(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2015 년 11 월 5 일 (05.11.2015)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2015/167210 A1

(51) 국제특허분류:
C12Q 1/68 (2006.01) *G01N 33/574* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2015/004233

(22) 국제출원일: 2015 년 4 월 28 일 (28.04.2015)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2014-0050613 2014 년 4 월 28 일 (28.04.2014) KR
10-2015-0059550 2015 년 4 월 28 일 (28.04.2015) KR

(71) 출원인: **가톨릭대학교 산학협력단 (THE CATHOLIC UNIVERSITY OF KOREA INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION)** [KR/KR]; 137-701 서울시 서초구 반포대로 222 가톨릭대학교 성의교정 내, Seoul (KR).

(72) 발명자: **오일환 (OH, Il Hoan)**; 135-865 서울시 강남구 학동로 88 길 5, 1 동 1403 호(삼성동, 진흥아파트), Seoul (KR).

(74) 대리인: **특허법인 다나 (DANA PATENT LAW FIRM)**; 135-936 서울시 강남구 역삼로 3 길 11 광성빌딩 신관 5 층, Seoul (KR).

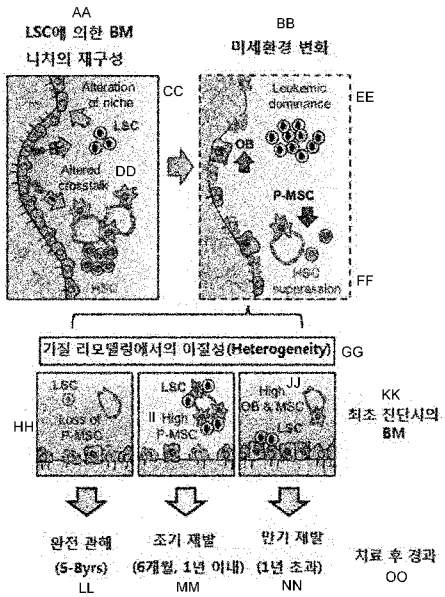
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA,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

[다음 쪽 계속]

WO 2015/167210 A1

(54) **Title**: METHOD FOR PREDICTING PROGNOSIS OF ACUTE MYELOID LEUKEMIA RELAPSE

(54) **발명의 명칭** : 급성 골수성 백혈병 재발의 예후 예측 방법



AA ... Reconstruction of BM niche by LSC
BB ... Changes in microenvironment
CC ... Alteration of niche
DD ... Altered crosstalk
EE ... Leukemic dominance
FF ... HSC suppression
GG ... Heterogeneity in substrate remodeling
HH ... Loss of P-MSC
II ... High P-MSC
JJ ... High OB & MSC
KK ... BM at initial diagnosis
LL ... Complete remission (5-8 yrs)
MM ... Early relapse (within six months, one year)
NN ... Late relapse (after one year)
OO ... Course after treatment

(57) **Abstract**: The present invention relates to a method for predicting the prognosis of acute myeloid leukemia relapse. According to the present invention, the prognosis of acute myeloid leukemia relapse can be predicted by analyzing changes in a bone marrow microenvironment during the early diagnosis of leukemia.

(57) **요약서**: 본 발명은 급성 골수성 백혈병 재발의 예후 예측 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따르면 백혈병 초기 진단 시, 골수의 미세환경 변화를 분석함에 의하여, 급성 골수성 백혈병의 재발의 예후를 예측할 수 있다.

(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))

명세서

발명의 명칭: 급성 골수성 백혈병 재발의 예후 예측 방법

기술분야

[1] 본 발명은 급성 골수성 백혈병 재발의 예후 예측 방법에 관한 것이다.

배경기술

[2] 백혈병(leukemia)은 백혈구가 종양으로 증식하는 질환을 총칭한다. 백혈병의 종류는 백혈병이 기원하는 백혈구에 따라 골수성 백혈병과 림프성 백혈병으로 분류되며, 진행 속도에 따라 급성 백혈병과 만성 백혈병으로 분류된다. 백혈병의 임상양상은 질환의 유형과 침범된 세포의 성질에 따라 다양하다. 림프성 백혈병은 림프계 혈액 세포가, 골수성 백혈병은 골수계 혈액 세포가, 그리고 만성 골수성 백혈병은 성숙기에 있는 세포가 변이해서 발생하며, 급성 골수성 백혈병(acute myeloid leukemia; AML)은 비교적 초기 단계의 조혈 과정에서 분화를 시작하는 골수계 모세포의 장애에 의해 발병된다. 급성 골수성 백혈병은 주로 성인, 고령자에게서 발병하며, 소아의 경우 전체 백혈병 환자의 10 내지 15% 정도이다. 급성 림프구성 백혈병은 주로 소아에서 발생하며, 2 내지 10세의 소아에서 가장 발생 빈도가 높은 것으로 알려져 있다. 만성 골수성 백혈병은 60대 이상의 노년기에 발생 빈도가 높으며, 만성 림프구성 백혈병은 우리나라에서는 매우 드물게 나타나는 백혈병이다. 급성 골수성 백혈병은 전체 급성 백혈병의 약 70%를 차지하는 것으로 알려져 있다.

[3] 급성 골수성 백혈병의 치료법으로 화학요법, 방사선요법, 또는 조혈모세포 이식요법이 있고, 최초 진단 시 통상적으로 화학요법에 의하여 완전 관해를 유도하게 된다. 최초 진단 후의 치료요법에 의하여, 완전 관해에 도달하면 골수 및 혈액검사상에서는 백혈병 세포를 발견할 수 없지만, 이론적으로는 여전히 체내에 1억 개 이상의 백혈병 세포가 존재한다. 따라서, 급성 골수성 백혈병은 완전 관해 후에도 재발의 위험이 높으며, 급성 골수성 백혈병은 관해 후의 재발의 예후의 예측이 중요하다.

[4]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[5] 따라서, 본 발명은 급성 골수성 백혈병 재발의 예후 예측용 마커, 상기 마커를 이용하여 급성 골수성 백혈병 재발의 예후를 예측하는 방법 및 급성 골수성 백혈병 재발의 예후 예측을 위하여 정보를 제공하는 방법을 제공하고자 한다.

[6]

과제 해결 수단

[7] 본 발명은 개체로부터 수득한 골수 시료 내의 기질 세포의 조성을 분석하는 것을 포함하는 급성 골수성 백혈병의 예후 예측을 위하여 정보를 제공하는

방법을 제공한다.

[8] 본 발명은 또한, 개체로부터 수득한 골수 시료 내의 기질 세포의 조성을 분석하는 것을 포함하는 급성 골수성 백혈병의 예후를 예측하는 방법을 제공한다.

[9]

발명의 효과

[10] 본 발명에 따르면 백혈병 초기 진단 시, 골수의 미세환경 변화를 분석함에 의하여, 급성 골수성 백혈병의 재발의 예후를 예측할 수 있다.

[11]

도면의 간단한 설명

[12] 도 1a는 정상 공여자 및 AML 환자의 골수에서 중간엽 세포 조성의 비교 결과를 보여준다(평균± SEM(standard error of the mean), AML에 대하여 n=51, 정상 공여자에 대하여 n=11).

[13] 도 1b는 공여자 및 AML 환자의 골수에서 중간엽 세포의 콜로니 형성 활성 및 증식능을 비교한 결과를 보여준다(AML에 대하여 n=51, 정상 공여자에 대하여 n=11).

[14] 도 1c는 FAB 분류에 의한 AMl 아형에 따른 환자의 BMs에서 중간엽 세포의 변경을 보여준다.

[15] 도 1d는 인-비트로에서 60일 동안 계대 배양하는 동안, 2 계대를 지나 계속 증식하는 정상 증식을 나타내는 AML-MSCs의 수를 보여준다(정상 공여자에 대하여n=2, AML 환자에 대하여 n=5).

[16] 도 1e는 공여자 및 AML 환자의 골수에서 중간엽 세포의 노화-연관 베타-갈락토시다아제 활성을 비교한 결과를 보여준다(3회 반복 실험, 평균± SEM(standard error of the mean), AML에 대하여 n=12, 정상 공여자에 대하여 n=9).

[17] 도 1f는 정상 공여자의 골수 및 이와 동일한 연령의 AML 환자의 골수에서 최초 진단 시의 CFU-F 수를 비교한 결과를 보여준다. 괄호 안의 숫자는 평균 연령을 나타낸다 (AML에 대하여 n=51, 정상 공여자에 대하여 n=11).

[18] 도 1g는 완전 관해 후의 AML 환자 및 정상 공여자의 골수에서 CFU-F의 수를 비교한 결과를 보여준다(AML 관해군에 대하여 n=17, 정상 공여자에 대하여 n=11).

[19] 도 2a는 AML 아세포 또는 정상 조혈세포와 공동-배양한 MSCs에서의 유전자 발현 분석을 위한 실험 설계를 보여주는 모식도이다(각 군당 n=3).

[20] 도 2b는 다양한 1000 개의 프로브의 계층적 군집화를 보여준다. (MAD>0.04). 히트맵(Heatmap)은 상대적으로 상향-(붉은색) 및 하향-(푸른색)조절된 부분을 나타낸다.

[21] 도 2c는 정상 $CD34^+$ 세포와 공동-배양한 MSCs와 비교하였을 때, 백혈병 $CD34^+$ 세포와 공동-배양한 MSCs에서, 상향- 및 하향-조절된 가장 중요한 10 GO 범주를

보여준다.

[22] 도 2d는 105 '세포 주기'-연관 유전자 세트들의 인리치먼트 플롯(enrichment plot)을 보여준다.

[23] 도 2e는 사이토카인-연관 유전자의 발현 수준에 관한 것으로, 'CHEMOKINE_RECEPTOR_BINDING' GO 범주에 속하는 43 개의 유전자의 상대적 발현 (붉은색은 상향 조절, 푸른색은 하향 조절을 나타냄) 수준을 보여준다.

[24] 도 3a는 크로스-토크 분자들의 발현 변화 분석을 실험의 모식도이다.

[25] 도 3b는 정상 $CD34^+$ 세포의 존재 또는 부존재 하에서, 정상 및 AML-MSCs (M2, M5a)의 jagged-1 또는 CXCL-12 단백질의 발현을 분석한 결과를 보여준다. (4회 반복 실험, 각 군당 n=4, *;$p<0.05$, ***;$p<0.001$).

[26] 도 3c는 조혈 전구세포의 정상 또는 AML-MSC와의 공동-배양이, 하향-흐름 노치 신호에 미치는 영향을 보여준다. 무-기질 (SF) 조건에서의 레벨과 비교한 전사체의 평균 폴드(mean folds)±SEM를 나타낸다 (3회 반복 실험, 각 군당 n=3).

[27] 도 3d는 백혈병 아세포의 존재 또는 부존재 하에서, 배양된 정상 또는 AML-MSCs (M2, M5a)에서의 jagged-1의 발현 퍼센트를 보여준다. (평균±SEM, 3회 반복 실험, 각 군당 n=3).

[28] 도 3e는 정상 또는 백혈병 아세포와 공동-배양에 의한, 정상 MSCs에서의 CXCL-12의 발현 변화를 유세포 분석기로 분석한 결과를 보여준다. MSCs의 각 군에서 CXCL-12(+) 세포의 평균 %를 SEM과 함께 보여준다 (3회 반복 실험, 각 군당 n=3).

[29] 도 3f및 도 3g는 인-비보에서, 정상 공여자 및 AML 환자의 신선한 BMs의 MSCs에서 jagged-1(도 3f) 및 CXCL-12(도 3g)의 발현 정도를 보여준다(MSCs (CD45-31-235a-) 중에서 jagged-1(+) 또는 CXCL-12 (+) 세포의 평균 %, 정상 공여자군에 대하여 n= 8, AML에 대하여 n=46).

[30] 도 3h는 초기 진단 시 및 관해 후의 AML 환자의 BM 구획의 jagged-1 또는 CXCL-12의 발현 변화를 면역조직화학으로 분석한 결과를 보여준다. 'S'로 표시한 부분은 망상 세포(reticular cells)에서 BM 시누소이드(sinusoid)에 인접한 양성 염색된 부분을 가리킨다. 또한 화살표는 양성 염색 부분을 가리키고 점선 부분은 고 배율로 확대한 영역을 가리킨다 (400X).

[31] 도 4a는 제대혈의 정상 $CD34^+$ 세포를 무-기질 조건 (SF)에서 5일간 배양하거나, 또는 두 개의 정상 공여자(#1, #2) 유래 MSCs 또는 4 명의 AML 환자 유래 백혈병 MSCs 상에서 5일간 공동-배양한 경우, $CD34^+$ 세포의 총 확장량을 보여준다(3회 반복 실험, 평균 SEM, 각 군당 n= 7, *$p<0.05$).

[32] 도 4b는 각 군의 MSCs와 공동 배양한 정상 CD34+ 세포를 방사선 처리 (250rad)한 NSG 마우스에 이식한 ($1X10^4$의 CD34+ 세포/마우스) 후, BM 세포의 인간 조혈 세포(hCD45+)에의 생착을 분석한 결과를 보여준다.

[33] 도 4c는 정상 및 AML-MSCs에서의 LTC-ICs 분석 결과를 보여준다 (장-기간

배양 후, 400개의 $CD34^+$ 세포 유래의 콜로니의 수, 4 회 반복 실험, 각 군당 n=4).

[34] 도 4d는 정상 또는 AML-MSCs의 백혈병 세포 증식에 미치는 영향을 보여준다 (평균±SEM, 3회 반복 실험, 각 군당 n=5-6).

[35] 도 4e는 각 군의 MSCs와 공동-배양한 백혈병 세포 (HL-60)를 방사선 처리한 NSG 마우스에 이식한 후의, 백혈병 세포의 생착(hCD45+)을 말초 (PB) 및 BMs에서 분석한 결과를 보여준다 (평균 생착 %(SEM), 각 군당 n= 6).

[36] 도 4f는 각 군의 MSCs와 공동-배양한 백혈병 세포 (HL-60)의 세포 주기를 형광/파이로닌 Y(Hoescht/Pyronin) 염색에 의하여 G_0 기에 있는 세포 집단의 %를 분석한 결과를 보여준다 (평균 SEM, 2 회 반복 실험, SF에 대하여 n=2, 공동-배양 군에 대하여 n=5-6, *p<0.05).

[37] 도 4g는 공동-배양하는 동안, Ara-C (2uM)를 처리한 백혈병 세포 (HL-60) 중에서, 세포 사멸(apoptosis) 과정에 있는 세포를 유세포 분석기로 분석한 결과를 보여준다 (평균±SEM, 3회 반복 실험, SF에 대하여 n=3, 공동-배양 군에 대하여 n=5-6).

[38] 도 5a는 MSCs (CD45-31-235a-), 내피 세포 (CD45-31-235a-31+)(EC), MSC 전구세포 (CD45-31-235a-146+166-)(M-progenitors), 성숙한 조골세포 (CD146+31-235a-146-166+)(OB), 및 1 ml 의 신선한 BM에 함유되어 있는 CFU-Fs의 수를 보여준다.

[39] 도 5b는 BM 기질 세포 조성의 급성 골수성 백혈병 재발 예측을 위한 바이오마커로서의 효용성을 검증하기 위하여, BM 기질 세포 조성의 AUC 값을 분석한 결과를 보여준다 (AUS 값이 >0.8 이상인 경우를 박스로 표시).

[40] 도 5c의 상단은 CR 및 다양한 재발군의 BM에서의 도 5b에서 도출한 바이오마커의 수를 보여준다(95% 신뢰구간(C.I.). 하단은 이들의 ROC(Receiver operating characteristic) 곡선 및 AUC 값 (SE)을 보여준다.

[41] 도 5d는 CR 및 재발AML 환자의 BM에 따른 기질 세포 조성의 차이를 보여준다. 조기 재발(≤1 년) 및 만기 재발(>1 년)군에서의 각 기질 조성의 수를 CR군과 비교하여 나타내었다(95% C.I.).

[42] 도 6은 백혈병-유도 니치의 변경 및 그들의 임상적 중요성을 나타낸 모식도이다.

[43]

발명의 실시를 위한 형태

[44] 급성 골수성 백혈병 (Acute myeloid leukemia; AML)의 발병 과정은 골수의 미세환경의 변화와 관련됨이 알려져 있다. 조혈모세포(hematopoietic stem cells; HSCs)의 변이로 인하여 백혈병 세포(leukemic cells)가 생성되면, 백혈병 세포, 백혈병 줄기 세포(leukemic stem cells; LSCs)가 주변의 미세환경에 변화를 일으켜 백혈병성 상태를 만들고 유지한다. 본 발명자들은 하기 실시예를 통하여, 정상 HSCs와 유사한 이들 LSCs가, 마우스에 이식되었을 때, 정상 HSCs의

니치(niche)와 경쟁하고, 더욱이 마우스에 이식된 백혈병 세포는 비정상적인 골수 니치를 형성하여 이식된 정상 HSCs을 종양 니치로 바꾸는 것을 확인하였다.

[45] 먼저, 급성 골수성 백혈병 환자의 골수 미세환경이 정상 개체와 다른지 확인하기 위하여, 백혈병 골수와 정상 골수의 중간엽 기질 세포의 조성을 분석하여 비교하였다(실시예 1). 급성 골수성 백혈병 골수는 정상 골수에 비하여 중간엽 전구세포(mesenchyaml progenitors; M-progenitors)의 상당한 손실이 나타났으나, 성숙한 조골세포(osteoblastic cells; OBs)는 증가하였다. 또한, 급성 골수성 백혈병 골수에서 콜로니 형성능과 증식능의 감소가 나타났고, β-갈락토시다아제 활성의 증가가 나타났다. 이는 백혈병 골수에서, 중간엽의 분화(mesenchymal differentiation)가 바뀌었음을 나타낸다.

[46] 상기와 같은 골수 미세환경의 변화가 백혈병 세포에 기인한 것인지 확인하기 위하여, 백혈병 세포와 중간엽 기질 세포를 공동 배양한 군과, 정상 세포와 중간엽 기질 세포를 공동 배양한 경우의 중간엽 기질 세포 내의 유전자 발현 양상을 분석하였다 (실시예 2). 그 결과, 백혈병 세포와 공동 배양한 군에서, 사이토카인 등과 관련된 유전자 발현의 증가 및 세포 주기 또는 증식 등과 관련된 유전자 발현의 감소가 나타났다. 또한, 백혈병 세포가 니치의 크로스-토크의 리모델링을 일으키는지 확인하고자, 크로스-토크 분자(cross-talk molecules)의 발현 양상을 분석하였다 (실시예 2). 그 결과, 백혈병 세포와 공동 배양한 중간엽 기질 세포에서, 크로스 토크 분자인 jagged-1의 발현 감소 및 CXCL-12의 발현 증가를 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 백혈병 세포가 니치의 변화를 야기함을 시사한다.

[47] 또한, 이러한 니치의 변화가, 조혈모세포의 기능에까지 영향을 미치는지 알아보기 위하여, 정상 조혈 기능 및 백혈병성 기능에 미치는 영향을 분석하였다. 그 결과, 백혈병 세포에 의한 니치의 변화로 인하여, 정상 조혈 작용이 억제됨을 확인할 수 있었다. 뿐만 아니라, 백혈병 세포에 의한 니치의 변화는 백혈병 세포의 세포사멸(apoptosis)에 대한 저항성 및 화학요법에의 내성을 키워주는 방향으로 작용함을 알 수 있었다 (실시예 3). 이는, 백혈병 세포가 정상 적인 조혈 작용은 망가뜨리는 한편, 백혈병 세포 자신의 생존에는 유리하게끔 기질을 리모델링함을 시사한다.

[48] 상기 결과들을 토대로, 본 발명자들은, 급성 골수성 백혈병에서, 백혈병 세포가 골수의 니치를 변화시키고, 이러한 니치의 변화가 골수 내의 미세환경을 변화시키며, 이러한 미세환경의 변화가 급성 골수성 백혈병 재발의 예후와 관련이 있을 것이라는 가설을 세웠다. 상기 가설이 타당하다는 것을 하기 실시예를 통해서 확인하여, 발명을 완성하였다.

[49] 따라서, 본 발명은 개체로부터 수득한 골수 시료 내의 미세환경의 변화를 분석하는 것을 포함하는 급성 골수성 백혈병 재발의 예후 예측을 위하여 정보를 제공하는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한, 개체로부터 수득한 골수 시료 내의

미세환경의 변화를 분석하는 것을 포함하는 급성 골수성 백혈병 재발의 예후 예측 방법을 제공한다. 골수의 미세환경의 변화는 골수 내의 기질 세포의 조성을 분석함으로써 확인할 수 있다.

[50] 본 발명에서 기질 세포(stromal cell)는 골수의 결합 조직(connective tissue) 세포를 의미하며, 미분화된 중간엽 기질 세포 primitive mesenchymal stromal cells; P-MSCs), 분화된 기질 세포(mesenchymal stromal cells; MSCs), 조골세포(muture osteoblastic cells; OB) 등을 포함한다.

[51] 한 구체예에서, 기질 세포의 조성의 분석은 개체로부터 수득한 골수 시료 내의, 미분화된 중간엽 기질 세포, 분화된 중간엽 기질 세포 및 조골세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 수준을 분석하는 것을 포함할 수 있다. 본 발명의 일 예에서, 미분화된 중간엽 기질 세포, 분화된 중간엽 기질세포 및 조골세포는 급성 골수성 백혈병 재발의 예후 예측용 마커로서 기능한다. 미분화된 중간엽 기질 세포, 분화된 중간엽 기질 세포 및 조골세포의 수준은 각각의 세포의 개수를 확인함으로써 분석할 수 있다. 기질 세포의 조성의 분석은 급성 골수성 백혈병 진단을 위한 골수 검사 시 수행되는 유세포 분석 등을 통하여 용이하게 분석할 수 있다.

[52] 본 발명의 일 예에서, 개체는 급성 골수성 백혈병 후보군으로, 백혈병 초기 진단을 위한 개체일 수 있다. 본 발명에 따르면, 초기의 급성 골수성 백혈병 진단 시, 추후의 재발의 예후까지 예측할 수 있는 이점이 있다.

[53] 한 구체예에서, 백혈병이 없는 개체로부터 수득한 골수 시료 내의 기질 세포의 조성과 비교하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 본 발명에서 백혈병이 없는 개체란 백혈병 기타 질환이 없는 정상 상태의 개체를 의미한다.

[54] 한 구체예에서, 백혈병이 없는 개체로부터 얻은 데이터와 급성 골수성 백혈병 후보군 데이터의 비교 결과, 후보군에서, 미분화된 중간엽 기질 세포 및 분화된 중간엽 기질 세포가 감소된 경우 급성 골수성 백혈병의 완전 관해의 지표일 수 있다. 본 발명에서 완전 관해란 최초 관해 판정 후, 5년 이상, 또는 5 년 내지 8년의 기간 동안 재발이 일어나지 않은 경우를 의미한다.

[55] 한 구체예에서, 미분화된 중간엽 전구세포의 증가는 급성 골수성 백혈병의 1년 이내의 조기 재발의 지표일 수 있다.

[56] 한 구체예에서, 분화된 중간엽 기질 세포 및/또는 조골세포의 증가는 급성 골수성 백혈병의 1년 초과의 만기 재발의 지표일 수 있다.

[57] 코호트 연구를 통해서, 백혈병 세포에 의한 기질의 리모델링이 급성 골수성 백혈병 재발의 예후와 관련이 있는지를 알아본 결과(실시예 4), 초기 진단 시 골수 내의 높은 수의 미분화된 중간엽 기질 세포는 조기 재발과 고도로 연관되고, 반면에 분화된 중간엽 기질 세포 또는 조골세포의 높은 수는 만기 재발과 연관됨을 확인할 수 있었다. 또한 미분화된 중간엽 기질 세포 및 분화된 중간엽 기질 세포의 감소는, 급성 골수성 백혈병의 완전 관해의 지표임을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 백혈병 초기 진단 시의 기질 미세환경 분석을 통하여,

급성 골수성 백혈병의 조기 및 만기 재발을 예측할 수 있음을 시사한다. 본 발명에 따르면, 백혈병 초기 진단 시 수행되는 골수 검사만으로도 용이하게 골수 내의 기질 세포의 조성을 분석하여, 급성 골수성 백혈병의 추후의 재발 가능성을 예측할 수 있다.

[58] 따라서, 본 발명은 급성 골수성 백혈병 재발 예후를 예측하기 위하여, 골수의 기질 세포의 조성을 분석하는 방법을 제공한다. 골수 기질 세포의 조성을 분석하는 방법은 상기 급성 골수성 백혈병 재발의 예후 예측을 위하여 정보를 제공하는 방법에서 기술한 내용이 모두 적용 또는 준용될 수 있다.

[59] 본 발명은 또한, 백혈병 세포가 골수의 기질에 영향을 주는 결과, 미분화된 중간엽 기질 세포, 분화된 중간엽 기질 세포 및 조골 세포의 수가 많을 때 급성 골수성 백혈병의 재발 가능성이 높음을 활용하여, 각종 중간엽 기질 세포와 백혈병 세포간의 상호작용의 억제를 통하여 급성 골수성 백혈병의 재발을 억제하는 방법 및 재발의 억제를 위하여 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[60] 본 발명은 또한, 후보 물질을 처리하고 상기 후보 물질이 백혈병 세포와 골수 기질 세포의 상호작용을 억제하는지 여부를 분석하는 것을 포함하는 급성 골수성 백혈병의 재발 억제제를 스크리닝하는 방법을 제공한다. 후보 물질을 처리한 경우가, 후보 물질을 처리하지 않은 대조군과 비교하여 백혈병 세포와 골수 기질 세포의 상호작용을 억제하는 경우, 상기 후보 물질은 급성 골수성 백혈병의 재발 억제제로 사용될 수 있다.

[61] 미분화된 중간엽 기질 세포가 증가하는 경우 급성 골수성 백혈병이 조기에 재발될 가능성이 높고, 분화된 중간엽 기질 세포 및/또는 조골세포가 증가하는 경우 만기에 재발될 가능성이 높으므로, 미분화된 중간엽 기질 세포, 분화된 중간엽 기질 세포 및 조골세포의 저해제로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 저해제를 급성 골수성 백혈병 재발의 예방 용도로 사용할 수 있다.

[62]

[63] 이하에서, 본 발명을 실시예를 통해 상세히 설명한다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[64] 이하의 실시예에서 모든 데이터는 통계 분석 시스템(Statistical Analysis System; SAS, 버젼 9.3; 미합중국 노스캐롤라이나주 캐리 소재 SAS Institute Inc.)을 사용하여 분석하였고 유의성의 수준을 $P<0.05$로 설정하였다.

[65]

[66] **[실시예 1] AML 환자의 BMs에서의 중간엽 세포의 변화 확인**

[67] 백혈병 환자의 골수 미세환경에의 잠재적 변화를 알아보기 위하여, 먼저 급성 골수성 백혈병(AML)으로 최초로 진단된 환자들의 전처리 없는 골수 기질 세포(Bone marrow stromal 세포)의 세포 조성을 분석하였다.

[68] 모든 실험에 있어서, 성모병원(St. Mary's hospital) 및 서울성모병원의 기관감사위원회(institutional review board)에 의한 연구의 승인에 따라 사전동의(informed consent)를 받은 후 전처리가 없는 급성 골수성 백혈병

환자들의 골수 샘플들을 수득하여 사용하였다. 피콜-파크 구배 원심분리(Ficoll-Paque gradient centrifugation)에 의하여 급성 골수성 백혈병 환자들의 골수 또는 백혈구분리반출 (leukapheresis) 샘플들로부터 경-밀도(light-density) 단핵세포들(mononuclear cells; MNCs)을 분리하고 그리고 분석을 위하여 동결 저장하였다. 산모들로부터의 탯줄 혈액 세포들 또는 정상 공여자들의 골수들을 사전동의 후 유사하게 수득하였다.

[69] 세포 조성 분석 결과, 중간엽 기질 세포(Mesenchymal stromal 세포; MSCs; CD45-31-235a-) 시험에서, 급성 골수성 백혈병 골수는 중간엽 전구세포(mesenchyaml progenitors; M-progenitors; CD45-31-235a-146+166-)의 상당한 손실이 나타났으나, 정상 골수에 비하여 성숙한 조골세포(osteoblastic cells; OBs; CD45-31-235a-146-166+)는 증가하였고(도 1a), 이는 중간엽의 분화(mesenchymal differentiation)가 바뀌었음을 나타낸다.

[70] 한편, 미분화된 중간엽 기질 세포는 골수 내에서 니치 세포(niche cell)를 포함하는 콜로니 형성 세포(colony forming cell; CFU-F)로 많이 발현되므로, 정상 및 백혈병 골수들에서의 중간엽 전구세포의 콜로니 형성 및 자기-재생(self-renewal)능을 검사하였다. CFU-F 형성을 위하여, BM MNCs를 14일 동안 플레이팅하였다(1x 10^6 세포/플레이트). 크리스탈 바이올렛으로 콜로니를 염색하거나 계대배양하였다. 콜로니를 형성하지 않은 BMs(no colony), 콜로니를 형성하였으나 2계대 내에서 성장 정지에 도달한 BMs(growth arrest) 및 3계대 이후 계속 증식한 BMs(normal growth)의 %를 도 1b에 나타내었다 (n= 51; AML, n=11; 정상 BM). 급성 골수성 백혈병 환자로부터의 골수 단핵 세포(MNCs)는 콜로니를 형성함에 있어서 빈번하게 실패(백혈병 골수와 정상 골수 각각에 대하여 13.7% 대 0%)하였고, 노화-연관 β-갈락토시다아제 활성(senescence-associated β-galactosidase activities)과 연관된 계대배양의 2계대(passages) 내에서의 가속된 성장 정지(growth arrest)는 정상 골수 보다 높은 빈도(급성 골수성 백혈병과 정상 각각에 대하여 33.3% 대 9.1%)로 나타났다(도 1b).

[71] 또한, FAB 분류에 따른 AML아형에 대한 중간엽 세포의 콜로니 형성능(도 1c) 및 증식능(도 1d)을 알아보았다.

[72] 그 결과, 급성 골수성 백혈병의 아형(subtypes)에 관계없이 급성 골수성 백혈병 환자에서 중간엽 기질 세포 기능의 변경이 관찰되었다(도 1c). 3계대 이후 성장을 나타낸 급성 골수성 백혈병-유도된 중간엽 기질 세포(AML-MSCs)에 대해서조차도, 60일의 계대 배양 동안에 보다 빈번한 증식의 감소가 관측되었다(도 1d).

[73] 자기 재생능 검사를 위하여, 3 명의 정상 공여자 또는 4 명의 AML 환자 (M1, M2, M5a, AML/골수이형성 아형 포함)로부터 얻은 배양-유도된 MSCs의 노화-연관 β-갈락토시다아제 활성을 분석하였다(정상; n=9, AML; n=12). 키트(미합중국 매사츄세츠 댄버 소재 셀시그널링사(세포 Signaling))를 이용하여,

매뉴얼에 따라 노화-연관 β-갈락토시다아제(SA-β-gal) 활성을 시험하였다. 이미지를 도 1c의 상단에 나타내고, 세 번 반복 실험 결과로부터의 평균±SEM 을 하단에 나타내었다. 도 1e에 도시한 바와 같이, β -갈락토시다아제 활성은 AML-MSC에서 더 높은 것으로 나타났다.

[74] 한편, 이러한 중간엽 세포의 변화가, AML의 관해 후에도 유지되는지 알아 보기 위하여, 초기 진단 시의 CFU-F와 관해 후의 CFU-F를 비교 분석하였다. 그 결과, 비록 급성 골수성 백혈병 골수에서의 콜로니 형성 세포들의 총 수가 연령이-일치하는(age-matched) 정상 골수들 보다 더 낮기는 하나, 급성 골수성 백혈병 환자가 완전한 관해(complete remission; CR)에 도달한 경우에는 이러한 차이는 더 이상 관찰되지 않았다(도 1f, 도 1g). 이는 급성 골수성 백혈병 골수에서 중간엽의 변경은 진행 중인 백혈병 유발 활성(leukemogenic activities)을 반영한다는 것을 의미한다.

[75] 위의 실험 결과로부터 확인한 중간엽의 변화를, 백혈병 아세포(leukemic blasts)가 직접적으로 야기하는 지를 알아보기 위하여, 중간엽 기질 세포들을 정상 $CD34^+$ 세포 또는 백혈병 $CD34^+$ 세포와 5일 동안 공동-배양하고, 조혈세포로부터 분리-정제하여, 분리-정제된 세포의 유전자 발현을 분석하였다. 중간엽 기질 세포들 내에서의 유전자 발현을 일루민 비드칩 어레이 혼성화 분석(Illumina BeadChip array hybridization analysis)으로 분석하였다. 6개의 발현 프로파일을 위하여, 중위 절대 편차(median absolute deviation; MAD)를 산출하고 평균연관(average linkage)을 갖는 계층적 군집화를 위하여 고도로 가변적인 유전자들(즉, 중위절대편차 상위 1000개의 유전자들)을 선택하였다. 백혈병 세포와 공동-배양한 중간엽 기질 세포의 전사 프로파일(transcrption profiles)을 정상 조혈 전구세포(hematopoietic progenitors)와 공동-배양한 중간엽 기질 세포들과 비교하였다(도 2a).

[76] 매우 가변적인 유전자들의 계층적 군집화(hierarchical clustering)는 정상 아세포 및 백혈병 아세포들과 공동-배양된 중간엽 기질 세포들을 명백하게 구별시켜(도 2b) 전사체들(transcriptomes)에서의 실질적인 차이를 나타내었다.

[77] 이들 전사체의 변화들과 연관되는 후보 분자의 기능들을 확인하기 위하여, 유전자 온톨로지(Gene Ontology; GO; MSigDB c5 범주들)로부터 기능적으로 연관된 유전자 세트들의 인리치먼트를 분석하는 GSEA(Gene Set Enrichment Analysis)을 수행하였다. 각 GO 범주에 대한 유전자들의 1000 순열에서 유의미한 정상 P값을 추산하였다. 다중 시험 조정(Multiple test adjustment)을 수행하여 유의미한(FDR < 0.1) GO 범주를 선택하였다. 전체적으로, 정상 $CD34^+$ 군에 비하여 백혈병 $CD34^+$로 공동-배양된 중간엽 기질 세포들에서 11 및 80 GO 범주들이 상향- 및 하향-조절된 유전자들의 유의미한(FDR < 0.1) 인리치먼트를 나타내었다(도 2c). 중요한 것은, 백혈병 조건 하에서 하향-조절된 G0 범주들 중에서, '세포-주기' 및 그의 연관된 기능들(예를 들면, '염색체' 및 'DNA 복제')에 대한 유전자들의 유의미한 인리치먼트가 관찰되었다. 이는 급성 골수성

백형병 환자들로부터의 중간엽 기질 세포들에서의 증식의 손실과 일치한다. 105 '세포 주기'-연관 유전자 세트들의 인리치먼트 플롯(enrichment plot)은 상위 20 리딩 에지(leading edge) 유전자들에 대하여 나타났다(도 2d 및 표 1). 이와는 대조적으로, 백혈병-배양된 중간엽 기질 세포에서 상향-조절된 G0 범주들 중에서, 2개의 사이토카인-연관된 G0 기능들이 관측되었다('케모카인 수용기 결합' 및 '케모카인 활성')(도 2c 및 도 2e).

[78] 이들 결과는 백혈병 세포들은 세포-주기 연관 유전자들의 현저한 억제 및 사이토카인-연관 유전자의 상향-조절을 수반하여 정상 조혈세포와는 명백히 상이한 전사체 리모델링(transcriptomic reprogramming)을 유도함을 나타낸다.

[79] [표 1] 백혈병 세포와 공동-배양된 MSC 에서 하향-조절된 상위 20 리딩 에지 유전자

유전자 기호	유전자 명칭
KNTC1	Kinetochore associate1
CENPA	Centromere protein A
RFC4	Replaication factor C subunit 4
PKMYT1	Protein kinase, membrane associated tyrosine/threonine 1
KIF2C	Kinesin family member 2C
PRC1	Protein regulator of cytokinesis 1
CCNA2	Cyclin A2
TTK	Dual specificity protein kinase TTK
CDKN3	Cyclin-dependent kinase inhibitor 3
MCM2	Minichromosome maintenance complex component 2
POLE2	Polymerase (DNA directed), epilon 2, accessory subunit
SUV39H1	Suppressor of variegation 3-9 homolog 1 (Drosophila)
UBE2C	Ubiquitin-conjugating enzyme E2C
AURKA	Aurora kinase A
MCM5	Minichromosome maintenance complex component 5
CDCA5	Cell division cycle associated 5
MPO	Myeloperoxidase
CDT1	Chromatin licensing and DNA replication factor 1
TOP2A	Topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa
CDC20	Cell division cycle 20

[80]

[81] **[실시예 2] 백혈병 니치의 정상 세포와 백혈병 세포에 대한 미세환경의 크로스-토크(cross-talk)의 재설정**

[82] 백혈병-유도된 중간엽 기질 세포들의 변경을 알아보기 위하여, 중간엽 기질 세포에서 크로스-토크 분자(cross-talk molecules)들의 발현 변화를 검사하였다. 정상 세포 및 백혈병 세포들과의 공동-배양 동안 니치에서 HSC 자기-재생을

자극하는 크로스-토크 분자인 jagged-1 및 CXCL-12(+)의 중간엽 발현을 검사하였다 (도 3a).

[83] 신선한 골수 기질 세포들(fresh bone marrow stromal cells)에 대한 분석을 위하여, 골수 단핵세포들을 중간엽 세포들 및 내피 세포들의 집단(subsets)에 대한 특정의 항체들로 염색하고 유세포 분석기로 분석하였다. 염소 항-jagged-1 항체(goat anti-Jagged-1 antibody; 미합중국 메릴랜드주 세인트루이스 소재 시그마-알드리치사(Sigma-Adrich))로의 염색 또는 마우스 항-CXCL12/SDF-1 항체(mouse anti-CXCL12/SDF-1 antibody; 미합중국 미네소타주 미네아폴리스 소재 알앤디시스템사(R&D system))로의 세포내 염색에 의하여 신선한 중간엽 기질 세포들 내에서의 jagged-1 또는 CXCL-12 발현의 유세포 분석을 수행하였다. 배양된 중간엽 기질 세포들에 대하여는, 토끼 항-jagged-1 항체(셀시그널링사)로의 세포내 염색에 의하여 jagged-1을 검출하였다. 면역조직화학법(immunohistochemistry)을 위하여, 골수 절편들을 탈파라핀화하고, 스프링크 에이치알피 검출 벌크 키트(SPlink HRP Detection Bulk Kit; 미합중국 워싱턴주 머컬티오 소재 골든 브릿지 인터내셔널사(Golden Bridge International))를 이용하여 면역조직화학 염색을 수행하였다. 골수 절편들 내의 상기 jagged-1 및 CXCL-12들을 각 분자의 세포내 도메인(intracellular domain)을 검출하는 토끼 항-jagged-1 항체(셀스테이닝사) 또는 마우스 항-CXCL12/SDF-1 항체(알앤디시스템사)로 검출하였다. 절편들은 3,3'디아미노벤지딘 기질(3,3'diaminobenzidine substrate) 및 헤마톡실린(hematoxylin)로의 대비염색(counterstain)에 의해 가시화하였다.

[84] 그 결과, 정상 조혈 전구세포들과의 공동-배양에 반응하여, 정상 중간엽 기질 세포들은 jagged-1(+) 세포들의 급격한 증가를 나타낸 반면에, 급성 골수성 백혈병-중간엽 기질 세포들은 이를 더 감소시켜 반대 방향에서의 급성 골수성 백혈병-중간엽 기질 세포들의 명백한 반응을 나타내었다(도 3b). 따라서, 급성 골수성 백혈병-중간엽 기질 세포들과 공동-배양된 정상 조혈 전구세포들이 정상 중간엽 기질 세포들과의 공동-배양에 비하여 하향-흐름 노치 신호(down-stream notch signals), Hes-1 또는 Hes-5의 유의미한 억제를 나타내었다(도 3c). 이와 대조적으로, 백혈병 아세포들과의 공동-배양 동안, 정상 중간엽 기질 세포들에서 jagged-1(+) 세포들이 증가하지 않았을 뿐만 아니라 급성 골수성 백혈병-중간엽 기질 세포들에서의 감소가 관측되지 않아(도 3d), 백혈병 아세포들 및 정상 조혈 전구세포들이 백혈병 미세환경 하에서 별개의 크로스-토크에 관여함을 나타내고 있다. 이와 유사하게, 정상 세포 또는 백혈병 세포들과 공동-배양하는 동안에, CXCL-12(+) 세포들에서의 중간엽 기질 세포들의 변화에 대하여 검사하였을 때, 급성 골수성 백혈병-중간엽 기질 세포들은 백혈병 세포들에 대하여 반응하여 선택적으로 CXCL-12(+) 세포의 뚜렷한 증가를 나타낸 반면에, 정상 조혈 세포들에 대한 공동-배양 동안에는 감소하였다(도 3e).

[85] 생체 내 백혈병 상태 하에서 이들 발견들을 더 탐색하기 위하여, 신선한,

비-배양된 중간엽 기질 세포들에서, 크로스-토크 분자들에 대한 AML 환자들의 BMs을 스크리닝하였다. AML BMs은 정상 골수들에 비하여 중간엽 기질 세포들 중에서도 jagged-1(+) 세포들의 %에서 뚜렷한 감소를 나타내었다(각각 정상 및 급성 골수성 백혈병에 대하여 5.4±1.0 대 0.5±0.2%)(도 3f). 유사하게, 중간엽 기질 세포들 중의 상기 CXCL-12(+) 세포들은 정상 골수들에 비하여 급성 골수성 백혈병 골수들 중에서 유의미하게 증가하여(각각 정상 및 급성 골수성 백혈병에 대하여 42.0±5.2 대 69.9±2.8%)(도 3g), 시험관 모델로부터 관측된 크로스-토크들의 변화를 재현하였다. 흥미롭게도, 초기 진단 시에 관측된 이들 변화들, 즉 jagged-1(+)의 감소 또는 CXCL-12(+) 중간엽 기질 세포들의 증가는 동일한 환자들의 골수들이 완전한 관해에 도달한 후에 분석한 경우에는 역전되었다(도 3h). 이는 백혈병 세포들이 백혈병 진행의 고유한 부분으로서 니치 크로스-토크의 리모델링(remodeling)을 야기함을 의미한다.

[86]

[87] **[실시예 3] 정상 HSC에 대하여 변형된 미세환경의 기능적 영향(Functional impact of altered microenvironment to normal HSC)**

[88] AML에서 중간엽 기질 세포의 변형된 미세환경이 HSC의 기능에 미치는 영향을 알아보았다. 이를 위하여, 백혈병 중간엽 기질 세포들을 정상 또는 급성 골수성 백혈병-중간엽 기질 세포들과 공동-배양하여, 백혈병 중간엽 기질 세포들이 정상 조혈 기능 또는 백혈병성 기능에 대하여 미치는 영향을 분석하였다.

[89] 공동-배양 24시간 이전에 중간엽 기질 세포들을 방사능처리(1500 센티그레이(cGy))하였다. 그리고 100ng/㎖ 인간 SCF, 100ng/㎖ 인간 Flt3L 및 20ng/㎖ 인간 IL-3, IL-6, 및 G-CSF(이스라엘 르호봇 소재 프로스펙-타니테크노진 리미티드(ProSpec-Tany TechnoGene Ltd))로 이루어지는 사이토카인 혼합물의 존재 하에서, 장기간 배양-개시 세포 배지(LTC-IC media; 캐나다 밴쿠버 소재 스템셀테크놀로지사(Stem 세포 Technology) H5100) 내에서, 상기 중간엽 기질 세포들을 정상 또는 백혈병 $CD34^+$ 세포들과 5일 동안 공동-배양하였다.

[90] 제대혈로부터의 정상 $CD34^+$ 세포를 무-기질 조건(stroma-free conditions; SF), 2명의 정상 공여자 유래의 MSCs 상에서의 공동-배양(#1, #2) 또는 4 명의 AML 환자 유래의 백혈병 MSCs 조건 하에서 5일 동안 배양하고 $CD34^+$ 세포의 총 증가량을 분석하였다(3회 반복 실험, 각 군당 n= 7). (*;$p<0.05$)

[91] 그 결과, 도 4a에 도시한 바와 같이, 정상 MSCs 상에서 공동-배양한 경우, $CD34^+$ 세포들의 유의미한 생체-외 증가가 관찰되었으나, AML-MSCs 상에서 공동-배양한 경우에는 이러한 증가가 관찰되지 않았다.

[92] 각 군의 MSCs 상에서 공동-배양된 정상 $CD34^+$ 세포를 방사선 처리된 (250rad) NSG 마우스에 이식하였다 ($1X10^4$의 $CD34^+$ 세포/마우스). 이식 8 주 후, 인간 조혈 세포 ($hCD45^+$)의 생착 여부를 알아보기 위하여 BM 세포를 분석하였다. NOD/SCID-γnull(NSG) 마우스를 잭슨 라보레토리(Jackson Laboratory; 미합중국

메인주 바하버 소재)로부터 구입하고, 여과된 개체 환기 케이지(filtered individual ventilation cage) 내에서 보관하였다. 재분포 분석을 위하여, 마우스(7 내지 10주령)들을 방사선 처리하고(250 센티그레이), 조혈 세포들을 정맥 내로 주사하였다. 이식 8주 후, 염색에 의하여 유세포분석기로 인간 세포 생착(engraftment)을 분석하였다.

[93] 그 결과, 도 4b의 왼쪽 그래프에서, 총 시험 마우스 중에서 양성 반응 (1% 보다 높은 경우)을 보인 마우스의 수를 괄호 안에 나타내었다. 정상 및 백혈병 MSC 군에서 평균 인간 세포 생착 수준을 도 4b의 오른쪽에 나타내었다(*$p<0.05$). 그 결과, NSG 마우스들 내로 이식한 경우, AML-MSCs 상에서 공동-배양된 정상 조혈 전구세포들은 정상 MSCs 상에서 배양된 세포들에 비하여 낮은 수준의 재분포 활성(repopulating activities)을 나타내었다(도 4b).

[94] 장-기간 배양-개시 세포분석(long-term culture-initiating cell(LTC-IC) assay)에 의하여 원시 조혈 세포 집단의 유지에 대한 분석을 위하여, 각각의 MSCs와 공동-배양된 정상 $CD34^+$ 세포를 6주 동안 장-기간 배양한 후, 콜로니 형성을 위하여 반-고체 배지에 플레이팅하였다. 장-기간 배양 후, 400 인풋 $CD34^+$ 유래 콜로니의 수를 분석한 결과(4회 실험, 각 군당 n=4), AML-MSCs 상에서 공동-배양된 $CD34^+$ 세포들에서 장-기간 배양-개시 세포들의 엄청난 손실이 나타났다(도 4c). 반면에, 정상 MSCs 군에서는 손실이 나타나지 않았다. 이는, AML-MSCs가 정상 조혈 작용에 억제 효과를 발휘하고, 원시 조혈 세포는 백혈병 중간엽 기질 세포들의 악영향에 현저하게 영향을 받음을 의미한다.

[95] 3일 동안, 무-기질 조건(stroma-free condition; SF) 하에서 AML 아세포 (M1, M3, HL-60)를 배양하거나, 정상 또는 AML-MSCs (M2, M5a)과 공동-배양하고, 백혈병 세포($CD45^+$)의 수를 분석하였다(3회 실험, 각 군당 n=5-6). 또한, 각 군의 MSCs와 공동-배양된 백혈병 세포 (HL-60)를 방사선 처리한 NSG 마우스에 이식하였다. 이식 6주 후, 말초 혈액(peripheral blood; PB) 및 BMs에서, 백혈병 세포의 생착 ($hCD45^+$)을 분석하였다 (각 군당 n= 6).

[96] 그 결과, 장-기간 배양 개시 세포 분석과는 달리, 인 비트로 증식 또는 생체 내 백혈병유발(leukemogenesis)에 있어서는 아무런 차이가 나타나지 않았다(도 4d, 도 4e). 이는, 상기 백혈병 세포들이 백혈병 니치들의 악영향에 대하여 저항성이 있음을 시사한다.

[97] 또한, 형광 및 파이로닌(Hoescht and pyronin)으로 염색하는 것에 의하여 각 군의 MSCs와 공동-배양된 백혈병 세포 (HL-60)의 세포 주기를 분석하고 G_0기의 % 세포 집단을 분석하였다 (2회 실험, SF; n=2, 공동-배양군; n=5-6).

[98] 각 군의 MSCs와 2일간 공동-배양 하는 동안, 백혈병 세포 (HL-60)를 Ara-C (2uM)로 처리하고, 백혈병 세포 ($CD45^+$) 중에서, 세포 사멸(apoptosis; AnnexinV+PI-) 과정에 있는 세포를 유세포 분석기로 분석하였다(3회 실험, SF; n=3, 공동-배양 군; n=5-6).

[99] 그 결과, 상기 급성 골수성 백혈병-중간엽 기질 세포들에의 공동-배양이 정상

중간엽 기질 세포들에의 공동-배양 보다 높은 비율의 백혈병 세포들을 정지상태로 이끌고 그리고 Ara-C 처리에 의하여 유도되는 세포사멸(apoptosis)에 더 높은 저항성을 부여하였다(도 4f, 도 4g). 동시에, 이들 결과들은 백혈병 미세환경이 정상 조혈 세포들을 선택적으로 억제하나, 백혈병 세포들의 백혈병 활성 및 화학요법-저항성(chemo-resistance)을 지지하는 방식으로 정상 세포 및 백혈병 세포들에 뚜렷한 영향을 발휘함을 나타낸다.

[100]

[101] **[실시예 4] 백혈병 환자의 예후 마커로서 니치의 리모델링(Remodeling of niche as a prognostic parameter in leukemia patients)**

[102] 정상 조혈 작용 및 백혈병 유발 활성들에 대한 기질 리모델링(stromal remodeling)의 기능상 영향을 발견하고, 이러한 기질 리모델링에서의 차이가 급성 골수성 백혈병 환자들의 임상과정에서의 이질성(heterogeneity)에 대하여 기여할 수 있다는 가설을 세웠다. 그 가능성을 시험하기 위하여, 급성 골수성 백혈병의 초기 진단에서의 골수 기질 변화들과 관해 후 5 내지 8년 동안의 이들의 후속하는 임상과정들 사이의 상관관계를 조사하는 코호트 연구(cohort study)를 설계하였다. 코호트 연구를 위하여, 완전 관해 후 5 내지 8년 동안의 완전한 추적 데이터를 갖는 급성 골수성 백혈병 환자들의 원시 골수 샘플들을 수집하였다(표 2). 관해 후 5 내지 8년 동안 완전한 관해를 유지한 급성 골수성 백혈병 환자군(CR, n=29), 그 후 재발된 급성 골수성 백혈병 환자군(relapse; R; n=14) 및 화학요법에 대하여 난치반응을 나타내는 급성 골수성 백혈병 환자군(refractory; Rf; n=5)에 대한 정상 공여자(normal donors; Nr; n=12)들로부터의 BM과 함께 기질 세포 조성을 검사하였다.

[103] [표 2] 코호트 연구에서 선택된 AML 환자 리스트

No.	성별	나이	타입	예후	No.	성별	나이	타입	예후
#1	F	48	M0	CR	#25	M	39	M3	CR
#2	F	65	M0	CR	#26	M	19	M3	CR
#3	F	23	M1	CR	#27	F	40	M3	CR
#4	M	38	M1	CR	#28	M	68	M3	CR
#5	M	43	M1	CR	#29	M	20	M4	CR
#6	F	50	M1	CR	#30	F	48	M1	재발
#7	F	20	M1	CR	#31	M	62	M1	재발
#8	M	36	M1	CR	#32	M	57	M1	재발
#9	F	47	M1	CR	#33	F	48	M1	재발
#10	F	52	M1	CR	#34	F	16	M1	재발
#11	F	17	M2	CR	#35	M	35	M2	재발
#12	M	51	M2	CR	#36	M	36	M2	재발
#13	F	23	M2	CR	#37	F	42	M2	재발
#14	M	43	M2	CR	#38	F	48	M2	재발
#15	M	35	M2	CR	#39	F	17	M2	재발
#16	M	33	M2	CR	#40	M	51	M4	재발
#17	M	34	M2	CR	#41	F	21	M5	재발
#18	M	29	M2	CR	#42	M	38	M5a	재발
#19	F	18	M2	CR	#43	M	52	M5b	재발
#20	F	32	M2	CR	#44	M	55	M1	난치
#21	M	56	M2	CR	#45	M	68	M2	난치
#22	F	60	M2	CR	#46	F	39	M4	난치
#23	M	37	M3	CR	#47	M	56	M5	난치
#24	M	42	M3	CR	#48	M	36	MLD	난치

[104]

[105] 비록 과도한 이질성이 급성 골수성 백혈병 환자들에서 관측되기는 하였으나, 골수의 기질 성분들에서 유의미한 차이점들이 발견되었다. 즉, 골수 내의 미분화 중간엽 기질 세포들 (CD45-31-235a-146+166-; P-MSCs) 및 콜로니 형성 세포들은 완전히 관해된 정상 골수들 보다 더 낮은 반면에, 분화된 중간엽 기질 세포들(MSCs; CD45-31-235a-) 및 조골세포들 (CD146+31-235a-146-166+; OB)은 완전 관해군 보다 재발군에서 더 높았다(도 5a). 그러나, 상기 환자군 중에서 내피 세포(EC; CD45-31-235a-31+) 함량에서는 유의미한 차이가 없었다.

[106] 따라서, 관해된 급성 골수성 백혈병 환자들의 재발의 예측을 위하여, 기질 패턴들에서의 이들 차이점들이 이러한 고-위험 환자들을 동정하는 데 사용할 수 있는지 여부를 알아보기로 하였다. 이를 위하여, ROC (receiver operating

characteristic) 곡선 및 그에 의하여 측정되는 '곡선하면적(area under the curve; AUC)'을 적용하는 것에 의하여 각 기질 성분에 대한 재발의 예측가능성(predictability)을 분석하였다.

[107] 그 결과, 도 5b에 도시한 바와 같이, 분화된 중간엽 기질 세포들(0.78±0.07)에 의하거나, 미분화 중간엽 기질 세포들(0.72±0.09)에 의하거나 또는 조골세포들(0.7±0.09)에 의한 전체 재발 군의 예측을 위한 AUC 값은 EC(0.63±0.09) 콜로니 형성 세포(0.68±0/09)에 의한 것보다 더 높았다(도 5b). 중요한 것은, 재발에 대한 예측은 조기(1년 이내; n=10) 및 만기(1년 초과; n=4) 재발을 개별적으로 분석하는 경우에 보다 더 유의미하게 되었다. 골수에서 미분화된 중간엽 기질 세포들의 높은 수는 조기 재발(1년 이내)의 높은 예측가능성을 나타내며(AUC = 0.8± 0.08)(도 5b 및 도 5d), 이는 관해 후 6개월 이내의 재발에 대하여 훨씬 유의미하였다(AUC = 0.88±0.06)(도 5c).

[108] 이와는 대조적으로, 만기 재발(1년 초과)의 환자들에 대하여 놀라운 차이가 나타났으며, 즉, 만기 재발에 대하여 높은 예측가능성을 갖는 완전 관해에 비하여 만기 재발 군에서 분화된 중간엽 기질 세포들 또는 조골세포들의 유의미하게 높은 수들이 관측되었다(각각 분화된 중간엽 기질 세포에 대하여는 AUC = 0.91±0.06, 조골세포에 대하여는 AUC = 0.88±0.08)(도 5c).

[109]

[110] 이들 결과를 종합하여, 도 6에 모식도로 나타내었다. 요약하면, 골수 내의 높은 수의 미분화된 중간엽 기질 세포는 조기 재발과 고도로 연관되고, 반면에 분화된 중간엽 기질 세포 또는 조골세포의 높은 수는 만기 재발과 연관된다. 즉, 급성 골수성 백혈병의 조기 및 만기 재발은 기질의 미세환경과 분명하게 연관되는 것이다(도 6).

[111] 따라서, 급성 골수성 백혈병의 임상과정에서의 이질성에 대한 파라미터는 급성 골수성 백혈병 환자의 임상과정의 예측을 위한 잠재적인 바이오마커(biomarker)로서 기능할 수 있고, 초기 진단에서 급성 골수성 백혈병 환자들의 골수에서의 기질 변화가, 이러한 급성 골수성 백혈병의 임상과정에서의 이질성에 대한 파라미터가 될 수 있음을 시사한다.

청구범위

[청구항 1] 개체로부터 수득한 골수 시료 내의 기질 세포의 조성을 분석하는 것을 포함하는 급성 골수성 백혈병 재발의 예후 예측을 위하여 정보를 제공하는 방법.

[청구항 2] 제1항에 있어서, 기질 세포의 조성의 분석은 개체로부터 수득한 골수 시료 내의, 미분화된 중간엽 기질 세포, 분화된 중간엽 기질 세포 및 조골세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 수준을 분석하는 것을 포함하는 급성 골수성 백혈병 재발의 예후 예측을 위하여 정보를 제공하는 방법.

[청구항 3] 제1항에 있어서, 개체는 급성 골수성 백혈병 후보군으로, 백혈병 초기 진단을 위한 개체인 급성 골수성 백혈병 재발의 예후 예측을 위하여 정보를 제공하는 방법.

[청구항 4] 제1항에 있어서, 백혈병이 없는 개체로부터 수득한 골수 시료 내의 기질 세포의 조성과 비교하는 것을 추가로 포함하는 급성 골수성 백혈병 재발의 예후 예측을 위하여 정보를 제공하는 방법.

[청구항 5] 제2항에 있어서, 미분화된 중간엽 기질 세포 및 분화된 중간엽 기질 세포의 감소는 급성 골수성 백혈병의 완전 관해의 지표인 급성 골수성 백혈병 재발의 예후 예측을 위하여 정보를 제공하는 방법.

[청구항 6] 제2항에 있어서, 미분화된 중간엽 기질 세포의 증가는 급성 골수성 백혈병의 1년 이내의 조기 재발의 지표인 급성 골수성 백혈병 재발의 예후 예측을 위하여 정보를 제공하는 방법.

[청구항 7] 제2항에 있어서, 분화된 중간엽 기질 세포 및/또는 조골세포의 증가는 급성 골수성 백혈병의 1년 초과의 만기 재발의 지표인 급성 골수성 백혈병 재발의 예후 예측을 위하여 정보를 제공하는 방법.

[청구항 8] 개체로부터 수득한 골수 시료 내의 기질 세포의 조성을 분석하는 것을 포함하는 급성 골수성 백혈병 재발의 예후를 예측하는 방법.

[청구항 9] 제8항에 있어서, 기질 세포의 조성의 분석은 개체로부터 수득한 골수 시료 내의, 미분화된 중간엽 기질 세포, 분화된 중간엽 기질 세포 및 조골세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 수준을 분석하는 것을 포함하는 급성 골수성 백혈병 재발의 예후를 예측하는 방법.

[청구항 10] 제8항에 있어서, 개체는 급성 골수성 백혈병 후보군으로, 백혈병 초기 진단을 위한 개체인 급성 골수성 백혈병 재발의 예후를 예측하는 방법.

[청구항 11] 제8항에 있어서, 백혈병이 없는 개체로부터 수득한 골수 시료 내의 기질 세포의 조성과 비교하는 것을 추가로 포함하는 급성 골수성

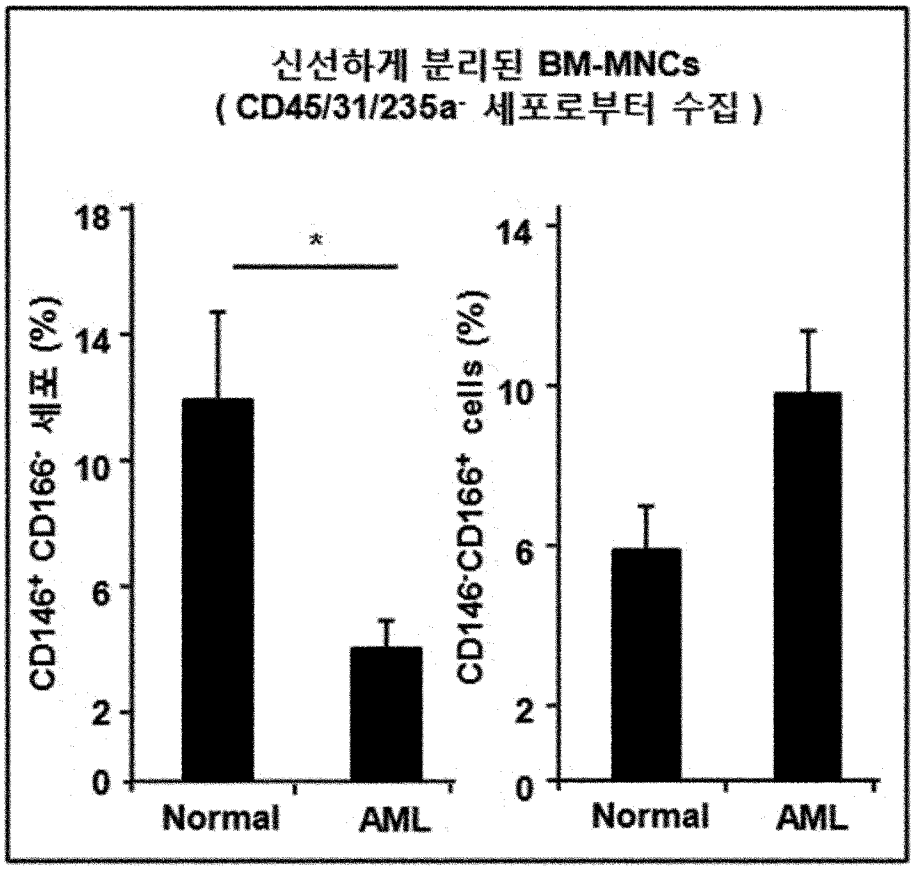
백혈병 재발의 예후를 예측하는 방법.

[청구항 12] 제9항에 있어서, 미분화된 중간엽 기질 세포 및 분화된 중간엽 기질 세포의 감소는 급성 골수성 백혈병의 완전 관해의 지표인 급성 골수성 백혈병 재발의 예후를 예측하는 방법.

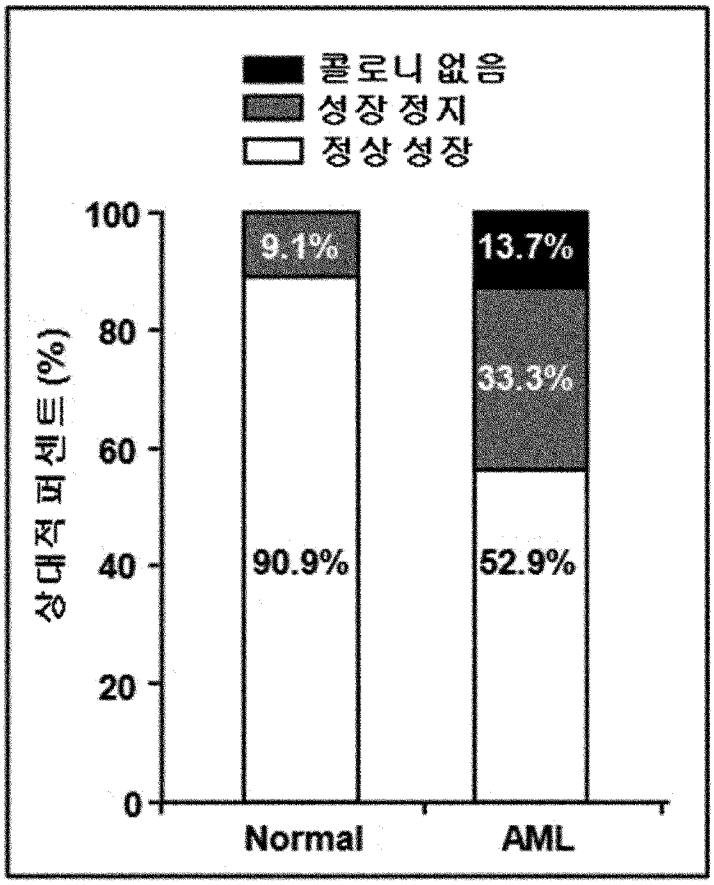
[청구항 13] 제9항에 있어서, 미분화된 중간엽 기질 세포의 증가는 급성 골수성 백혈병의 1년 이내의 조기 재발의 지표인 급성 골수성 백혈병 재발의 예후를 예측하는 방법.

[청구항 14] 제9항에 있어서, 분화된 중간엽 기질 세포 및/또는 조골세포의 증가는 급성 골수성 백혈병의 1년 초과의 만기 재발의 지표인 급성 골수성 백혈병 재발의 예후를 예측하는 방법.

[Fig. 1a]


신선하게 분리된 BM-MNCs
(CD45/31/235a- 세포로부터 수집)
CD146+ CD166- 세포 (%)
CD146-CD166+ cells (%)
*
18
14
10
6
2
0
Normal
AML

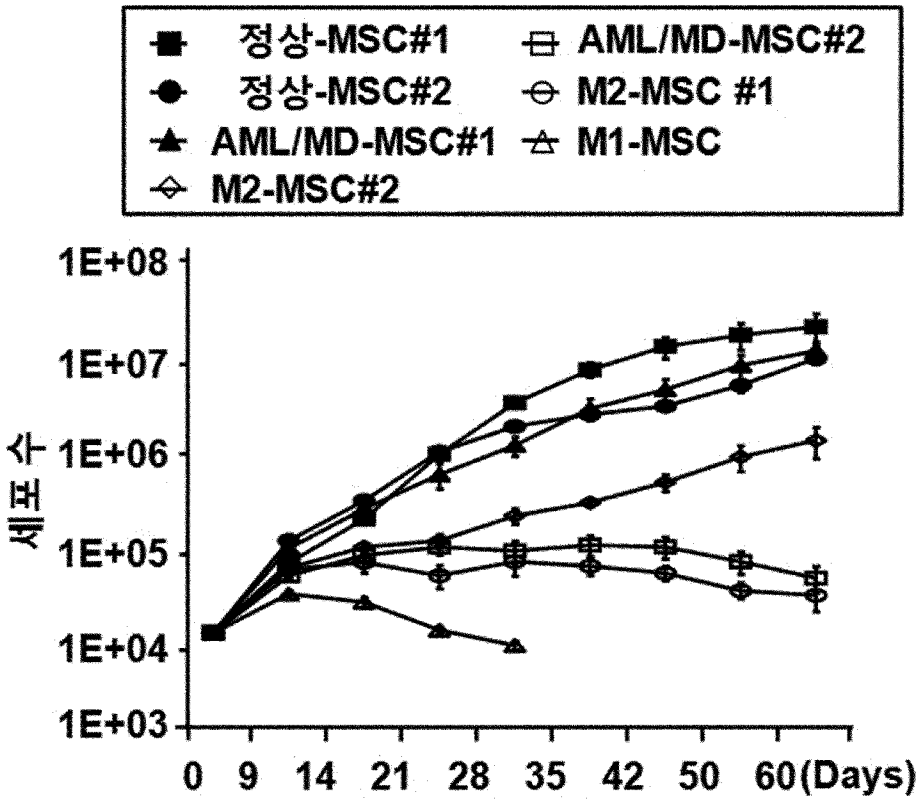
[Fig. 1b]


콜로니 없음
성장 정지
정상 성장
상대적 퍼센트 (%)
100
80
60
40
20
0
9.1%
90.9%
13.7%
33.3%
52.9%
Normal
AML

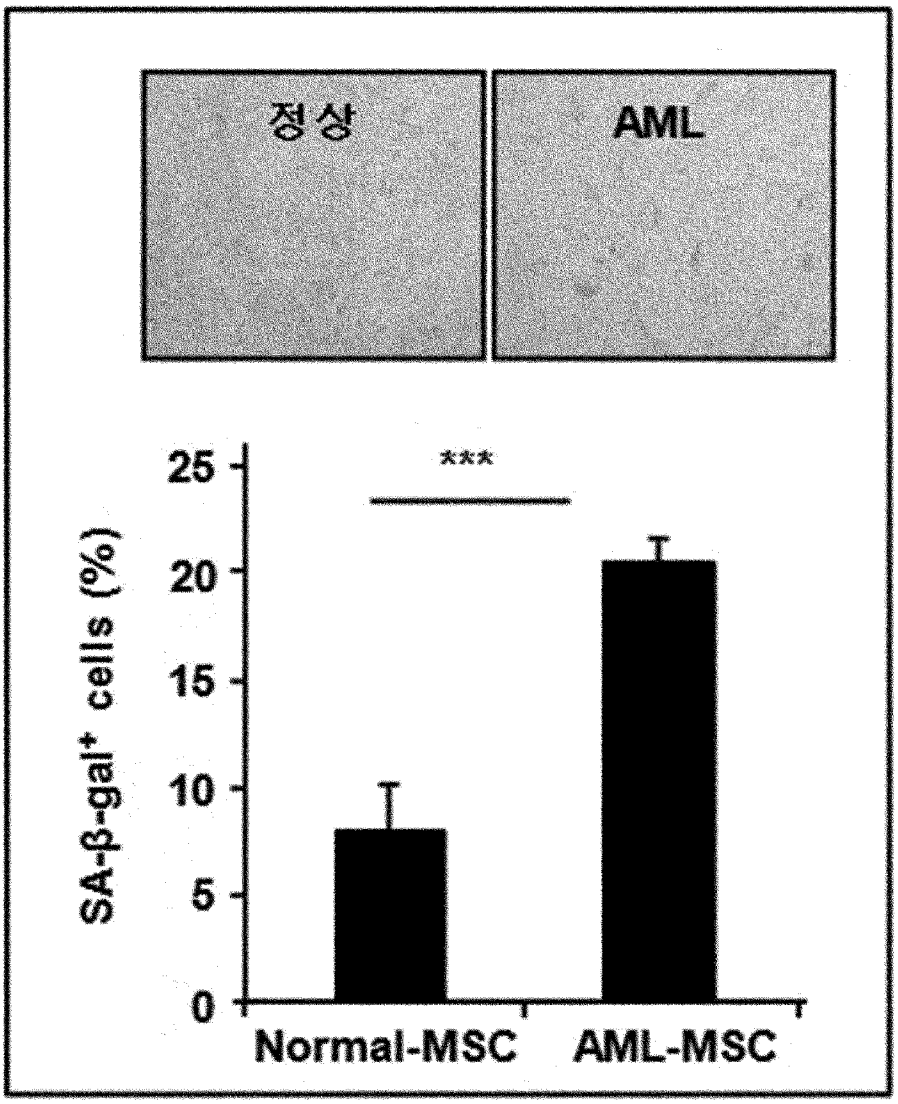
[Fig. 1c]

	No. Test	정상 성장	성장 증지	콜로니 형성 없음
정상I	11	10/11 (90.9%)	1/11 (9.1%)	0/11 (0.0%)
AML (M1)	13	9/13 (69.2%)	1/13 (7.7%)	3/13 (23.1%)
AML (M2)	14	8/14 (57.1%)	4/14 (28.6%)	2/14 (14.3%)
AML (M3)	9	0/9 (0.0%)	8/9 (88.9%)	1/9 (11.1%)
AML (M4)	2	1/2 (50.0%)	1/2 (50.0%)	0/2 (0.0%)
AML (M5)	5	4/5 (80.0%)	1/5 (20.0%)	0/5 (0.0%)
AML (M7)	1	0/1 (0.0%)	0/1 (0.0%)	1/1 (100.0%)
AML/MD	7	5/7 (71.4%)	2/7 (28.6%)	0/7 (0.0%)

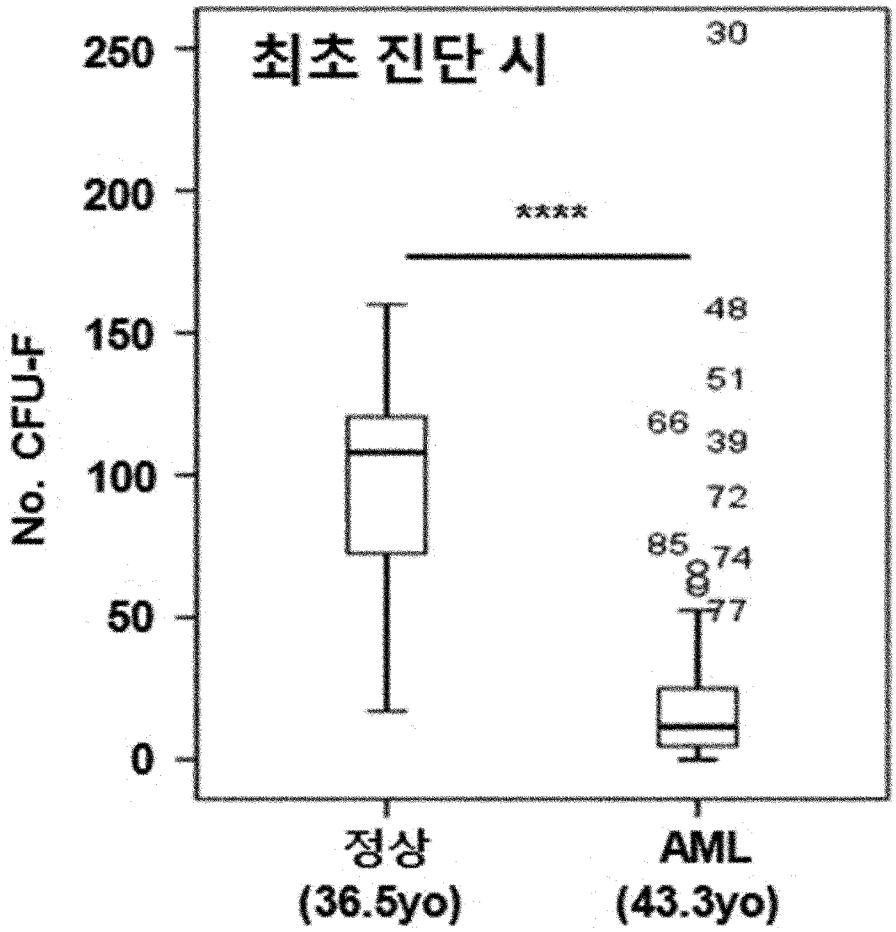
[Fig. 1d]



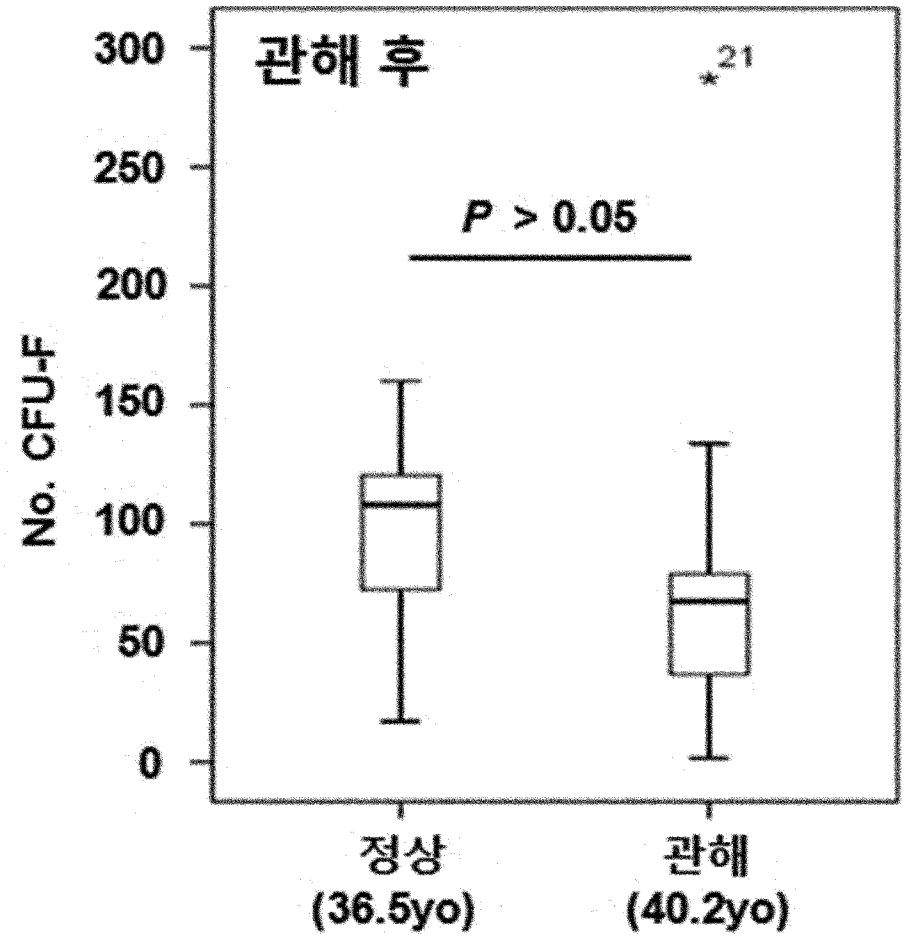
[Fig. 1e]



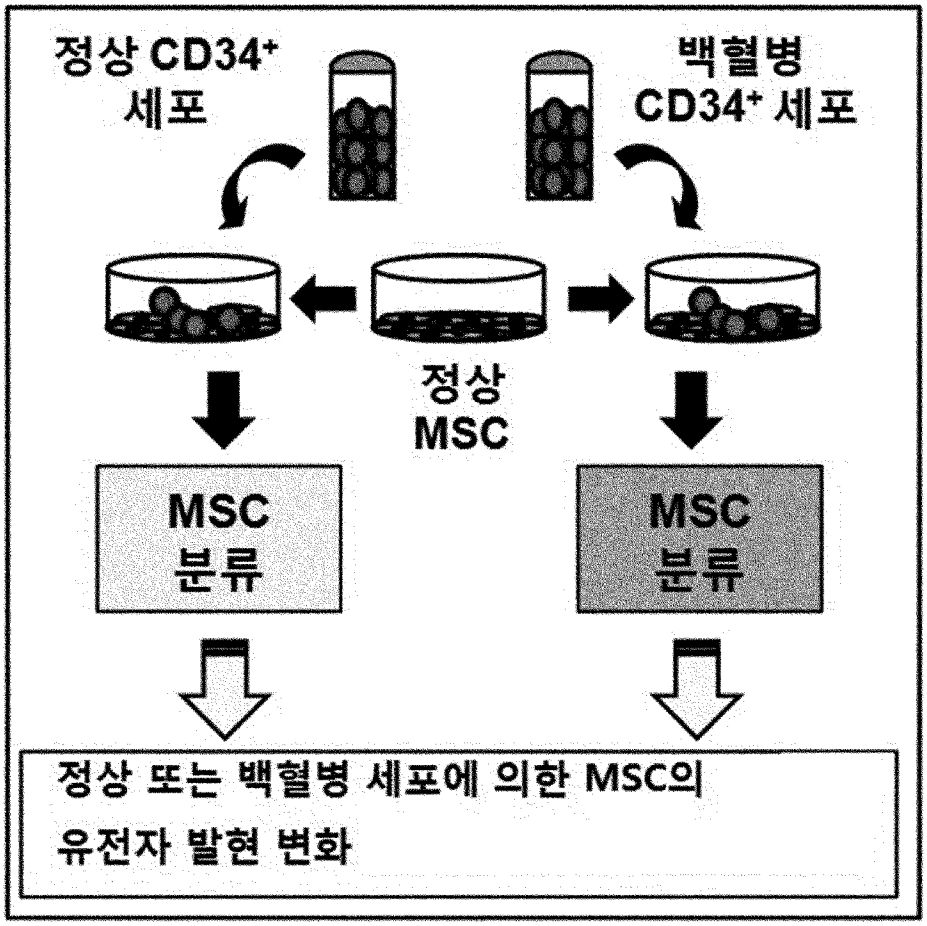
[Fig. 1f]


최초 진단 시
No. CFU-F
250
200
150
100
50
0
****
30
48
51
66
39
72
85
74
77
정상
(36.5yo)
AML
(43.3yo)

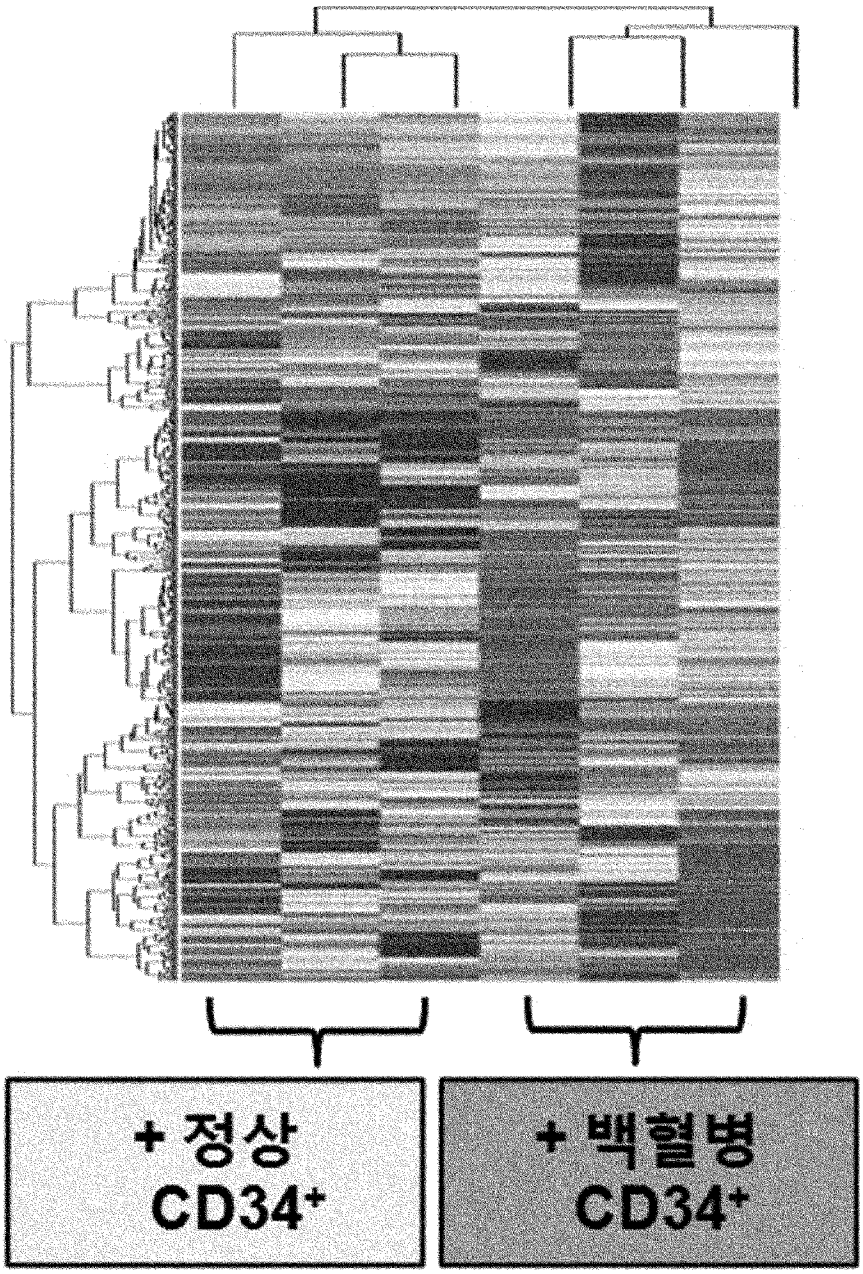
[Fig. 1g]


관해 후
No. CFU-F
300
250
200
150
100
50
0
21
P > 0.05
정상
(36.5yo)
관해
(40.2yo)

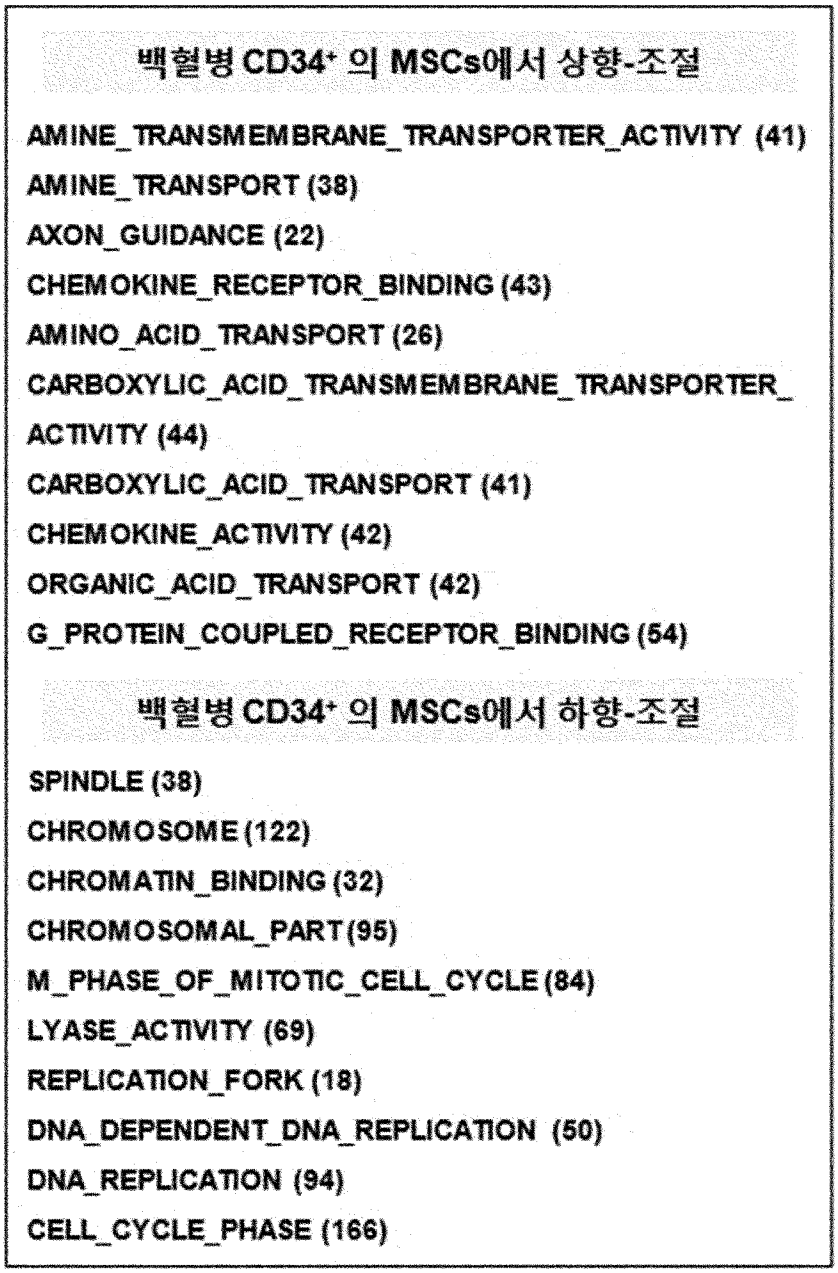
[Fig. 2a]


정상 CD34+ 세포
백혈병 CD34+ 세포
정상 MSC
MSC 분류
MSC 분류
정상 또는 백혈병 세포에 의한 MSC의 유전자 발현 변화

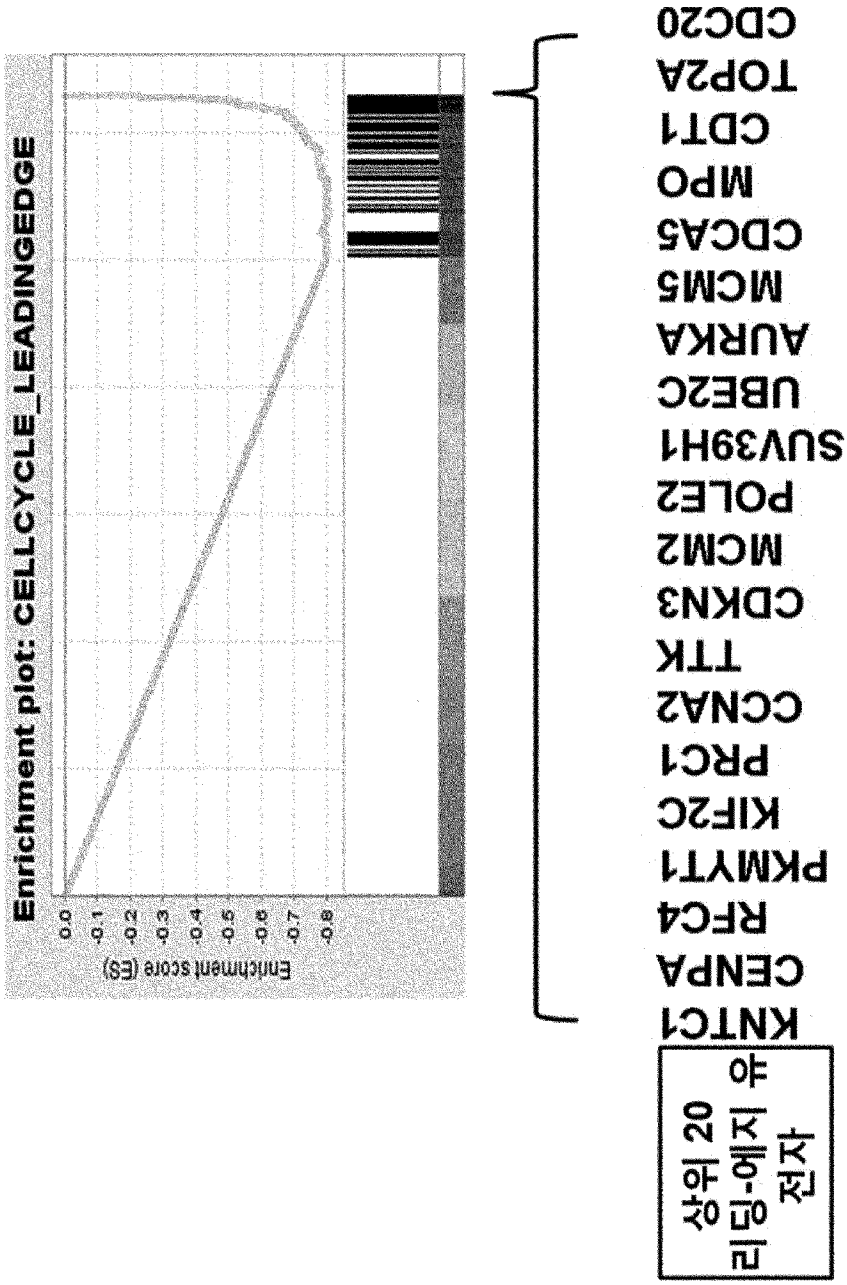
[Fig. 2b]



[Fig. 2c]

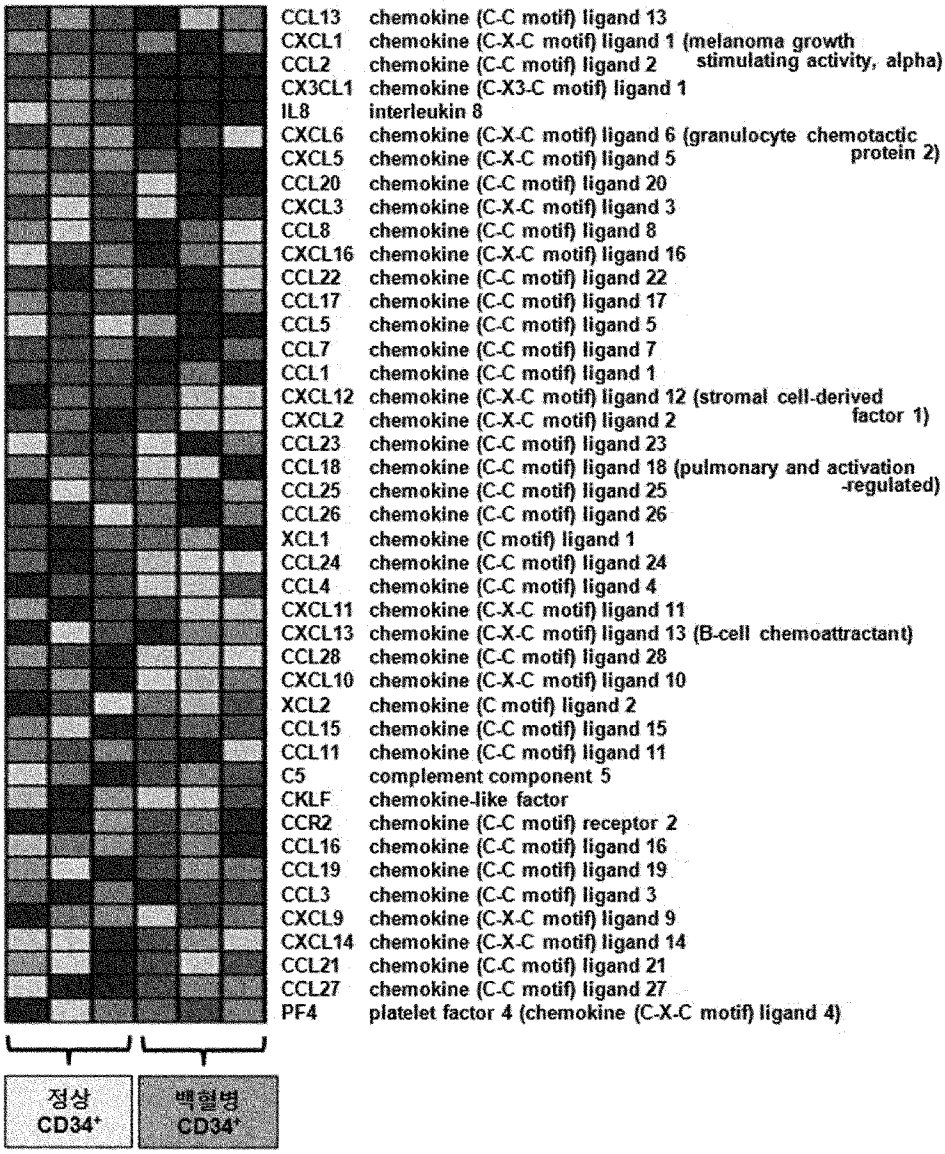

백혈병 CD34+ 의 MSCs에서 상향-조절
AMINE_TRANSMEMBRANE_TRANSPORTER_ACTIVITY (41)
AMINE_TRANSPORT (38)
AXON_GUIDANCE (22)
CHEMOKINE_RECEPTOR_BINDING (43)
AMINO_ACID_TRANSPORT (26)
CARBOXYLIC_ACID_TRANSMEMBRANE_TRANSPORTER_ ACTIVITY (44)
CARBOXYLIC_ACID_TRANSPORT (41)
CHEMOKINE_ACTIVITY (42)
ORGANIC_ACID_TRANSPORT (42)
G_PROTEIN_COUPLED_RECEPTOR_BINDING (54)
백혈병 CD34+ 의 MSCs에서 하향-조절
SPINDLE (38)
CHROMOSOME (122)
CHROMATIN_BINDING (32)
CHROMOSOMAL_PART (95)
M_PHASE_OF_MITOTIC_CELL_CYCLE (84)
LYASE_ACTIVITY (69)
REPLICATION_FORK (18)
DNA_DEPENDENT_DNA_REPLICATION (50)
DNA_REPLICATION (94)
CELL_CYCLE_PHASE (166)

[Fig. 2d]

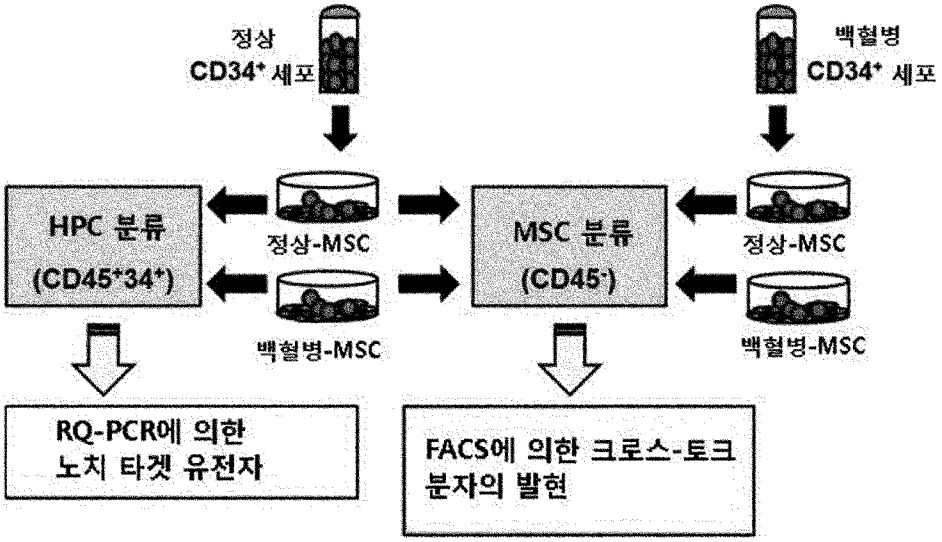

Enrichment plot: CELLCYCLE_LEADINGEDGE
Enrichment score (ES)
0.0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
0.7
0.8
KNTC1
CENPA
RFC4
PKMYT1
KIF2C
PRC1
CCNA2
TTK
CDKN3
MCM2
POLE2
SUV39H1
UBE2C
AURKA
MCM5
CDCA5
MPO
CDT1
TOP2A
CDC20
상위 20 리딩-에지 전자
야

[Fig. 2e]

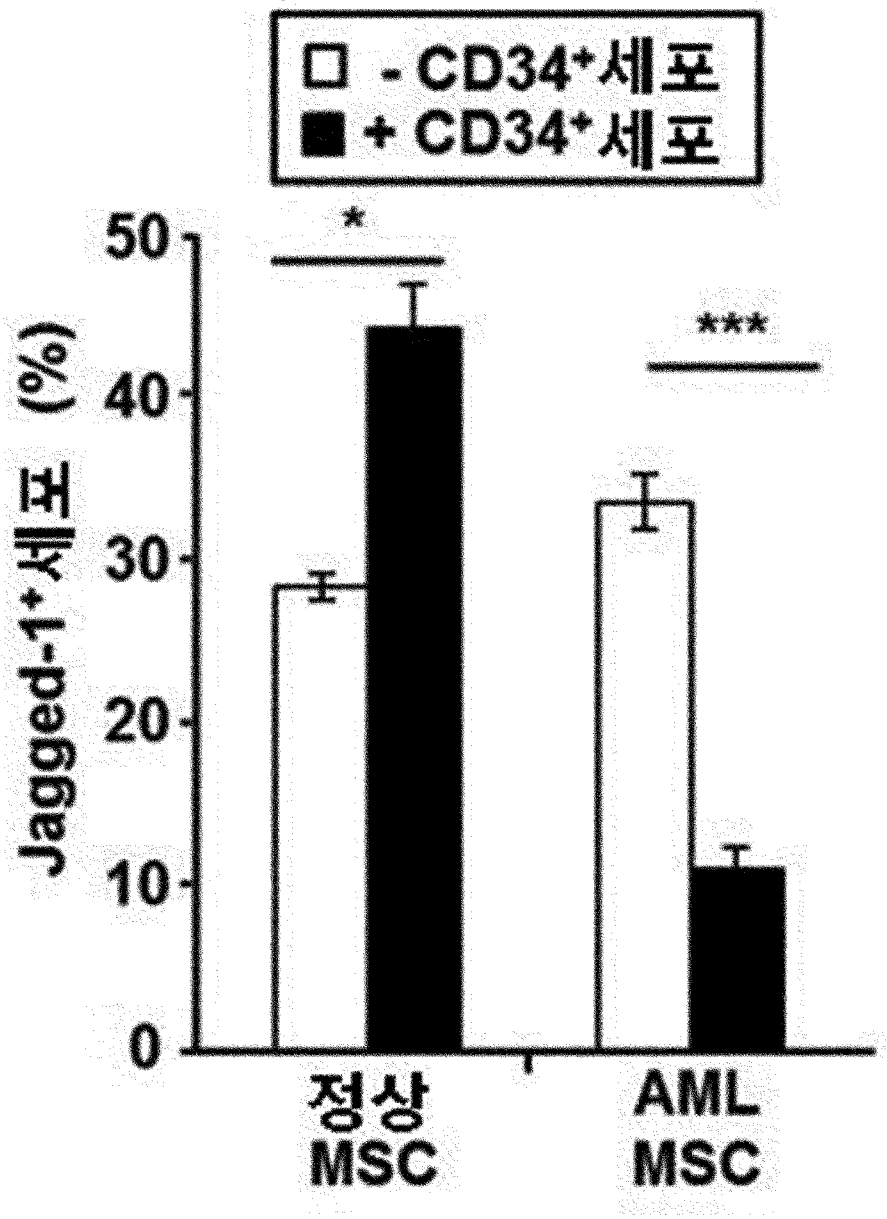
백혈병 CD34⁺ 세포와 공동-배양된 MSC 에서 상향-조절된 분비 유전자



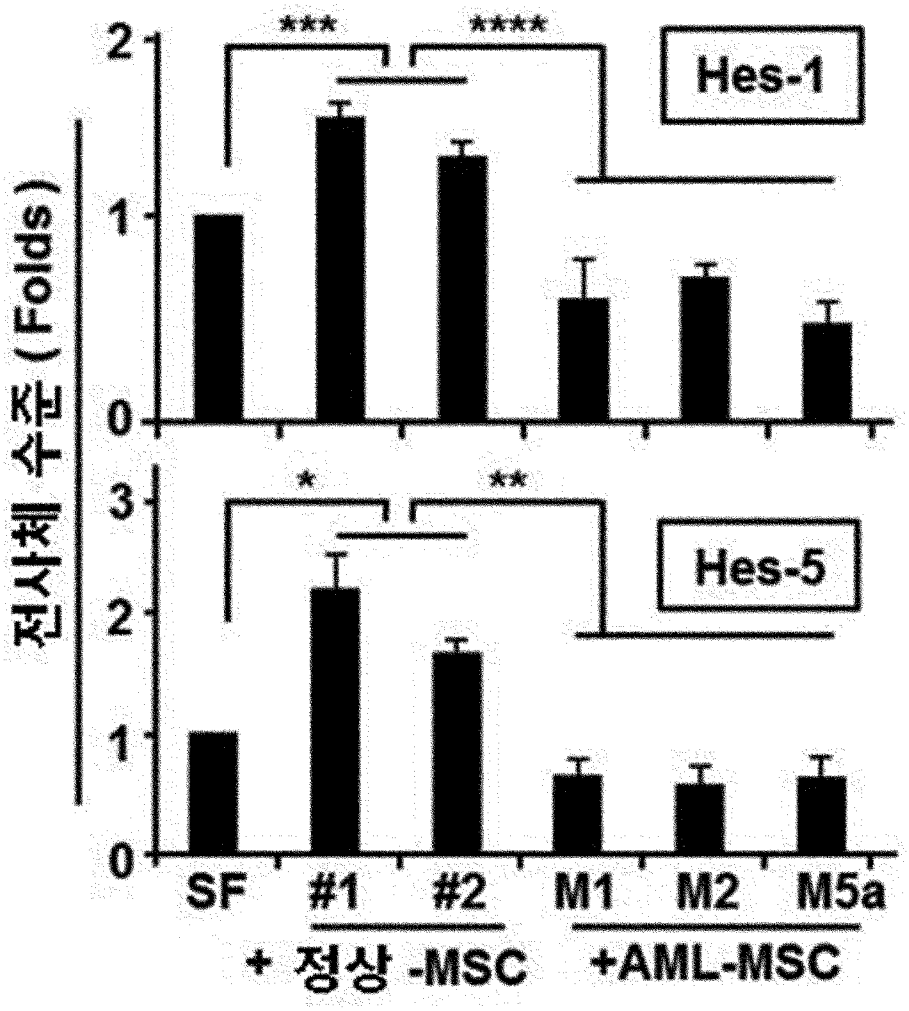
[Fig. 3a]



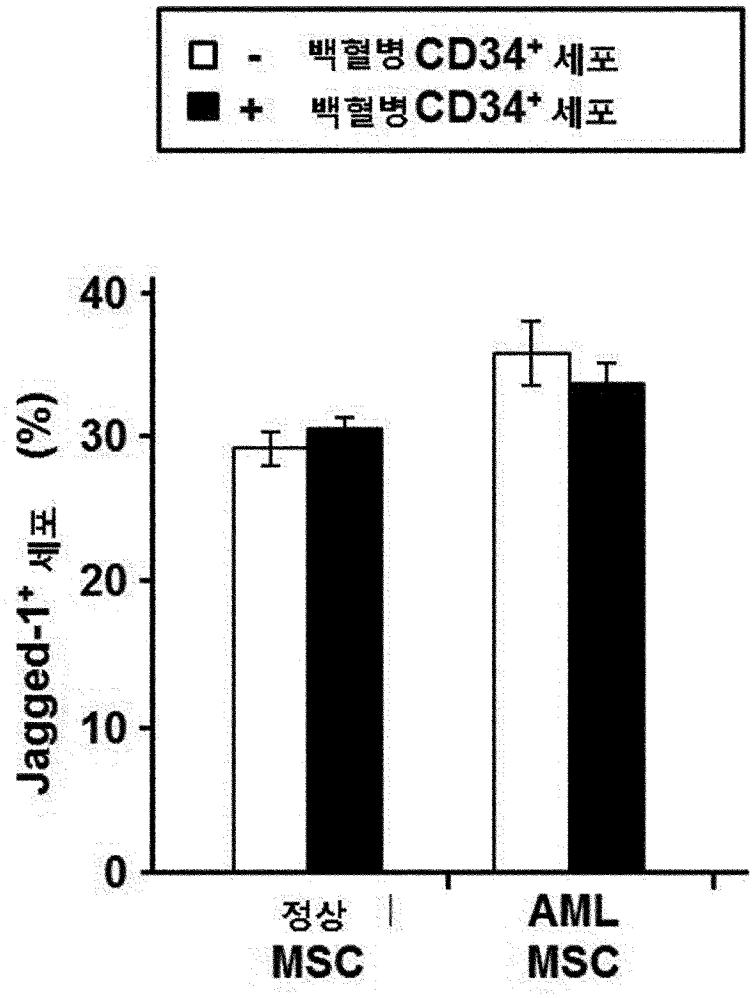
[Fig. 3b]



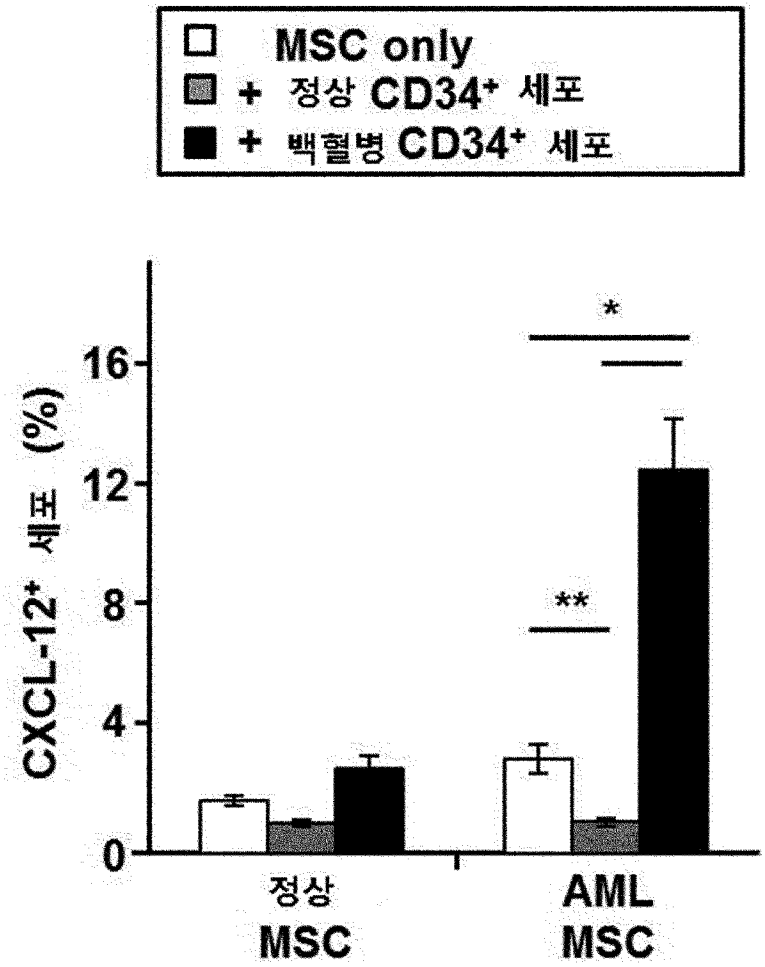
[Fig. 3c]



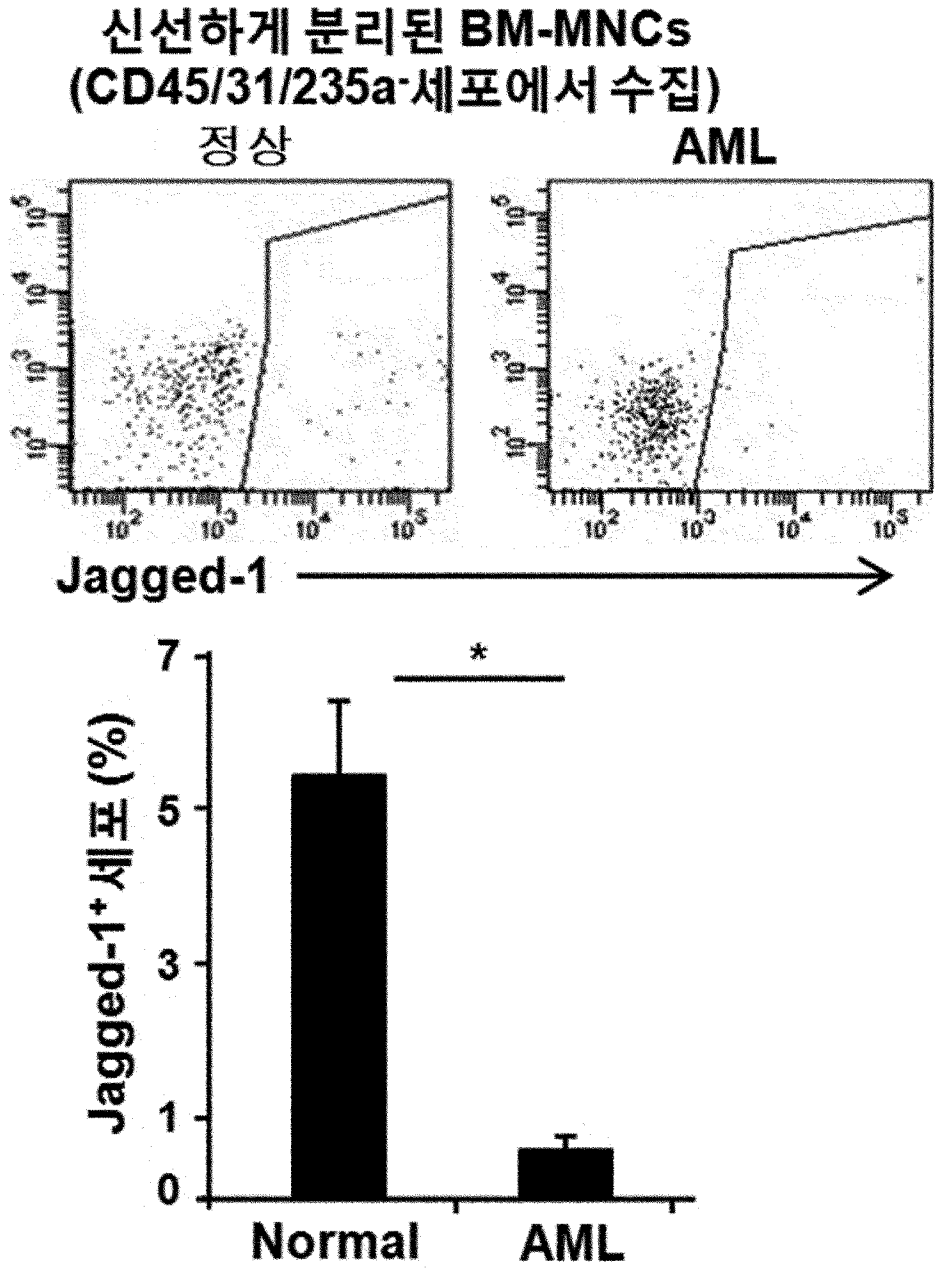
[Fig. 3d]



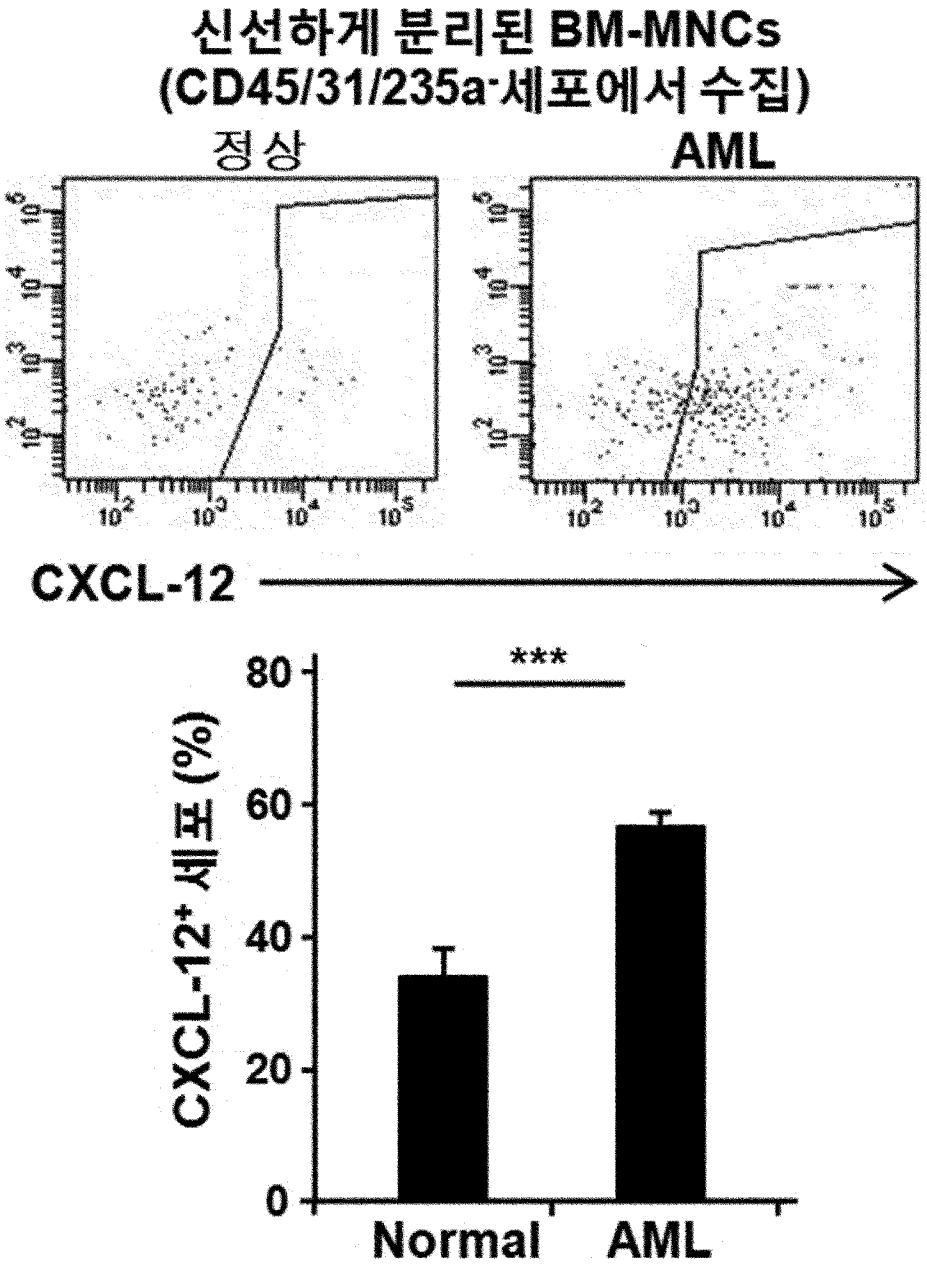
[Fig. 3e]


MSC only
+ 정상 CD34+ 세포
+ 백혈병 CD34+ 세포
CXCL-12+ 세포 (%)
0
4
8
12
16
*
**
정상 MSC
AML MSC

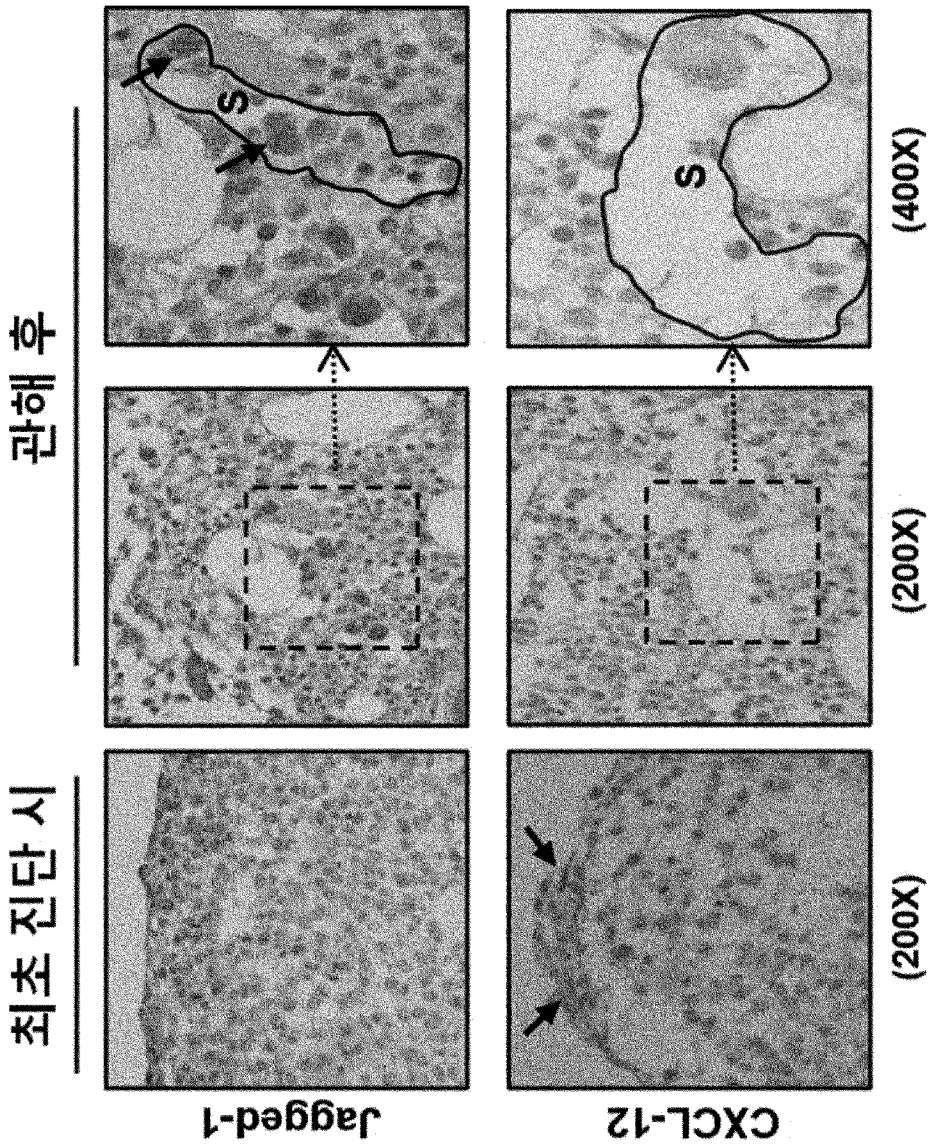
[Fig. 3f]


신선하게 분리된 BM-MNCs
(CD45/31/235a-세포에서 수집)
정상
AML
Jagged-1
Jagged-1+ 세포 (%)
*
Normal
AML

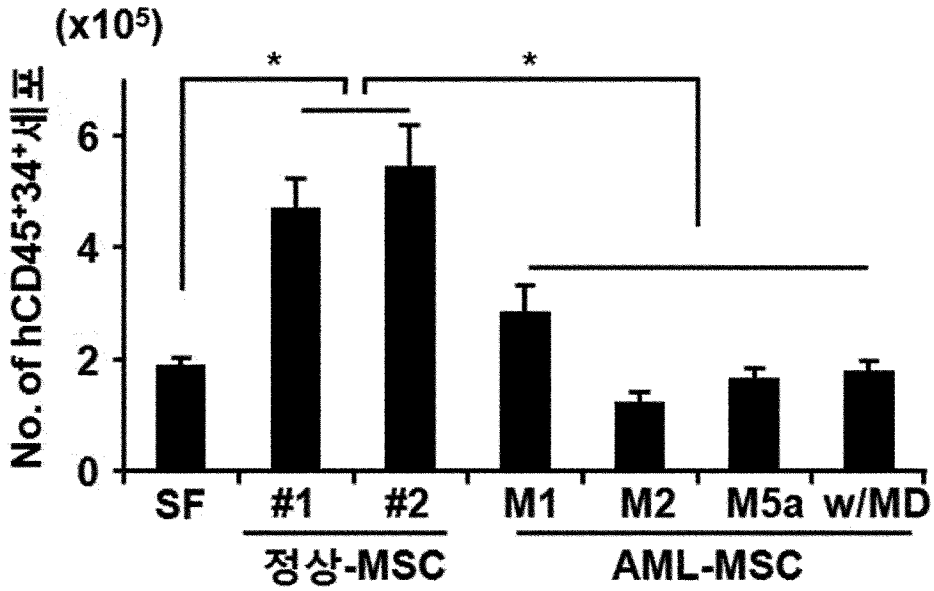
[Fig. 3g]


신선하게 분리된 BM-MNCs
(CD45/31/235a-세포에서 수집)
정상
AML
CXCL-12
***
CXCL-12+ 세포 (%)
80
60
40
20
0
Normal
AML

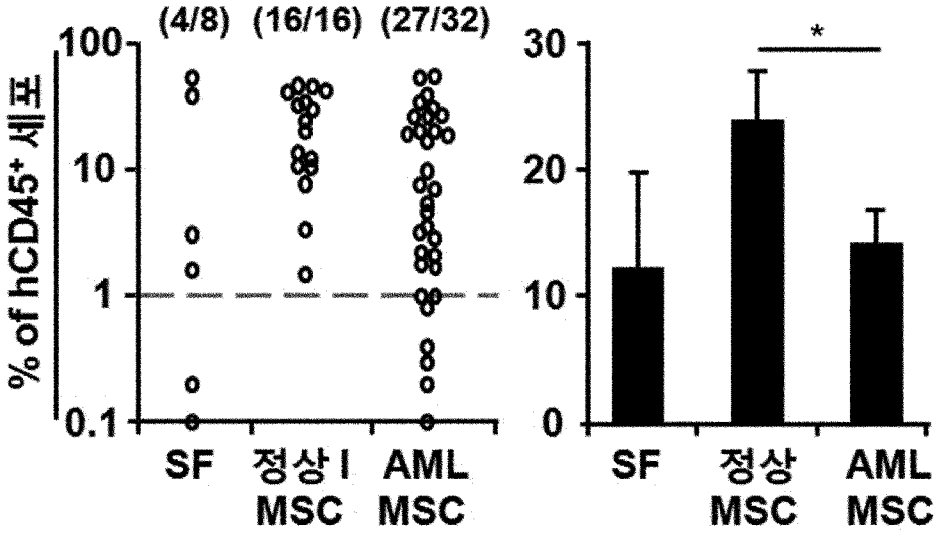
[Fig. 3h]


관해 후
최초 진단 시
S
S
(400X)
(200X)
(200X)
Jagged-1
CXCL-12

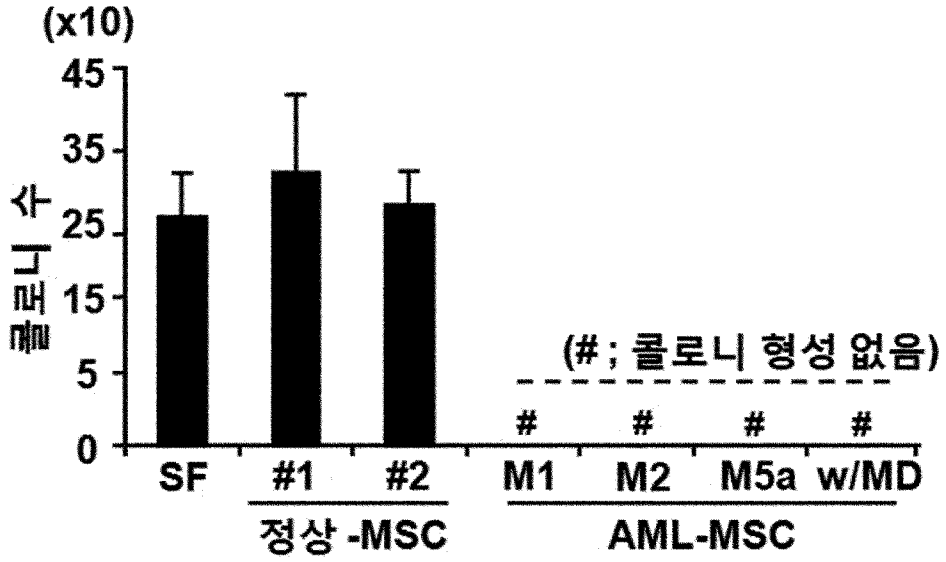
[Fig. 4a]


(x10⁵)
No. of hCD45⁺34⁺세포
*
*
0
2
4
6
SF
#1
#2
M1
M2
M5a
w/MD
정상-MSC
AML-MSC

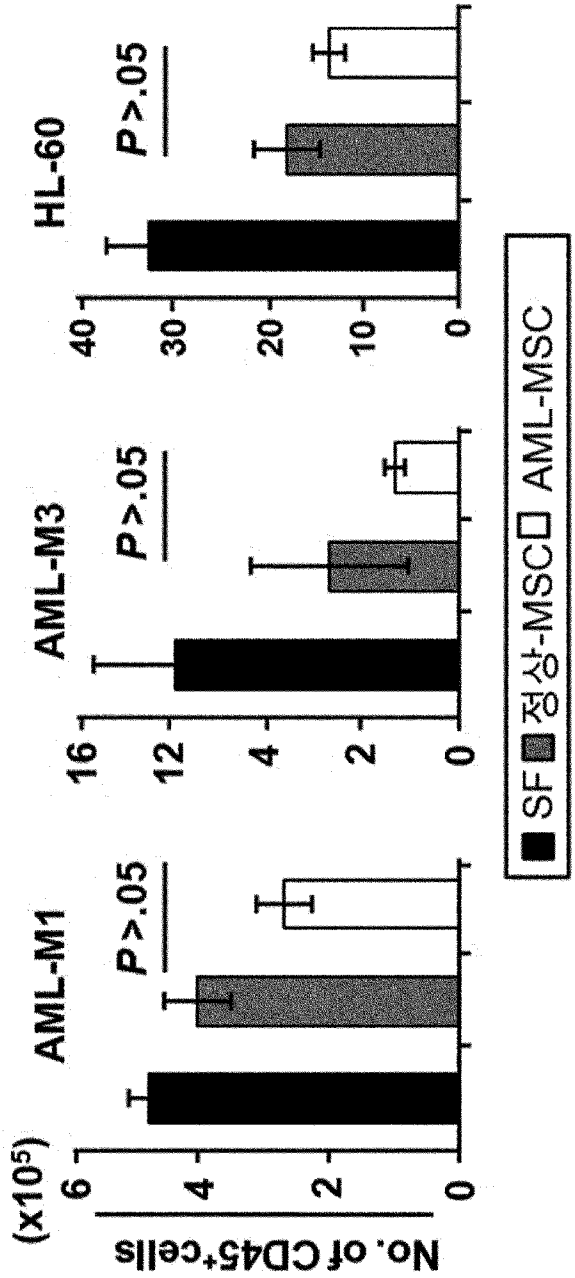
[Fig. 4b]


(4/8)
(16/16)
(27/32)
100
10
1
0.1
% of hCD45+ 세포
SF
정상 I MSC
AML MSC
30
20
10
0
*
SF
정상 MSC
AML MSC

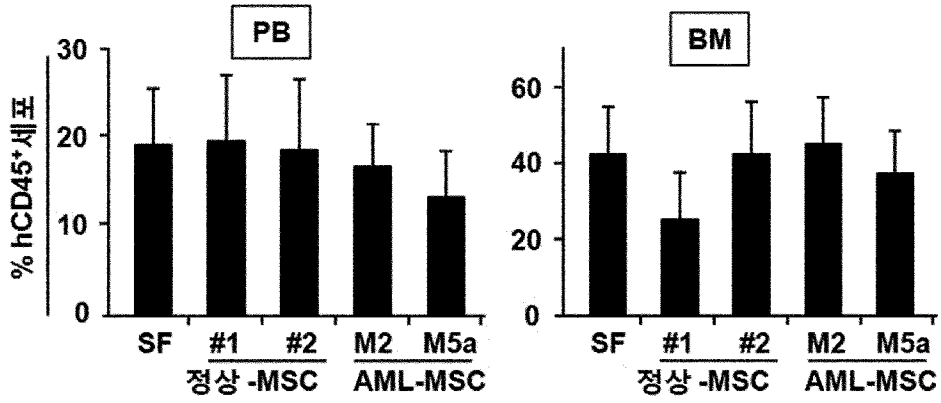
[Fig. 4c]


(x10)
45
35
25
15
5
0
콜로니 수
(#; 콜로니 형성 없음)
#
#
#
#
SF
#1
#2
M1
M2
M5a
w/MD
정상 -MSC
AML-MSC

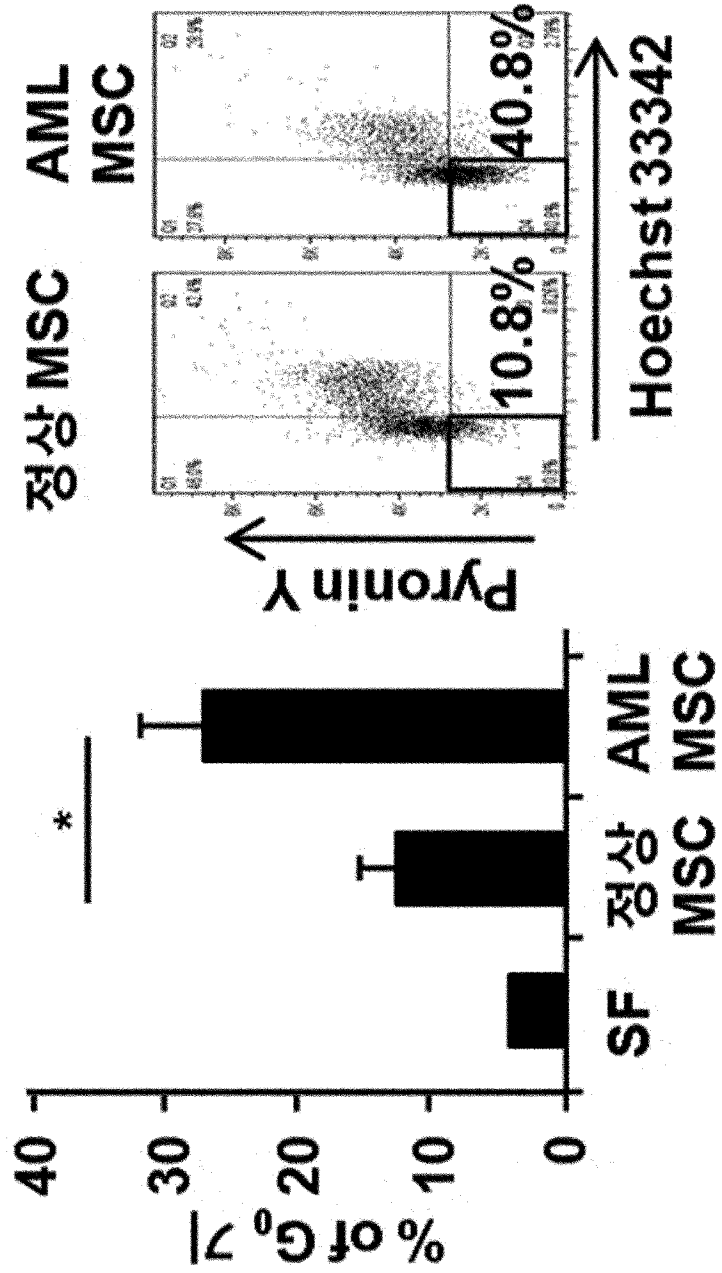
[Fig. 4d]


HL-60
P>.05
AML-M3
P>.05
AML-M1
P>.05
SF 정상-MSC AML-MSC
No. of CD45+cells
(x10^5)
0
2
4
6
0
2
4
12
16
0
10
20
30
40

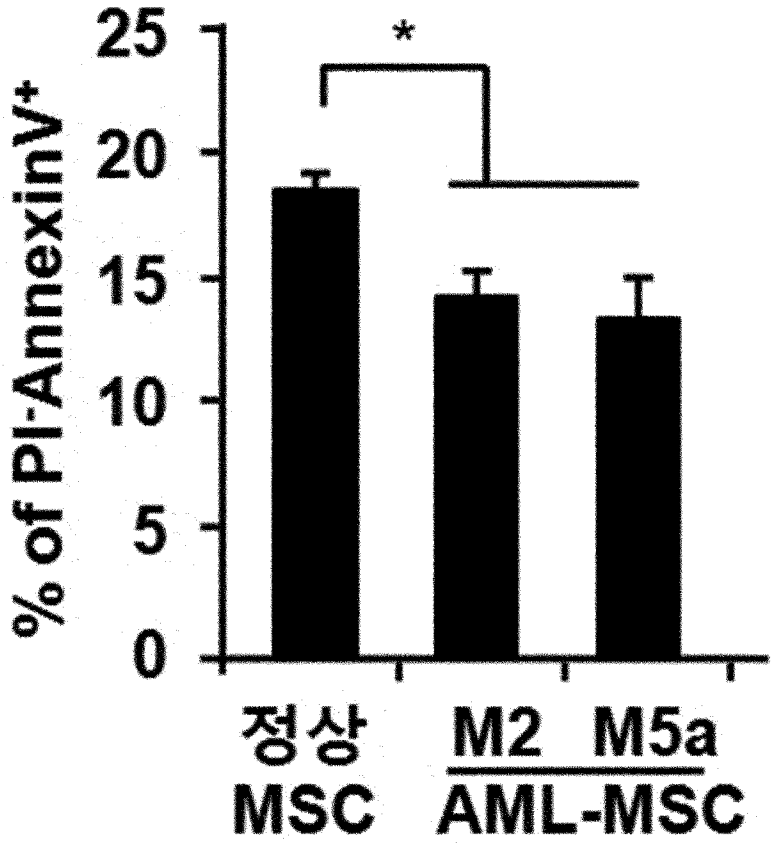
[Fig. 4e]


PB
BM
% hCD45+세포
SF
#1
#2
M2
M5a
정상 -MSC
AML-MSC

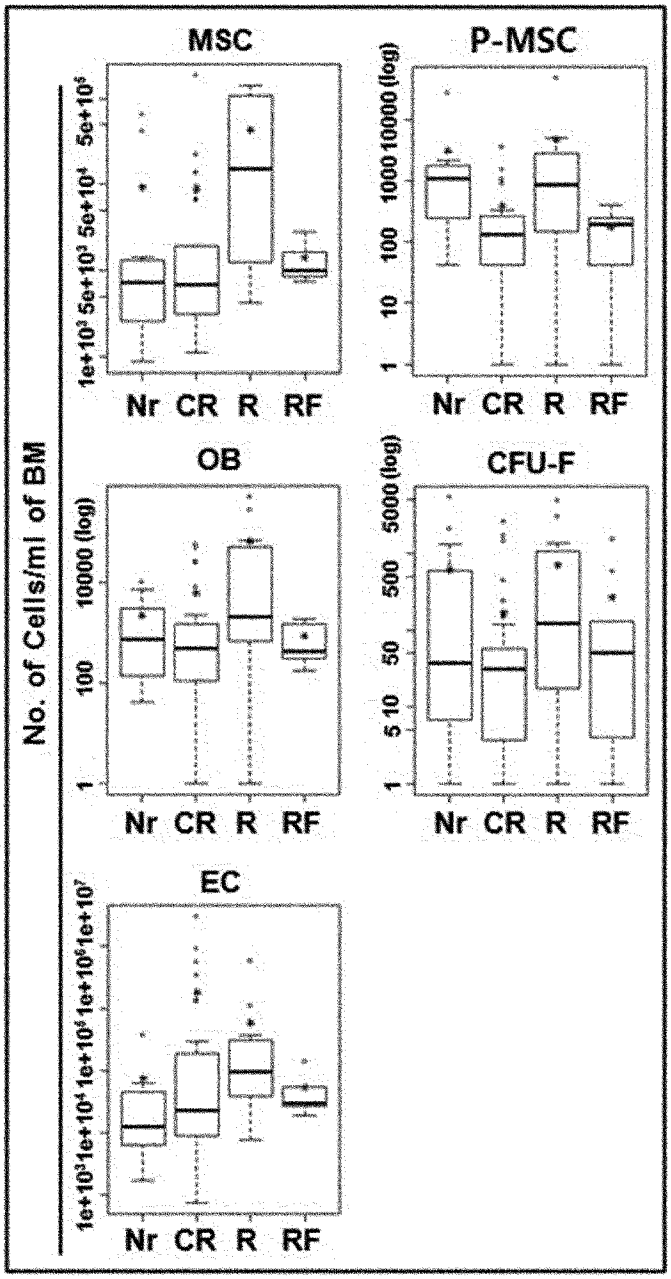
[Fig. 4f]


AML MSC
정상 MSC
40.8%
10.8%
Hoechst33342
Pyronin Y
% of G0 기
40
30
20
10
0
*
SF
정상 MSC
AML MSC

[Fig. 4g]



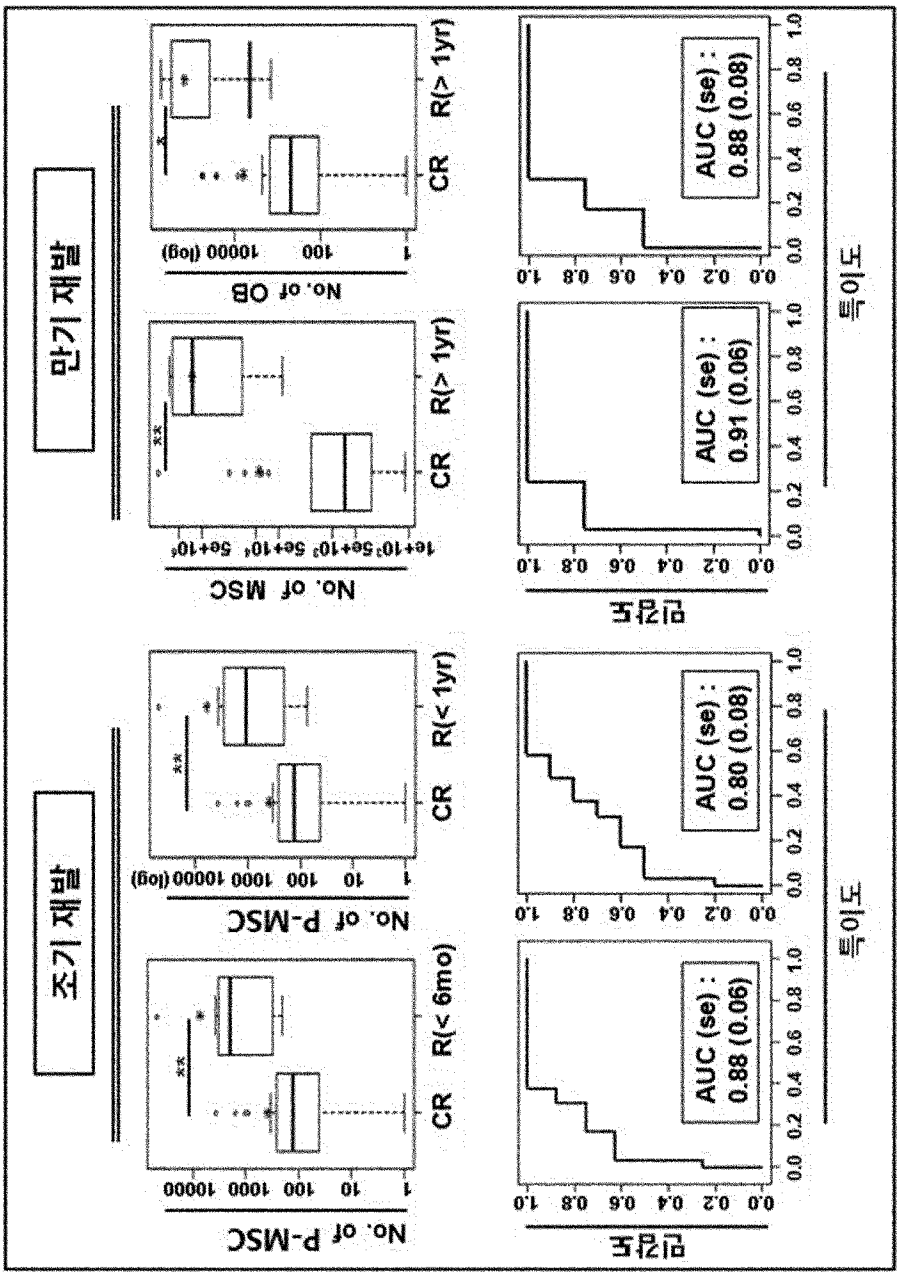
[Fig. 5a]


MSC
P-MSC
OB
CFU-F
EC
No. of Cells/ml of BM
Nr
CR
R
RF
1e+10³ 5e+10³ 5e+10⁴ 5e+10⁵
1 10 100 1000 10000 (log)
1 100 10000 (log)
1 5 10 50 500 5000 (log)
1e+10³ 1e+10⁴ 1e+10⁵ 1e+10⁶ 1e+10⁷

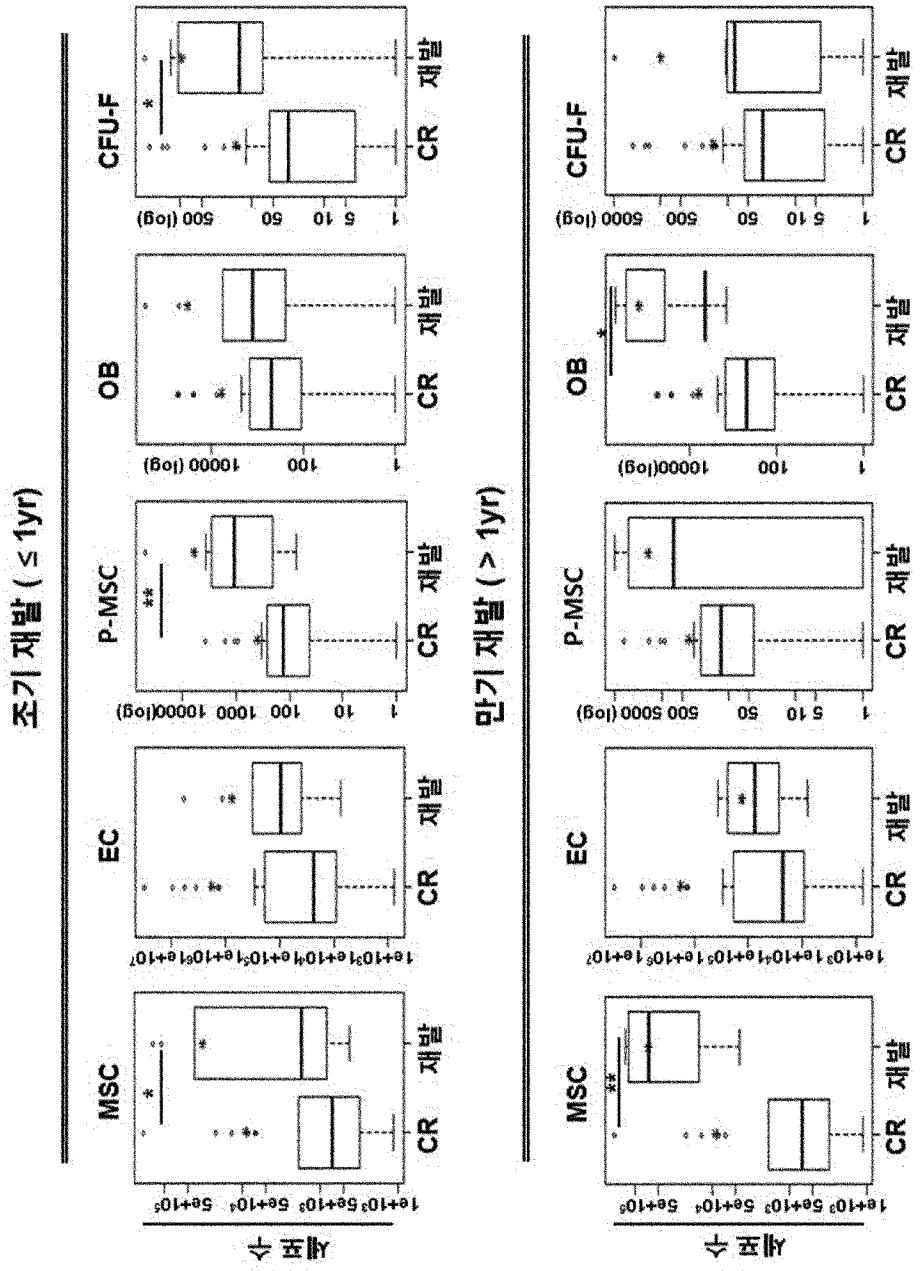
[Fig. 5b]

AUC (se)	MSC	EC	P-MSC	OB	CFU-F
재발 vs. CR (total)	0.78 (0.07)	0.63 (0.09)	0.72 (0.09)	0.70 (0.09)	0.69 (0.09)
1yr 이내의 조기 재발 vs. CR	0.73 (0.09)	0.65 (0.09)	0.80 (0.08)	0.63 (0.11)	0.73 (0.10)
1yr 이후의 만기 재발 vs. CR	0.91 (0.06)	0.57 (0.15)	0.52 (0.25)	0.88 (0.08)	0.59 (0.18)

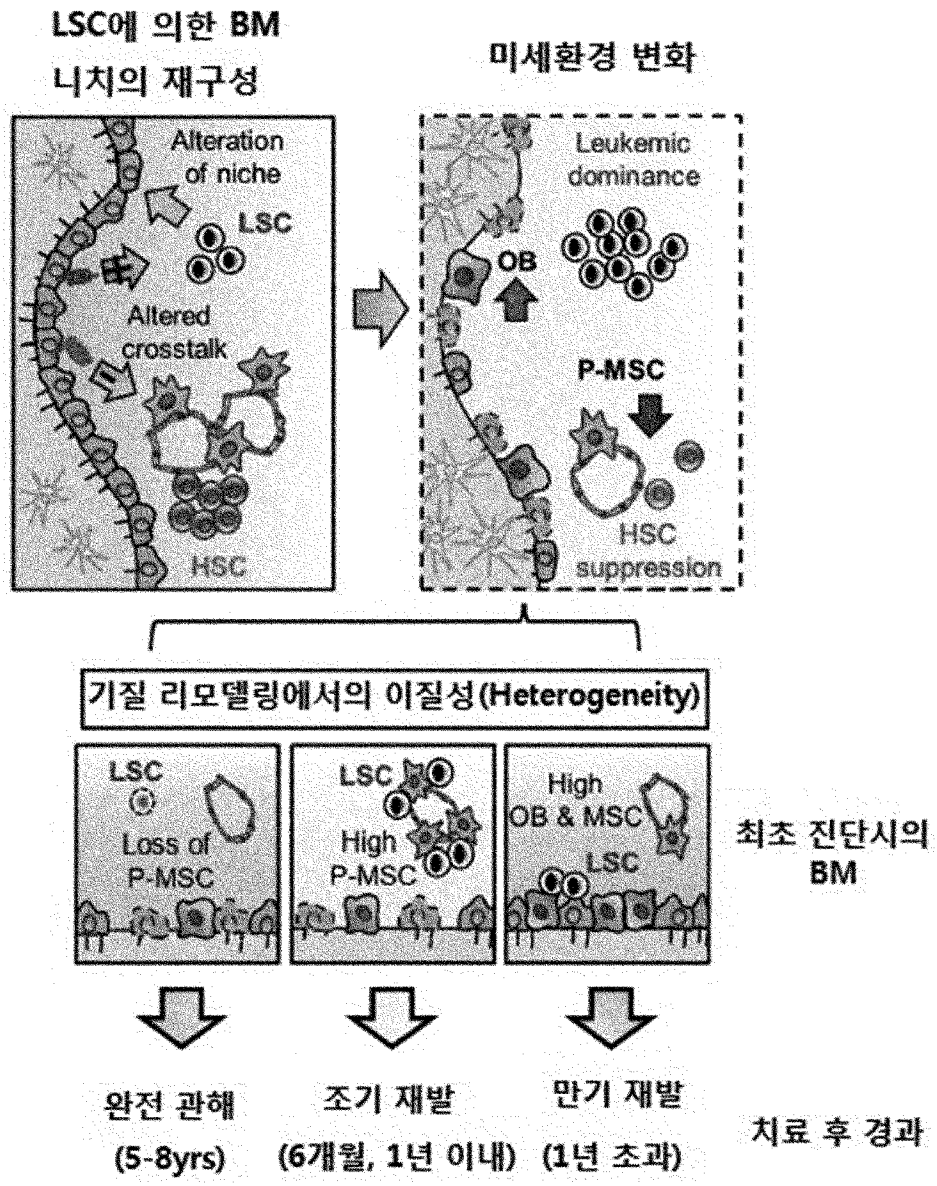
[Fig. 5c]


만기 재발
조기 재발
No. of OB
No. of MSC
No. of P-MSC
No. of P-MSC
CR
R(> 1yr)
R(< 1yr)
R(< 6mo)
AUC (se) : 0.88 (0.08)
AUC (se) : 0.91 (0.06)
AUC (se) : 0.80 (0.08)
AUC (se) : 0.88 (0.06)
민감도
특이도

[Fig. 5d]



[Fig. 6]


LSC에 의한 BM
니치의 재구성
미세환경 변화
Alteration
of niche
LSC
Altered
crosstalk
HSC
Leukemic
dominance
OB
P-MSC
HSC
suppression
기질 리모델링에서의 이질성(Heterogeneity)
LSC
Loss of
P-MSC
LSC
High
P-MSC
High
OB & MSC
LSC
최초 진단시의
BM
완전 관해
(5-8yrs)
조기 재발
(6개월, 1년 이내)
만기 재발
(1년 초과)
치료 후 경과

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2015/004233

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/68(2006.01)i, G01N 33/574(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)

C12Q 1/68; A61K 39/395; G01N 33/574

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: bone marrow, stromal cell, mesenchymal stromal cells, osteoblast, leukemia, recurrence

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	RODRGUEZ-PARDO et al., "Mesenchymal stem cells promote leukaemic cells aberrant phenotype from B-cell acute lymphoblastic leukaemia" Hematology Oncology and Stem Cell Therapy, vol. 6, nos. 3-4, pages 89-100 (2013) See abstract; pages 90, 97, 98.	1-4,8-11
A		5-7,12-14
A	MUDRY et al., "Stromal cells regulate survival of B-lineage leukemic cells during chemotherapy" Blood, vol. 96, no. 5, pages 1926-1932 (2000) See abstract.	1-14
A	MANABE et al., "Bone marrow-derived stromal cells prevent apoptotic cell death in B-lineage acute lymphoblastic leukemia" Blood, vol. 79, no. 9, pages 2370-2377 (1992) See abstract.	1-14
A	NING et al., "The correlation between cotransplantation of mesenchymal stem cells and higher recurrence rate in hematologic malignancy patients: outcome of a pilot clinical study" Leukemia, vol. 22, no. 3, pages 593-599 (2008) See abstract.	1-14

☒ 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
03 JULY 2015 (03.07.2015)	**03 JULY 2015 (03.07.2015)**
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.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2015/004233

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2012-0070450 A1 (ISHIKAWA et al.) 22 March 2012 See abstract; claims 1-21.	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2015/004233

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2012-0070450 A1	22/03/2012	EP 2412825 A1	01/02/2012
		EP 2412825 A4	23/10/2013
		US 2014-0274788 A1	18/09/2014
		WO 2010-110346 A1	30/09/2010

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2015/004233

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12Q 1/68(2006.01)i, G01N 33/574(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
C12Q 1/68; A61K 39/395; G01N 33/574

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: 골수, 기질세포, 중간엽 기질세포, 조골세포, 백혈병, 재발

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	RODRGUEZ-PARDO 등, 'Mesenchymal stem cells promote leukaemic cells aberrant phenotype from B-cell acute lymphoblastic leukaemia' Hematology Oncology and Stem Cell Therapy, 6권, 3-4호, 페이지 89-100 (2013) 요약; 페이지 90, 97, 98 참조.	1-4,8-11
A		5-7,12-14
A	MUDRY 등, 'Stromal cells regulate survival of B-lineage leukemic cells during chemotherapy' Blood, 96권, 5호, 페이지 1926-1932 (2000) 요약 참조.	1-14
A	MANABE 등, 'Bone marrow-derived stromal cells prevent apoptotic cell death in B-lineage acute lymphoblastic leukemia' Blood, 79권, 9호, 페이지 2370-2377 (1992) 요약 참조.	1-14
A	NING 등, 'The correlation between cotransplantation of mesenchymal stem cells and higher recurrence rate in hematologic malignancy patients: outcome of a pilot clinical study' Leukemia, 22권, 3호, 페이지 593-599 (2008) 요약 참조.	1-14

☒ 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
2015년 07월 03일 (03.07.2015)	2015년 07월 03일 (03.07.2015)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관
김승범
전화번호 +82-42-481-3371

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2015/004233

C(계속). 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	US 2012-0070450 A1 (ISHIKAWA 등) 2012.03.22 요약; 청구항 1-21 참조.	1-14

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2015/004233

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2012-0070450 A1	2012/03/22	EP 2412825 A1	2012/02/01
		EP 2412825 A4	2013/10/23
		US 2014-0274788 A1	2014/09/18
		WO 2010-110346 A1	2010/09/30