



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0099743
(43) 공개일자 2017년09월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/28 (2015.01) A61K 35/35 (2014.01)
A61K 9/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 35/28 (2013.01)
A61K 35/35 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0120642
(22) 출원일자 2016년09월21일
심사청구일자 2016년09월21일
(30) 우선권주장
1020160021980 2016년02월24일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
나홍식
서울특별시 서초구 서초대로65길 13-10, 111동 1301호 (서초동, 서초래미안아파트)
이재희
서울특별시 강북구 솔샘로 159, 118동 201호 (미아동, 벽산라이브파크)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 무한

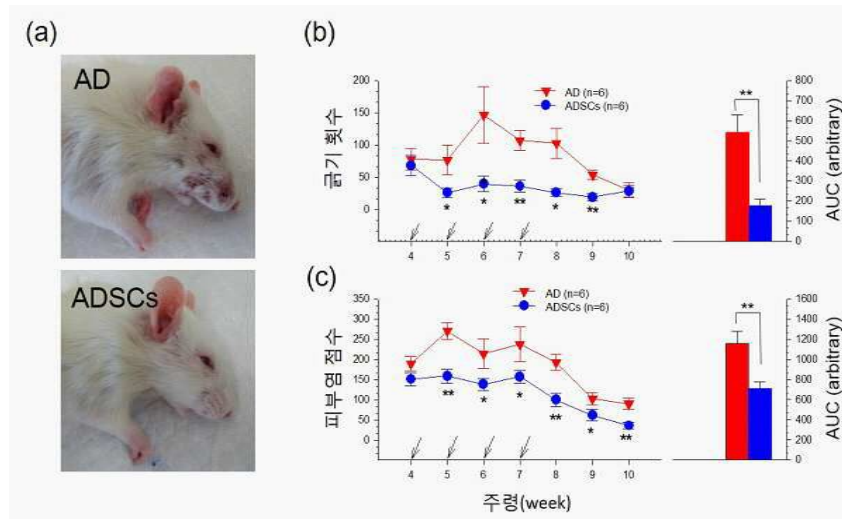
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 지방조직유래줄기세포를 함유한 아토피 피부염의 세포치료제 조성물 및 이를 이용한 세포치료법

(57) 요약

본 발명은, 지방조직유래줄기세포를 포함하는 세포치료제 조성물에 관한 것으로서, 본 발명의 세포치료제 조성물은 아토피 피부염에 특이적인 Th2 및 Th17의 면역반응을 억제시키고, 혈청 IgE 항체 양을 감소시킬 수 있다. 또한, 본 발명의 세포치료제 조성물은 피부의 항균물질인 CAMP의 생성을 촉진하여 황색포도상구균의 증식을 억제할 수 있으므로, 아토피 피부염 치료제로 활용될 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A61K 9/0019 (2013.01)

(72) 발명자

노봉일

서울특별시 강남구 역삼로 307, 204동 301호 (역삼동, 역삼아이파크)

백승근

서울특별시 강북구 솔샘로 159, 118동 201호 (미아동, 벽산라이브파크)

박이진

강원도 춘천시 시청길10번길 11, 302호 (조양동)

김혜영

서울특별시 노원구 동일로173길 36-32, 401호 (공릉동)

한대호

서울특별시 강남구 언주로30길 13, B동 1003호 (도곡동, 대림아크로빌)

명세서

청구범위

청구항 1

CD44, CD54 및 CD105 를 발현하는 지방조직유래줄기세포를 포함하는, 아토피 피부염 치료용 세포치료제 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 지방조직유래줄기세포는, 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*)에 대하여 증식억제 효과를 갖는 것인, 아토피 피부염 치료용 세포치료제 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 지방조직유래줄기세포는, 피부 조직 내 CAMP (cathelicidin antimicrobial peptide)의 발현을 증가시키는 것인, 아토피 피부염 치료용 세포치료제 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 지방조직유래줄기세포는, Th2 면역반응을 억제시키는 것인, 아토피 피부염 치료용 세포치료제 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 Th2 면역반응의 억제는, IL-4를 분비하는 CD4+ T 세포(IL-4+CD4+ T세포)의 수를 감소시키는 것인, 아토피 피부염 치료용 세포치료제 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 지방조직유래줄기세포는, Th17 면역반응을 억제시키는 것인, 아토피 피부염 치료용 세포치료제 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 Th17 면역반응의 억제는, IL-17A를 분비하는 CD4+ T 세포(IL-17A+CD4+ T세포)의 수를 감소시키는 것인, 아토피 피부염 치료용 세포치료제 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 지방조직유래줄기세포는, 혈청 내 IgE의 양을 감소시키는 것인, 아토피 피부염 치료용 세포치료제 조성물.

청구항 9

지방조직유래줄기세포를 포함하는 세포치료제 조성물을, 인간을 제외한 아토피 피부염을 증상을 나타내는 개체에 직접 투여하는 단계;를 포함하는,

황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*)의 증식을 억제하는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 지방조직유래줄기세포는, 아토피 피부염을 증상을 나타내는 개체의 피부 조직에서 CAMP (cathelicidin antimicrobial peptide)의 발현을 증가시켜,

황색포도상구균의 증식을 억제하는 방법.

청구항 11

지방조직유래줄기세포를 포함하는 세포치료제 조성물을, 인간을 제외한 아토피 피부염을 증상을 나타내는 개체에 직접 투여하는 단계;를 포함하는,

아토피 피부염에 특이적인 Th2 면역반응 및 Th17 면역반응을 억제하는 방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 지방조직유래줄기세포는, 림프절 내 IL-4를 분비하는 CD4+ T 세포 (IL-4+CD4+ T세포) 및 IL-17A를 분비하는 CD4+ T 세포(IL-17A+CD4+ T세포)의 수를 감소시키는 것이고,

아토피 피부염에 특이적인 Th2 면역반응 및 Th17 면역반응을 억제하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 지방조직유래줄기세포(adipose tissue-derived stem cells, ADSCs)를 포함하는 아토피 피부염의 세포치료제 조성물 및 이를 이용하여 황색포도상구균의 증식을 억제하거나 Th2 및 Th17의 면역반응을 억제하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003]

아토피 피부염(atopic dermatitis)은 피부소양증(skin pruritus)을 동반하여 만성적으로 호전과 재발을 반복하는 비전염성(non-contagious), 염증성(inflammatory) 피부질환이다(De Benedetto et al, *J Invest Dermatol* 129:14-30, 2009). 습진(eczema)의 한 유형으로서 천식(asthma), 알레르기성 비염(allergic rhinitis)과 함께 대표적인 알레르기성 질환으로 최근 산업화 사회(industrial society)를 중심으로 그 발병률이 꾸준히 증가하고 있다. 환자의 70~80%에서 개인력 또는 가족력이 있는 것으로 미루어 아토피 피부염의 발병에 유전적 소인이 깊

이 관련되어 있는 것으로 짐작된다(Uehara and Kimura, *Acta Dermatol Venereol*, 73:62-63, 1993). 아토피 피부염은 질병 자체의 심각성뿐만 아니라 외상에서 오는 사회적, 정신적 스트레스로 인하여 온전한 사회생활의 영유에 치명적인 지장을 초래한다. 또한 만성 불안 및 우울증과 같은 정신질환을 동반하기 때문에 심각한 임상적 문제로 인식되고 있다.

[0004] 아토피 피부염의 발병률은 지난 20년 동안 꾸준히 증가되어 왔는데, 특히 아프리카, 동아시아, 서유럽 및 북아메리카 지역의 증가세가 현저하다(Deckers et al, *PLoS One* 7:e39803, 2012). 아토피 피부염은 소아습진(infantile eczema)이라고도 알려질 정도로 영·유아와 아동에서 그 발병률이 매우 높다. 아토피 피부염은 전연령대에서 발병하지만 대부분의 경우 나이가 들면서 대체로 발병률은 줄어들지만, 성인에 이르기까지 호전과 악화의 반복적인 만성적 경과를 보이기도 한다. 전체 소아인구의 약 20%가 성인기 이전에 아토피 피부염을 경험하며 이중 약 60% 소아환자는 성장 후에도 아토피 피부염으로 고통을 받고 있다는 역학연구보고가 있다(Saito, *Int Arch Allergy Immunol*, 137:319-325, 2005).

[0005] 아토피 피부염의 원인은 아직 정확히 알려져 있지 않다. 그러나, 환자의 유전적 소인과 함께 면역학적 이상, 피부보호막의 이상, 병원성 박테리아의 감염 및 환경적 요인 등 여러 원인이 복합적으로 작용하여 유발되는 다인성 피부질환(multifactorial skin disease)인 것으로 밝혀지고 있다(Akdis et al, *J Allergy Clin Immunol*, 118:152-169, 2006). 최근 연구결과들에 의하면 영·유아기 아토피 피부염을 경험한 환자 중 일부는 천식이나 알레르기성 비염 등의 다른 알레르기성 질환으로 이행하는 아토피 행진(atopic march)의 경과를 보이기도 한다.

[0006] 피부의 염증 또는 면역학적 이상이 아토피 피부염의 병인으로 알려져 있다. 전체 환자의 약 80%에서 혈중 면역글로블린E (IgE) 항체가 증가되는 것으로 알려져 있으며(van Bever, *Eur J Pediatr*, 151:870-873), 이와 관련된 비만세포(mast cell) 활성화를 통한 염증, 면역작용이 아토피 피부염을 유발 또는 악화시킨다고 보고되어 있다(Kawakami et al, *Curr Opin Immunol*, 21:666-678, 2009). IgE는 인터루킨(interleukin, IL)-4 또는 IL-13과 같은 Th2 계열의 시토카인(cytokine)에 의해 합성이 촉진되는 것으로 알려진 바(Renauld, *J Clin Pathol*, 54:577-589, 2001), 아토피 피부염 환자의 피부조직 내에서 증가된 IL-4 또는 IL-13이 비만세포(mast cell) 활성화와 함께 관찰된다. 최근 IL-17, IL-21, IL-22 및 CCL20과 같은 Th17 계열의 시토카인도 아토피 피부염의 발병기전에 깊이 관련되어 있다는 사실들이 보고되고 있다(Mu et al, *Clinic Rev Allerg Immunol*, 47:193-218, 2014). Th2 (T helper type 2)와 Th17세포(T helper 17 cell)는 특정 시토카인과 전사인자의 영향에 따라 CD4⁺ T세포에서 분화된다. 표피투과장벽기능(epidermal permeability barrier function)의 이상은 병원성 미생물 또는 알레르기 유발물질에 대한 피부감염 가능성을 증가시킨다. 실제로 아토피 피부염 환자의 경우 박테리아 감염에 취약한 것으로 보고되어 있다. 아토피 피부염 환자의 90%에서 황색포도구균(*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*)이 관찰되며, 피부염의 정도가 피부 내 황색포도구균 밀도와 비례하는 것으로 알려져 있다(Ong and Leung, *Immunol Allergy Clin North Am*, 30:309-321, 2010; Schlievert et al, *J Allergy Clin Immunol*, 125:39-49, 2010). 황색포도구균에 대한 항생제 투여가 피부염을 호전시킨다는 보고도 이 박테리아와 아토피 피부염의 발병기전 사이의 관련성을 증명한다.

[0007] 아토피 피부염은 적절한 피부관리 또는 생활습관의 변화를 통해서도 충분히 호전될 수 있으나, 질환이 심각한 환자의 경우, 현재 통용되는 치료법에 적절히 치료되지 않는 난치성(intractability)을 보인다. 일반적으로 스테로이드제 또는 타크로리무스(Tacrolimus)와 피메크로리무스(Pimecrolimus) 연고(ointment)와 같은 면역조절제(immune modulator)를 치료에 사용하고 있으나, 그 효과에 대한 의구심과 심각한 약물부작용은 안전성을 담보한 효과적인 치료제 개발을 요구하고 있다.

[0008] 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cells, MSCs)는 자가재생(self-renewal)하는 다능성(multi-potent) 간질세포(stromal cells)로서 다양한 세포유형으로 분화할 수 있다. 이 줄기세포는 생체 외(in vitro)와 생체 내(in vivo)에서 면역조절(immune modulation) 효과를 나타낸다. MSCs는 세포분열을 정지시켜 T세포(T cell)와 B세포(B cell)의 증식 및 분화를 억제할 뿐 만 아니라(Ucelli et al, *Nat Rev Immunol*, 8:726-736, 2008; Miguel et al, *Curr Mol Med*, 12:574-91, 2012), 가지세포(dendritic cell), 자연살해세포(natural killer cell)와 대식세포(macrophage)의 증식, 분화, 성숙 및 기능을 조절함으로써 강력한 면역억제(immunosuppression) 작용을 하는 것으로 알려져 있다(Spaggiari et al, *Blood*, 107:1484-1490, 2006). 이러한 면역조절 및 면역억제 작용 때문에, MSCs는 면역관련 질환의 세포치료법(cell therapy)으로 주목 받고 있다.

[0009] 지방조직유래줄기세포(adipose tissue-derived stem cell, ADSCs)는 몸 전체의 지방조직에서 발견되는 미분화된 다능성(multipotent) 세포이며, 지방조직은 신체에 매우 풍부하게 분포하며 지방흡입술(liposuction)에서 부수적으로 획득이 용이하고, 세포수득률도 높아 자가세포이식.autologous cell transplantation)이 가능하다.

하지만, 아토피 피부염에서 ADSCs의 효과에 대한 연구는 충분히 이루어지고 있지 않다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명의 목적은, 지방조직유래줄기세포를 포함하는 아토피 피부염 치료용 세포치료제 조성물을 제공하는 것이다. 또한, 본 발명의 또 다른 목적은, 피부 조직에서 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*)의 증식을 억제하는 방법, 및 아토피 피부염에 특이적인 Th2 면역반응 및 Th17 면역반응을 억제하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0012] 그러나, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 해당 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0014] 본 발명의 일 실시예에 따르면, CD44, CD54 및 CD105 를 발현하는 지방조직유래줄기세포를 포함하는 아토피 피부염 치료용 세포치료제 조성물을 제공한다.
- [0016] 일측에 따르면, 상기 지방조직유래줄기세포는, 아토피 피부염을 가진 피부로부터 분리된 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*)에 대하여 증식억제 효과를 가질 수 있다.
- [0018] 일측에 따르면, 상기 지방조직유래줄기세포는, 피부 조직 내 CAMP (cathelicidin antimicrobial peptide)의 발현을 증가시킬 수 있다.
- [0020] 일측에 따르면, 상기 지방조직유래줄기세포는, Th2 면역반응을 억제시킬 수 있다.
- [0022] 일측에 따르면, 상기 Th2 면역반응의 억제는, IL-4를 분비하는 CD4+ T 세포 (IL-4+CD4+ T세포)의 수를 감소시킬 수 있다.
- [0024] 일측에 따르면, 상기 지방조직유래줄기세포는, Th17 면역반응을 억제시킬 수 있다.
- [0026] 일측에 따르면, 상기 Th17 면역반응의 억제는, IL-17A를 분비하는 CD4+ T 세포(IL-17A+CD4+ T세포)의 수를 감소시킬 수 있다.
- [0028] 일측에 따르면, 상기 지방조직유래줄기세포는, 혈청 내 IgE의 양을 감소시킬 수 있다.
- [0030] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 지방조직유래줄기세포를 포함하는 세포치료제조성물을, 인간을 제외한 아토피 피부염을 증상을 나타내는 개체에 직접 투여하는 단계;를 포함하는 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*)의 증식을 억제하는 방법을 제공한다.
- [0032] 일측에 따르면, 상기 지방조직유래줄기세포는, 아토피 피부염을 증상을 나타내는 개체의 피부 조직에서 CAMP

(cathelicidin antimicrobial peptide)의 발현을 증가시킬 수 있다.

[0034] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 지방조직유래줄기세포를 포함하는 세포치료제 조성물을, 인간을 제외한 아토피 피부염을 증상을 나타내는 개체에 직접 투여하는 단계;를 포함하는 아토피 피부염에 특이적인 Th2 면역반응 및 Th17 면역반응을 억제하는 방법을 제공한다.

[0036] 일측에 따르면, 상기 지방조직유래줄기세포는, 림프절 내 IL-4를 분비하는 CD4⁺ T 세포(IL-4+CD4⁺ T세포) 및 IL-17A를 분비하는 CD4⁺ T 세포(IL-17A+CD4⁺ T세포)의 수를 감소시킬 수 있다.

발명의 효과

[0038] 지방조직유래줄기세포를 포함하는 세포치료제 조성물은, 아토피 피부염에 특이적인 T 도움세포 유형2(Th2)와 유형17(Th17)의 면역반응을 억제시키고, 혈청 IgE 항체 양을 감소시킬 수 있다. 또한, 피부의 항균물질인 CAMP (cathelicidin antimicrobial peptide)의 생성을 촉진하여 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)의 증식을 억제할 수 있다. 이러한 효과는 아토피 피부염 증상을 개선시키므로 아토피 피부염 세포치료제 조성물 및 치료 방법으로 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0040] 도 1은, 지방조직에서 분리하여 배양한 세포의 단백질을 형광이용세포분류법으로 분석한 그래프이다.

도 2는, 아토피 피부염의 흰쥐모델에 출생 후 4주차부터 1주 간격으로 총 4회 이식한 경우, ADSCs 세포치료제 조성물의 효과를 나타낸 그래프이다.

도 3은, 아토피 피부염의 흰쥐모델에 출생 후 2주차부터 1주 간격으로 총 4회 이식한 경우, ADSCs 세포치료제 조성물의 효과를 나타낸 그래프이다.

도 4는, 아토피 피부염의 흰쥐모델에 출생 후 4주차부터 1주 간격으로 총 4회 이식한 ADSCs 세포치료제 조성물의 Th2 및 Th17 면역반응 억제 효과를 나타낸 그래프이다.

도 5는, 아토피 피부염의 흰쥐모델에 출생 후 5주차에 1회 단일이식한 ADSCs 세포치료제 조성물의 Th2 및 Th17 면역반응 억제 효과를 나타낸 그래프이다.

도 6은, 아토피 피부염의 흰쥐모델에 출생 후 4주차에 1회 단일이식한 ADSCs 세포치료제 조성물의 혈청 IgE 항체 감소 효과를 나타낸 그래프이다.

도 7은, 지방조직유래줄기세포(ADSCs)가 황색포도상구균의 집락형성을 억제할 수 있음을 확인한 실험결과이다.

도 8은, 아토피 피부염의 흰쥐모델에 출생 후 4주차부터 1주 간격으로 총 4회 이식한 ADSCs 세포치료제 조성물의 황색포도상구균 억제 효과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0041] 이하에서, 첨부된 도면을 참조하여 실시예들을 상세하게 설명한다. 각 도면에 제시된 동일한 참조 부호는 동일한 부재를 나타낸다.

[0042] 아래 설명하는 실시예들에는 다양한 변경이 가해질 수 있다. 아래 설명하는 실시예들은 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 이들에 대한 모든 변경, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

[0043] 실시예에서 사용한 용어는 단지 특정한 실시예를 설명하기 위해 사용된 것으로, 실시예를 한정하려는 의도가 아니다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성 요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성 요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.

- [0044] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 실시예가 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.
- [0045] 또한, 첨부 도면을 참조하여 설명함에 있어, 도면 부호에 관계없이 동일한 구성 요소는 동일한 참조 부호를 부여하고 이에 대한 중복되는 설명은 생략하기로 한다. 실시예를 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 실시예의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.
- [0047] 본 발명의 일 실시예에 따르면, CD44, CD54 및 CD105를 발현하는 지방조직유래줄기세포를 포함하는, 아토피 피부염 치료용 세포치료제 조성물(이하, ADSCs 세포치료제 조성물)를 제공한다.
- [0048] 일측에 따르면, 상기 지방조직유래줄기세포는, 아토피 피부염을 가진 피부로부터 분리된 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*)에 대하여 증식억제 효과를 가질 수 있다. 본 발명의 지방조직유래줄기세포를 포함하는 세포치료제 조성물이 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)의 증식을 억제하는지 여부는 CLSI 항생제 내성검사(Clinical and Laboratory Standards Institute antimicrobial susceptibility method)에 준하여 실시하였다. 황색포도상구균이 접종된 배지에서 지방조직유래줄기세포배양액을 처리한 경우, 억제구역(inhibition zone)이 형성되었는지 여부를 살펴보았으며(실시예 10 참조), 세포치료제 조성물이 투여된 군과 대조군의 피부를 채취하여 단위 면적당(1 cm^2) 형성된 황색포도상구균의 집락 수를 비교하여 분석하였다(실시예 10 참조).
- [0049] 일측에 따르면, 상기 지방조직유래줄기세포는, 피부 조직 내 CAMP (cathelicidin antimicrobial peptide)의 발현을 증가시킬 수 있다.
- [0050] 일측에 따르면, 상기 지방조직유래줄기세포는, Th2 면역반응을 억제시킬 수 있다.
- [0051] 일측에 따르면, 상기 Th2 면역반응의 억제는, IL-4를 분비하는 CD4⁺ T 세포 (IL-4+CD4⁺ T세포)의 수를 감소시킬 수 있다. 본 발명의 지방조직유래줄기세포를 포함하는 세포치료제 조성물이 T도움세포 유형2(T helper cell type 2, Th2) 면역반응을 억제하는지 여부는 형광이용세포분류법(fluorescence-activated cell sorting, FACS)을 이용하여 IL-4 사이토카인을 분비하는 CD4⁺ T세포 수를 계산하여 확인하였다(실시예 7 참조).
- [0053] 일측에 따르면, 상기 지방조직유래줄기세포는, Th17 면역반응을 억제시킬 수 있다.
- [0054] 일측에 따르면, 상기 Th17 면역반응의 억제는, IL-17A를 분비하는 CD4⁺ T 세포(IL-17A+CD4⁺ T세포)의 수를 감소시킬 수 있다. 본 발명의 지방조직유래줄기세포를 포함하는 세포치료제 조성물이 T도움세포 유형17(T helper cell type 17, Th17) 면역반응을 억제하는지 여부는 형광이용세포분류법(fluorescence-activated cell sorting, FACS)을 이용하여 IL-17A 사이토카인을 분비하는 CD4⁺ T세포 수를 계산하여 확인하였다 (실시예 8 참조).
- [0055] 일측에 따르면, 상기 지방조직유래줄기세포는, 혈청 내 IgE의 양을 감소시킬 수 있다. 본 발명의 지방조직유래줄기세포를 포함하는 세포치료제 조성물이 면역글로블린 E (IgE)를 감소시키는지 여부는 해당 기술분야의 통상의 기술자가 일반적으로 사용하는 Enzyme linked immune sorbent assay (ELISA) 방법으로 혈청 IgE 항체를 정량하여 확인하였다 (실시예 9 참조).
- [0057] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 지방조직유래줄기세포를 포함하는 세포치료제조성물을, 인간을 제외한 아토피 피부염을 증상을 나타내는 개체에 직접 투여하는 단계;를 포함하는 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*)의 증식을 억제하는 방법을 제공한다. 상기 세포치료제 조성물을 투여하는 방법은, 안와정맥총 주사법을 사용하는 것일 수 있다. 종래의 포유류에 대한 조성물 투여 방법 중에서, 예를 들면 말초정맥 투여 방법에 비하여, 상기 안와정맥총 주사법은 치료제가 투여되는 개체에서 발생할 수 있는 스트레스를 최소화할 수 있으며, 세포치료제 조성물의 반복이식이 용이하며, 이식 또는 주사 성공률이 매우 높으며, 출생 후 2주 미만의 개체를

대상으로 하여도 반복적으로 시행할 수 있는 특징이 있다. 안와정맥총 주사법을 사용함에 따라, 본 발명의 세포치료제 조성물은 적은 수의 줄기세포만으로도 아토피 피부염에 대하여 치료 또는 예방 효과를 가질 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 세포치료제 조성물은 지방조직유래줄기세포를 1×10^4 내지 5×10^4 세포 수/ μl 포함할 수 있으나, 종래의 방법을 사용하는 경우에는, 동일 부피당 10^3 내지 10^5 배 이상의 세포 수를 더 포함해야 한다. 약물학적으로 유효한 1회의 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. 예를 들면, 상기와 같이 농도 기준이 아닌, 개체의 체중을 고려하여 투여될 수 있으며, 상기 투여량은 1.0×10^4 내지 1.0×10^{10} 세포/kg, 바람직하게는 1.0×10^5 내지 1.0×10^9 세포/kg 일 수 있으며, 1일 투여 횟수는 경우에 따라 1회 투여되거나 또는 수 회로 나누어 투여될 수 있다.

[0058] 또한, 상기 세포치료제 조성물은 출생 후 2주 차가 되는 시점부터 투여될 수 있으며, 보다 바람직하게는 4주 차 이후부터 투여될 수 있다. 또한, 투여 간격은 1일 내지 1주 간격으로 투여될 수 있다. 상기 투여 시점과 투여 간격은 개체의 종류, 상태, 또는 질환의 중증 정도에 따라 달라질 수 있다. 예를 들면, 인간을 대상으로 하는 경우에는, 6개월 간격으로 투여될 수 있으며, 설치류의 경우에는, 바람직하게는 4주 차 이후부터 투여될 수 있으며, 1주 간격으로 투여될 수 있다.

[0060] 일측에 따르면, 상기 지방조직유래줄기세포는, 아토피 피부염 증상을 나타내는 개체의 피부 조직에서 CAMP (cathelicidin antimicrobial peptide)의 발현을 증가시킬 수 있다.

[0062] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 지방조직유래줄기세포를 포함하는 세포치료제 조성물을, 인간을 제외한 아토피 피부염을 증상을 나타내는 개체에 직접 투여하는 단계;를 포함하는 아토피 피부염에 특이적인 Th2 면역반응 및 Th17 면역반응을 억제하는 방법을 제공한다.

[0064] 일측에 따르면, 상기 지방조직유래줄기세포는, 림프절 내 IL-4를 분비하는 CD4+ T 세포(IL-4+CD4+ T세포) 및 IL-17A를 분비하는 CD4+ T 세포(IL-17A+CD4+ T세포)의 수를 감소시킬 수 있다.

[0065] 본 발명의 지방조직유래줄기세포를 포함하는 세포치료제 조성물이 아토피 피부염의 증상을 개선시키는지에 대하여, 상기 세포치료제 조성물이 투여된(또는 이식된) 아토피 피부염 동물모델의 피부염 점수 및 긁는 횟수를 계산하여 확인하였다. 예를 들면, 만성 가려움증의 시간추이는 매주 한 시간에 걸쳐 긁는 행동을 디지털 비디오로 촬영 후 재생하는 과정에서 그 횟수를 정량하여 조사할 수 있다. 긁는 행동의 판정과 정량은 현재 당업계에 공지된 방법에 따라 실시할 수 있으며, 예를 들면, 뒷발을 바닥에서 떼어 다시 바닥에 내려 놓을 때까지 피부를 긁는 연속된 행동을 1회 긁기로 판정하여 1 시간 동안 관찰되는 횟수를 가려움증 정도의 척도로 사용할 수 있다(실시예 5 참조).

[0066] 또한, 아토피 피부염의 시간경과는 매주 동일 시간에 피부염의 정도를 수치화하여 분석할 수 있으며, 피부염의 수치화는 해당 기술분야에 공지된 방법에 따라 실시할 수 있다. 예를 들면, 얼굴(face), 귀(ears) 및 등(back)에서 피부염이 발생한 직경 5 mm 피부를 평가단위로 하여 아래와 같이 피부의 상태에 따라 점수를 부여하고, 모든 평가단위의 총합을 피부염 정도의 척도로 사용할 수 있다(실시예 6 참조).

[0068] 본 발명에서 용어, "세포치료제 조성물"은 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. 미국은 1993년부터, 우리나라는 2002년부터 세포치료제 조성물을 의약품으로 관리하고 있다. 이러한 세포치료제 조성물은 크게 두 분야로 분류할 수 있으며 그 첫 번째는 조직재생 혹은 장기기능 회복을 위한 "줄기세포 치료제"이며, 두 번째는 생체 내 면역반응의 억제 혹은 면역반응의 항진 등 면역반응 조절을 위한 면역세포 치료제

로 분류할 수 있다.

- [0069] 본 발명에서 용어, "치료"는 상기 세포치료제 조성물의 투여로 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 의미한다.
- [0070] 본 발명의 세포치료제 조성물은 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.
- [0071] 또한, 상기 세포치료제 조성물은 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.
- [0072] 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.
- [0073] 이렇게 제조된 본 발명의 세포치료제 조성물 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.
- [0074] 본 발명에서 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 본 발명의 세포치료제 조성물을 도입하는 것을 의미하며, 분화된 세포의 이식을 포함한다. 본 발명의 세포치료제 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있다.
- [0075] 본 발명의 세포치료제 조성물의 투여는 임의의 동물에 적용가능하며, 동물은 인간 및 영장류뿐만 아니라, 소, 돼지, 양, 말, 개, 쥐, 랫트 및 고양이 등의 가축을 포함할 수 있다.
- [0076] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.
- [0077] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0079] **실시예 1 : 지방조직유래줄기세포(adipose tissue-derived stem cells, ADSCs)의 분리 및 배양**

- [0080] 줄기세포 배양을 위해 10 내지 11주령의 건강한 성체 흰쥐의 복부피하지방과 내장지방을 분리하여 PBS에 여러 번 씻어 혈액을 제거한 후 잘게 잘랐다. 상기 지방조직을 50 ml 튜브에 나누어 담고 동일한 양의 0.075% 콜라게네이즈 유형 I (collagenase type I)을 넣어 잘 섞일 수 있게 흔들어 준 후 37 °C 배양기에서 45분 동안 배양하였다. 지방조직과 줄기세포의 분리를 위해 4,000 rpm에서 5 분 동안 원심분리 후, 70 μm 세포여과기(cell strainer)에 걸러 내었다. 15% 우태혈청(Fetal Bovine Serum, FBS)과 1% 페니실린/스트렙토마이신 콕테일(penicillin/streptomycin cocktail)이 포함된 배지에서 37 °C/5% CO₂ 환경에서 2일 동안 배양 후 적혈구를 제거하기 위해 동일한 배지로 갈아준 후 약 1주일 동안 배양하였다. 줄기세포가 배양 접시에 80-90% 정도 자라게 되면 0.25% 트립신-이디티에이(Trypsin-EDTA)를 처리 후 단일 세포로 떼어내어 2차 배양을 하였다. 처음 배양 후 2~3번의 계대배양(subculture)한 줄기세포를 실험동물에 이식하였다. 본 동물실험에 관한 연구계획은 고려대학교 의과대학 실험동물윤리위원회(Korea University College of Medicine Animal Research Policies Committee)에 의해 승인 받았다.

[0082] **실시예 2 : 지방조직유래줄기세포(adipose tissue-derived stem cells, ADSCs)의 동정(identification)**

[0083] 지방조직에서 분리·배양한 줄기세포를 형광물질이 표지된 anti-CD31, anti-CD44, anti-CD45, anti-CD54 및, anti-CD 105 항체로 염색한 후 FACSCalibur™ (BD #E97500527)를 이용하여 ADSCs로서의 특성을 분석하였다.

[0084] 도 1은, 지방조직에서 분리하여 배양한 세포의 단백질을 형광이용세포분류법(fluorescence-activated cell sorting, FACS)으로 분석한 그래프이다.

[0085] 도 1을 참고하면, ADSC 생체지표 물질인 CD44, CD54 및 CD105 발현세포가 각각 전체 배양세포의 88.91, 88.91, 및 89.15%인 반면 비표지물질인 CD31 및 CD45 발현세포는 전체 배양세포의 1.78% 및 3.10%로 조사되었다. 따라서, 상기 배양세포가 ADSCs임을 확인하였다.

[0087] **실시예 3 : ADSCs 세포치료제 조성물 준비 및 이식**

[0088] 배양 후 2~3회 계대한 줄기세포에 트립신을 처리하여 단일 세포로 만든 후 우태혈청과 항생제가 포함되지 않은 배양액 30 μ l에 1×10^6 의 세포를 희석하여 인슐린 주사기에 넣어 준비하였다. 이식 방법은 안와정맥총 주사법(retro-orbital injection)으로 실시하였으며, 아토피 피부염이 유발된 동물에게 4주령부터 일주일 간격으로 7주령까지 총 4회 이식하였다. 대조군은 줄기세포가 포함되지 않은 배양액을 동일한 양으로 주사하였다.

[0090] **실시예 4 : 아토피 피부염의 흰쥐 모델 제작**

[0091] 출생 후 48시간 이전의 흰쥐(rat) 새끼의 등쪽 피하에 10% Tween 80과 10% 에탄올(ethanol)이 포함된 생리식염수(0.9% saline)에 정제된 캡사이신(50 mg/kg)을 녹여 체중 1 g 당 10 μ l를 주사하였다. 캡사이신 피하주사 후 유발되는 무호흡증(apnea)은 자발적인 호흡이 재개될 때까지 수회에 걸쳐 흉부를 압박하는 방식으로 극복하여 어미에 돌려주고 3주령이 되어 암수를 구분할 때까지 동일 우리에서 키웠다.

[0093] **실시예 5 : 아토피 피부염의 만성 가려움증에 대한 ADSCs 세포치료제 조성물 효과**

[0094] 만성 가려움증의 시간추이는 출생 후 3주차부터 매주 한 시간에 걸쳐 동물의 긁는 행동을 디지털 비디오로 촬영한 후 재생하는 과정에서 그 횟수를 정량하여 조사하였다. 뒷발을 바닥에서 떼어 다시 바닥에 내려 놓을 때까지 피부를 긁는 연속된 행동을 1회 긁기로 판정하여 1 시간 동안 관찰되는 횟수를 가려움증 정도의 척도로 사용하였다. 동물을 거울이 설치된 투명한 플라스틱 통에 넣어 30분 가량 환경에 적응시킨 후 디지털 비디오 카메라(DCR-SR300, Sony, Japan)로 1시간 동안 행동을 녹화하였다. 비디오 파일을 컴퓨터에서 2배속으로 재생하면서 긁는 횟수를 기록하였다. 동물의 행동은 사람의 간섭이 없는 공간에서 촬영되었으며, 분석은 동물군의 정보를 모르는 실험자에 의해 맹검법(blind test)으로 실시되었다. ADSCs 세포치료제 조성물은 출생 후 4주차부터 1주 간격으로 총 4회 이식하였다. 세포치료제 조성물 이식군(ADSCs)과 대조군(AD, 지방조직유래줄기세포가 함유되지 않은 배지 투여군)의 비교는 *t*-test 검정법을 이용하여 시행하였으며, 모든 실험 결과는 평균±표준오차로 나타내었고 유의적인 차이는 5% 수준에서 검정하였다.

[0096] 도 2는, 아토피 피부염의 흰쥐모델에 출생 후 4주차부터 1주 간격으로 총 4회 이식한 경우, ADSCs 세포치료제 조성물의 효과를 나타낸 그래프이다. 도 2a는 대조군(AD)과 세포치료제 조성물 이식군(ADSCs) 동물에서 관찰되는 아토피 피부염을 나타낸 사진이며, 도 2b는 ADSCs 세포치료제 조성물 이식에 의한 가려움증의 증상을 나타낸 그래프이다. 그래프 내 AUC (area under the curve)는 실험 전기간 동안의 누적효과를 의미하며, 그래프 내 화살표는 세포치료제 조성물을 이식한 시점을 의미한다.

[0097] 도 2b를 참고하면, 대조군에서는 시간경과에 따라 출생 후 6주까지 시간당 긁는 횟수가 증가하다가 이후 진정되는 경향이 나타났으나, ADSCs 세포치료제 조성물 이식군에서는 이식 이후 긁는 횟수가 이식 이전 수준보다 낮게 유지되는 경향이 관찰되었다. 통계분석 결과, 실험기간(출생 후 5~9주) 동안 세포치료제 조성물 이식군의 긁는 횟수가 대조군에 비해 유의하게 낮은 것을 알 수 있었다(**P*<0.05, ***P*<0.001, *t*-test). AUC (area under the curve) 분석 결과에서도, 실험기간 동안 세포치료제 조성물 이식군의 누적 긁기 횟수가 대조군에 비해 현저히 적었다는 것을 알 수 있었다(***P*=0.003, *t*-test). 상기 결과로부터, 혈관에 이식한 ADSCs 세포치료제 조성물이

아토피 피부염에 동반되는 만성 가려움증 치료효과를 나타내는 것을 알 수 있었다.

[0099] **실시예 6 : 아토피 피부염에 대한 ADSCs 세포치료제 조성물의 개선효과**

[0100] 상기 실시예 5에서와 같이 매주 동물의 가려움증 평가를 위한 행동 촬영 직전에 동물의 피부상태를 조사하여 아토피 피부염의 정도를 수치화하여 분석하였다. 얼굴(face), 귀(ears) 및 등(back)에서 피부염이 발생한 직경 5 mm 피부를 평가단위로 하여 아래와 같이 피부의 상태에 따라 점수를 부여하고, 모든 평가단위의 총합을 피부염 정도의 척도로 사용하였다(Mihara et al, *Br J Dermatol* 15:335-345, 2004): 얼굴: 0, normal; 1, wispy fur; 2, alopecia and flare; 3, bleeding or ulcerative lesion; 귀: 0, normal; 1, flare; 2, bleeding; 3, loss of part of the ear; 등: 0, normal; 1, wispy fur; 2, alopecia; 3, sever alopecia, bleeding or ulcerative lesion).

[0101] ADSCs 세포치료제 조성물은 출생 후 2주차 또는 4주차부터 1주 간격으로 총 4회 이식하였다. ADSCs 세포치료제 조성물 이식군과 대조군의 비교는 *t*-test 검정법을 이용하여 시행하였으며, 모든 실험 결과는 평균±표준오차로 나타내었고 유의적인 차이는 5% 수준에서 검정하였다.

[0102] 도 2c는, 아토피 피부염의 흰쥐모델에 출생 후 4주차부터 1주 간격으로 총 4회 이식한 경우, ADSCs 세포치료제 조성물 이식에 의한 아토피 피부염의 증상 점수를 나타낸 그래프이다. 그래프 내 AUC (area under the curve) 는 실험 전기간 동안의 누적효과를 의미하며, 그래프 내 화살표는 세포치료제 조성물을 이식한 시점을 의미한다. (***P*<0.01, **P*<0.05 (*t*-test))

[0103] 도 3은, 아토피 피부염의 흰쥐모델에 출생 후 2주차부터 1주 간격으로 총 4회 이식한 경우, ADSCs 세포치료제 조성물 이식에 의한 아토피 피부염의 증상 점수를 나타낸 그래프이다. 그래프 내 화살표는 세포치료제 조성물을 이식한 시점을 의미한다. (***P*<0.01, **P*<0.05 (*t*-test))

[0104] 도 2c 및 도 3을 참고하면, 대조군(AD)에서는 시간경과에 따라 피부염 점수가 증가하였다가 9주 이후 자연 치유되는 경향이 관찰되었다.

[0105] 그러나, 출생 후 4주차부터 ADSCs 세포치료제 조성물을 이식한 동물군(ADSCs)에서는 이식 전의 피부염이 악화되지 않고 3주간 유지되다가 8주 이후 급격한 회복 양상이 나타났다. ADSCs 세포치료제 조성물을 이식한 전기간 동안, 세포치료제 조성물 이식군의 피부염 점수가 대조군에 비해 현저히 낮은 것을 알 수 있었다(**P*<0.05, ***P*<0.001, *t*-test, 도 2의 a와 c). AUC (area under the curve) 분석 결과에서도, 실험기간 동안 세포치료제 조성물 이식군의 전체 피부염 점수가 대조군에 비해 현저히 낮았다는 것을 알 수 있었다(***P*=0.009, *t*-test).

[0106] 아토피 피부염이 아직 유발되지 않은 출생 후 2주차부터 ADSCs 세포치료제 조성물을 이식한 동물군에서는 피부염 개선효과가 아토피 피부염 발생 초기에 매우 제한적으로 나타나는 것으로 조사되었다(도 3).

[0107] 이는 ADSCs 세포치료제 조성물이 아토피 피부염 발병의 예방보다는 유발된 아토피 피부염을 개선 또는 치료하는데 더 유용할 수 있음을 알 수 있게 한다. 상기 결과로부터, ADSCs 세포치료제 조성물이 아토피 피부염 증상을 개선하는 치료효과를 가지고 있다는 것을 알 수 있었다.

[0109] **실시예 7 : ADSCs 세포치료제 조성물 이식에 의한 Th2 면역반응의 억제**

[0110] 실험기간 중 단일 또는 총 4 회에 걸쳐 ADSCs 세포치료제 조성물을 이식한 동물군(ADSCs)과 동일한 주령의 대조군(AD)의 경추 림프절(cervical lymph node, cLN)에서 면역세포를 획득하였다. 경추 림프절을 10% 우태혈청이 포함된 배양액에 넣어 분쇄한 후, 70 μ m 세포거름망에 걸러 면역세포만을 획득하였다. 면역 세포 1X10⁶ 개를 ionomycin (Sigma, MO, USA), phorbol 12-myristate 13-acetate (Sigma, MO, USA), monesin (ebioscience, CA, USA)이 포함된 배양액에 넣어 37 °C에서 3시간 동안 배양하였다. Anti-CD4 (ebioscience, CA, USA)와 anti-IL-4 (BD bioscience, CA, USA) 항체를 넣어 반응 후, FACSCaliburTM 로 분석하였다.

[0111] 도 4는, 아토피 피부염의 흰쥐모델에 출생 후 4주차부터 1주 간격으로 총 4회 이식한 ADSCs 세포치료제 조성물의 Th2 및 Th17 면역반응 억제 효과를 나타낸 그래프이다. 도 5는, 아토피 피부염의 흰쥐모델에 출생 후 5주차에 1회 단일이식한 ADSCs 세포치료제 조성물의 Th2 및 Th17 면역반응 억제 효과를 나타낸 그래프이다.

[0112] 도 4의 IL-4 그래프를 참고하면, 정상동물군(Naive)에서 Th2 사이토카인 계열의 IL-4를 분비하는 $CD4^{+}$ T 세포 (IL-4 $^{+}CD4^{+}$ T세포)의 비율은 전체 림프절 세포의 0.73% 인데 비해, 아토피 피부염이 유발된 대조동물군(AD)에서는 0.99%로 증가한 것이 관찰되었다. 그러나, ADSCs 세포치료제 조성물을 총 4회 이식한 동물군(ADSCs)에서는 IL-4 $^{+}CD4^{+}$ T세포의 비율이 정상동물보다 낮은 0.61%로 나타났다.

[0113] 도 5의 IL-4 그래프를 참고하면, 상기 효과는 ADSCs 세포치료제 조성물을 1회 단일이식한 경우에도 나타났다. 아토피 피부염이 유발된 대조동물군(AD)의 경우 IL4 $^{+}CD4^{+}$ T 세포의 비율이 2.39 ± 0.63 인 반면, 단일이식 동물군에서는 1.41 ± 0.06 로 감소한 것이 확인되었다.

[0114] 상기 결과로부터 ADSCs 세포치료제 조성물이 아토피 피부염과 관련된 Th2 면역반응을 억제시킬 수 있음을 확인할 수 있었다.

[0116] 실시예 8 : ADSCs 세포치료제 조성물 이식에 의한 Th17 면역반응의 억제

[0117] 상기 실시예 7과 같이 경주 림프절에서 면역세포를 획득하여 anti-CD4 (ebioscience, CA, USA)와 anti-IL-17A (ebioscience, CA, USA) 항체를 넣어 반응시킨 후 FACSCaliburTM로 분석하였다.

[0118] 도 4는, 아토피 피부염의 흰쥐모델에 출생 후 4주차부터 1주 간격으로 총 4회 이식한 ADSCs 세포치료제 조성물의 Th2 및 Th17 면역반응 억제 효과를 나타낸 그래프이다. 도 5는, 아토피 피부염의 흰쥐모델에 출생 후 5주차에 1회 단일이식한 ADSCs 세포치료제 조성물의 Th2 및 Th17 면역반응 억제 효과를 나타낸 그래프이다.

[0119] 도 4의 IL-17A 그래프를 참고하면, 정상동물군(Naive)에서 Th17 사이토카인 계열의 IL-17A를 분비하는 $CD4^{+}$ T 세포(IL-17A $^{+}CD4^{+}$ T세포)의 비율은 전체 림프절 세포의 1.08% 인데 반해, 아토피 피부염이 유발된 대조동물군(AD)에서는 1.47%로 증가한 것이 관찰되었다. 그러나, ADSCs 세포치료제 조성물을 총 4회 이식한 동물군(ADSCs)에서는 IL-17A $^{+}CD4^{+}$ T세포의 비율이 정상동물보다 낮은 0.83%로 나타났다

[0120] 도 5의 IL-17A 그래프를 참고하면, 상기 효과는 ADSCs 세포치료제 조성물을 1회 단일이식한 경우에는 나타나지 않았다. 아토피 피부염이 유발된 대조동물군(AD)과 단일이식 동물군에서의 IL-17A $^{+}CD4^{+}$ T 세포의 비율이 각각 5.36 ± 0.20 과 4.32 ± 1.04 로 차이가 없는 것을 확인하였다.

[0121] 상기 결과로부터 ADSCs 세포치료제 조성물의 반복이식이 아토피 피부염과 관련된 Th17 면역반응을 억제시킬 수 있음을 확인할 수 있었다.

[0123] 실시예 9 : ADSCs 세포치료제 조성물 이식에 의한 혈청 IgE 항체 감소

[0124] 혈청(serum)에 함유된 IgE 양은 Rat IgE ELISA Qauntitation Kit (Cusabio, Chania)를 이용하여 제조사의 프로토콜에 따라 Enzyme linked immune sorbent assay (ELISA) 방법으로 정량화하였다. 혈청은 1 주전 ADSCs 세포치료제 조성물을 1 회 이식한 5주령의 세포치료제 조성물 이식군과 그 대조군 동물로부터 획득하였다. ADSCs 세포치료제 조성물이식군(ADSCs), 대조군(AD) 및 정상동물군(Naive)의 비교는 *t*-test 검정법을 이용하여 시행하였으며, 모든 실험 결과는 평균±표준오차로 나타내었고, 유의적인 차이는 5% 수준에서 검정하였다.

[0126] 도 6은, 아토피 피부염의 흰쥐모델에 출생 후 4주차에 1회 단일이식한 ADSCs 세포치료제 조성물의 혈청 IgE 항체 감소 효과를 나타낸 그래프이다.

[0127] 도 6을 참고하면, 아토피 피부염이 유발된 대조동물군(AD)의 혈청 IgE 항체 양은 $24.95 \pm 1.53^{***}$ ng/ml로 정상동물군(Naive)의 10.26 ± 1.42 ng/ml에 비해 현저히 증가되어 있었다($^{***}P < 0.001$, *t*-test). 그러나 ADSCs 세포치료제 조성물을 이식한 동물군(ADSCs)의 혈청 IgE 항체 양은 $15.08 \pm 2.01^{##}$ ng/ml로 대조동물군(AD)에 비해 낮았으며($^{##}P = 0.003$, *t*-test), 이 값은 정상동물군에 비교하여 통계적 유의성이 없는 것으로 조사되었다. 즉, 아토피 피부염이 유발된 대조군(AD)에서 증가했던 혈청 IgE 항체가 세포치료제 조성물 이식군(ADSCs)에서는 정상

동물(Naive) 수준으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다. (그래프 내 'n.s.'는 통계적으로 차이가 없음을 의미한다.)

[0128] 상기 결과로부터 ADSCs 세포치료제 조성물의 이식이 아토피 피부염과 관련된 혈청 IgE 항체 증가를 억제시킬 수 있음을 확인할 수 있었다.

[0130] **실시예 10 : ADSCs 세포치료제 조성물에 이식에 의한 황색포도구균 집락형성의 억제**

[0131] 10-1. 흰쥐 피부에서 황색포도구균(*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*) 균주 분리

[0132] 흰쥐 피부에서 황색포도구균의 분리는 당업계에 공지된 일반적인 방법으로 시행하였다. 상기 실시예 4와 같이 제작한 아토피 피부염의 흰쥐모델에서 피부염 증상을 보이는 3주령의 흰쥐 3마리의 피부에서 5개의 균주를 분리하였으며, 황색포도구균을 동정하는데 사용되는 *nuc* 유전자 발현유무를 PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction)으로 검증하였다.

[0133] 도 7a는 아토피 피부염이 유발된 흰쥐 피부에서 분리한 균주에서 황색포도상구균의 생체지표인 *nuc* 유전자가 발현되는 것을 확인한 사진이다.

[0134] 도 7a를 참고하면, 아토피 피부염 증상을 보이는 흰쥐에서 분리된 5개의 균주에서 279 염기쌍(base pair, bp)의 *nuc* 유전자가 발현되어, 이들 모두가 황색포도상구균임을 확인하였다.

[0136] 10-2. 항균제 감수성 검사(antimicrobial susceptibility method)

[0137] 황색포도상구균의 methicillin 저항성(methicillin resistance)은 국제 표준화 기관인 CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)의 항균제 감수성 검사법(antimicrobial susceptibility method)으로 조사하였다. 상기 실시예 10-1에서 분리한 균주들을 대상으로 oxacillin disc 확산법을 시행하고, methicillin 저항성 유전자, *mecA* 발현 유무를 PCR로 확인하였다. 각 균주 1×10^8 /ml 세포를 Mueller Hinton 배지에 도말하고, 항균제 디스크를 배지 중앙에 올려놓고 37 °C에서 24 시간 배양한 후, 집락형성(colonization) 억제구역(inhibition zone)의 직경을 측정하였다. 항균제 디스크는 oxacillin 30 µg을 사용하였고, 각각의 억제구역 직경이 22 mm 이상인 경우 감수성이 있는 것으로 판정하였다.

[0138] 도 7b 및 7c는, 황색포도상구균 배지 내 항균제 처리에 의한 억제구역을 나타내는 사진과 감수성 결과를 나타낸 표이다.

[0139] 도 7b 및 7c를 참고하면, 각 균주를 도말한 5개의 배지 모두에서 항균제 oxacillin (30 µg)에 의한 22 mm 이상의 억제구역이 형성되었으며, 5개의 균주 모두 methicillin 감수성 황색포도상구균임을 확인하였으며, *mecA* 유전자는 발현되지 않는 것을 확인하였다.

[0141] 10-3. ADSCs 배양액에 의한 황색포도구균 집락형성 억제 검사

[0142] 지방조직유래줄기세포(ADSCs) 배양액(cultured medium)이 상기 실시예 10-1에서 분리한 황색포도구균의 집락형성(colonization)을 억제하는지 여부를 조사하였다. 균주 1×10^8 /ml 세포를 Mueller Hinton 배지에 도말하고, ADSCs ($5 \sim 6 \times 10^6$ cells) 배양액 10 또는 20 µl 를 적신 disc를 올려놓고, 37 °C에서 24 시간 배양한 후 집락형성 억제구역의 직경을 측정하였다. ADSCs가 함유되지 않은 배양액(DMEM)과 cefoxitin 30 µg disc를 각각 음성 대조군(negative control)과 양성 대조군(positive control)으로 사용하였다.

[0143] 도 7d 및 7e는, 황색포도상구균 배지 내 억제구역을 나타내는 사진과 억제구역의 크기를 나타낸 그래프이다.

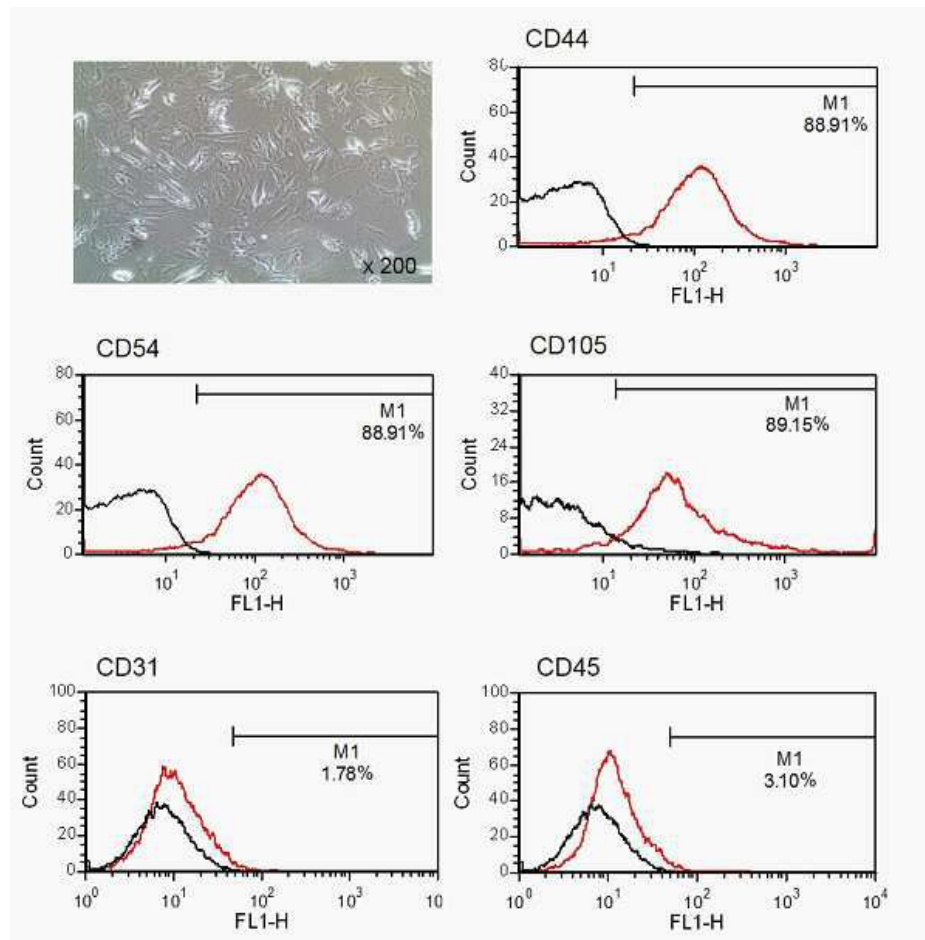
[0144] 도 7d 및 7e를 참고하면, DMEM과는 달리, ADSCs 배양액 10, 20 µl 모두 양-의존적으로 집락형성 억제구역을 형성하는 것으로 나타났다.

[0145] 상기 결과로부터, ADSCs 배양액이 황색포도구균의 집락형성을 억제할 수 있음을 확인할 수 있었다.

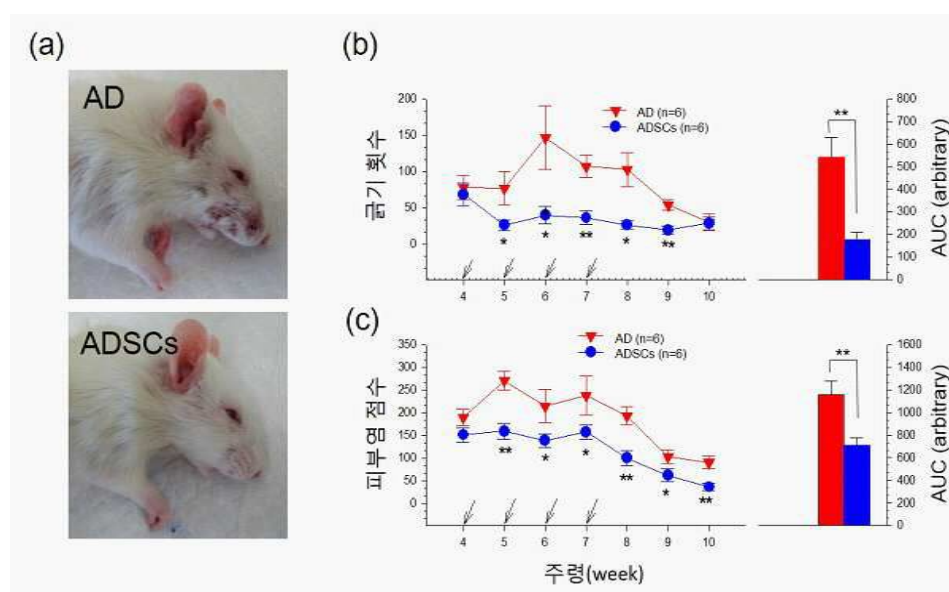
- [0147] 10-4. ADSCs 세포치료제 조성물에 의한 황색포도구균의 피부 집락형성 억제
- [0148] 아토피 피부염의 흰쥐모델에 출생 후 4주차부터 1주 간격으로 총 4 회 ADSC 세포치료제 조성물을 이식한 동물군 (ADSCs) 및 이와 동일한 주령의 대조군(AD) 피부(1 cm^2)를 채취한 후, 이를 분쇄하여 멸균수로 계단희석(serial dilution)하여 황색포도구균 선택배지에 도말하고 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 48시간 동안 배양하였다. 아토피 피부염이 발생한 부위(lesional skin)와 주변의 비손상 부위(non-lesional skin)에서 그램당 집락형성단위(CFU/g)를 비교·분석 하였다. 또한, 세포치료제 조성물 이식군과 대조군의 피부에서 항균물질(anti-microbial peptide)로 알려진 CAMP (cathelicidin antimicrobial peptide)의 mRNA 발현량을 RT-PCR로 정량화하여 분석하였다.
- [0149] 도 8은, 아토피 피부염의 흰쥐모델에 출생 후 4주차부터 1주 간격으로 총 4회 이식한 ADSCs 세포치료제 조성물의 황색포도상구균 억제 효과를 나타낸 것이다(*in vivo* 실험).
- [0150] 도 8a를 참고하면, 피부염으로 손상된 부위(lesional skin)에서 황색포도상구균 g당 집락형성단위가 대조군(A D)의 경우 1.8×10^6 인데 반해 세포치료제 조성물 이식군(ADSCs)에서는 1.0×10^4 으로 현저히 감소한 것을 확인하 였다. 반면에, 도 8b를 참고하면, 피부염이 발생하지 않은 비손상 부위(non-lesional skin)에서는 두 동물군 간에 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 또한, 도 8c를 참고하면, ADSCs 세포치료제 조성물 이식군의 피부에서는 피부 항균물질인 CAMP mRNA 발현량이 대조군에 비해 2 배 이상 (2.14 ± 0.40 배) 증가하였다. (* $P < 0.05$ (t- test))
- [0151] 따라서, ADSCs 세포치료제 조성물은 피부에서 CAMP 발현을 증가시켜 황색포도구균의 집락형성을 억제하는 것으 로 판단되며, 상기 실험결과는 ADSCs 세포치료제 조성물이 아토피 피부염에서 황색포도구균의 감염을 억제시켜 피부염을 개선하는 치료효과를 갖는다는 점을 나타낸다.
- [0153] 이상과 같이 실시예들이 비록 한정된 실시예와 도면에 의해 설명되었으나, 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가 진 자라면 상기의 기재로부터 다양한 수정 및 변형이 가능하다. 예를 들어, 설명된 기술들이 설명된 방법과 다 른 순서로 수행되거나, 및/또는 설명된 구성요소들이 설명된 방법과 다른 형태로 결합 또는 조합되거나, 다른 구성요소 또는 균등물에 의하여 대치되거나 치환되더라도 적절한 결과가 달성될 수 있다.
- [0154] 그러므로, 다른 구현들, 다른 실시예들 및 특허청구범위와 균등한 것들도 후술하는 특허청구범위의 범위에 속한 다.

도면

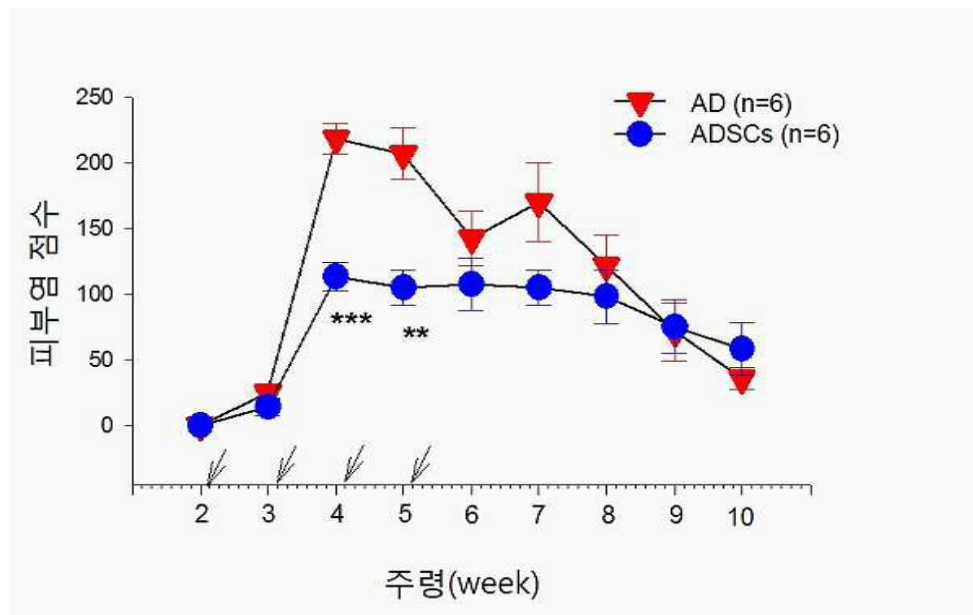
도면1



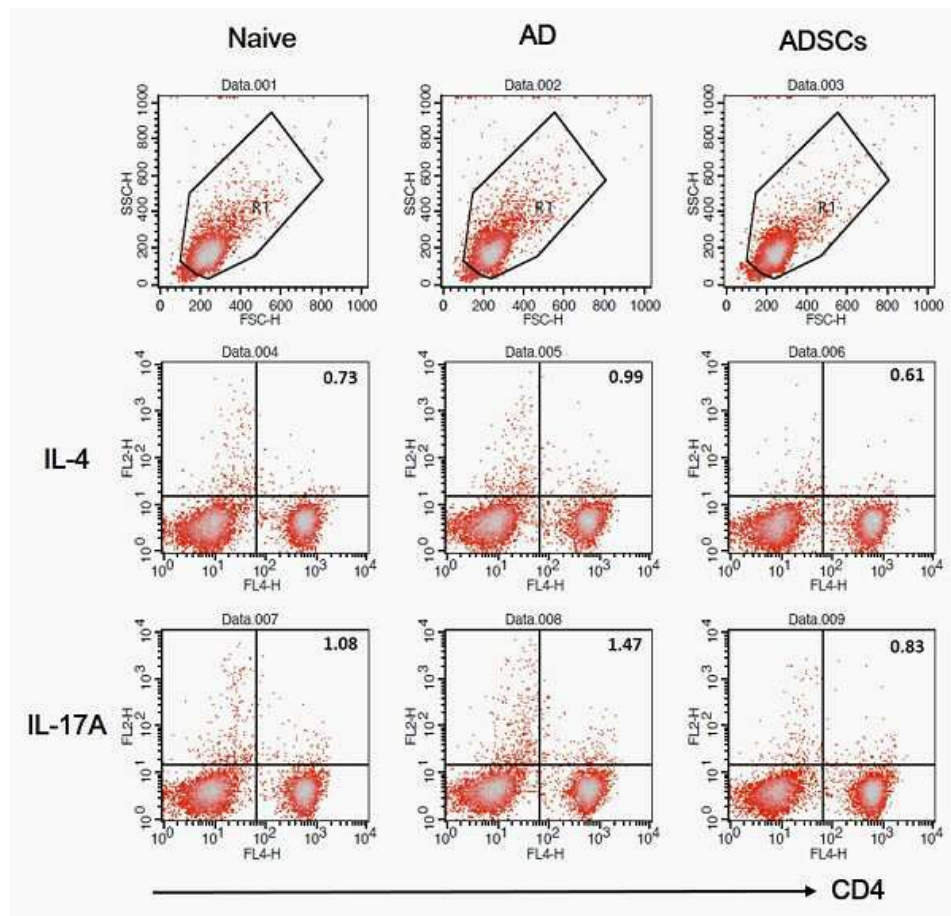
도면2



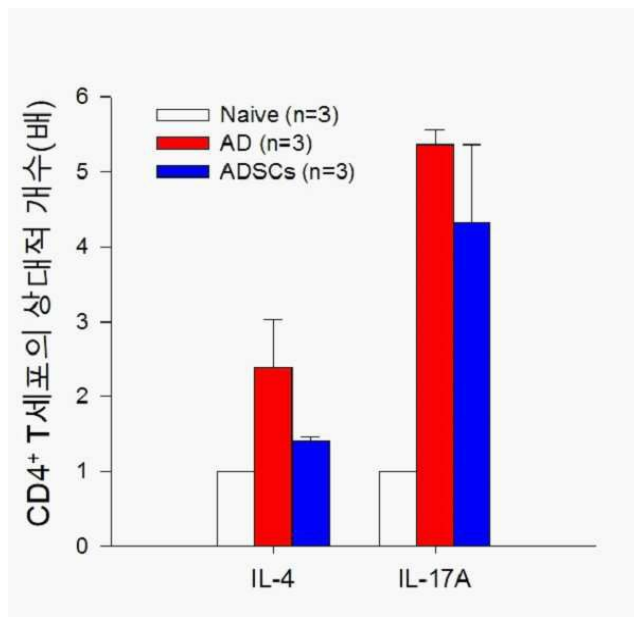
도면3



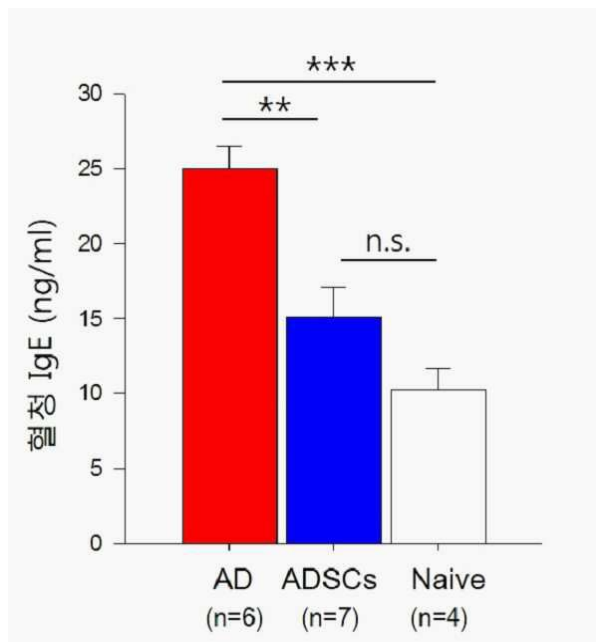
도면4



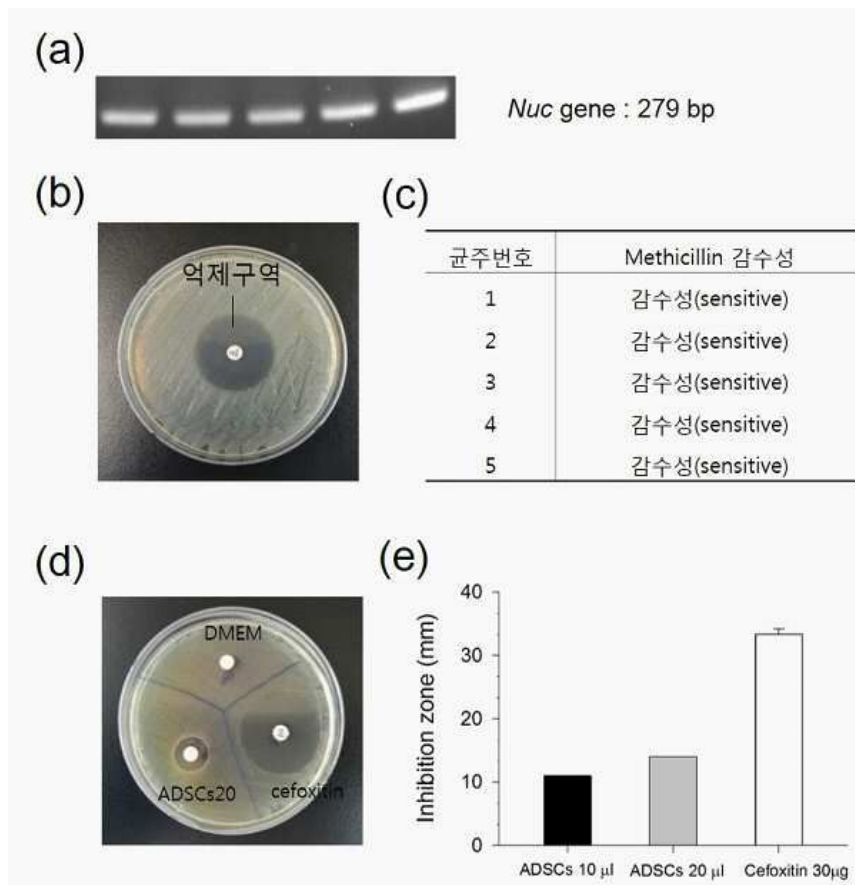
도면5



도면6



도면7



도면8

