



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0081613
(43) 공개일자 2017년07월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/12 (2015.01) A61K 35/28 (2015.01)
(52) CPC특허분류
A61K 35/12 (2013.01)
A61K 35/28 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0083337(분할)
(22) 출원일자 2017년06월30일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2015-0024205
원출원일자 2015년02월17일
심사청구일자 2015년02월17일
(30) 우선권주장
1020140018132 2014년02월17일 대한민국(KR)

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
정성애
서울특별시 서초구 신반포로23길 80, 602호 (잠원동, 오피라하우스)
박주원
서울특별시 양천구 목동동로 350, 512동 106호 (목동, 목동신시가지아파트5단지)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
안소영

전체 청구항 수 : 총 5 항

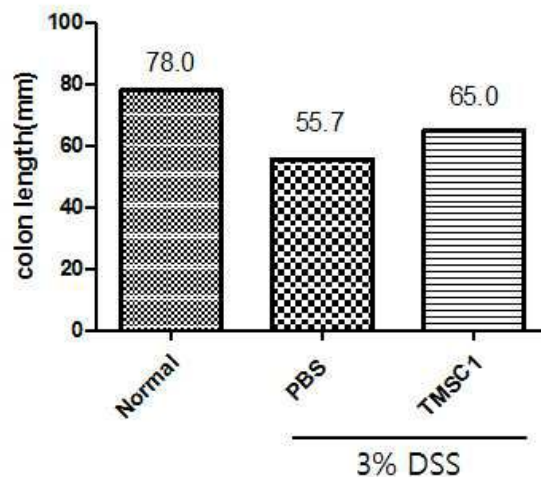
(54) 발명의 명칭 편도 유래 중간엽 줄기세포를 포함하는 만성 염증성 장질환 예방 또는 치료용 약학 조성물

(57) 요약

본 발명은 편도 유래 중간엽 줄기세포(Tonsil-derived mesenchymal stem cells, TMSC)를 유효성분으로 포함하는 만성 염증성 장질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 편도 유래 중간엽 줄기세포(TMSC)를 유효성분으로 함유하는 조성물은 만성 염증성 인자의 발현을 감소시키고 만성 염증성 장 질환에 따른 염증, 질병 활성을 감소시키며, 특히 타 유래 줄기세포와 대비하여 질환의 예방 또는 치료에 현저한 효과를 보이는바, 만성 염증성 장질환의 예방 또는 치료에 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도6



(72) 발명자

김한수

서울특별시 영등포구 의사당대로 110, E동 503호
(여의도동, 미성아파트)

우소연

서울특별시 마포구 독막로 209, 103동 1501호 (신수동, 세양청마루아파트)

유경하

서울특별시 강남구 영동대로118길 76, 102동 202호 (삼성동, 삼성동대우멤버스카운티1차)

정성철

서울특별시 서초구 명달로4길 68, A동 502호 (서초동, 서초네스피아)

조인호

충청남도 천안시 서북구 천안대로 999-7, 101동 2001호 (두정동, 이안더센트럴)

송은미

서울특별시 송파구 풍성로26길 31, 202동 604호 (풍납동, 송파현대힐스테이트)

김성은

서울특별시 강남구 압구정로 201, 80동 503호 (압구정동, 현대아파트)

유연실

서울특별시 중구 다산로 32, 15동 1301호 (신당동, 남산타운)

박윤신

서울특별시 구로구 새말로 31, 110동 402호 (구로동, 롯데구로아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345205083

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기초연구사업(학술진흥)(2013)-일반연구자지원사업-기본연구(모험연구)

연구과제명 면역 불균형으로 인한 질병 발생 기전의 새로운 해석과 세포치료 신기술 연구

기 여 율 1/1

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2013.06.01 ~ 2016.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

편도 유래 중간엽 줄기세포(TMSC)를 유효성분으로 포함하는 만성 염증성 장질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물로서,

상기 만성 염증성 장질환은 궤양성 대장염 또는 크론병인, 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 조성물은 정맥 또는 복강 내 투여용으로 제형화되는 것인 만성 염증성 장질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 염증성 장질환의 예방 또는 치료는 설사 감소, 혈변 감소 또는 장 길이 증가 중 어느 하나 이상에 의한 것인 만성 염증성 장질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 염증성 장질환의 예방 또는 치료는 인터루킨-6 및 TNF- α 의 감소에 의한 것인 만성 염증성 장질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 편도 유래 중간엽 줄기세포는 인터루킨-1 β 로 선처리된 것인 만성 염증성 장질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 염증성 장질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 줄기세포(stem cell)는 생물 조직을 구성하는 다양한 세포들로 분화할 수 있는 세포로서 배아, 태아 및 성체의 각 조직에서 얻을 수 있는 분화되기 전 단계의 미분화 세포들을 총칭한다. 최근 들어, 기관 재생과 면역반응 조절 능력을 가지는 성체 줄기세포에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 현재 임상 및 연구에서 사용되고 있는 성체 줄기세포의 공급원은 골수, 지방세포, 체대혈 등이 있다.

[0003] 그러나, 중간엽 줄기세포 중에서도 몇몇 줄기세포는 그 이용에 있어서 세포를 얻는데 큰 제한이 있기 때문에 그 이용이 어렵다. 예를 들어, 가장 비침습적인 방법을 이용해 얻을 수 있는 세포는 골수채취를 통한 중간엽 줄기세포이다. 하지만 가장 비침습적인 방법인 골수채취는 마취가 필요하고 고통을 유발하여, 그 이용에 제한이 있다. 이에 대한 대안으로 환자 맞춤형 줄기세포를 분리하기 위해 말초혈액을 이용한 세포획득법 등이 요구되고 있으나 말초 혈액만으로는 성인에서 분리할 수 있는 중간엽 줄기세포의 수가 너무 적고 분리방법이 경제적이기 못하며, 분리해낸다고 해도 세포치료에 사용가능한 양만큼 증식이 원활하지 않은 경우가 대부분이기에 실용성을 높일 수 있는 대체 방안이 필요하다. 또한, 고령인 환자에서 얻는 성체 줄기세포는 낮은 연령에게서 얻는 세포들에 비해 그 이용 가능성이 현저히 떨어지며 각종 인자들의 분비 및 줄기세포의 병변으로 이동 능력 등이 떨어지기 때문에, 저연령의 환자로부터 자연스럽게 분리될 수 있거나 버려지는 조직으로부터 세포를 얻을 필요성이 있다.

[0004] 한편, 염증성 장질환(Inflammatory bowel disease, IBD)은 위장관 내에 급성 또는 만성적인 염증을 유발하는 질

환으로, 복통, 발열, 설사, 하혈 등의 증상을 수반한다. 대체로, 궤양성 대장염(Ulcerative colitis, UC)과 크론병(Cron's disease, CD)의 2가지 형태로 분류되는데, 궤양성 대장염은 주로 점막을 침범하여, 자주 문드러짐이나 궤양을 형성하는 대장의 원인불명의 확산성 비특이성 염증(diffuse nonspecific inflammation)의 일종으로서 혈성 설사를 비롯하여 다양한 전신 증상을 수반한다. 크론병은 구강에서 항문까지 전 소화관을 비연속성으로 점막에서 장관(腸管) 전 층에 궤양, 섬유화, 협착과 병변이 진전되는 원인불명의 육아종성 염증성 병변으로, 복통, 만성 설사, 발열, 영양장애 등의 전신 증상을 수반한다.

[0005] 상기 염증성 장질환의 발병원인은 아직까지 구체적으로 밝혀져 있지 않으나, 면역기능의 이상이 관여하는 것으로 알려져 있는데, 이에 관여하는 면역학적 요인으로는 선천적 면역성, 사이토카인(Cytokine)의 생성, CD4의 활성화 등이 알려져 있으며, 특히 사이토카인이 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있는데, 염증 부위에서 종양괴사인자(Tumor necrosis cytokine; TNF- α), 인터루킨(Interleukin; IL)-1, IL-6, IL-8 생성이 염증성 장질환(Inflammatory bowel disease, IBD) 환자에게 현저하게 증가되는 것이 확인되었다.

[0006] 이러한 염증성 장질환의 근본적 치료법은 확립되어 있지 않다. 이 때문에 완전한 치료를 목표로 하는 것이 아니라, 증상을 완화시키고, 상태를 가능한 장기간 유지하는 약제가 사용되고 있는 실정이다. 약제로서 주로 아미노살리실산제, 부신피질 스테로이드제, 면역억제제 등이 사용되지만, 다양한 부작용이 보고되고 있다. 예를 들어, 아미노살리실산 제제로서 자주 사용되는 살라조설파피리딘은 구역질, 구토, 식욕부진, 발진, 두통, 간장해, 백혈구 감소, 이상 적혈구, 단백뇨, 설사 등의 부작용이 보고되고 있다. 또한 부신피질스테로이드제는 일반적으로는 프레드니솔론의 경구투여, 관장, 좌약, 정맥 주사 등으로 사용되지만, 위궤양이나 장기사용에 의한 대퇴골두 괴사 등 부작용이 강하다.

[0007] 이러한 배경 하에, 안전하고 효과가 현저한 염증성 장질환에 대한 치료제의 개발이 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 편도 유래 중간엽 줄기세포(Tonsil-derived mesenchymal stem cells)를 유효성분으로 포함하는 염증성 장질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명자들은 부작용이 없고 인체 적용에 적합한 염증성 장질환 치료제 관하여 연구 개발을 수행하던 중, 편도 유래 중간엽 줄기세포가 염증성 장질환의 예방 또는 치료에 현저한 효과를 가짐을 발견하고 본 발명을 완성하였다.

[0010] 본 발명은 편도 유래 중간엽 줄기세포(Tonsil-derived Mesenchymal stem cells, TMSC)를 유효성분으로 포함하는 염증성 장질환의 예방 및 치료용 약학 조성물을 제공한다. 즉, 개체로부터 분리, 배양 및 특수한 조작을 통해 제조된 세포 및 조직으로 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품으로 사용되어 염증성 장질환의 예방 및 치료에 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 편도 유래 중간엽 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 조성물은 염증성 장질환의 예방 또는 치료 용도로 지금까지 알려진 바가 없으며, 특히 타 유래 줄기세포와 대비하여 질환의 예방 또는 치료에 현저한 효과를 보이는바, 염증성 장질환의 예방 또는 치료에 유용하게 이용될 수 있다.

[0011] 본 발명의 용어 "줄기세포"란, 자기 복제 능력을 가지면서 두 개 이상의 새로운 세포로 분화하는 능력을 갖는 세포를 의미하며, 만능 줄기세포(Totipotent stem cell), 전분화능 줄기세포(Pluripotent stem cells), 다분화능(다능성) 줄기세포(Multipotent stem cells)로 분류할 수 있다. 만능 줄기세포(Totipotent stem cells)란, 하나의 완전한 개체로 발생해 나갈 수 있는 만능의 성질을 가진 세포로 난자와 정자의 수정 이후 8 세포기까지의 세포가 이러한 성질을 가지며 이 세포를 분리하여 자궁에 이식하면 하나의 완전한 개체로 발생해 나갈 수 있는 세포를 의미한다. 전분화능 줄기세포(Pluripotent stem cells)란, 외배엽, 중배엽, 내배엽층 유래의 다양한 세포와 조직으로 발생할 수 있는 세포로서, 수정 4 내지 5일 후 나타나는 배반포(Blastocyst)의 안쪽에 위치한 내세포괴(Inner cell mass)에서 유래하며, 이를 배아 줄기 세포라 하며 다양한 다른 조직 세포로 분화되지만 새로운 생명체를 형성하지는 못하는 세포를 의미한다. 줄기세포는 그 유래 및 특성에 따라 상이한 분화능, 증식능 및 면역학적 특성을 지닐 수 있다.

[0012] 본 발명에서 용어 "편도(Tonsil)"란, 목의 안쪽과 코의 뒷부분에 위치하여, 외부에서 침입하는 세균 등의 물질로부터 일차적으로 우리 몸을 방어함과 동시에 림프상피 면역조직으로 작용을 수행하는 조직을 의미한다. 상기

편도는 인두편도, 귀인두관편도, 구개편도, 혀편도 등을 포함한다. 본 발명에 있어서 상기 편도는 편도 유래 중간엽 줄기세포를 제공하는 원천조직으로 사용된다.

[0013] 본 발명의 용어 "편도 유래 줄기세포(Tonsil-derived Mesenchymal stem cell, TMSC)"는 편도에서 유래한 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cells; MSCs)를 의미한다.

[0014] 본 발명에 있어서, 편도 유래 중간엽 줄기세포는 당업계에서 알려진 방법에 따라 편도로부터 추출 가능하며, 예컨대, 편도 유래 중간엽 줄기세포(TMSC)는 편도선 절제수술을 받은 환자에게서 분리한 편도선 조직으로부터 채취하여 사용할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 환자에게서 분리한 편도선 조직으로부터 채취할 경우 채취한 편도조직을 완충액으로 세척한 후, 효소혼합액을 처리하여 결합조직을 분해하고, 이때 부유된 조직을 원심 분리하고, 잘라진 조직 내의 세포 혼합액을 피콜파크용액을 이용한 세포분획법과 원심분리법으로 하층의 침전된 부분만을 배양하고, 세포바닥에의 부착능을 보이는 세포부분만을 분리한 후, 배양접시 바닥에의 부착능을 보이는 세포 중 세포표면 표지자를 이용한 면역화확방법을 이용하여 편도 유래 중간엽 줄기세포를 분리하여 사용할 수 있다.

[0015] 본 발명의 편도 유래 중간엽 줄기세포는 인터루킨-1 β (IL-1 β)로 선처리된 편도 유래 중간엽 줄기세포일 수 있다. 편도 유래 중간엽 줄기세포에 인터루킨-1 β (IL-1 β)의 선처리는 세포의 염증 유발 표적 장기로의 이동을 향상시키고, 면역조절능을 증가시키는 측면에서 편도 유래 중간엽 줄기세포의 염증성 장질환의 예방 또는 치료 효과를 현저히 증진시킨다. 인터루킨-1 β (IL-1 β)의 선처리는 편도 유래 중간엽 줄기세포 5x10⁵ 개당 10ng 내지 20ng의 농도를 72 내지 96시간동안 처리하는 것이 바람직하다.

[0016] 본 발명에 따른 편도 유래 중간엽 줄기세포는 소아 청소년에서 가장 흔하게 행해지는 편도절제술 후 폐기되는 편도조직을 사용하는 것이기 때문에 줄기세포를 얻기 위한 별도의 침습적인 절차를 거치지 않고 충분한 세포 양을 확보할 수 있다. 또한 급성 염증성 장질환 뿐만 아니라 만성 염증성 장질환에서도 현저한 치료 효과를 보이며, 타 유래 줄기세포와 대비하여서도 염증 유발 표적 장기로의 이동성이 크며 면역 조절능이 우수한바, 실제 임상에서 적용할 염증성 장질환 치료에 병태생리학적으로 더 부합하는 약학 조성물에 해당한다.

[0017] 본 발명에 있어서, 염증성 장질환(Inflammatory bowel disease, IBD)이란 복통, 발열, 설사, 하혈 등의 증상을 수반하면서, 위장관 내에 급성 또는 만성적인 염증을 유발하는 질환을 의미한다. 상기 염증성 장질환은 예컨대, 궤양성 대장염(Ulcerative colitis, UC)과 크론병(Cron's disease, CD)의 2가지 형태를 포함할 수 있다. 궤양성 대장염은 주로 점막을 침범하여 자주 문드러짐이나 궤양을 형성하는 대장의 원인불명의 확산성 비특이성 염증(diffuse nonspecific inflammation)의 일종으로서, 혈성 설사를 비롯하여 다양한 전신 증상을 수반한다. 크론병은 구강에서 항문까지 전 소화관을 비연속성으로 점막에서 장관 전 층에 궤양, 섬유화, 협착과 병변이 진전되는 원인불명의 육아종성 염증성 병변으로, 복통, 만성 설사, 발열, 영양장애 등의 전신 증상을 수반한다.

[0018] 또한, 상기 염증성 장질환은 질병 이환의 기간에 따라 급성 염증성 장질환 또는 만성 염증성 장질환으로 나눌 수 있다. 임상에서 통상적으로 표현하는 급성 염증성 장질환은 질병의 이환 기간이 단기적이며 질병의 진행이 급속하여 치료에 반응할 경우 완치에 이르나 반응하지 않을 경우 전신적인 영향으로 치사에까지 이르게 할 수 있는 상태이다. 만성 염증성 장질환은 질병 이환이 상당 기간 지속되며 염증의 악화와 호전을 반복하고 서서히 장의 변형 및 기능 소실에 이르게 하며, 악화된 염증의 활성도가 얼마나 심각한지에 따라 치사 가능성과 장애의 정도가 결정되는 상태이다. 임상에서 대표적인 급성 염증성 장질환은 감염성 장염이 가장 흔하다. 만성 염증성 장질환은 크론병, 궤양성 대장염, 베체트 장염을 포함한다. 본 약학 조성물이 치료 목적으로 하는 질환은 바람직하게 만성 염증성 장질환일 수 있다.

[0019] 본 발명에서 용어, "예방"이란, 상기 약학 조성물의 투여로 염증성 장질환을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[0020] 본 발명의 "치료"는 치료하고자 하는 개개인 또는 세포의 천연 과정을 변경시키기 위해 임상적으로 개입하는 모든 행위를 의미하는데, 임상 병리 상태가 진행되는 동안 또는 이를 예방하기 위해 수행할 수 있다. 목적하는 치료 효과에는 질병의 발생 또는 재발을 예방하고, 증상을 완화시키며, 질병에 따른 모든 직접 또는 간접적인 병리학적 결과를 저하시키며, 전이를 예방하고, 질병 진행 속도를 감소시키며, 질병 상태를 경감 또는 일시적 완화시키며, 차도시키거나 예후를 개선시키는 것이 포함된다. 본 발명의 목적상 상기 치료는 상기 약학 조성물의 투여로 염증성 장질환의 증세가 호전되거나 완치되는 모든 행위를 포함하는 것으로 해석될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다.

[0021] 본 발명의 염증성 장질환(Inflammatory bowel disease, IBD)의 예방 또는 치료용 조성물의 투여량은 환자의 상

태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의하여 적절하게 선택될 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 유효량은 바람직한 효과를 주기 위해 요구되는 화합물의 양이다. 유효량은 당업자에게 인식되어 있듯이 투여의 경로, 부형제의 사용 및 다른 약제와 함께 사용할 수 있는 가능성에 따라 변할 수 있다. 본 약학 조성물은 세포 생존률이 50% 이상(즉 세포군 속의 세포 중 적어도 50 %가 기능을 발휘하거나 살아 있음)인 세포군을 포함할 수 있다. 적어도 세포군 속 세포의 60 %가 생존하고 있는 것이 바람직하다. 더 바람직하게는 상기 약학 조성물 속 세포군 세포의 생존률이 적어도 70 %, 80 %, 90 %, 95 % 또는 99 %이다. 또한 상기 약학 조성물의 농도는 1ml 당 1×10^5 개 내지 1×10^9 개, 바람직하게는 1×10^6 개 내지 2×10^8 개, 보다 바람직하게는 1×10^7 개 일 수 있다.

- [0022] 또한, 본 발명의 약학 조성물은 생착(engraftment)을 촉진하는 화합물(예를 들어 항-T세포 수용체 항체, 면역억제제 등), 알부민, 텍스트란 40, 젤라틴, 하이드록시에틸 전분 등의 안정제를 하나 이상 포함할 수 있다.
- [0023] 본 발명의 염증성 장질환의 예방 또는 치료용 조성물의 투여 형태는 단독으로 또는 다른 약학적 활성 화합물과 결합뿐만 아니라 적당한 집합으로 사용될 수 있다.
- [0024] 본 발명의 염증성 장질환의 예방 또는 치료용 조성물은, 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 잘 알려진 방법을 사용하여 약학적 제형으로 제조될 수 있다. 제형의 제조에 있어서, 활성 성분을 담체와 함께 혼합 또는 희석하거나, 용기 형태의 담체 내에 봉입시키는 것이 바람직하다.
- [0025] 따라서, 본 발명의 염증성 장질환의 예방 또는 치료용 조성물은, 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화 하여 사용될 수 있고, 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [0026] 예를 들어, 본 발명의 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.
- [0027] 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들어, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크같은 윤활제들도 사용된다.
- [0028] 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되고, 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들어 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0029] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성 용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로세라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0030] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 본 발명의 편도 유래 중간엽 줄기세포(TMSC)를 유효성분으로 포함하는 염증성 장질환의 예방 또는 치료용 세포치료제를 제공한다.
- [0031] 본 발명에 있어서, 용어 "세포치료제"는 개체로부터 분리, 배양 및 특수한 조작을 통해 제조된 세포 및 조직으로 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품(미국 FDA규정)으로서, 세포 혹은 조직의 기능을 복원시키기 위하여 살아있는 자가, 동종, 또는 이종세포를 체외에서 증식 선별하거나 다른 방법으로 세포의 생물학적 특성을 변화시키는 등의 일련의 행위를 통하여 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품을 의미한다.
- [0032] 본 발명의 세포치료제는 1ml 당 1.0×10^5 개 내지 1.0×10^9 개, 바람직하게는 1.0×10^6 개 내지 1.0×10^8 개, 보다 바람직하게는 1.0×10^7 개의 세포를 포함할 수 있다.
- [0033] 본 발명의 세포치료제는 동결되지 않은 채 사용되거나 차후 사용을 위해 동결될 수 있다. 동결되어야 할 경우,

표준 냉동보존제 (예를 들어 DMSO, 글리세롤, 에피라이프 (Epilife[®]) 세포 동결 배지 (Cascade Biologics))가 동결 전 세포 집단에 첨가될 수 있다.

[0034] 또한, 상기 세포치료제는 약학적 분야의 통상의 방법에 따라 환자의 신체 내 투여에 적합한 단위투여형의 약학적 제제로 제형화시켜 투여할 수 있으며, 상기 제제는 1회 또는 수회 투여에 의해 효과적인 투여량을 포함한다. 이러한 목적에 적합한 제형으로는 비경구투여 제제로서 주사용 앰플과 같은 주사제, 주입 백과 같은 주입제, 및 에어로졸 제제와 같은 분무제 등이 바람직하다. 상기 주사용 앰플은 사용 직전에 주사액과 혼합 조제할 수 있으며, 주사액으로는 생리 식염수, 포도당, 만니톨, 링거액 등을 사용할 수 있다. 또한, 주입 백은 염화폴리비닐 또는 폴리에틸렌 재질의 것을 사용할 수 있으며, 박스터 (Baxter), 벡톤 디킨슨 (Becton Dickinson), 메드셉 (Medcep), 내셔널 호스피탈 프로덕츠 (National Hospital Products) 또는 테루모 (Terumo) 사의 주입 백을 예시할 수 있다.

[0035] 상기 약학적 제제에는 상기 유효성분 외에 하나 또는 그 이상의 약학적으로 허용가능한 통상의 불활성 담체, 예를 들어, 주사제의 경우에는 보존제, 무통화제, 가용화제 또는 안정화제 등을, 국소 투여용 제제의 경우에는 기제 (base), 부형제, 윤활제 또는 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0036] 이렇게 제조된 본 발명의 세포치료제 또는 약학적 제제는 당업계에서 통상적으로 사용하는 투여방법을 이용하여 이식 및 기타 용도에 사용되는 다른 줄기세포와 함께 또는 그러한 줄기세포와의 혼합물의 형태로 투여될 수 있으며, 바람직하게는 치료가 필요한 환자의 질환 부위에 직접 생착 또는 이식하거나 복강에 직접 이식 또는 주입하는 것이 가능하나 이에 한정되지는 않는다. 또한, 상기 투여는 카테터를 이용한 비외과적 투여 및 질환부위 절개 후 주입 또는 이식 등 외과적 투여방법 모두 가능하나 카테터를 이용한 비외과적 투여방법이 보다 바람직하다. 또한 통상의 방법에 따라 비경구적으로, 예를 들면 직접 병변에 투여하는 것 외에 조절계 줄기세포 이식의 일반적 방법인 혈관 내 주입에 의한 이식도 가능하다.

[0037] 상기 편도 유래 중간엽 줄기세포(TMSC)의 1일 투여량은 1.0×10^4 내지 1.0×10^{10} 세포/kg 체중, 바람직하게는 1.0×10^5 내지 1.0×10^9 세포/kg 체중을 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나, 유효성분의 실제 투여량은 치료하고자 하는 질환, 질환의 중증도, 투여경로, 환자의 체중, 연령 및 성별 등의 여러 관련 인자에 비추어 결정되어야 하는 것으로 이해되어야 하며, 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0038] 본 발명에 따르면, 편도 유래 중간엽 줄기세포(TMSC)가 포함된 약학조성물은 급성 또는 만성 염증성 장질환에서 대장 길이를 회복시키며, 표피 상피층을 회복시키고, 설사 및 혈변을 감소시키며, 음와 손상을 감소시킨다. 특히, 질병활성도(Disease activity index, DAI) 및 대장 길이 측면에서 현저한 예방 및 치료 효과를 보인다. 또한, 인터루킨-6(IL-6), TNF- α 염증성 인자의 발현을 크게 감소시키고 항염증인자인 IL-10을 증가시킨다.

[0039] 이러한 결과를 통하여 편도 유래 중간엽 줄기세포(TMSC)에 의한 면역조절활성에 의해 상기 조성물이 염증성 장질환의 예방 및 치료에 유용할 수 있음을 알 수 있었다.

[0040] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 편도 유래 중간엽 줄기세포(TMSC)를 포함하는 약학 조성물 또는 세포치료제를 염증성 장질환을 가진 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 염증성 장질환 치료 방법을 제공한다.

[0041] 편도 유래 중간엽 줄기세포(TMSC)를 포함하는 약학 조성물 및 세포치료제는 상기에서 설명한 바와 같다.

[0042] 본 발명의 용어 "개체"란, 상기 염증성 장질환이 발병될 가능성이 있거나, 또는 발병된 인간을 포함한 모든 동물을 의미한다. 본 발명의 조성물을 개체에 투여함으로써, 염증성 장질환을 완화 또는 치료할 수 있다.

[0043] 본 발명에서 용어, "완화"는 본 발명에 따른 조성물의 투여로 염증성 장질환이 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 말한다.

[0044] 본 발명의 약학조성물의 투여는 염증성 장질환 동물에 적용가능하며, 동물은 인간 및 영장류뿐만 아니라, 소, 돼지, 양, 말, 개, 쥐, 랫트 및 고양이 등의 가축을 포함한다.

[0045] 본 발명에서 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 본 발명의 약학조성물 또는 세포치료제를 도입하는 것을 의미하며, 편도 유래 중간엽 줄기세포(TMSC)의 이식을 포함한다. 본 발명의 약학 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있다.

[0046] 상기 약학 조성물은 목적 또는 필요에 따라 당업계에서 사용되는 통상적인 방법, 투여 경로, 투여량에 따라 적

절하게 개체에 투여될 수 있다. 투여 경로의 예로는 비경구, 피하, 복강 내, 폐 내, 및 비강 내로 투여될 수 있으며, 비경구 주입에는 근육 내, 정맥 내, 동맥 내, 복강 내 또는 피하투여가 포함된다. 또한 당업계에 공지된 방법에 따라 적절한 투여량 및 투여 횟수가 선택될 수 있으며, 실제로 투여되는 본 발명의 약학 조성물의 양 및 투여 횟수는 치료하고자 하는 증상의 종류, 투여 경로, 성별, 건강 상태, 식이, 개체의 연령과 체중, 및 질환의 중증도와 같은 다양한 인자에 의해 적절하게 결정될 수 있다.

[0047] 본 발명의 편도 유래 중간엽 줄기세포(TMSC)를 유효성분으로 포함하는 조성물 또는 세포치료제는 염증성 장질환이 발병한 개체 또는 발병 가능성이 있는 부위에 직접 주입될 수 있다. 바람직하게 편도 유래 중간엽 줄기세포(TMSC)를 유효성분으로 포함하는 조성물을 복강 또는 정맥으로 주입될 수 있다.

발명의 효과

[0048] 본 발명의 편도 유래 중간엽 줄기세포(TMSC)를 유효성분으로 함유하는 조성물은 염증성 인자의 발현을 감소시키고 염증성 장 질환에 따른 염증, 질병 활성을 감소시키며, 특히 타 유래 줄기세포와 대비하여 질환의 예방 또는 치료에 현저한 효과를 보이는바, 염증성 장질환의 예방 또는 치료에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0049] 도 1은 급성 염증성 장질환 동물 모델에서 편도 유래 중간엽 줄기세포(TMSC)의 복강 내 투여(ip)를 통한 질환의 예방 및 치료 효과 확인 방법에 관한 모식도이다.

도 2는 급성 염증성 장질환 동물 모델에서 편도 유래 중간엽 줄기세포(TMSC)의 정맥 투여(iv)를 통한 질환의 예방 및 치료 효과 확인 방법에 관한 모식도이다.

도 3은 편도 유래 중간엽 줄기세포(TMSC)를 복강 내 투여한 염증성 장질환 동물 모델에서 Disease Activity Index(DAI)를 확인한 결과를 나타내는 도이다.

도 4는 편도 유래 중간엽 줄기세포(TMSC)를 정맥 투여한 염증성 장질환 동물 모델에서 Disease Activity Index(DAI)를 확인한 결과를 나타내는 도이다.

도 5는 편도 유래 중간엽 줄기세포(TMSC)를 복강 내 투여한 염증성 장질환 동물 모델에서 대장 길이 변화를 확인한 결과를 나타내는 도이다.

도 6은 편도 유래 중간엽 줄기세포(TMSC)를 정맥 투여한 염증성 장질환 동물 모델에서 대장 길이 변화를 확인한 결과를 나타내는 도이다.

도 7은 편도 유래 중간엽 줄기세포(TMSC)를 복강내 투여한 염증성 장질환 동물 모델에서 장벽 조직의 변화를 보여주는 도면이다 (A; TMSC를 투여한 장의 근위부, B; TMSC를 투여한 장의 원위부, C; DSS를 투여한 장의 근위부, D; DSS를 투여한 장의 원위부).

도 8은 편도 유래 중간엽 줄기세포(TMSC)를 복강 내 염증성 장질환 동물 모델에서 조직학적 분석을 보여주는 도면이다.

도 9는 편도 유래 중간엽 줄기세포(TMSC)를 복강 내 투여한 염증성 장질환 동물 모델에서 염증유발 유전자의 발현변화를 보여주는 도면이다.

도 10은 편도 유래 중간엽 줄기세포(TMSC)를 복강내 투여한 장염동물모델 마우스에서 IL-6 유전자의 발현 정도를 보여주는 도면이다.

도 11은 급성 염증성 장질환 모델에서 편도 유래 중간엽 줄기세포 투여에 따른 치료 효과를 확인한 결과를 나타내는 도이다.

도 12는 만성 염증성 장질환 동물 모델에서 편도 유래 중간엽 줄기세포(TMSC)의 투여를 통한 질환의 예방 및 치료 효과 확인 방법에 관한 모식도이다.

도 13은 만성 염증성 장질환 동물 모델에서 편도 유래 중간엽 줄기세포 투여에 따른 Disease Activity Index를 확인한 결과를 나타내는 도이다.

도 14는 만성 염증성 장질환 동물 모델에서 편도 유래 중간엽 줄기세포 투여에 따른 대장 길이 변화를 확인한 결과를 나타내는 도이다.

도 15는 만성 염증성 장질환 동물 모델에서 편도 유래 중간엽 줄기세포 투여에 따른 IL-6 및 IL-10 변화를 확인한 결과를 나타내는 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0050] 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예, 제조예를 제시한다. 하기의 실시예, 제조예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예, 제조예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.
- [0051] **실시예 1: 편도 유래 중간엽 줄기세포(TMSC) 분리 및 배양**
- [0052] 이화여자대학교 목동병원 이비인후두경부외과의 환자 중에서 10세 미만의 6명의 환자 (남아 5인, 여아 1인, 평균 연령 7.2세)를 대상으로 편도선 절제술을 시행하였다. 본 연구수행은 임상윤리위원회의 심의를 통과하였다(ECT 11-53-02). 적출된 편도조직의 3분의 2는 임상조직검사에 사용하였으며, 나머지 3분의 1을 본 실험에 사용하였다.
- [0053] 획득한 편도조직을 생리식염수로 세척한 후, 효소혼합액 210 U/ml의 콜라겐분해효소 I(collagenase type I)(Invitrogen)과 10 μ g/ml DNase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)가 혼합된 세포배양액 RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute medium 1640, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA)에서 37 °C의 조건하에서 30분 동안 반응시켜 편도조직내의 결합조직을 분쇄하여 단일세포로의 분리를 유도하였다. 분쇄하였다. 부유된 조직을 원심분리, 여과하여 세포를 획득하였다. 획득한 세포를 RPMI 1640/20 % NHS (normal human serum) (PAA Laboratories, GmbH, Paching, Austria)로 2회 세척하고, RPMI 1640/10 % NHS로 1회 세척하였다. 세척된 세포를 Ficoll-Paque (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) 용액을 이용하여 농도구배 원심분리에 적용하여 단핵 세포들을 수득하였다. 상기 단핵세포 10⁸개를 10 % 우태혈청(Fetal bovine serum, FBS, Invitrogen), 100 μ g/ml 스트렙토마이신 및 100 U/ml 암피실린을 함유하는 DMEM-HG (Dulbecco's modified Eagle's medium-High Glucose) (Invitrogen)배지에 접종하고 48시간 동안 배양하였다. 배양이 종료된 후, 부착되지 않은 부유세포는 제거하고, 편도 유래 중간엽 줄기세포로 간주되는 부착된 세포는 4주에 걸쳐 3 내지 5세대까지 계대 배양하여 본 실험에 사용하였다.
- [0054] **실시예 2: 실험동물**
- [0055] 실험에 사용된 동물은 7 내지 8주령의 수컷 C57BL/6 마우스로 오리엔트 바이오사(Orient Bio Co., Ltd., Seoul, Korea)로부터 구입하였다. 마우스는 이화여자대학교 의학연구소의 동물 실험실에서 7일간의 적응기간 후 실험을 진행하였으며 적응기간 동안 물과 사료를 제한하지 않았다. 실험동물에 표준화된 환경을 제공하였으며, 12시간 간격으로 낮과 밤을 유지하였고, 실내 온도(23 $\pm$ 2 °C) 및 습도(55 내지 55 %)를 적정 수준으로 유지시켰다.
- [0056] **실시예 3: 급성 염증성 장질환 동물 모델에서의 편도 유래 중간엽 줄기세포의 치료 효과 확인**
- [0057] 실험에 사용된 마우스는 정상 대조군, dextran sulfate sodium (DSS) 염증성 장질환군, 편도 유래 중간엽 줄기세포(TMSC) 투여군으로 나누어 실험을 진행하였다. 정상 대조군을 제외한 마우스는 3% DSS (MP Biochemical, Irvine, CA, USA) 용액을 7일간 복용시켜 염증성 장질환을 유발하였으며, 정상 대조군 마우스는 같은 시간 동안 동량의 물을 제공하였다.
- [0058] 상기 염증성 장질환 동물 모델에 편도 유래 중간엽 줄기세포(TMSC)를 투여하는 방식은 복강내 투여 방법(Intraperitoneal injection, ip injection) 및 정맥 투여 방법(Intravenous injection, iv injection)으로 구분하여 진행하였으며, 이들 각각을 도 1 및 도 2에 나타내었다.
- [0059] 도 1에 나타난 바와 같이, 복강내 투여 방법은 염증성 장질환 유발 3일 제에 쥐의 복강 내로 편도 유래 중간엽 줄기세포(TMSC)를 주사하는 방법으로 1 x 10⁶ 세포를 투여하였다.
- [0060] 또한 도 2에 나타난 바와 같이, 정맥 투여 방법은 복강내 투여 방법과 동일한 실험 조건에서 편도 유래 중간엽 줄기세포(TMSC)를 쥐 꼬리 정맥을 통하여 투여하는 방식으로서, 상기 정맥 투여방법에서 1 x 10⁶ 개의 세포를 투여하여 실험을 진행하였다.
- [0061] **(1) Disease Activity Index (DAI) 측정에 의한 육안적 평가**
- [0062] 실시예 3의 편도 유래 중간엽 줄기세포(TMSC) 투여 방법으로 처리된 염증성 장질환 동물모델의 염증성 장질환의

강도를 측정하기 위하여 체중 변화, 변의 굳기, 변이나 항문에서 육안적으로 관찰되는 혈변 유무를 [표 1]의 질병활성도(DAI) 등급에 따라 7일 동안 매일 확인하여 질병활성도(DAI)를 측정하였다.

[표 1]

등급	체중감소	변 굳기	혈변 유무
0	체중변화 없음	정상	정상
1	1 내지 5 %	-	-
2	5 내지 10 %	묽은 변	감혈
3	10 내지 20 %	-	-
4	> 20 %	설사	육안적인 혈변

그 결과를 도 3 및 도 4에 나타내었다.

도 3은 복강 투여 방식에 따른 Disease Activity Index 분석 결과를 나타낸다. 복강내 투여방식으로 DSS를 투여한 마우스에서는 4일째부터 무른 변 및 육안적인 혈변이 보이기 시작하였으며 7일째에는 모든 마우스에서 설사와 혈변을 관찰할 수 있었다. 상기 육안적으로 관찰된 사항을 질병활성도(DAI)를 등급화하여 질병활성도(DAI)를 비교하였을 때, DSS 투여군보다 편도 유래 중간엽 줄기세포(TMSC) 투여군에서 투약 기간 동안 질병활성도(DAI)가 낮음을 확인하였다.

도 4는 복강 투여 방식에 따른 Disease Activity Index 분석 결과를 나타낸다. 정맥 투여방식으로 DSS를 투여한 마우스에서는 복강내 투여 방식과 마찬가지로 4일째부터 무른 변 및 육안적인 혈변이 보이기 시작하였으며 7일째에는 모든 마우스에서 설사와 혈변을 관찰할 수 있었다. 정맥 투여군의 질병활성도(DAI)는 편도 유래 중간엽 줄기세포(TMSC) 투여군에서 설사가 비교적 덜하고 혈변이 호전되며, 정맥투여군이 복강내 투여군보다 호전 효과가 더 큰 것을 확인하였다. 또한 임상 증상이 가장 심한 염증성 장질환 유발 7일째의 질병활성도(DAI)를 비교하였을 때 DSS 투여군에서 보다 편도 유래 중간엽 줄기세포(TMSC) 투여군에서의 질병활성도(DAI)가 낮음을 확인하였다.

상기 육안적인 분석 결과를 통하여, 편도 유래 중간엽 줄기세포(TMSC)의 투여가 염증성 장질환의 예방 및 치료에 현저한 효과를 가짐을 확인하였다.

(2) 조직학적 대장염 등급법(Histological Colitis Scoring System)에 의한 염증범위 분석

조직학적 기준에 의한 염증범위를 분석하기 위하여 염증성 장질환 유도 후 8일째된 마우스의 경추를 탈골시켜 희생시켰다. 상기 마우스를 희생시킨 후 맹장에서 항문까지 이르는 장을 적출하여 장 길이를 측정하였고, 장의 근위부와 원위부에서 검체를 채취하였다. 채취된 대장 조직은 포르말린에 고정시키고 헤마톡실린-에오신(hematoxylin-eosin)염색을 시행하였다. 조직학적인 분석은 [표 2]의 조직학적 대장염 등급법(Histological Colitis Scoring System)에 따라 각 검체의 염증 정도(Inflammation severity), 염증 범위(Inflammation extent), 음와손상(Crypt damage) 정도, 전체 대장의 손상 범위(Percent involvement, %)를 측정하여 각 변수를 합산한 결과를 분석하였다.

[표 2]

특징	등급	상대표현
염증 정도 (Inflammation severity)	0	염증없음
	1	가벼운 상태
	2	보통 상태
	3	심각한 상태
염증 범위 (Inflammation extent)	0	염증없음
	1	점막층
	2	점막하층
	3	전층
음와 손상 (Crypt damage)	0	손상없음
	1	기저 음와 1/3 손상
	2	기저 음와 2/3 손상
	3	음와 소실 ; 표면상피 존재
	4	음와 및 표면상피 소실
전체 대장의 손상범위 (Percent involvement)	0	0 %
	1	1 내지 25 %
	2	26 내지 50 %
	3	51 내지 75 %
	4	76 내지 100 %

복강 내 투여방식 및 정맥투여 방식으로 편도 유래 중간엽 줄기세포(TMSC)를 투여한 염증성 장질환 동물 모델의

대장길이를 측정하여 염증 범위를 분석하였다.

[0074] 그 결과를 도 5 및 도 6에 나타내었다.

[0075] 도 5는 복강내 투여방식에 의한 대장 길이를 측정한 결과를 나타낸다. 정상 대조군의 평균 대장 길이가 82.5 mm 인 반면 DSS 투여군은 62.0 mm로 통계적으로 유의하게 짧음을 확인하였다($P < 0.01$). 또한, 편도 유래 중간엽 줄기세포(TMSC) 투여군에서 대장 길이는 67.0 mm로 DSS 투여군(62.0 mm)에 비하여 편도 유래 중간엽 줄기세포(TMSC) 투여군에서 대장길이가 긴 경향을 나타내었다($P=0.073$).

[0076] 도 5는 정맥 투여방식에 의한 대장 길이를 측정한 결과를 나타낸다. 정맥 투여방식에 의한 대장길이를 측정한 결과, DSS 투여군은 55.7 mm인 것에 비하여 편도 유래 중간엽 줄기세포(TMSC) 투여군의 장길이는 65mm로 편도 유래 중간엽 줄기세포(TMSC) 정맥 투여군에서 장 길이의 감소가 적음을 확인하였다.

[0077] 상기의 두 가지 방식으로 편도 유래 중간엽 줄기세포(TMSC)를 투여한 염증성 장질환 동물 모델의 대장길이를 비교분석한 결과, 두가지 방식 모두에서 DSS 투여군에서 보다 편도 유래 중간엽 줄기세포(TMSC) 투여군의 장길이가 현저히 긴 것이 확인되었다.

[0078] 또한 편도 유래 중간엽 줄기세포(TMSC)를 처리한 군 및 DSS 투여군에서의 조직학적 상태를 비교하여 그 결과를 도 7에 나타내었다. 도 7의 A는 TMSC를 투여한 장의 근위부; B는 TMSC를 투여한 장의 원위부; C는 DSS를 투여한 장의 근위부; 및 D는 DSS를 투여한 장의 원위부를 나타낸다. 도 7에서 확인되는 바와 같이, DSS 투여군은 장벽 전체에 부종이 심하고, 상피층이 거의 소실되었으며 염증세포들은 점막하층과 근육층 일부까지 침윤되고, 음와(crypt)의 손상이 심하여 형태가 유지되지 않음이 확인되었다.

[0079] 또한, 상기 [표 2]의 조직학적 등급(Histologic Scoring System)을 적용하여 장의 염증의 정도를 평가한 결과를 도 8에 나타내었다. 편도 유래 중간엽 줄기세포(TMSC) 투여군(편도 유래 중간엽 줄기세포(TMSC)1)이 DSS 투여군(DSS)에 비하여 조직학적 등급점수가 낮음을 확인하였다.

[0080] 이러한 조직학적 등급정도를 합산한 결과로부터 DSS 투여군에 비하여 편도 유래 중간엽 줄기세포(TMSC) 투여군들에서 긴 대장길이, 표면상피층 존재 및 음와 손상이 적어 조직학적 점수가 낮음을 확인함으로써 편도 유래 중간엽 줄기세포(TMSC)가 염증성 장질환의 예방 및 치료에 현저한 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

[0081] (3) 편도 유래 중간엽 줄기세포 처리에 따른 염증매개물질의 변화

[0082] 실시예 3에서 채취한 검체는 -70°C 초저온 냉동고에 동결시켜 분석 전까지 보관하였다. 채취한 검체에 Easy-BLUETM (Intron biotechnology, Seoul, Korea)를 이용하여 RNA를 분리하였고, 분리된 RNA의 농도를 UV-spectrophotometer를 이용하여 260 nm에서 측정하였다.

[0083] RNA 2 μg 을 oligo dT primer 0.5 μg 에 넣고, 70°C 에서 10분간 반응시킨 후, Molony Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (MMLV RT)(Promega, Madison, Wisconsin, USA) 200 unit, RNasin Ribonuclease inhibitor(Promega, Madison, WI, USA) 25 unit를 첨가하여 42°C 에서 60분간 반응시켜 cDNA를 합성하였다. cDNA를 template로 사용하여 각각의 primer 5 pmol, Taq DNA polymerase (Promega, Madison, WI, USA) 1 unit, 5x polymerase reaction buffer, dNTP 200 μM 를 사용하여 증폭시켰다. 본 실험에서 사용한 primer의 염기서열은 [표3]과 같다.

[0084] [표 3]

프라이머	서열(5' 3')	서열번호
GAPDH-foward	TGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAG	1
GAPDH-reverse	TCCTTGGAGGCCATGTAGGCCAT	2
IL-1 β foward	GCAACTGTCTCTGAACCTCA	3
IL-1 β reverse	CTCGGAGCCTGTAGTGCAG	4
IL-6-foward	CCGGAGAGGAGACTTCACAG	5
IL-6-reverse	TCCACGATTTCACAGAGAAC	6
TNF- α -foward	ACGGCATGGATCTCAAAGAC	7
TNF- α -reverse	AGATAGCAAATCGGCTGACG	8
IFN- γ -foward	GCATCTTGGCTTTGCAGCTC	9
IFN- γ -reverse	CGACTCCTTTTCGGCTTCCT	10

[0085]

[0086]

상기 증폭산물은 2% agarose gel에 전기영동하여 Geldoc 2000 system(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 통해 mRNA 발현을 확인하였고 GAPDH mRNA 발현을 기준으로 IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- γ 와 같은 염증물질의 상대적인 발현량을 측정하였다.

[0087]

그 결과를 도 9에 나타내었다. IL-1 β , IL-6, TNF- α 및 IFN- γ 의 유전자 발현정도를 측정한 결과, 편도 유래 중간엽 줄기세포 처리에 따라 IL-1 β , IL-6, TNF- α 및 IFN- γ 가 감소하는 것이 확인되었다.

[0088]

특히, 도 10에 나타낸 바와 같이, IL-6 발현정도가 정상 대조군에 비하여 DSS 투여군에서 통계적으로 유의하게 증가하였으며($P < 0.05$), 또한 편도 유래 중간엽 줄기세포(TMSC) 투여군(TMSC1)에서의 IL-6 발현정도가 감소함을 확인하였다. 이러한 결과를 통하여 편도 유래 중간엽 줄기세포(TMSC)에 의해 IL-6의 발현정도가 낮아짐으로써 염증성 장 질환의 예방 또는 치료에 현저한 효과가 있음을 알 수 있었다.

[0089]

실시예 4: 급성 염증성 장질환 모델에서의 모델에서의 편도 유래 중간엽 줄기세포의 치료 효과 확인

[0090]

실험에 사용된 동물은 C57BL/6 마우스 수컷 7주령을 구입하고, 동물실험실에서 7일간의 적응기간 후 실험을 진행하였다. 급성 염증성 장질환 동물 모델에서 사용되는 마우스는 정상 대조군(Normal), DSS 투여군(DSS), 편도 유래 중간엽 줄기세포 투여군(TMSC)으로 나누어 실험을 진행하였다. 정상 대조군은 실험기간 동안 음용수(물)를 제공하였고, DSS 유도 급성 염증성 장질환은 3% DSS를 7일간 투여하였다.

[0091]

편도 유래 중간엽 줄기세포 투여군은 1×10^6 의 cell을 실험 시작 3일 때 투여하였고, 투여 방법을 복강내 투여(ip)와 정맥내 투여(iv)로 나누어 실시하였다.

[0092]

상기 실시예 3과 동일한 방식으로 Disease Activity Index, 대장 길이, Histologic grading 및 염증성 인자(IL-6 및 TNF- α)의 변화를 확인하여 그 결과를 도 11에 나타내었다.

[0093]

도 11의 A는 Disease activity index를 나타내며, B는 대장 길이 변화를 나타내며, C는 인터루킨-6의 발현변화를 나타내며, D는 TNF- α 의 발현 변화를 나타내며, E는 Histological Grading 결과를 나타낸다. 도 11에서 확인되는 바와 같이, 편도 유래 중간엽 줄기세포의 투여에 따라 Disease activity index가 DSS 투여군과 대비하여 감소되는 것이 확인되었으며, 대장 길이가 DSS 투여군보다 긴 것이 확인되었으며, 염증성 인자들로 인터루킨-6 및 TNF- α 발현이 감소되는 것이 확인되었으며, Histological Grading도 감소되는 것이 확인되었다.

[0094]

상기 결과들을 통하여 편도 유래 중간엽 줄기세포(TMSC)가 염증성 장 질환의 예방 또는 치료에 현저한 효과가 있음을 확인하였다.

[0095]

실시예 4: 만성 염증성 장질환 모델에서의 모델에서의 편도 유래 중간엽 줄기세포의 치료 효과 확인

[0096]

만성 염증성 장질환 모델에서 사용되는 마우스는 정상 대조군, DSS 투여군, HEK293 투여군, 편도 유래 중간엽 줄기세포 투여군으로 나누어 실험을 진행하였다. 정상 대조군은 실험기간 동안 음용수(물)를 제공하였고, DSS 투여군은 1.5% DSS와 음용수(물)을 5일씩 3회 반복 투여하였다. 편도 유래 중간엽 줄기세포 1×10^6 투여군의 투여시점을 6일, 9일, 12일, 16일째 투여하는 군을 포함하였으며, 투여 전에 편도 유래 중간엽 줄기세포가 IL-1 β 10ng로 72시간동안 처리된 군도 포함시켰다. 실험에 사용되는 편도 유래 중간엽 줄기세포는 계대(passage) 6~8

로 사용하였고, 배양은 DMEM(low glucose)에 10% FBS와 penicillin/streptomycin을 함유한 배지를 사용하였다. 세포의 투여는 복강 내 투여로 진행하였다. 실험 과정은 도 12에 모식도로 나타내었다.

[0097] 실험이 진행되는 동안 매일 disease activity index를 측정하여 점수로 기록하고, 실험 마지막 날에 마우스들을 희생시켜 장 조직과 혈액을 채취하였다. 채취된 장조직과 혈액을 이용하여 대장 길이를 분석하고, 인터루킨-6 및 인터루킨(IL-10)의 발현 변화를 측정하였다. 분석 결과는 도 14 내지 16에 나타내었다.

[0098] 도 14는 disease activity index 분석 결과를 나타낸다. 만성 염증성 장질환을 유도한 경우에, 편도 유래 중간엽 줄기세포를 일정 간격을 두고 투여하는 경우 disease activity index가 크게 감소되는 것이 확인되었으며 IL-1 β 로 선처리된 경우에도 disease activity index가 크게 감소되었다.

[0099] 도 15는 대장 길이 변화를 측정한 것으로, DSS 유도 만성 염증성 장질환 모델과 대비하였을 때, 정상 대조군은 81.7mm, DSS 투여군은 57.3mm, HEK293 투여군은 59.0mm, 편도 유래 중간엽 줄기세포를 간격을 두고 투여하는 군은 72.2mm, L-1 β 로 선처리 편도 유래 중간엽 줄기세포 처리군은 70.0mm으로 확인되어, 편도 유래 중간엽 줄기세포 투여 및 IL-1 β 로 선처리 편도 유래 중간엽 줄기세포 처리에 따라 대장 길이가 현저히 증가하는 것이 확인되었다.

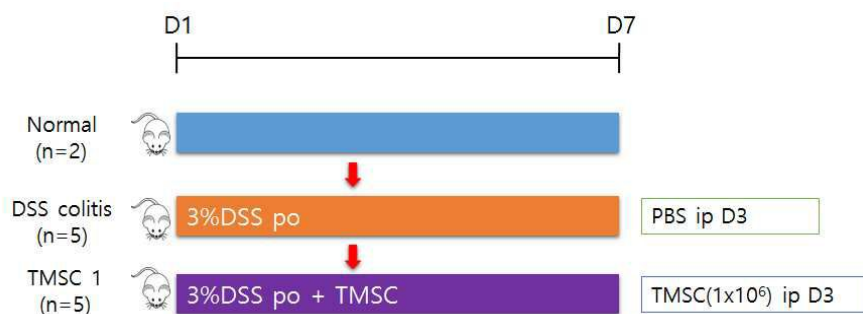
[0100] 도 16은 IL-6 및 IL-10의 발현 변화를 확인한 결과를 나타낸다. 도 16에서 확인되는 바와 같이, 편도 유래 중간엽 줄기세포의 처리에 따라 IL-6의 발현은 현저히 감소되었으며, IL-10의 경우 그 발현이 크게 증가되는 것이 확인되었다.

[0101] 상기 결과들로부터 본원 발명의 편도 유래 중간엽 줄기세포가 만성 염증성 장질환의 예방 및 치료에 현저한 효과를 보이는 것이 확인되었다.

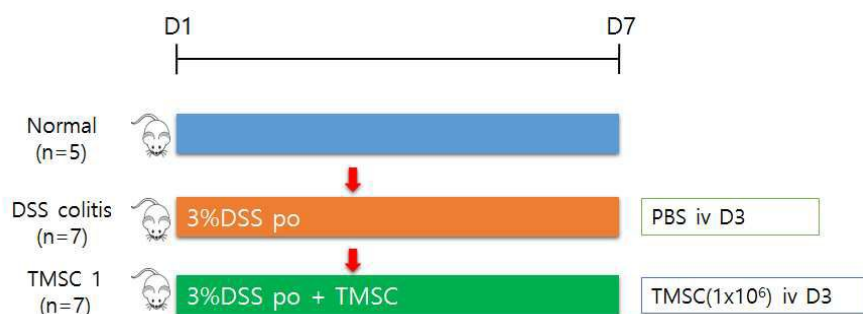
[0102] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

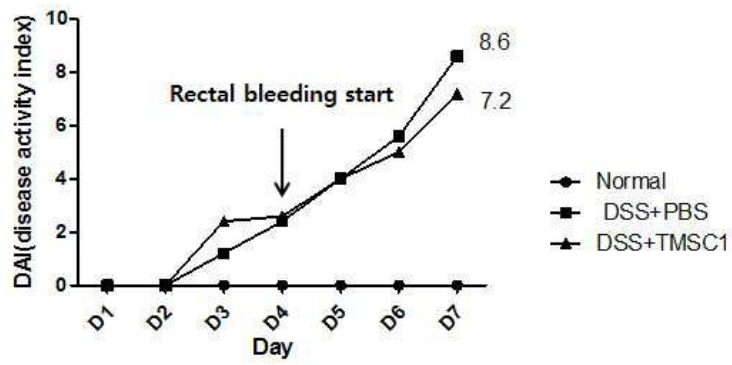
도면1



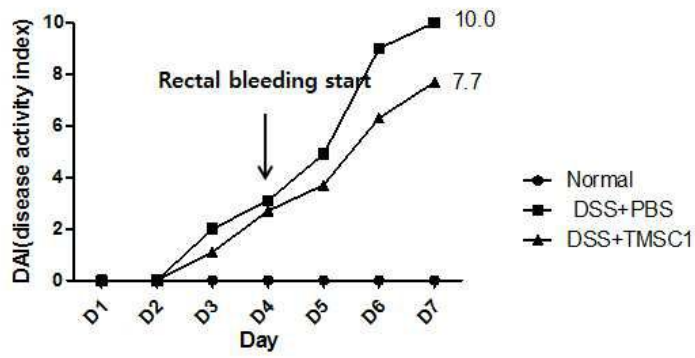
도면2



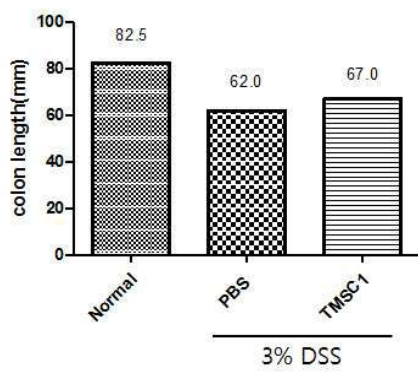
도면3



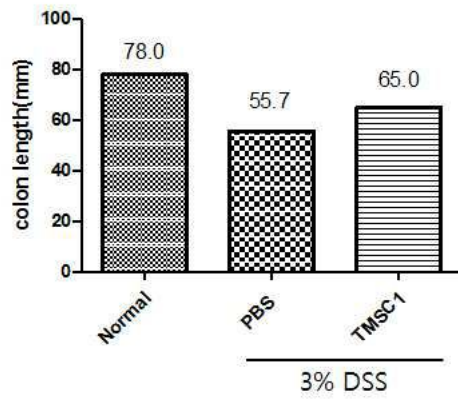
도면4



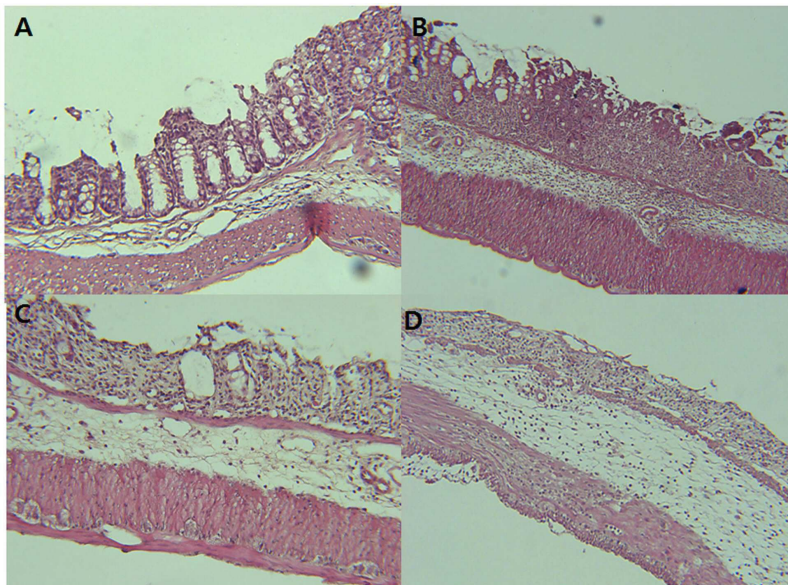
도면5



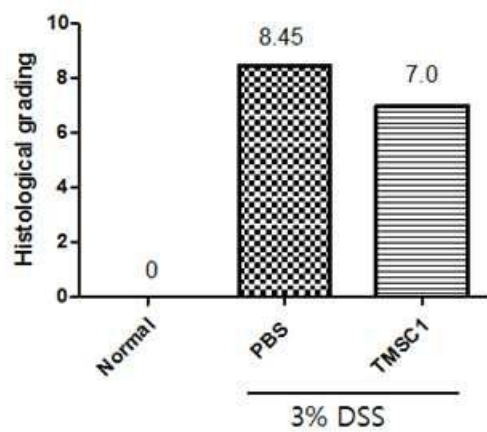
도면6



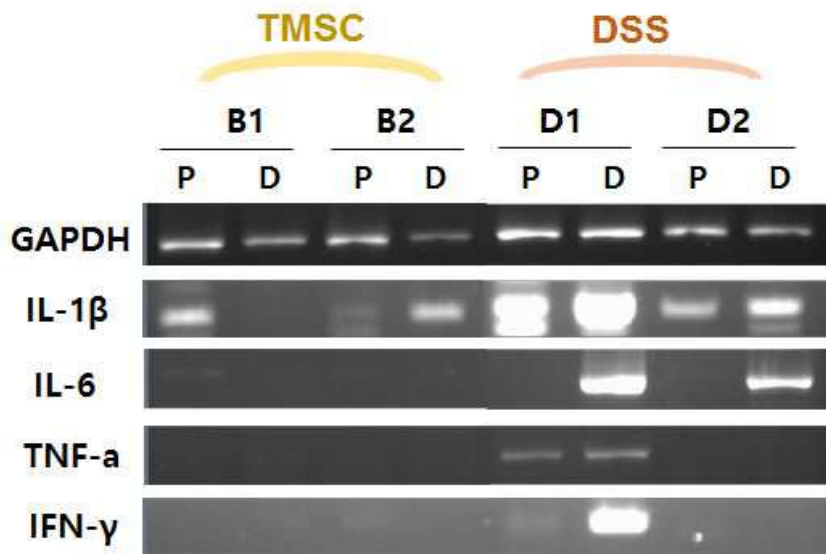
도면7



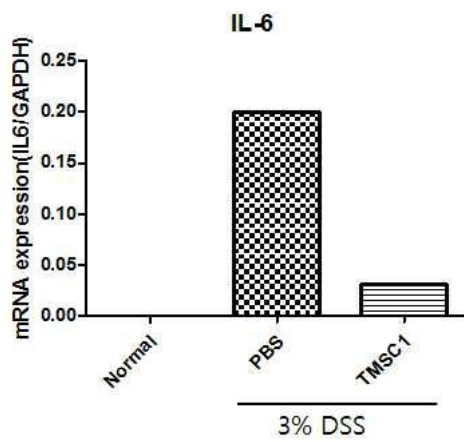
도면8



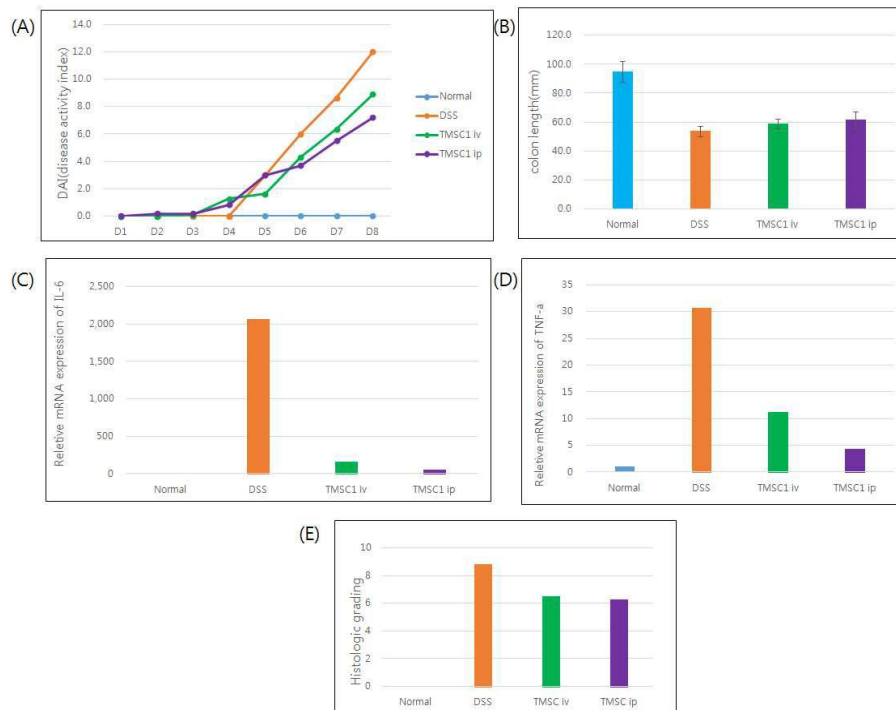
도면9



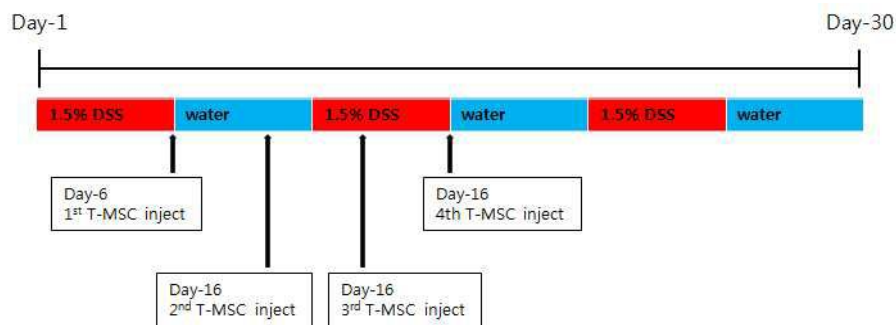
도면10



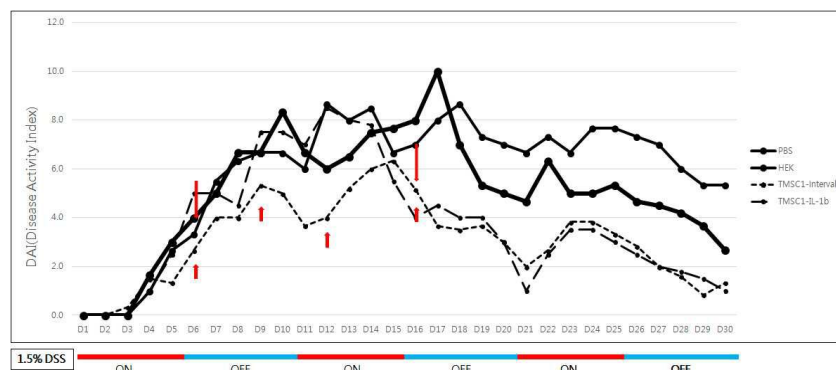
도면11



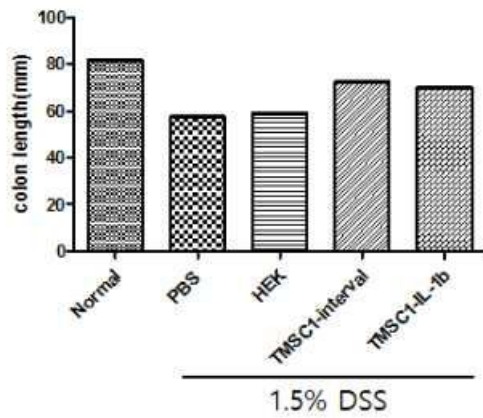
도면12



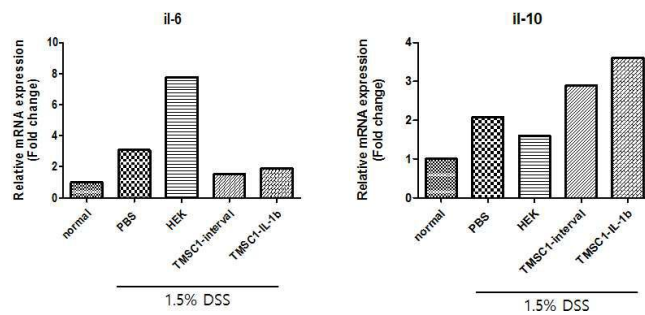
도면13



도면14



도면15



서열 목록

- <110> Ewha University - Industry Collaboration Foundation
- <120> Pharmaceutical composition comprising tonsil-derived mesenchymal stem cells for prevention or treatment of Inflammatory Bowel Disease
- <130> P14-128-REA-EWHA
- <150> 2014-0018132
- <151> 2014-02-17
- <160> 10
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 25
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> GAPDH forward primer
- <400> 1

tgatgacatc aagaaggtgg tgaag	25
<210> 2	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> GAPDH reverse primer	
<400> 2	
tccttgagg ccatgtaggc cat	23
<210> 3	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> IL-1b foward primer	
<400> 3	
gcaactgttc ctgaactca	19
<210> 4	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> IL-1b reverse primer	
<400> 4	
ctcggagcct gtagtgcag	19
<210> 5	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> IL-6 foward primer	
<400> 5	
ccggagagga gacttcacag	20
<210> 6	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> IL-6 reverse primer

<400> 6

tccacgattt cccagagaac

20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TNF-a foward primer

<400> 7

acggcatgga tctcaaagac

20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TNF-a reverse primer

<400> 8

agatagcaaa tcggctgacg

20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IFN-gamma forward primer

<400> 9

gcatcttggc ttgcagctc

20

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IFN-gamma reverse primer

<400> 10

cgactccttt tccgcttcct

20