



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년12월19일
(11) 등록번호 10-1930718
(24) 등록일자 2018년12월13일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/071 (2010.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 5/0672 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2017-7030820(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2013년03월28일
심사청구일자 2017년10월25일
- (85) 번역문제출일자 2017년10월25일
- (65) 공개번호 10-2017-0121340
- (43) 공개일자 2017년11월01일
- (62) 원출원 특허 10-2014-7029890
원출원일자(국제) 2013년03월28일
심사청구일자 2014년10월24일
- (86) 국제출원번호 PCT/JP2013/059376
- (87) 국제공개번호 WO 2013/147082
국제공개일자 2013년10월03일
- (30) 우선권주장
JP-P-2012-073594 2012년03월28일 일본(JP)
(뒷면에 계속)
- (56) 선행기술조사문헌
WO2011118795 A1*
JP2004000497 A*
- *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

전체 청구항 수 : 총 11 항

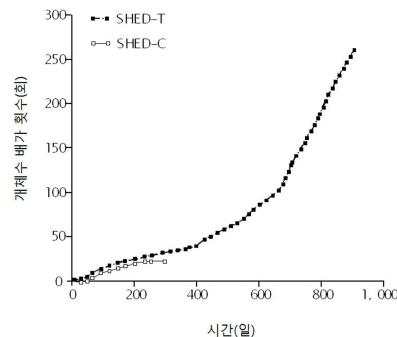
심사관 : 이효진

(54) 발명의 명칭 불사화 줄기세포 및 그 생산물을 유효 성분으로 하는 의약 조성물 및 의약 제제

(57) 요약

다양한 원인으로 생기는 각종 조직의 재생 능력을 갖는 성장인자를 생산하는 불사화 줄기세포(immortalized stem cell) 및 그 생산방법을 제공하는 것을 목적으로 한다. 또한 손상조직 복원용 약학 조성물 및 의약 제제, 및 상기 배양 상청(culture supernatant)의 경피 흡수방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도1

포유류의 간엽계 세포, 초기 발생배 및 체세포로 이루어진 군에서 선택되는 줄기세포를 분리하여, 상기 줄기세포를 초기배양하여 얻은 초기배양세포에 4 종류의 유전자를 도입하여 유전자 도입세포를 생성하고, 상기 유전자 도입세포에서 STRO-1의 발현을 지표로 하여 선택된 불사화 줄기세포를 제공한다. 또한 이 불사화 줄기세포의 배양 상청을 유효성분으로 함유하는 손상조직 복원용 약학 조성물 및 의약 제제를 제공한다.

(30) 우선권주장

JP-P-2012-187321 2012년08월28일 일본(JP)

JP-P-2012-275169 2012년12월17일 일본(JP)

JP-P-2013-026886 2013년02월14일 일본(JP)

명세서

청구범위

청구항 1

포유류의 치수줄기세포를 초기 배양하여 얻은 초기 배양세포에 hTERT, bmi-1, E6, 및 E7 유전자를 도입하여 유전자 도입세포를 생성하고,

상기 유전자 도입세포에서,

개체 배가 횟수 20회 시점에서 적어도 40% 이상이 STRO-1 양성세포인 것,

개체 배가 횟수 20회 시점에서 상기 초기 배양세포와 동등한 신생 골량(neonatal bone quantity) 생산 능력을 갖는 것, 및

텔로미어(telomere) 복원능 및 적어도 250회 이상 분열할 수 있는 분열능을 갖는 것,

을 지표로 하여 선택함으로써 얻어지고,

암화 활성이 없는 것을 특징으로 하는 불사화 줄기세포.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 치수줄기세포는, 탈락한 유치, 탈락한 영구치, 발치된 유치, 및 발치된 영구치로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 치아에서 얻은 줄기세포인 것을 특징으로 하는 불사화 줄기세포.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 포유류는 인간, 돼지, 말, 및 원숭이로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 불사화 줄기세포.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 불사화 줄기세포는 적어도, IGF-1, VEGF, TGF- β 1 및 HGF를 배양 상청(culture supernatant) 중에 분비하는 것을 특징으로 하는 불사화 줄기세포.

청구항 5

제 1항에 기재된 불사화 줄기세포의 배양 상청을 함유하는, 방사선성 케양에 의해 손상된 조직, 육창에 의해 손상된 조직, 뇌졸중에 의해 손상된 뇌조직, 간염에 의해 손상된 간조직, 및 아토피성 피부염에 의해 손상된 피부로부터 선택되는 손상조직 복원용 약학 조성물.

청구항 6

제 5항에 기재된 약학 조성물을 함유하는, 손상조직 복원용 의약 제제.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 손상조직 복원용 의약 제제의 제형은, 분말, 액제, 젤제, 스프레이제 및 경피 흡수 시스

템으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 손상조직 복원용 의약 제제.

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

제 6항에 있어서, 상기 손상조직 복원용 의약 제제 중 배양 상청의 함유량은, 제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 기재된 불사화 줄기세포가 생산하는 배양 상청을 100%로 했을 때, 50 ~ 500%(w/v)인 것을 특징으로 하는 손상조직 복원용 의약 제제.

청구항 14

포유류의 치수세포에서 줄기세포를 분리하는 분리 단계;

상기 줄기세포를 초기 배양하여, 초기 배양세포를 얻는 배양 단계;

상기 초기 배양세포에, hTERT, bmi-1, E6, 및 E7 유전자를 도입하여, 유전자 도입세포를 만드는 유전자 도입 단계; 및

상기 유전자 도입세포에서, 하기 (1) 내지 (3)을 지표로 하여 세포를 선택하는 선택 단계를 구비하여 암화 활성이 없는 불사화 줄기세포를 얻는 것을 특징으로 하는 불사화 줄기세포의 생산 방법.

(1) 개체 배가 횟수 20회의 시점에서 적어도 40% 이상이 STRO-1 양성인 것

(2) 개체 배가 횟수 20회의 시점에서 상기 초기 배양세포와 동등한 신생 골량(neonatal bone quantity) 생산 능력을 갖는 것

(3) 텔로미어(telomere) 복원능 및 적어도 250회 이상 분열할 수 있는 분열능을 갖는 것

청구항 15

제 14항에 있어서, 상기 치수세포는, 탈락한 유치, 탈락한 영구치, 발치된 유치, 및 발치된 영구치로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 치아에서 얻은 세포인 것을 특징으로 하는 불사화 줄기세포의 생산 방법.

청구항 16

제 14항에 있어서, 상기 포유류는, 인간, 돼지, 말, 및 원숭이로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 불사화 줄기세포의 생산 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 치수 유래의 불사화 줄기세포(imortalized stem cell) 및 그 생산물을 유효 성분으로 하는 의약 조성물 및 의약 제제에 관한 것이다. 보다 상세하게는 자연스럽게 탈락했거나 또는 발치한 사람의 유치 또는 영구치의 치수에서 얻은 줄기 세포를 개변한 불사화 줄기세포, 그 세포가 생산하는 각종 생체 인자를 유효 성분으로 하는 의약 조성물, 및 의약 제제에 관한 것이다.

배경 기술

[0003]

여러가지 이유로 손상된 생체 기능을 복원하는 방법에는 크게 나누어 이식 의료 및 재생 의료가 있다. 이식 의료는 기증자로부터 장기를 제공받아 이를 이식하여 생체 기능을 복원시키고자 하는 것이다.

[0004]

이에 대해 재생 의료는 본인을 포함하여 몇몇의 세포 또는 조직을 배양하고, 이를 가공하여 장애가 있는 장기에 대체하여 손실된 조직이나 장기를 복구하거나 재생하는 의료라 하여 줄기 세포 등이 이용된다.

[0005]

현재 재생 의료에 응용되고 있거나 응용 가능한 것은 인체 줄기 세포, 인간 배아 줄기 세포(ES 세포) 및 인간 유도 만능 줄기(iPS) 세포의 3 종류이다.

[0006]

여기에서 인체 줄기 세포는 이미 연구에 사용되며, 성인 조직에 존재하고 특정 조직, 기관 및 장기에만 분화하지 않는다는 특성이 있다. 또한, 골수 및 지방 조직에 존재하는 "간엽계 줄기세포"는 예외적으로, 뼈, 연골, 혈관 등 다양한 조직으로 분화할 수 있다. 이러한 신체적 성격의 줄기세포를 사용하는 경우, 자기 세포를 이용하면 면역 거부가 없고, 또한 생착도 좋다. 또한 이러한 줄기세포의 장기 배양에서 종양화 되었다는 보고는 없다.

[0007]

한편, 분화할 수 있는 세포가 어느 정도 한정되어 있는 것, 인간의 조직에서 채취할 때 침습을 동반하는 것, 또한, 분화되는 조직의 종류가 한정되는 것, 및 배양 계대 가능 수가 사십 몇 회, 일수로는 100 ~ 200 일로 제한이 있는 것으로 알려져 있다.

[0008]

인간 배아 줄기 세포(ES 세포)는 생식 의료 등으로 생긴 임여 배아(배반포)에서 "내부 세포 덩어리"를 제거하고 이를 배양한 줄기 세포이다. 분화 만능성을 갖는 것의 지표가 되는 기형종을 형성하기 위해 세배엽 어느 것에도 분화될 수 있다고 믿고 있다. 심근, 신경, 망막에 분화시켰다는 보고도 있다. 배아 줄기(ES) 세포는 불사화한 주화 세포(established cell)이기 때문에 하나의 세포주를 무한하게 배양을 계속할 수 있다. 그리고 적절한 배양 조건에서 세포로 균일한 제품을 대량 제조할 수 있다.

[0009]

한편, 수정란을 이용하게 되므로 제공시에는 윤리적인 문제가 발생하지 않도록 엄격한 대응이 필요로 한다. 또한 기본적으로 타가이식이기 때문에 면역 반응에 의한 거부 반응에 대한 대처가 필요하다. 또한 세포 배양시에는 이종 세포 또는 혈청을 이용할 필요가 있고, 이식한 재생 조직에 조금이라도 미분화 세포가 혼합되어 있으면 기형종(양성 종양)을 형성하기 쉽다는 것이 알려져 있다.

[0010]

인간 유도 만능 줄기(iPS) 세포는 성인의 세포(피부 등)에 ES 세포에 특이적으로 발현되는 유전자의 일부를 도입하여 수립되는 세포이다. 자기 유래의 iPS 세포를 사용하면 면역 거부 문제는 생기지 않고, ES 세포의 분화 기술을 그대로 사용할 수 있다.

[0011]

마지막으로, 유도 만능 줄기(iPS) 세포는 ES 세포처럼 수정란을 이용하는 것이 아니라 성인의 조직을 이용하여 배아 줄기 세포와 거의 동질의 세포를 제작할 수 있으며 자기 유래의 iPS 세포를 이용하면 면역 반응에 의한 거부 반응 문제도 없다.

[0012]

한편, 양성 종양뿐만 아니라, 악성 종양(배아세포 암)화 쉬운 것, 및 유전자를 도입 한 전 세포 중에서 형태적으로 ES 세포와 유사한 세포를 선별하기 위해 iPS 세포로 수립되는 세포의 비율은 낮은 것으로 알려져 있다.

[0013]

줄기 세포 자체를 재생 의료에 사용하는 것은, 상기와 같은 문제점이 있기 때문에 다양한 줄기 세포 자체를 사용하는 것이 아니라 그들이 생산하는 다양한 생체 인자, 예를 들면 각종 성장인자를 사용하는 방법이 모색되어 왔다(WO 2011/118795 호, 이하 '종래 기술 1').

[0014]

그리고 종래 기술 1은 혈관 내피 성장인자(VEGF), 간세포 성장인자(HGF), 인슐린양 성장인자(IGF), 혈소판 유래

성장인자(PDGF), 형질 전환 성장인자-베타(TGF- β) 등의 성장인자를 포함한 인간 탈락 유치 치수 줄기 세포 등 줄기 세포의 배양 상청(culture supernatant)을 포함하는 손상부 치료용 조성물이 개시되어 있다.

선행기술문현

특허문현

[0016] (특허문현 0001) [특허문현 1] WO 2011/118795 호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0017] 종래 기술 1은 피부의 빛 노화에 의한 손상의 회복, 뼈 재생 등에 효과가 있는 상기 손상부 치료용 조성물을 제공했다는 점에서 뛰어난 기술이다.

[0018] 한편, 사용되는 치수 유래 줄기 세포가 주화 세포가 아니기 때문에 이 줄기 세포를 필요시 조정하거나 동결 보존한 시료를 용해시켜 세포를 증식시키지 않으면 목적으로 하는 배양 상청을 얻을 수 없고, 배양 상청(culture supernatant)을 입수하기까지 시간이 걸린다는 문제가 있다.

[0019] 일반적으로 배양 세포 중 정상 세포에서 수립된 주화 세포의 경우, 50 ~ 60 회 계대 후에는 세포가 분열하지 않고, 그 세포는 죽음을 맞이한다. 당연히 배양 세포가 생산하는 생체 인자의 조성도 시간의 경과와 함께 변화하기 때문에 무한 증식이 가능한 주화 세포를 사용할 수 없는 경우 일정한 조성의 배양 상청을 얻기 어렵다는 문제가 있다.

[0020] 한편, 대표적인 무한 증식이 가능한 세포로는 암 세포를 들 수 있다. 이것은 암세포가 정상이면 생체에 의한 통제 하에 적절하게 분열과 증식이 제어되는 세포가 그 통제에서 벗어나 무제한 증식하게 된 것이기 때문이다. 따라서 무한 증식할 수 있는 세포에도 암화한 것은 생체에 유해한 생체 인자를 생산할 수 있기 때문에 사용할 수 없다.

[0021] 이상으로부터 무한 증식이 가능하지만, 암화하지 않는 불사화 줄기세포(imortalized stem cell)의 수립에 대한 강한 사회적 요구가 있다.

[0022] 또한 배양 상청을 의약 조성물로 사용하기 위해서는 상기의 불사화 줄기세포는 일정한 생체 인자를 장기간에 걸쳐 생산을 계속할 수 있는 것이어야 한다.

과제의 해결 수단

[0024] 본원 발명은 상기와 같은 사정 하에서 완성된 것이다.

[0025] 즉, 본원 발명의 제 1 측면은 치수줄기세포, 골수줄기세포, 제대줄기세포, 지방줄기세포, 및 초기발생배, 또한 간엽계 세포를 제외한 체세포군으로 이루어진 군으로부터 포유류의 세포군에서 줄기 세포를 분리하여, 상기 줄기 세포를 초기 배양하여 얻어진 초기 배양 세포에, hTERT, bmi-1, E6, E7, Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc 및 p16INK4a로 이루어진 군에서 선택되는 4 종류의 유전자를 도입하여 유전자 도입 세포를 생성하고, 상기 유전자 도입 세포에서 STRO-1의 발현을 지표로 선택된, 텔로미어(telomere) 복구능 및 적어도 200 번 이상 분열할 수 있는 분열능을 갖는 불사화 줄기세포(imortalized stem cell)이다. 또한, 상기 치수 줄기세포는 탈락한 유치, 탈락한 영구치, 발치된 유치 및 발치된 영구치로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 치아 치수에서 얻어지는 세포인 것이 바람직하다.

[0026] 상기 발생 배아는 배반기의 배아인 것이 바람직하다. 또한, 상기 포유류는 인간, 돼지, 말, 및 원숭이로 이루어진 군에서 선택되는 것이 바람직하다. 상기 골수 줄기세포는 뼈를 만드는 골아 세포 및 연골 세포, 지방 줄기 세포 등 간엽계와 비 간엽계 양쪽으로 분화하는 능력을 가진 세포인 것이 바람직하다. 또한, 상기 제대 세포는 태아와 태반을 연결하고 있는 제대혈에 포함된 조혈 줄기세포 및 간엽계 세포를 말하며, 이러한 많은 것을 포함하는 것이 바람직하다. 상기 골수 줄기 세포는 뼈를 만드는 골아 세포 및 연골 세포, 지방 세포 등 간엽계와 비 간엽계 양쪽으로 분화하는 능력을 가진 세포인 것이 바람직하다. 또한, 상기 제대 세포는 Warton 's jelly에서 얻은 세포인 것이 바람직하다. 상기 지방 줄기 세포는 모든 줄기 세포로 분화할 수 있는 미분화 세

포인 것이 바람직하다.

[0027] 또한, 상기 4 종류의 유전자를 간엽계 세포에 도입하는 경우에는, hTERT, bmi-1, E6 및 E7인 것이 바람직하다. 또한 체세포에 도입하는 경우에는 Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc 및 p16INK4a로 이루어진 군에서 선택되는 4 종류인 것이 바람직하다.

[0028] 또한, 개체 배가 횟수 20 회의 시점에서 세포 개체수의 적어도 40% 이상이 STRO-1 발현 세포이며, 한편, 초기 배양 세포와 동등한 신생 뼈 양 생산 능력을 갖는 것이 바람직하다.

[0029] 또한, 상기 불사화 줄기세포는 적어도 IGF-1, VEGF, TGF- β 1 및 HGF를 배양 상청중에 분비하는 것이 바람직하다.

[0031] 본 발명의 제 2 측면은 상술한 특성을 갖는 불사화 줄기세포의 배양 상청(culture supernatant)을 함유하는 약학 조성물이다.

[0033] 또한, 본 발명의 제 3 측면은 상기 약학 조성물을 함유하는 손상 조직 복원용 약학 제제이다. 여기서, 상기 손상 조직 복원용 약학 제제의 제형이 분말, 액체, 젤제, 스프레이제 및 경피 흡수 시스템으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 것인 것이 바람직하다. 또한, 상기 손상 조직은 궤양 또는 욕창이 형성된 조직, 세포의 변성에 의해 손상된 뇌 조직, 수술 조작에 의해 결손된 뇌 조직, 외상성 뇌 질환에 의해 손상된 뇌 조직, 염증성 뇌 질환에 의해 손상된 뇌 조직, 손상된 뼈 조직, 손상된 치주 조직, 중추 신경계 질환에 의해 손상된 조직 및 난치성 피부염에 의해 손상된 조직으로 이루어진 군에서 선택되는 조직인 것이 바람직하다.

[0034] 여기서, 상기 세포의 변성은 알츠하이머 병, 파킨슨병, 치매, 정신 분열증, 우울증, 저산소 뇌증, 근 위축성 측삭 경화증(ALS), 뇌경색, 소뇌 변성증, 당뇨병 및 간염으로 이루어진 군에서 선택되는 질환으로 인한 것이 바람직하다. 또한, 상기 외상성 뇌 질환은 교통 사고 또는 추락 사고에 의해 생긴 것이 바람직하다. 또한, 상기 염증성 뇌 질환은 뇌염 뇌증, 간질, 야콥병 및 소아마비로 이루어진 군에서 선택되는 것이 바람직하다. 또한, 상기 중추 신경계 질환은 척수 손상 및 척수 질환으로 이루어진 군에서 선택되는 것이 바람직하다. 상기 난치성 피부염은 아토피성 피부염인 것이 바람직하다.

[0035] 또한, 상기 손상 조직 복원용 약학 제제 중 배양 상청의 함량이 상기 어느 하나의 불사화 줄기세포가 생산하는 배양 상청을 100%로 하였을 때 50 ~ 500%(w/v)인 것이 바람직하다.

[0037] 본 발명의 제 4 측면은 포유류의 간엽계 세포, 초기 발생 배아 및 간엽계 세포를 제외한 체세포로 이루어진 군에서 선택되는 세포군에서 줄기세포를 분리하는 분리 공정과; 상기 줄기세포를 초기 배양시 초기 배양 세포를 얻을 배양 공정과; 상기 초기 배양 세포에 4 가지 유전자를 도입하여 유전자 도입 세포를 만드는 유전자 도입 공정과; 상기 유전자 도입 세포에서 개체 배가 횟수 20 회의 시점에서 STRO-1의 발현량 및 뼈 재생 능력을 지표로 세포를 선택하는 선택 단계; 를 모두 갖춘 불사화 줄기세포의 생산 방법이다.

[0038] 여기서, 상기 간엽계 세포는 치수 세포, 골수 세포, 제대 세포, 및 지방 세포로 이루어진 군에서 선택되는 것이 바람직하다. 상기 치수 세포는 상기 초기 발생 배, 상기 골수 줄기세포, 및 상기 탯줄 세포는 상술 한 바와 같다. 상기 포유류도 상술한 바와 같다.

[0039] 또한, 상기 4 종류의 유전자는 hTERT, bmi-1, E6, E7, Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc 및 p16INK4a로 이루어진 군에서 선택되는 4 종류인 것이 바람직하다. 여기에서 간엽계 세포에 도입하는 경우에는 hTERT, bmi-1, E6 및 E7인 것이 바람직하다. 또한 체세포에 도입하는 경우에는 Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc 및 p16INK4a로 이루어진 군에서 선택되는 4 종류인 것이 바람직하다.

[0040] 상기 hTERT은 인간 텔로머라아제(telomerase) 역전사 효소의 유전자이며, bmi-1은 줄기세포의 자기 복제 및 분화 제어에 관여하는 폴리콤 군 유전자(Polycomb gene)이다. E6 및 E7은 인유두종 바이러스(Human papillomavirus : HPV)가 자기 복제를 위해 사용하는 초기 유전자를 코딩하는 오픈 리딩 프레임(open reading frame) 내에 존재하는 유전자이다.

[0042] 본 발명의 제 5 측면은, 상술한 의약 제제를 시트 모양의 촉촉한 부재에 흡수시켜 시트 형태의 제제로 제형 제조 공정과, 상기 시트 형태의 제제로 손상된 부위를 꾀복(coating)하는 손상 부위 꾀복 공정과, 플러스로 대전된 전극을 원하는 부위에 접촉시키는 전극 접촉 공정을 모두 갖춘 것을 특징으로 하는 경피 흡수 방법이다.

[0043] 본 발명의 불사화 줄기세포는 40 회 분열 후에도 세포 개체수의 적어도 40% 이상의 STRO-1 발현 세포를 함유하고 있다. 또한 텔로미어 복구 능력을 가지고 있기 때문에 적어도 200번 이상 분열할 수 있다. 또한, 상술 한

각종 생체 인자를 장기간, 배양 상청 중에 분비할 수 있다.

발명의 효과

- [0045] 본 발명에 의하면, 이 때문에 장기간에 걸쳐 일정한 생체 인자를 장기간에 걸쳐 생산을 계속할 수 있는 불사화 줄기세포(immortalized stem cell)를 제공할 수 있다.
- [0046] 또한, 본원 발명의 다른 측면에 따르면 다양한 손상 조직의 복구에 사용할 수 있는 약학 조성물 및 의약 제제를 제공할 수 있다.
- [0047] 또한 손상 부위에서 활성 성분의 흡수 효율을 높일 수 있는 새로운 경피 흡수 방법을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0049] 도 1은 상술한 치수 세포에서 선택된 불사화 줄기세포(immortalized stem cell)와, 불사화 줄기세포가 아닌 세포의 개체 배화 수(population doubling time, 이하 "PD"라 한다)와 배양 기간과의 관계를 나타내는 그래프이다. 도 1 중 SHED-T 불사화 줄기세포를 나타내며 SHED-C는 불사화 줄기세포가 아닌 세포를 나타낸다. 도 2는 SHED-C 및 SHED-T에서 STRO-1 발현의 결과를 나타내는 그래프이다(도 2 (A) ~ (D)). 도 2 중 PD20은 개체 수배화 횟수 = 20 회, PD30은 개체 수배화 횟수 = 30 회 및 PD40은 개체 수배화 횟수 = 40 회를 나타낸다. 도 3은 피부의 궤양을 치료했을 때의 회복 상황을 보여주는 사진이다. (A)는 치료 전, (B)는 치료 후 피부 상태를 나타낸다. 도 4는 개체 배가 시간(횟수)과 신생 골량과의 관계를 나타내는 그래프이고, 도 4, **는 $p < 0.05$, ***는 $p < 0.01$ 를 나타낸다. 신생 골 양은 하기의 계산식으로 구하였다.
- 신생 골량 = 신생 뼈 면적 / 시야 면적 $\times 100$
- 도 5는 도 4에 나타낸 각 개체 배가 시간 때의 SHED-C와 SHED-T와 이식했을 때 조직 염색 이미지를 나타내는 도이다.
- 도 6은 육창 궤양을 치료했을 때의 회복 상황을 보여주는 사진이다. (A)는 치료 전, (B)는 치료 후 피부 상태를 나타낸다.
- 도 7은 임플란트 수술시 상기 의약 제제를 사용했을 때의 1 ~ 6 월 경과 후 리모델링의 진행 상황을 나타내는 CT 스캔에 의한 도이다. (A) ~ (C)는 정면 촬영상, 및 (D) ~ (F)는 수평 방향 촬영상이다.
- 도 8은 치주 질환 환자의 치조골 상태를 나타내는 사진이다. (A)는 치료 시작시(수술 전), (B)는 수술 후 3 개월 치조골의 상태를 나타낸다.
- 도 9는 β -TCP를 기반으로 한 발치와의 뼈 형성을 관찰한 결과를 나타내는 사진이다. (A)는 발치 후 3 개월, (B)는 발치 후 6 월로 이식한 결과를 나타낸다.
- 도 10은 기반으로 β -TCP(β 삼인산 칼슘, $3\text{CaO} \cdot \text{P}_2\text{O}_5$)를 사용했을 때의 β -TCP의 뼈의 대체 등을 나타내는 도이다. (A)는 적출물(extraction)을 보여주는 사진이며, (B)는 조직 염색의 결과를 나타내는 사진이다. (C)와 (D)는 촬영상을 부분적으로 확대한 것이다. 도 10 중 NB는 신생 뼈를, 또한 TCP는 β -TCP를 나타낸다. 또한 BV는 혈관을 나타내며, SF는 적출물 바닥을 나타낸다.
- 도 11은 후 신경구를 통해 줄기세포 유래의 배양 상청의 경비 투여할 경우의 적용 부위를 나타내는 도이다.
- 도 12는 경비 투여를 하고 있을 때의 사진이다.
- 도 13은 뇌졸중 환자의 혈관의 폐색부를 나타내는 MRA의 이미지이다.
- 도 14는 뇌졸중 환자의 뇌 손상 부위를 나타내는 CT 스캔 이미지이다.
- 도 15는 뇌졸중 환자의 뇌 손상 부위의 혈류량을 나타내는 MRI 사진이다. (A)는 뇌졸중 직후 사진이며, (B)는 치료 후 사진이다.
- 도 16은 치료기간 동안 환자의 상태를 나타내는 점수(NIHSS)의 변천을 나타내는 그래프이다.
- 도 17은 환자의 기능 회복 상황을 보여주는 사진이다. (A)는 기능의 회복 상황을 나타내는 사진, (B)는 하반신

의 회복 상황을 보여주는 사진이다.

도 18은 투여군과 비 투여군과의 미니 정신 상태 검사(Mini Mental State : MMS) 및 하세가와 식 시험 중 하나를 수행한 결과의 경시 변화를 나타내는 도이다. 도 18(A)는 비 투여군, 도 18(B)는 투여군의 결과를 나타낸다.

도 19은 난치성 피부염에 대한 치료 효과를 나타내는 사진이다. 도 19(A)는 치료 시작 전, 도 19(B)는 치료 종료시의 상태를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0050]

이하, 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다.

[0052]

본원 발명의 불사화 줄기세포(imortalized stem cell)를 얻으려면 먼저 포유류의 간엽계 세포, 초기 발생배 및 간엽계 세포 이외의 체세포로 구성된 세포군에서 줄기세포를 분리한다. 상기 포유류로는 인간, 돼지, 말, 및 원숭이로 이루어진 군에서 선택되는 것이나, 인간 세포의 유전적 유사성이 높고, 또한 감염의 위험이 낮기 때문에 바람직하다.

[0053]

본 명세서 중 "간엽계 세포"는 조골 세포, 지방 세포, 근육 세포, 연골 세포 등 간엽계에 속하는 세포로의 분화 능을 가진 세포를 말한다. 구체적인 간엽계 세포로는 상기의 동물 치수 세포, 골수 세포, 제대 세포 및 지방 세포 등을 들 수 있다. 또한 "초기 발생배"는 ES 세포를 수립하는데 필요한 수정란보다 발생이 진행된 배반포 까지 초기 단계의 배아를 말한다. "체세포"은 생물체를 구성하는 세포 중 생식 세포 이외의 세포를 총칭한 것을 말한다.

[0054]

또한 "치수 세포"는 재생 능력을 갖는 치아의 신경에 포함된 줄기세포의 일종을 말한다. 치아는 경질의 재료로 보호되어 있기 때문에 자외선이나 방사선을 통하지 않고서는 유전자도 손상되기 어렵다는 특성이 있다. "골수 세포"는 골수 천자액 중에 얻어지는 세포의 총칭이며, 골수아세포 등의 백혈구계 세포, 적아구계 세포, 골수 거대핵구, 및 형질 세포 등이 포함된다.

[0055]

본 명세서에서 제대 세포는 태아와 태반을 연결하는 제대 중에 존재하는 세포이며, 제대 중에 포함되어 조혈 줄기세포를 풍부하게 함유하는 제대혈을 포함한다.

[0056]

또한, 상술 한 줄기세포 중에 도입하는 유전자로는 hTERT, bmi-1, E6, E7, Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc 및 p16INK4a 등을 들 수 있다. hTERT는 텔로미어 복구 효소의 유전자이며, bmi-1은 폴리콤(polycomb) 복합체를 구성하는 단백질의 하나인 Bmi-1 유전자이다. 여기에서 Bmi-1은 조혈 줄기세포의 유지에 필요하며, 활성 증강에 의해 조혈 줄기세포를 증가시킬 수 있는 작용이 있다.

[0057]

E6 및 E7은 HPV-16 또는 HPV-18의 초기 유전자이다. 또한 Oct3/4는 Sox2와 협조하여 표적 유전자의 전사를 활성화하는 유전자이다. Klf4(Kruppel 형 전사 인자 4)는 세포 분열과 배아 발달에 관련된 유전자를 조절하고 소화암의 암 억제 인자로 관여하고 있다.

[0058]

Sox2는 SRY-related HMG box 유전자군에 속하며 기능의 미분화성(다능성) 유지에 관여하는 것으로 알려진 유전자이다. c-Myc는 발암 유전자이며, c-Myc으로 유도된 종양에서 세포의 생존과 죽음을 모두 촉진하는 유전자이다. p16INK4a은 암세포의 세포주기를 조절하는데 중요한 역할을 하는 유전자이다.

[0060]

이하에서 인간의 탈락 유치에서 치수 세포를 이용한 불사화 줄기세포를 제작하는 경우를 예로 들어 설명한다.

[0061]

먼저 탈락 유치를 들어, 클로로헥시딘(Chlorhexidine), 이서진(Iosidine; iodine based disinfectant) 용액 그 외의 소독약으로 소독한 후 치관 부분을 분할하고 치과용 리머(reamer)로 치수 조직을 회수한다.

[0062]

채취한 치수 조직을 기본 배지, 예를 들어 5 ~ 15%의 소 혈청(calf serum 이하 "CS") 및 50 ~ 150 unit/mL의 항생물질을 함유하는 Dulbecco의 변법 이글 배지(Dulbecco 's Modified Eagle 's Medium, 이하 "DMEM")에 혼탁한다. 이어 1 ~ 5 mg/mL의 콜라제나아제 및 1 ~ 5 mg/mL의 디스파아제를 이용하여 37°C에서 0.5 ~ 2 시간 동안 처리한다.

[0063]

상기 기본 배지로는 DMEM 외에 Iscove's Modified Dulbecco's Medium(IMDM)(GIBCO 사 제작 등), HamF12 배지 (SIGMA 사 제작, GIBCO 사 제작 등), RPMI1640 배지 등을 사용할 수 있다. 두 가지 이상의 기본 배지를 병용해도 된다. 혼합 배지의 일례로서 IMDM과 HamF12를 동량으로 혼합한 배지(예를 들어 상품명 : IMDM/HamF12(GIBCO 사)로 시판됨)을 들 수 있다.

- [0064] 또한 기본 배지에 첨가하는 것으로는 소 태아 혈청(fetal bovine serum 또는 fetal calf serum 이하 "FBS" 또는 "FCS"), 인간 혈청, 양 혈청, 그 외의 혈청, 혈청 대체물(Knockout serum replacement(KSR) 등), 소 혈청 알부민(bovine serum albumin, 이하 "BSA"), 페니실린, 스트렙토마이신 그 외 기타 항생제, 각종 비타민, 각종 미네랄을 들 수 있다.
- [0065] 상기 기본 배지는 후술하는 세포 선별 용의 배양 및 선별 후 세포 배양에 사용할 수도 있다.
- [0066] 효소 처리 후 3 ~ 10 분간 원심 분리(3,000 ~ 7,000 회전/분)하고, 치수 세포를 회수한다. 필요에 따라 셀 스트레이너를 이용하여 세포의 선별을 실시한다. 선별된 세포를 예를 들어, 3 ~ 6 mL 상기 기본 배지로 다시 혼탁하여 직경 4 ~ 8 cm의 부착성 세포 배양용 접시에 파종한다.
- [0067] 이어서, 배양액, 예를 들어, 10% FCS를 함유하는 DMEM을 첨가한 후, 5% CO₂ 인큐베이터에서 37°C에서 2 주 정도 배양한다. 상기 배양액을 제거한 후 PBS 등으로 세포를 1 ~ 여러번 세척한다. 배양액의 제거 및 세포 세척을 대신하여 콜로니를 형성한 접착성의 치수 줄기세포를 회수할 수 있다. 접착력의 치수 줄기세포, 예를 들어 0.025 ~ 0.1%의 트립신과 0.3 ~ 1 mM의 EDTA로 몇 분 동안 37°C에서 처리하여 접시에서 박리시킨 후 세포를 회수한다.
- [0068] 효소 처리 후 3 ~ 10 분간 원심 분리(3,000 ~ 7,000 회전/분)하고, 치수 세포를 회수한다. 필요에 따라 셀 스트레이너를 이용하여 세포의 선별을 실시한다. 선별된 세포를 예를 들어, 3 ~ 6 mL 상기 기본 배지로 다시 혼탁하여 직경 4 ~ 8 cm의 부착성 세포 배양용 접시에 파종한다.
- [0069] 이어서, 배양액, 예를 들어, 10% FCS를 함유하는 DMEM을 첨가한 후, 5% CO₂ 인큐베이터에서 37°C에서 2 주 정도 배양한다. 상기 배양액을 제거한 후 PBS 등으로 세포를 1 ~ 여러번 세척한다. 배양액의 제거 및 세포 세척을 대신하여 콜로니를 형성한 접착성의 치수 줄기세포를 회수할 수 있다. 접착력의 치수 줄기세포, 예를 들어 0.025 ~ 0.1%의 트립신과 0.3 ~ 1 mM의 EDTA로 몇 분 동안 37°C에서 처리하여 접시에서 박리시킨 후 세포를 회수한다.
- [0070] 다음으로, 상기와 같이 선별된 접착성 세포를 배양한다. 예를 들어, 상기와 같이 얻은 치수 줄기세포를 부착성 세포 배양용 접시에 파종하여 5% CO₂, 37°C의 조건에서 인큐베이터에서 배양한다. 이상과 같이 인간 탈락 유치 줄기세포의 초기 배양 세포(SHED-P)를 얻을 수 있다.
- [0071] 계대 배양은 예를 들어, 육안으로 관찰하여 서브컨플루엔트(subconfluent) 또는 컨플루엔트(confluent)에 도달하였을 때, 상술 한 바와 같이, 트립신과 EDTA와를 이용하여 세포를 배양 용기에서 박리시켜 회수하고 다시 배양액을 넣은 배양 용기에 파종한다.
- [0072] 여기에서 서브컨플루엔트는 배양 용기의 세포 부착면의 약 70%에 세포가 부착된 상태를 말한다. 예를 들어, 계대 배양을 1-8 회 반복하고 선별된 세포를 필요한 세포 수, 예를 들면 약 1×10^7 개/mL까지 증식시킨다. 이상과 같이 배양한 후 세포를 회수하여 액체 질소에서 보관한다. 다양한 기증자로부터 회수한 세포를 치수 줄기 세포 뱅크의 형태로 저장하게 할 수 있다.
- [0073] 이어서, 상기 줄기세포를 초기 배양하여 얻어진 일차 배양 세포에 4 가지 유전자를 도입하여 유전자 도입 세포를 생성한다. 여기에 소개하는 유전자는 hTERT, bmi-1, E6, E7, Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc 및 p16INK4a로 이루어진 군에서 선택되는 4 종류인 것이 바람직하다. hTERT, bmi-1, E6, E7을 도입함으로써 보다 개체 수배화 회수가 많은 불사화 줄기세포를 얻을 수 있다. 여기에서 hTERT은 인간 텔로머라아제(telomerase) 역전사 효소의 유전자이며, bmi-1 줄기세포의 자기 복제와 분화 제어에 관여하는 폴리콤(Polycomb)군 유전자이다. E6 및 E7은 인유두종 바이러스(Human papillomavirus?FHPV)가 자기 복제를 위해 사용하는 초기 유전자를 코딩하는 오픈리딩프레임(open reading frame) 내에 존재하는 유전자이다.
- [0074] 이러한 유전자의 도입은 하기와 같이 할 수 있다.
- [0075] 목적으로 하는 상기 유전자를 통합하는 플라스미드를 조제하고, 이것을 셔틀 벡터, 예를 들어, pShuttle2에 통합하여 상기 유전자를 클로닝한다. 이 셔틀 벡터로 대장균을 형질 전환하여 카나마이신 내성 형질 전환체를 선택한다. 선택한 카나마이신 내성 형질 전환체의 플라스미드 DNA를 정제하고 제한 효소 부위를 분석하여 재조합체를 식별한다.
- [0076] 다음으로, 제한 효소, 예를 들어, PI-Sce I 및 I-Cue I을 사용하여 발현 카세트를 상기 셔틀 벡터에서 잘라, 이

것을 아데노 바이러스 벡터, 예를 들어, Adeno-X viral DNA에 라이케이션(ligations)한다. 얻어진 라이케이션 산물을 Swa I로 절단하고 이를 이용하여 대장균을 형질전환(transformation)한다.

[0077] 얻어진 형질 전환체 중에서 암페실린 내성 형질 전환체를 선택한다. 상기 유전자가 포함된 재조합 아데노 바이러스 DNA를 정제하고 제한 효소 부위를 분석하여 재조합 체를 식별한다.

[0078] 이어 Pac I로 재조합 아데노 바이러스를 절단하고 이를 HEK293 세포에 감염(transtransf)시킨다. 재조합 아데노 바이러스를 증식시켜 이를 모아 바이러스의 역가를 측정한다. 통상적인 방법에 따라 바이러스를 정제하여 표적 세포인 SHED-P에 감염시킨다.

[0079] 바이러스 감염 후 세포군을 통상적인 방법에 따라 FITC로 염색하고 flow cytometer를 이용하여 STRO-1 양성 세포를 검출한다. 여기에서 STRO-1은 골수의 분화능을 갖는 간엽계 줄기세포 마커의 하나로 간주하고 있으며 세포의 불사화(immortalization)의 지표가 된다.

[0080] 이상과 같이, 치수 유래의 불사화 줄기세포를 얻을 수 있다.

[0082] 다음으로, 수득한 불사화 줄기세포를 상술한 기본 배지, 예를 들어, 10% FBS를 첨가한 DMEM을 사용하여 5% CO₂, 37°C의 조건에서 24 ~ 48 시간 배양하고, 배양 상청을 얻는다. 배양 상청의 회수는 예를 들어, 피펫 등을 사용할 수 있다. 회수한 배양 상청(culture supernatant)은 그대로 본 발명의 약학 조성물의 유효 성분으로 사용하여도 좋고, 농축, 용매의 치환, 투석, 동결 건조, 희석 그 외의 다른 처리 후, 본 발명의 약학 조성물의 유효 성분으로 사용하여도 좋다.

[0083] 또한 후술하는 바와 같이, 상기와 같이하여 얻은 불사화 줄기세포의 배양 상청은 다양한 성장인자를 포함하고 고급 정제를 하지 않아도 다양한 작용을 나타낸다. 즉 각종 질병의 치료에 사용할 수 있는 본 발명의 의약 조성물을 단순 공정으로 제조할 수 있기 때문에 고도 정제에 따른 각종 성장인자의 생리 활성의 저하를 방지할 수 있다.

[0085] 또한, 본 발명에서 사용하는 "불사화 줄기세포의 배양 상청"은 불사화 줄기세포를 배양하여 얻어지는 각종 생체 인자를 함유하는 배양 상청을 말하며, 불사화 줄기세포 외의 다른 세포를 포함하지 않는 용액을 말한다. 혈청이 포함되지 않은 배양 상청을 준비하는 경우에는 초기 배양에서 계대까지의 모든 과정에서 혈청 배지를 사용하거나 또는 세포를 회수하기 전에 몇 번의 계대를 할 때 무혈청 배지를 사용하면 좋다.

[0086] 상기의 방법으로 선발 및 배양한 치수 줄기세포는 생체에서 채취한 조직이나 세포이며, 최초에 과종된 초기 배양 세포와 유사한 특성이 있다. 일반적으로 일차 배양 세포는 그 소스가 된 장기와 유사한 성질을 가지며, 정상 세포에 가깝다는 점에서 중요하다. 그러나 주화 세포(established cell)에 비해 증식 속도가 느리며, 또한 배양을 계속하는 동안 탈분화를 일으키는 경우도 있어, 그 성질을 가진 채로 유지하는 것이 어렵다.

[0087] 그러나, 본 발명의 불사화 줄기세포는 세포 배가 횟수가 20 번 또는 40 번인 시점에서, 세포의 미분화 정도의 마커가 되는 STRO-1의 발현 비율이, 불사화 줄기세포가 아닌 치수 줄기세포보다도 훨씬 높고, 약 1.5 ~ 3 배의 높은 비율을 나타내는 것이 바람직하다. STRO-1의 발현 비율의 높이는 초기 배양 세포와 유사한 특성을 나타낼 수 있는 지표가 되기 때문이다.

[0088] 또한, 본 발명의 불사화 줄기세포는 인슐린양 성장인자(IGF-1), 혈관 내피세포 성장인자(VEGF), 트랜스포밍 증식인자-β(TGF-β) 및 간세포 증식인자인 HGF에서 이루어진 군에서 선택되는 적어도 2 이상의 성장인자를 배양 상청 중에 분비한다. 여기에서 "성장인자"는 세포 분열을 촉진시키고, 형태의 변화와 확대를 가져올 폴리펩티드의 총칭이다. 성장인자를 생산하는 세포의 종류에 따라 인자는 달라지며, 상피 성장인자(EGF), 섬유 아세포 성장인자(FGF), 신경 성장인자(NGF), 종양 증식인자(TGF) 등으로 크게 구분된다.

[0089] 또한 각 세포의 세포막에 있는 수용체는 티로신ки나아제(Tyrosine Kinase) 활성을 갖고, 성장인자가 결합하면 단백질의 티로신 잔기가 인산화된 세포의 증식 및 분화를 일으킨다. 성장인자가 개체 발생에서 중배엽 유도 물질로 되어 있는 예가 몇 가지 알려져 있다. 또한 면역 체계를 조절하는 림포카인(lymphokine) 개체 발생에서 중배엽 유도 물질로 되어 있는 예가 몇 가지 알려져 있다. 이러한 성장 요인은 공지의 ELISA법, 마이크로어레이(micro array)법 등으로 정량할 수 있다.

[0090] 상기 IGF-1은 인슐린과 배열이 매우 유사한 폴리펩티드이며, 세포 배양에서 인슐린과 마찬가지로 유사 분열 유발 등의 반응을 일으킨다. 신경 세포의 성장에도 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 또한, 상기 VEGF는 배아 형성기에 혈관이 없는 곳에 새로운 혈관을 형성하는 혈관 형성 및 기존 혈관에서 분지 신장하여 혈관을 형성하

는 혈관 신생에 관여하는 일련의 당단백이다. 상기 TGF- β 는 또한 많은 세포에 대한 강력한 증식 억제 인자가 되며, 세포의 분화, 유주 및 접착에 밀접하게 관여하여 개체 발생과 조직 재구축, 상처 치유, 염증 및 면역, 암의 침윤 및 전이 등 다양한 영역에 중요한 역할을 담당하고 있다. 또한 HGF는 간세포뿐만 아니라 다양한 세포에 대한 세포 증식 촉진, 세포 운동 촉진, 항 아포토시스(세포 사멸), 형태 형성 유도, 혈관 신생 그 외의 조직 및 장기의 재생과 보호를 담당하는 다목적 생리 활성을 가지고 있다.

- [0091] 상술한 각종 줄기세포, 예를 들면, 15% FCS를 첨가한 DMEM 중에서 37°C에서 소정의 기간 동안 배양함으로써 상기 성장인자를 포함하는 배양 상청을 얻을 수 있다. 또한, 상기 줄기세포의 배양 상청에는 IGF-1, VEGF, TGF- β 및 HG 이외에도 약 70 종류의 단백질이 포함된다.
- [0092] 얻어진 배양 상청 중 15 mL를 Amicon Ultra Centrifugal Filter Units-10K(Millipore 사 제조)에 넣어 \times 4,000 g에서 약 60 분간 원심 분리하여 약 200 μ l까지 농축한다. 이어서, 이 투브에 배양 상청과 동량의 멸균 PBS를 투입하고 다시 \times 4,000 g에서 약 60 분간 원심 분리하여 용매를 PBS로 교환한다. 얻어진 200 μ L의 용액을 마이크로 테스트 투브에 회수하여 농축 줄기세포 배양 상청으로 한다.
- [0093] 상기 Amicon을 사용하는 방법 대신 에탄을 침전법으로 농축할 수 있다. 예를 들어, 5 mL의 배양 상청에 대해 45 mL의 100% 에탄올을 가하여 혼합하여 -20°C에서 60 분간 방치한다. 그 후, \times 15,000 g에서 15 분 동안 4°C에서 원심 분리하여 상청을 제거한다.
- [0094] 이어서, 예를 들면, 10 mL의 90% 에탄올을 가하여 잘 교반하고 다시 \times 15,000 g에서 5 분간 4°C에서 원심 분리한다. 상청액을 제거하고 얻어진 펠렛을 예를 들어, 500 μ L의 멸균수에 용해할 수 있다. 용해 후 전량을 마이크로 테스트 투브에 회수하여 농축 줄기세포 배양 상청으로 한다.
- [0095] 이상과 같이, 얻어진 배양 상청 또한 통상적인 방법에 따라 동결 건조하고, 사용시 조정한 의약 조성물로 할 수 있다.
- [0096] 이 의약 제제에 포함된 배양 상청 중 성장인자의 양은, 전체 건조 중량을 기준으로 약 50 ~ 500 중량%인 것이 바람직하다. 50 중량% 미만에서는 효과가 발휘되지 않고 500 중량%를 넘어도 효과의 개선은 기대할 수 없기 때문이다.
- [0097] 이 의약 조성물의 제형은 분말, 액제, 젤제, 스프레이제 및 경피 흡수 시스템 등을 들 수 있다. 예를 들면, 충전제, 부형제, pH 조정제 등의 첨가제를 첨가하여 멸균된 유리 앰플, 세럼 투브 그 외 소형의 용기에 넣고 의약 제제로 할 수 있다. 사용할 때 식염수 및, 멸균제 주사용으로 용해하고 경비 투여하여도 좋고, 또한 거즈에 침투시켜 환부에 부착해도 된다. 치조골 그 외의 뼈의 재형성에 사용하는 경우에는 기반재료로써 콜라겐 및 β -TCP 등을 사용하여 이들을 상기 용해액에 침지시켜 채워 넣을 수 있다.
- [0099] 본원 발명의 의약 제제를 적용할 수 있는 손상 조직으로는 궤양 또는 욕창이 형성된 조직, 혈관의 폐색에 의해 손상된 뇌 조직, 뼈, 치주조직 및 중추 신경계 질환에 의해 손상된 조직 등을 들 수 있다.
- [0100] 여기에서 "궤양"은 괴사를 일으킨 조직이 용해 또는 분리된 후 장기의 표면에 생긴 조직 결손부를 말하며, 상피, 진피, 점막 등에 형성된다. 진피에 도달하지 않은 것은 짓무름(erosion)이라고 한다. 구체적으로는, 피부, 코 구강 점막, 각막 그 외의 체표에 접하는 부분, 소화관, 기도, 요로, 혈관 그 외의 관강(tubular) 장기의 내부 빈 곳에 궤양이 형성된다.
- [0101] "욕창"이라 함은 임상적으로 환자가 장기간 같은 자세로 뒤척일 수 없는 상태가 된 경우, 몸과 지지면(대부분 침대)가 접촉하고 있는 부분에서 국소적 혈액 순환 부전이 되어 주변 조직에 괴사를 일으킨 상태를 말한다.
- [0102] "외과적인 조직에 의해 결손됨"이라 함은 뇌종양의 적출 그 외의 수술에 의해 결손된 것을 말한다.
- [0103] "혈관의 폐색"은 혈관이 하기의 어떤 이유로 폐쇄된 상태를 말한다. 예를 들어, 동맥 경화에 의해 혈관이 협착을 일으켜 거기에서 먼저 혈액이 흐르지 않게 된 상태, 심장 부근의 혈관의 동맥 경화 부위에 그 혈관의 색전(embolus)(혈액이나 지방 등의 뎅어리)이 혈관 내벽에서 벗겨져 혈관을 막고 거기에서 먼저 혈액이 흐르지 않게 된 상태, 염증과 경련 또는 혈액 성분 및 혈액 흐름에 변화가 일어나서, 혈액 공급이 끊어지는 것을 말한다.
- [0104] "뇌"는 기억, 감정, 의사 결정 등의 기능이 있다. 뇌와 척수는 뇌척수액이라고 불리는 액체에 의해 쌓여있다. 뇌척수액(cerebrospinal fluid, CSF)은 뇌를 보호하고 영양 대사 산물을 운반하는 역할을 한다. 뇌척수액은 척추 천자(puncture)에 의해 채취할 수 있지만, 그 성상은 질환 등에 의해 변화한다.
- [0105] 여기에서 "척추"는 척추 동물이 가지고 있는 신경 줄기를 말한다. 또한 "중추 신경계"는 척수와 뇌를 맞춘 조

직을 가리킨다. 중추 신경계는 말초에서 자극에 의한 반사 중추로 작동하고, 자극을 통합하는 기능이 있다.

[0106] 중추 신경계의 손상은 척수 손상 등에 의해 발생한다. 여기에서 "척수 손상"은 외부 충격, 척수 종양, 탈장(hernia) 그 외의 내적 요인에 의해 척수가 손상된 상태를 말한다. 손상의 정도에 따라 척수가 도중에 완전히 차단된 완전형과 척수가 손상되거나 압박을 받고 있지만 척수의 기능이 부분적으로 유지되는 불완전형으로 나누어진다.

[0107] 또한 "척수 질환"은 노화 변화에 의한 경추증(디스크의 팽창(protrude) 및 뼈의 가시 형성)의 변화에 따라 경추의 척추관에 있는 척수가 압박되어 발병한다.

[0108] 상기의 의약 제제는 액체 또는 젤제로 상처 부위에 적용하여도 좋지만, 시트상 제제로 적용할 수 있다. 먼저 보습성의 부재, 예를 들어, 거즈, 의료용 보습 시트 등에 흡수시켜 시트 형태의 제제로 한다. 그런 다음 시트상의 제제에서 손상된 부위를 페복(coating)한다. 손상 부위를 페복한 시트 위를 -로 대전된 막대 모양의 전극을 부드럽게 회전시키면서 이동시키고, 상처 부위와 떨어진 원하는 부위를 풀러스로 대전된 전극에 접촉시킨다.

[0109] 이상과 같이, 상처 부위에 적용된 전극과 다른 부위에 적용된 전극 사이에 흐르는 전류를 이용하여 상기 의약 제제 중 유효 성분을 효율적으로 투여할 수 있다.

[0110] 이상과 같은 손상 조직에 본원 발명의 의약 제제를 적용함으로써 조직의 조속한 회복을 도모할 수 있다.

[실시예 1]

(불사화 SHED의 제작 및 배양 방법)

[0114] (1) 추출용 시약, 플라스미드 등

[0115] (1-1) 시약 등

[0116] 카나마이신(Kan), 암피실린(Amp), LB 액체 배지와 LB 한천 배지, 클리코겐, 아가로오스, 멸균수, 초산 암모늄, 초산 나트륨, 도데실 황산나트륨(sodium dodecyl sulfate) 및 RNase A를 사용하였다. 50 mg/mL의 카나마이신(Kan)과 암피실린(Amp)을 준비하고, 스타크(stock) 용액으로 -20°C에 저장했다. 클리코겐은 20 mg/mL로 조제하였다. 10 mg/mL의 RNase A를 준비하고 -20°C에 저장하였다. 10 M(포화) 초산 암모늄(NH₄OAc), 3 M의 아세트산나트륨(NaOAc; pH 5.2)을 제조하였다.

[0117] (1-2) 제한 효소 등

[0118] 대장균 컴피턴트셀(Supercharge EZ10 Electrocompetent Cells, 제품 코드 636756), Swa I(제품 코드 1111A, Smi I가 동급), Xho I(제품 코드 1094A), T4 DNA Ligase(제품 코드 2011A), NucleoBond Xtra Midi(제품 코드 740410.10 / 0.50 / .100), NucleoSpin Plasmid(제품 코드 740588 10/50/250)는 모두 다카라 바이오에서 구입하였다. Pac I는 New England Biolabs에서 구입하였다.

[0119] (1-3) 버퍼 등

[0120] 1 × TE Buffer(1 mM의 EDTA를 포함하는 10 mM Tris-HCl [pH 8.0]), 100 mM Tris-HCl(pH 8.0)로 포화된 페놀:클로로포름:이소아밀알코올(25:24:1, 이하 "PCI 혼합액"이라 한다)을 제조하였다. 에탄올은 100% 및 70%로 사용했다. 미니 스케일에서의 재조합에 사용하는 pAdeno-X 플라스미드 DNA의 정제에 하기의 버퍼 1-4를 조제하였다.

[0121]

[0122] 버퍼 1 : 10 mM EDTA 및 50 mM 포도당을 포함하는 25 mM Tris-HCl(pH 8.0) (오토클레이브 후, 4°C에서 저장)

[0123] 버퍼 2 : 1% SDS를 포함하는 0.2 M NaOH(사용 직전에 조제, 밀봉시 상온 저장)

[0124] 버퍼 3 : 5 M KOAc(오토클레이브 후, 4 °C에서 저장)

[0125] 버퍼 4 : 1mM EDTA, 20 μg/ml RNase를 포함한 10 mM Tris-HCl(pH 8.0)(사용 직전에 RNase를 첨가한다. -20 °C에서 저장)

[0127] (2) 아데노 바이러스 정제 및 β-gal 분석용 시약

[0128] 인간 5 형 아데노 바이러스로 형질 전환한 사람 HEK293 세포(ATCC # CRL1573)를 사용했다. HEK293 세포는 완전 배지에서 배양하였다. 완전 배지의 조성은 100 unit/ml의 페니실린G 나트륨과 100 μg/ml 스트렙토마이신, 4

mM 글루타민 및 10% FBS를 첨가한 DMEM(Dulbecco 's Modified Eagle 's Medium, 기본 배지)로 하였다. 페니실린G 나트륨 용액은 10,000 units/ml, 황산 스트렙토마이신 용액은 10,000 μ g/ml로 조제하여 스톡 용액으로 저장했다.

[0129] 배양은 60 mm 플레이트, 100 mm 플레이트, 6-웰 플레이트, T75 및 T175 플라스크를 사용하였다.

[0130] 트립신-EDTA(제품 코드 CC-5012)는 다카라 바이오로부터 구입했다. 인산 완충생리식염수(PBS, Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 불포함) 및 Dulbecco 's 인산 완충생리식염수(DPBS, Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 함유)를 제조하였다. 또한 0.33%의 뉴트럴 레드(Neutral Red) 염색액, 0.4% 트립판블루(trypan blue) 염색액을 사용했다.

[0131] β -gal 분석에는 X-Gal(5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside(25 mg/ml)) 디메틸포름아미드(dimethylformamide; DMF) 용액은 -20°C에서 차광 저장했다. Luminescent β -gal Detection Kit II(제품 코드 631712, 다카라 바이오 제조)을 사용했다.

[0133] (3) 예비 시험

[0134] (3-1) lacZ를 포함한 재조합 아데노 바이러스(pAdeno-X-lacZ)의 구축

[0135] 10 mL의 상술한 완전 배지에 해동 후 DMSO를 제거한 HEK293 세포를 다시 혼탁하여 전량을 100 mm 배양 접시에 옮겼다. HEK293 세포가 부착한 후 배양액을 제거하고 세포를 멸균 PBS로 1 번 세척하고 1 ml의 트립신-EDTA 용액을 첨가하여 약 2 분간 처리했다.

[0136] 다음은 10 ml의 전체 배지를 첨가하여 트립신의 반응을 중지하고 부드럽게 혼탁하였다. 바이어블 계산을 수행하여 배양액 10 ml를 넣은 100 mm 플레이트에 10^5 개의 세포를 옮겨 균일하게 펼쳤다.

[0137] pShuttle2-lacZ (Adeno-X Expression System 1에 포함된 양성 대조 벡터)와 키트에 포함되어 있는 Adeno-X Viral DNA(PI-Sce I 및 I-Ceu I digested)를 사용하고 키트에 첨부된 프로토콜에 따라 lacZ를 포함한 재조합 아데노 바이러스를 구축했다. 표적 세포인 SHED에 감염시켜 β -갈락토시다아제의 발현을 분석하고 벡터가 구축되는 것을 확인하였다.

[0138] (3-2) 재조합 pShuttle2 플라스미드의 구축

[0139] 재조합 pShuttle2 Vector(이하 "rpShuttle2 Vector"라 한다)의 구축 전에 키트에 포함되어 있는 pShuttle2 Vector 및 pShuttle2-lacZ Vector에서 DH5 α 대장균을 형질전환하였다. 50 μ g/ml의 카나마이신을 함유하는 LB 한천 플레이트(이하 "LB/Kan"이라 한다)에 형질전환체를 선택하고 단일 콜로니에서 채취한 균체를 새로운 LB/Kan에 획선(streaking)하고 37°C에서 하룻밤 배양했다.

[0140] 이어서, hTERT, bmi-1, E6, E7을 pShuttle2에 다음과 같이 클로닝하였다. 이러한 유전자에 적합한 제한 효소로 pShuttle2 Vector를 절단했다.

[0141] 이어서, 상기 키트에 첨부되어 있는 pShuttle2 Vector Information Packet(PT3416-5)를 참조하여 삽입하는 DNA에 부합하는 멀티 클로닝 사이트를 결정했다. 제한 효소 처리된 상기 플라스미드를 알칼리 인산가수분해효소로 처리하여 정제하였다.

[0142] 통상적인 방법에 따라 표적 DNA 단편을 조제하고 정제하였다. 위의 제한 효소로 절단한 벡터 및 상기 유전자 단편을 라이케이션(ligation)하고 DH5 α 세포(컴피턴트 세포)를 라이케이션 산물로 형질전환했다. 상기 컴피턴트 세포의 일부를 취하고 키트에 포함되어 있는 대조 벡터 pShuttle2-lacZ Vector로 형질 전환하여 양성 대조로 하였다.

[0143] 형질전환된 대장균을 포함한 혼합액을, LB/Kan 한천 플레이트에 접종하고 카나마이신 내성(Kanr)의 형질전환체(콜로니)를 선택했다. 5 ~ 10 개의 Kan 내성 클론을 선택하고 소량의 액체 배지에 접종하여 증폭하였다. 이러한 클론이 rpShuttle2 Vector를 가지고 있는지 확인한 후, 밤새 배양하였다. 그 후 시판 실리카 흡착 컬럼을 사용하여 통상적인 방법에 따라 구축된 플라스미드 DNA를 정제하였다.

[0144] 이 플라스미드 DNA를 제한 효소로 처리하여 1% 아가로오스 겔 전기영동을 실시하여 목적의 재조합 플라스미드를 동정하였다. 시퀀싱에 의해 삽입된 단편의 방향과 삽입 부위를 확인하고 positive 클론을 동정하였다.

[0145] 재조합 pShuttle2 플라스미드 DNA(이하 "rpShuttle2 플라스미드 DNA"라 한다)를 대상 세포에 직접 트랜스펙트(transfект)하고 웨스턴 블로트를 실시하여 목적 단백질의 발현을 예비적으로 확인하였다.

[0146] (3-3) rpShuttle2 플라스미드 DNA의 PI-Sce I/I-Ceu I 이중 절단

[0147] 상기와 같이, 제작한 rpShuttle2 플라스미드 DNA에서 도입 유전자의 발현 카세트(cassette)를 PI-Sce I 및 I-Ceu I로 절단하였다. 키트에 첨부된 프로토콜에 기재된 *in vitro* 라이케이션 방법에 따라 잘라낸 발현 카세트를 Adeno-X Viral DNA에 통합하였다. rpShuttle2 플라스미드 DNA의 PI-Sce I/I-Ceu I 이중 절단액을 30 μ l 준비하여 하기 표 1에 기재한 시약을 1.5 ml의 멸균된 microcentrifuge 관에 넣어 혼합하였다.

표 1

시약 등	액량(μ L)	
	튜브1	튜브2(1acZ대조)
멸균수	19.5	19.5
10×이중반응액	3.0	3.0
rpShuttle2 플라스미드 DNA(500 ng/ μ l)	2.0	—
pShuttle2-lac Z 플라스미드(500 ng/ μ l)	—	2.0
PI-Sce I(1 unit/ μ l)	2.0	2.0
I-Ceu I(5 unit/ μ l)	0.5	0.5
10×BSA	3.0	3.0
합계	30.0	30.0

[0149] 이어서, 충분히 혼합한 후에 마이크로 원심 투브에 넣고 가볍게 원심분리한 다음 37°C에서 3 시간 반응하였다.

[0150] 1 kb 래더(DNA 크기 마커)와 함께 상기 이중 절단 후의 반응액(5 μ l)를 1% 아가로오스/EtBr gel로 전기영동하였다.

[0151] (3-4) 페놀 : 클로로포름 : 이소 아밀 알코올 추출

[0152] 원심 투브에 상술한 이중 절단액의 나머지(25 μ l)에 70 μ L의 1 \times TE Buffer(pH 8.0)과 100 μ L의 PCI 혼합액을 첨가하여 vortex로 충분히 교반하였다. 이어서 원심 분리기를 이용하여 4°C에서 14,000 rpm에서 5 분간 원심 분리하여 물층을 정정한 1.5 ml 마이크로 원심 투브로 옮겼다. 여기에 400 μ L의 95% 에탄올, 25 μ L의 10 M 초산 암모늄 및 1 μ L 글리코겐(20 mg/ml)을 첨가하여 vortex로 충분히 교반하였다.

[0153] 이어서 4°C에서 14,000 rpm에서 5 분간 원심 분리하여 상청을 흡인하여 제거하고 펠렛을 얻었다. 이 펠렛에 300 μ L의 70% 에탄올을 첨가하여 실온에서 14,000 rpm으로 2 분간 원심분리하였다. 상청을 주의 깊게 흡입하여 제거하고 펠렛을 실온에서 약 15 분간 바람 건조하였다.

[0154] 펠렛이 건조된 후 이를 10 μ L의 멸균 1 \times TE Buffer(pH 8.0)에 용해하고 사용할 때까지 -20°C에서 보관했다.

[0156] (4) 재조합 Adeno-X 플라스미드 DNA의 구축

[0157] (4-1) Adeno-X 바이러스 계놈의 발현 카세트의 서브 클로닝

[0158] 하기의 표 2에 나타낸 시약을 순서대로 1.5 ml의 멸균 마이크로원심튜브에 넣고 부드럽게 혼합하고 가볍게 원심 분리한 후 16°C에서 밤새 배양하였다.

표 2

시약 등	액량(μ L)
PI-Sce I/I-Ceu I 절단이 끝난 pShuttle2 플라스미드 DNA	2.0
PI-Sce I/I-Ceu I 절단이 끝난 pShuttle2-lac Z 플라스미드 DNA	—
멸균수	3.0
10× DNA Ligation Buffer	1.0
Adeno-X Viral DNA(250 ng/ μ l)	3.0
DNA Ligase(1 unit/ μ L)	1.0
합계	10.0

[0160] 각 샘플에 90 μ L의 1 \times TE Buffer(pH 8.0)과 100 μ L의 PCI 혼합액을 가하여, vortex에서 부드럽게 교반하였다. 4°C에서 14,000 rpm으로 5 분간 원심 분리하여 물층을 정정한 1.5 ml 마이크로원심튜브에 옮기고 여기에 400 μ L의 95% 에탄올, 25 μ L의 10 M 초산 암모늄용액 및 1 μ L 글리코겐(20 mg/ml)을 첨가하여 vortex에서

부드럽게 교반 하였다.

[0161] 4°C에서 5 분 동안 14,000 rpm에서 원심 분리하여 상청을 흡입으로 제거하여 펠렛을 얻었다. 그런 다음 에탄올 침전 조작은, 상기 (3-4)과 동일하게 수행했다.

[0162] 펠렛이 건조된 후 이를 15 μ L의 멀균 증류수에 용해했다.

[0163] (4-2) 재조합 Adeno-X 플라스미드 DNA의 Swa I 절단

[0164] 하기 표 3에 나타낸 절단액을 조제하고 원심 투브에 넣은 각 샘플 이외에 2 시간, 25°C에서 배양하였다.

표 3

시약 등	액량(μ L)
라이게이션(ligation) 산물	15
10×Swa I Digestion Buffer	2.0
10× BSA	2.0
Swa I(10 units/ μ L)	1.0
합계	20.0

[0166] 각 샘플에 80 μ L의 1 \times TE Buffer(pH 8.0)과 100 μ L의 PCI 혼합액을 가하여, vortex에서 부드럽게 교반하였다. 마이크로 원심 투브, 4°C에서 5 분 동안 14,000 rpm에서 원심분리 하였다. 다음의 에탄올 침전의 조작은, 상기 (3-4)과 같이하고, 펠렛의 용해액은 사용할 때까지 -20°C에서 보관했다.

[0167] (4-3) 재조합 Adeno-X 플라스미드 DNA에 의한 대장균의 형질 전환 확인

[0168] 일렉트로포레이션(electroporation)용 캠피던트셀(대장균)을 Supercharge EZ10Electrocompetent Cell(제품 코드 636756)을 사용하여 상기 (4-2)에서 얻은 Swa I 절단 산물로 형질 전환하였다.

[0169] 형질 전환 혼합액을 LB 배지에 암피실린(최종농도 100 μ g/mL)을 가한 한천 플레이트(이하 "LB/Amp 한천 플레이트"라 한다)에 접종하고 37°C에서 하룻밤 배양했다. 암피실린 내성(Amp^r) 형질전환체로서 약 10^6 개의 콜로니를 얻었다. 얻어진 콜로니를 제품과 함께 제공되는 Adeno-X System PCR Screening Primer Set로 확인하였다.

[0170] 5 mL 신선한 LB/Amp 액체 배지에 단일 콜로니에서 균체를 접종하고 하룻밤 배양하였다. 다음 날 후술하는 미니 스케일법에 따라 Adeno-X 플라스미드 DNA를 정제하였다.

[0171] (4-4) 재조합 Adeno-X 플라스미드 DNA의 미니스케일 준비

[0172] 대수 증식의 배양액 5 mL를 14,000 rpm에서 30 초간 원심 분리하여 상층액을 제거하였다. 펠렛을 다시 10,000 rpm에서 1 분간 원심 분리하여 마이크로피펫을 사용하여 상층액을 제거하였다.

[0173] 여기에 150 μ L의 상기 버퍼 1을 더해 부드럽게 피펫을 이용하여 재현탁 하였다. 이 세포 혼탁액에 150 μ L 버퍼 2를 첨가하여 부드럽게 전도 혼합하고 얼음에 5 분간 방치했다. 냉각한 세포 혼탁액에 150 μ L 버퍼 3을 추가하여 다시 전도 혼합하고 얼음에 5 분간 방치하였다.

[0174] 이 세포 혼탁액을 4°C에서 14,000 rpm으로 5 분간 원심 분리하여 투명한 상청을 청정한 1.5 mL 원심 투브에 옮겼다. 이 상청에 450 μ L의 PCI 혼합액을 첨가하여 전도 혼합하여 교반하였다. 그 후, 4°C에서 14,000 rpm에서 5 분간 원심 분리하여 물층을 청정한 1.5 mL 마이크로원심투브에 옮겼다.

[0175] 다음의 에탄올 침전 조작은, 상기 (4-1)와 같이 조작하여 펠렛의 용해액은 사용할 때까지 -20°C에서 보관했다. 원하는 rDNA는 후술하는 제한 효소에 의한 분석 및 PCR을 통해 확인하였다.

[0177] (5) 얻어진 rAdeno-X 플라스미드 DNA의 제한 효소 부위 분석

[0178] PI-Sce I 및 I-Ceu I을 사용하여 분석을 실시했다. 하기 표 4에 나타내는 시약을 1.5 mL의 멀균된 microcentrifuge 관에 넣고 30 μ L의 PI-Sce I/I-Ceu I 이중 절단반응액을 첨가하여 충분히 교반하고 가볍게 회전시켜 내용물을 모았다.

표 4

[0179]	시약 등	액량(μ L)
	멸균수	19.5
	10×이중반응액	3.0
	rpAdeno-X DNA(500 ng/ μ l)(500 ng/ μ l)	2.0
	pShuttle2-lac Z 플라스미드(500 ng/ μ l)	—
	PI-Sce I(1 unit/ μ l)	2.0
	I-Ceu I(5 unit/ μ l)	0.5
	10×BSA	3.0
	합계	30.0

[0180] 37°C에서 3 시간 배양한 후 제한 효소 처리를 실시하였다. 이 처리 후 반응액을 1% 아가로오스/EtBr gel로 전기영동하였다.

[0182] (6) 재조합 아데노 바이러스의 생산

[0183] (6-1) HEK293 세포 트랜스펙트용 rAdeno-X 플라스미드 DNA의 조제

[0184] 하기 표 5에 나타내는 시약 등을 1.5 ml의 멸균 원심 투브에 넣어 혼합하고 원심 분리기로 가볍게 원심분리하였다. 그 후, 37°C에서 2 시간 배양한 후 rAdeno-X 플라스미드 DNA의 Pac I 제한 효소 처리를 실시하였다.

표 5

[0185]	시약 등	액량(μ L)
	멸균수	20
	pAdeno-X 플라스미드 DNA(500 ng/ μ l)	10
	10×Pac I Digestion Buffer	4
	10×BSA	4
	Pac I(10 units/ μ L)	2
	합계	40

[0186] 60 μ L의 1 × TE Buffer(pH 8.0)와 100 μ L의 PCI 혼합액을 첨가하여 vortex로 온화하게 교반하고 원심 분리기에서 4 °C에서 5 분 동안 14,000 rpm로 원심분리하였다. 물총을 깨끗한 1.5 ml의 멸균 원심튜브에 조심스럽게 옮겼다.

[0187] 다음의 에탄올 침전의 조작은, 상기 (3-4)와 같이 조작하여 펠릿의 용해액은 사용할때까지 -20°C에서 보관했다.

[0188] (6-2) Pac I 소화 Adeno-X 플라스미드 DNA의 HEK293 세포에 트랜스펙션(transfection)

[0189] 상기 플라스미드 DNA의 트랜스펙션을 24 시간 전에 60mm 배양 접시당 세포수가 $1\sim 2 \times 10^6$ (약 100 cells/ mm^2)이 되도록, HEK293 세포를 접종하고 37°C, 5% CO₂ 존재 아래에서 배양하였다.

[0190] 각 배양 접시에 Pac I 절단한 10 μ L의 Adeno-X 플라스미드 DNA를 트랜스펙트하고 표준 트랜스펙션 방법(CalPhos Mammalian Transfection Kit, 제품 코드 631312, 다카라 바이오 제조)에 따라 HEK293 세포에 Adeno-X DNA를 도입했다. 트랜스펙션 다음날부터, CPE(세포 변성 효과)이 일어나고 있는지를 확인했다.

[0191] 1 주일 후에 배양 접시의 바닥과 측면에 부착되어 있는 세포를 부드럽게 교반하여 유리시켰다. 얻어진 세포 혼탁액을 15 ml의 멸균된 원뿔 원심튜브에 옮기고, 실온에서 5 분간 1,500 × g로 원심분리 하였다.

[0192] 얻어진 침전물을 500 μ L의 멸균 PBS에 혼탁하였다. 드라이 아이스/에탄올에 냉동시켜 37°C의 항온조에서 용해시키는 동결 용해 조작을 3 회 반복하여 세포를 충분히 용해시킨 용해물(lysate)을 얻었다. 이어 가볍게 원심 분리하여 부유물을 제외하고 상청을 멸균된 별도의 투브에 옮겨 즉시 사용하였다. 즉시 사용하지 않은 분은 -20°C에 저장했다.

[0193] 60 mm 플레이트 배양 세포에 250 μ L의 상기 용해물을 첨가하여 배양을 계속했다. 또한 Adeno-X Rapid Titer Kit(제품 코드 631028, 다카라 바이오 제조)에 포함된 안티 Hexon 항체를 사용하여 이 키트의 설명서(PT3651-

1)에 따라 아데노 바이러스의 역가를 측정하였다.

[0194] (6-3) 고역가(titer) 바이러스 준비를 위한 바이러스의 증폭

[0195] 이 역가 측정을 시작하기 약 24 시간 전에 HEK293 세포를 T75 플라스크에 접종하고 37°C, 5% CO₂ 존재 하에서 하룻밤 배양하고, 50 ~ 70% 컨플루언트(confluent)되어 있는지를 확인했다.

[0196] 다음날 바이러스를 포함한 새로운 배지로 교체하고, MOI = 10으로 감염시켰다. 3°C, 5% CO₂ 존재 하에서 90 분간 배양한 후 플라스크를 제거하고 10 mL의 배지를 첨가했다.

[0197] 37°C, 5% CO₂ 존재 하에서 3 ~ 4 일간 배양하고 CPE를 확인했다. 50%의 세포가 벗겨진 곳에, 상기와 동일하게 유리된 세포 혼탁액으로 하여 15 mL의 멸균된 원뿔원심튜브에 옮겼다. 상기와 같이 동결 용해 조작을 수행하여 세포를 용해시켰다. Adeno-X Rapid Titer Kit(제품 코드 631028)를 사용하여 10⁷ PFU/mL의 역가를 얻었다.

[0198] 웨스턴 블로팅을 실시하여, 포장(packaging)된 아데노 바이러스 계놈이 목적 유전자에 특이적인 전사 단위의 복사를, 기능하는 형태로 가지고 있는지를 확인했다.

[0200] (7) 표적 세포에 아데노 바이러스 감염

[0201] (7-1) 표적 세포에 감염

[0202] 감염 24 시간 전에 6-웰 플레이트에 1 × 10⁶ 개의 SHED을 접종했다. 접종 다음날 배지를 제거하고 바이러스를 포함하는 1.0 mL의 배지를 각 플레이트의 중심에 첨가하였다. 이 용액을 SHED가 형성한 단층 전체에 균일하게 펴쳤다.

[0203] 37°C, 5% CO₂ 존재 하에서 4 시간 배양하여 바이러스를 SHED에 감염시켰다. 이어서 신선한 배지를 첨가하고, 37°C, 5% CO₂ 존재 하에서 배양하였다. 감염 후 24 시간 ~ 48 시간 후까지 도입 유전자의 발현을 경시적으로 분석했다.

[0204] (7-2) 감염 세포의 β- 갈락토시다아제 발현 분석

[0205] Adeno-X-lacZ를 감염시킨 접착성 세포에서 β-갈락토시다아제의 발현은 Luminescent β-gal Detection Kit II (제품 코드 631712, 크론테크 사)를 사용하여 분석했다.

[0207] [실시예 2]

[0208] (1) SHED 제작

[0209] 10 세의 건강한 남아에서 얻은 탈락 유치를 사용했다. 이 탈락 유치를 이서진(Isodine) 용액으로 소독한 후 치과용 다이아몬드 포인트를 사용하여 치관을 수평 방향으로 절단하고 치과용 리머(reamer)를 사용하여 치수 조직을 회수하였다. 얻어진 치수 조직을 3 mg/mL의 I 형 콜라게나제 및 4 mg/mL의 디스파아제의 용액에 37°C에서 1 시간 반응시켰다. 이어서 이 용액을 70 mm의 세포 스트레이너(Falcon 사 제품)를 사용하여 여과했다.

[0210] 여과하여 나눠진 세포를 4 mL의 상기 배지에 재현탁하고 직경 6 cm의 부착성 세포배양용 접시에 파종하였다. 10% FCS를 함유하는 DMEM(Dulbecco 's Modified Eagle 's Medium)이 접시에 첨가하여 5% CO₂, 37°C로 조정한 인큐베이터에서 2 주 정도 배양하였다. 콜로니를 형성한 접착성 세포(치수 줄기세포)를 0.05% 트립신 · 0.2 mM EDTA에서 5 분 동안 37°C에서 처리하고 접시에서 박리된 세포를 회수하였다.

[0211] 다음으로, 상기와 같이 선발한 접착성 세포를 부착성 세포배양용 접시(콜라겐 코트 접시)에 파종하고 5% CO₂, 37°C로 조정한 인큐베이터에서 일차 배양하여 초기 배양 세포로 하였다. 육안 관찰에서 서브컨플루언트(배양 용기의 표면의 약 70%를 세포가 차지하는 상태) 또는 컨플루언트되었을 때, 0.05% 트립신 · 0.2 mM EDTA에서 5 분 동안 37°C에서 처리하여 세포를 배양 용기에서 박리하여 회수하였다.

[0212] 이렇게 얻어진 세포를 다시 상기의 배지를 넣은 접시에 파종하여 계대 배양을 몇 번 하여 약 1 × 10⁷ 개/mL까지 증식시켰다. 얻어진 세포를 액체 질소에 저장했다.

[0213] 그 후, 일차 배양 세포를 상기 배지를 이용하여 약 1 × 10⁴ 세포/cm²의 농도로 계대 배양하였다. 1 ~ 3 회 계대 세포를 실험에 사용하였다. 인간 BMMSC(골수 간엽줄기세포, Bone Marrow Mesenchymal stem cells)는 롤자

사로부터 구입하여 제조업체의 지침에 따라 배양하였다.

[0214] 이상과 같이, 인간 탈락 유치 치수 줄기세포(SHED)를 얻었다. 얻어진 SHED을 FACSTARPLUS(백톤 디킨슨 사 제조)를 이용하여 각 시료에 약 1×10^6 개의 STRO-1 양성 세포를 다음과 같이 정렬하였다.

[0215] 브로모데옥시우리딘 BrdU 염색 키트 제조 업체(Invitrogen 사 제조)의 취급 설명서에 따라 BrdU를 12 시간 캡처하고 SHED의 증식 속도를 평가하였다(각 군에 대해 $n = 3$). 실험은 5 회 반복했다. 1 원 배치 분산 분석 후 Tukey-Kramer 검정을 실시하여 통계적 차이를 평가하였다.

[0216] STRO-1을 면역 형광으로 검출하기 위해 SHED을 3% 파라포름알데히드로 고정한 후 PBS로 2 회 씻어, 100 mM 글리신에서 20 분간 처리했다. 이어 이 세포를 0.2%의 Triton-X(Sigma-Aldrich 사)에서 30 분간 투과 처리한 다음 5% 당나귀 혈청 및 0.5% 소 혈청 알부민의 혼합물에서 20 분 동안 배양하였다.

[0217] 다음으로 세포를 일차 항체의 마우스 항 사람 STRO-1 항체(1:100, R & D 사 제품)과 함께 1 시간 배양한 후 이차 항체의 염소 항 마우스 면역 글로불린 M-FITC 항체(1 : 500, Southern Biotech 사 제조)와 함께 30 분 동안 배양하여 벡터 방파 DAPI(Vector Laboratories Inc)를 사용하여 마운트하였다.

[0218] 그 후, 15% FBS를 첨가한 α-MEM을 6 웰 플레이트에 넣고 정렬된 세포를 클론 제작용으로 파종하였다. 증식된 세포 중에서 약 300 콜로니를 시험용으로 모아두었다(pool).

[0220] (2) 유전자의 도입

[0221] 상술한 바와 같이, bmi-1, E6, E7 및 hTERT의 4 개의 유전자를 아데노 바이러스 벡터에 내장하여, 이러한 유전자 산물을 발현하는 바이러스 벡터를 제작하였다. 대조적으로 이러한 유전자를 넣지 않은 대조 벡터를 제작하였다.

[0222] SHED을 100 mm^2 의 콜라겐 코트 접시에 1×10^6 개를 파종하여 10% FBS를 첨가한 DMEM을 첨가하여 서브컨플루 엔트까지 배양하였다. 이 배지를 흡입 후 제거하여 상기 배지로 희석한 바이러스 용액 500 μL 를 추가하여(MOI = 10), 37°C에서 5% CO² 인큐베이터 중에서 1 시간 배양하여 상기 바이러스 벡터를 감염시켰다. 감염 48 시간 후 배지를 상기의 것으로 바꾸고 퓨로마이신(Puromycin)(1 pg/mL)을 가한 상기의 배지에 감염된 세포를 10 일간 배양하여 선택하고 500 ~ 600 개의 내성 클론을 모았다(pool). 3 ~ 4 일 마다 약 0.5×10^5 개의 SHED을 100 mm^2 배양 살레에 파종하여 계대하였다. 유전자가 도입된 SHED을 SHED-T, 유전자가 도입되지 않는 SHED을 SHED-C로 하였다.

[0224] [실시예 3]

[0225] (1) SHED-C 및 SHED-T의 성장 속도 측정

[0226] SHED-T(유전자를 도입한 SHED)의 개체수가 배가 상태를 도 1에 나타내었다. 도 중 종축은 개체 수배화 횟수(세포 분열 횟수, 회), 가로축은 시간(배양 일수)이다. 또한 배양 중인 SHED이 1 개월간 분열하지 않는 상태를 세포의 노화의 판단 기준으로 하였다.

[0227] SHED-C는 30 회 정도에서 성장이 멈추고 노화 또는 증식 정지 단계에 들어갔다. 이에 대해 SHED-T는 250PD을 넘어 800 일 경과 후에도 증식했다.

[0229] (2) 유동 세포 계측법(flow cytometry) 분석

[0230] 단일 세포 혼탁액을 얻기 위해 접착성 단층세포를 트립신/EDTA로 반응시켰다. 2×10^5 개의 세포에 항 STRO-1 단클론 항체(1:100)를 첨가하여 방치하고 FACSCalibur flow cytometer(Becton Dickinson 사)를 사용하여 분석했다. 대응하는 동형(isotype)이 동일한 대조 항체와 비교하여 99% 이상의 비율로 형광 수준이 높은 경우에 발현이 양성으로 하였다. SHED-T 및 SHED-C 모두 초기 및 후기의 계대 세포를 고정하고 FITC 결합 STRO-1 항체로 염색했다. 그 후, 유동 세포 계측법(flow cytometry)으로 분석했다. 시험은 각각 두 번 시행 하였다. SHED-C는 STRO-1 양성 세포의 비율이 PD20에서 27%이며, PD30에서는 15%까지 감소했다(도 2 (A) 및 (B)). SHED-T에서는 STRO-1 양성 세포의 비율이 각각 PD20에서 46%, PD40에서 41%였다(도 2 (C) 및 (D)).

[0232] (3) 분화능 검토

[0233] PD0, PD10 및 PD20에서 SHED-C 및 SHED-T의 분화능을 신생 골량의 형성능 및 조직 염색으로 조사하였다.

- [0234] 먼저 2.0×10^6 개의 SHED-C 또는 SHED-T를 40 mg의 수산화 인화석(hydroxyapatite)/산칼슘인산염(calcium phosphate tribasic)(HA/TCP) 세라믹 분말(올림푸스 공업(주))에 혼합하여 10 주령의 면역 무방비 상태 마우스(NIH-bgnu-xid, 암컷, Harlan Sprague Dawley 사 제조)의 등쪽 표면 피하에 이식했다.
- [0235] 이식 8 주 후 이식물을 회수하고 4% 포르말린으로 고정하여 탈회한 후 파라핀 포매(embedding)하기 위해 10% EDTA를 포함한 PBS 용액으로 벼퍼링했다. 일부는 플라스틱 포매하기 위해 70% 에탄올 용액에 보존하였다.
- [0236] 파라핀 절편을 탈파라핀화 하고 이를 수화(hydration)한 후 혜마톡실린 및 에오신(이하 "H&E" 라 한다)로 염색하였다. 도 5 (A) ~ (C)는 SHED-T(불사화 줄기세포)의 PDO ~ PD20의 염색 이미지를 나타내며 도 5 (D) ~ (F)는 SHED-C(정상 세포)의 PDO ~ PD20의 염색 이미지를 나타낸다. 생체 내에서 새로운 뼈의 형성을 정량하기 위해 특정 영역을 선택하고 SHED-T 이식 후 형성된 이식물 또는 SHED-C 이식 후 형성된 이식물 각각에 대해 신생 뼈의 면적과 시야 면적을 산출하고, 이 수치에서 신생 골량을 구했다.
- [0237] 신생 골량 = 신생 뼈 면적/시야 면적 × 100
- [0238] 도 4에 각 개체수 배가 횟수(배가 시간)에서, SHED-T 및 SHED-C와의 신생 골량의 변화를 보여주었다. 도 중 **는 $p < 0.05$, ***은 $p < 0.01$ 을 나타낸다. 또한 신생 골량은 하기의 계산식으로 구하였다.
- [0239] 도 4에 나타낸 바와 같이, SHED-C에서는 개체수 배가 횟수가 늘어나는 것에 대해 신생 골량이 감소하고 PD20에서는 PDO의 약 1/5까지 떨어졌다. 이에 대해 SHED-T에서는 PD20까지 신생 골량은 거의 변동이 없고, PD20에서는 SHED-T는 SHED-C의 5 배 이상의 뼈를 형성한 것으로 나타났다.
- [0241] (4) 암화 활성 평가
- [0242] SHED-C 및 SHED-T 세포를 면역 무방비 상태 마우스의 피하 조직에 1×10^6 개를 이식했다. 이식 후 30 일 이상 관찰을 실시하였지만, 이 기간 동안 상기 세포를 이식 한 어떤 마우스에서도 종양이 형성되지 않았다. 또한 SHED-T 세포는 40 ~ 200PD의 배양 세포의 모든 클론의 형태에 변화는 없었다.
- [0243] 이상으로부터 SHED-T에는 암화 활성이 없음을 보여주었다.
- [0245] (5) 평가
- [0246] SHED-T는 260PD을 넘어도 분화 능력을 유지하면서 증식하는 능력을 가지고 있는 것으로 나타났지만, SHED-C는 분화 능력을 가지고 있지만 30PD 이하에서 노화하였다.
- [0247] 이상에서, SHED-T 불사화 줄기세포가 되고, 활성이 높은 SHED 배양 상청의 대량 생산에 적합한 것으로 나타났다.
- [0249] [실시예 4]
- [0250] (1) 경부 방사선 케양에 대한 치료 효과
- [0251] 64 세의 오른쪽 설암(T3NOM0) 환자(남성)의 혀 반 측절제를 실시했다. 약 6 개월 후 오른쪽 경부 림프절에 전위를 확인하였기 때문에 60GY의 방사선 조사 및 전경부 절개 수술을 실시했다. 수술 후 3 주에 턱 아래에서 목에 걸쳐 상처 치유 부전이 생겨 케양이 형성되었다(도 3 (A)). 따라서 방사선성 경부 케양으로 진단했다.
- [0252] 환부의 상처 치유를 촉진하기 위해 상기와 같이 얻은 SHED-T의 배양 상청 10 mL를 환부 부위를 덮는 크기의 거즈에 적셔서 환부에 부착했다. 2 일에 1 회, 상기 배양 상청을 적신 거즈를 14 회 교환한 상태에서, 1 개월 후에는 케양이 폐쇄되었다(도 3 (B)). 이상에서 상기 배양 상청은 상피의 케양에 효과가 있는 것으로 나타났다.
- [0254] (2) 육창에 대한 치료 효과
- [0255] 60 세 남성의 허리에 형성된 육창을 상기 SHED-T의 배양 상청으로 치료했다. 이 남성은 2 년 전에 뇌졸중을 일으켜 한쪽편이 마비가 되었다. 육창의 치료를 위해 내원했다.
- [0256] 감염을 일으킨 육아 조직(도 6 (A))를 완전히 제거하고 10 mL의 SHED-T의 배양 상청을 희석하지 않고 거즈에 함침시켜 환부를 덮었다. 거즈 교환을 매일 실시하였으며, 2 주 후에 피부의 끝에서 환부를 덮도록 새로운 상피가 형성되었다(도 6 (B)).
- [0257] 이상으로부터 SHED-T의 배양 상청은 상피의 케양 및 육창의 치료에 효과가 있는 것으로 나타났다.
- [0259] [실시예 5]

- [0260] (1) 치과 영역에서 SHED-T의 배양 상청의 치료 효과
- [0261] 남성 11 명, 여성 5 명 등 총 16 명의 환자(35 세 ~ 70 세)의 28개의 부위에 대해 치과 영역에서 SHED-T의 배양 상청의 치료 효과를 검토했다.
- [0262] 증상의 사례 내역으로는 임플란트 관련이 14 명(18 부위) 및 치주 질환 관련이 7 명(10 부위)이었다. 임플란트 관련을 보다 자세히 보면 뼈 재생 유도(GBR) 소켓 보존(socket preservation)이 11 명(15 부위), 사이너스리프트(Sinus-lift)가 3 명(3 부위)이었다.
- [0263] 여기서, GBR(뼈 유도 재생)법은 결손된 치조골 및 턱뼈 등 뼈조직의 재생을 촉진하는 치료 방법이며, 임플란트를 심기 위해 충분한 뼈의 양이 없는 경우 등에 이용되고 있다. 또한 소켓 보존은 뼈 흡수를 방지하기 위해 발치 시점에서 인공 뼈 등을 "구멍"에 넣어 뼈를 재생시키는 방법을 말한다.
- [0264] 사이너스리프트(상악동거상술)은 상악골의 내부에 존재하는 상악동이 확대하여 치조골이 있는 부분의 두께가 임플란트를 실행하기 위해 불충분한 경우에 행해진다. 그 두께가 부족한 상악동 부위에 이식 뼈 및 뼈 보충재, 최근에는 임플란트 본체의 일부를 삽입하여 상악동의 바닥 부분을 끌어올리는 기술을 말한다.
- [0265] 실시 증상 예의 평가를, 2011년 9월까지 26 부위에 대한 수술 후 3 개월 또는 6 개월의 퀸트겐(CT 포함)으로 평가했다. 다음의 5 단계로 나누어 평가하였다. 결과를 표 6, 도 7 (A) ~ (F), 도 8 (A) 및 (B), 및 도 9 (A) 및 (B)에 나타내었다.
- [0266] 도 7 (A)에서는 흰색 화살표로 가리킨 부분에 β -TCP의 분말이 막혀있는 것이 관찰되었다. 이에 대해 도 7 (C)에서는 동일한 부분이 화살표로 가리킨 부분의 구조가 변화하고 아래쪽에 있는 뼈와 같은 무구조로 되어있어 뼈 형성이 촉진되는 것으로 확인되었다.
- [0267] 또한, 도 7 (D)는 흰색 화살표 부분에 뼈가 아니라 육아 조직이 형성되어 있는 것, 그리고 검은 색 화살표 부분에 미숙한 골이가 형성되는 것이 관찰되었다. 이에 대해 도 7 (F)는 검은 화살표 부분이 성숙한 뼈가 되고, 뼈 형성이 촉진되는 것으로 확인되었다.
- [0268] 이상으로부터 치과 분야에 있어서 뼈 형성 촉진이 확인되었다.
- [0269] 5 (착효, Complete response) : 결손부의 30 % 이상에서 골 재생이 보임
- [0270] 4 (효과) : 결손부에 골 재생이 보임(대체로 30 % 정도)
- [0271] 3 (불변) : 골 재생은 분명하지 않지만, 흡수는 없음
- [0272] 2 (흡수) : 골 흡수가 보임
- [0273] 1 (불량) : 현저하게 골 흡수를 보이거나, 또는 부작용이 발생함

표 6

No.	환자	연령	성별	부위	수술내용	수술일	경과일수	기반재	평가	유해사상
1	HS	46	F	1-56	골재생	2011.2.11	11M	인공뼈	5	없음
2	KT	60	M	1-6	골재생	2011.5.16	8M	콜라겐	3	없음
3	KT	60	M	2-1	골재생	2011.5.16	8M	콜라겐	4	없음
4	YF	40	M	1-7	골재생	2011.5.23	8M	콜라겐	3	없음
5	YF	40	M	1-6	재생*	2011.5.23	8M	콜라겐	3	없음
6	HN	35	M	7-1	골재생	2011.5.30	8M	인공뼈	4	없음
7	TO	45	F	1-56	골재생	2011.5.30	8M	인공뼈	4	없음
8	TY	70	M	1-1	골재생	2011.6.13	7M	콜라겐	4	없음
9	AM	66	M	43-1	재생*	2011.6.13	7M	콜라겐	3	없음
10	TT	51	F	7-1	골재생	2011.6.25	7M	콜라겐	5	없음
11	TS	59	M	1-7	골재생	2011.7.4	6M	인공뼈	5	없음
12	TS	59	M	1-6	재생*	2011.7.4	6M	인공뼈	4	없음
13	EO	59	F	1-45	재생*	2011.7.25	6M	콜라겐	3	없음
14	EO	59	F	1-67	재생*	2011.7.25	6M	콜라겐	4	없음
15	NK	58	M	1-567	골재생	2011.8.1	5M	콜라겐	5	없음
16	HS	67	F	1-5	골재생	2011.8.8	5M	콜라겐	5	없음
17	HS	67	F	1-7	골재생	2011.8.8	5M	콜라겐	5	없음
18	HS	67	F	1-7	골재생	2011.8.8	5M	인공뼈	5	없음

19	KM	51	M	7-1	골재생	2011.8.8	5M	콜라겐	5	없음
20	MK	63	M	1-1-1	골재생	2011.8.29	5M	인공뼈	2	없음
21	HM	61	M	1-67	재생*	2011.8.29	5M	콜라겐	4	없음
22	HM	61	M	76-1	재생*	2011.8.29	5M	콜라겐	5	없음
23	TS	59	M	6-1	재생*	2011.8.30	5M	콜라겐	3	없음
24	TS	59	M	6-1	재생*	2011.8.30	5M	콜라겐	3	없음
25	TS	59	M	7-1	골재생	2011.8.30	5M	콜라겐	3	없음
26	TH	64	M	1-567	골재생	2011.9.13	4M	인공뼈	5	없음
27	NK	58	M	7-1	재생*	2012.1.23	0M	콜라겐	-	없음
28	TY	70	M	1-1	골재생	2012.1.24	0M	인공뼈	-	없음

[0276] *치주재생

[0278] 상기 28개의 증상 사례 중 평가시기가 도래하지 않은 No. 27 및 28에 대해서는 평가하지 않았다. 평가를 실시한 전체 증상 사례(26 명) 중 착효(5) 10 사례(38.5%), 효과(4) 7 사례(26.9%), 불변(3) 8 사례(30.8%), 흡수(2) 1 사례(3.8%), 불량(1) 0 사례였다.

[0279] 착효 및 효과를 합치면 17 명(65.4%)이라는 높은 반응률을 보였다.

[0280] 질환별 내역을 보면, 임플란트 관련(17 명) 중 착효(5) 9 사례(52.9%), 효과(4) 4 사례(23.5%), 불변(3) 3 사례(17.7%), 흡수(2) 1 사례(5.9%), 불량(1) 0 사례였다. 임플란트 관련은 착효 및 효과를 합치면 13 사례(79.4%)라는 매우 높은 반응률을 보였다.

[0281] 또한 치주 질환 관련 9 사례에서는 착효 1 사례(11.1%), 효과 3 사례(33.3%), 불변 5 사례(55.6%), 흡수 및 불량은 확인되지 않았다. 치주 질환 관련에서도 착효 및 효과를 합치면 총 4 사례(44.4%)라는 좋은 반응률을 보였다.

[0282] 또한 기반별로 보면, β -TCP를 기반으로 한 8 사례에서는 착효가 4 사례(50.0%), 효과가 3 사례(37.5%), 불변 및 불량은 없었으며, 흡수가 1 사례(12.5%)라는 결과를 나타내었다. 기반으로 β -TCP를 사용하는 경우에는 착효 및 효과를 합치면 7 사례(87.5%)라는 매우 높은 반응률을 보였다.

[0283] 기반으로 테루더미스(Terudermis)/테루플러그(Teruplug)(Col)을 사용한 18 사례에서는 착효 6 사례(33.3%), 효과 4 사례(22.2%), 불변 8 사례(44.5%), 흡수 1 사례(0.1%), 불량은 없었다. 기반으로 테루더미스/테루플러그(Col)를 사용한 경우에는 착효 및 효과를 합치면 10 사례(55.5%)의 높은 반응률을 보였다.

[0284] 임플란트는 도 7-9에 나타낸 바와 같이 어떠한 증상 사례에서도 뼈의 재형성이 관찰되었다.

[0285] 또한 기반으로 β -TCP를 사용했을 때, β -TCP의 뼈의 치환 등이 어떻게 일어나고 있는지를, 제출 조직을 헤마톡실린 및 에오신으로 염색하여 확인하였다. 결과를 도 10 (A) ~ (D)에 나타내었다. 도 중 NB로 표시되는 신생 뼈의 형성이 명확하게 관찰되어 BV로 표시되는 혈관도 확인되었다.

[0286] 이상으로부터 SHED-T의 배양 상청에는 골 형성능이 있는 것이 확인되었다.

[실시예 6]

[0289] (1) 치수 줄기세포 유래 사이토카인의 뇌졸중 환자의 비강 투여

[0290] 회백질에서 허혈성, 백질의 허혈, 또는 혼합 영역에서의 허혈 중 하나를 수반하는 8 명의 환자(남자 6 명, 여자 2 명)를 대상으로 SHED-T의 배양 상청을 투여하여 치료 효과를 검토했다. 8 명의 환자는 모두 이 임상 실험에 참가하기 전에, 뇌졸중의 표준 치료를 받았으며, MRI 진단, 신경학적 시험 및 NIHSS를 이용하여 점수화한 평가를 받았다. 표 1에 나타낸 환자는 뇌졸중 발병 후 20 일 ~ 133 일이 경과하였다. 환자의 프로파일을 하기 표 7에 나타낸다.

[0291] 실시예 1에서 제조한 SHED-CM(SHED-T의 배양 상청)를 비강 내 후신경의 집중된 부위보다 경비 투여하였다(도 11 및 12). 투여 기간은 투여개시 시점부터 기산하였다.

표 7

No.	환자	성별	연령	증상	발병일	투여일	투여까지의 일수(일)	단계	결과
1	DM	M	31	편마비	2010/3/24	2011/4/9	381	만성	불변
2	TK	M	58	편마비	2011/3/22	2011/4/9	20	급성	착효
3	NO	M	72	편마비	2007/6/1	2011/4/11	1410	만성	불변
4	YS	F	70	편마비	2010/9/1	2011/5/9	250	만성	불변
5	IM	M	58	편마비	2010/9/27	2011/9/6	344	만성	불변
6	AU	F	72	편마비	2010/3/25	2011/9/19	543	만성	불변
7	MK	M	55	편마비	2010/11/6	2011/10/8	336	만성	불변
8	KT	M	60	편마비	2010/12/10	2011/1/10	31	급성	착효

[0293] 회복 상황은 투여 시작 후 1 일, 2 일, 4 일, 7 일, 14 일, 1 개월, 3 개월, 6 개월 및 1 년의 각 시점에서 신경 외과 의사 및 신경 학자가 평가했다. 블라인드 테스트는 거치지 않았다. 모든 환자에 대해 뇌 MRI 및 MRA를 실시했다. MRA는 자기공명혈관조영이라고 불리며, 혈관의 상태를 입체 영상으로 볼 수 있는 검사이다. 어느 환자의 MRA에 의한 이미지를 도 13에, 또한 MRI에 의한 화상을 도 14에 각각 나타내었다.

[0294] SHED-T의 배양 상청 투여 전후의 혈중 산소 농도, 체온, 혈압, 심박수, 호흡수 등을 심전도를 이용하여 주의 깊게 모니터했다. 투여 전후에 흉부 엑스선 촬영도 하였다.

[0295] SHED-CM의 비강 내 투여 전 및 투여 1 년 경과 후, 모든 환자에 대해 혈관 병변을 확인하기 위한 핵자기공명 혈관 촬영을 실행하였고, 컬러화 핵자기공명영상(MRI)으로 촬영 결과를 관찰하였다. 신경학적 상태는 미국 국립 보건 연구소(NIH)의 뇌졸중 기준(NIHSS)을 기준으로 점수화 하였다.

[0296] 8 명 중 2 명의 환자(그 중의 급성기)는 NIH 기준 및 MRI 이미지에서 현저한 회복을 보였다(도 15 (A) 및 15 (B), 도 16). No.2 환자는 도 17 (A)와 같이 마비?던 오른손으로 컵 쌓기가 가능해졌고, 또한 도 17 (B)와 같이 보행할 수 있는 수준까지 회복하였다.

[0297] SHED-CM을 투여한 어떤 환자에서도 중추신경계에 종양, 비정상적인 세포 증식, 및 신경학적 악화는 관찰되지 않았다. 또한 어떤 환자에서도 코의 이상, 전신성 악성 종양, 전신성 감염은 관찰되지 않았다.

[0298] 이상으로부터, 불사화 줄기세포를 이용하여 거의 무한의 배양 상청을 얻을 수 있어서, 이 배양 상청으로부터 약을 제조하는 경우에는 성장인자의 대량 생산이 가능해질 것으로 나타났다. 또한 이를 통해 저렴한 비용으로 약제의 제조가 가능해진다는 장점이 있다.

[0299] 상술 한 바와 같이, 셀소스(cell source)로써 특정 불사화 줄기세포를 사용할 수 있는 것, 및 이 불사화 줄기세포가 특정 성장인자를 지속적으로 같은 비율로 생산을 계속할 수 있는 것에서 세포 상청액 중에 성장인자의 함유량과 종류를 거의 일정하게 유지하는 것이 가능해진다. 따라서 양산화(mass production)할 경우, 배양 상청의 내용 성분을 규격화하기 쉬운 장점이 있다.

[실시예 7]

[0302] (1) 치수 줄기세포 유래 사이토카인의 알츠하이머 환자에게 점비 투여

[0303] 알츠하이머병 환자에 대해 SHED-T의 배양 상청을 경비 투여하여 치료 효과를 검토했다. 환자의 평균 연령은 79.5 ± 3 세, 여성 3 명이었다.

[0304] SHED-T의 배양 상청을 점비로 1 일 1 회, 총 28 회 투여했다. 투여의 효과는 하기 표 8 및 표 9에 나타내는 미니 정신 상태 검사 및 하세가와 식 검사로 실행하였다.

[0305] 도 18 (A)와 같이, 비 투여군의 경우 MMS 및 하세가와 식으로 평가한 경우에도 큰 개선은 없었다.

[0306] 이에 대해 SHED-T의 배양 상청 투여군에서는 3 개월 째에서 인텍스 값이 상승하기 시작, 7 개월 이후는 MMS 및 하세가와 식으로 평가한 경우에도 상승폭이 커지고, 알츠하이머병의 증상의 개선이 확인되었다.

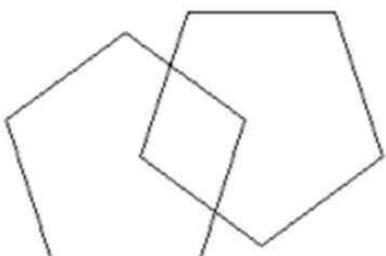
[0307] 투여군 환자 중 78 세의 알츠하이머병 환자가 특히 현저한 개선을 보였다. 이 환자는 2010 년 5 월 11 일에 뇌 경색이 발병하고 고도의 건망증을 보였다(Cornell Medical Index : CMI = 27). 이에 따라 2010 년 12 월 20 일에 요양 시설에 입소했다.

[0308] 2011년 2월 9일부터 SHED-T의 배양 상청을 점비로 1일 1회, 총 28회 투여하고 투여의 효과를 하기 표 8 및 표 9에 나타내는 미니 정신상태 검사 및 하세가와 식 검사를 실시하였으며, 고차뇌기능의 대폭적인 개선이 확인되었다. 자취 및 자립 보행이 가능한 수준까지 회복했기 때문에 이 환자는 2011년 4월 16일에 퇴원하여 귀가했다.

표 8

미니멘탈스테이트 검사 항목(Mini Mental State : MMS)	
설문	설문
1. 일시(5점) 올해는 몇 년도 입니까 지금의 계절은 무엇입니까 오늘은 무슨 요일 입니까 오늘은 몇 월 몇 일 입니까	7. 한자 읽기(1점) 다음의 문장을 반복한다 "모두 함께, 힘을 합쳐 그물을 당깁니다"
2. 현재 지역(5점) 여기는 무슨 구 입니까 여기는 무슨 시 입니까 여기는 무슨 병원 입니까 여기는 어느 지방 입니까	8. 언어 이해(3점) 다음의 3개의 명령을 구두로 전달하여 다 들은 후 실행 "오른손에 이 종이를 들어주세요" "그것을 반 접어 주세요" "책상 위에 놓아 주세요"
3. 기억 서로 관계가 없는 물품의 이름을 3개 들려주고 그대로 복창 1개 답할 때마다 1점 모두 답하지 못하면 6회 까지 반복	9. 문장이해(3점) 다음의 문장을 읽어서 실행 "옷을 여미어 주세요"
4. 7 시리즈 100부터 순서대로 7을 뺏 5회 가능하면 5점 틀렸을 경우 중단	10. 문장구성(1점) 무엇이든 문장을 써주세요
5. 상기(3점) 3에서 표시된 물품 이름을 다시 복창	11. 도형파악 다음 도형을 그려주세요
6. 호칭 시계와 연필을 보여, 명칭을 답하게함	

[0310] [도형]



[0311]

표 9

No.	질문	회답
1	몇 살입니까? (2살 오차까지는 정답)	정답 1 오답 0
2	오늘은 몇 년도 몇월 몇 일 입니까? 무슨 요일입니까? (년 월 일, 요일 각각 1점)	년 월 일, 요일 모두 정답 1 오답 0
3	우리들이 지금 있는 장소는 어디입니까? (자발적으로 나오면 2점, 나오지 않는 경우 5초를 두고, "집입니까? 병원입니까? 시설입니까?" 중 적당한 선택을 하면 1점)	자발적 회답 2 선택지에 대한 회답 1 오답 0

4	지금부터 말하는 3개의 언어를 말해주세요. 또한 이후 같은 질문을 들려드리므로 기억해 주세요. 이하 어느 하나를 말함 1) : a) 벚꽃 b) 고양이 c) 전차 2) : a) 매실 b) 개 c) 자전거	a), b), c)각각에 대해 정답 1 오답 0
5	100부터 7을 순서대로 빼기 100-7은? 그리고 또한 7을 빼면? 이라는 질문을 한다. 최초에 답이 정답인 경우 중지.	어느 질문에도 정답 1 오답 0
6	내가 지금부터 말하는 숫자를 거꾸로 말해주세요. "6-8-2, 3-5-2-9"를 거꾸로 말한다. 3번 실패하면 중지.	어느 질문에도 정답 1 오답 0
7	이전에 외운 언어를 다시 한번 말해주세요 자발적으로 회답이 있으면 각 2점, 없는 경우는 이하의 힌트를 주어 정답이면 1점. 힌트 : a) 식물 b) 동물 c) 타는 것	a), b), c) 각각에 대해 정답(자발적) 1 힌트로 정답 1 오답 0
8	지금부터 5개의 물건을 보여준다. 그것을 숨기면 무엇이었는지 말해주세요. 시계, 담배, 거울, 펜, 화폐 등 서로 관련이 없는 물건으로 한다.	5개 정답 5 4개 정답 4 3개 정답 3 2개 정답 2 1개 정답 1 정답 없음 0
9	알고 있는 야채의 개수를 가능한 많이 말해 주세요. 답한 야채의 이름을 종이에 기입한다. 도중에 멈추거나 약 10초간 기다려도 나오지 않는 경우 중지	10개 회답 5 9개 회답 4 8개 회답 3 7개 회답 2 6개 회답 1 5개 이하 0

[0314] 이상으로부터 SHED-T의 배양 상청은 알츠하이머병에 대해서도 효과가 있는 것으로 나타났다.

[실시예 8]

[0317] (1) 간염에 대한 SHED-T의 배양 상청의 치료 효과

[0318] 비 대상성 간경변을 비롯한 중증 간질환의 근본적 치료는 간 이식 이지만 기증자 부족 등의 이유로 실제로 대처요법 밖에 행해지지 않았다. 이를 보완하기 위해 불사화 유치 줄기세포 유래 성장인자(SHED-T)의 투여에 의한 간 재생요법을 실시했다.

[0319] 표 10에 나타내는 Child-Pugh 값이 7 이상, 또한 총 빌리루빈(bilirubin)값이 3.0 mg/dL 이하, 혈소판 수가 $5.0 \times 10^9 \times 10^3$ 이상이고 활성기의 간종양이 없는 남성 환자 3 명(58 ~ 70 세) 환자를 대상으로 하였다. 또한 이러한 환자는 만성기 뇌졸중(발병 후 1 년 이상 경과)에 있으며 파킨슨병의 치료가 행해진 사례이다.

[0320] 프로토콜은 1 일 1 회, 불사화 유치 줄기세포 유래 성장인자(2 μ g)을 5 ml의 생리식염수에 용해하여 경비적으로 연일 투여하였다. 28 회를 1 쿠르(cours)로 2 쿠르 시행하였다.

[0321] 증상 사례 내역 및 효과를 표 11에 나타내었다.

표 10

	1점	2점	3점
간성뇌증	없음	경도	때때로 혼수상태
복수	없음	소량	중등량
혈청빌리루빈(mg/dl)	2.0 미만	2.0 ~ 3.0	3.0 초과
혈청알부민(g/dl)	3.5 초과	2.8 ~ 3.5	2.8 미만
프로트롬빈 시간(%)	70 초과	40 ~ 70	40 미만

	Child-Pugh 분류	A	5 ~ 6점
		B	7 ~ 9점
		C	10 ~ 15점

표 11

[0323]

No.	환자	연령	병명	수술 전			12개월 후		
				CP ^{*1}	(mg/dl)		CP ^{*1}	(mg/dl)	
					TP ^{*2}	Alb ^{*3}		TP ^{*2}	Alb ^{*3}
1	A	70	알콜성 간염	7	7.5	2.8	5	8.5	3.4
2	B	58	B형 간염	7	6.5	2.9	5	8	3.5
3	C	65	불명	7	5	2.4	5	6.5	3.8

[0324] *1 : Child-Pugh 값 *2 : 총 단백질 *3 : 알부민

[0326] (2) 결과

[0327] 어떠한 환자에서도 총 단백질 값 및 혈청 알부민 값이 모두 증가하고 CP가 B 분류에서 A 분류로 되고, 간 재생이 일어나고 있다고 사료되었다.

[0329] [실시예 9]

[0330] (II 형 당뇨병에 대한 SHED-T의 배양 상청의 치료 효과)

[0331] II 형 당뇨병 환자에 대한 SHED-T의 치료 효과를 검토했다. 치료 방법은 SHED-T(2 μ g)을 5 ml의 생리식염수에 용해하여 1 일 1 회, 경비적으로 투여하였다. 28 회를 1 쿠르로 2 쿠르 시행하였다.

[0332] 효과 판정은 치료 전과 12 주 후의 HbA1c(Glycated haemoglobin)의 변화를 지표로 하여 시행하였다. 또한 증상 사례는 전체 치료기간 동안, 두통, 비통, 혈당 변화 등의 부작용은 없었다. 또한 어떤 환자도 당뇨병 치료제로 메트포민(Metformin)의 복용, 운동 요법을 실시했지만 효과가 나타나지 않았다.

표 12

[0333]

No.	환자	연령	병력(년)	BMI(kg/m ²)	치료전 HbA1c(%)	12주 후 HbA1c(%)
1	F	51	5	32.2	8.6	6.9
2	M	52	6	32.3	8.23	7.0
3	M	60	4	31.0	8.5	6.5

[0334] 어떤 환자에게서도 치료 전에 비해 HbA1c(%)이 저하되었고, 당뇨병의 개선이 두드러졌다. 이상으로부터 SHED-T는 당뇨병에도 효과가 있는 것으로 나타났다.

[0336] [실시예 10]

[0337] (난치성 피부염에 대한 SHED-T의 배양 상청의 치료 효과)

[0338] 난치성 피부염(아토피성 피부염)을 가진 개(래브라도 리트리버, 8 살, 암컷)에 SHED-T(2 μ g)을 5 ml의 생리식염수에 용해하여 1 일 1 회 환부에 도포하였다. 14 회를 1 주기로 하였다.[0339] SHED-T를 사용하기 전에 2 개월간, 개 인터페론- γ 제제를 사용했지만 치료 효과가 나타나지 않았기 때문에 SHED-T로 전환하였다.

[0340] SHED-T 치료 시작 전에, 도 19A에 나타낸 바와 같이 난치성 피부염을 가지고 있는 부분의 털이 빠져 하얗게 보이고 있었지만, 치료 후에는 털이 나고 피부염이 일어난 부위가 알 수 없을 만큼 깨끗하게 치유되었다.

[0341] 이상으로부터 SHED-T는 난치성 피부염에도 효과가 있는 것으로 나타났다.

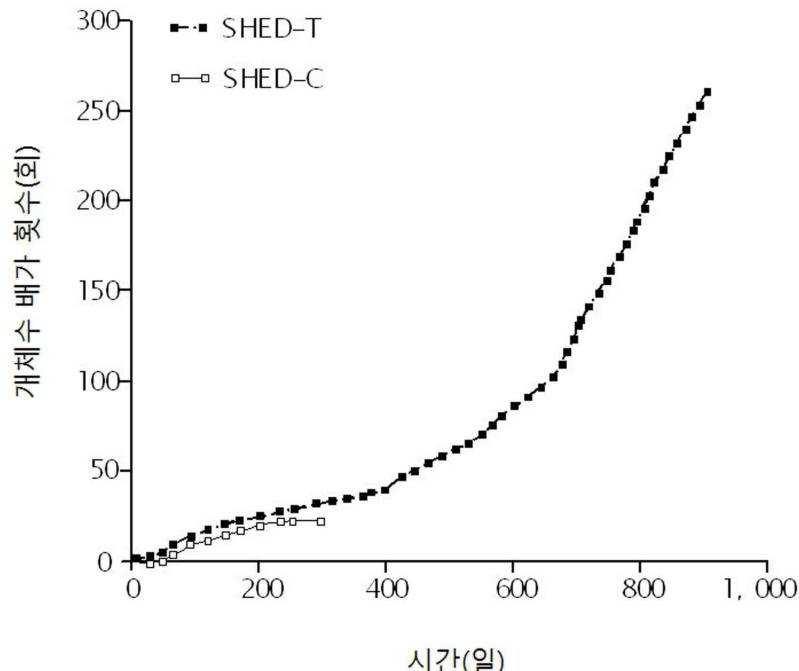
산업상 이용가능성

[0343]

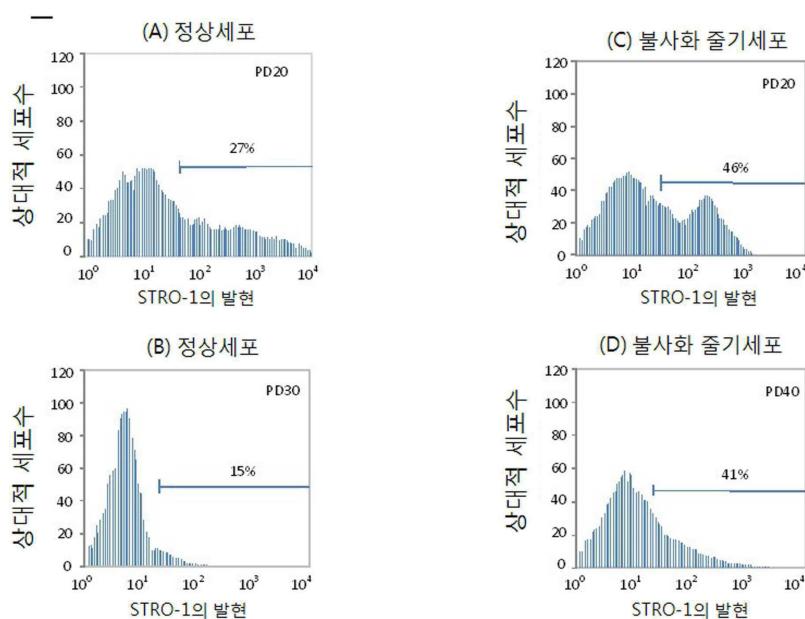
본 발명은, 의과 및 치과 영역에서 사용하는 약제의 생산 등에 있어서 매우 유용하다.

도면

도면1



도면2



도면3

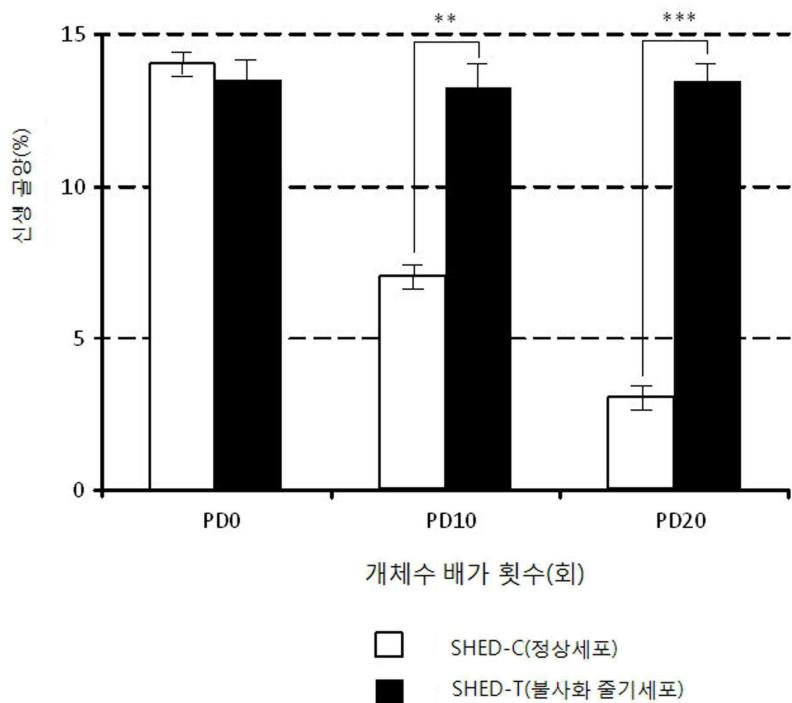
(A)



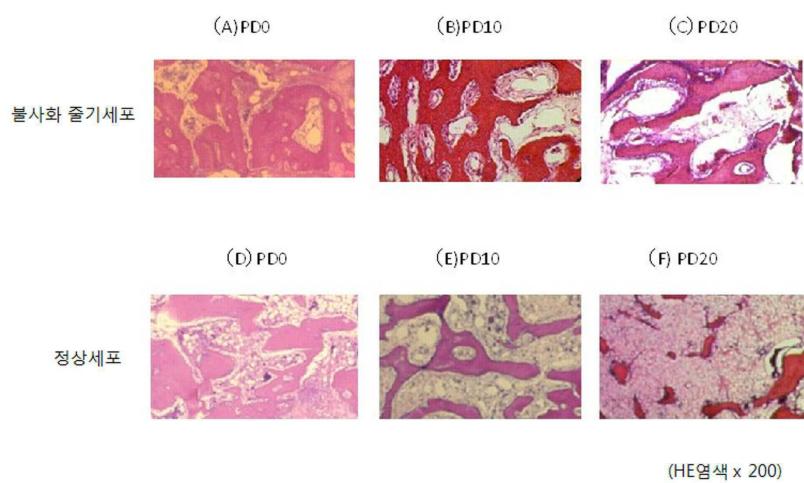
(B)



도면4

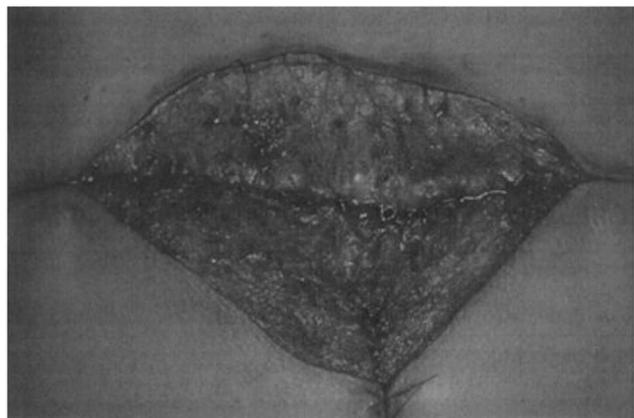


도면5

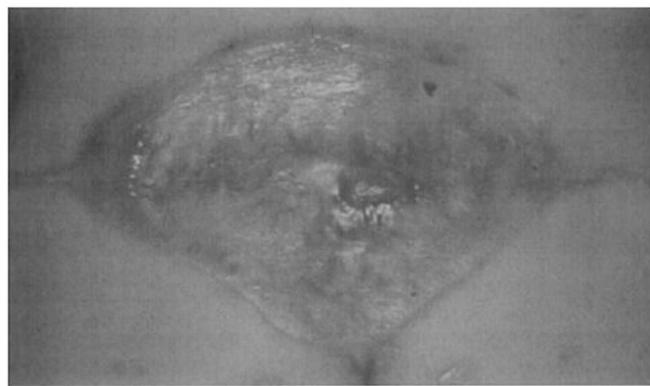


도면6

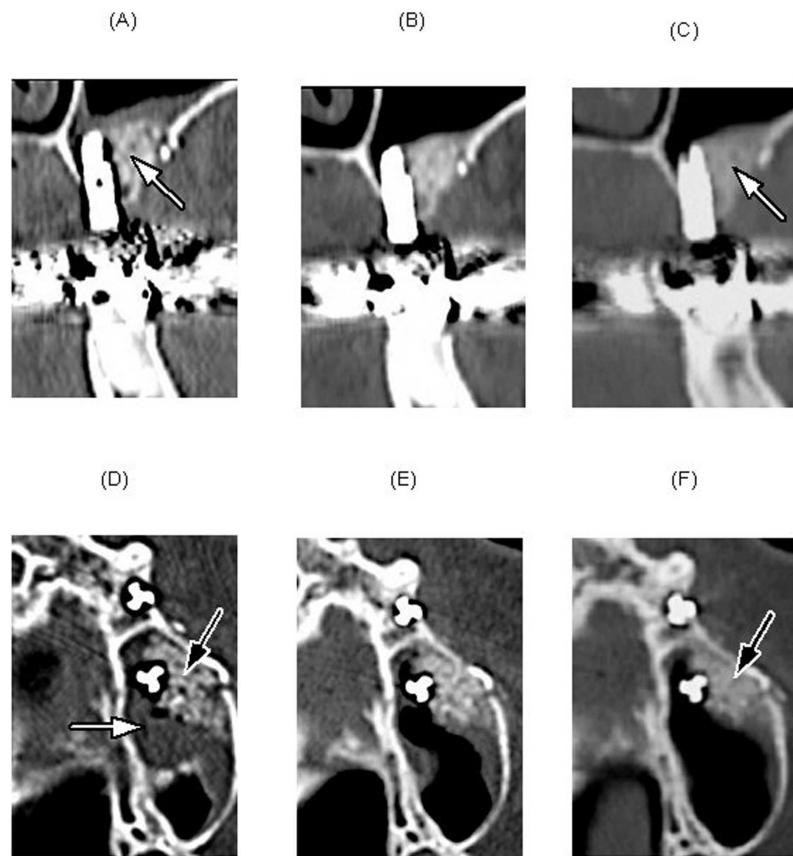
(A)



(B)



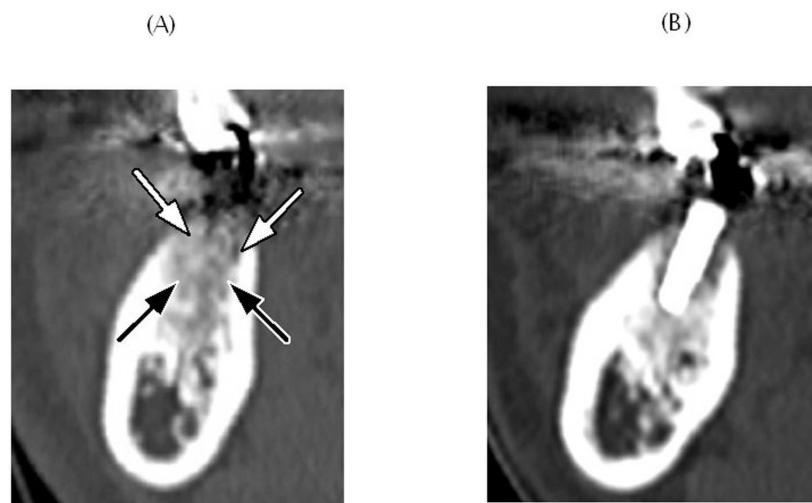
도면7



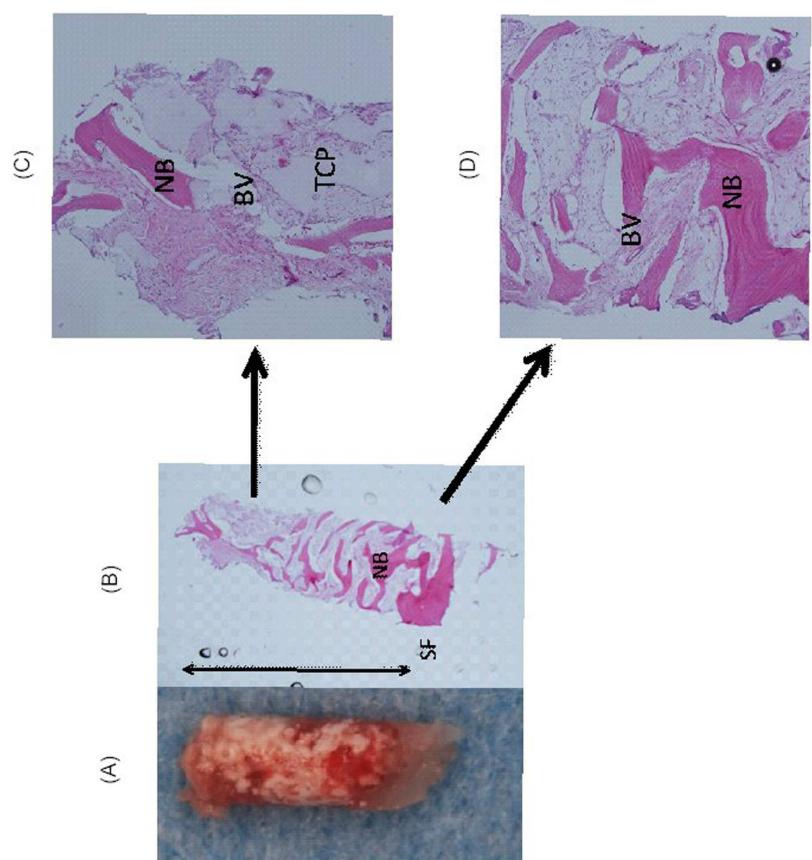
도면8



도면9

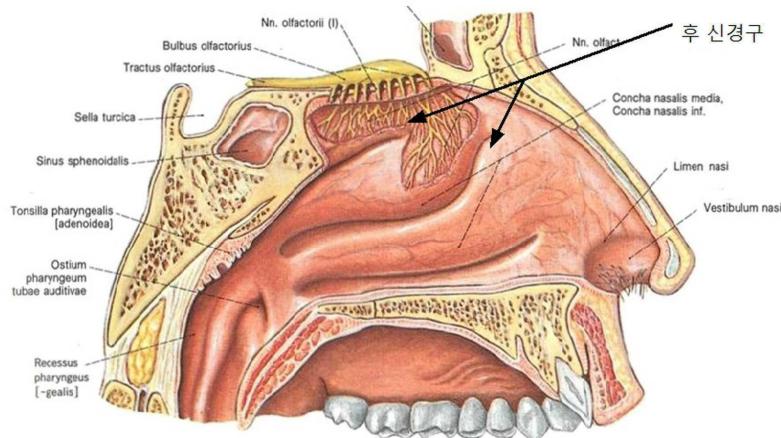


도면10



도면11

후 신경구를 통해 즐기세포 유래의 배양 상청의 경비 투여



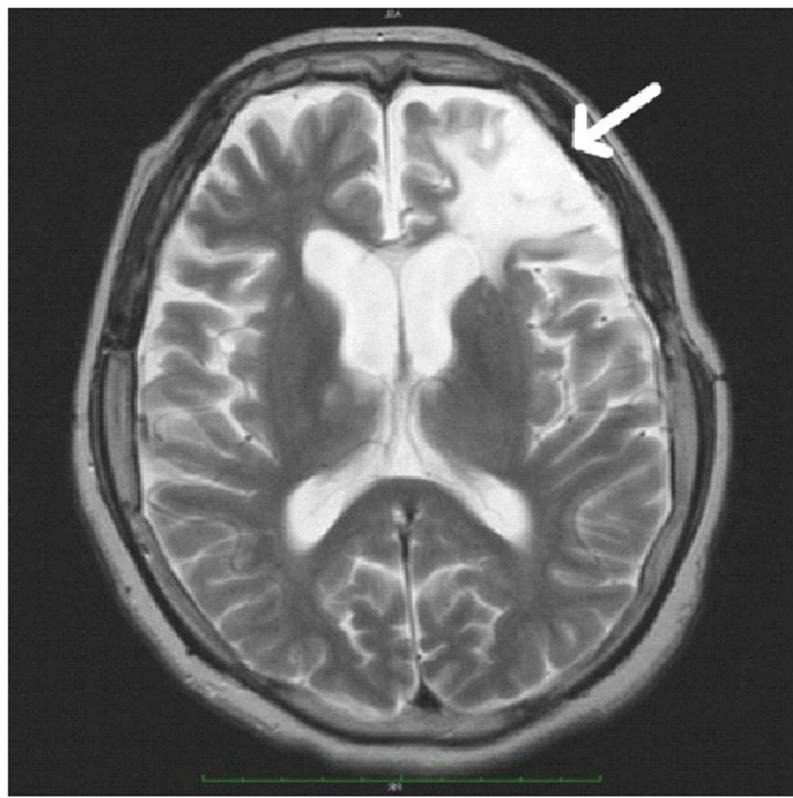
도면12



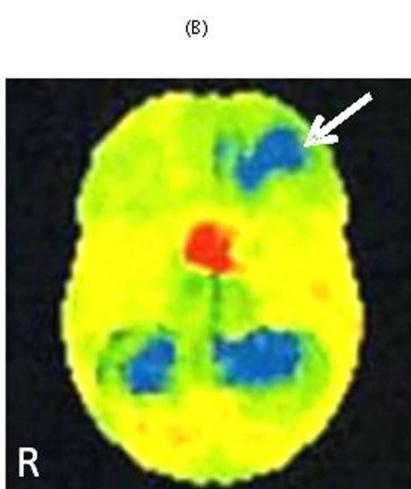
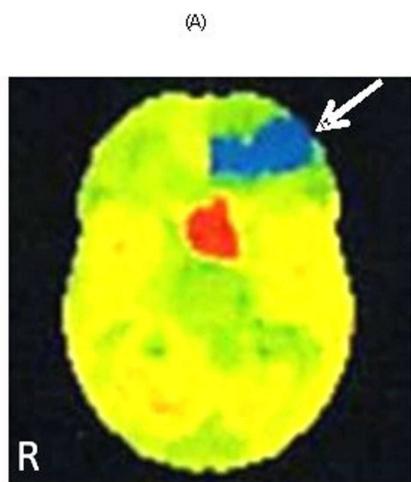
도면13



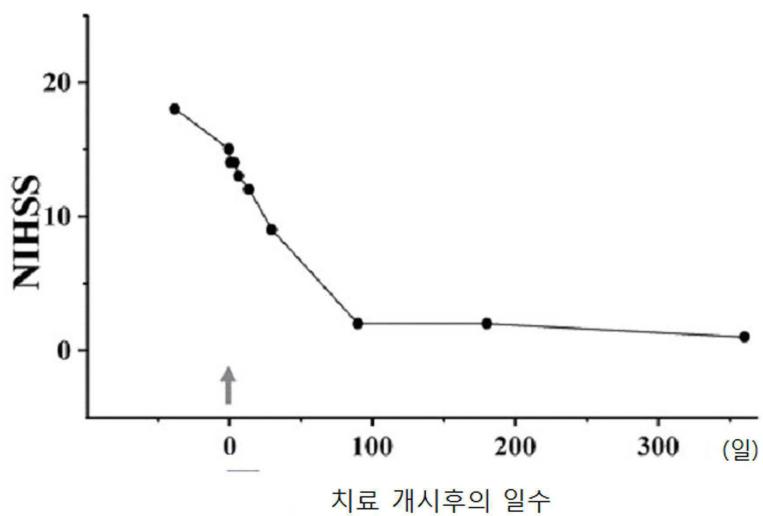
도면14



도면15



도면16



도면17

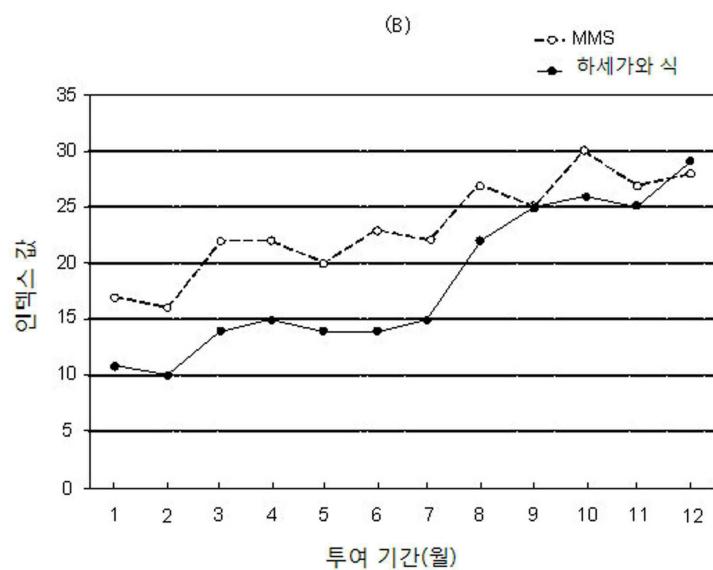
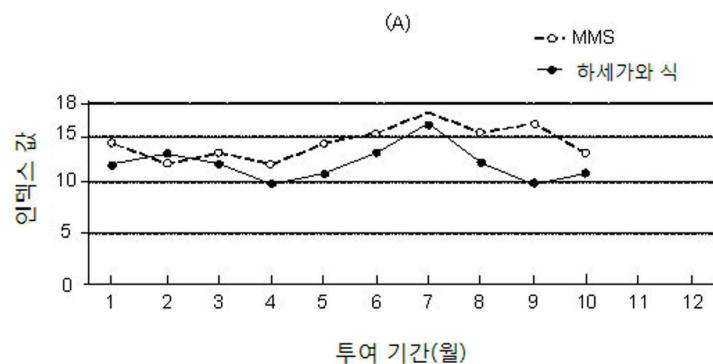
(A)



(B)



도면18



도면19

(A)



(B)

