

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2017년 2월 2일 (02.02.2017)



(10) 국제공개번호
WO 2017/018629 A1

- (51) 국제특허분류:
A61L 27/38 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2016/002428
- (22) 국제출원일: 2016년 3월 11일 (11.03.2016)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2015-0106974 2015년 7월 29일 (29.07.2015) KR
- (71) 출원인: 고려대학교산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) [KR/KR]; 02841 서울시 성북구 안암로 145 고려대학교, 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, 14-1106, Seoul (KR). 김종호 (KIM, Jong-Ho); 02853 서울시 성북구 안암로 30, 501호, Seoul (KR). 서하림 (SEO, Ha-Rim); 50964 경상남도 김해시 흥동로 104, 303호, Gyeong-sangnam-do (KR).
- (74) 대리인: 이처영 (LEE, Cheo Young) 등; 06133 서울시 강남구 테헤란로 123 11층, Seoul (KR).

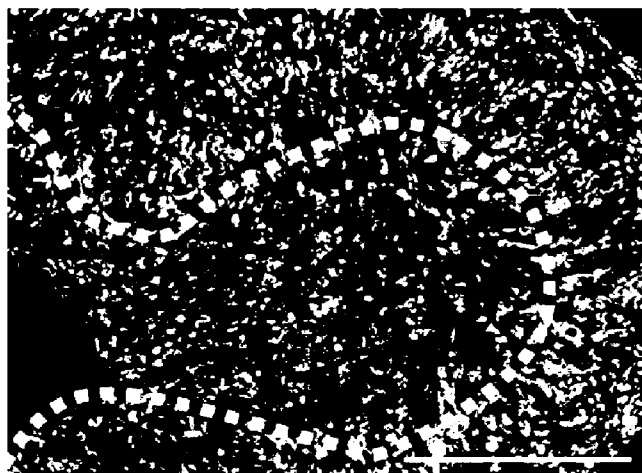
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, 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, 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 제 21 조(3))

(54) Title: MYOCYTE-MIXED SHEET USING STEM CELL SUPPORT, AND MANUFACTURING METHOD THEREFOR

(54) 발명의 명칭 : 줄기세포 지지체를 이용한 근세포 혼합시트 및 그의 제조방법



(57) Abstract: The present invention relates to a myocyte-mixed sheet using a stem cell support, and a manufacturing method therefor and, more specifically, to a method for manufacturing an *in vivo*-implantable, myocyte-mixed sheet by using adipose-derived stem cells as a support. According to the present invention, the myocyte-mixed sheet using an adipose-derived stem cell support, can be easily manufactured in a short period of time at low cost and enables stable and safe *in vivo* implantation of cells, which are difficult to be manufactured in sheets individually, thereby being useful for industrial purposes in addition to clinical application such as local regenerative therapy.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]

WO 2017/018629 A1



본 발명은 줄기세포 지지체를 이용한 근세포 혼합시트 및 그의 제조방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 지방줄기세포를 지지체로 사용하여 생체 내로 이식 가능한 근세포와의 혼합시트를 제조하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 지방줄기세포 지지체를 이용한 근세포의 혼합시트는 단시간에 저비용으로 제조가 용이하고, 단독으로 시트제작이 어려운 세포를 안정적이고 안전하게 생체 내로 이식할 수 있으므로, 국소재생 치료 등의 임상적 응용 외에도 산업적으로 유용하다.

명세서

발명의 명칭: 줄기세포 지지체를 이용한 근세포 혼합시트 및 그의 제조방법

기술분야

- [1] 본 발명은 줄기세포 지지체를 이용한 근세포 혼합시트 및 그의 제조방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 지방줄기세포를 지지체로 사용하여 생체 내로 이식 가능한 근세포와의 혼합시트를 제조하는 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 줄기세포 (stem cell)는 자기 복제 능력 및 어떤 조직으로든 분화할 수 있는 능력을 가진 미분화 세포이다. 미분화 상태의 줄기세포를 각각의 적절한 조건을 제공해주면, 다양한 세포와 조직으로 분화할 수 있다. 이러한 줄기세포의 분화 능력을 이용한 손상된 조직의 재생 치료가 활발히 연구되고 있다.
- [4] 대표적으로 지방줄기세포 (adipose-derived stem cell; ADSC)와 같은 다분화능 (multipotency)을 가지는 줄기세포는 조직이나 기관의 특이적인 세포로만 분화할 수 있는 줄기세포로서, 조직의 성장과 발달 및 성체 조직의 유지와 재생을 유도하는 기능을 가지고 있다. 이러한 조직 특이적 다분화능 세포들을 총칭하여 성체 줄기세포라 한다 (A. Miranville *et al.*, *Circulation*, 110:349, 2004). 성체줄기세포는 인간 배아에서 추출한 배아 줄기세포와 달리, 성체의 조직에서 추출하기 때문에 윤리적인 문제가 적으며 자가 재생 능력이 뛰어나고 지방, 골, 연골, 혈관내피, 심장근세포 등으로 분화하는 다분화능을 가지고 있다. 또한, 다른 조직에서보다 많은 양의 줄기세포를 얻을 수 있으며, 추출과정이 안전하고 용이하다는 장점이 있다 (P.A. Zuk *et al.*, *Tissue Eng.*, 7:211, 2001).
- [5] 최근 손상된 장기와 조직의 재생을 위하여 줄기세포를 이식한 후, 손상의 회복이 보고되었다 (Strauer *et al.*, *Circulation* 106:1913, 2002). 이에, 줄기세포를 이식하기 위해 손상된 장기나 조직에 직접 주사하는 방법 및 정맥혈관 등으로 주사하여 전신 투여하는 방법 등의 손상된 장기와 조직으로의 다양한 세포이식 방법이 시도되고 있다. 하지만, 이식된 줄기세포는 생착률 (engraftment)이 낮으며, 대부분이 씻겨나가는 (wash-out) 것으로 보고되고 있으며, 특히, 이식된 세포를 추적 관찰한 결과, 대부분이 폐나 신장에 존재함으로써 손상 입은 장기나 조직에서 직접적인 효과 또는 이식된 세포를 확인하는데 어려움이 있다. 이를 극복하기 위하여, 줄기세포의 양과 빈도를 높여 이식을 시행하고 있지만, 고농도의 세포 수를 지속적으로 반복 이식해야 하는 문제점이 있으며, 이식을 성공적으로 할지라도 열악한 세포환경의 등으로 기대 이상의 치료 효과를 보기에 한계가 있다.
- [6] 따라서, 최근 들어 세포 배양 시트를 이용한 치료법이 활발히 연구되고 있다.

세포 시트를 이용한 대표적인 방법으로, 표면이 온도 응답성 폴리머로 도말되어 있는 배양접시 방법이 제시되었다. 그러나 온도 응답성 폴리머로 도말되어 있는 배양접시의 배양은 많은 양의 세포를 이용한 세포 시트는 제작할 수 있으나, 다양한 종류의 세포와 배양의 상태에 따라 시트를 회수할 수 없는 단점이 있었다. 또한 이식될 부위의 크기에 따른 상이한 시트의 제조의 어려움과 그에 따른 경제적이 부담이 가중되는 실정이다. 따라서, 시트로 만들기 쉽지 않은 고동 (beating)하는 심장근세포를 포함한 다양한 세포를 안정적으로 이식하기 위해, 지지체를 이용한 세포이식 기술이 보고되었다. 대표적으로 고분자 물질과 혼합 지지체 및 생분해성 지지체 등을 이용한 시도들은 모두 생체재료를 사용함에도 불구하고, 이식된 세포가 생착될 기간 동안에 세포 생존을 보장하지 못하며, 이식의 저효율 및 시간적, 경제적, 이식 후의 부작용 측면에서 한계를 가진다.

- [7] 이에, 본 발명자들은 손상된 장기나 조직의 치료에 줄기세포의 다분화성 이점을 적용하여 기존의 세포 시트의 단점을 극복하기 위해 예의 노력한 결과, 지방줄기세포를 지지체로 사용한 심장근 세포의 혼합시트를 제작하여 혼합된 세포의 증식, 생존 및 안정적인 생착률 증가 등의 기능을 극대화 시킬 수 있는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

[8]

[9] **발명의 요약**

- [10] 본 발명의 목적은 줄기세포 지지체를 이용한 근세포 혼합시트의 제조방법 및 상기 방법으로 제조된 줄기세포 지지체를 이용한 근세포 혼합시트를 제공하는데 있다.

[11]

- [12] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (a) 지방줄기세포를 배양한 다음, 지방줄기세포에 이식용 근세포를 추가 시딩 (seeding)하여 함께 배양하는 단계; 및 (b) 상기 (a) 단계에서 배양된 지방줄기세포와 이식용 근세포의 혼합시트를 박리하여 회수하는 단계를 포함하는 지방줄기세포 지지체와 이식용 근세포의 혼합시트의 제조방법을 제공한다.

- [13] 본 발명은 또한, 상기 방법에 의해 제조된 지방줄기세포 지지체와 이식용 근세포의 혼합시트를 제공한다.

[14]

도면의 간단한 설명

- [15] 도 1은 단위 면적당 지방줄기세포의 밀도를 나타낸 그래프이다.

- [16] 도 2는 지방줄기세포를 낮은 밀도와 높은 밀도로 배양하여 분비하는 사이토카인을 비교한 나타낸 그래프이다.

- [17] 도 3은 지방줄기세포를 5×10^6 개를 시딩한 후, 광학현미경을 이용하여 획득한 사진이다 (스케일 바는 100 μm).

- [18] 도 4는 지방줄기세포를 이용한 시트형성 결과사진이다.
- [19] 도 5는 지방줄기세포 시트형성 후, 헤마톡실린-에오신 염색 (hematoxylin & eosin stain)으로 확인한 다층구조 사진이다 (스케일 바는 100 μm).
- [20] 도 6은 마우스 배아줄기세포 및 골수줄기세포를 CFDA (Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester) 염색 후, 시트형성을 확인한 사진이다.
- [21] 도 7은 마우스 배아줄기세포의 시트형성에 대한 핵 염색 사진이다.
- [22] 도 8은 마우스 골수줄기세포의 시트형성에 대한 핵 염색 사진이다.
- [23] 도 9는 심근경색이 유도된 심장에서의 지방줄기세포 시트와 지방줄기세포를 이식한 후 경시적으로 확인한 심장 내 존재 유무를 확인한 사진 및 생착율에 대한 결과이다.
- [24] 도 10은 심근경색이 유도된 심장에서의 지방줄기세포 시트와 지방줄기세포를 이식한 28일 후, 심장에서 존재 유무를 섬유화세포 (Masson's trichrome) 염색기법으로 확인한 다층구조 사진이다.
- [25] 도 11은 지방줄기세포 지지체를 이용한 마우스 배아줄기세포에서 유도된 고동하는 심장근세포 혼합시트를 만드는 과정에서 실시한 지방줄기세포와 마우스 배아줄기세포에서 유도된 고동하는 심장근세포 (그린)의 비율에 따른 결과이다 (스케일 바는 100 μm).
- [26] 도 12는 지방줄기세포 지지체를 이용한 마우스 배아줄기세포에서 유도된 고동하는 심장근세포 혼합시트 형성 후, 광학현미경을 이용하여 획득한 사진이다. 점선 내부가 고동하는 심장근세포가 존재하는 영역이다 (스케일 바는 100 μm).
- [27] 도 13은 지방줄기세포 지지체를 이용한 마우스 배아줄기세포에서 유도된 고동하는 심장근세포 혼합시트 형성 결과 사진이다.
- [28] 도 14는 지방줄기세포 지지체를 이용한 마우스 신생아의 심장근세포 혼합시트 형성 후, 광학현미경을 이용하여 획득한 사진이다.
- [29] 도 15는 지방줄기세포 지지체를 이용한 마우스 신생아의 심장근세포 혼합시트 형성 후, 면역형광염색법을 이용하여 심장근세포(레드)와 주변의 지방줄기세포 (핵; 블루)의 사진이다 (스케일 바는 100 μm).
- [30] 도 16은 지방줄기세포 지지체를 이용한 다양한 근세포 혼합시트 형성을 확인한 결과이다 (a: 심장근아세포, b: 관상동맥 평활근세포, c: 근육아세포).
- [31] 도 17은 지방줄기세포 (그린) 지지체를 이용한 다양한 근세포 (레드) 혼합시트 형성 후, 면역형광염색법을 이용하여 혼합시트의 핵 (블루)을 관찰한 사진이다 (a: 심장근아세포, b: 관상동맥 평활근세포, c: 근육아세포).
- [32]
- [33] **발명의 상세한 설명 및 바람직한 구현예**
- [34] 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.

[35]

[36] 본 발명에서는 지지체로서의 지방줄기세포를 일반 배양접시에서 배양한 후, 근세포를 추가 시딩하여 혼합시트를 제조한 결과, 다층을 형성하지 못하여 시트 제작이 어려운 고동하는 근세포와 줄기세포의 혼합시트를 제작할 수 있었다.

[37]

따라서, 본 발명은 일 관점에서 (a) 지방줄기세포를 배양한 다음, 지방줄기세포에 이식용 근세포를 추가 시딩 (seeding)하여 함께 배양하는 단계; 및 (b) 상기 (a) 단계에서 배양된 지방줄기세포와 이식용 근세포의 혼합시트를 박리하여 회수하는 단계를 포함하는 지방줄기세포 지지체와 이식용 근세포의 혼합시트의 제조방법에 관한 것이다.

[38]

본 발명은 다른 관점에서, 상기 방법에 의해 제조된 지방줄기세포 지지체와 이식용 근세포의 혼합시트에 관한 것이다.

[39]

본 발명에 있어서, 상기 상기 지지체는 지방조직 유래 줄기세포인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[40]

본 발명에서, 지지체로 사용된 지방줄기세포는 다양한 세포로의 분화 및 손상된 장기 또는 조직에서의 회복효과가 보고된 만큼 혼합하는 세포와의 협력효과 (synergistic effect)를 극대화를 위해 지방줄기세포를 사용하는 것이 바람직하다. 또한, 본 발명에서는 마우스 지방줄기세포를 사용하고 있으나, 이에 한정하지 않고, 인간, 백서, 돼지 그리고 원숭이들을 포함하는 모든 포유류에서 분리한 지방줄기세포의 사용이 가능하다.

[41]

상기 지지체로서의 지방줄기세포는 생체 내에서 유래하여 증식과 분화능을 가지며, 분화된 세포의 기능이 검증되어 있어 체내 이식 후, 손상된 장기 또는 조직에서 생착과 증식이 가능하다. 또한, 주위조직과 융화되어 염증 반응을 최소화 할 수 있는 특징이 있다.

[42]

지방줄기세포의 유래는 본 발명에서 특별히 그 종류를 한정하지 않으나, 지방조직은 성숙한 지방세포를 포함한 이를 둘러싸고 있는 다양한 주변 조직과의 결합되어 구성된 것으로 체내 위치에 상관없이 모든 지방조직을 총칭한다. 대표적으로 정소주위지방, 피하지방, 장간막지방, 위장지방 그리고 후복막지방조직들의 사용이 바람직하며, 본 발명에서는 대표적으로 남성 마우스에서 정소주위 지방조직을 분리, 세척하여 콜라게나제를 이용하여 순수한 지방줄기세포를 회수하여 사용하였다.

[43]

상기 분리 회수된 지방줄기세포는 배양 배지에서 2세대 까지 배양 후, 통상적 세포 표현형 마커를 이용하여 속성을 확인할 수 있다. 이 마커들은 CD13, CD29, CD34, CD44, CD49a, CD90 그리고 Sca-1 등이 바람직하나, 이들만으로 제한되지는 않는다. 또한, 다양한 세포 분화를 통하여 줄기세포의 역가를 평가할 수 있다. 분화유도는 지방, 골, 연골, 신경, 혈관내피, 심장근세포 등을 포함하며, 이들만으로 제한되지는 않는다.

[44]

본 발명에 있어서, 상기 지지체로서의 지방줄기세포 형성에 있어서, 36시간

동안 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터 (incubator)에서 배양하는 것이 바람직하다. 만약 배양 시간이 상기 시간 미만이면 지방줄기세포가 지지체로 형성되기까지 충분하지 않아 찢어지는 문제점이 있으며, 상기 시간 이상이면 오랜 배양 시간으로 인해 지방줄기세포의 줄기세포 역가의 저하, 저산소 (hypoxia)에 의한 세포사멸로 이어질 수 있는 문제점이 있으므로 상기 시간이 가장 적절하다.

- [45] 본 발명에 있어서, 상기 줄기세포는 $0.5 \sim 1.0 \times 10^6$ cells/cm² 밀도로 시딩 (seeding)하여 배양하는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [46] 일반적으로 일반 6 wells 플레이트에 시트제작이 가능한 밀도인 5×10^6 개 이상을 시딩하는 하는 것이 바람직하다. 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 초과되면 상대적으로 사멸한 세포가 많아져, 배양액의 혼탁 등 오염의 가능성이 높아지는 문제점이 있으므로 상기 면적당 밀도가 가장 적합하다. 본 발명에서는 지지체로서의 지방줄기세포 시트를 제작을 위한 시딩하는 최적의 면적 당 세포 양을 도출하였다 (도 1).
- [47] 본 발명에 있어서, 지지체로서의 지방줄기세포 시트 제조에서 세포 밀도에 따른 성장인자, 사이토카인 (cytokine) 및 호르몬들의 분비를 확인한 결과 성장인자인 Adiponectin, MCP-1, SDF-1, VEGFc, HGF, IGF 및 TGFβ1이 저밀도의 지방줄기세포보다 고밀도의 지방줄기세포에서 많이 분비되는 것을 확인하였다. 또한, 세포외기질에서는 Collagen I, Laminin-α4, Fibronectin 그리고 Vitronectin의 통계적 유의성 있는 분비를 확인할 수 있었는데, 이들의 분비는 반드시 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 인자들은 지방줄기세포간의 견고한 시트 형성을 도와주며, 이식 후 파라크린 효과 (paracrine effect)로 작용하여 보다 우수한 이식의 효과를 나타낼 수 있다 (도 2).
- [48] 줄기세포를 이용한 세포이식이 오랜 기간 동안 다양한 방법으로 시도되고 있으며, 최근 줄기세포 이식방법 중 하나로 세포시트를 이용하는 방법이 대두되고 있다. 그러나, 이식하는 세포의 특성에 따라 시트형성의 제약이 보고되고 있다. 예를 들어, 줄기세포나 다층 (multi-layer)을 형성하는 세포의 경우에는 제작에 제약이 없으나, 고동하는 심장근세포나 다층을 형성하지 못하는 세포는 현재의 시트제작 방법으로는 한계가 있다. 따라서, 본 발명은 이러한 세포 종류의 한계점을 극복할 수 있는 새로운 혼합시트 제작법을 제시한다.
- [49] 본 발명에 있어서, 추가 시딩하는 세포의 종류와 유래는 특별히 한정되지 않으며, 기존의 시트형태로 제작이 가능한 세포 및 불가능한 세포 모두가 포함된다. 본 발명에서는 백서 (rat) 유래 심장근아세포, 인간 유래 관상동맥 평활근세포, 마우스 유래 근육아세포인 것이 바람직하며, 고동하는 심장근세포인 것이 가장 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [50] 본 발명에 있어서, 추가 시딩하는 세포는 다층을 형성하지 못하거나 고동하는

이식용 근세포인 것이 바람직하며, 구체적으로 심장근세포, 심장근아세포, 평활근세포 또는 근육아세포인 것이 더욱 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [51] 본 발명에 있어서, 상기 근세포는 지지체로 사용된 지방줄기세포가 시딩된 6 wells plate 위에 2×10^6 개의 고동하는 심장근세포를 추가로 시딩하는 것을 특징으로 할 수 있다. 만약 상기의 추가 혼합세포의 개수가 상기 제시된 세포 수 미만이면 혼합세포의 생착율의 저하 및 증식면적이 좁아져 효과가 미미해지며, 반대로 상기 제시된 세포 수를 초과하면 지지체로 사용된 지방줄기세포의 저산소 상태 및 지지체의 강도를 감소할 수 있으므로 상기 범위 내에서 적절히 조절하여 사용하는 것이 바람직하다.
- [52] 본 발명에서는 추가 혼합세포로의 마우스 배아줄기세포에서 유도된 고동하는 심장근세포 혼합시트를 형성하는 최적의 비율을 도출하였다 (도 11).
- [53] 따라서, 본 발명에 있어서, 상기 줄기세포와 심장근세포는 2:3의 비율로 시딩 (seeding)하는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [54] 본 발명에 있어서, 고동하는 심장근세포 혼합시트 형성에 있어서, 48시간 동안 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 배양하는 것이 바람직하다. 만약 배양 시간이 상기 시간 미만이면 추가 혼합세포의 생착 및 안정화까지의 시간이 충분하지 않아 혼합시트가 만들어지지 않는 문제점이 있으며, 상기 시간 이상이면 오랜 배양 시간으로 지지체로서의 지방줄기세포의 과다한 증식으로 인한 줄기세포 역가의 저하, 저산소에 의한 세포사멸로 이어질 수 있는 문제점이 있으므로 상기 시간이 가장 적절하다.
- [55] 본 발명에서는 상기 세포 비율과 배양시간 조건을 동일하게 하여 지지체로 지방줄기세포를 이용한 다양한 종 및 유래의 근세포 혼합시트를 제작하고, 성공적인 혼합시트 형성을 확인하였다 (도 16 및 도 17).
- [56] 본 발명에 있어서, 상기 혼합세포 시트의 박리는 스크레이퍼를 사용하는 것것이 가장 바람직하나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다. 그러나 일반 배양접시의 특성상, 단백질 분해효소를 사용하면 모든 세포의 해리시키는 문제점이 있다.
- [57] 본 발명에 있어서, 상기 회수된 혼합세포 시트는 전체 배양접시 면적의 60% 이상인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 시트는 적절한 세포의 시딩에 기인하고, 손상된 장거나 조직의 면적을 보충하기 위해 자유로운 사이즈로 구성할 수 있다. 상기 지지체의 형상 및 면적에 대해서는 특별히 한정은 없다.
- [58] 또한, 회수한 혼합시트가 심장근세포와 혼합되어 있는지 검증하기 위하여 심장 특이적 마커를 이용하여 면역염색법으로 확인이 가능하다 (도 14 및 도 15). 마우스 배아줄기세포에서 심장근세포로 유도하게 되면 고동하는 심장근세포를 확인할 수 있으며, 이는 심장 특이적 마커를 이용하여 평가가 가능하다. 이 마커들은 cTnT (cardiac troponin T), cTnI (cardiac troponin I), α -cardiac actin,

α -actinin 및 MHC (myosin heavy chain) 등이 바람직하며, 이들만으로 제한되지는 않는다. 이런 세포의 표현형으로 심장 특이적 세포로 평가될 수 있다.

- [59] 본 발명의 지방줄기세포 지지체를 이용한 심장근세포 혼합시트의 이식에 있어서 심근경색 동물모델을 사용하였으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명에서는 부유된 지방줄기세포보다 지방줄기세포를 지지체로 이용한 시트가 오랜 기간 동안 생착한 결과를 얻었다 (도 9). 기존의 세포 혼합시트의 경우, 이식 후 3~4일째에 비해 28일 정도 경과한 후에는 생착율이 현저히 떨어지는 문제가 있어, 대부분 이식 후 세포의 존재를 확인한 정도에 그칠 뿐, 이식 효율이 우수한 세포 혼합시트가 없는 실정이다. 그러나, 본 발명의 지방줄기세포 지지체를 이용한 심장근세포 혼합시트는 도 6에 나타난 바와 같이, 이식 후 28일이 경과한 후에도 4일째와 비교하여 30% 정도의 우수한 생착율을 확인할 수 있다. 이는 공지의 세포 혼합시트 또는 국소주사요법에 비해 매우 우수한 생착율을 나타내는 것을 알 수 있다.
- [60] 나아가, 기존의 지지체의 소스로 제공되었던 다양한 물질 및 생체 재료는 부착성 및 이식에 중점을 둔 기술이나, 본 발명에 따른 지방줄기세포를 지지체로 이용한 시트는 부착성 이외에도 생체 내에서 오랫동안 생착 가능하고, 손상된 조직에서의 섬유화된 부위가 감소되는 회복효과를 나타내므로, 파라크린 효과 (paracrine effect)를 요구할 수 있는 우수한 시트이다 (도 10). 뿐만 아니라, 특정 세포를 표면이 온도 응답성 폴리머로 도말되어 있는 배양 접시에 배양하고, 피브리노겐 등의 생체물질을 이용하여 시트를 제작하는 기존의 방법의 경우 온도 응답성 폴리머로 도말되어 있는 배양 접시로 인해 장시간 배양이 불가능하다는 문제점이 있다. 이 밖에 시간과 비용이 많이 들고 생체 이외의 재료 사용으로 그에 따른 부작용이 보고되고 있어, 본 발명의 새로운 혼합시트 제작 방법은 이러한 한계점을 극복할 수 있다.
- [61] 본 발명의 이식 가능한 시트 제작용 지방줄기세포 지지체를 이용한 심장근세포 혼합시트의 제조방법은 기존의 온도 응답성 폴리머 배양접시, 생체, 화학재료를 사용하는 시트의 제조방법에 비하여 조작 (handling)이 용이하다. 또한, 기존의 구축된 장비를 이용하므로 경제적 부담이 적고, 세포 이식을 준비하는 시간을 최소화 할 수 있는 방법으로서, 이식 후에도 세포생존이 탁월하고 지방줄기세포를 이용하므로 부작용이 적어 세포이식이 필요한 장기 또는 조직에서 시트를 통한 세포치료의 향상된 효과를 기대할 수 있다.
- [62] 보다 구체적으로, 본 발명에서는 생체 내에 존재하는 지방줄기세포의 다양한 성장인자의 배출을 확인하였으며, 이러한 줄기세포를 사용함으로써 면역거부반응을 제거할 수 있다. 또한, 고동하는 심장근세포의 경우 단독으로 사용하여 시트를 제작하는 것이 어려울 뿐만 아니라 장기간 배양이 어려우며, 회수율이 높지 않다는 단점이 있다. 그러나, 본 발명에 따라 기존에 유용하게 사용되고 있는 지방줄기세포 시트를 지지체로 이용하면, 단독으로 세포시트로 제작하기 어려운 세포 (심장근세포와 같은 고동하는 세포)를 혼합하여 제조하여

회수율에 대한 문제를 해결할 수 있다. 또한, 지방줄기세포와의 혼합시트는 기타 화학적 처리나 생체 이외 재료를 사용하지 않고 순수하게 지방줄기세포와 다양한 세포를 혼합하여 특정 조직을 목적으로 한 이식이 가능한 세포시트라는 장점이 있다.

[63] 이렇게 만들어진 지방줄기세포 지지체를 이용한 심장근세포 혼합시트를 손상된 조직의 치료를 위하여 이식한 결과, 종래 보고된 단독 줄기세포의 이식에 비하여 세포 전달 성공률 및 기능회복이 증대되었다. 특히, 경색된 심근 내로의 이식에 있어서 경색부위에서 신생혈관생성의 증가를 확인하였으며, 이에 치료 시간을 단축시킬 수 있는 유리한 효과를 나타내었다.

[64] 따라서, 본 발명은 시간과 비용이 적게 소모될 뿐만 아니라, 일반 배양접시에 지방줄기세포를 다양한 세포와 혼합하여 단층이 아닌 밀도 높은 견고한 다층으로 구성된 혼합시트를 제작할 수 있다. 즉, 기존의 화학 및 생체 이외의 성분을 이용한 이식 방법과 달리 부작용이 없고 이식 후의 안정적인 효과를 나타내는, 안전하고 안정적인 국소 재생 치료 등의 임상 응용으로의 발전 가능성이 기대되는 세포의 혼합시트 제작법이다. 이에, 본 발명은 재생공학, 세포공학, 조직공학 그리고 의공학 등의 의학 및 생물학 분야에 매우 유용한 발명이다.

[65]

[66] 실시예

[67] 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.

[68]

[69] 실시예 1: 지지체로서의 지방줄기세포 시트제작

[70] 마우스의 정소주위 지방조직으로부터 순수한 지방줄기세포를 회수하였다.

회수한 줄기세포를 MesenCult™ Proloferation kit (스템셀 테크놀로지)를 이용하여 FBS와 다양한 성장인자를 포함하는 Basal medium에서 2세대 배양 후, 줄기세포마커로 알려진 Sca-1의 양성 발현을 확인하였으며, 지방, 골, 혈관내피 및 심장근세포의 4가지 세포로의 분화유도를 통해 줄기세포임을 검증하였다.

[71] 먼저, 면적당 세포의 밀도에 따른 시트형성의 유무를 알아보기 위하여, 다양한 세포밀도로 6 wells 플레이트에 시딩하였다.

[72] 그 결과, 5×10^6 개 이하의 세포밀도에서 최적의 밀도 조건을 도출하였다 (도 1). 또한, 높은 밀도의 지방줄기세포가 낮은 밀도보다 다양한 성장인자와 세포외기질의 분비가 더욱 증가함을 확인하였다 (도 2).

[73] 그 다음, 줄기세포를 48시간 동안 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 배양하여 광학현미경을 통해 세포의 형태를 확인한 후 (도 3), 스크레이퍼로 박리하여

시트를 회수하였다 (도 4 및 도 5).

[74]

[75] 실시예 2: 다양한 줄기세포를 이용한 시트제작

[76] 본 실시예에서는 마우스 유래의 배아줄기세포 및 마우스 유래의 성체줄기세포인 골수줄기세포를 이용한 줄기세포 시트 형성을 확인하였다.

[77] 각각의 줄기세포를 CFDA (Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester) 염색으로 라벨링 한 후, 실시예 1에서 확립한 세포밀도 조건(약 5×10^6 개 세포)으로 시딩하여 48시간 동안 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다. 마우스 배아줄기세포는 GMEM을 Basal medium으로 하여 FBS 및 성장인자를 추가한 배양액을 사용하였으며, 마우스 골수 줄기세포는 고량의 글루코스가 포함된 DMEM에 FBS를 추가한 배양액을 사용하여 배양하였다.

[78] 그 결과, 배아줄기세포와 골수줄기세포는 시트 형성 전에 낮은 밀도에 의해 와해되어 지지체로의 시트를 형성하지 못하거나, 시트를 형성하더라도 쉽게 찢어지는 문제가 발생하여 이식이 불가능한 결과를 확인할 수 있었다 (도 6).

[79] 이에, 상기 CFDA 라벨링 된 배아줄기세포와 골수줄기세포의 동결절편을 이용하여 염색된 세포의 조밀도 및 시트 형성 여부를 다시 확인하였다. CFDA에 의해 그린으로 염색된 줄기세포의 핵을 DAPI (블루)로 염색한 후, 100, 200 및 400배의 광학현미경으로 관찰하였다.

[80] 그 결과, 마우스 유래의 배아줄기세포는 지지체로서 시트를 형성하지 못하고 단편으로 나뉘어져 있음을 알 수 있었으며 (도 7), 마우스 유래의 골수줄기세포는 다층의 세포층이 형성되는 것이 간헐적으로 관찰되었지만, 이들이 여러 단편으로 존재하였다 (도 8).

[81] 따라서, 배아줄기세포 및 골수줄기세포는 지지체로서의 줄기세포시트 형성을 할 수 없음을 확인하였다. 도 2의 결과를 보면, 지방줄기세포는 다양한 성장인자 및 세포외기질의 분비에 의해 지지체로서의 시트 형성이 가능한 것으로 보인다.

[82]

[83] 실시예 3: 지방줄기세포 시트의 이식효과

[84] 지방줄기세포 시트의 장기나 조직 내로의 이식여부 및 이식 효과를 확인하기 위해, 6-7주령 쥐를 준비하여 관상동맥의 결찰로 심근경색을 유도한 후, 유도된 심근경색의 경색부위에 성공적으로 회수된 지방줄기세포 시트 및 부유된 지방줄기세포를 이식하였다. 이식 후, 28일 동안 경시적 지방줄기세포의 존재 여부 및 심장 기능의 효과를 확인하였다.

[85] 그 결과, 경시적으로 이식된 지방줄기세포 시트가 부유된 지방줄기세포보다 오랜 기간 동안 경색부위 내에 존재함을 확인할 수 있었으며, 희생 후 경색된 부위를 평가하는 섬유화 정도도 대조군에 비해 감소하는 것을 확인할 수 있었다 (도 9 및 도 10). 또한, 시트 이식 후 생착 (engraftment/graft)율을 보면, 28일째와 4일째를 비교하여 약 30% 정도가 남아 있는 것을 알 수 있다 (도 9).

[86] 또한, 심장기능을 측정하는 심초음파의 결과에서도 대조군에 비하여 증가된

심장기능의 증진을 관찰하였으며, 줄기세포 이식을 통한 신생혈관으로의 분화 및 증가된 성장인자의 분비로 인해 경색된 심장에서의 지방줄기세포 시트의 긍정적인 효과를 확인할 수 있었다.

[87]

[88] 실시예 4: 지방줄기세포 지지체를 이용한 마우스 배아줄기세포에서 유도된 심장근세포 혼합시트

[89] 마우스 배아줄기세포를 회수한 후, 유도물질을 이용하여 4.5일 동안 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 고동하는 심장근세포로 유도하여 FBS, 2-mercaptoethanol, L-glutamine이 포함된 알파-MEM 배지에서 배양하였다. 본 유도시스템은 고동하는 심장근세포로 유도가 이루어지면, eGFP (enhanced green fluorescent protein)의 발현이 나타나므로, eGFP 발현이 나타난 마우스 배아줄기세포에서 유도된 고동하는 심장근세포를 성공적으로 획득하였다.

[90] 그 다음, 마우스 지방줄기세포를 6 wells 플레이트에 5×10^6 개를 시딩하여 36시간 동안 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 MesenCult™ Proliferation kit (스템 셀 테크놀로지)를 이용하여 FBS와 다양한 성장인자를 포함하는 Basal medium에서 배양한 후, 마우스 배아줄기세포에서 유도된 고동하는 심장근세포를 2×10^6 개를 추가로 시딩하여 지방줄기세포를 배양한 동일한 배양액을 이용하여 48시간 동안 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다.

[91] 지지체로서의 지방줄기세포와 마우스 배아줄기세포에서 유도된 고동하는 심장근세포의 최적 비율을 조사하기 위하여, 다양한 비율에서 혼합세포 시트 형성의 유무와 혼합된 세포인 마우스 배아줄기세포에서 유도된 고동하는 심장근세포의 eGFP 발현 및 군집의 크기를 비교하였다.

[92] 그 결과, 지지체로서의 지방줄기세포와 마우스 배아줄기세포에서 유도된 고동하는 심장근세포의 비율은 2:3이 혼합시트 형성하는 최적 비율임을 도출할 수 있었다 (도 11).

[93] 또한, 지방줄기세포를 지지체로 이용한 고동하는 심장근세포의 혼합세포를 광학현미경으로 관찰한 결과, 지지체로서의 지방줄기세포와 마우스 배아줄기세포에서 유도된 심장근세포 (점선 내)가 공존하며 고동하는 것을 확인하였다 (도 12).

[94] 이후, 지방줄기세포 지지체를 이용한 마우스 배아줄기세포에서 유도된 고동하는 심장근세포의 혼합세포를 스크레이퍼로 박리하여 지방줄기세포 지지체를 이용한 마우스 배아줄기세포에서 유도된 고동하는 심장근세포의 혼합시트를 획득하였다 (도 13). 혼합시트의 박리 후에도 고동하는 심장근세포를 확인할 수 있었으며, 고동하는 심장근세포와 지방줄기세포 사이에서의 분리는 관찰되지 않았다.

[95]

[96] 실시예 5: 지방줄기세포 지지체를 이용한 마우스 신생아의 심장근세포 혼합시트

- [97] 출산 직후 (출산 후 48시간 내) 마우스의 심장조직을 회수하여, 회수 심장조직을 잘게 갈아 콜라게나제를 30분 처리 후, 마우스 신생아 심장근세포를 획득하였다. 마우스 신생아 심장근세포를 2계대 배양한 후, 신생아 심장근세포의 특징 중 하나인 고동의 여부를 확인하기 위해 cTnT, cTnI, α -cardiac actin, MHC 등의 항체를 이용하여 염색하였다.
- [98] 그 결과, 획득한 마우스 신생아 심장근세포의 고동 속성을 파악하였다.
- [99] 다음으로, 마우스 지방줄기세포를 6 wells 플레이트에 5×10^6 개를 시딩한 후, 36시간 동안 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 MesenCult™ Proloferation kit (스템셀 테크놀로지)를 이용하여 FBS와 다양한 성장인자를 포함하는 Basal medium에서 배양한 후, 획득한 신생아의 심장근세포 2×10^6 개를 추가로 시딩하여 지방줄기세포를 배양한 동일한 배양액을 이용하여 48시간 동안 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다.
- [100] 그 결과, 지방줄기세포 지지체를 이용한 신생아의 심장근세포의 혼합세포를 스크레이퍼로 박리하여 지방줄기세포 지지체를 이용한 신생아의 심장근세포 혼합시트를 얻을 수 있었다.
- [101] 또한, 지방줄기세포 지지체를 이용한 신생아의 심장근세포 혼합시트를 현미경 상으로 관찰한 결과, 지지체로 사용된 지방줄기세포 사이에서 신생아의 심장근세포의 특징인 고동함을 확인할 수 있었으며, cTnT 항체를 이용한 면역형광염색법으로 지방줄기세포 지지체를 이용한 신생아의 심장근세포 혼합시트를 검증하였다 (도 14 및 도 15).
- [102] 지방줄기세포와 심장근세포의 혼합시트 제조에서, MesenCult™ Proloferation kit (스템셀 테크놀로지)를 이용하여 FBS와 다양한 성장인자를 포함하는 Basal medium으로 지방줄기세포를 배양한 후 추가로 심장근세포를 시딩하여 동일한 배양액으로 2일간 배양하였다. 마우스 배아줄기세포에서 유도된 심장근 세포 및 마우스 신생아의 심장근 세포 모두 기존의 마우스 지방줄기세포 배양액을 사용하여 배양한 경우, 심장근세포의 변화는 관찰되지 않았다.
- [103]
- [104] 실시예 6: 지방줄기세포 지지체를 이용한 다양한 근세포 혼합시트
- [105] 본 실시예에서는 지지체로 지방줄기세포를 이용하여 다양한 종 및 유래의 근세포 혼합시트를 제조하였다. 지방줄기세포를 지지체로 하여 백서 (rat) 유래 BDIX 심장근아세포, 인간 유래 관상동맥 평활근세포 또는 마우스 유래 C3H 근육아세포를 이용하여 각각의 혼합시트 형성을 시도하였다.
- [106] 그 결과, 도 16에 나타난 바와 같이 백서 (rat) 유래 BDIX 심장근아세포, 인간 유래 관상동맥 평활근세포 및 마우스 유래 C3H 근육아세포는 지방줄기세포와 상공적인 혼합시트를 형성하였다.
- [107] 그 다음, 마우스 지방줄기세포는 세포를 구별하기 위해 CFDA (Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester; 그린) 염색을 실시하고, 6 wells plate에 5×10^6 개를 시딩한 후, 36시간 동안 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서

배양하였다. 그 다음, DiI (1,1'-Diocetyl-3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanine Perchlorate; 레드)를 이용하여 염색한 백서 (rat) 유래 BDIX 심장근아세포, 인간 유래 관상동맥 평활근세포 및 마우스 유래 C3H 근육아세포 각각을 배양한 지방줄기세포에 2×10^6 개씩 추가 시딩하고, 지방줄기세포를 배양한 동일한 배양액을 이용하여 48시간 동안 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다. 이후, 획득한 각각의 혼합시트는 동결절편을 시행하여 DAPI(블루)로 핵을 염색하였다.

[108] 지지체로 지방줄기세포와 백서 (rat) 유래 BDIX 심장근아세포 혼합시트 형성을 100 및 400배 형광현미경으로 관찰한 결과, 지지체로서의 지방줄기세포 (그린)와 백서 (rat) 유래 BDIX 심장근아세포 (레드)가 공존하는 것을 확인할 수 있었으며, 다층으로 구성된 혼합시트임을 확인할 수 있었다 (도 17A. 지지체로서의 지방줄기세포와 백서(랫) 유래 BDIX 심장근아세포를 이용한 혼합시트는 서로 상이한 세포 사이에 분리 없이 견고하였다.

[109] 또한, 지지체로 지방줄기세포와 인간 유래 관상동맥 평활근세포 혼합시트 형성을 200 및 400배 형광현미경으로 관찰한 결과, 지지체로서의 지방줄기세포 (그린)와 인간 유래 관상동맥 평활근세포 (레드)가 공존하는 것을 확인할 수 있었다 (도 17B). 그리고, 지지체로 지방줄기세포와 마우스 유래 C3H 근육아세포 혼합시트 형성을 200 및 400배 형광현미경으로 관찰한 결과 또한 지지체로서의 지방줄기세포 (그린)와 마우스 유래 C3H 근육아세포 (레드)가 공존하는 것을 확인할 수 있었다 (도 17C).

[110] 지방줄기세포와 여러가지 근세포의 혼합시트 제조에서는, MesenCult™ Proloferation kit (스템셀 테크놀로지)를 이용하여 FBS와 다양한 성장인자를 포함하는 Baseal mesdium으로 지방줄기세포를 배양한 후 추가로 백서 (rat) 유래 BDIX 심장근아세포, 인간 유래 관상동맥 평활근세포 또는 마우스 유래 C3H 근육아세포를 시딩하여 동일한 배양액으로 2일간 배양하였다. 백서 (rat) 유래 BDIX 심장근아세포, 인간 유래 관상동맥 평활근세포 및 마우스 유래 C3H 근육아세포 모두 기존의 마우스 지방줄기세포 배양액을 사용하여 배양한 경우, 세포의 변화는 관찰되지 않았다.

[111] 따라서, 지지체로서 줄기세포는 마우스 유래 배아 또는 골수 줄기세포를 이용한 시트형성은 확인할 수 없었으나, 종의 구별 없이 다양한 근세포를 이용하여 지방줄기세포와의 혼합시트를 제조한 경우 모두 분리 없이 견고히 혼합시트가 형성됨을 확인할 수 있었다.

[112]

산업상 이용가능성

[113] 본 발명에 따른 지방줄기세포 지지체를 이용한 근세포의 혼합시트는 단시간에 저비용으로 제조가 용이하고, 단독으로 시트제작이 어려운 세포를 안정적이고 안전하게 생체 내로 이식할 수 있으므로, 국소재생 치료 등의 임상적 응용

외에도 산업적으로 유용하다.

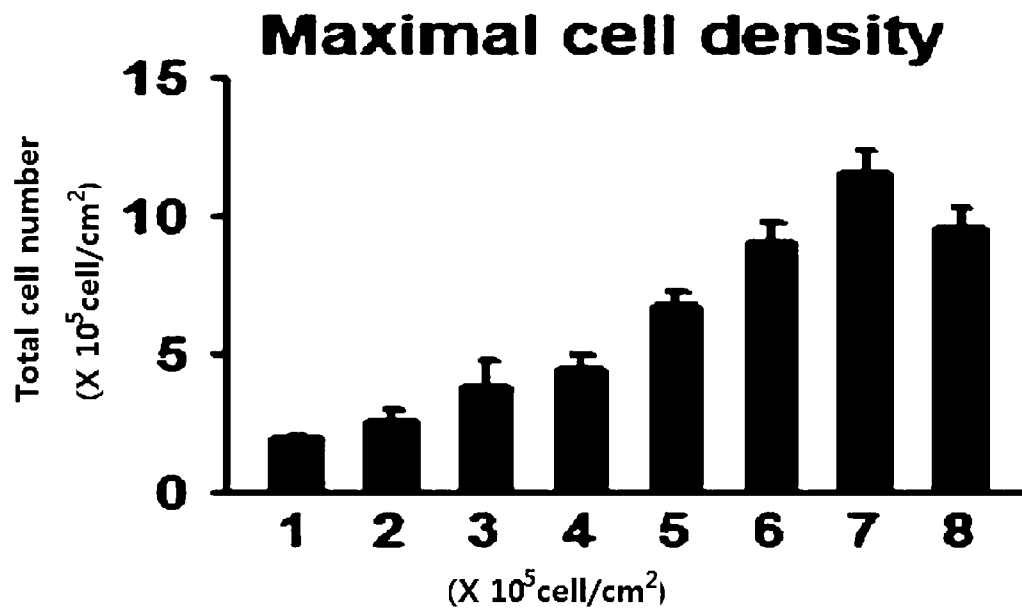
[114]

[115] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 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.

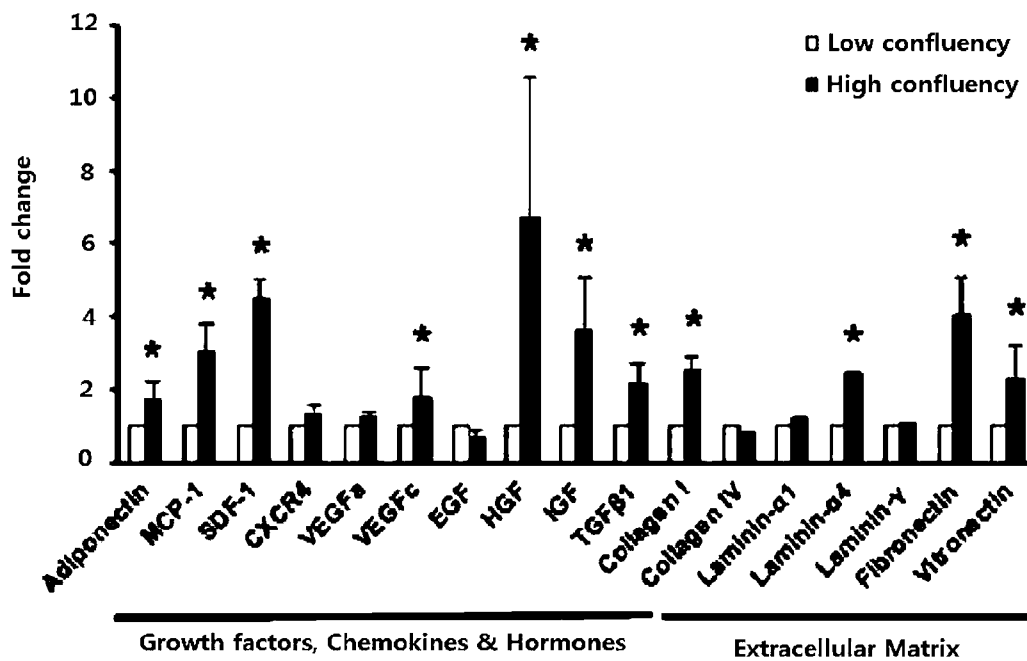
청구범위

- [청구항 1] 다음 단계를 포함하는 지방줄기세포 지지체와 이식용 근세포의 혼합시트의 제조방법:
 (a) 지방줄기세포를 배양한 다음, 지방줄기세포에 이식용 근세포를 추가 시딩 (seeding)하여 함께 배양하는 단계; 및
 (b) 상기 (a) 단계에서 배양된 지방줄기세포와 이식용 근세포의 혼합시트를 박리하여 회수하는 단계.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 이식용 근세포는 심장근세포, 심장근아세포, 평활근세포 또는 근육아세포인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 심장근세포는 고동하는 세포인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 (a) 단계의 지방줄기세포는 $0.5 \sim 1.0 \times 10^6$ cells/cm² 밀도로 시딩 (seeding)하여 배양하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 (a) 단계의 추가 시딩 (seeding)은 지방줄기세포와 이식용 근세포 각각의 시딩 (seeding)시 세포수 비율을 1:1~2로 하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 (b) 단계의 혼합세포 시트의 박리는 스크레이퍼를 사용하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 (b) 단계의 회수된 혼합세포 시트는 전체 배양접시 면적의 60% 이상인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 8] 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조된 지방줄기세포 지지체와 이식용 근세포의 혼합시트.

[도1]



[도2]



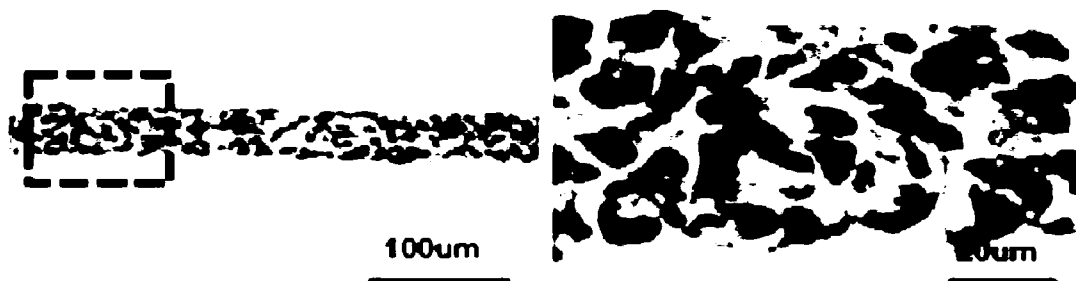
[도3]



[도4]



[도5]



[도6]

마우스 유래 배아 줄기세포

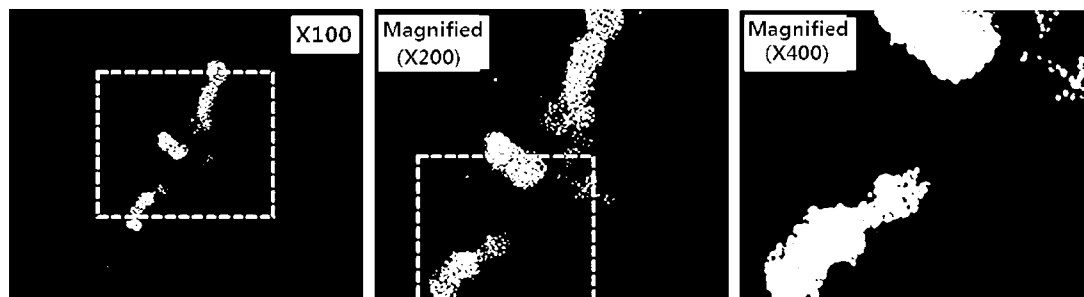


마우스 유래 골수 줄기세포



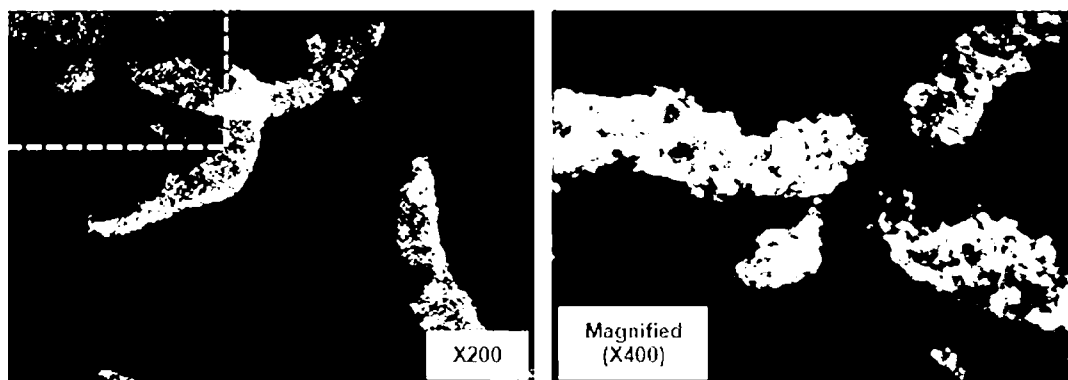
[도7]

마우스 유래 배아 줄기세포

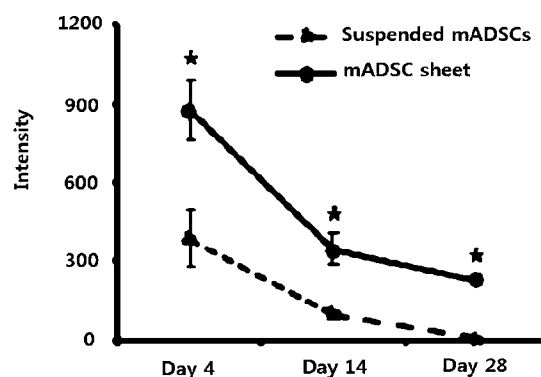
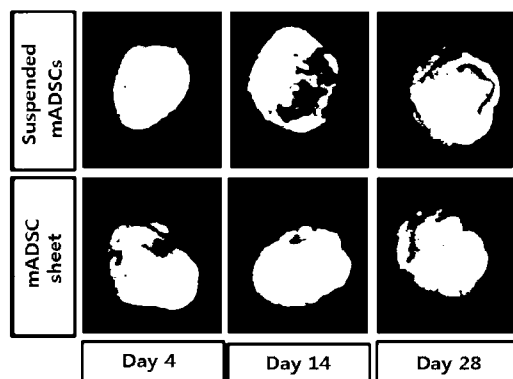


[도8]

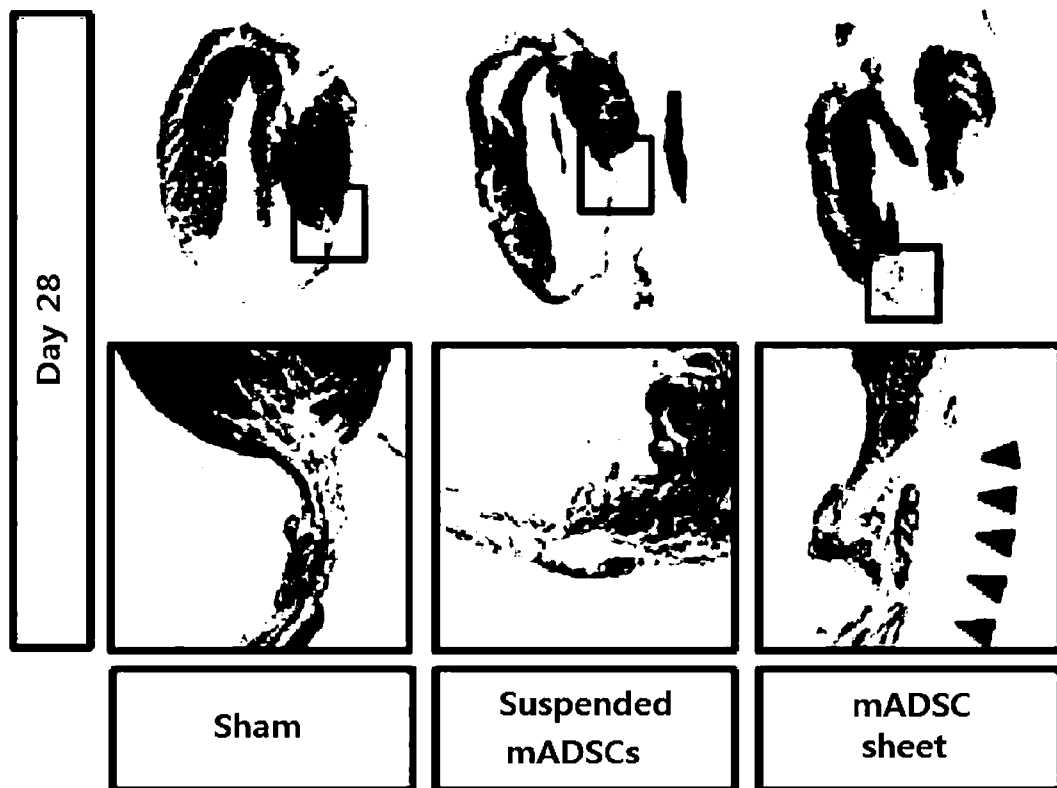
마우스 유래 골수 줄기세포



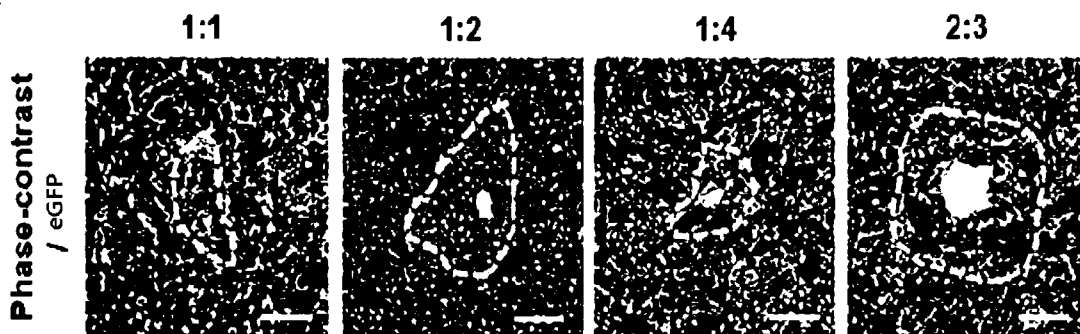
[도9]



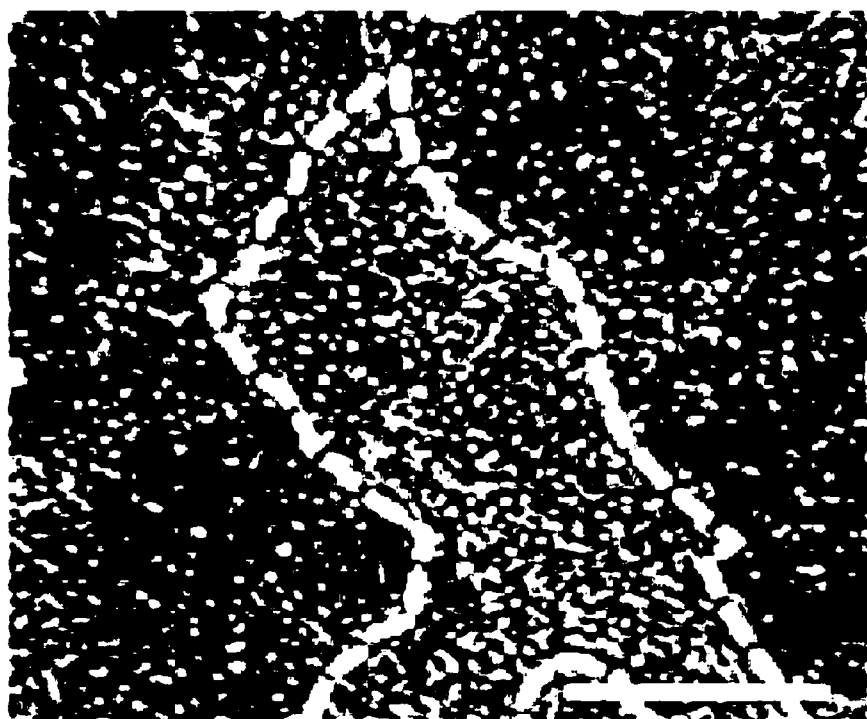
[도10]



[도11]



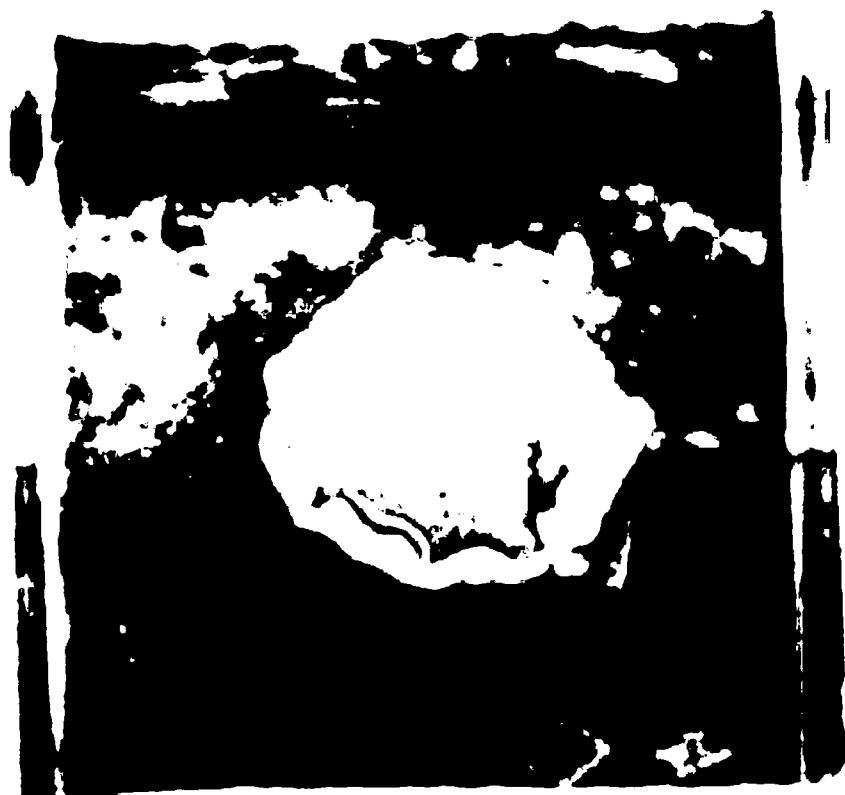
[도12]



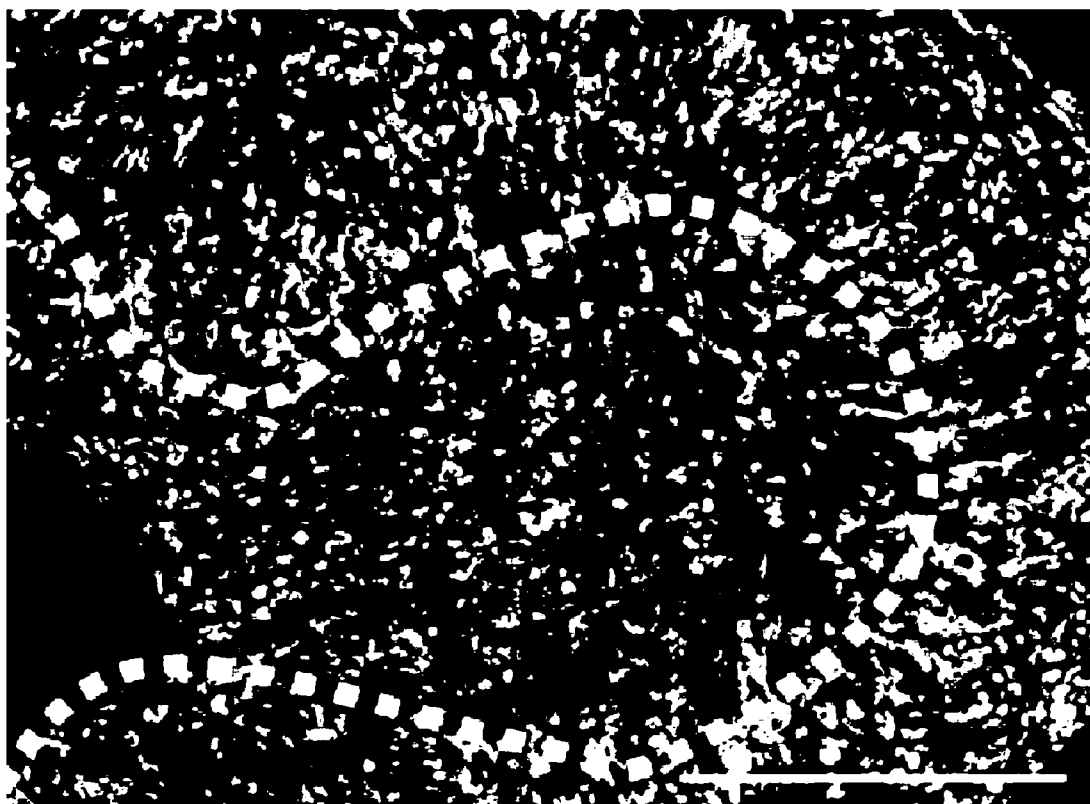
[도13]



[도14]



[도15]

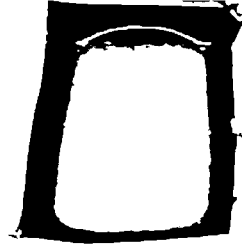


[도16]

A. 지방줄기세포 지지체로 한
백서(랫) 유래 BDIX 심장근아세포 혼합시트



B. 지방줄기세포 지지체로 한
사람 유래 관상동맥 평활근세포 혼합시트

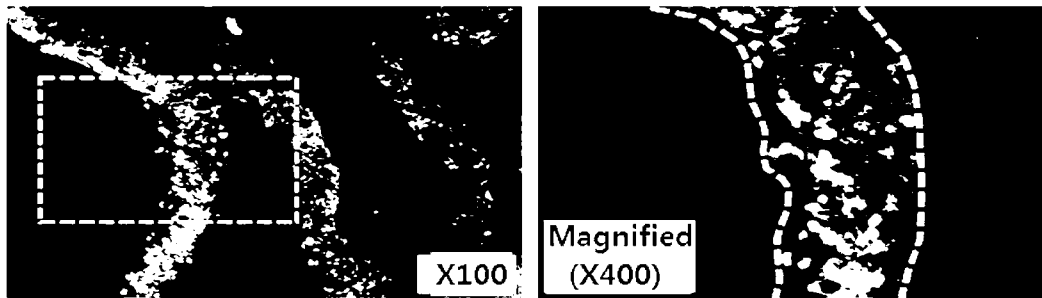


C. 지방줄기세포 지지체로 한
마우스 유래 C3H 근육아세포 혼합시트

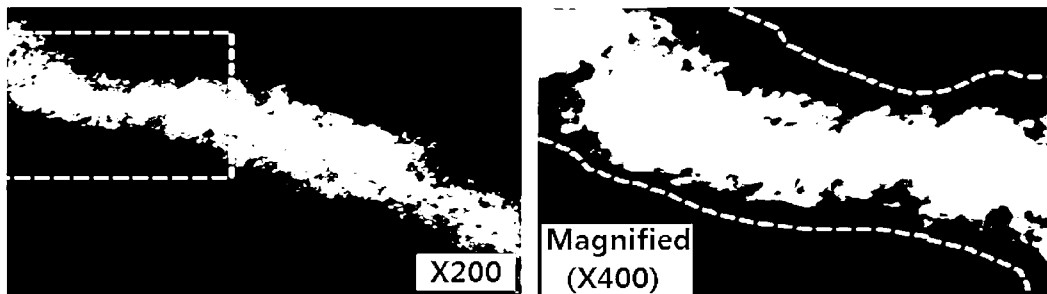


[도17]

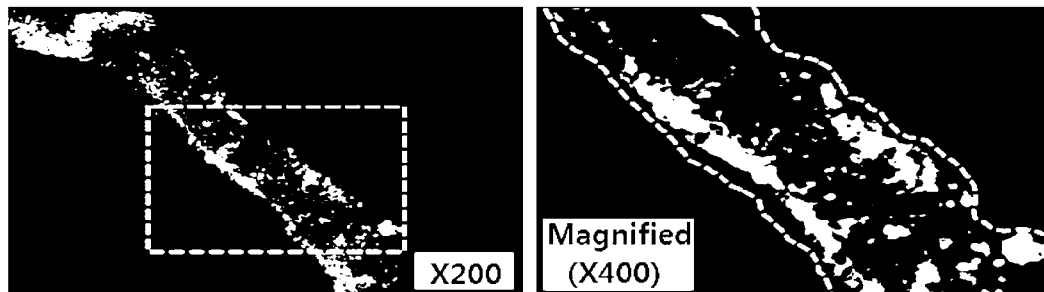
A. 지방줄기세포 지지체로 한
백서(랫) 유래 BDIX 심장근아세포 혼합시트



B. 지방줄기세포 지지체로 한
사람 유래 관상동맥 평활근세포 혼합시트



C. 지방줄기세포 지지체로 한
마우스 유래 C3H 근육아세포 혼합시트



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/002428**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****A61L 27/38(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)

A61L 27/38; C12N 5/06; C12N 5/077; A61L 27/00; A61K 35/12; C12M 3/00; C12N 5/0775

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: myofibroblast, seeding, cultivation, sheet, fat tissue, derived, stem cell, muscle fiber

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2008-307205 A (OSAKA UNIV.) 25 December 2008 See claims 1-9; paragraphs [0007]-[0053].	1-8
A	KR 10-1518651 B1 (DONGGUK UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 07 May 2015 See paragraphs [0022]-[0064]; claims 1-4.	1-8
A	JP 2012-235731 A (TOKYO WOMEN'S MEDICAL COLLEGE et al.) 06 December 2012 See paragraphs [0018]-[0044]; claims 1-10; figures 1-7.	1-8
A	JP 2014-155494 A (CELLSEED INC. et al.) 28 August 2014 See the entire document.	1-8
A	JP 2010-017128 A (TOYOTA CENTRAL R&D LABS. INC.) 28 January 2010 See the entire document.	1-8
PX	KR 10-1586839 B1 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) 19 January 2016 See paragraphs [0017]-[0093]; claims 1-8; figures 1-17.	1-8



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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

07 JUNE 2016 (07.06.2016)

Date of mailing of the international search report

14 JUNE 2016 (14.06.2016)

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/KR2016/002428

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
JP 2008-307205 A	25/12/2008	JP 5230969 B2	10/07/2013
KR 10-1518651 B1	07/05/2015	NONE	
JP 2012-235731 A	06/12/2012	NONE	
JP 2014-155494 A	28/08/2014	EP 1857126 A1	21/11/2007
		JP 2011-224398 A	10/11/2011
		JP 4921353 B2	25/04/2012
		JP 5562303 B2	30/07/2014
		US 2008-0226692 A1	18/09/2008
		WO 2006-093151 A1	08/09/2006
JP 2010-017128 A	28/01/2010	JP 4553038 B2	29/09/2010
KR 10-1586839 B1	19/01/2016	NONE	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))**A61L 27/38(2006.01)i****B. 조사된 분야**

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61L 27/38; C12N 5/06; C12N 5/077; A61L 27/00; A61K 35/12; C12M 3/00; C12N 5/0775

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: 심근 아세포, 시딩, 배양, 시트, 지방조직, 유래, 줄기세포, 근세포

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	JP 2008-307205 A (OSAKA UNIV.) 2008.12.25 청구항 1-9; 단락 [0007]-[0053] 참조.	1-8
A	KR 10-1518651 B1 (동국대학교 산학협력단) 2015.05.07 단락 [0022]-[0064]; 청구항 1-4 참조.	1-8
A	JP 2012-235731 A (TOKYO WOMEN'S MEDICAL COLLEGE 등) 2012.12.06 단락 [0018]-[0044]; 청구항 1-10; 도면 1-7 참조.	1-8
A	JP 2014-155494 A (CELLSEED INC. 등) 2014.08.28 전체문서 참조.	1-8
A	JP 2010-017128 A (TOYOTA CENTRAL R&D LABS INC.) 2010.01.28 전체문서 참조.	1-8
PX	KR 10-1586839 B1 (고려대학교 산학협력단) 2016.01.19 단락 [0017]-[0093]; 청구항 1-8 참조; 도면 1-17 참조.	1-8

☐ 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

2016년 06월 07일 (07.06.2016)

국제조사보고서 발송일

2016년 06월 14일 (14.06.2016)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

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

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

한인호

전화번호 +82-42-481-3362



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
JP 2008-307205 A	2008/12/25	JP 5230969 B2	2013/07/10
KR 10-1518651 B1	2015/05/07	없음	
JP 2012-235731 A	2012/12/06	없음	
JP 2014-155494 A	2014/08/28	EP 1857126 A1	2007/11/21
		JP 2011-224398 A	2011/11/10
		JP 4921353 B2	2012/04/25
		JP 5562303 B2	2014/07/30
		US 2008-0226692 A1	2008/09/18
		WO 2006-093151 A1	2006/09/08
JP 2010-017128 A	2010/01/28	JP 4553038 B2	2010/09/29
KR 10-1586839 B1	2016/01/19	없음	