

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2015년 7월 16일 (16.07.2015)



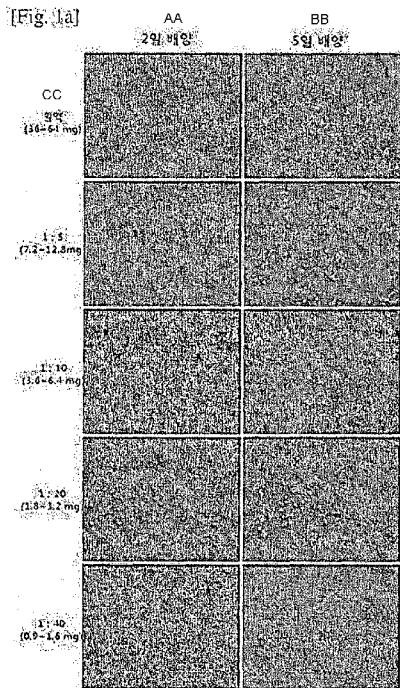
(10) 국제공개번호
WO 2015/105249 A1

- (51) 국제특허분류: A61F 13/02 (2006.01) A61L 15/28 (2006.01)
A61L 15/44 (2006.01) A61K 35/12 (2015.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2014/006068
- (22) 국제출원일: 2014년 7월 7일 (07.07.2014)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2014-0003499 2014년 1월 10일 (10.01.2014) KR
10-2014-0065816 2014년 5월 30일 (30.05.2014) KR
- (71) 출원인: (주)안트로젠 (ANTEROGEN CO., LTD.) [KR/KR]; 153-782 서울시 금천구 디지털로 130 남성플라자 405호 (가산동), Seoul (KR).
- (72) 발명자: 이성구 (LEE, Sung-Koo); 153-782 서울시 금천구 디지털로 130 남성플라자 405호 (가산동), Seoul (KR). 김미형 (KIM, Mihyung); 153-782 서울시 금천구 디지털로 130 남성플라자 405호 (가산동), Seoul (KR).
- (74) 대리인: 김보민 (KIM, Bo-min) 등; 137-900 서울시 서초구 바우피로 23 4층(우면동, 선일빌딩), 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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, 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, 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 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, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: MESENCHYMAL STEM CELLS-HYDROGEL-BIODEGRADABLE OR MESENCHYMAL STEM CELLS-HYDROGEL-NON-DEGRADABLE SUPPORT COMPOSITION FOR SKIN REGENERATION OR WOUND HEALING

(54) 발명의 명칭: 피부 재생 또는 상처 치유를 위한 중간엽 줄기세포-하이드로겔-생분해성 또는 중간엽 줄기세포-하이드로겔-비분해성 지지체 조성물



AA ... 2 days culture
BB ... 5 days culture
CC ... Undiluted solution

(57) Abstract: The present invention relates to a composition and a sheet, comprising a mesenchymal stem cells-hydrogel-biodegradable support or a mesenchymal stem cells-hydrogel-non-degradable support, and a preparation method therefor. More specifically, the sheet comprising an adipose-derived mesenchymal stem cells-hydrogel-biodegradable or non-degradable support according to the present invention has beneficial effects of having excellent skin regeneration and wound treatment capabilities, and is capable of reducing treatment duration compared to conventional therapeutics because the stem cells having high activity can be applied to wound sites intactly without an isolation step using proteases, and an extracellular matrix, such as a collagen, a laminin, a fibronectin, and an elastin, secreted from the mesenchymal stem cells in a culture step is present to be intactly patched on a hydrogel.

(57) 요약서: 본 발명은 중간엽 줄기세포-하이드로겔-생분해성 지지체 또는 중간엽 줄기세포-하이드로겔-비분해성 지지체를 포함하는 조성물, 시트 및 이의 제조 방법에 관한 것으로서 보다 구체적으로 본 발명에 따른 지방유래 중간엽 줄기세포-하이드로겔 생분해성 또는 비분해성 지지체를 함유하는 시트는 단백질 분해효소를 이용한 단리과정 없이 고효율의 줄기세포가 그대로 상처 부위에 도포될 수 있고, 배양 단계에서 중간엽 줄기세포로부터 분비되는 콜라겐, 라미닌, 피브로넥틴, 엘라스틴과 같은 세포외기질이 온전하게 하이드로겔에 침포되어 존재함으로써 종래 치료제에 비하여 피부 재생 및 상처 치료능력이 현저히 우수하며, 치료기간을 단축시킬 수 있는 유리한 효과를 나타낸다.

WO 2015/105249 A1

ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, **공개:**
MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, — 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

명세서

발명의 명칭: 피부 재생 또는 상처 치유를 위한 중간엽 줄기세포-하이드로겔-생분해성 또는 중간엽 줄기세포-하이드로겔-비분해성 지지체 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 중간엽 줄기세포-하이드로겔-생분해성 지지체 또는 중간엽 줄기세포-하이드로겔-비분해성 지지체를 포함하는 피부 재생 또는 상처 치료용 조성물, 시트(sheet) 및 이의 제조 방법에 관한 것으로서, 특히 본 발명의 줄기세포를 포함하는 시트형 조성물은 피부 재생 또는 상처(wound) 치유용 드레싱제로 사용될 수 있다.

배경기술

- [2] 당뇨병이란 우리 몸이 섭취한 음식물을 적절하게 사용하지 못하여 혈액 속의 포도당(혈당)의 수치가 정상인보다 훨씬 높은 상태를 말하며 당뇨병은 당뇨발 혹은 당뇨족이라고도 하며 당뇨병자에게 나타나는 주된 합병증으로 당뇨병으로 인한 혈액순환장애와 혈관속 높은 당 수치가 신경세포를 죽여 감각을 무더지게 하여 발생한다.
- [3] 일반적인 창상의 치유는 손상된 조직 및 침입한 병원균의 제거와 손상된 조직의 재형성이 필요한 연속과정으로 1) 백혈구 등의 염증세포가 모여들어 외부에서 침입한 균과 죽은 조직 등을 제거하는 염증과정, 2) 백혈구가 분비한 성장인자의 자극에 의해 상처주위의 상피세포가 이동하고 증식하여 손상된 부분을 덮고 진피층의 섬유세포가 콜라겐을 축적시켜 새로운 모세혈관을 생성하고 흠을 채워 상피화가 일어나는 증식과정, 3) 염증세포가 사라지고 임시로 생성된 육아조직이 원래의 피부조직에 가깝게 성숙되는 성숙과정을 거치게 된다. 이러한 복구 과정은 다양한 성장 인자 및 사이토카인-인슐린양성장인자(Insulin-like Growth Factor; IGF), 형질전환성장인자(Transforming Growth Factor beta; TGF-β), 혈관내피세포성장인자 (Vascular Endothelial Growth Factor; VEGF), 염기성 섬유아세포성장인자(basic Fibroblast Growth Factor; bFGF), 혈소판유래성장인자(Platelet-derived Growth Factor; PDGF), 신경성장인자(Nerve Growth Factor; NGF), 과립구 단핵구 콜로니 자극인자(Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor; GM-CSF), 표피세포성장인자(Epidermal Growth Factor; EGF), 간세포성장인자(Hepatocyte Growth Factor; HGF)의 작용을 통하여 진행되며, 염증성 세포, 섬유아세포, 케라티노사이트 및 내피 세포와 같은 상이한 형태의 세포들의 상호 작용을 통하여 진행된다.
- [4] 일반적인 상처는 상기 창상 치유 과정의 순차적인 진행을 통하여 쉽게 치유될 수 있으며, 피부의 재생 또는 창상 치료는 염증반응(inflammation),

재상피화(re-epithelialization), 육아조직의 형성(granulation), 섬유조직형성(fibroplasia), 창상조직의 수축(contraction)등 여러 가지 과정을 통해 이루어진다(Freedberg et al., J. Clin. Psychol., 57: 433-455, 2001). 피부 재생의 일련의 과정들은 각질세포(keratinocytes), 섬유아세포(fibroblasts), 내피세포(endothelial cells), 대식세포(macrophage), 혈소판(platelets) 등과 같은 여러 세포들의 협력에 의해서 이루어지며 이러한 세포들의 이동, 침윤, 증식, 분화와 같은 복합적인 진행은 다양한 성장인자(growth factor), 사이토카인, 케모카인에 의해서 조절 받기에 생물학적 인자나 화학물질의 유효성이 알려져 있다.

- [5] 그러나, 상기 성장인자, 사이토카인을 이용한 창상 치유 기술은 이들 단백질을 생산, 분리하는 데 많은 비용이 소요되며, 창상 치유과정에는 이들 단백질들이 복합적으로 작용하기에 한 가지 종류의 단백질만을 사용할 경우 창상치료제로 부분적인 창상 완화를 제공하지만, 치유기간이 길고 치료에 대한 반응이 최적에 미치지 못하는 등 비효과적이라는 점 때문에 실제 상용화에 문제점이 있다.
- [6] 또한 특히 당뇨병 환자에서의 만성 상처의 경우, 성장 인자의 생성 감소, 혈관신생 감소, 및 케라티노사이트와 섬유아세포의 이동 및 증식 악화 등의 여러 요인으로 인하여 창상치유과정이 계속 진행되지 못하고 염증기에 머물러 있는 경우가 흔하며, 쉽게 재생되지 않는다(*Eur J Cell Biol* 81:153-60, 2002; *Br J Surg* 90:133-46, 2003).
- [7] 이러한 배경으로 인해, 피부를 구성하는 섬유아세포 또는 표피세포 또는 두 가지 모두로 이루어진 인공 피부 및 배양 피부를 이용하여 당뇨병성 창상에 이식하는 기술이 개발되고 있다.
- [8] 최근 줄기세포 연구가 활발해지면서 줄기세포가 피부세포로 분화가 가능하고 피부세포보다 활성이 높아 더 많은 양의 다양한 성장인자를 분비하고, 면역반응까지 조절할 수 있다는 것이 밝혀지면서 줄기세포를 당뇨를 유발한 쥐의 창상 부위에 이식하여 당뇨성 창상을 치료하는 방법이 시도되고 있다 (*J Diabetes Res.* 2013;2013:647107, *Diabetes.* 2013 Jul;62(7):2588-94, *Plast Reconstr Surg.* 2011 Oct;128(4):872-80.). Maharlooei MK 등(*Diabetes Res Clin Pract.* 2011 Aug;93(2):228-34)은 지방조직으로부터 분리한 성체 줄기세포가 당뇨 쥐에서의 창상 치유력이 증가되었음을 보여주었다. 또한, 당뇨발 케양 환자를 대상으로 각 환자의 복부에서 지방조직을 흡입한 후 지방유래 줄기세포를 추출해 배양하지 않은 상태로 창상부위에 도포한 결과, 8주 내에 모든 환자의 창상부위가 완전히 치유되었음이 보고되었다.
- [9] 그러나 배양하지 않은 세포에는 면역세포가 포함되어 있어 반드시 환자 자신의 조직을 채취하여야 한다는 결점이 있다. 이는 매우 번거로울 뿐만 아니라 당뇨병 환자는 한번 발생한 상처가 잘 치유되지 않기 때문에 지방흡입수술 과정이 또 다른 만성적인 창상을 유발할 가능성이 있다. 지방조직에서 세포를 분리한 후 계대배양하게 되면 면역세포 등은 사라지게 되어 면역원성이 없으면서, 오히려

과도한 면역반응을 억제할 수 있고, 각종 성장인자를 분비할 수 있는 자가 및 동종이식이 가능한 중간엽 줄기세포가 남게 된다. 이러한 상태의 배양한 세포를 단리하여 질환에 적용하는 기술이 개발되었으며 이를 1세대 줄기세포치료제라고 한다.

[10] 그러나 종래의 1세대 줄기세포치료제는 트립신 또는 디스파아제 등의 단백질 분해효소를 처리하여 얻은 단리된 세포로 단백질 분해효소를 처리하는 동안 세포막에 노출되어 있는 모든 단백질을 비선택적으로 분해하기 때문에 세포간 결합과 기저막 단백질 등이 거의 유지되지 않는다. 또한 중간엽 줄기세포는 부착성이 강한 세포로 단일 세포로 분리하였을 때 6~24시간 내에 사멸하게 되며 생착률이 아주 낮다는 결점을 가지고 있다.

[11] 한편 상처 치유를 위한 하이드로겔 형태의 세포전달용 비히클에 대한 한국등록특허 1,101,321호가 있다. 여기에서는 생리식염수, 인산완충용액(PBS), 및 세포배양배지로 이루어진 균으로부터 선택된 수성 매질에 겔란트(gellant) 없이 비이온성 계면활성제인 폴리프로필렌글리콜폴리에틸렌글리콜 축합물이 15~50%의 중량비로 혼합되어 분산되어 구성된 하이드로겔 형태를 갖는 세포 전달(delivery)용 비히클 조성물이 개시되어 있다. 그러나 습윤효과 및 상처 수축억제 효과에 기인하여 상처치유를 보다 촉진시키는 효과가 개시되어 있을 뿐 성장인자 분비 촉진 또는 세포간물질 레벨 상승 등의 메커니즘에 의한 치유효과에 대하여는 구체적으로 나타나있지 않고, 생분해성 지지체 또는 비분해성 지지체 시트의 사용에 대하여 개시되어 있지 않으며, 하이드로겔의 경우 제조농도에 따라 망목 구조의 크기, 경도 및 분해속도가 다르기 때문에 세포의 형태 및 증식 속도에 영향을 미치게 되는데 특히 중간엽 줄기세포에 적용되기 위한 최적 농도 조건에 대하여도 나타나있지 않다.

[12] 본 발명은 상기와 같은 종래 기술의 문제점을 해결하고자 하였으며, 배양한 중간엽 줄기세포를 하이드로겔에 현탁하여 생분해성 또는 비분해성 지지체에 부착한 후 배양하는 고효성의 살아있는 중간엽 줄기세포를 포함하는, 피부 재생 또는 상처 치료용 조성물 및 시트, 그리고 이의 제조방법을 제공하는 것을 목적으로 한다. 이와 같은 방법으로 제조된 시트에 포함되어 있는 중간엽 줄기세포의 대부분은 CD73 및 CD90을 발현하며 70% 이하의 세포에서 CD105를 발현한다.

[13] [선행기술문헌]

[14] [특허문헌]

[15] 한국등록특허 1,293,762호, 한국등록특허 1,106,015호, 한국공개특허 2010-0114729호, 한국등록특허 1,328,604호, 국제특허 WO2013/022447호, 한국등록특허 1,101,321호, 국제특허 WO2008/060374호, 한국등록특허 1,335,176호

[16] [비특허문헌]

[17] J Diabetes Res. 2013;2013:647107, Diabetes. 2013 Jul;62(7):2588-94, Plast Reconstr

Surg. 2011 Oct;128(4):872-80.; Maharlogei MK등, Diabetes Res Clin Pract. 2011 Aug;93(2):228-34.; Tissue eng 4(4):1403~414, 1988

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [18] 본 발명은 인간의 지방조직에서 분리한 중간엽 줄기세포를 피부재생 및 상처 치유에 이용하기 위한 것으로, 임상적으로 유효한 치료효과를 얻기 위한 고효성의 중간엽 줄기세포를 포함하는 피부 재생 또는 상처 치료용 조성물 또는 시트, 및 이의 제조 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제 해결 수단

- [19] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명에서는 지방유래 중간엽 줄기세포-하이드로겔-생분해성 지지체 또는 비분해성 지지체를 포함하는 조성물, 시트 및 이의 제조 방법을 제공한다.
- [20] 본 발명에 따른 피부 재생 또는 상처 치료용 조성물에서, 중간엽 줄기세포는 CD29, CD44, CD73, CD90 및 CD105에 대하여 양성이며, CD34 및 CD45에 대해 음성인 자가 또는 동종 유래 세포이다.
- [21] 본 발명에 따른 일 양태에서, 지지체로는 PGA(poly-gamma-glutamic acid), PLA(poly lactic acid), PGA/PLA, 비크릴 메쉬, 사람 양막, 소 양막 및 돼지 콜라겐, 키틴, 키토산, 피브로넥틴 및 텍스트란으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 생분해성 고분자 지지체를 사용하거나, 멸균된 부직포 섬유, PET(polyethylene terephthalate) 필름, PE(polyethylene) 필름, PP(polypropylene) 필름과 같은 비분해성 지지체, 또는 이들의 조합체 예를 들어 PGA/부직포 섬유, PLA/부직포 섬유, PGA/PLA/부직포 섬유를 사용할 수 있다.
- [22] 본 발명에 따른 일 양태에서, 하이드로겔은 피브린 글루, 히알루론산 또는 이의 유도체, 젤라틴, 콜라겐, 알긴산, 셀룰로오스 및 펙틴으로 이루어진 그룹으로부터 선택될 수 있고, 이때 피브린 글루를 형성하는 피브리노겐의 농도는 0.5 내지 30 mg/mL일 수 있고, 보다 구체적으로 0.5 내지 20 mg/mL일 수 있고, 보다 더 구체적으로 0.5 내지 10 mg/mL일 수 있다.
- [23] 본 발명에 따른 일 양태에서, 피부 재생 및 상처 치료용 시트를 제조하기 위하여 줄기세포를 하이드로겔과 혼합하여 지지체 1 cm² 당 4,000 내지 6,000개로 균일하게 도포하고, FBS 및 bFGF 또는 EGF를 함유하는 배지에서 배양하여 지지체 1 cm² 당 줄기세포 20,000개 이상, 보다 구체적으로 20,000개 내지 200,000개가 되도록 증식시키는 단계를 포함한다.

발명의 효과

- [24] 본 발명에 따른 고효성의 중간엽 줄기세포를 포함하는 조성물 또는 시트는, 단백질 분해효소를 이용한 단리(선별) 과정 없이 고효성의 줄기세포가 그대로 상처 부위에 도포될 수 있고, 배양 단계에서 중간엽 줄기세포로부터 분비되는 콜라겐, 라미닌, 피브로넥틴, 엘라스틴과 같은 세포외기질이 온전하게

하이드로겔에 첩포되어 존재함으로써 종래 치료제에 비하여 피부 재생 및 상처 치료능력이 현저히 우수하며, 치료 기간을 단축시킬 수 있는 유리한 효과를 나타낸다.

- [25] 보다 구체적으로 본 발명에 따른 지방유래 중간엽 줄기세포-하이드로겔-지지체는, 무혈청 배지에서도 섬유아세포 형태를 유지하였고 1주가 경과한 후에도 90% 이상 생존하는 것으로 나타나 종래 줄기세포치료제에 비하여 생존기간이 현저히 증가하였고, 동결보관 후 해동하였을 때 시트의 형태 및 강도가 그대로 유지되었으며 시트 내 세포도 95% 이상 생존한 것으로 나타나 주유효 성분인 세포의 손상없이 -80°C에서 장기간 냉동보관이 가능하고, 세포 성장 및 혈관형성을 촉진하는 다양한 성장인자와 사이토카인이 지속적으로 분비되고, 다양한 종류의 세포외기질을 다량 분비할 뿐만 아니라 분비된 세포외기질이 하이드로겔 내에 머물러 있어 체내에 이식하였을 때 다양한 기질을 제공함으로써 상처치유를 용이하게 할 수 있고, 면역반응을 유발하지 않으며 오히려 상처부위에서 염증이 발생하더라도 면역세포에 의해 다량 분비되어 면역반응성을 증가시키는 역할을 하는 TNF-alpha의 분비량을 현저히 감소시켜 염증을 완화시킴으로써 상처치유를 도울 수 있는 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

- [26] 도 1a는 피브리노겐 원액 및 단계별 희석된 용액으로 만들어진 피브린 겔과 혼합하여 배양한 인간 지방유래 중간엽 줄기세포의 형태를 AO/EtBr로 염색하여 관찰한 형광현미경 사진이다 (400 배율). 피브리노겐의 희석배수 및 트롬빈이 포함된 세포현탁액과 1:1 혼합되어 최종 피브린 글루를 형성하였을 때 농도는 괄호하여 표기하였다.
- [27] 도 1b는 피브리노겐 원액 및 단계별 희석된 용액으로 만들어진 피브린 겔과 혼합하여 배양한 인간 지방유래 중간엽 줄기세포에 WST-1을 첨가하여 측정된 흡광도 그래프이다.
- [28] 도 2a는 인간 지방유래 중간엽 줄기세포-하이드로겔-생분해성 또는 비분해성 지지체 시트의 사진이다.
- [29] 도 2b는 도 2a의 시트 내 세포 사진으로, a는 시트 형성 직후 (Day 0), b는 5일 동안 배양한 후의 광학현미경 관찰 사진이며, c는 5일 배양 후 세포를 AO/EtBr 염색 후 형광현미경으로 관찰한 사진이다.
- [30] 도 2c는 도 2a의 시트 내 세포의 시간에 따른 생존율을 나타낸 그래프이다.
- [31] 도 3a는 인간 지방유래 중간엽 줄기세포-하이드로겔-생분해성 지지체 또는 비분해성 지지체 시트를 -80°C에서 동결보관한 후 해동한 사진이다.
- [32] 도 3b는 도 3a의 시트 내 세포를 AO/EtBr로 염색하여 형광현미경으로 관찰한 사진으로, a는 생분해성 지지체 또는 비분해성 섬유 지지체에 부착된 중간엽 줄기세포를, b는 비분해성 필름 지지체에 부착된 중간엽 줄기세포를 보여주고

있다.

- [33] 도 4는 인간 지방유래 중간엽 줄기세포-하이드로겔-생분해성 또는 비분해성 지지체 시트를 녹여 단일세포로 분리한 후 세포표면단백질로 염색한 후 유세포분석기로 분석한 결과이다: 종래 기술에 따라 2차 배양한 지방유래 중간엽 줄기세포와 비교하여 CD29, CD44, CD73, CD90의 발현은 유사하였으나, CD105의 경우 발현이 감소하여 70% 이하였다.
- [34] 도 5a는 인간 지방유래 중간엽 줄기세포-하이드로겔-생분해성 지지체 시트 또는 비분해성 지지체 시트에서 분비되는 VEGF와 HGF의 양을 ELISA로 정량하여 나타낸 그래프이다.
- [35] 도 5b는 인간 지방유래 중간엽 줄기세포-하이드로겔-생분해성 지지체 시트 또는 비분해성 지지체 시트에서 분비되는 혈관형성 촉진 인자를 사이토카인 어레이 키트를 이용하여 분석한 결과이다.
- [36] 도 6은 인간 지방유래 중간엽 줄기세포-하이드로겔-생분해성 지지체 시트 또는 비분해성 지지체 시트를 세포외기질단백질로 형광염색하여 관찰한 사진이다.
- [37] 도 7a는 인간 지방유래 중간엽 줄기세포-하이드로겔-생분해성 지지체 시트 또는 비분해성 지지체 시트를 동종의 말초혈액단핵세포와 공동배양한 후 말초혈액단핵세포에서 분비되는 TNF- α 의 양을 ELISA로 정량하여 나타낸 그래프이다.
- [38] 도 7b는 인간 지방유래 중간엽 줄기세포-하이드로겔-생분해성 지지체 시트 또는 비분해성 지지체 시트를 동종의 활성화된 말초혈액단핵세포에 첨가하여 공동배양한 후 말초혈액단핵세포에서 분비되는 TNF- α 의 양을 ELISA로 정량한 후 TNF- α 의 분비 억제율 (%)로 환산하여 나타낸 그래프이다.
- [39] 도 8a는 당뇨병성 창상 모델에 인간 지방유래 중간엽 줄기세포-하이드로겔-생분해성 지지체 시트 또는 비분해성 지지체 시트, 비히클 대조군, 하이드로겔 대조군, 단일 줄기세포 대조군 처치 후 시험 결과를 나타낸 그래프이다. y축은 원래 창상면적에 대한 백분율 (%)를 나타내고, x축은 처치 후 일수를 나타낸다.
- [40] 도 8b는 당뇨병성 창상 모델에 인간 지방유래 중간엽 줄기세포-하이드로겔-생분해성 지지체 시트 또는 비분해성 지지체 시트, 비히클 대조군, 하이드로겔 대조군, 단일 줄기세포 대조군 처치 후 날짜별로 관찰한 결과이다.
- 발명의 실시를 위한 최선의 형태**
- [41] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명에서는 지방유래 중간엽 줄기세포-하이드로겔-생분해성 또는 비분해성 지지체를 포함하는 피부 재생 또는 상처 치료용 조성물, 시트 및 이의 제조 방법을 제공한다.
- [42] 본 발명은 (a) 지방조직에서 중간엽 줄기세포를 분리하여 증식배지에서 2세대 이상 배양하는 단계; (b) 배양한 지방유래 중간엽 줄기세포를 하이드로겔을

이용하여 생분해성 지지체 및 비분해성 지지체로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 1종 이상의 지지체, 또는 1종 이상의 생분해성 지지체 및 1종 이상의 비분해성 지지체의 조합체에 부착시켜 지방유래 중간엽 줄기세포-하이드로겔-지지체를 수득하는 단계; 및 (c) 단계(b)에서 수득된 지방유래 중간엽 줄기세포-하이드로겔-지지체를 증식배지에서 배양하는 단계를 포함하고, 여기에서 단계(a) 또는 단계(c)의 증식배지는 FBS(fetal bovine serum), 및 bFGF(basic fibroblast growth factor), EGF(epidermal growth factor), TGF-beta1(transforming growth factor beta-1), PDGF(platelet-derived growth factor), VEGF(Vascular endothelial growth factor), HGF(hepatocyte growth factor) 및 IFG-1(insulin-like growth factor)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 1종 이상의 인자를 포함하는 배지인, 피부 재생 또는 상처 치료용 시트의 제조방법에 관한 것이다.

- [43] 본 발명에 따른 일 양태에서, 상기 증식배지에 포함되는 인자는 보다 구체적으로 bFGF(Basic Fibroblast Growth Factor), EGF(Epidermal Growth Factor), 또는 이들의 조합일 수 있다.
- [44] 본 발명에 따른 일 양태에서, 중간엽 줄기세포는 CD29, CD44, CD73, CD90 및 CD105에 대하여 양성이며, CD34 및 CD45에 대해 음성인 자가 또는 동종유래 세포이다.
- [45] 본 발명에 따른 일 양태에서, 창상 치료용 시트를 제조하기 위하여 줄기세포를 하이드로겔과 혼합하여 지지체 1 cm² 당 4,000 내지 6,000개로 균일하게 도포하고, FBS, bFGF 및 EGF로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나 이상이 포함되는 배지에서 배양하여 지지체 1 cm² 당 줄기세포 20,000개 이상, 보다 구체적으로 20,000개 내지 200,000개가 되도록 증식시키는 단계를 포함한다.
- [46] 본 발명에 따른 일 양태에서, 상기 단계(c)에서, 물리적 자극, 저산소 자극, 마이토겐 자극 및 IFN- γ 와 같은 염증인자 자극으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 자극을 추가적으로 수행하여 세포를 활성화시키는 단계(d)를 추가로 포함할 수 있다. 특히 당뇨병 창상으로 손상된 조직의 경우, 혈관이 파괴되거나 기능이 저하되어 산소공급이 원활하지 못하고 만성 염증이 존재하기 때문에 손상된 조직에 투여된 줄기세포는 저산소 스트레스 및 염증인자에 의해 활성화되고 성장인자 및 사이토카인 분비가 급격히 증가된다. 따라서 지지체 시트 제조단계에서 저산소 스트레스, 마이토겐 또는 염증인자를 처리하여 고농도의 성장인자와 사이토카인을 분비하는 고효율의 줄기세포를 포함하는 조성물, 시트를 제조할 수 있다.
- [47] 본 발명에 따른 일 양태에서, 하이드로겔로는 피브린 글루, 히알루론산, 젤라틴, 콜라겐, 알긴산, 셀룰로오스 또는 펙틴을 사용할 수 있으나, 이로 제한되는 것은 아니다. 하이드로겔로서 피브린 글루를 사용할 경우, 피브린 글루는 0.5 내지 30 mg/mL 농도, 구체적으로 0.5 내지 20 mg/mL의 농도, 보다 구체적으로 0.5 내지 10 mg/mL 농도, 보다 더 구체적으로 0.5 내지 5 mg/mL 농도의 피브리노젠을

- 포함하는 것을 특징으로 하며, 1 내지 50 I.U./mL 농도, 구체적으로 1 내지 30 I.U./mL 농도, 보다 구체적으로 5 내지 20 I.U./mL 농도의 트롬빈을 포함할 수 있다.
- [48] 본 발명에 따른 일 양태에서, 하이드로겔 자체만으로도 줄기세포-하이드로겔 시트의 제조가 가능하나, 하이드로겔은 강도가 낮아 기계적/물리적 힘에 의해 쉽게 찢어질 수 있어 시트의 크기가 제한되며 사용 시 세심한 주의가 요구되는 단점이 있는데, 생분해성 지지체 또는 비분해성 지지체에 중간엽 줄기세포-하이드로겔을 부착시키는 경우 지지체가 중간엽 줄기세포-하이드로겔의 강도를 높여 조작성이 보다 용이해질 수 있다.
- [49] 본 발명에 따른 일 양태에서, 생분해성 지지체로는 PGA(poly-gamma-glutamic acid), PLA(poly lactic acid), 비크릴 메쉬, 사람 양막, 소 양막 및 돼지 콜라겐, 키틴, 키토산, 피브로넥틴 및 텍스트란으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 1종, 또는 2종 이상의 조합을 사용할 수 있고, 비분해성 지지체로는 멸균된 부직포 섬유, PET(polyethylene terephthalate) 필름, PE(polyethylene) 필름 및 PP(polypropylene) 필름으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 1종, 또는 2종 이상의 조합을 사용할 수 있으나, 이로 제한되는 것은 아니다.
- [50] 본 발명에 따른 일 양태에서, 1종 이상의 생분해성 지지체 및 비분해성 지지체의 조합체를 지지체로 사용할 수 있으며, 예를 들면 PGA/부직포 섬유, PLA/부직포 섬유 또는 PGA/PLA/부직포 섬유의 형태로 사용할 수 있으나, 이로 제한되는 것은 아니다.
- [51] 본 발명에 따른 일 양태에서, 상처는 특히 당뇨성 창상일 수 있다.
- [52] 본 발명에 따른 일 양태에서, 상기 단계(c)에서, 지방유래 중간엽 줄기세포-하이드로겔-지지체를 1 내지 20 w/v% DMSO 및 1 내지 50 w/v% 인간혈청알부민을 함유하는 동결보관제에 넣어 냉동보관하는 단계(e)를 추가로 포함할 수 있으며, 여기에서 냉동보관 후 해동하였을 때 지방유래 중간엽 줄기세포의 생존율은 90% 이상인 것을 특징으로 한다.
- [53] 본 발명에 따른 또 다른 일 양태에서, 지방유래 중간엽 줄기세포 및 하이드로겔을 포함하며; 생분해성 지지체 및 비분해성 지지체로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 1종 이상의 지지체, 또는 1종 이상의 생분해성 지지체 및 비분해성 지지체의 조합체를 함유하는, 피부 재생 또는 상처 치료용 조성물이 제공된다.
- [54] 본 발명에 따른 일 양태에서, 하이드로겔은 피브린 글루, 히알루론산, 젤라틴, 콜라겐, 알긴산, 셀룰로오스 및 펙틴으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나, 이로 제한되는 것은 아니다. 하이드로겔로서 피브린 글루를 사용할 경우, 피브린 글루는 0.5 내지 30 mg/mL 농도, 구체적으로 0.5 내지 20 mg/mL의 농도, 보다 구체적으로 0.5 내지 10 mg/mL 농도, 보다 더 구체적으로 0.5 내지 5 mg/mL 농도의 피브리노겐을 포함하는 것을 특징으로 하며, 1 내지 50 I.U./mL 농도, 구체적으로 1 내지 30 I.U./mL 농도, 보다 구체적으로 5 내지 20

I.U./mL 농도의 트롬빈을 포함할 수 있다.

- [55] 본 발명에 따른 일 양태에서, 생분해성 지지체로는 PGA(poly-gamma-glutamic acid), PLA(poly lactic acid), 비크릴 메쉬, 사람 양막, 소 양막 및 돼지 콜라겐, 키틴, 키토산, 피브로넥틴 및 텍스트란으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 1종, 또는 2종 이상의 조합을 사용할 수 있고, 비분해성 지지체로는 멸균된 부직포 섬유, PET(polyethylene terephthalate) 필름, PE(polyethylene) 필름 및 PP(polypropylene) 필름으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 1종, 또는 2종 이상의 조합을 사용할 수 있으나, 이로 제한되는 것은 아니다.
- [56] 본 발명에 따른 일 양태에서, 1종 이상의 생분해성 지지체 및 비분해성 지지체의 조합체를 지지체로 사용할 수 있으며, 예를 들면 PGA/부직포 섬유, PLA/부직포 섬유 또는 PGA/PLA/부직포 섬유의 형태로 사용할 수 있으나, 이로 제한되는 것은 아니다.
- [57] 본 발명에 따른 일 양태에서, 상처는 특히 당뇨성 창상일 수 있다.
- [58] 본 발명에 따른 또 다른 일 양태에서, 상기 조성물을 유효성분으로 함유하는, 피부 재생 또는 상처 치료용 시트가 제공된다.

발명의 실시를 위한 형태

- [59] 본 발명에 따른 일 양태에서 보다 구체적으로 상기 방법은:
- [60] (a) 지방조직에서 중간엽 줄기세포를 분리하여 FBS(Fetal Bovine Serum), 성장인자인 bFGF(Basic Fibroblast Growth Factor) 또는 EGF(Epidermal Growth Factor)를 포함하는 증식배지에서 2계대 이상 배양하는 단계; (b) 배양한 지방유래 중간엽 줄기세포를 하이드로겔을 이용하여 생분해성 또는 비분해성 지지체, 또는 이들의 조합체에 부착하는 단계; (c) 상기 단계(b)의 지방유래 중간엽 줄기세포-하이드로겔-생분해성 또는 비분해성 지지체를 FBS, 성장인자인 bFGF 또는 EGF를 포함하는 배지에서 약 5일 동안 배양하여 시트를 제조하는 단계; (d) 상기 단계(c)의 배양시 물리적 자극, 저산소 자극, 마이토겐 자극, 염증인자 자극을 추가적으로 수행하여 세포를 활성화시키는 단계; (e) 상기 단계(c) 또는 단계(d)의 지방유래 중간엽 줄기세포-하이드로겔-생분해성 또는 비분해성 지지체 시트에 FBS와 성장인자인 bFGF 또는 EGF가 제거된 배지에서 세척하는 단계; (f) (c)의 중간엽 줄기세포-하이드로겔-생분해성 또는 비분해성 지지체 시트를 10% DMSO 및 5% 인간혈청알부민으로 구성된 동결보관제에 넣어 냉동 보관하는 단계; (g) 동결 보관된 중간엽 줄기세포-하이드로겔-생분해성 또는 비분해성 지지체 시트를 해동하여 생리식염수로 세척하여 동결보관제를 제거하는 단계; (h) 당뇨병성 창상에 창상크기에 따라 자른 후 상처 부위에 부착하는 단계; 및 (i) 상기 시트를 드레싱으로 덮어주는 단계를 포함한다. 상기 방법을 보다 구체적으로 살펴보면 다음과 같다.
- [61] 단계 a)에서 인간지방조직에서 중간엽 줄기세포를 분리하고 2계대 이상

배양하는 방법은 종래 기술 (한국등록특허 1,328,604)에 따른 것으로 증식배지를 사용하여 세포를 배양함으로써, 다량의 중간엽 줄기세포를 단시간 내에 효과적으로 얻을 수 있다. 종래 기술에 따라 2계대 이상 배양한 인간 지방유래 중간엽 줄기세포는 플라스틱 배양용기에 부착하여 섬유아세포 형태를 유지하며, CD10, CD13, CD29, CD44, CD59, CD71, CD90, CD105 및 Oct4에 대하여 양성이고, CD34, CD45, CD104, CD106 및 Stro-1에는 음성을 나타낸다. 또한 줄기세포로서 체외에서 지방세포, 뼈세포, 연골세포, 근육세포, 신경세포로 분화할 수 있는 능력을 가진다. 또한 VEGF, HGF, TGF- β 1, NGF, IGF와 같은 다양한 성장인자를 분비하며, 면역조절능력을 보유하고 있어 다양한 질환치료에 적용하는 기술이 개발되고 있다.

- [62] 상기 b) 단계에서는 a)에서 2계대 이상 배양한 지방유래 중간엽 줄기세포를 트립신 또는 디스파아제 처리하여 단일세포로 만들고 하이드로겔에 현탁한 후 생분해성 또는 비분해성 지지체 섬유에 약 5,000 개/cm² 농도로 균일하게 뿌려 부착시켰다. 이후 10% FBS 및 EGF 또는 bFGF가 포함된 증식배지를 이용하여 3~5일 동안 배양하였다. 본 발명의 실시예에서 사용한 하이드로겔은 피브린 겔이나, 이에 한정되지는 않으며 이외에도 콜라겐, 히알루론산, 젤라틴, 알긴산, 셀룰로오스, 펙틴을 포함할 수 있다.
- [63] 또한 본 발명의 실시예에서 사용한 생분해성 지지체는 비크릴 메쉬 또는 소양막을, 비분해성 지지체로는 덜균된 거즈, PET 필름이나, 이 또한 이에 한정되지 않고, PGA/부직포 섬유, PGA/PLA/부직포 섬유, 사람 양막, 콜라겐 막 등을 사용할 수 있다.
- [64] 본 발명에 있어서 하이드로겔은 일차적으로는 생분해성 또는 비분해성 지지체 섬유 또는 PET 필름, PE 필름, PP 필름에 중간엽 줄기세포를 부착시키는 기능을 수행하고, 이차적으로는 부착성 세포인 중간엽 줄기세포에 기질을 제공하여 세포가 기질에 부착하여 안정적으로 생존할 수 있는 환경을 제공한다. 또한 하이드로겔은 무수히 많은 3차원 망목 구조 (pore)를 포함하고 있어 배양액에 포함된 FBS, bFGF 또는 EGF가 망목 구조를 통과하여 세포에 작용하여 증식할 수 있는 환경을 제공한다. 하이드로겔은 제조하는 농도에 따라 망목 구조의 크기, 경도, 분해속도가 다르기 때문에 세포의 형태 및 증식 속도에 주요한 영향을 미치게 된다. 본 발명의 실시예에서는 최종 0.5-10 mg/mL의 피브린 겔을 사용함으로써 중간엽 줄기세포의 증식속도를 높였으며, 반면 적절한 겔의 경도가 유지되도록 하였다.
- [65] 상기 c) 단계에서 중간엽 줄기세포-하이드로겔-생분해성 또는 비분해성 지지체 시트에서 중간엽 줄기세포는 빠르게 증식하여 3~5일 동안 4배 이상 증가하며 cm² 당 20,000개 이상의 세포를 포함할 수 있다.
- [66] 본 발명에서, 하이드로겔 내에서 증식한 세포는 지방유래 중간엽 줄기세포의 특성인 CD29, CD44, CD73, CD90, CD105를 발현하며, VEGF, HGF를 포함한 다양한 성장인자를 분비할 수 있다. 또한 면역세포에서 분비되는 대표적인

- 염증성 인자인 TNF- α 와 IFN- γ 억제 능력도 보유하고 있다. 즉, 하이드로겔 내에서 배양된 세포는 중간엽 줄기세포의 특성을 유지하는 것을 특징으로 한다.
- [67] 또한, 상기 c) 단계에서는 저산소 스트레스, 마이토겐 (mitogen) 처리, 염증인자 (IFN- γ) 처리를 혼용할 수 있다. 당뇨병성 창상으로 손상된 조직은 혈관이 파괴되거나 기능이 저하되어 산소공급이 원활하지 못하고 만성적인 염증이 존재하기 때문에 손상된 조직에 투여된 줄기세포는 저산소 스트레스 및 염증인자에 의해 활성화되고 성장인자 및 사이토카인 분비가 급격히 증가된다.
- [68] 앞서 설명한 바와 같이 본 발명은 지방유래 중간엽 줄기세포-하이드로겔-생분해성 또는 비분해성 지지체 시트 제조 단계에서 저산소 스트레스, 마이토겐 또는 염증인자를 처리하여 고농도의 성장인자와 사이토카인을 분비하는 고효성의 줄기세포를 포함하는 시트의 제조방법을 제공하고 있다.
- [69] 또한, 본 발명에 따라 제조한 지방유래 중간엽 줄기세포-하이드로겔-생분해성 또는 비분해성 지지체 시트는 고효성의 줄기세포가 단백질분해효소를 이용한 단리과정 없이 그대로 창상에 도포될 수 있기 때문에 치료능력이 뛰어나다. 또한, 단백질분해효소를 이용한 단리 과정이 없기 때문에 배양하는 단계에서 중간엽 줄기세포에서 분비되는 콜라겐, 라미닌, 피브로넥틴, 엘라스틴과 같은 세포외기질이 온전하게 하이드로겔에 침포되어 존재하여 창상 치료를 촉진할 수 있다.
- [70] 앞서 설명한 바와 같이 본 발명의 상기 b) 단계에서 하이드로겔 자체만으로도 줄기세포-하이드로겔 시트의 제조가 가능하다. 그러나 하이드로겔은 강도가 낮아 기계적/물리적 힘에 의해 쉽게 찢어지기 때문에 시트의 크기가 제한적이고 사용시 세심한 주의가 요구된다. 반면, 본 발명에 따라 줄기세포-하이드로겔을 생분해성 또는 비분해성 지지체에 부착하게 되면 지지체가 줄기세포-하이드로겔의 강도를 높여 조작이 용이하도록 하였다. 또한 시트의 두께는 0.1~2 mm로 제조하여 상처에 적용시 시트가 찢어지는 것을 방지하고 시트 내 충분한 세포수가 포함되도록 하여 치료 효과를 높였다.
- [71] 본 발명의 e) 단계는 지방유래 중간엽 줄기세포-하이드로겔-생분해성 또는 비분해성 지지체 시트는 생리식염수로 2~3회 세척하여 동물유래 성분인 FBS를 제거하고 보다 완전하게 제거하기 위하여 무혈청 DMEM 배지에서 세척할 수 있다. 상기 과정에서 FBS가 제거되어 시트를 인체에 도포할 때 동물유래 성분에 의해 발생할 수 있는 부작용을 최소화하였다.
- [72] 본 발명은 또한 지방유래 중간엽 줄기세포-하이드로겔-생분해성 또는 비분해성 지지체 시트를 동결보관하는 방법을 포함한다. 크라이오백에 시트가 충분히 잠기도록 10% DMSO와 5% 인간혈청알부민 용액으로 구성된 동결보관제를 넣고 실링한 후 -80°C에서 보관할 수 있다. 일반적으로 단백질효소 처리하여 단리된 세포, 인공피부 (표피세포 또는 진피세포 또는 두 가지 세포 모두로 구성된 인공피부)는 -80°C에서 동결 보관할 경우 세포가 손상되어 상처에

적용할 때 치료효과가 감소되는 것으로 알려져 있다 (*Tissue eng 4(4):1403-414, 1988*). 그러나 본 발명에 따라 제조한 중간엽 줄기세포-하이드로겔-생분해성 또는 비분해성 지지체 시트는 하이드로겔이 줄기세포를 감싸고 있어 외부 충격 및 스트레스로부터 세포를 보호하여 -80°C 에서도 세포의 손상 없이 장기간 보관이 가능하도록 하였다.

[73] 본 발명에 따른 일 실시양태에서, 상처 치료를 증진시키는 데 유용한 유효량의 1종 이상의 성장인자, 사이토카인, 호르몬 또는 세포외매트릭스 화합물 또는 단백질을 본 발명에 따른 조성물과 함께 투여할 수 있으며, 구체적으로 GCSF, IL6, IL8, IL10, MCP1, MCP2, 조직인자, bFGF, KGF, VEGF, PLGF, MMP1, MMP9, TIMP1, TIMP2, TGF-beta1, HGF 등을 그 예로 들 수 있으나 이로 제한되는 것은 아니다.

[74] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명한다. 단, 이들 실시예는 본 발명의 예시일 뿐, 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

[75] 실시예 1: 인간 지방유래 중간엽 줄기세포의 배양 방법

[76] 지방 조직은 보통 지방 흡입술로 얻을 수 있지만, 이에 한정되지는 않는다.

[77] 지방 흡입에 의해 얻어진 지방 조직으로부터 다음과 같이 지방유래 중간엽 줄기세포를 분리하였다: 혈액을 제거하기 위해 지방 조직을 같은 부피의 PBS로 3~4 회 세척하였다. 지방 조직과 같은 부피의 콜라게나제 용액을 넣어 37°C 수욕에서 반응시켰다. 이를 원심분리용 튜브에 옮겨 넣고 20°C , 1,500 rpm에서 10 분 동안 원심분리하였다. 상층액인 지방층을 제거하고, 아래층인 콜라게나제 용액을 흔들리지 않도록 조심해서 분리하였다. 기질배지를 넣어 현탁시킨 후, 20°C , 1,200 rpm에서 5 분 동안 원심분리하였다. 이때, 아래에 가라앉는 것이 스트로마-혈관 분획으로, 상층액을 제거하였다. 스트로마-혈관 분획을 기질배지에 현탁시켜 배양용기에 접종하고, 37°C , 5% CO_2 인큐베이터에서 24 시간 동안 배양하였다. 배양액 제거 후 인산염 완충용액으로 세척하고, 기질배지, 또는 기질배지에 염기성 섬유아세포 성장인자(bFGF)가 1 ng/ml 농도로 포함된 증식배지, 또는 기질배지에 표피세포 성장인자(EGF)가 5 ng/ml 농도로 포함된 배지를 이용하여 증식시켰다. 지방유래 중간엽 줄기세포가 배양용기의 80~90% 정도로 자라면 트립신 처리하여 단일 세포로 분리하여 수득하였다.

[78] 실시예 2: 하이드로겔로써 피브리린 글루의 농도 결정

[79] 동결 건조된 트롬빈은 염화칼슘용액 1 mL을 첨가하여 400~600 I.U. 가 되도록 하였다. 또는 동결된 트롬빈을 해동하여 동일 농도가 되도록 조절한 후 사용하였다. 동결 건조된 피브리노겐에 아프로티닌 용액 1 mL을 첨가하거나 동결된 피브리노겐을 해동하여 71.5~126.5 mg/mL (원액)로 준비한 후 1:5, 1:10, 1:20, 1:40이 되도록 단계별 희석하였다. 상기 실시예 1에서 2세대 이상 배양한 세포를 수집하여 현탁한 후 트롬빈을 40~50:1의 비율 (v/v)로 섞어준 후 단계별 희석한 피브리노겐과 1:1 혼합하여 피브리린 겔이 형성되도록 하였다. 30분 후

겔이 완전히 굳으면 10% FBS, 1 ng/mL bFGF가 포함된 배양배지를 첨가한 후 37 °C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 5일 동안 배양하였다. 배양 2일째와 5일째 세포-피브린 겔 혼합물을 취하여 얇게 절편을 만든 후 10 µg/mL 아크린딘 오렌지/에티뉼 브로마이드 (AO/EtBr)로 염색하고 형광현미경을 이용하여 세포형태와 생존율을 측정하였다. 또한 배양 5일째 WST-1을 첨가하여 세포증식 정도를 측정하였다.

- [80] 도 1a는 원액 또는 희석된 피브리노겐 용액으로 제조한 피브린 겔 내에서 줄기세포의 형태와 수를 보여주는 현미경 사진이다. 피브리노겐 원액으로 만들어진 피브린 겔 내에서는 5일째까지 대부분의 세포가 구형의 세포형태를 그대로 유지하고, 거의 증식하지 못하였다. 반면, 희석배수가 증가할수록 세포는 빠르게 섬유아세포 형태를 형성하였고 더 많이 증식하였다. 원액 피브리노겐으로 제조한 피브린 겔 (36~64 mg) 내에서는 일부 죽은 세포가 관찰되었으나 희석한 피브리노겐으로 제조한 피브린 겔 내에서는 죽은 세포가 관찰되지 않았다. 즉, 36~64 mg의 고농도 피브린 겔은 지방유래 중간엽 줄기세포에 대한 세포독성이 약하게 존재하지만 18~32 mg 이하 농도의 피브린 겔은 세포독성이 없음을 보여주는 것이다.
- [81] 도 1b는 피브리노겐 겔에 따른 줄기세포의 증식능력을 WST-1을 이용하여 정량적으로 측정하여 나타낸 그래프로 희석배수가 증가할수록 흡광도가 증가하였다. 즉, 피브리노겐을 20배 (3.6~6.3 mg/mL) 또는 40배 (1.8~3.2 mg/mL) 희석하여 만든 피브린 겔에서 줄기세포가 가장 잘 증식함을 알 수 있다.
- [82] 실시예 3: 인간 지방유래 중간엽 줄기세포-하이드로겔-생분해성 또는 비분해성 지지체 시트 제조
- [83] 상기 실시예 1에서 2세대 이상 배양한 중간엽 줄기세포를 수집하여 증식배지로 현탁하였다. 상기 실시예 2의 결과에 기초하여 트롬빈을 최종 8~15 I.U.가 되도록 세포현탁액에 첨가하였다. 지지체로써, 약 10 x 10 cm 크기의 사각형 모양의 생분해성 지지체인 비크릴 메쉬, 소양막 또는 비분해성 지지체인 거즈 및 PET 필름에 약 3~6.5 mg/mL 농도의 피브리노겐을 도포하여 균일하게 도포하였다. 그 후 트롬빈이 포함된 세포현탁액을 지지체에 cm² 당 약 5,000개가 되도록 도포한 후 위-아래로 조심스럽게 흔들어 세포-피브린 겔이 지지체에 균일하게 형성되어 부착되도록 하였다. 30분 후 피브린 겔이 완전히 굳으면 증식배지를 첨가하고 37 °C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 3~5일 동안 배양하였다.
- [84] 도 2a는 인간 지방유래 중간엽 줄기세포를 피브린 하이드로겔과 혼합하여 생분해성 지지체인 비크릴 메쉬, 소양막, 비분해성 지지체인 거즈 또는 PET 필름에 부착시킨 후 배양하여 제조된 시트의 사진이다. 즉, 본 발명에 따라 세포-하이드로겔을 생분해성 또는 비분해성 지지체에 부착하여 시트를 제조함으로써 시트의 강도를 높여 손쉽게 다룰 수 있도록 하였다. 또한, 세포-하이드로겔-생분해성 또는 비분해성 지지체 시트의 두께는 0.1~2 mm로 임상적 적용시 시트가 쉽게 찢어지거나 파손되는 것을 방지하고 줄기세포의

함량을 높임으로써 치료효과를 증대시킬 수 있도록 하였다.

- [85] 도 2b는 시트를 현미경 또는 AO/EtBr 염색 후 형광현미경으로 관찰한 사진이다. 도 2b에서 보여주듯이 0일에는 구형의 지방유래 중간엽 줄기세포가 지지체에 낮은 농도로 분포되어 있었으나, 5일 동안 배양한 후에는 섬유아세포형태의 세포가 하이드로겔에 의해 지지체에 부착되어 증식된 것이 관찰되었다. 시트 cm²당 약 20,000 ~ 60,000개의 세포가 균질하게 분포하였으며 100% 생존하였다.
- [86] 또 다른 실시예로, 5일 동안 배양한 상기 시트를 생리식염수로 세척하여 FBS를 제거하고 무혈청 DMEM을 첨가하여 37°C에서 10일 동안 방치하였다. 3일, 5일, 7일, 10일째 EtBr/AO 염색 후 생존율을 측정하였다. 그 결과, 도 2c에서 보여주듯이 상기 발명에 따라 제조한 시트 내에서 지방유래 중간엽 줄기세포는 무혈청 배지에서도 섬유아세포형태를 유지하였고 3일째 98% 이상, 7일째 90% 이상, 10일째는 80% 이상 생존하였다.
- [87] 실시예 4: 인간 지방유래 중간엽 줄기세포-하이드로겔-생분해성 또는 비분해성 지지체 시트의 동결보관
- [88] 상기 실시예 3에서 제조한 인간 지방유래 중간엽 줄기세포-하이드로겔-생분해성 또는 비분해성 지지체 시트를 세척하여 세포배양액을 제거한 후 동결보관제 (10% DMSO 및 인간혈청알부민 용액)가 들어 있는 크라이오백에 넣어 -80°C에서 동결 보관하였다. 약 1달 후 상기 크라이오백을 꺼내 37°C 항온수조에 담근 후 흔들어 동결보관제를 녹여 따라 버렸다. 생리식염수를 첨가한 후 위-아래로 흔들어주고 따라버렸다. 1~3회 더 추가 세척하여 동결보관제를 완전히 제거한 후 AO/EtBr로 염색하여 생존율을 측정하였다.
- [89] 그 결과 도 3에 나타난 바와 같이, -80°C에서 동결보관 후 해동한 인간 지방유래 중간엽 줄기세포-하이드로겔-생분해성 또는 비분해성 지지체는 시트의 형태 및 강도가 그대로 유지되었으며, 시트 내 세포도 95% 이상 생존하고 있음을 보여주고 있다. 즉, 본 발명에 따라 제조된 인간 지방유래 중간엽 줄기세포-하이드로겔-생분해성 또는 비분해성 지지체 시트는 주유효 성분인 세포의 손상 없이 -80°C에서 장기간 냉동보관이 가능함을 보여주고 있다.
- [90] 실시예 1: 인간 지방유래 중간엽 줄기세포-하이드로겔-생분해성 또는 비분해성 지지체의 생물학적 특성
- [91] 상기 실시예 1에서 분리 및 배양한 지방유래 중간엽 줄기세포는 종래 기술 (한국등록특허 1,328,604호)에 따른 것으로 CD10, CD13, CD29, CD44, CD59, CD71, CD90, CD105 및 Oct4에 대하여 양성이고, CD34, CD45, CD104, CD106 및 Stro-1에는 음성이었다. 상기 실시예 1에서 수득한 세포를 이용하여 제조한 실시예 3의 시트를 효소처리하여 피브린 글루를 녹여낸 후 단일세포로 분리하였다. 수집된 세포를 1.5 ml 원심분리용 튜브에 옮긴 후 FACS 염색용액(1% 우태아혈청이 포함된 인산염완충용액) 1 ml를 넣고 잘 섞은 다음,

- 10,000 rpm으로 5초 동안 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 FACS 염색용액 1 ml에 재부유하여 10,000 rpm으로 5초 동안 원심분리한 후 상층액을 제거하고 FACS 염색용액 300 μ l에 재부유하였다. 샘플 수에 따라 원심분리용 튜브 당 약 0.5~1.0 x 10⁶개의 세포가 포함되도록 새로운 튜브에 분주하고 항체를 첨가한 후 얼음에서 30분 동안 반응하였다. FACS 염색용액 1 ml에 재부유하여 10,000 rpm으로 5초 동안 원심분리한 후 상층액을 제거하였다. FACS 고정액 400 ~ 500 μ l를 첨가하여 재부유하고 유세포 분석기를 이용하여 분석하였다.
- [92] 그 결과, 도 4에서 보여주는 것과 같이, 본 발명에 따라 하이드로겔 내에서 배양한 지방유래 중간엽 줄기세포는 여전히 CD29, CD44, CD73, CD90, CD105에 양성반응을 보였으며, CD34, CD45에 음성인 면역학적 특성을 유지하였다. 단, CD105의 발현은 70% 이하로, 종래 기술 (한국등록특허 1,328,604호)에 따라 배양하였을 때와 비교하여 20% 이상 감소하였다.
- [93] 실험예 2: 인간 지방유래 중간엽 줄기세포-하이드로겔-생분해성 또는 비분해성 지지체의 성장인자 분비
- [94] 실시예 3의 인간 지방유래 중간엽 줄기세포-하이드로겔-생분해성 또는 비분해성 지지체 시트 또는 실시예 4의 동결보관된 시트를 해동하여 PBS로 세척한 후 0.8 x 0.8 cm로 자른 후 24-well 플레이트에 2장씩 넣고 DMEM 1 ml를 첨가하였다. 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 72시간 배양한 후 상층액을 수집한 후, 중간엽 줄기세포에서 분비되는 대표적인 성장인자인 VEGF, HGF의 양을 ELISA 법을 이용하여 측정하였다. 그 결과, 도 5a에서 보여주는 바와 같이, 상기 시트는 HGF 및 VEGF를 분비하였다.
- [95] 또 다른 실시예로, 상기 수집한 상층액을 혈관형성과 관련된 사이토카인 어레이 키트를 이용하여 분석하였다. 그 결과, 도 5b에서 보여주는 바와 같이, 상기 시트는 혈관형성을 촉진하는 HGF, VEGF를 비롯한 성장인자와 서프린(Serpin) E1(PAI-1)과 F1 (PDEF), TIMP-1, CXCL8 (IL-8), FGF-2, DPPIV (CD26)과 같은 다양한 사이토카인을 다량 분비하였다. 즉, 본 발명에 따라 제조한 하이드로겔 및 생분해성 또는 비분해성 지지체를 이용하여 배양한 중간엽 줄기세포를 당뇨병성 창상과 같은 상처 부위에 적용하면 세포증식 및 혈관형성을 촉진하는 다양한 성장인자와 사이토카인이 지속적으로 분비됨으로써 상처 치유를 용이하게 할 수 있다는 점을 알 수 있었다.
- [96] 실험예 3: 인간 지방유래 중간엽 줄기세포-하이드로겔-생분해성 또는 비분해성 지지체의 ECM 분비능
- [97] 상기 실시예 3에서 제조한 지방유래 중간엽 줄기세포-하이드로겔-생분해성 또는 비분해성 지지체의 동결절편을 만든 후 3.7% 포름알데히드를 포함하는 PBS로 30분 동안 고정시켰다. PBS로 3회 세척하고 5% 정상 염소 혈청 (normal goat serum)과 0.1% 트리톤(triton)-X100을 포함하는 PBS로 30분 동안 침투 (permeablization) 및 블로킹 (blocking)을 수행하였다. 1차 항체를 포함하는 PBS를 첨가한 후 37°C에서 1 시간 동안 반응시킨 후 PBS로 3회 세척하고, 2차 항체를

첨가한 후 상온에서 30 분 동안 반응시켰다. PBS로 3회 세척한 후 마운팅 하고 형광현미경으로 관찰하였다.

- [98] 도 6은 시트 내 지방유래 중간엽 줄기세포의 세포외기질단백질 (extracellular matrix; ECM)의 분비능을 보여주는 사진으로(x400), 여기에 나타난 바와 같이 본 발명에 따라 제조한 지방유래 중간엽 줄기세포-하이드로겔-생분해성 또는 비분해성 지지체는 전체적으로 콜라겐 타입 I, 피브로넥틴 및 라미닌에 양성반응을 나타내었다. 즉, 본 발명에 따라 제조한 지방유래 중간엽 줄기세포-하이드로겔-생분해성 또는 비분해성 지지체를 구성하는 세포는 다양한 종류의 세포외기질을 다량 분비할 뿐만 아니라 분비된 세포외기질이 하이드로겔 내에 머물러 있어 체내에 이식하였을 때 다양한 기질을 제공함으로써 창상치유를 용이하게 할 수 있다.
- [99] 실험예 4: 동종의 인간 지방유래 중간엽 줄기세포-하이드로겔-생분해성 또는 비분해성 지지체의 면역조절기능
- [100] 실시예 3의 인간 지방유래 중간엽 줄기세포-하이드로겔-생분해성 또는 비분해성 지지체 시트 또는 실시예 4의 동결보관된 시트를 해동하여 PBS로 세척한 후 각각 0.8 x 0.8 cm로 자른 후 24-well 플레이트에 1장씩 넣었다. 그리고 조직 적합성 항원 (Human Leukocyte Antigen; HLA)이 다른 공여자에서 얻은 말초혈액단핵세포 (peripheral Blood Mononuclear Cell; PBMC) 5 x 10⁵개를 24-well 플레이트에 첨가하였다. 양성대조군으로는 말초혈액단핵세포에 마이토겐 (mitogen)인 PHA (phyto-hemagglutinin)를 첨가하여 말초혈액단핵세포의 면역반응을 유발하였다. 반응 시작 후 3일째 상등액을 수집하여 분비된 TNF- α 의 양을 ELISA 방법을 이용하여 측정하였다.
- [101] 도 7a는 동종의 인간 지방유래 중간엽 줄기세포-하이드로겔-생분해성 또는 비분해성 지지체의 면역반응 유도능을 보여주는 도면으로, 여기에 나타난 바와 같이 양성대조군인 말초혈액단핵세포는 PHA에 의해 활성화되는 반면, 상기 실시예 3 또는 4에 따라 제조한 동종인간 지방유래 중간엽 줄기세포-하이드로겔-생분해성 또는 비분해성 지지체와의 반응에서는 TNF- α 가 거의 분비되지 않았다. 즉, 동종의 인간 지방유래 중간엽 줄기세포-하이드로겔-생분해성 또는 비분해성 지지체는 면역반응을 유발하지 않는 것이 확인되었다.
- [102] 또 다른 실험예로, 말초혈액단핵세포 5 x 10⁵개를 24-well 플레이트에 넣고 PHA로 활성화시켜 면역반응을 유발하고, 상기 실시예 3 또는 4에 따라 제조한 동종의 인간 지방유래 중간엽 줄기세포-하이드로겔-생분해성 또는 비분해성 지지체 시트를 0.8 x 0.8 cm로 자른 후 플레이트에 1장씩 첨가하였다. 반응 3일째 상등액을 수집하여 TNF- α 의 분비량을 측정하였다.
- [103] 그 결과, 도 7b에서 보여주는 바와 같이 PHA로 활성화된 말초혈액단핵세포에서 동종인간 지방유래 중간엽 줄기세포-하이드로겔-생분해성 또는 비분해성 지지체 시트는 TNF- α 의

분비량을 60% 이상 감소시켰다. 즉, 동종인간 지방유래 중간엽 줄기세포-하이드로겔-생분해성 또는 비분해성 지지체 시트는 면역반응을 유발하지 않으며, 또한 과도한 면역반응이 발생했을 때는 면역세포에 의해 다량 분비되어 면역반응성을 증가시키는 역할을 하는 TNF- α 의 분비량을 현저히 감소시키는 역할을 한다. 따라서 지방유래 중간엽 줄기세포-하이드로겔-생분해성 또는 비분해성 지지체 시트를 당뇨병성 창상에 덮어주면 지속되는 창상의 염증을 완화시켜 창상이 치유되도록 도울 수 있다.

- [104] 실험예 5: 지방유래 중간엽 줄기세포-하이드로겔-생분해성 또는 비분해성 지지체 시트의 상처치유 효과
- [105] 수컷 db/db 당뇨병 마우스를 에스엘씨(일본)로부터 구입한 후 혈당이 250 mg/dL 이상이 될 때까지 순화하였다. 수술을 위하여 마우스에 럼푼과 졸레틸 50을 1:1로 혼합하여 복강에 투여하였다. 마취된 마우스의 등 부위를 제모기로 제모한 후 이소프로판올로 소독하였다. 마우스마다 등 양쪽에 직경 8 mm의 원형 생검 창상을 만들고, 원형의 창상이 유지되고 창상이 수축되는 것을 방지하기 위하여 실리콘 스플린트를 부착하였다. 창상을 디지털 카메라로 사진 촬영하였다. 실시예 3의 인간 지방유래 중간엽 줄기세포-하이드로겔-생분해성 또는 비분해성 지지체 시트를 창상과 동일한 크기로 잘라준 후 창상에 덮어주었다. 창상이 충분히 덮이도록 테가덤으로 드레싱하고 그 위에 탄력보호대로 한번 더 드레싱하였다. 5일 후 테가덤을 조심해서 떼어내고 사진을 촬영한 후 다시 테가덤으로 덮어주었다. 이후 약 2주에 걸쳐 3일에 한 번씩 연속 사진을 촬영하고 NIH 화상프로세싱 프로그램인 ImageJ를 이용하여 창상면적을 계산하여 초기 창상 면적에 대한 백분율(%)로 나타내어 정량하였다.
- [106] 그 결과, 도 8a에서 보여주는 것과 같이 창상 형성 후 8일까지는 인간지방유래 중간엽 줄기세포-하이드로겔-생분해성 또는 비분해성 시트를 처치한 군이 비히클 대조군 또는 하이드로겔 대조군의 창상 크기와 비교하여 감소하는 양상을 보였으나 통계적인 차이는 관찰되지 않았다. 그러나, 11일부터 인간 지방유래 중간엽 줄기세포-하이드로겔-생분해성 또는 비분해성 시트를 처치한 군이 비히클 대조군 또는 하이드로겔 대조군의 창상 크기보다 유의하게 더 작았으며, 14일째는 인간지방유래 중간엽 줄기세포-하이드로겔-생분해성 또는 비분해성 시트를 처치한 군의 대부분 창상이 완전히 닫힌 반면 비히클 대조군, 하이드로겔 대조군, 단일세포 처치군은 일부 개체를 제외하고 대부분 마우스에서 여전히 창상이 남아 있었다. 종래의 기술로 배양한 단일세포 처치군은 대조군과 비교하여 창상의 크기가 감소하였으나 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 즉, 종래 기술로 배양한 단일 인간지방유래 중간엽 줄기세포는 당뇨병성 창상에 대한 치유효과가 미비한 반면, 본 발명에 따라 제조한 인간지방유래 중간엽 줄기세포-하이드로겔-생분해성 또는 비분해성 지지체 시트는 당뇨병성 창상 치유 효과가 높았다.

산업상 이용가능성

- [107] 본 발명에 따른 고효성의 중간엽 줄기세포를 포함하는 조성물 또는 시트는, 단백질 분해효소를 이용한 단리(선별) 과정 없이 고효성의 줄기세포가 그대로 상처 부위에 도포될 수 있고, 배양 단계에서 중간엽 줄기세포로부터 분비되는 콜라겐, 라미닌, 피브로넥틴, 엘라스틴과 같은 세포외기질이 온전하게 하이드로겔에 침포되어 존재함으로써 종래 치료제에 비하여 피부 재생 및 상처 치료능력이 현저히 우수하며, 치료 기간을 단축시킬 수 있는 유리한 효과를 나타내는바 피부 재생 및 상처 치료용 조성물 또는 시트로 유용하게 사용될 수 있어 산업상 이용가능성이 있다.

청구범위

- [청구항 1] (a) 지방조직에서 중간엽 줄기세포를 분리하여 증식배지에서 2계대 이상 배양하는 단계; (b) 배양한 지방유래 중간엽 줄기세포를 하이드로겔을 이용하여 생분해성 지지체 및 비분해성 지지체로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 1종 이상의 지지체, 또는 1종 이상의 생분해성 지지체 및 1종 이상의 비분해성 지지체의 조합체에 부착시켜 지방유래 중간엽 줄기세포-하이드로겔-지지체를 수득하는 단계; 및 (c) 단계(b)에서 수득된 지방유래 중간엽 줄기세포-하이드로겔-지지체를 증식배지에서 배양하는 단계를 포함하고, 여기에서 단계(a) 또는 단계(b)의 증식배지는 FBS(fetal bovine serum), 및 bFGF(basic fibroblast growth factor), EGF(epidermal growth factor), TGF- β 1(transforming growth factor β -1), PDGF(platelet-derived growth factor), VEGF(Vascular endothelial growth factor), HGF(hepatocyte growth factor) 및 IFG-1(insulin-like growth factor)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 1종 이상의 인자를 포함하는 배지인, 피부 재생 또는 상처 치료용 시트의 제조방법.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 하이드로겔은 피브린 글루, 히알루론산, 젤라틴, 콜라겐, 알긴산, 셀룰로오스 및 펙틴으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 피부 재생 또는 상처 치료용 시트의 제조방법.
- [청구항 3] 제2항에 있어서, 피브린 글루는 0.5 내지 30 mg/mL 농도의 피브리노겐을 포함하는 것을 특징으로 하는, 피부 재생 또는 상처 치료용 시트의 제조방법.
- [청구항 4] 제2항에 있어서, 피브린 글루는 0.5 내지 10 mg/mL 농도의 피브리노겐을 포함하는 것을 특징으로 하는, 피부 재생 또는 상처 치료용 시트의 제조방법.
- [청구항 5] 제2항에 있어서, 피브린 글루는 1 내지 50 I.U./mL 농도의 트롬빈을 포함하는 것을 특징으로 하는, 피부 재생 또는 상처 치료용 시트의 제조방법.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 생분해성 지지체는 PGA(poly-gamma-glutamic acid), PLA(poly lactic acid), 비크릴 메쉬, 사람 양막, 소 양막 및 돼지 콜라겐, 키틴, 키토산, 피브로넥틴 및 텍스트란으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 1종, 또는 2종 이상의 조합이고, 비분해성 지지체는 멸균된 부직포 섬유, PET(polyethylene terephthalate) 필름, PE(polyethylene) 필름 및 PP(polypropylene) 필름으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 1종, 또는 2종 이상의 조합인 것을

- [청구항 7] 특징으로 하는, 피부 재생 또는 상처 치료용 시트의 제조방법.
제1항에 있어서, 1종 이상의 생분해성 지지체 및 비분해성 지지체의 조합체는 PGA/부직포 섬유, PLA/부직포 섬유 또는 PGA/PLA/부직포 섬유인 것을 특징으로 하는, 피부 재생 또는 상처 치료용 시트의 제조방법.
- [청구항 8] 제1항에 있어서, 상기 단계(c)에서, 물리적 자극, 저산소 자극, 마이토겐 자극 및 염증인자 자극으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 자극을 추가적으로 수행하여 세포를 활성화시키는 단계(d)를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 피부 재생 또는 상처 치료용 시트의 제조방법.
- [청구항 9] 제1항에 있어서, 상처는 당뇨성 창상인 것을 특징으로 하는, 피부 재생 또는 상처 치료용 시트의 제조방법.
- [청구항 10] 제1항에 있어서, 상기 단계(c)에서, 지방유래 중간엽 줄기세포-하이드로겔-지지체를 1 내지 20 w/v% DMSO(dimethyl sulfoxide) 및 1 내지 50 w/v% 인간혈청알부민을 함유하는 동결보관제에 넣어 냉동보관하는 단계(e)를 추가로 포함하고, 여기에서 냉동보관 후 해동하였을 때 지방유래 중간엽 줄기세포의 생존율이 90% 이상인, 피부 재생 또는 상처 치료용 시트의 제조방법.
- [청구항 11] 지방유래 중간엽 줄기세포 및 하이드로겔을 포함하며; 생분해성 지지체 및 비분해성 지지체로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 1종 이상의 지지체, 또는 1종 이상의 생분해성 지지체 및 비분해성 지지체의 조합체를 함유하는, 피부 재생 또는 상처 치료용 조성물.
- [청구항 12] 제11항에 있어서, 하이드로겔은 피브린 글루, 히알루론산, 젤라틴, 콜라겐, 알긴산, 셀룰로오스 및 펙틴으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 피부 재생 또는 상처 치료용 조성물.
- [청구항 13] 제12항에 있어서, 피브린 글루는 0.5 내지 30 mg/mL 농도의 피브리노겐을 포함하는 것을 특징으로 하는, 피부 재생 또는 상처 치료용 조성물.
- [청구항 14] 제12항에 있어서, 피브린 글루는 0.5 내지 10 mg/mL 농도의 피브리노겐을 포함하는 것을 특징으로 하는, 피부 재생 또는 상처 치료용 조성물.
- [청구항 15] 제12항에 있어서, 피브린 글루는 1 내지 50 I.U./mL 농도의 트롬빈을 포함하는 것을 특징으로 하는, 피부 재생 또는 상처 치료용 조성물.
- [청구항 16] 제11항에 있어서, 생분해성 지지체는 PGA(poly-gamma-glutamic acid), PLA(poly lactic acid), 비크릴 메쉬, 사람 양막, 소 양막 및

돼지 콜라겐, 키틴, 키토산, 피브로넥틴 및 텍스트란으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 1종, 또는 2종 이상의 조합이고, 비분해성 지지체는 멸균된 부직포 섬유, PET(polyethylene terephthalate) 필름, PE(polyethylene) 필름 및 PP(polypropylene) 필름으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 1종, 또는 2종 이상의 조합인 것을 특징으로 하는, 피부 재생 또는 상처 치료용 조성물.

[청구항 17]

제11항에 있어서, 1종 이상의 생분해성 지지체 및 비분해성 지지체의 조합체는 PGA/부직포 섬유, PLA/부직포 섬유 또는 PGA/PLA/부직포 섬유인 것을 특징으로 하는, 피부 재생 또는 상처 치료용 조성물.

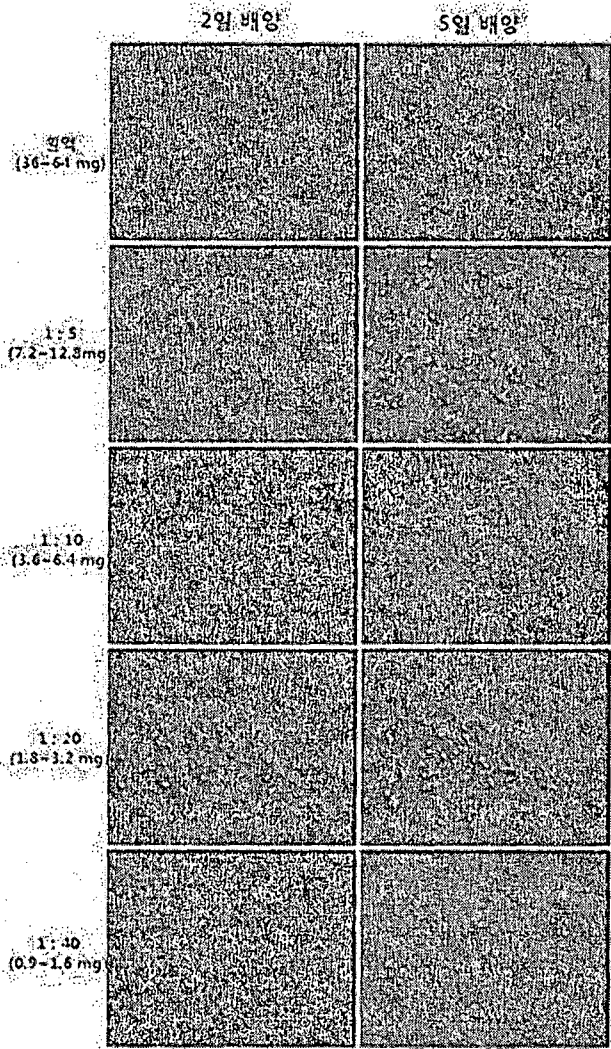
[청구항 18]

제11항에 있어서, 상처는 당뇨성 창상인 것을 특징으로 하는, 피부 재생 또는 상처 치료용 조성물.

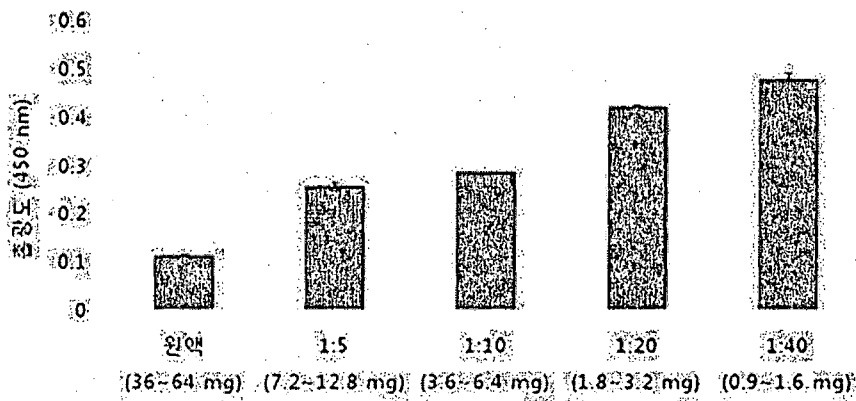
[청구항 19]

제11항 내지 제18항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 유효성분으로 함유하는, 피부 재생 또는 상처 치료용 시트.

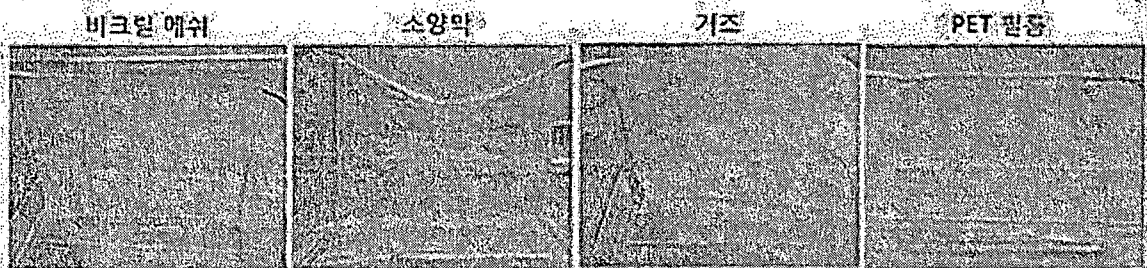
[Fig. 1a]



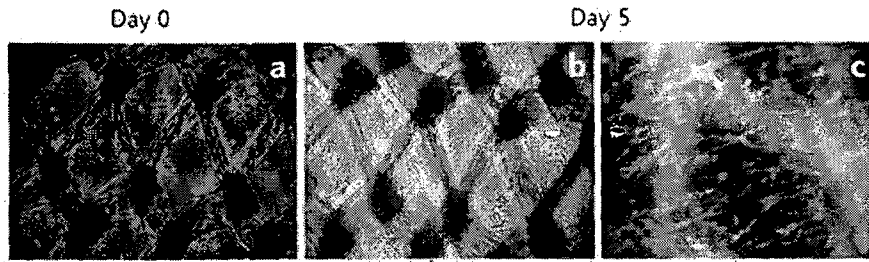
[Fig. 1b]



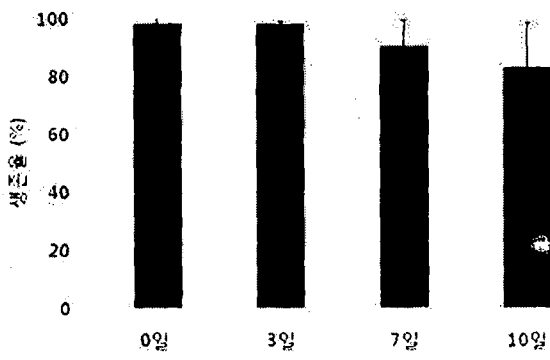
[Fig. 2a]



[Fig. 2b]



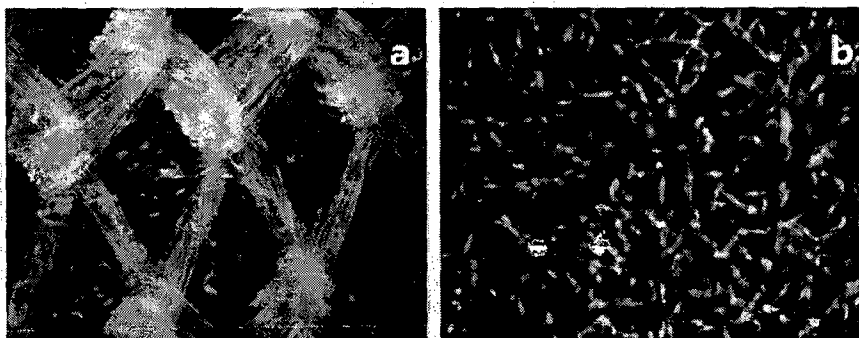
[Fig. 2c]



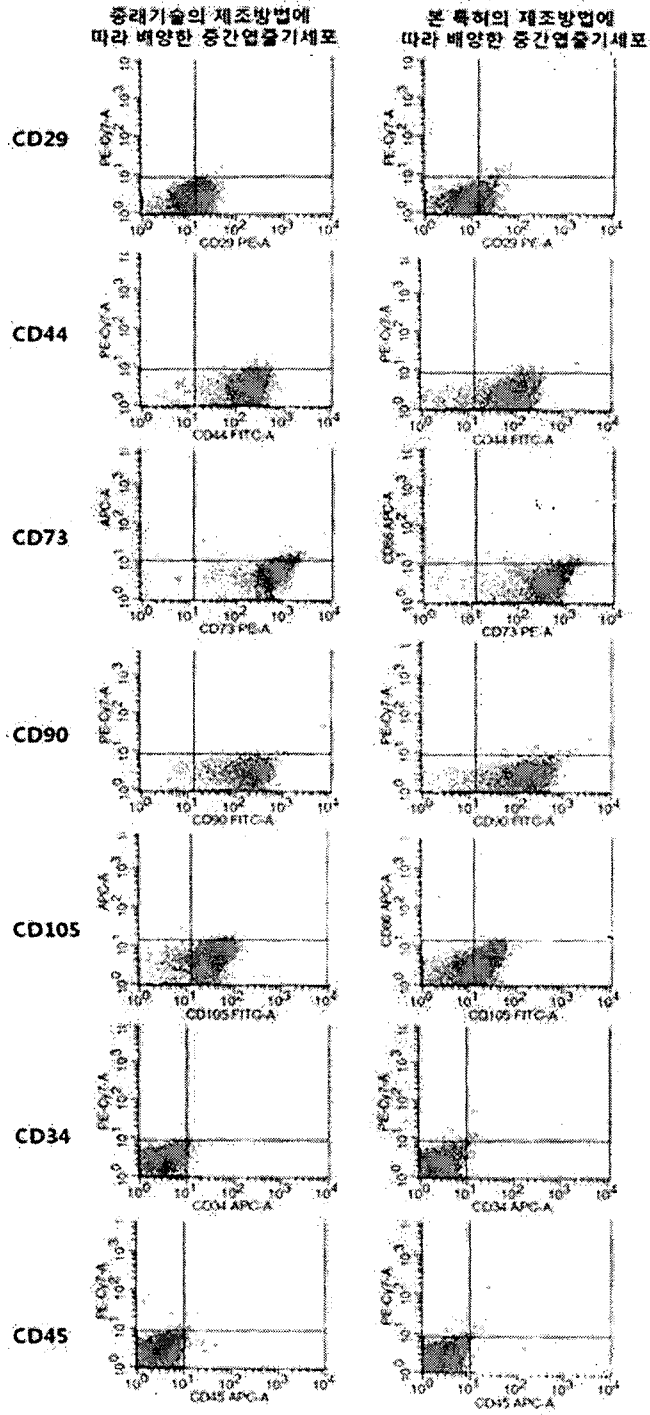
[Fig. 3a]



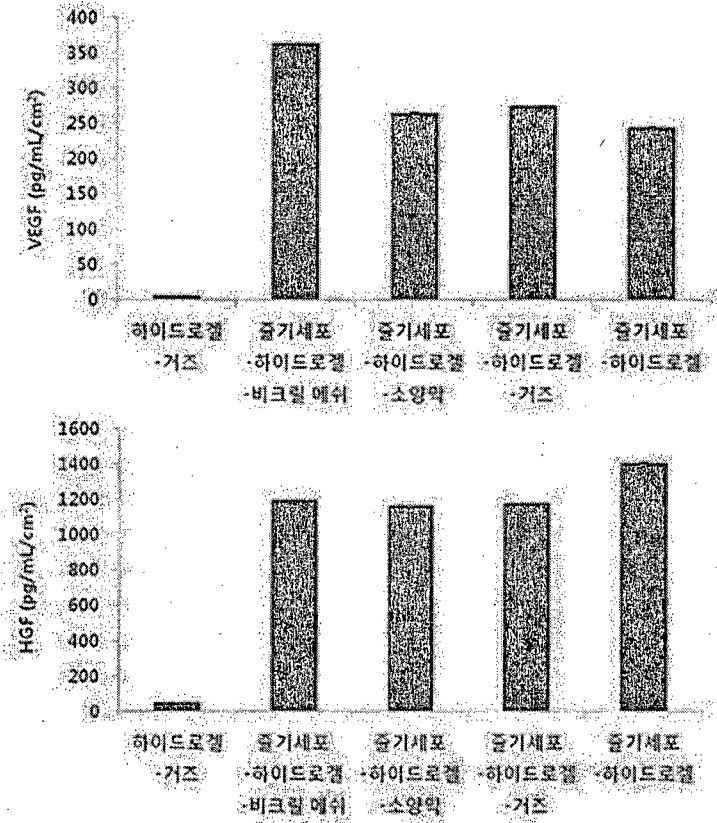
[Fig. 3b]



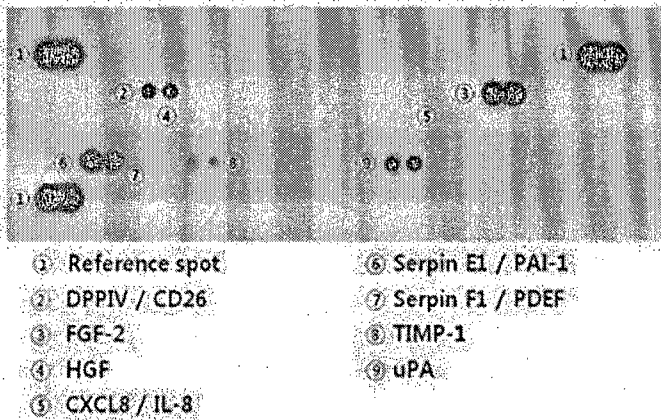
[Fig. 4]



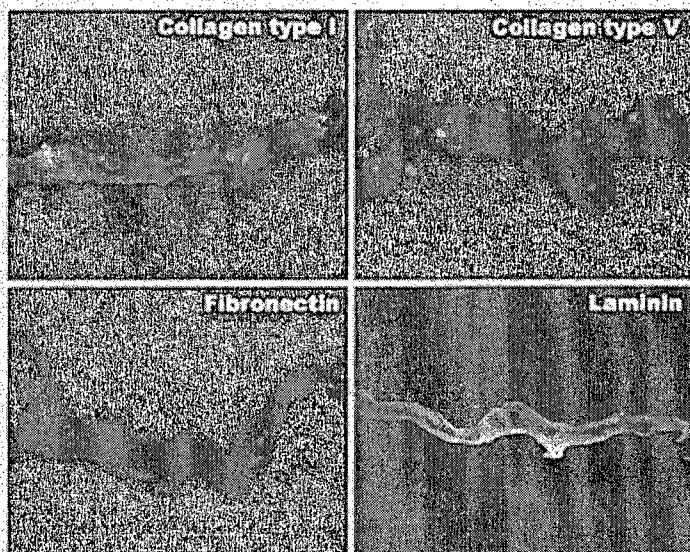
[Fig. 5a]



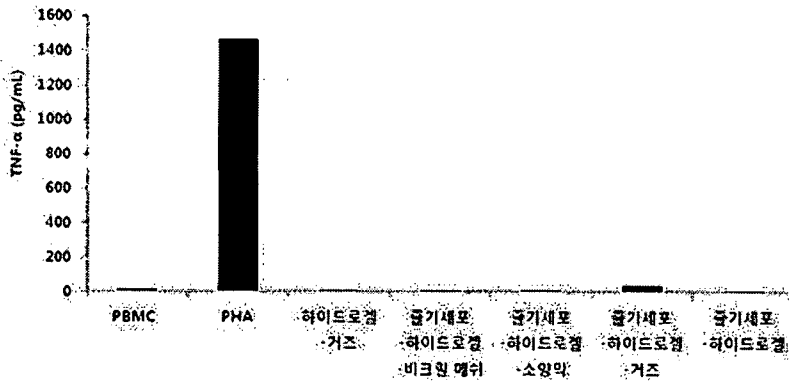
[Fig. 5b]



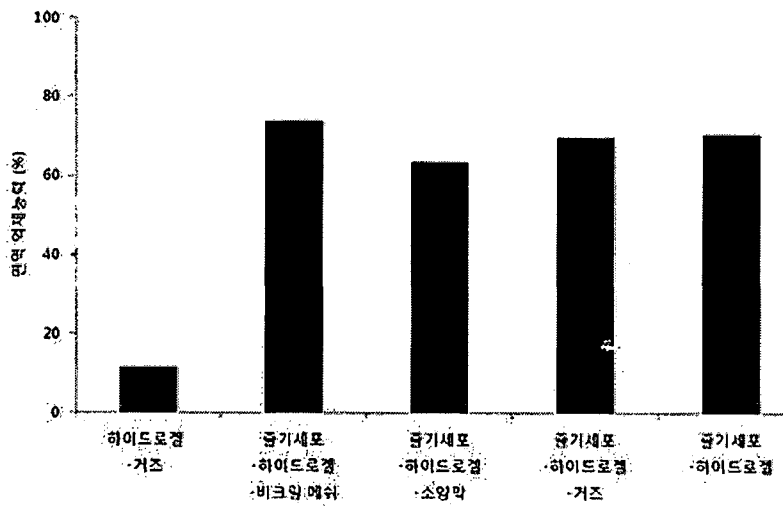
[Fig. 6]



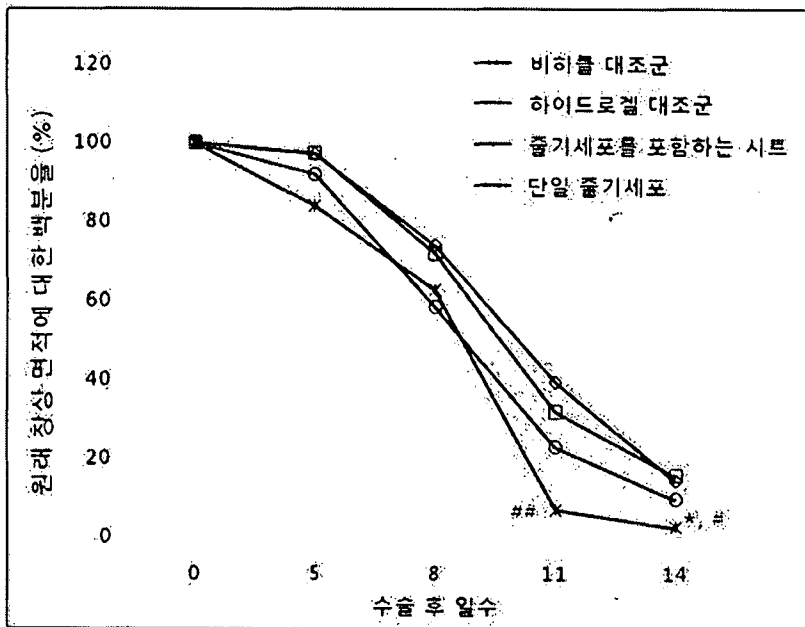
[Fig. 7a]



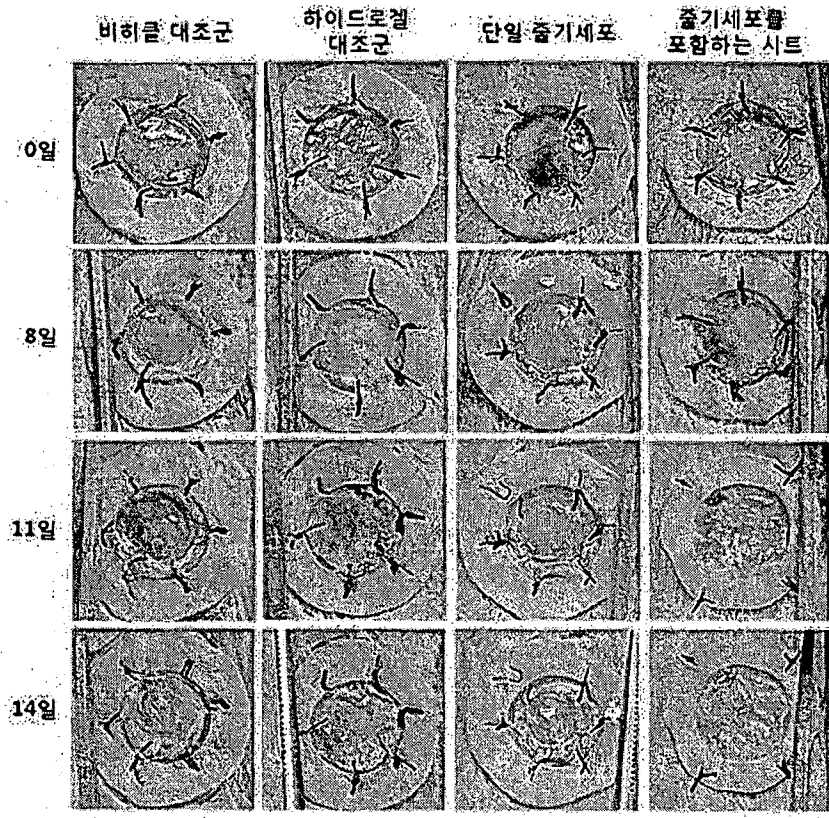
[Fig. 7b]



[Fig. 8a]



[Fig. 8b]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/006068

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61F 13/02(2006.01)i, A61L 15/44(2006.01)i, A61L 15/28(2006.01)i, A61K 35/12(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)

A61F 13/02; A61F 2/14; A61P 17/02; A61L 27/18; A61F 2/00; A61K 45/00; C12N 5/079; A61L 27/00; A61K 35/12; A61K 47/30; C12N 5/0775; A61L 31/00; A61K 47/48; A61L 15/44; A61L 15/28

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) & Keywords: mesenchymal stem cell, cultivation, hydro-gel, support, skin regeneration, wound, sheet

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-2008-0032212 A (ARBLAST CO., LTD. et al.) 14 April 2008 See abstract; paragraphs [0102]-[0191], [0307]; claims 1-13.	1-19
Y	KR 10-2012-0126284 A (ANTEROGEN CO., LTD.) 21 November 2012 See abstract; paragraph [0006]; claims 1-8.	1-19
A	KR 10-2009-0086066 A (UNIVERSITY OF VIRGINIA PATENT FOUNDATION) 10 August 2009 See abstract; claims 1-22.	1-19
A	US 2004-0101518 A1 (VACANTI, C. A. et al.) 27 May 2004 See abstract; claims 1-22.	1-19
A	KR 10-2007-0035592 A (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF ILLINOIS) 30 March 2007 See abstract; claims 1-14.	1-19
A	KR 10-2010-0049341 A (MCTT CO., LTD.) 12 May 2010 See abstract; claims 1-10.	1-19
A	KR 10-2013-0091818 A (AJOU UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 20 August 2013 See abstract; claims 1-3.	1-19



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

"I" 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

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

"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

"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)

"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

"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

"&" document member of the same patent family


Date of the actual completion of the international search

14 NOVEMBER 2014 (14.11.2014)

Date of mailing of the international search report

17 NOVEMBER 2014 (17.11.2014)

Name and mailing address of the ISA/KR


 Korean Intellectual Property Office
 Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
 Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2014/006068

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2008-0032212 A	14/04/2008	CA 2616794 A1	01/02/2007
		CN 42862 A	13/08/2008
		CN 42862 B	04/01/2012
		EP 1944045 A1	16/07/2008
		EP 1944045 A4	25/01/2012
		EP 1944045 B1	18/09/2013
		KR 10-1313033 B1	01/10/2013
		US 2009-0175954 A1	09/07/2009
		US 2012-0276080 A1	01/11/2012
		US 8231908 B2	31/07/2012
		WO 2007-013331 A1	01/02/2007
KR 10-2012-0126284 A	21/11/2012	NONE	
KR 10-2009-0086066 A	10/08/2009	AU 2008-320031 A1	22/05/2008
		AU 320031 B2	02/05/2013
		CA 2665475 A1	22/05/2008
		EP 2076275 A2	08/07/2009
		EP 2076275 A4	04/07/2012
		JP 2010-505849 A	25/02/2010
		US 2010-0111897 A1	06/05/2010
		WO 2008-060374 A2	22/05/2008
		WO 2008-060374 A3	27/11/2008
US 2004-0101518 A1	27/05/2004	AU 1999-62499 A	16/11/1999
		EP 1076533 A1	21/02/2001
		EP 1076533 A4	01/12/2004
		EP 1076533 B1	11/04/2007
		JP 04451985 B2	14/04/2010
		JP 2002-512842 A	08/05/2002
		US 7470425 B2	30/12/2008
		WO 99-55252 A1	04/11/1999
KR 10-2007-0035592 A	30/03/2007	AU 2005-260656 A1	12/01/2006
		AU 2005-260656 B2	22/09/2011
		CA 2579755 A1	12/01/2006
		CN 101084026 A0	05/12/2007
		EP 1793874 A2	13/06/2007
		EP 1793874 B1	19/12/2012
		JP 2008-504933 A	21/02/2008
		US 2008-0274185 A1	06/11/2008
		WO 2006-004951 A2	12/01/2006
		WO 2006-004951 A3	16/02/2006
KR 10-2010-0049341 A	12/05/2010	CN 07596 A	04/01/2012
		JP 2012-507510 A	29/03/2012
		KR 10-1101321 B1	02/01/2012
		US 2011-0256089 A1	20/10/2011
		WO 2010-062059 A2	03/06/2010

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2014/006068

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		WO 2010-062059 A3	19/08/2010
KR 10-2013-0091818 A	20/08/2013	KR 10-1364624 B1	19/02/2014
		WO 2013-119045 A1	15/08/2013

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))
A61F 13/02(2006.01)i, A61L 15/44(2006.01)i, A61L 15/28(2006.01)i, A61K 35/12(2006.01)i

B. 조사된 분야
조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
A61F 13/02; A61F 2/14; A61P 17/02; A61L 27/18; A61F 2/00; A61K 45/00; C12N 5/079; A61L 27/00; A61K 35/12; A61K 47/30; C12N 5/0775; A61L 31/00; A61K 47/48; A61L 15/44; A61L 15/28

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: 중간엽 줄기세포, 배양, 하이드로젤, 지지체, 피부 재생, 상처, 시트

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	KR 10-2008-0032212 A (아르브라스트 가부시키가이샤 외) 2008.04.14. 요약; 문단 [0102]-[0191], [0307]; 청구항 1-13 참조.	1-19
Y	KR 10-2012-0126284 A ((주)안트로젠) 2012.11.21. 요약; 문단 [0006]; 청구항 1-8 참조.	1-19
A	KR 10-2009-0086066 A (유니버시티 오브 버지니아 페이턴트 파운데이션) 2009.08.10. 요약; 청구항 1-22 참조.	1-19
A	US 2004-0101518 A1 (VACANTI, C. A. 외) 2004.05.27. 요약; 청구항 1-22 참조.	1-19
A	KR 10-2007-0035592 A (더 보오드 오브 트러스티스 오브 더 유니버시티 오브 일리노이즈) 2007.03.30. 요약; 청구항 1-14 참조.	1-19
A	KR 10-2010-0049341 A (주식회사 엠씨티티) 2010.05.12. 요약; 청구항 1-10 참조.	1-19
A	KR 10-2013-0091818 A (아주대학교산학협력단) 2013.08.20. 요약; 청구항 1-3 참조.	1-19

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 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌
 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.
 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.
 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌
 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일 2014년 11월 14일 (14.11.2014)	국제조사보고서 발송일 2014년 11월 17일 (17.11.2014)
--	---

ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-472-7140	심사관 한인호 전화번호 +82-42-481-3362
---	------------------------------------



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2008-0032212 A	2008/04/14	CA 2616794 A1	2007/02/01
		CN 42862 A	2008/08/13
		CN 42862 B	2012/01/04
		EP 1944045 A1	2008/07/16
		EP 1944045 A4	2012/01/25
		EP 1944045 B1	2013/09/18
		KR 10-1313033 B1	2013/10/01
		US 2009-0175954 A1	2009/07/09
		US 2012-0276080 A1	2012/11/01
		US 8231908 B2	2012/07/31
		WO 2007-013331 A1	2007/02/01
KR 10-2012-0126284 A	2012/11/21	없음	
KR 10-2009-0086066 A	2009/08/10	AU 2008-320031 A1	2008/05/22
		AU 320031 B2	2013/05/02
		CA 2665475 A1	2008/05/22
		EP 2076275 A2	2009/07/08
		EP 2076275 A4	2012/07/04
		JP 2010-505849 A	2010/02/25
		US 2010-0111897 A1	2010/05/06
		WO 2008-060374 A2	2008/05/22
		WO 2008-060374 A3	2008/11/27
US 2004-0101518 A1	2004/05/27	AU 1999-62499 A	1999/11/16
		EP 1076533 A1	2001/02/21
		EP 1076533 A4	2004/12/01
		EP 1076533 B1	2007/04/11
		JP 04451985 B2	2010/04/14
		JP 2002-512842 A	2002/05/08
		US 7470425 B2	2008/12/30
		WO 99-55252 A1	1999/11/04
KR 10-2007-0035592 A	2007/03/30	AU 2005-260656 A1	2006/01/12
		AU 2005-260656 B2	2011/09/22
		CA 2579755 A1	2006/01/12
		CN 101084026 A0	2007/12/05
		EP 1793874 A2	2007/06/13
		EP 1793874 B1	2012/12/19
		JP 2008-504933 A	2008/02/21
		US 2008-0274185 A1	2008/11/06
		WO 2006-004951 A2	2006/01/12
		WO 2006-004951 A3	2006/02/16
KR 10-2010-0049341 A	2010/05/12	CN 07596 A	2012/01/04
		JP 2012-507510 A	2012/03/29
		KR 10-1101321 B1	2012/01/02
		US 2011-0256089 A1	2011/10/20
		WO 2010-062059 A2	2010/06/03

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		WO 2010-062059 A3	2010/08/19
KR 10-2013-0091818 A	2013/08/20	KR 10-1364624 B1	2014/02/19
		WO 2013-119045 A1	2013/08/15