



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0107705
(43) 공개일자 2018년10월02일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0775 (2010.01) *A61K 35/28* (2015.01)
B82Y 5/00 (2017.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 5/0662 (2013.01)
A61K 35/28 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2017-0151427
(22) 출원일자 2017년11월14일
심사청구일자 2017년11월14일
(30) 우선권주장
1020170036269 2017년03월22일 대한민국(KR)
- (71) 출원인
(주)오스힐
서울특별시 구로구 가마산로 226, 4층(구로동, 고려구로빌딩)
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
- (72) 발명자
송해용
서울특별시 구로구 경인로 65길 16-15, 1102동 101호 (신도림동, 신도림4차e-편한세상)
김성은
서울특별시 양천구 목동서로 397, 2001호 (신정동, 대림아크로빌)
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인충현

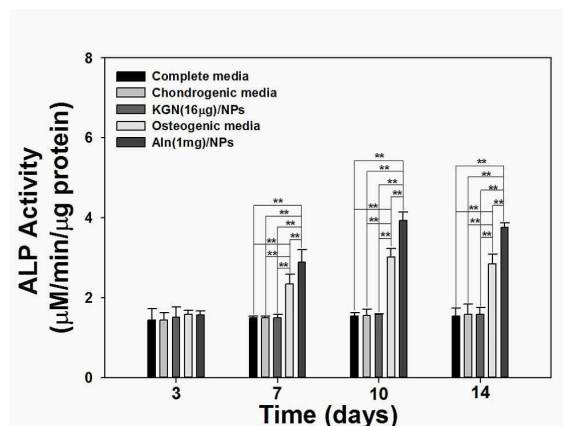
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 골 또는 연골 형성제를 포함하는 나노입자가 탑재된 줄기세포 분화 방법

(57) 요약

본 발명은 골 또는 연골 형성제를 포함하는 나노입자가 내부에 탑재된 줄기세포 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명의 나노입자가 내부에 탑재된 줄기세포는 별도의 골 또는 연골 분화배지 없이도 원하는 골 또는 연골로 보다 효율적으로 분화할 수 있어 골 또는 연골 질환의 치료제로서 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

C12N 5/0654 (2013.01)

C12N 5/0655 (2013.01)

B82Y 5/00 (2013.01)

C12N 2506/1346 (2013.01)

(72) 발명자

김학준

서울특별시 강남구 선릉로 221, 302동 1702호 (도곡동, 도곡렉슬아파트)

윤영필

서울특별시 강서구 초록마을로 32길 29-17, 401호 (화곡동)

조인호

충청남도 천안시 서북구 천안대로 999-7, 101동 2001호(두정동, 이안더센터빌)

정성철

서울특별시 서초구 명달로4길 68, A동 502호 (서초동, 서초네스피아)

심규식

경기도 광명시 연서로12번길 19, 201호(철산동)

이재용

경기도 광주시 행정타운로 143-38, 105동 302호(회덕동, 상록파크타운)

명세서

청구범위

청구항 1

하기의 단계를 포함하는 골 또는 연골 형성제를 포함하는 나노입자가 내부에 탑재된 줄기세포의 제조방법:

- (a) 골 또는 연골 형성제를 용해하고 고분자와 교반하여 혼합물을 형성하는 단계;
- (b) 상기 혼합물로부터 골 또는 연골 형성제를 포함하는 나노입자를 분리하는 단계; 및
- (c) 상기 나노입자를 분산시킨 세포배양액을 줄기세포에 주입하는 단계.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 골 또는 연골 형성제는 FGF(fibroblast growth factor), PDGF(platelet-derived growth factor), EGF(epidermal growth factor), VEGF(vascular endothelial growth factor), IGF(insulin-like growth factor), TGF- β (Transforming growth factor-beta), OIF(osteoid-inducing factor), 안지오제닌(angiotensin), 엔도세린(endothelin), HGF(hepatocyte growth factor), KGF(keratinocyte growth factor), BMP(bone morphogenetic protein), GDF(growth differentiation factor) 및 CSF(colony-stimulating factor)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 골 형성제는 알렌드로네이트(alendronate), 리제드로네이트, 졸레드로네이트, 에티드로네이트, 코로드로네이트, 티루드로네이트, 파미드로네이트, 올파드로네이트, 이반드로네이트, 텍사메타손 및 락토페린으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 연골 형성제는 카토게닌(Kartogenin), 스타틴(statin), 플루프로스테놀(fluprostenol), 비타민 D(vitamin D), 에스트로겐(estrogen), SERM(selective estrogen receptor modifier), 비스포스페이트(bisphosphonate), src-티로신 카이네이즈 저해제, 카텡신 K 저해제(cathepsin K inhibitor), 베칼로 ATPase 저해제(vacuolar-ATPase inhibitor), 프로스타글랜딘(prostaglandin), 수산화인회석(hydroxyapatite) 및 인산삼석회(tricalcium phosphate)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 고분자는 폴리(락타이드-코-글리콜라이드) (Poly(lactide-co-glycolide)), 폴리(락티에시드)(Poly(lactic acid)), 폴라카프로락톤(Polycaprolactone), 폴리글리콜라이드(Polyglycolide), 폴리(L-락타이드)(Poly(L-lactide)), 폴리(D-락타이드)(Poly(D-lactide)), 메톡시 폴리(에틸렌글리콜)-b-폴리(카프로락톤)(Methoxy poly(ethylene glycol)-b-poly(caprolactone)), 메톡시 폴리(에틸렌글리콜)-b-폴리(락타이드-코-글리콜라이드)(Methoxy poly(ethylene glycol)-b-poly(lactide-co-glycolide)), 메톡시 폴리(에틸렌글리콜)-b-폴리(L-락타이드)(Methoxy poly(ethylene glycol)-b-poly(L-lactide)), 폴리(L-락타이드)-b-폴리(에틸렌글리콜)-b-폴리(L-락타이드)(Poly(L-lactide)-b-poly(ethylene glycol)-b-poly(L-lactide)), 폴리(락타이드-코-글리콜라이드)-b-폴리(에틸렌글리콜)-b-폴리(락타이드-코-글리콜라이드)(Poly(lactide-co-glycolide)-b-poly(ethylene glycol)-b-poly(lactide-co-glycolide)), 폴리(스티렌)-b-폴리(D,L-락타이드)(Poly(styrene)-b-poly(D,L-lactide)), 폴리(락타이드-코-글리콜라이드)-b-테트라에틸렌글리

콜-b-폴리(락타이드-코-글리콜라이드)(Poly(lactide-co-glycolide)-b-tetraethylene glycol-b-poly(lactide-co-glycolide)) 및 폴리(락타이드-코-글리콜라이드)-b-폴리(에틸렌글리콜)-b-폴리(락타이드-코-글리콜라이드)(Poly(lactide-co-glycolide)-b-Poly(ethylene glycol)-b-Poly(lactide-co-glycolide))로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 나노입자는 50 내지 800 nm 크기인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (c)는 세포배양액 1 ml 당 나노입자를 0.5 내지 20 mg 분산시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제 1 항에 있어서, 상기 줄기세포는 중간엽 줄기세포인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제 1 항에 있어서, 상기 세포배양액은 완전배지(Complete media)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제 9 항에 있어서, 상기 완전배지는 골 또는 연골 형성제를 포함하지 않는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제 1 항의 방법에 따라 제조된 골 또는 연골 형성제를 포함하는 나노입자가 내부에 탑재된 줄기세포를 배양하는 단계를 포함하는 줄기세포의 골 또는 연골로의 분화방법.

청구항 12

제 1 항의 방법에 따라 제조된 골 또는 연골 형성제를 포함하는 나노입자가 내부에 탑재된 줄기세포의 3차원 세포 집합체(Spheroid cell).

청구항 13

제 12 항의 세포 집합체를 포함하는 골 또는 연골 분화용 조성물.

청구항 14

골 또는 연골 형성제를 포함하는 나노입자가 내부에 탑재된 줄기세포를 포함하는 골질환 또는 연골질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 골 또는 연골 형성제를 포함하는 나노입자가 탑재된 줄기세포 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

[0003] 최근 조직공학과 재생의학의 발달에 의하여 손상된 조직과 장기를 치료할 수 있는 치료방법으로 줄기세포를 이용한 세포치료방법이 대두되고 있다. 줄기세포란, 여러 종류의 신체 조직으로 분화할 수 있는 능력을 가진 세포, 즉 '미분화' 세포를 의미한다. 이러한 미분화 상태에서 적절한 조건을 맞춰주면 다양한 조직 세포로 분화할 수 있으므로 손상된 조직을 재생하는 등의 치료에 응용하기 위한 연구가 진행되고 있다. 줄기세포에는 사람의 배아를 이용해 만들 수 있는 배아줄기세포(Embryonic stem cell)와 혈구세포를 끊임없이 만드는 골수세포와 같은 성체 줄기세포(Adult stem cell)가 있다. 성체 줄기세포는 제대혈(탯줄혈액)이나 다 자란 성인의 골수와 혈액 등에서 추출해낸 세포로서 뼈와 간, 혈액 등 구체적 장기의 세포로 분화되기 직전의 원시세포다. 여기에는 조혈모세포(Hematopoietic Stem Cell)와 재생의학의 재료로 각광 받고 있는 중간엽 줄기세포(Mesenchymal Stem Cell), 신경줄기세포(Neural Stem Cell) 등이 있다. 성체 줄기세포는 증식이 어렵고 쉽게 분화되는 경향이 강한 대신에 여러 종류의 성체 줄기세포를 사용하여 실제 의학에서 필요로 하는 장기재생을 할 수 있을 뿐 아니라 이식된 후 각 장기의 특성에 맞게 분화할 수 있는 특성을 지니고 있다. 또한 성체줄기세포는 인간 배아에서 추출한 배아 줄기세포와 달리 골수나 뇌세포 등 이미 성장한 신체조직에서 추출하기 때문에 윤리논쟁을 피할 수 있는 장점이 있다. 하지만, 배아줄기세포에 비해 체외 계대 배양 및 분화능에 한계점이 존재하는 단점이 있다(NEW 경제용어사전, 미래와경영연구소, 2006).

[0004] 상기와 같은 성체 줄기세포 또는 중간엽 줄기세포의 분화능을 향상시키기 위해 다양한 시도들이 있어왔다. 대한민국 등록특허 제10-1517295호에서는 고분자 나노섬유 시트 다중층에 중간엽 줄기세포 및 연골세포가 씨딩된 나노섬유 스캐폴드를 이용하여 골 및 연골 재생의 효율을 증진시킬 수 있음을 개시하고 있다. 또한, 대한민국 등록특허 제10-0920951호는 생분해성 고분자와 인산칼슘계 생체적합성 세라믹을 포함하여 성형 제조된 복합 지지체에 인간 지방조직 유래 줄기세포를 로딩하여 줄기세포의 골세포로의 분화를 자극하는 기술을 개시하고 있다. 대한민국 등록특허 제10-0684932호에서는 중간엽 줄기세포를 생분해성 고분자 포함배지에서 배양하여 중간엽 줄기세포가 고정된 삼차원 지지체를 제조하고, 이를 동물에 주입한 다음, 저주파의 초음파로 처리하여 골수유래 중간엽 줄기세포로부터 연골세포의 분화속도 및 분화율을 효율적으로 향상시킬 수 있음을 개시하고 있다.

[0006] 상기와 같이 현재 중간엽 줄기세포의 분화효율을 향상시키기 위해 완전배지(complete media)가 아닌 골 또는 연골 분화배지를 이용하는 기술, 다양한 종류의 3차원 지지체를 활용하는 기술, 초음파 처리 기술 등 다양한 기술들이 출현하고 있다.

[0007] 하지만, 초음파 처리 기술은 별도의 장비가 필요하고, 3차원 지지체를 활용하는 기술은 지지체를 따로 만들어서 줄기세포에 결합시키는 별도의 공정이 요청되며, 골 또는 연골 분화배지를 이용하는 기술은 골 또는 연골 형성제를 포함하는 배지를 지속적으로 교체해 주어야 하는 불편함이 따르는 실정이다.

[0009] 상기한 배경기술로서 설명된 사항들은 본 발명의 배경에 대한 이해 증진을 위한 것일 뿐, 이 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 이미 알려진 종래기술에 해당함을 인정하는 것으로 받아들여져서는 안 될 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명자들은 별도의 장비나 지지체 없이 줄기세포의 골 또는 연골로의 분화능을 효율적으로 향상시킬 수 있는 방법을 찾기 위해 부단히 노력하였다. 그 결과 골 또는 연골 형성제를 포함하는 나노입자를 줄기세포에 분산시키고 이를 배양함으로써, 상기 나노입자를 줄기세포 안에 탑재할 경우 별도의 골 또는 연골 분화배지 없이도

완전배지 내에서 원하는 골 또는 연골로 보다 효율적으로 분화할 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하게 되었다.

[0013] 따라서, 본 발명의 목적은 골 또는 연골 형성제를 포함하는 나노입자가 내부에 탑재된 줄기세포의 제조방법을 제공하는데 있다.

[0014] 본 발명의 다른 목적은 골 또는 연골 형성제를 포함하는 나노입자가 내부에 탑재된 줄기세포를 포함하는 골질환 또는 연골질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는데 있다.

[0016] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0018] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 골 또는 연골 형성제를 포함하는 나노입자가 내부에 탑재된 줄기세포의 제조방법을 제공한다:

[0019] (a) 골 또는 연골 형성제를 용해하고 고분자와 교반하여 혼합물을 형성하는 단계;

[0020] (b) 상기 혼합물로부터 골 또는 연골 형성제를 포함하는 나노입자를 분리하는 단계; 및

[0021] (c) 상기 나노입자를 분산시킨 세포배양액을 줄기세포에 주입하는 단계.

[0023] 본 발명자들은 별도의 장비나 지지체 없이 줄기세포의 골 또는 연골로의 분화능을 효율적으로 향상시킬 수 있는 방법을 찾기 위해 부단히 노력하였다. 그 결과 골 또는 연골 형성제를 포함하는 나노입자를 줄기세포에 분산시키고 이를 배양함으로써, 상기 나노입자를 줄기세포 안에 탑재할 경우 추가적인 골 또는 연골 분화배지의 주입이나 골 또는 연골 형성제의 공급 없이도 완전배지 내에서 원하는 골 또는 연골로 보다 효율적으로 분화할 수 있음을 확인하였다.

[0025] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 나노입자가 내부에 탑재된 줄기세포를 배양하는 단계를 포함하는 줄기세포의 골 또는 연골로의 분화방법을 제공한다.

[0027] 본 발명을 각 단계에 따라 설명하면 다음과 같다:

[0028] (a) 골 또는 연골 형성제 용해 후 고분자와 교반하여 혼합물을 제조

[0029] 본 발명의 골 또는 연골 형성제를 포함하는 나노입자가 내부에 탑재된 줄기세포를 제조하기 위해서 먼저 골 또는 연골 형성제를 적합한 용매에 용해시킨다.

[0030] 본 명세서에서, 용어 “골 형성제”는 골의 생성 또는 복구를 촉진, 유도, 자극, 개시하는 인자 또는 물질로서, 성장인자(예를 들어, 골유도 또는 혈관형성인자(osteoinductive or angiogenic factor)), 골전도성 물질(osteoconductive material) 및 골형성 물질(osteogenic material)을 의미한다(미국공개특허 제US2007-0168041호).

[0031] 상기 성장인자는 FGF-1, FGF-2 및 FGF-4를 포함하는 FGF(fibroblast growth factor); PDGF-AB, PDGF-BB 및 PDGF-AA를 포함하는 PDGF(platelet-derived growth factor); EGF(epidermal growth factor); VEGF(vascular endothelial growth factor); IGF-I 및 -II를 포함하는 IGF(insulin-like growth factor); TGF- β 1, 2 및 3를 포함하는 TGF- β (Transforming growth factor-beta); OIF(osteoid-inducing factor); 안지오제닌(angiotensin); 엔도세린(endothelin); HGF(hepatocyte growth factor); KGF(keratinocyte growth factor); BMP-1, BMP-3, BMP-2, OP-1, BMP-2A, BMP-2B, BMP-7 및 BMP-14을 포함하는 BMP(bone morphogenetic protein); GDF-5를 포함하는 GDF(growth differentiation factor); CSF-1, G-CSF, 및 GM-CSF를 포함하는 CSF(colony-

stimulating factor)를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

- [0032] 상기 골전도성 물질은 칼슘, 인, 수산화인회석(hydroxyapatite), 콜라겐을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0033] 상기 골형성 물질은 알렌드로네이트(alendronate), 리제드로네이트, 졸레드로네이트, 에티드로네이트, 코로드로네이트, 티루드로네이트, 파미드로네이트, 올파드로네이트, 이반드로네이트, 텍사메타손 및 락토펜을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0034] 본 명세서에서, 용어 “연골 형성제”는 연골의 생성 또는 복구를 촉진, 유도, 자극, 개시하는 인자 또는 물질로서, 상기 성장인자 및 연골형성 물질을 의미한다. 상기 연골형성 물질은 카토게닌(Kartogenin); 카토로바스타틴, 심바스타틴 및 아토르바스타틴을 포함하는 스타틴(statin); 플루프로스테놀(fluprostenol), 비타민 D(vitamin D); 에스트로겐(estrogen); SERM(selective estrogen receptor modifier), 알렌드로네이트(alendronate) 및 이반드로네이트(ibandronate)를 포함하는 비스포스페이트(bisphosphonate); src-티로신 카이네이즈 저해제; 카텡신 K 저해제(cathepsin K inhibitor); 베쿨로 ATPase 저해제(vacuolar-ATPase inhibitor); PGE-2를 포함하는 프로스타글랜딘(prostaglandin); 수산화인회석(hydroxyapatite); 및 인산삼석회(tricalcium phosphate)를 포함하나 이에 제한되지 않는다(국제 공개특허 제W02003/043576호).
- [0035] 적합한 용매로는 상기 골 또는 연골 형성제의 종류에 따라 당업계에 공지된 다양한 용매를 이용할 수 있고, 바람직하게는 디메틸설폭사이드(DMSO), 디메틸포름아미드(DMF), 테트라하이드로퓨란(THF), 아세토니트릴, 디클로로메탄, 에틸아세테이트, 헥산, 디에틸에테르, 벤젠, 클로로포름, 아세톤 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 사용할 수 있으며, 보다 바람직하게는 디메틸설폭사이드를 이용하여 용해시킬 수 있다.
- [0036] 상기 용해 후에는 고분자와 교반하여 혼합물을 형성한다.
- [0037] 본 발명에서 이용할 수 있는 고분자는 폴리(락타이드-코-글리콜라이드) (Poly(lactide-co-glycolide)), 폴리(락티에시드)(Poly(lactic acid)), 폴라카프로락톤(Polycaprolactone), 폴리글리콜라이드(Polyglycolide), 폴리(L-락타이드)(Poly(L-lactide)), 폴리(D-락타이드)(Poly(D-lactide)), 메톡시 폴리(에틸렌글리콜)-b-폴리(카프로락톤)(Methoxy poly(ethylene glycol)-b-poly(caprolactone)), 메톡시 폴리(에틸렌글리콜)-b-폴리(락타이드-코-글리콜라이드)(Methoxy poly(ethylene glycol)-b-poly(lactide-co-glycolide)), 메톡시 폴리(에틸렌글리콜)-b-폴리(L-락타이드)(Methoxy poly(ethylene glycol)-b-poly(L-lactide)), 폴리(L-락타이드)-b-폴리(에틸렌글리콜)-b-폴리(L-락타이드)(Poly(L-lactide)-b-poly(ethylene glycol)-b-poly(L-lactide)), 폴리(락타이드-코-글리콜라이드)-b-폴리(에틸렌글리콜)-b-폴리(락타이드-코-글리콜라이드)(Poly(lactide-co-glycolide)-b-poly(ethylene glycol)-b-poly(lactide-co-glycolide)), 폴리(스티렌)-b-폴리(D,L-락타이드)(Poly(styrene)-b-poly(D,L-lactide)), 폴리(락타이드-코-글리콜라이드)-b-테트라에틸렌글리콜-b-폴리(락타이드-코-글리콜라이드)(Poly(lactide-co-glycolide)-b-tetraethylene glycol-b-poly(lactide-co-glycolide)), 폴리(락타이드-코-글리콜라이드)-b-폴리(에틸렌글리콜)-b-폴리(락타이드-코-글리콜라이드)(Poly(lactide-co-glycolide)-b-Poly(ethylene glycol)-b-Poly(lactide-co-glycolide))를 포함하나 이에 제한되지 않는다.
- [0039] (b) 나노입자의 제조 및 분리
- [0040] 다음으로 상기 혼합물로부터 나노입자를 분리한다. 나노입자를 제조하는 방법은 당업계에 공지된 다양한 방법을 이용할 수 있으며, 예를 들어, 투석(dialysis), 원심분리, 세척, 동결건조 등의 과정을 통해 나노입자를 제조할 수 있다. 나노입자의 크기는 50 내지 800 nm 크기가 바람직하며, 보다 바람직하게는 200 내지 400 nm이다. 나노입자의 크기가 너무 작으면 나노입자 내부에 약물을 탑재할 수 있는 효율이 낮아지며, 나노입자의 크기가 너무 커지면 줄기세포 내에 탑재되는 나노입자의 양이 현저히 감소하기 때문에, 줄기세포 내에 나노입자를 탑재할 수 있는 효율이 매우 떨어진다.
- [0042] (c) 나노입자를 분산시킨 세포배양액을 줄기세포에 주입
- [0043] 상기 나노입자를 제조한 후, 세포배양액에 분산하고 이를 줄기세포에 주입한다. 예를 들어, 줄기세포를 적당한 장소(예를 들어, 웰 플레이트)에 분주한 후 상기 나노입자를 분산시킨 세포배양액을 상기 줄기세포가 분주된 곳에 주입한다.
- [0044] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 나노입자는 세포배양액 1 ml 당 나노입자를 0.5 내지 20 mg 분

산시키는 것이다. 나노입자를 너무 적은 양으로 분산시킬 경우, 줄기세포에 탑재되는 나노입자의 양이 상대적으로 적으며, 이로 인해 매우 낮은 양의 골 또는 연골 형성제가 줄기세포내로 탑재되어 줄기세포 분화 효율이 매우 떨어진다. 한편, 높은 양의 나노입자를 줄기세포에 분산할 경우, 줄기세포가 탑재할 수 있는 나노입자의 양이 한계가 있으며, 일정 한계 이상은 흡수하지 않으며, 높은 농도의 나노입자를 줄기세포에 처리하게 되면, 많은 양의 나노입자를 흡수한 줄기세포의 생존율이 낮아진다.

[0045] 세포의 증식을 위한 배지로서 바람직하게는 완전배지(complete media) 이다.

[0046] 본 명세서에서 용어 “완전배지”는 기본배지(basal medium) 또는 기본배지에 혈청(예를 들어, FBS(Fetal Bovine Serum))을 추가한 배지를 의미한다.

[0047] 기본배지의 예로는 Eagles's MEM (Eagle's minimum essential medium, Eagle, H. *Science* 130:432(1959)), α -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)), Waymouth'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)) 등이 이용될 수 있다. 가장 바람직하게는 DMEM이다. 배지 및 세포의 배양에 대한 일반적인 설명은, R. Ian Freshney, *Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique*, Alan R. Liss, Inc., New York에 상세하게 기재되어 있으며, 이 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.

[0048] 상기 완전배지는 상기 혈청 외에 항생제(예를 들어, 페니실린/스트렙토마이신) 및 기타 알부민, 지질, 인슐린 등의 구성성분을 추가적으로 포함할 수 있다. 본 발명의 완전배지는 바람직하게는 상기 구성성분 외에 골 또는 연골 형성제는 추가적으로 포함되지 않은 것이다.

[0049] 상기 줄기세포는 당업계에 공지된 다양한 줄기세포를 이용할 수 있으며, 바람직하게는 성체줄기세포, 보다 바람직하게는 중간엽 줄기세포(Mesenchymal Stem Cell), 보다 더 바람직하게는 골수(Bone marrow), 제대(Cord) 또는 제대혈(Cord blood), 지방(Adipose), 편도(Tonsil) 유래 중간엽 줄기세포를 이용할 수 있다.

[0051] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 상기 나노입자가 내부에 탑재된 줄기세포의 3차원 세포 집합체(Spheroid cell)를 제공한다.

[0052] 본 발명의 또 다른 특징 중의 하나는 상기 나노입자가 내부에 탑재된 줄기세포는 상기 세포배양액 내에서 3차원 세포 집합체(spheroid cells)를 형성하는 것이다. 상기 세포집합체는 줄기세포 내부에 탑재된 골 또는 연골 형성제를 지속적으로 방출(sustained release)할 수 있다(도 1).

[0054] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 세포 집합체를 포함하는 골 또는 연골 분화용 조성물을 제공한다.

[0055] 본 발명의 조성물은 골분화배지(Osteogenic media) 또는 연골분화배지(Chondrogenic media)를 이용하지 않았음에도 불구하고, 일반 세포배양액 내에서 골 또는 연골로 보다 효율적으로 분화할 수 있다.

[0056] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 나노입자가 탑재된 줄기세포 또는 이의 3차원 세포 집합체는 나노입자를 탑재하지 않은 줄기세포 또는 이의 3차원 세포 집합체와 비교하여, 골 또는 연골 분화 관련 아무런 물질을 함유하지 않은 세포배양액에서 배양했음에도 불구하고 골분화배지 또는 연골분화배지를 이용한 경우보다 골 또는 연골 분화 효율이 유의적으로 증가하였다(도 2 내지 7).

[0058] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 골 또는 연골 형성제를 포함하는 나노입자가 내부에 탑재된 줄기세포를 포함하는 골질환 또는 연골질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0059] 본 발명의 약학 조성물에 의해 예방 또는 치료되는 골 또는 연골 질환은 병리학적 또는 물리적으로 인한 뼈 및

연골 조직의 손상으로부터 유래한 질환이며, 바람직하게는 관절연골 손상(반월상연골손상, 추간판 탈출증 등), 골관절염, 골다공증, 골연화증, 구루병, 섬유성 골염, 무형성 골질환, 대사성 골질환, 골용해, 건 또는 인대질환, 백혈구 감소증, 뼈의 기형, 고칼슘혈증, 신경압박 증후군 또는 물리적 손상으로 인한 뼈 또는 연골의 손상이다.

- [0060] 또한, 본 발명의 약학 조성물에 의해 예방 또는 치료되는 골 또는 연골 질환은 골 또는 연골에 손상, 결함(defect) 또는 부족이 있는 경우도 포괄하는 의미로서 예컨대 연골괴사, 골연골염, 연골과열, 연골외상, 연골결핍 및 선천성 기관연화 등이 있으나 반드시 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 약학 조성물은 관절연골(articular Cartilage), 귀 연골, 비연골, 팔꿈치 연골, 반월상연골(meniscus), 무릎연골, 늑연골, 발목연골, 기관연골, 후두연골 및 척추 연골 등 연골 부위에 제한 없이 연골의 결함 및 손상이 있는 부위에 효과적으로 사용될 수 있다.
- [0061] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 골 또는 연골 형성제를 포함하는 나노입자가 내부에 탑재된 줄기세포 또는 이의 집합체를 투여한 경우, 골 또는 연골 형성제만을 투여한 경우와 비교하여 염증인자의 발현을 감소시키거나, 항염증인자의 발현을 증가시킨다.
- [0062] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 골 또는 연골 형성제를 포함하는 나노입자가 내부에 탑재된 줄기세포 또는 이의 집합체를 투여한 경우, 동일 용량의 골 또는 연골 형성제만을 투여한 경우와 비교하여 염증인자의 발현을 감소시키거나, 항염증인자의 발현을 증가시킨다.
- [0063] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명의 조성물은 염증인자(예를 들어, $\text{TNF-}\alpha$)의 발현을 감소시키며, 바람직하게는 투여 후 5주 이상, 보다 바람직하게는 투여 후 12주 이상 염증인자의 발현을 감소시킨다.
- [0064] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명의 조성물은 항염증인자(예를 들어, IL-4)의 발현을 증가시키며, 바람직하게는 투여 후 5주 이상, 보다 바람직하게는 투여 후 8주 이상 항염증인자의 발현을 증가시킨다.
- [0065] 본 발명의 조성물이 약학 조성물로 제조되는 경우, 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본 발명의 약학 조성물에 포함되는 약학적으로 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, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘, 미네랄 오일, 식염수, PBS(phosphate buffered saline) 또는 배지 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0066] 본 발명의 약학 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.
- [0067] 본 발명의 약학 조성물은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 바람직하게는 비경구 투여 방식, 보다 바람직하게는 근육 내(intramuscular), 관절 내(intraarticular), 관절낭 내(intracapsular) 또는 활액낭 내(intrabursal) 투여이다.
- [0068] 본 발명의 약학 조성물의 적합한 투여량은 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. 본 발명의 약학 조성물의 일반적인 투여량은 성인 기준으로 1일 당 10^2 - 10^{10} 세포이다.
- [0069] 본 발명의 약학 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약학적으로 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, 시럽제 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

발명의 효과

- [0071] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0072] (i) 본 발명은 골 또는 연골 형성제를 포함하는 나노입자가 내부에 탑재된 줄기세포 및 이의 제조방법을 제공

한다.

[0073] (ii) 본 발명에 따르면, 본 발명의 나노입자가 내부에 탑재된 줄기세포는 별도의 골 또는 연골 분화배지 없이도 원하는 골 또는 연골로 보다 효율적으로 분화할 수 있어 골 또는 연골 질환의 치료제로서 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0075] 도 1은 본 발명에 따른 골분화 또는 연골분화 인자를 포함하는 나노입자가 탑재된 줄기세포의 약물방출 거동을 나타낸다.

도 2는 조골세포로 분화한 본 발명에 따른 골분화 인자를 포함하는 나노입자가 탑재된 줄기세포에 대한 알칼리성 포스파타제 활성도를 나타낸다.

도 3은 조골세포로 분화한 본 발명에 따른 골분화 인자를 포함하는 나노입자가 탑재된 줄기세포에 대한 칼슘 침착 농도를 나타낸다.

도 4는 연골세포로 분화한 본 발명에 따른 연골분화 인자를 포함하는 나노입자가 탑재된 줄기세포에 대한 GAG/DNA 농도를 나타낸다.

도 5는 본 발명의 줄기세포가 발현하는 마커 유전자들의 발현 양상을 나타낸다(도 5a: 골분화 마커(ALP, RUX-2, OCN 및 OPN) 발현 양상, 도 5b: 연골분화 마커(aggrecan, COL10A1, COL1A1 및 COL2A1) 발현 양상).

도 6은 조골세포로 분화한 본 발명에 따른 골분화 인자를 포함하는 나노입자가 탑재된 줄기세포에 대한 알칼리성 포스파타제 활성도 및 칼슘 침착 농도를 나타낸다.

도 7은 연골세포로 분화한 본 발명에 따른 연골분화 인자를 포함하는 나노입자가 탑재된 줄기세포에 대한 GAG/DNA 농도 및 연골분화 마커(aggrecan 및 COL1A1)의 발현 양상을 나타낸다.

도 8은 본 발명에 따른 나노입자가 탑재된 줄기세포의 관절 연골 손상 억제 정도를 나타낸 것이다.

도 9는 본 발명에 따른 나노입자가 탑재된 줄기세포의 염증인자의 발현 억제 정도를 나타낸 것이다.

도 10은 본 발명에 따른 나노입자가 탑재된 줄기세포의 항염증인자의 발현 증가 정도를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0076] 이하, 실시 예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시 예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시 예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0078] 실시예

[0079] 실시예 1. 골 형성제 탑재 생분해성 나노입자가 함유된 줄기세포의 3차원 세포집합체(spheroid cells) 제조

[0080] 디메틸설폭사이드 10 ml에 알렌드로네이트(Alndronate, Aln)을 10 mg을 용해시킨 다음 PEG-PLGA(폴리에틸렌글리콜-폴리락타이드-코-글리콜라이드) 40 mg과 PLGA(폴리락타이드-코-글리콜라이드) 160 mg을 넣고 1시간 동안 200 rpm으로 교반하여 완용시켰다. 반응 혼합물이 다 녹으면 투석막(dialysis membrane; MWCO 6,000~8,000)에 넣어 3일 동안 투석(dialysis)하고, 원심분리한다. 상층액을 제거한 다음 고형분은 증류수를 사용하여 3회 세척한 뒤, 동결건조함으로써 알렌드로네이트가 1 ml 당 1 mg이 탑재된 나노입자를 제조하였다.

[0081] 0.5% 아가로스 젤이 코팅 된 96-웰 플레이트에 1×10^5 의 편도유래줄기세포를 분주한 후, Aln(1 mg) 나노입자가 1 mg/ml의 농도로 분산된 세포배양액(완전배지(complete media): 10% FBS (Fetal bovine serum, GIBCO), 1% 페니실린/스트렙토마이신(GIBCO) 포함된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, GIBCO)을 주입하여 알렌드로네이트 탑재 생분해성 나노입자가 함유된 줄기세포의 3차원 세포 집합체(spheroid cells)를 제조하였다. 또한, 상기 방식과 같은 방식으로 다른 종류의 골 형성제인 BMP-2가 탑재된 나노입자를 제조하고, BMP-2(500 ng/ml) 나노입자가 1 mg/ml의 농도로 분산된 세포배양액을 주입하여 마찬가지로 BMP-2 탑재 생분해성 나노입자

가 함유된 줄기세포의 3차원 세포 집합체를 제조하여 실험에 이용하였다.

[0083] 실시예 2. 연골 형성제 탑재 생분해성 나노입자가 함유된 줄기세포의 3차원 세포집합체 제조

[0084] 디메틸설폭사이드 10 ml에 카토게닌(Kartogenin, KGN) 160 μ g을 용해시킨 것을 제외하고, 실시예 1의 방법으로 카토게닌이 1 ml 당 16 μ g이 탑재된 나노입자를 제조하였다.

[0085] 0.5% agarose gel이 코팅 된 96-well plate에 1×10^5 의 편도유래줄기세포를 분주한 후, KGN(16 μ g) 나노입자가 1 mg/ml의 농도로 분산된 세포배양액(complete media)을 주입하여 카토게닌 탑재 생분해성 나노입자가 함유된 줄기세포의 3차원 세포 집합체(spheroid cells)를 제조하였다. 또한, 상기 방식과 같은 방식으로 다른 종류의 연골 형성제인 TGF- β 가 탑재된 나노입자를 제조하고, TGF- β (500 ng/ml) 나노입자가 1 mg/ml의 농도로 분산된 세포배양액을 주입하여 마찬가지로 TGF- β 탑재 생분해성 나노입자가 함유된 줄기세포의 3차원 세포 집합체를 제조하여 실험에 이용하였다.

[0087] 비교예 1. Control(Complete media) 3차원 세포 집합체 제조

[0088] 0.5% 아가로스 젤이 코팅 된 96-웰 플레이트에 1×10^5 의 편도유래줄기세포를 분주한 후, 세포배양액(complete media)을 주입하여 줄기세포의 3차원 세포 집합체(spheroid cells)를 제조하였다.

[0090] 비교예 2. 골분화배지(Osteogenic media) 3차원 세포 집합체 제조

[0091] 0.5% 아가로스 젤이 코팅 된 96-웰 플레이트에 1×10^5 의 편도유래줄기세포를 분주한 후, 골 분화 배지(Osteogenic media: 100 μ M/ml ascorbic acid (Sigma-Aldrich), 2 mM β -glycerophosphate (Sigma-Aldrich), 10 mM dexamethasone (Thermo Fisher) 포함된 Complete media)을 주입하여 줄기세포의 3차원 세포 집합체(spheroid cells)를 제조하였다.

[0093] 비교예 3. 연골분화배지(Chondrogenic media) 3차원 세포 집합체 제조

[0094] 0.5% 아가로스 젤이 코팅 된 96-웰 플레이트에 1×10^5 의 편도유래줄기세포를 분주한 후, 연골분화배지(Chondrogenic media: 6.25 μ g/ml Insulin (Sigma), 10 ng/ml TGF- β (Sigma-Aldrich), 50 nM L-ascorbic acid(Sigma) 포함된 Complete media)을 주입하여 줄기세포의 3차원 세포 집합체(spheroid cells)를 제조하였다.

[0096] 시험예 1. 약물 방출 거동 테스트

[0097] 실시예 1, 2에서 제조된 생분해성 나노입자로부터 약물 방출 거동을 분석하였다. 구체적으로, 실시예 1, 2의 생분해성 나노입자 40 mg을 1 ml의 PBS 버퍼(pH 7.4)에 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 100 rpm으로 교반하면서 정해진 시간 간격(1, 3, 5, 10시간 및 1, 3, 5, 7, 14, 21, 28일 간격)으로 새로운 버퍼를 교환해주며 약물(알렌드로네이트 그리고 카토게닌) 방출 거동을 측정하였다. 방출된 알렌드로네이트 그리고 카토게닌의 양은 Flash Multimode Reader(VarioskanTM, Thermo Scientific, USA)를 이용하여 알렌드로네이트는 293 nm, 카토게닌은 300 ~ 400 nm에서 흡광도를 측정하여 분석하였으며, 그 결과를 하기 도 1에 나타내었다.

[0098] 도 1에서 보여주듯이, 실시예 1, 2에 따른 생분해성 나노입자는 초반 1일 동안에는 탑재하고 있던 약물이 다소 빠르게 방출되기는 하였으나, 그 이후로 4주 동안 탑재된 약물이 지속적으로 방출되는 특성을 보였다.

[0100] 시험예 2. 알칼리성 포스파타제 활성화도 평가

[0101] 조골세포의 초기분화 마커인 알칼리성 포스파타제 활성화도 측정을 통해 실시예 1, 2에 따른 약물이 탑재된 생분해성 나노입자(Aln(1 mg)/NPs 그리고 KGN(16 μ g)/NPs)와 생분해성 나노입자가 들어가지 않은 비교예 1, 2 및 3

에 따른 세포배양배지(Complete media), 골분화배지(Osteogenic media) 그리고 연골분화배지(Chondrogenic media)의 골융합 효능을 평가하였다.

[0102] 실시예 1, 2의 생분해성 나노입자를 1 mg/ml의 농도로 세포배양액에 넣고 초음파(Sonicator)로 10시간 동안 분산 시켜준 뒤, 와트만 실린지 필터를 이용하여 박테리아, 세균 등을 걸러냈다. 다음으로, 0.5% 아가로스로 코팅 된 96-웰 플레이트에 1×10^5 의 편도유래줄기세포를 분주한 후, 상기 편도유래줄기세포가 분주된 곳에 실시예 1, 및 2의 나노입자가 1 mg/ml의 농도로 분산된 세포배양액을 주입하였고 비교예 1, 2 및 3에 따른 세포배양배지(Complete media), 골분화배지(Osteogenic media) 그리고 연골분화배지(Chondrogenic media)는 0.5% 아가로스로 코팅 된 96-웰 플레이트에 1×10^5 의 편도유래줄기세포를 분주한 후, 각각의 배지를 주입하여 3일, 7일, 10일 및 14일 동안 3차원 집합체(Spheroid) 세포 형태로 분화 및 배양하였다. 상기 편도유래줄기세포가 분주된 곳에 배양 후, 세포를 PBS 버퍼로 세척한 뒤, 상기 세포에 $1 \times \text{RIPA}$ 버퍼를 주입하고 4℃에서 110 W로 1분 동안 초음파 처리하였다. 다음으로 용해된 세포를 4℃에서 3분 동안 13,500 rpm으로 원심분리한 뒤, 상층액에 p-니트로페닐포스파테이트 용액을 첨가하여 37℃에서 30분 동안 배양한 후, 500 mL의 1 N NaOH로 반응을 종결시켰다. 405 nm에서 흡광도를 측정하였으며 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0103] 하기 도 2에 나타난 바와 같이, 실시예 1의 약물탐재 생분해성 나노입자에서 조골세포로 분화한 편도유래줄기세포에 대한 알칼리성 포스파타제 활성도가 실시예 2 그리고 비교예 1, 2 및 3 각각의 배지에 비교하여 유효성 있게 증가하는 것으로 평가되었다.

[0105] 시험예 3. 칼슘 침착 평가

[0106] 조골세포의 후기 분화 마커인 칼슘 침착 정도를 측정하여 실시예 1, 2에 따른 약물이 탑재된 생분해성 나노입자(Aln(1 mg)/NPs 그리고 KGN(16 μg)/NPs)와 생분해성 나노입자가 들어가지 않은 비교예 1, 2 및 3에 따른 세포배양배지(Complete media), 골분화배지(Osteogenic media) 그리고 연골분화배지(Chondrogenic media)의 골융합 효능을 평가하였다.

[0107] 구체적으로, 실시예 1, 2의 생분해성 나노입자를 1 mg/ml의 농도로 세포배양액에 넣고 초음파(Sonicator)로 10시간 동안 분산 시켜준 뒤, 와트만 실린지 필터를 이용하여 박테리아, 세균 등을 걸러냈다. 다음으로, 0.5% 아가로스로 코팅 된 96-웰 플레이트에 1×10^5 의 편도유래줄기세포를 분주한 후, 상기 편도유래줄기세포가 분주된 곳에 실시예 1 및 2의 나노입자가 1 mg/ml의 농도로 분산된 세포배양액을 주입하였고 비교예 1, 2 및 3에 따른 세포배양배지(Complete media), 골분화배지(Osteogenic media) 그리고 연골분화배지(Chondrogenic media)는 0.5% 아가로스로 코팅 된 96-웰 플레이트에 1×10^5 의 편도유래줄기세포를 분주한 후, 각각의 배지를 주입하여 7일, 14일 및 21일 동안 3차원 집합체(Spheroid) 세포 형태로 배양하였다. 배양 후, 세포를 PBS 버퍼로 세척한 뒤, Tris-EDTA 용액으로 각각의 나노입자로부터 세포를 떼어내었다. 떼어낸 세포는 13,500 rpm으로 1분간 원심분리한 뒤, 0.1 % 트리톤 X-100 용액을 세포에 넣고, 65℃에서 3시간 보관 후 초음파를 가하여 세포의 막을 분쇄하고, 원심분리를 하였다. 상층액을 분리한 뒤, QuantiChrom™ Calcium Assay 키트를 이용하여 612 nm에서 흡광도를 측정 비교하여 칼슘 침착 정도를 분석하였으며, 이를 하기 도 3에 나타내었다.

[0108] 도 3에 나타난 바와 같이, 실시예 1의 약물탐재 생분해성 나노입자에서 조골세포로 분화한 편도유래줄기세포에 대한 칼슘 침착 농도가 실시예 2 그리고 비교예 1, 2 및 3 각각의 배지에 비교하여 유효성 있게 증가하는 것으로 평가되었다.

[0110] 시험예 4. GAG 분석

[0111] 연골세포의 분화 마커인 글리코스아미노글리칸(glycosaminoglycan, GAG)를 측정하여 실시예 1, 2에 따른 약물이 탑재된 생분해성 나노입자(Aln(1 mg)/NPs 그리고 KGN(16 μg)/NPs)와 그리고 생분해성 나노입자가 들어가지 않은 비교예 1, 2 및 3에 따른 세포배양배지(Complete media), 골분화배지(Osteogenic media) 그리고 연골분화배지(Chondrogenic media)의 연골세포 분화를 평가하였다. 구체적으로, 실시예 1, 2의 생분해성 나노입자를 1 mg/ml의 농도로 세포배양액에 넣고 초음파(Sonicator)로 10시간 동안 분산 시켜준 뒤, 와트만 실린지 필터를 이용하여 박테리아, 세균 등을 걸러냈다. 다음으로, 0.5% 아가로스로 코팅 된 96-웰 플레이트에 1×10^5 의 편도유래줄기세포를 분주한 후, 상기 편도유래줄기세포가 분주된 곳에 실시예 1 및 2의 나노입자가 1 mg/ml의 농도

로 분산된 세포배양액을 주입하였고 비교예 1, 2 및 3에 따른 세포배양배지(Complete media), 골분화배지(Osteogenic media) 그리고 연골분화배지(Chondrogenic media)는 0.5% 아가로스로 코팅 된 96-웰 플레이트에 1×10^5 의 편도유래줄기세포를 분주한 후, 각각의 배지를 주입하여 7일, 14일 및 21일 동안 3차원 집합체(Spheroid) 세포 형태로 배양하였다. 배양 후, 세포를 PBS 버퍼로 세척한 뒤, Tris-EDTA 용액으로 각각의 나노입자로부터 세포를 떼어내었다. 떼어낸 세포는 13,500 rpm으로 1분간 원심분리한 뒤, 0.1 % 트리톤 X-100 용액을 세포에 넣고, 4℃에서 1분간 초음파를 가하여 세포의 막을 분쇄하고, 원심분리를 하였다. 상층액을 분리한 뒤, quant-it picogreen dsdna assay kit 키트를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정 비교하여 DNA양 정도를 분석하였으며, Blyscan Glycosaminoglycan Kit B1000를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정 비교하여 이를 하기 GAG를 정량 분석하였다. 이를 도 4에 나타내었다.

[0112] 도 4에 나타낸 바와 같이, 실시예 2의 약물담재 생분해성 나노입자에서 연골세포로 분화한 편도유래줄기세포에 대한 GAG/DNA 농도가 실시예 1 그리고 비교예 1, 2 및 3 각각의 배지에 비교하여 유효성 있게 증가하는 것으로 평가되었다.

[0114] 시험예 5. 유전자 발현 분석

[0115] 골아세포의 전기, 후기 분화 마커 유전자와 연골세포의 후기 분화 마커 유전자의 발현 분석을 통해 실시예 1, 2에 따른 약물이 담재된 생분해성 나노입자(Aln(1 mg)/NPs 그리고 KGN(16 μ g)/NPs)와 생분해성 나노입자가 들어가지 않은 비교예 1, 2 및 3에 따른 세포배양배지(Complete media), 골분화배지(Osteogenic media) 그리고 연골분화배지(Chondrogenic media)의 골융합 및 연골융합 효능을 평가하였다. 구체적으로 실시예 1 및 2의 나노입자를 1 mg/ml의 농도로 세포배양액에 넣고 초음파(Sonicator)로 10시간 동안 분산 시켜준 뒤, 와트만 실린지 필터를 이용하여 박테리아, 세균 등을 걸러냈다. 다음으로, 0.5% 아가로스로 코팅 된 96-웰 플레이트에 1×10^5 의 편도유래줄기세포를 분주한 후, 상기 편도유래줄기세포가 분주된 곳에 실시예 1, 및 2의 나노입자가 1 mg/ml의 농도로 분산된 세포배양액을 주입하였고 비교예 1, 2 및 3에 따른 세포배양배지(Complete media), 골분화배지(Osteogenic media) 그리고 연골분화배지(Chondrogenic media)는 0.5% 아가로스로 코팅 된 96-웰 플레이트에 1×10^5 의 편도유래줄기세포를 분주한 후, 각각의 배지를 주입하여 7일 및 21일 동안 3차원 집합체(Spheroid) 세포 형태로 분화 및 배양하였다. 배양 후, 세포를 PBS 버퍼로 세척한 뒤, Tris-EDTA 용액으로 각각의 나노입자로부터 세포를 떼어내었다. 떼어낸 세포는 13,500 rpm으로 1분간 원심분리한 뒤, 세포에 Trizol 시약 용액과 클로로포름을 넣어주고, 4℃에서 1분간 초음파를 가하여 세포를 분리한 뒤, 원심분리를 하였다. 상층액을 분리한 뒤, RNeasy Mini kit(RNeasy mini kit; Qiagen, Doncaster, VIC, Australia)를 이용하여 NanoDrop 260/280 nm에서 RNA 농도를 측정하였다. 분리된 RNA는 AccuPower RT-PCR PreMix(Bioneer, Korea)를 이용하여 cDNA 합성 및 실시간 증합효소 연쇄반응(Real-time PCR)으로 분석하였다.

[0116] 도 5에 나타낸 바와 같이, 비교예 1은 골분화와 연골분화에 관련된 유전자의 발현이 없었으나, 본 발명에 따른 실시예 1, 2의 약물 담지 생분해성 나노입자는 골분화(ALP, RUX-2, OCN 및 OPN)와 연골분화(aggrecan, COL10A1, COL1A1 및 COL2A1) 관련된 초기 및 후기 마커 유전자들의 발현이 증가하였다. 따라서, 본 발명에 따른 실시예 1, 2의 약물 담재 생분해성 나노입자는 골분화 및 연골분화에 효과적임을 입증하였다.

[0118] 시험예 6. 다른 골 형성제(BMP-2) 및 연골 형성제(TGF- β) 담재 생분해성 나노입자가 함유된 줄기세포의 3차원 세포집합체 분석

[0119] 추가적으로, 상기 골 형성제 Aln 및 연골 형성제 KGN 외 다른 종류의 골 형성제 및 연골 형성제를 포함하는 나노입자를 함유하는 줄기세포의 경우에도 동일한 골분화 또는 연골분화의 양상을 나타내는지 확인하기 위하여 추가실험을 하였다.

[0120] 상기 실시예 1에서 제조된 BMP-2(500 ng)/NPs를 이용하여 시험예 2(알칼리성 포스파타제 활성화도 평가) 및 시험예 3(칼슘 침착 평가)과 동일한 평가를 수행하였다. 시험결과, Aln(1 mg)/NPs 패턴과 유사하게 BMP-2(500 ng)/NPs의 경우 역시 알칼리성 포스파타제 활성화도 및 칼슘 침착 농도가 유효성 있게 증가하는 것으로 평가되었다(도 6).

[0121] 또한, 상기 실시예 2에서 제조된 TGF- β (500 ng)/NPs를 이용하여 시험예 4(GAG 분석) 및 시험예 5(유전자 발현 분석)와 동일한 평가를 수행하였다. 시험결과, KGN(16 μ g)/NPs 패턴과 유사하게 TGF- β (500 ng)/NPs의 경우

역시 GAG/DNA 농도가 유효성 있게 증가하는 것으로 평가되었으며, 연골분화(aggrecan, COL10A1, COL1A1 및 COL2A1) 관련된 초기 및 후기 마커 유전자들의 발현이 증가함을 확인하였다(도 7).

[0122] 따라서, 본 발명의 생분해성 나노입자가 함유된 줄기세포의 3차원 세포집합체는 다양한 종류의 골 형성제 또는 연골 형성제를 탑재할 수 있으며, 완전배지에서 배양하는 것만으로도 골분화 배지 또는 연골분화 배지를 이용한 효과 이상의 골분화 또는 연골분화 효과를 나타낼 수 있다.

[0124] 시험예 7. 3차원 세포집합체 및 KGN 탑재 나노입자에 대한 골관절염 치료 효능 확인

[0125] 1) 골관절염 동물 모델을 이용한 유효성 검증

[0126] 추가적으로, 골관절염 유도를 위해, 쥐를 마취하에 모노소듐 아이오도아세테이트(Monosodium Iodoacetate, MIA) [PBS (pH 7.4)에서 0.5 mg/mL] 50 μ L를 오른쪽 무릎 관절 내 주입하였다. 골관절염 유도 1주 후, 관절강 내 각 시료를 주입하였다. 대조군 및 실험군은 하기와 같다:

[0127] (a) 양성 대조군 (정상군, Control)

[0128] (b) 음성 대조군 (MIA 처리군)

[0129] (c) 실험 1군 (MIA 처리군 + 세포집합체 (Complete media) 주입)

[0130] (d) 실험 2군 (MIA 처리군 + 세포집합체 (Chondrogenic media) 주입)

[0131] (e) 실험 3군 (MIA 처리군 + 세포집합체/나노입자(Complete media) 주입)

[0132] (f) 실험 4군 (MIA 처리군 + 세포집합체/Kartogenin (16 ug)/나노입자 주입)

[0133] (g) 실험 5군 (MIA 처리군 + Kartogenin (16 ug) solution 주입)

[0135] 2) 방사학적 촬영 분석

[0136] 방사학적 영상 확인을 위해, 12주 후 적출하여, In-Vivo DXS 4000 Pro System 방사선 촬영 장치로 측정하였다.

그 결과, MIA 처리군과 세포집합체(Complete media) 및 세포집합체(Chondrogenic media) 주입군은 골관절염 유도를 억제하지 못해 관절 간격이 상당히 좁아지고, 관절연골 손상이 나타났다(도 8b, c, d). 그리고, 세포집합체/나노입자도 마찬가지로 관절 간격이 좁아지고 관절 연골 손상이 나타났다 (도 8e). 그러나, 세포집합체/Kartogenin (16 ug)/나노입자 처리군에서는 골관절염이 거의 없었고 관절 연골의 손상이 거의 없었다(도 8f).

[0138] 3) 염증인자 유전자 발현도 평가

[0139] 골관절염 동물모델에 실험군 주입 후, MIA 주입 1~12주 실험동물의 복대동맥으로부터 혈액을 채취하여 채취된 혈액을 이용하여 염증 (pro-inflammatory) 마커 (TNF- α)를 real-time PCR를 이용하여 측정하고 항염증 효과를 확인하였다. 분리된 혈액에서 QIAamp RNA Blood Mini Kit를 이용하여 RNA를 분리한 후 NanoDrop 260/280 nm 에서 RNA 농도를 측정하였다. 분리된 RNA는 AccuPower[®] RT-PCR PreMix을 이용하여 cDNA 합성 및 실시간 중합 효소 연쇄반응 (Real-time PCR)으로 분석하였다. 양성 대조군과 비교하여 음성 대조군인 MIA 처리군, 세포집합체 (Complete media) 주입군, 세포집합체 (Chondrogenic media) 주입군, 그리고 세포집합체/나노입자 (Complete media) 주입군들은 염증인자 발현도(TNF- α)가 증가하는 것을 확인하였고, 반면, KGN/나노입자 (KGN (16 ug)/NPs) 주입군에서는 염증인자 발현도가 감소되는 것을 확인하였다. 또한 KGN solution (KGN (16 ug) solution) 주입군에서 5주까지는 KGN/나노입자 주입군과 유사하게 염증인자 발현도가 감소하였으나 12주에서는 KGN/나노입자 주입군에 비해 지속적으로 염증을 억제하지 못하여 염증인자 발현도가 증가되는 것을 확인하였다 (도 9).

[0141] 4) 항염증인자 유전자 발현도 평가

[0142] 골관절염 동물모델에서 채취된 혈액을 이용하여 항염증 (anti-inflammatory) 마커 (IL-4)를 real-time PCR를

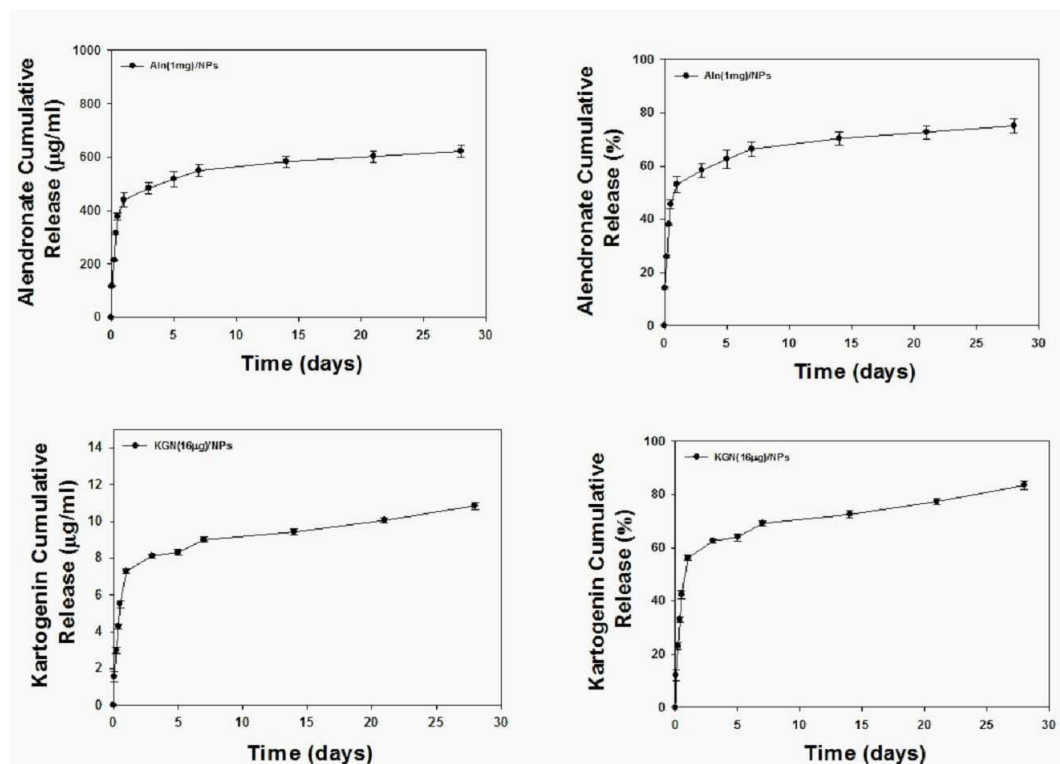
이용하여 측정하고 항염증인자 유전자 발현도를 확인하였다. 분리된 혈액에서 QIAamp RNA Blood Mini Kit를 이용하여 RNA를 분리한 후 NanoDrop 260/280 nm에서 RNA 농도를 측정하였다. 분리된 RNA는 AccuPower[®] RT-PCR PreMix을 이용하여 cDNA 합성 및 실시간 중합효소 연쇄반응 (Real-time PCR)으로 분석하였다. 양성 대조군과 비교하여 음성 대조군인 MIA 처리군, 세포집합체 (Complete media) 주입군, 세포집합체 (Chondrogenic media) 주입군, 그리고 세포집합체/나노입자(Complete media) 주입군들은 항염증인자 발현도(IL-4)가 변화가 없는 것을 확인하였고 반면, KGN/나노입자 (KGN (16 ug)/NPs) 주입군에서는 항염증인자 발현도가 증가하는 것을 확인하였다. 또한 KGN solution (KGN (16 ug) solution) 주입군에서 5주까지는 KGN/나노입자 주입군과 유사하게 항염증인자 발현도가 증가하였으나 8주에서는 KGN/나노입자 주입군에 비해 지속적으로 항염증 인자 발현도가 유지되지 않아 항염증인자 발현도가 감소되는 것을 확인하였다(도 10).

[0144]

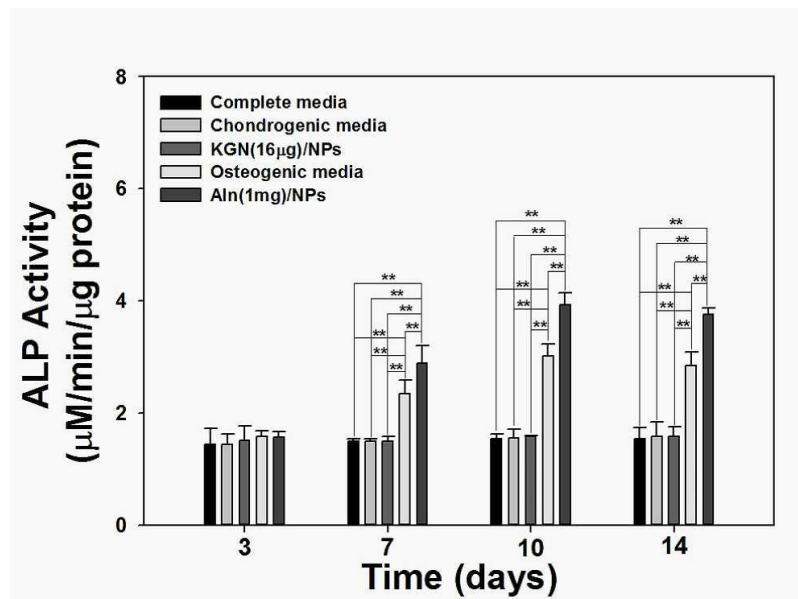
이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

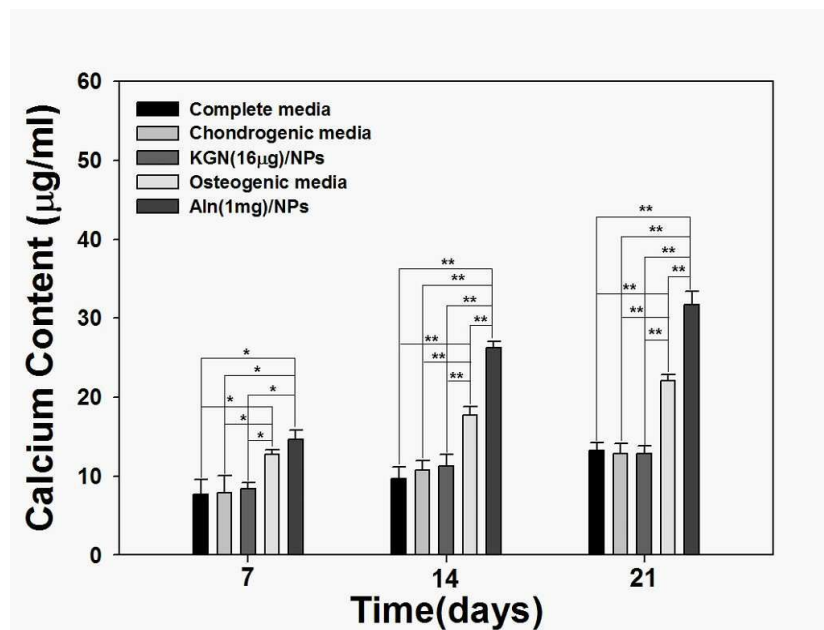
도면1



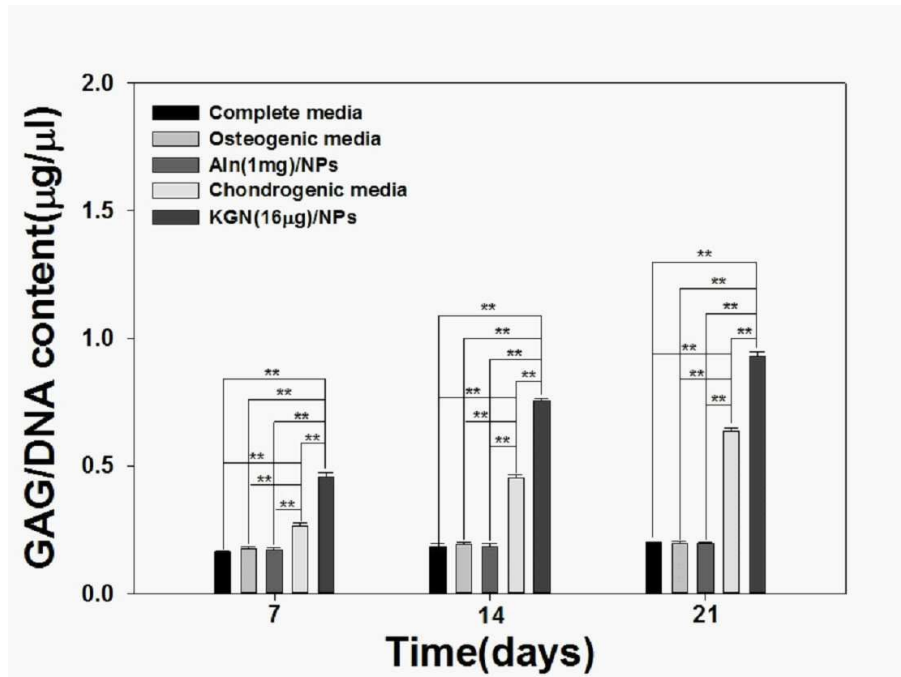
도면2



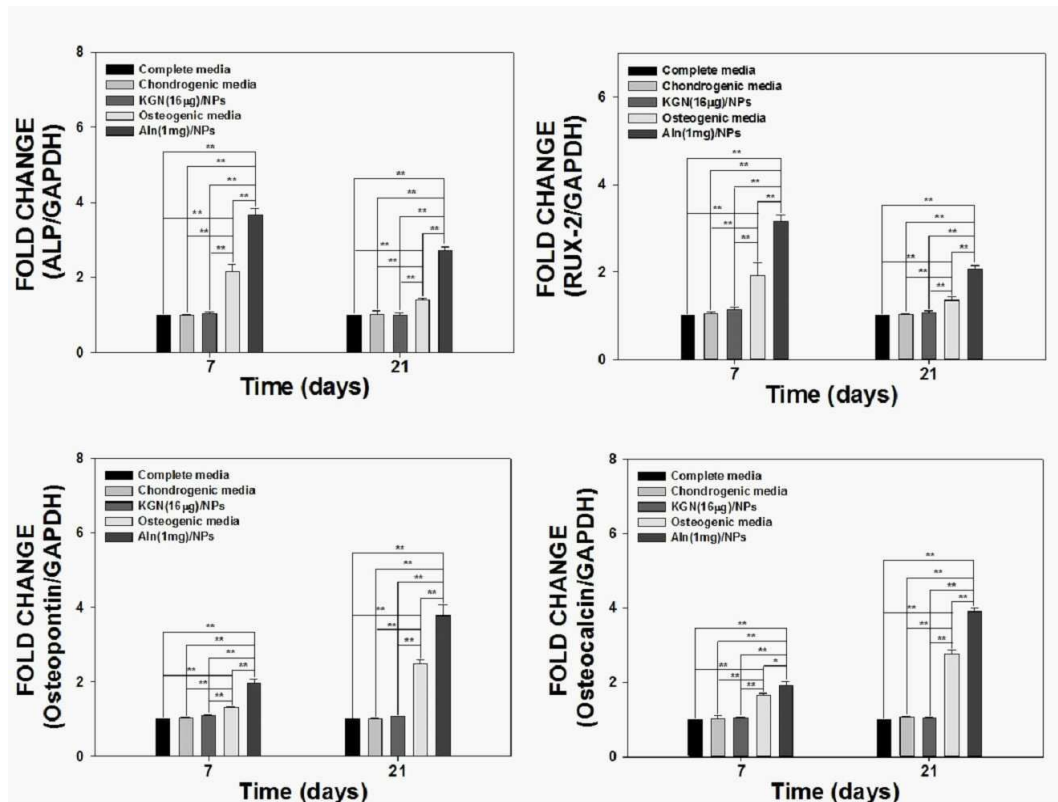
도면3



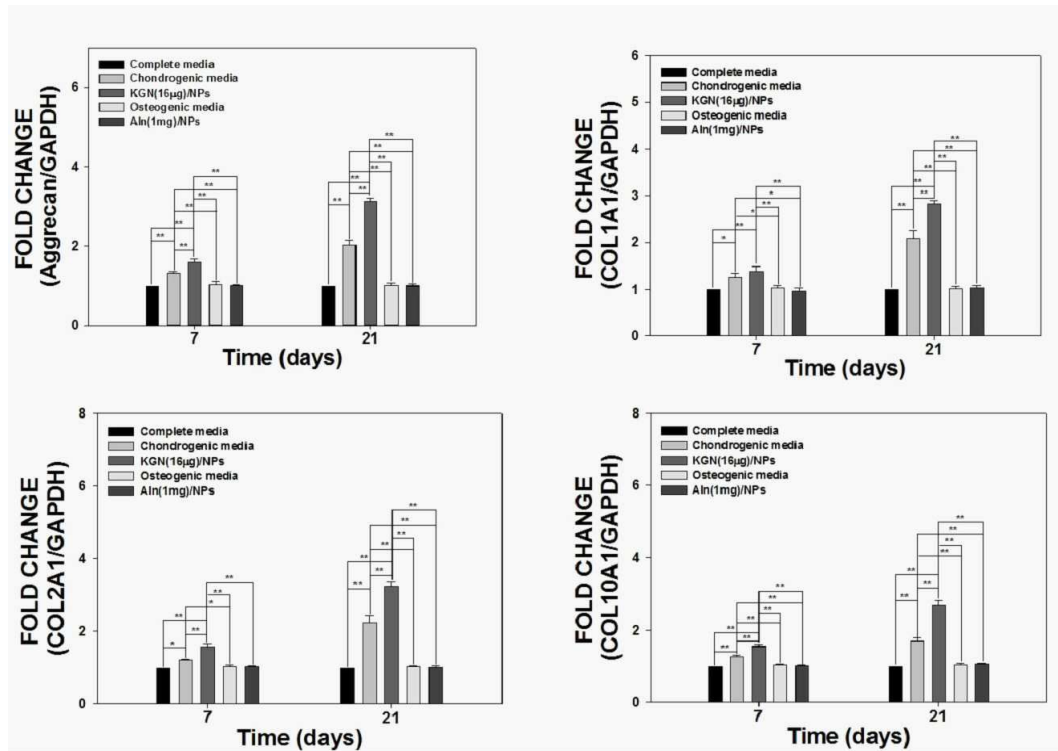
도면4



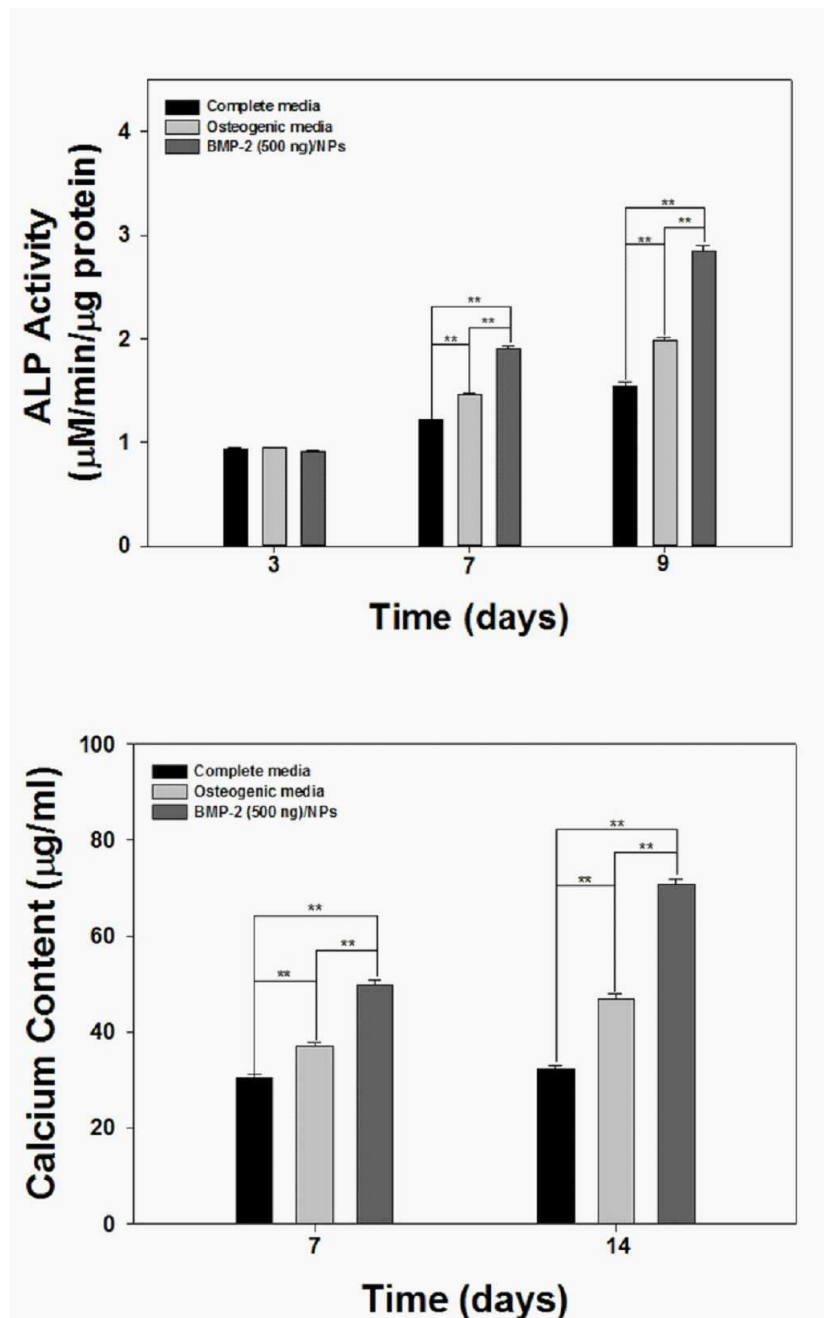
도면5a



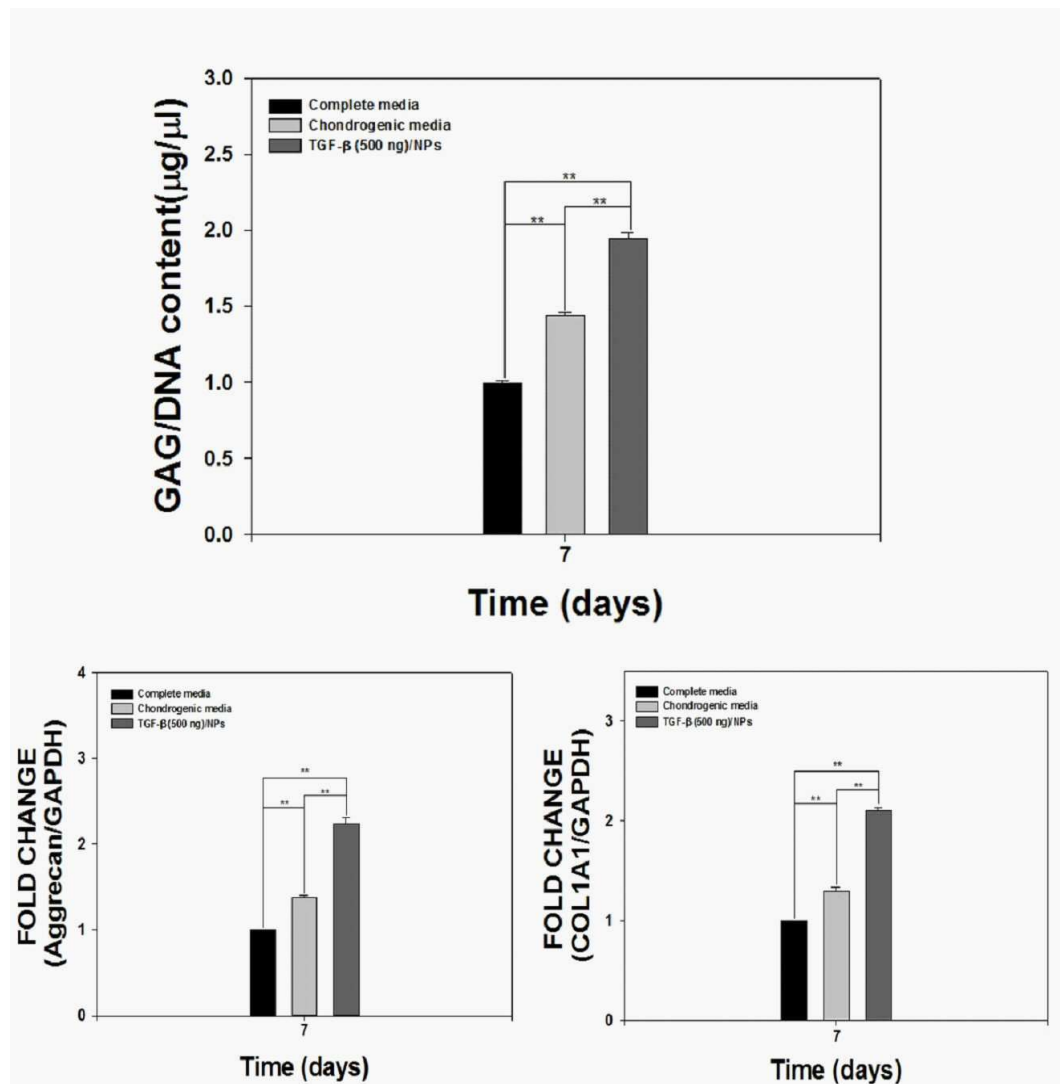
도면5b



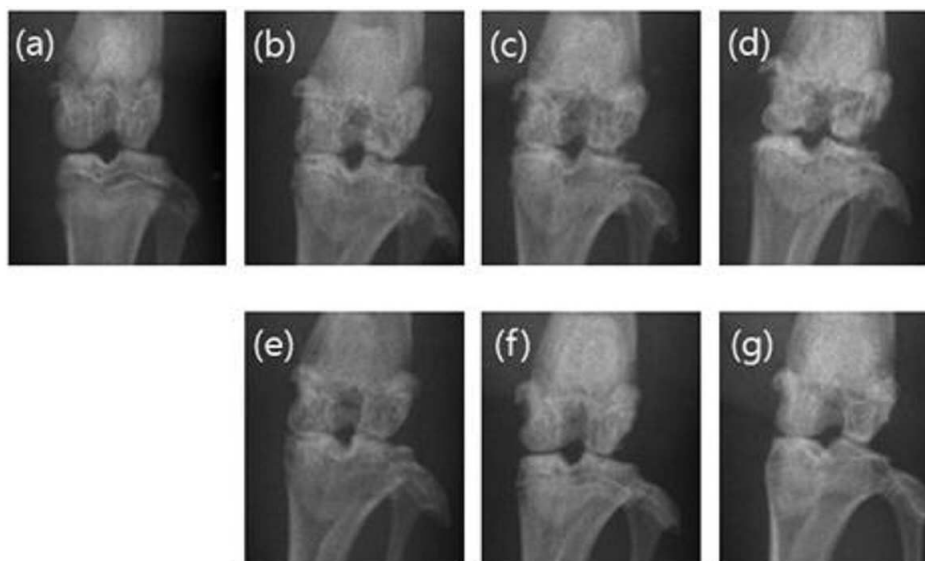
도면6



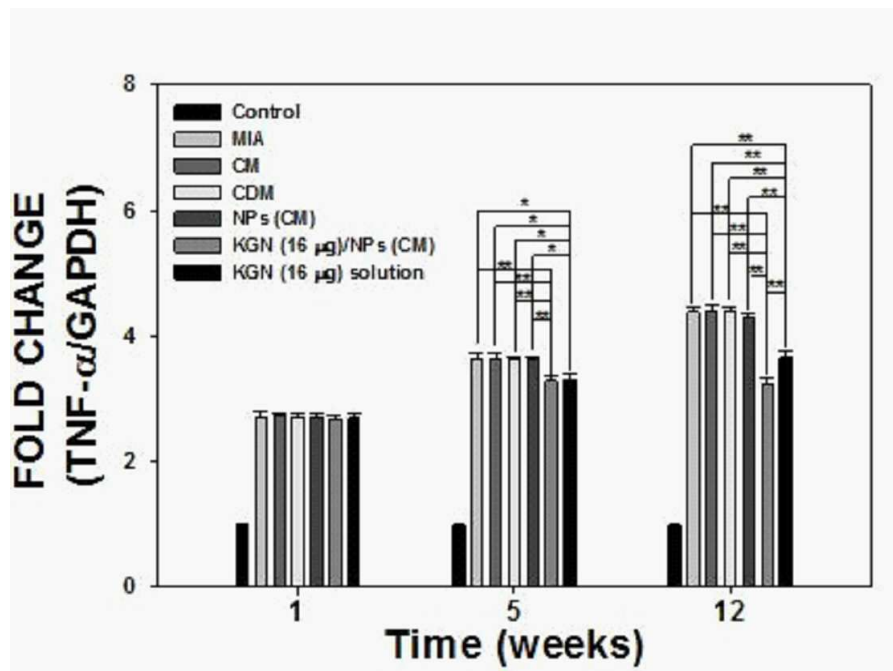
도면7



도면8



도면9



도면10

