

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(43) 국제공개일
2012년 3월 15일 (15.03.2012)

PCT

(10) 국제공개번호
WO 2012/033352 A2

- (51) 국제특허분류:
C12N 5/074 (2010.01) A61K 35/32 (2006.01)
C12N 5/077 (2010.01) A61P 19/00 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2011/006637
- (22) 국제출원일: 2011년 9월 7일 (07.09.2011)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2010-0088144 2010년 9월 8일 (08.09.2010) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 주식회사 강스템홀딩스 (KANG STEM HOLDINGS CO., LTD) [KR/KR]; 서울특별시 관악구 신림동 산 56-1 서울대학교 105 동 유전공학연구소 창업보육센터 406호, 151-742 Seoul (KR).
- (72) 발명자: 김
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 강경선 (KANG, Kyung Sun) [KR/KR]; 서울시 서초구 방배3동 래미안 타워 102동 1601호, 137-935 Seoul (KR). 서민수 (SEO, Min Soo) [KR/KR]; 대구광역시 달서구 장기동 814-1 파랑새마을 501동 1601호, 704-180 Daegu (KR). 박상범 (PARK, Sang Bum) [KR/KR]; 서울특별시

시 관악구 봉천동 219-9번지 204호, 151-050 Seoul (KR).

- (74) 대리인: 손민 (SON, Min); 서울 강남구 삼성동 159-9 도심공향타워 6층 한일국제특허사무소, 135-973 Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

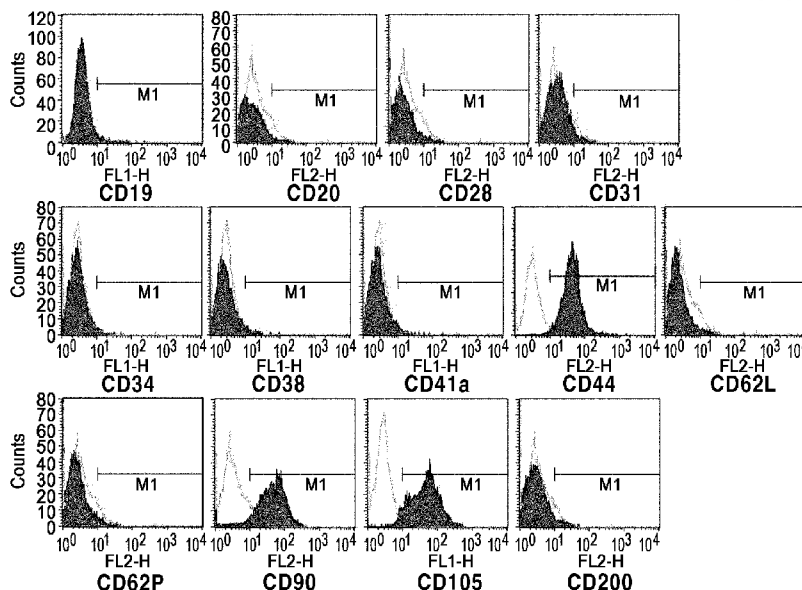
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: EQUINE AMNIOTIC FLUID DERIVED MULTIPOTENT STEM CELLS AND A PRODUCTION METHOD THEREFOR

(54) 발명의 명칭 : 말과동물 양수 유래 다분화능 줄기세포 및 그 제조방법

[Fig. 2]



(57) Abstract: The present invention relates to equine amniotic fluid derived multipotent stem cells (eAF-MSCs) and to a production method therefor, and more specifically relates to equine amniotic fluid derived multipotent stem cells which exhibit all negative immunological characteristics with respect to CD19, CD20, CD28, CD31, CD34, CD38, CD41a, CD62L, CD62P and CD200, and exhibit all positive immunological characteristics with respect to CD44, CD90 and CD105, and have the ability to differentiate into ectodermally, mesodermally or endodermally derived cells. According to the present invention, since it has been confirmed that equine amniotic fluid can be used as a source of supply of equine adult multipotent stem cells and since the produced equine amniotic fluid derived multipotent stem cells exhibit outstanding growth abilities and differentiation abilities, it follows that stem cells can be used as active ingredients of equine cell drugs which are required in volume, and, in particular, the stem cells of the present invention

which have excellent growth abilities and differentiation abilities are useful in the treatment of bone, tendon and muscular injury and deletion diseases in racehorses and the like.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]



SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:
— 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))

본 발명은 말과동물 양수 유래 다분화능 줄기세포 (equine amniotic fluid-derived multipotent stem cells; eAF-MSCs) 및 그의 제조방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는, CD19, CD20, CD28, CD31, CD34, CD38, CD41a, CD62L, CD62P 및 CD200 에 대하여 모두 음성의 면역학적 특성을 나타내고, CD44, CD90 및 CD105 에 대하여 모두 양성의 면역학적 특성을 나타내며, 외배엽, 중배엽 또는 내배엽 유래 세포로 분화하는 능력을 가지는, 말과동물 양수 유래 다분화능 줄기세포에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 말과동물의 양수가 말과동물 성체 다분화능 줄기세포의 공급원이 될 수 있음을 확인하였고, 제조된 말과동물 양수 유래 다분화능 줄기세포는 우수한 증식능 및 분화능을 나타내는 바, 줄기세포가 대량으로 요구되는 말과동물의 세포 치료제의 유효성분으로 사용될 수 있으며, 특히 성장능 및 분화능이 뛰어난 본 발명의 줄기세포는 경주마 등의 뼈, 힘줄, 근육 부상 및 결실 질환의 치료에 유용하다.

명세서

발명의 명칭: 말과동물 양수 유래 다분화능 줄기세포 및 그 제조방법

기술분야

- [1] 본 발명은 말과동물 양수 유래 다분화능 줄기세포 (equine amniotic fluid-derived multipotent stem cells; eAF-MSCs) 및 그 제조방법에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 사람 마커인 CD19, CD20, CD28, CD31, CD34, CD38, CD41a, CD62L, CD62P 및 CD200에 대하여 모두 음성의 면역학적 특성을 나타내고, 사람 마커인 CD44, CD90 및 CD105에 대하여 모두 양성의 면역학적 특성을 나타내며, 외배엽, 중배엽 또는 내배엽 유래 세포로 분화하는 능력 및 미분화상태로 14세대 이상 배양되는 능력을 가지는, 말과동물 양수 유래 다분화능 줄기세포에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 21세기 생명공학은 인간복지를 목표로 식량, 환경, 건강 문제에 새로운 해결책의 가능성을 제시하고 있으며, 특히 최근 줄기세포의 이용기술은 난치병 치료의 새로운 장으로 떠오르고 있다. 이전까지는 난치병 치료를 위해 장기이식이나 유전자 치료 등이 제시되었으나, 면역 거부와 공급장기 부족, 유전자에 대한 지식 부족으로 실용화가 미진하였다.
- [3] 이에 줄기세포 연구에 대한 관심이 고조되어, 증식과 분화를 통해 모든 기관을 형성할 능력을 가진 만능 줄기세포가 대부분의 질병 치료는 물론 장기 훼손을 근원적으로 해결할 수 있는 것으로 인식되었다. 또한, 많은 과학자가 거의 모든 장기재생은 물론 난치병이었던 파킨슨병, 각종 암, 당뇨병과 척수손상 등의 치료에 이르기까지 다양하게 줄기세포의 적용 가능성을 제시해왔다.
- [4] 줄기세포(stem cell)란 자기 복제 능력을 가지면서 두 개 이상의 세포로 분화하는 능력을 갖는 세포로, 만능 줄기세포(totipotent stem cell), 전분화능 줄기세포(pluripotent stem cells), 다분화능 줄기세포(multipotent stem cells; MSCs)로 분류할 수 있다.
- [5] 만능 줄기세포(totipotent stem cell)는 하나의 완전한 개체로 발생해 나갈 수 있는 만능의 성질을 가진 세포로 난자와 정자의 수정 이후 8세포기까지의 세포가 이러한 성질을 가지며 이 세포를 분리하여 자궁에 이식하면 하나의 완전한 개체로 발생해 나갈 수 있다. 전분화능 줄기세포(pluripotent stem cells)는 외배엽, 중배엽, 내배엽층 유래의 다양한 세포와 조직으로 발생할 수 있는 세포로, 수정 4-5일 후 나타나는 배반포(blastocyst)의 안쪽에 위치한 내세포괴(inner cell mass)에서 유래하며 이를 배아 줄기세포라 하며 다양한 다른 조직세포로 분화되지만 새로운 생명체를 형성하지는 못한다.
- [6] 다분화능 줄기세포는 성체 골수에서 최초로 분리되었고(Y. Jiang *et al.*, *Nature*, 418:41, 2002), 그 후 다른 여러 성체 조직에서도 확인되었다(C.M. Verfaillie,

Trends Cell Biol., 12:502, 2002). 다시 말해, 골수는 가장 널리 알려진 줄기 세포의 공급원이지만, 다분화능 줄기세포는 피부, 혈관, 근육 및 뇌로부터도 확인되었다(J.G. Toma *et al.*, *Nat. Cell Biol.*, 3:778, 2001; M. Sampaolesi *et al.*, *Science*, 301:487, 2003; Y. Jiang *et al.*, *Exp. Hematol.*, 30:896, 2002). 그러나, 골수와 같은 성체 조직 내의 줄기 세포는 매우 드물게 존재하고, 이러한 세포들은 분화유도하지 않고 배양하기 어려워서, 특이적으로 스크린된 배지들이 없으면 그 세포들을 배양하기 어렵다.

- [7] 말과동물(Equine)은 말과(Equidae; Genus *Equus*)에 속하는 포유류 동물이며, 개나 고양이와 함께, 인간과 친숙한 매우 드문 종류의 동물이다. 말과동물과 관련된 산업은 경마 산업과 같이 범세계적인 산업을 이루고 있다. 경마 산업에서는 좋은 혈통의 말이 매우 큰 가치를 가지고 있다. 이러한 좋은 혈통의 경마용 말이 부상을 당할 경우, 그 치유가 문제되므로, 세포 치료제의 개발의 중요성이 부각되어 왔다. 또한, 말의 크기를 고려할 때, 많은 세포를 안정적으로 공급하는 점도 주요한 기술적 과제였다.
- [8] 따라서, 말의 여러 조직 유래의 줄기세포를 분리하고 특성화하는 것이 줄기세포 연구 분야의 주요과제가 되어왔다. 인간과 쥐 유래의 줄기세포는 여러 종래기술에서 시도되어 왔으나, 말과동물의 경우, 특히 경마시장과 관련하여, 그 근육, 뼈, 연골, 힘줄 또는 근육의 치료를 위한 세포 치료제로서의 필요성이 큼에도 불구하고 아직 연구가 미진한 상황이다.
- [9] 말과동물의 지방조직에서 줄기세포를 분리하는 것이 보고된 바 있으나 (Armando de Mattos Carvalho *et al.*, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 132:303, 2009), 말과동물의 경우, 다른 포유류와는 달리 그 특성상 지방조직이 개체에 다량 존재하지 않으므로 수득이 극히 어렵다는 문제가 있어왔다. 또한, 지방을 개체로부터 획득하는 방법은 침습적이며 (invasive), 고통을 유발한다. 말과 골수 유래 줄기세포의 경우도 골수 획득의 방법이 지방과 마찬가지로 침습적인 방법을 사용한다는 점과 경주마로 이용되는 말과 동물의 특성상 지방 또는 골수 유래 줄기세포는 세포 획득에 뚜렷한 한계가 있다.
- [10]
- [11] 한편, 성체줄기세포를 세포 치료제로 사용하기 위해서 현 기술단계에서는 미분화 상태가 유지될 수 있는 배양 조건이 규격화되어야 하며, 이와 더불어, 조직으로부터 분리한 성체줄기세포는 다종의 세포가 혼합된 상태이기 때문에, 균질의 성체줄기세포를 다량 배양할 수 있는 기술도 해결해야 할 문제점 중에 하나이다. 특히 조직 또는 혈액으로부터 성체줄기세포를 분리하는 방법은 통상적으로 다수의 표면항원에 대한 항체를 이용한 Cell sorting을 예로 들 수 있다. 상기 방법은 성체줄기세포의 표면항원을 파악하고 있어야 한다는 한계가 있으며, 문제는 성체줄기세포 공통의 표면항원(이하, 마커)이 밝혀지지 않았고, 또한 성체줄기세포 마커가 다양하게 개발되어 있지 않은 상태이며, 알려진 마커도 분화상태에 따라서 발현 정도가 다르며, 특히 Sorting하는 장비가

고가라는 점에서 활용하는데 제약이 많다.

- [12] 또한, 양수에는 성체줄기세포뿐만 아니라, 기타 단핵세포 및 타 줄기세포가 함께 혼합되어 있을 가능성이 있으며, 이러한 혼합된 세포배양 조건에서는 양분(nutrient)의 분배 정도가 달라질 수 있으며, 이로 인하여 세포의 분화상태에 비균질성을 야기할 수 있다. 결국, 균질한 세포군으로 제조할 수 없다는 문제는 치료제로서 사용할 경우 예상하는 효과와 다르게 나타날 수 있다는 치명적인 단점으로 작용하기 때문에, 균질한 성체줄기세포를 다량 얻을 수 있는 효과적인 배양 기술의 개발이 시급한 상황이다.

- [13] 이에 본 발명자들은 수득이 용이한 새로운 세포 공급원인 암말의 양수 (equine amniotic fluid)로부터 최초로 균질성이 향상된 줄기세포 (Stem cells) 군(population)을 분리하여, 타 줄기세포에 비해 빠르고 지속적인 자기 재생 능력 (성장능), 다분화능 줄기세포의 면역특성 및 다른 세포로의 우수한 분화 능력, 특히 골세포로의 분화능이 현저히 뛰어남을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [14] 본 발명의 목적은 말과동물 양수 유래 성체 줄기세포인 다분화능 줄기세포를 제공하는데 있다.
- [15] 본 발명의 다른 목적은 말과동물 양수 유래 다분화능 줄기세포의 제조방법을 제공하는데 있다.
- [16] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 말과동물 양수 유래 다분화능 줄기세포를 다양한 세포로 분화시키는 방법을 제공하는데 있다.
- [17] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 말과동물 양수 유래 다분화능 줄기세포 또는 이로부터 분화된 세포를 유효성분으로 함유하는 세포 치료제를 제공하는데 있다.

과제 해결 수단

- [18] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 사람 마커인 CD19, CD20, CD28, CD31, CD34, CD38, CD41a, CD62L, CD62P 및 CD200에 대하여 모두 음성의 면역학적 특성을 나타내고, 사람 마커인 CD44, CD90 및 CD105에 대하여 모두 양성의 면역학적 특성을 나타내며, 외배엽, 중배엽 또는 내배엽 유래 세포로 분화하는 능력 및 미분화상태로 14세대 이상 배양되는 능력을 가지는 말과동물 양수 유래 다분화능 줄기세포를 제공한다.
- [19] 본 발명에 있어서, 상기 말과동물 양수 유래 다분화능 줄기세포는 특히 연골세포, 골세포 또는 지방세포로 분화하는 능력을 가지는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [20] 본 발명은 또한, 말과동물 양수에서 분리한 줄기세포를 EGM-2 (Endothelial cell Growth Medium-2)배지에서 배양하는 제1단계; 및 배양된 세포를 회수하는

제2단계를 포함하여, 상기와 같은 특성을 나타내고 배양전 줄기세포들보다 균질화도가 향상된 말과동물 양수 유래 다분화능 줄기세포의 제조방법을 제공한다.

- [21] 본 발명은 또한, 상기 말과동물 양수 유래 다분화능 줄기세포 또는 그 줄기세포가 연골세포, 골세포, 지방세포, 건세포(힘줄세포) 또는 근육세포로 분화한 세포를 유효성분으로 함유하는 세포 치료제를 제공한다.

발명의 효과

- [22] 본 발명에 따르면, 말과동물의 양수가 말과동물 성체 다분화능 줄기세포의 공급원이 될 수 있음을 확인하였고, 본 발명에 따라 제조된 말과동물 양수 유래 다분화능 줄기세포는 우수한 증식능 및 분화능을 나타내는 바, 줄기세포가 대량으로 요구되는 말과동물의 세포 치료제의 유효성분으로 사용될 수 있으며, 특히 성장능 및 분화능이 뛰어난 본 발명의 줄기세포는 경주마 등의 뼈, 힘줄, 근육 부상 및 결실 질환의 치료에 유용하다.

도면의 간단한 설명

- [23] 도 1은 분리한 eAF-MSCs의 사진 (1A, 1B) 및 성장곡선 (1C)를 나타낸 그래프이다.
- [24] 도 2는 eAF-MSCs의 Flow cytometry analysis (FACs) 결과이다.
- [25] 도 3은 eAF-MSCs의 연골세포 분화 유도 및 펠렛의 사진 (3A) 및 톨루이딘 블루 염색 결과이다.
- [26] 도 4는 eAF-MSCs의 골세포 분화 유도에 대한 알리자린 레드 S 염색 결과 (4A, 4B : 대조군; 4C, 4D : 실험군) 및 염색결과를 정량한 그래프 (4E) 이다.
- [27] 도 5는 eAF-MSCs의 지방세포 분화 유도에 대한 오일 레드 O 염색 결과 (5A, 5B : 대조군; 5C, 5D : 실험군) 및 염색결과를 정량한 그래프 (5E) 이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [28] 양수 (amniotic fluid)는 양막 주머니 안에 존재하는 액체를 뜻하는 것으로, 태아를 보호하고, 외부자극에 완충 역할을 하며, 박테리아 감염에 차단막이 될 수 있는 역할을 하는 액체이다.
- [29] 줄기세포 (stem cell)는 자기 복제 능력을 가지면서 두 개 이상의 세포로 분화하는 능력을 갖는 세포를 말하며, 성체 줄기세포는 발생과정이 진행되어 배아의 각 장기가 형성되는 단계 혹은 성체단계에서 나타나는 줄기세포를 의미한다.
- [30] 말과동물 (Equine)은 말과 (Genus *Equus*) 아래 속하는 동물을 뜻하는 용어로, 그 종류로는 대표적으로, 얼룩말 (Subgenus *Hippotigris*), 말 (Subgenus *Equus*), 당나귀 (Subgenus *Asinus*), 노새 (Subgenus *Hippotigris*+*Asinus*)가 속해 있다.
- [31] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법 및

이하에 기술하는 실험 방법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[32]

[33] 이하, 본 발명에 대하여 자세히 설명한다.

[34] MSCs는 주로 비균질의 세포군집(heterogeneous population)으로 배양된다. 증식하는 동안에 세포군집은 자가재생(self-renewal) 및 분화능(plasticity) 측면에서 다양해진다. 따라서, 더 균질한 세포 군집 (homogenous cell population)을 분리하는 것이 필요하다.

[35] 종래 말과동물의 지방세포에서 분리된 다분화능 줄기세포는 사람 마커인 CD13 (4.27%)에 대해 음성의 면역학적 특성을 나타내고, 사람 마커인 CD44 (73.68%) 및 사람 마커인 CD44, CD90 (92.14%)에 대해 양성인 면역학적 특성을 나타냄이 보고된 바 있다(Armando de Mattos Carvalho *et al.*, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 132:303, 2009).

[36] 그러나, 본 발명은 말과동물의 양수로부터 분리한 줄기세포를 EGM-2에서 배양하고 이어서 DMEM에서 배양한 세포들에 대해, 특정 사람 마커들에 대한 항체들을 이용하여 Flow cytometry 분석한 결과, 사람 마커인 CD19, CD20, CD28, CD31, CD34, CD38, CD41a, CD62L, CD62P 및 CD200에 대해서는 낮은 범위 (2.81% 이하)의 결과 및 CD44, CD90 및 CD105에 대하여 높은 범위 (95.10% 이상)의 결과를 확인하였고, 이로부터 종래 기술에 비하여 균질성이 향상된 줄기세포 군을 얻을 수 있는 방법을 확인하였다. 이때 상기 항체들은 상이한 종(species)간에도 교차반응하는 항체를 이용하였다.

[37] Flow cytometry에 사용되는 말과동물에 특이적인 항체가 다양하게 없는 상황에서, 본 발명은 말과동물의 양수 내 존재하는 다양한 종류의 세포들로부터, 사람 마커인 CD19, CD20, CD28, CD31, CD34, CD38, CD41a, CD62L, CD62P, CD200, CD44, CD90, CD105 각각에 대한 항체들을 이용하여 말과동물 양수 유래의 MSC 표현형을 구별할 수 있음을 확인하였다는데 특징이 있다.

[38] 또한, 본 발명은 사람 마커인 CD19, CD20, CD28, CD31, CD34, CD38, CD41a, CD62L, CD62P 및 CD200에 대하여 모두 음성의 면역학적 특성을 나타내고, 사람 마커인 CD44, CD90 및 CD105에 대하여 모두 양성인 면역학적 특성을 나타내는 줄기세포 군(population)이 말과동물의 양수에 존재하는 것을 확인하였으며, 이러한 면역학적 특징의 규명을 통해 특정 줄기세포 군을 말과동물의 양수로부터 분리할 수 있으며, 이러한 줄기세포군은 외배엽, 중배엽 또는 내배엽 유래 세포로 분화하는 능력을 가질뿐만아니라, 미분화상태로 14세대 이상 배양되는 능력을 가짐을 확인하였다는데 특징이 있다.

[39] 여기서, 사람 마커인 CD44는 세포 표면 당단백질로서 MSC의 이동(migration)에 관여한다. 사람 마커인 CD90은 Thy-1이라고도 불리는 여러 종류(피부유래 줄기세포, 내피유래 줄기세포, 중간엽 줄기세포)의 줄기세포의 마커이다(Masson NM. *et al.*, *Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol.*,

Jul;290(1):G45-54, 2006). 사람 마커인 CD105는 endoglin이라고도 알려져 있는, MSCs 마커이다(Dominici M. *et al.*).

[40] 한편, 본 발명에 의해 제조된 줄기세포 군은 면역세포 마커인 CD19, CD20, CD28, CD38, CD62L, CD200, 내피세포 마커인 CD31, CD62P, 혈구세포 마커인 CD34, CD45 및 혈소판 마커인 CD41a에 대응되는 말과동물의 마커들은 발현되지 않았으므로, 얻어진 세포는 순수한 줄기세포 집단임을 알 수 있다.

[41]

[42] 본 발명은 제1관점에서, 말과동물 양수에서 분리한 줄기세포를 EGM-2 (Endothelial cell Growth Medium-2) 배지에서 배양하는 제1단계; 및 배양된 세포를 회수하는 제2단계를 포함하여, 다음과 같은 특성을 나타내고 배양된 줄기세포들보다 균질화도가 향상된 말과동물 양수 유래 다분화능 줄기세포의 제조방법을 제공한다:

[43] (a) 사람 마커인 CD19, CD20, CD28, CD31, CD34, CD38, CD41a, CD62L, CD62P 및 CD200에 대하여 모두 음성의 면역학적 특성을 나타내고, 사람 마커인 CD44, CD90 및 CD105에 대하여 모두 양성 of 면역학적 특성을 나타냄;

[44] (b) 외배엽, 중배엽 또는 내배엽 유래 세포로 분화하는 능력을 가짐; 및

[45] (c) 미분화상태로 14계대 이상 배양되는 능력을 가짐.

[46]

[47] 또한, 본 발명은 제2관점에서, 말과동물의 양수를 준비하는 제1단계; 및 상기 양수로부터 사람 마커인 CD19, CD20, CD28, CD31, CD34, CD38, CD41a, CD62L, CD62P 및 CD200에 대하여 모두 음성의 면역학적 특성을 나타내고, 사람 마커인 CD44, CD90 및 CD105에 대하여 모두 양성 of 면역학적 특성을 나타내는 다분화능 줄기세포를 분리하는 제2단계를 포함하여, 다음과 같은 특성을 나타내는 균질의 말과동물 양수 유래 다분화능 줄기세포의 제조방법을 제공한다:

[48] (a) 외배엽, 중배엽 또는 내배엽 유래 세포로 분화하는 능력을 가짐; 및

[49] (b) 미분화상태로 14계대 이상 배양되는 능력을 가짐.

[50]

[51] 나아가, 본 발명은 제3관점에서, 다음과 같은 특성을 가지는 말과동물 양수 유래 다분화능 줄기세포를 제공한다:

[52] (a) 사람 마커인 CD19, CD20, CD28, CD31, CD34, CD38, CD41a, CD62L, CD62P 및 CD200에 대하여 모두 음성의 면역학적 특성을 나타내고, 사람 마커인 CD44, CD90 및 CD105에 대하여 모두 양성 of 면역학적 특성을 나타냄;

[53] (b) 외배엽, 중배엽 또는 내배엽 유래 세포로 분화하는 능력을 가짐; 및

[54] (c) 미분화상태로 14계대 이상 배양되는 능력을 가짐.

[55] 본 발명은 말과동물 양수로부터 줄기세포 공급원을 추출하기 위해 원심분리를 수행할 수 있고, 특히 밀도-그라디언트 용액을 사용하여 원심분리하는 것이 바람직하다. 원심분리는 특정 세포를 밀도에 따라 분리하기 위한 것으로,

말과동물 양수에 대해 밀도-그래디언트 용액을 사용하여 원심분리한 후 중간층인 세포층에서 줄기세포 공급원을 추출할 수 있다. 더욱 바람직하게는 Ficoll-Paque 밀도-그래디언트 (Ficoll-Paque Density-gradient) 용액을 사용하여 원심분리할 수 있다. 가장 바람직하게는, 밀도 구배가 뚜렷하게 나타나도록 하여 buffy coat layer가 명확하게 구별되도록 하기 위하여, 말과동물 양수를 PBS로 1:1(v:v) 비율로 희석한 후, Ficoll-Paque 밀도-그래디언트 (Ficoll-Paque Density-gradient) 용액을 사용하여 원심분리할 수 있다. 그 결과 줄기세포 공급원으로부터 그 외의 산출물 및 잔해를 분리할 수 있다.

- [56] 한편, 말과동물 양수로부터 분리한 줄기세포 공급원은 DMEM 배지에서는 부착 및 성장이 이루어지지 않았고, EGM-2 배지에서만 부착배양할 수 있었다. 그리고, EGM-2 배지에서 부착배양된 세포들은 이후 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 배지에서도 분화없이 배양이 가능하였다.
- [57] 본 발명에서 사용하는 EGM-2 배지는 EBM (Endothelial cell Basal Medium) 배지에 Endothelial cell Growth Medium-2 SingleQuot를 첨가하여 얻을 수 있으며, 바람직하게는 Lonza 사 (스위스)의 제품을 이용할 수 있다. EGM-2 배지는 혈관과 관련된 세포(예, HUVEC cells) 배양시 주로 사용되는 배지이다.
- [58] EGM-2 배지는 여러 가지 성장인자 (human-basic fibroblast growth factor; h-bFGF, vascular endothelial growth factor; VEGF, long R3-insulin-like growth factor; R3-IGF, 및 human epidermal growth factor;h-EGF)를 함유하여 세포의 성장을 촉진할 수 있으며, FBS를 10~20%로 풍부하게 포함하는 것이 바람직하다.
- [59] 또한, 본 발명은 세포가 부착배양할 수 있는 배양접시를 사용할 수 있다. 이를 위해 피브로넥틴이 코팅된 배양접시를 사용할 수 있다.
- [60] 한편, DMEM 배지는 여러 회사에서 생산되고 있는 바, 시중에서 쉽게 구할 수 있으며, 당 업계에서 일반적으로 사용되는 세포배양배지로 교체가 가능하다. 즉 MEM, 알파-MEM, DMEM, basal medium일 수 있으며, FBS (fetal bovine serum)과 같은 영양성분을 포함하는 것이 바람직하다. 또한, DMEM 배지는 low-glucose DMEM인 것이 바람직하다.
- [61] 본 발명의 바람직한 양태는, 말과동물 양수를 PBS로 1:1(v:v) 비율로 희석한 후, Ficoll-Paque 밀도-그래디언트 (Ficoll-Paque Density-gradient) 용액을 사용하여 원심분리하여 분리한 줄기세포 공급원을, 일차적으로 20% FBS (fetal bovine serum) 및 Endothelial cell Growth Medium-2 (EGM-2 Single Quot; Lonza, Switzerland)를 함유하는 내피세포기초배지 (Endothelial cell Basal Medium)에서 배양한 다음, 10% FBS-DMEM배지 (low glucose-DMEM)로 배지를 교체하여 바닥에 붙지 않은 세포를 제거하여 순수한 다분화능 줄기세포를 수득하는 것이다.
- [62] 한편, 특정한 세포표면항원적, 면역학적 특징을 가지는 성체줄기세포의 분리는 예컨대 항체 처리에 의한 분리, 형광, 자석, 나노 입자의 검출수단을 이용할 수 있다.

- [63] 상기 형광, 자석, 나노 입자의 검출수단은 항체에 부착되어, 형광이용세포분류기 (Fluorescence Activated Cell Sorter, FACS) 또는 MACS(Magnetic Activated Cell Sorter) 등의 세포의 면역학적 특성을 이용한 방법으로 분리할 수 있으며, 이에 한정되는 것이 아니며, 해당 기술분야에서 통상의 기술을 가진 자에 의하여 용이하게 선택될 수 있다.
- [64] 본 발명에 따라 말과동물 양수로부터 분리된 줄기세포는 플로우 사이터메트리를 이용한 FACS 법으로 그 면역학적 특성을 규명하였다.
- [65] 이때, 수득한 줄기세포 용액을 수집하고, 원심분리 등의 방법으로 세포를 분리한 후, 직접 항체로 염색하는 방법과, 한번 적당한 배지에서 배양, 증식을 실시한 후에 항체를 염색하는 방법을 이용할 수 있다.
- [66] 세포의 염색은 우선, 표면 항원을 인식하는 일차항체와 목적 샘플을 혼합하고, 얼음 위에서 30분 내지 1시간 인큐베이션 한다. 일차 항체가 형광으로 표지되어 있는 경우에는 세정 후 분리한다. 일차 항체가 형광 표지되어 있지 않는 경우에는 세정 후 일차 항체에 대해서 결합 활성을 갖는 형광 표지된 이차 항체와 일차 항체가 반응한 세포를 혼합하고, 다시 얼음물에서 30분 내지 1시간 인큐베이션 한다. 세정 후, 일차 항체와 이차 항체에서 염색된 세포를 분리할 수 있다.
- [67] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 방법에 의해 제조된 말과동물 양수 유래 다분화능 줄기세포는 12계대에 이르기까지 CPDL 지수가 점진적으로 증가하여 우수한 증식율을 가진다는 것을 알 수 있었다. 또한, 다분화능 줄기세포는 12계대 이후에도 계속적이고 꾸준하게 증식이 가능하였으며, 14계대까지도 여전히 증가하고 있음이 확인되었다. 이는 종래 보고된 말 지방 유래 다분화능 세포가 약 10계대까지 배양되는 것과 비교하여 확연히 증가된 성장능을 나타내는 것을 확인한 것이다.
- [68] 따라서 본 발명에 따라 분리된 말과동물 양수 유래 다분화능 줄기세포는 미분화상태로 최소한 14계대 이상 배양되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [69] 본 발명에서, 상기 말과동물은 얼룩말, 말, 노새 및 당나귀로 구성된 군에서 선택되는 하나일 수 있다.
- [70]
- [71] 본 발명은 제4관점에서, 본 발명에 따른 상기 다분화능 줄기세포를 연골세포 분화배지에 배양하는 것을 특징으로 하는 다분화능 줄기세포를 연골세포로 분화시키는 방법을 제공한다. 일반적으로 알려진 연골세포로의 분화 유도 배지의 조성은 TGF-beta1 10ng/ml, L-ascrobate-2-phosphate 50uM, insulin 6.25 ug/ml이다.
- [72] 또한, 본 발명은 제5관점에서, 본 발명에 따른 상기 다분화능 줄기세포를 텍사메타손, 베타-글리세로포스페이트 및 아스코르베이트-2-인산을 함유한 배양배지에 배양하는 것을 특징으로 하는 다분화능 줄기세포를 골세포로 분화시키는 방법을 제공한다.

- [73] 본 발명은 제6관점에서, 본 발명에 따른 상기 다분화능 줄기세포를 텍사메타손, 인도메타신, 3-이소부틸-메틸잔틴 및 인슐린을 함유한 배양배지에 배양하는 것을 특징으로 하는 다분화능 줄기세포를 지방세포로 분화시키는 방법을 제공한다.
- [74] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 말과동물 양수 유래 다분화능 줄기세포는 적절한 유도배지에 배양할 경우, 각각 중배엽 유래의 세포인 연골세포 (chondrocyte), 골세포 (osteocyte) 또는 지방세포 (adipocyte)로 우수한 효율로 분화가 가능함을 확인하였다. 따라서, 적절한 자극이 주어질 경우, 중배엽 유래의 세포인 건세포 (tenocyte), 근세포 (myocyte)로 우수한 효율로 분화가 가능함은 당업자에게 자명할 것이다. 한편, 본 발명의 다분화능 줄기세포의 경우, 표면항원이나 자기재생능력, morphology에서 줄기세포의 특징을 나타내고 있는 바, 적절한 자극이 주어질 경우, 외배엽 또는 내배엽 유래의 세포로 분화할 수 있음은 당업자에게 자명할 것이다.
- [75] 또한, 본 발명의 일 실시예에서는 상기 다분화능 줄기세포를 골세포로 분화하도록 유도하는 10% FBS, 0.1 μ M 텍사메타손, 10 mM 베타-글리세로포스페이트, 50 μ M 아스코르베이트-2-인산을 포함한 DMEM배지에 배양할 경우, 일반 배양배지에 배양한 대조군에 비해 분화하는 정도를 정량한 값이 13배 높음을 확인하여, 골세포로의 분화능력이 매우 우수함을 확인하였다.
- [76]
- [77] 본 발명은 제7관점에서, 본 발명에 따른 다분화능 줄기세포 또는 이로부터 분화된 세포를 유효성분으로 함유하는 세포 치료제를 제공한다.
- [78] 연골세포로 분화될 수 있는 본 발명에 따른 다분화능 줄기세포 또는 이로부터 분화된 연골세포는 말과동물의 골관절염 치료용 세포 치료제의 유효성분으로 사용될 수 있다.
- [79] 골세포로 분화될 수 있는 본 발명에 따른 다분화능 줄기세포 또는 이로부터 분화된 골세포는 말과동물의 골 결실 질환 치료용 세포 치료제의 유효성분으로 사용될 수 있다. 또한, 말과동물의 골 부상 치료용 세포치료제로도 병행하여 사용이 가능함은 당업자에게 자명할 것이다.
- [80] 지방세포로 분화될 수 있는 본 발명에 따른 다분화능 줄기세포 또는 이로부터 분화된 지방세포는 말과동물의 지방 조직 형성용 세포 치료제의 유효성분으로 사용될 수 있다.
- [81] 건세포로 분화될 수 있는 본 발명에 따른 다분화능 줄기세포 또는 이로부터 분화된 건세포는 말과동물의 힘줄 조직 형성용 세포 치료제의 유효성분으로 사용될 수 있다.
- [82] 근세포로 분화될 수 있는 본 발명에 따른 다분화능 줄기세포 또는 이로부터 분화된 근세포는 말과동물의 근육 조직 형성용 세포 치료제의 유효성분으로 사용될 수 있다.

[83] 상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명에 따른 다분화능 줄기세포는 골세포, 연골세포, 지방세포, 건세포, 근세포 등 중배엽 유래의 세포로 분화하는 능력이 우수하므로, 본 발명에 따른 다분화능 줄기세포 또는 이로부터 분화된 세포를 유효성분으로 함유하는 세포 치료제의 효능이 뛰어날 것 또한 당업자에게 자명하다 할 것이다. 또한, 본 발명에 따른 다분화능 줄기세포 또는 이로부터 분화된 세포는 그 유래가 말과동물의 양수인 바, 다른 동물 유래 줄기세포 또는 이로부터 분화된 세포에 비하여 거부반응이 적을 것이 자명하여, 말과동물의 세포 치료제에 특히 유용하게 사용될 수 있다.

[84]

[85] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아닌 것은 당업자에게 자명할 것이다.

[86]

[87] 실시예 1

[88] **eAF-MSCs(말과동물 양수 유래 다분화능 줄기세포)의 수득**

[89] **1-1: 말 양수의 수집**

[90] 말 양수는 대한민국 마사의 마구간에서 서러브레드 씨암말(thoroughbred mares)의 분만 시 획득하였다. 분만 시의 암말은 매우 예민하고, 태반피부는 암말에 의하여 파열되기 매우 쉬우므로, 암말을 자극하지 않기 위하여 조심스럽게 양수를 채취하였다. 모든 양수는 피부 파열 전 30ml 주사기, 18-gauge 바늘로 수집되었다. 오염을 막기 위하여, 주사기, 장갑을 이용하였으며, 모든 과정은 빠르게 수행하였다. 샘플은 12시간 내에 섭씨 4도를 유지하며 연구실로 옮겨졌다. 평균적으로 얻을 수 있었던 양수의 양은 약 30ml였다.

[91]

[92] **1-2: 단핵세포의 분리**

[93] MSCs는 단핵세포에서 분리되는 것이 종래의 연구에서 알려져 있는바, (Colter DC et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 97(7):3213-8, 2000) 단핵세포(MNCs)는 다음과 같은 방법으로 분리하였다. 먼저, 명확한 buffy coat layer를 얻기 위하여, 말 양수에 PBS (Phosphated Buffered Saline)를 1:1 (v:v) 비율로 보충하여 희석하였다. 희석된 샘플을 Ficoll-Paque density-gradient (GE healthcare, US)를 이용하여, 2500rpm에서 20분 동안 원심분리하였다. 단핵세포를 수득한 후, 혈구 및 혈소판을 제거하기 위하여 PBS로 수회 세척하여 단핵세포를 분리하였다.

[94]

[95] **1-3: 단핵세포의 배양 및 MSCs의 수득**

[96] 실시예 1-2에 따른 단핵세포를 피브로넥틴으로 코팅된 100mm배양접시 (Nunc, US)에 분주하고 5% CO₂, 37도 조건에서 배양하였다. 피브로넥틴은 세포가 접시에 잘 부착되게 하기 위하여 사용하였다. 배양 배지는 20% FBS (fetal bovine serum, Gibco-BRL, US) 및 Endothelial cell Growth Medium-2 SingleQuot (EGM-2

Single Quot; Lonza, Switzerland)를 함유하는 내피세포기초배지 (Endothelial cell Basal Medium; EBM, Lonza, Switzerland)를 사용하였다. 기초배지에 함유된 여러 가지 성장인자 (human-basic fibroblast growth factor; h-bFGF, vascular endothelial growth factor; VEGF, long R3-insulin-like growth factor; R3-IGF, 및 human epidermal growth factor;h-EGF)는 초기 세포의 성장을 촉진시키는 역할을 하였다.

[97] 7일 후, 10% FBS 성장배지 (low-glucose Dulbecco's Modified Eagle's Medium; low glucose-DMEM, Gibco-BRL, US)로 배지를 교체하였다. 바닥에 붙지 않은 세포 및 부유물을 제거하여 MSCs를 수득하였다. 바닥에 부착된 세포만이 접시에 남았으며, 그 형상 (morphology)를 관찰하였다. 성장배지는 부착세포가 70-80% 컨플루언시에 도달할 때까지 2주에 1번 교체하였다.

[98] 그 결과, 도 1A 및 B에 나타난 바와 같이, 세포의 자라는 형상은 spindle 모양이었으며, 이는 BM-MSCs(Bone marrow-Mesenchymal stem cells)나, UCB-MSCs(Umbilical cord blood-Mesenchymal stem cells)의 형상과 유사하였음을 관찰하였으며, 이에 의하여 eAF-MSCs를 수득하였다.

[99]

[100] 실시예 2

[101] **eAF-MSCs의 계대수 관측을 통한 자가재생능력의 검증**

[102] 다분화능 줄기세포 (MSCs)를 비롯한 줄기세포는 자가재생능력이 있으며, 많은 경우에, 자가재생능력은 배아줄기세포 (ESCs), 조혈줄기세포 (HSCs), 암 줄기세포 (CSCs)와 같은 계속적이고 꾸준한 증식율과 관련되어 있다 (Reya T. *et al.*, *Nature*, Nov 1;414(6859):105-11, 2001). 따라서 eAF-MSCs의 성장효율 및 증식포텐셜을 측정하기 위하여, 실시예 1-3에 의해 수득된 줄기세포의 CPDL (cumulative population doubling level)값을 측정하였다.

[103] CPDL은 세포의 증식율을 나타내는 지수로서,

[104] 다음과 같은 식으로 표현된다.

[105] $CPDL = \ln(N_f/N_i)/\ln 2$

[106] (Ni: 초기 분주한 세포수; Nf: 최종 세포수)

[107] 실시예 1-3에 의해 수득된 세포를 6-well 배양접시(Nunc)에 5×10^4 개 분주하고, 5-7일 후 계대배양하였다. 최종 세포수를 세고, 5×10^4 개를 다시 분주하였다. CPDL을 얻기 위하여, 각 계대별로 계산한 후, 그 전 계대의 값과 더하였다. 증식율이 감소하는 것이 관찰될 때까지 계대배양하였다.

[108] 그 결과, 도 1C에 나타난 바와 같이, CPDL 곡선은 eAF-MSCs가 14계대까지 자라고 있음을 보여준다. 12계대부터 CPDL 지수는 감소하기 시작함을 확인하였다. 그러나 14계대의 증식레벨이 그 전의 계대 세포들보다 낮지만, 여전히 증가하고 있으며, 12계대까지는 CPDL 지수의 감소가 없음을 관찰하였는데, 이러한 결과는 eAF-MSCs가 자가재생능이 있음을 시사하는 것이다.

[109]

- [110] 실시예 3
- [111] 플로우사이토메트리 분석에 의한 eAF-MSCs의 면역표현형 특성 확인
- [112] 일반적으로, 사람 MSCs는 구별되는 표면항원마커를 나타낸다. 세포치료국제협회 (International Society of Cellular Therapy)에 따르면, 일반적으로 사람 MSCs는 사람 마커인 CD73, CD44, CD90 및 CD105에 양성발현을 보이며, 사람 마커인 CD11b, CD14, CD18, CD79a, CD34, CD45 및 HLA-DR에 음성 발현을 나타낸다(Dominici M. *et al.*, *Cytoherapy*, 8(4):315-7, 2006). 따라서, eAF-MSCs에 대해 플로우사이토메트리 분석을 하여 면역표현형을 알아보기 위해 아래 실험을 수행하였다.
- [113] 실시예 1-3에 의해 수득된 5 계대의 eAF-MSC에 대하여, Flow cytometry에 사용되는 말과동물에 특이적인 항체가 다양하게 없어서, 사람 마커인 13개의 CD 마커들 (CD19, CD20, CD28, CD31, CD34, CD38, CD41a, CD62L, CD62P, CD200, CD44, CD90 및 CD105)에 대한 플로우사이토메트리 분석을 시행하였다.
- [114] 세포를 BD Biosciences(US)의 프로토콜에 따라 염색하였다. 즉, eAF-MSCs를 PBS로 2회 세척한 후, 0.25% trypsin/EDTA를 이용하여 수득하였다. 각각 그룹에 따라 나누었으며, 나누어진 그룹은 약 1×10^5 개의 세포를 함유하였다. Mouse anti-human CD19, mouse anti-human CD20, mouse anti-human CD28, mouse anti-human CD31, mouse anti-human CD34, mouse anti-human CD38, mouse anti-human CD41a, mouse anti-human CD 44, mouse anti-human CD62L, mouse anti-human CD62P, mouse anti-human CD200, mouse anti-human CD90는 BD Biosciences 제품이며, mouse anti-humanCD105는 Serotec(US) 제품을 사용하였으며, 표면항원검출에 사용하였다. 모든 항체들은 FITC(Fluorescein isothiocyanate) 또는 PE(phycoerythrin)과 결합시켰다.
- [115] 세포들을 4도에서 30분간 염색시켰다. 항체와의 결합이 끝난 후, 세포를 PBS로 세척하고, 500 μ l의 PBS에 다시 부유하였다. 분석은 FACS Calibur™(BD Biosciences) 기기 및 Cell Quest Pro™(BD Biosciences) 소프트웨어를 사용하여 시행하였다.
- [116] 그 결과, 도 2 및 표 1에 나타난 바와 같이, 중간엽 줄기세포와 비슷한 발현 패턴을 관찰할 수 있었다. CD44, CD90 및 CD105는 양성 발현패턴을 나타내었다. 이 결과에 의해 eAF-MSCs가 줄기세포임을 확인하였다.
- [117] 반면에, 면역세포 마커인 CD19, CD20, CD28, CD38, CD62L, CD200, 내피세포 마커인 CD31, CD62P, 혈구세포 마커인 CD34 및 혈소판 마커인 CD41a는 발현되지 않았다. 이 결과에 의해, eAF-MSCs가 전형적인 MSCs의 면역표현형을 보이는 순수한 줄기세포의 집단이라는 것을 확인하였다.
- [118] 표 1

[Table 1]

eAF-MSCs의 flow cytometry 분석

<u>Marker</u>	<u>Percent (%)</u>
<u>CD19</u>	<u>2.81</u>
<u>CD20</u>	<u>1.45</u>
<u>CD28</u>	<u>1.52</u>
<u>CD31</u>	<u>2.38</u>
<u>CD34</u>	<u>1.47</u>
<u>CD38</u>	<u>1.99</u>
<u>CD41a</u>	<u>1.66</u>
<u>CD44</u>	<u>99.47</u>
<u>CD62L</u>	<u>1.33</u>
<u>CD62P</u>	<u>1.87</u>
<u>CD90</u>	<u>96.22</u>
<u>CD105</u>	<u>95.10</u>
<u>CD200</u>	<u>2.53</u>

[119]

[120] 실시예 4

[121] **eAF-MSCs의 트릴리니지(Trilineage)분화 분석을 통한 분화능 검증**

[122] eAF-MSCs의 특성화를 검증하기 위하여, 트릴리니지 분화 분석을 수행하였다. 일반적으로 MSCs는 *in vitro*에서 연골세포, 골세포 및 지방세포로 분화할 수 있다. 그러므로 eAF-MSCs의 분화가능여부를 검증하기 위해, 각각 계통에 맞는 배지에서 배양하였다.

[123] **4-1: 연골세포로의 분화 가능 여부**

[124] 연골세포로의 분화가능여부를 탐구하기 위해, 실시예 1-3의 방법으로 수득한 eAF-MSCs를 15ml polypropylene tube에 분주하고, 원심분리하여 펠렛으로 만들었다. 펠렛은 하얗고 투명한 외관을 가졌다. 펠렛을 37도, 5% 이산화탄소 조건 인큐베이터에서 1ml의 연골세포 분화 유도 배지(Lonza, Wakersville, MD, USA)에서 배양하였다(실험군). 총 3주간 배양하였으며, 3일마다 배지를 교체하였다. 또한, 대조군으로서 연골세포 분화 유도 배지 대신, 성장 배지에서 같은 조건으로 배양하였다.

[125] 또한, 실험군 펠렛의 내부 구조를 확인하기 위하여, 실험군 펠렛을 3 μ m 크기로 세절하여 디파라피나이즈된 슬라이드에 처리하였다. 그 후, 중류수로 수화하여 연골 조직 형태를 살피기 위해 주로 사용되는 톨루이딘 블루 (Toluidin blue;

tolonium chloride)로 1분간 처리하여 염색분석하였다. 과도 염색은 증류수로 수회 세척하였으며, 그 후 건조하였다. 슬라이드는 xylene으로 깨끗이 하였으며, Canada balsam과 커버슬립으로 덮었다.

- [126] 그 결과, 도 3A에 나타난 바와 같이, 시간이 지남에 따라, 실험군 펠렛은 응집되고 튜브 밑에 둥근 모양의 구조를 형성함을 확인하였다. 그러나, 대조군 펠렛은 응집되지 않았으며, 모든 세포는 배지를 교환할 때마다 부유하였다. 따라서 대조군 세포들은 연골세포로의 분화가 일어나지 않았음을 확인하였다.
- [127] 또한, 도 3B에 나타난 바와 같이, 실험군 펠렛은 톨루이딘 블루 염색에 양성반응을 나타냈으며, 펠렛의 형상 또한 일반적인 연골조직과 비슷함을 확인하였다. 둥근 모양의 구조를 형성한 펠렛은 피펫팅이나 볼텍싱에 의해서도 응집이 풀리지 않았다. 이로써 본 발명에 따른 말 양수유래 줄기세포가 성공적으로 연골세포로 분화하였음을 확인하였다.

[128]

[129] **4-2: 골세포로의 분화 가능 여부**

- [130] 골세포로의 분화가능여부를 탐구하기 위해, 실시예 1-3에서 얻은 eAF-MSCs를 골세포 분화 유도 배지에서 배양하였다. 또한, 대조군으로서 골세포 분화 유도 배지 대신, 성장 배지에서 같은 조건으로 배양하였다. 총 2주간 배양하였으며, 3일마다 배지를 교체하였다.

- [131] 골세포로의 분화(Osteogenesis)의 경우, 1×10^5 개의 세포를 6-well 접시에 분주하고, 70-80% 컨플루언시를 나타낼 때까지 배양한 후, 골세포 분화 유도 배지에 처리하였다(10% FBS, 0.1 μ M 덱사메타손, 10 mM 베타-글리세로포스페이트, 50 μ M 아스코르베이트2인산을 포함한 DMEM배지; Sigma-Aldrich, US). 대조군은 FBS만을 포함한 DMEM 배지를 사용하였다.

- [132] 1주에 2번 배지를 교환하면서 2주간 배양한 후, 골세포로의 분화는 칼슘 퇴적을 측정하기 위해 알리자린 레드 S 염색을 통하여 측정하였다. 세포를 PBS로 세척하고, 70% ice-cold 에탄올에서 1시간동안 고정하였다. 그 후 증류수로 3회 세척한 후, 40mM의 알리자린 레드 S (pH 4.2; Sigma-Aldrich)를 사용하여 상온에서 10분간 염색하였다.

- [133] 정량을 위해서, 증류수로 5회 세척한 후, 1시간 동안 100mM의 세틸피리디늄 클로라이드(Sigma-Aldrich)를 사용하여 알리자린 레드 S 염색을 가용화시켰다. 가용화된 알리자린 레드 S 염색은 스펙트로포토미터를 이용하여 570nm에서 발현을 관찰하였다.

- [134] 그 결과, 도 4A 내지 4D에 나타난 바와 같이, 알리자린 레드 S 염색에 의한 칼슘 퇴적을 확인할 수 있었다. 도 4C 및 4D에 나타난 바와 같이, 골세포 분화 유도 배지에서 배양한 세포들은 알리자린 레드 S 염색에 양성 반응을 나타내었다. 그러나 도 4A 및 4B에 나타난 바와 같이, 대조군 세포들은 염색되지 않음을 확인하였다. 또한, 도 4E에 나타난 바와 같이, 세틸피리디늄 클로라이드(Sigma-Aldrich)를 사용하여 정량화해 본 결과, 대조군에 비해 골세포

분화 유도 배지에서 배양한 세포는 13배나 더 높은 값을 나타내었다. 이로써 본 발명에 따른 말 양수유래 줄기세포가 성공적으로 골세포로 분화하였음을 확인하였다.

[135]

[136] **4-3: 지방세포로의 분화 가능 여부**

[137] 지방세포로의 분화(Adipogenesis)의 경우, 1×10^5 개의 세포를 6-well 접시에 분주하고, 90-100% 컨플루언시를 나타낼 때까지 배양한 후, 지방세포 분화 유도 배지(낮은 글루코오스, 10% FBS, 100nM 덱사메타손, 10 μ g/ml 인슐린, 0.5 mM 3-이소부틸-1-메틸잔틴, 0.2 mM 인도메타신 조건을 가진 DMEM 배지)에서 배양하였다.

[138] 3일에 1번 배지를 교환하면서 2주간 배양한 후, 지방 방울 검출은 지용성 염색약인 Oil red O 염색을 통하여 검출하였다. 사진을 찍었으며, 광학 밀도는 500nm에서 측정하였다. 상세하게는, 약 1시간 동안 10% 포르말린으로 고정시킨 후, 60% isopropanol을 사용하여 녹여 분리하였다. 그 후 오일 레드 O 염색을 10분 동안 하였다.

[139] 과도 염색된 것은 5회 물로 세척하여 제거하였으며, 1시간 동안 100% isopropanol를 사용하여 오일 레드 O 염색을 가용화시켰다. 가용화된 오일 레드 O 염색은 스펙트로포토미터를 이용하여 500nm에서 발현을 관찰하였다.

[140] 그 결과, 도 5A 내지 5D에 나타난 바와 같이, 대조군은 지방 방울을 나타내지 않았으나, 지방세포 분화 유도 배지에서 배양된 세포는 1주 후 지방 방울을 형성하였다. 도 5C 및 5D에 나타난 바와 같이, 지방세포 분화 유도 배지에서 배양된 세포는 2주 후 오일 레드 O 염색에 양성 반응을 나타내었다. 도 5D에 검정 화살표로 표시된 것과 같은 지방 방울을 확연하게 확인할 수 있었다.

[141] 또한, 도 5E에 나타난 바와 같이, 이소프로파놀로 정량화 한 결과, 대조군에 비해 지방세포 분화 유도 배지에서 배양한 세포는 5배 더 높은 값을 나타내었다. 이로써 본 발명에 따른 말 양수유래 줄기세포가 성공적으로 지방세포로 분화하였음을 확인하였다. 따라서 실시예 4에서, 본 발명에 따른 말 양수유래 줄기세포가 중배엽 유래의 세포로 분화가능함을 확인하였으며, 그 분화 정도가 우수함을 확인하였다.

[142]

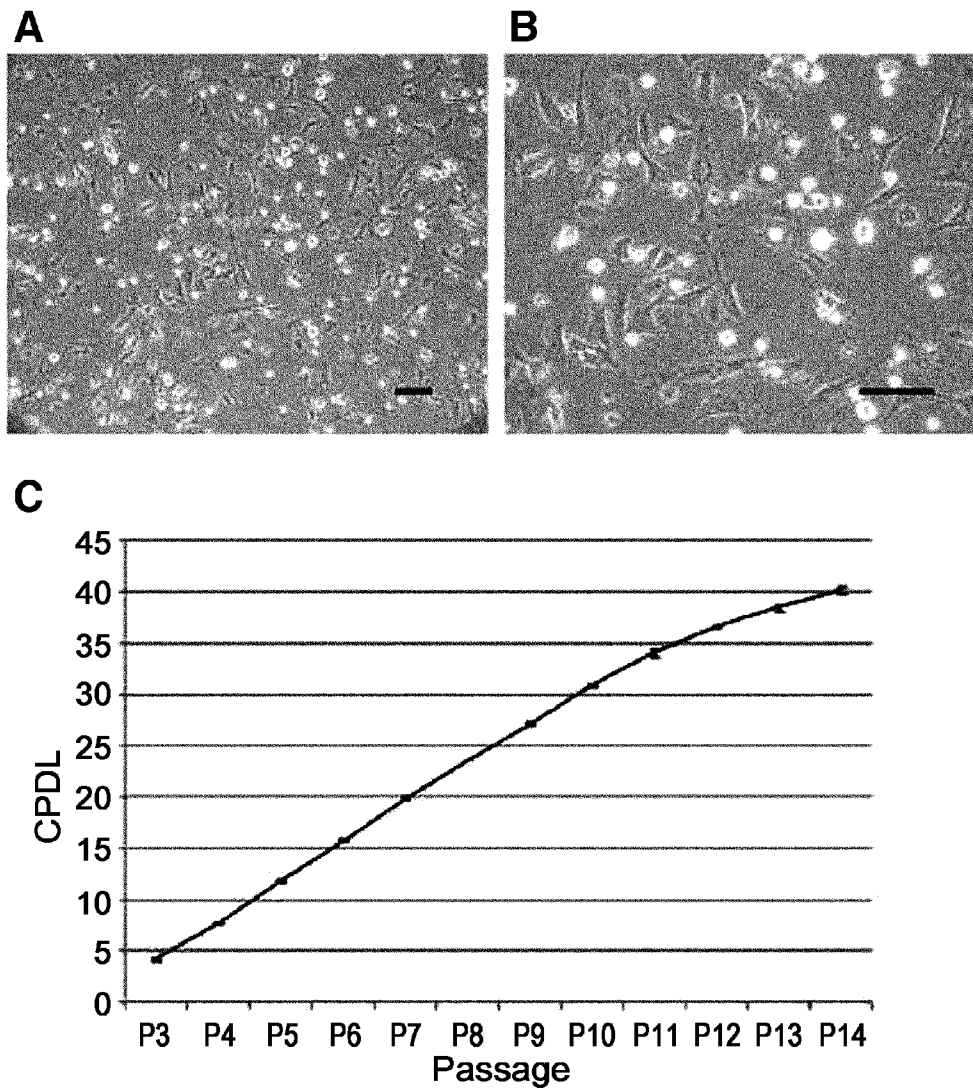
[143] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점을 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

청구범위

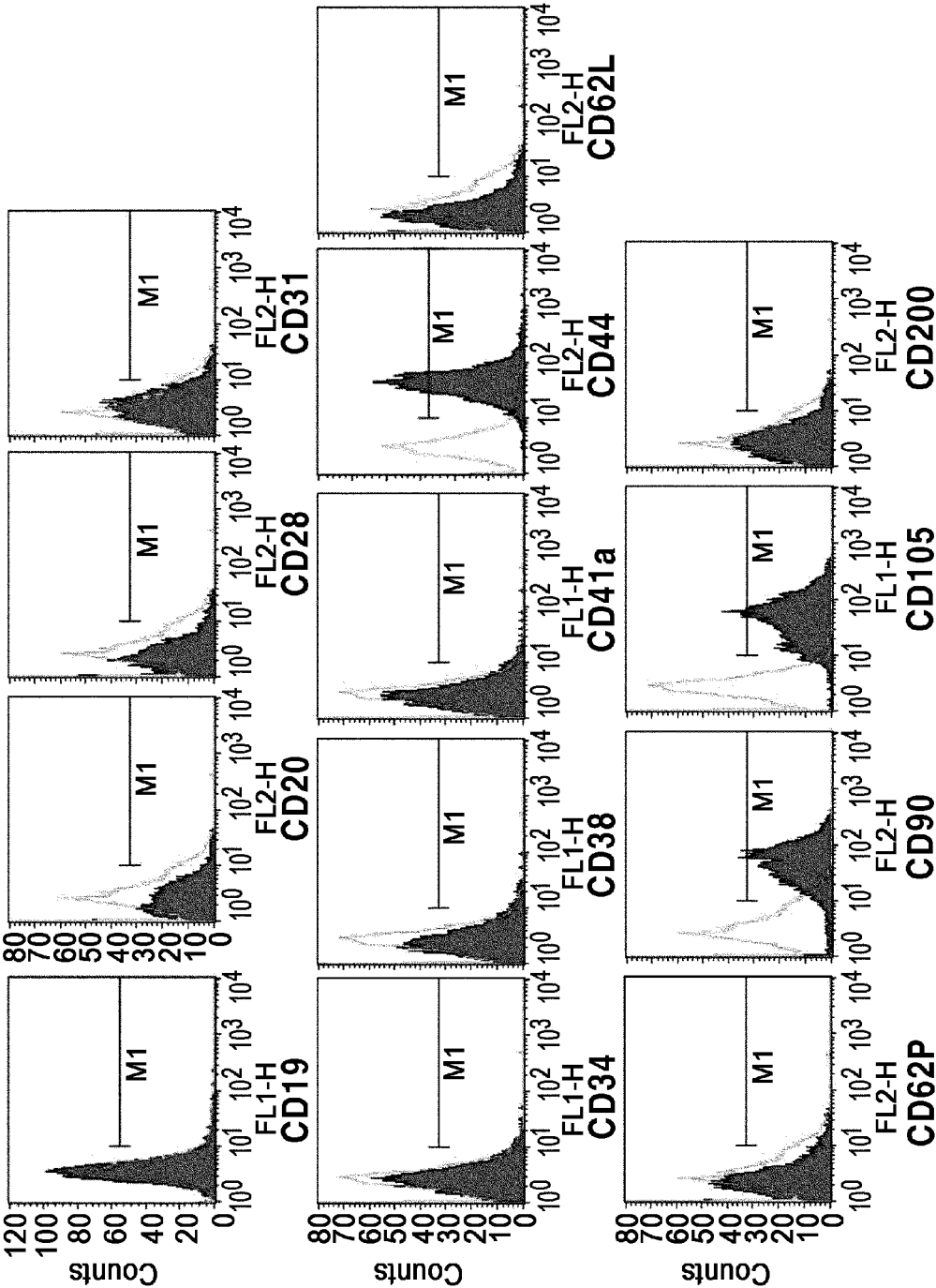
- [청구항 1] 말과동물 양수에서 분리한 줄기세포를 EGM-2 (Endothelial cell Growth Medium-2) 배지에서 배양하는 제1단계; 및 배양된 세포를 회수하는 제2단계를 포함하여, 다음과 같은 특성을 나타내고 배양전 줄기세포들보다 균질화도가 향상된 말과동물 양수 유래 다분화능 줄기세포의 제조방법:
 (a) 사람 마커인 CD19, CD20, CD28, CD31, CD34, CD38, CD41a, CD62L, CD62P 및 CD200에 대하여 모두 음성의 면역학적 특성을 나타내고, 사람 마커인 CD44, CD90 및 CD105에 대하여 모두 양성인 면역학적 특성을 나타냄;
 (b) 외배엽, 중배엽 또는 내배엽 유래 세포로 분화하는 능력을 가짐; 및
 (c) 미분화상태로 14세대 이상 배양되는 능력을 가짐.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 제1단계에서 말과동물 양수에서 분리된 줄기세포는 밀도-그라디언트 용액을 사용하여 원심분리한 후 중간층인 세포층에서 추출한 것이 특징인 제조방법.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 제1단계는 말과동물 양수에서 분리한 줄기세포를 EGM-2 (Endothelial cell Growth Medium-2) 배지에서 부착 배양하는 것이 특징인 제조방법.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 제1단계에서 EGM-2 배지에 소태아혈청 (FBS)를 첨가하여 배양하는 것이 특징인 제조방법.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 제1단계에서 배양한 세포를 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 배지로 교체하여 배양하는 단계를 더 추가하는 것이 특징인 제조방법.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 DMEM배지는 FBS (Fetal Bovine Serum)를 함유하는 저글루코오스 DMEM 배지인 것이 특징인 제조방법.
- [청구항 7] 말과동물의 양수를 준비하는 제1단계; 및 상기 양수로부터 사람 마커인 CD19, CD20, CD28, CD31, CD34, CD38, CD41a, CD62L, CD62P 및 CD200에 대하여 모두 음성의 면역학적 특성을 나타내고, 사람 마커인 CD44, CD90 및 CD105에 대하여 모두 양성인 면역학적 특성을 나타내는 다분화능 줄기세포를 분리하는 제2단계를 포함하여, 다음과 같은 특성을 나타내는 균질의 말과동물 양수 유래 다분화능 줄기세포의 제조방법:
 (a) 외배엽, 중배엽 또는 내배엽 유래 세포로 분화하는 능력을 가짐; 및
 (b) 미분화상태로 14세대 이상 배양되는 능력을 가짐.

- [청구항 8] 제7항에 있어서, 제2단계에서 면역학적 분리는 상기 사람 마커에 대해 상이한 종(species)간에도 교차반응하는 항체를 사용하는 것이 특징인 제조 방법.
- [청구항 9] 다음과 같은 특성을 가지는 말과동물 양수 유래 다분화능 줄기세포:
 (a) 사람 마커인 CD19, CD20, CD28, CD31, CD34, CD38, CD41a, CD62L, CD62P 및 CD200에 대하여 모두 음성의 면역학적 특성을 나타내고, 사람 마커인 CD44, CD90 및 CD105에 대하여 모두 양성인 면역학적 특성을 나타냄;
 (b) 외배엽, 중배엽 또는 내배엽 유래 세포로 분화하는 능력을 가짐; 및
 (c) 미분화상태로 14세대 이상 배양되는 능력을 가짐.
- [청구항 10] 제9항에 있어서, 상기 중배엽 유래 세포는 연골세포, 골세포, 지방세포, 건세포 또는 근세포인 것이 특징인 다분화능 줄기세포.
- [청구항 11] 제9항에 있어서, 상기 말과동물은 얼룩말, 말, 노새 및 당나귀로 구성된 군에서 선택되는 하나인 것이 특징인 다분화능 줄기세포.
- [청구항 12] 제9항 내지 제11항 중 어느 한 항의 다분화능 줄기세포를 연골세포 분화배지에 배양하는 것을 특징으로 하는 다분화능 줄기세포를 연골세포로 분화시키는 방법.
- [청구항 13] 제9항 내지 제11항 중 어느 한 항의 다분화능 줄기세포를 덱사메타손, 베타-글리세로포스페이트 및 아스코르베이트-2-인산을 함유한 배양배지에 배양하는 것을 특징으로 하는 다분화능 줄기세포를 골세포로 분화시키는 방법.
- [청구항 14] 제9항 내지 제11항 중 어느 한 항의 다분화능 줄기세포를 덱사메타손, 인도메타신, 3-이소부틸-메틸잔틴 및 인슐린을 함유한 배양배지에 배양하는 것을 특징으로 하는 다분화능 줄기세포를 지방세포로 분화시키는 방법.
- [청구항 15] 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 기재된 방법에 의해 제조된 다분화능 줄기세포, 또는 제9항 내지 제11항 중 어느 한 항에 기재된 다분화능 줄기세포, 또는 이로부터 분화된 세포를 유효성분으로 함유하는 세포 치료제.
- [청구항 16] 제15항에 있어서, 말과동물의 골관절염 치료용, 말과동물의 골 결실 질환 치료용, 말과동물의 지방 조직 형성용, 말과동물의 힘줄 조직 형성용 또는 말과동물의 근육 조직 형성용인 세포 치료제.

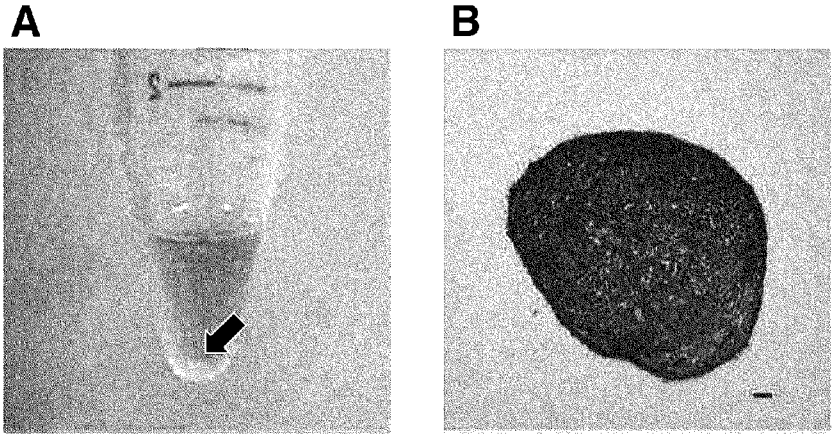
[Fig. 1]



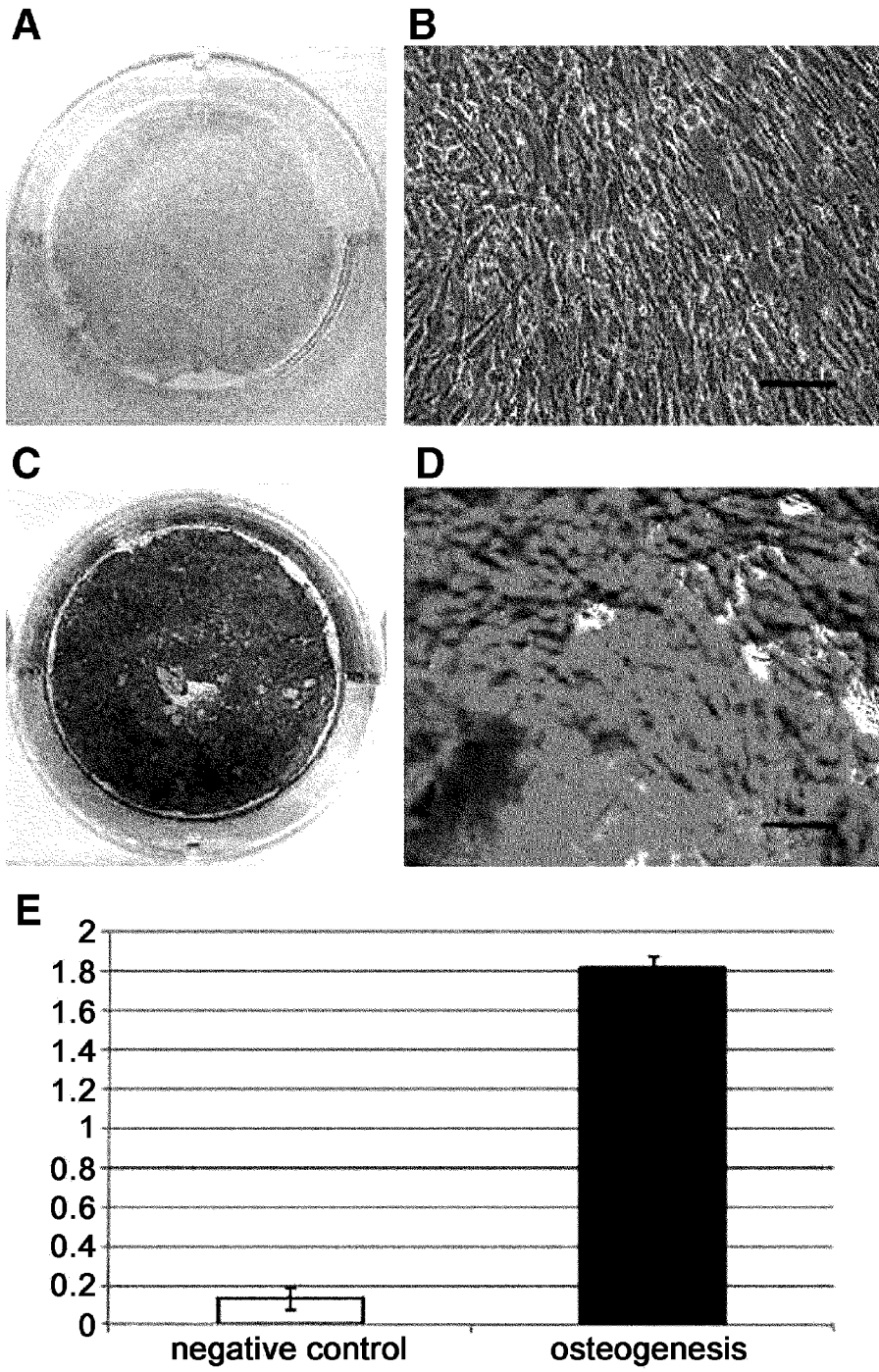
[Fig. 2]



[Fig. 3]



[Fig. 4]



[Fig. 5]

