(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2018 년 3 월 1 일 (01.03.2018)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2018/038575 A1

(51) 국제특허분류:
A61K 35/28 (2006.01) *A61K 9/02* (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01) *A61K 9/08* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2017/009328

(22) 국제출원일: 2017 년 8 월 25 일 (25.08.2017)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2016-0109537 2016 년 8 월 26 일 (26.08.2016) KR

(71) 출원인: 연세대학교 산학협력단 **(INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY)** [KR/KR]; 03722 서울시 서대문구 연세로 50, Seoul (KR). **가톨릭관동대학교산학협력단 (CATHOLIC KWANDONG UNIVERSITY INDUSTRY FOUNDATION)** [KR/KR]; 25601 강원도 강릉시 범일로579번길 24, Gangwon-do (KR).

(72) 발명자: **박용범 (PARK, Yong Beom)**; 06667 서울시 서초구 명달로11길 29-3, 502호, Seoul (KR). **김한수 (KIM, Han Soo)**; 08288 서울시 구로구 새말로 93, 107동 1701호, Seoul (KR). **문진희 (MUN, Chin Hee)**; 15834 경기도 군포시 번영로 580, 101동 209호, Gyeonggi-do (KR). **최성미 (CHOI, Seong Mi)**; 22708 인천시 서구 간촌로27번길 6, 403호, Incheon (KR).

(74) 대리인: **특허법인 정안 (HONESTY & JR PARTNERS INTELLECTUAL PROPERTY LAW GROUP)**; 06103 서울시 강남구 선릉로 615, 5층, Seoul (KR).

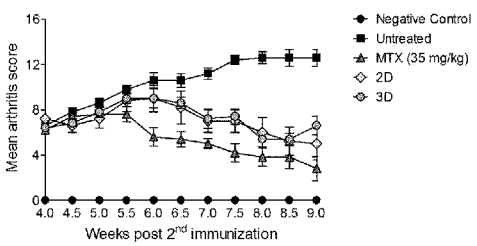
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:
— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR TREATING RHEUMATOID ARTHRITIS, COMPRISING MESENCHYMAL STEM CELL-DERIVED SECRETORY PROTEOME, AND THERAPEUTIC METHOD USING SAME

(54) 발명의 명칭: 중간엽 줄기세포 유래 분비 단백체를 포함하는 류마티스 관절염 치료용 약제학적 조성물 및 이를 이용한 치료 방법



(57) Abstract: The present invention relates to a composition for preventing, ameliorating or treating an autoimmune disease using mesenchymal stem cell-derived secretory proteome. A pharmaceutical composition according to the present invention increases the expression of IL-10, which is a representative immunomodulatory cytokine, and reduces the expression of inflammatory cytokines such as TNF- α, IL-6 and IL-12 (p70), and thus can effectively prevent or treat various autoimmune diseases including rheumatoid arthritis.

(57) 요약서: 본 발명은 중간엽 줄기세포 유래 분비 단백체를 이용한 자가면역질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 대표적 면역조절 사이토카인인 IL-10 의 발현을 증가시키고, TNF-α, IL-6, IL-12(p70) 와 같은 염증성 사이토카인의 발현은 감소시켜 류마티스 관절염을 비롯한 다양한 자가면역질환을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다.

WO 2018/038575 A1

명세서

발명의 명칭: 중간엽 줄기세포 유래 분비 단백체를 포함하는 류마티스 관절염 치료용 약제학적 조성물 및 이를 이용한 치료 방법

기술분야

[1] 본 발명은 중간엽 줄기세포 유래 분비 단백체를 이용한 자가면역질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[2] 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis)은 성인에서 가장 흔하게 발병하는 염증성 관절염으로, 그 원인이 아직 완전히 알려지지 않았으나, 자가면역 기전으로 인한 관절 내 활막의 염증 반응으로 이해되고 있다. 류마티스 관절염을 치료하는 데 사용되는 항류마티스 약제들과 생물학적 제재들이 염증 조절을 통해 관절염을 개선하는 효과를 보이지만, 궁극적인 치료 목표인 관해를 유도하기에는 아직 부족하다. 여러 환자들에서 치료 효과가 불완전하고, 치료 약제 관련 부작용이 치료에 걸림돌이 되고 있으며, 생물학적 제제를 장기간 사용할 때 그 약제에 대한 항체가 생성되어 치료 효과가 떨어지기도 한다.

[3] 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cells)는 조직이나 기관의 분화된 세포들 사이에 존재하는 미분화된 성체 줄기세포로서, 골수, 지방, 근육 등 인체 내 여러 조직으로부터 분리할 수 있으며, 스스로 증식하는 자가 재생능력(self-renewal)을 가지고 있다. 또한, 체외에서 쉽게 증식이 가능하고 지방세포, 골세포, 연골세포, 근세포 등 여러 가지 다양한 조직 세포로 분화 가능하여 기존 줄기세포 연구들은 분화 기능을 이용한 재생 연구에 집중되어 왔다.

[4] 최근 여러 연구들에 의해 밝혀지고 있는 중간엽 줄기세포의 면역조절기능은, 면역반응에 의한 손상으로부터 조혈모세포를 보호하고, 면역반응의 각 단계에 작용하여 면역조절 작용을 나타내어, 그 결과 면역반응 억제 및 항염증 반응으로 나타난다. 이러한 면역조절기능은 자연살해세포(NK cell), 수지상 세포(dendritic cell), 대식세포(macrophage), T 세포 및 B 세포 등과 같은 다양한 면역세포들과의 상호작용을 통해 일어난다. 중간엽 줄기세포의 항염증 효과는 줄기세포로부터 분비되는 다양한 성장인자, 단백질에 의해 손상 조직이 복구되는 인접 분비(paracrine)로 설명되기도 하지만, 인접 분비 효과를 이용한 염증성 질환치료에 관련된 연구는 현재까지 미비한 실정이다.

[5] 한편, 분비 단백체는 임상적인 활용을 위한 특성 분석과 오염 분석 및 품질관리 등이 모두 완료된 타가 (동종)세포주로부터 대용량으로 제조와 합성이 가능하기 때문에, 세포 대체를 위한 세포 치료제와는 달리 공여 세포의 부족이나 의료적인 문제를 손쉽게 극복할 수 있는 생물학적 제제이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[6] 본 발명의 일 목적은 윤리적 문제가 없고, 면역원성을 갖지 않는 중간엽 줄기세포의 배양액 유래 분비 단백체를 이용하여 효과적으로 자가면역질환을 예방, 개선 및 치료할 수 있는 조성물을 제공하고자 한다.

[7] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제 해결 수단

[8] 본 발명의 일 구현 예에 따르면, 중간엽 줄기세포 유래 분비 단백체(secretome)를 포함하는, 자가면역질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[9] 본 발명에서 상기 "중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell)"는 인간을 포함한 포유동물, 바람직하게는 인간의 성체 세포로부터 유래된 중복성(multipotency)을 갖는 미분화 세포를 말하며, 예를 들어, 골수, 혈액, 뇌, 피부, 지방(즉, 지방조직 또는 지방세포), 제대혈, 제대의 바르톤 젤리(Wharton's jelly) 등의 다양한 성체 세포로부터 유래될 수 있다.

[10] 또한, 본 발명에서 상기 "분비 단백체(secretome)"는 상기 중간엽 줄기세포로부터 분비되는 성분들 중에 단백질 성분의 총합을 의미한다. 분비 단백체는 세포 내에서 유전자의 전사(transcription), 번역(translation) 및 변형(post-translational modification)을 거친 후 세포에 의해 세포 밖 환경으로 방출되는 성분들을 의미한다. 분비 단백체의 대표적인 발현 마커는 EGF 및 VEGF 등과 같은 성장 인자와 콜라겐(collagen) 및 피브로넥틴(fibronectin)과 같은 세포 외 기질 단백질에 해당한다.

[11] 본 발명에서 상기 분비 단백체는 중간엽 줄기세포를 배양하여 얻어진 배양액으로부터 분리된 것일 수 있다.

[12] 본 발명에서 상기 중간엽 줄기세포를 배양하는 방법은 2차원 배양 또는 3차원 배양 방법에 의할 수 있다.

[13] 본 발명에서 상기 중간엽 줄기세포를 2차원 배양하는 방법으로는, 중간엽 줄기세포를 중간엽 줄기세포 배양용 배지에 24 내지 96 시간 동안 배양한 뒤 무혈청 배지에서 24 내지 72 시간 동안 배양하며 수행될 수 있다.

[14] 여기서, 상기 중간엽 줄기세포 배양용 배지의 조성을 특별히 제한하지는 않으나 혈청 배지일 수 있다. 예를 들면, 소 태아 혈청(Fetal bovine serum, FBS)을 5 내지 15 중량% 및 머캅토에탄올(mercaptoethanol)을 0.05 내지 0.2 mM로 포함하는 둘베코수정이글배지(Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM) 또는 RPMI-1640 배지 등이거나, StemPro 배지, MSCGro 배지, MesenCult 배지 또는 NutriStem 배지 등과 같은 무혈청 배지일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며 당해 기술분야에서 중간엽 줄기세포의 배양을 위하여 사용될 수 있는 배지라면

제한없이 사용될 수 있다.

[15] 또한, 상기 무혈청 배지로는 페놀 레드(Phenol red) 및 항생제를 배제한 둘베코수정이글배지(Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며 당해 기술분야에서 임상 등급의 세포 배양에 이용할 수 있는 배지를 포함해서 중간엽 줄기세포의 배양을 위하여 사용될 수 있는 것으로 소 태아 혈청이 배제된 배지라면 제한없이 사용될 수 있다.

[16] 본 발명에서는 중간엽 줄기세포의 배양 조건에 따라 분비 단백체의 분비량과 구성 성분에 차이를 보일 수 있으며, 통상적인 배양은 정산 산소 분압 (산소 20 부피% 수준) 하에서 이루어진다. 그러나, 체내 환경은 저산소분압이며, 이러한 환경을 in vitro에서 제공하여 줄기세포를 배양했을 때 세포의 성장과 분화 및 신생혈관 생성능이 향상되고, 그에 따라 줄기세포의 치료 효과도 상승될 수 있다. 따라서, 본 발명에서 상기 분비 단백체는 중간엽 줄기세포를 정상 산소 배양조건 (20 부피% O_2)에서 배양하여 얻어진 것뿐만 아니라, 상기 중간엽 줄기세포를 저산소 배양조건 (0.5 ~1 부피% O_2) 하에서 배양하여 얻어진 것일 수 있다.

[17] 또한, 본 발명에서는 상기 분비 단백체로는, 상기 2차원 배양하여 얻어진 배양액을 500 내지 1,500 xg에서 원심분리하여 상등액을 회수한 뒤 얻어진 고분자 성분의 농축물을 사용하는 것이 염증성 사이토카인의 발현은 억제하고 항염증성 사이토카인의 발현은 활성화시켜 면역 반응을 더욱 억제할 수 있어 바람직하다.

[18] 본 발명의 일 구체 예에서 상기 고분자 성분의 농축물은 상기 원심분리하여 얻어진 상등액을 0.1 내지 0.3 μM 필터, 바람직하게는 0.2 μM 필터로 상기 상등액을 여과하는 단계; 및 3 kDa 이하 분자를 여과하는 단계에 의하여 얻어질 수 있다.

[19] 여기서, 상기 3 kDa 이하 분자를 여과하는 방법으로는, 접선유동여과(tangential flow filtration:TFF) 장치를 이용하여 정용 여과에 의해 수행될 수 있다. 또한, 본 발명에서는 상기 정용 여과 시 튜브연동식 정량 액체 펌프 (peristatic tubing pump)를 이용하여 주사 용수로 상기 상등액을 대체 희석하면서 0 내지 5 ℃에서 농축할 수 있다.

[20] 또한, 본 발명의 다른 구체 예에서 상기 고분자 성분의 농축물은 상기 원심분리하여 얻어진 상등액을 알코올류 극성용매와 반응시키며 유효성분을 농축시켜 얻어질 수 있다.

[21] 여기서, 상기 알코올류 극성용매는 탄소수 1 내지 6의 저급 알코올, 상기 알코올의 희석용액, 예컨대, 95% 또는 90% 알코올 수용액, 또는 환원제에 의해 아이소프로필 알코올이 되는 아세톤 등을 단독 또는 2종 이상 사용할 수 있다.

[22] 또한, 본 발명에서 상기 알코올 수용액은 알코올의 희석용액을 의미하는 것으로, 예를 들어, 95% 에탄올, 90% 에탄올 등을 포함할 수 있다.

[23] 본 발명에서 상기 알코올류 극성용매는 상기 상등액에 대하여 2 내지 5배의

중량비의 함량으로 혼합하는 것이, 상등액 내의 고분자 농축물의 유효성분만을 효과적인 농축할 수 있어 바람직하다.

[24] 또한, 본 발명에서 상기 상등액과 알코올류 극성용매의 반응은 -30 내지 0 ℃에서 5 내지 500분 동안 수행되는 것이 바람직하다.

[25] 본 발명의 일 예시에 따르면, 상기 2차원 배양하여 얻어진 배양액을 원심분리하여 얻어진 상등액에 100% 알코올을 부가하여 -30 내지 0 ℃에서 5 내지 500분 동안 방치할 수 있다. 이후, 이를 원심분리 한 후 침전물에 90% 알코올을 부가하여 다시 원심분리할 수 있다. 선택적으로 원심분리 후 얻어진 침전물에 멸균수를 첨가하여 현탁한 후 동결할 수 있다.

[26] 본 발명에서는 필요에 따라 상기와 같이 얻어진 고분자 농축물을 6 내지 10 시간 동안 동결 건조하는 단계를 더욱 포함할 수 있다. 본 발명에서는 상기 동결 건조에 의하여 분비 단백체의 고분자 농축물을 분말 형태의 제제로 얻을 수 있다.

[27] 또한, 본 발명에서 상기 중간엽 줄기세포를 3차원 배양하는 방법으로는, 중간엽 줄기세포를 중간엽 줄기세포 배양용 배지에 24 내지 96 시간 동안 배양한 뒤 무혈청 배지에서 부유시키며 24 내지 72 시간 동안 배양하며 수행될 수 있다.

[28] 여기서, 상기 중간엽 줄기세포 배양용 배지의 조성을 특별히 제한하지는 않으나 혈청 배지일 수 있다. 예를 들면, 소 태아 혈청(Fetal bovine serum, FBS)을 5 내지 15 중량% 및 머캅토에탄올(mercaptoethanol)을 0.05 내지 0.2 mM로 포함하는 둘베코수정이글배지(Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며 당해 기술분야에서 중간엽 줄기세포의 배양을 위하여 사용될 수 있는 배지라면 제한없이 사용될 수 있다.

[29] 단, 본 발명에서는 상기 3차원 배양 시 중간엽 줄기세포를 무혈청 배지에 부유 및 배양시키기에 앞서 트립신(trypsin) 또는 동물 유래 성분이 없는 재조합 트립신을 처리할 수 있다. 본 발명에서 상기 "재조합 트립신"은 동물 유래 성분이 없는 재조합 트립신일 수 있으며, 예를 들면 옥수수 내에서 생산된 재조합 트립신일 수 있다. 상기 동물 유래 성분이 없는 재조합 트립신은 상업적으로 구매 가능하며, 예를 들면, TrypLETM Select(GIBCO Invitrogen), TrypLETM Express(GIBCO Invitrogen), TrypZeanTM(Sigma Aldrich) 또는 Recombinant Trypsin SolutionTM(Biological Industries)일 수 있으며, 특별히 제한하지 않는다.

[30] 본 발명에서 상기 무혈청 배지로는 둘베코수정이글배지(Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며 당해 기술분야에서 중간엽 줄기세포의 배양을 위하여 사용될 수 있는 것으로 소 태아 혈청이 배제된 배지라면 제한없이 사용될 수 있다.

[31] 본 발명에서는 상기 3차원 배양 시 중간엽 줄기세포를 무혈청 배지에서 부유 및 배양시킬 때 스피너 플라스크를 이용하여 30 내지 90 rpm의 회전 속도로 회전시키며 배양하는 것이 정치 배양하는 경우보다 염증성 사이토카인의 발현은 억제하고 항염증성 사이토카인의 발현은 활성화시켜 면역 반응을 더욱

억제할 수 있어 바람직하다.

[32] 또한, 본 발명에서는 상기 분비 단백체로는, 상기 3차원 배양하여 얻어진 배양액을 500 내지 1,500 xg에서 원심분리하여 상등액을 회수한 뒤 얻어진 고분자 성분의 농축물을 사용하는 것이 염증성 사이토카인의 발현은 억제하고 항염증성 사이토카인의 발현은 활성화시켜 면역 반응을 더욱 억제할 수 있어 바람직하다.

[33] 본 발명의 일 구체 예에서 상기 고분자 성분의 농축물은 상기 원심분리하여 얻어진 상등액을 0.1 내지 0.3 μM 필터, 바람직하게는 0.2 μM 필터로 상기 상등액을 여과하는 단계; 및 3 kDa 이하 분자를 여과하는 단계에 의하여 얻어질 수 있다.

[34] 여기서, 상기 3 kDa 이하 분자를 여과하는 방법으로는, 접선유동여과(tangential flow filtration:TFF) 장치를 이용하여 정용 여과에 의해 수행될 수 있다. 또한, 본 발명에서는 상기 정용 여과 시 튜브연동식 정량 액체 펌프 (peristatic tubing pump)를 이용하여 주사 용수로 상기 상등액을 대체 희석하면서 0 내지 5 ℃에서 농축할 수 있다.

[35] 또한, 본 발명의 다른 구체 예에서 상기 고분자 성분의 농축물은 상기 원심분리하여 얻어진 상등액을 알코올류 극성용매와 반응시키며 유효성분을 농축시켜 얻어질 수 있다.

[36] 여기서, 상기 알코올류 극성용매는 탄소수 1 내지 6의 저급 알코올, 상기 알코올의 희석용액, 예컨대, 95% 또는 90% 알코올 수용액, 또는 환원제에 의해 아이소프로필 알코올이 되는 아세톤 등을 단독 또는 2종 이상 사용할 수 있다.

[37] 또한, 본 발명에서 상기 알코올 수용액은 알코올의 희석용액을 의미하는 것으로, 예를 들어, 95% 에탄올, 90% 에탄올 등을 포함할 수 있다.

[38] 본 발명에서 상기 알코올류 극성용매는 상기 상등액에 대하여 2 내지 5배의 중량비의 함량으로 혼합하는 것이, 상등액 내의 고분자 농축물의 유효성분만을 효과적인 농축할 수 있어 바람직하다.

[39] 또한, 본 발명에서 상기 상등액과 알코올류 극성용매의 반응은 -30 내지 0 ℃에서 5 내지 500분 동안 수행되는 것이 바람직하다.

[40] 본 발명의 일 예시에 따르면, 상기 2차원 배양하여 얻어진 배양액을 원심분리하여 얻어진 상등액에 100% 알코올을 부가하여 -30 내지 0 ℃에서 5 내지 500분 동안 방치할 수 있다. 이후, 이를 원심분리 한 후 침전물에 90% 알코올을 부가하여 다시 원심분리할 수 있다. 선택적으로 원심분리 후 얻어진 침전물에 멸균수를 첨가하여 현탁한 후 동결할 수 있다.

[41] 본 발명에서는 필요에 따라 상기와 같이 얻어진 고분자 농축물을 6 내지 10 시간 동안 동결 건조하는 단계를 더욱 포함할 수 있다. 본 발명에서는 상기 동결 건조에 의하여 분비 단백체의 고분자 농축물을 분말 형태의 제제로 얻을 수 있다.

[42] 본 발명에서 상기와 같이 얻어진 중간엽 줄기세포 유래 분비 단백체는

자가면역질환을 효과적으로 예방, 개선 또는 치료할 수 있다.

[43] 본 발명에서 상기 자가면역질환은 개체 자신의 조직에 대해 일어나고 지정된 비-악성 질환 또는 장애이다.

[44] 모든 정상 개체에 있어서 가장 중요한 특성 중의 하나는 자기(self)를 구성하고 있는 항원물질에 대해서는 해롭게 반응하지 않는 반면, 비자기(non-self) 항원들에 대해서는 이를 인식하고 반응하여 제거할 수 있다. 자기항원에 대한 생체의 무반응을 면역학적 무반응성(immunologic unresponsiveness) 또는 관용(tolerance)이라고 한다. 그러나 자기관용을 유도 또는 유지함에 있어서 이상이 생기면 자기항원에 대하여 면역반응이 일어나게 되고, 그 결과 자신의 조직을 공격하는 현상이 발생하는데 상기 과정에 의해 발생되는 질환을 자가면역질환이라고 한다.

[45] 상기 자기 면역 질환은 자신의 장기조직이나 그 성분에 대해 항체가 생산되는 염증성 질환으로서, 다수의 조직과 장기에 만성적인 전신적 염증을 일으키는 질병을 총칭할 수 있다.

[46] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 자가면역질환은 류마티스 관절염, 염증성 척추관절염, 성인형 스틸씨병, 대식세포 활성증후군, 전신경화증, 다발성근염, 피부근염, 혈관염, 혼합 결합조직질환, 쇼그렌 증후군, 궤양성 대장염, 크론병, 알러지성 천식, 알러지성 비염, 아토피성 피부염, 담마진, 누선염, 결막염, 건선, 심상성 천포창, 파킨슨병, 근위축성 측색경화증, 중증 근무력증, 다발성경화증, 알츠하이머 질환, 뇌졸중, 동맥경화증, 혈관 재협착, I형 당뇨병, II형 당뇨병, 당뇨성 망막증 및 만성 갑상선염으로 이루어진 군에서 하나 이상 선택될 수 있으나, 바람직하게는 류마티스 관절염일 수 있다.

[47] 본 발명에서 상기 "예방"은 동물의 병리학적 세포의 발생 또는 세포의 손상, 소실의 정도의 감소를 의미한다. 예방은 완전할 수 있으며 또는 부분적일 수도 있다. 이 경우에는 개체 내의 병리학적 세포의 발생 또는 비정상적인 면역 작용 등이 상기 자가면역질환의 예방 및 치료용 조성물을 사용 하지 않은 경우와 비교하여 감소하는 현상을 의미할 수 있다.

[48] 본 발명에서 상기 "치료"는 치료하고자 하는 대상 또는 세포의 천연 과정을 변경시키기 위하여 임상적으로 개입하는 모든 행위를 의미하며, 임상 병리 상태가 진행되는 동안 또는 이를 예방하기 위하여 수행할 수 있다. 목적하는 치료 효과는 질병의 발생 또는 재발을 예방하거나, 증상을 완화시키거나, 질병에 따른 모든 직접 또는 간접적인 병리학적 결과를 저하시키거나, 전이를 예방하거나, 질병 진행 속도를 감소시키거나, 질병 상태를 경감 또는 일시적 완화시키거나, 예후를 개선시키는 것을 포함할 수 있다. 즉, 상기 치료는 상기 조성물에 의해 자가면역질환의 증세가 호전되거나 완치되는 모든 행위를 포괄하는 것으로 해석될 수 있다.

[49] 본 발명에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 캡슐, 정제, 과립, 주사제, 연고제, 분말 또는 음료 형태임을 특징으로 할 수 있으며, 상기 약제학적 조성물은

인간을 대상으로 하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[50] 본 발명의 약제학적 조성물은 이들로 한정되는 것은 아니지만, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 캡슐, 정제, 수성 현탁액 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물은 약제적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체는 경구 투여 시에는 결합제, 활탁제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서(elixir), 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다. 기타, 용액, 현탁액, 정제, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형할 수 있다.

[51] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말디톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충진제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[52] 본 발명에 따른 약제학적 조성물의 투여 경로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 구강, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장이 포함된다. 경구 또는 비경구 투하가 바람직하다.

[53] 본 발명에서, "비경구"는 피하, 피내, 정맥내, 근육내, 관절내, 활액낭내, 흉골내, 경막내, 병소내 및 두개골내 주사 또는 주입기술을 포함한다. 본 발명의 약제학적 조성물은 또한 직장 투여를 위한 좌제의 형태로 투여될 수 있다.

[54] 본 발명의 약제학적 조성물은 사용된 특정 화합물의 활성, 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 정식, 투여시간, 투여경로, 배출율, 약물 배합 및 예방 또는 치료될 특정 질환의 중증을 포함한 여러 요인에 따라 다양하게 변할 수 있고, 상기 약제학적 조성물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 질병의 정도, 약무형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 1일 0.0001 내지 50 mg/kg 또는 0.001 내지 50 mg/kg으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 본 발명에 따른 의약 조성물은 환제, 당의정, 캡슐, 액제, 겔, 시럽, 슬러리, 현탁제로 제형될 수 있다.

[55]

[56] 본 발명의 다른 구현 예에 따르면, 중간엽 줄기세포 유래 분비 단백체(secretome)를 포함하는, 자가면역질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물에 관한 것이다.

[57] 본 발명에서 중간엽 줄기세포, 분비 단백체 및 자가면역질환에 관한 자세한 설명은 상기 약제학적 조성물에 기재된 바와 중복되어, 명세서 기재의 과도한 복잡성을 피하기 위해 이하의 기재를 생략한다.

[58] 본 발명의 식품 조성물은 각종 식품류, 예를 들어, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 분말, 과립, 정제, 캡슐, 과자, 떡, 빵 등의 형태로 제조될 수 있다. 본 발명의 식품 조성물은 독성 및 부작용이 거의 없는 중간엽 줄기세포 유래 분비 단백체로 구성된 것이므로 예방 목적으로 장기간 복용 시에도 안심하고 사용할 수 있다.

[59] 본 발명의 분비 단백체 혹은 이를 포함하는 고분자 성분의 농축물이 식품 조성물에 포함될 때 그 양은 전체 중량의 0.1 내지 50%의 비율로 첨가할 수 있다.

[60] 여기서, 상기 식품 조성물이 음료 형태로 제조되는 경우 지시된 비율로 상기 식품 조성물을 함유하는 것 외에 특별한 제한점은 없으며 통상의 음료와 같이 여러가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 즉, 천연 탄수화물로서 포도당 등의 모노사카라이드, 과당 등의 디사카라이드, 슈크로스 등의 및 폴리사카라이드, 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜 등을 포함할 수 있다. 상기 향미제로서는 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등) 등을 들 수 있다.

[61] 그 외 본 발명의 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다.

[62] 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.1 내지 약 50 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

발명의 효과

[63] 본 발명에 따른 조성물은 대표적 면역조절 사이토카인인 IL-10의 발현을 증가시키고, TNF-α, IL-6, IL-12(p70)와 같은 염증성 사이토카인의 발현은 감소시켜 류마티스 관절염을 비롯한 다양한 자가면역질환을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다.

[64] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 특허청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[65] 도 1은 본 발명의 일 실시예에서 콜라겐 유도 관절염 마우스 모델에 인간 지방 유래 중간엽 줄기세포의 2차원 배양액으로부터 분리 및 농축한 분비 단백체; 3차원 회전 배양액으로부터 분리 및 농축한 분비 단백체; 및 MTX를 처리한 후 관절염 중증도를 평가한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

[66] 도 2는 본 발명의 일 실시예에서 콜라겐 유도 관절염 마우스 모델에 인간 지방 유래 중간엽 줄기세포의 2차원 배양액으로부터 분리 및 농축한 분비 단백체; 3차원 회전 배양액으로부터 분리 및 농축한 분비 단백체; 및 MTX를 처리한 후 마우스의 발 두께의 변화를 그래프로 나타낸 것이다.

[67] 도 3은 본 발명의 일 실시예에서 콜라겐 유도 관절염 마우스 모델에 인간 지방 유래 중간엽 줄기세포의 2차원 배양액으로부터 분리 및 농축한 분비 단백체; 3차원 회전 배양액으로부터 분리 및 농축한 분비 단백체; 및 MTX를 처리한 후 마우스의 발 사진과, 발 조직의 H&E 염색된 사진을 나타낸 것이다.

[68] 도 4a 내지 도 4c는 각각 본 발명의 일 실시예에서 콜라겐 유도 관절염 마우스 모델에 인간 지방 유래 중간엽 줄기세포의 2차원 배양액으로부터 분리 및 농축한 분비 단백체; 3차원 회전 배양액으로부터 분리 및 농축한 분비 단백체; 및 MTX를 처리한 후 염증 세포의 침윤(inflammatory cell infiltration), 활막 증식(synovial hyperplasia) 및 골 미란(bone erosion)의 정도를 정량적으로 점수화한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

[69] 도 5는 본 발명의 일 실시예에서 콜라겐 유도 관절염 마우스 모델에 인간 지방 유래 중간엽 줄기세포의 2차원 배양액으로부터 분리 및 농축한 분비 단백체 및 MTX를 처리한 후 마우스 발 조직에서 조직에서 인도시아닌 그린 형광도를 촬영한 광학 이미징 (optic imaging) 사진을 나타낸 것이다.

[70] 도 6a 내지 도 6e는 본 발명의 일 실시예에서 콜라겐 유도 관절염 마우스 모델에 인간 지방 유래 중간엽 줄기세포의 2차원 배양액으로부터 분리 및 농축한 분비 단백체; 3차원 회전 배양액으로부터 분리 및 농축한 분비 단백체; 및 MTX를 처리한 후 염증 관련 사이토카인 (TNF-α, IL-12(p70), IL-6, IL-10, IL-1β)의 발현량 변화를 그래프로 나타낸 것이다.

[71] 도 7a 및 도 7b는 본 발명의 일 실시예에서 콜라겐 유도 관절염 마우스 모델에 인간 지방 유래 중간엽 줄기세포의 2차원 배양액 유래 분비 단백체와 상기 2차원 배양액으로부터 분리 및 농축한 분비 단백체를 처리한 후 TGF-β1 및 갈렉틴-1의 발현량 변화를 그래프로 나타낸 것이다.

[72] 도 7c 및 도 7d는 본 발명의 일 실시예에서 콜라겐 유도 관절염 마우스 모델에 인간 지방 유래 중간엽 줄기세포의 3차원 회전 배양액 유래 분비 단백체와 3차원 정치 배양액 유래 분비 단백체를 처리한 후 TGF-β1 및 갈렉틴-1의 발현량 변화를 그래프로 나타낸 것이다.

[73] 도 8a 및 도 8b는 각각 본 발명의 일 실시예에서 콜라겐 유도 관절염 마우스

모델에 인간 지방 유래 중간엽 줄기세포의 2차원 배양액으로부터 분리 및 농축한 분비 단백체; 3차원 회전 배양액으로부터 분리 및 농축한 분비 단백체; 및 MTX를 처리한 후 총 비장 세포의 수 및 비장 세포 내 CD4+ T 세포의 발현을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

[74] 도 9a 및 도 9b는 각각 본 발명의 일 실시예에서 콜라겐 유도 관절염 마우스 모델에 인간 지방 유래 중간엽 줄기세포의 2차원 배양액으로부터 분리 및 농축한 분비 단백체; 3차원 회전 배양액으로부터 분리 및 농축한 분비 단백체; 및 MTX를 처리한 후 비장 내 $CD4^{+}IFN\text{-}\gamma^{+}$ T 세포 및 $CD4^{+}$ $CD25^{+}FoxP3^{+}$ T 세포의 변화를 나타낸 것이다.

[75] 도 10a 및 도 10b는 각각 본 발명의 일 실시예에서 콜라겐 유도 관절염 마우스 모델에 인간 지방 유래 중간엽 줄기세포의 2차원 배양액으로부터 분리 및 농축한 분비 단백체; 3차원 회전 배양액으로부터 분리 및 농축한 분비 단백체; 및 MTX를 처리한 후 비장 내 수지상 세포 및 복강 내 염증성 (M1) 및 항염증성 (M2) 마크로파지의 변화를 나타낸 것이다.

[76] 도 11은 본 발명의 일 실시예에서 중간엽 줄기세포 유래 2차원 배양액 및 3차원 회전 배양액으로부터 분리 및 농축한 분비 단백체에서 발현이 확인된 총 310개 사이토카인의 관련성을 생물학적 과정(biological process), 분자적 기능(molecular function) 및 세포적 구성(cellular component)으로 분석한 결과를 나타낸 것이다.

[77] 도 12a, 도 12b 및 도 12c는 각각 본 발명의 일 실시예에서 중간엽 줄기세포 유래 2차원 배양액 및 3차원 회전 배양액으로부터 분리 및 농축한 분비 단백체에서 발현되는 사이토카인의 생물학적 과정, 분자적 기능 및 세포적 구성 별로 관련성이 높은 기능들을 정리한 결과를 나타낸 것이다.

[78] 도 13은 본 발명의 일 실시예에서 중간엽 줄기세포 유래 2차원 배양액에서 분리 및 농축한 분비 단백체 대비 3차원 회전 배양액으로부터 분리 및 농축한 분비 단백체에서 발현이 증가된 사이토카인과, 그 발현이 감소된 사이토카인을 상위 20개씩 배수 변화(fold change)로 나타낸 것이다.

[79] 도 14a 내지 도 14c는 각각 본 발명의 일 실시예에서 중간엽 줄기세포 유래 2차원 배양액에서 분리 및 농축한 분비 단백체 대비 3차원 회전 배양액으로부터 분리 및 농축한 분비 단백체에서 발현이 증가 또는 감소된 사이토카인 중에서 유효한 의미를 갖는 사이토카인을 단백질 네트워크(protein network) 분석 및 정량 분석한 결과를 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[80] 본 발명의 일 구현 예에 따르면, 중간엽 줄기세포 유래 분비 단백체(secretome)를 포함하는, 자가면역질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[81] 본 발명의 다른 구현 예에 따르면, 중간엽 줄기세포 유래 분비 단백체(secretome)를 포함하는, 자가면역질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물에

관한 것이다.

발명의 실시를 위한 형태

[82] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[83]

[84] 실시예

[85]

[86] 시약 및 화학 제품

[87] DMEM(Dulbecco modified Eagle's medium-low glucose), FBS(Fetal Bovine Serum), 페니실린/스트렙토마이신, 2-머캅토에탄올(×1000), trypsin/EDTA(0.05%) 및 trypan blue (0.4%)는 인비트로젠사로부터 구매하였다.

[88]

[89] 인간 지방 세포로부터 중간엽 줄기세포의 확보

[90] 한국 식약청의 기준[GMP(의약품 제조 품질 관리 기준)]을 준수하는 연세대학교 세포치료센터로부터 골수 유래의 인간 중간엽줄기세포를 초기 계대에서 분양 받아서 배양하였다. 식약청 임상 승인 인간 중간엽 줄기세포의 배양 조건인 배양 접시에 중간엽 줄기세포 배양용 배지 (10% FBS, 0.1 mM mercaptoethanol이 첨가된 DMEM low glucose)를 넣고, 72~86 시간 동안 배양하였다. 매 2~3일 간격으로 배지 교환하였으며, 세포 배양물은 70~85% 의 컨플루어스(confluency)로 계대하고 5번째 계대를 연구에 사용하였다.

[91]

[92] 중간엽 줄기세포의 배양

[93] 1. 2차원 배양법

[94] 중간엽 줄기세포를 80% 컨플루언스로 배양하고, PBS 완충액으로 4회 이상 반복 세척하여 우태혈청 등의 단백질 성분을 제거한 뒤, 항생제와 우태혈청이 배제된 무혈청 배지 (DMEM-low glucose)로 48시간 배양한 후 배양액을 회수하였다.

[95] 2. 3차원 스피너 회전 배양법

[96] 중간엽 줄기세포를 80% 컨플루언스로 배양한 다음 트립신(trypsin) 처리하여 회수하고, PBS 완충액으로 2차례 세척하여 혈청 성분을 제거한 뒤 무혈청 배지에 부유시킨 후 스피너 플라스크(Spinner flask)에서 60 rpm으로 회전시키며 48시간 배양하고 배양액을 회수하였다.

[97] 3. 3차원 정치 배양법

[98] 상기 3차원 스피너 회전 배양법과 효과 비교를 위하여, 중간엽 줄기세포를 80% 컨플루언스로 배양한 다음 트립신(trypsin) 처리하여 회수하고, PBS 완충액으로

2차례 세척하여 혈청 성분을 제거한 다음 무혈청 배지에 부유시킨 후 48시간 동안 정치 배양한 뒤 배양액을 회수하였다.

[99]

[100] 배양액으로부터 분비 단백체의 분리 및 농축

[101] 상기 2차원 및 3차원 배양법으로 대용량으로 배양한 중간엽 줄기세포 배양액을 1회 1000 x g에서 원심분리하여 세포 잔류물을 1차 제거하였다. 그 후, 2차로 0.2 μM 필터로 세포 잔해 등의 거대 입자를 여과하고, 3 kDa 이하 분자를 여과하는 접선유동여과(tangential flow filtration:TFF) 캡슐 (PALL 사, minimate TFF 캡슐)을 이용하여 정용여과 (diafiltration) 시스템으로 여과하는 과정에서 튜브연동식 정량 액체 펌프 (peristatic tubing pump)로 주사용수 (saline solution 또는 링거주사액)으로 지속적으로 배양액을 대체 희석하면서 4 ℃에서 농축하였다. 농축된 배양액의 단백질의 농도를 굴절계 측정 및 브래드포드 시약으로 확인하였으며, 실험 시까지 -80 ℃에 보관하였다.

[102] 단, 농축 효과를 비교하기 위하여 상기와 같은 여과 및 농축 과정을 거치지 않은 2차원 배양액 또한 실험 시까지 -80 ℃에 보관하였다 (2차원 배양액 유래 분비 단백체).

[103]

[104] 콜라겐 유도 관절염 동물 모델 제작 및 치료 효과 확인

[105] 콜라겐 유도 관절염 동물 모델을 제작하기 위하여 6~7주령된 DBA/1 마우스를 사용하였다. 관절염의 유발은 분리 정량된 소 유래 II형 콜라겐(Bovine type II collagen)을 동량의 완전 프로인트 보강제(complete Freud's adjuvant)에 혼합하여 100 μg씩 마우스의 꼬리 기시 부분의 피 내(intradermal) 주사 (primary immunization)를 하였다. 2주 후에 소 유래 II형 콜라겐 50 μg과 불완전 프로인트 보강제(incomplete Freud's adjuvant)를 혼합하여 상기 마우스의 꼬리 부분에 추가로 피내 주사(2nd boosting)를 하였다. 치료 효과를 확인하기 위하여, 관절염의 중증도가 6~8점 되었을 때부터 상기 얻어진 분비 단백체를 투여하기 시작하여, 5주 동안 치료하였다. 1주일에 3번씩 음의 대조군 (negative control: 관절염을 유발하지 않은 군)과 양의 대조군 (untreated: 관절염을 유발하였지만 치료를 하지 않은 군)은 생리식염수를 복강 주사하였고, 처리군은 각각 메토트렉세이트 (MTX, 35 mg/kg), 2차원 배양액 유래 분비 단백체 (200 μg/mouse), 2차원 배양액으로부터 분리 및 농축한 분비 단백체 (200 μg/mouse), 3차원 회전 배양액으로부터 분리 및 농축한 분비 단백체 (200 μg/mouse) 및 3차원 정치 배양액으로부터 분리및 농축한 분비 단백체 (200 μg/mouse)를 복강 주사하고 관절염의 중증도를 측정하였다.

[106] 관절염의 중증도는 1주일에 2번 육안으로 발의 발적과 부종 및 변형의 발생 유무를 관찰하여 각 시기별 관절염 중증도를 측정하였으며, 하기 점수에 따라 정량화하여 각 처리에 따른 관절염 중증도의 변화는 도 1에 나타내었다. 또한, 주 2회 칼리퍼를 이용하여 발의 두께 (paw thickness)를 측정하였고, 각 처리에 따른

마우스 발 두께의 변화는 도 2에 나타내었다.

[107] 0: 음의 대조군을 기준으로 하며 정상인 경우

[108] 1: 발 중심부 또는 발가락, 발목, 무릎 관절 중 경도의 염증 소견 (발적,부종)이 있는 상태

[109] 2: 여러 부위에 중증도의 관절염이 발생한 상태

[110] 3: 발 전체를 침범하는 중증의 염증이 관찰되는 상태

[111] 4: 염증에 의해 결과적으로 경직(ankylosis)나 관절 움직임의 소실이 유발된 상태

[112] 도 1에서 보는 바와 같이, 2차원 배양액 및 3차원 회전 배양액에서 분리 및 농축한 분비 단백체(2D, 3D)를 처리한 경우, 무처리한 경우에 비하여 관절염 중증도가 현저히 감소하였고, 종전에 관절염 치료제로 사용되던 MTX를 상당량 투여한 경우와 동등한 수준의 치료 효과를 보였다.

[113] 또한, 도 2에서 보는 바와 같이, 2차원 배양액 및 3차원 회전 배양액에서 분리 및 농축한 분비 단백체(2D, 3D)를 처리한 경우, 무처리한 경우에 비하여 관절염 유도 마우스의 발의 두께가 현저히 감소하였고, 종전에 관절염 치료제로 사용되던 MTX를 상당량 투여한 경우와 동등한 수준의 치료 효과를 보였다.

[114]

[115] <u>조직 검사</u>

[116] 상기 각 처리된 콜라겐 유도 마우스 관절염 모델의 관절 조직을 포르말린으로 고정한 후, 4%의 포름산(formic acid)에서 탈석회화 과정을 거여 파라핀에 고정하였다. 조직을 절편한 후, 헤마톡실린-에오신(H&E) 염색을 시행했다. 염색된 조직 슬라이드에서 염증 세포의 침윤, 활막 세포의 과증식 및 연골 파괴도를 분석하였다. 각 처리에 따른 마우스의 발의 모습과 염색된 조직의 사진을 도 3에 함께 나타내었다. 또한, 각 처리에 따른 마우스 발 조직의 염색 슬라이드 결과에 있어서, 염증 세포의 침윤(inflammatory cell infiltration), 활막증식(synovial hyperplasia) 및 골 미란(bone erosion)의 정도를 정량적으로 점수화하여 그 결과를 도 4a 내지 도 4c에 나타내었다.

[117] 도 3에서 보는 바와 같이, 2차원 배양액 및 3차원 회전 배양액에서 분리 및 농축한 분비 단백체(2D, 3D)를 처리한 경우, 무처리한 경우에 비하여 관절염 유도 마우스의 발의 두께가 현저히 감소하였고, 종전에 관절염 치료제로 사용되던 MTX를 상당량 투여한 경우와 동등 수준의 치료 효과를 보였다.

[118] 도 4a 내지 도 4c에서 보는 바와 같이, 2차원 배양액 및 3차원 회전 배양액에서 분리 및 농축한 분비 단백체(2D, 3D)를 처리한 경우, 무처리한 경우에 비하여 염증 세포의 침윤, 활막 증식 및 골 미란의 정도가 현저히 감소한 것을 볼 수 있고, 종전에 관절염 치료제로 사용되던 MTX를 상당량 투여한 경우와 동등한 수준의 치료 효과를 보였다.

[119]

[120] <u>광학 이미징(Optic imaging)</u>

[121] 상기와 같이 2차원 배양액에서 분리 및 농축한 분비 단백체를 처리한 콜라겐 유도 마우스 관절염 모델의 꼬리 정맥에 인도시아닌 그린(indocyanine green, ICG)를 645 uM 주입하고 3분이 경과한 후, eXplore Optix System (Advanced Research Technologies Inc., Montreal, Canada)을 이용하여 관절강 내에 머물러 있는 형광도를 측정하였고, 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[122] 도 5에서 보는 바와 같이, 2차원 배양액에서 분리 및 농축한 분비 단백체(secretome)를 처리한 경우, 분비 단백체를 처리하지 않은 경우(untreated)에 비하여 마우스 발 조직에서 인도시아닌 그린 형광도가 현저히 감소한 것을 볼 수 있고, MTX를 상당량 투여한 경우와 동등한 수준의 형광도를 보였다.

[123]

[124] 분비 단백체 투여 후 염증 관련 사이토카인의 측정

[125] 상기와 같이 2차원 배양액 및 3차원 배양액 유래 분비 단백체를 처리한 콜라겐 유도 마우스 관절염 모델의 혈청을 채취하여 염증 관련 사이토카인 (TNF-α, IL-12(p70), IL-6, IL-10, IL-1β) 및 갈렉틴-1(galectin-1)의 농도를 ELISA를 이용하여 측정하여 그 결과를 도 6a 내지 도 6e 및 도 7a 내지 도 7d에 나타내었다.

[126] 도 6a 내지 도 6c 및 도 6e에서 보는 바와 같이, 2차원 배양액 및 3차원 회전 배양액에서 분리 및 농축한 분비 단백체(2D, 3D)를 처리한 경우, 무처리한 경우에 비하여 염증성 사이토카인인 TNF-α, IL-12(p70), IL-6 및 IL-1β의 발현량이 현저히 감소하였고, MTX보다도 감소 효과가 뛰어난 것을 볼 수 있었다. 또한, 도 6d에서 보는 바와 같이, 항염증성 사이토카인인 IL-10의 경우, 2차원 배양액 및 3차원 회전 배양액에서 분리 및 농축한 분비 단백체(2D, 3D)를 처리한 경우, 무처리한 경우나 MTX를 처리한 경우에 비하여 발현량이 현저하게 증가한 것을 볼 수 있다.

[127] 또한, 도 7a 및 도 7b에서 보는 바와 같이, 2차원 배양액으로부터 분리 및 농축한 분비 단백체(2D(농축))를 처리한 경우가, 단순히 2차원 배양액 유래 분비 단백체(2D(무농축))를 처리한 경우보다 항염증성 사이토카인인 TGF-β1 및 갈렉틴-1의 발현량이 더욱 증가한 것을 볼 수 있다.

[128] 또한, 도 7c 및 도 7d에서 보는 바와 같이, 3차원 회전 배양액으로부터 분리 및 농축한 분비 단백체(3D(회전))를 처리한 경우가, 3차원 정치 배양액으로부터 분리 및 농축한 분비 단백체(3D(정치))를 처리한 경우보다 항염증성 사이토카인인 TGF-β1 및 갈렉틴-1의 발현량이 더욱 증가한 것을 볼 수 있다.

[129] 이를 통하여, 중간엽 줄기세포의 2차원 배양 후 본 발명에 따른 분리 및 농축 과정을 거쳐 얻어진 분비 단백체가 단순히 2차원 배양 후 얻어진 분비 단백체보다 항염 효과가 뛰어난 것을 알 수 있고, 또한 중간엽 줄기세포의 3차원 회전 배양하여 얻어진 분비 단백체가 3차 정치 배양하여 얻어진 분비 단백체보다 항염 효과가 현저히 뛰어난 것을 알 수 있다.

[130]

[131] 유세포분석 (flow cytometry)

[132] 상기와 같이 2차원 배양액 및 3차원 배양액 유래 분비 단백체를 처리한 콜라겐 유도 마우스 관절염 모델의 림프관 및 비장에서 비장 세포(splenocyte)를 분리한 후, 유세포 분석기 (FacsVerse, BD Pharmigen, 미국)를 이용하여 총 비장 세포의 수를 측정하고, CD4의 발현 정도로 분석한 후, FlowJo를 사용하여 결과를 분석하여 도 8에 나타내었다. 또한, 상기 비장 세포에서 면역 조절에 중요한 역할을 하는 조절 T 세포 (Tregs)의 표식자인 CD4+ CD25+FoxP3+를 이용하여 Tregs 세포의 분포를 유세포 분석기 (FacsVerse, BD Pharmigen, 미국)로 분석한 후, FlowJo를 사용하여 결과를 분석하여 도 9에 나타내었다. 또한, CD4+ IFN-γ+를 이용하여 Th1 세포의 분포를 분석하고, 선천면역 반응을 조절하는 비장 내 수지상세포 (dendritic cell)와 복강 내 마크로파지 (macrophage)의 성숙 및 활성을 CD86와 MCH, CD206의 발현 정도로 분석한 후, FlowJo를 사용하여 결과를 분석하여 도 10에 나타내었다.

[133] 도 8a에서 보는 바와 같이, 2차원 배양액 및 3차원 회전 배양액에서 분리 및 농축한 분비 단백체(2D, 3D)를 처리한 경우, 무처리한 경우에 비하여 비장 세포의 수가 현저히 감소된 것을 볼 수 있었고, 도 8b에서 보는 바와 같이, CD4+ T 세포의 분획이 MTX를 처리한 경우에 비하여도 감소한 것을 볼 수 있었다.

[134] 도 9a에서 보는 바와 같이, 2차원 배양액 및 3차원 회전 배양액에서 분리 및 농축한 분비 단백체(2D, 3D)를 처리한 경우, 무처리한 경우에 비하여 Th1 세포를 나타내는 CD4+IFN-γ+ T 세포의 분획이 현저히 감소된 것을 볼 수 있었고, 도 9b에서 보는 바와 같이, 조절 T 세포를 나타내는 CD4+ CD25+FoxP3+ T 세포의 분획은 각 처리에 따라 큰 차이가 없음을 볼 수 있었다.

[135] 도 10a에서 보는 바와 같이, 비장 내 수지상 세포의 활성 정도의 표지자인 CD86 및 MHC의 발현량은 각 처리군에 따라 큰 차이가 없음을 볼 수 있었다. 반면, 도 10b에서 보는 바와 같이, 마우스의 복강 내 염증성 마크로파지(M1)의 표지자인 CD86의 경우, 2차원 배양액 및 3차원 회전 배양액에서 분리 및 농축한 분비 단백체(2D, 3D)를 처리한 경우가 무처리한 경우나 MTX를 처리한 경우에 비하여 발현량이 현저히 감소한 것을 볼 수 있었고, 항염증성 마크로파지(M2)의 표지자인 CD206의 경우, 2차원 배양액 및 3차원 회전 배양액에서 분리 및 농축한 분비 단백체를 처리한 경우가 무처리한 경우나 MTX를 처리한 경우에 비하여 발현량이 현저히 증가한 것을 볼 수 있었다.

[136]

[137] 항체 분석에 의한 사이토카인 프로파일링(Cytokine profiling by antibody array)

[138] 중간엽 줄기세포 유래 분비 단백체에서 생성되는 단백질을 분석하기 위해, Fullmoon BioSystems Antibody Array (SCK100)를 이용하였다. 구체적으로, 상기 2차원 배양액 및 3차원 배양액으로부터 분리 및 농축된 분비 단백체 60㎕를 표지 버퍼(labeling buffer)를 이용하여 총 부피가 75㎕가 되도록 맞춘 후, 비오틴 표지(biotin labeling)하여 배양시킨 후 블러킹(blocking)하였다. 탐지(detection)는

Cy-3 스트렙토아비딘(streptoavidin)으로 이루어졌으며, 차광된 상태에서 310개의 사이토카인의 발현을 측정하였다.

[139] 도 11에서는 중간엽 줄기세포 유래 2차원 배양액 및 3차원 회전 배양액으로부터 분리 및 농축한 분비 단백체에서 발현이 확인된 총 310개 사이토카인의 관련성을 생물학적 과정(biological process), 분자적 기능(molecular function) 및 세포적 구성(cellular component)으로 분석한 결과를 나타내었다.

[140] 또한, 도 12는 중간엽 줄기세포 유래 2차원 배양액 및 3차원 회전 배양액으로부터 분리 및 농축한 분비 단백체에서 발현되는 사이토카인의 기능 인리치먼트 분석 결과를 나타낸 것이다. 보다 상세하게는 도 12a, 도 12b 및 도 12c 각각은 DAVID 프로그램을 사용하여 확인된 310개의 단백질을 생물학적 과정, 분자적 기능 및 세포적 구성 별로 관련성이 높은 기능들을 정리한 결과이다.

[141] 또한, 하기 표 1은 중간엽 줄기세포 유래 2차원 배양액에서 분리 및 농축한 분비 단백체 대비 3차원 회전 배양액으로부터 분리 및 농축한 분비 단백체에서 발현이 증가되는 85개 사이토카인 중에서 55개 사이토카인을 나타낸 것이다.

[142]

[143] [표1]

List of increased cytokine	Fold change(3D secretome/2D secretome)
Plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1	3.615
Ferritin	2.160
Insulin-like growth factor-binding protein 7, IGF-BP7	1.898
Osteoprotegerin, OPG	1.644
CTGFL/WISP-2	1.636
Beta-2-Microglobulin	1.517
Macrophage colony-stimulating factor, M-CSF	1.497
Tissue inhibitors of metalloproteinases-1, TIMP-1	1.441
Galectin-1	1.408
C-Kit	1.329
Insulin-like growth factor-binding protein 3, IGF-BP3	1.288
Matrix metalloproteinases 2, MMP-2	1.272
Matrix metalloproteinases 10, MMP-10	1.200
Galectin-3	1.187
Catenin-alpha	1.139
Transforming growth factor-β2, TGF-β2	1.108
Catenin-gamma	1.098
S 100A10/P11	1.089
Trefoil factor 2, TFF-2	1.086
soluble tumor necrosis factor-receptor II, sTNF-receptor II	1.078
Transforming growth factor beta Receptor III, TGF-β Receptor III	1.064
Transforming growth factor beta Receptor II, TGF-β Receptor II	1.062
Vascular endothelial growth factor receptor 1(Flt-1)	1.056
Stem cell growth factor (SCGF)-beta	1.055
Vascular endothelial growth factor B(VEGFB)	1.053
Cancer Antigen 15-3(CA15-3)	1.052

Serine/threonine protein kinase 2(AKT2)	1.045
B-cell lymphoma/leukemia 10(BCL-10)	1.044
Soluble Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand(s-TRAIL) Receptor-2	1.043
Platelet-derived growth factor receptor(PDGFR) alpha	1.041
Vitamin K-dependent protein Z(PROZ)	1.038
Platelet-derived growth factor subunit(PDGFB)	1.037
Interleukin(IL)-1 beta	1.035
Tyrosine-protein kinase(LYN)	0.135
Myostatin(GDF-8)	1.034
B-cell receptor(Scd22)	1.032
CD14	1.031
IGF1 receptor(IGF 1R)	1.031
Tyrosine-protein kinase receptor(TYRO3)	1.029
Mucosae-associated epithelial chemokine(MEC)	1.027
Activated leukocyte cell adhesion molecule(ALCAM)	1.027
Vascular endothelial growth factor receptor 2(KDR (VEGFR2))	1.025
Histone-lysine N-methyltransferase (MLL)	1.023
FGFR1 Oncogene Partner	1.020
Ovarian carcinoma antigen (CA125)	1.020
Androgen receptor	1.019
Tissue inhibitor of metalloproteinases 3(TIMP3)	1.019
Stromal cell-derived factor(SDF)-1 alpha	1.018
Glycoprotein hormones alpha chain(alpha hCG)	1.018
sTRAIL/APO2L	1.018
Intercellular adhesion molecule(ICAM)-1	1.016
Visfatin	1.015
Monocyte chemoattractant protein (MCP)-2	1.015
Interleukin-13 receptor subunit alpha-1(CA19-9)	1.015
Integrin alpha-5(ITGA-5)	1.014

[144]

[145] 또한, 하기 표 2는 중간엽 줄기세포 유래 2차원 배양액에서 분리 및 농축한 분비 단백체 대비 3차원 회전 배양액으로부터 분리 및 농축한 분비 단백체에서 발현이 감소되는 224개 사이토카인 중에서 55개 사이토카인을 나타낸 것이다.

[146]

[147] [표2]

List of decreased cytokine	Fold change(3D secretome/2D secretome)
Fibroblast growth factor 5(FGF-5)	0.585
Follistatin	0.774
Fibroblast growth factor(FGF)-acidic	0.776
Interleukin(IL)-1RA	0.783
Adipolean Variant	0.792
4-1BB Receptor	0.802
sCD40 Ligand	0.812
Insulin-like growth factor(IGF)-I	0.815
Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor(GM-CSF)	0.816
Endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor(EG-VEGF)	0.819
Granulocyte colony-stimulating factor(G-CSF)	0.822
Insulin-like growth factor(IGF)-II	0.822
Soluble receptor activator of NF-kappa B(sRANK Receptor)	0.822
Fibroblast growth factor(FGF)-basic	0.822
Adiponectin	0.824
Interleukin(IL)-6	0.826
Eotaxin	0.827
Interleukin(IL)-4	0.827
sFas Ligand/Apo1L	0.829
Epidermal growth factor receptor(EGFR)	0.830
Tumor necrosis factor(TNF)-beta	0.834
Vascular cell adhesion protein(VCAM)-1	0.838
Platelet-derived growth factor subunit B(PDGF-BB)	0.838
RANTES	0.839
Interleukin(IL)-7	0.839

Tumor necrosis factor ligand superfamily member 9(4-1BBL)	0.840
Vascular endothelial growth factor(VEGF)	0.845
Activation-inducible TNF-related ligand(AITRIL)	0.849
Tumor necrosis factor(TNF)-alpha	0.850
Interleukin-2 receptor subunit(sIL-2R) alpha	0.850
A proliferation-inducing ligand(APRIL)	0.857
Fms-related tyrosine kinase 3(Flt3)-Ligand	0.858
Exodus-2	0.863
sRANKL	0.864
B cell-attracting chemokine (BCA)-1	0.866
Eotaxin-2	0.868
Artemin	0.869
Beta-defensin 104(BD-4)	0.870
C-X-C motif chemokine (CXCL)16	0.871
Eotaxin-3	0.872
Fibroblast growth factor(FGF)-10	0.873
Beta-defensin 4A(BD-2)	0.874
Fibroblast growth factor(FGF)-16	0.875
Beta-defensin 103(BD-3)	0.875
Beta-defensin 1(BD-1)	0.877
B cell activating factor(BAFF)	0.878
Platelet-derived growth factor subunit A(PDGF-AA)	0.881
Connective tissue growth factor(CTGF)	0.883
Interleukin(IL)-8	0.883
Bone morphogenetic protein(BMP)-7/OP-1	0.886
Endostatin	0.887
Fibroblast growth factor(FGF)-17	0.889
Ciliary neurotrophic factor(CNTF)	0.889
C-C motif chemokine 27(CTACK)	0.890
Interleukin(IL)-10	0.893

[148]

[149] 또한, 도 13은 중간엽 줄기세포 유래 2차원 배양액에서 분리 및 농축한 분비 단백체 대비 3차원 회전 배양액으로부터 분리 및 농축한 분비 단백체에서 발현이 증가된 사이토카인과, 그 발현이 감소된 사이토카인을 상위 20개씩 배수 변화(fold change)로 나타낸 결과이다. 2차원 배양액에서 분리 및 농축한 분비 단백체에 비해 3차원 회전 배양액으로부터 분리 및 농축한 분비 단백체에서 발현이 증가한 사이토카인에는 플라스미노겐 활성화 인자 억제제-1(Plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1), 페리틴(Ferritin), 인슐린 유사 성장인자-결합 단백질 7(Insulin-like growth factor-binding protein 7, IGF-BP7), 오스테오프로테게린(Osteoprotegerin, OPG), CTGFL/WISP-2, 베타-2-마이크로글로불린(Beta-2-Microglobulin), 마크로파지 콜로니-자극 인자(Macrophage colony-stimulating factor, M-CSF), 메탈로프로티네이즈-1 조직 억제제(Tissue inhibitors of metalloproteinases-1, TIMP-1), 갈렉틴-1(Galectin-1), C-Kit, 인슐린 유사 성장인자-결합 단백질 3(Insulin-like growth factor-binding protein 3, IGF-BP3), 매트릭스 메탈로프로티네이즈 2(Matrix metalloproteinases 2, MMP-2), MMP-10, 갈렉틴-3(Galectin-3), 카테닌-α(Catenin-alpha), TGF-β2, 카테닌-γ(Catenin-gamma), S 100A10/P11, TFF-2, sTNF-수용체 II(sTNF-receptor II)가 있다. 한편, 2차원 배양액에서 분리 및 농축한 분비 단백체에 비해 3차원 회전 배양액으로부터 분리 및 농축한 분비 단백체에서 발현이 감소한 사이토카인에는 섬유아세포 증식인자 5(Fibroblast growth factor 5, FGF-5), 폴리스타틴(Follistatin), 섬유아세포 성장인자-acidic(Fibroblast growth factor (FGF)-acidic), 인터류킨-1RA(Interleukin (IL)-1RA), 아디폴리안 변이체(Adipolean Variant), 4-1BB 수용체(4-1BB Receptor), sCD40 리간드(sCD40 Ligand), IGF-I, GM-CSF, EG-VEGF, G-CSF, IGF-II, sRANK 수용체(sRANK Receptor), FGF-basic, 아디포넥틴(Adiponectin), IL-6, 에오탁신(Eotaxin), IL-4, sFas 리간드(sFas Ligand)/Apo1L, EGFR이 있다.

[150] 도 14a 내지 도 14c는 중간엽 줄기세포 유래 2차원 배양액에서 분리 및 농축한 분비 단백체 대비 3차원 회전 배양액으로부터 분리 및 농축한 분비 단백체에서 발현이 증가 또는 감소된 사이토카인 중에서 유효한 의미를 갖는 사이토카인을 단백질 네트워크(protein network) 분석 및 정량 분석한 결과이다. 도 16의 (a)는 중간엽 줄기세포 유래 2차원 배양액에서 분리 및 농축한 분비 단백체 대비 3차원 회전 배양액으로부터 분리 및 농축한 분비 단백체에서 1.25배 이상 발현이 증가한 사이토카인의 신호 네트워크(signaling network)를 보여주는 모식도이다. 도 16의 (b)는 중간엽 줄기세포 유래 2차원 배양액에서 분리 및 농축한 분비 단백체 대비 3차원 회전 배양액으로부터 분리 및 농축한 분비 단백체에서 0.8배 이하 발현이 감소한 사이토카인의 신호 네트워크를 보여주는 모식도이다. 도 16의 (c)는 중간엽 줄기세포 유래 2차원 배양액에서 분리 및 농축한 분비 단백체 대비 3차원 회전 배양액으로부터 분리 및 농축한 분비 단백체에서 1.25배 이상

발현이 증가하거나, 0.8배 이하 발현이 감소한 사이토카인에 대한 정량 분석 결과이다. 2차원 배양액 유래 분비 단백체에 비해 3차원 회전 배양액 유래 분비 단백체에서 1.25배 이상 배수 값이 증가한 사이토카인에는 플라스미노겐 활성화 인자 억제제-1(Plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1), 페리틴(Ferritin), 인슐린 유사 성장인자-결합 단백질 7(Insulin-like growth factor-binding protein 7, IGF-BP7), 오스테오프로테게린(Osteoprotegerin, OPG), CTGFL/WISP-2, 베타-2-마이크로글로불린(Beta-2-Microglobulin), 마크로파지 콜로니-자극 인자(Macrophage colony-stimulating factor, M-CSF), 메탈로프로티네이즈-1 조직 억제제(Tissue inhibitors of metalloproteinases-1, TIMP-1), 갈렉틴-1(Galectin-1), C-Kit, (인슐린 유사 성장인자-결합 단백질 3(Insulin-like growth factor-binding protein 3, IGF-BP3) 및 매트릭스 메탈로프로티네이즈 2(Matrix metalloproteinases 2, MMP-2)가 있다. 2차원 배양액 유래 분비 단백체에 비해 3차원 회전 배양액 유래 분비 단백체에서 0.8배 이하 배수 값이 감소한 사이토카인에는 섬유아세포 증식인자 5(Fibroblast growth factor 5, FGF-5), 폴리스타틴(Follistatin), 섬유아세포 성장인자-acidic(Fibroblast growth factor (FGF)-acidic), 인터류킨-1RA(Interleukin (IL)-1RA) 및 아디폴리안 변이체(Adipolean Variant)가 있다.

[151] 이상에서 본 발명의 실시예에 대하여 상세하게 설명하였지만 본 발명의 권리범위는 이에 한정되는 것은 아니고, 청구범위에 기재된 본 발명의 기술적 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 다양한 수정 및 변형이 가능하다는 것은 당 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에게는 자명할 것이다.

산업상 이용가능성

[152] 본 발명은 중간엽 줄기세포 유래 분비 단백체를 이용하여, 류마티스 관절염, 염증성 척추관절염, 성인형 스틸씨병, 대식세포 활성증후군, 전신경화증, 다발성근염, 피부근염, 혈관염, 혼합 결합조직질환, 쇼그렌 증후군, 궤양성 대장염, 크론병, 알러지성 천식, 알러지성 비염, 아토피성 피부염, 담마진, 누선염, 결막염, 건선, 심상성 천포창, 파킨슨병, 근위축성 측색경화증, 중증 근무력증, 다발성경화증, 알츠하이머 질환, 뇌졸중, 동맥경화증, 혈관 재협착, I형 당뇨병, II형 당뇨병, 당뇨성 망막증 및 만성 갑상선염 등의 다양한 자가면역질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

청구범위

[청구항 1] 중간엽 줄기세포 유래 분비 단백체(secretome)을 포함하는, 자가면역질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

[청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 분비 단백체는 상기 중간엽 줄기세포를 배양하여 얻어진 배양액으로부터 분리된 것인, 약제학적 조성물.

[청구항 3] 제2항에 있어서,
상기 중간엽 줄기세포의 배양은 2차원 배양 또는 3차원 배양에 의하는, 약제학적 조성물.

[청구항 4] 제3항에 있어서,
상기 중간엽 줄기세포의 2차원 배양은, 상기 중간엽 줄기세포를 중간엽 줄기세포 배양용 배지에 24 내지 96 시간 동안 배양한 뒤 무혈청 배지에서 24 내지 72 시간 동안 배양하며 수행되는, 약제학적 조성물.

[청구항 5] 제4항에 있어서,
상기 중간엽 줄기세포 배양용 배지는 소 태아 혈청(Fetal bovine serum, FBS)을 5 내지 15 중량% 및 머캅토에탄올(mercaptoethanol)을 0.05 내지 0.2 mM로 포함하는 둘베코수정이글배지(Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM), RPMI-1640 배지, StemPro 배지, MSCGro 배지, MesenCult 배지 및 NutriStem 배지로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인, 약제학적 조성물.

[청구항 6] 제3항에 있어서,
상기 분비 단백체는, 상기 중간엽 줄기세포를 2차원 또는 3차원 배양하여 얻어진 배양액을 500 내지 1,500 xg에서 원심분리하여 상등액을 회수한 뒤 얻어진 농축물인, 약제학적 조성물.

[청구항 7] 제6항에 있어서,
상기 농축물은 0.1 내지 0.3 μM 필터로 상기 상등액을 여과하는 단계; 및 3 kDa 이하 분자를 여과하는 단계에 의하여 얻어진 것인, 약제학적 조성물.

[청구항 8] 제7항에 있어서,
상기 3 kDa 이하 분자의 여과는, 접선유동여과(tangential flow filtration:TFF) 장치를 이용하여 정용 여과에 의해 수행되는, 약제학적 조성물.

[청구항 9] 제6항에 있어서,
상기 농축물은 회수된 상등액과 알코올류 극성용매를 반응시켜 얻어진 것인, 약제학적 조성물.

[청구항 10] 제9항에 있어서,
상기 상등액과 알코올류 극성용매의 반응은 -30 내지 0 ℃에서 5 내지 500분 동안 수행되는, 약제학적 조성물.

[청구항 11] 제9항에 있어서,
상기 알코올류 극성용매는 상기 상등액에 대하여 2 내지 5배의 중량비의 함량으로 혼합되는, 약제학적 조성물.

[청구항 12] 제6항에 있어서,
상기 농축물은 동결 건조된 것인, 약제학적 조성물.

[청구항 13] 제3항에 있어서,
상기 중간엽 줄기세포의 3차원 배양은, 상기 중간엽 줄기세포를 중간엽 줄기세포 배양용 배지에 24 내지 96 시간 동안 배양한 뒤 무혈청 배지에서 부유시키며 24 내지 72시간 동안 배양하며 수행되는, 약제학적 조성물.

[청구항 14] 제13항에 있어서,
상기 3차원 배양 시 중간엽 줄기세포를 무혈청 배지에 부유 및 배양시키기에 앞서 트립신(trypsin) 또는 동물 유래 성분이 없는 재조합 트립신을 처리하는, 약제학적 조성물.

[청구항 15] 제13항에 있어서,
상기 무혈청 배지로는 페놀 레드(Phenol red) 및 항생제가 배제된 둘베코수정이글배지(Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM)인, 약제학적 조성물.

[청구항 16] 제13항에 있어서,
상기 3차원 배양 시 스피너 플라스크를 이용하여 30 내지 90 rpm의 회전 속도로 회전시키며 수행되는, 약제학적 조성물.

[청구항 17] 제1항에 있어서,
상기 자가면역질환은 류마티스 관절염, 염증성 척추관절염, 성인형 스틸씨병, 대식세포 활성증후군, 전신경화증, 다발성근염, 피부근염, 혈관염, 혼합 결합조직질환, 쇼그렌 증후군, 궤양성 대장염, 크론병, 알러지성 천식, 알러지성 비염, 아토피성 피부염, 담마진, 누선염, 결막염, 건선, 심상성 천포창, 파킨슨병, 근위축성 측색경화증, 중증 근무력증, 다발성경화증, 알츠하이머 질환, 뇌졸중, 동맥경화증, 혈관 재협착, I형 당뇨병, II형 당뇨병, 당뇨성 망막증 및 만성 갑상선염으로 이루어진 군에서 선택되는, 약제학적 조성물.

[청구항 18] 제17항에 있어서,
상기 자가면역질환은 류마티스 관절염인, 약제학적 조성물.

[청구항 19] 중간엽 줄기세포 유래 분비 단백체(secretome)을 포함하는,
자가면역질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

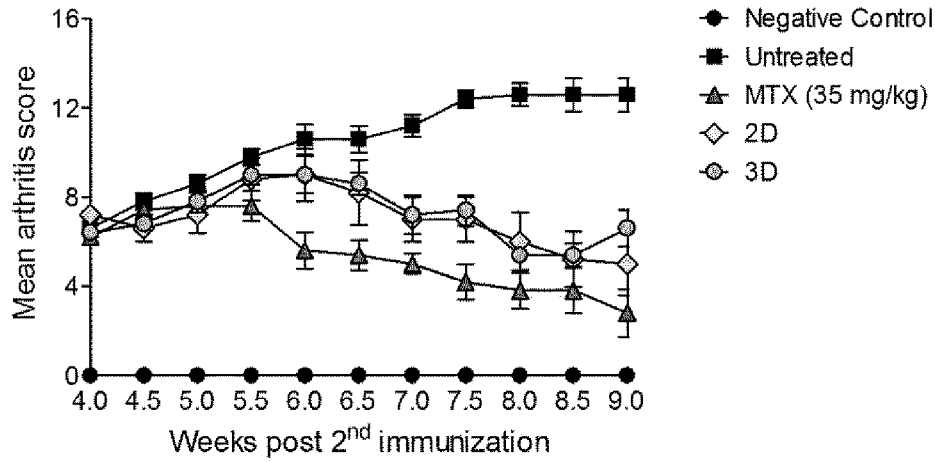
[청구항 20] 제19항에 있어서,
상기 분비 단백체는 상기 중간엽 줄기세포를 배양하여 얻어진 배양액으로부터 분리된 것인, 식품 조성물.

[청구항 21] 제19항에 있어서,
상기 중간엽 줄기세포의 배양은 2차원 배양 또는 3차원 배양에 의하는,

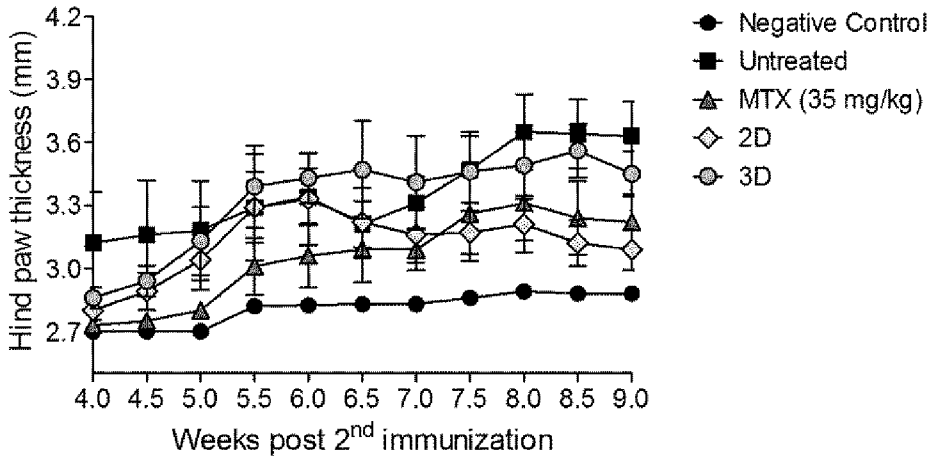
식품 조성물.

[청구항 22] 자가면역질환을 예방 또는 치료하기 위하여, 치료를 필요로 하는 대상에게 청구항 제1항 내지 제18항 중 어느 한 항의 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 자가면역질환의 예방 또는 치료 방법.

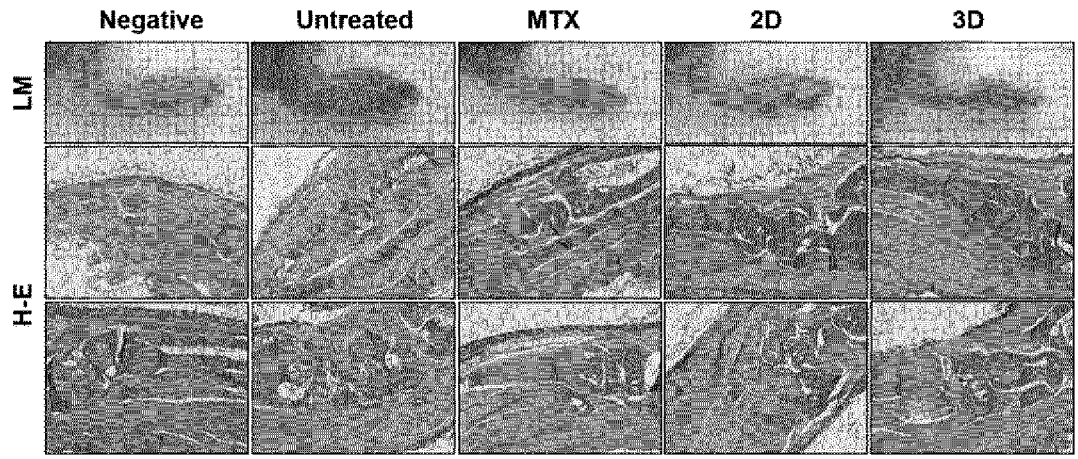
[도1]


Mean arthritis score
16
12
8
4
0
4.0 4.5 5.0 5.5 6.0 6.5 7.0 7.5 8.0 8.5 9.0
Weeks post 2nd immunization
Negative Control
Untreated
MTX (35 mg/kg)
2D
3D

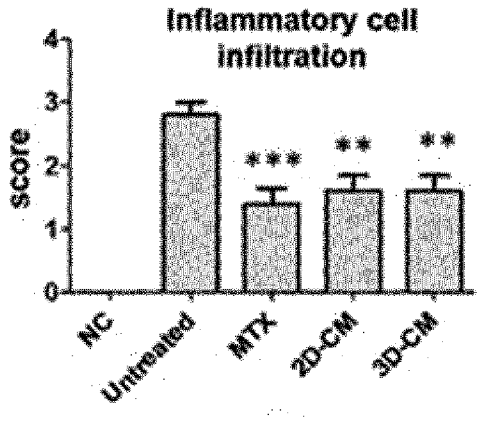
[도2]


Hind paw thickness (mm)
4.2
3.9
3.6
3.3
3.0
2.7
4.0 4.5 5.0 5.5 6.0 6.5 7.0 7.5 8.0 8.5 9.0
Weeks post 2nd immunization
Negative Control
Untreated
MTX (35 mg/kg)
2D
3D

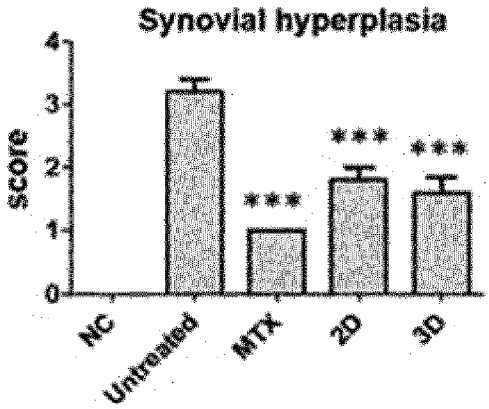
[도3]


Negative
Untreated
MTX
2D
3D
LM
H-E

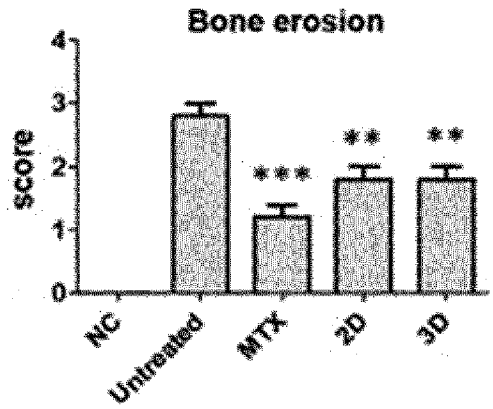
[도4a]


Inflammatory cell infiltration
score
0
1
2
3
4
***
**
**
NC
Untreated
MTX
2D-CM
3D-CM

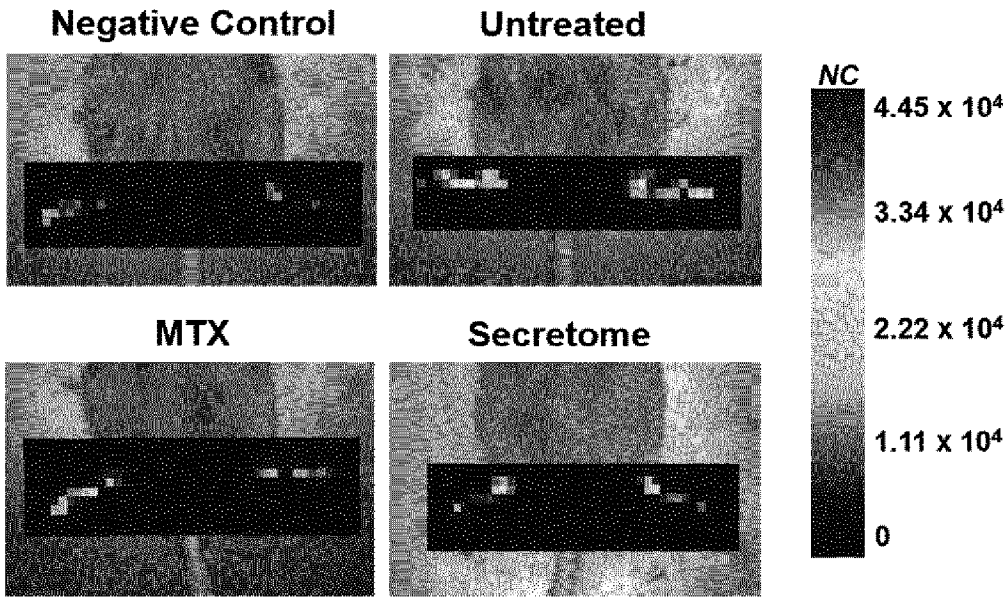
[도4b]


Synovial hyperplasia
score
0
1
2
3
4
***
***
***
NC
Untreated
MTX
2D
3D

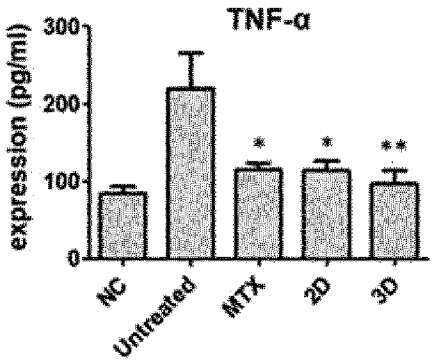
[도4c]


Bone erosion
score
0
1
2
3
4
***
**
**
NC
Untreated
MTX
2D
3D

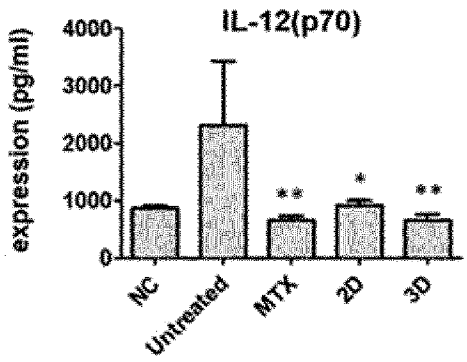
[도5]


Negative Control
Untreated
MTX
Secretome
NC
4.45 x 10⁴
3.34 x 10⁴
2.22 x 10⁴
1.11 x 10⁴
0

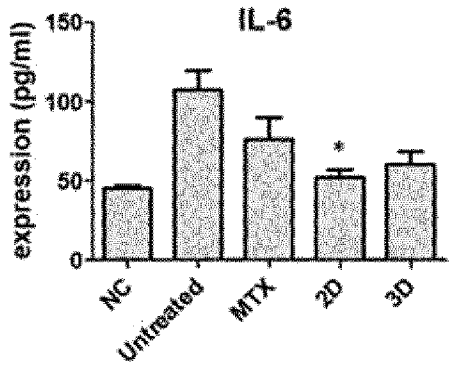
[도6a]


TNF-α
expression (pg/ml)
300
200
100
0
*
*
**
NC
Untreated
MTX
2D
3D

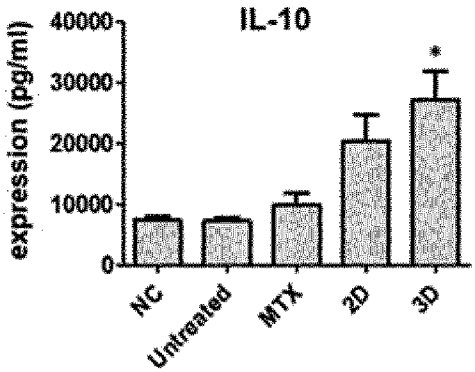
[도6b]


IL-12(p70)
expression (pg/ml)
4000
3000
2000
1000
0
**
*
**
NC
Untreated
MTX
2D
3D

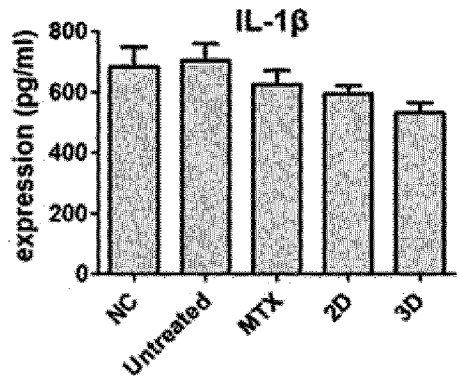
[도6c]



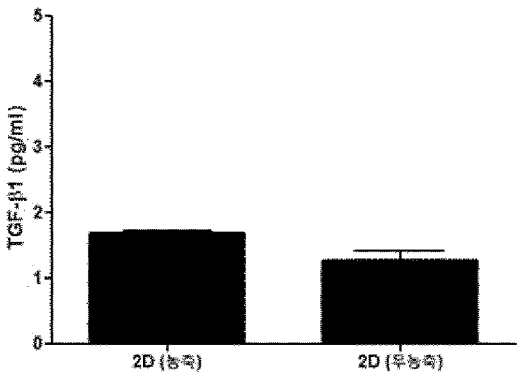
[도6d]



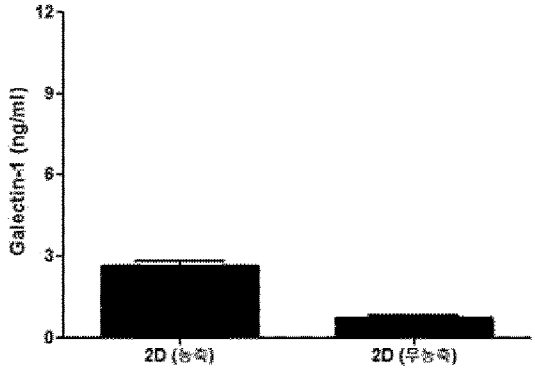
[도6e]



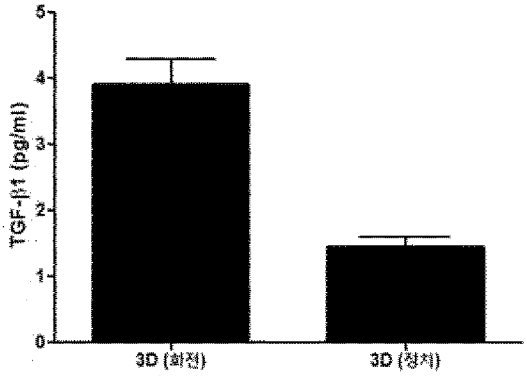
[도7a]



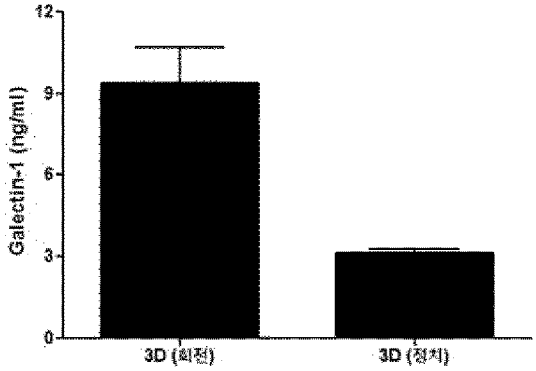
[도7b]



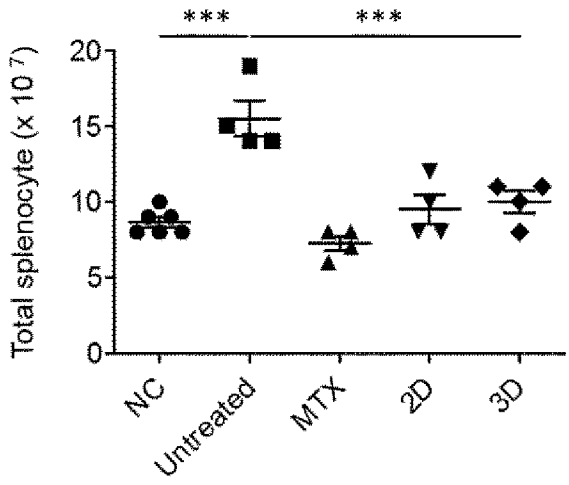
[도7c]



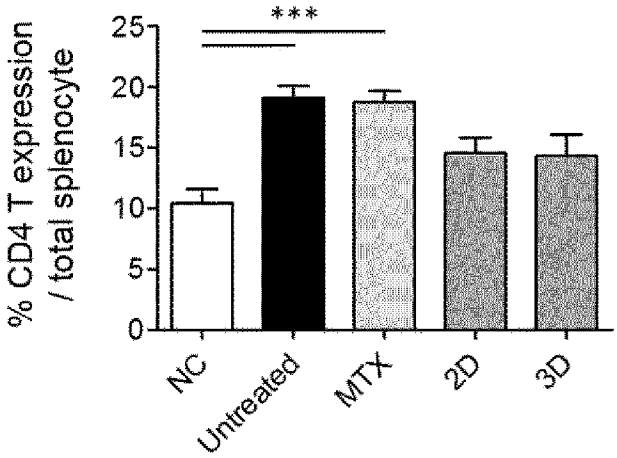
[도7d]



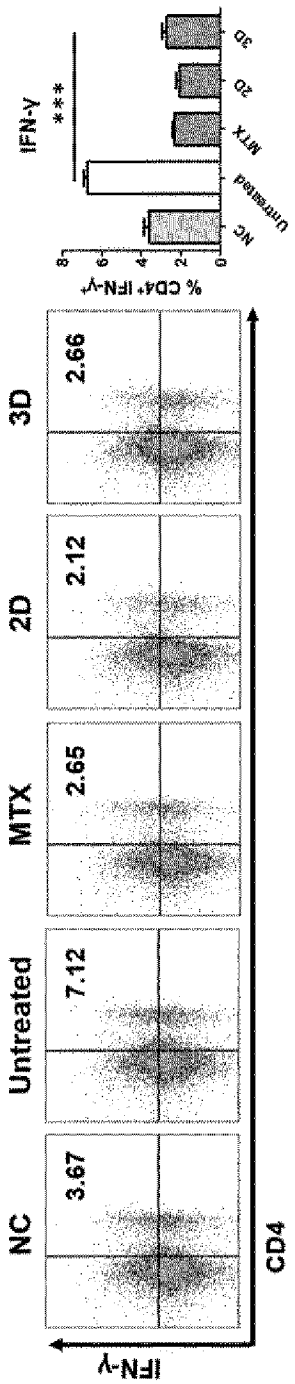
[도8a]



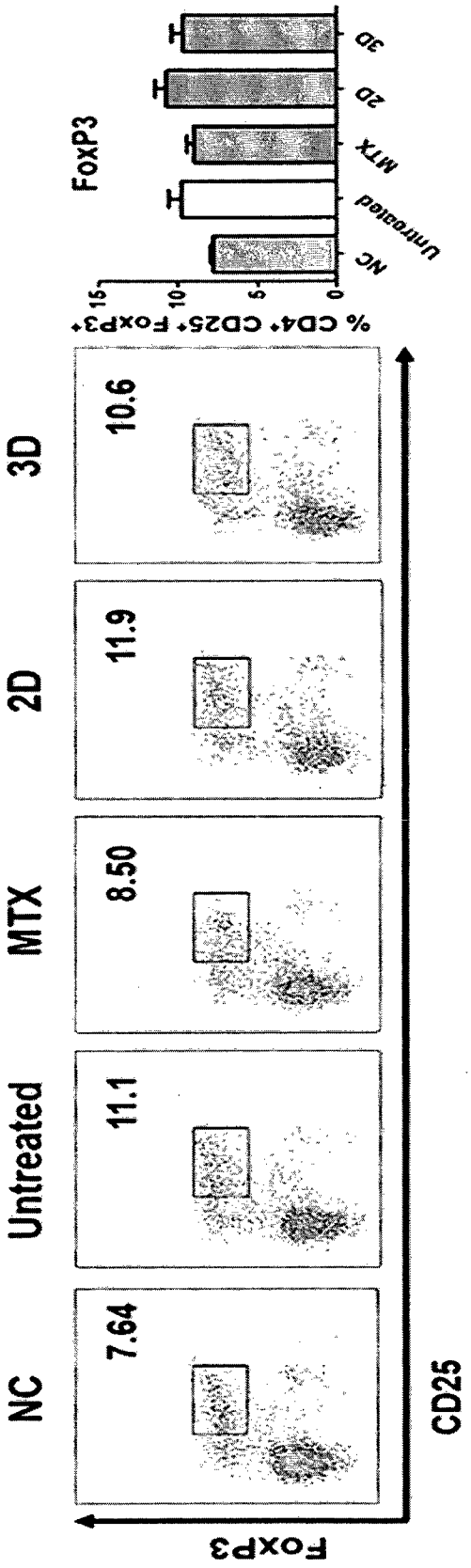
[도8b]


***
% CD4 T expression / total splenocyte
25
20
15
10
5
0
NC
Untreated
MTX
2D
3D

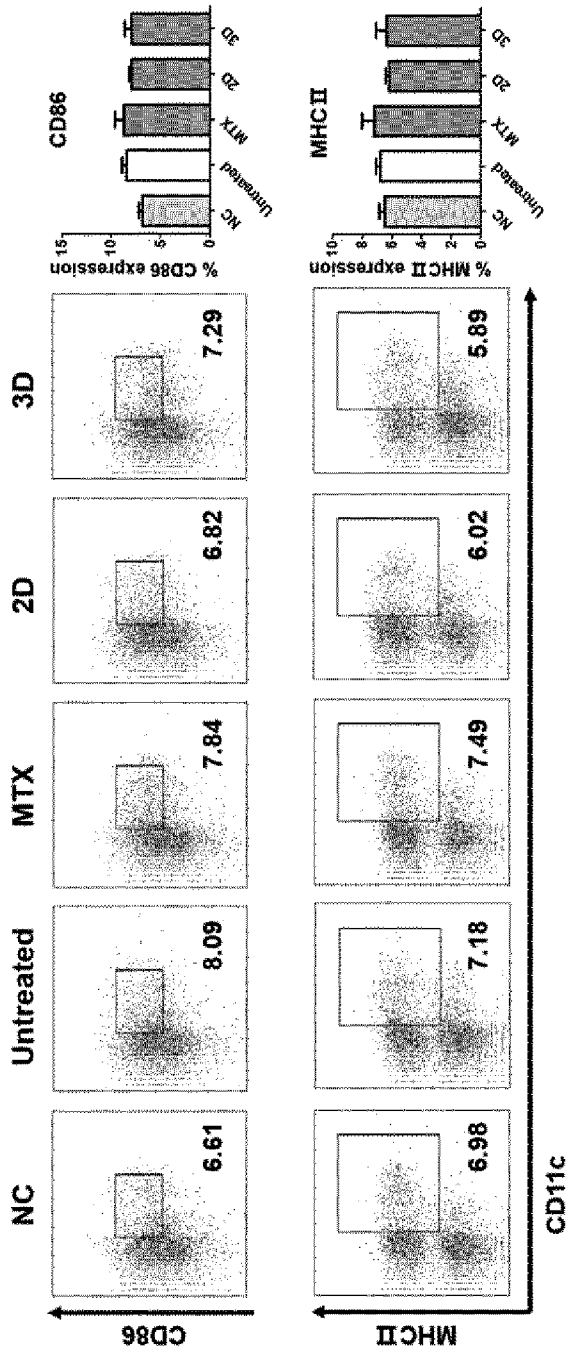
[도9a]


IFN-γ
***
% CD4+ IFN-γ+
NC
Untreated
MTX
2D
3D
3.67
7.12
2.65
2.12
2.66
CD4
IFN-γ

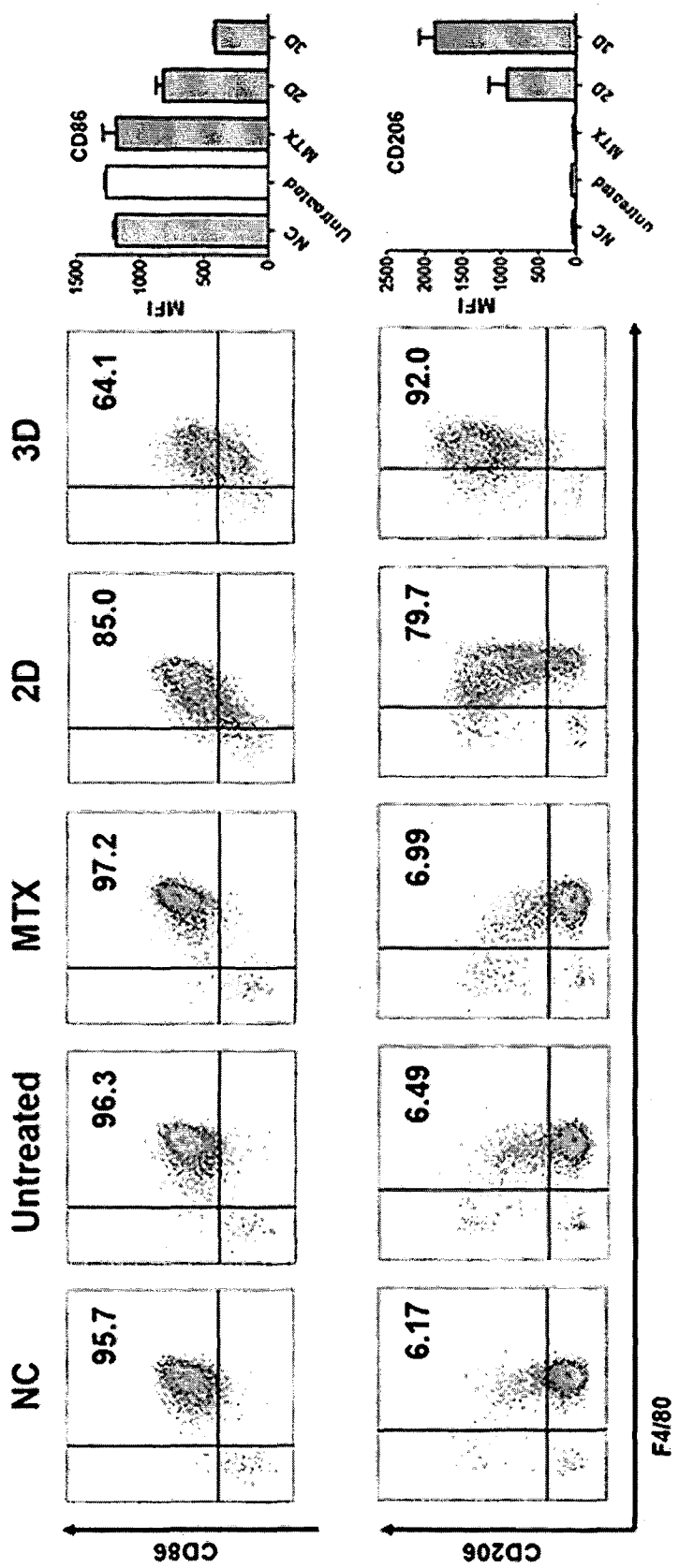
[도 9b]


NC
Untreated
MTX
2D
3D
7.64
11.1
8.50
11.9
10.6
FoxP3
CD25
FoxP3
% CD4+ CD25+ FoxP3+
0
5
10
15
NC
Untreated
MTX
2D
3D

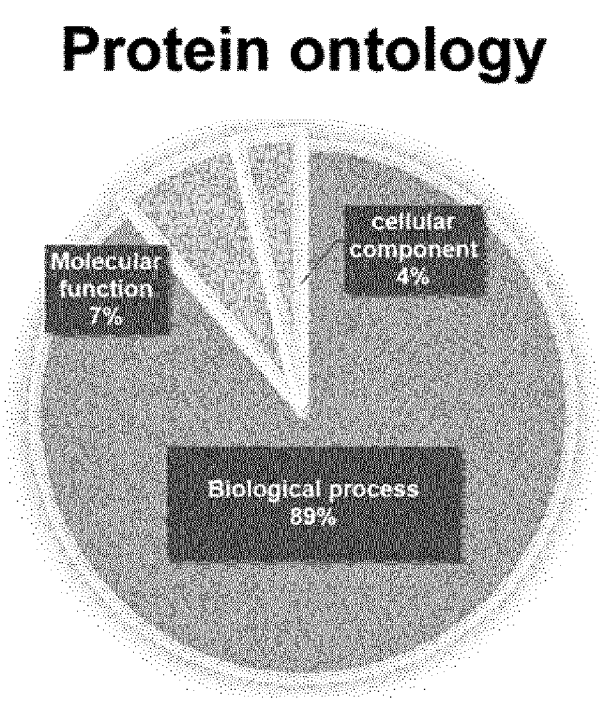
[도10a]


CD86
MHCII
CD11c
NC
Untreated
MTX
2D
3D
6.61
8.09
7.84
6.82
7.29
6.98
7.18
7.49
6.02
5.89
% CD86 expression
% MHCII expression
CD86
MHC II
NC
Untreated
MTX
2D
3D

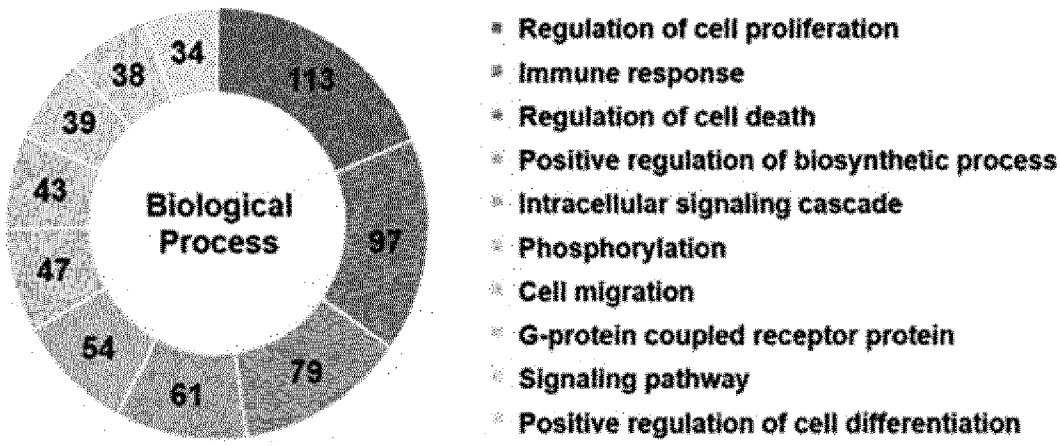
[도 10b]


CD86
CD206
MFI
NC
Untreated
MTX
2D
3D
95.7
96.3
97.2
85.0
64.1
6.17
6.49
6.99
79.7
92.0
F4/80

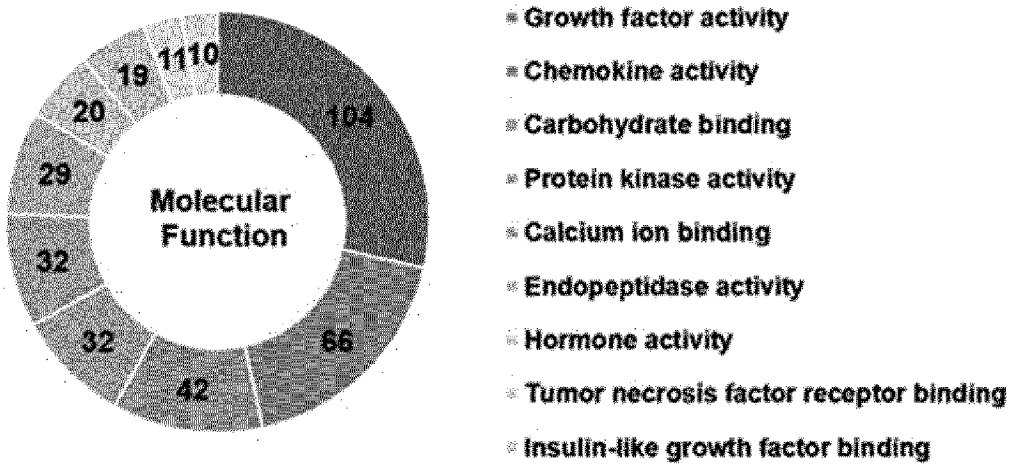
[도11]



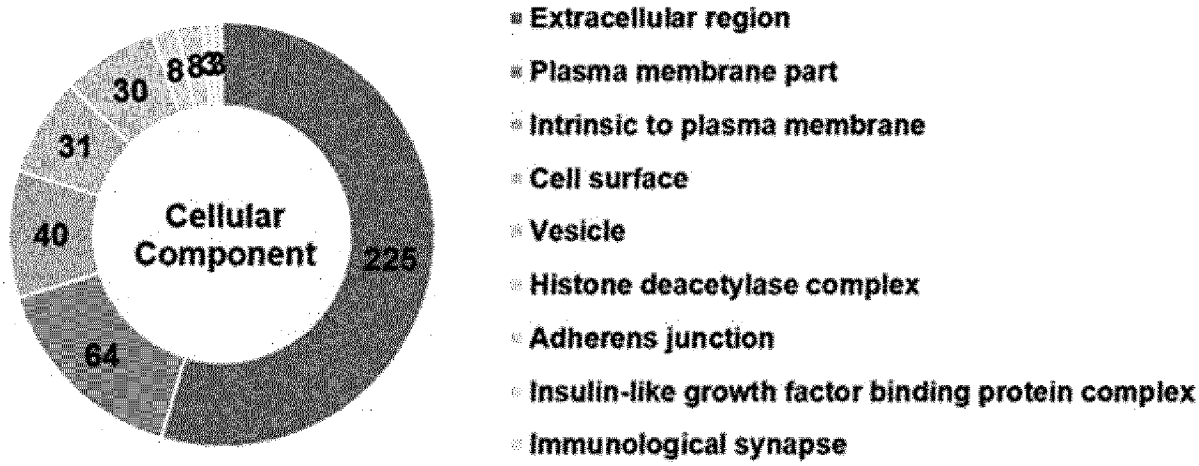
[도12a]



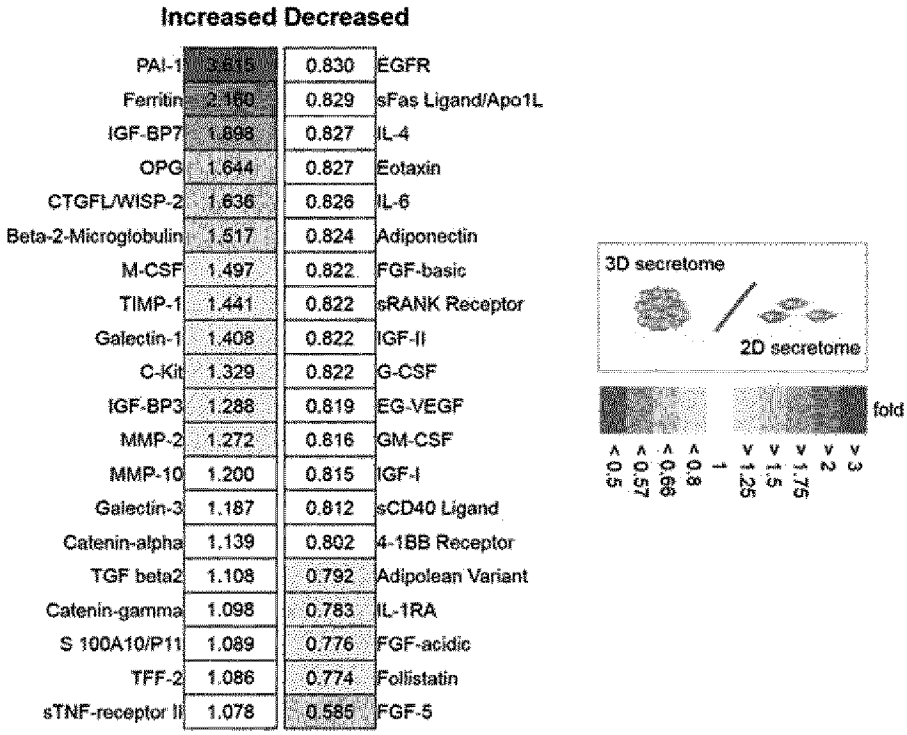
[도12b]



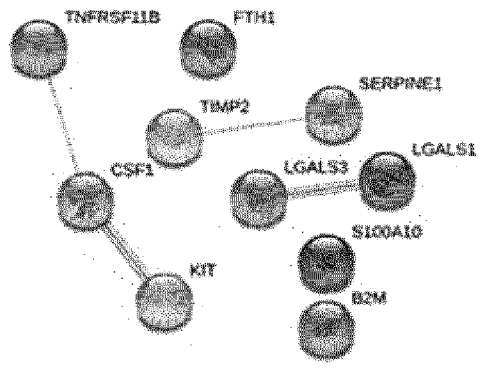
[도12c]



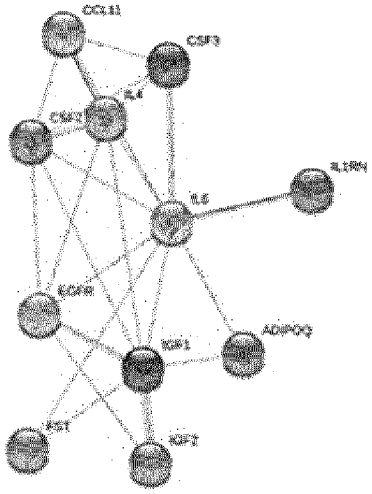
[도13]



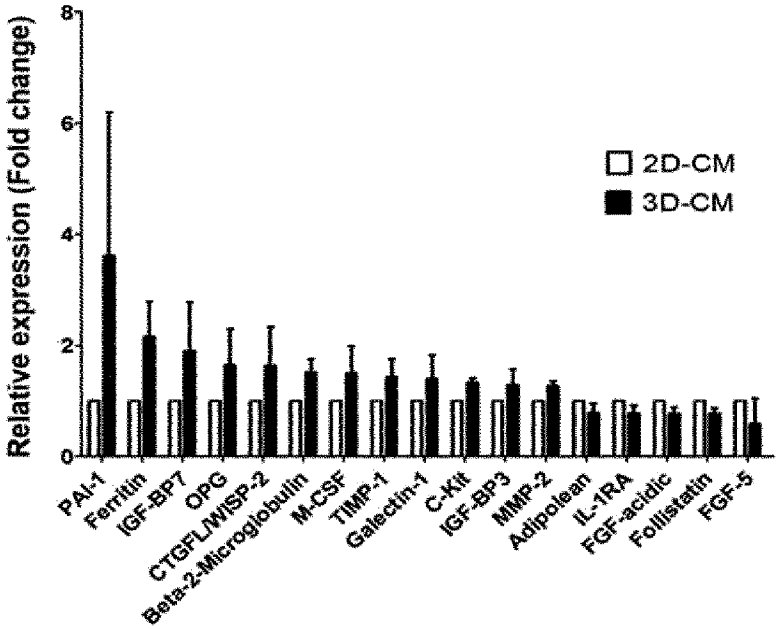
[도14a]



[도14b]



[도14c]


Relative expression (Fold change)
8
6
4
2
0
2D-CM
3D-CM
PAI-1
Ferritin
IGF-BP7
OPG
CTGFL/WISP-2
Beta-2-Microglobulin
M-CSF
TIMP-1
Galectin-1
C-Kit
IGF-BP3
MMP-2
Adipolean
IL-1RA
FGF-acidic
Follistatin
FGF-5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2017/009328

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 35/28(2006.01)i, A61K 9/00(2006.01)i, A61K 9/02(2006.01)i, A61K 9/08(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 35/28; A61K 35/44; A61K 35/12; A61P 37/00; A61K 35/14; A61K 9/00; A61K 9/02; A61K 9/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above
Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: mesenchymal stem cells, secretome, culture solution, autoimmune, rheumatoid

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SHIMOJIMA, C. et al., "Conditioned Medium from the Stem Cells of Human Exfoliated Deciduous Teeth Ameliorates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis", The Journal of Immunology, 06 April 2016. (Published online), vol. 196, pages 4164-4171 See abstract; pages 4165-4169; and figures 1-6.	1-21
X	US 2013-0195899 A1 (MEDISTEM, INC.) 01 August 2013 See abstract; and claims 1-19.	1-21
X	KIM, HS., "Mesenchymal Stem Cells vs. Mesenchymal Stem Cell Secretome for Rheumatoid Arthritis Treatment", JSM Arthritis, 04 May 2016, vol. 1, no. 1, thesis no. 1001, internal pages 1-2 See page 2.	1-21
A	WO 2014-115912 A1 (KYUNGPOOK NATIONAL UNIVERSITY HOSPITAL) 31 July 2014 See the entire document.	1-21
A	WO 2013-125899 A1 (KANG STEM HOLDINGS CO., LTD.) 29 August 2013 See the entire document.	1-21

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
27 OCTOBER 2017 (27.10.2017)	**27 OCTOBER 2017 (27.10.2017)**
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2017/009328

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **22**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 22 pertains to a method for treatment of the human body by surgery, and thus pertains to subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17 (2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2017/009328

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2013-0195899 A1	01/08/2013	US 2016-0361399 A1	15/12/2016
		US 9427450 B2	30/08/2016
WO 2014-115912 A1	31/07/2014	KR 10-2014-0095262 A	01/08/2014
WO 2013-125899 A1	29/08/2013	KR 10-1512171 B1	16/04/2015
		KR 10-2013-0096661 A	30/08/2013

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2017/009328

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 35/28(2006.01)i, A61K 9/00(2006.01)i, A61K 9/02(2006.01)i, A61K 9/08(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
A61K 35/28; A61K 35/44; A61K 35/12; A61P 37/00; A61K 35/14; A61K 9/00; A61K 9/02; A61K 9/08

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌
한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))
eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 중간엽 줄기세포, 분비 단백체, 배양액, 자가면역, 류마티스

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	SHIMOJIMA, C. 등, 'Conditioned medium from the stem cells of human exfoliated deciduous teeth ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis' The Journal of Immunology, 2016.04.06.(온라인공개), 196권, 페이지 4164-4171 초록; 페이지 4165-4169; 및 도면 1-6 참조.	1-21
X	US 2013-0195899 A1 (MEDISTEM, INC.) 2013.08.01 초록; 및 청구항 1-19 참조.	1-21
X	KIM, HS., 'Mesenchymal stem cells vs. mesenchymal stem cell secretome for rheumatoid arthritis treatment' JSM Arthritis, 2016.05.04., 1권, 1호, 논문번호 1001, 내부페이지 1-2 페이지 2 참조.	1-21
A	WO 2014-115912 A1 (경북대학교병원) 2014.07.31 전체 문헌 참조.	1-21
A	WO 2013-125899 A1 (주식회사 강스템홀딩스) 2013.08.29 전체 문헌 참조.	1-21

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2017년 10월 27일 (27.10.2017)	2017년 10월 27일 (27.10.2017)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관
감유림
전화번호 +82-42-481-3516

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2017/009328

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: 22
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 22은 치료에 의한 인체의 처치방법에 관한 것이므로 PCT 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.

2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,

3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.

2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.

3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.

4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에 관한 기재

☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.

☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.

☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2017/009328

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2013-0195899 A1	2013/08/01	US 2016-0361399 A1	2016/12/15
		US 9427450 B2	2016/08/30
WO 2014-115912 A1	2014/07/31	KR 10-2014-0095262 A	2014/08/01
WO 2013-125899 A1	2013/08/29	KR 10-1512171 B1	2015/04/16
		KR 10-2013-0096661 A	2013/08/30