



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0054975
(43) 공개일자 2023년04월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A01N 1/02 (2006.01) *A61K 35/15* (2015.01)
C12N 5/073 (2010.01) *C12N 5/077* (2010.01)

(52) CPC특허분류

A01N 1/021 (2013.01)
A61K 35/15 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0138113

(22) 출원일자 2021년10월18일

심사청구일자 2021년10월18일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

재단법인대구경북과학기술원

대구 달성군 현풍읍 테크노중앙대로 333

(72) 발명자

김용준

서울특별시 동대문구 한천로58길 47, 107동 102호(이문동, 쌍용아파트)

전원배

대구광역시 달성군 현풍읍 테크노중앙대로 333, 302동 506호(대구경북과학기술원 비슬빌리지)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인태백

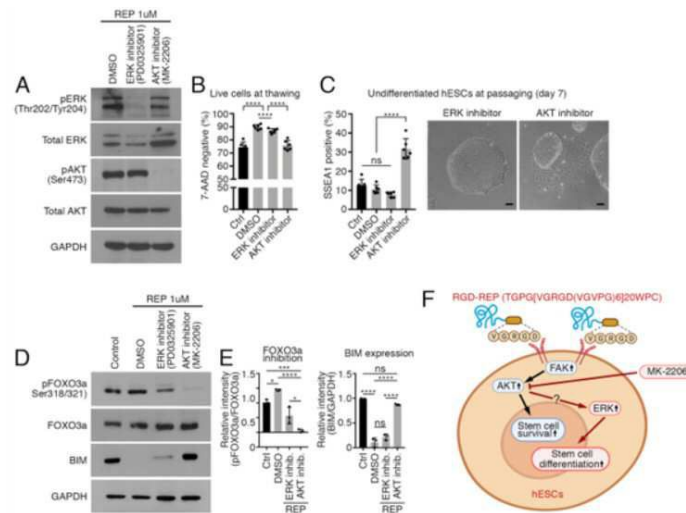
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 엘라스틴 유사 인공 세포외기질을 이용한 줄기세포의 동결보존 방법

(57) 요약

본 발명은 엘라스틴 유사 인공 세포외기질을 이용한 줄기세포의 동결보존 방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 엘라스틴 유사 인공 세포외기질을 포함하는 줄기세포 동결보존 기술은 인간 배아줄기세포가 발현하는 인테그린에 부착하는 RGD 모티프를 이용하여 인간 배아줄기세포의 생체 내 환경을 모사함과 동시에, 초기 인간 배아줄기세포 발생 환경에 존재하지 않는 세포외기질인 엘라스틴 단백질 구조를 이용함으로써 불필요한 배아줄기세포의 분화 기전을 자극하지 않는 장점을 나타내므로, 줄기세포 활용 과학기술 연구를 위한 동결 보존용 제품 개발, 세포치료제 개발 및 동결 보존을 위한 제품 개발에 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

C12N 5/0603 (2013.01)

C12N 5/0656 (2013.01)

C12N 2533/50 (2013.01)

(72) 발명자

이윤일

대구광역시 달성군 유가읍 테크노대로 195, 101동
302호(대구테크노폴리스 반도유보라 아이비파크)

이영삼

대구광역시 달성군 현풍읍 테크노중앙대로 333,
401동 602호(대구경북과학기술원 비슬빌리지)

김정희

서울특별시 동대문구 망우로20길 22, 201호(
휘경동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711132765

과제번호 2019M3A9H1103478

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 바이오.의료기술개발(R&D)

연구과제명 인간 줄기세포 유래 Schwann cell과 세포외기질 펩타이드 혼합 이식에 의한 말초신

경병증의 수초화 재생

기 여 율 1/1

과제수행기관명 대구경북과학기술원

연구기간 2021.01.01 ~ 2021.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

엘라스틴 유사 인공 세포외기질을 포함하는 줄기세포의 동결보존용 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 엘라스틴 유사 인공 세포외기질은 아르기닌-글리신-아스파르트산(Arginine-Glycine-Aspartate; RGD)-엘라스틴 유사 폴리펩타이드(elastin like polypeptide; ELP)인 것을 특징으로 하는 줄기세포의 동결보존용 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 엘라스틴 유사 인공 세포외기질은 ERK 신호는 활성화하지 않고, AKT 신호는 활성화하며, FOXO3a 활성화를 억제하고, 세포사멸인자 BIM 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는 줄기세포의 동결보존용 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 줄기세포는 배아줄기세포(embryonic stem cell), 유도만능줄기세포(induced pluripotent stem cell), 성체줄기세포(Adult stem cell/Tissue-specific stem cell) 및 중간엽줄기세포(mesenchymal stem cell)로 이루어진 군으로부터 선택된 것을 특징으로 하는 줄기세포의 동결보존용 조성물.

청구항 5

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항의 조성물을 줄기세포에 처리하여 줄기세포를 동결보존시키는 단계를 포함하는 줄기세포의 동결보존 방법.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 상기 조성물 중 엘라스틴 유사 인공 세포외기질은 0.5 내지 10 μ M의 농도로 첨가한 것을 특징으로 하는 줄기세포 동결보존 방법.

청구항 7

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항의 조성물을 줄기세포에 처리하여 줄기세포를 동결보존시키는 단계; 상기 동결보존된 줄기세포의 해동 과정에서 줄기세포 외 용액을 제거하는 단계; 및 상기 용액이 제거된 줄기세포의 부양 후 플레이트에 이동하여 재배양하는 단계를 포함하는 줄기세포의 해동 및 재배양 방법.

청구항 8

줄기세포 및 제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 세포치료제.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 세포치료제는 동결물 또는 동결건조물인 것을 특징으로 하는 세포치료제.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 엘라스틴 유사 인공 세포외기질을 이용한 줄기세포의 동결보존 방법에 관한 것으로, 상기 엘라스틴 유사 인공 세포외기질을 이용하면 인간 줄기세포의 동결보존 후 재배양 과정에서의 생존력 증가를 촉진함으로써

세포치료제 및 줄기세포 연구의 효율성을 확보할 수 있다.

배경 기술

- [0002] 줄기세포는 재생의학, 약리학 및 기초과학 연구 분야로 광범위하게 적용이 가능하다는 잠재력을 보유하고 있으며, 세포이식 및 조직공학과 같은 임상예의 적용을 위한 세포 공급원으로서의 역할이 기대되고 있다.
- [0003] 세포 보존 기술은 세포 배양 기술의 발전과 더불어, 생물학적 연구를 기초로 한 생명공학 분야에 널리 이용되고 있으며, 그 중 동결보존(cryopreservation) 방법이 주로 사용되고 있다. 동결보존 방법은 세포를 동결배지에 현탁하여 세포의 온도를 일정하게 낮추어 최종적으로 -196°C 에 냉동 보존하는 것으로 일반적으로 세포에 내동성을 부여하고 보호하는 역할로 디메틸설폭사이드(dimethyl sulfoxide, DMSO), 글리세롤(glycerol) 등의 동해 방지제와 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS) 또는 이를 포함한 세포배양 배지가 주성분으로 이용되고 있다.
- [0004] 그러나, 이와 같은 세포 동결보존 방법은 동해방지제 DMSO와 동물 유래 혈청 FBS가 갖는 세포 독성, 동물 병원성 오염 등의 세포 손상을 야기할 수 있으므로, 새로운 세포 보존 방법과 조성액에 대한 개발과 검증이 필요하다.
- [0005] 특히, DMSO를 처리하는 유리화 동결 또는 대량 동결보존 방법은 해동된 세포의 생존률이 매우 낮다는 한계가 있기 때문에, 이러한 줄기세포의 동결보존 후의 낮은 생존율은 임상학적 적용 또는 치료의 목적으로 이용하기 위해 최우선적으로 해결해야 할 과제이다.
- [0006] 지금까지 동결보존 후의 생존율을 높이기 위한 동결보존 방법들이 다수 연구된 바 있지만, 엘라스틴 유사 인공 세포외기질을 이용한 줄기세포의 동결보존 방법은 아직까지 알려진 바 없다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0007] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-2116954호(2020.05.25. 등록)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명은 엘라스틴 유사 인공 세포외기질을 이용하여 인간 줄기세포의 동결보존 후 재배양 과정에서의 생존력 증가를 촉진함으로써 세포치료제 및 줄기세포 연구의 효율성 확보를 그 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 엘라스틴 유사 인공 세포외기질을 포함하는 줄기세포의 동결보존용 조성물을 제공한다.
- [0010] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 줄기세포에 처리하여 줄기세포를 동결보존시키는 단계를 포함하는 줄기세포의 동결보존 방법을 제공한다.
- [0011] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 줄기세포에 처리하여 줄기세포를 동결보존시키는 단계; 상기 동결보존된 줄기세포의 해동 과정에서 줄기세포 외 용액을 제거하는 단계; 및 상기 용액이 제거된 줄기세포의 부양 후 플레이트에 이동하여 재배양하는 단계를 포함하는 줄기세포의 해동 및 재배양 방법을 제공한다.
- [0012] 또한, 본 발명은 상기 줄기세포 및 상기 조성물을 포함하는 세포치료제를 제공한다.

발명의 효과

- [0013] 본 발명에 따른 엘라스틴 유사 인공 세포외기질을 포함하는 줄기세포 동결보존 기술은 인간 배아줄기세포가 발현하는 인테그린에 부착하는 RGD 모티프를 이용하여 인간 배아줄기세포의 생체 내 환경을 모사함과 동시에, 초기 인간 배아줄기세포 발생 환경에 존재하지 않는 세포외기질인 엘라스틴 단백질 구조를 이용함으로써 불필요한 배아줄기세포의 분화 기전을 자극하지 않는 장점을 나타내므로, 줄기세포 활용 과학기술 연구를 위한 동결 보존용 제품 개발, 세포치료제 개발 및 동결 보존을 위한 제품 개발에 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1에서 A는 인간 배아줄기세포(H1, H9)와 섬유아세포(CRL, BJ)의 인테그린(integrin) mRNA 발현 패턴을 분석한 결과, 인간 배아줄기세포가 RGD 모티프와 결합할 수 있는 다수의 인테그린을 발현하고 있음을 확인하였고, B는 RGD 모티프와 결합할 수 있는 조합의 인테그린의 인간배아줄기세포에서의 단백질 발현을 항체 염색 및 flowcytometer를 이용하여 검증한 결과이다.

도 2에서 A는 RGD 모티프를 포함하는 REP를 정제하여 분자량을 확인한 것이고, B는 REP를 세포에 적용하기 위한 농도별 aggregates 형성 조건을 확인하였고, C는 고농도 REP의 배양액과의 혼합시 세포배양 온도에서 aggregates가 형성되었으나 배양액과 혼합이 어려운 것을 확인하였고, D는 저농도 REP의 세포 배양액과의 혼합 후 rotation을 활용한 세포 침전 억제 조건을 확인하였고, E는 배양액과 REP 농도별 혼합액 내 24시간 배양에 따른 인간 배아줄기세포의 생존율을 측정한 것이고, F는 E 결과의 정량적 분석을 나타낸 것이고, G는 배양액과 REP 농도별 혼합액 내 24시간 배양에 따른 생존 배아줄기세포의 줄기세포 표지인자 발현 비율을 측정한 것이고, H는 G 결과의 정량적 분석을 나타낸 것이고, I는 G의 REP 1 μ M 처리 조건에서 줄기세포 표지인자 발현 세포를 재 분리하여 배양한 결과 지속적인 줄기세포 표지인자 발현을 재확인한 것이고, J는 I의 줄기세포 성장물을 7일간 추적 관찰한 것이다.

도 3에서 A는 인간 줄기세포 동결 보존시 줄기세포 수집 후 0.5 내지 10 μ M의 REP를 포함한 동결보존액을 이용하여 single cell 또는 clump로 재부양 후 동결 및 해동 후 재배양하는 과정의 모식도를 나타낸 것이고, B는 REP를 포함한 동결보존액을 이용하여 보존된 줄기세포의 해동 후 사멸 세포 비율 및 플레이트 부착 24시간 후 생존 세포의 수를 확인한 결과, REP를 포함한 동결보존액 처리 세포의 사멸 세포가 적고 생존율이 높음을 확인하였고, C는 해동 후 플레이트 부착 및 24시간 배양된 세포의 줄기세포 표지인자(OCT4) 발현 비율의 차이가 없음을 확인하였고, D는 REP가 포함된 동결보존액을 사용한 줄기세포의 해동 후 세포 성장물에 이상이 없음을 확인하였고, E는 REP가 포함된 동결보존액을 사용한 줄기세포의 해동 후 세포 성장물은 이를 사용하지 않은 세포와 차이가 없으나, 최초 생존율의 차이로 인해 REP가 포함된 동결보존액을 사용한 줄기세포가 재배양 7일 후 더 많은 세포의 양을 가짐을 확인하였고, F는 REP가 포함된 동결보존액을 사용한 줄기세포 외배엽, 중배엽, 내배엽 분화 후 각 분화 표지인자의 발현을 qRT-PCR을 이용하여 분석한 결과, 분화능력에 이상이 없음을 확인한 것이다.

도 4에서 A는 인간 배아줄기세포에 대한 REP의 생존률 증가 기전 규명을 위한 ERK, AKT 신호 활성화 여부를 확인한 것이고, B는 FAK 신호 활성화 결과의 정량화 분석 결과로서 FAK 신호가 활성화되었고, C는 ERK 신호 활성화 결과의 정량화 분석 결과로서 ERK 신호가 활성화되지 않았으며, D는 AKT 신호 활성화 결과의 정량화 분석 결과로서 AKT 신호가 활성화되었다.

도 5에서 A는 REP 첨가 조건에서 배아줄기세포 동결시 ERK 또는 AKT 신호 억제를 검증한 것이고, B는 REP 첨가 조건에서 배아줄기세포 동결시 ERK 또는 AKT 신호 억제에 의한 생존율 변화를 확인한 것이고, C는 AKT 억제시 REP 처리에 의해 생존한 배아줄기세포는 분화가 촉진됨을 확인하였고, D는 배아줄기세포에 대한 REP 처리시 FOXO3a 활성화 억제 및 세포사멸인자 BIM 발현 억제를 확인하였고, E는 D 결과의 정량적 분석을 나타낸 것이고, F는 인간 배아줄기세포 동결보존 및 해동 후 재배양 시 RGD-모티프를 포함한 REP 첨가에 의한 생존력 증가 분자 기전에 대한 모식도를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.

[0016] 본 발명자는 줄기세포 동결보존 시 생존력 확보 및 재배양시 회복력 증가를 위한 동결보존액 첨가물로서의 재조합 단백질을 이용하는 기존 기술과 비교하여, 본 발명에 따른 엘라스틴 유사 인공 세포외기질(REP)을 첨가하는 줄기세포 동결보존 기술은 줄기세포가 생체 내에서 부착하는 세포외기질의 RGD 모티프를 포함하지만 인간 배아줄기세포의 불필요한 신호전달 기전을 활성화하지 않는 인공 세포외기질을 사용함으로써 세포외기질로부터 해리된 줄기세포의 anoikis를 방지하고 불필요한 분화 자극을 방지하여 해동 후 재 배양 과정에서의 줄기세포 생존력을 증가시키는 것을 규명함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0018] 본 발명은 엘라스틴 유사 인공 세포외기질을 포함하는 줄기세포의 동결보존용 조성물을 제공한다.

- [0019] 상기 엘라스틴 유사 인공 세포외기질은 아르기닌-글리신-아스파르트산(Arginine-Glycine-Aspartate; RGD)-엘라스틴 유사 폴리펩타이드(elastin like polypeptide; ELP)일 수 있다.
- [0020] 상기 엘라스틴 유사 인공 세포외기질은 ERK 신호는 활성화하지 않고, AKT 신호는 활성화하며, FOXO3a 활성화를 억제하고, 세포사멸인자 BIM 발현을 억제함으로써 인간 배아줄기세포 동결보존 및 해동 후 재배양시 생존률을 향상시킬 수 있다.
- [0021] 상기 줄기세포는 배아줄기세포(embryonic stem cell), 유도만능줄기세포(induced pluripotent stem cell), 성체 줄기세포(Adult stem cell/Tissue-specific stem cell) 및 중간엽줄기세포(mesenchymal stem cell)로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0022] 또한, 본 발명의 동결보존용 조성물은 완충제, 등장화제 또는 세포사멸 억제제를 추가로 포함할 수 있다. 상기 완충제는 시트레이트, 포스페이트, 숙시네이트, 타르트레이트, 푸마레이트, 글루코네이트, 옥살레이트, 락테이트, 아세테이트, 히스티딘 및 트리스로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있다. 상기 등장화제는 염화나트륨, 염화칼륨, 붕산, 붕산나트륨, 만니톨, 글리세린, 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌, 글리콜, 말토스, 자당, 에리쓰리톨, 아라비톨, 자일리톨, 소르비톨 트리할로즈 및 포도당으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있다. 상기 세포사멸 억제제는 ROCK(Rho-associated kinase) 억제제, 카탈라아제(catalase) 및 zVAD-fmk로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있다.
- [0024] 또한, 본 발명은 엘라스틴 유사 인공 세포외기질을 포함하는 줄기세포의 동결보존용 조성물을 줄기세포에 처리하여 줄기세포를 동결보존시키는 단계를 포함하는 줄기세포의 동결보존 방법을 제공한다.
- [0025] 상기 조성물 중 엘라스틴 유사 인공 세포외기질은 0.5 내지 10 μ M의 농도로 첨가할 수 있다.
- [0026] 본 발명에 따른 줄기세포의 동결보존 방법은 동결 보존할 대상에 본 발명에 따른 유효량의 엘라스틴 유사 인공 세포외기질을 포함하는 줄기세포의 동결보존용 조성물을 접촉시키거나 첨가하고, 동결 보존을 위한 온도로 냉각하는 단계를 포함할 수 있으며, 당해 기술 분야에서 공지된 기술을 이용하여 수행할 수 있으며, 예를 들어, 급속 냉각기, 또는 액체 질소를 사용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0028] 또한, 본 발명은 엘라스틴 유사 인공 세포외기질을 포함하는 줄기세포의 동결보존용 조성물을 줄기세포에 처리하여 줄기세포를 동결보존시키는 단계; 상기 동결보존된 줄기세포의 해동 과정에서 줄기세포 외 용액을 제거하는 단계; 및 상기 용액이 제거된 줄기세포의 부양 후 플레이트에 이동하여 재배양하는 단계를 포함하는 줄기세포의 해동 및 재배양 방법을 제공한다.
- [0030] 본 발명에서 "동결보존(cryopreservation)"은 동결을 통해 장기간에 걸쳐 세포를 안정하게 유지시키는 것을 의미한다. 세포는 일반적으로 배양에서 일만 개 중에 한 개 정도의 비율로 돌연변이가 일어나고 있으며, 장기간에 걸쳐 세포의 계대를 계속하면, 본래의 세포집단과는 다른 세포집단으로 변하고, 심하게는 세포가 가진 특정 기능이 계대 배양에 의해 소실되는 경우도 있다. 또한, 계대배양 중 마이크로플라스마 등에 감염될 수도 있다. 이러한 문제점으로 인하여 세포의 고유한 특성이 소실되기 전에 세포를 동결시키고 이를 보존하고, 필요 시에 꺼내어 사용할 수 있도록 세포의 동결 보존을 수행한다. 특히, 줄기세포의 경우 치료제로 이용하기 위해서는 필요한 상황에 건강한 줄기세포를 즉시 사용할 수 있어야 하므로, 효과적인 동결보존은 줄기세포에서 더욱 중요하게 여겨지고 있다. 동결 보존은 세포를 동결시켜 보존하는 당업계의 통상적인 방법을 통하여 수행될 수 있으며, 그 예로 유리화 동결(Vitrification method), 완만동결(Slow freezing method) 또는 대량 동결보존이 포함될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0032] 또한, 본 발명은 줄기세포 및 엘라스틴 유사 인공 세포외기질을 포함하는 줄기세포의 동결보존용 조성물을 포함하는 세포치료제를 제공한다.
- [0033] 상기 세포치료제는 동결물 또는 동결건조물일 수 있다.
- [0034] 본 발명에서 "세포치료제"는 사람 및 동물로부터 분리, 배양 및 특수한 조작을 통해 제조된 세포 및 조직으로

치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품(미국 FDA 규정)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 의미한다.

[0035] 상기 세포치료제는 약학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함할 수 있다. 상기 "약학적으로 허용되는"이란 상기 조성물에 노출되는 세포나 인간에게 독성이 없는 것을 의미한다. 상기 담체는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제, 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등 당업계에 공지된 것이라면 제한없이 사용할 수 있다.

[0036] 상기 세포치료제는 각종 제형의 형태로 통용되는 기법에 따라 제조될 수 있으며, 질병 부위로 이동을 유도할 수 있다면 어떠한 경로를 통해서든지 투여 가능하다. 경우에 따라서는 줄기세포를 병변으로 향하게 하는 수단을 구비한 비히클에 로딩하는 방안을 고려할 수도 있다. 따라서 본 발명의 조성물은 국소(혈측, 설하, 피부 및 안내 투여를 포함), 비경구(피하, 피내, 근육내, 점적, 정맥 내, 동맥 내, 관절 내 및 뇌척수액 내를 포함) 또는 경피성 투여를 포함한 여러 경로를 통해 투여할 수 있으며, 바람직하게는 비경구로, 가장 바람직하게는 발병부위에 직접 투여할 수 있다.

[0037]

[0038] 이하에서는 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0040] 실시예 1: 인간 배아줄기세포의 인테그린 mRNA 발현 패턴 분석

[0041] 인간 배아줄기세포(H1, H9)와 섬유아세포(CRL, BJ)를 각각 feeder free 조건의 laminin-511 코팅 및 Essential 8 배양액 또는 10% 소 혈청이 포함된 DMDM으로 배양하여, 인테그린(integrin) mRNA 발현 패턴을 mRNA sequencing으로 분석하였다. 전체 mRNA sequencing 분석 자료 중 RGD 모티프에 결합 가능한 인테그린 A와 B 그룹의 구성요소를 선별하여 인테그린 유전자 subtype 마다 각 세포 간의 발현 양을 비교하였다. 세포 별로 두 번의 반복 시료로부터 polyA+ 세포를 분리하고, 이후 제작된 라이브러리는 Illumina HiSeq2500 sequencer 기기를 이용하여 데이터화되었다. 생성된 FASTQ 파일은 hg38 human transcriptome release 29를 기준으로 맵핑하였으며, RStudio (R version 3.5.3)과 package "tximport"를 이용하여 전사체 발현양이 해석되었다.

[0042] 그 결과, 도 1A와 같이 인간 배아줄기세포는 RGD 모티프와 결합할 수 있는 다수의 인테그린을 발현하고 있음을 확인하였다.

[0043] 그리고, RGD 모티프와 결합할 수 있는 조합의 인테그린의 인간배아줄기세포에서의 단백질 발현을 항체 염색 및 flowcytometer를 이용하여 분석하였다. 부착 배양 중인 인간 배아줄기세포를 accutase 처리와 원심분리기를 이용하여 수거하였으며, 1% bovine serum albumin과 1 µg/ml DNaseI을 포함하는 PBS 100 µl 당 1,000,000 개의 세포와 1 µg의 각각의 인테그린 단백질에 대한 항체를 혼합하여 1시간의 냉장 보관 후 Flowcytometer에서 항체에 염색된 세포를 측정하였다.

[0044] 그 결과, 도 1B와 같이 RGD 모티프와 결합할 수 있는 조합의 인테그린의 인간배아줄기세포에서의 단백질 발현을 항체 염색 및 flowcytometer를 이용하여 검증할 수 있었다.

[0046] 실시예 2: 엘라스틴 유사 인공 세포외기질(RGD-ELP; REP) 정제

[0047] 본 발명에서 사용된 엘라스틴 유사 인공 세포외기질은 아르기닌-글리신-아스파르트산(Arginine-GlycineAspartate; RGD)-엘라스틴 유사 폴리펩타이드(elastin like polypeptide; ELP)로서, 줄여서 REP로 명명하였다. REP는 ELP를 주형으로 RGD(아르기닌-글리신-아스파르트산)의 아미노산 배열을 가지는 리간드를 가지는 구조의 단백질이다.

[0048] REP는 이전에 알려진 합성방법[Jeon W B, Park B H, Wei J, Park R W (2011) J Biomed Mater Res A97(2): 152-7]에 따라 합성하였다. RGD(아르기닌-글리신-아스파르트산)의 아미노산을 코딩한 DNA 단편을 재귀적 방향성 라이게이션(recursive directional ligation: RDL)에 의해 성공적으로 클로닝되었으며, 이를 pET계 발현벡터로 형질전환시킨 *E. coli* BLR(DE3)에서 발현시켜 정제하였다. 역전이 사이클링을 3 라운드 실시하여 순도를

높였고, SDS-PAGE로 순도 95% 이상임을 확인하였다(도 2A).

[0050] 실시예 3: 농도별 REP 처리 조건 및 세포 성능 분석

[0051] 도 2B와 같이 REP를 세포에 적용하기 위해 다양한 농도 조건별로 REP와 PBS를 혼합하여 세포배양 온도에서 aggregates 형성 조건을 확인하였고, REP의 aggregate가 형성된 조건에서는 배양액의 침투가 어려워 세포 배양이 불가능하므로 REP의 세포에 대한 효과 평가를 위해 aggregate 형성 최소화 조건을 수립하였다. 적정 농도의 REP와 rotation을 병행하여 REP 처리에 따른 인간 배아줄기세포의 생존률과 줄기세포 표지인자 발현 비율을 7AAD 시약을 이용한 사멸세포 염색법과 전분화능 줄기세포 성격 유지시 발현하는 표지인자인 OCT4 발현물을 확인하는 방법으로 분석하였다.

[0052] 그 결과, 도 2C와 같이 고농도 REP의 배양액과의 혼합시 세포배양 온도에서 aggregates가 형성되었으나 배양액과 혼합이 어려운 것을 확인하였고, 도 2D와 같이 저농도 REP의 세포 배양액과의 혼합 후 rotation을 활용한 세포와 REP의 응집 및 침전 억제 조건을 확인하였다.

[0053] 그리고, 도 2E는 배양액과 REP 농도별 혼합액 내 24시간 배양에 따른 인간 배아줄기세포의 생존률을 측정한 것으로, 1 μ M의 REP 처리 시 인간 배아줄기세포의 생존률이 크게 향상되는 것을 확인할 수 있었고, 도 2F는 도 2E에 따른 생존률 결과를 정량적으로 분석하여 나타낸 것이다.

[0054] 그리고, 도 2G는 배양액과 REP 농도별 혼합액 내 24시간 배양에 따른 생존 배아줄기세포의 줄기세포 표지인자 발현 비율을 측정한 것으로, 역시 1 μ M의 REP 처리 시 인간 배아줄기세포의 줄기세포 표지인자 발현 비율이 크게 증가되는 것을 확인할 수 있었고, 도 2H는 도 2G에 따른 줄기세포 표지인자 발현 비율 결과의 정량적 분석을 나타낸 것이다.

[0056] 실시예 4: REP 포함 동결보존액을 이용한 동결 및 해동 후 재배양에 따른 세포 성능 분석

[0057] 도 3A에서 인간 줄기세포 동결보존 시 줄기세포 수집 후 0.5 내지 10 μ M의 REP를 포함한 동결보존액을 이용하여 single cell 또는 clump로 재부양 후 동결 및 해동 후 재배양하는 과정의 모식도를 나타내었고, 부착 배양중인 인간 배아줄기세포를 accutase 또는 versene 으로 처리하여 수거 한 후 원심분리하여 침전된 500,000 - 1,000,000 개의 배아줄기세포를 1 μ M REP, 900 μ l의 fetal bovine serum, 100 μ l의 DMSO로 구성된 세포 동결보존액으로 재부양 및 동결보존 튜브에 이동하고 동결처리하였다. 해동 된 배아줄기세포는 1,200 rpm에서 3분간 원심분리하여 Laminin-511이 코팅된 배양접시로 이동하였으며, 이후 일 1회 배양액 교체를 통해 REP의 자연 세척을 진행하였고, 실시예 3과 동일한 방법으로 생존률 및 줄기세포 표지인자 발현 비율을 flowcytometer를 이용하여 분석하였다.

[0058] 도 3B와 같이 REP를 포함한 동결보존액을 이용하여 보존된 줄기세포의 해동 후 사멸 세포 비율 및 플레이트 부착 24시간 후 생존 세포의 수를 확인한 결과, 엘라스틴 유사 인공 세포의 기질을 포함한 동결보존액 처리 세포의 사멸 세포가 적고 생존율이 높음을 확인하였다.

[0059] 도 3C에서는 해동 후 플레이트 부착 및 24시간 배양된 세포의 줄기세포 표지인자(OCT4) 발현 비율의 차이가 없음을 확인하였고, 도 3D에서는 REP가 포함된 동결보존액을 사용한 줄기세포의 해동 후 세포 성장률에 이상이 없음을 확인하였고, 도 3E에서는 REP가 포함된 동결보존액을 사용한 줄기세포의 해동 후 세포 성장률은 이를 사용하지 않은 세포와 차이가 없으나, 최초 생존율의 차이로 인해 REP가 포함된 동결보존액을 사용한 줄기세포가 재배양 7일 후 더 많은 세포의 양을 가짐을 확인하였다.

[0060] 또한, 도 3F와 같이 REP가 포함된 동결보존액을 사용한 줄기세포 외배엽, 중배엽, 내배엽 분화 후 각 분화 표지인자의 발현을 qRT-PCR을 이용하여 분석한 결과, 분화능력에 이상이 없음을 확인하였다.

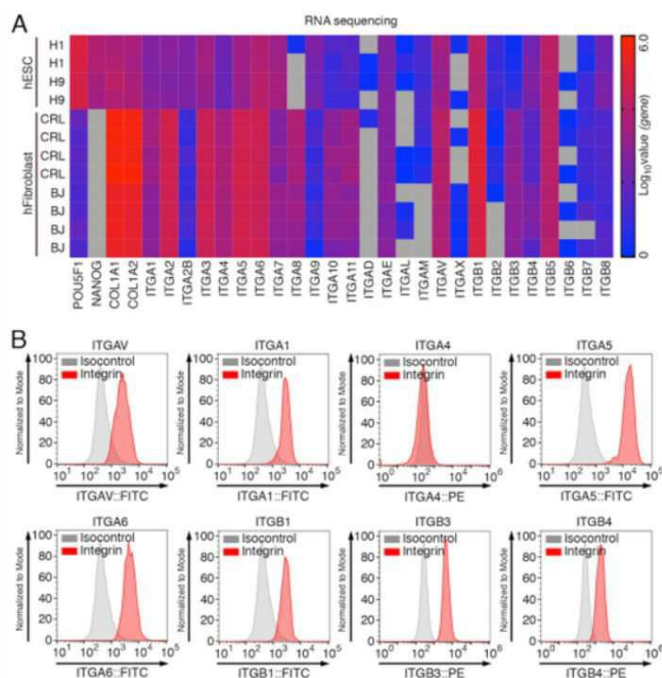
[0062] 실시예 5: 인간 배아줄기세포에 대한 REP의 생존률 증가 관련 작용기전 규명

[0063] 인간 배아줄기세포에 대한 REP의 생존률 증가 관련 작용기전을 규명하기 위하여, FAK, ERK 및 AKT 신호 활성화 여부를 immunoblotting 방법으로 분석하였다. REP 적용 조건 별 동결된 배아줄기세포의 해동 직후 cell lysis buffer를 이용하여 단백질을 추출하였으며, immunoblotting 이후 densitometer를 이용하여 결과를 해석하였다.

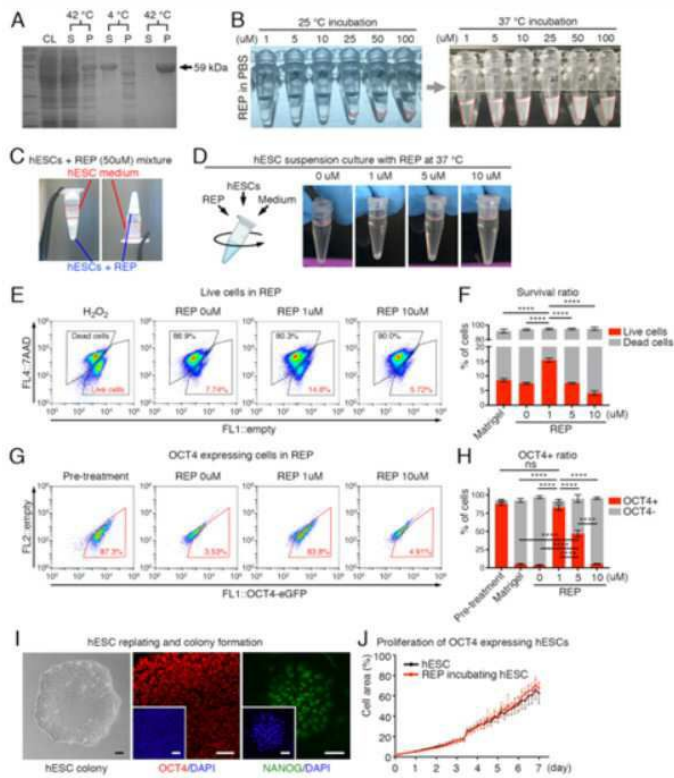
- [0064] 그 결과, 인간 배아줄기세포에 대한 REP의 생존률 증가는 도 4A 및 도 4B와 같이 FAK 신호의 활성화와 관련되었고, 도 4A 및 도 4C와 같이 ERK 신호의 활성화와는 관련되지 않았으며, 도 4A 및 도 4D와 같이 AKT 신호의 활성화와 관련되었다.
- [0066] 실시예 6: 인간 배아줄기세포 동결보존 및 해동 후 재배양 시 REP 첨가에 의한 생존력 증가 관련 작용기전 규명
- [0067] REP 첨가 조건 하 인간 배아줄기세포 동결 시 작용기전을 규명하기 위하여, ERK 및 AKT 신호 활성화 여부와 FOXO3a 활성화 억제 및 세포사멸인자 BIM 발현 억제 효과를 신호전달기전 억제제 처리 및 immunoblotting 방법으로 분석하였다. REP를 적용한 세포 동결과정 3시간 전부터 ERK 또는 AKT 신호 저해제를 세포에 처리하였으며, 세포 동결보존액 역시 각 신호 저해제를 첨가하였다. 이후 해동된 세포로부터 단백질을 추출 및 immunoblotting을 시행하였으며, 결과는 densitometer를 이용하여 해석되었다.
- [0068] 그 결과, 도 5A는 REP 첨가 조건에서 배아줄기세포 동결시 ERK 또는 AKT 신호 억제제를 검증한 것으로, 도 5B는 REP 첨가 조건에서 배아줄기세포 동결시 ERK 또는 AKT 신호 억제에 의한 생존율 변화를 확인하였고, 도 5C는 AKT 억제시 REP 처리에 의해 생존한 배아줄기세포는 분화가 촉진됨을 확인하였다.
- [0069] 도 5D는 배아줄기세포에 대한 REP 처리시 FOXO3a 활성화 억제 및 세포사멸인자 BIM 발현 억제를 확인하였고, 도 5E는 도 5D의 억제 효과에 대한 정량적 분석을 나타낸 것이다.
- [0070] 도 5F는 인간 배아줄기세포 동결보존 및 해동 후 재배양 시 RGD-모티프를 포함한 REP 첨가에 의한 생존력 증가 분자기전에 대한 모식도를 나타낸 것이다.
- [0072] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술한 바, 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.
- [0073] 본 발명의 범위는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

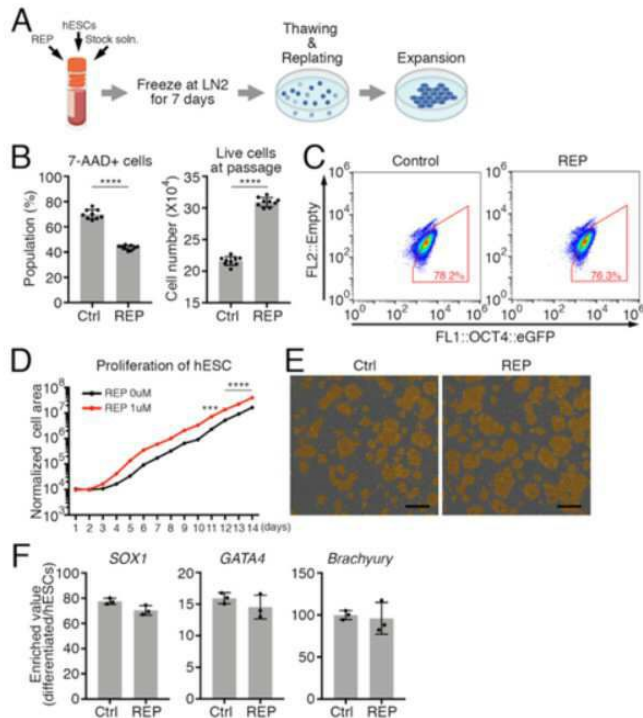
도면1



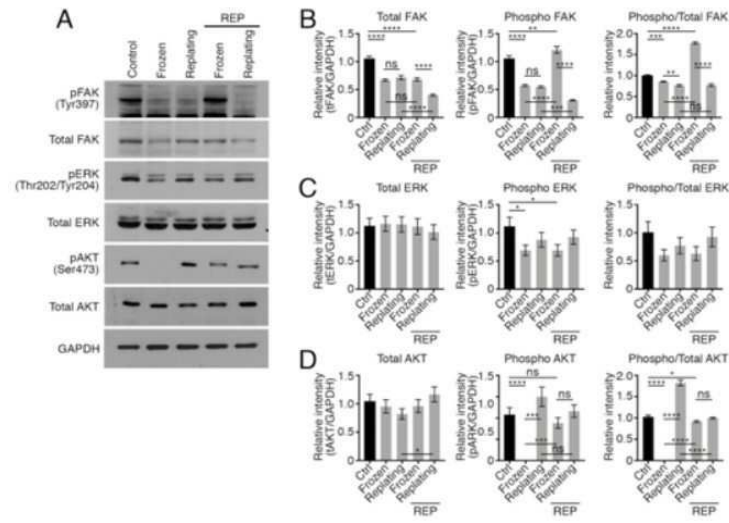
도면2



도면3



도면4



도면5

