



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년10월29일  
(11) 등록번호 10-2037823  
(24) 등록일자 2019년10월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 14/475 (2006.01) C07K 1/14 (2006.01)  
C12N 5/0735 (2010.01) C12N 5/0775 (2010.01)  
(21) 출원번호 10-2013-0094832  
(22) 출원일자 2013년08월09일  
심사청구일자 2017년11월24일  
(65) 공개번호 10-2015-0018203  
(43) 공개일자 2015년02월23일  
(56) 선행기술조사문헌  
W02010020876 A2\*  
Bhang S.H. et al, TISSUE ENGINEERING: Part A  
18(19&20):pp.2138-2146 (2012.)\*  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
서울대학교산학협력단  
서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)  
(72) 발명자  
이은주  
서울 성북구 정릉로 305, 101동 1406호 (정릉동,  
경남아파트)  
김효수  
서울특별시 용산구 독서당로 111번지 한남더힐  
105동 T202호  
(74) 대리인  
이명진

전체 청구항 수 : 총 11 항

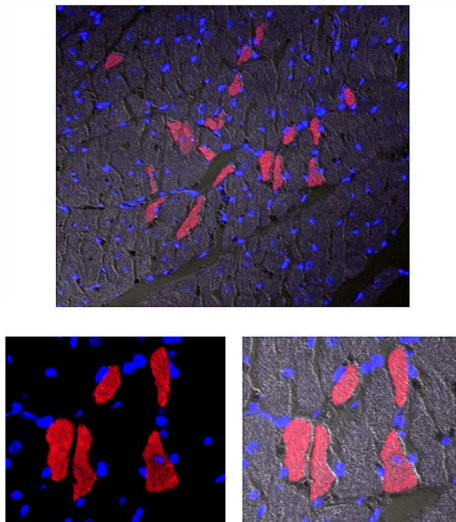
심사관 : 김정아

(54) 발명의 명칭 줄기세포 응집체를 이용한 혈관 신생 인자의 대량 획득 방법, 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 줄기세포 응집체를 이용한 혈관 신생 인자의 대량 획득 방법, 및 상기 줄기세포 응집체의 배양액을 포함하는 허혈성 질환 예방 및 치료용 조성물에 관한 것으로, 구체적으로, 본 발명에서는 줄기세포를 동물 유래 성분인 우혈청과 안정성이 떨어지는 완충용액, 내성이 증가될 수 있는 항생제 성분 등이 전혀 포함되어 있지 않은 무첨가 기본 배지(basal medium)에서 부유 배양을 통해 줄기세포의 응집체를 구축할 경우, 상기 줄기세포 응집체 배양액으로부터 혈관 신생 인자를 대량으로 획득함과 동시에, 이를 허혈 조직에 이식할 경우 단일 세포 이식에 비해 조직 내 생착률이 현저히 증가됨을 확인함으로써, 본 발명이 허혈성 질환의 예방 또는 치료에 효과적으로 이용될 수 있음을 밝혔다.

대표도 - 도3b



## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

- (a) 줄기세포를 무첨가 기본 배지(basal medium)에서 부유 배양함으로써 줄기세포 응집체를 형성시키는 단계;
- (b) 상기 줄기세포 응집체를 무첨가 기본 배지에서 배양하는 단계;
- (c) 상기 줄기세포 응집체의 배양액으로부터 세포를 제외한 배양 상등액을 획득하는 단계; 및
- (d) 상기 배양 상등액으로부터 혈관 신생 인자를 수득하는 단계를 포함하는 혈관 신생 인자의 대량 수득 방법으로서,  
상기 무첨가 기본 배지는 항생제, 및 혈청 또는 혈청 대체물을 포함하지 않은 것을 특징으로 하고,  
상기 방법은 무첨가 기본 배지를 사용함으로써 혈관 신생 인자의 분비량이 증가되며, 항생제 내성 위험성이 저하된 것을 특징으로 하는, 방법.

#### 청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 줄기세포는 중간엽 줄기세포, 배아 줄기세포, 배아 생식세포, 배아 종양세포 및 유도만능줄기세포로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 방법.

#### 청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 혈관 신생 인자는 VEGF A(vascular endothelial growth factor A) 또는 HGF(Hepatocyte growth factor)인 것을 특징으로 하는, 방법.

#### 청구항 4

- 제 1항에 있어서, 상기 방법은 (a) 단계 이전에
- (i) 줄기세포를 평판 배양하는 단계;
  - (ii) 상기 평판 배양된 줄기세포에서 단일 세포를 분리하는 단계;
  - (iii) 상기 분리된 단일 세포를 포함하는 세포 드롭(drop)을 형성하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.

#### 청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 평판 배양은 영양 배지(rich medium)에서 배양되는 것을 특징으로 하는, 방법.

#### 청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 영양 배지는 혈청(serum) 또는 혈청 대체물(serum replacement)을 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.

**청구항 7**

제 4항에 있어서, 상기 세포 드롭은 10 ~ 100  $\mu\text{l}$ 의 무첨가 기본 배지 내에 500개 내지 1500개의 단일 세포를 포함하고 있는 것을 특징으로 하는, 방법.

**청구항 8**

제 4항에 있어서, 상기 세포 드롭은 20  $\mu\text{l}$ 의 무첨가 기본 배지 내에 750개 내지 1250개의 단일 세포를 포함하고 있는 것을 특징으로 하는, 방법.

**청구항 9**

제 4항에 있어서, 상기 세포 드롭은 20  $\mu\text{l}$ 의 무첨가 기본 배지 내에 1000개의 단일 세포를 포함하고 있는 것을 특징으로 하는, 방법.

**청구항 10**

제 1항에 있어서, 상기 배양은 24시간 이상 배양하는 것을 특징으로 하는, 방법.

**청구항 11**

제 1항에 있어서, 상기 배양은 24시간 내지 72시간 동안 배양하는 것을 특징으로 하는, 방법.

**청구항 12**

삭제

**청구항 13**

삭제

**청구항 14**

삭제

**청구항 15**

삭제

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 줄기세포 응집체를 이용한 혈관 신생 인자의 대량 수득 방법 및 이를 이용한 허혈성 질환 치료 방법에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 허혈(ischemia)이란, 혈관이 협착 또는 수축하거나, 정상적인 혈관 생성이 충분히 이루어지지 않아 혈류의 공급이 중단되어 세포 손상이 일어나는 부분적 혈액 부족 증상을 말한다. 허혈성 질환은 이러한 허혈 증상으로 인해 유발되는 질환을 통칭하는 것으로, 허혈성 뇌졸중, 허혈성 대장염 및 심혈관 질환을 포함한다. 허혈성 질환으로

대표되는 질환인 허혈성 뇌졸중 또는 허혈성 심장 질환은 혈전이나 동맥경화증에 의해 뇌동맥 또는 관상동맥이 폐쇄되어 혈류량이 역치점 이하로 감소되는 허혈로 인해, 뇌 신경 세포 및 심장 세포에 손상을 초래하여 결국 세포사멸이 일어나고, 이를 통해 뇌경색(brain infarction) 및 심근경색(myocardial infarction)이 나타나게 된다. 그 밖에도 허혈로 인한 혈액 공급의 중단은 허혈성 심부전, 허혈성 장염, 안질환, 허혈성 하지질환 등의 각종 허혈성 질환을 유발하게 된다.

[0003] 이러한 허혈성 질환의 치료 방법으로는 약물 요법, 스텐트를 이용하여 좁은 혈관을 확장시켜 주는 관상 동맥 성형술이 있으며, 심장의 경우 동맥 우회술을 시행하기도 한다. 그러나, 이러한 치료방법은 혈관이 너무 많이 굳어 있거나, 이식에 사용할 수 있는 혈관을 모두 사용하였거나, 재협착으로 인한 동맥성형술의 반복 시행에도 계속적인 재발이 일어날 경우에는 적절한 치료 방법으로서의 역할을 하지 못하게 된다. 따라서 이와 같은 기존 치료 방법의 한계를 극복하기 위해 허혈을 완화시키는 혈관 신생 인자(vasculogenic factor)를 이용하여 허혈성 조직의 신혈관형성을 향상시키고자 하는 방법이 새로운 치료 전략으로 관심받고 있다.

[0004] 혈관 신생 인자의 치료적 적용은, Folkman 등에 의해 최초로 문헌발표되었다(N. Engl. J. Med. 285, 1182-1186(1971)). 또한 그 후의 연구에 의해, 재조합 혈관 신생인자, 예를 들면 섬유아세포 증식인자(FGF) 패밀리, 내피세포 증식인자(EGF) 및 혈관내피 증식인자(VEGF) 등을 사용하여 심근 및 하지허혈증의 동물 모델에 있어서의 측부혈행로의 발달을 촉진 및/또는 증진시킬 수 있음이 확인되었다(Circulation 90, II-228-II-234(1994)). 또한, 간 실질세포 증식인자(HGF)가 VEGF와 동일하게 내피 특이적 증식 인자로서 작용하고(J. Hypertens. 14, 1067-1072(1996)), 폐색성 동맥경화증(ASO)의 치료에 유용하게 이용될 수 있을 뿐 아니라(Circulation, Vol.100, No.18, No.1672(1999), Japanese Circulation Journal Vol.64, Suppl. I, p478, No.P079(2000)), 심근경색에 있어서의 허혈 재관류상해에 대해서도, HGF 유전자가 유효하게 작용함이 이미 잘 알려져 있다(Circulation, Vol.96, No.8, No.3459(1997), Ann. Thorac. Surg., 67, p1726-1731(1999), Gene Therapy, 7: 417-427(2000)).

[0005] 줄기세포(stem cell)는 생물 조직을 구성하는 다양한 세포들로 분화(differentiation)할 수 있는 세포로서, 배아, 태아 및 성체의 각 조직에서 얻을 수 있는 분화되기 전 단계의 미분화 세포들을 총칭한다. 줄기세포는 분화 자극(환경)에 의하여 특정 세포로 분화가 진행되며, 분화가 완료되어 세포분열이 정지된 세포와는 달리 세포분열에 의해 자신과 동일한 세포를 생산(self-renewal)할 수 있어 증식(proliferation; expansion)하는 특성이 있으며, 다른 환경 또는 다른 분화 자극에 의해 다른 세포로도 분화될 수 있어 분화에 유연성(plasticity)을 가지고 있는 것이 특징이다.

[0006] 줄기세포는 크게 배아(embryo)에서 얻어지고 모든 세포로 분화될 수 있는 잠재력(totipotent)을 지닌 전분화능(pluripotency)의 배아 줄기 세포(embryonic stem cell, ES cell)와 각 조직에서 얻어지는 다분화능(multipotency)의 성체 줄기 세포(adult stem cell)로 구분된다. 배아 발생 초기인 포배기(blastocyte)의 세포내피(inner cell mass)는 장차 태아를 형성할 부분으로서 이 세포내피로부터 형성된 배아 줄기 세포는 이론적으로 한 개체를 구성하는 모든 조직의 세포로 분화될 수 있는 잠재력을 지닌 줄기세포이다. 즉, 배아 줄기 세포는 무제한적으로 증식이 가능한 미분화 세포이고, 모든 세포로 분화할 수 있으며 성체 줄기 세포와 달리 배(germ) 세포도 만들 수 있어 다음 세대로 유전될 수 있다.

[0007] 인간 배아 줄기 세포는 인간 배아(blastocyst) 형성시 세포내피(inner cell mass)만을 분리하여 배양함으로써 제조되는데, 현재 전 세계적으로 만들어진 인간 배아 줄기 세포는 불임시술 뒤 남은 냉동 배아로부터 얻어진 것이다. 이 세포의 특징은 모든 세포로 분화 가능한 잠재력(totipotent)을 갖고 있어, 어떠한 조직 세포로도 분화될 수 있으며, 또한 사멸하지 않고(immortal) 미분화상태에서 배양가능하며 배 세포(germ cell)의 제조도 가능하므로 다음 세대로 유전될 수 있는 특징을 가지고 있다(Thomson et al., Science, 282: 1145-1147, 1998; Reubinoff et al., Nat. Biotechnol., 18: 399-404, 2000).

[0008] 하지만, 이렇듯 여러 세포로 분화할 수 있는 분화능을 가진 인간 배아 줄기세포를 세포 치료제로 이용하기 위한 다양한 시도는 아직 암화 형성과 면역 거부 반응의 높은 벽을 완전히 제어하지 못하는 상황이다.

[0009] 최근 이러한 문제점을 극복하기 위한 대안으로 면역 조절 기능을 가지고 있는 것으로 보고되고 있는 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell; MSC)가 제시되고 있다. Friendenstein 연구단(Exp Hematol, 4(5):267-274, 1976)에 의해 골수에서 처음 확인된 중간엽 줄기세포(Mesenchymal stem cells; MSCs)는 전능성 세포로, 재생

의학에서 큰 잠재성을 가진다. 상기 MSCs는 생체 내 여러 유형의 중간엽 계통, 예를 들어 골세포(Osteocytes), 연골세포(Chondrocytes), 힘줄세포(tendinocytes), 지방세포(Adipocytes), 근육세포(Myocytes), 및 섬유아세포(Fibroblasts) 등으로 분화될 수 있다. 또한, 적절한 배지 조건에서는 신경 세포(Hung SC et al., Stem Cells, 20(6):522-529, 2002; Sanchez-Ramos J et al., Exp Neurol, 164(2):247-256, 2000), 심근세포(Kadivar M et al., Biochem Biophys Res Commun, 340(2):639-647, 2006), 내피세포(Reyes M et al., Blood, 98(9):2615-2625, 2001), 및 간세포(Kang XQ et al., World J Gastroenterol, 11(47):7461-7465, 2005)로 교차 분화될 수 있다. 게다가 골수 MSCs는 클래스 II가 아닌 클래스 I MHC 항원을 발현하거나, MSCs가 면역원성 활성이 없는 것을 나타내는 상호 자극 분자들을 발현한다(Klyushnenkova E et al., J Biomed Sci, 12(1):47-57, 2005). MSCs는 면역억제 활성을 나타내므로, 이식 촉진제 및 태아 이식(fatal graft) 및 숙주 질환의 억제제로 사용될 수 있으며(Le Blanc K et al., Lancet, 363(9419):1439-1441, 2004; El-Badri N.S et al., Exp Hematol, 26(2):110-116, 1998), 골수, 지방 조직, 제대혈(cord blood), 말초혈, 신생아 조직(neonatal tissues), 인간 태반 등의 다양한 성인 조직으로부터 분리될 수 있다(Kassis I et al., Bone Marrow Transplant, 37(10):967-976, 2006; Wang HS et al., Stem Cells, 22(7):1330-1337, 2004; Fukuchi Y et al., Stem Cells, 22(5):649-658, 2004).

[0010] 하지만, 줄기세포는 다분화 잠재능을 가지고 있어서 손상된 조직에서 필요한 세포로의 분화를 유도할 수 있다는 점에서 세포 치료에서 잠재력이 크지만, 현재 개발수준에서는 체내 이식 후 생존율이 높지 않아서 실제로 임상 적용에서 광범위하고 안정적으로 성공한 예를 찾기 어렵다.

[0011] 특히, 지방, 골수 또는 제대혈 유래 줄기세포치료제가 허혈성 질환 치료에 사용될 수 있고, 혈관을 재생시킬 수 있는 것으로 밝혀졌으나, 허혈 부위에 이식된 줄기세포의 대부분은 사멸되어 세포치료제의 치료 효능이 크지 않은 문제점이 있어 왔다. 또한, 레만(Rehman J) 등은 지방 유래 줄기세포에서 혈관 재생에 관련된 인자가 분비된다는 것을 보고하였으나(Circulation 2004; 109(10): 1292-8), 이 방법에서도 역시 줄기세포가 단일 세포 형태로 허혈 부위에 이식되어 이식된 세포의 생존율이 극히 낮아 실제 임상 적용이 어려운 문제가 있었다.

[0012] 한편, 생체에서와는 달리, 체외에서 인위적으로 동물 세포를 배양하기 위하여 배양 배지를 공급하려면, 혈장이나 림프액과 같은 체액을 근거한 생체의 조건에 가까운 영양분과 pH, 온도, 삼투압 등의 환경 조건을 충분히 만족시켜 주어야 한다. 따라서, 체액을 근거로 배양 배지 조성을 결정하고 이 결정된 배양 배지를 선택하여 혈청을 적정 비율로 세포에 맞게 첨가한 뒤 세포 배양에 이용하여 왔다. 이런 방법으로서, 배지 개발 초기에는 1950년경 모건(Morgan) 등이 체액 조성을 근거로 M199 배지를 만들어 태아 세포(primary chick)를 배양하였다. 이어서 개발된 주요 배지로는, 이글(Eagle)이 사람과 쥐의 태아 세포 배양에 이용한 Eagle's medium, 쥐의 태아 세포 배양에 이용한 배양액(Dulbecco's modified eagles medium), Ham's F-12와 모르(Moore) 등이 햄스터 종양 세포 배양에 이용한 RPMI-1640 등이 있다.

[0013] 세포 배양시, 세포의 영양 요구성에 따라 상기의 배지에 5 내지 20%의 동물혈청을 첨가하여 사용한다. 혈청에는 세포의 성장과 기능을 촉진하는 인슐린 또는 폴리펩티드계통의 다양한 호르몬과 세포의 분열과 기능을 조절하는 성장 인자들, 그리고 피브로넥틴과 같은 부착 및 확산 인자들, 결합 단백질로 트랜스페린이 있으며, 지질, 무기질 등 미량 요소들이 다수 포함되어 있다. 혈청은 또한 완충액으로서 배양액의 삼투압과 pH를 조절하며, 단백질 분해 저해 및 물리적 충격에서 세포를 보호할 수 있는 점성 작용도 가지고 있어, 기본이 되는 배지에 일정 농도의 혈청을 넣어 배양용 배지를 만들고 있다.

[0014] 인간 줄기세포를 체외에서 배양하기 위해 동물 혈청 (우태아 혈청)을 함유하는 배지를 이용하는 경우, 우태아 혈청이 세포내 잔류하여 강력한 이종항원으로 작용하며 광우병등 소의 질환의 인체 감염 가능성 등으로 인해 우태아 혈청으로 배양한 세포의 인체 이식이 미국에서는 금지되어 있는 상황이며, 이를 대체하기 위한 혈청 대체물(Serum replacament) 등이 개발되고 있으나 인체 이식에서는 여전히 많은 안전성 문제가 발생되고 있다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0015] 본 발명은 상기와 같은 종래 기술상의 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로, 동물 유래 성분인 우혈청과 안정성이 떨어지는 완충용액, 내성이 증가될 수 있는 항생제 성분 등이 전혀 포함되어 있지 않은 무첨가 기본 배지

(basal medium)에서 줄기세포를 부유 배양하여 형성되는 줄기세포 응집체가 허혈성 조직의 신혈관형성을 향상시킬 수 있는 혈관 신생 인자를 대량 분비하고, 상기 줄기세포 응집체를 허혈 조직에 이식할 경우 단일 세포 이식에 비해 조직 내 생착률이 현저히 증가됨을 밝힘으로써, 본 발명의 방법이 혈관 신생 인자를 대량 수득할 수 있을 뿐 아니라, 이를 허혈성 질환의 치료에 적합하게 적용할 수 있음을 제시하고자 한다.

[0016] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0017] 본 발명은 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 하기의 단계를 포함하는 혈관 신생 인자의 대량 수득 방법을 제공한다:

[0018] (a) 줄기세포를 무첨가 기본 배지(basal medium)에서 부유 배양함으로써 줄기세포 응집체를 형성시키는 단계; 및

[0019] (b) 상기 줄기세포 응집체의 배양액으로부터 혈관 신생 인자를 수득하는 단계.

[0020] 본 발명의 일 구현예로, 상기 줄기세포는 중간엽 줄기세포, 배아 줄기세포, 배아 생식세포, 배아 종양세포 및 유도만능줄기세포로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 한다.

[0021] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 혈관 신생 인자는 VEGF A(vascular endothelial growth factor A) 또는 HGF(Hepatocyte growth factor)인 것을 특징으로 한다.

[0022] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 기본 배지는 Eagle's MEM (Eagle's minimum essential medium),  $\alpha$ -MEM, Iscove's MEM, 199 medium, CMRL 1066, RPMI 1640, F12, F10, DMEM (Dulbecco's modification of Eagle's medium), DMEM 및 F12의 믹스처(mixture), Waymouth's MB752/1, McCoy's 5A, 및 MCDB 또는 이의 변형 배지로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 한다.

[0023] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 방법은 (a) 단계 이전에

[0024] (i) 줄기세포를 평판 배양하는 단계;

[0025] (ii) 상기 평판 배양된 줄기세포에서 단일 세포를 분리하는 단계; 및

[0026] (iii) 상기 분리된 단일 세포를 포함하는 세포 드롭(drop)을 형성하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0027] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 평판 배양은 영양 배지(rich medium)에서 배양되는 것을 특징으로 한다.

[0028] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 영양 배지는 혈청(serum) 또는 SR(serum replacement)을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0029] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 세포 드롭은 10 ~ 100  $\mu$ l의 무첨가 기본 배지 내에 500개 내지 1500개의 단일 세포를 포함하고 있는 것을 특징으로 한다.

[0030] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 세포 드롭은 20  $\mu$ l의 무첨가 기본 배지 내에 750개 내지 1250개의 단일 세포를 포함하고 있는 것을 특징으로 한다.

[0031] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 세포 드롭은 20  $\mu$ l의 무첨가 기본 배지 내에 1000개의 단일 세포를 포함하고 있는 것을 특징으로 한다.

[0032] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 무첨가 기본 배지에서 줄기 세포를 부유 배양함에 있어, 배양 시간은 24시간 이상 배양하는 것을 특징으로 한다.

[0033] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 무첨가 기본 배지에서 줄기 세포를 부유 배양함에 있어, 배양 시간은 24시간 내지 72시간 동안 배양하는 것을 특징으로 한다.

[0034] 아울러, 본 발명은 혈관 신생 인자를 유효성분으로 하는 줄기세포 응집체의 배양액을 포함하는 허혈성 질환 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.



- [0035] 본 발명의 일 구현예로, 상기 허혈성 질환은 허혈성 뇌질환 또는 허혈성 심장질환인 것을 특징으로 한다.
- [0036] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 허혈성 심장질환은 관상동맥질환, 울혈성 심부전, 만성 심부전, 심근증 및 심근 경색증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 한다.
- [0037] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 심근증은 허혈성 심근증, 확장성 심근증, 비대형 심근증, 특발성 심근증, 원발성 심근증, 속발성 심근증 및 판막성 심근증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 한다.

**발명의 효과**

- [0038] 본 발명의 방법은 줄기세포를 구형의 응집체로 형성시킴으로써, 세포 배양액 내로 혈관 신생 인자를 과량 분비할 수 있고, 상기 세포 배양액은 종래 세포 배양 배지에서 사용되던 동물 유래 성분과 완충 용액, 항생제 및 지시약 등의 성분들이 없어 임상에 안전하게 적용가능할 뿐 아니라, 상기 세포 배양액 내에는 허혈성 혈관 질환의 치료에 적용할 수 있는 혈관 신생 인자 및 조직 내 이식시 생착률이 증가된 줄기세포 응집체가 포함되어 있어, 허혈성 질환의 치료에 유용하게 적용될 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

- [0039] 도 1은 세포 드롭(drop)을 제작하고, 1, 6, 24, 48 및 72 시간대별로 배양한 후, 광학현미경(NIKON)으로 응집체 형성을 관찰한 결과이다(배율: 상단 x100):
  - a: 세포 드롭(drop) 제작 및 이의 형태; 및
  - b: 형성된 응집체를 현미경으로 관찰한 결과.
- 도 2는 각각의 배지 조건에서 배양되어 제작된 세포 드롭에서 1, 6, 24, 48 및 72 시간대별로 세포를 제외한 세포 배양 상등액을 회수하고, 상등액 내 분비된 인간 혈관내피세포 성장인자 A(Vascular endothelial growth factor A, VEGF A )와 인간 간세포 성장인자(Hepatocyte growth factor, HGF)의 양을 ELISA를 수행하여 확인한 결과이다:
  - a: 우혈청 및 항생제가 포함된 영양 배지(hEBM) 내 세포 드롭을 배양한 세포 배양액; 및
  - b: 무첨가 기본 배지(α-MEM) 내 세포 드롭을 배양한 세포 배양액.
- 도 3은 허혈성 심혈관 래트 모델의 심장 조직에 단일 세포 또는 본 발명의 줄기세포 응집체를 이식하고, 14일 후 관찰한 조직 사진이다(배율: 상단 x200, 하단 x800):
  - a: 단일 세포 이식 조직; 및
  - b. 본 발명의 줄기세포 응집체 이식 조직.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0040] 본 발명자들은 줄기세포에서 분비되는 혈관 신생 인자를 대량으로 수득하는 방법, 및 생체에 이식할 경우 생착율이 증가되고 허혈 치료 작용이 우수한 줄기세포 치료제를 개발하기 위해 연구를 수행하였으며, 그 결과 줄기세포를 동물 유래 성분인 우혈청과 안정성이 떨어지는 완충용액, 내성이 증가될 수 있는 항생제 성분 등이 전혀 포함되어 있지 않은 무첨가 기본 배지(basal medium)에서 부유 배양을 통해 줄기세포의 응집체를 구축할 경우, 상기 세포 응집체 배양액으로부터 혈관 신생 인자를 대량으로 수득함과 동시에, 이를 허혈 조직에 이식할 경우 단일 세포 이식에 비해 조직 내 생착률이 현저히 증가됨을 밝힘으로써, 본 발명의 방법이 허혈성 질환의 치료에 적합하게 이용될 수 있다는 사실을 규명하고, 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.
- [0041] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0042] 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 혈관 신생 인자의 대량 수득 방법을 제공한다:

- [0043] (a) 줄기세포를 무첨가 기본 배지(basal medium)에서 부유 배양함으로써 줄기세포 응집체를 형성시키는 단계; 및
- [0044] (b) 상기 줄기세포 응집체의 배양액으로부터 혈관 신생 인자를 수득하는 단계.
- [0045] 최근 들어 난치성, 퇴행성 질환을 치료하기 위해 줄기세포 또는 기타 자가 또는 타가세포를 이용한 세포 치료의 연구가 활발해지면서 생체 내에 존재하여 세포간 신호전달 기작을 담당하는 신호물질들이 발견되고 있으며, 이러한 물질의 구체적인 효과에 대해서도 연구가 진행되고 있다. 구체적으로 조직의 재생에 관여하는 신생인자의 구조와 합성에 대한 연구가 진행되었지만 대부분의 신생 인자는 3차원적으로 복잡한 단백질의 구조를 가지고 있어 화학적으로 합성하는데 여러 가지 문제점이 발생되고 있으며 그러한 합성에 들어가는 비용 또한 매우 고가인 것이 현실이다. 이에 본 발명자들은 허혈성 질환을 효율적으로 치료하기 위해 생체 내에서의 활성을 유지하면서 낮은 가격에 활성형의 혈관 신생 인자를 획득하는 방법을 개발하였다.
- [0046] 새로운 혈관의 발생이나 혈관 신생은 친혈관(parental blood vessel)의 내피세포의 활성화와 함께 개시되지만, 인 비보에서의 혈관 신생을 자극할 뿐 아니라, 인 비트로에서 내피세포에 대해 마이토제닉하게(mitogenically) 작용하는 것이 나타내어져 있는 성장인자를 본 명세서에서의 '혈관 신생 인자'라 한다.
- [0047] 상기 '혈관 신생 인자'는 섬유아세포 성장인자(FGF) 패밀리(Science 257, 1401-1403(1992), Nature 362, 844-846(1993)), 내피세포 성장인자(EGF)(J. Surg. Res. 54, 575-583(1993)), 간 세포 성장인자(HGF)(J. Hypertens. 14, 1067-1072(1996)) 또는 혈관 내피 성장인자(VEGF)를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0048] 간 세포 성장인자(HGF)는 분자량 약 10만의 고분자 단백질로서, 상피세포, 혈관내피세포, 심근세포, 연골세포 등의 성장인자로 알려져 있으며, 실험용 쥐를 통한 실험 결과 현저한 항간염 작용과 치료 효과가 밝혀진바 있다. 이러한 HGF는 만성 상해 조직에서 세포 사멸을 일으키는 TGF- $\beta$ 의 발현을 억제하여 조직을 재구축하는 인자로서 조직 기관의 형성과 손상된 조직의 재생에 필수 인자로 고려되고 있으며, 심근증, 당뇨병, 동맥경화증 등의 난치성 질환의 치료제로서 유효하다.
- [0049] 혈관 내피 성장인자(VEGF)(Ferrara, N. et al, Biochem Biophys Res Commun, 161:(2)851-8(1989))는 혈관 투과성 요소 (Senger, D.R. et al., Science, 219:(4587)983-5(1983))로 알려져 있으며 이는 동종 이량체로 34-42 kDa의 분자량을 가지며, hepar린이 결합된 글리코 단백질이다, 이는 혈관 형성 요소를 가지고 있어 내피세포의 유사분열 촉진과 혈관 투과성 능력을 향상시킬 수 있다. VEGF는 제한된 염기 서열로 알려진 일차구조로 표현되며 이는 혈소판 유래 성장인자(PDGF)의 A, B사슬과 상동성을 가진다.
- [0050] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 '혈관 신생 인자'는 VEGF A(vascular endothelial growth factor A) 또는 HGF(Hepatocyte growth factor)이다.
- [0051] 본 명세서에서, 용어 '줄기세포'는 자기복제능력(self-renewal)과 조직을 구성하는 세포로 분화(differentiation)할 수 있는 세포들을 총칭하며, 특정 분화 자극(환경)에 의해 특정 세포로 분화할 수 있는 능력을 가지고 있다. 줄기세포는 세포분열이 정지된 분화된 세포와는 달리 세포분열에 의해 자신과 동일한 세포를 생산(self-renewal)할 수 있고, 분화 자극이 가해지면 특정 세포로 분화되고 이러한 분화는 다른 환경 또는 다른 분화 자극에 의해 다양한 세포로도 분화될 수 있는, 분화의 유연성(plasticity)을 가지고 있는 것이 특징이다.
- [0052] 본 발명이 적용되는 줄기세포는 제한이 없으며, 줄기세포의 특성, 무한정 증식 및 특정세포로의 분화능을 갖는 세포는 본 발명이 적용될 수 있는 세포이다. 본 발명이 적용되는 줄기세포는 크게 두 종류로 구별된다: 배아줄기세포 (ES) 및 배아생식세포 (EG)를 포함하는 전능성 줄기세포(pluripotent stem cell)와 다능성 줄기세포(multipotent stem cell). 배아줄기세포는 배반포의 내부세포괴(ICM)로부터 유래되고, 배아생식세포는 5-10 주령의 생식용기(gonadal ridge)의 원시생식세포로부터 유래된다. 한편, 다능성 줄기세포는 배아 조직, 태아조직 및 성체 조직에서 발견되며, 이는 성체줄기세포를 포함한다. 전능성 줄기세포는 인 비트로에서 무한정 증식되며, 3종류의 모든 배아층(외배엽, 중배엽과 내배엽)으로부터 유래되는 다양한 세포로 분화될 수 있는 능력을 갖는다.
- [0053] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 줄기세포는 중간엽 줄기세포, 배아 줄기세포, 배아 생식세포, 배아 종양세포, 또는 유도만능줄기세포를 포함하며, 바람직하게는 중간엽 줄기세포이나, 이에 한정되는 것은 아니다.



용어 '유도만능줄기세포'는 비-전분화능 세포(예를 들면, 체세포)로부터 특정 유전자를 삽입하여 인공적으로 유래된 전분화능 줄기세포의 하나이다. 유도만능줄기세포는 줄기세포 유전자 및 단백질 발현, 염색체 메틸화, 배가시간(doubling time), 배아체 형성, 테라토마 형성, 생존성 키메라 형성, 교잡성 및 분화성을 가지는 면에서 전분화능 줄기세포(예를 들면, 배아줄기세포)와 동일하다고 여겨진다.

[0054] 본 명세서에서 용어 '무첨가 기본 배지(basal medium)'는 동물 세포 배양에 이용되는 보편적인 배지로, 동물 유래 성분인 혈청과 완충 용액, 항생제 및 지시약 등의 추가 성분들이 전혀 포함되어 있지 않은 배지를 의미한다.

[0055] 예를 들면, 상기 배지는 Eagles's MEM (Eagle's minimum essential medium, Eagle, H. Science 130:432(1959)),  $\alpha$ -MEM (Stanner, C.P. et al., Nat. New Biol. 230:52(1971)), Iscove's MEM (Iscove, N. et al., J. Exp. Med. 147:923(1978)), 199 배지 (Morgan et al., Proc. Soc. Exp. Bio. Med., 73:1(1950)), CMRL 1066, RPMI 1640 (Moore et al., J. Amer. Med. Assoc. 199:519(1967)), F12 (Ham, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 53:288(1965)), F10 (Ham, R.G. Exp. Cell Res. 29:515(1963)), DMEM (Dulbecco's modification of Eagle's medium, Dulbecco, R. et al., Virology 8:396(1959)), DMEM과 F12의 혼합물 (Barnes, D. et al., Anal. Biochem. 102:255(1980)), Way-mouth's MB752/1 (Waymouth, C. J. Natl. Cancer Inst. 22:1003(1959)), McCoy's 5A (McCoy, T.A., et al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 100:115(1959)) 및 MCDB 시리즈 (Ham, R.G. et al., In Vitro 14:11(1978)), 및 이의 변형 배지를 포함한다. 배지의 상세한 기술은 R. Ian Freshney, Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique, Alan R. Liss, Inc., New York에서 알 수 있으며, 상기 기술은 본 명세서에 참조로 포함된다. 바람직하게는 상기 배지는 추가 성분이 전혀 포함되지 않은 무첨가  $\alpha$ -MEM 배지이나, 다른 추가 성분이 포함되지 않은 동물 세포 배양에 통상적으로 이용되는 어떠한 배지도 가능하다.

[0056] 줄기세포가 여러 종류의 세포로 분화할 수 있다는 것은 잘 알려져 있다. 예를 들면, 상기 줄기세포는 세포 분화를 위한 조건하에서 조혈 세포, 신경 세포, 베타 세포 (beta cell), 심장 세포, 근육 세포, 간세포, 연골 세포, 상피 세포, 요로 세포 및 유사 세포로 분화하도록 유도된다. 줄기세포가 분화하기 위한 배지 조건 및 방법은 Palacios, et al., PNAS. USA, 92:7530-7537(1995), Pedersen, J. Reprod. Fertil. Dev., 6:543-552(1994), 및 Bain et al., Dev. Biol, 168:342-357(1995)에 개시되어 있다.

[0057] 본 명세서에서, 용어 '줄기세포 응집체'란, 줄기세포의 집합으로서 특정 세포로의 분화 전 단계의 세포들이 치밀하게 모여 형성된 구형의 세포 집단을 의미한다. 당업계에서는 줄기세포를 우혈청을 첨가하지 않은 무혈청 기본 배지에서 부유 배양하여 일정 시간이 지날 경우, 응집체가 형성될 수 있음이 이미 알려져 있으나, 무첨가 기본 배지에서 부유 배양을 통해 응집체를 형성시키고, 이를 24시간 이상 유지시킬 수 있음 대해서는 본 발명에서 최초로 밝힌 것으로, 따라서, 본 발명의 줄기세포 응집체는 무첨가 기본 배지에서 부유 배양된 상태로 유지된다. 또한, 당업계에 알려진 바에 따르면, 세포 응집체의 센터는 hypoxia 상태임은 공지的事实이다(Cell culture as spheroids: an approach to multicellular resistance. Anticancer Res. 1998 Nov-Dec;18(6A):4147-58).

[0058] 본 명세서에서, 용어 '부유 배양'은 부착된 형태로 세포 증식을 유도하는 평판 배양과 상반된 개념으로 저부착 패트리 디쉬를 이용하여 세포가 부유된 상태로 증식할 수 있도록 배양하는 것을 의미한다.

[0059] 본 발명의 방법은 상기 (a) 단계 이전에

[0060] (i) 줄기세포를 평판 배양하는 단계;

[0061] (ii) 상기 평판 배양된 줄기세포에서 단일 세포를 분리하는 단계; 및

[0062] (iii) 상기 분리된 단일 세포를 포함하는 세포 드롭(drop)을 형성하는 단계를 추가로 포함할 수 있고,

[0063] 상기 단계 (b) 이후에, 세포 응집체의 배양액을 정제하는 과정을 추가적으로 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0064] 상기 평판 배양은 영양 배지(rich medium)에서 배양되는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니며, 본 명세서에서 용어 '영양 배지'는 동물 세포 배양에 이용되는 보편적인 배지에 동물 유래 성분인 혈청과 완충 용액, 항생제 또는 지시약 등의 추가 성분이 포함되어 있는 배지를 의미한다.
- [0065] 상기 '영양 배지'는 혈청(serum) 또는 SR(serum replacement)이 포함되는 것이 바람직하며, 추가적으로 동물 세포의 체외 증식에 도움을 줄 수 있는 성분이라면 어느 것이든 포함될 수 있다.
- [0066] 상기 세포 드롭은 10 ~ 100  $\mu$ l의 무첨가 기본 배지 내에 500개 내지 1500개의 단일 세포를 포함할 수 있고, 20  $\mu$ l의 무첨가 기본 배지 내에 750개 내지 1250개의 단일 세포를 포함할 수 있으며, 20  $\mu$ l의 무첨가 기본 배지 내에 1000개의 단일 세포를 포함하고 있는 것이 가장 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0067] 상기 무첨가 기본 배지에서 줄기 세포를 부유 배양함에 있어, 배양 시간은 24시간 이상 배양하는 것이 바람직하고, 24시간 내지 72시간 동안 배양하는 것이 더욱 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0068] 아울러, 본 발명은 혈관 신생 인자를 유효성분으로 하는 줄기세포 응집체의 배양액을 포함하는 허혈성 질환 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0069] 상기 '줄기세포 응집체의 배양액'은 무첨가 기본 배지에서 줄기세포 응집체를 부유 배양하여 얻어진 세포 배양액으로서, 배양된 줄기세포 응집체가 포함되어 있는 배지를 의미하며, 따라서, 세포 응집체 자체가 이식되어 혈관 조직을 재생 및 회복시켜 허혈성 질환을 치료할 수 있을 뿐만 아니라, 세포 응집체에서 분비된 혈관 신생 인자가 다량 포함되어 있어, 허혈성 질환의 치료에 더욱 효과적으로 적용될 수 있다.
- [0070] 이에 더하여, 세포 응집체에서 분비된 혈관 신생 인자를 채집하여 이를 허혈성 질환 치료에 적용할 수도 있으며, 이러한 경우 세포 자원 자체의 소모가 적고 줄기세포 이식치료의 위험성인 테라토마 또는 암화 등의 가능성이 없는 더욱 안전한 치료방법이 될 수 있다.
- [0071] 본 발명의 허혈성 질환 예방 또는 치료용 조성물은 살아있는 동물 개체에 투입 또는 이식하여 생착될 수 있도록, 본 발명의 방법에 의해 제조된 줄기세포 응집체의 배양액을 포함하는 조성물을 지칭하고, 상기 배양액은 줄기세포 응집체 및 이로부터 분비된 혈관 신생 인자를 포함한다.
- [0072] 상기 허혈성 질환은 허혈성 뇌혈관 질환 또는 허혈성 심장 질환을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니며, 상기 허혈성 뇌혈관 질환은 뇌졸중 및 뇌혈관성 치매증을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0073] 또한, 상기 허혈성 심장질환은 관상동맥질환, 울혈성심부전, 만성심부전, 심근증 및 심근경색증을 포함하나 이에 한정되는 것은 아니고, 상기 심근증은 선천성, 판막 질환, 고혈압, 관동맥 질환, 심낭질환 등 다른 심장 질환 없이, 호흡 곤란, 흉통, 두근거림 등의 증상이 나타나는 심장 근육에 이상이 발생하는 여러 질환군을 일컬으며, 상기 심근증은 허혈성심근증, 확장성심근증, 비대형심근증, 특발성심근증, 원발성심근증, 속발성심근증 및 판막성 심근증을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0074] 상기 본 발명에 따른 허혈성 질환 예방 또는 치료용 조성물을 살아있는 동물 개체의 조직에 투여 또는 이식하고, 상기 조성물에 포함된 줄기세포 응집체가 개체내 조직에 생착되거나, 배양액 내 포함된 혈관 신생 인자가 신혈관형성을 향상시킴으로써, 또는 이의 조합 효과에 의해 허혈성 질환을 치료할 수 있다.
- [0075] 본 발명의 조성물은 유효성분 외에 약학적으로 허용 가능한 통상의 담체를 포함할 수 있고, 주사제의 경우 보존제, 무통화제, 가용화제 또는 안정화제 등이 있으며, 국소투여용 제제의 경우에는 기체, 부형제, 윤활제 또는 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0076] 본 발명의 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

- [0077] 본 발명의 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 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 형태일 수 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0078] 본 발명의 조성물은 비경구로 투여할 수 있고, 정맥 내, 피하, 복강 내 투여 또는 국소 적용이 가능하고, 허혈이 일어나 세포사멸이 유도된 조직에는 어디든 적용될 수 있으며, 바람직하게는 심장내 주사(intracardiac injection) 형태로 투여될 수 있다. 본 발명에 따른 조성물의 비경구 투여용 조성물(예, 주사제)은 약제학적으로 허용 가능한 담체, 예를 들어, 멸균 정제수, 약 pH 7의 완충액, 또는 생리식염수 중에 분산 및/또는 용해시켜 생체 내에 주입될 수 있으며, 필요할 경우, 보존제, 안정화제 등과 같은 통상의 첨가제를 포함할 수 있다.
- [0079] 또한, 본 발명에서 주입되는 줄기세포 응집체 배양액의 양은 크게 제한되지 않고, 배양액 내 포함된 줄기세포 응집체는 전체 배양액 대비 10 내지 100 %가 포함될 수 있고, 바람직하게는 20 내지 70 %로 포함될 수 있으며, 가장 바람직하게는 40 %가 포함될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 배양액의 용량 및 줄기세포 응집체 함량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다.
- [0080] 본 발명에서 사용되는 용어 '예방'은 본 발명의 조성물의 투여로 허혈성 질환을 억제시키거나 진행을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0081] 본 발명에서 사용된 용어 '치료'는 1) 아직 허혈성 질환을 보유하고 있다고 진단되지 않았으나, 이러한 경향이 있는 동물, 바람직하게는 포유동물, 보다 바람직하게는 인간에서 질병 또는 장애가 발생하는 것의 예방, 2) 허혈성 질환의 억제, 즉 발전의 억제, 및 3) 허혈성 질환의 경감을 의미한다. 구체적으로, 상기 조성물을 치료학적으로 유효한 양으로 허혈성 질환의 치료가 필요한 대상(subject)의 손상조직에 주입 또는 이식할 경우, 주변 중추신경계 또는 말초신경계의 줄기세포를 해당 조직의 세포로 분화시켜 손상된 조직의 기능을 회복시키고 허혈성 질환을 치료할 수 있다. 한편, 상기 투여 대상은 인간을 포함하는 포유동물일 수 있다.
- [0082] 본 명세서에서 달리 정의되지 않은 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상적으로 사용되는 의미를 갖는다.
- [0083] 본 발명의 조성물은 허혈성 질환의 예방 또는 치료에 사용되는 경우, 본 발명의 조성물은 단독의 요법으로 이용될 수 있으나, 다른 통상적인 화학 요법 또는 물리적 수술 요법과 함께 이용될 수도 있으며, 이러한 병행 요법을 실시하는 경우에는 보다 효과적으로 허혈성 질환을 치료할 수 있다.
- [0084] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.
- [0085] **[실시예]**
- [0086] **실시예 1. 줄기세포 응집체의 형성**
- [0087] **1-1. 줄기세포의 평판 배양**
- [0088] 본 발명의 줄기세포 응집체를 얻기 위하여, 론자(Lonza)사에서 구매한 골수유래 중간엽 줄기세포(Mesenchymal Stem Cells, MSC)를 이용하였다.
- [0089] 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cells; MSCs)는 흔히 중간엽 기질세포(mesenchymal stromal cells)라고 불리기도 하는데, 골수(bone marrow; BM)에 존재하지만 결합 조직의 항상성을 유지하기 위하여 이동 신호에 반응하여 순환계로 방출된다. 최근에 중간엽 줄기세포는 조직 재생, 혈액 생성보조(hematopoietic support) 및 면역 조절(immunomodulation)을 포함하는 다방면의 기능성 때문에 세포 및 면역 치료 분야에서 폭넓은 관심을 받고 있다(Minguell JJ et al., Exp Biol Med, 226:507-520(2001); Caplan AI et al., Trend Mol Med, 7:259-264(2001); Tocci A et al., Hematol J., 4:92-96(2003)).
- [0090] 상기 구입한 중간엽 줄기세포는 기본 배지인  $\alpha$ -MEM (alpha Minum Essential Medium, Invitrogen) 배지에 10%

우태아혈청(GIBCO), 50 IU/ml 페니실린 및 50 mg/ml 스트렙토마이신(Invitrogen)이 첨가된,  $\alpha$ -MEM 영양 배지를 이용하여 평판 배양하였다.

**[0091] 1-2. 평판 배양된 줄기세포에서 단일 세포의 분리**

**[0092]** 상기 실시예 1-1에서 평판 배양된 중간엽 줄기세포가 배양 디쉬의 80-90%를 채우면 영양 배지를 제거하고 DPBS(Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, 칼슘 및 마그네슘 미포함)로 씻어주었다. 이후, 단일 세포 분리를 위해 0.25% 트립신/EDTA(GIBCO)를 처리하여 37°C, CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 30초 동안 정치하였으며, 0.25% 트립신/EDTA를 불활성화시키기 위해 10% 우태아혈청이 포함된  $\alpha$ -MEM 배양 배지를 처리한 다음, 1200 rpm에서 5분간 원심분리를 수행하여 세포를 침전시켰다. 원심분리 후 상등액을 제거하고 아래에 가라 앉은 세포에 다른 첨가물이 전혀 포함되지 않은 무첨가 기본 배지인  $\alpha$ -MEM 배지를 넣어 혼탁시키고, 다시 원심분리기를 이용하여 1200rpm, 5분간 세포를 침전시켰으며, 상기 과정을 1-2회 반복하여 세포 내에 잔류하는 남은 우태아혈청을 완전히 제거하였다. 이를 통해 평판 배양되어 디쉬에 부착되어있던 줄기세포를 단일 세포로 분리하였다.

**[0093] 1-3. 단일 세포를 포함하는 세포 드롭(drop)의 형성**

**[0094]** 상기 실시예 1-2에서 원심분리를 통해 침전된 세포에 무첨가 기본 배지인  $\alpha$ -MEM 배지를 첨가하여 혼탁시킨 후, 한 드롭 당 1000개 세포/20  $\mu$ l가 들어가는 세포 드롭을 제작하였다.

**[0095]** 비교 대조군으로는 hEBM (human Embryonic body medium; DMEM/F-12(Invitrogen) 배지에 20% KOSR (Knock out serum replacement, Invitrogen), 0.1 mmol/l,  $\beta$ -말캅토에탄올(Sigma), 1% 비필수아미노산(Invitrogen), 50 IU/ml 페니실린 및 50 mg/ml 스트렙토마이신(Invitrogen)이 포함된, hEBM 영양 배지를 이용하여 한 드롭 당 1000개 세포/20  $\mu$ l가 들어가는 세포 드롭을 제작하였다.

**[0096]** 이로써, 혈청 및 기타 다른 영양성분이 포함되어 있지 않은 무첨가 기본 배지( $\alpha$ -MEM) 내에 단일 세포가 포함된 세포 드롭, 및 혈청 대체물 및 기타 다른 영양성분이 포함된 영양 배지(hEBM) 내에 단일 세포가 포함된 세포 드롭을 제작하였다.

**[0097] 1-4. 줄기세포 응집체의 형성**

**[0098]** 상기 실시예 1-3에서 제작된 각각의 세포 드롭(drop)을 37°C, CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 1, 6, 24, 48 및 72 시간 동안 부유 배양(suspension culture)하고, 각 시간대별로 광학 현미경(NIKON)을 이용하여 배양액 내 세포 응집체의 형성 유무를 관찰하였다.

**[0099]** 그 결과, 기본 배지인  $\alpha$ -MEM 배지 내 세포 드롭을 배양한 세포 배양액 및 영양 배지인 hEBM 배지 내 세포 드롭을 배양한 세포 배양액 모두에서 24시간 이후부터 완전한 구형의 세포 응집체가 형성되어 유지됨을 확인하였다(도 1).

**[0100] 실시예 2. 줄기세포 응집체의 부유 배양액 내 혈관 신생 인자의 양 측정**

**[0101]** 상기 실시예 1에서 제작된 각각의 세포 드롭을 1, 6, 24, 48 및 72 시간 동안 배양한 세포 배양액에서, 세포를 제외한 세포 배양 상등액을 회수하여 분비된 인간 혈관내피세포 성장인자 A(Vascularendothelial growth factor A, VEGF A) 및 인간 간세포 성장인자(Hepatocyte growth factor, HGF)의 양을 측정하였다.

**[0102]** 이를 위해, ELISA KIT(R&D system)을 이용하였으며, 구체적인 방법은 하기와 같다. 각각의 배지에서 얻어진 세포 배양 상등액과 각 성장인자(VEGF A, HGF)의 표준용액을 각각의 성장인자에 대한 항체(R&D system)가 코팅되어 있는 웰에 100  $\mu$ l씩 넣고 상온에서 2시간 방치하였다. 항원항체 결합반응이 끝난 뒤 각 웰을 세척액으로 4회 세척하고 각 성장인자의 이차 항체(R&D system)가 결합된 용액 200  $\mu$ l를 넣어준 뒤 상온에서 2시간 방치하였다. 이차항체 결합반응이 끝난 뒤 각 웰을 세척액으로 4회 세척하고 발색시약 200  $\mu$ l(R&D system)를 넣은 다음 450 nm에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하였다.

**[0103]** 그 결과, 24 시간대를 기준으로 보았을 때 배양 상등액 내 혈관 신생 인자의 양이 영양 배지에 포함되어 부유

배양된 세포 응집체와 비교하여 무첨가 기본 배지에 포함되어 부유 배양된 세포 응집체에서 hVEGF는 약 2배, hHGF는 10배 이상 더 많이 분비되는 것을 관찰하였다(도 2).

**[0104] 실시예 3. 줄기세포 응집체의 심근 조직 내 이식 및 생착 관찰**

[0105] 상기 실시예 2에서 얻어진 세포 배양액에서 배양 상등액을 제거하고 수득한 세포 응집체를 허혈성 심혈관 래트 모델의 심장조직에 이식하고, 14일 후 심장 조직을 분리하고 현미경(Carl Zeiss)으로 조직 내 세포 생착을 관찰하였다.

[0106] 허혈성 심혈관 래트 모델이라 함은 심장의 관상동맥을 결찰시켜 허혈상태를 유도하여 만든 동물 허혈성 심혈관 질환 모델을 의미하고, 기존의 이식 방법인 중간엽 줄기세포를 단독 세포로 분리한 후 심장조직에 이식한 경우(도 3a)와 무첨가 기본 배지에서 24시간 동안 부유 배양을 통해 형성된 세포 응집체를 심장 조직에 이식한 경우(도 3b)에서 각각의 조직 내 세포 생착을 확인하였다.

[0107] 이식된 조직 내 세포 생착율을 계측하기 위하여, 기존의 이식 방법인 단일 세포와 본 발명의 방법에 의해 얻어진 세포 응집체 염색을 위하여 DiI로 염색 (염색된 세포가 적색으로 표시)한 다음 SD 래트의 좌심실 (Left ventricular wall)에 이식하였다.

[0108] 구체적으로, 래트를 에테르로 마취하고, 2% 이소플루란이 포함된 공기를 인공 호흡기를 통해 지속적으로 처치하였으며, 깊은 마취하에서 개흉하고(제3 늑간), 심낭을 핀셋으로 찢어, 심장을 노출시켰다. 노출된 심장에 30G의 바늘이 부착된 시린지로  $1 \times 10^5$  개의 단일 세포 및 세포 응집체가 포함된 생리 식염수 60  $\mu$ l를 주입하였다. 주사 바늘을 심첨부에서 심장 자유벽을 통과해 심기부 쪽으로 3mm 정도 밀어 주입하였으며, 이식 후 신속하게 폐흉하고, 자율 박동의 회복을 기다린 후 케이지로 돌려보냈다. 이식 14일 후, 심장을 관류 고정하여, 동결 절편을 제조하였으며, 각 조직 절편에서 핵 표지를 위하여 사이토스블루 (Sytox blue)로 염색(염색된 핵이 청색으로 표시)한 다음, 형광 현미경으로 관찰하였다(도 3).

[0109] 그 결과, 본 발명의 방법에 의해 제작된 세포 응집체가 이식된 조직의 경우(도 3b) 기존의 방법인 단독 세포가 이식된 경우(도 3a)에 비해 조직 내 남아 있는 세포가 현저히 많을 뿐 아니라, 기존 조직에 잘 융합되어 있음을 확인하였으며, 이를 통해 본 발명의 방법에 의해 제작된 줄기세포 응집체가 조직 내 생착률이 매우 우수함을 알 수 있다.

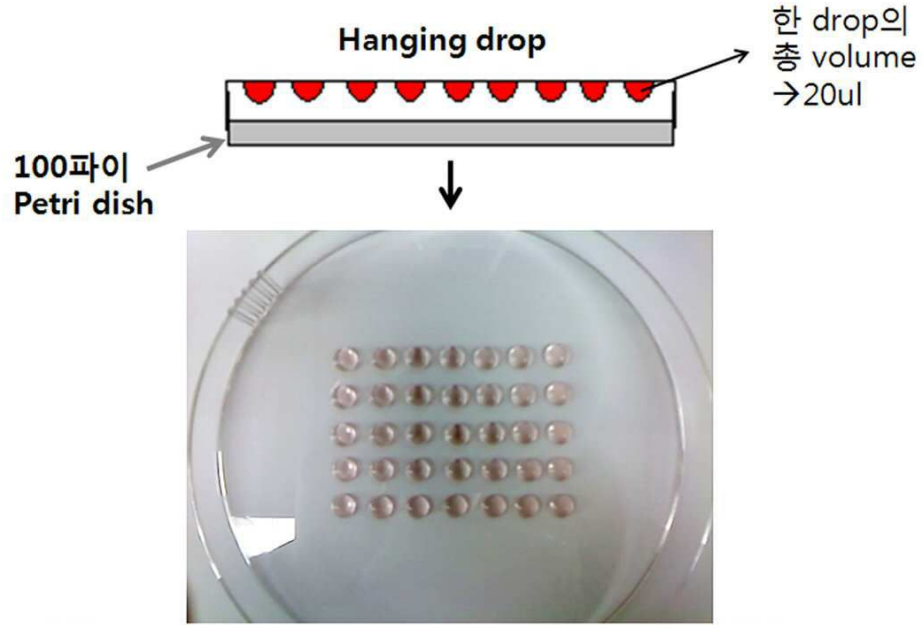
[0110] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.



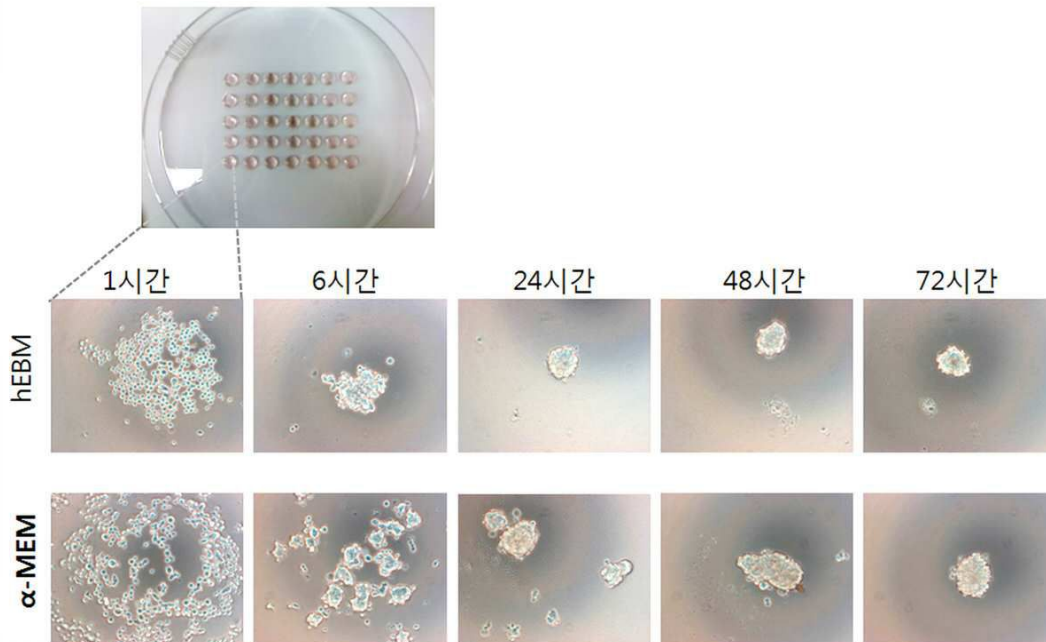
도면

도면1a

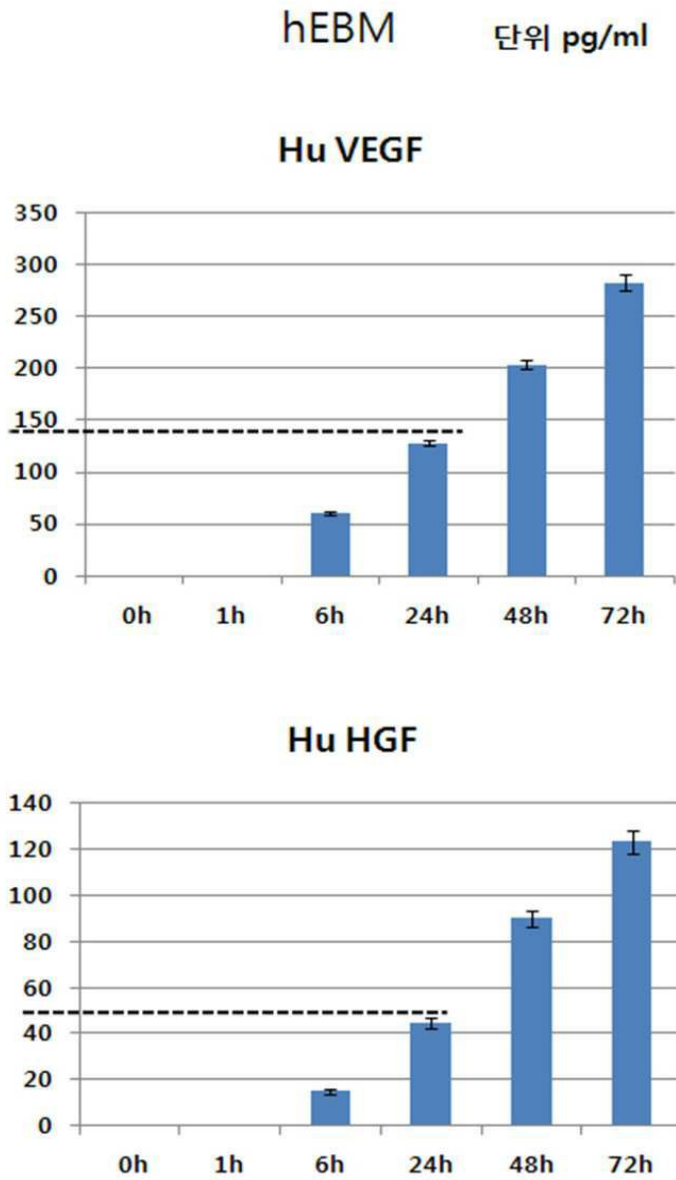
### 세포 드롭(Drop) 의 형태



도면1b



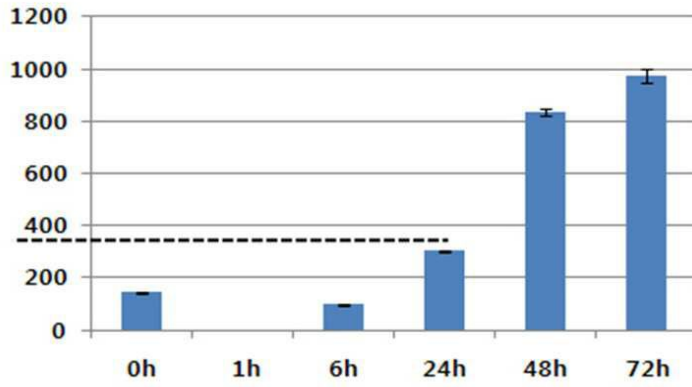
도면2a



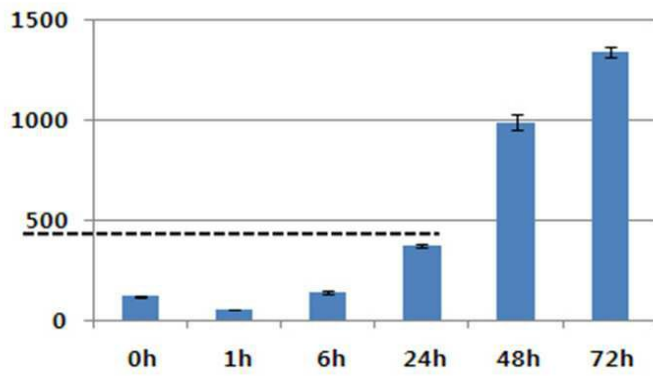
도면2b

**$\alpha$ -MEM**      단위 pg/ml

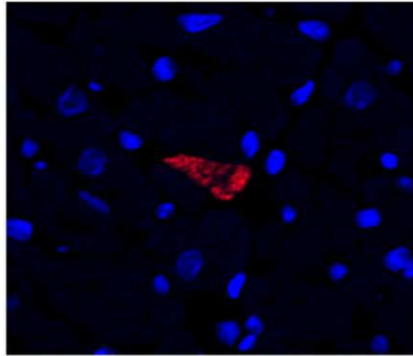
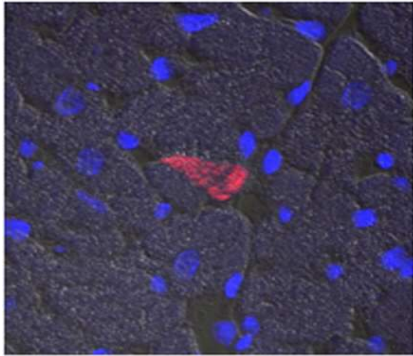
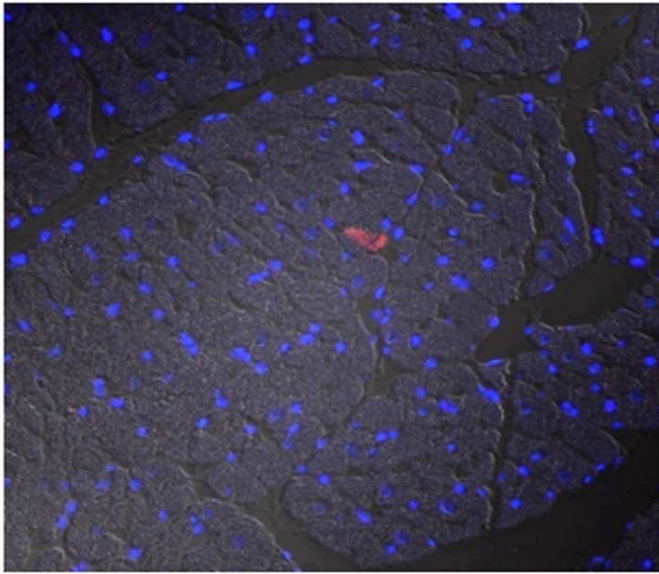
**Hu VEGF**



**Hu HGF**



도면3a



도면3b

