



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(11) 공개번호 10-2012-0100962  
 (43) 공개일자 2012년09월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
**A61K 35/14** (2006.01) **A61K 35/28** (2006.01)  
**A61P 13/12** (2006.01)  
 (21) 출원번호 10-2012-7011181  
 (22) 출원일자(국제) 2010년09월30일  
 심사청구일자 없음  
 (85) 번역문제출일자 2012년04월30일  
 (86) 국제출원번호 PCT/US2010/050812  
 (87) 국제공개번호 WO 2011/041478  
 국제공개일자 2011년04월07일  
 (30) 우선권주장  
 61/248,316 2009년10월02일 미국(US)

(71) 출원인  
**박스터 헬스케어 에스.에이.**  
 스위스 8152 글라트파르크 (오프피콘) 투르가우  
 에르슈트라쎄 130  
**박스터 인터내셔널 인코포레이티드**  
 미국 일리노이주 60015 디어필드 원 박스터 파크  
 웨이  
 (72) 발명자  
**암라니 데이비드 엘**  
 미국 53209 위스콘신주 글렌데일 웨스트 윈저 서  
 클 1961  
**모트라그 델라라**  
 미국 60010 일리노이주 배링턴 레이크우드 드라이브  
 브 938  
 (뒷면에 계속)  
 (74) 대리인  
**김영, 장수길**

전체 청구항 수 : 총 26 항

(54) 발명의 명칭 **신장 손상을 치료하는데 사용하기 위한 조혈 줄기 세포**

**(57) 요약**

환자에게 신장 손상을 치료하는데 효과적인 양의 조혈 줄기 세포들(HSC)을 투여함을 포함하는, 환자에서 신장 손상을 치료하는 방법이 본원에 제공된다. 일부 구체예에서, HSC의 투여를 지연시킴으로써, 상기 HSC가 상기 신장 손상 직후 투여되지 않도록 한다. 특정 측면들에서, 상기 HSC는 환자에게 상기 신장의 복구 상 개시 동안 투여된다. 본원에서 사용하기 위한 관련 방법 및 조성물을 포함하는 본 발명의 추가의 구체예 및 측면이 본원에 기술되어 있다.

(72) 발명자

**호프 캐서린 엠**

미국 60044 일리노이주 레이크 블러프 더블유 위치  
우드 레인 412

**코헨 에이미**

미국 60030 일리노이주 그레이슬레이크 더블유 위  
네바고 드라이브 17521

**더필드 제레미**

미국 90115 워싱턴주 시애틀 44쓰 애비뉴 엔이  
6015

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

환자에서 신장 손상을 치료하는데 효과적인 양의 조혈 줄기 세포(HSC)를 손상 후 적어도 약 20시간째에 및 손상 후 약 14일 전에 환자에게 투여함을 포함하는, 환자에서 신장 손상을 치료하는 방법.

**청구항 2**

환자에서 신장병 또는 신장 의학 상태를 예방하는데 효과적인 양의 조혈 줄기 세포(HSC)를 손상 후 적어도 약 20시간째에 및 손상 후 약 14일 전에 환자에게 투여함을 포함하는, 신장 손상을 포함하는 환자에서 신장병 또는 신장 의학 상태를 예방하는 방법.

**청구항 3**

청구항 2에 있어서, 신장병 또는 신장 의학 상태가 급성 신부전, 만성 신장병 및 사이질 섬유증으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 방법.

**청구항 4**

환자의 생존을 증가시키기에 효과적인 양의 조혈 줄기 세포(HSC)를 손상 후 적어도 약 20시간째에 및 손상 후 약 14일 전에 환자에게 투여함을 포함하는, 신장 손상을 포함하는 환자의 생존을 증가시키는 방법.

**청구항 5**

청구항 1 내지 4 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 신장 손상이 상기 환자의 신장에서 세관주위 모세혈관 손실을 유발하는 방법.

**청구항 6**

청구항 1 내지 5 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 급성 신장 손상이 상기 환자에서 허혈, 독소, 안지오텐신-전환 효소 억제제(ACEI) 또는 안지오텐신 II 수용체 차단제, 혈액 수혈 반응, 근육에 대한 손상 또는 외상, 수술, 쇼크, 저혈압 중 하나 이상에 의해 유발되는 방법.

**청구항 7**

청구항 1 내지 6 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 신장 손상이 신장 허혈성 재관류 손상인 방법.

**청구항 8**

청구항 1 내지 7 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 HSC가 손상 후 적어도 약 20시간째에 및 손상 후 약 7일 전에 투여되는 방법.

**청구항 9**

청구항 8에 있어서, 상기 HSC가 손상 후 적어도 22시간째에 및 손상 후 약 4일 전에 투여되는 방법.

**청구항 10**

청구항 9에 있어서, 상기 HSC가 손상 후 대략 24시간째에 투여되는 방법.

**청구항 11**

청구항 1 내지 청구항 10 중의 어느 한 항에 있어서, HSC의 제2 투여를 추가로 포함하는 방법.

**청구항 12**

청구항 11에 있어서, HSC의 상기 제2 투여가 상기 제1 투여 후 적어도 약 12시간째에 투여되는 방법.

**청구항 13**

청구항 12에 있어서, HSC의 상기 제2 투여가 상기 제1 투여 후 적어도 약 24시간째에 투여되는 방법.

**청구항 14**

청구항 1 내지 13 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 HSC가 세포 집단의 일부이고, 이러한 집단의 상기 세포 중 적어도 30%가 CD34<sup>+</sup>HSC인 방법.

**청구항 15**

청구항 14에 있어서, 상기 세포의 적어도 50%가 CD34<sup>+</sup>HSC인 방법.

**청구항 16**

청구항 15에 있어서, 상기 세포의 적어도 75%가 CD34<sup>+</sup>HSC인 방법.

**청구항 17**

청구항 16에 있어서, 상기 세포의 75% 초과가 CD34<sup>+</sup>HSC인 방법.

**청구항 18**

청구항 1 내지 17 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 HSC가 공여자의 말초 혈액으로부터 분리된 골수 세포로 이동 되는 방법.

**청구항 19**

청구항 18에 있어서, 상기 공여자가 상기 환자이고 상기 HSC가 상기 환자에 대해 자가성인 방법.

**청구항 20**

청구항 1 내지 19 중의 어느 한 항에 있어서, 적어도  $2.5 \times 10^6$  HSC가 상기 환자에게 투여되는 방법.

**청구항 21**

청구항 1 내지 20 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 HSC가 비경구적으로 투여되는 방법.

**청구항 22**

HSC의 집단 및 약제학적 담체를 포함하는 약제학적 조성물.

**청구항 23**

청구항 22에 있어서, 비경구 투여용으로 제형화된 약제학적 조성물.

**청구항 24**

청구항 22 또는 23에 있어서, 상기 HSC가 신장 허혈성 재관류 손상용 치료제에 접합되는 약제학적 조성물.

**청구항 25**

청구항 22 내지 24 중의 어느 한 항에 있어서, 신장병 또는 신장 의학 상태를 치료하기 위한 치료제를 추가로 포함하는 약제학적 조성물.

**청구항 26**

청구항 25에 있어서, 치료제가 TLR2 억제제, ATF3 유전자 또는 유전자 생성물, 및 미네랄로코르티코이드 수용체 차단제, 라이소포스파티드산, 2-메틸아미노크로만, 21-아미노스테로이드, 트리메타지딘, 및 수라민으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 약제학적 조성물.

**명세서**

**기술분야**

**[0001] 관련 출원의 상호 참조**

[0002] 본 출원은 2009년 10월 2일에 출원된 미국 가특허출원번호 61/248,316호의 우선권을 주장하며, 이는 참조함으로써 그 전문이 본원에 통합된다.

**배경기술**

[0003] 비록 신장은 놀랄만한 재생력을 지니지만, 만성 신장병 및 급성 신장 손상 후 또는 반복되고 만성적인 신장 손상 둘다 이후 신 부전은 현재 세계적으로 이환률(morbidity) 및 사망률의 선도하는 원인이다[1-3]. 또한, 만성 신장병은 심혈관병 및 심혈관 이환률에 대한 선도적인 독립된 위험 인자로 확인되어 왔다[4]. 만성 신장병은 손상 후 비성공적이거나 부적절한 신장 회복을 나타낼 수 있으며, 현재 신장의 복구 및 재생을 증진시키는 치료법은 거의 없다[5].

[0004] 신장 세관주위 미세혈관구조는, 이의 취약한 혈관구조가 일반적으로 손상 후 재생될 수 없기 때문에, 최근에 관심이 증가하고 있다. 이는 신장의 만성 허혈을 유도하여[12-15], 만성 염증, 관 위축, 및 사이질 섬유증, 만성 신장병의 특징들을 촉발시킨다[12, 13]. 손상 후 세관주위 모세관의 비성공적인 재생은 만성 신장병으로의 진행에 대해 중심인 것으로 제안되어져 왔다[12-14].

[0005] 골수로부터 줄기 세포의 재생 및 혈관형성 특징에 있어 많은 관심이 있어 왔으며[6-8], 신장병의 마우스 모델에서 몇가지 연구들은, 골수의 마우스 중간엽 간질 세포(MSC)가 가능하게는 주변분비 또는 전신계적 분비 메카니즘에 의해 신장 손상을 방지하거나 약화시킬 수 있음이 밝혀졌다[6, 9, 10]. 그러나, 신장 복구에 있어서 조혈 줄기 세포들(HSC)의 가능한 혈관형성 역할은 거의 분석되어 있지 않고 기관 복구 및 재생을 촉진하기 위한 세포 치료요법에 있어서 인간 HSC를 수거하는 실행가능성을 확인하는 연구는 없었다[11].

[0006] 따라서, 당해 분야에서 신장 손상의 치료 방법을 개발하기 위한 요구가 존재한다.

**[0007] 발명의 간단한 요약**

[0008] 본원에 기술된 연구는 인간 CD34+ 줄기 세포가 손상된 신장에서 보충되어 생존, 혈관 재생 및 기능 회복을 촉진함을 최초로 입증한다. 신장의 복구 및 재생을 촉진하는 인간 CD34+ 조혈 줄기 세포들의 능력을 마우스에서 확립된 허혈 재관류 손상 모델을 사용하여 연구하였다. 신장 손상 후에 예를 들면, 전신계적으로 투여된 인간 HSC를 마우스의 손상된 신장에 선택적으로 보충함으로써 혈관구조내 및 주변에서 주로 국제화시켰다. 이러한 보충은 신장 미세혈관구조의 향상된 복구, 세관 내피 세포, 향상된 기능성 회복 및 증가된 생존과 관련되었다. 일부 예에서, HSC는 신장에서 조기 골수 및 림프 분화 마커를 획득하였으며 또한 내피 후대세포 마커의 획득을 나타내었지만 신장에 대한 보충 후 전-혈관형성 전사체의 높은 수준의 합성을 보유하고 있었다. 비록 주입된 정제된 HSC가 적은 수의 순환하는 내피 후대세포 및 때때로 내피 세포를 함유하지만, 단지 드문 인간 내피 세포가 마우스 모세관벽에서 확인되었으며, 이는, HSC 매개된 신장 복구가 혈관구조의 교체라기보다는 주변분비 메카니즘에 의한 것임을 제안한다. 이러한 연구는 손상 후 신장 복구를 증진시키기 위한 촉망되는 치료학적 전략으로서 인간 HSC를 발전시킨다.

[0009] 따라서, 본 발명은 환자에게 조혈 줄기 세포들(HSC)을 투여함을 포함하는, 환자에서 신장 손상을 치료하는 방법을 제공한다. HSC는 환자에게 신장 손상을 치료하기에 효과적인 양으로 투여되며, 당해 양은 또한 본원에 기술되어 있다. 본 발명의 특정 구체예에서, HSC의 투여는 지연되는데; 즉, HSC는 신장 손상 직후 투여되지 않는다. 본 발명의 일부 측면에서, HSC는 환자에게 신장의 복구 상의 개시시에, 예를 들면, 손상 후 적어도 약 12시간, 14 시간, 16 시간, 18 시간, 20 시간, 22 시간, 또는 24 시간째에 투여된다. 추가의 구체예에서, HSC는 환자에게 손상 후 약 24 시간째에, 또는 이후 수회, 그러나 손상 후 약 14일 전에 투여된다. HSC의 투여 시간과 관련된 추가의 구체예는 본원에 상세히 기술된다.

[0010] 본원에 추가로 제공된 것은 HSC의 투여를 포함하는 방법에 관한 것이다. 예를 들어, 신장 손상을 포함하는 환자에서 신장병 또는 신장 의학적 상태를 예방하는 방법, 신장 손상을 포함하는 환자의 생존을 증가시키는 방법, 및 신장 손상을 포함하는 환자에서 신장병 또는 신장 의학 상태에 의해 유발되거나 이와 관련된 비-신장병 또는 비-신장 의학 상태를 예방하는 방법이 제공된다.

[0011] 본 발명의 일부 구체예에서, 본 발명의 방법에 사용된 HSC는 약제학적으로 허용되는 담체와 함께 제형화된다. 따라서, 본 발명은 HSC의 집단 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 특정 구체예에서, 약제학적 조성물은 임의로 HSC에 접합된 추가의 치료제 또는 진단제를 포함한다. 이러한 약제학적 조성물은 치료제 또는 진단제를 손상된 신장에 전달하는데 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명은 환자에게 치료제 또는 진단제에 접합된 HSC를 투여함을 포함하는, 환자에서 손상된 신장에 치료제 또는 진단제를 전달하는 방법을 제공한다.

[0012] 일부 측면에서, 약제학적 조성물은 세포의 이중 집단을 포함하며, 여기서, HSC (예를 들면, CD34+ HSC)는 집단의 세포들의 적어도 약 25% (예를 들면, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 적어도 약 98%)를 구성한다. 본 발명의 약제학적 조성물 및 이의 용도의 추가의 구체예도 본원에 제공된다.

**도면의 간단한 설명**

[0013] 도 1은, 인간 조혈 줄기 세포들이 NOD/SCID 마우스의 허혈후 재관류 손상 신장, 비장 및 골수에 보충됨을 입증한다. (A) 마우스 CD31 표지화(labeling)로 나타낸 세관주위 모세관내 CMFDA 표지된 인간 세포들(화살표)은 나타내는 IRI 후 d1에 선택적으로(adoptively) 이전된 인간 HSC를 제공받은 NOD/SCID 마우스 신장의 IRI 3일 후 대표적인 공초점 영상. (B) IRI 후 및 IRI 후 3, 5 및 7일째에 대조군 신장에서 확인된 인간 HSC의 수를 나타내는 그래프. (C) IRI 후 24시간째에 인간 HSC로 처리한 NOD/SCID 마우스의 7일 후 IRI 신장의 인간 HLA 부류 I(녹색, 화살표)을 검출하는 대표적인 공초점 영상. (D) IRI 후 및 IRI 후 7, 14 및 28일째에 대조군 신장에서 단면당 인간 HLA 부류 I 세포의 수를 나타내는 그래프. (E) 신장 IRI 후 1d째에 선택적으로 이전된, IRI 후 3d째에 비장에서 CMFDA 표지된 인간 HSC의 대표적인 공초점 영상. (F) IRI 후 3, 5 및 7일째에 비장에서 단면당 CMFDA 양성 세포들의 수를 나타내는 그래프. (G) IRI 후 d1에서 선택적으로 이전된 인간 HSC를 제공받은 신장 IRI 마우스의 d7 후 신장으로부터 전 골수의 CD11b(마우스 및 인간 항원을 검출) 및 인간 CD45에 대한 대표적인 유동 세포분석 플롯. (H) d1 및 d2째에 마우스 골 HSC(E)에서 인간 CD45+ 세포의 집단을 나타내는 그래프. (D)에서 심각하게 손상된 세관내 우세한 파편은 (E)에서 현저히 낮은 정도를 나타냄에 주목한다. (F) 비히클 또는 HSC(n=시점당 3개) 다음의 마우스에 대한 세관 손상 지표를 나타내는 그래프. (G-H) IRI 후 d1 및 d2째에 비히클(G) 또는 HSC(H)을 제공받은 IRI d28 후 시리우스(Sirius) 적색-염색된 신장의 대표적인 영상. (I) 비히클 또는 HSC(n= 시점당 3)에 이어 마우스에 대한 섬유증 영역을 나타내는 그래프. 평균 ± SD. \*P < 0.05, 비히클에 대해(바아 = 50 μm).

도 2는 신장 허혈재관류 손상 후 NOD/SCID 마우스로 인간 HSC의 선택된 이전이 이환률을 감소시키고 신장 기능을 증진시킴을 입증한다. (A) 손상 후 1일째 PBS(비히클, n=16) 또는 2.5X10<sup>6</sup>(HSC, n=10) 정맥내 주입 후 양쪽 IRI에 이은 1, 2 및 7일째 혈장 크레아티닌 수준. 데이터는 평균 ± SD이다. P 값 < 0.01. (B) PBS(비히클) 또는 2.5X10<sup>6</sup> 인간 HSC(HSC)를 손상 후 1일째에 정맥내 주사한 후 양쪽 IRI를 겪고 있는 마우스에 대한 각각의 시점에서 생존 곡선 및 수. P 값 = 0.039.

도 3은, 인간 HSC의 선택적 이전이 신장 허혈 재관류 손상 후 세관주위 모세혈관 손실을 약화시키고 관 내피 손상을 감소시킴을 입증한다. (A-B) d1 및 d2에서 비히클 (A) 또는 HSC (B)를 제공받은 d7 후 IRI 신장의 외부 수질의 마우스 CD31-표지된 세관주위 모세관(PTC)의 대표적인 영상. (A)에서 현저한 PTC 손실에 주목한다. (C) 비히클 또는 HSC(n= 시점당 3개) 후 마우스에 대한 PTC 지표를 나타내는 그래프. (D-E) d1 및 d2에 비히클 (D) 또는 HSC (E)를 제공받은 마우스로부터 d5후 IRI 신장 외부 수질의 PAS 염색한 신장 단면의 대표적인 광 영상. (D)에서 심각하게 손상된 세관내 우세한 잔해는 (E)에서 훨씬 적은 정도로 존재함에 주목한다. (F) 비히클 또는 HSC(n= 시점당 3개) 후 마우스에 대한 세관 손상 지표를 나타내는 그래프. (G-H) IRI 후 d1 및 d2에 비히클 (G) 또는 HSC (H)를 제공받은 d28 후 IRI의 시리우스 적색-염색된 신장의 대표적인 영상. (I) 비히클 또는 HSC(n= 시점당 3개) 후 마우스에 대한 섬유증 부위를 나타내는 그래프. 평균±SD. \* 비히클 그룹에 대해 P < 0.05. (바아 = 50 μm).

도 4는, 신장에서 인간 HSC의 분화를 입증한다. 신장 외부 수질의 대표적인 공초점 영상(A, C) 및 에피플루오레센스(epifluorescence) 영상(E)은 손상 후 1일째에 HSC의 정맥내 주사를 제공받고 마우스 혈관 구조의 mCD31 (적색)을 나타내기 위해 공표지된(colabeled) d5 후 IRI 신장에서 세포(화살표머리부분)내 인간 CD45 (A), 인간 CD68 (C), 및 인간 CD3 (E)의 발현을 나타낸다. 인간 CD45 (B), 인간 CD68 (D), 및 인간 CD3 (F) 세포들의 수를 나타내는 그래프는 후 IRI 신장 및 대조군 신장에서 확인되었다. 데이터는 평균 ± SD이다. n = 6/시점.

(G-H) d1 및 d2에 인간 HSC를 제공받고 CMFDA(화살표 머리)로 표지되고 인간 CD133 (G), CD146 (H) 및 KDR (I)에 대한 항체로 공-표지된 NOD/SCID 마우스의 IRI 신장의 3일 후 대표적인 에피플루오레센스 영상. 항-KDR 항체는 또한 마우스 내피(화살표)를 검출하였음에 주목한다(바아 = 50 μm).

도 5는, 드른 인간 내피 세포가 허혈 손상 및 HSC 주입 후 신장에서 검출될 수 있음을 입증한다. (A-B) 일부는 모세혈관(화살표 머리)내로 통합된 것으로 여겨지지만(A) 대부분은 형태학적으로 단핵구이고 hCD45(화살표 머리)(B)를 공-발현하는 인간 CD31 발현 세포의 존재를 나타내는 d28 후 IRI 신장의 공초점 영상. (C) 손상 후 1일째 HSC의 선택적 이전 후 시간에 따른 후 IRI 신장내에서 인간 CD31 발현 세포의 수를 나타내는 그래프. (D) 후 IRI 신장내 인간 CD45의 발현을 결여한 세포내에서 인간 폰 빌레브란트 인자(von Willebrand factor: vWF)(화살표 머리) 및, 마우스 vWF가 아닌 것의 특이적인 발현(바아 = 50 μm).

도 6은, 인간 HSC가 신장 허혈성 손상 후 신장내에서 혈관형성 주변분비 인자를 생성함을 입증한다. 선택적 이전 전에 HSC(백색) 및 HSC에 있어서 혈관형성 후 전사체의 GAPDH와 비교하고, 선택적 이전 후 48시간째 후 IRI 신장으로부터 정제된 상대적인 유전자 발현. 신장으로 보충된 HSC는 혈관형성 전 전사체의 고-수준 발현을 보 유함에 주목한다. 평균 ± SD. n = 6개/그룹. (바아 = 50 μm).

도 7은 손상 후 신장의 복구에 있어서 HSC의 기능의 모델을 입증한다. HSC는 손상된 신장으로 보충되며, 여기서 이들은 CEP 마커 CD146을 획득하여 손상된 모세혈관 및 사이질내에 국제화한다. 주변분비 메카니즘에 의해 세포 복구를 촉진하는 안지오프이에틴, 혈관 내피 성장 인자, 간세포 성장 인자 및 인슐린 유사 성장 인자를 포함하는 사이토킨의 국소 생산이 생성된다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

**[0014] 발명의 상세한 설명**

**[0015]** 본원에 기술된 데이터는 손상된 신장을 지닌 포유동물에게 투여된 HSC의 특이적인 국제화 및, 세관주위 미세혈관구조를 포함하나, 이에 한정되지 않는 손상된 신장 조직의 후속적인 복구를 최초로 입증하며, 당해 복구는 HSC에 의해 매개된다. 따라서, 본 발명은 환자에서 신장 손상을 치료하는데 효과적인 양의 조혈 줄기 세포 (HSC)를 환자에게 투여함을 포함하는, 환자에서 신장 손상을 치료하는 방법을 제공한다.

**[0016]** 본원에 사용된 것으로서, 용어 "치료하다" 및 또한 이로부터 유래된 단어들은 표적화된 상태의 100% 또는 완전한 완화를 필수적으로 내포하지는 않는다. 오히려, 당해 분야에서 통상의 기술자가 유익한 것으로 인식하는 다양한 정도의 치료학적 효과가 존재한다. 이와 관련하여, 본원에 기술된 방법은 특정 양 또는 특정 수준의 신장 손상의 치료학적 잇점을 제공하므로 손상을 "치료한다". 예를 들면, 각종 측면에서, 신장 손상을 치료하는 방법은 환자의 손상된 신장 조직의 복구 또는 재생을 촉진하거나, 환자의 생존을 증가시키거나, 신장의 기능적 회복을 향상시키거나, 신장에 대한 기능을 회복시킴을 포함한다. 다른 측면에서, 본 발명에 의해 제공된 치료는 손상된 신장에 의해 유발된 하나 이상의 상태 또는 증상의 완화를 포함한다. 예로서 및 제한하지 않고, 본원에 기술된 본 발명의 방법은 신장 세관주위 미세혈관구조(예를 들면, 세관주위 모세혈관)의 향상된 복구 또는 재생, 신장내 혈관[예를 들면, 세관주위 미세혈관구조(예를 들면, 세관주위 모세혈관)]의 생성 또는 안정화, 손상된 신장에서 혈관형성의 유도, 또는 세관 내피 세포의 향상된 복구 또는 신장의 음성적 리모델링의 발생 감소 중 하나 이상을 달성한다.

**[0017] 신장 손상**

**[0018]** 본 발명의 각종 측면에서, 제공된 방법은 본원에 추가로 기술된 바와 같은, 허혈, 독소에 대한 노출, 안지오텐신-전환 효소 억제제(ACEI) 또는 안지오텐신 II 수용체 차단제의 사용, 혈관 수혈 반응, 근육에 대한 손상 또는 외상, 수술, 쇼크, 저혈압 또는, ARF 또는 만성 신장병의 원인들중 어느 것 중 어느 하나 이상에 의해 유발된 신장에 대한 특정 손상을 지닌 환자에서 신장 손상을 치료하기 위한 것이다.

**[0019]** 표적화된 신장 손상은 수질, 피질, 신장 피라미드(renal pyramid), 엽간 동맥, 신장 동맥, 신장 정맥, 신장 문(renal hilum), 신우, 요관, 소신배(minor calyx), 신장피막, 열등한 신장 피막, 우수한 신장 피막, 엽간 정맥, 신장 단위, 대신배(major calyx), 신장 유두, 사구체, 보우만 주머니(Bowman's capsule), 및 신장 기능의 조직을 포함하나 이에 한정되지 않는, 신장내에서 발견된 특정 조직에 대한 손상을 포함하며, 당해 조직은 기능의 부분적이거나 완전한 손실을 초래하기에 충분하게 손상된다. 손상된 신장 조직은 신장 사구체 벽세포들(parietal cells), 신장 사구체 발세포들, 사구체내 혈관사이 세포들, 사구체의 내피 세포들, 신장 세관 근처 솔가장자리 세포들(proximal tubule brush border cells), 요세관고리(loop of Henle) 막 분절 세포들, 두꺼운

상행각(thick ascending limb) 세포들, 신장 먼 세관(kidney distal tubule) 세포들, 신장 수집관(kidney collecting duct) 세포들, 및 간질 신장 세포들을 포함하나, 이에 한정되지 않는 신장에서 발생하는 명백한 세포 유형 중 특정의 하나 이상을 포함한다. 본 발명의 특정 구체예에서, 신장 손상은 신장 세관주위 미세혈관구조에 대한 손상을 포함한다. 특정 측면에서, 신장 손상은 세관주위 모세혈관에 대한 손상을 포함한다. 일부 구체예에서, 신장 손상은 세관(관) 상피 세포에 대한 손상을 포함한다.

[0020] 신장병 및 신장 의학 상태의 예방

[0021] 신장이 자가복구 또는 자가재생에 대한 놀랄만한 능력을 가지고 있다고 해도, 신장 손상은 흔히 신장병 또는 신장 의학 상태에 대한 증가된 성향을 초래한다. 본원에 제공된 환자에서 신장 손상을 치료하는 방법은 신장의 성공적인 복구 및 재생을 허용함으로써, 환자가 신장병 또는 신장 의학 상태로의 증가된 성향을 가지지 않도록 함은 이론화되어 있다. 따라서, 본 발명은 신장 손상을 포함하는 환자에서 신장병 또는 신장 의학 상태를 예방하는 방법을 제공한다. 당해 방법은 환자에게 신장병 또는 신장 의학 상태를 예방하기에 효과적인 양의 HSC를 투여함을 포함한다. 일부 구체예에서, 당해 양은 신장 손상을 치료하는데 효과적이며, 예를 들면, 신장 기능을 회복하고, 신장 세관주위 미세혈관구조를 재생하는데 효과적인 양이다.

[0022] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "예방하다" 및 또한 이로부터 기원한 단어는 100% 또는 완전한 예방을 필수적으로 내포하지 않는다. 오히려, 당해 분야의 통상의 지식을 가진 자에게 잠재적인 잇점을 가진 것으로 인식되는 다양한 정도의 예방이 있다. 이와 관련하여, 본원에 기술된 예방 방법은 신장병 또는 신장 의학 상태의 예방의 특정 양 또는 특정 수준을 제공한다. 각종 측면에서, 예방 방법은 신장병 또는 신장 의학 상태, 또는 이의 증상 또는 상태의 개시, 발달, 발생 또는 진행을 지연시키거나, 늦추거나, 감소시키거나, 약화시키는 방법이다.

[0023] 일부 구체예에서, 예방된 신장병 또는 신장 의학 상태는 급성 신부전, 만성 신장병, 신장 사이질 섬유증, 당뇨병성 신장병, 사구체신염, 수신증(hydronephrosis), 신장염(interstitial nephritis), 신장 결석(신장결석증), 신장 종양[예를 들면, 윌름즈 종양, 신세포 암종], 루푸스 신장염, 최소변화병(minimal change disease), 신증후군, 깔대기콩팥염, 신부전(예를 들면, 급성 신부전 및 만성 신부전 이외의 것)이다.

[0024] 급성 신부전

[0025] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "급성 신부전"은 "급성 신장 손상" 또는 "ARF"와 동의어이며 신장에 대한 손상으로 인한 신장 기능의 급속한 손실을 말한다. ARF는 일반적으로 신장에 의해 배출되는 질소성(예를 들면, 혈청 크레아틴 및/또는 뇨 배출) 및 비-질소성 폐기물의 수준에 있어서 갑작스러운 변화로 인해 표시된 복합 증후군이다. ARF의 증상 및 진단은 당해 분야에 공지되어 있다. 참조: 예를 들면, *Acute Kidney Injury, Contributions to Nephrology*, Vol. 156, vol. eds. Ronco et al., Karger Publishers, Basel, Switzerland, 2007, and Bellomo et al., *Crit Care* 8(4): R204-R212, 2004.

[0026] 다양한 측면에서, ARF는 원인에 따라, 전-신장 ARF, 고유의 ARF, 또는 후-신장 ARF가 있다. 이와 관련하여, 전-신장 ARF는 혈당저하증(예를 들면, 쇼크, 탈수, 체액 손실, 또는 과도한 이뇨제 사용으로 인한), 간콩팥 증후군, 혈관 문제들(예를 들면, 신증후군 관련 신축상전색병, 신정맥혈전증), 감염(예를 들면, 패혈증), 심각한 화상, 분리증(sequestration)(예를 들면, 심장막염, 췌장염으로 인한), 및 저혈압(예를 들면, 항고혈압(antihypertensiveness), 혈관확장제 사용으로 인한) 중 하나 이상에 의해 유발될 수 있다.

[0027] 고유의 ARF는 독소 또는 의약(예를 들면, NSAIDs, 아미노글리코사이드 항생제, 요오드화된 조영제, 리튬, 포스페이트), 신장병증(예를 들면, 인산나트륨과의 대장 내시경검사 장 체제와 관련됨), 횡문근융해[예를 들면, 손상(예를 들면, 압력 손상 또는 광범위한 블런트 외상(extensive blunt), 스타틴, 자극인자 사용에 의해 유발됨), 용혈, 다발골수종, 급성 사구체신염 중 하나 이상에 의해 유발될 수 있다.

[0028] 후-신장 ARF는 의약(예를 들면, 항콜린작용약물), 양성 전립샘 비대 또는 전립샘 암, 신장 결석, 복부 악성종양(예를 들면, 난소 암, 결장직장암), 폐쇄된 뇨 카테터, 및 결정뇨 또는 미오글로불린뇨증, 또는 방광염을 유발하는 약물 중 하나 이상에 의해 유발될 수 있다.

[0029] ARF는 환자에서 허혈, 독소, 안지오텐신-전환 효소 억제제(ACEI) 또는 안지오텐신 II 수용체 차단제의 사용, 혈액 수혈 반응, 근육에 대한 손상 또는 외상, 수술, 쇼크 및 저혈압에 의해 유발될 수 있다. ARF를 유발하는 독소는 항진균 또는 방사선사진술 염료일 수 있다. 또한, 일부 구체예에서, ARF는 급성 요세관 괴사 또는 신장 허혈 재관류 손상을 포함한다.

[0030] 만성 신장병

- [0031] 신장병 또는 신장 의학 상태를 예방하는 방법의 일부 구체예에서, 신장병은 만성 신장병(CKD)이다. 본원에 사용된 것으로서, "만성 신병"으로 또한 공지되어 있는 "만성 신장병"은 수개월 또는 수년의 기간에 걸친 신장 기능의 진행적 손실을 말한다. 치료되는 CKD는 예를 들면, 1 단계, 2 단계, 3 단계, 4 단계 또는 5 단계(또한 확립된 CKD, 말기 단계 신장병(end-stage renal disease: ESRD), 만성 신장 부전(chronic kidney failure: CKF), 또는 만성 신부전(chronic renal failure: CRF)로 공지됨]을 포함하는 어떠한 단계이다.
- [0032] CKD는 급성 신장 손상, 급성 신장 손상의 원인들, 당뇨병성 신장병을 초래하는 제1형 및 제2형 진성 당뇨병, 높은 혈액 압(고혈압), 사구체신염(신장의 여과 시스템의 염증 및 손상), 다낭신장병, 진통제 신장병을 초래하는 진통제(예를 들면, 아세트아미노펜, 이부프로펜)의 사용(예를 들면, 규칙적이고 장기간에 걸친 사용), 허혈성 신장병을 초래하는 죽상경화증, 결석에 의한 뇨의 흐름의 폐쇄, 확장된 전립샘, 폐쇄(협착), HIV 감염, 낮적 혈구병, 헤로인 남용, 아밀로이드증, 신장결석, 만성 신장 감염, 및 특정 암을 포함하나, 이에 한정되지 않는 다수의 인자 중 어느 하나에 의해 유발될 수 있다.
- [0033] 비-신장병 및 비-신장 의학 상태의 예방
- [0034] 만성 신장병은 심혈관병 및 심혈관 이환률에 대한 선도적인 별개의 위험 인자로서 확인되어 왔다. 본원에 기술된 HSC의 투여는 또한 신장병 및 신장 의학 상태 이외의 질병 또는 의학 상태를 예방하는데 유용한 것으로 이론화되어 있다. 따라서, 신장 손상을 포함하는 환자에서 신장병 또는 신장 의학 상태에 의해 유발되거나 이와 관련된 비-신장병 또는 비-신장 의학 상태를 예방하는 방법이 또한 본원에 제공된다. 당해 방법은 환자에게 비-신장병 또는 비-신장 의학 상태를 예방하는데 효과적인 양으로 HSC를 투여함을 포함한다. 특정 구체예에서, 비-신장병 또는 비-신장 의학 상태는 심혈관병이다.
- [0035] 생존 증가
- [0036] 급성 신장 손상 후 또는 반복적이고 만성인 신장 손상 둘다 후 만성 신장병 및 신장 부전은 현재 세계에서 이환률 및 사망율의 선도적인 원인이다. 본원에서, 본원에 기술된 HSC의 투여는 또한 신장 손상을 포함하는 환자의 사망률을 예방(생존 증가)하는데 유용한 것으로 이론화되어 있다. 따라서, 신장 손상을 포함하는 환자의 생존을 증가시키는 방법이 또한 본원에 제공된다. 당해 방법은 환자에게 환자의 생존을 증가시키는데 효과적인 양의 HSC를 투여함을 포함한다.
- [0037] 조혈 줄기 세포(HSC)
- [0038] 본원의 목적을 위해, 용어 "조혈 줄기 세포" 또는 "HSC"는 예를 들면, 골수(단핵구 및 대식구, 중성구, 호염기구, 호산구, 적혈구, 거핵구, 혈소판, 다지돌기 세포들), 및 림프구 계통(T-세포들, B-세포들, 천연 킬러(NK) 세포들)을 포함하는 혈액 세포 유형을 유발하는 다능성 줄기 세포를 말한다. HSC는 다능성, 올리고포텐트(oligopotent), 또는 단분화능 HSC일 수 있다.
- [0039] HSC 및 HSC의 공급원을 수득하는 방법
- [0040] HSC는 당해 분야에 공지된 어떠한 수단으로도 수득할 수 있다. 일부 구체예에서, HSC는 공여자로부터 분리된다. 본원에 사용된 것으로서 용어 "분리된"은 이의 천연 환경으로부터 제거됨을 의미한다. HSC는 각종 측면에서 골수, 지방 조직, 혈액, 난황낭, 골수 조직(예를 들면, 간, 비장, 신생아, 예를 들면, 태아 간, 태아 비장), 제대혈, 태반, 및 대동맥-생식샘-중신(aorta-gonad-mesonephros)을 포함하나, 이에 한정되지 않는 HSC를 포함하는 어떠한 성인, 태아 또는 배아 조직으로부터도 분리된다.
- [0041] HSC의 공여자는 환자와 관련하여 본원에 기술된 숙주 중 어느 것이다. 일부 측면에서, 공여자는 포유동물이다. 구체적인 측면에서, 공여자는 인간이다. 다른 측면에서, HSC의 공여자는 환자와 동일하다. 이와 관련하여, HSC는 환자에 대해 "자가"로 고려된다. 일부 구체예에서, HSC의 공여자는 환자와는 상이하지만, 공여자 및 환자는 동일한 종이다. 이와 관련하여, HSC는 "동종이계"인 것으로 고려된다.
- [0042] 일부 구체예에서, HSC는 공여자의 골수, 예를 들면, 공여자의 히프(hip)로부터 주사기 및 침을 사용하여 분리한다. 다른 구체예에서, HSC는 혈액(예를 들면, 말초 혈액)으로부터 분리한다. 특정 측면에서, HSC는 HSC를 공여자 골수로부터 혈액, 예를 들면, 말초 혈액으로 이동시키는 것을 유도하거나 촉진하는 사이토키인으로 공여자를 예비-처리한 후 혈액으로부터 분리한다. 일부 예에서, 사이토키는 과립구-콜로니 자극 인자(G-CSF), 과립구 대식구 콜로니 자극 인자(GM-CSF), 또는 AMD-3100이다.
- [0043] 일부 구체예에서, HSC는 원시 세포들 또는 새로이 분리된 세포들이다. 달리, HSC는 배양된 세포들, 확립된 세포주의 세포들이고/이거나 HSC의 동결된 스톡으로부터 해동된다. HSC는 예를 들면, 기탁기관[the American

Tissue Culture Collection(ATCC), the National Stem Cell Resource(NSCR), National Stem Cell Bank(NSCB)], 및 다른 시판 회사와 같은 세포 저장소를 통해 획득할 수 있다.

[0044] 다른 측면에서, HSC의 특수 집단을 획득하기 위한 추가의 단계를 수행한다. 일부 구체예에서, HSC가 정제된다. 본원에 사용된 것으로서 용어 "정제된"은 순도에 있어서 증가됨을 의미하며, 여기서, "순도"는 상대적인 용어이며, 절대적인 순도로 필수적으로 고려되지 않는다. 각종 측면에서, 예를 들면, 순도는 적어도 약 50%이거나, 60%, 70% 또는 80% 이상일 수 있거나, 100%일 수 있다. 따라서, 일부 구체예에서, 본 발명의 HSC는 세포들의 이종 집단의 일부 또는 세포들의 실질적으로 동종인 집단의 일부이다. 예를 들면, 일부 측면에서 HSC는 HSC의 클론성 집단이며, 여기서, 집단의 각각의 세포는 집단의 다른 세포로부터 유전적으로 명백하지 않다. 세포의 이종 집단은 다른 유형의 세포들, HSC이외의 세포들을 포함한다. 예를 들면, 일부 측면에서 세포들의 이종 집단은, HSC 이외에, 백혈구 세포들(골수 계통 또는 림프 계통의 백혈구 세포들), 적혈구 세포, 내피 세포, 순환하는 내피 전구체 세포들, 상피 세포, 신장 세포, 폐 세포, 골세포, 골수세포, 뉴우린, 평활근 세포들을 포함한다. 달리는 또는 추가로, 세포들의 이종 집단은 HSC 만을 포함하지만, HSC는 클론성, 예를 들면 다른 것과 유전적으로 구별된다. 이종 집단의 HSC는 본원에 추가로 논의된 바와 같이 상이한 표현형을 갖는다. 특수 표현형을 갖는 세포, 예를 들면, HSC를 분리하는 적합한 방법은 당해 분야에 공지되어 있으며, 예를 들면, 광학 유동 분류기(예를 들면, 형광성-활성화된 세포 분류(FACS))를 사용하는 방법 및 비-광학 유동 분류기(예를 들면, 자기-활성화된 세포 분류)를 사용하는 방법을 포함한다.

[0045] HSC에 의해 발현된 마커

[0046] HSC는 HSC의 특징의 표현형 특성을 갖는다. 일부 구체예에서, HSC는 계통 마커(즉, lin-)(의 발현)에 대해 음성이다. 일부 예에서, HSC는 CD34, CD38, CD90, CD133, CD105, CD45, 및 c-키트 중 하나 이상(의 발현)에 대해 양성이다. 일부 예에서, HSC는 CD34+이고 다른 예에서, HSC는 CD45+이다. 여전히 다른 측면에서, HSC는 CD34+ 및 CD45+이다. 특정 구체예에서, HSC의 표현형은 환자에게 투여시 변화한다. 따라서, 일부 구체예에서, HSC는 마커, 예를 들면, 순환하는 내피 후대세포(CEP) 마커(CEP, 예를 들면, CD146, CD133, CD34, CD117, CD31 상에 발현된 마커)에 대해 양성인 되는 것들이다.

[0047] HSC는 임의로 이종 세포 집단의 일부이며, 여기서, 집단 중 적어도 25%(예를 들면, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%)의 세포들은 특수 표현형을 갖는다. 본 발명의 일부 구체예에서, HSC는 세포의 이종 집단의 일부이며, 여기서, 적어도 25% (예를 들면, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%)의 세포들은 CD34+ HSC이다. 본 발명의 일부 구체예에서, HSC는 세포들의 이종 집단의 일부이며, 여기서, 적어도 25% (예를 들면, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%)의 세포 들은 CD45+ HSC이다. 본 발명의 일부 구체예에서, HSC는 세포들의 이종 집단의 일부이며, 여기서, 적어도 25% (예를 들면, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%)의 세포들은 환자에게 투여 후 CD146+ HSC이 되는 HSC이다.

[0048] HSC의 추가의 변형 단계

[0049] 일부 측면에서, HSC는 분리되고/되거나 정제된 후 추가로 변형된다. 하나의 대안으로, 세포는 HSC 집단의 확장, 유전자의 HSC내로의 전달, HSC의 분화 또는, 치료제 또는 진단제와 같은 화합물의 HSC로의 접합을 목적으로 시험관내에서 배양된다. 이들 추가 단계를 수행하는 방법은 당해 분야에 잘 공지되어 있다. 예를 들면, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001; Ogawa et al., Blood 81: 2844-2853 (1993); U.S. Patent 7,144,731; Li et al, FASEB J 15: 586 (2001); Norol et al., Experimental Hematology 35(4): 653-661 (2007); Verhoeyen and Cosset, Gene Transfer: Delivery and Expression of DNA and RNA, eds. Friedmann and Rossi, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2007를 참조한다.

[0050] 약제학적 조성물

[0051] 본원에 기술된 HSC는 약제학적 조성물과 같은 조성물로 임의로 제형화된다. 이와 관련하여, 본 발명은 HSC 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 담체는 편리하게 사용된 것들 중 어느 것이며 가용성 및 활성 화합물(들)과의 반응성 결여와 같은 화학-물리적 고려에 의해, 및 투여 경로에 의해서만 제한된다. 본원에 기술된 약제학적으로 허용되는 담체, 예를 들어, 비히클, 보조제, 부형제 및 희석제는 당해 분야의 숙련가에게 잘 공지되어 있으며 공공에 용이하게 이용가능하다. 하나의 측면에서, 약제학적으로 허용되

는 담체는 활성제(들), 예를 들면, 조절 주기 세포들에 대해 화학적으로 불활성인 것, 및 사용 조건하에서 치명적인 부작용 또는 독성이 없는 것이다. 담체의 선택은 약제학적 조성물을 포함하는 특수 제제에 의해서, 및 약제학적 조성물을 투여하기 위해 사용된 특수 경로에 의해 부분적으로 결정될 것이다. 따라서, 본 발명의 약제학적 조성물의 각종의 적합한 제형이 존재한다.

- [0052] 투여 경로
- [0053] 일부 구체예에서, HSC를 포함하는 약제학적 조성물은 비경구 투여, 피하 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 동맥내 투여, 경막내 투여, 또는 복강내 투여를 위해 제형화된다. 다른 구체예에서, 약제학적 조성물은 비강, 스프레이, 경구, 에어로졸, 직장, 또는 질내 투여를 통해 투여된다.
- [0054] HSC를 투여하는 방법은 당해 분야에 공지되어 있다. 예를 들면, 미국 특허 5423778, 5550050, 5662895, 5800828, 5800829, 5811407, 5833979, 5834001, 5834029, 5853717, 5855619, 5906827, 6008035, 6012450, 6049026, 6083523, 6206914, 6303136, 6306424, 6322804, 6352555, 6368612, 6479283, 6514522, 6534052, 6541024, 6551338, 6551618, 6569147, 6579313, 6599274, 6607501, 6630457, 6648849, 6659950, 6692738, 6699471, 6736799, 6752834, 6758828, 6787357, 6790455, 6805860, 6852534, 6863900, 6875441, 6881226, 6884427, 6884428, 6886568, 6918869, 6933281, 6933286, 6949590, 6960351, 7011828, 7031775, 7033345, 7033603, 7049348, 7070582, 7074239, 7097832, 7097833, 7135172, 7145055, 7157080, 7166280, 7176256, 7244242, 7452532, 7470425, 및 7494644 중 어느 것을 참조한다.
- [0055] 비경구
- [0056] 일부 구체예에서, 본원에 기술된 약제학적 조성물은 비경구 투여용으로 제형화된다. 본 발명의 목적을 위해, 비경구 투여는 정맥내, 동맥내, 근육내, 경부내, 뇌심실내, 심장내, 피하, 골내, 피내, 경막내, 복강내, 방광내, 및 해면체내 주사 또는 주입을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0057] 비경구 투여용으로 적합한 제형은 수성 및 비-수성, 등장성 멸균 주사액을 포함하며, 이는 항-산화제, 완충제, 정균제(bacteriostat), 및 제형이 의도된 수용체의 혈액과 등장성이 되도록 하는 용질, 및 현탁화제, 가용화제, 증점제, 안정화제, 및 방부제를 포함할 수 있는 수성 및 비-수성 멸균 현탁제를 함유할 수 있다. 약제학적 조성물은 각종 측면에서 비누 또는 세제와 같은 약제학적으로 허용되는 표면활성제, 펙틴, 카르보머, 메틸셀룰로오스, 하이드록시프로필메틸셀룰로오스 또는 카복시메틸셀룰로오스와 같은 현탁화제, 또는 유화제 및 다른 약제학적 보조제가 첨가되거나 첨가되지 않는, 물, 염수, 수성 텍스트로즈 및 관련 당 용액, 프로필렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 글리콜과 같은 글리콜, 글리세롤, 에테르, 폴리(에틸렌글리콜) 400, 오일, 지방산, 지방산 에스테르 또는 글리세라이드 또는, 아세틸화된 지방산 글리세라이드를 포함하는 멸균 액체 또는 액체들의 혼합물과 같은 약제학적 담체 속의 생리학적으로 허용되는 희석제를 통해 투여된다.
- [0058] 비경구 제형에 임의로 사용된 오일은 석유, 동물, 야채 또는 합성 오일을 포함한다. 오일의 구체적인 예는 땅콩, 대두, 참깨, 면화씨, 옥수수, 올리브, 와셀린 및 무기물을 포함한다. 비경구 제형에 사용하기에 적합한 지방산은 올레산, 스테아르산 및 이소스테아르산을 포함한다. 에틸 올레이트 및 이소프로필 미리스테이트는 적합한 지방산 에스테르의 예이다.
- [0059] 일부 구체예에서 비경구 제형은 방부제 또는 완충제를 함유한다. 주사 부위에서 자극을 최소화시키거나 제거하기 위하여, 이러한 조성물은 임의로 약 12 내지 약 17의 친수성-친지성 균형(HLB)을 갖는 하나 이상의 비이온성 표면활성제를 함유한다. 이러한 제형중 표면활성제의 양은 통상적으로 약 5% 내지 약 15 중량%의 범위일 것이다. 적합한 표면활성제는 소르비탄 모노올레이트와 같은 폴리에틸렌 글리콜 소르비탄 지방산 에스테르 및, 에틸렌 옥사이드와, 프로필렌 옥사이드와 프로필렌 글리콜의 축합에 의해 형성된 소수성 염기와의 고 분자량 부가물을 포함한다. 비경구 제형은 각종 측면에서 앰플 및 바이알과 같은 단일-투여량 또는 다중-투여량 밀봉 용기 내에 제공되며, 멸균 액체 부형제, 예를 들면, 사용 직전에 주사용 수의 첨가만이 요구되는 냉동-건조된(동결건조된) 조건에서 저장될 수 있다. 즉석 주사 용액 및 현탁액은 특정 측면에서, 멸균 산제, 입제 및 앞서 기술된 종류의 정제로부터 제조된다.
- [0060] 주사가능한 제형은 본 발명에 따른다. 주사가능한 조성물에 효과적인 약제학적 담체에 대한 요건은 당해 분야의 통상의 기술자에게 잘 공지되어 있다[참조: 예를 들면, *Pharmaceutics and Pharmacy Practice*, J. B. Lippincott Company, Philadelphia, PA, Banker and Chalmers, eds., pages 238-250 (1982), and *ASHP Handbook on Injectable Drugs*, Toissel, 4th ed., pages 622-630 (1986)].

[0061] 세포 전달 매트릭스

[0062] 일부 구체예에서, HSC는 세포 전달 매트릭스를 통해 부여된다. 특정 구체예에서 세포 전달 매트릭스는 콜라겐, 피브린, 키토산, MATRIGEL, 폴리에틸렌 글리콜, 화학적으로 가교결합가능하거나 광가교결합가능한 텍스트란을 포함하는 텍스트란 등을 포함하는 특정의 하나 이상의 중합체 및 하이드로겔을 포함한다. 특정 구체예에서, 세포 전달 매트릭스는 축합된 및 비-축합된 콜라겐 겔, 예를 들면, 피브린, 알기네이트, 아가로즈, 젤라틴, 하이알루로네이트, 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 포함하나, 이에 한정되지 않는 하이드로겔, 화학적 가교결합, 광가교결합 또는 이들 둘다에 적합한 텍스트란을 포함하는 텍스트란, 알부민, 폴리아크릴아미드, 폴리글리콜릭산, 폴리비닐 클로라이드, 폴리비닐 알코올, 폴리(n-비닐-2-피롤리돈), 폴리(2-하이드록시 에틸 메타크릴레이트), 친수성 폴리우레탄, 아크릴성 유도체, 폴리프로필렌 옥사이드 및 폴리에틸렌 옥사이드 공중합체와 같은 플루로닉스, 35/65 폴리(엡실론-카프로락톤)(PCL)/폴리(글리콜산)(PGA), Panacryl® 생흡수성 작제물, Vicryl® 폴리글락티드 910, 및 자가조립되는 펩타이드 및 플루오로중합체(예를 들면, Teflon® 플루오로중합체)와 같은 비-재흡수성 물질, 가소제 및 금속 중 하나 이상을 포함한다.

[0063] 일부 예에서 매트릭스는 비-분해가능한 물질, 예를 들면, 연장된 폴리테트라플루오로에틸렌(ePTFE), 폴리테트라플루오로에틸렌(PTFE), 폴리에틸렌테트라프탈레이트 (PET), 폴리(부틸렌 테트라프탈레이트 (PBT), 폴리우레탄, 폴리에틸렌, 폴리카보네이트, 폴리스티렌, 실리콘 등, 또는 폴리(락틱-코-글리콜산; PLGA), PLA, 또는 PGA와 같은 선택적으로 분해가능한 물질을 포함하나, 이에 한정되지 않는다(참조: 또한 Middleton et al., Biomaterials 21:2335 2346, 2000; Middleton et al., Medical Plastics and Biomaterials, March/ April 1998, at pages 30 37; Handbook of Biodegradable Polymers, Domb, Kost, and Domb, eds., 1997, Harwood Academic Publishers, Australia; Rogalla, Minim. Invasive Surg. Nurs. 11:6769, 1997; Klein, Facial Plast. Surg. Clin. North Amer. 9:205 18, 2001 ; Klein et al., J. Dermatol. Surg. Oncol. 11:337 39, 1985; Frey et al., J. Urol. 154:812 15, 1995; Peters et al., J. Biomed. Mater. Res. 43:422 27, 1998; and Kuijpers et al., J. Biomed. Mater. Res. 51:13645, 2000).

[0064] 일부 구체예에서 매트릭스는, 생흡수가 가능한 것에 상관없이, 생분해성 스캐폴드(scaffold), 라티스(lattice), 자가조립성 구조물 등, 액체, 겔 또는 고체를 포함한다. 이러한 매트릭스는 치료학적 세포 치료, 외과적 치유, 조직 가공, 및 상처 치유 분야에 공지되어 있다. 특정 측면에서, 매트릭스는 HSC로 예비치료된다. 다른 구체예에서, 매트릭스는 매트릭스 또는 이의 공간과 함께 근접하여 HSC와 함께 집단화된다. HSC는 매트릭스에 부착할 수 있거나 매트릭스 공간내에 포착되거나 함유될 수 있다. 특정 측면에서, 세포가 매트릭스와 근접하여 성장하고, 치료학적으로, 환자 자신의 신장 세포의 성장, 복구 및/또는 재생에 사용되는 경우 매트릭스-HSC 복합체는 자극되고 지지되며, 적절한 혈관형성은 유사하게 자극되거나 지지된다. 매트릭스-세포 조성물은 이식, 주사, 외과적 부착, 다른 조직을 사용한 이식술 등을 포함하는, 당해 분야에 공지된 특정 방식으로 환자의 체내로 도입시킬 수 있다. 일부 구체예에서, 생체내에서, 또는 보다 더 바람직하게는 반응계내에서 매트릭스 형태, 예를 들어, 반응계내 중합가능한 겔을 본 발명에 따라 사용할 수 있다. 이러한 겔의 예는 당해 분야 등에 공지되어 있다.

[0065] 일부 구체예에서, HSC는 스캐폴드, 발포체 또는 하이드로겔과 같은 3-차원 골격 또는 매트릭스내로 씨딩(seeding)되어 상응하게 부여된다. 특정 측면에서 골격은 실질적으로 평편하거나, 실질적으로 원통형이거나 관형과 같은 각종 형태로 구성되거나, 고려하여 수정된 구조가 요구되거나 바람직할 수 있는 완전한 자유-형태일 수 있다. 일부 측면에서 2개 이상의 실질적으로 평편한 골격은 서로 맨 위에 놓이며 경우에 따라 함께 보장되어 다층 골격을 생성한다.

[0066] 본 발명의 측면에서 사용될 수 있는 매트릭스, 예를 들어, 스캐폴드의 예는 매트(직물, 편물 및 보다 바람직하게는 부직포) 다공성 또는 반다공성 발포체, 자가 조립상 펩타이드 등을 포함한다. 부직포 매트릭스는 예를 들면, 천연 또는 합성 중합체로 구성된 섬유를 사용하여 형성시킬 수 있다. 일부 구체예에서, 상표명 VICRYL®(제조사: 뉴저지주 서머빌 소재의 Ethicon, Inc.)하에 시판되는 글리콜산 및 락트산((PGA/PLA)의 흡수성 공중합체를 사용하여 매트릭스를 형성시킨다. 예를 들면, 미국 특허 6,355,699에 논의된 바와 같은, 냉동-건조 또는 동결건조와 같은 공정에 의해 형성된, 폴리(엡실론-카프로락톤)/폴리(글리콜산)(PGA/PLA) 공중합체로 구성된 발포체를 또한 스캐폴드로서 제공할 수 있다. 겔은 또한 본원에 사용된 바와 같은 적합한 매트릭스를 형성한다. 예에는 예를 들면, 자가조립성 펩타이드로 구성된 하이드로겔 및 반응계내 중합가능한 겔을 포함한다. 이들 물질들은 일부 측면에서 조직의 성장을 위한 지지체로서 사용된다. 반응계내-형성되는 분해성 네트워크가 또한 본 발명에서 사용하기에 적합하다(참조: 예를 들면, Anseth, K. S. et al., 2002, J. Controlled Release 78: 199-

209; Wang, D. et al., 2003, Biomaterials 24: 3969-3980; 미국 특허 공개 2002/0022676 to He et al.). 이들 물질은 일부 측면에서 주사에 적합한 유액으로 제형화된 후, 각종 수단(예를 들면, 온도, pH, 광에 대한 노출에 있어서의 변화)에 의해 유도되어 반응계내에서 또는 생체내에서 분해가능한 하이드로겔 네트워크를 형성할 수 있다.

- [0067] 일부 구체예에서, 골격은 생분해가능한 물질, 예를 들면, PGA, PLA, PCL 공중합체 또는 배합물, 또는 하이알루론산으로부터 제조된 멀티필라멘트(yarn)로 구성될 수 있는 펠트(felt)이다. 특정 측면에서, 사는 크림핑(crimping), 컷팅(cutting), 카딩(carding) 및 니들링(needling)으로 이루어진 표준 직물 가공 기술을 사용하여 펠트로 제조된다. 특정 측면에서, HSC는 복합 구조일 수 있는 발포체 스캐폴드 위에 씌워진다. 또한, 3차원 골격은 일부 측면에서 복구되거나, 교체되거나 증강될 신장내 또는 신장 주변의 특수 구조와 같은 유용한 형태로 성형된다.
- [0068] 골격은 세포 부착을 향상시키기 위하여 HSC의 접종 전에 처리될 수 있다. 예를 들면, HSC를 사용한 접종 전에, 나일론 매트릭스를 0.1 몰 아세트산으로 처리하고 폴리라이신, PBS 및/또는 코라겐 속에서 항온처리하여 나일론을 피복한다. 폴리스티렌은 일부 측면에서 황산을 사용하여 유사하게 처리한다.
- [0069] 추가의 구체예에서, 3차원 골격의 외부 표면을 다른 것들 중에서 하나 이상의 단백질(예를 들면, 콜라겐, 탄성 섬유, 그물 섬유), 당단백질, 글리코사미노글리칸(예를 들면, 헤파린 설페이트, 콘드로이틴-4-설페이트, 콘드로이틴-6-설페이트, 더마탄 설페이트, 케라틴 설페이트), 세포 매트릭스 및/또는 젤라틴, 알기네이트, 한천, 아가로즈, 및 식물 검과 같은, 그러나 이에 한정되지 않는 다른 물질의 첨가 또는 골격의 혈장 피복에 의해서와 같이, 변형시켜 세포의 부착 또는 성장 및 조직의 분화를 개선시킨다.
- [0070] 일부 구체예에서 스캐폴드는 이것이 비-트롬보젠성이도록 하는 물질을 포함한다. 이들 물질은 특정 구체예에서 내피 성장, 이주 및 세포외 매트릭스 부착을 촉진하고 지속시킨다. 이러한 물질의 예는 라미닌 및 제IV형 콜라겐과 같은 기저 막 단백질과 같은 천연 물질, ePTFE와 같은 합성 물질, 및 PURSPAN®(제조원: 캘리포니아주 버켈리 소재의 The Polymer Technology Group, Inc.)과 같은 세그먼트화된 폴리우레탄우레아 실리코를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 이들 물질은 또한 스캐폴드가 비-트롬보젠성이 되도록 처리할 수 있다. 이러한 처리는 헤파린과 같은 항-혈전제, 및 혈장 피복과 같이 물질의 표면 전하를 변경시키는 처리를 포함한다.
- [0071] 특정 구체예에서, HSC를 포함하는 약제학적 조성물은 본원에 기술된 성분들중 어느 것을 포함하는, 세포 전달 매트릭스의 성분들 중 어느 것을 포함한다.
- [0072] 투여량
- [0073] 본원의 목적을 위해, 투여된 약제학적 조성물의 양 또는 투여량은 합리적인 시간 간격에 걸쳐 대상체 또는 동물에서 예를 들면, 치료학적 또는 예방학적 반응을 달성하기에 충분하다. 예를 들면, 약제학적 조성물의 투여량은 투여 시간으로부터 약 1 내지 4일 또는 그 이상, 예를 들면, 5일, 6일, 1주, 10일, 2주, 16 내지 20일 이상의 기간내에 신장 허혈 재관류 손상을 치료하거나 예방하는데 충분하다. 특정 구체예에서, 기간은 심지어 더 길다. 투여량은 특수한 약제학적 조성물의 효능 및 동물(예를 들면, 인간)의 상태, 및 치료될 동물(예를 들면, 인간)의 체중에 의해 결정된다.
- [0074] 투여된 투여량을 측정하기 위한 많은 검정이 당해 분야에 공지되어 있다. 일부 구체예에서, 상이한 투여량의 HSC가 각각 제공된 포유동물의 세트 중에서 포유동물에게 이러한 HSC의 제공된 투여량의 투여시 손상된 신장에 HSC가 국제화하는 정도를 비교함을 포함하는 검정을 사용하여 포유동물에게 투여될 출발 투여량을 결정한다. HSC가 특정 투여량의 투여시 손상된 신장에 국제화되는 정도는 예를 들면, 본원에 기술된 방법을 포함하는, 당해 분야에 공지된 방법으로 검정할 수 있다.
- [0075] 추가로 또는 대안적으로, 특수 투여량의 HSC가 신장 세관주위 모세혈관 손실의 악화, 세관 상피 세포의 재생, 장기간 섬유증의 예방, 사망율의 감소, 또는 신장 손상 후 신장 기능의 개선을 유발시키는 정도를 비교함을 포함하는 검정을 사용하여 포유동물에게 투여될 출발 투여량을 측정할 수 있다. 이러한 검정은 실시예에서 본원에 기술되어 있다.
- [0076] 약제학적 조성물의 투여량은 또한 특수 약제학적 조성물의 투여를 동반할 수 있는 특정 부작용 효과의 존재, 특성 및 정도에 의해 결정될 수 있다. 전형적으로, 주치의는 각각의 개인 환자를 치료하기 위한 약제학적 조성물의 용량을 연령, 체중, 일반적인 건강, 식이, 성별, 투여될 약제학적 조성물의 치료제(들), 투여 경로, 및 치료되는 상태의 중증도와 같은 각종 인자를 고려하여 결정할 것이다. 예로서 및 본 발명을 제한하지 않고, 약제학

적 조성물의 용량은, 적어도 약  $0.5 \times 10^6$  (예를 들면, 적어도 약  $1 \times 10^6$ ,  $1.5 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$ ,  $2.5 \times 10^6$ ,  $3.0 \times 10^6$ ,  $5.0 \times 10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ )의 HSC가 환자에게 투여되도록 하는 용량일 수 있다.

- [0077] 투여 시기
- [0078] 제공된 방법에서, HSC는 환자에게 신장에 대한 손상 시간을 참조하여 한번에 투여된다. 본 발명의 특정 구체예에서, HSC의 투여는 지연되며; 즉, HSC는 신장 손상 직후 투여되지 않는다(예를 들면, 손상 후 약 30분 이후, 약 1 시간 이후, 약 2 시간 이후, 약 3 시간 이후, 약 4 시간 이후, 약 5 시간 이후, 약 6 시간 이후, 약 7 시간 이후, 약 8 시간 이후, 약 9 시간 이후, 약 10 시간 이후, 약 11 시간 이후, 또는 약 12 시간 이후 투여함).
- [0079] 본 발명의 일부 측면에서, HSC는 환자에게 신장 손상의 복구 상의 시작시 투여된다. 본원에 사용된 것으로서 용어 "신장 손상의 복구 상"은, 세포가 파괴된 후 존재하는 신장단위의 재집단화, 호염기성, 납작한 평편세포의 라이닝, 세관 세포의 정상 형태의 복원, 상피 세포 탈분화, 운동, 증식 또는 재분화, 신장단위의 기능적 온전함의 복원, 신장 기능의 복원에 의해 나타나는 바와 같이, 신장 재생 반응이 관측되는 손상 후 시간을 말한다. 신장의 회복 상은 포유동물에서 잘 문서화되어 있다[참조: 예를 들면, Reimschuessel, ILAR J 42: 285-291 (2001)]. 일부 구체예에서, HSC는 손상 후 적어도 약 12 시간(예를 들면, 적어도 약 14 시간, 적어도 약 16 시간, 적어도 약 18 시간, 적어도 약 20 시간, 적어도 약 21 시간, 적어도 약 22 시간, 적어도 약 23 시간, 적어도 약 24 시간, 적어도 약 25 시간, 적어도 약 26 시간, 적어도 약 28 시간, 적어도 약 30 시간, 적어도 약 32 시간, 적어도 약 32 시간, 적어도 약 34 시간, 적어도 약 36 시간, 적어도 약 38 시간, 적어도 약 40 시간, 적어도 약 42 시간, 적어도 약 44 시간, 적어도 약 46 시간, 적어도 약 48 시간, 적어도 약 50 시간, 적어도 약 52 시간, 적어도 약 54 시간, 적어도 약 56 시간, 적어도 약 58 시간, 적어도 약 60 시간, 적어도 약 62 시간, 적어도 약 64 시간, 적어도 약 66 시간, 적어도 약 68 시간, 적어도 약 70 시간, 적어도 약 72 시간)이 되는 시점에 투여된다.
- [0080] 추가의 구체예에서, HSC는 환자에게 상술한 시점에 그리고 손상 후 약 14일(예를 들면, 약 13일, 약 12일, 약 11일, 약 10일, 약 9일, 약 8일, 약 7일, 약 6일, 약 5일, 약 4일, 약 3일)이 되기 전에 투여된다. 일부 구체예에서, HSC는 환자에게 손상 후 약 24시간이 되는 시점에 투여하거나, 또는 일정시간 이후이지만 손상 후 약 14일이 되기 전에 투여한다.
- [0081] 일부 측면에서, HSC는 손상 후 X시간이 되는 시점에 그리고 손상 후 Y시간이 되기 전에 투여되며, 여기서, X는 약 20시간, 21시간, 22시간, 23시간, 24시간, 25시간, 26시간, 27시간, 28시간, 29시간, 30시간, 31시간, 32시간, 33시간, 34시간, 35시간, 36시간, 40시간, 48시간, 52시간, 58시간, 64시간, 72시간, 3.5일, 4일, 5일, 6일, 1주, 8일, 9일, 10일로 이루어진 그룹 중에서 선택되고, 여기서, Y는 16일, 15일, 14일, 13일, 12일, 11일, 10일, 9일, 8일, 1주로 이루어진 그룹 중에서 선택되며, 여기서, X는 Y 미만이다. 본 발명의 일부 측면에서, HSC는 손상 후 약 20, 21, 22, 23, 24 시간이 되는 시점에 투여된다.
- [0082] 본 발명의 일부 구체예에서, HSC는 환자에게 1회 이상 투여된다. HSC는 매일 1회, 매일 2회, 매일 3X, 4X, 주 1회, 매 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 또는 14일에 1회, 또는 매달 1회 투여할 수 있다. 일부 구체예에서, HSC는 손상 후 약 24 시간이 되는 시점에 (예를 들면, 24 시간이 되는 시점에) 투여되며 손상 후 약 48 시간이 되는 시점에 (예를 들면, 48 시간이 되는 시점에)에 다시 투여된다.
- [0083] 조절된 방출 제형
- [0084] 약제학적 조성물은 특정 측면에서 데포트 형태(depot form)로 변형됨으로써 약제학적 조성물이 투여되는 신체내로 방출되는 방식이 체내에서 시간 및 위치와 관련하여 조절되도록 한다(참조; 예를 들면, 미국 특허 4,450,150). 데포트 형태는 각종 측면에서 치료제 또는 활성제(들), 및 중합체와 같은 다공성 또는 비-다공성 물질을 포함하는 이식가능한 조성물이며, 여기서, HSC는 물질 및/또는 비-다공성 물질의 붕해에 의해 캡슐화되거나 이를 통해 확산된다. 이후에, 데포트는 체내의 바람직한 위치내로 이식되고 HSC는 예정된 속도로 이식체로부터 방출된다.
- [0085] 따라서, 특정 측면에서, 약제학적 조성물은 생체내 방출 프로파일의 특정 유형을 갖도록 변형된다. 본 발명의 일부 측면에서, 약제학적 조성물은 즉시 방출, 조절된 방출, 서방출, 연장된 방출, 지연된 방출 또는 이-상(bi-phase) 방출 제형이다.
- [0086] 집합체

- [0087] 본 발명의 일부 구체예에서, HSC는 예를 들면, 치료제 또는 진단제와 같은 제2 잔기에 부착되거나 연결된다. 당해 구체예의 HSC는 손상된 신장 조직에 특이적으로 국제화할 수 있으므로, 표적화제로서 작용한다. 따라서, 본 발명은 하나의 측면에서 진단제의 치료제에 부착된 HSC를 포함하는 조성물을 제공한다. 본원의 목적을 위한 적합한 치료제 및 진단제는 당해 분야에 공지되어 있으나, 본원에 언급된 것들 중의 어느 하나로 한정되지는 않는다.
- [0088] 병용물
- [0089] 접합체를 포함하는 본원에 기술된 약제학적 조성물은 일부 구체예에서 자체로 투여된다. 다른 구체예에서, 접합체를 포함하는 약제학적 조성물은 다른 치료제 또는 진단제와 함께 투여된다. 일부 구체예에서, 약제학적 조성물은 예를 들면, 사이토킨 또는 성장 인자, 소염제, TLR2 억제제, ATF3 유전자 또는 유전자 생성물, 및 미네랄로코르티코이드 수용체 차단제(예를 들면, 스피로놀락톤), 라이소포스파티드산, 2-메틸아미노크로만(예를 들면, U83836E), 21-아미노스테로이드(예를 들면, 라조로이드(U74389F)), 트리메타지딘, 안지오텐신 전환 효소(ACE) 억제제 또는 안지오텐신 수용체 차단제(ARB), 및 수라민을 포함하는 신장병 또는 신장 의학 상태를 치료하는 것으로 공지된 다른 치료제와 함께 투여된다.
- [0090] 일부 구체예에서, HSC는 항-혈전형성제, 항-세포사멸제, 소염제, 면역억제제(예를 들면, 사이클로스포린, 라파마이신), 항산화제 또는, 에프로드세이트 및 트립톨라이드와 같이 당해 분야에서 신장 손상 또는 신장병을 치료하는데 통상적으로 사용된 기타 제제, HMG-CoA 리덕타제 억제제(예를 들면, 심바스타틴, 프라바스타틴, 로바스타틴, 플루바스타틴, 세리바스타틴 및 아토르바스타틴), 세포 분해물, 가용성 세포 분획, 막에 풍부한 세포 분획, 세포 배양 배지(예를 들면, 조건화된 배지), 또는 세포외 매트릭트 영양 인자[예를 들면, 간세포 성장 인자(HGF), 골 형태발생 단백질-7 (BMP-7), 형질전환 성장 인자 베타(TGF-β), 매트릭스 메탈로프로테이나제-2(MMP-2), 및 염기성 섬유모세포 성장 인자(bFGF)]를 포함하나, 이에 한정되지 않는 추가의 다른 치료제와 함께 투여된다.
- [0091] 환자 유형
- [0092] 본원에 기술된 본 방법과 관련하여, 환자는 특정 숙주이다. 일부 구체예에서, 숙주는 포유동물이다. 본원에 사용된 것으로서, 용어 "포유동물"은 특정의 단공류(monotreme), 유대목(marsupial), 및 태반 분류(placental taxas)를 포함하나, 이에 한정되지 않는 포유동물 부류의 특정 척추동물을 말한다. 일부 구체예에서, 포유동물은 마우스 및 햄스터와 같은 쥐목의 포유동물, 및 토끼와 같은 토끼목의 포유동물 중 하나이다. 특정 구체예에서, 포유동물은 고양이과(고양이) 및 개과(개)를 포함하는 육식목으로부터 기원한다. 특정 구체예에서, 포유동물은 소과(소) 및 돼지과(돼지)를 포함하는 우제류 또는, 말과(말)을 포함하는 페르소다틸라(Perssodactyla) 목으로부터 기원한다. 일부 예에서, 포유동물은 영장류 목, 세보이드(Ceboids) 목, 또는 시모이드(Simoids) 목(원숭이) 또는 유인원 목(인간 및 유인원)이다. 특수 구체예에서, 포유동물은 인간이다.
- [0093] 다음 실시예는 본 발명을 단지 설명하기 위해 제공되며 어떠한 방식으로든 이의 영역을 한정하지 않는다.
- [0094] 실시예
- [0095] 실시예 1
- [0096] 다음 물질 및 방법이 실시예 2 내지 7에서 사용되었다.
- [0097] 동물
- [0098] 수컷 면역 결핍성 비-비만 당뇨병(NOD/SCID) 마우스(NOD.CB17-Prkdc<sup>scid</sup>/J) (공급원: 메릴랜드주 바 하버 소재의 Jackson Laboratories)를 8-10주령에서 사용하였다. 이들 동물은 당뇨병이 아니지만, 기능성 T 및 B 세포들을 결여하였음에 주목한다. 모든 마우스를 여과기 탑 우리(filter top cage)에 가두고 멸균된 사료와 산성화된 물을 제공하였다. 모든 실험 프로토콜은 기관(Harvard Center for Animal Research and Comparative Medicine)에 의해 승인되었다.
- [0099] 인간 말초 혈액 CD34+ 세포 증식 및 트래킹
- [0100] 인간 말초 혈액 CD34+ 줄기 세포들을 정상 성인의 공여자(제품번호: mPB026, 공급원: 캘리포니아주 버클레어 소재의 A11Cells)로부터 수득된 과립구 콜로니 자극 인자(G-CSF) 이동된 성분채집(apheresis)으로부터 선택하였다. 요약하면, G-CSF(10μg/kg/일)를 공여자에게 연속 5일 동안 투여하여 공여자 골수로부터 말초 순환 내로 CD34+ 세포들을 이동시켰다. 공여자는 5 및 6일째에 성분채집하여 이동된 말초 혈액 단핵 세포들을 수집

하였다. CD34+ 세포들을 ISOLEX 300i 자기 세포 양성 선택 시스템(버전 2.5, 제조원: 미국 일리노이주 디어필드 소재의 Baxter Healthcare)을 사용하여 장치 사용자 매뉴얼과 함께 제공된 프로토콜에 따라 성분채집 생성물로부터 고도로 농축시켰다. 정제된 세포를 유동 세포분석법(하기 참조)으로 특성화하였다. 농축되고, 선택된 세포를 0.5% 인간 혈청 알부민이 들어있는 RPMI 속에서 25°C로 유지시키고 48시간내에 사용하였다. 생존능을 시험하기 위해,  $2 \times 10^5$  세포들의 분취량을 7-AAD (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 20분, 100  $\mu\text{l}$ 의 PBS중 4°C)로 표지하고, FACS 완충액 (PBS/5% BSA)으로 세척한 후, 유동 세포분석법으로 분석하였다. 일부 실험에서, 전신계 투여 후 HSC를 추적하기 위하여, 인간 CD34+ 세포들을 10 ml의 RPMI 중에서 25°C에서 30분 동안  $1\mu\text{g}/10^7$  세포들을 사용하는 녹색 형광성 트래이서 5-클로로메틸플루오레세인 디아세테이트(CMFD, Invitrogen)로 표지하였다. 과량의 CMFD를 원심분리(250xg 5분) 후 RPMI(제조원: Invitrogen) 중 10ml의 5% BSA(고순도)(제조원: Sigma) 속에 재현탁시킴으로써 퀀칭(quenching)시켰다. 추가로 원심분리 후 세포를 1%BSA/RPMI( $12.5 \times 10^6/\text{ml}$ ) 속에 재현탁시켰다. CMFD 표지하는 7-AAD를 사용하여 검출한 생존능에 있어 어떠한 변화도 수득하지 않았다(나타내지 않음).

[0101] 동물 모델

[0102] 신장의 허혈-재관류 손상을 앞서 기술된 방법[1]으로부터 변형시켰다. 요약하면, 0일째에, 마취시킨 수컷 마우스(8-10주령)의 신장을 옆과외과적 절개를 통해 노출시키고 36.8-37.3°C의 중심 온도에서 외과 클램프를 한쪽 신장 또는 양쪽 신장의 신장 동맥 및 정맥을 가로질러 위치시켰다. 신장이 탁한 것을 확인한 후, 27분(편측성 모델) 또는 25분(양측성 모델) 동안 후복막 속에 채워치시켰다. 클램프를 제거하고 신장에 대한 재관류를 육안으로 확인하고, 상처를 봉합하였다. 인간 HSC의 효과를 시험하기 위해, 편측성 IRI 신장 손상을 가진 마우스를 2개 그룹으로 나누었다. 신장 손상 후 1 및 2일째에, 치료 그룹 n = 6-10마리/그룹)에서, CMFD로 표지시킨  $2.5 \pm 10^6$  인간 CD34+ 세포들을 함유하는 200  $\mu\text{l}$ 의 세포 현탁액을 꼬리 정맥을 통해 정맥내 주입하였다. 대조군 그룹에서는, 마우스에게 비히클만을 제공하였다. 마우스를 신장 IRI 후 3, 5, 7, 14 및 28일 째에 희생시켰다.

[0103] 신장 기능

[0104] 신장 기능을 평가하기 위해, 양측성 IRI 신장 손상을 가진 마우스(d0)를 2개 그룹으로 무작위로 나누었다. 치료 그룹(n = 10)에  $2.5 \times 10^6$  인간 HSC를 1 및 2일째에 정맥내 꼬리 정맥 주입으로 제공하였다. 대조군 그룹(n = 16)에게는 비히클만을 제공하였다. 혈장 크레아티닌을 앞서 기술된 방법[1]을 사용하여 손상 후 1, 2, 5, 7, 14 및 28일째에 꼬리 정맥으로부터 취하였다.

[0105] 조직 제조, 면역염색, 영상 및, 손상 및 복구의 정량화

[0106] 마우스에게 빙냉 PBS를 관류한 후 기관들은 2시간 동안 페리오레이트-라이신 파라포름알데하이드(PLP) 용액속에서 고정시킨 후 18% 슈크로스 속에 16시간 고정한 후, 최적 절단 온도(optimal cutting temperature: OCT) 배지(동결된 조직에 대해 최적 절단 온도를 보증하고 저온유지장치 상에서 단면화하기 전에 조직을 봉매(embedding)하기 위해 사용된 봉매 배지)(-80 °C)[2] 속에 보존하거나, 광 현미경용 조직을 10% 중성-완충된 포르말린 속에 12시간 동안 고정시키고, 70% 에탄올에 이진시킨 후, 파라핀 단면(3mm) 및 단면들에 대해 가공하고 과요오드산-슈프(Schiff)(PAS) 또는 피크로시리우스 적색 염료 2로 염색하였다. 면역형광성 표지화를 5mm 동결 단면에서 수행하였다. 신장, 비장 및 심장 속에서 주입된 인간 세포를 검출하기 위해, 마우스 항원에 대해 교차-반응성이 없는 인간 백혈구 항원에 대한 항체를 사용하거나 CMFD의 형광성을 사용하였다(7일까지). 다음 항체들은 또한 기술된 방법[1, 2]을 이용하여 사용하였다: 항-인간 백혈구 항원 제I 부류(HLA)-ABC (FITC, 1:200, 제조원: eBioscience), 항-인간 CD45 (FITC, 1:200, 제조원: eBioscience), 랫트-항-인간 CD45 (1:200, 제조원: Abcam), 항-인간 CD68 (FITC, 1:200, 제조원: eBioscience), 항-인간 CD3 (FITC, 1:200, 제조원: eBioscience), 항-인간 CD31 (FITC, 1:200, 제조원: eBioscience), 토끼 항-인간 vWF (1:200, 제조원: Abcam), 항-인간 CD146 (FITC, 1:100, 제조원: Abcam), 바이오틴-항-인간 CD 13 3 (1:100, 제조원: Miltenyi), 토끼-항-인간-CD 13 3 (1:100, 제조원: Cellsignaling), 염소-항-인간 KDR (1:100, 제조원: R&D Systems), 및 토끼-항-인간 KDR (1:100, NeoMarkers)에 이어, 토끼-항 FITC(1:200, 제조원: Invitrogen), 항-랫트 Cy3 또는 항-토끼 Cy3 또는 항-염소 Cy3 (1:400, 제조원: Jackson Immunosresearch) 또는 항-아비딘 Cy3 (1:3000, 제조원: Jackson Immunosresearch). 인간 항원과 교차반응하지 않는 마우스 혈관구조 랫트-항-마우스 CD31(1:200, 제조원: eBioscience)을 표지하기 위해, 항-랫트 Cy3(1:400, 제조원: Jackson Immunosresearch)을 적용하였다. 단면을 1% 파라포름알데하이드(PFA)로 후-고정시킨 후, 벡타시일드(Vectashield) 속에 DAPI와 함께 두었다. 세

관주위 모세혈관 손실 및 세관 손상을 항-CD31-Cy3 표지된 신장 단면 또는 PAS 염색된 파라핀 단면 각각을 앞서 보고한 바와 같이[3] 블라인드화된 점수매김 방법을 사용하여 평가함으로써 측정하였다. 요약하면, 영상을 피질 및 외부 수질을 혼입시킨 전체 시상 단면위에서 연속적으로 디지털 영상(X200)으로 포획하였다(10-20개 영상). 각각의 영상을 격자에 의해 252 정사각형으로 나누었다. 세관주위 모세혈관 손실을 계산하기 위해, 세관주위 모세혈관이 없는 각각의 정사각형을 양성 점수로 수득하고; 최종 점수를 양성 점수 퍼센트로 나타내었다. 세관 손상을 평가하기 위하여, 각각의 정사각형 세관 손상의 존재(세관 평편화, 괴사, 세포자멸사 또는 캐스트(cast)의 존재)는 양성 점수를 생성한다. 최종 점수는 영상당 양성 점수를 가진 정사각형의 퍼센트이며, 이는 개개 신장으로부터 모든 영상에 대해 평균화되었다. 에피형광성 영상을 Nikon TE2000 현미경, CoolSnap 카메라(제조원: 독일 소재의 Roper Scientific)로 촬영하고 IP 실험실 소프트웨어(제조원: 캘리포니아주 산 조세 소재의 BD Biosciences)를 사용하여 진행시켰다. 공촛점 영상을 Nikon C1 D-Eclipse 공촛점 현미경을 사용하여 생성시켰다. 투사 영상은 0.1mm 단계에서 획득한 10Z-스택 영상으로부터 생성시켰다. 단면들 사이의 비교를 위해, 포함하는 모든 공촛점 셋팅을 단면들 사이에서 일정하게 유지시켰다.

[0107] 유동 세포분석기 분석 및 분류

[0108] 이소렉스(Isoplex)가 풍부한 CD34 세포들을 앞서 기술된 방법[1]을 이용하여, 다음 인간 항체 조합들을 사용하여 분석하였다: 항-CD31-FITC(1:100, BD), 항-CD146-PE(1:100, BD), 항-KDR-FITC(1:100, 제조원: R&D Systems), 항-CD45-FITC(1:100, BD), 항-CD140b-Alexa Fluor 488(1:100, BD), 항-CD29-PE(1:100, BD), 항-CD105-FITC(1:100, R&D Systems), 항-CD34-PE(1:100, BD), 항-CD99-FITC(1:100, BD), 항-CD144-PE(1:100, R&D Systems), 항-CD38-FITC(1:100, BD), 항-CD14-FITC(1:100, BD), 항-CD64-PE(1:100, BD), 항-CD61-PerCP(1:100, BD) 항-CD133-APC(1:100, Miltenyi), 항-CXCR4-APC(1:100, BD), 항-CD90-APC(1:100, BD), 항-CD117-APC(1:100, BD), 항-VEGFR1-APC(1:100, R&D Systems). HSC의 완전한 특성화는 또한 문서화된 것이다(D.M. & A.C. 미공개됨). 단일 세포들을 신장, 비장 및 골수로부터 앞서 기술한 바와 같이[2] 제조하였다. 요약하면, 신장, 비장 및 골수로부터의 단일 세포들( $1 \times 10^5$ )을 FACS 완충액 속에 재현탁시키고 인간 CD45(FITC, 1:200, 제조원: eBioscience) 및 마우스 CD11b(PE, 1:200, 제조원: eBioscience)에 대한 항체들로 30분 동안 항온처리하였다. FACS 세척 완충액으로 세척하고 200  $\mu$ l FACS 완충액 속에 재현탁시킨 후, 세포들을 BD FACSCalibur 유동 세포분석기를 이용하여 분석하였다. 주사한 후 2일째에 CMFDA로 표지한 인간 HSC를 FACSaria[2]를 사용하여 FACS 분류에 의해 직접 분류하였다. 신장으로부터 분류된 CMFDA+ 세포들을 즉시 분해하고 RNA를 RNA Easy(제조원: Qiagen) 시스템을 사용하여 실시간 PCR을 위해 정제하였다.

[0109] 실시간 PCR

[0110] 총 RNA를 조직 및 세포들로부터 키트(제조원: RNA Easy Qiagen)를 사용하여 제조업자의 지시에 따라 생성하였다. 순도를 A260 내지 A280에 의해 측정하였다. cDNA를 1 $\mu$ g의 총 RNA로부터 iScript 및 무작위 헥사머 및 폴리 dT를 포함하는 프라이머를 사용하여 합성하였다[2]. 인간 및, 마우스 시료의 실시간 PCR을 ABI7900HT 서열 검출 시스템(제조원: 보스턴 소재의 PerkinElmer Life Sciences, 캘리포니아 포스터 시티 소재의 Applied BioSystems)을 사용하여 SYBR-Green(SYBR Green PCR kit; 제조원: Qiagen)의 존재하여 앞서 기술된 방법[4]을 사용하여 수행하였다. 인간 GAPDH, HPRT1, 안지오펜티엔 1(ANGPT1), 섬유모세포 성장 인자 2(FGF2), 간세포 성장 인자(HGF), 인슐린-유사 성장 인자 1(IGF1), 인터루킨-8(IL8), 혈소판-기원한 성장 인자 b(PDGFb), 형질전환 성장 인자 b 1(TGFb 1), 혈관 내피 성장 인자(VEGF), TIE1에 대해 특이적인 프라이머/프로브 세트들 제조업자(Sabiosciences)로부터 입수하였다. 등량의 cDNA를 RT-PCR 반응에 사용하고 반응 혼합물(제조원: Sabiosciences)을 사용하기 직 전에 함께 혼합하였다. 모든 반응들을 3회 수행하였다. 실시간 PCR의 최적화를 제조업자의 지시에 따라 수행하였다. 표준 곡선 측정을 위해, 4개의 log2 단계들에서 일련 희석시키고 시료들에 대해 평행하게 수행된 모든 시료들의 혼주물(pool)을 사용하였다. 각각의 반응물의 총 용적은 20  $\mu$ l 이었으며, 300 nM 전방 및 300 nM 역방 프라이머 및 125ng의 cDNA를 함유하였다. 적절한 음성 대조군을 각각의 반응을 위해 수행하였다.

[0111] 통계학적 분석

[0112] 모든 값은 평균  $\pm$  표준 편차(SD)로 제공된다. 만텔-콕스 로그-랭크 시험(Mantel-Cox Log-rank test)을 사용하여 생존을 분석하였다. 2개 그룹들 사이의 비교들을 쌍을 이루지 않은 t-시험(2개의 꼬리화됨)으로 수행하였다. 쌍을 이룬 t 시험을 사용하여 동물 또는, 결보기 수술한 마우스(sham operated mouse)와 비교하여 질병이 있는 마우스의 좌측(IRI) 및 우측(대조군) 신장을 직접 비교하였다. 0.05 미만의 P 값은 모든 통계학적 시험에서 유의적인 것으로 고려하였다.

[0113] 실시예 2

[0114] 이소렉스-정제된 G-Csf-이동된 조혈 줄기 세포들의 특성화

[0115] 조혈 줄기 세포-이동된 인간 공여자로부터의 CD34+ 풍부한 백혈구를 생존능 및 순도에 대해 분석하였다. 99% 이상의 HSC는 7-AAD 배제법(나타내지 않음)에 의해 생존가능하였다. 96% 이상의 백혈구는 CD45+이었으며, CD34+는, 이들이 조혈 줄기 세포들(HSC)이었음을 나타낸다(참조: 표 1). 소수는 CD34를 발현하였으나 CD45는 발현하지 않았다. 농축된 백혈구의 추가의 특성화를 세포 표면 마커 CD14, CD34, CD146, CD133, CD31, VEGFR2 를 사용하여 추정된 내피 후대세포의 다중-계통 잠재성 및 확인을 입증하기 위해 수행하였다(참조: 표 2)[19]. 특성화는, HSC 외에, 이동된 인간 말초 혈액 CD34+ 세포들이 소수의 순환하는 내피 후대세포들(CEP) 및 드문 순환하는 내피 세포들(CECs)을 함유함을 나타낸다.

표 1

| 사람 CD34+가 풍부한 이동된 말초 혈액 줄기 세포<br>(n = 6/그룹). |       |            |            |
|--|-------|------------|------------|
| 마커   | CD34+ | CD34+CD45- | CD34-CD45+ |
| 평균   | 96.44 | 0.08       | 2.96       |
| SD   | 0.84  | 0.13       | 0.89       |

[0116]

표 2

| 사람 CD34+가 풍부한 이동된 말초 혈액 줄기 세포들 내의 CEP 및 CEP 표현형<br>(n = 6/그룹) |                |                     |                              |                            |                            |
|---|----------------|---------------------|------------------------------|----------------------------|----------------------------|
|   | CEPs           |                     |                              |                            | CECs                       |
| 마커들   | CD34+<br>CD14+ | CD34+KDR+<br>CD133+ | CD34+KDR+<br>CD146-<br>CD31- | CD34+CD133+<br>CD45+CD146+ | CD34+CD133-<br>CD146+CD31+ |
| 평균  | 0.05           | 0.30                | 0.05                         | 0.07                       | 0.05                       |
| SD  | 0.04           | 0.22                | 0.07                         | 0.11                       | 0.06                       |

[0117]

[0118] 실시예 3

[0119] 허혈 재관류 손상후 복구 동안 신장으로 보충되는 인간 조혈 줄기 세포들

[0120] 신장 복구에 있어서 인간 HSC의 효과를 연구하기 위해, 본 발명자들은, 이들이 손상된 신장으로 보충될 수 있는 지를 초기에 측정하였다. 예비 연구에서, 손상 전에 CMFDA로 표지된  $2.5 \times 10^6$  HSC의 정맥내 주입은 주사 후 24시간째에 유의적인 보충을 초래하지 않았다(데이터는 나타나지 않음). 다음에, 본 발명자들은 신장 IRI 후 1일 및 2일째에 CMFDA-표지된 HSC를 주입하고, 많은 보충된 HSC가 신장 실질에서 검출될 수 있는 손상 후 3, 5 및 7 일째에 관측하였다(도 1a, 1b). 많은 양이 세관주위 모세혈관(PTC)내에 국재화하였지만, 일부는 혈관주위 위치 내 모세혈관의 범위 외부에서 검출되었다(도 1c). 본 발명자들은 또한, 편측 IRI 후, 소량이 존재하였지만, 손상되지 않은 신장으로 HSC의 유의적인 보충을 인식하였다(도 1b). 그러나, 본 발명자들은 심장에서 어떠한 HSC도 검출할 수 없었으며(나타내지 않음), 이는 이러한 사실이 손상되지 않은 신장 및 손상된 신장으로 HSC의 특수한 보충임을 나타낸다. CMFDA가 시간에 따라 희석될 수 있다는 걱정으로 인하여, 본 발명자들은 표지되지 않은 HSC를 손상 후 d1 및 d2에 마우스들내로 주입하였다. 이들 표지되지 않은 세포는 HLA 제I 부류(도 1c, 1d)에 대한 항체에 의해 검출되었다. HLA-I 양성 세포들은 신장에서 모든 시점에서 용이하게 검출되었지만 명백하게 IRI 후 14일 및 28일째에 신장에서 HLA-I+ 세포들의 지속성이 존재하였다(도 1d). 예측한 바와 같이, HSC는

또한 비장 및 골수에서 확인되었고(도 1e-1h), HSC가 마우스 골수내로 주입(engraft)되어 마우스가 이제 키메라가 됨을 제안하는, 골수내 HSC가 골수 마커 CD11b를 유도하였다(도 1g)는 IRI 후 d7에서의 증거와 함께, 골수내에서 HSC의 지속성이 존재하였다.

[0121] 실시예 4

[0122] 사망율을 감소시키고 허혈성 재관류 손상 후 신장 기능을 개선시키는 전신계적 인간 조혈 줄기 세포 치료요법

[0123] 손상된 신장으로의 HSC 보충이 복구 동안 어떠한 기능적 결과를 갖는지를 측정하기 위하여, 본 발명자들은 마우스들을 양측성 IRI(0일)에 적용한 다음, d1 및 d2에 인간 HSC의 정맥내 주입하였다. 혈장 크레아티닌을 걸보기 수술 마우스들(d0, 혈장 크레아티닌 값은  $0.05 \pm 0.06$ 이다)에서 및 IRI 후 d1, d2, 및 d7에 평가하였다. 양측성 신장 IRI는 24 시간제에 혈청 크레아티닌에 있어 유의적인 증가를 초래하였고 48시간제에 피크가 되었다(도 2a). 비록 24시간제(처음 주사 시간)에 혈장 크레아티닌 수준이 처리 및 비처리 그룹에서 상이하지 않았지만, HSC를 제공받은 마우스들에서 48시간제에 혈장 크레아티닌에 있어서 현저하고 유의적인 감소가 있었던 반면(도 2a).도 2a), 마우스의 비처리 그룹은 이 시점에 혈장 크레아티닌 수준이 지속적으로 높게 상승하였다. d7까지 생존한 마우스들에서, 비처리 및 처리 그룹들 둘다 유사한 수준의 혈장 크레아티닌 수준들을 나타내었다. IRI 모델이 회복 모델이므로 이것은 놀라운 것이 아니다. 그러나, 비처리 그룹에서는, 마우스들의 단지 50%만이 7일까지 생존한 반면(도 2b), 인간 HSC를 제공받은 마우스들의 90%가 7일까지 생존하였다(도 2b). 2개 그룹에서 생존 수는 도 2b에서 알 수 있다. 이들 놀라운 발견은, 인간 HSC가 신장 복구/재생 둘 다를 증진시키고 생존을 향상시킴을 나타낸다.

[0124] 실시예 5

[0125] 신장 세관주위 모세관 손실을 약화시키고, 세관 상피 재생을 촉진하며, 허혈성 재관류 손상 후 장기간 섬유증을 방지하는 인간 조혈 줄기 세포 치료요법

[0126] HSC가 신장 복구를 증진시키는 메커니즘을 연구하기 위해, 본 발명자들은 세관주위 모세혈관(PTC)의 손실 및 세관 손상의 지속성에 대해 신장 단면을 분석하였다(도 3). 형태계측법에 의한 mCD31-표지된 PTC의 분석은, HSC 처리가 복구 동안 PTC 손실을 예방함을 나타내었다(도 3a-3c). 그러나, 주목할만하게도 14 및 28일 후 PTC 손실은 상이하지 않았으며, 이는, PTC의 재생을 촉진시키는 내인성 인자가 존재하지만, HSC 치료요법은 혈관구조의 조기 손실을 약화시킴을 나타낸다. 유사하게, HSC 치료요법은 IRI의 당해 모델의 복구 상 동안 세관 손상의 지속성을 약화시켰으며(도 3d-3f), 이는, HSC가 세관 재생을 직접적으로 또는 간접적으로 촉진시킴을 제안한다. 본 발명자들을 앞서, 신장 IRI가 만성 신장병의 선구자인, 지속적인 사이질 섬유증을 초래할 수 있으며 신장 기능의 진행성의 장기간 손실과 강하게 관련될 수 있음을 입증하였다[14, 20-22]. 손상된 신장의 복구 동안 HSC의 전신계적 주입이 손상의 장기간 결과에 영향을 미치는지를 시험하기 위하여, 본 발명자들은 사이질 섬유증을 정량화하였다(도 3g-3i). 비처리 처리된 마우스들에서, 사이질 섬유증은 손상 후 4주내에 진행적으로 축적하였지만, HSC를 제공받은 마우스들에서 사이질 섬유증은 d28까지 약화되었다.

[0127] 실시예 6

[0128] 허혈성 재관류 손상 후 신장에서 조기 림프구 및 골수 분화 및 내피 후대세포 마커를 획득한 인간 조혈 줄기 세포

[0129] HSC는 골수, 적혈구, 거핵세포 및 림프구 계통 세포들의 공급원이다. 본 발명자들은, 많은 HSC가 손상 후 d3에 신장으로 보충된 한편 다수의 보충된 세포들은 d7 전체에서 점진적으로 감소하였지만, 이후 손상 후 d28까지 다시 증가하였음을 알았다(도 1). 본 발명자들은 인간 림프구 및 골수 강제(commitment) 마커들에 대해 신장을 표지하였다(도 4). 손상 후 d3과 같이 조기에, 많은 보충된 HSC는 CD68 또는 CD3을 획득하였으며 이러한 유도는 손상되지 않은 신장 및 손상된 신장 둘다에서 유사하였다(도 4). HSC 중 어느 것도 단핵세포 핵 형태를 획득한 d7 전체에서 신장으로 보충되지 않은 반면, 이러한 데이터는, 신장내 골수 및 림프구 계통으로의 조기 국소적 강제가 존재함을 제안한다. 신장내에서 인간 세포의 수는 손상 후 말기에 증가한다. 본 발명자들은, IRI 신장 후 d14 및 d28에 호중구의 특징적인 핵을 지닌 이따금씩의 인간 세포를 관측하였다(나타내지 않음). 이들 발견은 BM 키메라현상의 발견과 함께, 신장내 인간 세포에 있어서 말기 증가가 골수 키메라현상을 반영하거나 신장내 성숙한 세포 유형의 국소적 분화를 반영함을 제안한다.

[0130] 신장내에서 HSC의 국소적 분화를 추가로 조사하기 위하여, 마커 VEGFR2(KDR), CD146 및 CD133, 및 세포 표면 발현으로 표지한 단편을 주입 전에 줄기 세포와 비교하였다(표 3). 소수의 이동된 풍부한 HSC가 KDR 또는 CD146을 발현하였지만, 대부분은 CD133을 발현하였다. 그러나, IRI 후 d3에 신장에서 거의 모든 보충된 HSC가 CD146

을 발현하였지만, CD133은 발현하지 않았기 때문에 표현형 스위치(phenotypic switch)가 존재하였다. KDR의 발현은 신장으로 보충된 것들과 비교하여 이동되고, 풍부한 HSC에서와 유사하였다. CD146은 CEP 기능과 관련되어 있으므로, 본 발명자들의 발견들은, 신장이 CEP 유형 기능으로의 HSC 분화를 촉진함을 제안한다.

표 3

| IRI 후 d3 및 d5에 정맥내 주사 전 및 신장으로의 보충 후 세포 표면 마커들을 발현하는 HSCs의 퍼센트 (n = 5/그룹) |           |             |             |
|---|-----------|-------------|-------------|
| 마커들   | CD34+KDR+ | CD34+CD146+ | CD34+CD133+ |
| hCD34+정맥내 주사전   | 0.32±0.15 | 0.12±0.16   | 73.9±5.97   |
| IRI 후 D3  | 1.0±1.7   | 97.9±3.63   | 0           |
| IRI 후 D5  | 0         | 47.6±4.1    | 0           |

[0131]

[0132]

실시예 7

[0133]

척장 메카니즘에 의해 주로 혈관 복구에 기여하는 인간 조혈 줄기 세포들

[0134]

신생혈관화를 지지하는 HSC의 역할을 추가로 연구하기 위해, 본 발명자들은, HSC가 내피 세포들내로 분화되는지를 초기에 측정하였다. 내피 세포의 2개의 마커인 CD31 및 인간 vWF에 대한 인간-특이적인 항체를 사용하여, 본 발명자들은 7, 14 및 28일째에, 그러나 비 조기 시점에서 손상된 신장내 인간 CD31+ 세포들을 확인하였다(도 5a, 5b, 5c). 따라서, CD31 발현은 최대 복구와 일치하지 않았다. 때때로 CD31+ HSC는 CD45 발현을 결여하였으며 PTC 벽내에서 내피 세포와 일치하는 형태로 발견되었다(도 5a). 그러나, 많은 대부분의 CD31+ 인간 세포들은 또한 CD45를 공-발현하거나(도 5b) 림프구 및 단핵구에 의한 CD31 발현과 일치하는, 백혈구 형태로 사이질내에 국제화하였으며, 이는, 인간 CD31이 내피의 특이적인 마커가 아님을 나타낸다. 항 인간-vWF 항체(마우스 vWF와 교차 반응하지 않았음)를 사용한 평행 연구는 또한, CD45 발현을 결여한 매우 드문 vWF+ 인간 세포들을 확인하였으며(도 5d), 이는 때때로 인간 세포가 내피 세포를 기능화한다는 관측에 무게를 더해주었다. 이러한 관찰들은, 인간 CD34+ 세포들이 모세관 재생을 지지하는데 단지 약간 기여하지만, 모든 HSC에서 CEP 마커 CD146의 현저한 유도가 존재했다는 증거를 제공하였으므로(표 1), 본 발명자들은, HSC가 주변분비 메카니즘에 의해 기능화되었는지를 시험하였다. 이는 손상 후 신장에서 HSC의 혈관내 및 혈관주위 부위에 특히 다루기쉽게 제공되었다. 이를 추가로 연구하기 위해, 본 발명자들은 IRI 후 d4째에 신장에 보충된 CMFDA-표지된 HSC를 정제하고 이를 마우스내로 전신계 주사 전에 균질성 HSC의 전사 프로파일을 비교하는 RT-PCR에 의해 이들의 인간 특이적인 전사 프로파일을 분석하였다. HSC는 ANG-1, FGF-2, 및 VEGF-A를 포함하는 프로-혈관형성 사이토킨에 대한 높은 수준의 전사체를 생성하였고, 또한 상피 재생에 있어서 이의 역할에 대해 인식된 높은 수준의 HGF를 생성하였다(도 6). 놀랍게도, 신장내로 보충된 HSC는 프로-혈관형성 사이토킨에 대해 매우 유사한 전사 활성을 나타내었으며, 혈관형성에 있어서 주변분비 역할을 지지하였다.

[0135]

실시예 8

[0136]

본원에 제공된 데이터에 대한 논의

[0137]

인간에서 급성 신장 손상은 지속되어 높은 이환률을 부여하며 제한된 치료학적 선택을 갖고, 이에 따라 새로운 치료학적 전략이 매우 바람직하기 때문에 잠재적인 재생 시도를 확인한다. 또한, 드러난 증거는, 인간에서 급성 신장 손상이 염증, 혈관병증, 상피 위축, 섬유증 및, 기관 부전을 초래하는 기능의 점진적 손실에 의해 특징화된 만성 신장병의 조짐임을 나타낸다[2, 14, 22, 23]. 신장 손상을 약화시키거나 복구 및 재생을 향상시키는 새로운 전략들은 단기간 충격을 가질 뿐만 아니라 신장 기능에 대한 장기간 과정을 가능하게 변경시킬 것이다. 이러한 치료요법에 대한 장기간 결과는 신장병에 영향을 줄 뿐만 아니라 만성 신장병이 심혈관병에 대한 독립된 위험인이므로 심혈관병에도 영향을 미칠 것이다[4]. 최근에, 성인 인간 말초 혈액 CD34+ 세포들 및 HSC는 뇌졸중 및 골 손상 이후 혈관형성 및 골형성을 증진시킴이 보고되었다[16, 24]. 또한, CD34+ 세포들은 외인적으로 적용된 G-CSF의 존재하에서 말초 순환으로 확장 및 이동하여[25-27], HSC를 용이하게 이용가능하도록 하고

임상적 세포 치료요법의 이유를 강화시킨다.

- [0138] 최근 연구에서, 본 발명자들은, 신장 손상 후 24시간째에 전신계적으로 투여된 인간 HSC가 손상된 신장으로 선택적으로 보충되어 주로 혈관구조내부 및 주변에 국제화됨을 입증하였다. 이러한 보충은 미세혈관구조, 세관 상피세포의 향상된 복구, 향상된 기능적 회복 및 증가된 생존과 관련되어 있으며 또한 장기간 섬유증을 예방하였다. HSC는 신장에서 조기 림프구 및 골수구 투입 마커들을 유도하였고, CEP 마커들을 획득하였지만 신장으로 보충 후 높은 수준의 프로-혈관형성 전사체들의 합성을 보유하고 있었다. 비록 정제된 HSC가 신장으로의 보충 전 소수의 순환하는 내피 후대세포들 및 때때로 순환하는 내피 세포들을 함유하고, 신장-보충된 HSC가 CEP 분화와 일치하게 CD146을 유도하였지만, 본 발명자들은 마우스 모세혈관 벽들내에서 매우 적은 인간 내피세포들을 확인하였다. 이와 함께 이들 데이터는, HSC 매개된 신장 복구가 혈관구조의 교체라기보다는 주변분비 메카니즘에 의한 것임을 나타낸다(도 7).
- [0139] 인간 HSC를 편측성 신장 IRI의 모델에서 손상된 신장으로 선택적으로 보충되었으며, 이는, 손상된 신장이 말초 순환내에 있는 HSC를 선택적으로 보충할 수 있음을 나타낸다. 후 IRI 신장으로의 인간 HSC의 선택적인 보충은, 간질 기원한 인자-1(SDF-1) 및 이의 수용체 CXCR4를 포함하는 케모킨의 국소 방출이 중요할 수 있으며, 전사 인자 전사증 유도 인자-1(HIF-1)이 국소 케모킨 유도를 조절하는데 중요한 역할을 할 수 있음을 나타낸다[28, 29]. 손상 발생시(d0)에 HSC의 전신계적 투여는 HSC의 불량한 보충을 초래하지만, 복구 상의 개시시에 HSC의 지연된 투여가 보충을 개시하는데 매우 효과적이었음이 주목가능하였다. 이러한 보충 패턴은 신장에 대한 단핵구 유입과 유사하며, 호중구 보충과는 달리, 추가의 단핵구활성물질이 HSC 보충에 중요한 역할을 할 수 있음을 제안한다. 마우스들에서 본 발명자들의 앞서의 연구들은 단순히 IRI에 대한 반응시 골수로부터의 내인성 HSC 이동 또는 신장으로의 보충에 대한 증거를 제공하지 않았는데, 이는, 골수내 이들의 정상적인 니치(niche)로부터 HSC의 보충을 위한 부절절한 내인성 시그날이 존재함을 나타낸다[30]. HSC의 말초 순환으로의 주사는 신장에 대한 효과적인 보충을 초래하므로, HSC 치료요법은 골수 니치로부터의 방출시 정상적인 블록을 극복한다. 소수의 인간 HSC는 또한 IRI의 편측 모델에서 손상되지 않은 신장으로 보충되었다. HSC는 동일한 마우스에서 심장 또는 위로, 또는 건강한 마우스의 신장으로 보충되었다(나타내지 않음). 편측 IRI에 대한 반응시, 손상되지 않은 신장은 비대 및 증식을 포함한 보충적인 변화를 겪는다. 따라서, 손상되지 않은 신장으로의 HSC 보충은 혈관형성을 촉진시키거나 손상의 부재하에서 보호 역할을 함이 가능하다.
- [0140] HSC는 HLA-제I 부류 항원에 대한 항체를 사용하여, IRI후 d14 및 d28을 통해 신장내에서 검출되었다. 약 7일째에 발생하는 최저치와 함께, 시간이 흐름에 따라 신장내 HSC 보유의 2개 양식의 분포가 존재하였다. 본 발명자들은, 마우스가 골수 키메라현상으로 발전하였고, d14 및 d28에(그러나 이보다 조기는 아님) 신장내 인간 세포 중 일부는 호중구이었음을 알았다. 따라서, 신장 복구 동안 처음 7d-10d 동안, HSC는 줄기 세포, 조기 위탁 세포 또는 CEP로 잔존하였고, 복구가 진행되면서 신장으로부터 서서히 사라져서, 원래의 전신계 순환 HSC로부터 기원하는 것보다 골수로부터 보충된 성숙한 백혈구로 후속적으로 교체되었다. CD31의 말기 발현 및 인간 호중구의 발생과 함께 신장내에서 인간 백혈구내 말기 증가는 키메라 골수로부터의 백혈구 보충과 일치한다. 그러나, 본 발명자들의 데이터는 섬유증에 있어서 장기간 영향을 초래하는 질병의 d1 및 d2 HSC 주입을 놀랍게도 지적한다. 이들 현재 연구들로부터, 장기간 섬유증에 있어서의 감소가 조기 혈관 복구를 증진시키는지 또는 이것이 말기 시점에서 회복성 인간 HSC의 지속적인 집단을 반영하는지가 불명확하다.
- [0141] 신장에서 허혈성 손상은 상피 손상에 의해 특성화된다. 세관주위 모세혈관(PTC)의 손실은 잘 기술되어 있지 않다. 그러나, 몇개의 심각한 급성 신장 손상 모델(허혈, 독소, 일시적인 안지오텐신 II)로부터 기원한 데이터는 우세한 섬유증의 발달을 전형적으로 앞서는 모세혈관 손실을 입증하며, 신생혈관형성은 혈관 구조의 보존 및 기관 기능의 복원에 있어서 중심 공정일 수 있다[12, 13, 32, 33]. 본 발명자들은 또한, 당해 연구에서, IRI에 이어 단지 비교적 약한 신장 손상과 함께 PTC의 현저한 손실이 존재하며, 비록 복구 동안 이러한 PTC의 유의적인 재생이 있지만, 손상 후 1개월 동안 혈관구조의 지속적인 손실이 있음을 입증하며, 이는, 신장이 피부와 같은 다른 기관과는 달리 손상[14] 후 재혈관신생에 있어 고유의 결점을 지님을 나타낸다. 본 발명자들의 연구는, HSC가 복구 동안 신장에서 PTC의 이러한 손실을 약화시키고, 이는 신장의 신속한 기능적 회복 및 마우스의 향상된 생존과 관련됨을 분명하게 입증한다. 본 발명자들의 편측 IRI 모델에서, PTC의 HSC 매개된 재생은 28주째에 장기간 지속적인 PTC 손실을 약화시키지 않았지만, 그럼에도 불구하고 양측 IRI 모델에서 관측된 회복 및 생존에 영향을 미쳤으며, 이는 신장 복구에 있어 중추적 공정으로서 조기 혈관 복구를 지적한다. 손상 후 초기 시점으로 제한되는 HSC 매개된 혈관 복구 효능에도 불구하고, 손상 후 1개월째에 신장에서 섬유증 진행의 예방이 존재한다. 조기 HSC 주입의 이러한 장기간 효능이 사이질 섬유증의 발달시 중심적인 상호작용일 수 있는 향상된 혈관주위-내피 세포 상호작용이 기인하는지를 이해하기 위해서는 추가의 연구가 요구될 것이다[34].

예비 연구들에서, IRI 신장 후 14일째에 마우스들에게 HSC의 말기 투여는 불량한 보충 및 향상된 혈관 복구의 증거가 거의 없음(나타내지 않음)을 초래하였으며, 이는, HSC가 유효할 수 있는 동안 손상 후 제한된 기간이 존재함을 나타낸다.

[0142] 비록 신장 IRI 모델이 세관 상피 세포, 특히 근접한 세관 세포의 S3 분절의 심각한 손상 및 복구에 의해 특성화된다고 해도, PTC 재생없이 이러한 손상된 세관은 지속적인 허혈로 인하여 성공적으로 재생되지 않을 경향이 있다[14, 35]. 본 발명자들의 연구들은 또한, HSC가 세관 손상 점수 및 기능적 회복에 의해 평가되는 것으로서 HSC가 상피 재생을 촉진시켰음을 나타내었다. HSC는 전-혈관형성 인자에 대한 고 수준의 전사체를 생성하였으며, 신장내 이들의 위치(혈관내 및 혈관주위)는 상피 복구를 2차적으로 촉진시키는 혈관 복구에 있어 주요 역할을 제안한다. 그러나, 상피 및 또한 상피 복구성 사이토킨 WNT7b(나타내지 않음)(참조: Lin et al. manuscript in submission)에 직접적으로 전-회복 효과를 가지는 것으로 알려진 HGF에 대한 고수준의 전사체는, HSC가 PTC 복구와는 독립적으로 상피 복구에 있어서 직접적인 주변분비 역할을 가질 수 있음을 제안한다.

[0143] HSC가 복구되는 신장내에서 CD3+ 및 CD68+ 발현을 신속하게 유도하였음은 흥미로운 것이다. 증가하는 증거는 손상 후 신장내 T 세포 및 단핵세포 기원한 세포 둘다에 대한 회복 역할을 지적한다[36, 37]. 따라서, HSC가 회복되는 T 세포들 및 회복되는 대식구로 국소적으로 분화하는 것이 가능하다. 신장 보충된 HSC 및 성숙한 T 세포와 말초 혈액으로부터의 단핵구 사이의 차이를 구별하기 위한 추가의 연구가 필요할 것이다[36, 37].

[0144] 성숙한 내피 세포를 직접적으로 형성시킴으로써 내피 재생에 있어 순환하는 내피 세포(CEC) 및 CEP의 역할은 고려할만한 연구 대상이 되어 왔다[18, 38]. 실제로, 본 발명자들은 마우스 골수 키메라에서, 소수의 내피 세포가 신장 IRI 및 복구 후 키메라 골수로부터 기원함을 이미 보고하였다[30]. 일부 연구에서, 내피 세포가 되는 백혈구를 검출하기 위한 프로모터 Tie2의 용도는, Tie2가 백혈구 및 내피 세포 둘다를 표지하므로 이후 해석 문제가 되었다[39]. 따라서, CEP가, 내피 세포가 되는 청구항들은 과장될 수 있다. 이러한 현재의 연구에서, 본 발명자들은, 거의 모든 보충된 인간 HSC가 일반적인 백혈구 마커 CD45를 보유하였으며, 이는 다른 발표된 데이터와 일치함을 지속적으로 발견하였다[11]. 본 발명자들은 내피 마커 CD31을 사용하여 인간 내피 세포들을 확인하였으나, CD31은 또한 B 세포들 및 단핵구/대식구를 표지하며[40], 이들 연구에서 내피 세포에 대해 비-특이적임을 입증하였다. 그러나, 일시적인 세포가 인간 내피 세포와 일치하여, 내피 형태, CD31의 발현, 폰빌레브란트 인자(vWF) 및, CD45의 부재[41]와 함께 모세혈관 벽내에서 확인되었다. 본 발명자들의 정제된 HSC의 초기 특성화에서, 정제된 CECs(<0.05%)의 소수의 집단[38, 42], 및 CEP의 소 집단이 존재하였다. 후 IRI 신장에서, 대부분의 인간 HSC는 CEP 마커를 획득하였다. 따라서, 이들 일시적인 인간 내피 세포는 CEP와 내피 세포의 세포 융합, 드문 CECs의 혼입 또는, 전환분화 또는 CEP로부터 기원하는 것이 가능하다. 특정하게, 인간 내피 세포의 외형은 신장 PTC 재생의 유의적인 메카니즘이 아니었다. 오히려, 본 발명자들의 연구들은, CEP 마커를 갖는 복구되는 신장으로 보충된 HSC 및 HSC가 다른 연구들에서 보고된 바와 같이 VEGF-A, HGF, ANG-1, IL-8, IGF-1 및 FGF-2를 포함하는 혈관형성 인자를 분비할 수 있음을 나타낸다[18, 24, 43]. 이들 사이토킨 모두는 강력한 혈관형성 인자로서 인식되어 있으며 증가된 혈관형성에 의해 신장 복구를 증진시킬 수 있다[44-46]. 신장내 HSC의 혈관내 및 혈관주위 위치와 조합하여, 본 발명자들은, HSC에 의한 생존 및 신장 복구 둘다의 주요 메카니즘이 주변분비 메카니즘에 의한 PTC 재생임을 제안한다[24].

[0145] 결론적으로, 본 발명자들은, 전신계적으로 투여된 말초 혈액 이동된 인간 HSC가 이환률을 감소시키고 세관주위 모세혈관에 지시된 주변분비 메카니즘에 의해 신속한 신장 복구 및 신장의 재생을 촉진시킴을 입증한다. 이러한 발견들은, 급성 신장병의 치료시 촉망되는 치료학적 전략으로서, 및 만성 신장병의 예방시 인간 HSC를 지지한다.

[0146] 참고 문헌

[0147] 실시예 1에 인용된 문헌

[0148] 1. Duffield JS, Park KM, Hsiao LL, et al. Restoration of tubular epithelial cells during repair of the postischemic kidney occurs independently of bone marrow-derived stem cells. *J Clin Invest.* Jul 2005;115(7):1743-1755.

[0149] 2. Lin SL, Kisseleva T, Brenner DA, et al. Pericytes and perivascular fibroblasts are the primary source of collagen-producing cells in obstructive fibrosis of the kidney. *Am J Pathol.* Dec 2008;173(6):1617-1627.

[0150] 3. Kang DH, Joly AH, Oh SW, et al. Impaired angiogenesis in the remnant kidney model: I. Potential

role of vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1. *J Am Soc Nephrol*. Jul 2001;12(7):1434-1447.

- [0151] 4. Tei K, Matsumoto T, Mifune Y, et al. Administrations of peripheral blood CD34+ positive cells contribute to medial collateral ligament healing via vasculogenesis. *Stem Cells*. Mar 2008;26(3):819-830.
- [0152] 본원에 또한 인용된 참고문헌
- [0153] 1. Meguid El Nahas A, Bello AK. Chronic kidney disease: the global challenge. *Lancet*. Jan 22-28 2005;365(9456):331-340.
- [0154] 2. Thadhani R, Pascual M, Bonventre JV. Acute renal failure. *N Engl J Med*. May 30, 1996;334(22):1448-1460.
- [0155] 3. Ali T, Khan I, Simpson W, et al. Incidence and outcomes in acute kidney injury: a comprehensive population-based study. *J Am Soc Nephrol*. Apr 2007;18(4):1292-1298.
- [0156] 4. Weiner DE, Tighiouart H, Amin MG, et al. Chronic kidney disease as a risk factor for cardiovascular disease and all-cause mortality: a pooled analysis of community-based studies. *J Am Soc Nephrol*. May 2004;15(5):1307-1315.
- [0157] 5. Sagrinati C, Ronconi E, Lazzeri E, et al. Stem-cell approaches for kidney repair: choosing the right cells. *Trends Mol Med*. Jul 2008;14(7):277-285.
- [0158] 6. Togel F, Weiss K, Yang Y, et al. Vasculotropic, paracrine actions of infused mesenchymal stem cells are important to the recovery from acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. May 2007;292(5):F1626-1635.
- [0159] 7. Li B, Morioka T, Uchiyama M, et al. Bone marrow cell infusion ameliorates progressive glomerulosclerosis in an experimental rat model. *Kidney Int*. Jan 2006;69(2):323-330.
- [0160] 8. Van Huyen JP, Smadja DM, Bruneval P, et al. Bone marrow-derived mononuclear cell therapy induces distal angiogenesis after local injection in critical leg ischemia. *Mod Pathol*. Jul 2008;21(7):837-846.
- [0161] 9. Bi B, Schmitt R, Israilova M, et al. Stromal cells protect against acute tubular injury via an endocrine effect. *J Am Soc Nephrol*. Sep 2007;18(9):2486-2496.
- [0162] 10. Imberti B, Morigi M, Tomasoni S, et al. Insulin-like growth factor-1 sustains stem cell mediated renal repair. *J Am Soc Nephrol*. Nov 2007;18(11):2921-2928.
- [0163] 11. Dekel B, Shezen E, Even-Tov-Friedman S, et al. Transplantation of human hematopoietic stem cells into ischemic and growing kidneys suggests a role in vasculogenesis but not tubulogenesis. *Stem Cells*. May 2006;24(5):1185-1193.
- [0164] 12. Basile DP. Challenges of targeting vascular stability in acute kidney injury. *Kidney Int*. Aug 2008;74(3):257-258.
- [0165] 13. Basile DP. The endothelial cell in ischemic acute kidney injury: implications for acute and chronic function. *Kidney Int*. Jul 2007;72(2):151-156.
- [0166] 14. Basile DP, Donohoe J, Roethe K, et al. Renal ischemic injury results in permanent damage to peritubular capillaries and influences long-term function. *Am J Physiol Renal Physiol*. Nov 2001;281(5):F887-899.
- [0167] 15. Yuan HT, Li XZ, Pitera JE, et al. Peritubular capillary loss after mouse acute nephrotoxicity correlates with down-regulation of vascular endothelial growth factor-A and hypoxia-inducible factor-1 alpha. *Am J Pathol*. Dec 2003;163(6):2289-2301.
- [0168] 16. Taguchi A, Soma T, Tanaka H, et al. Administration of CD34+ cells after stroke enhances

neurogenesis via angiogenesis in a mouse model. *J Clin Invest*. Aug 2004;114(3):330-338.

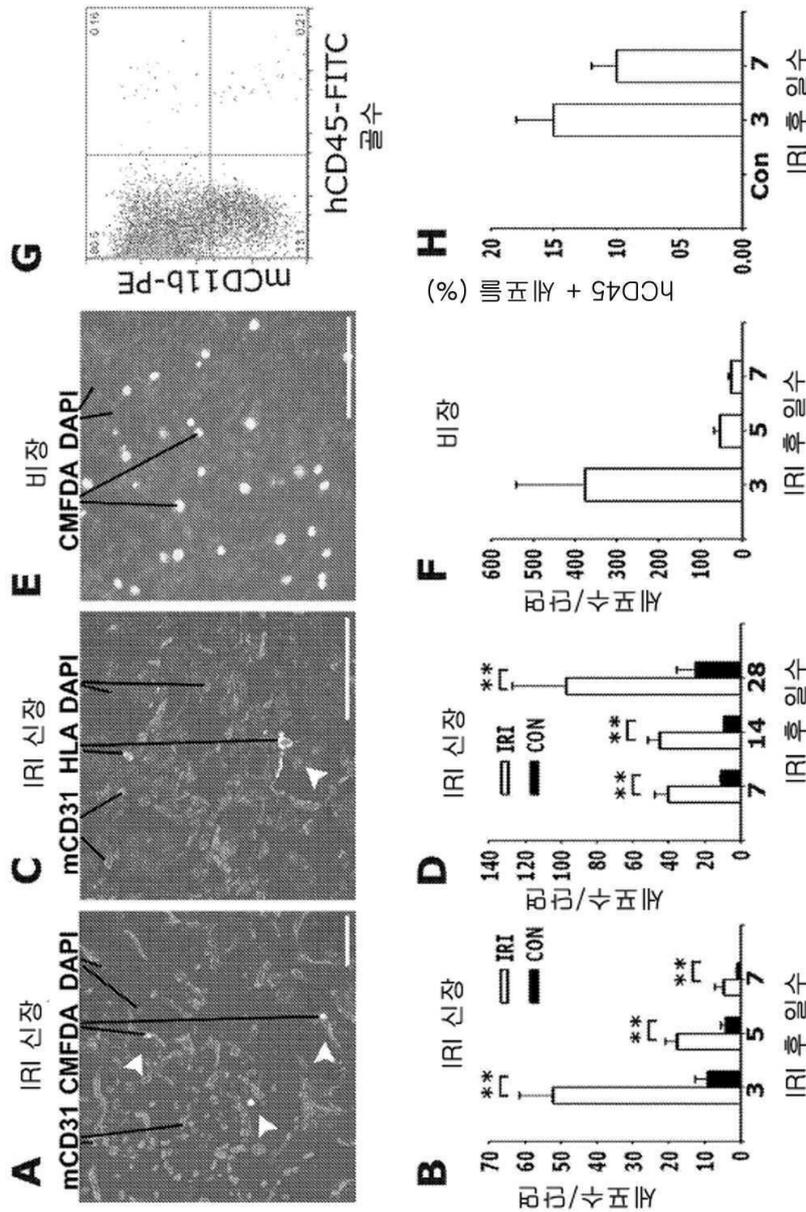
- [0169] 17. Tei K, Matsumoto T, Mifune Y, et al. Administrations of peripheral blood CD34-positive cells contribute to medial collateral ligament healing via vasculogenesis. *Stem Cells*. Mar 2008;26(3):819-830.
- [0170] 18. Rafii S, Lyden D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med*. Jun 2003;9(6):702-712.
- [0171] 19. Bertolini F, Shaked Y, Mancuso P, et al. The multifaceted circulating endothelial cell in cancer: towards marker and target identification. *Nat Rev Cancer*. Nov 2006;6(11):835-845.
- [0172] 20. Furuichi K, Gao JL, Murphy PM. Chemokine receptor CX3CR1 regulates renal interstitial fibrosis after ischemia-reperfusion injury. *Am J Pathol*. Aug 2006;169(2):372-387.
- [0173] 21. Kim J, Seok YM, Jung KJ, et al. Reactive oxygen species/oxidative stress contributes to progression of kidney fibrosis following transient ischemic injury in mice. *Am J Physiol Renal Physiol*. May 20 2009.
- [0174] 22. Ishani A, Xue JL, Himmelfarb J, et al. Acute kidney injury increases risk of ESRD among elderly. *J Am Soc Nephrol*. Jan 2009;20(1):223-228.
- [0175] 23. Bagshaw SM. Short- and long-term survival after acute kidney injury. *Nephrol Dial Transplant*. Jul 2008;23(7):2126-2128.
- [0176] 24. Matsumoto T, Kawamoto A, Kuroda R, et al. Therapeutic potential of vasculogenesis and osteogenesis promoted by peripheral blood CD34-positive cells for functional bone healing. *Am J Pathol*. Oct 2006;169(4):1440-1457.
- [0177] 25. Weisel KC, Moore MA, Kanz L, et al. Extended in vitro expansion of adult, mobilized CD34+ cells without significant cell senescence using a stromal cell coculture system with single cytokine support. *Stem Cells Dev*. Mar 2009;18(2):229-234.
- [0178] 26. Gaia S, Smedile A, Omede P, et al. Feasibility and safety of G-CSF administration to induce bone marrow-derived cells mobilization in patients with end stage liver disease. *J Hepatol*. Jul 2006;45(1):13-19.
- [0179] 27. Van Epps DE, Bender J, Lee W, et al. Harvesting, characterization, and culture of CD34+ cells from human bone marrow, peripheral blood, and cord blood. *Blood Cells*. 1994;20(2-3):411-423.
- [0180] 28. Kollet O, Shivtiel S, Chen YQ, et al. HGF, SDF-1, and MMP-9 are involved in stress-induced human CD34+ stem cell recruitment to the liver. *J Clin Invest*. Jul 2003;112(2):160-169.
- [0181] 29. Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, et al. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med*. Aug 2004;10(8):858-864.
- [0182] 30. Duffield JS, Park KM, Hsiao LL, et al. Restoration of tubular epithelial cells during repair of the postischemic kidney occurs independently of bone marrow-derived stem cells. *J Clin Invest*. Jul 2005;115(7):1743-1755.
- [0183] 31. Lombardi D, Gordon KL, Polinsky P, et al. Salt-sensitive hypertension develops after short-term exposure to Angiotensin II. *Hypertension*. Apr 1999;33(4):1013-1019.
- [0184] 32. Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*. Dec 15 2005;438(7070):932-936.
- [0185] 33. Freedman SB, Isner JM. Therapeutic angiogenesis for coronary artery disease. *Ann Intern Med*. Jan 1 2002;136(1):54-71.
- [0186] 34. Lin SL, Kisseleva T, Brenner DA, et al. Pericytes and perivascular fibroblasts are the primary source of collagen-producing cells in obstructive fibrosis of the kidney. *Am J Pathol*. Dec 2008;173(6):1617-1627.

- [0187] 35. Thomas SE, Anderson S, Gordon KL, et al. Tubulointerstitial disease in aging: evidence for underlying peritubular capillary damage, a potential role for renal ischemia. *J Am Soc Nephrol*. Feb 1998;9(2):231-242.
- [0188] 36. Ascon DB, Lopez-Briones S, Liu M, et al. Phenotypic and functional characterization of kidney-infiltrating lymphocytes in renal ischemia reperfusion injury. *J Immunol*. Sep 1 2006;177(5):3380-3387.
- [0189] 37. Duffield JS, Tipping PG, Kipari T, et al. Conditional ablation of macrophages halts progression of crescentic glomerulonephritis. *Am J Pathol*. Nov 2005;167(5):1207-1219.
- [0190] 38. Asahara T, Kawamoto A. Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol*. Sep 2004;287(3):C572-579.
- [0191] 39. Lewis CE, De Palma M, Naldini L. Tie2-expressing monocytes and tumor angiogenesis: regulation by hypoxia and angiopoietin-2. *Cancer Res*. Sep 15, 2007;67(18):8429-8432.
- [0192] 40. Newman PJ. The biology of PECAM-1. *J Clin Invest*. Dec 1 1997;100(11 Suppl):S25-29.
- [0193] 41. Yeh ET, Zhang S, Wu HD, et al. Transdifferentiation of human peripheral blood CD34+-enriched cell population into cardiomyocytes, endothelial cells, and smooth muscle cells in vivo. *Circulation*. Oct 28 2003;108(17):2070-2073.
- [0194] 42. Matsumoto T, Kuroda R, Mifune Y, et al. Circulating endothelial/skeletal progenitor cells for bone regeneration and healing. *Bone*. Sep 2008;43(3):434-439.
- [0195] 43. Hattori K, Dias S, Heissig B, et al. Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells. *J Exp Med*. May 7 2001;193(9):1005-1014.
- [0196] 44. Losordo DW, Dimmeler S. Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for ischemic disease. Part I: angiogenic cytokines. *Circulation*. Jun 2004;109(21):2487-2491.
- [0197] 45. Brindle NP, Saharinen P, Alitalo K. Signaling and functions of angiopoietin-1 in vascular protection. *Circ Res*. Apr 28, 2006;98(8):1014-1023.
- [0198] 46. Haider H, Jiang S, Idris NM, et al. IGF-1-overexpressing mesenchymal stem cells accelerate bone marrow stem cell mobilization via paracrine activation of SDF-1alpha/CXCR4 signaling to promote myocardial repair. *Circ Res*. Nov 21, 2008;103(11):1300-1308.
- [0199] 치료 조성물 또는 방법과 관련된 모든 기술은 또한 본 발명의 "용도"를 정의하기 위해 고려되어야 한다. 예를 들어, 본 발명은 본원에 확인된 상태의 치료 또는 본원에 확인된 치료학적 목표(예를 들면, 이를 필요로 하는 인간에서 혈당 강하)를 달성하기 위한 살리실산의 공급원의 용도를 포함한다. 유사하게, 본 발명은 또한 이러한 치료/목적에 위한 의약의 제조를 위한 살리실산의 공급원의 용도를 포함한다.
- [0200] 앞서의 요약은 본 발명의 모든 측면을 정의하기 위하여 의도된 것이 아니며, 추가의 측면은 상세한 설명과 같은 다른 단원에 기술되어 있다. 전체 서류는 통일된 기재내용과 관련되도록 의도되며, 본원에 기술된 특징들의 모든 조합은, 심지어 특징들의 조합이 동일한 문장, 또는 단락, 또는 당해 문서의 단원내에서 함께 발견되지 않는다고 해도, 고려됨을 이해하여야 한다.
- [0201] 앞서의 내용 외에도, 본 발명은 추가의 측면으로서, 어떠한 방식으로든 위에서 구체적으로 언급한 변형들보다 영역면에서 협소한 본 발명의 모든 구체예를 포함한다. 속(genus)으로서 기술된 본 발명의 측면들과 관련하여, 모든 개개 종들은 개별적으로 본 발명의 별개의 측면들로 고려된다. 범위로서 기술된 측면들에 대하여, 모든 소범위들 및 개개의 값들은 구체적으로 고려된다.
- [0202] 본 발명의 출원인(들)이 본원에 첨부된 특허청구범위의 모든 범위를 발명하였지만, 본원에 첨부된 특허청구범위는 다른 것들의 선행 기술의 작업을 이들의 영역내에 포함함을 의도하지는 않는다. 따라서, 특허청구범위의 범위내 법정 선행 기술이 특허청 또는 다른 실체 또는 개인에 의해 출원인들의 주의를 기울인다 해도, 출원인(들)은 적용가능한 특허법하에서 보정 권리를 발휘할 권리를 가짐으로써 이러한 법정 선행 분야 또는 법정 선행

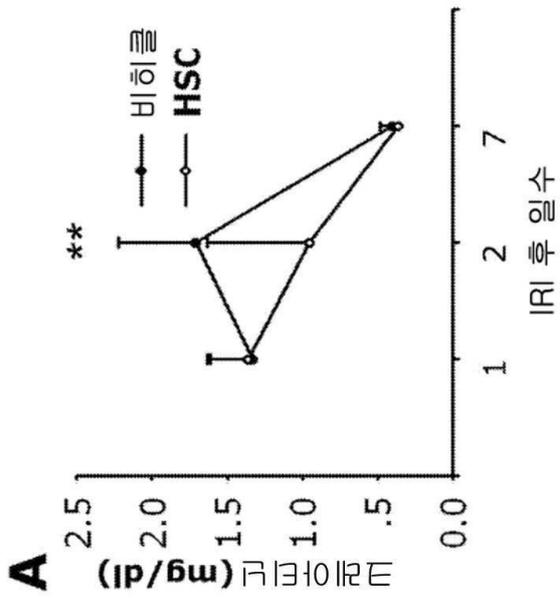
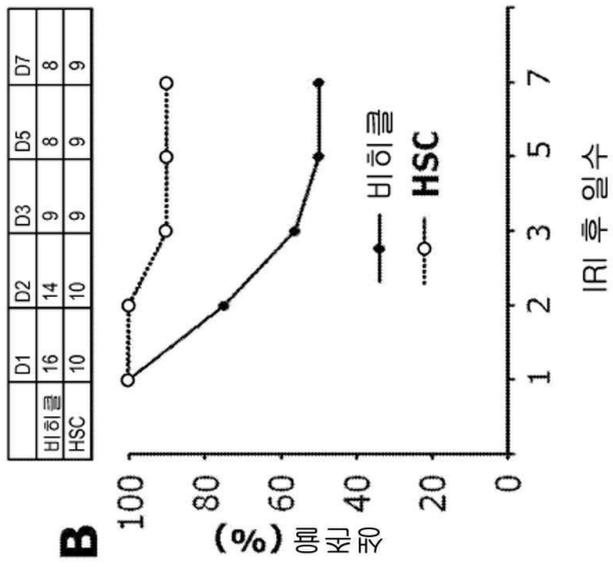
분야의 명백한 변화가 이러한 특허청구범위의 범위로부터 구체적으로 배제되도록 이러한 특허청구범위의 주제를 재정의한다. 이러한 보정된 특허청구범위에 의해 정의된 본 발명의 변화는 또한 본 발명의 측면으로 의도된다. 본 발명의 추가의 특징들 및 변화들은 본원의 전체로부터 당해 분야의 숙련자에게 명백할 것이며, 모든 이러한 특징들은 본 발명의 측면들로서 의도된다.

도면

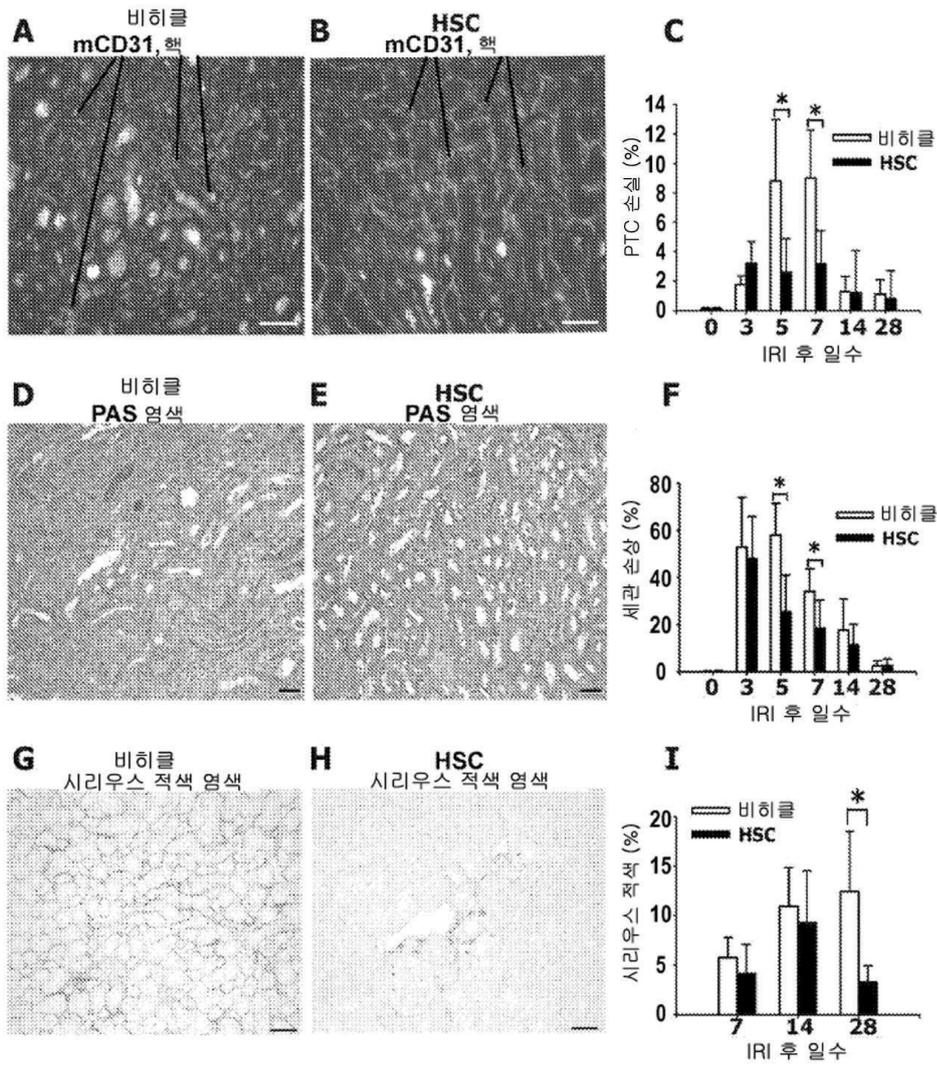
도면1



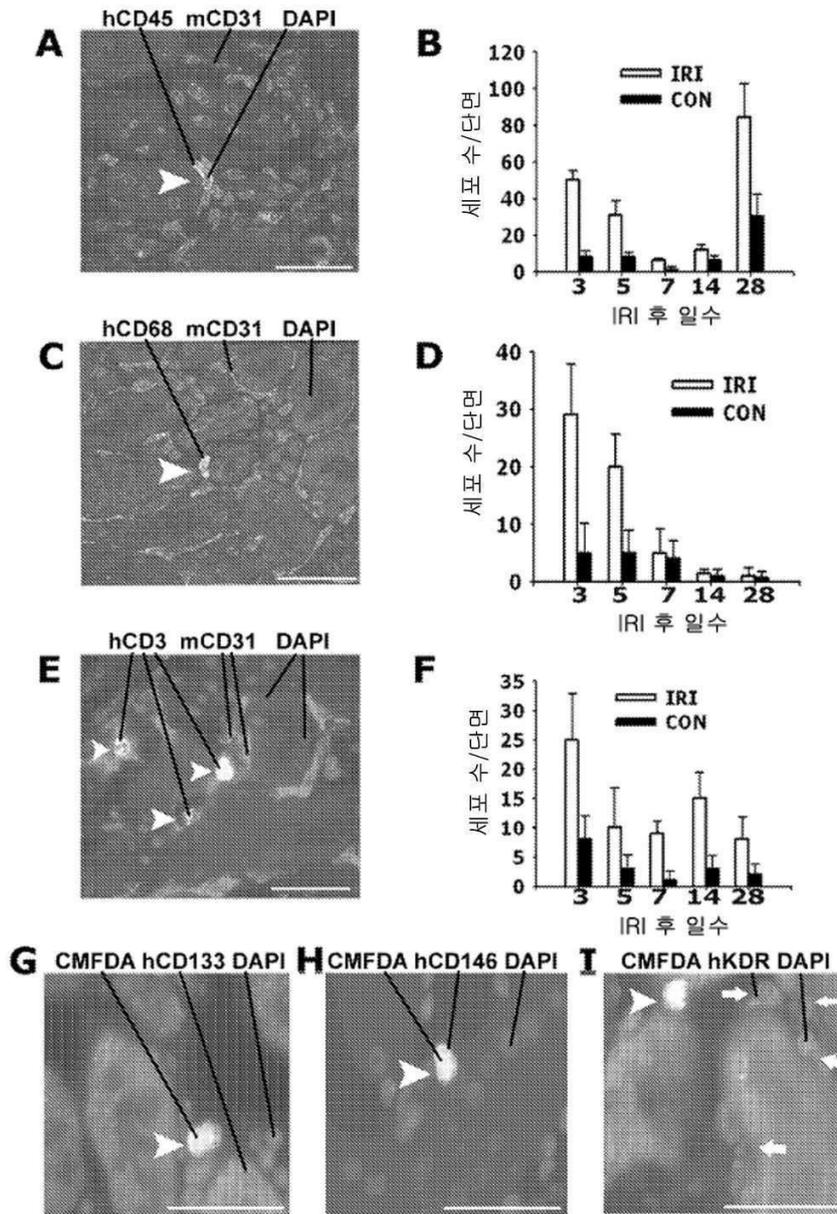
도면2



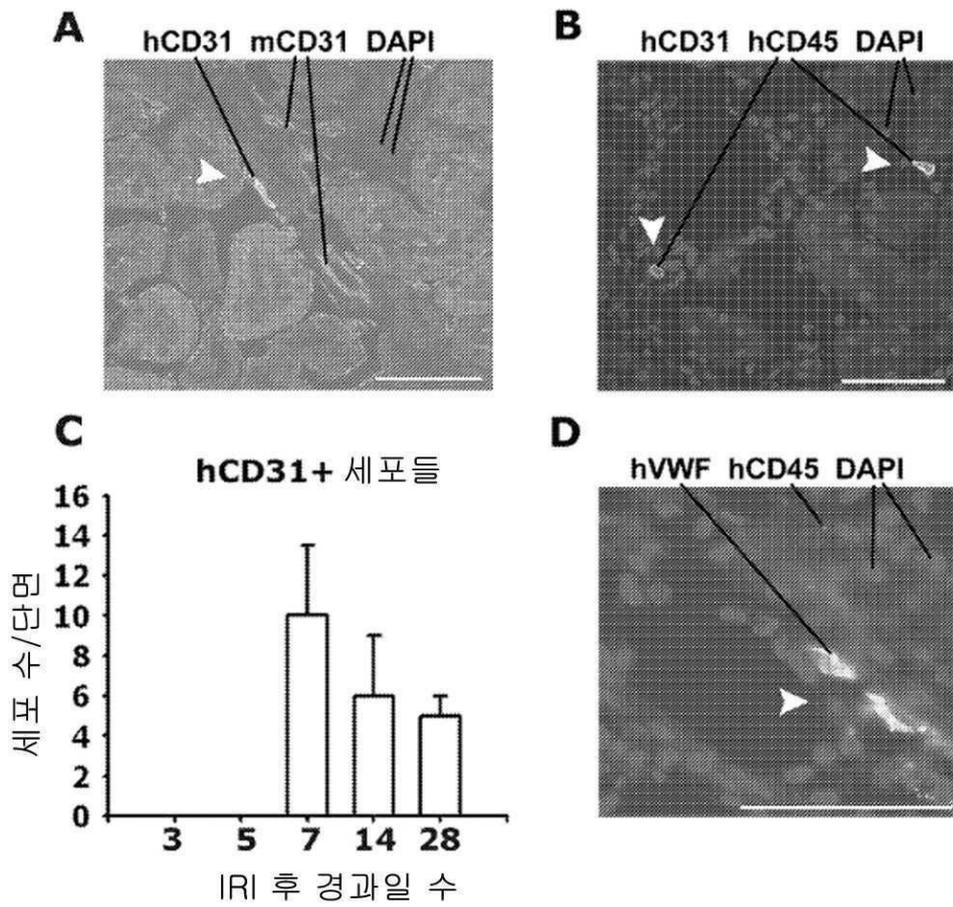
도면3



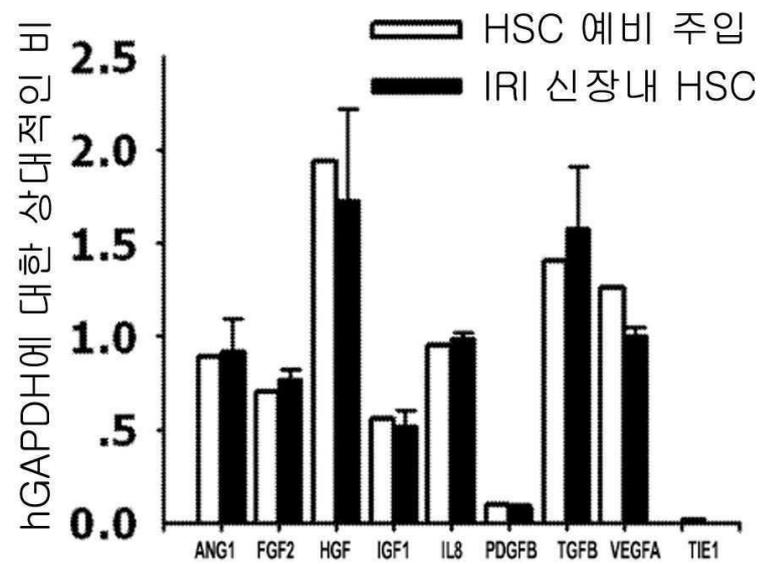
도면4



도면5



도면6



도면7

