



(19) 대한민국특허청(KR)
 (12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0083407
 (43) 공개일자 2012년07월25일

(51) 국제특허분류(Int. C1.)
C12N 5/071 (2010.01) *C12N 11/00* (2006.01)
A61K 35/36 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-7009488

(22) 출원일자(국제) 2010년09월16일
 심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2012년04월13일

(86) 국제출원번호 PCT/GB2010/001739

(87) 국제공개번호 WO 2011/033260
 국제공개일자 2011년03월24일

(30) 우선권주장
 0916370.0 2009년09월18일 영국(GB)

(71) 출원인
 후지필름 다이오신쓰 바이오테크놀로지스 유케
 리미티드
 영국 티에스23 1엘에이치 빌링햄 벨라시스 애비
 뉴

(72) 발명자
 카라 부펜드라 발라브
 영국 클리브랜드 티에스23 1엔와이 빌링햄 벨라
 시스 애비뉴 퍼오 박스 2

(74) 대리인
 리앤톡특허법인

전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 줄기 세포 조건화된 배지 조성물

(57) 요약

조건화된 세포 배양 배지를 준비하는 방법이 제공된다. 이 방법은 a) 세포 성장을 지지하기에 효과적인 조성을 가진 성장 배지에서 진핵세포를 배양하는 단계; b) 상기 성장 배지로부터 배양된 세포를 분리하는 단계; 및 c) 세포 생존력을 유지시키는데는 적합하지만, 실질적 세포 성장을 지지하는데는 적합지 않은 조성을 갖는 기초 배지에서 상기 배양된 세포를 유지시키는 단계를 포함한다. 상기 세포는 바람직하게는 결직초 세포, 모유두 세포 또는 진피 섬유아세포이다. 상기 조성물은 약학 조성물 특히 상처 치유를 위한 약학 조성물로서 유용하다.

특허청구의 범위

청구항 1

- a) 세포 성장을 지지하기에 효과적인 조성을 가진 성장 배지에서 진핵세포를 배양하는 단계;
- b) 상기 성장 배지로부터 배양된 세포를 분리하는 단계;
- c) 세포 생존력을 유지시키는데는 적합하지만, 실질적 세포 성장을 지지하는데는 적합하지 않은 조성을 갖는 기초 배지에서 상기 배양된 세포를 유지시키는 단계;를 포함하는 조건화된 세포 배양 배지를 준비하는 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 세포가 결직초(dermal sheath) 세포, 모유두(dermal papilla) 세포 또는 진피 섬유아세포(dermal fibroblast)인 것의 방법.

청구항 3

청구항 1 또는 2에 있어서, 상기 기초 배지가 상기 배양된 세포의 도입에 앞서 단백질이 없는 것인 방법.

청구항 4

청구항 1 내지 3 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포가 미세담체(microcarrier)에 부착되어 배양된 것인 방법.

청구항 5

청구항 1 내지 4 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포가 상기 성장 배지로부터 분리된 후 및 상기 기초 배지로 도입되기 전에 세척된 것인 과정.

청구항 6

청구항 1 내지 5 중 어느 한 항에 있어서, 단계 c)의 산물은 하기의 공정들 중 하나 이상을 더 거치는 것인 방법:

- a) 부분적 또는 완전한 정제;
- b) 동결;
- c) 동결건조; 및
- d) 건조.

청구항 7

청구항 1 내지 6 중 어느 항에 따른 방법에 의해 생산된 조성물.

청구항 8

청구항 1 내지 6 중 어느 한 항에 따른 방법에 의해 생산된 약학 조성물.

청구항 9

청구항 8에 있어서, IL-6, Gro- α , SDF-1, FGF-2, SPARC, PAI-1, IL-8, 콜라겐, 피브로네틴, I-309, IL-13, MIF 및 SDF-1 및 TGF- β 단백질 중 하나 이상을 포함하는 것인 조성물.

청구항 10

상처 치유를 위한 청구항 8 또는 9에 따른 약학 조성물의 용도.

청구항 11

- a) 성장 배지 중에서 결직초 세포, 모유두 세포 또는 진피 섬유아세포로 구성된 군으로부터 선택된 줄기 세포 가능성을 보유하는 분화된 인간 세포를 배양하는 단계; 및 b) 상기 세포로부터 상기 배양 배지를 분리하는 단

계에 의해 얻어진 조건화된 세포 배양 배지를 포함하는 약학 조성물.

청구항 12

청구항 11에 있어서, Gro-a, I-309, IL-6, IL-8, IL-13, MIF, PAI-1, SDF-1 및 TGF- β 단백질 중의 하나 이상을 포함하는 것인 조성물.

청구항 13

청구항 11 또는 12에 있어서, 하기 공정들 중 하나 이상을 더 거친 조성물:

- a) 부분적 또는 완전한 정제;
- b) 동결;
- c) 동결건조; 및
- d) 건조.

청구항 14

상처 치유를 위한 청구항 11 내지 13 중 어느 한 항에 따른 조성물의 용도.

청구항 15

청구항 8, 9, 11, 12 또는 13의 어느 한 항에 따른 조성물의 약물로서의 용도.

명세서

기술분야

[0001]

본 발명은 약학적, 미용적 및 기능성 화장품적 적용, 특히 외상이나 병변의 치료를 포함하는 상처 치유에 사용하는 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002]

줄기 세포는 복수 유형의 세포를 만드는 능력 때문에 많은 치료적, 미용적 및 기능성 화장품적 분야에서 큰 이점이 있다. 예를 들어 EP 0980270을 참고하라. 게다가, 줄기세포를 포함한, 세포를 성장시키는데 사용되는 배양 배지는 성장하는 세포에 의한 단백질 및 다른 인자들의 배지로의 분비로 인하여 치료적, 미용적 및 기능성 화장품적 용도에 대하여 기술된다. 예를 들면 US7,118,746; US7,160,726 및 WO2008/020815를 참고하라. 치료적, 미용적 및 기능성 화장품적 목적의 대안 조성물을 확인하는 것이 바람직한 것으로 남아있다. 줄기 세포의 성장을 지지하는데 사용되는 단백질 물질에 오염되지 않은 조건화된 배지를 생산하는 방법을 확인하는 것이 특별히 바람직하다. 나아가, 조건화된 배지의 제조를 위한 효과적이고 규모를 변경할 수 있는(scalable) 방법을 확인하는 것이 특별히 바람직하다.

발명의 내용

[0003]

본 발명의 제1 양태에 따르면, a) 성장 배지 중에서 결직초(dermal sheath) 세포, 진피 섬유아세포(dermal fibroblast cell) 또는 모유두(dermal papilla) 세포로 구성된 군으로부터 선택된 줄기세포 가능성을 보유한 분화된 인간 세포를 배양하는 단계 및 b) 상기 세포로부터 상기 배양 배지를 분리하는 단계에 의하여 얻어진 조건화된 세포 배양 배지를 포함하는 약학 조성물이 제공된다.

[0004]

본 발명의 제1 양태에서 사용될 수 있는 성장 배지는 상기 세포의 성장에 충분한 배양 배지이다. 세포 배양 과정과 배양 배지는 당해 분야에서 잘 알려져 있고, 혈청이 보충된 기초 배지, 혈청이 없는 배지, 단백질 없는 배지 또는 화학적으로 정의된 성장 배지를 포함한다. 성장 배지는 전형적으로 필수 아미노산, 당, 염, 비타민, 미네랄/무기염, 미량 금속, 지질 및 뉴클레오시드를 포함하고, 혈청, 단백질(예를 들어 인슐린, 트란스페린, 성장인자 및 다른 호르몬), 항생물질(예를 들어 젠타미신, 스트렙토미신, 페니실린), 부착인자(예를 들어 피브로넥틴, 콜라겐, 라미닌)와 같은 세포 증식을 자극하는데 필수적인 다양한 부가적 성분으로 보충되어 있다. 보충물은 혈청의 경우와 같이 조합되어, 또는 개별적으로 첨가될 수 있다. 성장 배지는 세포에 조절된 인비트로 환경에서 성장하기 위한 개별적 세포 유형의 영양 요구를 충족하는데 필요한 성분을 제공한다.

[0005]

일 구체예에서, 상기 세포 배양 방법은 하나의 배양 용기에서 조작되고, 상기 세포는 미세담체를 포함한 배양 용기로 직접 접종되고, 상기 세포는 소망의 세포 밀도가 달성될 때까지 증식된다. 다른 구체예에서, 상기 세포 배양 방법은 하나 이상의 핵(seed) 확장 용기 뒤의 세포 생산 용기와 같이, 적어도 두개의 다른 세포 배양 용기/시스템에서 조작된다. 이러한 복수 핵 확장 공정은 바람직하게는 최종 생산 세포 배양 용기에 접종하기에 충분한 수의 세포가 얻어질 때까지 증가하는 크기의 배양 용기를 이용한다. 상기 핵 확장 배양 용기는 동일한 유형일 수 있으나(예를 들어, 조직 배양 플라스크(tissue culture flask), 진탕 플라스크(shake flask), 롤러 플라스크(roller flask), 스피너 플라스크(spinner flask), 진동 생물반응기(wave bioreactor), 교반 수조 생물반응기(stirred tank bioreactor)) 상기 핵 확장이 진행됨에 따라 크기가 증가하는 것이거나 또는 생산 생물반응기로 전이되는 것에 대비하여 상기 핵 배양이 확장됨에 따라 크기가 증가하는 배양 시스템의 혼합체(예를 들면 조직 배양 플라스크에서 진탕 플라스크로 스피너 플라스크로 교반 수조 생물반응기인 시스템으로)일 수 있다.

[0006]

시험관 내 환경은 최적 성장온도, 용존 산소, 이산화탄소, pH 및 삼투압을 유지시키기 위해 전형적으로 조절된다. 많은 세포 배양 배지 제제는 당해 분야에 알려져 있거나 상업적 출처로부터 용이하게 얻을 수 있다. 세포 배양 기간에 걸쳐서 세포를 성장하게 하는 성장 배지에 세포를 파종(seeding)함으로써 조건화된 세포 배양 배지를 생산할 수 있다는 것이 당업자에게 알려져 있다. 세포 배양의 마지막 또는 세포 배양 중 선택된 시점에서 세포는 제거하고 조건화된 배지를 수확한다. 상기 조건화된 배지는 원래 세포 배양 성장 배지의 많은 성분을 함유할 뿐만 아니라 세포에 의해 분비된 세포성 대사산물 및 부가적 단백질 또한 함유할 것이다. 분비된 단백질은 생물적으로 활성인 성장인자, 시토킨, 프로테아제 및 그밖의 세포외 단백질 및 켙티드일 수 있다. 많은 구체예에서, 본 발명의 제1 양태에 따른 상기 조성물은 하나 이상의 Gro-a, I-309, IL-6, IL-8, IL-13, MIF, PAI-1, SDF-1 및 TGF- β 단백질, 특히 TGF- β 1를 포함한다.

[0007]

본 발명의 제2 양태에 따르면,

[0008]

a) 세포 성장을 지지하기에 효과적인 조성을 가진 성장 배지에서 진핵세포를 배양하는 단계;

[0009]

b) 상기 성장 배지로부터 배양된 세포를 분리하는 단계;

[0010]

c) 세포 생존력을 유지시키는데는 적합하지만, 실질적 세포 성장을 지지하는데는 적합하지 않은 조성을 갖는 기초 배지에서 상기 배양된 세포를 유지시키는 단계를 포함하는 조건화된 세포 배양 배지를 준비하는 방법이 제공된다.

[0011]

본 발명의 제2 양태에서 이용될 수 있는 진핵세포는 'Basic Cell Culture' Oxford University Press (2002) Ed. J. M. Davis; 및 'Animal Cell Culture' Oxford University Press (2000) Ed. John. R. W. Masters;에 기재되어 있으며 둘 다 참조에 의하여 본 명세서에 전체로서 포함되어진다. 용어 "줄기세포(stem cell)"는 복수 조직 유형의 세포를 생성시킬 수 있는 세포를 기술한다. 줄기세포는 그렇게 하라는 지시를 제공하는 특정한 신호 복합체와 함께 제공되는 경우 다른 세포 유형이 될 능력을 가진 배아, 태아 또는 성체로부터의 세포이다. 다른 유형의 줄기 세포가 있다. 하나의 전능성(totipotent) 세포는 정자가 난자를 수정시키고, 그래서 전체 개체를 형성할 능력을 가질 때 형성된다. 수정 후 첫 번째 시간들(first hours)에, 상기 세포는 동일한 전능성 세포로 분열한다. 수정 후 대략 4일 및 세포 분열의 몇 사이클 후에, 상기 전능성 줄기세포는 특화(specialize)를 시작한다. 전능성 세포가 더 특화될수록, "다분화성(pluripotent)"이라고 한다. 다분화성 세포는 신체의 모든 세포 유형으로 분화될 수 있으나, 태반을 생성하거나 태아발생에 필요한 지지 조직을 생성하지는 않는다. 다분화성 세포의 분화 가능성이 "완전(total)"하지 않기 때문에, 이러한 세포들은 "전능성(totipotent)"이라고 하지 않고, 이것들은 배아(embryos)도 아니다. 다분화성 줄기 세포는 더 특화되어 다능성(multipotent) 줄기 세포로 되는데, 이는 특정 기능을 위하여 특화된 특정 계통의 세포로 분화하도록 되어 있다. 다능성 세포는 그들이 유래된 조직에서 발견되는 세포 유형으로 분화될 수 있다; 예를 들어 결직초, 모유두 및 진피 섬유아세포 같은 중간엽 줄기세포와 같은 다능성(성체) 줄기 세포.

[0012]

세포들은 성체, 신생아(neonatal) 또는 태아 조직으로부터 유래될 수 있고 자가이거나(autologous) 동종(allogenic)일 수 있다. 상기 세포는 당해 분야에서 잘 확립된 방법을 이용하여 유전적으로 변형될 수 있다. 상기 유전적 조작은 예를 들어 단백질을 상향조절(up-regulate) 또는 하향조절(down-regulate)하기 위하여, 새로운 단백질을 도입하기 위하여, 또는 이온 농도를 조절하기 위한 것과 같은, 세포 성장 조건화된 세포 배양 배지 또는 조건화된 기초 세포 배양 배지에 분비되는 하나 이상의 성분의 농도를 바꾸기 위해 사용될 수 있다.

[0013]

어떤 구체예에서, 상기 세포는 공동배양으로 성장된다. 공동배양된 세포는 함께 성장한 두개 이상의 다른 종

류의 세포의 혼합물이다.

- [0014] 상기 제2 양태의 방법에서 사용되기에 적합한 세포는 당해 분야에서 알려진 방법에 의해 얻어질 수 있다. 특히 세포는 조직으로부터 분리될 수 있고, 이전에 세포 스톡(stock)이 완료된 세포로부터 확장되고, 계대되고 (passaged) 배양되어 세포 성장 조건화된 세포 배양 배지 또는 조건화된 기초 세포 배양 배지를 생산할 수 있다. 상기 세포 성장 조건화된 세포 배양 배지 또는 조건화된 기초 세포 배양 배지는 비분화된(un-differentiated) 또는 분화된 세포를 사용하여 생산될 수 있다.
- [0015] 본 발명의 제2 양태의 방법에서 이용된 세포는 바람직하게는 결직초 세포, 진피 섬유아세포 또는 모유두 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 줄기 세포 가능성을 보유하는 분화된 인간 세포이다.
- [0016] 본 발명의 제2 양태에서 이용될 수 있는 성장 배지는 제1 양태에서 상기 기술되었다. 세포는 소망된 세포 밀도가 달성될 때까지 성장 배지에서 배양된다.
- [0017] 본 발명의 제2 양태에서 이용된 기초 배지는 세포 생존력을 유지하는데는 적합한 조성, 예를 들어 세포 용해를 막기 위한 pH 및 삼투압을 갖지만, 실질적 세포 성장을 지지하는데는 적합하지 않은 조성, 및 바람직하게는 세포 성장을 지지하지 않는 조성을 가진다. 기초 배지는 무기염류, 아미노산, 비타민 및 당을 포함한 에너지원과 같은 기초 성분을 포함하지만, 혈청, 단백질, 호르몬 및 부착인자(attachment factor)와 같은 성분들로는 보충되지 않는다. 바람직한 에너지원은 글루타민을 포함한다. 기초 배지는 상기 배양된 세포를 도입하기 전까지는 단백질이 없고, 상기 배양된 세포가 도입된 후에 상기 기초 배지에 단백질 보충물이 첨가되지 않는다. 기초 배지의 조성은 세포성 대사산물과 분비물을 기초 배지에 배출하도록 하기 위해 배양된 세포의 생존력을 유지하기 위해 선택된다. 이용될 수 있는 기초 배지의 예에는 Ames Medium, Basal Medium Eagle's, Click's Medium, Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Ham's Nutrient mixture F-12, Glasgow Minimum Essential Medium, Iscove's Modified Dulbecco's Medium, Minimum Essential Medium Eagle 및 RPMI-1640 Medium이 포함된다.
- [0018] 본 발명의 제2 양태의 많은 바람직한 구체예에서, 상기 세포는 성장 배지로부터 분리된 후, 및 기초 배지에 도입되기 전에 세척된다. 세포에 적합한 세척 용액의 예는 당해 분야에서 잘 알려져 있고, 포스페이트-완충 (phosphate-buffered) 염수와 같은 완충액을 포함한다. 일부 바람직한 구체예에서, 이용된 세척용액은 상기한 바와 같은 기초 배지이고, 일반적으로 상기 세포에서 동일한 기초 배지는 뒤에서 유지된다.
- [0019] 기초 배지로 배양된 세포를 도입하는 것은 세포 성장 기간의 끝에 달성된 동일한 세포 농도에서 또는 더 바람직하게는 기초 배지에 분비된 성분의 농도를 증가시키기 위해 더 높은 농도에서 일 수 있다. 상기 세포가 2D 배양에서 성장할 때, 세포는 일반적으로 성장하여 고도 유착 단일층(hightly confluent monolayer)을 산출한다. 이러한 세포 농도는 전형적으로 cm^2 당 1×10^4 내지 1×10^5 세포, 바람직하게는 cm^2 당 2×10^4 내지 5×10^4 세포이다. 이러한 세포의 고도 유착 단일층은 기초 배지와의 접촉이 2D 모드로 수행될 때 또한 이용된다. 미세담체에 부착된 것과 같은 세포가 3D 배양에서 성장한 경우, 세포는 일반적으로 리터당 1×10^7 내지 1×10^{12} 세포 범위, 바람직하게는 리터당 1×10^8 내지 1×10^{10} 세포 범위의 농도로 성장한다. 2D 또는 3D 배양의 많은 구체 예에서, 이용된 기초 배지의 부피는 세포 성장을 지지하는데 이용된 배지의 부피보다 15배 이하, 일반적으로는 2 내지 10배, 약 5배와 같은, 바람직하게는 4 내지 6배 더 낮다.
- [0020] 상기 배양된 세포는 배지가 원하는 조성을 가질 때까지 일반적으로는 12시간초과의 기간 동안, 전형적으로는 약 24 시간과 같은 18시간 내지 26시간까지 일반적으로 기초 배지에 유지된다. 이 재인큐베이션 기간의 끝에서 상기 세포는 제거되어 무세포 조건화된 기초 세포 배양 배지를 생성한다. 상기 조건화된 기초 세포 배양 배지는 세포성 대사물질 및 분비된 단백질을 함유하게 된다. 분비된 단백질은 생물학적으로 활성인 성장인자, 시토킨, 프로테아제 및 다른 세포의 단백질 및 펩티드일 수 있다.
- [0021] 배양물 중의 세포를 기술하기 위해 다양한 용어가 사용된다. '세포 배양물(cell culture)'은 일반적으로 생물 개체에서 수거되고 제어된 조건(controlled conditions)에서 성장한 세포를 일컫는다. 1차 세포 배양물은 제1 서브 배양 전에 생명체로부터 직접적으로 수거된 세포, 조직 또는 기관의 배양물이다. 세포들은 성장 및/또는 분열을 촉진하여, 더 많은 세포 개체군을 초래하는 조건 하의 성장 배지에 놓여질 때 배양물 중에서 확장된다. 세포주(cell line)는 제1 세포 배양물의 하나 이상의 서브배양(sub-cultivation)에 대해 형성된 세포들의 집단이다. 서브배양의 각 회는 하나의 계대(passage)로 언급된다. 당업자에게 계대 기간 동안 많은 집단 배가(population doubling)가 있을 수 있다는 것으로 이해된다.

- [0022] 고정 의존적(anchorage dependent) 또는 부착 의존적(attachment dependent) 세포는 조직 배양 중 증식 및 성장을 위해 표면에 부착하는 것이 요구되는 세포이다. 일부 구체예에서, 본 발명을 실시하는데 사용되는 세포는 혼탁배양에서 성장할 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 혼탁능 세포(suspension-competent cell)는 크고, 단단한 응집체를 만들지 않고 혼탁액에서 자랄 수 있는 세포, 즉, 단일분산(mono-disperse)하거나 응집체마다 몇 개의 세포만을 가진 느슨한(loose) 응집체로 성장하는 세포이다. 혼탁능 세포는, 제한없이, 적응(adaptation)이나 조작(manipulation) 없이 혼탁액 중에서 성장하는 세포 및 혼탁액 성장이나 부착의 존성 세포의 점진적인 적응에 의하여 혼탁능으로 만들어진 세포를 포함한다. 만약 이러한 세포들이 사용된다면, 세포의 증식은 혼탁액 중에서 이루어질 수 있고, 따라서 미세담체는 생산 생물반응기 자체에서 마지막 증식기 및 생산기에서만 사용될 수 있다. 혼탁적응 세포(suspension-adapted cell)의 경우에, 사용된 상기 미세담체는 전형적으로 상기 세포들이 담체의 내부 구조 안에 물리적 포착(entrapment)에 의해 부착되는 거대다공성(macroporous) 담체이다.
- [0023] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "미세담체(microcarrier)"는 세포 부착 및 성장에 적합한 작고, 분리된 입자를 말한다. 비록 항상은 아니더라도 종종, 미세담체는 중합체로부터 형성된 다공성 비드이다. 미세담체는 또한 움푹 팬 곳(dent)이 있는 조밀한 표면을 가질 수 있다. 보통, 세포는 이러한 비드의 외부 표면 위에 부착하고 성장한다.
- [0024] 본 발명의 방법은 세포 성장을 돋는 조건 하에서 세포를 배양함으로써 실시된다. 온도, pH, 용준 산소(저 산소 조건(hypoxic low oxygen conditions)을 포함) 등과 같은 배양 조건은 상기 특정 세포에 최적인 것으로 알려져 있는 것이고, 이 분야의 당업자 또는 전문가에게 명백한 것이다(예를 들어, Animal Cell Culture: A Practical Approach 2nd Ed., Rickwood, D. and Hames, B. D., eds., Oxford University Press, New York(1992)를 참고하라).
- [0025] 본 발명의 제1 및 제2 양태에서, 상기 세포는 유리하게도 고체 지지체 매질에 부착되어 배양된다. 대규모 생산을 위한 선택사항은 조직 배양 플라스크, 롤러 병, 관류 기초 시스템(perfusion based system)(예를 들어, 중공 섬유 생물반응기, 내부 및 외부 스픈 필터, 어쿠스틱 세포 보류 장치, 여과 기초 세포 보류 장치) 단독, 멀티플레이트, 또는 적층판 세포 배양 시스템, 세포 입방체(cell cubes), 및 미세담체를 포함한다. 세포는 또한 세포가 부착할 수 있게 하고 세포를 두층 이상으로(one than one layer) 성장할 수 있게 하는 물질 및 또는 형태로 구성된 3차원 스캐폴드를 사용하여 배양될 수 있다. 상기 구조물(framework)의 구조는 망(mesh), 해면체(sponge)를 포함할 수 있고 또는 히드로겔로부터 형성할 수 있다. 하나의 적합한 3차원 구조물은 IntegraTM Dermal Regeneration Template(Integra Life Sciences)이다. 상기 세포는 3차원 스캐폴더 상에서 직접 배양될 수 있고 또는 세포 성장 조건화된 세포 배양 배지 또는 조건화된 기초 세포 배양 배지를 생산하기 위해 3차원 스캐폴드에 재접종(re-seed)되기 전에 조직 배양 플라스크, 롤러 병, 중공 섬유 시스템, 단일, 복수-플레이트 또는 적층-플레이트 세포 배양 시스템, 세포 입방체 및 미세담체로부터 수득될 수 있다. 세포는 관류 세포 배양을 사용해서도 배양될 수 있다. 관류 세포 배양에서 상기 세포는 필터(예를 들어 내부 또는 외부 스픈 필터), 세포 보류 망, 세포 침전기(settler), 어쿠스틱 장치 등과 같은 세포 보류 장치를 사용하여 생물반응기 중에 보류된다. 세포 배양 성장 배지는 생물반응기에 연속적 또는 주기적으로 공급되고 세포가 없는 '이미 다쓴(spent)' 배지는 연속적 또는 주기적으로 제거된다.
- [0026] 일부 바람직한 구체예에서, 상기 세포는 고체 미세담체의 표면에 부착하거나 또는 매크로다공성 미세담체의 내부 구조에 있어서 미세담체는 젤라틴(가수분해된 콜라겐) 미세담체인 내부에 부착되거나 또는 물리적 포착에 의해 부착한다. 이러한 미세담체는 젤라틴 입자, 가교 젤라틴(cross linked gelatin) 입자 또는 폴리스티렌 또는 글라스 입자와 같은 담체 물질의 피복으로 사용되는 젤라틴을 포함할 수 있다. 젤라틴은 천연 기원으로부터의 것이거나 또는 재조합적으로 또는 합성적으로 생산될 수 있다.
- [0027] 일부 구체예에서, 상기 세포 배양 공정은 하나의 배양 용기에서 조작된다. 상기 세포는 미세담체를 함유한 상기 배양 용기에 직접 접종되고, 상기 세포는 소망된 세포 밀도가 달성될 때까지 증식된다. 상기 증식된 세포를 함유하는 미세 담체는 무균적으로 수화 및 세척된다. 상기 세척된 미세담체는 그 다음에 기초 배지에서 재현탁되고 한동안(전형적으로 24시간) 세포 생존력을 유지하기 위해 최적 조건 하에서 인큐베이션된다. 상기 조건화된 배지가 그 다음에 수화된다. 세척 단계는 한 번 이상 수행될 수 있다.
- [0028] 다른 구체예에서, 상기 세포 배양 공정은 하나 이상의 핵 확장 용기에 뒤따르는 세포 생산 용기와 같은 적어도 다른 두 개의 세포 배양 용기/시스템에서 조작된다. 이러한 복수 핵 확장 공정은 바람직하게는 마지막 생산 세포 배양 용기의 접종을 위하여 충분한 수의 세포가 얻어질 때까지 증가하는 크기의 배양 용기를 이용한

다. 상기 핵 확장 배양 용기는 동일한 유형일 수 있으나(예를 들어, 조직 배양 플라스크, 진탕 플라스크, 롤러 병, 스피너 플라스크, 진동 생물반응기, 교반 수조 생물반응기) 상기 핵 확장이 진행됨에 따라 크기가 증가하는 것이거나 또는 생물반응기 생산으로 전이되는 것에 대비하여 상기 핵 배양이 확장됨에 따라 크기가 증가하는 배양 시스템의 혼합체(예를 들면 조직 배양 플라스크로 진탕 플라스크로 스피너 플라스크로 교반 수조 생물반응기인 시스템으로)일 수도 있다.

[0029] 상기 미세담체가 세포 배양 용기의 바닥까지 침전하게 함으로써 필요한 경우 배지교환이 이루어질 수 있고, 그 후에 상기 성장 배지 부피의 전부까지 및 전부를 포함한 선택된 비율이 제거되고, 상기 미세담체는 선택적으로 세척되고, 신선한 세포 배양 성장 배지의 상응하는 비율은 상기 세포 배양 용기에 첨가된다. 상기 미세담체는 그 후에 배지 중에 재현탁되고 배양은 지속된다. 이러한 배지 제거 및 교환 공정은 소망된 세포 밀도가 달성될 때까지 반복될 수 있다.

[0030] 본 발명의 방법에서 이용될 수 있는 젤라틴 미세담체는 전형적으로 거친 구상이나 다른 모양일 수 있고 다공성 또는 고체이다. 미세담체의 다공성 및 고체 유형 모두 공급자로부터 상업적으로 이용가능하다. 매크로다공성의 젤라틴 미세담체는 예를 들어 스웨덴의 Percell Biolytica AB로부터 이용가능한 "Cultispher" 미세담체와 같이 상업적으로 이용가능하다. 젤라틴 매크로다공성의 미세담체는 입자가 고도로 가교된 젤라틴 매트릭스에 기초하고, 입자 크기가 10-500 μm 이고 지름 1-50 μm 의 많은 구멍으로 둘러싼 중합체 매트릭스로 구성된 특징이 있다. 세포 부착을 위한 미세담체의 사용은 교반 용기 및 고정 의존적 세포의 성장을 위한 관련된 생물반응기의 사용을 촉진시킨다. 상기 세포는 일반적으로 혼탁된 입자에 부착한다. 혼탁액의 바람직함(desirability)은 전형적으로 사용될 수 있는 미세담체의 물리적 변수를 제한한다. 미세담체 입자 크기 범위는 보통 고정 의존적 세포 유형을 수용하기에 충분히 크지만, 진탕 플라스크, 롤러 병, 스피너 플라스크, 진동 생물반응기 및 교반 수조 생물반응기 시스템과 같은 세포 배양 생물반응기 중에 사용하기에 적합한 성질을 가지는 혼탁액을 형성하는데 충분히 작은 것으로 선택된다. 젤라틴 또는 콜라겐은 리신의 아민 기를 통해서, 글루타민산 또는 아스파르트산의 카르복시 기를 통해서, 또는 이것들의 조합을 통해서 가교될 수 있다.

[0031] 세포는 당해 분야에서 알려진 방법, 예를 들어 세포 침전 및 경사(decant), 배치(batch) 또는 연속적인 원심분리 및/또는 마이크로 여과를 사용하여 성장 또는 유지된 배지로부터 분리된다. 얻어진 상기 세포 없는(cell-free) 배지는 예를 들어 한외여과(ultrafiltration), 정용여과(diafiltration) 또는 크로마토그래피 정제를 사용하여, 하나 이상의 인자 또는 성분을 농축 또는 감소시키기 위하여 더 처리될 수 있다.

[0032] 본 발명의 제2 양태의 방법에서 생산된 조건화된 배지는 바람직하게는 약학 조성물로서 이용된다. 따라서, 그러한 약학 조성물은 본 발명의 제3 양태를 형성한다. 상기 약학 조성물, 특히 결직초 세포, 진피 섬유아세포 또는 모유두 세포에서 유래된 상기 약학 조성물은 보통 상처 및 병변 치료에 유용하게 이용된다. 상기 조성물은 또한 상기 배지의 성분이 효과적이라고 알려진 다른 적용에 대하여 사용될 수 있다.

[0033] 바람직한 조성물은 하나 이상의 IL-6, Gro- α , SDF-1, FGF-2, SPARC, PAI-1, IL-8, 콜라겐, 피브로넥틴, I-309, IL-13, MIF 및 SDF-1 및 TGF- β 단백질, 특히 TGF- β 1을 포함한다. 특히 바람직한 조성물은 표 2, 3 또는 4에 실린 하나 이상의 단백질을 포함한다.

[0034] 본 발명의 제1 및 제3 양태의 조성물은 액체로서 약학적으로 이용될 수 있고, 동결, 냉동건조될 수 있고, 막(film)으로 형성될 수 있고 또는 건조되어 분말로 될 수 있다. 상기 조성물은 희석, 농축, 다른 성분과 혼합될 수 있고 또는 부분적 또는 완전히 정제될 수 있다. 상기 조성물은 임의의 적합한 수단에 의해 인체 또는 동물체에 전달될 수 있다. 상기 조건화된 배지는 내부 투여를 위한 운반체로서 약학적으로 허용가능한 담체와 함께 제제화되거나, 상처/병변에 직접 적용되거나, 국소 적용을 위한 고약(salve) 또는 연고(ointment)로 제제화되거나, 또는, 예를 들어, 상처 드레싱(dressing), 이식가능한 조성물 및 의료 장치를 위한 피복을 생성하기 위하여 생분해성 중합체 또는 히드로겔로 만들어지거나 또는 생분해성 중합체 또는 히드로겔에 첨가되거나 또는 그 중 분산될 수 있다. 생분해성 중합체 중에 분산시키는 것의 한 이점은 상기 시스템이 서방성 전달시스템으로 사용될 수 있다는 것이다. 이는 상처의 단백질 분해 환경으로부터의 빠른 분해에 대한 내성이 있어야만 하고 생활성 성분의 지속된 방출을 가져야만 하는 생활성 성분을 중합체로부터 만성 상처로 전달하는 것에 특히 유리하다. 상기 전달 방법이 상기 조건화된 배지가 전달되어야 하는 상기 특정 인비보 적용에 의존적이라는 것은 당업자에게 명백할 것이고 당업자는 그에 따라 어느 수단을 적절하게 이용할 것인지를 결정할 수 있을 것이다.

[0035] 조직은 상기 세포 대신 또는 상기 세포에 추가하여 세포의 분비물을 적용함에 의한 내인성 조직 수복(tissue repair)의 향상을 통해 재생 또는 치유될 것이다. 본 발명은 복수 단백질의 차별적 발현/분비를 포함하는 복

수 수복 과정들이 최적의 조직 수복 및 리모델링에 필요하다는 전제에 기초하고 있다. 본 발명에서 생산된 상기 조건화된 배지는 조직 수복, 리모델링 및 상처 치유에 중요하다고 믿어지고 예를 들어 상처 치유의 인비보 모델에서 고갈되어 보인 많은 조절 단백질(regulatory protein)을 함유한다. 이 단백질의 예는 TGF- β , IL-6, Gro- α , SDF-1, FGF-2, SPARC, PAI-1, IL-8, 콜라겐, 피브로넥틴, I-309, IL-13, MIF 및 SDF-1을 포함한다.

[0036]

TGF- β 1은 피부 상처 치유에서 우세한 TGF- β 단백질이다. 상처 치유에서 TGF- β 1은 염증, 신생혈관형성(angiogenesis), 재상피화(re-epithelialisation) 및 결합 조직 재생(connective tissue regeneration)에 중요하다. 이는 상처의 발생과 함께 증가된 발현을 가지는 것을 밝혔다(Kopecki Z, Luchetti MM, Adams DH, Strudwick X, Mantamadiotis T, Stoppacciaro A, Gabrielli A, Ramsay RG, Cowin AJ, *J Pathol* 2007;211:351-61. Kane CJ, Hebda PA, Mansbridge JN, Hanawalt PC, *J Cell Physiol* 1999;148:157-73). 인비트로 연구는 TGF- β 1이 피브로넥틴, 피브로넥틴 수용체, 및 콜라겐 및 프로테아제 억제제를 포함하는 세포외 기질(extracellular matrix:ECM) 형성과 연관된 유전자 발현을 증가시킴으로써 과립화 형성의 시작을 돋는다는 것을 밝혔다(White L A; Mitchell T I; Brinckerhoff C E, *Biochimica et biophysica acta*, 2000;1490(3):259-68. Mauviel A, Chung KY, Agarwal A, Tamai K, Uitto J, *J Biol Chem* 1996;271:10917-23. Papakonstantinou E, Aletra AJ, Roth M, Tamm M, Karakiulakis G, *Cytokine* 2003, 24: 25-35. Zeng G, McCue HM, Mastrangelo L, Mills AJ, *Exp Cell Res* 1996; 228:271-6). 게다가 인비트로 연구는 TGF- β 1이 콜라겐 기질의 섬유아세포 수축을 촉진하여 상처 수축에 역할을 한다는 것을 보여준다(Meckmongkol TT, Harmon R, McKeown-Longo P, Van De Water L, *Biochem Biophys Res Commun* 2007;360:709-14). 상처 치유의 기질 형성 및 리모델링 기에, TGF- β 1은 콜라겐 생산, 특히 유형 I 및 II에 관여한다(Papakonstantinou E, Aletra AJ, Roth M, Tamm M, Karakiulakis G, *Cytokine* 2003;24:25-35). 과발현된 경우, TGF- β 1은 비대성 및 켈로이드(keloid) 상처의 발달에서도 중요한 역할을 있다고 알려진 결합 조직 성장 인자(connective tissue growth factor, CTGF)를 자극하는 것으로 밝혀졌다(Colwell AS, Phan TT, Kong W, Longaker MT, Lorenz PH, *Plast Reconstr Aesthet Surg* 2005;116:1387-90).

[0037]

IL-6는 상처 치유 반응을 시작하는데 중요한 것으로 밝혀지고 발현은 상처 발생 후에 증가하고, 오래된 상처에서 지속하는 경향이 있다(Sogabe Y, Abe M, Yokoyama Y, Ishikawa, O, *Wound Repair Regen* 2006;14:457-62. Grellner W, Georg T, Wilske J, *Forensic Sci Int* 2000;113:251-64. Finnerty CC, Herndon DN, Przkora R, Pereira CT, Oliveira HM, Queiroz DM, Rocha AM, Jeschke MG, *Shock* 2006;26:13-9). IL-6는 각화세포(keratinocytes)에 대한 유사분열촉진효과(Randle M Gallucci, Dusti K Sloan, Julie M Heck, Anne R Murray and Siyy J O'Dell, *Journal of Investigative Dermatology* (2004) 122, 764-772) 및 증식촉진효과(Sato M, Sawamura D, Ina S, Yaguchi T, Hanada K, Hashimoto I, *Arch Dermatol Res* 1999;291:400-4. Peschen M, Grenz H, Brand-Saberi B, Bunaes M, Simon JC, Schopf E, Vanscheidt W, *Arch Dermatol Res* 1998;290:291-7)가 있고 호중구에 화학유인적이다(chemoattractive).

[0038]

Gro- α (CXCL1) 케모킨은 CXC 패밀리의 일원이고 호중구 화학주성(chemotaxis)의 강력한 조절인자이며 급성 상처에서 상향조절된다. 인비트로 연구는 각화세포의 이동을 촉진시킴으로써 재상피화에 역할을 제시한다(Englehardt E, Toksoy A, Goebeler M, Debus S, Brocker EB, Gillitzer R, *Am J Pathol* 1998;153:1849-60. Christopherson K II, Hromas R, *Stem Cells* 2001;19:388-96).

[0039]

SDF-1(CXCL12)은 림프구를 상처에 보급하고 신생혈관생성을 촉진시킴으로써 염증 반응에 역할을 한다. 급성 상처에서 항상성이 교란된 경우, SDF1은 상처 가장자리에서 증가된 수준으로 나타난다(Toksoy A, Muller V, Gillitzer R, Goebeler M, *Br J Dermatol* 2007;157:1148-54). SDF-1은 상피 세포의 증식 및 이동을 촉진한다(Salcedo R, Wasserman K, Young HA, Grimm MC, Howard OM, Anver MR, Kleinman HK, Murphy WJ, Oppenheim JJ, *Am J Pathol* 1999;154:1125-35). SDF-1은 또한 각화 세포의 증식을 증가시켜서 재상피화에 기여할 수 있다(Florin L, Maas-Szabowski N, Werner S, Szabowski A, Angel P, *J Cell Sci* 2005;118(Pt9):1981-9).

[0040]

FGF-2(bFGF)는 다양한 ECM 성분의 합성 및 침적을 조절하고, 재상피화 중의 각화세포 운동성을 증가시키고(Sogabe Y, Abe M, Yokoyama Y, Ishikawa, O, *Wound Repair Regen* 2006;14:457-62. Grellner W, Georg T, Wilske J, *Forensic Sci Int* 2000;113:251-64. Di Vita G, Patti R, D'costino P, Caruso G, Arcara M, Buscemi S, Bonventre S, Ferlazzo V, Arcoleo F, Cillari E, *Wound Repair Regen* 2006;14:259-64) 섬유아세포의 이동을 촉진시키고 콜라겐제를 생산하기 위해 이들을 자극시킨다(Sasaki T, *J Dermatol*. 1992 Nov;19(11):664-6).

[0041]

SPARC(Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine)는 재생에의 기능을 암시하는(Louise H. Jorgensen, Stine J. Petersson, Jeeva Sellathurai, Ditte C. Andersen, Susanne Thayssen, Dorte J. Sant, Charlotte

H. Jensen and Henrik D. Schroer, *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, Volume 57 (1): 29-39, 2009) 피부 상처를 치유하는 것(Reed MJ, Puolakkainen P, Lane TF, Dickerson D, Bornstein P, Sage EH, *J Histochem Cytochem* 1993, 41:1467-1477)과 같은 리모델링 및 수복하는 동안 여러 조직에서 발현된다. 많은 기질세포 단백질(matricellular protein)은 손상(injury)에 대한 반응에서 증가된 발현을 보여준다(Bradshaw AD, Sage EH, *J Clin Invest* 2001, 107:1049-1054). SPARC는 기질세포 당단백이며, 세포와 ECM의 상호작용을 조절한다. 가속된 피부 상처 봉합 및 변경된 콜라겐 침적은 SPARC-널 마우스에서 보고되었다(Bradshaw AD, Reed MJ, Sage EH, *J Histochem Cytochem* 2002, 50:1-10). 상처 부위에서의 발현 경향 및 인비트로 연구로부터, SPARC는 상처 치유의 제어와 관련되어 있다(Basu A, Kligman LH, Samulewicz SJ, Howe CC, *BMC Cell Biol.* 2001;2:15. Epub 2001 Aug 7).

[0042] PAI-1(SerpineE1)은 플라스민 생성의 중요한 생리학적 조절인자이다. PAI-1은 표피의 각화 세포에 의해 통상적으로 발현되는 것은 아니지만, 인비트로 및 인비보 상처 손상 후 발현이 증가되는 것이 밝혀졌다(Romer J, Lund LR, Eriksen J, Ralfkjaer E, Zeheb R, Gelehrter TD, Dano K, Kristensen P, *J Invest Dermatol* 1991, 97:803-811. Staiano-Coico I, Carano K, Allan VM, Steiner MG, Pagan-Charry I, Bailey BB, Babaar P, Rigas B, Higgins PJ, *Exp Cell Res* 1996, 227:123-134). 상처 치유에서 PAI-1의 역할을 지지하는 연구는 PAI-1 기능의 손실이 가속화된 상처 치유를 야기한다는 것을 나타낸다(Joyce C.Y. Chan, Danielle A. Duszczyszyn, Francis J. Castellino and Victoria A Ploplis, *American Journal of Pathology*. 2001;159:1681-1688). 연구들은 uPA 및 PAI-1은 공간적 및 시간적으로 모두, 재상피화 중 각화세포 및 결합조직 세포의 이동 및, 상처 치유와 관련된 조직 리모델링 동안 그들의 발현이 조절된다는 것을 나타내었다(Romer J, Lund LR, Eriksen J, Ralfkjaer E, Zeheb R, Gelehrter TD, Dano K, Kristensen P, *J Invest Dermatol* 1991, 97:803-811).

[0043] IL-8 발현은 급성 상처에서 증가되고(E, Toksoy A, Goebeler M, Debus S, Brocker EB, Gillitzer R, *Am J Pathol* 1998;153:1849-60), 각화세포 이동 및 증식을 증가시킴으로써 재상피화에 역할을 하는 것으로 밝혀졌다(Michel G, Kemeny L, Peter RU, Beetz A, Reid C, Arenberger P, Ruzicka T, *FEBS Lett* 1992;305:241-3. Tuschil A, Lam C, Haslberger A, Lindley I, *J Invest Dermatol*. 1992 Sep;99(3):294-8). 이는 또한 백혈구의 MMP 발현을 유도하고, 조직 리모델링을 자극한다(Englehardt E, Toksoy A, Goebeler M, Debus S, Brocker EB, Gillitzer R, *Am J Pathol* 1998;153:1849-60). 이는 호중구에 대한 강력한 화학유인인자이며, 따라서 염증 반응에 참여한다(Rennekampff HO, Hansbrough JF, Kiessig V, Doree C, Sticherling M, Schroer JM, *J Surg Res.* 2000 Sep;93(1):41-54). 게다가 높은 수준의 IL-8 침가는 각화 세포 증식 및 섬유아세포에 의한 콜라겐 격자 수축을 감소시킨다(Iocono JA, Colleran KR, Remick DG, Gillespie BW, Ehrlich HP, Garner WL, *Wound Repair Regen.* 2000 May-Jun;8(3):216-25).

[0044] 콜라겐 및 피브로네틴 - 상처 치유의 증식 기는 신생혈관생성, 콜라겐 침적, 과립화 조직 형성, 상피화, 및 상처 수축에 의해 특징 지워진다(Midwood K.S., Williams L.V., and Schwarzbaumer J.E. 2004, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36 (6): 1031-1037). 섬유 증식증(fibroplasia) 및 과립화 조직 형성에서, 섬유아세포는 콜라겐 및 피브로네틴을 분비함으로써 성장하여 새로운 ECM을 형성한다(Midwood K.S., Williams L.V., and Schwarzbaumer J.E. 2004, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36 (6): 1031-1037). 섬유아세포는 염증 단계가 끝남에 따른 상처 과정 후에 2 내지 5일 상처 부위에 들어가기 시작하고, 상처-후(post-wounding) 1 내지 2주에 그들의 수는 최고치가 된다(de la Torre J., Sholar A. (2006), *Wound healing: Chronic wounds*. Emedicine.com, accessed January 20, 2008). 첫 번째 주의 끝에는, 섬유아세포는 상처에서 주된 세포이다(Stadelmann W.K., Digenis A.G. and Tobin G.R. (1998), *The American Journal of Surgery* 176 (2): 26S-38S). 섬유증식증은 상처 후 2 내지 4주에 끝난다. 손상 후의 첫 2 내지 3일 동안, 섬유아세포는 주로 증식 및 이동하고, 반면 그 후에는, 그것들은 상처 부위 중에 콜라겐 기질을 침적하는 1차적인 세포이다(Stadelmann W.K., Digenis A.G. and Tobin G.R. (1998), *The American Journal of Surgery* 176 (2): 26S-38S). 정상 조직의 섬유아세포는 가장자리로부터 상처 부위 안으로 이동한다. 처음에는 섬유아세포는 피브로네틴에 부착하여 염증기에 형성된 피브린 딱지(fibrin scab)를 사용하여 가로질러 이동하고 피브린에 부착한다(Romo T. and Pearson J.M. 2005, *Wound Healing, Skin*. Emedicine.com, accessed December 27, 2006). 다음으로 섬유아세포는 상처 베드에 기질(ground substance)을, 그 다음에는 콜라겐에 기질을 침적시키는데, 이들은 이동을 위해 거기에 부착할 수 있다(Rosenberg L., de la Torre J. (2006), *Wound Healing, Growth Factors*. Emedicine.com, accessed January 20, 2008). 콜라겐 침적은 상기 상처의 강도를 증가시키기 때문에 중요하게 여겨진다; 콜라겐이 침적되기 전에, 피브린-피브로네틴 덩어리는 상처를 폐쇄되도록 지탱한다(Greenhalgh D.G. (1998), *The International*

Journal of Biochemistry & Cell Biology 30 (9): 1019-1030). 또한, 염증, 신생혈관생성, 및 결합 조직 구성 (construction)에 관련된 세포는 섬유아세포에 의해 침적된 콜라겐 기질 상에서 부착, 성장 및 분화한다 (Ruszczak Z. 2003, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55(12): 1595-1611).

[0045] 인간 시토킨 I-309는 작은 당단백이고, 신생혈관생성 중 인간 단핵세포를 특이적으로 자극하는 많은 염증성 시토킨과 구조적으로 관련되어 있다(Miller MD, Krangel MS, *Proc Natl Acad Sci USA* 1992b 89:2950-2954).

[0046] 일반적으로 이러한 인자들의 직접적 첨가에 의해 성장 인자의 공급을 증진시키는 것은 상처 치료에서 바람직하게 생각된다. 이러한 접근방법에 의하여 면역 적합성 및 종양 생성성(tumorigenecity)과 같은 그러나 이에 국한되지는 않는 세포에 기초한 치료법에 관련된 현 문제는 제거될 것이다. 본 발명의 상기 세포 성장 조건화된 세포 배양 배지 및 상기 조건화된 기초 세포 배양 배지는 또한 필요한 것으로 알려진 인자들의 많은 배열이 상기 출원인의 세포 성장 조건화된 세포 배양 배지 및 상기 조건화된 기초 세포 배양 배지에서 발견되기 때문에 조직 또는 손상의 복구 및/또는 재생이 요구되는 다른 유형의 조직 손상 치료에 유용하다.

[0047] 본 발명은 하기 실시예들에 의해 제한 없이 기술된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

세포주의 확립

[0049] 모낭 중간엽 세포는 아래에 기술된 변형과 더불어 EP980270에 실질적으로 기술된 바와 같이 분리되었다. 인간 피부 조직 시료를 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 암포테리신 및 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 젠타미신을 포함하는 Minimal Essential Medium (MEM, Sigma M4655)으로 세 번 세척하였다. 해부 현미경 하에서, 생장기(anagen) '종구(end bulbs)'는 미세한 수술 용 가위로 절개되고 작은 부피의 MEM(전형적으로 100 내지 $200\mu\text{l}$)에 넣었다. 상기 종구는 바늘을 이용하여 반전되고(inverted), 상기 유두(papillae)는 절개되고 상기 초(sheath)는 추출되었다. 상기 유두 및 초는 그후에 4개의 세포 배양 웰 플레이트(Nunc)로 분리되어 이전되었다. 10개의 유두 및 10개의 초가 20% 태아 소 혈청(FBS), $0.5\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 암포테리신 및 $5\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 젠타미신이 보충된 1ml의 MEM 중의 웰마다 이전되었다. 상기 4개의 세포 배양 플레이트는 살균 및 표준조건(37°C , 5% 이산화탄소) 하에서 배양되었다. 세포 성장 10일이 지난 후, 세포는 각 웰로부터 떼어내어지고(당해 분야에서 잘 확립된 표준 방법을 이용) 35mm 직경 세포 배양 접시(Nunc)에 분리되어 이전되었다. 세포 성장이 유착되면, 상기 결직초(이하 'AVDS'라 함) 및 모유두(이하 'AVDP'라 함) 세포주는 앞에서 나타낸 바와 같이 떼어내어지고 위에 기술한 조건 하에서 더 확장하기 위해 T25 세포 배양 플라스크(Nunc)로 전이되었다. 진피 섬유아세포(이하 'AVDF'라 함) 세포주는 위에 기술한 동일한 인간 피부 조직 시료로부터 확립되었다. 상기 유두 진피(papillary dermis)는 망상 진피 및 지방층(adipose layer)으로부터 분리되고 그 다음에 대략 2 내지 3mm^2 표면적의 조각으로 현미경하에서 절개되었다. 절개된 조직은 상기 결직초 및 모유두 세포주를 위해 기술한 것과 같이 보충된 MEM을 함유한 T25 세포 배양 플라스크(Nunc)로 이전되었다. 진피 섬유아세포(AVDF) 세포주를 함유한 상기 T25 세포배양 플라스크는 멸균 및 표준 조건에서 배양되었다(이전에 기술한 바대로). 상기 진피 섬유아세포(AVDF) 세포는 그 다음에 상기 동일한 조건을 사용하여 더 확장되고 그때 상기 배양이 유착에 도달하였다.

[0050] AVDS, AVDP 및 AVDF 세포주는 많은 인간 조직 시료로부터 확립되었다. 하기 예에 기술되는 이러한 세포주의 요약은 아래 표 1에 제공된다.

표 1

세포주 요약

세포주 명칭	타입
AVDP2	Dermal papilla
AVDS4	Dermal sheath
AVDS6	Dermal sheath
AVDF3	Dermal fibroblast
AVDF4	Dermal fibroblast
AVDP3	Dermal Papilla

실시 예 1

[0052] MEM + 10% FBS 중의 정치(static) 배양에서 성장한 AVDF4 및 AVDS4 세포가 수확되었다(당해 분야에서 잘 확립된 표준 방법을 사용). 상기 세포는 50ml MEM + 10% 태아 소 혈청(FBS) 중 플라스크 당 5×10^5 세포에서 225cm² 플라스크에 파종하는데 사용되었고, 4일째에 신선한 배지로 교환하는 것과 함께(MEM + 10% FBS) 37°C, 5% CO₂에서 8일 동안 인큐베이션하였다. 상기 조건화된 배지는 8일째 수확되었고, 분석 전에 여과(0.2μm)되었고 -20°C에서 동결되었다.

[0053] AVDF4 및 AVDS4에서 조건화된 배지는, 키트에서 제공되는 방법을 따라 사람 시토킨 배열 "panel A" 키트(R&D Systems ARY005)를 사용하여 분석하였다. MEM + 10% FBS는 또한 AVDF4 및 AVDS4 성장 배지는 10% FBS를 함유하였기 때문에 대조군으로서 분석되었다. 상기 얻어진 결과는 도면 1에 제시되어 있다. MEM + 10% FBS 대조군에 대하여 증가된 강도를 갖는 것으로 확인되는 점(spot)은 당해 분야에서 잘 기술된 방법을 사용하여 정량되었다. 상기 데이터는 각 막의 양성 대조군 및 MEM+10% FBS 대조군 막의 대응되는 시토킨 점에 대하여 표준화되었다. 도면 2에 나타난 결과는 2배수 시료(duplicate sample)로부터의 AVDS4 및 AVDF4 조건화된 배지에서 확인된 각 시토킨의 상대적인 수준을 나타낸다. 놀랍게도 상기 확인된 시토킨 중에서 사용된("panel A" 키트 중에 포함된 것들에 제한) 시토킨 Gro-α, I-309, IL6, IL-8, PAI-1이 AVDS4 및 AVDF4 세포주 모두에 의해서 생산된 상기 조건화된 배지에서 검출되었다. 이들은 당해 분야에서 상처 치유 과정을 촉진하는데 중요한 것으로 확립되어 있다.

실시예 2

[0054] 혈청이 없는 조건화된 배지가 진피 섬유아세포, 결직초 및 모유두 세포주로부터 준비되었다. AVDF4, AVDS4 및 AVDP2 세포는 MEM + 10% FBS 세포 배양 성장 배지 중 정치 배양에서 37°C, 5% CO₂에서 6일 동안 성장되었다. 상기 세포는 수확되었고(당해 분야에서 잘 확립된 표준 방법 이용) 75cm² 플라스크에 15ml의 MEM + 10% 태아 소 혈청 중 플라스크 당 2×10^6 세포로 분리되어 파종되었다. 상기 플라스크는 37°C, 5% CO₂에서 24시간 동안 인큐베이션되었다. 이러한 인큐베이션 시간 후에 상기 성장 배지는 각 플라스크로부터 제거되고 버려졌다. 세포 단일층은 20ml 인산 완충 염수(PBS)로 세 번 세척되었고 그 다음에 20ml MEM 단독으로(FBS 비함유) 세 번 더 세척되었다. 2mM의 글루타민이 보충된 새로운 MEM(FBS 비함유, 6ml)이 그 후에 각 플라스크로 첨가되고 상기 플라스크는 37°C, 5% CO₂에서 24시간 동안 인큐베이션되었다. 상기 조건화된 기초 배지는 각 플라스크로부터 수확되었고, 분석 전에 여과(0.2μm)되고 -20°C에서 동결 저장되었다. MEM 성장 배지의 시료(FBS 비함유)는 또한 대조군으로도 포함되었다. 시료(8ml)는 해동하고 Amicon Ultra 15 Centriprep 장치(Millipore)를 사용하여 3200 RCF, 45분, 실온에서 250μl로 농축되었다. 각 시료의 200μl는 그 후 Speedvac을 사용하여 두 배 더 농축되었다. 4개의 각 시료의 10μl는 그 다음에 4-20% NuPage(Invitrogen) SDS-PAGE 젤 환원을 사용하여 분석되었고 EZBlue(Sigma)를 사용하여 염색되었다. 상기 SDS-PAGE 젤은 도면 3에 나타난다. 상기 SDS-PAGE 젤의 각 레인(1 내지 4)은 깨끗한 외과용 메스의 칼날로 10개 밴드로 절단되었고, 상기 40개의 밴드 각 단백질은 ProGest 분해 로봇을 위한 표준 과정을 이용하여 트립신으로 분해되었다. 5μl의 상기 각 분해물은 당해 분야에서 잘 확립된 것과 같은 LC-MS-MS를 사용하여 Thermo LTQ XL Orbitrap Electrospray 질량 분석기로 분석되었다. MS-MS 스펙트럼은 Mascot(Matrixscience) 및 Sequest(Thermo) 검색 엔진 및 ProteomeDiscoverer(Thermo) Interface를 이용하여 Swissprot 데이터베이스의 최근 버전에 대하여 검색되었다. 검색 매개변수는 매우 엄격하게 고정되었다(FDR < 1%). 확인된 상기 단백질은 각 AVDP2, AVDF4 및 AVDS4로부터 조건화된 배지에 대하여 표 2, 3 및 4에 각각 제시되어 있다.

표 2

AVDP2 조건화된 기초 세포 배양 배지에서 확인된 단백질

확인된 단백질		
45 kDa 칼슘-결합 단백질	필라민-A	포스포글리세레이트 키나제 1
6-포스포글루코노락톤아제	필라민-B	포스포글리세레이트 뮤타아제 1
72 kDa 유형 IV 콜라겐아제	필라민-C	포스포세린 아미노트란스퍼라제
아브히드롤라제 도메인-함유 단백질14B	FK506-결합 단백질 9	색소 상피세포-유래 인자

아디포사이트 인핸서-결합 단백질 1	프력토스-비스포스페이트 알돌라제 A	플라스미노겐 액티베이터 억제제 1
알콜 데히드로게나제 [NADP+]	갈렉틴-1	플렉틴-1
알도스 리덕타제	갈렉틴-3-결합 단백질	폴리펩티드 N-아세틸갈락토스아미닐트란스퍼라제 10
알파-2-매크로글로불린	감마-글루타밀 히드롤라제	폴리펩티드 N-아세틸갈락토스아미닐트란스퍼라제 2
알파-액티닌-4	겔솔린	폴리펩티드 N-아세틸갈락토스아미닐트란스퍼라제 5
알파-에놀라제	글리아-유래 네신	임신-특이적 베타-1-글리코단백질 5
아넥신 A1	글루코스-6-포스페이트 이소머라제	프로콜라겐 C-엔도펩ти다제 인해서 1
아스파테이트 아미노트란스퍼라제, 세포질	글루타티온 S-트란스퍼라제 P	프로콜라겐-리신, 2-옥소글루타레이트 5-디옥시게나제 1
ATP 신타제 서브유니트 베타, 미토콘드리아	글루타티온 트란스퍼라제 오메가-1	프로콜라겐-리신, 2-옥시글루타레이트 5-디옥시게나제 2
기저막-특이적 혜파란 술페이트 프로테오글리칸 코어 단백질	글리세르알데히드-3-포스페이트 데히드로게나제	프로콜라겐-리신, 2-옥소글루타레이트 5-옥시게나제 3
이작용성 아스파토키나제/호모 세린 데히드로게나제 1	글리실-tRNA 신타제	프로필린-1
비글리칸	열충격 70 kDa 단백질 6	단밸질 디슬피드-이소머라제 A6
빌리베르딘 리덕타제 A	열 충격 단백질 베타-1	단백질 S100-A6
카드해린-11	헵-결합 단백질 2	퓨린 뉴클레오시드 포스포릴아제
칼신테닌-1	HLA 클래스 I 조직적합성 항원, 알파 사슬 G	추정되는 비균질 핵 리보뉴클레오단밸질 A1-유사 단밸질 3
칼루메닌	히알루로난 및 프로테오글리칸 연결 단백질 1	추정되는 뉴클레오시드 디포스페이트 키나제
카르보닐 리덕타제 [NADPH] 1	불활성 세린 프로테아제 RAMP	추정되는 쿠논 옥시도리덕타제
연골 올리고머릭 기질 단백질	인슐린-유사 성장 인자-결합 단백질 2	피루베이트 키나제 아이소자임 M1/M2
카텝신 B	인슐린-유사 성장 인자-결합 단백질 3	쿠논 옥시도리덕타제
카텝신 Z	인슐린-유사 성장 인자-결합 단백질 4	Rab GDP 해리 억제제 알파
CD109 항원	인슐린-유사 성장 인자-결합 단백질 6	Rab GDP 해리 억제제 베타
CD166 항원	인슐린-유사 성장 인자-결합 단백질 7	Ras GTP아제-활성화-유사 단백질 IQGAP1
클로리드 세포내 채널 단백질 1	인테그린 베타-유사 단백질 1	레티콜로칼빈-1
콘드로이틴 술페이트 프로테오글리칸 4	간질성 콜라게나제	Rho GDP-해리 억제제 1
클러스터린	케라틴, 유형 I 세포골격 9	스캐빈저 수용체 시스테인-고함유 도메인-함유 단백질 LOC284297
콜라겐 알파-1(I) 사슬	키네신-유사 단백질 KIF7	세마포린-7A
콜라겐 알파-1(III) 사슬	락토일글루타티온 라이아제	세린 프로테아제 HTRA1
콜라겐 알파-1(IV) 사슬 콜라겐 알파-1(IV) 사슬	라민-A/C	세르핀 B6
콜라겐 알파-1(V) 사슬	라미닌 서브유닛 베타-1	세르핀 B7
콜라겐 알파-1(VI) 사슬	잠복-변형 성장 인자 베타-결합 단백질 2	헬청 알부민
콜라겐 알파-1(VII) 사슬	잠복-변형 성장 인자 베타-결합 단백질, 이소폼 1S	S-포르밀글루타티온 히드롤라제
콜라겐 알파-1(XI) 사슬	루신-고함유 반복-함유 단백질 15	스탄니오칼신-2
콜라겐 알파-1(XII) 사슬	루신-고함유 반복-함유 단백질 40	스트로메리신-1
콜라겐 알파-2(I) 사슬	L-락테이트 데히드로게나제 A 사슬	술프하드릴 옥시다제 1
콜라겐 알파-2(IV) 사슬	L-락테이트 데히드로게나제 B 사슬	네쉬-SH3의 타겟
콜라겐 알파-2(V) 사슬	루미칸	티오래독신 도메인-함유 단백질 5
콜라겐 알파-2(VI) 사슬	리실 옥시다네 호몰로그 2	티오래독신-의존성 폐록시드 리덕타제, 미토콘드리아
콜라겐 알파-3(VI) 사슬	말레이트 데히드로게나제, 세포질	트롭보스폰딘-1
보체 C1q 종양 괴사 인자-관련 단백질 5	말레이트 데히드로게나제, 미토콘드리아	트란스알돌라제
C-유형 렉틴 도메인 패밀리 11 멤버 A	포유류 에펜디민-관련 단백질 1	변형 성장 인자-베타-유도 단백질 ig-h3
시스타틴-C	기질-리모델링-관련 단백질 8	트란스케톨라제
딕코프-관련 단백질 3	메탈로프로티나제 억제제 1	트립신-3

데히드로파리미딘아제-관련 단백질 2	미토콘드리아 분열 인자 호몰로그 A	트립토파닐-tRNA 신타제, 세포질
DNA-(아프리미딘산 또는 아프리미딘산 부위) 라이아제	모에신	유비퀴논 생합성 단백질 COQ7 호몰로그
EGF-함유 피불린-유사 세포외기질 단백질 2	뉴로필린-1	유비퀴논 카르복실-터미널 히드롤라제 이소머라제 L1
소포체 아미노펩티다제 1	뉴클레오빈딘-1	유비퀴틴-유사 변경-활성 효소 1
소포체 단백질 ERp29	올팍토메딘-유사 단백질 2B	비특성화된 메탈로포스포에스터라제 CSTP1
엔도시알린	올팍토메딘-유사 단백질 3	유로키나제-유형 플라스미노겐 활성자
세포외 기질 단백질 1	첫번째 단백질 호몰로그에서 밖(Out at first protein homolog)	바소린
F-액틴-캐핑 단백질 서브유니트 알파-1	펩티딜-프롤릴 시스-트란스 이소머라제 B	베르시칸 코어 단백질
파신	페록시다신 호몰로그	비멘틴
피브릴린-1	페록시레독신-1	빈쿨린
피브로넥틴	페록시레독신-4	WD 반복-함유 단백질 1
피불린-1	페록시레독신-6	Xaa-프로 디펩티다제
필라그린-2	포스파티딜에탄올아민-결합 단백질 1	진크 핑거 단백질 276

표 3

AVDF4 조건화된 기초 세포 배양 배지에서 확인된 단백질

[0056]

확인된 단백질		
2',3'-환상-뉴클레오티드 2'-포스포디에스터라제	피브로넥틴	플라스미노겐 활성자 억제제 1
45 kDa 칼슘-결합 단백질	피불린-1	플라스틴-3
60 kDa 열 충격 단백질, 미토콘드리아	필라민-A	임신-특이적 베타-1-글리코단백질 5
72 kDa 유형 IV 콜라게나제	필라민-B	프로콜라겐 C-엔도펩티다제 인핸서 1
아그레кан 코어 단백질	필라민-C	프로콜라겐-리신, 2-옥소글루타레이트 5-디옥시게나제 1
알도스 리덕타제	FK506-결합 단백질 10	프로콜라겐-리신, 2-옥소글루타레이트 5-디옥시게나제 2
알파-2-매크로글로불린	프력토스-비스포스페이트 알돌라제 A	프로콜라겐-리신, 2-옥소글루타레이트 5-디옥시게나제 3
알파-액티닌-4	갈락チン-3-결합 단백질	프로필린-1
알파-에놀라제	감마-글루타밀 히드롤라제	프롤릴 3-히드록실라제 1
아릴슬파타제 B	겔솔린	단백질 BCCIP 호몰로그
아스파테이트 아미노트란스퍼라제, 미토콘드리아	글루코스-6-포스페이트 이소머라제	단백질 디슬피드-이소머라제 A6
ATP아제 패밀리 AAA 도메인-함유 단백질 5	열 충격 단백질 베타-1	단백질 ZNF750
밴드 3 음이온 수송 단백질	면역글로불린 수퍼패밀리 함유 루신-고함유 반복 단백질	추정 비균질 핵 리보누클레오단백질 A1-유사 단백질 3
기저막-특이적 혜파란 슬페이트 프로테오글리칸 코어 단백질	불활성 세린 프로테아제 RAMP	추정 뉴클레오시드 디포스페이트 키나제
비글리칸	인슐린-유사 성장 인자-결합 단백질 4	피루베이트 키나제 이소자임 M1/M2
비오티니다제	인슐린-유사 성장 인자-결합 단백질 6	Rab GDP 해리 억제제 알파
칼신테닌-1	인슐린-유사 성장 인자-결합 단백질 7	Rab GDP 해리 억제제 베타
칼루메닌	인테그린 베타-유사 단백질 1	Ras GTP아제-활성-유사 단백질 IQGAP1
연골 올리고머릭 기질 단백질	간질성 콜라게나제	리티콜로칼빈-1
카텝신 B	라미닌 서브유니트 알파-4	세마포린-7A
카텝신 Z	라미닌 서브유니트 베타-1	세린 프로티아제 HTRA1

CD109 항원	라미닌 서브유니트 감마-1	세르핀 B6
콜라겐 알파-1(I) 사슬	잠복-변형 성장 인자 베타-결합 단백질 2	세르핀 B7
콜라겐 알파-1(III) 사슬	잠복-변형 성장 인자 베타-결합 단백질, 이성체 1S	스탄니오칼신-2
콜라겐 알파-1(IV) 사슬	L-락테이트 데히드로게나제 A 사슬	연골메리신-1
콜라겐 알파-1(V) 사슬	루미칸	슬프히드릴 옥시다제 1
콜라겐 알파-1(VI) 사슬	리실 옥시다제 호몰로그 2	테스티칸-1
콜라겐 알파-1(XII) 사슬	매크로파지 메탈로엘라스타제	티오레독신 도메인-함유 단백질 5
콜라겐 알파-2(I) 사슬	말레이트 데히드로게나제, 세포질	트롭보스폰딘-1
콜라겐 알파-2(V) 사슬	기질-리모델링 단백질 5	트롭보스폰딘-2
콜라겐 알파-2(VI) 사슬	기질-리모델링-관련 단백질 8	트란스알돌라제
콜라겐 알파-3(IV) 사슬	메탈로프로티나제 억제제 1	변형 성장 인자-베타-유도 단백질 ig-h3
콜라겐 알파-3(VI) 사슬	모에신	트란스겔린
콜라겐 트리플 헬릭스 반복-함유 단백질 1	니도겐-1	트란스케톨라제
보체 C1r 서브컴포넌트	올팍토메딘-유사 단백질 3	트립토파닐-tRNA 신타제, 세포질
보체 C1s 서브컴포넌트	올팍토 수용체 5C1	티로신-단백질 키나제 수용체 UFO
덕코프-관련 단백질 3	첫번째 단백질 호몰로그에서 밖(Out at first protein homolog)	유비퀴틴 카르복실-터미널 헤드 롤라제 이소자입 L1
디히드로리포일 데히드로게나제, 미토콘드리아	펩티딜-프롤릴 시스-트란스 이소머라제 B	유비퀴틴-유사 변경-활성화 효소 1
데히드로피리미딘아제-관련 단백질 2	페리오스틴	바소린
EGF-함유 피볼린-유사 세포외 기질 단백질 2	페록시레독신-1	비멘틴
소포체 단백질 ERp29	포스포글리세레이트 키나제 1	빈콜린
세포외 기질 단백질 1	포스포글리세레이트 뮤타제 1	비트로넥틴
파신	포스포세린 아미노트란스퍼라제	WD 반복-함유 단백질 1
피브릴린-1	색소 상피세포-유래 인자	

표 4

AVDS4 조건화된 기초 세포 배양 배지에서 확인된 단백질

확인된 단백질		
45 kDa 칼슘-결합 단백질	세포외 기질 단백질 1	뉴클레오빈딘-2
60 kDa 열 충격 단백질, 미토콘드리아	에즈린	올팍토메딘-유사 단백질 3
72 kDa 유형 IV 콜라게나제	파신	펩티딜-프롤릴 시스-트란스 이소머라제 B
78 kDa 글루코스-조절된 단백질	피브릴린-1	페리오스틴
아데닐릴 시클라제-관련 단백질 1	피브릴린-2	페록시다신 호몰로그
알도스 리덕타제	피브로넥틴	페록시레독신-1
알파-2-매크로글로불린	피볼린-1	페록시레독신-6
알파-액티닌-4	필라민-A	포스포글리세레이트 키나제 1
알파-에놀라제	필라민-B	포스포글리세레이트 뮤타제 1
알파-N-아세틸글루코사미니다제	필라민-C	포스포세린 아미노트란스퍼라제
아스파테이트 아미노트란스퍼라제, 세포질	프럭토스-비스포스페이트 알돌라제 A	색소 상피세포-유래 인자
아스파테이트 아미노트란스퍼라제, 미토콘드리아	프럭토스-비스포스페이트 알돌라제 C	플라스미노겐 활성화 억제제 1
밴드 3 음이온 수송 단백질	갈렉틴-1	헬소판-유래 성장 인자 D
기저막-특이적 혜파란 슬레이트 프로테오글리칸 코어 단백질	갈렉틴-3-결합 단백질	플렉틴-1

베타-1,4-갈락토실트란스페라제 5	감마-글루타밀 히드롤라제	폴리펩티드 N-아세틸갈락토스아미닐 트란스페라제 10
비글리칸	겔솔린	폴리펩티드 N-아세틸갈락토스아미닐 트란스페라제 2
비오티니다제	아교세포-유래 넥신	프로콜라겐 C-엔도펩티다제 인핸서 1
카드헤린-11	글루코스-6-포스페이트 이소머라제	프로콜라겐-리신, 2-옥소글루타레이트 5-디옥시게나제 1
카드헤린-2	글루타티온 S-트란스페라제 P	프로콜라겐-리신, 2-옥소글루타레이트 5-디옥시게나제 2
칼신태닌-1	글루타티온 트란스페라제 오메가-1	프로콜라겐-리신, 2-옥소글루타레이트 5-디옥시게나제 3
칼루메닌	글리세르알데히드-3-포스페이트 데하이드로게나제	프로필린-1
연골 올리고머릭 기질 단백질	글리실-tRNA 신타제	프롤릴 3-히드록실라제 1
카텝신 B	G-단백질 연관 수용체 143	단백질 디슬피드-이소머라제 A6
카텝신 D	열 충격 70 kDa 단백질 6	단백질 ZNF750
카텝신 Z	열 충격 단백질 베타-1	추정 비균일 핵 리보뉴클레오단백질 A1-유사 단백질 3
CD 109 항원	히알루로난 및 프로테오글리칸 연결 단백질 1	추정 뉴클레오시드 디포스페이트 키나제
CD166 항원	Ig 갑마-1 사슬 C 부위	피루베이트 키나제 이소자임 M1/M2
CD44 항원	면역글로불린 슈퍼페밀리 포함 루신-고 함유 반복 단백질	Rab GDP 해리 억제제 알파
클로리드 세포내 채널 단백질 1	인히빈 베타 A 사슬	Rab GDP 해리 억제제 베타
콜라겐 알파-1(I) 사슬	인슐린-유사 성장 인자-결합 단백질 4	Ras GTP아제-활성-유사-단백질 IQGAP1
콜라겐 알파-1(III) 사슬	인슐린-유사 성장 인자-결합 단백질 6	레티클로칼빈-1
콜라겐 알파-1(IV) 사슬	인슐린-유사 성장 인자-결합 단백질 7	세마포린-7A
콜라겐 알파-1(V) 사슬	인테그린 베타-유사 단백질 1	세린 프로테아제 HTRA1
콜라겐 알파-1(VI) 사슬	간질성 콜라게나제	세르핀 B6
콜라겐 알파-1(VII) 사슬	라민-A/C	세르핀 B7
콜라겐 알파-1(XI) 사슬	잠복-변형 성장 인자 베타-결합 단백질 2	스탄니오칼신-2
콜라겐 알파-1(XII) 사슬	잠복-변형 성장 인자 베타-결합 단백질, 이성체 1S	스트로멜리신-1
콜라겐 알파-2(I) 사슬	레구마인	솔프히드릴 옥시다제 1
콜라겐 알파-2(IV) 사슬	루신-고함유 반복-포함 단백질 15	테스티칸-1
콜라겐 알파-2(V) 사슬	L-락테이트 데하이드로게나제 A 사슬	티오레독신 도메인-포함 단백질 5
콜라겐 알파-2(VI) 사슬	루미칸	트롭보스폰딘-1
콜라겐 알파-3(VI) 사슬	리실 옥시다제 호몰로그 2	트롭보스폰딘-2
보체 C1r 서브컴포넌트	매크로파지 만노스 수용체 2	트란스알돌라제
C-유형 렉틴 도메인 패밀리 11 멤버 A	매크로파지 이동 억제성 인자	변형 성장 인자-베타-유도 단백질 ig-h3
시클린-A2	말레이트 데하이드로게나제, 세포질	트란스겔린
시스타틴-C	말레이트 데하이드로게나제, 미토콘드리아	트란스케톨라제
데코린	기질-리모델링-관련 단백질 5	트립토파닐 t-RNA 신타제, 세포질
딕코프-관련 단백질 3	메탈로프로ти나제 억제제 1	티로신-단백질 키나제 수용체 UFO
디하이드로리포일 데하이드로게나제, 미토콘드리아	마이크로피브릴-관련 단백질 2	유비퀴틴 카르복실-터미널 히드롤라제 이소자임 L1
디펩티딜-펩티다제 3	마이크로피브릴-관련 단백질 5	유비퀴틴-유사 변형-활성화 효소 1
DnaJ 호몰로그 서브패밀리 멤버 4	모에신	바소린
디스트로글리칸	모에신/에즈린/라딕신 호몰로그 1	비멘틴
EGF-포함 피볼린-유사 세포외 기질 단백질 2	뉴로필린-1	빈쿨린
연장 인자 1-갑마	니도겐-1	비트로넥틴
소포체 단백질 ERp29	핵 수용체 공활성체	WD 반복-포함 단백질 1
엔도시알린	뉴클레오빈딘-1	

[0058]

놀랍게도 총 177개의 상이한 인간 단백질이 세포주 AVDP2로부터 조건화된 기초 세포 배양 배지에서 확인되었고, 세포주 AVDF4로부터 조건화된 기초 배지에서 131개의 상이한 인간 단백질 및 세포주 AVDS4로부터 조건화된 기초 배지에서 167개의 상이한 인간 단백질이 확인되었다. 이것은 상기 조건화된 기초 세포 배양 배지를 생산하기 위해 사용된 상기 상태적으로 짧은 인큐베이션 기간 및 기초 세포 배양 배지를 고려하면 특히 예상할 수 없는 것이었다. 이 문서에 기술된 상기 세포는 그래서 일부 또는 모든 이러한 단백질, 또는 상기 세포들에 의해 분비 또는 발현된 임의의 단백질 또는 다른 분자의 기원으로서 사용될 수 있다. 당업자는 상기 분석이 상처 치유에 중요한 것으로서 당해 분야에서 확립된 단백질의 존재를 나타낸다고 평가하고, 새로운 단백질이 확인되었다고 평가할 것이다. 어떻게 상기 세 가지 세포주의 차이가 상기 조건화된 기초 세포 배양 배지의 서로 다른 물리적 구체예를 생산하기 위하여 사용될 수 있을 것인지 또는 어떻게 상기 조건화된 기초 세포 배양 배지가 더 처리되어 예를 들어 한외여과, 정용여과(diafiltration) 또는 크로마토그래피 정제를 사용하여 하나 이상의 인자 또는 성분을 농축 또는 감소시킬 수 있을지 당업자에게 명백할 것이다.

실 시 예 3

[0059]

정치 배양 조건에서 성장한 225cm^2 세포 성장 플라스크(Nunc)의 진피 섬유아세포 AVDF3을 떼어내고 당해 분야에서 잘 기술된 방법을 사용하여 세포수를 결정하였다. 2mM 글루타민(Sigma)로 보충된 혈청이 없는 성장 배지의 330ml의 총 부피 중 1.5g/L(상기 제조자에 의하여 기술된 바에 따라 제조된) Cultispher S 미세담체를 포함하는 1.5L 세포 배양 스피너 플라스크에 파종하기 위해 2.3×10^6 의 세포가 사용되었다. 상기 스피너 플라스크의 상부 공간(head space)은 5% CO_2 , 2% O_2 기체로 평형화되었다. 상기 스피너 플라스크는 37°C의 세포 인큐베이터에 이전하고 마그네틱 교반기 베이스를 사용하여 35rpm에서 교반되었다. 상기 기술된 조건에서 4일간 배양한 후에 세포 배양 상청액 35ml는 스피너 플라스크에서 제거되고 혈청 없는 성장 배지로 대체되었다(위에서 기술). 인큐베이션 5일 및 7일에, 배양 상청액 50ml는 제거되고 위에서 기술한 바와 같이 새로운 혈청 없는 배지로 교체되었다. 8일째에, 배양 상청액 80ml가 제거되고 새로운 혈청 없는 배지로 대체되었다. 배양의 총 10일 후에 상기 AVDF3 세포는 당해 분야에서 잘 알려진 방법을 사용하여 미세담체로부터 떼어내어졌다. 2mM 글루타민, 0.2% 플로닉 F-68 및 1.5g/L(이전에 기술된 대로 준비한) Cultispher S 미세담체로 보충된 혈청 없는 성장 배지의 총 부피 2L 중 글라스 세포 배양 생물반응기(Applikon)를 접종하기 위해 1.35×10^7 세포를 사용하였다. 상기 생물반응기는 온도 36.5°C, pH 7.0(이산화탄소 기체 살포(sparging) 및/또는 수산화나트륨 첨가에 의해 수동제어), 용존 산소 장력 5.0%(공기 포화) 및 상기 배양 과정에 걸쳐 점진적으로 60rpm까지 증가되는 40rpm 교반기 속도에서 배양되었다. 상기 세포 배양 중의 용존 산소 수준은 CO_2 및 N_2 기체 살포를 이용하여 유지되었다. 에멀젼 C 소포제(Sigma)는 발포가 관찰되면 상기 생물반응기에 넣었다. 기술한 상기 조건에서 4일간 배양한 후에, 배양 상청액 200ml는 생물반응기로부터 제거되고 (상기 기술된 바와 같이) 새로운 혈청 없는 성장 배지으로 대체되었다. 6, 8, 10, 11, 13, 15, 17 및 21일에 추가적 배양 상청액 200ml가 제거되고 새로운 혈청 없는 성장 배지(상기 기술)으로 대체되었다. 배양 17일 후에, 200ml의 배양물(배지 및 세포 부착된 미세담체)은 무균적으로 수확되었다. 상기 수확된 배양물은 4개의 50ml 원뿔 모양의 시료 튜브로 균등하게 분액되고 상기 세포 부착된 미세담체는 중력에 의해 시료 튜브의 바닥으로 침전되게 하였다. 미세담체 없는 배양 배지는 조심스럽게 제거하고 상기 침전된 세포 부착된 미세담체는 본래 세포 배양으로부터 다 쓴 성장 배지의 미량물질을 제거하기 위해 PBS로 처음 세 번 세척하고 MEM(PBS 미포함)으로 세 번 더 세척되었다. 상기 세포 부착된 미세담체는 45ml MEM(FBS 미포함) + 2mM 글루타민의 최종 15ml 부피에 합쳐졌다. 이 혼탁액은 대략 플라스크 당 2×10^6 세포로 $3 \times \text{E}125$ 진탕 플라스크에 파종하기 위해 사용되었다. 상기 플라스크의 상부공간은 5% CO_2 , 2% O_2 기체로 평형화되고 37°C, 60rpm에서 24시간 동안 오르비탈 진탕기(orbital shaker)로 이전되었다. 상기 조건화된 기초 배지는 분석에 앞서 각 플라스크로부터 수확되고, $0.2\mu\text{m}$ 필터를 사용하여 여과되고, -20°C에 저장되었다.

실 시 예 4

[0060]

정치 배양 조건에서 성장한 진피 섬유아세포 AVDP3의 2개의 225cm^2 세포 배양 플라스크(Nunc)는 떼어내어지고 당해 분야에서 잘 기술된 방법을 사용하여 세웠다. 2.4×10^6 세포는 4mM 글루타민으로 보충된 MesenPro 성장 배지(저혈청, Invitrogen)의 총 부피 300ml의 1.5g/L Cultispher S 미세담체(이전에 기술된 대로 준비된)를 포함하는 1.5L 세포 배양 스피너 플라스크에 파종하기 위하여 사용되었다. 상기 스피너 플라스크의 상부공간

은 5% CO₂, 2% O₂ 기체로 평형화되었다. 상기 스피너 플라스크는 37°C에서 세포 배양 인큐베이터로 이전되고 마그네틱 교반기 베이스를 사용하여 35rpm에서 교반되었다. 상기 기술된 조건에서 3일 동안 인큐베이션한 후 세포 배양 상청액의 80ml는 상기 스피너 플라스크로부터 제거되고(상기 기술한 대로) 새로운 성장 배지로 대체되었다. 상기 기술된 조건에서 총 9일 동안 인큐베이션한 후, 10ml 시료를 상기 스피너 플라스크로부터 수거하고 세포수 및 세포 생존력을 당해 분야에서 잘 기술된 표준 방법을 이용하여 결정하였다. 상기 세포수 및 세포 생존력은 상기 미세담체에 부착된 상기 스피너 플라스크에 보류된 생세포 총수를 추정하기 위해 사용되었다. 세포 부착된 상기 미세담체는 위에서 기술한대로 PBS를 사용하여 세척하고 그 다음에 최종 부피 75ml MEM(FBS 미포함)에 혼탁하고 미세담체에 부착된 대략 2.5×10^7 세포로 하나의 250ml 진탕 플라스크에 과종하기 위해 사용되었다. 상기 플라스크의 상부 공간은 5% CO₂, 2% O₂ 기체로 평형화되고 37°C, 60rpm에서 24시간 동안 오르비탈 교반기에 이전되었다. 상기 조건화된 기초 배지는 분석 전에 상기 플라스크로부터 수확되고, 0.2μm 필터를 이용하여 여과되고, -20°C에서 저장되었다.

[0061] 정치 배양 조건에서 성장한 진피 섬유아세포 AVDS6의 2개의 225cm² 세포 배양 플라스크(Nunc)는 떼어내어지고 당해 분야에서 잘 기술된 방법을 사용하여 세웠다. 2.4 x 10⁶ 세포는 4mM 글루타민으로 보충된 MesenPro 성장 배지(Invitrogen)의 총 부피 300ml의 1.5g/L CultiSpher S 미세담체(이전에 기술한 대로 준비된)를 포함하는 1.5L 세포 배양 스피너 플라스크에 과종하기 위하여 사용되었다. 상기 스피너 플라스크의 상부 공간은 5% CO₂, 2% O₂ 기체로 평형화되었다. 상기 스피너 플라스크는 37°C에서 세포 배양 인큐베이터로 이전되고 마그네틱 교반기 베이스를 사용하여 35rpm에서 교반되었다. 상기 기술된 조건에서 3일 동안 배양한 후 세포 배양 상청액의 80ml는 상기 스피너 플라스크로부터 제거되고(상기 기술한 대로) 새로운 성장 배지로 대체되었다. 상기 기술된 조건에서 총 9일 동안 인큐베이션한 후, 10ml 시료를 상기 스피너 플라스크로부터 수거하고 세포수 및 세포 생존력을 당해 분야에서 잘 기술된 표준 방법을 사용하여 결정하였다. 상기 세포수 및 세포 생존력은 상기 스피너 플라스크에 보류된 생세포 총수를 추정하기 위해 사용되었다. 세포 부착된 상기 미세담체는 위에서 기술한 대로 PBS를 사용하여 세척되고 그 다음에 최종 부피 54ml MEM(FBS 미포함)에 합쳐지고 미세담체에 부착된 대략 1.8×10^7 세포로 하나의 250ml 진탕 플라스크에 과종하기 위해 사용되었다. 상기 플라스크의 상부 공간은 5% CO₂, 2% O₂ 기체로 평형화되고 37°C, 60rpm에서 24시간 동안 오르비탈 교반기에 이전되었다. 상기 조건화된 기초 배지는 분석 전에 상기 플라스크로부터 수확되고, 0.2μm 필터를 이용하여 여과되고, -20°C에서 저장되었다.

실시 예 5

[0062] AVDF4, AVDS4 및 AVDP2(실시예 1 및 2에서 기술한 대로 준비한), AVDF3(실시예 3에서 기술한 대로 준비한) 및 AVDS6 및 AVDP3(실시예 4에서 기술한 대로 준비한)로부터의 조건화된 배지는 SearchLight Array Technology(Aushon Biosystems Inc.)을 사용하여 분석되었다. MEM 및 MEM + 10% FBS 성장 배지는 대조군으로서 포함되었다. Aushon SearchLight Protein Array Technology는 각 포획-항체가 96-웰 미세플레이트의 각 웰 안에 배열로 스팍팅 된 분석물(analyte)의 화학발광 또는 형광 검출에 기초하는 다중화(multiplexing) 샌드위치-ELISA 시스템이다. 16개까지의 분석물(각 웰마다 4 x 4 배열)이 웰마다 측정될 수 있고, 그래서 16개의 시토킨 또는 다른 바이오마커가 각 시료(50μl)에서 동시에 분석될 수 있다. 시료는 TGFβ-1, IL-6, IL-8 및 PAI-1 수준에 대하여 분석되었다. 상기 조건화된 배지/조건화된 기초 배지 시료에서 확인된 각 단백질의 농도는 도 4, 5, 6 및 7에 제시되어 있다. 시료는 숫자 1 내지 10으로 명명되고 이를 시료의 실체는 표 5에 표시되어 있다.

표 5

시료 실체

시료 번호	세포주 명칭	조건화된 배지 생산 방법
1	MEM 대조군	-
2	AVDF3	실시예 3
3	AVDS6	실시예 4
4	AVDP3	실시예 4
5	AVDS4	실시예 1

6	AVDF4	실시예 1
7	AVDP2	실시예 2
8	AVDS4	실시예 2
9	AVDF4	실시예 2
10	MEM + 10% FBS 대조군	-

[0064]

도 4-7에 제시된 데이터는 상처 치유와 관련된 중요한 단백질(TGF β -1, IL-6, IL-8 및 PAI-1)이 상기 3개 새로운 세포 유형 AVDS, AVDP 및 AVDF로부터 조건화된 배지에서 검출 및 정량될 수 있다는 것을 입증한다. 상기 조건화된 세포 배양 배지 또는 조건화된 기초 세포 배양 배지 중의 단백질 수준은 사용된 상기 세포 농도 및/ 또는 상기 성장 배지 조성 및/또는 상기 세포 배양 시스템을 조정함으로써 변화될 수 있다. 어떻게 상기 세포 배양 성장 조건, 사용된 세포주의 추가적 개발이 미세담체에 부착된 세포수를 증가시키기 위하여 수행될 수 있는지 및 조건화된 기초 세포 배지를 생산할 때 어떻게 이것이 단백질의 분비에 영향을 미치는지는 당업자에게 또한 명백할 것이다. 미세담체에 부착된 세포를 사용한 2L 교반 수조 세포 배양 생물반응기를 이용하여 생성된 상기 데이터가 본 발명의 물리적 구체예의 대규모 생산을 위한 규모변경 가능하고 경제적인 제조 시스템인 조건화된 기초 배지를 생산하는 것을 입증한다는 것은 당업자에게 명백할 것이다. 미세담체가 침전될 수 있는 세포를 확장하기 위한 미세담체에 기초한 생물반응기 공정이 완료되었을 때에, 조건화된 배지가 수확되고 및/또는 미세담체에 부착한 세포가 인시튜에서 세척되고 기초 세포 배양 배지에서 인큐베이션된다는 것은 당업자에게 명백할 것이다. 상기 조건화된 기초 배지는 상기 미세담체의 인시튜 침전(중력 침전) 및 세포 없는 조건화된 기초 세포 배양 배지를 경사함으로써 쉽게 수확할 수 있다.

실시예 6

[0065]

AVDF4, AVDS4 및 AVDP2(실시예 1 및 2에 기술한 대로 준비한), AVDF3(실시예 3에 기술한 대로 준비한) 및 AVDS6 및 AVDP3(실시예 4에 기술한 대로 준비한)으로부터 조건화된 배지는 당해 분야에서 잘 확립된 바와 같은 웨스턴 블로팅에 의해 분석되었다. 간단히, 시료는 환원되고 MES 전개 완충액(running buffer)을 사용한 SeeBlue 분자 중량 마커(molecular weight marker, Invitrogen)를 사용한 4-12% BisTris 겔(Invitrogen)에서 전개되었다. 상기 시료는 그 후에 PVDF 막으로 이전되었다. 블로팅 후, 상기 막은 실온에서 한 시간 동안 진동(rocking) 플랫폼에서 15ml의 차단 완충액(blocking buffer, PBS + 1% BSA)중에 인큐베이션되었다. 상기 차단 완충액은 경사되고 상기 막은 하루 밤 동안 4°C에서 생쥐 단일클론 항-SPARC 항체(Sigma WH0006678M2)의 1/2000 희석액 8ml중에서 인큐베이션되었다. 상기 막은 그 후에 진동 플랫폼 상에서 실온에서 각 5분간 15ml PBS + 0.05% Tween 20로 세 번 세척되었다. 토끼 항-생쥐 IgG(전체 분자)-페록시다제(Sigma A9044)의 1/10,000 희석액 8ml가 추가되고 한 시간 동안 진동 플랫폼상에서 실온에서 인큐베이션되었다. 상기 막은 그 후에 진동 플랫폼에서 실온에서 각 5분간 15ml PBS + 0.05% Tween 20으로 세 번 세척되었다. 상기 막은 진동 플랫폼상에서 실온에서 15분 동안 15ml의 물에 용해된 SIGMAFAST 3,3'-디아미노벤지딘 정제(Sigma D4418)중에서 인큐베이션함으로써 발색되었다. 상기 웨스턴 블로팅의 결과는 도 8에 제시되어 있다.

[0066]

세포 배양 플라스크, 스피너 플라스크 및 생물반응기를 사용하여 확장되었고 AVDS, AVDP 및 AVDF 세 가지 세포주 모두에서 조건화된 배지는 SPARC 단백질의 분비 및 축적을 나타낸다.

실시예 7

[0067]

AVDF4, AVDS4 및 AVDP2(실시예 1 및 2에 기술한 대로 준비한), AVDF3(실시예 3에 기술한 대로 준비한) 및 AVDS6 및 AVDP3(실시예 4에 기술한 대로 준비한)으로부터 조건화된 배지는 피브로네틴 및 콜라겐 단백질의 분비 및 축적에 대해(당해 분야에서 잘 확립된) 도트 블로트로 분석되었다. 상기 PVDF 막은 메탄올로 습윤(wet)하고 그 다음에 PBS에서 담그고, 각 시료 10 μ l와 대조군은 상기 막 상에 스포팅되었다. 표준(피브로네틴 - Sigma F1141 또는 콜라겐 - Sigma C8919) 50ng 및 5ng은 또한 상기 막 상으로 스포팅되고 모든 스포트은 한 시간 동안 공기건조(air dry)되었다. 상기 막은 그 다음에 메탄올에서 다시 습윤되고, PBS 중에서 헹구고 그 다음에 4°C에서 차단 완충액(PBS + 1% BSA) 8ml 중에 하루 밤 동안 인큐베이션되었다. 상기 차단 완충액은 경사되고 상기 막은 진동 플랫폼 상에서 실온에서 2시간 동안 생케톨라제 단일클론 항-피브로네틴 항체(Sigma F7387) 또는 생케톨라제 단일클론 항-콜라겐 항체(Sigma C2456) 중 하나의 1/200 희석액 4ml 중에 인큐베이션되었다. 상기 막은 그 다음에 진동 플랫폼 상에서 실온에서 각 5분 동안 8ml PBS + 0.05% Tween 20에 세 번 세척되었다. 토끼 항-생쥐 IgG(전체 분자)-페록시다제(Sigma A9044)의 1/2000 희석액 4ml를 첨가하고 한 시간 동안 진동 플랫폼 상에서 실온에서 배양하였다. 상기 막은 그 다음에 진동 플랫폼 상에서 실온에서 각 5분 동

안 8ml PBS + 0.05% Tween 20으로 세 번 세척되었다. 상기 막은 진동 플랫폼 상에서 실온에서 15분 동안 15ml 물에 용해된 SIGMAFAST 3,3'-디아미노벤지딘 정제(Sigma D4418) 중에서 인큐베이션함으로써 발색되었다. 상기 도트 블로트의 결과는 표 6에 제시되어 있다.

[0068] 세포 배양 플라스크, 스퍼너 플라스크 및 생물반응기를 이용하여 확장된 AVDS, AVDP 및 AVDF 모든 세 가지 세포주에서 조건화된 배지는 콜라겐 단백질의 분비 및 축적을 나타낸다.

표 6

[0069] 콜라겐 및 피브로넥틴의 존재에 대한 세포 성장 조건화된 세포 배양 배지 및 조건화된 기초 세포 배양 배지의 분석

시료	조건화된 배지 제조	50ng 표준 대비 스포트 강도 (+++)	
		콜라겐	피브로넥틴
50ng 표준	-	+++	+++
MEM 대조군	-	ND	ND
AVDS4	실시예 1	+	+++
AVDF4	실시예 1	+	++++
AVDP2	실시예 1	++	++++
AVDS4	실시예 2	(1)	++
AVDF4	실시예 2	+	++++
AVDF3	실시예 3	++++	++++
AVDS6	실시예 4	++	+++
AVDP3	실시예 4	+++	+++
MEM + 10% FBS		ND	+

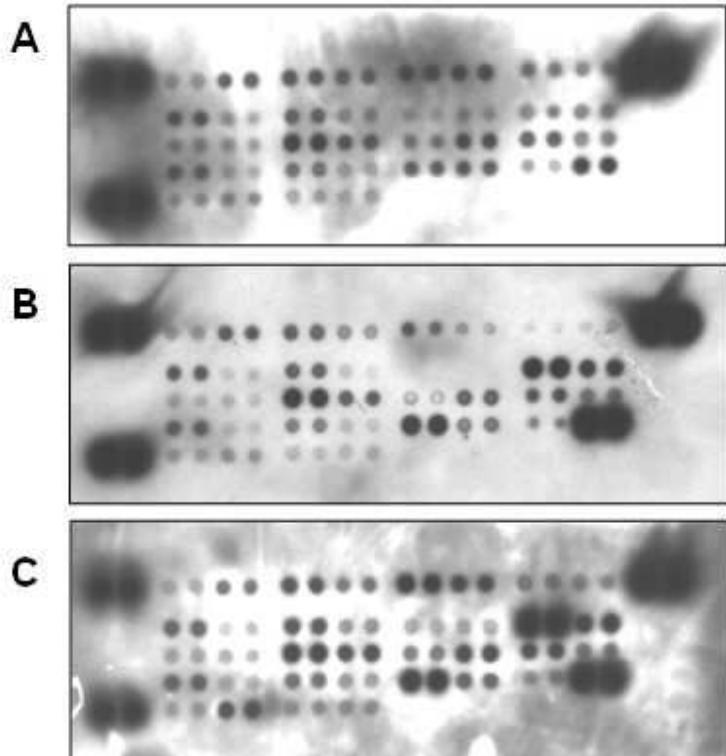
[0070] ND = 검출되지 않음(not detected)

[0071] (1) = 시료 중의 FBS에 의해 마스킹된 도트. LC-MS-MS 분석(실시예 2)은 콜라겐의 분비와 축적을 나타낸다.

도면

도면1

"Array Panel A" 막을 사용한 조건화된 배지의 분석



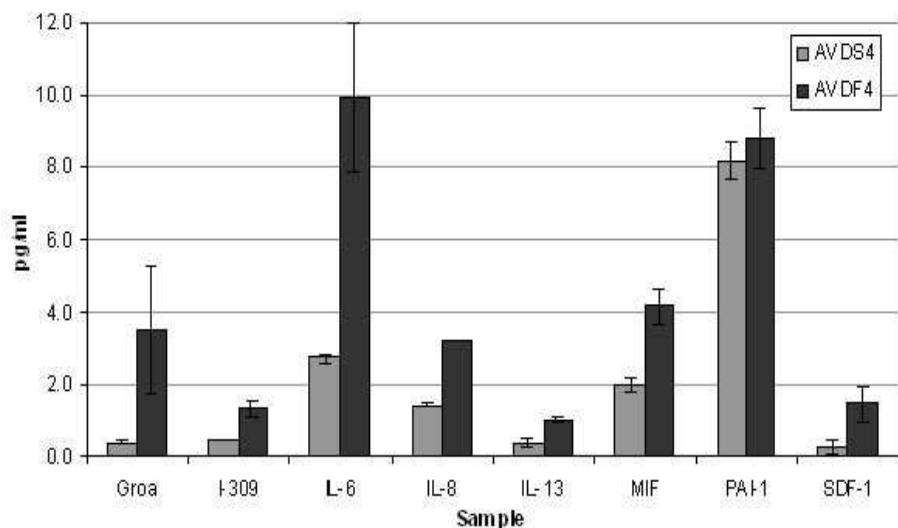
A - MEM + 10% FBS 대조군

B - 조건화된 배지 - AVDS4

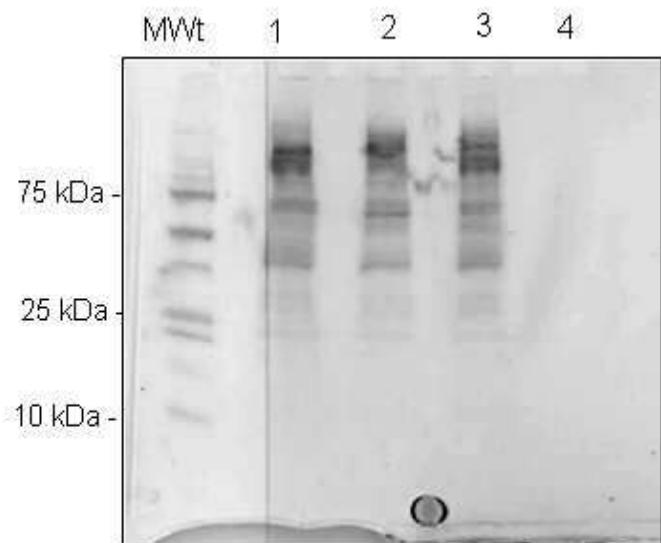
C - 조건화된 배지 - AVDF4

도면2

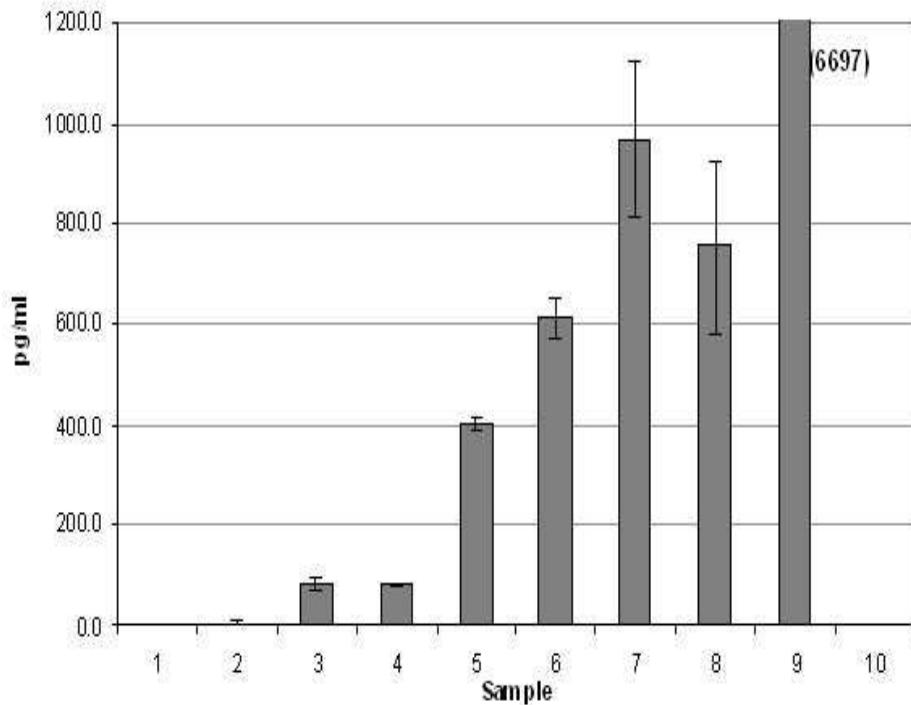
조건화된 배지에서 확인된 시토킨의 상대적 수준

**도면3**

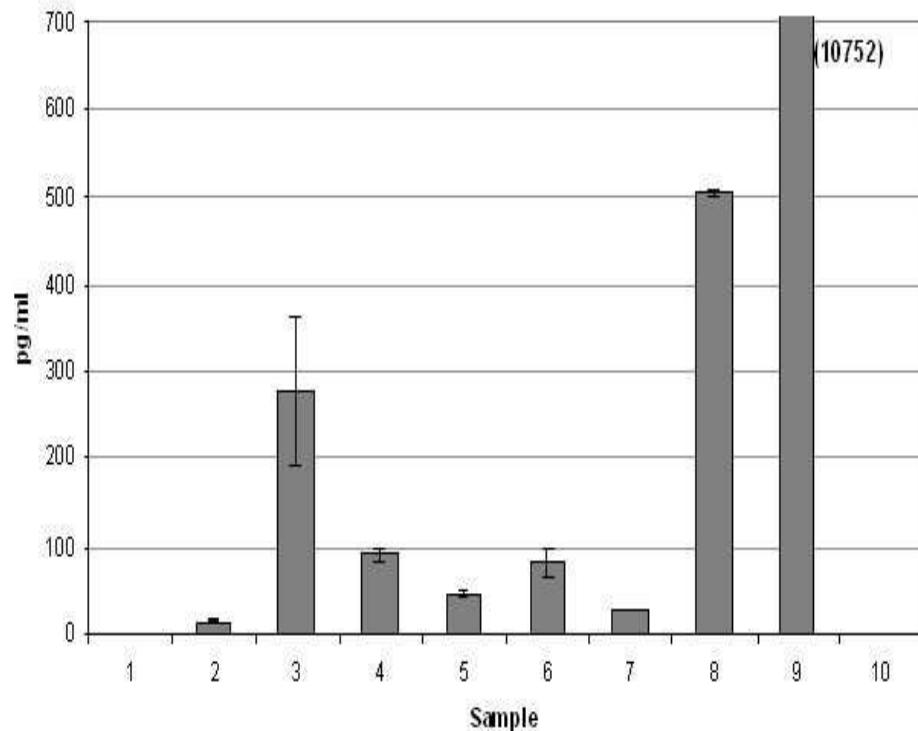
EZBlue 염색된 농축된 조건화된 배지의 SDS-PAGE 분석



- 1 - AVDP2 배지
- 2 - AVDF4 배지
- 3 - AVDS4 배지
- 4 - MEM 음성 대조군

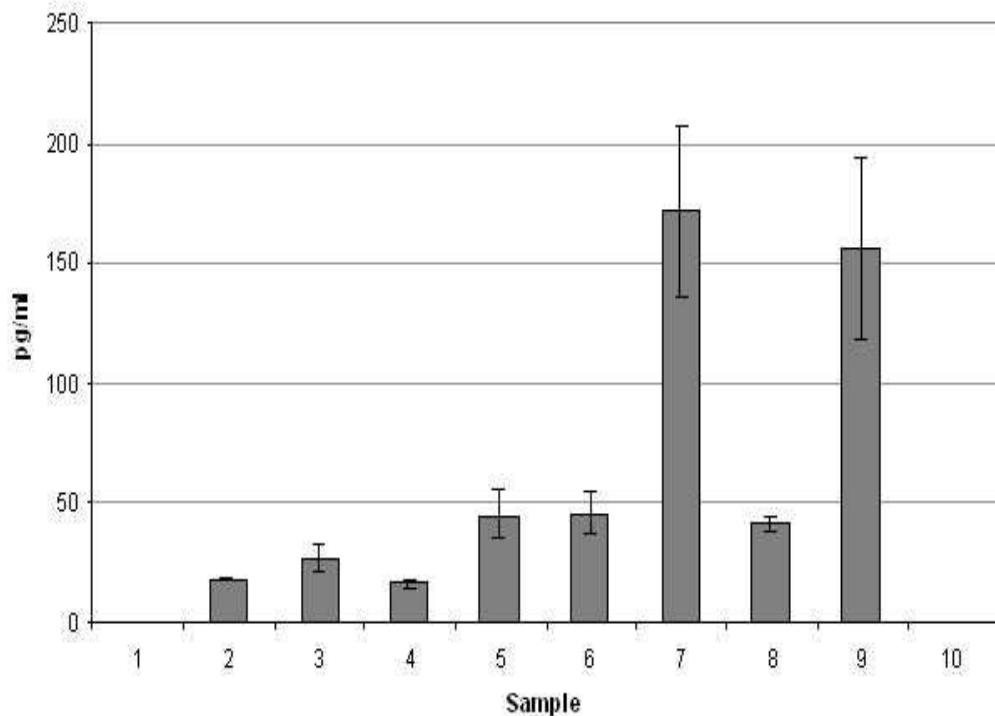
도면4조건화된 배지 시료에서 인간 TGF- β 1의 수준**도면5**

조건화된 배지 시료에서 인간 IL-6의 수준

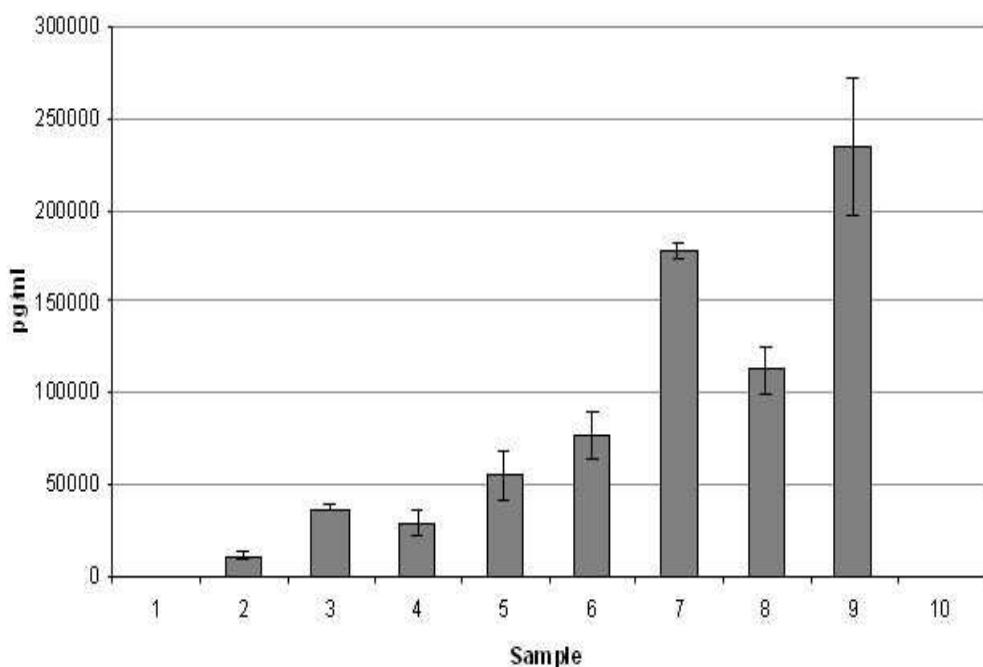


도면6

조건화된 배지 시료에서 인간 IL-8의 수준

**도면7**

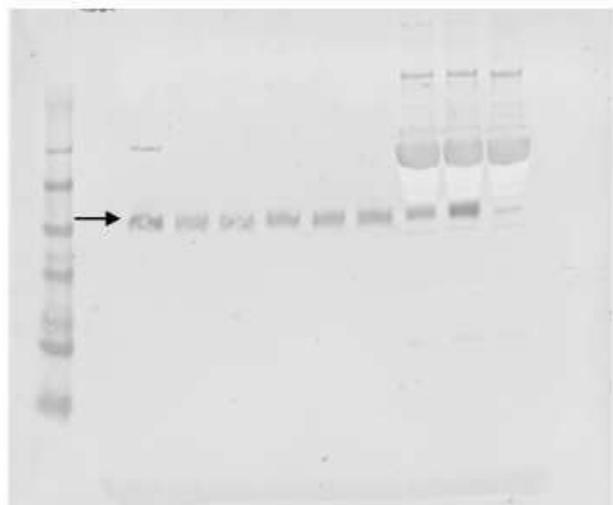
조건화된 배지 시료에서 인간 PAI-1의 수준



도면8

생쥐 항-SPARC 항체와 인큐베이션된 조건화된 배지 시료의 웨스턴 블로트

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11



례인	시료	조건화된 배지 제조
1	SeeBlue 분자량 마커	
2	MEM 대조군	
3	AVDF3	실시예 3
4	AVDS6	실시예 4
5	AVDP3	실시예 4
6	AVDS4	실시예 1
7	AVDF4	실시예 1
8	AVDP2	실시예 2
9	AVDS4	실시예 2
10	AVDF4	실시예 2
11	MEM + 10% FBS	