

명세서

발명의 명칭: 인간 만능줄기세포로부터 중간엽 줄기세포의 제조방법 및 이에 의해 제조된 중간엽 줄기세포

기술분야

- [1] 본 발명은 인간 만능줄기세포로부터 중간엽 줄기세포의 제조방법에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 무이종 (xeno-free), 무혈청 (serum-free)의 중간엽 줄기세포 제조 환경 및 구상체 형태의 배아체를 이용한 균일한 모양과 크기의 성숙 배아체 형성을 통해 안전성이 증대되고, 다수의 계대배양 후에도 중간엽 줄기세포의 특성이 장기간 유지되는 중간엽 줄기세포를 제조하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 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 세포 분열에 의해 자신과 동일한 세포를 복제(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.
- [3] 줄기세포는 그 분화능에 따라 만능(pluripotency), 다분화능(multipotency) 및 단분화능(unipotency) 줄기세포로 나눌 수 있다. 만능줄기세포(pluripotent stem cells)는 모든 세포로 분화될 수 있는 잠재력을 지닌 만능(pluripotency)의 세포로서 배아줄기세포 (embryonic stem cell, ESC) 및 유도만능줄기세포(induced pluripotent stem cells, iPSC) 등이 이에 해당된다. 다분화능 및/또는 단분화능 줄기세포로는 성체줄기세포를 예로 들 수 있다.
- [4] 배아줄기세포는 배아발생 초기인 포배기(blastocyst)의 세포내괴(inner cell mass)로부터 형성되며, 모든 세포로 분화 가능한 잠재력을 가지고 있어 어떠한 조직 세포로도 분화될 수 있으며, 또한 사멸하지 않고(immortal) 미분화 상태에서 배양 가능하며, 성체줄기세포와 달리 생식 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).
- [5] 인간 배아줄기세포는 인간 배아 형성시 세포내괴만을 분리하여 배양함으로써 제조되는데, 현재 전 세계적으로 만들어진 인간 배아줄기세포는 불임시술 뒤 남은 냉동배아로부터 얻어진 것이다. 모든 세포로 분화될 수 있는 만능을 가진 인간 배아줄기세포를 세포치료제로 이용하기 위한 다양한 시도가 이루어져 왔지만 아직 암발생의 위험과 면역거부반응의 높은 벽을 완전히 제어하지

못하고 있는 실정이다.

- [6] 한편, 만능줄기세포의 개념으로 포함되고 있는 유도만능줄기세포(iPSC)는 분화가 끝난 성체세포를 여러 가지 방법으로 역분화시켜, 분화 초기 단계인 만능줄기세포로의 상태로 회귀시킨 세포이다. 현재까지 역분화 세포는 유전자 발현과 분화능에서 만능줄기세포인 배아줄기세포와 거의 동일한 성격을 나타내는 것으로 보고되어 있다. 하지만 이러한 iPSC의 경우도 자가 세포를 이용하여 면역거부반응의 위험성은 배제할 수 있으나, 암 발생의 위험성은 여전히 해결해야 할 과제로 남아있다.
- [7] 이러한 문제점을 극복하기 위한 대안으로 면역조절기능과 함께 암발생의 위험성이 없는 중간엽 줄기세포가 제시되고 있다. 중간엽 줄기세포는 지방세포, 골세포, 연골세포, 근육세포, 신경세포, 심근세포 등으로의 분화가 가능한 다능성을 가진 세포로 면역 반응을 조절하는 기능도 가지고 있는 것으로 보고되어 있다. 중간엽 줄기세포는 다양한 조직에서 분리 및 배양이 가능하나 각 기원에 따른 능력 및 세포표면 표지자가 조금씩 다르기 때문에 중간엽 줄기세포를 명확히 정의하는 것은 용이하지 아니하다. 다만 골세포, 연골세포, 근육세포로 분화가 가능하며, 소용돌이(spindle) 모양의 형태를 가지고, 기본적인 세포표면 표지자인 세포표면 표지자인 CD73(+), CD105(+), CD34(-) 및 CD45(-)를 발현하는 경우 일반적으로 중간엽 줄기세포로 규정하고 있다.
- [8] 또한, 중간엽 줄기세포가 세포치료제로 이용되기 위해서는 재생의학 및/또는 세포치료분야에서 요구되는 최소 세포수(약 1×10^6 정도)를 만족시켜야 하는데, 적정조건을 잡고 기준을 정하는 실험까지 고려한다면 필요한 세포수는 더욱 늘어나게 된다. 따라서 기존의 다양한 기원의 중간엽 줄기세포로부터 이 정도의 양을 공급하려면 in vitro(시험관내) 실험에서 최소 10번 정도의 계대가 필요하게 되며, 이 경우 세포가 노화되고 변형되어 더 이상 세포치료제로서의 목적을 달성하기에는 적합하지 않을 수 있다. 결국 임상에 적용되는 세포와 품질평가 진행 세포가 달라질 수밖에 없어 사후 검증 형태의 과정으로 일어나는 위험을 배제할 수 없는 단점을 가지고 있다. 따라서, 세포치료제로 이용하기 위해서는 장기간 계대배양이 반복되어도 변형되지 않고 중간엽 줄기세포의 특성을 유지하는 것이 중요하다.
- [9] 이러한 성체 유래 중간엽 줄기세포의 대안으로, 인간 만능줄기세포에서 중간엽 줄기세포로의 분화 유도방법이 제시되고 있다. 그러나, 현재까지 알려진 방법은 많은 비용이 소요되며, 농도 조절이 필요한 특정 사이토카인(예를 들어 BMP)에 의한 유도과정 또는 xeno pathogen의 위험이 있는 이종 영양세포(xeno feeder)의 유도, 우혈청 (Fetal Bovine Serum, FBS)의 사용 등의 단점을 내포하고 있다. 종래의 인간 만능줄기세포에서 중간엽 줄기세포로의 분화 유도방법(WO 2011052818)은 인간 만능줄기세포의 배양시 xeno pathogen의 문제가 될 수 있는 이종 영양세포(xeno feeder) 위에서 배양하므로 영양세포의 사용을 통한 외래 세포의 유입 가능성이 있다. 또한, 만능줄기세포 배양시 우혈청 또는

우태아혈청(fetal calf serum) 등과 같은 동물 유래 혈청의 사용으로 인한 인수공통 감염증 우려로 향후 세포치료제 개발시 외래 동물 혈청을 사용하지 않는 무이종 및 무혈청(xeno-free & serum-free) 배양법의 개선이 요구된다.

- [10] 이에, 본 발명자들은 인간 만능줄기세포로부터 분화 유도된 중간엽 줄기세포를 세포치료제로 상용화시키기 위해 줄기세포의 안전성 및 대량생산 문제를 해결하고자 예의 노력한 결과, 무이종 및 무혈청(xeno-free & serum-free) 배양 환경을 통해 세포의 안전성을 극대화하고, 구상체 형태의 배아체를 이용하여 균일한 모양과 크기의 성숙 배아체를 형성시켜 이로부터 분화 유도된 중간엽 줄기세포가 반복 계대배양 후에도 중간엽 줄기세포 특성을 장기간 유지하는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [11] 본 발명의 목적은 외래 세포 및 외래 동물성 유래 물질의 오염으로 인한 안전성이 개선되고, 반복 계대배양 후에도 중간엽 줄기세포 특성이 장기간 유지되는 중간엽 줄기세포의 제조를 통해 세포치료제로 이용 가능한 인간 만능줄기세포로부터 중간엽 줄기세포를 제조하는 방법을 제공하는데 있다.
- [12] 본 발명의 다른 목적은 상기 방법에 의해 제조된 중간엽 줄기세포 및 이를 이용한 세포치료제를 제공하는데 있다.

기술적 해결방법

- [13] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은,
- [14] (a) 인간 만능줄기세포를 이종 영양세포 (xeno feeder cell) 없이 무혈청 만능줄기세포 배양 배지에서 배양하여 인간 만능줄기세포의 콜로니를 얻고, 상기 콜로니로부터 인간 만능줄기세포를 단리(isolation)하는 단계;
- [15] (b) 단리(isolation)된 만능줄기세포를 배아체 형성 배지에 현탁한 후 만능줄기세포가 응집되도록 배양하여 단일의 구상체 형태의 배아체를 형성시키는 단계;
- [16] (c) 상기 배아체를 배아체 성숙 배지에서 부유배양하여 성숙 배아체를 형성시키는 단계;
- [17] (d) 상기 배아체를 무이종 (xeno-free), 무혈청의 중간엽 줄기세포 배양 배지에서 부착 배양시켜 중간엽 줄기세포로 분화를 유도하는 단계; 및
- [18] (e) 상기 분화된 중간엽 줄기세포를 무이종 (xeno-free), 무혈청의 중간엽 줄기세포 배양 배지에서 중간엽 줄기세포의 동일성을 유지하면서 증식 및 배양하는 단계를 포함하는 인간 만능줄기세포로부터 장기간의 계대배양 안정성을 유지하는 중간엽 줄기세포를 제조하는 방법을 제공한다.
- [19] 본 발명은 또한, 상기 방법에 의해 제조된 인간 만능줄기세포로부터 분화 유도된 중간엽 줄기세포 및 상기 중간엽 줄기세포를 포함하는 세포치료제를 제공한다.

도면의 간단한 설명

- [20] 도 1은 기존의 만능줄기세포 유래 중간엽 줄기세포의 제조방법 (WO 2011052818)과 본 발명의 개량된 만능줄기세포 유래 중간엽 줄기세포의 제조방법을 비교한 도식도이다.
 - [21] 도 2는 인간 만능줄기세포를 이중 영양세포 (xeno feeder cell) 없이 무혈청 만능줄기세포 배양 배지에서 배양하여 얻은 인간 만능줄기세포의 콜로니를 (A) $200\mu\text{m} \times 200\mu\text{m}$ 의 크기로 균일하게 조각낸 후 (B) 단리(isolation)한 세포 형태를 나타낸 것이다.
 - [22] 도 3은 무영양세포, 무이종 및 무혈청 환경에서 배양된 만능줄기세포의 특성을 분석하기 위해 만능성 마커인 OCT-4 및 SSEA-4의 면역형광염색을 수행한 결과를 보여준다.
 - [23] 도 4는 기존의 제조방법 (WO 2011052818)으로 제조된 배아체와 본 발명의 개량 방법으로 제조된 배아체의 크기 및 형태를 비교한 것이다.
 - [24] 도 5는 기존의 제조방법 (WO 2011052818)으로 제조된 배아체 및 본 발명의 개량 방법으로 제조된 배아체에서 중간엽 줄기세포로의 분화 효율 및 세포모양을 비교한 것이다.
 - [25] 도 6은 무영양세포, 무이종 및 무혈청 환경에서 배양된 만능줄기세포 유래 중간엽 줄기세포의 세포표면 마커 발현 분석 결과를 보여준다.
 - [26] 도 7은 무영양세포, 무이종 및 무혈청 환경에서 배양된 만능줄기세포 유래 중간엽 줄기세포의 분화능 분석 결과를 보여준다.
 - [27] 도 8은 무영양세포, 무이종 및 무혈청 환경에서 배양된 만능줄기세포 유래 중간엽 줄기세포의 G-밴드 핵형 (G-band karyotype) 분석 결과를 보여준다.
 - [28] 도 9는 기존의 만능줄기세포 유래 중간엽 줄기세포의 제조방법 (WO 2011052818)으로 제조된 만능줄기세포 유래 중간엽 줄기세포와 본 발명의 개량된 만능줄기세포 유래 중간엽 줄기세포의 제조방법으로 제조된 만능줄기세포 유래 중간엽 줄기세포의 7 세대 및 12 세대 세포 형태를 비교한 것이다.
 - [29] 도 10은 기존의 만능줄기세포 유래 중간엽 줄기세포의 제조방법 (WO 2011052818)과 본 발명의 개량된 만능줄기세포 유래 중간엽 줄기세포의 골세포, 연골세포, 지방세포로의 분화능을 확인한 것이다.
 - [30] 도 11은 무영양세포, 무이종 및 무혈청 환경에서 성숙 배아체 형성 단계를 거쳐 배양된 (A) 서양인의 배아줄기세포 및 (B) 동양인의 유도만능줄기세포 유래 중간엽 줄기세포 제조방법에 대한 모식도이다.
 - [31] 도 12는 무영양세포, 무이종 및 무혈청 환경에서 배양된 (A) 서양인의 배아줄기세포 및 (B) 동양인의 유도만능줄기세포의 만능성을 분석한 것이다.
- 발명의 실시를 위한 형태**
- [32] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적

용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

- [33] 본 발명의 용어 "줄기세포"는 조직 및 기관의 특수화된 세포를 형성하도록 비제한적으로 재생할 수 있는 마스터 세포를 지칭한다. 줄기세포는 발달가능한 만능성 또는 다능성 세포이다. 줄기세포는 2개의 딸줄기세포, 또는 하나의 딸줄기세포와 하나의 유래('전이:transit') 세포로 분열될 수 있으며, 이후에 조직의 성숙하고 완전한 형태의 세포로 증식된다. 이러한 줄기세포는 다양한 방법으로 분류할 수 있다. 그 중 가장 흔히 이용되는 방법 중 하나는 줄기세포의 분화능에 따른 것으로 3배엽으로의 분화가 가능한 만능줄기세포(pluripotent stem cells), 특정 배엽 이상으로의 분화로 한정되는 다분화능 줄기세포(multipotent stem cells) 및 특정 배엽으로만 분화가 가능한 단분화능 줄기세포(unipotent stem cells)로 나눌 수 있다.
- [34] 본 발명의 용어 "만능줄기세포"라 함은 생체를 구성하는 3가지 배엽(germ layer) 모두로 분화될 수 있는 전능성을 지닌 줄기세포를 지칭하며, 일반적으로 배아줄기세포(ESC)와 유도만능줄기세포(iPSC)가 이에 해당된다. 성체줄기세포는 다분화능 또는 단분화능 줄기세포로 구분할 수 있다.
- [35] 본 발명의 용어 "중간엽 줄기세포"는 지방세포, 골세포, 연골세포, 근육세포, 신경세포, 심근세포 등의 세포로 분화할 수 있는 다능성(multipotency)을 보유하고 있는 줄기세포를 의미한다.
- [36] 본 발명의 용어 "분화(differentiation)"는 세포가 분열 증식하여 성장하는 동안에 세포의 구조나 기능이 특수화되는 현상을 의미한다. 다능성 중간엽 줄기세포는 계통이 한정된 전구세포(예컨대, 중배엽성 세포)로 분화한 후, 다른 형태의 전구세포로 더 분화될 수 있고(예컨대, 골모세포 등), 그 뒤 특정 조직(예컨대, 뼈 등)에서 특징적인 역할을 수행하는 말기 분화세포(예컨대, 지방세포, 골세포, 연골세포 등)로 분화될 수 있다.
- [37] 본 발명의 용어 "배아체 (embryoid body, EB)"는 만능줄기세포의 분화를 유도하기 위해 생성된 만능줄기세포의 응집체이다. 본 발명에서 "성숙 배아체(mature embryoid body)"는 만능줄기세포의 응집체, 즉 배아체가 부유배양을 통해 분열을 거듭하여 그 크기가 커진 상태로, 본 발명에서 성숙 배아체는 중간엽줄기세포로의 분화를 유도하기 위한 재료로 사용된다.
- [38] 본 발명의 용어 "세포치료제"는 사람으로부터 분리, 배양 및 특수한 조작을 통해 제조된 세포 및 조직으로 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품(미국 FDA규정)으로서, 세포 혹은 조직의 기능을 복원시키기 위하여 살아있는 자가, 동종, 또는 이종세포를 체외에서 증식, 선별하거나 다른 방법으로 세포의 생물학적 특성을 변화시키는 등의 일련의 행위를 통하여 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품을 지칭한다. 세포치료제는 세포의 분화정도에 따라 크게 체세포치료제, 줄기세포치료제로 분류되며 본 발명은

특히 줄기세포치료제에 관한 것이다.

[39]

[40] 본 발명에서는 인간 만능줄기세포로부터 분화 유도된 중간엽 줄기세포를 세포치료제로 상용화시키기 위해 세포의 안전성 및 대량생산 문제를 해결하고자, 무영양세포 (feeder cell free), 무이종 (xeno-free) 및 무혈청 (serum-free) 환경에서 인간 만능줄기세포를 중간엽 줄기세포로 분화 유도하였다. 또한, 인간 만능줄기세포의 세포간 응집에 의해 단일의 구상체 형태의 배아체를 형성하도록 하고, 이러한 배아체들을 부유배양하여 균일한 모양과 크기의 성숙 배아체를 형성함으로써 성숙 배아체 간의 품질 차이를 최소화하였고, 이에 따른 중간엽 줄기세포로의 분화 효율 및 일관성을 향상시켰다. 이렇게 제조된 중간엽 줄기세포는 20 세대 이상 장기간 계대배양을 반복하여도 중간엽 줄기세포 특성이 안정하게 유지되는 획기적인 효과를 나타냈다. 즉, 본 발명은 외래 세포 및 외래 동물성 유래 물질의 오염 없이 안전하고, 구상체 형태의 배아체를 이용한 균일한 모양과 크기의 성숙 배아체 형성을 통해 품질이 고르고, 계대배양 안정성이 장기간 우수하여 대량 생산이 가능한 인간 만능줄기세포 유래 중간엽 줄기세포를 제조하였다. 따라서, 본 발명의 방법으로 제조된 생산성 및 안전성이 향상된 중간엽 줄기세포는 재생의학 및 세포치료 분야에서 필요로 하는 중간엽 줄기세포를 지속적으로 대량 공급하는 것을 가능하게 한다.

[41]

[42] 따라서, 본 발명은 일 관점에서,

[43] (a) 인간 만능줄기세포를 이종 영양세포 (xeno feeder cell) 없이 무혈청 만능줄기세포 배양 배지에서 배양하여 인간 만능줄기세포의 콜로니를 얻고, 상기 콜로니로부터 인간 만능줄기세포를 단리(isolation)하는 단계;

[44] (b) 단리(isolation)된 만능줄기세포를 배아체 형성 배지에 현탁한 후 만능줄기세포가 응집되도록 배양하여 단일의 구상체 형태의 배아체를 형성시키는 단계;

[45] (c) 상기 배아체를 배아체 성숙 배지에서 부유배양하여 성숙 배아체를 형성시키는 단계;

[46] (d) 상기 배아체를 무이종 (xeno-free), 무혈청의 중간엽 줄기세포 배양 배지에서 부착 배양시켜 중간엽 줄기세포로 분화를 유도하는 단계; 및

[47] (e) 상기 분화된 중간엽 줄기세포를 무이종 (xeno-free), 무혈청의 중간엽 줄기세포 배양 배지에서 중간엽 줄기세포의 동일성을 유지하면서 증식 및 배양하는 단계를 포함하는 인간 만능줄기세포로부터 중간엽 줄기세포를 제조하는 방법에 관한 것이다.

[48]

[49] 이하, 각 단계별로 상세히 설명한다.

[50] (a) 인간 만능줄기세포를 이종 영양세포 (xeno feeder cell) 없이 무혈청

- 만능줄기세포 배양 배지에서 배양하여 인간 만능줄기세포의 콜로니를 얻고, 상기 콜로니로부터 인간 만능줄기세포를 단리(isolation)하는 단계
- [51] 본 발명에 있어서, 상기 인간 만능줄기세포는 배아줄기세포 또는 유도만능줄기세포일 수 있다. 상기 인간 만능줄기세포는 미분화 상태이다.
- [52] 일반적으로 종래에는 인간 만능줄기세포를 배양하는데 있어서 미분화 상태를 계속 유지시키기 위해서는 지지체가 필요하고, 종래의 인간 만능줄기세포 지지체로는 생쥐 배아 유래 섬유모세포가 우선적으로 이용되어 왔다. 그러나, 이중간의 각종 병원체의 유입이 임상학적으로 만능줄기세포를 사용하고자 할 때 문제점으로 인식됨으로 인해 그에 대한 대안책으로 인간 유래 여러 세포에 대하여 지지체로서의 가능성이 보고된 바 있다. 그러나 이 또한 타가 유래 병원체의 절대적 배제가 불가능하고, 미분화 상태의 유지를 위한 외래 인자(예를 들어, bFGF, IGF, ACTIVIN 등)가 필수적으로 필요한 점과 장기 배양을 위한 계속적 세포의 공급이 불가능한 단점 등을 극복할 수 없다.
- [53] 그러나, 본 발명의 방법은 이중 영양세포 (xeno feeder cell) 없이, 비트로넥틴 (vitronectin)을 코팅한 배양용기를 사용하고, 무혈청 배지로 인간 만능줄기세포를 배양하여도 미분화 상태를 유지시킬 수 있다.
- [54] 본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계의 만능줄기세포는 인간 유래의 세포외기질 (extracellular matrix), 동물 유래 성분을 포함하지 않는 세포외기질 또는 세포외기질을 대체할 수 있는 합성물질을 코팅한 배양용기에서 배양된 세포인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [55] 상기 인간 유래의 세포외기질은 비트로넥틴 (vitronectin), 콜라겐 (collagen) 또는 라미닌 (laminin)인 것이 바람직하고, 상기 인간을 제외한 동물 유래 성분을 포함하지 않는 세포외기질은 동물 유래 성분 프리 매트릭스 (animal component free matrigel)인 것이 바람직하며, 또한, 상기 세포외기질을 대체할 수 있는 합성물질은 헤파란 황산 프로테오글리칸 (Heparan sulfate proteoglycan)인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [56] 즉, 본 발명의 방법은 모든 단계에서 이중 영양세포 (xeno feeder cell), 사이토카인 및 이중 물질 무첨가 배지에서 수행되는 것을 특징으로 할 수 있다. 즉, 무영양세포 (feeder cell free), 무이종 (xeno-free) 및 무혈청 (serum-free) 환경에서 수행되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [57] 특히, 종래의 방법 (WO 2011052818)은 FBS가 포함된 배지에서 배양된 이중 영양세포를 사용하여 만능줄기세포를 배양하였으나, 본 발명은 이중 영양세포 (xeno feeder cell) 없이 무혈청 배지에서 배양된 인간 만능줄기세포를 사용한 것을 특징으로 할 수 있다.
- [58] 또한, 종래에는 만능줄기세포 배양 배지로 KSR, NEAA, 메타-머캅토에탄올(β -mercaptoethanol), bFGF가 포함된 DMEM/F12를 사용하였으나, 본 발명은 무혈청의 만능줄기세포 배양 배지를 사용한다.
- [59] 본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계의 인간 만능줄기세포를 배양하는 무혈청

배지는 TeSR-E8 (essential 8 media), TeSR-2 또는 StemMACS iPS-Brew XF, Human 배지일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[60]

[61] (b) 단리(isolation)된 만능줄기세포를 배아체 형성 배지에 현탁한 후 만능줄기세포가 응집되도록 배양하여 단일의 구상체 형태의 배아체를 형성시키는 단계

[62] 본 발명에서는 인간 만능줄기세포로부터 중간엽 줄기세포로의 분화 유도를 위해 균일한 모양과 크기의 성숙 배아체를 이용하는 것을 특징으로 한다. 종래의 방법에서는 균일한 모양과 크기의 배아체를 생성할 수 없어 중간엽 줄기세포로 일관된 분화 효율을 기대하기 어려웠으나, 본 발명에서는 인간 만능줄기세포의 세포간 응집에 의해 단일의 구상체 형태의 배아체를 형성하도록 하고, 이러한 배아체들을 부유배양하여 균일한 모양과 크기의 성숙 배아체를 형성함으로써 이러한 기술적 한계를 극복하였다. 이를 통해 인간 만능줄기세포 유래 중간엽 줄기세포의 분화 효율을 개선함과 동시에 반복 계대배양 후에도 줄기세포 특성을 장기간 유지하는 획기적으로 우수한 중간엽 줄기세포를 제조하였다.

[63] 종래의 방법 (WO 2011052818)은 배아체 형성시 만능줄기세포를 부유배양 하였으나, 본 발명은 만능줄기세포가 서로 응집하여 단일의 구상체 형태의 배아체를 형성하도록, 만능줄기세포를 배양 용기 뚜껑에 접촉한 후, 거꾸로 뒤집어 세포가 중력에 의해 응집할 수 있도록 24시간 동안 현적배양하고, 이렇게 형성된 세포 응집체, 즉 배아체를 다시 부유배양하여 성숙 배아체로 성숙시켰다. 그 결과, 도 1에서 보여주는 것과 같이, 균일한 모양과 크기의 성숙 배아체가 형성되었고, 이러한 성숙 배아체는 중간엽 줄기세포로의 일관된 분화 효율과 계대 배양시의 안정성을 나타낼 수 있다.

[64] 도 4에는 종래의 방법으로 제조된 성숙 배아체의 크기 및 형태가 균일하지 않은 것에 비해, 본 발명의 방법으로 제조된 성숙 배아체는 크기가 300 ~ 500 μ m로 균일하고, 형태도 구상체로 일정한 것을 보여준다. 또한, 이렇게 제조된 성숙 배아체로부터 분화 유도된 중간엽 줄기세포는 분화효율 및 중간엽 줄기세포의 크기가 일정한 것을 알 수 있다. 하지만, 종래의 방법으로 제조된 배아체로부터 분화 유도된 중간엽 줄기세포는 분화효율뿐만 아니라 세포 모양도 일정하지 않다 (도 5).

[65] 더욱이, 균일한 모양과 크기의 성숙 배아체로부터 분화 유도된 중간엽 줄기세포는 놀랍게도 20 계대까지 중간엽 줄기세포 표면 마커인 CD29, CD44, CD73, 및 CD105의 발현이 90% 이상 나타났다. 또한, 조혈모세포 특이적 표면 마커인 CD45, MHC class type II 마커인 HLA-DR, 및 만능줄기세포 특이적 표면 마커인 SSEA-3, TRA-1-60, TRA-1-81에 대한 세포 표면 마커의 발현이 2% 이하로 나타났다. 즉, 본 발명의 방법으로 제조된 중간엽 줄기세포는 장기간 계대 배양이 가능하며 고순도를 유지하고 있으므로 세포치료제로 사용할 수 있는 줄기세포를 대량생산 가능하게 한다. 종래의 방법으로 제조된 중간엽

줄기세포는 세포치료제로 사용할 정도의 기준을 충족할 정도가 되면, 세포가 노화되고 변형되어 더 이상 세포치료제로서의 목적을 달성하기에는 적합하지 않게 되었다. 결국 임상에 적용되는 세포와 품질평가 진행 세포가 달라질 수밖에 없는 단점이 있었다. 하지만, 본 발명의 중간엽 줄기세포는 세포치료제로 이용하기 위해서 장기간 계대배양이 반복되어도 변형되지 않고 중간엽 줄기세포의 품질특성을 유지하므로, 세포치료제 상용화에 매우 유용하다.

- [66] 비록, 배아체의 크기를 조절하는 방법 (KR 10-2013-0013537) 또는 현적배양 (Hanging drop method)을 통해 균일한 크기의 배아체를 형성시키는 방법 (KR 10-2007-0075006)등이 알려져 있지만, 균일한 크기의 배아체 형성은 세포 분화 효율에 영향을 미친다고 알려져 있을 뿐이며, 균일한 사이즈의 배아체로부터 분화 유도된 중간엽 줄기세포의 노화 또는 세포 변형 억제에 대한 효과는 전혀 알려진 바가 없다. 하지만, 본 발명에서는 균일한 모양과 크기의 성숙 배아체를 형성시켜, 이로부터 분화 유도된 중간엽 줄기세포의 중간엽 줄기세포 특성이 20 계대까지 장기간 유지되는 것을 확인하였다. 특히, 종래의 방법으로 제조된 배아체로부터 분화 유도된 중간엽 줄기세포는 CD105의 발현이 6계대 만에 43.6%, 12계대에는 26.6%까지 감소한 것을 확인하였다 (표 2). 즉, 종래 방법으로 제조된 줄기세포는 20 계대까지 중간엽 줄기세포의 특성을 유지하지 못하지만, 본 발명의 줄기세포는 균일한 사이즈의 배아체 형성을 통해 20 계대까지 장기간 중간엽 줄기세포 특성을 유지할 수 있다.
- [67] 따라서, 본 발명은 무영양세포 (feeder cell free), 무이종 (xeno-free) 및 무혈청 (serum-free) 배양 환경을 통해 외래 동물성 유래 물질의 오염 문제를 해소하여 안전성이 우수한 중간엽 줄기세포를 제조하는 동시에, 구상체 형태의 배아체를 이용하여 균일한 모양과 크기의 성숙 배아체를 형성시켜 중간엽 줄기세포로의 분화 효율 개선 및 20 계대 이상 장기간 계대배양에도 중간엽 줄기세포 특성이 안정하게 유지되는 획기적인 효과를 가지는 인간 만능줄기세포 유래 중간엽 줄기세포를 제조하였다.
- [68] 본 발명에 있어서, "구상체 형태의 배아체라 함은 둥근 구 형태의 세포 응집체를 의미하며, 여기에서 구상체 형태는 흔히 스페로이드 형태라고도 표현된다.
- [69] 본 발명에 있어서, 상기 (b) 단계의 배아체는 만능줄기세포들의 세포간 응집을 유도할 수 있는 배양 방법이면 어떠한 것이든 사용가능하다. 만능줄기세포들의 응집체, 즉 단일의 구상체 형태의 배아체를 제조할 수 있는 배양법이라면 모두 가능하며 한정되지 않는다. 예를 들어, (b) 단계의 배아체는 현적 배양, 또는 V-형태 튜브 (V-shape tube), 둥근 형태 96웰 플레이트 (round shape 96 well plate) 또는 코니칼 튜브(conical tube)를 이용한 배양을 통해 형성될 수 있다.
- [70] 본 발명에 있어서, 상기 (b) 단계의 배아체 형성 배지는 만능줄기세포 간의 세포 응집을 유도할 수 있는 배지이면 어떠한 것이든 사용가능하다. 예를 들어, 단계 (b)의 배아체 형성 배지는 Aggrewell EB formation medium, Gibco Essential 6

Medium, CTS Essential 6 Medium, 또는 TeSR-E6일 수 있다. (b) 단계의 배양은 18 시간 내지 30 시간 동안, 예를 들어, 20 시간 내지 28 시간, 22 시간 내지 26 시간, 예컨대, 24 시간 동안 배양할 수 있다.

[71]

[72] (c) 상기 배아체를 배아체 성숙 배지에서 부유배양하여 성숙 배아체를 형성시키는 단계;

[73] (c) 단계는 배아체를 부유배양 시키면서 키우는 단계로서, 이 단계에서 얻어진 성숙 배아체는 균일한 모양과 크기를 갖는다는 것을 특징으로 한다.

[74] 성숙 배아체가 "균일한 모양과 크기"를 갖는다는 것은 구상체 형태의 배아체들을 부유배양하여 얻어진 성숙 배양체들이 서로 모양과 크기가 균일함을 뜻한다. 성숙 배양체들의 모양은 배아체와 마찬가지로 구상체 형태이며, 성숙 배아체의 크기는 전체 성숙 배아체들의 평균 크기의 $\pm 15\%$ 이내의 크기로 균일하다. 즉, 성숙 배아체들의 평균 크기를 100%이라 할 때, 성숙 배아체의 최소 크기는 90% 이내, 성숙 배아체의 최대 크기는 120% 이내로 그 크기가 상당히 균일하다. 바람직하게는 성숙 배아체의 크기는 전체 성숙 배아체들의 평균 크기의 $\pm 10\%$ 의 크기로 균일하다. 이 경우, 성숙 배아체들의 평균 크기를 100%이라 할 때, 성숙 배아체의 최소 크기는 90%, 성숙 배아체의 최대 크기는 110% 이내이다. 성숙 배아체의 평균 크기는 배아체의 성숙 배양 조건 및 기간에 따라 달라질 수 있으나, 줄기세포로의 분화유도를 위해 적합한 성숙 배아체의 평균 크기는 350 ~ 450 μm , 예컨대, 380 내지 420 일 수 있다. 바람직하게는 성숙 배아체는 300 ~ 500 μm 의 균일한 크기를 갖는다.

[75] 본 발명에 있어서, 상기 (c) 단계의 부유배양은 배아체 성숙을 위한 배아체 성숙 배지를 이용하여 수행된다. 배아체 성숙 배지는 일반적으로 공지된 것을 사용할 수 있으며, 특별히 제한되는 것은 아니다. 이에 제한되는 것은 아니나, 본 발명의 구체예에서, (c) 단계의 배아체 성숙 배지는 KSR (Knock out serum replacement), NEAA (non-essential amino acid) 및 베타-머캅토에탄올 (β -mercaptoethanol)을 포함하는 기본배지일 수 있다. 상기 기본배지는 DMEM/F12, alpha MEM, Ham's F12 media 또는 DMEM일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[76] 상기 (c) 단계의 부유배양은 10 ~ 18일간, 예를 들어, 12 ~ 16일간, 예컨대 14일간 배양할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[77]

[78] (d) 상기 배아체를 무이종 (xeno-free), 무혈청의 중간엽 줄기세포 배양 배지에서 부착 배양시켜 중간엽 줄기세포로 분화를 유도하는 단계

[79] 인간 만능줄기세포에서 중간엽 줄기세포로 분화를 유도하는 경우, 일반적으로 외부에서 사이토카인인 BMP (bone morphogenetic protein) 등을 첨가하여 분화 유도를 개시하기도 하지만, 본 발명에서는 BMP 등의 첨가 없이 중간엽 줄기세포로 분화가 자연스럽게 유도됨을 확인하였다. 종래의 방법 (WO 2011052818)에서는 중간엽 줄기세포의 분화시 FBS가 포함된 DMEM 배지를

사용하였고, 증식 배양에서도 FBS가 포함된 EGM2-MV 배지를 사용하였다. 그러나, 본 발명은 무이종 (xeno-free) 및 무혈청 (serum-free) 환경에서 중간엽 줄기세포의 증식 및 배양을 수행하였다.

- [80] 본 발명에 있어서, 상기 (d) 단계에서 사용되는 중간엽 줄기세포 배양배지는 L-glutamine이 포함된 무이종 (xeno-free)의 무혈청 배지일 수 있다. L-glutamine의 배지 내 총 농도는 2 ~ 4mM에 맞추어 사용하는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [81] 상기 (d) 단계의 무이종(xeno-free), 무혈청의 중간엽 줄기세포 배양배지는 Stempro SFM Xeno-free 배지, PRIME-XV MSC Expansion XSFM 배지, Human Mesenchymal-XF Expansion 배지, MSC Nutristem XF 배지, StemMACS MSC expansion media kit XF, human 배지 또는 FBS 대신 5 ~ 20% human platelet lysate를 포함한 배지 등을 예로 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [82] 또한, 본 발명에 있어서, 상기 (d) 단계의 중간엽 줄기세포로 분화 유도는 12 ~ 20일간, 예를 들어, 14 ~ 18일간, 예컨대, 16일간일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [83] 본 발명의 일 실시예에서는 분화유도 인자 및 혈청이 포함되지 않은 Stempro MSC SFM Xeno-free 배지에서 중간엽 줄기세포의 분화를 유도하였다.
- [84]
- [85] (e) 상기 분화된 중간엽 줄기세포를 무이종 (xeno-free), 무혈청의 중간엽 줄기세포 배양 배지에서 중간엽 줄기세포의 동일성을 유지하면서 증식 및 배양하는 단계
- [86] 단계 (e)는 분화가 유도된 중간엽 줄기세포를 증식, 배양하는 단계이다. 인간 중간엽 줄기세포를 포함하는 세포치료제를 상업화하기 위해 이 단계에서 얻어지는 중간엽 줄기세포가 충분한 양으로 확보되면서도, 동시에 중간엽 줄기세포의 동일성, 즉, 중간엽 줄기세포로서의 특성을 유지하는지가 매우 중요한 문제이다.
- [87] 본 발명에서는, 상기 분화 유도된 중간엽 줄기세포를 증식 배양함에 있어서, 추가적인 분화 유도 인자 및 FBS (fetal bovine serum)가 첨가되지 않은 xeno-free 배지에서 배양한다.
- [88] (d) 단계와 마찬가지로, 본 발명에 있어서, 상기 (e) 단계에서 사용되는 중간엽 줄기세포 배양배지는 L-glutamine이 포함된 무이종 (xeno-free)의 무혈청 배지일 수 있다. L-glutamine의 배지 내 총 농도는 2 ~ 4mM에 맞추어 사용하는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [89] 상기 (e) 단계의 무이종(xeno-free), 무혈청의 중간엽 줄기세포 배양배지는 Stempro SFM Xeno-free 배지, PRIME-XV MSC Expansion XSFM 배지, Human Mesenchymal-XF Expansion 배지, MSC Nutristem XF 배지, StemMACS MSC expansion media kit XF, human 배지 또는 FBS 대신 5 ~ 20% human platelet lysate를 포함한 배지 등을 예로 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [90] 본 발명의 일 실시예에서는 중간엽 줄기세포 증식 배지로 FBS가 첨가되지 않은 Stempro MSC SFM 배지를 사용하였으나, 이에 한정되는 것은 아니며 이중 단백질과 같은 이중 물질이 포함되지 않은(xeno-free) 배지를 사용할 수 있다.
- [91] 상기에서 설명한 바와 같이 중간엽 줄기세포를 세포치료제로 사용하기 위해서는 충분한 양의 세포를 공급하는 것이 우선되어야 하는데, 이를 위해서는 중간엽 줄기세포의 계대배양이 필요하다. 그러나 계대배양을 계속하게 되면 중간엽 줄기세포가 노화되어 분열능력이 없어지고 그 활성(분화능)을 잃어버리게 되는 문제가 있다. 이와 관련하여 본 발명에서는 무이종 및 무혈청 배지에서도 체외배양시 중간엽 줄기세포의 특성 및 활성이 20 계대 이상 오래 유지될 수 있음을 확인하였다(표 1). 즉, 본 발명의 방법으로 제조된 중간엽 줄기세포는 중간엽 줄기세포 특성을 장기간 유지할 수 있으므로, 대량 생산을 통한 세포치료제로 사용이 가능하다. 이러한 특징은 무이종(xeno-free), 무혈청(serum-free)의 중간엽 줄기세포 제조 환경 및 균일한 크기의 배아체 제조를 통해 달성될 수 있다.
- [92] 중간엽 줄기세포는 균일한 방추형(spindle shape)의 fingerprint pattern 형태와 기본적인 세포표면 표지자 CD73(+), CD105(+), CD34(-), CD45(-) 등의 발현 정도로 규정하고 있으며, 골세포, 연골세포, 지방세포 등으로 분화가 가능하다.
- [93] 본 발명에 있어서, 상기 (e) 단계의 중간엽 줄기세포는 지방세포, 골세포, 연골세포, 근육세포, 신경세포 및 심근세포로 구성된 군에서 선택된 세포로 분화할 수 있는 다능성(multipotency)을 보유한 중간엽 줄기세포인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [94] 본 발명의 일 실시예에서는, 만능줄기세포 유래 중간엽 줄기세포의 계대배양에 따른 줄기세포 특성 지속성(consistency)을 확인하기 위하여, 20 계대까지 세포 표면 마커의 변화를 비교 분석하였다. 중간엽 줄기세포 표면 마커인 CD29, CD44, CD73, CD105, 조혈모세포 특이적 표면 마커인 CD45, MHC class type II 마커인 HLA-DR, 및 만능줄기세포 특이적 표면 마커인 SSEA-3, TRA-1-60, TRA-1-81에 대한 세포 표면 마커의 발현을 12 계대부터 20 계대까지 비교 분석한 결과, 20 계대까지 중간엽 줄기세포 표면 마커인 CD29, CD44, CD73, 및 CD105의 발현이 90% 이상을 유지하고 있음을 확인하였다(표 1). 또한, 종래의 방법(WO 2011052818)으로 제조된 만능줄기세포 유래 중간엽 줄기세포는 CD105의 발현이 6 계대 세포에서 50% 미만으로 나타났고, 특히 12회 계대 배양 후에는 26.6%까지 감소하는 것을 확인하였다(표 2). 즉, 종래 방법으로 제조된 줄기세포는 20계대까지 중간엽 줄기세포의 특성을 유지하지 못하지만, 본 발명의 줄기세포는 균일한 모양과 크기를 갖는 성숙 배아체 형성을 통해 20 계대까지 장기간 중간엽 줄기세포 특성을 유지할 수 있다.
- [95] CD105는 중간엽 줄기세포의 특이적인 표면 마커 중 하나로 알려져 있으며, 2003년 Duff SE 등의 보고에 따르면, CD105는 중간엽 줄기세포에 의한 혈관 재생에 중요한 역할을 담당하고 있다고 보고되었다(*The FASEB Journal*

2003;17(9):984-992). 또한, CD105는 중간엽 줄기세포의 골세포 분화 (Levi B *et al.*, *The Journal of Biological Chemistry*. 2011;286(45):39497-39509) 뿐만 아니라, 중간엽 줄기세포의 골세포, 연골세포, 지방세포 등 세포 분화 후 감소되어 중간엽 줄기세포의 줄기세포능 (stemness)의 유지에 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다 (Jin HJ *et al.*, *BBRC* 2009;381(4):676-681).

- [96] 본 발명에 있어서, 상기 (e) 단계의 중간엽 줄기세포는 CD29(+), CD44(+), CD73(+), 및 CD105(+),의 세포표면 마커를 발현하는 중간엽 줄기세포인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [97] 본 발명에 있어서, 상기 세포표면 마커 발현은 20 계대 이상의 중간엽 줄기세포에서 90% 이상 유지되는 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 CD105(+) 세포표면 마커의 발현이 20 계대 이상의 중간엽 줄기세포에서 90% 이상 유지되는 것이나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [98] 본 발명에 있어서, 상기 (e) 단계의 중간엽 줄기세포는 CD34(-), CD45(-), HLA-DR(-), TRA-1-60(-), 및 TRA-1-81(-)의 중간엽 줄기세포인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [99]
- [100] 본 발명은 다른 관점에서, 상기 방법에 의해 제조된 인간 만능줄기세포로부터 분화 유도된 중간엽 줄기세포에 관한 것이다.
- [101] 본 발명의 방법으로 제조된 인간 만능줄기세포로부터 분화 유도된 중간엽 줄기세포는 기원 인종 (동양인 및 서양인) 및 종류 (배아줄기세포 및 유도만능줄기세포)의 차이에도 불구하고, 동일한 결과를 도출하였다. 본 발명은 다양한 유전적 기원을 가지는 인간 만능줄기세포로부터 중간엽 줄기세포를 생산하는데 일반적으로 사용할 수 있는 규범화된 분화 유도 및 증식 배양 방법을 제공한다. 즉, 본 발명의 규범화된 방법은 다양한 유전적 배경 및/또는 배양 환경을 가지는 만능줄기세포로부터 중배엽 줄기세포를 분화 유도하기 위해 일반적으로 사용할 수 있는 방법이다.
- [102] 본 발명의 일 실시예에서는 인간 만능줄기세포로 국립줄기세포재생센터 내 줄기세포은행에 등록된 SNUhES35/hES12011003 배아줄기세포를 사용하여 중간엽 줄기세포를 생산하였으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [103] 또한, 본 발명의 다른 실시예에서는 서양인의 배아줄기세포로 국립줄기세포재생센터 내 줄기세포은행에 등록된 ESI-017/hES22014005, ESI-035/hES22014006를 사용하여 중간엽 줄기세포를 생산하였으나, 이에 한정되는 것은 아니며, ESI-049/hES22014007, ESI-051/hES22014008, ESI-053/hES22014009 등의 배아줄기세포를 사용할 수 있다.
- [104] 본 발명의 또 다른 실시예에서는 동양인의 유도만능줄기세포를 사용하여 중간엽 줄기세포를 생산하였으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [105] 본 발명은 또 다른 관점에서 상기 방법에 의해 제조된 인간 만능줄기세포로부터 분화 유도된 중간엽 줄기세포를 유효성분으로 포함하는

세포치료제에 관한 것이다. 세포치료제는 중간엽 줄기세포 외에 주사용수를 포함할 수 있다. 또한, 세포치료제는 동결을 위해 사용되는 동결부형제를 포함할 수 있다. 동결부형제는 동물 유래 성분을 포함하지 않는 CryoStor 10 (CS10) 혹은 STEM-CELLBANKER DMSO Free GMP grade인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 통상 중간엽 줄기세포를 포함하는 세포치료제는 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^8$ cells/kg의 용량으로 대상체에 투여된다. 본 발명에 따른 중간엽 줄기세포를 포함하는 세포치료제는 일반적으로 중간엽 줄기세포의 이식 치료의 효과로 알려진 다양한 질병의 치료를 위해 제한없이 사용될 수 있다. 특히, 본 발명에 따른 중간엽 줄기세포를 포함하는 세포치료제는 COVID-19 바이러스에 감염된 환자나 중증급성췌장염(Severe acute pancreatitis, SAP) 등 치료하기 위해 사용될 수 있다.

[106]

[107] [실시예]

[108] 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 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[109]

[110] 실시예 1: 인간 만능줄기세포로부터 중간엽 줄기세포로의 제조방법

[111] 1-1: 무영양세포 (feeder cell free), 무이종 (xeno-free) 및 무혈청 (serum-free) 환경에서 만능줄기세포의 배양 및 만능성 확인

[112] 무영양세포, 무이종 및 무혈청 환경에서 만능줄기세포가 만능성 (pluripotency)을 유지하며 체외 배양이 가능한지 확인하기 위하여, 조직 배양 용기에 인체 세포외기질 (human extracellular matrix) 성분인 인간 비트로넥틴 (human vitronectin)을 최종농도 10 $\mu\text{g/mL}$ 이 되도록 조직 배양 용기에 코팅한 다음 무이종, 무혈청 배지인 TeSR-2 또는 TeSR-E8 (essential 8 media) 배지를 이용하여 미분화 상태의 인간 만능줄기세포 (한국인 유래 배아줄기세포 : SNUhES35/hES12011003)를 배양하여 만능줄기세포의 콜로니들을 얻었다 (도 1, 좌측 ESC 배양 사진). Confluency가 60 % 일 때(20 colony 이상)의 만능줄기세포 콜로니를 EZPassage Passaging Tool을 이용하여 약 200 μm x 200 μm 의 크기로 균일하게 조각낸 후(도 2A) 파이펫을 이용하여 배양 용기에서 떼어내고, conical tube에 옮기고, 정치시켜 세포들을 가라앉힌 후 상층액을 제거하였다. 단리(isolation)된 만능줄기세포는 약 10 내지 15 μm 의 크기(직경)를 갖는 구형의 세포로 확인되었다(도 2B).

[113] 무영양세포, 무이종 및 무혈청 환경에서 배양된 만능줄기세포의 만능성을 확인하기 위하여, 면역형광염색법 (immunofluorescence staining)을 통하여 줄기세포의 만능성 마커 중 하나인 OCT-4 및 SSEA-4의 발현을 확인하였다.

[114] 그 결과, 무영양세포, 무이종 및 무혈청 환경에서 배양된 만능줄기세포에서

만능성을 나타내는 마커인 OCT-4 및 SSEA-4가 발현되고 있었다. 즉, 배양된 만능줄기세포가 무영양세포, 무이종 및 무혈청 환경에서 만능성을 유지하고 있음을 확인할 수 있었다 (도 3).

[115]

[116] 1-2: 만능줄기세포의 성숙 배아체 형성

[117] 만능줄기세포가 현탁된 배아체 형성 배지 (Aggrewell EB Formation Medium)의 일정 용량을 페트리 배양 용기 (petri dish)의 뚜껑에 접종한 후 현적 배양하여 세포 응집체, 즉 배아체를 형성하였다. 배아체를 다시 배아체 성숙 배지에 접종 후 부유배양 하여 일정한 크기의 성숙 배아체를 형성시켰다.

[118] 구체적으로, 단리(isolation)된 만능줄기세포가 담긴 conical tube에 배아체 형성 배지 (Aggrewell EB Formation Medium)(인간 만능줄기세포 20 콜로니당 400 μ l의 농도)를 넣어 파이프팅에 의해 배아체 형성 배지 중에 단리(isolation)된 만능줄기세포가 단일 세포가 되도록 현탁시켰다. 만능줄기세포가 현탁된 배아체 형성 배지를 20 μ l씩 조직 배양 용기 뚜껑에 접종한 후, 거꾸로 뒤집어 세포가 중력에 의해 응집할 수 있도록 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 현적배양하였다. 24시간 배양 후, 단일한 구상체 형태의 세포 응집체, 즉 배아체가 형성되었다.

[119] 형성된 배아체를 배아체 성숙 배지 (DMEM/F12, 20% Knock out serum replacement (KSR), 0.1 mM non-essential amino acid (NEAA), 0.1 mM β -mercaptoethanol)를 이용하여 페트리 배양 용기 (petri dish)에서 부유 배양하고, 2 ~ 3일 간격으로 배지를 교환하며 14일간 배양하였다 (도 1 참조).

[120] 그 결과, 구상체로 형태가 일정하고, 300 ~ 500 μ m의 균일한 크기의 성숙 배아체가 형성된 것을 확인할 수 있었다 (도 4, 우측 개량방법 사진).

[121]

[122] 1-3: 성숙 배아체의 중간엽 줄기세포로의 분화 유도 및 증식

[123] 14일간 배양된 성숙 배아체를 무이종 기재인 CellStart™(Thermo Fisher Scientific)으로 코팅된(78 μ L/cm² 농도) 6 well 플레이트에 부착시켰다. 부착 시, 배아체 4 ~ 5개씩을 각 well 마다 접종한 후, 중간엽 줄기세포로 분화를 유도하기 위하여 무이종 및 무혈청 중간엽 줄기세포 배양배지인 StemPro MSC SFM XenoFree™(Thermo Fisher Scientific)를 이용하여 분화를 유도하였다.

[124] 중간엽 줄기세포로의 분화 유도 및 초기 배양을 위하여, 2 ~ 3일에 한번씩 새로 배지를 교환해 주며 계대배양 없이 16일간 배양을 진행하였다.

[125] 현미경을 통하여 부착된 성숙 배아체로부터 분화된 중간엽 줄기세포가 충분히 증식하는 것을 확인한 후, 계대배양을 실시하였다.

[126] 또한, 이렇게 제조된 만능줄기세포 유래 중간엽 줄기세포는 계대배양을 진행하고, 무이종 및 무혈청 환경에서 분화 및 증식을 위하여 StemPro MSC SFM XenoFree 배지를 이용하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양을 진행하였다.

[127] 도 5는 기존의 제조방법 (WO 2011052818)으로 제조된 배아체 및 본 발명의

개량 방법으로 제조된 배아체에서 중간엽 줄기세포로의 분화 효율 및 세포모양을 비교한 것이다. 본 발명의 방법에 따르면, 균일한 배아체의 형태 및 크기로 인해 중간엽 줄기세포로의 분화 효율 및 세포모양이 일정한 것을 확인할 수 있었다(도 5 하단). 하지만, 종래의 방법으로 제조된 배아체로부터 분화 유도된 중간엽 줄기세포는 분화효율 뿐만 아니라 세포 모양도 일정하지 않다(도 5 상단).

[128]

[129] 실시예 2: 만능줄기세포 유래 중간엽 줄기세포의 특성 분석

[130] 2-1: 중간엽 줄기세포의 세포표면 표지자 발현 분석

[131] 실시예 1의 방법으로 제조된 만능줄기세포 유래 중간엽 줄기세포가 중간엽 줄기세포의 특성을 가지고 있는지 확인하기 위하여, 유세포 분석기 (flow cytometry)를 이용한 세포 표면 마커의 분석 및 골세포, 연골세포, 지방세포로의 분화가 가능한지를 분석하였다.

[132] 도 6은 무영양세포, 무이종 및 무혈청 환경에서 배양된 만능줄기세포 유래 중간엽 줄기세포의 세포표면 마커 발현 분석 결과를 보여준다.

[133] 그 결과, 만능줄기세포 유래 중간엽 줄기세포는 중간엽 줄기세포 특이적 표면 마커인 CD73 및 CD105가 양성으로 발현되고 있음을 확인하였으며, 면역반응과 관련된 MHC class type II의 세포 표면 마커인 HLA-DR, 조혈모세포 특이적 세포 표면 마커인 CD34와 CD45의 발현이 음성임을 확인하였다.

[134] 뿐만 아니라, 만능줄기세포의 혼입 여부를 확인하기 위하여 만능줄기세포 특이적 세포 표면 마커인 TRA-1-60의 발현을 확인한 결과, TRA-1-60의 발현이 음성임을 확인하여, 제조된 만능줄기세포 유래 중간엽 줄기세포가 일반적인 중간엽 줄기세포의 특이적 세포표면 표지자를 발현하고 있음을 확인하였다 (도 6).

[135]

[136] 2-2: 중간엽 줄기세포의 분화능 분석

[137] 실시예 1의 방법으로 제조된 만능줄기세포 유래 중간엽 줄기세포의 분화능을 분석하기 위하여, 지방세포 (adipocyte), 골세포 (osteocyte), 및 연골세포 (chondrocyte)로 14일간 분화를 유도한 후 각각 특이적 화학염색법을 통해 분화능을 검증하였다.

[138] 지방세포로 분화 유도 14일 후 Oil-Red-O 염색을 진행한 결과, 제작된 만능줄기세포 유래 중간엽 줄기세포가 지방세포로의 분화가 이루어졌음을 확인하였으며, 골세포 분화 유도 14일 후 Alizarin-Red-S 및 Alkaline Phosphatase 염색을 진행한 결과, 제작된 만능줄기세포 유래 중간엽 줄기세포가 지방세포로 분화가 이루어졌음을 확인하였다. 또한, 연골세포 분화 유도 14일 후 Alcian Blue 염색을 진행한 결과, 제작된 만능줄기세포 유래 중간엽 줄기세포가 연골세포로 분화되었음을 확인하였다 (도 7).

[139] 이는 실시예 1에서 제조된 만능줄기세포 유래 중간엽 줄기세포가 일반적인

중간엽 줄기세포의 분화능과 유사한 분화능을 가지고 있음을 나타낸다.

[140]

[141] 2-3: 중간엽 줄기세포의 염색체 이상 분석

[142] 실시예 1의 방법으로 제조된 만능줄기세포 유래 중간엽 줄기세포의 분화과정에서 염색체 이상이 발생하는지 확인하기 위하여 G-밴드 핵형분석 (G-banding Karyotyping) (Saccone *et al*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 89:4913-4917, 1992)을 진행하였다.

[143] 그 결과, 제작된 만능줄기세포 유래 중간엽 줄기세포에서 46XY의 정상 핵형을 확인하였으며, 이는 실시예 1에서 제조된 만능줄기세포 유래 중간엽 줄기세포의 분화과정에서 어떠한 염색체 이상도 야기되지 않았음을 나타낸다 (도 8).

[144]

[145] 2-4: 중간엽 줄기세포의 줄기세포 특성 지속성 분석

[146] 실시예 1의 방법으로 제조된 만능줄기세포 유래 중간엽 줄기세포의 계대배양에 따른 줄기세포 특성 지속성 (consistency)을 확인하기 위하여, 배양용기에서 지속적인 계대배양을 진행하여 20 계대까지 세포 표면 마커의 변화를 비교 분석하였다.

[147] 중간엽 줄기세포 표면 마커인 CD29, CD44, CD73, CD105, 조혈모세포 특이적 표면 마커인 CD45, MHC class type II 마커인 HLA-DR, 및 만능줄기세포 특이적 표면 마커인 SSEA-3, TRA-1-60, TRA-1-81에 대한 세포 표면 마커의 발현을 12 계대부터 20 계대까지 비교 분석하였다 (표 1).

[148] 그 결과, 실시예 1의 방법으로 제조된 만능줄기세포 유래 중간엽 줄기세포는 12 계대부터 20 계대까지 중간엽 줄기세포 표면 마커인 CD29, CD44, CD73, 및 CD105의 발현이 90% 이상을 유지하고 있음을 확인하였다. 또한, 조혈모 세포 특이적 세포 표면 마커인 CD45, MHC class type II 마커인 HLA-DR, 만능줄기세포 특이적 세포 표면 마커인 SSEA-3, TRA-1-60 및 TRA-1-81의 세포 표면 마커의 발현은 음성으로 유지되고 있음을 확인하였다.

[149] 이러한 결과는 실시예 1의 방법으로 제조된 만능줄기세포 유래 중간엽 줄기세포가 20 계대까지 중간엽 줄기세포의 특성을 유지하고 있음을 시사하며, 향후 중간엽 줄기세포를 이용한 치료제의 대량 배양뿐만 아니라 유전자 도입을 통한 세포 기능 강화 줄기세포 치료제의 개발에도 중요한 세포 재원으로 활용 가치가 높다고 할 수 있다.

[150] [표 1]

[151]

마커		분석 결과(%)									
		PN12	PN13	PN14	PN15	PN16	PN17	PN18	PN19	PN20	
동정 마커	CD29	99.94±0.03	98.21±3.07	99.95±0.02	99.84±0.16	99.88±0.03	99.76±0.13	99.78±0.07	99.80±0.13	99.65±0.07	
	CD44	99.96±0.03	99.96±0.04	99.97±0.02	99.98±0.00	99.95±0.02	99.92±0.04	99.89±0.07	99.89±0.02	99.73±0.11	
	CD73	98.11±0.57	98.85±0.62	99.60±0.04	99.51±0.16	98.63±1.09	98.13±0.20	99.13±0.41	98.85±0.73	99.00±0.40	
	CD105	99.64±0.06	99.77±0.26	99.76±0.12	99.51±0.37	99.27±0.45	98.99±0.50	99.49±0.09	99.41±0.28	99.49±0.18	
순도 마커	CD34	2.61±0.29	2.93±1.05	2.07±0.48	2.45±0.17	1.77±0.45	1.52±0.11	2.05±0.79	1.96±0.73	1.84±0.61	
	CD45	0.87±0.21	1.18±0.22	0.70±0.21	0.85±0.03	0.80±0.28	0.82±0.04	0.95±0.17	1.07±0.31	0.52±0.17	
	HLA-DR	0.72±0.09	0.89±0.29	0.75±0.20	0.94±0.24	0.94±0.20	0.47±0.42	1.01±0.43	0.88±0.09	0.73±0.21	
	SSEA-3	0.85±0.17	0.96±0.32	0.69±0.17	0.45±0.26	0.34±0.15	0.61±0.20	0.56±0.10	0.69±0.14	0.80±0.34	
	TRA-1-60	0.51±0.16	0.44±0.09	0.59±0.14	0.53±0.27	0.48±0.08	0.50±0.06	0.53±0.14	0.68±0.09	0.44±0.19	
	TRA-1-81	0.59±0.24	0.44±0.07	0.71±0.29	0.51±0.31	0.32±0.06	0.55±0.06	0.46±0.08	0.80±0.23	0.49±0.12	

[152]

[153] 실시예 3: 제조방법 차이에 따른 만능줄기세포 유래 중간엽 줄기세포의 특성 비교

[154] 3-1: 세포 형태 (cell morphology) 비교

- [155] 동일한 만능줄기세포로부터 서로 다른 중간엽 줄기세포 제조방법으로 제작된 만능줄기세포 유래 중간엽 줄기세포 2종의 세포형태를 현미경을 이용하여 비교하였다. 제조된 만능줄기세포 유래 중간엽 줄기세포의 7 계대 및 12 계대의 형태학적인 비교를 진행하였다.
- [156] 기존의 방법 (WO 2011052818)으로 제조된 만능줄기세포 유래 중간엽 줄기세포와 상기 실시예를 통해 제조된 만능줄기세포 유래 중간엽 줄기세포는 모두 방추형 (spindle shape)의 형태를 가지고 있었으며, 7 계대까지 세포의 형태가 유사하게 유지되고 있음을 확인하였다. 그러나, 기존의 방법으로 제조된 만능줄기세포 유래 중간엽 줄기세포의 경우 12 계대에서 세포가 뭉치는 현상이 발생하였다.
- [157] 하지만, 상기 실시예를 통해 제조된 만능줄기세포 유래 중간엽 줄기세포는 12 계대 배양 후에도 방추형의 세포 형태를 잘 유지하고 있음을 확인하였다 (도 9).
- [158]
- [159] 3-2: 세포 표면 마커 발현 비교
- [160] 실시예 3-1과 같이, 기존의 방법 (WO 2011052818)으로 제조된 만능줄기세포 유래 중간엽 줄기세포와 본 발명을 통해 제조된 만능줄기세포 유래 중간엽 줄기세포의 세포 표면 마커 발현을 비교하였다.
- [161] 본 발명의 방법에 의해 제작된 만능줄기세포 유래 중간엽 줄기세포는 6, 8, 12 계대까지 중간엽 줄기세포 특이적 세포표면 마커인 CD29, CD44, CD73, CD105의 발현이 90% 이상으로 양성임을 확인하였다. 또한, 조혈모세포 특이적 세포표면 마커인 CD34, CD45, MHC class type II 마커인 HLA-DR 및 만능줄기세포 특이적 세포 표면 마커인 TRA-1-60의 발현은 음성임을 확인하였다 (표 2).
- [162] 반면, 기존의 방법으로 제조된 만능줄기세포 유래 중간엽 줄기세포는 CD105를 제외한 나머지 세포표면 표지자의 발현은 6, 8, 12 계대까지 본 발명의 방법에 의해 제작된 만능줄기세포 유래 중간엽 줄기세포와 유사하게 유지되었으나, CD105의 발현이 6 계대 세포에서 50% 미만으로 나타났고, 특히 12회 계대 배양 후에는 26.6%까지 감소하는 것을 확인하였다 (표 2).
- [163] [표 2]
- [164]

구분	기존의 방법 (WO 2011052818)			본 발명의 개량방법		
	PN6	PN8	PN12	PN6	PN8	PN12
CD29	99.9%	100.0%	99.9%	99.9%	98.6%	99.9%
CD44	99.8%	100.0%	99.8%	99.9%	99.6%	99.9%
CD73	99.3%	97.9%	97.3%	99.9%	99.2%	98.4%
CD105	43.6%	47.1%	26.6%	99.7%	99.8%	99.8%
CD34	0.9%	2.1%	0.8%	6.7%	0.7%	1.8%
CD45	0.2%	0.8%	0.7%	0.1%	0.8%	0.4%
HLA-DR	0.5%	0.5%	0.2%	0.0%	0.9%	0.3%
SSEA-3	0.1%	0.0%	0.2%	N/A	0.4%	0.1%
TRA-1-60	0.0%	0.3%	0.0%	0.0%	0.8%	0.1%
TRA-1-81	0.0%	0.4%	0.1%	N/A	0.8%	0.1%

[165]

[166] 3-3: 골세포, 연골세포, 지방세포 분화능 비교

[167] 실시예 3-1과 같이, 기존의 방법 (WO 2011052818)으로 제조된 만능줄기세포 유래 중간엽 줄기세포와 본 발명을 통해 제조된 만능줄기세포 유래 중간엽 줄기세포의 골세포, 연골세포, 지방세포로의 분화능을 비교하였다.

[168] 본 발명의 방법에 의해 제작된 만능줄기세포 유래 중간엽 줄기세포는 기존의 방법으로 제조된 만능줄기세포 유래 중간엽 줄기세포에 비해 골세포, 연골세포, 지방세포로의 분화능이 더 높은 것을 확인하였다 (도 10).

[169]

[170] 실시예 4: 만능줄기세포 종류 차이에 따른 중간엽 줄기세포의 비교[171] 4-1: 서양인 배아줄기세포 유래 중간엽 줄기세포

[172] 본 발명의 방법으로 제조된 중간엽 줄기세포가 만능줄기세포의 기원 인종에 따라 차이가 있는지 확인하기 위하여, 서양인 배아줄기세포(ESI-017/hES22014005, ESI-035/hES22014006)를 무영양세포, 무이종 및 무혈청 환경에서 배양을 진행하였다.

- [173] 실시예 1-1의 방법과 동일하게, 조직 배양 용기에 인체 세포외기질 (human extracellular matrix) 성분인 인간 비트로넥틴 (human vitronectin)을 최종농도 10 $\mu\text{g/mL}$ 이 되도록 코팅한 다음 무이종, 무혈청 배지인 TeSR-2 배지를 이용하여 미분화 상태의 서양인 만능줄기세포를 배양하였다 (도 11A).
- [174] 무영양세포, 무이종 및 무혈청 환경에서 배양된 만능줄기세포의 만능성을 확인하기 위하여, 면역형광염색법 (immunofluorescence staining)을 통하여 줄기세포의 만능성 마커 중 하나인 OCT-4 및 SSEA-4의 발현을 확인한 결과, 서양인 만능줄기세포에서 만능성을 나타내는 OCT-4 및 SSEA-4가 발현되고 있었다. 또한, Alkaline phosphatase 발현을 확인하여 배양된 서양인 만능줄기세포가 만능성을 유지하고 있음을 알 수 있었다 (도 12A).
- [175] 또한, 배양된 서양인 만능줄기세포로부터 중간엽 줄기세포의 분화를 유도하기 위하여, 실시예 1-2와 동일한 방법 및 배지로 성숙 배아체를 형성시켰으며, 이렇게 14일간 배양된 성숙 배아체를 실시예 1-3과 동일한 방법 및 배지로 중간엽 줄기세포로 분화시켰다. 현미경을 통하여 부착된 성숙 배아체로부터 분화된 중간엽 줄기세포가 충분히 증식하는 것을 확인한 후 계대배양을 실시하였으며, 무이종 및 무혈청 환경에서 분화 및 증식을 위하여 StemPro MSC SFM Xeno-free 배지를 이용하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양을 진행하였다 (도 11A).
- [176] 따라서, 본 발명의 방법으로 제조된 중간엽 줄기세포는 만능줄기세포의 기원 인종에 따라 차이가 없는 것을 확인할 수 있었다.
- [177]
- [178] 4-2: 유도만능줄기세포 유래 중간엽 줄기세포
- [179] 본 발명의 방법으로 제조된 중간엽 줄기세포가 만능줄기세포의 종류에 따라 차이가 있는지 확인하기 위하여, 유도만능줄기세포 (iPSC, induced pluripotent stem cell)를 무영양세포, 무이종 및 무혈청 환경에서 배양을 진행하였다.
- [180] 실시예 1-1의 방법과 동일하게, 조직 배양 용기에 인체 세포외기질 (human extracellular matrix) 성분인 인간 비트로넥틴 (human vitronectin)을 최종농도 10 $\mu\text{g/mL}$ 이 되도록 코팅한 다음 무이종, 무혈청 배지인 TeSR-2 배지를 이용하여 미분화 상태의 유도만능줄기세포를 배양하였다 (도 11B).
- [181] 무영양세포, 무이종 및 무혈청 환경에서 배양된 만능줄기세포의 만능성을 확인하기 위하여, 면역형광염색법 (immunofluorescence staining)을 통하여 줄기세포의 만능성 마커 중 하나인 OCT-4 및 SSEA-4의 발현을 확인한 결과, 유도만능줄기세포에서 만능성을 나타내는 OCT-4 및 SSEA-4가 발현되고 있었다. 즉, 배양된 유도만능줄기세포가 만능성을 유지하고 있음을 알 수 있었다 (도 12B).
- [182] 또한, 배양된 유도만능줄기세포로부터 중간엽 줄기세포의 분화를 유도하기 위하여, 실시예 1-2와 동일한 방법으로 성숙 배아체를 형성시켰으며, 이렇게 14일간 배양된 성숙 배아체를 실시예 1-3과 동일한 방법으로 중간엽 줄기세포로

분화시켰다. 현미경을 통하여 부착된 배아체로부터 분화된 중간엽 줄기세포가 충분히 증식하는 것을 확인한 후 계대배양을 실시하였으며, 무이종 및 무혈청 환경에서 분화 및 증식을 위하여 Stempro MSC SFM Xeno-free 배지를 이용하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양을 진행하였다 (도 11B).

[183] 따라서, 본 발명의 방법으로 제조된 중간엽 줄기세포는 만능줄기세포의 종류에 따라 차이가 없는 것을 확인할 수 있었다.

[184] 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.

산업상 이용가능성

[185] 본 발명에 따른 인간 만능줄기세포로부터 중간엽 줄기세포를 제조하는 방법은 무영양세포 (feeder cell free), 무이종 (xeno-free) 및 무혈청 (serum-free) 배양 환경을 통해 외래 동물성 유래 물질의 오염 문제를 해소하고, 구상체 형태의 배아체를 이용한 균일한 모양과 크기의 성숙 배아체 형성을 통해 장기간 반복 계대배양 후에도 세포의 특성이 변형되지 않는 중간엽 줄기세포를 대량 생산할 수 있으므로, 안전성 및 효율성이 우수한 세포치료제 상용화에 유용하다.