

명세서

발명의 명칭: 중간엽 줄기세포 및 혈관내피전구세포를 유효성분으로 포함하는 폐쇄성 혈관질환 또는 이의 합병증 예방 또는 치료용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 중간엽 줄기세포 및 혈관내피전구세포를 유효성분으로 포함하는 폐쇄성 혈관질환 또는 이의 합병증 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 혈관내피전구세포 (EPC: endothelial progenitor cell)는 말초혈액에서 최초로 규명된 세포로 혈관 신생을 촉진하는 세포이다.
- [3] 새로운 혈관은 신생혈관형성 (angiogenesis), 동맥신생 (arteriogenesis) 및 맥관형성 (vasculogenesis) 과정에 의해 생성되는데, 신생혈관형성 과정은 이미 존재하는 성숙한 혈관내피세포 (endothelial cell)들로부터 자라나는 혈관내피세포의 증식 및 이동과 관련이 있으며, 동맥신생은 이미 존재하는 소동맥 연결 (arteriolar connection)을 측부혈관 (collateral vessels)으로 리모델링하는 과정이며, 맥관형성은 혈관내피전구세포 (endothelial progenitor cells)가 성숙한 혈관 내피세포로 분화되는 과정을 통해 진행된다. 따라서 골수로부터 나와서 순환하는 혈관내피전구세포는 혈관 손상 부위로 이동하고, 새롭게 형성되는 혈관으로의 직접적인 삽입 또는 다양한 신생혈관형성 및 영양 인자들의 분비를 통해 새로운 혈관 형성에 관여한다.
- [4] 따라서 혈관내피전구세포는 재생의학 분야 및 재혈관신생을 통한 치료목적에 잠재적인 표적으로 주목받고 있다. 이에 혈관내피전구세포의 기능을 증가시키기 위한 연구가 진행되고 있는데, 일 예로 생체 외 (ex vivo) 유전자를 변형시킨 재조합 EPCs의 제조에 대한 연구가 진행된 바 있고, 혈관내피 성장인자 (vascular endothelial growth factor (VEGF) 또는 저산소증 유도인자-1 α (hypoxiainducible factor-1 α)를 이용하여 EPCs의 신생혈관형성 능력 (pro-angiogenic capacity)을 증가시키는 기술이 연구된 바 있다.
- [5] 한편, 현재 폐쇄성 혈관질환에서의 세포치료로 이용되는 크게 2가지 세포로 나누어진다. 허혈 환경 (Ischemic niche)에서의 직접적으로 혈관으로 분화할 수 있는 G-CSF mobilized MNC와 BM (Bone Marrow)-EPC와 혈관을 생성에 기여하는 growth factor를 다량으로 분비하여 간접적으로 혈관 형성의 도움을 주는 Paracrine effect 방식의 BM-MSC (중간엽 줄기세포)와 ADSC (지방유래줄기세포)가 있다.
- [6] 그러나, 이들 세포치료 방식은 단일 세포 투여이기 때문에 복잡한 구조의 혈관으로의 분화 및 기능이 어려우며, 직접적인 혈관 형성 없이 paracrine effect만으로 치료적 효과를 기대하기란 어렵다는 한계가 있다. 이러한 혈관

구조적 기능적 문제를 해결하기 위해서는, 혈관내피세포 (Endothelial cell) 뿐만 아니라 혈관주위세포 (Pericyte) 특히 arteriole 등의 재생을 위해서는 평활근세포 (smooth muscle cells) 의 역할이 중요한데, 중간엽 줄기세포가 이러한 혈관주위세포 및 평활근 세포 역할을 하여 형성된 혈관의 안정 및 기능에 기여한다고 알려져 있다.

- [7] 이에 따라 본 발명자들은 기존의 단일 투여 방식이 아닌 복합 투여 방식으로 Ischemic niche에서 혈관내피세포로 직접적인 분화할 수 있는 혈관내피세포 및 혈관주위세포 및 평활근 세포의 역할이 가능한 골수 유래 중간엽 줄기세포를 복합 처리하는 경우, 하지동맥 폐쇄성 질환에서의 안정적인 혈관을 형성하고 혈류량을 회복하는 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [8] 본 발명의 목적은 혈관내피전구세포 및 중간엽 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 폐쇄성 혈관질환 또는 이로 인한 궤양 예방 또는 치료용 세포치료제 조성물을 제공하는 데 있다.
- [9] 또한, 본 발명의 다른 목적은 폐쇄성 혈관질환 또는 이로 인한 궤양 예방 또는 치료용 세포치료제의 제조방법을 제공하는 데 있다.
- [10] 또한, 본 발명의 다른 목적은 혈관내피전구세포 및 중간엽 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 폐쇄성 혈관질환 또는 이로 인한 궤양 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 데 있다.
- [11] 또한, 본 발명의 다른 목적은 폐쇄성 혈관질환 또는 이로 인한 궤양 예방 또는 치료방법을 제공하는 데 있다.

과제 해결 수단

- [12] 상기와 같은 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 혈관내피전구세포 및 중간엽 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 폐쇄성 혈관질환 또는 이로 인한 궤양 예방 또는 치료용 세포치료제 조성물을 제공한다.
- [13] 이어서, 본 발명은 혈관내피전구세포 및 중간엽 줄기세포를 혼합하는 단계를 포함하는 폐쇄성 혈관질환 또는 이로 인한 궤양 예방 또는 치료용 세포치료제의 제조방법을 제공한다.
- [14] 나아가, 본 발명은 혈관내피전구세포 및 중간엽 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 폐쇄성 혈관질환 또는 이로 인한 궤양 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [15] 마지막으로, 본 발명은 상기 약학 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 폐쇄성 혈관질환 또는 이로 인한 궤양 예방 또는 치료방법을 제공한다.

발명의 효과

- [16] 본 발명은 혈관내피전구세포 및 중간엽 줄기세포를 복합 처리하는 경우, 혈관형성능이 현저히 향상되는 것을 확인함으로써, 폐쇄성 혈관질환 또는 이로

인한 궤양 예방 또는 치료를 위한 새로운 세포치료제 및 이의 제조방법을 제공할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [17] 도 1은 혈류량 분석 실험 방법을 간략히 나타낸 사진이다.
- [18] 도 2는 형광 영상 분석기를 통한 DiR-EL-100의 분포 시험 방법을 간략히 나타낸 사진이다.
- [19] 도 3은 세포 비율변화에 따른 혈관망 형성능 관찰 결과를 나타낸 사진이다.
- [20] 도 4는 배양기간에 따른 혈관망 형성능 관찰 결과를 나타낸 사진이다.
- [21] 도 5는 폐쇄성 혈관질환 동물모델에서 복합 줄기세포에 의한 혈류량 회복에 의한 족부 보존 실험 결과를 나타낸 사진이다.
- [22] 도 6은 복합 줄기세포에 의한 생체 내 혈관망 형성능 관찰 결과를 나타낸 사진이다.
- [23] 도 7은 복합 줄기세포의 생체 내 세포의 이동 및 잔존 여부 확인 결과를 나타낸 사진 및 그래프이다.
- [24] 도 8은 복합 줄기세포의 장기 체내 분포 관찰 결과를 나타낸 사진이다.
- [25] 도 9는 복합 줄기세포 투여 후 조직 분석 결과를 나타낸 사진이다.
- [26] 도 10은 복합 줄기세포의 투여용량별 치료 효능 평가 실험의 모식도이다.
- [27] 도 11은 복합 줄기세포의 투여용량별 수술 병변의 외형변화 관찰 결과를 나타낸 사진 및 그래프이다.
- [28] 도 12는 복합 줄기세포의 투여용량별 혈류량 분석 결과를 나타낸 사진 및 그래프이다.
- [29] 도 13은 복합 줄기세포의 허혈 조직에서의 혈관망 형성능 관찰 결과를 나타낸 사진이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [30] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 실시예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허 청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.
- [31] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어 (terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 “포함”한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라

다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

- [32] 본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 '%'는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는 (w/w) %, 고체/액체는 (w/v) %, 그리고 액체/액체는 (v/v) %이다.
- [33] 본 발명의 "혈전"은 혈액 인자의 응집물로서, 주로 혈소판 및 피브린의 응집물로 이루어지며, 통상적으로 혈관의 과도한 출혈을 막기 위하여 형성된다. 혈소판이 내피하층의 표명과 접촉시 혈전을 생성시켜 혈관계를 차단하는 반응이 개시되는데 이러한 과정을 지혈이라고 하고, 상기 과정은 상처 부위에서 과도한 출혈을 막는데 매우 중요하다. 동맥 혈전은 국소 폐색에 의한 심각한 질환을 야기하는 반면, 정맥 혈전은 주로 원거리 폐색, 또는 색전을 야기한다.
- [34] 이때, "폐색 (occlusion)"은 혈관이 완전히 막히거나 또는 부분적으로 막혀 혈관이 좁아져 있는 상태를 포괄하는 용어이다. 폐색의 정도는 측정된 혈류량에 기초하여 판단될 수 있다. 즉, 폐색의 정도는 부분적 폐색 (partial occlusion) 또는 완전 폐색 (complete occlusion)으로 분류되며, 부분적 폐색은 정상 혈류량 (baseline blood flow)의 50-60% 수준으로 감소된 경우를 의미하며, 완전 폐색은 90-100% 수준으로 감소된 경우를 의미한다.
- [35] 현재 폐쇄성 혈관질환에서의 세포치료로 이용되는 크게 2가지 세포로 나누어진다. 허혈 환경 (Ischemic niche)에서의 직접적으로 혈관으로 분화할 수 있는 G-CSF mobilized MNC와 BM (Bone Marrow)-EPC와 혈관을 생성에 기여하는 growth factor를 다량으로 분비하여 간접적으로 혈관 형성의 도움을 주는 Paracrine effect 방식의 BM-MSC (중간엽 줄기세포)와 ADSC (지방유래줄기세포)가 있다.
- [36] 그러나, 이들 세포치료 방식은 단일 세포 투여이기 때문에 복잡한 구조의 혈관으로의 분화 및 기능이 어려우며, 직접적인 혈관 형성 없이 paracrine effect만으로 치료적 효과를 기대하기란 어렵다는 한계가 있다.
- [37] 이에 본 발명자들은 기존의 단일 투여 방식이 아닌 복합 투여 방식으로 Ischemic niche에서 혈관내피세포로 직접적인 분화할 수 있는 혈관내피세포 및 혈관주위세포 및 평활근 세포의 역할이 가능한 골수 유래 중간엽 줄기세포를 복합 처리하는 경우, 하지동맥 폐쇄성 질환에서의 안정적인 혈관을 형성하고 혈류량을 회복하는 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.
- [38] 따라서, 본 발명은 혈관내피전구세포 및 중간엽 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 폐쇄성 혈관질환 또는 이로 인한 궤양의 예방 또는 치료용 세포치료제 조성물을 제공한다.
- [39] 본 발명에서 사용되는 용어 "중간엽 줄기세포 (MSC)"는 뼈, 연골, 지방, 근육세포를 포함하는 다양한 중배엽성 세포로 분화할 수 있는 다분화능 줄기세포 (multipotent stem cell)를 의미한다. 상기 중간엽 줄기세포는 제대, 제대혈, 골수, 지방, 근육, 신경, 피부, 양막, 융모막, 탈락막 또는 태반에서 유래된 것일 수 있고, 바람직하게는 인간 골수 유래 중간엽 줄기세포 (BM-MSC, Bone

Marrow- Mesenchymal Stem Cell)일 수 있다. 중간엽 줄기세포는 신체 손상이 발생된 부위로 직접 이동하여 손상된 조직 및 세포를 재생하는 능력을 가지고 있고 체외에서 쉽게 증식할 수 있으며, 여러 가지 세포형태로 분화가 가능한 다분화능 세포로 유전자 치료와 세포 치료에 있어서 유용한 표적으로 이용되고 있다.

- [40] 또한, 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 혈관내피 전구세포 및 중간엽 줄기세포는 2:1의 비율로 혼합되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [41] 또한, 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 혈관내피전구세포 및 중간엽 줄기세포는 인간 골수 유래 중간엽 줄기세포인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [42] 또한, 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 폐쇄성 혈관질환은 뇌혈관질환 (cerebrovascular disease, CVD), 심혈관질환 (cardiovascular disease), 동맥경화성 혈관질환 (arteriovascular disease), 관상동맥질환 (coronary artery disease, CAD) 및 말초혈관질환 (peripheral artery disease, PAD)으로 이루어진 군에서 선택되는 질환일 수 있으며, 바람직하게는 관상동맥질환 (coronary artery disease, CAD) 및 말초혈관질환 (peripheral artery disease, PAD)일 수 있다. 구체적으로, 상기 폐쇄성 혈관질환은 뇌졸중, 뇌경색, 뇌혈전증, 뇌색전증, 열공성 뇌경색, 급성 관동맥 증후군, 협심증, 대동맥 협착증, 심근경색증, 각차단, 뇌허혈, 급성 허혈성 심혈관질환 (acute ischemic arteriovascular event), 혈전성 정맥염, 정맥혈전색전증, 심부정맥혈전증 (deep vein thrombosis), 폐색전증 (pulmonary embolism), 말초혈관질환, 아테롬성 동맥경화증, 혈관경련, 재협착증, 혈관염에 의한 혈관 폐색증 등이 포함된다.
- [43] 본 발명에서 사용되는 용어 "뇌혈관질환 (cerebrovascular disease, CVD)"이란 산소-풍부 혈액을 안면 및 뇌에 공급하는 혈관에서 일어나는 동맥경화성 혈관질환으로, 일반적으로 CAD 및/또는 PAD (peripheral artery disease)와 함께 발생하는 동반질환 (comorbid disease) 뿐 아니라, 허혈성 질환 또는 혈류량의 부족을 야기하는 질환도 포함한다. 예를 들어, CVD는 허혈성 뇌혈관질환, 급성 뇌경색, 뇌졸중, 허혈성 뇌졸중, 출혈성 뇌졸중, 정맥류, 경증인지장애 (mild cognitive impairment, MCI) 또는 일과성 허혈발작 (transient ischemic attacks, TIA)을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [44] 본 발명에서 사용되는 용어 "심혈관질환 (cardiovascular disease)" 또는 "동맥경화성 혈관질환 (arteriovascular disease)"이란 심장, 심장 판막, 혈액 및 몸의 혈관구조 (vasculature)에 영향을 미치는 수많은 상태를 분류하는데 이용되는 일반적인 용어로, 심장 또는 혈관에 영향을 미치는 질병들을 포함한다. 바람직하게는, 대사증후군, 증후군X, 아테롬성 동맥경화증, 죽상혈전증, 관상동맥질환, 안정 및 불안정 협심증, 뇌졸중, 대동맥 협착증 또는 대동맥류 같은 대동맥 질환, 뇌혈관질환, 말초혈관질환 또는 급성 허혈성 동맥경화성 이벤트를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [45] 본 발명에서 사용되는 용어 “관상동맥질환 (coronary artery disease, CAD)”이란 심근에 혈액을 공급하는 동맥 (관상동맥)이 죽상경화 (atherosclerotic), 칼슘 침전에 의한 경화 및/또는 좁아져서 발생하는 동맥경화성 혈관질환을 의미한다. CAD는 심근으로의 혈류량 감소를 초래하며 이에 따라 심근이 충분한 양의 산소를 공급받지 못하고 궁극적으로 괴사 (necrosis)를 야기한다. CAD는 급성 관상동맥증후군, 심근경색 (심장마비), 협심증 (안정 및 불안정) 또는 심장으로 혈액을 공급하는 혈관에서 발생하는 아테롬성 동맥경화증 및 죽상혈전증을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [46] 본 발명에서 사용되는 용어 “말초혈관질환 (peripheral artery disease, PAD)”이란 심장 및 뇌 이외의 곳에서 발생하는 아테롬성 동맥경화증 및 죽상혈전증 같은 질환으로 일반적으로 CAD와 함께 발생하는 동반질환 (comorbid disease)을 포함한다.
- [47] 본 발명에서 사용되는 용어 “궤양 (ischaemic ulcer)”은 점막근육판을 넘어 조직이 결손되는 상태를 말하고, 본 발명에서는 정맥성 궤양 (venous ulcer) 또는 말초정맥질환 (peripheral vascular disease, PVD)으로 인한 궤양인 울혈성 궤양 (stasis ulcer), 동맥성 궤양 (arterial ulcer)인 허혈성 궤양 (ischemic ulcer) 또는 당뇨병 환자에서 흔히 나타내는 궤양인 말초신경병증 궤양 (neuropathic ulcer)을 의미한다.
- [48] 또한, 상기 혈관내피 전구세포는 개체에 투여 시 혈관 세포에 위치하는 것일 수 있다.
- [49] 또한, 상기 중간엽 줄기세포는 개체에 투여 시 혈관주위세포 (pericyte)에 위치하는 것일 수 있다.
- [50] 또한, 상기 개체는 치료, 관찰 또는 실험의 대상인 포유동물을 의미하며, 바람직하게는 인간을 의미한다.
- [51] 본 발명에서 사용되는 용어 “혈관주위세포 (pericyte)”는 혈관내피와 특이한 국소접촉을 형성하는, 미세혈관계의 기저막 내에 위치한 혈관 벽세포를 의미한다. Rouget 세포, 외막세포 (adventitial cell) 또는 벽세포 (mural cell)로도 불리는 소혈관 주위의 결합조직 세포로, 혈관내피 외부의 10% 내지 50%를 둘러싸고 있는 것으로 알려져 있다. 가늘고 긴 수축성 세포이며 기저막 외부에서 모세혈관전세동맥 주위를 싸고 있다.
- [52] 상기 혈관주위세포는 상대적으로 미분화된 다분화능 세포이며 혈관을 지지하는 기능을 하고, 필요에 따라서 섬유아세포, 평활근 또는 대식세포로도 분화할 수 있다. 또한, 상기 혈관주위세포는 혈관신생뿐 아니라 혈-뇌 장벽 안정성에 중요한 역할을 하며, 혈관 내 세포에 대한 접착력으로 미세혈관계에서 혈류를 조절할 수 있다.
- [53] 그러므로 본 발명에 따른 상기 세포치료제는 혈관내피전구세포 및 중간엽 줄기세포의 복합 투여를 통해 혈관신생, 혈관재생 및 혈관장벽의 안정성을 더욱 증진시킬 수 있다.

- [54] 본 발명에서 사용되는 용어 "세포치료제"는 개체로부터 분리, 배양 및 특수한 조작을 통해 제조된 세포 및 조직으로 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품 (미국 FDA 규정)으로서, 세포 혹은 조직의 기능을 복원시키기 위하여 살아있는 자가, 동종 또는 이종세포를 체외에서 증식 선별하거나 다른 방법으로 세포의 생물학적 특성을 변화시키는 등의 일련의 행위를 통하여 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품을 의미한다.
- [55] 상기 세포치료제 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 비경구의 경로를 통하여 투여될 수 있다. 비경구 투여, 예를 들어 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [56] 본 발명의 세포치료제 조성물은 동결되지 않은 채 사용되거나 차후 사용을 위해 동결될 수 있다. 동결되어야 할 경우, 표준 냉동보존제 (예를 들어 DMSO, 글리세롤, 에피라이프 (Epilife®) 세포 동결 배지 (Cascade Biologics))가 동결 전 세포 집단에 첨가될 수 있다.
- [57] 또한, 상기 세포치료제 조성물은 약학 분야의 통상의 방법에 따라 환자의 신체 내 투여에 적합한 단위투여형의 약학 제제로 제형화시켜 투여할 수 있으며, 상기 제제는 1회 또는 수회 투여에 의해 효과적인 투여량을 포함한다. 이러한 목적에 적합한 제형으로는 비경구투여 제제로서 주사용 앰플과 같은 주사제, 주입 백과 같은 주입제, 및 에어로졸 제제와 같은 분무제 등이 바람직하다. 상기 주사용 앰플은 사용 직전에 주사액과 혼합 조제할 수 있으며, 주사액으로는 생리 식염수, 포도당, 만니톨, 링거액 등을 사용할 수 있다. 또한, 주입 백은 염화 폴리비닐 또는 폴리에틸렌 재질의 것을 사용할 수 있으며, 박스터 (Baxter), 벡톤 디킨슨 (Becton Dickinson), 메드셉 (Medcep), 내셔널 호스피탈 프로덕츠 (National Hospital Products) 또는 테루모 (Terumo) 사의 주입 백을 예시할 수 있다.
- [58] 상기 약학 제제에는 상기 유효성분 외에 하나 또는 그 이상의 약학으로 허용가능한 통상의 불활성 담체, 예를 들어, 주사제의 경우에는 보존제, 무통화제, 가용화제 또는 안정화제 등을, 국소 투여용 제제의 경우에는 기제 (base), 부형제, 윤활제 또는 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [59] 또한, 상기 세포치료제 조성물은 상기 세포들을 수용하기 위한 지지체, 바람직하게는 생분해성 지지체를 더 포함 할 수 있다. 상기 생분해성 지지체는 피브린 글루, 히알루론산, 젤라틴, 콜라겐, 알긴산, 셀룰로오스, 펙틴, 키틴, 폴리글라이콜산, 또는 폴리유산과 같은 하이드로겔일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [60] 또한, 상기 세포치료제 조성물은 약학으로 허용가능한 담체를 더 포함할 수 있으며, 상기 약학으로 허용가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1종 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액 및 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다.

- [61] 상기 완충액은 선택적으로 아세테이트, 시트레이트, 타르트레이트, 락테이트, 숙시네이트, 또는 포스페이트일 수 있다. 상기 안정제는 만니톨, 히스티딘, 리신, 글리신, 수크로스, 프럭토스, 트레할로스, 락토스 또는 이들의 혼합물일 수 있다. 상기 등장제는 글리세린, 락토스, 만니톨, 텍스트로스, 염화나트륨, 황산나트륨 또는 소르비톨일 수 있다. 상기 항산화제는 아세톤, 중아황산나트륨, 부틸화 히드록시 아니솔, 부틸화 히드록시톨루엔, 시스테인, 시스테이네이트 HCl, 디티오나이트 나트륨, 겐티스산, 겐티스산 에탄올아민, 글루타메이트모노나트륨, 포름알데히드 술폰실레이트 나트륨, 메타비술파이트 포타슘, 메타비술파이트 나트륨, 모노티오글리세롤, 프로필 갈레이트, 아황산나트륨, 티오글리콜레이트 나트륨, 또는 아스코르브산일 수 있다. 상기 벌크화제는 만니톨, 글리신, 락토스, 수크로스, 트레할로스, 텍스트린, 히드록시에틸 스타치, 피콜 또는 젤라틴일 수 있다.
- [62] 이렇게 제조된 본 발명의 세포치료제 조성물 또는 약학 제제는 당업계에서 통상적으로 사용하는 투여방법을 이용하여 이식 및 기타 용도에 사용되는 다른 줄기세포와 함께 또는 그러한 줄기세포와의 혼합물의 형태로 투여될 수 있으며, 바람직하게는 치료가 필요한 환자의 질환 부위에 직접 생착 또는 이식하거나 복강에 직접 이식 또는 주입하는 것이 가능하나 이에 한정되지는 않는다. 또한, 상기 투여는 카테터를 이용한 비외과적 투여 및 질환부위 절개 후 주입 또는 이식 등 외과적 투여방법 모두 가능하나 카테터를 이용한 비외과적 투여방법이 보다 바람직하다. 또한 통상의 방법에 따라 비경구적으로, 예를 들면 직접 병변에 투여하는 것 외에 조절계 줄기세포 이식의 일반적 방법인 혈관 내 주입에 의한 이식도 가능하다.
- [63] 또한, 혈관내피전구세포 및 중간엽 줄기세포의 혼합물의 1일 투여량은 1.0×10^4 내지 1.0×10^{10} 세포/kg 체중, 바람직하게는 1.0×10^5 내지 1.0×10^9 세포/kg 체중, 더욱 바람직하게는 1.2×10^5 내지 1.2×10^7 세포/kg을 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나, 유효성분의 실제 투여량은 치료하고자 하는 질환, 질환의 중증도, 투여경로, 환자의 체중, 연령 및 성별 등의 여러 관련 인자에 비추어 결정되어야 하는 것으로 이해되어야 하며, 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [64] 이어서, 본 발명은 혈관내피전구세포 및 중간엽 줄기세포를 혼합하는 단계를 포함하는 폐쇄성 혈관질환 또는 이로 인한 궤양 예방 또는 치료용 세포치료제의 제조방법을 제공한다.
- [65] 본 발명의 세포치료제의 제조방법은 상술한 세포치료제를 포함하기 때문에, 상술한 본 발명의 세포치료제와 중복된 내용은 중복된 내용의 기재에 의한 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.
- [66] 나아가, 본 발명은 혈관내피전구세포 및 중간엽 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 폐쇄성 혈관질환 또는 이로 인한 궤양 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

- [67] 본 발명의 약학 조성물은 상술한 혈관내피전구세포 및 중간엽 줄기세포를 포함하기 때문에, 상술한 본 발명의 혈관내피전구세포 및 중간엽 줄기세포와 중복된 내용은 중복된 내용의 기재에 의한 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.
- [68] 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여, 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [69] 본 발명에 따른 조성물은 약학으로 유효한 양의 혈관내피전구세포 및 중간엽 줄기세포의 혼합물을 단독으로 포함하거나 하나 이상의 약학으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다. 상기에서 약학으로 유효한 양이란 면역질환의 증상을 예방, 개선 및 치료하기에 충분한 양을 말한다. 상기에서 "약학으로 허용되는"이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 조성물을 말한다.
- [70] 또한, 약학으로 허용 가능한 담체를 포함하는 조성물은 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 생리식염수, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시 벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유, 텍스트린, 칼슘카보네이트, 프로필렌글리콜 및 리퀴드 파라핀으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 통상의 담체, 부형제 또는 희석제 모두 사용 가능하다. 상기 성분들은 상기 유효성분인 혈관내피전구세포 및 중간엽 줄기세포의 혼합물에 독립적으로 또는 조합하여 추가될 수 있다.
- [71] 또한, 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함될 수 있으며, 이러한 고형제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스 (sucrose) 또는 락토오스 (lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [72] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁용제, 유제,

동결건조제제, 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기재로는 위텟솔 (witepsol), 마크로골, 트윈 (tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[73] 또한, 본 발명의 약학 조성물은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제 및 좌제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형을 가질 수 있다. 좌제의 기재로는 위텟솔 (witepsol), 마크로골, 트윈 (tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[74] 또한, 본 발명의 혈관내피전구세포 및 중간엽 줄기세포의 혼합물의 인체에 대한 효과적인 투여량은 환자의 나이, 몸무게, 성별, 투여형태, 건강상태 및 질환 정도에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로 약 0.01-1000 mg/kg/일이며, 바람직하게는 0.01-350 mg/kg/일이다. 몸무게가 60kg인 성인 환자를 기준으로 할 때, 일반적으로 0.6-60000 mg/일이며, 바람직하게는 0.6-2100 mg/일이며, 의사 또는 약사의 판단에 따라 일정시간 간격으로 1일 1회 내지 수회로 분할 투여할 수도 있다.

[75] 마지막으로, 본 발명은 상기 약학 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 폐쇄성 혈관질환 또는 이로 인한 궤양의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

[76] 본 발명에서, 용어 "개체"란 질병의 예방, 조절 또는 치료방법을 필요로 하는 대상을 의미하고, 사람, 개, 원숭이, 고양이, 설치류, 예컨대 마우스, 유전자 조작된 마우스 등 제한 없이 사용될 수 있다. 보다 구체적으로는, 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐 (mouse), 쥐 (rat), 개, 고양이, 말, 소 등의 포유류를 의미한다.

[77] 본 발명의 약학 조성물은 치료학적으로 유효한 양 또는 약학으로 유효한 양으로 투여될 수 있다.

[78] 본 발명에서, 용어 "치료학적으로 유효한 양"은 대상 질환을 예방 또는 치료하는데 유효한 조성물의 약학으로 허용가능한 염의 양을 의미하며, 본 발명의 조성물의 치료적으로 유효한 양은 여러 요소, 예를 들면 투여방법, 목적부위, 환자의 상태 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 인체에 사용 시 투여량은 안전성 및 효율성을 함께 고려하여 적정량으로 결정되어야 한다. 동물실험을 통해 결정한 유효량으로부터 인간에 사용되는 양을 추정하는 것도 가능하다. 유효한 양의 결정시 고려할 이러한 사항은, 예를 들면 Hardman and Limbird, eds., Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th ed. (2001), Pergamon Press; 및 E.W. Martin ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed. (1990), Mack Publishing Co.에 기술되어있다.

[79] 본 발명에서, 용어 "약학으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지

량을 정도의 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 건강상태, 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여, 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

- [80] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [81] <실시예 1> 실험재료 및 방법
- [82] 1-1. 세포 배양
- [83] 인간 골수 단핵구 세포 (MNC)를 준비하여 각 세포 선별배지에서 seeding 후 골수 유래 혈관내피전구세포 및 중간엽 줄기세포의 분리하였다. 인간 골수 단핵구 세포 (MNC)는 STEMCELL Technologies Inc (캐나다 밴쿠버)에서 구입하여 사용하였다.
- [84] EPC 배양을 위해, 분리된 BM-MNC는 I형 콜라겐 (CellMatrix, VA, USA)으로 코팅된 100mm 디쉬에서 내피성장 배지-2 (EGM-2, Lonza, Basel, Switzerland)로 배양하였다. 배지는 7일까지 매일 교체하였고, 이후에는 3일마다 교체하였다. EPC는 70~80 %의 컨플루언스(confluency) 상태에서 계대 배양하였다.
- [85] MSC 배양을 위해서는, BM-MNC를 100mm 디쉬에서 중간엽 줄기세포 성장 배지(Stem MACS, Miltenyi)로 배양하였다. 배지는 3일 마다 교체하였고 70~80 %의 컨플루언스(confluency) 상태에서 계대배양하였다.
- [86] 1-2. 동물 모델의 준비
- [87] Balb/c-nu mouse를 Ketamin (100mg/Kg) 과 Rompun (5mg/kg)을 복강투여 마취 후, 양와위 자세 (supine position)로 눕히고, 의료용 테이프를 이용하여 다리 고정 시킨 후, 피부를 발목부터 넓적다리 부위까지 절개하여, 대퇴동맥 (common femoral artery)을 노출시켰다. 이후 총대퇴동맥 (common femoral artery)을 Needle holder와 봉합 6-0 silk를 이용하여 결찰시켜, 혈류의 흐름을 막아주었다. 천대퇴동맥 (superficial femoral artery)의 proximal부위를 6-0 silk로 이용하여 결찰 시켜주었다. 결찰 진행 시, 천대퇴동맥과 신경과 매우 인접하게 있기 때문에 micro-fine forcep을 이용하여 분리한 후, 봉합 바늘을 조심히 넣은 후 결찰하였다. 천대퇴동맥의 distal 부위를 6-0 silk를 이용하여 결찰시켜 주었다.
- [88] 천대퇴동맥의 Distal 결찰 부위를 micro-fine forceps을 이용하여 잡은 후,

조심스럽게 신경과 분리한 후 들어올려 준 뒤, 수술용 가위를 이용하여 혈관을 제거해주었다. 절개된 피부를 5-0 silk 봉합해준 후, 혈류량을 측정하여 허혈이 나타나는지 여부를 확인하였다. 그 후 포비돈으로 봉합 부위를 소독해주었다.

- [89] 투여 방법은 insulin 주사기 (1 mL, 29G)를 이용하여 천대퇴동맥 제거한 혈관 근처인 허혈 구역 (IR) 근육부위에 2.0 mm ~ 2.5 mm 간격으로 5곳 (Yellow spot)으로 나누어 한 spot당 10 μ L씩 투여하여 총 50 μ L를 최초 1회만 투여하였다.

[90] **1-3. 면역형광염색**

- [91] 건조가 완료된 슬라이드를, Xylene을 통해서 탈파라핀 시킨 후, 고농도 알코올에서 저농도 알코올로 거친 후 수세해주었다. 조직 슬라이드를 완충 용액인 0.01M 구연산 (pH 6.0) 담근 후 전자레인지에서 10분 동안 가열하고 상온에서 충분히 식힌 후, PBS 세척하였다. 조직의 Autofluorescence 막기 위해, 0.1% sodium borohydride (in PBS) 상온에서 차광 유지하며 1시간 담가 놓고 PBS로 충분히 세척해주었다. 항체 침투를 위해 0.1% Triton-X에 10분 담가 놓은 후 워싱하였다. 2% NHS로 blocking 용액을 만든 후 상온에서 1시간 처리하였다.

- [92] 이어서, 희석한 1차 항체 (primary Ab)를 처리하였다. 4°C 온도로 overnight 동안 차광상태로 보관하며, 마르지 않도록 주의한다. 충분히 PBS로 washing한 후, 2차 항체 (Second Ab)를 상온에서 1시간 처리하였다. 2% NHS blocking 용액에 WGA를 5 μ g/mL 농도로 희석한 후 37°C에서 1시간 처리하고, DAPI를 10~20 μ M 농도로 DW에 희석한 후 상온에서 5분 처리하였다.

[93] **1-4. 혈류량 분석 (Doppler test)**

- [94] Laser doppler 장비 설치 및 기기 작동시킨 후 (도 1A), 마우스 동물모델의 복부 부위를 알코올 솜으로 소독하고, ketamine과 rompun을 복강 주사하여 마취를 진행하였다 (도 1B). 이후 마우스 동물모델을 복위 (prone) 자세로 눕힌 후 Laser doppler 장비를 이용하여 혈류량을 측정하였다 (도 1C, D).

[95] **1-5. 튜브 형성 어세이 (tube formation assay)**

- [96] Matrigel (Corning Inc, NY, USA)을 웰당 10 μ L로 μ -슬라이드 (Ibidi, Grafelfing, Germany)에 처리하였다. EPC와 MSC의 혼합 세포를 다양한 비율로 준비한다. 0.2 % FBS가 함유된 α -MEM (GIBCO, NY, USA) 배지로 현탁하고 Matrigel에 시딩한 후, 이후 이미지는 현미경 (Leica)으로 획득하였다.

[97] **1-6. In vivo imaging**

- [98] 형광 영상 분석기 (MaestroII, Whole Body Image)를 통한 DiR-EL-100의 분포 시험은 하기의 방법으로 수행하였다.

- [99] 형광 영상 분석기 (MaestroII) 전원 및 기기와 연결된 컴퓨터의 Maestro software를 켜주고, Initialization될 때까지 1분정도 기다렸다 (도 2A).

- [100] 복부 부위를 알코올 솜으로 소독한 후, ketamine과 rompun을 복강 주사하여 마취를 진행한다. 기기의 문을 연 후, 마취 된 Mouse를 양와위 자세 (Supine position)로 눕힌 후 문을 닫아준다 (도 2B, C).기기의 interior illumination을 누른

- 후, Mouse의 위치 및 촬영 영역을 설정해준다. 적합한 Filter를 선택한 후, 촬영 크기 및 노출 감도 등의 설정하여 최적의 조건을 설정한다 (도 2D)
- [101] Sacrifice 후, 체내 형광 영상 분석기로 (MaestroII) 촬영 후 부검을 실시하였다.복강을 절개하여 복대정맥과 후대정맥을 절단하여 방열치사 시켰다. 주요 장기/조직 (투여 위치인 대퇴근, 간, 비장, 뇌, 신장, 심장, 폐, 장간막 림프절, 투여 위치의 반대쪽 대퇴근) 적출하여, Cold PBS로 충분히 씻어낸다.적출한 장기/조직들을 형광 영상 분석기 (MaestroII)로 촬영한다.
- [102] **1-7. 통계분석**
- [103] 모든 데이터는 평균 $\pm$ 표준 편차로 표시하였고, P 값 < 0.05 미만인 경우 의미있는 값으로 고려하였다 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).
- [104] <실시예 2> 복합 줄기세포의 비율 및 배양기간에 따른 혈관망 형성능 분석
- [105] 혈관내피전구세포 및 중간엽 줄기세포 비율 및 배양기간에 따른 혈관망 형성능 변화를 확인하기 위해, 혈관내피전구세포 및 중간엽 줄기세포를 0:1, 1:0, 2:1, 1:2, 5:1, 10:1 및 100:1의 비율로 혼합한 후 복합줄기세포를 제조하고, 동일한 세포 수의 실험군을 각각 처리하여 혈관망 형성 여부를 관찰하였다. 그 결과는 도 3 및 도 4에 나타내었다.
- [106] 세포 비율별 혈관망 형성능 확인 결과, EPC 단독 처리군 (1:0)에서도 혈관 형성능이 관찰되었으나, 혈관내피전구세포 및 중간엽 줄기세포를 혼합한 복합 줄기세포 처리군에서 우수한 혈관 형성능이 관찰되었다. 특히, 혈관내피전구세포 및 중간엽 줄기세포가 2:1의 비율로 혼합된 복합 줄기세포의 경우 1:2, 5:1, 10:1, 100:1의 비율로 혼합된 복합 줄기세포와 비교하여 현저히 우수한 혈관 형성능을 가지는 것을 확인하였다 (도 3 참조).
- [107] 또한, 배양 기간별 혈관망 형성능 확인 결과, 혈관내피전구세포 및 중간엽 줄기세포를 혼합한 복합 줄기세포 처리군의 경우 단시간내에 정교한 세포 재배열이 관찰되었으나, 혈관내피전구세포 및 fibroblast (LF)를 혼합한 복합 줄기세포의 경우 상기와 같은 세포 재배열이 관찰되지 않았다 (도 4A 참조). 또한, 혈관내피전구세포의 노화에 따라 혈관망 형성능이 감소하나, 혈관내피전구세포 및 중간엽 줄기세포를 혼합하는 경우, 혈관내피전구세포의 노화에 의해 감소된 혈관망 형성능이 회복되는 것을 확인하였다 (도 4B 참조).
- [108] 이러한 결과는 중간엽 줄기세포가 혈관내피전구세포의 혈관 형성능을 현저히 향상시킨다는 것을 의미한다. 이후 실험에서는 혈관망 형성능이 가장 우수한 혈관내피전구세포 및 중간엽 줄기세포가 2:1의 비율로 혼합된 복합 줄기세포를 사용하였다.
- [109] <실시예 3> 폐쇄성 말초동맥 질환에서 복합 줄기세포에 의한 유효성 및 혈관 형성능 분석
- [110] 폐쇄성 말초동맥 질환에서 복합 줄기세포의 유효성 및 혈관 형성능 확인을 위해 하지동맥 폐쇄성 질환 비임상 동물모델에서 혈류량 회복에 따른 족부 보존 여부 및 생체 내에서 복합 줄기세포의 혈관 형성 여부를 확인하였다. 그 결과는

도 5 및 도 6에 나타내었다.

- [111] 하지동맥 폐쇄성 질환 비임상 동물모델에서 혈류량 회복에 따른 족부 보존 여부 확인 결과, 복합 줄기세포가 투여되지 않은 동물모델에서는 족부 보존이 관찰되지 않았으나, 복합 줄기세포가 투여된 동물모델에서 족부 보존이 관찰되었다 (도 5 참조). 또한, 생체 내에서 복합 줄기세포의 혈관 형성 확인 결과, 생체 내에서 혈관내피전구세포 및 중간엽 줄기세포가 복합 줄기세포 투여에 의해 보존된 족부에 존재하는 것을 확인하였다 (도 6 참조).
- [112] <실시예 4> 복합 줄기세포의 이식 후 체내 분포 관찰
- [113] 복합줄기세포의 이식후 체내 분포 관찰을 위해 복합줄기세포 (EPC+MSC) total 1.2×10^6 / Mouse 용량으로 DiR로 염색한 후, balb/c-nu 대퇴근육에 주입 후, 형광영상분석 장비 (Maestro II)의 NIR 파장을 이용하여 생체내 세포의 이동 및 잔존 여부를 형광 신호가 사라질 때까지 지속 관찰하였다. 또한, 형광 신호가 사라진 후 부검하여 장기 및 조직 내의 투여한 복합줄기세포의 잔존여부를 확인하였다. 그 결과는 도 7 및 도 8에 나타내었다.
- [114] 도 7 및 도 8에 나타낸 바와 같이, 대퇴근육에 세포 투여 30분 후에 형광 발현 세기가 가장 강하게 측정되었으며, 2주 (14일) 까지는 높은 수준으로 유지되다가 3주 (21일)까지 형광 세기가 점차 감소하는 경향을 보였다. 또한, 4주 (28일) 후부터는 비슷한 형광 세기로 약 16주 (116일)까지 유지하였으며, 이는 투여한 세포가 체내로 정착했다는 것을 의미한다. 또한, 16주 (116일) 후 복합 줄기세포가 투여된 마우스를 부검한 결과 투여 위치인 대퇴근육에서만 형광 발현이 감지되었으며, 다른 장기 및 조직에서는 형광이 관찰되지 않았다. 즉, 생체내로 이식된 복합줄기세포는 투여 위치에서만 존재하며 다른 조직 및 장기로의 이동하거나 잔류하지 않는다는 것을 의미한다.
- [115] 이어서, 혈관내피전구세포 및 중간엽 줄기세포가 체내에서 각각 어떠한 형태로 존재하는지 확인하기 위해 조직학적 분석을 수행하였으며, 그 결과는 도 9에 나타내었다. 도 9에 나타낸 바와 같이, 혈관내피전구세포 (EPC)는 혈관 세포에 위치해 있으며, 중간엽 줄기세포 (MSC)는 혈관주위세포 (pericyte)에 위치하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 이식 세포가 허혈성 부위에서 유지되며, host tissue내에서 신생혈관형성에 직접 참여했다는 것을 의미한다.
- [116] <실시예 5> 복합 줄기세포의 용량별 치료 효능 평가
- [117] 복합 줄기세포 (EPC+MSC)의 용량별 치료 효능을 평가하기 위해, 세포용량 (이식세포 수)별 수술 병변의 외형 변화 관찰 실험 및 혈류량 측정 실험을 수행하였다. 실험은 하기 표 1의 세포용량으로 1개의 대조군과 4개의 실험군으로 디자인하였으며, 전체 volume은 동일하게 유지하되, 고용량부터 저용량까지 세포를 이식하였고 2주간 관찰하였다 (도 10 참조). 그 결과는 도 11 및 도 12에 나타내었다.
- [118] [표 1]

- [119]
- | Group | 이식세포수 (세포용량) | | | |
|-------|--------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | 용량범위 | EPC | MSC | Total |
| G1 | Saline | Saline | Saline | Saline |
| G2 | 기준 (현재) | 8.0×10^5 | 4.0×10^5 | 1.2×10^6 |
| G3 | G2의 1/5 | 1.6×10^5 | 8.0×10^4 | 2.4×10^5 |
| G4 | G2의 1/10 | 8.0×10^4 | 4.0×10^4 | 1.2×10^5 |
| G5 | G2의 1/20 | 4.0×10^4 | 2.0×10^4 | 6.0×10^4 |
- [120] 수술 병변의 외형 변화 관찰 결과, 대조군인 G1그룹과 비교적 적은 수의 세포를 이식한 G5그룹은 severity가 굉장히 높게 나타났다. 반면에, 복합줄기세포를 이식한 G2 내지 G4 그룹에서는 모두 유의미한 치료효과를 나타내었다 (도 11 참조). 이러한 결과를 통해 복합줄기세포의 폐쇄성 혈관 질환의 치료효과를 나타내는 유효한 범위는 G2 (1.2×10^6) 내지 G4 (1.2×10^5)임을 확인하였다.
- [121] 세포 용량에 따른 혈류량 측정 결과, 대조군 G1은 시간에 따른 혈류량 감소 및 조직 소실이 나타나는 양상으로 관찰되었다. 반면에, 복합줄기세포를 이식한 실험군은 혈류량이 점차 회복되면서 조직 보존이 나타나게 되는 것을 확인하였다 (도 12A 참조). 또한, 혈액 관류율 (blood perfusion ratio) 측정 결과, G2, G3 및 G4 그룹이 시간 경과에 따라 점차적으로 혈류량이 개선되며 조직이 회복되는 것을 관찰하였으며, 이러한 결과를 통해 복합 줄기세포의 최소 유효 용량 (minimal effective dose, MED)은 1.2×10^5 인 것을 알 수 있다.
- [122] <실시예 6> 복합 줄기세포의 허혈 조직에서의 혈관 형성 확인
- [123] 복합 줄기세포 (EPC+MSC)의 허혈 조직에서 혈관 형성 및 혈류량 개선 관계를 확인하기 위해, 상기 실시예 5의 G3 및 G4 그룹의 동물 모델에서 조직면역염색을 수행하였다. WGA는 근육 및 혈관 구조를 확인하고자 실시하였으며, 관찰 protein은 혈관 마커인 CD31과 α SMA를 확인하였다. 그 결과는 도 13에 나타내었다.
- [124] 도 13에 나타낸 바와 같이, G3 및 G4 모두 허혈환경 (ischemic environment)에서 혈관 형성을 하는 것을 확인하였으며, 세포 수에 따른 혈관 형성 차이는 관찰할 수 없었다.

청구범위

- [청구항 1] 혈관내피전구세포 및 중간엽 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 폐쇄성 혈관질환 또는 이로 인한 궤양의 예방 또는 치료용 세포치료제 약학 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 혈관내피전구세포 및 중간엽 줄기세포는 인간 골수 유래 중간엽 줄기세포인 것을 특징으로 하는, 폐쇄성 혈관질환 또는 이로 인한 궤양의 예방 또는 치료용 세포치료제 약학 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 폐쇄성 혈관질환은 뇌혈관질환 (cerebrovascular disease, CVD), 심혈관질환 (cardiovascular disease), 동맥경화성 혈관질환 (arteriovascular disease), 관상동맥질환 (coronary artery disease, CAD) 및 말초혈관질환 (peripheral artery disease, PAD)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 질환인 것을 특징으로 하는, 폐쇄성 혈관질환 또는 이로 인한 궤양의 예방 또는 치료용 세포치료제 약학 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 세포치료제는 1.2×10^5 내지 1.2×10^7 세포/kg 체중의 투여용량으로 투여되는 것을 특징으로 하는, 폐쇄성 혈관질환 또는 이로 인한 궤양의 예방 또는 치료용 세포치료제 약학 조성물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 혈관내피전구세포는 개체에 투여 시 혈관 세포에 위치하는 것을 특징으로 하는, 폐쇄성 혈관질환 또는 이로 인한 궤양의 예방 또는 치료용 세포치료제 약학 조성물.
- [청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 중간엽 줄기세포는 개체에 투여 시 혈관주위세포 (pericyte)에 위치하는 것을 특징으로 하는, 폐쇄성 혈관질환 또는 이로 인한 궤양의 예방 또는 치료용 세포치료제 약학 조성물.
- [청구항 7] 혈관내피전구세포 및 중간엽 줄기세포를 혼합하는 단계를 포함하는, 폐쇄성 혈관질환 또는 이로 인한 궤양의 예방 또는 치료용 세포치료제의 제조방법.
- [청구항 8] 제7항에 있어서,
상기 혈관내피전구세포 및 중간엽 줄기세포는 2:1의 비율로 혼합되는 것을 특징으로 하는, 폐쇄성 혈관질환 또는 이로 인한 궤양의 예방 또는 치료용 세포치료제의 제조방법.
- [청구항 9] 제7항에 있어서,
상기 혈관내피전구세포 및 중간엽 줄기세포는 인간 골수 유래 중간엽 줄기세포인 것을 특징으로 하는, 폐쇄성 혈관질환 또는 이로 인한 궤양의

- 예방 또는 치료용 세포치료제의 제조방법.
- [청구항 10] 혈관내피전구세포 및 중간엽 줄기세포를 유효성분으로 포함하는, 폐쇄성
혈관질환 또는 이로 인한 궤양의 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 11] 제10항의 약학 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 폐쇄성
혈관질환 또는 이로 인한 궤양의 예방 또는 치료 방법.