



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년08월12일
(11) 등록번호 10-2143961
(24) 등록일자 2020년08월06일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/44 (2015.01) A61K 31/557 (2006.01)
A61K 31/5585 (2006.01) A61K 35/12 (2020.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 35/44 (2013.01)
A61K 31/557 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2015-7004319
- (22) 출원일자(국제) 2013년07월30일
심사청구일자 2018년07월13일
- (85) 번역문제출일자 2015년02월17일
- (65) 공개번호 10-2015-0036716
- (43) 공개일자 2015년04월07일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2013/052700
- (87) 국제공개번호 WO 2014/022376
국제공개일자 2014년02월06일
- (30) 우선권주장
61/678,208 2012년08월01일 미국(US)
61/750,458 2013년01월09일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
JP2011015609 A
US20030118567 A1

- (73) 특허권자
유나이티드 세러퓨틱스 코오폰레이션
미국 메릴랜드 20910 실버 스프링 스프링 스트리트 1040
- (72) 발명자
제프스, 로저
미국 27514 노스캐롤라이나주 샬렐 힐 포레스트 오크스 드라이브 3410
피터센, 토마스
미국 27705 노스캐롤라이나주 더럼 피치웨이 드라이브 4315
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
양영준, 김영

전체 청구항 수 : 총 17 항

심사관 : 윤동준

(54) 발명의 명칭 프로스타시클린-처리된 내피 전구 세포를 사용한 폐동맥 고혈압의 치료

(57) 요약

본원은 단리된 내피 전구 세포 (EPC)를 제공하는 단계; EPC를 프로스타시클린으로 처리하며, 여기서 처리된 EPC는 증진된 혈관신생 특성을 갖는 과다증식성 표현형을 나타내는 것인 단계; 및 폐동맥 고혈압 (PAH)을 앓고 있는 대상체에게 처리된 EPC를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, PAH를 치료하는 방법에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

A61K 31/5585 (2013.01)

A61K 35/12 (2013.01)

(72) 발명자

일라간, 로저 엠.

미국 27215 노스캐롤라이나주 벌링턴 싱클레어 트
레이스 2022

웨이드, 마이클

미국 27516 노스캐롤라이나주 샬럿 힐 올드 스톤
하우스 로드 714

명세서

청구범위

청구항 1

단리된 내피 전구 세포 (EPC)를 제공하는 단계; 및 EPC를 프로스타시클린으로 처리하며, 여기서 프로스타시클린은 EPC의 성장을 증진시키는 것인 단계를 포함하는, EPC의 성장을 촉진하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, EPC가 인간으로부터 단리되는 것인 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, EPC가 조직 또는 세포 배양으로부터 단리되는 것인 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 프로스타시클린이 트레프로스티닐인 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 처리된 EPC가 증진된 혈관신생 특성을 갖는 과다증식성 표현형을 나타내는 것인 방법.

청구항 6

프로스타시클린으로 처리된 단리된 EPC를 포함하며, 여기서 처리된 EPC는 증진된 혈관신생 활성을 갖는 과다증식성 표현형을 나타내는 것인 조성물의 제조방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 프로스타시클린이 에포프로스테놀 소듐, 트레프로스티닐, 일로프로스트 및 PGI₂ 수용체 효능제로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 8

제6항에 있어서, EPC가 인간으로부터 단리되는 것인 방법.

청구항 9

제6항에 있어서, EPC가 조직 또는 세포 배양으로부터 단리되는 것인 방법.

청구항 10

제6항에 있어서, 프로스타시클린이 트레프로스티닐인 방법.

청구항 11

제6항에 있어서, EPC가 내피 콜로니 형성 세포인 방법.

청구항 12

제6항에 있어서, EPC가 유전자 변형된 것인 방법.

청구항 13

제6항에 있어서, 조성물이 하나 이상의 제약상 허용되는 담체를 추가로 포함하는 방법.

청구항 14

제6항에 있어서, 조성물이 EPC 이외에 하나 이상의 치료제를 추가로 포함하는 방법.

청구항 15

제6항에 있어서, 조성물이 하나 이상의 성장 인자를 추가로 포함하는 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 성장 인자가 FGF, VEGF-A, VEGF-B, BMP-4 및 TGF-베타로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 17

제6항에 있어서, 조성물이 중간엽 줄기 세포 또는 중간엽 줄기 세포와 접촉하여 그의 하나 이상의 성분을 함유하는 배양 배지를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본원은 2012년 8월 1일에 출원된 미국 가출원 번호 61/678,208 및 2013년 1월 9일에 출원된 미국 가출원 번호 61/750,458을 우선권 주장하며, 상기 가출원의 내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0003] 기술분야

[0004] 본원은 폐동맥 고혈압 (PAH) 및 다른 유형의 폐고혈압을 치료하는데 있어서 내피 전구 세포 (EPC)의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 폐동맥 고혈압 (PAH)은 치료하지 않으면 진단 후 평균 2.8년 이내에 사망에 이르게 되는 진행성 폐 장애이다. 폐 순환의 수축 증가는 우심장에 스트레스를 증가시키며, 이는 우심부전으로 발전할 수 있다. 정의하자면, 만성 폐고혈압의 경우 평균 폐 동맥압 (mPAP)은 휴식시 >25 mmHg 또는 발휘시 >30 mmHg 이다 (정상치 <20 mmHg). 폐동맥 고혈압의 병리생리상태는 폐혈관의 혈관수축 및 재형성을 특징으로 한다. 만성 PAH에서는, 초기에 근육화되지 않은 폐 혈관의 신생근육화가 존재하고, 이미 근육화된 혈관의 혈관 근육의 두께가 증가한다. 이러한 폐 순환의 소멸 증가는 우심장에 대해 진행성 스트레스를 생성하여, 우심장으로부터의 박출량을 감소시키고, 결국에는 우심부전을 초래한다 (M. Humbert et al., J. Am. Coll. Cardiol. 2004, 43, 13S-24S). PAH는 유병률이 백만명당 1 내지 2명인 극히 드문 장애이다. 환자의 평균 연령은 36세인 것으로 추정되었으며, 환자의 10%만이 60세를 넘었다. 남성보다는 여성에서 명백히 더 많이 발병한다 (G. E. D'Alonzo et al., Ann. Intern. Med. 1991, 115, 343-349).

[0006] 시중에서 입수가능한 표준 요법 (예를 들어, 프로스타시클린 유사체, 엔도텔린 수용체 길항제, 포스포디에스테라제 억제제)은 삶의 질, 운동 내성 및 환자의 예후를 개선시킬 수 있다. 이들 요법의 원리는 주로, 혈관 긴장도에 영향을 미치지만 병원성 재형성 과정에는 직접적으로 영향을 미치지 않는 혈류역학이다. 또한, 이들 의약의 사용 가능성은 때때로 중증 부작용 및/또는 복잡한 투여 유형을 통해 제한된다. 특정 단독요법에 의해 환자의 임상적 상황이 개선되거나 안정화될 수 있는 기간은 한정되어 있다. 결국, 상기 요법들을 강화하여, 다수의 의약이 공동으로 제공되어야 하는 조합 요법이 적용된다. 폐동맥 고혈압 요법에서의 모든 진보에도 불구하고, 이러한 중증 장애의 치유 가망은 아직까지 없다.

[0007] 내피 전구 세포는 성체 골수 뿐만 아니라 말초 혈액 및 인간 체대혈에서 확인되었으며, 증식하여 성숙한 내피 세포로 분화하는 그의 효력을 유지하는 것으로 나타났다 (Ashara et al., Science 275:964 (1997); Murohara et al., J. Clin. Invest. 105(11):1527-36(2000)). 배아발생 동안 새로운 혈관의 발달인 혈관생성은 내피 전구 세포 (EPC) 및 조혈 줄기 세포를 포함하는 혈액성의 형성으로 시작된다 (Risau, Nature 386(6626):671-4 (1997); Risau, FASEB J. 9(10):926-33 (1995); Risau et al., Development 102(3):471-8 (1988); Flamme et al., Development 116(2):435-9 (1992); Hatzipoulos et al., Development 125(8):1457-68 (1998); Doyle et al., Endothelium 13(6):403-10 (2006); Ribatti, Leuk Res. (4):439-44 (2007)).

[0008] EPC는 출생후 신생혈관화에 참여하는 것으로 나타났다 (Takahashi et al., Nat Med. 5(4):434-8 (1999); Isner and Asahara, J Clin Invest. 103(9):1231-6 (1999)). 또한, EPC는 혈관신생, 혈관 복구 및 혈관보호에 참여하는 것으로 밝혀졌다 (Doyle et al., Endothelium 13(6):403-10 (2006)).

[0009] 본 발명에 이르러 놀랍게도, 프로스타시클린-처리된 EPC가 PAH를 치료하는데 유용한 것으로 밝혀졌다.

발명의 내용

[0010] 본 발명의 한 실시양태는 단리된 내피 전구 세포 (EPC)를 제공하는 단계; EPC를 프로스타시클린으로 처리하며, 여기서 처리된 EPC는 증진된 혈관신생 활성을 갖는 과다증식성 표현형을 나타내는 것인 단계; 및 폐동맥 고혈압 (PAH)을 앓고 있는 대상체에게 처리된 EPC를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, PAH를 치료하는 방법이다. 또 다른 실시양태에서, 프로스타시클린은 에포프로스테놀 소듐, 트레프로스티닐, 일로프로스트 및 PGI₂ 수용체 효능제로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 대상체는 인간이다. 또 다른 실시양태에서, EPC는 자가유래이고/거나, PAH를 앓고 있는 대상체의 혈액으로부터 단리되고/거나, 내피 콜로니 형성 세포이고/거나, 유전자 변형되고/거나, 하나 이상의 성장 인자와 함께 공투여되고/거나, 중간엽 줄기 세포와 함께 또는 중간엽 줄기 세포와 접촉하여 그의 하나 이상의 성분을 함유하는 배양 배지와 함께 공투여되고/거나, 프로스타시클린과 함께 공투여된다. 또 다른 실시양태에서, EPC는 프로스타시클린, 및 중간엽 줄기 세포 또는 중간엽 줄기 세포와 접촉하여 그의 하나 이상의 성분을 함유하는 배양 배지 모두와 함께 공투여된다. 또 다른 실시양태에서, 성장 인자는 FGF, VEGF-A, VEGF-B, BMP-4 및 TGF-베타로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또 다른 실시양태에서 조성물은 하나 이상의 제약상 허용되는 담체 또는 EPC 이외에 하나 이상의 치료제를 추가로 포함하는 제약 조성물이다. 또 다른 실시양태에서, 조성물은 폐 혈관 복구를 촉진한다. 또 다른 실시양태에서, 대상체는 EPC의 단리 전에 프로스타시클린으로 전처리된다.

[0011] 본 발명의 또 다른 실시양태는 단리된 EPC를 제공하는 단계; 및 EPC를 프로스타시클린으로 처리하며, 여기서 프로스타시클린은 EPC의 성장을 증진시키는 것인 단계를 포함하는, EPC의 성장을 촉진하는 방법이다. EPC는 인간으로부터 또는 조직 또는 세포 배양으로부터 단리될 수 있다. 또한, 처리된 EPC는 증진된 혈관신생 특성을 갖는 과다증식성 표현형을 나타낼 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 프로스타시클린은 트레프로스티닐이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 실시양태는 단리된 EPC를 제공하는 단계; 및 PAH를 앓고 있는 대상체에게 프로스타시클린과 EPC를 공투여하는 단계를 포함하는, PAH를 치료하는 방법이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 실시양태는 단리된 EPC를 제공하는 단계; PAH를 앓고 있는 대상체에게 EPC를 투여하는 단계; 및 상기 대상체에게 프로스타시클린을 투여하는 단계를 포함하는, PAH를 치료하는 방법이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 실시양태는 단리된 EPC를 제공하는 단계; PAH를 앓고 있는 대상체에게 프로스타시클린을 투여하는 단계; 및 상기 대상체에게 EPC를 투여하는 단계를 포함하는, PAH를 치료하는 방법이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 달리 특정되지 않는 한, 단수 형태는 "하나 이상"을 의미한다.

[0016] 달리 구체적으로 정의되지 않는 한, 본원에서 사용된 모든 전문 과학 용어는 (예를 들어, 줄기 세포 생물학, 세포 배양, 분자 유전학, 면역학, 면역조직화학, 단백질 화학 및 생화학에서) 통상의 기술자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다고 여겨질 것이다.

[0017] 달리 나타내지 않는 한, 본 발명에서 이용된 제조법 단백질, 세포 배양 및 면역학적 기술은 통상의 기술자에게 널리 공지된 표준 절차이다. 이러한 기술은 원천 문헌, 예컨대 [J. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley and Sons (1984)], [J. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989)], [T. A. Brown (editor), Essential Molecular Biology: A Practical Approach, Volumes 1 and 2, IRL Press (1991)], [D. M. Glover and B. D. Hames (editors), DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes 1-4, IRL Press (1995 and 1996)], 및 [F. M. Ausubel et al. (editors), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988, 현재까지의 모든 업데이트 포함)], [Ed Harlow and David Lane (editors) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory, (1988)], 및 [J. E. Coligan et al. (editors) Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons (현재까지의 모든 업데이트 포함)] 전반에 걸쳐 기재되고 설명되어 있으며, 본원에 참조로 포함된다.

[0018] 본원에 사용된 용어 "대상체" (또한 본원에서 "환자"로 언급됨)는 온혈 동물, 바람직하게는 인간을 비롯한 포유 동물을 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 대상체는 영장류이다. 보다 더 바람직한 실시양태에서, 대상체는 인간이다.

[0019] 본원에 사용된 용어 "치료하는", "치료하다" 또는 "치료"는 폐동맥 고혈압의 하나 이상의 증상을 감소시키거나 제거하는데 충분한 치료 유효량의 본원에 정의된 바와 같은 세포를 투여하는 것을 포함한다.

[0020] 본원에 사용된 용어 "예방하는", "예방하다" 또는 "예방"은 폐동맥 고혈압의 하나 이상의 증상의 발달을 중단시키거나 방해하는데 충분한 치료 유효량의 본원에 정의된 바와 같은 세포를 투여하는 것을 포함한다.

[0021] 본원에 사용된 용어 "줄기 세포"는 표현형 및 유전자형이 동일한 딸세포 뿐만 아니라 하나 이상의 다른 최종 세포 유형 (예를 들어, 말단 분화 세포)를 생성할 수 있는 자기-재생 세포를 의미한다. 용어 "줄기 세포"는 전능성, 만능성 및 다능성 세포 뿐만 아니라 이들의 분화로부터 유래된 전구 및/또는 전구체 세포를 포함한다.

[0022] 본원에 사용된 용어 "전능 세포" 또는 "전능성 세포"는 완전한 배아 (예를 들어, 배반포)를 형성할 수 있는 세포를 의미한다.

[0023] 본원에 사용된 용어 "만능 세포" 또는 "만능성 세포"는 완전한 분화 다기능성, 즉 포유동물 신체의 대략 260가지 세포 유형 중 임의의 유형으로 성장할 수 있는 능력을 갖는 세포를 의미한다. 만능 세포는 자기-재생될 수 있고, 조직 내에 휴면상태 또는 정지상태로 남아있을 수 있다.

[0024] "다능성 세포" 또는 "다능 세포"는 임의의 여러 성숙한 세포 유형을 생성할 수 있는 세포를 의미한다. 본원에 사용된 이러한 어구는 성체 또는 배아 줄기 세포 및 전구 세포, 및 이들 세포의 다능성 자손을 포괄한다. 만능 세포와는 달리, 다능 세포는 모든 세포 유형을 형성할 수 있는 능력을 갖지 않는다.

[0025] 본원에 사용된 용어 "전구 세포"는 특정 유형의 세포로 분화하거나 특정 유형의 조직을 형성하는데 수입되는 세포를 의미한다.

[0026] 내피 전구 세포

[0027] 본 발명은 EPC를 제공한다. EPC는 증식하도록 유도될 수 있는 미분화 세포이다. EPC는 각각의 세포 분열에 의

해 하나 이상의 딸세포가 또한 EPC 세포이도록 자기-유지를 할 수 있다. EPC는 100, 250, 500, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000배 또는 그 초과로 확장될 수 있다.

- [0028] EPC의 표현형결정은 이들 세포가 수임 조혈 마커 CD45를 발현하는지를 나타낸다. 추가로, EPC는 VEGFR-2 및/또는 Tie-2에 대하여 면역반응성일 수 있다. 임의로, EPC는 CD14에 대하여 면역반응성이다. EPC는 다능 전구 세포이다.
- [0029] 혈관 내피 성장 인자 (VEGF)는, 배아 혈관신생 및 조혈에 필수적인 신호를 운반하는 VEGFR-1 (flt-1) 및 VEGFR-2 (flk-1/KDR) 및 VEGFR-3/Flt-4를 포함한 특정 티로신 키나제 수용체를 통하여 작용한다. VEGF가 3개 수용체 모두에 결합하지만, 대부분의 생물학적 기능은 VEGFR-2를 통하여 매개되고, VEGFR-1의 역할은 현재 공지되어 있지 않다. VEGFR3/Flt4 신호전달은 림프 내피 세포의 발달에 중요하다고 공지되어 있고, VEGFR3 신호전달은 내피 세포에 림프 내피-유사 표현형을 부여할 수 있다. VEGFR은 혈관 성장, 혈관이완, 혈관 투과성의 유도, 내피 세포 이동, 증식 및 생존의 자극에 필수적인 과정에 대한 신호를 전달한다. 내피 세포는 모든 상이한 VEGF-R을 발현한다. 배아발생 동안, 단일 전구 세포인 혈관모세포가 조혈계와 혈관계 둘 다를 생성시킬 수 있다고 보고되었다.
- [0030] Tie-2는 내피-특이적 수용체 티로신 키나제이며, 안지오펜이에틴 1에 대한 수용체이다. 이는 활발히 증가하는 혈관의 내피에서 주로 발현되고 가장 이른 포유동물 내피 세포 계통 마커를 나타낼 수 있는 유형 I 막 단백질이다. Tie-2는 내피 세포 증식 및 분화의 조절에 관여할 가능성이 있으며, 혈관의 형성 동안 내피 세포의 특별한 배향을 지시할 수 있다.
- [0031] CD14 항원은 리포폴리사카라이드 (LPS)와 LPS-결합 단백질 (LBP)의 복합체에 대한 고친화도 수용체이다. CD14 항원은 CD14, TLR4 및 MD-2로 구성된 기능적 헤테로머 LPS 수용체 복합체의 일부이다. CD14는 말초 혈액, 다른 체액 및 다양한 조직, 예컨대 림프절 및 비장에서 대부분의 인간 단핵구 및 대식세포 상에 강하게 발현된다. CD14는 인간 호중구 및 골수 수지상 세포의 하위집단 상에 약하게 발현된다.
- [0032] CD45 항원은 티로신 포스파타제이며, 백혈구 공통 항원 (LCA)으로서도 공지되어 있다. CD45는 적혈구 세포, 혈소판 및 이들의 전구체 세포를 제외하고 조혈 기원의 모든 인간 세포 상에 존재한다. CD45 분자는 T 세포 및 B 세포 활성화에 요구되며, 세포의 활성화 상태에 따라 5개 이상의 이소형으로 발현된다.
- [0033] VEGFR-1+, VEGFR-2+ 및 Tie-2+ 세포는 각각 혈액 중 단핵 세포 전체 집단의 대략 $3.0 \pm 0.2\%$, $0.8 \pm 0.5\%$, $2.0 \pm 0.3\%$ 를 구성한다. CD14+/VEGFR-2+ 세포는 대략 혈액 중 단핵구 전체 집단의 $2.0 \pm 0.5\%$ 및 혈액 중 단핵 세포 전체 집단의 대략 $0.08 \pm 0.04\%$ 를 구성한다.
- [0034] EPC는 시험관내 장기간 배양물 중에 유지될 수 있다. EPC는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12회 또는 그 초과로 계대배양될 수 있다.
- [0035] EPC는 세포 배양 1-3 주 후에 전형적으로 발달하는 내피 콜로니-형성 세포를 포함한다. 내피 콜로니-형성 세포는 내피 계통에 수입된 전구체 세포의 특성을 가지며, 문헌 [Smardja et al., Angiogenesis 14(1):17-27 (2011)]에 따라 신생혈관에 합쳐질 수 있다.
- [0036] **EPC의 단리 및 배양**
- [0037] EPC의 단리, 정제, 생체의 배양 및 특성화는 문헌 [Hill et al., N. Engl. J. Med. 348:593-600 (2003)], [Assmus et al., Circulation 106:3009-16 (2002)], [Wang et al., J. Am. Coll. Cardiol. 49:1566-71 (2007)] 및 [Kalka et al., P.N.A.S. 97:3422-7 (2000)]에 기재되어 있으며, 상기 문헌의 내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. 또한, 내피 콜로니-형성 세포의 단리, 정제, 생체의 배양 및 특성화는 문헌 [Yoder et al., Blood 109:1801-1809 (2007)], [Ingram et al., Blood 104:2752-2760 (2004)] 및 [Smardja et al., Angiogenesis 14(1):17-27 (2011)]에 기재되어 있으며, 상기 문헌의 내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.
- [0038] 예를 들어, 세포 집단은 양성 선택에 의해 또는 어느 순서로든 양성 선택과 음성 선택의 혼합에 의해 단리된다. 전구 세포 집단은 정제된다. 정제된 EPC 집단은 세포가 단리되는 미정제 세포 집단보다 훨씬 더 높은 비율의 EPC를 함유한다.
- [0039] 예를 들어, 정제 절차는 전체 집단에 대하여 EPC를 적어도 5배 증가, 바람직하게는 적어도 10배 증가, 보다 바람직하게는 적어도 15배 증가, 가장 바람직하게는 적어도 20배 증가, 최적으로는 적어도 25배 증가시켜야 한다. 정제된 EPC 집단은 적어도 15%, 바람직하게는 적어도 20%, 보다 바람직하게는 적어도 25%, 가장 바람직하게는

적어도 35%, 최적으로는 적어도 50%의 EPC를 포함하여야 한다.

- [0040] 본원에 기재된 방법은 최대 75%, 바람직하게는 최대 80%, 보다 바람직하게는 최대 85%, 가장 바람직하게는 최대 90%, 최적으로는 최대 95%의 줄기 세포를 포함하는 혼합물을 유도할 수 있다. 이러한 방법은 99%, 99.90%, 심지어 100%의 EPC를 포함하는 혼합물을 생산할 수 있다. 따라서, 본 발명의 정제된 집단은 상기 기재된 바와 같이 천연으로 존재하는 집단보다 훨씬 더 높은 수준의 EPC를 함유한다.
- [0041] 정제된 EPC 집단은, EPC의 항원 특성을 발현하는 줄기 세포들의 집단을 함유하는 미정제 세포 혼합물을 항원의 세포의 부분에 특이적으로 결합하는 분자와 접촉시킴으로써 단리할 수 있다. 이러한 기술은 양성 선택으로서 공지되어 있다. 분자에의 EPC의 결합은 EPC가 항원을 발현하지 않는 오염 세포로부터 충분히 구별되도록 하여, 오염 세포로부터 줄기 세포를 단리하도록 한다. 항원은 바람직하게는 VEGFR이고, 보다 바람직하게는 VEGFR-2이다.
- [0042] 오염 세포로부터 전구 세포를 분리하는데 사용된 분자는 EPC를 특성화하는 항원에 특이적으로 결합하는 임의의 분자일 수 있다. 분자는, 예를 들어 모노클로날 항체, 모노클로날 항체의 단편, 또는 수용체인 항원의 경우에는 그 수용체의 리간드일 수 있다. 예를 들어, FLK-1과 같은 VEGF 수용체의 경우, 리간드는 VEGF이다.
- [0043] 본 발명의 고유한 단리된 세포는 그의 CD45+ 상태 및 혈관 내피 성장 인자 수용체 (VEGFR), 예를 들어 VEGFR-2의 소유에 의해서 다른 세포로부터 분리될 수 있다. 세포는 통상적인 세포 분리 기술, 예컨대 씨빈(Civin)의 미국 특허 번호 4,714,680, 4,965,204, 5,035,994 및 5,130,144, 츠카모토 등(Tsukamoto et al.)의 미국 특허 번호 5,750,397, 및 로켄 등(Loken et al.)의 미국 특허 번호 5,137,809 (이들 특허 각각은 그 전문이 본원에 참조로 포함됨)에 기재된 기술에 의해 단리될 수 있다. 따라서, 예를 들어, CD45 특이적 모노클로날 항체 또는 VEGFR-특이적 항체는 고체 지지체, 예컨대 니트로셀룰로스, 아가로스 비드, 폴리스티렌 비드, 중공 섬유 막, 자기 비드 및 플라스틱 페트리 디쉬 상에 고정될 수 있다. 이어서, 전체 세포 집단은 고체 지지체를 통과하거나 비드에 첨가된다.
- [0044] 결합 분자에 결합된 세포는, 잔존하는 세포 현탁액으로부터 고체 지지체를 물리적으로 분리함으로써 세포 현탁액으로부터 제거될 수 있다. 예를 들어, 고체 지지체가 줄기 세포에 결합하기에 충분한 시간을 허용한 후, 비결합 세포는 생리학적 완충제로 용리되거나 세척 제거될 수 있다.
- [0045] 결합된 세포는 주로 고체 상 및 결합 분자의 성질에 따라 임의의 적절한 방법에 의해 고체 상으로부터 분리될 수 있다. 예를 들어, 결합된 세포는 강력한 교반에 의해 플라스틱 페트리 디쉬로부터 용리될 수 있다. 대안적으로, 결합된 세포는 고체 상과 항체 사이의 효소-감수성 "스페이스" 서열을 효소에 의해 "닉" 또는 소화시킴으로써 용리될 수 있다. 아가로스 비드에 결합된 적합한 스페이스 서열은, 예를 들어 파마시아로부터 상업적으로 입수가 가능하다.
- [0046] 이어서, 용리된 풍부화된 세포 분획은 원심분리에 의해 완충제로 세척되어 종래 기술에 따라 추후의 사용을 위해 저온에서 생존 상태로 보존될 수 있다. 세포는 또한, 예를 들어 수용자 내로 정맥내 주입되어 즉시 사용될 수 있다.
- [0047] 고체 지지체에 부착된 채로 남아있는 세포들은 사용된 항체에 의해 인식된 마커를 함유하는 세포들이다. 따라서, 항-CD45 항체가 사용된다면, 생성되는 집단에는 CD45+ 세포가 매우 풍부할 것이다. 사용된 항체가 VEGFR이라면, 생성되는 집단에는 VEGFR+ 세포가 매우 풍부할 것이다. 이어서, 다른 마커에 대한 항체가 부착되어 있는 고체 상을 사용하는 단계를 반복함으로써 상기 집단에는 다른 마커가 풍부해질 수 있다.
- [0048] CD45+ VEGFR+ 세포를 분류하기 위한 또 다른 방법은 유동 세포측정법, 가장 바람직하게는 형광-활성화된 세포 분류기 (FACS), 예컨대 벡톤-딕킨슨(Becton-Dickinson)에서 팩스캔(FACScan) 또는 팩스칼리버(FACSCalibur)라는 명칭으로 제조한 FACS에 의해 수행된다. 이러한 기술에 의해, CD45 마커를 갖는 세포는 특정 형광 염료에 접합된 항-CD45 항체에 의해 상기 염료로 태그부착된다. 유사하게, 세포의 VEGFR 마커는 다른 형광 염료에 접합된 항-VEGFR 항체에 의해 상기 다른 염료로 태그부착된다. 염색된 세포가 기기 상에 위치할 때, 세포의 스트림은 형광색소를 여기시키는 아르곤 레이저 빔을 통해 지시되어 광을 방출한다. 이러한 방출광은 일련의 광학 필터에 의해서 형광색소의 방출 파장에 특이적인 광전증배관 (PMT)에 의해 검출된다. PMT에 의해 검출된 신호는 그 자신의 채널에서 증폭되고, 컴퓨터에 의해 여러 상이한 형태로 디스플레이된다 -- 예를 들어 히스토그램, 도트 디스플레이 또는 키투어 디스플레이. 따라서, 하나의 파장에서 방출되는 형광 세포는 특정 형광색소-표지된 시약과 반응성인 분자를 발현하는 반면, 비-형광 세포 또는 다른 파장에서 방출되는 형광 세포는 상기 분자를 발현하지 않고 다른 파장에서 형광을 내는 형광색소-표지된 시약에 반응성인 분자를 발현할 수 있다. 유동

세포측정기는 또한 세포에 의해 발현된 형광의 양 (형광 강도)을 디스플레이한다는 점에서 반-정량적이다. 이는 상대적 의미에서 세포에 의해 발현된 분자의 수와 상관관계가 있다.

- [0049] 유동 세포측정기는 또한 비-형광 파라미터, 예컨대 세포 부피 또는 세포가 레이저 빔을 통과할 때 세포에 의해 산란된 광을 측정하도록 구비되어 있을 수 있다. 세포 부피는 보통 직접적인 측정이다. 광 산란 PMT는 전방각으로 세포에 의해 산란 (전방 산란; FSC)된 광 또는 직각으로 세포에 의해 산란 (측방 산란; SSC)된 광을 검출한다. 두 파라미터가 다른 인자에 의해 영향을 받을 수 있을지라도 FSC는 보통 크기의 지수인 반면 SSC는 세포 복잡성의 지수이다.
- [0050] 바람직하게는, 유동 세포측정기에는 1개 초과 PMT 방출 검출기가 구비되어 있다. 추가 PMT는 다른 방출 파장을 검출할 수 있어서, 각각 개별적 분리 채널에서 1개 초과 형광색소의 동시 검출이 가능하다. 컴퓨터에 의해 각 채널의 분석 또는 각 파라미터와 또 다른 것의 상관관계를 수행한다. FACS 기계에 전형적으로 사용되는 형광색소는 525 nm에서 방출 피크를 갖는 플루오레세인 이소티오시아네이트 (FITC) (녹색), 575 nm에서 방출 피크를 갖는 R-피코에리트린 (PE) (오렌지색-적색), 620 nm에서 방출 피크를 갖는 아이오도화프로피듐 (PI) (적색), 660 nm에서 방출 피크를 갖는 7-아미노악티노마이신 D (7-AAD) (적색), 670 nm에서 방출 피크를 갖는 R-피코에리트린 Cy5 (RPE-Cy5) (적색), 및 655-750 nm에서 방출 피크를 갖는 알로피코시아닌 (APC) (진적색)을 포함한다.
- [0051] 이들 및 다른 유형의 FACS 기계는 상이한 특성의 세포를 상이한 용기로 편향시킴으로써 다양한 분획을 물리적으로 분리하기 위한 추가의 능력을 가질 수 있다.
- [0052] 출발 물질, 예컨대 골수, 말초 혈액 또는 제대혈의 CD45+ VEGFR+ 집단을 분리하기 위한 임의의 다른 방법이 또한 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 본 발명의 다양한 하위집단 (예를 들어, CD14+, Tie2+, CD144-)은 유사한 방식으로 분리될 수 있다.
- [0053] 미정제 세포 집단이 상기 기재된 바와 같이 정제되기 전 또는 정제된 후에, 전구 세포의 집단은 관련 기술분야에 공지된 방법에 의해 추가로 농축될 수 있다. 예를 들어, 전구 세포는 EPC의 하나 이상 항원 특성에 대한 양성 선택에 의해 풍부화될 수 있다. 이러한 항원은, 예를 들어 CD14 또는 Tie-2를 포함한다.
- [0054] 한 실시양태에서, 혈액은 공여자의 순환 말초 혈액으로부터 직접 채혈한다. 혈액은 EPC를 포획하기 위한 고체상-연결된 결합 분자, 예컨대 항체 VEGFR-2를 함유하는 칼럼을 통해 연속적으로 스며든다. 전구 세포-고체상 연결 혈액은 관련 기술분야에 공지된 방법, 예컨대 혈액성분채집술에 의해 공여자의 순환계에 즉시 반환된다. 혈액은 충분한 수의 전구 세포가 칼럼에 결합할 때까지 이러한 방식으로 처리된다. 이어서, 줄기 세포는 관련 기술분야에 공지된 방법에 의해 칼럼으로부터 분리된다. 이러한 방법은 드문 말초 혈액 전구 세포가 매우 많은 부피의 혈액으로부터 수거되도록 하며, 공여자로 하여금 비용 및 골수 수거의 통증 및 마취, 진통, 수혈 및 감염과 연관된 위험성을 피할 수 있도록 한다.
- [0055] EPC는 본원에 기재된 방법을 사용하여 배양 및 증식된다. 세포는 밀도 구배 원심분리에 의해 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)를 분리함으로써 말초 혈액으로부터 수득된다.
- [0056] 세포 현탁액은 세포를 지속시킬 수 있는 임의의 용기, 특히 배양 플라스크, 배양 플레이트 또는 롤러 병, 더욱 특히 25 cm² 배양 플라스크와 같은 작은 배양 플라스크에 시딩된다. 현탁액에서 배양된 세포는 대략 5x10⁴ 내지 2x10⁵ 개 세포/ml (예를 들어, 1x10⁵ 개 세포/ml)로 재현탁된다. 고정 기관 상에 플레이팅된 세포는 대략 2-3x10³ 개 세포/cm²로 플레이팅된다. 임의로, 배양 플레이트는 콜라겐과 같은 매트릭스 단백질로 코팅된다. 세포는, HEM, DMEM, RPMI 및 F-12 등을 포함하며 글루타민 및 다른 아미노산, 비타민, 미네랄 및 단백질, 예컨대 트랜스페린 등과 같이 세포 대사에 요구되는 보충물들을 함유하는, 세포 성장을 지지할 수 있는 임의의 공지된 배양 배지 내에 놓일 수 있다. 배양 배지는 또한 효모, 박테리아 및 진균에 의한 오염을 방지하기 위한 항생제, 예컨대 페니실린, 스트렙토마이신 및 겐타미신 등을 함유할 수 있다. 배양 배지는 소, 말 및 닭 등으로부터 유래된 혈청을 함유할 수 있다.
- [0057] 배양 조건은 생리학적 조건에 가까워야 한다. 배양 배지의 pH는 생리학적 pH에 가까워야 한다 (예를 들어, pH 6 내지 8, 약 pH 7 내지 7.8, 또는 pH 7.4). 생리학적 온도는 약 30°C 내지 40°C 범위이다. EPC는 약 32°C 내지 약 38°C의 온도에서 배양된다 (예를 들어, 약 35°C 내지 약 37°C).
- [0058] 임의로, 배양 배지는 하나 이상의 증식-유도 ("유사분열촉진") 성장 인자로 보충된다. "성장 인자"는 EPC에 대한 성장, 증식-유도, 분화-유도 또는 영양 효과를 갖는 단백질, 펩티드 또는 기타 분자이다. "증식-유도 성장

인자"는 세포의 표면에 있는 수용체에 결합하여 세포에 영양 또는 성장-유도 효과를 발휘하는 임의의 분자를 비롯하여, EPC가 증식하도록 하는 영양 인자이다. 증식-유도 성장 인자는 EGF, 암피레굴린, 산성 섬유모세포 성장 인자 (aFGF 또는 FGF-1), 염기성 섬유모세포 성장 인자 (bFGF 또는 FGF-2), 형질전환 성장 인자 알파 (TGF α), VEGF 및 이들의 조합을 포함한다. 성장 인자는 보통 약 1 fg/ml 내지 1 mg/ml 범위의 농도로 배양 배지에 첨가된다. 약 1 내지 100 ng/ml의 농도이면 보통 충분하다. 단순 적정 검정이 특정 성장 인자의 최적 농도를 결정하기 위해 용이하게 수행될 수 있다.

[0059] 성장 및 영양 인자의 생물학적 효과는 일반적으로 세포 표면 수용체에의 결합을 통해 매개된다. 다수의 이들 인자들에 대한 수용체가 확인되어 왔고, 특정 수용체에 대한 항체 및 분자 프로브가 이용가능하다. EPC는 분화의 모든 단계에서 성장 인자 수용체의 존재에 대해 분석될 수 있다. 많은 경우에서, 특정 수용체의 확인은 외인성 성장 또는 영양 인자의 첨가에 의해 특정 발달 경로를 따라 세포를 좀 더 분화시키는데 있어서의 이용 전략에 대한 지침을 제공한다.

[0060] 일반적으로, EPC의 배양 배지는 시험관내에서 약 3-10일 후, 배지를 흡인해내고 새로운 배지를 배양 플라스크에 첨가함으로써 다시 채워진다. 임의로, 흡인된 배지는 수집되고 여과되어 후속적 계대 EPC에 대한 조건 배지로서 사용된다. 예를 들어, 10%, 20%, 30%, 40% 또는 그 초과 조건 배지가 사용된다.

[0061] EPC 세포 배양물은 증식을 재개시하도록 용이하게 계대배양될 수 있다. 예를 들어, 시험관내에서 3-7일 후, 배양 플라스크를 잘 진탕한 다음, EPC를 50 ml 원심분리 튜브에 옮겨 낮은 속도로 원심분리한다. 배지를 흡인해내고, EPC를 소량의 배양 배지에 재현탁시킨다. 이어서, 세포를 계수하고, 목적하는 밀도로 재플레이팅하여 증식을 재개시시킨다. 이러한 절차를 매주 반복하여 각 계대에서 생존 세포 수의 대수적 증가를 일으킬 수 있다. 목적하는 수의 EPC를 얻을 때까지 상기 절차를 계속한다.

[0062] EPC 및 EPC 자손은 이들이 필요할 때까지 관련 기술분야에 공지된 임의의 방법에 의해 동결보존될 수 있다 (예를 들어, 미국 특허 번호 5,071,741, PCT 국제 특허 출원 WO93/14191, WO95/07611, WO96/27287, WO96/29862 및 WO98/14058, Karlsson et al., 65 Biophysical J. 2524-2536 (1993) 참조). EPC는 특정 동결보존제를 함유하는 등장성 용액, 바람직하게는 세포 배양 배지에 현탁될 수 있다. 상기 동결보존제는 디메틸설폭시드 (DMSO) 및 글리세롤 등을 포함한다. 이들 동결보존제는 5-15% (예를 들어, 8-10%)의 농도로 사용된다. 세포는 -10 $^{\circ}$ C 내지 -150 $^{\circ}$ C (예를 들어, -20 $^{\circ}$ C 내지 -100 $^{\circ}$ C 또는 -70 $^{\circ}$ C 내지 -80 $^{\circ}$ C)의 온도로 점차 동결된다.

[0063] **프로스타시클린으로의 EPC 처리**

[0064] 본 발명의 한 측면에 따르면, 프로스타시클린은 단리된 EPC를 처리하는데 사용된다. 본원에 사용된 용어 "프로스타시클린"은 임의의 프로스타글란딘 I₂ (PGI₂), 임의의 프로스타시클린 유사체 및 임의의 PGI₂ 수용체 효능제를 포함한다. 그 예는 에포프로스테놀 소듐 (예를 들어 플로란(Flolan)[®]), 트레프로스티닐 (예를 들어 티바소(TYVASO)[®]), 레모둘린(Remodulin)[®], 일로프로스트 (예를 들어 벤타비스(Ventavis)[®]) 및 PGI₂ 수용체 효능제 (예를 들어 셀렉시페그(Selezipag))를 포함한다.

[0065] 프로스타시클린으로 처리된 EPC는 증진된 혈관신생 특성을 갖는 과다증식성 표현형을 나타내며, 이는 비처리 EPC와 비교하여 PAH를 치료하는데 있어서 유리하다.

[0066] EPC는 다양한 방식으로 프로스타시클린으로 처리될 수 있다. 예를 들어, 프로스타시클린이 EPC의 확장 동안 생체외에서 EPC를 처리하는데 사용될 수 있고; 프로스타시클린이 EPC와 함께 수용자에게 공투여될 수 있고; 프로스타시클린이 또한 이식 후의 EPC를 처리하는데 사용될 수 있다. 본 발명의 한 실시양태에 따르면, EPC는 수용자 자신의 혈액 또는 골수로부터 제조된다. 그러한 경우에, 프로스타시클린은 또한 EPC가 수용자로부터 단리되기 전에 EPC를 처리하는데 사용될 수 있다.

[0067] **EPC의 투여**

[0068] EPC의 투여/이식에 의한 PAH의 치료는 문헌 [Wang et al., J. Am. Coll. Cardiol. 49:1566-71 (2007)], [Zhao et al. Circ. Res. 96:442-450 (2005)] 및 [Nagaya et al., Circulation 108:889-895(2003)]에 기재되어 있으며, 상기 문헌의 내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0069] 손상된 혈관 내로의 EPC의 투여/이식은 손상된 혈관 조직, 예를 들어 정맥, 동맥, 모세관을 복구시켜 혈관 기능을 회복시키는 잠재력을 갖는다. 그러나, 이식 목적에 적합한 세포의 부재는 이러한 절차의 전체 잠재력이 충족되는 것을 막는다. "적합한" 세포는 하기 기준 중 하나 이상을 충족하는 세포이다: (1) 다수로 수득될 수 있

음; (2) 필요한 경우 유전자 물질의 삽입을 허용하기 위해 시험관내에서 증식될 수 있음; (3) 무기한으로 생존하여 이식시 혈관 복구를 촉진할 수 있음; 및 (4) 비-면역원성이며, 바람직하게는 환자 자신의 조직 또는 상용성 공여자로부터 수득됨. 적합한 EPC는 자가유래, 동종 또는 이종일 수 있다.

[0070] EPC는 비정상적 혈관계 또는 관상동맥 부전 증상을 가진 대상체에게 투여될 수 있다. EPC는 수용자 자신의 혈액 또는 골수로부터 제조될 수 있다. 이러한 경우에, EPC는 분리된 조직으로부터 생성되어 상기 기재된 방법을 사용하여 시험관내에서 증식될 수 있다. 세포 수가 적합하게 확장되었을 때, EPC는 수거되고, 필요한 경우 유전자 변형되고, 수용자의 혈관계 내로의 직접 주사용으로 준비될 수 있다.

[0071] EPC는 숙주에 대해 이종인 공여자 조직으로부터 제조될 수 있다. 이종이식편이 성공적이기 위해서, 이식된 조직에 대한 면역 반응을 감소시키거나 제거하는 일부 방법이 보통 이용된다. 따라서, EPC 수용자는 시클로스포린과 같은 면역억제 약물의 사용을 통하여 또는 국부 적용 면역억제제를 이용하는 국부 면역억제 전략을 통하여 면역억제될 수 있다. 국부 면역억제는 문헌 [Gruber, 54 Transplantation 1-11 (1992)]에 개시되어 있다. 미국 특허 번호 5,026,365에는 국부 면역억제에 적합한 캡슐화 방법이 개시되어 있다.

[0072] 면역억제 기술 이용에 대한 대안으로서, 문헌 [Smithies et al., 317 Nature 230-234 (1985)]에 교시되어 있으며 세포주에서의 유전자 대체 또는 녹아웃 (Zheng et al., 88 Proc. Natl. Acad. Sci. 8067-8071 (1991))으로 확대되는, 배아 줄기 세포에서의 상동 재조합을 사용하는 유전자 대체 또는 녹아웃 방법이 주요 조직적합성 복합체 (MHC) 유전자의 절제를 위해 EPC에 적용될 수 있다. MHC 발현이 결여된 EPC는 수용자를 면역억제시킬 필요없이 동종 및 심지어 이종의 조직적합성 장벽을 넘어 풍부화된 내피 세포 집단의 이식을 가능하게 한다. 공여자 세포의 항원성을 감소시키기 위한 재조합 방법의 사용에 관한 일반적인 검토 및 인용이 또한 문헌 [Gruber, 54 Transplantation 1-11 (1992)]에 개시되어 있다. 표면 변형에 의해 이식물의 면역원성을 감소시키기 위한 예시적인 접근이 PCT 국제 특허 출원 WO 92/04033 및 PCT/US99/24630에 개시되어 있다. 대안적으로, MHC 항원을 변경하거나 삭제한 트랜스제닉 동물로부터 EPC를 제조하여 이식편의 면역원성을 감소시킬 수 있다.

[0073] EPC는 마이크로캡슐화 (예를 들어, 본원에 참조로 포함된 미국 특허 번호 4,352,883, 4,353,888 및 5,084,350 참조) 및 마크로캡슐화 (예를 들어, 각각 본원에 참조로 포함된 미국 특허 번호 5,284,761, 5,158,881, 4,976,859 및 4,968,733 및 PCT 국제 특허 출원 WO 92/19195 및 WO 95/05452 참조)를 비롯한 공지의 캡슐화 기술에 따라 캡슐화되어 숙주에게 인자를 전달하는데 사용될 수 있다. 마크로캡슐화는 각각 본원에 참조로 포함된 미국 특허 번호 5,284,761, 5,158,881, 4,976,859, 4,968,733, 5,800,828 및 PCT 국제 특허 출원 WO 95/05452에 기재되어 있다. 다중 마크로캡슐화 장치가 숙주에 이식될 수 있다.

[0074] 수용자의 조직에 대해 동종인 조직으로부터 제조된 EPC는 수용자의 조직적합성 유형과 밀접하게 매칭시키기 위해 널리 공지된 조직 유형결정 방법을 사용하여 용도에 대해 시험될 수 있다.

[0075] 혈관계에 투여된 EPC는 혈관 이식편을 형성하여, 그 세포가 이식된 또는 기존의 내피 세포와의 접촉을 유지하면서 인접하는 혈관 세포와의 정상적인 연결을 형성할 수 있다. 따라서, 이식된 EPC는 질환 및 노화로 인해 손상된 혈관 조직을 재확립할 수 있다.

[0076] 숙주 혈관 조직 내로의 이식편의 기능적 통합은 다양한 기능 회복에 대한 이식편의 유효성을 검사함으로써 평가될 수 있다.

[0077] 본 발명의 한 실시양태에 따르면, EPC는 하나 이상의 성장 인자, 예컨대 FGF, VEGF-A, VEGF-B, BMP-4, TGF-베타 등과 함께 수용자에게 공투여될 수 있다. EPC는 또한 중간엽 줄기 세포 또는 그의 배양 배지, 및/또는 프로스타시클린 (예를 들어, 트레프로스티닐)과 함께 수용자에게 공투여될 수 있다.

[0078] **중간엽 줄기 세포 (MSC)**

[0079] 중간엽 줄기 세포 (MSC)는 골수, 혈액, 치수 세포, 지방 조직, 피부, 비장, 췌장, 뇌, 신장, 간, 심장, 망막, 뇌, 모낭, 장, 폐, 림프절, 흉선, 골, 인대, 건, 골격근, 진피 및 골막에서 발견되는 세포이고; 상이한 배선, 예컨대 중배엽, 내배엽 및 외배엽으로 분화할 수 있다. 따라서, MSC는 지방, 골, 연골, 탄성, 근육 및 섬유 결합 조직을 포함한 (이에 제한되지 않음) 다수의 세포 유형으로 분화할 수 있다. 이들 세포가 진입하는 특정 계통-수입 및 분화 경로는 기계적인 영향 및/또는 내인성 생물활성 인자, 예컨대 성장 인자, 시토카인 및/또는 숙주 조직에 의해 확립된 국부 미세환경 상태에서부터의 다양한 영향에 좌우된다. 따라서, MSC는 비-조혈 전구 세포로서, 이는 분열하여 줄기 세포 또는 전구체 세포인 딸세포를 생성하고 이는 제때에 비가역적으로 분화하여 표현형 세포를 생성할 것이다. MSC의 예는 중간엽 전구체 세포 (MPC)를 포함한다.

- [0080] MSC는 성장 또는 분화 동안 세포의 환경으로 방출될 수 있는 화합물을 통하여 그의 활동을 수행할 수 있다는 것이 발견되었다. 일부 측면에서, 이러한 화합물은 직경이 약 30 nm 내지 약 200 nm인 엑소솜으로 언급되는 미세 소포를 포함한다. 엑소솜은 생체내에서 숙주 세포에 의해 내재화될 수 있다.
- [0081] 엑소솜은 다소포체 분류 경로로부터 유래된 소포이다. 최근 연구는 엑소솜이 세포간 소통과 면역조절 과정의 촉진에 유용한 생물활성 소포라는 것을 보여준다. MSC 엑소솜은 20S 프로테아솜 및 다수의 RNA (메신저 RNA, 비-코딩 RNA, 마이크로RNA)를 함유한다.
- [0082] 엑소솜 이외에, MSC는 또한 본 개시내용의 목적에 유용한 다른 생물활성 분자/소포를 방출한다. 이러한 분자 및 소포는 비제한적으로 미토콘드리아 및 성장 인자를 포함한다. MSC로부터 방출된 상기 분자 및 소포를 함유하는 배양 배지를 제조하고 추가로 특정 분자 및 소포를 분리하는 방법이 관련 기술분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Hu et al., *Frontiers in Genetics*, 2:56, 1-9 (2012)]을 참조한다.
- [0083] 일부 실시양태에서, 환자에게 MSC 또는 MSC-조건화 배양 배지를 EPC 및/또는 프로스타시클린과 함께 공투여하기 전에, MSC 또는 MSC-조건화 배양 배지는 프로스타시클린으로 임의로 전처리될 수 있다. 따라서, 또한 한 실시양태에서, 중간엽 줄기 세포 (MSC) 또는 MSC-조건화 배양 배지를 프로스타시클린과 접촉시키는 것을 포함하는, 생체내 전달을 위한 MSC 또는 MSC-조건화 배양 배지의 제조 방법을 제공한다. 또 다른 실시양태는 이러한 방법에 의해 수득가능한 처리된 MSC 또는 MSC-조건화 배양 배지를 제공한다.
- [0084] 화학적 화합물에 의한 세포 또는 배지의 전처리는 공지된 기술을 포괄한다. 한 측면에서, 프로스타시클린은 MSC를 함유하는 배양 배지에 첨가되어 공동-인큐베이션될 수 있다. 그러나, 임의로, 이러한 공동-인큐베이션은 성장 인자 (예를 들어, VEGF 및 안지오펜이텐-1 또는 -2, 혈소판-유래 성장 인자)의 첨가 및/또는 저산소증을 추가로 수반할 수 있다.
- [0085] MSC 또는 MSC-조건화 배양 배지는 다양한 방식으로 프로스타시클린으로 처리될 수 있다. 예를 들어, 프로스타시클린이 MSC의 확장 동안 생체외에서 MSC를 처리하는데 사용될 수 있고; 프로스타시클린이 또한 투여 후의 MSC를 처리하는데 사용될 수 있다. 본 개시내용의 한 실시양태에 따르면, MSC는 수용자 자신의 혈액 또는 골수로부터 제조될 수 있다. 그러한 경우에, 프로스타시클린은 또한 MSC가 수용자로부터 분리되기 전에 MSC를 처리하는데 사용될 수 있다.
- [0086] **제약 조성물**
- [0087] 전형적으로, 세포는 하나 이상의 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물로 투여된다. 어구 "제약상 허용되는"은 타당한 의학적 판단의 범위 내에서, 합리적인 이익/위험 비율에 상응하도록 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응 또는 다른 문제 또는 합병증 없이 인간 및 동물의 조직과의 접촉에 사용하기에 적합한 화합물, 물질, 조성물 및/또는 투여 형태를 의미한다. 본원에 사용된 어구 "제약상 허용되는 담체"는 제약상 허용되는 물질, 조성물 또는 비허용, 예컨대 액체 또는 고체 충전제, 희석제, 부형제 또는 용매 캡슐화 물질을 의미한다.
- [0088] 제약상 허용되는 담체는 염수, 수성 완충 용액, 용매 및/또는 분산 매질을 포함한다. 이러한 담체의 사용은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 용액은 바람직하게는 멸균성이고, 용이하게 주사가능할 수 있을 정도로 이동적이다. 바람직하게는, 용액은 제조 및 저장 조건 하에서 안정하며, 예를 들어 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 아스코르브산 및 티메로살 등을 사용하여 박테리아 및 진균과 같은 미생물의 오염 작용에 대항하여 보존된다.
- [0089] 제약상 허용되는 담체의 역할을 할 수 있는 물질 및 용액의 일부 예는 다음을 포함한다: (1) 당, 예컨대 락토스, 글루코스 및 수크로스; (2) 전분, 예컨대 옥수수 전분 및 감자 전분; (3) 셀룰로스 및 그의 유도체, 예컨대 소듐 카르복시메틸 셀룰로스, 에틸 셀룰로스 및 셀룰로스 아세테이트; (4) 분말화 트라가칸트; (5) 맥아; (6) 젤라틴; (7) 활석; (8) 부형제, 예컨대 코코아 버터 및 좌제 왁스; (9) 오일, 예컨대 땅콩 오일, 목화씨 오일, 홍화 오일, 참깨 오일, 올리브 오일, 옥수수 오일 및 대두 오일; (10) 글리콜, 예컨대 프로필렌 글리콜; (11) 폴리올, 예컨대 글리세린, 소르비톨, 만니톨 및 폴리에틸렌 글리콜; (12) 에스테르, 예컨대 에틸 올레에이트 및 에틸 라우레이트; (13) 한천; (14) 완충제, 예컨대 수산화마그네슘 및 수산화알루미늄; (15) 알긴산; (16) 발열원 무함유 물; (17) 등장성 염수; (18) 링거액; (19) 에틸 알콜; (20) pH 완충 용액; (21) 폴리에스테르, 폴리카르보네이트 및/또는 폴리무수물; 및 (22) 제약 제제에 이용되는 다른 비-독성 상용성 물질.
- [0090] 본 발명의 방법에 유용한 제약 조성물은 중합체 담체 또는 세포의 매트릭스를 포함할 수 있다.
- [0091] 다양한 생물학적 또는 합성 고체 매트릭스 물질 (즉 고체 지지체 매트릭스, 생물학적 접촉제 또는 드레싱 및 생물학적/의학적 스캐폴드)이 본 발명에서 사용하기에 적합하다. 매트릭스 물질은 바람직하게는 생체내 응용에

사용하기 위해 의학적으로 허용된다. 이러한 의학적으로 허용되고/거나 생물학적으로 또는 생리학적으로 허용되는 또는 상용성인 물질의 비제한적 예는 흡수성 및/또는 비-흡수성인, 예컨대 돼지-유래 소장 점막하 (SIS) (및 다른 SIS 공급원)인 고체 매트릭스 물질; 가교 또는 비가교 알기네이트, 히드로콜로이드, 발포체, 콜라겐 겔, 콜라겐 스폰지, 폴리글리콜산 (PGA) 메쉬, 폴리글락틴 (PGL) 메쉬, 플리스, 발포체 드레싱, 생체접착제 (예를 들어, 피브린 접착제 및 피브린 겔) 및 하나 이상의 층의 죽은 포화된 피부 등가물을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0092] 적합한 중합체 담체는 합성 또는 천연 중합체 뿐만 아니라 중합체 용액으로 형성된 다공성 메쉬 또는 스폰지를 포함한다. 매트릭스의 한 형태는 중합체 메쉬 또는 스폰지이고; 다른 형태는 중합체 히드로겔이다. 사용될 수 있는 천연 중합체는 단백질, 예컨대 콜라겐, 알부민 및 피브린; 및 폴리사카라이드, 예컨대 알기네이트 및 히알루론산의 중합체를 포함한다. 합성 중합체는 생분해성 및 비-생분해성 중합체 둘 다를 포함한다. 생분해성 중합체의 예는 히드록시산 중합체, 예컨대 폴리락트산 (PLA), 폴리글리콜산 (PGA) 및 폴리락트산-글리콜산 (PLGA), 폴리오르토에스테르, 폴리무수물, 폴리포스파젠 및 이들의 조합을 포함한다. 비-생분해성 중합체는 폴리아크릴레이트, 폴리메타크릴레이트, 에틸렌 비닐 아세테이트 및 폴리비닐 알콜을 포함한다.

[0093] 가변성이 있는 이온 또는 공유결합으로 가교된 히드로겔을 형성할 수 있는 중합체가 세포를 캡슐화하는데 사용된다. 히드로겔은, 유기 중합체 (천연 또는 합성)가 공유결합, 이온결합 또는 수소결합을 통해 가교되어 3차원의 개방-격자 구조를 생성함으로써 이 구조가 물 분자를 포획하여 겔을 형성하는 경우에 형성되는 물질이다. 히드로겔을 형성하는데 사용될 수 있는 물질의 예는 폴리사카라이드, 예컨대 알기네이트, 폴리포스파젠 및 폴리아크릴레이트 (이들은 이온결합으로 가교됨), 또는 블록 공중합체, 예컨대 플루로닉스(Pluronic)TM 또는 테트로닉스(Tetronics)TM, 폴리에틸렌 옥시드-폴리프로필렌 글리콜 블록 공중합체 (이들은 각각 온도 또는 pH에 의해 가교됨)를 포함한다. 다른 물질은 단백질, 예컨대 피브린, 중합체, 예컨대 폴리비닐피롤리돈, 히알루론산 및 콜라겐을 포함한다.

[0094] 일반적으로, 하전된 측기를 갖는 상기 중합체 또는 그의 1가 이온성 염은 수용액, 예컨대 물, 완충 염 용액 또는 수성 알콜 용액에 적어도 부분적으로 가용성이다. 양이온과 반응할 수 있는 산성 측기를 갖는 중합체의 예는 폴리(포스파젠), 폴리(아크릴산), 폴리(메타크릴산), 아크릴산과 메타크릴산의 공중합체, 폴리(비닐 아세테이트) 및 술폰화 중합체, 예컨대 술폰화 폴리스티렌이다. 아크릴산 또는 메타크릴산 및 비닐 에테르 단량체 또는 중합체의 반응에 의해 형성된 산성 측기를 갖는 공중합체가 또한 사용될 수 있다. 산성 기의 예는 카르복실산 기, 술폰산 기, 할로겐화 (바람직하게는 플루오린화) 알콜 기, 페놀계 OH 기 및 산성 OH 기이다. 음이온과 반응할 수 있는 염기성 측기를 갖는 중합체의 예는 폴리(비닐 아민), 폴리(비닐 피리딘), 폴리(비닐 이미다졸) 및 일부 이미노 치환된 폴리포스파젠이다. 중합체의 암모늄 또는 4급 염은 또한 백본 질소 또는 펜던트 이미노 기로부터 형성될 수 있다. 염기성 측기의 예는 아미노 및 이미노 기이다.

[0095] 또한, 본 발명의 방법에 사용된 조성물은 하나 이상의 치료제를 포함할 수 있다. 예를 들어, 조성물은 염증 또는 통증을 치료하는데 도움을 주기 위한 진통제, 또는 조성물로 치료할 부위의 감염을 방지하기 위한 항감염제를 함유할 수 있다. 보다 구체적으로, 유용한 치료제의 비제한적 예는 하기의 치료 카테고리들을 포함한다: 진통제, 예컨대 비스테로이드성 항염증 약물, 오피에이트 효능제 및 살리실레이트; 항감염제, 예컨대 구충제, 항헬기성균제, 항생제, 아미노글리코사이드 항생제, 항진균 항생제, 세팔로스포린 항생제, 마크롤리드 항생제, 여러가지 β-락탐 항생제, 페니실린 항생제, 퀴놀론 항생제, 술폰아미드 항생제, 테트라시클린 항생제, 항미코박테리아제, 항결핵 항미코박테리아제, 항원충제, 항말라리아 항원충제, 항바이러스제, 항레트로바이러스제, 살개선제, 항염증제, 코르티코스테로이드 항염증제, 항소양제/국부 마취제, 국소 항감염제, 항진균 국소 항감염제, 항바이러스 국소 항감염제; 전해질 및 신장 작용제, 예컨대 산성화제, 알칼리화제, 이뇨제, 탄산 안하이드라제 억제제 이뇨제, 루프 이뇨제, 삼투성 이뇨제, 칼륨-보존성 이뇨제, 티아지드 이뇨제, 전해질 대체물 및 요산 배설촉진제; 효소, 예컨대 췌장 효소 및 혈전용해 효소; 위장제, 예컨대 항설사제, 위장 항염증제, 위장 항염증제, 제산 항궤양제, 위 산-펌프 억제제 항궤양제, 위 점막 항궤양제, H2-차단제 항궤양제, 담석분해제, 소화제, 구토제, 완하제 및 대변 연화제, 및 위장운동촉진제; 일반 마취제, 예컨대 흡입 마취제, 할로겐화 흡입 마취제, 정맥내 마취제, 바르비투레이트 정맥내 마취제, 벤조디아제핀 정맥내 마취제 및 오피에이트 효능제 정맥내 마취제; 호르몬 및 호르몬 개질제, 예컨대 낙태제, 부신 작용제, 코르티코스테로이드 부신 작용제, 안드로겐, 항안드로겐, 면역생물학적 작용제, 예컨대 인터페로-γ, 면역억제제, 독소이드 및 백신; 국부 마취제, 예컨대 아미드 국부 마취제 및 에스테르 국부 마취제; 근골격 작용제, 예컨대 항위 항염증제, 코르티코스테로이드 항염증제, 금 화합물 항염증제, 면역억제성 항염증제, 비스테로이드성 항염증 약물 (NSAID), 살리실레이트 항염증제, 미네랄; 및 비타민, 예컨대 비타민 A, 비타민 B, 비타민 C, 비타민 D, 비타민 E 및 비타민 K.

- [0096] 본 발명의 방법에 유용한 조성물은 세포 배양 성분, 예를 들어 아미노산, 금속, 조효소 인자 뿐만 아니라 줄기 세포의 후속 분화로부터 발생할 수 있는 일부 다른 세포 소집단을 포함하는 배양 배지를 포함할 수 있다.
- [0097] 본 발명의 방법에 유용한 조성물은, 예를 들어 배양 배지로부터 대상 세포를 침강시키고 이들을 목적하는 용액 또는 물질에 재현탁시킴으로써 제조될 수 있다. 세포는 배양 배지로부터, 예를 들어 원심분리, 여과, 한외여과 등에 의해 침강되고/거나 변경될 수 있다.
- [0098] 통상의 기술자는 조성물 중 및 본 발명의 방법으로 투여할 세포 및 임의의 담체(들)의 양을 용이하게 결정할 수 있다. 한 실시양태에서, 임의의 첨가제 (활성 세포(들) 이외)는 포스페이트 완충 염수 중 0.001 내지 50% (중량) 용액의 양으로 존재하고, 활성 성분은 마이크로그램 내지 밀리그램 정도로, 예컨대 약 0.0001 내지 약 5 중량%, 바람직하게는 약 0.0001 내지 약 1 중량%, 보다 더 바람직하게는 약 0.0001 내지 약 0.05 중량%, 또는 약 0.001 내지 약 20 중량%, 바람직하게는 약 0.01 내지 약 10 중량%, 보다 더 바람직하게는 약 0.05 내지 약 5 중량%로 존재한다. 물론, 동물 또는 인간에게 투여할 임의의 조성물 및 임의의 특정 투여 방법에 대해서는, 예컨대 적합한 동물 모델, 예를 들어 설치류, 예컨대 마우스에서 치사 용량 (LD) 및 LD50을 결정하여 독성을 결정하고, 적합한 반응을 유발할 조성물(들)의 투여량, 그 안의 성분들의 농도 및 조성물(들)의 투여 시점을 결정하는 것이 바람직하다. 이러한 결정은 통상의 기술자의 지식, 본 개시내용 및 본원에서 인용된 문헌으로부터 과도한 실험을 요구하지 않는다. 그리고, 순차적 투여를 위한 시간은 과도한 실험 없이 확인될 수 있다.
- [0099] 본 발명의 방법에 유용한 조성물은 카테터 투여, 전신 주사, 국부 주사, 정맥내 주사, 자궁내 주사 또는 비경구 투여를 비롯하여, 특히 국부 주사를 통해 투여될 수 있다. 본원에 기재된 치료 조성물 (예를 들어, 제약 조성물)을 투여하는 경우, 그 조성물은 일반적으로 단위 투여량의 주사가 가능한 형태 (용액, 현탁액, 에멀전)로 제제화될 것이다.
- [0100] **EPC의 유전자 변형**
- [0101] 한 실시양태에서, 본 발명의 방법에 사용된 세포는 유전자 변형된다. 바람직하게는, 세포는 이중 단백질을 생산하도록 유전자 변형된다. 전형적으로, 세포는 이중 단백질이 세포로부터 분비되도록 유전자 변형될 것이다. 그러나, 한 실시양태에서 세포는 기능적 비-단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 예컨대 dsRNA (전형적으로 RNA 침묵화를 위한 것), 안티센스 올리고뉴클레오티드 또는 촉매 핵산 (예컨대 리보자임 또는 DNA자임)을 발현하도록 변형될 수 있다. 한 실시양태에서, EPC는 내피 산화질소 신타제 (eNOS), 헵 옥시게나제 (HMOX1) 및 프로스타시클린 신타제 (PTGIS)로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질을 발현 또는 과다발현하도록 유전자 변형된다.
- [0102] 유전자 변형 세포는 변형 세포의 성장을 지지하기에 충분한 양의 하나 이상의 시토카인의 존재 하에 배양될 수 있다. 그 결과 수득된 유전자 변형 세포는 (예를 들어, 이식에서) 즉시 사용되거나, 시험관내에서 배양 및 확장되거나, 추후의 사용을 위해 저장될 수 있다. 변형 세포는 관련 기술분야에 널리 공지된 방법에 의해 저장될 수 있으며, 예를 들어 액체 질소에서 동결될 수 있다.
- [0103] 본원에 사용된 유전자 변형은 본원에 기재된 세포 내로의 외인성 또는 외래 폴리뉴클레오티드의 도입 또는 상기 세포 내의 내인성 유전자의 변형을 포함하는 임의의 유전자 변형 방법을 포괄한다. 유전자 변형은 형질도입 (숙주 또는 공여자로부터의 숙주 DNA를 수용자에게 시험관내 또는 생체내에서 바이러스 매개 전달함), 형질감염 (단리된 바이러스 DNA 계층으로 세포를 형질전환함), 리포솜 매개 전달, 전기천공, 인산칼슘 형질감염 또는 공동침전 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 형질도입 방법은 세포를 생산자 세포와 함께 직접 공동배양하거나 또는 적절한 성장 인자 및 다가양이온의 존재 또는 부재 하에 바이러스 상청액 단독과 함께 배양하는 것을 포함한다.
- [0104] 상기 내용이 특정 바람직한 실시양태에 관한 것이지만, 본 발명이 이로써 제한되지는 않는다는 것을 이해할 것이다. 다양한 변형이 개시된 실시양태에 대해 이루어질 수 있으며, 이러한 변형은 본 발명의 범위 내에 있는 것으로 의도된다는 것을 통상의 기술자는 인지할 것이다.
- [0105] 본 명세서에 인용된 모든 공보, 특허 출원 및 특허는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.