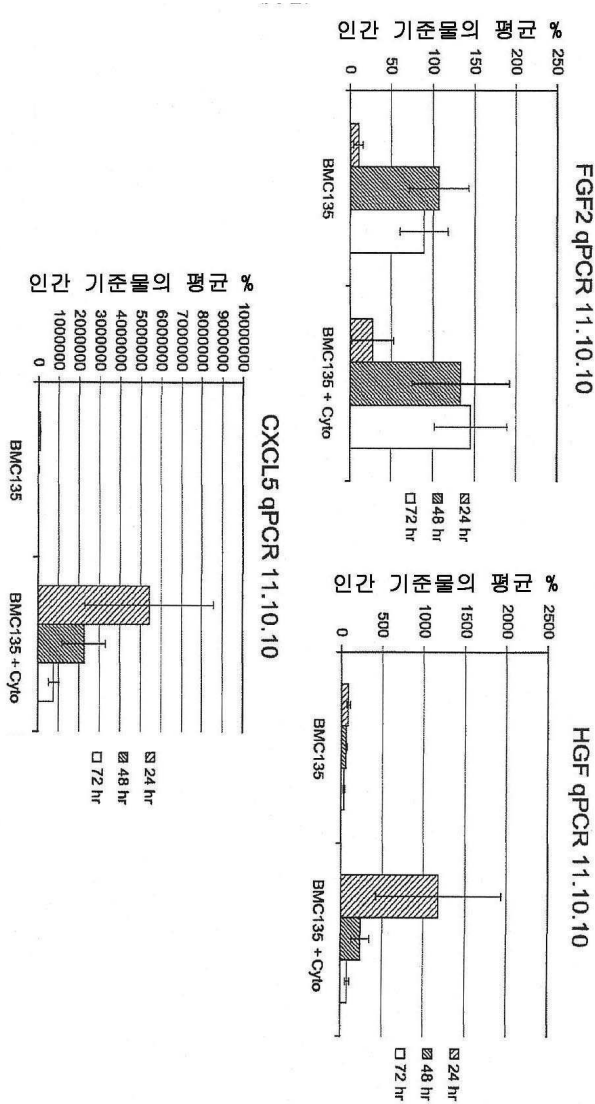
도면5



도면6



도면7





상향조절되는 혈관인생 인자의 샘플

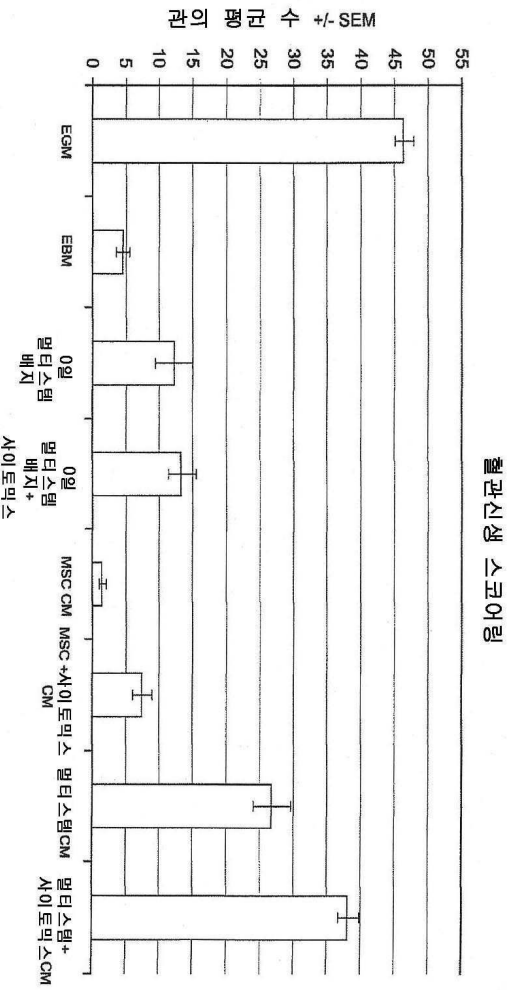
6 시간

기호	멀티시스템 기본 발현	멀티시스템 + 사이토믹스	변화 배수
IL8	7762.2	21887	2.81
CXCL5	5176.2	12990.2	2.51
VEGFC	3513.2	6143.6	1.75
TGFB3	42.5	173.3	4.08
IL6	312.5	13073.5	41.84
FGF2	146.2	444.1	3.04
PTGS2 (cox-2)	458.3	4918.6	10.73

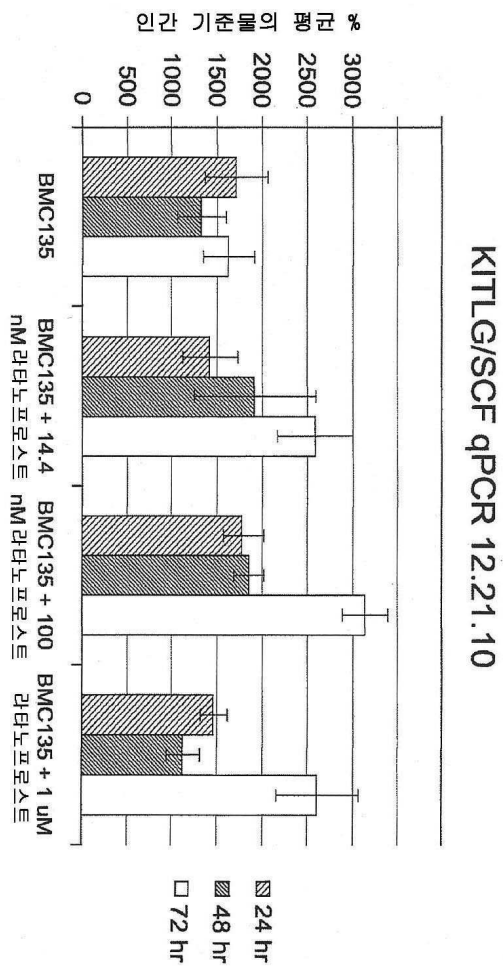
48 시간

기호	멀티시스템 기본 발현	멀티시스템 + 사이토믹스	변화 배수
IL8	184.6	26604.4	144.12
CXCL5	779.6	19267.2	24.71
VEGFC	1101	2777	2.523
VEGFA	284.1	485.9	1.84
TGFB3	41.4	215.1	5.120
IL6	25.7	960.3	37.37
ACVRL1	60.9	235.6	3.87
ANGPTL 4	1667.5	5296.5	3.18
CYR61	6609.5	10185.1	1.540
TNFRSF 12A	341.4	894.6	2.62

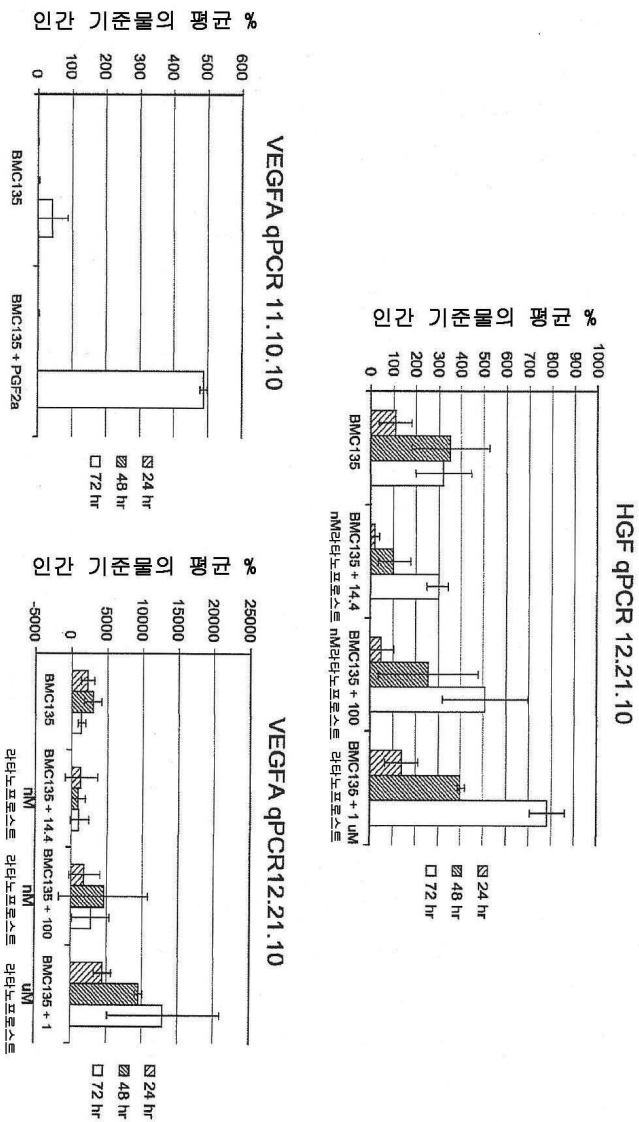
도면9



도면10a

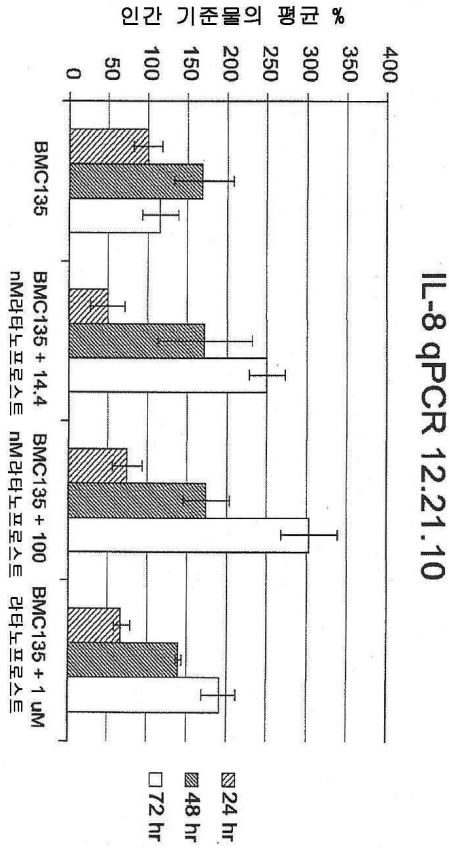


도면10b

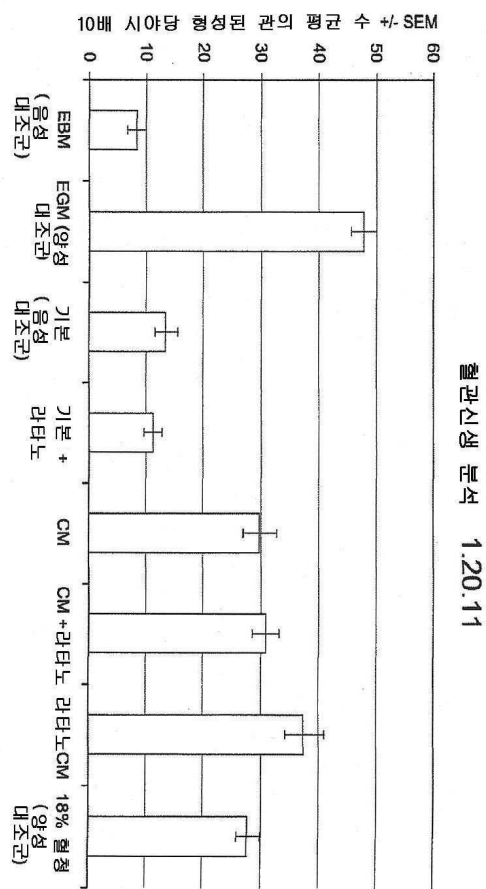




도면10c



도면11



도면12

