



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0125943
(43) 공개일자 2014년10월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/02 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0043527
(22) 출원일자 2013년04월19일
심사청구일자 2013년04월19일

(71) 출원인
창원대학교 산학협력단
경상남도 창원시 의창구 창원대로 20(퇴촌동)
(72) 발명자
김동완
부산광역시 연제구 과정로343번길 43 연산자이아
파트 117동 2804호
김규빈
경상남도 창원시 의창구 창원대로 548 대동아파트
106동 405호
(74) 대리인
김순웅

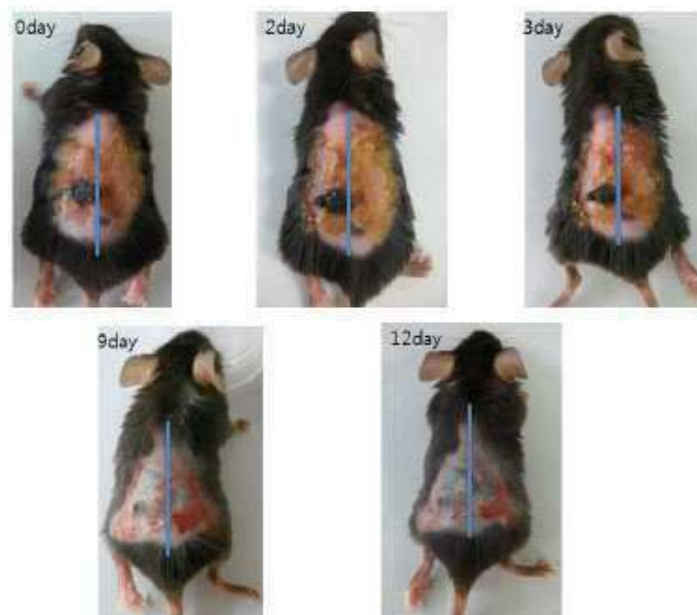
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 지방유래줄기세포에 T항원을 도입한 ADSC-T 세포의 배양액을 유효성분으로 포함하는, 염증질환의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 지방유래줄기세포에 T항원을 도입한 ADSC-T 세포의 배양액을 유효성분으로 포함하는, 염증질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 지방유래줄기 세포주(ADSC-T)의 배양액은 자가면역질환인 아토피 피부염을 완화시키고, I κ B α 를 발현을 증가시켜 NF- κ B의 발현을 억제하여 염증을 치료 또는 억제하는데 탁월한 효능을 가지고 있으므로 염증질환의 예방 또는 치료에 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도7



특허청구의 범위

청구항 1

지방유래줄기세포에 T항원을 도입한 ADSC-T 세포(adipose-derived stem cell-T cell)의 배양액을 유효 성분으로 포함하는, 염증질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 T 항원의 도입은 형질감염을 통해 이루어지는 것을 특징으로 하는, 염증질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 지방유래줄기세포(ADSC-T)의 배양액은

- (a) 흡입지방조직에 콜라게나아제 효소를 처리한 후 원심분리하여 지방유래 줄기세포를 분리하여 배양하는 단계;
- (b) 플라스미드 발현 벡터(pEF321 β -T)를 상기 (a) 단계에서 배양한 지방유래 줄기세포에 형질 감염시켜 SV40 T 항원을 발현하는 지방유래 줄기세포(ADSC-T)를 제조하는 단계; 및
- (c) 상기 제조된 지방유래 줄기세포(ADSC-T)를 배양하여 배양액을 수득하는 단계;를 포함하여 제조되는 것을 특징으로 하는, 염증 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 형질감염은 인산화칼슘 형질감염, 전기천공법, 미세주입법 및 리포솜 주입법으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 방법으로 수행하는 것을 특징으로 하는, 염증질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 염증질환은 알러지 질환, 비염, 천식, 급성통증, 만성통증, 치주염, 치은염, 염증성 장 질환, 통풍, 심근경색, 동맥경화, 울혈성 심부전, 고혈압, 협심증, 위궤양, 알츠하이머병, 뇌경색, 다운증후군, 다발성 경화증, 비만, 당뇨, 치매, 우울증, 정신분열증, 결핵, 수면장애, 패혈증, 화상 및 체장염으로부터 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 염증질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

지방유래줄기세포에 T항원을 도입한 ADSC-T 세포(adipose-derived stem cell-T cell)의 배양액을 유효성분으로 포함하는, 염증질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

명세서

기술분야

본 발명은 지방유래줄기세포에 T항원을 도입한 ADSC-T 세포(adipose-derived stem cell-T cell)의 배양액을 유효성분으로 포함하는, 염증질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0002] 21세기 의학 및 삶의 질의 향상으로 인간평균수명은 100세를 바라보고 있다. 인간수명이 늘어남에 따라 질병예방과 노화방지에 관한 관심도가 커지고 있다. 사람의 신체피부는 시간이 지남에 따라 외부자극과 신체피부노화에 의해서 주름, 기미, 재생력이 떨어지는 현상 등이 나타난다. 이는 신체노화를 눈으로 확인할 수 있는 요소가 되며, 이러한 피부노화방지에 관한 관심도는 매우 크며, 사람들은 피부노화를 방지하기 위하여 치료제 및 화장품을 사용하고 있다. 이러한 관심도에 따라 화장품 회사들은 지속적으로 신규물질에 관하여 탐색하고 있다.
- [0003] 지방유래줄기세포 배양액은 미백, 상처치유, 주름개선, 항노화 효과가 있다고 알려져 있으며, 최근 의약품 및 화장품으로서의 상업적으로 이용가치가 상승하고 있다. 지방유래줄기세포는 여러 성장인자 및 사이토카인(cytokine)을 생산한다고 알려져 있으며 지방줄기세포가 생산한 물질은 피부 미백, 재생, 항산화에 효과가 있는 물질을 포함하고 있다고 보고되었다. 그러나, 지방유래줄기세포 배양액이 항염증 효능이 있다는 사실은 크게 연구된 바가 없다.
- [0004] 줄기세포란 특정한 세포로 분화가 진행되지 않은 채 유지되다가, 필요한 경우 신경, 혈액, 연골 등 신체를 구성하는 모든 종류의 세포로 분화할 능력을 가진 세포를 말한다. 이러한 줄기세포를 얻을 수 있는 방법은 크게 두 가지가 있는데, 첫째는 수정란으로부터 발생한 배아로부터 얻는 것(배아줄기세포)이고, 둘째는 성인이 된 우리 몸의 각 부분에 간직되어 있는 줄기세포(성체줄기세포)를 회수하는 것이다. 기능적인 면에서 차이는 있지만 배아줄기세포나 성체줄기세포는 모두 여러 종류의 세포로 분화할 수 있는 특징을 가지고 있다. 배아줄기세포는 분화능력이 매우 뛰어나고 텔로머가 긴 장점이 있으나, 윤리적인 문제를 안고 있고 세포를 다량확대하는 것이 어려운 단점이 있는 반면, 성체줄기세포는 세포수를 많이 얻을 수 있으나 타인에게 이식할 때 감염의 위험이나 분화능력이 상대적으로 떨어지는 단점을 가지고 있다.
- [0005] 상기한 단점에도 불구하고 성체줄기세포는 의학적으로 적용하기에 대단히 안전한 것이 특징이다. 또한 지방유래줄기세포는 흡입지방으로부터 쉽게 수득할 수 있어 윤리문제가 없으며 수득이 용이하다는 장점이 있다.
- [0006] 지방에서 유래된 줄기세포(Primary ADSC; primary adipose-derived stem cell)는 상업적으로 활용가치가 높으나, 느린 성장속도와 짧은 수명으로 인해서 줄기세포 배양액의 대량생산이 용이하지 않다는 큰 단점을 지니고 있다.
- [0007] 상기한 단점을 극복하기 위해서, 본 발명자는 시미안 바이러스(Simian virus)(SV40)의 T 항원을 주입한 ADSC(Adipose-derived stem cell)-T 세포주(cell line)를 제작하였다. 이 세포주는 제 1차(primary) ADSC 세포주와 비교하여 3배 증가한 증식속도 및 세포수명이 약 6개월까지 연장되었다. 따라서 본 발명은 지방유래줄기세포에 T항원을 도입한 ADSC-T(adipose-derived stem cell-T cell) 세포주의 제작을 통해 제 1차 ADSC 세포주가 가지고 있던 배양액의 대량생산에 있어서의 한계점을 보완한 것이다.
- [0008] 한편, 염증반응의 조절은 염증 관련 질환의 병인과 밀접하게 관련되며, 이러한 염증 반응은 다양한 신호전달, 예를들어, 사이클로옥시게나제, NO 합성효소, 사이토카인 등의 순차적인 활성화와 관련된다. NO, IL-6 및 IL-1 β 와 같은 인터루킨, TNF- α 를 포함한 염증 매개물의 과도한 생성은 류마티스 관절염, 염증성 장질환, 골다공증, 건선, 내독소혈증, 독성쇼크증후군과 같은 염증질환을 매개한다. 인체에서 발생하는 염증 반응은 크게 급성 염증 반응(Acute inflammation)과 만성 염증 반응(Chronic inflammation)으로 구분할 수 있다. 급성 염증 반응은 외부로부터 유입된 항원으로부터 신체를 보호하기 위해 급속하게 발생하는 반응이다. 급성 염증 과정의 시작은 인터루킨-1 β (interleukin-1 beta), 인터루킨-6(interleukin-6), 종양괴사인자- α (tumor necrosis factor- α ; TNF- α)와 같은 염증성 사이토카인의 분비 및 유도 산화질소 합성효소(inducible nitric oxide synthase; iNOS) 및 사이클로옥시게나제-2(cyclooxygenase-2; COX-2) 등과 같은 염증 매개 물질 합성 유전자들의 증가를 동반하게 된다. 이처럼 분비된 염증 조절 물질에 의해 활성화된 대식 세포들이 유입된 항원을 효과적으로 제거하게 되며 항원이 모두 제거되면 더 이상의 진행은 멈추게 된다. 그러므로 급성 염증 반응이 인체 질환으로 발전할 가능성은 매우 희박하나, 백일해(pertussis) 등 일부 만성염증질환으로 발전하는 경우에는 IL-23의 발현이 증가하여 만성염증으로 진행된다(Infect. Immun., 73: 1590-1597, 2005). 급성과 달리 만성 염증 반응은 외부 항원보다는 인체 내부적 요인에 의해 장기간 동안 진행되는 염증 반응으로 대식 세포에 의한 단순 염증 반응이 아닌 대식 세포, 호중구와 T 림프구가 포함된 염증 반응으로 IL-17 및 IL-23의 발현이 증가되고 이로 인한 TNF- α 등 염증성 사이토카인들이 지속적으로 발현되어 일어난다(Trends in Immunol., 27: 17-23,

2006). 이와 같은 만성염증질환의 치료는 고전적으로 프레드니솔론과 같은 스테로이드에 의한 염증 억제제, 나프록센과 같은 비스테로이드성 항염치료제(nonsteroidal anti-inflammatory drugs; NSAID) 및 사이클로스포린이나 FK506과 같이 칼슘 및 칼모듈린 의존성 단백인산화 효소인 칼시뉴린(calcineurin)에 결합하여 그 작용을 억제하는 면역억제제가 가장 많이 사용되어 왔다. 그러나 이러한 스테로이드를 비롯한 면역억제제들은 신독성, 감염, 임파종, 당뇨병, 진전(tremor), 두통, 설사, 고혈압, 오심, 신기능 장애 등의 부작용이 따르게 된다. 그러므로, 현재 사용되는 염증질환 치료제의 부작용을 줄이면서도 염증 매개물의 과잉발현을 억제하는 효과적인 염증질환 치료제의 개발이 시급한 실정이다.

[0009] 또한 염증 반응은 조직(세포)의 손상이나 외부 감염원(박테리아, 바이러스, 곰팡이, 다양한 종류의 알레르기 유발물질)에 감염되었을 때 국소 혈관과 체액중 각종 염증 매개인자 및 면역세포가 관련되어 효소 활성화, 염증 매개물질 분비, 체액 침윤, 세포 이동, 조직 파괴 등 일련의 복합적인 생리적 반응과 홍반, 부종, 발열, 통증 등 외적 증상을 나타낸다. 정상인 경우 염증 반응은 외부감염원을 제거하고 손상된 조직을 재생하여 생명체 기능 회복을 하지만 항원이 제거되지 않거나 내부 물질이 원인이 되어 염증 반응이 과도하거나 지속적으로 일어나면 오히려 점막손상을 촉진하고, 그 결과 일부에서는 암 발생 등의 질환에 이른다. 생체에 있어서 염증의 발생 원인으로서 다양한 생화학적 현상이 관여하고 있으며 특히 산화질소(nitric oxide, NO)를 발생시키는 효소인 산화질소 합성효소(nitric oxide synthase, NOS)와 프로스타글란딘(prostaglandin)의 생합성과 관련된 효소들은 염증 반응을 매개하는데 있어서 중요한 역할을 하고 있는 것으로 알려져 있다. 따라서, L-아르기닌(L-arginin)으로부터 NO를 생성시키는 효소인 NOS나, 아라키돈산(arachidonic acid) 으로부터 프로스타글란딘류를 합성하는데 관련된 효소인 COX(Cyclooxygenase)는 염증을 차단하는데 있어서 주요한 타겟이 되고 있다. 기존의 연구에 의하면 혈관 및 신경에서와 같이 항상 일정수준으로 발현되는 NOS에 의해 소량 생성되는 NO는 신경 전달이나 혈관확장을 유도하는 정상적인 신체의 항상성 유지에 중요한 역할을 하는 반면 각종 사이토카인이나 외부 자극에 유도되는 iNOS(induced NOS)에 의해 발생하는 NO는 세포독성이나 각종 염증 반응을 일으키는 것으로 알려져 있으며 만성염증은 iNOS 활성 증가와 관련이 있다는 연구결과가 있다(Appleton L. et al Adv. Pharmacol., 35, 27-28, 1996).

[0010] 또 다른 연구로는 시클로옥시게나제도 2종류의 이소형태가 존재하는데 시클로옥시게나제-1(Cyclooxygenase-1; COX-1)는 세포내에 항상 존재하여 세포보호 작용에 필요한 프로스타글란딘(PGs)을 합성하는 작용을 하는 반면 COX-2는 염증 반응시 세포내에서 급격히 증가하여 염증반응에 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다.

[0011] 현재까지 염증 완화 목적으로 사용하는 항염제는 비스테로이드계로 이부프로펜(ibuprofen), 플루페나믹산(flufenamic acid) 및 인도메타신(indomethacin) 등이 있고, 스테로이드계로는 프레드니솔론(prednisolone) 및 덱사메타손(dexamethasone) 등이 있으며 알란토인, 감초산 및 그 유도체 등이 항염 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 하지만, 소비자가 체감할 정도의 충분한 항염 효과를 갖는 원료 개발이 여전히 요구되고 있다.

[0012] 이에 본 발명자는 상기와 같은 염증질환의 예방 또는 치료에 있어서의 문제점을 해결하기 위한 연구를 수행한 결과, 지방유래줄기세포에 T항원을 도입한 ADSC-T(adipose-derived stem cell-T) 세포주를 확립하고, ADSC-T 세포 배양액의 항염증 효과를 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명의 목적은 지방유래줄기세포에 T항원을 도입한 ADSC-T 세포(adipose-derived stem cell-T cell)의 배양액을 유효성분으로 포함하는, 염증질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 다른 목적은 지방유래줄기세포에 T항원을 도입한 ADSC-T 세포(adipose-derived stem cell-T cell)의 배양액을 유효성분으로 포함하는, 염증질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 지방유래줄기세포에 T항원을 도입한 ADSC-T 세포(adipose-derived stem

cell-T cell)의 배양액을 유효성분으로 포함하는, 염증질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은 지방유래줄기세포에 T항원을 도입한 ADSC-T 세포(adipose-derived stem cell-T cell)의 배양액을 유효성분으로 포함하는, 염증질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0017] 본 발명에 따른 지방유래줄기 세포주(ADSC-T)의 배양액은 자가면역질환인 아토피 피부염을 완화시키고, I κ B α 를 발현을 증가시켜 NF- κ B의 발현을 억제하여 염증을 치료 또는 억제하는데 탁월한 효능을 가지고 있으므로, 염증질환의 예방 또는 치료에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1A는 흡입지방조직으로부터 분리한 모든 세포를 플레이트에 도말한 후 현미경으로 관찰한 도이며, 도 1B는 부유세포를 제거한 후 플레이트에 부착된 세포만을 계대 배양한 후 현미경으로 관찰한 도이다(각 x100 확대).

도 2는 지방유래 줄기세포(ADSC)가 지방세포로 분화되었는지 Oil-Red O로 염색한 결과를 나타낸 도이다 [지방유래 줄기세포의 분화유도 전(A), 분화유도 30일 후(B), 분화유도 30일 후 Oil-Red O로 염색한 결과(C)].

도 3은 ADSC-T 세포의 형태학적 변화를 현미경으로 관찰한 도이다[일차 지방유래 줄기세포(primary ADSC)(A), pEF321 β -T 플라스미드의 도입에 의해 형성된 지방유래 줄기세포의 고밀도 세포 군집(high-density focus)(B, C), 고밀도 세포 군집에서 얻은 세포를 배양하여 확립한 ADSC-T 세포(D)](각 x100 확대).

도 4는 ADSC-T 및 대조군으로 사용한 COS-1 세포 내에 발현된 SV40 T 항원을 형광항체 염색법으로 관찰한 도이다.

도 5는 T 항원의 단일클론항체(monoclonal antibody)를 이용하여 ADSC-T 세포의 T 항원의 웨스턴 블로팅(western blotting) 분석 결과를 나타낸 도이다[일차 지방유래 줄기세포(A), ADSC-T(B, C, D), COS-1(E)].

도 6은 일차 지방유래 줄기세포(primary ADSC)와 ADSC-T의 3개 세포(ADSC-T-1, ADSC-T-2, ADSC-T-3)의 증식 속도를 나타낸 도이다.

도 7은 본 발명의 지방유래줄기세포에 T항원을 도입한 ADSC-T 세포(adipose-derived stem cell-T cell; ADSC-T) 배양액이 아토피 피부염에 미치는 효과를 나타낸 도이다.

도 8은 본 발명의 지방유래줄기세포에 T항원을 도입한 ADSC-T 세포 배양액(ADSC-T-CM; adipose-derived stem cell-T culture medium)이 I κ B α 의 분해에 미치는 효과를 나타낸 도이다.

도 9는 본 발명의 지방유래줄기세포에 T항원을 도입한 ADSC-T 세포 배양액(ADSC-T-CM; adipose-derived stem cell-T culture medium)이 NF- κ B를 억제시키는 효과를 나타낸 도이다.

도 10은 지방유래줄기세포(ADSC) 및 본 발명의 지방유래줄기세포에 T항원을 도입한 ADSC-T 세포에서 I κ B α 의 발현 수준을 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 본 발명은 시미안 바이러스(Simian virus; SV40)의 T 항원 유전자를 지방유래줄기세포에 주입하여 제작된 ADSC-T(adipose-derived stem cell) 세포주의 배양액을 유효성분으로 포함하는, 염증질환의 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

[0020] 상기 조성물은 약학적 조성물 또는 식품 조성물을 포함한다.

[0021] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0022] 본 발명자들은 SV40의 T 항원의 발현이 여러 가지 세포의 수명을 연장시킨다는 것에 기초하여, 흡입지방으로부터 줄기세포(Adipose-Derived Stem Cells, ADSC)를 분리하고, 분리한 지방유래 줄기세포의 증식속도를 증가시키고 증식수명을 연장하기 위하여 SV40의 T 항원을 발현하는 벡터를 도입하면 지방유래 줄기세포의 수명

이 연장될 것이라고 예상하였다. 이를 확인하기 위하여 SV40의 T 항원을 발현하는 벡터인 pEF321 β -T 플라스미드를 지방유래 줄기세포에 도입하였고 그 결과, SV40의 T 항원을 발현하는 지방유래 줄기세포의 수명이 연장되고, 증식속도가 향상되는 것을 확인할 수 있었다.

[0023] 본 발명에 있어서 “시미안 바이러스(Simian Virus 40; SV40)”는 폴리오마 바이러스 과, 폴리오마 바이러스 속, 시미안 바이러스40 중에 속하는 바이러스로서, 5245개의 염기로 이루어지는 고리형 이중가닥 유전체를 가지며, 숙주범위가 넓어 여러 가지 세포의 형질전환 벡터로서 사용된다.

[0024] 상기 SV40의 “T 항원”은 종양을 유발하는 바이러스인 SV40의 감염초기에 합성되는 초기 단백질로서, 감염세포의 종양화에 기여하는 단백질이다. T 항원은 세포의 형질전환시, 세포측의 암억제 유전자산물(p53 등)과 결합하여 그 활성을 억제하는 작용이 있어 여러 가지 세포의 불멸화(immortalization)에 응용된다.

[0025] 본 발명의 조성물에서 유효성분인 지방유래줄기세포(ADSC-T)의 배양액은,

[0026] (a) 흡입지방조직에 콜라게나아제 효소를 처리한 후 원심분리하여 지방유래 줄기세포를 분리하여 배양하는 단계;

[0027] (b) 플라스미드 발현 벡터(pEF321 β -T)를 상기 (a) 단계에서 배양한 지방유래 줄기세포에 형질 감염시켜 SV40 T 항원을 발현하는 지방유래 줄기세포(ADSC-T)를 제조하는 단계; 및

[0028] (c) 상기 제조된 지방유래 줄기세포(ADSC-T)를 배양하여 배양액을 수득하는 단계;를 포함하여 제조될 수 있다.

[0029] 본 발명의 ADSC-T 세포 배양액의 제조방법을 단계별로 상세히 설명하면 다음과 같다.

[0030] 상기 (a)단계는 흡입지방조직으로부터 지방유래 줄기세포를 분리하여 배양하는 단계로, 먼저 흡입지방조직에 콜라게나아제 효소를 1:1의 중량비로 혼합한 후 30~40℃에서 40~50분 동안 처리한 다음, 원심분리하여 지방유래 줄기세포를 분리한다.

[0031] 상기 “콜라게나아제 효소”는 콜라겐의 가수분해를 촉진하는 효소로서, 지방조직의 콜라겐을 분해하여 지방줄기세포를 각각 분리시키는 역할을 한다. 상기 원심분리는 2~5분간 500~1000G에서 수행될 수 있고, 바람직하게는 3분간 800G에서 수행되어 상등액에 부유된 지질과 지방세포층을 제거한 후 여과기를 이용하여 세포성 잔사를 제거한다. 상기 여과기는 100 μ m 여과기가 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0032] 상기 세포성 잔사를 제거한 후, 생리식염수를 넣고 원심분리를 반복하여 세포를 세척한다. 상기 원심분리는 2~5분간 150~500G에서 수행될 수 있고, 바람직하게는 300G에서 3분 동안 수행될 수 있다.

[0033] 상기 분리된 지방유래 줄기세포(ADSC)를 10% FBS(Fetal Bovine Serum), 100units/ml 페니실린과 100 μ g/ml 스트렙토마이신이 첨가된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Media)배지에서 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 배양하며, 세포의 밀도(confluence)가 80~90%가 되면 계대 배양한다. 상기 배양법은 당업계에 공지된 세포배양방법을 응용할 수 있다.

[0034] 상기 (b)단계는 SV40 T 항원을 발현하는 지방유래 줄기세포(ADSC-T)를 제조하는 단계로, 플라스미드 발현 벡터(pEF321 β -T)를 상기 (a) 단계에서 분리한 지방유래 줄기세포에 형질 감염시켜 SV40 T 항원을 발현하는 지방유래 줄기세포(ADSC-T)를 얻는다.

[0035] 상기 “벡터”는 DNA 재조합 실험에 있어서, 목적하는 DNA 단편을 숙주세포 등에 도입시킬 수 있는 DNA로서, 벡터 DNA는 제한효소 등으로 절단, 개환하여 여기에 목적으로 하는 DNA 단편을 삽입하여 연결하고 숙주세포에 도입시킬 수 있다. 목적 DNA 단편을 연결한 벡터 DNA는 숙주세포의 염색체 DNA에 삽입되어 숙주의 분열과 더불어 각 세포로 분배되어 목적 DNA 단편을 대대로 유지하며 이어져 나간다.

[0036] 상기 플라스미드 발현 벡터 “pEF321 β -T”는 SV40의 T 항원을 코딩하는 핵산서열을 포함하는 플라스미드를 의미한다.

[0037] 상기 “형질 감염”은 유전자 DNA, 플라스미드 DNA, 바이러스 DNA·RNA 등을 세포의 배양액 또는 세포의 현탁액을 통해 세포에 주입하여 유전자 도입 및 감염을 유발시키는 것을 의미한다. 구체적으로, 상기 발현 벡터의 형질 감염은 당업계에 공지되어 있는 인산화칼슘(calcium phosphate) 형질 감염, 전기천공법(electroporation), 미세주입법(microinjection) 그리고 리포솜 주입법(liposome injection)등을 포함한 이용가능한 모든 형질 감염 방법을 사용할 수 있다. 또한 바이러스나 박테리아를 운반자로 사용하여 진핵세포에 DNA

를 도입할 수도 있다.

- [0038] 예를 들어, 상기 pEF321 β -T 플라스미드를 전기천공법으로 도입하는 방법은 지방유래 줄기세포를 무혈청 배지, 바람직하게는 무혈청 DMEM 내에서 플라스미드와 혼합하고 전기충격을 주는 방법을 이용할 수 있으나, 이에 한정되지는 아니하며, 당업계에 알려진 전기천공 프로토콜을 사용하여 플라스미드를 도입할 수 있다.
- [0039] 외래 유전자를 도입한 세포는 일정시간 배양을 통하여 도입된 유전자의 발현을 유도하고 발현 여부를 검증해보아야 한다. 도입 유전자의 발현을 위한 배양은 바람직하게는 37℃에서 5% CO₂ 배양기에 배양하는 것이나 이에 한정되지 않는다. 본 발명에 도입된 유전자는 SV40의 T 항원을 발현하는 유전자로서, T 항원의 발현여부는 상기 T 항원에 특이적으로 결합하는 항체를 이용한 항원-항체 결합 반응을 통해 지방유래 줄기세포내 발현된 T 항원을 검출함으로써 검증할 수 있다. 구체적으로는, 통상의 효소면역분석법(ELISA), 방사능면역분석법(Radioimmunoassay, RIA), 샌드위치 측정법, 면역조직화화학염색법, 항원-항체 응집법 등을 이용하여 검증할 수 있고, 웨스턴 블로팅 및 형광항체염색법으로 T 항원의 발현여부를 검증할 수 있다.
- [0040] 상기 (c)단계는 지방유래 줄기세포(ADSC-T)를 배양하여 배양액을 수득하는 단계로, ADSC-T 세포를 1×10^5 cell/ml로 배양하는 단계; 세포의 밀도가 80%가 되고나서 계대 배양하는 단계; 및 세포의 밀도가 70~90%가 되고난 뒤 2일 후 배양액을 수거하는 단계에 의해 제조된다.
- [0041] 상기 방법에 의해 제조된 배양액을 원심분리하여 세포의 잔사를 제거하고 상등액만 수득한다. 상기 원심분리는 500~1000G에서 2~5분간, 바람직하게는 800G에 3분간 원심 분리한다.
- [0042] 상기 지방유래 줄기세포(ADSC-T) 배양액을 위한 배지는 당업계에 알려진 기본 배지를 제한 없이 사용할 수 있다. 기본 배지는 인위적으로 합성하여 제조할 수 있으며, 상업적으로 제조된 배지를 사용할 수도 있다. 상업적으로 제조되는 배지의 예를 들면, DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), MEM (Minimal Essential Medium), BME (Basal Medium Eagle), RPMI 1640, F-10, F-12, α -MEM (α -Minimal essential Medium), G-MEM (Glasgow's Minimal Essential Medium) 및 Isocove's Modified Dulbecco's Medium 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 상기 세포 배양 배지에는 필요에 따라 한 가지 이상의 보조성분을 첨가할 수 있는데, 이러한 보조성분으로는 태아 송아지, 말 또는 사람 등의 혈청을 비롯하여, 미생물의 오염을 막기 위한 페니실린 G (Penicillin G), 스트렙토마이신 설페이트 (streptomycin sulfate) 및 겐타마이신 (gentamycin) 등의 항생제, 암포테리신 B (amphotericin B) 및 니스타틴 (nystatin) 등의 항진균제 (antifungal agent) 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 성분 중 하나 이상을 사용할 수 있다.
- [0043] 상기 방법에 의해 제조된 본 발명의 지방유래 줄기세포(ADSC-T)의 배양액은 자가면역질환인 아토피 피부염을 완화시키고, IkB α 를 발현을 증가시켜 NF- κ B의 발현을 억제하여 염증을 치료 또는 억제하는데 탁월한 효능을 가지고 있으므로 염증질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.
- [0044] 상기 염증 질환이란 만성 또는 급성 염증성 질환을 의미한다. 만성염증은 활동성 염증, 조직 손상 및 치유의 시도가 동시에 행해지는 장기간 지속되는(수주 또는 수개월) 염증으로 간주된다[참조:Robbins Pathological Basis of Disease by R.S. Cotran, V. Kumar, and S.L. Robbins, W. B. Saunders Co., p. 75, 1989]. 비록 만성 염증이 급성 염증 에피소드를 따를 수 있기는 하지만, 만성 염증은, 예를 들어, 지연된 과민 감성 반응을 일으키는 지속적인 감염(예: 결핵, 매독, 진균 감염), 지속적인 내독소(예: 증가된 혈장 지질) 또는 외독소(예:실리카, 석면, 켈런 타르, 수술 봉합사) 노출, 또는 자가 조직에 대한 자가면역 반응(예: 류마티스성 관절염, 전신성 홍반성 낭창, 다발성 경화증, 건선)의 결과, 시간이 경과됨에 따라 진행되는 잠행성 과정을 개시할 수 있다. 따라서, 만성 염증은 류마티스성 관절염, 재협착증, 건선, 다발성 경화증, 수술 유착, 결핵 및 만성 염증성 폐 질환(예: 천식, 진폐증, 만성 폐색성 폐 질환, 비염 및 폐 섬유증)과 같은 많은 의학적 증상을 포함한다. 보다 구체적으로 상기 염증질환은 알러지 질환, 비염, 천식, 급성통증, 만성통증, 치주염, 치은염, 염증성 장질환, 통풍, 심근경색, 동맥경화, 울혈성 심부전, 고혈압, 협심증, 위궤양, 알츠하이머병, 뇌경색, 다운증후군, 다발성 경화증, 비만, 당뇨, 치매, 우울증, 정신분열증, 결핵, 수면장애, 폐혈증, 화상 또는 췌장염으로부터 선택된 1종 이상인 것을 의미한다.
- [0045] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 포함할 수 있으며, 통상의 방법에 따라 액제, 현탁액, 에멀전, 로션제, 연고제 등의 경피투여용 제형으로 제제화될 수 있다. 상기 약학적으로 허용가능한 담체는 인산 완충 식염수(phosphate buffered saline), 정제수, 멸균수 등의 수성 희석제 혹은 용제를 포함하며, 프로필렌글리콜(propylene glycol), 올리브 오일 등의 비수성 희석제 혹은 용제를 포함한다. 또한, 필요에 따라 습윤제, 방향제, 보존제 등을 포함할 수 있다. 상기 약학적 조성물에 함유되는 ADSC-T 세포 배양액은

환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 예를 들면, 상기 지방유래 줄기세포 배양액의 일일 투여량은 1일 0.01~100mg/kg, 바람직하게는 0.1~10mg/kg으로 투여할 수 있으며, 상기 투여는 하루에 한번 또는 수회 나누어 투여할 수도 있다.

[0046]

상기 담체(들)는 수용자에게 유해하지 않고 제제의 다른 성분과 상용성 면에서 "허용되는" 것이어야 한다. 이러한 관점에서, 약학적으로 허용되는 담체는 임의약학 투여에 적합한, 임의의 모든 용매, 분산 매질, 코팅, 항박테리아 및 항진균 활성제, 등장성 및 흡수 지연제 등을 포함하고자 한다. 약학적으로 활성있는 물질을 위한 그러한 매질 및 활성제의 사용은 당분야에 공지이다. 임의의 통상적 매질 또는 활성제는 활성 화합물과 상용성이 아닌 것을 제외하고, 조성물에서의 그 용도가 고려된다. 보조적인 활성 화합물(당분야에 공지 및/또는 본 발명에 따라 동정 또는 디자인됨)이 또한 조성물에 도입될 수 있다. 제제는 편리하게 단위 제형으로 존재할 수 있고 제약/미생물학 분야에서 잘 알려진 임의의 방법으로 제조될 수 있다. 대체로, 일부 제제는 화합물을 액체 담체 또는 미분 고체 담체 또는 둘 모두와 혼합하고, 이후 필요하면 적합한 제제로 그 생성물을 성형시켜 제조된다.

[0047]

본 발명의 약학 조성물은 그 목적 투여 경로에 적합하도록 제제화되어야 한다. 투여 경로는 경구, 귀, 눈, 코, 또는 비경구, 예를 들면 정맥내, 피부내, 흡입, 경피(국소), 경점막, 및 직장 투여를 포함한다. 비경구, 피부내, 또는 피하 적용을 위해 사용되는 용액 또는 현탁액은 다음의 성분들을 포함할 수 있다: 멸균 희석제, 예컨대 주사용 물, 염수 용액, 고장유, 폴리에틸렌글리콜, 글리세린, 프로필렌글리콜 또는 다른 합성 용매; 항박테리아제 예컨대 벤질 알콜 또는 메틸 파라벤; 항산화제 예컨대 아스코르브산 또는 중아황산나트륨; 킬레이팅제 예컨대 에틸렌디아민테트라아세트산; 완충제 예컨대 아세테이트, 시트레이트 또는 포스페이트 및 장력조절제 예컨대 염화나트륨 또는 텍스트로스, pH는 산이나 염기, 예컨대 염산 또는 수산화나트륨으로 조정될 수 있다.

[0048]

경구 또는 비경구 투여에 유용한 용액은 제약 분야에 공지된 임의의 방법을 통해 제조될 수 있으며, 예를 들어, 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, (Gennaro, A., ed.), Mack Pub., (1990)]에 기술된 것을 참조한다. 비경구 투여용 제제는 또한 구강 투여용 글리코콜레이트, 직장 투여용 메톡시살리실레이트, 또는 질 투여용 시트르산을 포함할 수 있다. 비경구 조제물은 앰플, 1회용 시린지 또는 유리나 플라스틱으로 제조된 복수 용량 바이알에 동봉될 수 있다. 직장 투여용 좌제는 또한 약물을 비자극성 부형제 예컨대 코코아 버터, 다른 글리세리드, 또는 실온에서는 고체이고 체온에서는 액체인 다른 조성물과 혼합하여 제조될 수 있다. 제제는 또한 예를 들면 폴리알킬렌글리콜 예컨대 폴리에틸렌글리콜, 식물성 오일, 및 수소화 나프탈렌을 포함할 수 있다. 직접 투여용 제제는 글리세롤 및 다른 고점도 조성물을 포함할 수 있다. 이러한 약물에 유용할 수 있는 다른 비경구 담체에는 에틸렌비닐 아세테이트 공중합체 입자, 삼투압 펌프, 이식성 주입계, 및 리포솜이 포함된다. 흡입 투여용 제제는 부형제로서, 예를 들면 락토스를 함유할 수 있거나, 또는 예를 들면 폴리옥시에틸렌-9-라우릴 에테르, 글리코콜레이트 및 데옥시콜레이트를 함유하는 수용액, 또는 점비액 형태로 투여되는 유성액, 또는 코 내에 적용되는 겔일 수 있다. 직장 전달을 위해 정제 관장이 또한 사용될 수 있다.

[0049]

경구 투여에 적합한 본 발명의 제제는 각각 사전결정된 약물의 양을 함유하는, 개별 단위 예컨대 캡슐, 젤라틴 캡슐, 사제, 정제, 트로키, 또는 로젠지; 분말 또는 과립 조성물; 수성액 또는 비수성액 중 용액 또는 현탁액; 또는 수중유 에멀션 또는 유중수 에멀션 형태일 수 있다. 약물은 또한 볼러스, 연약 또는 페이스트 형태로 투여될 수 있다. 정제는 경우에 따라 1 이상의 보조 성분과 함께 약물을 압착 또는 몰당시켜 제조될 수 있다. 압착 정제는 적절한 기계에서, 경우에 따라 결합제, 윤활제, 불활성 희석제, 표면 활성 또는 분산제와 혼합된, 자유 유동 형태, 예컨대 분말 또는 과립 형태의 약물을 압착시켜 제조될 수 있다. 몰당된 정제는 적절한 기계에서, 불활성 액체 희석제로 습윤시킨 적절한 담체 및 분말화 약물의 혼합물을 몰당시켜 제조될 수 있다.

[0050]

경구 조성물은 대체로 불활성 희석제 또는 식용 담체를 포함한다. 경구 치료 투여 목적을 위해, 활성 화합물은 부형제와 함께 도입될 수 있다. 구강정결체로서 사용하기 위한 유체 담체를 이용해 제조된 경구 조성물은 유체 담체 중 화합물을 포함하고 경구에 적용되어 획소리를 내고 뱉어내거나 또는 삼켜지게 된다. 약학적으로 적합한 결합제, 및/또는 보강제 물질이 조성물의 일부로서 포함될 수 있다. 정제, 알약, 캡슐, 트로키 등은 임의의 이하 성분, 또는 유사한 성질의 화합물을 함유할 수 있다: 결합제, 예컨대 미세결정 셀룰로스, 검 트라가칸트 또는 젤라틴; 부형제 예컨대 전분 또는 락토스; 붕해제 예컨대 알긴산, 프리모겔, 또는 옥수수전분; 윤활제 예컨대 스테아르산마그네슘 또는 스테로테스; 유동화제 예컨대 콜로이드성 이산화규소; 감미제, 예컨대 수크로스 또는 사카린; 또는 풍미제 예컨대 페퍼민트, 메틸 살리실레이트, 또는 유기 풍미제.

[0051]

주사용으로 적합한 약학 조성물은 멸균 수용액(수용성인 경우) 또는 분산액 및 멸균 주사 용액 또는 분

산액의 즉석 제조를 위한 멸균 분말을 포함한다. 정맥내 투여를 위해, 적절한 담체는 생리적 염수, 정세균성 물, Cremophor ELTM(BASF, Parsippany, NJ) 또는 인산 완충 염수(PBS)를 포함한다. 제조 및 보관 조건 하에서 안정해야 하고 미생물 예컨대 박테리아 및 진균의 오염 작용에 대해 보존되어야 한다. 담체는 예를 들면, 물, 에탄올, 폴리올(예컨대, 글리세롤, 프로필렌글리콜, 및 액상 폴리에틸렌글리콜), 및 이의 적절한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 적절한 유동성은 예를 들면, 코팅 예컨대 레시틴을 사용하는 것에 의해, 분산물의 경우에는 필요한 입자 크기의 유지에 의해, 그리고 계면활성제의 사용에 의해 유지된다. 많은 경우, 등장화제, 예컨대 당, 다가알콜 예컨대 만니톨, 솔비톨 또는 염화나트륨이 조성물에 포함되는 것이 바람직하다. 주사용 조성물의 장기간 흡수는 조성물에 흡수를 지연시키는 활성제, 예를 들면 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴을 첨가시킴으로써 이루어질 수 있다.

[0052] 멸균 주사용액은 상기 열거된 성분 중 1 또는 그 조합과 적절한 용매 중 필요량의 활성 화합물을 도입하고, 필요한 경우 여과 멸균을 후속하여 제조될 수 있다. 대체로, 분산액은 활성 화합물을 염기성 분산 매질 및 상기 열거된 성분 중에서 필요한 다른 성분을 함유하는 멸균 비히클에 활성 화합물을 도입하여 제조된다. 멸균 주사용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우, 제조 방법은 이전에 멸균여과된 그 용액으로부터 임의 추가적인 목적 성분이 더해진 활성 성분의 분말이 생성되는 진공 건조법 및 냉동 건조법을 포함한다.

[0053] 관절내 투여에 적합한 제제는 미세결정형, 예를 들면 수성 미세결정 현탁액 형태일 수 있는 약물의 멸균 수성 조제물 형태일 수 있다. 리포솜 제제 또는 생분해성 중합체 시스템이 또한 관절 내 및 눈 투여 둘 모두를 위한 약물을 준비하는데 사용될 수 있다.

[0054] 눈 치료를 포함하여, 국소 투여에 적합한 제제는 액체 또는 반액체 조제물 예컨대 도찰제, 로션, 겔, 도포제, 수중유 또는 유중수 에멀션 예컨대 크림, 연고 또는 페이스트; 또는 용액 또는 현탁액 예컨대 점적액을 포함한다. 피부 표면에 국소 투여를 위한 제제는 약물을 피부학적으로 허용되는 담체 예컨대 로션, 크림, 연고 또는 비누로 분산시켜 제조된다. 국소 도포하고 제거를 억제하기 위해 피부 상에 막이나 층을 형성할 수 있는 담체가 특히 유용하다. 내부 조직 표면에 국소 도포를 위해, 활성제는 액체 조직 접착제 또는 조직 표면에 접착을 강화시키는 것으로 알려진 다른 물질에 분산될 수 있다. 예를 들면, 히드록시프로필셀룰로스 또는 피브리노젠/트롬빈 용액을 사용하는 것이 유리하다. 대안적으로, 조직 코팅 용액, 예컨대 펙틴-함유 제제가 사용될 수 있다.

[0055] 흡입 치료를 위해, 스프레이로 분배되는 분말 흡입(자가추진 또는 스프레이 [0556] 제제)은 네블라이저 이거나 또는 오토마이어가 사용될 수 있다. 이러한 제제는 분말 흡입 장치 또는 자가 추진 분말-분배 제제로부터 폐 투여를 위한 미분 형태일 수 있다. 자가 추진 용액 및 스프레이 제제의 경우, 원하는 스프레이 특징(즉, 원하는 입자 크기를 갖는 스프레이를 생성할 수 있는 특징)을 갖는 밸브의 선택에 의해 또는 제어된 입자 크기의 현탁 분말로서 활성 성분을 유입시켜서 그 효과를 달성할 수 있다. 흡입 투여를 위해, 화합물은 또한 적절한 추진제, 예를 들면 가스 예컨대 이산화탄소를 함유하는 가압 용기 또는 분배기, 또는 네블라이저로부터의 에어로졸 스프레이 형태로 전달될 수 있다.

[0056] 전신 투여는 또한 경점막 또는 경피 수단에 의해 이루어질 수 있다. 경점막 또는 경피 투여를 위해, 투과하려는 장벽에 적합한 침투제가 제제에 사용된다. 그러한 침투제는 대체로 당분야에 공지이며, 예를 들면, 경점막 투여를 위해, 세제 및 담즙산염이 포함된다. 경점막 투여는 코 스프레이 또는 좌제의 사용을 통해 수행될 수 있다. 경피 투여를 위해, 활성 화합물은 대체로 당분야에서 공지된 바와 같이 연고, 셀브, 젤 또는 크림으로 제제화된다.

[0057] 본 발명의 식품 조성물에 포함되는 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 본 발명의 지방유래줄기세포에 T항원을 도입한 ADSC-T 세포(adipose-derived stem cell-T cell)의 배양액을 유효성분으로 포함하는, 염증 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물에 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함하는 낙농제품, 각종 수프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

[0058] 상기 식품 조성물은 건강 음료 조성물을 포함할 수 있고, 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토오스, 슈크로오스와 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알코올이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나 사카린, 아스파르트마과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 상기 지방유래줄기세포에 T항원을 도입한 ADSC-T 세포(adipose-derived stem cell-T cell)의 배양액 100g당 일반적

으로 0.01 내지 0.04 g, 바람직하게는 약 0.02 내지 0.03 g이다.

[0059] 이하, 본 발명을 실시예에 의거하여 보다 구체적으로 설명한다. 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0060] [제조예 1] 지방유래줄기세포에 T항원을 도입한 ADSC-T 세포(adipose-derived stem cell-T cell) 배양액의 제조

[0061] 1. 지방조직으로부터 지방유래 줄기세포(Adipose-Derived Stem Cell)의 분리 및 배양

[0062] 지방유래 줄기세포(ADSC)의 분리는 성형외과에서 지방흡입술을 시행한 환자에게 동의를 구한 후, 채취한 지방조직에서 지방유래 줄기세포(ADSC)를 추출하였다. 구체적으로는, 분리된 지방조직을 PBS(phosphate buffered saline)로 세척한 후 0.075% 콜라게나아제(sigma)와 1:1의 중량비로 혼합하여 37℃에서 45분 동안 처리하였다. 효소 처리 후, 800G에서 5분 동안 원심 분리하여 상등액에 부유된 지질과 지방세포 층을 제거한 후 100 μ m 여과기로 여과하여 세포성 잔사를 제거하였다. 여과액에 생리식염수를 가한 후 300G에서 3분 동안 원심 분리하여 2-3번 정도 세포를 세척하여 지방유래 줄기세포(ADSC)를 얻었다.

[0063] 수득한 지방유래 줄기세포(ADSC)를 10% FBS(Fetal bovine Serum), 100units/ml 페니실린과 100 μ g/ml 스트렙토마이신이 첨가된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Media)배지에서 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 분리된 지방유래 줄기세포(ADSC)는 적혈구와 혼합되어 있으며, 이 적혈구를 제거하기 위하여 적혈구 용해 완충용액을 사용하기도 하나 적혈구 용해 완충용액 사용시 지방유래 줄기세포(ADSC)의 수가 감소되는 경향이 있다. 따라서 초기배양시 분리된 지방유래 줄기세포(ADSC) 원상태와 적혈구를 함께 배양하였다. 이러한 이유로 초기배양시 지방유래 줄기세포(ADSC)가 적혈구와 혼합되어 배양되었다(도 1A). 초기 배양 1일 후 지방유래 줄기세포(ADSC)가 플레이트에 다 부착되었을 거라고 판단하고 PBS로 2회 세척하여 부유세포 및 적혈구를 제거하였다. 완전히 제거되지 않은 적혈구는 계대배양 시 트립신화(trypsinization)에 의해 제거하였다. 세포의 밀도(confluence)가 배양기의 80-90%가 되면 계대 배양하였다.

[0064] 초기 배양 약 2-3일 후 섬유아세포 형태(fibroblast morphology)를 가진 지방유래 줄기세포(ADSC)가 나타남을 확인할 수 있었다. 이후 10cm 플레이트로 계대 배양 후 지방유래 줄기세포(ADSC)의 모양을 관찰하였다. 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0065] 도 1에 나타난 바와 같이, 지방유래 줄기세포(ADSC)는 다른 성체줄기세포처럼 섬유아세포와 같은 형태를 나타냄을 확인하였다.

[0066] 2. 지방유래 줄기세포(ADSC)의 지방세포(adipocyte)로의 분화 능력 확인

[0067] 상기 지방유래줄기세포의 분리 및 배양 실험에서 수득한 지방유래줄기세포(ADSC)가 지방세포로 분화되는지 확인하기 위해, 지방유래 줄기세포(ADSC)를 지방세포 분화 유도 배지를 사용하여 4주간 분화를 유도시킨 후, 지방세포로 분화되었는지를 확인하였다. 지방세포 분화유도 배지는 PromoCell사에서 판매중인 Preadipocyte Differentiation Medium을 사용하였고, 분화된 지방세포의 지방세포 유지배지는 PromoCell사에서 판매중인 Adipocyte Nutrition Medium을 사용하였다. 구체적으로는, 지방유래 줄기세포(ADSC)를 지방세포 분화유도 배지에서, 3일 간격으로 배지를 교환하면서 10일간 배양하여 분화를 유도하였고, 이후 지방세포 유지 배지로 바꾸어서 20일간 추가로 더 배양하였다. 배양된 세포는 10% 포르말린에 고정시키고 60% Oil-Red O 용액으로 염색하여 세포내 지방소적(lipid droplet)을 시각화하였다. 결과는 도 2에 나타내었다.[지방유래 줄기세포 분화유도 전(A), 분화유도 30일 후(B), 분화유도 30일 후 Oil-Red O 염색 결과(C)].

[0068] 도 2에 나타난 바와 같이, 배양 30일 후 지방유래 줄기세포(ADSC)에서 지방세포 특유의 지방소적이 관찰되어 지방세포로 분화됨을 확인할 수 있었다. 또한, 배양 30일 후 Oil-Red O염색 결과 지방소적이 붉게 염색되어 지방세포로 분화되었음을 확인할 수 있었으며(C), 분화를 유도하지 않은 세포의 경우 염색이 되지 않은 것을 확인할 수 있었다(A). 따라서, 지방유래 줄기세포(ADSC)가 정상적인 지방세포로 분화할 수 있는 능력을 보유함을 알 수 있다.

3. SV40 T 항원의 발현에 의한 ADSC-T 세포주의 확립 및 특징

(1) 형질 감염(transfection)

SV40 T 항원을 지방유래 줄기세포(ADSC)에서 안정적으로 발현시키기 위해 SV40의 T 항원 유전자를 발현시키는 pEF321 β -T 플라스미드 DNA를 지방유래 줄기세포(ADSC)에 전기천공 방법으로 도입하였다. 구체적으로는, 20 μ g의 상기 플라스미드 벡터 pEF321 β -T와 1x10개의 지방유래 줄기세포를 800 μ l의 무혈청 DMEM내에서 혼합하고 0.4cm²의 큐벳에 담아 전기충격을 주었다. 전기충격은 Gene Pulser X cell Electroporation System(BIO-RAD)을 이용하여 160V, 15m/초의 조건으로 실시하였다. 플라스미드 벡터 pEF321 β -T가 도입되어 고밀도 세포군집(High density focus)을 형성한 지방유래 줄기세포는 페니실린 캡(penicillin cap)을 씌워 트립신화한 다음 세포를 클로닝한 뒤 24 웰 플레이트(well plate)에 배양하고 세포가 배양기의 80-90%가 되었을 때 계대 배양하였으며, 이 세포주를 ADSC-T로 명명하였다.

ADSC-T 세포의 형태학적 변화를 도 3에 나타내었다.

도 3A에 나타난 바와 같이, 일차 지방유래 줄기세포(primary ADSC)의 경우 세포의 크기가 크고 긴 섬유아세포(fibroblast)의 형태로 접촉제어(contact inhibition)에 의해 증식이 정지되어 세포 단층(monolayer)을 형성하는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 도 3B 및 3C에 나타난 바와 같이, 일차 지방유래 줄기세포에 pEF321 β -T 플라스미드가 도입되어 SV40 T 항원이 발현된 지방유래 줄기세포(ADSC-T)가 접촉제어 받지 않고 세포 단층 위에 세포들이 겹쳐 자라는 현상이 나타나 세포 밀도가 높은 고밀도 세포 군집(high-density focus)을 형성하는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 도 3D에 나타난 바와 같이, ADSC-T는 세포의 크기가 작아지면서 방추형으로 변화되었음을 알 수 있었다. 이러한 ADSC-T의 세포 형태 변화는 SV40 T 항원의 발현에 의한 것이라고 추정해 볼 수 있다.

(2) ADSC-T 세포의 T 항원 발현 여부-형광항체염색법

ADSC-T 세포 내의 T 항원의 발현을 확인하기 위하여, SV40 T 항원에 대한 단일클론항체(monoclonal antibody)와 FITC(Fluorescein isothiocyanate)로 표식된 항-마우스 IgG를 사용하여 형광항체염색을 시행하여 UV 하에서 T 항원의 발현을 관찰하였다. 이때 대조군으로 COS-1 세포를 사용하였으며, COS-1 세포의 경우 SV40 T 항원을 이용하여 만들어진 세포로서 ADSC-T 세포의 SV40 T 항원 발현 유무를 비교 확인할 수 있다.

구체적으로는, ADSC-T 세포 및 COS-1 세포를 에탄올과 아세톤을 1:1로 혼합한 용액으로 18분간 고정하였다. 고정된 세포를 PBS로 세척한 후, SV40 T 항원에 특이적으로 결합하는 마우스의 단일클론항체와 함께 37℃에서 1시간 동안 배양하였다. 배양된 세포를 PBS로 세척한 후 FITC로 표식된 토끼의 항-마우스 IgG와 함께 37℃에서 1시간 동안 배양하였다. 상기 배양된 세포를 형광 현미경으로 관찰하였다. 상기 실험에 대한 결과를 도 4에 나타내었다.

도 4에 나타난 바와 같이, 고밀도 세포 군집(high-density focus)에서 분리된 ADSC-T 세포가 SV40 T 항원에 대한 단일클론항체(monoclonal antibody)로 염색되어 COS-1 세포와 마찬가지로 T 항원이 발현되는 것을 확인할 수 있었다.

3. ADSC-T 세포의 웨스턴 블로팅(western blotting)을 이용한 T 항원 발현 확인

3개의 ADSC-T 세포로부터 각각 총 세포추출물(Total cell extract)을 제조하여 웨스턴 블로팅(western blotting)으로 세포 내에 존재하는 SV40 T 항원을 검출하였다. 구체적으로는, 동량의 단백질을 포함하는 각 세포의 추출물을 10% SDS-폴리아크릴아미드 겔로 전기영동한 후, 니트로 셀룰로오스막에 옮겼다. SV40 T 항원에 특이적으로 결합하는 마우스의 단일클론항체(IgG)를 결합시킨 후 퍼옥시다제가 접합된 항-마우스 IgG를 사용하여 발색시켰다.

상기 결과를 도 5에 나타내었다.

도 5에 나타난 바와 같이, 웨스턴 블로팅 결과 ADSC-T의 3개의 세포(B, C, D)에서 양성 대조군인 COS-1(E) 세포처럼 T 항원이 발현됨을 확인할 수 있었으며, 음성 대조군인 일차 지방유래 줄기세포(primary ADSC)는 T 항원이 발현되지 않음을 확인하였다(A). 상기 결과로부터, 분리된 ADSC-T 세포주는 T 항원을 안정적으로 발현하고 있었으며, T 항원에 의해 세포증식이 증가되었고, 세포의 형태가 변화되었음을 알 수 있었다.

4. SV40 T 항원에 의해 수립된 ADSC-T 세포의 증식속도

시미안 바이러스 40(SV40) T 항원에 의해 확립된 ADSC-T 와 제 1차 지방유래 줄기세포(primary ADSC)의 세포 증식 속도를 측정하여 비교하였다. 세포배양 시 세포의 밀도가 80% 되었을 경우 계대배양을 시행하였고, 매 계대마다 세포를 계수하여 세포증식곡선(cell growth curve)을 작성하여 비교하였다. 상기 결과를 도 6에 나타내었다.

도 6에 나타난 바와 같이, 일차 지방유래 줄기세포(primary ADSC)는 약 6-7일 간격으로 한 번씩 세포분열을 하는 반면, 3개의 ADSC-T 의 세포는 모두 약 2일에 한 번씩 세포분열을 하는 것으로 나타났다. 또한 일차 지방유래 줄기세포(primary ADSC)의 경우 증식 속도가 점점 떨어져 사멸하는 현상을 나타내었지만, ADSC-T 의 경우에는 3개의 세포주간에 약간의 차이는 있었으나 전체적으로 세포의 수명이 길어지고 빠른 증식속도를 나타내었다. 이러한 증식속도 향상은 약 6개월(50 계대)까지 계속되었고, 이후에는 세포의 증식속도가 떨어지는 양상을 나타내었다.

5. ADSC-T 세포 배양액의 제조

본 발명의 세포 배양액을 제조하기 위해, DMEM에 FBS가 10% 함유된 배지로 ADSC-T, ADSC 세포를 배양액(Cultrued Medium : CM) 배지로 3일간 배양하였다. 실험에 이용한 배양액의 계대(passage) 숫자는 ADSC-T 는 22 계대, 제 1차 ADSC 세포는 6 계대에서 수득한 배양액을 이용하였다.

[실시예 1] ADSC-T 세포 배양액의 항염증 효과 검증

1. ADSC-T 세포 배양액의 C57BL/6 마우스를 이용한 *in vivo* 항염증 효과 실험

ADSC-T 배양상등액의 항염증 효과를 알아보기 위하여, C57BL/6 마우스 실험을 시행하였다.

먼저 마우스 실험으로 7주령의 C57BL/6 마우스를 사용하였다. 마우스 배부를 1차적으로 애니멀 클리퍼(animal clipper)로 제모하고, 2차로 일반 제모약을 사용하여 남아있는 털을 약 2-3분간 제모한 후 깨끗이 제거하였다. 지방유래세포(ADSC-T)는 각 1×10^5 세포/ml로 배양하였으며, 세포의 밀집도(confluence)가 80%에 도달한 이후 3일을 경과하여 배양상등액을 수득하였다. 수득한 배양상등액은 0.2 필터로 여과하였으며, 이 상등액을 시료 배양액으로 사용하였다.

아토피 유발물질로는 DNCB(1-chloro-2,4-dinitrochlorobenzene)를 사용하였는데, DNCB는 아세톤에 0.5% 농도로 용해시켜 사용하였다. 일주간 $50 \mu\text{l}$ 씩 배부의 오른쪽과 왼쪽에 나누어 도포한 후 눈에 보일 정도로 아토피 피부염이 유발되면 그 시점부터 ADSC-T 배양상등액을 도포하였다. 배양 상등액을 도포할 시 마우스의 자연치유를 막기 위하여 DNCB도 함께 도포하였는데 그 시간차는 6시간으로 하였다. 아토피 피부염의 치료 효과를 알아보기 위하여 하루에 한 번 에테르(ether)를 이용하여 가볍게 흡입마취한 후 사진 촬영을 하여 검토하였다. 마우스의 배부에 아토피 피부염이 유발되어 배양 상등액을 도포하기 하루 전을 0 일로 정하였다. 그 결과를 도 7에 나타내었다.

도 7에 나타난 바와 같이, 배양 상등액을 도포하고 이틀 후 배양 상등액을 도포한 왼쪽 배부에 살점이 짓물러 붙은 부분이 벗겨지는 것을 관찰할 수 있어 항염증 효과가 있음을 알 수 있었다. 배양 상등액을 도포하고 삼일 후 도포한 왼쪽 배부의 굳은 짓물이 거의 벗겨진데에 비해 도포하지 않은 오른쪽 배부는 배부에 붉게 변한 것을 확인할 수 있었다. 배양 상등액을 도포하고 9일 후 양 쪽의 붉은 부분을 비교해 본 결과 배양 상등액을 도포한 왼쪽 배부가 도포하지 않은 오른쪽 배부보다 작다는 사실을 관찰할 수 있었다. 배양 상등액을 도포하고 12일 후 도포한 왼쪽 배부는 붉은기가 사라져 거의 다 나은 데에 비해 오른쪽 배부에는 붉은기가 남아있는 것을 확인할 수 있었다. 이 결과로 ADSC-T 배양 상등액이 자가면역질환인 아토피 피부염의 완화에도 효과가 있다는 사실을 확인하였다.

2. ADSC-T 세포 배양액의 웨스턴 블로팅(western blotting)을 이용한 *in vitro* 항염증 효과 실험

ADSC-T 세포배양 상등액의 항염증 효과를 *in vitro*에서 확인하기 위하여 웨스턴 블로팅 실험을 시행하

였다. 293T 세포에 I κ B α , I κ B β , NIK의 발현 플라스미드를 형질감염(transfection)시켜 NF- κ B를 활성화시키고, 24시간 후 배지에 ADSC-T 세포 배양 상등액을 첨가하여 두 시간 단위로 세포를 수득하였다. 수득한 세포를 완충액 A(10 mM pH 7.9 hepes, 1mM EDTA, 10mM KCl, 1mM DTT, protease inhibitor)로 현탁(suspension)한 후 얼음 상에서 15분 동안 반응시켰다. 이 후 1 ml 주사기에 25G 니들(needle)을 이용해 20번 스트로크(stroke)하여 세포막을 파괴시키고, 14,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C 조건으로 15분 동안 원심 분리하여 세포 배양 상등액을 수득하였다. 분리한 세포 배양 상등액을 단백질 정량과 웨스턴 블로팅에 이용하였다. 그 결과를 도 8에 나타내었다.

[0095] 도 8에 나타낸 바와 같이, 293T 세포를, 표시된 발현 플라스미드로 형질감염시켰고 DMEM 단독 또는 50% ADSC-T-CM을 포함하는 DMEM을 이용하여 배양하였다. 세포질 추출물을 제조하여 웨스턴 블로팅(western blotting)에 이용하였다. 배양 상등액을 처리해준 후 두 시간마다 수거한 293T 세포에서 I κ B α 의 양이 증가한 것을 확인하였고, I κ B α 는 NF- κ B의 억제제이므로 이는 세포질 내에서 NF- κ B의 활성이 배양액 처리에 의해 낮아졌다는 것을 의미한다.

[0096] 또한 NF- κ B의 활성을 다른 방법으로 확인하기 위하여 CAT 어세이(Chloramphenicol acetyltransferase assay)를 시행하였다. 상기 결과를 도 9에 나타내었다.

[0097] 도 9에 나타낸 바와 같이, 이 실험결과 역시 세포 배양 상등액을 처리해준 293T세포에서 NF- κ B가 저해됨을 확인할 수 있었다.

[0098] 3. ADSC와 ADSC-T의 세포내 I κ B α 의 발현 정도의 비교

[0099] ADSC와 ADSC-T의 세포내 I κ B α 의 발현 정도를 비교하기 위하여 ADSC 세포와 ADSC-T 세포를 총 용해 완충액(total lysis buffer)으로 처리하여 얻은 세포 추출물을 전기영동 한 후 웨스턴 블로팅 실험을 수행하였다. 그 결과를 도 10에 나타내었다.

[0100] 도 10에 나타낸 바와 같이, ADSC-T 세포 추출물에서 I κ B α 의 양이 ADSC 세포 추출물에 비하여 높다는 사실을 확인할 수 있었고, 이 결과로부터 ADSC-T 세포질 내에 NF- κ B 활성이 저해되어 있음을 추정해볼 수 있다. 따라서, ADSC-T를 배양한 배양액 속에는 NF- κ B를 활성화시킬만한 요소들이 존재하지 않을 것으로 추정되고, 오히려 NF- κ B를 억제시킬 수 있을 것으로 예상된다.

[0101]

[0102] 따라서, 이상의 실험결과를 통하여 본 발명에 따른 지방유래줄기세포에 T항원을 도입한 ADSC-T 세포의 배양액은 염증질환의 예방 또는 치료 효과를 가지고 있음을 확인하였다.

[0103] 이하 본 발명의 약학적 조성물 및 식품 조성물의 제제예를 설명하나, 본 발명을 한정하고자함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

[0104] 제제예 1. 약학적 제제의 제조

[0105] 1-1. 산제의 제조

[0106] 지방유래줄기세포에 T항원을 도입한 ADSC-T 세포의 배양액 20 mg

[0107] 유당 100 mg

[0108] 탈크 10 mg

[0109] 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충전하여산제를 제조한다.

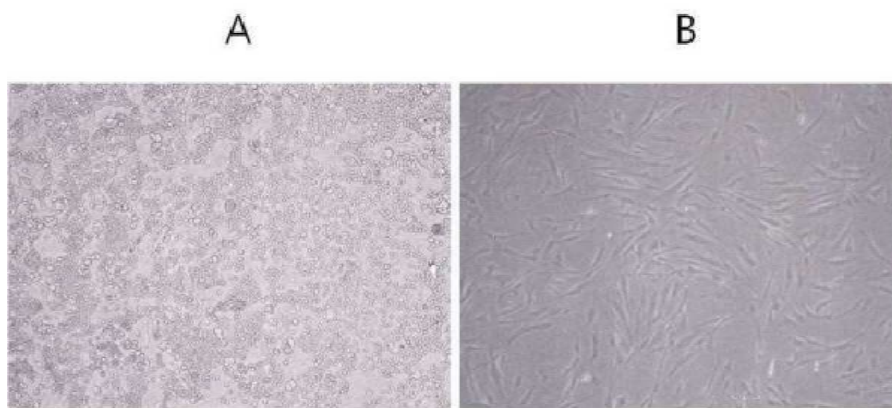
[0110] 1-2. 정제의 제조

[0111]	지방유래줄기세포에 T항원을 도입한 ADSC-T 세포의 배양액	10 mg
[0112]	옥수수전분	100 mg
[0113]	유당	100 mg
[0114]	스테아린산 마그네슘	2 mg
[0115]	상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.	
[0116]	1-3. 캡슐제의 제조	
[0117]	지방유래줄기세포에 T항원을 도입한 ADSC-T 세포의 배양액	10 mg
[0118]	결정성 셀룰로오스	3 mg
[0119]	락토오스	14.8 mg
[0120]	마그네슘 스테아레이트	0.2 mg
[0121]	통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.	
[0122]	1-4. 주사제의 제조	
[0123]	지방유래줄기세포에 T항원을 도입한 ADSC-T 세포의 배양액	10 mg
[0124]	만니톨	180 mg
[0125]	주사용 멸균 증류수	2974 mg
[0126]	Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	26 mg
[0127]	통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당 (2 ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.	
[0128]	1-5. 액제의 제조	
[0129]	지방유래줄기세포에 T항원을 도입한 ADSC-T 세포의 배양액	20 mg
[0130]	이성화당	10 g
[0131]	만니톨	5 g
[0132]	정제수	적량
[0133]	통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100 ml로 조절한 후 갈색병에 충전하여 멸균시켜 액제를 제조한다.	
[0134]	제제예 2. 식품 제제의 제조	
[0135]	2-1. 건강식품의 제조	
[0136]	지방유래줄기세포에 T항원을 도입한 ADSC-T 세포의 배양액	100 mg
[0137]	비타민 혼합물	적량
[0138]	비타민 A 아세테이트	70 µg
[0139]	비타민 E	1.0 mg
[0140]	비타민 B1	0.13 mg

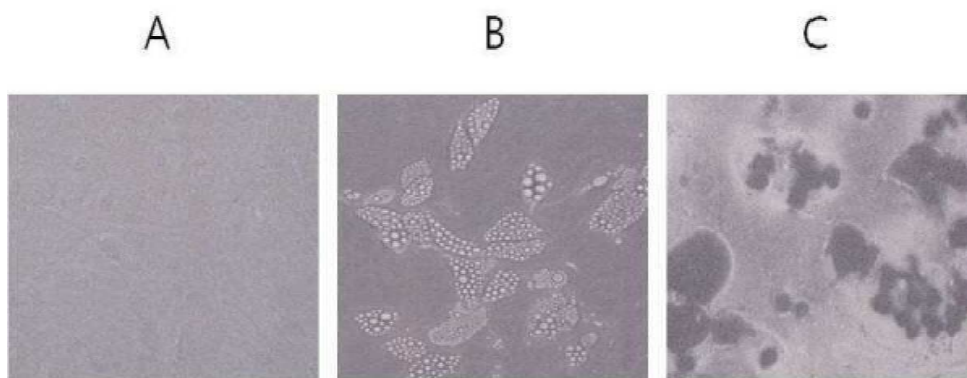
[0141]	비타민 B2	0.15 mg
[0142]	비타민 B6	0.5 mg
[0143]	비타민 B12	0.2 μg
[0144]	비타민 C	10 mg
[0145]	비오틴	10 μg
[0146]	니코틴산아미드	1.7 mg
[0147]	엽산	50 μg
[0148]	판토텐산 칼슘	0.5 mg
[0149]	무기질 혼합물	적량
[0150]	황산제1철	1.75 mg
[0151]	산화아연	0.82 mg
[0152]	탄산마그네슘	25.3 mg
[0153]	제1인산칼륨	15 mg
[0154]	제2인산칼슘	55 mg
[0155]	구연산칼륨	90 mg
[0156]	탄산칼슘	100 mg
[0157]	염화마그네슘	24.8 mg
[0158]	상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.	
[0159]	2-2. 건강음료의 제조	
[0160]	지방유래줄기세포에 T항원을 도입한 ADSC-T 세포의 배양액 100 mg	
[0161]	비타민 C	15 g
[0162]	비타민 E(분말)	100 g
[0163]	젖산철	19.75 g
[0164]	산화아연	3.5 g
[0165]	니코틴산아미드	3.5 g
[0166]	비타민 A	0.2 g
[0167]	비타민 B1	0.25 g
[0168]	비타민 B2	0.3g
[0169]	물	정량
[0170]	통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간 동안 85 ℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2 l 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강음료 조성물 제조에 사용한다.	
[0171]	상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만 수요계층이나, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.	

도면

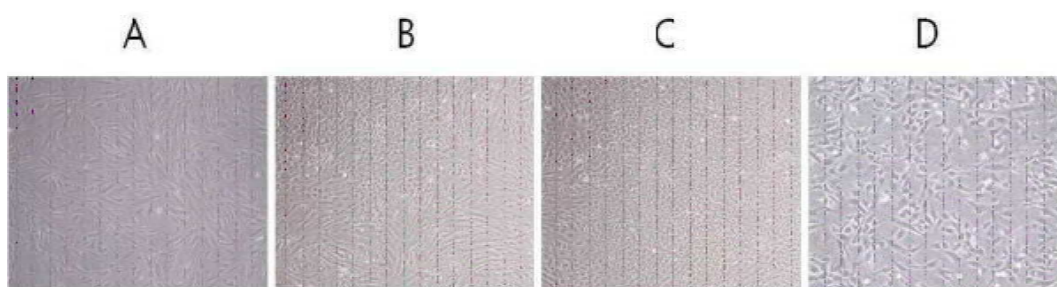
도면1



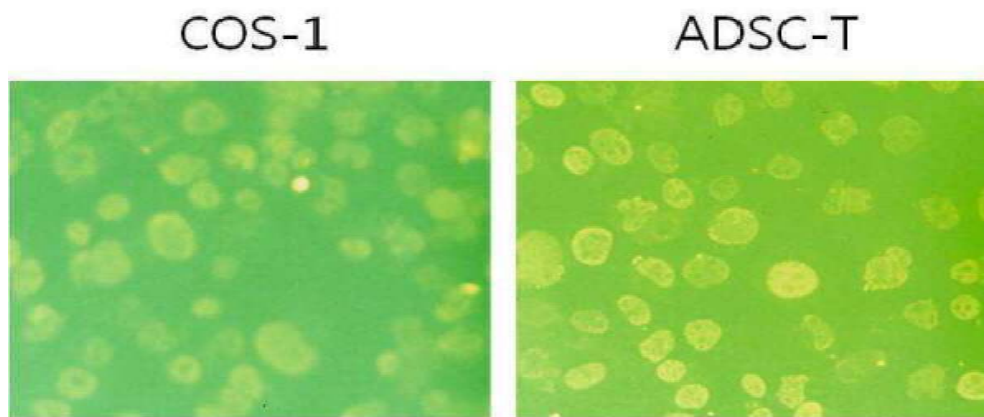
도면2



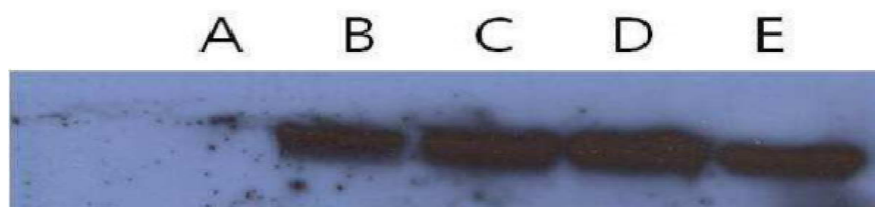
도면3



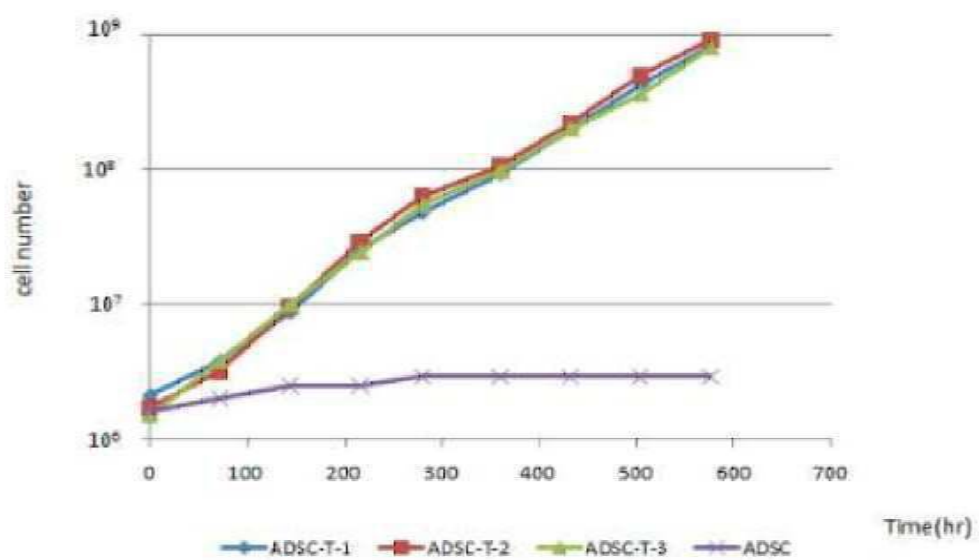
도면4



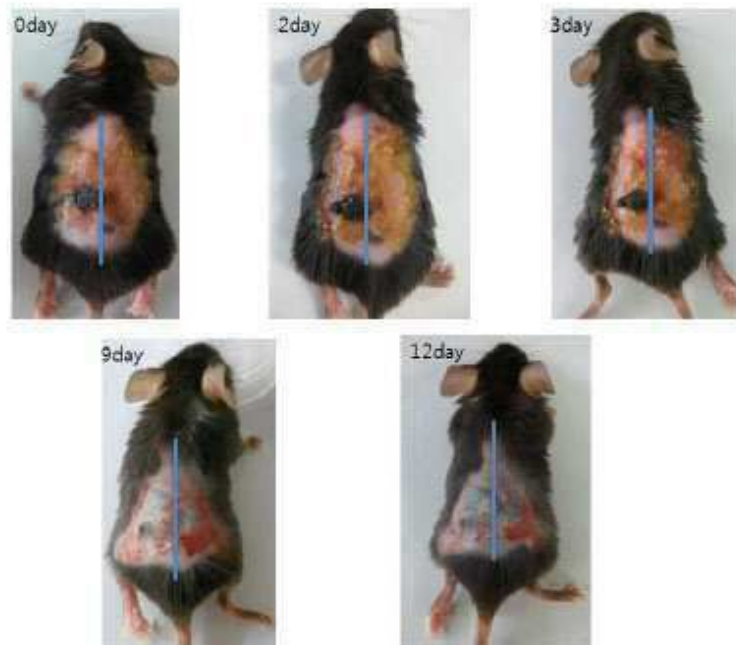
도면5



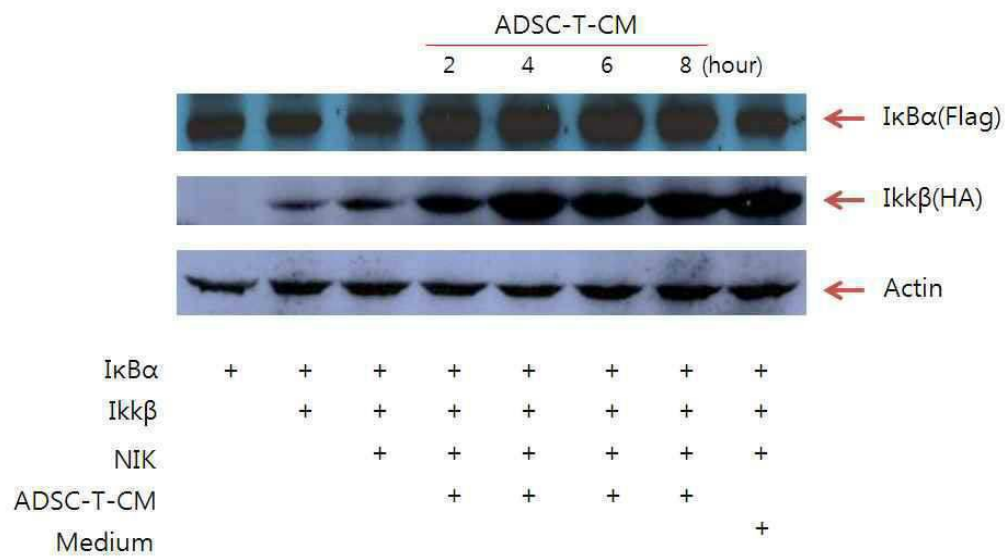
도면6



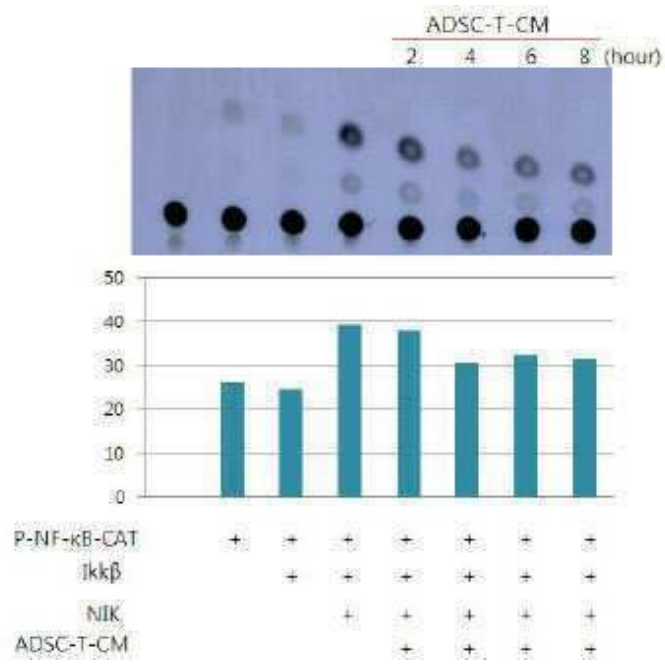
도면7



도면8



도면9



도면10

