

명세서

발명의 명칭: 세포치료제의 유효성 평가 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 세포치료제의 유효성 평가 방법 및 골관절염 치료제의 제조 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 퇴행성 관절염이라고도 불리는 골관절염은 연골의 손상 혹은 퇴행성 변화로 인해 관절을 이루는 뼈와 연골 및 인대 등에 손상이 일어나고, 염증과 통증이 생기는 만성질환이다. 골관절염은 손가락, 무릎(슬관절), 엉덩이(고관절), 허리(요추관절), 목(경추관절) 등 체내 거의 모든 관절에서 발병된다. 골관절염의 발병원인은 아직까지 명확히 규명되지 않았지만, 연령, 유전적 소인, 외상, 환경적 영향 등 복합적인 원인으로 발생한다고 알려져 있다. 과거에는 그 발생이 나이와 연관이 있어 관절의 과다 사용이나 노화에 따른 연골 마모로 인하여 발생하는 것으로 여겼으나, 연골의 대사에 관여하는 여러 물질(사이토카인, 분해효소 등)들이 밝혀지면서 다양한 원인들에 의해 이들 물질이 연골세포 대사균형의 이상, 염증면역반응 등을 일으켜 연골을 손상시키는 것으로 이해되고 있다.
- [4] 골관절염의 주요 증상은 반복적인 통증과 관절의 강직감, 기동력 감소 및 기능상실이다. 임상적 경과를 보통 서서히 진행되어가며, 어느 정도 병이 진행되면서 관절연골의 소실과 변성에 의해 관절면이 불규칙해지면 통증 정도가 심해지고, 점진적인 운동장애로 인해 일상생활에 큰 지장을 초래하게 된다. 또한 관절의 변형도 야기된다. 연골의 성장과 관련한 조절인자(modulator) 및 생화학적 인자(biochemical factor)를 표적으로 한 연구들이 진행 중에 있다. 이러한 인자들은 골 형성의 효과적인 자극인자인 BMP(bone morphogenic protein) 및 세포 성장과 세포 외 기질(extracellular matrix, ECM) 형성을 자극하는 TGF- β (transforming growth factor beta)를 포함한다. 특히, TGF- β 는 콜라겐(collagen)과 프로테오글리칸(proteoglycan) 합성, 연골세포의 성장 및 조직 재생에 관여하는 것으로 알려져 있다. 또한, TGF- β 는 면역억제 및 항-염증 기능을 가지는 것으로 알려져 있다. EGF(epidermal growth factor), IGF-I(insulin-like growth factor I), BFGF(basic fibroblast growth factor)와 같은 다른 성장인자 역시 연골 재생을 자극하나, 이러한 성장인자들은 연골 손상에 효과를 나타내지 않았다.
- [5] 상기와 같은 성장인자들은 투여에 있어서, 농도, 방출 속도, 및 전달 방법 등을 결정하기 어려움이 존재한다. 연구자들은 동물실험에서 입증된 결과를 통하여, 이러한 인자들을 리포솜(liposome)을 통하거나 배지에 용해시켜 전달하려는

노력을 지속적으로 해왔다. 그러나, 이러한 인자들의 사람으로의 적용은 크게 발전하지 못한 상황이다.

- [6] 유전적으로 변형된 연골세포의 이용은 세포-매개 유전자 치료법과 결합하여 연골의 재생을 성공적으로 이끌어낸 매우 신규한 기술이다 (Lee KH 등 Hum Gene Ther 2001; 12: 1805-1813, SUN U. SONG 등 Tissue Engineering 2005; 11: 1516-1526). 이 방법은 TGF- β 유전자를 가진 레트로바이러스 벡터로 형질도입 (transduction) 된 동종 (allogeneic) 사람 연골세포와 동종 정상연골세포를 혼합하여 사용한다. 이러한 방법은 외과적 방법을 최소화함과 동시에 연골 재생을 유도할 수 있다.
- [7] 한편, 살아있는 세포를 생산하여 제공하는 세포치료제의 경우 배지 변경 등의 생산 조건이나 온도 등의 작업 환경의 변화에 의해 의약품에 차이가 발생할 수 있다. 따라서 세포치료제 생산 시 실질적으로 환자에게 적용 가능한 수준으로 치료 유효성이 확보되었는지 확인하기 위한 품질 관리 기준이 필수적인 상황이다. 그러나 유효성이 확보된 세포치료제인지 검증하는 통일된 절차와 기술을 확보하는 것은 매우 어려운 단계이다. 따라서, 각 세포치료제에 적합하게 유효성을 검증할 수 있는 방법과 기준을 수립하는 단계가 반드시 필요하다.

[8]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [9] 이러한 상황 하에서, 본 발명자들은 특정 질환, 특히, 골관절염에 대한 세포치료제의 유효성을 평가하는 방법을 개발하고, 효과가 우수한 골관절염 치료제를 제조할 수 있는 방법을 확립하기 위하여 예의 노력하였다. 그 결과, TGF- β 단백질을 발현하도록 형질전환시킨 재조합 세포에서 TGF- β 의 특정 수치 이상의 발현량을 나타내는 경우, 당해 세포치료제가 골관절염 치료에 있어 유의한 효과를 나타내는 것을 확인하였다. 또한, 형질전환시키지 않은 세포에서 TSP-1 (thrombospondin 1)이 특정 수치 이상의 발현량을 나타내는 경우, 당해 세포치료제가 골관절염 치료에 있어 유의한 효과를 발휘하는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [10] 따라서, 본 발명의 목적은 세포치료제의 유효성 평가 방법을 제공하는 데 있다.
- [11] 또한, 본 발명의 다른 목적은 골관절염 치료제를 제조하는 방법을 제공하는 데 있다.

[12]

과제 해결 수단

- [13] 이하, 본 발명에 대하여 보다 상세히 설명한다.
- [14] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 세포치료제의 유효성 평가 방법을 제공한다:
- [15] (1) (a) TGF- β (Transforming growth factor beta)로 형질전환시킨 포유류 세포의

- 제1 집단; 및 (b) 상기 유전자로 형질전환시키지 않은 포유류 세포의 제2 집단을 각각 준비하는 단계;
- [16] (2) 상기 단계 (1)의 제1 집단 및 제2 집단을 각각 바이알 (vial) 내에 충전하는 단계;
- [17] (3) 상기 단계 (2)의 제1 집단을 불활성화하는 단계;
- [18] (4) 상기 단계 (3)의 제1 집단을 배양하는 단계;
- [19] (5) 상기 단계 (4)의 상기 제1집단으로부터 TGF- β 의 농도를 측정하는 단계; 및
- [20] (6) 상기 단계 (5)에서 측정된 TGF- β 농도를 바탕으로 세포 조성물의 치료제로서의 유효성을 평가하는 단계로서,
- [21] 상기 단계 (6)에서 TGF- β 의 발현량이 0.65 ng/10⁵cell/24 hr 이상인 경우, 치료제로서 유효한 것으로 판단한다.
- [22] 이와 관련하여, 상기 제1집단은 TGF- β 으로 형질전환시켜 유전형질이 변형된 세포이다. 이와 같이 유전형질이 변형된 세포를 의약품으로 제공하고자 할 때, 예기치 못한 상황을 방지하고 안전성을 확보하기 위해서는 세포를 복제불능(replication incompetent) 상태로 만드는 불활성화 하는 과정 (예를 들어, 방사선 조사)을 거치는 것이 바람직하다. 하지만 불활성화 과정은 세포의 TGF- β 분비 및 세포에 영향을 미치게 되므로 불활성화한 후에도 치료제로서 유효한지 그 유효성을 판단하기 위한 판단 기준이 필수적으로 요구된다.
- [23] 따라서, 본 발명의 가장 큰 특징은 TGF- β 로 형질전환시킨 포유류 세포의 제1 집단; 및 상기 유전자로 형질전환시키지 않은 포유류 세포의 제2 집단으로 구성된 세포치료제(혼합세포) 중 제1 집단 내 TGF- β 발현량을 기준으로 이용하여, 상기 제1 집단의 품질을 확인함으로써 세포치료제로서의 유효성 여부를 결정하는 것이다.
- [24] 본 발명에서, TGF- β 로 형질전환시킨 포유류 세포의 제1 집단에 포함되는 세포 또는 세포군은, 바람직하게는 TGF- β 1을 발현하는 세포 또는 세포군이다.
- [25] 본 발명에서, 본 발명의 세포치료제의 유효성을 판단하는 기준으로서 상기 제1 집단의 TGF- β 발현량은 목적하는 효과를 달성하는 한, 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 0.65 ng/10⁵cell/24hr 이상이며, 보다 바람직하게는 1.0 ng/10⁵ cell/24hr 이상이고, 가장 바람직하게는 1.7 ng/10⁵cell/24hr 이상이다.
- [26] 본 발명의 일 실시예에서는 TGF- β 의 발현량이 0.63 ng/10⁵cell/24hr 일 때, 유의성있는 통증 완화 및 연골 구조 개선 효과가 없음을 확인함으로써, 최소 0.65 ng/10⁵cell/24hr 이상의 TGF- β 발현량이 요구됨을 확인하였다.
- [27] 본 발명의 세포치료제에 대한 유효성의 지표는 지표로서 정확성 및 신뢰도가 탁월하므로 골관절염 치료제의 유효성 결정에 이용될 수 있다.
- [28] 본 발명에서 상기 TGF- β 단백질의 발현 수준을 의미하는 용어는 발현량 또는 분비량으로 표현할 수 있다.
- [29] 본 명세서에서 사용되는 용어 "유효성 판단"은 본원에서 세포치료제의 치료 효과에 대해 유리하게 또는 불리하게 반응할 가능성을 지칭하는데 사용된다. 본

발명에서, 상기 판단은 이러한 반응의 정도에 관한 것이다. 예컨대, 유효성 판단은 세포치료제 처치 후에 골관절염 치료 효과 여부 및/또는 그러할 확률에 관한 것이다.

- [30] 본 발명의 바람직한 구현 예에 따르면, 상기 단계 (3)의 불활성화는 방사선 조사에 의한 것이고, 상기 방사선 조사는 감마선, 엑스선 또는 전자선일 수 있으나, 이에 제한되지 않고 당업계에 공지된 다양한 기술을 이용하여 용이하게 실시될 수 있다.
- [31] 본 발명의 바람직한 구현 예에 따르면, 상기 단계 (2)의 바이알은 동결보존액을 포함하며, 상기 동결보존액은 DMSO(Dimethyl sulphoxide)를 포함한다.
- [32] 바람직하게는, 상기 동결보존액은 DMSO를 5 내지 15 부피%로 포함할 수 있다.
- [33] 또한, 상기 단계 (3) 불활성화는 바이알을 동결하기 전 또는 후에 수행될 수 있으며, 상기 동결은 -20 내지 -196°C에서 수행될 수 있다.
- [34] 상기 단계 (4)의 배양은 동결된 바이알을 해동 후 수행되며, 상기 해동은 15 내지 40°C에서 1 내지 90분 동안 방치하여 실시할 수 있다.
- [35] 상기 단계 (4)의 배양은 6 내지 96시간동안 수행될 수 있다.
- [36] 본 발명의 바람직한 구현 예에 따르면, 상기 포유류 세포는 연골세포 또는 연골전구세포일 수 있다.
- [37] 또한, 본 발명은 추가적으로 상기 제2 집단의 TSP-1 유전자의 발현 여부를 확인하는 단계를 포함한다. 예를 들어, 정상의 연골세포, 연골전구세포 또는 줄기세포는 TSP-1을 발현함이 공지되어 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 TSP-1의 발현 유무가 상기 제2 집단을 포함하는 세포치료제의 치료 효과에 중요한 역할을 함을 확인하였다.
- [38] 따라서, 상기 제2 집단 내 TSP-1 유전자의 산물인 RNA 또는 단백질을 검출함으로써 상기 유전자의 발현 여부를 확인할 수 있으며, 제2 집단의 유효성을 평가할 수 있다.
- [39] 본 발명의 세포치료제의 유효성을 판단하는 기준으로서 상기 제2 집단의 TSP-1 발현량은 목적하는 효과를 달성하는 한, 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 31 ng/10⁵cell/24hr 이상이며, 보다 바람직하게는 50 ng/10⁵cell/24hr 이상이고, 가장 바람직하게는 90 ng/10⁵cell/24hr 이상이다.
- [40] 본 발명의 일 실시예에서는 TSP-1의 발현량이 30.53 ng/10⁵cell/24hr 일 때, 유의성있는 통증 완화 및 연골 구조 개선 효과가 없음을 확인함으로써, 최소 31 ng/10⁵cell/24hr 이상의 TSP-1 발현량이 요구됨을 확인하였다.
- [41] 본 발명의 일 구현 예에 따르면, 상기 (a) TGF-β로 형질전환시킨 포유류 세포의 제1 집단; 및 (b) 상기 유전자로 형질전환시키지 않은 포유류 세포의 제2 집단으로 구성된 세포치료제 중 상기 제1 집단 내 TGF-β의 발현량이 0.65 ng/10⁵ cell/24 hr 이상이고; 상기 제2 집단 내 TSP-1의 발현량이 31 ng/10⁵cell/24 hr 이상으로 검출(확인)된 경우, 상기 세포치료제는 골관절염에 대한 치료 효과가 있는 것으로 판단한다.

- [42] 상기 검출은 통상적으로는 시료로부터 RNA 또는 단백질을 추출하여, 추출물 중의 RNA 또는 단백질의 특정 부분을 검출함으로써 실시할 수 있다. 이러한 RNA 또는 단백질의 검출은 면역분석학적 방법, 하이브리드화 반응 및 증폭반응에 의해 측정될 수 있으나, 이에 제한되지 않고 당업계에 공지된 다양한 기술을 이용하여 용이하게 실시될 수 있다.
- [43] 상기 검출 제제는 상기 유전자에 특이적인 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 프라이머 쌍, 프로브 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된다. 즉, 핵산의 검출은 유전자를 암호화하는 핵산 분자 또는 상기 핵산 분자의 상보물에 하이브리드화되는 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용하는 증폭반응에 의해 수행될 수 있다.
- [44] 예를 들어, 프라이머를 이용한 핵산의 검출은 PCR (polymerase chain reaction)과 같은 증폭 방법을 사용하여 유전자 서열을 증폭한 다음 당업계에 공지된 방법으로 유전자의 증폭 여부를 확인함으로써 수행될 수 있다.
- [45] 또한, 상기 검출 제제는 상기 단백질의 아미노산 부위에 대하여 특이적으로 결합하는 항체일 수 있고, 다클론 항체, 단클론 항체, 재조합 항체 및 이들의 조합을 모두 포함한다.
- [46] 상기 항체는 다클론 항체, 단클론 항체, 재조합 항체 및 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라 및 항체 분자의 기능적인 단편, 예를 들어, Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv를 모두 포함한다. 항체 생산은 당업계에 널리 공지된 기술을 이용하여 용이하게 제조할 수 있고, 제조되어 상업적으로 판매되는 항체를 이용할 수 있다.
- [47]
- [48] 또한, 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 골관절염 치료제 제조 방법을 제공한다:
- [49] (1) (a) TGF- β 로 형질전환시킨 포유류 세포의 제1 집단; 및 (b) 상기 유전자로 형질전환시키지 않은 포유류 세포의 제2 집단을 각각 준비하는 단계;
- [50] (2) 상기 단계 (1)의 제1 집단 및 제2 집단을 각각 바이알 내의 동결보존액 내에 충전하는 단계;
- [51] (3) 상기 단계 (2)의 제1 집단을 바이알을 동결하기 전 또는 후에 불활성화하는 단계;
- [52] (4) 상기 단계 (3)의 상기 제1 집단을 해동하는 단계;
- [53] (5) 상기 단계 (4)의 제1 집단을 배양하는 단계;
- [54] (6) 상기 단계 (5)의 제1 집단으로부터 TGF- β 의 발현량을 측정하는 단계; 및
- [55] (7) 상기 단계 (6)에서 측정된 TGF- β 발현량이 0.65 ng/10⁵ cell/24 hr 이상인 세포를 선별하는 단계.
- [56] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 방법은 (8) 단계로서 상기 제2 집단의 TSP-1의 발현량을 측정하여 상기 TSP-1의 발현량이 31 ng/10⁵ cell/24 hr 이상인 세포를 선별하는 단계를 추가적으로 포함한다.

[57] 즉, 본 발명의 방법은 상기 제 1 집단의 TGF- β 발현량이 0.65 ng/10⁵ cell/24 hr 이상이고, 상기 제2 집단의 TSP-1의 발현량이 31 ng/10⁵ cell/24 hr 이상인 세포들을 선별하고, 치료제로 유효한 것으로 판단하여 제조한다.

[58] 본 발명의 골관절염 치료제 제조 방법은 상술한 (a) TGF- β 로 형질전환시킨 포유류 세포의 제1 집단; 및 (b) 상기 유전자로 형질전환시키지 않은 포유류 세포의 제2 집단 내 TGF- β 및/또는 TSP-1의 발현량을 기반으로 유효성을 판단하는 구성을 포함하므로, 중복된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.

[59]

발명의 효과

[60] 본 발명의 세포치료제에 대한 유효성 판단 기준으로서 (a) TGF- β 로 형질전환시킨 포유류 세포의 제1 집단 내 TGF- β 발현 수준; 및 (b) 상기 유전자로 형질전환시키지 않은 포유류 세포의 제2 집단 내 TSP-1 발현 수준을 이용하면, 개개의 세포치료제에 대한 치료 유효성을 치료 개시 전에 확실하게 판정할 수 있어, 치료 효과를 향상시키는 것이 가능해진다. 또한, 효과가 얻어지지 않는 세포치료제의 사용을 회피할 수 있기 때문에 불필요한 시술 및 부작용을 회피할 수 있다.

[61]

도면의 간단한 설명

[62] 도 1은 TC 세포에서 TGF- β 1 단백질의 발현량을 보여준다.

[63] 도 2는 세포 생산 batch 별 TGF- β 1의 발현량을 확인한 결과를 보여준다.

[64] 도 3a는 MIA 골관절염 동물모델에 혼합세포 및/또는 anti-TGF- β 1 중화 항체(anti-TGF- β 1 neutralizing antibody)를 처리했을 때 본 프레이 필라멘트(von Frey filament) 테스트 결과를 보여준다. 도 3b는 상기 본 프레이 필라멘트 결과를 AUC(area under the curve)로 나타낸 것이다.

[65] 도 4는 HC 및 TC 세포에서 TSP-1 단백질의 발현량을 보여준다.

[66] 도 5는 세포 생산 batch 별 TSP-1의 발현량을 확인한 결과를 보여준다.

[67] 도 6a는 MIA 골관절염 동물모델에 혼합세포 및/또는 anti-TSP-1 중화 항체를 처리했을 때 본 프레이 필라멘트 테스트 결과를 보여준다. 도 6b는 상기 본 프레이 필라멘트 결과를 AUC(area under the curve)로 계수한 결과를 보여준다.

[68] 도 7a는 MIA 골관절염 동물모델에 다양한 값의 TGF- β 1 발현을 나타내는 혼합세포를 처리했을 때 본 프레이 필라멘트 테스트 결과를 보여준다. 도 7b는 상기 본 프레이 필라멘트 결과를 AUC(area under the curve)로 나타낸 것이다. 도 7c는 H&E 염색 조직 분석 결과를 보여준다.

[69] 도 8a는 TGF- β 1 유효 최소값을 확인하기 위하여 120Gy 혼합세포 1, 2 VFF test 결과를 보여준다. 도 8b는 AUC로 계수한 결과를 보여준다.

[70] 도 9a는 TSP-1 유효 최소값을 확인하기 위하여 120Gy 혼합세포 1, 2 VFF test

결과를 보여준다. 도 9b는 AUC로 계수한 결과를 보여준다. 도 9c는 H&E 염색 조직 분석 결과를 보여준다.

[71]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[72] 이하, 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[73]

[74] 실시예 1. 세포치료제의 준비

[75] 본 발명에 이용된 세포치료제는 TGF- β 1(NCBI Reference Sequence: NM_000660.6)를 발현하도록 형질전환 시킨 세포집단(제1 집단; TC) 및 상기 유전자로 형질전환 시키지 않은 정상 세포집단(제2 집단; HC)을 포함하는 혼합세포이다.

[76] 상기 TC는 TGF- β 1의 cDNA를 공지의 방법에 따라 세포에 주입하여 제조할 수 있다. 예를 들면, TGF- β 1의 cDNA를 암피실린, 네오마이신 등의 저항유전자를 갖는 공지의 벡터[예를 들어, Promega사의 pCI(암피실린 저항유전자 함유)]에 포함시켜 TGF- β 1의 cDNA를 포함하는 벡터를 제조한 후, 연골세포에 인산칼슘(calcium phosphate) 방법 또는 리포펙틴 (lipofectin) 방법 등의 공지의 방법에 따라 주입함으로써 제조할 수 있다.

[77] 또한, 상기 HC 및 TC는 사람 유래 연골세포로서, HC는 정상 연골세포이고 TC는 TGF- β 1가 분비되도록 형질전환된 연골세포이다. HC 및 TC의 제작방법은 [Cytotherapy, 2012 Feb; 14(2): 247-256] 및 미국 특허 제7,005,127호와 미국 특허 제7,282,200호에 개시되어 있다.

[78] 상기 HC 및 TC의 혼합비는 세포수를 기준으로 3:1로 혼합하여 이하 실시예에 적용하였다.

[79] 제작된 TC 및 HC는 각각 바이알에 충전한 후 동결하여 혼합세포 치료제로의 사용을 위해 준비/보관하였다. 이때, TC는 동결 전 또는 동결 후 방사선 조사를 통해 불활성화하였다.

[80]

[81] 실시예 2. 세포치료제에서의 TGF- β 1 발현 확인

[82] 본 발명자들은 실시예 1과 같이 준비한 세포치료제인 혼합세포에 대하여 유효성을 판단하는 기준을 구축하고자, 제조 공정에 따라 제조된 TC 세포가 TGF- β 1를 발현하는지 여부를 확인하였다.

[83] TC 세포를 바이알에 충전한 후 동결시킨 상태에서 불활성화를 시켰다. 불활성화 시킨 후 동결 보관 중인 세포 바이알을 꺼내어 37°C 항온조에서 해동시킨 후, 세포를 바이알에서 꺼내 배지가 들어있는 코니컬 튜브에 넣었다.

세포를 210 x g에서, 5 분간 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 세포 침전물을 충분히 풀어주고 배양배지로 현탁시킨 다음, 6-well plate에 1.0×10^5 cells/well이 되도록 3 개 well에 접종하고 2 mL 배양배지를 넣어준 후 24시간 동안 37°C CO₂ 배양기에서 배양하였다.

[84] 24시간 후, 배지를 교체하고 다시 37°C CO₂ 배양기에서 24 시간 배양한 후에 1 mL씩 배양액을 샘플링하였다. 이때 3 개 well에는 배지만을 단독으로 2mL 넣어 음성 대조군으로 이용하였다. 샘플링한 배양액 내 TGF- β 1의 양을 ELISA 방법으로 측정하였으며, 음성 대조군도 동일하게 측정하였다. TGF- β 1 분비량 계산은 "샘플의 TGF- β 1 평균 분비량 - 음성 대조군의 TGF- β 1 평균 분비량"으로 계산하였다.

[85] 그 결과, 도 1 및 하기 표 1에 나타낸 바와 같이, TC 세포에서는 평균 5.07ng/1x10⁵cells/24hr의 TGF- β 1이 발현됨을 확인할 수 있었다.

[86]

[87] [표1]

TGF- β 1(ng/1x10 ⁵ cells/24hr)	TC
평균	5.07

[88]

[89] **실시예 3. 배치(batch)별 TGF- β 1 발현량 확인**

[90] TC 세포에서 세포치료제로서 유효성을 나타내는 TGF- β 1 발현 기준을 구축하기 위하여 세포 배양 배치 (batch)별로 TGF- β 1의 발현량을 조사하였다.

[91] 그 결과, 도 2 및 하기 표 2에 나타낸 바와 같이, 배치별로 TGF- β 1 단백질의 발현량에 차이가 나타남을 알 수 있었다.

[92]

[93] [표2]

TC	Batch 1	Batch 2	Batch 3
TGF- β 1(ng/1x10 ⁵ cells/24hr)	9.86	9.87	12.46

[94]

[95] 이와 같이, 생산 배치별로 TGF- β 1 단백질의 발현량에 차이가 나타나므로, 공정이 달라지는 등의 변화가 있을 경우에 더 큰 차이가 발생할 가능성도 존재한다. 따라서, 유효한 효과를 동일하게 재현해 낼 수 있는 세포치료제의 품질관리를 위해서는, TGF- β 1 발현의 기준 농도가 구축되어야 함을 알 수 있다.

[96]

[97] **실시예 4. 세포치료제에서 TGF- β 1 발현과 치료효능의 관련성 검증**

[98] 본 발명자들은 실질적으로 TC의 TGF- β 1 발현량과 치료효과 사이에 밀접한 관련이 존재하는지 여부를 검증하기 위해, MIA 골관절염 동물모델을 제작한 후 혼합세포 및/또는 anti-TGF- β 1 중화 항체를 처리하여 통증 변화를 관측하였다.

- [99] MIA 투여 2주 후 골관절염이 유발된 개체를 대상으로 대조군인 CS-10 투여그룹(vehicle) 또는 HC와 TC를 3:1로 섞은 혼합세포(1.2×10^6)를 왼쪽 무릎 관절강 내에 투여하였다. 중화항체실험을 위해 대조항체(IgG, 500ng/30 μ L) 및 TGF- β 1 중화항체(anti-TGF- β 1, 500ng/30 μ L)를 혼합세포 투여 당일과 3일째에 왼쪽 무릎 관절강 내에 투여하였다.
- [100] 이 후, 본 프레이 필라멘트 테스트를 측정하였다. 상기 테스트는 1980년 Dixon(Chaplan S.R. et al., Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw, Journal of Neuroscience Methods, 1994, 53: 55-63; 및 Dixon W.J., Efficient analysis of experimental observations, Annual Reviews Pharmacology and Toxicology, 1980, 20: 441-62)이 확립한 50% up & down threshold 법을 사용하였다. N 값이 각각 0.4, 0.6, 1, 2, 4, 6, 8, 15 gram(g)인 총 9 개의 본 프레이 필라멘트를 이용하여 통증 반응을 조사하고 정해진 패딘에 따라서 역치(threshold)값을 계산하였다
- [101] 그 결과, 도 3a 및 도 3b에 나타낸 바와 같이, 실험 후 7일째 CS-10 투여그룹(vehicle)에서 1.46 ± 0.54 , 혼합세포 투여그룹에서 4.87 ± 0.8 의 측정결과를 확인하였다. 이러한 통증 치료 효과는 세포 투여 후 42일째까지 유사한 경향으로 나타났으며, CS-10 투여그룹과 비교했을 때 모든 측정값에서 통계적 유의성이 있는 진통 효능이 관찰되었다($P < 0.05$).
- [102] 또한, 혼합세포 투여 시 TC에서 분비되는 TGF- β 1이 진통효능에 어떠한 영향이 나타나는지 확인하기 위해, TGF- β 1 단백질의 활성을 중화 및 억제하여 그 효능을 차단시키는 anti-TGF- β 1 중화 항체를 함께 처리했을 때, 혼합세포 투여그룹에서 나타났던 통증 치료 효과는 투여 후 7일째 TGF- β 1 중화항체 투여그룹(혼합세포+anti-TGF- β 1)에서 1.43 ± 0.38 로 CS-10 투여그룹과 비슷한 정도로 통증이 나타남을 확인할 수 있었으며, 42일째까지 차이가 나타나지 않았다. 반면 대조항체(IgG)를 사용한 그룹(혼합세포+IgG)은 혼합세포 투여그룹과 유사한 통증 치료 효과를 유지하였다.
- [103] 상기로부터 TC에서 분비되는 TGF- β 1이 골관절염 치료에 중요한 영향을 나타냄을 알 수 있다.
- [104]
- [105] 실시예 5. 세포치료제에서의 TSP-1 발현 확인
- [106] HC 및 TC 세포에서 TSP-1(NCBI Reference Sequence: NM_003246.3) 단백질의 발현여부 및 발현량을 조사하기 위하여, 상기 실시예 2에서 상술한 바와 같이 동일하게 동결 보관중인 각 세포 바이알을 해동하고 ELISA 방법으로 TSP-1의 양을 측정하였다.
- [107] 그 결과, 도 4 및 하기 표 3에 나타낸 바와 같이, HC 세포에서는 $180.37\text{ng}/1 \times 10^5$ cells/24hr의 TSP-1 이 발현되었으나, TC 세포에서는 $0.29\text{ng}/1 \times 10^5$ cells/24hr 으로 TSP-1의 발현이 저해됨을 확인할 수 있었다.
- [108]

[109] [표3]

TSP-1(ng/1x10 ⁵ cells/24hr)	HC	TC
평균	180.37	0.29

[110]

[111] 실시예 6. 배치(batch)별 TSP-1 발현량 확인

[112] HC 세포에서 세포치료제로서 유효성을 나타내는 TSP-1 발현 기준을 구축하기 위하여, 상기 실시예 2에서 상술한 바와 같이 동일하게 세포 배양 배치(batch)별로 TSP-1의 발현량을 조사하였다.

[113] 그 결과, 도 5 및 하기 표 4에 나타난 바와 같이, 배치마다 TSP-1 발현량에 차이가 나타남을 알 수 있었다.

[114]

[115] [표4]

HC	Batch 1	Batch 2	Batch 3
TSP-1(ng/1x10 ⁵ cells/24hr)	76.41	162.30	116.14

[116]

[117] 이와 같이, 생산 배치별로 TSP-1 단백질의 발현량에 차이가 나타나므로, 공정이 달라지는 등의 변화가 있을 경우에 더 큰 차이가 발생할 가능성도 존재한다. 따라서, 유효한 효과를 동일하게 재현해 낼 수 있는 세포치료제의 품질관리를 위해서는, TSP-1 발현의 기준 농도가 구축되어야 함을 알 수 있다.

[118]

[119] 실시예 7. 세포치료제에서 TSP-1 발현과 치료효능의 관련성 검증

[120] 본 발명자들은 혼합세포의 치료 효과를 검증하기 위해, 상기 실시예 4에서 상술한 바와 같이 동일하게 MIA 골관절염 동물모델을 제작한 후 혼합세포 및 anti-TSP-1 중화 항체를 처리하여 통증 변화를 관측하였다.

[121] 그 결과, 도 6a 및 6b에 나타난 바와 같이, 실험 후 7일째 CS-10 투여그룹(Vehicle)에서 1.19 ± 0.23 , 혼합세포 투여그룹에서 6.79 ± 1.03 의 측정결과를 확인하였다. 이러한 통증 치료 효과는 혼합세포 투여 후 42일째까지 유사한 경향으로 나타났으며, CS-10 투여그룹과 비교했을 때 모든 측정값에서 통계적 유의성이 있는 진통 효능이 관찰되었다($P < 0.05$).

[122] 또한, 혼합세포 투여 시 HC에서 분비되는 TSP-1이 진통효능에 어떠한 영향이 나타나는지 확인하기 위해, TSP-1 단백질의 활성을 중화 및 억제하여 그 효능을 차단시키는 anti-TSP-1 중화 항체를 함께 처리했을 때, 혼합세포 투여그룹에서 나타났던 통증 치료 효과는 투여 후 7일째 TSP-1 중화항체 투여그룹(anti-TSP-1+혼합세포)에서 2.28 ± 0.54 로 CS-10 투여그룹과 비슷한 정도로 통증이 나타남을 확인할 수 있었으며, 42일째까지 비슷한 경향이 유지되었다. 반면, 대조항체(IgM)를 사용한 그룹(IgM+혼합세포)은 혼합세포

투여그룹과 유사한 진통효과를 나타내었다($p<0.05$).

[123] 상기로부터 HC에서 분비되는 TSP-1이 골관절염 치료에 중요한 영향을 나타냄을 알 수 있다.

[124]

[125] 실시예 8. 세포치료제에서 TGF- β 1 최소 용량 검증

[126] 본 발명자들은 혼합세포의 구성 세포인 TC의 TGF- β 1의 최소값을 확인하기 위해 MIA 투여 2주 후 골관절염이 유발된 개체를 대상으로 각각 다른 TGF- β 1 값을 나타내는 TC를 이용하여 HC와 TC를 3:1의 세포수 비율로 섞은 혼합세포(2.8×10^5 cells)를 처리한 후 통증 변화를 관찰하였다.

[127] 이때, 서로 다른 조건 등의 영향으로 TGF- β 1 발현량이 다른 TC의 상황을 구현하기 위해, 각각 다른 TGF- β 1 값을 나타내는 TC를 준비하였다. 각각 TGF- β 1에 대한 shRNA 처리 및 150 Gy 감마선 조사를 이용하여 제작하였고, 표 5와 같은 TGF- β 1 (ng/ 1×10^5 cells/24 hr) 평균값을 확인하였다.

[128]

[129] [표5]

	TC	shRNA Control	shRNA	150Gy
TGF- β 1 (ng/ 1×10^5 cells/24 hr)	21.71	7.00	0.35	0.63

[130]

[131] 그 결과, 도 7a 및 도 7b에 나타난 바와 같이, 실험 후 14일째 CS-10 투여그룹(Vehicle)에서 1.17 ± 0.53 , 혼합세포 투여그룹에서 6.06 ± 1.91 의 측정결과를 확인하였다. 이러한 통증 치료 효과는 세포 투여 후 42일째까지 유사한 경향으로 나타났으며, CS-10 투여그룹과 비교했을 때 모든 측정값에서 통계적 유의성이 있는 진통 효능이 관찰되었다($P<0.05$).

[132] 또한, 세포 투여 후 14일째 shRNA control(shCon) 처리 투여그룹에서 6.21 ± 1.59 , 150 Gy 감마선 조사된 TC를 이용한 혼합세포 투여그룹에서 1.39 ± 0.23 , TGF- β 1에 대한 shRNA를 함께 처리한 혼합세포 투여그룹에서 0.86 ± 0.49 의 측정 결과를 확인하였다. 이러한 효과는 세포 투여 후 42일째까지 유사한 경향으로 나타났다.

[133] 본 프레이 필라멘트 측정결과를 AUC 값으로 표시하였을 경우에도 대조군인 CS-10 투여그룹(Vehicle) 대비 혼합세포 투여그룹과 shRNA 대조군(shCon) 처리 투여 그룹에서 통계적으로 유의한 결과를 확인하였다 ($p<0.05$).

[134] 동일한 동물 모델에서 분리한 조직의 H&E 염색 분석 결과, 도 7c에 나타난 바와 같이, 혼합세포 투여그룹과 shCon 처리 투여그룹에서 연골 구조 개선이 관찰되었다.

[135] 반면, 대조물질인 CS-10 투여그룹(Vehicle)과 TGF- β 1에 대한 shRNA를 함께

처리한 혼합세포 투여그룹 및 150 Gy 감마선 조사된 TC를 이용한 혼합세포 투여그룹에서는 연골 구조 개선이 관찰되지 않았다.

[136]

[137] 또한, 추가적으로 TC에서 분비되는 TGF- β 1의 통증완화 및 연골 구조 개선 유효 최소값을 확인하기 위하여, 또 다른 배치에서 생산된 TC를 이용한 혼합세포의 진통 효과 및 연골 구조개선을 확인하였다.

[138] 준비된 TC의 TGF- β 1 값은 9 ng/1x10⁵ cells/24 hr 및 1.7 ng/1x10⁵ cells/24 hr이었으며, 이들을 각각 혼합세포 조제에 사용하였고, 조제된 혼합세포는 각각 9ng_혼합세포 및 1.7ng_혼합세포로 표시하였다.

[139] 그 결과, 도 8a 및 도 8b에 나타낸 바와 같이, 9ng_혼합세포, 1.7ng_혼합세포 및 대조군인 CS-10 투여그룹(Vehicle) 투여 후 14일째 CS-10 투여그룹(Vehicle)에서 1.48 $\pm$ 0.26, 9ng_혼합세포에서 5.57 $\pm$ 1.13, 1.7ng_혼합세포에서 7.41 $\pm$ 1.21의 측정결과를 확인하였다. 세포 투여 후 42일째까지 유사한 경향으로 나타났으며, CS-10 투여그룹과 비교했을 때 9ng_혼합세포 및 1.7ng_혼합세포 투여그룹 측정값 모두 통계적 유의성이 관찰되었다 (P<0.05).

[140] 본 프레이 필라멘트 측정결과를 AUC 값으로 표시하였을 경우에도 대조군인 CS-10 투여그룹(Vehicle) 대비 9ng_혼합세포 및 1.7ng_혼합세포 투여그룹에서 통계적 유의성이 관찰되었다 (p<0.05).

[141] 따라서, TC에서 분비되는 각각 다른 TGF- β 1 를 이용한 혼합세포 투여 후 확인 결과에서, 통증완화 및 연골 구조 개선 유효 TGF- β 1 최소값은 150 Gy 감마선 조사-혼합세포 투여그룹에서 확인된 0.63 ng/1x10⁵ cells/24 hr보다 큰 값, 즉, 0.65 ng/1x10⁵ cells/24 hr 이상인 것으로 확인되었다.

[142]

[143] 실시예 9. 세포치료제에서 TSP-1 최소 용량 검증

[144] 본 발명자들은 혼합세포의 구성 세포인 HC의 TSP-1의 최소값을 확인하기 위해 MIA 투여 2주 후 골관절염이 유발된 개체를 대상으로 각각 다른 TSP-1 값을 나타내는 HC를 이용하여 HC와 TC를 3:1로 섞은 혼합세포(2.8x10⁵)를 처리한 후 통증 변화를 관측하였다.

[145] 이때, 서로 다른 조건 등의 영향으로 TSP-1 발현량이 다른 HC의 상황을 구현하기 위해, 각각 다른 TSP-1 발현을 나타내는 HC를 준비하였다.

[146] 각각 다른 TSP-1 값의 HC는 TSP-1에 대한 siRNA를 이용하여 제작하였고, 표 6과 같은 TSP-1 (ng/1x10⁵ cells/24 hr) 평균값을 확인하였다.

[147]

[148] [표6]

	HC	siRNA Control	siRNA 1	siRNA 2
TSP-1 (ng/1x10 ⁵ cells/24 hr)	349.03	200.09	92.13	30.53

[149]

[150] 그 결과, 도 9a 및 도 9b에 나타난 바와 같이, 실험 후 14일째 CS-10 투여그룹(Vehicle)에서 0.6 ± 0.19 , 혼합세포 투여그룹에서 4.7 ± 1.03 , 혼합세포+siRNA Control 투여그룹에서 4.7 ± 1.67 의 측정 결과를 확인하였다. 이러한 효과는 세포 투여 후 42일째까지 유사한 경향으로 나타났으며, CS-10 투여그룹과 비교했을 때 측정값에서 통계적 유의성이 있는 진통 효능이 관찰되었다 ($P < 0.05$).

[151] 또한, 세포 투여 후 14일째 혼합세포+siRNA 1 투여그룹에서 3.95 ± 0.94 , 혼합세포+siRNA 2 투여그룹에서 1.89 ± 0.9 의 측정결과를 확인하였다. CS-10 투여그룹과 비교했을 때 혼합세포+siRNA 1 투여그룹에서 통계적 유의성이 있는 진통 효능이 관찰되었다. 이러한 통증 치료 효과는 세포 투여 후 42일째까지 유사한 경향으로 나타났다.

[152] 또한, 본 프레이 필라멘트 측정결과를 AUC 값으로 표시하였을 경우에도 대조군인 CS-10 투여그룹(Vehicle) 대비 혼합세포 투여그룹, siRNA control 처리 투여그룹 및 혼합세포+siRNA 1 투여그룹에서 통계적으로 유의한 결과를 확인하였다 ($p < 0.05$).

[153] 추가적으로, 동일한 동물 모델에서 분리한 조직의 H&E 염색 분석 결과, 도 9c에 나타난 바와 같이, 혼합세포 투여그룹과 siRNA control 처리 투여그룹, 혼합세포+siRNA 1 투여그룹에서 연골 구조 개선이 관찰되었다. 반면, 대조군인 CS-10 투여그룹(Vehicle)과 혼합세포+siRNA 2 투여그룹에서는 연골 구조 개선이 관찰되지 않았다.

[154] 따라서, 상기로부터 HC에서 분비되는 TSP-1의 통증완화 및 연골 구조 개선 유효 최소값은 혼합세포+siRNA 2 투여그룹에서 확인된 $30.53 \text{ ng}/1 \times 10^5 \text{ cells}/24 \text{ hr}$ 보다 큰 값, 즉, $31 \text{ ng}/1 \times 10^5 \text{ cells}/24 \text{ hr}$ 이상인 것으로 확인되었다.

[155]

[156] 결론적으로, 본 발명에 따라 확립된, (a) 제1 집단인 TGF- β 로 형질전환시킨 포유류 세포의 특정 수준의 TGF- β 발현량; 및 (b) 제2 집단인 상기 유전자로 형질전환시키지 않은 포유류 세포의 특정 수준의 TSP-1의 발현량을 기반으로 하는 골관절염 세포치료제에 대한 유효성 평가 방법을 이용하는 경우, 개개의 세포치료제에 대한 유효성을 치료 개시 전에 확실하게 판정할 수 있어, 균일한 치료 효과를 나타내도록 할 수 있다.

[157]

청구범위

- [청구항 1] 다음 단계를 포함하는 세포치료제의 유효성 평가 방법:
- (1) (a) TGF- β (Transforming growth factor beta)로 형질전환시킨 포유류 세포의 제1 집단; 및 (b) 상기 유전자로 형질전환시키지 않은 포유류 세포의 제2 집단을 각각 준비하는 단계;
 - (2) 상기 단계 (1)의 제1 집단 및 제2 집단을 각각 바이알 내에 충전하는 단계;
 - (3) 상기 단계 (2)의 제1 집단을 불활성화하는 단계;
 - (4) 상기 단계 (3)의 제1 집단을 배양하는 단계;
 - (5) 상기 단계 (4)의 상기 제1 집단으로부터 TGF- β 의 농도를 측정하는 단계; 및
 - (6) 상기 단계 (5)에서 측정된 TGF- β 농도를 바탕으로 세포 조성물의 치료제로서의 유효성을 평가하는 단계로서,
- 상기 단계 (6)에서 TGF- β 의 발현량이 0.65 ng/10⁵ cell/24 hr 이상인 경우, 치료제로서 유효한 것으로 판단하는 것인, 방법.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
- 상기 단계 (4)의 불활성화는 방사선 조사에 의한 것인, 방법.
- [청구항 3] 제2항에 있어서,
- 상기 방사선 조사는 감마선, 엑스선 또는 전자선인 것인, 방법.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
- 상기 단계 (2)의 바이알은 동결보존액을 포함하는 것인, 방법.
- [청구항 5] 제4항에 있어서,
- 상기 단계 (2)의 동결보존액은 DMSO(Dimethyl sulphoxide)를 포함하는 것인, 방법.
- [청구항 6] 제5항에 있어서,
- 상기 단계 (2)의 동결보존액은 DMSO를 5 내지 15부피%로 포함하는 것인, 방법.
- [청구항 7] 제1항에 있어서,
- 상기 단계 (3) 불활성화는 바이알을 동결하기 전 또는 후에 수행되는 것인, 방법.
- [청구항 8] 제7항에 있어서,
- 상기 동결은 -20 내지 -196°C에서 수행되는 것인, 방법.
- [청구항 9] 제7항에 있어서,
- 상기 단계 (4)의 배양은 동결된 바이알을 해동 후 수행되는 것인, 방법.
- [청구항 10] 제9항에 있어서,
- 상기 해동은 15 내지 40°C에서 1 내지 90분 동안 방치하는 것인, 방법.
- [청구항 11] 제1항에 있어서,

- 상기 단계 (4)의 배양은 6시간 내지 96시간 동안 수행되는 것인, 방법.
- [청구항 12] 제1항에 있어서,
상기 치료는 골관절염의 치료인 것인, 방법.
- [청구항 13] 제1항에 있어서,
상기 제2 집단의 TSP-1(thrombospondin 1)의 발현량을 확인하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 방법.
- [청구항 14] 제13항에 있어서,
상기 TSP-1의 발현량이 $31 \text{ ng}/10^5 \text{ cell}/24 \text{ hr}$ 이상인 경우, 치료제로서 유효한 것으로 판단하는 것인, 방법.
- [청구항 15] 제1항에 있어서,
상기 포유류 세포는 연골세포 또는 연골전구세포인 것인, 방법.
- [청구항 16] 다음 단계를 포함하는 골관절염 치료제 제조 방법:
(1) (a) TGF- β (Transforming growth factor beta)로 형질전환시킨 포유류 세포의 제1 집단; 및 (b) 상기 유전자로 형질전환시키지 않은 포유류 세포의 제2 집단을 각각 준비하는 단계;
(2) 상기 단계 (1)의 제1 집단 및 제2 집단을 각각 바이알 내의 동결보존액 내에 충전하는 단계;
(3) 상기 단계 (2)의 제1 집단을 바이알을 동결하기 전 또는 후에 불활성화하는 단계;
(4) 상기 단계 (3)의 상기 제1 집단을 해동하는 단계;
(5) 상기 단계 (4)의 제1 집단을 배양하는 단계;
(6) 상기 단계 (5)의 제1집단으로부터 TGF- β 의 발현량을 측정하는 단계; 및
(7) 상기 단계 (6)에서 측정된 TGF- β 발현량이 $0.65 \text{ ng}/10^5 \text{ cell}/24 \text{ hr}$ 이상인 세포를 선별하는 단계.
- [청구항 17] 제16항에 있어서,
상기 방법은 (8) 단계로서 상기 제2 집단의 TSP-1(thrombospondin-1)의 발현량을 측정하여 상기 TSP-1의 발현량이 $31 \text{ ng}/10^5 \text{ cell}/24 \text{ hr}$ 이상인 세포를 선별하는 단계를 추가적으로 포함하는 것인, 방법.