



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0134994
 (43) 공개일자 2014년11월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/12 (2006.01) **A61K 38/30** (2006.01)
A61K 31/375 (2006.01) **A61K 9/08** (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2013-0055158
 (22) 출원일자 2013년05월15일
 심사청구일자 2014년04월17일

(71) 출원인
라정찬
 충청북도 청원군 내수읍 신기초정로 699
주식회사 케이스템셀
 서울특별시 영등포구 국회대로76길 10 (여의도동, 기독교한국침례회총회빌딩)
 (72) 발명자
라정찬
 충청북도 청원군 내수읍 신기초정로 699
강성근
 서울특별시 관악구 성현로 80, 116동 504호 (봉천동, 관악드림타운아파트)
조정윤
 서울특별시 송파구 동남로28길 13 (오금동)
 (74) 대리인
이처영

전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 정맥 투여용 줄기세포 조성물

(57) 요약

본 발명은 10 내지 20 μm 의 직경을 가지고, 단세포로 존재하는 줄기세포를 $1 \times 10^7 \sim 5 \times 10^8$ 세포수/ml로 함유하는 것을 특징으로 하는 정맥 투여용 줄기세포 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 정맥 투여에 적합한 줄기세포 조성물을 제공할 수 있어, 혈관 내로 투여된 줄기세포가 안정적으로 표적 조직에 도달하여 활성을 나타내는 효능을 보다 효율적으로 높일 수 있으므로 줄기세포를 이용한 세포 치료 효능을 획기적으로 증진시킬 수 있다.

특허청구의 범위

청구항 1

10 내지 20 μm 의 직경을 가지고, 단세포로 존재하는 줄기세포를 $1 \times 10^7 \sim 5 \times 10^8$ 세포수/ml로 함유하는 것을 특징으로 하는 정맥 투여용 줄기세포 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 줄기세포는 직경이 10 내지 15 μm 인 것을 특징으로 하는 정맥 투여용 줄기세포 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 혈관 내 투여에 적합한 직경을 가지는 줄기세포는 기본배지; 및 NAC(N-acetyl-L-cysteine), 아스코르브산 (ascorbic acid), 인슐린 또는 인슐린 유사인자, 히드로코르티손, 텍사메타손, bFGF (basic fibroblast growth factor), 헤파란 황산 (heparan sulfate), 2-머캅토에탄올 (2-mercaptoethanol), EGF (epidermal growth factor) 및 항산화제로 구성된 군에서 선택되는 2가지 이상의 성분을 함유하는 배지에서 배양하여 수득하는 것을 특징으로 하는 정맥 투여용 줄기세포 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 기본 배지는 M199/F12(mixture)(GIBCO), MEM-alpha배지(GIBCO), 저농도 글루코오스 함유 DMEM배지(Welgene), MCDB 131배지(Welgene), IMEM배지(GIBCO), K-SFM, DMEM/F12 배지, PCM 배지 및 MSC 확장 배지 (Chemicon)로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 정맥 투여용 줄기세포 조성물.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 항산화제는 셀레늄, 아스코르브산, 비타민 E, 카테킨, 라이코펜, 베타카로틴, 코엔자임 Q-10, EPA(eicosapentaenoic acid) 및 DHA(docosahexanoic acid)로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 정맥 투여용 줄기세포 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 항산화제는 셀레늄인 것을 특징으로 하는 정맥 투여용 줄기세포 조성물.

청구항 7

제3항에 있어서, 상기 배지는 FBS (fetal bovin serum) 또는 칼슘을 추가로 함유하는 것을 특징으로 하는 정맥 투여용 줄기세포 조성물.

청구항 8

제3항에 있어서, 배양된 줄기세포를 트립신으로 처리하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 정맥 투여용 줄기세포 조성물.

청구항 9

제3항 또는 제8항에 있어서, 배양된 줄기세포를 아스피린 함유 용액에 부유시키는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 정맥 투여용 줄기세포 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 아스피린 함유 용액은 생리식염수, 하트만-D 용액 및 PBS (Phosphate Buffered Saline) 로 구성된 군에서 선택되는 용액을 추가로 함유하는 것을 특징으로 하는 정맥 투여용 줄기세포 조성물.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 아스피린은 이소소르비드 기재 아스피린 또는 니코틴산 기재 아스피린 화합물 중에서 선택되는 것인 정맥 투여용 줄기세포 조성물.

청구항 12

제9항에 있어서, 상기 아스피린의 함량은 0.0001 내지 0.01 mg/ml인 것을 특징으로 하는 정맥 투여용 줄기세포 조성물.

청구항 13

제1항에 있어서, 상기 줄기세포는 성체 줄기세포인 것을 특징으로 하는 정맥 투여용 줄기세포 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 줄기세포는 지방조직 유래 중간엽 줄기세포인 것을 특징으로 하는 정맥 투여용 줄기세포 조성물.

청구항 15

하기 단계를 포함하여, 10 내지 20 μm 의 직경을 가지고, 단세포로 존재하는 줄기세포를 $1 \times 10^7 \sim 5 \times 10^8$ 세포 수/ml로 함유하는 것을 특징으로 하는 정맥 투여용 줄기세포 조성물을 제조하는 방법:

(a) 지방조직 또는 상피조직 유래의 성체 줄기세포를 기본배지; 및 NAC(N-acetyl-L-cysteine), 아스코르브산 (ascorbic acid), 인슐린 또는 인슐린 유사인자, 히드로코르티손, 텍사메타손, bFGF (basic fibroblast growth factor), 헤파란 황산 (heparan sulfate), 2-머캅토에탄올 (2-mercaptoethanol), EGF (epidermal growth factor) 및 항산화제로 구성된 군에서 선택되는 2가지 이상의 성분을 함유하는 배지에서 배양하는 단계;

(b) 상기 (a) 단계에서 배양하여 수득한 줄기세포에 트립신을 처리하는 단계;

(c) 상기 (a) 단계에서 배양하여 수득한 줄기세포 또는 (b) 단계에서 트립신을 처리한 줄기세포를 아스피린 함유 용액에 부유시키는 단계; 및

(d) (c) 단계에서 수득한 줄기세포를 $1 \times 10^7 \sim 5 \times 10^8$ 세포수/ml로 함유하는 정맥투여용 줄기세포 조성물을 제조하는 단계.

명세서

기술분야

본 발명은 정맥 투여용 줄기세포 조성물에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 줄기세포 및 부형제를 함유하는 정맥

[0001]

투여용 줄기세포 조성물에 있어서, 상기 줄기세포는 혈관 내 투여에 적합한 직경을 가지고, 단세포로 존재하며, 농도는 $1 \times 10^7 \sim 5 \times 10^8$ 세포수/ml인 것을 특징으로 하는 정맥 투여용 줄기세포 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 줄기세포(stem cell)는 자기 복제 능력을 가지면서 두 개 이상의 세포로 분화하는 능력을 갖는 세포를 말하며, 만능 줄기세포(totipotent stem cell), 전분화능 줄기세포(pluripotent stem cell), 다분화능 줄기세포(multipotent stem cell)로 분류할 수 있다. 만능 줄기세포(totipotent stem cell)는 하나의 완전한 개체로 발생해 나갈 수 있는 만능의 성질을 가진 세포로 난자와 정자의 수정 이후 8세포기까지의 세포가 이러한 성질을 가지며 이 세포를 분리하여 자궁에 이식하면 하나의 완전한 개체로 발생해 나갈 수 있다. 전분화능 줄기세포(pluripotent stem cell)는 외배엽, 중배엽, 내배엽층 유래의 다양한 세포와 조직으로 발생할 수 있는 세포로서, 수정 4~5일 후 나타나는 배반포(blastocyst)의 안쪽에 위치한 내세포괴(inner cell mass)에서 유래하며, 이를 배아 줄기세포라 하며 다양한 다른 조직 세포로 분화되지만 새로운 생명체를 형성하지는 못한다. 다분화능 줄기세포(multipotent stem cell)는 이 세포가 포함되어 있는 조직 및 기관에 특이적인 세포로만 분화할 수 있는 줄기세포로서, 태아기, 신생아기 및 성체기의 각 조직 및 장기의 성장과 발달은 물론 성체조직의 항상성 유지와 조직손상 시 재생을 유도하는 기능에 관여하고 있으며 조직 특이적 다능성 세포들을 총칭하여 성체 줄기세포라 한다.

[0003] 성체 줄기세포는 인체의 각종 장기에 이미 존재하는 세포를 채취, 줄기세포를 발전시킨 것으로 특정 조직으로만 분화되는 특징이 있다. 그러나 최근에는 성체 줄기세포를 이용, 간세포 등 각종 여러 조직으로 분화시키는 실험이 성공을 거두고 있어 주목된다. 특히, 병이나 사고에 의한 기능 장애나 부조화에 빠진 생체 조직 및 장기의 재생 및 기능 회복을 위해 세포를 적극적으로 활용하여 실시하는 치료법인 재생 의료에 있어서, 환자 본인으로부터 줄기세포, 혈액 유래 단핵세포 혹은 골수 유래 단핵세포를 수집하는 단계, 시험관 배양으로 세포 증식 및/또는 분화를 유도하는 단계, 및 선택된 미분화(줄기세포 및/또는 전구세포) 및/또는 분화세포를 착상에 의해 환자 자신의 몸에 도입하는 단계를 포함하는 방법이 많이 이용되고 있다. 이처럼, 기존의 고전적인 약물치치나 수술적 방법을 통한 질병치료가 손상된 세포·조직·장기를 건강한 것으로 바꾸는 세포·조직대체치료법으로 전환될 것으로 예측됨으로써, 줄기세포의 활용도는 더욱 높아지게 될 것이다.

[0004] 이에, 현재 줄기세포의 다양한 기능이 연구되고 있는 실정이며, 그 중에서도 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cells)를 이용한 세포치료가 각광을 받기 시작하면서, 인체로부터 분리된 중간엽 줄기세포를 치료에 적합하도록 개선하기 위한 기술이 개발되고 있다 (WO 2006/019357, 대한민국 등록특허 제0795708호, 대한민국 등록특허 제0818214호, Leu, Steve Lin et al., Journal of translational medicine, 8(1):63, 2010; Kim, J.M. et al., Brain research, 1183:43, 2007, Kim, Young-Ki et al., Journal of veterinary clinics, 28:122, 2011; Park SS. et al., Cytotherapy, 14(5):584, 2012; Soo-Kyung Kang et al., Stem Cells and Development, 15(4):583, 2006). 줄기세포는, 관절염, 퇴행성 관절염 등과 같이 손상부위에 직접 주입하여 치료효과를 기대할 수도 있지만 줄기세포를 정맥에 투여할 수도 있다. 정맥을 통하여 투여되는 줄기세포는 손상된 장기 등의 손상된 신체 내부로 직접 전달되어 손상 부위를 치료하는 효과를 나타낼 수 있으므로 신경계 질환, 알츠하이머, 암, 당뇨, 류마티스 등의 다양한 질병에 대한 치료효과를 나타낼 수 있을 것이라 예상된다.

[0005] 그러나, 혈관 내 투여에 적합한 줄기세포 조성물을 제조하는 방법에 대한 기술은 아직까지 연구가 미흡한 실정이다.

[0006] 이에, 본 발명자들은 표적 부위에 안정적으로 도달하여 목적하는 치료효과를 나타낼 수 있는 정맥 투여용 줄기세포 조성물을 개발하고자 예의 노력한 결과, 정맥 내로 투여되기 전 줄기세포가 파쇄되거나 응집되지 않고, 정맥 투여에 적합한 직경을 가지며 단세포 형태임과 동시에 치료효과를 나타내기에 적합한 수의 줄기세포를 함유하는 정맥투여용 줄기세포 조성물을 개발하고 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 정맥 투여용 줄기세포 조성물을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 10 내지 20 μm 의 직경을 가지고, 단세포로 존재하는 줄기세포를 $1 \times 10^7 \sim 5 \times 10^8$ 세포수/ml로 함유하는 것을 특징으로 하는 정맥투여용 줄기세포 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0009] 본 발명에 따른 정맥투여용 줄기세포 조성물은 정맥 투여시 혈관이 전혀 막히지 않으면서 손상부위에 줄기세포를 전달하므로 우수한 치료효과를 나타낼 수 있어 줄기세포의 혈관 내 투여에 의한 세포치료 효능을 획기적으로 증진시킬 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0010] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법 및 이하에서 기술하는 실험 방법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0011] 본 발명에서 사용하는 용어 "줄기세포(stem cell)"란 자기 복제 능력을 가지면서 두 개 이상의 세포로 분화하는 능력을 갖는 세포를 말하며, "성체 줄기세포"는 발생과정이 진행되어 배아의 각 장기가 형성되는 단계 혹은 성체단계에서 나타나는 줄기세포를 의미한다.

[0012] 본 발명에서 사용하는 용어 "중간엽 줄기세포"는 인간 또는 포유류의 조직으로부터 분리해 낸 미분화된 줄기세포로서, 다양한 조직에서 유래할 수 있다. 특히, 체대 유래 중간엽 줄기세포, 체대혈 유래 중간엽 줄기세포, 골수 유래 중간엽 줄기세포, 지방 유래 중간엽 줄기세포, 근육 유래 중간엽 줄기세포, 신경 유래 중간엽 줄기세포, 피부 유래 중간엽 줄기세포, 양막 유래 중간엽 줄기세포 및 태반 유래 중간엽 줄기세포일 수 있으며, 각 조직에서 줄기세포를 분리하는 기술은 당해 업계에 이미 공지되어 있다.

[0013] 본 발명에서 사용하는 용어 "지방 조직 유래 중간엽 줄기세포"란 지방조직에서 분리해 낸 미분화된 성체 줄기세포로서, 본 명세서에 축약하여 "지방 유래 성체 줄기세포", "지방 줄기세포" 또는 "지방 유래 줄기세포"라고 지칭하기도 한다. 이는 당업계에 공지된 통상의 방법을 통하여 획득할 수 있는데, 그 분리 방법은 예를 들어 다음과 같을 수 있다. 즉, 지방흡입술로부터 얻어지는 생리 식염수에 부유된 지방 함유 suspension을 배양한 다음, 플라스크 등 배양용기에 부착된 줄기세포 층을 트립신으로 처리한 다음 회수하거나, 스크래퍼로 긁어서 소량의 생리 식염수에 부유되는 것을 직접 회수하거나 하는 방법 등을 통해 지방 유래 중간엽 줄기세포를 분리할 수 있다.

[0014] 본 발명에서 "혈관 내 투여에 적합한 크기를 가지는 줄기세포"란 혈관 내로 투여된 줄기세포가 혈류 내 흐름이나 순환을 방해하지 않으면서 표적 조직으로 용이하게 이동하여 그 활성을 나타낼 수 있도록 직경이 정맥의 직경에 비하여 작은, 바람직하게는 직경이 10 내지 20 μm 인 줄기세포, 더욱 바람직하게는 직경이 10 내지 15 μm 인 줄기세포를 의미한다.

[0015] 본 발명에서, "이송"이란 줄기세포 자체 또는 줄기세포를 함유하는 용액을 담은 용기 등을 자동차 등의 교통수단에 의하여 운송하는 것을 의미하며, "보관"은 실온에서 보관하는 것 이외, 냉장에서의 보관도 포함한다.

[0016] 본 발명에서, "줄기세포의 파쇄 및 응집 방지"는 단세포 형태의 줄기세포가 깨지거나 응집됨 없이 그 형태를 유지하는 것을 의미하는 것으로, 일 예로 이송이나 보관 중 줄기세포의 세포막이 깨지거나 세포 간 응집(aggregation)이 형성되지 않고 단세포(single cell) 형태를 유지하는 것을 의미할 수 있다.

[0017] 줄기세포는 다양한 방법, 예를 들면, 정맥내, 동맥내 또는 복강내 투여 등의 방법으로 신체 내로 투여될 수 있는데 그 중에서도 정맥 투여는 외과적 수술 없이도 간편하면서도 안전하게 질병을 치료할 수 있어 유용하다. 그러나 정맥 내로 투여된 줄기세포가 실제로 표적 부위에 안정적으로 도달하여 목적하는 치료효과를 나타내기 위해서는 여러 가지 요건이 만족되어야 한다.

[0018] 먼저, 혈관 내로 투여된 줄기세포가 혈류 내 속도를 감소시키거나 혈전을 형성하지 않도록 혈관 내 투여에 적합한 크기여야 한다. 다양한 조직에서 유래될 수 있는 중간엽 줄기세포(Mesenchymal stem cell)는 환자나 그 유래, 배양 상태나 방법에 따라 형태나 증식 정도가 제각각이며 그 크기도 직경이 약 10 내지 300 μm 으로 다양하다. 그러나 인간의 후모세관 정맥(post-capillary venules)은 대략 그 직경이 20 내지 50 μm 이며, 소동맥은 직경이 10 내지 30 μm 이고(Schmidt GT, 1989), 모세혈관은 직경이 10 μm 내외로(Schmidt GT, 1989; Chien,

1975; John Ross, 1991; Herbert et al., 1989; Arthur and Guyton, 1997; Renkin, 1989; Gaetgens, 1980; Row 1979), 보통의 중간엽 줄기세포의 직경보다 작다. 따라서, 상대적으로 크기가 큰 중간엽 줄기세포가 정맥 내로 투여되면 혈관 내 활성화에 영향을 줄 수 있다. 구체적으로, 혈류 속도를 감소시킬 수 있을 뿐 아니라, 혈액 순환을 방해하여 혈류의 중단, 혈전 형성, 혈관 폐색, 심지어 사망을 유발할 수 있다는 문제점이 있다. 이와 관련하여, 직경이 약 20 내지 53 μm 인 중간엽 줄기세포를 마우스에 정맥 투여시 혈류 속도가 감소되었고, 심근 경색, 혈전 형성의 유발이 관찰되었다는 보고가 있다 (D.Furlani et al. Microvascular Research 77 (2009) 370-376). 따라서, 적합한 크기의 줄기세포를 혈관 내에 투여하는 것이 중요하다.

[0019] 또한, 혈관 내로 투여되기 전 줄기세포는 파쇄되거나 응집 (aggregation)의 형성이 없어야하며, 혈관 내로 투여된 후에도 단일 세포 (single cell)로서 세포의 파괴나 응집의 형성 없이 표적 부위에 안정적으로 도달하여야 한다. 신체 내 투여를 위하여 줄기세포에 트립신 등을 처리하여 단세포 형태로 제조할 수 있지만 단세포 형태로 제조된 줄기세포라 하더라도 이송이나 보관 중 세포막이 깨지거나 세포 간 응집 (aggregation)이 형성되는 문제점이 있다. 단세포 (single cell) 형태가 아닌 응집된 줄기세포 또는 깨진 세포는 정맥 투여 등의 방법으로 신체에 투여되는 경우, 혈관 내피세포나 혈소판 등과 부착하여 혈류 속도를 감소시키거나 혈액 순환을 방해할 수 있으며 심지어 미세지관이나 혈관 등의 폐색을 초래할 수도 있다 (D.Furlani et al. Microvascular Research 77 (2009) 370-376). 따라서, 혈관 내로 투여되기 전 세포가 파쇄되거나 응집 (aggregation)이 형성되지 않아야 하며, 혈관 내로 투여된 후에도 단일 세포 (single cell)로서 세포의 파괴나 응집의 형성 없이 표적 부위에 안정적으로 도달하여야 한다.

[0020] 뿐만 아니라, 표적 부위에 도달한 줄기세포가 목적하는 치료효과를 나타내도록 일정 농도 이상의 세포 투여가 전제되어야 한다. 따라서, 임상적으로 적용하고자 하는 줄기세포를 대량으로 수득하는 것이 중요하다.

[0021] 따라서 본 발명은 혈관 내로 투여되기 전 줄기세포의 파쇄 및 응집을 방지하여 신체 내 투여에 적합하며, 혈관 내 투여에 적합한 크기를 가져서 혈관 내로 투여된 줄기세포가 혈류 내 속도를 감소시키거나 혈전을 형성하지 않으므로 안정적으로 치료효과를 나타내는, 안전성이 우수한 정맥 투여용 줄기세포 조성물을 제공하기 위한 것이다.

[0022] 본 발명은 일 관점에서, 10 내지 20 μm 의 직경을 가지고, 단세포로 존재하는 줄기세포를 $1 \times 10^7 \sim 5 \times 10^8$ 세포 수/ml로 함유하는 것을 특징으로 하는 정맥 투여용 줄기세포 조성물을 제공한다.

[0023] 본 발명에서 사용되는 줄기세포는 바람직하게는 성체 줄기세포, 그 중에서도 지방조직, 또는 모낭·양막 등 상피조직에서 얻어지는 성체 줄기세포를 이용할 수 있다. 가장 바람직하게는 지방 조직 유래 성체 줄기세포를 사용할 수 있다. 중간엽 줄기세포 (mesenchymal stem cells, MSCs)를 사용할 수 있고, 특히 지방조직 유래 중간엽 줄기세포 (Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell, AdMSCs)일 수 있다.

[0024] 상기 지방 또는 상피조직은 포유류 유래인 것이 바람직하고, 그 중에서도 인간 유래인 것이 더욱 바람직하다. 본 발명의 일 실시예에서는 인간 지방조직 유래 중간엽 줄기세포 (Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cell, AdMSCs)를 사용하였다.

[0025] 본 발명에서, 정맥 투여용 줄기세포 조성물에 함유되는 줄기세포는, 기본배지; 및 NAC(N-acetyl-L-cysteine), 아스코르브산 (ascorbic acid), 인슐린 또는 인슐린 유사인자, 히드로코르티손, 텍사메타손, bFGF (basic fibroblast growth factor), 헤파란 황산 (heparan sulfate), 2-머캅토에탄올 (2-mercaptoethanol), EGF (epidermal growth factor) 및 항산화제로 구성된 군에서 선택되는 2가지 이상의 성분을 함유하는 배지에서 줄기세포를 배양하여 수득한다.

[0026] 본 발명의 줄기세포 조성물에 함유되는 줄기세포 수득을 위한 배양 배지에서 사용되는 기본 배지(basal medium)는 당업계에서 줄기세포 배양에 적합하다고 알려져 있는 간단한 조성을 가지는 통상적인 배지를 뜻한다. 일반적으로 배양에 이용되는 기본 배지로는 MEM (Minimal Essential Medium), DMEM (Dulbecco modified Eagle Medium), RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium), K-SFM (Keratinocyte Serum Free Medium)이 있으며, 이 외에도 당업계에서 이용되는 배지이면 족하다. 바람직하게는, M199/F12(mixture)(GIBCO), MEM-alpha배지(GIBCO), 저농도 글루코오스 함유 DMEM배지(Welgene), MCDB 131배지(Welgene), IMEM배지(GIBCO), K-SFM, DMEM/F12 배지, PCM 배지 및 MSC 확장배지 (Chemicon)로 구성된 군에서 선택될 수 있다. 특히, 이 중에서도 바람직하게는 K-SFM 배지를 사용할 수 있다.

- [0027] 상기 중간엽 줄기세포 배양물의 획득에 사용되는 기본 배지는 당 업계에 공지된, 중간엽 줄기세포의 미분화된 표현형의 증식을 촉진하면서 분화는 억제하는 첨가제로 보충될 수 있다. 또한, 배지는 등장액 중의 중성 완충제 (예컨대 인산염 및/또는 고농도 중탄산염) 및 단백질 영양분(예를 들면 혈청, 예컨대 FBS, FCS (fetal calf serum), horse serum, 혈청 대체물, 알부민, 또는 필수 아미노산 및 비필수 아미노산, 예컨대 글루타민, L-글루타민)을 함유할 수 있다. 나아가, 지질(지방산, 콜레스테롤, 혈청의 HDL 또는 LDL 추출물) 및 이 종류의 대부분의 보존액 배지에서 발견되는 기타 성분(예컨대 인슐린 또는 트랜스페린, 뉴클레오시드 또는 뉴클레오티드, 피루빈산염, 임의의 이온화 형태 또는 염인 당원, 예컨대 글루코스, 셀레늄, 글루코코르티코이드, 예컨대 히드로코르티손 및/또는 환원제, 예컨대 β -메르캅토에탄올)을 함유할 수 있다.
- [0028] 또한, 배지는 세포가 서로 유착하거나, 용기벽에 유착하거나, 너무 큰 다발을 형성하는 것을 방지할 목적으로, 항응집제 (anti-clumping agent), 예컨대 Invitrogen이 판매하는 것들(Cat # 0010057AE)을 포함하는 것이 유익할 수 있다.
- [0029] 그 중에서도, 하기의 1이상의 추가의 첨가제를 사용하는 것이 유리할 수 있다:
- [0030] · 줄기세포 인자(SCF), c-키트를 이량화하는 다른 리간드 또는 항체, 및 동일한 신호 전달 경로의 다른 활성화제
- [0031] · 다른 티로신 키나아제 관련 수용체, 예컨대 혈소판-유도된 성장 인자(Platelet-Derived Growth Factor; PDGF), 대식세포 콜로니-자극 인자, Flt-3 리간드 및 혈관 내피 성장 인자(Vascular Endothelial Growth Factor; VEGF)의 수용체를 위한 리간드
- [0032] · 환형 AMP 농도를 높이는 인자, 예컨대 포르스폴린
- [0033] · gp130을 유도하는 인자, 예컨대 LIF 또는 Oncostatin-M
- [0034] · 조혈모 성장 인자, 예컨대 트롬보포이에틴(TPO)
- [0035] · 변형성 성장 인자, 예컨대 TGF β 1
- [0036] · 뉴로트로핀, 예컨대 CNTF
- [0037] · 항생제, 예컨대 겐타마이신 (gentamicin), 페니실린, 스트렙토마이신
- [0038] 본 발명의 줄기세포 조성물에 함유되는 줄기세포 수득을 위한 배양 배지는 상기 기본 배지 이외에, NAC(N-acetyl-L-cysteine), 아스코르브산 (ascorbic acid), 인슐린 또는 인슐린 유사인자, 히드로코르티손, 텍사메타손, bFGF (basic fibroblast growth factor), 헤파란 황산 (heparan sulfate), 2-머캅토에탄올 (2-mercaptoethanol), EGF (epidermal growth factor) 및 항산화제로 구성된 군에서 선택되는 2가지 이상의 성분을 추가로 함유할 수 있다.
- [0039] 구체적으로, 인슐린을 대체하는 성분으로 인슐린 유사인자를 함유할 수 있는데, 이는 포도당 대사와 단백질 대사를 향상시켜 세포성장을 촉진하는 역할을 한다. 특히 재조합 IGF-1(Insulin-like growth factor-1)을 사용하는 것이 바람직하다. 인슐린 유사인자의 바람직한 함량은 10 내지 50 ng/ml이며, 이의 성분이 10ng/ml 미만일 경우에는 세포자살(Apoptosis)을 초래하며, 50 ng/ml을 초과할 경우에는 세포독성 및 비용증가의 문제점이 있다. 히드로코르티손의 경우, 그 함량은 60 내지 80 ng/ml일 수 있다.
- [0040] 섬유아세포 증식인자 (bFGF)를 함유할 수 있는데, 이는 in vivo 상태에서 다양한 형태의 세포증식을 야기할 수 있으며, 바람직하기로는 재조합 단백질을 사용한다. 섬유아세포 증식인자의 바람직한 함량은 1 내지 100 ng/ml 이다.
- [0041] 항산화제로는 셀레늄(selenium), 아스코르브산, 비타민 E, 카테킨, 라이코펜, 베타카로틴, 코엔자임 Q-10, EPA(eicosapentaenoic acid), DHA(docosahexanoic acid) 등을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 셀레늄을 사용할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 항산화제로서 셀레늄을 사용하였으며, 사용되는 셀레늄의 양은 0.5 내지 10 ng/ml 인 것이 바람직하다. 이때, 이의 함량이 0.5 ng/ml 미만이면 산소독성에 민감하며, 10 ng/ml을 초과하면 심각한 세포독성을 초래하기 때문이다. 아스코르브산의 경우, 그 함량은 0.1 내지 0.3 mM으로 사용할 수 있다.
- [0042] 본 발명에서 사용되는 배지는 FBS (fetal bovin serum), 칼슘 및 EGF으로 구성된 군에서 선택되는 성분을 추가로 함유할 수 있다. 칼슘의 함량은 0.05 내지 0.13 mM의 양으로 함유될 수 있다. 상피세포 성장인자(Epidermal

growth factor; EGF)는 in vivo 상태에서 다양한 형태의 세포증식을 야기할 수 있으며, 바람직하기로는 재조합 단백질을 사용한다. 상피세포 성장인자의 바람직한 함량은 10 내지 50 ng/ml이며, 이의 함량이 10 ng/ml 미만이면 특별한 효과가 없으며, 50ng/ml을 초과하면 세포에 독성을 가진다.

- [0043] 본 발명에 따른 상기 배지에서 배양된 줄기세포는 바람직하게는 10 내지 20 μ m, 더욱 바람직하게는 10 내지 15 μ m의 직경을 가지므로 혈관 내 투여에 적합하다.
- [0044] 또한, 본 발명에 따른 배지에서 줄기세포를 배양하는 경우, 바람직하게는 4회 내지 6회 계대 배양시 $7 \times 10^5 \sim 5 \times 10^8$ 세포수/ml로 증식된 줄기세포를 얻을 수 있다. 또한, 상기 계대 배양을 통해 줄기세포의 수를 증가시키는 동안 기능적/형태학적으로 세포의 변형도 일어나지 않으므로 본 발명에 따른 줄기세포는 임상에 효과적으로 적용할 수 있다. 종래의 방법에 의한 줄기세포 배양에 의하면, 높은 수율의 줄기세포를 얻기 위해서는 계대 배양을 여러 차례 수행하여야 하므로 인력 및 시간이 많이 소요되며, 특히 계대 배양에 필요한 배지 성분 중 일부는 대단히 고가여서 경제적으로도 장점이 존재하지 않았다. 그러나, 본 발명에 따른 배지를 사용하는 경우, 단 3회 내지 5회의 계대배양만으로도 임상적으로 적용 가능할 정도의 고농도의 줄기세포를 제조하는 것이 가능하다.
- [0045] 따라서 본 발명은 다른 관점에서, 기본배지; 및 NAC(N-acetyl-L-cysteine), 아스코르브산 (ascorbic acid), 인슐린 또는 인슐린 유사인자, 히드로코르티손, 텍사메타손, bFGF (basic fibroblast growth factor), 헤파란 황산 (heparan sulfate), 2-머캅토에탄올 (2-mercaptoethanol), EGF (epidermal growth factor) 및 항산화제로 구성된 군에서 선택되는 2가지 이상의 성분을 함유하는, 정맥 투여에 적합한 줄기세포 제조용 배지를 제공한다.
- [0046] 한편, 본 발명에 따른 줄기세포 조성물에 함유되는 줄기세포를 제조함에 있어서, 상기 기술한 본 발명에 따른 배지에서 정맥 투여용 줄기세포에 트립신을 처리할 수 있다. 배양된 줄기세포에 트립신을 처리하면 단세포 형태의 줄기세포를 얻을 수 있는데, 이때 트립신은 세포 간의 응집을 억제하여 세포가 단세포 (single cell)의 형태를 갖도록 처리되는 것으로, 세포 간의 응집 형성을 억제할 수 있는 물질이면 대체하여 사용할 수 있다.
- [0047] 또한, 본 발명에 따른 정맥 투여용 조성물에 함유되는 줄기세포를 제조함에 있어서, 상기 기술한 본 발명에 따른 배지에서 배양된 줄기세포를 아스피린 함유 용액에 부유시킬 수 있다.
- [0048] 본 발명에서 “아스피린 함유 용액”은 아스피린 화합물을 함유하는 용액을 의미하는 것으로, 용매로는 바람직하게는 생리식염수를 사용할 수 있으나 그 외에도 하트만-D 용액, PBS(Phosphate Buffered Saline) 등 당업계에서 일반적으로 사용하는 기제라면 제한없이 사용할 수 있다. 상기 아스피린은 통상 시판되고 있는 아스피린 제제 뿐 아니라 아스피린 유사 화합물을 사용할 수도 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 아세틸살리실산 (Sigma; A5376), 알타질주 (Arthalgyl Injection) 또는 아스피린리신 (신풍제약)을 생리식염수에 첨가하여 아스피린 함유 용액을 제조하였다. 이때, 첨가되는 아스피린의 함량은 0.0001 내지 0.01 mg/ml인 것이 바람직하다. 첨가되는 아스피린의 양이 그보다 많으면 세포의 생존율이 감소할 수 있으며, 그보다 적으면 세포 파괴나 응집 억제의 효과가 미비할 수 있다.
- [0049] 줄기세포를 상기 아스피린 함유 용액에 부유시키면 이송이나 보관 중 줄기세포의 파쇄 및 응집 (aggregation)이 나타나지 않으므로 이러한 줄기세포는 신체 내 투여에 바로 적용할 수 있으므로 유용하다. 따라서, 바람직하게는 혈관 투여시 사용되는 줄기세포는 아스피린 함유 생리식염수에 부유시킨 후 이용할 수 있다.
- [0050] 배양된 줄기세포를 아스피린 함유 용액에서 부유시키면 이송이나 보관 중 줄기세포가 파쇄되거나 응집되는 것을 방지할 수 있으므로 유용하다. 따라서, 혈관 내 투여시 사용되는 줄기세포는 아스피린 함유 생리식염수에 부유시킨 후 이용할 수 있다. 아스피린 함유 용액은 아스피린 화합물을 함유하는 용액을 의미하는 것으로, 용매는 바람직하게는 생리식염수를 사용할 수 있으나 그 외에도 하트만-D 용액, PBS(Phosphate Buffered Saline) 등 당업계에서 일반적으로 사용하는 기제라면 제한없이 사용할 수 있다. 상기 아스피린은 통상 시판되고 있는 아스피린 제제 뿐 아니라 아스피린 유사 화합물을 사용할 수 있다. 상기 첨가되는 아스피린의 함량은 0.0001 내지 0.01 mg/ml인 것이 바람직하다. 첨가되는 아스피린의 양이 그보다 많으면 세포의 생존율이 감소할 수 있으며, 그보다 적으면 세포 응집 억제의 효과가 미비할 수 있다.

- [0051] 상기 기술한 방법에 따라 수득한 줄기세포를 함유하는 본 발명의 정맥 투여용 줄기세포 조성물은 환자의 정맥 내로 직접 투여될 수 있다.
- [0052] 투여량은 예를 들면, 치료하고자 하는 목적 부위 주변의 정맥 혈관에 1개소 또는 복수 개소(예를 들면 2-50개소)에 투여할 수 있으며, 투여량은 $1.0 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^8$ 세포/kg(체중), 보다 바람직하게는 $1.0 \times 10^6 \sim 1.0 \times 10^7$ 세포/kg(체중)이 바람직하다. 다만, 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 증상, 투여조성물의 형태, 투여방법 등에 따라 상이해도 되고, 당업자라면 적절히 조정하는 것이 가능하다. 투여횟수는 1회 또는 임상상 용인 가능한 부작용의 범위에서 복수회 가능하고, 투여부위에 대해서도 1개소 또는 복수개소 투여해도 된다. 인간 이외의 동물에 대해서도, kg당 인간과 동일한 투여량으로 하거나, 또는 예를 들면 목적의 동물과 인간과의 허혈기관(심장 등)의 용적비(예를 들면 평균값) 등으로 상기의 투여량을 환산한 양을 투여할 수 있다. 본 발명의 치료의 대상동물로서는, 인간 및 그 밖의 목적으로 하는 포유동물을 들 수 있고, 구체적으로는 인간, 원숭이, 마우스, 랫트, 토끼, 양, 소, 개, 말, 돼지 등이 포함된다.
- [0053] 본 발명에 따른 정맥 투여용 줄기세포 조성물은, 줄기세포를 $1 \times 10^7 \sim 5 \times 10^8$ 세포수/ml로 함유할 수 있다.
- [0054] 본 발명에 따른 정맥 투여용 줄기세포 조성물은, 약학적으로 허용할 수 있는 담체 및/또는 첨가물 등을 포함하는 조성물일 수 있다. 예를 들면, 멸균수, 생리식염수, 완충의 완충제(인산, 구연산, 그 밖의 유기산 등), 안정제, 염, 산화방지제(아스코르브산 등), 계면활성제, 현탁제, 등장화제, 또는 보존제 등을 포함해도 된다. 국소 투여를 위해, 바이오 폴리머 등의 유기물, 히드록시아파타이트 등의 무기물, 구체적으로는 콜라겐 매트릭스, 폴리락트산 폴리머 또는 코폴리머, 폴리에틸렌글리콜 폴리머 또는 코폴리머 및 그의 화학적 유도체 등과 조합시키는 것도 바람직하다.
- [0055] 본 발명에 따른 정맥 투여용 줄기세포 조성물은 바람직하게는 주사에 적당한 제형으로 조제되어야 한다. 이를 위해서는, 본 발명의 줄기세포는 약학적으로 허용되는 수용액 중에 용해되어 있거나 또는 용액상태에서 동결된 것이 바람직하다. 따라서, 본 발명의 정맥 투여용 줄기세포 조성물은 줄기세포를 현탁 또는 희석하기 위해 사용할 수 있는, 약학적으로 허용할 수 있는 목적으로 하는 담체를 추가로 포함할 수 있다. 이러한 담체로서는, 예를 들면 증류수, 생리식염수, PBS(phosphate buffered saline) 또는 하트만-D(중외제약)를 사용하는 것이 좋다.
- [0056] 의약품으로서의 형태를 취하기 위해서 필요한 제제담체나 부형제를, 나아가서는 안정화제나 흡착방지제를 함유할 수 있고, 제형도 주사제를 사용할 수 있으며, 주사 시 통증을 감소시킬 수 있는 무통화제를 사용할 수 있고, 필요에 따라 적당한 디바이스를 사용할 수 있다.
- [0057] 본 발명에 따른 정맥 투여용 줄기세포 조성물의 형태는 주사기나 디바이스에 담겨진 최종 주입 형태, 냉동이 가능한 크라이오바이알(cryovial)의 형태, 또는 액상의약품을 담을 수 있는 파이로젠이 없는 유리병과 고무진, 알루미늄 캡형태로 충전될 수 있다. 디바이스의 형태로는 주사기, 멀티실린지 등이 사용될 수 있으며 사지허혈성 질환의 경우에는 세포가 투여되는 동안 세포가 shear 되어 손상을 입히지 않으면서 고통을 최소화 할 수 있는 주사바늘(needle)을 이용하며 바람직하게는 20gauge에서 31gauge 범위에서 투여할 부위를 고려하여 사용하며, 실린지나 디바이스가 세포 생존력에 영향을 미치지 않는 소재를 사용한다.
- [0058] 본 발명에 따른 정맥 투여용 줄기세포 조성물에, 그 투여방법이나 제형에 따라 필요한 경우, 현탁제, 용해보조제, 안정화제, 등장화제, 보존제, 흡착방지제, 계면활성화제, 희석제, 부형제, pH 조정제, 무통화제, 완충제, 함황(含硫)환원제, 산화방지제 등을 적절히 첨가할 수 있다.
- [0059] 현탁제의 예로는, 메틸셀룰로오스, 폴리소르베이트 80, 히드록시에틸셀룰로오스, 아라비아고무, 트라간트말, 카르복시메틸셀룰로스나트륨, 폴리옥시에틸렌소르비탄모노라우레이트 등을 들 수 있다. 용액보조제로는, 폴리옥시에틸렌경화피마자유, 폴리소르베이트 80, 니코틴산아미드, 폴리옥시에틸렌소르비탄모노라우레이트, 메크로골, 피마자유지방산에틸에스테르 등을 들 수 있다. 안정화제로는, 텍스트란 40, 메틸셀룰로오스, 젤라틴, 아황산나트륨, 메타황산나트륨 등을 들 수 있다. 등장화제로는, 예를 들어 D-만니톨, 소르비톨 등을 들 수 있다. 보존제로는, 예를 들어 파라옥시벤조산메틸, 파라옥시벤조산에틸, 소르브산, 페놀, 크레졸, 클로로크레졸 등을 들 수 있다. 흡착방지제로는, 예를 들어 인간혈청알부민, 레시틴, 텍스트란, 에틸렌옥사이드·프로필렌옥사이드 공중합

체, 히드록시프로필셀룰로오스, 메틸셀룰로오스, 폴리옥시에틸렌 경화피마자유, 폴리에틸렌글리콜 등을 들 수 있다. 함황환원제로는, 예를 들어 N-아세틸시스테인, N-아세틸호모시스테인, 티옥토산, 티오디글리콜, 티오에탄올아민, 티오글리세롤, 티오소르비톨, 티오글리콜산 및 그 염, 티오황산나트륨, 글루타티온, 탄소원자수 1~7의 티오알칸산 등의 술폰히드릴기를 갖는 것 등을 들 수 있다. 산화방지제로는, 예를 들어 에리소르브산, 디부틸히드록시톨루엔, 부틸히드록시아니솔, α-토코페롤, 아세트산토코페롤, L-아스코르브산 및 그 염, L-아스코르브산팔미테이트, L-아스코르브산스테아레이트, 아황산수소나트륨, 아황산나트륨, 갈릭산트리아밀, 갈릭산프로필 또는 에틸렌디아민4아세트산나트륨 (EDTA), 피로인산나트륨, 메타인산나트륨 등의 킬레이트제를 들 수 있다. 동결보존제로는, 예를 들어 DMSO, 글리세롤 등을 들 수 있다. 나아가서는, 염화나트륨, 염화칼륨, 염화칼슘, 인산나트륨, 인산칼륨, 탄산수소나트륨 등의 무기염; 시트르산나트륨, 시트르산칼륨, 아세트산나트륨 등의 유기염 등의 통상 첨가되는 성분을 함유하고 있어도 된다.

[0060] 본 발명의 일 실시예에서는 본 발명에 따른 배지에서 지방 유래 중간엽 줄기세포를 배양하였다. 지방 유래 중간엽 줄기세포는 다음과 같은 방법으로 획득할 수 있다. 우선, 지방흡입술(Liposuction) 등에 의해 복부로부터 얻어진 인간 지방조직을 분리하여 PBS로 세척한 다음, 조직을 잘게 자른 후 콜라겐 분해 효소를 첨가한 DMEM배지를 사용하여 분해 후, PBS로 세척하고 1000 rpm에서 5분간 원심분리 한다. 상층액은 제거하고 바닥에 남은 펠렛은 PBS로 세척한 후 1000 rpm으로 5분간 원심분리 한다. 100 μm 매쉬를 사용하여 부유물을 제거한 다음, PBS로 다시 세척하였다. DMEM(10% FBS, 2 mM NAC, 0.2 mM 아스코르브산)배지에서 배양하고, 하룻밤 지난 후 배양용기 바닥에 부착되지 않은 세포들은 PBS로 세척하고, NAC, 아스코르브산, 칼슘, EGF, 인슐린 및 히드로코르티손을 함유한 K-SFM 배지를 2일마다 교체하면서 배양하여 중간엽 줄기세포를 분리하여 계대 배양하여 중간엽 줄기세포를 얻을 수 있다. 그러나 이 외에도 당업계에 공지된 방법으로 중간엽 줄기세포를 얻을 수 있다.

[0061] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0062] **실시예 1: 인간 지방조직 유래 중간엽 줄기세포 분리**

[0063] 지방흡입술(Liposuction)에 의해 복부지방으로부터 지방조직을 각각 분리하여 PBS로 세척하였다. 세척된 지방조직을 잘게 자른 후 콜라게나아제 타입 1 (1mg/ml)을 첨가한 DMEM media를 이용해 37°C에서 2시간 동안 조직을 분해시켰다. 콜라게나아제 처리된 조직을 PBS로 세척 후 1000rpm에서 5분간 원심분리 하여, 상층액을 제거하고, 펠렛을 PBS로 세척한 후 1000rpm으로 5분간 원심분리하였다. 100μm mesh에 필터링하여 부유물을 제거한 후 PBS로 세척하고, 10% FBS, 2mM NAC(N-acetyl-L-cysteine), 0.2mM 아스코르브산이 첨가된 DMEM 배지에서 배양하였다.

[0064] 하룻밤 지난 후 부착되지 않은 세포들은 PBS로 세척하고, 5% FBS, 2mM NAC, 0.2mM 아스코르브산, 0.09mM 칼슘, 5ng/ml rEGF, 5μg/ml 인슐린, 10 ng bFGF 및 74ng/ml 히드로코르티손 및 1ng/ml의 셀레늄(selenium)을 함유한 K-SFM을 2일마다 교체하면서 계대배양하였으며, 3계대 배양하여 지방 유래 중간엽 줄기세포를 분리하였다.

[0065] **실시예 2: 정맥투여용 줄기세포 배양을 위해 적절한 배지성분의 탐색**

[0066] 실시예 1에서 사용된 K-SFM 배지에 첨가되는 활성성분인 FBS, bFGF (basic fibroblast growth factor), 인슐린, 히드로코르티손, EGF (epidermal growth factor), 아스코르브산 (ascorbic acid), NAC(N-acetyl-L-cysteine) 및 셀레늄을 모두 함유하는 배지 (배지 1)와 상기 활성성분 중 하나 이상을 제거한 배지 (배지 2 ~ 배지 10)를 하기와 같이 제조하였다. 구체적인 배지 성분은 다음과 같다:

[0067] 배지 1: K-SFM 배지 + FBS + NAC + 아스코르브산 + 인슐린 + 히드로코르티손 + bFGF + EGF + 셀레늄

[0068] 배지 2: K-SFM 배지 + NAC + 아스코르브산 + 인슐린 + 히드로코르티손 + bFGF + EGF + 셀레늄 (배지 1의 성분 중 FBS 제외)

[0069] 배지 3: K-SFM 배지 + FBS + NAC + 아스코르브산 + 인슐린 + 히드로코르티손 + EGF + 셀레늄 (배지 1의 성분

중 bFGF 제외)

- [0070] 배지 4: K-SFM 배지 + FBS + NAC + 아소코르브산 + 히드로코르티손 + bFGF + EGF + 셀레늄 (배지 1의 성분 중 인슐린 제외)
- [0071] 배지 5: K-SFM 배지 + FBS + NAC + 아소코르브산 + 인슐린 + bFGF + EGF + 셀레늄 (배지 1의 성분 중 히드로코르티손 제외)
- [0072] 배지 6: K-SFM 배지 + FBS + NAC + 아소코르브산 + 인슐린 + 히드로코르티손 + bFGF + 셀레늄 (배지 1의 성분 중 EGF 제외)
- [0073] 배지 7: K-SFM 배지 + FBS + NAC + 인슐린 + 히드로코르티손 + bFGF + EGF + 셀레늄 (배지 1의 성분 중 아소코르브산 제외)
- [0074] 배지 8: K-SFM 배지 + FBS + 아소코르브산 + 인슐린 + 히드로코르티손 + bFGF + EGF + 셀레늄 (배지 1의 성분 중 NAC 제외)
- [0075] 배지 9: K-SFM 배지 + FBS + NAC + 아소코르브산 + 인슐린 + 히드로코르티손 + bFGF + EGF (배지 1의 성분 중 셀레늄 제외)
- [0076] 배지 10: K-SFM 배지 + FBS + NAC + 아소코르브산 + 인슐린 + 히드로코르티손 + 셀레늄 (배지 1의 성분 중 bFGF 및 EGF 제외)

[0077] 상기 활성성분이 각각 제거된 배지(배지 2 내지 배지 10) 및 K-SFM 배지 (대조군)에서 지방 유래 줄기세포를 배양하였다. 각각의 배지에서 3 passage까지 세포를 계대한 후 트립신을 처리한 뒤 공초점 현미경 (confocal microscope)으로 세포 직경을 측정하였다.

[0078] 측정 결과, 실시예 1에서 사용된 배지에서 배양된 줄기세포는 약 10 내지 15 μm 의 입도를 가진다는 것을 확인하였다 (도시하지 않음).

[0079] **실시예 3: 줄기세포의 증식능에 영향을 미치는 배지성분의 탐색**

[0080] 실시예 2에서 제조한 배지 1 내지 배지 10에서 지방 유래 줄기세포를 배양하였다. 지방 줄기세포는 20대, 30대, 70대, 80대의 각 연령대별 남자 3명으로부터 수득한 지방 유래 줄기세포를 이용하였다. 실시예1의 방법으로 수득한 지방유래 줄기세포를 상기 각각의 배지에서 1×10^5 cells/ml을 seeding하여 배양일별 (day 1, day 2, day 3, day 4)로 트립신을 처리한 뒤 공초점 현미경 (confocal microscope)으로 세포 수를 확인하였다. 하기 표 1에서는 각 연령별로 남자 3명 (N=3)의 세포 수의 평균을 나타내었다. 그 결과, 하기 표에서 알 수 있는 바와 같이 본 발명에 따른 배양방법에 의하면 줄기세포를 4계대 배양하는 경우, 약 $7 \times 10^5 \sim 1.1 \times 10^6$ 세포수/ml의 줄기세포를 제조할 수 있음을 확인할 수 있었다 (표 1 참조). 또한, 연령별로 다소 차이가 있지만 배지 9번의 경우 CPDL(Cell population doubling level) 값이 가장 높았으며, 20대 및 30대의 경우에는 1×10^5 cells/ml의 줄기세포를 seeding 하였을 때 4일(d4) 되는 시점에서 세포 수가 10~11배 증가하였으며, 70대 및 80대의 경우에는 세포 수가 7~9배 증가하였음을 확인할 수 있었다 (도시하지 않음).

[표 1]

배지 (배지 1 내지 배지 10)에서 배양일차별 획득된 지방유래 중간엽줄기세포의 세포 수 (수/ml) (각 군별 N=3의 평균 세포수로 표시함)

Age	Day (Post seeding)	Total Cell Count($\times 10^6$ /ml)									
		M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10
20	Day 1	1.8	1.6	1.9	1.8	1.5	1.6	1.5	1.5	1.0	1.3
	Day 2	4.0	1.2	3.6	4.4	4.0	4.7	3.9	4.4	4.0	1.2
	Day 3	11.2	1.0	8.9	14.0	12.9	12.8	11.8	12.8	11.2	1.3
	Day 4	14.6	0.8	9.9	13.7	17.1	19.2	21.8	20.7	20.2	1.7
30	Day 1	1.8	1.1	1.7	1.7	1.7	2.2	1.7	1.4	2.3	1.5
	Day 2	2.7	0.8	2.2	3.2	3.0	3.2	3.2	3.4	4.4	1.2
	Day 3	9.0	1.0	7.1	8.9	11.8	10.5	10.6	11.8	11.5	1.3
	Day 4	15.9	1.0	12.1	16.2	15.2	17.0	20.5	22.6	22.1	1.6
70	Day 1	1.4	0.8	1.4	1.3	1.3	1.4	1.2	0.9	1.4	1.1
	Day 2	3.1	0.8	5.1	2.3	2.6	2.3	2.8	2.4	2.8	1.2
	Day 3	7.3	0.8	5.6	6.9	9.7	8.3	8.1	8.2	10.4	1.3
	Day 4	10.5	0.6	7.4	9.4	9.2	11.0	14.7	12.9	13.1	1.2
80	Day 1	1.7	1.1	1.7	1.6	1.3	1.3	1.3	1.3	1.4	1.2
	Day 2	2.7	1.1	1.9	2.2	2.7	2.8	2.8	2.9	2.1	0.8
	Day 3	6.4	0.8	5.8	7.3	9.9	6.1	5.9	5.7	5.6	1.1
	Day 4	9.9	0.7	7.1	9.9	7.8	17.0	11.3	11.4	11.0	1.1

[0081]

[0082] 실시예 4: 줄기세포의 단일 세포 (single cell) 유지 능력

[0083] (1) 아세틸살리실산을 농도별로 첨가한 생리식염수로 처리

[0084] 상기 실시예 1에서 분리한 지방조직 유래 중간엽 줄기세포에 트립신 처리한 후, 아세틸살리실산 (Acetylsalicylic acid) (Sigma; A5376)을 농도별로 첨가한 생리식염수에 1.0×10^7 cells 농도로 부유시킨 후, 12시간, 24시간에서의 생존율을 관찰하였다. 상기 아세틸살리실산을 첨가한 생리식염수는, 생리식염수에 아세틸살리실산을 농도별로 첨가하여 37°C에서 30분 동안 sonication하여 제조하였다.

[표 2]

생존율	아스피린 농도			
	0mg/10ml	1.0mg/10ml	2.0mg/10ml	5.0mg/10ml
12 hours	85%	50%	20%	10%
24 hours	70%	10%	10%	5%

[0085]

[0086] 실험 결과, 생리식염수 10 ml에 대하여 아스피린의 첨가량이 1.0mg 이상인 경우에는 세포 독성이 있음을 확인할 수 있었다.

[0087] (2) 알타질주 (Arthalgyl Injection)를 농도별로 첨가한 생리식염수로 처리

[0088] 상기 실시예 1에서 분리한 지방조직 유래 중간엽 줄기세포에 트립신 처리한 후, 알타질주 (Arthalgyl Injection)를 농도별로 첨가한 생리식염수에 1.0×10^7 cells 농도로 부유시킨 후, 12시간, 24시간에서의 생존

율을 관찰하였다.

[표 3]

생존율	아스피린 농도			
	0mg/10ml	0.001mg/10ml	0.01mg/10ml	0.1mg/10ml
12 hours	95%	91%	90%	90%
24 hours	90%	87%	85%	84%
48 hours	85%	80%	77%	74%
72 hours	65%	63%	61%	61%

[0089]

[0090]

실험 결과, 생리식염수 10 ml에 대하여 아스피린의 첨가량이 0.001 내지 0.1mg인 경우에는 지방줄기세포의 생존에 영향을 주지 않음을 확인할 수 있었다. 지방줄기세포를 아스피린 부유액에 부유시킨 후 72시간까지 정치 가능하나, 좋기로는 24 시간 이내 처리하는 것이 좋았다.

[0091]

(3) 알타질주 (Arthalgyl Injection)를 농도별로 첨가한 생리식염수에 처리한 줄기세포의 증식력

[0092]

상기 실시예 1에서 분리한 지방조직 유래 중간엽 줄기세포에 트립신 처리한 후, 알타질주 (Arthalgyl Injection)를 농도별로 첨가한 생리식염수에 1.0×10^7 cells 농도로 부유시킨 후, 24시간 후의 생존율을 관찰하였다.

[표 4]

생존율	아스피린 농도			
	0mg/10ml	0.001mg/10ml	0.01mg/10ml	0.1mg/10ml
24 hours	95%	92%	91%	91%

[0093]

[0094]

실험 결과, 생리식염수 10 ml에 대하여 알타질주의 첨가량이 0.001 내지 0.1mg인 경우, 지방줄기세포의 증식능력에 영향을 주지 않음을 확인할 수 있었다.

[0095]

또한, 상기 부유시킨 세포 1.0×10^6 cells를 7일간 배양한 뒤의 세포 수와 생존율도 관찰한 결과를 하기에 나타내었다.

[표 5] 아스피린 농도 별 24시간 후 생존률 (n=3)

생존율	아스피린 농도			
	0mg/10ml	0.001mg/10ml	0.01mg/10ml	0.1mg/10ml
평균	91±1%	90±0%	88±2.6%	87±1%
Donor 1	90%	90%	85%	87%
Donor 2	91%	90%	89%	86%
Donor 3	92%	90%	90%	88%

[0096]

[표 6] 아스피린 농도별 24시간 부유후, 배양시 증식력에 미치는 영향 (n=3)>

세포수	아스피린 농도			
	0mg/10ml	0.001mg/10ml	0.01mg/10ml	0.1mg/10ml
Donor 1	8.0 X 10 ⁶	7.6 X 10 ⁶	8.2 X 10 ⁶	7.8 X 10 ⁶
Donor 2	1.18 X 10 ⁷	1.32 X 10 ⁷	1.1 X 10 ⁷	1.12 X 10 ⁷
Donor 3	1.02 X 10 ⁷	1.0 X 10 ⁷	1.3 X 10 ⁷	1.02 X 10 ⁷

[0097]

[0098] (4) 아스피린리신 (신풍제약)을 첨가한 생리식염수에 처리한 줄기세포의 특성

[0099] 상기 실시예 1에서 분리한 지방조직 유래 중간엽 줄기세포에 트립신 처리한 후, 아스피린리신 (신풍제약)을 농도별로 첨가한 생리식염수에 줄기세포를 1.0 X 10⁶ cells 농도로 부유시킨 후, 5일간 배양하여 세포수를 측정하였다. 그리고 24시간 냉장 보관 후 FACS를 측정하여 세포특성을 확인하였다.

[표 7]

발현율	아스피린 농도	
	0mg/10ml	0.1mg/10ml
CD29	99.97%	99.97%
CD31	0%	0.21%
CD44	99.45%	99.25%
CD45	0.19%	0.17%
CD90	99.73%	99.66%
CD105	99.9%	99.89%

[0100]

[0101] 실험 결과, 아스피린리신 농도에 의한 세포 생존율은 다소 감소하나 유의적이지 않았으며 5일간 배양한 후의 세포수도 개체 차이는 있으나 농도별 차이는 거의 없었다. 24시간 동안 아스피린이 첨가된 생리식염수에 부유한 후 24시간 냉장 보관한 지방유래 중간엽 줄기세포의 특성도 아스피린 농도에 의한 영향은 없는 것으로 관찰되었다.

[0102] 이상으로 본 발명의 내용을 상세히 기술하였는바, 당 업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.