

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2017년 3월 23일 (23.03.2017)



(10) 국제공개번호
WO 2017/048097 A1

- (51) 국제특허분류:
A61K 35/28 (2006.01) C12N 5/0775 (2010.01)
A61K 35/50 (2006.01) C12N 15/85 (2006.01)
A61K 35/51 (2015.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2016/010414
- (22) 국제출원일: 2016년 9월 19일 (19.09.2016)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2015-0130377 2015년 9월 15일 (15.09.2015) KR
- (71) 출원인: 주식회사 강스템바이오텍 (KANGSTEM BIOTECH CO., LTD.) [KR/KR]; 08826 서울특별시 관악구 관악로 1, 서울대학교 수의과대학 생명공학연구동 (81동) 2층, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 강정선 (KANG, Kyung Sun); 06338 서울특별시 강남구 개포로 116길 17 (일원동), Seoul (KR). 김태윤 (KIM, Tae Yoon); 05572 서울특별시 송파구 올림픽로 4길 15, 8동 702호 (잠실동, 아시아선수촌아파트), Seoul (KR).
- (74) 대리인: 이희숙 (LEE, Hee Sook); 06141 서울특별시 강남구 테헤란로 33길 11, 9층 (역삼동, JS빌딩) 시원국제특허법률사무소, 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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, 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).

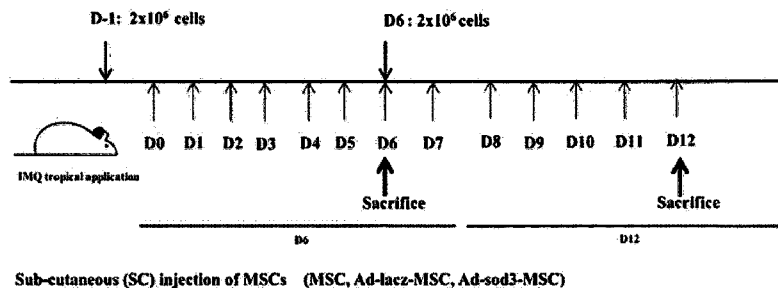
공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING INFLAMMATORY DISEASES, CONTAINING, AS ACTIVE INGREDIENT, STEM CELLS OVEREXPRESSING SOD3

(54) 발명의 명칭 : SOD3를 과발현하는 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 조성물

【도 10】



(57) Abstract: The present invention provides a pharmaceutical composition for preventing or treating inflammatory diseases, containing, as an active ingredient, stem cells overexpressing SOD3. The present inventor has ascertained that mesenchymal stem cells (MSCs) overexpressing SOD3 have a stronger antioxidant activity and immune regulatory function than normal MSCs, and thus the MSCs overexpressing SOD3 can be an effective treatment agent for inflammatory diseases, autoimmune diseases, organ transplant rejection and the like.

(57) 요약서: 본 발명은 SOD3를 과발현하는 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다. 본 발명자는 SOD3를 과발현하는 중간엽 줄기세포 (MSC)가 일반 MSC에 비해 더욱 강한 항산화 활성, 면역조절기능을 가진다는 것을 확인하였으며, 따라서, SOD3를 과발현하는 MSC는 염증성 질환이나 자가면역질환, 장기이식 거부반응 등에 대하여 효과적인 치료제가 될 수 있다.

WO 2017/048097 A1

【명세서】**【발명의 명칭】**

SOD3를 과발현하는 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 조성물

【기술분야】

본 출원은 2015년 9월 15일에 출원된 대한민국 특허출원 제10-2015-0130377호를 우선권으로 주장하고, 상기 명세서 전체는 본 출원의 참고문헌이다.

본 발명은 SOD3를 과발현하는 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 SOD3(extracellular superoxide dismutase)를 과발현하는 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 대한 것이다.

【배경기술】

염증성 질환이란 여러 외부 자극 혹은 내부 요인으로 인해 인체 여러 장기나 조직에 염증성 면역세포의 침윤과 더불어 부종, 발적 및 동통이 나타나고 조직학적 변화를 보이는 상태를 말한다. 이러한 염증은 손상조직과 이동하는 세포(migrating cell)로부터 생산되는 다양한 화학매개인자에 의하여 촉발되며, 이들 화학매개인자들은 염증 과정의 형태에 따라 다양한 것으로 알려져 있다. 정상적인 경우에 생체는 염증 반응을 통하여 발병 요인을 중화시키거나 제거하고 상한 조직을 재생시켜서 정상적인 구조와 기능을 회복시키지만, 그렇지 못한 경우에는 만성 염증과 같은 질병 상태로 진행되기도 한다.

이러한 염증 질환을 치료하기 위한 가장 일반적인 염증성 질환 예방 또는 치료제는 크게 스테로이드성 및 비스테로이드성 염증성 질환 예방 또는 치료용제로 구분되며, 이중 대부분의 합성 염증성 질환 예방 또는 치료용제는 부작용 이외에 여러 가지 부작용을 수반하는 경우가 많으므로 효과가 탁월하며 부작용이 적은 염증성 질환 예방 또는 치료제의 개발이 절실히 요구되고 있는 실정이다.

한편, 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell, MSC)는 중간엽 조직 계통으로 분화하는 능력을 가진 다분화능 전구세포이다. 이 세포는 다양한 세포에서 적응 및 선천성 면역 반응을 조절하여 잠재적인 면역 조절 효과를 매개할 수 있어, 자가

면역 질환을 치료하기 위한 새로운 대안으로 떠오르고 있다. 또한 면역억제 및 항염증 효과(유럽등록특허 제EP02298861호, 미국공개특허 제US20120269774호)를 가질 뿐만 아니라 T 세포의 활성화 및 증식을 억제하는 것으로 알려져 있다(Li ZJ et al., *PLoS ONE* 8(10): 77159, 2013).

하지만 MSC의 일반적인 항염증 효과에 대해서만 공지되어 있을 뿐, 염증 관련 질환에 대하여 더욱 강력한 효과를 갖도록 최적화된 MSC 줄기세포 치료제는 아직까지 개발이 미진한 실정이다. 따라서 염증성 질환의 예방 또는 치료에 적합한 MSC 치료제 개발이 절실히 요구된다.

【발명의 상세한 설명】

【기술적 과제】

이에, 본 발명자들은 부작용은 현저히 낮으면서 염증성 질환의 예방 및 치료에 적합한 줄기세포를 포함하는 염증성 질환의 치료제에 대하여 연구하던 중 중간엽 줄기세포(MSC)에서 SOD3를 과발현하면 면역조절과 항산화 효과 등의 기능이 현저하게 향상되는 것을 발견하여 본 발명을 완성하였다.

따라서, 본 발명의 목적은

SOD3(extracellular superoxide dismutase)를 과발현하는 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은

염증성 질환 치료용 제제를 제조하기 위한 SOD3를 과발현하는 줄기세포의 용도를 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은

상기 SOD3를 과발현하는 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물의 유효량을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 것을 특징으로 하는 염증성 질환의 치료 방법을 제공하는 것이다.

【기술적 해결방법】

상기의 목적을 달성하기 위해, 본 발명은

SOD3(extracellular superoxide dismutase)를 과발현하는 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 염증성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

본 발명의 다른 목적을 달성하기 위해, 본 발명은

염증성 질환 치료용 제제를 제조하기 위한 SOD3를 과발현하는 줄기세포의 용도를 제공한다.

본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위해, 본 발명은

상기 SOD3를 과발현하는 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물의 유효량을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 것을 특징으로 하는 염증성 질환의 치료 방법을 제공한다.

이하 본 발명을 상세히 설명한다.

달리 규정되지 않는 한, 본 발명에 사용된 기술적 및 과학 용어들은 본 발명이 속하는 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 이해하는 바와 동일한 의미를 갖고, 다음 문헌에 기재된 바와 부합된다(Singleton et al, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, 2nd Ed., 1994; Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, Immunobiology, 5th Ed., 2001).

본 발명은 SOD3를 과발현하는 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 염증성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

본 발명에 따른 상기 약학적 조성물은 SOD3를 유효성분으로 포함하는 조성물일 수도 있고, 유효성분으로서 SOD3로 이루어진 조성물일 수도 있으며, 또는 유효성분으로서 SOD3로 필수적으로 구성되는 조성물일 수도 있다.

본 명세서에서 용어 “~을 포함하는(comprising)” 이란 “함유하는(including)” 또는 “특징으로 하는(characterized by)”과 동일한 의미로 사용되며, 본 발명에 따른 조성물 또는 방법에 있어서, 구체적으로 언급되지 않은 추가적인 구성 성분 또는 방법의 단계 등을 배제하지 않는다. 또한 용어 “~로 구성되는

(consisting of)”이란 별도로 기재되지 않은 추가적인 요소, 단계 또는 성분 등을 제외하는 것을 의미한다. 용어 “필수적으로 구성되는(essentially consisting of)”이란 조성물 또는 방법의 범위에 있어서, 기재된 물질 또는 단계와 더불어 이의 기본적인 특성에 실질적으로 영향을 미치지 않는 물질 또는 단계 등을 포함할 수 있는 것을 의미한다.

본 발명에서 "단백질"은 폴리펩타이드(polypeptide) 또는 펩타이드(peptide)와 호환성있게 사용되며, 예컨대, 자연 상태의 단백질에서 일반적으로 발견되는 바와 같은 아미노산 잔기의 중합체를 말한다.

상기 "SOD3(superoxide dismutase 3, extracellular)"란 세포의 분비 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈(extracellular superoxide dismutase, EC-SOD) 단백질로서, 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈(superoxide dismutase) 단백질의 세 가지 종류 중 세포 외부로 분비되는 단백질을 일컫는다. 인간의 정상형(wild-type, WT) SOD3 단백질의 아미노산 서열은 NCBI Genbank database의 NP_003093.2 등의 accession number로 공지되어 있으며, 인간의 SOD3 단백질을 암호화하는 mRNA의 염기서열은 NM_003102.2 등의 accession number로 공지되어 있다.

SOD3 단백질은 음이온의 부동 변화(dismutation) 반응을 촉매하고, 세포 외부로 분비되어 세포외 기질(extracellular matrix)에 존재하며, 항혈관신생, 항염증, 항화학주성, 항암활성 등의 효과를 나타낸다. 구체적으로는 피부암, 색소 침착성 질환, 광노화, 피부염, 표피증식질환, 건선, 아토피, 두드러기 및 알레르기 등의 질환을 치료하는데 유효한 효과를 가지고 있으며(대한민국 등록특허 제 100676502호), 혈관 신생에 의한 질병의 예방 및 치료에도 효과가 있는 것으로 알려져 있다(대한민국 등록특허 제 101019470호). 또한, 대장암, 폐암, 간암, 위암, 식도암, 췌장암, 담낭암, 신장암, 방광암, 전립선암, 고환암, 자궁경부암, 자궁내막암, 유방암, 난소암, 갑상선암, 뇌암, 두경부암, 악성흑색종, 림프종 등의 암 질환에도 유효한 효과를 가지는 것으로 알려져 있다(대한민국 공개특허 제 10-2008-108876호).

본 발명에서 SOD3는 인간 및 마우스를 포함하는 포유동물, 바람직하게는 인간으로부터 유래한 단백질을 의미하며, 가장 바람직하게는 서열번호 1로 표시되는

인간의 정상형 SOD3 단백질의 아미노산 서열, 또는 서열번호 3으로 표시되는 재조합 SOD3 단백질(209E-SOD3)의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다.

상기 인간의 정상형 SOD3는 N-말단 부위의 개시 메치오닌 아미노산을 포함하여 18번째의 알라닌까지는 시그널 펩타이드로 되어 있으며, 활성화된 SOD3는 상기 시그널 펩타이드가 제거된 222개의 아미노산으로 구성된다. SOD3의 C-말단 영역(아미노산 잔기 210번~215번)에는 헤파린 결합 도메인(heparin binding domain)을 가지고 있다. 시그널 펩타이드를 포함하는 240개의 아미노산으로 이루어진 전체 길이의 인간 SOD3의 아미노산 서열은 서열번호 1에 표시된 바와 같다.

또한 본 발명에서의 SOD3는 전체 길이의 인간 SOD3 중 N-말단 부위의 시그널 펩티드 및 C-말단 부위의 헤파린 결합 도메인이 포함된 13개의 아미노산(아미노산 잔기 210번~222번)이 제거된 209개의 아미노산으로 이루어진 것일 수도 있다. 상기 시그널 펩타이드와 헤파린 결합 도메인이 제거된 SOD3 단백질은 본 발명에서 209E-SOD3 또는 209E로 지칭할 수 있으며, 바람직하게는 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 가질 수 있다. 상기 209E-SOD3는 항-SOD3 항체와도 결합할 수 있으며, 정상형 SOD3와 동일한 효소 활성 및 ROS 제거 활성을 갖는 것으로 확인된 바 있다(대한민국 공개특허 제10-2008-0108876호).

본 발명에서의 SOD3는 정상형 SOD3 또는 209E-SOD3 단백질과 실질적으로 동등한 생리 활성을 갖는 기능적 동등물(functional equivalent), 기능적 유도체(functional derivative) 및 상기 SOD3 단백질의 단편이 모두 포함된다. 실질적으로 동등한 생리 활성이란 정상형 SOD3와 동등한 수준의 효소 활성 및/또는 세포의 분비 특성과 세포내 투과성을 갖는 것을 의미하며, SOD3와 동등한 효소 활성으로 인하여 줄기세포, 바람직하게는 중간엽 줄기세포에서 과발현되었을 때 줄기세포의 면역 및 염증 조절능력을 향상시키게 된다. 상기 줄기세포의 면역 및 염증 조절능력이란 구체적으로는 염증으로 인한 면역 세포의 침윤 억제, 전염증성 T 세포의 증식과 분화 및 전염증성 매개체/사이토카인의 발현의 억제, 염증조절능을 갖는 Treg 세포의 증식과 분화 및 Treg 관련 사이토카인의 발현 증가, NFkB 신호전달계의 인산화 억제 등을 의미하며, 본 명세서에서 서술한 본 발명의 SOD3를 과발현하는 줄기세포가 갖는 특성에서 기재한 바와 같다.

상기 SOD3의 기능적 동등물은 바람직하게는 서열번호 1 또는 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상의 서열 상동성(homology)을 갖는 폴리펩티드일 수 있다. 또한 상기 기능적 동등물은 본 발명의 SOD3의 아미노산 서열 중 일부가 부가, 치환 또는 결실의 결과 생성될 것일 수 있다. 상기에서 아미노산의 치환은 바람직하게는 보존적 치환이다. 천연에 존재하는 아미노산의 보존적 치환의 예는 다음과 같다: 지방족 아미노산(Gly, Ala, Pro), 소수성 아미노산(Ile, Leu, Val), 방향족 아미노산(Phe, Tyr, Trp), 산성 아미노산(Asp, Glu), 염기성 아미노산(His, Lys, Arg, Gln, Asn) 및 황 함유 아미노산(Cys, Met). 또한 상기 기능적 동등물에는 본 발명의 SOD3의 아미노산 서열상에서 아미노산의 일부가 결실된 변형체도 포함된다. 상기 아미노산의 결실 또는 치환은 바람직하게는 SOD3 단백질의 생리활성에 직접적으로 관련되지 않은 영역에 위치해 있다. 아울러 상기 SOD3의 아미노산 서열의 양 말단 또는 서열 내에 몇몇의 아미노산이 부가된 변형체도 포함된다. 예를 들어 209E-SOD3과 같이 SOD3의 효소 활성에는 영향을 주지 않으면서 SOD3 전체 길이의 일부분이 제거된 펩티드일 수 있으며, SOD3 단백질과 실질적으로 동등한 생리 활성을 갖는 SNP(small nucleotide polymorphism) 등 SOD3의 다형성(polymorphism) 단백질일 수도 있다.

본 발명의 기능적 동등물의 범위에는 본 발명의 SOD3 단백질의 기본 골격 및 이의 생리 활성을 유지하면서 단백질의 일부 화학 구조가 변형된 폴리펩티드 유도체도 포함된다. 예를 들어, 여기 한정되는 것은 아니지만, 본 발명의 SOD3 단백질의 안정성, 세포내 투과성, 저장성, 휘발성 또는 용해도 등을 변경시키기 위한 구조 변경이 이에 포함된다.

본 발명의 약학적 조성물에 유효성분으로 포함되는 SOD3를 과발현하는 줄기세포는 바람직하게는 중간엽 줄기세포일 수 있다.

본 발명의 "중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell, MSC)"는 뼈(bone), 연골(cartilage), 지방조직(fat tissue), 힘줄(腱), 신경조직(nerve tissue), 섬유아세포(fibroblast) 및 근육세포(muscle cell) 등 구체적인 장기의 세포로 분화되기 전의 다분화 전구 세포(multipotent progenitor)를 말한다. 본 발명에서 중간엽 줄기세포는 분화되지 않은 상태, 즉 줄기세포 상태로 조성물 중에 포함된다. 본 발명

의 중간엽 줄기세포는 포유류에서 유래한 것일 수 있으며 바람직하게는 인간에서 유래한 것일 수 있다.

본 발명의 중간엽 줄기세포는 제대, 제대혈, 태반, 골수, 지방조직, 근육, 양수 및 양막으로 이루어진 군으로부터 선택된 조직에서 유래한 것일 수 있다. 바람직하게는 본 발명의 중간엽 줄기세포는 제대혈 또는 태반 유래 중간엽 줄기세포일 수 있으며, 가장 바람직하게는 제대혈 유래 중간엽 줄기세포일 수 있다. 제대혈 또는 태반 유래 중간엽 줄기세포는 골수 유래 중간엽 줄기세포보다 분화 능력 및 증식 능력이 뛰어난 특징을 지닌다.

본 발명에서 사용된 용어 제대혈은 포유동물의 태반과 태아를 연결하는 제대 정맥으로부터 채취된 혈액을 말한다. 상기 제대혈은 출산시 공여자의 제대정맥으로부터 용이하게 채취할 수 있다. 보다 구체적으로, 정상질식분만의 경우에는 출산 후 자궁 내에 아직 태반이 남아있는 상태에서 밖으로 만출된 제대정맥으로부터 채취할 수 있다. 또는 제왕절개의 경우에는 출산 후 태반 역시 자궁 밖으로 만출된 상태에서 제대정맥으로부터 채취한다.

본 명세서에서, "태반 줄기세포"라는 용어는 형상, 세포 표면 표지 또는 1차 배양 후 계대 수에 무관하게 포유류 태반에서 유래한 줄기세포 또는 전구세포로서 조직 배양 기질(tissue culture substrate), 예를 들어 조직 배양 플라스틱 또는 피브로넥틴 피복 조직 배양판에 부착하는 것을 말한다. 그러나 본 명세서에서 "태반 줄기세포"라는 용어는 영양막 세포(trophoblast)를 가리키는 것은 아니다. 세포는 줄기세포의 특징 중 적어도 하나, 예를 들어 적어도 하나 이상의 세포 유형으로 분화할 수 있는 능력 등을 갖추고 있으면 줄기세포이다.

태반 또는 제대혈로부터 당업계에 공지된 방법에 따라 중간엽 줄기세포를 분리할 수 있다. 상기 중간엽 줄기세포의 분리는 종래 알려진 어떤 분리방법에 의해서도 분리될 수 있다. 예를 들면, 밀도차를 이용한 분리법(density gradient fractionation), 면역선택(immunoselection) 및 감별 부착 분리법(differential adhesion separation) 등이 있다. 제대혈 또는 태반으로부터 중간엽 줄기세포를 분리, 배양하는 방법은 기존에 사용되어 온 방법은 모두 사용할 수 있다.

상기에서 분리된 중간엽 줄기세포의 배양은 당업계에 공지된 세포 배양용 배지에서 수행할 수 있으며, 예를 들면, 이에 한정되지는 않으나, DMEM 배지, McCoy's 5A 배지, Eagle's basal 배지, CMRL 배지, Glasgow 최소 필수 배지, Ham's F-12 배지, Iscove's modified Dulbecco's 배지, Liebovitz' L-15 배지, RPMI 1640 배지, KSB-3 basal media 등이 있다. 또한, 본 발명에서 세포 배양 배지에는 필요에 따라 한 가지 이상의 보조 성분을 첨가할 수 있는데, 우태아혈청, 말 또는 인간 등의 혈청을 비롯하여, 미생물의 오염을 막기 위한 항생제 및 항진균제 등을 사용할 수 있다.

분리 또는 배양된 줄기세포는 사용 전까지 당업계에 공지된 방법에 의해 보관될 수 있다. 일반적으로 줄기세포는 동결보호(cyoprotection) 처리한 후 냉동 보관할 수 있다. 상기 동결보호 처리는 당업계에 공지된 DMSO, 글리세롤, 폴리비닐피롤리돈, 폴리에틸렌 글리콜, 알부민, 덱스트란, 수크로스, 에틸렌 글리콜, i-에리스리톨, D-리비톨, D-만니톨, D-솔비톨, i-이노시톨, D-락토스 또는 콜린 클로라이드와 같은 동결보호제를 이용하여 수행할 수 있다.

본 발명에 따른 SOD3를 과발현하는 줄기세포는 SOD3를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 발현 벡터를 줄기세포에 형질도입시켜 수득한 것일 수 있다.

본 명세서에서 용어 "발현(expression)"은 세포에서 단백질 또는 핵산의 생성을 의미하며, "과발현(overexpression)"은 정상적인 상태 또는 일반적인 상태보다 특정 유전자의 발현의 수준이 과도하게 증가한 것을 의미한다. 본 발명에서 SOD3를 과발현하는 줄기세포는 구체적으로는 SOD3 단백질의 발현 수준이 증가하여 SOD3 단백질의 활성이 증가되어 있는 줄기세포이다.

본 명세서에서 "폴리뉴클레오티드(polynucleotide)" 또는 핵산은 단일-또는 이중-가닥의 형태로 된 데옥시리보뉴클레오티드(DNA) 또는 리보뉴클레오티드(RNA)를 말한다. 다른 제한이 없는 한, 자연적으로 생성되는 뉴클레오티드와 비슷한 방법으로 핵산에 혼성화되는 자연적 뉴클레오티드의 공지된 아날로그도 포함된다.

줄기세포에서 SOD3를 과발현시키는 가장 일반적인 방법은 SOD3 유전자를 포

함하는 폴리뉴클레오티드를 줄기세포에 인위적으로 또는 실험적으로 도입하여 SOD3 유전자의 복제개수(copy number)를 증가시키는 것이다. 원래의 세포가 가지고 있던 것이 아닌 외인성(exogenous) 폴리뉴클레오티드를 세포 내부로 주입하는 것을 형질 감염(transfection), 그리고 이로 인하여 세포의 유전적 형질이 변화되는 현상을 형질전환(transformation)이라고 한다. 상기 외인성 폴리뉴클레오티드가 바이러스 또는 바이러스 유래 벡터를 통하여 세포 내부로 주입되는 과정을 형질도입(transduction)이라고 부른다. 본 명세서에서는 용어 ‘형질전환’, ‘형질감염’ 그리고 ‘형질도입’ 이 외인성 폴리뉴클레오티드를 세포에 도입되어 정상형과 다른 유전적 형질을 갖게 된 것 또는 그러한 과정을 일컫는 것으로서 유사한 의미로 사용된다.

본 발명에서 SOD3를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 포유류에서 유래한 SOD3 유전자일 수 있으며, 바람직하게는 서열번호 2로 표시되는 인간의 정상형 SOD3를 암호화하는 염기서열 또는 서열번호 4로 표시되는 209E-SOD3를 암호화하는 염기서열을 포함하는 것일 수 있다.

또한 상기 SOD3를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 인간의 SOD3의 염기서열, 바람직하게는 서열번호 2 또는 서열번호 4로 표시되는 염기서열과 실질적인 동일성을 나타내는 서열도 포함한다. 실질적인 동일성은 인간 SOD3를 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 염기서열과 비교 대상이 되는 임의의 다른 염기서열을 최대한 대응되도록 정렬하고, 당해 기술분야에서 통상적으로 이용되는 분석 방법과 알고리즘을 이용하여 서열을 비교 분석하는 경우, 최소 70% 이상의 상동성을 나타내는 서열을 의미한다. 상기 SOD3를 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 염기서열과 실질적으로 동일한 염기서열에 의해 암호화되는 단백질은 SOD3 단백질, 바람직하게는 서열번호 1 또는 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 단백질의 기능적 동등물일 수 있다. SOD3 단백질의 기능적 동등물에 대하여서는 본 명세서에서 앞서 서술한 바와 같다.

본 명세서에서 "재조합 발현 벡터"란 적합한 숙주세포에서 목적 단백질 또는 목적 핵산(RNA)을 발현할 수 있는 벡터로서, 폴리뉴클레오티드(유전자) 삽입물이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물을 말한다. 작동가능하게 연결된(operably linked)"이란 일반적 기능을 수행하도록 핵

산 발현 조절 서열과 목적하는 단백질 또는 RNA를 코딩하는 핵산 서열이 기능적으로 연결(functional linkage)되어 있는 것을 말한다. 즉, 단백질 또는 RNA를 코딩하는 핵산 서열이 발현 조절 서열에 의해 유전자 발현이 가능하게 되는 방식으로 연결된 것을 의미하는 것으로, 예를 들어 프로모터와 단백질 또는 RNA를 코딩하는 핵산 서열이 작동가능하게 연결되어야 코딩하는 핵산 서열의 발현에 영향을 미칠 수 있다. 재조합 벡터와의 작동적 연결은 당해 기술분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용한다.

본 발명의 재조합 발현 벡터는 클로닝 분야에서 통상적으로 사용되는 벡터라면 그 종류가 특별히 제한되지 않으며, 그 예로는 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파아지 벡터 및 바이러스 벡터 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 바람직하게는 바이러스에서 유래한 벡터를 사용할 수 있다. 상기 플라스미드에는 대장균 유래 플라스미드(pBR322, pBR325, pUC118 및 pUC119, pET-22b(+)), 바실러스 서브틸리스 유래 플라스미드(pUB110 및 pTP5) 및 효모 유래 플라스미드(YEp13, YEp24 및 YCp50) 등이 있으며, 상기 바이러스는 레트로바이러스, 아데노바이러스 또는 백시니아 바이러스와 같은 동물 바이러스, 배큘로 바이러스와 같은 곤충 바이러스 등이 사용될 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.

본 발명에 따른 핵산을 포함하는 발현 벡터는 당업계에 공지된 방법, 예를 들어 이에 한정되지는 않으나, 일시적 형질감염(transient transfection), 미세주사, 형질도입(transduction), 세포융합, 칼슘 포스페이트 침전법, 리포솜 매개된 형질감염(liposome-mediated transfection), DEAE 덱스트란-매개된 형질감염(DEAE Dextran-mediated transfection), 폴리브렌-매개된 형질감염(polybrene-mediated transfection), 전기천공법(electroporation), 유전자 총(gene gun) 및 세포 내로 핵산을 유입시키기 위한 공지의 방법에 의해 줄기세포 내로 도입할 수 있다.

본 발명에 따른 SOD3를 과발현하는 줄기세포는 SOD3를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 발현 벡터를 바람직하게는 전기천공법 또는 바이러스로 매개되는 형질도입 방법을 이용하여 중간엽 줄기세포에 주입하여 형질전환한 것일 수 있다.

또한 본 발명의 줄기세포는 재조합 바이러스 벡터를 이용하여 다음의 단계를 거쳐 제조될 수 있다: (a) 서플벡터, SOD3를 암호화하는 핵산 및/또는 단백질 형질 도입 도메인이 작동가능하게 연결된 DNA 컨스트럭트를 포함하는 재조합 바이러스 벡터를 제조하는 단계; (b) 상기 재조합 바이러스 벡터를 바이러스 생산 세포주에 형질감염시켜 SOD3 발현 재조합 바이러스를 제조하는 단계; 및 (c) 상기 SOD3 발현 재조합 바이러스로 중간엽 줄기세포를 감염시키는 단계.

상기 서플벡터는 PUB110, PGX1416, PGX1417, PUL61, PSA77 및 PGX1418 등이 있으며, 본 발명의 일실시예에서는 ColE1의 pCA14(Invitrogen)를 사용하였다. 본 발명의 바이러스 벡터는 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 아데노연관바이러스(AAV) 벡터, 벡시니아바이러스 벡터, 허피스바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 및 아비폭스바이러스 벡터로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 한다. 바람직하게는 아데노바이러스 벡터일 수 있다.

본 발명에 따른 SOD3로 형질전환되어 SOD3를 과발현하는 중간엽 줄기세포(MSC)는 면역억제기능을 갖는 유전자의 발현이 증가되어 있으며, 염증 반응에서 호중구 및 수지상세포의 기능과 침윤을 조절함으로써 강력한 면역 조절 능력을 발휘한다. 뿐만 아니라 SOD3를 과발현하는 MSC는 전염증성 매개체/사이토카인의 발현량을 현저하게 감소시켰으며, 특히 TLR-7와 NF κ B의 활성화를 억제하는 것으로 확인되었다. 본 발명자의 실시예는 SOD3를 과발현하는 MSC가 염증성 질환에 대하여 효과적인 치료제가 될 수 있음을 시사한다.

본 발명의 SOD3를 과발현하는 줄기세포는 하기 특성 중 적어도 한 가지 특성을 가지는 것을 특징으로 한다.

(a) CD4⁺ T 세포, CD8⁺ T 세포, 호중구, 수지상세포로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 침윤을 억제하는 특성을 나타냄;

(b) CD4⁺ T 세포, CD8⁺ T 세포, Th1 세포, Th2 세포, Th17 세포의 분화 및 증식은 억제하고 Treg의 분화와 증식은 촉진하는 특성을 나타냄;

(c) IL-1 α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-17, IL-20, IL-22, IL-23, TNF- α , IFN- γ , CXCL1 및 CCL20으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 염증성 사이토카인의 발현을 억제하는 반면, Treg 관련 사이토카인인 IL-10와 TGF- β 의 발현은 증가시키는 특성을 나타냄;

(d) NF κ B, p38, JNK, STAT1 및 STAT3으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 인산화를 억제하는 특성을 나타냄;

(e) 체내 cAMP 수준을 증가시키는 특성을 나타냄.

(f) icIL-1Ra, TGF- β , IL-10, HO-1, IDO-1 등 면역억제 기능이 있는 유전자의 발현이 증가되어 있는 특성을 나타냄.

본 발명자들이 다양한 세포 실험과 동물 실험을 통해 밝힌 SOD3를 과발현하는 줄기세포, 특히 중간엽 줄기세포(MSC)의 면역조절능력은 구체적으로 다음과 같다.

본 발명의 일실시예에서는 SOD3로 형질전환된 MSC(SOD3-MSC)와 공동배양한 HaCaT 세포에서는 TNF- α 와 IFN- γ 의 자극에 의해 유도되는 전염증성 사이토카인(proinflammatory cytokine)의 발현 수준이 형질전환하지 않은 MSC와 공동배양한 HaCaT에 비교하여 현저하게 감소하고, 반대로 항염증 사이토카인으로 알려진 TGF- β 의 발현은 증가한 것을 관찰하였다.

또한 다른 일실시예에서는 SOD3-MSC에서는 형질전환되지 않은 MSC 또는 대조군으로 LacZ로 형질전환된 MSC(LacZ-MSC)와 비교하여, icIL-1Ra, TGF- β , IL-10, HO-1 그리고 IDO-1과 같은 다양한 면역억제 기능을 갖는 유전자의 발현 수준이 크게 증가한 것으로 확인되었다. 이는 SOD3를 과발현하는 MSC는 그렇지 않은 MSC와 비교하여 과도한 면역 반응을 억제하는 면역 조절능력이 크게 향상된 것을 보여주는 것이다. 특히 HO-1과 IDO-1은 염증성 사이토카인과 Th17에 의한 반응을 억제하고 면역세포의 세포사멸을 유도하는 등의 면역조절 활성이 있음이 보고된 바 있다. 따라서, SOD3를 과발현하는 MSC는 HO-1 또는 IDO-1의 발현 증가를 통하여 천식, 건선, 아토피 등의 자가면역질환 및 장기이식환자에서 발생할 수 있는 염증과 이식 거부반응을 효과적으로 조절할 수 있음을 이해할 수 있다.

본 발명의 다른 일실시예에서는 MSC와 공동배양한 혼합림프구배양 실험에서 형질전환하지 않은 MSC와 비교하여 SOD3-MSC과 공동배양했을 때 CD4+ T 세포와 CD8+ T 세포 분화와 증식이 억제되는 것을 확인하였다. 또한 본 발명의 다른 일실시예에서는 미분화 T 세포들을 각각 다른 MSC(MSC, LacZ-MSC, SOD3-MSC, MSC+DETCA)와 공동배양하면서 Th1, Th2, Th17, Treg 세포로 분화 유도한 결과, SOD3-MSC는 SOD3를

과발현하지 않는 MSC와 비교하여 미분화 T 세포의 Treg 세포로의 분화는 증진시키고, Th17과 다른 T 세포로의 분화는 억제하는 것을 더욱 확인하였다.

본 발명의 다른 실시예에서는 염증성 질환 중 건선과 같은 급성 발진성 피부염의 모델로 마우스 실험을 수행하였으며, MSC를 투여한 마우스보다 SOD3-MSC를 투여한 마우스의 피부에서 홍반, 각질화 등의 피부 증상, 피부 두께, 면역 세포의 피부로의 침윤 현상 등으로 측정되는 만성 급진성 피부염의 병변이 더욱 효과적으로 개선되었다. 또한 세포 실험에서 확인한 결과와 마찬가지로, SOD3-MSC를 투여한 마우스에서 전염증성 매개체의 발현은 더 효과적으로 억제하고, Treg 세포와 관련된 IL-10의 발현은 증가시키는 것으로 확인되었다. 추가적으로 신호전달 경로에 대한 실험에서 특히 NFkB 신호전달체계를 억제하는 것을 확인하였다.

또한 난백 단백질로 유발되는 아토피 유사 피부 염증의 마우스 모델에서도 MSC를 투여한 마우스보다 SOD3-MSC를 투여한 마우스에서 염증 병변이 현저하게 개선되는 것을 확인하였다.

따라서 이상의 세포 실험과 동물 실험 결과는 SOD3의 과발현으로 인하여 MSC의 면역조절능력이 현저하게 향상되는 것을 보여주며, SOD3를 과발현하는 MSC는 염증성 질환의 예방 또는 치료에서 기존의 아무 처리하지 않은 MSC보다 더욱 효과적인 줄기세포 치료제로 사용될 수 있음을 시사한다.

본 명세서에서 "치료"란 치료되는 개체 또는 세포의 자연적 과정을 변경시키는 임상적 시술을 의미하며, 임상적 병리의 예방을 위해서도 수행될 수 있다. 치료의 바람직한 효과는 질병의 발생 또는 재발 억제, 증상의 완화, 질병의 임의의 직접 또는 간접적인 병리학적 결과의 감소, 질병 진행 속도의 감소, 질병 상태의 개선, 호전, 완화 또는 개선된 예후 등을 포함한다.

본 명세서에서 사용되는 용어 "예방"은 질병의 발병을 억제시키거나 진행을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

본 발명에서의 예방 또는 치료의 표적인 염증성 질환은 바람직하게는 Th2 또는 Th17 매개성 질환일 수 있다. 상기 "Th2 또는 Th17 매개성 질환"은 Th2 세포

또는 Th17 세포에 의해 매개되는 질환을 말한다. 본 발명에서의 Th2 또는 Th17 매개성 질환은 더욱 바람직하게는 장기이식 거부반응, 자가면역 질환, 염증성 장질환, 염증성 안질환, 아토피를 포함하는 염증성 피부질환 및 알레르기성 질환으로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있다.

상기 Th2 매개성 질환은 Th2 세포에 의해 매개되는 질환으로, 특히 알레르기를 일으키는 항원(allergen) 특이적인 Th2 세포의 생성 및 활성화로 유발되는 질환을 의미한다. Th2 세포는 CD4와 T 세포 수용체(TCR)를 발현하는 면역세포로, GATA3 전사인자 등의 작용으로 IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 등의 사이토카인을 분비하면서 체액성 면역에 관여한다. Th2 세포가 자가항원(autoantigen)에 대하여 과다 활성화되면, 비만세포(mast cell)와 IgE가 관여하는 알레르기와 과다면역반응이 일어나는 것으로 알려져 있다. 아토피 피부염, 아토피와 관련된 다른 피부 질환, 알레르기성 비염, 알레르기성 천식 등을 포함하는 Th2 매개 질환에서 Th2의 분화를 억제하거나 활성을 억제함으로써 Th2 매개성 질환을 치료할 수 있음을 알 수 있다.

상기 Th17 매개성 질환은 Th17 세포의 과다한 분화로 인한 Th17/Treg 세포간의 불균형 또는 Th17 세포의 과다한 활성화로 인해 발생하거나 병세가 악화되는 질환을 의미한다. Th17 세포는 대표적인 전염증성(proinflammatory) 세포로서, 미감작 CD4+ T 세포가 TGF β 와 IL-6가 존재하는 환경에서 항원성 자극을 받으면 ROR γ t, STAT-3 등의 전사인자의 작용을 통해 분화한다. 성숙한 Th17 세포는 염증성 사이토카인인 IL-17, IL-21, IL-22 등을 분비하며, 염증이 시작된 말초조직으로 침윤하여 대식세포, 수지상세포, 섬유모세포, 혈관내피세포, 파골세포 등과 상호작용하여 염증성 사이토카인과 기타 염증성 인자의 분비를 증폭시키고 조직 손상을 일으킨다. 이같은 Th17 세포는 다양한 자가면역 질환, 알레르기성 질환, 염증성 질환 그리고 장기이식 거부반응 등에서 주요 병인성 세포로 밝혀진 바 있다. 한편 Treg 세포는 Th17 세포와는 반대로 염증을 조절하는 역할을 하는 세포로서, 미감작 CD4+ T 세포가 TGF β 가 존재하는 환경에서 적절한 항원성 자극을 받으면 Foxp3 등의 전사인자를 발현하며 분화하게 된다. 성숙한 Treg 세포는 TGF β 와 IL-10 등의 사이토카인을 통해 T 세포의 증식과 활성을 감소시키는 것으로 알려져 있다. 특히 면역계에서 자가관용(self-tolerance)에 중요한 역할을 하며, 마우스 모델 등의 동물 실험에서 Treg 활성을 조절하여 자가면역질환과 장기이식 거부반응을 치료할 수 있는 가능성이 제시된 바 있다.

상기 Treg 세포와 Th17 세포는 각각 염증을 억제하거나 염증을 증폭시키는 상반된 기능을 하지만, 이들은 동일한 전구세포로부터 분화되며, 건강한 정상 상태에서는 두 세포 간 균형을 이루고 있다. 미감작 CD4⁺ T 세포가 TGF β 와 항원성 자극에 의해 분화할 때 존재하는 염증성 사이토카인 종류에 따라 Treg 또는 Th17 세포로 분화의 방향이 결정되는데, 병인성 Th17 세포가 과분화되거나 활성이 과다해져서 서로의 역할을 적절히 견제해야 하는 Treg 세포와 Th17 세포의 균형이 깨지면 Th17 매개성 질환이 유발되는 것이다. 따라서 상기 Th17 매개성 질환에서, Th17 세포의 증식과 분화는 억제하고 Treg의 분화를 유도함으로써 면역 세포간 균형과 항상성을 회복하여 상기 Th17 매개성 질환을 치료할 수 있음을 알 수 있다.

본 발명자들은 실시예에서 세포 실험과 동물 실험을 통해 SOD3를 과발현하도록 형질전환된 MSC(SOD3-MSC)가 Th2 또는 Th17 세포의 분화는 억제하고, Treg 세포의 분화는 증가시키는 것을 확인하였다. 특정 T 세포 분화 조건에서, SOD3-MSC와 공동배양한 미감작 CD4⁺ T 세포들은 MSC와 공동배양하지 않은 대조군 또는 SOD3를 과발현하지 않는 MSC와 공동배양한 T 세포와 비교하여 IL-4, GATA3 등 Th2 표지자와 ROR γ t와 IL-17 등 Th17 표지자의 발현량은 현저하게 감소하였으며, Foxp3, TGF β , IL-10 등 Treg 표지자의 발현량은 반대로 크게 증가하여, SOD3-MSC가 Th2 및 Th17의 분화는 억제하고 Treg의 분화는 증진시키는 것을 확인하였다(실시예 <1-7>). 또한 만성 급진성 피부 염증의 마우스 모델에서도 SOD3-MSC를 주입한 마우스의 피부에서는 SOD3를 과발현하지 않는 MSC와 비교하여 IL-6, IL-17과 IL-22 등 Th2와 Th17 관련 전염증성 사이토카인의 발현량은 현저하게 감소하였으며, 반대로 Treg 관련 염증 조절 사이토카인인 IL-10의 발현은 크게 증가한 것을 관찰하였다(실시예 <2-3>). 또한 상기 급진성 피부 염증 마우스 모델과 아토피 유사 피부 염증의 마우스 모델에서 SOD3-MSC는 SOD3를 과발현하지 않는 MSC와 비교하여 증상을 개선시키는 탁월한 효과가 있었다. 이상의 실험 결과는 SOD3를 과발현하는 MSC가 Th2 또는 Th17 매개 질환의 효과적인 세포 치료제가 될 수 있음을 시사한다.

또한 본 발명에서 염증성 질환은 보다 구체적으로는 급성 또는 만성 장기이식 거부반응, 이식편대숙주병, 염증성 장 질환, 크론병, 궤양성 대장염, 염증성 피부 질환, 다발성 경화증, 췌장염, 외상 유발 쇼크, 기관지 천식, 알러지성 비염, 알러지성 결막염, 낭포성 섬유증, 급성 기관지염, 만성 기관지염, 급성 세기관지

염, 만성 세기관지염, 골관절염, 통풍, 척추관절병증, 강직성 척추염, 라이터 증후군, 건선성 관절병증, 장질환 척추염, 연소자성 관절병증, 연소자성 강직성 척추염, 반응성 관절병증, 감염성 관절염, 후-감염성 관절염, 루게릭병, 결절성 다발동맥염, 과민성 혈관염, 루게릭 육아종증, 류마티스성 다발성 근육통, 관절세포 동맥염, 칼슘 결정침착 관절병증, 가성 통풍, 비-관절 류마티즘, 점액낭염, 건초염, 상과염, 신경병증성 관절질환(neuropathic joint disease 또는 charcot joint), 출혈성 관절증(hemarthrosis), 알레르기 자반병, 비후성 골관절병증, 다중심성 세망조직구종, 척추측만증(scoliosis), 혈색소증, 혈색소병증, 고지단백혈증, 저감마글로불린혈증, 가족성 지중해열(familial Mediterranean fever), 베체트씨병, 전신성 홍반성 루푸스, 재귀열, 패혈증, 패혈성 쇼크, 급성 호흡곤란 증후군, 다발성 장기부전, 만성 폐쇄성 폐질환(chronic obstructive pulmonary disease), 류마티스성 관절염(rheumatoid arthritis), 급성 폐손상(acute lung injury), 기관지 폐 형성장애(broncho-pulmonary dysplasia), 제1형 당뇨병, 제2형 당뇨병, 동맥경화, 알츠하이머성 치매, 가족성 한랭자가염증 증후군(familial cold autoinflammatory syndrome), 머클-웰스 증후군(Muckle-Wells syndrome), 신생아발병 다발성 염증성 질환(neonatal multisystem inflammatory disease), 만성 유아 신경피부관절 증후군(chronic infantile neurologic cutaneous articular syndrome), 성인발증형 스틸병(adult-onset Still's disease), 접촉성 피부염, 포상기태(hydatidiform mole), PAPA 증후군(syndrome of pyogenic arthritis, pyoderma gangrenosum and acne), 고면역글로불린 D 증후군(hyperimmunoglobulin d syndrome), 크리오피린 관련 주기적 증후군(cryopyrin-associated periodic syndrome), 각막염, 결막염, 망막염, 망막혈관염, 포도막염, 안검염, 알레르기결막염, 건성 안(dry eye), 전신성 경피증(progressive systemic sclerosis), 다발성 근염(polymyositis), 자가면역성 뇌척수염, 중증 근무력증(myasthenia gravis), 결절성 다발성 동맥염(polyarteritis nodosa) 및 섬유조직염(fibromyalgia syndrome)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 질환인 것일 수 있다.

본 명세서에서 “장기이식 거부반응(transplant rejection)”이란, 구체적으로는 심장, 폐, 심장 및 폐 복합, 간, 신장, 췌장, 피부, 장(bowel) 또는 각막 등 고형장기의 이식 후에 이식받은 환자의 체내 면역세포가 이식기관에 침윤하고 공격함으로써 세포사멸과 조직 괴사 등을 유발하여 발생하는 급성 또는 만성 이식 거부반응, 그리고 골수이식 후 이식편대숙주병(graft-versus-host disease, GVHD)일

수 있다.

상기 염증성 질환 중 염증성 피부 질환은 건선, 아토피성 피부염, 습진성 피부염, 접촉성 피부염, 지루성 피부염, 장미색 비강진, 편평 태선, 혈관염, 모공성 홍색 비강진, 봉와직염, 모낭염, 용종, 천포창, 수포성(bullous) 천포창, 표피 수포증, 담마진, 혈관 부종, 맥관염, 홍반 및 피부 호산구 증가증으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 질환인 것을 특징으로 한다.

또한 SOD3를 과발현하는 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 허용되는 담체 및 희석제를 추가로 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용되는 담체 및 희석제는 줄기세포 및 이를 이식받을 수혜자에 대해 생물학적 및 생리학적으로 친화적인 것일 수 있다. 약학적으로 허용되는 희석제의 예로는 이에 한정되지는 않으나, 염수, 수용성 완충액, 용매 및/또는 분산제(dispersion media)를 들 수 있다.

또한 본 발명은 SOD3를 과발현하는 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 자가면역질환 또는 장기이식 거부반응의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

전술한 바와 같이, 자가면역질환 또는 장기이식 거부반응에는 공통적으로 전염증성 Th17 세포가 중요하게 관여하고 있으며, 본 발명자들이 규명한 바에 따르면 SOD3를 과발현하는 MSC는 Th17의 증식과 분화는 억제하고 염증을 조절하는 Treg 세포의 분화는 촉진시킨다. 또한 SOD3를 과발현하는 MSC는 icIL-1Ra, TGF- β , IL-10, HO-1 그리고 IDO-1과 같은 다양한 면역억제 기능을 갖는 유전자의 발현 수준이 크게 증가되어, 과도한 면역 반응을 억제하는 면역 조절능력이 크게 향상되어 있음을 확인하였다. 이에 따라 통상의 기술자는 본 발명에 따른 SOD3를 과발현하는 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물을 통하여 과도한 면역 반응을 억제함으로써 자가면역질환과 장기이식 거부반응의 예방 또는 치료의 효과를 기대할 수 있음을 알 수 있다.

상기 “장기이식 거부반응”은 전술한 바와 같이, 예를 들어 심장, 폐, 심장 및 폐 복합, 간, 신장 등의 고형 장기의 이식 후에 이식받은 환자에서 발생하는 급성 또는 만성 이식 거부반응, 그리고 골수이식 후 이식환자에서 발생하는 이식편

대숙주병(graft-versus-host disease, GVHD)일 수 있다.

또한 상기 “자가면역질환”은 체내 면역 세시스템이 외부에서 유래한 항원이 아닌 내부의 정상 세포 또는 단백질을 공격하여 발생하는 질환으로서, 구체적인 예로는 전신 홍반성 낭창, 루푸스, 류마티스 관절염, 자가면역성 간염, 자가면역성 용혈성 질환, 약물 유발성 자가면역성 용혈성 빈혈, 자가면역성 내이질환, 메니에르병, 제1형 당뇨병, 루푸스, 베체트병, 크론병, 길랑 바레 증후군, 자가면역성 갑상선염, 하시모토 갑상선염, 췌양성 대장염, 쇼그렌 증후군, 경피증, 다발성 경화증, 결절성 다발 동맥염, 건선, 아토피 피부염, 백반, 심상성 천포창(Pemphigus vulgaris), 피부근염, 중증 근무력증(myasthenia gravis), 애디슨씨 병(Addison's disease) 등이 있다.

장기이식 거부반응과 자가면역질환 모두 과다 염증 반응을 동반하는 경우가 많기 때문에, 염증성 질환으로도 분류가 가능하여 앞서 본 명세서에서 염증성 질환으로서 기재한 질환의 일부가 이에 해당할 수 있다.

또한, 본 발명의 약학적 조성물은 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 공지된 방법을 사용하여 제형화될 수 있다.

상기 본 발명의 약학적 조성물은 주사제의 형태로 제제화되는 것이 바람직하며, 투여경로로는 경피내, 근육내, 복강내, 정맥내, 피하내, 비강내, 척수강내, 구강내 경로를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 본 발명의 실시예에서는 마우스에 SOD3로 형질전환한 MSC를 국소 피하주사하여 투여하고 치료 효과를 확인하였다.

또한, 본 발명의 약학적 조성물은 도관법을 사용하여 적용될 수도 있는데, 말초 정맥 접근법에 있어서, 세포는 단일 덩어리 또는 여러 개의 더 작은 분취량으로 도관을 통해 주사될 수 있다. 도관을 이용한 세포의 투여는 예를 들면, 표준 말초 정맥내 도관, 중앙 정맥 도관, 또는 폐동맥 도관을 통한 정맥내 전달을 포함할 수 있다.

본 발명의 약학적 조성물의 투여량은 투여 경로, 투여 시간, 치료 횟수, 치료 기간, 치료가 필요한 개체의 연령, 체중, 건강 상태, 성별, 질환의 중증도, 약물에 대한 민감도, 식이 및 배설율, 등 다양한 요인을 고려하여 당업자가 상술한 특정 용도에 따른 적절한 유효량을 결정할 수 있다. 상기 "유효량"이란 개체에게 투여하였을 때, 염증성 질환이나 자가면역질환, 장기이식 거부반응 등의 개선, 치료, 예방, 검출 또는 진단 효과를 나타내기에 충분한 양을 말하며, 상기 "개체"란 동물, 바람직하게는 포유동물, 가장 바람직하게는 인간을 포함하는 동물일 수 있으며, 동물에서 유래한 세포, 조직, 기관 등일 수도 있다. 상기 개체는 치료가 필요한 환자일 수 있다.

본 발명의 방법은 염증 반응을 억제하기 위하여 필요한 만큼의 줄기세포를 이용할 수 있다. 예를 들어, 상기 줄기세포는 1×10^2 개, 1×10^5 개, 1×10^7 개, 1×10^8 개, 1×10^9 개 또는 더 많은 수의 줄기세포를 포함할 수 있다. 본 발명의 일실시예에서는 2×10^6 개의 SOD3로 형질전환 MSC를 마우스 모델에 피하주사한 바 있다.

상기 투여는 하루에 한번 또는 수회 나누어 투여할 수도 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 단독으로 투여되거나 염증성 질환이나 자가면역질환, 장기이식 거부반응 등의 예방 또는 치료에 효과가 있는 것으로 알려진 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 병용하여 투여할 경우 다른 치료제와 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 상기 단독 투여 또는 병용 투여시 본 발명의 약학적 조성물의 투여량은 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 바람직하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

또한 본 발명은 염증성 질환 치료용 제제를 제조하기 위한 SOD3를 과발현하는 줄기세포의 용도를 제공한다.

상기 용도와 관련하여, 본 발명에 따른 SOD3를 과발현 하는 줄기세포, 특히 SOD3를 과발현하는 중간엽 줄기세포(MSC)의 염증 조절 활성과 이에 기반한 염증성 질환의 치료 효과, 그리고 SOD3를 과발현하는 줄기세포의 제작 방법에 대하여서는 본 명세서에서 전술한 바와 같다.

또한 본 발명은 SOD3를 과발현하는 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물의 유효량을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 것을 특징으로 하는 염증성 질환의 치료 방법을 제공한다.

본 발명에 따른 상기 약학적 조성물은 SOD3를 유효성분으로 포함하는 조성물일 수도 있고, 유효성분으로서 SOD3로 이루어진 조성물일 수도 있으며, 또는 유효성분으로서 SOD3로 필수적으로 구성되는 조성물일 수도 있다.

상기 염증성 질환의 치료 방법과 관련하여, 본 발명에 따른 SOD3를 과발현하는 줄기세포, 특히 SOD3를 과발현하는 중간엽 줄기세포(MSC)의 염증 조절 활성과 이에 기반한 염증성 질환의 치료 효과, 치료 효과를 내기 위한 유효량 및 투여 방법 등은 본 명세서에서 전술한 바를 참고로 할 수 있다.

【유리한 효과】

따라서 본 발명은 SOD3를 과발현하는 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다. SOD3로 형질전환되어 SOD3를 과발현하는 중간엽 줄기세포(MSC)는 일반 MSC에 비해 더욱 강한 항산화 활성, 면역조절기능을 가지고 있으며 따라서, SOD3-형질도입 MSC는 염증성 질환, 자가면역질환 또는 장기이식 거부반응 등에 대하여 효과적인 치료제가 될 수 있다.

【도면의 간단한 설명】

도 1은 SOD3로 형질전환된 MSC(SOD3-MSC) 또는 대조군 MSC(MSC)의 SOD3 발현 양상을 확인하는 RT-PCR(도 1의 A), 웨스턴 블랏(도 1의 B), SOD3 효소 활성(도 1의 C) 실험 결과를 나타낸다.

도 2는 SOD3-MSC 또는 MSC에서 TNF- α 와 IFN- γ 자극으로 생성되는 활성산소종을 관찰하기 위한 형광염색사진과 형광광도계 측정 결과를 나타낸 그래프이다.

도 3은 SOD3 형질전환이 MSC의 세포 증식에 미치는 영향을 확인하기 위한 시간에 따른 MTT 어세이 결과(도 3의 A)와 측정된 세포의 수(도 3의 B)를 나타낸 그래프이다.

도 4는 SOD3-MSC 또는 MSC가 HaCaT 세포의 염증 관련 사이토카인의 발현에 미치는 영향을 확인하기 위한 RT-PCR 실험 결과를 나타낸다.

도 5는 MSC, LacZ로 형질전환된 MSC(LACZ-MSC), SOD3로 형질전환된

MSC(SOD3-MSC)에서 RT-PCR 결과로 측정된 intracellular IL-1Ra(icIL-1Ra), soluble IL-1Ra(sIL-1Ra), unspliced IL-1Ra의 발현 수준(도 5의 A) 및 icIL-1Ra mRNA 수준의 정량 분석(도 5의 B), HO-1, DIO-1, TGF- β , Galectin-1, IL-10의 발현 수준(도 5의 C), 해당 세포의 배양 배지에서 면역어세이로 측정된 PGE2의 수준(도 5의 D)을 나타낸다.

도 6은 음성대조군(Control(-)), 양성대조군(Control(+)), 그리고 실험조건에 따라 아무 처리하지 않은 MSC(MSC), LacZ 형질전환된 MSC(LACZ-MSC), SOD3 형질전환된 MSC(SOD3-MSC), DETCA 처리한 SOD3 형질전환된 MSC(SOD3-MSC+DETCA)와 각각 공동배양한 CFSE-기반 혼합림프구반응 실험에서의 CD4⁺ T 세포와 CD8⁺ T 세포 증식을 측정하기 위한 유세포분석(FACS) 결과를 나타낸다. DETCA는 SOD3 효소 억제제이다.

도 7은 도 6의 FACS 결과를 정량화한 그래프를 나타낸다. 세로축의 Stimulation index(%)는 자극을 가했을 때의 세포 수/자극을 가하지 않았을 때의 세포수의 백분율을 나타낸다.

도 8은 T 세포의 계통특이적 핵심 전사인자와 사이토카인의 발현 수준을 측정하는 RT-PCR 결과를 보여주는 그래프이다.

도 9는 Treg 계통특이적인 핵심 전사인자 및 사이토카인의 발현 수준을 측정하는 RT-PCR 결과(상단)와 MSC가 Treg 세포분화의 미치는 영향을 보여주는 유세포분석 결과(하단)를 나타낸다.

도 10은 IMQ로 유발된 만성 급진성 피부 염증의 마우스 실험 개요의 모식도이다.

도 11은 IMQ로 유발된 만성 급진성 피부 염증 생체 모델 실험에서 각 실험군 마우스의 병변 진행을 보여주는 마우스의 등 피부 사진이다.

도 12는 IMQ로 유발된 만성 급진성 피부 염증의 마우스 실험에서 H&E 염색한 각 실험군의 마우스 등 피부 절편의 현미경 사진이다.

도 13은 IMQ로 유발된 만성 급진성 피부 염증의 마우스 실험에서 각 실험군의 마우스의 등 피부의 표피 두께 측정 결과를 비교하는 막대그래프이다.

도 14는 IMQ로 유발된 만성 급진성 피부 염증의 마우스 실험에서 각 실험군의 마우스의 비장에 침윤한 T 세포, 호중구(Gr1⁺) 및 수지상세포(CD11c⁺)의 비율을 나타낸 그래프이다.

도 15는 IMQ로 유발된 만성 급진성 피부 염증의 마우스 실험에서 각 실험군의 마우스의 피부에 침윤한 T 세포, 호중구(Gr1⁺) 및 수지상 세포(CD11c⁺)를 면역

조직화학법으로 염색하여 분석한 현미경 사진이다. 화살표는 염색된 세포를 가리키는 것이다.

도 16은 IMQ로 유발된 만성 급진성 피부 염증 생체 모델 실험에서 각 실험군의 마우스의 피부에 침윤한 T 세포, 호중구($Gr1^+$) 및 수지상 세포($CD11c^+$)의 숫자를 나타낸 그래프이다.

도 17은 IMQ로 유발된 만성 급진성 피부 염증의 마우스 실험에서 각 실험군의 마우스의 피부에서 발현된 전염증성 매개체의 mRNA 수준을 측정한 RT-PCR 결과를 나타내는 그래프이다.

도 18은 IMQ로 유발된 만성 급진성 피부 염증 생체 모델 실험에서 각 실험군의 마우스의 피부에 존재하는 TLR-7, NF- κ B, JNK, p38, STAT1, STAT3, JAK1, JAK2의 발현량과 인산화 수준을 보여주는 웨스턴 블랏 실험 결과를 나타낸다.

도 19는 IMQ로 유발된 만성 급진성 피부 염증 생체 모델 실험에서 각 실험군의 마우스의 혈장에서 측정한 cAMP 농도를 나타내는 막대그래프이다.

도 20은 난백 단백질(OVA)로 유발되는 아토피 유사 피부 염증의 마우스 실험 과정을 보여주는 모식도이다.

도 21은 난백 단백질(OVA)로 유발되는 아토피 유사 피부 염증의 마우스 실험에서 각 실험군의 마우스의 병변 진행을 보여주는 등 피부 사진이다.

【발명의 실시를 위한 형태】

이하 본 발명을 상세히 설명한다.

단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<실험 방법>

MSC의 배양 및 동정

인간의 제대혈에서 유래한 중간엽 줄기세포(hUCB-MSC)는 제공자의 동의하에 인간 탯줄의 혈액 샘플로부터 수집하였다. 탯줄 혈액 샘플은 채취 후 항응고제로 작용하는 구연산 인산 포도당을 포함하는 혈액수집팩에 보관하였다. 실험을 위한 처리는 24시간 이내에 실시하였다. Ficoll-Paque PLUS 농도 구매(Amersham Biosciences)하에 원심분리하여 단핵 세포 분획을 분리하였다. HBSS(Jeil Biotech Services)로 세척하고, 저혈당 Dulbecco의 변형된 Eagle 배양액(DMEM, Invitrogen Corp), 20% 우태아 혈청(Gibco-BRL), 2mM L-글루타민, 1mM 피루브산 나트륨 및 1%

의 항생제/항진균제(Life Technologies)로 재현탁하였다. 항생제/항진균제는 100U/ml 페니실린, 100 µg/ml 스트렙토마이신, 25 µg/ml의 암포테리신B를 포함한다. 7일 후, 부착되지 않은 세포는 제거하고, 부착된 세포를 두 가지 배양액을 일주일마다 바꿔가며 배양하였다. 세포는 5% CO₂, 37°C의 습윤 조건에서 배양하였다. 융합성 세포의 약 60%를 0.1% 트립신-EDTA로 분리하였고, 배양 플레이트에 옮겨 담았다.

hUCB-MSCs의 면역표현형을 분석하여 MSC와 관련된 항원 양성 마커의 존재와 조혈 계통 마커의 부재를 유동세포 분석법(Epics XL, Beckman Coulter)으로 조사하였다. 양성 마커로는 CD90(Thy-1), CD105(endoglin) 및 SH3(CD73)가 있으며, 조혈 계통 마커로는 CD34, CD45 및 CD31과 같은 내피 세포 마커가 있다. 세포는 HLA class I에는 양성이었지만, HLA-DR에는 음성이었다. 각각의 형광표지 단일클론 항체는 Becton Dickinson에서 구입하였다.

전기천공법을 이용한 SOD3 형질전환과 SOD3 과발현의 확인

본 명세서 도 1 내지 4의 실험 결과는 전기천공법으로 SOD3 형질전환된 MSC를 이용하였다. 전기천공법(electroporation)은 MSC에 Neon™ 프로토콜(Invitrogen)에 따라 전기 자극(1000 voltage, 1 pulse)을 가하여 세포막의 투과성을 증가시킨 뒤 DNA를 세포 내에 주입하였으며, DNA의 과발현 유무는 단백질을 습득하여 웨스턴 블랏하거나, 인간 SOD3의 유전자(Genbank accession number NM_003102.2)를 PCR로 증폭시켜 1.5% agarose gel에서 확인하였다. 증폭 프로그램은 94°C 5min; 94°C 40s, 57°C 30s, 72°C 60s(35 cycle); 72°C 10min; 4°C 0-∞로 구성하였다(∞는 무한대로, 특정된 시간이 없다는 의미로 사용함).

SOD3 형질도입을 위한 아데노바이러스 발현 벡터 및 형질도입 조건

본 명세서 도 5 내지 21의 실험 결과는 아데노바이러스로 SOD3 형질도입된 MSC를 이용하였다. 인간의 SOD3를 포함하는 pRC/CMV hSOD3 벡터는 상동 재조합(homologous recombination)으로 E1 서플렉터인 pCA14에 삽입하였다. 병합 서플렉터와 벡터 dE1-k35/lacZ는 상동 재조합에 의해 다시 결합시켜서 최종적으로 dE1-k35/SOD3 컨스트럭트를 제조하였다. 재조합 아데노바이러스를 포함하는 상층액은 플라크로부터 분리하여 293 세포에서 증식시켰다. 준비된 인간의 SOD3 유전자 또는 LacZ 유전자를 포함하는 아데노바이러스는 10 감염다중도(multiplicity of infection, MOI)로 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell, MSC)에 형질도입하였

다.

SOD3의 효소 활성 측정

SOD3의 효소 활성은 슈퍼옥사이드 라디칼을 측정하여 확인하였다. 20 μ l의 시료에 200M xanthine(Sigma)와 PBS상의 50M WST-1(Dojindo)를 혼합하고, 0.0005unit XOD(Sigma)를 처리한 후, formazan 염료 신호 발색을 분광학적으로 측정하였다.

MTT 어세이

MSC의 세포 증식을 측정하기 위하여 MTT 어세이를 실시하였다(Man et al., 2006; Weichert et al., 1991). 6×10^3 cell MSC를 24시간 동안 배양하고, 배양된 MSC를 전기천공법을 이용하여 인간 SOD3 유전자로 형질전환시킨 뒤, 24시간, 48시간, 72시간째에 MTT(5mg/ml)를 해당 well에 20 μ l을 처리하고, 4시간 동안 추가 배양하였다. 배지를 제거하고, well당 100 μ l dimethyl sulfoxide로 세포를 용해시키고 흡수파장 595nm로 흡광도를 측정하였다(Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA).

TNF- α 와 IFN- γ 자극으로 MSC에서 생성되는 활성산소종의 측정

MSC는 6-well plates에 분배하여 24시간 배양한 후, 10ng/ml TNF- α 와 100 U/ml IFN- γ 로 1시간 동안 자극하였다. 30분 동안 Hanks balanced salt solution (HBSS)으로 세포를 안정시킨 후, 37°C에서 30분 동안 10 μ M 2,7-dichlorofluorescein diacetate(H2DCF-DA)로 염색하였다. 방출파장 513nm과 여기파장 488nm 조건으로 공초점 현미경(confocal microscopy)으로 DCF-fluorescence를 통해 ROS를 관찰하고, 형광광도계(Synergy, BIO TEK, US)로 형광도를 측정하였다.

면역억제 분자(immunosuppressive molecule) 발현 분석

MSC에서 발현되는 면역억제기능을 갖는 유전자 발현을 분석하기 위하여 다음과 같은 방법으로 MSC를 배양하고 TNF- α 및 IFN- γ 로 자극하거나 자극이 없는 상태에서 유전자 발현을 분석하였다:

-Day 0: 60mm 배양접시(dish)에 MSC(1×10^4 cells/cm²)를 배양한 후(medium volume: 3 ml), 70-80% confluency로 세포를 배양함.

-Day 1: 상기 배양된 MSC를 wild-type SOD3를 포함하는 아데노바이러스 또는 대조군 바이러스(AdLacZ)로 24시간 동안 감염시켜 SOD3로 형질도입되도록 함.

-Day 2: 바이러스 감염 24시간 후에 새로운 MSC 성장배지로 교체함.

-Day 3: 24시간 동안 추가 배양하고, TNF- α (10ng/ml)와 IFN- γ (100Unit/ml)를 첨가하여 자극하거나 자극하지 않은 세포를 수득하여 mRNA 수준을 측정하여 해당 유전자 발현 분석을 수행함.

유전자 발현 분석을 위해 QuantiTect Reverse Transcription Kit(QIAGEN)을 이용하여 1 μ l total RNA로부터 cDNA를 합성하였다. 간단히, gDNA wipeout Buffer를 이용하여 Template RNA에서 유전체 DNA(genomic DNA)를 제거하고, 42°C에서 2분간 배양 후, 즉시 얼음에 보관하였다. 이후 역전사효소(reverse transcriptase), RT buffer 및 RT primer mix를 template RNA와 혼합한 후, 42°C에서 15분, 95°C에서 3분 동안 반응을 진행하였다. 합성된 cDNA는 사용할 때까지 -20°C에 보관하였다. 그 후, 0.25 template, 1 μ l의 해당 primer, 10 μ l TOP polymerase mixture 그리고 8.75 μ l의 증류수를 혼합하여 최종 부피 20 μ l로 RT-PCR을 수행하였다. PCR 결과는 1% agarose gel로 전기영동하여 확인하였다. RT-PCR과 real-time PCR에 사용된 프라이머 서열은 다음과 같으며 Bioneer(Korea)에서 주문제작하였다: *icIL-1Ra* forward 5'-TTATGGGCAGCAGCTCAGTT-3'(서열번호 15), reverse 5'-TTGACACAGGACAGGCACAT-3'(서열번호 16); *sIL-1Ra* forward 5'-TCCGCAGTCACCTAATCACTC-3'(서열번호 17), reverse 5'-TTGACACAGGACAGGCACAT-3'(서열번호 18); *unspliced IL-1Ra* forward 5'-GGCCTCCGCAGTCACCTAATCACTCT-3'(서열번호 19), reverse 5'-GGTCGCACTATCC ACATCTGGG-3'(서열번호 20); *HO-1* forward 5'-CCTGGTGTCCCTTCAATCAT-3'(서열번호 21), reverse 5'-GGCGATGAGGTGGAATACAT-3'(서열번호 22); *IDO-1* forward 5'-TGTGAACCCAAAAGCATTTTTC-3'(서열번호 23), reverse 5'-AAAGACGCTGCTTTGGCC-3'(서열번호 24); *TGF- β* forward 5'-CCCAGCATCTGCAAAGCTC-3'(서열번호 25), reverse 5'-GTCAATGTACAGCTGCCGCA-3'(서열번호 26); *Galectin-1* forward 5'-GGTCTGGTCGCCAGCAACCTGAAT-3'(서열번호 27), reverse 5'-TGAGGCGGTTGGGGAACCTG-3'(서열번호 28); *IL-10* forward 5'-AAGCTGAGAACCAAGACCCAGACATCAAGGCG-3'(서열번호 29), reverse 5'-AGCTATCCCAGAGCCCCAGATCCGATTTTGG-3'(서열번호 30); *GAPDH* forward 5'-AAGGTCGGAGTCAACGGATTTGGT-3'(서열번호 31), reverse 5'-AGTGATGGCATGGACTGTGGTCAT-3'(서열번호 32).

프로스타글란딘 E2 번역어세이

프로스타글란딘 E2(prostaglandin E2, PGE2)의 측정은 모든 표준물질과 샘플

에 대하여 2번씩 반복하여 수행하였다(duplicate). 100 μ l의 표준희석물질(standard diluent; Tissue Culture Media)은 NSB와 Bo(0pg/mL 표준물질)에 넣고, 100 μ l의 표준물질을 적당한 well에 첨가하였다. 이와 유사하게 100 μ l의 샘플을 해당 well에 첨가하였다. 이후 50 μ l assay buffer를 NSB well에 첨가하고, 50 μ l blue conjugate를 total activity(TA)와 blank well을 제외한 나머지 각각의 well에 첨가하였다. 이후 50 μ l의 yellow antibody를 각 well에 첨가하고 plate shaker(~500rpm)에서 2시간 동안 반응시켰다. 400 μ l의 wash solution으로 각 well을 3번 세척하였다. 마지막 세척 후, 각 well의 버퍼를 모두 제거하고, lint free paper towel을 이용하여 남아 있는 washing buffer를 모두 제거한 다음 5 μ l blue conjugate를 TA well에 첨가하였다. 다음으로 200 μ l의 pNpp substrate solution을 각 well에 첨가하였다. 실온에서 진동 없이 45분간 반응을 진행하고, 각각의 well에 50 μ l의 stop solution을 첨가한 후, 405nm에서 흡광도를 측정하였다.

T 세포 증식 분석

MSC 및 SOD3로 형질전환한 MSC와 공동배양한 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포의 증식을 확인하기 위하여 CFSE(carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester)-MLR 분석을 실시하였다. 24웰 플레이트(Costar, Corning)에 1×10^6 개의 CFSE-표지된 반응 세포(responder cell, C57BL/6 마우스의 전체 비장세포)를 넣고, 3000cGY로 방사능 처리한 1×10^6 개의 자극 세포(stimulator cell, Balb/c 마우스 세포)로 자극하여 실시하였으며, 3회 반복하였다(triplicate). CFSE 표지는 반응 세포를 200×10^6 cell/ml 밀도로 PBS에 재현탁하였다. 5 μ M의 최종 농도로 CFSE(Molecular Probes, Inc.)를 첨가하고, 세포를 빛에 노출시키지 않고 실온에서 10분간 진탕배양하였다. 차가운 RPMI1640 배양 배지(GIBCO)를 첨가하여 세포의 CFSE 표지를 중단시키고, 5분간 얼음에 보관하였다. 세포를 분리하여 배양 배지로 2회 세척한 후, 재현탁하였다. CFSE로 표지된 반응 세포와 방사능 처리된 자극 세포는 배양 배지상에서 2×10^6 cells/ml의 밀도로 맞추고, 24웰 플레이트에서 총 1ml 부피에서 MSC 또는 SOD3로 형질전환된 MSC와 T 세포를 10:1의 비율로 혼합하여 37°C, 5% CO₂, 습도 100% 조건에서 공동배양하였다. 5일 동안 배양한 후, 세포를 수득하고 2회 세척한 후 PBS에 재현탁하였다. 반응 세포의 하위인자들은 FITC-결합 항-마우스 CD4 및 PE-결합 항-마우스 CD8(BD Biosciences Pharmingen)을 사용하여 정량하였다.

T 세포 분화 분석

미감작(naive) CD4⁺ T 세포는 MACS 컬럼(Miltenyi Biotech)을 이용하여 C57BL/6 마우스의 림프절과 비장으로부터 음성 선별(negative selection)에 의해 분리하였다. 분리된 세포는 플레이트에 부착한 CD3 항체와 10% FBS, 2mM 글루타민, 1% 페니실린-스트렙토마이신을 포함하는 RPMI1640 배지에 첨가한 CD28 항체(2 μ g/ml) 항체를 이용하여 활성화하였다. Th1 분화 조건(Th1 polarizing conditions; 10 μ g/ml anti-IL4 Ab, 10ng/ml IL-12), Th2 분화 조건(Th2 polarizing conditions; 10 μ g/ml anti-IFN- γ Ab, 10ng/ml IL-4), Th17 분화 조건(Th17 polarizing condition; 20ng/ml IL-6, 5ng/ml TGF- β , 10 μ g/ml IFN- γ 항체, 10 μ g/ml IL-4 항체) 또는 Treg 분화 조건(Treg polarizing condition; 5ng/ml TGF- β 및 10ng/ml IL-2)에서 세포를 극성화시킨 후, MSC 또는 SOD3-형질도입 MSC와 10:1의 비율로 4일 동안 공동배양하였다. CD4⁺ T 세포의 분화를 위한 사이토카인과 항체는 BD Bioscience에서 구입하였다. 배양 4일 후 세포를 수득하여 Th1, Th2, Th17 또는 Treg 세포 분화에 특이적인 분자 또는 사이토카인을 이용한 mRNA 발현 양상을 분석하였다.

실험 동물과 질환 모델

실험에 사용한 마우스는 8주차의 C57BL/6 마우스(mouse)로, 특정 병원균이 없는 상태에서 표준 마우스 사료와 물로 사육하였으며, 보건복지부의 지침에 따른 가톨릭 대학교 가톨릭 윤리위원회의 규정에 따라 다루었다.

마우스의 피부에 만성 급진성 염증을 유발하기 위하여 마우스의 등의 털을 면도하여 제거하고, 12일 동안 1일 1회 62.5mg의 시판 이미퀴모드(imiquimod, IMQ) 크림(5%, Aldara 3M pharmaceuticals)을 면도한 마우스의 피부에 도포하였다.

아토피 유사 피부 염증을 유발하기 위하여 SPF 조건에서 키운 마우스에 OVA 단백질 10 μ g과 항원보강제인 aluminum hydroxide 4mg을 혼합하여 실험 시작(D0), 7일(D7), 14일(D14)에 복강 내로 주입하여 동물을 감작시켰다. 실험 시작 21일째부터 OVA 100 μ g을 100 μ l의 PBS에 녹여 1x1cm² 크기의 거즈에 적셔 패치를 만들고, 제모한 마우스의 등에 붙여 7일 동안 면역반응을 유도하였다. 35일부터 일주일간 다시 동일한 방법으로 OVA 패치로 면역 반응을 유도하였다. 실험 시작 후 42일에 MSC, LacZ-MSC, 그리고 SOD3-MSC를 병변 부위에 주사하고, 49일째에 피부의 변화를 육안으로 관찰하였다.

MSC의 마우스 피하 주사

IMQ와 ovalbumin을 이용한 동물 실험에서 MSC의 피하 주사는 각 실험 조건에 맞는 MSC를 2×10^6 의 세포수로 마우스 피하에 주사하였으며, MSC 피하 주사에 대한 대조군으로는 MSC 대신 동일 부피의 인산염 완충 식염수(PBS)를 피하 주사하였다.

마우스 피부 cAMP 농도 분석

IMQ 도포 6일 및 12일째의 마우스로부터 등 피부 세포와 혈장을 수득하여 cAMP 농도를 측정하였다. cAMP 농도 분석에는 cAMP ELISA kit(BD immunocytometry)를 사용하였다.

마우스 모델의 조직학적 평가와 형광조직염색

IMQ 도포 6일 및 12일째의 마우스로부터 등 피부 세포를 수득하고, 4% 파라포름알데하이드(PFA)에 고정한 후, 파라핀에 내장하였다. 피부 샘플은 회전식 마이크로톰(Leica)을 이용하여 $4 \mu\text{m}$ 두께의 조직 절편을 준비하였다. 이후 크실렌(xylene)을 이용하여 탈지하고, 농도구배 알코올로 탈수하였다. 상기 전처리한 조직 절편은 헤마톡실린과 에오신(H&E 염색)으로 염색하였다. 형광조직염색 실험은 조직 절편을 CD4, CD8, CD11c, Gr-1 등에 대한 1차 항체로 반응시킨 후, 적절한 Alexa fluor 488, Alexa fluor 647 등의 형광표지된 2차 항체로 반응시켜 실시하였다.

마우스 비장세포 유세포분석(flow cytometry analysis)

각 실험군의 마우스로부터 전체 비장세포를 수득하여 MACS 버퍼(0.5% BSA가 포함된 PBS)에 재현탁하고, FITC-결합 항마우스 CD4 항체, PE-결합 항마우스 CD8 항체, APC-결합 항마우스 Gr1 항체 및 PE-결합 항마우스 CD11c 항체로 반응시켰다. 항체 반응 30분 후에 MACS 버퍼로 세척하고, 원심분리를 하고, FACS 분석을 수행하기 위해 MACS 버퍼 $500 \mu\text{l}$ 로 재현탁하였다.

마우스 피부 유전자 발현 분석을 위한 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR)과 실시간 정량 중합효소연쇄반응(real-time quantitative PCR)

RNA는 TRIzol 시약(Invitrogen)을 이용하여 마우스의 등 피부로부터 수득하였다. cDNA는 $1 \mu\text{g}$ 의 총 RNA로부터 역전사 시스템(Qiagen)을 이용하여 합성하였다. IL-1 α (QT00113505), IL-1 β (QT00021385), IL-4(QT00160678), IL-6(QT00182896),

IL-10(QT00106169), IL-17(QT00103278), IL-20(QT00126735), IL-22(QT00128324), IL-23(QT01663613), IFN γ (QT00000525), TNF- α (QT01079561), TGF- β (QT00025718), CXCL-1(QT00199752), CCL20(QT00261898) 및 GAPDH(QT02448075)의 프라이머 세트는 Qiagen사에서 구입하였다(상기 괄호 안의 일련번호는 Qiagen 카탈로그 번호). Foxp3, T-bet, GATA3, ROR γ t, SOD3의 발현량을 확인하기 위한 프라이머 서열은 다음과 같다: Foxp3 forward GCAACAGCACTGGAACCTTC(서열번호 5), Foxp3 reverse GCATTGCTTGAGGCTGCGTA(서열번호 6); T-bet forward AGCCAGCCAAACAGAGAAGA(서열번호 7), T-bet reverse AATGTGCACCCTTCAAACCC(서열번호 8); GATA3 forward ACATGTCATCCCTGAGCCAC(서열번호 9), GATA3 reverse AGGAACTCTTCGCACACTTG(서열번호 10); ROR γ t forward GCCTACAAT GCCACCACC(서열번호 11), ROR γ t reverse ATT GAT GAG AAC CAG GGC(서열번호 12); SOD3 forward TGTGGAGCAGAGGAGAAGCTCAAC(서열번호 13); SOD3 reverse AAGCTCTCTTGGAGCAGCTGGAAA(서열번호 14). GAPDH mRNA를 내인성 대조군(endogenous control)으로 하였다. PCR은 Rotor-Gene 6000(Corbett)과 QuantiTect SYBR Green PCR Kit(Qiagen)를 이용하여 실시하였다. 증폭 프로그램은 1 cycle의 95°C에서 10분, 35 cycle의 95°C 20초, 55°C 20초, 72°C 20초로 구성하였다.

마우스 피부 단백질 발현 분석을 위한 웨스턴 블랏

단백질 샘플은 마우스의 등 피부로부터 수득하였다. 동일한 양의 단백질을 각 레인에 로딩하여 전기영동하고 멤브레인에 단백질을 블로팅하고, 표적 단백질은 표적 단백질 특이적인 1차 항체로 반응시키고 화학발광 시스템(GE health care Life Science)으로 감지하였다.

통계분석

데이터는 평균±표준편차(means±SD)로 표시하였고, 통계적 유의성은 독립된 그룹에 대한 student *t*-test 또는 ANOVA로 판단하였다. 통계적으로 유의한 차이는 본 명세서 도면에서 *, \$, # 등으로 표시하였다. 별도로 기재하지 않은 경우 모든 실험은 3회 반복하였다.

<실시예 1>

SOD3를 과발현하는 중간엽 줄기세포(MSC)의 제작과 효능 검증

<1-1> SOD3로 형질전환된 MSC의 SOD3 과발현 확인

인간의 SOD3 유전자로 형질전환된 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell, MSC)의 SOD3 단백질 발현 양상과 SOD3 효소 활성을 알아보았다.

MSC는 전기천공법을 이용하여 인간의 SOD3 유전자로 형질전환하고, 24시간 후 수득하여 RT-PCR과 웨스턴 블랏을 실시하여 단백질 발현량을 확인하였다. SOD3 효소 활성은 24시간 배양한 세포 배양액에 존재하는 슈퍼옥사이드 라디칼의 양을 측정하여 확인하였다.

도 1에서 나타나듯이, SOD3로 형질전환한 MSC(SOD3-MSC)에서는 형질전환하지 않은 MSC(MSC)와 비교하여 SOD3의 mRNA(도 1의 A)와 SOD3 단백질(도 1의 B)을 과발현하는 것을 알 수 있었다. 또한 SOD3의 활성에 있어서도, SOD3-MSC는 MSC에 비하여 현저하게 높은 SOD3 활성을 나타내었다(도 1의 C). SOD3로 형질전환된 MSC는 SOD3를 과발현하며, 높은 SOD3 효소 활성을 갖는 것을 확인하였다.

<1-2> SOD3로 형질전환된 MSC의 활성산소종 생성량 감소

SOD3로 형질전환된 MSC에서 TNF- α /IFN- γ 자극으로 인해 생성되는 활성산소종(ROS)의 양을 알아보았다.

MSC는 전기천공법을 이용하여 인간 SOD3 유전자로 형질전환하였으며, TNF- α (10ng/ml)와 IFN- γ (100U/ml)로 1시간 동안 자극하고, 생성되는 ROS는 H2DCF-DA로 형광염색하고 형광광도계를 이용하여 측정하였다.

도 2에서 나타나듯이, 형질전환하지 않은 MSC에서는 TNF- α /IFN- γ 자극으로 인해 ROS가 다량 발생하여 강한 형광을 나타냈으나, SOD3-MSC에서는 TNF- α /IFN- γ 로 자극한 뒤에도 PBS를 처리한 대조군(control)과 크게 달라지지 않았으며, 오히려 형광이 감소하는 경향을 보였다. 즉, SOD3-MSC는 형질전환하지 않은 MSC에 비하여 활성산소종 생성능이 크게 억제되어 있는 것을 확인하였다.

<1-3> SOD3의 형질전환이 MSC의 세포 증식에 미치는 영향

SOD3 형질전환이 MSC의 세포 증식에 미치는 영향을 MTT 어세이를 이용하여 알아보았다.

도 3에서 나타나듯이, 형질전환하지 않은 MSC와 비교하여 SOD3-MSC는 형질전환 24시간 후 72시간까지 세포 증식이 향상되었으며(도 3의 A), 세포의 수도 현저하게 증가한 것으로 나타났다(도 3의 B). 이상의 결과는 SOD3로 인한 형질전환이 MSC의 세포 증식을 촉진하는 것을 보여준다. SOD3로 형질전환된 MSC의 세포 증식 활성이 증가한 것은 향후 염증성 질환의 세포 치료제 등으로 개발될 경우 치료 효율이 더욱 높아질 수 있을 가능성을 보여준다.

<1-4> SOD3로 형질전환된 MSC의 염증 관련 사이토카인의 발현 억제 효과

SOD3로 형질전환된 MSC가 염증 반응의 중요 매개체인 사이토카인의 발현량에 미치는 영향을 알아보았다.

전기천공법으로 형질전환된 SOD3-MSC 또는 MSC를 인간의 각질형성세포(keratinocyte)인 HaCaT 세포주와 공동배양하면서 TNF- α 와 IFN- γ 로 12시간 동안 자극한 후, HaCaT 세포를 수득하여 HaCaT 세포가 발현하는 다양한 염증성 사이토카인의 수준을 qRT-PCT로 측정하였다.

도 4에서 나타나듯이, MSC와 공동배양한 HaCaT 세포(MSC)에서는 TNF- α 와 IFN- γ 의 자극에 의해 IL-1 α , IL-1 β , TNF- α 그리고 CCL-20의 사이토카인의 mRNA 발현 수준이 크게 증가하였으나, SOD3를 과발현하는 SOD3로 형질전환된 MSC와 공동배양한 HaCaT(SOD3-MSC)에서는 상기 사이토카인의 발현량이 효과적으로 억제되는 것을 확인하였다. CXCL-1의 경우, 형질전환하지 않은 MSC와 공동배양한 HaCaT(MSC)에서는 TNF- α 와 IFN- γ 의 자극으로 인해 발현량이 거의 변하지 않았으나 SOD3-MSC와 공동배양한 HaCaT(SOD3-MSC)에서의 발현량은 더욱 감소하였다. 한편 항염증 사이토카인이며 Treg의 표지자인 TGF- β 의 경우에는 TNF- α 와 IFN- γ 로 자극하지 않은 상태에서 SOD3-MSC로 공동배양한 HaCaT(SOD3-MSC)가 MSC와 공동배양한 HaCaT(MSC) 보다 높은 발현 수준을 나타내었으며, TNF- α 와 IFN- γ 처리에 의해 그 증가폭이 더욱 커지는 것을 관찰하였다.

이상의 결과는 SOD3를 과발현하고 분비하는 MSC는 그렇지 않은 MSC와 비교하여 공동배양한 인접 HaCaT 세포에서 TNF- α 와 IFN- γ 로 유발되는 염증성 사이토카인의 발현은 더욱 효과적으로 억제하고, 항염증성 사이토카인의 발현은 크게 향상시킴으로써 염증 반응을 다각적이고 효과적으로 조절할 수 있음을 보여준다.

<1-5> SOD3로 형질전환된 MSC의 면역억제 관련 분자 발현 분석

SOD3로 형질전환된 MSC에서 발현되는 면역억제 관련 물질의 발현 양상을 분석하였다.

MSC를 배양하여 AdLacZ 또는 AdSOD3 아데노바이러스로 형질도입하고, TNF- α (10ng/ml)와 IFN- γ (100U/ml)로 자극하거나, 자극하지 않은 상태에서 RT-PCR을 이용하여 세포내 IL-1Ra(intracellular IL-1Ra, icIL-1Ra), 수용성 IL-1Ra(sIL-1Ra), unspliced IL-1Ra, HO-1, IDO-1, TGF- β , galectin-1 그리고 IL-10의 세포내 mRNA 발현 수준을 측정하였다(도 5의 A 내지 C). icIL-1Ra의 상대적인 발현 수준은 real-time PCR로 분석하였으며(도 5의 B), GAPDH를 대조군(control)으로 이용하였다. 또한 MSC를 배양한 상등액(supernatant)을 수득하여 PGE2 ELISA kit(Enzo Life Sciences, NY, USA)를 이용하여 PGE2 농도를 측정하였다.

도 5의 A 내지 C에서 나타나듯이, SOD3를 과발현하도록 형질전환된 MSC(SOD3-MSC)에서는 형질전환되지 않은 MSC(MSC) 또는 대조군으로 LacZ로 형질전환된 MSC(LacZ-MSC)와 비교하여, icIL-1Ra, TGF- β , IL-10, HO-1 그리고 IDO-1과 같은 다양한 면역억제 기능을 갖는 유전자의 발현 수준이 크게 증가한 것으로 나타났다. 흥미롭게도, TNF- α 와 IFN- γ 로 자극된 MSC에서는 IDO-1과 IL-10의 발현이 증가하였는데, SOD3-MSC에서는 이들 유전자의 발현이 더욱 증가하였다. 반면, SOD3의 과발현이 MSC의 PGE2의 분비량(도 5의 D)이나 galectin-1의 발현 수준에는 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

IL-1Ra를 투여받은 장기이식환자들에서 장기로 침윤한 백혈구(graft-infiltrating leukocyte)의 수가 급격히 감소한 것으로 보고된 바 있다(Shiraishi M et al., *J Surg Res.*, 58(5): 465-470, 1995). 따라서, SOD3를 과발현하는 MSC에서는 IL-1Ra의 발현이 크게 증가하므로, 이를 통하여 보다 효과적으로 장기이식환자에서 염증 반응과 이식 거부를 억제할 수 있음을 예상할 수 있다.

한편, TGF- β 와 HO-1은 *in vitro* 및 *in vivo*에서 IL-10의 생산과 면역억제 Treg 세포의 생성을 촉진하는 한편, 전염증성 사이토카인은 억제하는 것으로 연관되어 왔다. HO-1은 p-STAT3-ROR γ t pathway를 억제함으로써 ROR γ t와 FOXP3 발현의 속도(kinetics)를 조절하여 Th17의 반응을 억제하고 항염증 작용을 나타내는 것이 확인되었기 때문에 천식, 건선, 아토피 피부염 등의 새로운 치료제의 타겟이 되고

있다. 또한 인간의 MSC는 indoleamine-2,3-dioxygenase-1(IDO-1)의 발현 유도가 가능함이 알려져 있는데, IDO-1은 T 세포 증식을 억제하고 면역세포에서 세포사멸(apoptosis)을 유발함으로써 면역 억제를 유도하여 급성 이식편대숙주병(GVHD)와 같은 자가면역질환의 핵심적인 조절자로 받아들여져 왔다. 따라서 이상의 실시예에서 확인한 바와 같이, MSC에서 SOD3를 과발현함으로써 HO-1이나 IDO-1과 같은 tryptophan의 이화작용 경로의 활성화를 유도하는 것이 다수의 자가면역질환의 강력한 치료제 타겟이 될 수 있음을 제시한다.

<1-6> SOD3로 형질전환된 MSC가 T 세포의 증식에 미치는 영향

SOD3로 형질전환된 MSC가 T 세포의 분화 및 증식 억제에 미치는 영향을 알아보았다.

서로 다른 종의 마우스(C67BL/6와 BalB/C)에서 분리한 T 세포를 실험 조건에 따라 MSC를 넣지 않거나, 아무 처리하지 않은 MSC, LacZ-형질도입된 MSC, SOD3-형질도입된 MSC와 공동배양하면서 CFSE 기반-혼합림프구반응(CFSE based-mixed lymphocyte reaction, MLR) 실험을 실시하고, CD4+ 또는 CD8+ 세포에 대하여 유세포분석하고(도 6), 유세포분석 결과를 정량 분석하였다(도 7).

도 7에서 나타나듯이, MSC와 공동배양하지 않은 경우(No MSCs)와 비교하여 아무 처리하지 않은 MSC(MSC) 또는 LacZ-형질도입 MSC(LACZ-MSC)와 공동배양한 경우에는 CD4+ T 세포와 CD8+ T 세포의 증식이 억제되었으며, SOD3-형질도입 MSC(SOD3-MSC)와 공동배양한 경우에는 T 세포 증식이 더욱 억제되었다. 한편 SOD3-MSC에 SOD3 억제제인 DETCA를 같이 처리한 경우에는(SOD3-MSC + DETCA), T 세포 증식 억제 효과는 아무 처리하지 않은 MSC(MSC)와 비슷한 수준을 보였다. 즉 SOD3-형질도입 MSC의 T 세포 증식 억제 효과는 과발현된 SOD3의 효소 활성화에 의하여 형질도입되지 않은 MSC 보다 증진된 것임을 알 수 있다.

<1-7> SOD3로 형질전환된 MSC가 T 세포의 분화에 미치는 영향

SOD3-형질도입 MSC가 T 세포의 분화에 미치는 영향을 알아보았다.

미감작(naive) T 세포들을 Th1, Th2, Th17 또는 Treg 세포 각각의 분화 조건에서 실험 조건에 따라 아무 처리하지 않은 MSC(MSC), LacZ-MSC 또는 SOD3-MSC와 공동배양(coculture)하고, 분화유도된 T 세포들이 발현하는 분화 관련 주요 전사인자의 발현 수준을 real-time qRT-PCR로 측정하였다.

도 8에서 나타나듯이, Th1, Th2, Th17 분화 조건에서 배양한 T 세포들의 계통특이적인 전사인자와 사이토카인인 IFN γ , T-bet, IL-4, GATA3, IL-17, ROR γ t, CCL20의 발현 양상을 mRNA를 측정하여 확인한 결과, MSC와 공동배양하지 않은 대조군(도 7에서 (+))과 비교하여, 아무 처리하지 않은 MSC(MSC) 또는 LacZ-MSC(LACZ-MSC)와 공동배양한 T 세포들에서는 상기 유전자들의 발현이 감소하였으며, SOD3-MSC와 공동배양한 세포에서는 상기 전사인자와 사이토카인의 발현이 더욱 현저하게 감소한 것을 확인하였다. SOD3-MSC에 의한 유전자 발현 억제 효과는 Th17 세포 특이적인 유전자인 IL-17, ROR γ t, CCL-20에서 더욱 강하게 나타났다. 한편 SOD3-MSC의 공동배양에 SOD3 효소 억제제인 DETCA를 추가한 경우(SOD3-MSC + DETCA)에는 SOD3-MSC의 상기 유전자 발현 억제 효과가 MSC 또는 LacZ-MSC와 유사한 것으로 나타났으며, 이는 SOD3-MSC에 의한 유전자 발현 억제 상승 효과는 SOD3의 효소 활성화에 의한 것임을 보여준다.

도 9에서 나타나듯이, Treg 분화조건에서 배양한 T 세포들의 계통특이적인 전사인자와 사이토카인인 Foxp3, TGF- β , IL-10의 발현 양상을 mRNA를 측정하여 확인한 결과, MSC와 공동배양하지 않은 대조군(도 9에서 (+))과 비교하여, 아무 처리하지 않은 MSC 또는 LacZ-MSC와 공동배양한 T 세포들에서는 상기 유전자들의 발현이 증가하였으며, SOD3-MSC와 공동배양한 세포에서는 상기 전사인자와 사이토카인의 발현이 더욱 현저하게 증가한 것을 확인하였다. 특히 SOD3-MSC에 의한 FOXP3의 발현 증가 효과는 유세포분석으로 세포 수준에서 확인할 수 있었다(도 9 하단). 한편 SOD3-MSC의 공동배양에 SOD3 효소 억제제인 DETCA를 추가한 경우(SOD3-MSC + DETCA)에는 SOD3-MSC의 상기 유전자 발현 억제 효과가 MSC 또는 LacZ-MSC와 유사한 것으로 나타났으며, 이는 SOD3-MSC에 의한 Treg 관련 유전자 발현 증가의 상승 효과는 SOD3의 효소 활성화에 의한 것임을 보여준다.

이는 SOD3 형질도입으로 인해 원래 MSC의 T 세포 분화 조절 효과가 현저하게 증가함을 보여주며, 특히 염증성 질환에서 병인 세포로 작용하는 Th17 세포의 분화는 낮추고, 염증을 조절하는 효과를 가진 Treg 세포의 분화를 유도하여 더욱 효과적으로 염증을 억제할 수 있는 가능성을 제시한다.

<실시예 2>

이미퀴모드로 유발된 만성 급진성 피부 염증 생체 모델

<2-1> SOD3로 형질전환된 MSC의 피부 염증 증상 억제 효과

<실시에 1>에서 관찰된, SOD3를 과발현하는 MSC의 T 세포의 증식과 분화에 대한 조절 효과를 바탕으로, SOD3로 형질전환된 MSC가 체내에서 염증을 조절하는 효과가 있는지 알아보았다.

선천면역체계(innate immune system)의 신호전달을 활성화시켜 건선과 유사한 급진성 피부 염증을 유발하는 것으로 알려진 이미퀴모드(imiquimod, IMQ)를 면도한 마우스의 등 피부에 매일 도포하여 피부 염증 반응을 유발하였다. 도 10의 실험 개요에 따라 IMQ 도포 전에 각 실험군의 마우스(군당 마우스 5마리)에 처리 조건에 따라 아무 처리하지 않은 MSC, LacZ-형질도입된 MSC, SOD3-형질도입된 MSC를 2×10^6 씩 피하주사하고, 면도한 마우스의 등에 IMQ를 12일간 지속적으로 도포한 뒤 피부에 일어나는 염증 반응을 비교 관찰하였다. 피부 염증 증상을 정량적으로 분석하기 위하여 마우스의 등 피부 조직을 채취하여 조직 표본을 H&E 염색하고 피부 표피(epidermis)의 두께를 측정하였다.

도 11에서 도시된 바와 같이, MSC를 피하주사하지 않고 IMQ를 도포한 마우스(IMQ)에서는 IMQ를 도포하지 않은 대조군(Control)과 비교하여 2-3일 후부터 육안으로 확인가능한 홍반(erhthema), 탈피(scaling) 및 피부가 두꺼워지는 등의 증상이 염증 증상과 동반하여 나타났다. 이같은 증상은 실험 시작 6일 후에 분명하게 관찰할 수 있었으며(Day 6), 실험 시작 후 12일(Day 12)까지 이러한 증상이 계속 진행되었다. 아무 처리하지 않은 MSC(MSC) 또는 LacZ-형질도입 MSC(LACZ-MSC)를 주사한 마우스들의 경우, IMQ로 유발된 피부의 증상들이 완화되는 경향을 보였다. 한편 SOD3-형질도입된 MSC(SOD3-MSC)를 주사한 마우스들은 MSC 또는 LACZ-MSC 주사한 마우스들과 비교하여 홍반, 탈피 등의 증상이 육안으로도 식별가능한 정도로 현저하게 감소함을 관찰하였다.

도 12와 도 13에서 나타나듯이, 대조군과 각 실험군의 마우스의 등 피부 조직 절편에서 측정한 피부 표피의 두께도 육안으로 관찰한 피부 염증 상태와 유사한 결과를 확인할 수 있었다. MSC 주사 없이 IMQ를 도포한 경우, 피부 표피의 두께는 대조군에 비하여 현저하게 증가하였으며, MSC 또는 LacZ-MSC로 주사한 경우, IMQ로 인한 피부 표피 두께의 증가가 감소하였다. 한편 SOD3-MSC를 주사한 마우스에서는

IMQ 도포 후 표피의 두께가 거의 증가하지 않아 IMQ를 도포하지 않은 대조군과 비슷한 수준이었으며, MSC 또는 LACZ-SOD3 주사한 마우스와 비교하여서도 표피 두께가 현저하게 얇은 것을 확인할 수 있었다.

이상의 결과는 SOD3를 이용한 형질전환으로 SOD3를 과발현하는 MSC가 피부 염증을 완화하는데 있어 일반 MSC에 비해 월등한 효과가 있음을 보여준다.

<2-2> SOD3로 형질전환된 MSC의 호중구 및 수지상세포의 침윤 억제 효과

IMQ로 피부 염증이 유발된 마우스의 비장과 피부의 면역 세포의 구성과 모집 현상(recruitment)을 알아보았다.

실험 조건에 따라 각각의 MSC를 주사한 마우스의 비장을 구성하는 CD4+ T 세포, CD8+ T 세포, 호중구(neutrophil, Gr1+ cell), 수지상세포(dendritic cell, CD11c+ cell)를 유세포분석으로 조사하고(도 14), IMQ 도포한 등 피부의 조직 절편을 다른 종류의 면역세포의 표지자에 대하여 염색하고 세포 수를 측정하였다(도 15-16).

도 14에서 나타나듯이, IMQ 처리한 마우스의 비장에서는 IMQ 처리하지 않은 대조군 마우스와 비교하여 CD4+ T 세포와 CD8+ T 세포가 감소하였으며, MSC를 주사한 마우스들에서는 CD4+ T 세포와 CD8+ T 세포가 다소 증가하는 것으로 나타났다. 이에 반하여 비장의 호중구(Gr1+ cell)와 수지상세포(CD11c+ cell)는 IMQ 처리로 인해 비장에서 수가 증가하였으며, SOD3-MSC 처리로 인해 호중구와 수지상세포의 수는 감소하였다.

도 15와 도 16에서 나타나듯이, 피부에서는 IMQ 처리에 의해 CD3+ T 세포, CD8+ T 세포(데이터 미도시), 호중구(Gr1+) 그리고 수지상세포(CD11c+)가 모두 현저히 증가하였으며, MSC 또는 LacZ-MSC 처리한 마우스에서는 IMQ로 유발되는 피부의 면역 세포 침윤 현상이 감소하였다. SOD3-MSC를 처리한 마우스에서는 다른 MSC 처리한 경우보다 침윤 현상이 더욱 억제되어, 피부 조직에 존재하는 T 세포, 호중구, 수지상세포가 모두 현저하게 감소한 것으로 관찰되었다.

<2-3> SOD3로 형질전환된 MSC의 염증 반응 매개체의 발현 억제 효과

IMQ로 피부 염증이 유발된 마우스의 등 피부의 사이토카인 발현 양상을 qRT-PCR로 측정하였다.

도 17에서 나타나듯이, IMQ 도포로 인해 다양한 염증성 사이토카인의 mRNA 수준이 크게 증가하였으며, MSC 또는 LacZ-MSC 주사한 마우스에서는 이들 사이토카인의 발현양이 다소 감소하는 경향이 있었다. SOD3-MSC를 주사한 마우스에서는 이들 염증성 사이토카인 발현 억제 효과가 다른 MSC과 비교하여 가장 큰 것으로 나타났다. 구체적으로는 Th17 세포가 발현하는 IL-17, IL-22, 그리고 주요 염증성 매개체 사이토카인인 IL-23, IL-1 β , IL-6, TNF- α 등의 발현양이 SOD3-MSC에 의해 현저하게 감소함을 확인하였다.

한편 항염증 사이토카인(anti-inflammatory cytokine)이며 Treg의 염증 조절과 관련된 IL-10의 경우, 다른 염증성 사이토카인들과는 달리 MSC 처리에 의해 발현양이 다소 증가하였으며, SOD3-MSC에서는 IL-10 증가 효과가 훨씬 월등한 것으로 관찰되었다.

이상의 결과는 SOD3의 도입으로 인해 MSC의 염증 조절 작용이 더욱 효과적으로 증가되었음을 보여주며, 다양한 사이토카인의 발현과 작용을 복합적으로 조절하여 염증성 질환의 증상을 완화할 수 있음을 시사한다.

<2-4> SOD3로 형질전환된 MSC가 염증 관련 신호전달에 미치는 영향

IMQ는 TLR-7 및/또는 TLR-8를 활성화시키고, 하위의 NF κ B 신호전달체계를 통해 생물학적 효과를 나타내는 것이 알려져 있다. 이에 SOD3를 과발현하거나 그렇지 않은 MSC를 비롯한 MSC의 처리가 TLR-7/TLR-8에 의한 신호전달에 미치는 영향을 IMQ 도포한 피부를 이용하여 웨스턴 블랏 실험으로 알아보았다.

도 18에서 나타나듯이, IMQ 도포한 마우스 등 피부에서는 TLR-7과 인산화된 NF κ B(p-NF κ B)가 활성화되고 발현 수준도 증가한 것을 확인하였다(도 18의 A). IMQ로 활성화된 TLR-7의 신호전달은 MSC 또는 LacZ-MSC의 처리에 의해 감소하는 경향을 보였으며, SOD3-MSC에 의해서는 더욱 현저하게 감소하였다. STAT1/3 그리고 JAK1에 대하여서도 유사한 결과를 관찰하였으나, SOD3-MSC는 특히 NF- κ B의 신호전달계에 대하여 중점적으로 현저히 억제 효과를 보이는 것으로 나타났다.

<2-5> 혈장과 세포에서의 cAMP 농도 증가

염증은 체내 유입된 항원이 T 보조세포를 자극하여 T 보조세포가 증식하면서 염증 유발 물질을 분비하면서 유발된다. T 보조세포의 증식은 세포 분열을 관장하는 두 가지 물질인 cAMP와 cGMP의 비율이 변하면서 일어나는데, cGMP가 높아지면 세포분열이 빨라지고, cAMP가 높아지면 세포분열이 느려지게 된다. 이러한 비율의 균형이 깨지면 염증성 질환에 걸릴 확률이 높아지는데, 예를 들어, 건선 환자에서는 세포 또는 혈장 내에 cGMP의 농도가 높은 경우가 많다. 이에 실험 조건에 따라 각각의 MSC를 처리한 마우스의 혈장에서의 cAMP의 농도를 엘라이자를 이용하여 측정하였다.

도 19에서 나타나듯이, MSC 또는 LacZ-MSC를 주사한 마우스의 혈장의 cAMP의 수준은 대조군과 비교하여 cAMP 수준이 증가하였으며, 특히 SOD3-MSC 주사한 마우스 혈장의 cAMP 수준이 가장 높은 것으로 측정되었다. IMQ 도포 6일째 이러한 경향이 더욱 분명하게 나타났다. 이러한 결과는 SOD3-MSC가 세포적 스트레스로부터 보호 기능을 한다는 것을 의미한다.

<실시에 3>

난백 알부민으로 유발되는 아토피 유사 피부염 생체 모델

SOD3를 과발현하는 MSC의 생체(*in vivo*) 내 염증 조절 효과를 다른 동물 모델을 이용하여 확인하였다. 난백 단백질(ovalbumin, OVA)을 항원으로 Balb/C 마우스에서 아토피 유사 피부염을 유발하고, MSC에 의한 염증 억제 효과를 비교 관찰하였다.

도 20의 실험 개요에 따라 SPF 조건에서 키운 마우스에 OVA 단백질과 항원보강제인 aluminum hydroxide를 혼합하여 실험 시작(D0), 7일(D7), 14일(D14)에 복강 내로 주입하여 동물을 감작시켰다. 실험 시작 21일 제부터 OVA 100 µg을 100 µl의 PBS에 녹여 1x1cm² 크기의 거즈에 적셔 패치를 만들고, 제모한 마우스의 등에 붙여 7일 동안 면역반응을 유도하였다. 35일부터 일주일간 다시 동일한 방법으로 OVA 패치로 면역 반응을 유도하였다. 실험 시작 후 42일에 실험 조건에 따라 MSC, LacZ-MSC, 또는 MSC-SOD3를 병변 부위에 주사하고(군당 마우스 5마리), 49일째에 피부의 변화를 육안으로 관찰하였다.

도 21에서 나타나듯이, MSC를 주입하지 않고 OVA 처리만 한 마우스(OVA)의 등 피부는 대조군(control)에 비교하여 피부가 거칠고, 각질화가 진행되며, 붉게 부풀어오르는 등 피부 염증이 진행되고 있는 것을 확인할 수 있었다. 아무 처리하지 않은 MSC를 주입한 마우스(OVA + MSC) 또는 LacZ-MSC를 주입한 마우스(OVA + LACZ-MSC)에서는 OVA만 처리한 마우스에 비하여 피부 염증이 어느 정도 개선되는 효과를 나타내었다. SOD3-MSC를 주입한 마우스(OVA + SOD3-MSC)에서는 피부의 각질과 염증 반응이 거의 사라지는 등, 피부의 상태가 대조군과 유사한 상태로 개선되었으며, 특히 다른 MSC를 주입한 마우스와 비교하여 확연한 염증 개선 효과를 확인할 수 있었다. 이상의 결과는 SOD3를 과발현하는 MSC가 피부 염증을 완화시키는데 일반 MSC에 비하여 뛰어난 효과가 있음을 보여준다.

【산업상 이용가능성】

SOD3를 과발현하는 중간엽 줄기세포는 일반 중간엽 줄기세포에 비해 더욱 강한 항산화 활성, 면역조절기능 및 세포성 면역조절기능을 가지고 있다. SOD3를 과발현하는 중간엽 줄기세포는 염증성 질환이나 자가면역질환, 장기이식 거부반응에 대하여 보다 효과적인 줄기세포 치료제를 개발하는데 유용하게 이용될 수 있다.

【청구의 범위】**【청구항 1】**

SOD3(extracellular superoxide dismutase)를 과발현하는 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

【청구항 2】

제1항에 있어서, 상기 줄기세포는 중간엽 줄기세포인 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 3】

제2항에 있어서, 상기 중간엽 줄기세포는 제대, 제대혈, 태반, 골수, 지방조직, 근육, 양수 및 양막으로 이루어진 군으로부터 선택된 조직에서 유래한 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 4】

제1항에 있어서, 상기 염증성 질환은 Th2 또는 Th17 매개성 질환인 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 5】

제4항에 있어서, 상기 Th2 또는 Th17 매개성 질환은 장기이식 거부반응, 자가면역 질환, 염증성 장질환, 염증성 안질환, 염증성 피부질환 및 알레르기성 질환으로 이루어진 군에서 선택된 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 6】

제1항에 있어서, 상기 염증성 질환은 급성 또는 만성 장기이식 거부반응, 이식편대숙주병, 염증성 장 질환, 크론병, 궤양성 대장염, 염증성 피부 질환, 다발성 경화증, 췌장염, 외상 유발 쇼크, 기관지 천식, 알러지성 비염, 알러지성 결막염, 낭포성 섬유증, 급성 기관지염, 만성 기관지염, 급성 세기관지염, 만성 세기관지염, 골관절염, 통풍, 척추관절병증, 강직성 척추염, 라이터 증후군, 건선성 관절병증, 장질환 척추염, 연소자성 관절병증, 연소자성 강직성 척추염, 반응성 관절병증, 감염성 관절염, 후-감염성 관절염, 루게릭병, 결절성 다발동맥염, 과민성 혈관염, 루게릭 육아종증, 류마티스성 다발성 근육통, 관절세포 동맥염, 칼슘 결정침착

관절병증, 가성 통풍, 비-관절 류마티즘, 점액낭염, 건초염, 상과염, 신경병증성 관절질환(neuropathic joint disease 또는 charcot joint), 출혈성 관절증(hemarthrosis), 알레르기 자반병, 비후성 골관절병증, 다중심성 세망조직구종, 척추측만증(scoliosis), 혈색소증, 혈색소병증, 고지단백혈증, 저감마글로불린혈증, 가족성 지중해열(familial Mediterranean fever), 베체트씨병, 전신성 홍반성 루푸스, 재귀열, 다발성 경화증, 패혈증, 패혈성 쇼크, 급성 호흡곤란 증후군, 다발성 장기부전, 만성 폐쇄성 폐질환(chronic obstructive pulmonary disease), 류마티스성 관절염(rheumatoid arthritis), 급성 폐손상(acute lung injury), 기관지 폐형성장애(broncho-pulmonary dysplasia), 제1형 당뇨병, 제2형 당뇨병, 동맥경화, 알츠하이머성 치매, 가족성 한랭자가염증 증후군(familial cold autoinflammatory syndrome), 머클-웰스 증후군(Muckle-Wells syndrome), 신생아발병 다발성 염증성 질환(neonatal multisystem inflammatory disease), 만성 유아 신경피부관절증후군(chronic infantile neurologic cutaneous articular syndrome), 성인발증형 스틸병(adult-onset Still's disease), 접촉성 피부염, 포상기태(hydatidiform mole), PAPA 증후군(syndrome of pyogenic arthritis, pyoderma gangrenosum and acne), 고면역글로불린 D 증후군(hyperimmunoglobulin d syndrome), 크리오피린 관련 주기적 증후군(cryopyrin-associated periodic syndrome), 각막염, 결막염, 망막염, 망막혈관염, 포도막염, 안검염, 알레르기 결막염, 건성 안(dry eye), 전신성 경피증(progressive systemic sclerosis), 다발성 근염(polymyositis), 자가면역성 뇌척수염, 중증 근무력증(myasthenia gravis), 결절성 다발성 동맥염(polyarteritis nodosa) 및 섬유조직염(fibromyalgia syndrome)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 질환인 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 7】

제6항에 있어서, 상기 염증성 피부 질환은 건선, 아토피성 피부염, 습진성 피부염, 접촉성 피부염, 지루성 피부염, 장미색 비강진, 편평 태선, 혈관염, 모공성 홍색 비강진, 봉와직염, 모낭염, 옹종, 천포창, 수포성(bulus) 천포창, 표피 수포증, 담마진, 혈관 부종, 맥관염, 홍반 및 피부 호산구 증가증으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 질환인 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 8】

제1항에 있어서, 상기 SOD3는 서열번호 1 또는 서열번호 3으로 표시되는 아

미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 9】

제1항에 있어서, 상기 SOD3를 과발현하는 줄기세포는 SOD3를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 발현 벡터를 줄기세포에 형질감염시켜 수득한 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 10】

제9항에 있어서, 상기 재조합 발현 벡터는 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 아데노연관바이러스(AAV) 벡터, 벡시니아바이러스 벡터, 허피스바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 및 아비폭스바이러스 벡터로 이루어진 군에서 선택된 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 11】

제9항에 있어서, 상기 SOD3를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 2 또는 서열번호 4로 표시되는 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 12】

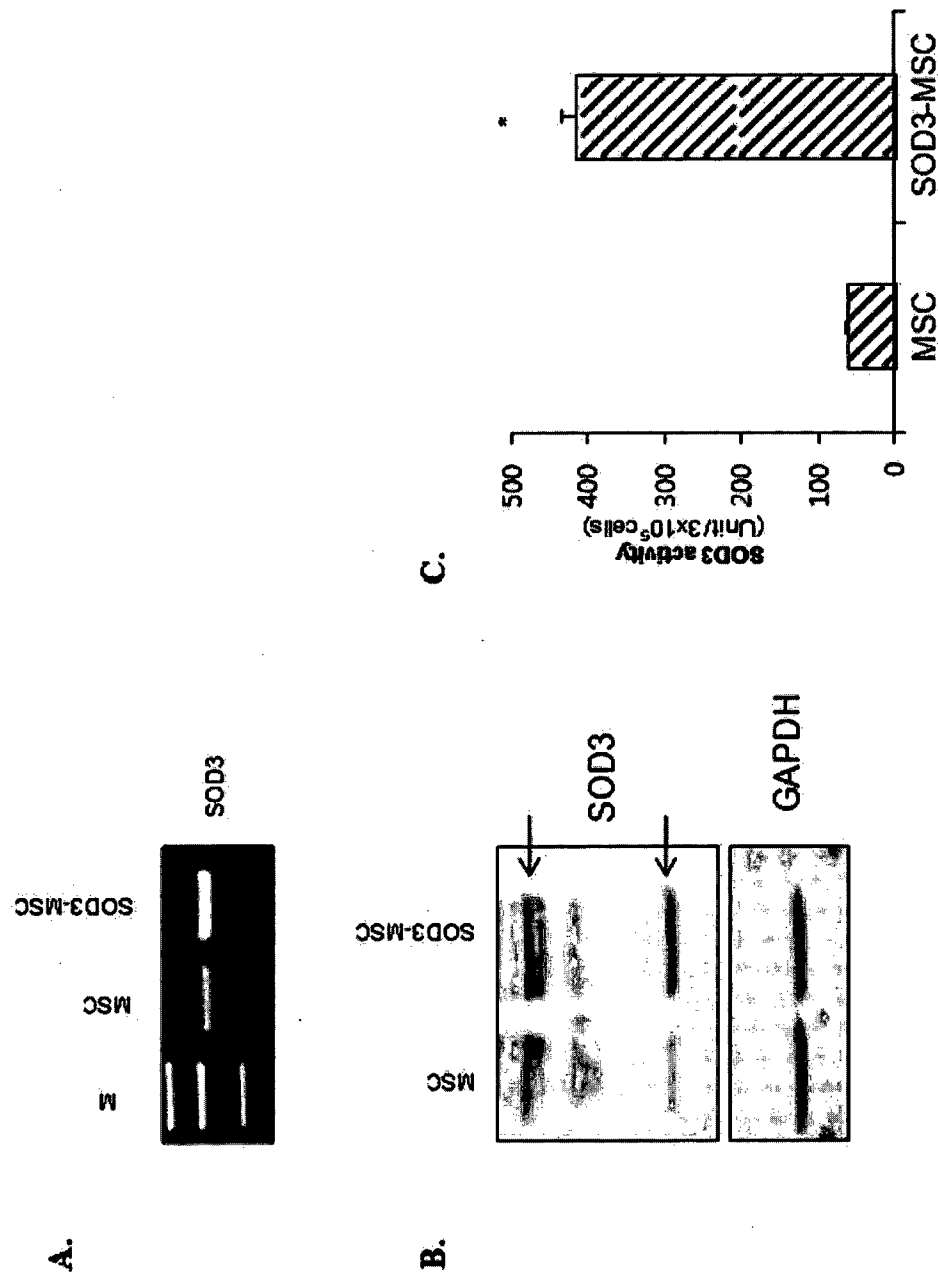
염증성 질환 치료용 제제를 제조하기 위한 SOD3를 과발현하는 줄기세포의 용도.

【청구항 13】

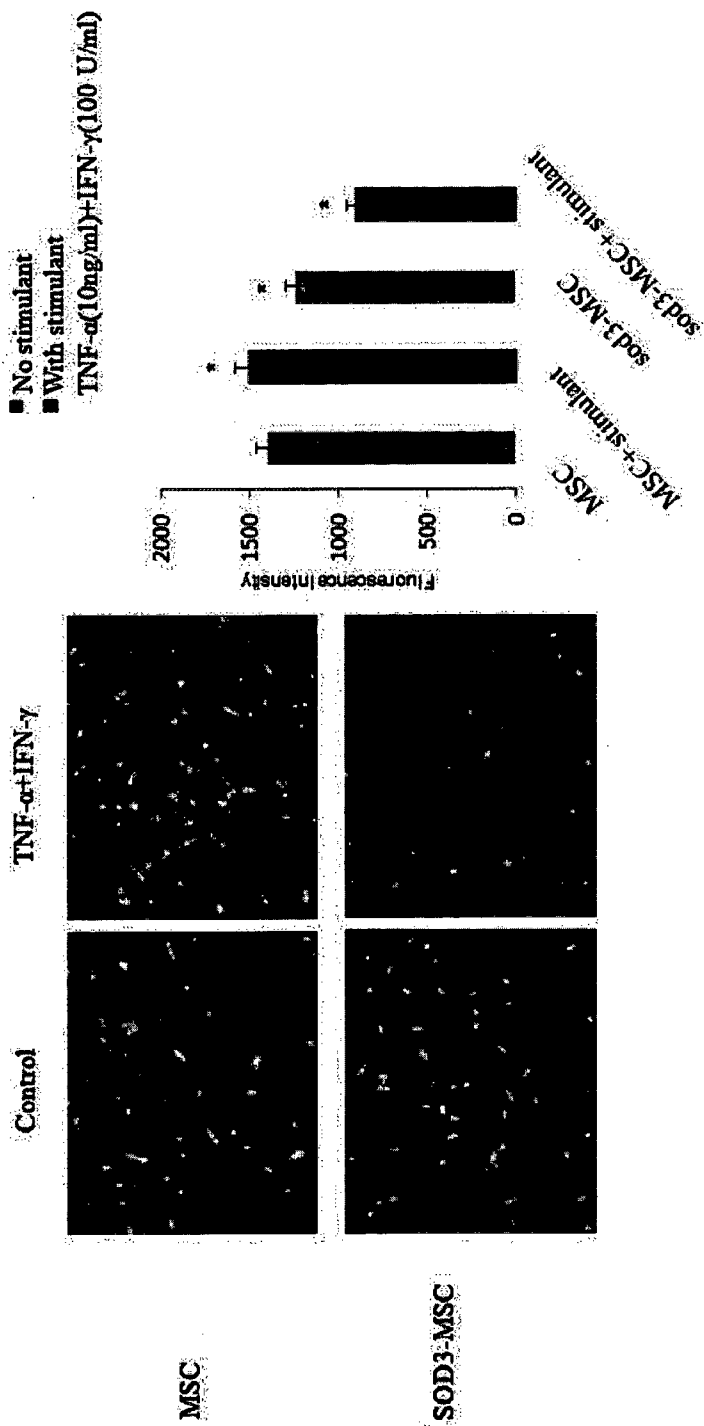
SOD3를 과발현하는 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물의 유효량을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 것을 특징으로 하는 염증성 질환의 치료 방법.

【도면】

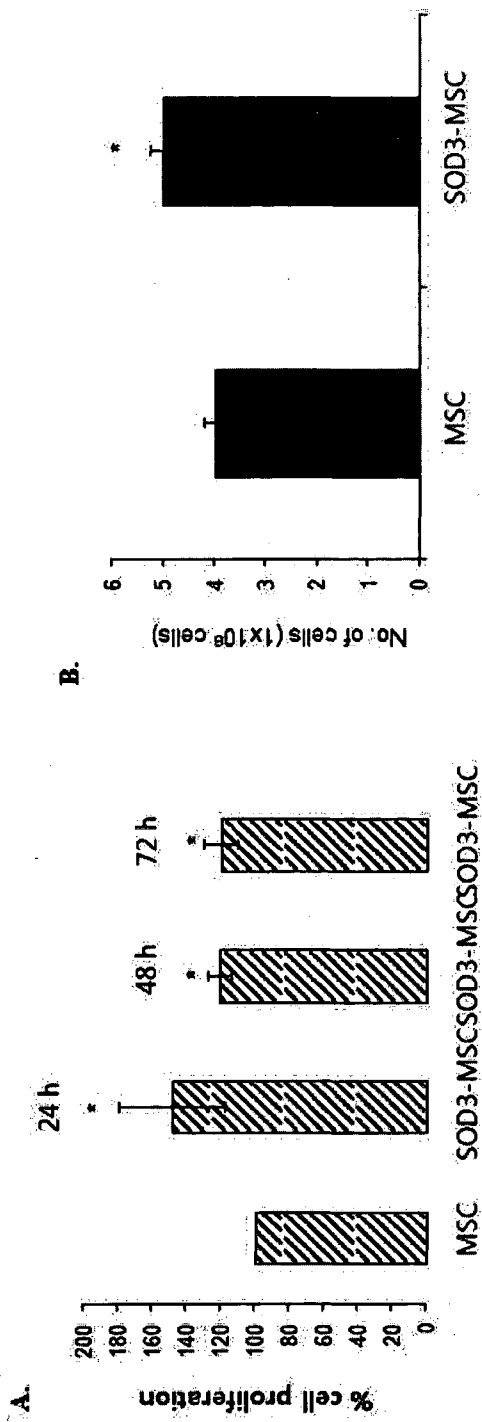
【도 1】



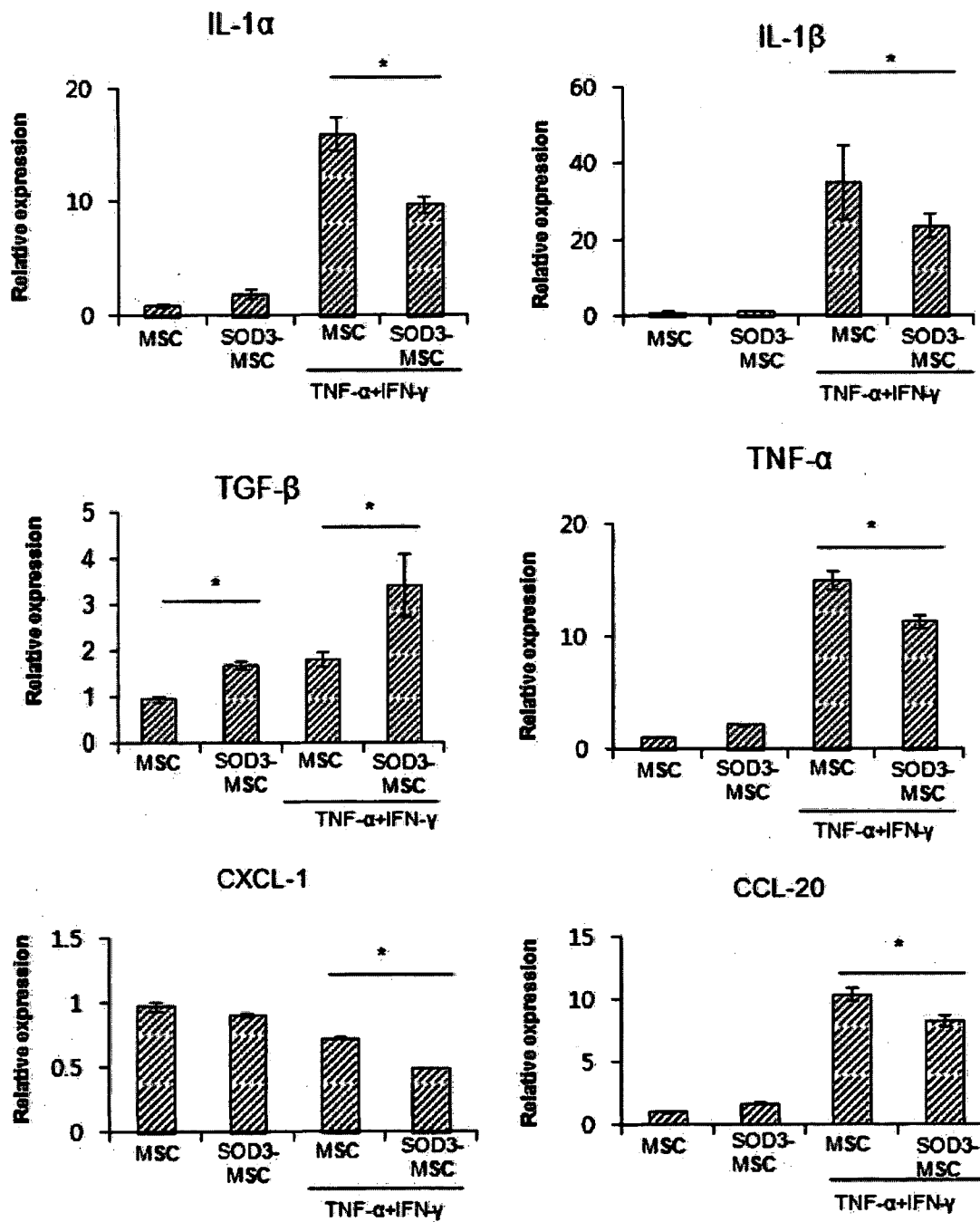
[도 2]



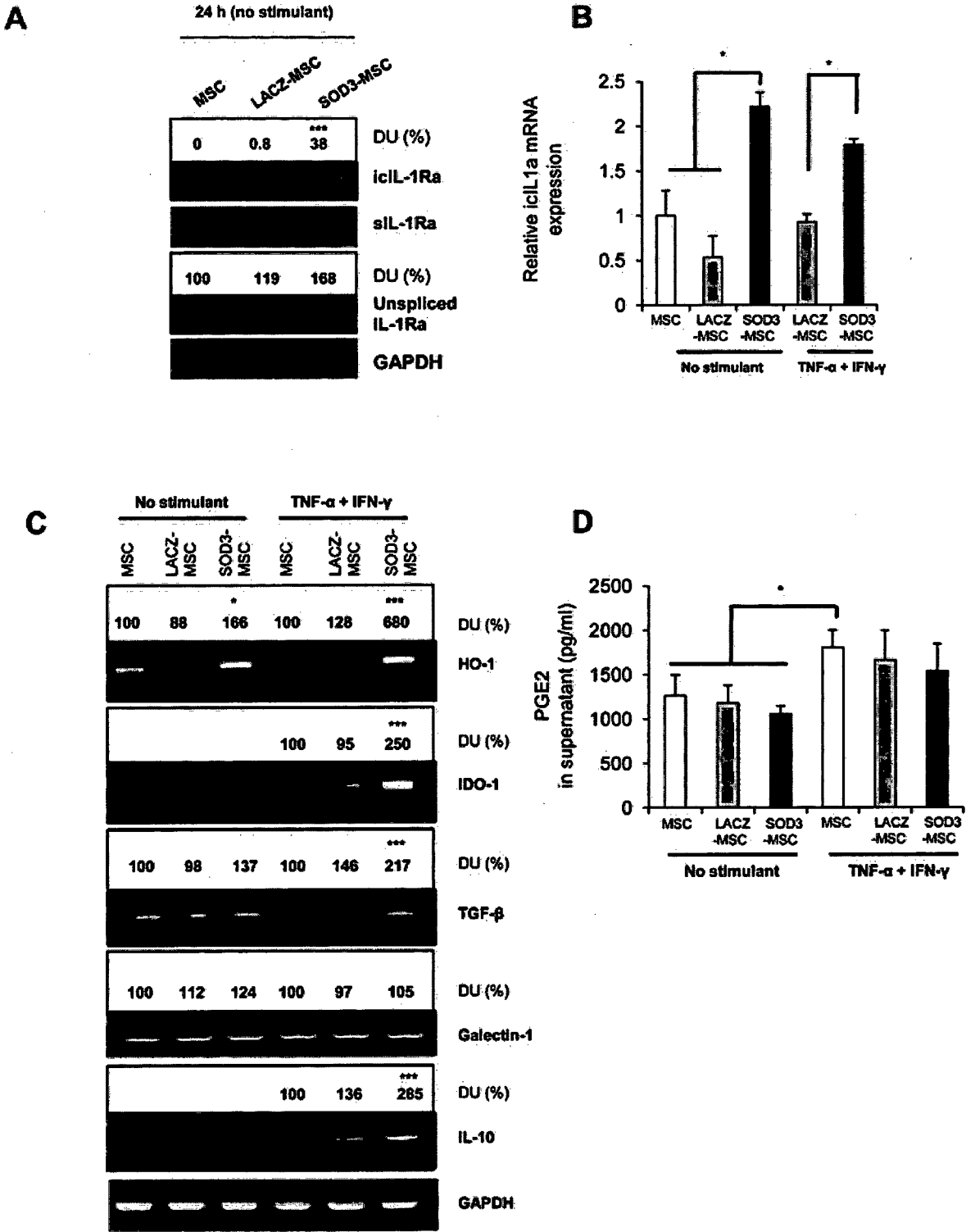
【図 3】



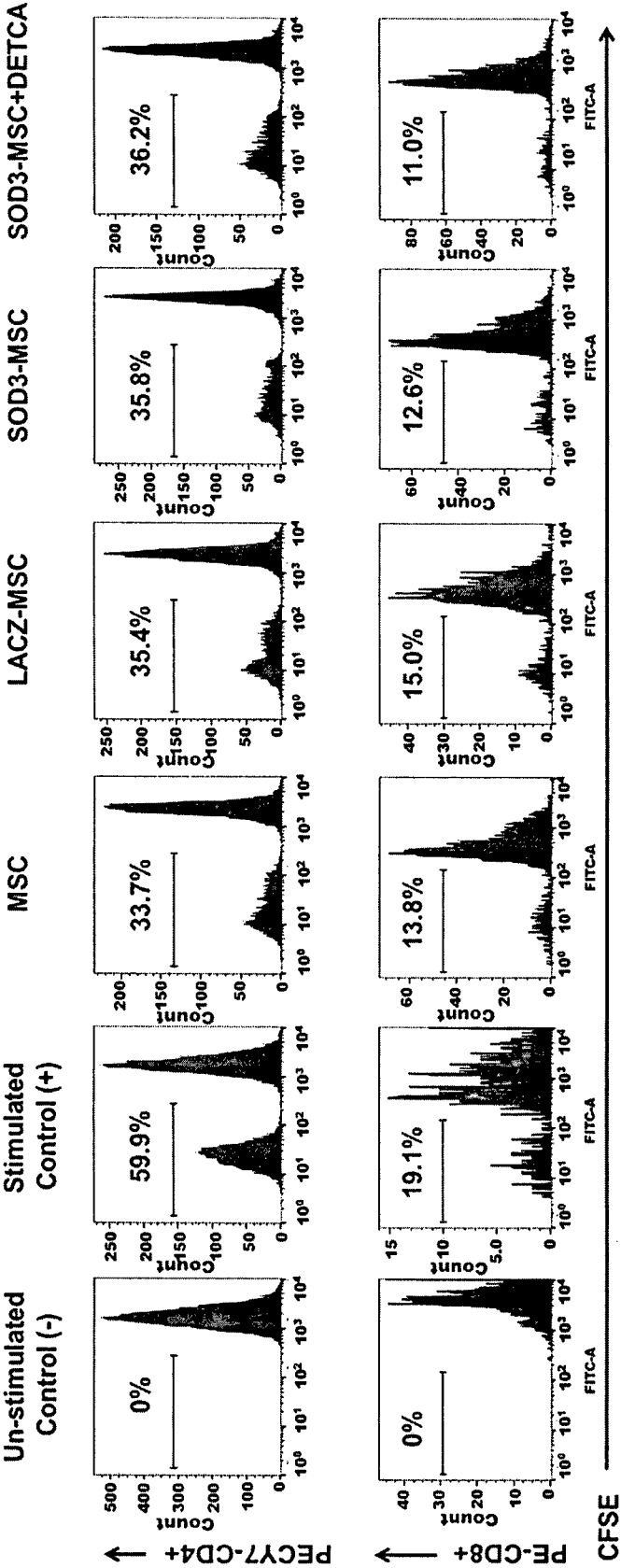
【도 4】



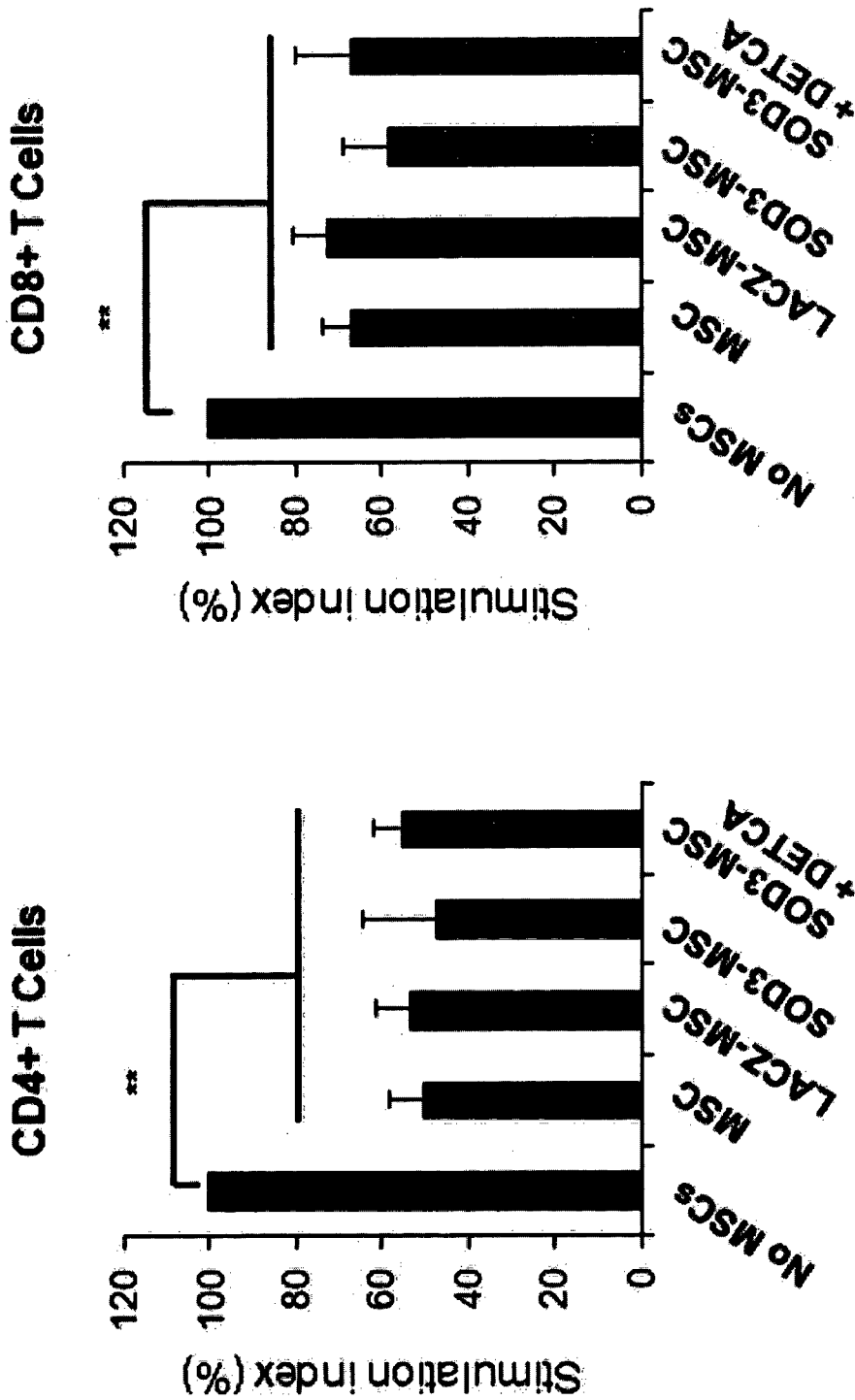
【도 5】



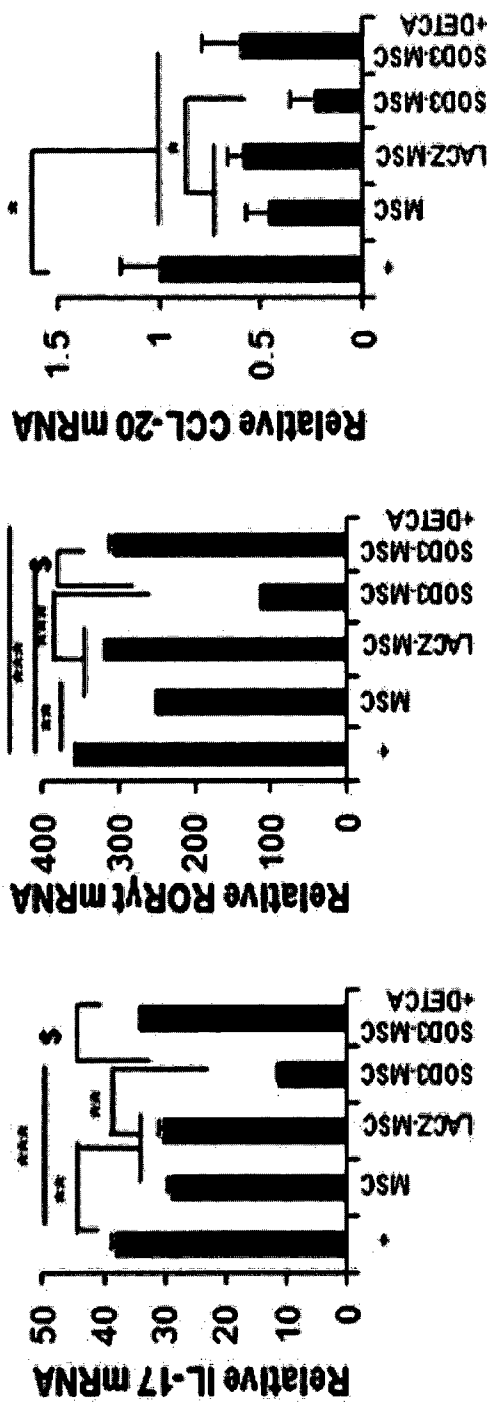
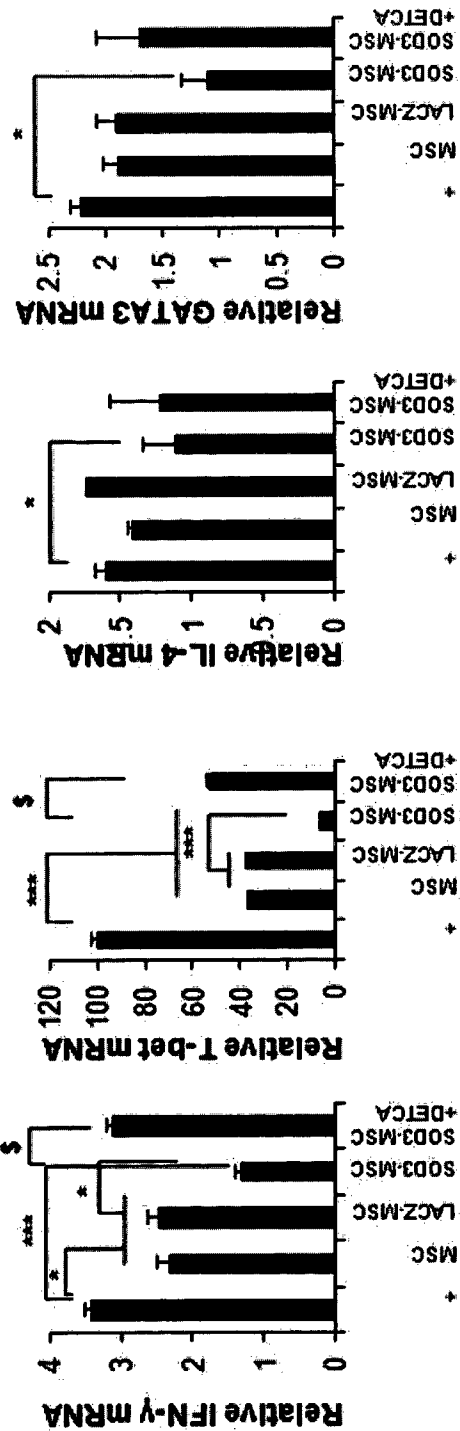
[Figure 6]



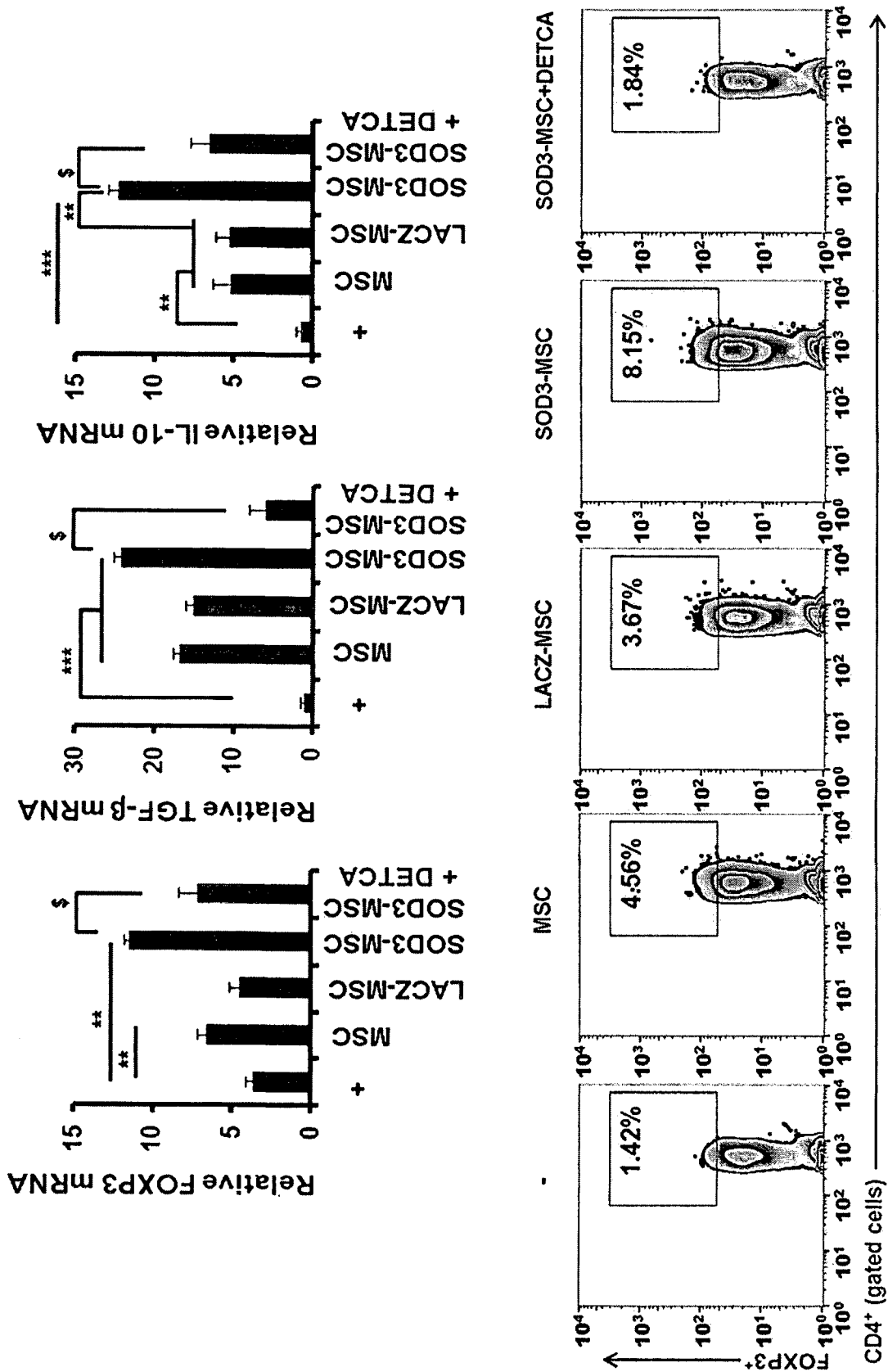
【도 7】



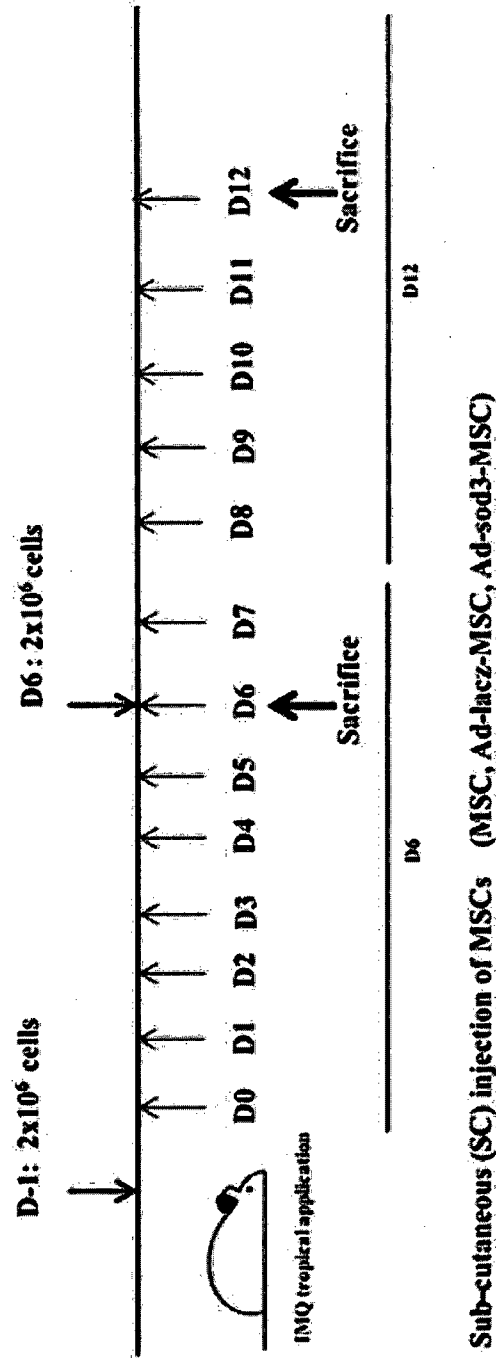
【 8 】



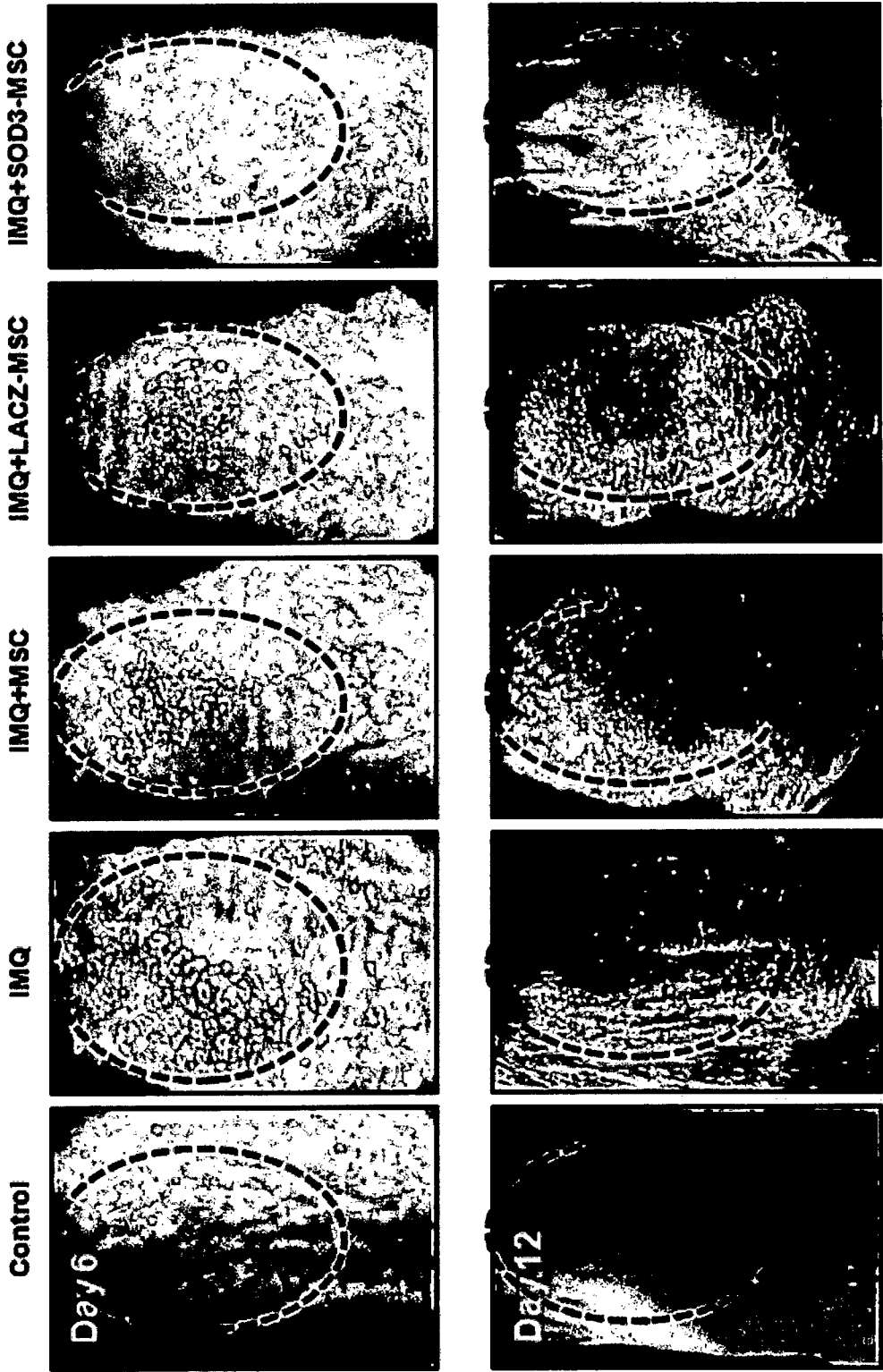
【도 9】



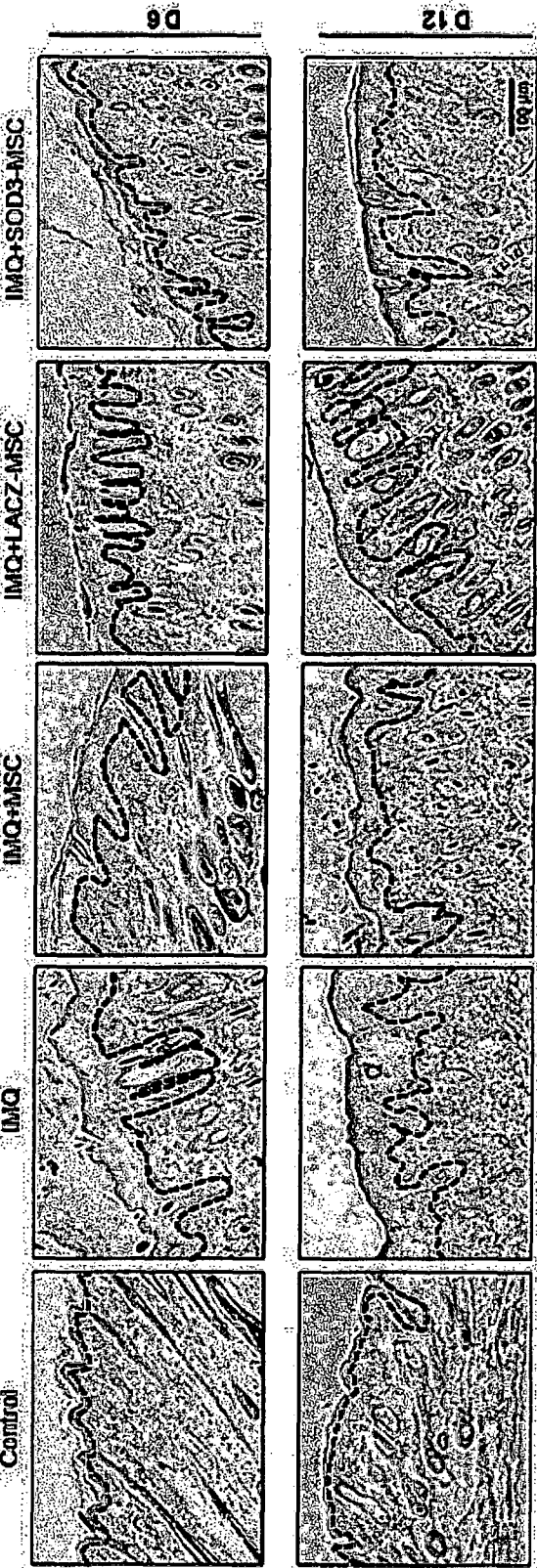
【도 10】



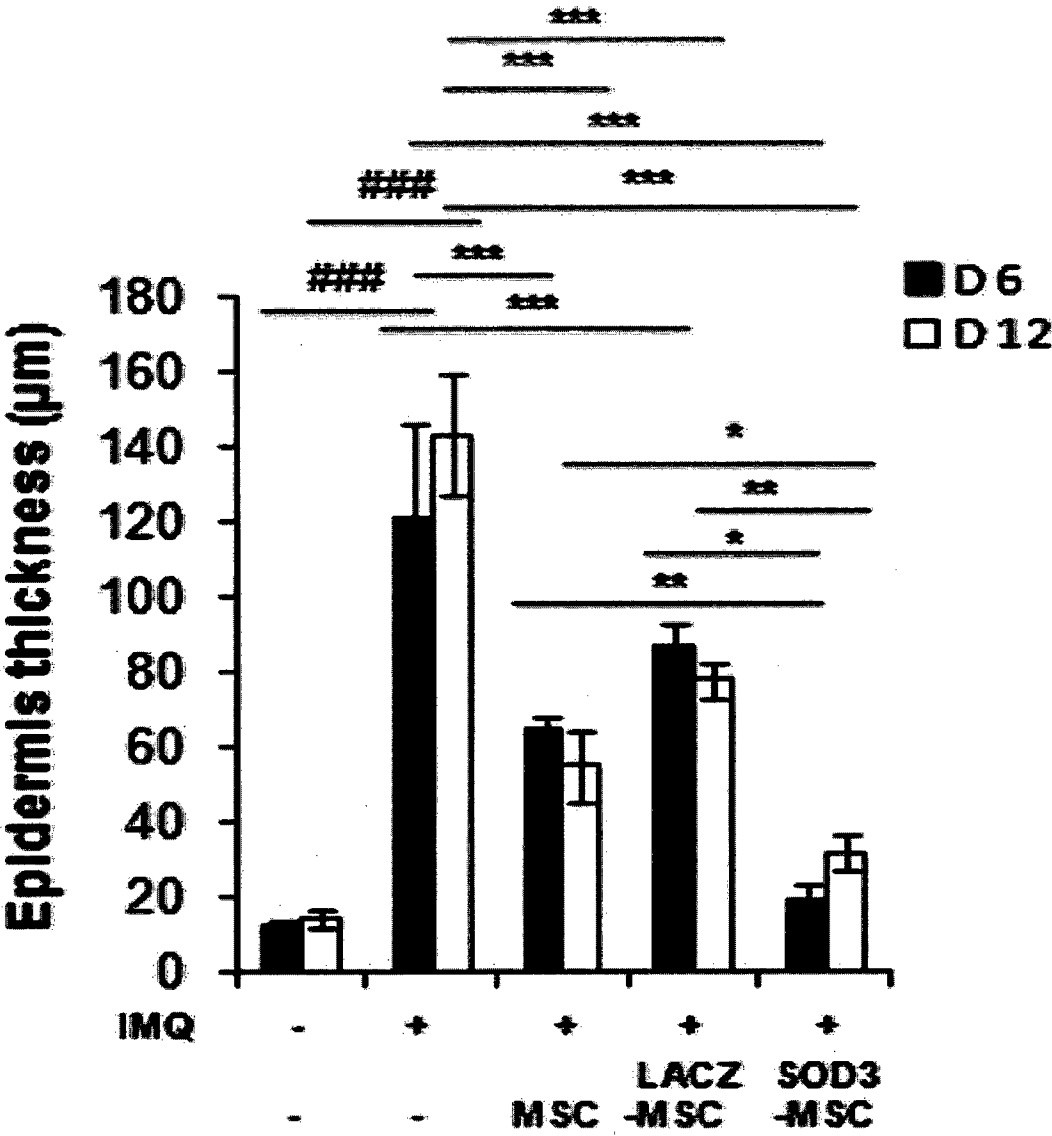
【도 11】



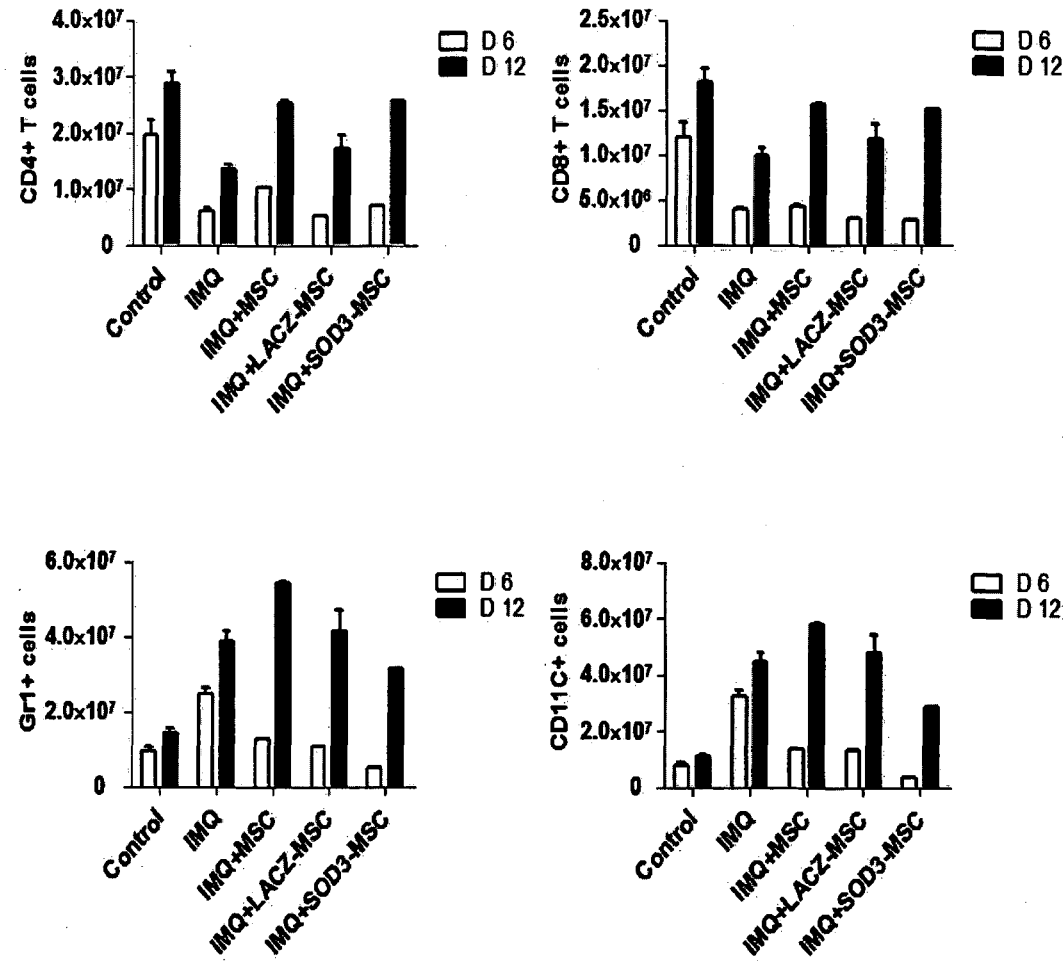
【도 12】



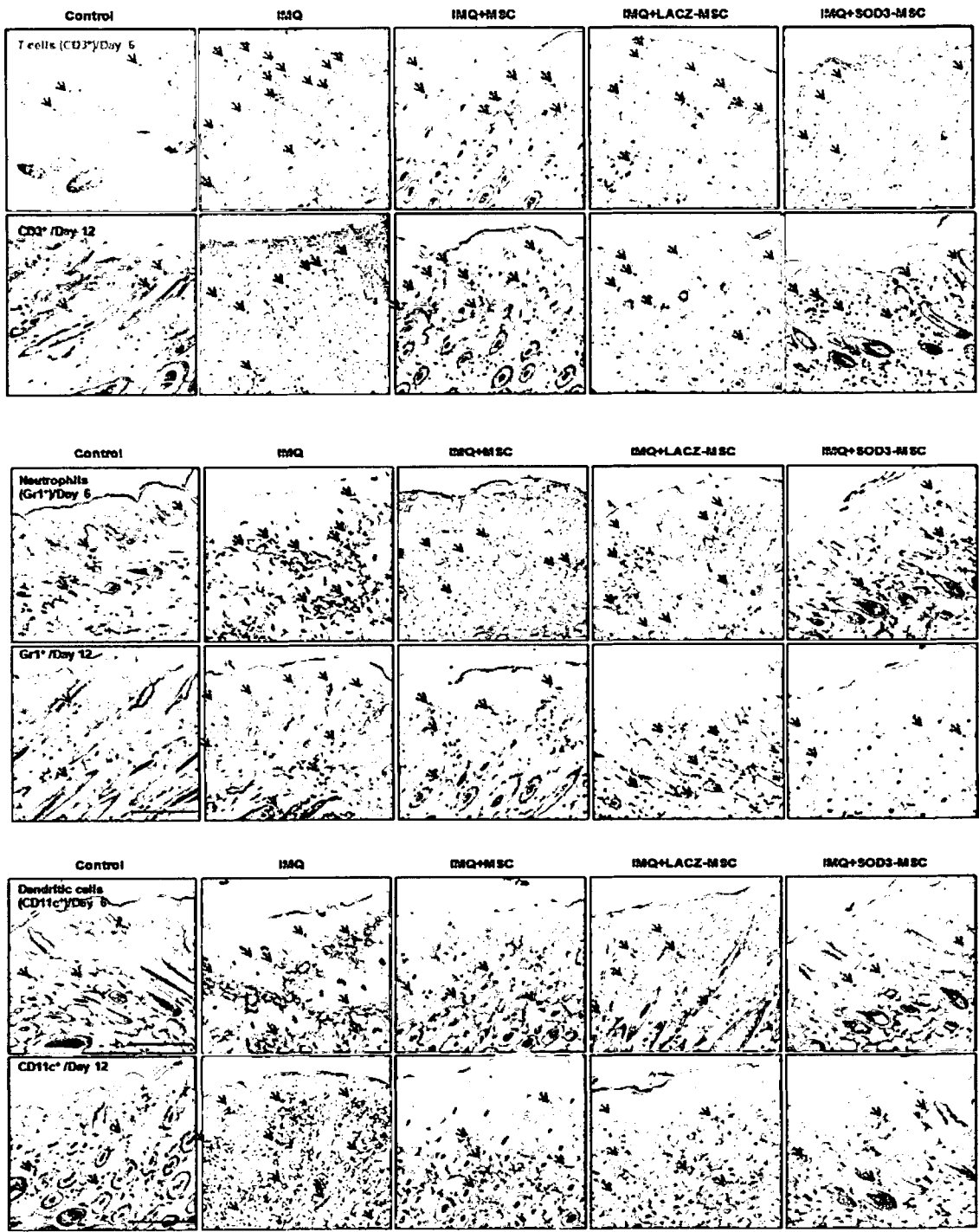
【도 13】



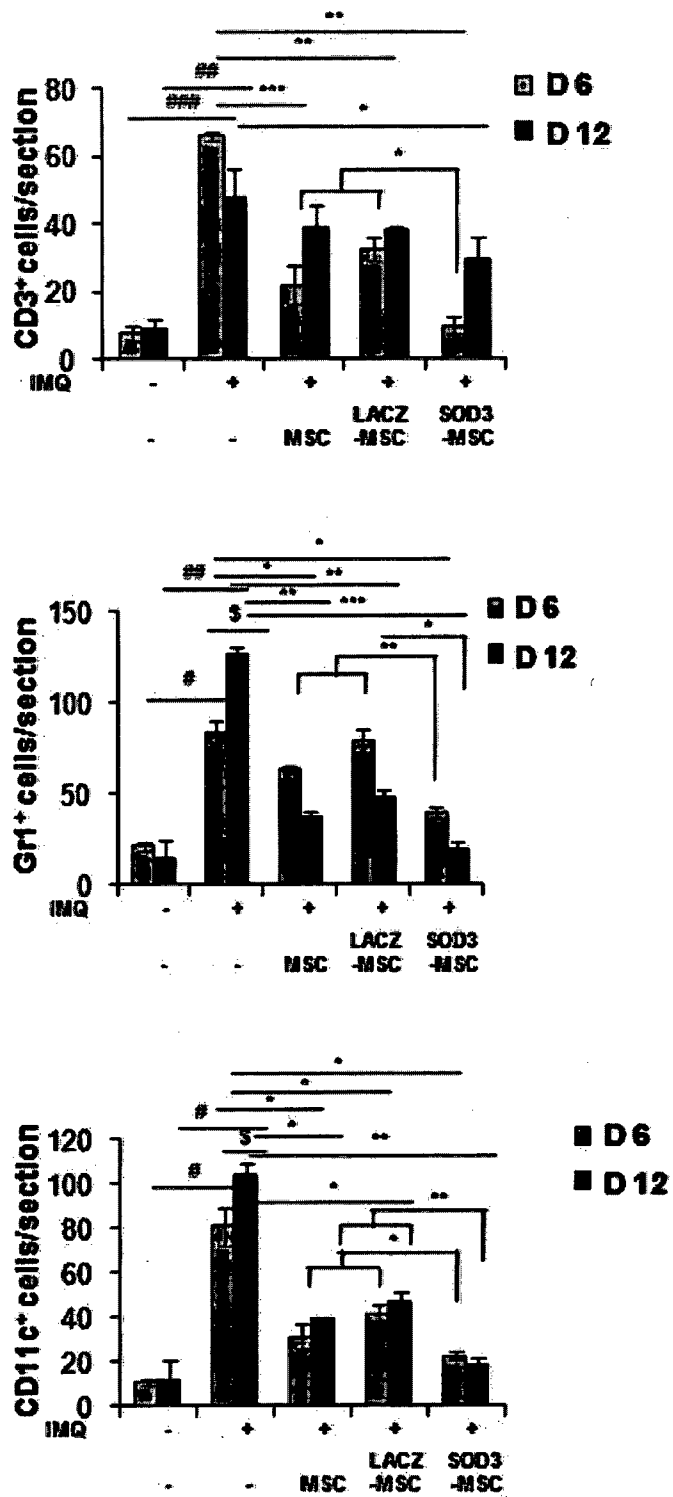
【도 14】



【도 15】

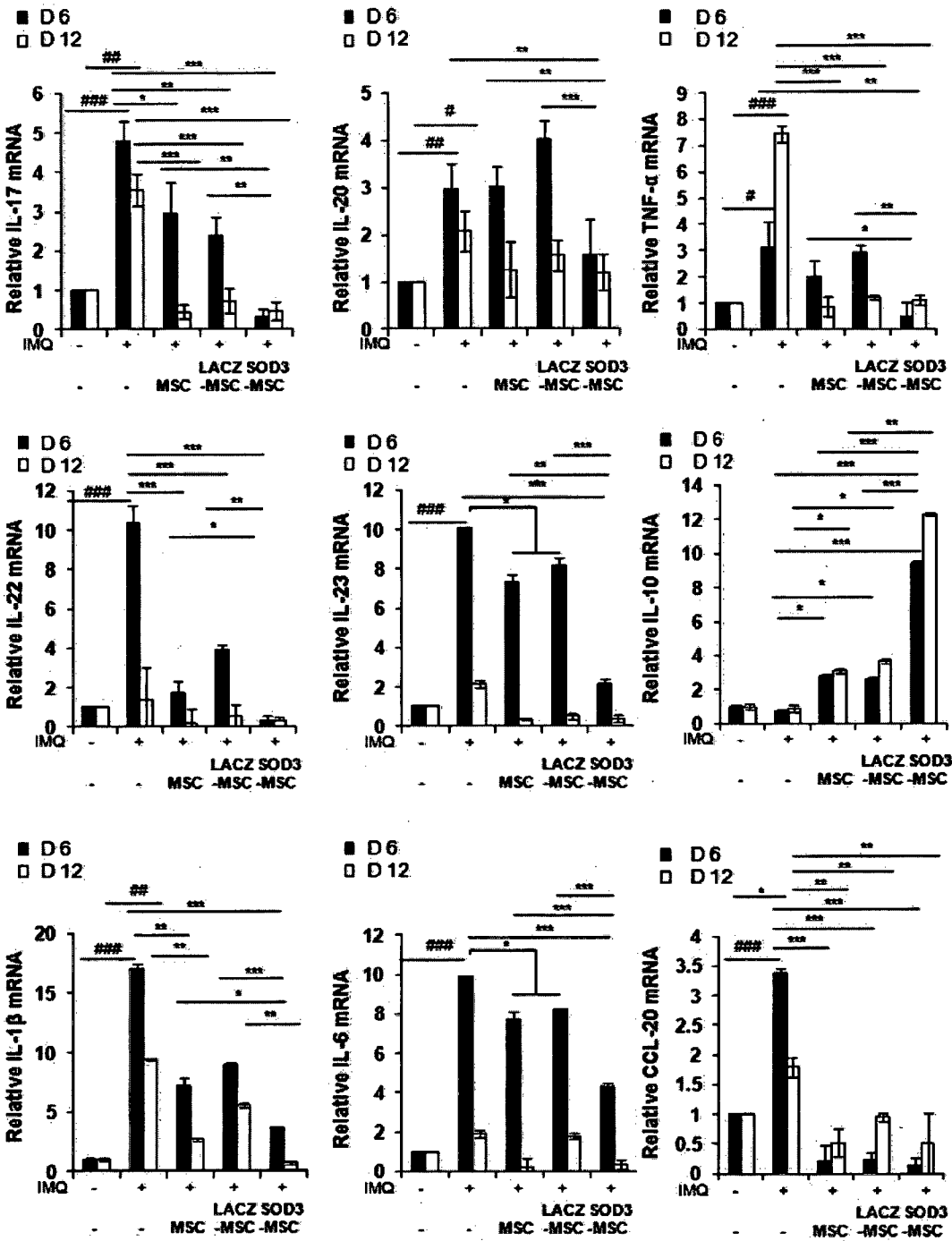


【도 16】

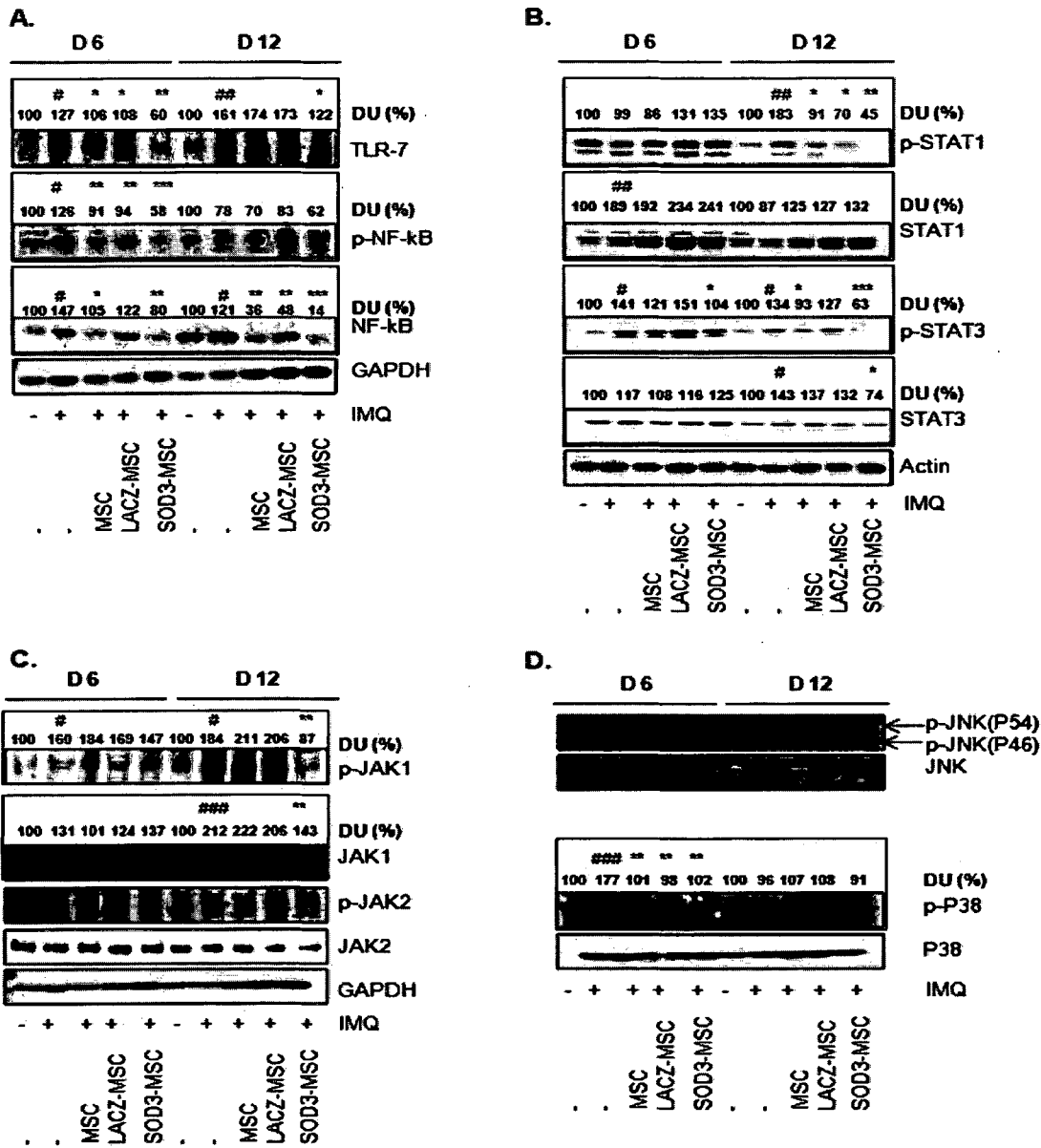


[도 17]

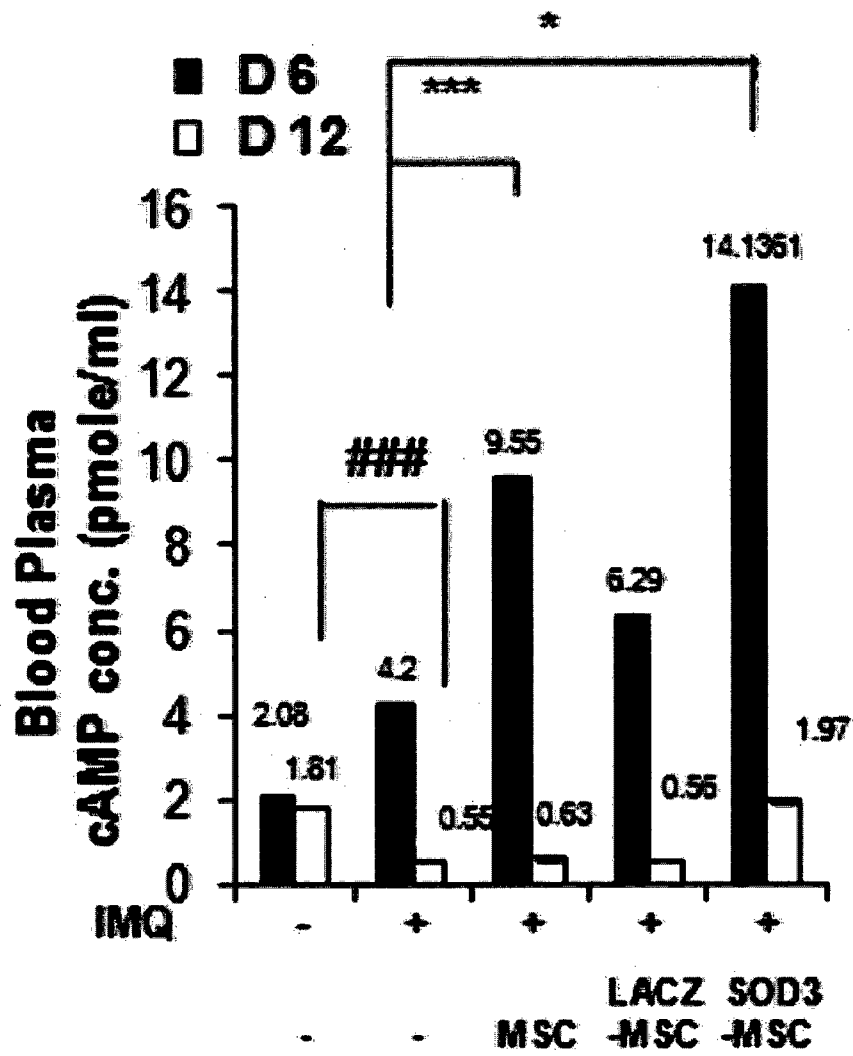
In skin



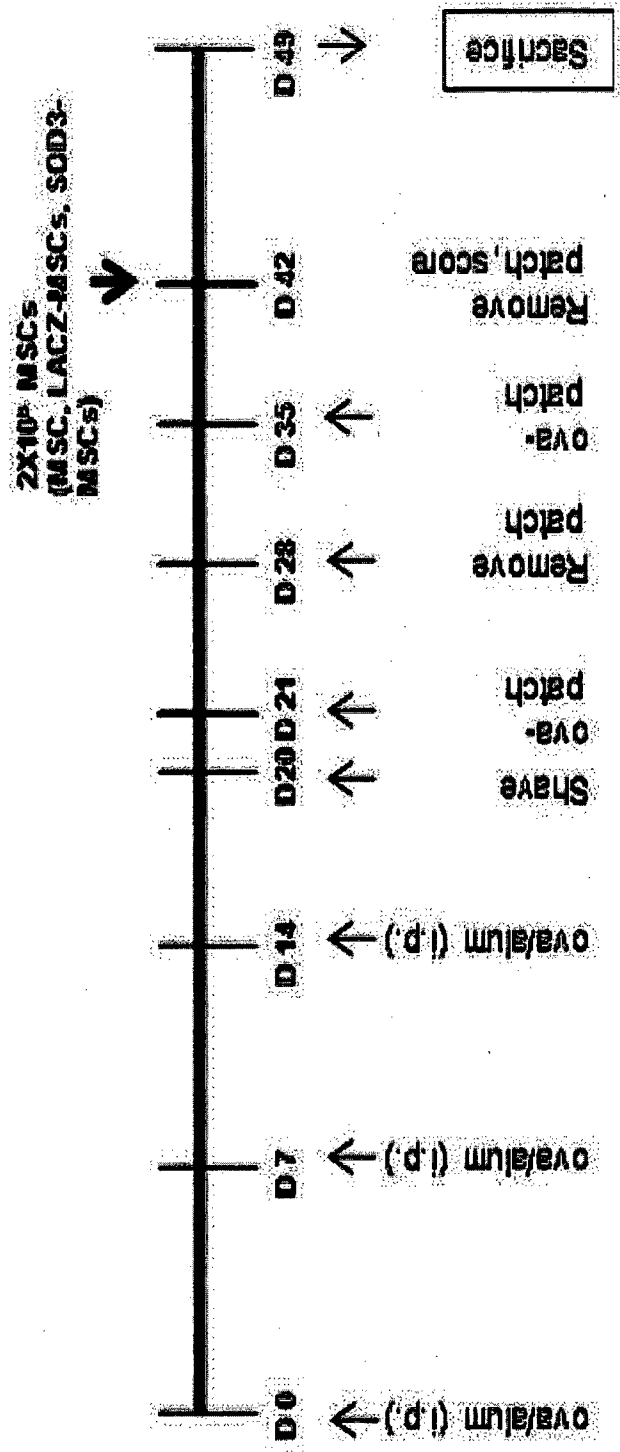
【도 18】



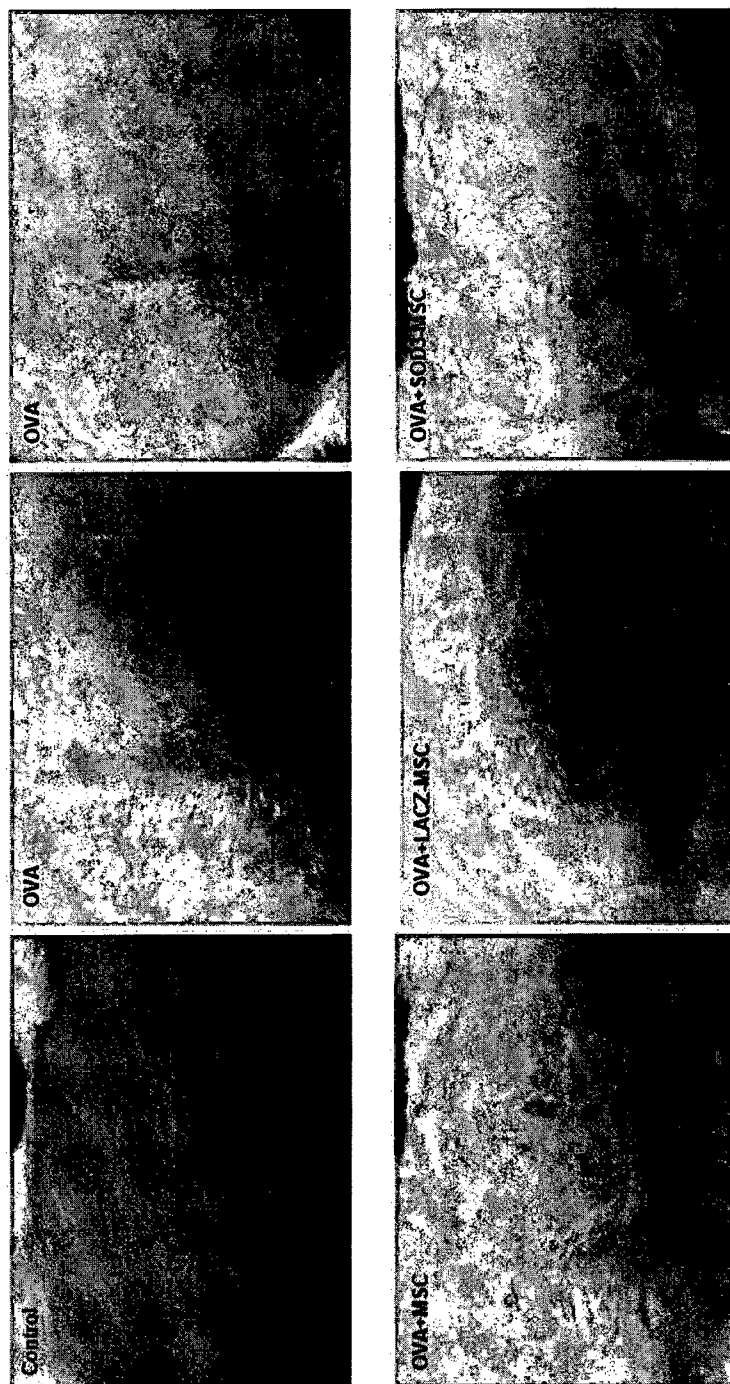
【도 19】



【도 20】



【도 21】



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/010414**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****A61K 35/28(2006.01)i, A61K 35/50(2006.01)i, A61K 35/51(2015.01)i, C12N 5/0775(2010.01)i, C12N 15/85(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; A61P 29/00; A61K 35/12; A61K 35/50; A61K 35/51; C12N 5/0775; C12N 15/85

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: SOD3, stem cell, transfection, inflammatory disease

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 102660580 A (SHENZHEN BEIKE BIO-TECHNOLOGY CO., LTD.) 12 September 2012 See abstract; paragraphs [0006], [0027], [0028]; and claim 1.	1-12
Y	KWON, M. -J. et al., "Superoxide Dismutase 3 Controls Adaptive Immune Responses and Contributes to the Inhibition of Ovalbumin-Induced Allergic Airway Inflammation in Mice", Antioxidants & Redox Signaling, 2012, vol. 17, no. 10, pages 1376-1392 See abstract; page 1376; and figures 3, 5 and 6.	1-12
Y	NCBI, GenBank accession no. AAA66000.1 (09 May 1995) See origin.	8
Y	NCBI, GenBank accession no. CR541853.1 (29 June 2004) See origin.	11
A	KEMP, K. et al., "Inflammatory Cytokine Induced Regulation of Superoxide Dismutase 3 Expression by Human Mesenchymal Stem Cells", Stem Cell Reviews and Reports, 2010, vol. 6, pages 548-559 See the entire document.	1-12
A	US 2012-0201791 A1 (YOO, T. J.) 09 August 2012 See the entire document.	1-12



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

10 JANUARY 2017 (10.01.2017)

Date of mailing of the international search report

11 JANUARY 2017 (11.01.2017)

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. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/010414

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	SAH, S. K. et al., "Effects of Human Mesenchymal Stem Cells Transduced with Superoxide Dismutase on Imiquimod-Induced Psoriasis-like Skin Inflammation in Mice", Antioxidants & Redox Signaling, February 2016, vol. 24, no. 5, pages 233-248 Abstract; pages 237-238; and figures 1, 2	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/010414

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.: **13**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 13 pertains to a method for treatment of the human body by therapy, 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/KR2016/010414

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
CN 102660580 A	12/09/2012	NONE	
US 2012-0201791 A1	09/08/2012	WO 2011-047345 A2	21/04/2011
		WO 2011-047345 A3	18/08/2011

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 35/28(2006.01)i, A61K 35/50(2006.01)i, A61K 35/51(2015.01)i, C12N 5/0775(2010.01)i, C12N 15/85(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 35/28; A61P 29/00; A61K 35/12; A61K 35/50; A61K 35/51; C12N 5/0775; C12N 15/85

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: SOD3, 줄기세포, 형질감염, 염증질환

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	CN 102660580 A (SHENZHEN BEIKE BIO-TECHNOLOGY CO., LTD.) 2012.09.12 요약; 단락 [0006], [0027], [0028]; 및 청구항 1 참조.	1-12
Y	KWON, M.-J. 등, 'Superoxide dismutase 3 controls adaptive immune responses and contributes to the inhibition of ovalbumin-induced allergic airway inflammation in mice' Antioxidants & Redox Signaling, 2012, 17권, 10호, 페이지 1376-1392 요약; 페이지 1376; 및 도면 3, 5 및 6 참조.	1-12
Y	NCBI, GenBank accession no.AAA66000.1 (1995.05.09) ORIGIN 참조.	8
Y	NCBI, GenBank accession no.CR541853.1 (2004.06.29) ORIGIN 참조.	11
A	KEMP, K. 등, 'Inflammatory cytokine induced regulation of superoxide dismutase 3 expression by human mesenchymal stem cells' Stem Cell Reviews and Reports, 2010, 6권, 페이지 548-559 문헌 전체 참조.	1-12
A	US 2012-0201791 A1 (YOO, T. J.) 2012.08.09 문헌 전체 참조.	1-12

☒ 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

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

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

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

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

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

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

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2017년 01월 10일 (10.01.2017)

국제조사보고서 발송일

2017년 01월 11일 (11.01.2017)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

박정민

전화번호 +82-42-481-3516



C(계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
PX	SAH, S. K. 등, 'Effects of Human mesenchymal stem cells transduced with superoxide dismutase on imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice' Antioxidants & Redox Signaling, 2016년2월, 24권, 5호, 페이지233-248 초록; 페이지 237-238; 및 도면 1, 2	1-12

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: 13
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 제13항은 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 관련됩니
다. 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 합
니다.
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 대상
으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발
명에 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.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
CN 102660580 A	2012/09/12	없음	
US 2012-0201791 A1	2012/08/09	WO 2011-047345 A2 WO 2011-047345 A3	2011/04/21 2011/08/18