



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0143116
(43) 공개일자 2014년12월15일

- | | |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
<i>C12N 5/0789</i> (2010.01) <i>A61K 35/12</i> (2006.01)
<i>A61P 9/10</i> (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2014-0068116</p> <p>(22) 출원일자 2014년06월05일
심사청구일자 2014년06월05일</p> <p>(30) 우선권주장
1020130064833 2013년06월05일 대한민국(KR)</p> | <p>(71) 출원인
서울대학교산학협력단
서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)</p> <p>(72) 발명자
박영배
서울특별시 강남구 압구정로42길 78
김효수
서울특별시 용산구 독서당로 111
(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
박원미</p> |
|--|---|

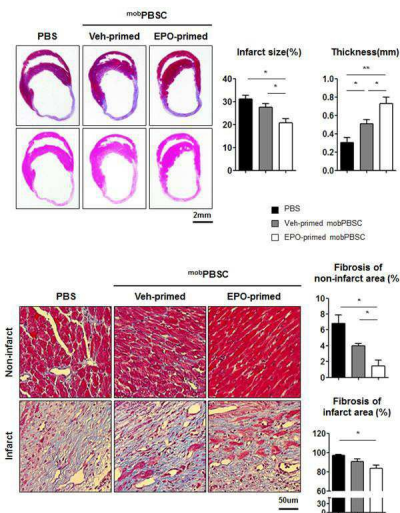
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **혈관 생성능이 향상된 말초혈액줄기세포 및 그 용도**

(57) 요약

본원은 EPO 또는 APS-프라이밍을 통해 혈관생성능이 향상된 말초혈액줄기세포의 제조 방법 및 그 용도를 개시한다. 본원의 방법에 따라 제조된 세포는 혈관 생성을 유도하여, 혈관 생성의 촉진이 필요한 다양한 질환 예를 들면 근육, 뇌, 심장, 신장, 또는 대장에서 발생한 허혈성 질환, 예를 들면 허혈로 인한 조직 손상, 뇌경색, 뇌졸중, 재관류손상, 심근경색, 울혈성심장기능상실, 말초혈관폐색증, 심장비후, 저심장수축증, 저심장이완증, 부적응성심장비대, 수축기 심부전, 이완기 심부전, 고혈압성 심부전, 동맥 및 승포판 질환, 폐동맥판 질환심혈관, 또는 허혈성 장심혈관 재생 또는 회복에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도7



- (72) 발명자
- | | |
|--|--------------------------------------|
| 강현재
서울특별시 종로구 사직로8길 4 | 윤지연
경기도 고양시 일산동구 노루목로 80 |
| 허진
서울특별시 성동구 독서당로 156 | 최재일
서울특별시 영등포구 양평로24길 9 |
| 강지훈
서울시 용산구 이촌로65가길 42 | 강진아
인천광역시 연수구 송도과학로27번길 70 |
| 한정규
경기도 안양시 동안구 평촌대로211번길 21 | |

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	A062260
부처명	보건복지부
연구관리전문기관	한국보건산업진흥원
연구사업명	보건의료기술연구개발사업
연구과제명	Priming 요법을 통한 혈관재생 및 혈류 개선 세포치료법 개발 : ngiogenic Cell Therapy
기여율	7/20
주관기관	서울대학교병원
연구기간	2009.12.01 ~ 2010.11.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	2010-0020257
부처명	교육과학기술부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	줄기세포선도연구팀육성
연구과제명	줄기 세포 Niche 조절을 통한 줄기세포치료 융합기술개발
기여율	6/20
주관기관	서울대학교 산학협력단
연구기간	2010.06.30 ~ 2015.07.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	A120247
부처명	보건복지부
연구관리전문기관	한국보건산업진흥원
연구사업명	보건의료연구개발사업
연구과제명	성체줄기세포의 심근경색 치료 효능 극대화기술 개발
기여율	7/20
주관기관	전남대학교병원
연구기간	2012.08.01 ~ 2015.07.31

특허청구의 범위

청구항 1

사이토카인으로 처리된 인간 유래의 말초 혈액을 제공하는 단계;

상기 혈액으로부터 단핵구 층을 분리하는 단계; 및

상기 단핵구를 에리쓰로포이에틴 또는 활성화된 혈소판 상등액 (Activated Platelet Supernatent)으로 처리하는 단계를 포함하는 혈관 생성능이 향상된 말초혈액줄기세포(mobPBSC)의 제조방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 사이토카인은 채취 전 1 일 내지 5 일 동안 사이토카인으로 처리되는 것인, 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 사이토카인은 G-CSF (Granulocyte colony stimulating factor)인, 방법.

청구항 4

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 따른 방법으로 제조된 혈관 생성능이 향상된 말초혈액줄기세포 (mobPBSC).

청구항 5

에리쓰로포이에틴 또는 활성화된 혈소판 상등액 (Activated Platelet Supernatent, APS)으로 활성화된 혈관 생성능이 향상된 말초혈액줄기세포(mobPBSC).

청구항 6

제 5 항에 있어서, 상기 말초혈액줄기세포는 자가 (autologous), 동종 (allogenic) 또는 이종 (xenogenic) 유래인, 말초혈액줄기세포.

청구항 7

제 4 항 또는 제 5 항에 있어서, 상기 에리쓰로포이에틴으로 처리된 세포는

처리되지 않은 세포와 비교하여, 인테그린 베타 1 및 2 그리고 CD14/CD16 이중 발현이 증가되어 있으며, 에리쓰로포이에틴 수용체를 경유한 IL8, IL10 및 FGF 유전자 및 단백질 발현이 증가된 것인 말초혈액줄기세포.

청구항 8

제 4 항 또는 제 5 항에 있어서, 상기 APS로 처리된 세포는 처리되지 않은 세포와 비교하여 IL9, IL17, PDGF 및 VEGF 의 유전자 발현이 높으며, 에리쓰로포이에틴 수용체, CD34, CD31, Tie2, CXCR4, 인테그린 알파5, 인테그린 베타 1, 인테그린 베타2 발현 증가 및 CD14/CD16 이중 발현이 증가된 것인 말초혈액줄기세포.

청구항 9

제 4 항 또는 제 5 항에 따른 말초혈액줄기세포를 포함하는 허혈성 질환 치료용 조성물.

청구항 10

제 9 항에 있어서, 상기 허혈성 질환은 심근경색, 협심증, 울혈성심장기능상실, 말초혈관폐색증, 심장비후, 저심장수축증, 저심장이완증, 부적응성심장비대, 수축기 심부전, 이완기 심부전, 고혈압성 심부전을 포함하는 허혈성 심장 질환인, 허혈성 질환 치료용 조성물.

청구항 11

제 4 항 또는 제 5 항에 따른 말초혈액줄기세포를 포함하는 혈관 생성 촉진용 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본원은 사이토카인 동원 말초혈액 줄기세포를 체외에서의 프라이밍 과정을 통하여 세포의 능력을 증진시켜 혈관 생성이 필요한 질환에 사용될 수 있는 세포 및 이를 이용한 세포 치료제 분야이다.

배경기술

[0002] 세포치료 방법은 주로 조직 재생이 가능한 성체 줄기세포 또는 전구세포를 이용한 것으로 예를 들면 골수유래 줄기세포를 이용한 혈관 및 근육을 재생하려는 시도가 있다. 하지만 성체줄기세포를 구성하는 세포 및 조직 재생에 적합한 줄기세포의 선별을 위한 방법에 대한 불충분한 이해로 인해 실제 사용에 어려움이 있다.

[0003] 지속적인 세포치료의 연구가 이뤄지고 있음에도 불구하고, 절대적인 줄기세포 수의 부족, 줄기세포들의 낮은 생착율 등이 항상 문제가 되고 있다. 때문에 효과적인 임상적용과 세포치료의 효율 극대화를 위해서 지속적인 노력이 필요하다.

[0004] 실제적으로, 소실되는 줄기세포를 최소화하려는 취지로 세포사를 예방하는 약제를 줄기세포에 사용하는 연구, 줄기세포를 조직 재생에 적합한 세포로 유도하기 위한 연구 등이 진행 중이다.

[0005] 허혈은 특정 조직으로 혈액공급이 충분치 못하여 산소, 영양분 공급이 충분히 이뤄지지 못하고 유해 대사산물의 제거가 이뤄지지 못하여, 결국 조직손상까지 가져오는 상태를 말한다. 임상적으로 대표적인 질환으로는 허혈성 심혈관 질환이 있다. 이러한 허혈성 심혈관 질환의 치료법으로는 관상동맥 성형술이 있으나, 지속적인 스텐트 기술의 발전에도 불구하고 이미 손상을 입은 조직을 되살리는 역할은 못하고 있다.

[0006] 이에 각광을 받는 치료법이 줄기세포를 이용한 심근의 재생이다.

[0007] 대한민국 공개특허 제2007-0054140호는 제대혈 유래 다분화능 줄기세포 및 이를 함유하는 허혈성괴사질환 치료용 세포치료제에 관한 것으로 폐쇄성 동맥질환에 의한 허혈성 괴사질환 치료용 세포치료제를 제공한다.

[0008] 허혈관련 질환의 근본적 치료를 위한 지속적 세포 치료제의 개발이 요구된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본원은 혈관 생성이 필요한 질환에 대한 세포 치료제를 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0010] 한 양태에서 본원은 사이토카인으로 처리된 인간 유래의 말초 혈액을 제공하는 단계; 상기 혈액으로부터 단핵구 층을 분리하는 단계; 및 상기 단핵구를 에리쓰로포이에틴 또는 활성화된 혈소판 상등액 (Activated Platelet Supernatent)으로 처리하는 단계를 포함하는 혈관 생성능이 향상된 말초혈액줄기세포(mobPBSC)의 제조방법에 관한 것이다.
- [0011] 다른 양태에서 본원은 또한 본원의 방법에 의해 제조된 혈관 생성능이 향상된 말초혈액줄기세포를 제공한다.
- [0012] 다른 측면에서 본원은 또한 에리쓰로포이에틴 또는 활성화된 혈소판 상등액 (Activated Platelet Supernatent, APS)으로 활성화된 혈관 생성능이 향상된 말초혈액줄기세포(mobPBSC)에 관한 것이다.
- [0013] 본원의 에리쓰로포이에틴으로 처리된 세포는 처리되지 않은 세포와 비교하여, 인테그린 베타 1 및 2 그리고 CD14/CD16 이중 발현이 증가되어 있으며, 에리쓰로포이에틴 수용체를 경유한 IL8, IL10 및 FGF 유전자 및 단백질 발현이 증가된 특징을 가지며, 또한 APS로 처리된 세포는 처리되지 않은 세포와 비교하여 IL9, IL17, PDGF 및 VEGF 의 유전자 발현이 높으며, 에리쓰로포이에틴 수용체, CD34, CD31, Tie2, CXCR4, 인테그린 알파5, 인테그린 베타 1, 인테그린 베타2 발현 증가 및 CD14/CD16 이중 발현이 증가된 특징을 나타낸다.
- [0014] 본원은 또한 본원의 mobPBSC를 포함하는 허혈성 질환 치료용 조성물을 제공하며, 이러한 조성물은 허혈성 심장 질환 예를 들면 심근경색, 협심증, 울혈성심장기능상실, 말초혈관폐색증, 심장비후, 저심장수축증, 저심장이완증, 부적응성심장비대, 수축기 심부전, 이완기 심부전, 고혈압성 심부전을 포함하는 허혈성 심장 질환의 치료에 유용하게 사용될 수 있다.
- [0015] 본원에 따른 세포는 혈관생성능이 향상된 것으로 mobPBSC를 포함하는 혈관 생성 촉진용 조성물에 관한 것이다.

발명의 효과

- [0016] 본원의 APS 또는 EPO 프라임된 mobPBSC는 혈관 형성을 유도하여, 혈관 생성의 촉진이 필요한 다양한 질환 예를 들면 근육, 뇌, 심장, 신장, 또는 대장에서 발생한 허혈성 질환, 예를 들면 허혈로 인한 조직 손상, 뇌경색, 뇌졸중, 재관류손상, 심근경색, 울혈성심장기능상실, 말초혈관폐색증, 심장비후, 저심장수축증, 저심장이완증, 부적응성심장비대, 수축기 심부전, 이완기 심부전, 고혈압성 심부전, 동맥 및 승포관 질환, 폐동맥관 질환심혈관, 또는 허혈성 장심혈관 재생 또는 회복에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0017] 도 1은 인간의 혈액으로부터 사이토카인(G-CSF)으로 동원한 말초혈액 줄기세포를 밀도차를 이용하여 분리해낸 후 에리쓰로포이에틴 배양액에서 프라임 하는 과정을 나타낸 모식도이다.
- 도 2는 FACS 기법을 통해 에리쓰로포이에틴으로 프라임한 사이토카인 유도 말초혈액 줄기세포의 특징을 확인한 결과이다.
- 도 3은 사이토카인(G-CSF)으로 동원한 말초혈액 줄기세포를 에리쓰로포이에틴 배양액에서 프라임을 실시한 세포군의 혈관신생 관련 유전자 및 단백질 발현이 증가함을 보여주는 결과이다. 또한 이는 에리쓰로포이에틴 리셉터를 경유하여 하위 JAK, AKT 신호전달 분자를 활성화 시킴으로서 일어남을 확인한 결과이다.
- 도 4는 사이토카인(G-CSF)으로 동원한 말초혈액 줄기세포를 에리쓰로포이에틴 배양액에서 프라임 실시한 세포군의 세포배양 상층액을 처리하였을 경우 HUVEC의 튜브형성(tube formation) 및 이동(migration) 능력이 향상되며 이것은 에리쓰로포이에틴 리셉터를 경유하여 일어남을 보여주는 결과이다.
- 도 5는 사이토카인(G-CSF)으로 동원한 말초혈액 줄기세포를 에리쓰로포이에틴 배양액에서 프라임 실시한 세포군이 HUVEC 과 ECM(Fibronectin)에 대한 부착능력(Attachment)이 높으며 이는 인테그린 증가에 의한 현상임을 보여주는 결과이다.
- 도 6은 면역시스템이 저하된 흉선이 없는 누드 마우스에 허혈뒷다리모델 (Ischemic hindlimb model)을 제작 후 에리쓰로포이에틴으로 프라임한 사이토카인 동원 말초혈액 줄기세포를 주사하였을 경우, 혈관 생성능이 우수

함을 보여주는 결과이다. 또한 21일 후 뒷다리 조직을 혈관내피세포 표지자인 CD34 (Cluster of Differentiation 34(초록색)의 인간 세포에 특이적인 항체를 이용하여 면역형광염색을 진행 한 결과, 에리쓰로포이에틴 배양액에서 프라이밍 실시한 사이토카인(G-CSF)으로 동원한 말초혈액 줄기세포가 혈관형성에 incorporation 되어있음을 확인한 결과이다.

도 7은 에리쓰로포이에틴으로 프라이밍한 사이토카인 동원 말초혈액 줄기세포를 면역시스템이 저하된 흥선이 없는 누드 마우스의 심장에 허혈을 유도한 후 주사하였을 경우 심장의 회복이 촉진됨을 보여주는 결과이다.

도 8은 APS (Activated Platelet Supernatant)에 의해 mobPBSC을 프라이밍하는 방법을 도식적으로 나타낸 것과 mobPBSC 분리 후 Giemsa 염색 결과, 활성화되지 않은 혈소판 상층액 (Naive platelet supernatant)과 APS 상층액에 대하여 사이토카인을 ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)를 이용하여 분석한 결과이다.

도 9는 mobPBSC를 Veh/APS로 6 시간동안 자극한 후 IL-8, IL-10, IL-13, IL-17, bFGF, TNF-, CXCR4, 및 EPOR (erythropoietin receptor) 유전자 발현에 대한 RT-PCR 분석결과이다.

도 10은 FACS기법을 통해 Veh/APS-프라이밍된 mobPBSC의 세포의 특징을 확인해본 결과이다.

도 11은 Veh/APS-프라이밍된 mobPBSC에서 파이프록틴 부착을 관찰한 결과이다.

도 12는 화학주성 (Chemotaxis)과 세포이동을 확인하기 위한 실험과정을 도식적으로 나타낸 것과 Veh/APS-프라이밍된 mobPBSC의 SDF-1에 대한 화학주성을 관찰 한 결과이다.

도 13은 Veh/APS-프라이밍된 mobPBSC을 배양한 상층액에서의 IL-8, IL-10, TNF-, IL-17, PDGF, 및 VEGF 발현에 대한 ELISA 분석결과와 그 상층액으로 처리된 HUVEC의 매트릭셀 관 형성 및 이동 분석 결과이다.

도 14는 면역시스템이 저하된 흥선이 없는 누드 마우스에 허혈뒷다리모델 (Ischemic hindlimb model)을 제작 후 Veh/APS-프라이밍된 mobPBSC 세포를 주입한 후 관류(perfusion) 정도를 측정된 결과와 조직학적 분석, APS-프라이밍된 mobPBSC를 주입한 세포에 의한 혈관형성을 나타내는 결과이다.

도 15는 면역시스템이 저하된 흥선이 없는 누드 마우스에 허혈뒷다리모델(Ischemic hindlimb model)을 제작 후 APS-프라이밍된 mobPBSC 세포를 주입한 군에서 대조군보다 혈관형성이 촉진됨을 보여주는 결과이다.

도 16은 면역시스템이 저하된 쥐(Nude mice)에 매트릭셀을 주입하여 주변 혈관생성능을 비교한 결과로 APS액으로 프라이밍 실시한 사이토카인(G-CSF) 동원 말초혈액 줄기세포를 주입시켰을 경우에 대조군에 비하여 혈관 생성능이 우수함을 보여주는 결과이다.

도 17은 활성화된 혈소판 상층액의 안정성 확보를 보여주는 결과이다.

상기 모든 도면에서 * : p<0.05; ** : p<0.01 및 *** : p<0.001를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 한 양태에서 본원은 사이토카인으로 처리된 인간 유래의 말초 혈액을 제공하는 단계; 상기 혈액으로부터 단핵구층을 분리하는 단계; 및 상기 단핵구를 에리쓰로포이에틴 또는 활성화된 혈소판 상층액 (Activated Platelet Supernatent)으로 처리하는 단계를 포함하는 혈관 생성능이 향상된 말초혈액줄기세포(mobPBSC)의 제조방법에 관한 것이다.

[0019] 본원에서 “혈관 생성 (blood vessel formation)”은 “혈관형성 (vasculogenesis)” 및 “혈관신생 (angiogenesis)”을 모두 포함하는 것이다. 혈관 형성은 초기 배아에서 일차 혈관총의 형성시 발생하는 것과 같이 내피세포 전구체의 성숙한 내피세포로의 제자리 분화 및 신생혈관을 형성하기 위한 이들 세포의 회합을 특징으로 한다. 혈관신생은 이미 존재하고 있는 혈관의 성장 및 분기에 의한 혈관 성장이 원인이다. 다른 측면에서는 이미 존재하는 혈관에서 유래한 것일 수도 있으며, 줄기세포, 혈관모세포 또는 기타 전구세포에서 생성된 것일 수 있다. 혈관 생성을 측정하는 방법은 공지된 것으로, 예를 들면 비분지형 혈관 분절의 수 (단위 면적당 분절의 수), 기능성 혈관밀도 (단위 면적당 관류된 혈관의 총 길이), 혈관 직경, 또는 혈관 부피 밀도 (단위면적당 각 분절의 직경과 길이를 근거로 계산한 총 혈관 부피)를 측정하여 결정할 수 있다.

[0020] 본원에서 사이토카인 동원 말초혈액 줄기세포 (mobPBSC, Mobilized Peripheral Blood Stem Cell)는 조혈제 처리 후 말초혈액을 뽑아 혈액 속의 골수 유래 성체 줄기세포를 가르키는 것이다. 본원 실시예에 기재된 방법에 따라 수득될 수 있으며, 예를 들면 사람에게 G-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor)와 같은 조혈제를 주사하면 골수의 줄기세포가 혈액순환계로 동원되어 많은 양의 골수 유래 성체 줄기세포들이 온몸을 순환할 수

있다. 이때, 말초에서 혈액을 채취하면 일반적인 상황보다 골수 유래 성체 줄기세포가 많이 밀집된 혈액을 얻을 수 있는데 이렇게 ‘사이토카인 동원 말초혈액 줄기세포’라 이른다.

- [0021] 본원에서, EPO(Erythropoietin)은 적혈구 생성을 촉진시켜 헤모글로빈 수치를 높여 빈혈 치료에 사용되는 약물로서 예를 들면 엘지생명과학과 같은 회사에서 시중에서 구입할 수 있다. 예를 들면 만성신부전 환자에게 나타나는 빈혈 및 증후성 빈혈 등의 치료에 사용된다. 그 이외에도 신경세포 및 심근세포 보호 작용이 있다고 알려져 있다.
- [0022] 본원에서 APS(activated platelet supernatant)는 본원의 프라이밍 물질로 사용되는 것으로, 혈소판 과다 혈장과 같이 혈소판이 활성화된 혈액으로부터 수득될 수 있으며, 예를 들면 본원 실시예에 기재된 방법대로 수득될 수 있다.
- [0023] 다른 측면에서 본원은 또한 혈관 생성능이 향상된 말초혈액줄기세포(mobPBSC)에 관한 것이다.
- [0024] 본원에 따라 제조된 EPO 또는 APS로 활성화된 세포는 다음과 같은 특징을 가지며, 본원 실시예의 기재등을 참고하여 당업자라면 용이하게 수득할 수 있을 것이다. 구체적으로 에리스로포이에틴으로 처리된 세포는 처리되지 않은 세포와 비교하여, 인테그린 베타 1 및 2 그리고 CD14/CD16 이중 발현이 증가되어 있으며, 에리스로포이에틴 수용체를 경유한 IL8, IL10 및 FGF 유전자 및 단백질 발현이 증가된 것이다. APS로 처리된 세포는 처리되지 않은 세포와 비교하여 IL9, IL17, PDGF 및 VEGF 의 유전자 발현이 높으며, 에리스로포이에틴 수용체, CD34, CD31, Tie2, CXCR4, 인테그린 알파5, 인테그린 베타 1, 인테그린 베타2 발현 증가 및 CD14/CD16 이중 발현이 증가된 것이다.
- [0025] 다른 측면에서 본원은 본원의 방법에 따라 제조된 세포를 포함하는 혈관생성 능이 필요한 질환 치료용 조성물 또는 혈관생성 촉진제를 제공한다.
- [0026] 일 구현에서 혈관생성능이 필요한 질환은 허혈 증상이며, “허혈 증상”이란 출혈, 색전 (embolism) 및 경색 (infarction) 등에 의해 조직으로의 혈류공급이 중단되어 세포손상이 일어난 상태로, 불충분한 혈액 순환으로 인한 산소결핍으로 인한 다양한 증상을 포함한다. 본원에서 “허혈성 질환”이란, 허혈로 인하여 발생하는 조직 또는 장기의 손상 또는 이로 인한 질환으로, 근육조직, 뇌, 심장, 신장, 대장과 같은 각종 장기를 포함하는 어떤 장기에서도 발생할 수 있다. 예를 들면 뇌 허혈은 뇌졸중, 재관류손상 등과 같은 질환으로 이어지며, 장의 경우 대장으로의 혈류가 감소할 경우 허혈성 대장염이 발생할 수 있고, 심장 허혈은 심근경색, 울혈성심장기능 상실로 이어질 수 있다.
- [0027] 한 구현예에서 허혈성 질환은 허혈성 심질환으로, 허혈로 인한 심혈관 조직 손상을 포함한다. 허혈성 심질환은 관상동맥의 죽상경화 등에 의하여 심근에 대한 혈류가 감소하여 초래되는 심장 질환으로, 임상적으로 예를 들면 근경색, 협심증, 울혈성심장기능상실, 말초혈관폐색증, 심장비후, 저심장수축증, 저심장이완증, 부적응성심장비대, 수축기 심부전, 이완기 심부전, 고혈압성 심부전, 동맥 및 승포관 질환, 및 폐동맥관 질환 등을 포함하나, 이로 제한하는 것은 아니다. APS-프라이밍된 mobPBSC을 포함하는 본원 조성물은 심장 조직의 혈관 생성을 촉진하거나 또는 심장 기능을 향상시키는데 사용될 수 있다.
- [0028] 다른 구현예에서 허혈성 질환은 허혈성 뇌질환으로 뇌졸중, 재관류 손상 및 하지허혈성질환과 같은 질환을 포함하나, 이로 제한하는 것은 아니다. APS-프라이밍된 mobPBSC을 포함하는 본원 조성물은 뇌 조직 혈관 생성을 촉진하거나 또는 뇌 기능을 향상시키는데 사용될 수 있다.
- [0029] 본원에서 ‘세포치료제’란 세포와 조직의 기능을 복원시키기 위하여 살아있는 자가 (autologous), 동종 (allogenic), 또는 이종 (xenogenic) 세포를 체외에서 증식 또는 선별하거나 기타 방법으로 세포의 생물학적 특성을 변화시키는 등의 일련의 방법을 통하여 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품을 말한다. 미국은 1993년부터, 우리나라는 2002년부터 세포치료제를 의약품으로 관리하고 있다. 이러한 세포치료제는 조직재생 혹은 장기기능 회복을 위한 “줄기세포 치료제”이며, 생체 내 면역반응의 억제 혹은 면역반응의 항진 등 면역반응 조절을 위한 “면역세포 치료제”로 분류 할 수 있다.
- [0030] 본원에서 “치료”란 질환, 또는 질환으로 인한 증상 또는 상태의 억제, 제거, 경감, 완화, 개선, 및/또는 예방을 포함하는 개념이다.
- [0031] 본원에서 “치료적으로 유효한 양”은 환자의 증상, 상태 또는 질환의 경감, 또는 치료에 필요한 양을 의미한다. 본원 조성물에 포함되는 APS-프라이밍된 mobPBSC의 유효량은 투여경로, 환자의 나이, 체중,

기저질환, 일반적 건강상태 등에 따라 달라질 수 있으며, 최종적으로 진료 의사의 판단에 의해서 결정될 것이다.

- [0032] 본원의 치료용 조성물에 사용되는 세포는 자가 (autologous), 동종 (allogenic), 이종 (xenogenic) 세포이며, 특히 자가 세포이다.
- [0033] 본원에 따른 세포 치료제는 상술한 본원에 따른 방법에 의해 제조될 수 있다.
- [0034] 본원에 따른 EPO 또는 APS로 활성화된 말초혈액줄기세포는 유세포 분석을 통하여 할 수 있다. 이러한 유세포 분석을 통해 본원에 따른 세포에 특이적인 마커를 확인할 수 있다.
- [0035] 본원에 따른 세포 치료제 또는 세포를 포함하는 약학 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 비경구 투여, 예를 들어, 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여될수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0036] 본원에 따른 치료제 또는 조성물은 일반적으로 사용되는 약학적으로 허용가능한 담체와 함께 적합한 형태로 제형화될 수 있다. '약학적으로 허용되는'이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증 등과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 조성물을 말한다. 약학적으로 허용되는 담체로는 예를 들면, 물, 적합한 오일, 식염수, 수성 글루코스 및 글리콜 등과 같은 비경구 투여용 담체 등이 있으며 안정화제 및 보존제를 추가로 포함할 수 있다. 적합한 안정화제로는 아황산수소나트륨, 아황산나트륨 또는 아스코르브산과 같은 항산화제가 있다. 적합한 보존제로는 벤즈알코늄 클로라이드, 메틸- 또는 프로필-파라벤 및 클로로부탄올이 있다. 또한 본 발명에 따른 세포치료용 조성물은 그 투여방법이나 제형에 따라 필요한 경우, 현탁제, 용해보조제, 안정화제, 등장화제, 보존제, 흡착방지제, 계면활성화제, 희석제, 부형제, pH 조정제, 무통화제, 완충제, 산화방지제 등을 적절히 포함할 수 있다. 상기에 예시된 것들을 비롯하여 본 발명에 적합한 약학적으로 허용되는 담체 및 제제는 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, 최신판]에 상세히 기재되어 있다.
- [0037] 본 발명의 세포치료용 조성물은 당해 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 분말, 과립, 정제 또는 캡슐 형태일 수 있다.
- [0038] 또한 상기 조성물은 세포치료제가 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수도 있다. 본 발명의 세포치료제 조성물은 질환의 치료를 위하여 치료학적으로 유효한 양의 세포치료제를 포함할 수 있다. 용어 '치료적으로 유효한 양'은 연구자, 의사, 의사 또는 기타임상에 의해 생각되는 조직계, 동물 또는 인간에서 생물학적 또는 의학적 반응을 유도하는 유효 성분 또는 약학적 조성물의 양을 의미하는 것으로, 이는 치료되는 질환 또는 장애의 증상의 완화를 유도하는 양을 포함한다. 본 발명의 조성물에 포함되는 세포치료제는 원하는 효과에 따라 변화될 것임은 당업자에게 자명하다. 그러므로 최적의 세포치료제 함량은 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있으며, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 다른 성분의 함량, 제형의 종류, 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 포함하는 것이 중요하다. 예컨대, 본 발명의 조성물의 투여량은 프라임된 말초혈액 줄기세포를 기준으로 1.0×10^7 내지 1.0×10^8 세포/kg(체중), 보다 바람직하게는 1.0×10^5 내지 1.0×10^8 세포/kg(체중)일 수 있다. 다만, 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성별, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있고, 당업자라면 이러한 요인들을 고려하여 투여량을 적절히 조절할 수 있다. 투여 횟수는 1회 또는 임상적으로 용인가능한 부작용의 범위 내에서 2회 이상이 가능하고, 투여 부위에 대해서도 1개소 또는 2개소 이상에 투여할 수 있다. 인간 이외의 동물에 대해서도, kg당 인간과 동일한 투여량으로 하거나, 또는 예를 들면 목적의 동물과 인간과의 허혈기관(심장 등)의 용적비(예를 들면, 평균값) 등으로 상기의 투여량을 환산한 양을 투여할 수 있다. 본 발명에 따른 치료의 대상동물로서는, 인간 및 그 밖의 목적으로 하는 포유동물을 예로 들 수 있고, 구체적으로는 인간, 원숭이, 마우스, 래트, 토끼, 양, 소, 개, 말, 돼지 등이 포함된다.
- [0039] 나아가, 본원 조성물은 허혈과 관련된 질환의 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 호르몬 치료, 약물 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0040] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의해 더욱 구체적으로 설명하나 본 발명의 범주가 이로 제한되는 것은 아니다.

[0041] 이하, 하기 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0042] **실시예 1. 사이토카인(G-CSF)으로 동원한 말초혈액 줄기세포의 에리쓰로포이에틴으로 프라이밍 처리 후 세포 성장 비교**

[0043] 도 1은 사이토카인(G-CSF)으로 동원한 말초혈액 줄기세포를 에리쓰로포이에틴으로 프라이밍하는 방법을 도식적으로 나타낸 것이다. 네 명의 건강한 지원자는 서울대 병원 실험 윤리위원회의 승인을 받아 동의서를 받은 후 모집하였다. 말초 혈액은 헬싱키 선언에 의거하여 동의를 받은 후 얻었다. 구체적으로, 상기 지원자에게 사이토카인(G-CSF, Dong-A Pharmaceutical, Korea)을 10 µg/kg으로 하루에 한번씩 총 3일 동안 주사한 후 헤파린 처리된 50ml 주사기로 말초혈액 100ml 을 얻었다. 50ml 튜브에 말초혈액 10ml 씩 나눠 담은 뒤 PBS(Phosphate-buffered saline)를 30ml을 넣어 조심히 잘 혼합한 뒤 Ficoll 10ml을 첨가한 후 2,500rpm, 25°C 조건에서 30분간 원심분리 하였다. 상단에 노란색 혈청층, 하얀색 단핵구층, 투명한 Ficoll 층, 그리고 하단의 붉은 적혈구 및 다핵구층 중 하얀색 단핵구층만을 분리하여 새로운 튜브에 옮겨 담았다. 옮겨 담은 단핵구층에 PBS를 첨가한 뒤 1800rpm 으로 4°C에서 10분간 원심분리한 뒤 세포 펠렛 만을 남겨놓은 후 헤파린 과정을 진행하여 순도 높은 말초혈액 줄기세포 군을 획득하였다. 이렇게 얻은 말초혈액 줄기세포는 EBM-2 (Endothelial basal medium-2) 에 5% FBS를 첨가한 배양액에 최종 농도 10 µM의 에리쓰로포이에틴 (엘지생명과학, Korea)을 포함하는 EBM-2(Endothelial basal medium-2) 배지를 프라이밍 물질로 사용하였다. 3x10⁷ 세포/ml 이상의 고 밀도로 교반 조건에서 6 시간 동안 프라이밍 하였다. 프라이밍 조건은 5% CO₂ 가 공급되는 배양기에서 37°C 를 유지하였다.

[0044] 도 2에서는 FACS 기법을 통해 에리쓰로포이에틴으로 6시간 프라이밍한 사이토카인(G-CSF) 동원 말초혈액 줄기세포의 성상을 비교한 결과이다. 대조군과 에리쓰로포이에틴으로 프라이밍한 사이토카인(G-CSF) 동원 말초혈액 줄기세포를 CD14, CD16, CD66, 인테그린 알파 4 (integrin alpha 4), 인테그린 알파 5 (integrin alpha 5), 인테그린 베타 1 (integrin beta 1), 인테그린 베타 2 (integrin beta 2), 아넥신 V (annexin V), PI 항체를 사용하여 30분, 4도 조건에서 염색한 후 FACS 장비 (BD FACS Canto)를 이용하여 발현을 확인하였다. 그 결과, 에리쓰로포이에틴으로 프라이밍 하였을 경우 CD14, CD16 동시 양성 세포군이 대조군에 비하여 약 10% 가량 증가하였고, 인테그린 베타 1 의 발현양도 증가하였음을 확인하였다. 또한 아넥신 V, PI 동시 양성 세포군과 아넥신 V 단일 양성세포군이 줄어드는 것을 확인하여 각각 세포괴사 및 세포사멸이 적게 나타나는 것을 확인 하였다.

[0045] **실시예 2. 혈관신생관련 유전자 및 분비 단백질 발현 확인 (in vitro 실험)**

[0046] 도 3 A 에서는 사이토카인 동원 말초혈액 줄기세포를 에리쓰로포이에틴 프라이밍 후 0분, 5분, 15분, 30분, 60 분 간격으로 단백질을 분리하여 웨스턴블랏을 통해 AKT 와 JAK 신호전달 분자의 활성화 형태(phosphorylational form)를 확인할 결과이다. 에리쓰로포이에틴 자극 시에 AKT 와 JAK 은 5분이내에 활성화되었고, 이는 에리쓰로포이에틴 리셉터를 차단하였을 시에 억제되었다. 이로부터 에리쓰로포이에틴에 의한 혈관신생 반응은 에리쓰로포이에틴 리셉터를 경유한 AKT 및 JAT 신호전달 분자를 활성화에 의한 것임을 나타내는 것이다.

[0047] 도 3 B 에서는 사이토카인 동원 말초혈액 줄기세포를 에리쓰로포이에틴 프라이밍 후 (6시간, 37°C, 5% CO₂ 조건) 총 RNA를 분리하여 RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction(RT-PCR)을 진행하였다. 이때 사용된 각 프라이어머는 하기 표 1과 같으며, PCR 조건은 다음과 같다: 95°C 15초, 95°C 15초, 60°C 1분. 그 결과, 대조군에 비해 에리쓰로포이에틴으로 프라이밍한 말초혈액 줄기세포군에서 혈관신생을 촉진하는 IL-8, IL-10, bFGF, MMP9, 인테그린 알파 V 및 인테그린 베타 8 유전자의 발현이 대조군과 비교하여 높은 것으로 나타났다.

[0048] [표 1]

Primer	Sequence	TM	Product size(bp)
IL-8	FW 5'-GTGCAGTTTTGCCAAGGAGT-3'	60	135
	RV 5'-AATTTCTGTGTTGGCGCAGT-3'		
IL-10	FW 5'- GCCTAACATGCTTCGAGATC-3'	60	206
	RV 5'- TGATGTCTGGGTCTTGGTTC-3'		
bFGF	FW 5'- GGCTATGAAGGAAGATGGAAGATT-3'	60	130
	TGCCACATACCAACTGGTGTATTT-3'		
MMP9	FW 5'-GGGCTTAGATCATTCCCTCAGTG -3'	60	94
	RV 5'-GCCATTCACGTCGTCCTTAT-3'		
Integrin alphaV	FW 5'- AATCTTCCAATTGAGGATATCAC -3'	60	140
	RV 5'- AAAACAGCCAGTAGCAACAAT -3'		
Integrin beta8	5'- AATTTGGTAGTGGAAGCCTATC-3'	60	146
	5'- GTCACGTTTCTGCATCCTTC-3'		

[0049]

[0050]

도 3 C에서는 에리쓰로포이에틴으로 프라이밍한 말초혈액 줄기세포에서, 혈관신생을 촉진한다고 알려진 사이토카인의 발현을 ELISA를 이용하여 비교분석하였다. 그 결과 에리쓰로포이에틴으로 프라이밍한 말초혈액 줄기세포의 혈관생성관련 인자로 알려진 IL-8, IL10, TNF-alpha 분비량이 대조군보다 더 높음을 확인하였다. 또한 에리쓰로포이에틴 blocking 항체와 JAK 억제제, AKT 억제제를 처리하였을 때에 에리쓰로포이에틴에 의한 반응이 감소되는 것으로 나타났다. ELISA는 Bio-Plex Prot™ Array System (kits and equipment of Bio-Rad, USA)을 이용하여 제조자의 방법대로 측정하였다.

[0051]

실시예 3. 혈관형성 효과 확인 (in vitro 실험)

[0052]

도 4에서는 실시예 1의 에리쓰로포이에틴 프라이밍 제제로 프라이밍 한 사이토카인 유도 말초혈액 줄기세포의 상등액을 이용하여 HUVEC (Human umbilical vein endothelial cell) 세포의 매트릭셀에서의 혈관형성 능 및 이동능력 차이를 확인한 결과이다. 또한 이것이 에리쓰로포이에틴 리셉터를 경유하여 하위 JAK 과 AKT 신호전달분자의 활성화에 의한 것임을 확인하였다. 도 5의 A는 얼음 위에서 35mm 콘포칼 접시 (ibidi, Germany) 바닥을 GFR 매트릭셀 (BD Biosciences)을 200 µl 로 코팅 한 후, 37°C 에서 30분 가량 배양하였다. 이어 HUVEC (2*10⁴ 개) 을 에리쓰로포이에틴으로 프라이밍한 사이토카인 유도 말초혈액 줄기세포의 상등액을 배양액으로 하여 매트릭셀로 코팅된 35mm Confocal dish 위에 조심스럽게 올렸다. 12시간 후에 현미경으로 HUVEC 의 관 형성능을 관찰한 결과, 에리쓰로포이에틴으로 프라이밍 한 경우 HUVEC 의 튜브 형성능 (브랜치 포인트 수 및 관 길이)이 더 우수함을 확인하였다. 또한 에리쓰로포이에틴 리셉터 블락킹 항체와 JAK inhibitor (AG490), AKT inhibitor (LY294002)를 각각 처리 시에 튜브 형성능 증가 현상이 저하됨을 확인하였다.

[0053]

도 4의 B에서는 HUVEC을 하루 전 접시에 배양한 후 일정한 두께의 직선모양의 스크래치를 주고 그 이후 에리쓰로포이에틴으로 프라이밍한 말초혈액 줄기세포의 배양액을 첨가하여 HUVEC 의 이동능력을 평가하였다. 도 4의 B에서 나타난 바와 같이, 대조군에 비하여 에리쓰로포이에틴으로 프라이밍한 말초혈액 줄기세포의 배양액을 첨가한 경우 HUVEC 의 이동능력이 우수하였다. 또한 에리쓰로포이에틴 리셉터 블락킹 항체와 JAK 억제제 (AG490), AKT 억제제 (LY294002)를 각각 처리 시에 튜브 형성능 증가 현상이 저하됨을 확인하였다. 이를 통하여, 에리쓰로포이에틴 프라이밍 처리 시에 사이토카인 동원 말초혈액 줄기세포의 혈관내피세포가 갖는 혈관형성능력을 향상시킴을 in vitro 실험을 통하여 확인하였다.

[0054]

도 5에서는 대조군과 에리쓰로포이에틴으로 프라이밍한 사이토카인 동원 말초혈액 줄기세포를 각각 5-(and-6)-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE; Sigma-aldrich, USA) 37°C 에서 1시간 동안 염색했

다. 그리고 2×10^5 개 세포들을 1시간 동안 HUVEC과 ECM(fibronectin)에 대한 부착능력을 확인하였다. 그 결과, 대조군에 비하여 에리쓰로포이에틴으로 프라이밍한 사이토카인 동원 말초혈액 줄기세포가 HUVEC와 ECM 성분(fibronectin)에 대한 부착능력이 우수함을 확인하였고 인테그린 블락킹 항체를 사용하였을 경우 부착능력 증가 현상이 저하됨을 확인하였다. 이를 통하여, 에리쓰로포이에틴 프라이밍 처리시 사이토카인 동원 말초혈액 줄기세포가 세포외기질 및 혈관내피세포에 부착할 수 있는 능력이 증가됨을 확인하였다. 더 나아가 이러한 부착능력 증가는 실제 작용부위로의 세포 engraftment 가 증가될 수 있음을 나타낸다.

[0055] **실시예 4. 혈관형성 효과 확인 (in vivo 실험)**

[0056] 도 6은 프라이밍되지 않은 대조군과 비교하여 에리쓰로포이에틴으로 프라이밍한 사이토카인 동원 말초혈액 줄기세포가 전임상 단계에서 혈관형성을 더 증가시킨다는 것을 나타내는 것이다. 구체적으로는 면역시스템이 저하된 쥐인 무흉선 누드 마우스 (athymic nude mice) (BAL/c-nu, 6-8 주령, 16-20 g, Oriental Bio, Korea)의 뒷다리(Hindlimb)에 허혈(Ischemic)을 유도하여 PBS와 프라이밍 되지 않은 대조군 (3×10^5 세포), 에리쓰로포이에틴으로 프라이밍된 사이토카인 동원 말초혈액 줄기세포 (3×10^5 cells)를 주입하였다. LDPI(Laser Doppler perfusion imaging)를 통해 허혈 직후, 허혈 후 3, 7, 14, 21일에 관류(Perfusion)를 측정하였다. 그 결과, 도 6의 A에 나타난 바와 같이, PBS (n=7) 또는 매체 프라이밍된 mobPBSC (n=7)를 주입한 그룹에 비해 에리쓰로포이에틴으로 프라이밍된 mobPBSC (n=7)에서 관류(Perfusion)가 더 우수한 것으로 나타났다. 이에 더하여, 성숙한 혈관을 관찰하기 위해 알파 평활근 액틴 (alpha smooth muscle actin, SMA- α , 붉은색)을 염색한 결과, 도 6의 B에 나타난 바와 같이, EPO-프라이밍된 mobPBSC를 주입한 경우 더욱 많은 혈관이 형성된 것으로 나타났다. 이를 정량한 결과 PBS와 매체 프라이밍된 mobPBSC 그룹과 비교하여 EPO-프라이밍된 mobPBSC를 주입한 경우 관의 수, 관 면적, 및 관의 길이가 유의하게 증가하였음을 확인하였다.

[0057] 도 6 C 에서 혈관내피세포 표지자인 CD34 (Cluster of Differentiation 34, 초록색)를 인간 세포에 특이적인 항체 및 SMA- α (붉은색)을 이용하여 면역형광염색을 진행한 결과 EPO-프라이밍된 mobPBSC를 주입한 세포가 실제로 혈관형성(Vasculogenesis)을 가능하게 함을 확인하였다.

[0058] 도 7에서는 면역시스템이 저하된 쥐인 무흉선 누드 마우스 (BAL/c-nu, 6-8 주령, 16-20 g, Oriental Bio)의 심장에 허혈(Ischemic)을 유도하여 PBS(n=6)와 본 발명의 대조군 (3×10^3)(n=6), 에리쓰로포이에틴으로 프라이밍한 사이토카인 동원 말초혈액 줄기세포 (3×10^3)(n=6)를 주입하였다. 14일 후 심장을 적출하여 MT(Masson's trichrome) 염색 및 H&E(Hematoxylin and eosin)을 실시하여 허혈크기 및 좌심벽 두께, 섬유화 면적 (fibrosis area) 비율을 측정하였다. 그 결과, 에리쓰로포이에틴으로 프라이밍한 사이토카인 동원 말초혈액 줄기세포를 주입한 허혈 심장의 회복이 가장 좋음을 확인하였다.

[0059] **실시예 5. 말초 혈액 줄기 세포(mobPBSC)와 활성화된 혈소판 상등액 (APS) 제조 및 APS 분석**

[0060] 네 명의 건강한 지원자는 서울대 병원 실험 윤리위원회의 승인을 받아 동의서를 받은 후 모집하였다. 말초 혈액은 헬싱키 선언에 의거하여 동의를 받은 후 얻었다.

[0061] mobPBSC 세포는 실시예 1에 기술한 바와 같이 수득하였다. 수득한 세포는 아래에 설명한 바와 같이 수득한 즉시 활성화된 혈소판 상등액으로 6시간동안 프라이밍 하였으며, 그 과정은 도 8의 A에 도식적으로 나타났다. 모든 분리 과정은 무균의 환경에서 진행되었으며, 분리된 mobPBSC의 순수성은 김사(Giemsa) 염색을 통해 확인하였다 (도 8의 B 참조).

[0062] 활성화된 혈소판 상등액을 얻기 위해, 먼저, 지원자로부터 얻은 100ml의 말초혈액을 130Xg(700rpm)로 20분 동안 상온에서 원심분리를 하여 PRP(Platelet Rich Plasma)를 분리했다. PRP를 새로운 시험관으로 옮겨 담고 400U/ml의 헤파린을 포함한 PBS를 넣고 900xg(2000rpm)로 7분 동안 상온에서 원심분리하였다. 이 후 상층액을 제거한 후 400U/ml의 헤파린을 포함한 PBS로 같은 과정을 두 번 더 반복했다. 이렇게 얻어진 혈소판은 10ml의 최종 용량에 0.5U/ml의 트롬빈 (Sigma-Aldrich,USA)를 넣어 배양기(37 $^{\circ}$ C, 5% 이산화탄소)에서 2시간 동안 활성화 시켰었다. 활성화가 끝난 후에는 혈소판을 10000xg로 10분 동안 상온에서 원심분리하여 제거한 후 상등액만 모아 배양기(37 $^{\circ}$ C, 5% 이산화탄소)에서 6시간동안의 프라이밍에 사용했다. 이 실험 과정은 도 8의 A에 도식화 되어 있다.

[0063] 도 8의 C는 활성화되지 않은 혈소판 상층액 (Naive platelet supernatant)과 활성화된 혈소판 상층액 (APS, Activated platelet supernatant)을 ELISA를 이용하여 분비된 사이토카인을 분석한 결과이다. 그 결과, IL-8, IL17, PDGF 및 VEGF 의 발현이 대조군과 비교하여 높은 것으로 나타났다. ELISA는 Bio-Plex Prot™ Array System (kits and equipment of Bio-Rad, USA)을 이용해서 측정했다.

[0064] 실시예 6. 혈관신생관련 유전자, 표지자의 발현 및 기능 고찰 (in vitro 실험)

[0065] 도 9는 mobPBSC를 APS로 6 시간 동안 배양(37℃, 5% CO₂ incubator)한 후 RNA를 분리하여 RT-PCR을 진행한 결과이다. 총 RNA는 TRIZOL(Invitrogen,USA) 시약으로 제조사에서 명시한 방법으로 얻었다. cDNA는 Primescript 1st strand cDNA synthesis kit(TAKARA,Japan)을 제조사의 방법대로 이용하여 합성했다. 증폭의 과정은 Maxime™ PCR(Intron,Korea)을 이용하여 반응 혼합물과 20ul 총량으로 진행했다. 사용된 프라이머 표 2와 같고, PCR 조건은 다음과 같다: 95℃ 15초, 95℃ 15초, 60℃ 1분. 그 결과, 매체로 프라이밍된 mobPBSC에 비해 APS-프라이밍된 mobPBSC에서 혈관생성을 촉진하는 IL-8, IL-10, IL-13, IL-17, bFGF, TNF-α, CXCR4, erythropoietin receptor (EPOR) 유전자의 발현이 더 높은 것으로 나타났다.

[0066] [표 2]

primer		Sequence	Tm(°C)	bp
IL8	FW	GGCCGTGGCTCTCTTGGCAG	62	178bp
	RV	TGTGTTGGCGCAGTGTGGTC		
IL10	FW	GCCTAACATGCTTCGAGATC	62	206bp
	RV	TGATGTCTGGGTCTTGGTTC		
IL13	FW	TAGGGAGGGGTAAAATTCCT	58	335bp
	RV	CGGTGACAAACACACTCATT		
IL17A	FW	GACCTCATTGGTGTCACTGCTAC	58	326bp
	RV	GGACAGAGTTCATGTGGTAGTCC		
bFGF	FW	TCTTCAACACCGAAATGCTG	62	206bp
	RV	AGCCCAGTTAGAGGGACCAT		
TNFα	FW	CCCTGAAAACAACCCTCAGA	58	217bp
	RV	AAGAGGCTGAGGAACAAGCA		
iNOS	FW	CATCAACAACAATGTGGAGAAAGC	62	378bp
	RV	TGGTTGACAAATTCGATAGCTTGA		
EPOR	FW	GAGATGCCAGAGTCAGATACCAC	62	301bp
	RV	AGGATACCTATCTGGTGCTGGAC		
CXCR4	FW	AGTCAACCTCTACAGCAGTGTCC	62	388bp
	RV	CAGGATGAGGATGACTGTGGTCT		
GAPDH	FW	GGGTGTGAACCATGAGAAGTATGA	62	368bp
	RV	CATATTTGGCAGGTTTTTCTAGACG		

[0067] 도 10은 활성화된 혈소판 상층액으로 프라이밍된 mobPBSC와 대조군의 세포 표면의 여러 항원을 형광을 이용한 유세포 분석기(FACS, Fluorescence-Activated Cell Analysis)를 이용하여 분석한 결과이다. 유세포 분석기로 BD FACS Canto 와 FITC 형광으로 표지된 항 EPO-Receptor(R&D, USA)와 Annexin V(Becton Dickinson), Integrin alpha 5(eBioscience, USA), integrin beta 2(Becton Dickinson) 항체, APC 형광으로 표지된 항 CD16(eBioscience), CD31(Becton Dickinson), CD34(Becton Dickinson), CXCR4(eBioscience) 항체, PEcy7 형광으로 표지된 항 CD14(eBioscience)항체, PE 형광이 달린 항 Tie2(R&D), PI(Becton Dickinson, USA), Integrin alpha 4(R&D), integrin beta 1(Becton Dickinson) 항체가 사용되었으며, 대조군으로 IgG를 사용했다. 매체-프라이밍된 mobPBSC에 비해 APS-프라이밍된 mobPBSC에서 혈관생성을 촉진하는 EPOR 양성 세포가 증가했다. 뿐만

아니라 조혈모줄기세포의 표지자인 CD34 양성 세포와 혈관생성 마커인 CD31, Tie2, CXCR4 양성 세포도 증가하였다. 또한 혈관생성 단핵구인 CD14(++)/CD16(+) 세포도 증가하였다. 반면에, 세포사멸 세포의 표지자인 Annexin (+) / PI (+)의 세포는 감소하였다. 매체 프라이밍된 mobPBSC에 비해 APS-프라이밍된 mobPBSC에서 혈관신생에 중요한 인테그린인 인테그린 $\alpha 5$, $\beta 1$ 및 $\beta 2$ 을 발현하는 세포가 증가하는 것으로 나타났다.

[0069] **실시예 7. 혈관형성 효과 확인 (in vitro 실험)**

[0070] 도 11은 HUVEC 세포와 ECM (Extra-Cellular Matrix)에 대하여 프라이밍된 mobPBSC의 부착능력을 조사하기 위하여, 하루 전에 HUVEC을 단층으로, 파이브로넥틴으로 코팅한 24웰 플레이트에 시딩(seeding)하였다. mobPBSC는 CFSE (5-(and-6)-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester, Sigma-Aldrich, USA)로 한 시간 동안 배양기(37°C, 5% 이산화탄소)에서 염색했다. CFSE로 염색한 mobPBSC를 2×10^5 개씩, 준비한 24웰 에 넣어 준 뒤 배양기(37°C, 5% 이산화탄소)에 두고 관찰했다. 결과는 떠 있는 mobPBSC를 PBS로 씻어낸 뒤, 붙어있는 mobPBSC만 형광을 40배율의 현미경으로 10개의 다양한 부분에서 촬영하여 SDF-1a를 향해 이동한 프라이밍된 mobPBSC를 정량했다. 그 결과, 매체로 프라이밍된 mobPBSC에 비해 APS-프라이밍된 mobPBSC에서 HUVEC와 파이브로넥틴에 대한 부착이 증가하였다.

[0071] 도 12의 A에서는 화학주성과 세포 이동을 확인하기 위한 실험과정을 도식적으로 나타낸 것이다. 구체적으로 화학주성 분석을 위해, 24-웰 플레이트와 트랜스웰 필터(transwell filter, 5 μ m pore size, Corning, USA)를 이용해 진행했다. 트랜스웰 필터는 파이브로넥틴 50 μ g, 100 μ g/ml로 코팅했다. 화학주성 분석에서와 같이, CFSE로 mobPBSC를 염색했다. 실험은 플레이트 아래쪽 웰에 100ng/ml의 재조합 인간 SDF-1a(Prospec, Israel)를 포함한 EBM2 배지를 두고 그 위에 트랜스웰 필터를 두었다. 이어 트랜스웰 필터 위에 CFSE로 염색된 mobPBSC(3×10^5)를 넣어 SDF-1a를 향하여 이동하는 프라이밍된 mobPBSC의 화학주성을 배양기(37°C, 5% 이산화탄소)에서 관찰했다. 결과는 트랜스웰 필터 아래의 형광을 40배율의 현미경으로 10개의 다양한 부분에서 촬영하여 SDF-1a를 향해 이동한, 프라이밍된 mobPBSC를 정량 했다. 그 결과, 매체 프라이밍된 mobPBSC에 비해 APS-프라이밍된 mobPBSC에서 화학주성이 증가한 것으로 나타났다 (도 12의 B).

[0072] 도 13은 프라이밍된 mobPBSC를 5% FBS(GIBCO)를 포함하는 EBM2(Lonza, Switzerland) 배지에서 배양 후, 매체/APS-프라이밍된 mobPBSC를 배양한 상등액을 모아 다음 실험에 사용되기 전까지 -20°C에 보관했다. Bio-Plex Pro™ Array System Kit과 장비(Bio-Rad, USA)를 이용한 ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay)를 진행하여 프라이밍된 mobPBSC가 분비한 TNF- α , IL6, IL8, IL10, IL17, IFN γ , PDGF-BB VEGF, basic FGF와 같은 사이토카인과 케모카인을 측정했다. 그 결과, 매체-프라이밍된 mobPBSC에 비해 APS-프라이밍된 mobPBSC에서 IL-8, IL-10, TNF- α , IL-17, PDGF, VEGF의 분비가 증가되었으며, IFN- γ , basic FGF은 큰 차이가 없었다[도 13의 A]. 매체-프라이밍된 mobPBSC와 APS-프라이밍된 mobPBSC의 상등액을 이용해서 HUVEC의 이동과 매트릭셀 관형성 분석을 진행했다. 그 결과, 매체-프라이밍된 mobPBSC에 비해 APS-프라이밍된 mobPBSC의 상등액을 처리한 HUVEC에서 이동 [도 13의 B.]과 관형성[도 13의 C.]이 증가한 것으로 나타났다.

[0073] **실시예 8. 혈관형성 효과 확인 (in vivo 실험)**

[0074] 본 실시예에서는 상기 매체-프라이밍된 mobPBSC에 비해서 APS-프라이밍된 mobPBSC가 전임상 단계에서 혈관형성을 더 증가시킨다는 것을 입증하였다.

[0075] 구체적으로는 활성화된 혈소판 상등액으로 프라이밍된 mobPBSC의 in vivo에서의 영향을 조사하기 위해 면역 시스템이 저하된 쥐인 무흉선 누드 마우스 (BAL/c-nu, 6-8 주령, 16-20g, Orient Bio, Korea)의 뒷다리에 허혈성 모델(Ischemic hindlimb model)을 만들고, 매트릭셀 플러그 분석을 진행했다. 대조군과 실험군은 (1) PBS 주사한 대조군 (2) 매체-프라이밍된 mobPBSC를 주사한 실험군, (3) APS-프라이밍된 mobPBSC를 주사한 실험군이며, 각 7마리씩 진행했다. 뒷다리 허혈모델은 쥐에게 1:4의 비율로 섞인 케타민과 자일라진 50ul를 복막 내 주사로 주입하여 마취시켰다. 이후 대퇴골의 동맥을 묶어 만들었으며, 직 후에 PBS와 세포(3×10^5 /50ul)를 내전근(두 부위) 내에 주사했다. 실험일로부터 0, 3, 7, 14, 21째 날에 LDPI (Moor Instruments)을 찍었으며, 21째 날에 쥐를 안락사 한 후 뒷다리를 분리하여 조직의 회복의 정도를 비교했다. 그 결과, 도 14에 나타난 바와 같이, PBS (n=7) 혹은 매체-프라이밍된 mobPBSC (n=7)를 주입한 그룹에 비해 APS-프라이밍된 mobPBSC (n=7)에서 관류(Perfusion)가 더 좋아진 것으로 나타났다[도 14의 A]. 또한, 허혈 조직의 조직학적인 조사를 위해서 각 실험군

에 대해 H&E 염색을 진행했다[도 14의 B]. 또한 새로 생성된 성숙된 혈관을 확인하기 위해서, 근육 조직을 할알과 평활근 액틴 (SMA- α , Sigma-Aldrich, USA)을 염색했다. 다음으로는, 항 인간 CD34(Leica biosystems, Germany)와 DAPI를 면역 형광 염색하여 쥐의 조직내의 사람 유래의 세포를 조사하였다. 결과는 콘포칼 또는 형광 현미경으로 분석하였다. 그 결과, 혈관내피세포 표지자인 CD34 (Cluster of Differentiation 34, 초록색)에 대한 인간 세포에 특이적인 항체 및 SMA- α (붉은색)을 이용하여 면역형광염색을 진행한 결과, APS-프라이밍된 mobPBSC를 주입한 세포가 실제로 혈관형성(Vasculogenesis)을 하는 것으로 나타났다 (도 14의 C).

[0076] 이에 더하여, 혈관을 보기 위해서 SMA- α (붉은색)을 염색한 결과, 도 15에 나타난 바와 같이, APS-프라이밍된 mobPBSC를 주입한 경우 더욱 많은 혈관이 형성되어 있다는 것을 확인하였다. 이를 정량한 결과 PBS와 매체-프라이밍된 mobPBSC 그룹보다 APS-프라이밍된 mobPBSC를 주입한 경우 혈관 수, 혈관 면적 및 혈관 길이가 유의하게 증가하였음을 확인했다.

[0077] 도 16은 매트릭셀 플러그 분석으로, VEGF-A($1\mu\text{g/ml}$), b-FGF($1\mu\text{g/ml}$), 매체/APS-프라이밍된 mobPBSC(5×10^5)를 넣은 $350\mu\text{l}$ 의 차가운 Matrigel(BD bioscience)을 쥐의 등에 피하로 주사했다. 대조군은 세포가 들어있지 않은 매트릭셀을 주사했다. 실험일로부터 21일에 쥐를 안락사 한 후에 매트릭셀을 분리했다. 혈관 생성을 비교하기 위해서 H&E와 면역 형광 염색을 진행했다. 혈관 형성은 선 구조, 적혈구를 포함하고 있는 둥근 형태로 관찰되었다. 모든 동물 실험은 서울대 병원 임상의학센터의 동물실험윤리위원회로부터 승인을 받은 후 수행되었으며, 실험동물 관리와 사용에 관한 국제 연구위원의 가이드라인에 따라 수행되었다. 그 결과 PBS와 매체-프라이밍된 mobPBSC 그룹보다 APS-프라이밍된 mobPBSC를 주입한 경우 더욱 많은 혈관들이 육안으로 관찰됐다 (도 16의 A). 또한 이를 H&E 염색과 SMA- α (붉은색)를 염색해 본 결과 실제로 APS-프라이밍된 mobPBSC를 주입한 경우에서 더욱 많은 혈관들이 관찰되었으며, 이를 정량한 결과 PBS와 매체-프라이밍된 mobPBSC 그룹보다 APS-프라이밍된 mobPBSC를 주입한 경우 혈관이 수, 면적 및 길이가 유의하게 증가했다 (도 16의 B).

[0078] 도면의 사진은 Olympus IX2 inverted fluorescence microscope(Olympus), Olympus DP50 CF CCD camera, analysis 5.0 software를 통해 취득하였으며, Zeiss LSM-710 META confocal microscope(Olympus)와 ZEN 2009 analysis software를 통해 confocal 사진 결과를 얻었다.

[0079] **실시예 9. APS의 안정성 검사(Thrombogenicity test)**

[0080] 본 실시예는 혈전형성 검사를 통해서 APS의 안전성을 시험하였다. 혈소판은 조직의 손상 회복에도 큰 영향을 끼치지만, 혈전 형성에도 큰 몫을 한다. 허혈성 심혈관처럼 ‘혈전 형성’ 이 병태 생리인 질병에 APS를 사용하는 것은 조직 손상 이전에 혈전의 생성을 늘릴 위험성이 있기 때문이다.

[0081] 도 17의 A 및 B는 활성화된 혈소판 상등액의 안정성을 확인하기 위해서, APS-프라이밍된 mobPBSC의 혈전형성 실험을 진행한 결과이다. 본 실험은 mobPBSC를 혈액에 섞은 후 혈소판의 활성화 정도를 측정했다. 혈소판의 활성화는 혈소판의 막에 존재하는 두 가지 당단백질인 CD41(integrin alpha IIb chain) 및 CD61(integrin beta 3 chain)을 통해 확인한 과정을 도 17의 A에 도식화하여 나타냈다.

[0082] 환자의 관상 동맥에 APS-프라이밍된 mobPBSC를 넣어주는 임상의 조건을 적용하기 위해서, 매체/APS-프라이밍된 mobPBSCs를 그 지원자의 혈액에 1×10^7 cells/ml의 농도로 섞은 후 아스피린을 넣지 않은 대조군과 20ug/ml 넣은 실험군을 소듐 사이트레이트 시험관(BD-Plymouth,UK)에 각각 준비했다. 30분동안 잘 섞어주며 혈소판을 활성화 시킨 후 130xg로 20분간 원심 분리하여 PRP를 분리했다. 이렇게 얻어진 PRP는 FACS를 진행하기 위해 FITC 형광으로 표지된 CD41, CD61 항체로 염색되었었고, IgG에 FITC 형광이 표지된 항체를 이용해 대조군으로 설정했다. 분리, 염색 과정에서의 혈소판의 자체적인 활성화를 막기 위해서 강한 충격이 가해지지 않도록 했다.

[0083] 도 17의 B는 FACS 분석 결과를 보여준다. CD61와 CD41a 모두 혈소판이 활성화되면 FACS 결과치가 증가한다. 결과적으로, APS과 매체로 프라이밍 한 mobPBSCs를 섞어준 전혈의 혈소판은 모두 활성화도가 증가하였다. 하지만, 심혈관 질환자에서 사용되는 항혈소판 제제인 아스피린에 의해 혈소판의 반응도는 감소하는 것으로 나타났다.

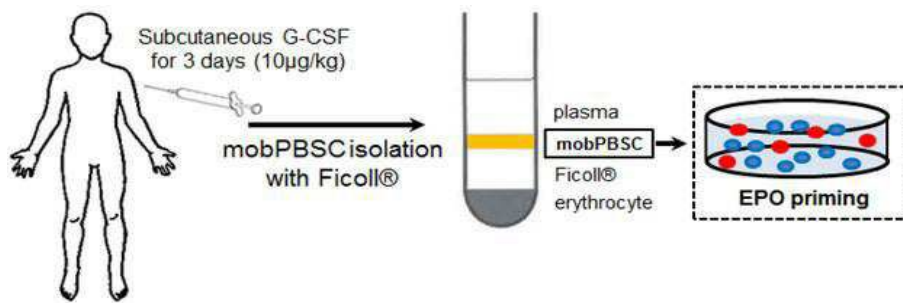
[0084] 이러한 결과는 APS 프라이밍으로 인한 전혈의 혈소판 활성도를 일부 증가하였으나 이는 항혈소판 제제의 병행 사용으로 다시 감소되는 것을 확인하였다. 즉, APS 프라이밍이 갖는 혈전의 위험 가능성을 항혈소판 제제 사용으로 감소시킬 수 있어 안정성 문제를 해결할 수 있음을 제시하는 도면이다.

[0085] 모든 통계적 분석은 Prism 5.0 program(GraphPad Software, USA)와 SPSS Version 18(SPSS Inc., USA)를 통해 이뤄졌었다. 결과는 평균의 평균±표준편차로 나타냈었다. 실험군 간의 비교는 Bonferroni analysis나 unpaired t-test의 사후 비교를 통한 격차를 분석하여 진행했다. P-value가 <0.05일 때, 통계적으로 유의한 것으로 나타났다.

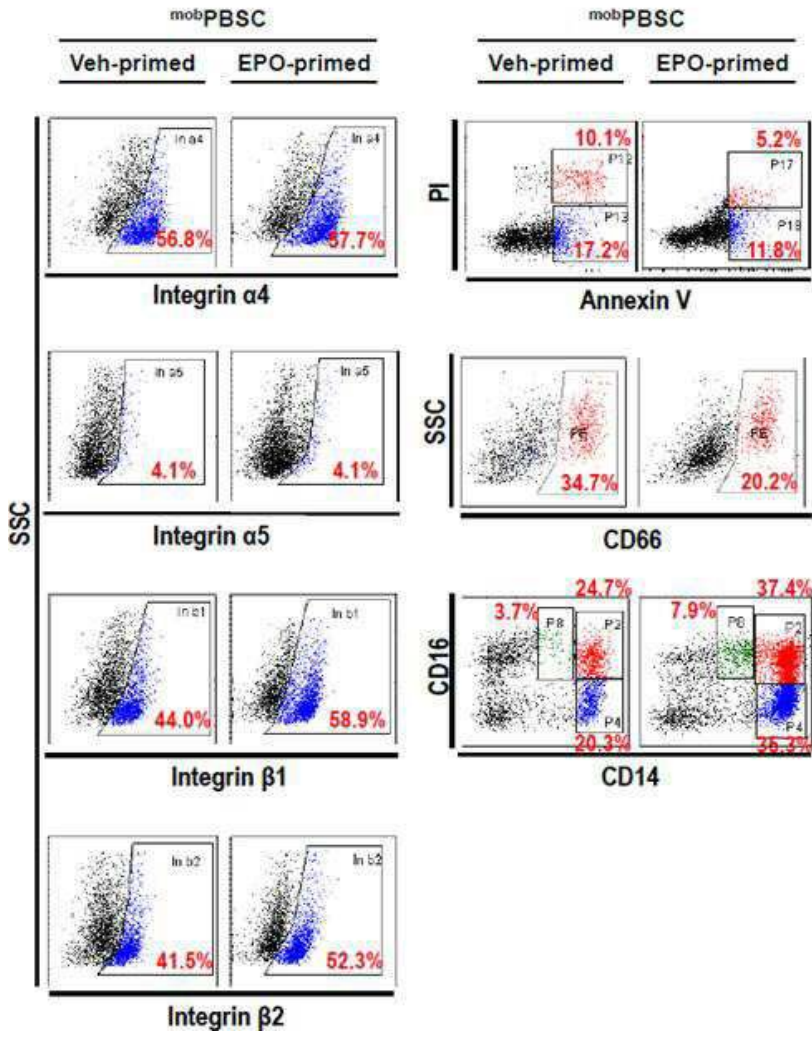
[0086] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해되어야 한다.

도면

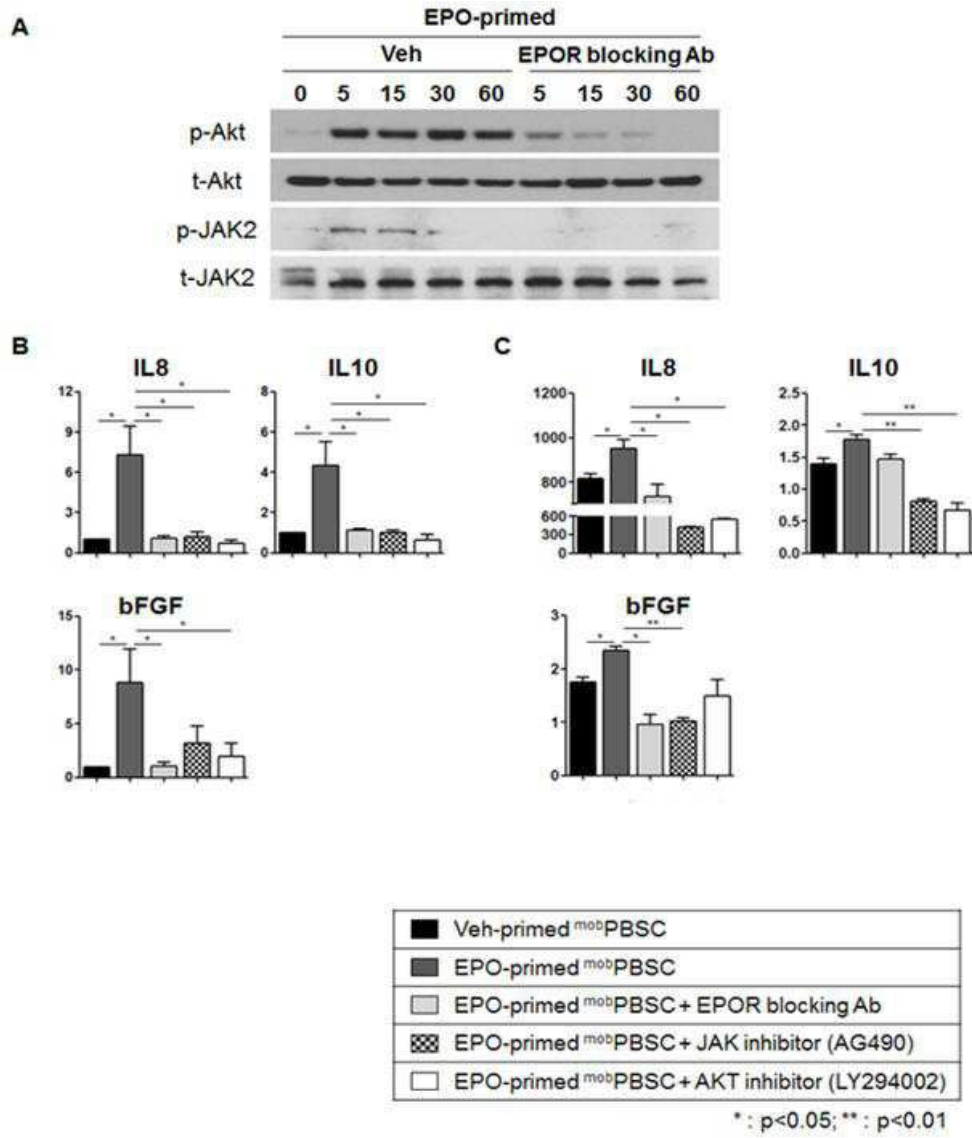
도면1



도면2

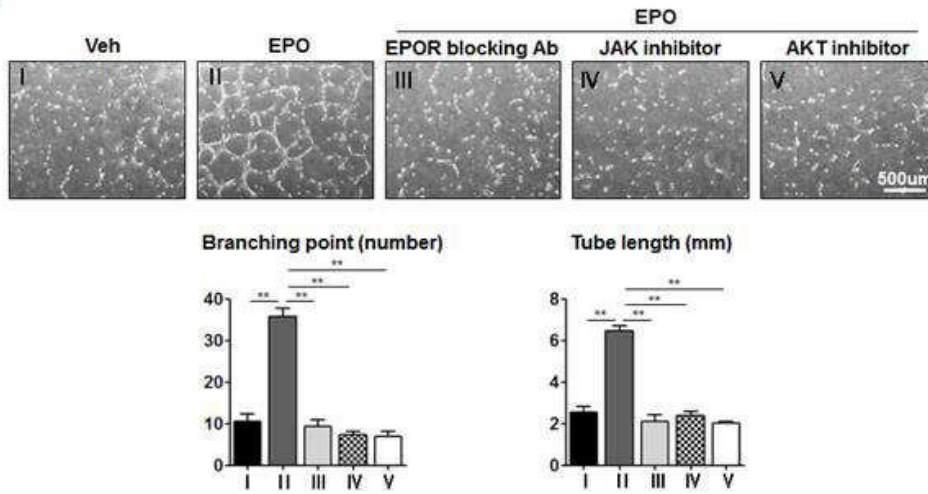


도면3

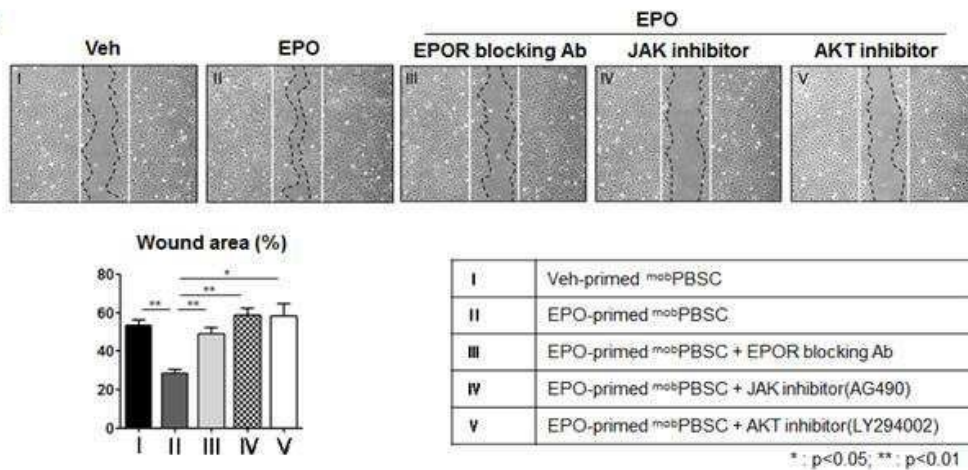


도면4

A



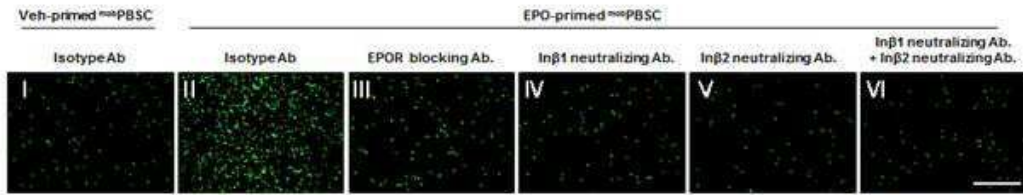
B



*: p<0.05, **: p<0.01

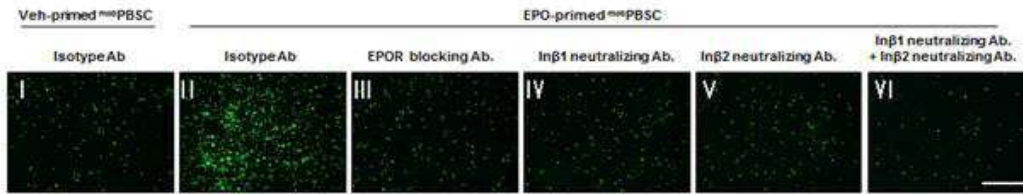
도면5

A Adherent cells to fibronectin



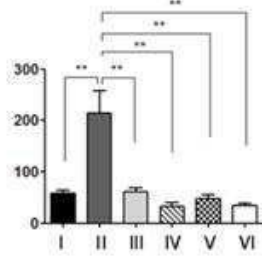
Scale bar = 250um.

B Adherent cells to HUVEC

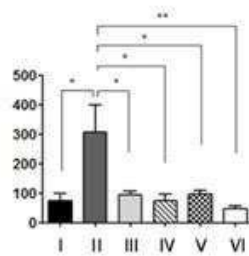


Scale bar = 250um.

C Adherent cells to fibronectin



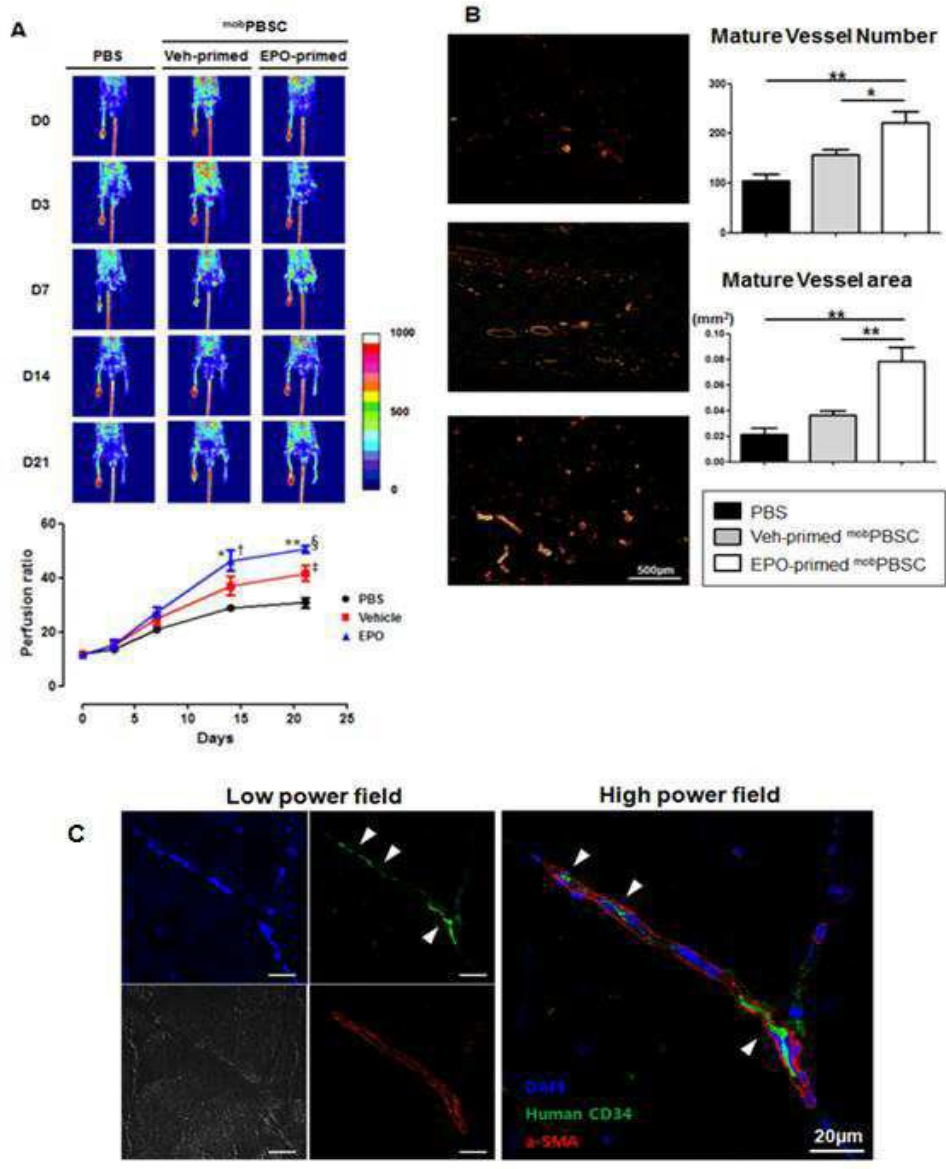
Adherent cells to HUVEC



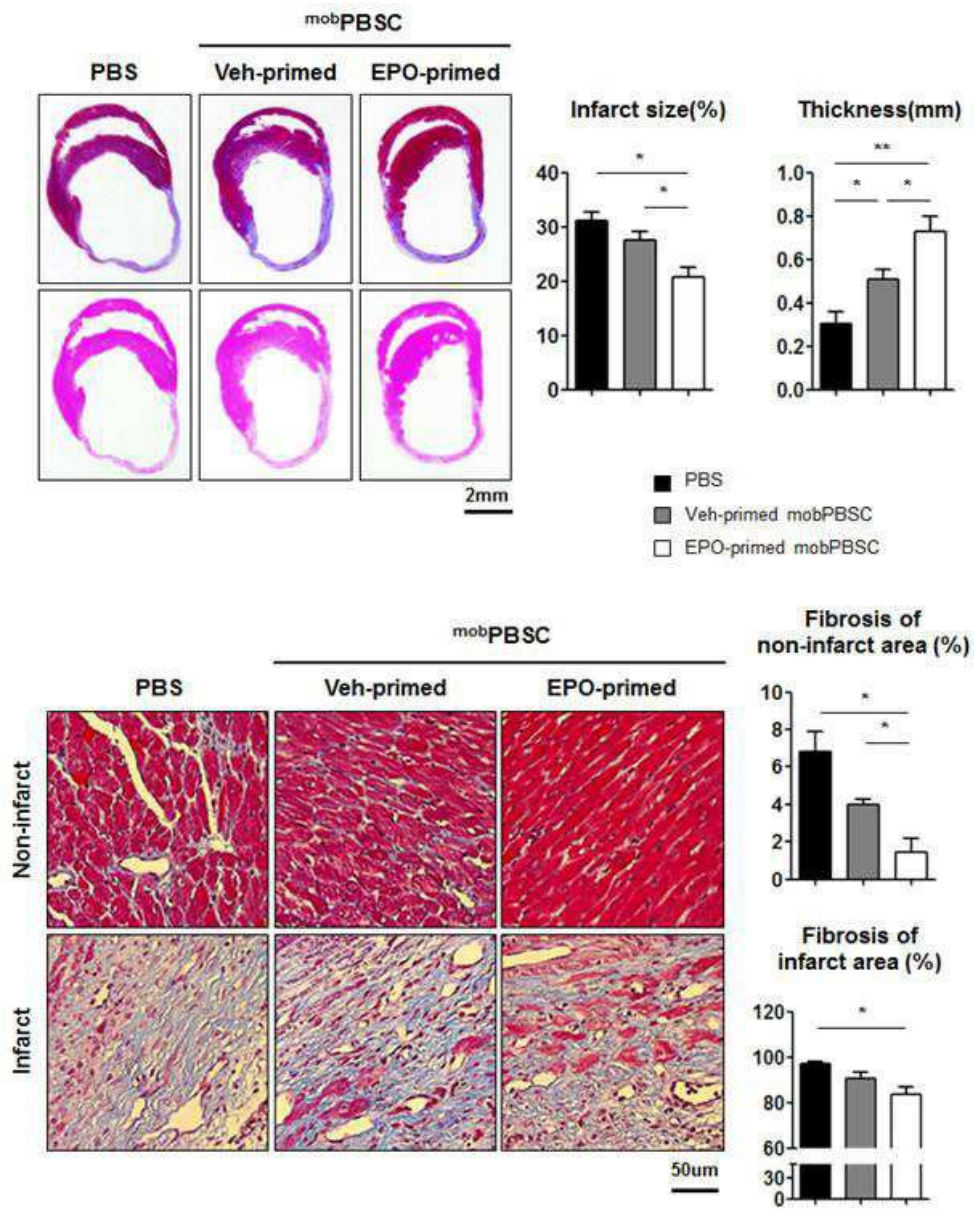
I	Veh-primed
II	EPO-primed
III	EPO-primed + EPOR blocking Ab.
IV	EPO-primed + Inβ1 neutralizing Ab.
V	EPO-primed + Inβ2 neutralizing Ab.
VI	EPO-primed + Inβ1 neutralizing Ab. + Inβ2 neutralizing Ab.

* : p<0.05; ** : p<0.01

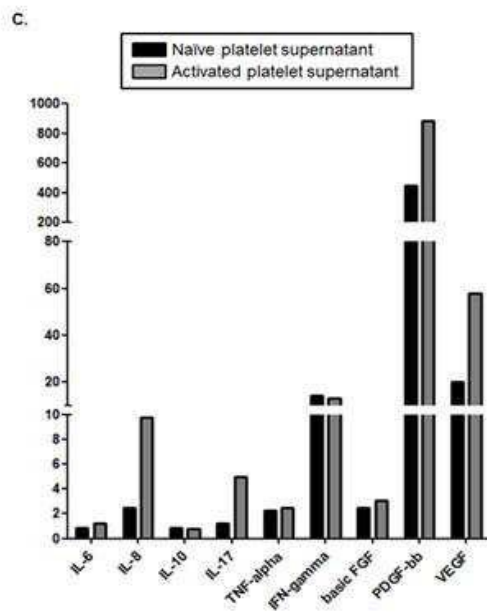
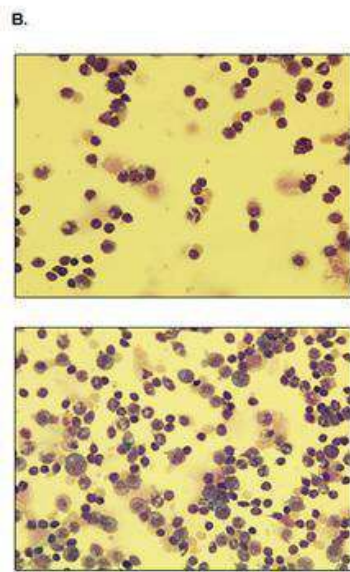
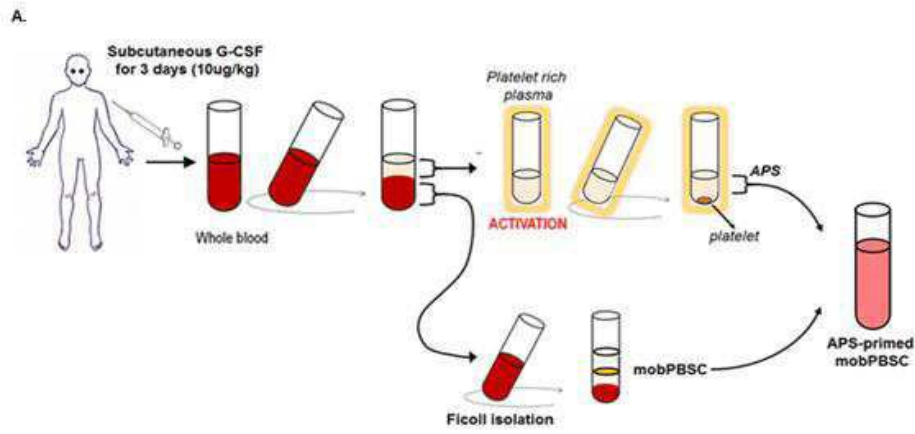
도면6



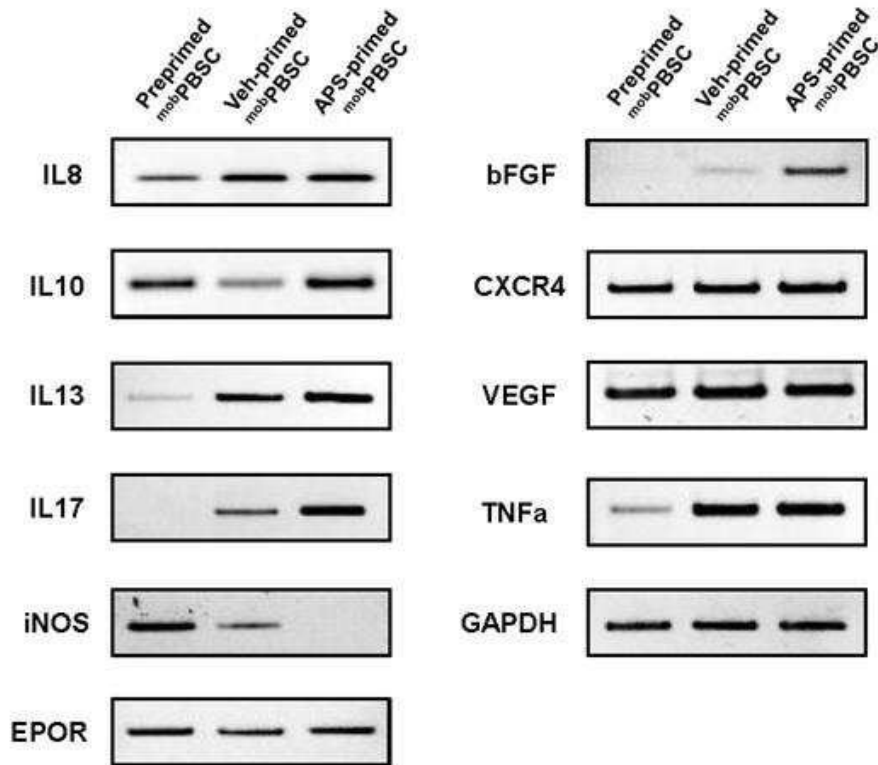
도면7



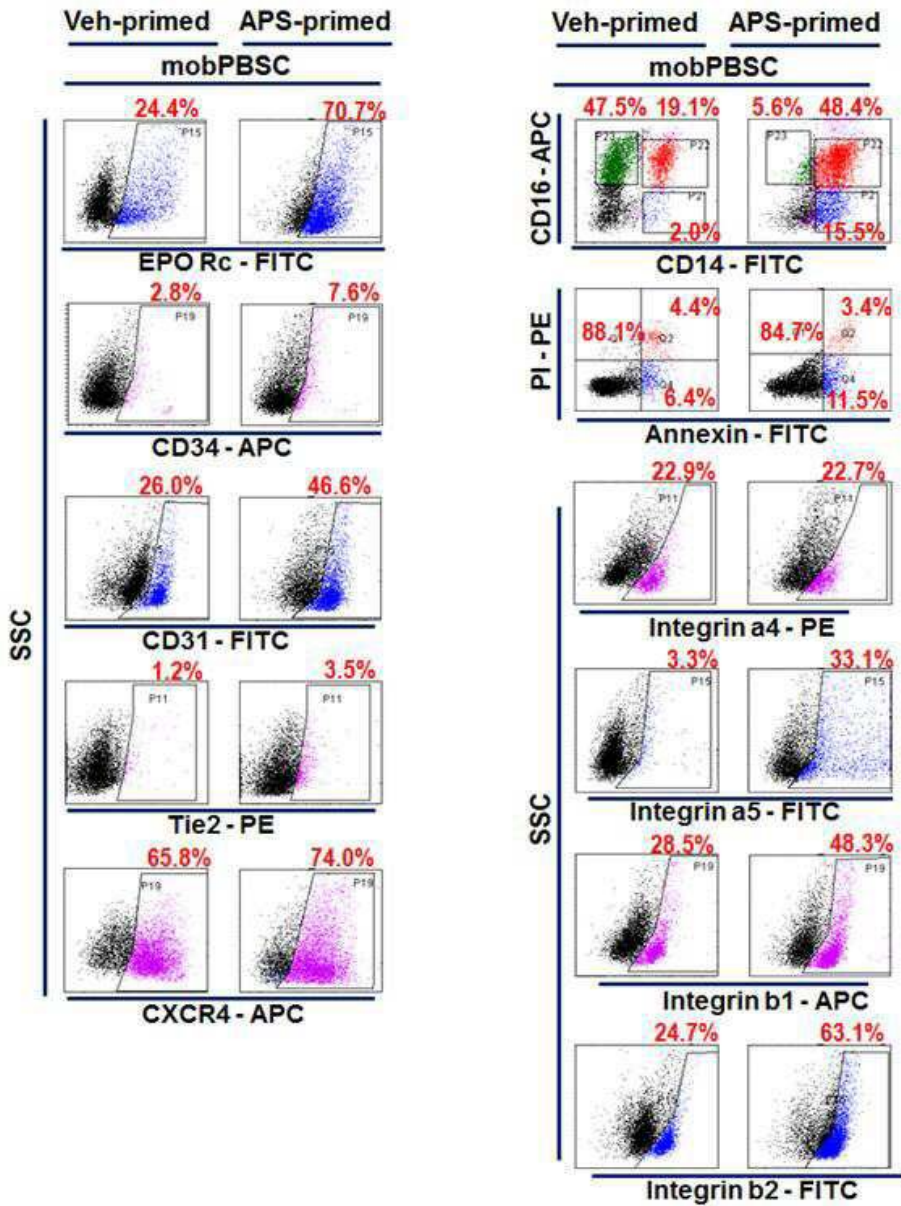
도면8



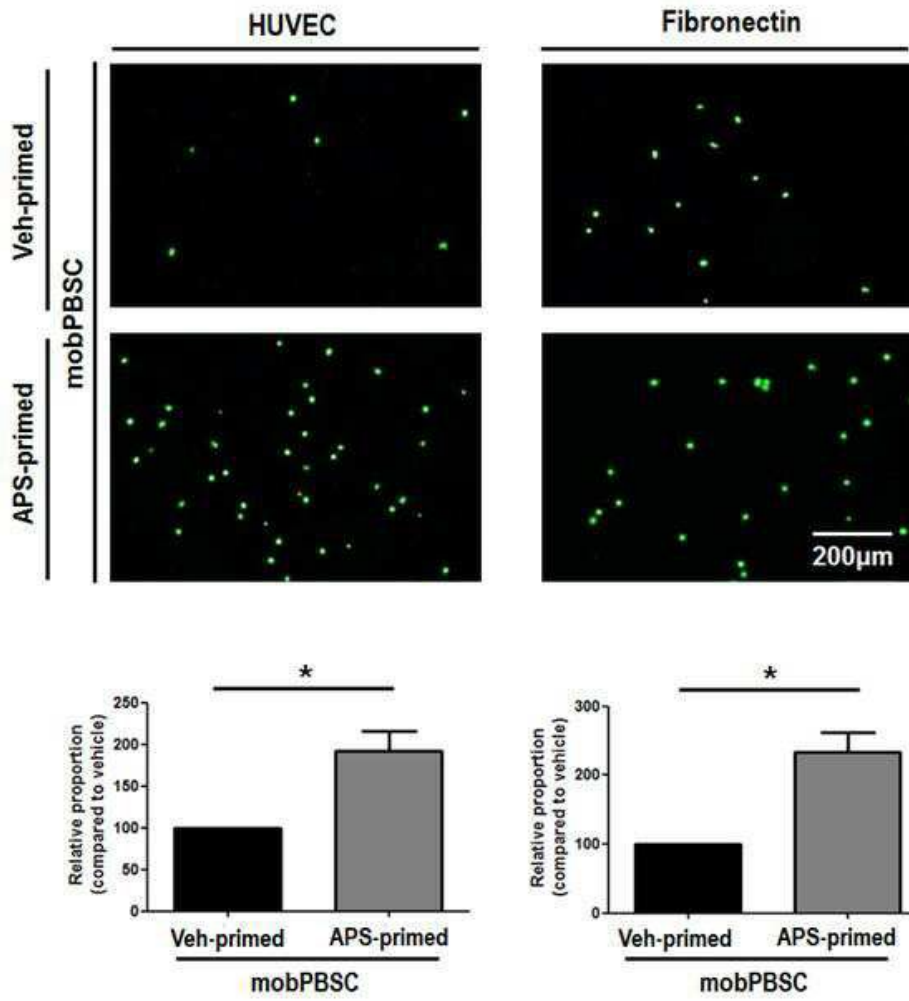
도면9



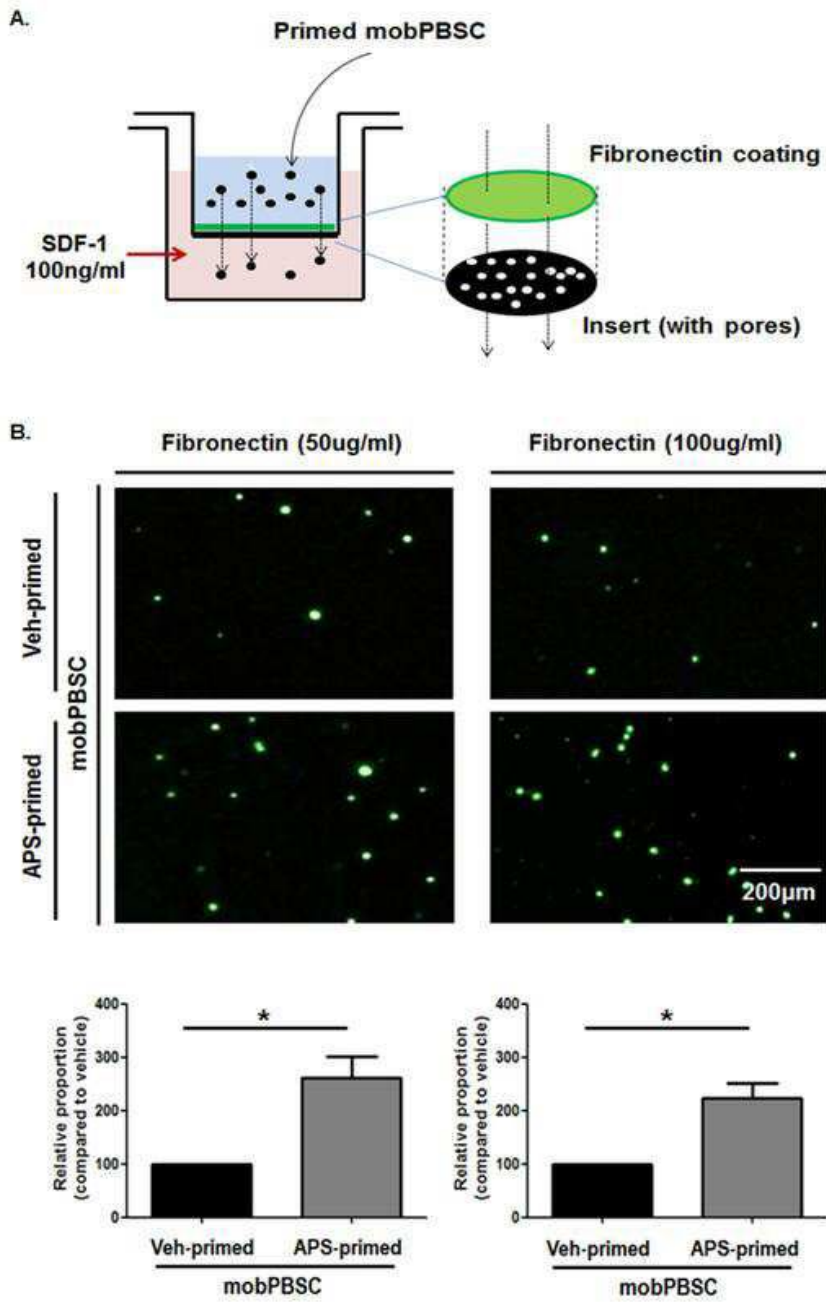
도면10



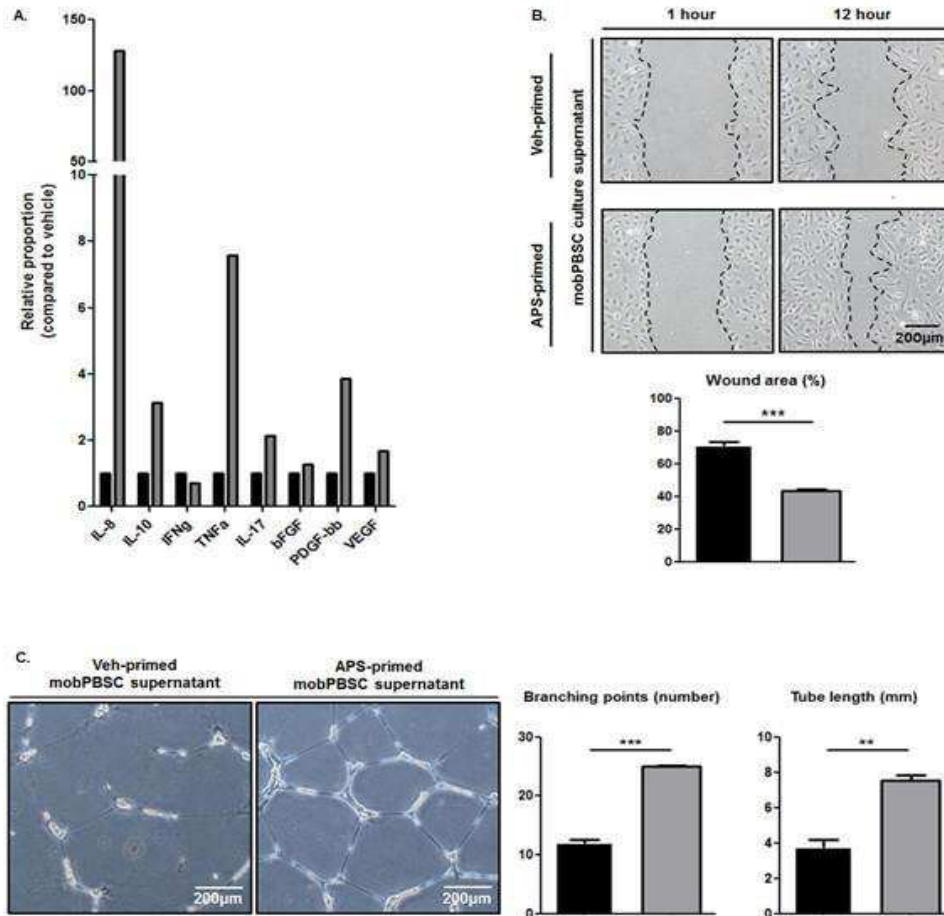
도면11



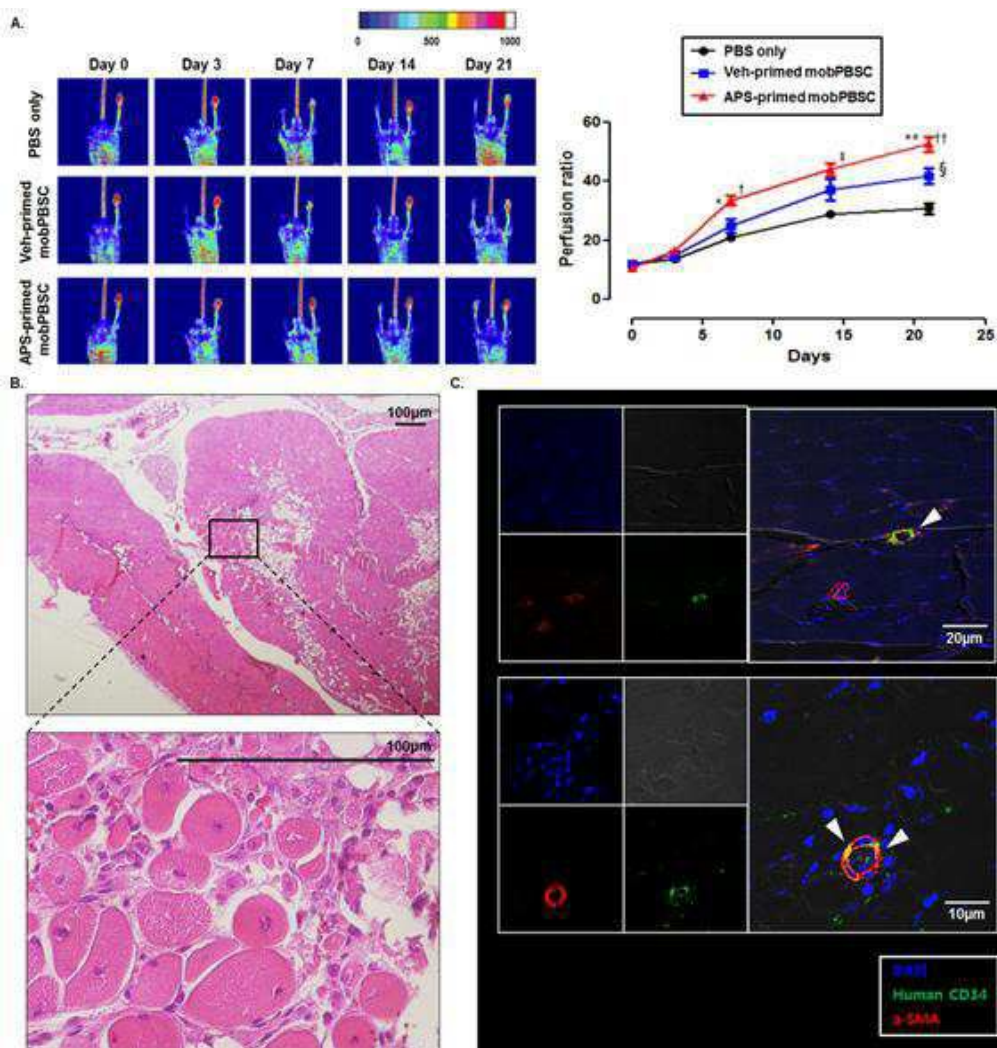
도면12



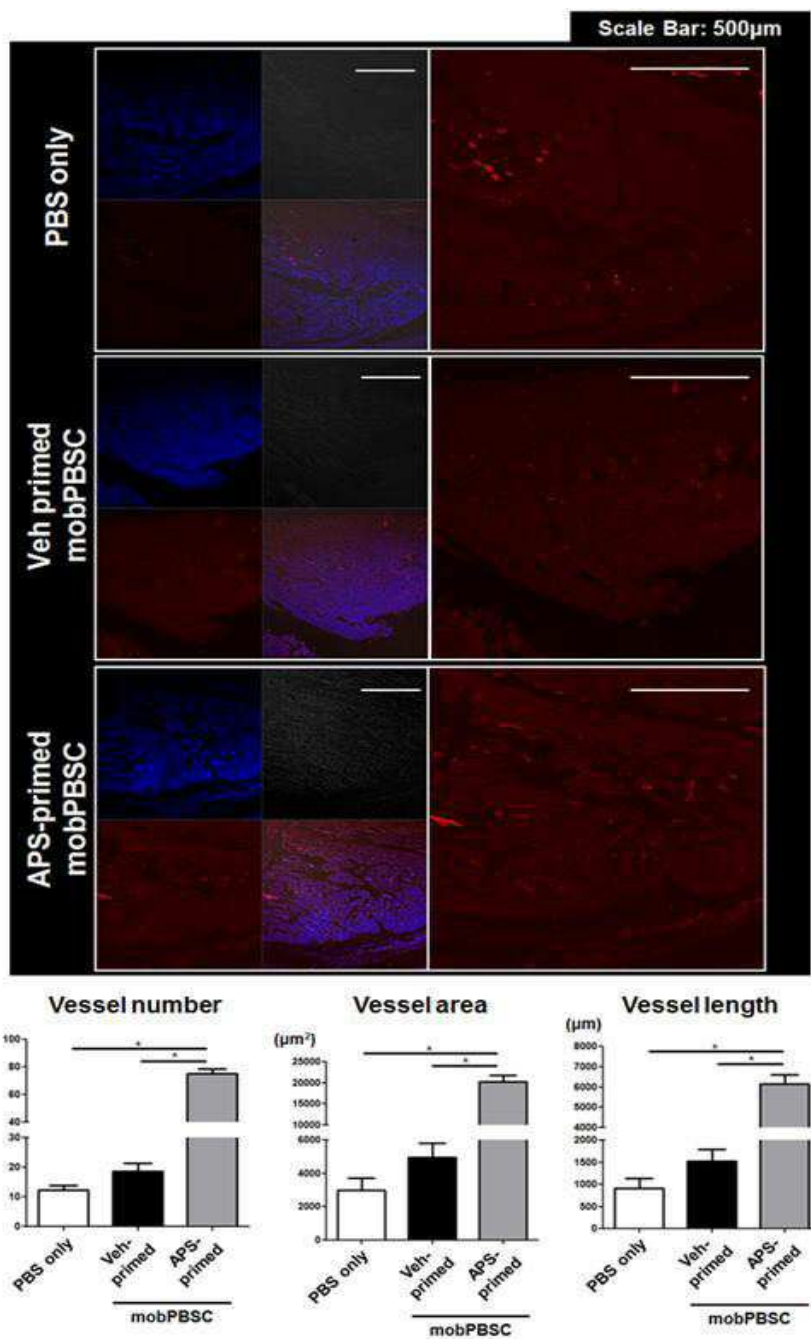
도면13



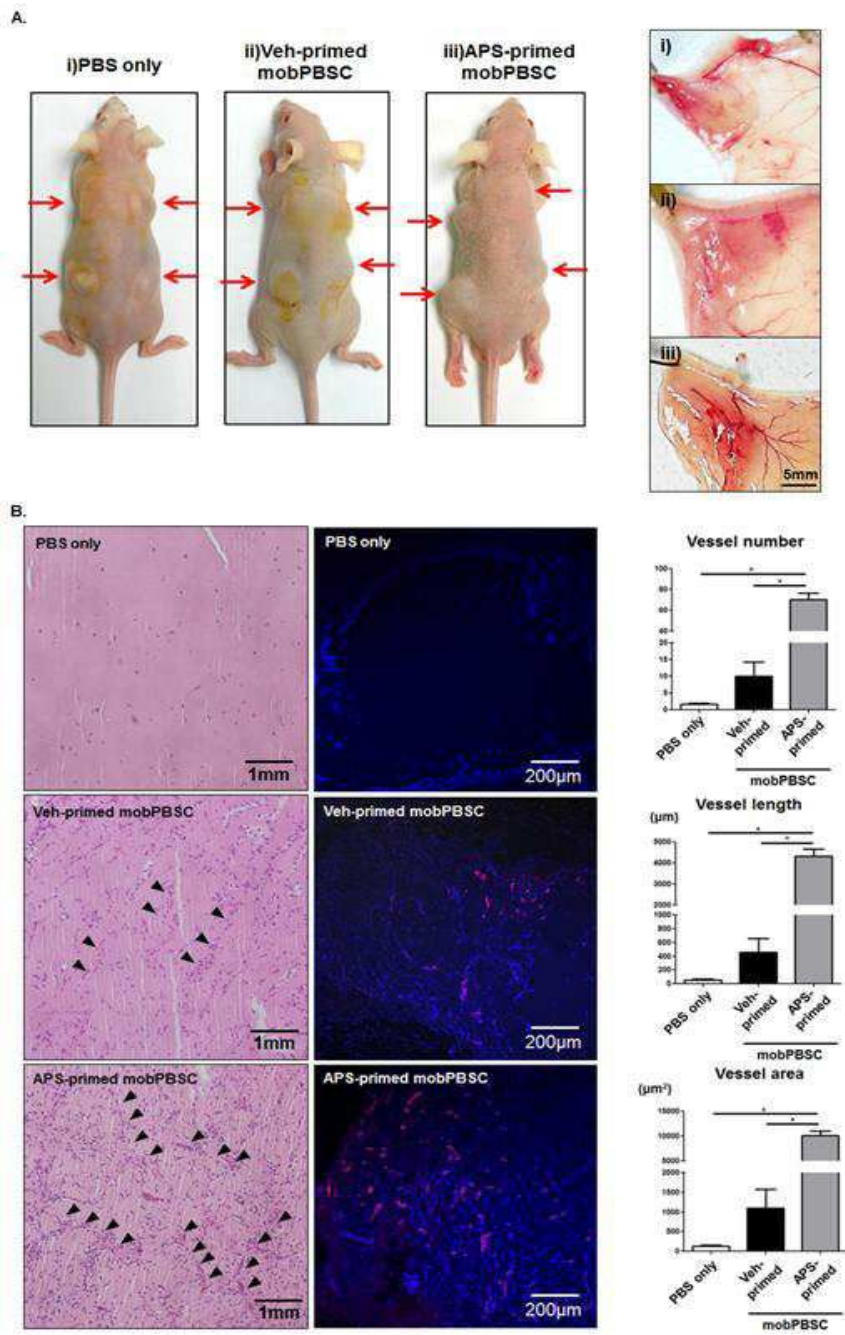
도면14



도면15



도면16



도면17

