



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0105555
(43) 공개일자 2008년12월04일

(51) Int. Cl.

A61K 35/28 (2006.01) A61P 37/06 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0053298

(22) 출원일자 2007년05월31일

심사청구일자 2008년05월15일

(71) 출원인

인하대학교 산학협력단

인천 남구 용현동 253 인하대학교

(72) 발명자

송순욱

인천 중구 신흥동 3가 7-308 정광씨팰리스 A-1104

이문희

인천 중구 신흥동3가 현재APT 103동 1706호

김철수

서울 서초구 양재동 63-2

(74) 대리인

이원희

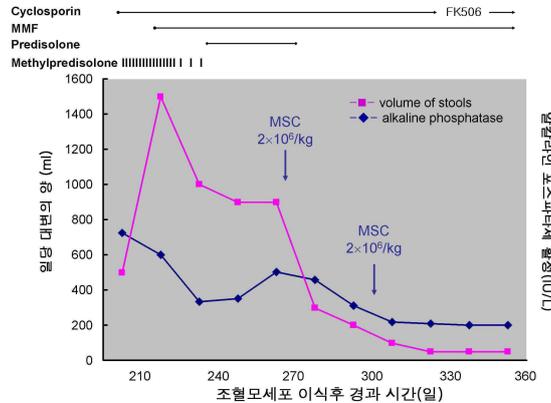
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 중간엽 골수세포를 이용한 이식편대숙주질환 치료제 및치료방법

(57) 요약

본 발명은 급성 또는 만성 이식편대숙주질환 치료제에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 본 발명은 급성 또는 만성 이식편대숙주질환 치료제에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 중간엽 줄기세포를 유효성분으로 함유하는 급성 또는 만성 이식편대숙주질환 치료제에 관한 것이다. 본 발명의 치료제는 종래에 치료가 매우 어려웠던 이식편대숙주질환, 특히 조혈모 이식수술 후 빈번히 발생하는 후유증으로 매우 치명적인 급성 또는 만성 이식편대숙주질환을 매우 효과적으로 치료할 수 있다.

대표도 - 도4



특허청구의 범위

청구항 1

중간엽 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 급성 또는 만성 이식편대숙주질환 치료제.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 중간엽 줄기세포는 층분리 배양방법을 통해 분리된 것을 특징으로 하는 치료제.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 중간엽 줄기세포는 CD29, CD44, CD105 세포표면 항원들을 발현하고 CD34, HLA-DR 세포표면 항원들은 발현하지 않는 것을 특징으로 하는 치료제.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 중간엽 줄기세포는 CD29, CD44, CD90, CD105 및 CD166 세포표면 항원을 발현하고, CD34, CD73, CD106, CD119 및 HLA-DR 세포표면 항원들은 발현하지 않는 것을 특징으로 하는 치료제.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 중간엽 줄기세포는 인터루킨-10(interlukin-10, IL-10)을 5 ng/ml 이상으로 발현하는 중간엽 줄기세포인 것을 특징으로 하는 치료제.

청구항 6

제 2항에 있어서, 상기 층분리 배양방법은 1) 개체로부터 골수를 채취하는 단계; 2) 채취한 골수를 배양하는 단계; 3) 단계 2)의 상층액만 새로운 용기로 이동시켜 배양하는 단계; 4) 단계 3)의 상층액을 분리하여 코팅제가 처리된 배양용기 또는 코팅제가 처리되지 않은 배양용기에서 반복 배양하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 치료제.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 단계 4)의 반복 배양은 중간엽 줄기세포를 37℃에서 1시간 내지 3시간 배양 후 37℃에서 12 내지 36 시간 배양을 2 내지 3회 반복하고 이어서 37℃에서 24 내지 72 시간으로 배양하며, 매번 상층액을 새로운 배양용기로 이동시킴으로써 수행되는 것을 특징으로 하는 치료제.

청구항 8

제 6항에 있어서, 상기 배양용기는 코팅제가 처리된 것을 특징으로 하는 치료제.

청구항 9

제 6항 또는 제 7항에 있어서, 상기 코팅제는 콜라겐(collagen), 폴리리신(poly-lysine), 피브리노겐(fibrinogen) 또는 젤라틴(gelatin)인 것을 특징으로 하는 치료제.

청구항 10

제 6항에 있어서, 상기 반복 배양은 4 내지 5회 수행되는 것을 특징으로 하는 치료제.

청구항 11

치료적 유효량의 중간엽 줄기세포를 급성 또는 만성 이식편대숙주질환에 걸린 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 상기 환자의 이식편대숙주질환의 치료방법.

청구항 12

제 11항에 있어서, 치료적 유효량은 1×10^4 cell/kg 내지 1×10^8 cell/kg인 것을 특징으로 하는 치료방법.

청구항 13

제 11항에 있어서, 상기 중간엽 줄기세포는 층분리 배양방법을 이용하여 분리된 것을 특징으로 하는 치료방법.

청구항 14

제 11항에 있어서, 상기 중간엽 줄기세포는 CD29, CD44, CD105 세포표면 항원들을 발현하고 CD34, HLA-DR 세포 표면 항원들은 발현하지 않는 것을 특징으로 하는 치료방법.

청구항 15

제 11항에 있어서, 상기 중간엽 줄기세포는 CD29, CD44, CD90, CD105 및 CD166 세포표면 항원을 발현하고, CD34, CD73, CD106, CD119 및 HLA-DR 세포표면 항원들은 발현하지 않는 것을 특징으로 하는 치료방법.

청구항 16

제 11항에 있어서, 상기 중간엽 줄기세포는 인터루킨-10(interlukin-10, IL-10)을 5 ng/ml 이상으로 발현하는 것을 특징으로 하는 치료방법.

청구항 17

제 11항에 있어서, 상기 층분리 배양방법은 1) 개체로부터 골수를 채취하는 단계; 2) 채취한 골수를 배양하는 단계; 3) 단계 2)의 상층액만 새로운 용기로 이동시켜 배양하는 단계; 4) 단계 3)의 상층액을 분리하여 코팅제가 처리된 배양용기 또는 코팅제가 처리되지 않은 배양용기에서 반복 배양하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 치료방법.

청구항 18

제 17항에 있어서, 상기 단계 4)의 반복 배양은 중간엽 줄기세포를 37℃에서 1시간 내지 3시간 배양 후 37℃에서 12 내지 36 시간 배양을 2 내지 3회 반복하고 이어서 37℃에서 24 내지 72 시간으로 배양하며, 매번 상층액을 새로운 배양용기로 이동시킴으로써 수행되는 것을 특징으로 하는 치료방법.

청구항 19

제 17항에 있어서, 상기 배양용기는 코팅제가 처리된 것을 특징으로 하는 치료방법.

청구항 20

제 17항 또는 제 19항에 있어서, 상기 코팅제는 콜라겐(collagen), 폴리리신(poly-lysine), 피브리노겐(fibrinogen) 또는 젤라틴(gelatin)인 것을 특징으로 하는 치료방법.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- <6> 본 발명은 본 발명은 급성 또는 만성 이식편대숙주질환 치료제에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 중간엽 줄기세포를 유효성분으로 함유하는 급성 또는 만성 이식편대숙주질환 치료제에 관한 것이다.
- <7> 이식편대숙주질환(graft-versus-host disease, GVHD)는 동종이식 때 주입되는 공여자(供與者)의 말초 혈액이나 골수내의 T림프구를 환자의 몸에서 남의 것으로 인식하여 면역 반응이 일어나는 질환을 말한다. 즉, 수혈된 살아있는 림프구에 의해 유발되며 면역 반응으로 인해 간 기능 이상, 피부 병변, 황달, 설사, 발열, 범혈구감소증 등의 증상이 나타나는 질환으로 심한 경우 환자가 사망할 수 있다.
- <8> 이식편대숙주질환은 크게 급성 이식편대숙주질환(acute graft-versus-host disease, aGVHD)와 만성 이식편대숙주질환(chronic graft-versus-host disease, cGVHD)로 구분되는데, 특히 cGVHD는 조혈모세포이식 후 100일 이상 생존한 환자의 20~70%에서 발생하는 가장 중요하고 흔한 합병증의 하나로 후기 이식 관련 중요

사망원인이다. cGVHD는 aGVHD에 연속되는 질환이 아니기 때문에, aGVHD는 다른 접근이 필요하며 최근에 조혈모 세포이식 치료법의 발달로 인하여 cGVHD가 더 큰 문제가 되고 있다.

- <9> cGVHD는 동종이식의 경우 이식 후 보통 4~6개월이 지나서 발생하며, 이식 80일 이전이나 1년 이후 발생하는 경우는 드물다. 따라서, 동종반응이 cGVHD를 일으키는 주요한 전제조건이며, cGVHD의 발명과정은 긴 잠복기를 거치거나, 표적 장기에 미치는 영향이 느리게 나타난다는 것을 알 수 있다. cGVHD에서 여러 가지 흉선 기능의 이상이 발견되고 있으며, 이식 전처치 등에 의한 손상 등으로 정상적인 흉선 또는 말초기전에 의해 동종항원이나 자가항원이 제거되지 않으면 이에 반응하여 병적인 이식편 T-세포가 확장하고 이러한 병적 CD 양성 T-세포는 Th2 면역반응으로 세포용해공격, 염증 섬유화 사이토카인의 분비, B-세포 활성화, 자가항체 생성을 통하여 표적 조직에 손상을 주는 등 자가면역질환과 유사한 면역장애가 오는 것을 생각된다.
- <10> cGVHD의 임상적 증상으로는 홍반, 건조, 가려움 색소변화, 반구진성 발진 등 피부의 변화, 손발톱 이상증, 손발톱 박리증 등의 손발톱의 변화, 머리카락의 가늘어짐, 탈모 등의 머리카락의 변화, 잇몸염, 점막염, 입술 위축 등의 입의 변화 등이 있으며, 이밖에, 눈, 생식기, 간, 폐, 위장관, 근막, 골격계, 장막 등에서 다양한 병변이 나타난다.
- <11> 일반적으로 조혈모세포 이식 100일 이후부터 발생하는 GVHD를 cGVHD로 정의하나 발생시기보다는 발현양상이 진단에 더욱 중요하다. 증상의 발현시기에 따라, aGVHD가 발생한 후 치유되지 않은 상태에서 cGVHD로 이행하는 진행형 시작(progressive onset), aGVHD가 완전히 치유된 후에 cGVHD가 나타나는 정지형 시작(quiet onset), 그리고 선행하는 aGVHD 없이 발생하는 신생형 시작(de novo)으로 나눌 수 있다. 이환율과 사망률은 진행형이 가장 높고, 다음으로 정지형이며, 신생형 시작의 경우 가장 낮다. 발현양상은 피부와 입점막의 태선모양 발진이 첫 징후인 경우가 많으며, aGVHD와 동일한 부분에 생길 수 있으나, 병변은 구진성, 침윤성이며, 흰 비늘로 덮여 있다. 병리 조직학적으로 aGVHD와 비교할 때 위성 세포괴사의 병변이 여전히 발견되지만, 림프구 침윤이 과경화성 띠를 보인다. 그 외에, 담도관이 많이 감소되어 있고, 쓸개즙 정체도 보이나, 약물과 연관된 간 병변이나 바이러스성 감염이 혼재되어 있는 경우가 있을 수 있어, 간혹 cGVHD와 구분하기 어려운 경우도 있다.
- <12> cGVHD인 경우 이미 면역 기능이 많이 저하되어 치료도중 심각한 감염이 우려되는바 치료로 인한 부작용이 적으면서 효과적인 새로운 치료방법이 절실히 필요하다. 이와 관련하여, 중간엽줄기세포가 여러 조직세포로 분화될 수 있는 능력이 있고 T 세포를 억제하여 이식편대숙주반응을 호전시킬 수 있다는 연구들이 보고되고 있다.
- <13> 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell)는 중배엽 기원의 원시세포(primordial cell)로서 미분화된 상태로 증식이 가능하고, 골수, 지방조직, 간, 힘줄, 활막 및 탯줄과 같은 다양한 조직으로부터 분리될 수 있으나, 중간엽 줄기세포로 명확하게 정의할 수 있는 단일 마커는 존재하지 않는다. 다만, 조혈모 표지로는 CD14, CD34 및 CD45가 잘 알려져 있고, 중간엽 표지로는 SH-2(CD105), SH-3(CD73), SH-4 및 Thy-1가 알려져 있다. 중간엽 줄기세포는 주조직 적합성 복합체(major histocompatibility complex, MHC) 클래스 I을 발현하고, MHC 클래스 II는 인터페론 감마(interferon gamma, IFN- γ)에 의해 발현이 유도될 수 있으며, Fas 또는 Fas 리간드(FAS L, CD40)과 보조자극분자(B7)를 발현하지 않기 때문에 면역반응을 유발하지 않고, 세포독성 림프구(cytotoxic T lymphocyte, CTL)와 자연살해(natural killer, NK) 세포에 의한 세포용해로부터 자유롭다. 뿐만 아니라, 중간엽 세포는 혼합 림프구 반응(mixed lymphocyte reaction, MLR)시 농도-의존적으로 T-세포 증식을 억제하고, B-세포의 증식과 면역글로불린의 생성을 억제하는데, MHC 적합성은 MSC 면역억제에 필수적이지는 않은 것으로 알려져 있다. 또한, MSC는 50회 분열하는 동안에는 핵형이나 텔로머라제 활성화에는 변화가 없는 것으로 알려져 있다.
- <14> 그러나, 인체 내에 존재하는 MSC는 매우 희귀하기 때문에, 이를 분리하는 기술의 개발이 절실하다. 현재 MSC의 분리방법으로는 농도 구배 원심분리, Sca-1 또는 STRO-1에 특이적인 단클론 항체를 이용한 방법, 세포크기에 따른 분리방법이 알려져 있다. 본 발명자들은 특정 기계장치 또는 시약을 필요로 하지 않는 효율적인 MSC 분리방법을 개발한 바 있는데(대한민국 공개 특허 제2007-0018738호), 상기 방법은 개체로부터 골수를 채취하여 배양 하되, 배양 상층액을 반복적으로 새로운 용기로 이동시켜 배양하는 것을 특징으로 한다.
- <15> cGVHD의 치료방법과 관련하여, 미국 특허 제6,544,506호는 장기 이식 환자에게 비-타가반응 항-제3자 세포독성 T-림프구를 투여하여 제3자 세포독성 T-림프구를 제거하는 것을 특징으로 하는 GVHD의 예방 및 치료방법을 개시하고 있고, 미국특허 제6,936,281호는 중간엽 줄기세포를 이용한 GVHD의 치료방법을 개시하고 있으며, 미국특허 제7,173,016호는 아테노신 디아미나제 저해제를 투여하는 단계를 포함하는 GVHD의 치료방법을 개시하고 있고, 미국특허 제6,328,960호는 장기 이식 수용 환자에게 항원에 대한 작용세포(effector cell)의 면역반응을 감소시

킬 수 있는 정도의 투여량의 중간엽 줄기세포를 투여함으로써 이식 수용 환자에서 상기 작용세포가 알로항원에 대한 감소된 면역 반응을 갖는 것을 특징으로 하는 GVHD의 치료방법을 개시하고 있으며, 미국특허 제6,368,636호는 작용세포를 알로항원에 대한 면역반응을 감소시킬 수 있을 정도의 투여량의 중간엽 줄기세포의 상층액과 접촉시키는 단계를 포함하는 작용세포에 의한 면역반응을 감소시키는 방법을 개시하고 있다. 특히, 상기 미국특허 제6,328,960호의 특허권자인 오시리스사(Osiris Therapeutics, Inc., USA)는 줄기세포 치료제인 프로키말(Prochymal™)을 aGVHD의 치료용도로 하는 임상실험을 진행중이다.

<16> 그러나, 아직까지 중간엽 줄기세포를 이용하여 cGVHD를 치료하는데 성공한 사례는 아직까지 보고된 바 없다.

<17> 이에, 본 발명자들은 cGVHD를 치료하고자 예의 노력한 결과, 충분히 배양방법으로 분리한 중간엽 줄기세포가 효과적으로 cGVHD를 치료할 수 있음을 임상적으로 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<18> 본 발명의 목적은 급성 또는 만성 이식편대숙주질환의 치료제를 제공하는 것이다.

<19> 본 발명의 다른 목적은 급성 또는 만성 이식편대숙주질환의 치료방법을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

<20> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 중간엽 줄기세포를 포함하는 급성 또는 만성 이식편대숙주질환 치료제를 제공한다.

<21> 또한, 본 발명은 치료적 유효량의 중간엽 줄기세포를 급성 또는 만성 이식편대숙주질환에 걸린 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 상기 환자의 이식편대숙주질환의 치료방법을 제공한다.

<22> 이하, 본 발명을 보다 구체적으로 설명하도록 한다.

<23> 본 발명은 중간엽 줄기세포를 포함하는 급성 또는 만성 이식편대숙주질환 치료제를 제공한다.

<24> 상기 중간엽 줄기세포는 특별히 이에 제한되는 것은 아니나, 충분히 배양방법을 통해 분리된 것이 바람직하고, CD29, CD44, CD105 세포표면 항원들을 발현하고 CD34, HLA-DR 세포표면 항원들은 발현하지 않는 것이 바람직하며, CD29, CD44, CD90, CD105 및 CD166 세포표면 항원을 발현하고, CD34, CD73, CD106, CD119 및 HLA-DR 세포표면 항원들은 발현하지 않는 것이 더욱 바람직하다.

<25> 더 나아가, 상기 중간엽 줄기세포는 인터루킨-10(interlukin-10, IL-10)을 과발현하는 것이 바람직한데, 배양시 IL-10을 5 ng/ml 이상으로 발현하는 것이 바람직하고, 10 ng/ml 이상으로 발현하는 것이 더욱 바람직하다.

<26> 상기 충분히 배양방법은 특별히 이에 제한되는 것은 아니나, 1) 개체로부터 골수를 채취하는 단계; 2) 채취한 골수를 배양하는 단계; 3) 단계 2)의 상층액만 새로운 용기로 이동시켜 배양하는 단계; 4) 단계 3)의 상층액만을 분리하여 코팅제가 처리된 배양용기 또는 코팅제가 처리되지 않은 배양용기에서 반복 배양하는 단계를 포함하는 것이 바람직하다.

<27> 상기 충분히 배양방법에 있어서, 상기 단계 4)의 반복배양은 특별히 이에 제한되는 것은 아니나 37℃에서 1시간 내지 3시간 배양 후 37℃에서 12 내지 36 시간 배양을 2 내지 3회 반복하고 이어서 37℃에서 24 내지 72 시간으로 배양하며, 매번 상층액을 새로운 배양용기로 이동시키는 것이 바람직하다. 또한, 배양용기는 특별히 이에 제한되는 것은 아니나, 코팅제가 처리된 것이 바람직하며, 상기 코팅제는 상기 배양용기에는 코팅제로 세포의 부착을 향상시킬 수 있는 모든 물질이 이용될 수 있으나, 바람직하게는 콜라겐(collagen), 폴리리신(poly-lysine), 피브리노겐(fibrinogen) 또는 젤라틴(gelatin)이 사용될 수 있고, 보다 바람직하게는 콜라겐 또는 폴리리신, 가장 바람직하게는 콜라겐이 사용될 수 있다. 또한, 콜라겐이 코팅된 배양용기에서 3회 내지 6회, 바람직하게는 4회 내지 5회 반복배양하는 것이 바람직하다.

<28> 본 발명의 치료제는, 당업자에게 공지된 방법으로 제제화하는 것이 가능하다. 예를 들면, 필요에 따라서 물 혹은 그 이외의 약학적으로 허용할 수 있는 액과의 무균성 용액, 또는 현탁액제의 주사제의 형태로 비경구적으로 사용할 수 있다. 예를 들면, 약리학상 허용되는 담체 혹은 매체, 구체적으로는, 멸균수나 생리 식염수, 식물유, 유화제, 현탁제, 계면활성제, 안정제, 부형제, 비히클(vehicle), 방부제, 결합제 등과 적당 조합해, 일반적으로 인정된 제약 실시예에 요구되는 단위 용량 형태로 혼화하는 것에 의해 제제화하는 것을 생각된다. 상기 제제에 있어서 유효 성분량은 지시받은 범위의 적당한 용량을 얻을 수 있도록 하는 것이다. 또한, 주사를 위한 무균 조

성물은 주사용 증류수와 같은 부형액을 이용해 통상의 제제 실시에 따라 처방할 수가 있다.

- <29> 주사용의 수용액으로서는, 예를 들면 생리 식염수, 포도당이나 그 외의 보조약을 포함한 등장용액, 예를 들면 D-소르비톨, D-만노스, D-만니톨, 염화 나트륨을 들 수 있어 적당한 용해 보조제, 예를 들면 알코올, 구체적으로는 에탄올, 폴리 알코올, 예를 들면 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 비이온성 계면활성제, 예를 들면 폴리소르베이트 80(TM), HCO-50으로 병용할 수 있다.
- <30> 유성액으로서는 참기름, 콩기름을 들 수 있어 용해 보조제로서 안식향산벤질, 벤질 알코올과 병용할 수 있다. 또한, 완충제, 예를 들면 인산염 완충액, 초산나트륨 완충액, 무통화제, 예를 들면, 염산 프로 카인, 안정제, 예를 들면 벤질 알코올, 페놀, 산화 방지제와 배합할 수 있다. 조제된 주사액은 통상, 적당한 앰플에 충전시킨다.
- <31> 환자의 체내에의 투여는 바람직하게는 비경구투여이며, 구체적으로는 정맥에의 1회 내지 3회의 투여가 기본이지만 그 이상의 투여라도 좋다. 또, 투여 시간은 단시간이라도 장시간 지속 투여라도 좋다. 더욱 구체적으로는, 주사제형, 경피투여형등을 들 수 있다. 주사제형의 예로서는 예를 들면, 정맥내 주사, 동맥내 주사, 선택적 동맥내 주사, 근육내 주사, 복강내 주사, 피하주사, 뇌실내 주사, 뇌내 주사, 골수액강내 주사등에 의해 투여할 수가 있지만, 바람직하게는 정맥내 주사이다. 정맥내 주사의 경우, 통상의 수혈의 요령에서의 이식이 가능해져 환자를 수술할 필요가 없고, 나아가 국소 마취도 필요없기 때문에, 환자 및 의사 쌍방의 부담이 가볍다. 또 병동에서의 이식 조작이 가능한 점으로써 매우 적합하다. 장래의 구급의료의 발전을 고려하면, 구급 반응중, 혹은 발증 현장의 투여도 생각할 수 있다.
- <32> 아울러, 본 발명은 치료적 유효량의 중간엽 줄기세포를 급성 또는 만성 이식편대숙주질환에 걸린 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 상기 환자의 이식편대숙주질환의 치료방법을 제공한다.
- <33> 상기 치료적 유효량은 특별히 이에 제한되는 것은 아니나, 1×10^4 cell/kg 내지 1×10^8 cell/kg인 것이 바람직하고, 1×10^5 cell/kg 내지 1×10^7 cell/kg인 것이 더욱 바람직하고, 5×10^5 cell/kg 내지 5×10^6 cell/kg인 것이 가장 바람직하다. 상기 투여방법은 특별히 이에 제한되는 것은 아니나, 비경구투여방법이라면 어느 것이나 사용가능하고, 전신 투여 또는 국소 투여가 가능하나, 전신 투여가 더 바람직하며, 정맥내 투여가 가장 바람직하다.
- <34> 상기 중간엽 줄기세포는 특별히 이에 제한되는 것은 아니나, 충분히 배양방법을 통해 분리된 것이 바람직하고, CD29, CD44, CD105 세포표면 항원들을 발현하고 CD34, HLA-DR 세포표면 항원들은 발현하지 않는 것이 바람직하며, CD29, CD44, CD90, CD105 및 CD166 세포표면 항원을 발현하고, CD34, CD73, CD106, CD119 및 HLA-DR 세포표면 항원들은 발현하지 않는 것이 더욱 바람직하다.
- <35> 더 나아가, 상기 중간엽 줄기세포는 인터루킨-10(interlukin-10, IL10)을 과발현하는 것이 바람직한데, 배양시 IL-10을 5 ng/ml 이상으로 발현하는 것이 바람직하고, 10 ng/ml 이상으로 발현하는 것이 더욱 바람직하다.
- <36> 상기 충분히 배양방법은 특별히 이에 제한되는 것은 아니나, 1) 개체로부터 골수를 채취하는 단계; 2) 채취한 골수를 배양하는 단계; 3) 단계 2)의 상층액만 새로운 용기로 이동시켜 배양하는 단계; 4) 단계 3)의 상층액만을 분리하여 코팅제가 처리된 배양용기 또는 코팅제가 처리되지 않은 배양용기에서 반복 배양하는 단계를 포함하는 것이 바람직하다.
- <37> 상기 충분히 배양방법에 있어서, 상기 단계 4)의 반복배양은 특별히 이에 제한되는 것은 아니나 37℃에서 1시간 내지 3시간 배양 후 37℃에서 12 내지 36 시간 배양을 2 내지 3회 반복하고 이어서 37℃에서 24 내지 72 시간으로 배양하며, 매번 상층액을 새로운 배양용기로 이동시키는 것이 바람직하다. 또한, 배양용기는 특별히 이에 제한되는 것은 아니나, 코팅제가 처리된 것이 바람직하며, 상기 코팅제는 상기 배양용기에는 코팅제로 세포의 부착을 향상시킬 수 있는 모든 물질이 이용될 수 있으나, 바람직하게는 콜라겐(collagen), 폴리리신(polylysine), 피브리노겐(fibrinogen) 또는 젤라틴(gelatin)이 사용될 수 있고, 보다 바람직하게는 콜라겐 또는 폴리리신, 가장 바람직하게는 콜라겐이 사용될 수 있다. 또한, 콜라겐이 코팅된 배양용기에서 3회 내지 6회, 바람직하게는 4회 내지 5회 반복배양하는 것이 바람직하다.
- <38> 본 발명자들은 대한민국 공개특허 제2007-0018738호에 개시된 방법(도 1 참조)으로 분리한 중간엽 줄기세포를 치료 불응 상태의 급성 또는 만성 이식편대숙주질환에 걸린 투자에게 투여하여 상기 질환을 호전시킬 수 있었다:

- <39> 우선, 상기 만성 이식편대숙주질환에 걸린 환자의 모친으로부터 중간엽줄기세포를 층분리방법으로 분리하여 단일 클론 유래의 세포주로 확립한 후, 이를 cMSC-15로 명명하였다. 상기 세포주가 실제 중간엽 줄기세포인지 유세포 분석을 통하여, 세포표면 항원분석을 수행하였다(도 2 참조). 그 결과, CD29, CD44, CD90, CD105 및 CD166 세포표면 항원을 발현하고, CD34, CD73, CD106, CD119 및 HLA-DR 세포표면 항원들은 발현하지 않는 것으로 나타나, 조혈모 줄기세포가 아니라, 중간엽 줄기세포임을 확인하였다. 한편, CD133이나 STRO-1 등은 음성에 가까운 발현양상을 나타내었다. 이어, 상기 세포주의 특성을 더욱 구체적으로 확인하기 위하여, TGF- β 및 IL-10의 발현 정도를 ELISA 방법으로 확인하였다(도 3 참조). 그 결과, TGF- β 의 경우는 대조군인 종래의 농도구배 방법을 통해 분리한 중간엽 줄기세포와 큰 차이가 없었으나, IL-10은 대조군에 비하여 5배 정도 발현이 증가되어 있음을 알 수 있었다.
- <40> 이에, 본 발명자들은 상기 확립된 중간엽 줄기세포주를 치료목적에 충분한 양으로 배양한 후, 만성 면역편대숙주질환이 발병하여 생명이 매우 위독한 환자의 치료에 적용하였다. 구체적으로 상기 환자는 18세 여자로서 급성 양표현형 골수성백혈병으로 진단 받고 유도요법으로 관해가 온 후 2006년 10월 HLA 일치 동종비혈연골수이식을 받았다. 6개월간 면역억제제를 사용 후 중단한 뒤 1개월 후부터 만성 이식편대숙주반응이 시작되어 사이클로스포린 A(Cyclosporin A, CsA), 마이코페놀레이트 모페틸(mycophenolate mofetil, MMF), 스테로이드 등으로 치료하였으나 계속되는 혈변과 빌리루빈 상승, 피부, 구강, 안구건조 등으로 환자 상태는 악화되었고 치료 합병증으로 사이토메갈로바이러스(cytomegalovirus, CMV)의 활성화와 BK 바이러스 감염으로 인해 혈뇨 및 혈액 내에서도 BK 바이러스가 확인되어 시테포르비르(Cideforvir)로 치료하기 시작하였다. 이에 본 발명자들은 한국식약청의 응급입상허가를 획득한 후 상기 배양된 중간엽줄기세포를 정맥주사로 1차 투여하였다. 투여하는 도중과 후에 전혀 이상반응은 관찰되지 않았으며 1차 투여 후 서서히 환자의 증상은 좋아졌고, 3주후 2차 투여하였다. 이후 환자의 증상은 현격히 호전되어 스테로이드를 끊은 상태로 환자는 2차 투여 후 34일 만에 퇴원하였고 현재는 면역억제제만 복용중이다. 병리학적으로 치료효과가 있는지 확인하기 위하여 본 발명자들은 치료기간 동안 주요 병변인 대변의 양과 혈중 알카라인포스파타제의 활성을 측정하였다(도 4 참조). 그 결과, 만성 면역편대숙주질환의 주요 병변인 대변의 양이 획기적으로 감소하였고, 혈청학적 지표인 혈중 알칼라인 포스파타제 활성 역시 정상치(60-220 ng/ml) 수준으로 떨어졌다. 또한, 증상이 호전되었는지 확인하기 위하여 대장내시경 분석을 수행하였다(도 5 참조). 그 결과, 도 5에서 나타나듯이, 본 발명의 중간엽줄기세포 투여후 시간이 경과함에 따라, 대장내시경 소견상 궤양은 많이 호전되었다.
- <41> 이사에서 살펴본 바와 같이, 본 발명자들은 임상실험을 통해, 본 발명의 층분리 배양방법으로 분리한 중간엽 줄기세포는 만성 면역편대숙주질환의 치료에 매우 효과적임을 확인하였다.
- <42> 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 보다 구체적으로 설명한다. 하기에 기재된 실시예는 본 발명을 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 권리범위가 그에 제한되지 않음은 당업자에게 자명한 사항이다.
- <43> <실시예 1> 중간엽 줄기세포의 층분리 배양에 의한 분리
- <44> 골수제공자(치료대상 만성 이식편대숙주질환 환자의 모)의 엉덩이 부분을 국소마취제로 마취시킨 후, 엉덩이뼈에 주사바늘을 찔러 골수를 채취하였다. 100 mm 배양용기에 20% FBS, 1% 페니실린/스트렙토마이신을 포함하는 10 ml DMEM(Dulbecco's modified Eagle's Medium, GIBCO-BRL, Life-technologies, MD, USA), 상기 골수제공자로부터 채취한 골수 3 ml를 넣어 37 $^{\circ}$ C, 5% CO $_2$ 세포배양기에서 2시간 배양하였다. 배양 후, 배양용기를 한쪽으로 살짝 기울여 바닥에 붙은 세포들이 되도록 떨어지지 않도록 최대한 배양용기의 상층 배양액만 새로운 용기로 옮겼다.
- <45> 동일한 과정을 한 번 더 반복한 후 수득한 배양액을 바닥에 교원질(collagen)이 코팅된 배양용기(Becton Dickinson)로 옮긴 후 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 배양하였다. 배양액을 다시 새로운 교원질이 코팅된 용기로 옮기고 24시간 후 다시 새로운 용기로 옮기고 24시간 후 또 새로운 용기로 옮겨주었다. 마지막으로 48시간 후 새로운 용기로 옮겨 준 후 남아있는 세포들이 배양용기 바닥에 붙어 자라는 것을 육안으로 확인하였다. 앞의 여러 층분리 단계들을 거쳐서 이 단계에까지 올 수 있는 세포들은 세포의 비중이 타 세포들보다 월등히 작은 세포들임을 짐작할 수 있다. 약 3 내지 5일의 시간이 지나면 세포들이 단일성 세포군(single clone)을 형성하는데, 이 단일성 세포군을 트립신을 처리하여 분리한 다음 웰당 10 2 내지 6 \times 10 2 의 세포수로 6-웰 배양용기로 옮겼다. 37 $^{\circ}$ C, 5% CO $_2$ 세포배양기에서 4 내지 5일 배양한 후 약 80% 자랐을 때, 세포들을 0.25% trypsin/1mM EDTA(GIBCO-BRL)를 처리하여 수득한 후, 75 cm 2 배양용기로 옮겨 계대배양하였다. 상기와 같이 단일 클론 유래의 세포주를 확보하고 이를 cMSC-15로 명명하였다.

- <46> 상기 세포의 모양을 현미경으로 관찰한 결과, 초기단계 세포들의 모양은 섬유아세포와 비슷한 모양을 지니고 있었고, 5번의 계대배양까지는 모양에 큰 변화를 발견할 수 없었다. 세포의 양이 2배로 증가하는 시간은 24-36 시간 정도로 섬유아세포와 큰 차이가 없음이 관찰되었다.
- <47> <실시예 2> 분리된 중간엽 줄기세포 확인
- <48> <2-1> 유세포분석기를 통한 중간엽 줄기세포의 특성 분석
- <49> 상기 실시예 <1-1>에서와 같은 방법으로 골수에서 분리한 cMSC-15가 중간엽 줄기세포가 맞는지 확인하기 위하여, 줄기세포 특이성을 가진 세포표면 항원들이 존재하는지 유세포분석기(BDbioscience)를 사용하여 알아보았다.
- <50> 75 cm² 배양용기에서 6 내지 7일 정도 계대배양한 줄기세포에 0.25% 트립신/1mM EDTA(GIBCO-BRL)를 처리하여 세포를 수득하였다. 1× PBS/0.4% BSA로 2회 세척하여 트립신이나 배양액 성분을 제거하였다. 원심분리로 세포를 침전시킨 후에 세포수를 측정하여 1×10⁶개의 세포를 1.5 ml 튜브에 모아 0.1% 정상 염소 혈청(goat serum)(Vector)으로 실온에서 1시간 블로킹하였다. 블로킹이 끝나면 1X PBS/0.4% BSA로 2회 세척한 후 플루오레세인 이소티오시아네이트(fluorescein isothiocyanate, FITC) 또는 피코에리스린(phycoerythrin, PE)이 부착된 항-CD14, CD29, CD31, CD34, CD44, CD73, CD90, CD105, CD106, CD119, CD133, CD166, HLA-DR, HLA Class I 및 STRO-1 항체(Serotec Ltd, Kidlington, OX, UK)로 각각 처리하여 4℃에서 40분간 반응시켰다. 이를 1× PBS/0.4% BSA로 2회 세척한 후 0.5 ml 1× PBS/0.4% BSA에 현탁하여 유세포분석기에 로딩하여 분석하였다.
- <51> 그 결과, 중간엽 줄기세포 특이성을 지닌 인테그린(integrin) 항원인 CD29와 매트릭스 수용체(matrix receptor) 항원들인 CD44와 CD105가 양성반응을 보였고, CD90, CD166 및 HLA-Class I 세포표면 항원을 발현하였으며, CD34, CD73, CD106, CD119 및 HLA-DR 세포표면 항원은 발현되지 않았다. 이 밖에, CD31, CD133 및 STRO-1의 경우 음성에 가까운 발현을 나타내었다(도 2). 이러한 세포표면 항원들의 발현은 6회의 계대배양을 한 후의 세포들에서도 동일하게 유지되는 특성을 보여 본 연구에 의해 분리한 세포가 중간엽 줄기세포의 특이 항원들을 계대배양을 하더라도 지속적으로 유지됨을 확인하였다.
- <52> <2-2> 중간엽 줄기세포주의 면역억제 관련 사이토카인 분비양상 분석
- <53> 본 발명자들은 본 발명에서 증분리배양방법으로 분리한 중간엽 줄기세포주의 특성을 보다 상세하게 알아보기 위해, 면역 억제 관련 사이토카인의 발현 정도를 분석하였다.
- <54> 구체적으로, 동일 골수기증자로부터 종래의 농도구배에 의한 분리방법으로 분리한 중간엽 줄기세포(대조군)과 상기 실시예 1의 방법으로 분리한 본 발명의 cMSC-15를 배양한 후, 배양액으로 분비된 TGF-β 및 IL-10의 발현 양을 효소연결면역흡착분석법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)을 통해 분석하였다. 정확한 분석을 위해 상기 두 가지 세포주는 무혈청 배지를 이용하여 배양하였으며, 상기 ELISA는 모두 Rndsystems사(USA)의 키트를 사용하여, 제조사의 지침대로 수행하였다.
- <55> 분석 결과, TGF-β는 대조군과 큰 차이가 없었으나, IL-10의 경우에는 본 발명의 증분리 배양방법에 의해 분리된 중간엽 줄기세포 cMSC-15가 대조군에 비하여 5배 이상의 발현이 증가되어 있음을 알 수 있었다(도 3). 이는 면역편대속주질환의 치료효과와 중간엽 줄기세포의 IL-10의 발현 수준이 밀접한 관련이 있다는 것을 시사한다.
- <56> <실시예 3> 분리된 중간엽 줄기세포의 임상예의 적용
- <57> <3-1> 중간엽 줄기세포의 투여
- <58> 환자는 18세 여자로 급성 양표현형 골수성백혈병으로 진단 받고 유도요법으로 관해가 온 후 2006년 10월 HLA 일치 동종비혈연골수이식을 받았다. 6개월간 면역억제제를 사용 후 중단한 뒤, 1개월 후부터 만성이식편대속주반응이 시작되어 사이클로스포린 A(CsA), 마이코페놀레이트 모페틸(mycophenolate mofetil, MMF), 스테로이드 등으로 치료하였으나 계속되는 혈변과 빌리루빈 상승, 피부, 구강, 안구건조 등으로 환자 상태는 악화되었고, 치료 합병증으로 CMV의 활성화와 BK virus 감염으로 인해 혈뇨 및 혈액 내에서도 BK 바이러스가 확인되어 시토프르비르(Cideforvir)로 치료하기 시작하였다. 한국식약청의 응급임상허가를 획득한 후, 상기 실시예 1에서 분리한 환자의 모친의 중간엽줄기세포를 GMP 시설에서 배양한 뒤 환자에게 정맥주사로 1차 투여(2×10⁶/kg)하였다. 투여하는 도중과 후에 전혀 이상반응은 관찰되지 않았으며, 1차 투여 후 서서히 환자의 증상은 좋아졌고 3주후 같은 양을 2차 투여하였다. 이후 환자의 증상은 현격히 호전되어 스테로이드를 끊은 상태로 환자는 2차 투여

후 34일 만에 퇴원하였고 현재는 면역억제제로 MMF 1.5g/day만 복용중이다.

<59> <3-2> 치료 후 병변의 변화

<60> 본 발명의 층분리배양방법으로 분리한 중간엽 줄기세포가 병리학적으로 치료효과가 있는지 확인하기 위하여, 본 발명자들은 치료기간 동안 주요 병변인 대변의 양과 혈중 알칼라인포스파타제의 활성을 측정하였다(도 4). 혈중 알칼라인 포스파타제의 활성은 상용 키트(Sigma Chemical Company, USA)를 이용하여 수행하였다. 그 결과, 만성 면역편대속주질환의 주요 병변인 대변의 양이 획기적으로 감소하였고, 혈청학적 지표인 혈중 알칼라인 포스파타제 활성 역시 정상치(60~220 IU/L) 수준으로 떨어졌다. 또한, 증상이 호전되었는지 확인하기 위하여 대장내시경 분석을 수행하였다(도 5). 그 결과, 중간엽줄기세포 투여 3개월째 대장내시경 소견상 궤양은 많이 호전되었다. 상술한 바와 같이 본 발명자들은 임상실험을 통해, 본 발명의 층분리 배양방법으로 분리한 중간엽 줄기세포는 만성 면역편대속주질환의 치료에 매우 효과적임을 확인하였다.

발명의 효과

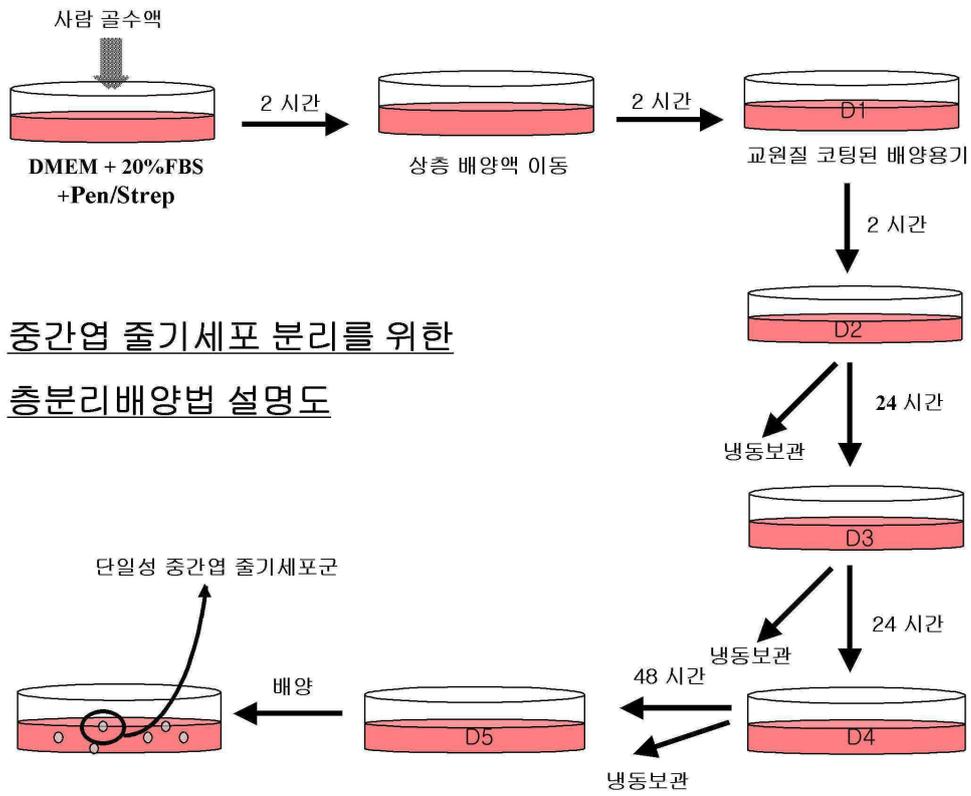
<61> 본 발명은 중간엽 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 급성 또는 만성 이식편대속주질환 치료제에 관한 것으로서, 본 발명의 치료제는 종래에 치료가 매우 어려웠던 이식편대속주질환, 특히 조혈모 이식수술 후 빈번히 발생하는 후유증으로 매우 치명적인 급성 또는 만성 이식편대속주질환을 매우 효과적으로 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

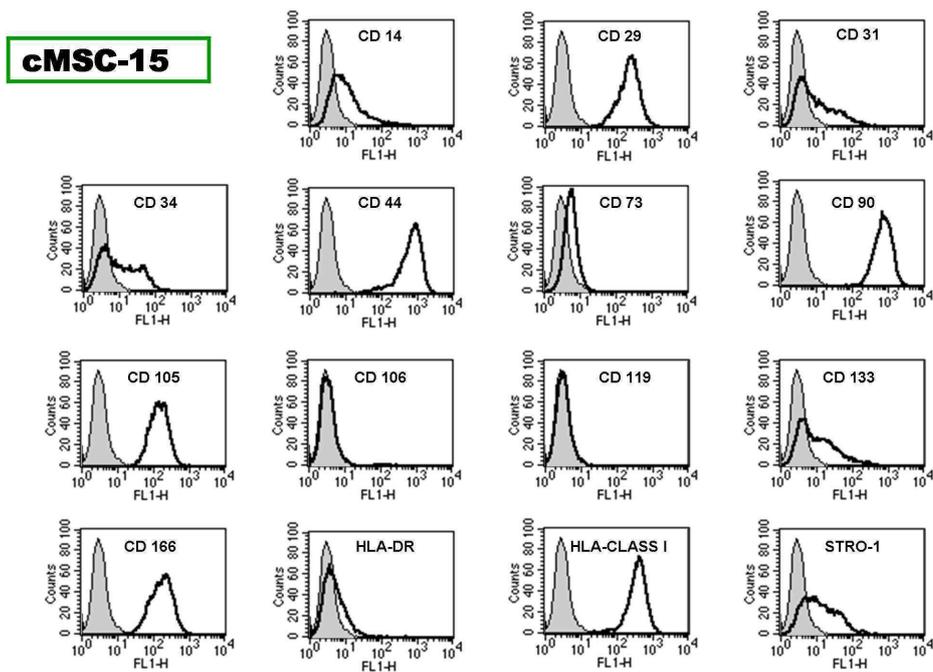
- <1> 도 1은 본 발명에서 사용한 층분리 배양에 의한 중간엽 줄기세포의 분리방법을 나타내는 도식이다.
- <2> 도 2는 층분리배양방법에 의해 분리된 중간엽 줄기세포의 표지자 발현 양상을 유세포분석으로 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.
- <3> 도 3은 본 발명의 층분리배양방법에 의해 분리된 중간엽 줄기세포주의 TGF-β 및 IL-10의 발현양상을 나타내는 그래프이다.
- <4> 도 4는 본 발명의 층분리배양방법에 의해 분리된 중간엽 줄기세포를 투여받은 만성 이식편대속주질환 환자의 대변 부피 및 알칼라인 포스파타제의 활성의 시간의 경과에 따른 변화를 나타내는 그래프이다.
- <5> 도 5는 본 발명의 층분리배양방법에 의해 분리된 중간엽 줄기세포를 투여받은 만성 이식편대속주질환 환자의 대장내시경 사진으로서, A는 치료전의 사진이고, B는 치료 후 10일이 경과한 뒤의 사진이며, C는 치료 후 1개월이 경과한 뒤의 사진이고, D는 치료 후 3개월이 경과한 뒤의 사진이다.

도면

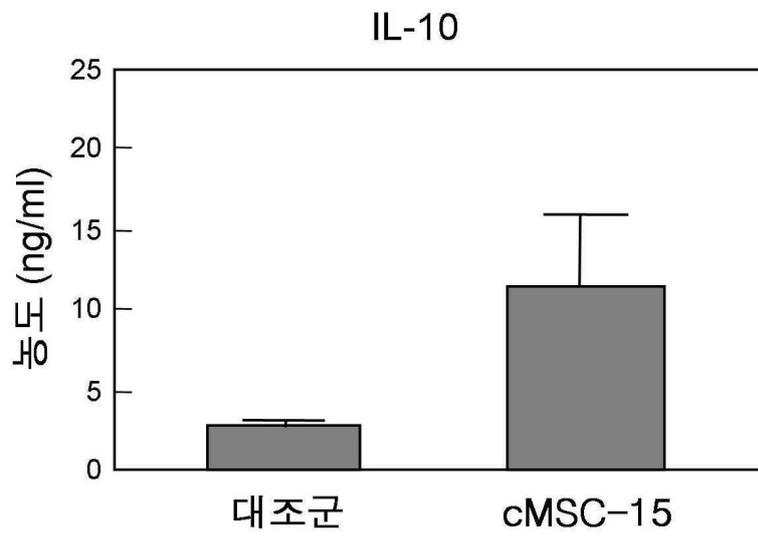
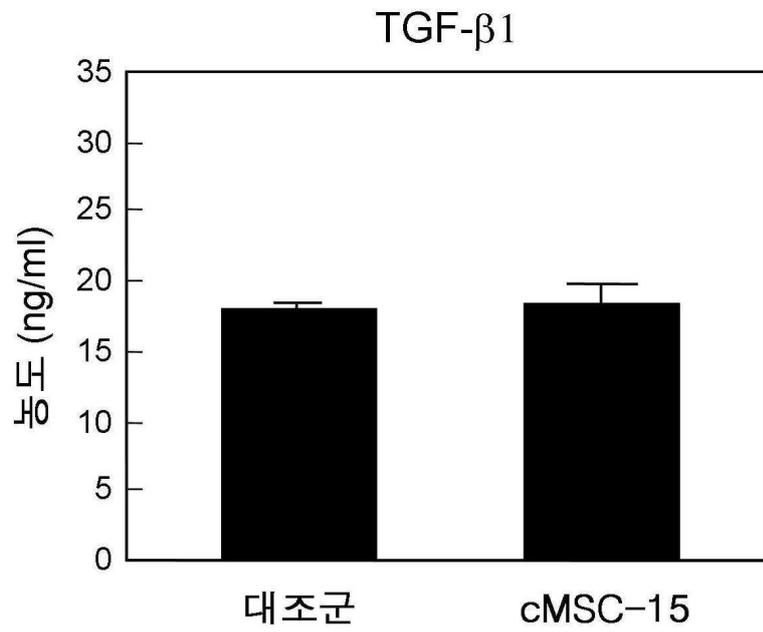
도면1



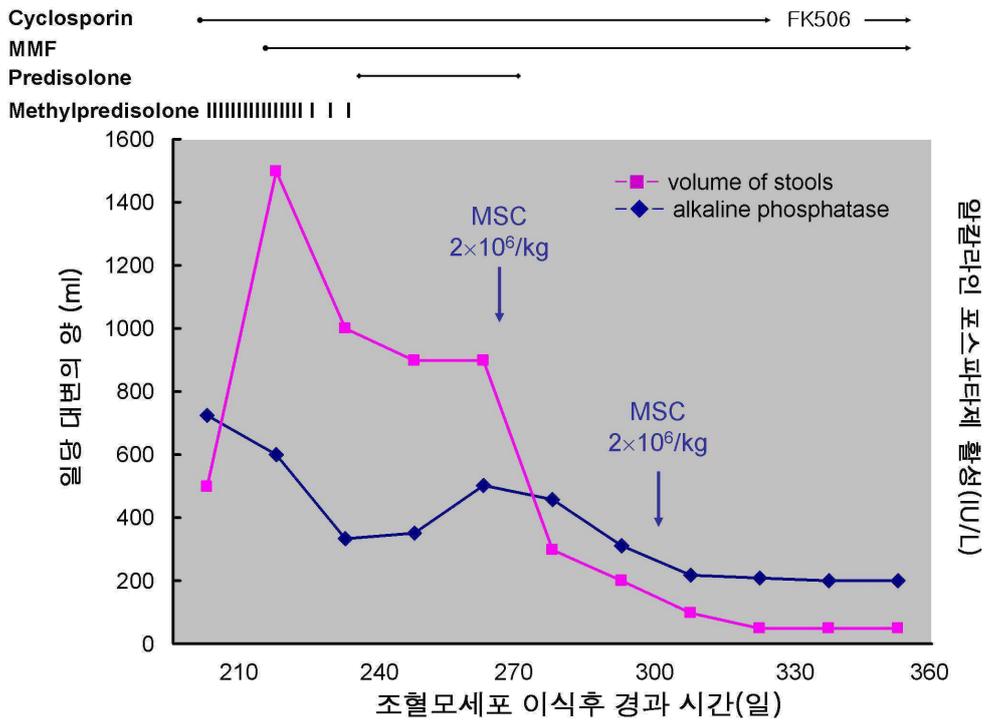
도면2



도면3



도면4



도면5

