



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년09월02일

(11) 등록번호 10-2439335

(24) 등록일자 2022년08월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61L 15/44 (2006.01) A61K 35/50 (2015.01)

A61K 9/70 (2006.01) A61L 15/22 (2006.01)

A61L 15/42 (2006.01) A61L 15/64 (2006.01)

A61L 27/38 (2006.01) A61L 27/60 (2006.01)

A61P 17/02 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61L 15/44 (2013.01)

A61K 35/50 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0176353

(22) 출원일자 2021년12월10일

심사청구일자 2021년12월10일

(56) 선행기술조사문헌

JP2018512959 A*

(뒷면에 계속)

(73) 특허권자

주식회사 엠케이바이오텍

대전광역시 유성구 대학로 99, 207호(궁동, 충남대학교 농업생명공학과)

글라드아이 주식회사

경상북도 구미시 구미대로 350-27, 금오테크노밸리 모바일융합기술센터 2층 지-스타캠프(신평동)

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

김민규

대전광역시 유성구 죽동로 321 금성백조예미지 102동 2401호

김은영

대전광역시 유성구 어은로 57 한빛아파트 136동 703호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

원대규

전체 청구항 수 : 총 13 항

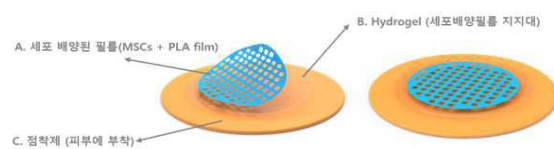
심사관 : 강연경

(54) 발명의 명칭 태반-유래 줄기세포를 함유하는 피부 재생용 바이오패치형 세포치료제

(57) 요약

본 발명은 태반-유래 줄기세포를 포함하는 피부 재생용 바이오패치형 세포치료제에 관한 것으로, 생분해성 고분자 필름에 태반-유래 줄기세포가 존재하는 상태 그대로 피부 등 생체 이식이 가능하기 때문에 오염이나 조작의 복잡함이 없이 간편하게 생체 이식 소재로 활용할 수 있는 효과가 있다.

대표도 - 도14



(52) CPC특허분류

A61K 9/70 (2021.05)
A61L 15/22 (2013.01)
A61L 15/425 (2013.01)
A61L 15/64 (2013.01)
A61L 27/3834 (2013.01)
A61L 27/3895 (2013.01)
A61L 27/60 (2013.01)
A61P 17/02 (2018.01)

(72) 발명자

이은지

대전광역시 서구 계룡로319번길 12, 현대팰리스
 103호

김령은

대전광역시 서구 계룡로251번길 21, 작은하우스
 103호

성경환

경상북도 칠곡군 석적읍 서중리5길 66-6 중리금호
 어울림 102동 1103호

홍종욱

경기도 수원시 장안구 정자천로133번길 26 백설마
 을성지, 동양고속아파트 552동 403호

(56) 선행기술조사문헌

KR100818214 B1*
 KR1020130053609 A*
 JP2010532225 A
 JP2020058786 A
 JP2021035976 A
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1425152201
과제번호	S2796281
부처명	중소벤처기업부
과제관리(전문)기관명	중소기업기술정보진흥원
연구사업명	창업성장기술개발(R&D)
연구과제명	피부치료용 줄기세포 바이오 패치 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	엠케이바이오텍
연구기간	2019.11.25 ~ 2021.11.24

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

태반-유래 줄기세포(Placenta-derived stem cells); 다공성 생분해성 고분자 필름 및 생체적합성 고분자 지지체를 포함하고,

상기 태반-유래 줄기세포는 다음과 같은 특성을 가지는 것인, 바이오패치형 세포치료제:

- a) CD44, CD90, CD105에 대하여 양성의 면역학적 특성을 나타내고, CD34, CD38, CD45, MHC class II에 대하여 음성의 면역학적 특성을 나타냄;
- b) 입방 형태(spindle-shape)의 형태학적 특성을 나타냄;
- c) 외배엽, 중배엽 또는 내배엽 유래 세포로 분화하는 능력을 가짐; 및
- d) 줄기세포의 특성을 유지 한 채 50 계대 이상 배양되는 자가 증식능력을 가짐.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 태반-유래 줄기세포는 다음의 단계를 포함하는 분리방법에 의해 얻어진 것인, 바이오패치형 세포치료제:

말과 동물 모체의 출산 후 분리되는 태반으로부터 양막(equine amniotic membrane) 조직을 얻는 단계;

양막 조직을 파쇄(chopping)하는 단계;

원심분리하여 펠렛(pellet)을 회수하는 단계;

세척 및 원심분리를 반복하여 단핵세포를 분리하는 단계; 및

소태아혈청 및 항생제가 첨가된 배지에서 배양하는 단계.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 말과 동물은 말, 당나귀, 노새, 얼룩말 또는 이들의 교잡으로 태어난 잡종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 바이오패치형 세포치료제.

청구항 4

삭제

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 중배엽 유래 세포는 지방세포, 골아세포, 연골세포, 또는 근세포인, 바이오패치형 세포치료제.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 태반-유래 줄기세포는 상기 다공성 생분해성 고분자 필름 표면에 배양되어 있는 것인, 바이오패치형 세포치료제.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 다공성 생분해성 고분자 필름 표면은 초음파 처리(sonication) 및/또는 플라즈마 처리된 것인, 바이오패치형 세포치료제.

청구항 8

제 6항에 있어서, 상기 다공성 생분해성 고분자 필름 이면은 이형 필름이 부착된 것인, 바이오패치형 세포치료제.

제.

청구항 9

제 1항에 있어서, 상기 다공성 생분해성 고분자 필름은 폴리락트산(Poly(lactic acid)), 폴리글리콜산(Poly(glycolic acid)), 폴리락티글리콜산(Poly(latic-co-glycolic acid)), 폴리디메틸실록산((Poly)dimethylsiloxane), 셀룰로오스(Cellulose), 폴리하이드록시뷰틸레이트 하이드록시발레레이트(Poly(hydroxybutyrate hydroxyvalerate)), 폴리에틸렌글리콜(Polyethylene glycol) 및 폴리카프로락톤(Poly-ε-caprolactone)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 필름인 것인, 바이오패치형 세포치료제.

청구항 10

제 1항에 있어서, 상기 생체적합성 고분자 지지체는 상기 태반-유래 줄기세포가 배양된 다공성 생분해성 고분자 필름의 이면에 부착된 것인, 바이오패치형 세포치료제.

청구항 11

제 1항에 있어서, 상기 생체적합성 고분자 지지체는 세포 배양을 위한 영양성분을 함유하는 것인, 바이오패치형 세포치료제.

청구항 12

제 11항에 있어서, 상기 세포 배양을 위한 영양성분은 세포외기질(extracellular matrix)을 포함하는 것인, 바이오패치형 세포치료제.

청구항 13

제 1항에 있어서, 상기 생체적합성 고분자 지지체는 젤라틴, 히알루론산, 헤파린, 셀룰로스, 텍스트란, 알지네이트, 키토산, 키틴, 콜라겐, 콘드로이틴황산 및 펙틴으로 이루어진 군으로부터 선택되는 지지체인 것인, 바이오패치형 세포치료제.

청구항 14

제 1항에 있어서, 상기 생체적합성 고분자 지지체는 0.05 내지 10.0 mm의 두께를 갖는 것인, 바이오패치형 세포치료제.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 태반-유래 줄기세포를 함유하는 피부 재생용 바이오패치형 세포치료제에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 줄기세포(stem cell)는 자기 복제가 가능하고 한 세포에서 다양한 조직을 구성하는 세포로 분화 및 증식이 가능 아직 분화되지 않은 미분화 세포로서, 손상 받은 신체 조직 및 세포를 재생할 수 있는 특이한 능력을 보유하고 있다. 현재 확실한 치료법이 없는 퇴행성 질병이나 심한 외상과 같은 치료가 어려운 손상에 있어 의학적 활용도가 매우 높은 차세대 기술로 인식되어 알려져 있으며, 재생의학 분야에서 줄기세포를 이용한 임상 시험 및 연구가 진행되고 있다.

[0003] 줄기세포는 세포 기원 조직의 발달 상태에 따라 크게 배아 유래 줄기세포(embryonic stem cells)와 성체 줄기세포(adult stem cells)로 구분되며, 그 외에 유전자 편집기술을 이용한 만능 유도 줄기세포(induced Pluripotent stem cells)가 있다. 줄기세포를 이용한 재생 치료 연구는 조직 원료 획득의 용이성, 줄기세포 분리 효율 및 종양 형성 문제 등을 고려하여 주로 성체 줄기세포의 한 종류인 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cells)가 이용되고 있으며, 골수, 지방, 태반 등의 조직에서 얻을 수 있다.

[0004] 태반 줄기세포는 제대혈, 양막 및 양수에서 유래한 줄기세포로, 다른 조직 유래 중간엽 줄기세포 중에서 가장 최근에 발견되어 연구되고 있다. 태반 줄기세포는 우수한 증식 능력을 가지고 있으며 종양형성 문제가 없고, 지

방, 뼈, 근육, 간, 신경 등의 중배엽, 내배엽, 외배엽 기원 조직으로 분화할 수 있는 능력을 지니고 있다. 특히 윤리적인 문제를 극복한 유일한 줄기세포이며, 출생 시 비침습적인 방법으로 확보가 가능한 장점이 있으며, 위와 같은 결과들은 성체 줄기세포 기원 조직 중 태아와 함께 생성되어 가장 빨리 채취 가능한 조직으로 태반 줄기세포의 세포 치료제로서의 가능성을 보여준다.

[0005] 하지만 줄기세포를 이용한 재생 치료는 이식한 줄기세포의 생존율 저하로 인한 이식 및 전달 효율성이 제한된다는 문제가 있으며, 최근 여러 기술과의 융합을 통하여 세포 단일 치료제 개발에 집중되어 왔던 연구 방향에서 안정성과 효용성이 보완된 전략 기술 발달이 진행되고 있다.

[0006] 한편, 바이오패치(Bio-patch)는 일반적으로 수술, 주사 및 피부 상처로 야기되는 감염을 예방하기 위한 목적으로 피부에 부착하는 일종의 드레싱으로서 사용되며, 최근 바이오 패치 기술은 건강관련 생체신호를 실시간 분석, 감지하는 패치형 센서, 만성질환 및 건강을 관리하는 부착형 생체신호 모니터링 모듈로도 응용되어 연구 개발되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) KR 10-1843293 B1

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명자들은 피부 조직 재생용 바이오패치형 세포치료제를 개발하고자 연구하던 중, 태반-유래 줄기세포를 생분해성 고분자 필름에 배양하여 피부 손상 부위에 바로 적용하는 반창고 타입의 치료제를 고안하고, 이를 이용한 피부 손상 치료를 통하여 치료제의 재생 능력을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

[0009] 따라서, 본 발명의 목적은 태반-유래 줄기세포(Placenta-derived stem cells); 다공성 생분해성 고분자 필름 및 생체적합성 고분자 지지체를 포함하는, 바이오패치형 세포치료제를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명자들은 피부 조직 재생용 바이오패치형 세포치료제를 개발하고자 연구하던 중, 태반-유래 줄기세포를 생분해성 고분자 필름에 배양하여 피부 손상 부위에 바로 적용하는 반창고 타입의 치료제를 고안하고, 이를 이용한 피부 손상 치료를 통하여 치료제의 재생 능력을 확인하였다.

[0011] 따라서, 본 발명은 태반-유래 줄기세포; 다공성 생분해성 고분자 필름 및 생체적합성 고분자 지지체를 포함하는, 바이오패치형 세포치료제에 관한 것이다.

[0012] 이하, 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.

[0014] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명은 태반-유래 줄기세포가 배양되어 있는 바이오패치형 세포치료제에 관한 것이다.

[0015] 본 발명에서 "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.

[0016] 본 발명에서 "태반-유래 줄기세포"는 태반으로부터 수득 될 수 있는 줄기세포를 지칭한다. 구체적으로는 태반 줄기세포, 다능성(multipotent) 세포 및 전구(progenitor) 세포를 포함한다.

[0017] 본 발명에서 "다능성 세포"는 포유류 신체의 약 260개 세포 유형의 임의의 하위세트로의 성장능력을 갖는 세포를 지칭한다. 만능성 세포와 달리, 다능성 세포는 모든 세포 유형을 형성하려는 능력을 갖지 않는다.

[0018] 본 발명에서 "전구 세포"는 특정 유형의 세포로 분화되거나 특정 유형의 조직을 형성하도록 된 세포를 지칭한다.

- [0019] 본 발명에서 "분화"는 세포가 분열 증식하여 성장하는 동안에 서로 구조나 기능이 특수화하는 현상, 즉 생물의 세포, 조직 등이 각각에게 주어진 일을 수행하기 위하여 형태나 기능이 변해가는 것을 말한다.
- [0020] 본 발명에서 "바이오패치"는 얇은 시트 또는 필름 형상으로서 바람직하게는 박막 형상을 가질 수 있으며, 피부나 인체의 장기 등 인체 부위의 어느 곳이든 부착하여 생물학적 기능을 활성화하고 세포의 증식이나 분화 등이 가능하도록 생물학적, 치료학적, 의료적 기능성을 가진 패치를 의미한다. 본질적으로는 패치의 주성분은 세포가 배양되어 있으면서 패치 재질은 생분해성을 가지므로 인체에서 분해되어 소멸되는 형태를 가진다.
- [0021] 본 발명에서 "세포치료제"는 사람으로부터 분리, 배양 및 특수한 저장을 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 이종 세포를 체외에서 증식·선별하거나 다른 방법으로 세포의 생물학적 특성을 변화시키는 등의 일련의 행위를 통하여 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품을 지칭한다. 세포치료제는 세포의 분화 정도에 따라 크게 체세포치료제, 줄기세포치료제로 분류되며 본 발명은 특히 줄기세포치료제에 관한 것이다.
- [0022] 상기 태반-유래 줄기세포는 다음의 단계를 포함하는 분리방법에 의해 얻어진 것일 수 있다.
- [0023] 말과 동물 모체의 출산 후 분리되는 태반으로부터 양막(equine amniotic membrane) 조직을 얻는 단계;
- [0024] 양막 조직을 파쇄(chopping)하는 단계;
- [0025] 원심분리하여 펠렛(pellet)을 회수하는 단계;
- [0026] 세척 및 원심분리를 반복하여 단핵세포를 분리하는 단계; 및
- [0027] 소태아혈청 및 항생제가 첨가된 배지에서 배양하는 단계.
- [0028] 본 발명에서 "말과 동물"이란, 말과(*Equidae*; Genus *Eauus*)에 속하는 포유류 동물로, 말, 당나귀, 노새, 그레비얼룩말, 산얼룩말, 얼룩말아속의 과가, 아시아야생당나귀, 아프리카야생당나귀, 캄당나귀, 타르판, 프세발스키말, 시리아당나귀, 또는 이들의 교잡으로 태어난 잡종 등이 이에 속한다.
- [0029] 본 발명에서 "태반"은 임신 중에 태아를 위해 만들어지는 것으로, 태반의 한쪽은 모체와 닿아 있고 다른 한쪽은 태아와 맞닿아 있으며 그 사이 공간에 모체의 혈액이 담겨 있어 태아에게 영양분을 공급하게 된다. 태반은 양막, 장막, 탈락막의 3층으로 구성되어 있다.
- [0030] 본 발명에서 "양막"은 융모막, 탈락막과 함께 삼중층의 구조로 태반을 구성하는 하나의 층이다. 상피 단층과 기질막의 이중층 구조를 갖는 얇은 무혈관 막으로 태아에 결합하여 환경을 구성하는 주머니이다.
- [0031] 상기 분리방법에 의해 얻어진 본 발명의 태반-유래 줄기세포는 중간엽 줄기세포 마커인 *CD44*, *CD90*, *CD105*에 대하여 양성인 면역학적 특성을 나타내고, 동시에 면역 세포 마커인 *CD34*, *CD38*, *CD45*, 면역 관련 마커인 *MHC class II*에 대하여 음성의 면역학적 특성을 나타낸다.
- [0032] 또한, 상기 분리방법에 의해 얻어진 본 발명의 태반-유래 줄기세포는 다능성을 나타내는 유전자(*Oct4*, *c-Myc*, 및 *Klf4*) 및 줄기세포에 특이적으로 나타나는 유전자(*PAX6*, *ALCAM*, *Integrin-β1*, *Endoglin*, 및 *HCAM*)에 대하여 모두 양성인 유전적 발현 특성을 나타낸다.
- [0033] 또한, 상기 분리방법에 의해 얻어진 본 발명의 태반-유래 줄기세포는 입방 형태(spindle-shape)의 형태학적 특성을 나타낸다.
- [0034] 또한, 상기 분리방법에 의해 얻어진 본 발명의 태반-유래 줄기세포는 외배엽, 중배엽 또는 내배엽 유래 세포로 분화하는 능력을 가진다.
- [0035] 나아가, 상기 분리방법에 의해 얻어진 본 발명의 태반-유래 줄기세포는 줄기세포의 특성을 유지 한 채 50 세대 이상 배양되는 자가 증식능력을 가진다.
- [0036] 상기 외배엽 유래 세포는 피부세포, 신경세포, 및/또는 성상세포, 상기 중배엽 유래 세포는 지방세포, 골아세포, 연골세포, 및/또는 근세포, 상기 내배엽 유래 세포는 췌장세포, 및/또는 폐세포일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0038] 본 발명의 다른 일 구현예에 따르면, 본 발명은 다공성 생분해성 고분자 필름 표면에 태반-유래 줄기세포가 배양되어 있는 바이오패치형 세포치료제에 관한 것이다.

- [0039] 본 발명에서 "다공성"은 공기나 습기 또는 세포가 투과할 수 있는 성질을 가진 것을 의미하며, 예컨대 시트나 필름, 박막 등의 형상에 작은 관통 구멍이 형성된 것을 포함한다. 통상적으로는 필름, 박막 등의 형태 자체가 다공질의 형태를 가진 것을 포함한다.
- [0040] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 다공성 생분해성 고분자 필름은 직경 1~10 μm 크기의 원형 또는 다각형상의 구멍이 다수 천공된 형성된 것일 수 있다. 여기서 '다수'라는 의미는 천공된 전체 구멍의 표면적이 전체 필름 면적의 20~50%범위를 차지하는 것을 의미한다.
- [0041] 본 발명에서 "생분해성"은 인체에 적용 시 시간이 경과함에 따라 생물학적 분해를 통해 인체에 아무런 영향을 주지 아니하고 서서히 분해되는 성질을 의미한다.
- [0042] 상기 다공성 생분해성 고분자 필름 표면은 초음파 처리(sonication) 및/또는 플라즈마 처리된 것일 수 있다. 상기 다공성 생분해성 고분자 필름 표면은 초음파 및/또는 플라즈마 처리함으로써 표면 친수화를 통한 줄기세포의 배양에 적합한 세포 부착력이 유도될 수 있다.
- [0043] 상기 다공성 생분해성 고분자 필름 이면은 이형 필름이 부착된 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 이형 필름은 상기 다공성 생분해성 고분자 필름의 이면에서 최외곽층으로 포함되는 것일 수 있다. 이때 사용되는 이형 필름으로는 불소가 코팅된 폴리에틸렌 테레프탈레이트(polyethylene terephthalate; PET) 필름을 사용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0044] 상기 다공성 생분해성 고분자 필름은 폴리락트산(Poly(lactic acid)), 폴리글리콜산(Poly(glycolic acid)), 폴리락틱글리콜산(Poly(latic-co-glycolic acid)), 폴리디메틸실록산((Poly)dimethylsiloxane), 셀룰로오스(Cellulose), 폴리하이드록시뷰티레이트 하이드록시발레레이트(Poly(hydroxybutyrate hydroxyvalerate)), 폴리에틸렌글리콜(Polyethylene glycol) 및/또는 폴리카프로락톤(Poly- ϵ -caprolactone) 필름일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0045] 상기 고분자 필름은 고분자 분자구조 내에 아마이드 결합, 에스터 결합 또는 글리코시딕 결합을 갖고 있어 생분해 가능하며, 짧게는 몇 주에서 길게는 몇 달 이내에 자연에서 분해되기 때문에 자연 친화적인 장점을 가지고 있다.
- [0047] 본 발명의 또 다른 일 구현예에 따르면, 본 발명은 태반-유래 줄기세포가 배양되어 있는 다공성 생분해성 고분자 필름 이면에 생체적합성 고분자 지지체(하이드로젤)가 부착되어 있는 바이오패치형 세포치료제에 관한 것이다.
- [0048] 상기 생체적합성 고분자 지지체는 세포 배양을 위한 영양성분을 함유하는 것일 수 있다. 구체적으로, 세포 배양을 위한 영양성분은 세포외기질(extracellular matrix)을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0049] 상기 생체적합성 고분자 지지체는 태반-유래 줄기세포가 배양되어 있는 다공성 생분해성 고분자 필름 이면에 부착되어, 다공성의 생분해성 고분자 필름의 구멍을 통해 세포 배양을 위한 영양성분(줄기세포 배양액 포함)을 세포에 공급함으로써, 세포의 활성을 유지하고 환부의 재생(치료) 효과를 극대화하는 기능을 할 수 있다. 추가적으로, 환부로부터의 삼출물을 담아내는 역할도 부수적으로 할 수 있다.
- [0050] 상기 생체적합성 고분자 지지체는 생체적합성 고분자로 이루어진 일정 두께를 갖는 얇은 막 형태의 구조물을 말하며, 원하는 형태로 잘라서 사용할 수 있는 장점이 있다.
- [0051] 상기 생체적합성 고분자 지지체는 0.05 내지 10.0 mm의 두께를 가질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0052] 상기 생체적합성 고분자 지지체는 젤라틴, 히알루론산, 해파린, 셀룰로스, 텍스트란, 알지네이트, 키토산, 키틴, 콜라겐, 콘드로이틴황산 및/또는 펙틴 지지체일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0054] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 바이오패치형 세포치료제는 태반-유래 줄기세포가 배양되어 있고 다공성을 가지는 생분해성 고분자 필름에 생체적합성 고분자 지지체가 적층된 형태를 가질 수 있다.
- [0055] 도 14는 본 발명의 일 실시예에 따른 바이오패치형 세포치료제의 적층 구조를 나타낸 것이다.
- [0056] 도 14를 참조하면, 본 발명의 바이오패치형 세포치료제는 태반-유래 줄기세포가 배양된 다공성 생분해성 필름과 세포 배양을 위한 영양성분이 함유된 생체적합성 고분자 지지체(하이드로젤)를 포함하는 형태로 구성될 수 있다.

[0057] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기와 같은 본 발명에 따른 바이오패치형 세포치료제를 이용하는 하나의 실시예로서, 본 발명의 바이오패치형 세포치료제를 이용하는 피부 재생 방식을 설명하면 다음과 같다.

[0058] 도 14에서와 같이, 태반-유래 줄기세포가 배양된 다공성 생분해성 고분자 필름(A) 및 생체적합성 고분자 지지체(하이드로겔)(B)가 적층된 바이오패치를 적당한 크기로 절단하거나 절단하지 아니하고 적용 부위에 붙인다. 여기서 적용 부위로는 예컨대 화상환자 치료 부위 등 다양한 적용 부위가 고려될 수 있다.

[0059] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 적용 부위에 붙이는 과정에서는 생체적합성 고분자 지지체에 추가적으로 점착제(C)를 덧대어 부착함으로써, 적용 부위(피부)에 부착하는 형태로 적용될 수 있다.

[0060] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 이와 같은 방법으로 바이오패치형 세포치료제를 적용하면, 다공성 생분해성 고분자 필름 표면에 배양된 줄기세포가 천공된 구멍을 따라 아래로 이동하고 피부 표면에 정착하여 성장하면서 매우 효과적인 피부 조직 재생 활성을 발휘할 수 있다. 상당한 시간 경과 후, 다공성 생분해성 고분자 필름은 분해되어 없어지고 활착된 세포로 인한 재생 효과를 발현하게 되는 것이다.

발명의 효과

[0061] 본 발명은 태반-유래 줄기세포를 포함하는 피부 재생용 바이오패치형 세포치료제에 관한 것으로, 생분해성 고분자 필름에 태반-유래 줄기세포가 존재하는 상태 그대로 피부 등 생체 이식이 가능하기 때문에 오염이나 조작의 복잡함이 없이 간편하게 생체 이식 소재로 활용할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0062] 도 1은 말의 양막 조직을 멸균된 배양 배지에 옮긴 모습이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따라, 본 발명의 양막 유래 세포의 초기 배양 결과를 나타낸다.

도 3a 및 도 3b는 본 발명의 일 실시예에 따라, 본 발명의 양막 유래 줄기세포의 자가 복제 및 증식 능력을 확인한 것으로, 도 3a는 초기 계대부터 45 계대 이상의 양막 유래 줄기세포의 Doubling time, 도 3b는 양막 유래 줄기세포와 피부 유래 섬유아세포의 doubling time을 비교한 그래프이다.

도 4는 양막 유래 줄기세포와 피부 유래 섬유아세포의 콜로니 형성 능력을 비교한 결과이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따라, 본 발명의 양막 유래 줄기세포의 지방세포로의 분화 능력을 확인한 결과이다. (A: 분화 유도 전(X100), B: 배양 7일 후(X100), C: 배양 7일 후(X200))

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따라, 본 발명의 양막 유래 줄기세포의 골아세포로의 분화 능력을 확인한 결과이다. (A: 분화 유도 전(X100), B: 배양 7일 후(X100), C: 배양 7일 후(X200))

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따라, 본 발명의 양막 유래 줄기세포의 연골세포로의 분화 능력을 확인한 결과이다. (A: 분화 유도 전(X100), B: 배양 7일 후(X100), C: 배양 7일 후(X200))

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따라, 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)을 이용하여 본 발명의 양막 유래 줄기세포의 다능성을 확인한 결과이다. (컨트롤 마커: beta-actin)

도 9는 본 발명의 일 실시예에 따라, 실시간 정량(qRT-PCR)을 이용하여 본 발명의 양막 유래 줄기세포의 다능성을 확인한 결과이다.

도 10은 본 발명의 일 실시예에 따라, 유세포 분석을 이용하여 본 발명의 양막 유래 줄기세포의 다능성을 확인한 결과이다. (red line: negative control, blue line: 양성 발현 데이터)

도 11은 본 발명의 일 실시예에 따라 제작된 다공성 필름 세포 배양면의 형태를 나타낸다.

도 12a 및 도 12b는 본 발명의 일 실시예에 따라 제작된 다공성 필름 세포 배양면에 대하여, 플라즈마 처리 조건별 PLLA/SSA 필름의 세포 생착률을 확인한 것으로, 도 12a는 인간 혈관내피 유래 암세포(Human hepatic adenocarcinoma cell line, sk-hep1 cells), 도 12b는 인간 피부 유래 섬유아세포(Human skin Fibroblast, CCD-986sk)에 대한 결과이다.

도 13은 본 발명의 일 실시예에 따른 하이드로겔 제작용 실리콘 몰드의 모식도를 나타낸다. 몰드를 통해 제작된 하이드로겔(C 및 F)은 젤라틴과 동결건조한 중간엽 줄기세포 배양액을 함유한다.

도 14는 본 발명의 일 실시예에 따른 바이오패치형 세포치료제의 모식도를 나타낸다. 줄기세포가 배양된 필름(A), 하이드로젤(B), 접착제(Backing layer, C)로 구성된다.

도 15는 본 발명의 일 실시예에 따라, 본 발명의 바이오패치형 세포치료제의 유무에 따른 세포 형태를 확인한 결과이다. (A: 바이오패치가 없는 경우, B: 바이오패치에 세포를 배양한 경우)

도 16은 본 발명의 일 실시예에 따라, 본 발명의 바이오패치형 세포치료제의 유무에 따른 줄기세포 증식 능력을 확인한 결과이다.

도 17은 본 발명의 일 실시예에 따라, 본 발명의 바이오패치형 세포치료제의 유무에 따른 세포 활성 및 생존 능력을 확인한 결과이다.

도 18은 본 발명의 일 실시예에 따라, 본 발명의 바이오패치형 줄기세포 치료제의 피부 치료 효능 유효성을 평가하기 위하여, 바이오패치형 줄기세포 치료제 이식 과정을 나타낸 도이다.

도 19a 및 19b는 본 발명의 일 실시예에 따라, 본 발명의 바이오패치형 줄기세포 치료제가 이식된 피부 손상 부위에 대한 시간 경과에 따른 상처 면적 변화를 확인한 것으로, 도 19a는 상처 면적을 측정된 사진, 도 19b는 상처 면적 대비 시간 경과 후의 상처 면적을 %로 도출하여 나타낸 결과이다.

도 20a 및 20b는 본 발명의 일 실시예에 따라, 본 발명의 바이오패치형 줄기세포 치료제가 이식된 피부 손상 부위에 대한 피부 재생 효과를 확인한 것으로, 도 20a는 손상된 피부의 H&E 조직 염색을 통한 조직학적 분석 결과, 도 20b는 조직 염색 사진에서 정상 피부 조직 끝부분(Skin margin)에서부터 재생피화가 진행된 부분까지의 길이를 수치화 하여 나타낸 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0063] 이하, 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.

[0065] 실시예 1. 태반 유래 세포의 분리 및 배양

[0066] 임신이 확인된 암말 분만 시, 모체와 분리되어 새끼를 감싸고 있는 양막 조직을 멸균된 수술 도구를 사용하여 멸균된 통으로 옮긴 후, 약 4 °C를 유지한 채로 평균 약 3시간 내에 실험실로 운반하였다. 운반된 양막 조직을 UV 살균한 무균 작업대 안에서 70% 에탄올에 담가 1회 소독한 뒤, 5% 페니실린/스트렙토마이신을 포함하는 PBS(phosphate Buffered Saline)로 3회 이상 세척하였다. 세척된 양막 조직을 멸균 접시로 옮긴 후(도 1 참조), 멸균된 수술용 메스를 사용하여 잘게 다진 다음 멸균 튜브로 옮기고 2500rpm, 7분 동안 원심 분리하여 펠렛(pellet)을 회수하였다. 회수한 펠렛으로부터 상기 세척(5% 페니실린/스트렙토마이신을 포함하는 PBS) 및 원심 분리(2500rpm, 7분) 과정을 2회 진행하여 단핵세포를 분리하였다.

[0067] 분리된 양막 유래 단핵세포의 초기 배양을 위하여, 15% FBS(fetal bovine serum), 1% Glutamax 및 1% 페니실린/스트렙토마이신이 포함된 DMEM(dulbecco Modified Eagle Medium) 배양 배지를 사용하였다. 이때, 세포 부착성을 높이기 위해 배양 접시를 0.1% 젤라틴으로 코팅하여 배양하였으며, 말과(Equidae) 동물의 체온과 같은 38.5 °C에서 5% CO₂ 환경의 인큐베이터에 넣고 배양하였다.

[0068] 죽은 조직 및 세포를 제거해주기 위해 초기 배양 시작 48h 안에 배양 배지를 교체하였고, 세포가 배양 접시 바닥에 부착된 것이 관찰되었을 경우에도 배양 배지를 교체하였으며, 배양 배지 바닥의 80% 이상 세포가 부착되면 계대 또는 동결하여 보관하였다.

[0069] 그 결과, 양막 유래 세포들은 평균 약 5 일 후 부착된 형태로 관찰할 수 있었으며, 도 2에서 확인할 수 있듯이, 세포의 형상은 섬유아세포와 유사한 입방(spindle)형으로 관찰되었으며(도 2의 A), 이는 다른 중간엽 줄기세포에서 나타나는 형상과 유사하다. 추가적으로, 세포 형태의 자세한 관찰(X100)을 위하여 Diff-quick으로 염색하여 확인하였다(도 2의 B).

[0071] 실시예 2. 태반 유래 줄기세포의 자가 복제 및 증식 능력 확인(doubling time analysis)

[0072] 상기 실시예 1에서 보관된 양막 유래 줄기세포를 6-웰 배양 접시에 200,000 cell/well의 밀도로 분주한 후 새로운 배지를 전혀 첨가하지 않는 방법으로 38.5 °C, 5% CO₂의 인큐베이터에 넣고 배양하여 배양 시간 및 전체 활

성 세포수를 관측하였다. 대조군으로 피부 유래 섬유아세포를 사용하였다.

[0073] Doubling time 분석은 세포가 처음의 수에서 두 배가 되는 시간 분석을 통해 세포의 증식율을 나타내는 지수로 표현되며, 다음과 같은 계산식으로 표현된다.

[0074] [계산식]

[0075] $\text{Doubling time (hr)} = \{(T - T_0) \log 2\} / (\log N - \log N_0)$

[0076] T-T₀: 세포 배양 시간(hr)

[0077] N₀: 초기 분주한 세포 수, N: 최종 배양된 세포 수

[0078] 활성 세포(viable cell)는 트립판 블루(trypan blue) 염색을 이용하여 계측하였다. 구체적으로, 6-웰 배양 접시 내의 배지를 제거하고 PBS로 세척 후 0.05% Trypsin-EDTA를 이용하여 세포를 기저면에서 분리시켰다. 이후 새로운 5% FBS가 포함된 배양액으로 Trypsin의 작용을 중지시키고, 세포 배양 접시에서 분리된 세포를 계측하였다.

[0079] 그 결과, 도 3a 및 3b에서 확인할 수 있듯이, 치료 능력이 없는 피부 유래 섬유아세포(Skin cell)에 비하여 본 발명의 양막 유래 줄기세포(AM-MSC)의 doubling time이 낮게 나타났다. 이는, 배양된 세포가 분열하여 처음 배양했던 수의 두 배가 되는 시점이 더 빠르다는 것으로, 본 발명의 양막 유래 줄기세포의 우수한 자가 복제 및 증식 능력을 시사한다.

[0080] 또한 도 4에서 확인할 수 있듯이, 치료 능력이 없는 피부 유래 섬유아세포(Skin fibroblast)에 비하여 본 발명의 양막 유래 줄기세포(Equine AM)의 콜로니 숫자 및 크기가 월등하게 나타났다. 이는, 본 발명의 양막 유래 줄기세포의 우수한 자가 재생 능력을 시사한다.

[0082] **실시예 3. 태반 유래 줄기세포의 분화 능력 확인**

[0083] 양막 유래 중간엽 줄기세포의 분화 능력을 확인하기 위하여, StemPro Differentiation Kit(Gibco, USA)를 사용하여 각각 계통에 맞는 배지에서 지방세포, 연골세포, 골세포로 분화를 유도하였다.

[0085] **1) 지방세포 분화(Adipogenic differentiation)**

[0086] StemPro Adipogenesis Differentiation Kit를 이용하여 6-웰 배양 접시에 200,000 cell/well의 밀도로 분주하고, 38.5 °C, 5 % CO₂의 인큐베이터에 넣고 배양하였다. 2일에 한 번씩 배지를 교환하였다. 오일 레드 오(Oil Red O)로 염색하여 분화 여부를 확인하였다.

[0087] 그 결과, 도 5에서 확인할 수 있듯이, 분화 유도 전에는 양막 줄기세포의 염색 음성 반응이 나타났으나(X100, 도 5의 A), 배양 약 7일 후 양막 유래 중간엽 줄기세포 모두 섬유아세포 형태에서 둥근 모양으로 세포의 형태가 변화한 것을 알 수 있었으며, 지질 방울 형성으로 인한 염색을 관찰할 수 있었다(X100, 도 5의 B; X200, 도 5의 C).

[0089] **2) 골아세포 분화(Osteogenic differentiation)**

[0090] StemPro Osteogenesis Differentiation Kit를 이용하여 6-웰 배양 접시에 200,000 cell/well의 밀도로 분주하고, 38.5 °C, 5 % CO₂의 인큐베이터에 넣고 배양하였다. 2일에 한 번씩 배지를 교환하였다. 알리자린 레드 에스(alizarin red S)로 염색하여 분화 여부를 확인하였다.

[0091] 그 결과, 도 6에서 확인할 수 있듯이, 분화 유도 전에는 양막 줄기세포의 염색 음성 반응이 나타났으나(X100, 도 6의 A), 배양 약 7일 후 양막 유래 중간엽 줄기세포 모두 섬유아세포 형태에서 입방형으로 세포의 형태가 변화한 것을 알 수 있었으며, 배양 약 21일 후 세포 외 기질(extracellular matrix)에 칼슘(calcium) 침전으로 인한 염색을 관찰할 수 있었다(X100, 도 6의 B; X200, 도 6의 C).

[0093] **3) 연골세포 분화(Chondrogenic differentiation)**

[0094] StemPro Chondrogenesis Differentiation Kit를 이용하여 1,000 cells/μL의 농도로 행잉 드롭(hanging drop)하고, 세포가 구 형태로 자라도록 38.5 °C, 5 % CO₂의 인큐베이터에 넣고 배양하였다. 3일에 한 번씩 배지를 추가 또는 교환하였다. 알리안 블루(alcian blue)로 염색하여 분화 여부를 확인하였다.

[0095] 그 결과, 도 7에서 확인할 수 있듯이, 분화 유도 전에는 양막 줄기세포의 염색 음성 반응이 나타났으나(X100,

도 7의 A), 배양 약 14 일 후 연골세포 분화로 인한 염색을 관찰할 수 있었다(X100, 도 7의 B; X200, 도 7의 C).

[0097] 실시예 4. 태반 유래 줄기세포의 다능성 확인

[0098] 국제 줄기세포 위원회(International society for cellular therapy, ISCT)에서 제시한 말과(Equidae) 동물의 중간엽 줄기세포에서 양성 발현을 보이는 *CD44*, *CD90*, *CD105*, 음성 발현을 보이는 *CD34*, *CD38*, *CD45* 및 면역 관련 마커 *MHC class II*에 대한 분석을 수행하였다. 또한, 양막 유래 줄기세포의 특성으로 알려진 배아줄기세포 관련 유전자 *Oct4*, *c-Myc*, *Klf4* 및 중간엽 줄기세포 관련 유전자 *PAX6*, *ALCAM*, *Integrin-β1*, *Endoglin*, *HCAM*에 대하여 mRNA 레벨에서의 발현 양상을 분석하였다.

[0100] 1) 역전사 중합효소 연쇄반응(Reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR)

[0101] Total RNA는 제조사의 지침에 따라 RNA 추출 키트를 사용하여 준비하였다 (Qiagen, Cat. No. 74104). RNA 시료 (Total RNA 1μl)는 iScript 역전사효소(BIO-RAD)를 사용하여 올리고 dT 프라이머 및 랜덤(random) 프라이머로 cDNA를 합성하였다. 구체적인 프라이머 서열은 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0102] PCR에 사용된 프라이머

유전자명	프라이머 서열		크기	Accession No.
beta-Actin	F	GGATGCAGAAGGAGATCACAG(서열번호 1)	125	NM_001081838.1
	R	CTGGAAGGTGGACAATGAGG(서열번호 2)		
OCT4	F	TCTCCCATGCACTCAAAGTG(서열번호 3)	197	XM_001490108
	R	AACTTCACCTTCCCTCCAAC(서열번호 4)		
c-Myc	F	GCCCATAAATTGCCAAGAGG(서열번호 5)	132	XM_023655154
	R	AGCCCTGACCTTTGAATGAC(서열번호 6)		
Klf4	F	ACCTCGCCTTACACATGAAG(서열번호 7)	218	XM_023629843.1
	R	TGGTTTCCTCATTTGTCTCTG(서열번호 8)		
PAX6	F	TGTTTGCCCGAGAAAGACTAG(서열번호 9)	224	XM_023646553.1
	R	AGAGGTGAAGGATGAAACAGG(서열번호 10)		
ALCAM	F	AGAAGGCAGGAAGTTGTGCG(서열번호 11)	147	XM_001503380.6
	R	GGAAAGTTGAGGATTGTGCG(서열번호 12)		
Integrin-β1	F	CTTATTGGCCTTGCAATGCT(서열번호 13)	169	XM_005606848.3
	R	TTCCCTCGTACTTCGGATTG(서열번호 14)		
HCAM	F	ATCCTCACGTCCAACACCTC(서열번호 15)	165	XM_005598012
	R	CTCGCCTTTCTGGGTGTAGC(서열번호 16)		
Endoglin	F	AAGAGCTCATCTCGAGTCTG(서열번호 17)	162	XM_003364144
	R	TGACGACCACCTCATTACTG(서열번호 18)		

[0103] RT-PCR은 95 ℃에서 4분간 변성 후, 95 ℃에서 30초, 56 ℃에서 30초, 및 72 ℃에서 30초를 34 회 반응시켰다. 73 ℃에서 5분간 최종 연장하였다. 베타 액틴(β-Actin) RT-PCR 반응은 34 회 및 60 ℃에서의 프라이머 어닐링

(annealing)으로 변형하여 수행하였다. 표적 유전자의 RT-PCR 특이적 증폭은 DNA 염기서열 분석으로 확인하였다.

[0104] 그 결과, 도 8에서 확인할 수 있듯이, 배아줄기세포 관련 유전자(*Oct4*, *c-Myc*, 및 *Klf4*) 및 중간엽 줄기세포 관련 유전자(*PAX6*, *ALCAM*, *Integrin- α 1*, *Endoglin*, 및 *HCAM*) 모두 발현되는 것을 알 수 있었다.

[0106] **2) 실시간 정량(quantitative real time PCR, qRT-PCR)**

[0107] 상기 RT-PCR에 사용했던 cDNA 합성 방법과 동일한 방법으로 cDNA를 합성하였다. qRT-PCR은 95 °C에서 10분간 변성 후, 94 °C에서 15초, 58 °C에서 30초, 및 72 °C에서 30초를 39 회 반응시켰다. 95 °C에서 10초, 65 °C에서 5초 간 반응시킨 후 대조군인 말의 피부 유래 섬유아세포와 마커 발현양을 비교하였다.

[0108] 그 결과, 도 9에서 확인할 수 있듯이, 치료 능력이 없는 피부 유래 섬유아세포(Skin)에 비하여 본 발명의 양막 유래 줄기세포(AM-MSC)에서 다능성을 나타내는 유전자(*Oct4*, *c-Myc*, 및 *Klf4*) 및 줄기세포에 특이적으로 나타나는 유전자(*PAX6*, *ALCAM*, *Integrin- β 1*, *Endoglin*, 및 *HCAM*) 모두 유의적으로 높게 발현되는 것을 알 수 있었다.

[0110] **3) 유세포 분석(Flow cytometry analysis)**

[0111] FITC(fluorescein isothiocyanate) 또는 PE(phycoerythrin)와 결합된 다양한 조합의 항체 또는 순수한 1차 항체를 양막 유래 줄기세포에 붙인 뒤 형광이 붙어있는 2차 IgG 항체를 사용하여 유세포 분석을 통해 세포 표지 인자를 분석하였다. 2차 IgG 항체를 기준으로 상대적인 발현 양상 비교를 위해 사용된 항체는 다음과 같다: CD29-PE, CD34-FITC, CD38-FITC, CD44-FITC, CD45, CD90-PE, CD105-FITC, MHC class II-FITC 및 IgG-FITC. 시료 당 약 $5 \sim 8 \times 10^5$ 개의 세포가 하나의 항체를 분석하는 데 사용되었으며, Cellquest 소프트웨어를 사용하여 유세포 분석(FACScan, BD Biosciences, USA)을 실시하였다.

[0112] 그 결과, 도 10에서 확인할 수 있듯이, 중간엽 줄기세포의 양성 발현 마커인 *CD29*, *CD44*, *CD90*, *CD105*에는 양성의 면역학적 표현형을 나타내었으며, 면역 세포 특이적 마커인 *CD34*, *CD38*, *CD45*, 면역 관련 마커인 *MHC class II*에는 음성의 면역학적 표현형을 나타내었다. 이는, 본 발명의 양막 유래 줄기세포는 중간엽 줄기세포의 특성을 가지고 있음을 시사한다.

[0114] **실시예 5. 바이오패치의 제작**

[0115] **1) 프라이머 처리**

[0116] 생분해성 PLLA(poly(L-Lactic acid)) 필름을 15 x 15 (cm)로 준비하였다. 먼저, 후술할 점착제 코팅 과정에서 세포 배양면을 보호하기 위하여 무진지(clean paper)를 이용하여 한쪽 면을 밀봉하였다. 그 다음, 점착제와 PLLA 필름 간의 친화성을 위하여 PLLA 필름 세포 배양면의 반대면에 프라이머를 처리하였다. 구체적으로, DY 39-067 Rubber Additive(SILASTIC®)를 솜에 적서 PLLA 필름에 고르게 1회 처리한 뒤, 40 °C 오븐에 넣어 5분간 건조시켜 충분히 용매를 날려주었다.

[0118] **2) 점착제 코팅**

[0119] 이액형 실리콘 점착제인 7-9700 Soft Skin Adhesive(DOW CORNING®) A와 B형을 45:55 비율로 배합하고, 교반기(overhead stirrer)를 이용하여 1000 rpm으로 2분간 교반하였다. 그 다음, 충분히 기포가 가라앉는 것을 확인한 뒤 자동도공기(Ocean science) 및 베이커 어플리케이터(baker applicator)를 이용하여 코팅하였다. 코팅은 15 x 15 (cm) 필름 기준 점착제 3 g을 필름에 올린 후 베이커 어플리케이터를 50 μ m로 설정하고 50 mm/sec 속도로 수행하였다. 점착제가 코팅된 필름은 40 °C 오븐에 넣어 6시간 동안 경화시켰다.

[0121] **3) 이형 필름 부착**

[0122] 불소 처리된 PET(polyethylene terephthalate) 이형 필름(FL-25BMM, 기승산업)을 반자동형 망글(Ocean science)을 이용하여 부착하였다. 또한, 기포가 생기지 않도록 하기 위하여 페이더 망글의 롤 사이에 점착제가 코팅된 PLLA 필름과 불소 처리된 PET 이형 필름을 넣은 후 핸들을 조절하여 높이를 조절하였다. 롤 속도는 10 rpm으로 진행하였다.

[0123]

[0124] **4) 다공성 필름 제작**

[0125] 정밀 타공기를 자체 제작하여, PET 이형필름이 부착된 PLLA 필름의 휨 현상을 최소화하는 방식의 다공성 필름을 제작하였다. 다공성 필름의 한 구멍의 직경은 약 1.5마이크론으로 진행하였고, 다공성 필름의 구멍이 난 총 면적은 필름 전체 면적의 20~50 %를 차지하였다(도 11 참조). 후 공정(타공 후 공정을 의미)에도 유리한 방식의 세포 배양면 디자인을 통하여 투명한 폴리머 재료의 생분해성 필름에 세포 배양이 가능하도록 설계하였다.

[0127] **5) 세포 배양면 처리**

[0128] 줄기세포의 배양에 적합한 세포 부착력을 유도하기 위해 초음파 처리와 플라즈마 처리를 진행하였다. 초음파 세척기로 다공성 필름을 세척하여 상온에 건조한 후, 대기압 플라즈마 처리를 진행하여 줄기세포 배양용 다공성 필름을 제작하였다.

[0129] 구체적으로, 플라즈마 처리 조건별 PLLA/SSA(Soft skin adhesive) 필름의 세포 생착률 테스트를 진행하였다. 인간 혈관내피 유래 암세포(Human hepatic adenocarcinoma cell line, sk-hepl cells)(ATCC) 및 인간 피부 유래 섬유아세포(Human skin Fibroblast, CCD-986sk)(ATCC)의 여러 플라즈마 조건 별 세포 생착 및 생존 능력을 확인하였다.

[0130] 이때, Plate A는 일반 세포 배양용기(cell culture plate)에 필름을 덧대지 않은 채로 세포를 넣지 않거나(-) 세포를 넣어(+) 각각 음성, 양성 대조군으로 사용하였다. 또한, Plate B는 Plate A의 재료와 같은 폴리스타이렌(polystyrene) 필름으로 또 다른 대조군으로 사용하였다. Plate C-F는 각기 다른 방식의 플라즈마 처리가 된 세포 배양 복합체(PLLA/SSA)이다. 구체적인 아르곤(lpm)/산소(sccm) 가스 조건은 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

[0131] PLLA/SSA 플라즈마 처리 조건

플레이트	아르곤(lpm)/산소(sccm)
Plate C	10/11
Plate D	10/8
Plate E	11/8
Plate F	12/11

[0132] 도 12a 및 12b에서 확인할 수 있듯이, 모든 실험군이 대조군(+) 대비 80% 이상의 생착율을 나타내었다. 특히, Plate D에서 세포 생착률 결과가 가장 좋은 것을 확인함으로써, Plate D의 플라즈마 처리 조건으로 최종 줄기세포 배양용 다공성 필름을 제작하였다.

[0134] **6) 하이드로젤 제작**

[0135] 젤라틴을 3차 증류수에 용해시킨 후, 상온에서 EDC(1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide)/NHS(N-hydroxysuccinide) 가교제와 tyramine hydrochloride를 넣고 12시간 동안 교반시켜 젤라틴을 개질하였다. 용액 내의 불순물과 미반응물을 제거하기 위해 0.1 M NaCl 용액, 25% 에탄올, 3차 증류수를 사용하여 투석을 진행하고, 투석이 끝난 용액은 동결건조하여 티라민으로 개질된 젤라틴 스펀지를 제조하였다. 티라민으로 개질된 젤라틴을 3차 증류수에 6wt%, 35 ℃로 녹였다. 별도로, 10 ml 세포배양액을 동결건조한 파우더를 4 ℃에서 3차 증류수 1 ml에 녹였다. 각 용액을 1:1로 상온에서 섞은 후 HRP(horseradish peroxidase)와 과산화수소(hydrogen peroxide, H₂O₂)를 최종농도가 각각 0.55 units/ml, 0.025 ul/ml가 되도록 넣어 섞은 뒤 실리콘 몰드에 부어 경화시켰다(도 13 참조).

[0137] **7) 바이오패치 제작**

[0138] 상기에서 제작된 줄기세포 배양용 다공성 필름(도 14의 A), 세포배양액이 함유된 하이드로젤(도 14의 B) 및 피부 부착용 점착제(도 14의 C)를 순서대로 배치시켜 바이오패치를 제작하였다.

[0140] **실시예 6. 태반 유래 줄기세포의 바이오패치에의 적용**

[0141] **1) 세포 준비**

[0142] 3~5 계대 사이의 양막 유래 세포를 15 % FBS, 1 % Glutamax 및 1 % 페니실린/스트렙토마이신이 포함된 DMEM 배양 배지를 사용하여 배양하였다. 배양 접시 내의 배지를 제거하고 PBS로 세척 후 0.05% Trypsin-EDTA를 이용하여

세포를 기저면에서 분리시켰다. 분리된 세포를 1×10^4 cells/cm² 수로 배양하였다.

[0144] 2) 세포 형태

[0145] 바이오패치가 없는 배양 접시와 상기 실시예 5에서 제작된 바이오패치가 있는 배양 접시 각각에서 2일 동안 배양한 세포를 PBS로 세척 후 메탄올로 세포를 고정시켰다. 고정된 세포는 크산텐(Xanten) 및 메틸렌 블루(methylene blue)를 이용하여 각각 세포질과 세포 핵을 염색한 후, 광학현미경을 이용하여 그 형태를 관찰하였다.

[0146] 그 결과, 도 15에서 확인할 수 있듯이, 바이오패치 유무에 따른 세포의 형태에 차이가 나타나지 않았다. 이는, 바이오패치 환경에서도 세포 형태의 변화 없이 배양이 가능한 것을 시사한다.

[0148] 3) 세포 수 및 세포 생존율

[0149] 바이오패치가 없는 배양 접시와 상기 실시예 5에서 제작된 바이오패치가 있는 배양 접시 각각에서 48 시간 동안 배양한 줄기세포를 PBS로 세척 후 0.05% Trypsin-EDTA를 이용하여 세포를 기저면에서 분리시킨 뒤 원심분리기를 이용하여 세포를 모아주었다. 모인 세포를 트리판 블루로 염색한 뒤 혈구계(hemocytometer) 위에 염색된 세포를 도포하고 광학현미경으로 관찰하였다. 염색되지 않은 세포와 염색된 세포의 수를 측정하여 그 수와 생존율을 측정하였다.

[0150] 그 결과, 도 16에서 확인할 수 있듯이, 바이오패치 유무에 따른 세포의 증식 능력에 차이가 나타나지 않았다. 이는, 바이오패치 환경에서도 세포 증식 능력의 차이 없이 배양이 가능한 것을 시사한다.

[0152] 4) 세포 독성 및 세포 사멸(MTT assay, Annexin V staining)

[0153] MTT assay

[0154] 바이오패치가 없는 배양 접시와 상기 실시예 5에서 제작된 바이오패치가 있는 배양 접시 각각에서 2일 동안 배양하고, Vybrant MTT Cell Proliferation Assay Kit(Thermo Fisher Scientific)를 이용하여 죽은 세포의 양을 비교하였다.

[0155] Annexin V staining

[0156] 바이오패치가 없는 배양 접시와 상기 실시예 5에서 제작된 바이오패치가 있는 배양 접시 각각에서 2일 동안 배양한 세포를 PBS로 세척 후 0.05% Trypsin-EDTA를 이용하여 세포를 기저면에서 분리시킨 뒤 원심분리기를 이용하여 세포를 모아주었다. 키트(No. V13241, Invitrogen)를 이용하여 염색하고 유세포분석기를 이용하여 살아있는 세포, 세포자살(apoptosis) 및 세포괴사(necrosis)를 분석하였다.

[0157] 그 결과, 도 17에서 확인할 수 있듯이, 바이오패치 유무에 따른 세포의 활성에 차이가 나타나지 않았다. 이는, 바이오패치 환경에서도 세포 증식 및 생존의 차이 없이 배양이 가능한 것을 시사한다.

[0159] 실시예 7. 바이오패치형 줄기세포 치료제의 피부 치료 효능 유효성 평가

[0160] 1) 피부 손상 동물 모델

[0161] 6주령의 수컷 ICR mice(두얼 바이오텍, KOREA)에 대하여, 충남대학교 동물실험윤리위원회 설치·운영 규정에 의거하여(승인번호, 202103A-CNU-072) 유효성 평가를 진행하였다. 마우스는 5주령에 반입 후 일주일간 안정화시킨 후, 마취제(80 mg/kg ketamine + 12 mg/kg xylazine)를 복강 내 투여하여 마취하고 Biopsy punch를 통해 창상을 유도하였다.

[0163] 2) 바이오패치형 줄기세포 치료제 이식

[0164] 상기 실시예 5에서 제작된 바이오패치에 상기 실시예 6-1)의 양막 유래 줄기세포를 배양한 바이오패치형 줄기세포 치료제를 피부 손상(창상) 부위에 부착 후 멸균 방수 필름(TegadermTM)으로 덮은 뒤, 피부가 수축되지 않도록 직경 6 mm의 구멍을 낸 둥근 모양의 실리콘을 피부에 부착시킨 후 봉합사로 꿰매어 고정시켜 유효성 평가를 진행하였다(도 18 참조). 줄기세포가 배양되지 않은 바이오패치를 대조군(Control)로 설정하였다.

[0166] 3) 결과

[0167] 피부 손상 면적 변화 확인

[0168] 상기 바이오패치형 줄기세포 치료제가 이식된 피부 손상 부위에 대하여, 치료제 이식 후 0, 3, 7, 10 또는 14일

에 상처 면적을 측정하였으며(도 19a), Image J 프로그램을 이용하여 상처 면적 변화를 확인하였다(도 19b).

[0169] 그 결과, 도 19a 및 19b에서 확인할 수 있듯이, 바이오패치형 줄기세포 치료제 처리 군에서 수술 후 7, 10, 14 일에 통계적으로 피부 손상 부위 면적이 유의하게 감소됨을 알 수 있었다.

[0171] 피부 재생 효과 확인

[0172] 상기 바이오패치형 줄기세포 치료제가 이식된 피부 손상 부위에 대하여, 치료제 이식 후 3 또는 7일에 상처 부분의 피부조직을 채취하였다. 채취한 조직을 10% 포르말린(formalin) 용액으로 고정 후 파라핀(paraffin) 블록을 제작하였다. 제작된 파라핀 블록에서 4 um 두께로 절단한 슬라이드를 Hematoxylin and eosin(H&E) 염색하여 과립조직형성(granulation tissue formation, 도 20a) 및 피부의 재생피화(re-epithelialization, 도 20b)를 평가하였다. 피부의 재생피화는 정상 피부 조직 끝부분(Skin margin)에서부터 재생피화가 진행된 부분까지의 길이를 Image J 프로그램을 이용하여 수치화하였다.

[0173] 그 결과, 도 20a 및 20b에서 확인할 수 있듯이, 피부 손상 3일 후 대조군은 0.27 ± 0.05 mm, 치료제 이식 그룹에서는 0.51 ± 0.04 mm의 재생피화가 일어났으며, 피부 손상 7일 후 대조군에서는 0.55 ± 0.05 mm, 치료제 이식 그룹에서는 1.07 ± 0.12 mm의 재생피화가 일어났다. 결과적으로, 본 발명의 바이오패치형 줄기세포 치료제 처리 군에서 상처 조직의 재생피화가 통계적으로 유의하게 촉진됨을 알 수 있었다.

[0175] [서열목록]

[0176] <110> mkbiotech.co.ltd

[0177] The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)

[0178] <120> Bio-patch type cell therapy product for Regenerating skin comprising Placenta-derived stem cells

[0179] <130> WP213199

[0180] <160> 18

[0181] <170> KoPatentIn 3.0

[0183] <210> 1

[0184] <211> 21

[0185] <212> DNA

[0186] <213> Artificial Sequence

[0187] <220>

[0188] <223> beta-Actin primer-F

[0189] <400> 1

[0190] ggatgcagaa ggagatcaca g 21

[0192] <210> 2

[0193] <211> 20

[0194] <212> DNA

[0195] <213> Artificial Sequence

[0196] <220>

[0197] <223> beta-Actin primer-R

[0198] <400> 2

[0199] ctggaaggtg gacaatgagg 20

[0201] <210> 3

[0202]	<211>	20	
[0203]	<212>	DNA	
[0204]	<213>	Artificial Sequence	
[0205]	<220>		
[0206]	<223>	OCT4 primer-F	
[0207]	<400>	3	
[0208]		tctcccatgc actcaaactg	20
[0210]	<210>	4	
[0211]	<211>	20	
[0212]	<212>	DNA	
[0213]	<213>	Artificial Sequence	
[0214]	<220>		
[0215]	<223>	OCT4 primer-R	
[0216]	<400>	4	
[0217]		aacttcacct tcctccaac	20
[0219]	<210>	5	
[0220]	<211>	21	
[0221]	<212>	DNA	
[0222]	<213>	Artificial Sequence	
[0223]	<220>		
[0224]	<223>	c-Myc primer-F	
[0225]	<400>	5	
[0226]		gcccataaaa ttgccaagag g	21
[0228]	<210>	6	
[0229]	<211>	20	
[0230]	<212>	DNA	
[0231]	<213>	Artificial Sequence	
[0232]	<220>		
[0233]	<223>	c-Myc primer-R	
[0234]	<400>	6	
[0235]		agccctgacc tttgaatgac	20
[0237]	<210>	7	
[0238]	<211>	20	
[0239]	<212>	DNA	
[0240]	<213>	Artificial Sequence	
[0241]	<220>		

[0242]	<223>	Klf4 primer-F	
[0243]	<400>	7	
[0244]		acctcgccctt acacatgaag	20
[0246]	<210>	8	
[0247]	<211>	21	
[0248]	<212>	DNA	
[0249]	<213>	Artificial Sequence	
[0250]	<220>		
[0251]	<223>	Klf4 primer-R	
[0252]	<400>	8	
[0253]		tggtttccctc attgtctcct g	21
[0255]	<210>	9	
[0256]	<211>	21	
[0257]	<212>	DNA	
[0258]	<213>	Artificial Sequence	
[0259]	<220>		
[0260]	<223>	PAX6 primer-F	
[0261]	<400>	9	
[0262]		tgttttccccg agaaagacta g	21
[0264]	<210>	10	
[0265]	<211>	21	
[0266]	<212>	DNA	
[0267]	<213>	Artificial Sequence	
[0268]	<220>		
[0269]	<223>	PAX6 primer-R	
[0270]	<400>	10	
[0271]		agaggtgaag gatgaaacag g	21
[0273]	<210>	11	
[0274]	<211>	20	
[0275]	<212>	DNA	
[0276]	<213>	Artificial Sequence	
[0277]	<220>		
[0278]	<223>	ALCAM primer-F	
[0279]	<400>	11	
[0280]		agaaggcagg aagtttgtcg	20
[0282]	<210>	12	

[0283]	<211>	20	
[0284]	<212>	DNA	
[0285]	<213>	Artificial Sequence	
[0286]	<220>		
[0287]	<223>	ALCAM primer-R	
[0288]	<400>	12	
[0289]		ggaaagttga ggattgtgcg	20
[0291]	<210>	13	
[0292]	<211>	20	
[0293]	<212>	DNA	
[0294]	<213>	Artificial Sequence	
[0295]	<220>		
[0296]	<223>	Integrin-b1 primer-F	
[0297]	<400>	13	
[0298]		cttattggcc ttgcattgct	20
[0300]	<210>	14	
[0301]	<211>	20	
[0302]	<212>	DNA	
[0303]	<213>	Artificial Sequence	
[0304]	<220>		
[0305]	<223>	Integrin-b1 primer-R	
[0306]	<400>	14	
[0307]		ttccctcgta cttcggattg	20
[0309]	<210>	15	
[0310]	<211>	20	
[0311]	<212>	DNA	
[0312]	<213>	Artificial Sequence	
[0313]	<220>		
[0314]	<223>	HCAM primer-F	
[0315]	<400>	15	
[0316]		atcctcacgt ccaacacctc	20
[0318]	<210>	16	
[0319]	<211>	20	
[0320]	<212>	DNA	
[0321]	<213>	Artificial Sequence	
[0322]	<220>		

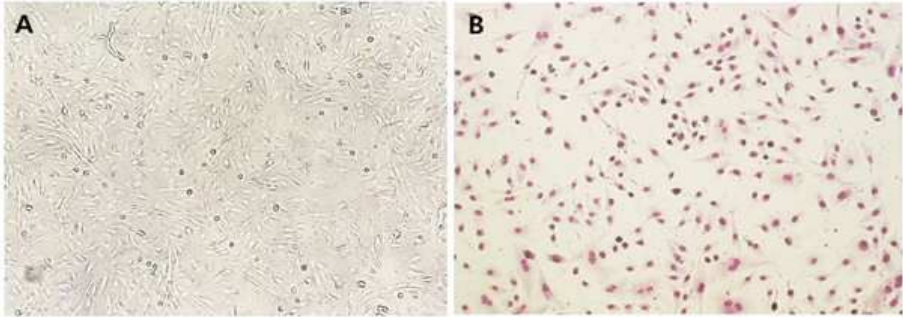
[0323]	<223>	HCAM primer-R	
[0324]	<400>	16	
[0325]		ctcgccctttc ttggtgtagc	20
[0327]	<210>	17	
[0328]	<211>	20	
[0329]	<212>	DNA	
[0330]	<213>	Artificial Sequence	
[0331]	<220>		
[0332]	<223>	Endoglin primer-F	
[0333]	<400>	17	
[0334]		aagagctcat ctcgagtctg	20
[0336]	<210>	18	
[0337]	<211>	20	
[0338]	<212>	DNA	
[0339]	<213>	Artificial Sequence	
[0340]	<220>		
[0341]	<223>	Endoglin primer-R	
[0342]	<400>	18	
[0343]		tgacgaccac ctcattactg	20

도면

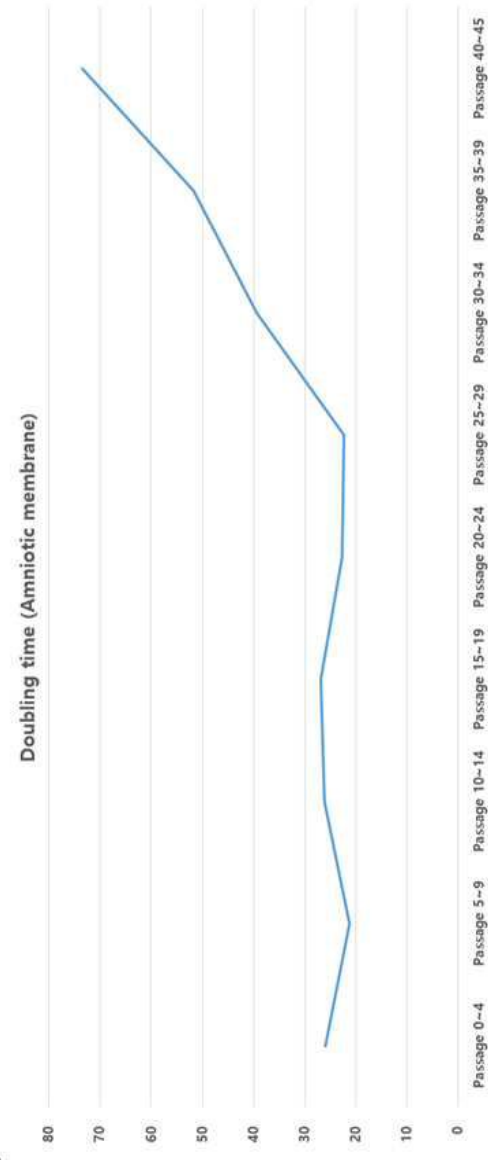
도면1



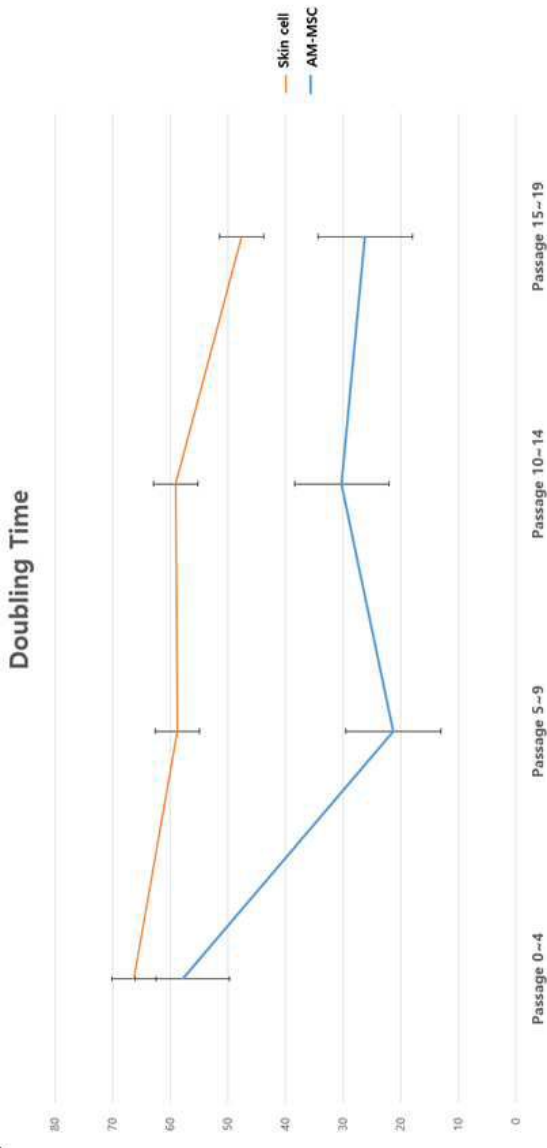
도면2



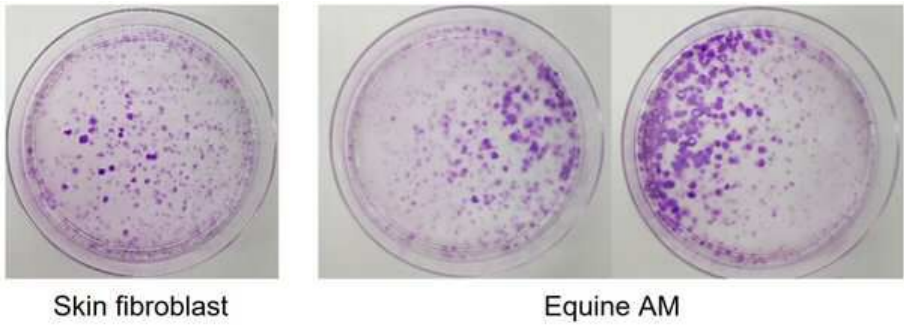
도면3a



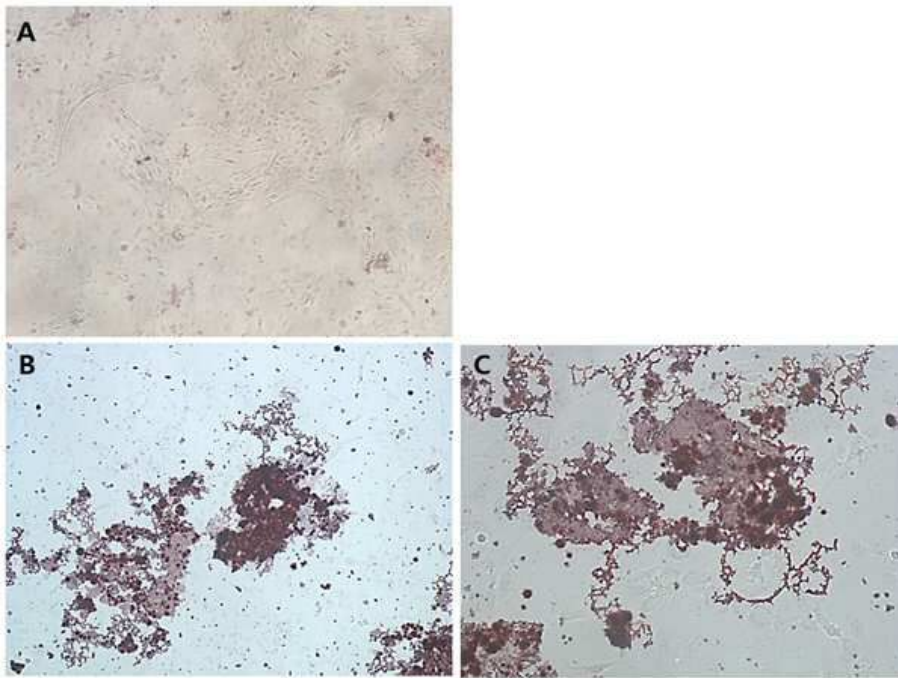
도면3b



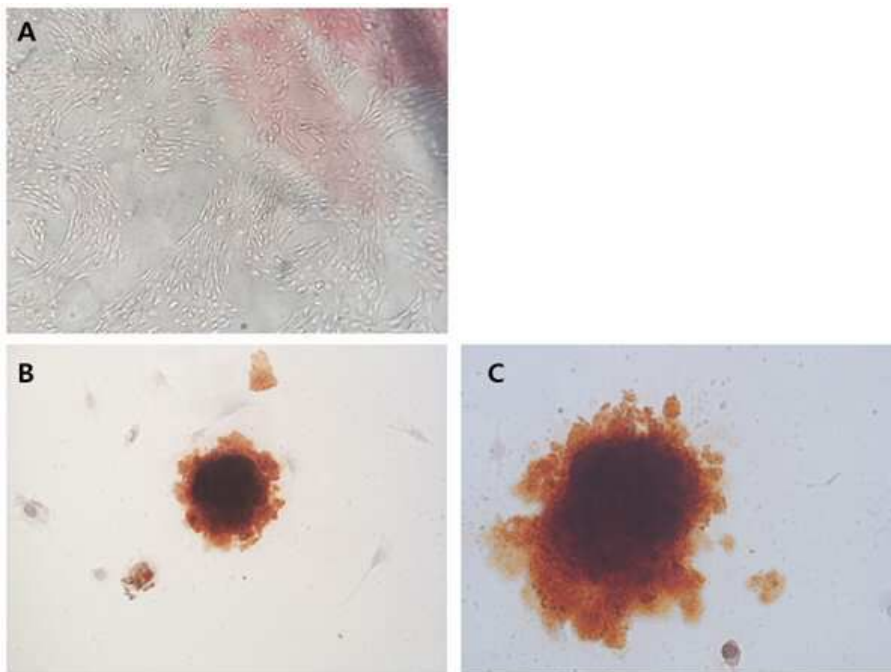
도면4



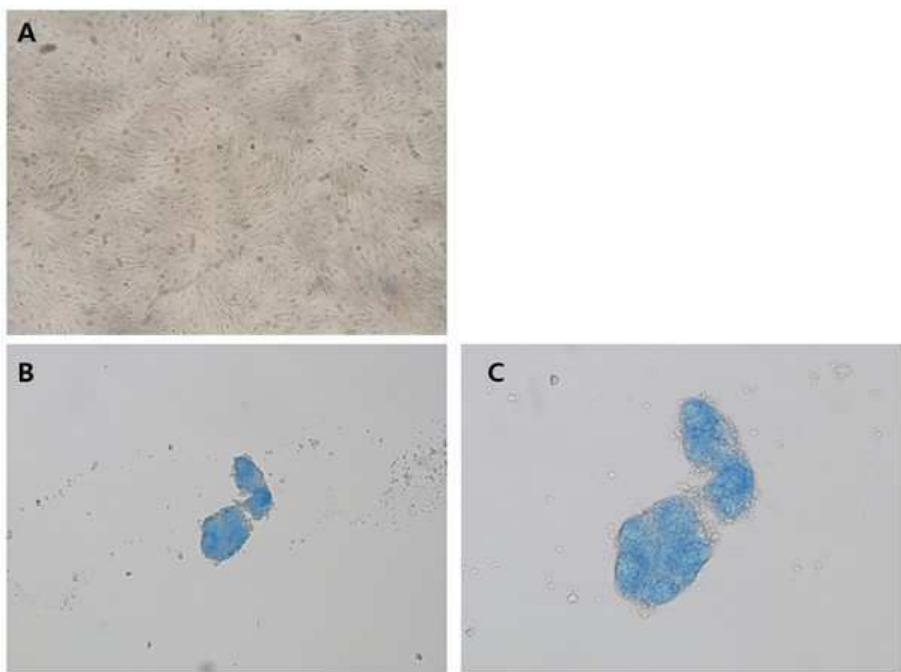
도면5



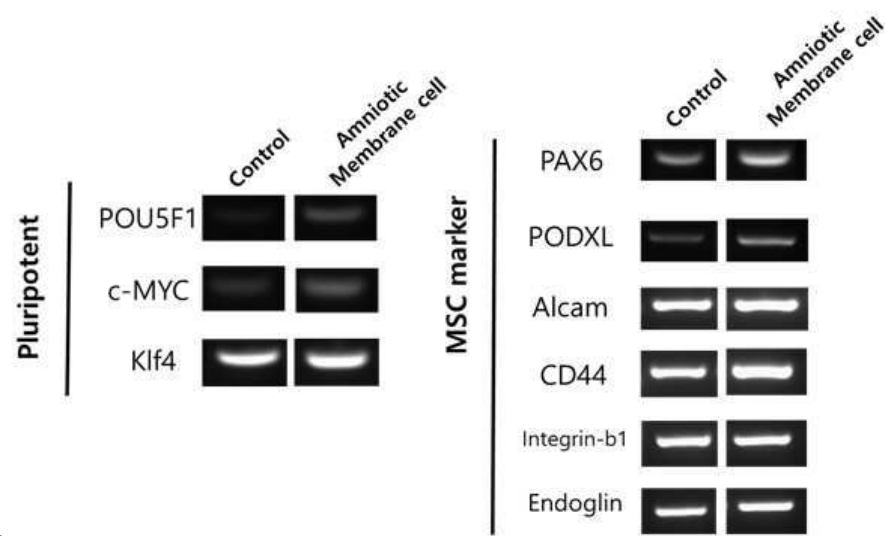
도면6



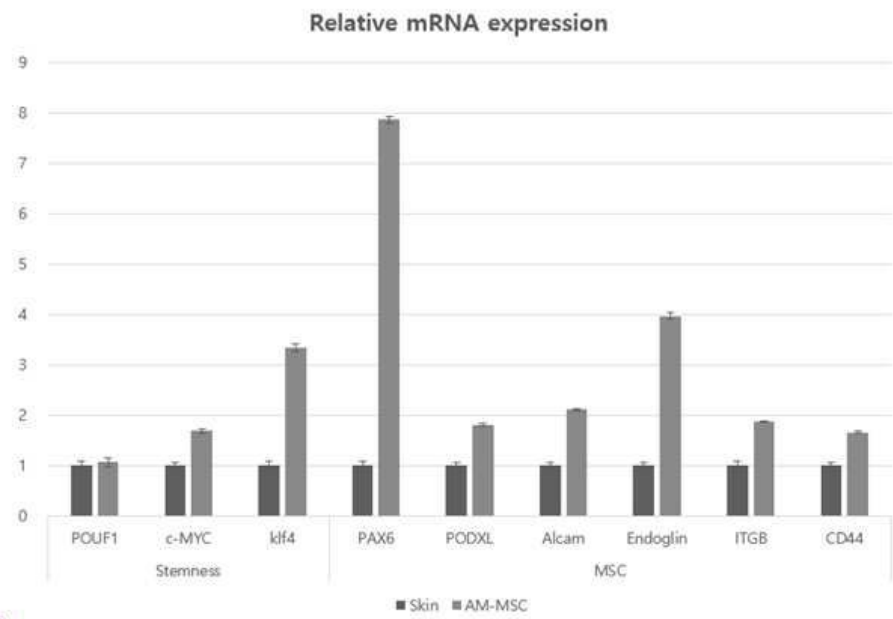
도면7



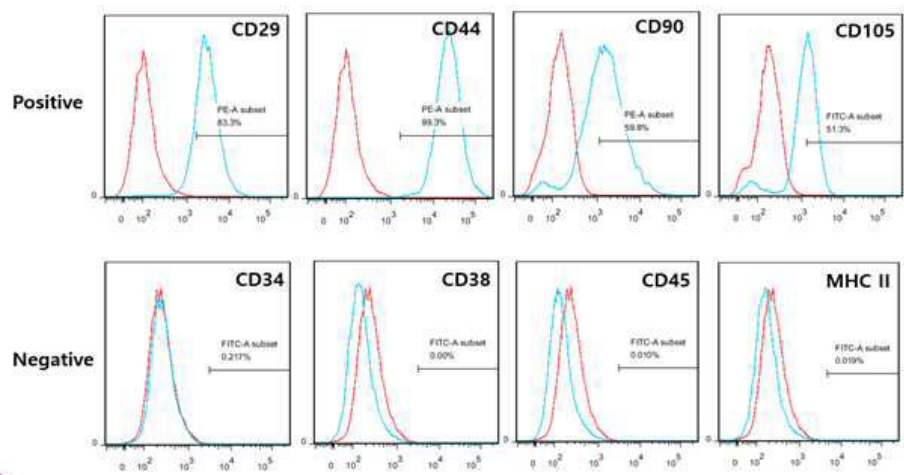
도면8



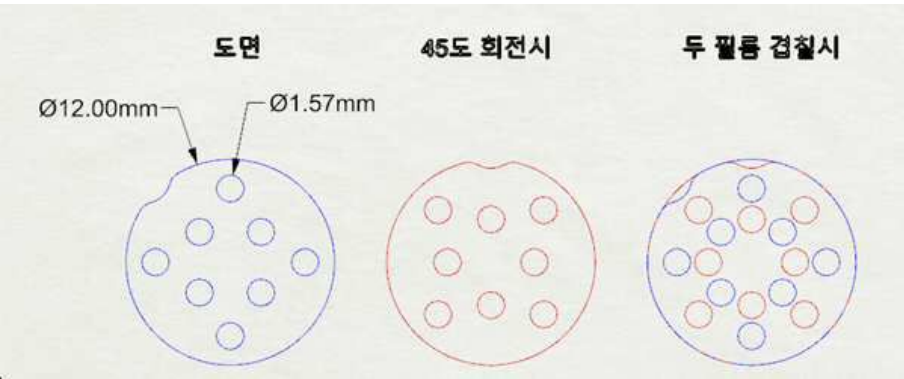
도면9



도면10

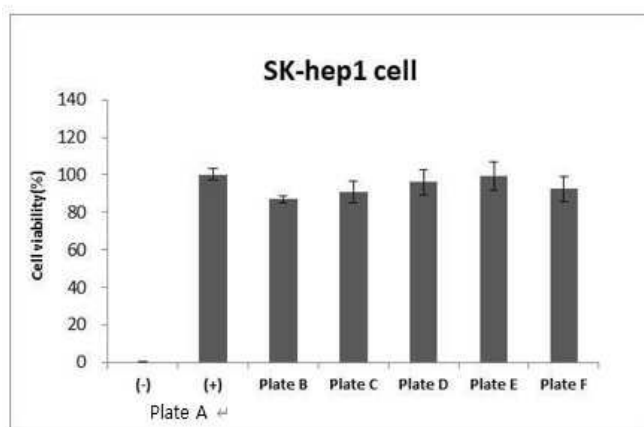


도면11



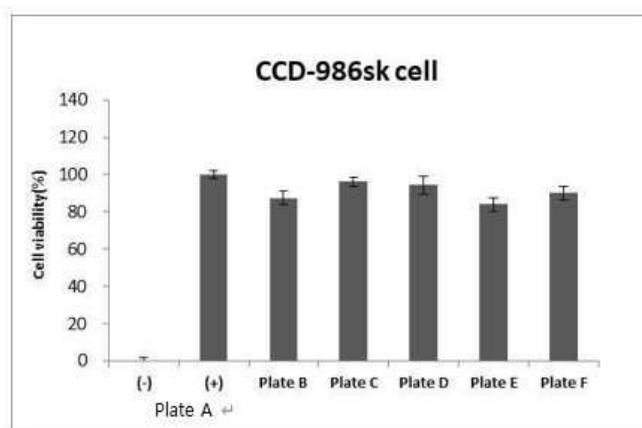
도면12a

SK-hep1		%Viability-Avg	%Viability-SD
Plate A	(-)	0.0	0.5
	(+)	100.0	3.1
Plate B		87.0	1.9
Plate C		90.8	5.7
Plate D		96.2	6.6
Plate E		99.1	7.6
Plate F		92.5	6.6

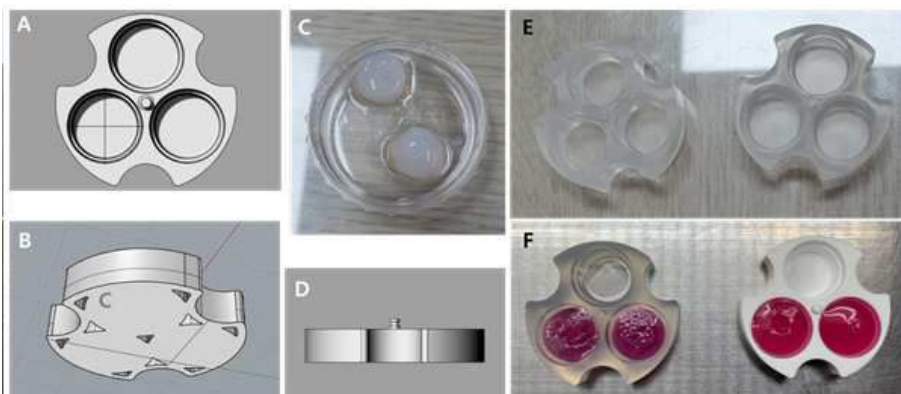


도면12b

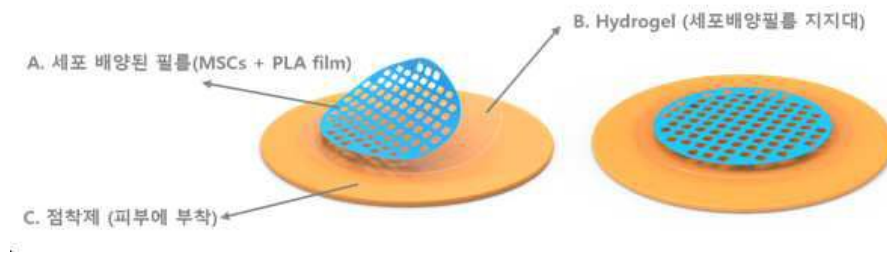
CCD-986sk		%Viability-Avg	%Viability-SD
Plate A	(-)	0.0	1.6
	(+)	100.0	2.2
Plate B		87.4	3.7
Plate C		96.0	2.3
Plate D		94.4	4.8
Plate E		83.9	3.9
Plate F		90.2	3.6



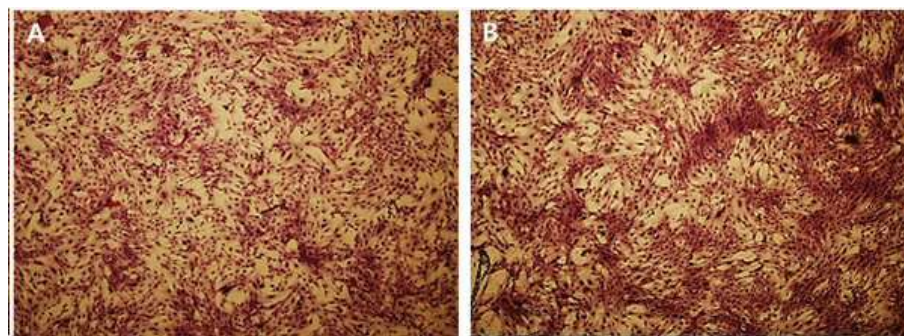
도면13



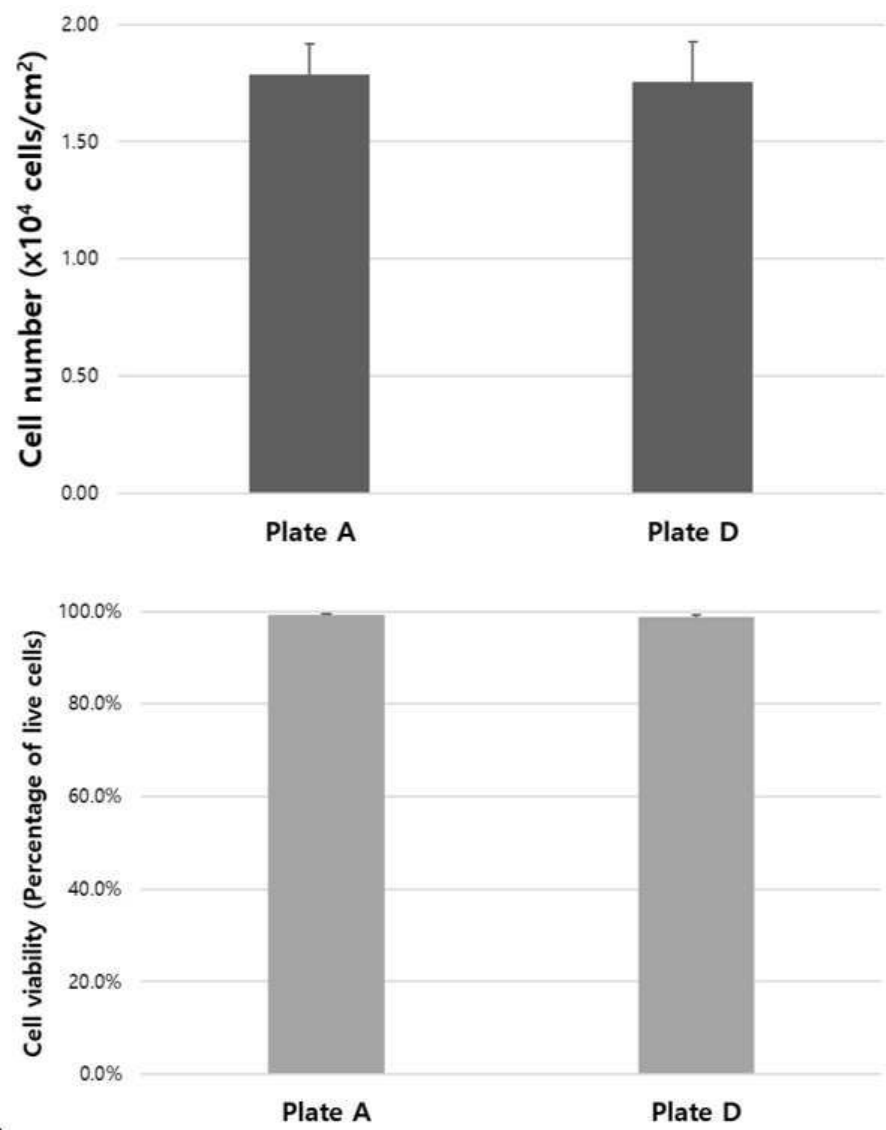
도면14



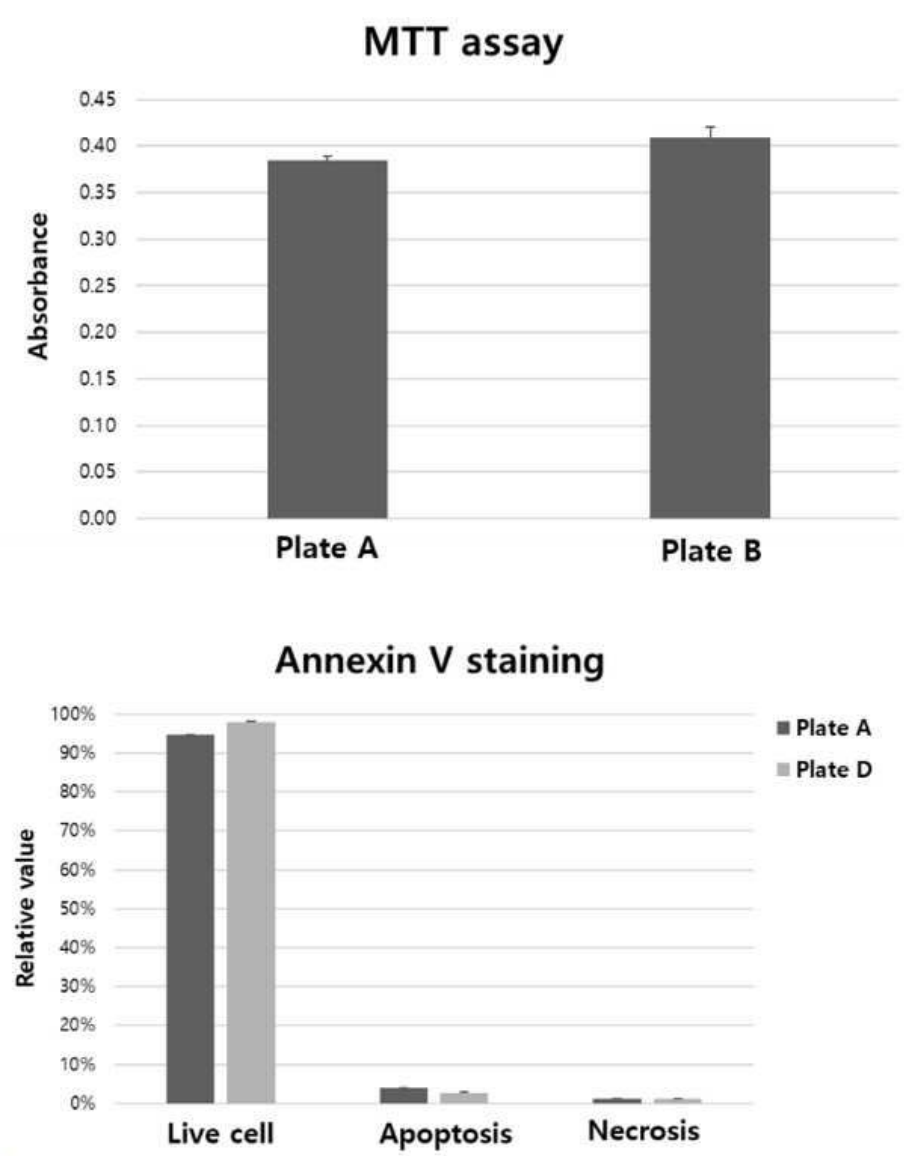
도면15



도면16



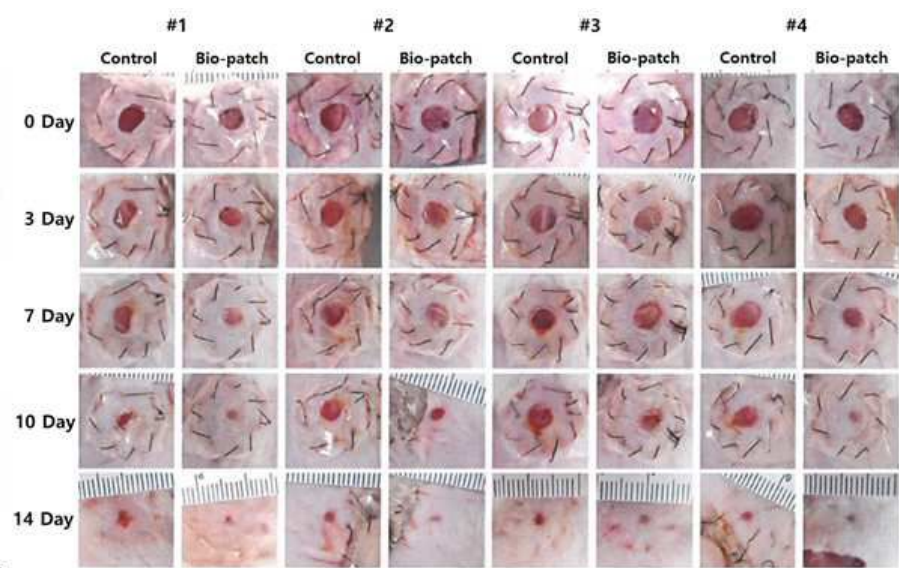
도면17



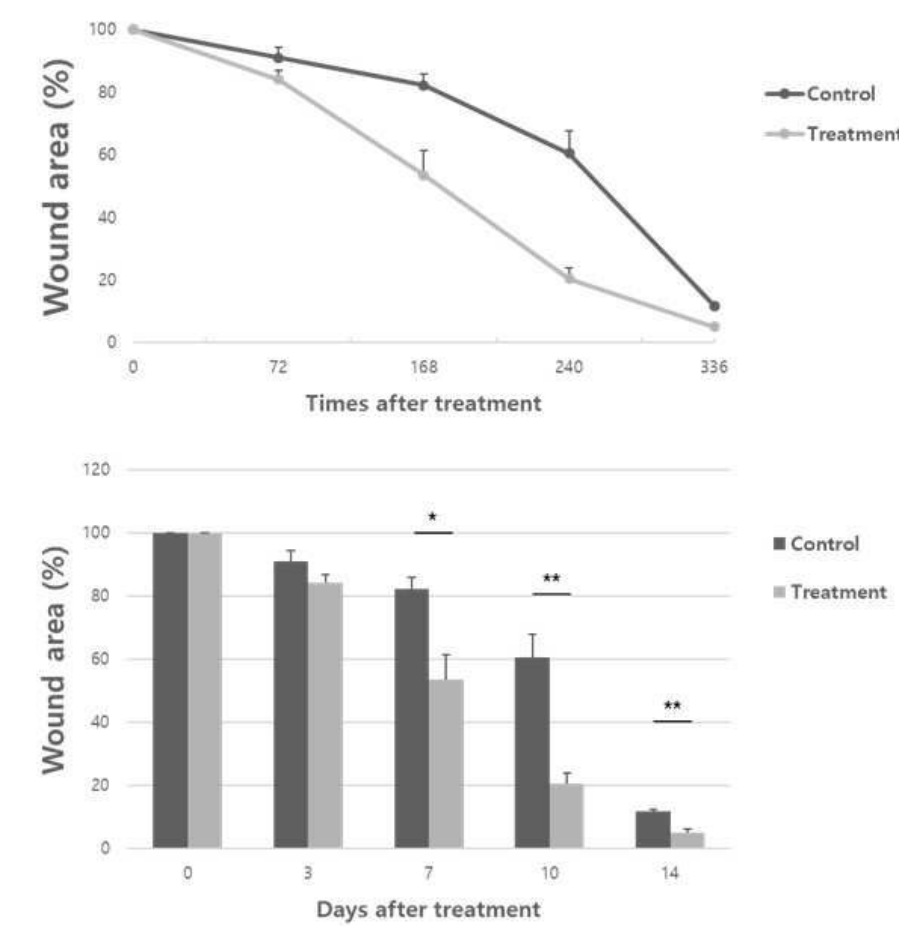
도면18



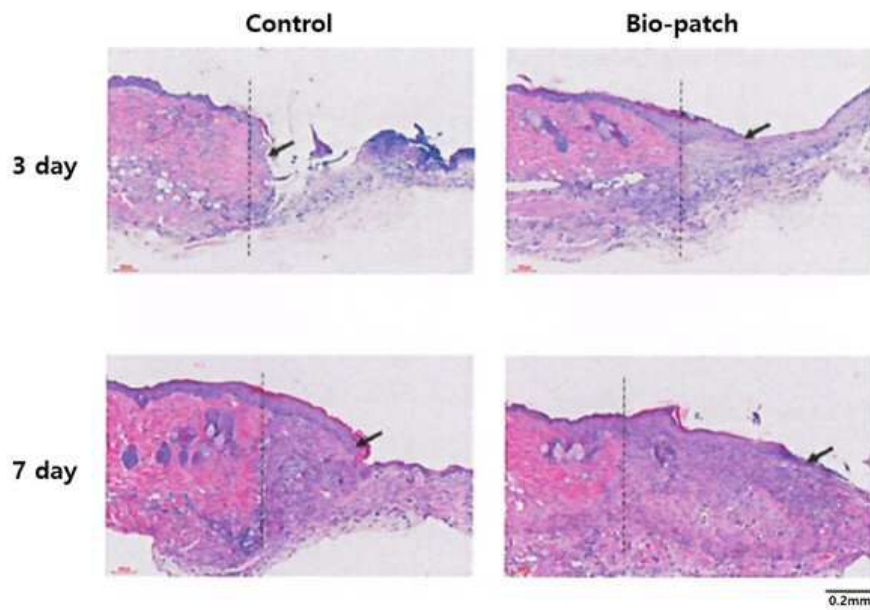
도면19a



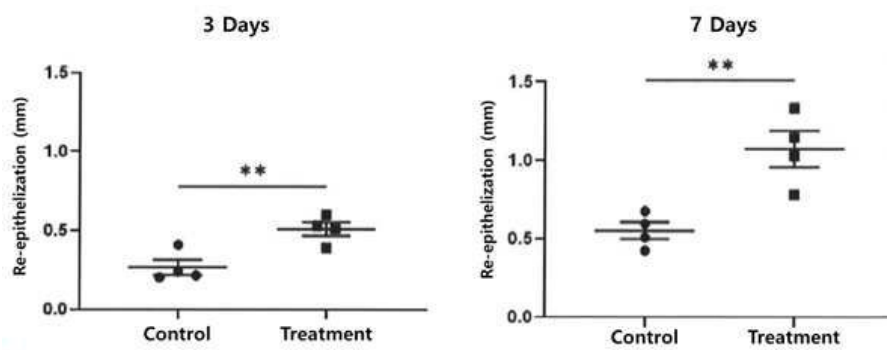
도면19b



도면20a



도면20b



서열 목록

- <110> mkbiotech.co.ltd
- The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)
- <120> Bio-patch type cell therapy product for Regenerating skin
comprising Placenta-derived stem cells
- <130> WP213199
- <160> 18
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 21
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> beta-Actin primer-F

<400>	1	
ggatgcagaa ggagatcaca g		21
<210>	2	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	beta-Actin primer-R	
<400>	2	
ctggaaggtg gacaatgagg		20
<210>	3	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	OCT4 primer-F	
<400>	3	
tctcccatgc actcaaactg		20
<210>	4	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	OCT4 primer-R	
<400>	4	
aacttcacct tcctccaac		20
<210>	5	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	c-Myc primer-F	
<400>	5	
gcccataaaa ttgccaagag g		21
<210>	6	
<211>	20	
<212>	DNA	

<213> Artificial Sequence
 <220><223> c-Myc primer-R
 <400> 6
 agccctgacc ttggaatgac 20
 <210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Klf4 primer-F
 <400> 7
 acctcgctt acacatgaag 20

 <210> 8
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Klf4 primer-R
 <400> 8
 tggtttctc attgtctct g 21
 <210> 9
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PAX6 primer-F
 <400> 9
 tgtttgcccg agaaagacta g 21
 <210> 10
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PAX6 primer-R
 <400> 10
 agaggtgaag gatgaaacag g 21

 <210> 11

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ALCAM primer-F
 <400> 11
 agaaggcagg aagttgtcg 20
 <210> 12
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ALCAM primer-R
 <400> 12
 ggaaagttga ggattgtgcg 20
 <210> 13
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Integrin-b1 primer-F
 <400> 13
 cttattggcc ttgcattgct 20
 <210> 14
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Integrin-b1 primer-R
 <400> 14
 ttccctcgta ctcggattg 20
 <210> 15
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HCAM primer-F
 <400> 15
 atcctcacgt ccaacacctc 20

<210> 16
 <211> 20
 <212>
 DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HCAM primer-R
 <400> 16
 ctcgcctttc ttggtgtagc 20
 <210> 17
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Endoglin primer-F
 <400> 17
 aagagctcat ctcgagtctg 20
 <210> 18
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Endoglin primer-R
 <400> 18
 tgacgaccac ctcattactg 20