



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년03월07일
(11) 등록번호 10-2644886
(24) 등록일자 2024년03월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0775 (2010.01) A61K 35/28 (2015.01)
A61K 35/30 (2015.01) A61K 35/32 (2015.01)
A61K 35/34 (2015.01) A61K 35/35 (2015.01)
A61K 35/44 (2015.01) C12N 5/071 (2010.01)
C12N 5/077 (2010.01) C12N 5/0789 (2010.01)
C12N 5/0793 (2010.01)

(52) CPC특허분류
C12N 5/0668 (2013.01)
A61K 35/28 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-7029505

(22) 출원일자(국제) 2018년04월09일
심사청구일자 2021년03월30일

(85) 번역문제출일자 2019년10월08일

(65) 공개번호 10-2019-0141137

(43) 공개일자 2019년12월23일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2018/059061

(87) 국제공개번호 WO 2018/189124
국제공개일자 2018년10월18일

(30) 우선권주장
17166389.1 2017년04월12일
유럽특허청(EPO)(EP)

(56) 선행기술조사문헌
JOURNAL OF VISUALIZED EXPERIMENTS (JOVE),
2010. 43.P.1_11,
HTTP://WWW.JOVE.COM/DETAILS.PHP?ID=2051,
[DOI: 10.3791/2051]

SCIENTIFIC REPORTS ,2017, VOL. 7: 696
[DOI:10.1038/S41598_017_00803_7]

WO2015091210 A1

JP2017500860 A*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

레바티스 에스아

벨기에 4000 리에주 아브뉴 드 로피탈 11 베테34

(72) 발명자

세르탱, 디디에

벨기에 4000 리에주 알레 뒤 6 우 13 (바 베6) 에
데블로프망 샹트르 드 록시젠 르쉐르쉐

쇠스테르, 쥐스틴

벨기에 4367 케메크제 클로 뒤 보스케 9

(74) 대리인

양영준, 이상영

전체 청구항 수 : 총 4 항

심사관 : 도현미

(54) 발명의 명칭 근육 유래 전구체 세포로부터 분화된 세포를 수득하는 방법

(57) 요약

본 발명은 근육 미세생검을 수집하는 단계, 샘플을 세포 배양 배지 중에 배치하는 단계, 세포를 수집하고 성장시키는 단계, 및 이들을 적합한 분화 배지 중에서 분화시키는 단계를 포함하는, 분화된 포유동물 세포를 제조하는 방법에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

A61K 35/30 (2013.01)

A61K 35/32 (2013.01)

C12N 5/0619 (2013.01)

C12N 5/0647 (2013.01)

C12N 5/0654 (2013.01)

C12N 5/0655 (2013.01)

C12N 5/0657 (2013.01)

C12N 5/067 (2013.01)

C12N 5/069 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

특정 중간엽 줄기 세포 집단을 단리시키고자 하는 임의의 분리 기술의 부재하에서, (i) 포유동물 개체로부터 수득된 근육 미세생검 샘플을 수집하는 단계, (ii) 단계 (i)의 수집된 근육 샘플을 배양 배지 중에 배치하는 단계, (iii) 상기 미세생검으로부터 출현된 세포를 성장시키는 단계, (iv) 미세생검 및 성장 세포를, 충분한 양의 성장 세포가 근육 샘플 주변에 존재할 때에 분리시키는 단계, (v) 세포를 거의 전면성장시까지 계속해서 성장시키는 단계, 및 (vi) 단계 (v)에서 수득된 세포를 분화 배지 중에서 분화시키는 단계를 포함하는, 분화된 포유동물 세포를 제조하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 근육 미세생검이 골격근 조직으로부터 채취된 것인 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 미세생검이 10 내지 30 mg, 12 내지 30 mg, 15 내지 30 mg, 10 내지 25 mg, 또는 10 내지 20 mg을 함유하는 것인 방법.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 지방세포, 골세포, 연골세포, 근원성 세포, 조혈 세포, 내피 세포, 신경 세포, 심장 세포, 또는 간세포로의 분화가 이들을 각각 지방형성, 골원성, 연골원성, 근원성, 조혈, 내피, 뉴런, 심장, 또는 간세포 분화 배지 중에서 배양함으로써 이루어지는 것인 방법.

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 근육-유래 전구체 세포 (mdP-세포)로부터 분화된 세포를 수득하는 새로운 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 줄기 세포는 자기 재생 및 다중 계통 분화를 특징으로 한다. 현재까지 많은 유형의 줄기 세포가 발견되었지만, 중간엽 줄기 세포 (MSC)는 중배엽 및 비-중배엽 유도체로 분화될 수 있는 그의 능력, 그의 면역조정 잠재능, 그의 광범위한 이용가능성 및 줄기 세포의 내생적 저장 유지에 그의 기여에 기인하여 가장 큰 관심을 유지해 오고 있다 (Karantalis *et al.* 2015).

- [0003] MSC는 신체 전역에 걸쳐 광범위하게 산재되어 있지만, 3개의 공급원이 주로 임상 연구에서 사용되는데, 이는 골수, 지방 조직, 및 보다 적게는 제대이다 ([Lv *et al.* 2014]; [Karantalis *et al.* 2015]). 골수 유래 중간엽 줄기 세포는 그의 샘플링은 고통스럽고, 그의 생산 수율은 낮음에도 불구하고, 가장 보편적으로 사용되는 줄기 세포이다. 이러한 단점을 해결하기 위해 줄기 세포의 다수의 다른 공급원들이 연구되어 왔다. 골격근은 자기 재생이 가능하고, 위성 세포와 같이 근원성 분화로 제한되는 것이 아니라, 다중 계통으로 분화될 수 있는 세포를 함유한다 ([Jankowski *et al.* 2002]; [Wu *et al.* 2010]).
- [0004] 2006년, 세포 요법 국제 사회(International Society for Cellular Therapy: ISCT)는 MSC의 공급원이 많다는 점을 고려하여 균일성을 위해, 인간 MSC를 정의하는 최소의 기준을 제안하였다: (1) MSC는 표준 배양 조건에서 플라스틱 부착성이어야 하고; (2) MSC는 CD105, CD73 및 CD90는 발현하고, CD45, CD34, CD14 또는 CD11b, CD79 알파 또는 CD19 및 HLA-DR 표면 분자는 발현하지 않아야 하며, (3) MSC는 시험관내에서 골모세포, 연골모세포 및 지방세포로 분화되어야 한다 (Dominici *et al.* 2006).
- [0005] 말 근육-유래 줄기 세포는 외식편 배양 후, 이어서 불연속 퍼콜 밀도 구배에 의해 밀도가 다른 줄기 세포 함유 분획을 분류하는 것에 의존하는 특허 방법을 사용하여 근육 미세생검으로부터 단리되었다 (Serteyn and Ceusters 2015; WO2015/091210). 상기 기술을 통해 6주 경과 후, 극소량의 근육 (15-20 mg)으로부터 대략 6,000만 개의 줄기 세포에까지 이를 수 있었다. 유세포 분석법을 이용한 면역표현형 분석 결과, 이들 세포는 CD105, CD90 및 CD44에 대해서는 양성인 반면, CD45 및 MHC-II에 대해서는 음성인 것으로 나타났다. 말 근육-유래 줄기 세포는 골세포, 연골세포, 지방세포, (각질형성세포), 간세포, 심근세포 및 내피 세포로 성공적으로 분화함에 따라 그의 만능성을 입증하였다. 추가로, 상기 세포는 면역조정 특성도 보였다. 그러므로, 이들 근육-유래 줄기 세포는 골수 유래 중간엽 줄기 세포에 대한 우수한 대안을 제공하면서, 미소침습 방식으로 풍부하고, 쉽게 달성될 수 있는, 중간엽 줄기 세포 (mdMSC) 집단을 나타낸다.
- [0006] 줄기 세포는 시험관내 연구에 유용한 도구임을 나타낸다. 실제로, 일단 분화 프로토콜이 확립되고 나면, 이를 통해 매우 표준화된 방식으로 연구를 수행할 수 있고, 사체로부터, 또는 표적화된 종 이외의 다른 종으로부터 유래된 세포인 무한증식 세포에 기초한, 적합성이 더 낮은 모델을 대체하면서, 재현가능성이 높은 세포 모델을 생성할 수 있다 (Pittenger *et al.* 2013 MSC book). 또한, 줄기 세포는 단일 개체로부터, 및 따라서, 단일 샘플링으로부터 다수의 상이한 세포 유형을 제공하는 기회를 주며, 이는 샘플링이 위험하거나, 또는 심지어는 안전하지 않은 세포 유형에 대해 수행되는 연구에 매우 유용한 도구를 구성한다. 추가로, 줄기 세포는 해당 환자의 하나 이상의 세포 유형에 대한 상이한 치료의 효능 및/또는 독성을 평가하는 데 가장 중요한 개별 치료 접근법 생성의 요구사항을 충족시켜 준다. 현재까지, 과학 문헌상에서는 분리, 배양 및 확장 단계 후에, 골수, 지방 조직, 혈액, 치수, 제대혈 등의 기원의 중간엽 줄기 세포로부터 분화된 세포를 수득하였다.
- [0007] 이제, 특정 또는 상이한 중간엽 줄기 세포 집단을 단리시키는 임의의 선행 분리 기술 없이, 근육 미세생검으로부터 분화된 세포를 수득할 수 있다는 것이 밝혀졌다. 상기 분리 기술은 일반적으로 효소 분해, 프리플레이팅, 밀도 구배 분리 등을 포함한다.

발명의 내용

- [0008] 본 발명에 따라, 분화된 포유동물 세포를 제조하는 방법은 특정 중간엽 줄기 세포를 단리시키고자 하는 분리 기술 또는 단계의 부재하에서, (i) 포유동물 개체로부터 근육 미세생검 샘플을 수집하는 단계, (ii) 단계 (i)의 수집된 근육 샘플을 적합한 배양 배지 중에 배치하는 단계, (iii) 상기 미세생검으로부터 출현된 세포를 성장시키는 단계, (iv) 상기 미세생검 및 성장 세포를, 충분한 양의 성장 세포가 근육 샘플 주변에 존재할 때에 분리시키는 단계, (v) 세포를 거의 전면성장시까지 계속해서 성장시키는 단계, 및 (vi) 단계 (v)로부터의 세포를 적합한 분화 배지 중에서 분화시키는 단계를 포함한다.
- [0009] 본 발명의 바람직한 실시양태에 따라, 상기 근육 미세생검은 골격근 조직으로부터 채취된 것이다.
- [0010] 미세생검 근육 샘플, 및 그로부터 출현되고, 그 주변에서 성장한 세포를 분리시키는 것은 조직 샘플을 제거하여, 추가 성장을 위해 세포를 관련 배양 배지 중에 그대로 남겨둌으로써 수행될 수 있다.
- [0011] 배양 배지는 이롭게는 약 20% 우태아 혈청, 약 5 ml 페니실린 (1,000 U/ml)-스트렙토마이신 (10,000 µg/ml), 약 2.5 ml 암포테리신 B (250 µg/ml) 및 약 5 ml HEPES를 포함하는 DMEM/F12를 포함한다. 추가 예로는 CTS (상표명) 및 테라피크(Therapeak) (상표명) 배양 배지가 있다. 통상의 기술자는 적절한 다른 배양 배지도 알 수 있고, 그의 일반 지식, 경험 및 기술을 이용하여 배양 배지를 프로세스 요건에 맞게 적합화시킬 수 있을 것

이다.

- [0012] 포유동물은, 마우스, 래트, 햄스터, 토끼, 개, 고양이, 기니아 피그, 소, 암소, 양, 말, 돼지 및 영장류, 예를 들어, 원숭이 및 유인원을 포함하나, 이에 제한되지 않는 가축 및 경작용 동물, 동물원 동물, 스포츠용 동물, 애완 동물, 반려 동물 및 실험용 동물을 포함하는 군으로부터, 뿐만 아니라, 인간으로부터도 선택될 수 있다.
- [0013] 이롭게는, 미세생검은 골격근 조직, 예컨대, 목, 어깨, 흉부, 등, 꼬리, 팔다리, 뒷다리, 앞다리, 후반신, 뒷발 등으로부터의 근육으로부터 취득된다. 말과 같은 포유동물의 경우, 미세생검은 바람직하게는 상완 삼두근 근육 조직으로부터 취득되고, 더욱 바람직하게는 상완 삼두근의 장두로부터 채취된다. 인간의 경우, 미세생검은 삼각근으로부터 취득될 수 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 과도한 부담 없이 적합한 공급원을 선택할 수 있을 것이다.
- [0014] 말의 경우, 예를 들어, 미세생검은 상완 삼두근의 장두에서 약 5 cm 깊이에서 수집될 수 있고, 약 10 내지 약 30 mg, 바람직하게는 약 12 mg 초과 또는 약 15 mg 초과 및/또는 약 25 mg 미만 또는 약 20 mg 미만의 조직을 함유할 수 있다. 인간의 경우, 미세생검은 약 10 내지 약 20 mg의 조직을 함유할 수 있다. 명확하게는, 비록 포유동물 및 골격 근육 조직 공급원에 따라, 통상의 기술자는 그의 일반 지식에 기초하여 및/또는 과도한 부담 없이 통상의 실험에 의해 미세생검의 깊이 및 추출하고자 하는 조직 샘플의 양을 적합화시킬 수 있을 것이다.
- [0015] 단리된 근육-유래 전구체 세포는 이들을 각각 적절한 지방형성, 골원성, 연골원성, 근원성, 조혈, 내피, 뉴런, 심장, 또는 간세포 분화 배지 중에서 배양함으로써 지방세포, 골세포, 연골세포, 근원성 세포, 조혈 세포, 내피 세포, 신경 세포, 심장 세포, 또는 간세포로 분화될 수 있다. 관련된 분화 배지는 통상의 기술자에게 공지되어 있으며, 상기 기술자는 과도한 부담 없이 그의 일반 지식, 경험 및 기술에 기초하여 적절한 배지 및 배양 조건을 선택할 수 있을 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0016] 본원에서 사용되는, "근육-유래 전구체 세포" 또는 "mdP-세포"라는 용어는 예컨대, 불연속 퍼콜 밀도 구배를 이 용함으로써 상이한 줄기 세포 함유 분획을 분리하지 않고, 외식편 배양에 의해 미세생검으로부터 비롯된 모든 세포를 의미하는 것으로 이해된다.
- [0017] 세포 분화관, 세포가 한 세포 유형에서 일반적으로 더욱 특수화된 유형으로 변하는 프로세스를 의미하는 것으로 이해된다. 이 프로세스는 유전자 발현을 제어하는 적절한 배지에 의해 유발될 수 있다. 본원에서 사용되는, "분화된 세포(들)"라는 용어는 유래 기점이 된 전구체 세포 또는 줄기 세포보다 더욱 특수화된, 예컨대, 지방 세포, 골세포, 연골세포, 근원성 세포, 조혈 세포, 내피 세포, 신경 세포, 심장 세포, 또는 간세포와 같은, 특수화된 세포 유형을 의미하는 것으로 이해된다.
- [0018] "줄기 세포"라는 용어는 일반적으로, 자기 재생이 가능한, 즉, 분화 없이도 증식할 수 있고, 그 또는 그의 자손은 상대적으로 더욱 특수화된 적어도 하나의 세포 유형을 생성할 수 있는 것인, 비특수화 또는 상대적으로 덜 특수화되고, 증식 능력이 있는 세포를 지칭한다. 상기 용어는 실질적으로 무한 자기 재생이 가능한 줄기 세포, 즉, 여기서 줄기 세포의 자손 또는 그의 적어도 일부는 실질적으로 비특수화 또는 상대적으로 덜 특수화된 표현형, 분화 잠재능, 및 모 줄기 세포의 증식 능력을 포함하는 것인 줄기 세포 뿐만 아니라, 제한된 자기 재생을 나타내는 줄기 세포, 즉, 여기서 자손 또는 그의 일부의 추가 증식 및/또는 분화 능력은 모 세포와 비교하여 명백하게 감소된 것인 줄기 세포를 포함한다. 예로서, 및 제한 없이, 줄기 세포는 하나 이상의 계통을 따라 분화하여 점점 더 상대적으로 더욱 특수화된 세포를 생산할 수 있거나 (여기서 상기 후손 및/또는 점점 더 상대적으로 더욱 특수화된 세포는 그 자체가 본원에 정의된 바와 같은 줄기 세포일 수 있다), 또는 심지어는 최종적으로 분화된 세포, 즉, 유사 분열 후의 세포일 수 있는, 완전히 특수화된 세포를 생산할 수 있다.
- [0019] 본원에서 사용되는, "중간엽 줄기 세포" 또는 "MSC"라는 용어는 중간엽 계통의 세포, 전형적으로, 2개, 바람직하게는 3개 이상의 중간엽 계통, 예컨대, 골세포 (골), 연골세포 (연골), 근육세포 (근육), 힘줄 세포 (힘줄), 섬유모세포 (결합 조직), 지방세포 (지방) 및 스트로모젠 (골수 기질) 계통의 세포를 생성할 수 있는, 포유동물 성체, 중배엽 유래 줄기 세포를 지칭한다. 일반적으로, 그러나, 제한 없이, 예컨대, 문헌 [Pittenger et al. 1999 (Science 284: 143-7)] 또는 [Barberi et al., 2005 (PLoS Med 2: e161)] 및 [Usas et al., 2011]에 기술되어 있는 바와 같이, 관련 기술분야에서 허용되는 표준 분화 조건 및 세포 표현형 평가 방법을 사용하여, 세포가 각 지방세포, 연골세포 및 골세포 계통의 세포를 형성할 수 있다면, 그 세포는 MSC인 것으로 간주될 수 있다. MSC라는 용어는 또한 MSC의 자손, 예컨대, 대상체의 생물학적 샘플로부터 취득된 MSC의 시험관내 또는 생

체의 증식에 의해 수득된 자손도 포함한다.

- [0020] ISCT는 세포가 중간엽 줄기 세포 (MSC)로서 정의되기 위해서는 소지하여야 하는 특성을 하기와 같이 정확하게 결정하였다: 세포는 플라스틱 부착성이고, 마커 CD73, CD90 및 CD105에 대해 양성이고, 마커 CD14 (또는 CD11b), CD34, CD45, CD79a (또는 CD19) 및 MHC-II에 대해 음성이어야 하고, 중배엽 기원의 세포, 예컨대, 골모세포, 연골모세포 및 지방세포로 분화할 수 있는 능력을 보여야 한다 (Dominici et al., 2006). 다른 MSC 마커, 예컨대, CD29 또는 CD44의 사용 또한 보고되었다 (Pittenger et al., 1999). 그러므로, 본 발명에 따라 사용되는 포유동물 MSC 세포는, 세포가 적어도 중간엽 마커 CD105, 및 바람직하게는 또한, 하기 마커: CD44 및 CD90 중 하나 이상의 것을 발현 또는 공동 발현한다는 것 (즉, 그에 대해 양성이라는 것)으로 정의된다. 본 발명의 포유동물 MSC 세포는 또한, 세포가 하기 마이크로RNA: miR-128, miR-133B, miR-218 또는 miR-802 중 하나 이상의 것을 발현 또는 공동 발현한다는 것 (즉, 그에 대해 양성이라는 것)으로 정의된다. 본 발명의 포유동물 MSC 세포는 또한, 세포가 miR-656을 발현하지 않는다는 것으로 정의된다.
- [0021] 마이크로RNA, miRNA, miR 또는 eca-miR이라는 용어는 본원에서 상호교환적으로 사용되고, 예컨대, 동물과 같은 살아있는 유기체의 내인성 유전자로부터 유래된, 19-25개의 뉴클레오티드 성숙한 비-코딩 RNA 또는 그의 전구체, 또는 그의 단편을 지칭한다. 성숙한 마이크로RNA는 프리-마이크로RNA (pre-miR)로 명명되는, 대략 75개의 뉴클레오티드 길이의 더욱 긴 헤어핀 유사 전구체로부터 프로세싱된 것이다.
- [0022] 세포가 특정 마커 또는 마이크로RNA에 대해 양성이라고 한다면, 이는 통상의 기술자가 적절한 측정을 수행하였을 때, 적합한 대조군과 비교하여, 상기 마커 또는 마이크로RNA에 대하여, 예컨대, 항체 검출가능 또는 역전사 증합효소 연쇄 반응에 의한 검출과 같이, 독특한 신호의 존재 또는 증거에 관하여 결론을 내릴 것이라는 것을 의미한다. 방법을 통해 마커 또는 마이크로RNA를 정량적으로 평가할 수 있는 경우, 양성 세포는 대조군과 유익적으로 상이하고, 그보다 더 높거나, 또는 더 강력한, 예컨대, 제한 없이, 대조군 세포에 의해 생성된 상기 신호보다 적어도 1.5배 더 높은, 예컨대, 적어도 2배, 적어도 4배, 적어도 10배, 적어도 20배, 적어도 30배, 적어도 40배, 적어도 50배 더 높은 또는 그 초과로 더 높은 신호를 생성한다.
- [0023] 세포 특이적 마커의 발현은 관련 기술분야에 공지된 임의의 적합한 면역학적 기술, 예컨대, 면역-세포화학법 또는 친화성 흡착법, 웨스턴 블롯 분석법, FACS, ELISA 등을 사용하여, 또는 효소 활성에 관한 임의의 적합한 생화학적 검정법에 의해, 또는 마커 mRNA의 양을 측정하는 임의의 적합한 기술, 예컨대, 노던 블롯, 반-정량적 또는 정량적 RT-PCR 등에 의해 검출될 수 있다.
- [0024] 마이크로RNA의 발현은 예를 들어, 전체 유전자 발현에 대한 검정법을 이용하여 (예컨대, 마이크로RNA 발현 프로파일링 분석을 위한 마이크로어레이 분석법, 즉시 사용가능한 마이크로RNA qPCR 플레이트 또는 RNA 서열분석을 이용하여), 또는 특이적 검출 검정법, 예를 들어, 제한하는 것은 아니지만, 정량적 PCR, 정량적 역전사 (실시간) PCR (qRT-PCR), 잠금 핵산 (LNA) 실시간 PCR, 또는 노던 블롯팅에 의해 결정될 수 있다. 특히, 마이크로RNA의 발현의 측정은 상기 마이크로RNA의 검출에 특이적인 올리고뉴클레오티드 프로브를 이용하여 수행될 수 있다. 상기 올리고뉴클레오티드 프로브는 마이크로RNA에 직접 및 특이적으로 결합할 수 있거나, 또는 상기 마이크로RNA를 특이적으로 역전사시킬 수 있다. 대안적으로, 상기 올리고뉴클레오티드 프로브는 상기 마이크로RNA로부터 수득된 cDNA에 결합할 수 있다. 상기 올리고뉴클레오티드 프로브는 또한 상기 마이크로RNA로부터 수득된 cDNA를 증폭시킬 수 있다.
- [0025] 본원에서 사용되는, "성장하는" 및 "배양하는"이라는 용어는 세포가 특정 수준의 전면생장물까지 증식된다는 것을 의미하는 것으로 이해된다.
- [0026] "미세생검 주변의 충분한 양의 세포"라는 용어는 충분한 세포가 근육 샘플 상에서 및/또는 그 인근에서 성장하고, 이로써, 상기 세포는 추가 성장을 위해 근육 샘플로부터 분리될 수 있다는 것을 의미한다.
- [0027] 본 발명에 따른 방법은 예를 들어, 독성 검정법, 기관 칩(organ-on-a-chip) 기반 실험, 약물 개발 및 개인 맞춤형 의학적 치료법 개발을 포함하는, 시험관내 연구를 위한, 지방세포, 골세포, 연골세포, 근원성 세포, 조혈 세포, 내피 세포, 신경 세포, 심장 세포, 및 간세포를 포함하나, 이에 제한되지 않는, 분화된 세포의 용이한 공급원을 제공한다. 개인 맞춤형 의학적 치료법은 상기 포유동물 분화된 세포의 양성 반응 수준을 평가함으로써 환자에 의한 양성 반응의 가능성을 평가하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0028] 본 발명은 문헌에 이미 기술되어 있는 방법에 대한, 효과적이고, 유망한 대안을 제공하고, 전구체 세포 수집의 최소 침습 특성에 기인하여 살아있는 포유동물에 대해 수행될 수 있는 가능성을 제공한다. 공지된 바와 같이, 근육-유래 세포는 줄기 세포를 포함하는, 상이한 계통 및 상이한 발생 단계로부터의 서브집단의 혼합물이다.

세포 배양은 간단한 방법으로 개시될 수 있다: 근육 미세생검이 외식편으로 사용될 수 있고, 전구체 세포는 적당한 시기에 자발적으로 출현한다. 상기와 같이 수행함으로써, 조작 횟수는 감소되고, 이로써 잠재적인 오염원을 막을 수 있고, 근육 미세생검 (외식편)에 의해 자연적으로 분비되는 성장 인자 정도면 충분하기 때문에, 외부 성장 인자를 첨가할 필요도 없다.

[0029] 본 발명은 고수율로 분화된 세포를 생성할 수 있는 간소화된, 효과적인 방법을 제공한다. 본 발명의 최초 출원일 시점의 지식 상태로는 근육 생검으로부터 직접 분화된 세포를 생산할 수 있다고는 어느 누구도 결론지을 수 없었다. 본 발명의 프로세스는 최초 출원일 시점에 통상의 기술자가 이용가능한 지식에 기초한, 반직관적인 것이다. 근육 샘플로부터의 세포를 골세포 (골), 연골세포 (연골), 근육세포 (근육), 힘줄 세포 (힘줄), 섬유모세포 (결합 조직), 지방세포 (지방) 및 스트로모겐 (골수 기질) 계통으로 분화시킬 수 있을 것이라고 어느 누구도 예상하지 못했다.

[0030] 본 발명은 자가 세포 사용에 특히 적합하고, 이는 결과가 유전적 특이성 또는 이상에 덜 의존하기 때문에 신뢰성이 더 높다는 것을 암시한다.

[0031] 본 발명은 치료를 필요로 하는 대상체 (이 어구는 주어진 병태 치료로 이익을 얻을 대상체 (포유동물)를 포함한다)에게 분화된 세포를 투여하는 치료 방법을 제공한다. 대상체로는 제한 없이, 상기 병태 진단을 받은 대상체, 상기 병태가 발생하기 쉬운 대상체, 및/또는 상기 병태를 예방하고자 하는 대상체를 포함할 수 있다. 분화된 세포는 하기 장애들 중 하나 이상이 것을 치료하는 데 사용될 수 있다: 포유동물 대상체에서 골다공증, 골절, 및 치유 기능부전 치료를 위한 골세포 분화된 세포; 인대염, 골연골증, 관절염, 건염, 제염염, 힘줄 및 인대 염증 치료를 위한 연골세포 분화된 세포; 심장 장애 치료를 위한, 예컨대, 심장 기능 개선, 경색된 심장 조직의 재건을 위한 근원성 세포 및 심장 세포; 자가면역 질환 및 혈액암 및 골수암, 예컨대, 다발성 골수종 및 백혈병 치료를 위한 조혈 분화된 세포; 내피 기능 장애 치료를 위한 내피 세포; 퇴행성 신경 질환, 파킨슨병, 헌팅턴병, 다발성 경화증 치료를 위한 신경 세포; 간 기능 장애 및 간암 치료를 위한 간세포 분화된 세포.

[0032] "치료하다" 또는 "치료"라는 용어는 이미 발생된 장애의 치료적 처치, 예컨대, 이미 발생된 근육-관절-골격 장애의 요법 뿐만 아니라, 원치않는 고통의 발생 기회를 방지하거나, 또는 감소시키고자 하는, 예컨대, 근육-관절-골격 장애, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 인대염, 골연골증, 관절염, 골다공증, 건염, 힘줄 및 인대 염증, 골절, 및 치유 기능부전의 이환 및 진행 기회를 방지하고자 하는 것을 목표로 하는 예방적 또는 방지적 조치, 이 둘 모두를 포함한다. 상기 치료의 유의한 또는 원하는 임상적 결과로는 제한 없이, 하나 이상의 증상 또는 하나 이상의 생물학적 마커의 경감, 질환 정도 감소, 질환 상태 안정화 (즉, 악화되지 않음), 질환 진행 지연 또는 저속화, 질환 상태 호전 또는 일시적 완화 등을 포함할 수 있다. "치료"는 또한 치료를 받지 않은 경우 예상되는 생존기간과 비교하여 생존기간을 연장시키는 것을 의미할 수 있다.

[0033] "예방적 유효량"이라는 용어는 대상체에서 연구원 또는 수의사가 추구하는 것과 같은 장애 발병을 억제 또는 지연시키는, 본 발명에 따른 수의학적 또는 제약 조성물의 양을 지칭한다. 본원에서 사용되는, "치료학적 유효량"이라는 용어는, 특히, 치료되는 질환 또는 장애의 증상의 경감을 포함할 수 있는, 대상체에서 연구원 또는 수의사가 추구하는 생물학적 또는 의학적 반응을 유도하는 본 발명에 따른 수의학적 또는 제약 조성물의 양을 지칭한다. 방법은 치료학적 유효 용량 및 예방적 유효 용량을 결정하는 관련 기술 분야에 공지되어 있다.

[0034] 치료는 본원에 정의된 바와 같이 자가 (즉, 치료하고자 하는 대상체로부터 유래된 세포), 동종 이계 (즉, 치료하고자 하는 대상체 이외의, 그러나, 같은 종에 속하는 대상체(들)로부터 유래된 세포) 또는 이종계 (즉, 치료하고자 하는 대상체와 다른 종에 속하는 대상체(들)로부터 유래된 세포) 분화된 세포 또는 그의 각 세포 집단을 사용할 수 있다.

[0035] 수의학적 또는 제약 조성물은 전형적으로 활성 성분으로서, 본 발명에 따라 수득된 분화된 세포 또는 세포 집단, 및 하나 이상의 제약상 허용되는 담체/부형제를 포함할 것이다. 본원에서 사용되는, "담체" 또는 "부형제"는 임의의 모든 용매, 희석제, 완충제 (예컨대, 예로서, 중성 완충처리된 염수 또는 포스페이트 완충처리된 염수), 가용화제, 콜로이드, 분산 매질, 비히클, 충전제, 킬레이팅제 (예컨대, 예로서, EDTA 또는 글루타티온), 아미노산 (예컨대, 예로서, 글리신), 단백질, 붕해제, 결합제, 활택제, 습윤화제, 유화제, 감미제, 착색제, 향미제, 방향제, 증점제, 데포 효과를 달성하기 위한 작용제, 코팅제, 항진균제, 보존제, 안정화제, 항산화제, 장성 조절제, 흡수 지연제 등을 포함한다. 수의학적 또는 제약 활성 물질을 위한 상기 매질 및 작용제 사용은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 상기 물질은 비독성이어야 하고, 세포의 활성을 방해하지 않아야 한다. 수의학적 사용을 위해, 세포는 또한 사료 보충제로 제제화되거나, 또는 그로서 투여될 수 있다.

- [0036] 담체 또는 부형제, 또는 다른 물질의 정확한 성질은 투여 경로에 의존할 것이다. 예를 들어, 조성물은 비경구적으로 허용되는 수용액 형태일 수 있다. 의학 제제에서의 일반 원리에 대해 독자는 문헌 [Cell Therapy: Stem Cell Transplantation, Gene Therapy, and Cellular Immunotherapy, by G. Morstyn & W. Sheridan eds., Cambridge University Press, 1996]; 및 [Hematopoietic Stem Cell Therapy, E. D. Ball, J. Lister & P. Law, Churchill Livingstone, 2000]을 참조한다.
- [0037] 상기 수의학적 또는 제약 조성물은 그 안의 (분화된) 세포 또는 세포 집단의 생존가능성을 보장하는 추가 성분을 함유할 수 있다. 예를 들어, 조성물은 바람직한 pH, 더욱 일반적으로는 중성에 가까운 pH를 달성하는 데 적합한 완충 시스템 (예컨대, 포스페이트 또는 카르보네이트 완충 시스템)을 포함할 수 있고, 세포가 확실하게 삼투성 스트레스를 막을 수 있도록 등장성 조건으로 만들기에 충분한 염을 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 목적에 적합한 용액은 관련 기술분야에 공지된 바와 같이, 포스페이트 완충처리된 염수 (PBS), 염화나트륨 용액, 링거 주사액 또는 락테이트 링거 주사액일 수 있다. 추가로, 본 조성물은 세포의 생존능을 증가시킬 수 있는, 예컨대, 알부민과 같은 캐리어 단백질을 포함할 수 있다.
- [0038] 수의학적 또는 제약 조성물은 치료하고자 하는 관련 조직 또는 기관 또는 그의 기능의 회복 또는 재생에 유용한 추가 성분을 포함할 수 있다. 예로서, 수의학적 또는 제약 조성물은 골 상처 및 결합 회복에 유용한 성분을 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 성분으로는 제한 없이, 골 형태형성 단백질, 골 기질 (예컨대, 시험관내에서 본 발명의 세포에 의해 또는 다른 방법에 의해 제조된 골 기질), 히드록시아파타이트/인산 삼칼슘 입자 (HA/TCP), 젤라틴, 폴리-락트산, 폴리-락트산 글리콜산, 히알루론산, 키토산, 폴리-L-리신, 및 콜라겐을 포함할 수 있다. 예를 들어, 골모세포는 복합물을 골원성 (혼자 힘으로 골 형성) 뿐만 아니라, 골-유도성으로 만들기 위해 탈회 골 기질 (DBM) 또는 다른 기질과 조합될 수 있다.
- [0039] 수의학적 또는 제약 조성물은 보충 생체활성 인자, 예컨대, 골 형태형성 단백질, 예컨대, BMP-2, BMP-7 또는 BMP-4, 또는 임의의 다른 성장 인자를 추가로 포함하거나, 또는 그와 함께 공동 투여될 수 있다. 다른 잠재적인 동반 성분으로는 골 재생에 도움을 주는 데 적합한 칼슘 또는 포스페이트의 무기 공급원을 포함한다 (WO 00/07639). 원하는 경우, 조직 재생 개선을 제공하기 위해 세포 시료가 캐리어 기질 또는 물질 상에 투여될 수 있다. 예를 들어, 물질은 과립형 세라믹, 또는 생체중합체, 예컨대, 젤라틴, 콜라겐, 오스테오넥틴, 피브리노젠, 또는 오스테오칼신일 수 있다. 다공성 기질은 표준 기술에 따라 합성될 수 있다 (예컨대, 문헌 [Mikos et al., Biomaterials 14: 323, 1993]).
- [0040] 수의학적 또는 제약 조성물은 분화된 세포의 도입 또는 투여 부위에서의 감염 또는 염증에 기인하는 합병증을 막기 위해, 보충 소독제, 무균제, 또는 미생물 파괴제, 예컨대, 살균제, 항박테리아제, 항생제, 또는 항진균제 및/또는 항감염제를 추가로 포함할 수 있거나, 또는 그와 함께 공동 투여될 수 있다.
- [0041] 분화된 세포 또는 세포 집단은 그가 이식되거나, 의도된 조직 부위로 이주하여 기능적 결합 부위를 재건하거나, 재생시킬 수 있도록 하는 방식으로 투여될 수 있다. 조성물 투여는 회복되는 근육-관절-골격 부위에 의존할 것이다. 예를 들어, 분화된 세포 또는 세포 집단은 병변에 (예컨대, 예를 들어, 힘줄 또는 인대에서) 직접, 또는 활막 관절에 (예컨대, 예를 들어, 힘줄 또는 관절 활막에) 투여될 수 있다.
- [0042] 예를 들어, 골형성은 조직을 리모델링하거나, 또는 스플릿, 또는 보철 장치를 삽입하는 외과 수술과 조화롭게 촉진될 수 있다. 다른 상황에서, 침습 수술은 요구되지 않을 것이며, 조성물은 주사에 의해, 예컨대, 초음파 유도 주사에 의해, 또는 유도가능 내시경을 사용하여 투여될 수 있다.
- [0043] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 분화된 세포 또는 세포 집단은 임플란트를 제공하는 데 적합한 기재로 전달되고/거나, 그 위에서 배양될 수 있다. 세포가 그 위의 표면의 적어도 일부분 상에 적용되고, 배양될 수 있는 기체는 금속, 예컨대, 티타늄, 코발트/크롬 합금 또는 스테인리스강, 생체활성 표면, 예컨대, 인산칼슘, 중합체 표면, 예컨대, 폴리에틸렌 등일 수 있다. 비록 덜 바람직하기는 하지만, 규산질 물질, 예컨대, 유리 세라믹스가 또한 기재로서 사용될 수 있다. 비록 인산칼슘이 기재의 필수 성분은 아니지만, 금속, 예컨대, 티타늄, 및 인산칼슘이 가장 바람직하다. 기체는 다공성 또는 비다공성일 수 있다. 기체는 생체분해성 또는 생체흡수성일 수 있다.
- [0044] 예를 들어, 본 발명에 따라 수득된 분화된 세포는 필요할 경우, 본 발명의 액체 영양 배지 중에서 고체 지지체를 인큐베이션시킴으로써 상기 세포가 증식되고/거나, 분화 프로세스를 계속 진행할 수 있도록 하기 위해 3차원 고체 지지체 상으로 전달될 수 있다. 세포는 예컨대, 상기 세포를 함유하는 액체 현탁액을 3차원 고체 지지체에 함침시킴으로써 상기 지지체 상으로 전달될 수 있다. 이러한 방식으로 수득된 함침된 지지체는 대상체에 이

식될 수 있다. 상기 함침된 지지체는 또한 최종적으로 이식되기 이전에 액체 배양 배지 중에 상기 지지체를 침지시킴으로써 재배양될 수 있다.

- [0045] 3차원 고체 지지체는 대상체에 이식될 수 있도록 하기 위해서는 생체적합성이어야 한다. 이는 임의의 적합한 형상, 예컨대, 원통형, 구형, 플레이트형, 또는 임의의 형상의 부분일 수 있다. 생체적합성 3차원 고체 지지체에 적합한 물질로는 특히 탄산칼슘, 및 특히, 아라고나이트, 구체적으로, 산호 골격 형태의 것, 알루미늄 기반, 지르코니아 기반, 인산 삼칼슘, 및/또는 히드록시아파타이트 기반의 다공성 세라믹스, 탄산칼슘이 히드록시아파타이트로 변환될 수 있게 하는 열수 교환에 의해 수득된 인조 산호 골격, 또는 다른 아파타이트-규회석 유리 세라믹스, 생체활성 유리 세라믹스, 예컨대, 바이오글래스(Bioglass)(TM) 유리를 언급할 수 있다.
- [0046] 본 설명에서, 본원에서 측정가능한 값, 예컨대, 파라미터, 양, 시간상 기간 등을 지칭할 때 사용되는 "약"이라는 용어는 명시된 값의 및 그로부터의 +/-10% 이하, 바람직하게는 +/-5% 이하, 더욱 바람직하게는 +/-1% 이하, 및 더욱더 바람직하게는 +/-0.1% 이하의 변동을 포함하는 것을 의미하며, 상기와 같은 변동이 본 개시된 발명에 수행하기에 적절한 한 그러하다. "약"이라는 수식어가 지칭하는 값 또한 구체적으로 그 자체, 및 개시된 값임을 이해하여야 한다.
- [0047] 본 발명과 관련된 일반 방법에 대해서는 예컨대, 문헌 ["Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed." (Sambrook et al., 1989)], [Animal Cell Culture (R. I. Freshney, ed., 1987)], 시리즈 [Methods in Enzymology (Academic Press), Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J. M. Miller & M. P. Calos, eds., 1987)]; ["Current Protocols in Molecular Biology and Short Protocols in Molecular Biology, 3rd Ed." (F. M. Ausubel et al., eds., 1987 & 1995)]; [Recombinant DNA Methodology II (R. Wu ed., Academic Press 1995)] (상기 문헌들은 본원에서 참조로 포함된다)를 포함하는, 널리 공지된 서적을 참조한다.
- [0048] 본 발명의 실시에서 유용한 일반 기술에 관한 추가의 상세한 설명을 위해, 실시자는 세포 생물학, 조직 배양, 및 발생학의 표준 서적 및 리뷰를 참조할 수 있다. 문헌 ["Teratocarcinomas and embryonic stem cells: A practical approach" (E. J. Robertson, ed., IRL Press Ltd. 1987)]; ["Guide to Techniques in Mouse Development" (P. M. Wasserman et al. eds., Academic Press 1993)]; ["Embryonic Stem Cell Differentiation in Vitro" (M. V. Wiles, Meth. Enzymol. 225:900, 1993)]; ["Properties and uses of Embryonic Stem Cells: Prospects for Application to Human Biology and Gene Therapy" (P. D. Rathjen et al., al., 1993)]을 포함한다. 줄기 세포 분화는 예컨대, 문헌 [[Robertson. 1997. Meth Cell Biol 75: 173]; 및 [Pedersen. 1998. Reprod Fertil Dev 10: 31], 및 [Usas et al., 2011] (상기 문헌들은 본원에서 참조로 포함된다)에서 리뷰된다.
- [0049] 세포 배양 및 배지 수집에서의 일반 기술은 문헌 [Large Scale Mammalian Cell Culture (Hu et al. 1997. Curr Opin Biotechnol 8: 148)]; [Serum-free Media (K. Kitano. 1991. Biotechnology 17: 73)]; [Large Scale Mammalian Cell Culture (Curr Opin Biotechnol 2: 375, 1991)], [Culture of animal cells: A manual of basic technique, Freshney, R.I. et al. 2005, 5th Edition, Wiley, New York] (상기 문헌들은 본원에서 참조로 포함된다)에 개략적으로 설명되어 있다.
- [0050] 본 개시내용에 열거된 마커 단백질에 대한 핵산 및 아미노산 서열 데이터는 일반적으로 공지되어 있고, 공용 데이터베이스로부터, 예컨대, 그 중에서도 특히, NIH "Protein Reviews on the Web" 데이터베이스 (<http://mpr.nci.nih.gov/prow/>), NIH "Entrez Gene" 데이터베이스 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene>) 또는 유니프로트/스위스프로트(Uniprot/Swissprot) 데이터베이스 (<http://www.expasy.org/>)로부터 입수할 수 있다. 상기 마커에 대해 적합한 검색 시약 및 방법은 상기 서열 정보에 기초하여 디자인될 수 있거나, 또는 더욱 일반적으로는 상업적으로 이용가능하다 (예컨대, 표지된 모노클로날 항체 시약).
- [0051] "CD105"라는 용어는 CD105로 공지된 항원, 또는 그의 동의어, 예컨대, 엔도글린을 포함한다. CD105는 세포 표면에 위치하는 막 당단백질이고, 공지된 중간엽 줄기 세포 마커이다. 예로서, 말 CD105 항원의 부분적인 아미노산 서열은 수탁 번호 AGW16345.1 하에 진뱅크(Genbank) 데이터베이스에서 찾아볼 수 있다.
- [0052] "CD90"이라는 용어는 항원 CD90, 또는 그의 동의어, 예컨대, Thy-1 막 당단백질을 포함한다. 예로서, 말 CD90 항원의 아미노산 서열은 수탁 번호 ACG61223.1 하에 진뱅크 데이터베이스에서 찾아볼 수 있다.
- [0053] "CD44"라는 용어는 일반적으로 CD44로 공지된 항원, 또는 그의 동의어, 예컨대, 세포외 기질 수용체 III, GP90 림프구 귀소/부착 수용체, HUTCH-I, 헤르메스(Hermes) 항원, 히알루로네이트 수용체, 또는 식세포성 당단백질 1

을 포함한다. 예로서, 말 CD44 항원의 아미노산 서열은 수탁 번호 CAA47331.1 하에 진뱅크 데이터베이스에서 찾아볼 수 있다.

[0054] 상기 MSC 마커 검출용의 예시적인 상업적으로 이용가능한 항체 시약으로는 특히 모노클로날 항체 항-CD105-RPE (ABD 세로테크(ABD Serotec)), 항-CD44-APC (BD 파르미겐(BD Pharmigen)), 및 항-CD90 (VMDR)을 포함한다. CD105, CD44, 또는 CD90에 특이적으로 결합하는 대안적 항체는 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 확인될 수 있다.

[0055] 본 개시내용에 열거된 마이크로RNA는 일반적으로 공지되어 있고, 공용 데이터베이스로부터, 예컨대, 그 중에서도 특히, miRBase 데이터베이스 (<http://www.mirbase.org>)로부터 입수할 수 있다. "miR-128"이라는 용어는 miR-128로 공지된 마이크로RNA, 또는 그의 전구체를 포함한다. 예로서, 말 miR-128의 뉴클레오티드 서열은 수탁 번호 MI0012821 하에 miRBase 데이터베이스에서 찾아볼 수 있다. "miR-133B"라는 용어는 miR-133B로 공지된 마이크로RNA, 또는 그의 전구체를 포함한다. 예로서, 말 miR-133B의 뉴클레오티드 서열은 수탁 번호 MI0012844 하에 miRBase 데이터베이스에서 찾아볼 수 있다. "miR-656"라는 용어는 miR-656으로 공지된 마이크로RNA, 또는 그의 전구체를 포함한다. 예로서, 말 miR-656의 뉴클레오티드 서열은 수탁 번호 MI0012915 하에 miRBase 데이터베이스에서 찾아볼 수 있다. 통상의 기술자는 마이크로RNA가 다른 명칭, 또는 동의어로 지칭될 수 있다는 것을 잘 알고 있다.

[0056] "세포 집단"이라는 용어는 일반적으로 세포 그룹을 지칭한다. 세포 집단은 공통 유형이거나, 또는 공통된 특성을 가지는 세포의 적어도 일부로 이루어질 수 있거나, 또는 그를 포함할 수 있다. 상기 특징으로는 제한 없이, 형태적 특징, 분화 잠재능 (예컨대, 만능성, 다능성, 단일 분화성 등; 예컨대, 다능성 또는 단일 분화성일 경우, 특정 세포 유형으로 분화할 수 있는 능력), 또는 1, 2, 3개 이상의 세포 연관 마커, 예컨대, 표면 항원의 존재 및/또는 수준을 포함할 수 있다. 따라서, 상기 특징이 세포 집단 또는 그의 일부를 정의할 수 있다. 바람직하게는 상기 세포 집단은 중간엽 줄기 세포 집단, 더욱 바람직하게는 실질적으로 균질한 중간엽 줄기 세포 집단이다.

[0057] "밀도 구배 원심분리"라는 표현은 세포의 밀도 기반 분리를 포함하는, 모든 유형의 세포 분리 기술 또는 생성물을 포함한다. 비제한적인 예는 수크로스 중합체, 또는 콜로이드성 실리카 구배의 밀도 구배 원심분리일 수 있다. 상업적으로 이용가능한 구배의 비제한적인 예로는 피콜 (폴리비닐피롤리돈 또는 실란으로 코팅된 콜로이드성 실리카), 피콜 (고분자량 수크로스 중합체), 피콜-플라크(Ficoll-Paque) (피콜 플러스 소듐 디아트리지오에이트 및 에테레이트 칼슘 디소듐), 부력 밀도 용액 (BDS, 콜로이드성 실리카 포함), 림포프랩 (소듐 디아트리지오에이트 및 다당류) 등이 있다.

[0058] 원하는 발현 프로파일을 가지는 살아있는 세포를 각 마커에 특이적인 시약 (가장 일반적으로는 면역학적 시약, 예컨대, 예로서, 모노클로날 항체)에 결합시킬 수 있고, 여기서 상기 시약은 결국에는 예컨대, 상기 시약이 결합하지 않은 세포로부터 그러한 결합이 이루어진 세포의 선별 또는 포획을 촉진시키기 위해 (예컨대, 형광단에 의해, 또는 자기 입자 또는 또 다른 유형의 정지상 상에의 고정화에 의해) 변형된다. 상기 방법에 관한 일반적인 가이드를 위해, 특히 문헌 [Flow Cytometry and Cell Sorting, 2nd ed., by Andreas Radbruch (ed.), Springer 1999 (ISBN 3540656308)]; [In Living Color: Protocols in Flow Cytometry and Cell Sorting, 1st ed., by RA Diamond and S Demaggio (eds.), Springer 2000 (ISBN 3540651497)]; [Flow Cytometry Protocols (Methods in Molecular Biology), 2nd ed., by TS Hawley and RG Hawley (eds.), Humana Press 2004 (ISBN 1588292355)]; [Affinity Separations: A Practical Approach, P Matejtschuk (ed.), Oxford University Press, 1997 (ISBN 0199635501)]; 및 [Dainiak et al. 2007. Adv Biochem Eng Biotechnol 106: 1 - 18]을 참조한다.

[0059] "적합한 배양 배지"라는 표현은 세포, 중간엽 줄기 세포 (MSC) 또는 중간엽 줄기 세포 집단의 생존 및/또는 성장을 지원하는 모든 세포 배양 배지를 포함한다. 비제한적인 예로 전형적으로는 적어도 항생제 및 우태아 혈청 (FBS)으로 보충되고, 임의적으로는 항진균제 및 완충제도 함께 보충된, DF20, DMEM-햄즈 F12(DMEM-Ham's F12), DMEM, 알파-MEM 등이 있다. 단지 예로서, 본 실시예에서는 하기 배양 배지가 사용되었다: 약 20% 우태아 혈청, 약 5 ml 페니실린 (1,000 U/ml)-스트렙토마이신 (10,000 µg/ml), 약 2.5 ml 암포테리신 B (250 µg/ml) 및 약 5 ml HEPES와 함께 DMEM/F12를 포함하는 DF20 배지. 다른 예로는 CTS (상표명) 및 테라피크 (상표명) 배양 배지가 있다.

[0060] 예컨대, 지방세포, 골세포 및 연골세포로의 분화를 위해, 전구체 세포는 적절한 "분화 배지" 중에서 배양된다. 상기 분화 배지는 예를 들어, 지방형성 분화를 위한: NH 아디포디프 배지(NH AdipoDiff Medium) (밀테니이 바이

오테크(Miltenyi Biotec)); 연골원성 분화를 위한: 연골세포 분화 배지 (NH 콘드로디프 배지(NH ChondroDiff Medium); 밀테니이 바이오테크); 골원성 분화를 위한: 골원성 배지 (NH 오스테오디프 배지(NH OsteoDiff Medium); 밀테니이 바이오테크)일 수 있다. 본원에 열거된 배지는 단지 예시적인 배지로서 제시된 것이지만, 통상의 기술자는 임의의 다른 상업적 분화 배지 또는 전문적으로 개발된 분화 배지를 사용할 수 있을 것이다. 다른 세포, 예컨대, 근원성 세포, 조혈 세포, 내피 세포, 신경 세포, 심장 세포, 또는 간세포에 적합한 분화 배지의 다른 예는 전구체 세포를 각각 적절한 근원성, 조혈, 내피, 뉴런, 심장, 또는 간세포 분화 배지 중에서 배양함으로써 수행될 수 있고, 그의 예는 예컨대, 문헌 [Usas et al., 2011]에서 찾아볼 수 있다.

[0061] 세포를 "탈착," "분산," "해리" 또는 "분리"시키는 적절한 방법은 일반적으로 관련 기술분야에 공지되어 있고, 본 발명에서 사용될 수 있다. 이는 예컨대, 단백질 분해 효소 처리, 2가 이온의 킬레이트화, 기계적 분해, 또는 상기 방법 중 임의의 것의 조합을 포함한다. 바람직하게는 상기 세포 해리는 바람직하게는 (예컨대, 상기 기술된 바와 같이) 트립신을 이용하는 효소 분해를, 임의적으로, 바람직하게는 (예컨대, 상기 기술된 바와 같이) EDTA를 이용하는 2가 이온의 킬레이트화, 및/또는 이러한 방식으로 처리된 세포의 기계적 해리와 함께 조합하여 수행하는 것을 포함할 수 있다. 기계적 해리는 예컨대, 보어가 작은 피펫 (예컨대, 1,000 μ l 마이크로 피펫 팁)을 통해 세포를 반복적으로 통과시키고/거나, 세포를 함유하는 현탁액 스트림을 고체 표면에 대해 (예컨대, 배양 배설 벽에 대해) 피펫팅 아웃을 수행하는 것을 포함할 수 있다.

[0062] 본 발명은 근육-유래 전구체 세포로부터의 분화된 연골세포 또는 골세포 제조를 참조하여 더욱 상세하게 기술될 것이다.

[0063] 실시예

[0064] mdP-세포의 분화로부터 분화된 연골세포 또는 골세포를 수득하면, 잠재적으로 골 질환을 앓는 환자에서의 침습적이고, 고통스러운 골 생검을 피할 수 있다.

[0065] 물질 및 방법

[0066] 말 골격근 샘플링

[0067] 리에주 대학의 말 클리닉(Equine Clinic of the University of Liege)에서 건강한 기증자로부터 말 골격근을 수집하였다. 실험 프로토콜은 리에주 대학의 동물 윤리 위원회(Animal Ethics Committee of the University of Liege)에 의해 검토 및 승인을 받았다 (협약 n° 1162). 근육 미세생검은 세르테인(Serteyn) 및 세우스터스(Ceusters) (2015)에 의해 보고된 바와 같이 수행되었다. 미세생검 표본은 진정제 투여 없이 서있는 말에서 상완 삼두근 근육 (장두, 삼두근 돌출부로부터의 수직 연장선과, 견갑 상완골 및 요상완골 관절 사이의 융선의 교차점 위치)으로부터 획득하였다. 14-게이지 미세생검 니들 및 미세생검 피스톤을 이용하여 샘플을 수집하였다. 샘플링 부위를 면도하고 (1 cm²면 충분하다), 무균 방식으로 제조하고, 2 ml 리도카인 2% (크실로카인(Xylocaine), 아스트라제네카(AstraZeneca: 스웨덴))을 피하 주사하였다. 메스 칼날 15번 팁을 이용하여 피부를 절개하고, 미세생검 니들을 5 cm 깊이로 전진시켰다. 불필요하다고 간주하여 피부 절개부를 봉합하지 않았고, 전체 시술은 15분 이내에 완료되었다. 수집 후 즉시, 샘플 (15-20 mg의 근육 조직)을, 20% 우태아 혈청(FBS; 기브코(Gibco); 10500-064), 페니실린 (100 UI/ml)-스트렙토마이신 (100 μ g/ml) (론자(Lonza: 벨기에 베르비에); DE17-602E) 및 암포테리신 B (1.25 μ g/ml) (론자: 벨기에 베르비에; 17-836E)로 보충된, DMEM/F12 (둘베코스 변형 이글즈 배지(Dulbecco's modified Eagle's medium)/햅즈 F12 (1:1 믹스), 15 mM HEPES, L-글루타민 포함; 론자: 벨기에 베르비에; BE12-719F)로 구성된 10 ml의 배양 배지 중에 배치시켰다. 샘플을 4°C하에 배양 배지 중에서 유지시켰고, 사용 전 제한 시간은 72시간을 초과하지 않았다.

[0068] 외식편 배양물을 이용한 mdP-세포의 단리

[0069] 근육 조직 손상을 막기 위해서는 미세생검 표본을 매우 조심스럽게 취급하여야 한다. 종류 후드 하에 작업하고, 무균 장비를 이용하여 무균 조건하에서 배양물 제조를 수행하였다. 37°C로 미리 가열된 5 ml 포스페이트 완충처리된 염수 (PBS) (DPBS, 둘베코스 포스페이트 완충처리된 염수 0.0095 M (PO₄), Ca 무함유, Mg 무함유; 론자: 벨기에 베르비에; BE17-512F) 중에서 샘플을 2회에 걸쳐 세정한 후, 비-근육 조직을 가능한 많이 제거하기 위해 시도하면서 PBS 중에서 주의하여 절개하였다. 이후, 남은 근육 조직을 한 번의 길이가 약 1 mm로 아주 작은 조각으로 나누었다. 조각을 6-웰 플레이트의 4개의 웰 내에 웰당 6 또는 7개의 비율로 분배하였다. 이어서 양이 충분하다고 간주될 때까지 (약 1 ml), 37°C로 미리 가열된 배양 배지를 한 방울씩 조심스럽게 첨가하였고, 조각은 단지 커버되기만 하면 된다. 실제로, 배양 배지가 부족하면, 외식편의 건조를 막지 못하고, 출현된 세포에 충분한 영양을 제공하지 못하며, 이식편의 부착을 과도하게 방해함에 따라 이식편은 부유 상태 그

대로 유지된다. 비어 있는 2개의 웰을 1 ml PBS로 충전시켜 외식편을 함유하는 웰이 건조되는 것을 막았다. 마지막에, 6-웰 플레이트를 제어식 대기 (5% CO₂ 및 21% O₂) 하에 37°C에서 인큐베이션시켰다. 외식편을 함유하는 웰을 매일 모니터링하였고, 필요시에는 배양 배지를 첨가하였다. 웰 내 분비된 성장 인자를 유지시키기 위해 배양 배지를 교체하지 않았다. PBS를 함유하는 웰은 필요시 보충해 주었다.

[0070] 새로 출현된 세포가 근육 조직 조각 주변에 헤일로로 형성하였을 때 (약 10일), 외식편을 제거하여 그의 피사를 막았고, 80%의 전면생장율에 도달하도록 세포에 추가 시간을 주었다 (약 10일).

[0071] 직접 단리된 mdP-세포의 골원성 또는 연골원성 분화

[0072] 세포가 80% 전면생장율에 도달하였을 때, 배양 배지를 완전히 제거하고, 골원성 또는 연골원성 분화를 수행하였다. 세포를 골원성 또는 연골원성 분화 배지 중에서 7 내지 21일 동안 유지시켰다. 각 웰을 2 ml 분화 배지로 충전시켰고, 배지를 주 1회로 완전히 교체해 주었다. 세포를 제어식 대기 (5% CO₂ 및 21% O₂) 하에 37°C에서 인큐베이션시켰다. 7일 후, 골원성 분화된 세포를 PBS 중에서 세척하고, 실온에서 5 min 동안 70% 에탄올 중에서 고정시킨 후, H₂O 중에서 수회에 걸쳐 세척하였다. 이어서 세포를 실온에서 15 min 동안 40 mM 알리자린 레드 (Alizarin Red) (시그마(Sigma)) (pH 4.2) 중에서 염색하고, H₂O 중에서 세정한 후, 대기 건조시켰다. 광학 현미경법에 의해 레드 염색을 조사하였다. 21일 후, 연골원성 분화된 세포를 실온에서 5 min 동안 70% 에탄올 중에서 고정시킨 후, H₂O 중에서 수회에 걸쳐 세척하였다. 이어서 세포를 알시안 블루(Alcian Blue)에서 염색하고, H₂O 중에서 세정한 후, 대기 건조시켰다. 광학 현미경법에 의해 블루 염색을 조사하였다.

[0073] 본 발명의 방법을 통해 잠재적으로 골 질환을 앓는 환자에서의 고통스러운 생검을 피할 수 있고, 추가로는 선행 기술의 기술과 비교하여 증가된 양으로 연골원성 또는 골원성 세포를 생산할 수 있다.