

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2018년 4월 5일 (05.04.2018)



(10) 국제공개번호
WO 2018/062876 A2

- (51) 국제특허분류:
미분류
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2017/010766
- (22) 국제출원일: 2017년 9월 27일 (27.09.2017)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2016-0123831 2016년 9월 27일 (27.09.2016) KR
- (71) 출원인: 가톨릭대학교 산학협력단 (THE CATHOLIC UNIVERSITY OF KOREA INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 06591 서울시 서초구 반포대로 222, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 조미라 (CHO, Mi-La); 04427 서울시 용산구 이촌로 156, 1103호, Seoul (KR). 김석중 (KIM, Seok-Jung); 06001 서울시 강남구 압구정로 151, 118동 604호, Seoul (KR). 이선영 (LEE, Seon-Yeong); 07766 서울시 강서구

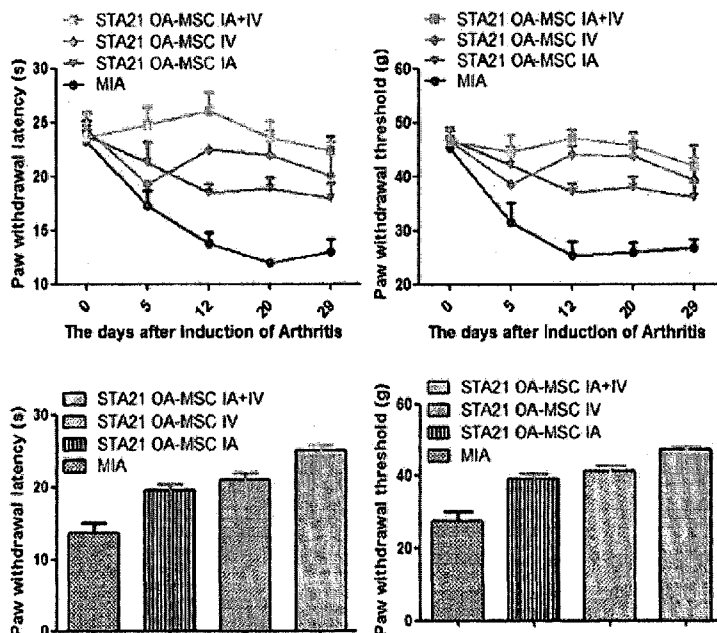
곰달래로15가길 8, 202호, Seoul (KR). 이승훈 (LEE, Seung-Hoon); 13806 경기도 과천시 향교달길 8, 127동 204호, Gyeonggi-do (KR). 나현식 (NA, Hyun-Sik); 06578 서울시 서초구 반포대로39길 46, 403호, Seoul (KR). 문수진 (MOON, Su-Jin); 06977 서울시 동작구 상도로53길 8, 309동 1204호, Seoul (KR). 권지예 (KWUAN, Ji-Ye); 25596 강원도 강릉시 남산초교길 65, 102동 401호, Gangwon-do (KR). 정경아 (JUNG, Kyung-Ah); 10551 경기도 고양시 덕양구 삼원로 102, 107동 801호, Gyeonggi-do (KR). 김은경 (KIM, Eun-Kyung); 01784 서울시 노원구 공릉로 351, 7동 509호, Seoul (KR). 김선애 (KIM, Seon-Ae); 11732 경기도 의정부시 신곡로 35, 201동 603호, Gyeonggi-do (KR).

- (74) 대리인: 위병갑 (WIE, Byoung-Gap); 06141 서울시 강남구 테헤란로33길7, 대영빌딩 7층, 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,

(54) Title: KIT FOR TREATMENT OF OSTEOARTHRITIS TO REDUCE PAIN

(54) 발명의 명칭: 통증이 경감되는 골관절염 치료용 키트

[도10]



(57) Abstract: The present invention relates to a kit for treatment of osteoarthritis to reduce pain, the kit comprising: a composition for intravenous administration, comprising STAT3 inhibitor-treated mesenchymal stem cells as an effective ingredient; and a composition for intraarticular administration, comprising mesenchymal stem cells as an effective ingredient, and a method for prevention and treatment of osteoarthritis by using the same. Osteoarthritis can be treated with the reduction of pain thereof by simultaneously administering STAT3 inhibitor-treated mesenchymal stem cells via an intravenous route and mesenchymal stem cells via an intraarticular route.

[다음 쪽 계속]



WO 2018/062876 A2

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:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))

(57) 요약서: 본 발명은 STAT3 억제제가 처리된 간엽줄기세포를 유효성분으로 포함하는 정맥내 투여용 조성물; 및 간엽줄기세포를 유효성분으로 포함하는 관절강내 투여용 조성물을 포함하는 통증이 경감되는 골관절염 치료용 키트 및 이를 이용한 골관절염 예방 및 치료 방법에 관한 것으로, STAT3 억제제가 처리된 간엽줄기세포를 정맥내 투여하고 동시에 간엽줄기세포를 관절강내 투여함으로써 골관절염의 통증을 경감시키면서도 치료할 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 통증이 경감되는 골관절염 치료용 키트

기술분야

- [1] 본 발명은 STAT3 억제제가 처리된 간엽줄기세포를 유효성분으로 포함하는 정맥내 투여용 조성물 및 간엽줄기세포를 유효성분으로 포함하는 관절강내 투여용 조성물을 포함하는 통증이 경감되는 골관절염 치료용 키트, 및 이를 이용한 골관절염 예방 및 치료 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 골관절염은 퇴행성 관절염으로도 명명되는 관절염의 일종으로서, 특정한 기질적 원인이 없이 주로 노년에 많이 발생되며 만성적으로 진행되는 관절구조의 변형으로 보행 장애 등의 운동 장애를 수반한다. 골관절염은 주로 관절연골(cartilage)의 점진적인 손상이나 퇴행성 변화로 인해 관절을 이루는 뼈와 인대 등에 손상이 일어나서 염증과 통증이 발생된다.
- [3] 골관절염이 진행될 때 TNF- α , IL-1 등의 염증성 사이토카인(cytokine)의 생성이 증가하고 콜라게네이즈(collagenase), 스트로멜라이신(stromelysin) 등과 같은 MMPs의 분비가 증가되어 관절연골의 파괴가 이루어지게 된다. 또한 MMPs는 IL-1, TNF- α 등을 유도시키게 되는데 이로 인하여 근육, 건, 인대 등과 같은 조직에도 영향을 끼쳐 심한 통증을 일으킨다.
- [4] 현재 골관절염의 치료를 위해서는, 아세트아미노펜, 트라마돌, 비스테로이드성 항염제(NSAIDs), 디아세린, 글루코사민 등의 약물이 사용되고 있으나, 골관절염의 통증을 일시적으로 경감시키는데 그치고 있다. 이에 따라, 골관절염을 치료하면서도 통증을 효과적으로 경감시킬 수 있는 치료법에 대한 필요성이 대두되고 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [5] 본 발명의 목적은 STAT3(Signal transducer and activator of transcription 3) 억제제가 처리된 간엽줄기세포를 유효성분으로 포함하는 정맥내 투여용 조성물; 및 간엽줄기세포를 유효성분으로 포함하는 관절강내 투여용 조성물을 포함하는, 통증이 경감되는 골관절염 치료용 키트를 제공하는 것이다.
- [6] 본 발명의 또 다른 목적은 약학적으로 유효한 양의 STAT3(Signal transducer and activator of transcription 3) 억제제가 처리된 간엽줄기세포를 유효성분으로 포함하는 조성물을 정맥내 투여하고, 동시에 간엽줄기세포를 유효성분으로 포함하는 조성물을 관절강내 투여하는 단계를 포함하는 골관절염 예방 및 치료 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [7] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 STAT3(Signal transducer and activator

of transcription 3) 억제제가 처리된 간엽줄기세포를 유효성분으로 포함하는 정맥내 투여용 조성물; 및 간엽줄기세포를 유효성분으로 포함하는 관절강내 투여용 조성물을 포함하는, 통증이 경감되는 골관절염 치료용 키트를 제공한다.

[8] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 관절강내 투여용 조성물은 STAT3 억제제가 처리될 수 있다.

[9] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 STAT3 억제제는 STA-21 (8-hydroxy-3-methyl-3,4-dihydrotetraphene-1,7,12(2H)-trione), SD282, 메트포민, AG-490 ((E)-2-Cyano-3-(3,4-dihydrophenyl)-N-(phenylmethyl)-2-propenamide), 아티프리모드 (Atiprimod; 3-(8,8-dipropyl-3-azaspiro[4.5]decan-3-yl)-N,N-diethylpropan-1-amine), 오라노핀 (Auranofin; 3,4,5-triacetyloxy-6-(acetyloxymethyl) oxane-2-thiolate; triethylphosphonium), 오로싸이오말레이트 (Aurothiomalate; Sodium 2-(auriosulfanyl)-3-carboxypropanoate), BMS-354825 (Dasatinib; N-(2-chloro-6-methylphenyl)-2-[[6-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-2-methyl-4-pyrimidinyl]amino]-5-thiazole carboxamide monohydrate), CADPE (3-(3,4-dihydroxy-phenyl)-acrylic acid 2-(3,4-dihydroxy-phenyl)-ethyl ester), 스타틱 (Stattic; 6-nitro-1,1-dioxide-benzo[b]thiophene), 도베실레이트 (Dobesilate; calcium 2,5-dihydroxybenzenesulfonate), 에탄올(Ethanol), NCX-4016(NO-Aspirin), 넬피나비어(Nelfinavir; (3S,4aS,8aS)-N-tert-butyl-2-[(2R,3R)-2-hydroxy-3-[(3-hydroxy-2-methylphenyl)formamido]-4-(phenylsulfanyl)butyl]-decahydroisoquinoline-3-carboxamide), PDP(phosphododecapeptide), PS-341(볼테조밋(Bortezomib); [(1R)-3-methyl-1-({(2S)-3-phenyl-2-[(pyrazin-2-ylcarbonyl)amino]propanoyl}amino)butyl]boronic acid), R115777(티피파르닙(tipifarnib); 6-[amino(4-chlorophenyl)(1-methyl-1H-imidazol-5-yl)methyl]-4-(3-chlorophenyl)-1-methylquinolin-2(1H)-one), S31-M2001(N-Hexyl-2-(1-naphthalenyl)-5-[[4-(phosphonoxy)phenyl]], 스타틴계 화합물, 소듐살리실레이트(Sodium Salicylate), 카페익산(Caffeic acid; 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-2-propenoic acid 3,4-Dihydroxy-cinnamic acid trans-Caffeate 3,4-Dihydroxy-trans-cinnamate)), 에모딘(Emodin; 1,8-Dihydroxy-3-(hydroxymethyl)-9,10-anthracenedione), 우르솔릭산(Ursolic acid; 3-beta-3-hydroxy-urs-12-ene-28-oic-acid), 레스베라트롤(Resveratrol; 3,5,4'-trihydroxy-trans-stilbene), 레티노익산(Retinoic acid; (2E,4E,6E,8E)-3,7-dimethyl-9-(2,6,6-trimethylcyclohexen-1-yl)nona-2,4,6,8-tetraenoic acid), EGCG(Epigallocatechin gallate; [(2R,3R)-5,7-dihydroxy-2-(3,4,5-trihydroxyphenyl)chroman-3-yl] 3,4,5-trihydroxybenzoate), Sr11302((E,E,Z,E)-3-Methyl-7-(4-methylphenyl)-9-(2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl

)-2,4,6,8-nonatetraenoic acid), 탄시논 IIA(Tanshinone IIA;
1,6,6-Trimethyl-6,7,8,9-tetrahydrophenanthro[1,2-b]furan-10,11-dione) 및
커큐민(curcumin;
(1E,6E)-1,7-Bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione)으로
이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있다. 예를 들어, 상기 STAT3
억제제는 STA-21, SD282 또는 메트포민일 수 있다.

- [10] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 정맥내 투여용 조성물의 투여 후 바로 상기
관절강내 투여용 조성물을 투여하거나, 상기 관절강내 투여용 조성물을 투여한
후 바로 상기 정맥내 투여용 조성물을 투여하거나, 또는 상기 정맥내 투여용
조성물과 상기 관절강내 투여용 조성물을 동시에 투여할 수 있다.
- [11] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 STAT3 억제제가 처리된 간엽줄기세포는
통증을 경감시킬 수 있다.
- [12] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 간엽줄기세포는 골관절염 환자의
말초혈액 또는 지방조직으로부터 분리된 것일 수 있다.
- [13] 또한 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 STAT3(Signal transducer and activator
of transcription 3) 억제제가 처리된 간엽줄기세포를 유효성분으로 포함하는
조성물을 정맥내 투여하고, 동시에 간엽줄기세포를 유효성분으로 포함하는
조성물을 관절강내 투여하는 단계를 포함하는 골관절염 예방 및 치료 방법을
제공한다.
- [14] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 간엽줄기세포를 유효성분으로 포함하는
조성물을 관절강내 투여는 STAT3 억제제가 처리될 수 있다.
- [15] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 STAT3 억제제는 STA-21
(8-hydroxy-3-methyl-3,4-dihydrotetraphene-1,7,12(2H)-trione), SD282, 메트포민,
AG-490 ((E)-2-Cyano-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-N-(phenylmethyl)-2-propenamide),
아티프리모드 (Atiprimod; 3-(8,8-dipropyl-3-azaspiro[4.5]decan-3-yl)-N,N-
diethylpropan-1-amine), 오라노핀 (Auranofin; 3,4,5-triacetyloxy-6-
(acetyloxymethyl) oxane-2-thiolate; triethylphosphonium), 오로싸이오말레이트
(Aurothiomalate; Sodium 2-(auriosulfanyl)-3-carboxypropanoate), BMS-354825
(Dasatinib;
N-(2-chloro-6-methylphenyl)-2-[[6-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-2-methyl-4-pyr-
imidinyl]amino]-5-thiazole carboxamide monohydrate), CADPE
(3-(3,4-dihydroxy-phenyl)-acrylic acid 2-(3,4-dihydroxy-phenyl)-ethyl ester), 스타틱
(Stattic; 6-nitro-1,1-dioxide-benzo[b]thiophene), 도베실레이트 (Dobesilate; calcium
2,5-dihydroxybenzenesulfonate), 에탄올(Ethanol), NCX-4016(NO-Aspirin),
넬피나비어(Nelfinavir;
(3S,4aS,8aS)-N-tert-butyl-2-[(2R,3R)-2-hydroxy-3-[(3-hydroxy-2-methylphenyl)forma-
mido]-4-(phenylsulfanyl)butyl]-decahydroisoquinoline-3-carboxamide),
PDP(phosphododecapeptide), PS-341(볼테조밋(Bortezomib);

[(1R)-3-methyl-1-({(2S)-3-phenyl-2-[(pyrazin-2-ylcarbonyl)amino]propanoyl}amino)butyl]boronic acid), R115777(티피파르닙(tipifarnib);
 6-[amino(4-chlorophenyl)(1-methyl-1H-imidazol-5-yl)methyl]-4-(3-chlorophenyl)-1-methylquinolin-2(1H)-one),
 S31-M2001(N-Hexyl-2-(1-naphthalenyl)-5-[[4-(phosphonooxy)phenyl]]), 스타틴계 화합물, 소듐살리실레이트(Sodium Salicylate), 카페익산(Caffeic acid;
 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-2-propenoic acid 3,4-Dihydroxy-cinnamic acid trans-Caffeate 3,4-Dihydroxy-trans-cinnamate)), 에모딘(Emodin;
 1,8-Dihydroxy-3-(hydroxymethyl)-9,10-anthracenedione), 우르솔릭산(Ursolic acid;
 3-beta-3-hydroxy-urs-12-ene-28-oic-acid), 레스베라트롤(Resveratrol;
 3,5,4'-trihydroxy-trans-stilbene), 레티노익산(Retinoic acid;
 (2E,4E,6E,8E)-3,7-dimethyl-9-(2,6,6-trimethylcyclohexen-1-yl)nona-2,4,6,8-tetraenoic acid), EGCG(Epigallocatechin gallate;
 [(2R,3R)-5,7-dihydroxy-2-(3,4,5-trihydroxyphenyl)chroman-3-yl]
 3,4,5-trihydroxybenzoate),
 Sr11302((E,E,Z,E)-3-Methyl-7-(4-methylphenyl)-9-(2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)-2,4,6,8-nonatetraenoic acid), 탄시논 IIA(Tanshinone IIA;
 1,6,6-Trimethyl-6,7,8,9-tetrahydrophenanthro[1,2-b]furan-10,11-dione) 및
 커큐민(curcumin;
 (1E,6E)-1,7-Bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있다. 예를 들어, 상기 STAT3 억제제는 STA-21, SD282 또는 메트포민일 수 있다.

[16] 본 발명의 일 실시예에 있어서, STAT3 억제제가 처리된 간엽줄기세포를 유효성분으로 포함하는 조성물을 정맥내 투여하는 것은 골관절염의 통증을 경감시킬 수 있다.

[17] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 간엽줄기세포는 골관절염 환자의 말초혈액 또는 지방조직으로부터 분리된 것일 수 있다.

발명의 효과

[18] 본 발명에 따른 STAT3 억제제가 처리된 간엽줄기세포는 염증유발인자의 발현을 효과적으로 억제할 수 있고, 항염증인자의 발현을 효과적으로 증가시키며, 케모카인 수용체(chemokine receptor)의 발현을 증가시키는 효과가 우수하다.

[19] 환자 유래의 간엽줄기세포는 일반적인 줄기세포를 사용하는 경우보다 줄기세포의 연골보호나 골관절염 염증 제어 효능을 더욱 개선할 수 있으며, 면역거부반응 등의 부작용을 최소화 할 수 있다. 다만 환자 유래의 간엽줄기세포는 줄기세포는 고령화 줄기세포일 경우가 많고, 자체의 기능이 저하되어 있기 때문에, 이를 포함하는 조성물은 면역질환의 치료제로서 더욱

유용하게 사용될 수 있는 효과가 있다.

- [20] 또한, 본 발명에 따른 키트를 사용하여 STAT3 억제제가 처리된 간엽줄기세포를 정맥내 투여하고, 동시에 간엽줄기세포를 관절강내 투여함으로써, 관절염의 치료하면서 통증을 효과적으로 경감시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [21] 도 1은 본 발명의 일 실시예에서 간엽줄기세포 또는 STA-21이 처리된 간엽줄기세포를 정맥내 투여했을 때 통증 정도를 나타낸 도이다.
- [22] 도 2는 투여 후 경과(0, 3, 11, 22 및 29일)에 따라 일 실시예에서 간엽줄기세포 또는 STA-21이 처리된 간엽줄기세포를 정맥내 투여했을 때 통증 정도를 나타낸 도이다.
- [23] 도 3은 일 실시예에서 간엽줄기세포 또는 STA-21이 처리된 간엽줄기세포를 정맥내 투여했을 때 micro-CT로 연골 손상 정도를 나타낸 도이다.
- [24] 도 4는 일 실시예에서 간엽줄기세포 또는 STA-21이 처리된 간엽줄기세포를 정맥내 투여했을 때 H&E 염색으로 연골 손상 정도를 나타낸 도이다.
- [25] 도 5는 일 실시예에서 간엽줄기세포 또는 STA-21이 처리된 간엽줄기세포를 정맥내 투여했을 때 염증성 사이토카인 발현을 나타낸 도이다.
- [26] 도 6은 본 발명의 일 실시예에서 간엽줄기세포 또는 STA-21이 처리된 간엽줄기세포를 관절강내 투여했을 때 통증 정도를 나타낸 도이다.
- [27] 도 7은 본 발명의 일 실시예에서 간엽줄기세포를 관절강내 투여하고 동시에 STA-21이 처리된 간엽줄기세포를 정맥내 투여했을 때의 통증 정도를 나타낸 도이다.
- [28] 도 8은 본 발명의 일 실시예에서 연골 손상 정도를 나타내는 micro-CT 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [29] 도 9는 본 발명의 일 실시예에서 간엽줄기세포를 관절강내 투여하고 동시에 STA-21이 처리된 간엽줄기세포를 정맥내 투여했을 때의 Ganglion 조직 내에 통증 마커 CGRP를 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- [30] 도 10은 본 발명의 일 실시예에서 STA-21이 처리된 간엽줄기세포를 관절강내 투여하고 동시에 STA-21이 처리된 간엽줄기세포를 정맥내 투여했을 때의 통증 정도를 나타낸 도이다.
- [31] 도 11은 본 발명의 일 실시예에서 연골 손상 정도를 확인하기 위하여 H&E 염색한 결과를 나타낸 도이다.
- [32] 도 12는 본 발명의 일 실시예에서 연골 손상 정도를 확인하기 위하여 C. Micro CT 분석을 통하여 골 볼륨(%)을 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- [33] 도 13은 명의 일 실시예에서 STA-21이 처리된 간엽줄기세포를 관절강내 투여하고 동시에 STA-21이 처리된 간엽줄기세포를 정맥내 투여했을 때의 통증 마커 TRPV1를 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- [34] 도 14는 in vitro 내 STA21 처리된 MSC의 타깃 세포 활성 조절 확인한 결과를

나타낸 도이다.

[35] 도 15는 본 발명의 일 실시예에서 SD-282 및 메트포민에 의한 통증 조절 및 연골보호 인자 발현 정도를 나타낸 도이다.

[36] 도 16은 본 발명의 일 실시예에서 SD-282 및 메트포민에 의한 항염증 및 연골보호에 대한 결과를 나타낸 도이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[37] 이하 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시예들을 상세히 설명한다. 이하의 설명에 있어, 당업자에게 주지 저명한 기술에 대해서는 그 상세한 설명을 생략할 수 있다. 또한, 본 발명을 설명함에 있어서, 관련된 공지 기능 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있다. 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다.

[38] 따라서 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[39] 본 발명의 용어, "STATs(Signal Transducer and Transcriptions)"는 STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B, STAT6의 7개의 subunit 형태를 가지는 전사인자이다. STATs은 N-터미널 도메인(ND), 코일드-코일 도메인(CCD), DNA-바인딩 도메인(DBD), 링커 도메인(LD), Src 호몰로지2(SH2) 및 전사활성 도메인(TAD)이 포함된 6가지 별개의 구조적 도메인을 공유하며, 그 중에 STAT3는 활성화에 의해 인산화되는 C-말단에 중요한 티로신(tyrosine)과 세린(serine) 잔기(Tyrosine 705, Serine 727 residues for STAT3)를 가지고 있다. 특히, STAT3는 다양한 경로를 통해 지속적으로 활성화 되어 종양형성을 촉진하는 역할을 하며, 또한 STAT3는 다양한 사이토카인과 성장인자-인터페론, 표피의 성장인자, 혈소판 유래된 성장인자, 인터루킨5, 인터루킨6, 간세포 성장인자, LIF(leukemia inhibitory factor), 뼈 형성유전 단백질2, 호르몬 랩틴, Src와 Ras같은 발암 단백질에 대한 반응으로써 티로신 705, 세린 727의 두 잔기에 인산화를 통하여 활성화된다. STAT3는 인간 세포에서 여러 유전자의 전사에 관여하는 전사조절인자이며, 정상적인 경우에는 외부로부터 사이토카인이나 성장 요소들에 의한 신호전달에 반응하여, 세포질에 존재하던 STAT3는 핵 안으로 이동하여 세포의 발달, 분화, 성장, 생존, 신생혈관합성 그리고 면역기능 등을 위한 유전자들을 조절한다. 그러나, STAT3가 비정상적일 경우에는 STAT3는 암의 발생에 중요한 기능을 한다. 많은 수의 악성종양, 동물모델 실험, 암 환자에서 활성화된 STAT3가 발견되었으며 STAT3에 의해서 암을 유발하고

발전시키는 여러 다양한 유전자의 발현을 조절한다. STAT3는 종양 세포에 대항하는 면역 활성화에 필요한 중재자의 발현을 억제하는 것으로 알려져 있고, 또한, STAT3의 활성화는 유전자발현 프로그램을 변경하면서 다양한 면역 세포에서 STAT3을 활성화시키는 인자들의 생산을 촉진함으로써 항암면역 반응을 억제하기도 한다.

- [40] 본 발명에서 용어, "간엽줄기세포"는 골수(bone marrow), 혈액, 진피 및 골막에서 분리되는 줄기세포로서, 다양한 세포 예컨대 지방세포, 연골세포 및 뼈세포 등으로 분화할 수 있는 전능성(pluripotent) 또는 다능성(multipotent) 세포를 의미한다.
- [41] 또한, 본 발명에서 사용된 "간엽줄기세포"는 골관절염 환자로부터 분리한 간엽줄기세포를 의미한다. 상기 간엽줄기세포는 동물, 바람직하게는 포유동물, 보다 바람직하게는 인간의 간엽줄기세포일 수 있다. 간엽줄기세포를 분리 및 배양하는 과정은 당업계에 잘 알려져 있으며, 예컨대, 미국특허 제5,486,359호에 개시되어 있으며, 상기 특허 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다. 또한, 상기 간엽줄기세포는 공지된 방법에 따라 골수의 조혈모세포로부터 부착특성에 의해 분리한 후 분화능력을 잃지 않은 상태에서 증식시켜 얻을 수 있다.
- [42] 보다 구체적으로는, 인간 또는 마우스를 포함하는 포유동물, 바람직하게는, 인간의 간엽줄기세포 소스, 예컨대, 혈액 또는 골수로부터 간엽줄기세포를 분리한다. 상기 골수는 경골, 대퇴골, 척수 또는 장골로부터 추출할 수 있다. 이어, 골수로부터 세포를 얻고, 이들 세포를 적합한 배지에서 배양한다. 배양과정에서 부유 세포를 제거하고 배양 플레이트에 부착된 세포들을 계대 배양하여, 최종적으로 구축된(established) 간엽줄기세포를 수득한다. 상기 과정에서 이용되는 배지로는, 줄기세포의 배양에 이용되는 일반적인 어떠한 배지도 이용할 수 있다. 바람직하게는, 혈청(예컨대, 우태아 혈청, 말 혈청 및 인간 혈청)이 함유된 배지이다. 본 발명에서 이용될 수 있는 배지는, 예를 들어, RPMI 시리즈, Eagles's MEM (Eagle's minimum essential medium, Eagle, H. Science 130:432(1959)), α -MEM (Stanner, C.P. et al., Nat. New Biol. 230:52(1971)), Iscove's MEM (Iscove, N. et al., J. Exp. Med. 147:923(1978)), DMEM (Dulbecco's modification of Eagle's medium, Dulbecco, R. et al., VirProcy 8:396(1959)) 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 배지에는, 다른 성분, 예를 들어, 항생제 또는 항진균제(예컨대, 페니실린, 스트렙토마이신) 및 글루타민 등이 포함될 수 있다. 배지 및 배양에 대한 일반적인 설명은 R. Ian Freshney, Culture of Animal Cells, Alan R. Liss, Inc., New York (1984)에 기재되어 있으며, 이 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.
- [43] 또한, 간엽줄기세포의 확인은, 예컨대, 유세포 분석을 통하여 할 수 있다. 이러한 유세포 분석은, 간엽줄기세포의 특이한 표면 마커를 이용하여 실시된다. 예컨대, 간엽줄기세포는 CD44, CD29 및/또는 MHC 클래스 I에 대하여 양성 반응을 나타낸다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명에서 이용되는

간엽줄기세포는 표면 마커 CD44, CD29 및 CD105에 대하여 양성 반응을 나타내며, CD34, CD45 및 HLA-DR(Human Leukocyte Antigen - antigen D Related)에 대해서는 음성 반응을 나타낸다. 줄기세포와 표면 마커를 언급하면서 사용되는 용어양성 반응은 표면 마커에 대한 항체를 줄기세포에 처리하는 경우, 줄기세포의 표면 항원과 특이적으로 결합하는 양상을 의미한다.

- [44] 본 발명은 STAT3 억제제가 처리된 간엽줄기세포를 유효성분으로 포함하는 정맥내 투여용 조성물 및 간엽줄기세포를 유효성분으로 포함하는 관절강내 투여용 조성물을 포함하는 통증이 경감되는 골관절염 치료용 키트, 및 이를 이용한 골관절염 골관절염 예방 및 치료 방법을 제공한다.
- [45] 상기 STAT3 억제제가 처리된 간엽줄기세포를 포함하는 정맥내 투여용 조성물과 간엽줄기세포를 포함하는 관절강내 투여용 조성물은 동시에 투여될 수 있다. 이때, “동시에” 투여된다는 것은, 상기 STAT3 억제제가 처리된 간엽줄기세포를 포함하는 조성물을 정맥내 투여한 후 상기 간엽줄기세포를 포함하는 조성물을 관절강내 투여하거나, 상기 간엽줄기세포를 포함하는 조성물을 관절강내 투여한 후 상기 STAT3 억제제가 처리된 간엽줄기세포를 포함하는 조성물을 투여하거나, 또는 정맥내 투여용 조성물과 상기 관절강내 투여용 조성물을 동시에 투여하는 것을 의미한다.
- [46] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 STAT3 억제제는 STA-21(8-hydroxy-3-methyl-3,4-dihydrotetraphene-1,7,12(2H)-trione), SD282, 메트포민, AG-490((E)-2-Cyano-3-(3,4-dihydrophenyl)-N-(phenylmethyl)-2-propenamide), 아티프리모드(Atiprimod; 3-(8,8-dipropyl-3-azaspiro[4.5]decan-3-yl)-N,N-diethylpropan-1-amine), 오라노핀(Auranofin; 3,4,5-triacetyloxy-6-(acetyloxymethyl)oxane-2-thiolate; triethylphosphonium), 오로싸이오말레이트(Aurothiomalate; Sodium 2-(auriosulfanyl)-3-carboxypropanoate), BMS-354825(Dasatinib; N-(2-chloro-6-methylphenyl)-2-[[6-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-2-methyl-4-pyrimidinyl]amino]-5-thiazole carboxamide monohydrate), CADPE(3-(3,4-dihydroxy-phenyl)-acrylic acid 2-(3,4-dihydroxy-phenyl)-ethyl ester), 스타틱(Stattic; 6-nitro-1,1-dioxide-benzo[b]thiophene), 도베실레이트(Dobesilate; calcium 2,5-dihydroxybenzenesulfonate), 에탄올(Ethanol), NCX-4016(NO-Aspirin), 넬피나비어(Nelfinavir; (3S,4aS,8aS)-N-tert-butyl-2-[(2R,3R)-2-hydroxy-3-[(3-hydroxy-2-methylphenyl)formamido]-4-(phenylsulfanyl)butyl]-decahydroisoquinoline-3-carboxamide), PDP(phosphododecapeptide), PS-341(볼테조밋(Bortezomib); [(1R)-3-methyl-1-((2S)-3-phenyl-2-[(pyrazin-2-ylcarbonyl)amino]propanoyl)amino)butyl]boronic acid), R115777(티피파르닙(tipifarnib); 6-[amino(4-chlorophenyl)(1-methyl-1H-imidazol-5-yl)methyl]-4-(3-chlorophenyl)-1-methylquinolin-2(1H)-one),

S31-M2001(N-Hexyl-2-(1-naphthalenyl)-5-[[4-(phosphonooxy)phenyl]], 스타틴계 화합물, 소듐살리실레이트(Sodium Salicylate), 카페익산(Caffeic acid; 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-2-propenoic acid 3,4-Dihydroxy-cinnamic acid trans-Caffeate 3,4-Dihydroxy-trans-cinnamate)), 에모딘(Emodin; 1,8-Dihydroxy-3-(hydroxymethyl)-9,10-anthracenedione), 우르솔릭산(Ursolic acid; 3-beta-3-hydroxy-urs-12-ene-28-oic-acid), 레스베라트롤(Resveratrol; 3,5,4'-trihydroxy-trans-stilbene), 레티노익산(Retinoic acid; (2E,4E,6E,8E)-3,7-dimethyl-9-(2,6,6-trimethylcyclohexen-1-yl)nona-2,4,6,8-tetraenoic acid), EGCG(Epigallocatechin gallate; [(2R,3R)-5,7-dihydroxy-2-(3,4,5-trihydroxyphenyl)chroman-3-yl] 3,4,5-trihydroxybenzoate), Sr11302((E,E,Z,E)-3-Methyl-7-(4-methylphenyl)-9-(2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)-2,4,6,8-nonatetraenoic acid), 탄시논 IIA(Tanshinone IIA; 1,6,6-Trimethyl-6,7,8,9-tetrahydrophenanthro[1,2-b]furan-10,11-dione) 및 커큐민(curcumin; (1E,6E)-1,7-Bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione)으로 이루어진 군 중에서 선택되는 것일 수 있으며, 예를 들어, STA-21, SD282 또는 메트포민일 수 있다.

- [47] 상기 STAT3 억제제는 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ 세포수의 간엽줄기세포에 $0.1 \mu\text{M} \sim 100 \mu\text{M}$ 의 농도로 처리하여 37°C 의 온도에서 24~72시간 배양하여 면역질환 치료능이 우수한 간엽줄기세포를 수득할 수 있다.
- [48] 상기 STAT3 억제제 중, "스타틴계 화합물"은 실라스타틴(Cilastatin), 나이스타틴(Nystatin), 로바스타틴(Lovastatin), 소마토스타틴(Somatostatin), 프라바스타틴(Pravastatin), 심바스타틴(Simvastatin), 플루바스타틴(Fluvastatin), 아토바스타틴(Atorvastatin), 세르바스타틴(Cervastatin), 울리나스타틴(Ulinastatin) 또는 로슈바스타틴(Rosuvastatin)인 것일 수 있다.
- [49] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 STAT3 억제제가 처리된 간엽줄기세포는 CD44, CD29 및 CD105는 양성이며, CD34, CD45 및 HLA-DR(Human Leukocyte Antigen - antigen D Related)는 음성의 면역학적 특징을 갖는 것일 수 있다.
- [50] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 STAT3 억제제가 처리된 간엽줄기세포는 인터루킨-6(Interleukin-6, IL-6), VEGF(Vascular endothelial growth factor) 또는 인터루킨-1 β (Interleukin-1 beta, IL-1 β)의 인자의 발현이 억제되는 것일 수 있다.
- [51] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 간엽줄기세포는 말초혈액 또는 지방조직으로부터 분리된 것일 수 있다.
- [52] 본 발명의 용어, "치료"란, 달리 언급되지 않는 한, 상기 용어가 적용되는 질환 또는 질병, 또는 상기 질환 또는 질병의 하나 이상의 증상을 역전시키거나, 완화시키거나, 그 진행을 억제하거나, 또는 예방하는 것을 의미하며, 본원에서 사용된 상기 치료란 용어는 치료하는 행위를 말한다. 따라서 포유동물에 있어서

골관절염과 같은 면역질환의 치료 또는 치료요법은 하기의 하나 이상을 포함할 수 있다:

- [53] (1) 면역질환의 성장을 저해함, 즉, 그 발달을 저지시킴;
- [54] (2) 면역질환의 확산을 예방함, 즉, 전이를 예방함;
- [55] (3) 면역질환을 경감시킴;
- [56] (4) 면역질환의 재발을 예방함; 및
- [57] (5) 면역질환의 증상을 완화함(palliating)

[58]

[59] 본 발명에 따른 키트의 조성물은 약학적으로 유효한 양의 STAT3 억제제가 처리된 간엽줄기세포 또는 간엽줄기세포를 단독으로 포함하거나 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다. 상기에서 약학적으로 유효한 양이란 면역질환의 증상을 예방, 개선 및 치료하기에 충분한 양을 말한다.

[60] 또한, 상기에서 "약학적으로 허용되는"이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 조성물을 말한다. 상기 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 또한, 충전제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[61] 또한, 본 발명의 조성물은 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 공지된 방법을 사용하여 제형화될 수 있다. 제형은 분말, 과립, 정제, 에멀전, 시럽, 에어로졸, 연질 또는 경질 젤라틴 캡셀, 멸균 주사용액, 멸균 분말의 형태일 수 있다.

[62] 또한, 본 발명에 조성물의 활성 성분의 투여량은 투여 경로, 환자의 연령, 성별, 체중 및 환자의 중증도 등의 여러 인자에 따라 적절히 선택될 수 있고, 본 발명에 따른 조성물은 골관절염의 증상을 예방, 개선 또는 치료하는 효과를 가지는 공지의 화합물과 병행하여 투여할 수 있다.

[63] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여방식, 수용자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 투여량은 바람직하게는 1일 당 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^{12}$ 세포/kg 이다.

[64] 본 발명의 약제학적 조성물은 치료적 유효량 또는 약학으로 유효한 양으로 투여한다. 용어 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간,

투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

[65]

[66] 이하 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

발명의 실시를 위한 형태

[67] **제조예 1 : 간엽줄기세포(mesenchymal stem cell, MSC)의 획득 및 배양**

[68] 본 발명자들은 하기의 과정을 통하여, 간엽줄기세포를 획득하였다. 우선, 골관절염 환자에서 외과적 수술 후에 얻어진 지방 조직을 10% 페니실린-스트렙토마이신을 포함한 PBS로 10회 이상 세척하여 혈액과 이물질을 제거한 후, 조직을 0.2~0.3g이 되도록 잘게 절단하였다. 0.2% 콜라게나아제(Roche, Sandhofer Strasse, Mannheim, Germany) 용액에 넣어서 37°C의 수욕, 100rpm에서 1시간 동안 반응시켰다. 100 μ m 메쉬를 이용하여 콜라게나아제에 의해서 분해된 용액층과 분해 되지 않은 조각을 분리한 후, 분리된 콜라게나아제 용액에 동량의 PBS를 첨가하였다. 이어, 4°C, 1200rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액인 지질과 지방층을 제거하고, 콜라게나아제 상층액을 제거하였다. 가라앉은 간엽줄기세포로부터 남은 콜라게나아제 용액을 제거하기 위해서 MSCGM[mesenchymal stem cell growth media: MSC 기본 배지 (Cambrex, Walkersville, MD, 미국), 간엽세포 성장보조물(Cambrex, Walkersville, MD, 미국), 4mM L-글루타민 및 페니실린(0.025 unit/500 ml)/스트렙토마이신(0.025 mg/500 ml)]를 넣어 다시 4°C, 1200 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. MSCGM은 우태아혈청을 포함하는 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)에 기초한 배지이다. 이어, 상층액을 제거하고, 얻어진 간엽줄기세포는 배양접시에 접종하여 MSCGM으로 37°C, 5% CO₂ 항온기에서 배양하였다. 이틀에 한번 씩 배양액을 교체하면서 배양하였다.

[69]

[70] **제조예 2 : STA-21이 처리된 간엽줄기세포의 제조**

[71] 3x10⁵ 세포수의 상기 제조예 1의 간엽줄기세포에 5 μ M 농도의 STA-21를 처리한 후 37°C의 온도에서 24~72시간 배양하여 STA-21이 처리된 간엽줄기세포를 제조하였다.

[72]

[73] **제조예 3: 골관절염 동물 모델**

[74] 본 발명의 키트의 골관절염 통증완화 효과를 실험하기 위해 골관절염 동물모델을 제작하였다.

[75] 구체적으로, 골관절염 동물모델을 제작하기 위해 200~250g인 5주령 수컷

Wistar 랫(rat)를 21~22°C의 온도에서 명암주기(light-dark cycle)를 12시간 간격으로 사육하였고 살균한 물과 사료를 공급하여 키웠다. 이후 골관절염 유도를 위해 랫(rat)의 오른쪽 무릎에 3mg/50 μ l의 용량으로 모노소듐 아이도아세테이트(Monosodium iodoacetate, MIA, Sigma, ST. Louis, MO)를 투여하여 골관절염을 유도하였다. MIA는 생리식염수에 용해시켜 투여하였다.

[76]

[77] 실시예 1: 투여 경로에 따른 STA-21이 처리된 간엽줄기세포의 통증 경감 효과

[78] 투여 경로에 따른 STA-21이 처리된 간엽줄기세포의 통증 경감 효과를 확인하기 위해 제조예 3의 골관절염 동물모델에 제조예 2의 3×10^5 세포수의 STA-21이 처리된 간엽줄기세포를 관절강내 주사(intraarticular injection)(STA21 OA-MSC IA) 또는 정맥내 주사(intravenous injection)(STA21 OA-MSC IV)로 주입하였다. 또한, 비교예로서 제조예 1의 간엽줄기세포 단독으로 정맥내 주사(OA-MSC IV) 또는 관절강내 주사(OA-MSC IA)로 주입하고 대조군(MIA)으로는 MIA만을 투여하였다.

[79]

[80] 실시예 1-1. 정맥내 주사(IV)에 따른 STA-21이 처리된 간엽줄기세포의 통증 경감 효과

[81] 투여 2일 후 Dynamic plantar aesthesiometer(Ugo Basile, Comerio, Italy)를 이용하여 통증을 측정하였다. 기계의 통증 측정 방법은 측정 기계 위에 그물로 된 판을 얹고 그 위에 아크릴로 된 동물고정틀 안에 랫(rat)을 넣은 후, 측정기기로 약물이 주입된 오른발에 짚어 주었다. 짚은 후에 기계가 자동적으로 발을 떼는데 걸리는 시간(s, 초)과 얼마만큼의 무게를 주었을 때 발을 떼는지(g)를 측정하여 그때 나오는 시간과 무게를 기재하여 통증 측정 그래프를 그렸다. 그 결과를 도 1 및 2에 나타내었다.

[82] 도 1에 나타낸 바와 같이, MIA만을 투여한 군에 비해 정맥내 투여된 OA 환자 유래 MSC를 주입한 군(OA-MSC IV)이 통증을 완화시킴을 확인할 수 있었으며, 특히, 정맥내 투여된 STA-21이 처리된 간엽줄기세포가 OA 환자 유래 MSC에 비해 통증을 더 경감시킴을 확인할 수 있었다.

[83] 도 2에 나타낸 바와 같이, 투여 후 경과(0, 3, 11, 22 및 29일)에 따라 정맥내 투여된 STA-21이 처리된 간엽줄기세포가 OA 환자 유래 MSC에 비해 통증을 더 경감시킴을 확인하였다. 특히, 투여 후 경과가 지나도 통증 경감 효과가 지속됨을 확인하였다.

[84]

[85] 또한, 각 투여군의 연골 손상 정도를 확인하기 위하여, 랫의 대퇴골(Femur) 및 경골(Tibia)을 채취하여 micro-CT로 관찰하여 연골 파괴 정도를 확인하였다. 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[86] 도 3에 나타낸 바와 같이, MIA만을 투여한 군보다 정맥내 투여된 OA 환자 유래 MSC를 주입한 군(OA-MSC IV)이 연골 손상이 억제되었으며, 상기 OA-MSC

IV군 보다 STA-21이 처리된 간엽줄기세포를 정맥내 투여했을 경우(STA21-MSC IV) 더욱 연골 손상이 완화됨을 확인하였다.

[87]

[88] 또한, 상기 각 군의 연골 손상 정도를 분석하기 위하여 H&E 염색을 수행하였으며, 각 군의 총 Mankin score, OARSI score 및 structure를 확인하였다(도 4). 또한, 각 군의 연골에서 발현되는 염증성 사이토 카인을 발현하는 세포를 분석하기 위하여, il-6, TNF-a, HIF2-a, IL-6(beta) IHC 염색을 수행하였으며, 이를 확인하였다(도 5). 그 결과를 도 4 및 5에 나타내었다.

[89] 도 4에 나타낸 바와 같이, STA-21이 처리된 간엽줄기세포를 정맥내 투여했을 경우(STA21-MSC IV), MIA만을 투여한 군과 정맥내 투여된 OA 환자 유래 MSC를 주입한 군(OA-MSC IV)보다 연골 손상이 감소됨을 확인하였다.

[90] 또한, 도 5에 나타낸 바와 같이, STA-21이 처리된 간엽줄기세포를 정맥내 투여했을 경우(STA21-MSC IV) MIA만을 투여한 군과 비교하여 염증성 사이토카인 발현을 억제하여, 통증을 경감시킴을 확인하였다.

[91]

[92] 실시예 1-2. 관절강내 주사(IA)에 따른 STA-21이 처리된 간엽줄기세포의 통증 경감 효과

[93] 관절강내 주사에 따른 각 군의 통증 경감 효과 확인은 상기 실시예 1-1에 기재된 기계의 통증 측정 방법에 따라 측정하였다. 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[94] 도 6에 나타낸 바와 같이, OA 환자 유래 MSC를 관절강내로 투여했을 때 정맥내 투여에 비해 통증억제 효과는 떨어지지만 연골 보호 효과는 더 좋은 것을 확인할 수 있었다. 또한, 관절강내 투여된 STA-21이 처리된 간엽줄기세포는 OA 환자 유래 MSC에 비해 연골 보호 및 통증 억제 둘 다에서 더 적은 효과를 나타냄을 확인할 수 있었다.

[95]

[96] 실시예 2 : 본 발명의 키트에 의한 골관절염 치료 효과 분석

[97] 실시예 2-1. 본 발명의 키트에 의한 통증 억제 효과 확인

[98] 제조예 3의 골관절염 동물모델에게 제조예 1의 3×10^5 세포수의 간엽줄기세포를 관절강내 주사(intraarticular injection)로 주입하고 제조예 2의 3×10^5 세포수의 STA-21이 처리된 간엽줄기세포를 정맥내 주사(intravenous injection)로 주입하였다(STA21 IV + OA IA). 비교예로서 STA-21이 처리된 간엽줄기세포 단독으로 정맥내 주사(STA21 OA-MSC IA)로 주입하거나 간엽줄기세포 단독으로 관절강내 주사(OA-MSC IA)로 주입하였다. 대조군(MIA)으로는 MIA만을 투여하였다.

[99] 투여 후 2일이 경과한 다음부터 투여 후 28일 까지 실시예 1과 같은 방법으로 통증정도를 확인하고 그 결과를 도 7에 나타내었다.

[100] 도 7에 볼 수 있는 바와 같이, 간엽줄기세포를 관절강내 주사로 주입하고 동시에 STA-21이 처리된 간엽줄기세포를 정맥내 주사로 주입했을 때(STA21 IV

+ OA IA), 비교예(STA21 OA-MSC IA 또는 OA-MSC IA)에 비해 개선된 통증 억제 효과를 나타냄을 확인할 수 있었다. 또한, 투여 후 시간이 경과하여도 통증 억제 효과는 지속됨을 확인하였다.

[101]

[102] 실시예 2-2. 본 발명의 키트에 의한 연골 손상 억제 효과 확인

[103] 각 투여군의 연골 손상 정도를 확인하기 위하여, 랫의 대퇴골(Femur) 및 경골(Tibia)을 채취하여 micro-CT로 관찰하여 연골 파괴 정도를 확인하였다(도 8).

[104] 도 8에 나타낸 바와 같이, 간엽줄기세포를 관절강내 투여하고 동시에 STA-21이 처리된 간엽줄기세포를 정맥내 투여했을 경우(STA21 IV + OA IA), 비교예(STA21 OA-MSC IA 또는 OA-MSC IA)에 비해 연골 파괴가 억제된 것이 관찰되었다.

[105]

[106] 실시예 2-3: 본 발명의 키트에 의한 조직 내에 통증 마커 확인 및 신경 통증 억제 효과 확인

[107] 통증 측정(in vivo)에서의 효과를 정량적으로 확인하기 위하여 동물 희생 시 척추를 따로 분리하고 척추의 등쪽 부분을 제거해 나가면서 척수를 드러나게 하였다. 그 후 요추 1~5번 사이에 있는 Dorsal Root Ganglion 조직을 채취하여 면역염색법을 통하여 통증 전달물질인 CGRP 발현량의 확인을 통해 직접적으로 통증의 억제를 관찰하였다. 그 결과를 도 9에 나타내었다.

[108] 도 9의 조직결과에서 볼 수 있는 것과 같이, 엽줄기세포를 관절강내 투여하고 동시에 STA-21이 처리된 간엽줄기세포를 정맥내 투여했을 경우(STA21 IV + OA IA), 비교예(STA21 OA-MSC IA 또는 OA-MSC IA)에 비해 통증 전달물질인 CGRP 발현량이 낮아짐을 확인하여, 연골파괴 뿐만 아니라 직접적인 신경 통증 억제도 이루어지는 것을 확인할 수 있다.

[109]

[110]

[111] 실시예 3 : STA-21이 모두 처리된 본 발명의 키트에 의한 골관절염 치료 효과 분석

[112] 실시예 3-1. 본 발명의 키트에 의한 통증 억제 효과 확인

[113] 제조예 3의 골관절염 동물모델에게 제조예 1의 3×10^5 세포수의 STA-21이 처리된 간엽줄기세포를 관절강내 주사(intraarticular injection)로 주입하고 제조예 2의 3×10^5 세포수의 STA-21이 처리된 간엽줄기세포를 정맥내 주사(intravenous injection)로 주입하였다(STA21 OA-MSC IA+IV). 비교예로서 STA-21이 처리된 간엽줄기세포 단독으로 정맥내 주사(STA21 OA-MSC IV)로 주입하거나, STA-21이 처리된 간엽줄기세포 단독으로 관절강내 주사(STA21 OA-MSC IA)로 주입하였다. 대조군(MIA)으로는 MIA만을 투여하였다.

[114] 투여 후 0, 5, 12, 20, 29일이 경과한 다음부터 실시예 1과 같은 방법으로

통증정도를 확인하고 그 결과를 도 10에 나타내었다.

- [115] 도 10에 볼 수 있는 바와 같이, STA-21이 처리된 간엽줄기세포를 관절강내 주사로 주입하고 동시에 STA-21이 처리된 간엽줄기세포를 정맥내 주사로 주입했을 때(STA21 OA-MSC IA+IV), 비교예(STA21 OA-MSC IA 또는 STA21 OA-MSC IA)에 비해 개선된 통증 억제 효과를 나타냄을 확인할 수 있었다. 또한, 투여 후 시간이 경과하여도 통증 억제 효과는 지속됨을 확인하였다.

[116]

[117] 실시예 3-2. 본 발명의 키트에 의한 연골 손상 억제 효과 확인

- [118] 각 투여군의 연골 손상 정도를 확인하기 위하여, H&E 염색을 수행하였으며, 각 군의 총 Mankin score, OARSI score 및 structure를 확인하였다(도 11). 또한, C. Micro CT 분석을 통하여 골 볼륨(%)을 분석하였다(도 12). 그 결과를 도 11 및 도 12에 나타내었다.

- [119] 도 11 및 도 12에 나타낸 바와 같이, STA-21이 처리된 간엽줄기세포를 관절강내 주사로 주입하고 동시에 STA-21이 처리된 간엽줄기세포를 정맥내 주사로 주입했을 때(STA21 OA-MSC IA+IV), 비교예(STA21 OA-MSC IA 또는 STA21 OA-MSC IA)에 비해 ankin score, OARSI score 및 structure가 낮고, 골 볼륨(%)가 높음을 확인하여, 연골 파괴가 억제된 것이 관찰되었다.

[120]

[121] 실시예 3-3: 본 발명의 키트에 의한 조직 내에 통증 마커 확인 및 신경 통증 억제 효과 확인

- [122] 통증 측정(in vivo)에서의 효과를 정량적으로 확인하기 위하여, 각 군이 투여된 신경절 내의 통증 마커인 TRPV1을 확인하기 위하여 IHC 염색하여 이를 확인하였다. 그 결과를 도 13에 나타내었다.

- [123] 도 13의 조직결과에서 볼 수 있는 것과 같이, STA-21이 처리된 간엽줄기세포를 관절강내 주사로 주입하고 동시에 STA-21이 처리된 간엽줄기세포를 정맥내 주사로 주입했을 때(STA21 OA-MSC IA+IV), 비교예(STA21 OA-MSC IA 또는 STA21 OA-MSC IA)에 비해 신경절 내의 통증 마커인 TRPV1 활성이 현저히 감소됨을 확인하였다.

[124]

[125] 실시예 3-4: in vitro 내 STA21 처리된 MSC의 타겟 세포 활성 조절 확인

- [126] STA21-MSC의 in vitro 내 효력을 평가하고 타겟 세포의 활성을 조절하기 위하여, Sta21-MSC와 연골세포(chondrocyte)(A), 파골세포(osteoclast)(B), 조골세포(osteoblast)(c)를 각각 공조 배양하여, 각 세포의 활성인자를 분석하였다. 각 세포는 1×10^4 로 공조 배양하였으며, 공조 배양시 3uM의 trans well을 사용하였다. 아래의 플레이트에 타겟 세포를 seeding 하였으며, trans well에는 STA21-MSC를 seeding하였다. 그 결과를 도 14에 나타내었다.

- [127] 도 14에 나타낸 바와 같이, 연골세포(Chondrocyte)와 공조 배양시 카다볼릭 팩터인 ADAMTS5의 활성은 억제 되었으며, 아나볼릭 인자인 TIMP1, 3의 활성은

증가됨을 확인하였다. 또한, 파골 세포와의 공조 배양시, 파골세포 활성 인자인 cathepsin-K의 활성이 억제됨을 확인하였다. 또한, 조골 세포와의 공조 배양시 조골세포에서 활성화되는 염증성 인자인 IL-6, IL-1b의 활성이 현저히 억제됨을 확인하였다. 따라서, 상기와 결과로 STA21 처리된 MSC는 연골 손상 및 염증 반응을 일으킬 수 있는 타겟 세포의 활성을 조절 할 수 있는 효과가 존재함을 in vitro 상으로 확인하였다.

[128]

[129] **실시예 4: SD-282에 의한 통증 조절 및 연골보호 인자 발현**

[130] 중간엽 줄기세포를 다른 자극 없이 메트포민과 SD282를 처리 하고 3일 동안 배양하여 ELISA (효소결합 면역흡착 분석법)를 통해 염증성 cytokine을 측정하였다. 도 15으로부터 통증과 더불어 염증관련 Factor 인 IL-6 cytokine은 SD282 및 메트포민에 의해 억제되었고, 항염증 인자인 IL-10 cytokine 발현량은 SD282에 의해 증가된 것을 확인할 수 있었다. 따라서 염증과 더불어 통증 매커니즘과도 연관이 있는 항염요소는 증가시키고 염증요소는 감소시켜 통증과 염증의 매개인자를 효과적으로 조절할 수 있음을 확인했다.

[131]

[132] **실시예 5: SD-282에 의한 항염증 및 연골보호**

[133] 연골세포에 IL-1beta를 처리하여 골관절염 연골과 유사한 상태로 만들어 주고 메트포민과 SD282를 처리하여 하룻동안 배양 후 RNA추출과, cDNA합성을 거쳐 중합효소연쇄반응 (PCR)을 통하여 연골 합성요소와 파괴 요소를 정량 분석하였다. 도 16에서 볼 수 있는 바와 같이, 연골 파괴 인자인 MMP-13은 SD282가 메트포민과 유사하게 억제하는 것을 확인하였고, 연골 보호 인자인 TIMP1의 발현량은 메트포민보다 SD282에 의해 더 크게 증가된 것을 관찰할 수 있었다. 따라서 SD282에 의해 Chondrogenesis mechanism을 활성화시키고 그로인해 Anabolic factor는 증가키시고 catabolic factor는 감소시켜 연골보호와 재생에 뛰어난 효과를 기대할 수 있다.

[134]

청구범위

- [청구항 1] STAT3(Signal transducer and activator of transcription 3) 억제제가 처리된 간엽줄기세포를 유효성분으로 포함하는 정맥내 투여용 조성물; 및 간엽줄기세포를 유효성분으로 포함하는 관절강내 투여용 조성물을 포함하는, 통증이 경감되는 골관절염 치료용 키트.
- [청구항 2] 제 1 항에 있어서,
상기 관절강내 투여용 조성물은 STAT3 억제제가 처리된 것을 특징으로 하는 키트.
- [청구항 3] 제1항 또는 제2항에 있어서,
상기 STAT3 억제제는 STA-21
(8-hydroxy-3-methyl-3,4-dihydrotetraphene-1,7,12(2H)-trione), SD282
(N,N-Ethyl-4-fluorophenyl biguanide), 메트포민, AG-490
((E)-2-Cyano-3-(3,4-dihydrophenyl)-N-(phenylmethyl)-2-propenamide),
아티프리모드 (Atiprimod; 3-(8,8-dipropyl-3-azaspiro[4.5]decan-3-yl)-N,N-diethylpropan-1-amine), 오라노핀 (Auranofin; 3,4,5-triacetyloxy-6-(acetyloxymethyl) oxane-2-thiolate; triethylphosphonium),
오로싸이오말레이트 (Aurothiomalate; Sodium
2-(auriosulfanyl)-3-carboxypropanoate), BMS-354825 (Dasatinib;
N-(2-chloro-6-methylphenyl)-2-[[6-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-2-methyl-4-pyrimidinyl]amino]-5-thiazole carboxamide monohydrate), CADPE
(3-(3,4-dihydroxy-phenyl)-acrylic acid 2-(3,4-dihydroxy-phenyl)-ethyl ester),
스타틱 (Stattic; 6-nitro-1,1-dioxide-benzo[b]thiophene), 도베실레이트
(Dobesilate; calcium 2,5-dihydroxybenzenesulfonate), 에탄올(Ethanol),
NCX-4016(NO-Aspirin), 넬피나비어(Nelfinavir;
(3S,4aS,8aS)-N-tert-butyl-2-[(2R,3R)-2-hydroxy-3-[(3-hydroxy-2-methylphenyl)formamido]-4-(phenylsulfanyl)butyl]-decahydroisoquinoline-3-carboxamide),
PDP(phosphododecapeptide), PS-341(볼테조밍(Bortezomib);
[(1R)-3-methyl-1-({(2S)-3-phenyl-2-[(pyrazin-2-ylcarbonyl)amino]propanoyl}amino)butyl]boronic acid), R115777(티피파르닙(tipifarnib);
6-[amino(4-chlorophenyl)(1-methyl-1H-imidazol-5-yl)methyl]-4-(3-chlorophenyl)-1-methylquinolin-2(1H)-one),
S31-M2001(N-Hexyl-2-(1-naphthalenyl)-5-[[4-(phosphonooxy)phenyl]],
스타틴계 화합물, 소듐살리실레이트(Sodium Salicylate), 카페익산(Caffeic acid; 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-2-propenoic acid 3,4-Dihydroxy-cinnamic acid trans-Caffeate 3,4-Dihydroxy-trans-cinnamate)), 에모딘(Emodin;
1,8-Dihydroxy-3-(hydroxymethyl)-9,10-anthracenedione),
우르솔릭산(Ursolic acid; 3-beta-3-hydroxy-urs-12-ene-28-oic-acid),

레스베라트롤(Resveratrol; 3,5,4'-trihydroxy-trans-stilbene),
 레티노익산(Retinoic acid;
 (2E,4E,6E,8E)-3,7-dimethyl-9-(2,6,6-trimethylcyclohexen-1-yl)nona-2,4,6,8-tetraenoic acid), EGCG(Epigallocatechin gallate;
 [(2R,3R)-5,7-dihydroxy-2-(3,4,5-trihydroxyphenyl)chroman-3-yl]
 3,4,5-trihydroxybenzoate),
 Sr11302((E,E,Z,E)-3-Methyl-7-(4-methylphenyl)-9-(2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)-2,4,6,8-nonatetraenoic acid), 탄시논 IIA(Tanshinone IIA;
 1,6,6-Trimethyl-6,7,8,9-tetrahydrophenanthro[1,2-b]furan-10,11-dione) 및
 커큐민(curcumin;
 (1E,6E)-1,7-Bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione)으로
 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것인 키트.

- [청구항 4] 제 1 항에 있어서,
 상기 정맥내 투여용 조성물과 상기 관절강내 투여용 조성물은 동시에
 투여되는 것인 키트.
- [청구항 5] 제 1 항에 있어서,
 상기 STAT3 억제제가 처리된 간엽줄기세포는 통증을 경감시키는 것인
 키트.
- [청구항 6] 제 1 항에 있어서,
 상기 간엽줄기세포는 골관절염 환자의 말초혈액 또는 지방조직으로부터
 분리된 것인 키트.
- [청구항 7] 약학적으로 유효한 양의 STAT3(Signal transducer and activator of
 transcription 3) 억제제가 처리된 간엽줄기세포를 유효성분으로 포함하는
 조성물을 정맥내 투여하고, 동시에 간엽줄기세포를 유효성분으로
 포함하는 조성물을 관절강내 투여하는 단계를 포함하는 골관절염 예방
 및 치료 방법.
- [청구항 8] 제7항에 있어서,
 상기 간엽줄기세포를 유효성분으로 포함하는 조성물을 관절강내 투여는
 STAT3 억제제가 처리된 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 9] 제7항 또는 제8항에 있어서,
 상기 STAT3 억제제는
 STA-21(8-hydroxy-3-methyl-3,4-dihydro-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene-1,7,12(2H)-trione),
 SD282, 메트포민, AG-490
 ((E)-2-Cyano-3-(3,4-dihydrophenyl)-N-(phenylmethyl)-2-propenamide),
 아티프리모드(Atiprimod; 3-(8,8-dipropyl-3-azaspiro[4.5]decan-3-yl)-N,N-
 diethylpropan-1-amine), 오라노핀(Auranofin; 3,4,5-triacetyloxy-6-
 (acetyloxymethyl) oxane-2-thiolate; triethylphosphonium),
 오로싸이오말레이트(Aurothiomalate; Sodium

2-(auriosulfanyl)-3-carboxypropanoate), BMS-354825(Dasatinib; N-(2-chloro-6-methylphenyl)-2-[[6-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-2-methyl-4-pyrimidinyl]amino]-5-thiazole carboxamide monohydrate), CADPE(3-(3,4-dihydroxy-phenyl)-acrylic acid 2-(3,4-dihydroxy-phenyl)-ethyl ester), 스타틱(Stattic; 6-nitro-1,1-dioxide-benzo[b]thiophene), 도베실레이트(Dobesilate; calcium 2,5-dihydroxybenzenesulfonate), 에탄올(Ethanol), NCX-4016(NO-Aspirin), 넬피나비어(Nelfinavir; (3S,4aS,8aS)-N-tert-butyl-2-[(2R,3R)-2-hydroxy-3-[(3-hydroxy-2-methylphenyl)formamido]-4-(phenylsulfanyl)butyl]-decahydroisoquinoline-3-carboxamide), PDP(phosphododecapeptide), PS-341(볼테조밋(Bortezomib); [(1R)-3-methyl-1-({(2S)-3-phenyl-2-[(pyrazin-2-ylcarbonyl)amino]propanoyl}amino)butyl]boronic acid), R115777(티피파르닙(tipifarnib); 6-[amino(4-chlorophenyl)(1-methyl-1H-imidazol-5-yl)methyl]-4-(3-chlorophenyl)-1-methylquinolin-2(1H)-one), S31-M2001(N-Hexyl-2-(1-naphthalenyl)-5-[[4-(phosphonooxy)phenyl]], 스타틴계 화합물, 소듐살리실레이트(Sodium Salicylate), 카페익산(Caffeic acid; 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-2-propenoic acid 3,4-Dihydroxy-cinnamic acid trans-Caffeate 3,4-Dihydroxy-trans-cinnamate)), 에모딘(Emodin; 1,8-Dihydroxy-3-(hydroxymethyl)-9,10-anthracenedione), 우르솔릭산(Ursolic acid; 3-beta-3-hydroxy-urs-12-ene-28-oic-acid), 레스베라트롤(Resveratrol; 3,5,4'-trihydroxy-trans-stilbene), 레티노익산(Retinoic acid; (2E,4E,6E,8E)-3,7-dimethyl-9-(2,6,6-trimethylcyclohexen-1-yl)nona-2,4,6,8-tetraenoic acid), EGCG(Epigallocatechin gallate; [(2R,3R)-5,7-dihydroxy-2-(3,4,5-trihydroxyphenyl)chroman-3-yl] 3,4,5-trihydroxybenzoate), Sr11302((E,E,Z,E)-3-Methyl-7-(4-methylphenyl)-9-(2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)-2,4,6,8-nonatetraenoic acid), 탄시논 IIA(Tanshinone IIA; 1,6,6-Trimethyl-6,7,8,9-tetrahydrophenanthro[1,2-b]furan-10,11-dione) 및 커큐민(curcumin; (1E,6E)-1,7-Bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것인 방법.

[청구항 10] 제7항에 있어서,

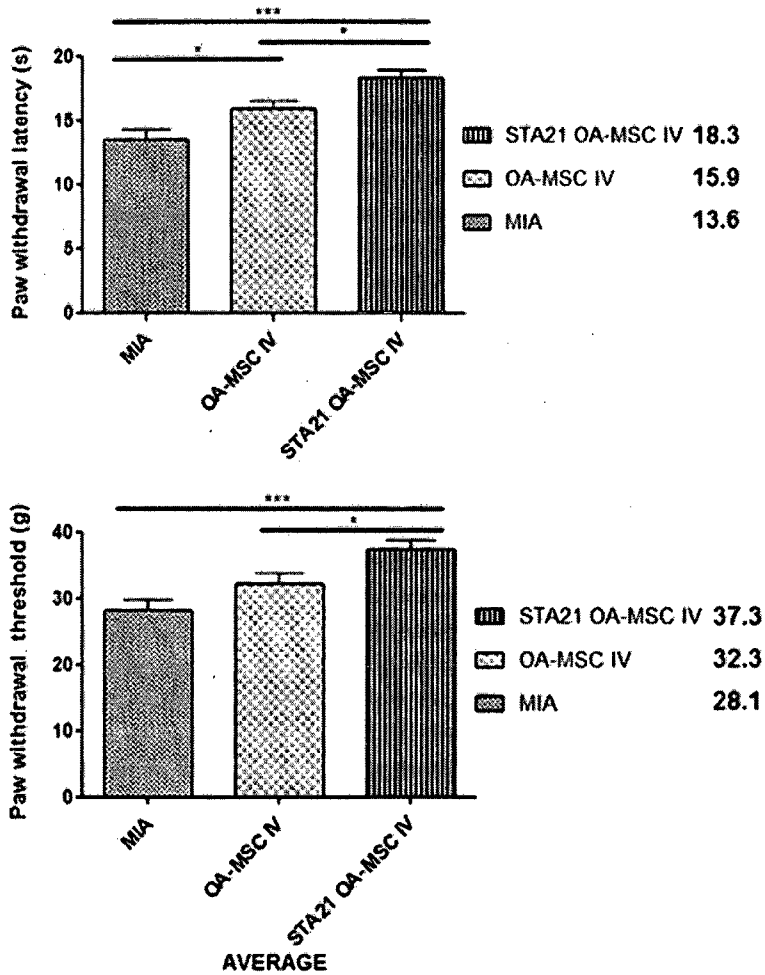
STAT3(Signal transducer and activator of transcription 3) 억제제가 처리된 간엽줄기세포를 유효성분으로 포함하는 조성물을 정맥내 투여하는 것은 골관절염의 통증을 경감시키는 것인 방법.

[청구항 11] 제7항에 있어서,

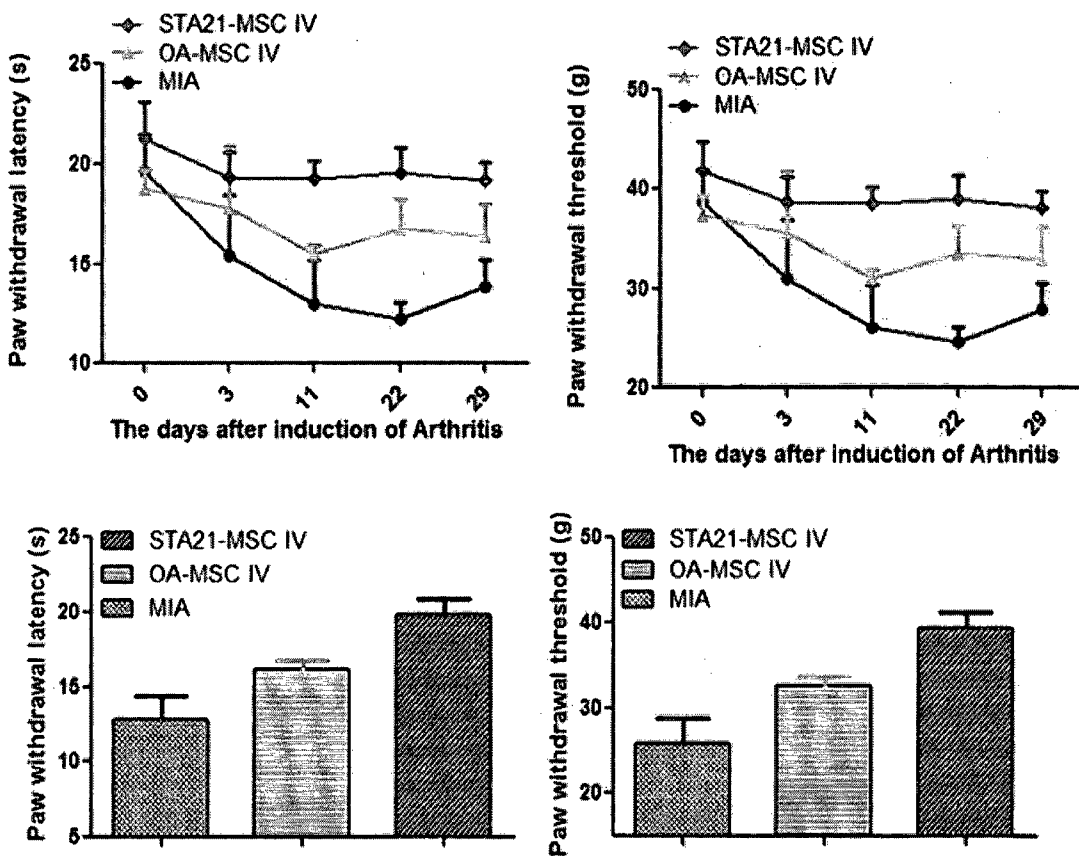
상기 간엽줄기세포는 골관절염 환자의 말초혈액 또는 지방조직으로부터

분리된 것인 방법.

[도1]

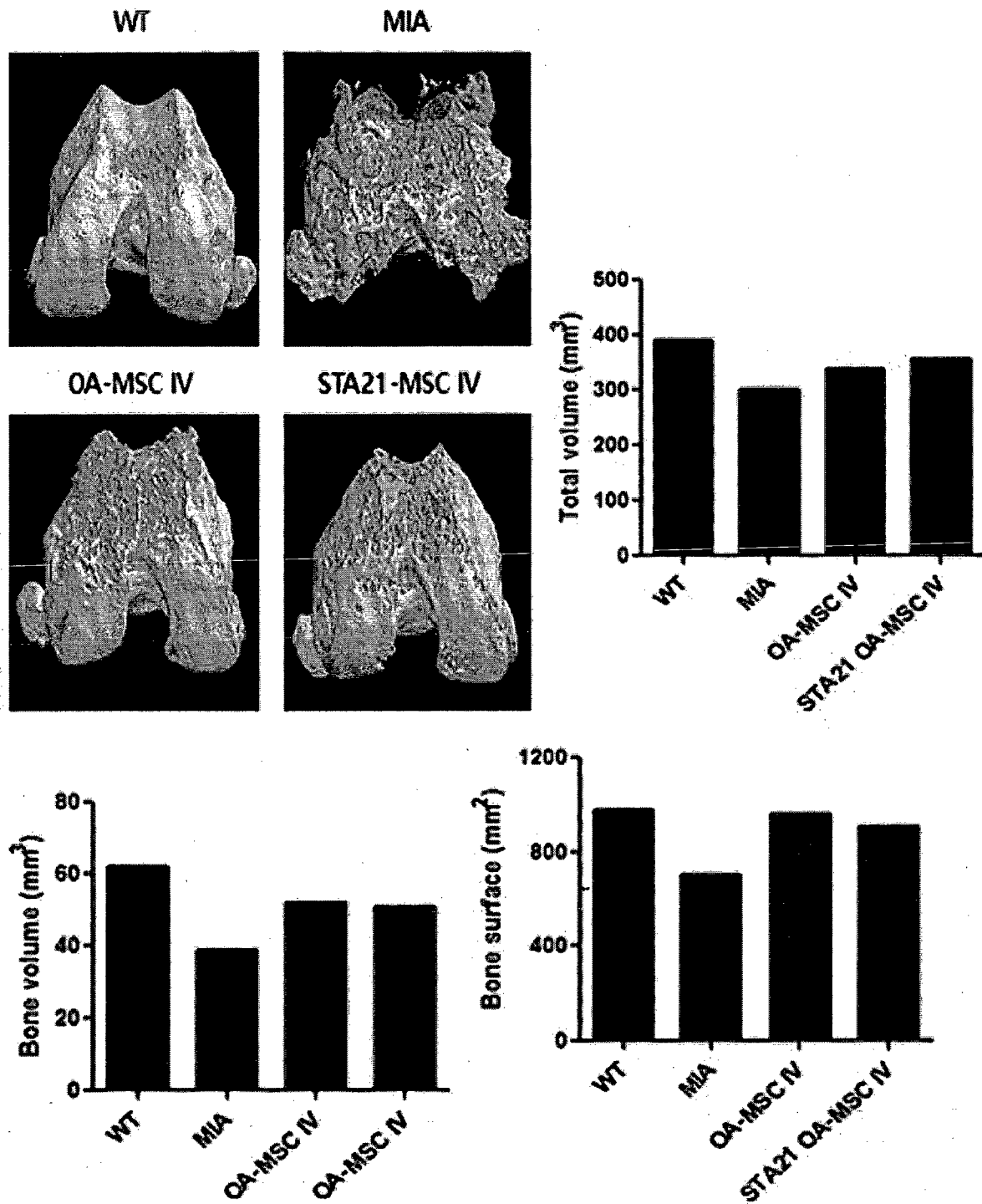


[도2]



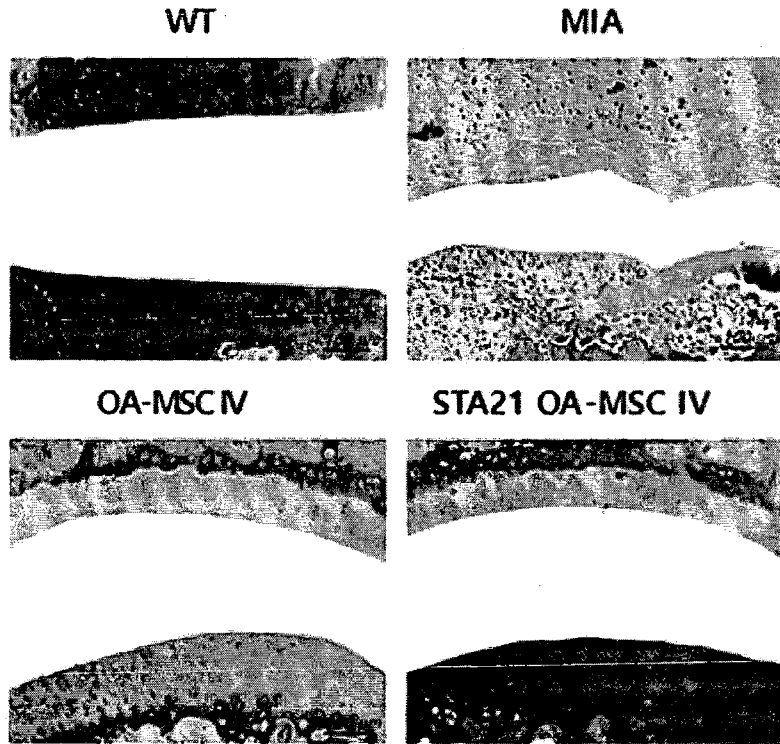
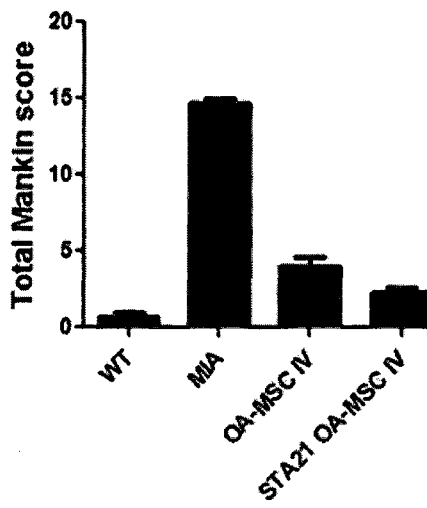
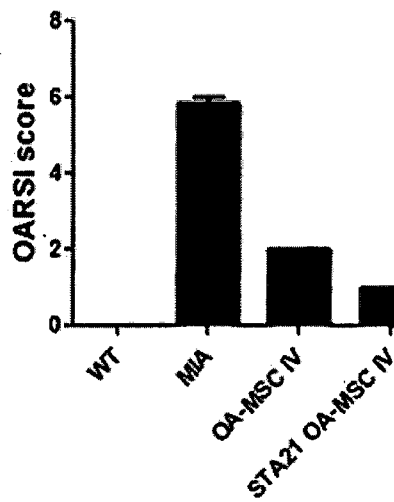
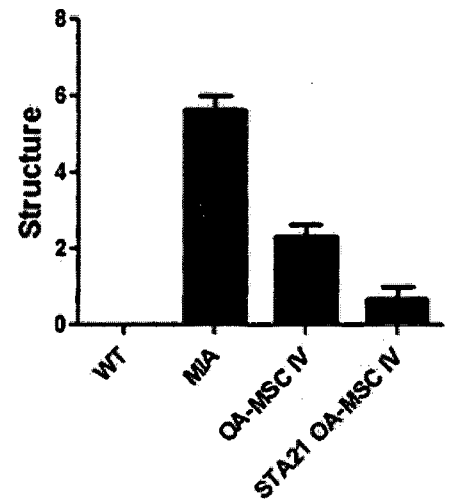
[도3]

2/11

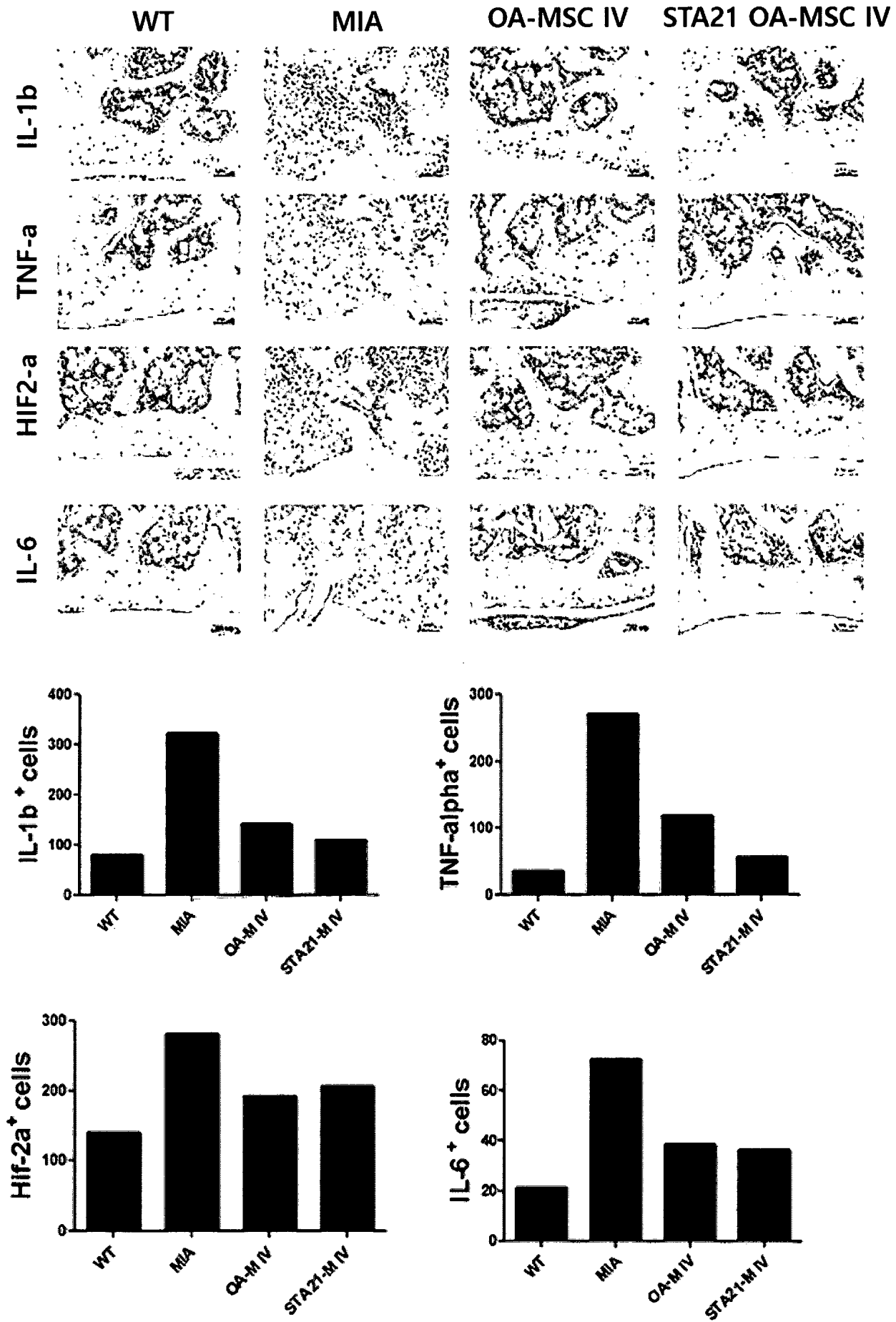


[도4]

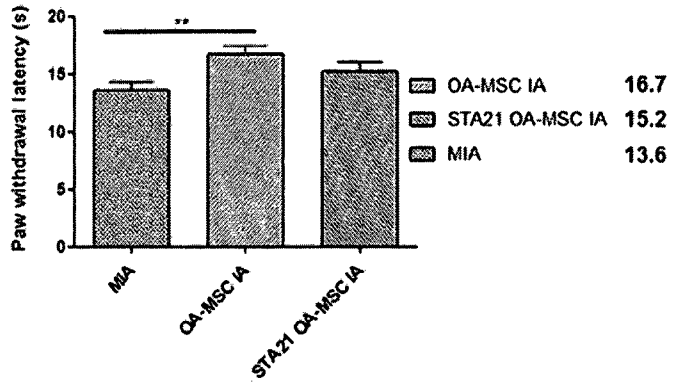
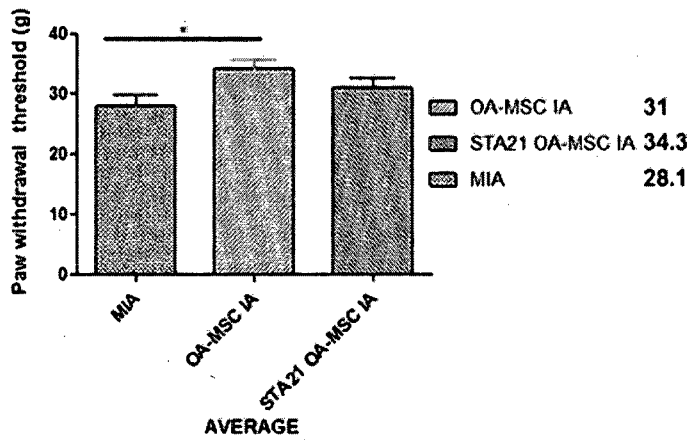
3/11



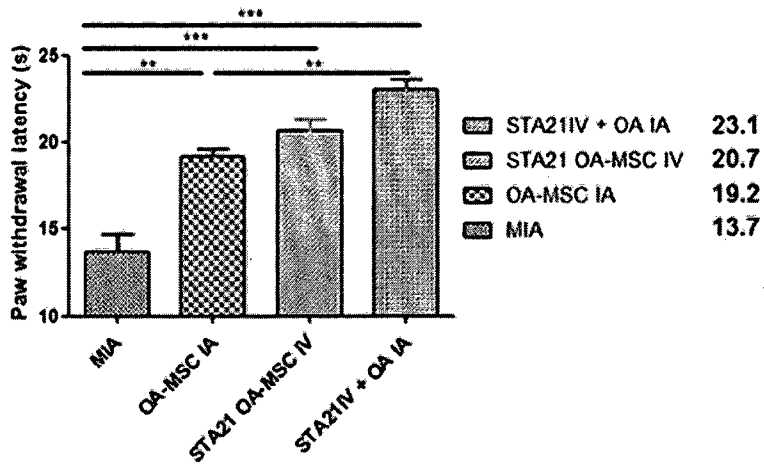
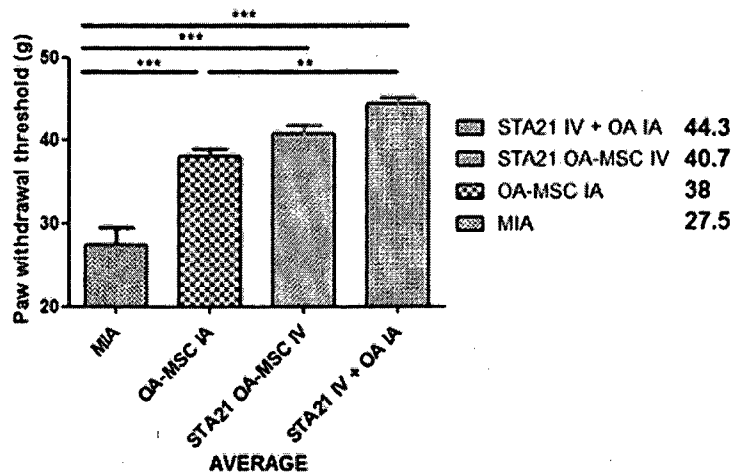
[도5]



[도6]

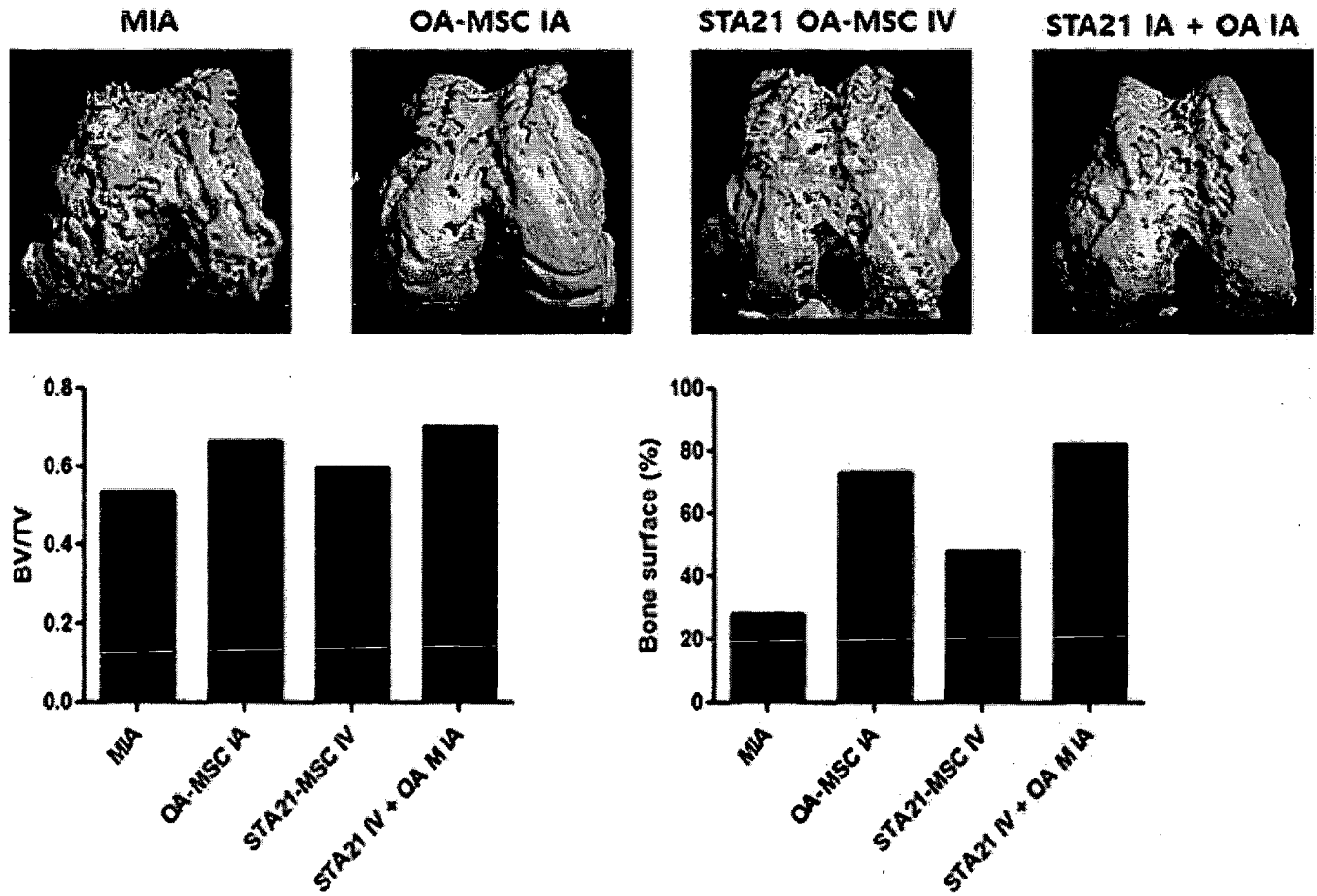


[도7]

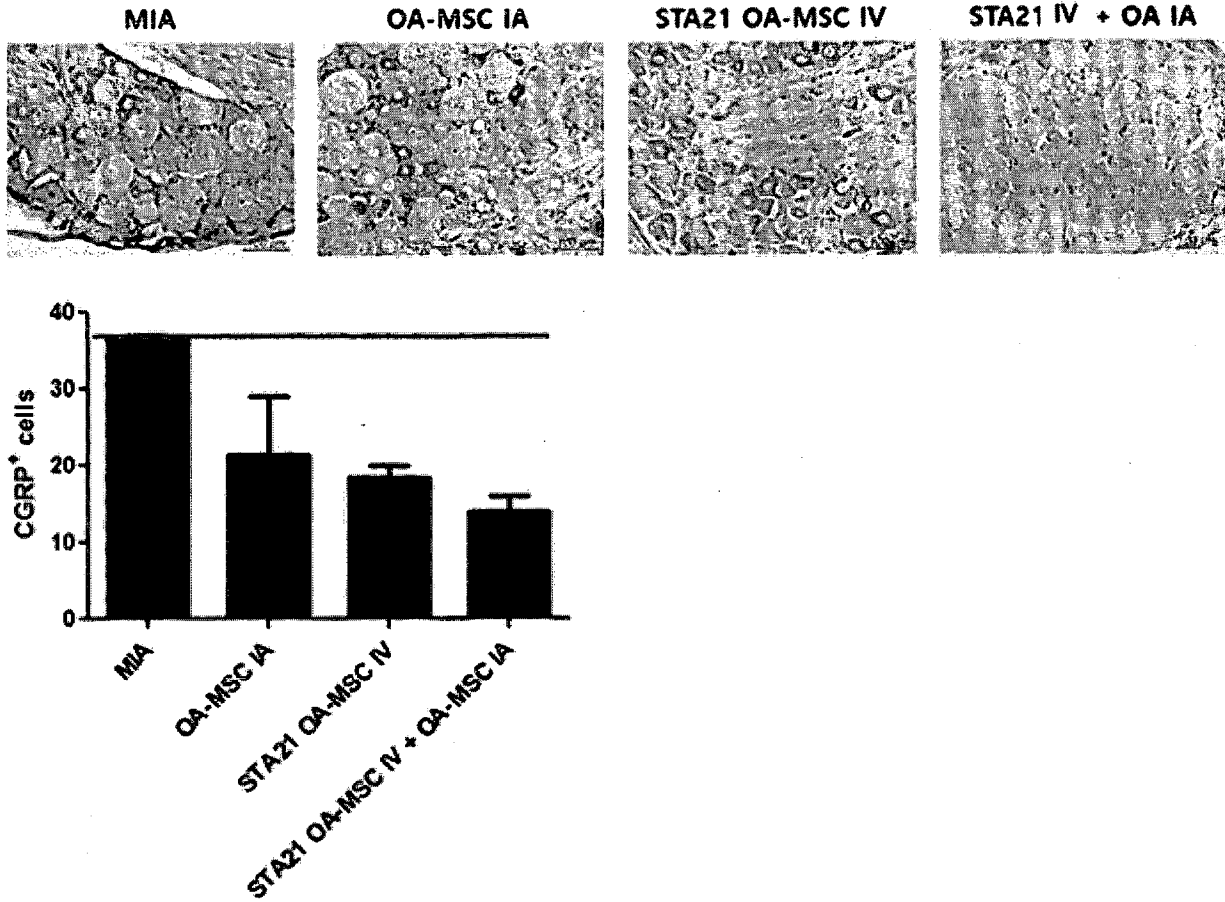


[도8]

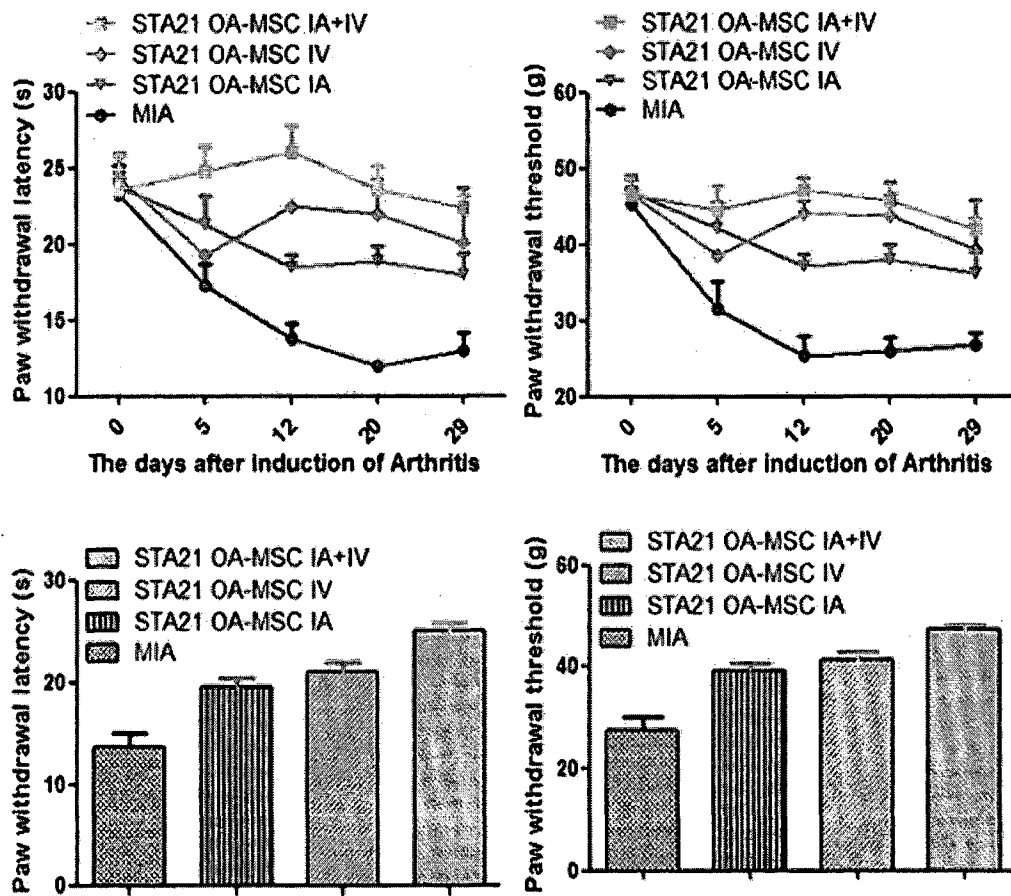
6/11



[도9]

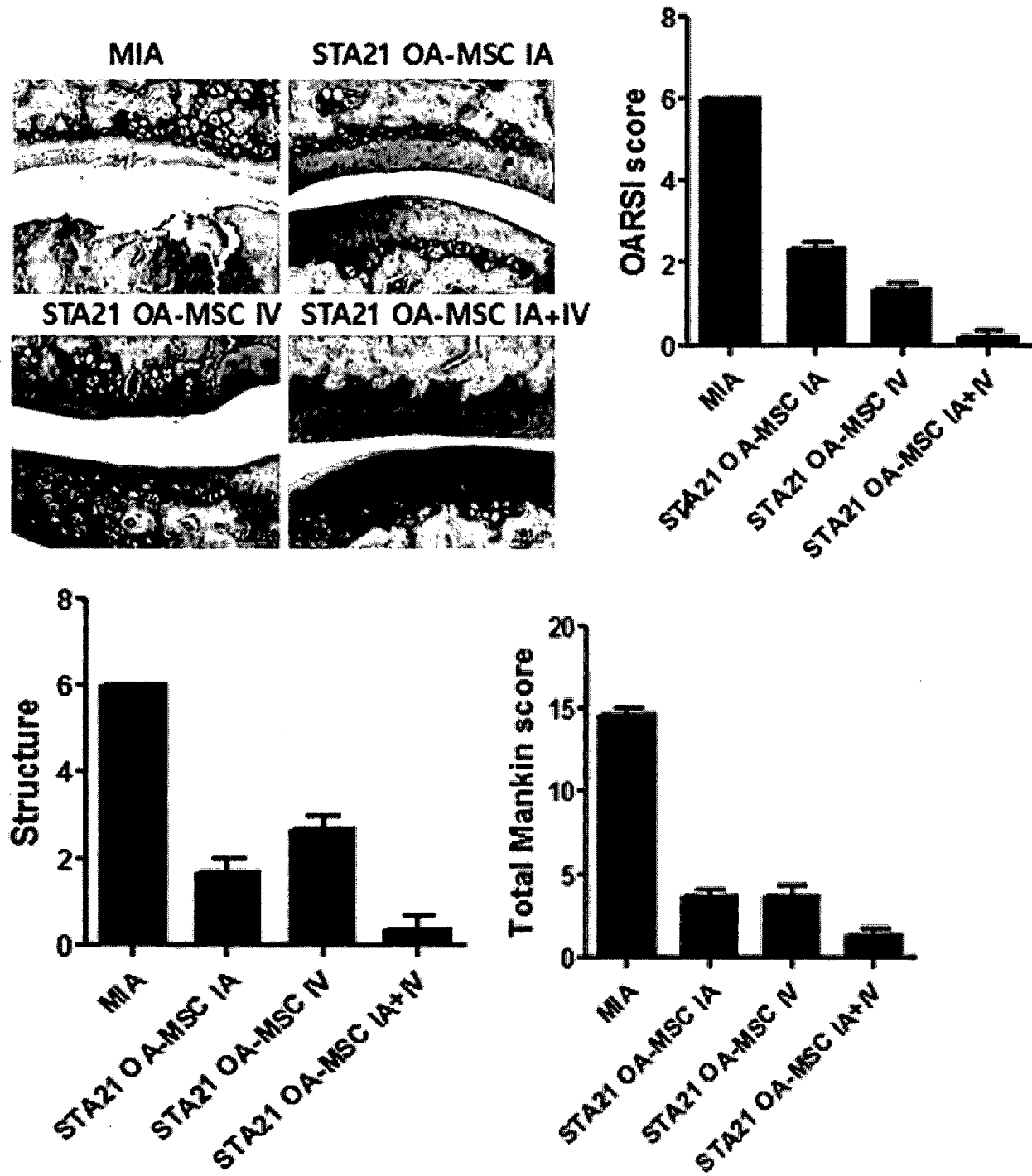


[도10]



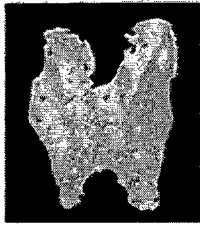
[도11]

8/11



[도12]

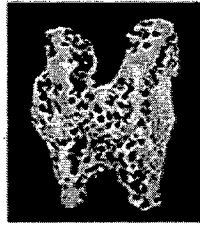
9/11

MIA

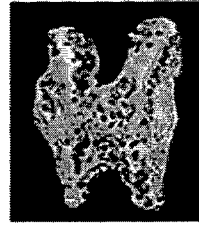
MIA_A.Bmp



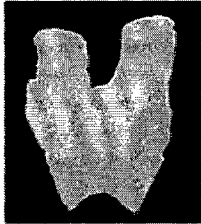
MIA_O.Bmp



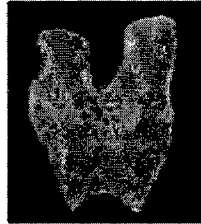
MIA01_S.Bmp



MIA01_검중용.Bmp

STA21 OA-MSC IA+IV

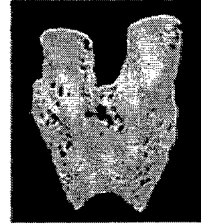
OA-M_IA+IV_A.Bmp



OA-M_IA+IV_O.Bmp



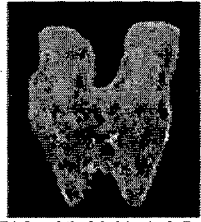
OA-M_IA+IV_S.Bmp



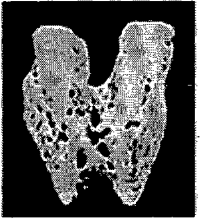
OA-M_IA+IV_검중용.Bmp

STA21 OA-MSC IA

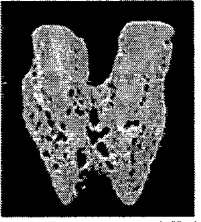
STA21 OA-M_IA-4_A.Bmp



STA21 OA-M_IA-4_O.Bmp



STA21 OA-M_IA-4_S.Bmp



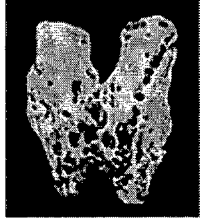
STA21 OA-M_IA-4_검중용.Bmp

STA21 OA-MSC IV

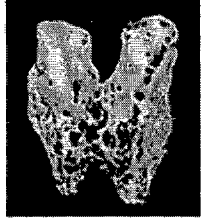
STA21 OA-M_IV-4_A.Bmp



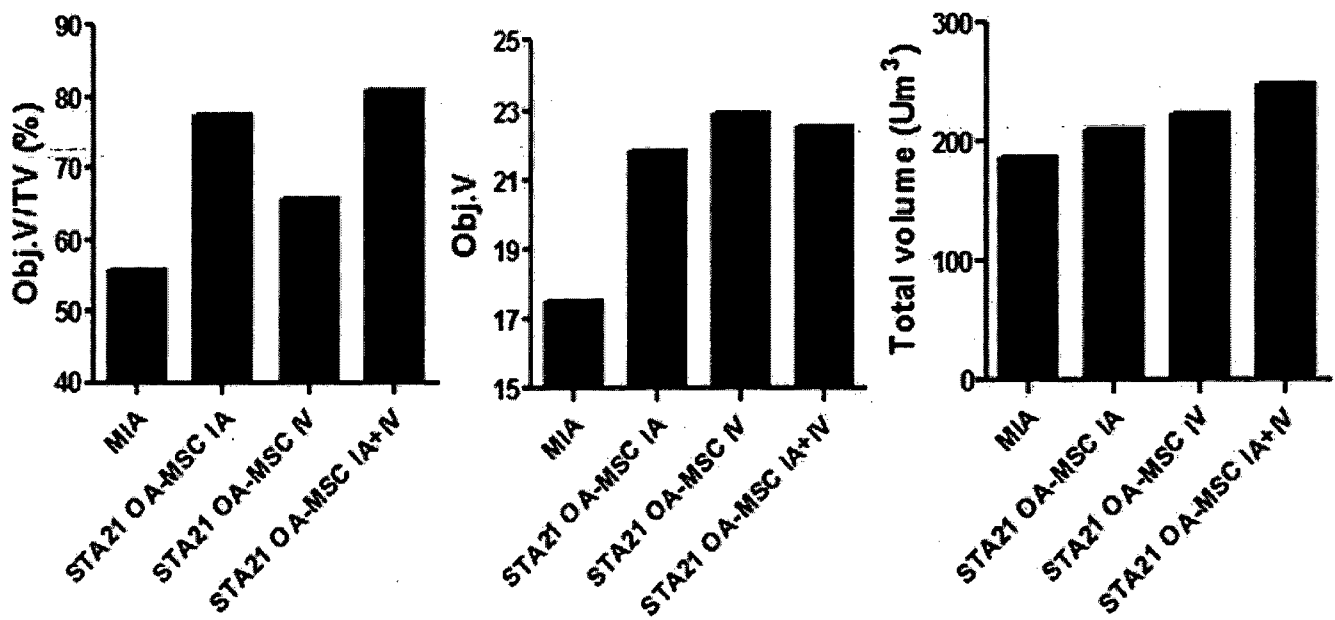
STA21 OA-M_IV-4_O.Bmp



STA21 OA-M_IV-4_S.Bmp

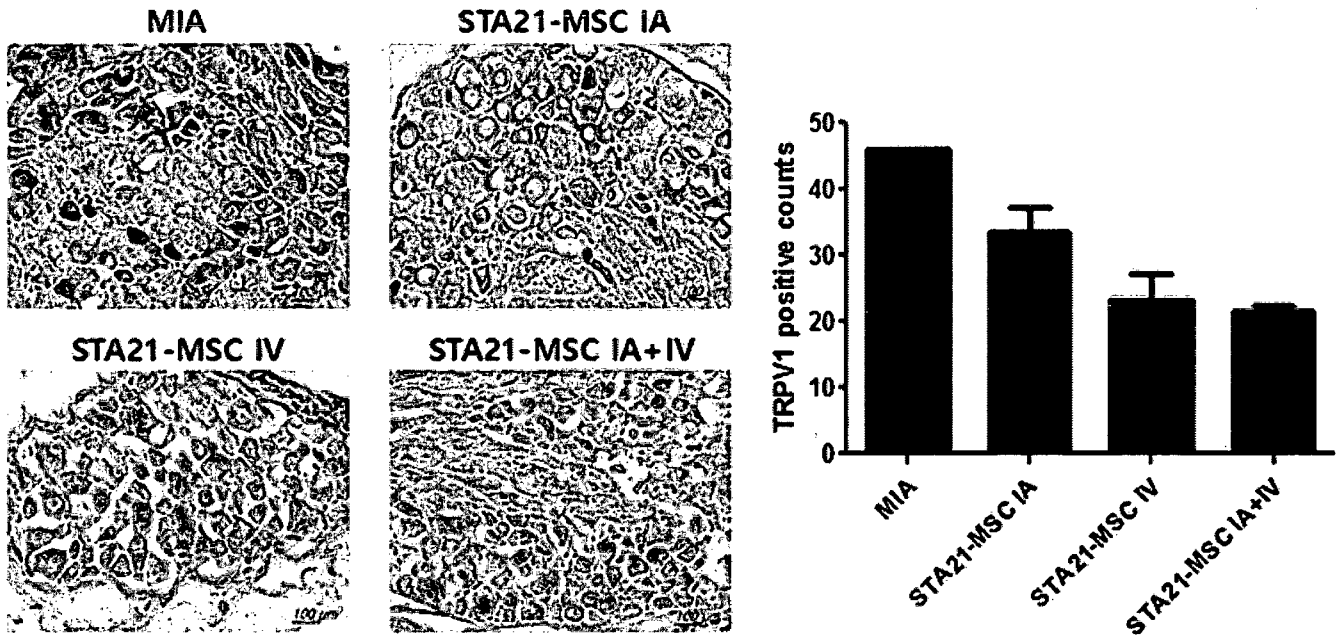


STA21 OA-M_IV-4_검중용.Bmp

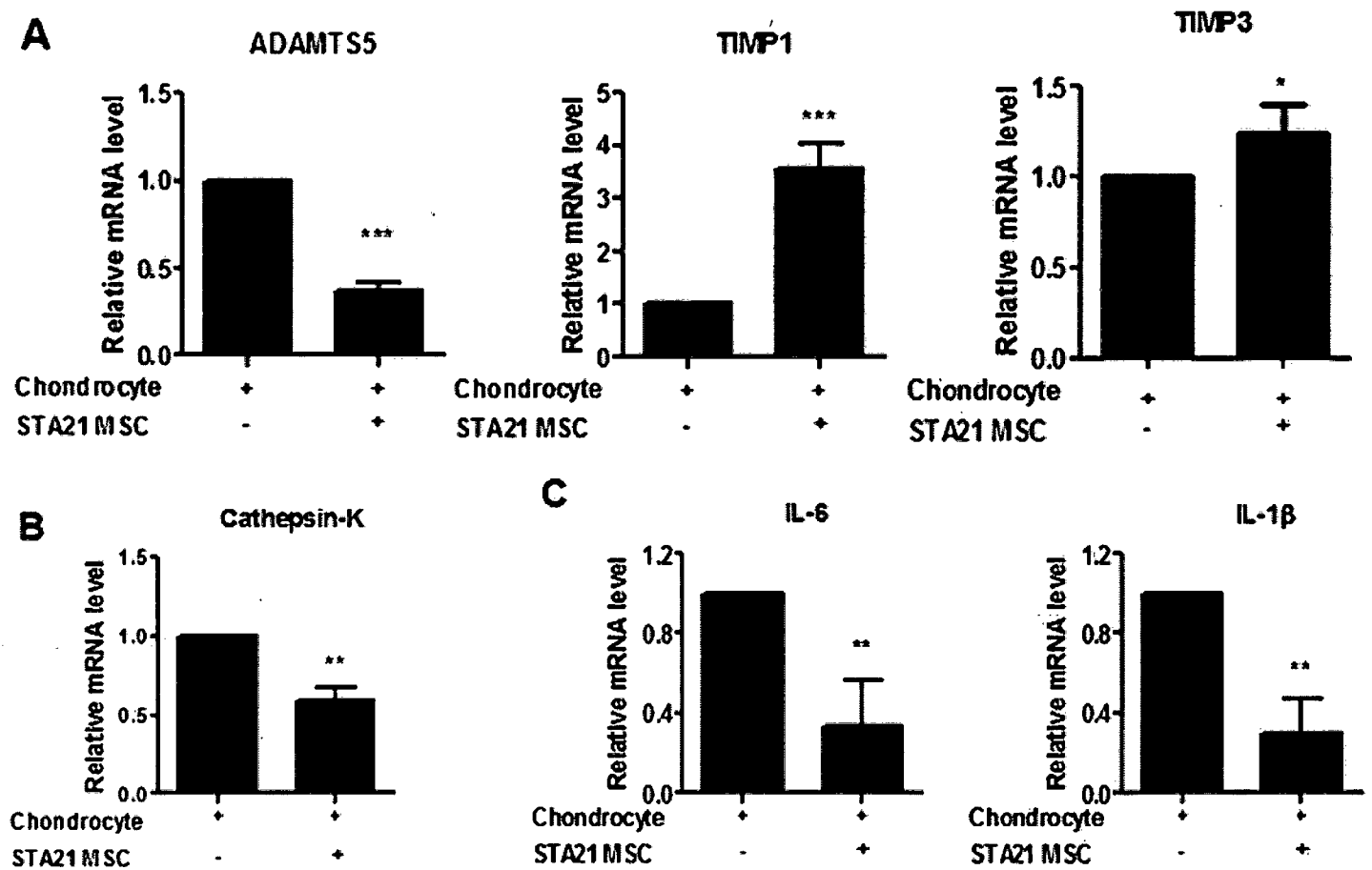


[도13]

10/11

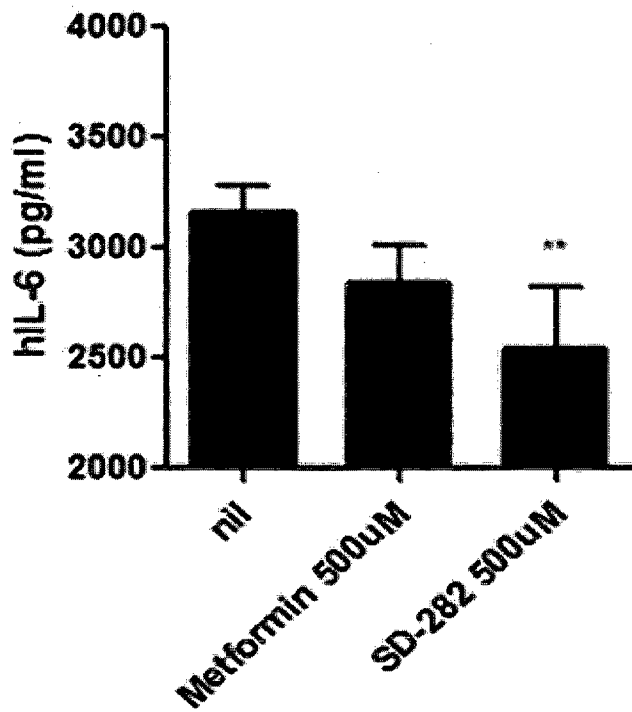
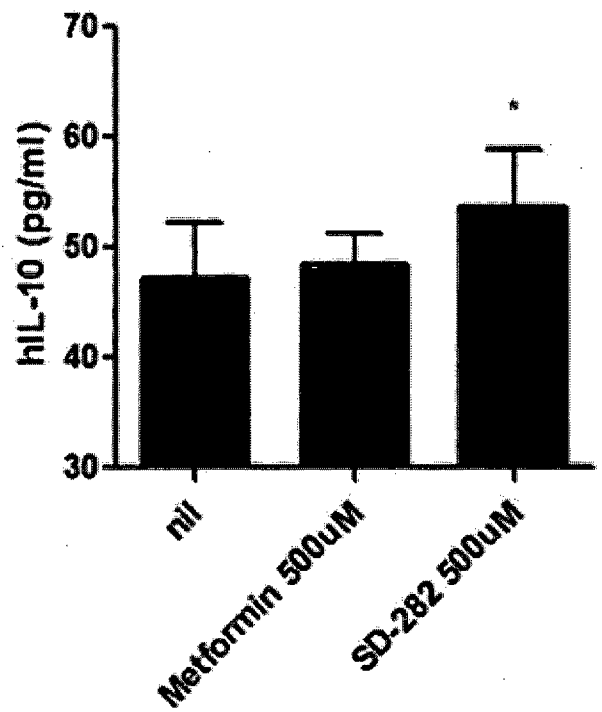


[도14]



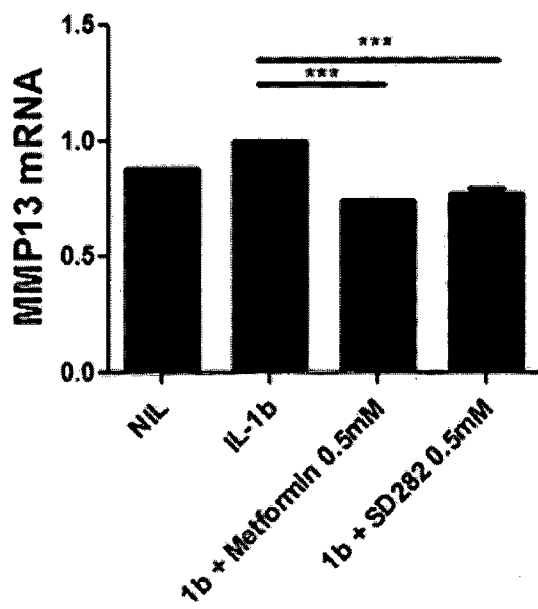
[도15]

11/11



[도16]

Catabolic factor



Anabolic Factor

