

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2012년 7월 19일 (19.07.2012)



(10) 국제공개번호
WO 2012/096461 A2

- (51) 국제특허분류:
C12N 5/0775 (2010.01) *C12N 5/02* (2006.01)
C07D 213/72 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2011/010159
- (22) 국제출원일: 2011년 12월 27일 (27.12.2011)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2011-0004016 2011년 1월 14일 (14.01.2011) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): **서울대학교병원 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY HOSPITAL)** [KR/KR]; 서울특별시 종로구 대학로 101, 110-744 Seoul (KR).
- (72) 발명자; 겸
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): **이은주 (LEE, Eun Ju)** [KR/KR]; 서울특별시 성북구 정릉동 1015 번지 경남아너스빌아파트 101 동 1406 호, 136-100 Seoul (KR). **김효수 (KIM, Hyo Soo)** [KR/KR]; 서울특별시 용산구 독서당로 111 한남더힐아파트 105 동 T-202 호, 140-210 Seoul (KR).
- (74) 대리인: **양부현 (YANG, Boo-Hyun)**; 서울특별시 관악구 인현동 1659-2 청동빌딩 301 호, 151-832 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, RW, 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, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

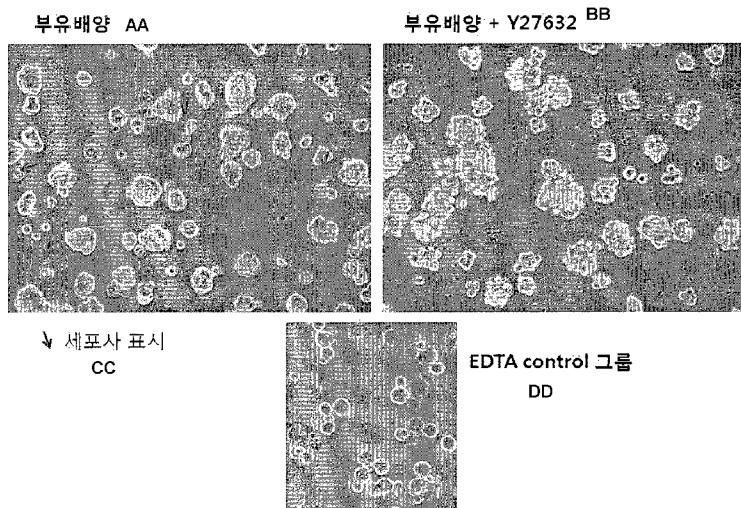
공개:

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

(54) Title: COMPOSITION FOR SUSPENSION CULTURING OF STEM CELLS

(54) 발명의 명칭: 줄기세포의 부유배양용 조성물

도 2



(57) Abstract: The present invention relates to a composition for suppressing cell death of stem cells during suspension culturing, a composition for mass culturing of stem cells, and a method for suppressing cell death of stem cells during suspension culturing. The composition of the present invention can be usefully used for effective single suspension culturing of stem cells, particularly, mesenchymal stem cells, or used for mass suspension culturing under the circumstances in which cell aggregation does not occur.

(57) 요약서: 본 발명은 부유배양 시 줄기세포의 세포사 억제용 조성물, 줄기세포의 대량 배양용 조성물 및 부유배양 시 줄기세포의 세포사 억제방법에 관한 것이다. 본 발명은 줄기세포, 특히 중배엽 줄기세포의 효율적인 단독 부유배양 또는 세포응집이 일어나지 않는 상황에서 효율적인 대량 부유배양에 유용하게 이용될 수 있다.

【명세서】

【발명의 명칭】

줄기세포의 부유배양용 조성물

5

【기술 분야】

본 발명은 줄기세포의 부유배양용 조성물 및 이를 이용한 줄기세포의 부유배양 방법에 관한 것이다.

10

【배경 기술】

줄기세포(stem cell)는 생물 조직을 구성하는 생물을 다양한 세포들로 분화할 수 있는 세포로서, 배아, 태아 및 성체의 각 조직에서 얻을 수 있는 분화(differentiation)되기 전 단계의 미분화 세포들을 총칭한다. 줄기세포는 분화 자극(환경)에 의하여 특정 세포로 분화가 진행되며, 세포분열이 정지된 분화된 세포와는 달리 세포분열에 의해 자신과 동일한 세포를 생산(self-renewal)할 수 있어 증식(proliferation; expansion)하는 특성이 있으며, 다른 환경 또는 다른 분화 자극에 의해 다른 세포로도 분화될 수 있어 분화에 유연성(plasticity)을 가지고 있는 것이 특징이다.

20

줄기세포는 크게 배아(embryo)에서 얻어지고 모든 세포로 분화될 수 있는 잠재력(totipotent)을 지닌 전분화능(pluripotency)의 배아줄기세포(embryonic stem cell, ES cell)와 각 조직에서 얻어지는 다분화능(multipotency)의 성체줄기세포(adult stem cell)로 구분된다. 배아줄기세포는 무제한적 증식이 가능한 미분화 세포로 모든 세포로 분화할 수 있으며, 성체줄기세포와 달리 배(germ) 세포도 만들 수 있어 다음 세대로 유전될 수 있다. 그러나 이러한 이점에도 불구하고 배아줄기세포를 세포 치료제로 이용하는 데에는 암화 형성, 면역거부반응 및 윤리적 법률적 제약 등 실용화에 어려운 점이 많은 상황이다.

25

최근 이러한 문제점을 극복하기 위한 대안으로 중배엽 줄기세포가 제시되고 있다. 중배엽 줄기세포는 지방세포, 골세포, 연골세포,

30

근육세포, 신경세포, 심근세포로의 분화가 가능한 다능성을 가진 세포로 면역 반응을 조절하는 기능도 가지고 있는 것으로 보고되고 있다.

세포 치료나 재생의학에서 최소 필요한 세포의 수는 1×10^9 정도이며, 배양조건 및 기준을 확립하는 단계에서 필요한 세포들까지 고려하면 그 양은 더욱 늘어난다. 기존의 다양한 기원의 중배엽 줄기세포로 이 정도의 양을 공급하려면 최소 인 비트로에서 10번 이상의 계대가 필요하며, 이 과정에서 세포는 노화되고 변형되어 더 이상 치료의 개념에 적합하지 않게 된다. 이는 지금의 중배엽 줄기세포의 배양시스템이 가지고 있는 풀어야 할 문제점의 하나이다. 중배엽 줄기세포를 세포치료제로 사용하기 위해서는 이러한 문제점을 해결 할 수 있는 새로운 대량생산 방법이 필요하다.

중배엽 줄기세포는 부착 의존성 세포로서 부유 배양 과정에서 세포응집(aggregation) 현상이 일어난다. 이러한 응집현상에 의하여 세포의 인 비보 활성도가 증가할 수 있으나 대량배양을 위한 부유 배양 또는 단독세포의 형태로 인 비보에 적용하고자 할 때는 이를 막는 방법이 필요하다. 중배엽 줄기세포의 효율증대 및 대량 생산에 단독세포의 부유 배양이 가장 적합하므로, 이 때 응집에 참여하지 못하는 세포들의 세포사를 막고 배양세포들의 활성을 유지하는 방법을 제시함으로써 궁극적으로 중배엽 줄기세포를 효율적으로 대량 배양하는 방법의 개발이 필요하다.

본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

【발명의 상세한 설명】

【기술적 과제】

본 발명자들은 중배엽 줄기세포의 생존률을 높이고 활성을 유지하는 효율적인 대량생산 방법을 개발하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 중배엽 줄기세포의 부유배양 시 ROCK 억제제를 첨가할 경우 응집에

참여하지 못한 세포들의 세포사(apoptosis)가 억제되면서 대량 부유배양 또는 단독배양이 가능함을 발견함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

따라서 본 발명의 목적은 부유배양 시 줄기세포의 세포사 억제용 조성물을 제공하는 데 있다.

5 본 발명의 다른 목적은 줄기세포의 대량 배양용 조성물을 제공하는 데 있다.

본 발명의 또 다른 목적은 부유배양 시 줄기세포의 세포사 억제방법을 제공하는 데 있다.

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

【기술적 해결방법】

15 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 ROCK 억제제(Rho-associated kinase inhibitor)를 유효성분으로 포함하는 부유배양 시 줄기세포의 세포사 억제용 조성물을 제공한다.

20 본 발명자들은 중배엽 줄기세포의 생존률을 높이고 활성을 유지하는 효율적인 대량생산 방법을 개발하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 중배엽 줄기세포의 부유배양 시 ROCK 억제제를 첨가할 경우 응집에 참여하지 못한 세포들의 세포사(apoptosis)가 억제되면서 대량 부유배양 또는 단독배양이 가능함을 발견하였다.

25 본 발명의 조성물은 “부유배양 시 줄기세포의 세포사 억제용 조성물”로 표현된다. 또한, 본 발명의 조성물은 “줄기세포의 단독 배양용 조성물(composition for culturing individual non-aggregated stem cells)”로 표현될 수도 있다.

30 본 명세서에서 용어 “ROCK(Rho-associated kinase)”는 세린-쓰레오닌 카이네이즈의 AGC(PKA/PKG/PKC) 패밀리에 속하며 포유류(인간, 래트, 마우스), 제브라피쉬(zebrafish), 제노푸스(Xenopus), 무척추동물(C. 엘레강스, 모기, 초파리) 및 닭에서 발견되는 인산화 효소를 말한다. 포유류의 ROCK는 카이네이즈 도메인, 꼬인 코일 부위(coiled-coil region) 및 PH(Pleckstrin homology) 도메인으로 구성되어 있으며, PH 도메인은

분자 내 폴딩에 의한 자가억제 기작을 가지므로 RhoA-GTP가 없으면 카이네이즈의 활성이 감소된다. 인간의 ROCK은 158 kDa의 분자량을 가지고 small GTPase RhoA의 주요 다운스트림 작동자이다. 용어 “ROCK 억제제(Rho-associated kinase inhibitor)”는 Y-27632(trans-4-[(1R)-1-Aminoethyl]-N-4-pyridinyl-cyclohexanecarboxamide, 2HCl), H-1152[(S)-(+)-(2-methyl-5-isoquinolinyl)sulfonylhomo-piperazine, 2HCl], HA-1077[(5-isoquinolinesulfonyl)homo-piperazine, 2HCl], 및 ROCK inhibitor II [N-(4-pyridyl)-N'-(2,4,6-trichlorophenyl)urea]를 포함하나, 이제 제한되지 않고 ROCK의 활성을 억제하는 것으로 당업계에 알려진 모든 물질을 포함한다.

본 명세서에서 용어 “줄기세포(stem cell)”는 생물 조직을 구성하는 다양한 세포들로 분화할 수 있는 세포로서, 조직 및 기관의 특수화된 세포를 형성하도록 비제한적으로 재생할 수 있는 미분화 세포들을 지칭한다. 줄기세포는 발달 가능한 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. 바람직하게는, 본 발명의 줄기세포는 중배엽 줄기세포이다.

본 명세서에서 용어 “중배엽 줄기세포”는 지방세포, 골세포, 연골세포, 근육세포, 신경세포, 심근세포로의 분화가 가능한 다분화능(multipotency)을 가진 줄기세포를 의미한다. 중배엽 줄기세포는 소용돌이 모양의 형태와 기본적인 세포표면 표식자 CD73(+), CD105(+), CD34(-), CD45(-)의 발현 정도를 통하여 식별된다.

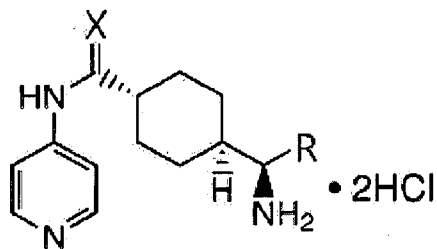
본 명세서에서 용어 “부유배양(suspension culture)”은 배양대상의 세포를 기질(substrate) 등에 고정시키지 않은 채로 배양액 내에서 부유(floating)하는 상태로 배양하는 것을 말한다. 부착(adhesion) 의존성인 중배엽 줄기세포는 부유배양 시에 세포 응집을 일으키며, 이러한 응집에 포함되지 못하고 홀로 부유하는 세포는 세포사(apoptosis)를 유발하여 사멸하므로, 부유배양에 의한 대량배양 시 또는 인 비보에서 단독배양의 필요가 있는 경우 줄기세포의 높은 생존율을 담보하기 위하여 세포사를 억제하는 것이 필요하다. 본 발명에 따르면, ROCK 억제제는

부유배양 상태에서의 줄기세포의 세포사를 억제하여 전체적인 세포수 증가 및 활성유지를 통해 부유배양의 효율을 크게 증가시킨다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 줄기세포는 부유배양에서 응집(aggregation) 되지 않고 분리되어 배양되는 세포이다. 본 발명에 따르면, ROCK 억제제는 부유배양 상태에서의 응집에 참여하지 못한 중배엽 줄기세포의 세포사를 억제하면서 더 많은 세포응집을 유도할 수 있으므로 부착 의존성인 줄기세포의 생존성 향상을 통해 부유배양의 줄기세포 수득율을 크게 증가시킨다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 ROCK 억제제는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물이다:

화학식 1



상기 화학식에서, X는 황 또는 산소이고, R은 C1-C3의 알킬기(alkyl group)이다. 보다 바람직하게는, 상기 X는 산소이고, 상기 R은 메틸기(methyl group)이다.

X는 산소이고, R은 메틸기인 화학식 1의 화합물은 Y-27632(trans-4-[(1R)-1-Aminoethyl]-N-4-pyridinyl-cyclohexanecarboxamide, 2HCl)이다. Y-27632는 배아줄기세포의 부유배양시 세포의 부유 응집(floating aggregates)을 형성하고 세포생존률을 향상시키는 역할을 하는 것으로 알려졌으나, 오히려 분리된 부유 중배엽 줄기세포의 세포사를 억제하는 기능은 아직 밝혀진 바가 없다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 줄기세포는 인간 중배엽 줄기세포이다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 항산화제를 추가적으로 포함한다.

본 명세서에서 용어 “항산화제”는 다른 분자의 산화를 억제하는 분자를 의미한다. 산화 반응은 전자가 이동하면서 자유라디칼을 생성시키며, 이에 의하여 세포에 손상을 주는 연쇄반응이 시작된다. 항산화제는 스스로 산화되면서 자유라디칼 중간체를 제거함으로써 이러한 연쇄반응을 종료시키므로, 그 자체로 환원제인 경우가 많다. 본 발명에서 이용되는 항산화제는 세포 배양시 이용되는 항산화제로써 당업계에 알려진 모든 항산화제를 포함하며, 바람직하게는 글루타리온(glutathione), 시스테인(cysteine), 시스테아민(cysteamine), 유비퀴놀(Ubiquinol) 및 bME (beta-mercaptoethanol)로 구성된 군으로부터 선택된다. 가장 바람직하게는, 본 발명의 항산화제는 bME(beta-mercaptoethanol)이다.

본 발명에 따르면, 줄기세포의 단독부유배양 시 ROCK 억제제와 함께 bME를 병용투여할 경우, 줄기세포의 생존성이 크게 증가하는 것을 확인하였다. 따라서, bME를 추가적인 배양조성물로 이용할 경우 단독 부유배양 또는 세포응집이 일어나지 않는 상황 하에서 부유 대량배양에서 줄기세포의 배양효율을 크게 증가시킬 수 있다.

본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 ROCK 억제제(Rho-associated kinase inhibitor)의 존재 하에서 줄기세포를 부유배양하는 단계를 포함하는 부유배양 시 줄기세포의 세포사 억제방법을 제공한다.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 E-카드헤린 블로커(E-cadherin blocker), ROCK 억제제(Rho-associated kinase inhibitor) 및 항산화제를 유효성분으로 포함하는 줄기세포의 대량 배양용 조성물을 제공한다.

본 명세서에서 용어 “E-카드헤린 블로커”는 Ca^{2+} 의존성 세포부착 인자인 E-카드헤린의 활성을 억제하는 모든 물질을 말하며, 예를 들어 인간의 E-카드헤린 단일클론 항체(예를 들어 HECD-1, SHE78-7), E-카드헤린 인코딩 유전자의 발현을 억제하는 핵산분자(예를 들어 shRNA, siRNA, miRNA, 리보자임(ribozyme), PNA(peptide nucleic acids) 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드)를 포함하나 이에 제한되지 않고 E-카드헤린의

활성을 억제하는 것으로 당업계에 알려진 모든 물질을 포함한다. 바람직하게는, 본 발명에서 이용되는 E-카드헤린 블로커는 E-카드헤린을 항원으로 인지하여 만들어진 E-카드헤린 항체이며, 보다 바람직하게는 E-카드헤린의 세포외 부분을 항원으로 인지해서 만들어진 E-cadherin

5 항체이다.

본 명세서에서 용어 “발현 억제”는 표적 유전자의 기능 저하를 야기하는 뉴클레오타이드 서열상의 변형을 의미하며, 바람직하게는 이에 의해 표적 유전자 발현이 탐지 불가능해지거나 무의미한 수준으로 존재하게 되는 것을 의미한다.

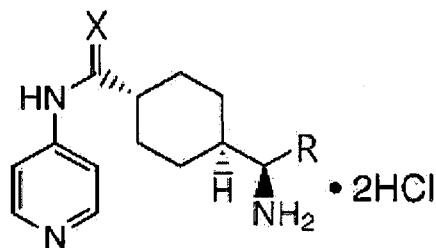
본 발명자들은 이전 연구에서, E-카드헤린이 중배엽 줄기세포의 응집현상의 주요한 인자이며, 이의 발현을 억제할 경우 부유배양 시 응집이 형성되지 않고 홀로 떨어진 단일세포(dissociated cells)들이 부유하다가 사멸한다는 사실을 확인하였다. 따라서 E-카드헤린 블로커 및 ROCK

10 억제제를 동시에 투여할 경우, 세포응집이 일어나지 않으면서도 세포 생존성 및 활성에 영향이 없어 부유배양에 의한 대량생산이 가능하게 되며,

15 인 비보에서의 단일배양도 효율적으로 수행할 수 있다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 ROCK 억제제는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물이다 :

20 화학식 1



상기 화학식에서, X는 황 또는 산소이고, R은 C1-C3의 알킬기(Alkyl group)이다. 보다 바람직하게는, 상기 X는 산소이고, 상기 R은

25 메틸기(methyl group)이다. 본 발명의 ROCK 억제제는 앞서 기술하였으므로 과도한 중복을 피하기 위하여 그 기재 생략한다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 줄기세포는 인간

중배엽 줄기세포이다.

본 발명의 방법은 “부유배양 시 줄기세포의 세포사 억제방법”으로 표현된다. 또한, 본 발명의 “조성물은 줄기세포의 부유배양 방법”으로 표현될 수도 있다.

5 본 발명에서 이용될 수 있는 줄기세포 부유배양용 배지는 동물세포의 배양에 통상적으로 이용되는 어떠한 배지도 가능하며, 예를 들어, 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.

20 상기 배양 과정에서 배양세포의 부유상태를 만들기 위해 바람직하게는 배지에 SR(serum replacement)를 첨가하거나, 저부착 배양 접시 또는 바이오리액터를 사용하여 배양할 수 있으나, 이에 제한되지 않고 당업계에서 사용되는 다양한 부유배양 방법을 사용할 수 있다.

25 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 항산화제를 추가적으로 포함한다.

30 본 발명의 보다 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 항산화제는 글루타리온(glutathione), 시스테인(cysteine), 시스테인(cysteamine), 유비퀴놀(Ubiquinol) 및 bME (beta-mercaptoethanol)로 구성된 군으로부터 선택된다. 가장 바람직하게는, 본 발명의 항산화제는 bME(beta-mercaptoethanol)이다.

본 발명에서 이용되는 항산화제에 관해서는 앞서 기술하였으므로

과도한 중복을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.

본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 줄기세포의 응집현상(aggregation)이 억제된 조건 하에서 ROCK 억제제의 존재 하에서 줄기세포를 부유배양하는 단계를 포함하는 부유배양 시 줄기세포의 세포사 억제방법을 제공한다.

본 발명의 ROCK 억제제 및 줄기세포의 배양방법에 관해서는 앞서 기술하였으므로 과도한 중복을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.

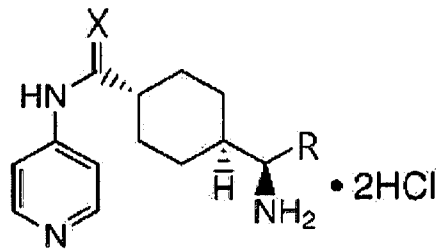
본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 줄기세포의 응집현상(aggregation)이 억제된 조건은 E-카드헤린 블로커(E-cadherin blocker)를 투여함으로써 형성된다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 줄기세포의 응집현상(aggregation)이 억제된 조건은 혐기적(anoxia) 조건을 조성함으로써 형성된다.

본 명세서에서 용어 “혐기적 조건”은 배양환경 내의 대기 중 산소 농도가 전체적으로 낮아지는 조건을 말한다. 바람직하게는 대기 중 산소농도가 0-3ppm이고, 보다 바람직하게는 0-1ppm인 경우를 말한다. 혐기적 조건은 당업계에서 알려진 다양한 방법에 의하여 조성될 수 있으며, 상업적으로 구입 가능한 다양한 혐기성 미생물 배양장치를 이용할 수 있다. 본 발명에 따르면, 본 발명자들은 저산소 혐기조건에서 부유 배양시 중배엽 줄기세포들의 응집현상이 없이 단독세포로 부유됨을 발견하였다. 따라서 이와 같이 저산소 혐기상태로 유발된 단독부유에 따른 세포사를 ROCK 억제제를 이용하여 막음으로써 단독배양 또는 부유 대량배양을 효율적으로 수행할 수 있게된다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 ROCK 억제제는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물이다:

화학식 1



상기 화학식에서, X는 황 또는 산소이고, R은 C1-C3의 알킬기(Alkyl group)이다.

5 보다 바람직하게는, 상기 X는 산소이고, 상기 R은 메틸기이다. 본 발명의 ROCK 억제제는 앞서 기술하였으므로 과도한 중복을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 줄기세포는 인간 중배엽 줄기세포이다.

10

【유리한 효과】

본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

15 (a) 본 발명은 부유배양 시 줄기세포의 세포사 억제용—조성물, 줄기세포의 대량 배양용 조성물 및 부유배양 시 줄기세포의 세포사 억제방법을 제공한다.

(b) 본 발명은 줄기세포, 특히 중배엽 줄기세포의 효율적인 단독 부유배양 또는 세포응집이 일어나지 않는 상황 하에서 부유 대량배양에 유용하게 이용될 수 있다.

20

【도면의 간단한 설명】

25 도 1은 Y27632 무처리 대조군 세포 및 Y27632 처리 세포를 부유배양 24시간 후에 뭉쳐진 세포들을 트립신 블루(trypan blue)로 염색한 결과를 나타낸 그림이다. 40 x 배율

도 2는 Y27632 무처리 대조군 세포 및 Y27632 처리 세포를 부유배양

24시간 후에 문쳐진 세포들을 트립신 블루(trypan blue)로 염색한 결과를 나타낸 100 x 배율의 그림이다. Y27632 무처리 그룹은 응집(aggregation)된 세포 외의 단독세포에서 세포사가 발생함을 관찰하였다. 칼슘 킬레이트 EDTA 처리시 응집이 발생하지 않았으며, 그에 따라 모든 세포에서 세포사가 발생하였으나, Y27632를 처리한 경우 응집하지 않는 단독세포의 세포사가 방지되고 이에 의해 추가적으로 응집현상이 증가되는 것을 확인하였다.

도 3은 Y27632 처리 세포 및 대조군 세포(naive cell)에서의 BCL-XL의 발현량을 웨스턴 블롯팅을 통하여 확인한 결과를 나타낸 그림이다.

도 4는 Y27632 처리 세포 및 대조군 세포에서의 ERK(extracellular signal-regulated kinase) 인산화 정도를 웨스턴 블롯팅을 통하여 확인한 결과를 나타낸 그림이다.

도 5는 Y27632 처리 세포, 아무 처리도 하지 않은 대조군 및 EDTA 처리 대조군의 HGF 발현량 비교를 위하여 ELISA 분석을 한 결과를 나타낸 그림이다.

도 6은 저산소 혐기조건에서 중배엽 줄기세포를 부유배양 후 24시간이 경과한 사진을 나타낸 그림으로, 세포들의 문침현상 없이 단독세포로 부유함을 알 수 있다. 배율 : 좌 40X, 우 100X

도 7은 저산소 혐기조건에서 Y27632 처리 여부에 따른 세포생존율을 비교 관찰한 결과를 나타낸 그림이다. 저산소 혐기조건에서는 중배엽 줄기세포의 세포 응집이 관찰되지 않고 이에 따라 대조군은 세포사가 많이 발생하나, Y27632 처리 세포는 단독세포상태를 유지하면서 세포사가 발생하지 않음을 확인하였다. 배율 : 40X

도 8은 저산소 팩을 이용하여 혐기적 조건을 조성한 후 24시간이 경과한 시점에서 Y27632 및 bME 처리여부에 따른 부유배양 줄기세포들의

활성을 비교 관찰한 결과를 나타낸 그림이다. 배율 : 40X, 100X 그림에 표기(도 8a), 200X(도 8b)

도 9는 E-cadherin blocking antibody를 이용하여 부유배양에서 세포응집을 저해하고 Y-27632 처리로 HGF 효율을 증대시킨 그림으로 24시간 처리 결과이다.

【발명의 실시를 위한 형태】

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명 하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

실시예

실험방법

20 인간 중배엽 줄기세포(BM-MSC)의 배양 및 세포수 측정

인간 중배엽 줄기세포(Lonza, Switzerland)를 10% FBS를 함유하는 α -MEM 배지를 이용하여 접촉증식 억제(contact inhibition)가 발생하지 않도록 배양하였다. 약 80% 정도의 컨플루언스에 도달한 시점에서, 세포수 측정을 위하여 배양액 제거(media suction)를 하고 PBS(무 칼슘, 무 마그네슘)로 세척하였다. 이후 0.25% 트립신/EDTA를 처리하고 37°C, CO₂ 인큐베이터에서 30초 간 정치하였다. 튜브에 떨어진 세포들을 채집하여, 10% FBS를 함유하는 α -MEM으로 디쉬에 남아 있는 세포를 깨끗이 빼내서 원심분리(1500rpm, 5분)하였다. 상층에 있는 배양액을 제거(suction)하고 가라 앉은 세포에 EB 배지(DMEM/F12 80% + 혈청 대체물(serum replacement) 20%) 5ml을 넣어 서스펜션시킨 후 다시 원심분리(1500rpm, 5분)하였다.

이후 100 Φ 페트리 디쉬에 배양액 10ml(Y27632 20 μ M를 포함 또는 불포함)을 넣고 각각 2.0×10^6 cell이 되도록 서스펜션하였다. 24시간 뒤에 문쳐진 세포들을 트립신 블루(trypsin blue)로 염색 후 자동 셀 카운터(automated cell counter, Invitrogen)로 세포수를 측정하였다.

5

웨스턴 블롯팅

세포시료 내에서 세포사멸 방지인자의 발현변화를 측정하기 위하여 BCL-XL의 발현량을 단백질 수준에서 측정하였다. 또한 세포를 6시간 동안 부유배양한 뒤에 수집하여 세포의 활성화도에 관여하는 ERK의 인산화 정도를 평가 하였다. 즉, 세포를 환원제[Lysis PreMix(4°C stock) + NaF(10M, x100) + 오소바나데이트(orthovanadate, 200 mM, x200) + 단백질 분해효소 억제제 콕테일(1 tablet/10 ml)]로 용해시킨 후 SDS-폴리아크릴아마이드 젤 전기영동을 하고 PVDF 이동막(transfer membrane, Millipore)에 옮긴 후 BCL-xl(Santa cruz biotechnology), ERK(Cell signaling Technology)을 이용한 일차 항원-항체 반응과 항-래빗 IgG, 항-마우스 IgG 를 이용한 이차 항원-항체 반응을 통하여 단백질 발현변화를 확인하였다.

20

HGF ELISA

세포의 처치가 필요한 체내의 상태는 상처를 입거나 파괴된 상태로 대부분 허혈성 저산소 혐기 조건으로, 이때 주요한 인자중 하나가 HGF(Hepatocyte growth factor)이다. 따라서 세포시료 내에서 상등액을 수집하여 혈관생성인자인 HGF의 발현량을 확인하기 위하여 HGF 특이 항체를 이용하여 제조자의 프로토콜에 따라 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) 분석을 실시하였다.

30 혐기조건 하에서의 인간 중배엽 줄기세포의 배양 및 세포수 측정

인간 중배엽 줄기세포를 10% FBS를 함유하는 α -MEM 배지를 이용하여

접촉증식 억제(contact inhibition)가 발생하지 않도록 배양하였다. 약 80% 정도의 컨플루언스에 도달한 시점에서, 세포수 측정을 위하여 배양액 제거(media suction)를 하고 PBS(무 칼슘, 무 마그네슘)로 세척하였다. 이후 0.25% 트립신/EDTA를 처리하고 37°C, CO₂ 인큐베이터에서 30초 간

5 배양하였다. 튜브에 떨어진 세포들을 채집하여, 10% FBS를 함유하는 α -MEM으로 디쉬에 남아 있는 세포를 깨끗이 빼내서 원심분리(2000rpm, 5분)하였다. 상층에 있는 배양액을 제거(suction)하고 가라 앉은 세포에 EB 배지(DMEM/F12 80% + 혈청 대체물(serum replacement) 20%) 5ml을 넣어 서스펜션시킨 후 다시 원심분리(1500rpm, 5분)하였다.

10 이후 100 Φ 페트리 디쉬에 배양액 10ml(Y27632 20 μ M를 포함 또는 불포함)을 넣고 각각 2.0×10^6 cell이 되도록 서스펜션한 뒤에, 저산소 팩(Anoxia pack, BD science)에 넣고 저산소 혐기조건을 유도하였다. 24시간 뒤에 뭉쳐진 세포들을 트립신 블루(trypan blue)로 염색 후 자동 셀 카운터(automated cell counter, Invitrogen)로 세포수를 측정하였다.

서스펜션을 통한 인간 중배엽 줄기세포(BM-MSC)의 단일세포 배양 유도

인간 중배엽 줄기세포를 10% FBS를 함유하는 α -MEM 배지를 이용하여 접촉증식 억제(contact inhibition)가 발생하지 않도록 배양하였다. 약 80% 정도의 컨플루언스에 도달한 시점에서, 세포수 측정을 위하여 배양액 제거(media suction)를 하고 PBS(무 칼슘, 무 마그네슘)로 세척하였다. 이후 0.25% 트립신/EDTA를 처리하고 37°C, CO₂ 인큐베이터에서 30초 간

20 정지하였다. 튜브에 떨어진 세포들을 채집하여, 10% FBS를 함유하는 α -MEM으로 디쉬에 남아 있는 세포를 깨끗이 빼내서 원심분리(1500rpm, 5분)하였다. 상층에 있는 배양액을 제거(suction)하고 가라 앉은 세포에 EB 배지(DMEM/F12 80% + 혈청 대체물(serum replacement) 20%) 5ml을 넣어 서스펜션시킨 후 다시 원심분리(1500rpm, 5분)하였다. 이후 100 Φ 페트리디쉬에 배양액 10ml(Y27632 20 μ M 를 포함 또는 불포함 및 베타 머캅토에탄올(beta mercaptoethanol) 1.43 μ M 을 포함 또는 불포함)을 넣고

30 각각 2.0×10^6 cell이 되도록 서스펜션하였다.

본 발명자들은 서스펜션 배양시 인간 중배엽 줄기세포는

저산소/혐기조건에서 세포 응집이 줄어드는 것을 발견하였다. 이를 기반으로 응집에 없는 부유배양을 하기 위하여 페트리 디쉬를 저산소 팩(Anoxia pack, BD science)에 넣어 저산소/혐기조건을 유도하고 24시간 동안 37℃로 인큐베이션 후 관찰하였다.

- 5 또한 본 발명자들은 서스펜션 배양시 인간 중배엽 줄기세포의 응집 현상의 주된 인자가 E-카드헤린(E-cadherin)임을 규명하였고, 이를 서스펜션 배양시 단독 배양 유도에 이용하기 위하여 세포를 E-카드헤린 블로커를 처리하여 서스펜션 배양시 응집유도를 저해하였다. 즉, 인간 중배엽 줄기세포를 10% FBS를 함유하는 α -MEM 배지를 이용하여 접촉증식
- 10 억제(contact inhibition)가 발생하지 않도록 배양하고 약 80% 정도의 컨플루언스에 도달한 시점에서, 세포수 측정을 위하여 배양액 제거(media suction)를 하고 PBS(무 칼슘, 무 마그네슘)로 세척하였다. 이후 0.25% 트립신/EDTA를 처리하고 37℃, CO₂ 인큐베이터에서 30초 간 정치하였다. 튜브에 떨어진 세포들을 채집하여, 10% FBS를 함유하는 α -MEM으로 디쉬에
- 15 남아 있는 세포를 깨끗이 빼내서 원심분리(1500rpm, 5분)하였다. 상층에 있는 배양액을 제거(suction)하고 가라 앉은 세포에 EB 배지(DMEM/F12 80% + 혈청 대체물(serum replacement) 20%) 5ml을 넣어 서스펜션시킨 후 다시 원심분리(1500rpm, 5분)하였다. 이후 100 Φ 페트리디쉬에 E-카드헤린 블로커(E-cadherin neutralizing antibody ; clone DECMA-1, Abcam) 12
- 20 /ml이 포함된 배양액 10ml(Y27632 20 μ M 를 포함 또는 불포함)을 넣고 각각 2.0×10^6 cell이 되도록 서스펜션하였다.

실험결과

25 인간 중배엽 줄기세포(UCB-MSC 및 BM-MSC)의 생존률 측정

- 일반배지에서 배양한 대조군 세포와 Y27632 투여배지에서 배양한 세포의 세포수를 측정한 결과, 대조군의 경우 총 1.8×10^6 세포 중에서 사멸한 세포는 1.26×10^6 이고, 생존한 세포는 0.54×10^6 로서, 30%의 생존률을 보였다. 반면, Y27632 투여배지에서 배양한 세포의 경우 총 1.8
- 30 $\times 10^6$ 세포 중에서 사멸한 세포는 0.54×10^6 이고, 생존한 세포는 1.26×10^6 로서, 70%의 생존률을 보였다. 이러한 결과를 통하여 Y27632에 의해

부유배양시 세포의 활성도가 현저히 증가함을 확인하였다(도 1 및 도 2).

웨스턴 블롯팅

세포의 생존성 및 활성도의 변화 정도를 단백질 수준에서 확인하기
5 위하여 웨스턴 블롯팅을 수행한 결과, Y27632 처리 세포에서 세포사
사멸방지 인자인 BCL-XL의 발현 및 세포 활성정도를 나타내는
ERK(extracellular signal-regulated kinase)의 인산화가 현저하게
증가함을 확인하였다(도 3 및 도 4).

10 HGF ELISA

허혈성 저산소 혐기 조건의 인자인 HGF의 발현량을 측정하기 위해
ELISA 분석을 한 결과, Y27632 처리 세포에서 아무 처리도 하지 않은
대조군 및 EDTA 처리 대조군에 비하여 HGF의 발현량이 크게 증가하였음을
확인하였다(도 5).

15

혐기조건 하에서의 인간 중배엽 줄기세포의 배양 및 세포수 측정

혐기조건 하의 일반배지에서 배양한 대조군 세포와 Y27632
투여배지에서 배양한 세포의 세포수를 측정하였다. 그 결과, 6시간
배양한 뒤의 대조군의 경우 총 1.6×10^6 세포 중에서 사멸한 세포는 $4.0 \times$
20 10^5 이고, 생존한 세포는 1.2×10^6 로서, 75%의 생존률을 보였다. 반면,
Y27632 투여배지에서 배양한 세포의 경우 총 1.6×10^6 세포 중에서 사멸한
세포는 2.4×10^5 이고, 생존한 세포는 1.2×10^6 로서, 84%의 생존률을
보였다. 한편 배양 후 24시간이 경과한 뒤에는, 대조군의 경우 총 $1.12 \times$
 10^6 세포 중에서 사멸한 세포는 6.4×10^5 이고, 생존한 세포는 5.2×10^5
25 로서, 45%의 생존률을 보인 반면, Y27632 투여배지에서 배양한 세포의 경우
총 1.4×10^6 세포 중에서 사멸한 세포는 1.6×10^5 이고, 생존한 세포는
 1.24×10^6 로서, 무려 90%의 생존률을 보였다. 이러한 결과를 통하여
Y27632에 의해 전체 세포수가 유지될 뿐만 아니라 생존세포의 증식으로
인하여 세포의 활성도가 현저히 증가함을 확인하였다(도 7).

30

항산화제에 의한 인간 중배엽 줄기세포(BM-MSC)의 서스펜션 유도

저산소 상태에서 세포 응집현상이 억제될 때의 세포사 억제효율을
 확인하기 위하여 Y27632 및 베타 머캅토에탄올의 투여여부를 달리하여
 세포의 활성을 관찰하였다. 도 8에서 보는 바와 같이, Y27632와 베타
 머캅토에탄올을 병용 투여시 단독세포 배양 효율이 크게 증가함을
 5 확인하였다.

E-cadherin blocker 이용한 부유 단독세포 배양 유도

부유 상태에서 세포 응집현상이 E-카드헤린 블로커에 의해 억제될
 때의 세포의 효율 증대를 확인하기 위하여 HGF 발현양을 확인 하였다. 도
 10 9에서 보는 바와 같이 부유 배양시 E-카드헤린 블로커에 의해 세포 응집이
 억제 되고, 혈관 유도 인자 HGF는 발현양이 증가 함을 관찰 하였다.

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

【특허청구범위】

【청구항 1】

ROCK 억제제(Rho-associated kinase inhibitor)를 유효성분으로 포함하는 부유배양 시 줄기세포의 세포사 억제용 조성물.

5

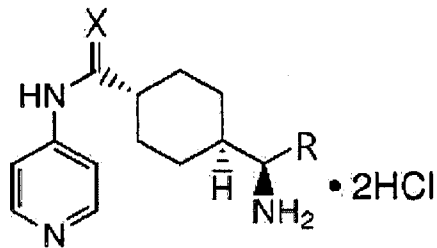
【청구항 2】

제 1 항에 있어서, 상기 줄기세포는 부유배양에서 응집(aggregation)되지 않고 분리되어 배양되는 세포인 것을 특징으로 하는 조성물.

10 【청구항 3】

제 1 항에 있어서, 상기 ROCK 억제제는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물인 것을 특징으로 하는 조성물:

화학식 1



15 상기 화학식에서, X는 황 또는 산소이고, R은 C1-C3의 알킬기(alkyl group)이다.

【청구항 4】

20 제 3 항에 있어서, 상기 X는 산소이고, 상기 R은 메틸기(methyl group)인 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 5】

제 1 항에 있어서, 상기 줄기세포는 인간 중배엽 줄기세포인 것을 특징으로 하는 조성물.

25

【청구항 6】

제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 항산화제를 추가적으로 포함하는

것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 7】

제 6 항에 있어서, 상기 항산화제는 글루타리온(glutathione),
5 시스테인(cysteine), 시스테인아민(cysteamine), 유비퀴놀(Ubiquinol) 및 bME
(beta-mercaptoethanol)로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는
조성물.

【청구항 8】

10 제 7 항에 있어서, 상기 항산화제는 bME(beta-mercaptoethanol)인
것을 특징으로 하는 조성물.

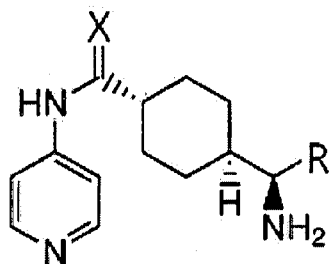
【청구항 9】

E-카드헤린 블로커(E-cadherin blocker), ROCK 억제제(Rho-
15 associated kinase inhibitor) 및 항산화제를 유효성분으로 포함하는
줄기세포의 대량 배양용 조성물.

【청구항 10】

제 9 항에 있어서, 상기 ROCK 억제제는 하기 화학식 1로 표시되는
20 화합물인 것을 특징으로 하는 조성물:

화학식 1



상기 화학식에서, X는 황 또는 산소이고, R은 C1-C3의 알킬기(Alkyl
group)이다.

【청구항 11】

제 10 항에 있어서, 상기 X는 산소이고, 상기 R은 메틸기인 것을

특징으로 하는 조성물

【청구항 12】

제 9 항에 있어서, 상기 줄기세포는 인간 중배엽 줄기세포인 것을
5 특징으로 하는 조성물.

【청구항 13】

제 9 항에 있어서, 상기 항산화제는 글루타리온(glutathione),
시스테인(cysteine), 시스테인아민(cysteamine), 유비퀴놀(Ubiquinol) 및 bME
10 (beta-mercaptoethanol)로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는
조성물.

【청구항 14】

제 13 항에 있어서, 상기 항산화제는 bME(beta-mercaptoethanol)인
15 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 15】

ROCK 억제제(Rho-associated kinase inhibitor)의 존재 하에서
줄기세포를 부유배양하는 단계를 포함하는 부유배양 시 줄기세포의 세포사
20 억제방법.

【청구항 16】

줄기세포의 응집현상(aggregation)이 억제된 조건 하에서 ROCK
억제제의 존재 하에서 줄기세포를 부유배양하는 단계를 포함하는 부유배양
25 시 줄기세포의 세포사 억제방법.

【청구항 17】

제 16 항에 있어서, 상기 줄기세포의 응집현상(aggregation)이
억제된 조건은 E-카드헤린 블로커를 투여함으로써 형성되는 것을 특징으로
30 하는 방법.

【청구항 18】

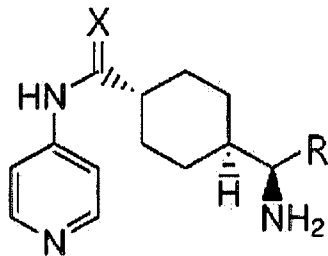
제 17 항에 있어서, 상기 줄기세포의 응집현상(aggregation)이 억제된 조건은 혐기적(anoxia) 조건을 조성함으로써 형성되는 것을 특징으로 하는 방법.

5

【청구항 19】

제 15 항 및 제 16 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ROCK 억제제는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물인 것을 특징으로 하는 방법 :

화학식 1



10

상기 화학식에서, X는 황 또는 산소이고, R은 C1-C3의 알킬기(Alkyl group)이다.

【청구항 20】

제 19 항에 있어서, 상기 X는 산소이고, 상기 R은 메틸기인 것을 특징으로 하는 방법.

15

【청구항 21】

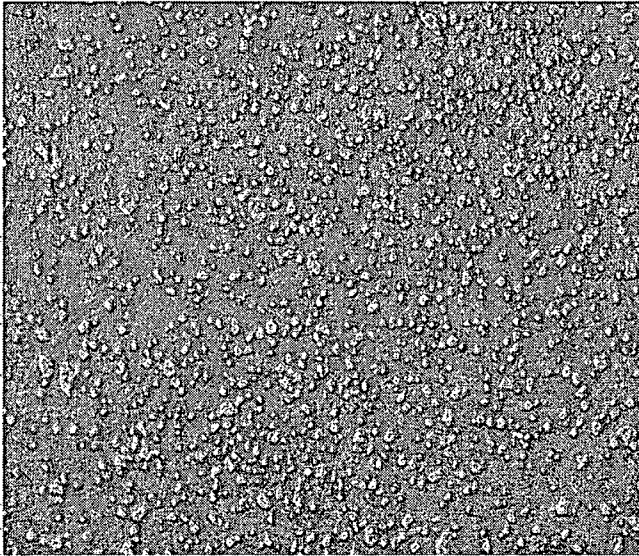
제 16 항에 있어서, 상기 줄기세포는 인간 중배엽 줄기세포인 것을 특징으로 하는 방법.

20

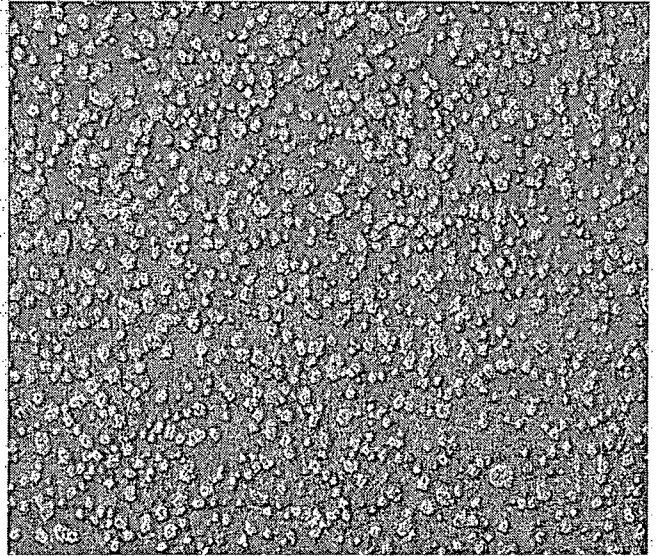
도 1

24시간 후

부유배양

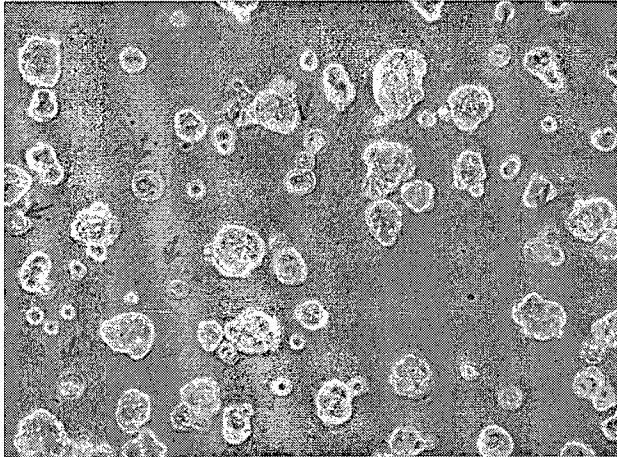


부유배양 + Y27632

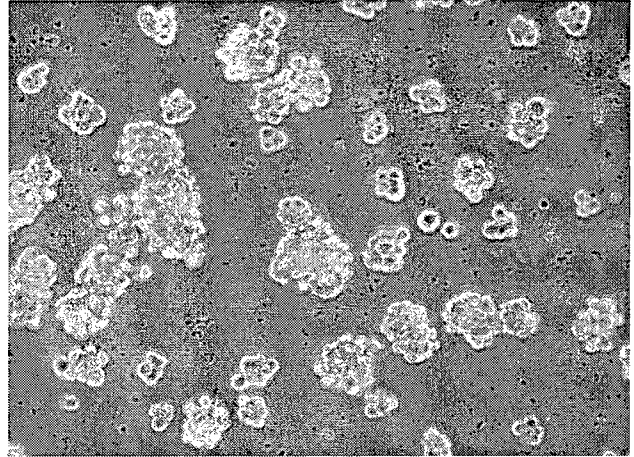


도 2

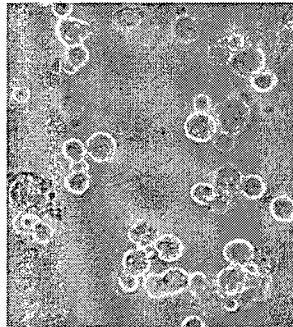
부유배양



부유배양 + Y27632

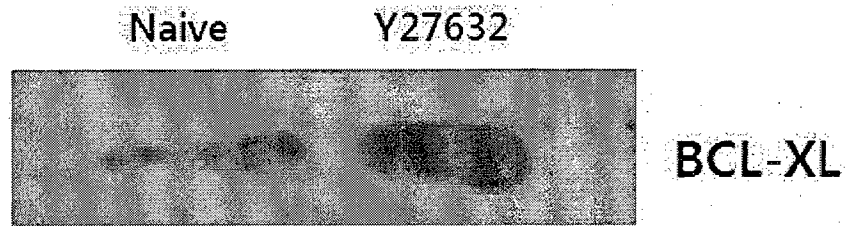


↓ 세포사 표시



EDTA control 그룹

도 3



도 4

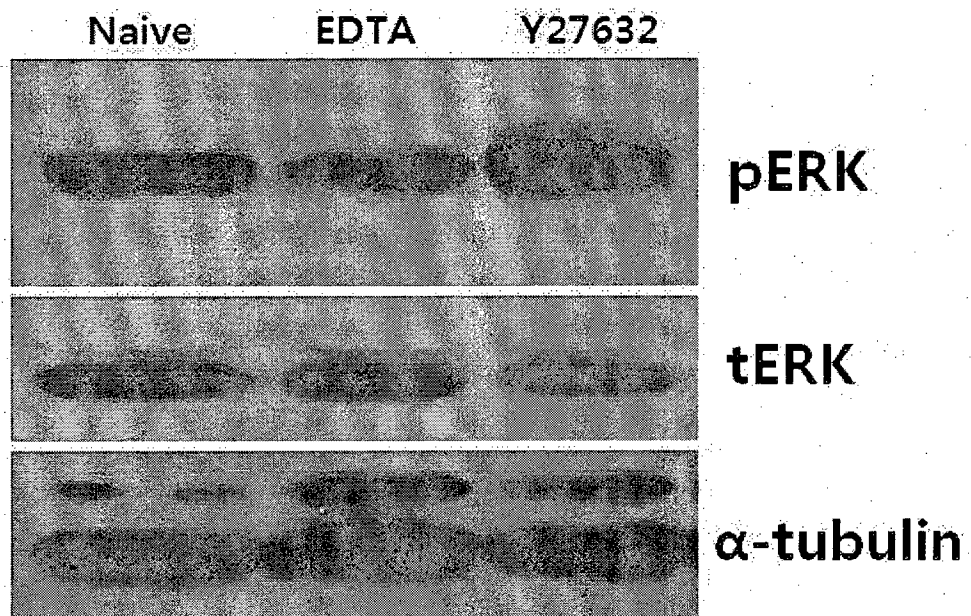
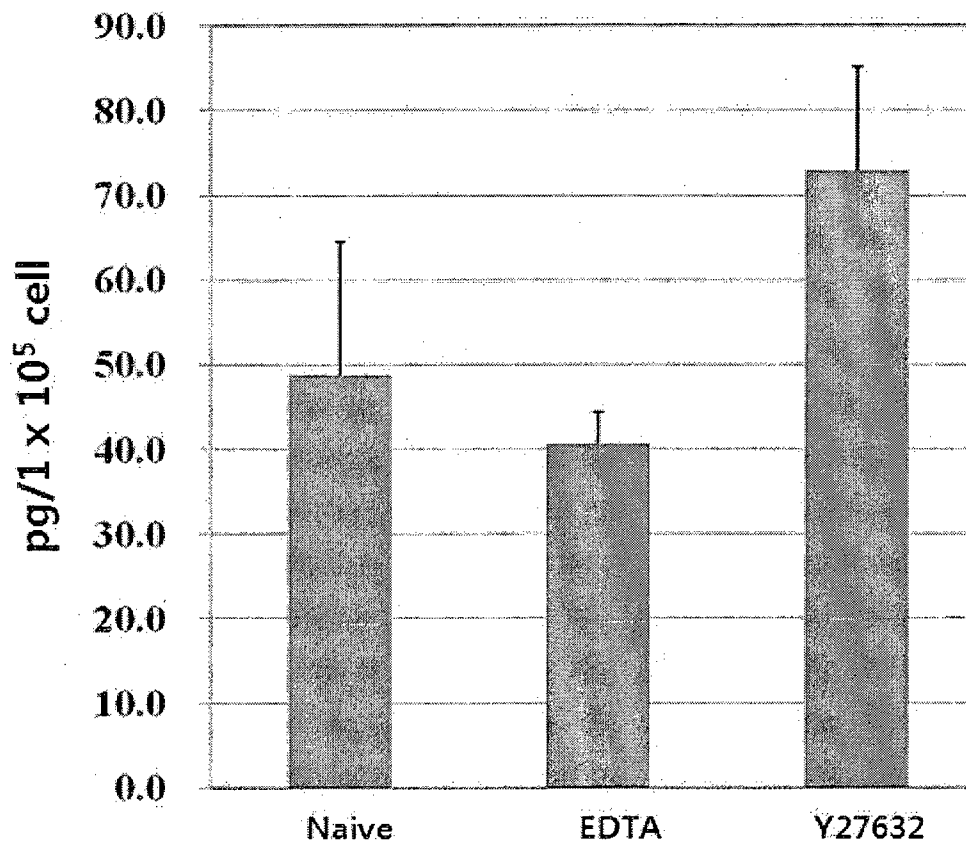
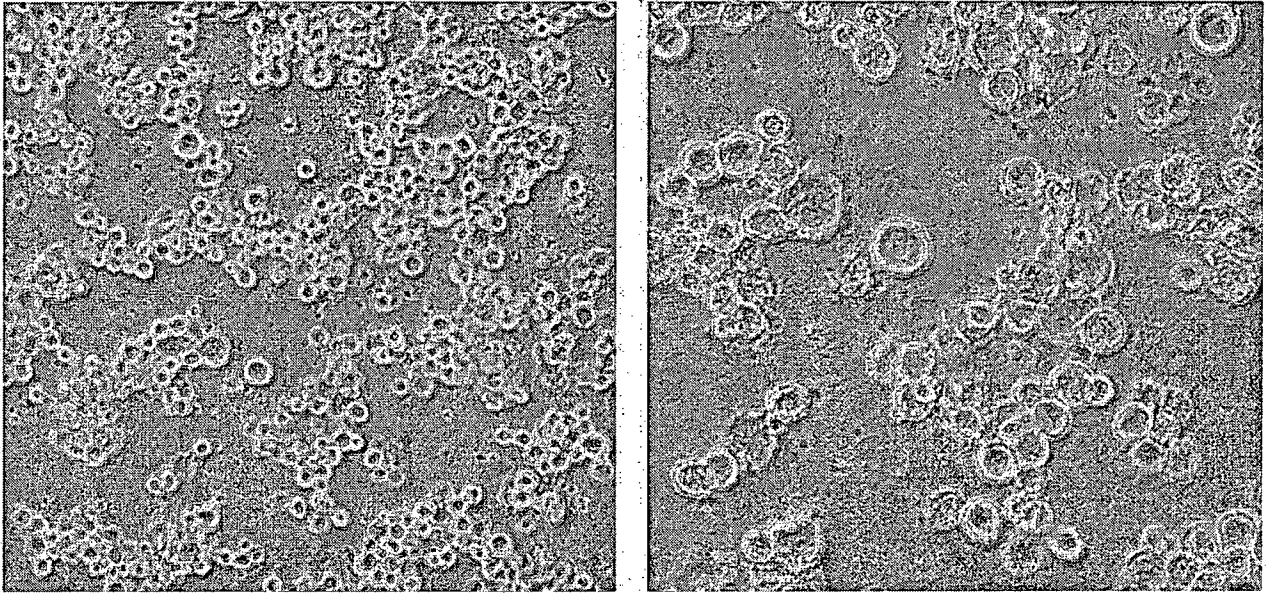


Figure 5

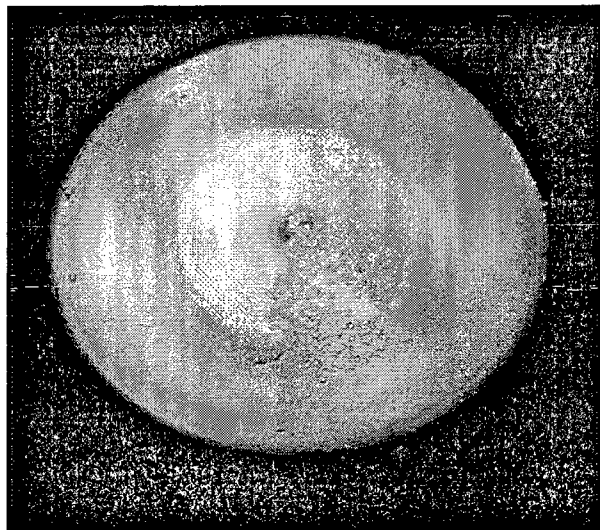


도 6

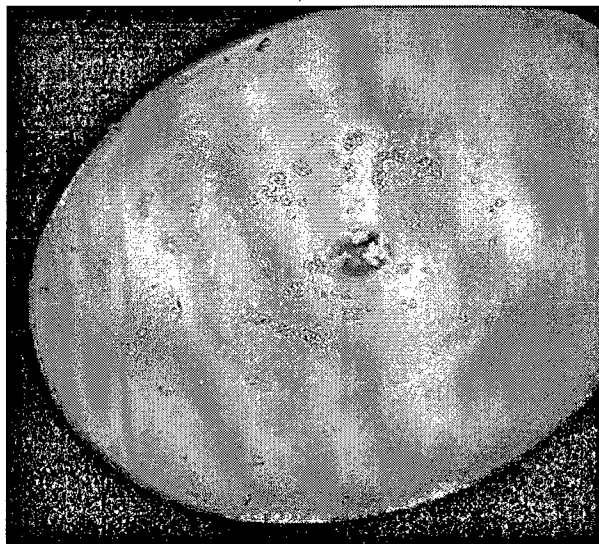


도 7

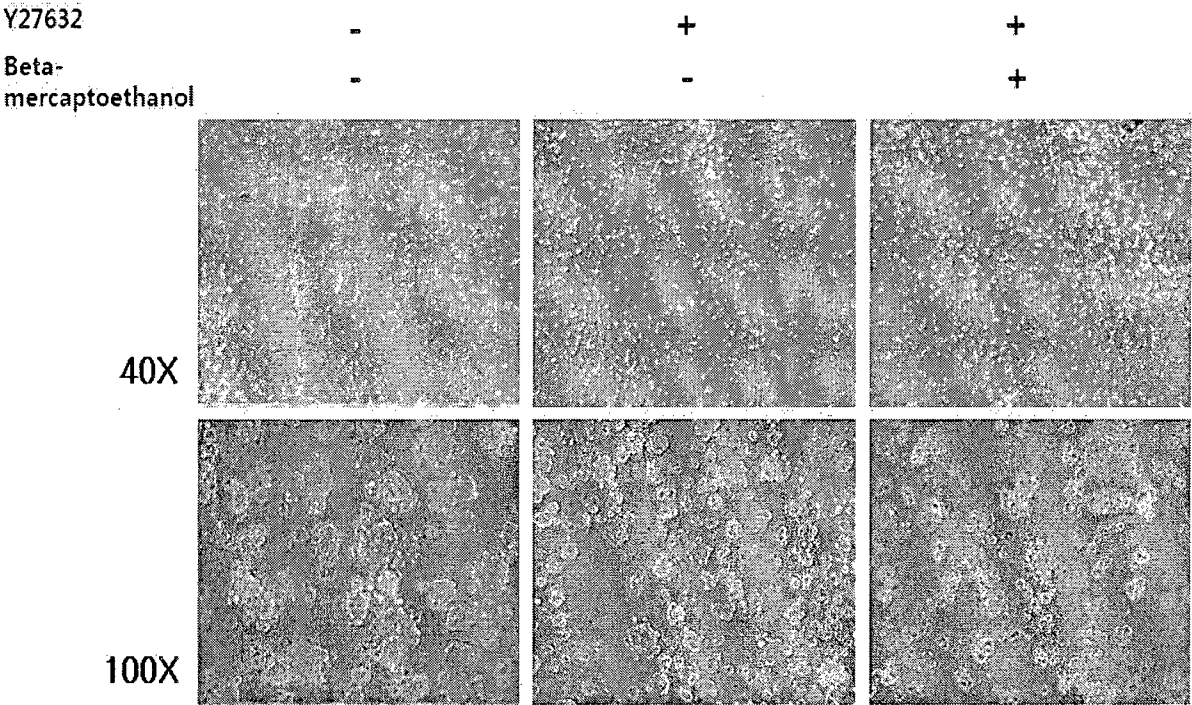
Naive



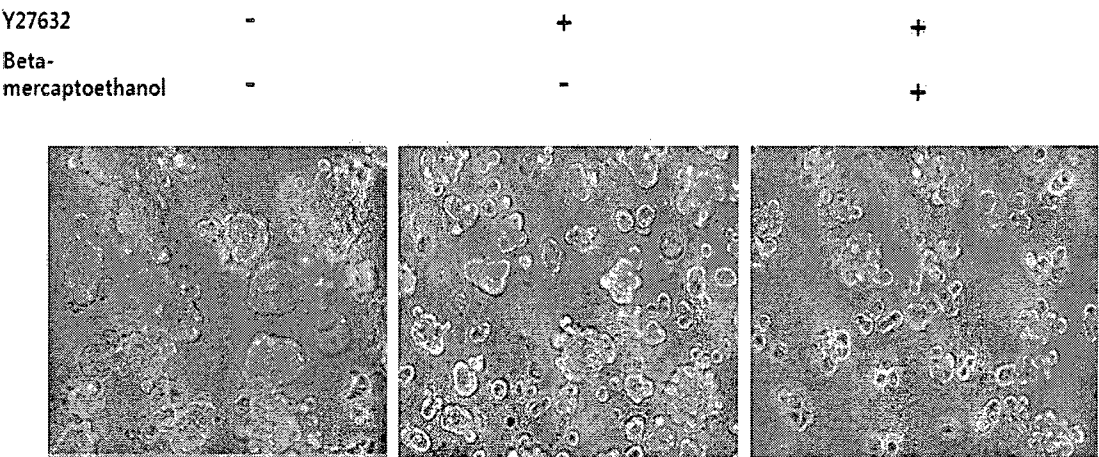
Y27632



도 8a



도 8b



도 9

