(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2016 년 8 월 11 일 (11.08.2016)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2016/126139 A1

(51) 국제특허분류:
A61K 35/32 (2006.01) *A61P 19/02* (2006.01)
A61K 35/12 (2006.01) *A61P 3/10* (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2016/001310

(22) 국제출원일: 2016 년 2 월 5 일 (05.02.2016)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
62/112,718 2015 년 2 월 6 일 (06.02.2015) US

(71) 출원인: **코오롱생명과학 주식회사 (KOLON LIFE SCIENCE, INC.)** [KR/KR]; 13837 경기도 과천시 코오롱로 13, Gyeonggi-do (KR).

(72) 발명자: **최헌식 (CHOI, Heonsik)**; 07030 서울시 동작구 사당로 2 가길 173, 101-203, Seoul (KR). **최경백 (CHOI, Kyoungbaek)**; 21387 인천시 부평구 부평문화로 37, 26-309, Incheon (KR). **이현열 (LEE, Hyeonyoul)**; 15536 경기도 안산시 상록구 본오공원 1 길 28, 302 호, Gyeonggi-do (KR). **김대욱 (KIM, Daewook)**; 17111 경기도 용인시 기흥구 서천동로 91 번길 8, 202 호, Gyeonggi-do (KR). **이혜선 (LEE, Hyesun)**; 06088 서울시 강남구 선릉로 130 길 19, 서광아파트 102-1209, Seoul (KR). **김민 (KIM, Min)**; 06086 서울시 강남구 봉은사로 507, 308 호, Seoul (KR). **김수정 (KIM, Sujeong)**; 07062 서울시 동작구 여의대방로 10 길 100, 101-306, Seoul (KR).

(74) 대리인: **이처영 (LEE, Cheo Young)** 등; 06133 서울시 강남구 테헤란로 123 11 층, Seoul (KR).

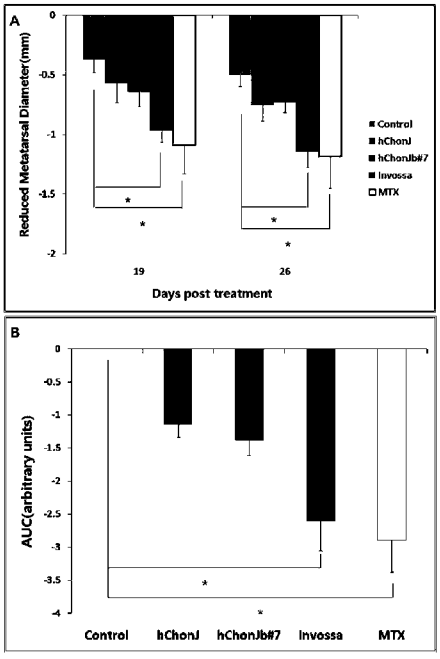
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, 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,

[다음 쪽 계속]

(54) **Title**: COMPOSITION FOR TREATING INFLAMMATORY DISEASES CAUSED BY HYPER-IMMUNE RESPONSES

(54) **발명의 명칭** : 과면역반응에 의해 유발되는 염증성 질환 치료용 조성물



(57) **Abstract**: The present invention relates to a cell therapeutic agent for treating inflammatory diseases caused by hyper-immune responses and, more specifically, to a composition for treating inflammatory diseases caused by hyper-immune responses, containing: (i) cartilage cells or cells, which can be differentiated into cartilage cells; and (ii) cartilage cells into which a gene encoding TGF-β is introduced or cells, which can be differentiated into cartilage cells into which a gene encoding TGF-β is introduced.

(57) **요약서**: 본 발명은 과면역반응에 의해 유발되는 염증성 질환 치료용 세포치료제에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 (i) 연골세포 또는 연골세포로 분화 가능한 세포; 및 (ii) TGF-β 를 코딩하는 유전자가 도입된 연골세포 또는 TGF-β 를 코딩하는 유전자가 도입된 연골세포로 분화 가능한 세포를 함유하는 과면역반응에 의해 유발되는 염증성 질환 치료용 조성물에 관한 것이다.

WO 2016/126139 A1

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))

명세서

발명의 명칭: 과면역반응에 의해 유발되는 염증성 질환 치료용 조성물

기술분야

[1] 본 발명은 세포치료제에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 (i) 연골세포 또는 연골세포로 분화 가능한 세포; 및 (ii) TGF-β(Transforming growth factor-beta)를 코딩하는 유전자가 도입된 연골세포 또는 TGF-β를 코딩하는 유전자가 도입된 연골세포로 분화 가능한 세포를 포함하는, 과면역반응에 의해 유발되는 염증성 질환 치료용 세포치료제에 관한 것이다.

[2]

배경기술

[3] 퇴행성관절염은 노화로 인해 관절을 보호하고 있는 연골이 점차적으로 소실됨으로써 발생하는 질환으로, 체중의 상당 부분을 지탱해야 하는 무릎 관절에 발생하기 쉽다.

[4] 이에 반해, 자가 면역질환인 류마티스 관절염은 우리 몸의 면역세포들이 관절을 공격하여 염증을 유발하고, 관절의 염증이 계속적으로 관절 연골과 골조직으로 침윤되어 조직의 부식을 가지고 오는 질환이다. 류마티스 관절염은 주로 손가락과 손목에 자주 발생하며, 특히 손가락의 중간 마디가 도드라지는 특성을 보인다. 퇴행성 관절염이 주로 50대 이후에 발생하는 것과는 달리, 류마티스 관절염은 젊은 층에서도 종종 발병한다.

[5] 퇴행성 관절염과 류마티스 관절염의 발생 원인, 증상, 발생 부위 및 발병 연령층을 비교해 보면 다음과 같다(표1).

[6]

[7] [표1]

	퇴행성 관절염	류마티스 관절염
발생원인	노화, 과체중, 무리한 동작의 반복	면역기능 이상
증상	부자연스러운 걸음걸이, 움직임 후 통증	관절 부위의 통증 및 열감, 휴식 후 통증
부위	무릎, 허리, 고관절 등 큰 관절	손가락, 손목, 발가락 등 작은 관절
연령	50대 이후 고령층	전 연령층

[8]

[9] 류마티스 관절염은 발병 시 관절 내 대식세포(macrophage)나 섬유아세포에서

사이토카인의 생성이 증가되며, Th1 세포에 의한 IFN-γ 및 Th17 세포에 의한 IL-17 사이토카인 생성이 증가된다고 보고되어 있다. Th1 및 Th17 세포에서 생산된 사이토카인은 관절염 증세를 악화시키는 반면, IL-4 및 IL-10 등과 같은 Th2 세포에 의해 생산된 사이토카인은 관절염을 예방 또는 치료하는 것으로 알려져 있다. Th2 형 사이토카인인 IL-4 또는 IL-10 유전자를 포함하는 바이러스 벡터를 관절염을 유도한 마우스의 관절 내에 주사할 경우 주사한 다리 뿐만 아니라 다른 다리에서도 치료 효과를 나타냈다는 보고가 있다 (SH Kim 등, J. Immunol., 166:3499-3505(2001)).

[10] 류마티스 관절염의 치료제 또는 경감제로서 현재까지 개발된 small molecule로는 메토트렉세이드(methotrexate), 아자티오프린(azathioprine), 사이클로포스파미드(cyclophosphamide) 및 코티코스테로이드(corticosteroid)가 있으며, 생물학적 제제로 TNF-α 길항제인 엔브렐(성분명 에타너셉트), 레미케이드 (Remicade; 성분명 인플릭시맵), 휴미라(성분명 아달리무맵) 등이 있다. 현재까지 개발된 류마티스 관절염 치료제의 대부분은 위장장애 등의 부작용이 있으며, 관절 손상의 진행을 크게 억제하지 못하고 있는 실정이다.

[11] 본 발명의 세포치료제 성분 중 하나인, TGF-ß1은 세포 성장 및 분화에 대한 다기능 조절자이다. 재조합 TGF-ß1를 척수강 내 주사하면 다분화능 효과를 갖는 다양한 유형의 세포를 타겟팅함으로써 신경 손상에 의한 신경병증 통증을 상당히 약화시킨다고 보고되어 있다.

[12] 최근에는 TGF-β1을 발현하는 연골세포 혹은 섬유아세포가 퇴행성 관절염 치료에 효과가 있다고 보고되었으나 (Lee KH 등 Hum Gene Ther 2001; 12: 1805-1813, SUN U. SONG 등 Tissue Engineering 2005; 11: 1516-1526), 퇴행성 관절염과 원인 및 병리가 다른 류마티스 관절염의 치료 가능성에 대해서는 보고된 바 없다.

[13] 이에, 본 발명자들은 항염증 작용과 류마티스 관절염의 치료효과를 갖는 세포치료제를 개발하고자 노력한 결과, 연골세포와 TGF-β1을 발현하는 연골세포의 혼합세포 조성물을 류마티스 관절염 유발 동물모델에 투여할 경우, 류마티스의 증상이 개선되는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

[14]

[15] **발명의 요약**

[16] 본 발명의 목적은 연골 세포 혹은 연골 세포로 분화가 가능한 세포와 화학적 합성 약물이 아닌 TGF-β1을 발현하는 연골 세포 혹은 TGF-β1을 발현하는 연골 세포로 분화가 가능한 특정 세포를 이용하여 과면역반응에 의해 유발되는 염증성 질환의 치료 용도를 제공하는데 있다.

[17]

[18] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (i) 연골세포 또는 연골세포로 분화 가능한 세포; 및 (ii) TGF-β를 코딩하는 유전자가 도입된 연골세포 또는 TGF-β를 코딩하는 유전자가 도입된 연골세포로 분화 가능한 세포를 포함하는

과면역반응에 의해 유발되는 염증성 질환 치료용 조성물을 제공한다.

[19] 또한, 본 발명은 (i) 연골세포 또는 연골세포로 분화 가능한 세포; 및 (ii) TGF-β를 코딩하는 유전자가 도입된 연골세포 또는 TGF-β를 코딩하는 유전자가 도입된 연골세포로 분화 가능한 세포를 함유하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 과면역반응에 의해 유발되는 염증성 질환의 치료방법을 제공한다.

[20] 또한, 본 발명은 (i) 연골세포 또는 연골세포로 분화 가능한 세포; 및 (ii) TGF-β를 코딩하는 유전자가 도입된 연골세포 또는 TGF-β를 코딩하는 유전자가 도입된 연골세포로 분화 가능한 세포를 함유하는 조성물의 과면역반응에 의해 유발되는 염증성 질환의 치료제로서의 용도를 제공한다.

[21] 또한, 본 발명은 (i) 연골세포 또는 연골세포로 분화 가능한 세포; 및 (ii) TGF-β를 코딩하는 유전자가 도입된 연골세포 또는 TGF-β를 코딩하는 유전자가 도입된 연골세포로 분화 가능한 세포를 함유하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, IL-6, IL-17A, IL-1β 및 TNF-α으로 구성된 군에서 선택되는 사이토카인의 발현 또는 활성을 억제하는 방법을 제공한다.

[22]

도면의 간단한 설명

[23] 도 1은 본 발명의 혼합세포 조성물의 류마티스 관절염과 퇴행성 관절염 치료 작용 기전을 도식화한 것이다.

[24] 도 2는 퇴행성 관절염 동물모델에서 혼합세포 투여 후의 통증 경감 효과를 von Frey 필라멘트 테스트를 통하여 확인한 결과를 나타낸 것이다.

[25] 도 3은 퇴행성 관절염 동물모델에서 혼합세포 투여 후 무릎 관절의 연골 상태를 확인하기 위하여 H&E 염색한 결과를 나타낸 것이다.

[26] 도 4는 퇴행성 관절염 동물모델에서 혼합세포 투여 후 무릎 관절의 연골 상태를 확인하기 위하여 Masson's trichrome 염색한 결과를 나타낸 것이다.

[27] 도 5는 퇴행성 관절염 동물모델에서 혼합세포 투여 후 연골 내 제1형 및 제2형 콜라겐 함량을 확인하기 위한 면역염색 결과를 나타낸 것이다.

[28] 도 6은 퇴행성 관절염 유발 동물모델에서 활액의 TGF-β1와 IL-10 발현 수준을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

[29] 도 7은 퇴행성 관절염 유발 동물모델의 세포 투여 관절강의 대식세포 상태를 확인하기 위하여 활막을 대식세포의 표면 항원인 CD68의 항체 및 IL-10 항체로 면역화학염색한 결과를 나타낸 것이다.

[30] 도 8의 A는 활막을 CD86 및 아르기나아제 1(Arginase1)에 대한 항체로 면역화학염색한 결과를 나타낸 것이고, B는 A의 이미지를 Image-Pro Plus를 사용하여 Invert version으로 전환한 것이며, C는 CD86 및 아르기나아제 1 양성 세포를 계측하여 그래프로 나타낸 것이다.

[31] 도 9는 활막 내 유전자 발현 프로파일의 qRT-PCR 결과를 나타낸 것이다.

[32] 도 10은 류마티스 관절염 유발 동물모델에서 혼합세포 투여 후 19일 및 26일째 중족골 부위의 부종 감소량을 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

[33] 도 11은 류마티스 관절염 유발 동물모델에서 혼합세포 투여 후 28일째 관절강에서 활액을 적출하여 사이토카인의 변화를 측정한 결과를 나타낸 것 것이다.

[34]

[35] **발명의 상세한 설명 및 구체적인** 구현예

[36] 동종(타가) 연골세포; 및 TGF-β를 발현하는 연골세포;를 함유하는 혼합세포는 퇴행성 관절염의 세포 매개 유전자 치료제로 알려져 있다. 골 관절염 환자를 대상으로 한 임상 2상 연구에서 상기 혼합세포는 골 관절염 환자의 통증, 활동성 및 연골 구조를 개선하는 것으로 확인되었다. 그러나, 혼합세포가 어떠한 기작으로 작용하는지에 대하여는 아직 밝혀지지 않았다.

[37] 본 발명자들은 골 관절염 동물 모델에 혼합세포를 투여한 후 통증과 구조 변형에 대한 효과를 관찰하고, 혼합세포가 항염증 환경을 유도하는지 확인한 결과, 혼합세포가 처치된 관절염 무릎 관절에서 항염증성 사이토카인 및 M2 대식세포가 증가함을 확인함으로써, 통증을 완화하고 관절 재생을 유도하는 항염증성 환경을 유도하는 것을 확인하였다.

[38] 따라서, 혼합세포가 면역억제성 특성을 가지는 M2 대식세포가 풍부한 환경을 유도하는 것으로 확인되었는 바, 과면역반응에 의한 염증성 질환에도 효과가 있을 것이라는 가정 하에, 류마티스 관절염 동물모델에 연골세포와 TGF-β를 발현하는 연골세포를 일정 비율로 혼합하여 무릎 관절에 투여하였다. 그 결과, 혼합세포를 투여했을 때 투여군에서 중족골의 부종이 감소하는 것을 확인하였으며, 또한 활액에서 염증 반응을 유도 촉진하는 사이토카인인 IL-6, IL-17A, IL-1β 및 TNF-α의 발현이 감소하는 것을 확인하였다. 혼합세포 1회 투여로 치료 효과가 26일간 유지되었다.

[39] 기존에 류마티스 관절염 치료제로서 사용되는 MTX(Methotrexate)와 같은 물질은 소화기계 및 구강 궤양을 일으킬 수 있으며 간독성 및 신부전 등을 일으킬 위험이 있다. 또한, 레미케이드 등 anti-TNF-α 항체와 같은 치료제들은 환자의 선천 면역 체계를 교란시킴으로써 결핵 보균자로부터 결핵 (TB)의 발현을 가져오는 것으로 알려져 있다. 이에 반해, 본 발명에 따른 세포 치료제는 퇴행성 관절염에 대한 임상 시험 결과 이와 같은 부작용이 나타나지 않는다는 장점이 있다. 따라서 본 발명자들은 혼합세포가 기존 류마티스 관절염 치료제의 단점을 극복한 새로운 치료제가 될 수 있다는 가능성을 확인할 수 있었다.

[40] 따라서 본 발명은 일 관점에서, (i) 연골세포 또는 연골세포로 분화 가능한 세포; 및 (ii) TGF-β를 코딩하는 유전자가 도입된 연골세포 또는 TGF-β를 코딩하는 유전자가 도입된 연골세포로 분화 가능한 세포를 함유하는, 과면역반응에 의해 유발되는 염증성 질환 치료용 조성물에 관한 것이다.

[41] 본 발명은 다른 관점에서, (i) 연골세포 또는 연골세포로 분화 가능한 세포; 및

(ii) TGF-β를 코딩하는 유전자가 도입된 연골세포 또는 TGF-β를 코딩하는 유전자가 도입된 연골세포로 분화 가능한 세포를 함유하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 과면역반응에 의해 유발되는 염증성 질환의 치료 방법에 관한 것이다.

[42] 본 발명은 또 다른 관점에서, (i) 연골세포 또는 연골세포로 분화 가능한 세포; 및 (ii) TGF-β를 코딩하는 유전자가 도입된 연골세포 또는 TGF-β를 코딩하는 유전자가 도입된 연골세포로 분화 가능한 세포를 함유하는 조성물의 과면역반응에 의해 유발되는 염증성 질환의 치료 용도에 관한 것이다.

[43] 본 발명에서, 상기 과면역반응에 의해 유발되는 염증성 질환은 류마티스 관절염, 다발성 경화증, 전신성 홍반성 루푸스, 근무력증, 대장염, 제1형 당뇨병 및 뇌염 등이 있으며, 그 중 류마티스 관절염 치료에 특히 효과적이다.

[44] 본 발명에서, 상기 연골세포로 분화 가능한 세포는 연골전구세포 또는 줄기세포일 수 있다.

[45] 본 발명에 있어서, (i) 연골세포 또는 연골세포로 분화 가능한 세포;와 (ii) TGF-β를 코딩하는 유전자가 도입된 연골세포 또는 TGF-β를 코딩하는 유전자가 도입된 연골세포로 분화 가능한 세포;는 다양한 혼합 비율로 혼합될 수 있으며, 바람직하게는 그 조성 비는 1:1~100:1 일 수 있으며, 3:1인 것이 더욱 바람직하다.

[46] 본 발명의 일 양태에서 과면역반응에 의해 유발되는 염증성 질환 치료용 조성물은 형질도입되지 않은 사람 연골세포(hChonJ 세포) 및 TGF-ß1을 발현하는 연골세포(hChonJb#7), 보다 구체적으로는 사람 동종(타가) 연골세포(hChonJ) 및 인간 TGF-ß1을 발현하는 연골세포를 포함한다. 이 두 종류의 세포는 다양한 혼합비율로 혼합될 수 있다. 예를 들면, 이들 두 세포는 3:1의 비율, 즉 hChonJ 세포가 3이고 hChonJb#7가 1인 비율로 혼합될 수 있다. 상기 3:1 비율의 혼합세포 및 이의 생산방법은 논문 [Cytotherapy, 2012 Feb; 14(2): 247-256] 및 미국 특허 제7,005,127호와 미국 특허 제7,282,200호에 개시되어 있다.

[47] 본 발명의 일 양태에서 혼합세포를 투여한 관절염 래트 모델은 투여 후 15일이 지난 후부터 통증이 완화되기 시작하였으며, 투여 후 56일이 지난 시점(실험 종료일)까지 통증완화 효과가 지속되었다. 이러한 통증 경감은 관절염 무릎 관절의 구조적 개선과 관련이 있는 것으로 확인되었으며, 투여된 혼합세포는 통증 경감과 연골 재생에 모두 효과적인 것으로 나타났다. 즉, 본 발명에서 사용하는 혼합세포는 통증 완화 및 연골 조직의 재생을 위한 세포 매개 유전자 치료요법이다.

[48] 본 발명의 다른 양태에서는 혼합세포를 투여한 관절염 래트 모델의 연골 조직에 대하여 제1형 콜라겐과 제2형 콜라겐에 대한 염색을 수행하여 조직학적으로 분석한 결과, 혼합세포가 제2형 콜라겐 양성인 유리질(hyaline) 연골조직을 재생시키는 것으로 확인되었다.

[49] 선천면역세포(innate immune cell)인 대식세포(macrophage)는 활성화 표현형에 따라 전염증(pro-inflammatory) 특성을 가지는 활성화된 “M1 대식세포”와

면역억제(immunosuppressive) 특성을 가지는 활성화된 "M2 대식세포"로 분류된다. IFN-γ는 M1 대식세포의 활성화와 연관된 핵심 사이토카인으로, 병원체 인식에 의해 유도된 TLR 시그널이 M1 대식세포의 분화에 기여한다. M1 대식세포는 TNFα, IL-12 및 IL-23의 발현을 높이고 IL-10의 발현을 낮추어, 조직 손상을 초래하는 Th1 및 Th17 면역반응을 유발하는 것으로 알려져 왔다. 이와는 대조적으로, M2 대식세포는 IL-10의 발현수준을 높이고 IL-12의 발현을 낮춤으로써 염증을 감소시켜 조직 재생을 촉진시킨다.

[50] 본 발명의 일 양태에서 TGF-β1을 발현하는 사람 연골세포인 hChonJb#7에서 발현되는 TGF-β와 보통의 인간 연골세포(human chondrocyte)인 hChonJ을 통해 유도되는 IL-10이 M2 대식세포의 생성을 유도하는 것으로 보이며, 생성된 M2 대식세포는 IL-10을 분비하여, 혼합세포를 투여한 관절에서 항염증성 환경을 조성하는 것으로 판단된다. 혼합세포가 투여된 동물모델의 활막을 조직학적으로 분석한 결과에서도 M2 대식세포의 증가를 확인할 수 있다 (도 8).

[51] 또한, 본 발명의 조성물의 면역억제 효과는, TGF-β1와 아르기나아제 1의 발현 증가에 의하여 유도되는 것으로 판단되며, 본 발명의 일 양태에서는 혼합세포 투여군 동물모델의 무릎 관절 활막에서 아르기나아제 1의 발현이 증가하였다.

[52] 아르기나아제 1의 발현 증가 및 이에 의한 L-아르기닌의 감소는, 면역시스템에서 강력한 면역억제 효과를 초래하는 것으로 알려져 있고, TGF-β가 아르기나아제 1의 전사 및 아르기나아제 활성을 유도한다는 것 또한 보고되고 있다 (Durante et al., Circulation, 103(8), 1121-7, 2001). 따라서, M2 대식세포는 TGF-β1 존재 하에서 더욱 효율적으로 면역을 조절할 수 있을 것으로 판단된다.

[53] 또한, 본 발명의 조성물의 항염증 효과는 혼합세포 투여에 의하여 집중된 M2 대식세포에서 발현하는 IL-10이 STAT3 및 PI3K을 활성화시키고, 이에 의하여 조절되는 Hmox-1에 의해 항염증 효과가 나타나는 것으로 보인다.

[54] 한편, 최근 만성 류마티스 관절염 환자의 활막과 활액에서 인터루킨-1(IL-1), 인터루킨-8(IL-8), 종양괴사인자-α(TNF-α), 형질전환 성장인자 β(TGF-β), 섬유아세포 성장인자(FGF) 및 혈소판에서 유도된 성장인자(PDGF) 등의 사이토카인과 성장인자가 검출되었다 (Nouri et al., Clin. Exp. Immunol. 55: 275-372, 1984; Thornton et al., Clin. Exp. Immunol. 86: 79-86, 1991; Saxne, et al., Arthritis Rheum. 31:1041-1045, 1988; Seitz et al., J. Clin. Invest. 87: 463-469, 1991; Lafyatis et al., J. Immunol.143: 1142-1148, 1989; Melnyk et al., Arthrtis Rheum.33: 493-500, 1990).

[55] IL-6는 B-세포 자극인자 2 또는 인터페론 β2로 알려진 사이토카인이다. IL-6는 B 임파구계 세포의 활성화에 관여하는 분화인자로서 (Hirano T. et al., Nature 324, 73-76, 1986), 다양한 세포의 작용에 영향을 미치는 다기능성 사이토카인인 것으로 밝혀졌다 (Akira, S. et al., Adv. In Immunology 54, 1-78, 1993).

[56] 만성 류마티스 관절염 환자의 혈청 또는 활액에는 과량의 인터루킨-6와 가용성

IL-6 수용체가 존재하는 것으로 보고되어 있다 (Houssiau et al., Arthritis Rheum. 31 : 784-788, 1988; Hirano et al., Eur. J. Immunol. 18: 1797-1801, 1988; Yoshioka et al., Japn. J. Rheumatol. In press). 류마티스 관절염의 동물 모델에서도 유사한 결과가 얻어졌기 때문에 (Takai et at., Arthritis Rheum. 32: 594-600, 1989; Leisten et al., Clin. Immunol. Immunopathol. 56: 108-115, 1990), IL-6가 만성 류마티스 관절염에 관련인자인 것으로 알려졌다.

[57] 한편, 류마티스 관절염에 대한 임상 개발에서 생물학적 제제인 세쿠키누맙은 IL-17A 활성을 억제하는 고-친화도 인간모노클로날 항체이다. RA 개념 입증 (PoC) 연구에서, 안정한 용량의 MTX를 투여한 활성 RA 환자에게 세쿠키누맙을 병용투여 하였다. 그 결과 세쿠키누맙을 사용한 치료군은 위약에 비해 류마티스 관절염의 임상 징후를 신속하게 개선하는 것을 확인하였다 (Hueber et al. (2010) Sci. Transl. Med. 2(52):52-72). 이는 IL-17A의 중화가 류마티스 관절염 환자에서 효능을 보일 가능성이 있음을 보여주는 데이타이다.

[58] 본 발명의 다른 양태에서는 CFA(complete Freund's adjuvant) 투여에 의하여 류마티스 관절염이 유도된 래트의 발바닥에 혼합세포를 투여하고, 중족골(metatarsal)의 부종을 28일간 확인한 결과, 혼합세포 투여군에서 중족골의 부종이 감소하는 것을 확인하였으며 (도 10), 염증 반응을 유도 촉진하는 Pro-inflammatory cytokine 항목인 IFN-γ, IL-6, IL-17A, IL-1β 및 TNF-α 분석 결과, 혼합세포 투여군과 MTX 투여군에서 대조군 대비 통계적 유의성 있게 감소하는 것을 확인하였다 (도 11).

[59] 따라서, 본 발명의 조성물은 류마티스 관절염 환자의 관절 활액에서 과량으로 분비되는 염증성 사이토카인인 IL-6, IL-17A, IL-1β 및 TNF-α의 발현을 억제하여 부종을 감소시키는 효과가 있다.

[60]

[61] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[62]

[63] 실시예 1: 관절염 동물모델에서 혼합세포 처리에 의한 통증완화 및 Col II 양성 연골의 재생 유도

[64] 관절염 환자를 대상으로 한 임상 2상에서 혼합세포를 처리하는 경우, 통증을 경감하고 관절의 환경을 구조적으로 개선하는 것을 관찰 할 수 있었다. 이에 대한 기작을 확인하기 위하여 MIA로 유도한 퇴행성 관절염 동물 모델에 혼합세포를 처리하고, 관절 조직학적 검사와 von Frey 필라멘트 테스트를 수행하였다.

[65]

[66] 1-1: MIA 유도 관절염 동물모델 제작

[67] 동물모델 제작에는 6주령 수컷 래트 (Spargue-Dawley, 200~225g, 나라 바이오텍, 대한민국)를 사용하였으며, 동물실험은 코오롱생명과학(대한민국) 실험동물운영위원회 (IACUC No. KLS IACUC 2013-04)의 승인 하에 수의과적 관리 하에 수행하였다.

[68] 관절염을 유도하기 위하여, 60mg/mL 농도의 MIA(monosodium iodoacetate, Sigma, USA) 용액 50㎕을 31G 주사기를 사용하여 래트의 왼쪽 무릎의 관절강 내에 투여하였다.

[69]

[70] 1-2: 세포치료를 위한 세포의 준비

[71] 본 발명에서 사용된 hChonJ는 사람 유래 연골세포이고, hChonJb#7는 TGF-β가 분비되도록 형질전환된 연골세포이다. 이들의 제작방법 및 혼합비는 [Cytotherapy, 2012 Feb; 14(2): 247-256] 및 미국 특허 제7,005,127호와 미국 특허 제7,282,200호에 개시되어 있다.

[72] hChonJb#7는 TGF-β의 cDNA를 공지의 방법에 따라 세포에 주입하여 제조할 수 있다. 예를들면, 메탈로치오네인 (methallothionein) 등의 프로모터 (promotor) 및 TGF-β의 cDNA를 암피실린, 네오마이신 등의 저항유전자를 갖는 공지의 벡터[예를들어, Gibco-BRL사의 pUC19(암피실린 저항유전자 함유)]에 포함시켜 TGF-β의 cDNA를 포함하는 벡터를 제조한 후, 연골세포에 인산칼슘(Calcium Phosphate) 방법 또는 리포펙틴(Lipofectin) 방법 등의 공지의 방법에 따라 주입함으로써 제조할 수 있다

[73]

[74] 1-3: 혼합세포 처리에 의한 통증 경감 및 연골 재생 효과 확인

[75] 관절염 유도 래트는 MIA 처리 2주 후에 혼합세포{(1.2×10^6 세포:hChonJ(9×10^5 세포)+ hChonJb#7(3.0×10^5 세포)}, hChonJ(9×10^5 세포), hChonJb#7(3.0×10^5 세포) 또는 대조군{CryoStor-10 (CS-10)}을 좌측 무릎 관절강에 투여하였으며, 증상을 관찰하고, 주 1회 체중을 측정하였다.

[76]

[77] von Frey 필라멘트 테스트를 수행하여 통증의 경감을 관찰한 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 통증 수치는 세포 투여 후 15일 후부터 감소하였으며, 그러한 효과는 관찰이 끝나는 날(투여 후 56일째)까지 지속되었다. TGF-β를 발현하는 hChonJb#7(3.0×10^5 세포) 투여군의 경우, 통증 경감은 15일부터 관찰되었으나, 6주 후에는 그 효과가 없어지는 것으로 확인되었다. 이에 비하여, 보통의 사람 연골세포인 hChonJ(9×10^5 세포)를 투여한 군에서는 통증 경감 효과가 나타나지 않았다.

[78] 혼합세포의 통증 경감 효과가 연골 재생과 관련이 있는지를 확인하기 위하여, 5개 실험 그룹의 왼쪽 무릎 관절을 적출하고, H&E 염색과 Masson's trichrome 염색을 통하여 조직학적 분석을 수행하였다 (도 3 및 도 4).

[79] 대조군(CS-10)과 hChonJ 투여군은 연골 재생이 확인되지 않았다. 이와는

대조적으로, hChonJb#7 투여군과 혼합 세포 투여군은 다른 대조군보다 많은 연골이 관찰되었다.

[80] 또한, 면역조직화학 염색결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 혼합세포 투여군의 연골 내 타입II 콜라겐 함량이 hChonJb#7 투여군 보다 높은 것을 확인하였으며, 이러한 결과로부터 혼합세포 투여군의 연골이 유리질 연골에 가깝다는 것을 알 수 있었다.

[81] 관절 상태 향상 정도를 평가하기 위하여, 논문 [Kobayasi, K., J. 등, J. Vet. Med. Sci., 65:1195-1199, 2003]에 기재된 방법으로 H&E 염색한 관절 조직의 조직병리학적 결과와 병리학적 점수를 평가하였고, 그 결과를 아래 표 2로 요약하였다. 아래 실험 결과 혼합세포 처리군의 연골이 가장 많이 개선되었다.

[82]

[83] [표2]

Treatment No. of Animals		Untreated 5 (x3)	Control 6 (x3)	hChonJ 6 (x3)	hChonJb#7 6 (x3)	Invossa 6 (x3)
Structural change in the joint						
Surface irregularities						
	1	2/15	3/18	0/18	5/18	7/18
	2	0/15	4/18	1/18	2/18	4/18
	3	0/15	10/18	14/18	3/18	4/18
Average pathology score		0.13	2.28	2.44	1.50	1.50
Standard Error		0.09	0.23	0.22	0.29	0.25
Ulceration						
	1	1/15	3/18	3/18	3/18	7/18
	2	0/15	8/18	7/18	3/18	6/18
	3	0/15	7/18	7/18	3/18	0/18
Average pathology score		0.07	2.22	2.11	1.61	1.06
Standard Error		0.07	0.18	0.18	0.21	0.19
Fibrillation of cartilage surface						
	1	0/15	3/18	3/18	1/18	3/18
	2	0/15	2/18	6/18	3/18	5/18
	3	0/15	7/18	5/18	3/18	1/18
Average pathology score		0	1.56	1.67	1.72	0.89
Standard Error		0	0.32	0.26	0.29	0.25
Disorganization of chondrocytes						
	1	1/15	1/18	7/18	3/18	6/18
	2	0/15	10/18	5/18	3/18	7/18
	3	0/15	5/18	4/18	0/18	0/18
Average pathology score		0.07	2.00	1.61	1.39	1.11
Standard Error		0.07	0.23	0.24	0.15	0.20
Exposure of subchondral bone						
	1	0/15	7/18	6/18	4/18	6/18
	2	0/15	1/18	0/18	4/18	1/18
	3	0/15	8/18	8/18	0/18	0/18
Average pathology score		0	1.83	1.67	0.67	0.44
Standard Error		0	0.29	0.30	0.21	0.15
Cellular changes of chondrocyte						
H&E staining						
	1	2/15	7/18	6/18	3/18	3/18
	2	0/15	2/18	3/18	4/18	1/18
	3	0/15	4/18	3/18	1/18	2/18
Average pathology score		0.13	1.28	1.17	1.11	0.94
Standard Error		0.09	0.27	0.26	0.17	0.20
Degeneration/Necrosis						
	1	0/15	3/18	2/18	5/18	6/18
	2	0/15	4/18	8/18	5/18	4/18
	3	0/15	11/18	8/18	5/18	0/18
Average pathology score		0	2.44	2.33	1.67	0.73
Standard Error		0	0.19	0.17	0.26	0.20
H&E staining Reduction of staining in cartliage						
	1	0/15	5/18	4/18	10/18	10/18
	2	0/15	5/18	5/18	5/18	2/18
	3	0/15	6/18	7/18	1/18	0/18
Average pathology score		0	1.83	1.94	1.28	0.73
Standard Error		0	0.23	0.23	0.17	0.14
Total pathology score		0.4±0.32	15.44±1.94	14.94±1.88	10.94±1.75	7.5±1.57

0: Normal 1: Slight, 2: Moderate, 3: Severe

[84]

[85] 실시예 2: 혼합세포처리가 항염증성 사이토카인 분비에 미치는 영향 분석

[86] 동물모델에서 혼합세포의 처리가 관절강 내의 활액(synovial fluid)의 사이토카인 발현 프로파일에 미치는 영향을 확인하였다.

[87] 세포 투여 부위에 대식세포가 유도되는지 여부를 확인하기 위하여, 활막에서 CD68 양성 세포의 존재를 확인하였다.

[88] 파라핀에 포매한 활막을 4㎛ 두께로 박절하고 조직슬라이드를 제작 후, CD68 항체(Novus, Co, USA)를 사용하여 면역조직화학염색을 실시하였다.

[89] 그 결과, 도 7의 A에 나타난 바와 같이, CD68 양성 세포가 혼합세포 투여군에서 크게 증가하였다.

[90] IL-10은 통증 경감 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다. 위의 보고를 기반으로 관절염 모델을 만든 후 혼합 세포를 투여하여, IL-10의 발현을 확인하였다. IL-10의 발현은 관절염 유발 래트의 활액에서 사이토카인 마그네틱 비드 패널 96웰 플레이트 어세이(#RECYTMAG-65K, Milipore, USA)를 사용하여 측정하였다.

[91] 그 결과, 도 6의 B에 나타난 바와 같이 혼합세포 투여군과 hChonJ 투여군에서 IL-10의 발현이 증가함을 확인하였다. 조직학적 분석 결과 역시 혼합세포 투여군에서 IL-10 양성 세포가 증가하는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 관절염 무릎 관절에서 혼합세포의 투여가 항염증성 사이토카인인 IL-10을 유도한다는 것을 나타낸다.

[92]

[93] 실시예 3: 혼합세포의 M2 타입 대식세포 풍부 환경 유도 확인

[94] 대식세포에는 M1 타입 및 M2 타입의 두 가지 형태가 있으며, M1 타입 대식세포는 급성 염증을 담당하여, IL-12 및 TNF-α와 같은 염증성 사이토카인을 높은 수준으로 분비하고, M2 대식세포는 상처치유와 항염증 조절 기능에 있어서, 중요한 역할을 한다.

[95] 실시예 2에서, 혼합세포 투여군에서 높은 수준의 IL-10 발현을 확인하였으므로, 혼합세포가 관절염 유도 동물의 무릎에서 대식세포를 유도하는지의 여부를 확인하고자, 동물모델의 활막에서 M1 대식세포의 표지인자인 CD86의 발현과 M2 대식세포 표지인자인 아르기나아제 1의 발현을 확인하였다.

[96] 이를 위하여, CD86 항체(AbD serotec, NC, USA) 및 마우스 아르기나아제 1 항체(BD Bioscience, USA)를 사용하여 파라핀 포매한 활막을 박절하여 면역조직화학염색을 하였다.

[97] 그 결과, 도 8에 나타난 바와 같이, CD86의 발현은 대조군과 혼합세포 투여군에서 차이가 없는 반면, 아르기나아제 1은 혼합세포 투여군에서 현저히 높게 나타났다. 이는 혼합세포가 M2 대식세포를 유도함을 보여준다.

[98]

[99] 실시예 4: 혼합세포에 의한 M2 대식세포 풍부 환경 유도 확인: RNA

[100] 실시예 3에서 확인한 M2 대식세포의 유도를 유전자 발현에서 확인하기

위하여, 동물모델의 활막으로부터 전체 RNA를 분리하고, M1 및 M2 대식세포의 유전자의 발현을 확인하였다.

[101] 세포 처리 래트의 활막에서의 RNA는 RNeasy Lipid Tissue Mini kit(QIAGEN, USA)를 사용하여 분리하였으며, 분리된 RNA로부터 SuperScript™ III First-Strand Synthesis System (Invitrogen, USA)을 사용하여 cDNA를 합성하였다.

[102] 이후 ABI7900 장비를 사용하여 real-time PCR을 수행하였다. PCR 반응혼합물은 1μL cDNA, 0.2μM의 각 프라이머, 10μL SYBR Premix Ex Taq(TAKARA, 일본)으로 총 50μL으로 맞추어 사용하였으며, 반응조건은 95℃에서 10초, 60℃에서 30초로 총 40사이클 수행하였다. 유전자 발현수준은 2-△△Ct 방법을 사용하여 β-액틴 유전자의 발현량과 비교하여 확인하였으며, 사용한 qRT-PCR 프라이머는 표 3에 나타내었다.

[103]

[104] [표3]

qRT-PCR 에 사용된 Primer 서열	Forward primer(서열 #)	Reverse primer (서열 #)
CD80	TGCTGGTTGGTCTTTTCCA(#1)	TGACTGCTCTTCAGAACAAAA(#2)
CD86	TCCTCCAGCAGTGGGAAACA(#3)	TTTGTAGGTTTCGGGTATCCTTGC(#4)
CD163	CTCAGCGTCTCTGCTGTCAC(#5)	GGCCAGTCTCAGTTCCTTCTT(#6)
Arg1	TTGATGTTGATGGACTGGAC(#7)	TCTCTGGCTTATGATTACCTTC(#8)
IL-1β	TCCAGGATGAGGACCCAAGC(#9)	TCGTCATCATCCCACGAGTCA(#10)
TNFα	ACTGAACTTCGGGGTGATTG(#11)	GCTTGGTGGTTTGCTACGAC(#12)
IL-10	CAAGGCAGTGGAGCAGGTGA(#13)	CCGGGTGGTTCAATTTTTCATT(#14)
Hmox-1	AGAGTTTCCGCCTCCAACCA(#15)	CGGGACTGGGCTAGTTCAGG(#16)
IL10Ra	CTGGTCACCCTGCCATTGAT(#17)	AGGCATGGCCAAAATACAAAGAAAC(#18)
CD68	ACTGGGGCTCTTGGAAACTACAC(#19)	CCTTGGTTTTGTTCGGGTTCA(#20)
β-actin	AGTTCGCCATGGATGACGAT(#21)	AAGCCGGCCTTGCACAT(#22)

Primer sequences for target genes for qRT-PCR of rat genes. CD = Cluster of Differentiation, Arg = Arginase, IL = Interleukin, TNFα = Tumor necrosis factors alpha, Hmox = Heme oxygenase

[105]

[106] qRT-PCR 결과 나타난 대식세포 집중 유전자 발현 프로파일을 도 9에 나타내었다. 혼합세포 투여군에 존재하는 많은 수의 CD68 양성 세포에 의하여, CD68의 발현은 혼합세포 투여군에서 높게 나타났다. TNF-α는 대조군과 혼합세포 투여군에서 큰 차이가 없었다. 항염증성 사이토카인인 IL-10은 혼합세포 투여군에서 매우 높게 발현되었다.

[107] IL-10의 mRNA 발현 증가가 단백질 발현으로 이어지는지 확인하기 위하여, 활막의 다중 사이토카인 어세이를 수행하였다. 그 결과, 도 10에 나타난 바와 같이, 혼합세포 투여군에서 IL-10 단백질의 수준이 급격히 증가하는 것으로 확인되었다. 추가적인 대식세포 표지인자인 IL-10RA(인터루킨 10 수용체 알파 서브유닛)과 Hmox1(heme oxygenase 1)의 mRNA 수준 또한 현저히 증가한 것을 확인하였다.

[108] 상기 결과들을 종합하면, 관절염 모델에서 혼합세포를 투여하는 경우, M2 대식세포의 유도가 증가됨을 알 수 있다.

[109]

[110] 실시예 5: 류마티스 관절염 동물모델에서의 혼합세포 효능 확인

[111] 5-1: 류마티스 관절염 동물모델의 제작

[112] 류마티스 관절염 유도 동물모델의 제작에는 7주령 암컷 래트(160~180g Lewis, 중앙실험동물, 일본)를 사용하였으며, 동물실험은 코오롱생명과학(대한민국) 실험동물운영위원회 (IACUC No. KLS IACUC 2015-07)의 승인 하에 수의과적 관리 하에 수행하였다.

[113] 류마티스 관절염을 유도하기 위하여, 5mg/mL 농도의 CFA(Complete Freud's Adjuvant, 제조사: Chondrex, Inc.) 용액 50㎕을 31G 주사기를 사용하여 래트의 발바닥 피하에 투여하였다. 3주 뒤 calipers 를 이용하여 중족골 부종 크기를 측정하여 관절염 유발을 확인한 다음 부종이 가장 심각하게 유도 되었을 때 시험물질을 Lewis-rat 좌측 무릎 관절강에 투여하였다.

[114]

[115] 5-2: 동물모델에 시험물질 투여

[116] 류마티스 관절염 유도 래트는 각 군을 6마리씩으로 하여, CFA 처리 3주 후에 혼합세포{(1.2×10^6 세포:hChonJ(9×10^5 세포)+ hChonJb#7(3.0×10^5 세포)}, hChonJ(9×10^5 세포), hChonJb#7(3.0×10^5 세포), 음성대조군(CS-10) 을 좌측 무릎 관절강에 투여하였다. 양성대조군의 경우 MTX (Methotrexate) 0.4mg/kg를 경구로 1주일에 1회씩, 총 3회 투여하였다. 3일에 한번 중족골 직경 및 체중을 측정하였다.

[117] 표 4에 각 실험군의 투여조건을 나타내었다.

[118]

[119] [표4]

각 실험군 별 투여조건

실험군		Cell/50μl*	동물 수	세포 투여시간	투여방법
AIA	음성대조군(비히클)	CS-10	6	AIA 유발 후 3 주째	관절내 투여
	hChonJ	$9X10^5$	6		
	hChonJb#7	$3X10^5$	6		
	혼합세포군	$1.2X10^6$	6		
	MTX	0.4mg/kg	6	Once a week (21d)	구강투여

[120]

[121] 5-3: 류마티스 관절염 동물모델에서의 혼합세포의 효과

[122] 상기 관절염 모델에 시험물질을 투여하고, caliper를 이용하여 중족골(metatarsal)의 부종 크기를 측정한 결과를 도 10에 나타내었다. 대조군(CS-10), hchonJ, hChonJb#7, Invossa, MTX (Methotrexate) 를 투여 후 19일째 및 26 일째 부종 크기 감소량을 측정한 결과, 혼합세포 투여군, MTX 투여군에서 대조군 대비 통계적 유의성 있는 감소량을 나타내었다.

[123]

[124] 5-4: 혼합세포 투여에 의한 사이토카인 분비 프로파일 분석

[125] 관절염 모델에 시료를 투여하고, 28일째 실험동물 래트의 왼쪽 무릎 관절강에서 활액을 적출하여 사이토카인을 분석하였으며, 그 결과를 도 11에 나타내었다. 래트 관절강에서 활액 적출은 주사용 식염수를 31G 인슐린주사기로 50μL 투여 후 주사기를 찌른 상태에서 바로 회수하는 방식으로 적출하였다. 사이토카인은 IFN-γ, IL-6, IL-17, IL-1β 및 TNF-α을 분석하였으며, 분석은 Rat Cytokine/Chemokine multiplex (RECYTMAG-65K, Millipore) 를 사용하여 수행하였다. 염증 반응을 유도 촉진하는 Pro-inflammatory cytokine 항목인 IFN-γ, IL-6, IL-17, IL-1β 및 TNF-α 분석 결과, 혼합세포 투여군과 MTX(Methotrexate) 투여군에서 대조군 대비 통계적 유의성 있게 감소하는 것을 확인하였다.

[126]

[127] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아님은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[128]

산업상 이용가능성

[129] 본 발명의 혼합세포 조성물은 기존 약물치료에 의한 부작용 없이 세포치료만으로 류마티스 관절염을 비롯한 염증성 질환의 증상을 개선하고, 과면역반응을 억제할 수 있다.

[130]

서열목록 Free Text

[131] 첨부파일 첨부하였음.

청구범위

[청구항 1] 다음을 포함하는 과면역반응에 의해 유발되는 염증성 질환 치료용 조성물:
(i) 연골세포 또는 연골세포로 분화 가능한 세포; 및
(ii) TGF-β를 코딩하는 유전자가 도입된 연골세포 또는 TGF-β를 코딩하는 유전자가 도입된 연골세포로 분화 가능한 세포.

[청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 과면역반응에 의해 유발되는 염증성 질환은 류마티스 관절염, 다발성 경화증, 전신성 홍반성 루푸스, 근무력증, 대장염, 제1형 당뇨병 및 뇌염으로 구성되는 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는, 조성물.

[청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 과면역반응에 의해 유발되는 염증성 질환은 류마티스 관절염인 것을 특징으로 하는, 조성물.

[청구항 4] 제1항에 있어서, 연골세포로 분화 가능한 세포는 연골전구세포 또는 줄기세포인 것을 특징으로 하는, 조성물.

[청구항 5] 제1항에 있어서, (i) 연골세포 또는 연골세포로 분화 가능한 세포와 (ii) TGF-β를 코딩하는 유전자가 도입된 연골세포 또는 TGF-β를 코딩하는 유전자가 도입된 연골세포로 분화 가능한 세포의 첨가비율은 1:1에서 100:1인 것을 특징으로 하는, 조성물.

[청구항 6] 제5항에 있어서, (i) 연골세포 또는 연골세포로 분화 가능한 세포와 (ii) TGF-β를 코딩하는 유전자가 도입된 연골세포 또는 TGF-β를 코딩하는 유전자가 도입된 연골세포로 분화 가능한 세포의 첨가비율은 1:1에서 100:1인 것을 특징으로 하는, 조성물.

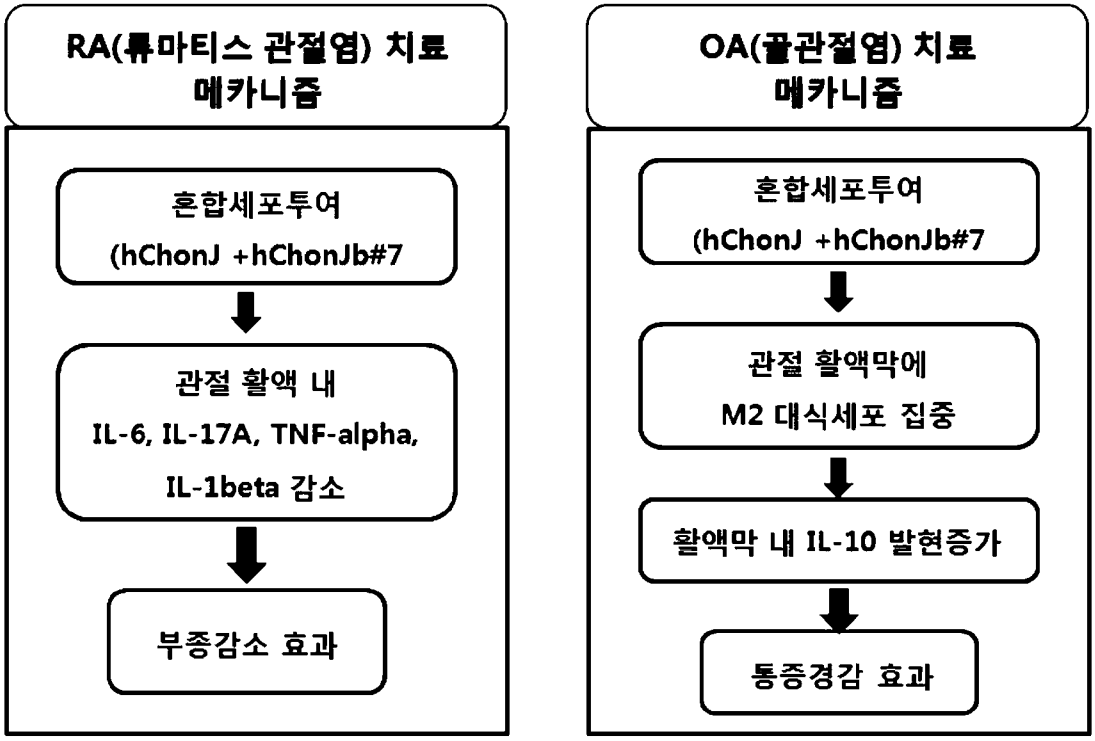
[청구항 7] 다음을 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 과면역반응에 의해 유발되는 염증성 질환의 치료방법:
(i) 연골세포 또는 연골세포로 분화 가능한 세포; 및
(ii) TGF-β를 코딩하는 유전자가 도입된 연골세포 또는 TGF-β를 코딩하는 유전자가 도입된 연골세포로 분화 가능한 세포.

[청구항 8] 다음을 포함하는 조성물의 과면역반응에 의해 유발되는 염증성 질환의 치료 용도:
(i) 연골세포 또는 연골세포로 분화 가능한 세포; 및
(ii) TGF-β를 코딩하는 유전자가 도입된 연골세포 또는 TGF-β를 코딩하는 유전자가 도입된 연골세포로 분화 가능한 세포.

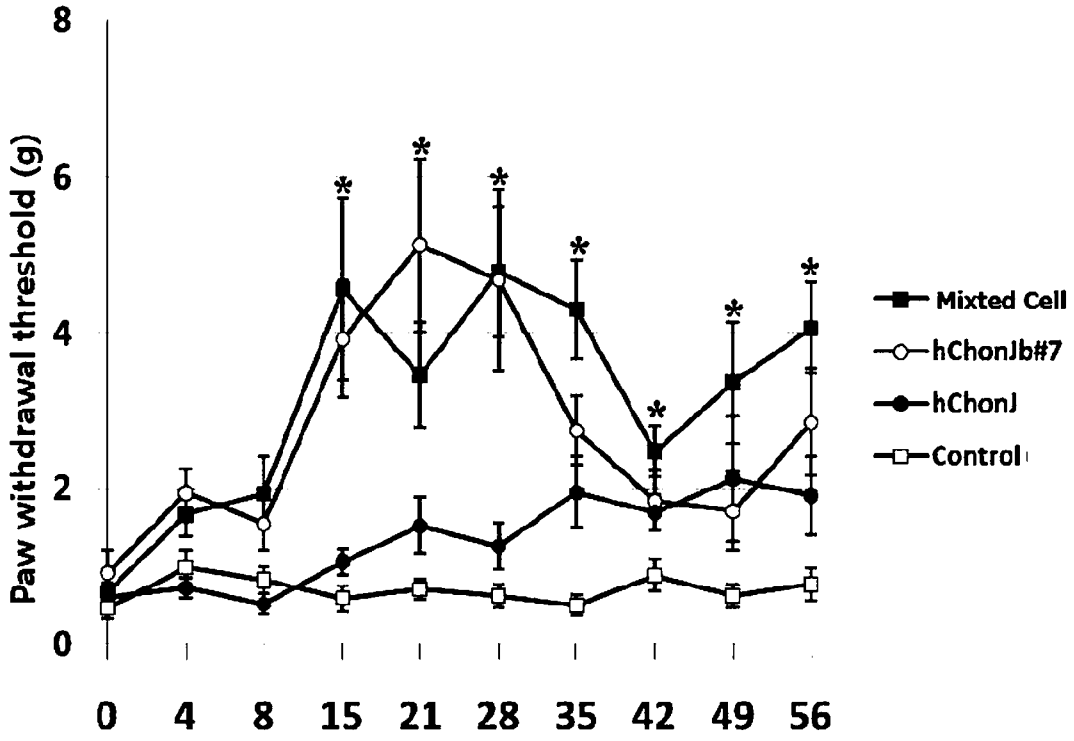
[청구항 9] 다음을 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, IL-6, IL-17A, IL-1β 및 TNF-α으로 구성된 군에서 선택되는 사이토카인의 발현을 억제하는 방법:
(i) 연골세포 또는 연골세포로 분화 가능한 세포; 및
(ii) TGF-β를 코딩하는 유전자가 도입된 연골세포 또는 TGF-β를 코딩하는

유전자가 도입된 연골세포로 분화 가능한 세포.

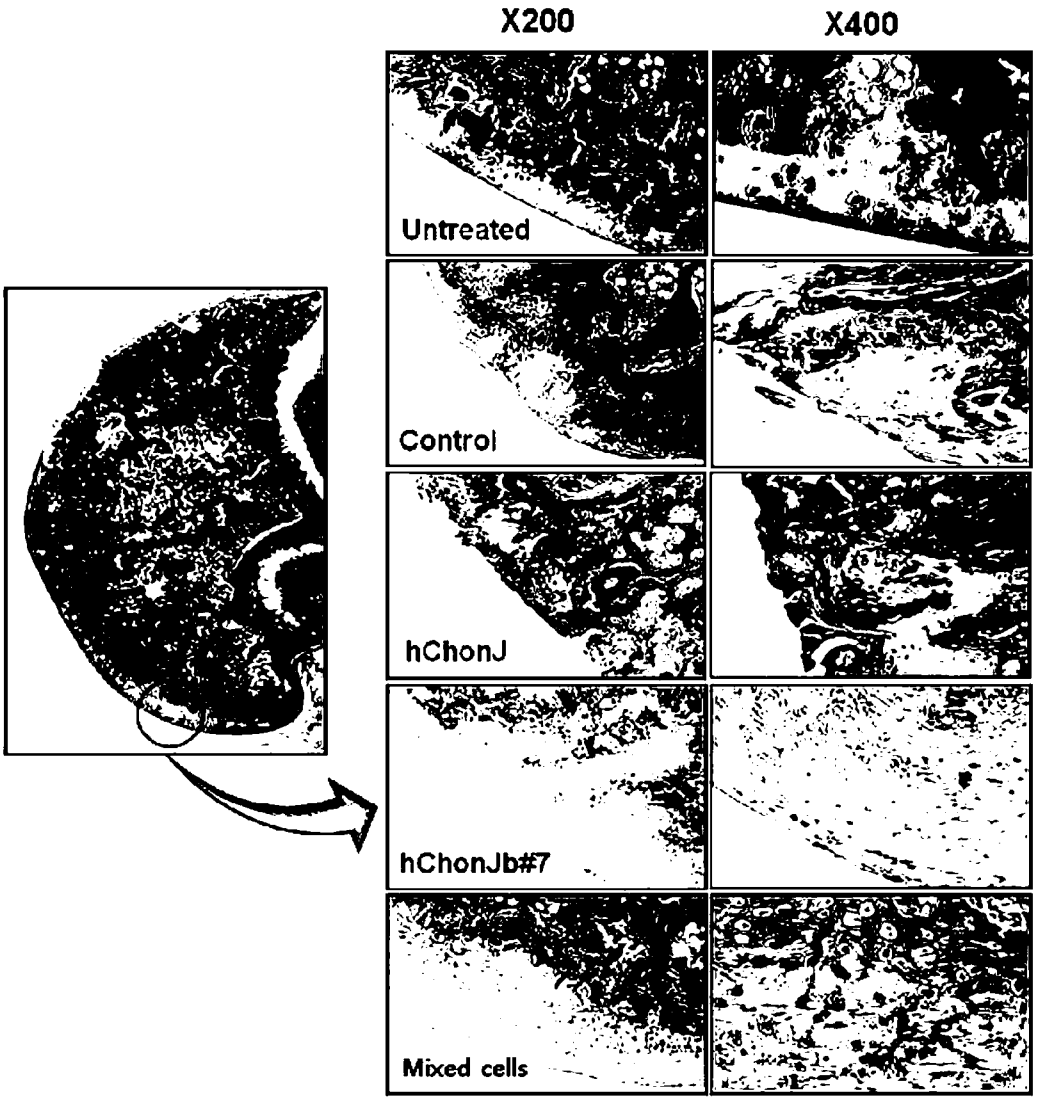
[도1]


RA(류마티스 관절염) 치료 메카니즘
혼합세포투여 (hChonJ +hChonJb#7
관절 활액 내 IL-6, IL-17A, TNF-alpha, IL-1beta 감소
부종감소 효과
OA(골관절염) 치료 메카니즘
혼합세포투여 (hChonJ +hChonJb#7
관절 활액막에 M2 대식세포 집중
활액막 내 IL-10 발현증가
통증경감 효과

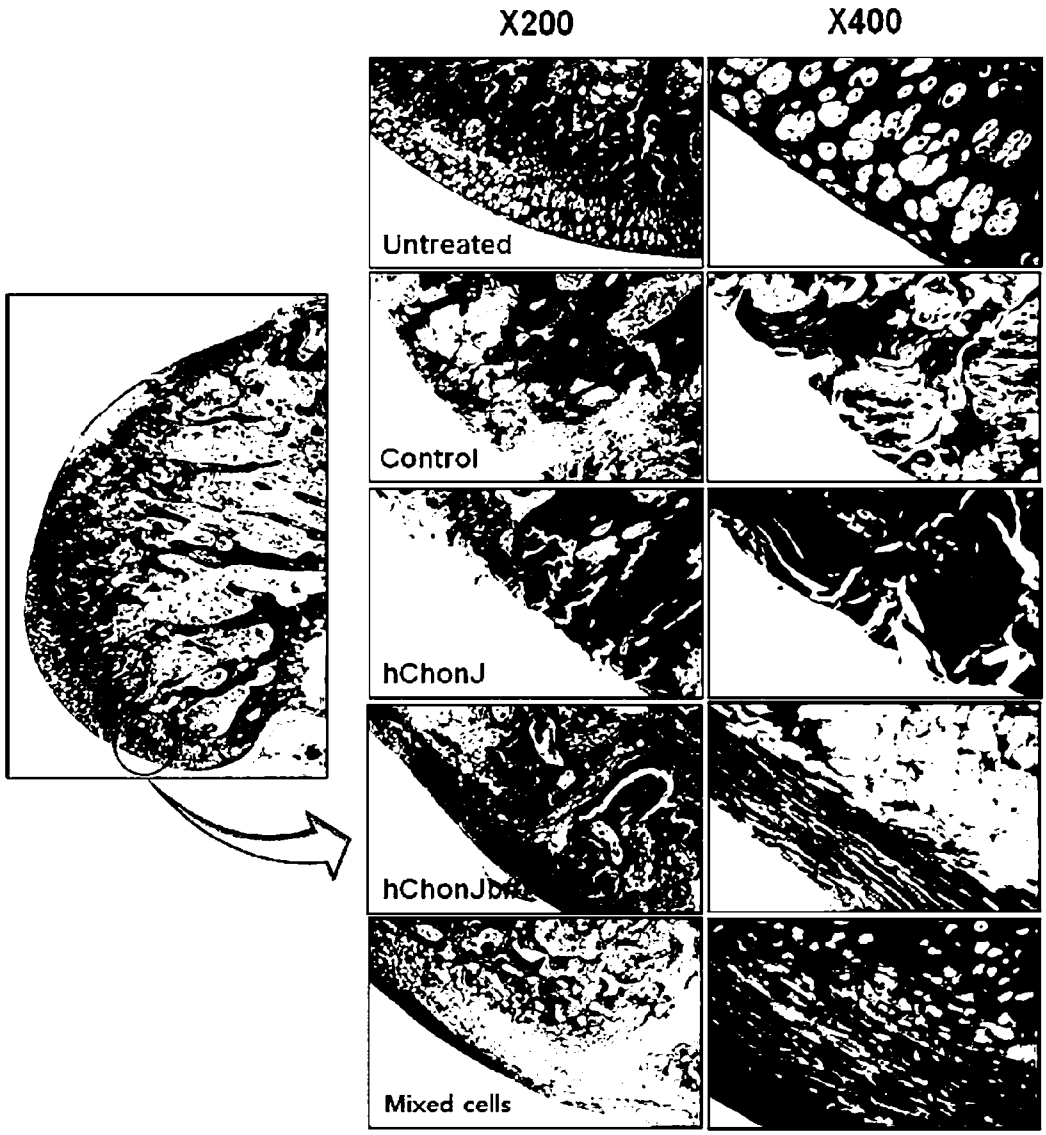
[도2]


Paw withdrawal threshold (g)
0
2
4
6
8
0 4 8 15 21 28 35 42 49 56
Mixted Cell
hChonJb#7
hChonJ
Control

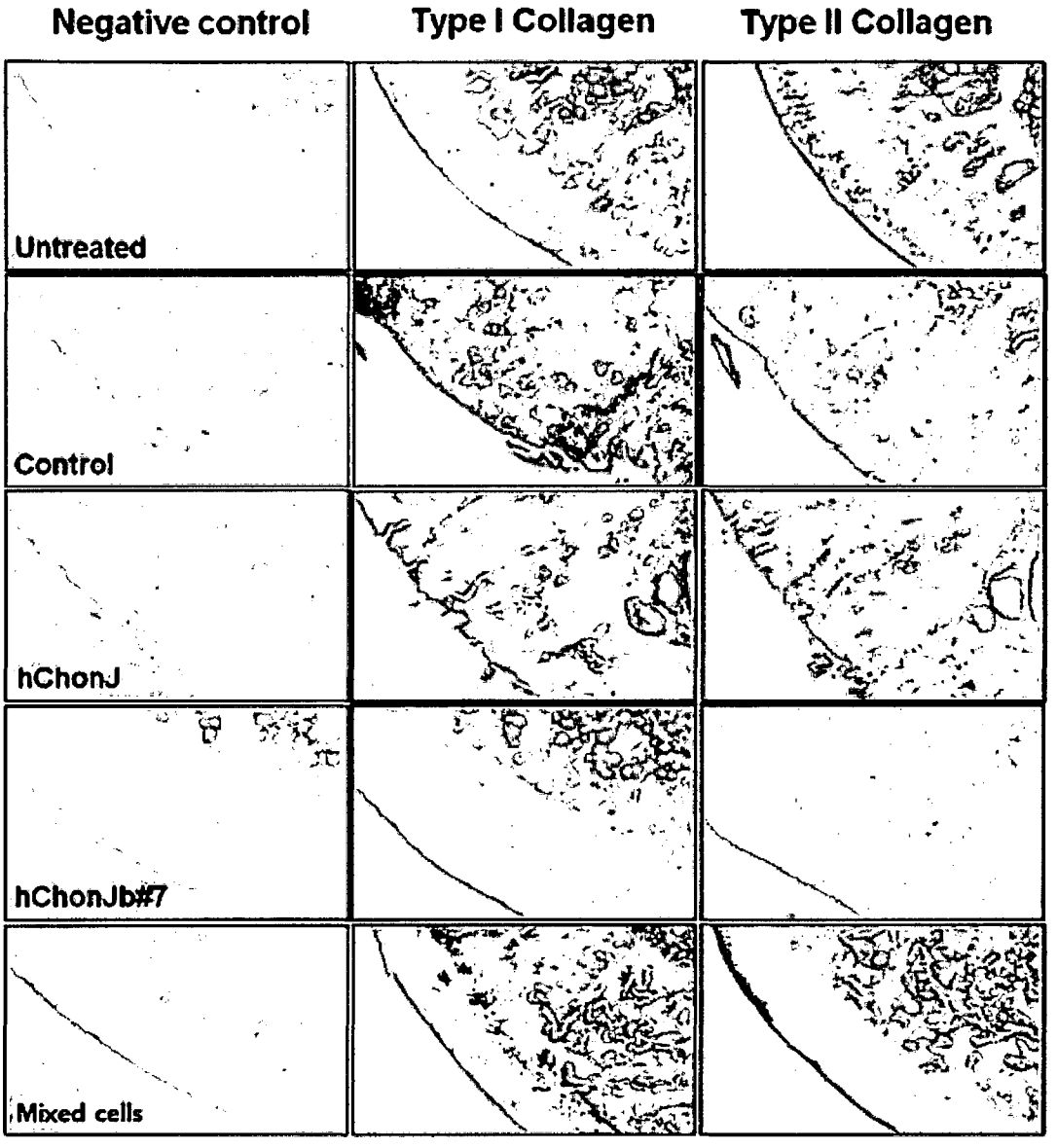
[도3]



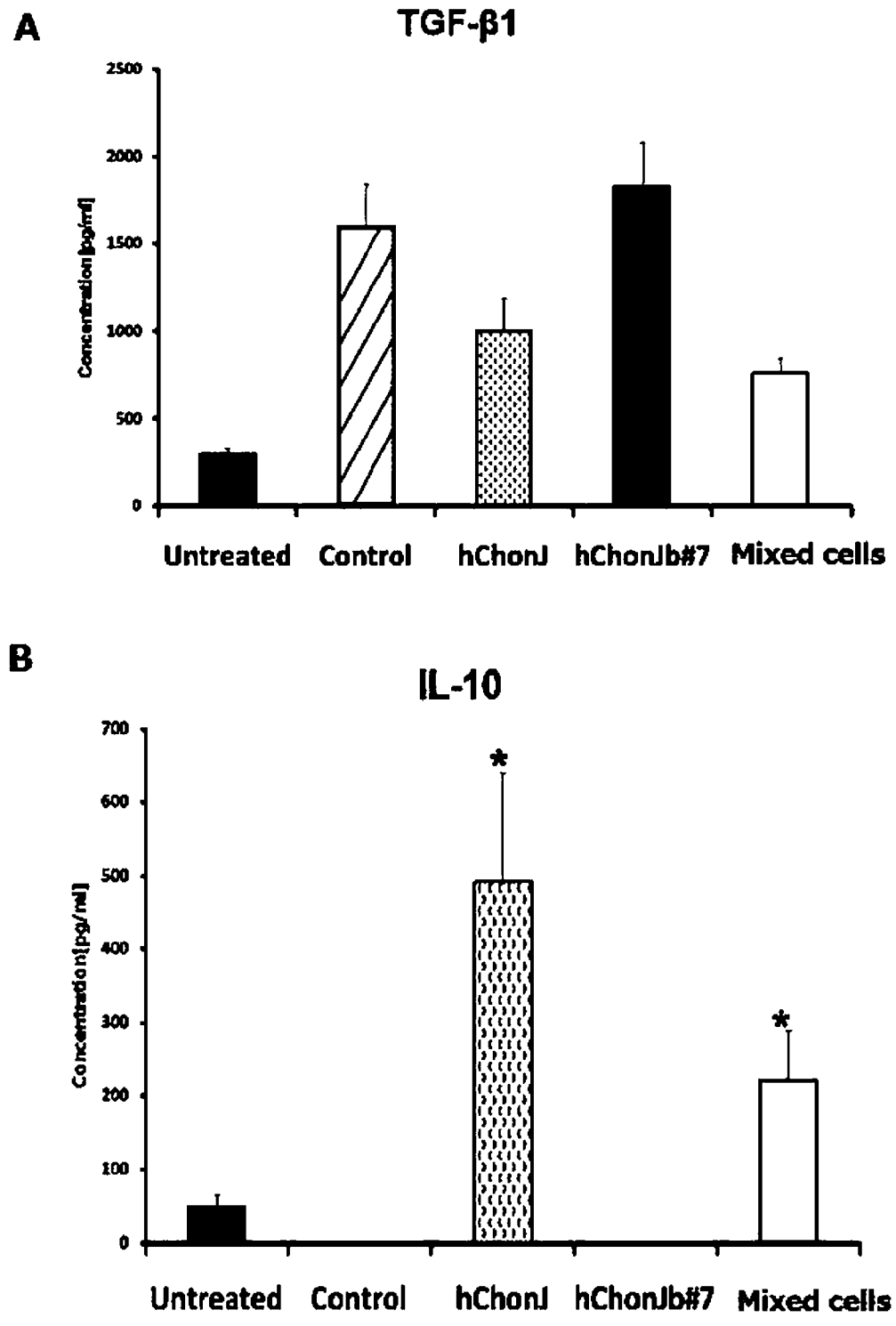
[도4]



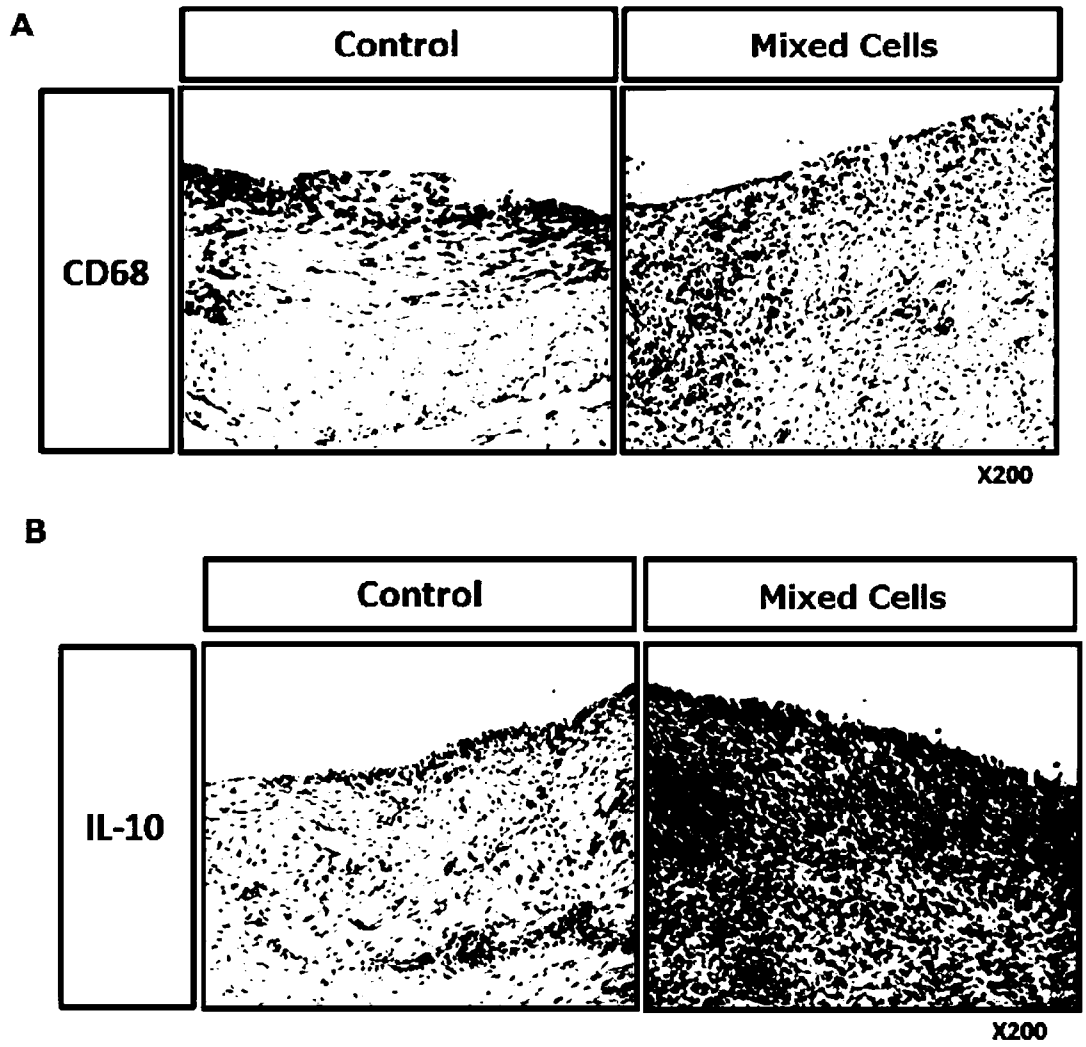
[도5]


Negative control
Type I Collagen
Type II Collagen
Untreated
Control
hChonJ
hChonJb#7
Mixed cells

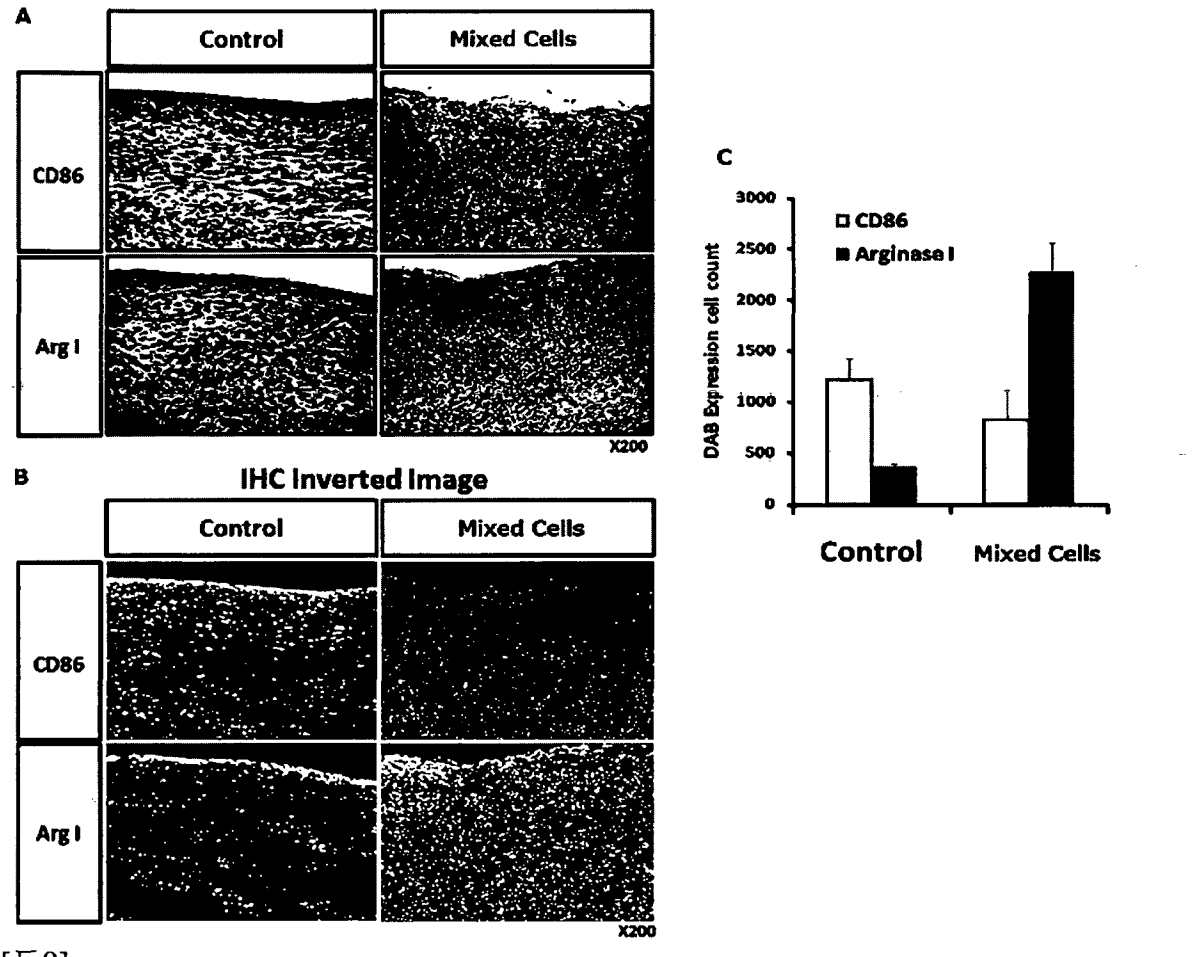
[도6]


A
TGF-β1
Concentration [pg/ml]
2500
2000
1500
1000
500
0
Untreated
Control
hChonJ
hChonJb#7
Mixed cells
B
IL-10
Concentration[pg/ml]
700
600
500
400
300
200
100
0
*
*
Untreated
Control
hChonJ
hChonJb#7
Mixed cells

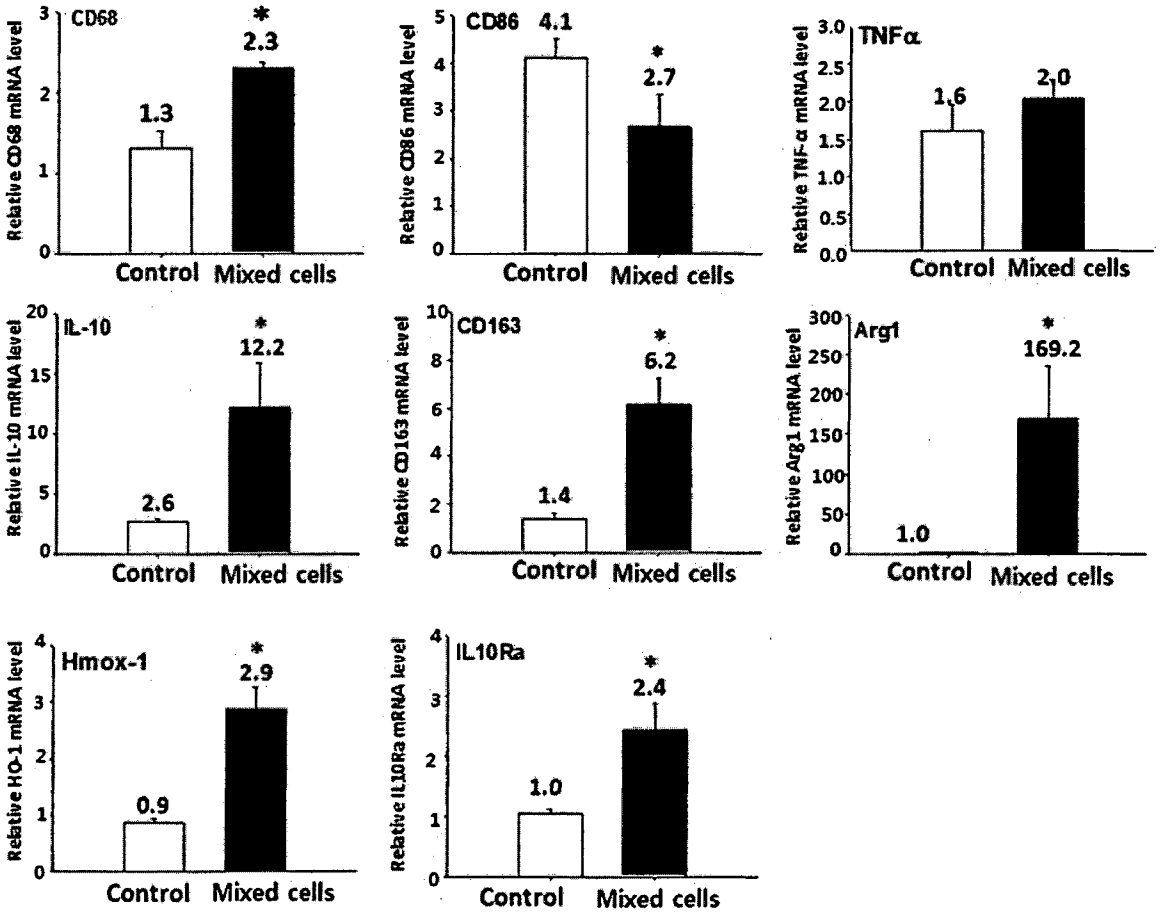
[도7]


A
Control
Mixed Cells
CD68
X200
B
Control
Mixed Cells
IL-10
X200

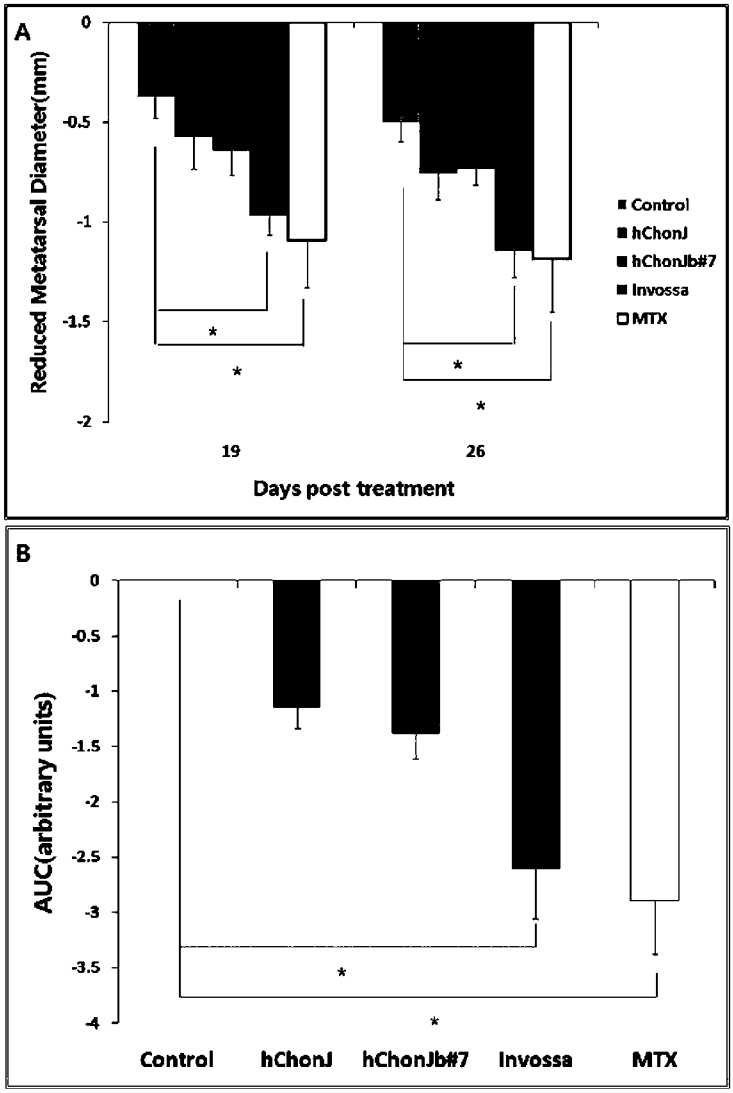
[도8]


A
Control
Mixed Cells
CD86
Arg I
X200
B
IHC Inverted Image
Control
Mixed Cells
CD86
Arg I
X200
C
CD86
Arginase I
DAB Expression cell count
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
Control
Mixed Cells

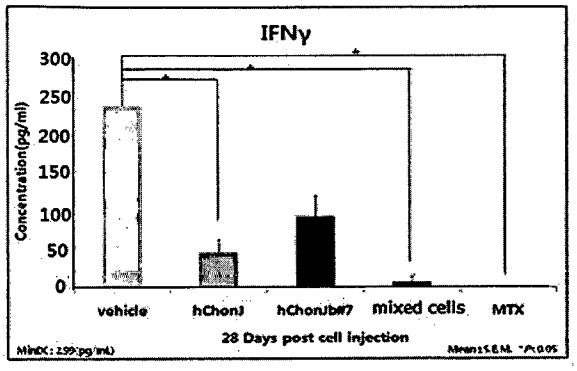
[도9]

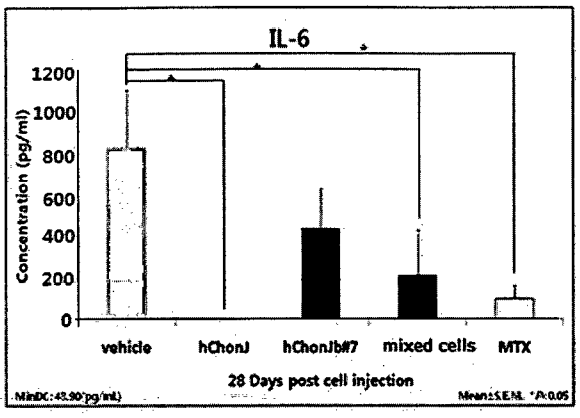

CD68
Relative CD68 mRNA level
1.3
2.3
Control
Mixed cells
CD86
Relative CD86 mRNA level
4.1
2.7
Control
Mixed cells
TNFα
Relative TNF-α mRNA level
1.6
2.0
Control
Mixed cells
IL-10
Relative IL-10 mRNA level
2.6
12.2
Control
Mixed cells
CD163
Relative CD163 mRNA level
1.4
6.2
Control
Mixed cells
Arg1
Relative Arg1 mRNA level
1.0
169.2
Control
Mixed cells
Hmox-1
Relative HO-1 mRNA level
0.9
2.9
Control
Mixed cells
IL10Ra
Relative IL10Ra mRNA level
1.0
2.4
Control
Mixed cells

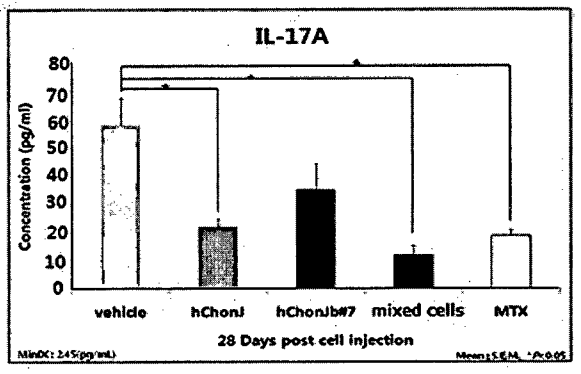
[도10]

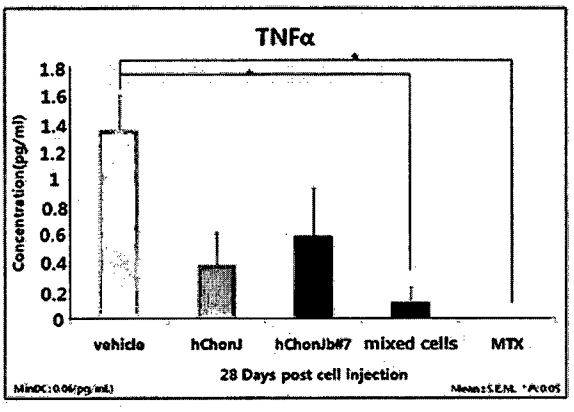

A
Reduced Metatarsal Diameter(mm)
0
-0.5
-1
-1.5
-2
Control
hChonJ
hChonJb#7
Invossa
MTX
*
*
*
*
19
26
Days post treatment
B
AUC(arbitrary units)
0
-0.5
-1
-1.5
-2
-2.5
-3
-3.5
-4
*
*
Control
hChonJ
hChonJb#7
Invossa
MTX

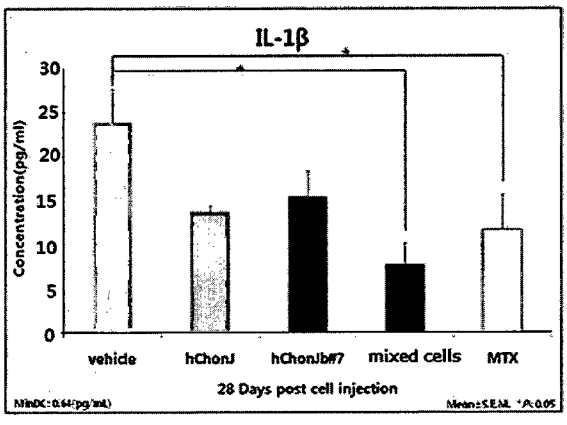
[도11]


IFNγ
Concentration(pg/ml)
300
250
200
150
100
50
0
vehicle
hChonJ
hChonJb#7
mixed cells
MTX
28 Days post cell injection


IL-6
Concentration (pg/ml)
1200
1000
800
600
400
200
0
vehicle
hChonJ
hChonJb#7
mixed cells
MTX
28 Days post cell injection


IL-17A
Concentration (pg/ml)
80
70
60
50
40
30
20
10
0
vehicle
hChonJ
hChonJb#7
mixed cells
MTX
28 Days post cell injection


TNFα
Concentration(pg/ml)
1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
vehicle
hChonJ
hChonJb#7
mixed cells
MTX
28 Days post cell injection


IL-1β
Concentration(pg/ml)
30
25
20
15
10
5
0
vehicle
hChonJ
hChonJb#7
mixed cells
MTX
28 Days post cell injection

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2016/001310

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 35/32(2006.01)i, A61K 35/12(2006.01)i, A61P 29/00(2006.01)i, A61P 19/02(2006.01)i, A61P 3/10(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 35/32; C12N 15/12; A61K 35/12; A61K 35/28; C12N 15/86; A61K 48/00; A61P 29/00; A61P 19/02; A61P 3/10

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: rheumatoid arthritis, inflammation disease, TGF-β coding, chondrocyte, stem cell, chondroprogenitor cell

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2011-049291 A2 (CATHOLIC UNIV. IND. ACAD. COOP.) 28 April 2011 See abstract; paragraphs [0024]-[0054]; and claims 1-13.	1-6,8
Y	WO 2011-047345 A2 (YOO, T, J.) 21 April 2011 Abstract; pages 21-22; and claims 1-19.	1-6,8
Y	GONZALEZ-REY, E. et al., "Human Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells Reduce Inflammatory and T cell Responses and Induce Regulatory T Cells In Vitro in Rheumatoid Arthritis", Annals of the Rheumatic Diseases, 2010, vol. 69, pages 241-248 See abstract; and pages 244-247.	1-6,8
Y	WANG, L. et al., "Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell Therapy for Patients with Active Rheumatoid Arthritis: Safety and Efficacy", Stem Cells and Development, 2013, vol. 22, no. 24, pages 3192-3202 See abstract; and pages 3196-3200.	1-6,8
A	US 2003-0175257 A1 (SONG, S. U. et al.) 18 September 2003 See the entire document.	1-6,8

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

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

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
22 JUNE 2016 (22.06.2016)	**23 JUNE 2016 (23.06.2016)**
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/KR2016/001310

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.: **7, 9**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 7 and 9 pertain to a method for treatment of the human body by surgery or therapy, and thus pertain 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/KR2016/001310

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 2011-049291 A2	28/04/2011	JP 2013-508353 A	07/03/2013
		KR 10-1301262 B1	27/08/2013
		KR 10-2011-0044490 A	29/04/2011
		US 2012-0207725 A1	16/08/2012
		WO 2011-049291 A3	21/07/2011
WO 2011-047345 A2	21/04/2011	US 2012-0201791 A1	09/08/2012
		WO 2011-047345 A3	18/08/2011
US 2003-0175257 A1	18/09/2003	EP 1485487 A2	15/12/2004
		EP 1485487 A4	09/11/2005
		JP 2005-519698 A	07/07/2005
		JP 4033400 B2	16/01/2008
		KR 10-0688871 B1	02/03/2007
		KR 10-2005-0012226 A	31/01/2005
		WO 03-077852 A2	25/09/2003
		WO 03-077852 A3	08/04/2004
		WO 03-077852 A8	23/12/2004

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2016/001310

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 35/32(2006.01)i, A61K 35/12(2006.01)i, A61P 29/00(2006.01)i, A61P 19/02(2006.01)i, A61P 3/10(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 35/32; C12N 15/12; A61K 35/12; A61K 35/28; C12N 15/86; A61K 48/00; A61P 29/00; A61P 19/02; A61P 3/10

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: 류마티스성 관절염, 염증질환, TGF-β 코딩, 연골세포, 줄기세포, 연골전구세포

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	WO 2011-049291 A2 (가톨릭대학교 산학협력단) 2011.04.28 요약; 단락 [0024]-[0054]; 및 청구항 1-13 참조.	1-6,8
Y	WO 2011-047345 A2 (YOO, T. J.) 2011.04.21 요약; 페이지 21-22; 및 청구항 1-19.	1-6,8
Y	GONZALEZ-REY, E. 등, 'Human adipose-derived mesenchymal stem cells reduce inflammatory and T cell responses and induce regulatory T cells in vitro in rheumatoid arthritis', Annals of the Rheumatic Diseases, 2010년, 69권, 페이지 241-248 요약; 및 페이지 244-247 참조.	1-6,8
Y	WANG, L. 등, 'Human umbilical cord mesenchymal stem cell therapy for patients with active rheumatoid arthritis: safety and efficacy', Stem Cells and Development, 2013년, 22권, 24호, 페이지 3192-3202 요약; 및 페이지 3196-3200 참조.	1-6,8
A	US 2003-0175257 A1 (SONG, S. U. 등) 2003.09.18 문헌 전체 참조.	1-6,8

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

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

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

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

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

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

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

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

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

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2016년 06월 22일 (22.06.2016)	2016년 06월 23일 (23.06.2016)

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

심사관
이정아
전화번호 +82-42-481-8740

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2016/001310

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: 7,9
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 7 및 9는 수술 또는 치료에 의한 인체의 처치방법에 관한 것이므로 PCT 17(2)(a)(i) 및 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.

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

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

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

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

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

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

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

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

이의신청에 관한 기재

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

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

☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2016/001310

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2011-049291 A2	2011/04/28	JP 2013-508353 A	2013/03/07
		KR 10-1301262 B1	2013/08/27
		KR 10-2011-0044490 A	2011/04/29
		US 2012-0207725 A1	2012/08/16
		WO 2011-049291 A3	2011/07/21
WO 2011-047345 A2	2011/04/21	US 2012-0201791 A1	2012/08/09
		WO 2011-047345 A3	2011/08/18
US 2003-0175257 A1	2003/09/18	EP 1485487 A2	2004/12/15
		EP 1485487 A4	2005/11/09
		JP 2005-519698 A	2005/07/07
		JP 4033400 B2	2008/01/16
		KR 10-0688871 B1	2007/03/02
		KR 10-2005-0012226 A	2005/01/31
		WO 03-077852 A2	2003/09/25
		WO 03-077852 A3	2004/04/08
		WO 03-077852 A8	2004/12/23