



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0065213
(43) 공개일자 2016년06월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0775 (2010.01) A61K 35/12 (2015.01)
A61K 35/28 (2015.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0662 (2013.01)
A61K 35/28 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-7013649(분할)
(22) 출원일자(국제) 2009년05월07일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2010-7027373
원출원일자(국제) 2009년05월07일
심사청구일자 2014년05월01일
(85) 번역문제출일자 2016년05월23일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2009/055549
(87) 국제공개번호 WO 2009/135905
국제공개일자 2009년11월12일
(30) 우선권주장
08155764.7 2008년05월07일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
본 테라퓨틱스 소시에테아노님
벨기에 비-6041 고셀리에 뒤 에이. 불랑 8
(72) 발명자
바되어 신디
벨기에 비-1750 진트-크빈텐스-레니크 알프레트
알피트슈트라트 8
바스티아넬리 엔리코
벨기에 비-1640 로데-생-게네스 아브뉴 드 라 리
베라시옹 41
페세쓰 사비에
벨기에 비-1430 비에르케 뒤 뒤 라도 98
(74) 대리인
특허법인코리아나

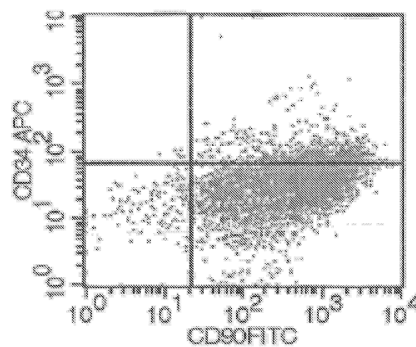
전체 청구항 수 : 총 23 항

(54) 발명의 명칭 간엽 줄기 세포 및 골-형성 세포

(57) 요약

본 발명은 하나 이상의 간엽 마커, 바람직하게는 적어도 CD105 및 CD34 를 동시-발현하는 신규의 유형의 간엽 줄기 세포(MSC)에 관한 것이다. 동종이형 표현형을 갖는 골-형성 세포가 또한 제공된다. 본 발명은 또한 세포 및 세포 집단을 제공할 뿐 아니라, 추가로 상기를 포함하는 산물 및 골 치료에 있어서 그의 용도를 제공한다.

대표도 - 도1



사분역	게이트%	X 평균	Y 평균
UL	0.10	15.04	90.45
UR	15.93	1328.65	132.45
LL	2.32	10.09	17.79
LR	81.65	768.45	32.63

(52) CPC특허분류

A61K 2035/124 (2013.01)
C12N 2501/113 (2013.01)
C12N 2501/115 (2013.01)
C12N 2501/119 (2013.01)
C12N 2501/135 (2013.01)
C12N 2501/22 (2013.01)
C12N 2501/24 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

적어도 CD105 및 CD34 를 동시-발현하는 것을 특징으로 하는 단리된 간엽 줄기 세포(MSC).

청구항 2

제 1 항에 있어서, CD105, CD90, CD73 및 CD34 를 동시-발현하는 단리된 MSC 세포.

청구항 3

MSC 세포 집단으로부터 적어도 CD105 및 CD34 를 동시-발현하는 세포의 아집단을 농축함을 포함하는, 적어도 CD105 및 CD34 를 동시-발현하는 MSC 세포를 수득하는 방법.

청구항 4

제 3 항에 있어서, 하기 단계를 포함하는 방법:

(a) 대상의 샘플로부터 MSC 세포를 단리하는 단계;

(b) 임의로, 상기 단계 (a) 의 MSC 세포를 농축하고/하거나 증식하는 단계; 및

(c) 상기 단계 (a) 또는 (b) 의 MSC 세포로부터 적어도 CD105 및 CD34 를 동시-발현하는 세포의 아집단을 농축하는 단계.

청구항 5

MSC 세포를 하나 이상의 조혈 성장 인자에, 또는 하나 이상의 혈관발생 성장 인자에, 또는 하나 이상의 조혈 성장 인자 및 하나 이상의 혈관발생 성장 인자에 노출시킴을 포함하고, 임의로 및 바람직하게는 MSC 세포를 FGF-2 에 노출시킴을 추가로 포함하는, MSC 세포, 바람직하게는 제 1 항 또는 제 2 항의 MSC 세포를 시험관 내 증식하는 방법.

청구항 6

MSC 집단을 하나 이상의 조혈 성장 인자에, 또는 하나 이상의 혈관발생 성장 인자에, 또는 하나 이상의 조혈 성장 인자 및 하나 이상의 혈관발생 성장 인자에 노출시킴을 포함하고, 임의로 및 바람직하게는 MSC 세포를 FGF-2 에 노출시킴을 추가로 포함하는, 제 1 항 또는 제 2 항의 MSC 세포를 MSC 집단으로부터 시험관 내 수득하고/하거나 제 1 항 또는 제 2 항의 MSC 세포를 위해 MSC 집단을 농축하는 방법.

청구항 7

제 5 항 또는 제 6 항에 있어서, 상기 조혈 성장 인자가 집락 자극 인자 2(CSF2), CSF3, 대식세포 CSF(M-CSF), 과립구 단핵구 CSF(GM-CSF), 인터페론(IFN), 암 괴사 인자(TNF), 및 조혈적으로 활성화인 사이토카인을 포함하는 군으로부터 선택되고, 상기 혈관발생 성장 인자가 혈소판-유래 성장 인자(PDGF), 혈관 내피 성장 인자(VEGF), 폰 빌레브란트 인자(vWF), 안지오프로테틴 1 또는 2, 섬유모세포 성장 인자, 및 에리트로포이에틴(EPO)을 포함하는 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 8

제 5 항 또는 제 6 항에 있어서, 상기 조혈 성장 인자가 GM-CSF 또는 IFN-감마, 더욱 바람직하게는 IFN-감마이고, 상기 혈관발생 성장 인자가 PDGF, FGF-1 또는 FGF-3, 더욱 바람직하게는 PDGF 또는 FGF-3 인 방법.

청구항 9

제 3 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항의 방법에 의해 수득가능한 MSC 세포.

청구항 10

제 1 항, 제 2 항 또는 제 9 항 중 어느 한 항의 MSC 세포를 골-형성 세포로 시험관 내 분화시킴으로써 수득가능한 골-형성 세포.

청구항 11

CD105 및 CD34 를 동시-발현하는 것을 특징으로 하는 단리된 골-형성 세포.

청구항 12

제 11 항에 있어서, CD105, CD90, CD73 및 CD34 를 동시-발현하는 단리된 골-형성 세포.

청구항 13

골-형성 세포를 하나 이상의 조혈 성장 인자에, 또는 하나 이상의 혈관발생 성장 인자에, 또는 하나 이상의 조혈 성장 인자 및 하나 이상의 혈관발생 성장 인자에 노출시킴을 포함하고, 임의로 및 바람직하게는 골-형성 세포를 FGF-2 에 노출시킴을 추가로 포함하는, 골-형성 세포, 바람직하게는 제 10 항 내지 제 12 항 중 어느 한 항의 골-형성 세포를 시험관 내 증식하는 방법.

청구항 14

골-형성 세포 집단을 하나 이상의 조혈 성장 인자에, 또는 하나 이상의 혈관발생 성장 인자에, 또는 하나 이상의 조혈 성장 인자 및 하나 이상의 혈관발생 성장 인자에 노출시킴을 포함하고, 임의로 및 바람직하게는 골-형성 세포를 FGF-2 에 노출시킴을 추가로 포함하는, 제 10 항 내지 제 12 항 중 어느 한 항의 골-형성 세포를 골-형성 세포 집단으로부터 시험관 내 수득하고/하거나 제 10 항 내지 제 12 항 중 어느 한 항의 골-형성 세포를 위해 골-형성 세포 집단을 농축하는 방법.

청구항 15

제 13 항 또는 제 14 항에 있어서, 상기 조혈 성장 인자가 집락 자극 인자 2(CSF2), CSF3, 대식세포 CSF(M-CSF), 과립구 단핵구 CSF(GM-CSF), 인터페론(IFN), 암 괴사 인자(TNF), 및 조혈적으로 활성인 사이토카인을 포함하는 군으로부터 선택되고, 상기 혈관발생 성장 인자가 혈소판-유래 성장 인자(PDGF), 혈관 내피 성장 인자(VEGF), 폰 빌레브란트 인자(vWF), 안지오프로테틴 1 또는 2, 섬유모세포 성장 인자, 및 에리트로포이에틴(EP0)을 포함하는 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 16

제 13 항 또는 제 14 항에 있어서, 상기 조혈 성장 인자가 GM-CSF 또는 IFN-감마, 더욱 바람직하게는 IFN-감마이고, 상기 혈관발생 성장 인자가 PDGF, FGF-1 또는 FGF-3, 더욱 바람직하게는 PDGF 또는 FGF-3 인 방법.

청구항 17

제 13 항 내지 제 16 항 중 어느 한 항의 방법에 의해 수득가능한 골-형성 세포.

청구항 18

MSC 세포 또는 골-형성 세포가 골발생 특성 및 전-혈관발생 특성을 모두 나타내는, 제 1 항, 제 2 항 또는 제 9 항 중 어느 한 항의 MSC 세포, 또는 제 10 항 내지 제 12 항 또는 17 항 중 어느 한 항의 골 형성 세포.

청구항 19

인간 기원인, 제 1 항, 제 2 항, 제 9 항 또는 제 18 항 중 어느 한 항의 MSC 세포, 또는 제 10 항 내지 제 12 항, 제 17 항 또는 제 18 항 중 어느 한 항의 골 형성 세포.

청구항 20

제 1 항, 제 2 항, 제 9 항, 제 18 항 또는 제 19 항 중 어느 한 항의 MSC 세포, 및/또는 제 10 항 내지 제 12 항, 제 17 항 내지 제 19 항 중 어느 한 항의 골 형성 세포를 포함하는 세포 집단.

청구항 21

골-관련 장애의 치료에 이용하기 위한, 제 1 항, 제 2 항, 제 9 항, 제 18 항 또는 제 19 항 중 어느 한 항의 MSC 세포 및/또는 제 10 항 내지 제 12 항, 제 17 항 내지 제 19 항 중 어느 한 항의 골 형성 세포, 또는 제 20 항의 세포 집단.

청구항 22

제 1 항, 제 2 항, 제 9 항, 제 18 항 또는 제 19 항 중 어느 한 항의 MSC 세포 및/또는 제 10 항 내지 제 12 항, 제 17 항 내지 제 19 항 중 어느 한 항의 골-형성 세포, 또는 제 20 항의 세포 집단, 및 하나 이상의 약학적으로 수용가능한 담체/부형제를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 23

제 1 항, 제 2 항, 제 9 항, 제 18 항 또는 제 19 항 중 어느 한 항의 MSC 세포 및/또는 제 10 항 내지 제 12 항, 제 17 항 내지 제 19 항 중 어느 한 항의 골-형성 세포, 또는 제 20 항의 세포 집단을 하나 이상의 약학적으로 수용가능한 담체/부형제와 혼합함을 포함하는, 제 21 항에 따른 약학적 제형물을 제조하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 일반적으로 세포 표현형 및 세포 분화의 분야 및, 의학에서 세포의 용도에 관한 것이다. 더욱 구체적으로, 본 발명은 신규의 간엽 줄기 세포(MSC) 유형 및 신규의 골-형성 세포 유형과 동일하고, 상기 MSC의 골발생 분화, 및 골 질환에 있어서 상기 MSC 및 상기 골-형성 세포의 치료적 및 예방적 이용에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 골발생 분화를 진행할 수 있거나 그러한 경향을 갖는 줄기 세포의 이식은 골-관련 질환의 치료를 위한, 특히 새로운 골의 생성이 치료에 필요한 경우에 유망한 방법이다.

[0003] 골수 간질 세포 또는 간엽 줄기 세포(BMSC 또는 MSC로 약칭됨)는, 이들 세포를 조직 배양 플라스틱에 부착함에 기초하여, 성체 골수 및 몇몇 다른 조직으로부터 쉽게 분리되고 증식될 수 있다. 신경, 간 및 근육 세포를 생성할 수 있는 MSC가 또한 보고되었지만(Prockop 1997, Science 276: 71-4), MSC는 대부분 세가지 잠재적, 중배엽-관련 운명, 즉 골발생, 지방세포성 및 연골세포성 분화를 진행할 수 있는 능력을 나타낸다(Pittenger et al. 1999, Science 284: 143-7).

[0004] MSC는 그중에서도 CD105, CD90 및 CD73을 포함하는 가용성 표면 마커의 발현으로 정의될 수 있다. 더욱이, 종래의 기술은 일반적으로 MSC가 CD34 항원에 대해 음성인 것으로 보여주는데, CD34 항원은 대신 미숙 혈액 및 내피 세포 내에서 고발현되는 것으로 알려져 있다. 특히, CD34-양성, 골수 기원 MSC는 이전에 기재된 바 없다. 또한, 향상된 골발생 및 골재발생 특성이 CD34-양성 MSC에 대해, 특히 골수로부터 기원한 CD34-양성 MSC에 대해 종래에 기재된 바 없다.

[0005] 골수 이식은 골 장애를 치료하기 위해 이용되어 왔다(Gangji et al. 2005, Expert Opin Biol Ther 5: 437-42). 그러나, MSC는 골수 샘플 내에 존재하는 모든 세포 중 오직 작은 비율을 나타낼 수 있고, 더욱이 골발생 분화에 대한 가변적 경향을 나타낼 수 있어, 이렇게 이식된 세포 중 상당한 비율이 결국 바라던 골 조직의 형성에 기여하지 않을 수 있다. 사실, 인간 성체 간엽 줄기 세포 조상(progenitor)의 오직 약 14%만이 골발생 잠재성을 유지하는 것으로 밝혀졌다(D'Ippolito et al. 1999, J Bone Miner Res. 14: 1115-22).

[0006] 그러한 관점에서, 간엽 줄기 세포로부터 골조상세포, 골모세포 또는 골-형성 세포의 생성 수율을 개선시킬 계속적 필요가 존재한다.

발명의 내용

과제의 해결 수단

[0007] 발명의 요약

- [0008] 본 발명자는 단리되고 임의로 증식된 MSC 세포의 작은 아집단이 하나 이상의 간엽 마커, 예컨대 예를 들어 CD90 또는 CD105, 더욱 바람직하게는 적어도 CD105 를, 통상 세포의 미숙 혈액 및 내피 특징을 나타내는 것으로 여겨지는 표지인 CD34 와 함께 동시-발현하는 것을 확인했다.
- [0009] 일반적인 MSC 세포 집단과 비교하여, 상기 신규의 세포 유형은 골-세포 마커인 알칼리성 포스파타아제(ALP)를 상당한 수준으로 발현하고, 새로운 골 매트릭스를 합성하고 광물화할 수 있다. 그러므로, 상기 세포는 골 재건축에 유용한 골-형성 세포를 생성하는 비교적 높은 잠재성을 가진다. 본 발명자는 또한 상기 세포가 크게 증식될 수 있고, 이로써 적당한 양의 골-형성 세포가 세포-기재 요법을 위해 특히 골 장애를 위해 발생될 수 있음을 관찰했다. 본 발명자는 상기 세포 아집단에 대한 MSC 세포를 농축하는 데 성공했는데, 그것은 그때 그의 표현형 및 생물학적 특성을 유지했다.
- [0010] 본 발명의 하나의 양상은 하나 이상의 간엽 마커 및 CD34 를 동시-발현하는 것을 특징으로 하는 단리된 간엽 줄기 세포(MSC)를 제공한다.
- [0011] 추가의 양상은 MSC 세포 집단으로부터 상기 하나 이상의 간엽 마커 및 CD34 를 동시-발현하는 세포의 아집단을 농축하거나 단리함을 포함하는 하나 이상의 간엽 마커 및 CD34 를 동시-발현하는 MSC 세포의 수득 방법을 제공한다. 하나의 구현예는 하기 단계를 포함하는 하나 이상의 간엽 마커 및 CD34 를 동시-발현하는 MSC 세포의 수득 방법을 제공한다: (a) 대상의 샘플로부터 MSC 세포를 단리하는 단계; (b) 임의로, 상기 단계 (a) 의 MSC 세포를 농축하고/하거나 증식시키는 단계; 및 (c) 상기 단계 (a) 또는 (b) 의 MSC 세포로부터 하나 이상의 간엽 마커 및 CD34 를 동시-발현하는 세포의 아집단을 농축하거나 단리하는 단계.
- [0012] 또다른 양상은 MSC 세포 집단으로부터 하나 이상의 간엽 마커 및 CD34를 동시-발현하는 세포의 아집단을 단리함을 포함하는 방법에 의해 수득가능한 MSC 세포에 관한 것이다. 하나의 구현예는 하기를 포함하는 단계로 수득가능한 MSC 세포를 제공한다: (a) 대상의 샘플로부터 MSC 세포를 단리하는 단계; (b) 임의로, 상기 단계 (a) 의 MSC 세포를 증식시키는 단계; 및 (c) 상기 단계 (a) 또는 (b) 의 MSC 세포로부터 하나 이상의 간엽 마커 및 CD34 를 동시-발현하는 세포의 아집단을 단리하는 단계.
- [0013] 또한 제공되는 것은 상기 양상들 모두에서 정의되는 바와 같은 하나 이상의 간엽 마커 및 CD34 를 동시-발현하는 단리된 간엽 줄기 세포(MSC)를 포함하는 세포 집단이다.
- [0014] 본 발명이 또한 상기 교시되는 바와 같은 MSC 세포 및 세포 집단, 예컨대 하나 이상의 간엽 마커 및 CD34 를 동시-발현하는 MSC 세포 및 그러한 MSC 세포를 포함하는 세포 집단의, 그중에서도 특히 상기 MSC 세포 및 세포 집단의 배양, 유지, 증식, 농축(예를 들어, 분류에 의함) 및 후-농축 증식을 포함하는, 다양한 조작을 포함한다는 것이 인지될 것이다.
- [0015] 추가의 양상은 상기 MSC 세포를 조혈 성장 인자 및/또는 혈관발생 성장 인자에, 바람직하게는 조혈 성장 인자 및 혈관발생 성장 인자에, 예를 들어, 하나 이상의 조혈 성장 인자 및/또는 하나 이상의 혈관발생 성장 인자에 노출시킴을 포함하는, 단리된 간엽 줄기 세포(MSC), 바람직하게는 본원에서 교시되는 바와 같은 하나 이상의 간엽 마커 및 CD34 를 동시-발현하는 단리된 MSC 의 시험관 내 증식 방법을 제공한다.
- [0016] 또한 이 방법은 적합한 배양 조건에 의해 MSC 집단(즉, 비교적 더욱 불균일한 MSC 집단)으로부터 하나 이상의 간엽 마커 및 CD34 를 동시-발현하는 MSC 세포를 수득함 및/또는, MSC 집단(즉, 비교적 더욱 불균일한 MSC 집단)을 하나 이상의 간엽 마커 및 CD34 를 동시-발현하는 MSC 세포를 위해 농축함을 위해 조정될 수 있다. 이는 상기 비교적 더욱 불균일한 MSC 집단(예를 들어, 대상의 샘플로부터 단리된 MSC 세포)을 조혈 성장 인자 및/또는 혈관발생 성장 인자에, 바람직하게는 조혈 성장 인자 및 혈관발생 성장 인자에, 예를 들어, 하나 이상의 조혈 성장 인자 및/또는 하나 이상의 혈관발생 성장 인자에 노출시킴을 수반한다.
- [0017] 유리하게는, 상기 방법은 CD34 및 하나 이상의 간엽 마커, 예컨대 바람직하게는 CD105, CD90 및/또는 CD73, 또한 바람직하게는 적어도 CD105 의 발현을 포함하는 MSC 세포를, 출발 또는 초기 MSC 세포 집단으로부터 수득하고/하거나 농축할 수 있다. 유리하게는, 농축의 목적이 되는 MSC 세포는 조혈 및/또는 내피 표지, 예컨대 예를 들어 CD45, CD133, CD31, CD14 및/또는 CD19 의 발현을 결여할 수 있다. 그러므로, 하나의 구현예에서 농축의 목적이 되는 MSC 세포는 CD34 및, CD105, CD90 및 CD73 중 하나 이상 또는 바람직하게는 전부, 또한 바람직하게는 적어도 CD105 의 발현을 포함할 수 있고, CD45, CD133, CD31, CD14 및 CD19 중 하나 이상 또는 바람직하게는 전부의 발현을 결여할 수 있다. 유리하게는, 본 발명의 방법은 그 방법의 적용 중에 초기 MSC 집단 내에서 CD34 및 하나 이상의 간엽 마커의 동시-발현을 포함하는 MSC 세포의 비율의 증가를 발견했다(예를 들어, 제한 없는 실험에서 CD105-양성 및 CD-34 양성 MSC 세포의 비율이 배양 중에 각각 15% 에서 95% 로 및 1

%에서 59.4%로 증가했다).

- [0018] 유리하게는, 본원에서 교시되는 바와 같은 조혈 및/또는 혈관발생 성장 인자에 노출시킴에 의해 증식되고/되거나 농축되는 MSC 세포는 적당한 골발생 특성(예를 들어, ALP 발현 및 염색에 의해 증명되는 바와 같음) 및 유익한 전-혈관발생 특성(예를 들어, 적합한 검정에서 vWF 및 VEGF 발현에 의해 및/또는 모세혈관-유사 구조 형성에 의해 증명되는 바와 같음)을 모두 나타낼 수 있다.
- [0019] 그러므로, 또한 본원에서 공개되는 것은 MSC 세포가 골발생 특성(ALP 발현, ALP 효소 활성 및/또는 ALP 염색에 의해 적합하게 그러나 제한 없이 증명되는 바와 같음) 및 전-혈관발생 특성(vWF 및/또는 VEGF, 바람직하게는 vWF 및 VEGF의 발현에 의해, 및/또는 매트릭셀 모델(Matrigel model)과 같은 적합한 모델 내에서 분지 신생-혈관 구조 또는 슈도튜브(pseudotubes)로 조직되는 능력에 의해 적합하게 그러나 제한 없이 증명되는 바와 같음)을 모두 나타내는, 일반적인 MSC 세포, 특히 하나 이상의 간엽 마커 및 CD34를 동시-발현하는 MSC 세포이다. 또한 포함되는 것은 그러한 MSC 세포를 포함하는 세포 집단이다.
- [0020] 또한 제공되는 것은 조혈 성장 인자 및/또는 혈관발생 성장 인자를 사용하여 MSC 세포 또는 세포 집단을 증식시키거나 농축하는 상기 방법에 의해 수득가능한 또는 직접 수득되는 MSC 세포이다.
- [0021] 또다른 양상은 상기 양상에서 정의되는 바와 같은 하나 이상의 간엽 마커 및 CD34를 동시-발현하는 간엽 줄기 세포(MSC)를 골-형성 세포, 예컨대 예를 들어 골모세포 또는 골조상세포로 시험관 내 분화시키는 방법에 관한 것이다.
- [0022] 추가의 양상은 상기 양상에서 정의되는 바와 같은 하나 이상의 간엽 마커 및 CD34를 동시-발현하는 간엽 줄기 세포(MSC)를 골-형성 세포로 시험관 내 분화시킴에 의해 수득가능한 골-형성 세포, 예컨대 예를 들어 골모세포 또는 골조상세포를 제공한다.
- [0023] 골-형성 세포 중 적어도 일부는 기원이 되는 MSC 세포의 상응하는 발현 프로필을 유지할 수 있기 때문에, 또다른 양상은 하나 이상의 간엽 마커 및 CD34를 동시-발현하는 것을 특징으로 하는 단리된 골-형성 세포, 예컨대 예를 들어 골모세포 또는 골조상세포를 제공한다.
- [0024] 추가로 공개되는 것은 하나 이상의 간엽 마커 및 CD34를 동시-발현하는 단리된 골-형성 세포를 포함하는 세포 집단이다. 그러므로, 또한 공개되는 것은 본원에서 교시되는 바와 같은 하나 이상의 간엽 마커 및 CD34를 동시-발현하는 단리된 MSC를 포함하고 추가로 본원에서 교시되는 바와 같은 하나 이상의 간엽 마커 및 CD34를 동시-발현하는 단리된 골-형성 세포를 포함하는 세포 집단이다.
- [0025] 또한 본 발명이 상기 교시되는 바와 같은 골-형성 세포 및 세포 집단, 예컨대 하나 이상의 간엽 마커 및 CD34를 동시-발현하는 골-형성 세포 및 그러한 골-형성 세포를 포함하는 세포 집단의, 그중에서도 특히 상기 골-형성 세포 및 세포 집단의 배양, 유지, 증식, 농축(예를 들어, 분류에 의해) 및 후-농축 증식을 포함하는 다양한 조작을 포함하는 것이 인지될 것이다.
- [0026] 또한 공개되는 것은 상기 하나 이상의 간엽 마커 및 CD34를 동시-발현하는 MSC 세포를 골-형성 세포로 분화시킴을 포함하는 하나 이상의 간엽 마커 및 CD34를 동시-발현하는 골-형성 세포의 수득 방법이다.
- [0027] 하나 이상의 간엽 마커 및 CD34를 동시-발현하는 상기 골-형성 세포는 또한 다른 방법에 의해 수득될 수 있다. 그러므로, 또한 공개되는 것은 골-형성 세포 집단으로부터 상기 하나 이상의 간엽 마커 및 CD34를 동시-발현하는 세포의 아집단을 농축하거나 단리함을 포함하는 하나 이상의 간엽 마커 및 CD34를 동시-발현하는 골-형성 세포의 수득 방법이다. 하나의 구현에는 하기 단계를 포함하는 하나 이상의 간엽 마커 및 CD34를 동시-발현하는 골-형성 세포의 수득 방법을 제공한다: (a) 대상의 샘플로부터 골-형성 세포를 단리하거나 대상의 샘플로부터 단리된 MSC 세포로부터 골-형성 세포를 분화시키는 단계; (b) 임의로, 상기 단계 (a)의 골-형성 세포를 농축하고/하거나 증식시키는 단계; 및 (c) 상기 단계 (a) 또는 (b)의 골-형성 세포로부터 하나 이상의 간엽 마커 및 CD34를 동시-발현하는 세포의 아집단을 농축하거나 단리하는 단계.
- [0028] 추가의 양상은 골-형성 세포를 조혈 성장 인자 및/또는 혈관발생 성장 인자에, 바람직하게는 조혈 성장 인자 및 혈관발생 성장 인자에, 예를 들어, 하나 이상의 조혈 성장 인자 및/또는 하나 이상의 혈관발생 성장 인자에 노출시킴을 포함하는, 단리된 골-형성 세포, 바람직하게는 본원에서 교시되는 바와 같은 하나 이상의 간엽 마커 및 CD34를 동시-발현하는 단리된 골-형성 세포의 시험관 내 증식 방법을 제공한다.
- [0029] 이 방법은 또한 적합한 배양 조건에 의해 골-형성 세포 집단(즉, 비교적 더욱 불균일한 골-형성 세포 집단)으로부터 하나 이상의 간엽 마커 및 CD34를 동시-발현하는 골-형성 세포를 수득하고/하거나 하나 이상의 간엽 마커

및 CD34 를 동시-발현하는 골-형성 세포를 위해 골-형성 세포 집단(즉, 비교적 더욱 불균일한 골-형성 세포 집단을)을 농축함을 위해 조정될 수 있다. 이는 상기 골-형성 세포(예를 들어, 대상의 샘플로부터 단리되거나 대상의 샘플로부터 단리된 MSC 세포로부터 분화된 골-형성 세포)의 비교적 더욱 불균일한 집단을 조절 성장 인자 및/또는 혈관발생 성장 인자에, 바람직하게는 조절 성장 인자 및 혈관발생 성장 인자에, 예를 들어, 하나 이상의 조절 성장 인자 및/또는 하나 이상의 혈관발생 성장 인자에 시험관 내 노출시킴을 수반한다.

[0030] 유리하게는, 상기 방법은 CD34 및 하나 이상의 간엽 마커, 예컨대 바람직하게는 CD105, CD90 및/또는 CD73, 또한 바람직하게는 적어도 CD105 의 발현을 포함하는 골-형성 세포를 출발 또는 초기 골-형성 세포 집단으로부터 수득하고/하거나 농축할 수 있다. 유리하게는, 농축의 목적이 되는 골-형성 세포는 조절 및/또는 내피 마커, 예컨대 예를 들어 CD45, CD133, CD31, CD14 및/또는 CD19 의 발현을 결여할 수 있다. 그러므로, 하나의 구현예에서 농축의 목적이 되는 골-형성 세포는 CD34 및, CD105, CD90 및 CD73 중 하나 이상 또는 바람직하게는 전부, 또한 바람직하게는 적어도 CD105 의 발현을 포함할 수 있고, CD45, CD133, CD31, CD14 및 CD19 중 하나 이상 또는 바람직하게는 전부의 발현을 결여할 수 있다. 유리하게는, 본 방법은 그 방법의 적용 중에 초기 골-형성 세포 집단 내에서 CD34 및 하나 이상의 간엽 마커의 동시-발현을 포함하는 골-형성 세포의 비율의 증가를 발견했다.

[0031] 유리하게는, 본원에서 교시되는 바와 같은 조절 및/또는 혈관발생 성장 인자에 노출시킴에 의해 증식되고/되거나 농축된 골-형성 세포는 적당한 골발생 특성(예를 들어, ALP 발현 및 염색에 의해 증명되는 바와 같음) 및 유의한 전-혈관발생 특성(예를 들어, 적합한 검정에서 vWF 및 VEGF 발현에 의해 및/또는 모세혈관-유사 구조 형성에 의해 증명되는 바와 같음)을 모두 나타낼 수 있다.

[0032] 그러므로, 본원에서 또한 공개되는 것은 골-형성 세포가 골발생 특성(ALP 발현, ALP 효소 활성 및/또는 ALP 염색에 의해 적합하게 그러나 제한 없이 증명되는 바와 같음) 및 전-혈관발생 특성(마트리젤 모델과 같은 적합한 모델 내에서 vWF 및/또는 VEGF, 바람직하게는 vWF 및 VEGF 의 발현에 의해, 및/또는 분지 신생-혈관 구조 또는 슈도튜브로 구성되는 능력에 의해 적합하게 그러나 제한 없이 증명되는 바와 같음)을 모두 나타내는, 일반적인 골-형성 세포, 특히 하나 이상의 간엽 마커 및 CD34 를 동시-발현하는 골-형성 세포이다.

[0033] 또한 제공되는 것은 조절 성장 인자 및/또는 혈관발생 성장 인자를 사용하여 골-형성 세포 또는 세포 집단을 증식시키거나 농축하는 상기 방법에 의해 수득가능한 또는 직접 수득되는 골-형성 세포이다.

[0034] 하나의 구현예에서, 조절 성장 인자는 당업계에 알려진 분명한 조절 활성을 갖는, 예컨대, 예를 들어, 조절 세포를 동원, 증식 유도 및/또는 자극할 수 있는 임의의 성장 인자를 포함할 수 있다. 하나의 구현예에서, 본 명세서 전반에서 의도되는 조절 성장 인자는 집락 자극 인자 2(CSF2), CSF3, 대식세포 CSF(M-CSF), 과립구 CSF(GM-CSF), 그중에서도 특히 IFN-알파 및 IFN-감마를 포함하는 인터페론(IFN), 암 괴사 인자(TNF), 및 조혈적으로 활성인 사이토카인 예컨대 그중에서도 특히 인터루킨 2(IL2), IL4, IL17 및 IL18 을 포함하는 또는 이들로 이루어진 군으로부터 선택된다. 바람직하게는, 상기 조절 성장 인자는 GM-CSF 및 IFN-감마로부터 선택될 수 있고, 더욱 바람직하게는 IFN-감마일 수 있다.

[0035] 하나의 구현예에서, 혈관발생 성장 인자는 당업계에 알려진 분명한 혈관발생 활성을 갖는, 예컨대, 예를 들어, 내피 세포를 동원하거나 내피 세포에 의해 모세혈관 구조의 형성을 유도할 수 있는 임의의 성장 인자를 포함할 수 있다. 하나의 구현예에서, 본 명세서 전반에서 의도되는 혈관발생 성장 인자는 그중에서도 특히 PDGF aa, ab, bb 를 포함하는 혈소판-유래 성장 인자(PDGF), 혈관 내피 성장 인자(VEGF1 또는 2), 폰 빌레브란트 인자(vWF), 안지오포이에틴(angiopoietin) 1 또는 2, 섬유모세포 성장 인자(FGF1, FGF-3, 또는 기타 FGF 인자; 또는 FGF-1 을 제외하고/하거나 FGF-2 를 제외한 FGF 인자) 및 에리트로포이에틴(EPO)를 포함하거나 이들로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또다른 구현예에서, 혈관발생 성장 인자는 PDGF, VEGF, vWF, 안지오포이에틴 2 및 EPO 를 포함하거나 이들로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0036] 바람직하게는, 혈관발생 성장 인자는 PDGF, FGF-1 및 3 으로부터 선택될 수 있고, 더욱 바람직하게는 PDGF 또는 FGF-3 일 수 있고, 더욱더 바람직하게는 PDGF 일 수 있다.

[0037] 바람직하게는, 상기 조절 성장 인자 및/또는 혈관발생 성장 인자에 부가하여 상기 MSC 또는 골-형성 세포는 추가로 상기 세포의 유지, 증식, 수득, 농축 및/또는 골발생 분화를 자극하기 위해 FGF-2 에 노출, 바람직하게는 동시에 노출될 수 있다.

[0038] 따라서, 바람직한 하나의 구현예에서 MSC 또는 골-형성 세포, 예컨대 예를 들어 본원에서 교시되는 바와 같은 CD34 및 하나 이상의 간엽 마커의 발현을 포함하는 MSC 또는 골-형성 세포를 증식시킴은, 상기 MSC 또는 골-형

성 세포를 GM-CSF, IFN-감마, PDGF, FGF-1 및 FGF-3 으로부터 선택된 하나 이상의 성장 인자에; 예를 들어 하나 이상의 GM-CSF 및 IFN-감마에 및/또는 하나 이상의 PDGF, FGF-1 및 FGF-3 에; 예를 들어 하나 이상의 GM-CSF 및 IFN-감마에 및 하나 이상의 PDGF, FGF-1 및 FGF-3 에 노출시킴을 포함할 수 있다. 임의로 상기 구현예들에서 상기 세포는 또한 FGF-2 에 노출, 바람직하게는 동시에 노출될 수 있다. 특히 바람직한 하나의 구현예에서 MSC 또는 골-형성 세포, 예컨대 예를 들어 본원에서 교시되는 바와 같은 CD34 및 하나 이상의 간엽 마커의 발현을 포함하는 MSC 또는 골-형성 세포를 증식시킴은, 상기 MSC 또는 골-형성 세포를 IFN-감마에 노출시킴을 포함할 수 있다. 이 처리는 이렇게 처리된 세포의 골발생 및 전-혈관발생 특징을 모두 현저히 향상시킨다.

[0039] 또다른 바람직한 하나의 구현예에서 본원에서 교시되는 바와 같은 CD34 및 하나 이상의 간엽 마커의 발현을 포함하는 MSC 또는 골-형성 세포를 위해 초기 MSC 또는 골-형성 세포 집단으로부터 농축함은, 상기 초기 MSC 또는 골-형성 세포 집단을 GM-CSF, IFN-감마, PDGF, FGF-1 및 FGF-3 으로부터 선택된 하나 이상의 성장 인자에; 예를 들어 하나 이상의 GM-CSF 및 IFN-감마에 및/또는 하나 이상의 PDGF, FGF-1 및 FGF-3 에; 예를 들어 하나 이상의 GM-CSF 및 IFN-감마에 및 하나 이상의 PDGF, FGF-1 및 FGF-3 에 노출시킴을 포함할 수 있다. 임의로 이들 구현예에서 상기 세포는 또한 FGF-2 에 노출, 바람직하게는 동시에 노출될 수 있다. 특히 바람직한 하나의 구현예에서 본원에서 교시되는 바와 같은 CD34 및 하나 이상의 간엽 마커의 발현을 포함하는 MSC 또는 골-형성 세포를 위해 초기 MSC 또는 골-형성 세포 집단으로부터 농축함은 상기 MSC 또는 골-형성 세포를 IFN-감마에 노출시킴을 포함할 수 있다. 이 처리는 이렇게 처리된 세포의 골발생 및 전-혈관발생 특징을 모두 현저히 향상시킨다.

[0040] 추가의 양상은 하기를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다: 상기 양상들에서 정의된 바와 같은 하나 이상의 간엽 마커 및 CD34 를 동시-발현하는 간엽 줄기 세포(MSC) 및/또는 상기 양상들에서 정의된 바와 같은 골-형성 세포 예컨대 하나 이상의 간엽 마커 및 CD34 를 동시-발현하는 골-형성 세포, 및 하나 이상의 약학적으로 수용가능한 담체/부형제. 상기 약학적 조성물은 상기 MSC 및/또는 골-형성 세포를 포함하는 세포 집단, 및 하나 이상의 약학적으로 수용가능한 담체/부형제를 포함할 수 있다.

[0041] 하기를 포함하는 약학적 제형물의 제조 과정이 또한 제공된다: 상기 양상들에서 정의된 바와 같은 하나 이상의 간엽 마커 및 CD34 를 동시-발현하는 간엽 줄기 세포(MSC) 및/또는 상기 양상들에서 정의된 바와 같은 골-형성 세포 예컨대 하나 이상의 간엽 마커 및 CD34 를 동시-발현하는 골-형성 세포, 또는 그러한 MSC 및/또는 골-형성 세포를 포함하는 세포 집단을, 상기 하나 이상의 약학적으로 수용가능한 담체/부형제와 혼합함.

[0042] 본 발명의 세포 생성물은 골-관련 장애의 예방적 및 치료적 처치에 특히 적합하다. 이렇게, 추가의 양상은 하기에 관한 것이다:

[0043] - 골-관련 장애의 치료에 있어서의 용도를 위한, 상기 양상들에서 정의된 바와 같은 하나 이상의 간엽 마커 및 CD34 를 동시-발현하는 간엽 줄기 세포(MSC), 또는 상기 양상들에서 정의된 바와 같은 골-형성 세포 예컨대 하나 이상의 간엽 마커 및 CD34 를 동시-발현하는 골-형성 세포, 또는 상기 정의된 바와 같은 세포들을 포함하는 세포 집단 또는 약학적 조성물;

[0044] - 골-관련 장애의 치료를 위한 약제의 제조를 위한, 상기 양상들에서 정의된 바와 같은 하나 이상의 간엽 마커 및 CD34 를 동시-발현하는 간엽 줄기 세포(MSC), 또는 상기 양상들에서 정의된 바와 같은 골-형성 세포 예컨대 하나 이상의 간엽 마커 및 CD34 를 동시-발현하는 골-형성 세포, 또는 상기 정의된 바와 같은 세포들을 포함하는 세포 집단의 용도;

[0045] - 상기 양상들에서 정의된 바와 같은 하나 이상의 간엽 마커 및 CD34 를 동시-발현하는 간엽 줄기 세포(MSC), 또는 상기 양상들에서 정의된 바와 같은 골-형성 세포 예컨대 하나 이상의 간엽 마커 및 CD34 를 동시-발현하는 골-형성 세포, 또는 상기 정의된 바와 같은 세포들을 포함하는 세포 집단 또는 약학적 조성물의 치료적 또는 예방적 유효량을 상기 대상에게 투여함을 포함하는, 그러한 치료가 필요한 대상의 골-관련 장애의 치료 방법.

[0046] 본 발명은 또한 대상에게, 예컨대 예를 들어 전신적으로 또는 골 병변 부위에 조성물을 투여하기 위해 조정된 외과적 기구를 포함하고, 추가로 상기 정의된 세포, 세포 집단 또는 약학적 조성물 중 임의의 포함하는 배열물을 제공한다.

[0047] 상기 양상들 및 구현예들 중 임의에서, 상기 하나 이상의 간엽 마커는 바람직하게는 CD105, CD90 및 CD73 으로부터 선택될 수 있고, 더욱 바람직하게는 CD90 또는 CD105 일 수 있다. 특히 바람직하게는, 상기 하나 이상의 간엽 마커는 CD105 일 수 있고, 즉 본원에서 교시되는 바와 같은 MSC 또는 골-형성 세포는 적어도 CD105 및 CD34 를 동시-발현할 수 있다.

[0048] 상기 양상들 중 임의의 일부 구현예에서, 세포(MSC 세포; 골-형성 세포)는 인간 기원이다. 바람직하게는, MSC 는 골수로부터 기원할 수 있다.

[0049] 이들 및 추가의 양상 및 구현예가 하기 부분 및 청구항에서 기재된다.

도면의 간단한 설명

[0050] 도 1 은 CD90(FITC) 및 CD34(APC) 발현의 이중-색상 유세포 분석(dual-colour flow cytometric analysis)을 도시한다. 도트 플롯 히스토그램(dot plot histogram)은 리스트 모드 데이터(list mode data)로서 수집된 5000 사건들을 나타낸다.

도 2 는 배양 1 주일 후 CD90/CD34+ 세포의 광학 현미경적 검사를 도시한다.

도 3 은 영양보충된 배양 조건 하에서 증식시킨 후 CD90(FITC) 및 CD34(APC) 발현의 이중-색상 유세포 분석을 도시한다. 도트 플롯 히스토그램은 리스트 모드 데이터로서 수집된 5000 사건들을 나타낸다.

도 4 는 CD90/CD34+ 세포에 의한 광물질화 (A) 및 ALP 염색 (B)을 도시한다.

도 5 는 광물질화 능력의 CD34+ 백분율에 대한 의존성을 도시한다.

도 6 은 ALP 염색에 의해 세포의 골발생 특성을 도시한다.

도 7 은 모세혈관-유사 구조 형성 검정에 의해 세포의 전-혈관발생 특성을 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0051] 발명의 상세한 설명

[0052] 본원에서 사용되는 단수형에는 문맥에서 명확하게 다르게 표시되지 않는 한 단수형 및 복수형이 모두 포함된다.

[0053] 본원에서 사용되는 "포함하는", "포함하다" 및 "~ 로 포함되는" 이라는 용어는 "포함되는", "포함되다" 또는 "함유하는", "함유하다" 와 동의어로 사용되고, 포괄적이거나 개방적이며, 부가적 비-언급된 일원, 요소 또는 방법 단계를 배제하지 않는다.

[0054] 종결점에 의한 수치 범위 한정에는 언급된 종결점 뿐 아니라 범위 내에 포함되는 모든 숫자 및 분수가 포함된다.

[0055] 파라미터, 양, 시간 기간 등과 같은 측정값을 언급하는 경우 본원에서 사용되는 "약" 이라는 용어는, 구체적인 값의 그리고 그로부터의 +/-10% 이하, 바람직하게는 +/-5% 이하, 더욱 바람직하게는 +/-1% 이하, 더욱더 바람직하게는 +/-0.1% 이하의 변화값을, 이러한 변화값이 공개된 발명에서 수행하기에 적합하다면 포함한다. 수식어 "약" 으로 언급되는 값은 그 자체가 또한 구체적으로, 그리고 바람직하게 공개되는 것으로 이해된다.

[0056] 본 명세서에서 언급된 모든 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 포함된다.

[0057] 다르게 정의되지 않는다면, 기술적 과학적 용어를 포함하여 본 발명을 공개하면서 사용된 모든 용어는 본 발명에 속하는 당업자에게 통상적으로 이해되는 의미를 갖는다. 추가적 안내의 수단으로, 본 발명의 교시를 더 잘 이해하기 위해 용어 정의가 포함된다.

[0058] "줄기 세포" 라는 용어는 일반적으로, 자가-부활이 가능한, 즉 분화 없이 증식가능한 미특화된 또는 비교적 덜 특화된 증식-잠재성 세포를 말하고, 이것 또는 이의 자손은 하나 이상의 비교적 더욱 특화된 세포 유형을 낳을 수 있다. 상기 용어는 상당히 비제한된 자가-부활이 가능한, 즉, 줄기 세포의 후손 또는 이의 일부 이상이, 모 줄기 세포의 미특화된 또는 비교적 덜 특화된 표현형, 분화 잠재성, 및 증식 능력을 상당히 보유하는 줄기 세포 뿐 아니라, 제한된 자가-부활을 나타내는, 즉, 추가의 증식 및/또는 분화에 대한 후손 또는 이의 일부의 능력이 모 세포와 비교하여 현저하게 감소된 줄기 세포를 포함한다. 제한 없이 예를 들어, 줄기 세포는 하나 이상의 계통을 그러므로 분화할 수 있는 자손을 낳아서, 점점 더 비교적 더욱 특화된 세포를 생성하거나, 심지어 후-유사분열일 수 있는 종결적으로 분화된 세포, 즉, 완전히 특화된 세포를 생성할 수 있으며, 상기 자손 및/또는 점점 더 비교적 더욱 특화된 세포는 그들 자체가 본원에서 정의되는 바와 같은 줄기 세포일 수 있다.

[0059] 본원에서 사용되는 "성체 줄기 세포" 라는 용어는 태아 단계에서 또는 출생 후 유기체 내에 존재하는 또는 이로부터(예컨대 이로부터 단리됨) 수득된 줄기 세포를 말한다.

- [0060] 본원에서 사용되는 "간엽 줄기 세포" 또는 "MSC" 라는 용어는, 예를 들어, 골세포성(골), 연골세포성(연골), 근육세포성(근육), 힘줄세포성(힘줄), 섬유모세포성(결합 조직), 지방세포성(지방) 및 간질세포성(골수 간질) 계통인 간엽 계통의 세포, 전형적으로 두 개의, 바람직하게는 세 개 이상의 간엽 계통의 세포를 발생시킬 수 있는 성체, 중배엽-유래 줄기 세포를 말한다. 일반적으로, 그러나 제한 없이, 세포가, 예를 들어, Pittenger et al. 1999 (Science 284: 143-7) 또는 Barberi et al. (PLoS Med 2: e161, 2005)에 기재된 바와 같은 표준의, 기술적으로 수용되는 분화 조건 및 세포 표현형 평가 방법을 사용하여, 지방세포, 연골세포 및 골세포 계통 각각의 세포를 형성할 수 있는 경우 MSC 로 여겨질 수 있다. MSC 세포는, 예를 들어, 골수, 혈액, 탯줄, 태반, 태아 난황 주머니, 진피, 특히 태아 및 청년기 피부(Young et al. 2001. Anat Rec 264: 51-62), 골막 및 지방 조직(Zuk et al. 2001. Tissue Eng 7: 211-28)으로부터 단리될 수 있다. 인간 MSC, 그의 단리, 시험관 내 증식 및 분화는, 예를 들어, Pittenger et al. 1999 (supra), 미국 특허 제 5,486,359 호; 미국 특허 제 5,811,094 호; 미국 특허 제 5,736,396 호; 미국 특허 제 5,837,539 호; 또는 미국 특허 제 5,827,740 호에서 기재되었다.
- [0061] 상기 용어는 또한 골수로부터 수득된 MSC 를 포함하며, 이는 통상적으로 "골수 간질 세포" 또는 "BMSC" 로 언급된다. BMSC 의 단리를 위한 골수 샘플은, 예를 들어, 엉덩이뼈 능선, 대퇴, 정강뼈, 척추, 갈비뼈 또는 다른 골수 공간으로부터 취득될 수 있다.
- [0062] 바람직한 하나의 구현예에서 본원에서 사용되는 MSC 또는 MSC 집단은 골수로부터 기원할 수 있으며, 예를 들어, 골수 샘플로부터 단리되고 임의로 증식될 수 있다. 골수로부터 기원한 MSC 및 MSC 집단은 다른 조직으로부터 기원한 MSC 와 다른 및/또는 보다 유리한 특징(예를 들어, 마커 프로파일, 기능, 증식, 분화 등)을 가질 수 있으며, 예컨대 제한 없이 더욱 효율적으로 및/또는 더욱 통제가능하게 골-형성 세포로 분화할 수 있다.
- [0063] MSC 및 BMSC 라는 용어는 또한 MSC 또는 BMSC 의 후손, 예를 들어, 대상의 생물학적 샘플로부터 수득된 MSC 또는 BMSC 의 시험관 내 또는 체외 증식에 의해 수득된 후손을 포함한다.
- [0064] 특정 성분과 관련하여 "단리하는" 이라는 용어는 하나의 성분을, 그 성분이 그로부터 "단리되는" 조성물의 하나 이상의 다른 성분으로부터 분리하는 것을 뜻한다. 임의의 세포, 세포의 군 또는 세포 집단과 관련하여 사용되는 "단리되는" 이라는 용어는 또한 그러한 세포, 세포의 군 또는 세포 집단이 동물 또는 인간 신체의 부분을 형성하지 않음을 의미한다.
- [0065] 본원에서 공개된 세포, 특히 MSC 세포 또는 골-형성 세포는, 하나 이상의 간엽 마커 및 CD34 를 동시-발현(즉, 그에 대해 양성임)한다. 본 명세서 전반에서 "동시-발현하다" 는 "~의 동시-발현을 포함하는" 이라는 의미를 포함함을 의도하며, 그러므로 그 세포는 그 세포를 특징화하는 특정 언급된 마커에 부가하여 다른 마커들을 발현할 수 있다.
- [0066] 세포가 특정 마커에 대해 양성이라고 말해지는 경우, 이는 당업자가 적합한 대조군과 비교하여 적절한 측정을 수행할 때 그 마커에 대해 예를 들어 항체-검출가능 또는 역 전사 폴리머라아제 연쇄 반응에 의한 검출과 같은 구별되는 신호의 존재 또는 증거를 결론내릴 것임을 의미한다. 그 방법이 마커의 정량적 평가를 가능하게 하는 경우, 양성 세포는 대조군과 유의하게 다르고 더 높거나 더 강한, 예를 들어 그러나 제한 없이, 대조군 세포에 의해 발생하는 신호보다 1.5 배 이상 높은, 예를 들어, 2 배 이상, 4 배 이상, 10 배 이상, 20 배 이상, 30 배 이상, 40 배 이상, 50 배 이상 높은 또는 심지어 더 높은 신호를 발생시킨다.
- [0067] 세포-특이적 마커의 발현은 당업계에 알려진 임의의 적합한 면역학적 기술, 예컨대 면역-세포화학법(immunocytochemistry) 또는 친화성 흡착법, 웨스턴 블롯 분석, FACS, ELISA 등을 사용하여, 또는 효소 활성의 임의의 적합한 생화학적 검정법에 의해, 또는 마커 mRNA 의 양을 측정하기 위한 임의의 적합한 기술, 예를 들어 노던 블롯, 반-정량적 또는 정량적 RT-PCR 등에 의해 검출될 수 있다.
- [0068] 본 명세서에 열거된 마커 단백질에 대한 핵산 및 아미노산 서열 데이터는 공지되어 있고, 공개 데이터베이스 예컨대, 그중에서도, NIH "Protein Reviews on the Web" 데이터베이스(<http://mpr.nci.nih.gov/prow/>), NIH "Entrez Gene" 데이터베이스(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene>) 또는 Uniprot/Swissprot 데이터베이스(<http://www.expasy.org/>)로부터 수득될 수 있다. 상기 마커에 대한 적합한 탐지 시약 및 방법은 상기 서열 정보에 기초하여 고안될 수 있거나, 또는 더욱 통상적으로, 상업적으로 입수가능하다(예를 들어, 공역된 모노클로날 항체 시약).
- [0069] 제한 없이 예를 들어, 상기 데이터베이스의 표제어를 순서대로 언급하면, 인간 CD34 항원은 "CD34", Gene ID 947, 및 acc. number P28906 (seq. version 2, entry version 74) (또한 Simmons et al. 1992. J Immunol

148: 267-271; Civin et al. 1984. J Immunol 133: 157) 하에서 발견되고; 인간 CD105 항원(또한 엔도글린으로 알려짐)은 "CD105", Gene ID 2022 및 acc. number P17813 (seq. version 2, entry version 91) (또한 Bellon et al. 1993. Eur J Immunol 23: 2340) 하에서 발견되고; 인간 CD90 항원(또한 Thy-1 막 당단백질로 알려짐)은 "CD90", Gene ID 7070 및 acc. number P04216 (seq. version 2, entry version 94) (또한 Cell surface Thy-1, ed. AF Reif and M Schlesinger, 1989, Marcel Dekker Inc., New York) 하에서 발견되고; 인간 CD73 항원(또한 엑토-5'-뉴클레오티다아제, EC 3.1.3.5 로 알려짐)은 "CD73", Gene ID 4907 및 acc. number P21589 (seq. version 1, entry version 87) (또한 Thomson et al. 1990. Tissue Antigens 35: 9) 하에서 발견된다.

[0070] CD34 의 탐지를 위한 입수가 가능한 항체 시료 예에는 그중에서도 특히 모노클로날 항체 6A6, 7E10 및 4H11 이 포함되고, CD105 에 대해서는 그중에서도 특히 모노클로날 항체 44G4, 1G2, E-9 및 GRE(Letarte et al. 1995. In: Leukocyte Typing V, ed. SF Schlossman et al., Oxford University Press, Oxford, p. 1756-1759)이 포함되고, CD90 에 대해서는 그중에서도 특히 모노클로날 항체 5E10(Craig et al. 1993. J Exp Med 177: 1331)이 포함되고, CD73 에 대해서는 그중에서도 특히 모노클로날 항체 1E9 및 7G2 (Thompson et al. 1990, *supra*) 및 4G4(Airas et al. 1993. J Immunol 151: 4228)이 포함된다.

[0071] 하나의 구현예에서, 하나 이상의 간엽 마커는 CD105, CD90 및 CD73 로부터 선택된다. 바람직하게는, 하나 이상의 간엽 마커가 CD90 또는 CD105 이고, 더욱 바람직하게는 하나 이상의 간엽 마커가 CD105 이다. 본 발명은 CD105 및 CD34 를 동시-발현하는 세포, CD90 및 CD34 를 동시-발현하는 세포 뿐 아니라, CD73 및 CD34 를 동시-발현하는 세포, 특히 MSC 세포 또는 골-형성 세포를 고찰한다. 또한 포함되는 것은 CD105, CD90 및 CD73 중 임의의 2개 또는 3개 모두를 CD34 와 함께 동시-발현하는 세포, 예컨대, 예를 들어, 적어도 CD105 및 CD90 을 CD34 와 함께 동시-발현하는 세포, 또는 적어도 CD105 및 CD73 을 CD34 와 함께 동시-발현하는 세포, 특히 MSC 세포 또는 골-형성 세포이다.

[0072] 실시예에서 보여지는 바와 같이, 상기 마커 프로파일의 세포는 또한 알칼리성 포스파타아제(ALP)를 동시-발현할 수 있다. 그러므로, 또한 제공되는 것은 하나 이상의 간엽 마커 및 CD34 를 동시-발현하고, 추가로 ALP, 더욱 바람직하게는 골-간-신장 유형의 ALP(ALPL)를 발현하는 본원에서 공개되는 바와 같은 세포, 특히 MSC 세포 또는 골-형성 세포이다. 후자의 유형의 전형적 인간 ALP 가 Weiss et al. 1986 (PNAS 83: 7182-7186)에서 Uniprot/Swissprot acc. number P05186 (seq. version 4, entry version 110) 하에 기재되어 있다. ALP 는 그의 공지된 서열 및 상업적으로 입수가 가능한 탐지 시약 예컨대 공액된 항체를 사용하여, 상기 설명된 바와 같이 본질적으로 탐지될 수 있다. 기질 예컨대 예를 들어 4-메틸엠펠리페릴 포스페이트(methylumbelliferyl phosphate)(Fernley et al. 1965. Biochem J. 97: 95-103) 또는 *p*-니트로페닐포스페이트를 사용한 효소-기재 검정이 또한 잘 알려져 있다.

[0073] 상기 마커 프로파일의 MSC 세포는 전형적으로 또한 간엽 세포의 다른 특질을 나타낼 수 있다. 예를 들어, MSC 세포는 추가로 CD106 (VCAM), CD166 (ALCAM), CD29, CD44, CD54 및 GATA-4 로부터 선택되는 간엽 마커를 하나 이상 또는 전부를 발현할 수 있다. MSC 세포는 추가로 어떤 형태학적 특질, 예컨대 하기 중 임의의 하나 이상을 나타낼 수 있다: 조직 배양 플라ستيك에 부착; 단층에서 성장; 및 돌출 핵인을 갖는 원형에서 타원형 핵이 있는 단핵 타원형, 별모양 또는 방추 형태.

[0074] 본원에서 사용되는 "골-형성 세포" 라는 용어는 일반적으로 골 물질 및/또는 골 매트릭스의 형성에 기여할 수 있는 세포를 언급하고, 개별적으로 골발생 분화 경로를 따라 부분적으로 또는 완전히 진행된 단리된 세포 또는 세포 집단을 뜻한다. 제한 없이, 골-형성 세포는 개별적으로 골조상세포, 골모세포, 골세포 및 당업계에 알려진 골발생 계통의 기타 세포 유형을 포함한다.

[0075] 당업자는 이처럼 일반적으로 본원에서 의도되는 "골-형성 세포" 라는 용어의 경계를 이해한다. 그럼에도 불구하고, 제한이 아닌 추가적 안내의 수단으로 본 골-형성 세포는 하기 특징 중 임의의 하나 이상 또는 전부를 나타낼 수 있다:

[0076] a) 상기 세포는 알칼리성 포스파타아제(ALP), 더욱 구체적으로 골-간-신장 유형의 ALP 의 발현을 포함한다;

[0077] b) 상기 세포는 프로콜라겐 유형 1 아미노-말단 프로펩티드(P1NP), 오스테오넥틴(ON), 오스테오펀(OP), 오스테오칼신(OCN) 및 골 시알로프로틴(BSP) 중 임의의 하나 이상의 발현을 포함한다;

[0078] c) 상기 세포는 외부 환경을 광화하거나, 칼슘-함유 세포 외부 매트릭스를 합성하는 능력의 증거를 보인다(예를 들어, 골발생 배지에 노출되었을 때; Jaiswal et al. 1997. J Cell Biochem 64: 295-312 참조). 세포 내부 칼슘 축적 및 매트릭스 단백질 내로의 침전은 통상적으로는, 예를 들어 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 내에서 배양하고, 세척하고 재-

배양한 후, 세포 내부에 존재하거나 세포 외부 매트릭스에 친전된 방사능 활성을 측정함으로써(미국 특허 제 5,972,703 호), 또는 알리자린 레드-기재 광화작용 검정(Alizarin red-based mineralization assay)(예를 들어, Gregory et al. 2004. Analytical Biochemistry 329: 77-84 참조)을 사용하여 측정될 수 있다;

[0079] d) 상기 세포는 실질적으로 지방세포 계통(예를 들어, 지방세포) 또는 연골세포 계통(예를 들어, 연골세포)의 세포 중 임의의 하나로, 바람직하게는 어느 것으로도 분화되지 않는다. 상기 세포 계통으로의 분화의 부재는 당업계에서 정립된 표준 분화 유도 조건(예를 들어, Pittenger et al. 1999. Science 284: 143-7 참조), 및 검정 방법(예를 들어, 유도되는 경우, 지방세포는 전형적으로 지질 축적을 보여주는 오일 레드 0 로 염색되고; 연골세포는 전형적으로 알시안 블루 또는 사프란인 0 로 염색됨)을 사용하여 시험될 수 있다. 지방발생 및/또는 연골발생 분화에 대한 경향의 실질적 결여는 적형적으로 시험되는 세포의 50% 미만, 또는 30% 미만, 또는 5% 미만, 또는 1% 미만이 각각의 시험에 적용되는 경우 지방발생 또는 연골발생 분화의 징조를 보일 것임을 의미할 수 있다.

[0080] 하나의 구현예에서 골-형성 세포는 상기 a), c) 및 d) 하에 열거된 모든 특징들을 나타낼 수 있다.

[0081] 추가로 고찰되는 것은 본원에서 공개되는 바와 같은 단리된 MSC 세포 또는 골-형성 세포를 포함하거나, 이러한 상기 세포 유형을 모두 포함하는 임의의 세포 집단이다. 본원에서 공개되는 바와 같은 상기 MSC 세포 또는 골-형성 세포, 또는 이러한 세포 유형을 모두 함께 합한 것은, 상기 세포 집단 내에 존재하는 세포의 2 % 이상, 바람직하게는 5 % 이상, 예컨대 10 % 이상, 더욱 바람직하게는 20 % 이상, 예컨대 30 % 이상, 더욱더 바람직하게는 40 % 이상, 예컨대 50 % 이상, 또는 매우 바람직하게는 60 % 이상, 예컨대 70 % 이상, 80 % 이상, 90 % 이상 또는 100 % 이하를 구성할 수 있다.

[0082] 바람직하게는, 본원에서 공개되는 바와 같은 MSC 세포 또는 골-형성 세포, 또는 그것을 포함하는 세포 집단은, 동물 기원, 더욱 바람직하게는 비-인간 포유류 또는 인간 기원, 더욱더 바람직하게는 인간 기원이다.

[0083] 본원에서 설명되는 바와 같은 하나 이상의 간엽 마커 및 CD34, 및 임의로 임의의 부가적 관심 표지를 동시-발현하는 MSC 세포는 그 자체로 공지된 방법에 의해 수득될 수 있다.

[0084] 예를 들어, 전통적 방법은 대상의 생물학적 샘플로부터 MSC 또는 BMSC 세포를 단리하고 임의로 증식시킴을 가능하게 한다.

[0085] 본원에서 사용되는 "생물학적 샘플" 또는 "샘플"이라는 용어는 일반적으로 생물학적 공급원으로부터, 예를 들어, 유기체, 기관, 조직 또는 세포 배양물 등으로부터 수득되는 샘플을 말한다. 동물 대상, 예컨대 비-인간 포유류 또는 인간 대상의 생물학적 샘플은 그러한 대상으로부터 제거되고 그의 세포를 포함하는 샘플을 말한다. 대상의 생물학적 샘플의 수득 방법은 당업계에 잘 알려져 있으며, 예를 들어, 조직 생검 또는 혈액 또는 골수 채취이다. 대상의 유용한 샘플은 그들의 MSC 또는 BMSC 세포를 포함한다. 이러한 샘플은 전형적으로 대상의 골수로부터, 예를 들어, 장골 능선, 대퇴, 경골, 척추, 갈비뼈 또는 기타 골수강으로부터 수득될 수 있다. MSC 를 포함하는 또다른 유용한 생물학적 샘플은, 예를 들어, 대상의 혈액, 태줄, 태반, 태아 난황 주머니, 피부, 골막, 또는 지방 조직으로부터 유래될 수 있다.

[0086] MSC 또는 BMSC 는 기질 표면에, 특히 조직 배양 플라스틱 표면에 부착할 수 있는 세포로부터 거기서 선별하고 배양함으로써 골수 또는 다른 공급원으로부터 단리되고 증식될 수 있다. 이 원칙에 기초한 프로토콜은 Pittenger et al. 1999 (supra) 및 본 명세서의 다른 곳에서 인용된 관련 특허 문서에 기재되어 있을 뿐만 아니라, Alhadlaq & Mao 2004(Stem Cells Dev 13: 436-48)에서 리뷰되었다. 이들 프로토콜은 본원에서 적용가능하다.

[0087] 바람직한 마커 단백질을 동시-발현하는 세포는 그 자체로 공지된 방법에 의해, 예컨대, 예를 들어, 형광 활성 세포 단리(FACS), 자기 활성 세포 단리(MACS) 또는 친화도-기재 기술 그중에서도 특히 친화 크로마토그래피를 사용하여, 단리되고 임의로 증식된 MSC 또는 BMSC 세포의 일반적 집단으로부터, 선별되고, 농축되거나 단리될 수 있다. 바람직한 발현 프로필을 갖는 살아있는 세포는 각각의 마커에 특이적인 시료(가장 통상적으로는 면역학적 시료 예컨대, 예를 들어, 모노클로날 항체)와 결합되게 되며, 예컨대 상기 시료에 의해 결합된 세포를 그렇게 결합되지 않은 세포로부터 선별 또는 포획함을 촉진하기 위해, 그 시료가 순서대로 변형된다(예를 들어, 형광단에 의해, 또는 자기 입자 또는 또다른 유형의 정지상에 고정화시킴으로써).

[0088] 상기 방법들에 대한 일반적 안내를 위해, 그중에서도 특히 하기를 참조한다: Flow Cytometry and Cell Sorting,

2nd ed., by Andreas Radbruch (ed.), Springer 1999 (ISBN 3540656308); In Living Color: Protocols in Flow Cytometry and Cell Sorting, 1st ed., by RA Diamond 및 S Demaggio (eds.), Springer 2000 (ISBN 3540651497); Flow Cytometry Protocols (Methods in Molecular Biology), 2nd ed., by TS Hawley and RG Hawley (eds.), Humana Press 2004 (ISBN 1588292355); Affinity Separations: A Practical Approach, P Matejtschuk (ed.), Oxford University Press, 1997 (ISBN 0199635501); 및 Dainiak et al. 2007. Adv Biochem Eng Biotechnol 106: 1-18.

[0089] 본 발명자는 또한 MSC 세포 또는 골-형성 세포의 시험관 내 증식을 위한, 및 특히 본원에서 정의되는 바와 같은 하나 이상의 간엽 마커 및 CD34 를 동시-발현하는 단리된 MSC 세포 또는 골-형성 세포의 시험관 내 증식을 위한 유리한 조건들을 발견했으며, 이는 또한 하나 이상의 간엽 마커 및 CD34 를 동시-발현하는 MSC 세포 또는 골-형성 세포를 비교적 더욱 불균일한 MSC 또는 골-형성 세포 집단으로부터 농축하기 위해 조정될 수 있다.

[0090] 이 문맥에서 사용되는 "농축" 이라는 용어는 세포 집단 내에서 바람직한 세포 유형 또는 세포 표현형의 상대적 비율을 증가시킴을 의미한다. 예를 들어, 농축 대상이 되는 출발 세포 집단으로부터, 상기 CD34 양성 MSC 세포 또는 골-형성 세포는 산출되는 세포 집단 내에 존재하는 세포의 2% 이상, 바람직하게는 5% 이상, 예컨대 10% 이상, 더욱 바람직하게는 20% 이상, 예컨대 30% 이상, 더욱더 바람직하게는 40% 이상, 예컨대 50% 이상, 또는 매우 바람직하게는 60% 이상, 예컨대 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상 또는 100% 이하로 농축될 수 있다.

MSC 세포 또는 MSC 세포 집단, 또는 골-형성 세포 또는 골-형성 세포 집단은, 조혈 성장 인자에, 또는 혈관발생 성장 인자에, 또는 조혈 및 혈관발생 성장 인자의 조합에 노출되며, 후자의 조합이 세포 증식 또는 농축에 대한 상승 효과를 달성한다. 조혈 및 혈관발생 성장 인자는 세포와 동시에 또는 임의의 순서에 따라 연속적으로, 바람직하게는 동시에 접촉될 수 있다. 유리하게는, 상기 세포는 그의 증식 및/또는 농축을 추가로 향상시키기 위해 FGF-2 에, 바람직하게는 동시에 노출될 수 있다.

[0091] 하나의 구현예에서, 조혈 성장 인자는 집락 자극 인자 2(CSF2), CSF3, 대식세포 CSF(M-CSF), 과립구 단핵구 CSF(GM-CSF), IFN-감마가 포함되는 인터페론(IFN), 암 괴사 인자(TNF), 및 조혈적으로 활성인 사이토카인 예컨대 그중에서도 특히 인터루킨 2(IL2)를 포함하거나 이들로 이루어진 군으로부터 선택된다. 더욱 바람직하게는, 조혈 성장 인자는 GM-CSF 및 IFN-감마로부터 선택되며, 더욱더 바람직하게는 IFN-감마일 수 있다. 하나의 구현예에서, 혈관발생 성장 인자는 혈소판-유래 성장 인자(PDGF), 혈관 내피 성장 인자(VEGF1 또는 2), 폰 빌레브란트 인자(vWF), 안지오프로테틴 2, 섬유모세포 성장 인자(FGF1, FGF3 또는 다른 FGF 인자) 및 에리트로포이에틴(EPO)을 포함하거나 이들로 이루어진 군으로부터 선택된다. 더욱 바람직하게는, 혈관발생 성장 인자는 PDGF, FGF-1 및 FGF-3, 더욱더 바람직하게는 PDGF 및 FGF-3 으로부터 선택되며, 더욱더 바람직하게는 PDGF 일 수 있다.

[0092] 본원에서 사용되는 "노출" 이라는 용어는 하나 이상의 분자, 성분 또는 물질을 또다른 것과 직접적으로 또는 간접적으로 합침 즉, 접촉시킴으로써, 그들 사이의 상호작용을 촉진시킴을 의미한다. 전형적으로, 성장 인자(들)는 세포가 배양되는 배지 내에 포함되는 방법으로 세포와 접촉될 수 있다. 본원에서 적용가능한 배지, 일회용품 및 세포 배양의 조건은 일반적으로 당업계, 예컨대 MSC, BMSC 및 골-형성 세포의 번식 및 분화 분야에 서 알려진 바와 같을 수 있다.

[0093] 골-형성 세포는 당업계에 알려진 단리된 MSC 세포로부터 분화에 의해 수득될 수 있다. 예를 들어, WO 2007/093431 의 방법이 사용될 수 있으며, 여기서 단리된 MSC 세포는 혈청 또는 혈장 및 염기성 섬유모세포 성장 인자(FGF-2)의 존재 하에서 배양된다. 또다른 구현예에서, 골발생 계통 세포는 Pittenger et al. 1999(supra) 및 Jaiswal et al. 1997(supra)에 의해 기재된 바와 같이 골발생 배지 내에서 MSC 세포를 분화시킴으로써 수득될 수 있다. 임의로, 통상적인 골발생 배지는 FGF-2 로 영양보충될 수 있다. 골-형성 세포는 또한 Skjodt et al. 1985 (J Endocrinol 105: 391-6)에 의해 기재된 바와 같이 해면 뼈로부터 직접 단리되고 배양될 수 있다.

[0094] 하나의 구현예에서, 골-형성 세포는 하나 이상의 간엽 마커 및 CD34 를 동시-발현하는 단리된 MSC 세포로부터 분화될 수 있다. 그러한 경우, 그렇게 수득된 골-형성 세포 집단은 상기 하나 이상의 간엽 마커 및 CD34 를 동시-발현하는 골-형성 세포를 위해 농축될 수 있다. 또다른 실시예에서, 골-형성 세포는 하나 이상의 간엽 마커 및 CD34 를 동시-발현하는 세포를 위해 농축된 적이 없는 MSC 세포로부터 수득될 수 있고, 또는 대상으로부터 직접 단리될 수 있다. 그러한 경우, 그렇게 수득된 골-형성 세포 집단은 일반적으로 상기 하나 이상의 간엽 마커 및 CD34 를 동시-발현하는 골-형성 세포를 위해 농축되지 않는다.

[0095] 상기 상황들 중 임의에서, MSC 세포에 대해 상기 기재된 바와 같은 기술(예컨대, 예를 들어, FACS, MACS 또는

친화도-기재 기술)이 비교적 더욱 불균일한 골 세포 집단으로부터 상기 하나 이상의 간엽 마커 및 CD34 를 동시-발현하는 골-형성 세포를 선별, 증식 또는 단리하기 위해, 유사하게 사용될 수 있다. 상기 하나 이상의 간엽 마커 및 CD34 를 동시-발현하는 골-형성 세포는 또한 본 명세서에서 교시되는 바와 같은 조혈 및/또는 혈관발생 성장 인자를 사용하여 농축될 수 있다.

[0096] 본 발명의 다양한 양상들의 문맥에서, "골-관련 장애" 라는 용어는, 그의 치료가 골발생 계통 또는 골-형성 세포, 예를 들어, 골조상세포, 골모세포 또는 골세포를 그 장애를 갖는 대상에게 투여함으로써 이익을 얻을 수 있는 임의의 유형의 골 질환을 언급한다. 특히, 이러한 장애는, 예를 들어, 감소된 골 형성 또는 과도한 골 흡수, 골 내에 존재하는 골모세포 또는 골세포의 감소된 수, 생존력 또는 기능, 대상 내 감소된 골 질량, 골의 가늘어짐, 저하된 골 강도 또는 탄성 등에 의해 특징화될 수 있다.

[0097] 제한 없이 예를 들어 상기 용어는 국부적 또는 전신적 장애, 예컨대, 임의의 유형의 골다공증 또는 골감소증, 예를 들어, 1차, 폐경후, 노인성, 코르티코이드-유도성, 임의의 2차, 단일- 또는 다부위 골괴사, 임의의 유형의 골절, 예를 들어, 불유합, 부정유합, 지연 유합 골절 또는 압박, 골 유합이 필요한 상태(예를 들어, 척추 유합 및 재건), 상안악면 골절, 골 재건술, 예를 들어, 트라우마 상해 또는 암 수술 후, 두개-안면 골 재건술, 불완전 골발생증, 골용해성 골 암, 파제트병, 내분비계 장애, 저인산혈증, 저칼슘혈증, 신장성 골발생장애, 골연화증, 무력성 골 질환, 류마티스 관절염, 부갑상샘항진증, 1차 부갑상샘항진증, 2차 부갑상샘항진증, 치주질환, 고르함-스타우트 질환 및 맥쿤-알브라이트 증후군을 포함한다.

[0098] 본 발명에서 기재되는 바와 같은 것들을 포함하는 MSC, BMSC 및 골-형성 세포 및 집단은 특히 골-관련 장애의 연구, 예방 및 치료 분야에서 다양한 용도를 갖는다.

[0099] 하나의 양상에서, 상기 세포 또는 세포 집단은 골 매트릭스를 시험관 내에서 생성하는 데 사용될 수 있다. 상기 골 매트릭스는, 예를 들어, 상기 세포 또는 세포 집단과 함께 또는 그들 없이, 골 관련 질환의 치료에 이용될 수 있다.

[0100] 본 세포 또는 세포 집단을 대상으로 도입하는 것은 상기 대상의 뼈 골절 및 골-관련 장애의 치료에 있어서 유용할 수 있다. "대상" 또는 "환자" 라는 용어는 치료, 관찰 또는 실험의 목적이 되는 바람직하게는 동물, 더욱 바람직하게는 온혈 동물, 여전히 더욱 바람직하게는 척추동물, 및 더욱더 바람직하게는 구체적으로 인간 및 비-인간 포유류가 포함되는 포유류를 언급한다. "포유류" 라는 용어에는 인간, 가축 및 농장 동물, 동물원 동물, 스포츠 동물, 애완 동물, 반려 동물 및 실험 동물, 예컨대, 예를 들어, 마우스, 랫트, 햄스터, 토끼, 개, 고양이, 기니아 피그, 소, 젓소, 양, 말, 돼지 및 영장류, 예를 들어, 원숭이 및 유인원으로 분류되는 임의의 동물이 포함되나 이에 제한되지 않는다. 특히 바람직한 것은 양 성별 및 모든 연령 카테고리가 포함되는 인간 대상이다.

[0101] 본 치료는 특히 그것을 필요로 하는 대상에게 주어질 것이며, 이 문구에는 예컨대 뼈 골절 또는 골-관련 장애와 같은 주어진 상태의 치료로부터 이익을 얻을 수 있는 대상이 포함된다. 그러한 대상에는 상기 상태로 진단을 받은 대상, 상기 상태로 발달할 경향이 있는 대상 및/또는 상기 상태가 방지되어야 할 대상이 제한 없이 포함될 수 있다.

[0102] "치료하다" 또는 "치료" 라는 용어는 이미 발달된 장애의 치료적 처치, 예컨대 이미 발달된 골-관련 장애의 치료 뿐 아니라, 그 목적이 바람직하지 않은 병의 발생 가능성을 방지 또는 경감함인, 예컨대 골-관련 장애의 발병 및 진행의 가능성을 방지함인, 예방적 또는 방지적 조치를 모두 포함한다. 유익하거나 바람직한 임상 결과에는 하나 이상의 증상 또는 하나 이상의 생물학적 마커의 경감, 질환 범위의 감소, 질환의 안정화된(즉, 악화되지 않는) 상태, 질환 진행의 연기 또는 감속, 질환 상태의 개선 또는 완화 등이 제한 없이 포함될 수 있다. "치료" 는 또한 치료를 받지 않은 경우에 기대되는 생존과 비교하여 연장된 생존을 의미할 수 있다.

[0103] "예방적 유효량" 이라는 용어는 연구자, 의사, 의학 박사 또는 기타 임상외과에 의해 탐색되는 대상에서 장애의 발생을 억제거나 지연시키는 활성 화합물 또는 약학적 제제의 양을 말한다. 본원에서 사용되는 "치료적 유효량" 이라는 용어는 연구자, 의사, 의학 박사 또는 기타 임상외과에 의해 탐색되는 대상에서, 그중에서도 특히 치료되는 질환 또는 장애의 증상의 경감이 포함될 수 있는 생물학적 또는 의학적 반응을 유도하는 활성 화합물 또는 약학적 제제의 양을 말한다. 치료적 및 예방적 유효량을 결정하기 위한 방법이 당업계에 알려져 있다.

[0104] 치료는 본원에서 정의되는 바와 같은 자가형(즉, 치료되는 대상으로부터 유래된 세포), 동종이형(즉, 치료되는 대상은 아니나 동일한 종에 속하는 대상으로부터 유래된 세포), 또는 이종(즉, 치료되는 대상이 아닌 종에 속하

는 대상으로부터 유래된 세포)인 MSC, BMSC 또는 골-형성 세포 또는 세포 집단을 사용할 수 있다.

- [0105] 본원에서 수득되는 바와 같은 인간 자가형 또는 동종이형 MSC, BMSC 또는 골-형성 세포 또는 세포 집단을 사용하는 인간 대상의 치료가 특히 예상된다.
- [0106] 적절히, 본원에서 유래되는 MSC, BMSC 또는 골-형성 세포 및 세포 집단은 약학적 조성물로서 제형화되고 투여될 수 있다.
- [0107] 약학적 조성물은 전형적으로 본 발명의 MSC, BMSC 또는 골-형성 세포 또는 세포 집단을 활성 성분으로서, 및 하나 이상의 약학적으로 수용가능한 담체/부형제를 포함할 것이다. 본원에서 사용되는, "담체" 또는 "부형제"에는 임의의 및 모든 용매, 희석액, 완충액(예컨대, 예를 들어, 중성 완충 식염수 또는 포스페이트 완충 식염수), 용해화제, 콜로이드, 분산 용매, 매개체, 충전물, 킬레이팅 제제(예컨대, 예를 들어, EDTA 또는 글루타치온), 아미노산(예컨대, 예를 들어, 글라이신), 단백질, 붕괴제, 결합제, 윤활제, 습윤 제제, 유화제, 감미료, 착색제, 조미료, 방향제, 증점제, 데포 효과(depot effect)를 달성하기 위한 제제, 코팅, 항진균 제제, 보존제, 안정화제, 항산화제, 산도 조절 제제, 흡수 지연 제제 등이 포함될 수 있다. 약학적으로 활성인 물질을 위한 상기 매체 및 제제의 용도가 당업계에 잘 알려져 있다. 이러한 물질은 무-독성이어야 하고 세포의 활성을 간섭해서는 안된다.
- [0108] 담체 또는 부형제 또는 기타 물질의 정확한 특성은 투여 경로에 따라 다를 것이다. 예를 들어, 조성물은 발열원이 없고 적합한 pH, 등장성 및 안정성을 갖는 비경구로 수용가능한 수용액의 형태일 수 있다. 의학적 제형의 일반적 원리에 관해, [Cell Therapy: Stem Cell Transplantation, Gene Therapy, and Cellular Immunotherapy, by G. Morstyn & W. Sheridan eds., Cambridge University Press, 1996; 및 Hematopoietic Stem Cell Therapy, E. D. Ball, J. Lister & P. Law, Churchill Livingstone, 2000] 을 참조한다.
- [0109] 이러한 약학적 조성물은 세포의 생존력을 보장하는 추가의 성분을 그 안에 함유할 수 있다. 예를 들어, 조성물은 바람직한 pH, 더욱 통상적으로는 중성에 가까운 pH 를 달성하기 위해 적합한 완충제 시스템(예를 들어, 포스페이트 또는 카르보네이트 완충제 시스템)을 포함할 수 있고, 삼투압 스트레스를 방지하기 위해 세포의 등장성 조건을 보장하기 위한 충분한 염을 포함할 수 있다. 예를 들어, 이들 목적에 적합한 용액은 당업계에 알려져 있는 포스페이트-완충 식염수(PBS), 소듐 클로라이드 용액, 링거 주사액(Ringer's Injection) 또는 락테이트 링거 주사액(Lactated Ringer's Injection)일 수 있다. 또한, 조성물은 세포의 생존력을 증가시킬 수 있는 담체 단백질, 예를 들어 알부민을 포함할 수 있다.
- [0110] 약학적 조성물은 골 부상 및 결함을 복구하는데 유용한 추가의 성분을 포함할 수 있다. 예를 들어, 이러한 성분에는 골 형태형성 단백질, 골 매트릭스(예를 들어, 본 발명의 세포에 의해 또는 기타 방법에 의해 시험관 내 생성된 골 매트릭스), 히드록시아파타이트/트리칼슘 포스페이트 입자(HA/TCP), 젤라틴, 폴리-락트산, 폴리-락트 글리콜산, 히알루론산, 키토산, 폴리-L-라이신, 및 콜라겐이 제한 없이 포함될 수 있다. 예를 들어, 골모세포성 세포는 그 조성물을 골발생(그 자체만의 골 형성)일 뿐 아니라 골유도성으로 만들기 위해 탈광화된 골 매트릭스(DBM) 또는 기타 매트릭스와 조합될 수 있다. 자가형 골수 세포를 동종이형 DBM 과 함께 사용한 유사한 방법이 양호한 결과를 산출했다(Connolly et al. 1995. Clin Orthop 313: 8-18).
- [0111] 약학적 조성물은 보조적 생물활성 인자 예컨대 골 형태형성 단백질, 예컨대 BMP-2, BMP-7 또는 BMP-4, 또는 임의의 기타 성장 인자를 추가로 포함하거나 이와 함께 동시-투여될 수 있다. 기타 잠재적 동반 성분에는 골 재생을 돕는데 적합한 칼슘 또는 포스페이트의 무기 공급원이 포함된다(WO 00/07639). 바람직한 경우, 세포 제제는 개선된 조직 재생을 제공하기 위해 담체 매트릭스 또는 물질 상에서 투여될 수 있다. 예를 들어, 상기 물질은 과립 세라믹, 또는 생중합체 예컨대 젤라틴, 콜라겐, 오스테오넥틴, 피브리노겐, 또는 오스테오칼신 일 수 있다. 다공성 매트릭스는 표준 기술에 따라 합성될 수 있다(예를 들어, Mikos et al., Biomaterials 14:323, 1993; Mikos et al., Polymer 35:1068, 1994; Cook et al., J. Biomed. Mater. Res. 35:513, 1997).
- [0112] 대안적으로 또는 부가적으로, 본 발명의 세포는 대상의 골 병변, 예를 들어, 수술 또는 골절 부위 내로 도입되기 전에 관심의 핵산으로 안정적으로 또는 일시적으로 형질전환될 수 있다. 관심의 핵산 서열에는 골모세포의 성장, 분화 및/또는 광화작용을 향상시키는 유전자 산물을 인코딩하는 서열이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다. 예를 들어, BMP-2 에 대한 발현 시스템이, 비-치유 골절 또는 골다공증의 치료 목적을 위해 안정적 또는 일시적 방식으로 도입될 수 있다. 세포 형질전환 방법은 당업자에게 알려져 있다.
- [0113] 추가의 양상에서, 본 발명은 조성물을 대상에게, 예컨대 예를 들어 전신적으로, 국소적으로 또는 골 병변 부위에, 투여하기 위한 외과적 기구를 포함하고, 본 발명의 상기 세포 또는 세포 집단, 또는 그러한 세포 또는 세포

집단을 포함하는 약학적 조성물을 추가로 포함하는 배양물에 관한 것이며, 여기서 그 배양물은 약학적 조성물을 예를 들어 전신적으로, 국소적으로 또는 골 병변 부위에 투여하기 위해 조정된다. 예를 들어, 적합한 외과적 기구는 본 발명의 세포를 포함하는 액체 조성물을, 예컨대 전신적으로 또는 골 병변 부위에, 주사할 수 있다.

[0114] 세포 또는 세포 집단은 그들이 의도되는 조직 부위로 이식 또는 이동하고 기능적으로 결손된 영역을 재구성하거나 재생할 수 있도록 하는 방식으로 투여될 수 있다. 조성물의 투여는 복구되는 근골격 부위에 따라 다를 것이다. 예를 들어, 조직을 재건하거나 스포츠, 또는 고관절 대체물과 같은 보철물 장치를 삽입하기 위한 수술 절차에 따라서 골발생이 촉진될 수 있다. 다른 경우에는, 외과적 수술이 필요하지 않다면, 조성물은 주사에 의해 또는 (예를 들어, 척추 복구를 위해) 조작 내시경을 사용하여 투여될 수 있다.

[0115] 하나의 구현예에서 상기 정의된 바와 같은 약학적 세포 제제가 액체 조성물의 형태로 투여될 수 있다. 구현예들에서, 세포 또는 그러한 것을 포함하는 약학적 조성물이 전신적으로, 국소적으로 또는 병변 부위에 투여될 수 있다.

[0116] 또다른 구현예에서, 세포 또는 세포 집단은 이식물을 제공하기에 적합한 기질로 이동되고/되거나 그 위에서 배양될 수 있다. 세포가 적용되고 배양될 수 있는 기질은 티타늄, 코발트/크롬 합금 또는 스테인레스 스틸과 같은 금속, 칼슘 포스페이트와 같은 생물활성 표면, 폴리에틸렌과 같은 중합체 표면 등일 수 있다. 덜 바람직하지만, 유리 세라믹과 같은 규산 물질도 기질로서 사용될 수 있다. 가장 바람직한 것은 티타늄과 같은 금속, 및 칼슘포스페이트이다(비록 칼슘포스페이트가 기질의 필수적인 성분은 아니지만). 기질은 다공성 또는 비-다공성일 수 있다.

[0117] 예를 들어, 증식된 세포, 또는 배양 접시 내에서 분화하고 있는 세포는 필요하다면 분화 과정을 증대 및/또는 지속시키기 위해 본 발명의 액체 영양 배지 내에서 고체 지지체를 인큐베이션함으로써 3-차원 고체 지지체 상으로 이동될 수 있다. 세포는, 예를 들어 상기 세포를 함유하는 액체 현탁액으로 3-차원 고체 지지체를 함침함으로써, 3-차원 고체 지지체 상으로 이동될 수 있다. 이러한 방식으로 수득된 함침된 지지체는 인간 대상에게 이식될 수 있다. 이러한 함침된 지지체는 또한 최종적으로 이식되기 전에, 액체 배양 배지에 지지체를 담금으로써 재배양될 수 있다.

[0118] 3-차원 고체 지지체는 인간에게 이식될 수 있게 하기 위해 생체적합성일 필요가 있다. 이것은 임의의 적합한 형상 예컨대 실린더, 구형, 플레이트 또는 임의의 형상의 일부일 수 있다. 생체적합성 3-차원 고체 지지체로서 적합한 물질 중에서 특히, 칼슘 카보네이트, 및 특히 아라고나이트, 구체적으로는 산호 뼈대의 형태, 알루미나 기재, 지르코니아 기재, 트리칼슘 포스페이트 및/또는 히드록시아파타이트 기재 다공성 세라믹, 칼슘 카보네이트를 히드록시아파타이트로 전환되게 할 수 있는 열수 교환에 의해 수득된 모조 산호 뼈대, 또는 그 밖의 아파타이트-규회석 유리 세라믹, Bioglass(TM) 유리와 같은 생물활성 유리 세라믹이 언급될 수 있다.

[0119] 상기 양상 및 구현예는 하기의 비제한적 실시예들에 의해 더욱 뒷받침된다.

[0120] 실시예들은 향상된 골 형성 특성 및 전-혈관발생 특성을 갖는, CD34(혈구-혈관발생 특징) 및 CD105(중간엽 특징)를 높은 수준으로 동시-발현하는 간엽 간질 세포로부터 유래된 골조상세포의 새로운 집단 아집단의 단리를 설명한다. 이 집단은 정상적으로 증식된 간엽 간질 세포의 1% 미만에 해당한다. 그러나, 이 집단은 이중 세포 분류(dual cell sorting)에 의해 및/또는 특별 조건하에서의 배양에 의해 90 배까지 성공적으로 농축될 수 있다. 이렇게 농축된 CD105/CD34+ 세포 집단(예를 들어 5 내지 50% 이하)은 골 질환의 치료에 현저히 유익한데, 이는 이렇게 농축된 집단이 상당히 더 높은 증식 잠재성 및 상당히 더 높은 골 재건축 특성을 갖기 때문이다. 추가로, 그의 혈관발생(CD34+) 성질이 치료 이익을 더하는데, 이는 재혈관신생 유도 및 골 재건축의 조합이 바람직한 것이기 때문이다.

[0121] 실시예 1

[0122] 골수 MSC 의 단리 및 배양. 환자 또는 건강한 지원자의 장골능선으로부터 100 ml 의 heparin화된 골수(BM)를 채취하였다. BM 을 포스페이트-완충 식염수(PBS, 2v:v)와 혼합하고, 밀도 구배 Ficoll 용액 상에 쌓아두었다. 원심분리후, 경계면으로부터 단핵 세포를 수확하고, PBS 에서 2 회 세척하였다. 세포를 20% 혈장이 보충된, 임의로 FGF-2 가 보충된 DMEM 배지에 재현탁하였다. 세포를 1×10^7 개 세포/175cm² 플라스크로 플레이트팅하고(시험된 범위 1×10^5 - 1×10^9 개), 5% CO₂ 함유 37°C 습윤 분위기에서 유지시켰다. 세포를 초기 배지 교환 전에 1 일 내지 4일 동안 부착되도록 두고, 이어서 하기 기재되는 바와 같은 시간 간격 동안 배양했다.

- [0123] *CD34 양성 세포의 분리.* 제 14 일의 표준 간엽 배양(DMEM 및 20% 혈장) 후, 대략 1×10^8 개 세포를 수확하고 PBS 에서 유지시켰다. 전체 세포 집단을 그후 APC-공액된 항-CD34 모노클로날 항체로 1시간 동안 상온에서 표지화했다. PBS 로 세척한 후, 세포를 원심분리로 침강시키고 1 ml 의 빙냉, 탈기 분류 완충제에 재현탁시켰다.
- [0124] 백톤 디킨슨 면역세포분석 시스템(Becton Dickinson Immunocytometry system) 상에서 세포 정제를 수행했다. 세포를 680nm 녹색 형광 파라미터를 사용하여 분류한 후, 형광 세포를 함유하는 점적을 멸균 마이크로원심분리기 튜브(Fisher scientific) 내에서 수집하고, 원심분리로 침강시킨 후 즉시 적절한 플라스크 내에 시딩했다.
- [0125] *배양에 의한 농축.* 제 28 일에 트립신 용액을 37 °C 에서 1-5 분 동안 사용하여 MSC 세포를 떼어냈다. 실시예에 기재된 성장 인자들과 함께 또는 이들 없이 동일한 표준 조건으로 또다른 1 주일 동안 배양하기 위해, 세포를 계수하고, 1×10^6 개 세포/ 175cm^2 로 플레이팅하였다.
- [0126] *표현형 분석.* 면역생물학적 세포 표면 마커를 유세포 분석에 의해 분석하였다. 세포를 하기 공액된 모노클로날 항체: CD105, CD90 및 CD73, 뿐 아니라 CD34 와 함께 15 분 동안 인큐베이션한 다음 PBS 로 세척한 후, 원심분리하고, 0.3 ml PBS 에 재현탁시켰다.
- [0127] *ALP 염색.* 세포를 ALP 탐지를 위해 제 28 일 또는 제 35 일에 염색했다. 세포를 PBS 로 2 회 세척한 후, 60% 시트레이트 완충 아세톤으로 30초 동안 상온에서 고정시킨 후, 증류수로 45 초 동안 다시 행겼다. 그 후 세포를 Fast Blue RR/Naphtol AS-MX 포스페이트 용액으로 30 분 동안 상온에서, 및 어둠 속에서 염색했다. 세포를 증류수로 2 분 동안 세척한 후, Mayer's Haematoxylin 용액에서 10 분 동안 대조염색했다. 마지막으로, 세포를 증류수에서 3 분 동안 세척했다.
- [0128] *광화작용 검정.* 제 28일 또는 제 35일에 세포를 트립신과 함께 인큐베이션하여 배양으로부터 회수하고, 6-웰 플레이트에서 60 내지 120000 개 세포/웰로 증식 배지 내에 플레이팅했다(12500 개 세포/ cm^2). 다음날, 배지를 2.5 ml 골발생 배지로 교체했다. 세포를 2, 3 또는 4 주 동안 배양했다. 배지를 매 3-4 일 마다 교체했다. 배양 2 주 후, 세포를 3.7% 포름알데히드/PBS 에서 고정시키고 알리자린 레드로 염색했다.
- [0129] *네트워크 형성 검정.* 세포 집단이 모세혈관-유사 구조의 네트워크를 형성하는 능력을 평가하기 위해 매트릭스 젤 튜브 형성 검정(Matrigel tube formation assay)을 수행했다. 간략히, 24-웰 배양 플레이트를 웰 당 10 μl (3.5 mg/ml)의 순수 Growth Factor-reduced Matrigel(BD Matrigel Basement Membrane Matrix, BD Biosciences, Erembodegem-Aalst, Belgium)로 제조사의 지시에 따라 코팅한 후, 30 분 동안 37 °C 에서 중합되도록 놔뒀다. 총 30×10^3 개 세포/웰을 Matrigel 상에 시딩하고, 6 시간 동안 37 °C 에서 인큐베이션했다. 세척 후, 도립 위상차 현미경을 사용하여 네트워크 및 튜브 형성을 관찰했다.
- [0130] *배지*
- [0131] 텍사메타손 희석액:
- [0132] Dex1 (5.10^{-4} M): 2 μl 텍사메타손 저장액 (5.10^{-2} M) + 198 μl α MEM
- [0133] Dex2 (10^{-6} M): 2 μl Dex1 (5.10^{-4} M) + 998 μl α MEM
- [0134] *골발생 배지(40 ml)*
- [0135] 부피 최종 농도
- [0136] α MEM 31 ml /
- [0137] FCS 6 ml 15%
- [0138] PenStrepGlu (100x) 400 μl 1x
- [0139] 텍사메타손 (Dex2) 400 μl 10^{-8} M
- [0140] 아스코르브산 200 μl 50 $\mu\text{g/ml}$
- [0141] β -글리세로포스페이트 2 ml 10 mM

[0142] 실시예 2

[0143] 세포 표현형

[0144] 세포 분류 또는 성장 인자 자극 없이 실시예 1 ("골수 MSC 의 분리 및 배양") 에서 설명한 바와 같이 수득된 MSC 세포 집단은, 그들의 간엽 기원과 일치되게 높은 수준의 간엽 마커(CD90, CD105 및 CD73)를 발현했다. 조혈 CD34 표면 분자가 낮은 수준(통상적으로 전체 집단의 5% 내지 15% 사이)으로 발현되었다. 세포의 골 잠재성을 나타내는 ALP 마커가 또한 매우 높게 발현되었다(표 1 및 2). CD34+ 세포 중 3 분의 1은 또한 CD90+ 였다(도 1 - CD90/CD34+ 의 낮은 및 높은 수준의 발현)

[0145] 표 1: MSC 의 표현형 마커(FACS에 의해 양성으로 간주되는 세포의 백분율)

	전체 세포 집단		
	CD90*	CD34	ALP
#1	95%	4.3%	9%
#2	92%	5.9%	11%
#3	98%	18.5%	6%
#4	99%	3.1%	7.8%
#5	99%	7.3%	9%
#6	97%	9.2%	9.5%
#7	85%	15.8%	8.7%

[0146]

[0147] *유사한 결과가 CD105 및 CD73 에 대해 수득됨

[0148] 표 2: MSC 의 표현형 마커 (FACS에 의해 양성으로 간주되는 세포의 백분율)

	전체 세포 집단		
	N	평균	SD
ALP	11	7.9	16.6
CD105	11	91.8	7.9
CD90	12	95.7	4.0
CD73	13	94.7	3.4
CD34	11	7.2	20.6

[0149]

[0150] 세포가 주로 오스테오칼신에 대해 음성이었음<33%

[0151] 실시예 3

[0152] CD34 양성 세포 분리

[0153] 실시예 1 ("골수 MSC 의 분리 및 배양") 에서 설명한 바와 같이 수행한 첫번째 증식 단계 마지막의 세포 분류 전에, MSC 세포를 플라스크 밖으로 수확했다. CD90/CD34+ 집단을 분리하기 위해 유세포분석 분류에 의한 양성 선별 방법을 사용했다. 세포를 먼저 특이 APC-커플링된 항-CD34 항체 용액으로 염색했다. 그후 세포 집단으로부터 CD34 공액된 세포를 분리하게 위해, 벡톤-딕킨슨(Becton-Dickinson) 형광 활성화 세포 분류기를 통해 세포 집단을 주입했다. 그후 CD34+ 세포를 포스페이트 완충 식염수 용액으로 수집했다.

[0154] 순도 체크를 위해 세포의 부분표본을 분석했다. 1×10^8 개 초기 세포 중 평균 약 50×10^6 개 세포를 분류했고, 10 내지 30 배의 농축에 상응하여, 이 중 15 내지 90% 가 CD90/CD34+ 골조상세포였다. 이들 세포를 동일한 조건 하에 추가로 배양했다.

[0155] 실시예 4

[0156] 증식 방법

[0157] 실시예 3 에서 설명한 바와 같이 수득한 단리된 CD34+ 세포를 1 주일 배양 프로토콜로 증식했다. 단리된 분획의 약 70-75% 가 정제 단계로 생존했다. 그 세포들을 성장 인자 및 사이토카인이 보충된 혈장을 함유하는 표준 배지 내에서 인큐베이션했다. 대안적으로 비-분류된 세포를 또한 배양할 수 있었다. 분류와 함께 또는 분류 없이 유사한 결과를 수득했다.

[0158] 조혈 인자(예컨대 CSF2, CSF3, M-CSF, GM-CSF, IFN, TNF, 또는 사이토카인 예컨대 IL2)를 단독으로 또는 조합으로 함께 인큐베이션한 세포는 표준 조건에서 성장한 세포와 동일한 수율로 성장할 수 있었다. 그러나 혈관발생 인자(예컨대 FLT1, PDGF, VEGF, vWF, 안지오펜테틴2, FGF1, FGF3 및 EPO)를 단독으로 또는 조합으로 함께 인큐베이션한 세포의 수율은 표준 조건에서 수득된 수율보다 평균 25% 더 높았다. 더욱 흥미롭게도, 조혈 및 혈관발생 인자 둘다의 조합이 50% 에 가까운 증식 수율의 최대 증가를 가져올 수 있었는데, 이는 그 조합의 상승 효과를 암시한다.

[0159] 골형성 배지에서 인큐베이션된 세포를 대조군으로 사용했고, 초기 CD90/CD34+ 초기 집단의 온전한 증식 속도를 가져왔다.

[0160] 예를 들어, 조혈 인자 GM-CSF 와 함께 FGF-2 의 존재 하에 인큐베이션한 세포가 GM-CSF 또는 FGF-2 를 단독으로 한 경우보다 수율을 현저히 증가시켰다(표 3).

[0161] 표 3: CD90/CD34+ 세포의 증식 수율 (표준 조건에 대한 %)

	표준	조혈 GM-CSF	FGF-2	조합 GM-CSF & FGF-2
배양 1	100%	97%	127%	145%
배양 2	100%	112%	142%	162%
배양 3	100%	102%	124%	138%
배양 4	100%	89%	103%	148%
배양 5	100%	98%	110%	123%
배양 6	100%	105%	130%	145%
평균	100%	98.2%	148%	178%

[0162] 더욱이, 배양 1 주일 후 CD90/CD34+ 세포의 형태가 초기 골 형성 세포와 동일한 방추-형상이었다(도 2).

[0164] 상기 골조상세포는 항상(배양 기간 중) 부착된 채로 있었는데, 이는 이 새로운 집단은 순환하지 않을 것이고 그러므로 순환하는 골모세포 계통(예컨대 Eghbali-Fatourech et al. 2007. Bone 40: 1370-7 의 것)과 구별된다는 것을 암시한다.

[0165] 증식 마지막에 이들 세포의 표면 마커 프로필을 표준 배양 조건에서 분석했다: CD34 마커가 높은 수준으로 유지되는 동안 다른 간엽 또는 골 특이적 마커는 변화하지 않은 채로 있었는데 이는 골형성(ALP) 및 조혈 서명(CD34 양성)을 모두 공유하는 새로운 집단의 발견을 지지한다(표 4 및 도 3).

[0166] 표 4: 영양보충된 배양 조건 하에서 1주일의 증식 후 CD90/CD34+ 세포의 표현형 마커(FACS에 의해 양성으로 간주되는 세포의 %)

	CD34+ 세포 집단		
	N	평균	SD
ALP	11	69.2	15.3
CD105	11	92.8	4.7
CD90	12	92.9	1.9
CD73	13	93.1	4.2
CD34	11	51.6	19.0

실시예 5

골 재건축 특성

이 새로운 집단(GM-CSF 및 FGF-2 의 조합의 존재 하에, 실시예 3 에서 수득됨)의 생물학적 특성을 ALP 생성(ALP 염색) 및 새로운 골 매트릭스를 형성하고 광화하는 능력을 측정함으로써 평가했다. CD34+ 세포는 상당한 양의 골 매트릭스를 생성했고(최대 2점에 점수 2점), ALP 염색 과정에 대해 현저히 양성이었다(최대 2점에 점수 2점), 이는 이 세포 집단이 높은 골 재건축 잠재성을 가짐을 암시한다(도 4). 비교를 하면, 표준 MSC 배양은 골 매트릭스 점수 1 내지 1.5 점 및 ALP 염색 점수 1.5 점을 가져왔다.

흥미롭게도, 집단 내에서 CD34+ 세포의 % 가 높을 수록 광화작용 능력이 더 높음이 밝혀졌다(도 5).

실시예 6

MSC 및 골-형성 세포의 증식, 농축 및 특성

조혈 및/또는 혈관발생 성장 인자의 존재 하에서의 증식 (표 5)

세포를 실시예 1 ("배양에 의한 농축") 에서 설명된 바와 같은 농축 프로토콜로 처리했다.

표 5 (n=3) 에서 나타나는 바와 같이, FGF-2(2 ng/ml)는 대조군 조건(FBS 15%)과 비교할 때 골-형성 세포 중 특정 집단의 증식 및 증대를 유도했다. 본 발명자의 데이터는 FGF-2 의 존재 하에서 이 골-형성 세포 집단의 발생 및/또는 증식이 GM-CSF(10 ng/ml) 또는 IFN-감마(10 ng/ml)를 사용하여 수득되고/되거나 유지될 수 있고, FGF-1(2 ng/ml), FGF-3(2 ng/ml) 또는 PDGF(1 ng/ml) 혈관발생 성장 인자를 사용하여 현저히 증가했음을 추가로 밝혔다.

표 5. 조혈 및/또는 혈관발생 성장 인자의 존재 하에서의 증식

조건	인자 *	배양 수율 %	FBS 15% 와 대비하여 증가된 증식 속도의 %	FGF-2 단독으로와 대비하여 증가된 증식 속도의 %
FBS 15%	-	284 +/- 257	100	-
FGF-2	A	537 +/- 69	189	100
FGF-1 ¹	A	746 +/- 112	263	139
FGF-3 ¹	A	605 +/- 50	213	113
PDGF ¹	A	756 +/- 110	266	141
GM-CSF ¹	H	524 +/- 61	185	98
IFN-γ ¹	H	508 +/- 16	179	95

¹ FGF-2 의 존재 하에서; *A= 혈관발생 및 H=조혈

표현형 특징화 (표 6)

증식된 골-형성 세포 (n=3) 의 유세포 분석으로 이 선별된 세포 집단이 CD34 를 전형적 간엽 세포 마커 예컨대

CD105, CD73, 및 CD90 과 함께 발현하는 한편, 조혈 및 내피 세포 표면 마커 예컨대 CD45, CD133, 및 CD31 항원을 결여하는 특이적 표현형 프로필을 나타냄을 증명했다.

표 6. 표현형 프로필

	조혈 세포 마커	간엽 세포 마커			내피 세포 마커		
	CD45 % 양성 세포	CD105 % 양성 세포	CD73 % 양성 세포	CD90 % 양성 세포	CD133 % 양성 세포	CD31 % 양성 세포	
FBS 15%	3+/-1	66+/-2	74+/-19	90+/-8	15.7+/-13	2.2+/-0.7	9.0+/-11.8
FGF-2	3+/-1.5	92+/-2	99+/-1	99+/-1	4.5+/-0.9	4.3+/-1.2	49+/-15
FGF-1 ¹	2.6+/-0.5	94+/-3	97+/-3	98+/-1	2.9+/-1.1	3.3+/-0.7	39+/-10
FGF-3 ¹	2.2+/-0.8	93+/-2	99+/-1	98+/-1	5.7+/-3.3	3.4+/-0.9	42+/-8
PDGF ¹	2.2+/-0.4	93+/-2	99+/-1	97+/-1	4.9+/-2.2	3.3+/-0.7	34+/-8
GM-CSF ¹	1.4+/-1.3	93+/-3	99+/-1	98+/-1	3.3+/-0.6	3.6+/-0.5	40+/-7
IFN-g ¹	2.3+/-0.1	92+/-3	99+/-1	86+/-2	4+/-1.5	3.3+/-0.7	28+/-7

¹ FGF-2 의 존재 하에서

골발생 특성 (표 7, 도 6)

증식된 골-형성 세포 집단의 유세포 분석 및 ALP 염색은 이들 세포가 강한 골발생 특성 (n=3) 을 나타냄을 지시했다. 더욱이, IFN-감마가 ALP 발현 및 염색을 모두 선택적으로 및 상당히 증가시키고, 이로써 세포의 골형성 특징을 향상시키는 밝혀진 점이 흥미롭다.

표 7. 골발생 특성 - ALP 측정

조건	골발생 특성			
	ALP 발현(유세포분석)		ALP 효소 활성	ALP 염색
	% 양성 세포	MFI	mU/mg 단백질	반-정량적 평가
FBS 15%	21+/-11.1	2.6	10	+
FGF-2	67+/-1	17.6	56	++
FGF-1 ¹	66+/-2	15.6	69	++
FGF-3 ¹	66+/-5	15.1	39	++
PDGF ¹	64+/-3	12.6	36	++
GM-CSF ¹	64+/-3	15.3	57	++
IFN-g ¹	82+/-2	28.7	318	+++

¹ FGF-2 의 존재 하에서

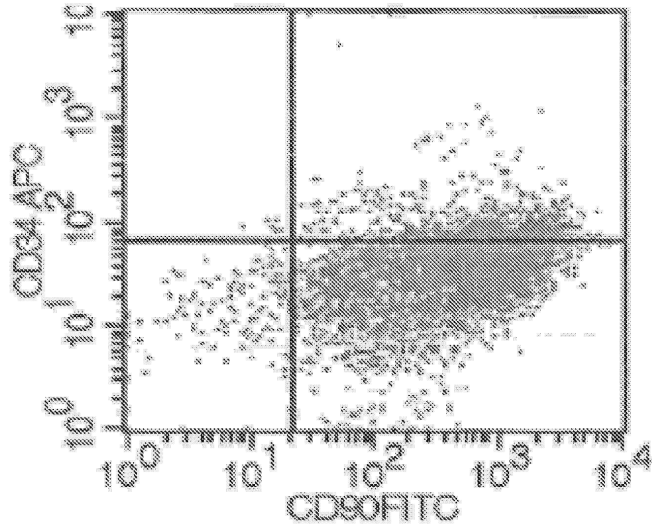
전-혈관발생 특성 및 모세혈관-유사 구조 형성 잠재성 (표 7, 도 7)

증식된 골-형성 세포의 유세포 분석으로 vWF 및 VEGF 분자 발현의 상향조절을 증명했다 (n=3). 더욱이, 도 7 (n=1) 에서 도시된 바와 같이, 본 발명자의 데이터는 이 골-형성 세포의 집단이 마트리젤 모델(Matrigel model)에서 분지 신생-혈관 구조 및 슈도튜브로 분화되고 조직될 수 있음을 지시했다. 추가로, IFN-감마가 대조군(및 기타 조혈 및/또는 혈관발생 인자)과 비교하여 이 네트워크 형성을 분명히 향상시키는 밝혔다.

이들 시험관 내 결과는 IFN-감마 및 증식된 골-형성 세포 집단이 모두 관 형성 및 모세혈관-유사 구조의 발달을 촉진하는 능력을 가짐을 보여준다(전-혈관발생 효과).

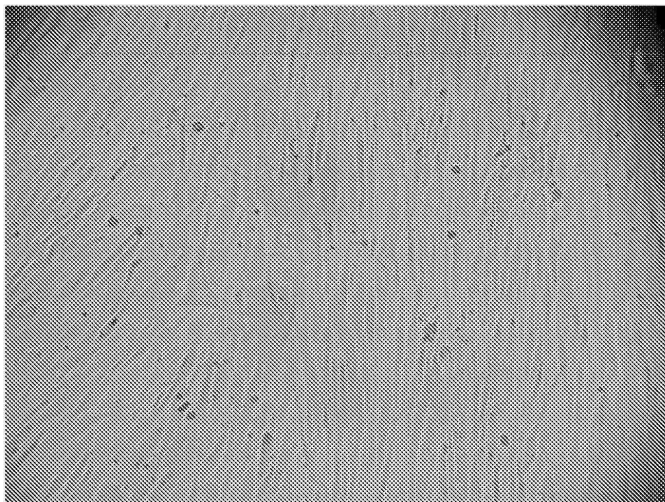
도면

도면1

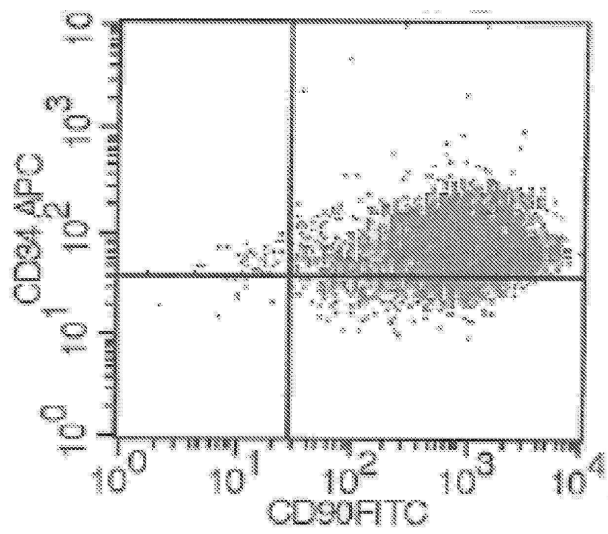


사분역	게이트드%	X 평균	Y 평균
UL	0.10	15.04	90.45
UR	15.93	1328.66	132.45
LL	2.32	10.09	17.79
LR	81.55	768.45	32.63

도면2

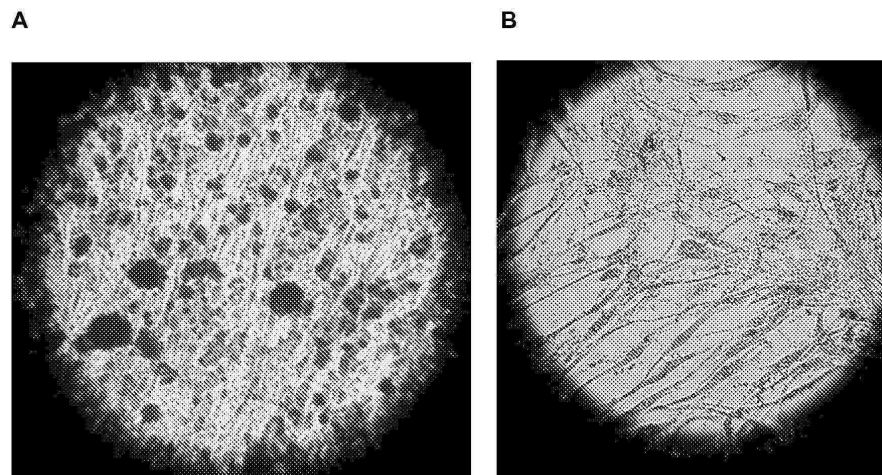


도면3

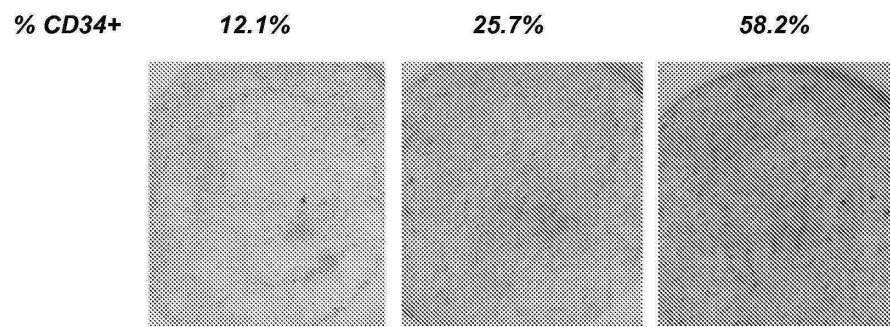


사분역	게이트드%	X 평균	Y 평균
UL	0.71	14.62	65.36
UR	86.85	1409.36	87.10
LL	0.19	12.16	25.91
LR	12.24	825.08	28.90

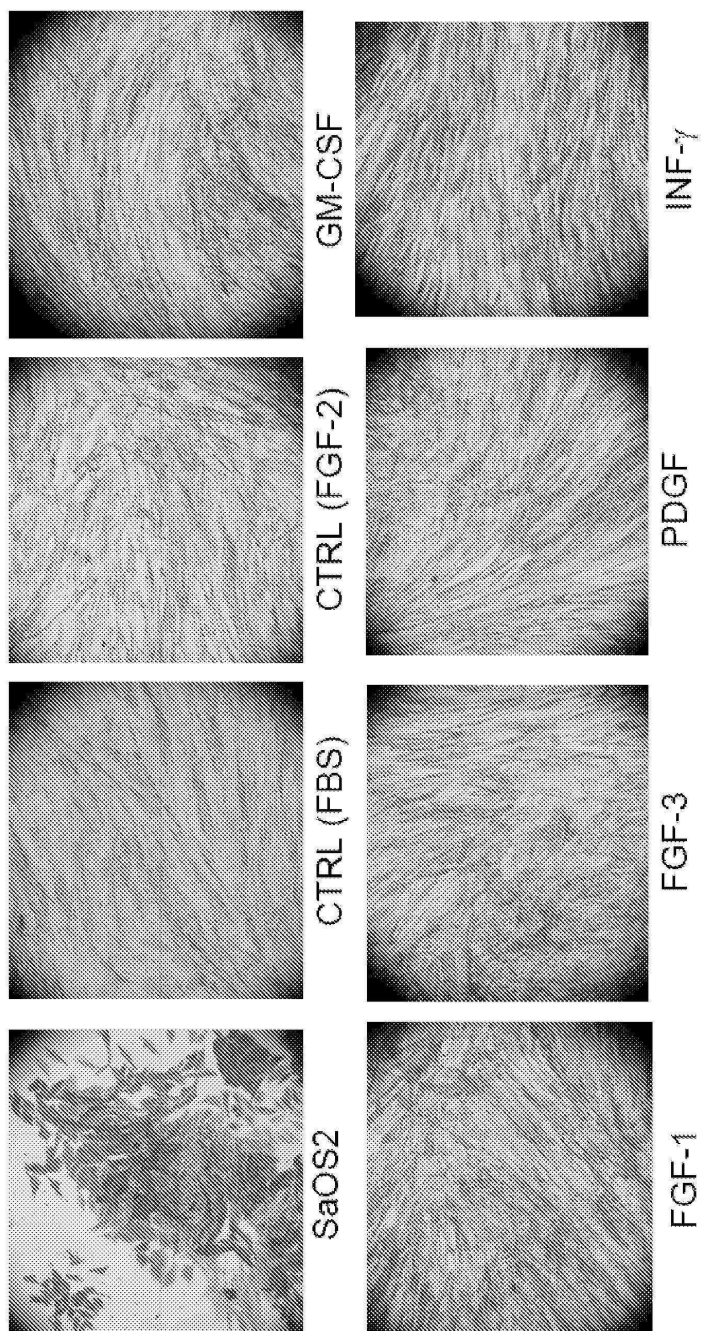
도면4



도면5



도면6



도면7

