



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(11) 공개번호 10-2012-0057784  
 (43) 공개일자 2012년06월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
**C12N 5/0775** (2010.01) **C12N 5/02** (2006.01)  
**C07K 14/475** (2006.01) **A61K 35/12** (2006.01)  
 (21) 출원번호 10-2010-0119284  
 (22) 출원일자 2010년11월29일  
 심사청구일자 없음

(71) 출원인  
**주식회사 알앤엘바이오**  
 서울특별시 관악구 관악로 120 (봉천동)  
 (72) 발명자  
**박형근**  
 경기도 수원시 장안구 화산로125번길 9, 106동  
 601호 (천천동, 천천 푸르지오)  
**강성근**  
 서울특별시 관악구 성현동 관악드림타운아파트  
 116동 504호  
 (뒷면에 계속)  
 (74) 대리인  
**이처영**

전체 청구항 수 : 총 11 항

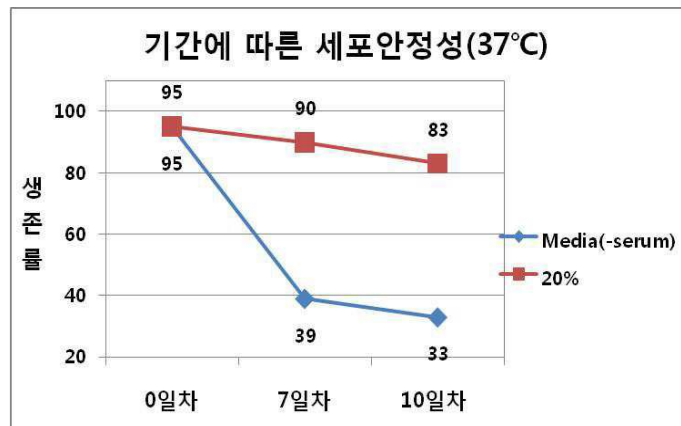
(54) 발명의 명칭 **줄기세포의 안정성 증진용 조성물**

**(57) 요약**

본 발명은 줄기세포의 안정성을 증진할 수 있는 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 중간엽 줄기세포 배양물 및 기제를 함유하는 줄기세포의 안정성 증진용 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따른 줄기세포의 안정성 증진용 조성물은, 줄기세포의 안정성을 증진하여, 생존율을 높게 유지하는 효과가 있으며, 본 발명에 따른 줄기세포의 안정성 증진용 조성물을 함유하는 세포치료제 주사제품은 장기간(10일) 동안, 세포치료제에 포함된 줄기세포의 생존율을 80% 이상으로 유지할 수 있으므로, 세포치료제 주사제품의 장기간 운송에 활용할 수 있고, 세포치료제에 포함된 줄기세포의 높은 생존율에 따라, 세포치료의 효과가 뛰어나므로, 양질의 세포치료제 주사제품의 제조에도 유용하게 사용될 수 있다.

**대표도 - 도5**



(72) 발명자

**라정찬**

경기도 수원시 장안구 만석로20번길 25, 626동  
701호 (정자동, 청솔마을 SK한화아파트)

**임자옥**

경기도 안양시 만안구 안양천서로 289, 뜨란채아  
파트 105동 902호 (안양동)

---

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

다음 단계를 통해 수득된 중간엽 줄기세포 배양물; 및 기제를 함유하는 줄기세포의 안정성 증진용 조성물:

- (a) 중간엽 줄기세포를 NAC(N-Acetyl Cysteine), 아스코르브산, 칼슘, 인슐린 및 하이드로코티손(Hydrocortisone)을 함유한 K-SFM(Keratinocyte-Serum Free Medium) 배지에서 4 내지 9일동안 배양하는 단계; 및
- (b) 상기 배양액에서 배양된 줄기세포를 제거하여 중간엽 줄기세포 배양물을 수득하는 단계.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 중간엽 줄기세포 배양물은 중간엽 줄기세포를 7 내지 9일동안 배양하여 제조된 것을 특징으로 하는 줄기세포의 안정성 증진용 조성물.

### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 배양물은 TGF (Transforming Growth Factor), bFGF (basic Fibroblast Growth Factor), IGF (Insulin-like Growth Factor), KGF (Keratinocyte Growth Factor), HGF (Hepatocyte Growth Factor), Fibronectin, VEGF (vascular endothelial growth factor) 및 Procollagen으로 구성된 군에서 선택되는 성분을 2가지 이상 함유하는 것을 특징으로 하는 줄기세포의 안정성 증진용 조성물.

### 청구항 4

제1항에 있어서, 상기 중간엽 줄기세포 배양물을 10 내지 50%(v/v) 함유하는 것을 특징으로 하는 줄기세포의 안정성 증진용 조성물.

### 청구항 5

제1항에 있어서, 상기 중간엽 줄기세포 배양물을 20%(v/v) 함유하는 것을 특징으로 하는 줄기세포의 안정성 증진용 조성물.

### 청구항 6

제1항에 있어서, 상기 중간엽 줄기세포는 제대 유래 중간엽 줄기세포, 제대혈 유래 중간엽 줄기세포, 골수 유래 중간엽 줄기세포, 지방 유래 중간엽 줄기세포, 근육 유래 중간엽 줄기세포, 양막 유래 중간엽 줄기세포 및 태반 유래 중간엽 줄기세포로 구성된 군에서 선택되는 중간엽 줄기세포인 것을 특징으로 하는 줄기세포의 안정성 증진용 조성물.

### 청구항 7

제1항에 있어서, 상기 중간엽 줄기세포는 지방 유래 중간엽 줄기세포인 것을 특징으로 하는 줄기세포의 안정성 증진용 조성물.

### 청구항 8

제1항에 있어서, 상기 기제는 생리식염수, 하트만-D 용액 및 PBS (Phosphate Buffered Saline)으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 줄기세포의 안정성 증진용 조성물.

**청구항 9**

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 줄기세포의 안정성 증진용 조성물은 현탁제, 용해보조제, 안정화제, 등장화제, 보존제, 흡착방지제, 계면활성화제, 희석제, pH 조정제, 무통화제, 완충제, 함황환원제, 산화방지제로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 추가로 함유하는 것을 특징으로 하는 줄기세포의 안정성 증진용 조성물.

**청구항 10**

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 줄기세포의 안정성 증진용 조성물을 함유하는 세포치료제 주사제품.

**청구항 11**

제9항의 줄기세포의 안정성 증진용 조성물을 함유하는 세포치료제 주사제품.

**명세서**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 줄기세포의 안정성을 증진할 수 있는 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 중간엽 줄기세포 배양물 및 기제를 함유하는 줄기세포의 안정성 증진용 조성물에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002] 21세기 생명공학은 인간복지를 목표로 식량, 환경, 건강 문제에 새로운 해결책의 가능성을 제시하고 있으며, 특히 최근 줄기세포의 이용기술은 난치병 치료의 새로운 장으로 떠오르고 있다. 이전까지는 인간의 난치병 치료를 위해 장기이식이나 유전자 치료 등이 제시되었으나, 면역 거부와 공급장기 부족, 유전자에 대한 지식 부족으로 실용화가 미진하였다.

[0003] 이에 줄기세포 연구에 대한 관심이 고조되어, 증식과 분화를 통해 모든 기관을 형성할 능력을 가진 만능 줄기세포가 대부분의 질병 치료는 물론 장기 훼손을 근원적으로 해결할 수 있는 것으로 인식되었다. 또한, 많은 과학자가 인체의 거의 모든 장기재생은 물론 난치병이었던 파킨슨병, 각종 암, 당뇨병과 척수손상 등의 치료에 이르기까지 다양하게 줄기세포의 적용 가능성을 제시해왔다.

[0004] 줄기세포(stem cell)란 자기 복제 능력을 가지면서 두 개 이상의 세포로 분화하는 능력을 갖는 세포로, 만능 줄기세포(totipotent stem cell), 전분화능 줄기세포(pluripotent stem cells), 다분화능 줄기세포(multipotent stem cells)로 분류할 수 있다.

[0005] 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 cells)는 외배엽, 중배엽, 내배엽층 유래의 다양한 세포와 조직으로 발생할 수 있는 세포로, 수정 4-5일 후 나타나는 배반포(blastocyst)의 안쪽에 위치한 내세포괴(inner cell mass)에서 유래하며 이를 배아 줄기세포라 하며 다양한 다른 조직세포로 분화되지만 새로운 생명체를 형성하지는 못한다. 다능성 줄기세포(multipotent stem cells)는 이 세포가 포함되어 있는 조직 및 기관에 특이적인 세포로만 분화할 수 있는 줄기세포이다.

[0006] 다분화능 줄기세포는 성체 골수에서 최초로 분리되었고(Y. Jiang et al., *Nature*, 418:41, 2002), 그 후 다른 여러 성체 조직에서도 확인되었다(C.M. Verfaillie, *Trends Cell Biol.*, 12:502, 2002). 다시 말해, 골수는 가장 널리 알려진 줄기 세포의 소스이지만, 다분화능 줄기세포는 피부, 혈관, 근육 및 뇌로부터도 확인되었다

(J.G. Toma *et al.*, *Nat. Cell Biol.*, 3:778, 2001; M. Sampaolesi *et al.*, *Science*, 301:487, 2003; Y. Jiang *et al.*, *Exp. Hematol.*, 30:896, 2002). 그러나, 골수와 같은 성체 조직내의 줄기 세포는 매우 드물게 존재하고, 이러한 세포들은 분화유도 하지 않고 배양하기 어려워서, 특이적으로 스크린 된 배지들이 없으면 그 세포들을 배양하기 어렵다. 즉, 줄기 세포들을 분리하여 체외에서 보존하기가 매우 어렵다는 단점이 있다.

[0007] 최근, 지방 조직이 다분화능 줄기세포의 새로운 소스임이 밝혀졌다 (B. Cousin *et al.*, *BBRC*, 301:1016, 2003; A. Miranville *et al.*, *Circulation*, 110:349, 2004; S. Gronthos *et al.*, *J. Cell Physiol.*, 189:54, 2001; M.J. Seo *et al.*, *BBRC*, 328:258, 2005). 즉, 지방추출(지방흡입술(liposuction))에 의해 얻어진 인간 지방조직에 미분화 세포군이 포함되어 있고, 이것이 in vitro상에서 지방세포, 골 형성세포, 근원세포 및 연골모세포로의 분화능을 갖는다는 것이 보고되었다 (P.A. Zuk *et al.*, *Tissue Eng.*, 7:211, 2001; A.M. Rodriguez *et al.*, *BBRC*, 315:255, 2004). 아울러 지방 조직 유래 세포가 근육 재생능 및 신경혈관분화를 촉진하는 능력이 있다는 것이 동물 모델 실험을 통하여 알려진 바 있다. 이러한 지방 조직은 대량으로 추출할 수 있다는 장점이 있어, 기존의 단점을 보완하는 새로운 줄기세포의 소스로 주목 받고 있다.

[0008] 지금까지 알려진 지방 유래 줄기세포로는 상피세포로 분화 가능한 인간 지방 유래 성체 줄기 세포 (M. Brzoska *et al.*, *BBRC*, 330:142, 2005), 골 형성 및 지방 세포로 분화 가능한 인간 지방 유래 성체 줄기세포 (Y. Cao *et al.*, *BBRC*, 332:370, 2005), 신경세포로 분화 가능한 인간 지방 유래 성체 줄기세포 (K.M. Safford *et al.*, *BBRC*, 294:371, 2005), 지방세포로 분화 가능한 쥐 지방 유래 줄기세포 (R. Ogawa *et al.*, *BBRC*, 319:511, 2004), 골 형성 및 연골 형성세포로 분화 가능한 쥐 지방 유래 줄기세포 (R. Ogawa *et al.*, *BBRC*, 313:871, 2004), 연골세포로 분화 가능한 인간 지방 유래 줄기세포 (H.A. Awad *et al.*, *Biomaterials*, 25:3211, 2004), 신경 세포로 분화 가능한 쥐 지방 유래 줄기세포 (J. Fujimura *et al.*, *BBRC*, 333:116, 2005) 및 골세포, 연골세포, 신경세포 또는 근육세포로 분화 가능한 지방 유래 줄기세포 (미국특허 6,777,231) 등이 있다.

[0009] 따라서 위와 같이 대량으로 획득이 가능해진 줄기세포는 악성, 신진대사의 선천이상, 혈액소병증 및 면역결핍을 비롯한 매우 다양한 장애의 치료에 사용될 수 있는 잠재력을 갖는 것이 널리 알려져 있는바, 현재 피부 재생 등 줄기세포 자체를 주사하는 세포치료제로서의 이용이 늘어나고 있는 추세이다. 이에 따라, 당업계에서는 줄기세포에 대한 관심이 증대되면서, 다양한 치료 목적, 특히 세포치료제로의 용도 및 다른 의학 관련 목적을 위해 장거리를 경유하는 다수의 인간 줄기세포의 안정적인 공급이 필수적이 되고 있는 실정이다.

[0010] 그러기 위해서 7~10일 정도의 장기간에도, 높은 줄기세포 생존율을 유지하여야 하는 것이 필수적이다. 그러나 현재, 얼리지 않은 세포를 장기간 유지할 경우, 세포 생존율이 현저하게 낮아지는 문제가 있다. 즉, 10일 정도면 40%정도의 세포가 사멸하고 있어 큰 문제가 되고 있다.

[0011] 따라서 장기간 생존율을 유지하기 위한 종래 기술로는, 인간 지방조직 유래 중간엽 줄기세포를 냉장 보관 조건을 통해 생리식염수에 부유하여 보관하는 기술이 있었으나, 그 경우 48시간 이상 보관 시, 70%이상의 생존율을 나타내기 어려웠다. 이를 개선하기 위해 슈크로오스나 알부민을 첨가하는 경우 48시간 내지 72시간까지는 생존율이 70%이상을 나타내어, 안정성이 향상되는 것이 확인된 바 있다. 또한, 기체를 생리식염수 대신 하트만-D나 PBS로 하는 경우에도 유의적인 큰 차이는 없었으며, 슈크로오스, 알부민 등의 첨가가 줄기세포의 안정성을 연장하는 것으로 확인되었다(한국 특허출원번호 제2008-69063호).

[0012] 또한, 세포를 동결시켰다가 해동시켜 사용하는 기술의 경우, 해동 당시의 생존율은 냉장상태에 비할 바 아니며, 부형제의 첨가 시 생존율이 다소 높아질지 모르나, 생물학적 관점에서 추후 장기적인 세포의 손상 및 줄기세포로서의 활동 가능성이 낮을 수 있어 기능이 문제되고, 동결 상태로의 운송도 냉장 운송보다 힘들어, 냉장조건(4℃)에서 세포치료제에 포함된 줄기세포의 생존율을 장기간 안정적으로 높게 유지해 주는 안정성 증진용 조성물의 개발이 필요한 실정이었다.

[0013] 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명자들은 줄기세포의 높은 생존율을 유지하기 위한 안정성 증진용 조성물의 개발에 예의 노력한 결과, 중간엽 줄기세포 배양물을 안정성 증진용 조성물로 구성하여 첨가한 경우, 줄기세포의 생존율이 7~10일 동안 안정적으로 높게 유지됨을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

- [0014] 본 발명의 목적은 중간엽 줄기세포 배양물을 함유하는 줄기세포의 안정성 증진용 조성물을 제공하는 데 있다.
- [0015] 본 발명의 다른 목적은, 상기 줄기세포의 안정성 증진용 조성물을 함유하는 세포치료제 주사제품을 제공하는 데 있다.

**과제의 해결 수단**

- [0016] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (a) 중간엽 줄기세포를 NAC(N-Acetyl Cysteine), 아스코르브산, 칼슘, 인슐린 및 하이드로코티손(Hydrocortisone)을 함유한 K-SFM(Keratinocyte-Serum Free Medium) 배지에서 4 내지 9일동안 배양하는 단계; 및 (b) 상기 배양액에서 배양된 줄기세포를 제거하여 수득된 중간엽 줄기세포 배양물; 및 기제를 함유하는 줄기세포의 안정성 증진용 조성물을 제공한다.
- [0017] 본 발명은 또한, 상기 줄기세포의 안정성 증진용 조성물을 함유하는 세포치료제 주사제품을 제공한다.

**발명의 효과**

- [0018] 본 발명에 따른 줄기세포의 안정성 증진용 조성물은, 줄기세포의 안정성을 증진하여, 생존율을 높게 유지하는 효과가 있으며, 본 발명에 따른 줄기세포의 안정성 증진용 조성물을 함유하는 세포치료제 주사제품은 장기간(10일) 동안, 세포치료제에 포함된 줄기세포의 생존율을 80% 이상으로 유지할 수 있으므로, 세포치료제 주사제품의 장기간 운송에 활용할 수 있고, 세포치료제에 포함된 줄기세포의 높은 생존율에 따라, 세포치료의 효과가 뛰어나므로, 양질의 세포치료제 주사제품의 제조에도 유용하게 사용될 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

- [0019] 도 1은 4℃에서 3일간 배양한 세포를 100배 배율로 나타낸 사진이다.
- 도 2는 4℃에서 배양물 농도에 따른 기간별 세포생존율(viability)를 나타낸 그래프이다.
- 도 3은 37℃에서 3일간 배양한 세포를 100배 배율로 나타낸 사진이다.
- 도 4는 37℃에서 배양물 농도에 따른 기간별 세포생존율(viability)를 나타낸 그래프이다.
- 도 5는 37℃에서 세포 배양배지와 20% 배양물 농도에 각각 배양된 세포의 기간별 세포생존율(viability)를 나타낸 그래프이다.
- 도 6은 중간엽 줄기세포의 배양시간 (1 내지 9일)에 따른 프로콜라겐의 분비농도를 나타낸 그래프이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0020] 본 발명에서 사용하는 용어 "주사용 세포치료제 또는 세포치료제"란 조직의 결함을 치료하기 위해 줄기세포를 함유하여 비경구투여, 즉 주사의 형태로 결함부위 또는 그 인접부위에 주사되어, 결함을 교정할 수 있는 약학 조성물을 의미한다.
- [0021] 본 발명에서 사용하는 용어 "기제"란 약학 조성물의 약리학적 특성을 나타내는 유효성분 외, 액체의 형태 등 형태를 유지하기 위하여 부가하는 물질을 의미하는 것으로, 일반적으로는 액체 형태를 위한 기제로서 생리식염수(Saline), 하트만-D 용액, PBS (Phosphate Buffered Saline) 등을 이용하고 있으나 그 외 여러 가지 조성을 포함할 수 있는 물질을 의미한다.
- [0022] 본 발명에서 사용하는 용어 "줄기세포(stem cell)"이란 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.
- [0023] 본 발명에서 사용하는 용어 "중간엽 줄기세포"는 인간 또는 포유류의 조직으로부터 분리해 낸 미분화된 줄기세포로서, 다양한 조직에서 유래할 수 있다. 특히, 제대 유래 중간엽 줄기세포, 제대혈 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.

- [0024] 본 발명에서 사용하는 용어 "지방 유래 줄기세포"란 지방조직에서 분리해 낸 미분화 줄기세포로, 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.
- [0025] 본 발명에서 사용하는 용어 "배양액"은, 상기 중간엽 줄기세포를 특정 성분을 함유하는 배지에 배양시킨 후 수거한 배지를 뜻한다. 결국 배양액에는 하기 설명하는 배양물 (배지 성분 및 세포 분비물) 및 배양된 줄기세포가 포함되어 있다.
- [0026] 본 발명에서 사용하는 용어 "중간엽 줄기세포 배양물"이란 상기 중간엽 줄기세포를 특정 성분을 함유하는 배지에 배양시킨 후, 배지를 수거한 다음 세포 데브리스(debris)를 제거하고 남은 브로스(broth)를 의미한다. 결국 상기 배양물에는 배지가 함유하고 있던 주요 성분 및 중간엽 줄기세포의 분비물이 포함되어 있다고 할 수 있다.
- [0027] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에 기재된 용어는 당업계에서 일반적으로 쓰이는 용어의 뜻으로 사용되었다. 또한, 본 명세서에 기재된 실험방법은 특별히 기재되어 있지 않으면, 당업계에서 일반적으로 실시하는 방법으로 수행되었다.
- [0028] 이하 본 발명에 대하여 구체적으로 설명한다.
- [0029] 본 발명은 일 관점에서, (a) 중간엽 줄기세포를 NAC(N-Acetyl Cysteine), 아스코르브산, 칼슘, 인슐린 및 하이드로코르티손(Hydrocortisone)을 함유한 K-SFM(Keratinocyte-Serum Free Medium) 배지에서 4 내지 9일동안 배양하는 단계; 및 (b) 상기 배양액에서 배양된 줄기세포를 제거하여 수득된 중간엽 줄기세포 배양물; 및 기체를 함유하는 줄기세포의 안정성 증진용 조성물에 관한 것이다.
- [0030] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 중간엽 줄기세포를 상기 성분들을 함유한 K-SFM배지에서 배양할 경우, 각종 유용한 성분에 대해 높은 생산력을 보이며, 특히 바람직하게는 4 내지 9일동안 배양하는 경우, 유용한 성분의 분비농도가 높음을 확인하였다. 가장 바람직하게는 7 내지 9일동안 배양하는 경우, 1 내지 2일 동안 배양하는 경우에 비하여 약 4배정도 높은 분비농도를 보였다. 9일 이상 배양하는 경우, 분비된 유용한 성분의 농도가 감소함을 확인하였으며, 또한, 배양하는 배지가 무혈청 배지이므로 장기간 배양시 영양성분의 부족으로 세포가 사멸하게 됨은 당업자에게 자명한 것이다.
- [0031] 따라서, 본 발명의 바람직한 일 양태로, 중간엽 줄기세포를 NAC(N-Acetyl Cysteine), 아스코르브산, 칼슘, 인슐린 및 하이드로코르티손(Hydrocortisone)을 함유한 K-SFM(Keratinocyte-Serum Free Medium) 배지에서 4 내지 9일동안 배양하여 중간엽 줄기세포 배양물을 얻을 수 있다. 가장 바람직하게는 7 내지 9일동안 배양하여 중간엽 줄기세포 배양물을 얻을 수 있다.
- [0032] 상기 중간엽 줄기세포 배양물의 획득에 사용되는 배지로서는 당업계에서 줄기세포 배양에 적합하다고 알려져 있는 통상적인 배지, 예를 들면 DMEM, MEM, K-SFM 배지 등을 사용할 수 있는데, 바람직하게는 무혈청 배지를 사용할 수 있으며, 가장 바람직하게는 K-SFM (Keratinocyte-SFM;Keratinocyte serum free medium) 배지를 사용할 수 있다.
- [0033] 본 발명의 중간엽 줄기세포 배양물의 획득에 사용되는 배지는 NAC, 아스코르브산, 칼슘, 인슐린 및 하이드로코르티손과 같은 성분을 포함하고 있으며, 이로 인하여 중간엽 줄기세포는 각종 유용한 성분에 대해 높은 생산력을 보일 수 있다. 특히 인슐린의 경우 바람직하게는 1-10 µg/ml 농도로 포함시킬 수 있다.
- [0034] 상기 중간엽 줄기세포 배양물의 획득에 사용되는 배지는 당 업계에 공지된, 중간엽 줄기세포의 미분화된 표현형의 증식을 촉진하면서 분화는 억제하는 첨가제로 보충될 수 있다.
- [0035] 또한, 배지는 등장액 중의 중성 완충제(예컨대 인산염 및/또는 고농도 중탄산염) 및 단백질 영양분(예를 들면 혈청, 예컨대 FBS, 혈청 대체물, 알부민, 또는 필수 아미노산 및 비필수 아미노산, 예컨대 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.

[0036] 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.

[0037] 그 중에서도, 하기의 1이상의 추가의 첨가제를 사용하는 것이 유리할 수 있다:

[0038] · 줄기 세포 인자(SCF, Steel 인자), c-키트를 이량화하는 다른 리간드 또는 항체, 및 동일한 신호 전달 경로의 다른 활성화제

[0039] · 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

[0040] · 환형 AMP 농도를 높이는 인자, 예컨대 포르스콜린

[0041] · gp130을 유도하는 인자, 예컨대 LIF 또는 Oncostatin-M

[0042] · 조혈모 성장 인자, 예컨대 트롬보포이에틴(TPO)

[0043] · 변형성 성장 인자, 예컨대 TGF β 1

[0044] · 다른 성장 인자, 예컨대 표피 성장 인자(EGF)

[0045] · 뉴로트로핀, 예컨대 CNTF

[0046] · N-acetyl-L-cysteine (NAC)

[0047] · Hydrocortisone

[0048] · Ascorbic Acid

[0049] 본 발명의 중간엽 줄기세포 배양물을 얻기 위한 중간엽 줄기세포는, 예를 들어, 이하와 같은 방법으로 획득할 수 있다.

[0050] 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, rEGF, BPE, 인슐린 및 하이드로코르티손을 함유한 케라티노사이트-SFM 배지를 2 일마다 교체하면서 배양하여 중간엽 줄기세포를 분리하여 계대 배양하여 중간엽 줄기세포를 얻을 수 있다. 이외에도 당업계에서 공지된 방법으로 중간엽 줄기세포를 얻을 수 있다. 이 외에도 당업계에 이미 공지된 방법으로 중간엽 줄기세포를 얻을 수 있다.

[0051] 본 발명의 중간엽 줄기세포 배양물을 얻기 위한 중간엽 줄기세포는, 예를 들어, 이하와 같은 방법으로 획득할 수 있다.

[0052] 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, rEGF, BPE, 인슐린 및 하이드로코르티손을 함유한 케라티노사이트-SFM 배지를 2 일마다 교체하면서 배양하여 중간엽 줄기세포를 분리하여 계대 배양하여 중간엽 줄기세포를 얻을 수 있다. 이

외에도 당업계에서 공지된 방법으로 중간엽 줄기세포를 얻을 수 있다. 이 외에도 당업계에서 이미 공지된 방법으로 중간엽 줄기세포를 얻을 수 있다.

- [0053] 본 발명의 중간엽 줄기세포 배양물은, 예를 들어 다음과 같은 방법으로 획득할 수 있다. 즉, 중간엽 줄기세포를 90% confluency로 배양한 후, NAC, ascorbic acid, calcium, 인슐린 및 Hydrocortisone를 함유한 Keratinocyte-SFM 배지에서 4 내지 9일동안 배양한 후, 배지를 수거하여 세포를 제거하고 중간엽 줄기세포 배양물을 획득할 수 있다. 가장 바람직하게는 7 내지 9일동안 배양하여, 배지를 수거한 후 원심분리 및 필터링하여 세포 debris를 제거함으로써 중간엽 줄기세포 배양물을 획득할 수 있다.
- [0054] 본 발명의 일 실시예에서는 상기 방법으로 획득한 중간엽 줄기세포 배양물을 줄기세포의 안정성 증진용 조성물에 10~50% (v/v), 바람직하게는 20% (v/v)로 포함시키는 경우, 줄기세포의 생존율이 기존에 비하여 유의하게 높아짐을 확인하였다.
- [0055] 본 발명의 일례로, 상기 중간엽 줄기세포 배양물은 줄기세포의 안정성 증진용 조성물에 바람직하게는 10~50%(v/v)로 함유될 수 있다. 더욱 바람직하게는 10~30%(v/v)로 함유될 수 있으며, 가장 바람직하게는 20%(v/v)로 함유될 수 있다.
- [0056] 본 발명에 있어서, 상기 줄기세포의 안정성 증진용 조성물에 함유된 기제로써, 일반적으로 사용되는 기체인 생리식염수, 하트만-D 용액, PBS(Phosphate Buffered Saline)을 사용할 수 있다. 이 외에 당해업계에서 일반적으로 쓰이는 기제라면 무엇을 사용하든 무방하다.
- [0057] 본 발명에 의하여 획득된 중간엽 줄기세포 배양물은, 중간엽 줄기세포가 고농도로 분비하는 이하와 같은 단백질 성분을 함께 함유하고 있을 수 있다:
- [0058] TGF
- [0059] bFGF
- [0060] IGF
- [0061] KGF
- [0062] HGF
- [0063] Fibronectin
- [0064] VEGF
- [0065] Procollagen
- [0066] 상기 TGF- $\beta$  (Transforming growth factor- $\beta$ ; 형질변환성장인자)는 배아에서 조직발생 형태 형성, 분화와 증식, 세포 사멸 등에 영향을 주며 성체에서는 상처받은 조직의 복구, 면역세포의 증식 조절 등의 기능을 한다.
- [0067] IGF-I (Insulin-like Growth Factor-1; 인슐린 유사 성장인자)는 70개의 아미노산으로 형성된 7.6kD의 단일 사슬 폴리펩타이드 호르몬으로, 성장호르몬에 반응하여 뼈, 근육, 신경 조직을 형성하고 다양한 조직에서 세포의 분화를 자극함으로써 손상된 세포를 재생시키고 성장을 촉진하는 역할을 한다.
- [0068] HGF (hepatocyte growth factor; 간세포성장인자)는 대개 피부, 뼈, 혈액, 신경조직의 세포성장, 분열을 조절하기 위해 몸에서 생산하는 호르몬들의 복합군으로 구성되어 있으며, 세포의 분열, 재생 및 세포이동을 조절하여 흉터나 화상, 필링으로 인해 손상된 피부의 회복에 탁월한 효과가 입증되고 있다. HGF는 새로운 세포생산을 활성화하도록 유도하거나, 다른 기능을 가지는 새로운 세포를 생산하여 TGF와 Epidermal Growth Factor 같이 외과적 상처 치유에 중요한 역할을 한다.
- [0069] VEGF (vascular endothelial growth factor; 혈관내피 성장인자)는 모세혈관에서 혈장단백질을 투과를 증가시키는 cytokine으로 세포의 분열과 이동을 촉진시키며 세포의 재구성을 일으키는 단백질분해효소를 유도하는 기능을 가진다. 또한 세포소멸의 억제를 통해 새로 형성된 혈관의 생존을 유지시키며 신경세포의 항원 제공 억제하여 면역조절을 담당하여 세포의 성장 및 분열을 유도한다. 혈관세포의 이동을 촉진시켜 새로운 세포의

발생 및 분화를 촉진시켜 세포의 구성을 증가시킨다.

- [0070] Procollagen(프로콜라겐)은 피부의 진피층을 구성하는 단백질 성분으로 수분과 결합해 피부의 촉촉함과 탄력을 유지하는 기능을 하는 성분이다.
- [0071] 본 발명에 있어서, 상기 중간엽 줄기세포는 제대 유래 중간엽 줄기세포, 제대혈 유래 중간엽 줄기세포, 골수 유래 중간엽 줄기세포, 지방 유래 중간엽 줄기세포, 근육 유래 중간엽 줄기세포, 양막 유래 중간엽 줄기세포 및 태반 유래 중간엽 줄기세포로 구성된 군에서 선택되는 중간엽 줄기세포일 수 있다. 바람직하게는, 세포의 유래원인 지방조직의 획득이 비교적 용이하므로, 줄기세포의 제조가 경제적인 지방 유래 중간엽 줄기세포일 수 있다.
- [0072] 본 발명에 있어서, 줄기세포의 안정성 증진용 조성물은, 그 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.
- [0073] 현탁제의 예로는, 메틸셀룰로오스, 폴리소르베이트 80, 히드록시에틸셀룰로오스, 아라비아고무, 트라간트말, 카르복시메틸셀룰로스나트륨, 폴리옥시에틸렌소르비탄모노라우레이트 등을 들 수 있다.
- [0074] 용액보조제로는, 폴리옥시에틸렌경화피마자유, 폴리소르베이트 80, 니코틴산아미드, 폴리옥시에틸렌소르비탄모노라우레이트, 메크로골, 피마자유지방산에틸에스테르 등을 들 수 있다.
- [0075] 안정화제로는, 텍스트란 40, 메틸셀룰로오스, 젤라틴, 아황산나트륨, 메타황산나트륨 등을 들 수 있다.
- [0076] 등장화제로는, 예를 들어 D-만니톨, 소르비톨 등을 들 수 있다.
- [0077] 보존제로는, 예를 들어 파라옥시벤조산메틸, 파라옥시벤조산에틸, 소르브산, 페놀, 크레졸, 클로로크레졸 등을 들 수 있다.
- [0078] 흡착방지제로는, 예를 들어 인간혈청알부민, 레시틴, 텍스트란, 에틸렌옥사이드프로필렌옥사이드 공중합체, 히드록시프로필셀룰로오스, 메틸셀룰로오스, 폴리옥시에틸렌 경화피마자유, 폴리에틸렌글리콜 등을 들 수 있다.
- [0079] 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.
- [0080] 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.
- [0081] 본 발명은 다른 관점에서, 상기 줄기세포의 안정성 증진용 조성물을 포함하는 세포치료제 주사제품을 제공한다. 상기 세포치료제 주사제품은 일반적으로 세포치료에 사용되는 화합물을 포함할 수 있으며, 또한 세포치료제의 주요 성분인 줄기세포 또는 그의 아군(sub-population)인 성체 줄기세포를 포함할 수 있다. 상기 줄기세포는 계대 배양 또는 미계대 배양한 세포일 수 있으며, 바람직하게는 자가 조직 유래의 줄기세포, 가장 바람직하게는 자가 지방 조직 유래의 중간엽 줄기세포일 수 있다.
- [0082] 본 발명에 따른 주사제품은 환자의 체질 및 결합의 종류에 따라 당 업계에 통상적으로 알려진 분량을 취하여 충전된 주사의 형태로 제조될 수 있다.
- [0083] 본 발명에 따른 주사제품은 치료하고자 하는 결합에 인접한 부위 또는 결합부위에 주사되어 이용될 수 있으며, 이러한 방법으로 교정될 수 있는 결합은 주름, 툰살, 흉터, 피부함몰, 입술형성부전, 치주 결합, 연부 조직 결합, 뼈 결합, 화상, 피부궤양 등이다.
- [0084] 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 당업계에서 통

상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

**실시예 1**

**[0085] 인간 지방조직으로부터 중간엽 줄기세포의 분리**

[0086] 지방흡입을 통해 복부에서 채취된 지방조직을 분리하여 PBS로 세척한 다음, 조직을 잘게 자른 후 콜라겐분해 효소 타입1 (1 mg/ml)을 첨가한 DMEM배지를 사용하여 37°C에서 2시간 동안 분해하였다. 다음으로, PBS로 세척한 후, 1000 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 상층액은 제거하고 바닥에 남은 펠렛은 PBS로 세척한 후 1000 rpm으로 5분간 원심분리하였다. 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 세척하였다. 그 후, 2 mM NAC, 0.2 mM 아스코르브산, 0.09 mM 갈슘, 5 ng/ml rEGF, 50 μg/ml BPE, 5 μg/ml 인슐린 및 74 ng/ml 하이드로코티손을 함유한 케라티노사이트-SFM 배지를 2일마다 교체하면서 배양하여 다분화능 줄기세포를 분리하였다.

**실시예 2**

**[0087] 중간엽 줄기세포 배양물의 제조**

[0088] 상기 실시예 1에서 분리한 지방조직 유래 중간엽 줄기세포를 90% confluency로 배양한 후, NAC, 아스코르브산, 갈슘, 인슐린 및 하이드로코티손을 함유한 케라티노사이트-SFM 배지로 교환하여 120시간 배양하였다.

[0089] 배양 후 배지를 수거하여 원심분리를 1500 rpm에서 5분 동안 한 후, 0.22 μm 필터를 이용하여 세포 debris를 제거하여, 중간엽 줄기세포 배양물을 수득하였다.

**실시예 3**

**[0090] 4°C에서 배양물 농도에 따른 줄기세포의 생존율 비교 측정**

[0091] 주사를 통해 투여하게 될 때까지 4°C 내외의 온도에서 냉장 보관하게 되는 냉장제형 세포치료제 주사제품에 사용되는 줄기세포의 생존율을 비교하기 위하여, 실시예 2의 방법에 따라 수득된 중간엽 줄기세포 배양물을 포함하는 부형제 조성물에 부유된 줄기세포의 생존율과 일반적인 등장액(saline) 용액에 부유된 줄기세포의 생존율을 비교하는 실험을 하였다.

[0092] 우선 성체 줄기세포를 준비하기 위하여 실시예 1의 방법으로 줄기세포를 준비하여 PBS로 1번 세척하였다. 그 후 실시예 2의 중간엽 줄기세포 배양물을 생리식염수(saline)과 함께 혼합하여 대조군(control;saline 100%), 10%, 20%, 30%, 40%, 50% v/v)로 나누어 실험 군당  $2 \times 10^6$  cell / 200 μl 의 세포 농도로 vial을 준비하였다. 이를 냉장제형의 일반적인 온도인 4°C에서 두어 3일째에 사진을 찍고 (도 1), 7일, 10일 간격으로 세포 생존율을 측정하였다.

[0093] 세포 생존율의 측정은 가라앉은 세포를 풀어주기 위해 손가락으로 vial 밑부분을 쳐서 세포를 풀어주고 피펫팅(pipetting) 해준 후, Trypan blue와 1:1로 희석하여 Invitrogen사(社)의 Countess™ Automated Cell Counter를 사용하여 생존율을 측정하였다.

[0094] 그 결과, 표 1에 나타난 것과 같이, 20% 농도로 중간엽 줄기세포 배양물을 혼합하였을 때 7일에 86%의 세포 생존율을 보여 75%인 대조군(Saline)과 차이를 보였고, 특히 10일째에는 여전히 84%의 생존율을 유지하고 있는데 비해 대조군은 62%로 생존율이 떨어져 장기간 생존율이 현저히 차이 난다는 것을 확인하였다(도 2). 7일 차 결과에 따라 중간엽 줄기세포 배양물의 바람직한 함유 농도는 10~50%, 더욱 바람직하게는 10~30%, 가장 바람직하게는 20%임을 확인하였다.

[0095] **4℃에서 배양물 농도에 따른 줄기세포의 생존율**

온도	4℃						
	배양물 농도	대조군	10%	20%	30%	40%	50%
0일		98.8%	98.8%	98.8%	98.8%	98.8%	98.8%
7일		75%	85%	86%	85%	83%	78%
10일		62%	80%	84%	74%	76%	71%

**실시예 4**

[0096] **37℃에서 배양물 농도에 따른 줄기세포의 생존율 비교 측정**

[0097] 일반적으로 생체의 온도인 37℃ 부근에서 줄기세포의 대사가 가장 활발하게 일어나므로, 빠른 시간 안에 세포의 생존율이 대조적으로 나타날 수 있음에 착안하여, 가혹조건 37℃에서 실시예 2의 중간엽 줄기세포 배양물을 포함하는 줄기세포의 안정성 증진용 조성물에 부유된 줄기세포의 생존율과 일반적인 기체인 saline 용액에 부유된 줄기세포의 생존율을 비교하는 실험을 하였다.

[0098] 우선 성체 줄기세포를 준비하기 위하여 실시예 1의 줄기세포를 준비하여 PBS로 1번 세척하였다. 그 후 실시예 2의 중간엽 줄기세포 배양물을 생리식염수(saline)과 함께 혼합하여 대조군(control;saline 100%), 10%, 20%로 나누어 실험 군당  $2 \times 10^6$  cell / 200  $\mu$ l 의 세포 농도로 vial을 준비하였다. 이를 37도에서 두어 3일째에 사진을 찍고(도 3), 7일, 10일 간격으로 세포 생존율을 측정하였다.

[0099] 세포 생존율의 측정은 가라 앉은 세포를 풀어주기 위해 손가락으로 vial 밑부분을 쳐서 세포를 풀어주고 pipetting 해준 후, Trypan blue와 1:1로 희석하여 Invitrogen社의 Countess™ Automated Cell Counter를 사용하여 생존율을 측정하였다.

[0100] 그 결과, 표 2에 나타난 바와 같이, 20% 농도로 중간엽 줄기세포 배양물을 혼합하였을 때 7일에 59%의 세포 생존율을 보여 48%인 control과 차이를 보였고, 특히 10일째에는 여전히 55%의 생존율을 유지하고 있는데 비해 control은 36%로 생존율이 떨어져 장기간 생존율이 현저히 차이 난다는 것을 확인하였다(도 4). 이 결과에 따라 37도 조건에서 최적의 농도는 10~20%, 바람직하게는 20%임을 확인하였다.

**표 2**

[0101] **37℃에서 배양물 농도에 따른 줄기세포의 생존율**

온도	37℃				
	배양물 농도	대조군	5%	10%	20%
0일차		88%	88%	88%	88%
7일차		48%	57%	68%	59%
10일차		36%	44%	43%	55%

**실시예 5**

[0102] **37℃에서 일반 배지와 줄기세포의 안정성 증진용 조성물에서의 생존율 비교 측정**

[0103] 일반적으로 세포 배양에 사용되며, 주사용 세포치료제의 기제로 포함되는 무혈청 DMEM배지에서 생존율과 배양물 포함 조성물에서의 생존율을 비교하여 보기 위하여, 아래 방법으로 생존율을 비교 측정하였다.

[0104] 우선, 실시예1의 줄기세포를 준비하여 PBS로 1번 세척하였다. 그 후 실시예 2의 중간엽 줄기세포 배양물을 생리식염수(saline)과 함께 혼합하여 20%(v/v)조성물을 준비하고, 같은 부피의 무혈청 DMEM 세포배양배지를 준비하여 실험 군당  $2 \times 10^6$  cell / 200  $\mu$ l 의 세포 농도로 vial을 준비하였다. 이를 섭씨 37도에서 0일, 7일, 10일 간격으로 세포 생존율을 측정하였다.

[0105] 세포 생존율의 측정은 가라앉은 세포를 풀어주기 위해 손가락으로 vial 밑부분을 쳐서 세포를 풀어주고 pipetting 해준 후, Trypan blue와 1:1로 희석하여 Invitrogen社의 Countess™ Automated Cell Counter를 사

용하여 생존율을 측정하였다.

[0106] 그 결과, 도 5 및 표 3에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 배양물 20%(v/v) 조성물은 10일차에도 83%의 생존율을 보이는데, 기존의 무혈청 세포배양배지를 이용할 경우, 10일차에는 33%, 7일차에도 39%만 생존함을 확인하여, 본 발명에 따른 줄기세포의 안정성 증진용 조성물의 우수성을 확인하였다.

**표 3**

[0107] **37°C에서의 무혈청 세포배양배지와 비교한 중간엽 줄기세포 생존율**

	0일차	7일차	10일차
무혈청 세포배양배지	95%	39%	33%
배양물 20%(v/v) 조성물	95%	90%	83%

**실시예 6**

[0108] **배양시간에 따른 성분 중 프로콜라겐의 분비농도 분석**

[0109] 본 발명의 줄기세포의 안정성 증진용 조성물에 포함되는 중간엽 줄기세포 배양물이 함유하고 있는 성분이 주 사용 세포치료제에 포함된 줄기세포의 생존율을 높이는데 기여할 것으로 예측된다. 따라서, 중간엽 줄기세포의 배양시간에 따라 TGF, bFGF, IGF, KGF, HGF, Fibronectin, VEGF, Procollagen과 같은 단백질 성분의 농도가 달라질 것인 바, 최적의 배양시간을 확인하기 위해, 배양시간에 따른 프로콜라겐의 분비농도를 확인하였다.

[0110] 상기 실시예 1에서 분리한 지방조직 유래 중간엽 줄기세포를 NAC, 아스코르브산, 칼슘, 인슐린 및 하이드로코티손을 함유한 케라티노사이트-SFM 배양배지 30 ml에 배양한 후, 배지를 수거하여 1차로 원심분리를 1500 rpm에서 5분 동안 실시하고, 2차로 0.22 μm 필터를 이용하여 세포 debris를 제거하여, 중간엽 줄기세포 배양물을 얻었다. 그 후 배양물을 ELISA 방법으로 분석하여 프로콜라겐의 농도를 측정하였다. ELISA 분석은 아래 표 4의 키트를 이용하여 수행하였다.

**표 4**

항목	품명	catalog#.	제조회사/판매회사
1	VEGF ELISA kit	DVE00	R&D/웅비메디텍
2	TGF-β ELISA kit	DB100B	R&D/웅비메디텍
3	HGF ELISA kit	DHG00	R&D/웅비메디텍
4	FGF ELISA kit	DFB50	R&D/웅비메디텍
5	IGF-I ELISA kit	DG100	R&D/웅비메디텍
6	KGF/FGF-7 ELISA kit	DKG00	R&D/웅비메디텍
7	PDGF-AB ELISA kit	DHD00B	R&D/웅비메디텍
8	EGF ELISA kit	DEG00	R&D/웅비메디텍
9	IFN-γ ELISA kit	DIF50	R&D/웅비메디텍
10	GM-CSF ELISA kit	DGM00	R&D/웅비메디텍
11	SDF-1α ELISA kit	DSA00	R&D/웅비메디텍
12	TNF-α ELISA kit	DTA00C	R&D/웅비메디텍
13	Adiponectin	DRP300	R&D/웅비메디텍
14	IL-1 ELISA kit	DLA50	R&D/웅비메디텍
15	IL-2 ELISA kit	D2050	R&D/웅비메디텍
16	IL-4 ELISA kit	D4050	R&D/웅비메디텍
17	IL-6 ELISA kit	D6050	R&D/웅비메디텍
18	IL-8 ELISA kit	D8000C	R&D/웅비메디텍
19	IL-10 ELISA kit	D1000B	R&D/웅비메디텍
20	IL-12 ELISA kit	D1200	R&D/웅비메디텍
21	Procollagen ELISA kit	MK101	Takara/Takara Korea

[0112] 그 결과, 표 5 및 도 6에서 나타난 바와 같이, 각 시점의 배양물에서 확인되는 프로콜라겐의 농도는 3일부터 높아지기 시작하여, 특히 4일 이후로는 바람직한 농도인 4000ng/ml를 상회하는 농도로 포함되는 것을 확인하였다. 8일차의 배양물에서 가장 높은 농도인 7995.9ng/ml가 확인되었으며, 그 이후로는 다시 낮아지는 것을 확인하였다. 따라서, 중간엽 줄기세포를 배양하는 시간은 바람직하게는 4 내지 9일, 더욱 바람직하게는 7 내지 9일, 가장 바람직하게는 8일임을 확인하였다.

표 5

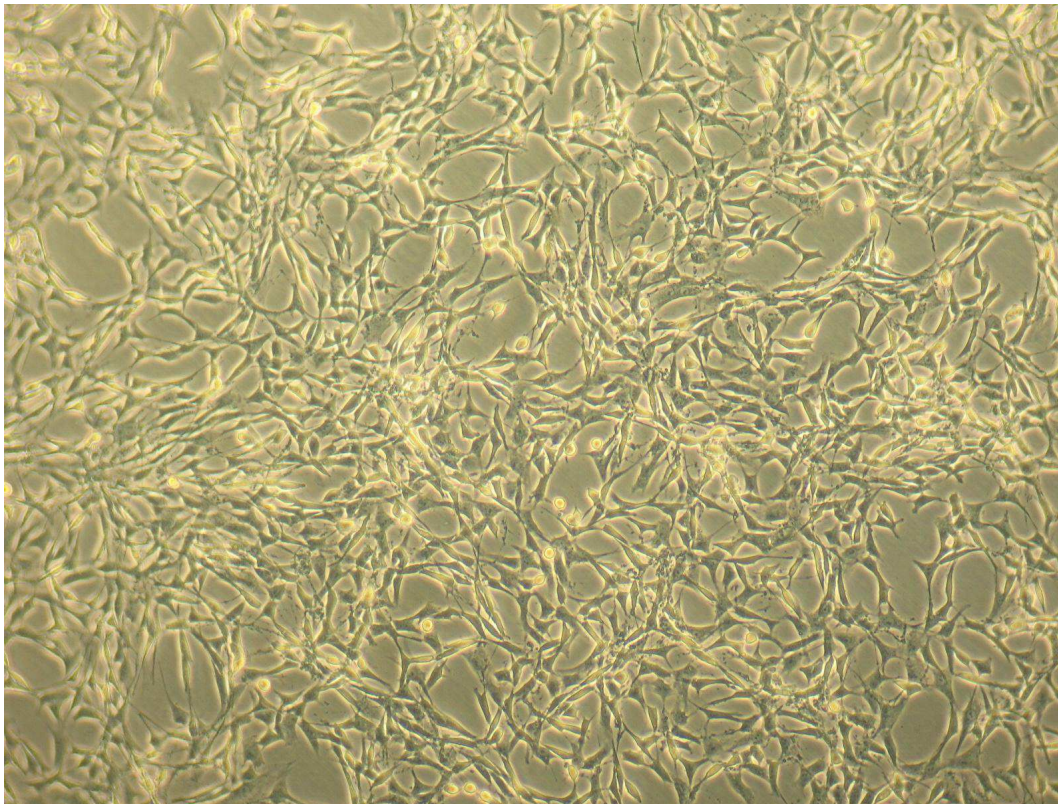
[0113]

배양일수(일)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
프로콜라겐 농도(ng/ml)	1199.7	1756.1	3456.1	4595.0	5456.3	6378.7	7240.4	7995.9	7323.8

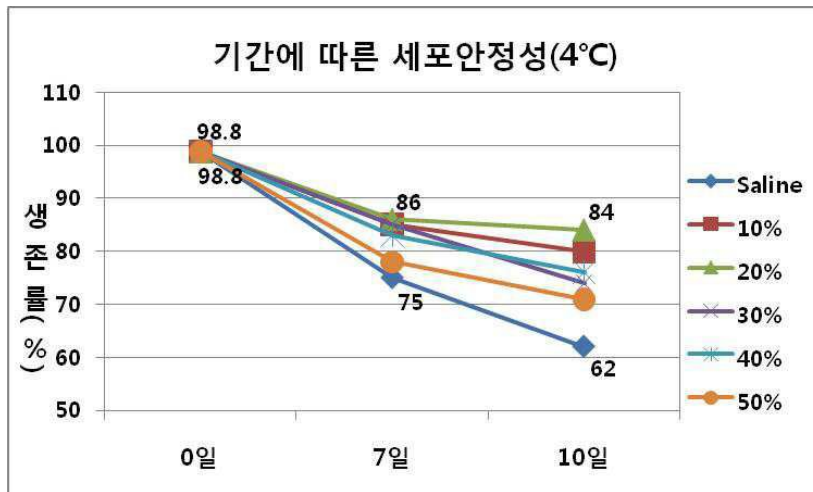
[0114] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부한 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

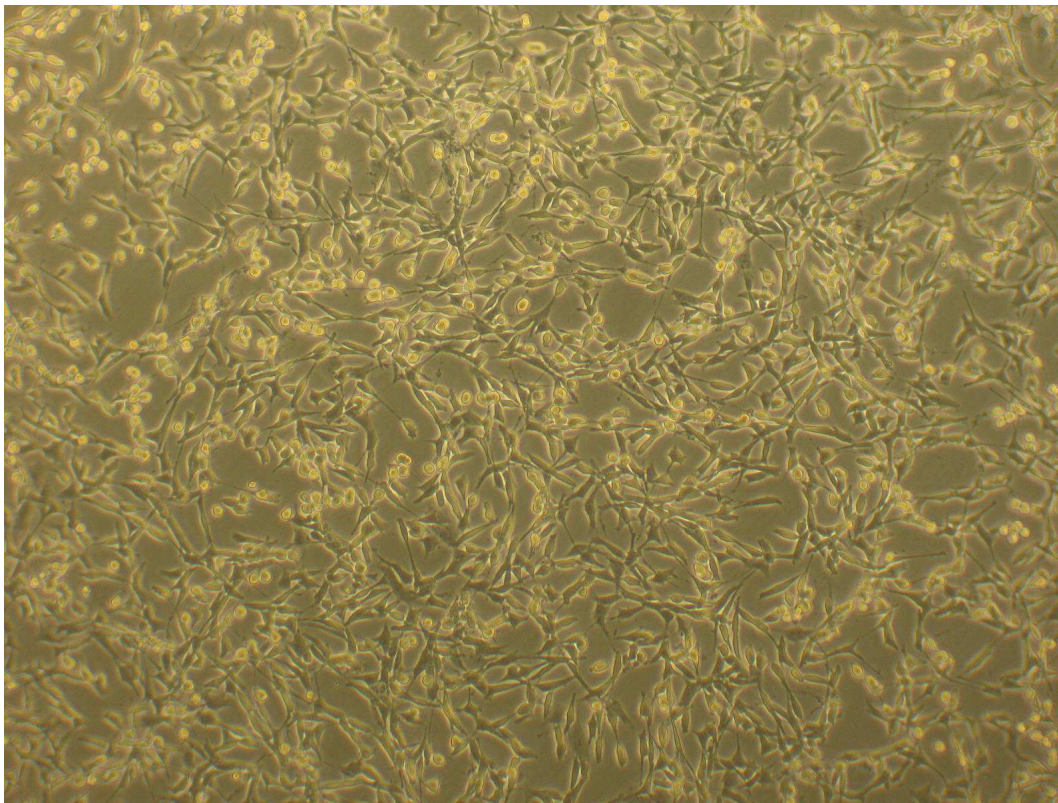
도면1



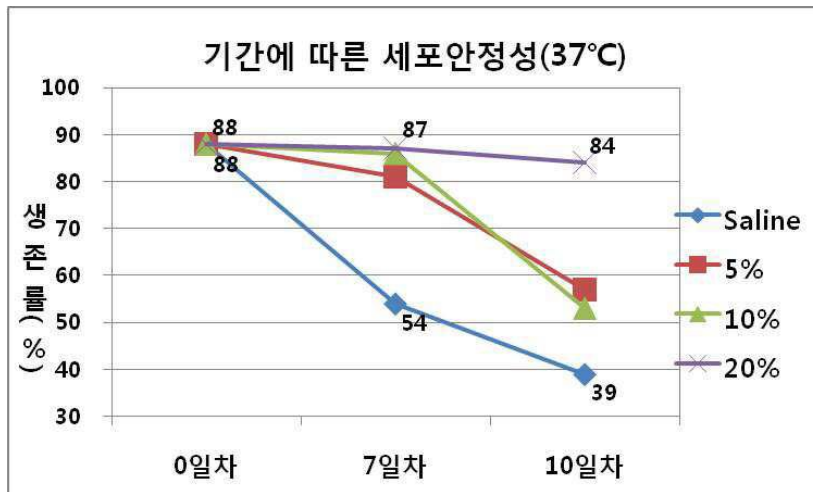
도면2



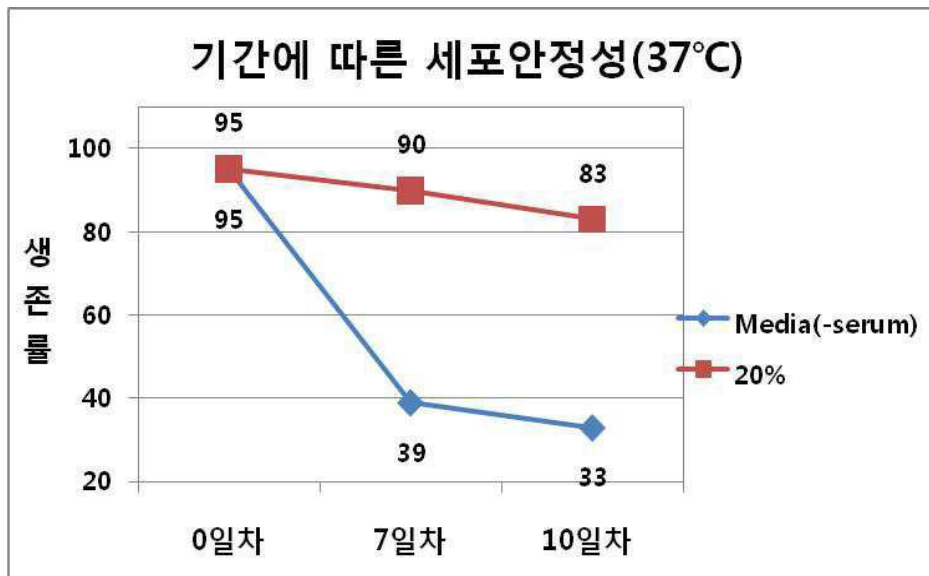
도면3



도면4



도면5



도면6

