

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구  
국제사무국

(43) 국제공개일

2020년 5월 22일 (22.05.2020)



(10) 국제공개번호

WO 2020/101185 A1

(51) 국제특허분류:

C12N 5/0775 (2010.01)

A61P 9/10 (2006.01)

A61K 35/28 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2019/013480

(22) 국제출원일:

2019년 10월 15일 (15.10.2019)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2018-0141454 2018년 11월 16일 (16.11.2018) KR

(71) 출원인: 고려대학교 산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) [KR/KR]; 02841 서울시 성북구 안암로 145, Seoul (KR).

(72) 발명자: 임도선 (LIM, Do-Sun); 06281 서울시 강남구 선릉로 206 101-204, Seoul (KR). 주형준 (JOO, Hyung Joon); 06289 서울시 강남구 선릉로 120 10-1405, Seoul (KR). 김중호 (KIM, Jong-Ho); 02751 서울시 성북구 화랑로 76 101-607, Seoul (KR).

(74) 대리인: 이치영 등 (LEE, Cheo Young et al.); 06133 서울시 강남구 테헤란로 123 11층, 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, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, 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)

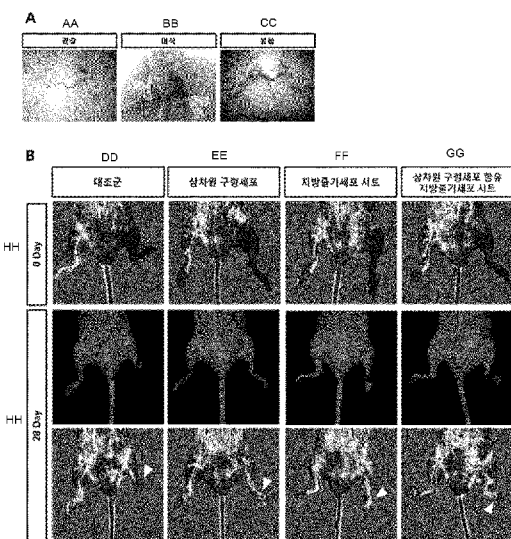
지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

(54) Title: ADIPOSE-DERIVED STEM CELL SHEET FOR TRANSPLANTATION HAVING INCREASED ANGIOGENESIS THROUGH THREE-DIMENSIONAL CO-CULTURE, AND METHOD FOR PRODUCING SAME

(54) 발명의 명칭: 삼차원 공배양을 통한 신생혈관능이 증가된 이식용 지방줄기세포 시트 및 이의 제조방법



AA ... Ligate  
BB ... Transplant  
CC ... Suture  
DD ... Control group  
EE ... Three-dimensional spherical cells  
FF ... Adipose-derived stem cell sheet  
GG ... Adipose-derived stem cell sheet containing three-dimensional spherical cells  
HH ... Day

(57) Abstract: The present invention relates to: an adipose-derived stem cell sheet containing three-dimensional spherical cells, wherein three-dimensional spherical cells of adipose-derived stem cells are co-cultured on a sheet composed of the adipose-derived stem cells; and a method for producing same. When the adipose-derived stem cell sheet containing three-dimensional spherical cells according to the present invention is transplanted into a patient having an ischemic disease, a high stem cell engraftment rate and angiogenesis are exhibited, and thus the adipose-derived stem cell sheet is considered to be effective for treating ischemic diseases.

(57) 요약서: 지방줄기세포로 구성된 시트 상에 지방줄기세포의 삼차원 구형세포가 공배양되어 있는 것을 특징으로 하는 삼차원 구형세포를 함유하는 지방줄기세포 시트 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 본 발명의 삼차원 구형세포를 함유하는 지방줄기세포 시트를 허혈성 질환 환자에 이식하는 경우, 높은 줄기세포 생존율과 신생혈관능을 나타내어, 허혈성 질환 치료에 효과적일 것으로 판단된다.

WO 2020/101185 A1

## 명세서

### 발명의 명칭: 삼차원 공배양을 통한 신생혈관능이 증가된 이식용 지방줄기세포 시트 및 이의 제조방법

#### 기술분야

- [1] 본 발명은 신생혈관능이 증가된 이식용 지방줄기세포 시트에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 지방줄기세포로 구성된 시트 상에 지방줄기세포의 삼차원 구형세포가 공배양되어 있는 것을 특징으로 하는 삼차원 구형세포를 함유하는 지방줄기세포 시트 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

[2]

#### 배경기술

- [3] 줄기세포는 어떤 조직으로든 분화할 수 있는 능력을 가진 세포를 말하며 미분화 세포로써 각각의 적절한 환경적, 화학적 및 물리적 조건을 제공해주면, 다양한 세포로의 분화를 증대시킬 수 있다. 이러한 줄기세포의 분화 능력 및 환경적, 화학적 및 물리적 조건을 변화시키는 선택적 재생치료가 활발히 연구되고 있다.
- [4] 대표적으로 지방줄기세포는 같은 다분화능을 가지고 있어 다양한 조직이나 기관의 특이적인 세포로 분화할 수 있는 줄기세포 중 하나로서, 조직의 성장과 발달 및 성체 조직의 유지와 재생을 유도하는 기능을 가지고 있다(A. Miranville *et al.*, *Circulation*, 110:349, 2004). 지방줄기세포는 인간 배아에서 추출한 배아 줄기세포와 달리, 성체의 조직에서 추출하기 때문에 윤리적인 문제가 적으며 자가재생능이 뛰어나고 지방, 골, 연골, 혈관내피, 심장근세포 등 다분화능을 가지고 있다. 또한, 지방줄기세포는 다양한 사이토카인을 비롯한 성장인자 분비를 통해 주변세포의 분화나 증식에 중요한 역할을 하고 있다(Kim *et al.*, *Tissue Eng Part A*. 23:1-11, 2017).
- [5] 손상된 장기 및 조직재생을 위하여 줄기세포를 이식한 후, 손상의 회복되는 케이스가 보고되고 있으며(Strauer *et al.*, *Circulation* 106:1913, 2002), 줄기세포를 이식하는 방법에는 손상된 장기나 조직에 직접 줄기세포를 주사하는 방법과 혈관 등으로 주사하여 투여하는 방법 등이 있다. 하지만 이식된 줄기세포는 생착률이 낮으며, 대부분이 씻겨나가는(wash-out) 것으로 보고되고 있다. 이를 극복하기 위하여, 줄기세포의 양과 빈도를 높여 이식을 시행하고 있지만, 고농도의 세포 수를 지속적으로 반복해야 하는 문제점이 있으며, 이식을 성공적으로 할지라도 빈곤한 세포 환경의 등으로 기대 이상의 치료 효과를 보기에 한계가 있다. 아울러, 기존의 시트 형성기술을 이용한 이식은 장기에 이식 후 신생혈관능이 기대치보다 낮기에 이를 극복하는 기술이 필요하다.
- [6] 본 발명자들은 폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트(Poly-2-hydroxyethyl methacrylate)로 전처리된 웰에서 지방줄기세포를 배양하여 수득한 삼차원

구형세포에서 신생혈관 관련 마커의 발현이 증가하는 것을 확인하였으나(대한민국 특허등록 10-188151), 동물 이식 시에 생착율이 낮고, 신생혈관능에 있어서도 개선이 필요하였다.

- [7] 이에, 본 발명자들은 줄기세포를 성공적으로 이식하여 높은 신생혈관능을 갖도록 하는 세포환경을 조성하고자 예의 노력한 결과, 삼차원 공배양을 통해 확보한 신생혈관능이 증가된 삼차원 구형세포와 지지체로서의 자가 지방줄기세포 시트를 공배양한 이식용 지방줄기세포 시트를 사용하여, 하지허혈 동물모델에 적용하는 경우, 높은 줄기세포 생착율과 신생혈관능을 나타내는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

[8]

[9] **발명의 요약**

- [10] 본 발명의 목적은 인체에 이식 시에 높은 생착율과 신생혈관능을 가지는 삼차원 구형세포를 함유하는 지방줄기세포 시트를 제공하는데 있다.

- [11] 본 발명의 다른 목적은 높은 줄기세포 생착율과 신생혈관능을 나타내는 삼차원 구형세포를 함유하는 지방줄기세포 시트의 제조방법을 제공하는데 있다.

- [12] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 삼차원 구형세포를 함유하는 지방줄기세포 시트를 함유하는 허혈성 질환 치료용 의약조성물을 제공하는데 있다.

- [13] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 삼차원 구형세포를 함유하는 지방줄기세포 시트를 투여하는 단계를 포함하는, 허혈성 질환의 치료 또는 예방 방법을 제공하는데 있다.

- [14] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 지방줄기세포 시트 상에 지방줄기세포의 삼차원 구형세포가 공배양되어 있는 것을 특징으로 하는 삼차원 구형세포를 함유하는 지방줄기세포 시트를 제공한다.

- [15] 본 발명은 또한, (a) 지방줄기세포를 배양하여 지방줄기세포 시트를 제조하는 단계; (b) 폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트로 전처리된 웰에서 지방줄기세포를 배양하여 삼차원 구형세포를 제조하는 단계; 및 (c) 상기 (a) 단계에서 제조된 지방줄기세포 시트와 상기 (b) 단계에서 제조된 삼차원 구형세포를 공배양하여 삼차원 구형세포를 함유하는 지방줄기세포 시트를 제조하는 단계를 포함하는 삼차원 구형세포를 함유하는 지방줄기세포 시트의 제조방법을 제공한다.

- [16] 본 발명은 또한, 상기 삼차원 구형세포를 함유하는 지방줄기세포 시트를 함유하는 허혈성 질환 치료용 의약조성물을 제공한다.

- [17] 본 발명은 또한, 상기 삼차원 구형세포를 함유하는 지방줄기세포 시트를 투여하는 단계를 포함하는, 허혈성 질환의 치료 또는 예방 방법을 제공한다.

- [18] 본 발명은 또한, 허혈성 질환의 치료 또는 예방을 위한 상기 삼차원 구형세포를 함유하는 지방줄기세포 시트의 용도를 제공한다.

- [19] 본 발명은 또한 허혈성 질환의 치료 또는 예방용 약제 제조를 위한 상기 삼차원 구형세포를 함유하는 지방줄기세포 시트의 사용을 제공한다.

[20]

**도면의 간단한 설명**

[21]

도 1은 폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트(poly-2-hydroxyethyl methacrylate)로 전처리된 6 웰 플레이트에서 지방줄기세포를  $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 개 시딩한 뒤, 24시간 및 48시간 동안 배양을 지속하면서 시간에 따른 삼차원 구형세포의 형태변화를 광학현미경을 이용하여 획득한 사진이다. 스케일 바는  $100 \mu\text{m}$ 이다.

[22]

도 2는 배양된 삼차원 구형세포에서 성숙 혈관내피세포 인자들인 FGF1, FGF2, CD144, Efnb4, Hey1, Hes1, Lyve1, Nrpl, Nrp2, Nos3, Nr2f2, Robo4, Sox17, Tie1, Tie2, vWF 및 Zo1의 발현을 mRNA 수준에서 확인한 결과를 나타낸 것이다.

[23]

도 3은 배양된 삼차원 구형세포에서 저산소 관련인자인 HIF-1 $\alpha$ 를 단백질 및 mRNA 수준에서 비교한 결과를 나타낸 것이다.

[24]

도 4는 지방줄기세포 시트 제작을 위하여,  $1 \times 10^6$ 개 지방줄기세포를 시딩한 뒤, 24시간 동안  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  세포배양기에서 배양한 결과를 광학현미경을 이용하여 획득한 사진이다. 스케일 바는  $100 \mu\text{m}$ 이다. B는  $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$  및  $2 \times 10^6$ 개 지방줄기세포를 시딩한 뒤, 24시간 동안  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  세포배양기에서 배양한 결과를 광학현미경을 이용하여 획득한 사진이다.

[25]

도 5의 (좌)는 삼차원 동시배양 후, 지방줄기세포 시트의 단면을 H&E 염색한 결과를 나타낸 것이고, (우)는 지방줄기세포 시트에서 저산소 관련인자인 HIF-1 $\alpha$ 의 발현을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

[26]

도 6은 삼차원 공배양 지방줄기세포 시트에서 신생혈관능과 관련된 대표적 인자 FGF2, PDGF 및 CD144를 면역 형광염색법으로 염색하여 확인한 결과를 나타낸 것이다.

[27]

도 7은 일반배양 지방줄기세포, 삼차원 구형세포 및 신생혈관능이 증가된 지방줄기세포 시트에서 분비하는 다양한 사이토카인 및 성장인자를 사이토카인 어레이 기법으로 비교한 결과를 나타낸 것이다.

[28]

도 8은 하지허혈 동물모델에서의 삼차원 구형세포, 지방줄기세포 시트 및 신생혈관능이 증가된 지방줄기세포 시트를 이식한 후 28일 후, 혈액 흐름의 개선도를 레이저 도플러를 통해 확인한 사진이다.

[29]

도 9는 급성심근경색 동물모델의 심장에서의 삼차원 구형세포, 지방줄기세포 시트 및 신생혈관능이 증가된 지방줄기세포 시트를 이식한지 42일 후, 심근경색 여부를 확인하는 섬유화세포(Masson's trichrome) 염색기법으로 확인한 심장 단면 사진이다.

[30]

[31]

**발명의 상세한 설명 및 구체적인 구현예**

[32]

다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로

이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

- [33] 난치성 질환의 세포 치료법이 임상에 적용되기 위해서는 미분화 줄기세포로부터 원하는 세포 계통으로 분화를 조절할 수 있어야 한다. 현재 허혈성 혈관질환의 줄기세포치료가 담보 상태에 머무르고 있는 가장 큰 이유가 이식된 세포가 혈관내피세포 등으로의 분화하는 비율이 매우 미미하다는 점이다. 이를 극복하기 위해 줄기세포를 이용한 세포 이식이 오랫동안 다양한 방법으로 시도되었으며, 최근 줄기세포 이식방법 중 하나로 세포시트를 이용하는 방법이 시도되고 있다. 다층 또는 세포를 혼합하여 시트의 제작이 가능하나, 실제 이식하고자 하는 조직에 이식되었을 때, 생착되는 정도와 신생혈관능을 증진시키는 효과에는 한계가 있었다. 이를 극복하는 시도에서 많은 화합물, 싸이토카인 및 성장인자 등의 추가를 진행한 시도가 있었지만, 시간과 비용이 많이 들고 생체 이외의 재료 사용으로 그에 따른 부작용이 존재하는 것이 보고되고 있으며, 싸이토카인의 대부분이 씻겨나가는 등의 이유로 이식된 세포의 분화 및 증식을 보장하지 못하며, 효율이 낮고, 이식 후의 부작용 측면에서 한계를 가지고 있었다. 본 발명에서는 이를 극복하기 위하여 신생혈관능이 증가된 지방줄기세포 시트를 제조하였다.
- [34] 생체 내 환경을 모사하면서 지방줄기세포를 삼차원 공배양을 통해 확보한 삼차원 구형세포 형성을 통해 신생혈관능이 증가된 세포를 확보, 지지체로서의 지방줄기세포는 자가 세포이며, 혼합된 세포의 배양될 수 있는 터전을 제공함으로써 안정적인 생착률 높이며, 증식 및 생존에 있어서 혼합된 세포의 기능을 극대화할 수 있는 장점이 있다. 이에 삼차원 구형세포와 지지체로서의 지방줄기세포 시트의 동시배양을 통하여 기존의 신생혈관능보다 증가된 새로운 신생혈관능이 증진된 지방줄기세포 시트를 제조하였다.
- [35] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, 지방줄기세포로 구성된 시트 상에 지방줄기세포의 삼차원 구형세포가 공배양되어 있는 것을 특징으로 하는 삼차원 구형세포를 함유하는 지방줄기세포 시트에 관한 것이다.
- [36] 본 발명에 따른 신생혈관능이 증가된 이식 가능한 지방줄기세포 시트는 기존의 세포시트 및 삼차원 구형세포만을 이용한 신생혈관능보다 우수하며, 제조방법의 조작이 쉽다. 또한, 신생혈관을 증진시키는 목적으로의 연구에서 성장인자 및 싸이토카인의 공급을 통한 경제적 부담과 세포 이식을 준비하는 시간을 최소화하는 방법이며, 이식 후에도 세포생존이 탁월하고 지방줄기세포를 이용하여 부작용이 적어 세포이식이 필요한 장기 및 조직에서 해당 시트를 통한 세포치료의 향상된 효과를 기대할 수 있다.
- [37] 본 발명에 있어서, 상기 삼차원 구형세포는 폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트로 전처리된 웰에서 지방줄기세포를 배양하여 제조되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [38] 본 발명에 있어서, 상기 공배양은 지방줄기세포 시트와 삼차원 구형세포가 4~1

: 0.2~2의 세포 수 비율로 시딩하여 배양하는 것을 특징으로 할 수 있으며, 보다 바람직하게는 2~1 : 0.5~1인 것을 특징으로 할 수 있다.

[39] 보다 구체적으로, 신생혈관능이 증가된 이식 가능한 지방줄기세포 시트에서 삼차원 구형세포와 시트의 제작에는 생체 내에 존재하는 지방줄기세포를 사용함으로써 다양한 성장인자의 배출 및 이를 동시배양 했을 때 더욱 신생혈관능과 관련된 사이토카인 및 성장인자의 발현이 증가됨을 확인하였다. 특히, 삼차원 구형세포를 만드는 기술은 폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트(Poly-2-hydroxyethyl methacrylate) 전처리 기술을 이용함으로써 짧은 시간 내에 삼차원 공배양을 통하여 어렵지 않게 삼차원 구형세포를 확보할 수 있다. 또한, 지지체로서의 지방줄기세포는 기타 화학적 처리나 생체 이외 재료를 사용하지 않고 순수하게 지방줄기세포만을 이용하여 다양한 층의 세포시트를 쉽게 만들고 회수 할 수 있다는 장점이 있다.

[40] 본 발명의 일 양태에서는 본 발명에 따른 신생혈관능이 증가된 이식 가능한 지방줄기세포 시트가 하지허혈 마우스 모델 및 심근경색 랫트 모델에서 손상된 조직의 치료연구에서 종래 보고된 다양한 줄기세포의 이식연구 결과와 비교하면 세포 전달 성공적이면서 신생혈관능이 더욱 우수함을 확인하였다. 이는 표적조직 내에서 치료 시간을 단축하게 할 수 있는 유리한 효과를 기대할 수 있었다.

[41] 따라서 본 발명을 이용하여 기존의 화합물, 사이토카인 및 성장인자의 추가 없이 기존의 생체성분으로만 만들어짐으로써 달리 부작용이 없고, 이식 후의 안정적인 효과를 보여줌에 따라 국소 재생치료 등의 임상 응용으로의 발전 가능성이 기대된다. 본 발명은 분화 기초연구 및 재생공학, 세포공학, 조직공학 그리고 의학 및 생물학 분야에 매우 유용한 발명이다.

[42] 본 발명에서는 지방줄기세포를 일반 6 웰 플레이트에 시딩하여 확보한 시트를 지지체로 하여, 폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트 전처리 기술을 이용한 삼차원 구형세포를 획득하여 상기 지지체와 삼차원 구형세포를 동시배양하여 신생혈관능이 증가된 이식 가능한 지방줄기세포 시트를 제작하였다. 동시배양된 신생혈관능이 증가된 이식 가능한 지방줄기세포 시트는 회수가 쉬운 장점이 있으며, 체내에 이식되었을 때 높은 생착율과 혈관신생효과를 나타낼 수 있다.

[43] 따라서, 본 발명은 다른 관점에서, (a) 지방줄기세포를 배양하여 지방줄기세포 시트를 제조하는 단계; (b) 폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트로 전처리된 웰에서 지방줄기세포를 배양하여 삼차원 구형세포를 제조하는 단계; 및 (c) 상기 (a) 단계에서 제조된 지방줄기세포 시트와 상기 (b) 단계에서 제조된 삼차원 구형세포를 공배양하여 삼차원 구형세포를 함유하는 지방줄기세포 시트를 제조하는 단계를 포함하는 삼차원 구형세포를 함유하는 지방줄기세포 시트의 제조방법에 관한 것이다.

[44] 본 발명의 손상된 장기 또는 조직으로의 이식에 있어서, 지지체로 쓰이는

세포는 지방줄기세포인 것이 특징이다. 지지체로 사용된 지방줄기세포는 다양한 세포로의 분화 및 손상된 장기 및 조직에서의 회복 효과가 보고된 만큼 혼합하는 세포와의 협력 효과를 극대화를 위해 지방줄기세포를 사용하는 것이 바람직하다. 또한, 삼차원 구형세포는 신생혈관능과 관련된 사이토카인 및 성장인자가 다른 줄기세포보다 증가하여 분비하는 지방줄기세포를 사용하는 것이 바람직하다. 본 발명에서의 인간유래 지방줄기세포를 사용하고 있으나, 이에 한정하지 않고, 마우스, 백서, 돼지 그리고 원숭이들을 포함하는 모든 포유류에서 분리한 지방줄기세포에 적용이 가능하다.

- [45] 상기 지지체 및 삼차원 구형세포 제작을 위한 폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트 전처리 6 웰 플레이트에서 공배양 될 지방줄기세포는 생체 내에서 유래하며 체내 이식 후, 손상된 장기 및 조직에서 생착과 증식을 할 수 있으며, 주위조직과 융화되어 염증 반응을 최소화하는 줄기세포를 말한다.
- [46] 지방줄기세포의 유래는 본 발명에서 특별히 그 종류를 한정하지 않으나, 지방조직은 성숙한 지방세포를 포함한 체내 위치에 상관없이 모든 지방조직을 총칭한다. 본 발명에서는 대표적으로 인간유래 지방줄기세포를 이용하였다.
- [47] 본 발명에 있어서, 삼차원 구형세포를 함유하는 지방줄기세포 시트의 제작을 위하여 상기 삼차원 구형세포는 6 웰 플레이트에서 배양하는 경우,  $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ /웰로 포함되는 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는  $5 \times 10^5$ 개인 것이 바람직하다. 지지체 시트를 위한 지방줄기세포는 6 웰 플레이트에서 배양하는 경우,  $5 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$ 개를 포함하는 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는  $1 \times 10^6$ 개 포함하는 것이 바람직하다.
- [48] 만약 상기 지방줄기세포의 개수가 상기 제시된 세포 수 미만이면 지방줄기세포의 낮은 생존율과 삼차원 구형세포 형성에 문제점이 있고, 이와 반대로 상기 제시된 범위에서 세포 수가 2배 이상 초과하면 상대적으로 삼차원 구형세포가 많아지며, 배양액의 혼탁 등 오염의 가능성이 커지는 문제점이 있으므로 상기 면적당 밀도가 가장 적합하다.
- [49] 본 발명의 일양태에서, 폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트 전처리를 통해 형성된 삼차원 구형세포는 배양 48시간 이후, 대표적으로 혈관내피세포 인자인 FGF1, FGF2, CD144, Efnb4, Hey1, Hes1, Lyve1, Nrp1, Nrp2, Nos3, Nr2f2, Robo4, Sox17, Tie1, Tie2, vWF 및 Zo1의 발현이  $5 \times 10^5$ 개 세포를 시딩했을 때 일반배양 및  $2 \times 10^5$ 개 세포 시딩했을 때 보다 증가함을 확인할 수 있었으며(도 2 참조), 삼차원 구형세포는 저산소 환경인자인 HIF-1 $\alpha$ 의 발현이 증대되어 있음을 확인하였다(도 3 참조). 저산소 환경은 혈관내피세포로의 분화를 유도하는 하나의 방법으로 잘 알려져 있다. 본 발명의 저산소 상태를 만들기 위한 삼차원 구형 세포의 크기는 자유롭게 구성할 수 있다.
- [50] 또한, 지방줄기세포를 지지체로 한 시트 확립을 위해 특별히 줄기세포의 유래를 한정하지 않으며, 대표적으로 일반 6 웰 플레이트에 시트제작이 가능한 밀도인  $1 \times 10^6$ 개/웰 이상을 시딩하는 것이 바람직하다(도 4 참조). 만약 상기

지방줄기세포의 개수가 상기 제시된 세포 수 미만이면 지지체의 역할을 수행할 수 없는 조밀한 시트가 형성되지 않는 문제점이 있고, 이와 반대로 상기 제시된 범위에서 세포 수가 2배 이상 초과하면 이식을 위한 회수 및 배양액의 혼탁 등 오염의 가능성이 커지는 문제점이 있으므로 상기 면적당 밀도가 동시배양에 있어 가장 적합하다.

- [51] 본 발명의 다른 양태에서는 본 발명의 지지체로서의 지방줄기세포 시트와 삼차원 구형세포의 동시배양을 통한 신생혈관능이 증가된 지방줄기세포 시트를 제작하였다. 동시배양에 있어서 지지체로서의 제작조건은 지지체로서의 지방줄기세포는 24시간 동안 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 세포배양기에서 1 X 10<sup>6</sup>개/웰의 세포를 6 웰 플레이트에 시딩하여 배양하며, 삼차원 구형세포는 폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트 전처리 된 6 웰 플레이트에 5 X 10<sup>5</sup> 개의 지방줄기세포를 6 웰 플레이트에 시딩한 후, 24시간 동안 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 세포배양기에서 배양하여 회수한 세포를 24시간 동안 동시배양하여 획득하였다.
- [52] 상기 본 발명의 신생혈관능이 증가된 지방줄기세포 시트를 제작에 있어서 24시간 동안 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 세포배양기에서 배양이 바람직하다. 만약 배양시간이 상기 시간 미만이면 삼차원 구형세포의 생착 및 안정화까지의 시간이 충분하지 않아 신생혈관능이 증가된 지방줄기세포 시트가 만들어지지 않는 문제점이 있으며, 상기 시간 이상이면 오랜 배양시간으로 지지체로서의 지방줄기세포 시트의 과다한 증식으로 인한 줄기세포 역가의 저하, 저산소에 의한 세포사멸로 이어질 수 있는 문제점이 있으므로 상기 시간이 가장 적절하다.
- [53] 또한, 동시배양에 있어서 지방줄기세포의 시트와 삼차원 구형세포의 비율은 4~1 : 0.2~2의 세포 수 비율로 시딩하여 배양하는 것이 바람직하며, 보다 바람직하게는 2~1 : 0.5~1인 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 2 : 1로 하는 것이 바람직하다. 다만 삼차원 구형세포가 과도하게 많을 수 새로운 층이 생겨날 수 있어서 엠보싱 모양의 최적 시트를 확보하지 못할 수 있다. 적은 수의 삼차원 구형세포를 동시배양 했을 때는 신생혈관능이 탁월하지 않을 수 있다. 이에 상기의 비율조건으로 동시배양하는 것이 가장 적절하다(도 5와 참조).
- [54] 나아가, 본 발명의 신생혈관능이 증가된 지방줄기세포 시트에서 삼차원 구형세포에서 발현을 확인한 저산소 환경인자인 HIF-1 $\alpha$ 의 발현이 유지되어 있음을 확인하였다(도 5우 참조). 저산소 환경은 신생혈관능 관련 인자의 증가를 유도하는 하나의 방법으로 잘 알려져 있다. 이를 통해 삼차원 구형세포와 지지체로서의 지방줄기세포 시트의 동시배양에도 다양한 인자의 발현이 유지되며 생착할 수 있음을 확인하였다. 다만, 신생혈관능 관련하여 확인할 수 있는 마커를 HIF-1 $\alpha$ 으로 한정하지 아니한다.
- [55] 상기 본 발명의 신생혈관능이 증가된 지방줄기세포 시트 제작에 있어서, 본 발명의 시트는 손상된 장기나 조직의 면적을 보충하기 위해 자유로운 크기로 구성할 수 있다. 상기 지지체로서 시트의 형상 및 면적에 대해서는 특별히

한정은 없다.

- [56] 본 발명의 또 다른 양태에서는, 신생혈관능이 증가된 지방줄기세포 시트에서 대표적으로 신생혈관능 관련 인자인 FGF2, PDGF 및 CD144의 발현을 면역형광염색법으로 확인할 수 있었다(도 6 참조). 신생혈관능 관련 인자는 주로 삼차원 구형세포에서 발현이 많았으며, 상기 인자를 포함하며 이들만으로 제한되지는 않는다.
- [57] 또한, 일반배양 지방줄기세포, 삼차원 구형세포 및 신생혈관능이 증가된 지방줄기세포 시트에서 분비하는 사이토카인 및 성장인자를 비교하였을 때, 신생혈관능이 증가된 지방줄기세포 시트에서 탁월한 사이토카인 및 성장인자의 분비가 증가함을 확인하였다(도 7 참고). 추가로 신생혈관능과 관련된 인자(bFGF, VEGF, ANGPT1 및 ANGPT2)의 발현이 통계적으로 발현량이 신생혈관능이 증가된 지방줄기세포 시트에서 증가되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 신생혈관능과 관련되어 있는 인자는 상기에 나열한 인자 등을 포함하며 이들만으로 제한되지는 않는다. 다만, 이런 세포의 표현형으로 신생혈관능을 평가될 수 있다.
- [58] 본 발명의 또 다른 양태에서, 우측다리의 대퇴부 동맥의 결찰을 통해 유도된 마우스 하지허혈 동물모델에 실험군 세포를 이식하는 방법으로 삼차원 구형세포는 주사기를 이용하여 이식하고, 지방줄기세포 시트 및 신생혈관능이 증가된 지방줄기세포 시트는 스크레이퍼로 박리하여 회수하여 결찰 주변부에 이식하였다. 이식방법은 반드시 이에 한정되는 것은 아니다. 이식 후, 하지혈류량의 평가를 위하여 이식 직후 및 28일까지 총 2번의 레이저 도플러를 이용한 혈류량을 측정하여 비교분석을 한 결과, 시간이 지남에 따라 대조군, 삼차원 구형세포 및 지방줄기세포 시트 이식군 보다 신생혈관능이 증가된 지방줄기세포 시트 이식 시 더 나은 혈류개선을 확인할 수 있었다(도 8 참조).
- [59] 본 발명의 또 다른 양태에서는 관상동맥의 결찰을 통해 급성심근경색 동물모델은 랫을 유도하였으며, 삼차원 구형세포, 지방줄기세포 시트 및 신생혈관능이 증가된 지방줄기세포 시트를 이식하였다. 이식 42일 후, 대조군, 삼차원 구형세포, 지방줄기세포 시트 및 신생혈관능이 증가된 지방줄기세포 시트 이식군의 심장을 회수하여 조직학적으로 분석을 위해 군 간의 심근경색 부위의 면적, 심장벽 두께 등을 비교하고, 섬유화세포 염색기법인 Masson's trichrome 염색으로 경색 부위의 변화를 비교한 결과, 신생혈관능이 증가된 지방줄기세포 시트 이식군에서 다른 군보다 경색의 부위가 감소한 것을 확인할 수 있었다(도 9 참조).
- [60] 따라서, 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 삼차원 구형세포를 함유하는 지방줄기세포 시트를 함유하는 허혈성 질환 치료용 의약조성물에 관한 것이다.
- [61] 본 발명의 신생혈관능이 증가된 지방줄기세포 시트 이식연구에 있어서, 손상된 장기나 조직의 면적을 보충하기 위해 자유로운 크기로 구성할 수 있다. 상기 지지체의 형상 및 면적에 대해서는 특별히 한정은 없다. 또한, 이식대상

적응증에 대해 하지허혈 및 심근경색증에 한정하지는 않는다.

- [62] 본 발명에 있어서, 상기 허혈성 질환은 하지 허혈증후군, 심근경색, 심부정, 부정맥 등의 허혈성 심장질환, 뇌경색, 허혈과 저산소증(ischemia and hypoxia), 혈관성 치매, 빈스뱅크병, 버거씨병 등을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [63] 본 발명의 의약 조성물은 수용성 용액으로 제조할 수 있다. 바람직하게는, 한스 용액(Hank's solution), 링거 용액(Ringer's solution) 또는 물리적으로 완충된 염수와 같은 물리적으로 적절한 완충용액을 사용할 수 있다. 수용성 주입(injection) 현탁액은 소듐 카복시메틸 셀룰로스와 솔비톨 또는 덱스트란과 같이 현탁액의 점도를 증가시킬 수 있는 기질을 첨가할 수 있다. 덧붙여서, 활성 성분의 현탁액은 적합한 유질의 주입 현탁액(oily injection suspensions)으로 제조될 수 있다. 적합한 친지성 용매 또는 담체는 참기름과 같은 지방산 또는 에틸 올레이트, 트리글리세라이드 또는 리포솜과 같은 합성 지방산 에스테르를 포함한다. 복수양이온성 비지질 아미노 폴리머(polycationic amino polymers)도 운반체로서 사용될 수 있다. 임의로, 현탁액은 화합물의 용해도를 증가시키고 고농도의 용액을 제조하기 위해 적합한 안정화제 또는 약제를 사용할 수 있다.
- [64] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 삼차원 구형세포를 함유하는 지방줄기세포 시트를 투여하는 단계를 포함하는, 허혈성 질환의 치료 또는 예방 방법에 관한 것이다.
- [65] 본 발명은 또 다른 관점에서, 허혈성 질환의 치료 또는 예방을 위한 상기 삼차원 구형세포를 함유하는 지방줄기세포 시트의 용도에 관한 것이다.
- [66] 본 발명은 또 다른 관점에서, 허혈성 질환의 치료 또는 예방용 약제 제조를 위한 상기 삼차원 구형세포를 함유하는 지방줄기세포 시트의 사용에 관한 것이다.
- [67]
- [68] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- [69]
- [70] 실시예 1: 지방줄기세포를 이용한 삼차원 구형세포 및 지지체 시트의 확보
- [71] 인간유래 지방줄기세포(LONZA, USA)를 이용하여 2세대 배양 후 삼차원 구형세포 및 지지체 시트를 확립하였다.
- [72] 구체적으로 지방줄기세포의 삼차원 구형세포를 확보하기 위하여 폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트(poly-2-hydroxyethyl methacrylate)로 전처리된 6 웰 플레이트에 다양한 세포밀도( $1 \times 10^5$  세포/웰,  $2 \times 10^5$  세포/웰 및  $5 \times 10^5$  세포/웰)로 줄기세포를 배양하여 삼차원 구형세포를 획득하였다. 배양조건은 세포를 시딩하여 각각 24시간 동안 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 세포배양기에서 배양하고, 배양 시간대별 및 시딩세포 수별 삼차원 구형세포의 생존 및 크기를

비교하였다.

- [73] 상기 폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트의 전처리는 100% 에탄올에 30분간 녹여 12g/mL의 농도로 제조하여, 6-웰 배양 플레이트에 1mL/웰의 양으로 분 주 후 37°C 인큐베이터에서 72시간 동안 에탄올을 증발시켜 폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트를 코팅하였다.
- [74] 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, 삼차원 구형세포의 지방줄기세포를 확인할 수 있었으며, 획득한 삼차원 구형세포는 배양 시간 및 시딩한 세포 수에 따라 다양한 크기의 세포를 획득할 수 있었다. 이에 삼차원 구형세포의 배양시간은 48시간으로 선정할 수 있었다.
- [75] 아울러, 배양된 삼차원 구형세포의 성숙 혈관내피세포의 대표적 인자들인 FGF1, FGF2, CD144, Efnb4, Hey1, Hes1, Lyve1, Nrp1, Nrp2, Nos3, Nr2f2, Robo4, Sox17, Tie1, Tie2, vWF 및 Zo1의 발현을 확인하였다.
- [76] 저산소 관련인자인 HIF-1 $\alpha$ 과 혈관내피세포의 대표적인 인자들의 발현확인, 일반배양 지방줄기세포와 삼차원 구형세포를 회수하여 단백질 수준에서 비교하였다. 이를 위해 웨스턴블롯 및 mRNA 수준에서 확인을 위해 각 타겟 human primer를 제작하여 RT-PCR기법을 이용하여 확인하였다.
- [77] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 성숙 혈관내피세포의 대표적 인자들인 FGF1, FGF2, CD144, Efnb4, Hey1, Hes1, Lyve1, Nrp1, Nrp2, Nos3, Nr2f2, Robo4, Sox17, Tie1, Tie2, vWF 및 Zo1의 발현이 5 X 10<sup>5</sup>개 세포를 시딩했을 때 일반배양 및 200,000개 세포를 시딩했을 때 보다 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통하여 높은 신생혈관능을 가지는 삼차원 구형세포 배양을 위한 최초 세포의 시딩 수는 5 X 10<sup>5</sup>세포로 선정하였다.
- [78] 또한, 구상체 배양에 있어서 저산소 상태에 의한 세포 변화가 중요하므로, 삼차원 구형세포의 저산소 정도를 확인하기 위하여 저산소 관련인자인 HIF-1 $\alpha$ 를 단백질 및 mRNA 수준에서 비교하였다. 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 삼차원 구형세포에서 저산소 관련인자(HIF-1 $\alpha$ )의 증가를 확인할 수 있었다.
- [79] 지방줄기세포 지지체 시트를 확보하기 위해 다양한 세포밀도로 지방줄기세포를 6웰 플레이트에 시딩하여 면적당 세포의 밀도에 따른 시트 형성의 여부를 확인하였다. 배양조건은 세포를 시딩하여 각각 24시간 동안 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 세포배양기에서 배양하였다. 면적당 세포의 밀도에 따른 시트 형성의 여부를 알아보기 위하여 다양한 세포 수(5 X 10<sup>5</sup>, 1 X 10<sup>6</sup> 및 2 X 10<sup>6</sup>)로 6 웰 플레이트에 시딩하였다.
- [80] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 일정량(1,000,000개)의 세포 수에서 동시배양을 위한 지지체 시트를 확립하였다. 지지체 시트 형성에 있어서 24시간 동안 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 세포배양기에서 배양이 바람직하였으며, 5 X 10<sup>5</sup>개 미만의 세포수를 시딩한 경우는 구멍이 나서 완전한 시트가 형성이 안되었으며, 2 X 10<sup>6</sup> 개 이상의 세포수를 시딩한 경우는 시트회수가 불가능하였다.

[81]

[82] 실시예 2: 신생혈관능이 증가된 이식 가능한 지방줄기세포 시트의 제작

[83] 지지체로서의 지방줄기세포를 형성에 있어서 24시간 동안 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>

세포배양기에서 1 X 10<sup>6</sup>개의 세포를 6 웰 플레이트에 시딩하여 배양하였다. 만약 배양시간이 24시간 이상이면 오랜 배양시간으로 인해 지방줄기세포의 줄기세포 역가의 저하, 저산소에 의한 세포사멸로 이어질 수 있는 문제점이 있으므로 동시배양을 위한 세포시트 배양시간은 24시간이 가장 적절하다.

[84] 다음으로 폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트로 전처리된 6웰

플레이트에 5 X 10<sup>5</sup>개의 지방줄기세포를 6웰 플레이트에 시딩한 후, 24시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 세포배양기에서 배양하여, 형성된 삼차원 구형세포를 상기 확보한 지방줄기세포 시트에 위에 동시배양을 하였다. 동시배양의 조건은 24시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 세포배양기에서 배양하였다.

[85] 삼차원 공배양 지방줄기세포 시트의 단면을 획득하여 H&E 염색한 사진을 도 5의 좌측에 나타내었다. 해당 단면에서 삼차원 구형세포가 지지체로서의 지방줄기세포 시트 위에 생착한 것을 확인할 수 있었다. 동시배양에 있어서 지방줄기세포의 시트와 삼차원 구형세포의 비율은 2 : 1로 하였으나, 이에 한정하지 아니한다. 다만 삼차원 구형세포가 과도하게 많을 수 새로운 층이 생겨날 수 있어서 엠보싱 모양의 최적 시트를 확보하지 못할 수 있다. 적은 수의 삼차원 구형세포를 동시배양 했을 때는 신생혈관능이 탁월하지 않을 수 있다.

[86] 삼차원 구형세포의 저산소 관련인자인 HIF-1 $\alpha$ 의 발현이 삼차원 공배양 지방줄기세포 시트에도 유지되는 것을 HIF-1 $\alpha$ 를 염색하여 확인하였다(도 5 우측). 아울러, 삼차원 공배양 지방줄기세포 시트에서 신생혈관능과 관련된 대표적 인자 FGF2, PDGF 및 CD144를 면역 형광염색법으로 염색하여 확인하였다. 그 결과, 도 6에 나타난 바와같이, FGF2, PDGF 및 CD144의 발현이 증가된 것을 확인할 수 있었다. 이는 동시배양을 통해서도 신생혈관능이 유지되고 있는 것을 확인할 수 있다.

[87] 또한, 일반배양 지방줄기세포, 삼차원 구형세포 및 상기 삼차원 공배양에 의해 신생혈관능이 증가된 지방줄기세포 시트에서 분비하는 다양한 사이토카인 및 성장인자를 사이토카인 어레이 기법으로 비교하였다.

[88] 사이토카인 어레이를 진행하기 위하여, 일반배양 지방줄기세포, 삼차원 구형세포 및 상기 삼차원 공배양에 의해 신생혈관능이 증가된 지방줄기세포 시트 배양 중에 24시간 후, 배양액을 회수하였다. 사이토카인 어레이는(Ray biotech; USA) 타깃 마커를 선택하여 디자인 하였으며 수행방법은 제조사 매뉴얼 내 통상적인 방법을 따라 진행하여 분석하였다.

[89] 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이, 신생혈관능이 증가된 지방줄기세포 시트에서 분비하는 인자가 일반배양 지방줄기세포, 삼차원 구형세포 분비 인자보다 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 특히, 신생혈관능과 관련된 인자(bFGF, VEGF, ANGPT1 및 ANGPT2)의 발현이 신생혈관능이 증가된

지방줄기세포 시트에서 증가하였음을 확인하였다. 신생혈관능이 증가된 지방줄기세포 시트에서 지지체로서의 지방줄기세포 시트가 분비하는 인자 및 삼차원 구형세포가 분비하는 신생혈관능 관련 인자와 동반 상승효과를 통해 관련 인자들의 발현을 증진하게 시킨 것을 확인할 수 있었다.

[90]

[91] 실시예 3: 신생혈관능이 증가된 지방줄기세포 시트를 이용한 마우스 하지허혈 동물모델로의 이식

[92] 누드마우스(BALB/C nude; 오리엔트바이오) 하지허혈 동물모델은 우측다리의 대퇴부 동맥의 결찰을 통해 유도하며(도 8A), 대퇴부 동맥 손상 마우스의 균은 삼차원 구형세포, 지방줄기세포 시트 및 신생혈관능이 증가된 지방줄기세포 시트를 이식하였다. 손상에 따른 대조군은 좌측다리를 이용하였으며, 하지허혈 마우스모델은 하지허혈 유도 후 28일 동안 지속해서 관찰하여 비교하였다.

[93] 누드마우스 하지허혈 동물모델로의 이식은 우측다리 대퇴부 동맥 결찰 주변부에 주입 또는 결찰된 혈관을 시트로 감싸서 이식하였으며, 1회 이식량은  $5 \times 10^5$  세포를 시딩하여 회수한 삼차원 구형세포 두 세트,  $1 \times 10^6$  세포로 만들어진 지방줄기세포 시트 및  $5 \times 10^5$  세포를 시딩하여 회수한 삼차원 구형세포와  $1 \times 10^6$  세포로 만들어진 삼차원 공배양에 의해 신생혈관능이 증가된 지방줄기세포 시트를 이식하였다.

[94] 이식 후, 하지혈류량의 평가를 위하여 이식 직후 및 28일까지 총 2번의 레이저 도플러를 이용한 혈류량을 측정하여 비교분석을 하였다. 그 결과, 도 8B에 나타난 바와 같이, 우측다리 내 혈류(빨간색; 화살표)가 증가되는 것을 확인함으로써 시간이 지남에 따라 대조군, 삼차원 구형세포 및 지방줄기세포 시트 이식군 보다 신생혈관능이 증가된 지방줄기세포 시트 이식 시 더 나은 혈류개선을 확인할 수 있었다.

[95] 상세하게, 하지허혈 동물모델의 우측다리의 대퇴부 동맥 결찰을 유도하여 혈류의 흐름이 없는 것으로 제대로된 하지허혈 동물의 성공적인 확립을 확인하고(0 Day) 상기 세포이식량과 방법으로 이식하였다. 28일 이후, 대조군은 신생혈관이 생기지 않아 두측다리 하단부가 괴사됨을 확인할 수 있었으나 삼차원 구형세포 및 지방줄기세포 시트 이식군에서 혈류의 흐름이 확인이되나 발끈에서의 괴사가 일어남을 확인할 수 있었다. 반면에 신생혈관능이 증가된 지방줄기세포 시트 이식군에서는 혈류의 개선과 다리 및 발의 괴사를 확인할 수 없었다.

[96]

[97] 실시예 4: 랫 심근경색 동물모델로의 신생혈관능이 증가된 지방줄기세포 시트 이식

[98] 급성심근경색 동물모델은 랫(SD; 오리엔트바이오)을 이용하여 관상동맥의 결찰을 통해 유도하였으며, 실험군은 대조군, 삼차원 구형세포, 지방줄기세포 시트 및 신생혈관능이 증가된 지방줄기세포 시트 이식군으로 나누어

진행하였다. 급성심근경색 백서모델은 경색유도 후 42일 동안 지속해서 관찰한 결과 이식 후 1일, 7일, 28일째에 각각 심초음파 검사를 시행하여 심장 기능의 증진 여부 및 군 간의 경색된 부위를 평가하는 섬유화 정도를 비교하여 평가하였다.

- [99] 급성심근경색 동물모델은 관상동맥 결찰로 생긴 경색주변주위에 이식량의 1/3씩 세 번으로 나누어 주입하였으며, 시트의 경우 경색부위를 포함한 심장표면에 이식하였으며, 1회 이식량은  $5 \times 10^5$  세포를 시딩하여 회수한 삼차원 구형세포 두세트,  $1 \times 10^6$  세포로 만들어진 지방줄기세포 시트 및  $5 \times 10^5$  세포를 시딩하여 회수한 삼차원 구형세포와  $1 \times 10^6$  세포로 만들어진 삼차원 공배양에 의해 신생혈관능이 증가된 지방줄기세포 시트를 이식하였다.
- [100] 이식 42일 후, 대조군, 일반배양 지방줄기세포, 삼차원 구형세포 및 신생혈관능이 증가된 지방줄기세포 시트 이식군의 심장을 회수하여 조직학적으로 분석을 위해 군 간의 심근경색 부위의 면적, 심장벽 두께 등을 비교하고, 섬유화세포 염색기법인 Masson's trichrome 염색으로 경색 부위의 변화를 비교하였다. Masson's trichrome 염색은 통상적인 조직 염색방법으로 진행하였다(Kim JH *et al.*, *PLoS One*. 11(6):e0158067, 2016).
- [101] 그 결과, 도 9에 나타난 바와 같이, 경색부위를 나타내는 부분(화살표)의 면적이 작으며, 심벽의 두께가 두꺼움을 확인함으로써 신생혈관능이 증가된 지방줄기세포 시트 이식군에서 다른 군보다 경색의 부위가 감소한 것을 확인할 수 있었다.
- [102] 상세하게, 급성심근경색을 유도, 이식하여 42일 후 회수한 심장조직에서 섬유화 정도를 확인하였다. 섬유화도에 있어 대조군, 일반배양 지방줄기세포 및 삼차원 구형세포 이식군보다 신생혈관능이 증가된 지방줄기세포 시트 이식군에서 섬유화된 면적이 감소된 것을 확인할 수 있었으며(화살표간), 두께에 있어서도 신생혈관능이 증가된 지방줄기세포 시트 이식군에서 다른 이식군보다 두꺼운 것을 확인할 수 있었다.

[103]

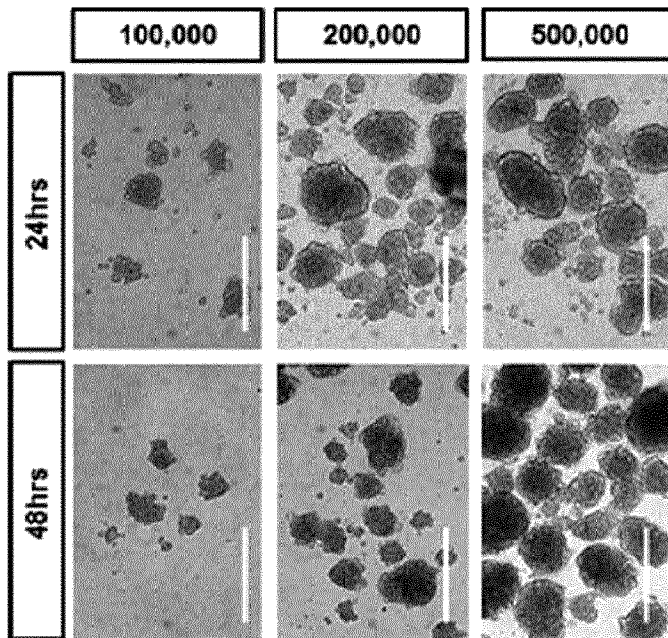
### 산업상 이용가능성

- [104] 본 발명의 삼차원 구형세포를 함유하는 지방줄기세포 시트를 허혈성 질환 환자에 이식하는 경우, 높은 줄기세포 생착율과 신생혈관능을 나타내어, 허혈성 질환 치료에 효과적인 것으로 판단된다.
- [105]
- [106] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

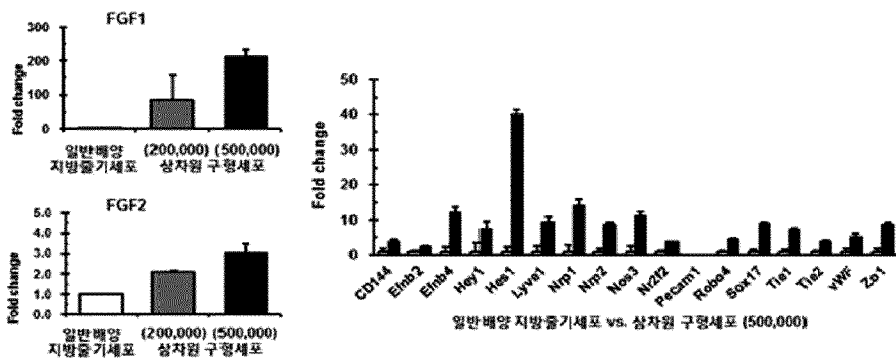
## 청구범위

- [청구항 1] 지방줄기세포 시트 상에 지방줄기세포의 삼차원 구형세포가 공배양되어 있는 것을 특징으로 하는 삼차원 구형세포를 함유하는 지방줄기세포 시트.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 삼차원 구형세포는 폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트로 전처리된 웰에서 지방줄기세포를 배양하여 제조되는 것을 특징으로 하는 지방줄기세포 시트.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 공배양은 지방줄기세포 시트와 삼차원 구형세포가 4~1:0.2~2의 세포 수 비율로 시딩하여 배양하는 것을 특징으로 하는 지방줄기세포 시트.
- [청구항 4] 다음 단계를 포함하는 삼차원 구형세포를 함유하는 지방줄기세포 시트의 제조방법:  
 (a) 지방줄기세포를 배양하여 지방줄기세포 시트를 제조하는 단계;  
 (b) 폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트로 전처리된 웰에서 지방줄기세포를 배양하여 삼차원 구형세포를 제조하는 단계; 및  
 (c) 상기 (a) 단계에서 제조된 지방줄기세포 시트와 상기 (b) 단계에서 제조된 삼차원 구형세포를 공배양하여 삼차원 구형세포를 함유하는 지방줄기세포 시트를 제조하는 단계.
- [청구항 5] 제4항에 있어서, 상기 삼차원 구형세포는 6 웰 플레이트에서 배양하는 경우,  $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 개 세포/웰로 시딩되고, 지방줄기세포 시트 제조를 위한 지방줄기세포는 6웰 플레이트에서 배양하는 경우,  $5 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$  세포/웰로 시딩되는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 6] 제1항의 삼차원 구형세포를 함유하는 지방줄기세포 시트를 함유하는 허혈성 질환 치료용 약학조성물.

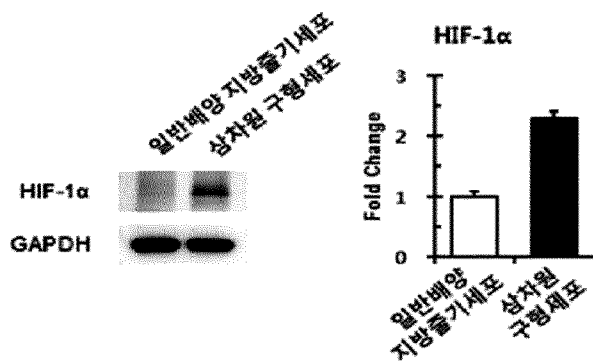
[도1]



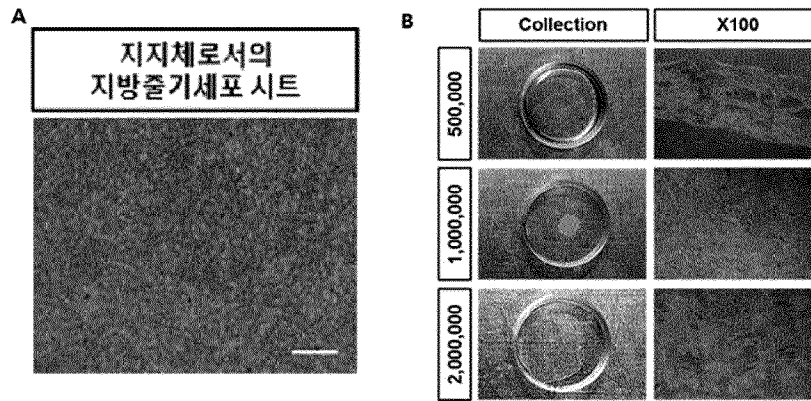
[도2]



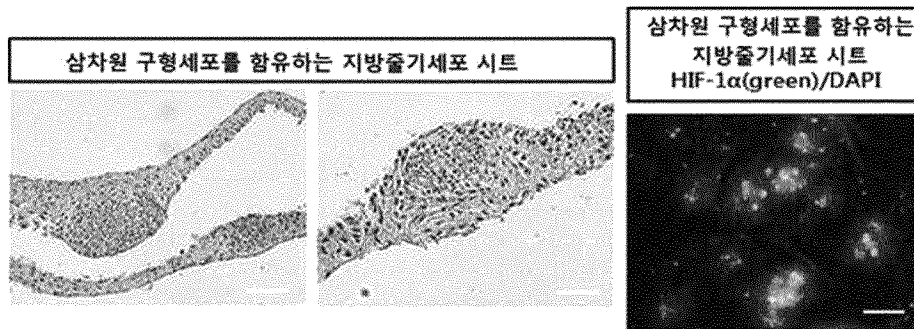
[도3]



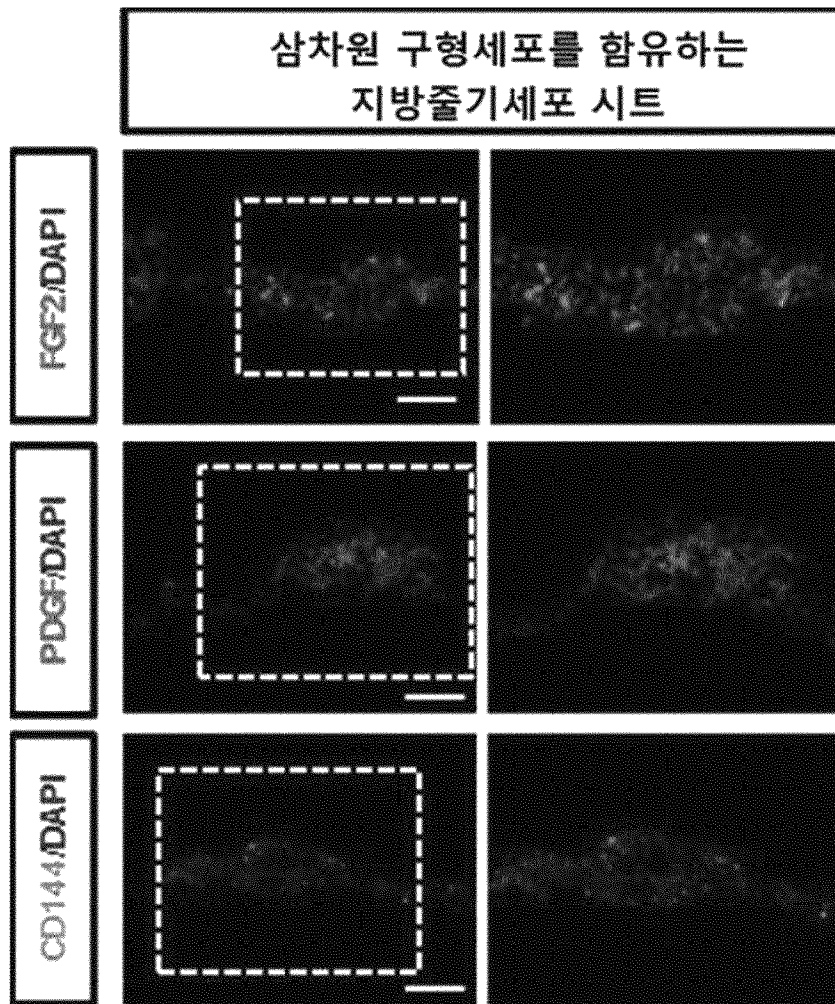
[도4]



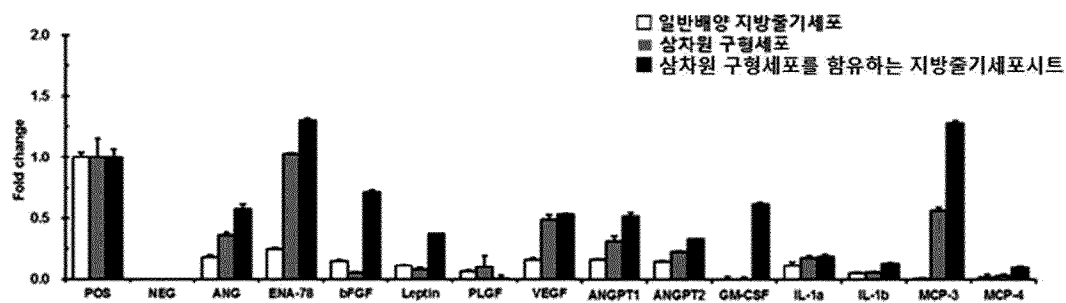
[도5]



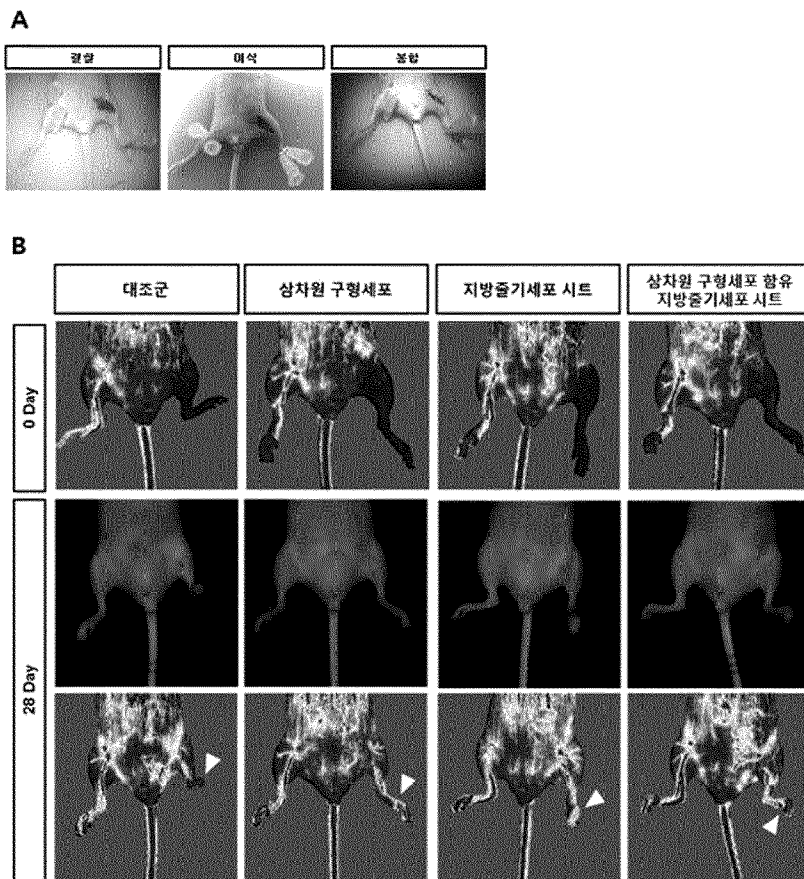
[도6]



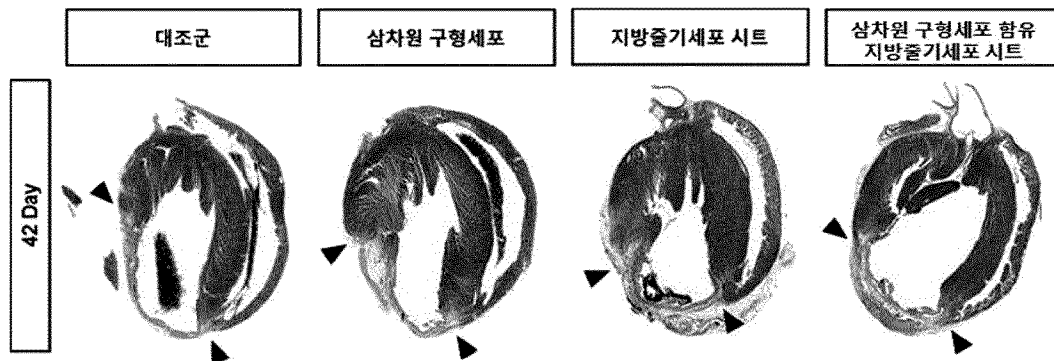
[도7]



[도8]



[도9]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/013480

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

*C12N 5/0775(2010.01)i, A61K 35/28(2006.01)i, A61P 9/10(2006.01)i*

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 5/0775; A61K 45/00; C12N 5/02; C12N 5/06; C12N 5/071; C12N 5/0735; C12N 5/08; G01N 33/53; A61K 35/28; A61P 9/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above

Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) &amp; Keywords: adipose-derived stem cell, sheet, co-culture, three-dimensional sphere cell, poly-2-hydroxyethyl methacrylate

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                      | Relevant to claim No. |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Y         | EP 1690929 A1 (NISHIDA, Kohji et al.) 16 August 2006<br>See paragraphs [0017], [0031], [0062]; claims 1, 9, 22.                                                         | 1-6                   |
| Y         | KR 10-2017-0104917 A (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) 18 September 2017<br>See paragraph [0027]; claim 1.                                            | 1-6                   |
| A         | KRETZSCHMAR, Kai et al. Organoids: modeling development and the stem cell niche in a dish. Developmental Cell. 2016, vol. 38, pages 590-600<br>See the entire document. | 1-6                   |
| A         | KR 10-2010-0061455 A (LIFESCAN, INC.) 07 June 2010<br>See the entire document.                                                                                          | 1-6                   |
| A         | US 2010-0166714 A1 (CHIEN, Kenneth R. et al.) 01 July 2010<br>See the entire document.                                                                                  | 1-6                   |
| A         | US 2009-0047738 A1 (SHIMMURA, Shigeto et al.) 19 February 2009<br>See the entire document.                                                                              | 1-6                   |



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 JANUARY 2020 (23.01.2020)

Date of mailing of the international search report

23 JANUARY 2020 (23.01.2020)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office  
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu,  
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.

**PCT/KR2019/013480**

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member | Publication<br>date |
|-------------------------------------------|---------------------|-------------------------|---------------------|
| EP 1690929 A1                             | 16/08/2006          | EP 1690929 A4           | 18/07/2007          |
|                                           |                     | WO 2005-035739 A1       | 21/04/2005          |
|                                           |                     | WO 2005-035739 A1       | 21/12/2006          |
| KR 10-2017-0104917 A                      | 18/09/2017          | KR 10-1881531 B1        | 25/07/2018          |
| KR 10-2010-0061455 A                      | 07/06/2010          | CN 102317443 A          | 11/01/2012          |
|                                           |                     | EP 2185691 A1           | 19/05/2010          |
|                                           |                     | EP 2185691 B1           | 14/03/2018          |
|                                           |                     | EP 2584034 A1           | 24/04/2013          |
|                                           |                     | EP 2584034 B1           | 25/10/2017          |
|                                           |                     | JP 2010-535035 A        | 18/11/2010          |
|                                           |                     | JP 2016-208984 A        | 15/12/2016          |
|                                           |                     | JP 6087043 B2           | 01/03/2017          |
|                                           |                     | JP 6453277 B2           | 16/01/2019          |
|                                           |                     | KR 10-1592180 B1        | 05/02/2016          |
|                                           |                     | WO 2009-048675 A1       | 16/04/2009          |
| US 2010-0166714 A1                        | 01/07/2010          | WO 2008-054819 A2       | 08/05/2008          |
|                                           |                     | WO 2008-054819 A3       | 26/03/2009          |
| US 2009-0047738 A1                        | 19/02/2009          | EP 1990407 A1           | 12/11/2008          |
|                                           |                     | EP 1990407 A4           | 01/07/2009          |
|                                           |                     | EP 2130911 A1           | 09/12/2009          |

**A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))**

C12N 5/0775(2010.01)i, A61K 35/28(2006.01)i, A61P 9/10(2006.01)i

**B. 조사된 분야**

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 5/0775; A61K 45/00; C12N 5/02; C12N 5/06; C12N 5/071; C12N 5/0735; C12N 5/08; G01N 33/53; A61K 35/28; A61P 9/10

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC  
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 지방줄기세포(adipose-derived stem cell), 시트(sheet), 공배양(co-culture), 3차원 구형 세포(three-dimensional sphere cell), 폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트(poly-2-hydroxyethyl methacrylate)

**C. 관련 문헌**

| 카테고리* | 인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재                                                                                                                       | 관련 청구항 |
|-------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Y     | EP 1690929 A1 (NISHIDA, KOHJI 등) 2006.08.16<br>단락 [0017], [0031], [0062]; 청구항 1, 9, 22 참조.                                                       | 1-6    |
| Y     | KR 10-2017-0104917 A (고려대학교 산학협력단) 2017.09.18<br>단락 [0027]; 청구항 1 참조.                                                                            | 1-6    |
| A     | KRETZSCHMAR, KAI 등, 'Organoids: modeling development and the stem cell niche in a dish', Developmental Cell, 2016, 38권, 페이지 590-600<br>전체 문헌 참조. | 1-6    |
| A     | KR 10-2010-0061455 A (라이프스캔, 인코포레이티드) 2010.06.07<br>전체 문헌 참조.                                                                                    | 1-6    |
| A     | US 2010-0166714 A1 (CHIEN, KENNETH R. 등) 2010.07.01<br>전체 문헌 참조.                                                                                 | 1-6    |
| A     | US 2009-0047738 A1 (SHIMMURA, SHIGETO 등) 2009.02.19<br>전체 문헌 참조.                                                                                 | 1-6    |

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

\* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후 “X”에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일

2020년 01월 23일 (23.01.2020)

국제조사보고서 발송일

2020년 01월 23일 (23.01.2020)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



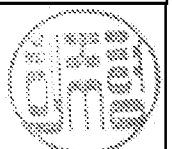
대한민국 특허청  
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,  
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-8150



| 국제조사보고서에서<br>인용된 특허문헌 | 공개일        | 대응특허문헌                                                                                                                                                                                                | 공개일                                                                                                                                                    |
|-----------------------|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| EP 1690929 A1         | 2006/08/16 | EP 1690929 A4<br>WO 2005-035739 A1<br>WO 2005-035739 A1                                                                                                                                               | 2007/07/18<br>2005/04/21<br>2006/12/21                                                                                                                 |
| KR 10-2017-0104917 A  | 2017/09/18 | KR 10-1881531 B1                                                                                                                                                                                      | 2018/07/25                                                                                                                                             |
| KR 10-2010-0061455 A  | 2010/06/07 | CN 102317443 A<br>EP 2185691 A1<br>EP 2185691 B1<br>EP 2584034 A1<br>EP 2584034 B1<br>JP 2010-535035 A<br>JP 2016-208984 A<br>JP 6087043 B2<br>JP 6453277 B2<br>KR 10-1592180 B1<br>WO 2009-048675 A1 | 2012/01/11<br>2010/05/19<br>2018/03/14<br>2013/04/24<br>2017/10/25<br>2010/11/18<br>2016/12/15<br>2017/03/01<br>2019/01/16<br>2016/02/05<br>2009/04/16 |
| US 2010-0166714 A1    | 2010/07/01 | WO 2008-054819 A2<br>WO 2008-054819 A3                                                                                                                                                                | 2008/05/08<br>2009/03/26                                                                                                                               |
| US 2009-0047738 A1    | 2009/02/19 | EP 1990407 A1<br>EP 1990407 A4<br>EP 2130911 A1                                                                                                                                                       | 2008/11/12<br>2009/07/01<br>2009/12/09                                                                                                                 |