(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2018 년 3 월 8 일 (08.03.2018)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2018/043937 A1

(51) 국제특허분류:
C12N 5/079 (2010.01) *A61K 35/30* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2017/008548

(22) 국제출원일: 2017 년 8 월 8 일 (08.08.2017)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2016-0110009 2016 년 8 월 29 일 (29.08.2016) KR

(71) 출원인: 사회복지법인 삼성생명공익재단 **(SAMSUNG LIFE PUBLIC WELFARE FOUNDATION)** [KR/KR]; 04348 서울시 용산구 이태원로55길 48, Seoul (KR).

(72) 발명자: **최병옥 (CHOI, Byung Ok)**; 06289 서울시 강남구 선릉로 120, 10동 1005호, Seoul (KR). **장종욱 (CHANG, Jong Wook)**; 04728 서울시 성동구 금호로 117, 104동 306호, Seoul (KR).

(74) 대리인: **김순웅 (KIM, Soon Woong)**; 08380 서울시 구로구 디지털로 31길 20 (구로동) 601호, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

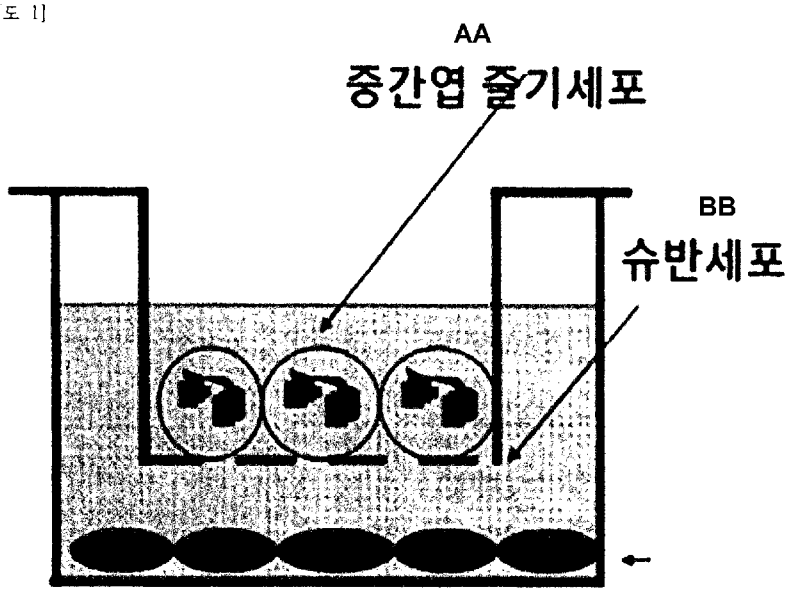
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE,

WO 2018/043937 A1

(54) Title: COMPOSITION FOR PROMOTING PERIPHERAL NERVE CELL PROLIFERATION COMPRISING PROTEIN SECRETED FROM MESENCHYMAL STEM CELLS

(54) 발명의 명칭: 중간엽 줄기세포 분비 단백질을 포함하는 말초신경 세포 증식 촉진용 조성물

[도 1]



AA ... Mesenchymal stem cell
BB ... Schwann cell

(57) Abstract: The present invention relates to a composition for promoting peripheral nerve cell proliferation comprising a protein secreted from mesenchymal stem cells, and a medium composition for promoting peripheral nerve cell proliferation comprising the protein. Also, the present invention relates to a method for promoting peripheral nerve cell proliferation using the protein secreted from the mesenchymal stem cells, a peripheral nerve cell of which proliferation is promoted thereby, and a cell therapeutic agent comprising the peripheral nerve cells. The protein secreted from the mesenchymal stem cells according to the present invention can effectively proliferate the peripheral nerve cells, especially Schwann cells, and enables mass production of peripheral nerve cells that can be used

[다음 쪽 계속]

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 제21조(3))

as an agent for cell therapy, and thus, is expected to be effective in the development of a therapeutic agent effective for neurological diseases.

(57) 요약서: 본 발명은 중간엽 줄기세포에서 분비되는 단백질을 포함하는 말초신경 세포 증식 촉진용 조성물, 및 상기 단백질을 포함하는 말초신경 세포 증식용 배지 조성물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 중간엽 줄기세포에서 분비되는 단백질을 이용한 말초신경 세포의 증식 촉진 방법 및 이에 의하여 증식이 촉진된 말초신경세포 및 이를 포함하는 세포치료제에 관한 것이다. 본 발명에 따른 중간엽 줄기세포에서 분비되는 단백질은 말초신경 세포, 특히 슈반세포를 효과적으로 증식시키는 바, 세포치료제로 이용될 수 있는 말초신경 세포의 대량 생산을 가능하게 하므로, 신경질환의 효과적인 치료제 개발에 유익할 것으로 기대된다.

명세서

발명의 명칭: 중간엽 줄기세포 분비 단백질을 포함하는 말초신경 세포 증식 촉진용 조성물

기술분야

[1] 본 발명은 중간엽 줄기세포 분비 단백질을 포함하는, 말초신경 세포 증식 촉진용 조성물에 관한 것이다.

[2]

배경기술

[3] 신경계는 크게 중추신경계, 말초신경계로 구분된다. 그 중 말초신경계는 중추신경계인 뇌 및 척수와 신체 말초를 연락하며 신경전달을 담당한다.

[4] 이러한 말초신경계는 체성신경계와 자율신경계로 분류되고, 체성신경계는 뇌신경과 척수신경으로 나누어진다. 또한, 체성신경계는 기능적으로 분류하면, 구심성 또는 감각성의 신경섬유와 원심성 또는 운동성의 신경섬유로 나뉜다. 구심성 또는 감각성 신경섬유는 감각수용기로부터 발생한 신경 신호를 중추신경에 전달하고, 원심성 또는 운동성의 신경섬유는 뇌·척수로부터 근육이나 분비선 등에 신경 신호를 전달하는 한다.

[5] 뇌로부터 나오는 말초신경인 뇌신경은 12쌍이 알려져 있고, 감각성, 운동성, 또는 혼합성의 신경섬유로 이루어져 있다. 이러한 12쌍의 신경쌍은 각각 후신경, 시신경, 동안신경, 활차신경, 삼차신경, 외전신경, 안면신경, 내이신경, 설인신경, 미주신경, 부신경, 설하신경이라 불린다. 이들 중, 감각성 또는 혼합성의 신경섬유로 이루어진 신경은 후신경, 시신경, 삼차신경, 안면신경, 내이신경, 설인신경, 미주신경이 알려져 있다.

[6] 척수로부터 발생되는 말초신경인 척수신경은 좌우 31쌍이 알려져 있고, 8쌍의 경신경, 12쌍의 흉신경, 5쌍의 요신경, 5쌍의 선골신경과 1쌍의 미골신경이 알려져 있다. 척수신경은 전부 혼합성의 신경섬유로 이루어지고, 피부 등으로 가는 감각섬유와 골격근으로 가는 운동섬유를 포함하고 있다.

[7] 감각성의 신경섬유, 즉 감각신경은 시각기, 청각기, 후각기, 미각기 및 피부 등의 감각 수용기가 수취한 빛, 소리, 온도나 접촉 등의 자극을 중추신경계에 정확히 전달하는 기능을 담당하고 있다. 중추신경계에 전해진 신경 신호는 최종적으로는 대뇌피질의 각 감각야, 예컨대, 시각야, 청각야 등에 전달되며, 정상적으로 감각이 인식된다.

[8] 그러나, 이러한 말초신경이 바이러스감염, 종양, 암, 허혈, 외상, 압박, 약물이나 방사선 요법 등의 원인에 의해 손상 받을 수 있다. 그 증상은 말초부의 자통, 저림, 작열감, 관절의 고유각 저하, 진동각 저하, 동통, 이상감각, 냉기 또는 화끈거림 등이 있다.

[9] 일반적으로 이러한 말초신경손상은 외상성 말초신경손상, 선천성

말초신경손상, 염증성 말초신경손상, 독성에의한 말초신경손상, 기타 종양성 혹은 특발성 말초신경손상으로 분류된다.

[10] 한편, 슈반세포(Schwann cells)는 말초신경계에서 신경을 수초화 할 수 있는 신경교(glia) (아교 또는 교) 세포이다. 슈반세포는 붕너 띠(Bungner band)를 형성함으로써 신경 손상 후 신경 재생에 있어 중요한 역할을 한다. 더 나아가, 슈반세포는 손상된 말초 신경섬유의 재생을 촉진시키는 다양한 성장인자 또는 사이토카인(cytokine)을 분비한다. 게다가, 척수손상 모델에서 슈반세포의 이식은 신경섬유 재생을 강화하고 기능적 회복을 증진시킨다. 따라서, 중추신경계에서 신경 재생을 위한 슈반세포의 이식이 제안되어 왔었지만, 이러한 접근은 슈반세포를 얻기 위해 외과적인 신경 조직 절취가 필요하므로 임상적인 세팅에서는 문제시된다. 또한, 치료상의 세포수를 얻기 위해 슈반세포의 수를 늘리는 것도 어렵다.

[11]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[12] 이에, 본 발명자들은 슈반세포를 효과적으로 증식하는 방법을 개발하기 위하여 예의 노력한 결과, 중간엽 줄기세포와 슈반세포를 공동배양하는 경우, 중간엽 줄기세포로부터 분비되는 단백질이 슈반세포의 증식에 유용함을 확인하고, 본 발명을 완성하기 이르렀다.

[13] 따라서, 본 발명의 일 목적은 말초신경 세포 증식 촉진용 조성물 및 이를 이용한 말초신경 세포의 증식 촉진 방법을 제공하는 것이다. 또한 본 발명은 상기 방법에 의하여 증식이 촉진된 말초신경세포 및 이를 포함하는 세포치료제를 제공하는 것이다.

[14]

과제 해결 수단

[15] 본 발명은 중간엽 줄기세포에서 분비되는 단백질을 포함하는, 말초신경 세포 증식 촉진용 조성물을 제공한다.

[16] 또한 본 발명은 중간엽 줄기세포에서 분비되는 단백질을 포함하는, 말초신경 세포 증식 촉진용 배지 조성물을 제공한다.

[17] 또한 본 발명은 말초신경세포 배양 배지에 중간엽 줄기세포에서 분비되는 단백질을 첨가하는 단계를 포함하는, 말초신경 세포 증식의 촉진 방법을 제공한다.

[18] 또한 본 발명은 상기 방법에 의하여 증식이 촉진된 말초신경 세포를 제공한다.

[19] 또한 본 발명은 상기 말초 신경 세포를 포함하는 세포 치료제를 제공한다.

[20]

발명의 효과

[21] 본 발명에 따른 중간엽 줄기세포에서 분비되는 단백질은 말초신경 세포, 특히

슈반세포를 효과적으로 증식시키는 바, 세포치료제로 이용될 수 있는 말초신경 세포의 대량 생산을 가능하게 하므로, 신경질환의 효과적인 치료제 개발에 유익할 것으로 기대된다.

[22]

도면의 간단한 설명

[23] 도 1은 S19 슈반세포주와 Wharton's Jelly derived mesenchymal stem cell의 공동배양 모식도이다.

[24] 도 2는 중간엽 줄기세포에 의한 슈반세포의 증식 촉진을 확인한 결과이다.

[25] 도 3은 배지내 중간엽 줄기세포가 분비한 단백질을 단백질 어레이를 통하여 확인한 도이다.

[26] 도 4는 Pref-1의 슈반세포의 증식에 대한 효과를 나타낸 도이다.

[27] 도 5는 Pref-1의 슈반세포 보호 효과를 나타낸 도이다.

[28]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[29] 본 발명의 일 양상은 중간엽 줄기세포에서 분비되는 단백질을 포함하는, 말초신경 세포 증식 촉진용 조성물를 제공한다.

[30] 이하 본 발명에 대하여 상세히 설명한다.

[31] 본 명세서에서 사용된 용어 "줄기세포"는, 다양한 신체 조직으로 분화할수 있는 능력을 갖는 미분화 세포로서, 이는 만능 줄기 세포(totipotent stem cell), 전분화능 줄기세포 (pluripotent stem cell), 다분화능 줄기세포(multipotent stem cell)로 분류될 수 있다.

[32] 본 명세서에서 사용된 용어 "중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell, MSC)"는 뼈, 연골, 지방, 근육세포를 포함한 여러 가지 중배엽성 세포 또는 신경세포와 같은 외배엽성 세포로도 분화하는 능력을 가진 다분화능 줄기세포(multipotent stem cell)이다. 상기 중간엽 줄기세포는 바람직하게는 탯줄, 태반, 제대, 제대혈, 골수, 지방, 근육, 신경, 피부, 양막, 융모막 및 탈락막으로 구성된 군에서 선택되는 것으로부터 유래될 수 있다. 또한, 상기 중간엽 줄기세포는 인간, 태아 또는 인간을 제외한 포유동물로부터 유래될 수 있다. 상기 인간을 제외한 포유동물은 보다 바람직하게는 개과 동물, 고양이과 동물, 원숭이과 동물, 소, 양, 돼지, 말, 랫트, 마우스 또는 기니피그 등일 수 있으며, 그 유래를 제한하지 않는다.

[33] 본 발명에서 상기 중간엽 줄기세포에서 분비되는 단백질은 중간엽 줄기세포와 슈반세포주를 공동배양하였을 때, 배지에서 그 분비가 증가한 단백질로서, 그 종류를 제한하지 않는다.

[34] 그 예로서, Dtk, BMPR-1B (BMP receptor type IB)/ALK6, beta-Defensin 2, CXCR2/IL-8 RB(Interleukin-8 receptor B), IFN-alpha/beta R1 (interferon-α/β receptor 1), FGF R4 (Fibroblast growth factor receptor 4), NeuroD1 (Neurogenic differentiation

1), CXCR6 (C-X-C chemokine receptor type 6), IL-12 (Interleukin 12) p40, Epirequlin, IL-1 (Interleukin 1) beta, IL-7R (Interleukin-7 receptor) alpha, BMP-15 (Bone morphogenetic protein 15), Pref-1 (Preadipocyte factor-1), MIP-1d (macrophage inflammatory protein-1D), FGF R3 (Fibroblast growth factor receptor 3), CCR5 (C-C chemokine receptor type 5), S100A10m, WIF-1 (WNT inhibitory factor 1), CD40 Ligand/TNFSF5/CD154, SDF-1 (stromal cell-derived factor 1)/CXCL12, Dance, 또는 Endocan 일 수 있으며, 바람직하게는 Pref-1일 수 있다.

[35] 상기 Pref-1 (Preadipocyte factor-1) 단백질은 세포외 도메인에 표피 성장인자 (EGF) 유사-반복절, 막근접 부위 (juxtamembrane region), 단일 막통과 도메인, 및 짧은 세포질막 꼬리를 갖는 막통과 단백질이다. Pref-1는 3T3-L1 지방전구세포 (preadipocyte)에서 검출되는 반면, 지방세포로 전환된 후에는 그 발현이 사라지는 단백질로 알려져 있다. Pref-1 은 Dlk1(Delta-like protein 1) 으로도 지칭될 수 있다.

[36] 상기 말초신경세포이란, 중추신경계 (CNS)의 바깥쪽에 있는 신경계를 말초신경계 (peripheral nervous system, PNS) 라고 한다.

[37] 대부분의 신경원의 세포체는 중추신경계 내에 위치해 있으며, 이 세포체에서 나오는 돌기, 즉 축삭 (axon)이 말초신경계를 형성한다. 말초신경계에서 축삭은 신경아교세포 (neuroglial cell)와 결합조직막 (connective tissue sheath)에 의해 싸여 있다. 하나의 축삭과 이를 둘러싼 수초 (myelin sheath)를 신경섬유 (nerve fiber)라고 하며 수초에 의해 싸여있지 않은 축삭은 그 자체가 하나의 신경섬유이다. 수초에 의해 싸여 있는 신경섬유를 유수신경섬유 (myelinated nerve fiber)라고 하며, 수초에 의해 싸여 있지 않는 신경섬유를 무수신경섬유 (unmyelinated nerve fiber)라고 한다. 수초는 신경아교세포의 하나인 슈반세포 (Schwann cell)에 의해 형성된다. 여러 개의 유수신경섬유와 무수신경섬유가 모여 신경섬유의 다발을 형성하며, 이러한 신경섬유의 다발이 결합조직막에 의해 싸여 있는 구조가 육안으로 관찰되는 신경 (nerve)이다. 상기 말초신경계를 구성하는 세포의 종류를 제한하지 않으나, 바람직하게는 슈반세포일 수 있다.

[38] 특히, 상기 중간엽 줄기세포에서 분비되는 단백질 중 Pref-1은 슈반세포를 특이적으로 증식하는 효과를 발휘한다.

[39] 또한, 본 발명의 다른 양상은 중간엽 줄기세포에서 분비되는 단백질을 포함하는, 말초신경 세포 증식 촉진용 배지 조성물 및 말초신경세포 배양 배지에 중간엽 줄기세포에서 분비되는 단백질을 첨가하는 단계를 포함하는, 말초신경 세포 증식의 촉진 방법을 제공한다.

[40] 말초신경, 특히 슈반세포의 경우, 증식이 매우 더딘 세포로 알려져 있으나, 본 발명에 따른 중간엽 줄기세포에서 분비되는 단백질을 처리하는 경우, 세포의 증식이 매우 효과적으로 촉진됨을 확인하였다.

[41] 상기 배양 배지는 신경세포를 배양하는데 사용되는 기본 배지로서, 당업계에서 신경세포 배양에 적합하다고 알려져 있는 통상적인 배지, 예를 들면 DMEM,

MEM, K-SFM 배지 등을 사용할 수 있다.

[42] 또한, 상기 배양 배지에는 항생제가 포함될 수 있으며, 일반적으로 페니실린/스트렙토마이신을 사용하지만 이에 제한되지 않는다.

[43] 또한, 상기 배양배지는 당업계에 공지된, 세포의 증식을 촉진할 수 있는 첨가제가 보충될 수 있다. 또한, 배지는 등장액 중의 중성 완충제(예컨대 인산염 및/또는 고농도 중탄산염) 및 단백질 영양분(예를 들면 필수 아미노산 및 비필수 아미노산, 예컨대 글루타민)을 함유할 수 있다. 나아가, 지질(지방산, 콜레스테롤, 혈청의 HDL 또는 LDL 추출물) 및 이 종류의 대부분의 보존액 배지에서 발견되는 기타 성분(예컨대 인슐린 또는 트랜스페린, 뉴클레오시드 또는 뉴클레오티드, 피루빈산염, 임의의 이온화 형태 또는 염인 당원, 예컨대 글루코스, 셀레늄, 글루코코르티코이드, 예컨대 히드로코르티존 및/또는 환원제, 예컨대 β-메르캅토에탄올)을 함유할 수 있다. 또한, 배지는 세포가 서로 유착하거나, 용기벽에 유착하거나, 너무 큰 다발을 형성하는 것을 방지할 목적으로, 항응집제 (anti-clumping agent) 등을 포함할 수도 있다.

[44] 본 발명의 다른 양상은 상기 방법에 의하여 증식이 촉진된 말초신경 및 이를 포함하는 세포치료제를 제공한다.

[45] 세포치료제란 "세포와 조직의 기능을 복원하기 위하여 살아있는 자가(autologous), 동종(allogenic), 혹은 이종(xenogenic)의 세포를 체외에서 증식, 선별하거나 여러 가지 방법으로 세포의 생물학적 특성을 변화시키는 일련의 행위를 통하여 치료, 진단, 예방의 목적으로 사용하는 의약품 (KFDA가 고시한 생물학적 제재 등의 품목허가 심사고시(2008-78호) 제 2조)"을 의미한다.

[46] 상기 세포치료제는 신경질환의 치료에 이용될 수 있다. 신경질환은 특히 말초신경 손상에 기인한 질환일 수 있으며, 그 종류를 제한하지 않는다. 예를 들어, 말초신경손상, 중추신경손상, 신경병증, 신경병증성 통증 또는 뇌질환일 수 있으며, 신경병증 또는 신경병증성 통증은 예를 들면 급성 염증성 탈수초성 다발성말초신경병증, 만성 염증성 탈수초성 다발성말초신경병증, 당뇨병성 말초신경병증, 대상포진, 혈관염신경병증, 유전성 말초신경병증, 척수 소뇌 변성증, 근위축성 측색경화증, 통증성 당뇨병성 말초 신경병증, 삼차 신경통, 대뇌 피질이나 척수시 상로를 따라 발생하는 암성 병변, 외상 후 신경병증, 대상포진후신경통, 환지통, 뇌졸중 후의 중추성 통증 및 시상통으로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있다. 뇌질환은 예를 들면 뇌졸중, 뇌종양, 치매, 파킨슨병, 알츠하이머병, 헌틴톤병, 간질 또는 허혈성 뇌질환에서 선택된 것일 수 있다. 또한, 말초신경손상 또는 중추신경손상은 신경단열증 및 외상성 신경손상일 수 있다.

[47] 상기 조성물이 신경질환의 치료용 약학적 조성물로 제조되는 경우, 상기 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있다. 상기 조성물에 포함되는 약학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘,

알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 약학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[48] 상기 신경질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있다. 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 내피 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여 및 직장내 투여 등으로 투여할 수 있다. 경구 투여시, 단백질 또는 펩타이드는 소화가 되기 때문에 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제형화 되어야 한다. 또한, 상기 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

[49] 상기 신경질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 상기 조성물의 바람직한 투여량은 성인 기준으로 100-100,000,000 (10^2-10^8) cell/kg 범위 내이다. 용어 "약학적 유효량"은 암을 예방 또는 치료하는 데, 또는 혈관신생으로 인한 질환의 예방 또는 치료하는 데 충분한 양을 의미한다.

[50] 상기 조성물은 당해 당업자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액, 시럽제 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캅셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다. 또한, 상기 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 또한 단회 또는 필요시 추가 투여될 수 있다.

[51]

발명의 실시를 위한 형태

[52] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[53] **실시예 1. 실험방법**

[54] 중간엽 줄기세포(MSC)와 슈반세포주를 공동배양하고 그 증식률을 분석하였다. 중간엽 줄기세포로는 사람의 탯줄유래 중간엽 줄기세포를 사용하였다.

[55] 구체적으로 공동배양챔버에서 하부챔버에는 S19 슈반세포주를, 상부챔버에는 Wharton's Jelly derived mesenchymal stem cell을 위치시키고 이를 공동배양 하였다. 그 배양 모식도를 도 1에 나타내었다.

[56] 공동배양 후 하부챔버의 슈반세포 증식정도를 세포 계수를 통하여 분석하였다. 이 때의 각 배지를 공동챔버에서 수확하여 농축한 후 protein array로 분석하여 MSC에서 분비가 증가하는 단백질을 동정하였다.

[57] 또한, 후보 단백질의 재조합 단백질을 줄기세포 대신 슈반세포 및 타 세포에 처리하여 세포증식유도를 확인하였으며, 각 재조합 단백질을 처리 후 세포 내 신호전달 인산화 효소를 분석하였다.

[58]

[59] **실시예 2. 결과**

[60] 실시예 2.1 - 중간엽 줄기세포주의 공동배양에 따른 슈반세포의 증식 촉진 효과

[61] 하부챔버에는 S19 슈반세포주를, 상부챔버에는 Wharton's Jelly derived mesenchymal stem cell을 위치시키고 이를 공동배양하였으며, 세포를 계수하여 슈반세포의 증식정도를 판단하였다. 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[62] 도 2에 나타난 바와 같이, 사람의 탯줄유래 중간엽 줄기세포는 슈반 세포의 증식을 촉진시킴을 확인하였다. 즉, 탯줄유래 중간엽 줄기세포를 슈반세포와 공동배양 후 슈반세포의 증식을 분석했을 때, 슈반세포의 증식이 시간이 지남에 따라 촉진되었다.

[63]

[64] **실시예 2.2 - 중간엽 줄기세포주가 분비하는 치료 효능 단백질의 동정**

[65] 중간엽 줄기세포가 슈반세포 사멸을 감소시키고 증식을 촉진시키므로 측분비(paracrine)효과를 보인다고 설명할 수 있으며, 이에 따라 배지 속의 단백질을 분석하여 공동배양 군에서 증가하는 단백질을 동정하는 것이 세포사멸 억제효과를 설명할 수 있다고 가정하였다. 이에 따라서, 단백질 어레이를 통하여 탯줄 줄기세포와 공동배양 시 탯줄유래 중간엽 줄기세포에서 분비가 2배 이상 늘어난 단백질을 도 3과 같이 분석하였다.

[66] 그 결과, 총 23종의 발현증가 단백질을 확인하였으며, 그 중 가장 높은 활성을 나타낼 것으로 예상되는 Pref-1 단백질을 선정하였다.

[67]

[68] **실시예 2.3 - Pref-1 단백질의 슈반세포 증식촉진 효과 확인**

[69] 상기 동정된 단백질 중 Pref-1 단백질의 슈반세포 증식촉진 효과를 확인하였다.

[70] 또한, 상기 단백질의 직접적 효과를 확인하기 위하여, 상기 단백질을 재조합하고, 이를 다양한 농도와 시간별로 슈반세포에 처리하여 슈반세포 증식과 신호 전달을 측정하였다.

[71] 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[72] 도 4는 Pref-1의 슈반세포의 증식에 대한 효과를 나타낸 도이다.

[73] 도 4에 나타난 바와 같이, S16 슈반세포는 증식이 매우 늦은 세포로 알려져

있으나 Pref-1 단백질을 농도별로 처리하면 슈반세포의 증식을 촉진함이 관찰되었다. Pref-1의 경우는 Erk-1,2 kinase를 활성화시키는 반면 Akt 에는 변화가 없음을 확인하였다.

[74] 또한, Pref-1이 슈반세포 특이적으로 그 증식에 영향을 미치는지를 확인하였다. 그 결과, Pref-1는 신경아세포종 (neuroblastoma cell)인 SHSY-5Y 세포와 근육세포인 C2C12세포의 증식에 영향을 미치지 못함을 확인하였는 바, Pref-1이 슈반세포에 특이적으로 작용함을 확인하였다.

청구범위

[청구항 1] 중간엽 줄기세포에서 분비되는 단백질을 포함하는, 말초신경 세포 증식 촉진용 조성물.

[청구항 2] 청구항 1에 있어서,
상기 중간엽 줄기세포에서 분비되는 단백질은 Dtk, BMPR-1B (BMP receptor type IB)/ALK6, beta-Defensin 2, CXCR2/IL-8 RB(Interleukin-8 receptor B), IFN-alpha/beta R1 (interferon-α/β receptor 1), FGF R4 (Fibroblast growth factor receptor 4), NeuroD1 (Neurogenic differentiation 1), CXCR6 (C-X-C chemokine receptor type 6), IL-12 (Interleukin 12) p40, Epirequlin, IL-1 (Interleukin 1) beta, IL-7R (Interleukin-7 receptor) alpha, BMP-15 (Bone morphogenetic protein 15), Pref-1 (Preadipocyte factor-1), MIP-1d (macrophage inflammatory protein-1D), FGF R3 (Fibroblast growth factor receptor 3), CCR5 (C-C chemokine receptor type 5), S100A10m, WIF-1 (WNT inhibitory factor 1), CD40 Ligand/TNFSF5/CD154, SDF-1 (stromal cell-derived factor 1)/CXCL12, Dance, 및 Endocan으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인, 말초신경 세포 증식 촉진용 조성물.

[청구항 3] 청구항 1에 있어서, 상기 말초신경 세포는 슈반세포인 것인, 말초신경 세포 증식 촉진용 조성물.

[청구항 4] 청구항 3에 있어서, 상기 중간엽 줄기세포에서 분비되는 단백질은 슈반세포 특이적으로 세포 증식을 촉진하는 것을 특징으로 하는, 말초신경 세포 증식 촉진용 조성물.

[청구항 5] 청구항 1에 있어서, 상기 중간엽 줄기세포는 탯줄, 태반, 제대, 제대혈, 골수, 지방, 근육, 신경, 피부, 양막, 융모막, 및 탈락막으로 구성된 군에서 선택되는 것으로부터 유래된 것인, 말초신경 세포 증식 촉진용 조성물.

[청구항 6] 중간엽 줄기세포에서 분비되는 단백질을 포함하는, 말초신경 세포 증식 촉진용 배지 조성물.

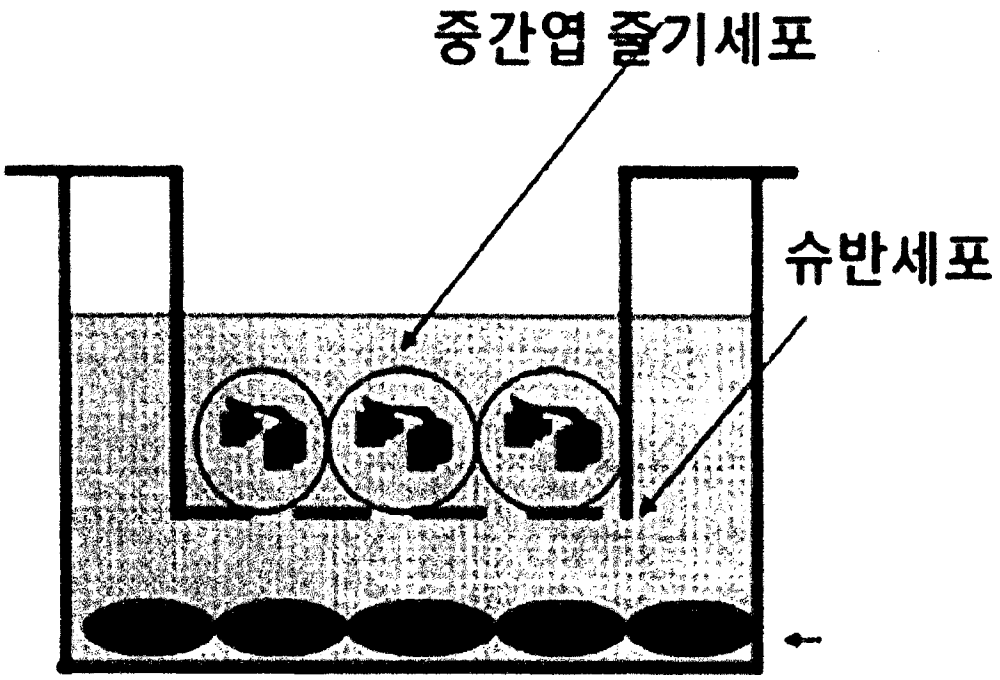
[청구항 7] 말초신경세포 배양 배지에 중간엽 줄기세포에서 분비되는 단백질을 첨가하는 단계를 포함하는, 말초신경 세포 증식의 촉진 방법.

[청구항 8] 청구항 7의 방법에 의하여 증식이 촉진된 말초신경 세포.

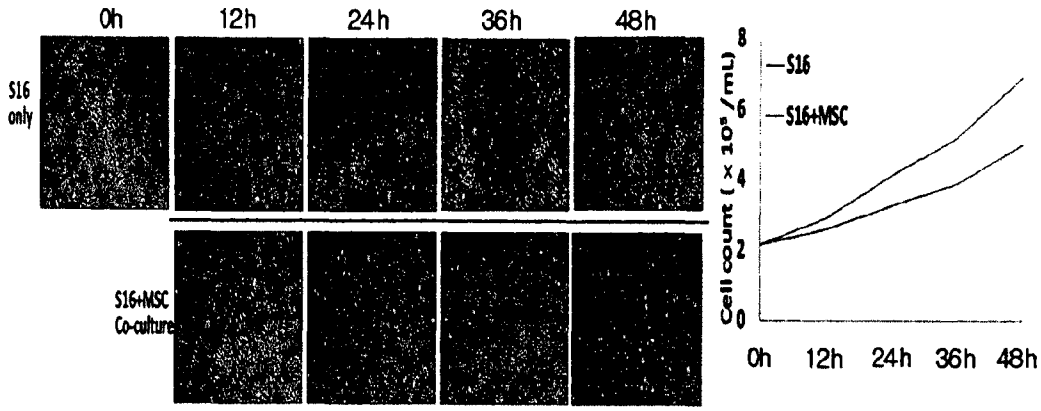
[청구항 9] 청구항 8의 말초신경 세포를 포함하는 세포치료제.

[청구항 10] 청구항 9에 있어서, 상기 세포치료제는 신경질환 치료용인, 세포치료제.

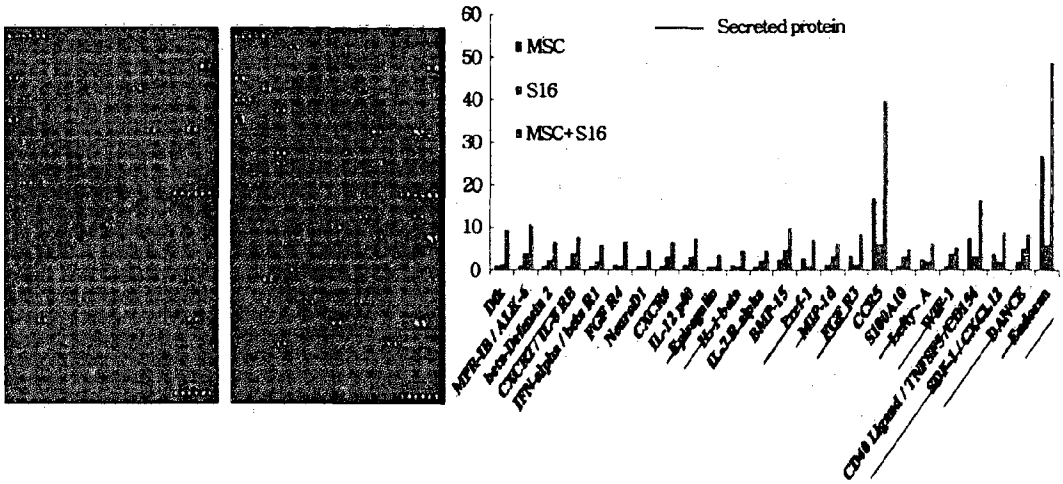
[도 1]


중간엽 줄기세포
슈반세포

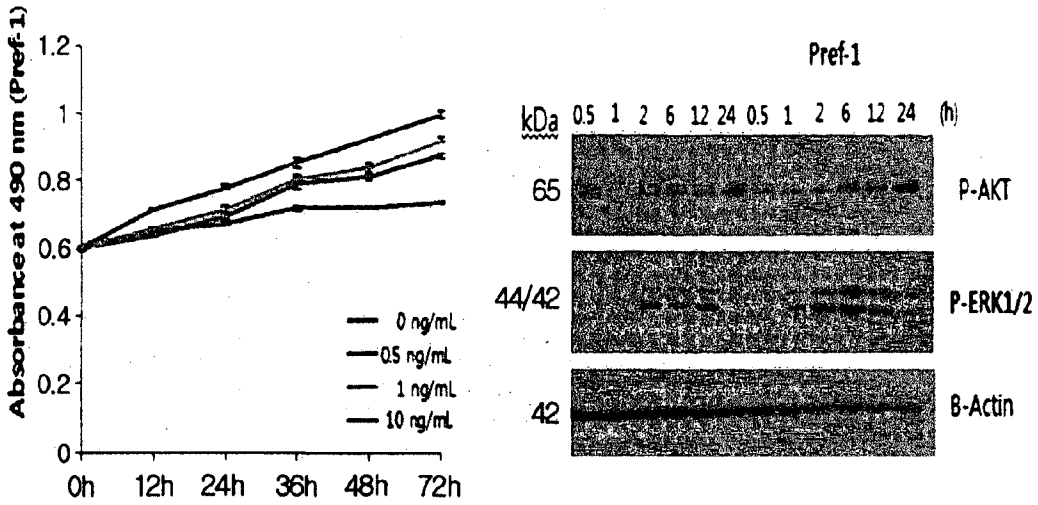
[도 2]


0h
12h
24h
36h
48h
S16 only
S16+MSC Co-culture
S16
S16+MSC
Cell count (x 10⁵ /mL)
0
2
4
6
8
0h
12h
24h
36h
48h

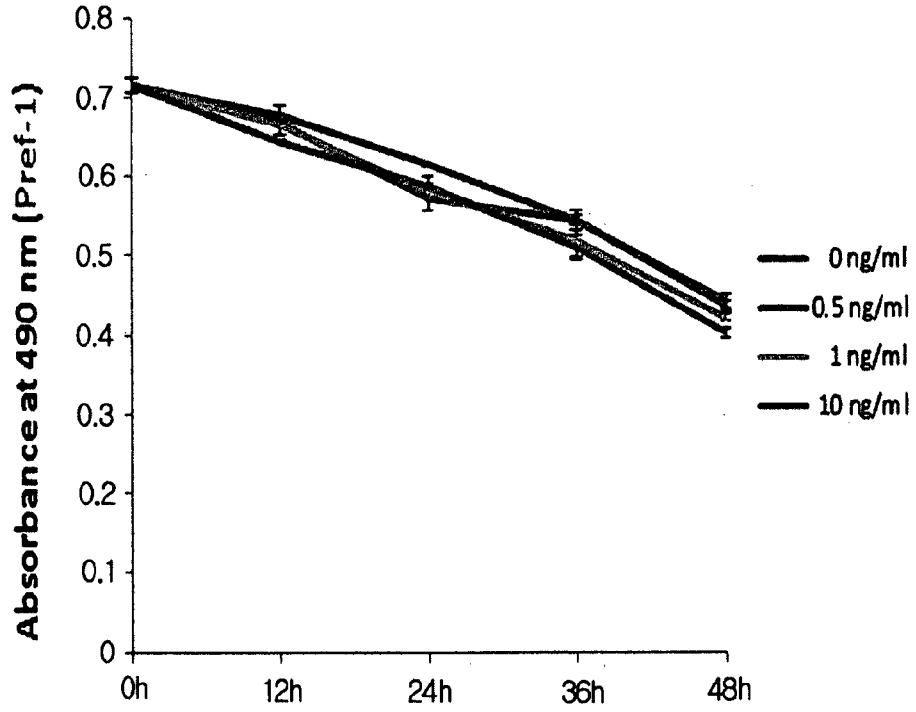
[도 3]


Secreted protein
MSC
S16
MSC+S16
60
50
40
30
20
10
0

[도 4]


Absorbance at 490 nm (Pref-1)
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0h
12h
24h
36h
48h
72h
0 ng/mL
0.5 ng/mL
1 ng/mL
10 ng/mL
Pref-1
kDa
0.5 1 2 6 12 24 0.5 1 2 6 12 24 (h)
65
P-AKT
44/42
P-ERK1/2
42
B-Actin

[도 5]


Absorbance at 490 nm (Pref-1)
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
0h
12h
24h
36h
48h
0 ng/ml
0.5 ng/ml
1 ng/ml
10 ng/ml

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2017/008548

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 5/079(2010.01)i, A61K 35/30(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)

C12N 5/079; C12N 5/071; A61K 35/30

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: mesenchymal stem cell, secretory protein, schwann cells, proliferation

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GUO, Z-Y. et al., "Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Promote Peripheral Nerve Repair via Paracrine Mechanisms", Neural Regeneration Research, 2015, vol. 10, no. 4, pages 651-658 See abstract; page 651, left column, first paragraph; page 655, right column, third paragraph; page 657, left column, second paragraph-right column, second paragraph; figure 2.	1-10
X	WANG, J. et al., "Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Promote Cell Proliferation and Neurotrophic Function of Schwann Cells in Vitro and in Vivo", Brain Research, 2009, vol. 1262, pages 7-15 See abstract; page 8, section 2.1; figures 1-3.	1-10
X	LI, Y. et al., "Amniotic Mesenchymal Stem Cells Display Neurovascular Tropism and Aid in the Recovery of Injured Peripheral Nerves", Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2014, vol. 18, no. 6, pages 1028-1034 See abstract; page 1033.	1-10
X	YANG, D-Y. et al., "Dual Regeneration of Muscle and Nerve by Intravenous Administration of Human Amniotic Fluid-derived Mesenchymal Stem Cells Regulated by Stromal Cell-derived Factor-1α in a Sciatic Nerve Injury Model", Journal of Neurosurgery, 2012, vol. 116, no. 6, pages 1357-1367 See abstract.	1-10

☒ 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
16 NOVEMBER 2017 (16.11.2017)	**17 NOVEMBER 2017 (17.11.2017)**
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2017/008548

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LADAK, A. et al. "Differentiation of Mesenchymal Stem Cells to Support Peripheral Nerve Regeneration in a Rat Model", Experimental Neurology, 2011, vol. 228, pages 242-252 See abstract; figure 1.	1-10
A	KR 10-2009-0008155 A (THE CATHOLIC UNIVERSITY OF KOREA INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 21 January 2009 See claims 1-5, 8 and 10-12.	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2017/008548

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2009-0008155 A	21/01/2009	KR 10-1133387 B1	09/04/2012
		US 2010-0297089 A1	25/11/2010
		US 8491885 B2	23/07/2013
		WO 2009-011546 A2	22/01/2009
		WO 2009-011546 A3	12/03/2009

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2017/008548

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 5/079(2010.01)i, A61K 35/30(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
C12N 5/079; C12N 5/071; A61K 35/30

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:중간엽 줄기세포, 분비 단백질, 슈반세포, 증식

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	GUO, Z-Y. 등, 'Human umbilical cord mesenchymal stem cells promote peripheral nerve repair via paracrine mechanisms', Neural Regeneration Research, 2015, 제10권, 제4호, 페이지 651-658 초록; 페이지 651, 좌컬럼, 첫 번째 단락; 페이지 655, 우컬럼, 세 번째 단락; 페이지 657, 좌컬럼, 두 번째 단락-우컬럼, 두 번째 단락; 도면 2 참조.	1-10
X	WANG, J. 등, 'Bone marrow mesenchymal stem cells promote cell proliferation and neurotrophic function of Schwann cells in vitro and in vivo', Brain Research, 2009, 제1262권, 페이지 7-15 초록; 페이지 8, 2.1 섹션; 도면 1-3 참조.	1-10
X	LI, Y. 등, 'Amniotic mesenchymal stem cells display neurovascular tropism and aid in the recovery of injured peripheral nerves', Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2014, 제18권, 제6호, 페이지 1028-1034 초록; 페이지 1033 참조.	1-10
X	YANG, D-Y. 등, 'Dual regeneration of muscle and nerve by intravenous administration of human amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells regulated by stromal cell-derived factor-1α in a sciatic nerve injury model', Journal of Neurosurgery, 2012, 제116권, 제6호, 페이지 1357-1367 초록 참조.	1-10

☒ 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
2017년 11월 16일 (16.11.2017)	2017년 11월 17일 (17.11.2017)

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

심사관
감유림
전화번호 +82-42-481-3516

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2017/008548

C (계속). 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	LADAK, A. 등, 'Differentiation of mesenchymal stem cells to support peripheral nerve regeneration in a rat model', Experimental Neurology, 2011, 제228권, 페이지 242-252 초록; 도면 1 참조.	1-10
A	KR 10-2009-0008155 A (가톨릭대학교 산학협력단) 2009.01.21 청구항 1-5, 8 및 10-12 참조.	1-10

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2017/008548

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2009-0008155 A	2009/01/21	KR 10-1133387 B1	2012/04/09
		US 2010-0297089 A1	2010/11/25
		US 8491885 B2	2013/07/23
		WO 2009-011546 A2	2009/01/22
		WO 2009-011546 A3	2009/03/12