



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년09월25일
(11) 등록번호 10-2582602
(24) 등록일자 2023년09월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/50 (2017.01) A61K 35/28 (2015.01)
C12N 5/0775 (2010.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/5073 (2013.01)
A61K 35/28 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-7034098
(22) 출원일자(국제) 2016년05월04일
심사청구일자 2021년04월21일
(85) 번역문제출일자 2017년11월24일
(65) 공개번호 10-2018-0041621
(43) 공개일자 2018년04월24일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2016/060049
(87) 국제공개번호 WO 2016/177805
국제공개일자 2016년11월10일
(30) 우선권주장
2015901605 2015년05월05일 오스트레일리아(AU)
(56) 선행기술조사문헌
JP2011196840 A*
C.Cao et al., The Spine Journal, Vol. 15,
2015, pp. 530-538.*
L.Wen et al., PLOS ONE, Vol. 9, No. 7, 2014.
Kyurkchive et al., World Journal of Stem
Cells, Vol. 6, No. 5, 2014, pp. 552-570.
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
메조블라스트 인터내셔널 에스에이알엘
스위스 메이린 1217 루트 드 프리-보아 20
(72) 발명자
시몬스, 폴
호주, 빅토리아 3000, 멜버른, 55 콜린스 스트리트,
레벨 38
수이레, 콜비
미국, 뉴욕 10017, 뉴욕, 플로어 3, 505 5번 애비뉴
쾨, 피오나
미국, 뉴욕 10017, 뉴욕, 플로어 3, 505 5번 애비뉴
(74) 대리인
이치영, 장제환

전체 청구항 수 : 총 16 항

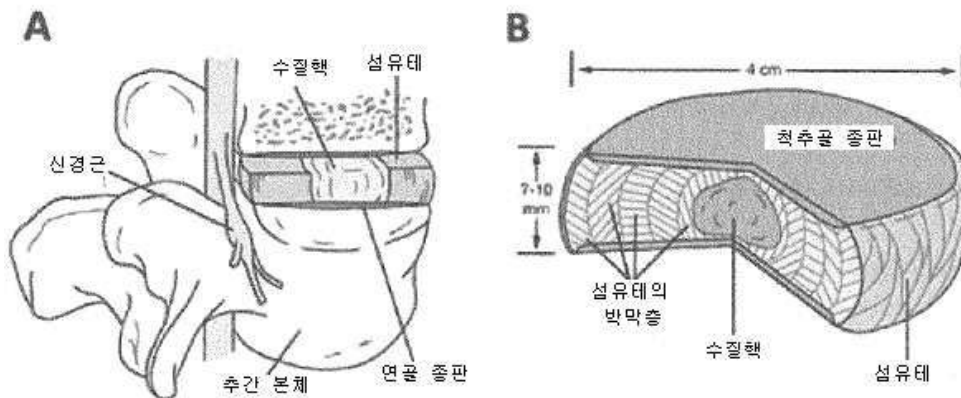
심사관 : 이민영

(54) 발명의 명칭 효능 검증

(57) 요약

본 발명은 배양액에서 방출된 TGF- β 수준에 근거하여, 배양된 중간엽 계통 전구체 세포 또는 줄기 세포의 생물학적 활성 또는 치료 효력을 결정하기 위한 방법에 관계한다. 본 발명은 또한, 배양액에서 세포에 의해 방출된 TGF- β 수준에 근거하여 선별된 중간엽 계통 전구체 세포 또는 줄기 세포의 단리된 개체군에 관계한다. 본 발명은 이런 선별된 세포 개체군을 투여함으로써, 퇴행성 디스크 질환으로 고통받는 개체의 치료에 더욱 관계한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 5/0663 (2013.01)

C12N 2501/15 (2013.01)

G01N 2333/495 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

다음을 포함하는 인간 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포(MLPSCs)의 생물학적 활성 또는 치료 효력의 결정 방법으로,

- (i) MLPSCs를 포함하는 인간 개체군(human population)을 획득하는 단계;
- (ii) 획득된 개체군의 세포를 배양 배지에서 배양하는 단계; 및
- (iii) MLPSCs에 의해 배양 배지 내로 방출된 TGF β 1의 양을 결정하는 단계를 포함하고,

여기서, 상기 TGF β 1의 양이 적어도 2800 pg/10⁶ 세포인 경우, 상기 인간 중간엽 계통 전구체 또는 줄기세포(MLPSCs)는 퇴행성 디스크 질환의 치료하기에 충분한 생물학적 활성 또는 치료 효력을 갖는 것으로 결정되고,

상기 생물학적 활성은 상기 인간 MLPSCs가 시험관 내 인간 섬유륜 세포에서 콜라겐 생성을 자극하는 능력을 포함하고,

상기 치료 효력은 퇴행성 디스크 질환에 대한 치료 효력을 포함하는, 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 개체군은 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포에 대해 농축되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 방법은 세포를 배양 용기에서 50,000 생존가능 세포/cm²의 밀도로 파종하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 방법은 세포를 0.5% 소 혈청 알부민으로 보충된 연골원성 기초 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 세포는 최소한 68 내지 76 시간 동안 배양되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

청구항 1에 있어서, 상기 방법은 세포가 배양된 배양 배지의 표본을 수집하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

청구항 9에 있어서, 상기 방법은 배양 배지에서 TGF β 1의 양을 결정하기에 앞서, 배양 배지에서 잠복성 TGF β 1

을 활성화하는 것을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

청구항 10에 있어서, 잠복성 TGF β 1을 활성화하는 것은 배양 배지의 pH를 낮추기 위해 산을 배양 배지 표본에 첨가하는 것을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

청구항 11에 있어서, 상기 방법은 pH를 낮추기에 앞서, 배양 배지 표본을 농축하는 것을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

청구항 11에 있어서, 산의 첨가 이후에, 배양 배지는 7.2 내지 7.6의 pH로 중화되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

청구항 1에 있어서, 상기 방법은 효소 결합 면역흡착 검정 (ELISA)에 의해, 배양 배지에서 TGF β 1의 양을 결정하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

퇴행성 디스크 질환의 치료에서 이용을 위해 선별된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포를 포함하는 단리된 세포 개체군에 있어서, 상기 세포 개체군은 청구항 1의 방법에서 검정될 때 2800 pg/10⁶ 세포 TGF β 1을 방출하는 것을 특징으로 하는 단리된 세포 개체군.

청구항 16

삭제

청구항 17

청구항 15에 있어서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 세포 개체군 중에서 최소한 5%를 포함하는 것을 특징으로 하는 단리된 세포 개체군.

청구항 18

청구항 15의 단리된 개체군 및 냉동보존제를 포함하는 조성물.

청구항 19

청구항 15의 단리된 개체군을 포함하는 조성물에 있어서, 상기 조성물은 히알루로난을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 20

청구항 15의 단리된 개체군을 포함하는 퇴행성 디스크 질환의 치료용 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 세포 요법 산물에 대한 효능 검정에 관계한다. 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포를 포함하는 세포 개체군에 대한 효능 검정이 제공된다.

배경 기술

[0002] 재생 또는 면역 요법 적용을 위한 여러 세포 요법 산물이 임상적 평가 및 시장 허가까지 진전되었다. 하지만, 이들 세포 요법 산물의 시장으로의 출시는 그들의 복잡성 및 이질성에 의해 방해되는데, 이것은 유관한 생물학

적 활성의 확인, 그리고 따라서, 일관된 세포 요법 산물 품질의 정의를 어렵게 만든다.

- [0003] 생리화학적 파라미터 (가령, 크기의 특징화, 형태, 광 산란 성질, 인장 강도, 세포 수, 합류점, 표현형 마커의 확인, 분비된 물질, 유전자형, 유전자 발현 프로파일)가 활성 물질, 중간체, 불순물 및 오염체의 확인 및 정량에 일과적으로 이용된다. 하지만, 생리화학적 파라미터는 산물이 생물학적으로 활성이고 강력할 (다시 말하면, 원하는 효과를 이끌어낼) 것이라는 것을 확증할 수 없다. 대조적으로, 생물학적 특징화는 시험관내, 또는 동물에서 및 궁극적으로 임상에서 생체내 모형화된 생물학적 시스템에 대한 산물의 효과를 고려한다.
- [0004] 미국 및 유럽에서 제약학적 규정은 분자 구조가 완전히 규정될 수 없는 활성 물질이 시장으로 출시되기 전에 그들의 효능에 대해 평가되도록 요구한다. 허가된 세포 요법 산물의 각 배치의 효능을 평가하는 것은 법적 요건이다.
- [0005] 효능 시험은 산물의 유관한 생물학적 활성 또는 활성들을 증명해야 한다. 산물 생물학적 기능 모두를 반영하는 것이 효능 시험에 대한 요건은 아니지만, 이것은 하나 또는 그 이상의 유관한 생물학적 기능을 지시할 것임에 틀림없다. 효능 시험에서 이용된 분석 방법에 대한 정확도, 감수성, 특이성 및 재현성이 확립될 것이고, 그리고 이들은 적절하게 건설할 것으로 예상된다.
- [0006] 세포 요법 산물의 효력에 결정적인 파라미터를 확인하고, 그리고 일관된 품질의 산물이 제조될 수 있도록 이들을 제어하는 것이 요구된다 (가령, 효능 시험을 통해).

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명자들은 차후에 "중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포"로서 지칭되는 중간엽 계통 전구체 또는 중간엽 계통 줄기 세포를 포함하는 세포 요법 산물의 생물학적 활성 또는 치료 효력을 측정하기 위한 효능 검정을 개발하였다.
- [0008] 따라서, 본 발명은 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포의 효능을 결정하기 위한 방법을 제공하고, 상기 방법은 다음을 포함한다:
- [0009] (i) 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포를 포함하는 개체군을 획득하고;
- [0010] (ii) 배양 배지에서 세포를 배양하고; 그리고
- [0011] (iii) 세포에 의해 배양 배지 내로 방출된 TGF β 1의 양을 결정하고, 여기서 최소한 약 2800 pg/10⁶ 세포 TGF β 1의 양은 생물학적 활성 또는 치료 효력을 지시한다. 가령, 최소한 약 2810 pg/10⁶ 세포 TGF β 1, 최소한 약 2820 pg/10⁶ 세포 TGF β 1, 최소한 약 2830 pg/10⁶ 세포 TGF β 1, 최소한 약 2840 pg/10⁶ 세포 TGF β 1, 최소한 약 2850 pg/10⁶ 세포 TGF β 1, 최소한 약 2860 pg/10⁶ 세포 TGF β 1, 최소한 약 2870 pg/10⁶ 세포 TGF β 1, 최소한 약 2880 pg/10⁶ 세포 TGF β 1, 최소한 약 2890 pg/10⁶ 세포 TGF β 1, 최소한 약 2900 pg/10⁶ 세포 TGF β 1, 최소한 약 2910 pg/10⁶ 세포 TGF β 1, 최소한 약 2920 pg/10⁶ 세포 TGF β 1, 최소한 약 2930 pg/10⁶ 세포 TGF β 1, 최소한 약 2940 pg/10⁶ 세포 TGF β 1, 최소한 약 2950 pg/10⁶ 세포 TGF β 1, 최소한 약 2960 pg/10⁶ 세포 TGF β 1, 최소한 약 2970 pg/10⁶ 세포 TGF β 1, 최소한 약 2980 pg/10⁶ 세포 TGF β 1, 최소한 약 2990 pg/10⁶ 세포 TGF β 1, 또는 최소한 약 3000 pg/10⁶ 세포 TGF β 1의 양은 생물학적 활성 또는 치료 효력을 지시한다.
- [0012] 본 발명은 또한, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포의 효능을 결정하기 위한 방법을 제공하고, 상기 방법은 다음을 포함한다:
- [0013] (i) 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포를 포함하는 개체군을 획득하고;
- [0014] (ii) 배양 배지에서 세포를 배양하고; 및
- [0015] (iii) 세포에 의해 배양 배지 내로 방출된 TGF β 1의 양을 결정하고, 여기서 최소한 약 400 pg/ml의 배양 배지 TGF β 1의 양은 생물학적 활성 또는 치료 효력을 지시한다. 가령, 최소한 약 405 pg/ml의 배양 배지 TGF β 1, 최소한 약 410 pg/ml의 배양 배지 TGF β 1, 최소한 약 415 pg/ml의 배양 배지 TGF β 1, 최소한 약 420 pg/ml의 배

양 배지 TGF β 1, 최소한 약 425 pg/ml의 배양 배지 TGF β 1, 최소한 약 430 pg/ml의 배양 배지 TGF β 1, 최소한 약 435 pg/ml의 배양 배지 TGF β 1, 최소한 약 440 pg/ml의 배양 배지 TGF β 1, 최소한 약 445 pg/ml의 배양 배지 TGF β 1, 최소한 약 450 pg/ml의 배양 배지 TGF β 1, 최소한 약 455 pg/ml의 배양 배지 TGF β 1, 최소한 약 460 pg/ml의 배양 배지 TGF β 1, 최소한 약 465 pg/ml의 배양 배지 TGF β 1, 최소한 약 470 pg/ml의 배양 배지 TGF β 1, 최소한 약 475 pg/ml의 배양 배지 TGF β 1, 최소한 약 480 pg/ml의 배양 배지 TGF β 1, 최소한 약 485 pg/ml의 배양 배지 TGF β 1, 최소한 약 490 pg/ml의 배양 배지 TGF β 1, 최소한 약 495 pg/ml의 배양 배지 TGF β 1, 또는 최소한 약 500 pg/ml의 배양액의 양은 생물학적 활성 또는 치료 효력을 지시한다.

- [0016] 한 구체예에서, 세포의 생물학적 활성은 시험관내에서 인간 섬유원 세포에서 콜라겐 생산을 자극하는 능력을 포함한다.
- [0017] 한 구체예에서, 치료 효력은 퇴행성 디스크 질환의 치료에서 치료 효력을 포함한다.
- [0018] 한 구체예에서, 상기 방법은 이전에 배양-확대된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포의 효능을 결정하는데 이용된다. 대안적 구체예에서, 상기 방법은 새로 단리된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포의 효능을 결정하는데 이용된다.
- [0019] 한 구체예에서, 개체군은 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포에 대해 농축된다.
- [0020] 한 구체예에서, 상기 방법은 농축된 개체군을 획득하기 위해, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포에 대해 농축하는 것을 더욱 포함한다. 가령, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 STRO-1+ 세포 및/또는 조직 비특이적 알칼리 인산분해효소 (TNAP)+ 세포의 선별에 의해 농축된다.
- [0021] 한 구체예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 인간 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포이다.
- [0022] 한 구체예에서, 상기 방법은 세포를 배양 용기에서 약 50,000 생존가능 세포/cm²로 과중하는 것을 포함한다.
- [0023] 한 구체예에서, 상기 방법은 세포를 0.5% 소 혈청 알부민으로 보충된 연골원성 기초 배지에서 배양하는 것을 포함한다.
- [0024] 한 구체예에서, 상기 방법은 유착성 세포를 최소한 68 내지 76 시간 동안 배양하는 것을 포함한다. 한 구체예에서, 유착성 세포는 먼저, 이들이 배양 용기에 부착하도록 허용하기 위해, 예로서 0.5% 소 혈청 알부민으로 보충된 연골원성 기초 배지에서 세포 개체군을 하룻밤 동안 배양함으로써 획득된다.
- [0025] 한 구체예에서, 상기 방법은 배양 배지의 표본을 수집하는 것을 포함하는데, 여기서 이들 세포가 배양되었다. 한 구체예에서, 수집된 표본은 이들 세포가 배양된 배양 배지 모두를 포함한다.
- [0026] 한 구체예에서, 상기 방법은 배양 배지에서 TGF β 1의 양을 결정하기에 앞서, 배양 배지에서 잠복성 TGF β 1을 활성화하는 것을 포함한다.
- [0027] 한 구체예에서, 잠복성 TGF β 1을 활성화하는 것은 배양 배지의 pH를 낮추기 위해, 산, 예를 들면, 1 N HCl을 배양 배지에 첨가하는 것을 포함한다. 한 구체예에서, 상기 방법은 pH를 낮추기에 앞서, 배양 배지 표본을 농축하는 것을 포함한다. 한 구체예에서, 상기 방법은 산의 첨가 이후에, 예로서, 1.2 N NaOH/0.5 M HEPES 또는 1N NaOH를 첨가함으로써 배양 배지의 pH를 7.2 내지 7.6으로 중화시키는 것을 포함한다.
- [0028] 한 구체예에서, 상기 방법은 효소 결합 면역흡착 검정 (ELISA)에 의해, 배양 배지에서 TGF β 1의 양을 결정하는 것을 포함한다.
- [0029] 한 가지 실례에서, ELISA는 다음을 포함한다:
- [0030] (i) 배양 배지를 표본 희석제에서 1:5 희석하고;
- [0031] (ii) 희석된 배양 배지를 TGF β 1에 특정한 단일클론 항체로 피복된 마이크로평판의 웰에 첨가하고;
- [0032] (iii) 표본 희석제를 마이크로평판의 각 웰에 첨가하고;
- [0033] (iv) 마이크로평판을 실온에서 2 시간 동안 배양하고;
- [0034] (v) 마이크로평판을 세척하고;
- [0035] (vi) TGF β 1 접합체를 웰에 첨가하고;

- [0036] (vii) 마이크로평판을 실온에서 2 시간 동안 배양하고;
- [0037] (viii) 마이크로평판을 세척하고;
- [0038] (ix) 기질 용액을 웰에 첨가하고;
- [0039] (x) 마이크로평판을 실온에서 30 분 동안 배양하고;
- [0040] (xi) 정지액을 웰에 첨가하고;
- [0041] (xii) 450 nm에 설정되고 570 nm에서 파장 교정된 마이크로평판 판독기에서 흡광도를 판독하고;
- [0042] (xiii) 회석을 위해 교정된 TGF β 1의 농도를 결정한다.
- [0043] 한 구체예에서, 표본 회석제는 0.5% 소 혈청 알부민으로 보충된 연골원성 기초 배지이다.
- [0044] 한 구체예에서, 상기 방법은 다음을 더욱 포함한다:
- [0045] 31.2-2000 pg/ml의 범위에서 변하는 최종 농도에서 표본 회석제에서 TGF β 1 표준의 연속 회석액을 제조하고;
- [0046] 표준을 단계 (iii) 전에 마이크로평판에 첨가하고;
- [0047] 4 파라미터 로지스틱 곡선 적합을 이용하여 표준 곡선을 구축하고; 그리고
- [0048] 표준 곡선을 참조하여 배양 배지에서 TGF β 1의 농도를 결정한다.
- [0049] 본 발명은 또한, 중간엽 계통 전구체 세포의 효능을 결정하기 위한 방법을 제공하고, 상기 방법은 다음을 포함한다:
- [0050] (i) 중간엽 계통 전구체 세포의 개체군을 획득하고;
- [0051] (ii) 세포를 배양 용기에서 50,000 생존가능 세포/cm²로 파종하고;
- [0052] (iii) 세포를 0.5% 소 혈청 알부민으로 보충된 연골원성 기초 배지에서 배양하고;
- [0053] (iv) 배양 배지를 수집하고;
- [0054] (v) 배양 배지의 pH를 감소시키기 위해 1 N HCl을 첨가함으로써, 세포에 의해 배양 배지 내로 방출된 잠복성 TGF β 1을 활성화하고;
- [0055] (vi) 1.2 N NaOH/0.5 M HEPES 또는 1N NaOH를 첨가함으로써 배양 배지의 pH를 7.2 내지 7.6로 중화시키고;
- [0056] (vii) 배양 배지를 0.5% 소 혈청 알부민으로 보충된 연골원성 기초 배지에서 1:5 희석하고;
- [0057] (viii) TGF β 1에 특정한 단일클론 항체로 피복된 마이크로평판의 웰에 희석된 배양 배지를 첨가하고;
- [0058] (ix) 표본 회석제를 마이크로평판의 각 웰에 첨가하고;
- [0059] (x) 마이크로평판을 실온에서 2 시간 동안 배양하고;
- [0060] (xi) 마이크로평판을 세척하고;
- [0061] (xii) TGF β 1 접합체를 웰에 첨가하고;
- [0062] (xiii) 마이크로평판을 실온에서 2 시간 동안 배양하고;
- [0063] (xiv) 마이크로평판을 세척하고;
- [0064] (xv) 기질 용액을 웰에 첨가하고;
- [0065] (xvi) 마이크로평판을 실온에서 30 분 동안 배양하고;
- [0066] (xvii) 정지액을 웰에 첨가하고;
- [0067] (xviii) 450 nm에 설정되고 570 nm에서 파장 교정된 마이크로평판 판독기 세트에서 흡광도를 판독하고;
- [0068] (xix) 회석을 위해 교정된 TGF β 1의 농도를 결정한다.
- [0069] 한 구체예에서, 상기 방법은 다음을 더욱 포함한다:

- [0070] 31.2-2000 pg/ml의 범위에서 변하는 최종 농도에서 0.5% 소 혈청 알부민으로 보충된 연골원성 기초 배지에서 TGFβ1 표준의 연속 희석액을 제조하고;
- [0071] 표준을 단계 (ix) 전에 마이크로평판에 첨가하고;
- [0072] 4 파라미터 로지스틱 곡선 적합을 이용하여 표준 곡선을 구축하고; 그리고
- [0073] 표준 곡선을 참조하여 배양 배지에서 TGFβ1의 농도를 결정한다.
- [0074] 본 발명은 또한, 치료에서 이용을 위해 선별된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포를 포함하는 세포 개체군을 제공하는데, 여기서 세포 개체군은 본 발명의 방법에서 검정될 때 2800 pg/10⁶ 세포 TGFβ1을 방출한다.
- [0075] 본 발명은 또한, 치료에서 이용을 위해 선별된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포를 포함하는 단리된 세포 개체군을 제공하는데, 여기서 세포 개체군은 본 발명의 방법에서 검정될 때 400 pg/ml 배양 배지 TGFβ1을 방출한다.
- [0076] 본 발명은 또한, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포를 포함하는 단리된 세포 개체군을 제공하고, 여기서 세포 개체군은 배양 조건 하에 TGFβ1의 방출을 결정함으로써 치료에서 이용을 위해 선택되었다.
- [0077] 한 구체예에서, 단리된 세포 개체군은 배양-확대된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포를 포함한다. 대안적 구체예에서, 단리된 세포 개체군은 새로 단리된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포를 포함한다. 한 구체예에서, 단리된 세포 개체군은 배양 조건 하에 TGFβ1의 방출을 결정하기 위해 검정된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포를 포함한다. 다른 구체예에서, 단리된 세포 개체군은 배양 조건 하에 TGFβ1의 방출을 결정하기 위해 표본추출된 개체군으로부터 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포를 포함한다 (다시 말하면, 단리된 개체군 그 자체에서 세포는 배양 조건 하에 TGFβ1의 방출을 결정하기 위해 검정되지 않았다).
- [0078] 한 구체예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 단리된 세포 개체군 중에서 최소한 5%를 포함한다.
- [0079] 한 구체예에서, 전술한 단리된 세포 개체군 중에서 한 가지 및 냉동보존제를 포함하는 조성물 역시 제공된다. 한 구체예에서, 조성물 내에 냉동보존제는 DMSO 또는 ProfreezeTM이다. 한 구체예에서, 조성물은 42.5% (v/v) ProfreezeTM/50% αMEM (v/v)/7.5% (v/v) DMSO에서 단리된 세포 개체군을 포함한다.
- [0080] 한 구체예에서, 전술한 단리된 세포 개체군 중에서 한 가지 및 히알루로난, 예를 들면, 최소한 약 0.5% HA 또는 HA 염, 최소한 약 0.6% HA 또는 HA 염, 최소한 약 0.7% HA 또는 HA 염, 최소한 약 0.8% HA 또는 HA 염, 최소한 약 0.9% HA 또는 HA 염, 최소한 약 1% HA 또는 HA 염, 최소한 약 1.5% HA 또는 HA 염, 최소한 약 2% HA 또는 HA 염, 최소한 약 2.5% HA 또는 HA 염, 최소한 약 3% HA 또는 HA 염, 최소한 약 3.5% HA 또는 HA 염, 최소한 약 4% HA 또는 HA 염, 최소한 약 4.5% HA 또는 HA 염, 최소한 약 5% HA 또는 HA 염, 최소한 약 6% HA 또는 HA 염, 최소한 약 7% HA 또는 HA 염, 최소한 약 8% HA 또는 HA 염, 최소한 약 9% HA 또는 HA 염, 또는 최소한 약 10% HA 또는 HA 염을 포함하는 조성물이 본원에서 제공된다.
- [0081] 본 발명은 또한, 퇴행성 디스크 질환을 앓는 개체를 치료하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 본 발명의 조성물을 개체에 투여하는 것을 포함한다.
- [0082] 한 구체예에서, 본 발명의 냉동보존된 조성물은 해동되고, 그리고 투여에 앞서 히알루로난 (HA) 또는 HA 염, 예를 들면, 예로서, 나트륨 HA와 혼합된다.
- [0083] 본 발명은 또한, 퇴행성 디스크 질환을 앓는 개체를 치료하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 최소한 약 400 pg/ml 배양 배지 TGFβ1을 포함하는 배양 배지를 개체에 투여하는 것을 포함한다.

도면의 간단한 설명

- [0084] **도면 1: IVD의 위치 및 구조.** (A) 2개의 추간 본체 사이에 추간관 (IVD)의 위치를 보여주는 표현. (B) 중심에서 섬유테 (AF)에 의해 둘러싸인 수질핵 (NP), 그리고 척추골 종판을 보여주는 건강한 디스크를 관통하는 뷰 ((Raj, 2008)로부터 개작된 도면).

도면 2: 마이크로매스 배양액에서 인간 NPCs의 증식 및 매트릭스 조성에 대한 MPC CM의 효과. (A) 중간엽 전구체 세포 (MPC) 조건부 배지 (CM)에 대한 응답으로 수질핵 세포 (NPC) 증식에서 EdU 통합을 증명하는 데이터. 데이터는 % 양성 EdU 통합의 평균 ± SD로서 표현된다. n = 3 중복/조건. (B) 인간 NPC 마이크로매스 배양액에서

황산화된 GAG 프로테오글리칸에 대한 알시안 블루 염색의 대표적인 이미지. (C) NP 마이크로매스 배양액으로부터 추출된 프로테오글리칸의 반정량. 데이터는 평균 \pm SD로서 표현된다. $n = 3$ 중복/조건. 기초 배지 대조와 대비하여 $p \leq 0.05$ 에 배정된 유의성.

도면 3: 마이크로매스 배양액에서 인간 AFC의 증식 및 매트릭스 생산에 대한 MPC CM의 시험관내 효과. (A) MPC CM에 대한 응답으로 섬유아 세포 (AFC) 증식을 증명하는 데이터. 데이터는 % 양성 EDU 통합의 평균 \pm SD로서 표현된다. $n = 3$ 중복/조건. (B) MPC CM에 대한 응답으로 AF 마이크로매스 배양액에 의해 생산된 전체 콜라겐의 정량. 평균 \pm SD로서 표현된, 한 공여자로부터 대표적인 데이터. $n = 3$ 중복/조건. 기초 배지 대조와 대비하여 $p \leq 0.05$ 에 배정된 유의성.

도면 4: MPC CM에서 검출된 TGF β 1의 수준. ELISA에 의해 측정된, MPC CM에서 TGF β 1의 검출. 데이터는 중복 표본의 평균으로서 표현된다. $n = 5$ 명의 상이한 공여자로부터 유래된 MPCs의 15개 로트.

도면 5: 인간 AFCs의 마이크로매스 배양액에서 히드록시프롤린 함량에 대한 TGF β 1 및 MPC CM의 효과. (A) 3명의 AFC 공여자로부터 AF 마이크로매스 배양액에서 재조합 인간 TGF β 1 (rhTGF β 1) 매개된 콜라겐 생산에 대한 용량 반응. 데이터는 항-TGF β 1 중화 항체로 rhTGF β 1 반응의 유의미한 저해를 증명한다. (B) 항-TGF β 1 중화 또는 IgG 대조 이후에 MPC CM에 대한 응답으로 AF 마이크로매스 배양액에 의해 생산된 전체 콜라겐의 정량. 3명의 AFC 공여자 및 MPC CM의 4-7개 로트로부터 산출된 데이터. 데이터는 평균 \pm SD로서 표현된다. $n = 3$ 중복/조건. $p \leq 0.05$ 에 배정된 유의성; * 기초 배지 대조와 대비하여; † IgG 대조와 대비하여.

도면 6: 태아 대 성인 AFC 마이크로매스 배양액에서 히드록시프롤린 함량에 대한 rhTGF β 1의 효과. 태아 및 성인 AFC 마이크로매스 배양액에 의한 rhTGF β 1에 대한 응답으로 콜라겐 생산. 각 데이터 포인트는 3명의 태아 또는 성인 AFC 공여자를 나타낸다. 데이터는 평균 \pm SD로서 표현된다. $n = 6-9$ 중복/조건.

도면 7: 성인 AFC 마이크로매스 배양액에서 히드록시프롤린 함량에 대한 TGF β 및 MPC CM의 효과. 3명의 AFC 공여자 (A, B, C)로부터 성인 AFC 마이크로매스 배양액에 의한 rhTGF β 1 또는 MPC CM에 대한 응답으로 콜라겐 생산. 데이터는 평균 \pm SD로서 표현된다. $n = 3-8$ 중복/조건. (D) 3개의 성인 AFC 로트에서 평균 히드록시프롤린 함량. $p \leq 0.05$ 에 배정된 유의성 (기초 배지 대조 (0 ng/mL rhTGF β 1)에 비하여).

도면 8: 상이한 기초 배지에서 성장된 MPCs으로부터 CM에서 TGF β 1 수준. CM 산출을 위한 최적 대 준최적 배지 제제에서 성장 이후에 ELISA에 의해 측정된 MPC CM에서 TGF β 1의 검출. 어두운 막대 = 연골원성 기초 배지 + 0.5% 소 혈청 알부민 (CBM + 0.5% BSA). 밝은 막대 = EBM-2 + 0.5% BSA. 데이터는 중복 표본의 평균으로서 표현된다. 단일 공여자로부터 유래된 모든 MPC 로트.

도면 9: MPC CM에서 검출된 TGF β 1의 수준. 표본의 TGF β 1 필요한 산-처리의 검출 및 그에 따른 측정은 CM에서 전체 TGF β 1을 반영한다. 데이터는 평균 \pm SD로서 표현된다. $n = 4$ 명의 상이한 공여자로부터 유래된 MPCs의 18개 로트.

도면 10: 마이크로매스 배양액에서 태아 인간 AFCs (로트 4729)의 매트릭스 조성에 대한 TGF β 1 및 MPC CM의 효과. (A) 4개 로트로부터 MPC 산물은 TGF β 1-표적화 siRNA 또는 스크램블된 음성 대조로 형질감염되었다. 형질감염된 세포로부터 산출된 CM에서 TGF β 1 수준이 도시된다. (B) 비조작된 또는 siRNA 형질감염된 MPCs로부터 유래된 CM에 대한 응답으로 태아 AFCs (로트 4729)에 의한 평균 콜라겐 생산. 데이터는 TGF β 1 siRNA로 CM 생물활성의 유의미한 저해를 증명한다. 데이터는 평균 \pm SD로서 표현된다. $n = 18$ 정상적인 CM (3-8 중복/CM) 및 4 스크램블된 또는 TGF β 1 siRNA 형질감염된 MPCs (3 중복/조건). 자극되지 않은 기저 대조 (*) 또는 스크램블된 대조 (+)에 비하여 $p \leq 0.05$ 에 배정된 유의성.

도면 11: AFC 콜라겐 생산과 대비하여 MPC CM에서 TGF β 1 수준의 회귀 분석.

도면 12: 초기 세포 파종 밀도, 시간 및 오퍼레이터의 함수로서 2개의 MPC 로트에 의한 TGF- β 1 분비. (A) 25,000 세포/cm²로 파종된 세포에 대한 시간 코스 분석. (B) 50,000 세포/cm²로 파종된 세포에 대한 시간 코스 분석.

도면 13. ELISA 키트의 3개 로트로부터 표준을 이용한 TGF β 1 표준 곡선의 선형성. (A) 검정기 희석제에서 준비된 표준 곡선. (B) CBM + 0.5% BSA에서 준비된 표준 곡선.

도면 14. 검정기 희석제 및 연골원성 기초 배지 (CBM) + 0.5% BSA에서 준비된 TGF β 1 ELISA 검정에 대한 표준 곡선의 비교, 매트릭스 효과는 검정기 희석제 및 CBM + 0.5%BSA에서 준비된 표준 곡선을 비교함으로써 평가되었

다 (동일한 평판에서 병렬로 분석됨). 각 표준은 이중으로 대표되고, 그리고 2가지 독립된 실험이 수행되었다. OD는 표준이 검정기 회석제와 비교하여 CBM에서 제조될 때 약간 더 높았는데, 이것은 매트릭스 효과의 존재를 지시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0085] 구체예의 설명

[0086] 일반적인 기술 및 정의

[0087] 명세서 전반에서, 달리 특정되지 않으면 또는 문맥에서 달리 요구되지 않으면, 단일 단계, 물질 조성물, 단계의 군 또는 물질 조성물의 군에 대한 언급은 이들 단계, 물질 조성물, 단계의 군 또는 물질 조성물의 군 중에서 하나 및 복수 (즉, 하나 또는 그 이상)을 포괄하는 것으로 간주될 것이다.

[0088] 당업자는 본원에서 설명된 발명이 구체적으로 설명된 것들 이외에 변이 및 변형을 허용한다는 것을 인지할 것이다. 본 발명은 이와 같은 모든 변이 및 변형을 포함하는 것으로 이해된다. 본 발명은 또한, 개별적으로 또는 집합적으로 본 명세서에서 지칭되거나 또는 지시된 모든 단계, 특질, 조성물 및 화합물, 그리고 상기 단계 또는 특질의 임의의 모든 조합 또는 임의의 2가지 또는 그 이상을 포함한다.

[0089] 본 발명은 본원에서 설명된 특정한 구체예에 의해 범위에서 제한되지 않고, 이들 실례는 단지 예증의 목적으로만 의도된다. 기능적으로-동등한 산물, 조성물 및 방법은 명확하게, 본 발명의 범위 내에 있다.

[0090] 본원에서 개시된 임의의 실례는 달리 특정되지 않으면, 필요한 부분만 약간 수정하여 임의의 다른 실례에 적용되는 것으로 간주될 것이다.

[0091] 달리 특정적으로 규정되지 않으면, 본원에서 이용된 모든 기술 용어 및 과학 용어는 당해 분야 (가령, 세포 배양, 분자유전학, 줄기 세포 분화, 면역학, 면역조직화학, 단백질 화학, 그리고 생화학)에서 평균적인 지식을 가진 자에 의해 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는 것으로 간주될 것이다.

[0092] 달리 지시되지 않으면, 본 발명에서 활용된 줄기 세포, 세포 배양 및 외과 기술은 당업자에게 널리 공지된 표준 절차이다. 이런 기술은 (Perbal, 1984) (Sambrook & Green, 2012) (Brown, 1991) (Glover & Hames, 1995 및 1996) (현재까지의 모든 갱신을 포함하는 Ausubel F. M., 1987) (Harlow & Lane, 1988), 그리고 (현재까지의 모든 갱신을 포함하는 Coligan, Kruisbeek, Margulies, Shevach, & Strober, 1991)과 같은 출처에서 기존 문헌 전역에서 기술되고 설명된다.

[0093] 용어 "및/또는", 예를 들면, "X 및/또는 Y"는 "X 및 Y" 또는 "X 또는 Y"를 의미하는 것으로 이해될 것이고, 그리고 양쪽 의미 또는 어느 한쪽 의미에 대한 명시적 뒷받침을 제공하는 것으로 간주될 것이다.

[0094] 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 약은 반대로 진술되지 않으면, 지정된 값의 +/- 10%, 더욱 바람직하게는 +/- 5%를 지칭한다.

[0095] 본 명세서 전반에서, 단어 "포함한다" 또는 변이, 예를 들면, "포함한다" 또는 "포함하는"은 언급된 원소, 완전체 또는 단계, 또는 원소, 완전체 또는 단계의 군의 포함, 하지만 임의의 다른 원소, 완전체 또는 단계, 또는 원소, 완전체 또는 단계의 군의 배제하지 않음을 암시하는 것으로 이해될 것이다.

[0096] 중간엽 계통 전구체 세포

[0097] 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포"는 다분화능, 그리고 중간엽 기원, 예를 들면, 조골세포, 연골세포, 지방세포, 간질 세포, 섬유모세포 및 힘줄, 또는 비-중배엽 기원, 예를 들면, 간세포, 신경 세포 및 상피 세포 중에서 어느 한쪽의 다수의 세포 유형으로 분화하는 능력을 유지하면서, 자가 재생하는 능력을 갖는 미분화된 다분화성 세포를 지칭한다.

[0098] 용어 "중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포"는 부모 세포 및 그들의 미분화된 자손 둘 모두를 포함한다. 상기 용어는 또한, 중간엽 전구체 세포, 다분화성 간질 세포, 중간엽 줄기 세포, 혈관주위 중간엽 전구체 세포, 그리고 이들의 미분화된 자손을 포함한다.

[0099] 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 자가, 이종유전성, 동계 또는 등질일 수 있다. 자가 세포는 그들이 재이식될 동일한 개체로부터 단리된다. 동종이계 세포는 동일한 종의 공여자로부터 단리된다. 이종유전성 세포는 다른 종의 공여자로부터 단리된다. 동계 또는 등질 세포는 유전적으로 동일한 생물체, 예를 들면, 쌍둥이, 클론,

또는 고도의 동족변식 연구 동물 모형으로부터 단리된다.

- [0100] 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 주로 골수에서 채취하지만, 예로서 제대혈 및 탯줄, 성체 말초혈, 지방 조직, 섬유주 골 및 치아 속질을 비롯한 다양한 숙주 조직 내에서도 존재하는 것으로 밝혀졌다.
- [0101] 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 숙주 조직으로부터 단리되고 STRO-1+ 세포의 선별에 의해 농축될 수 있다. 가령, 개체로부터 골수 흡인물은 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포의 선별을 할 수 있게 하기 위해, STRO-1 또는 TNAP에 대한 항체로 더욱 처리될 수 있다. 한 가지 실험에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 (Simmons & Torok-Storb, 1991)에서 설명된 STRO-1 항체를 이용함으로써 농축될 수 있다.
- [0102] STRO-1+ 세포는 골수, 혈액, 치아 속질 세포, 지방 조직, 피부, 비장, 췌장, 뇌, 신장, 간, 심장, 망막, 뇌, 모낭, 장, 폐, 림프절, 흉선, 뼈, 인대, 힘줄, 골격근, 진피 및 골막에서 발견되는 세포이고; 그리고 생식계열, 예를 들면, 중배엽 및/또는 내배엽 및/또는 외배엽으로 분화할 수 있다. 따라서, STRO-1+ 세포는 지방, 골성, 연골성, 탄력성, 근육 및 섬유성 결합 조직을 포함하지만 이들에 한정되지 않는 다수의 세포 유형으로 분화할 수 있다. 이들 세포가 들어가는 특정한 계통-수입 및 분화 경로는 기계적 영향 및/또는 내인성 생리활성 인자, 예를 들면, 성장 인자, 사이토킨 및/또는 숙주 조직에 의해 확립된 국부 미세환경 조건으로부터 다양한 영향에 의존한다. 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "농축된"은 한 특정 세포 유형의 비율 또는 다수의 특정 세포 유형의 비율이 세포의 처리되지 않은 개체군 (가령, 그들의 선천적 환경에서 세포)과 비교할 때 증가되는 세포 개체군을 설명한다. 한 가지 실험에서, STRO-1+ 세포에 대해 농축된 개체군은 최소한 약 0.1% 또는 0.5% 또는 1% 또는 2% 또는 5% 또는 10% 또는 15% 또는 20% 또는 25% 또는 30% 또는 50% 또는 75% STRO-1+ 세포를 포함한다. 이점에 관하여, 용어 "STRO-1+ 세포에 대해 농축된 세포 개체군"은 용어 "X% STRO-1+ 세포를 포함하는 세포 개체군"에 대한 명시적 뒷받침을 제공하는 것으로 간주될 것인데, 여기서 X%는 본원에서 언급된 바와 같은 백분율이다. STRO-1+ 세포는 일부 실험에서, 클론원성 집락을 형성할 수 있다, 예를 들면, CFU-F (섬유모세포) 또는 이들의 부분집합 (가령, 50% 또는 60% 또는 70% 또는 70% 또는 90% 또는 95%)이 이러한 활성을 가질 수 있다.
- [0103] 한 가지 실험에서, 세포 개체군은 선별가능 형태에서 STRO-1+ 세포를 포함하는 세포 제조물로부터 농축된다. 이점에 관하여, 용어 "선별가능 형태"는 세포가 STRO-1+ 세포의 선별을 허용하는 마커 (가령, 세포 표면 마커)를 발현한다는 것을 의미하는 것으로 이해될 것이다. 마커는 STRO-1일 수 있지만, 반드시 그러할 필요는 없다. 가령, 본원에서 설명되고 및/또는 예시된 바와 같이, STRO-2 및/또는 STRO-3 (TNAP) 및/또는 STRO-4 및/또는 VCAM-1 및/또는 CD146 및/또는 3G5를 발현하는 세포 (가령, MPCs)는 또한, STRO-1을 발현한다 (그리고 STRO-1^{br}일 수 있다). 따라서, 세포가 STRO-1+이라는 지시는 세포가 STRO-1 발현에 의해 선별된다는 것을 의미하지 않는다. 한 가지 실험에서, 세포는 최소한 STRO-3 발현에 근거하여 선별된다, 가령, 이들은 STRO-3+ (TNAP+)이다.
- [0104] 세포 또는 이들의 개체군의 선별에 대한 참조는 특정한 조직 공급원으로부터 선별을 반드시 필요로 하는 것은 아니다. 본원에서 설명된 바와 같이, STRO-1+ 세포는 매우 다양한 공급원에서 선택되거나 또는 이들로부터 단리되거나 또는 이들로부터 농축될 수 있다. 다시 말하면, 일부 실험에서, 이들 용어는 STRO-1+ 세포를 포함하는 임의의 조직, 또는 혈관성 조직, 또는 혈관주위세포 (가령, STRO-1+ 혈관주위세포)를 포함하는 조직, 또는 본원에서 언급된 조직 중에서 임의의 한 가지 또는 그 이상으로부터 선별에 대한 뒷받침을 제공한다.
- [0105] 한 가지 실험에서, 본 발명의 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 TNAP+, VCAM-1+, THY-1+, STRO-2+, STRO-4+ (HSP-90 β), CD45+, CD146+, 3G5+로 구성된 군에서 개별적으로 또는 집합적으로 선택되는 하나 또는 그 이상의 마커를 발현한다.
- [0106] "개별적으로"은 본 발명이 언급된 마커 또는 마커의 군을 별개로 포괄하고, 그리고, 개별 마커 또는 마커의 군이 본원에서 별개로 열거되지 않음에도 불구하고, 첨부된 청구항이 이런 마커 또는 마커의 군을 서로로부터 별개로 및 분할가능하게 규정할 수 있다는 것으로 의미된다.
- [0107] "집합적으로"은 본 발명이 언급된 마커 또는 펩티드 군의 임의의 숫자 또는 조합을 포괄하고, 그리고 마커 또는 마커의 군의 이런 숫자 또는 조합이 본원에서 특정적으로 열거되지 않음에도 불구하고, 첨부된 청구항이 이런 조합 또는 하위조합을 마커 또는 마커의 군의 임의의 다른 조합으로부터 별개로 및 분할가능하게 규정할 수 있다는 것으로 의미된다.
- [0108] 한 가지 실험에서, STRO-1+ 세포는 STRO-1^{br} (동의의 STRO-1^{br})이다. 한 가지 실험에서, STRO-1^{br} 세포는 STRO-1^{호립} 또는 STRO-1^{중간} 세포에 비하여 우선적으로 농축된다.

- [0109] 한 가지 실험에서, STRO-1^{밝은} 세포는 추가적으로, TNAP+, VCAM-1+, THY-1+, STRO-2+, STRO-4+ (HSP-90β) 및/또는 CD146+ 중에서 하나 또는 그 이상이다. 가령, 세포는 전술한 마커 중에서 하나 또는 그 이상에 대해 선별되고 및/또는 전술한 마커 중에서 하나 또는 그 이상을 발현하는 것으로 밝혀진다. 이점에 관하여, 마커를 발현하는 것으로 밝혀진 세포는 특이적으로 시험될 필요가 없고, 오히려 이전에 농축되거나 또는 단리된 세포가 시험되고 차후에 이용될 수 있고, 단리된 또는 농축된 세포는 동일한 마커를 또한 발현하는 것으로 합리적으로 가정될 수 있다.
- [0110] 한 가지 실험에서, STRO-1^{밝은} 세포는 혈관주위 마커 3G5의 존재에 의해 특징화되는, WO 2004/85630에서 규정된 바와 같은 혈관주위 중간엽 전구체 세포이다.
- [0111] 소정의 마커에 대해 "양성"인 것으로 지칭되는 세포는 마커가 세포 표면 상에 존재하는 정도에 따라 낮은 (lo 또는 흐린) 또는 높은 (밝은, bri) 수준의 마커를 발현할 수 있는데, 여기서 상기 용어는 세포의 분류 과정에서 이용된 형광 또는 다른 마커의 강도에 관계한다. lo (또는 흐린 또는 둔한) 및 bri의 차이는 분류된 특정 세포 개체군에서 이용된 마커의 맥락에서 이해될 것이다. 소정의 마커에 대해 "음성"인 것으로 지칭되는 세포는 상기 세포로부터 반드시 완전하게 부재할 필요는 없다. 이러한 용어는 마커가 상기 세포에 의해 상대적으로 매우 낮은 수준에서 발현되고, 그리고 이것이 검출가능하게 표지화될 때 매우 낮은 신호를 산출하거나 또는 배경 수준, 예를 들면, 아이소타입 대조 항체를 이용하여 검출된 수준을 초과하여 검출될 수 없다는 것을 의미한다.
- [0112] 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "밝은" 또는 bri는 검출가능하게 표지화될 때, 상대적으로 높은 신호를 산출하는 세포 표면 상에 마커를 지칭한다. 이론에 의해 한정됨 없이, "밝은" 세포는 표본 내에 다른 세포보다 더욱 많은 표적 마커 단백질 (가령, STRO-1 항체에 의해 인식되는 항원)을 발현하는 것으로 제안된다. 가령, STRO-1^{bri} 세포는 FITC-접합된 STRO-1 항체로 표지화될 때 형광 활성화된 세포 분류 (FACS) 분석에 의한 결정에서, 비-밝은 세포 (STRO-1^{둔한/흐린})보다 더욱 큰 형광 신호를 생산한다. 한 가지 실험에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 골수로부터 단리되고 STRO-1+ 세포의 선별에 의해 농축된다. 본 실시예에서, "밝은" 세포는 시작 표본에서 내포된 가장 밝게 표지화된 골수 단핵 세포 중에서 최소한 약 0.1%를 구성한다. 다른 실험에서, "밝은" 세포는 시작 표본에서 내포된 가장 밝게 표지화된 골수 단핵 세포 중에서 최소한 약 0.1%, 최소한 약 0.5%, 최소한 약 1%, 최소한 약 1.5%, 또는 최소한 약 2%를 구성한다. 한 가지 실험에서, STRO-1^{밝은} 세포는 "배경", 다시 말하면, STRO-1-인 세포에 비하여 STRO-1 표면 발현의 2 로그 크기 높은 발현을 갖는다. 그에 비해, STRO-1^{흐린} 및/또는 STRO-1^{중간} 세포는 STRO-1 표면 발현의 2 로그 크기보다 높지 않은 발현, 전형적으로 약 1 로그 또는 "배경"보다 낮은 발현을 갖는다.
- [0113] 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "TNAP"는 조직 비특이적 알칼리 인산분해효소의 모든 동종형을 포괄하는 것으로 의도된다. 가령, 상기 용어는 간 동종형 (LAP), 뼈 동종형 (BAP) 및 신장 동종형 (KAP)을 포괄한다. 한 가지 실험에서, TNAP는 BAP이다. 한 가지 실험에서, TNAP는 부다페스트 조약의 규정 하에 기탁 번호 PTA-7282로 2005년 12월 19일자에 ATCC에 기탁된 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 STRO-3 항체에 결합할 수 있는 분자를 지칭한다.
- [0114] 게다가, 한 가지 실험에서, STRO-1+ 세포는 클론원성 CFU-F를 발생시킬 수 있다.
- [0115] 한 가지 실험에서, 유의미한 비율의 STRO-1+ 세포가 최소한 2가지 상이한 생식계열로 분화할 수 있다. 세포가 수입될 수 있는 계통의 무제한적 실험은 뼈 전구체 세포; 담관 상피 세포 및 간세포에 대해 다분화성인 간세포 선조체; 희소돌기아교세포 및 별아교세포로 진행되는 신경아교 세포 전구체를 산출할 수 있는 신경 한정된 세포; 뉴런으로 진행되는 뉴런 전구체; 심장 근육 및 심근세포에 대한 전구체, 글루코오스-반응성 인슐린 분비 췌장 베타 세포주를 포함한다. 다른 계통은 상아질모세포, 상아질-생산 세포 및 연골세포, 그리고 다음의 전구체 세포를 포함하지만 이들에 한정되지 않는다: 망막 색소 상피 세포, 섬유모세포, 피부 세포, 예를 들면, 각질 세포, 수지상 세포, 모낭 세포, 신장 관 상피 세포, 평활근 및 골격근 세포, 고환 선조체, 혈관 내피 세포, 힘줄, 인대, 연골, 지방세포, 섬유모세포, 골수 버팀질, 심장 근육, 평활근, 골격근, 혈관주위세포, 혈관, 상피, 신경교, 뉴런, 별아교세포 및 희소돌기아교세포 세포.
- [0116] 한 가지 실험에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 MSCs이다. MSCs는 균질한 조성물일 수 있거나 또는 MSCs가 농축된 혼합된 세포 개체군일 수 있다. 균질한 MSC 조성물은 유착성 골수 또는 골막 세포를 배양함으로써 획득될 수 있고, 그리고 이들 MSCs는 독특한 단일클론 항체로 확인되는 특정한 세포 표면 마커에 의해 확인될 수 있다. MSCs가 농축된 세포 개체군을 획득하기 위한 방법은 예로서, US 특허 5486359에서 설명된다. MSCs

에 대한 대안적 공급원은 혈액, 피부, 제대혈, 근육, 지방, 뼈 및 연골막을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다.

[0117] 단리된 또는 농축된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 배양에 의해 시험관내에서 확대될 수 있다. 당업자에 의해 인지되는 바와 같이, 단리된 또는 농축된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 냉동보존되고, 해동되고, 그리고 배양에 의해 시험관내에서 차후 확대될 수 있다.

[0118] 한 가지 실험에서, 단리된 또는 농축된 또는 배양된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 혈청-보충된 배양 배지, 예를 들면, 10% 소 태아 혈청 (FBS) 및 글루타민으로 보충된 알파 최소 필수 배지 (α MEM)에서 50,000 생존 가능 세포/cm²로 파종되고, 그리고 37 °C, 20% O₂에서 하룻밤 동안 배양 용기에 부착하도록 허용된다. 배양 배지는 차후에, 0.5% 소 혈청 알부민 (BSA)으로 보충된 연골원성 기초 배지 (CBM; Lonza, Walkersville, MD)로 대체되고, 그리고 세포는 이들 세포에 의해 배양 배지 내로 방출된 TGF β 1의 양을 결정하기에 앞서, 37 °C, 5% O₂에서 추가 68 내지 72 시간 동안 배양된다.

[0119] 배양된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 생체내에서 세포와 표현형적으로 상이하다. 가령, 한 구체예에서, 이들은 다음의 마커, CD44, NG2, DC146 및 CD140b 중에서 하나 또는 그 이상을 발현한다.

[0120] 배양된 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 생체내에서 세포와 생물학적으로 상이하고, 생체내에서 거의 비-순환성 (정지) 세포와 비교하여 더욱 높은 비율의 증식을 갖는다.

[0121] 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 개체에 투여에 앞서 냉동보존될 수 있다.

[0122] TGF β 1 수준의 양을 결정

[0123] 본 발명은 웨스턴 블롯, 효소 결합 면역흡착 검정 (ELISA), 형광-연결된 면역 흡착 검정 (FLISA), 경쟁 검정, 방사면역검정, 측방 유동 면역검정, 관류 면역검정, 전기화학발광 검정, 혼탁-기초된 검정, 혼탁도측정-기초된 검정, 중간엽 계통 또는 전구체 세포를 배양하는데 이용된 배양 배지에서 TGF β 1의 검출을 위한 형광 활성화된 세포 분류 (FACS)-기초된 검정, 그리고 표면 플라스몬 공명 (SPR 또는 Biacore)을 비롯한 임의의 형태의 검정을 예기한다.

[0124] 적합한 검정의 한 형태는 예로서, ELISA 또는 FLISA이다.

[0125] 한 형태에서, 이런 검정은 TGF β 1 결합 단백질을 고체 매트릭스, 예를 들면, 예로서 폴리스티렌 또는 폴리카보네이트 마이크로웰 또는 딥스틱, 막, 또는 유리 지지체 (가령, 유리 슬라이드) 위에 고정시키는 것을 수반한다. 시험 표본은 이후, TGF β 1 결합 단백질과 직접적으로 접촉되고, 그리고 표본 내에 TGF β 1은 결합되거나 또는 포획된다. 표본 내에 임의의 결합되지 않은 단백질을 제거하기 위한 세척 이후에, 상이한 에피토프에서 TGF β 1에 결합하는 단백질이 포획된 TGF β 1과 직접적으로 접촉된다. 이러한 검출기 단백질은 일반적으로, ELISA의 경우에 검출가능한 리포터 분자, 예를 들면, 예로서, 효소 (가령, 양고추냉이 과산화효소 (HRP)), 알칼리 인산분해효소 (AP) 또는 β -갈락토시다아제), 또는 FLISA의 경우에 형광단으로 표지화된다. 대안으로, 검출기 단백질에 결합하는 두 번째 표지화된 단백질이 이용될 수 있다. 임의의 결합되지 않은 단백질을 제거하기 위한 세척 이후에, 검출가능한 리포터 분자는 ELISA의 경우에 기질, 예를 들면, 예로서, 과산화수소, TMB, 또는 톨루이딘, 또는 5-브로모-4-클로로-3-인돌-베타-D-갈락토피라노시드 (x-gal)의 첨가에 의해 검출된다. 당연히, 고정된 (포획) 단백질 및 검출기 단백질은 반대의 방식으로 이용될 수 있다.

[0126] 이후, 표본 내에 항원의 수준이 공지된 양의 마커를 이용하여 산출된 표준 곡선을 이용하여, 또는 대조 표본과의 비교에 의해 결정된다.

[0127] 앞서 설명된 검정은 검출을 위한 기초로서 화학발광 또는 전자화학발광을 이용하기 위해 쉽게 변형된다.

[0128] 당업자에게 명백한 바와 같이, 면역 흡착 검정에 근거된 다른 검출 방법이 본 발명의 성과에서 유용하다. 가령, 상기 설명에 근거된 면역 흡착 방법은 검출용 방사성 표지, 또는 검출용 금 표지 (가령, 콜로이드 금), 또는 예로서, 검출용 NAD⁺를 피포하는 리포솜, 또는 아크리딘염 연결된 면역 흡착 검정을 이용한다.

[0129] 본 발명의 일부 실험에서, TGF β 1의 수준은 표면 플라스몬 공명 검출기 (가령, BIAcore™, GE Healthcare, Piscataway, N.J.), 관류 장치 (가령, US 특허 7205159에서 설명된 바와 같이), 마이크로- 또는 나노-면역검정 장치 (가령, US 특허 7271007에서 설명된 바와 같이), 측방 유동 장치 (가령, US 공개 20040228761 또는 US 공개 20040265926에서 설명된 바와 같이), 형광 분극 면역검정 (FPIA, 가령, US 특허 4593089 또는 US 특허

4751190에서 설명된 바와 같이), 또는 번역탁도측정 검정 (가령, US 특허 5571728 또는 US 특허 6248597에서 설명된 바와 같이)을 이용하여 결정된다.

[0130] **조성물 및 투여**

[0131] 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포를 포함하는 조성물은 제약학적으로 허용되는 담체에서 제조될 수 있다. 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "제약학적으로 허용되는 담체"는 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포의 저장을 용이하게 하고, 투여를 용이하게 하고 및/또는 생물학적 활성을 유지하는 물질 조성물을 지칭한다.

[0132] 한 가지 실례에서, 담체는 수용자에서 유의미한 국부 또는 전신 부작용을 유발하지 않는다. 제약학적으로 허용되는 담체는 고체 또는 액체일 수 있다. 제약학적으로 허용되는 담체의 유용한 실례는 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포의 생존력 및 활성에 영향을 주지 않는 희석제, 용매, 계면활성제, 부형제, 현탁제, 완충제, 윤활제, 어쥬번트, 운반제, 유화제, 흡수제, 분산 매체, 코팅, 안정제, 보호 콜로이드, 접착제, 농후제, 요변성 작용제, 침투 작용제, 격리 작용제, 골격, 등장성 및 흡수 지연 작용제를 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 적합한 담체의 선택은 당업자의 지식 범위 안에 있다.

[0133] 적합한 제약학적 담체는 히알루로난, 화학적으로 변형된 히알루로난, 식염수, 인산염 완충된 식염수, 콘드로이틴 황산염, 글루코사민, 만노사민, 프로테오글리칸, 프로테오글리칸 단편, 키틴, 키토산, 또는 다른 다당류 또는 중합체 물질을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다.

[0134] 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 또한, 골격 내에 통합되거나 또는 임베드될 수 있다. 적합한 골격은 생물학적, 분해성 골격을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 자연 생물분해성 골격은 콜라겐, 섬유결합소 및 라미닌 골격을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 합성 생물분해성 골격은 폴리글리콜산 골격 (가령, (Vacanti, Morse, & Saltzman, 1988) (Cima, Ingber, Vacanti, & Langer, 1991) (Vacanti, Langer, Schloo, & Vacanti, 1991)에 의해 설명된 바와 같이), 합성 중합체, 예를 들면, 예로서, 폴리무수물, 폴리오르토에스테르 및 폴리유산; 그리고 젤라틴 재흡수성 스펀지, 예를 들면, 예로서, GelformTM (Pfizer)을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다.

[0135] 본 발명의 조성물은 단위 약형에서 편의하게 제공될 수 있고, 그리고 당분야에서 널리 공지된 방법 중에서 한 가지에 의해 제조될 수 있다. 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "투여 단위 형태"는 치료되는 개체에 대한 단위 용량으로서 적합한 물리적으로 구별된 단위를 지칭한다; 각 단위는 제약학적 담체와 함께, 원하는 치료 또는 예방 효과를 산출하기 위해 계산된 활성 화합물의 미리 결정된 양을 내포한다. 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포의 용량은 인자, 예를 들면, 치료되는 개체의 질환 상태, 연령, 성별 및 체중에 따라 변할 수 있다.

[0136] 예시적인 용량은 최소한 약 1×10^6 세포를 포함한다. 가령, 용량은 약 1.0×10^6 내지 약 1×10^{10} 세포, 예로서, 약 1.1×10^6 내지 약 1×10^9 세포, 예로서, 약 1.2×10^6 내지 약 1×10^8 세포, 예로서, 약 1.3×10^6 내지 약 1×10^7 세포, 예로서, 약 1.4×10^6 내지 약 9×10^6 세포, 예로서, 약 1.5×10^6 내지 약 8×10^6 세포, 예로서, 약 1.6×10^6 내지 약 7×10^6 세포, 예로서, 약 1.7×10^6 내지 약 6×10^6 세포, 예로서, 약 1.8×10^6 내지 약 5×10^6 세포, 예로서, 약 1.9×10^6 내지 약 4×10^6 세포, 예로서, 약 2×10^6 내지 약 3×10^6 세포를 포함할 수 있다.

[0137] 한 가지 실례에서, 용량은 약 5×10^5 내지 2×10^7 세포, 예로서, 약 6×10^6 세포 내지 약 1.8×10^7 세포를 포함한다. 용량은 예로서, 약 6×10^6 세포 또는 약 1.8×10^7 세포일 수 있다.

[0138] 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 조성물의 세포 개체군의 최소한 약 5%, 최소한 약 10%, 최소한 약 15%, 최소한 약 20%, 최소한 약 25%, 최소한 약 30%, 최소한 약 35%, 최소한 약 40%, 최소한 약 45%, 최소한 약 50%, 최소한 약 55%, 최소한 약 60%, 최소한 약 65%, 최소한 약 70%, 최소한 약 75%, 최소한 약 80%, 최소한 약 85%, 최소한 약 90%, 최소한 약 95%를 포함한다.

[0139] 본 발명의 조성물은 냉동보존될 수 있다. 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포의 냉동보존은 느린-속도 냉각 방법 또는 당분야에서 공지된 '빠른' 동결 프로토콜을 이용하여 실행될 수 있다. 바람직하게는, 냉동보존의 방법은 해동된 세포와 비교하여 냉동보존된 세포의 유사한 표현형, 세포 표면 마커 및 성장률을 유지한다.

[0140] 냉동보존된 조성물은 냉동보존 용액을 포함할 수 있다. 냉동보존 용액의 pH는 전형적으로 6.5 내지 8, 바람직하

게는 7.4이다.

- [0141] 냉동보존 용액은 무균, 비-발열원 등장성 용액, 예를 들면, 예로서, Plasmalyte ATM를 포함할 수 있다. 100 mL의 Plasmalyte ATM는 526 mg의 염화나트륨, USP (NaCl); 502 mg의 나트륨 글루콘산염 (C₆H₁₁NaO₇); 368 mg의 아세트산나트륨 삼수화물, USP (C₂H₃NaO₂ · 3H₂O); 37 mg의 염화칼륨, USP (KCl); 및 30 mg의 염화마그네슘, USP (MgCl₂ · 6H₂O)를 내포한다. 이것은 항균제를 내포하지 않는다. pH는 수산화나트륨으로 조정된다. pH는 7.4 (6.5 내지 8.0)이다.
- [0142] 냉동보존 용액은 ProfreezeTM을 포함할 수 있다. 냉동보존 용액은 부가적으로 또는 대안으로, 배양 배지, 예를 들면, αMEM을 포함할 수 있다.
- [0143] 동결을 조장하기 위해, 냉동보호제, 예를 들면, 예로서, 디메틸설폭시드 (DMSO)가 통상적으로 냉동보존 용액에 첨가된다. 이상적으로, 냉동보호제는 세포 및 환자에 대해 비독성이고, 비항원성이고, 화학적으로 비활성이고, 해동한 후 높은 생존율을 제공하고, 그리고 세척 없이 이식을 허용해야 한다. 하지만, 가장 흔히 이용되는 항동결제, DMSO는 일부 세포독성을 나타낸다. 히드록시에틸 전분 (HES)이 냉동보존 용액의 세포독성을 감소시키기 위해, 대체제로서 또는 DMSO와 합동으로 이용될 수 있다.
- [0144] 냉동보존 용액은 DMSO, 히드록시에틸 전분, 인간 혈청 성분 및 다른 단백질 증량제 중에서 하나 또는 그 이상을 포함할 수 있다. 한 가지 실험에서, 냉동보존된 용액은 약 5% 인간 혈청 알부민 (HSA) 및 약 10% DMSO를 포함한다. 냉동보존 용액은 메틸셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈 (PVP) 및 트레할로스 중에서 하나 또는 그 이상을 더욱 포함할 수 있다.
- [0145] 한 구체예에서, 세포는 42.5% ProfreezeTM/50% αMEM/7.5% DMSO에서 현탁되고 제어된-속도 냉동기에서 냉각된다.
- [0146] 냉동보존된 조성물은 해동되고, 그리고 개체에 직접적으로 투여되거나 또는 예로서, HA를 포함하는 다른 용액에 첨가될 수 있다. 대안으로, 냉동보존된 조성물은 해동될 수 있고, 그리고 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 투여에 앞서 대체 담체에서 재현탁될 수 있다.
- [0147] 본 발명의 조성물은 치료되는 특정 질환 상태에 적합한 루트에 의해 투여될 수 있다. 가령, 본 발명의 조성물은 전신적으로, 다시 말하면, 비경구, 정맥내 또는 주사에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 조성물은 특정 조직 또는 장기에 표적화될 수 있다.
- [0148] 투약 섭생은 최적 치료 반응을 제공하기 위해 조정될 수 있다. 가령, 단일 일시 주사가 투여될 수 있거나, 여러 분할된 용량이 시간의 추이에서 투여될 수 있거나, 또는 용량이 치료 상황의 긴급성에 의해 지시된 바와 비례하여 감소되거나 또는 증가될 수 있다. 투여의 용이함 및 용량의 균일성을 위해 비경구 조성물을 투약 단위 형태로 조제하는 것이 유리할 수 있다.
- [0149] 일부 구체예에서, 세포 조성물로 요법의 개시에 앞서 환자의 면역을 억제하는 것이 필요하지 않거나 또는 바람직하지 않을 수 있다. 실제로, 양에서 동종이계 STRO-1+ 세포의 이식은 면역억제의 부재에서 충분히 용인되었다. 하지만, 다른 경우에, 세포 요법을 개시하기에 앞서 환자를 약리학적으로 면역억제하는 것이 바람직하거나 또는 타당할 수 있다. 이것은 전신 또는 국부 면역억제제의 이용을 통해 달성될 수 있거나, 또는 이것은 피포된 장치에서 세포를 전달함으로써 달성될 수 있다. 세포는 이들 세포에 의해 요구되는 영양소와 산소 및 치료적 인자에 투과성인 캡슐 내에 피포될 수 있고, 상기 세포는 면역 체액성 인자 및 세포에 여전히 불투과성이다. 바람직하게는, 캡슐화제는 저자극성이고, 표적 조직에서 쉽고 안정되게 위치되고, 그리고 이식된 구조에 부가된 보호를 제공한다. 이식된 세포에 대한 면역 반응을 감소시키거나 또는 제거하기 위한 이런 저런 수단은 당분야에서 공지된다. 대안으로서, 세포는 그들의 면역원성을 감소시키기 위해 유전적으로 변형될 수 있다.
- [0150] 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 다른 유익한 약물 또는 생물학적 분자 (성장 인자, 영양 인자)와 함께 투여될 수 있는 것으로 인지될 것이다. 다른 작용제와 함께 투여될 때, 이들은 단일 제약학적 조성물에서 또는 별개의 제약학적 조성물에서 함께, 다른 작용제와 동시에 또는 다른 작용제와 순차적으로 (다른 작용제의 투여 전 후에) 투여될 수 있다. 공동투여될 수 있는 생리활성 인자는 항아포토시스성 작용제 (가령, EPO, EPO 미메티바디, TPO, IGF-I 및 IGF-II, HGF, 카스파제 저해제); 항염증제 (가령, p38 MAPK 저해제, TGF-베타 저해제, 스타틴, IL-6 및 IL-1 저해제, PEMIROLASTTM, TRANILASTTM, REMICADETM, SIROLIMUSTM, 그리고 비스테로이드성 항염증

성 약물 (NSAIDs), 예를 들면, TEPOXALIN™, TOLMETIN™, SUPROFEN™; 면역억제제/면역조정제 (가령, 칼시뉴린 저해제, 예를 들면, 시클로스포린, 타크롤리무스); mTOR 저해제 (가령, SIROLIMUS™, EVEROLIMUS™); 항증식제 (가령, 아자티오프린, 미코페놀레이트 모페틸); 코르티코스테로이드 (가령, 프레드니솔론, 히드로코르티손); 항체, 예를 들면, 단일클론 항-IL-2R알파 수용체 항체 (가령, 바실릭시맙, 다클리주맙), 다중클론 항-T-세포 항체 (가령, 항흉선세포 글로불린 (ATG); 항림프구 글로불린 (ALG); 단일클론 항-T 세포 항체 OKT3)); 항-혈전형성 작용제 (가령, 헤파린, 헤파린 유도체, 우로키나아제, PPACK (텍스트로페닐알라닌 프롤린 아르기닌 클로로메틸 케톤), 항트롬빈 화합물, 혈소판 수용체 길항제, 항트롬빈 항체, 항혈소판 수용체 항체, 아스피린, 디피리다몰, 프로타민, 히루딘, 프로스타글란딘 저해제 및 혈소판 저해제); 및 항산화제 (가령, 프로부콜, 비타민 A, 아스코르빈산, 토코페롤, 보조효소 Q-10, 글루타티온, L-시스테인, N-아세틸시스테인)뿐만 아니라 국부 마취제를 포함한다.

[0151] 퇴행성 디스크 질환의 치료

[0152] 추간판 (IVD)은 척추의 척추체를 연결하는 기능적 단위이고, 그리고 척추 단위의 충격 흡수 및 이동성을 담당한다 (Raj, 2008). 이것은 중심 수질핵 (NP) 및 주변 섬유테 (AF)로 구성되고, 그리고 2개의 연결성 종판 (EP)에 의해 척추체로부터 분리된다 (도면 1). NP는 IVD의 젤라틴모양 내측 코어를 형성한다. 이것은 대량의 프로테오글리칸 아그레칸과 함께 유형 II 콜라겐 섬유의 불규칙한 그물망을 포함하는데, 상기 프로테오글리칸 아그레칸은 이의 높은 음이온성 글리코사미노글리칸 (GAG) 함량 및 수분의 결합으로, 조직 점탄성, 단단함 및 압축에 대한 내성을 제공한다 (Watanabe, Yamada, & Kimata, 1998). AF는 각 종판 사이에 비스듬히 정향된 유형 I 콜라겐 섬유로 구성되는 상이한 종판에 의해 형성되는 외부 AF (Marchand & Ahmed, 1990), 그리고 유형 II 콜라겐으로의 이행 및 증가된 프로테오글리칸 함량에 의해 특징화되는 덜 섬유성이고 덜 조직화된 내부 AF (Humzah & Soames, 1988)로 세분된다. 이러한 구조는 AF가 압축 시에 NP 내에서 산출된 정수압을 제약할 수 있게 하고, 척추 분절 사이에 이동성을 용이하게 한다 (Guerin & Elliott, 2007) (Schmidt, Kettler, Heuer, Simon, Claes, & Wilke, 2007). 최외각 AF를 제외하고, IVD는 비신경이고 (Roberts, Eisenstein, Menage, Evans, & Ashton, 1995), 혈관을 실질적으로 결여하고 (Crock & Goldwasser, 1984), 그리고 결과적으로, 영양소 및 산소 공급을 위해 EP를 통한 확산에 의존한다 (Urban, Smith, & Fairbank, 2004). 단위로서 IVD의 항상성은 3 구조 모두의 최적 기능을 필요하게 만들고, 그리고 이들 구조 중에서 하나 또는 그 이상의 장애는 IVD 변성을 야기할 수 있다.

[0153] IVD의 완전성은 세포와 기질 (ECM) 합성/동적 및 분해 사이에 균형을 집합적으로 조절하는 주변분비 및/또는 자가분비 방식에서, 사이토킨, 성장 인자, 효소 및 효소 저해제의 활성의 미세한 균형에 의해 유지된다.

[0154] IVD 변성에서, 이러한 미묘한 균형의 섭동은 복수의 병인적 인자 (가령, 노화, 감염, 흡연, 유전자 소인, 비정상적인 생체역학 부하 또는 IVD 영양적 상태)에 의해 촉발된다 (Roberts, Evans, Trivedi, & Menage, 2006) (Cheung, et al., 2009). 비록 반드시 결합의 일차 부위일 필요는 없지만, 조직병리학적 변화는 먼저, ECM의 증가된 파괴, 변경된 매트릭스 합성 (주로 유형 II 콜라겐 생산으로부터 유형 I 콜라겐 생산으로의 스위치 및 아그레칸의 감소된 합성으로 구성됨), 그리고 아포토시스를 통한 세포 소실 및 클러스터를 형성하는 생존 세포의 원지 복제의 증거로 NP에서 관찰된다 (Adams & Roughley, 2006) (Johnson & Roberts, 2007) (Le Maitre, Pockert, Buttle, Freemont, & Hoyland, 2007). NP에서 팽창 압력의 결과적인 상실은 NP와 AF 사이에 힘의 정상적인 균형의 상실 및 AF로의 변성 과정의 연장을 야기하고, 혈관 및 신경의 IVD로의 루트를 허용하는 미세외상 ('파열')을 유발하고 (Hilton & Ball, 1984) 퇴행성 디스크 질환과 연관된 통증의 발생으로 이어진다.

[0155] 특정한 개시 사건과 상관없이, IVD 변성은 내인성 NP 세포 (NPCs) 및 AF 세포 (AFCs) 둘 모두에 의한, 그리고 면역계의 비상주 세포, 예를 들면, 대식세포 및 T-세포에 의한 친염증성 분자의 비정상적인 합성 및 분비에 의해 매개되는 것으로 생각된다 ((Freemont, 2009) (Risbud & Shapiro, 2014)에 의해 리뷰됨). 디스크 변성의 분비된 친염증성 매개체는 다양한 케모킨에 더하여 종양 괴사 인자 α (TNF α), 인터류킨 (IL)-1 β , IL-6, IL-17 및 IL-17을 포함하는데 (Risbud & Shapiro, 2014) (Seguin, Pilliar, Roughley, & Kandel, 2005) (Le Maitre, Hoyland, & Freemont, 2007) (Shamji, et al., 2010) (Purmessur, Walter, Roughley, Laudier, Hecht, & Iatridis, 2013), 이들 중에서 TNF α 및 IL-1 β 의 역할이 가장 광범위하게 연구된다. 양쪽 사이토킨은 ECM 변성에 관련된 유전자의 상향조절을 유도한다 (Le Maitre, Hoyland, & Freemont, 2007) (Le Maitre, Freemont, & Hoyland, 2005) (Le Maitre, Hoyland, & Freemont, 2007). IL-1 β 및 이의 수용체 둘 모두 변성된 IVD 조직에서 상향조절되고 (Le Maitre, Hoyland, & Freemont, 2007) (Le Maitre, Hoyland, & Freemont, 2007), 반면 TNF α 의 발현은 신경돌기 내성장 및 자극에 또한 연루되었다 (Murata, Onda, Rydevik, Takahashi, & Olmarker,

2006) (Wang, Markova, Anderson, Zheng, Shapiro, & Risbud, 2011).

- [0156] 한 구체예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 손상된 추간 디스크에 정상적인 기계적 및 또는 생리학적 성질을 복원하기 위해 NP 내로 주사된다.
- [0157] 다양한 생물학적 및 합성 물질이 NP 내로 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포와의 공동 주사를 위해 예기된다. 가령, 하나 또는 그 이상의 자연 또는 합성 글리코사미노글리칸 (GAGs) 또는 뮤코다당류, 예를 들면, 예로서, 히알루로난 (히알루론산; HA), 콘드로이틴 황산염, 테르마탄 황산염, 케라틴 황산염, 헤파린, 헤파린 황산염, 갈락토사미노글리쿠론글리칸 황산염 (GGGS), 그리고 이들의 생리학적 염이 NP 내로 직접적으로 주사될 수 있다. HA는 윤활 세포에 의한 내인성 HA 합성 및 연골세포에 의한 프로테오글리칸 합성의 자극에서 일정한 역할을 수행하고, 연골분해 효소의 방출을 저해하고, 그리고 연골 악화에 일조하는 것으로 알려진 산소 유리 라디칼의 스캐빈저로서 행동하는 것으로 제안되었다. 콘드로이틴 황산염 및 글루코사민 주사가능물질은 유사하게, 관절 연골 변성의 진행을 차단하는 것으로 밝혀졌다. 주장하건대, 다른 GAG가 이들을 DDD를 겪는 디스크 내로 주사를 위한 이상적인 후보로 만드는 치료적 가치를 갖는 유사한 보호 또는 회복 성질을 제공할 수 있다. GAG의 다른 귀중한 성질은 수분을 유인하고 유지하는 이들의 강한 능력이다. 따라서, 점성 겔을 형성하기 위해 GAG를 수분 또는 다른 수성 물질과 혼합하는 것이 타당할 수 있는데, 상기 겔은 이후, NP의 흡인으로부터 창출된 공간 내로 주사되거나, 또는 대안으로, 보충물로서 현재의 NP에 첨가될 수 있다. 자연 "하이드로겔"이 따라서 형성될 수 있고, 이들은 3차원에서 공간을 충전하고, 그리고 압력에 저항하고 디스크가 움직임과 연관된 충격을 적절하게 흡수할 수 있게 하는 포장재와 유사하게 작용할 수 있다.
- [0158] 합성 히알루로닉 겔, 예를 들면, 예로서, Euflexxa®, (Ferring Pharmaceuticals) 또는 Restylane™ (Q-Med Aktiebolag Co., Sweden) 역시 이용에 적합하다.
- [0159] 공동투여에 이용될 수 있는 다른 주사가능 합성 물질의 실례는 의학적 등급 실리콘, Bioplastique™ (폴리비닐피롤리돈 담체에서 현탁된 고체 실리콘 입자; Uroplasty BV, Netherlands), Arteplast™ (젤라틴 담체에서 현탁된 폴리메틸메타크릴산염 (PMMA)의 마이크로스피어; Artcs Medical, USA), Artecoll™ (소 연골 담체에서 현탁된 부드러운 PMMA 구체; Artepharma Pharmazeu Tische, GMBH Co., Germany)을 포함한다. 게다가, 합성 하이드로겔 조성물이 디스크에 정상적인 모양을 복원하고, 따라서 정상적인 생체역학 기능을 복원하는 충전제 물질로서 이용될 수 있다.
- [0160] 공지된 연골보호 능력을 갖는 항산화제 또한, NP 내로 주사의 후보이다. 이들의 실례는 토코페롤 (비타민 E), 초과산화물 디스무타아제 (SOD), 아스코르브산염 (비타민 C), 카탈라아제 등을 포함한다. 게다가, 알긴산나트륨의 양친매성 유도체 등도 본원에서 주사에 예기된다. 추가적으로, 재조합 골원성 단백질-1 (OP-1)은 NPCs 및 AFCs에 의한 프로테오글리칸 풍부한 매트릭스의 형성을 증진하는 능력으로 인해 주사를 위한 훌륭한 후보이다.
- [0161] 합성 주사가능물질의 이용 또한 예기된다. 이들은 특히, 주요 목적이 디스크에 생체역학 기능을 복원하는 것인 상황에 적용가능하다.
- [0162] HA는 단독으로 또는 다른 GAGs와 합동으로, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포를 전달하기 위한 담체로서 이용될 수 있다. HA/GAG 조성물의 농도 및 점성은 일괄적으로 결정될 수 있다. 한 구체예에서, 조성물은 최소한 약 0.5% HA 또는 HA 염을 포함한다. 가령, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포를 포함하는 세포 개체군은 1:1 비율에서 Euflexxa™ (1% 나트륨 히알루론산염)에서 현탁될 수 있었다.
- [0163] 다른 실례에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 피브린 접착제와 혼합으로 전달될 수 있다. 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "피브린 접착제"는 칼슘 이온의 존재에서 피브린 중합체의 교차연결에 의해 형성된 불용성 매트릭스를 지칭한다. 피브린 접착제는 피브린 매트릭스를 형성하는 생물학적 조직 또는 유체로부터 유래된 피브리노겐, 또는 이의 유도체 또는 대사산물, 피브린 (가용성 단위체 또는 중합체) 및/또는 이들의 복합체로부터 형성될 수 있다. 대안으로, 피브린 접착제는 재조합 DNA 기술에 의해 생산된 피브리노겐, 또는 이의 유도체 또는 대사산물, 또는 피브린으로부터 형성될 수 있다.
- [0164] 피브린 접착제는 또한, 피브리노겐 및 피브린 접착제 형성의 촉매제 (가령, 트롬빈 및/또는 인자 XIII)의 상호작용에 의해 형성될 수 있다. 당업자에 의해 인지되는 바와 같이, 피브리노겐은 촉매제 (가령, 트롬빈)의 존재에서 단백질분해적으로 개열되고 피브린 단위체로 전환된다. 피브린 단위체는 이후, 교차연결되어 피브린 접착제 매트릭스를 형성할 수 있는 중합체를 형성할 수 있다. 피브린 중합체의 교차연결은 촉매제, 예를 들면, 인자

XIII의 존재에 의해 증강될 수 있다. 피브린 접착제 형성의 촉매제는 혈장, 냉동침전물, 또는 피브리노겐 또는 트롬빈을 내포하는 다른 혈장 분획물로부터 유래될 수 있다. 대안으로, 촉매제는 재조합 DNA 기술에 의해 생산될 수 있다.

[0165] 피브리노겐을 트롬빈과 합동하는 것은 응괴 형성을 야기한다. 응괴가 형성되는 속도는 피브리노겐과 혼합된 트롬빈의 농도에 의존한다. 효소 의존성 반응이기 때문에, 온도가 더욱 높을수록 (37℃까지) 응괴 형성 속도가 더욱 빠르다. 응괴의 인장 강도는 이용된 피브리노겐의 농도에 의존한다.

[0166] 피브린 응괴가 HA의 존재에서 산출될 때, 이것은 상호작용을 겪고, 그리고 교차연결된 매트릭스와 서로 맞물리게 된다. 이러한 매트릭스는 조직 재생에서 주요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있고 조직 수복에서 세포 조절 기능을 수행한다 (Weigel, Fuller, & Le Boeuf, 1986). HA의 용해 속도 역시 HA-피브린 매트릭스에서 지연될 수 있는데, 이것은 이러한 GAG의 치료 효과를 연장하는데 유익할 수 있었다 (Wadstrom & Tengblad, 1993).

[0167] 여러 간행물이 치료적 작용제의 전달을 위한 피브린 접착제의 이용을 설명한다. 가령, US 특허 4983393은 아가로오스, 한천, 식염수 글리코사미노글리칸, 콜라겐, 피브린 및 효소를 포함하는 질내 삽입물로서 이용을 위한 조성물을 개시한다. 게다가, US 특허 3089815는 피브리노겐 및 트롬빈으로 구성된 주사가능 제약학적 제조물을 개시하고, 그리고 US 특허 6468527은 신체 내에서 특정한 부위로 다양한 생물학적 및 비생물학적 작용제의 전달을 용이하게 하는 피브린 접착제를 개시한다.

[0168] 본 발명의 조성물은 디스크 공간에 "외과적으로 첨가"될 수 있다. 다시 말하면, 조성물은 신체의 자연 성장 또는 재생 과정에 의해 "첨가된" 것으로부터 구별되게, 의료인의 개입에 의해 첨가될 수 있다. 비록 조성물을 디스크 내로 도입하는 다른 외과적 방법이 이용될 수 있긴 하지만, 외과 기술은 바람직하게는, 피하주사 바늘을 통한 주사를 포함한다. 가령, 조성물은 팽창된 윤상 개구부를 통한 압출에 의해, 카테터를 통한 주입에 의해, 외상 또는 외과적 절개에 의해 창출된 개구부를 통한 삽입에 의해, 또는 디스크 공간 내로 조성물의 침습성 또는 최소 침습성 침착의 다른 수단에 의해 디스크 내로 도입될 수 있다.

[0169] 유전적으로-변형된 세포

[0170] 한 구체예에서, 중간엽 계통 전구체 또는 줄기 세포는 예로서, 관심되는 단백질, 예를 들면, 치료적 및/또는 예방적 유익성을 제공하는 단백질, 예를 들면, 인슐린, 글루카곤, 소마토스타틴, 트립시노겐, 키모트립시노겐, 엘라스타아제, 카르복시펩티드분해효소, 췌장 지질분해효소 또는 아밀라아제, 또는 증강된 혈관형성과 연관되거나 또는 이의 원인이 되는 폴리펩티드, 또는 세포의 췌장 세포 또는 혈관 세포로의 분화와 연관된 폴리펩티드를 발현하고 및/또는 분비하기 위해 유전적으로 변형된다.

[0171] 세포를 유전적으로 변형하기 위한 방법은 당업자에게 명백할 것이다. 가령, 세포에서 발현되는 핵산은 세포에서 발현을 유도하기 위한 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 가령, 핵산은 개체의 다양한 세포에서 작동가능한 프로모터, 예를 들면, 예로서, 바이러스 프로모터, 예를 들면, CMV 프로모터 (가령, CMV-IE 프로모터) 또는 SV-40 프로모터에 연결된다. 추가의 적합한 프로모터는 당분야에서 공지된다.

[0172] 바람직하게는, 핵산은 발현 구조체의 형태에서 제공된다. 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "발현 구조체"는 세포 내에서 이것이 작동가능하게 연결되는 핵산 (가령, 리포터 유전자 및/또는 계수기-선별가능 리포터 유전자)에 발현을 부여하는 능력을 갖는 핵산을 지칭한다. 본 발명의 맥락 내에서, 발현 구조체는 플라스미드, 박테리오파지, 파지미드, 코스미드, 바이러스 하위-유전체 또는 유전체 단편, 또는 이중성 DNA를 발현가능 형태에서 유지하고 및/또는 복제할 수 있는 다른 핵산을 포함하거나 또는 이것일 수 있는 것으로 이해된다.

[0173] 본 발명의 성과를 위한 적합한 발현 구조체의 작제를 위한 방법은 당업자에게 명백할 것이고, 그리고 예로서, (현재까지 모든 갱신을 포함하는 Ausubel F. M., 1987) 또는 (Sambrook & Green, 2012)에서 설명된다. 가령, 발현 구조체의 각 성분은 예로서, PCR을 이용하여 적합한 주형 핵산으로부터 증폭되고, 그리고 차후에, 적합한 발현 구조체, 예를 들면, 예로서, 플라스미드 또는 파지미드 내로 클로닝된다.

[0174] 이런 발현 구조체에 적합한 벡터는 당분야에서 공지되고 및/또는 본원에서 설명된다. 가령, 포유류 세포에서 본 발명의 방법에 적합한 발현 벡터는 예로서, pcDNA 벡터 스위트의 벡터 (Invitrogen), pCI 벡터 스위트의 벡터 (Promega), pCMV 벡터 스위트의 벡터 (Clontech), pM 벡터 (Clontech), pSI 벡터 (Promega), VP 16 벡터 (Clontech), 또는 pcDNA 벡터 스위트 (Invitrogen)의 벡터이다.

[0175] 당업자는 추가 벡터 및 이런 벡터의 공급원, 예를 들면, 예로서, Invitrogen Corporation, Clontech 또는 Promega를 숙지할 것이다.

- [0176] 단리된 핵산 분자 또는 이를 포함하는 유전자 구조체를 발현을 위한 세포 내로 도입하기 위한 수단은 당업자에게 공지되어 있다. 소정의 생물체에 대해 이용된 기술은 공지된 성공적인 기술에 의존한다. 재조합 DNA를 세포 내로 도입하기 위한 수단은 그 중에서도 특히, 현미주입, DEAE-텍스트란에 의해 매개된 형질감염, 예로서 리포펙타민 (Gibco, MD, USA) 및/또는 선택틴 (Gibco, MD, USA)을 이용함으로써 리포솜에 의해 매개된 형질감염, PEG-매개된 DNA 흡수, 전기천공, 그리고 예로서 DNA-코팅된 텅스텐 또는 금 입자 (Agracetus Inc., WI, USA)를 이용함으로써 마이크로입자 충격을 포함한다.
- [0177] 대안으로, 본 발명의 발현 구조체는 바이러스 벡터이다. 적합한 바이러스 벡터는 당분야에서 공지되고 상업적으로 가용하다. 핵산의 전달 및 상기 핵산의 숙주 세포 유전체 내로의 통합을 위한 전통적인 바이러스-기초된 시스템은 예로서, 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 또는 아데노 연관된 바이러스 벡터를 포함한다. 대안으로, 아데노바이러스 벡터가 에피솜 형태로 남아있는 핵산을 숙주 세포 내로 도입하는데 유용하다. 바이러스 벡터는 표적 세포 및 조직에서 유전자 전달의 효율적이고 다능한 방법이다. 추가적으로, 높은 형질도입 효율이 많은 상이한 세포 유형 및 표적 조직에서 관찰되었다.
- [0178] 가령, 레트로바이러스 벡터는 일반적으로, 최대 6-10 kb의 외래 서열에 대한 포장 능력을 갖는 시스-작용 긴 말단 반복 (LTRs)을 포함한다. 최소 시스-작용 LTRs가 벡터의 복제 및 포장에 충분하고, 이것은 이후, 장기간 발현을 제공하기 위해 발현 구조체를 표적 세포 내로 통합하는데 이용된다. 폭넓게 이용되는 레트로바이러스 벡터는 무린 백혈병 바이러스 (MuLV), 긴팔원숭이 유인원 백혈병 바이러스 (GaLV), 유인원 면역결핍 바이러스 (Srv), 인간 면역결핍 바이러스 (HIV), 그리고 이들의 조합에 근거된 것들을 포함한다 (가령, 국제 공개 WO1994/026877, (Buchschacher & Panganiban, 1992) (Johann, Gibbons, & O'Hara, 1992) (Sommerfelt & Weiss, 1990) (Wilson, Reitz, Okayama, & Eiden, 1989) (Miller, Garcia, von Suhr, Lynch, Wilson, & Eiden, 1991) (Miller & Rosman, 1989) (Miller, 1990) (Scarpa, Cournoyer, Munzy, Moore, Belmont, & Caskey, 1991) (Burns, Friedmann, Driever, Burrascano, & Yee, 1993)를 참조한다).
- [0179] 다양한 아데노 연관된 바이러스 (AAV) 벡터 시스템이 또한 핵산 전달을 위해 개발되었다. AAV 벡터는 당분야에서 공지된 기술을 이용하여 쉽게 작제될 수 있다. (가령, US 특허 5173414 및 5139941, 국제 공개 WO 92/01070 및 WO 93/03769, (Lebkowski, McNally, Okarma, & Lerch, 1988) (Vincent, Moore, & Haigwood, 1990) (Carter, 1992) (Muzyczka, 1992); (Kotin, 1994) (Shelling & Smith, 1994) (Zhou, et al., 1994)를 참조한다).
- [0180] 본 발명의 발현 구조체를 전달하는데 유용한 추가 바이러스 벡터는 예로서, 바이러스의 폭스 패밀리로부터 유래된 것들, 예를 들면, 우두바이러스 및 조류 수두 또는 알파바이러스 또는 접합체 바이러스 벡터 (가령, (Fisher-Hoch, et al., 1989)에서 설명된 것)를 포함한다.
- [0181] **실시예 1 재료와 방법**
- [0182] **STRO-3+ 세포의 선별에 의한 MPCs의 면역선택**
- [0183] 골수 (BM)는 건강한 정상적인 성인 지원자 (20-35 세)로부터 수확된다. 간단히 말하면, 40 ml의 BM이 후부 장골 능선으로부터 리튬-헤파린 항응고제-내포 튜브 내로 흡인된다.
- [0184] BM 단핵 세포 (BMMNC)는 기존 문헌 (Zannettino, Buhning, Niutta, Watt, Benton, & Simmons, 1998)에서 설명된 바와 같이, Lymphoprep™ (Nycomed Pharma, Oslo, Norway)를 이용한 밀도 구배 분리에 의해 제조된다. 4℃에서 30 분 동안 400 x g에서 원심분리 이후에, 연층이 전달 피펫으로 제거되고, 그리고 5% 소 태아 혈청 (FCS, CSL Limited, Victoria, Australia)을 내포하는 Hank의 균형 염 용액 (HBSS; Life Technologies, Gaithersburg, MD)으로 구성된 "HHF"에서 3회 세척된다.
- [0185] STRO-3+ (또는 TNAP+) 세포는 차후에, 기존 문헌 (Gronthos & Simmons, 1995) (Gronthos, 2003)에서 설명된 바와 같이, 자성 활성화된 세포 분류에 의해 단리되었다. 간단히 말하면, 거의 $1-3 \times 10^8$ BMMNC가 얼음 위에서 20 분 동안, HHF에서 10% (v/v) 정상적인 토끼 혈청으로 구성되는 차단 완충액에서 배양된다. 이들 세포는 얼음 위에서 1 시간 동안, 차단 완충액에서 STRO-3 mAb의 200 μ l의 10 μ g/mL 용액과 함께 배양된다. 이들 세포는 차후에, 400 x g에서 원심분리에 의해 HHF에서 2회 세척된다. HHF 완충액에서 염소 항생제 γ -비오틴 (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, UK)의 1/50 희석액이 첨가되고, 그리고 세포는 얼음 위에서 1 시간 동안 배양된다. 세포는 상기와 같이 MACS 완충액 (1% BSA, 5 mM EDTA 및 0.01% 아지드화나트륨으로 보충된 Ca^{2+} -

및 Mg^{2+} -없는 PBS)에서 2회 세척되고 0.9 ml MACS 완충액의 최종 부피에서 재현탁되었다.

[0186] 100 μ l 스트렙타비딘 마이크로비드 (Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach, Germany)가 세포 현탁액에 첨가되고 얼음 위에서 15 분 동안 배양된다. 세포 현탁액은 2회 세척되고, 0.5 ml의 MACS 완충액에서 재현탁되고, 그리고 차후에, 미니 MACS 칼럼 (MS Columns, Miltenyi Biotec) 위에 부하되고, 그리고 STRO-3 mAb (수탁 번호 PTA-7282 하에 2005년 12월 19일자에 American Type Culture Collection (ATCC)에 기탁됨 - 국제 공개 WO 2006/108229를 참조한다)에 결합하지 않은 세포를 회수하기 위해 0.5 ml MACS 완충액으로 3회 세척되었다. 추가 1 ml MACS 완충액의 첨가 후, 칼럼은 자석으로부터 제거되고, 그리고 TNAP+ 세포는 양압에 의해 단리된다. 각 분획물로부터 세포의 분취량은 스트렙타비딘-FITC로 염색될 수 있고, 그리고 순도는 유세포분석법에 의해 사정된다.

[0187] 이러한 방식으로 단리된 중간엽 전구체 세포 (MPCs)는 STRO-1^{밝은} MPCs이다.

[0188] MPC CM의 산출

[0189] 조건부 배지 (CM)는 가용한 MPC 산물 로트 (263873, 22-12-001US, 22-12-02US, 345938, 2011CC053, 2011CC011, 2012CC010, 322509, 376232, 376233, 380505, 380507, 385470, 385471, 1857469)로부터 산출되었고, 그리고 상이한 공여자와 임상의 및 산물 개발 제조 작업을 나타낸다. 냉동보존된 MPC 산물은 해동되고, 그리고 세포는 혈청-보충된 성장 배지에서 50,000 세포/ cm^2 로 파종되고 37°C, 20% O_2 에서 하룻밤 동안 부착하도록 허용되었다. 디스크 세포-기초된 기능적 검정과 양립성인 CM을 산출하기 위해, MPC 성장 배지는 209 μ l 배지/ cm^2 의 용적에서 0.5% 소 혈청 알부민 (BSA)으로만 보충된 연골원성 기초 배지 (CBM; Lonza, Walkersville, MD)로 대체되었고, 그리고 세포는 37°C, 5% O_2 에서 3 일 동안 배양되었다. 이러한 배양 기간의 종결점에서, 배지는 수집되고 현탁액에서 임의의 세포를 제거하기 위해 원심분리되었고, 그리고 결과의 상층액은 수집되고 이용 때까지 -80°C에서 보관되었다.

[0190] NPC 증식에 대한 생물학적 검정

[0191] MPC CM에 대한 응답으로 수질핵 세포 (NPC) 증식은 활발하게 분열하는 세포에서 5-에티닐-2'-데옥시우리딘 (EdU)의 DNA 통합의 정량에 의해 사정되었다. 인간 NPCs는 혈청-내포 성장 배지에서 2,500 세포/ cm^2 로 폴리-L-리신-코팅된 배양 접시 위에 파종되었다. 세포는 37°C, 5% O_2 에서 배양에 의해 하룻밤 동안 부착하도록 허용되고, 이후 48 시간 동안 혈청-기아되었다. 혈청-박탈 이후에, 세포는 48 시간 동안 MPC CM으로 자극되었다. EdU가 제조업체의 사용설명서 (Click-iTTM Kit, Invitrogen, Carlsbad, CA)에 따라서, 배양의 마지막 18 시간 동안 세포에 첨가되었다. 차후에, 세포는 트립신으로 분리되고 생존력에 대해 염색되었다. 세포는 이후, 고정되고, EdU 통합에 대해 염색되고, 그리고 유세포분석법에 의해 분석되었다. 생존가능 개체군 내에 EdU⁺ 세포는 EdU로 염색되지 않은 대조 세포에 비하여 확인되었다.

[0192] NPC 프로테오글리칸 합성에 대한 생물학적 검정

[0193] 시험관내에서 NPC 매트릭스 생산에 대한 MPC CM의 효과는 세포외 기질 (ECM) 내에 침착된 프로테오글리칸의 염색 이후에 마이크로매스 배양액으로부터 추출된 알시안 블루 염료의 반정량적 계측에 의해 조사되었다. 인간 NPC 마이크로매스 배양액을 확립하기 위해, 100,000 세포를 내포하는 성장 배지의 10 μ l 방울을 5 μ g/ cm^2 에서 인간 섬유결합소로 코팅된 48 웰 평판의 각 웰에 첨가함으로써, NPC가 고밀도 2차원 (2D) 배양액에서 파종되었다. 세포는 2 시간 동안 부착하도록 허용되고, 그 이후에 웰을 침수시키기 위한 완전한 성장 배지의 첨가 및 세포의 하룻밤 동안 배양이 뒤이었다. 다음 날, 세포는 따뜻한 PBS에서 1회 세척되고, 그리고 7 일 동안 MPC CM로 자극에 앞서 48 시간 동안 혈청-기아되었다. 배양 기간의 종결점에서, 세포는 원지에서 10% 아연 포르말린에서 고정되고 프로테오글리칸을 검출하기 위해 알시안 블루로 염색되었다. 대표적인 웰의 디지털 이미지가 포착되었고, 그리고 평판은 1-2 시간 동안 공기 건조되었다. 알시안 블루 염료가 0.25% Triton X-100을 포함하는 6N 구아니딘 HCl에서 각 웰로부터 추출되었고, 그리고 흡광도 (OD)가 평판 판독기를 이용하여 각 표본에 대해 600 nm에서 계측되었다 (Bjornsson, 1993).

[0194] AFC 증식에 대한 생물학적 검정

[0195] AFCs에 적절한 것으로 밝혀진 배양 기간에 대한 변형을 제외하고, NPC 증식을 계측하는데 이용된 방법과 유사하

게, MPC CM에 대한 응답으로 섬유테 세포 (AFC) 증식이 EdU 통합에 의해 계측되었다. 간단히 말하면, AFCs는 혈청-보충된 AFC 성장 배지에서 2,500 세포/cm²로 파종되었다. 하룻밤 동안 부착 이후에, 세포는 3 일 동안 MPC CM으로 처리에 앞서 48 시간 동안 혈청-기아되었다. 배양의 마지막 18 시간 동안, 세포는 EdU로 펄싱되었다. 세포는 이후, 수확되고, 염색되고, 그리고 유세포분석법에 의해 분석되었다.

[0196] AFC 콜라겐 합성에 대한 생물학적 검정

[0197] 섬유테 (AF) 마이크로매스 배양액을 확립하기 위해, 100,000 세포를 내포하는 성장 배지의 10 μ l 방울을 5 μ g/cm²에서 인간 섬유결합소로 코팅된 48 웰 평판의 각 웰에 첨가함으로써, 섬유테 세포 (AFCs)가 고밀도 2차원 (2D) 배양액에서 파종되었다. 세포는 2 시간 동안 부착하도록 허용되고, 그 이후에 웰을 침수시키기 위한 완전한 성장 배지의 첨가 및 세포의 하룻밤 동안 배양이 뒤이었다. 다음 날, 세포는 따뜻한 PBS에서 1회 세척되고, 그리고 7 일 동안 MPC CM으로 자극에 앞서 48 시간 동안 혈청-기아되었다. 이러한 배양 기간의 종결점에서, MPC CM-자극된 콜라겐 생산이 상업적으로 가용한 키트 (Sigma, St Louis, MO)를 이용한 히드록시프롤린 검정에 의해 계측되었다. 배지는 흡인되었고, 그리고 세포는 물로 세척되었다. 침착된 콜라겐은 염화수소산에서 가수분해되었고, 그리고 결과의 상층액은 수집되고 증발되었다. 각 표본은 히드록시프롤린을 산화시키기 위한 클로라민 T의 존재에서 짧게 배양되었다. 최종적으로, 4- (디메틸아미노)벤즈알데히드가 각 표본에 첨가되어, 560 nm에서 관측되는 비색 산물을 유발하였다. 각 실험에서, 표준 곡선은 공지된 양의 히드록시프롤린 (0.2-1 μ g)을 이용하여 설정되어, MPC CM 처리에 대한 응답으로 콜라겐 합성의 정량적 결정을 실시가능하게 하였다.

[0198] 성인 AFCs의 단리 및 배양

[0199] 성인 사체 디스크 조직은 다음의 배제 기준에 대해 선별검사된 공여자로부터 획득되었다:

[0200] [표 1]

추간 조직 공여자에 대한 배제 기준

연령	<50세
성별	제한 없음
사망의 원인	척추에 대한 직접적인 효과를 갖는 외상 근골격을 침범한 암
병력	골관절염 류머티스성 관절염 다른 콜라겐/연골/골 질환
보행	사망전 >1개월 병상에 있음

[0201] 조직은 소화를 위한 실험실로의 수송을 위해 0.1% (v/v)의 최종 농도에서 항생제 (가령, 페니실린 (200 U/mL), 스트렙토마이신 (200 mg/mL) 및 판자이존 (1.25 mg/mL) 또는 젠타마이신 (50 mg/mL))을 포함하는 DMEM-Ham의 F12 (1:1)-10% 소 태아 혈청 (FBS)으로 구성되는 보존 배지에 집어넣어졌다. 소화를 위한 조직을 준비하기 위해, AF 조직은 NP 조직으로부터 조심스럽게 절개되고, 이것은 별개의 소화 및 단리를 겪었다. 각 디스크는 절개되고 별개로 배양되었다. 모든 소화는 기존 문헌 (Melrose, Ghosh, Taylor, Latham, & Moore, 1997) (Melrose, Smith, Ghosh, & Taylor, 2001) (Shen, Melrose, Ghosh, & Taylor, 2003)에서 설명된 바와 같이, 45 ml의 무균 DMEM-Hams F12-10% FBS에서 수행되었다. 간단히 말하면, 조직은 무균 조건 하에 스캐폴로 미세하

게 깎둑썰기되었다. 거의 2.5 g의 깎둑썰기된 조직은 0.2% w/v 프로나아제 및 0.01% w/v DNA분해효소의 효소 용액을 내포하는 50 ml 원뿔형 튜브로 이전되었다. 조직은 37°C에서 90 분 동안 소화되었다. 나머지 조직은 10 ml PBS로 세척되었고, 그리고 상층액은 폐기되었다. 잔여 조직은 이후, 조직이 완전하게 분리될 때까지 수 시간 동안, 항생제를 내포하는 DMEM-Hams F12-10% FBS에서, 클로스트리듐 히스톨리티쿰 (*Clostridium histolyticum*)으로부터 0.05% w/v 세균 콜라겐분해효소 유형 1A, 0.01% w/v DNA분해효소 (45 ml/튜브)로 소화되었다. 세포는 원심분리 (800 g x10 분)에 의해 수집되고 DMEM-Hams F12-10% FBS에서 1회 세척되었다. 결과의 세포 현탁액은 세포 계수 및 생존력을 결정하기 위해, 70 μ m 셀 스트레이너에 통과되고 재현탁되었다. NPCs 및 AFCs 둘 모두 DMEM-Hams F12-5% FBS 및 2 mM L-글루타민에서 조직 배양 처리된 플라스크에서 파종되었다. 일차 NPCs 및 AFCs는 80-90% 합류 때까지 배양되고, 그리고 휴스턴에 소재하는 Mesoblast laboratories로 발송되었다. 일차 배양액은 0.05% 트립신/0.1% EDTA로 수확되고 냉동보존되었다. 일차 성인 AFCs는 해동되고, 1 계대 동안 10,000 세포/cm²로 파종되고, 이후 생물학적 검정을 설정하기 위해 수확되었다.

[0203] 태아 AFCs는 상업적인 판매자 (ScienCell, Carlsbad, CA)로부터 획득되었다.

[0204] ELISA에 의한 MPC CM에서 TGF β 1 수준의 측정

[0205] MPC CM에서 TGF β 1 수준은 제조업체의 사용설명서 (R&D systems)에 따라서 ELISA에 의해 측정되었다.

[0206] 이용에 앞서, MPC CM은 제조업체의 프로토콜에 따른 전체 TGF β 1 수준의 측정을 위해 필요한 산 활성화 단계를 용이하게 하기 위해 거의 40-배 농축되었다. 산 처리 이후에, 표본은 생물학적 검정에서 이용을 위해 CBM에서 본래 용적으로 재구성되었다.

[0207] ELISA는 표준 및 표본 희석의 재구성 및 제조에 이용된 희석제의 변형을 제외하고, 제조업체의 프로토콜에 따라서 수행된다. 키트에서 제공된 TGF β 1 표준은 0.5% BSA (CBM + 0.5% BSA)로 보충된 CBM에서 재구성된다. 연속 희석액은 31.2-2000 pg/ml의 범위에서 변하는 최종 농도로 CBM + 0.5% BSA에서 제조된다. 표본은 산-활성화되고 CBM + 0.5% BSA에서 1:5 희석된다. 표준, 표본 및 대조는 TGF β 1에 특정한 단일클론 항체로 피복된 마이크로평판에 첨가된다. 실온 (RT)에서 2 시간 배양 이후에, 평판은 세척된다. TGF β 1 접합체가 각 웰에 첨가되고, 그리고 평판은 실온에서 2 시간 동안 배양된다. 평판은 이후, 다시 한 번 세척되고, 그리고 기질 용액이 각 웰에 첨가되고 실온에서 30 분 동안 배양된다. 정지액이 각 웰에 첨가되고, 그리고 각 표본의 흡광도 (OD)가 450 nm에 설정되고 570 nm에서 파장 교정된 마이크로평판 판독기에서 판독된다. 표준 곡선은 4 파라미터 로지스틱 곡선 적합을 이용하여 구축된다. 각 표본에서 TGF β 1의 농도는 표준 곡선으로부터 도출되고, 그리고 최종 결과를 획득하기 위해 희석에 대해 교정된다.

[0208] TGF β 1 녹다운 MPC의 산출

[0209] 새로 해동된 MPC 산물 (n = 4)은 TGF β 1 siRNA 또는 대조로서 스크램블된 올리고뉴클레오타이드로 형질감염되었다. 세포는 혈청 없는 α MEM에서 현탁되고, 그리고 TGF β 1 siRNA 또는 스크램블된 siRNA (500 pmol, Life Technologies, Carlsbad, CA) 및 리포펙타민 (Life Technologies)을 내포하는 형질감염 혼합물과 합동되었다. 세포는 이후, 섬유결합소-코팅된 평판 위에 고밀도로 파종되고 하룻밤 동안 부착하도록 허용되었다. 다음 날, 세포는 세척되었고, 그리고 배지가 CBM + 0.5% BSA로 대체되었다. 세포는 인큐베이터로 복귀되고 37°C, 5% O₂/95% CO₂에서 72 시간 동안 손대지 않은 채로 남겨졌다. 이러한 배양 기간의 종결점에서, 배양 상층액은 수집되고, 현탁액에서 펠렛 세포 또는 조직파편으로 원심분리되고, 이후 분취되고 검정 때까지 -80°C에서 보관되었다.

[0210] 실시예 2 개념 증거 실험

[0211] 디스크 수복에서 MPCs에 대한 적절한 효능 검정을 확립할 목적으로, MPCs가 퇴행성 디스크 질환 (DDD)에서 치료적 유의성을 매개할 수 있는 잠재적 기전을 모형화하고 평가하기 위한 일련의 시험관내 연구가 착수되었다.

[0212] 실험실 조건 하에, MPCs는 적절한 유도 신호에 대한 응답으로 시험관내 연골원성 분화에 대한 능력을 비롯하여, 다계열 잠재력을 소유한다. 고전적인 시험관내 연골형성 검정은 3 주의 기간에 걸쳐 TGF β 1의 존재에서 고밀도 펠렛에서 세포를 배양하는 것을 수반하다 (Johnstone, Hering, Caplan, Goldberg, & Yoo, 1998). 펠렛은 이후, 고정되고, 분할되고, 그리고 연골세포 활성의 홀마크인 프로테오글리칸의 존재를 검출하기 위해 염색된다. 이러한 검정을 수행하는데 필요한 시간 및 사정을 위한 비-정량적 방법을 고려하면, 이러한 검정은 방출 검정으로서 자격 및 검증에 적합하지 않은 것으로 고려되었다. 이런 이유로, 시험관내 연골원성 방출 검정의 개발이 추구되지 않았다. 그 대신에, 노력은 효능 검정 개발을 위한 기초로서 추간판 (IVD) 세포에서 MPCs의 주변분비 작용

기전을 확인하는데 집중되었다.

[0213] MPCs는 염증을 약화시키고, 세포 증식을 증진하고, 매트릭스 생산을 자극하는 것으로 알려진 인자를 비롯하여, 다양한 범위의 생리활성 가용성 인자를 분비한다 (See, et al., 2011). MPC 산물의 복수 로트의 사이토킨 프로필이 조사되었고, 그리고 광범위한 범위의 생리활성 분자의 분비가 확증되었다. 이들 데이터에 근거하여, IVD 내로 도입 이후에, MPCs는 디스크-상주 세포에서 작용하는 가용성 분자의 방출을 통한 주변분비 기전에 의해 내인성 수복 과정을 자극할 수 있는 것으로 가정되었다. 본 발명자들은 NPCs 및/또는 AFCs의 생존, 증식 및 분화에 기여하고, 디스크 기능의 지속된 증강을 야기할 수 있는 분비된 인자의 확인에 집중하였다. 디스크 세포에 대한 동화작용 효과를 갖는 분비된 인자를 확인하기 위한 유관한 문헌의 광범위한 스크린이 수행되었다. 이러한 조사에 의해 확인된 인자는 차후에, 면역검정에 의하여 MPC CM에서 선별검사되었고, 그리고 이들 데이터로부터, TGFβ1이 선도 후보로서 확인되었다.

[0214] TGFβ1-매개된 작용 기전이 MPC 산물의 사정을 위한 효능 검정의 개발에 대한 기초를 제공할 수 있는 지를 결정하기 위해, 다음의 목적으로 시험관내 개념 증거 실험이 수행되었다:

[0215] 1. MPC CM이 NPC 증식 및 매트릭스 생산을 자극하는 지를 결정함; 및

[0216] 2. MPC CM이 AFC 증식 및 매트릭스 생산을 자극하는 지를 결정함; 및

[0217] 3. MPC CM에서 TGFβ1이 디스크 세포에서 MPC CM의 시험관내 생물활성을 매개하는 지를 결정함.

[0218] **MPC-유래된 가용성 인자는 NPC 증식 및 프로테오글리칸 생산을 자극한다**

[0219] NP는 일차적으로, IVD 내에 팽창 압력에 대한 기질을 제공하는 물-결합 분자인 프로테오글리칸, 아그레칸으로 구성된다. NPCs는 IVD에서 프로테오글리칸의 일차 공급원이고, 그리고 따라서, 조직 구조 및 기능을 유지하는데 핵심적인 역할을 수행한다. 이에 더하여, NPCs에 의한 프로테오글리칸의 침착은 건강한, 통증-없는 디스크의 비신경 환경을 보존하는데 중요할 수 있는데, 그 이유는 시험관내 연구에서 무손상 프로테오글리칸 매트릭스가 신경돌기 내성장을 억제하는 것으로 밝혀졌기 때문이다 (Johnson, Caterson, Eisenstein, Hynds, Show, & Roberts, 2002). 반대로, DDD는 NPC 사멸, 매트릭스 붕괴와 상실 및 신경돌기 내성장과 연관된다 (Loreto, Musumeci, Castorina, Loreto, & Martinez, 2011) (Melrose, Roberts, Smith, Menage, & Ghosh, 2002). 이런 이유로, 손상된 NP 조직의 수복은 상주하는 NPC 개체군의 유지 및 매트릭스 합성의 자극 둘 모두를 필요로 할 수 있다. 차례로, NPCs의 지지는 디스크 구조와 기능을 향상시키고 통증 감각을 약화시킬 수 있다. MPC CM이 NPC 기능에 충격을 주는 지를 조사하기 위해, 시험관내에서 인간 NPC 증식 및 프로테오글리칸 생산에 대한 MPC CM의 효과를 측정하기 위한 생물학적 검정이 확립되었다.

[0220] MPCs의 다양한 로트로부터 CM의 표본은 EdU 통합에 의해 결정될 때, NPC 증식 검정에서 활성화에 대해 시험되었다. 도면 2A에서, 시험된 10개 로트 중에서 9개는 자극되지 않은 대조 세포 (12.9%)와 비교하여, 배양 중인 활발하게 분열하는 NPCs의 비율에서 유의미한 증가를 자극하였다 (평균 %EdU⁺ 세포 = 44.9±15.7%, 범위 = 38.9-66.9%, n = 4명 공여자로부터 10개 로트). 나머지 로트는 기초 배지 대조와 비교하여 NPC 증식에 대한 유의미한 효과가 없었다.

[0221] 2D 고밀도 배양액에서, NPCs는 알시안 블루 염색에 의해 확인된 낮은 수준의 프로테오글리칸을 구조성으로 생산하였다 (도면 2B). MPCs의 3개의 상이한 로트로부터 CM은 자극되지 않은 대조 세포에 비하여 더욱 강렬한 알시안 블루 염색에 의해 지시된 바와 같이, 이들 기준선 수준을 초과하여 프로테오글리칸 합성을 유의미하게 증강시켰다. 프로테오글리칸 합성을 정량하기 위해, 알시안 블루 염료가 흡광도 판독을 위해 추출되었다. NPCs의 MPC CM-처리는 기초 배지에서 성장된 대조 세포와 비교하여, 프로테오글리칸 함량에서 거의 2-배 증가를 유발하였다 (평균 OD = 0.40±0.02, 범위 = 0.38-0.42, n = 1명 공여자로부터 3개 로트) (도면 2C).

[0222] 종합하면, 이들 데이터는 MPC CM이 프로테오글리칸의 증식 및 합성에 대한 효과에 의해 측정될 때, NPCs에 대한 동화작용 효과를 갖는 인자(들)를 내포한다는 증거를 제공한다. 이런 이유로, MPC 처리는 NPCs에서 주변분비 작용을 통해 손상된 디스크에서 치유 기전을 자극할 수 있다.

[0223] **MPC-유래된 가용성 인자는 AFC 증식 및 콜라겐 합성을 자극한다**

[0224] IVD의 AF는 일차적으로, 원섬유 콜라겐 I 및 콜라겐 II로 구성되는데, 이들은 NP를 둘러싸는 층판 시트를 형성한다. 콜라겐 I의 수준은 외부 층에서 높고 NP와의 경계면을 향할수록 감소하고, 반면 콜라겐 II 함량은 외부 층으로부터 증가하고 조직의 중심을 향할수록 고도로 농축된다. 이들 콜라겐 구배는 디스크에 인장 강도 및 탄

력성 둘 모두를 제공하는데, 이들은 IVD 구조 및 기능을 뒷받침한다. 무손상 AF는 디스크 조직 내로 뉴런 및 혈관 내성장에 대항하여 장벽을 창출하는데 중요한 역할을 한다. 대조적으로, DDD에서 발생하는 바와 같이, AF에서 파괴는 IVD의 구조적 및 기능적 장애, 그리고 혈관 및 뉴런 침습과 연관된 통증을 야기한다. AF의 콜라겐 매트릭스는 상주하는 AFCs에 의해 유지된다. 퇴행성 디스크로부터 AFCs는 ECM 성분 및 세포 증식에 관련된 유전자의 하향조절에 의해 특징화되는 손상된 표현형을 전시하는 것으로 밝혀졌다 (Gruber, Hoelscher, & Hanley, 2010). DDD 조직에서 AF 개체군은 증가된 비율의 노쇠화 세포 및 증식하는 세포의 비율에서 수반성 감소를 내포하는 것으로 밝혀졌다 (Gruber, Ingram, Davis, & Hanley, 2009). AFCs의 풀 및 활성을 유지하는데 도움을 주는 치료 전략은 AF 구조 및 기능의 수복에 의해 장기간 유익성을 야기할 수 있다. MPC-유래된 인자가 AFC 기능에 충격을 주는 지를 결정하기 위해, 시험관내에서 인간 AFC 증식 및 콜라겐 합성에 대한 MPC CM의 효과를 측정하기 위한 생물학적 검정이 확립되었다.

[0225] 도면 3A는 MPCs의 상이한 로트로부터 산출된 CM 표본이 EdU 통합에 의해 측정된 AFC 증식을 기초 배지 단독에서 성장된 세포에서 관찰된 수준을 초과하여 증가시켰다는 것을 보여준다. 이러한 실험에서, 시험된 7개 로트 모두로부터 CM이 대조 배지 (3.6%)와 비교하여, 배양 중인 활발하게 분열하는 세포의 비율에서 유의미한 증가를 자극하였다 (평균 %EdU⁺ 세포 = 27.1±15.1%, 범위 = 7.8-53.2%, n = 3명 공여자로부터 10개 로트).

[0226] AFC 증식을 자극하는 것에 더하여, MPC CM은 AFC 콜라겐 합성을 증가시켰다. MPC CM으로 처리된 AFCs는 기초 배지 단독에서 성장된 세포 (0.01 µg/mL)와 비교하여, 훨씬 높은 수준의 히드록시프롤린을 내포하였다 (평균 히드록시프롤린 함량 = 0.3±0.1 µg/mL, 범위 = 0.2-0.5 µg/mL, n = 3명 공여자로부터 MPCs의 6개 로트) (도면 3B). 이들 유형의 생물학적 검정에 내재하는 관찰된 가변성에도 불구하고, 종합하면, 이들 데이터는 MPC CM이 AFC 활성을 자극하는 가용성 인자를 내포한다는 것을 명확하게 증명한다.

[0227] **AFC 콜라겐 합성에서 TGFβ1의 역할**

[0228] TGFβ1의 잠재력 기여를 조사하기 위해, 5명의 상이한 공여자를 포괄하는 복수 MPC 산물 로트로부터 유래된 CM에서 TGFβ1의 수준이 조사되었다. 중화 항-TGFβ1 항체의 존재 및 부재에서 시험관내 AFC 콜라겐 합성에서 TGFβ1의 추정 원인 역할이 차후에 조사되었다.

[0229] MPC CM에서 TGFβ1 수준은 제조업체의 사용설명서 (R&D systems, Minneapolis, MN)에 따라서 ELISA에 의해 측정되었다. MPC CM에서 TGFβ1의 수준은 1083.1-4202.8 pg/ml의 범위에서 변화하였다 (평균 = 2981.6±1054.3 pg/ml, n = 5명의 상이한 공여자로부터 산출된 15개 로트) (도면 4).

[0230] 상기 데이터는 MPC가 그들의 CM에서 건설한 수준의 TGFβ1을 재현적으로 분비한다는 것을 확증하였다. 도면 5A에서 보여지는 바와 같이, AFCs의 3개의 상이한 로트는 1-3 ng/mL TGFβ1 사이에서 안정 상태를 유지하는, 콜라겐의 명확한 TGFβ1 용량 의존성 합성을 보여주었다. 중화 항-TGFβ1 항체의 존재에서, 1 ng/mL TGFβ1에 대한 응답으로 AFCs에 의한 콜라겐 합성은 TGFβ1의 부재에서 획득된 수준보다 아주 조금 높은 수준까지 감소되었다. 이들 데이터는 TGFβ1에 대한 표적 AFC 개체군의 선형 용량-반응성 및 항-TGFβ1 중화 항체의 효능을 검증한다.

[0231] MPC-유래된 TGFβ1이 AFC 콜라겐 생산에서 원인적 효과를 수행하는 지를 조사하기 위해, MPC CM 표본은 AF 배양액에 첨가에 앞서, TGFβ1에 대한 중화 항체로 사전 처리되었다. 도면 5B, 왼쪽 패널에서, 7개 MPC 로트 각각으로부터 CM은 기초 배지 대조와 비교하여 AFCs에서 히드록시프롤린 함량의 통계학적으로 유의한 증가를 자극하였다. TGFβ1 활성의 중화는 7개 로트 중에서 5개에서 히드록시프롤린 함량의 유의미한 감소를 유발하였다. 감소된 콜라겐 합성을 향한 추세가 나머지 2개 로트에서 목격되었는데, 이들은 또한, 이러한 검정에서 가장 낮은 수준의 활성을 내포하였다. CM 표본은 상이한 공여자로부터 AFCs의 상이한 로트를 교차하여 시험되었고 (도면 5B, 중심 및 오른쪽 패널), 그리고 각 실험에서 유사한 패턴의 결과가 관찰되었다. 항-TGFβ1 중화 항체의 존재에서 콜라겐 합성의 완전한 저해 (동등한 수준의 대조 항체와 비교하여)가 CM의 여러 로트에서 증명되었고, 따라서 이들 특정한 사례에서, TGFβ1은 콜라겐 합성을 증진하는데 있어서 유일한 원인적 인자인 것으로 증명된다.

[0232] **개념 증거 실험으로부터 결론**

[0233] 상기 데이터는 MPC CM이 NPC와 AFC 증식 및 매트릭스 생산을 자극하는 가용성 인자를 내포한다는 것을 증명한다. 디스크 세포에 대해 동화작용 효과를 갖는 것으로 밝혀진 TGFβ1은 복수 MPC 로트로부터 CM에서 검출되었다. 게다가, TGFβ1은 MPC CM으로 처리된 세포에서 콜라겐 합성의 핵심 작동체인 것으로 밝혀졌다. 상기 데이터는 MPC-유래된 TGFβ1이 AFC 콜라겐 합성을 자극하고, 그리고 따라서, AF의 수복 및 DDD의 배경에서 장기간 치료적 유익성에 기여할 수 있다는 것을 암시한다. 이런 이유로, MPC CM에서 TGFβ1 수준의 검출은 디스크 수복

에 대한 MPC 효능의 잠재적 대응 척도를 나타낸다.

- [0234] 상기 데이터는 또한, TGF β 1-주동된 생물활성을 계측하기 위한 정량적 검정, 다시 말하면, NPC와 AFC 증식의 척도로서 EdU 통합 검정 및 AFC 콜라겐 합성의 척도로서 히드록시프롤린 검정의 확립을 증명한다. 히드록시프롤린 검정은 AFCs의 상이한 로트를 이용하여 수행되었고, 그리고 이들 조사 결과는 AFCs에서 MPC CM의 콜라겐 합성-증진 작용의 재현성, 그리고 표적 세포 공여자와 관계없이, 이런 효과에 대한 TGF β 1의 기여를 뒷받침한다. 상이한 NP 및 AFC 로트의 성과를 비교하기 위한 유사한 노력이 EdU 통합 검정의 사정에서 착수되었다. MPC 산물 로트 사이에 TGF β 1 수준에서 일부 가변성이 관찰되었다 (선별검사된 로트에서 범위 = 1083.1-4202.8 pg/ml). 중요하게는, 이러한 범위의 TGF β 1 수준은 재조합 인간 TGF β 1 (rhTGF β 1)을 이용한 AFC 콜라겐 합성 검정에서 기준선 대조와 비교하여 통계학적으로 유의한 계측가능한 활성을 갖는 것으로 나타났다. 종합하면, 이들 데이터는 MPC CM에서 TGF β 1 생물활성을 계측하기 위한 이러한 생물학적 검정의 이용을 뒷받침한다.
- [0235] **실시예 3 태아 AFCs 및 성인 AFCs의 비교가능성**
- [0236] AFC 콜라겐 합성에 대한 MPC CM의 효과를 계측하기 위한 생물학적 검정이 이전에 개발되었다. 이러한 검정은 상업적인 이용가능성으로 인해, 태아 AFCs를 이용하여 개발되었다. 이러한 인자는 효능 검정 개발 노력에서 중요한 공급 유익성을 나타낸다. 대조적으로, 성인 AFCs는 현재 상업적으로 가용하지 않다. 본 발명자들은 태아 AFCs가 콜라겐 합성 생물학적 검정에서 성인 AFCs에 대한 적합한 대안이라는 것을 실증하려 모색하였다. 이런 이유로, 이들은 태아 AFCs 및 성인 AFCs의 마이크로매스 배양액에 대한 rhTGF β 1 및 MPC CM의 효과를 비교하였다.
- [0237] 태아 세포와 유사하게, 성인 AFCs는 rhTGF β 1 (0.1-3 ng/mL)에 대한 용량 의존성 반응을 나타냈다 (도면 6 및 표 2). 태아 세포와 비교하여, 콜라겐의 기준선 수준은 성인 AFCs의 배양액에서 더욱 높았고, 그리고 낮은 수준의 TGF β 1 (100 pg/ml)에 대한 반응의 크기 또한 더욱 컸다 (도면 6 및 표 2).
- [0238] 500 pg/ml에 대한 응답으로 생산은 태아 AFCs 및 성인 AFCs 사이에 유사하였다. 성인 AFC 배양액에서 1-3 pg/ml TGF β 1에서 용량 반응 곡선은 안정 상태가 시작되는 반면, 태아 AFCs의 경우에 상기 곡선은 선형 상태로 남아있었다.
- [0239] MPC CM으로 성인 AFCs의 처리는 성인 AFCs에서 콜라겐 생산의 견실하고 유의미한 증가를 자극하였다 (도면 7 및 표 3).

[0240] [표 2]

TGFβ1 자극에 대한 태아 및 성인 AFCs의 반응

태아 AFC - 로트 5945		태아 AFC - 로트 4755				태아 AFC - 로트 4729				모든 tAFC				
rh TGFβ1 (pg/ml)	평균 히드록시프로린 ($\mu\text{g}/10^5$ 세포)		SD	N	평균 히드록시프로린 ($\mu\text{g}/10^5$ 세포)		SD	N	평균 히드록시프로린 ($\mu\text{g}/10^5$ 세포)		SD			
	SD	N	SD	N	SD	N	SD	N	SD	N				
0	0.069	0.052	9		0.034	0.022	8		0.038	0.011	9	0.047	0.019	
100	0.100	0.033	9		0.080	0.035	9		0.072	0.014	9	0.084	0.015	
500	0.453	0.075	9		0.466	0.113	9		0.327	0.165	9	0.415	0.077	
1000	0.714	0.134	9		0.725	0.265	9		0.862	0.135	6	0.767	0.082	
3000	1.187	0.205	9		0.979	0.205	9		1.121	0.058	6	1.096	0.106	
성인 AFC - 공여자 1				성인 AFC - 공여자 2				성인 AFC - 공여자 3				모든 aAFC		
rh TGFβ1 (pg/ml)	평균 히드록시프로린 ($\mu\text{g}/10^5$ 세포)		SD	N	평균 히드록시프로린 ($\mu\text{g}/10^5$ 세포)		SD	N	평균 히드록시프로린 ($\mu\text{g}/10^5$ 세포)		SD	평균 히드록시프로린 ($\mu\text{g}/10^5$ 세포)		SD
	SD	N	SD	N	SD	N	SD	N	SD	N	SD	SD	N	
0	0.245	0.101	6		0.105	0.022	9		0.185	0.043	9	0.179	0.070	
100	0.523	0.183	6		0.359	0.058	9		0.524	0.127	9	0.469	0.095	
500	1.366	0.237	7		1.198	0.294	9		1.247	0.183	8	1.270	0.086	
1000	1.633	0.292	9		1.655	0.197	9		1.451	0.168	9	1.580	0.112	
3000	1.861	0.382	9		1.910	0.168	9		1.638	0.164	9	1.803	0.145	

[0241]

[0242]

[표 3]

성인 AFCs에서 시험된 MPC 로트로부터 산출된 조건부 배치 표본

임의 로트#	공여자 1				공여자 2				공여자 3				모든 AFC			
	TGFβ1 (pg/ml)	평균 히드록시프로린 (μg)	SD	N	평균 히드록시프로린 (μg)	SD	N	평균 히드록시프로린 (μg)	SD	N	평균 히드록시프로린 (μg)	SD	평균 히드록시프로린 (μg)	SD	N	N
GMP-4	3084.53	1.253	0.138	5,000	0.779	0.138	5,000	1.141	0.157	6,000	1.063	0.253	16,000			
GMP-5	3191.16	1.405	0.276	6,000	1.322	0.144	6,000	1.102	0.030	3,000	1.311	0.219	15,000			
GMP-6	3601.95	1.783	0.218	6,000	1.636	0.099	3,000	1.393	0.231	3,000	1.649	0.246	12,000			
GMP-7	2569.11	1.046	0.101	6,000	1.399	0.218	6,000	1.308	0.179	6,000	1.281	0.224	18,000			
GMP-8	3178.29	1.429	0.077	6,000	1.334	0.180	3,000	1.160	0.323	5,000	1.313	0.234	14,000			
GMP-9	3480.65	1.371	0.216	6,000	1.562	0.211	8,000	1.552	0.291	4,000	1.496	0.235	18,000			
GMP-11	3089.14	1.394	0.385	5,000	1.450	0.205	6,000	1.317	0.164	6,000	1.387	0.249	17,000			
GMP-12	3620.38	1.452	0.191	6,000	1.340	0.201	5,000	1.276	0.209	6,000	1.357	0.203	17,000			
GMP-13	3537.31	1.404	0.119	6,000	1.416	0.237	6,000	1.470	0.246	8,000	1.434	0.204	20,000			
GMP-14	1979.12	1.404	0.230	6,000	1.370	0.153	6,000	1.254	0.025	6,000	1.343	0.164	18,000			
GMP-15	3119.66	1.240	0.275	6,000	1.405	0.218	6,000	1.445	0.156	6,000	1.363	0.227	18,000			
GMP-16	2963.90	1.323	0.354	5,000	1.255	0.393	4,000	1.341	0.174	3,000	1.305	0.307	12,000			
GMP-17	3770.39	1.746	0.262	6,000	1.365	0.193	6,000	1.316	0.133	6,000	1.476	0.274	18,000			
GMP-18	2942.00	1.417	0.402	6,000	1.231	0.255	6,000	1.286	0.133	6,000	1.311	0.288	18,000			
모든 로트 평균	3151.97	1.405			1.347			1.311			1.361					
모든 로트 SD	469.65	0.186			0.195724344			0.127			0.134					
모든 로트 CV	0.1490	0.1324			0.1453			0.0968			0.0981					
최소	1979.12	1.05			0.78			1.10			1.06					
최대	3770.39	1.78			1.64			1.55			1.65					

[0243]

[0244]

종합하면, 이들 데이터는 TGFβ1로 태아 및 성인 AFCs의 마이크로매스 배양액의 자극이 콜라겐 생산을 용량 의존성 방식으로 증가시킨다는 것을 증명한다. MPC CM으로 성인 AFCs의 처리는 태아 AFCs에서 앞서 관찰된 효과와 유사하게, 히드록시프로린 함량에서 견실한 증가를 유발하였다. 종합하면, 이들 데이터는 태아 AFCs가 이러한 세포 유형에서 콜라겐 생산에 대한 MPC CM의 효과를 사정하기 위한, 성인 AFCs에 대한 적합한 대안을 나타낸다는 것을 지시한다.

[0245]

실시예 4 DDD에서 MPC 산물에 대한 TGFβ1 효능 검정 개발

[0246]

MPCs가 DDD에서 유의한 효과를 가질 수 있는 다수의 잠재적 주변분비 기전을 조사하기 위해 시험관내 모형이 이용되었다 (실시예 2). 이들 중에서, AFCs에 의한 콜라겐 생산의 자극은 장기간 치료적 유의성을 향한 중요한 단계를 나타낼 수 있다. AFC 콜라겐 생산의 증가는 디스크의 구조적 완전성의 수복을 유발하고, 혈관 및 뉴런 내 성장을 저해하고, 그리고 차례로, 디스크의 생체역학 기능을 향상시키고 통증을 감소시킬 수 있다.

[0247]

AFC 콜라겐 생산에 대한 MPC-유래된 가용성 인자의 효과를 조사하기 위해, 본 발명자들은 AFCs의 마이크로매스 배양액에서 히드록시프로린 (콜라겐의 주요 성분)의 수준을 계측하기 위한 정량적 검정을 개발하였다 (실시예

2). 이러한 검정은 태아 AFCs 및 rhTGFβ1의 3개의 상이한 로트를 이용하여 확립되었다. 본 발명자들은 rhTGFβ1 (100-3000 pg/ml의 농도 범위를 교차하여)이 AFCs에서 콜라겐 생산을 용량 의존성으로 자극한다는 것을 보여주었다 (도면 5A). 본 발명자들은 또한, MPC CM이 이러한 생물학적 검정에서 콜라겐 생산을 자극한다는 것을 증명하였다. MPC CM의 콜라겐-자극 효과는 최소한 부분적으로, TGFβ1 활성화에 기인하였는데, 그 이유는 항-TGFβ1 중화 항체가 이들 효과를 제거했기 때문이다 (도면 5B). 중요하게는, rhTGFβ1 및 MPC CM 둘 모두의 콜라겐-자극 효과가 상이한 공여자를 나타내는 AFCs의 복수 로트를 교차하여 재현가능하였는데, 이것은 이들 효과가 AFC 공여자와 무관하다는 것을 지시하였다. 본 발명자들은 또한, 상업적으로-가용한 태아 AFCs가 이러한 생물학적 검정에서 성인 AFCs에 대한 적합한 대안이라는 것을 확증하였다 (실시예 3). 종합하면, 이들 데이터는 효능 검정 개발에 대한 2가지 핵심 요소를 제공한다: 첫째로, 상기 데이터는 MPCs가 주변분비 기전을 통해 AFCs에 의한 콜라겐 생산을 자극할 수 있고, 그리고 TGFβ1이 이러한 세팅에서 핵심적인 역할을 수행한다는 개념 증거를 제공한다. 두 번째로, 상기 데이터는 MPC CM 생물활성을 계측하기 위한 AFC 콜라겐 합성 검정의 유용성을 뒷받침한다. 따라서, MPC CM에서 발견된 TGFβ1의 건실한 수준 및 AFC 콜라겐 생산에 대한 MPC CM의 효과에서 TGFβ1의 원인적 역할을 고려하면, 상기 데이터는 또한, TGFβ1이 DDD에서 유관한 MPC 생물활성의 합리적인 후보 대응 마커라는 것을 암시한다.

[0248] 효소 결합 면역흡착 검정 (ELISA)-기초된 방법이 DDD에서 MPCs에 대한 효능 검정으로서 MPC CM에서 TGFβ1을 검출하는데 이용되었다.

[0249] TGFβ1 수준은 상업적으로 가용한 ELISA를 이용하여, 2개의 상이한 기초 배지에서 성장된 MPCs로부터 CM에서 계측되었다. 상기 데이터는 배지 제제의 함수로서 CM에서 TGFβ1 수준의 현저한 차이를 증명한다 (도면 8). 이들 표본은 MPC TGFβ1 생산 및 시험관내 생물활성의 사정을 위한 CM의 산출을 위한 최적 기초 배지를 결정하는 실험에서 생산되었다. 단지 0.5% BSA로만 보충된 CBM (도면 8, 어두운 막대)이 이들 실험에서 이용을 위해 선택되었고, 그리고 MPC 기능의 지지 및 IVD-기초된 기능적 생물학적 검정에서 하류 적용과의 양립성을 균형 잡는 배지를 반영한다. 더 나아가, 이들 데이터는 또한, TGFβ1 ELISA가 MPC에 의한 TGFβ1 합성에 부정적으로 영향을 줄 수 있는, 제조 공정에서 변화를 검출하는데 이용될 수 있다는 것을 증명한다.

[0250] **MPC CM은 인간 AFCs에 의한 콜라겐 생산을 자극하고 건실한 수준의 TGFβ1을 내포한다**

[0251] 도면 7 및 표 4는 태아 AFCs의 3개의 독립된 로트에서 콜라겐 생산에 대한 MPC CM의 효과를 보여준다. 상기 데이터는 각 AFC 로트가 시스템 적합성을 확증하기 위해 실험에 포함된 rhTGFβ1 (100-3000 pg/ml)에 용량 의존성 방식으로 반응하였다는 것을 증명한다. GMP 로트 1-18로부터 CM은 각각, AFC 로트 4729에서 검정되었다 (도면 7A). 분취량이 가용한 경우에, CM 표본은 또한, AFC 로트 5945 및 4755에서 검정되었다 (도면 7B 및 도면 7C). 각 MPC 로트는 AFC 로트 4729에서 자극되지 않은 대조와 비교하여, 콜라겐 생산의 통계학적으로 유의한 증가를 자극하였다 (도면 7A). 이러한 효과는 AFC 로트 5945 및 4755에서 재현되었다 (도면 7B 및 도면 7C). 도면 7D는 각 MPC CM 표본에 대한 모든 AFC 로트의 평균 반응을 보여준다.

[0252] MPC CM의 콜라겐-자극 활성화는 각 표본에서 건실한 수준의 TGFβ1의 존재와 연관되었다 (도면 9 및 표 4). 표준화된 배양 조건 하에, MPC 상층액에서 전체 TGFβ1 수준은 1979.12-4202.82 pg/ml의 범위에서 변하고, 평균이 3303.16 ± 569.56 pg/ml이었다.

[0253] **AFC 콜라겐 합성 생물학적 검정에서 MPC CM의 최소 역치 효과를 확립**

[0254] TGFβ1 분비에 근거된 MPCs에 대한 예비적 방출 명세를 확립하기 위해, 본 발명자들은 먼저 AFC 콜라겐 합성 생물학적 검정에서 MPC CM의 최소 역치 효과를 확인하는 것을 모색하였다. 본 발명자들은 이러한 역치가 표본 유형 (CM)의 특징 및 생물학적 검정 그 자체의 특징 둘 모두의 함수일 것이라고 추론하였다. 도면 7 및 도면 9에서 보여지는 바와 같이, 시험된 로트로부터 MPC CM 표본은 다양한 TGFβ1 수준 (1979.12-4202.82 pg/ml)을 내포하는데, 이들 모두 자극되지 않은 기준선 대조를 초과하여 콜라겐 합성에서 유의미한 증가를 유발하였다. 이에 더하여, 본 발명자들은 비록 MPC CM 표본에서 TGFβ1의 평균 수준이 3303.16 ± 569.56 pg/ml이지만, 콜라겐 생산에 대한 MPC CM의 효과가 3000 pg/ml에서 rhTGFβ1 단독에 의해 유도된 효과보다 적다는 것을 확인하였는데, 이것은 MPC CM이 이러한 검정에서 TGFβ1의 작용을 저해하는 인자를 내포할 수 있다는 가설과 일치한다. 이런 이유로, 이러한 생물학적 검정에서 보통 효력보다 약한 활성을 반영할 MPC CM에서 생물활성의 수준을 확립하기 위해, 본 발명자들은 TGFβ1이 siRNA 기술을 이용하여 감소되는 MPC 로트로부터 CM을 산출하였다.

[0255] **TGFβ1 녹다운 MPCs로부터 CM의 특징화**

- [0256] 본 발명자들은 ELISA에 의해 MPC CM에서 TGF β 1 수준을 측정함으로써 TGF β 1 녹다운을 실증하였다. 도면 10A 및 표 5는 대조 스크램블된 올리고뉴클레오타이드 또는 TGF β 1 siRNA로 형질감염된 각 MPC 로트로부터 CM에서 TGF β 1 수준을 보여준다. 500 pmol siRNA로 MPCs의 형질감염은 생존력에 대한 직접적인 효과 없이, 스크램블된 대조와 비교하여 TGF β 1 수준에서 거의 90% 감소를 유발하였다 (데이터 제시되지 않음).
- [0257] TGF β 1의 녹다운을 확증한 후, MPC CM 표본은 AFC 히드록시프롤린 검정에서 시험되었다. 도면 10B 및 표 5는 스크램블된 siRNA로 형질감염된 MPCs로부터 CM이 시험된 모든 MPC 로트에 의해 자극된 평균 수준과 AFC에서 유사한 수준의 콜라겐 생산을 자극하였다는 것을 보여준다. 대조적으로, TGF β 1 녹다운 MPC CM에 대한 응답으로 AFC 콜라겐 합성은 스크램블된 siRNA 대조로부터 MPC CM으로 자극된 AFC와 비교하여 현저하게 감소되었다. 하지만, TGF β 1 녹다운 MPCs로부터 CM의 효과는 기준선 대조를 유의미하게 초과하여 존속하였는데, 이것은 잔여 TGF β 1 활성 및/또는 다른 기여 인자의 존재를 암시한다.
- [0258] 요약하면, 상기 데이터는 녹다운 MPCs가 평균적으로 204.81 \pm 52.07 pg/ml TGF β 1을 분비하고, 이것이 AFCs에서 0.17 \pm 0.06 μ g 히드록시프롤린의 생산을 유발하였다는 것을 증명한다 (도면 10 및 표 5). 이러한 수준의 히드록시프롤린은 AFC 생물학적 검정에서 MPC CM의 최소 관찰된 효과를 나타낸다. 본 발명자들은 이러한 최소 효과 수준이 현재 가용한 데이터 세트에 근거하여 보통 효력보다 약한 세포 및 강력한 세포 사이에 역치를 규정하는 것으로 고려한다. 강력한 세포의 용인 기준의 엄격함을 증가시키기 위해, 최소 효과 수준은 0.23 μ g 히드록시프롤린까지 0.17 μ g 역치 수준보다 1 SD 초과로 설정되었다.

[0259] [표 4]

태아 AFC에서 시험된 MPC 로트로부터 산출된 CM 표본

		로트 5945			로트 4755			로트 4729			모든 fAFC		
표본/ 로트 #	TGFβ1 (pg/ml)	평균 히드롤시프롤린 (µg)	SD	N	평균 히드롤시프롤린 (µg)	SD	N	평균 히드롤시프롤린 (µg)	SD	N	평균 히드롤시프롤린 (µg)	SD	N
GMP-1	4189.92	NT	NT	NT	0.350	0.075	3	NT	NT	NT	0.350	0.075	3
GMP-2	4202.82	0.223	0.114	2	0.433	0.150	3	NT	NT	NT	0.381	0.140	5
GMP-3	2886.46	NT	NT	NT	0.292	0.048	3	NT	NT	NT	0.292	0.048	3
GMP-4	3084.53	0.386	0.126	9	0.440	0.065	6	0.265	0.030	8	0.358	0.117	23
GMP-5	3191.16	0.390	0.186	10	0.359	0.064	6	0.279	0.034	6	0.351	0.126	22
GMP-6	3601.95	0.500	0.186	11	0.277	0.167	6	0.297	0.217	6	0.389	0.223	23
GMP-7	2569.11	0.300	0.097	9	0.390	0.035	6	0.296	0.061	6	0.325	0.063	21
GMP-8	3178.29	0.410	0.079	6	0.409	0.073	6	0.411	0.108	6	0.410	0.083	18
GMP-9	3480.65	0.473	0.059	6	0.481	0.068	6	0.390	0.109	6	0.448	0.087	18
GMP-10	4050.11	0.237	0.095	3	0.228	0.059	3	NT	NT	NT	0.233	0.071	6
GMP-11	3089.14	0.422	0.073	6	0.393	0.062	6	0.414	0.114	6	0.410	0.082	18
GMP-12	3620.38	0.479	0.099	6	0.441	0.084	6	0.406	0.027	6	0.442	0.078	18
GMP-13	3537.31	0.427	0.024	6	0.483	0.074	6	0.403	0.055	7	0.436	0.062	19
GMP-14	1979.12	0.367	0.022	6	0.326	0.089	6	0.329	0.081	6	0.341	0.069	18
GMP-15	3119.66	0.434	0.134	6	0.416	0.079	6	0.407	0.032	6	0.419	0.087	18
GMP-16	2963.90	0.514	0.156	6	0.463	0.036	6	0.329	0.095	6	0.435	0.129	18
GMP-17	3770.39	0.697	0.135	6	0.422	0.038	6	0.420	0.120	6	0.513	0.167	18
GMP-18	2942.00	0.524	0.118	6	0.443	0.034	6	0.274	0.038	6	0.414	0.128	18
모든 로트 평균	3303.16	0.426			0.391			0.351			0.386		
모든 로트 SD	569.56	0.106			0.073			0.061			0.065		
모든 로트 CV	0.172	0.248			0.185			0.173			0.169		
최소	1979.123	0.223			0.228			0.265			0.233		
최대	4202.824	0.697			0.483			0.420			0.513		

NT=시험되지 않음
GMP 4-6 세표의 2개 중 하나 이상이 CM을 산출하기 위해 독립적으로 파종되었다. 데이터는 중복의 평균을 나타낸다.

[0260]

[0261]

[표 5]

TGFβ1-녹다운 MPCs로부터 산출된 CM 표본

표본/ 로트 #	조건	TGF-β1 pg/mL	SD	% 침묵 대 스크램블된	태아 AFC - 로트 4729	
					평균 히드록시프로린 ($\mu\text{g}/10^5$ 세포)	SD
기준 배지		0			0.047	0.019
모든 MPC		3303.160	569.557		0.351	0.061
GMP-11	스크램블된	2037.455	11.39	-	0.416	0.118
	siTGFβ1	143.843	4.43	92.9	0.153	0.013
GMP-12	스크램블된	2272.886	9.71	-	0.283	0.042
	siTGFβ1	236.551	3.33	89.6	0.102	0.025
GMP-13	스크램블된	2268.294	58.23	-	0.516	0.206
	siTGFβ1	180.810	0.90	92.0	0.214	0.192
GMP-6	스크램블된	2894.451	87.15	-	0.533	0.229
	siTGFβ1	258.034	15.53	91.1	0.222	0.142
모든 스크램블된 평균		2368.272	367.60	-	0.44	0.11
모든 siTGFβ1 평균		204.810	52.07	91.4	0.17	0.06

[0262]

TGFβ1 분비에 근거하여 MPCs에 대한 예비적 방출 명세의 확립

[0263]

[0264]

비조작된 MPC 및 TGFβ1 녹다운 MPC를 이용한 우리의 실험으로부터 데이터를 이용하여, 본 발명자들은 TGFβ1 수준 및 시험관내 AFC 콜라겐 생산 사이의 관계를 조사하고, 그리고 DDD에서 MPC 임상적 산물의 방출을 위해 필요한 TGFβ1의 역치 수준을 확인하기 위한 통계학적 분석을 수행하였다.

[0265]

AFC 콜라겐 합성 생물학적 검정에서 MPC CM TGFβ1 수준 및 활성 사이의 관계

[0266]

먼저, MPC CM 내에 존재하는 TGFβ1의 수준 및 시험관내에서 AFC에 의한 콜라겐 생산에 대한 MPC CM의 효과 사이에 관계가 있는 지가 결정되었다. 비조작된 MPCs 및 녹다운 MPCs로부터 데이터는 총 26개 표본에 대해 합동되었다. 이러한 데이터 세트에서, TGFβ1 수준은 143.8-4202.8 pg/ml 범위에서 변하고, 그리고 콜라겐 수준은 0.10 내지 0.53 μg 범위에서 변하였다 (표 4 및 표 5). 피어슨 상관에 의해, TGFβ1 수준 및 콜라겐 생산 사이에 통계학적으로 유의한 관계가 있었다 ($r=0.65$, $p<0.001$). TGFβ1 수준 및 콜라겐 생산 사이에 최고 적합의 라

인을 결정하기 위해 회귀 분석이 수행되었다 ($p < 0.001$, 도면 11을 참조한다).

[0267] 상기 확립된 AFC 콜라겐 합성 생물학적 검정에서 MPC CM의 최소 효과 수준을 이용하여, 이러한 선형 회귀 모형은 AFC 생물학적 검정에서 $0.23 \mu\text{g}$ 의 콜라겐 생산을 자극하는데 405 pg/ml 의 $\text{TGF}\beta 1$ 이 필요할 것으로 예측한다.

[0268] **모형의 감수성 및 특이성의 평가**

[0269] 모형의 감수성 및 특이성이 조사되었다. 역치를 405 pg/ml 에서 설정한 후, 우연성 분석이 수행되었다. 감수성은 100%인 것으로 밝혀졌다, 다시 말하면, 양성 (AFC 생물학적 검정에서 $\geq 0.23 \mu\text{g}$ 히드록시프롤린을 자극)일 것으로 예측된 표본의 22/22가 실제로 진정으로 양성이었다. 본 발명자들은 특이성이 100%임을 확인하였다, 다시 말하면, 역치 ($< 0.23 \mu\text{g}$ 히드록시프롤린을 자극) 미만일 것으로 예측된 표본의 4/4가 실제로 진정으로 음성이었다. 가양성 표본이 없었고, 그리고 가음성 표본이 없었다.

[0270] 여기서 제시된 데이터는 시험관내에서 AFCs에 의한 콜라겐 생산을 자극하는 MPCs의 잠재적 대응 마커로서 $\text{TGF}\beta 1$ 의 이용을 뒷받침한다. AFC 콜라겐 합성 생물학적 검정을 이용하여, MPC 산물의 18개 로트로부터 산출된 CM 표본은 시험관내에서 AFCs에 의한 콜라겐 생산을 자극하고, 그리고 ELISA에 의해 계측될 때, 건설한 수준의 $\text{TGF}\beta 1$ 을 내포하는 것으로 밝혀졌다. 이러한 효과는 $\text{TGF}\beta 1$ -녹다운 MPCs로부터 CM에서 약화되었는데, 이것은 이러한 세팅에서 $\text{TGF}\beta 1$ 에 대한 원인적 역할을 증명하고, 중화 항체 연구로부터 이전에 제시된 데이터와 일치한다. 비조작된 MPCs 및 $\text{TGF}\beta 1$ 녹다운 MPCs로부터 데이터를 합동하여, AFC 콜라겐 합성 생물학적 검정에서 생물활성에 필요한 MPC CM에서 $\text{TGF}\beta 1$ 의 역치 수준이 규정되었다. 실험 데이터의 통계학적 분석은 시험관내에서 AFCs에 의한 콜라겐 생산에서 유의미한 증가를 자극하는데 필요한 $\text{TGF}\beta 1$ 의 최소 수준으로서 405 pg/ml 의 확인을 야기하였다. 이런 이유로, 405 pg/ml $\text{TGF}\beta 1$ 은 MPCs DDD에 대한 예비적 방출 명세를 나타낸다. 종합하면, 이들 데이터는 MPC CM에서 $\text{TGF}\beta 1$ 의 ELISA-기초된 검출이 인간 디스크에서 내인성 수복 과정을 자극하는 MPCs의 잠재력의 합리적인 척도를 제공한다는 것을 증명한다.

[0271] **실시예 5 $\text{TGF}\beta 1$ 효능 검정의 최적화**

[0272] $\text{TGF}\beta 1$ 효능 검정은 배양-회수된 MPC 산물에 의해 방출된 $\text{TGF}\beta 1$ 수준을 계측한다. 이러한 검정에는 2가지 부분이 있다: (1) 배양-회수된 MPC 산물로부터 MPC CM의 산출, 그리고 (2) 상업적으로-가용한 효소 결합 면역흡착 검정 (ELISA, R&D Systems Human $\text{TGF}\beta 1$ Quantikine ELISA)을 이용하여 CM에서 $\text{TGF}\beta 1$ 수준의 검출.

[0273] **MPC CM에서 $\text{TGF}\beta 1$ 수준에 대한 세포 파종 밀도, 배양 중인 시간 및 오퍼레이터간 가변성의 총격의 사정.**

[0274] MPC 로트 345938 및 2011cc063이 본 연구에서 이용되었다. MPC 산물은 해동되고, 세척되고, 계수되고, 그리고 10% 소 태아 혈청 (FBS)으로 보충된 αMEM 에서 25,000 또는 50,000 생존가능 세포/ cm^2 로 6-웰 평판에 파종되었다. 다음 날, 세포를 PBS로 세척한 후, 배지가 CBM+0.5% BSA로 대체되었다. CM은 CBM 배지 교체 이후에 24, 48, 68, 70, 72, 74, 76 및 120 시간에 수집되었다. 각 시점은 삼중으로 수집되었고, 그리고 각 CM 표본은 ELISA에 의해 이중으로 $\text{TGF}\beta 1$ 함량에 대해 분석되었다. 오퍼레이터간 가변성을 결정하기 위해, 세포의 각 로트의 단일 바이알이 해동되고, 2개의 분취량으로 나뉘지고, 그리고 세포 계수부터 CM의 수집까지의 실험이 2명의 오퍼레이터에 의해 병렬적으로 수행되었다.

[0275] 도면 12는 초기 세포 파종 밀도, 시간 및 오퍼레이터의 함수로서 2개의 MPC 로트에 의한 $\text{TGF}\beta 1$ 분비를 보여준다. 도면 12A는 25,000 생존가능 세포/ cm^2 로 파종된 세포로부터 데이터를 보여준다. 로트 345938 및 2011cc063 둘 모두에서, 비록 수준이 68 시간 및 76 시간 사이에 변동이 없긴 하지만, $\text{TGF}\beta 1$ 수준은 시간의 추이에서 증가하였다 (24-120 시간). 조사된 각 시점에서 로트 345938로부터 CM 표본에서 결정된 $\text{TGF}\beta 1$ 수준에서 유의미한 분석가간 가변성이 있었다. 로트 2011cc063에 대한 결과의 분석가간 가변성은 덜 현저하였다. 50,000 생존가능 세포/ cm^2 로 파종된 세포로부터 데이터는 도면 12B에서 도시된다. 50,000 생존가능 세포/ cm^2 로 파종된 세포로부터 획득된 $\text{TGF}\beta 1$ 수준은 세포가 25,000 세포/ cm^2 로 파종될 때 관찰된 수준보다 높았다. 하지만, 더욱 낮은 밀도로 파종된 세포로부터 CM 표본과 유사하게, 50,000 생존가능 세포/ cm^2 로 파종된 세포로부터 CM에서 $\text{TGF}\beta 1$ 수준은 시간의 추이에서 증가하였고, 그리고 68-76 시간 프레임 내에서 변화가 없었다. 각 로트에 대해 각 분석가에 의해 획득된 결과는 세포가 50,000 생존가능 세포/ cm^2 로 파종될 때 필적하였다.

[0276] 이들 데이터는 세포를 50,000 생존가능 세포/ cm^2 로 파종하는 것이 세포를 25,000 생존가능 세포/ cm^2 로 파종하는

것과 비교하여, 분석가 사이에 더욱 일관된 데이터를 산출한다는 것을 암시한다. 이들 데이터는 또한, TGF β 1 수준이 68 시간 및 76 시간 사이에 변화가 없다는 것을 지시하는데, 이것은 이러한 시간 프레임 (CBM 배지 교체 이후에 72 ± 4 시간)이 TGF β 1 효능 검정을 위한 CM 수집에 대한 허용되는 시간 프레임을 나타낸다는 것을 암시한다.

산 활성화된 표본의 중화를 위한 1 N NaOH 대 1.2 N NaOH/0.5 M HEPES의 비교

검정에 앞서, CM 표본은 잠복성 TGF- β 1을 활성화시켜 TGF β 1 ELISA에 의해 검출가능한 면역반응성 단백질이 되도록 하기 위해 산 처리되어야 한다. 이것은 표본에 1 N HCl의 첨가, 그 이후에 pH 7.2-7.6으로 중화에 의해 달성된다. 중화 단계는 1.2 N NaOH/0.5 M HEPES (TGF β 1 ELISA 제조업체의 프로토콜에 따라) 또는 1 N NaOH를 이용하여 실행될 수 있다. TGF β 1 ELISA를 위한 산성화된 표본을 중화하기 위한 비완충된 및 완충된 NaOH의 비교 가능성이 결정되었다. 3개의 MPC 로트 (345938, 2011cc063, 2011cc048)로부터 CM 표본은 산 처리되었다. 중복 표본은 이후, 1 N NaOH 또는 1.2 N NaOH/0.5 M HEPES를 이용하여 pH 7.2-7.4로 중화되었다. TGF- β 1 수준은 차 후에, ELISA에 의해 중복 표본에서 결정되었다.

데이터는 표 6에서 도시된다. TGF β 1 수준은 NaOH 및 HEPES-완충된 NaOH로 중화된 중복 산-활성화된 CM 표본에서 유사하였다 ($p > 0.05$, 스튜던트 t 검정). 이런 이유로, 비완충된 NaOH가 TGF β 1 효능 검정을 위한 CM 표본 준비에서 HEPES-완충된 NaOH를 대신할 수 있다.

[표 6]

1 N NaOH 및 1.2 N NaOH/0.5 M HEPES로 중화된 중복 산-활성화된 CM 표본에서 TGF β 1 수준의 비교

		검정 결과						교정된 TGF β 1 (pg/ml)		
로트	중화 완충액	평균 OD	SD	CV	TGF β 1 (pg/ml)	검정 SD	검정 CV	산 활성화 교정	검정 회색 교정 (x5)	SD
345938	NaOH	0.91	0.03	2.95	500.93	20.046	4	701.302	3506.51	140.32
	NaOH/HEPES	0.74	0.01	1.63	377.684	8.064	2.1	679.83	3399.16	72.58
2011-cc-063	NaOH	0.80	0.03	3.44	422.294	19.58	4.6	591.21	2956.06	137.06
	NaOH/HEPES	0.66	0.03	5.21	329.076	22.763	6.9	592.34	2961.68	204.87
2011-cc-048	NaOH	0.69	0.04	5.23	345.448	23.532	6.8	483.63	2418.14	164.72
	NaOH/HEPES	0.57	0.04	6.29	270.987	22.411	8.3	487.78	2438.883	201.70

요약

2명의 독립된 오퍼레이터가 시간의 함수로서 TGF β 1의 분비에 대해 2가지 상이한 초기 세포 밀도 (25,000 생존 가능 세포/cm² 및 50,000 생존가능 세포/cm²)를 시험하였다. 결과는 세포가 50,000 생존가능 세포/cm²로 파종될 때, 세포가 더욱 낮은 밀도로 파종될 때보다 2명의 오퍼레이터로부터 획득된 값 사이에 더욱 일관성이 있다는 것을 지시한다. 중요하게는, 68 시간 및 76 시간 사이에 수집된 전체 표본에 걸쳐 TGF β 1 수준에서 가변성이 거의 없다. 이들 데이터에 근거하여, MPC CM은 세포를 50,000 생존가능 세포/cm²로 파종함으로써 제조되고, 그리고 TGF β 1 효능 검정을 위한 MPC CM의 수집은 CBM + 0.5% BSA의 첨가 후 72 ± 4 시간에 수행되는 것이 권장된다.

상기 데이터는 1N NaOH로 중화된 TGF β 1 수준 산-활성화된 CM 표본이 1.2N NaOH/0.5M HEPES로 중화된 표본에 필적한다는 것을 증명한다. 이런 이유로, 1 N NaOH는 TGF β 1 ELISA를 위한 표본 중화를 위한 1.2 N NaOH/0.5 M HEPES에 대한 허용되는 대체제이다.

실시예 6: TGF β 1 효능 검정의 성과

TGF β 1 ELISA의 성과는 다음의 파라미터의 사정에 의해 평가되었다:

- [0288] 1. 검정 선형성: 표준 곡선이 검정기 희석제 또는 CBM + 0.5% BSA에서 준비되었다;
- [0289] 2. 기질 간섭: rhTGFβ1이 검정기 희석제 또는 CBM + 0.5% BSA에서 희석되었다; 및
- [0290] 3. 검정 정확도 및 표본 선형성: 연속-희석된 CM 표본에서 스파이크와 회복 및 TGFβ1을 조사하기 위한 실험이 수행되었다.

[0291] **검정 선형성**

[0292] 표준 곡선의 적합도가 사정되었다. 3개의 별개의 키트로부터 TGFβ1 표준이 재구성되고, 그리고 ELISA 키트 또는 CBM + 0.5% BSA에서 제공된 검정기 희석제에서 희석되었다. 연속 희석액이 2000 pg/ml로부터 제조되었다. 키트 제조업체에 의해 확립된 표준 곡선은 7개 포인트 및 제로 포인트로 구성된다. 이런 이유로, 표준 곡선의 확립된 범위는 31.2 내지 2,000 pg/mL이었다. 각 표준 농도는 이중으로 분석되었다. 상관 계수 (R^2)는 4- 파라미터 로지스틱 비선형 회귀 곡선 적합을 이용하여 결정되었다. 전형적으로, 허용되는 표준 곡선 R^2 는 ≥ 0.95 이다. 검정기 희석제를 이용하여 산출된 3개의 표준 곡선에 대한 상관 계수는 0.991 내지 1.000의 범위에서 변하고, 반면 CBM+0.5% BSA에서 준비된 3개의 표준 곡선 모두에 대해 $R^2=1.000$ 이었다. 표준 곡선은 도면 13에서 도시된다. 표준 곡선의 정확도를 담보하기 위해, TGFβ1 농도는 역산되고 % 회복이 결정되었다. 전반적으로, % 회복은 80%-120% 이내에 있는 것으로 밝혀졌다 (표 7).

[0293] [표 7]

[0294] 검정기 희석제 및 CBM + 0.5% BSA에서 준비된 표준 곡선

검정기 희석제						CBM+0.5% BSA					
표준 곡선	표본	TGFβ1 (pg/ml)	평균 OD	역산 (pg/ml)	% 회복	표준 곡선	표본	TGFβ1 (pg/ml)	평균 OD	역산 (pg/ml)	% 회복
1	1	0	0.064	UND	-	4	1	0	0.098	1.75	-
	2	31.2	0.107	25.51	81.8		2	31.2	0.144	28.66	91.8
	3	62.5	0.154	77.50	124.0		3	62.5	0.192	58.96	94.3
	4	125	0.257	148.16	118.5		4	125	0.296	129.35	103.4
	5	250	0.435	251.40	100.6		5	250	0.463	252.87	101.1
	6	500	0.738	450.59	90.1		6	500	0.751	495.61	99.1
	7	1000	1.22	1287.23	128.7		7	1000	1.232	1002.61	100.3
	8	2000	1.274	1604.11	80.2		8	2000	1.894	2000.89	100.0
2	1	0	0.061	2.76	-	5	1	0	0.06	2.44	-
	2	31.2	0.112	27.64	88.6		2	31.2	0.115	30.51	91.8
	3	62.5	0.167	59.62	95.4		3	62.5	0.171	63.29	94.3
	4	125	0.264	121.41	97.1		4	125	0.267	123.00	103.4
	5	250	0.45	257.27	102.9		5	250	0.46	254.13	101.1
	6	500	0.739	504.99	101.0		6	500	0.77	495.98	99.1
	7	1000	1.198	991.14	99.1		7	1000	1.282	1002.14	100.3
	8	2000	1.896	2003.48	100.2		8	2000	1.972	1999.43	100.0
3	1	0	0.073	3.15	-	6	1	0	0.095	2.54	-
	2	31.2	0.113	28.17	90.3		2	31.2	0.156	29.86	95.7
	3	62.5	0.156	58.36	93.4		3	62.5	0.209	56.67	90.7
	4	125	0.245	126.89	101.5		4	125	0.328	123.84	99.1
	5	250	0.381	243.15	97.3		5	250	0.533	255.98	102.4
	6	500	0.664	518.61	103.7		6	500	0.86	504.50	100.9
	7	1000	1.069	986.15	98.6		7	1000	1.365	991.46	99.1
	8	2000	1.758	2004.12	100.2		8	2000	2.103	2005.11	100.3

[0295]

[0296] **기질 간섭**

[0297] 기질 간섭을 조사하기 위해, rhTGF-β1 (R&D systems)이 검정기 희석제에서 또는 CBM + 0.5% BSA에서 0, 50, 250 및 1,500 pg/mL로 준비되었다. 각 농도는 이중으로 준비되었다. 각 표본에서 TGFβ1 농도는 ELISA에 의해 결정되었다. 각 표본에 대한 평균 농도 및 % 회복은 표 8에서 제공된다. 검정기 희석제에서, % 회복은 70.4 내지 74.7%의 범위에서 변하고, 반면 CBM + 0.5% BSA에서 회복은 94.5 내지 106.1%의 범위에서 변하였다.

[0298] [표 8]

[0299] 기질 간섭의 분석

			검정 결과 (검정기 희석제에서 표준 곡선)					
희석제	rhTGFβ1 pg/ml	반복	OD	평균 OD	TGFβ1 (pg/ml)	검정 SD	검정 CV	% 회복
검정기 희석제	0	1	0.071	0.072	2.56	0.59	23.2	
		2	0.072					
	50	1	0.124	0.124	35.52	0.20	0.5	71.0
		2	0.124					
	250	1	0.292	0.304	176.02	13.97	7.9	70.4
		2	0.316					
	1500	1	1.167	1.174	1120.94	12.09	1.1	74.7
		2	1.18					
CBM	0	1	0.093	0.093	15.01	0.44	3	
		2	0.092					
	50	1	0.148	0.149	53.06	0.87	1.6	106.1
		2	0.15					
	250	1	0.362	0.374	236.14	14.48	6.1	94.5
		2	0.385					
	1500	1	1.38	1.422	1468.85	86.83	5.9	97.9
		2	1.463					

[0300]

[0301] 추가적으로, 매트릭스 효과는 검정기 희석제 및 CBM + 0.5%BSA에서 준비된 표준 곡선을 비교함으로써 평가되었다 (동일한 평판에서 병렬로 분석됨). 각 표준은 이중으로 대표되고, 그리고 2가지 독립된 실험이 수행되었다. 도면 14는 평균 OD는 표준이 검정기 희석제와 비교하여 CBM에서 제조될 때 약간 더 높았다는 것을 보여주는데, 이것은 매트릭스 효과의 존재를 지시한다.

[0302] **검정 정확도**

[0303] 검정 정확도를 평가하기 위한 스파이크와 회복 실험이 수행되었다. 3개의 상이한 농도의 rhTGFβ1 (50, 250 및 500 pg/mL)이 3개의 MPC 로트 (345938, 2011cc063, 2011cc048)로부터 유래된 CM 내로 스파이크되었다. 각 조건은 이중으로 검정되었다. 각 농도에서 TGFβ1의 퍼센트 회복은 다음의 공식을 이용하여 계산되었다:

[0304] $[평균\ 측정된\ 농도 / 예상된\ 농도] \times 100$

[0305] 평균 측정된 농도는 표준 곡선으로부터 결정된 바와 같은, 스파이크된 표본 내에 TGFβ1 농도에 상응한다. 3개의 세트의 데이터로부터 결과는 표 9에서 도시된다. 허용되는 스파이크 회복은 전형적으로, 80-120%의 범위에서 변한다. 모든 표본에 대한 퍼센트 회복 값은 96.17% 내지 126.87%의 범위에서 변하였다. 시험된 각 농도에서 평균 TGFβ1 회복이 계산되었다: 50 pg/mL: 112.1%, 250 pg/mL: 103.8%, 500 pg/mL: 97.8%.

[0306] [표 9]

[0307] ELISA 정확도의 사정.

		검정 결과			
로트	스파이크된 rhTGFβ1 (pg/ml)	TGFβ1 (pg/ml)	SD	CV	% 회복
345938	0	685.98	28.50	4.2	
	50	736.78	23.66	3.2	100.1
	250	940.32	63.74	6.8	100.5
	500	1166.31	126.60	10.9	98.3
2011-cc-063	0	319.39	24.41	7.6	
	50	468.64	13.41	2.9	126.9
	250	617.35	44.09	7.1	108.4
	500	809.00	9.67	1.2	98.7
2011-cc-048	0	450.99	13.96	3.1	
	50	547.61	5.61	1.0	109.3
	250	718.54	47.51	6.6	102.5
	500	914.52	69.52	7.6	96.2

[0308]

[0309] 표본 선형성

[0310] 표본 선형성은 순수한, 그리고 2x, 5x 및 10x 희석된 3개의 상이한 MPC 로트 (22-12-002US, 1857469, 345938)로부터 유래된 CM 표본을 검정함으로써 사정되었다. 각 표본은 이중으로 평가되었다. 소정의 표본의 각 희석에서 정확도 (% 변동)는 아래와 같이 계산되었다:

[0311] $\% \text{ 변동} = (\text{결과} - \text{모든 희석의 평균 결과}) / \text{모든 희석의 평균 결과} \times 100$

[0312] 결과는 표 10에서 요약된다. % 변동은 -17.8 내지 10.5%의 범위에서 변하였다. 허용되는 % 변동은 전형적으로 $\pm 20\%$ 이다.

[0313] [표 10]

표본 선형성의 사정.

로트	회석	반복	검정 결과					교정된 결과				
			OD	평균 OD	TGF-β1 (pg/mL)	SD	%CV	TGF-β1 (pg/mL)	SD	%CV	회석 평균 결과	% 변동
22-12002US	1	1	2.227	2.20	2221.94	43.04	1.9	3110.72	60.25	1.94	3784.72	-17.81
		2	2.171									
	1/2	1	1.402	1.39	1345.79	13.45	1	3768.22	26.90	0.71		1.00
		2	1.384									
	1/5	1	0.705	0.70	597.51	1.61	0.3	4182.56	8.07	0.19		10.51
		2	0.703									
	1/10	1	0.443	0.42	291.24	30.97	10.6	4077.36	309.71	7.60		7.73
		2	0.402									
1857469	1	1	1.653	1.65	1627.88	1.23	0.1	2279.03	1.72	0.08	2443.76	-6.74
		2	1.652									
	1/2	1	1.036	1.02	937.91	27.74	3	2626.13	55.49	2.11		7.46
		2	0.999									
	1/5	1	0.485	0.50	370.80	15.60	4.2	2595.57	78.01	3.01		6.21
		2	0.506									
	1/10	1	0.311	0.30	162.45	10.22	6.3	2274.30	102.21	4.49		-6.93
		2	0.297									
345938	1	1	2.122	2.11	2121.79	23.59	1.1	2970.51	33.03	1.11	3506.29	-15.28
		2	2.091									
	1/2	1	1.343	1.33	1278.79	18.75	1.5	3580.61	37.50	1.05		2.12
		2	1.319									
	1/5	1	0.656	0.66	547.52	3.92	0.7	3832.61	19.60	0.51		9.31
		2	0.661									
	1/10	1	0.393	0.39	260.10	0.77	0.3	3641.43	7.69	0.21		3.85
		2	0.394									

요약

상기 데이터는 MPC 배양액으로부터 수집된 CM에서 TGFβ1을 계측하기 위한 TGFβ1 ELISA의 적합성에 대한 뒷받침을 제공한다. 표준 곡선의 R² 값은 0.991 - 1.000의 범위에서 변화였고, 그리고 각 표준 농도에서 TGFβ1 회복은 80 - 120% 이내에 있는 것으로 밝혀졌다. 매트릭스 효과를 조사하기 위해 수행된 실험은 검정기 회석제와 비교하여 CBM + 0.5% BSA에서 TGFβ1의 더욱 높은 회복, 그리고 검정기 회석제와 비교하여 CBM + 0.5% BSA에서 준비된 표준 곡선에서 약간 상향 및 우측 이동을 지시하였다. 이런 이유로, 표준 곡선은 CBM + 0.5% BSA에서 준비되는 것이 권장된다.

참고문헌

- Adams, M. A., & Roughley, P. J. (2006). *Spine*, 31, 2151-2161.
- Ausubel, F. M. (Ed.). (1987 including all updates until present). *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: John Wiley & Sons.
- Bae, W. C., & Masuda, K. (2011). *The Orthopedic Clinics of North America*, 2011, 585-601, ix.
- Bjornsson, S. (1993). *Analytical Biochemistry*, 210, 282-291.
- Brown, T. A. (Ed.). (1991). *Essential Molecular Biology: A Practical Approach* (Vol. 1 and 2). Oxford: IRL Press at Oxford University Press.
- Buchsacher, G. L., & Panganiban, A. T. (1992). *Journal of Virology*, 2731-2739.
- Burns, J. C., Friedmann, T., Driever, W., Burrascano, M., & Yee, J. K. (1993). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 8033-8037.

- [0326] Carter, B. J. (1992). *Current Opinion in Biotechnology*, 533-539.
- [0327] Cheung, K. M., Karppinen, J., Chan, D., Ho, D. W., Song, Y. Q., Sham, P., et al. (2009). *Spine*, 34, 934-940.
- [0328] Cima, L. G., Ingber, D. E., Vacanti, J. P., & Langer, R. (1991). *Biotechnology Bioengineering*, 38, 145-158.
- [0329] Coligan, J. E., Kruisbeek, A. M., Margulies, D. H., Shevach, E. M., & Strober, W. (Eds.). (1991 including all updates until present). *Current Protocols in Immunology*. New York: John Wiley & Sons.
- [0330] Crock, H. V., & Goldwasser, M. (1984). *Spine*, 9, 702-706.
- [0331] Fisher-Hoch, S. P., McCormick, J. B., Auperin, D., Brown, B. G., Castor, M., Perez, G., et al. (1989). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 56, 317-321.
- [0332] Freemont, A. J. (2009). *Rheumatology*, 48, 5-10.
- [0333] Glover, M., & Hames, B. D. (Eds.). (1995 and 1996). *DNA Cloning: A Practical Approach* (Vols. 1-4).
- [0334] Gronthos, S. (2003). *Journal of Cell Science*, 116(Pt 9), 1827-1835.
- [0335] Gronthos, S., & Simmons, P. J. (1995). *Blood*, 85(4), 929-940.
- [0336] Gruber, H. E., Ingram, J. A., Davis, D. E., & Hanley, E. N. (2009). *The Spine Journal : Official journal of the American Spine Society*, 9, 210-215.
- [0337] Gruber, H. E., Hoelscher, G. L., & Hanley, E. N. (2010). *The Spine Journal : Official journal of the North American Spine Society*, 10, 721-727.
- [0338] Guerin, H. L., & Elliott, D. M. (2007). *Journal of Orthopaedic Research - Official publication of the Orthopaedic Research Society*, 25, 508-516.
- [0339] Harlow, E., & Lane, D. (1988). *Antibodies: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- [0340] Hilton, R. C., & Ball, J. (1984). *Annals of the Rheumatic Diseases*, 43, 302-307.
- [0341] Humzah, M. D., & Soames, R. W. (1988). *The Anatomical Record*, 220, 337-356.
- [0342] Johann, S. V., Gibbons, J. J., & O'Hara, B. (1992). *Journal of Virology*, 65, 1635-1640.
- [0343] Johnson, W. E., & Roberts, S. (2007). *Biochemical Society Transactions*, 35, 680-682.
- [0344] Johnson, W. E., Caterson, B., Eisenstein, S. M., Hynds, D. L., Show, D. M., & Roberts, S. (2002). *Arthritis and Rheumatism*, 46, 2658-2664.
- [0345] Johnstone, B., Hering, T. M., Caplan, A. I., Goldberg, V. M., & Yoo, J. U. (1998). *Experimental Cell Research*, 238, 265-272.
- [0346] Kotin, R. M. (1994). *Human Gene Therapy*, 793-801.
- [0347] Le Maitre, C. L., Freemont, A. J., & Hoyland, J. A. (2005). *Arthritis Research and Therapy*, 7, R732-745.
- [0348] Le Maitre, C. L., Hoyland, J. A., & Freemont, A. J. (2007). *Arthritis Research and Therapy*, 9, R77.
- [0349] Le Maitre, C. L., Hoyland, J. A., & Freemont, A. J. (2007). *Arthritis Research and Therapy*, 9, R83.
- [0350] Le Maitre, C. L., Pockert, A., Buttle, D. J., Freemont, A. J., & Hoyland, J. A. (2007). *Biochemical Society Transactions*, 2007, 652-655.
- [0351] Lebkowski, J. S., McNally, M. M., Okarma, T. B., & Lerch, L. B. (1988). *Molecular and Cellular Biology*, 3988-3996.
- [0352] Loreto, C., Musumeci, G., Castorina, A., Loreto, C., & Martinez, G. (2011). *Annals of Anatomy =*

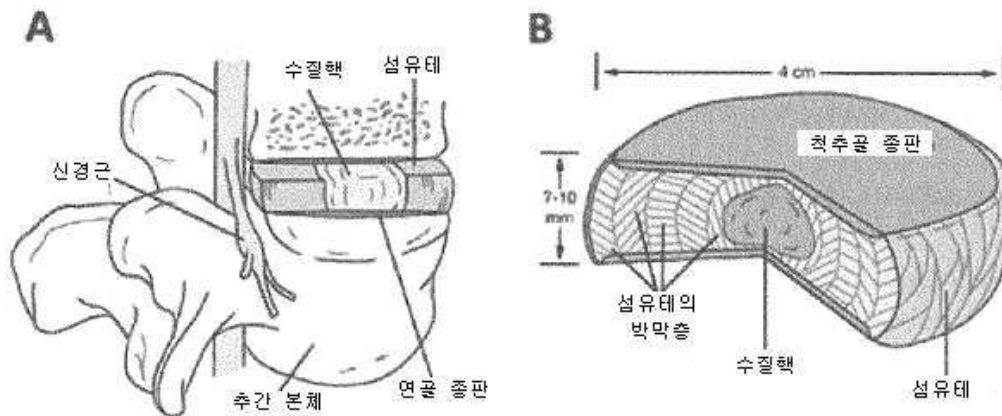
Anatomischer Anzeiger : Official organ of the Anatomische Gesellschaft, 193, 156-162.

- [0353] Marchand, F., & Ahmed, A. M. (1990). *Spine, 15, 402-410.*
- [0354] Masuda, K. (2008). *European Spinel Journal : Official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society, 17 Suppl 4, 441-451.*
- [0355] Melrose, J., Ghosh, P., Taylor, T., Latham, J., & Moore, R. (1997). *Journal of Spinal Disorders, 10(1), 56-67.*
- [0356] Melrose, J., Roberts, S., Smith, S., Menage, J., & Ghosh, P. (2002). *Spine, 27, 1278-1285.*
- [0357] Melrose, J., Smith, S., Ghosh, P., & Taylor, T. (2001). *Cells Tissues Organs, 168, 137-146.*
- [0358] Miller, A. D. (1990). *Human Gene Therapy, 7, 5-14.*
- [0359] Miller, A. D., & Rosman, G. J. (1989). *Biotechniques, 7, 980-990.*
- [0360] Miller, A. D., Garcia, J. V., von Suhr, N., Lynch, C. M., Wilson, C., & Eiden, M. V. (1991). *Journal of Virology, 65, 2220-2224.*
- [0361] Murata, Y., Onda, A., Rydevik, B., Takahashi, I., & Olmarker, K. (2006). *Spine, 31, 530-535.*
- [0362] Muzyczka, N. (1992). *Current Topics in Microbiology and Immunology, 158, 97-129.*
- [0363] O'Halloran, D. M., & Pandit, A. S. (2007). *Tissue Engineering, 13, 1927-1954.*
- [0364] Perbal, B. V. (1984). *A Practical Guide to Molecular Cloning.* New York: Wiley.
- [0365] Purmessur, D., Walter, B. A., Roughley, P. J., Laudier, D. M., Hecht, A. C., & Iatridis, J. A. (2013). *Biochemical and Biophysical Research Communications, 433, 151-156.*
- [0366] Raj, P. P. (2008). *Pain Practice, 8, 18-44.*
- [0367] Risbud, M. V., & Shapiro, I. M. (2014). *Nature Reviews. Rheumatology, 10, 44-56.*
- [0368] Roberts, S., Eisenstein, S. M., Menage, J., Evans, E. H., & Ashton, I. K. (1995). *Spine, 20, 2645-2651.*
- [0369] Roberts, S., Evans, H., Trivedi, J., & Menage, J. (2006). *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume, 88 Suppl 2, 10-14.*
- [0370] Sambrook, J., & Green, M. R. (2012). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Fourth Edition).* New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- [0371] Scarpa, M., Cournoyer, D., Munzy, D. M., Moore, K. A., Belmont, J. W., & Caskey, C. T. (1991). *Virology, 75, 849-852.*
- [0372] Schmidt, H., Kettler, A., Heuer, F., Simon, U., Claes, L., & Wilke, H. J. (2007). *Spine, 32, 748-755.*
- [0373] See, F., Seki, T., Psaltis, P. J., Sondermeijer, H. P., Gronthos, S., Zannettino, A. C., et al. (2011). *Journal of Cellular and Molecular Medicine, 15, 2117-2129.*
- [0374] Seguin, C. A., Pilliar, R. M., Roughley, P. J., & Kandel, R. A. (2005). *Spine, 30, 1940-1948.*
- [0375] Shamji, M. F., Setton, L. A., Jarvis, W., So, S., Chen, J., Jing, L., et al. (2010). *Arthritis and Rheumatism, 62, 1974-1982.*
- [0376] Shelling, A. N., & Smith, M. G. (1994). *Gene Therapy, 7, 165-169.*
- [0377] Shen, B., Melrose, J., Ghosh, P., & Taylor, T. (2003). *European Spine Journal, 12, 66-75.*
- [0378] Sommerfelt, M. A., & Weiss, R. A. (1990). *Virology, 76, 58-59.*
- [0379] Urban, J. P., Smith, S., & Fairbank, J. C. (2004). *Spine, 29, 2700-2709.*

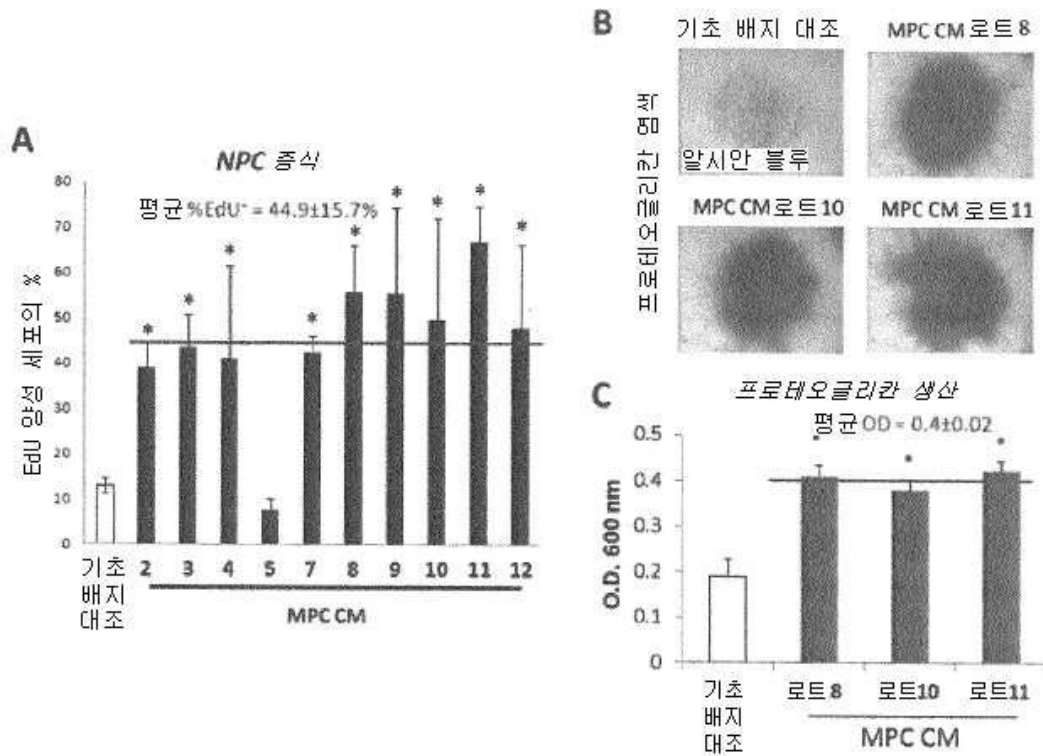
- [0380] Vacanti, C. A., Langer, R., Schloo, B., & Vacanti, J. P. (1991). *Plastic Reconstructive Surgery*, 88, 753-749.
- [0381] Vacanti, J. P., Morse, M. A., & Saltzman, W. M. (1988). *Journal of Pediatric Surgery*, 23, 3-9.
- [0382] Vincent, K. A., Moore, G. K., & Haigwood, N. L. (1990). *Vaccine*, 353-359.
- [0383] Wadstrom, J., & Tengblad, A. (1993). *Journal of Medical Science*, 98, 159-167.
- [0384] Wang, J., Markova, D., Anderson, D. G., Zheng, Z., Shapiro, I. M., & Risbud, M. V. (2011). *The Journal of Biological Chemistry*, 286, 39738-39749.
- [0385] Watanabe, H., Yamada, Y., & Kimata, K. (1998). *Journal of Biochemistry*, 124, 687-693.
- [0386] Weigel, P. H., Fuller, G. M., & Le Boeuf, R. D. (1986). *Journal of Theoretical Biology*, 119, 219-234.
- [0387] Wilson, C., Reitz, M. S., Okayama, H., & Eiden, M. V. (1989). *Journal of Virology*, 63, 2374-2378.
- [0388] Zannettino, A. C., Buhning, H. J., Niutta, S., Watt, S. M., Benton, M. A., & Simmons, P. J. (1998). *Blood*, 92(8), 2613-2628.
- [0389] Zhou, S. Z., Cooper, S., Kang, L. Y., Ruggieri, L., Heimfeld, S., Srivastava, A., et al. (1994). *The Journal of Experimental Medicine*, 179, 1867-1875.

도면

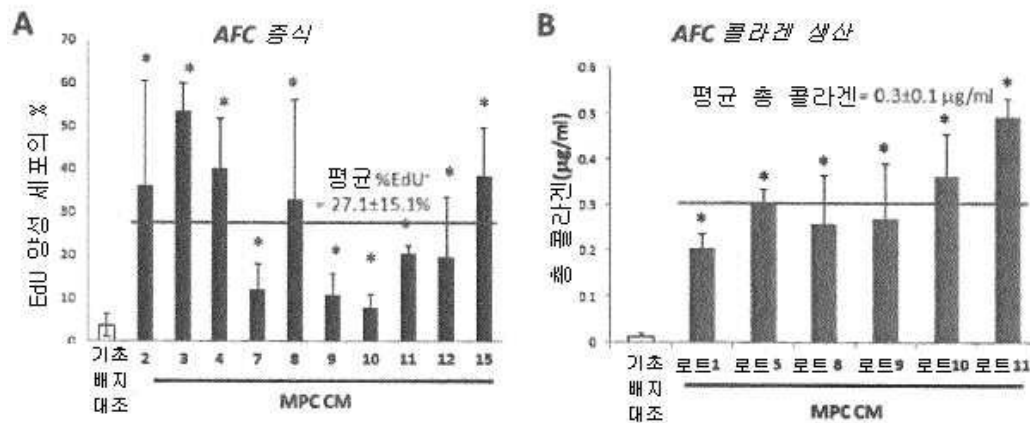
도면1



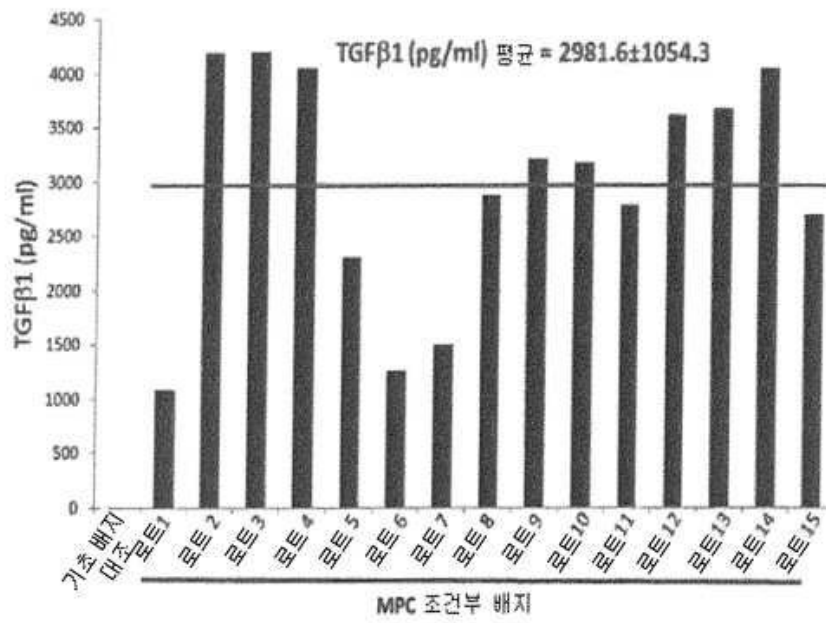
도면2



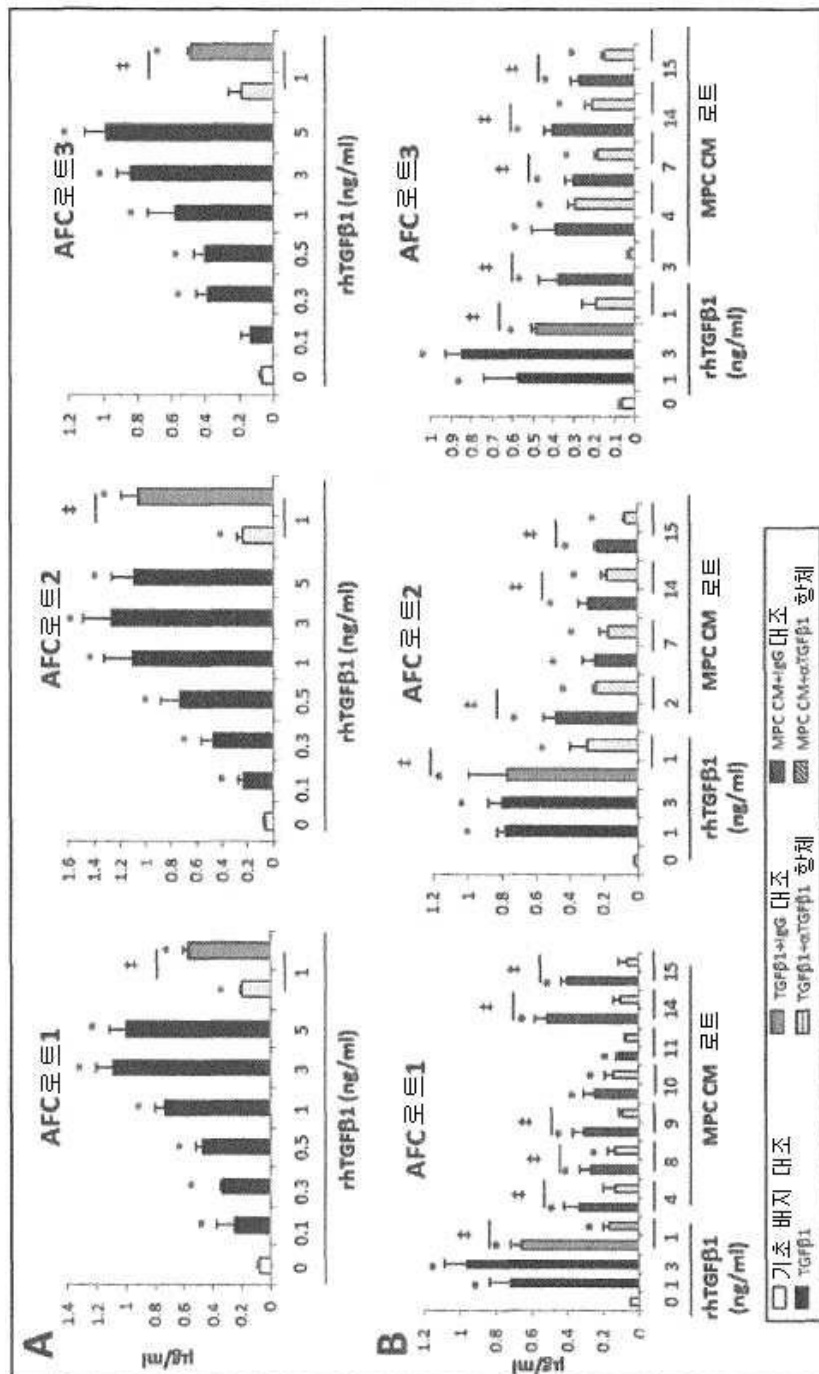
도면3



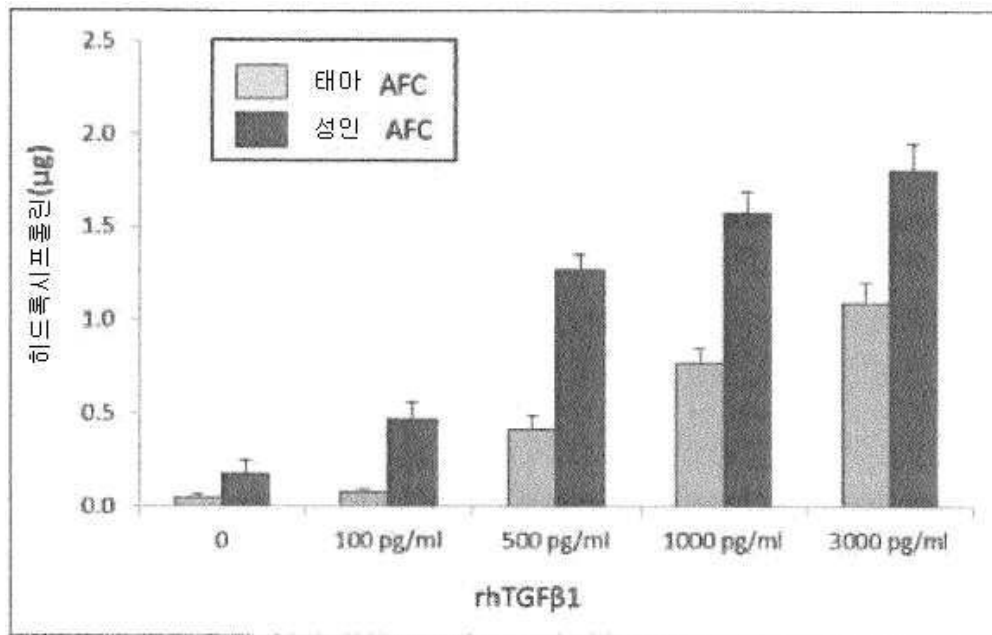
도면4



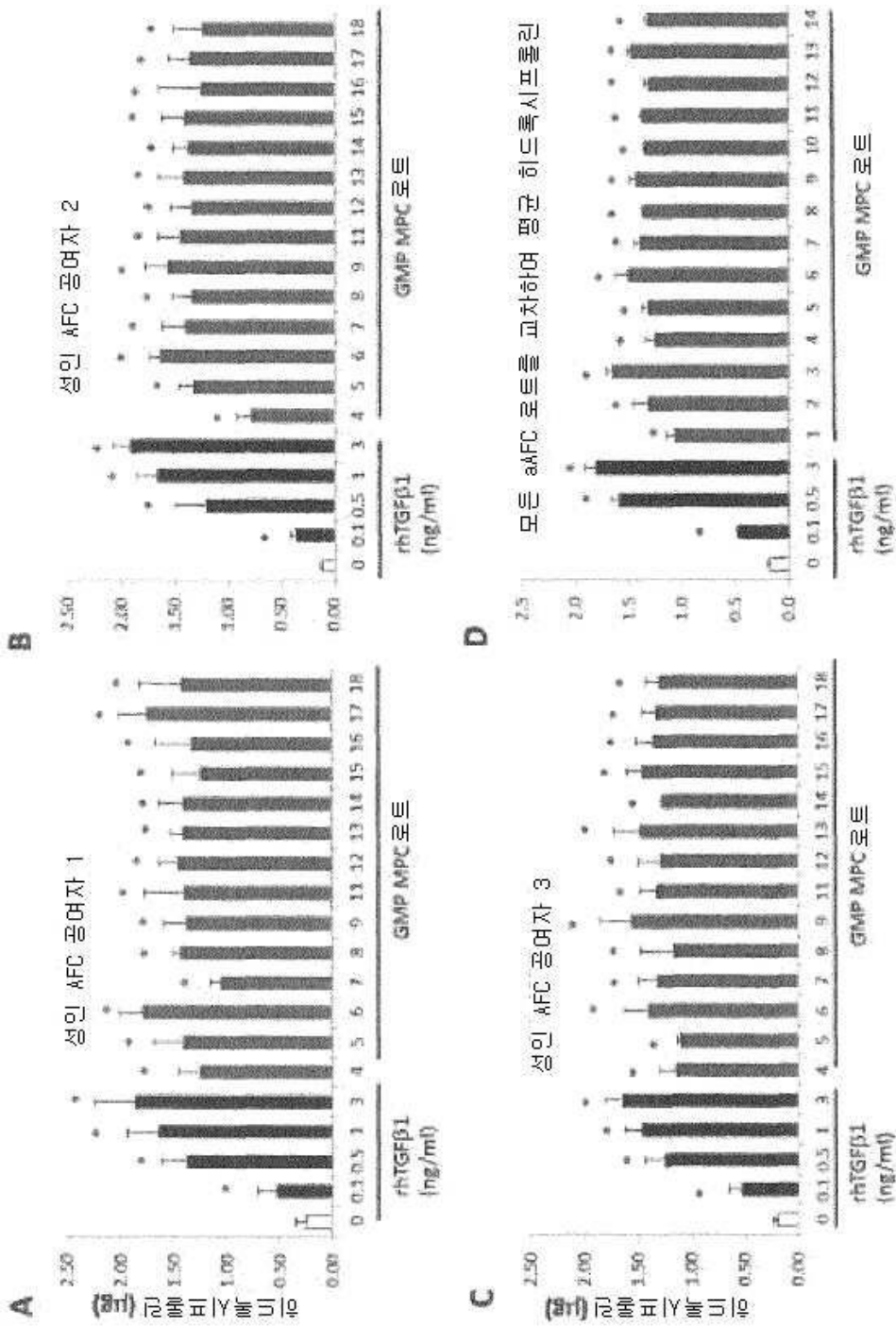
도면5



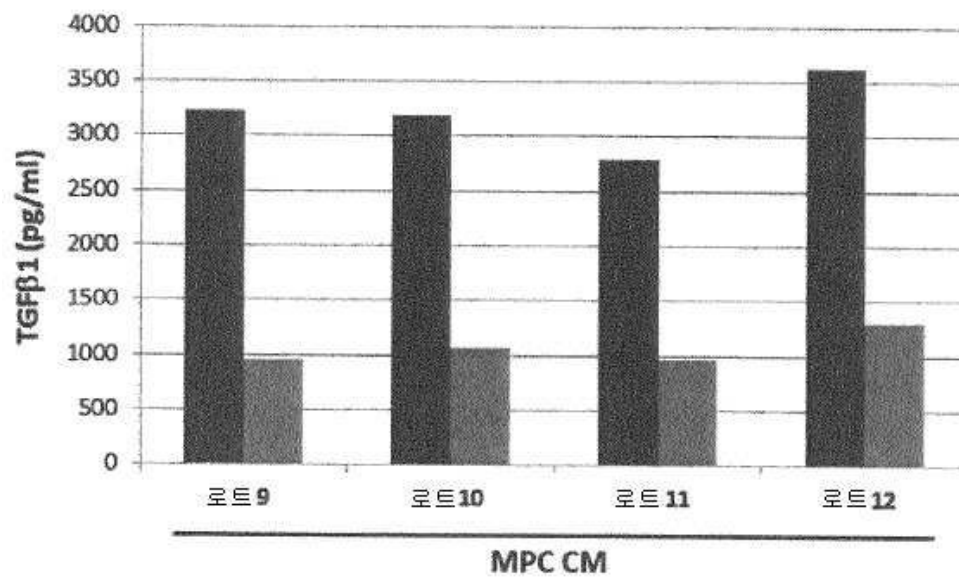
도면6



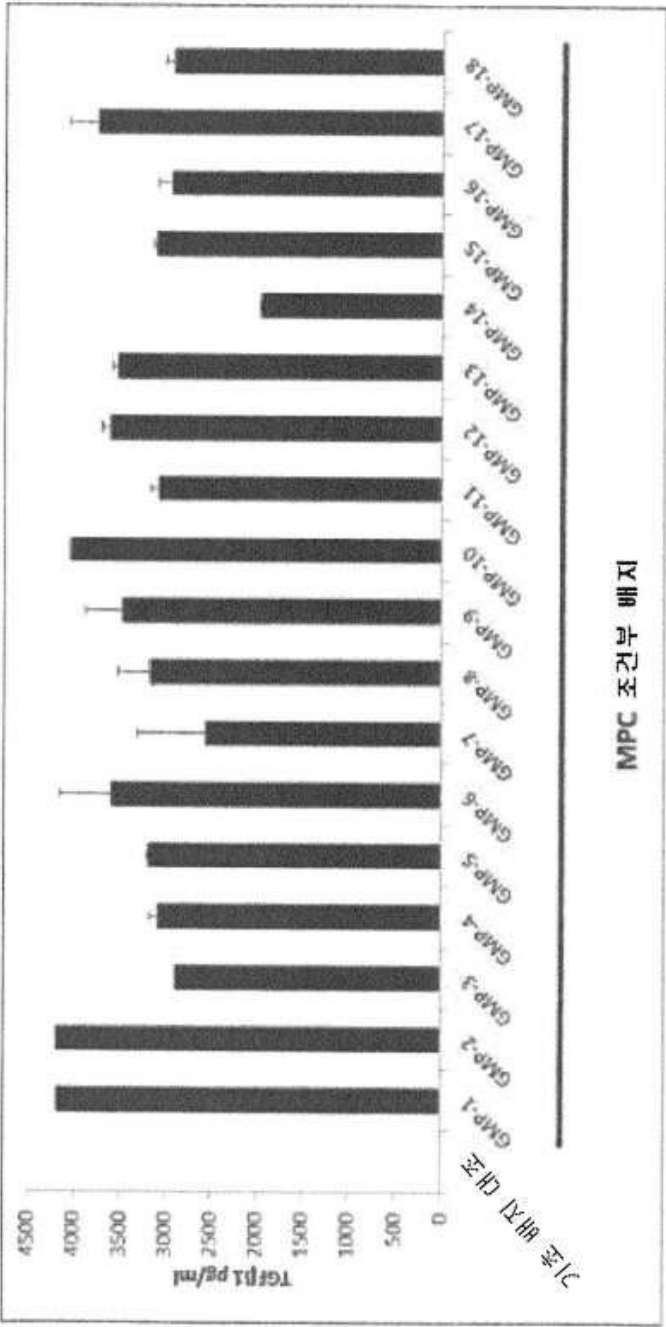
도면7



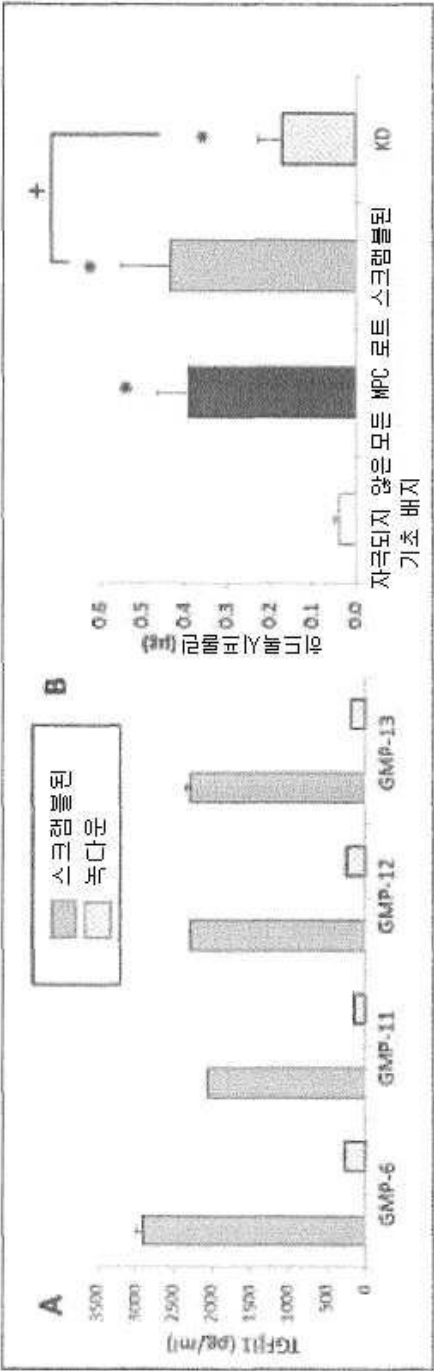
도면8



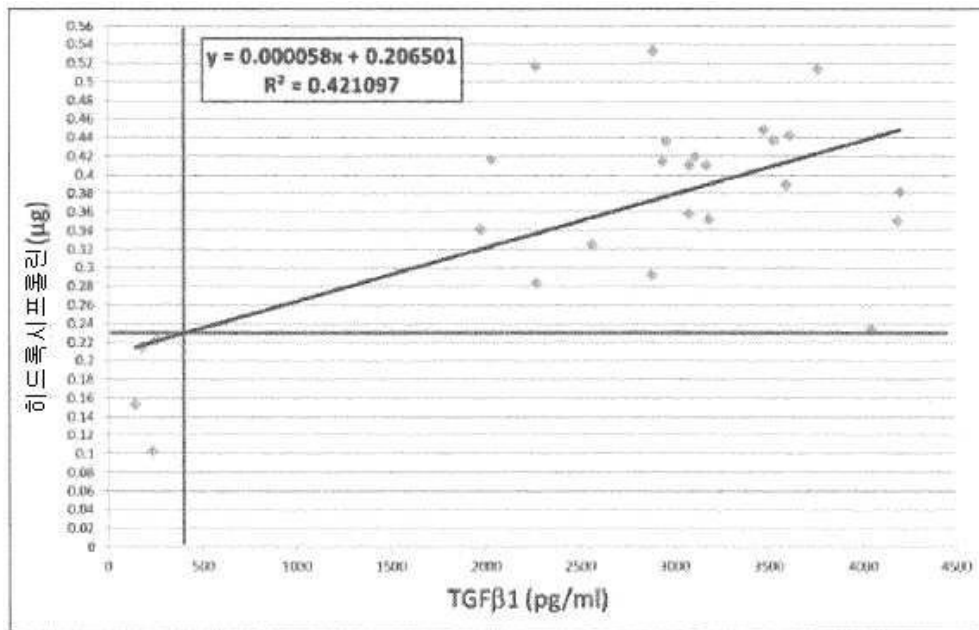
도면9



도면10



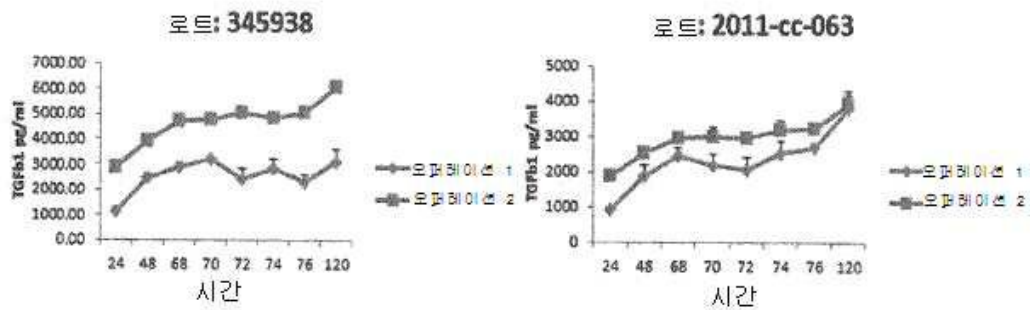
도면11



도면12

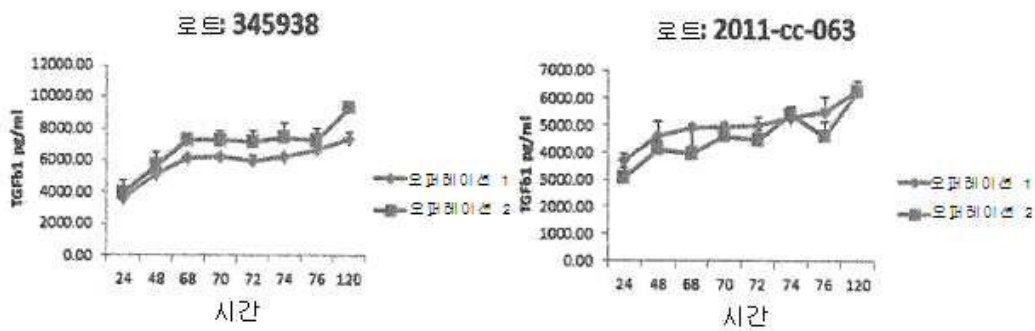
A

25,000 세포/cm²



B

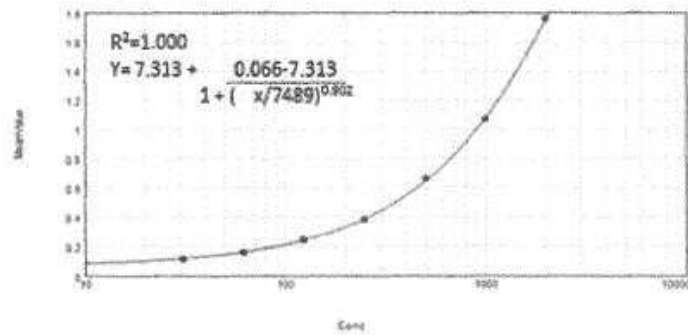
50,000 세포/cm²



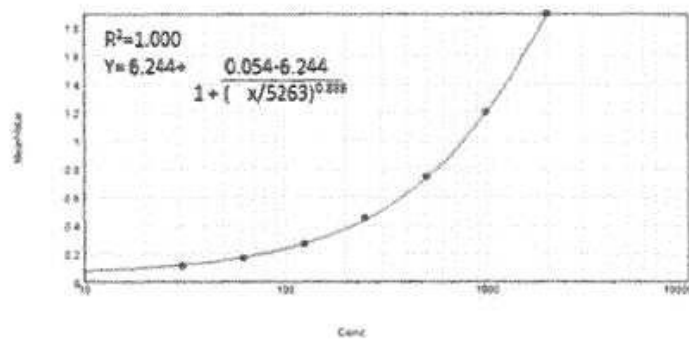
도면13a

A

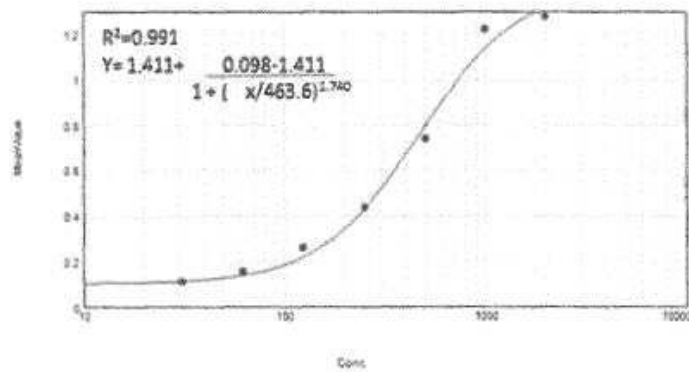
검정기 희석제에서 표준 곡선 - 1



검정기 희석제에서 표준 곡선 - 2



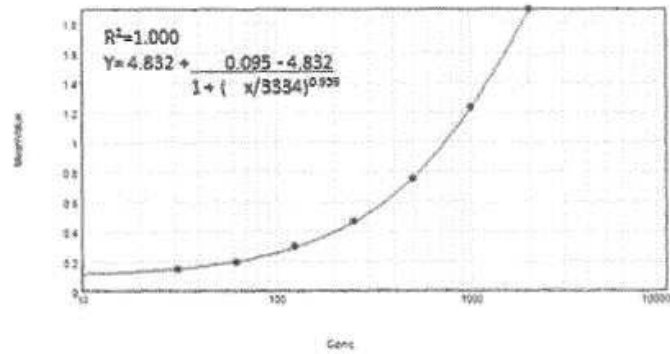
검정기 희석제에서 표준 곡선 - 3



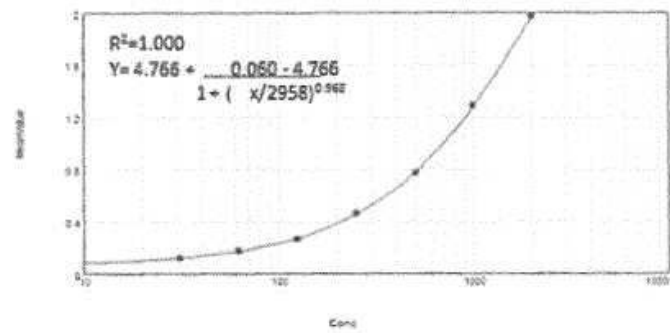
도면13b

B

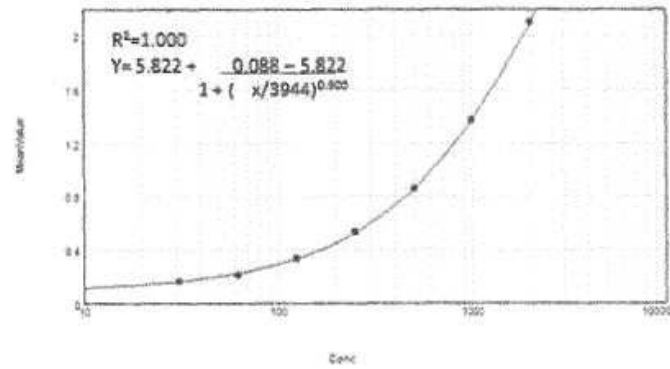
CBM + 0.5% BSA에서 표준 곡선-1



CBM + 0.5% BSA에서 표준 곡선-2



CBM + 0.5% BSA에서 표준 곡선-3



도 13(계속)

도면14

