(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0006683
(43) 공개일자 2023년01월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61L 27/38 (2006.01) *C12N 5/077* (2010.01)
(52) CPC특허분류
A61L 27/3834 (2013.01)
A61K 35/28 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0086606
(22) 출원일자 2021년07월01일
심사청구일자 2021년07월01일

(71) 출원인
인천대학교 산학협력단
인천광역시 연수구 아카데미로 119 (송도동)
(72) 발명자
차재민
서울특별시 영등포구 신풍로 77, 104동 705호
조수민
인천광역시 연수구 한진로 49, 503동 408호
(74) 대리인
차준용

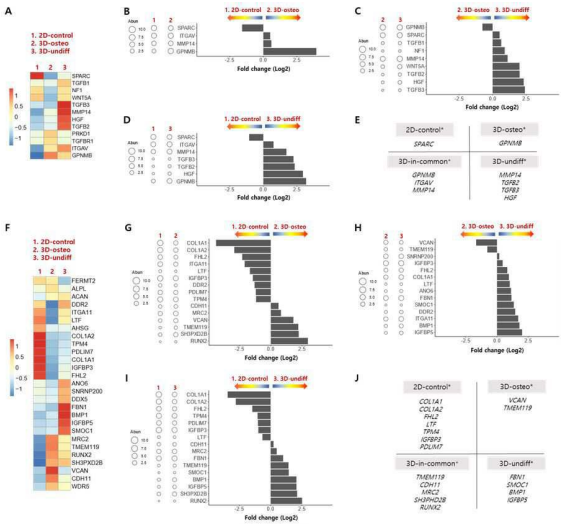
전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 발명의 명칭 **미분화 줄기세포 스페로이드를 포함하는 이식용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 미분화 중간엽 줄기세포 스페로이드를 포함하는 조직 재생용 이식 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 상기 미분화 중간엽 줄기세포 스페로이드(spheroid)는 분화 중간엽 줄기세포 스페로이드(spheroid)에 비하여 혈관신생(Angiogenesis) 및 골형성(Osteogenesis)에 관련된 단백질 인자 중 MMP14, TGF-β2, TGF-β3, HGF의 발현이 더 높은 것을 특징으로 하며, 상기 미분화 중간엽 줄기세포 스페로이드를 이용함으로써, 세포외 기질을 활발하게 분비하면서 인 비보 미세환경과의 접촉 표면적도 극대화하여, 생착률과 조직 재생능이 현저하게 우수한 재생 치료용 인체 삽입 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도5



(52) CPC특허분류
A61L 27/3847 (2013.01)
A61L 27/3895 (2013.01)
A61P 19/08 (2018.01)
C12N 5/0654 (2013.01)
A61L 2300/412 (2013.01)
A61L 2430/02 (2013.01)
C12N 2500/38 (2013.01)
C12N 2506/1353 (2013.01)
C12N 2513/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711117744
과제번호 2020R1F1A1072695
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명 질환 맞춤형 줄기세포 유래 엑소좀 치료제의 대량생산을 위한 고효율 3차원 줄기세포 배양 플랫폼 개발
기 여 율 1/1
과제수행기관명 인천대학교
연구기간 2020.06.01 ~ 2023.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

균일한 크기의 복수개의 미분화 중간엽 줄기세포 스페로이드(spheroid)로부터 유래된 균일한 크기의 복수개의 조직 비드(tissue bead)에 있어서,

상기 조직 비드(tissue bead)는 분화 중간엽 줄기세포 스페로이드(spheroid)이며, 상기 미분화 중간엽 줄기세포 스페로이드(spheroid)는 상기 분화 중간엽 줄기세포 스페로이드(spheroid)에 비하여 혈관신생(Angiogenesis) 및 골형성(Osteogenesis)에 관련된 단백질 인자 중 MMP14, TGF-β2, TGF-β3, HGF의 발현이 더 발현이 더 높고, 골분화 유전자 BMP2 발현이 더 높은 것을 특징으로 하는,

상기 미분화 중간엽 줄기세포 스페로이드(spheroid)를 포함하는 조직 재생용 이식 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 미분화 중간엽 줄기세포 스페로이드(spheroid)는 상기 분화 중간엽 줄기세포 스페로이드(spheroid)에 비하여 혈관신생(Angiogenesis)에 관련된 단백질 인자 중 WNT5B의 발현이 더 높고, 골형성(Osteogenesis)에 관련된 단백질 인자 중 SMOC1 및 BMP1의 발현이 더 높은 것을 특징으로 하는, 조직 재생용 이식 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 미분화 중간엽 줄기세포 스페로이드(spheroid)는 상기 분화 중간엽 줄기세포 스페로이드(spheroid)에 비하여 Thy1(CD90), ALCAM(CD166), TFRC(CD71), ITGB1(CD29), CD44, CD9 및 NT5E(CD73) MSC 마커가 더 높게 표현되는 것을 특징으로 하는, 조직 재생용 이식 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 미분화 중간엽 줄기세포 스페로이드(spheroid)는 단일층(Monolayer)에서 배양한 미분화 중간엽 줄기세포에 비하여 혈관신생(Angiogenesis) 및 골형성(Osteogenesis)에 관련된 단백질 인자 중 MMP14, TGF-β2, TGF-β3, HGF의 발현이 더 높고, 혈관신생(Angiogenesis)에 관련된 단백질 인자 중 WNT5B의 발현이 더 높으며, 골형성(Osteogenesis)에 관련된 단백질 인자 중 SMOC1 및 BMP1의 발현이 더 높은 것을 특징으로 하는, 조직 재생용 이식 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 미분화 중간엽 줄기세포 스페로이드는 50-150㎛의 평균 직경을 가지는 것을 특징으로 하는 조직 재생용 이식 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 미분화 중간엽 줄기세포 스페로이드는 200 - 600 개의 세포를 포함하는 것을 특징으로 하는 조직 재생용 이식 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 조직은 골(bone) 조직인 것을 특징으로 하는 조직 재생용 이식 조성물.

청구항 8

제7항의 조성물을 유효성분으로 포함하는 골 질환의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 골 질환은 골다공증, 골형성 부전증, 치주질환, 골절, 대사성 골염, 섬유성 골염, 무형성 골질환, 골 연화증, 구루병, 고칼슘 혈증, 다발성 골수종 및 파제트병으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 10

(a) 대상체로부터 분리된 줄기세포를 3차원 배양하여 복수개의 미분화 중간엽 줄기세포 스페로이드(spheroid)를 형성하는 단계; 및

(b) 상기 복수개의 미분화 중간엽 줄기세포 스페로이드를 배양하여 복수개의 골 조직 비드(bone tissue bead)을 생성하는 단계;를 포함하며,

상기 골 조직 비드(bone tissue bead)는 분화 중간엽 줄기세포 스페로이드(spheroid)이며, 상기 미분화 중간엽 줄기세포 스페로이드(spheroid)는 상기 분화 중간엽 줄기세포 스페로이드(spheroid)에 비하여 혈관신생(Angiogenesis) 및 골형성(Osteogenesis)에 관련된 단백질 인자 중 MMP14, TGF-β2, TGF-β3, HGF의 발현이 더 높고, 골분화 유전자 BMP2 발현이 더 높은 것을 특징으로 하는,

상기 미분화 중간엽 줄기세포 스페로이드(spheroid)를 포함하는 조직 재생용 이식 조성물의 제조방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 미분화 중간엽 줄기세포 스페로이드(spheroid)는 상기 분화 중간엽 줄기세포 스페로이드(spheroid)에 비하여 혈관신생(Angiogenesis)에 관련된 단백질 인자 중 WNT5B의 발현이 더 높고, 골형성(Osteogenesis)에 관련된 단백질 인자 중 SMOC1 및 BMP1의 발현이 더 높은 것을 특징으로 하는, 조직 재생용 이식 조성물의 제조방법.

청구항 12

제10항에 있어서,

상기 미분화 중간엽 줄기세포 스페로이드(spheroid)는 상기 분화 중간엽 줄기세포 스페로이드(spheroid)에 비하여 Thy1(CD90), ALCAM(CD166), TFRC(CD71), ITGB1(CD29), CD44, CD9 및 NT5E(CD73) MSC 마커가 더 높게 표현되는 것을 특징으로 하는, 조직 재생용 이식 조성물의 제조방법.

청구항 13

제10항에 있어서,

상기 단계 (a)는 마이크로웰 어레이 배양 용기에서 줄기세포를 부유 배양(suspension culture)함으로써 수행되는 것을 특징으로 하는 조직 재생용 이식 조성물의 제조방법.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 마이크로웰 어레이 배양 용기는 마이크로웰 당 0.005 - 0.05 mm^3 용적을 가지는 마이크로웰 플레이트인 것을 특징으로 하는 조직 재생용 이식 조성물의 제조방법.

청구항 15

제13항에 있어서,

상기 부유배양은 상기 마이크로웰 어레이 배양 용기 내 웰 당 0.5 x 10^6 - 1.5 x 10^6개의 세포를 분주함으로써 이루어지는 것을 특징으로 하는 조직 재생용 이식 조성물의 제조방법.

청구항 16

제10항에 있어서,

상기 단계 (b)는 골 분화 유도인자를 포함하는 배양 배지에서 이루어지는 것을 특징으로 하는 조직 재생용 이식 조성물의 제조방법.

청구항 17

제16항에 있어서,

상기 골 분화 유도인자는 β-글리세로포스페이트(glycerophosphate), 아스코르빈산 및 덱사메타손으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 조직 재생용 이식 조성물의 제조방법.

청구항 18

제10항에 있어서,

상기 미분화 중간엽 줄기세포 스페로이드(spheroid)는 단일층(Monolayer)에서 배양한 미분화 중간엽 줄기세포에 비하여 혈관신생(Angiogenesis) 및 골형성(Osteogenesis)에 관련된 단백질 인자 중 MMP14, TGF-β2, TGF-β3, HGF의 발현이 더 높고, 혈관신생(Angiogenesis)에 관련된 단백질 인자 중 WNT5B의 발현이 더 높으며, 골형성(Osteogenesis)에 관련된 단백질 인자 중 SMOC1 및 BMP1의 발현이 더 높은 것을 특징으로 하는, 조직 재생용 이식 조성물의 제조방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 미분화 줄기세포 스페로이드를 포함하는 이식용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 골형성 단백질(Bone morphogenetic protein, BMP)는 골 기질에서 유래한 단백질로써, 중간엽 줄기세포의 골 분화 촉진을 위한 가장 효과적인 방법으로 인식되고 있다. 최근 임상적으로 가장 많이 사용되는 BMP로는 BMP-2(Infuse®, 메드트로닉)와 BMP-7(OP-1®, 스트라이커바이오텍)이며, 자가 골과 유사한 정도의 유합율을 달성하는 것으로 보고되었다. 국내에서도 시지바이오에서 Novosis®가 개발되어 임상에서 사용 중이다.

[0003] BMP의 2008년 미국 시장규모는 약 6천억원으로 매년 25% 이상 증가 추세를 보이고 있고, 향후 1조원 규모로 성장할 것으로 전망되고 있다. 하지만 BMP는 고가의 단백질로서, 원치 않는 주위 조직에도 골이 형성되며, 고용량으로 사용시 골육종이 형성되는 부작용이 있으며, 특히 단백질이기 때문에 보관 및 관리가 어렵다는 단점이 있다.

[0004] 한편, 줄기세포는 3차원 스페로이드 형성을 통해 세포들의 긴밀한 3차원적 유대형성을 조성할 수 있으며, 이를 통해 생체 내 줄기세포 본래의 기질을 유사하게 구현하여 치료 효능을 크게 강화할 수 있어, 줄기세포 스페로이드 형성을 통해 골 분화능, 치료인자 분비능 등을 개선시킬 수 있으나, GMP 도입이 어려운 배양 플랫폼의 한계 등으로 실용화에 성공한 예는 없다. 이에, 제한된 치료자원인 줄기세포의 치료적 가치를 극대화하기 위해, 실험자 숙련도에 의존하지 않고 누구나 세포 손실 없이 균일하게 세포 수와 크기가 조절된 줄기세포 스페로이드의 대량 수득을 반복 재연할 수 있는 최적화된 공정의 개발이 요구되고 있다.

[0005] 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.

선행기술문헌

비특허문헌

[0006] (비특허문헌 0001) Biotechnology Advances, 34(8): 1427-1441(2016)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명자들은 골 손상 부위에 이식되어 비가역적인 양적 소실이 발생한 골 조직의 재생을 유도함으로써 골 조직 소실로 인한 증상의 발전을 억제하거나, 이를 제거하거나 또는 경감시키는 역할을 할 수 있는 우수한 치료 조성물을 개발하기 위해 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 미분화 중간엽 줄기세포 스페로이드가 분화 중간엽 줄기세포 스페로이드 및 기존 치료제로서 인허가를 받은 단일층(Monolayer)에서 배양한 2D 미분화 중간엽 줄기세포 보다 골재생에 필요한 골유도 및 혈관 형성 촉진 관련 치료 인자 발현 정도가 더 높다는 점을 발견함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0008] 따라서, 본 발명의 목적은 조직 재생용 이식 조성물 및 이의 제조방법을 제공하는 데 있다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 골 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 데 있다.

[0010] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 균일한 크기의 복수개의 미분화 중간엽 줄기세포 스페로이드(spheroid)로부터 유래된 균일한 크기의 복수개의 조직 비드(tissue bead)에 있어서, 상기 조직 비드(tissue bead)는 분화 중간엽 줄기세포 스페로이드(spheroid)이며, 상기 미분화 중간엽 줄기세포 스페로이드(spheroid)는 상기 분화 중간엽 줄기세포 스페로이드(spheroid)에 비하여 혈관신생(Angiogenesis) 및 골형성(Osteogenesis)에 관련된 단백질 인자 중 MMP14, TGF-β2, TGF-β3, HGF의 발현이 더 높고, 골분화 유전자 BMP2 발현이 더 높은 것을 특징으로 하는, 상기 미분화 중간엽 줄기세포 스페로이드(spheroid)를 포함하는 조직 재생용 이식 조성물을 제공한다.

[0012] 상기 미분화 중간엽 줄기세포 스페로이드(spheroid)는 생체적합성 고분자를 포함하는 다공성 지지체에 담지함으로써, 상기 조직 재생용 이식 조성물을 제작할 수 있다.

[0013] 상기 미분화 중간엽 줄기세포 스페로이드(spheroid)는 상기 분화 중간엽 줄기세포 스페로이드(spheroid)에 비하여 혈관신생(Angiogenesis)에 관련된 단백질 인자 중 WNT5B의 발현이 더 높고, 골형성(Osteogenesis)에 관련된 단백질 인자 중 SMOC1 및 BMP1의 발현이 더 높은 것을 특징으로 한다.

[0014] 상기 미분화 중간엽 줄기세포 스페로이드(spheroid)는 상기 분화 중간엽 줄기세포 스페로이드(spheroid)에 비하여 Thy1(CD90), ALCAM(CD166), TFRC(CD71), ITGB1(CD29), CD44, CD9 및 NT5E(CD73) MSC 마커가 더 높게 표현되는 것을 특징으로 한다.

[0015] 상기 마커들은 단일층(Monolayer)에서 배양한 2D 미분화 중간엽 줄기세포에 비해서도 더 많이 발현되는 경향이 확인되어 상기 미분화 중간엽 줄기세포 스페로이드(spheroid)가 미분화 줄기세포로서의 성질이 잘 유지되면서 3차원 스페로이드 구조체로 잘 형성되었음을 알 수 있다.

[0016] 상기 미분화 중간엽 줄기세포 스페로이드(spheroid)는 단일층(Monolayer)에서 배양한 미분화 중간엽 줄기세포에 비하여 혈관신생(Angiogenesis) 및 골형성(Osteogenesis)에 관련된 단백질 인자 중 MMP14, TGF-β2, TGF-β3, HGF의 발현이 더 높고, 혈관신생(Angiogenesis)에 관련된 단백질 인자 중 WNT5B의 발현이 더 높으며, 골형성(Osteogenesis)에 관련된 단백질 인자 중 SMOC1 및 BMP1의 발현이 더 높은 것을 특징으로 한다.

[0018] 본 명세서에서 용어 "조직 비드(tissue bead)"는 줄기세포 또는 전구세포와 같은 미분화 세포의 3차원 스페로이드를 배양하여 스페로이드 단계에서의 크기와 모양을 어느 정도 유지하면서 조직으로 분화됨으로써 균일한 크기의 구슬 모양을 가지게 된 조직의 조각들을 의미한다. 따라서, 본 발명의 조직 비드는 "구형의 조직 단편(spherical tissue fraction)"으로 표현될 수도 있다. 또한, 본 발명의 조직 비드는 분화 중간엽 줄기세포 스페

로이드로 표현될 수도 있다.

[0019] 본 발명의 조직 비드가 균일한 모양과 크기를 가지는 것은 유래하는 세포 응집체의 균일한 모양과 크기에 기인한다. 따라서, 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 조직 비드는 미분화 중간엽 줄기세포 스페로이드로부터 분화된 후 추가적인 응집, 자가 조립 또는 분할이 일어나지 않고 미분화 중간엽 줄기세포 스페로이드로 존재할 당시와 유사한 외형과 크기를 유지한다. 구체적으로는, 본 발명의 조직 비드는 마이크로 수준의 직경을 가지는 구체(sphere)이며, 보다 구체적으로는 50-150㎛의 평균 직경을 가지는 구체이다. 본 발명의 조직 비드는 전반적으로 구슬 모양의 구체에 가깝기는 하나, 상술한 스페로이드와 마찬가지로 기하학적으로 완전한 구형일 필요는 없다.

[0020] 본 발명에 따르면, 본 발명의 조직 비드는 마이크로 수준의 직경을 가지는 다수의 입자 형태로 존재하여 이식 후인 비보 내 미세환경과의 접촉 표면적이 현저하게 증가함으로써 보다 효율적인 조직 생착 및 재생에 기여할 수 있다.

[0021] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명에서 미분화 중간엽 줄기세포 스페로이드를 이루는 세포는 미분화 세포이며, 보다 구체적으로는 줄기세포 또는 전구세포이고, 가장 구체적으로는 줄기세포이다.

[0022] 본 명세서에서, 용어 "전구세포(progenitor cell)"는 줄기세포와 유사하게 특정 유형의 세포로 분화할 수 있는 능력을 갖지만, 줄기세포보다 특이적이고 표적화 되어 있으며, 줄기세포와 달리 분열 횟수가 유한한 미분화 세포를 의미한다. 본 발명에서 이용되는 전구세포는 중간엽 유래의 전구세포일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0023] 본 명세서에서, 용어 "줄기세포(stem cell)"는 조직을 구성하는 각 세포로 분화(differentiation)되기 전 단계의 미분화 세포로서, 특정 분화 자극(환경) 하에서 특정 세포로 분화할 수 있는 능력을 가지는 세포들을 총칭한다. 줄기 세포는 세포분열이 정지된 분화된 세포와는 달리 세포분열에 의해 자신과 동일한 세포를 생산(self-renewal)할 수 있고, 분화 자극이 가해지면 자극의 성격에 따라 다양한 세포로 분화될 수 있는, 분화의 유연성(plasticity)을 가지고 있는 것이 특징이다.

[0024] 본 발명에서 이용되는 줄기세포는 줄기세포의 특성, 즉 미분화, 무한정 증식 및 특정세포로의 분화능을 가져 재생하고자 하는 조직으로 분화 유도가 가능한 세포라면 제한 없이 이용될 수 있다.

[0025] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명에서 이용되는 줄기세포는 중간엽 줄기세포이다.

[0026] 본 명세서에서 용어 "중간엽 줄기세포"는 지방세포, 골세포, 연골세포, 근육세포, 신경세포, 심근세포로의 분화가 가능한 다분화능(multipotency)을 가진 줄기세포를 의미한다. 중간엽 줄기세포는 소용돌이 모양의 형태와 기본적인 세포표면 표식자 CD73(+), CD105(+), CD34(-), CD45(-)의 발현 정도를 통하여 식별될 수 있으며, 다분화능과 함께 면역 반응을 조절하는 기능도 가진다.

[0027] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명에서 이용되는 세포 응집체는 미분화 중간엽 줄기세포 스페로이드(spheroid)이다. 보다 구체적으로는, 상기 미분화 중간엽 줄기세포 스페로이드는 50-150㎛의 평균 직경을 가진다. 보다 더 구체적으로는 70 - 130㎛, 가장 구체적으로는 90 - 110㎛의 평균 직경을 가진다.

[0028] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명에서 이용되는 미분화 중간엽 줄기세포 스페로이드는 200-600개의 세포를 포함한다. 보다 구체적으로는 250-550개의 세포를 포함하며, 보다 더 구체적으로는 300-500개의 세포를 포함하며, 가장 구체적으로는 350-450개의 세포를 포함한다.

[0029] 본 명세서에서 용어 "생체 적합성"은 생체 내에 투여되어 기관의 세포, 조직 또는 체액과 접촉하는 경우 단기적 혹은 장기적 부작용을 일으키지 않는 성질을 의미하며, 구체적으로는 생체조직 또는 혈액과 접촉하여 조직을 괴사시키거나 혈액을 응고시키지 않는 조직적합성(tissue compatibility) 및 항응혈성(blood compatibility) 뿐 아니라 생체 투여 후 일정 기간이 경과한 뒤 소멸되는 생분해성(biodegradability)을 포함하는 의미이다. 본 명세서에서 용어 "생분해성" 은 pH 6-8의 생리적 용액(physiological solution)에 노출되었을 때 자연적으로 분해되는 성질을 의미하며, 구체적으로는 생체 내에서 체액, 분해 효소 또는 미생물 등에 의해서 시간의 경과에 따라 분해될 수 있는 성질을 의미한다.

[0030] 본 발명에서 사용 가능한 생체적합성 또는 생분해성 고분자는 상술한 생체적합성 또는 생분해성을 가지는 고분자라면 어떠한 합성 또는 천연 고분자도 적용될 수 있으며, 예를 들어 젤라틴, 콜라겐, 키토산, 하이아론산, 폴리(발레로락톤), 폴리(하이드록시부틸레이트), 폴리(하이드록시발러레이트), PCL(polycaprolactone), PLLA (poly(L-lactic acid)), PGA (poly(glycolic acid)), PLGA(poly(lactic-co- glycolic acid)), LCL (poly(L-

Lactide-co-ε caprolactone)) 및 이들의 조합을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 구체적으로는 젤라틴, 콜라겐, 키토산, 하이아론산, 폴리(발레로락톤), 폴리(하이드록시부틸레이트), 및 폴리(하이드록시발러레이트)으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상이며, 가장 구체적으로는 젤라틴이다.

[0031] 본 명세서에서 용어 "이식"은 수용자에게 이식된 조직 또는 세포의 기능적 완전성을 유지하려는 목적 하에 공여자로부터 수용자에게 생존 조직, 세포 또는 이들을 수용하는 인공 지지체를 전달하는 과정을 의미한다.

[0032] 본 명세서에서 용어 "지지체(scaffold)"는 생체 세포 또는 조직, 구체적으로는 손상된 조직에서 유래한 세포, 손상된 조직의 회복에 관여하는 세포 또는 이들로부터 분화된 조직의 단편(조직 비드)을 안착시킴으로써 손상 조직의 회복 및 재생을 촉진하기 위한 조직공학(tissue engineering)적 구조체를 의미한다.

[0033] 본 명세서에서 용어 "조직의 안착(tissue attachment)"은 이식되는 조직 비드가 고유의 생물학적 활성을 유지한 채 기질 또는 다른 조직에 직접 또는 간접적으로 흡착하는 것을 의미한다. 구체적으로는, 본 발명의 지지체는 단일 층으로 이루어진 평면 구조일 수도 있고 복수개의 층이 적층된 3차원 구조일 수도 있다.

[0034] 본 발명의 지지체는 일정한 크기의 기공(pore)이 반복적으로 나타나는 다공성(porous) 형태를 띨 수 있는 망(mesh) 형태, 섬유 형태, 해면(sponge) 형태가 제한없이 사용될 수 있다. 보다 구체적으로는, 본 발명에서 이용되는 지지체는 해면(sponge) 형태이다.

[0035] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 골(bone) 조직 재생용 이식 조성물이다. 본 발명의 조성물이 골 조직 재생용으로 사용될 경우 본 발명의 조직 비드는 세포 응집체에 골 분화 자극을 가하여 분화시킨 골 조직 비드(bone tissue bead)이며, 이를 지지체에 담지하여 손상된 골 조직에 부착시킬 경우 골 재생을 촉진할 수 있다.

[0036] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 본 발명의 골(bone) 조직 재생용 이식 조성물을 유효성분으로 포함하는 골 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0037] 본 발명에서 이용되는 골 조직 재생용 이식 조성물에 대해서는 이미 상술하였으므로, 과도한 중복을 피하기 위해 그 기재를 생략한다.

[0038] 본 명세서에서 용어 "골질환"은 외상, 골절, 암세포의 골전이, 파골 세포의 과다 활성을 비롯한 다양한 원인으로 인해 야기되는 골 조직의 손상을 동반하거나 동반할 가능성이 있는 모든 질환을 포함한다. 구체적으로는, 본 발명의 조성물로 예방 또는 치료될 수 있는 골 질환은 예를 들어 골다공증, 골형성 부전증, 치주질환, 골절, 대사성 골염, 섬유성 골염, 무형성 골질환, 골 연화증, 구루병, 고칼슘혈증, 다발성 골수종 및 파제트병을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0039] 본 명세서에서 용어 "예방"은 질환 또는 질병을 보유하고 있다고 진단된 적은 없으나, 이러한 질환 또는 질병에 걸릴 가능성이 있는 대상체에서 질환 또는 질병의 발생을 억제하는 것을 의미한다.

[0040] 본 명세서에서 용어 "치료"는 (a) 질환, 질병 또는 증상의 발전의 억제; (b) 질환, 질병 또는 증상의 경감; 또는 (c) 질환, 질병 또는 증상을 제거하는 것을 의미한다. 본 발명의 조성물은 골 손상 부위에 이식되어 비가역적인 양적 소실이 발생한 골 조직의 재생을 유도함으로써 골 조직 소실로 인한 증상의 발전을 억제하거나, 이를 제거하거나 또는 경감시키는 역할을 한다. 따라서, 본 발명의 조성물은 그 자체로 이들 질환 치료의 조성물이 될 수도 있고, 혹은 골 질환에 대한 치료효과를 가지는 다른 약리성분과 함께 투여되어 상기 질환에 대한 치료 보조제로 적용될 수도 있다. 이에, 본 명세서에서 용어 "치료" 또는 "치료제"는 "치료 보조" 또는 "치료 보조제"의 의미를 포함한다.

[0041] 본 명세서에서 용어 "투여"는 본 발명의 조성물의 치료적 유효량을 대상체에 직접적으로 투여함으로써 대상체의 체내에서 동일한 양이 형성되도록 하는 것을 말하며, "이식" 또는 "주입"과 동일한 의미를 가진다.

[0042] 본 발명에서 용어 "치료적 유효량"은 본 발명의 조성물을 투여하고자 하는 개체에게 치료적 또는 예방적 효과를 제공하기에 충분한 정도로 함유된 조성물의 함량을 의미하며, 이에 "예방적 유효량"을 포함하는 의미이다.

[0043] 본 명세서에서 용어 "대상체"는 제한 없이 인간, 마우스, 래트, 기니아 피그, 개, 고양이, 말, 소, 돼지, 원숭이, 침팬지, 비비 또는 붉은털 원숭이를 포함한다. 구체적으로는, 본 발명의 대상체는 인간이다.

[0044] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, (a) 대상체로부터 분리된 줄기세포를 3차원 배양하여 복수개의 미분화 중간엽 줄기세포 스페로이드(spheroid)를 형성하는 단계; 및 (b) 상기 복수개의 미분화 중간엽 줄기세포 스페로이드를 배양하여 복수개의 골 조직 비드(bone tissue bead)을 생성하는 단계;를 포함하며, 상기 골 조직 비드(bone

tissue bead)는 분화 중간엽 줄기세포 스페로이드(spheroid)이며, 상기 미분화 중간엽 줄기세포 스페로이드(spheroid)는 상기 분화 중간엽 줄기세포 스페로이드(spheroid)에 비하여 혈관신생(Angiogenesis) 및 골형성(Osteogenesis)에 관련된 단백질 인자 중 MMP14, TGF-β2, TGF-β3, HGF의 발현이 더 높고, 골분화 유전자 BMP2 발현이 더 높은 것을 특징으로 하는, 상기 미분화 중간엽 줄기세포 스페로이드(spheroid)를 포함하는 조직 재생용 이식 조성물의 제조방법을 제공한다.

[0045] 본 발명에서 사용되는 줄기세포, 조직 비드, 생체적합성 고분자 및 이를 포함하는 다공성 지지체에 대해서는 이미 상술하였으므로, 과도한 중복을 피하기 위해 그 기재를 생략한다.

[0046] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 단계 (a)는 마이크로웰 어레이 배양 용기에서 줄기세포를 부유 배양(suspension culture)함으로써 수행된다.

[0047] 본 명세서에서 용어 "부유배양(suspension culture)"은 배양 대상세포를 기질(substrate) 등에 고정시키지 않은 채로 배양액 내에서 부유(floating)하는 상태로 배양하는 것을 말한다. 부착(adhesion) 의존성인 줄기세포는 부유 배양 시에 세포 응집을 일으키며, 이러한 응집에 포함되지 못하고 홀로 부유하는 세포는 세포사(apoptosis)를 유발하여 사멸하게 되므로 세포는 그 부착 특성에 맞는 환경이 조성되어야 한다. 본 발명에 따르면, 복수의 웰을 가지는 다중 웰에서 줄기세포를 부유배양 함으로써 웰 크기에 따른 직경의 스페로이드가 웰 수만큼 형성된다. 이에, 본 발명은 동일한 크기와 모양을 가지는 규격화된 줄기세포 스페로이드를 대량으로 수득할 수 있다.

[0048] 보다 구체적으로는, 상기 마이크로웰 어레이 배양 용기는 웰 당 0.005 - 0.05 mm^3의 용적을 가지는 마이크로웰 플레이트이다.

[0049] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 부유배양은 상기 마이크로웰 어레이 배양 용기 내 웰 당 0.5 x 10^6 - 1.5 x 10^6개의 세포를 분주함으로써 이루어진다. 보다 구체적으로는 0.7 x 10^6 - 1.3 x 10^6개의 세포를, 가장 구체적으로는 0.9 x 10^6 - 1.1 x 10^6개의 세포를 분주한다.

[0050] 본 명세서에서 용어 "세포 배양액"은 당, 아미노산, 각종 영양물질, 무기질 등과 같이 세포의 성장 및 증식에 필수적인 요소를 포함하는, 인 비트로에서 세포 성장 및 증식을 위한 혼합물을 의미한다.

[0051] 세포 배양용 배지에 추가적으로 포함될 수 있는 성분은 예를 들어 글리세린, L-알라닌, L-아르기닌 하이드로클로라이드, L-시스테인 하이드로클로라이드-모노하이드레이트, L-글루타민, L-히스티딘 하이드로클로라이드-모노하이드레이트, L-리신 하이드로클로라이드, L-메티오닌, L-프롤린, L-세린, L-트레오닌, L-발린, L-아스파라긴-모노하이드레이트, L-아스파르트산, L-시스틴 2HCl, L-글루탐산, L-이소류신, L-류신, L-페닐알라닌, L-트립토판, L-티로신 디소듐염 디하이드레이트, i-이노시톨, 티아민 하이드로클로라이드, 나이아신아미드, 피리독신 하이드로클로라이드, 바이오틴, D-판토텐산칼슘, 엽산, 리보플라빈, 비타민 B12, 염화나트륨(NaCl), 탄산수소나트륨($NaHCO_3$), 염화칼륨(KCl), 염화칼슘($CaCl_2$), 인산수소나트륨 모노하이드레이트(NaH_2PO_4-H_2O), 황산동 펜타하이드레이트($CuSO_4$-$5H_2O$), 황산제이철 헵타하이드레이트($FeSO_4$-$7H_2O$), 염화마그네슘(무수), 황산마그네슘($MgSO_4$), 인산수소이나트륨(Na_2HPO_4), 황산아연 헵타하이드레이트($ZnSO_4$-$7H_2O$), D-글루코즈(덱스트로즈), 소듐 피루베이트, 히포크산틴 Na, 리놀렌산, 리포산, 푸트레신 2HCl 및 티미딘을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0052] 본 발명에 따른 세포 배양용 배지는 인위적으로 제조하여 사용하거나, 혹은 상업적으로 시판되는 것을 구입하여 사용할 수 있다. 상업적으로 시판되고 있는 배양용 배지의 예는 IMDM(Iscove's Modified Dulbecco's Medium), αMEM(Alpha Modification of Eagle's Medium), F12(Nutrient Mixture F-12) 및 DMEM/F12(Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12)를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0053] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 단계 (b)는 골 분화 유도인자를 포함하는 배양 배지에서 이루어진다.

[0054] 따라서 골분야 유도인자를 포함하는 배양 배지는 줄기세포로부터 스페로이드를 형성하는 단계에서만 사용되거나, 혹은 스페로이드 형성 후 골 조직 비드로 분화하는 단계에서만 사용되거나, 혹은 양 단계 모두에서 사용될 수 있다.

[0055] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 단계 (b)에서 사용되는 골 분화 유도인자는 β-글리세로포스페이트

(glycerophosphate), 아스코르빈산, 및 덱사메타손으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상이다. 보다 구체적으로는 β-글리세로포스페이트, 아스코르빈산 및 덱사메타손이다.

[0056] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 단계 (a)는 3 - 5일 동안 배양하고, 상기 단계 (b)는 줄기세포 스페로이드를 7 - 18일 동안 배양함으로써 수행된다. 보다 구체적으로는 상기 단계 (b)는 7 - 16일 동안 배양하고, 보다 더 구체적으로는 7 - 15일 동안 배양한다.

발명의 효과

[0057] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0058] (a) 본 발명은 미분화 줄기세포 스페로이드를 포함하는 조직 재생용 이식 조성물 및 이의 제조방법을 제공한다.

[0059] (b) 본 발명은 미분화 줄기세포 스페로이드를 이용함으로써, 세포외 기질을 활발하게 분비하면서 인 비보 미세환경과의 접촉 표면적도 극대화하여, 생착률과 조직 재생능이 현저하게 우수한 재생 치료용 인체 삽입 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

[0060] (c) 본 발명에서 액체 크로마토그래피-질량 분광분석(LC-MS)에 의해 얻어진 MSC-스페로이드의 단백질 프로파일링 데이터는 골 재생을 위한 MSC-스페로이드의 확인과 역가에 대한 신뢰할 수 있는 표준을 제공할 수 있다.

[0061] (d) 본 발명에 따르면, 미분화 중간엽 줄기세포 스페로이드(spheroid)가 단일층(Monolayer)에서 배양한 미분화 중간엽 줄기세포와 비교하여 hMSC의 주요 마커가 동등 또는 그 이상 수준으로 발현되기 때문에, 기존의 MSC 치료제로서 인허가 기준을 만족하고 있는 종래의 단일층(Monolayer)에서 배양한 미분화 중간엽 줄기세포 치료제를 대체하면서도 보다 우수한 치료제를 제공할 수 있으며, 또한 임상 진입에도 유리한 효과가 있다. 또한, 본 발명의 미분화 중간엽 줄기세포 스페로이드(spheroid)는 기존의 MSC 치료제로서 인허가 기준을 만족하고 있는 종래의 단일층(Monolayer)에서 배양한 미분화 중간엽 줄기세포 치료제보다 골재생 효능은 월등히 우수한 효과가 있다.

[0062] (e) 미분화 중간엽 줄기세포 스페로이드의 경우 배양 기간이 3-5일, 즉 4일 정도로서, 7-18일 이상이 소요되는 분화 중간엽 줄기세포 스페로이드보다 생산 기간이 단축될 수 있으며, 이로 인한 비용 절감 효과도 우수하다. 또한, 본 발명에서 미분화 중간엽 줄기세포 스페로이드(spheroid)는 분화 중간엽 줄기세포 스페로이드(spheroid)에 비하여 혈관신생(Angiogenesis) 및 골형성(Osteogenesis)에 관련된 단백질 인자의 발현이 더 크기 때문에 치료제로서의 효과가 보다 우수할 수 있다. 또한, 분화 중간엽 줄기세포 스페로이드를 MSC 치료제로 사용하기 위하여는 본 발명의 미분화 중간엽 줄기세포 스페로이드에 비하여 임상 인허가 과정이 더욱 복잡하고, 더 자세한 QC 및 안전성 시험 결과를 요구하기 때문에, 본 발명의 미분화 중간엽 줄기세포 스페로이드의 치료제 적용 가능성이 보다 높다고 할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0063] 도 1은 마이크로웰 플랫폼을 이용하여 대량 형성한 균일한 줄기세포 스페로이드를 보여주는 그림이다.

도 2는 2차원 배양된 줄기세포와 미분화 및 분화 3차원 줄기세포 스페로이드의 골 분화 유전자 발현양상을 비교한 qPCR 실험결과로서, 7일 배양 및 15일 배양 에서 BMP-2 발현 양상을 각각 나타낸다.

도 3은 2차원 배양된 줄기세포와 미분화 및 분화 3차원 줄기세포 스페로이드의 골 분화 유전자 발현양상을 비교한 qPCR 실험결과로서, 7일 배양 (도 3A) 및 15일 배양 (도 3B)에서 COL1, ALP, RUNX2, OSX 및 OCN 발현 양상을 각각 나타낸다.

도 4는 (A, B, C, D) 혈관 신생에 모두 관여하는 각 그룹별 주요 단백질 표현에 대한 열 지도가 풍부한 비율의 로그 스케일로 각각 비교 제시한 그림이고, (E) 각 그룹별 발현양이 우수한 단백질 인자를 나타낸다.

도 5는 (A, B, C, D) 혈관 신생 및 골형성 관련 각 그룹별 주요 단백질 표현에 대한 열 지도가 풍부한 비율의 로그 스케일로 각각 비교 제시한 그림이고, (E) 각 그룹별 발현양이 우수한 단백질 인자를 나타내고, (F, G, H, I) 골형성 관련 각 그룹별 주요 단백질 표현에 대한 열 지도가 풍부한 비율의 로그 스케일로 각각 비교 제시한 그림이고, (J) 각 그룹별 발현양이 우수한 단백질 인자를 나타낸다.

도 6은 (A) hMSC의 주요 마커 표현에 대한 열 지도, (B, C, D) 각 그룹별 주요 마커에 대한 로그 스케일로 비교한 상대적 발현양 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0064] 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.

[0066] **실시예**

[0067] **실시예 1: 스페로이드의 제작 및 특성 분석**

[0068] 세포배양

[0069] 세포는 인간 골수유래 중간엽 줄기세포(hMSC, Lonza, Switzerland)를 37℃, 5% CO_2 배양기에서 배양을 하였다. hMSC를 키우기 위한 배지는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Low Glucose, Gibco, USA)에 10% FBS(Fetal Bovine Serum, Gibco, USA)와 1% Anti-Anti(Antibiotics-Antimycotic, Gibco, USA)를 첨가한 배지를 사용하였으며, 배지는 3일마다 교환하면서 유지 및 배양을 하였고 계대수는 7을 넘기지 않았다. 또한 골 분화 배지의 경우, α-MEM (Minimum Essential Medium-Alpha, Gibco, USA)에 10% FBS와 1% Anti-Anti를 추가한 배지에 추가적으로 10mM β-글리세로포스페이트(Sigma, USA)와 50μM L-아스코르빅-2-포스페이트(Sigma, USA), 그리고 0.1μM 덱사메타손(Sigma, USA)을 넣어 사용했다. 골 분화 배지는 배지 교환이나 hMSC를 분주하기 직전에 만들어 사용했다.

[0071] 스페로이드의 제작

[0072] 마이크로웰 어레이에 hMSC를 분주하고 스페로이드를 형성하기 위해, 상용화된 6-웰 플레이트인 EZ_Sphere(Reprocell, USA)를 사용하였다. hMSC를 분주하기 전, 무혈청 DMEM으로 마이크로웰 내부를 세척하고 기포를 제거한 뒤 사용하였다. hMSC를 마이크로웰에 분주하기 위해, hMSC를 TrypLE Express(Gibco, USA)로 트립신화하였고, 0.4% 트립신 블루로 염색하여 혈구계수기(Hematocytometer)를 이용하여 세포 수를 파악했다. hMSC는 일반 hMSC 배양 배지 혹은 골 분화 배지로 균질하게 부유시킨 다음, 1.0 x 10^6 세포/웰로 분주하였고, 최종 골 분화 배지의 양은 4mL/웰이 되도록 하였다. 골 분화 배지는 3일마다 교환하였으며, 스페로이드가 움직이지 않도록 최대한 조심스럽게 3mL만 피펫으로 제거를 한 뒤, 신선한 골 분화 배지 3mL를 넣는 방식으로 배지를 교환하였다. 스페로이드는 광학현미경(Optical Microscope, CKX53 Olympus, Japan)을 이용하여 관찰하였다(도 1).

[0073] hMSC-스페로이드의 대량생산은 GMP 호환뿐만 아니라 상업적으로 이용 가능한 마이크로웰 어레이 시스템을 사용하여 효율적으로 이루어졌다. 마이크로웰 어레이 시스템은 6-웰 플레이트를 기반으로 설계되었다. 6-웰 판의 웰은 직경 500 μm, 깊이 200 μm의 2,400개의 마이크로웰을 포함하고 있으며, 따라서 단일 마이크로웰 어레이 시스템을 사용하여 14,400개의 hMSC-스페로이드를 한 번에 생산할 수 있다.

[0074] 마이크로웰 어레이의 고유한 구성은 표면상의 셀 부착에 대한 완전한 저항과 시드 후 마이크로웰에 끼이지 않는 셀에 대한 힘든 세척 단계에서 셀 손실을 방지할 수 있도록 지원할 수 있다. 따라서, 6-웰 플레이트의 각 웰에 처음 시드된 hMSC 중 1 x 10^6은 각 스페로이드의 크기와 셀 번호를 정밀하게 제어함에 따라 완전히 2,400개의 hMSC-스페로이드로 형성되었다 (도 1A와 1B에 나온 직경 약 100μm 크기의 ~417 셀/스페이로이드).

[0075] hMSC-스페로이드는 hMSC 성장배지('3D-undiff'라는 그룹) 또는 골생배지('3D-diff'라는 그룹)에서 7일 동안 배양되었지만, 초기에는 크기와 세포수가 규제된 대로 유지되었으며, FBS 1을 사용한 MSC-스페로이드의 이전 연구와 일치하였다.

[0076] hMSC-스페로이드의 크기 압축은 유의한 변화 차이 없이 4일차에 비해 7일에 관찰되는 경향이 있었다(도 1B). 셀 생존 분석 결과, 3D-diff 및 3D-undiff 그룹에서 배양된 90% 이상의 세포가 배양 기간 7일(도 1D와 E) 동안 생존 가능한 것으로 조사되었다.

[0077] 본 발명의 FACS 분석에 따르면 3D-undiff 그룹의 세포 중 95% 이상에서 양성 hMSC 마커로 알려져 있는 CD44와 CD73가 2D 배양 플레이트에서 3일간 배양된 hMSC('2D-undiff'이라는 그룹)와 유사한 정도로 표현되었다. 반대로

3D-오스테오 그룹은 이들을 각각 86.7%와 43.4%로 현저히 낮은 수준으로 표현했는데, 이는 7일간의 골형성 매개 치료로 골형성 분화가 촉발된 것으로 나타났다. CD45와 CD34와 같은 음성의 hMSC-마커 표현형에서 모든 그룹은 2%보다 낮은 음의 결과를 나타냈다(도 1F).

[0078] 미분화(3D-undiff) 및 골 분화(3D-diff) 조건에서 배양된 MSC-스페로이드를 수집하여 MSC 성장 배지를 사용하여 단일층(2D-undiff)에서 배양한 종래 MSC와 4일 동안 비교하였다. 샘플의 철저한 단백질 프로파일링 데이터를 얻기 위해 LC-MS 분석을 수행했으며 MSC-스페로이드의 확인과 역가가 정량적으로 조사되었다.

[0080] 스페로이드 크기 측정

[0081] 스페로이드를 모으기 위해 7일 또는 15일간 미분화 혹은 골 분화된 스페로이드를 300rpm에 3분간 원심분리하였다. 이후 PBS로 부유시킨 다음 48-웰 (Non-adherent Cell Culture Plate(SPL, South Korea)에 분주한 다음 광학현미경을 이용하여 40x의 배율에서의 스페로이드 사진을 촬영하였다. 이후 크기는 ImageJ 프로그램을 이용하여 스페로이드의 크기를 측정하였으며, 최소 50개 이상의 무작위의 스페로이드를 선택하여 직경을 측정하였다.

[0083] 스페로이드 세포 생존 분석 (Live & Dead Assay)

[0084] 배양된 스페로이드의 생존여부를 확인하기 위해 Live & Dead 어세이 (Thermo, USA)를 수행하였다. 스페로이드를 수집하기 위해 7일 또는 15일간 골 분화된 스페로이드를 300rpm에 3분간 원심 분리하였다. Live & Dead 어세이에서 제시한 방법대로 만든 형광 용액을 넣고 30분간 37℃에서 반응시킨 뒤 형광현미경(Fluorescent Microscope, CKX53, Olympus, Japan)을 이용하여 CalceinAM(살아있는 세포)과 EthD-1(죽은 세포)을 관찰 및 촬영하였다.

[0086] 스페로이드의 골분화능 분석 (Quantitative Polymerase Chain Reaction, qPCR)

[0087] 골 분화 배지에 배양한 스페로이드의 골 분화능을 평가하기 위해 7일, 15일간 스페로이드를 배양한 다음 Trizol(Invitrogen, USA)에 녹인 후 RNA을 추출하였다. 이후 역전사 효소(TOYOBO, Japan)를 이용하여 cDNA를 합성한 뒤 실시간 중합효소연쇄반응(Quantitative Polymerase Chain Reaction, qPCR, Bio-Rad, USA)을 실시하였으며, 골 분화를 확인하기 위한 필수적인 마커 유전자들을 검출하였다(표 1). 각 유전자의 발현은 2D_hMSC Day 3의 유전자의 상대적인 양으로 수치화 하여 나타내었다 (도 2 및 도 3).

[0088] 2D 배양 그룹과 3D 배양 그룹 간의 비교에서, BMP2, RUNX2, OSX, ALP와 같은 골 형성 유전자의 대부분은 배양 기간 동안 3D 배양 그룹에서 고도로 조절되는 것으로 보였다. 특히 BMP2 유전자 발현량은 3D-undiff 그룹의 경우, 2D 배양 그룹 및 3D-diff 그룹에 비해 수백 내지 수천 배 이상 상향 조절되었음을 알 수 있다(도 2).

표 1

유전자	프라이머 서열 (5`→3`)		NCBI 접근번호
ALP	정방향	GGA ACT CCT GAC CCT GAC C	NM_000478
	역방향	TCC TGT TCA GCT CGT ACT GC	
COL1A1	정방향	AGG GCT CCA ACG AGA TCG AGA	NM_000088
	역방향	TAC AGG AAG CAG ACA GGG CCA	
RUNX2	정방향	GCA GTT CCC AAG CAT TTC AT	NM_001015051
	역방향	CAC TCT GGC TTT GGG AAG AG	
OSX	정방향	CTG GCA CAC AGG CGA GAG GC	NM_001173467
	역방향	GGA GCA GAG CAG CAG GTG AA	
OCN	정방향	GCA GCG AGG TAG TGA AGA GAC	NM_199173
	역방향	AGC AGA GCG ACA CCC TA	
BMP-2	정방향	CCT CAG CAG AGC TTC AGG TT	NM_001200
	역방향	TGC TTG CAT TCT GAT TCA CC	
GAPDH	정방향	CCG CAT CTT CTT TTG CGT CG	NM_002046
	역방향	CCC AAT ACG ACC AAA TCG GTT G	

[0090]

[0092] 한편, 모든 그룹의 주요 단백질 표현에 대한 열 지도가 풍부한 비율의 로그 스케일로 제시하였으며, TGF-β 및 MSC 특정 단백질의 정량적 도트 플롯을 나타내었다 (도 4 내지 도 5). LC-MS를 통해 약 4,200개의 단백질을 분석했으며, 그 중 MSC별, 면역 관련, ECM 관련, 통합, 혈관 생성/골 형성, 신호 전달 등 6개 범주의 대표적인 단백질을 이번 연구를 위해 선정했다.

[0093] 본 발명의 일 실시형태에 따르면, 상기 미분화 중간엽 줄기세포 스페로이드(spheroid)(3D-undiff)는 상기 분화 중간엽 줄기세포 스페로이드(spheroid)(3D-diff)에 비하여 혈관신생(Angiogenesis) 및 골형성(Osteogenesis)에 관련된 단백질 인자 중 MMP14, TGF-β2, TGF-β3, HGF의 발현이 더 높은 것을 알 수 있다. 즉, 프로파일링된 단백질 중 MMP14, TGF-β2, TGF-β3, HGF은 미분화 중간엽 줄기세포 스페로이드(spheroid)(3D-undiff)가 다른 그룹(역가에 대한 표준)에 비해 상당히 높은 수준으로 발현되는 것으로 나타났다(도 5A-5E).

[0094] 상기 미분화 중간엽 줄기세포 스페로이드(spheroid)는 상기 분화 중간엽 줄기세포 스페로이드(spheroid)에 비하여 혈관신생(Angiogenesis)에 관련된 단백질 인자 중 WNT5B의 발현이 더 높고(도 4A-4E), 골형성(Osteogenesis)에 관련된 단백질 인자 중 SMOC1 및 BMP1의 발현이 더 높은 것을 특징으로 한다(도 5F-5J).

[0095] 상기 미분화 중간엽 줄기세포 스페로이드(spheroid)는 단일층(Monolayer)에서 배양한 미분화 중간엽 줄기세포에 비하여 혈관신생(Angiogenesis) 및 골형성(Osteogenesis)에 관련된 단백질 인자 중 MMP14, TGF-β2, TGF-β3, HGF의 발현이 더 높고, 혈관신생(Angiogenesis)에 관련된 단백질 인자 중 WNT5B의 발현이 더 높으며, 골형성(Osteogenesis)에 관련된 단백질 인자 중 SMOC1 및 BMP1의 발현이 더 높은 것을 특징으로 한다(도 4 내지 도 5).

[0097] 도 6을 참조하면, 유량 세포측정 분석(확인 및 순도) 결과이며, 유량 세포측정학 분석은 3D-undiff 그룹의 MSC가 MSC 치료를 위해 예비적으로 설정된 MSC 특성의 확인과 순도 표준을 만족함을 나타낸다.

[0098] 상기 미분화 중간엽 줄기세포 스페로이드(spheroid)(3D-undiff)는 상기 분화 중간엽 줄기세포 스페로이드(spheroid)(3D-diff)에 비하여 CD73 및 CD44 MSC 마커가 더 높게 표현되는 것을 알 수 있다.

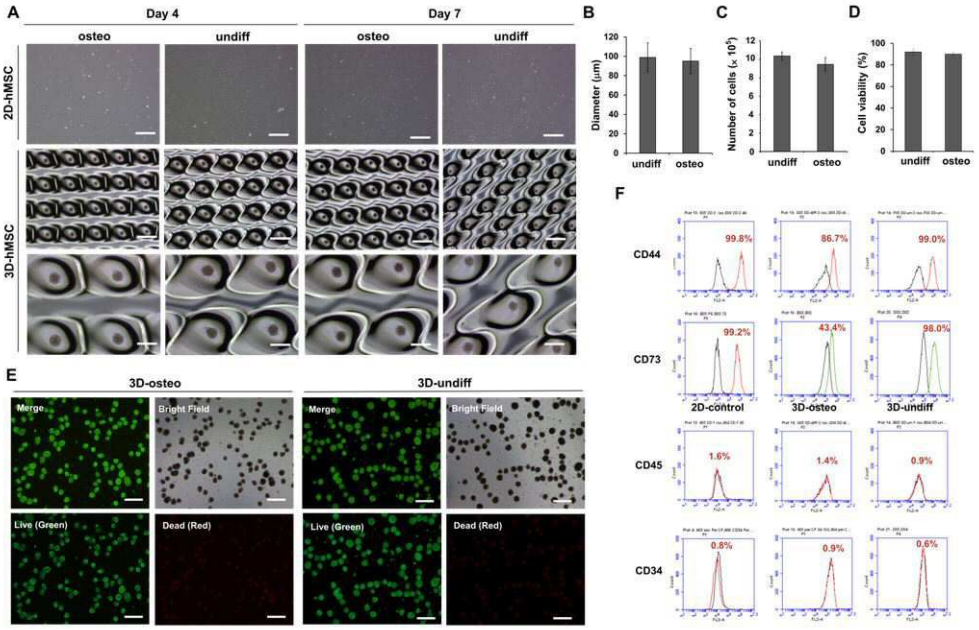
[0099] 또한, 상기 미분화 중간엽 줄기세포 스페로이드(spheroid)(3D-undiff)는 단일층(Monolayer)에서 배양한 미분화 중간엽 줄기세포(2D-undiff)에 비하여 CD73 및 CD44 MSC 마커가 더 높게 표현되는 것을 알 수 있다.

[0101] 본 발명의 일 실시형태에 따르면, 미분화 중간엽 줄기세포 스페로이드의 경우 배양 기간이 3-5일, 즉 4일 정도로서, 7-18일 이상이 소요되는 분화 중간엽 줄기세포 스페로이드보다 생산 기간이 단축될 수 있으며, 이로 인한 비용 절감 효과도 우수하다. 또한, 본 발명에서 미분화 중간엽 줄기세포 스페로이드(spheroid)는 분화 중간엽 줄기세포 스페로이드(spheroid)에 비하여 혈관신생(Angiogenesis) 및 골형성(Osteogenesis)에 관련된 단백질 인자의 발현이 더 크기 때문에 치료제로서의 효과가 보다 우수할 수 있다. 또한, 분화 중간엽 줄기세포 스페로이드를 MSC 치료제로 사용하기 위하여는 본 발명의 미분화 중간엽 줄기세포 스페로이드(spheroid)에 비하여 임상 인허가 과정이 더욱 복잡하고, 더 자세한 QC 및 안전성 시험 결과를 요구하기 때문에, 본 발명의 미분화 중간엽 줄기세포 스페로이드(spheroid)의 치료제 적용 가능성이 보다 높다고 할 수 있다.

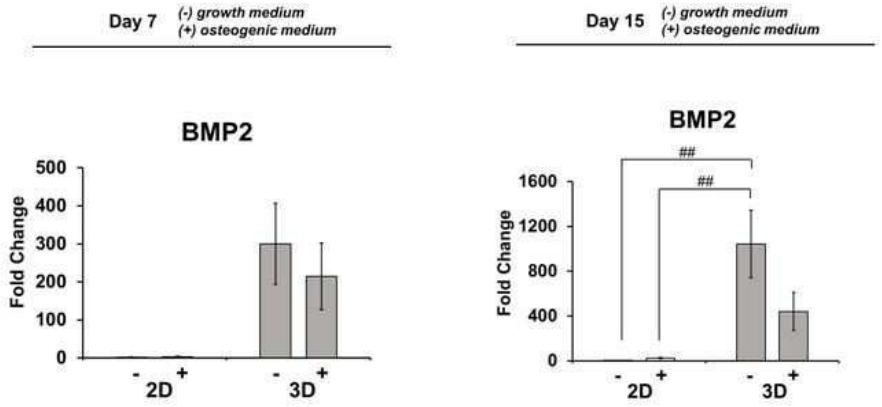
[0103] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

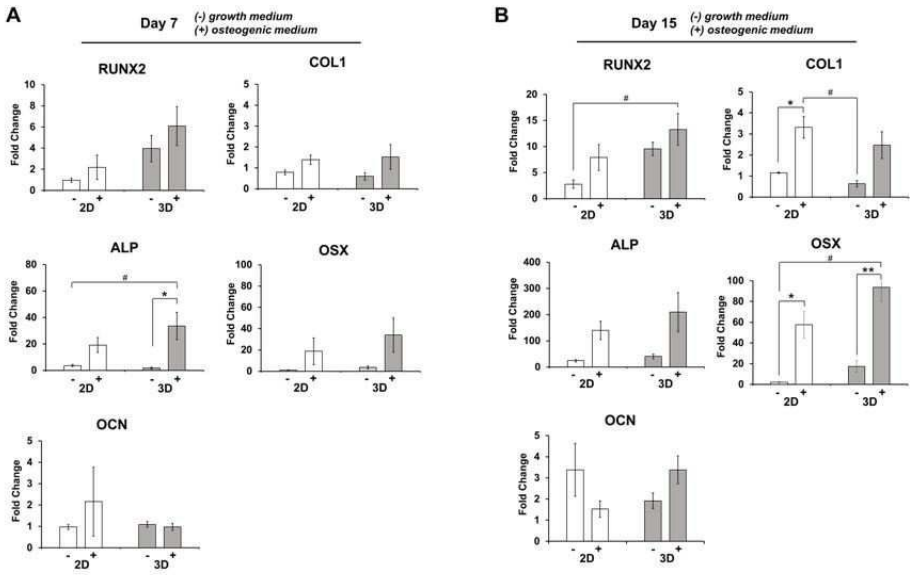
도면1


A
Day 4
Day 7
osteo
undiff
osteo
undiff
2D-hMSC
3D-hMSC
B
Diameter (μm)
undiff
osteo
C
Number of cells (x 10⁵)
undiff
osteo
D
Cell viability (%)
undiff
osteo
E
3D-osteo
3D-undiff
Merge
Bright Field
Live (Green)
Dead (Red)
F
CD44
CD73
CD45
CD34
99.8%
86.7%
99.0%
99.2%
43.4%
98.0%
1.6%
1.4%
0.9%
0.8%
0.9%
0.6%
2D-control
3D-osteo
3D-undiff

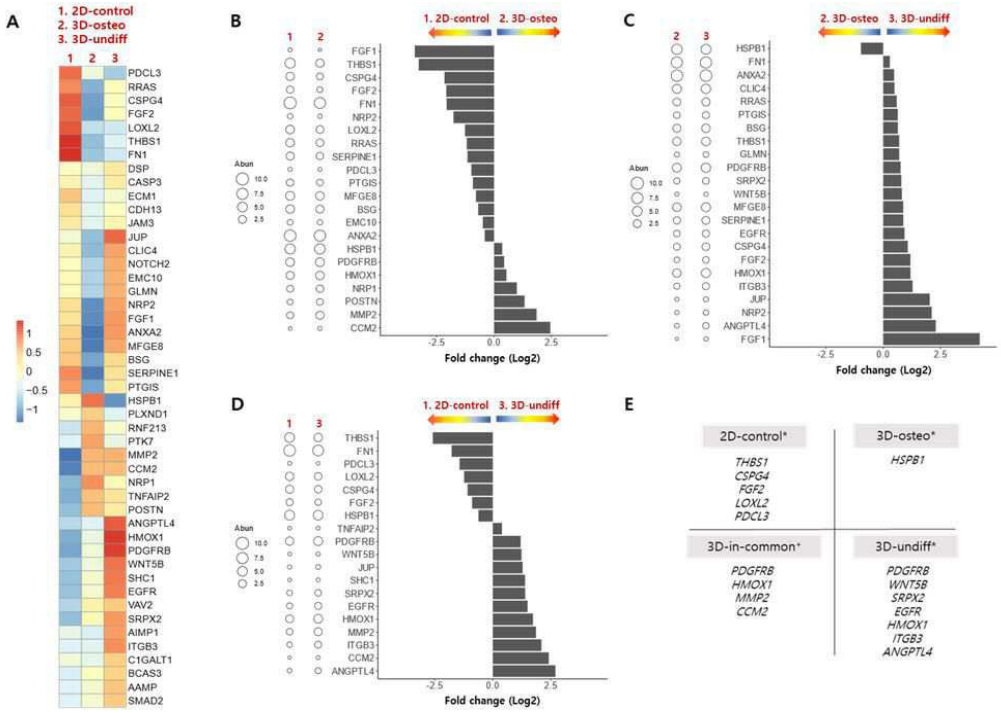
도면2


Day 7
(-) growth medium
(+) osteogenic medium
BMP2
Fold Change
500
400
300
200
100
0
-
+
2D
3D
Day 15
(-) growth medium
(+) osteogenic medium
BMP2
##
##
Fold Change
1600
1200
800
400
0
2D
3D

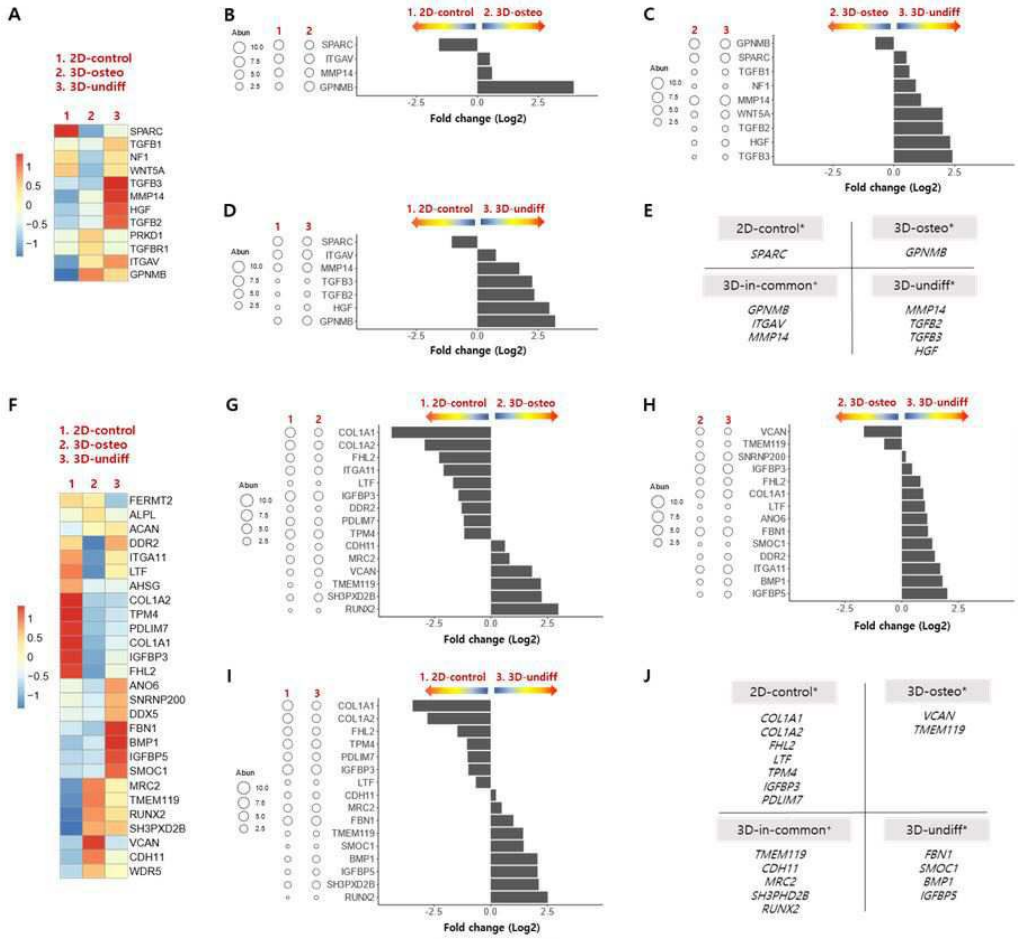
도면3


A
Day 7
(-) growth medium
(+) osteogenic medium
RUNX2
COL1
ALP
OSX
OCN
Fold Change
2D
3D
B
Day 15
(-) growth medium
(+) osteogenic medium
RUNX2
COL1
ALP
OSX
OCN
Fold Change
2D
3D

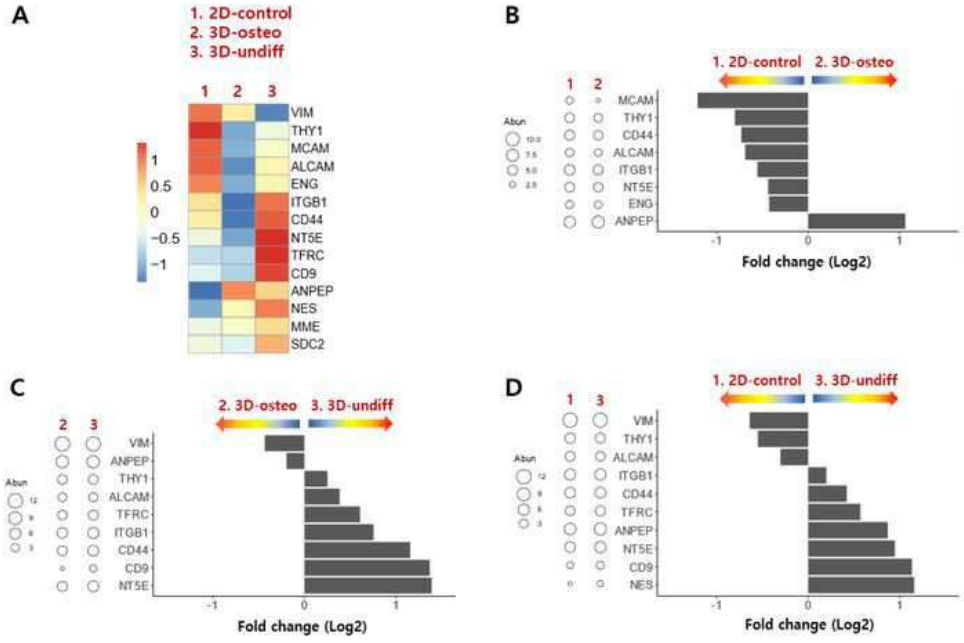
도면4


A
1. 2D-control
2. 3D-osteo
3. 3D-undiff
PDCL3
RRAS
CSPG4
FGF2
LOXL2
THBS1
FN1
DSP
CASP3
ECM1
CDH13
JAM3
JUP
CLIC4
NOTCH2
EMC10
GLMN
NRP2
FGF1
ANXA2
MFGE8
BSG
SERPINE1
PTGIS
HSPB1
PLXND1
RNF213
PTK7
MMP2
CCM2
NRP1
TNFAIP2
POSTN
ANGPTL4
HMOX1
PDGFRB
WNT5B
SHC1
EGFR
VAV2
SRPX2
AIMP1
ITGB3
C1GALT1
BCAS3
AAMP
SMAD2
B
1. 2D-control
2. 3D-osteo
Fold change (Log2)
C
2. 3D-osteo
3. 3D-undiff
Fold change (Log2)
D
1. 2D-control
3. 3D-undiff
Fold change (Log2)
E
2D-control*
THBS1
CSPG4
FGF2
LOXL2
PDCL3
3D-osteo*
HSPB1
3D-in-common*
PDGFRB
HMOX1
MMP2
CCM2
3D-undiff*
PDGFRB
WNT5B
SRPX2
EGFR
HMOX1
ITGB3
ANGPTL4

도면5


A
1. 2D-control
2. 3D-osteo
3. 3D-undiff
SPARC
TGFB1
NF1
WNT5A
TGFB3
MMP14
HGF
TGFB2
PRKD1
TGFBR1
ITGAV
GPNMB
B
1. 2D-control 2. 3D-osteo
Fold change (Log2)
C
2. 3D-osteo 3. 3D-undiff
Fold change (Log2)
D
1. 2D-control 3. 3D-undiff
Fold change (Log2)
E
2D-control*
SPARC
3D-osteo*
GPNMB
3D-in-common*
GPNMB
ITGAV
MMP14
3D-undiff*
MMP14
TGFB2
TGFB3
HGF
F
1. 2D-control
2. 3D-osteo
3. 3D-undiff
FERMT2
ALPL
ACAN
DDR2
ITGA11
LTF
AHSG
COL1A2
TPM4
PDLIM7
COL1A1
IGFBP3
FHL2
ANO6
SNRNP200
DDX5
FBN1
BMP1
IGFBP5
SMOC1
MRC2
TMEM119
RUNX2
SH3PXD2B
VCAN
CDH11
WDR5
G
1. 2D-control 2. 3D-osteo
Fold change (Log2)
H
2. 3D-osteo 3. 3D-undiff
Fold change (Log2)
I
1. 2D-control 3. 3D-undiff
Fold change (Log2)
J
2D-control*
COL1A1
COL1A2
FHL2
LTF
TPM4
IGFBP3
PDLIM7
3D-osteo*
VCAN
TMEM119
3D-in-common*
TMEM119
CDH11
MRC2
SH3PHD2B
RUNX2
3D-undiff*
FBN1
SMOC1
BMP1
IGFBP5

도면6


A
1. 2D-control
2. 3D-osteo
3. 3D-undiff
VIM
THY1
MCAM
ALCAM
ENG
ITGB1
CD44
NT5E
TFRC
CD9
ANPEP
NES
MME
SDC2
B
1. 2D-control 2. 3D-osteo
Fold change (Log2)
C
2. 3D-osteo 3. 3D-undiff
Fold change (Log2)
D
1. 2D-control 3. 3D-undiff
Fold change (Log2)