



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0117343
(43) 공개일자 2013년10월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/074 (2010.01) C12N 5/02 (2006.01)
C12N 5/0775 (2010.01)
(21) 출원번호 10-2013-0042517
(22) 출원일자 2013년04월17일
심사청구일자 없음
(30) 우선권주장
1020120040488 2012년04월18일 대한민국(KR)

(71) 출원인
라정찬
충청북도 청원군 내수읍 신기초정로 699
(72) 발명자
라정찬
충청북도 청원군 내수읍 신기초정로 699
강성근
서울특별시 관악구 성현로 80 관악드림타운아파트
116동 504호
신일섭
서울특별시 관악구 관악로 285 동아아파트 107동
1108호
(74) 대리인
이처영

전체 청구항 수 : 총 17 항

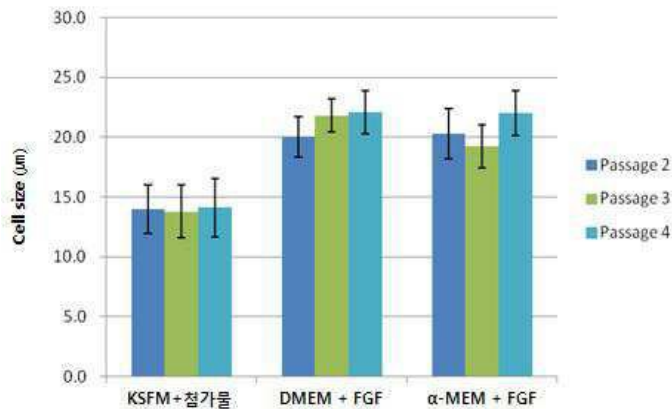
(54) 발명의 명칭 **혈관 내 투여에 적합한 크기를 가지는 줄기세포의 제조방법**

(57) 요약

본 발명은 혈관 내 투여에 적합한 크기를 가지는 줄기세포의 제조방법에 관한 것으로, 바람직하게는 직경이 11 내지 16 μm 인 줄기세포의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한, 혈관 내 투여에 적합한 크기를 가지는 줄기세포 제조용 배지에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 혈관 내 투여에 적합한 크기를 가지는 줄기세포를 제조할 수 있어, 혈관 내로 투여된 줄기세포가 안정적으로 표적 조직에 도달하여 활성을 나타내는 효능을 보다 효율적으로 높일 수 있으므로 줄기세포를 이용한 세포치료 효능을 획기적으로 증진시킬 수 있다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

기본 배지; 및 NAC(N-acetyl-L-cysteine), 인슐린 또는 인슐린 유사인자, 하이드로코르티손, bFGF (basic fibroblast growth factor) 및 항산화제로 구성된 군에서 선택되는 2가지 이상의 성분을 함유하는 배지에서 줄기세포를 배양하는 단계를 포함하는, 혈관 내 투여에 적합한 크기를 가지는 줄기세포의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 기본 배지는 M199/F12(mixture)(GIBCO), MEM-alpha배지(α -Minimal Essential Medium: Welgene), 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 혈관 내 투여에 적합한 크기를 가지는 줄기세포의 제조방법.

청구항 3

제1항에 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 혈관 내 투여에 적합한 크기를 가지는 줄기세포의 제조방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 항산화제는 셀레늄인 것을 특징으로 하는 혈관 내 투여에 적합한 크기를 가지는 줄기세포의 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 배지는 FBS (fetal bovin serum), 칼슘 및 EGF으로 구성된 군에서 선택되는 성분을 추가로 함유하는 것을 특징으로 하는 혈관 내 투여에 적합한 크기를 가지는 줄기세포의 제조방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 배양된 줄기세포를 트립신으로 처리하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 혈관 내 투여에 적합한 크기를 가지는 줄기세포의 제조방법.

청구항 7

제1항 또는 제6항에 있어서, 배양된 줄기세포를 아스피린 함유 용액에 부유시키는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 혈관 내 투여에 적합한 크기를 가지는 줄기세포의 제조방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 혈관 내 투여에 적합한 크기를 가지는 줄기세포는 직경이 11 내지 16 μm 인 것을 특징으로 하는 혈관 내 투여에 적합한 크기를 가지는 줄기세포의 제조방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 줄기세포는 성체 줄기세포인 것을 특징으로 하는 혈관 내 투여에 적합한 크기를 가지는 줄기세포의 제조방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 줄기세포는 지방 조직 유래 중간엽 줄기세포인 것을 특징으로 하는 혈관 내 투여에 적합한 크기를 가지는 줄기세포의 제조방법.

청구항 11

기본배지; 및 NAC(N-acetyl-L-cysteine), 인슐린 또는 인슐린 유사인자, 하이드로코르티손, bFGF (basic

fibroblast growth factor) 및 항산화제로 구성된 군에서 선택되는 2가지 이상의 성분을 함유하는, 혈관 내 투여에 적합한 크기를 가지는 줄기세포 제조용 배지.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 기본 배지는 M199/F12(mixture)(GIBCO), MEM-alpha배지(α-Minimal Essential Medium: Welgene), 저농도 글루코오스 함유 DMEM배지(Dulbecco modified Eagle Medium: 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 혈관 내 투여에 적합한 크기를 가지는 줄기세포 제조용 배지.

청구항 13

제11항에 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 혈관 내 투여에 적합한 크기를 가지는 줄기세포 제조용 배지.

청구항 14

제11항에 있어서, 상기 항산화제는 셀레늄인 것을 특징으로 하는 혈관 내 투여에 적합한 크기를 가지는 줄기세포 제조용 배지.

청구항 15

제11항에 있어서, 상기 배지는 FBS (fetal bovin serum), 칼슘 및 EGF으로 구성된 군에서 선택되는 성분을 추가로 함유하는 것을 특징으로 하는 혈관 내 투여에 적합한 크기를 가지는 줄기세포 제조용 배지.

청구항 16

제11항에 있어서, 상기 줄기세포는 성체 줄기세포인 것을 특징으로 하는 혈관 내 투여에 적합한 크기를 가지는 줄기세포 제조용 배지.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 줄기세포는 지방 조직 유래 중간엽 줄기세포인 것을 특징으로 하는 혈관 내 투여에 적합한 크기를 가지는 줄기세포 제조용 배지.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 혈관 내 투여에 적합한 크기를 가지는 줄기세포의 제조방법에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 혈관 내 투여에 적합하도록 직경이 1 내지 16 μm인 줄기세포를 제조하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[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 줄기 세포라 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·조직 대체치료법으로 대체될 것으로 예측됨으로써, 줄기세포의 활용도는 더욱 높아지게 될 것이다.
- [0004] 이에, 현재 줄기세포의 다양한 기능이 연구되고 있는 실정이며, 그 중에서도 중간엽 줄기 세포(mesenchymal stem cells)를 이용한 세포치료기술이 각광을 받기 시작하면서, 인체로부터 분리된 중간엽 줄기세포를 치료에 적합하도록 개선하기 위한 기술이 개발되고 있다 (WO 2006/019357, 대한민국 등록특허 제0795708호, 대한민국 등록특허 제0818214호).
- [0005] 그러나, 혈관 내 투여에 적합하도록 줄기세포를 제조하는 방법에 대한 기술은 아직까지 연구가 미흡한 실정이다.
- [0006] 이에, 본 발명자들은 기본 배지; 및 NAC(N-acetyl-L-cysteine), 인슐린 또는 인슐린 유사인자, 하이드로코르티손, bFGF (basic fibroblast growth factor) 및 항산화제로 구성된 군에서 선택되는 2가지 이상의 성분을 함유하는 배지에서 줄기세포를 배양하는 경우, 혈관 내 투여에 적합한 크기의 줄기세포를 제조할 수 있다는 것을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명의 목적은 혈관 내 투여에 적합한 크기를 가지는 줄기세포의 제조방법을 제공하는데 있다.
- [0008] 본 발명의 다른 목적은 혈관 내 투여에 적합한 크기를 가지는 줄기세포 제조용 배지를 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

- [0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 기본배지; 및 NAC(N-acetyl-L-cysteine), 인슐린 또는 인슐린 유사인자, 하이드로코르티손, bFGF (basic fibroblast growth factor) 및 항산화제로 구성된 군에서 선택되는 2가지 이상의 성분을 함유하는 배지에서 줄기세포를 배양하는 단계를 포함하는, 혈관 내 투여에 적합한 크기를 가지는 줄기세포의 제조방법을 제공한다.
- [0010] 본 발명은 또한, 기본배지; 및 NAC(N-acetyl-L-cysteine), 인슐린 또는 인슐린 유사인자, 하이드로코르티손, bFGF (basic fibroblast growth factor) 및 항산화제로 구성된 군에서 선택되는 2가지 이상의 성분을 함유하는, 혈관 내 투여에 적합한 크기를 가지는 줄기세포 제조용 배지를 제공한다.

발명의 효과

- [0011] 본 발명에 따르면, 직경이 11 내지 16 μm 인 줄기세포를 제조할 수 있어, 표적 조직으로의 이동이 용이하며 안정성이 우수한 줄기세포를 제조할 수 있으므로 줄기세포의 혈관 내 투여에 의한 세포치료 효능을 획기적으로 증진시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0012] 도 1은 배양액과 계대에 따른 지방유래 중간엽 줄기세포의 크기를 나타낸 그래프이다.
 도 2는 배양액에 따른 지방유래 중간엽 줄기세포의 마커발현을 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0013] 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 이하에 기술하는 실험 방법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [0014] 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.
- [0015] 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.
- [0016] 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 수득할 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.
- [0017] 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 정맥이나 모세혈관의 직경에 비하여 작은, 바람직하게는 직경이 11 내지 16 μm 인 줄기세포를 의미한다.
- [0018] 줄기세포는 다양한 방법, 예를 들면, 정맥내, 동맥내 또는 복강내 투여 등의 방법으로 신체 내로 투여될 수 있는데 그 중에서도 정맥 내 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. 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 10 내지 50 μm 이며, 소동맥은 직경이 8 내지 30 μm 이고(Schmidt GT, 1989), 모세혈관은 직경이 8 μm 정도로(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 활성에 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 16 내지 53 μm 인 중간엽 줄기세포를 마우스에 정맥 내 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. 또한, 혈관 내로 투여되기 전 세포의 파쇄나 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. 뿐만 아니라, 표적 부위에 도달한 줄기세포가 목적하는 치료효과를 나타내도록 일정 농도 이상의 세포 투여가 전제되어야 한다. 상기 여러 요건 중, 본 발명은 혈관 내 투여에 적합한 크기를 가져서 혈관 내로 투여된 줄기세포가 혈류 내 속도를 감소시키거나 혈전을 형성함 없이 안정적으로 치료효과를 나타내도록 하기 위한 줄기세포를 제공하기 위한 것이다.

- [0019] 본 발명은 일 관점에서, 기본 배지; 및 NAC(N-acetyl-L-cysteine), 인슐린 또는 인슐린 유사인자, 하이드로코르티손, bFGF (basic fibroblast growth factor) 및 항산화제로 구성된 군에서 선택되는 2가지 이상의 성분을 함유하는 배지에서 줄기세포를 배양하는 단계를 포함하는, 혈관 내 투여에 적합한 크기를 가지는 줄기세포의 제조 방법을 제공한다.
- [0020] 본 발명에서 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 당해 업계에서 이용되는 배지라면 제한없이 사용할 수 있다. 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.
- [0021] 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.
- [0022] 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.
- [0023] 그 중에서도, 하기의 1이상의 추가의 첨가제를 사용하는 것이 유리할 수 있다:
- [0024] · 줄기 세포 인자(SCF, Steel 인자), c-키트를 이량화하는 다른 리간드 또는 항체, 및 동일한 신호 전달 경로의 다른 활성제
- [0025] · 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
- [0026] · 환형 AMP 농도를 높이는 인자, 예컨대 포르스콜린
- [0027] · gp130을 유도하는 인자, 예컨대 LIF 또는 Oncostatin-M
- [0028] · 조혈모 성장 인자, 예컨대 트롬보포이에틴(TPO)
- [0029] · 변형성 성장 인자, 예컨대 TGF β 1
- [0030] · 뉴로트로핀, 예컨대 CNTF
- [0031] · 항생제, 예컨대 겐타마이신 (gentamicin), 페니실린, 스트렙토마이신
- [0032] 본 발명에서 사용되는 배지는 상기 기본 배지 이외에, NAC(N-acetyl-L-cysteine), 인슐린 또는 인슐린 유사인자, 하이드로코르티손, bFGF (basic fibroblast growth factor) 및 항산화제로 구성된 군에서 선택되는 2가지 이상의 성분을 추가로 함유할 수 있다.
- [0033] 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 10 ng/ml 미만일 경우에는 세포자살(Apoptosis)을 초래하며, 50 ng/ml을 초과할 경우에는 세포독성 및 비용증가의 문제점이 있다.
- [0034] 섬유아세포 증식인자 (bFGF)를 함유할 수 있는데, 이는 *in vivo* 상태에서 다양한 형태의 세포증식을 야기할 수

있으며, 바람직하기로는 제조합 단백질을 사용한다. 섬유아세포 증식인자의 바람직한 함량은 1 내지 100 ng/ml 이다.

[0035] 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.

[0036] 본 발명에서 사용되는 배지는 FBS (fetal bovin serum), 칼슘 및 EGF으로 구성된 군에서 선택되는 성분을 추가로 함유할 수 있다. 상피세포 성장인자(Epidermal growth factor; EGF)는 *in vivo* 상태에서 다양한 형태의 세포증식을 야기할 수 있으며, 바람직하기로는 제조합 단백질을 사용한다. 상피세포 성장인자의 바람직한 함량은 10 내지 50 ng/ml이며, 이의 함량이 10 ng/ml 미만이면 특별한 효과가 없으며, 50 ng/ml을 초과하면 세포에 독성을 가진다.

[0037] 본 발명에 따른 배지에서 배양된 줄기세포는 바람직하게는 11 내지 16 μ m의 직경을 가지므로 혈관 내 투여에 적합하다.

[0038] 따라서 본 발명은 다른 관점에서, 기본배지; 및 NAC(N-acetyl-L-cysteine), 인슐린 또는 인슐린 유사인자, 하이드로코르티손, bFGF (basic fibroblast growth factor) 및 항산화제로 구성된 군에서 선택되는 2가지 이상의 성분을 함유하는, 혈관 내 투여에 적합한 크기를 가지는 줄기세포 제조용 배지를 제공한다.

[0039] 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 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, 인슐린 및 하이드로코르티손을 함유한 K-SFM 배지를 2일마다 교체하면서 배양하여 중간엽 줄기세포를 분리하여 계대 배양하여 중간엽 줄기세포를 얻을 수 있다. 그러나 이 외에도 당업계에서 공지된 방법으로 중간엽 줄기세포를 얻을 수 있다.

[0040] 본 발명의 제조방법은, 본 발명에 따른 배지에서 배양된 줄기세포를 트립신으로 처리하는 단계를 추가로 포함할 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.

[0041] 본 발명의 제조방법은, 본 발명에 따른 배지에서 배양된 줄기세포를 아스피린 함유 용액에 부유시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 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 기체라면 제한없이 사용할 수 있다. 상기 아스피린은 통상 시판되고 있는 아스피린 제제뿐 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.

[0042] 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.

[0043] 실시예 1: 인간 지방조직 유래 중간엽 줄기세포 분리

[0044] 지방흡입술(Liposuction)에 의해 복부지방으로부터 분리된 지방조직을 PBS로 세척한 다음, 지방조직을 잘게 자른 후 콜라게나아제 타입 1 (1mg/ml)을 첨가한 DMEM media를 이용해 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 조직을 분해시켰다.

콜라게나아제 처리된 조직을 PBS로 세척 후 1000rpm에서 5분간 원심분리 하여, 상층액을 제거하고, 펠렛을 PBS로 세척한 후 1000rpm으로 5분간 원심분리하였다. 100 mesh에 필터링하여 부유물을 제거한 후 PBS로 세척하고, 10% FBS, 2mM NAC(N-acetyl-L-cysteine), 0.2mM 아스코르브산이 첨가된 DMEM 배지에서 배양하였다.

[0045] 하룻밤 지난 후 부착되지 않은 세포들은 PBS로 세척하고, 5% FBS, 2mM NAC, 0.2mM 아스코르브산, 0.09mM 칼슘, 5ng/ml rEGF, 5ng/ml 인슐린, 10 ng bFGF 및 74ng/ml 하이드로코르티손 및 1ng/ml의 셀레늄(selenium)을 함유한 K-SFM(Keratinocyte Serum Free Medium)을 2일마다 교체하면서 계대배양하였으며, 3계대 배양하여 지방 유래 중간엽 줄기세포를 분리하였다.

[0046] 실시예 1에서 3 계대까지 배양하여 얻은 지방 유래 중간엽 줄기세포를 하기의 각 배지에 seeding하고 5일에 걸쳐 배양하였다. 5일의 배양일에 세포의 크기와 세포 특성을 측정하였다.

[0047] 배지 조성

[0048] 1) KFSM+첨가물: K-SFM + FBS + NAC + 아스코르브산 + 칼슘 + rEGF

[0049] + 인슐린 + bFGF + 하이드로코르티손 + 셀레늄

[0050] 2) DMEM+FGF: DMEM(low-glucose) + 10 % FBS + 5 ng/ml FGF

[0051] 3) α-MEM+FGF: α-MEM + 10 % FBS + 5 ng/ml FGF

표 1

배지 조성에 따른 세포 크기 (μm)

	Passage 2	Passage 3	Passage 4
KFSM+첨가물	14 ± 2.0	13.8 ± 2.2	14.1 ± 2.4
DMEM+FGF	20 ± 1.7	21.8 ± 1.4	22.1 ± 1.8
α-MEM+FGF	20.3 ± 2.1	19.2 ± 1.8	22.0 ± 1.9

[0053] 세포의 크기는 ‘KFSM+첨가물’ 배양군의 세포가 가장 작았고, α-MEM을 basal로 하여 배양한 군들의 세포 크기가 DME 군보다 세포 크기의 변화가 컸다. ‘KFSM+첨가물’ 군의 세포는 계대를 거처도 11 ~ 16 μm을 유지하는 것에 반해, 타배지군들은 계대가 진행될수록 20 μm 이상의 큰 세포 크기를 나타냈다 (도 1).

[0054] 상기 조건의 배양 배지로부터 얻은 계대 4 지방 유래 중간엽 줄기세포를 FACS 측정하여 세포 특성을 확인하였다.

표 2

	KFSM+첨가물	DMEM+FGF	α-MEM+FGF
CD 29	99.0 %	99.4 %	99.9 %
CD 90	99.7 %	99.6 %	99.6 %
CD 31	0.1 %	4.2 %	0.5 %
CD 34	0.0 %	2.3 %	0.2 %
CD 45	0.1 %	4.2 %	2.1 %

[0056] 상기 배지로부터 얻은 지방 중간엽 줄기세포의 특성을 확인 한 결과, 줄기세포의 positive 마커 발현에는 배지에 대한 영향이 없으나 negative 마커는 ‘KFSM+첨가물’ 배지군에서 배양한 세포보다 DMEM + FGF(%)처리된 배양 배지군의 세포에서 발현률이 좀 더 높았다 (도 2).

[0057] 실시예 1에서 분리된 줄기세포를 SEM(Scanning Electron Microscopy)으로 관찰하여 측정된 결과, 대부분의 줄기세포가 약 11 내지 16 μm의 직경을 가지며, 세포 간 응집이 형성되지 않음을 확인할 수 있었다.

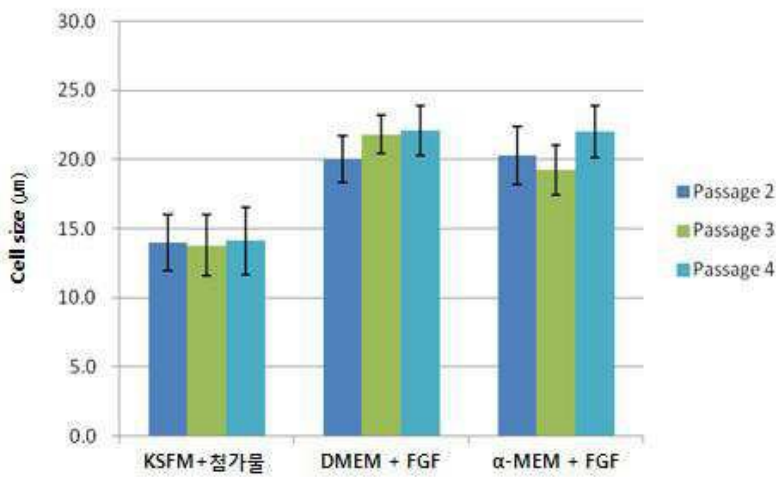
[0058] 실시예 2: Small size 줄기세포 제조용 배지성분의 탐색

[0059] 실시예 1에서 사용된 K-SFM 배지에 첨가되는 활성성분인 FBS, NAC, 아스코르브산, 칼슘, rEGF, 5ng/ml 인슐린, bFGF, 하이드로코르티손 및 셀레늄(selenium) 중 하나씩을 제거한 배지를 제조하고, 상기 활성성분이 각각 제거된 배지 및 'KSFM+첨가물' 군에서 지방 유래 줄기세포를 배양하였다. 상기 각각의 배지에서 3 passage까지 계대한 후 트립신을 처리한 뒤 공초점 현미경 (confocal microscope)으로 세포 직경을 측정하였다. 그 결과 셀레늄이 포함된 배지에 배양된 지방 유래 줄기세포의 크기는 11.6 ~ 16.5 μm 였으나, 셀레늄이 제거된 배지에서 배양한 줄기세포 크기는 18.1 ~ 23.9 μm 인 것을 확인할 수 있었다.

[0060] 이상으로 본 발명의 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 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.

도면

도면1



도면2

