

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구  
국제사무국

(43) 국제공개일  
2014년 12월 4일 (04.12.2014)



(10) 국제공개번호  
WO 2014/193060 A1

- (51) 국제특허분류:  
A61K 35/28 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01)  
A61K 31/65 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2013/011476
- (22) 국제출원일: 2013년 12월 11일 (11.12.2013)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:  
10-2013-0060458 2013년 5월 28일 (28.05.2013) KR
- (71) 출원인: 가톨릭대학교 산학협력단 (CATHOLIC UNIVERSITY INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 137-701 서울시 서초구 반포대로 222, 가톨릭대학교 성의교정내, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 전신수 (JEUN, Sin-Soo); 137-935 서울시 서초구 남부순환로 2183, 102동 1502호, Seoul (KR). 유충현 (RYU, Chung-Heon); 158-096 서울시 양천구 신월로 9길 37, 102동 1102호, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 태평양 (BAE, KIM & LEE IP GROUP); 137-858 서울시 서초구 강남대로 343, 11층, Seoul (KR).

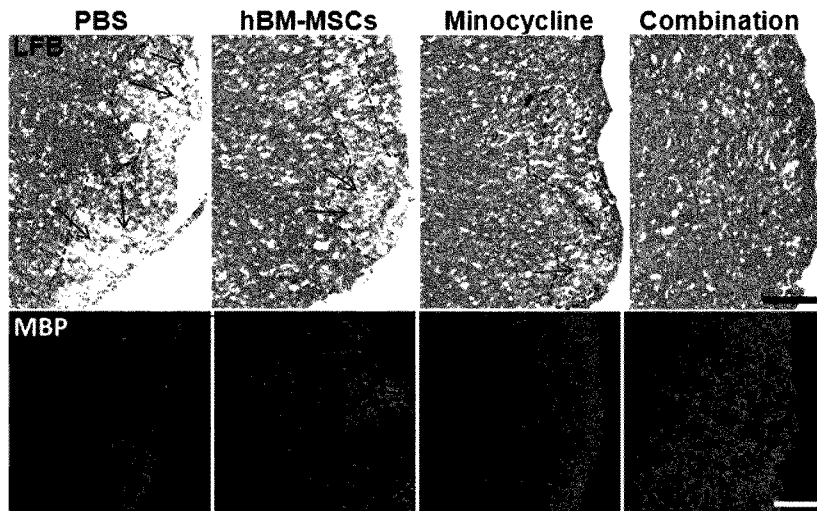
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU,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

(54) Title: THERAPEUTIC AGENT AND TREATMENT METHOD FOR MULTIPLE SCLEROSIS THROUGH CONCOMITANT ADMINISTRATION OF HUMAN BONE MARROW-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELL AND MINOCYCLINE

(54) 발명의 명칭 : 인간골수유래 중간엽줄기세포와 미노사이클린 병용투여를 통한 다발성경화증 치료제 및 치료방법



(57) Abstract: The present invention relates to the concomitant administration of a human bone marrow-derived mesenchymal stem cell (hBM-MSC) and minocycline, and alleviates the clinical severity of multiple sclerosis compared to a conventional separate use of minocycline, and solves the problem of exhibiting anti-inflammatory and neuron protective effects and good resistance for long term use but having toxicity to CNS. The concomitant administration of hBM-MSC and minocycline exhibits a remarkable reduction in clinical score compared to the separate use thereof. Further, the concomitant administration of hBM-MSC and minocycline strengthens immunomodulatory effects, suppresses pro-inflammatory cytokines (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) and conversely increases anti-inflammatory cytokines (IL-4, IL-10). In addition, the number of apoptotic cells is confirmed to be significantly reduced in TUNEL dyeing if hBM-MSC and minocycline are concomitantly administered compared to the separate use thereof. Therefore, the concomitant administration of hBM-MSC and minocycline can be used for treating multiple sclerosis.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]



WO 2014/193060 A1



---

본 발명은 hBM-MSC 과 미노사이클린을 병용투여에 관한 것으로서, 종래에 미노사이클린 단독 사용시 다발성경화증의 임상적 심각도를 개선하고, 항염증, 신경보호 효과 및 장기사용에 좋은 내성을 보이는 반면 CNS 에 독성이 있었던 문제점을 개선한 것이다. 미노사이클린 또는 hBM-MSC 를 개별적으로 사용한 경우에 비해서 병용투여한 경우 면역점수(clinical score)에서 현저한 감소를 나타냈다. 더욱이 hBM-MSC 과 미노사이클린의 병용투여는 면역조절효과를 강화하며, 전염증 사이토카인(IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ )를 억제하고, 역으로 항염증 사이토카인(IL-4, IL-10)을 증가시킨다. 또한 TUNEL 염색을 통해 개별투여에 비하여 병용투여한 경우 사멸세포의 수가 현저하게 감소한 것을 확인하였다. 따라서, hBM-MSC 과 미노사이클린의 병용투여를 다발성경화증의 치료에 유용하게 사용할 수 있다.

## 명세서

### 발명의 명칭: 인간골수유래 중간엽줄기세포와 미노사이클린 병용투여를 통한 다발성경화증 치료제 및 치료방법

#### 기술분야

- [1] 본 발명은 인간골수유래 중간엽줄기세포와 미노사이클린을 병용투여하여 다발성경화증, 뇌척수염 등을 예방 또는 치료하기 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다.

#### 배경기술

- [2] 다발성경화증은 자가면역과 관련된 염증성 질환으로서 CNS의 액손(Axon) 주위 미엘린수초(myelin sheath)에 손상이 생겨 탈수초화되고 뉴런의 손실이 발생한다. 다발성경화증은 완화와 증세 회복 이후에 악화 등과 같은 다양한 징후와 증상에 의해서 특징지어지며, 가장 일반적인 유형은 재발완화반복성 다발성경화증(relapsing-remitting MS)이다. 계속 진행되면 신경계의 손상이 축적되고 회복은 더더지게 되면서 만성 퇴행성 질환과 같은 양상으로 지속적으로 악화되는데 이것을 이차진행성 다발성경화증(secondary progressive MS)라고 한다. 발병 후 처음부터 뚜렷한 재발 없이 점진적으로 진행되는 경우는 일차진행성 다발성경화증(primary progressive MS)라고 한다.
- [3] 다발성경화증 환자의 생존율을 개선시키기 위해서 많은 실험적인 치료법이 개발되었다. 글라티라머 아세테이트(glatiramer acetate)나 미토산트론(mitoxantrone)같은 다발성경화증의 치료를 위한 몇몇의 방법이 있으며, 이러한 약제는 면역학적인면을 목표로 한다. 몇몇의 승인된 다발성경화증의 치료법이 존재함에도 불구하고 많은 환자들은 이러한 약제에 적절하게 반응하지 않으므로 다발성경화증을 위한 더욱 효과적인 치료를 위한 프로토콜이 필요한 실정이다.
- [4] EAE(실험적알리지성뇌척수염: experimental autoimmune encephalomyelitis)는 CNS 자가면역질환에 대한 질환동물모델이며 특정 CNS 항원에 면역이 뒤따른다. EAE 모델은 많은 임상 및 조직병리학에서 인간의 다발성경화증과 유사하다고 보고되어 다발성경화증의 기작 및 치료 효과 등을 연구하기 위한 동물모델로서 가장 보편적으로 사용된다.
- [5] 척수염은 감염 등에 의해 발생하는 일반적인 척수의 염증을 말한다. 과거 영상학적 검사가 개발되기 이전에 이 질환은 척수의 한 단면을 횡(가로)으로 침범하는 염증이라고 생각되었고, 따라서 급성횡단성척수염이라는 이름이 붙여졌다. 그 후 의학의 발전에 따라 척수에 발생하는 염증이 척수의 길이 방향(세로 방향)으로 발생할 수 있다는 것이 알려졌다. 척수염의 원인은 매우 다양하지만 급성횡단성척수염은 주로 면역매개반응(immune-mediated reaction)에 의해 발생하는 것을 말하며, 원인이 밝혀지지 않은 경우와 다른 전신

질환과 동반되는 경우로 나누어진다.

- [6] 혈액뇌장벽(Blood-Brain Barrier)은 뇌척수액과 혈액을 분리시키는 장벽으로 높은 선택적 투과성을 갖고 있어 몸의 주요 조절 중추를 혈액으로 운반될 수 있는 세균 등과 같은 병원체와 혈액 내의 잠재적인 위험 물질로부터 격리시키는 역할을 한다.
- [7] 미노사이클린(minocycline)은 테트라사이클린 계열의 항생물질로서 화학식은  $C_{23}H_{27}N_3O_7$ 이고, 7-bis(dimethylamino)-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahydro-3,10,12,12a-tetrahydroxy-1,11-dioxo-2-naphhtacenecar-boxomide이며 분자량은 457.49이며, 항균력이 강하고 혈중농도가 장기간 유지되며 경구, 주사용으로 사용할 수 있다. 또한 혈액뇌장벽 통과 기능과 항염증 기능 및 세포사멸방지 기능을 보유한 반합성 테트라사이클린 유도체로서, CNS 관련 질병을 치료하는데 있어서 적합하다. 따라서 다양한 퇴행성신경질환의 진행을 지연시키기에 효과적이다.
- [8] EAE와 다발성경화증에서 미노사이클린의 사용은 치료 후 2개월 이내에 질병의 활성을 약화시키며, MRI(magnetic resonance imaging)에서 조영증강(gadolinium enhancement)을 감소시켰다. 또한 미노사이클린은 EAE에서 엑손의 탈수초화를 방지하여 신경보호 효과를 나타내고, 신경사멸을 약화시키고, Th1에서 Th2의 표현형으로 면역분화를 조절한다. 그렇게 함으로써 척수로 T세포의 침윤을 감소시킨다.
- [9] 다만 미노사이클린은 루프스(systemic lupus erythematosus)나 혈청병(serum sickness)같은 부작용을 일으킬 수 있고, 고용량을 복용시 CNS에 유독하므로 저용량의 미노사이클린을 이용한 병용투여 방법을 개발할 필요가 있다.
- [10] MSC(mesenchymal stem cells)는 성체 다능성 세포로서 골모세포, 연골모세포, 지방세포 등 중간엽계열로 분화된다. 현재 MSC는 MSC의 자기재생능력과 다양한 계열과 면역억제능력 때문에 예비임상현장(preclinical)과 임상현장에서 연구되어 졌다. 더욱이 MSC는 상처 부위로 이동할 수 있다.
- [11] 지금까지 EAE 마우스에서 다발성경화증의 치료에 대해 몇몇의 치료 전략이 연구되었으나, CNS에서 세포의 염증성 침윤을 방지 및/또는 탈수초화와 세포사멸 방지에 초점을 맞추어 더 연구될 필요가 있다.

## 발명의 상세한 설명

### 기술적 과제

- [12] 따라서 본 발명의 목적은 골수 유래의 중간엽줄기세포(BM-MSK); 및 미노사이클린 화합물 또는 상기 화합물의 약제학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 다발성경화증 또는 뇌척수염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [13] 또한 시험관 내에서(in vitro) 혈장에 BM-MSK; 및 미노사이클린 화합물 또는 상기 화합물의 약제학적으로 허용 가능한 염의 혼합물을 처리하여 Th1

사이토카인(proinflammatory cytokine)을 감소시키거나 또는 Th2 사이토카인(anti-inflammatory cytokine)을 증가시키는 사이토카인 발현의 조절방법을 제공하는 것이다.

- [14] 또한 BM-MSC; 및 미노사이클린 화합물 또는 상기 화합물의 약제학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 다발성경화증 또는 뇌척수염의 예방 또는 치료용 세포치료제를 제공하는 것이다.

### 과제 해결 수단

- [15] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 BM-MSC; 및 미노사이클린 화합물 또는 상기 화합물의 약제학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 다발성경화증 또는 뇌척수염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [16] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 골수 유래의 중간엽줄기세포는 인간의 골수일 수 있다.
- [17] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 골수는 다발성경화증 또는 뇌척수염이 발병한 개체로부터 수득한 자가골수(autologous bone marrow)일 수 있다.
- [18] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 다발성경화증 또는 뇌척수염의 예방 또는 치료는 신경세포의 탈수초화방지(demyelination), 신경보호 효과(neuroprotective effect), 조직손상의 감소, 세포사멸(apoptosis) 방지 또는 염증성 침윤(inflammatory infiltration)의 억제 효과에 의한 것일 수 있다.
- [19] 본 발명의 약학적 조성물에는 약학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함할 수 있다. 상기 '약학적으로 허용되는'이란 상기 조성물에 노출되는 세포나 인간에게 독성이 없는 것을 말한다. 상기 담체는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제, 기제, 부형제, 유희제, 보존제 등 당업계에 공지된 것이라면 제한없이 사용할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 각종 제형의 형태로 통용되는 기법에 따라 제조될 수 있다. 예컨대, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 포함제 형태로 제조할 수 있다. 아울러, 본 발명의 약학적 조성물은 원하는 목적에 따라 적당한 용기 내에 포장될 수 있다.
- [20] 본 발명의 약학적 조성물은 적절한 제형으로 투여될 수 있으며, 목적하는 방법에 따라 비경구 투여, 예를 들면, 정맥 내 주사, 근육 내 주사, 복강 내 주사, 피하 주사될 수 있고, 표적세포로의 국소적 투여가 행해질 수 있다.
- [21] 상기 약학적 조성물의 투여량은 개체의 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 투여시간, 투여 경로, 배출률, 약물 배합 및 특정 질환의 중증을 포함한 여러 요인에 따라 다양하게 변할 수 있다. 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다. 또한 상기 BM-MSC는 성인 기준으로 치료학적 유효량인  $2 \times 10^5$  세포/kg ~  $2 \times 10^7$  세포/kg 범위 내의 투여량으로 투여될 수 있으나, 이에 한정하지 않는다. 상기 미노사이클린 화합물

또는 상기 화합물의 약제학적으로 허용 가능한 염은 성인 기준으로 0.001 내지 100mg/kg 범위 내의 투여량으로 투여될 수 있으나, 상기 투여량은 본 발명의 범위를 한정하는 것이 아니다.

- [22] 본 발명은 상기 약학적 조성물을 대상체(subject)에게 투여하는 단계를 포함하는 다발성경화증 또는 뇌척수염의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [23] 본 발명은 시험관 내에서 혈장에 BM-MS; 및 미노사이클린 화합물 또는 상기 화합물의 약제학적으로 허용 가능한 염의 혼합물을 처리하여 Th1 사이토카인을 감소시키거나 또는 Th2 사이토카인을 증가시키는 사이토카인 발현의 조절 방법을 제공한다.
- [24] 본 발명은 BM-MS; 및 미노사이클린 화합물 또는 상기 화합물의 약제학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 다발성경화증 또는 뇌척수염의 예방 또는 치료용 세포치료제를 제공한다.
- [25] 본 발명에서 사용된 용어 '세포치료제'는 사람으로부터 분리, 배양 및 특수한 저장을 통해 제조된 세포 및 조직으로 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품(미국 FDA 규정)으로서, 세포 혹은 조직의 기능을 복원시키기 위하여 살아있는 자가, 동종, 또는 이종세포를 체외에서 증식, 선별하거나 다른 방법으로 세포의 생물학적 특성을 변화시키는 등의 일련의 행위를 통하여 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품을 지칭한다. 세포치료제는 세포의 분화 정도에 따라 크게 체세포치료제, 줄기세포치료제로 분류되며 본 발명은 특히 줄기세포치료제에 관한 것이다.
- [26] 본 발명은 상기 세포치료제를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 다발성경화증 또는 뇌척수염의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [27] 상기 예방 또는 치료 방법은 바람직하게는 BM-MS와, 미노사이클린 또는 상기 화합물의 약제학적으로 허용 가능한 염을 병용투여하는 것일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.
- [28] 세포의 생존력 분석(viability assay)을 통해서 hBM-MS가 미노사이클린에 영향을 받는지 확인하였다. 미노사이클린이 처리된 hBM-MS를 MSC 표면의 마커를 이용한 유세포분석기(flow cytometry)를 통해서 특징지었고, 다양한 분화능력이 있는지 분석하였다.
- [29] 미노사이클린은 hBM-MS의 표면 표현형, 분화능력 및 생존성에 영향을 미치지 않는 반면, 높은 농도의 미노사이클린은 성상교세포(astrocyte)의 생존성에 영향을 미친다.
- [30] EAE는 C57BL/6 마우스에서 MOG35-55를 사용하여 유발시켰으며, 염증세포, 탈수초화 및 신경보호 효과를 검색하기 위해서 면역병리학 분석(immunopathology assays)이 사용되었다.
- [31] Th1과 Th2 발달을 나타내는 특징적인 사이토카인인 IFN- $\gamma$ (interferon gamma), TNF- $\alpha$ (tumor necrosis factor alpha) 및 IL-4(interleukin-4), IL-10(interleukin-10)은 ELISA에 의해 측정되었으며, TUNEL 염색법은 EAE 마우스의 척수에서

세포사멸(cell apoptosis)을 설명하기 위해서 사용되었다.

[32] 병원의 복잡성(pathogenic complexity)과 다발성경화증 마커조합의 이질성으로 인해 병용투여는 매력적인 치료전략이다.

[33] hBM-MSc는 퇴행성신경질환에 있어서 치료제로서 가능성이 있다.

hBM-MSc는 인간의 척수로부터 쉽게 얻을 수 있고, T세포에 의해서 세포 표면 항원의 인식이 잘 되지 않기 때문에 면역시스템의 감시를 피할 수 있으며, 이식에 사용된다. hBM-MSc는 T 림프구의 활성화와 증식을 억제하며, Th2 극성 면역반응을 유도하고, 내인성 치료를 유도함으로써 시험관 내와 체내 양쪽에서 면역조절 기능을 보여준다. 또한 hBM-MSc를 이식한 경우 EAE에서 염증을 억제하고, 탈수초화를 감소시키며, 신경과 엑손을 보호하는 것이 가능하며, 손상된 조직 특이적인 이동과 표적화함으로써 실용적인 방법을 제공한다.

[34] 본 발명에서는 hBM-MSc과 미노사이클린의 병용투여가 EAE 마우스에서 유익한 효과를 발휘하는지 확인하였고, 본 발명자는 병용투여 치료가 증상의 개시를 지연시킴을 증명하였으며, 또한 면역적 심각도, 염증, 탈수초화를 완화시키고 각각의 약물투여보다 신경보호 효과를 강화한다.

[35] 가장 중요한 점은 이런 병용투여가 면역조절기능을 강화하며, 다발성경화증환자의 기능적 회복을 향상시키는 점에서 의약적 용도를 제공하는 것에 그 특징이 있다.

### 발명의 효과

[36] hBM-MSc과 미노사이클린의 병용투여는 Th1 사이토카인에서 Th2 사이토카인으로 이동을 촉진하며, 염증세포의 유입을 감소시키고, 탈수초화를 억제하며, 세포사멸을 감소시키고, 신경보호기능을 강화하며, EAE 마우스에서 질병의 진행을 예방하여 효과적인 치료를 발휘한다. 또한 미노사이클린 단독 치료에서 발생하는 부작용을 최소화할 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[37] 도 1a, 도 1b 및 도 1c는 hBM-MSc의 생존성에 대한 미노사이클린의 효과를 도시한 것이다.

[38] 도 2a, 도 2b 및 도 2c는 hBM-MSc과 미노사이클린의 병용투여(combination treatment)가 마우스에서 임상적 EAE의 심각도를 완화하는 것을 도시한 것이다.

[39] 도 3a, 도 3b 및 도 3c는 hBM-MSc과 미노사이클린이 EAE 마우스 척수에서 염증을 감소시키는 것을 도시한 것이다.

[40] 도 4a, 도 4b 및 도 4c는 hBM-MSc과 미노사이클린의 병용투여가 EAE 마우스의 척수에서 탈수초화를 감소시키는 것을 도시한 것이다.

[41] 도 5a 내지 도 5d는 병용투여가 EAE 마우스의 척수에서 신경교의 활성을 감소시키며, 뉴런을 보호하는 것을 도시한 것이다.

[42] 도 6a 및 도 6b는 병용투여에 의한 EAE 마우스에서 Th1 사이토카인에서 Th2 사이토카인으로 균형의 이동을 촉진하는 것을 도시한 것이다.

- [43] 도 7a 및 도 7b는 EAE 마우스 척수에서 hBM-MSC과 미노사이클린의 병용투여가 세포사멸을 감소시키는 것을 도시한 것이다.
- [44] 도 8은 EAE 마우스의 척수에서 미노사이클린 처리된 hBM-MSC를 확인한 것을 도시한 것이다.
- [45] 도 9a 및 도 9b는 병용투여가 EAE 마우스에서 Th1 빈도를 감소시키며, Th2 빈도를 증가시키는 것을 도시한 것이다.
- [46] 도 10은 EAE 마우스의 요추척수에서 세포사멸의 특징을 도시한 것이다.

### 발명의 실시를 위한 최선의 형태

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

[48]

[49] <실험예>

#### [50] 1. hBM-MSC의 제조 및 성장교세포

- [51] hBM-MSC는 Lonza(Walkersville, IN, USA)에서 구입하였으며 세포는 해동하였고, 배양의 개시는 제조사의 지침대로 수행하였다.
- [52] 세포를 걸쳐디쉬에 분주하고, 분주된 MSC 세포에 hBM-MSC 기본 배지와 성장 보충제를 공급하였다(37°C, 5% CO<sub>2</sub>). 성장교세포는 ATCC(American Type Culture Collection; Manassas, VA, USA)에서 분양받았다.
- [53] 배지는 10%의 FBS(fetal bovine serum)를 포함하는 DME배지(Dulbecco' modified Eagle' medium; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에서 배양하였다.

[54]

#### [55] 2. 미노사이클린에 대한 MSC의 활성과 특성의 평가

- [56] 미노사이클린은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, 증류수에 1 mM을 녹인 후 여과멸균하였다. hBM-MSC 또는 성장교세포는 각각 24-웰 플레이트(8x10<sup>3</sup>) 또는 96-웰 플레이트(5x10<sup>3</sup>)에 식종하였다.
- [57] 미노사이클린의 hBM-MSC 또는 성장교세포에 대한 세포독성을 확인하기 위해 미노사이클린의 양을 증가시켰다. 투여 후 24시간 경과한 때 세포의 활성을 MTT assay(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium; Sigma-Aldrich)를 이용하여 분석하였다.
- [58] 세포표면마커를 확인하기 위해서 FACS를 수행하였다. 미노사이클린 처리한 hBM-MSC과 처리하지 않은 hBM-MSC을 트립신화한 후, PBS(phosphate buffered saline)로 세척한 다음 hBM-MSC의 지방세포계열 또는 골형성세포계열로 분화는 상술한 대로 미노사이클린 포함 또는 비포함된 상태에서 유도되었다. 미노사이클린이 포함되거나 비포함된 유도배지에서 배양을 시작 3주 경과 후 분화된 세포는 10% 포름알데히드로 고정하였다.

[59] 지방세포는 세포내 지방소적(lipid droplet)을 염색하여 검출하였으며, 10분 동안 0.3%의 Oil Red O 염색을 수행하였으며, 골세포는 인산 칼슘을 통해서 검출하였으며, 20분 동안 0.2% Alizarin Red S로 염색하였다.

[60]

[61] **3. EAE 유도 및 처치**

[62] EAE는 MOG35-55(Hooke Labs, Lawrence, MA, USA)를 사용하여 11주령의 암컷 C57BL/6 마우스에 유도시켰으며, 총 200 $\mu$ g MOG35-55를 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*) 6 mg/ml이 포함된 CFA(complete Freund's adjuvant)에 현탁하여 마우스 2부분에 피하주사하였다. MOG35-55 주사 2시간 및 24시간 후 마우스에 100 ng의 백일해 독소(pertussis toxin)를 복강 내에 투여하였다.

[63] EAE의 임상 증상인 마비는 면역조치 5일 후부터 매일 측정하였으며, 마우스는 다음과 같은 임상 증상의 점수(Score)로 환산하였다. 임상적인 증상이 없으면 0점, 늘어진 꼬리가 나타나면 1점, 뒷다리에 부분적인 마비가 나타나면 2점, 뒷다리에 완전한 마비가 나타나면 3점, 뒷다리에 완전한 마비와 앞다리에 완전한 마비가 나타나면 4점, 빈사 상태 또는 사망에 이르면 5점이다.

[64] 마우스는 무작위적으로 다음의 4그룹으로 나누었다. 1그룹은 PBS (n=10), 2그룹은 hBM-MSD(정맥주사 100  $\mu$ l PBS 내에 1.5x10<sup>6</sup> 세포, n=10), 3그룹은 미노사이클린(10 mg/kg, 복강내 주입, n=10), 4그룹은 hBM-MSD와 미노사이클린의 병용투여(n=10).

[65] 모든 조치는 면역처리 후 7일부터 시작하였으며, 미노사이클린은 마우스가 도살될 때까지 지속적으로 복강 내에 투여했다.

[66]

[67] **4. 조직병리학**

[68] 마우스는 면역처리 후 46일에 도살하였으며, 요추척수에서 일부분을 분리 및 동결하였고 H&E(hematoxylin and eosin)염색과 LFB(Luxol Fast Blue)염색을 하였다.

[69] 염증세포, 탈수초화 및 신경손실을 확인하기 위해서 면역형광염색을 하였으며, 일반적인 절차에 따라 신경교세포를 활성화하였다. 면역형광법을 위해서 요추척수부분은 4°C에서 하룻밤 동안 다음의 항체와 함께 배양했다.

[70] 단일클론성 쥐 GFAP(anti-gial fibrillary acidic protein; Millipore, Temecula, CA, USA),

[71] 다중클론성 토끼 Iba1(anti-ionized calciumbinding adaptor molecule 1; Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan),

[72] 단일클론성 쥐 NeuN(antineuronal nuclear antigen; Chemicon International Temecula, CA, USA),

[73] 단일클론성 쥐 항-CD4(BD Biosciences Pharmingen, CA, USA), 다중클론성 토끼 MBP(anti-mouse myelin basic protein; Millipore, Billerica, MA, USA).

[74] 항체 염색은 항-토끼항체와 항-쥐항체(Cy3-conjugated secondary antibodies;

Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA)를 통해서 시각화하였으며, 면역반응력의 특이성은 주향체 또는 부향체가 누락된 부위에서 면역조직화학상 반응(immunohistochemical reaction)이 부존재하는지를 통해서 확인하였다. 세포핵의 대비염색은 DAPI(4-6-diamidino-2- phenyindole)를 사용하여 10분 동안 수행하였다.

[75] 모든 사진은 LSM 700 공초점 현미경(Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)를 통해서 얻었다.

[76]

[77] **5. ELISA 측정**

[78] 혈장의 사이토카인은 ELISA를 통해서 결정하였으며, 혈장은 면역처리 후 40일에 각 그룹의 모든 개체로부터 획득하였다. 혈장은 피복된 96-웰 플레이트에서 4시간 동안 실온 배양하였고, 3회 세척한 후에 복합항체를 2시간 동안 실온에서 추가하였고, 기질용액에서 30분 동안 배양하였다. 그 후 정지액을 사용하여 반응을 정지시켰다.

[79] 각 웰의 광학밀도는 마이크로플레이트 리더를 이용하여 450 nm에서 측정하였다.

[80]

[81] **6. TUNEL(Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling; Roche, Basel, Switzerland) assay를 통한 세포사멸 측정**

[82] 세포사멸은 Cy3-conjugated streptavidin(Jackson ImmunoResearch Laboratories)를 사용하여 TUNEL assay로 시각화하였다. 슬라이드는 60°C에서 2시간 동안 증류수에 담갔으며, TdT(terminal deoxynucleotidyl transferase) 표지완충액으로 세척하였다.

[83] TUNEL 반응 혼합물은 피펫으로 절편 위에 떨어뜨린 후 37°C에서 1시간 동안 가습챔버에서 배양하였고, 종료완충액을 사용하여 종결시켰다. 세포핵의 대비염색은 절편에 DAPI를 추가하여 10분 동안 배양을 통해 수행하였다. 세포사멸의 특징 이외에도, 절편은 NeuN, GFAP, Ib-1, CD4로 각각 중복 표지되었다.

[84]

[85] **7. 정량과 통계적 분석**

[86] 측정은 각 동물의 조치 상태를 모르는 시험관에 의해서 수행되었으며, 각 그룹에서 획득한 요추척수측선의 6에서 8부위를 정성분석하였다.

[87] H&E 염색과 LFB 염색은 Slide Scanner for Digital Pathology(SCN400, Leica, Wetzlar, Germany)를 사용하여 측정하였으며, 면역형광은 공초점 현미경을 통해서 측정하였으며, 모든 사진은 MetaMorph(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA; version 7.5)으로 측정하였다.

[88] 침윤세포의 수, 염색양성세포의 수 또는 형광강도의 평균은 각각의 병변부위의 세포수 또는 형광강도로 나타내었다. 병변 크기는 LFB 비교 염색된 척수부위의

정량병리학분석에 의해 결정했다. 병변 크기는 촬영된 대물배율에 따른 병변부위의 면적으로 나타내었으며, 데이터는 평균  $\pm$  SEMs으로 표시하였다.

- [89] 그룹간의 모든 통계적인 비교는 ANOVA(one-way analysis of variance: 분산편도분석)과 본페로니 보정을(Bonferroni corrections) 통한 사후검증(post-hoc)으로 분석하였으며, p값  $<0.05$  는 유의적인 것으로 고려하였다.

[90]

[91] <실시예 1>

[92] **hBM-MSC의 생존성, 표현형, 분화에 대한 미노사이클린의 효과 확인**

- [93] 미노사이클린이 hBM-MSC과 성상교세포의 생존에 영향을 미칠 수 있는지 여부를 검사하기 위해서, 상기 두 세포를 각각 미노사이클린을 다양한 농도로 포함하는 배지에서 성장시켰다.

- [94] hBM-MSC과 성상교세포의 생존성은 미노사이클린(0~10 mM)을 투여하고 24시간 후에 MTT를 통해서 분석하였다. 그 결과 도 1a에 나타난 것과 같이 미노사이클린은 10 mM이 될 때까지 hBM-MSC의 생존성에 영향을 미치지 않았으며, 고농도(810 mM)에서 성상교세포의 생존성을 감소시켰다(Points, mean; bars, SE.). 즉 hBM-MSC의 생존성은 10  $\mu$ M이 될 때까지 영향받지 않았으며, 성상교세포의 생존성은 810  $\mu$ M에서 감소하였다.

- [95] 성상교세포에 대한 독성의 증거는 CNS의 세포 종류에 따른 독성을 나타내며, 다음의 체내에서 병용투여실험을 위해서 낮은 용량의 미노사이클린을 사용할 것을 암시한다. 또한 미노사이클린이 처리된 hBM-MSC의 특징은 hBM-MSC 표면 표현형을 FACS를 통해서 측정하였으며, 야생형 hBM-MSC과 미노사이클린이 처리된 hBM-MSC은 모두 유사하게 CD90, CD44, CD73 강한 양성 CD34, CD45, HLA-DR 강한 음성으로 나타났다. 표면마커에 대한 FACS 분석은 야생형 hBM-MSC 및 미노사이클린 처리된 hBM-MSC 사이에 차이를 보여주지 않았다(도 1b 참조). hBM-MSC 표현형에 대한 미노사이클린의 영향을 FACS로 분석하였으며, 도 1b에 나타난 것과 같이 야생형(흑색선)과 미노사이클린 처리된 hBM-MSC(적색선)은 MSC표현형 표면마커에 대한 항체로 표지되었다.

- [96] 미노사이클린은 MSC표현형 표면마커의 발현에 영향을 미치지 않았으며, hBM-MSC은 CD90, CD44, CD73을 발현하였으며, CD34, CD45, HLA-DR을 결여되었다.

- [97] hBM-MSC의 분화능에 대한 미노사이클린의 효과는 미노사이클린(10  $\mu$ M)을 3주 동안 처리하거나 처리하지 않은 유도배지에 배양함으로써 평가하였다.

- [98] 미노사이클린은 지방세포계열 또는 골형성계열로 분화하는 능력에 영향을 미치지 않았다. hBM-MSC의 분화능에 대한 미노사이클린의 효과를 측정하였으며, 그 결과 도 1c에 나타난 것과 같이 미노사이클린은 hBM-MSC이 각각 Oil Red O와 Alizarin Red S로 염색되어 지방세포계열 또는 골세포계열로

분화하는 능력에도 영향을 미치지 않았다. 이러한 결과는 독립적인 실험으로 표시하였다. 또한, 미노사이클린 처리 hBM-MSC는 정맥 투여 후 EAE 마우스에 정맥투여 후 척수로 이동 및 이식되었다. 그 결과 도 8에 나타난 것과 같이 EAE 마우스의 척수에서 미노사이클린 처리된 hBM-MSC를 확인하였으며, Ad-GFP (50 MOI)이 투입된 hBM-MSC는 미노사이클린으로 처리되었다(10  $\mu$ M).

- [99] 미노사이클린 처리( $1.5 \times 10^6$ ) 후 5일에 hBM-MSC를 Zeiss LSM 700 다초점 현미경으로 이미지화하였으며, 병변부위에 GFP 형질전환된 hBM-MSC는 녹색이며, 다수가 혈관과 밀접하게 연관되었다((A)는 첫 번째 사진임). 두 번째 사진은 첫 번째 사진의 (a) 부분의 사각형을 고배율로 확대한 것이다(Scale bar = 200  $\mu$ m in (a).) 핵은 DAPI로 비교염색되어 청색으로 표시되었다. 화살표는 GFP 양성의 세포를 나타낸다(A 내의 Scale bar = 1mm)
- [100] 이러한 결과는 hBM-MSC의 생존성 및 특성은 미노사이클린에 의해 영향을 받지 않는 것으로 확인되었다.
- [101]
- [102] <실시예 2>
- [103] 병용투여의 EAE 마우스의 임상 점수에 있어서의 영향
- [104] EAE 마우스에서 병용투여의 효과 및 미노사이클린의 질병에 대한 진전을 평가하기 위해서, 면역처리 후 7일 후에 마우스에 PBS, hBM-MSC, 미노사이클린 및 미노사이클린과 hBM-MSC 병용투여를 실시하였다(n=10/군).
- [105] 면역처리 후 50일까지 행동학적으로 기능을 테스트하였으며, PBS 처리된 마우스는 면역처리 10일 후 EAE 마우스의 임상 증상이 진행되었다.
- [106] PBS 처리와 비교하여, hBM-MSC 또는 미노사이클린 처리된 마우스는 임상 증상의 발병이 지연되었으며(p = 0.0035, PBS vs. hBM-MSC 처리), hBM-MSC 처리된 마우스는 EAE의 임상 증상으로 진행이 면역처리 후 평균  $12.0 \pm 1.80$ 일이 소요되었다. 미노사이클린 처리된 마우스는 EAE의 임상 증상으로 진행이 면역처리 후 평균  $12.67 \pm 1.0$ 일이 소요되었다(p < 0.001, PBS vs. 미노사이클린 처리).
- [107] 병용투여는 개별투여 치료에 비해 임상 증상의 발병을 현저하게 지연시켰다, EAE로 진행된 마우스는 면역처리 후 평균  $14.5 \pm 1.0$ 일이 소요되었다(p < 0.001, hBM-MSC vs. 병용투여; p = 0.007, 미노사이클린 vs. 병용투여)(도 2a 참조).
- [108] PBS 치료의 평균 임상점수 :  $3.166 \pm 1.075$ , hBM-MSC 치료 :  $1.433 \pm 0.534$ , 미노사이클린 처리 :  $1.223 \pm 0.4936$ , P < 0.001, PBS 대 hBM-MSC 치료, P < 0.001, PBS 대 미노사이클린 치료로 나타났으며, 최고 면역점수는 PBS 처리 :  $3.640 \pm 1.284$ , hBM-MSC 치료 :  $2.333 \pm 0.6831$ , 미노사이클린 처리 :  $2.033 \pm 0.2582$ , P = 0.028, PBS 대 hBM-MSC 치료, P = 0.014, PBS 대 미노사이클린 치료로 나타났다. 따라서 PBS 치료에 비하여, hBM-MSC 치료 또는 미노사이클린 치료는 평균 임상점수 및 최고 임상점수를 현저히 감소시켰다.
- [109] 병용투여한 그룹의 평균면역점수  $0.7375 \pm 0.3235$ 이며, p = 0.005, hBM-MSC vs.

병용투여;  $p=0.031$ , 미노사이클린 vs. 병용투여 또한 병용투여한 그룹의 최대면역점수는  $1.1625 \pm 0.3292$ 이다( $p=0.009$ , hBM-MSc vs. 병용투여;  $p=0.024$ , 미노사이클린 vs. 병용투여. 도 2b, 2c 참조). 병용투여한 그룹은 각각을 개별 투여한 그룹에 비하여 전체 질병진행 면에서 훨씬 현저하게 감소시켰다.

[110] EAE는 암컷 C57 BL/6마우스에서 MOG 35-55 아미노산 펩타이드로 면역처리되었으며, 도 2a, 도 2b 및 도 2c에 나타난 것과 같이, 매일 측정된 다른 EAE 치료에 대한 임상점수의 평균( $n=10/\text{군}$ )은 다음과 같다(도 2a). PBS 치료된 마우스는 4등급의 평균 최대 심각도로서 EAE로 진행되었다. hBM-MSc 또는 미노사이클린 개별처리는 1등급의 평균 최대 심각도로서 질병의 심각도를 감소시킨다. 병용투여는 1등급의 평균 최대 심각도로서 질병의 심각도를 현저히 완화한다(Points, mean; bars, SE.). 4그룹의 평균 임상점수는 면역처리 후 1일부터 50일까지 측정되었다. PBS 치료에 비해 hBM-MSc 또는 미노사이클린 개별치료는 평균 임상점수를 현저하게 감소시켰다. hBM-MSc 또는 미노사이클린 개별치료에 비해 병용투여는 평균 임상점수를 현저하게 감소시켰다( $p < 0.05$ )(도 2b). 전체실험의 각 과정에 대한 각 마우스의 최대 임상점수를 기록하였으며, 4그룹의 최대 임상점수의 추세는 평균 임상점수와 같다( $p < 0.05$ . Columns, mean; bars, SE. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , one-way ANOVA with post-hoc Bonferroni corrections)(도 2c). 결과는 세 개의 독립된 실험을 나타낸다.

[111] 이러한 결과는 EAE 마우스에서 hBM-MSc과 미노사이클린의 병용투여가 면역적 심각성을 완화하고 신경기능회복을 향상시킨다는 것을 나타낸다.

[112]

[113] <실시예 3>

[114] 병용투여의 EAE 마우스 척수에 있는 염증 세포의 수에 대한 영향

[115] 병용투여에 따른 임상점수의 개선은 CNS에 염증성 침윤을 감소시킬 수 있다. 염증 세포의 유입에 대한 병용투여의 효과를 확인하려면, 단핵세포와 T세포 침윤을 탐지하기 위해서 EAE 마우스의 요추척수 절편은 H&E 와 항-CD4로 표지했다. 침윤세포는 PBS 치료된 그룹의 척수 백질에서 증가하였으며, 그러나 이러한 세포는 개별치료와 비교하여 병용투여한 후에는 감소하였다(도 3a 참조).

[116] 입체학적 분석은 hBM-MSc 또는 미노사이클린의 개별치료는 PBS 치료에 비하여 침윤세포의 수를 감소시키지만( $p < 0.001$ , PBS vs. hBM-MSc 치료;  $p < 0.001$ , PBS vs. 미노사이클린 치료), 개별치료에 비하여 병용투여의 경우 훨씬 현저한 감소가 나타난다( $p = 0.002$ , hBM-MSc vs. 병용 투여;  $p = 0.020$ , 미노사이클린 vs. 병용 투여)(도 3b 참조).

[117] 나아가, hBM-MSc 또는 미노사이클린의 개별투여에 비해 병용투여한 마우스의 요추에서 CD4<sup>+</sup>T 세포의 침윤이 현저히 감소한 것은 명백한 증거이다( $p < 0.001$ , hBM-MSc vs. 병용투여;  $p = 0.003$ , 미노사이클린 vs. 병용투여)(도 3c 참조).

- [118] 이러한 결과는 도 3a, 3b 및 3c와 같이 나타났으며, EAE 마우스의 요추척수에서 단핵과 T세포의 침윤을 검출하기 위해서 H&E(윗 패널)과 CD4염색(아래 패널)이 수행되었다. 화살표는 침윤된 지역을 나타낸다(Scale bar, 200  $\mu$ m)(도 3a). 통계적 분석은 PBS 치료에 비해 hBM-MSC 또는 미노사이클린 개별치료가 임상점수를 현저하게 감소시킨 것을 나타낸다. hBM-MSC 또는 미노사이클린 개별치료에 비해서 병용투여가 침윤세포의 수를 20-30%까지 현저하게 감소시킨 것을 나타낸다( $p < 0.05$ )(도 3b). hBM-MSC 또는 미노사이클린 개별치료에 비해서 병용투여가 CD4<sup>+</sup> 세포를 30-40%까지 현저하게 감소시킨 것을 나타낸다( $p < 0.05$ ). Columns, mean; bars, SE. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , one-way ANOVA with post-hoc Bonferroni corrections.)(도 3c).
- [119] 이러한 결과 hBM-MSC과 미노사이클린의 병용치료는 EAE 마우스 척수에서 염증을 감소시킨다는 것을 확인하였다.
- [120]
- [121] <실시예 4>
- [122] 병용투여의 EAE 마우스 척수에서 탈수초화에 대한 영향
- [123] EAE 마우스에서 조직 손상이 감소되는지 확인하기 위해, 요추척수 절편은 LFB 와 anti-MBP로 표지 되었다.
- [124] 탈수초화는 요추척수백질에서 확인되었고 감소되었으며, 각각의 개별치료에 비해 병용투여한 경우 큰 범위로 감소하였다(도 4a 참조). 탈수초화의 정도에 대한 통계학적 분석에서 PBS 치료한 마우스 그룹에 비해 hBM-MSC 또는 미노사이클린을 단독으로 처리한 마우스에서 현저한 감소를 나타내었다( $p < 0.001$ , PBS vs. hBM-MSC 치료;  $p < 0.001$ , PBS vs. 미노사이클린 치료).
- [125] 더욱이 개별처리한 그룹에 비해 병용투여한 그룹에서 현저한 감소가 나타났다( $p < 0.001$ , PBS vs. 병용투여;  $p = 0.017$ , hBM-MSC vs. 병용투여;  $p = 0.038$ , 미노사이클린 vs. 병용투여)(도 4b 참조). 또한 면역형광염색은 PBS처리된 마우스 그룹에 비해 hBM-MSC 또는 미노사이클린 치료된 그룹의 척수에서 MBP 발현이 현저한 것을 알 수 있었다( $p = 0.048$ , PBS vs. hBM-MSC 치료;  $p = 0.007$ , PBS vs. 미노사이클린 치료).
- [126] hBM-MSC또는 미노사이클린 개별치료된 그룹에 비해 병용투여 그룹의 MBP 양성 세포의 표지 강도는 현저히 증가했다( $p = 0.005$ , hBM-MSC vs. 병용투여;  $p = 0.003$ , 미노사이클린 vs. 병용투여) (도 4c 참조).
- [127] 이러한 결과는 도 4a, 도 4b 및 도 4c와 같이 나타났으며, LFB (윗 패널)와 MBP(아래 패널)가 염색된 척수 부위는 EAE 마우스에서 탈수초화 범위를 검출하기 위해 측정되었다. 화살표는 탈수초화가 일어난 지역을 나타낸다(Scale bar, 200  $\mu$ m.)(도 4a). 통계적 분석은 hBM-MSC 또는 미노사이클린 개별치료에 비해서 병용투여가 탈수초화를 현저히 감소시킨 것을 나타낸다( $p < 0.05$ )(도 4b). hBM-MSC 또는 미노사이클린 개별치료에 비해서 병용투여가 MBP 양성 세포의 수를 현저하게 보호한 것을 나타낸다(Columns, mean; bars, SE. \* $p < 0.05$ , \*\* $p <$

0.01, \*\*\* $p < 0.001$ , one-way ANOVA with post-hoc Bonferroni corrections)(도 4c).  
결과는 세번의 개별적인 실험을 나타낸다. 이러한 결과는 hBM-MSC과  
미노사이클린의 병용투여는 조직손상을 감소시키고, EAE의 임상 증상을  
경감한다는 것을 확인하였다.

[128]

[129] <실시예 5>

[130] 병용투여의 EAE 마우스 척수에서 신경염증과 신경퇴행성에 대한 영향

[131] 신경염증과 신경퇴행성은 GFAP-, Iba-1- 및 NeuN 양성 세포로 평가하였다.

[132] PBS 마우스에서는 강렬한 신경교세포(glial)의 활성화와 병변부위에서 GFAP 및 Iba-1에 강렬하게 염색된 세포수의 증가가 분명했다. 본 발명자는 PBS 처리된 EAE 마우스에 비해 hBM-MSC 또는 미노사이클린 개별처리된 마우스에서 신경교세포와 미세아교세포(microglia)의 수가 감소한 것을 확인했다.

[133] 병용투여한 경우에는 적은 수의 GFAP- 및 Iba-1 양성의 성상교세포 및 미세아교세포만 관찰되었다(도 5a 참조).

[134] 실험결과 GFAP:  $p < 0.001$ , PBS vs. hBMMSCs 치료;  $p < 0.001$ , PBS vs. 미노사이클린 치료; Iba-1:  $p = 0.002$ , PBS vs. hBM-MSC 치료;  $p = 0.001$ , PBS vs. 미노사이클린 치료로 나타났다. 따라서 GFAP- 와 Iba-1 양성인 세포의 통계학적 분석은 PBS 치료와 비교하여 hBM-MSC 또는 미노사이클린 개별치료에 의해 활성화된 성상교세포에 대한 표지의 형광강도 및 활성화된 미세아교세포의 수에 있어 현저히 감소되었다.

[135] 실험결과 GFAP:  $p < 0.001$ , hBM-MSC vs. 병용투여;  $p < 0.001$ , 미노사이클린 vs. 병용투여; Iba-1:  $p = 0.009$ , hBM-MSC vs. 병용투여;  $p = 0.024$ , 미노사이클린 vs. 병용투여로 나타났다. 따라서 각각 개별치료된 경우에 비해 병용투여된 그룹은 현저한 감소가 있었다(도 5b, 5c 참조).

[136] 다음으로 본 발명자들은 요추척수의 회질(gray matter)에서 신경세포의 수를 세어 각각의 치료에 의한 신경보호 효과를 측정하였다. PBS 치료에 비해 hBM-MSC 또는 미노사이클린 개별처리된 EAE 마우스의 회질에서 NeuN의 수가 증가하였다. 반면 병용투여한 경우는 개별처리된 조직의 NeuN 보다 뚜렷한 증가를 유도했다.

[137] 통계학적 분석은 PBS 치료에 비해 hBM-MSC 또는 미노사이클린 치료된 마우스의 척수 부분에서 NeuN 양성 세포의 수가 현저히 증가한 것을 확인하였다( $p = 0.016$ , PBS vs. hBMMSCs 치료;  $p = 0.004$ , PBS vs. 미노사이클린 치료). 그러나 hBM-MSC 또는 미노사이클린 개별치료에 비해 병용투여한 그룹의 경우 현저한 상승이 있었다( $p < 0.001$ , hBM-MSC vs. 병용투여;  $p < 0.001$ , 미노사이클린 vs. 병용투여)(도 5d 참조).

[138] 이러한 결과는 도 5a 내지 도 5d와 같이 나타났으며, 절편은 GFAP(윗 패널), Iba-1(중간 패널), 및 NeuN(아래 패널)으로 표지되었으며, 면역반응으로 각각 성상교세포, 미세아교세포와 뉴런을 검출하였다. 또한 GFAP 면역반응의 강도는

PBS 치료된 EAE 마우스에서 표시되며, hBM-MSC 또는 미노사이클린 개별치료된 EAE 마우스에서 감소되었다(도 5a). 그러나 소수의 정상교세포는 병용투여된 그룹에 반응하였다.

[139] 미세아교세포와 반응하여 확인되는 Iba-1은 4가지의 EAE 그룹에서 GFAP와 같은 면역반응 패턴으로 나타났으며, 반대 패턴은 모든 그룹의 신경마커, NeuN에서 확인되었다(Scale bar, 200  $\mu$ m).

[140] 도 5b는 GFAP 형광도의 통계학적 분석한 것이며, Iba-1 양성 세포의 수는 hBM-MSC 또는 미노사이클린에 비해 병용투여에서 정상교세포 및 미세아교세포의 활성이 현저하게 감소된 것을 나타낸다(도 5c). 통계학적 분석은 EAE 마우스의 척수에서 hBM-MSC 또는 미노사이클린에 비해 병용투여한 경우 NeuN 양성 세포의 수가 현저히 증가한 것을 나타낸다( $p < 0.01$ ). Columns, mean; bars, SE. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , one-way ANOVA with post-hoc Bonferroni corrections)(도 5d).

[141] 종합해 보면, 이러한 결과는 hBM-MSC과 미노사이클린의 병용투여는 CNS에서 신경퇴행을 경감하고, 신경염증을 감소시키며, EAE에서 임상 증상을 완화시킨다는 것을 나타낸다.

[142]

[143] <실시예 6>

[144] 병용투여의 EAE 마우스에서 Th1 사이토카인과 Th2 사이토카인간 균형에 대한 영향

[145] 염증성 사이토카인의 발현을 조절하는지 확인하기 위해서, 본 발명자는 EAE 마우스의 혈장에서 IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$ 와 IL-4/IL-10의 발현을 ELISA를 통하여 측정하였다.

[146] 측정된 결과, IFN- $\gamma$ :  $p = 0.010$ , PBS vs. hBM-MSC 치료;  $p = 0.005$ , PBS vs. 미노사이클린 치료; TNF- $\alpha$ :  $p = 0.042$ , PBS vs. hBM-MSC 치료;  $p = 0.009$ , PBS vs. 미노사이클린 치료; IL-4:  $p = 0.004$ , PBS vs. hBM-MSC 치료;  $p = 0.001$ , PBS vs. 미노사이클린 치료; IL-10:  $p = 0.022$ , PBS vs. hBM-MSC 치료;  $p = 0.008$ , PBS vs. 미노사이클린 치료로 나타나며, 본 발명자는 PBS 치료된 그룹에 비해 hBM-MSC 또는 미노사이클린 치료된 그룹에서 IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$  Th1 사이토카인의 발현이 현저히 감소된 것과 IL-4/IL-10 Th2 사이토카인의 발현이 현저히 증가된 것을 확인하였다(도 6a 및 도 6b 참조).

[147] 또한 측정된 결과, IFN- $\gamma$ :  $p = 0.006$ , hBM-MSC vs. 병용투여;  $p = 0.048$ , 미노사이클린 vs. 병용투여; TNF- $\alpha$ :  $p = 0.006$ , hBM-MSC vs. 병용투여;  $p = 0.009$ , 미노사이클린 vs. 병용투여; IL-4:  $p < 0.001$ , hBM-MSC vs. 병용투여;  $p < 0.001$ , 미노사이클린 vs. 병용투여; IL-10:  $p = 0.028$ , hBM-MSC vs. 병용투여;  $p = 0.043$ , 미노사이클린 vs. 병용투여로 나타났고, 본 발명자는 각각의 hBM-MSC 또는 미노사이클린 개별치료된 그룹에 비해 병용투여된 그룹에서 IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$  Th1 사이토카인의 발현이 현저히 감소된 것과 IL-4/IL-10 Th2 사이토카인의 발현이

- 현저히 증가된 것을 확인하였다(도 6a 및 도 6b 참조). 또한 초기 면역 반응은 CNS로 면역세포이동에 앞서 주변부에서 이루어졌다.
- [148] 혈장은 면역처리 후 40일된 EAE 마우스 5그룹에서 분리되었다. 혈장 내의 사이토카인 단백질의 발현 수준은 ELISA로 정량화하였다. 이러한 결과는 도 6a 및 도 6b와 같이 나타났다.
- [149] 통계학적 분석은 PBS 치료에 비해서 hBM-MSc 또는 미노사이클린 개별처리된 경우 IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$  Th1 사이토카인이 현저하게 감소된 것을 나타내며, hBM-MSc 또는 미노사이클린 개별치료한 그룹에 비해 병용투여한 그룹에서 유사한 발현 패턴이 분명하게 나타났다(도 6a).
- [150] PBS 치료에 비해서 hBM-MSc 또는 미노사이클린 개별처리된 그룹의 경우 IL-4과 IL-10 단백질 발현 수준이 현저하게 증가된 것으로 나타났으며, hBM-MSc 또는 미노사이클린 개별치료한 그룹에 비해 병용투여한 그룹에서 유사한 발현 패턴이 분명하게 나타났다(Columns, mean; bars, SE. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , one-way ANOVA with post-hoc Bonferroni corrections)(도 6b). 이 결과는 세 번의 독립적인 실험을 나타낸다.
- [151] 본 발명자들은 시험관 내 시스템에서 전신 면역 미세환경에 대해 모든 치료 효과를 시험하였으며, IFN- $\gamma$  와 IL-4의 생산여부는 모든 EAE 그룹에서 항-MOG35-55로 자극된 비장을 분리하여 평가하였다.
- [152] 분석에 의하면, PBS 치료된 그룹에 비해 hBM-MSc 또는 미노사이클린 치료된 그룹에 경우 IFN- $\gamma$ 는 현저히 감소되었으며, IL-4 생산은 현저히 증가하였다는 것을 알 수 있다(IFN- $\gamma$ :  $p = 0.006$ , PBS vs. hBM-MSc 치료;  $p < 0.001$ , PBS vs. 미노사이클린 치료; IL-4:  $p = 0.042$ , PBS vs. hBM-MSc 치료;  $p = 0.035$ , PBS vs. 미노사이클린 치료).
- [153] 병용투여의 경우에도 같은 패턴이 나타난다. 그러나 각각의 치료에 비해 효과가 현저히 높은 것을 알 수 있다(IFN- $\gamma$ :  $p = 0.025$ , hBM-MSc vs. 병용투여;  $p = 0.037$ , 미노사이클린 vs. 병용투여; IL-4:  $p = 0.039$ , hBM-MSc vs. 병용투여;  $p = 0.046$ , 미노사이클린 vs. 병용투여)(도 9a 및 도 9b 참조).
- [154] 이러한 결과는 도 9와 같이 나타났으며, 면역처리 후 40일에 분리된 EAE 마우스의 지라세포( $5 \times 10^5$ /웰)는 MOG35-55에 의해 자극받았다. MOG 특이적인 IFN- $\gamma$  (도 9a)/IL-4 (도 9b)를 생산하는 비장의 수는 ELISPOT를 통해서 측정하였다. 병용투여는 hBM-MSc 또는 미노사이클린을 개별적으로 투여한 경우에 비하여 Th1의 빈도를 현저하게 감소시켰으나, 미엘린 단백질 특이적인 Th2의 빈도는 증가하였다( $p < 0.05$ ). 이러한 결과에서 hBM-MSc과 미노사이클린의 병용투여가 EAE의 효과기에 조직적으로 영향을 미친다는 것을 알 수 있다.
- [155] 공통적으로 병용투여한 마우스에서 사이토카인 균형이 Th1 사이토카인에서 Th2 사이토카인으로 현저하게 이동했다는 것을 알 수 있다.
- [156]

[157] <실시예 7>

[158] 병용투여의 EAE 마우스 척수에서 세포사멸에 대한 영향

[159] 병용투여가 세포사멸로부터 손상된 척수 세포를 보호하는지 확인하기 위해서, TUNEL을 통해서 신경세포사(apoptotic cell death)를 측정하였다.

[160] 이러한 결과는 도 7a 및 도 7b와 같이 나타났으며, 세포사멸은 TUNEL 염색으로 측정하였으며, TUNEL 양성 세포는 적색이며, DAPI로 비교염색한 것은 청색으로 나타난다(Scale bar, 200  $\mu$ m)(도 7a).

[161] TUNEL 양성 세포는 MetaMorph image analysis를 이용하여 정량하였으며, PBS 치료된 그룹에 비해 hBM-MSD 또는 미노사이클린 개별처리된 그룹에서 사멸세포의 수가 통계적으로 현저히 감소하였다. 또한 병용투여의 경우 hBM-MSD 또는 미노사이클린 개별처리된 그룹에 비해서 훨씬 현저한 감소를 보여준다( $p < 0.001$ ) Columns, mean; bars, SE.  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$ , one-way ANOVA with post-hoc Bonferroni corrections)(도 7b). 또한 결과는 3개의 독립적인 실험을 나타낸다.

[162] PBS 치료된 그룹에 비해서 개별치료된 그룹에서 사멸세포의 수가 감소했다( $p < 0.001$ , PBS vs. hBM-MSD 치료;  $p < 0.001$ , PBS vs. 미노사이클린 치료), 그러나 개별치료된 그룹에 비해 병용투여한 그룹의 경우 사멸세포의 수가 훨씬 현저히 감소된 것을 나타낸다(도 7a 및 도 7b 참조).

[163] 따라서 EAE에서 병용투여의 경우 병변부위에서 세포사멸을 감소시키며, 또한 본 발명자는 대부분의 사멸세포가 NeuN와 신경 마커(neuronal marker)로 이중표지된 것을 확인하였다. 반면 오직 소수만 GFAP, Iba-1, 또는 CD4에 양성이었다.

[164] 이러한 결과는 도 10과 같이 나타났으며, 첫 번째열의 (A)사진은 요추척수의 백질에서 녹색으로 표시되는 NeuN과 TUNEL(적색)의 이중 표지된 부위이다. 첫 번째열의 두 번째 사진은 (A)의 사각형을 고배율로 확대한 것이다. 또한 대부분의 사멸세포는 NeuN에 대해 양성이다(a에서 화살표)

[165] 두 번째열의 (B)사진은 요추척수의 백질에서 녹색으로 표시되는 GFAP(녹색)과 TUNEL(적색)의 이중 표지된 부위이다. 두 번째열의 두 번째 사진은 (B)의 사각형을 고배율로 확대한 것이다. 또한 소수의 사멸세포는 GFAP에 대해 양성이다(b에서 화살표)

[166] 세 번째열의 (C)사진은 요추척수의 백질에서 녹색으로 표시되는 Iba-1(녹색)과 TUNEL(적색)의 이중 표지된 부위이다. 세 번째열의 두 번째 사진은 (C)의 사각형을 고배율로 확대한 것이다.

[167] 네 번째열의 (C)사진은 요추척수 백질에서 녹색으로 표시되는 CD4(녹색)과 TUNEL(적색)의 이중 표지된 부위이다. 네 번째열의 두 번째 사진은 (C)의 사각형을 고배율로 확대한 것이다. 또한 소수의 사멸세포는 CD4에 대해 양성이다(d에서 화살표)

[168] 핵은 DAPI(청색)로 대비염색 되었으며 화살표는 양성인 세포를 나타낸다. A,

B, C, D 내의 Scale bars = 200  $\mu\text{m}$ , a, b, c, d 내의 Scale bars = 100  $\mu\text{m}$ .

[169] 이러한 결과는 EAE 마우스의 척수에서 병용투여가 신경사멸을 감소시킬 수 있다는 것을 나타낸다.

[170]

[171] <실시예 8>

[172] 새로운 약제 또는 질병 과정의 다른 측면에 영향을 미치거나 또는 병용투여로 개별약물의 낮은 투여량을 사용하여 부작용을 완화시키는 치료법을 확인하기 위해서 다발성경화증의 치료를 향상시키기 위한 치료적 접근을 시도하였다.

[173] 본 발명자는 고용량의 미노사이클린은 성상교세포의 활성을 감소시킨다는 것을 확인하였고, 또한 hBM-MSC세포에 대한 미노사이클린의 효과를 확인하였으며, 고용량에서조차 활성 및 특성에 영향을 미치지 않는다는 것도 확인하였다.

[174] 현재 EAE 마우스에서 PBS 치료에 비해 hBM-MSC 또는 낮은 투여량의 미노사이클린의 개별치료가 현저한 효과를 갖지만, 병용투여는 EAE 마우스를 질병의 진행 과정에서 보호하고, 질병의 심각도를 현저히 완화, 염증침윤의 감소, 탈수초화 감소, 신경퇴행성의 감소 및 면역조절강화 기능을 갖는다. hBM-MSC과 미노사이클린의 치료조합은 기준을 충족하므로, 다발성경화증에 있어서 이들의 병용투여가 합리적이다.

[175] 병용투여의 치료 효과에 대한 많은 가능성 있는 기작이 있다. 본 발명에서 병용투여의 첫 번째 유익한 효과는 EAE 마우스의 혈장과 비장 배양에서 IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$  과 IL-4/IL-10 발현과 생산의 조절에 관여할 수 있다는 점이다.

[176] 사이토카인은 다발성경화증의 발병에서 중요한 역할을 한다. CNS에서 Th1과 Th2간의 균형은 Th1 관여 질병인 EAE로 진행함에 있어 중요한 결정요인이 된다. 반면, Th2 사이토카인은 완화와 회복에 관여되는 것으로 알려져 왔다.

[177] 조직 특이적 자가면역에서 사이토카인 균형은 저항력과 감수성을 결정하는 중심이 된다. EAE 감수성은 주된 염증전 Th1 사이토카인인 IFN- $\gamma$ 와 TNF- $\alpha$ 의 발현에 관련된 것으로 생각된다. 반면 IL-4과 IL-10 같은 Th2 사이토카인은 질병을 예방하거나, 개선시키는 항염증성 사이토카인이다. TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ 과 IL-4/IL-10은 Th1과 Th2의 진행을 나타내고, 다발성경화증과 EAE 질환 모두에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 생각되어진다.

[178] 본 발명에서 병용투여는 EAE 마우스에서 Th1에서 Th2 사이토카인으로 이동을 촉진한다는 것을 확인하였으며, 더욱이 hBM-MSC은 T 림프구의 활성과 분화를 억제할 수 있고, Th2 극성 면역반응을 유도하며, 내생치유(endogenous repair)를 촉진한다. 따라서 시험관 내와 체내에서 모두 면역조절효과를 발휘한다. hBM-MSC과 미노사이클린의 병용투여한 효과는 각각을 개별투여한 시너지 효과를 넘어서는다.

[179] 두 번째 가능성 있는 기작은 염증과 신경교의 활성을 억제하는 것이다. 염증은 재발완화반복성 다발성경화증과 EAE에서 조직손상의 원인으로 추정된다.

그러므로 항염증은 초기 다발성경화증에서 주된 치료 목표로 계속 고려된다.

- [180] 신경교의 활성화는 염증성 사이토카인의 생산과 주변세포를 압도하는 대량분화를 통해 세포파괴에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 본 발명에서 hBM-MSc 또는 미노사이클린 개별치료는 병용투여와 함께 단핵과 T세포의 침윤과 미세아교세포 및 성상교세포의 활성을 현저히 감소시켰다.
- [181] 본 발명에서 제시된 데이터는 신경아교세포 활성화의 저해가 EAE 심각도를 개선한다는 점과 일치하며, 미노사이클린이 미세아교세포의 활성을 저해하여 신경보호기능을 갖는다는 점과도 일치한다.
- [182] hBM-MSc의 이식은 미세아교세포와 성상교세포의 활성을 감소시켜 신경보호 효과의 가능성과 실용적인 수단을 제공한다. 이점은 또한 EAE 마우스에서 병용투여가 치료 효과를 강화하기 위한 중요한 요소가 된다. 또한 본 발명에서 미노사이클린이 신경보호 효과를 유도하는 것이 항염증 활성화 때문이 아닌, 세포내 항사멸신호 전달체계의 유도를 통해서 달성한다는 점을 확인하였으며, 이러한 점은 hBM-MSc과 미노사이클린의 병용투여가 EAE 마우스의 병변부위에서 세포사멸을 현저하게 감소시킨다는 점과 일치한다.

[183]

- [184] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

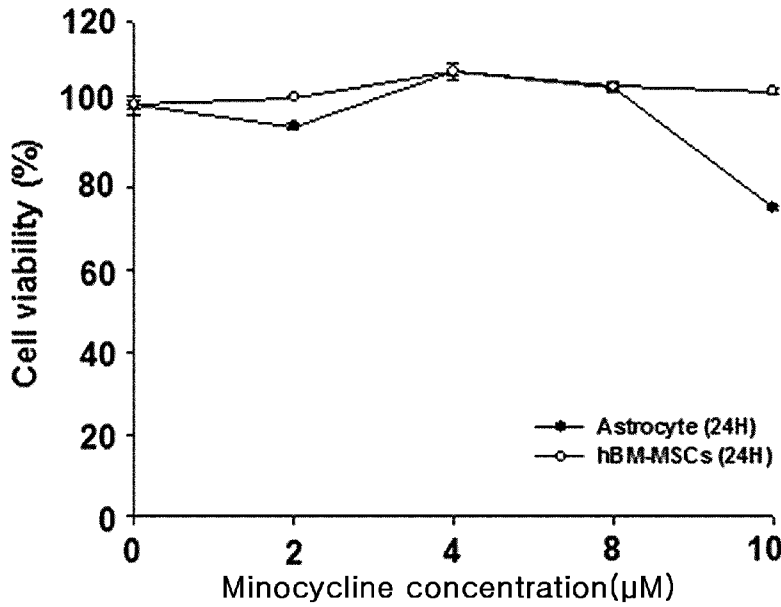
### 산업상 이용가능성

- [185] 골수 유래의 중간엽줄기세포(BM-MSc)와 미노사이클린의 병용투여는 Th1 사이토카인에서 Th2 사이토카인으로 이동을 촉진하며, 염증세포의 유입을 감소시키고, 탈수초화를 억제하며, 세포사멸을 감소시키고, 신경보호기능을 강화하며, EAE 마우스에서 질병의 진행을 예방하여 효과적인 치료를 발휘한다. 또한 미노사이클린 단독 치료에서 발생하는 부작용을 최소화할 수 있다. 따라서, hBM-MSc과 미노사이클린의 병용투여를 다발성경화증 치료에 사용할 수 있다.
- [186]

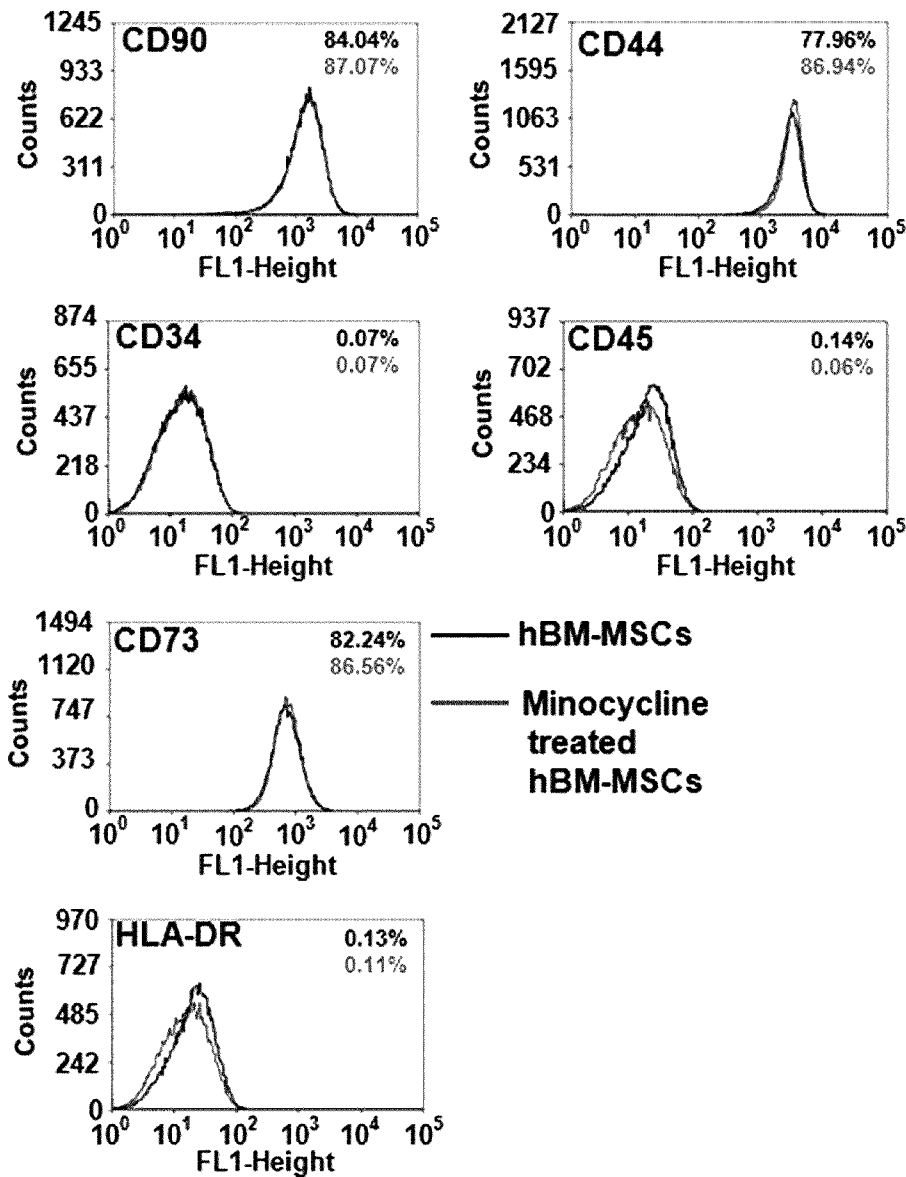
## 청구범위

- [청구항 1] 골수 유래의 중간엽줄기세포(BM-MSC); 및 미노사이클린(minocycline) 화합물 또는 상기 화합물의 약제학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 다발성경화증 또는 뇌척수염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 2] 청구항 1에 있어서, 상기 골수 유래의 중간엽줄기세포는 인간의 골수로부터 유래한 것을 특징으로 하는 다발성경화증 또는 뇌척수염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 3] 청구항 1에 있어서, 상기 골수는 다발성경화증 또는 뇌척수염이 발병한 개체로부터 수득한 자가골수(autologous bone marrow)인 것을 특징으로 하는 다발성경화증 또는 뇌척수염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 4] 청구항 1에 있어서, 상기 다발성경화증 또는 뇌척수염의 예방 또는 치료는 신경세포의 탈수초화방지(demyelination), 신경보호 효과(neuroprotective effect), 조직손상의 감소, 세포사멸(apoptosis) 방지 또는 염증성침윤(inflammatory infiltration)의 억제 효과에 의한 것을 특징으로 하는 다발성경화증 또는 뇌척수염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 5] 시험관 내에서(in vitro) 혈장에 골수유래 중간엽줄기세포(BM-MSC); 및 미노사이클린 화합물 또는 상기 화합물의 약제학적으로 허용 가능한 염의 혼합물을 처리하여 Th1 사이토카인(proinflammatory cytokine)은 감소시키거나 또는 Th2 사이토카인(anti-inflammatory cytokine)은 증가시키는 사이토카인 발현의 조절 방법.
- [청구항 6] 골수 유래의 중간엽줄기세포(BM-MSC); 및 미노사이클린 화합물 또는 상기 화합물의 약제학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 다발성경화증 또는 뇌척수염의 예방 또는 치료용 세포치료제.
- [청구항 7] 청구항 1 내지 청구항 4 중 어느 한 항의 조성물을 대상체(subject)에게 투여하는 단계를 포함하는 다발성경화증 또는 뇌척수염의 예방 또는 치료 방법.
- [청구항 8] 청구항 6의 세포치료제를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 다발성경화증 또는 뇌척수염의 예방 또는 치료 방법.

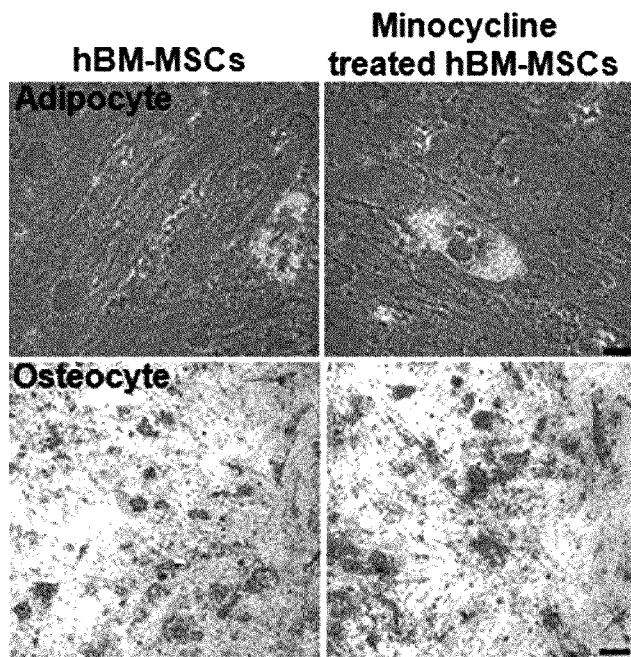
[Fig. 1a]



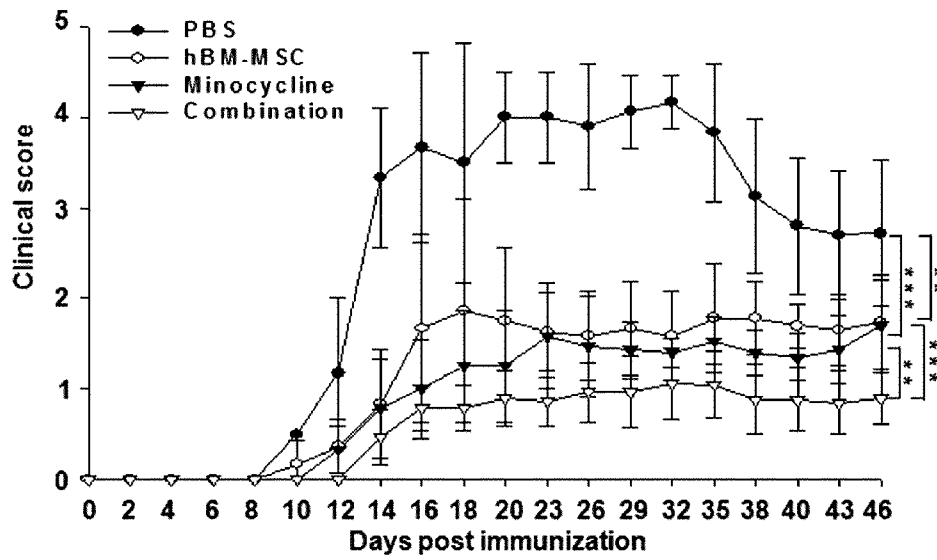
[Fig. 1b]



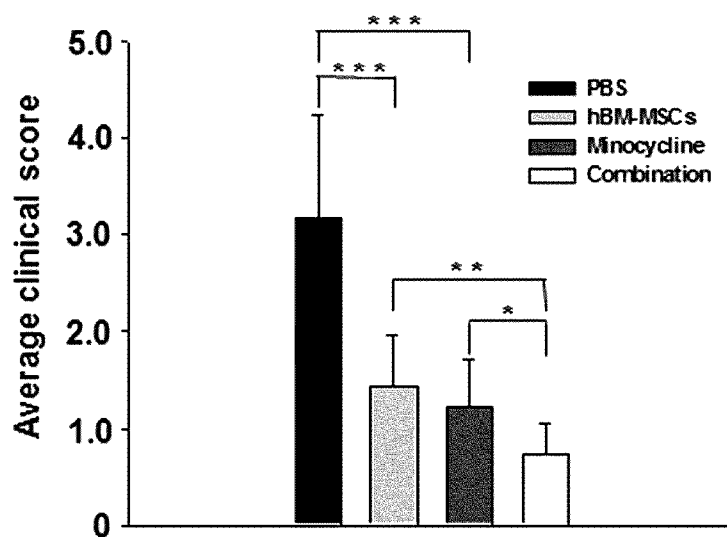
[Fig. 1c]



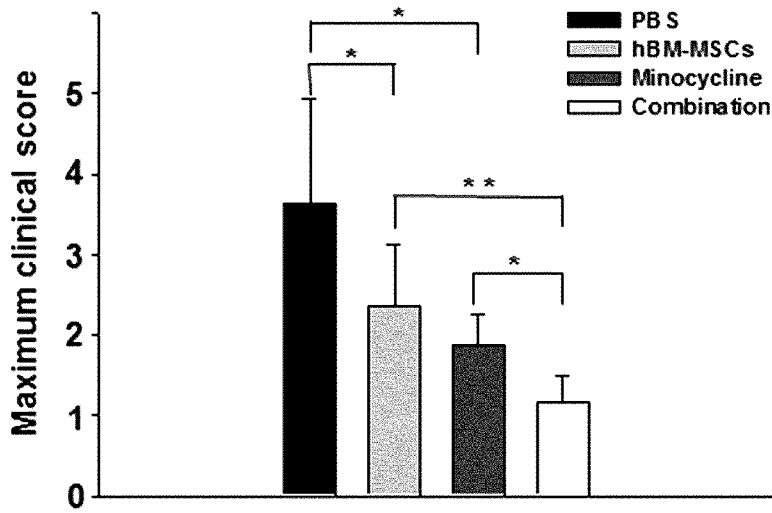
[Fig. 2a]



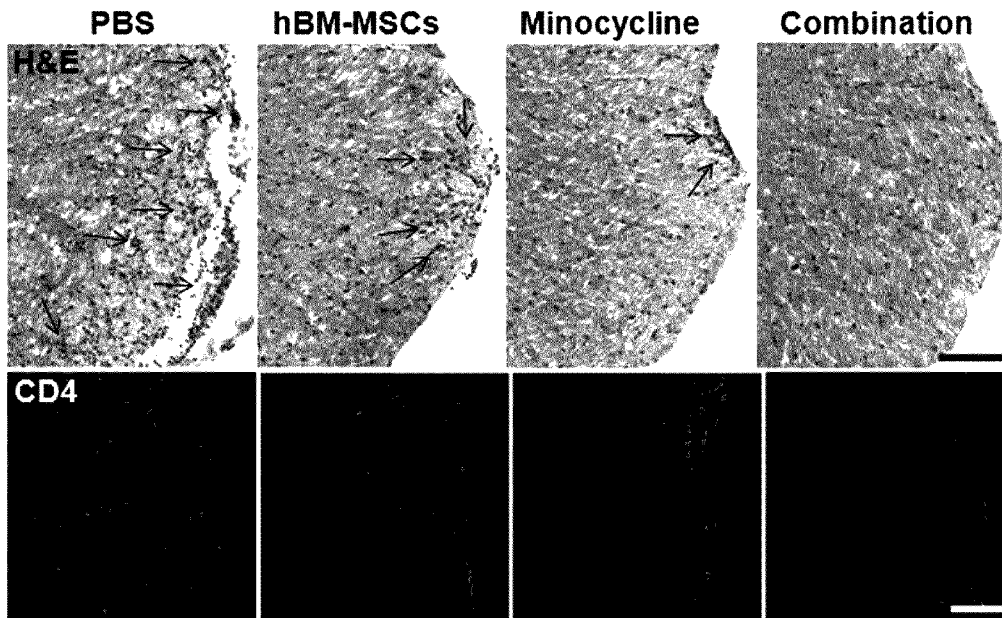
[Fig. 2b]



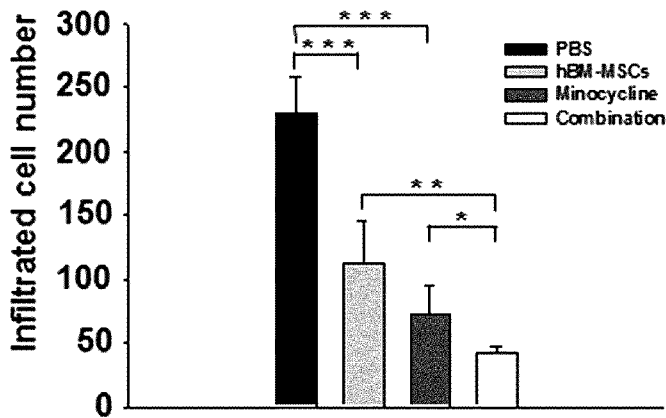
[Fig. 2c]



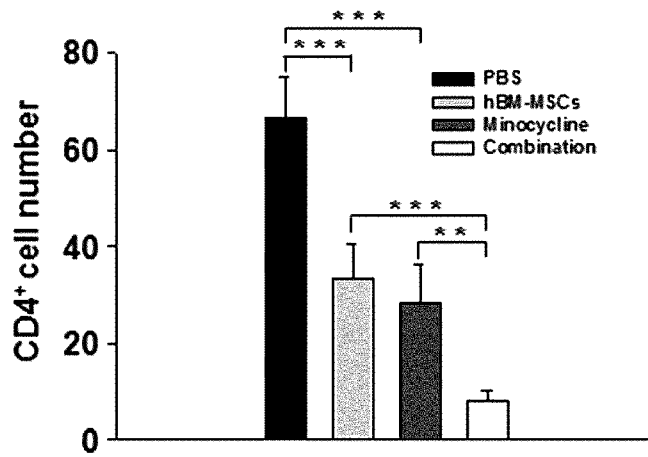
[Fig. 3a]



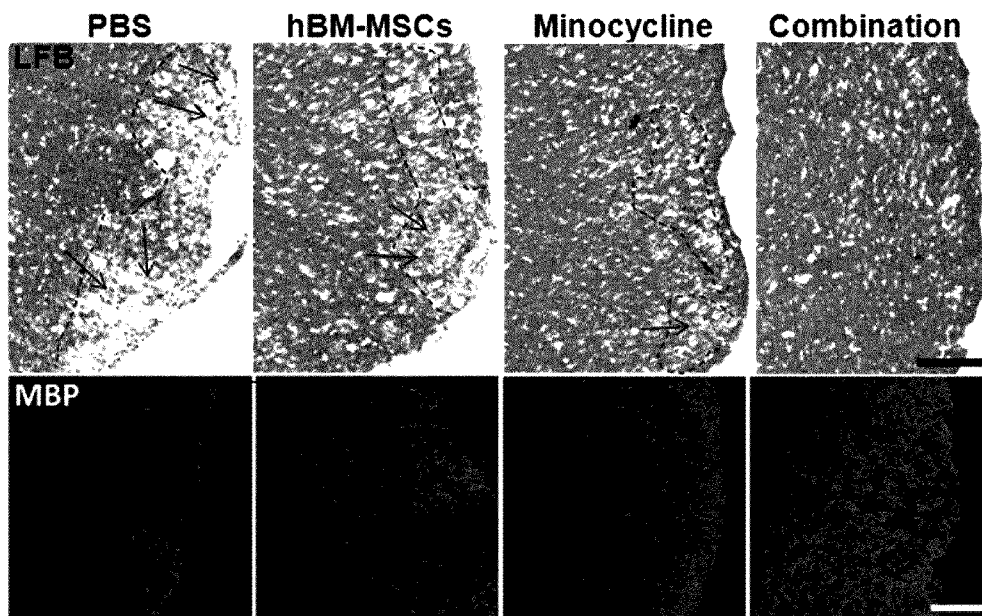
[Fig. 3b]



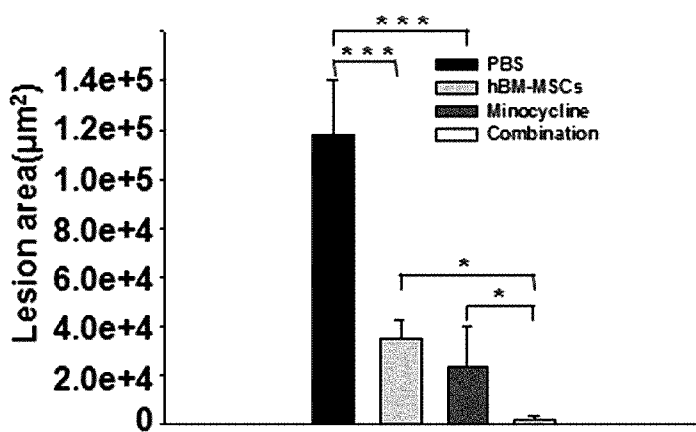
[Fig. 3c]



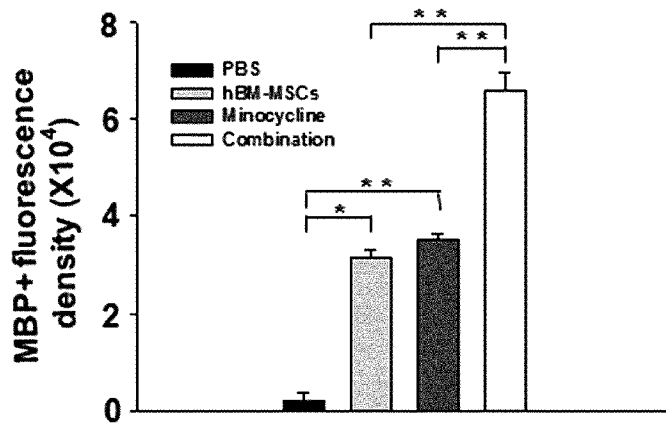
[Fig. 4a]



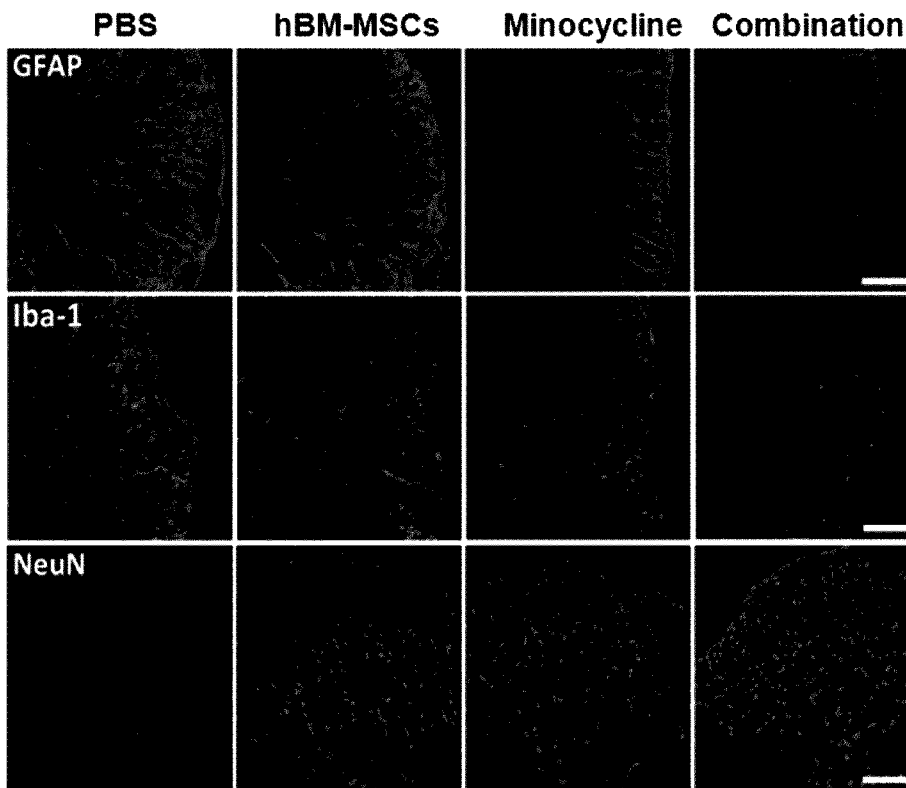
[Fig. 4b]



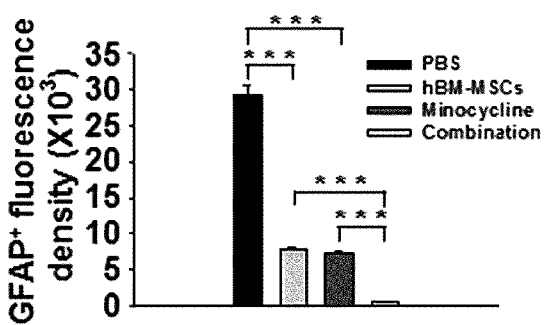
[Fig. 4c]



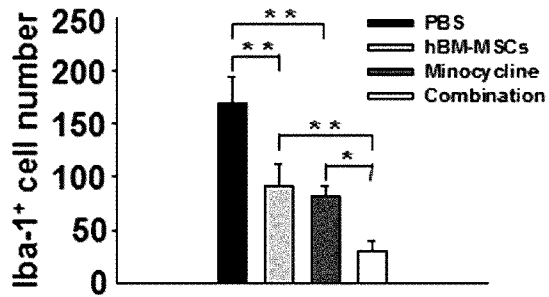
[Fig. 5a]



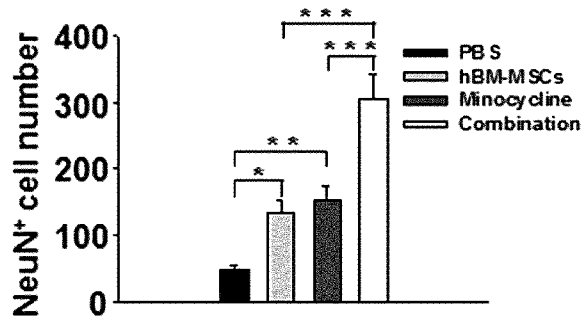
[Fig. 5b]



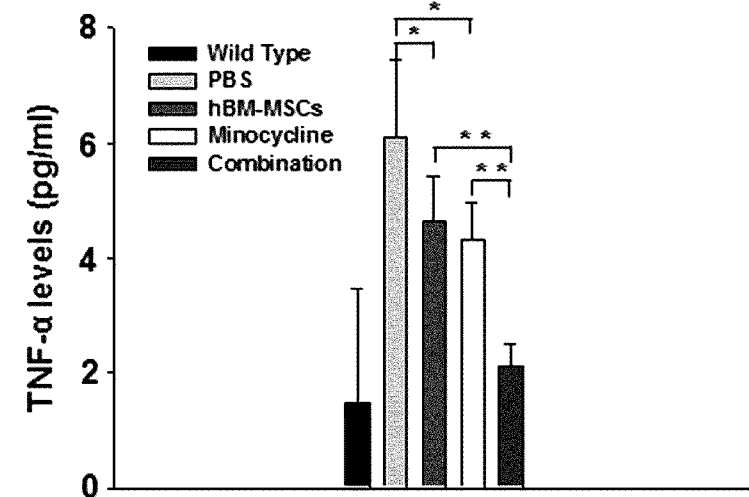
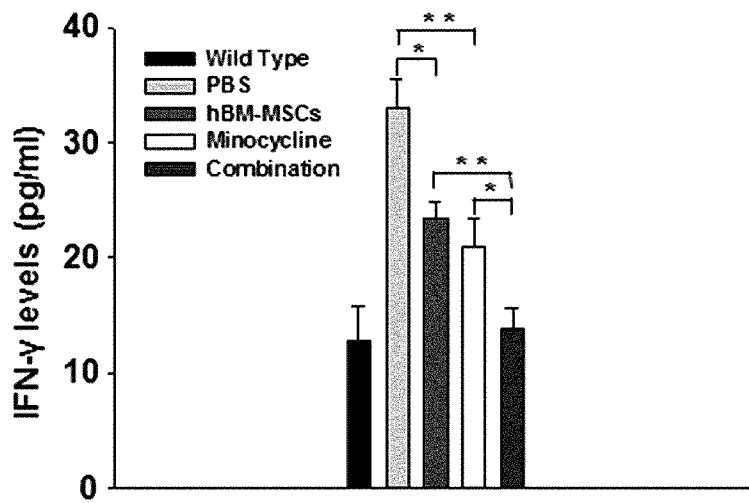
[Fig. 5c]



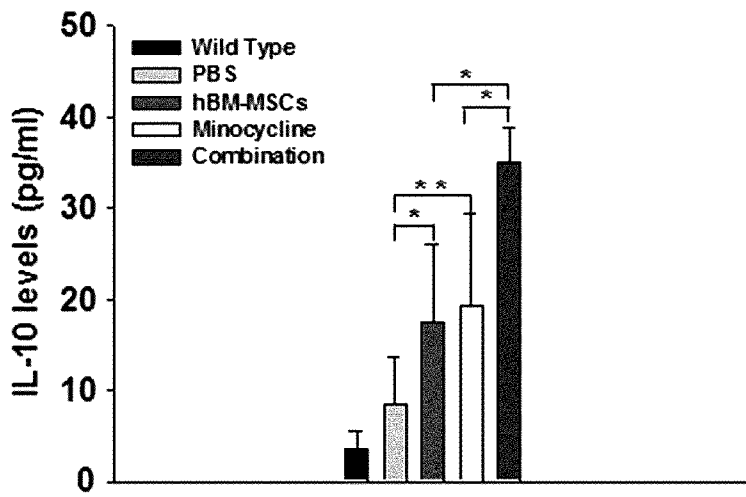
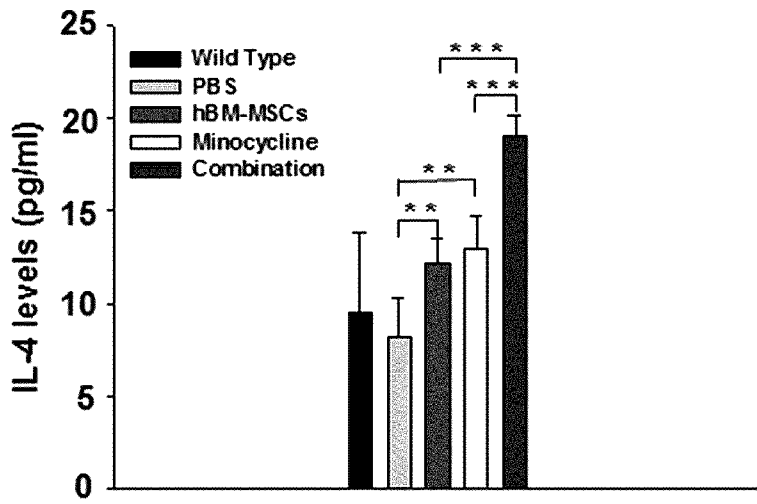
[Fig. 5d]



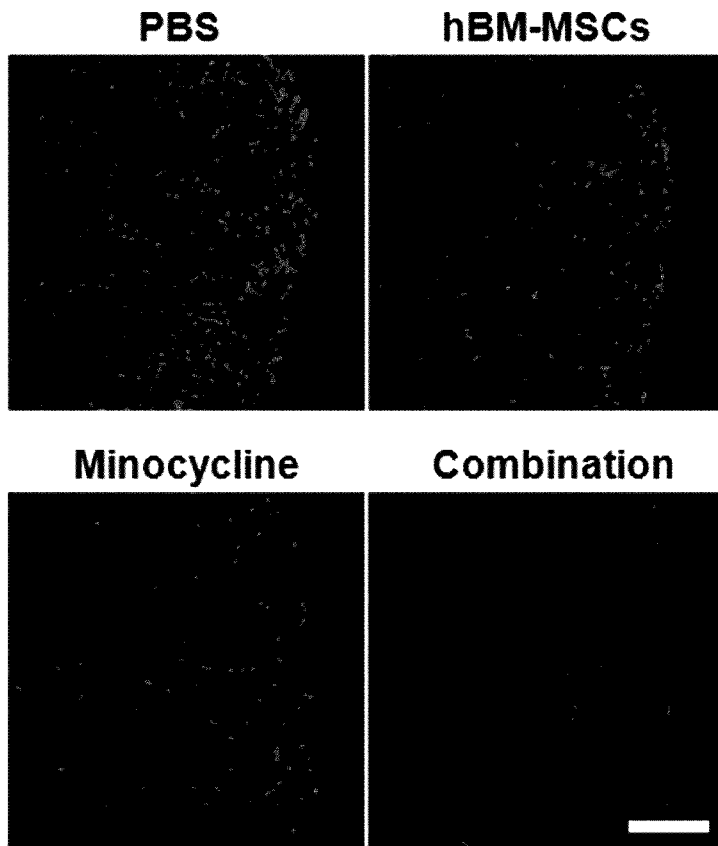
[Fig. 6a]



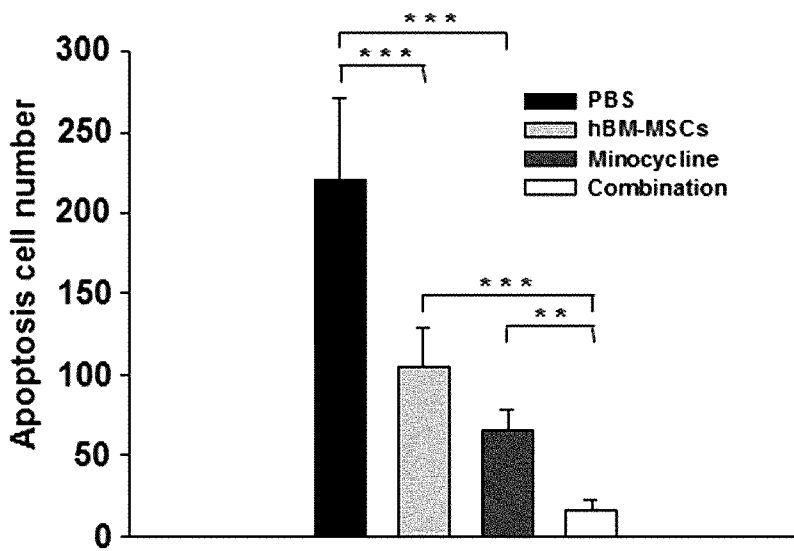
[Fig. 6b]



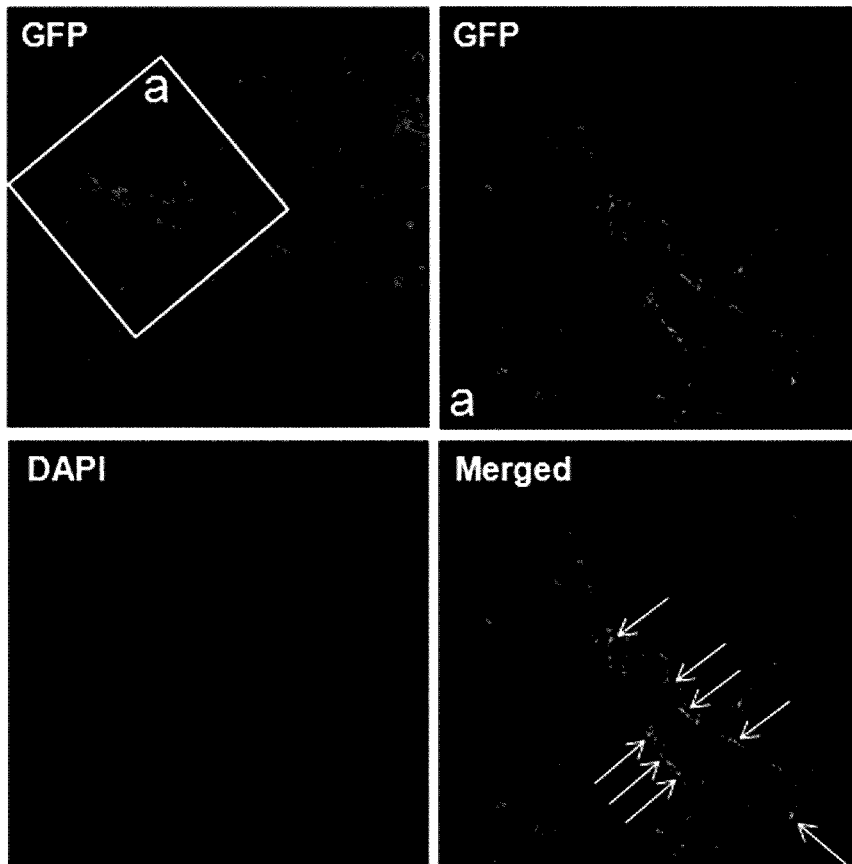
[Fig. 7a]



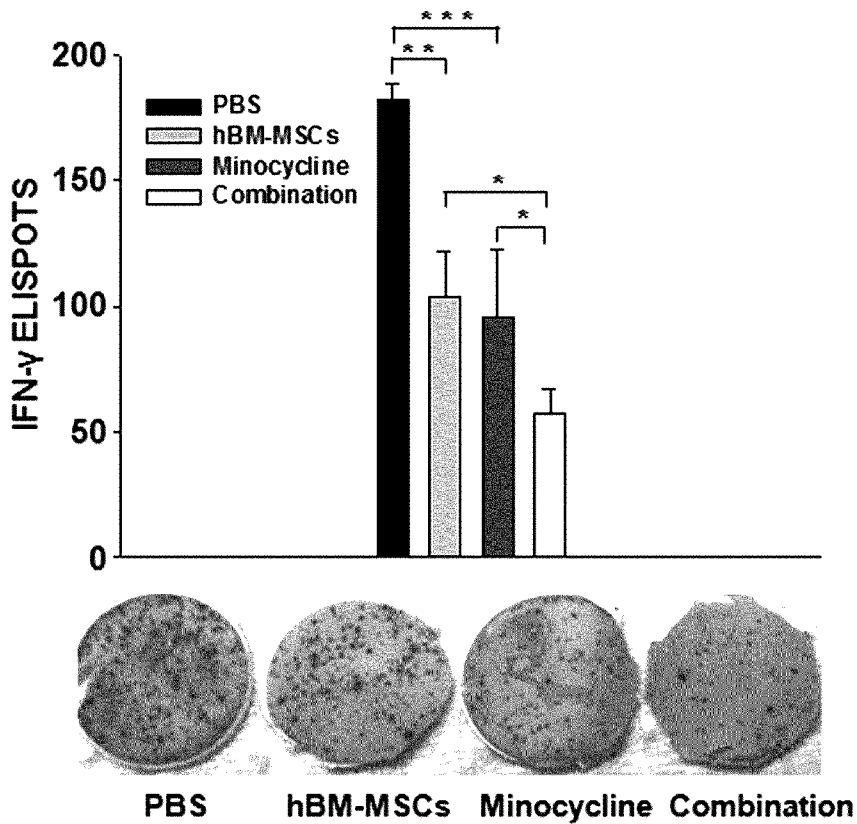
[Fig. 7b]



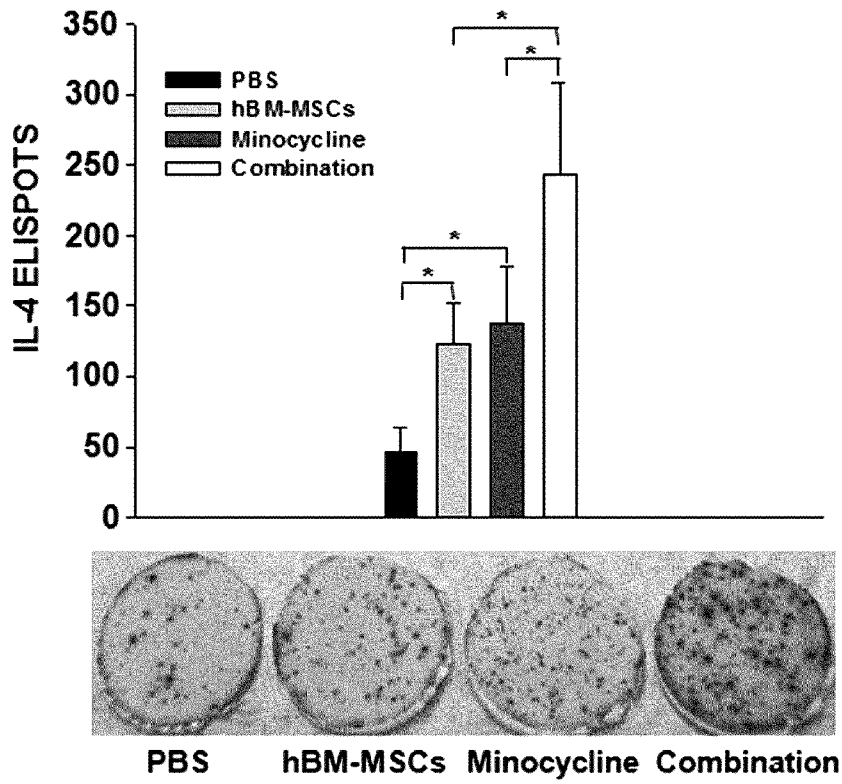
[Fig. 8]



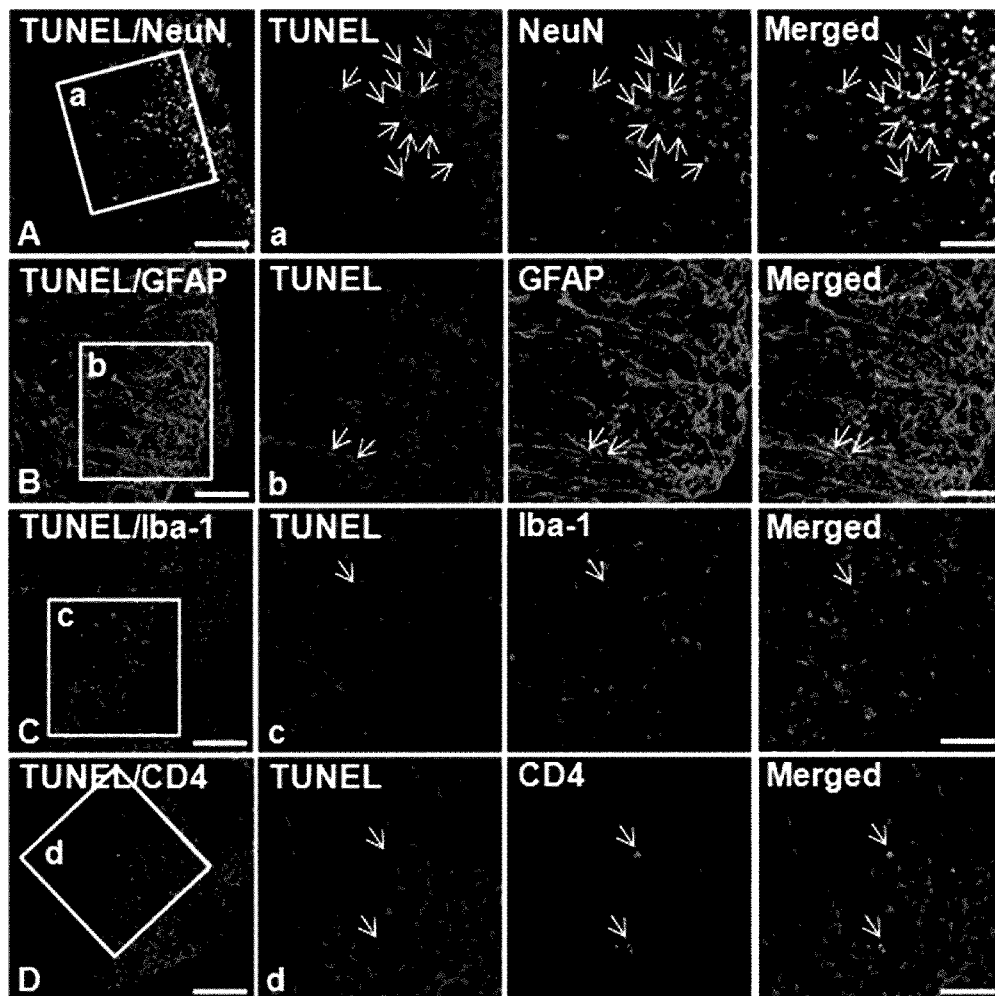
[Fig. 9a]



[Fig. 9b]



[Fig. 10]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2013/011476

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

*A61K 35/28(2006.01)i, A61K 31/65(2006.01)i, A61P 25/00(2006.01)i, A61P 29/00(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 35/28; A61P 21/00; A61K 31/60; A61K 31/65; A61K 35/50; A61P 25/28; A61P 25/00; A61P 29/00

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) &amp; Keywords: mesenchymal stem cells, minocycline, tetracycline, multiple sclerosis, encephalomyelitis, demyelination

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LIANHUA BAI et al., "Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce Th2-polarized immune response and promote endogenous repair in animal models of multiple sclerosis", GLIA, vol. 57, pp. 1192-1203, 2009. See abstract, pages 1193, 1199, figure 6.	1-6
Y	US 2002-0022608 A1 (DUNCAN, Ian D. et al.) 21 February 2002 See abstract, paragraph [0045], claims 1, 2, figures 1-4.	1-6
A	NAOKO NIIMI et al., "Minocycline suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis by increasing tissue inhibitors of metalloproteinases", Neuropathology, vol. 33, pp. 612-620, 14 April 2013 See abstract, page 619.	1-6
A	US 2007-0238711 A1 (METZ, Luanne et al.) 11 October 2007 See abstract, claim 1, figures 2-5.	1-6
A	KR 10-2010-0054759 A (MEDIPOST CO., LTD.) 25 May 2010 See abstract, claims 1, 6.	1-6

 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

"I" 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

"&amp;" document member of the same patent family


Date of the actual completion of the international search

25 MARCH 2014 (25.03.2014)

Date of mailing of the international search report

26 MARCH 2014 (26.03.2014)

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/KR2013/011476

**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, 8  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claims 7-8 pertain to a method for prevention or treatment of the human diseases, 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/KR2013/011476**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2002-0022608 A1	21/02/2002	US 6613756 B2	02/09/2003
US 2007-0238711 A1	11/10/2007	CA 2569098 A1	15/12/2005
		EP 1758563 A1	07/03/2007
		IL 179330 D0	15/05/2007
		WO 2005-117902 A1	15/12/2005
KR 10-2010-0054759 A	25/05/2010	AU 2009-314797 A1	20/05/2010
		CA 2743620 A1	20/05/2010
		CN 102281883 A	14/12/2011
		EP 2365816 A2	21/09/2011
		JP 2012-508733 A	12/04/2012
		KR 10-2010-0054711 A	25/05/2010
		KR 10-2010-0054731 A	25/05/2010
		KR 10-2011-0087263 A	02/08/2011
		US 2011-0262393 A1	27/10/2011
		WO 2010-056075 A2	20/05/2010
		WO 2010-056075 A3	30/09/2010

<b>A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))</b> A61K 35/28(2006.01)i, A61K 31/65(2006.01)i, A61P 25/00(2006.01)i, A61P 29/00(2006.01)i		
<b>B. 조사된 분야</b> 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 35/28; A61P 21/00; A61K 31/60; A61K 31/65; A61K 35/50; A61P 25/28; A61P 25/00; A61P 29/00 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: 중간엽줄기세포, 미노사이클린, 테트라사이클린, 다발성경화증, 뇌척수염, 탈수초		
<b>C. 관련 문헌</b>		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	LIANHUA BAI 외 6명, "Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce Th2-polarized immune response and promote endogenous repair in animal models of multiple sclerosis", GLIA, Vol.57, pp.1192-1203, 2009. 요약, 페이지 1193, 1199, 도면 6 참조.	1-6
Y	US 2002-0022608 A1 (IAN D. DUNCAN 외 1명) 2002.02.21 요약, 식별번호 [0045], 청구항 1, 2, 도면 1-4 참조.	1-6
A	NAOKO NIIMI 외 2명, "Minocycline suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis by increasing tissue inhibitors of metalloproteinases", Neuropathology, Vol.33, pp.612-620, 2013.04.14. 요약, 페이지 619 참조.	1-6
A	US 2007-0238711 A1 (LUANNE METZ 외 2명) 2007.10.11 요약, 청구항 1, 도면 2-5 참조.	1-6
A	KR 10-2010-0054759 A (메디포스트(주)) 2010.05.25 요약, 청구항 1, 6 참조.	1-6
<input type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 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 특허문헌 "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 2014년 03월 25일 (25.03.2014)	국제조사보고서 발송일 2014년 03월 26일 (26.03.2014)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-472-7140	심사관 윤소라 전화번호 +82-42-481-3367	

제2기제란 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, 8  
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,  
청구항 7, 8 발명은 사람을 대상으로 하는 질병의 예방 또는 치료방법에 관한 것이므로, PCT 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당합니다.
- 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.

제3기제란 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.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2002-0022608 A1	2002/02/21	US 6613756 B2	2003/09/02
US 2007-0238711 A1	2007/10/11	CA 2569098 A1	2005/12/15
		EP 1758563 A1	2007/03/07
		IL 179330 D0	2007/05/15
		WO 2005-117902 A1	2005/12/15
KR 10-2010-0054759 A	2010/05/25	AU 2009-314797 A1	2010/05/20
		CA 2743620 A1	2010/05/20
		CN 102281883 A	2011/12/14
		EP 2365816 A2	2011/09/21
		JP 2012-508733 A	2012/04/12
		KR 10-2010-0054711 A	2010/05/25
		KR 10-2010-0054731 A	2010/05/25
		KR 10-2011-0087263 A	2011/08/02
		US 2011-0262393 A1	2011/10/27
		WO 2010-056075 A2	2010/05/20
		WO 2010-056075 A3	2010/09/30