

명세서

발명의 명칭: 세포의 냉동제형

기술분야

- [1] 본 발명은 세포, 바람직하게는 줄기세포의 냉동제형에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 글루타치온을 유효성분으로 함유하여, 냉동보존된 줄기세포 등의 세포의 세포생존율을 현저히 향상시킬 수 있는 줄기세포의 냉동제형에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 줄기세포 등의 세포의 보관을 위해서는 냉동보존(cryopreservation) 방법이 통상적으로 이용된다. 세포는 기원, 채취 조직 및 체내 미세환경에 따라 생리학적 특성이 다르기 때문에, 각각의 세포를 냉동보존 할 때에도 대상 세포에 적합한 냉동보존방법이 적용되어야 한다. 특히 줄기세포의 경우는 고유의 특이적 분열 능력과 분화능력을 유지하기 위해 최적화된 냉동보존 조건이 요구되며, 보관 직후 세포치료제로서 활용될 수 있기 때문에 저독성의 보존액을 사용하는 것이 필수적이다. 줄기세포의 냉동보존을 위한 효과적인 기술을 개발하는 것은 줄기세포 은행수립을 위한 중요한 단계이기도 하다. 냉동보존(cryopreservation)은 보통 -80°C 에서 -196°C 의 초저온에서 샘플을 냉동저장하여 세포기능을 유지시키는 방법으로, 세포의 장거리 운송 및 장기간 저장을 가능하게 하는 방법이다.
- [4] 냉동 보존제(cryoprotective agents)는 냉동 및 해동과정에서 발생하는 물리적 및 화학적인 세포손상을 감소시켜 해동한 후의 세포생존도를 향상시킨다. 일반적으로 10%(v/v) 디메틸 술피록사이드[*dimethyl sulfoxide*, DMSO] 및 90%(v/v) FBS로 이루어진 냉동보존제(CPA)를 세포의 냉동보존에 사용한다. 상기 배합은 여러 종류의 줄기세포에 널리 사용되어 왔다. 그러나 DMSO와 FBS를 사용하는 방법은 많은 단점들을 가지고 있다. 예를 들어, 또한, 동결보존제 내의 혈청(FBS 등)은 감염이나 면역반응 등을 나타낼 수 있다(Kocaoemer *et al.*, *Stem Cells*, 25:1270-1278, 2007). 특히, 구성성분이 일정하지 않은 혼합물로서, 사람을 포함한 동물에서 얻게 되므로 매번 생산될 때마다 그 구성성분의 비율이 달라질 수 있어 실험용도의 사용뿐 아니라 산업적 사용에 있어서도 다양한 문제를 야기하고 있다. 따라서, 혈청의 사용을 최소화하거나 또는 아예 혈청이 없는 무혈청 배지를 사용하는 것이 바람직하다. 따라서 냉동보존된 세포의 임상 적용을 위해서 승인된 물질과 동물 유래가 아닌 생물학적 재료를 포함하는 명확한 냉동보존제의 사용이 필요하다.
- [5] 아울러, 탈수, 산소 유리 라디칼의 형성 및 세포사멸사(apoptosis)는 냉동 중 또는 후에 세포생존도를 감소시키는 주요한 원인이다. 수크로스 및 트레할로스와 같은 이당류는 비독성 천연 냉동보존제이자 냉동건조를 위한 첨가제 및 탈수 중에 세포막 안정제로서 널리 사용되어 왔다. 퍼옥사이드 라디칼(peroxide radical)

은 지질과산화, 단백질 산화 및 DNA 손상과 같은 산화적 손상을 세포에 일으킨다.

- [6] 이에, 본 발명에서는 세포, 바람직하게는 줄기세포의 냉동 보존 중 퍼옥사이드 라디칼에 의한 세포생존도 감소를 최소화할 수 있는 줄기세포 등의 세포의 냉동 제형을 개발하고자 예의 노력한 결과, 글루타치온을 함유하는 냉동제형을 이용하여 줄기세포 등의 세포를 냉동보관하는 경우, 해동 후 세포생존율이 현저히 증가하는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

[7]

[8] **발명의 요약**

- [9] 본 발명의 목적은 세포, 바람직하게는 줄기세포의 냉동 보관 후 해동 시에 세포 생존율을 현저히 향상시킬 수 있는 세포의 냉동제형을 제공하는데 있다.

- [10] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 글루타치온과 줄기세포를 함유하는 세포, 바람직하게는 줄기세포의 냉동제형을 제공한다.

[11]

도면의 간단한 설명

- [12] 도 1은 줄기세포 냉동제형을 위한 항산화제를 스크리닝한 결과를 나타낸 것이다.

- [13] 도 2는 줄기세포 냉동제형을 위한 글루타치온의 농도 최적화 결과를 나타낸 것이다.

- [14] 도 3은 본 발명에 따른 냉동제형(4)을 이용하여 줄기세포를 저농도(5×10^5 세포/ $500\mu\text{l}$)으로 1주일간 동결시킨 후, 해동하여 4시간 및 8시간 배양하여 세포 생존율을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

- [15] 도 4는 본 발명에 따른 냉동제형(4)을 이용하여 줄기세포를 고농도(5×10^6 세포/ $100\mu\text{l}$)으로 1주일간 동결시킨 후, 해동하여 4시간 및 8시간 배양하여 세포 생존율을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

- [16] 도 5는 본 발명에 따른 냉동제형(EN001 현탁화제)을 이용하여 줄기세포를 1개월간 동결한 후, 해동하여 4시간 및 8시간 배양하여 세포생존율을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

- [17] 도 6은 본 발명에 따른 냉동제형(EN001 현탁화제)을 이용하여 줄기세포를 18개월간 동결한 후, 해동하여 배양 시간에 따른 세포 뭉침 현상(A) 및 세포생존율을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

- [18] 도 7은 본 발명에 따른 냉동제형을 사용하여, 태줄 유래 중간엽 줄기세포(WJ-MSC), 제대혈 유래 중간엽 줄기세포(UCB-MSC), 지방 유래 중간엽 줄기세포(AD-MSC), 태반 유래 중간엽 줄기세포(PL-MSC), 섬유아세포 및 뇌암세포주 H4를 동결 보관한 후, 각각 4°C 및 37°C 에서 해동하여 안정성을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

[19]

[20] **발명의 상세한 설명 및 바람직한 구현예**

[21] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명에서 달리 정의되지 않는 한, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[22] 본 발명에서는 세포, 바람직하게는 줄기세포의 냉동 보존 중 퍼옥사이드 라디칼에 의한 세포생존도 감소를 최소화할 수 있는 줄기세포 등의 세포의 냉동제형을 개발하고자, 여러 항산화제를 사용하여, 줄기세포를 동결시킨 후, 해동하여 세포생존율을 확인하였으며, 이들 항산화제 중 글루타치온을 함유하는 냉동제형으로 줄기세포를 냉동보관하는 경우, 해동 후 세포생존율이 현저히 증가하는 것을 확인하였다.

[23] 따라서, 본 발명은 글루타치온(glutathione)과 세포, 바람직하게는 줄기세포를 함유하는 세포의 냉동제형에 관한 것이다.

[24] 본 발명의 냉동제형은 기본 용액으로 하트만 용액을 사용하고, 인간 혈청 알부민 및 DMSO를 추가로 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[25] 본 발명에 있어서, 상기 글루타치온은 50~1000 μ M 농도로 포함될 수 있으며, 바람직하게는 50~500 μ M 농도로 포함될 수 있으며, 더욱 바람직하게는 50~200 μ M 농도로 포함될 수 있으며, 더 더욱 바람직하게는 60~150 μ M 농도로 포함될 수 있다.

[26] 본 발명에 있어서, 상기 인간 혈청 알부민은 1~30% 농도로 포함되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[27] 본 발명에 있어서, 상기 DMSO는 0.5~30% 농도로 포함되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[28] 본 발명에 있어서, 상기 세포, 바람직하게는 줄기세포는 $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ cell/mL 농도로 포함되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[29] 본 발명에 있어서, 상기 하트만 용액은 0.1~0.5 g/L의 염화칼슘, 0.1~0.8 g/L의 염화칼륨, 2~10 g/L의 염화나트륨 및 1~5g/L의 락트산나트륨(sodium lactate)을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있으며, 바람직하게는 0.27 g/L의 염화칼슘, 0.4 g/L의 염화칼륨, 6 g/L의 염화나트륨 및 3.22 g/L의 락트산나트륨(sodium lactate)을 포함할 수 있다.

[30]

[31] [실시예]

[32] 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 해석되지 않는 것은 해당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[33]

- [34] 실시예 1: 줄기세포의 냉동제형을 위한 항산화제 스크리닝
- [35] 본 발명의 실시예에서는 제대혈 유래 중간엽 줄기세포를 사용하여, 줄기세포에 대한 냉동제형을 확립하였다.
- [36] 제대 중간엽줄기세포(Wharton's Jelly-mesenchymal stem cell, WJ-MSC)는 삼성서울병원에서 승인한 IRB (IRB# 2015-09-023-003)의 기준에 따라 삼성서울병원 산부인과와의 협업 연구를 통하여 탯줄 및 태반을 확보한 후 탯줄 유래 중간엽 줄기세포(WJ-MSC)는 PARK 등의 방법(*Arch. Pharm. Res.* 39: 1171-1179, 2016)에 따라 분리된 탯줄로부터 분리하였다. 구체적으로, 탯줄을 3-4 cm 길이로 잘라내고, 조직을 잘게 자르고 콜라게나아제 용액(Gibco, USA)을 이용하여 세포외기질을 분해하기 위해 60-90 분 동안 처리 해준 다음, 0.25% 트립신(Gibco, USA)을 추가하여 30분 동안, 37°C에서 분해를 더 유도하였다. 이후, 소태아혈청(FBS; Biowest, USA)을 첨가하여, 1000g에서 10분 동안 원심분리를 이용하여 세포를 얻고, 10% FBS(fetal bovine serum, Invitrogen-Gibco) 및 50 µg/mL 젠타마이신(Invitrogen-Gibco)이 포함되어 있는 MEM Alpha(Minimum Essential Medium, Invitrogen-Gibco, Rockville, MD) 배지를 이용하여 37°C, 5% CO₂ 환경에서 세포를 배양한 인간 탯줄 유래 중간엽 줄기세포(WJ-MSC)를 실험에 사용하였다.
- [37] 일반적인 줄기세포의 냉동제형은 기본 용액이 되는 링거용액과 동결보존제로 DMSO를 사용하고, 인간 혈청 알부민을 사용한다(표 1).
- [38] [표1]

일반적인 냉동제형의 조성

	성분	역할
1	링거용액 (ringer's solution)	기본 용액
2	DMSO	동결보존(cryopreservation)
3	인간 혈청 알부민 (Human Serum Albumin, HSA)	동결보존 및 세포 회복(cell recovery) (FBS 대체제)
4	항산화제(Anti-oxidant)	세포 회복

- [39] 본 실시예에서는 항산화제 줄기세포의 냉동 보존 중 퍼옥사이드 라디칼에 의한 세포생존도 감소를 최소화할 수 있는 항산화제를 선별하기 위하여, 항산화제로, 아세타도트(acetadote), 퍼설파티아민 하이드로클로라이드(fursultiamine hydrochloride), 비타민 C(Vitamin C) 및 글루타치온(Glutation)을 사용하여, WJ-MSC를 96 웰 플레이트에 1x10⁴ 개 세포를 시딩하여 24시간 배양한 후, CCK-8 어레이를 통해 항산화제가 WJ-MSCs의 세포생존율에 미치는 영향을 확인하였다.
- [40] 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, 항산화제로 글루타치온을 사용한 경우, 세포생존율이 가장 높았으며, 세포증식이 오히려 증가한 것을 확인하였다.
- [41]
- [42] 실시예 2: 냉동제형의 글루타치온의 최적 농도 확인

- [43] 냉동제형에서 글루타치온의 최적 농도를 결정하기 위하여, WJ-MSC에 과산화수소(H_2O_2)를 각각 $0\mu\text{M}$, $10\mu\text{M}$, $50\mu\text{M}$ 및 $100\mu\text{M}$ 를 처리하여 활성산소종에 의한 스트레스를 유도하고, 글루타치온을 $0\mu\text{M}$, $10\mu\text{M}$, $50\mu\text{M}$ 및 $100\mu\text{M}$ 로 처리하여, 세포회복(cell recovery)이 일어나는 지를 CCK-8 어세이를 이용하여 확인하였다.
- [44] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 글루타치온을 $100\mu\text{M}$ 사용하였을 때 가장 높은 세포생존율을 확인하였으며, 냉동제형에는 $100\mu\text{M}$ 농도로 글루타치온을 사용하도록 결정하였다.
- [45]
- [46] 실시예 3: 줄기세포의 냉동제형의 생존율 확인
- [47] 줄기세포 냉동제형에 적합한 최적의 링거용액(Ringer's solution) 선별하기 위하여, 기성품 동결제형 CS5(시그마, USA), CS10(시그마, USA) 을 대조군으로 하고, DSL 1:2:3 용액(씨제이헬스케어)와 하트만 용액(Hartmann solution, 이노엔)을 기본 용액으로 사용하였을 때의 단기안정성을 확인하였다.
- [48] 저농도(5×10^5 세포/ $500\mu\text{l}$)로 1주일간 동결보관된 WJ-MSC를 각각 4°C 와 37°C 에서 해동한 후, 4시간 및 8시간 두었을 때, 세포생존율을 측정하였다.
- [49] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, H+HSA+G+DMSO 조건(하트만 용액 + 사람 혈청 알부민 + 글루타치온 +DMSO)을 냉동제형으로 사용하였을 때 가장 높은 세포생존율을 나타내었다.
- [50] 아울러, 고농도(5×10^6 세포/ $100\mu\text{l}$)로 1주일간 동결보관된 WJ-MSC를 각각 4°C 와 37°C 에서 해동한 후, 4시간 및 8시간 두었을 때, 세포생존율을 측정하였다.
- [51] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 고농도 줄기세포를 사용하였을 때에도, H+HSA+G+DMSO 조건의 냉동제형에서 가장 높은 세포생존율을 나타내었다.
- [52] 따라서, 본 발명에 따른 세포, 바람직하게는 줄기세포 냉동제형은 하트만 용액(Hartmann solution, 이노엔)에 인간 혈청 알부민(HSA), 글루타치온 및 DMSO를 포함하는 제형으로 결정하였으며, "EN001 현탁화제"로 명명하였다.
- [53]
- [54] 실시예 4: 줄기세포의 냉동제형의 안정성 확인
- [55] 시판 냉동제제인 CS5(시그마, USA) 및 CS10(시그마, USA)와 FBS와 DMSO를 포함하는 냉동제형을 사용하여, 본 발명의 줄기세포 냉동제형인 "EN001 현탁화제"와 비교하여 단기안정성을 확인하였다.
- [56] 각 냉동제형에서 1개월간 세포를 동결보존 한 후, 각각 4°C 와 37°C 에서 해동한 후, 4시간 및 8시간 두었을 때의 세포생존율을 측정하였다.
- [57] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 냉동제형을 사용하였을 때 가장 높은 세포생존율을 나타내었다.
- [58] 아울러, 본 발명의 줄기세포 냉동제형인 "EN001 현탁화제"에서 18개월 동안 동결보관한 후, 해동하여, 단일세포와 세포뭉침(clumping) 비율을 확인하였으며, 세포생존율을 확인하였다.

[59] 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이, 본 발명의 줄기세포 냉동제형인 "EN001 현탁 화제"를 사용하였을 때, 세포몽침 발생률이 현저히 낮았으며(A), 세포생존율(B) 또한 80% 이상 유지되는 것을 확인하였다.

[60]

[61] 실시예 5: 줄기세포 냉동제형의 확장성 확인

[62] 본 발명에 따른 냉동제형을 사용하여, 탯줄 유래 중간엽 줄기세포(WJ-MSC) 뿐만 아니라, 제대혈 유래 중간엽 줄기세포(UCB-MSC), 지방 유래 중간엽 줄기세포(AD-MSC), 태반 유래 중간엽 줄기세포(PL-MSC), 섬유아세포 및 뇌암세포주 H4를 1개월간 동결 보관한 후, 각각 4°C 및 37°C에서 해동하여 안정성을 확인하였다.

[63] 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이, 4°C에서 해동하는 경우 사용한 모든 종류의 세포에서 높은 세포생존율을 나타내었다.

[64]

산업상 이용가능성

[65] 본 발명에 따르면, 줄기세포 등의 냉동 후 해동 시에 세포생존율을 향상시킬 수 있어, 줄기세포 등의 세포 치료제의 보관 및 운송과정에서 발생할 수 있는 치료 효율의 저하를 방지할 수 있다.

[66]

[67] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시태양일 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.

청구범위

- [청구항 1] 글루타치온(glutathione)과 세포를 함유하는 세포의 냉동제형.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 하트만 용액, 인간 혈청 알부민 및 DMSO를 추가로 포함하는 세포의 냉동제형.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 글루타치온은 50~1000 μ M 농도로 포함되는 것을 특징으로 하는 세포의 냉동제형.
- [청구항 4] 제2항에 있어서, 상기 인간 혈청 알부민은 1~30% 농도로 포함되는 것을 특징으로 하는 세포의 냉동제형.
- [청구항 5] 제2항에 있어서, 상기 DMSO는 0.5~30% 농도로 포함되는 것을 특징으로 하는 세포의 냉동제형.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 세포는 줄기세포인 것을 특징으로 하는 세포의 냉동제형.
- [청구항 7] 제6항에 있어서, 상기 줄기세포는 $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ cell/mL 농도로 포함되는 것을 특징으로 하는 세포의 냉동제형.
- [청구항 8] 제2항에 있어서, 상기 하트만 용액은 0.1~0.5 g/L의 염화칼슘, 0.1~0.8 g/L의 염화칼륨, 2~10 g/L의 염화나트륨 및 1~5g/L의 락트산나트륨(sodium lactate)을 포함하는 것을 특징으로 하는 세포의 냉동제형.