

명세서

발명의 명칭: 골관절염 예방 또는 치료용 약학적 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 골관절염 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 이의 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. 골관절염은 그 발생이 나이와 연관이 있어 관절의 과다 사용이나 노화에 따른 연골 마모로 인하여 발생하는 것으로 여겨져 왔다. 하지만 최근 골관절염의 발생 기전과 연골세포의 여러 자극에 대한 반응들이 알려지면서, 단순히 노화와 연관되어 피할 수 없는 현상이 아니라 연골세포 대사균형의 이상 등 다양한 원인에 의한 관절 손상과, 이로 인해 여러 전신적 인자와 국소적 인자들이 서로 작용하여 발생하는 관절질환으로 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.
- [5] 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.
- [6] 특히, TGF- β 는 프로테오글리칸(proteoglycan) 합성, 연골세포의 생장 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.
- [7] 상기와 같은 성장인자들은 투여에 있어서, 농도, 방출 속도, 및 전달 방법 등을 결정하기 어려움이 존재한다. 연구자들은 동물실험에서 입증된 결과를 통하여, 이러한 인자들을 리포솜을 통하거나 배지에 용해시켜 전달하려는 노력을

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

- [8] 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 형질 도입 (transduction) 된 동종(allogeneic) 사람 연골세포와 동종 정상연골세포를 혼합하여 사용한다. 이러한 방법은 외과적 방법을 최소화함과 동시에 연골 재생을 유도할 수 있다.
- [9] 성숙된 연골 세포는 구형의 모양을 띄며 제 2형 교원질 섬유(Type II collagen)와 아주 큰 분자량의 응축 프로테오글리칸(proteoglycan), 비교원질(non-collagenous fiber) 섬유를 합성한다.
- [10] 골관절염에서의 관절의 손상을 연골세포를 이식하여 치료하려는 노력이 지속적으로 이루어지고 있다. 특히 연골의 손상에 대한 조직공학적인 지지체로서 연골세포를 이용하고자 하는 기술들이 공개된 바 있는데, 한국 특허 공개번호 제 10-2015-0014369 호에서는 연골세포 또는 연골분화능을 갖는 세포를 V자 모양의 바닥의 플레이트(deep well plate)에 분주하고, 원심분리한 후 3차원 배양하여 구슬형의 연골세포 치료제를 제조하는 기술을 언급하고 있다. 상기 문헌에서는 구슬형의 연골조직이 손상부위를 채움으로써 연골손상부위의 모양 및 두께에 상관없이 결손부위를 복구할 수 있음을 언급하고 있다.
- [11] 또한, 미국 특허 공개번호 제 2005-0152882 호에서는 1 내지 27 mm³의 직경을 갖는 입자(particle) 형태의 연골과 매트릭스의 조합을 포함하는 연골의 성장 촉진용 조성물을 언급하고 있다.
- [12] 또한, 미국 특허 공개번호 제 2016-0038544 호에서는 골관절염에서의 연골 대체를 위한 연골-유사조직을 제조하기 위하여 고밀도의 연골세포 전구체(chondroblast) 집단을 형성한다.
- [13] 상기와 같이 지금까지 알려진 연골세포를 이용한 치료용 조성물의 경우 대부분 작게 만든 조직이나 고밀도 집단 등의 덩어리를 이용하는 것이 일반적이었으며, 조직이나 세포 덩어리가 배제된 연골세포 조성물의 치료 효과에 대해서는 알려진 바 없다. 한편, 생물학적 제제의 경우 아주 작은 차이로도 전혀 다른 결과를 나타낼 수 있다. 따라서 아직까지 덩어리를 형성하지 않는 연골세포가 치료 효과를 나타낼 수 있는지에 대해서는 사실 상 입증된 바가 없는 상황이다.
- [14] 또한, 실질적으로 환자에게 적용 가능한 수준으로 유효성이 확보된 세포치료제를 제공하기 위해서는 어떠한 크기와 유형의 세포가 요구되는 지에 대한 특정 및 선별의 필요성이 여전히 남아있다.
- [15]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [16] 이러한 상황 하에서, 본 발명자들은 특정 질환, 특히, 골관절염에 대한 세포치료제를 개발하기 위하여 예의 노력하였다. 그 결과, 목적의 유전자, 예를 들어, TGF- β 를 발현하도록 형질전환시킨 세포 및 형질전환시키지 않은 정상 세포 각각이 특정 크기를 갖도록 선별하는 것이 연골세포 상호간의 응집을 최소화하면서, 유효한 치료 효과를 나타낼 수 있음을 확인하였다.
- [17] 또한, 선별된 특정 크기 이하의 혼합세포가 환자에게 투여되는 경우 우수한 치료 효과를 유지하면서도 환자 순응도를 향상시킬 수 있으며, 실제 환자에게 투약하기 위한 치료제 생산 시설 또는 병원에서의 품질 관리에 용이함을 확인하고 본 발명을 완성하기에 이르렀다.
- [18] 따라서, 본 발명의 목적은 골관절염 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 데 있다.
- [19] 또한, 본 발명의 다른 목적은 세포치료제 제조용 키트를 제공하는 데 있다.
- [20] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 골관절염 치료제를 제조하는 방법을 제공하는 데 있다.
- [21]

과제 해결 수단

- [22] 이하, 본 발명에 대하여 보다 상세히 설명한다.
- [23] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 형질전환시킨 포유류 세포 집단을 포함하는 골관절염 예방 또는 치료용 약학적 조성물로서, 상기 집단에 포함되는 세포 또는 세포군은 200 μm 미만의 D_{90} 입자 직경을 갖는 것인 약학적 조성물을 제공한다.
- [24] 본 발명의 가장 큰 특징은 목적 유전자[예를 들어, TGF- β 중 TGF- $\beta 1$]로 형질전환시킨 포유류 세포(세포군 또는 세포집단)를 특정하는 기준으로서, 입자 크기, 예컨대, 200 μm 미만의 D_{90} 입자 직경을 기반으로 선별하여, 상기 세포의 치료학적 유효성을 확인함으로써 세포치료제 조성물로 이용하는 것이다.
- [25] 본 발명에서 사용되는 용어 "형질전환"은 형질도입 또는 형질감염과 동일한 의미로서 혼용된다.
- [26] 본 발명의 조성물의 유효 성분인 상기 포유류 세포 집단에 포함되는 세포 또는 세포군은 단일 세포 또는 세포가 결합되어 있는 형태로 정의된다.
- [27] 본 발명에서, 포유류 세포 집단에 포함되는 세포 또는 세포군의 분류 기준은 입자 크기, 특히, 입자 직경 크기 분포의 D_x 이다.
- [28] 본 명세서에서 상기 포유류 세포 집단에 대한 기준을 언급하면서 사용되는 용어 "입자 직경 크기 분포의 D_x "는 분포의 x번째 백분위를 나타내며; 본 발명에서, 예컨대, D_{90} 은 90번째 백분위를 나타내고, D_{90} 의 경우에, 이것은 종종 $D(0.90)$ 또는 $D[0.9]$ 또는 이와 유사하게 기록될 수 있다. 중앙 입자 크기 및 D_x 에 관해서 대문자 D 또는 소문자 d는 상호 교환할 수 있으며, 동일한 의미를 갖는다.

- [29] 상기 형질전환시킨 포유류 세포 집단에 포함되는 세포 또는 세포군은 200 μm 미만의 D_{90} 입자 직경을 갖는 것이 바람직하다. 상기 형질전환시킨 포유류 세포 집단에 포함되는 세포 또는 세포군의 입자 직경은 예컨대, 1 μm 내지 199 μm , 1 μm 내지 150 μm , 1 μm 내지 100 μm , 1 μm 내지 90 μm , 1 μm 내지 80 μm , 1 μm 내지 70 μm , 1 μm 내지 60 μm , 1 μm 내지 50 μm 또는 1 μm 내지 40 μm 일 수 있다.
- [30] 반면, 200 μm 이상의 D_{90} 입자 직경을 갖는 형질전환시킨 포유류 세포 집단의 경우, 불규칙하고 커다란 덩어리가 없어지지 않고 그대로 잔존하여 골관절염 치료용 약학적 조성물에 적용하기에 부적합하다.
- [31] 본 발명에서, 형질전환시킨 포유류 세포 집단에 포함되는 세포 또는 세포군은, 바람직하게는 TGF- β 를 발현하는 세포 또는 세포군이며, 가장 바람직하게는 TGF- β 1을 발현하는 세포 또는 세포군이다. 본 발명에 따르면, 상기 세포 집단은 불활성화되는 것이 바람직하다.
- [32] 상기 불활성화는 방사선 조사 (irradiate)에 의한 것이고, 상기 방사선 조사는 감마선, 엑스선 또는 전자선일 수 있다.
- [33] 또한, 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 세포 집단은 형질전환시키지 않은 포유류 세포 집단과 혼합하여 투여될 수 있다.
- [34] 상기 형질전환시키지 않은 포유류 세포 집단에 포함되는 세포 또는 세포군은 300 μm 미만의 D_{90} 입자 직경을 갖는 것이 바람직하다. 상기 형질전환시키지 않은 포유류 세포 집단에 포함되는 세포 또는 세포군은 예컨대, 1 μm 내지 299 μm , 1 μm 내지 240 μm , 1 μm 내지 230 μm , 1 μm 내지 220 μm , 1 μm 내지 210 μm , 1 μm 내지 200 μm , 1 μm 내지 190 μm , 1 μm 내지 180 μm , 1 μm 내지 170 μm , 1 μm 내지 160 μm , 1 μm 내지 150 μm , 1 μm 내지 140 μm , 1 μm 내지 130 μm , 1 μm 내지 120 μm , 1 μm 내지 110 μm , 1 μm 내지 100 μm , 1 μm 내지 90 μm , 1 μm 내지 80 μm , 1 μm 내지 70 μm , 1 μm 내지 60 μm , 1 μm 내지 50 μm 또는 1 μm 내지 40 μm 일 수 있다.
- [35] 반면, 300 μm 이상의 D_{90} 입자 직경을 갖는 형질전환시키지 않은 포유류 세포 집단의 경우, 불규칙하고 커다란 덩어리가 없어지지 않고 그대로 잔존하여 골관절염 치료용 약학적 조성물에 적용하기에 부적합하다.
- [36] 본 발명의 일 구현예에서 TGF- β 를 발현하도록 형질전환된 세포 및 형질전환시키지 않은 포유류 세포가 각각 특정 크기를 갖도록 분리하는 것이 연골세포 상호간의 응집을 최소화 하고, 치료 효과에도 유익함을 확인하였다. 또한, 선별된 특정 크기 이하의 세포가 환자에게 투여되는 경우 환자 순응도를 향상시킬 수 있으며, 치료제 생산 시설 또는 병원에서의 품질 관리에 용이하다.
- [37] 또한, 일 구현예에서 TGF- β 를 발현하는 연골세포 및 형질전환시키지 않은 포유류 세포인 정상세포를 여과 등을 통하여 특정 크기의 세포 또는 세포군으로 이루어지도록 선별하는 것이 세포간의 응집을 억제할 수 있다는 것을 확인하였다.
- [38] 즉, 형질전환시킨 포유류 세포 집단에 포함되는 세포 또는 세포군의 D_{90} 값이 200 μm 미만, 예컨대, 100 μm 이고; 형질전환시키지 않은 포유류 세포 집단에

포함되는 세포 또는 세포군의 D_{90} 값이 $300\ \mu\text{m}$ 미만, 예컨대, $200\ \mu\text{m}$ 일 경우 세포간 응집이 효과적으로 억제된다.

- [39] 또한, 상기 특정 크기의 세포 또는 세포군은 단일 세포 상태, 콜로니 상태, 클러스터 상태 또는 이들이 혼합된 상태일 수 있다.
- [40] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 형질전환시키지 않은 포유류 세포 집단 대 형질전환시킨 포유류 세포 집단의 비율은 세포수를 기준으로 0.1 내지 10 대 1이며, 보다 바람직하게는 1 내지 10 대 1이고, 더욱 바람직하게는 1 내지 3 대 1일 수 있으며, 가장 바람직하게는 3 대 1일 수 있다.
- [41] 본 발명에서, 포유류 세포는 연골세포 또는 연골전구세포 일 수 있다.
- [42] 본원에서 사용되는 용어 "연골세포"는, 세포가 탈분화 또는 재분화되는지에 상관없이 분리된 연골세포 집단을 의미한다. 수시간에 걸쳐 시험관 배양을 실시한 후, 연골세포는 섬유아세포와 같은 다른 세포형으로 탈분화되는 것으로 관찰되었다. 그러나, 유도를 실시하는 경우, 이들 세포는 연골세포로 재분화시킬 수 있다. 본 발명의 목적에서 "연골세포"는, 시간이 경과되면서 탈분화되는 연골세포를 임의로 포함하는, 본래의 출발 연골세포 배양물을 포함한 샘플을 의미한다.
- [43] 본 발명에서, 연골세포는 동종세포인 것이 바람직하다. 본 발명을 단일형 세포뿐만 아니라 결합조직 세포의 혼합된 배양물로도 실시할 수 있음을 잘 알 것이다. 결합조직세포는 화합물 또는 방사능으로 처리하여 세포가 목적의 유전자, 바람직하게는 TGF- β 를 안정하게 발현하도록 할 수 있음을 잘 알 것이다. 바람직하게는, 결합조직 세포는 이를 주사한 숙주 유기체에 면역반응을 일으키지 않는다. 이와 관련하여 세포 매개된 유전자 치료 또는 체세포 치료의 경우, 자가세포뿐만 아니라 동종세포를 사용할 수도 있다.
- [44] 또한, 상기 포유류 세포는 사람 유래일 수 있다.
- [45] 본 명세서에서 용어 "예방"은 질환 또는 질병을 보유하고 있다고 진단된 적 없으나, 이러한 질환 또는 질병에 걸리기 쉬운 경향이 있는 동물, 예컨대, 포유류에서 질환 또는 질병의 발생을 억제하는 것을 의미한다.
- [46] 본 명세서에서 용어 "치료"는 (i) 질환 또는 질병의 발전의 억제; (ii) 질환 또는 질병의 경감; 및 (iii) 질환 또는 질병의 제거를 의미하며, 바람직하게 상기 치료하고자 하는 질환 또는 질병은 골관절염이다.
- [47] 또한, 본 발명의 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함할 수 있다.
- [48] 본 발명의 약학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의

약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.

- [49] 본 발명의 약학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 따라 다양한 방법으로 처방될 수 있다.
- [50] 한편, 본 발명의 약학적 조성물의 투여량은 바람직하게는 1회 당 1.0×10^6 내지 3×10^7 개의 세포이다.
- [51] 본 발명의 약학적 조성물은 비경구로 투여할 수 있고, 비경구로 투여되는 경우, 관절강 내, 정맥 내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있다. 바람직하게는 본 발명의 약학적 조성물은 관절강 부위에 주입될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 적용되는 질환의 종류에 따라, 투여 경로가 결정되는 것이 바람직하다.
- [52] 본 발명의 조성물에 포함되는 유효성분의 농도는 치료 목적, 환자의 상태, 필요 기간, 질환의 위중도 등을 고려하여 결정하며 특정 범위의 농도로 한정되지 않는다.
- [53] 본 발명의 약학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [54] 또한, 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 TGF- β 로 형질전환시킨 포유류 세포 집단을 포함하는, 골관절염 치료 또는 예방을 위한 세포치료제 제조용 키트를 제공하며, 상기 집단에 포함되는 세포 또는 세포군은 $200 \mu\text{m}$ 미만의 D_{90} 입자 직경을 갖는 것이 바람직하다.
- [55] 상기 키트는 형질전환시키지 않은 포유류 세포 집단을 추가로 포함할 수 있으며, 상기 형질전환시키지 않은 포유류 세포 집단에 포함되는 세포 또는 세포군은 $300 \mu\text{m}$ 미만의 D_{90} 입자 직경을 갖는 것이 바람직하다.
- [56] 상기 키트에는 상기 세포치료제로서 상기 포유류 세포 집단뿐만 아니라, 당 분야에서 일반적으로 사용되는 도구, 시약 등이 포함될 수 있다.
- [57] 상기 도구 또는 시약의 일 예로, 적합한 담체, 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 표지 물질, 발색단(chromophores), 용해제, 세정제, 완충제, 안정화제 등이 포함되나 이에 제한되지 않는다. 표지물질이 효소인 경우에는 효소 활성을 측정할 수 있는 기질 및 반응 정지제를 포함할 수 있다. 담체는 가용성 담체, 불용성 담체가 있고, 가용성 담체의 일 예로 당 분야에서 공지된 생리학적으로

허용되는 완충액, 예를 들어 PBS가 있고, 불용성 담체의 일 예로 폴리스틸렌, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리에스테르, 폴리아크릴로니트릴, 불소 수지, 가교 텍스트란, 폴리사카라이드, 라텍스에 금속을 도금한 자성 미립자와 같은 고분자, 기타 종이, 유리, 금속, 아가로오스 및 이들의 조합일 수 있다.

- [58] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 골관절염 치료제를 제조하는 방법을 제공한다:
- [59] (1) TGF- β 로 형질전환시킨 포유류 세포 집단 및 형질전환시키지 않은 포유류 세포 집단을 각각 준비하는 단계; 및
- [60] (2) 상기 단계 (1)의 TGF- β 로 형질전환시킨 포유류 세포 집단 중 200 μ m 미만의 D₉₀ 입자 직경을 갖는 세포 또는 세포군; 및 형질전환시키지 않은 포유류 세포 집단 중 300 μ m 미만의 D₉₀ 입자 직경을 세포 또는 세포군을 각각 선별하는 단계;
- [61] (3) 상기 단계 (2)의 각각 선별된 세포 집단을 분리된 바이알 내에 각각 충전하는 단계; 및
- [62] (4) 상기 단계 (3)의 바이알 내에 각각의 세포 집단을 혼합하는 단계.
- [63] 즉, 상기 골관절염 치료제는 TGF- β 로 형질전환시킨 포유류 세포 집단과 형질전환시키지 않은 포유류 세포 집단과 혼합하여 투여될 수 있으며, TGF- β 로 형질전환시킨 포유류 세포 집단에 포함되는 세포 또는 세포군은 200 μ m 미만의 D₉₀ 입자 직경을 갖고, 상기 형질전환시키지 않은 포유류 세포 집단에 포함되는 세포 또는 세포군은 300 μ m 미만의 D₉₀ 입자 직경을 갖는 것이 바람직하다.
- [64] 상기 선별은 물리적, 화학적 또는 전자적 선별일 수 있다. 물리적 선별로는 일정 크기의 mesh를 이용하거나, 세포여과체 또는 필터를 이용하는 방법이 이용될 수 있으며, 또한, 이러한 물리적 선별 외에 세포의 형광, 자기, 전하 등을 이용하는 세포 선별 방법이 응용될 수 있으며, 이에 한정되지 않는다.
- [65]
- [66] 본 발명의 키트 및 치료제 제조 방법은 상술한 구성을 포함하므로, 중복된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재 생략한다.
- [67]

발명의 효과

- [68] 본 발명의 조성물의 유효 성분인 선별된 특정 크기 이하의 TGF- β 로 형질전환시킨 포유류 세포 및 형질전환시키지 않은 포유류 세포의 혼합세포 조성물은 세포 덩어리를 내포하지 않으면서도 유효하게 우수한 치료 효능을 나타내므로, 의약품 품질관리 측면에서 보았을 때 불순물과 용이하게 구분 가능하여 치료제 생산 시설 또는 병원에서 관리하기 용이한 장점이 있다. 또한, 선별된 세포는 연골세포 상호간의 추가 응집을 나타내지 않아, 보관에도 유익하다. 나아가, 선별된 특정 크기 이하의 혼합세포가 환자에게 투여되는 경우 환자 순응도를 향상시킬 수 있다.
- [69]

도면의 간단한 설명

- [70] 도 1은 연골세포의 세포 여과체(Cell strainer) 통과 전후의 바이알을 나타낸다.
- [71] 도 2a는 형질전환시키지 않은 세포의 세포 여과체 통과 전후 현미경 관찰 결과를 보여준다. 도 2b는 형질전환시킨 세포의 세포 여과체 통과 전후 현미경 관찰 결과를 보여준다.
- [72] 도 3a는 형질전환시키지 않은 세포의 세포 여과체 통과 전 및 통과 후 시간 경과에 따른 현미경 관찰 결과를 보여준다. 도 3b는 형질전환시킨 세포의 세포 여과체 통과 전 및 통과 후 시간 경과에 따른 현미경 관찰 결과를 보여준다.
- [73] 도 4a는 MIA 골관절염 동물모델에 선별된 혼합세포를 처리했을 때 본 프레이 필라멘트 테스트의 결과를 보여준다. 도 4b는 MIA 골관절염 동물모델에 선별된 혼합세포를 처리했을 때의 본 프레이 필라멘트 결과를 AUC(area under the curve)로 나타낸 것이다.
- [74] 도 5는 MIA 골관절염 동물모델에 선별된 혼합세포를 처리했을 때 H&E 염색 연골 조직 분석 결과를 보여준다.

[75]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [76] 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.

[77]

[78] 실시예 1. 세포치료제의 준비

- [79] 본 발명에 이용된 세포치료제는 TGF- β 1(NCBI Reference Sequence: NM_000660.6)을 발현하도록 형질전환시킨 세포집단(제1 집단; 이하, TC) 및 상기 유전자로 형질전환시키지 않은 정상 세포집단(제2 집단; 이하, HC)을 포함하는 혼합세포이다.
- [80] 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[예를들어, 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. 또는 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 등의 유전자 전달체를 사용하여 제조할 수도 있다.
- [81] 상기 HC 및 TC는 사람 유래 세포로서, HC는 정상 연골세포이고 TC는 TGF- β 1이 분비되도록 형질전환된 세포이다. HC 및 TC의 제작방법은 [Cytotherapy, 2012 Feb; 14(2): 247-256] 및 미국 특허 제7,005,127호와 미국 특허 제7,282,200호에 개시되어 있다.

- [82] 상기 HC 및 TC의 혼합비는 세포수를 기준으로 3:1 비율로 혼합하여 이하 실시예에 적용하였다.
- [83] 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.
- [84]
- [85] **실시예 2. 유효성을 갖는 세포의 유형 선별**
- [86] 본 발명자들은 상기 실시예 1에서 준비된 세포치료제인 혼합세포의 세포 응집 유형 및 크기에 따른 유효성을 확인하고자 하였다.
- [87] 이를 위하여, 세포 여과체(cell strainer)를 포어(pore) 크기 별로 준비하여 여과시킨 후, HC 세포 및 TC 세포의 뭉침 현상 유무를 확인하는 일련의 QC(quality control)를 실시하였다.
- [88]
- [89] 2-1. HC 세포에서의 세포 여과체 포어 크기에 따른 세포 뭉침 현상 확인
- [90] 본 발명자들은 HC 세포를 배양하여 세포 부유액을 모았다. 일부 세포는 세포 여과체를 적용하지 않고 바이알에 세포를 충전하여 이물검사를 시행하였다. 나머지 세포 부유액은 200 및 300 μm 포어 크기의 세포 여과체로 세포를 거른 후 세포 여과체 적용 후의 이물검사를 시행하였다.
- [91] 그 결과는 하기 표 1에 나타난 바와 같다.
- [92]
- [93] [표1]
- | HC 세포 | 미 적용 | 200 μm | 300 μm |
|---|------|-------------------|-------------------|
| 세포 여과체 (cell strainer) 사용 후 세포 뭉침 현상 유무 | 유 | 무 | 유 |
- [94] 즉, HC 세포의 세포 여과체 포어 크기에 따른 세포 뭉침 현상 유무를 확인하기 위하여, 세포 덩어리를 완전히 제거하는 방법으로 세포 여과체를 이용하여 세포 부유물을 통과시킨 후 세포 덩어리의 감소 여부를 확인했을 때, HC 세포의 경우, 200 μm 세포 여과체를 통과한 세포는 도 1에 나타난 바와 같이 세포 덩어리가 모두 여과되어 충전 후 이물검사에서 적합 판정을 받았다.
- [95] 또한, 도 2a에 나타난 바와 같이, 200 μm 세포 여과체 적용 후에는 세포 덩어리가 없어지는 것이 현미경으로 관찰되었다.
- [96] 반면, 300 μm 세포 여과체 적용 후에는 도 1에 나타난 바와 같은 불규칙하고 커다란 덩어리가 없어지지 않고 그대로 잔존하는 것이 육안으로 확인되었다.
- [97] 따라서, HC 세포의 경우, 300 μm 세포 여과체를 통과할 수 있는 300 μm 미만의 D₉₀ 입자 직경을 갖는 세포, 특히, 200 μm 이하의 D₉₀ 입자 직경을 갖는 세포가 적합하다는 것을 알 수 있다.
- [98]

[99] 2-2. TC 세포에서의 세포 여과체에 포어 크기에 따른 세포 뭍침 현상 확인

[100] 본 발명자들은 TC 세포를 배양하여 세포 부유액을 모으고, 일부 세포는 세포 여과체를 적용하지 않고 바이알에 세포를 충전하여 이물검사를 시행하였다. 나머지 세포 부유액은 70, 100 및 200 μm 포어 크기의 세포 여과체로 세포를 거른 후 세포 여과체 적용 후의 이물검사를 시행하였다.

[101] 그 결과는 하기 표 2에 나타난 바와 같다.

[102]

[103] [표2]

TC 세포	미적용	70 μm	100 μm	200 μm
세포 여과체(Cell strainer) 사용 후 세포 뭍침 현상 유무	유	무	무	유

[104] 즉, TC 세포의 세포 여과체 포어 크기에 따른 세포 뭍침 현상 유무를 확인하기 위하여, 세포 덩어리를 완전히 제거하는 방법으로 세포 여과체를 이용하여 세포 부유물을 통과시킨 후 세포 덩어리의 감소 여부를 확인했을 때, TC 세포의 경우, 70 μm 및 100 μm 세포 여과체를 통과한 세포는 도 1에 나타난 바와 같이 세포 덩어리가 모두 여과되어 충전 후 이물검사에서도 적합 판정을 받았다.

[105] 또한, 도 2b에 나타난 바와 같이, 100 μm 세포 여과체 적용 후에는 세포 덩어리가 없어지는 것이 현미경으로도 관찰되었다.

[106] 반면, 200 μm 세포 여과체 적용 후에는 도 1에 나타난 바와 같은 불규칙하고 커다란 덩어리가 없어지지 않고 그대로 잔존하는 것이 육안으로 확인되었다.

[107] 따라서, TC 세포의 경우, 200 μm 세포 여과체를 통과할 수 있는 200 μm 미만의 D₉₀ 입자 직경을 갖는 세포, 특히, 100 μm 이하의 D₉₀ 입자 직경을 갖는 세포가 적합하다는 것을 알 수 있다.

[108]

[109] 실시예 3. 여과체 적용 후 추가적인 응집방지 여부 확인

[110] 본 발명자들은 상기 실시예 2에서 준비된 세포 여과체 통과 전, 후의 세포가 시간이 지남에 따라 세포 응집 유형 및 크기에 변화가 없는지 여부와 여과체 적용이 추가적인 응집 방지에도 도움을 주는지 여부를 확인하고자 하였다.

[111] 이를 위하여, 세포 여과체(cell strainer)를 포어(pore) 크기 별로 준비하여 여과시킨 후, 상온에서 바이알을 방치하여 HC 세포 및 TC 세포의 뭍침 현상이 시간이 지남에 따라 변하는지 확인하였다.

[112]

[113] 3-1. HC 세포에서의 세포 여과체 적용 후 시간에 따른 세포 뭍침 현상 확인

[114] 본 발명자들은 HC 세포를 배양하여 세포 부유액을 모았다. 일부 세포는 세포 여과체를 적용하지 않고 바이알에 세포를 충전하고 시간이 지남에 따른 세포 뭍침 현상을 확인하였다. 나머지 세포 부유액은 200 μm 포어 크기의 세포 여과체로 세포를 거른 후에 바이알에 세포를 충전하고 시간이 지남에 따른 세포

뭉침 현상을 확인하였다.

- [115] HC 세포의 세포 여과체 포어 크기에 따른 세포 뭉침 현상 유무를 확인하기 위하여, 세포 덩어리를 완전히 제거하는 방법으로 세포 여과체를 이용하여 세포 부유물을 통과시킨 후 세포 덩어리의 감소 여부를 확인하였다.
- [116] 그 결과, 도 3a에 나타낸 바와 같이, 0시간에 200 μm 세포 여과체 적용 후에는 세포 덩어리가 없어지는 것이 현미경으로 관찰되었다. 또한, 3 시간 경과 후에도 세포 덩어리가 더 이상 생기지 않는 것을 현미경으로 관찰하였다.
- [117] 반면, 세포 여과체를 적용하지 않은 경우에는 불규칙하고 커다란 덩어리가 없어지지 않고 그대로 잔존하는 것이 현미경으로 관찰되었으며, 이는 시간이 지나도 그대로 잔존하는 것을 확인할 수 있었다.

[118]

[119] 3-2. TC 세포에서의 세포 여과체 적용 후 시간에 따른 세포 뭉침 현상 확인

- [120] 본 발명자들은 TC 세포를 배양하여 세포 부유액을 모았다. 일부 세포는 세포 여과체를 적용하지 않고 바이알에 세포를 충전하고 시간이 지남에 따른 세포 뭉침 현상을 확인하였다. 나머지 세포 부유액은 100 μm 포어 크기의 세포 여과체로 세포를 거른 후에 바이알에 세포를 충전하고 시간이 지남에 따른 세포 뭉침 현상을 확인하였다.

- [121] TC 세포의 세포 여과체 포어 크기에 따른 세포 뭉침 현상 유무를 확인하기 위하여, 세포 덩어리를 완전히 제거하는 방법으로 세포 여과체를 이용하여 세포 부유물을 통과시킨 후 세포 덩어리의 감소 여부를 확인하였다.

- [122] 그 결과, 도 3b에 나타낸 바와 같이 0시간에 100 μm 세포 여과체 적용 후에는 세포 덩어리가 없어지는 것이 현미경으로도 관찰 되었다. 또 시간이 지나서 3시간이 지나도 세포 덩어리가 더 이상 생기지 않는 것을 현미경으로 관찰 하였다.

- [123] 반면, 세포 여과체를 적용 하지 않은 경우에는 도 3b에 나타낸 바와 같이 불규칙하고 커다란 덩어리가 없어지지 않고 그대로 잔존하는 것이 현미경으로 관찰되었으며, 이는 시간이 지나도 그대로 잔존하는 것을 확인할 수 있었다.

[124]

[125] 실시예 4. MIA 골관절염 모델에서 선별된 혼합세포 처리에 의한 골관절염 치료 효과 확인

[126] 4-1. 통증 완화 효과 확인

- [127] 본 발명자들은 MIA 투여로 골관절염을 유발시킨 래트 동물모델에 상기 실시예 2에서 확인된 특정 크기 이하의 세포로 선별된 혼합세포, 즉, 300 μm 미만의 D_{90} 입자 직경을 갖는 HC 세포 및 200 μm 미만의 D_{90} 입자 직경을 갖는 TC 세포가 3:1 비율로 혼합된 혼합세포를 투여했을 때 진통 효능을 비교하여 본 발명의 혼합세포 치료제의 유효성을 확인하고자 하였다.

- [128] 즉, 본 발명자들은 선별된 혼합세포의 치료 효과를 점검하기 위해, MIA 골관절염 동물모델을 제작한 후 선별된 혼합세포를 처리하여 통증 변화를

관찰하였다.

- [129] 먼저, 동물모델 제작에는 6주령 수컷 래트(Spargue-Dawley, 200~225 g, 나라 바이오텍, 대한민국)를 사용하였으며, 동물실험은 코오롱생명과학(대한민국) 실험동물운영위원회(IACUC No. KLS IACUC 2013-04)의 승인 하에 수의과적 관리 하에 수행하였다.
- [130] 관절염을 유도하기 위하여, 60 mg/mL 농도의 MIA(monosodium iodoacetate, Sigma, USA) 용액 50 μ L을 31G 주사기를 사용하여 래트의 왼쪽 무릎의 관절강 내에 투여하였다.
- [131] MIA 투여 2주 후 골관절염이 유발된 개체를 대상으로 대조물질(CS-10)과 혼합세포를 각각 왼쪽 무릎 관절강 내에 투여하였다.
- [132] [표3]

군	성별	동물수(마리)	동물번호	MIA 투여량(mg/knee)	투여물질(50 μ L/knee)
G1	M	6	1481-1486	3	vehicle (CS-10)
G2	M	6	1505-1510	3	2.8X10 ⁵ cells

- [133] 이후, 본 프레이 필라멘트(von Frey filament) 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. N값이 각각 0.4, 0.6, 1, 2, 4, 6, 8, 15 gram(g)인 총 9개의 필라멘트를 이용하여 통증 반응을 조사하고 정해진 패턴에 따라서 역치 (threshold)값을 계산하였다.
- [134] 혼합세포 및 대조물질 투여 후 일정 시간 (0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56일)이 지난 후에 본 프레이 필라멘트 테스트 값을 측정하였다.
- [135] 그 결과, 도 4a 및 4b에 나타낸 바와 같이, 혼합세포 투여 후 일정기간 (0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56일)에 본 프레이 필라멘트 측정값은 대조군인 CS-10 투여군 대비 혼합세포 투여군에서 통계적으로 유의하게 진통 효과가 나타남을 확인하였다($p < 0.05$). 본 프레이 필라멘트 결과를, 성능 평가지표로 사용되는 곡선하면적 AUC 값으로 표시하였을 경우에도 대조군인 CS-10 투여군 대비 혼합세포 투여군에서 통계적으로 유의미한 결과를 확인하였다($p < 0.05$).
- [136]
- [137] 4-2. 연골 생성 효과 확인
- [138] 본 발명자들은 MIA 투여로 골관절염을 유발시킨 래트 동물모델에 대조군(vehicle)과 상기 실시예 2와 같이 특정 크기 이하의 세포로 선별된

혼합세포를 투여했을 때 연골 생성 효과를 비교하여 혼합세포 치료제의 유효성을 확인하고자 하였다.

[139] 이를 위해, 본 발명자들은 상기 실시예 4-1에서와 같이 준비한 동물모델을 실험 수행 56일 후 희생시키고 H&E 염색 조직 분석을 수행하였다.

[140] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 대조군 (vehicle)인 CS-10 투여군에서는 연골 생성이 관찰되지 않은 반면, 혼합세포 (mixed cell) 투여군에서는 연골 생성이 관찰됨을 확인하였다.

[141]

[142] 결론적으로, 본 발명에 따라 선별된, 300 μm 미만의 D_{90} 입자 직경을 갖는 HC 세포 및 200 μm 미만의 D_{90} 입자 직경을 갖는 TC 세포가 3:1 비율로 혼합된 혼합세포는 덩어리진 세포가 없는 상태에서도 우수한 통증 완화 및 연골 생성 효과를 나타내므로 탁월한 골관절염 치료제로서 이용할 수 있다.

청구범위

- [청구항 1] 형질전환시킨 포유류 세포 집단을 포함하는 골관절염 예방 또는 치료용 약학적 조성물로서, 상기 집단에 포함되는 세포 또는 세포군은 200 μm 미만의 D_{90} 입자 직경을 갖는 것인, 약학적 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 형질전환시킨 포유류 세포 집단은 추가적으로 방사선 조사(irradiate)한 것인, 약학적 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 조성물은 상기 형질전환시키지 않은 포유류 세포 집단외에 형질전환시키지 않은 포유류 세포 집단을 추가로 포함하는 것인, 약학적 조성물.
- [청구항 4] 제3항에 있어서,
상기 형질전환시키지 않은 포유류 세포 집단에 포함되는 세포 또는 세포군은 300 μm 미만의 D_{90} 입자 직경을 갖는 것인, 약학적 조성물.
- [청구항 5] 제3항에 있어서,
상기 조성물은 형질전환시키지 않은 포유류 세포 집단 대 형질전환시킨 포유류 세포 집단은 세포수를 기준으로 1 내지 10 대 1의 비율로 혼합된 것인, 약학적 조성물.
- [청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 포유류 세포는 연골세포 또는 연골전구세포인 것인, 약학적 조성물.
- [청구항 7] 제1항에 있어서,
상기 포유류 세포는 TGF- β (Transforming growth factor beta)로 형질전환시킨 것인, 약학적 조성물.
- [청구항 8] TGF- β (Transforming growth factor beta)로 형질전환시킨 포유류 세포 집단을 포함하는, 세포치료제 제조용 키트로서,
상기 집단에 포함되는 세포 또는 세포군은 200 μm 미만의 D_{90} 입자 직경을 갖는 것인, 키트.
- [청구항 9] 제8항에 있어서,
상기 키트는 상기 형질전환시키지 않은 포유류 세포 집단외에 형질전환시키지 않은 포유류 세포 집단을 추가로 포함하는 것인, 키트.
- [청구항 10] 제9항에 있어서,
상기 형질전환시키지 않은 포유류 세포 집단에 포함되는 세포 또는 세포군은 300 μm 미만의 D_{90} 입자 직경을 갖는 것인, 키트.
- [청구항 11] 제9항에 있어서,
상기 키트는 형질전환시키지 않은 포유류 세포 집단 대 형질전환시킨 포유류 세포 집단은 세포수를 기준으로 1 내지 10 대 1의 비율로 혼합된 것인, 키트.

- [청구항 12] 다음 단계를 포함하는 골관절염 치료제를 제조하는 방법:
- (1) TGF- β (Transforming growth factor beta)로 형질전환시킨 포유류 세포 집단 및 형질전환시키지 않은 포유류 세포 집단을 각각 준비하는 단계; 및
 - (2) 상기 단계 (1)의 TGF- β 로 형질전환시킨 포유류 세포 집단 중 200 μm 미만의 D_{90} 입자 직경을 갖는 세포 또는 세포군; 및 형질전환시키지 않은 포유류 세포 집단 중 300 μm 미만의 D_{90} 입자 직경을 세포 또는 세포군을 각각 선별하는 단계;
 - (3) 상기 단계 (2)의 각각 선별된 세포 집단을 분리된 바이알 내에 각각 충전하는 단계; 및
 - (4) 상기 단계 (3)의 바이알 내에 각각의 세포 집단을 혼합하는 단계.
- [청구항 13] 제12항에 있어서,
상기 단계 (4)의 혼합은 상기 단계 (2)의 형질전환시킨 포유류 세포 집단과 형질전환시키지 않은 포유류 세포 집단은 세포수를 기준으로 1 내지 10 대 1의 비율로 혼합되는 것인, 방법.
- [청구항 14] 제12항에 있어서,
상기 단계 (1)의 TGF- β 로 형질전환시킨 포유류 세포 집단은 추가적으로 방사선 조사(irradiate)한 것인, 방법.