(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0135112
(43) 공개일자 2019년12월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/28 (2015.01) *A61K 31/423* (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01) *A61P 29/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 35/28 (2013.01)
A61K 31/423 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0060140
(22) 출원일자 2018년05월28일
심사청구일자 2018년05월28일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
윤태영
서울특별시 중랑구 공릉로18길 59, 101동 804호(묵동, 브라운스톤태릉아파트)
박혜영
경기도 용인시 수지구 성복2로 86, 108동 802호(성복동, 성동마을 엘지빌리지1차)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 하나

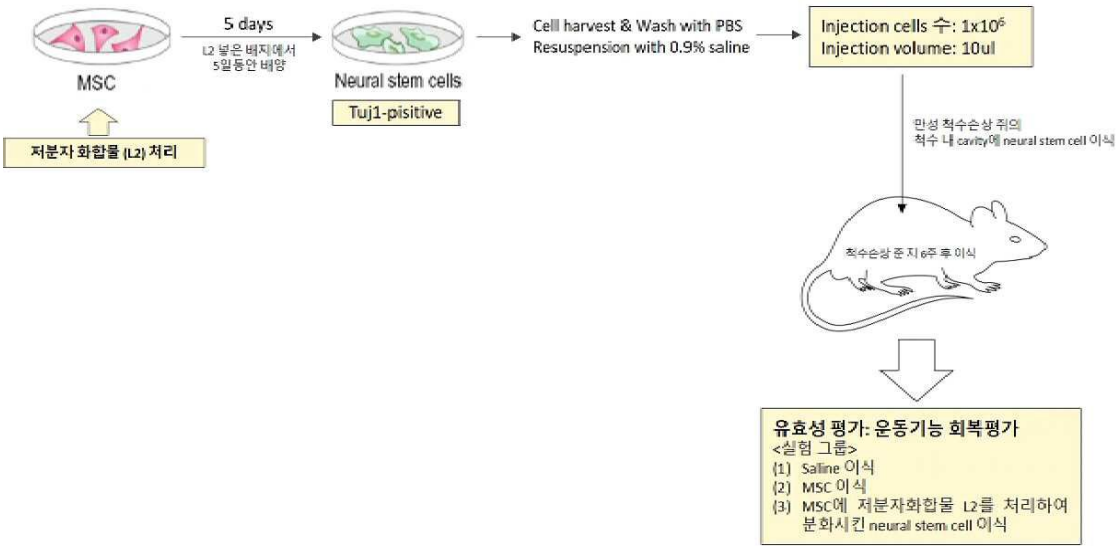
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **신규 화합물을 처리한 줄기세포를 포함하는 척수손상 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 척수손상 치료용 조성물에 관한 것으로, 특정 화합물을 처리하고 배양한 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 포함하는 척수손상 치료용 조성물이 제공된다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
A61P 25/00 (2018.01)
A61P 29/00 (2018.01)
(72) 발명자
이지윤
서울특별시 중랑구 공릉로18길 59, 103동 1204호(묵동, 브라운스톤태릉아파트)
전상용
서울특별시 송파구 올림픽로4길 42, 12동 205호(잠실동, 우성아파트)
주봉건
경기도 고양시 일산동구 위시티4로 46, 202동 1201호(식사동, 위시티일산자이2단지아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 HI16C2188
부처명 보건복지부
연구관리전문기관 한국보건산업진흥원
연구사업명 첨단의료기술개발
연구과제명 저분자 화합물을 이용한 중간엽 유래 신경줄기세포의 개발
기 여 율 1/1
주관기관 경희대학교 산학협력단
연구기간 2016.11.08 ~ 2021.07.31

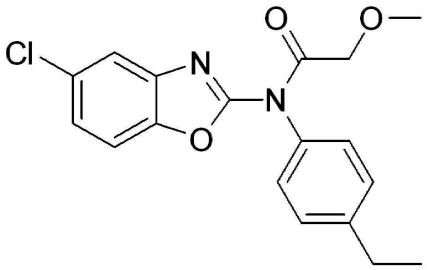
명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1의 화합물을 처리한 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 포함하는 척수손상 치료용 조성물.

[화학식 1]



청구항 2

제1항에 있어서,

상기 척수손상은 외상 또는 염증에 의해 유발된 척수손상 치료용 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 염증은 급성 횡단성 척수염, 급성 파종성 척수염, 척수병증, 비호지킨 림프종, 수두증, 유전성 실조증, 신경매독, 미나마타병, 루게릭병 및 다발성 결화증으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상에 의해 유발된 척수손상 치료용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 줄기세포는 중간엽줄기세포(mesenchymal stem cell)인 척수손상 치료용 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 줄기세포는 상기 화합물 처리 후 96 내지 144시간 배양된 척수손상 치료용 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

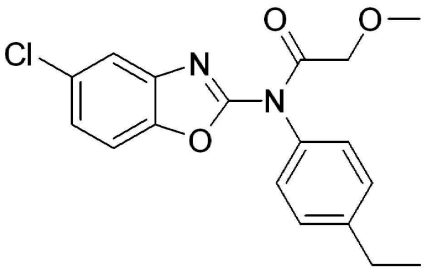
상기 줄기세포는 이동성 신경모세포(migrating neuroblast)로 분화된 것인 척수손상 치료용 조성물.

청구항 7

(a) 줄기세포에 하기 화학식 1의 화합물을 처리하는 단계; 및

(b) 상기 화합물이 처리된 줄기세포를 96 내지 144시간 배양하는 단계;를 포함하는 척수손상 치료용 줄기세포 제조방법.

[화학식 1]



발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 신규 화합물을 처리하고 배양한 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 척수손상 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 뼈는 외상 등으로 인해 척수신경이 손상을 받게 되면 인체기능의 마비를 초래한다. 척수 신경 조직은 뇌와 비교할 때 단순한 구조를 가지고 있으나 재생은 쉽지 않다.

[0003] 척수손상 후 일어나는 병리학적 현상은 시간에 따라 크게 일차적 손상과 이차적 손상으로 나누어진다.

[0004] 일차적 손상은 손상 직후 수 분 내에 일어나는 현상으로서 주로 상처 부위의 세포가 괴사(necrosis)하는데, 이 시기에는 워낙 빠르게 세포가 파괴되기 때문에 약물학적인 치료로 다루기가 거의 불가능하다.

[0005] 일차적 손상에 이은 이차적 손상은 수 시간에서 수일에 거쳐 천천히 진행되는데, 상처부위의 세포만 퇴화되는 것이 아니라 주변의 신경세포와 희소돌기아교세포에서 아폽토시스에 의하여 서서히 세포사멸이 시작된다.

[0006] 세포사멸은 상처부위를 중심으로 하여 지속적으로 진행되어 결국 척수 내부의 손상부위가 점차 넓어지게 된다.

[0007] 또한, 신경 신호의 이동통로인 축삭과 축삭의 기능을 돕는 미엘린 수초의 퇴화가 일어나, 종국적으로 척수 내 빈 공간이 형성되며 더 이상의 신경 신호 전달이 이루어질 수 없게 되어 영구적인 기능 소실이 야기된다.

[0008] 오랜 기간 척수신경 외상 후 일어나는 병리작용에 대한 원인 규명과 재생에 관한 연구를 통하여 척수손상으로 인한 영구적 기능 마비를 억제하거나 완화시키려는 연구가 진행되어왔다.

[0009] 척수손상의 초기 기전은 워낙 빠르게 진행되어 약물학적인 치료로 다루기 어렵기 때문에, 이차적인 기전을 다루는 약물학적 전략이 치료제 개발이 중요하다.

[0010] 현재까지 스테로이드, 항산화제, 글루타메이트 수용체 억제제, 이온 채널 억제제, 갱글리오시드(ganglioside), 축삭돌기 재생 억제제에 대한 항체, 항염증제, 신경영양인자 등 다양한 가능성 있는 약물학적인 치료들이 시도된 바 있다.

[0011] 그러나 메틸프레드니솔론만이 척수손상 후 유일한 치료제로서 사용되고 있으며, 그럼에도 불구하고 불분명한 치료 효과와 과량의 투여량으로 인한 부작용 등 많은 문제점을 안고 있다.

[0012] 따라서, 약이나 물리치료(physiotherapy)를 이용한 척수손상 치료는 한계에 도달하였으며, 세포의 이식에 의한 치료에 초점을 맞춘 많은 실험적인 연구가 진행되고 있다.

[0013] 줄기세포(stem cell)는 불명확한 periods를 위해 유기체의 삶 동안 내내 분화하는 능력을 갖는 세포로서 이를 이용한 치료방법이 연구되고 있으나, 그 방법이 현재까지 확립되어 있지 않다.

[0014] 척수손상 후 손상부위에 분화능을 갖는 세포를 이식하는 것은 영구적으로 소실된 신경세포를 대체하여 손상부위에 새로운 신경세포를 제공하고 이로 인해 신경 재생을 촉진시키기 위한 치료 전략으로 이용되고 있다.

[0015] 본 발명자들은 줄기세포 이식에 있어서 특정 화합물 처리를 통해 척수손상 치료 효과가 현저히 개선될 수 있음을 확인하였으며 향후 임상의 빠른 적용을 앞당길 수 있는 기준점을 마련하고자 하였다.

발명의 내용

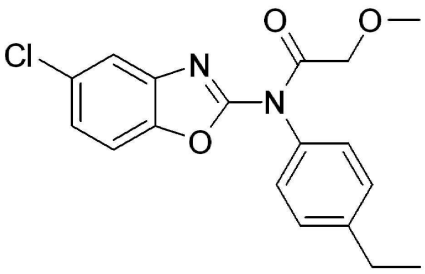
해결하려는 과제

[0016] 본 발명은 전술한 종래기술의 문제점을 해결하기 위하여 줄기세포 기반의 척수손상 치료제를 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0017] 본 발명의 일 측면에 따르면, 하기 화학식 1의 화합물을 처리한 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 포함하는 척수손상 치료용 조성물이 제공된다.

[0018] [화학식 1]



[0019]

[0020] 일 실시예에 있어서, 상기 척수손상은 외상 또는 염증에 의해 유발될 수 있다.

[0021] 일 실시예에 있어서, 상기 염증은 급성 횡단성 척수염, 급성 파종성 척수염, 척수병증, 비호지킨 림프종, 수두증, 유전성 실조증, 신경매독, 미나마타병, 루게릭병 및 다발성 결화증으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상에 의해 유발될 수 있다.

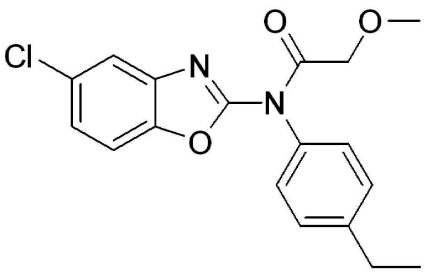
[0022] 일 실시예에 있어서, 상기 줄기세포는 중간엽줄기세포(mesenchymal stem cell)일 수 있다.

[0023] 일 실시예에 있어서, 상기 줄기세포는 상기 화합물 처리 후 96 내지 144시간 배양될 수 있다.

[0024] 일 실시예에 있어서, 상기 줄기세포는 이동성 신경모세포(migrating neuroblast)로 분화된 것일 수 있다.

[0025] 본 발명의 다른 측면에 따르면, (a) 줄기세포에 하기 화학식 1의 화합물을 처리하는 단계; 및 (b) 상기 화합물이 처리된 줄기세포를 96 내지 144시간 배양하는 단계;를 포함하는 척수손상 치료용 줄기세포 제조방법이 제공된다.

[0026] [화학식 1]



[0027]

발명의 효과

[0028] 본 발명에 따르면, 상기 척수손상 치료용 조성물은 일정 단계로 분화한 줄기세포를 이용하므로 종래 줄기세포 기반 치료제 대비 신경세포 재생 효과가 현저히 우수하다.

[0029] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0030] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 줄기세포의 배양방법을 도식화한 것이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 줄기세포를 이용한 운동기능 회복평가 실험 방법을 도식화한 것이다.

도 3은 줄기세포 분화에 따른 Neuronal lineage marker를 나타낸 것이다.

도 4는 Neuronal lineage marker를 이용하여 줄기세포의 분화 단계를 확인한 것이다.

도 5는 동물을 실험 대상으로 한 행동학적 평가 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0031] 이하에서는 첨부한 도면을 참조하여 본 발명을 설명하기로 한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며, 따라서 여기에서 설명하는 실시예로 한정되는 것은 아니다. 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 구비할 수 있다는 것을 의미한다.

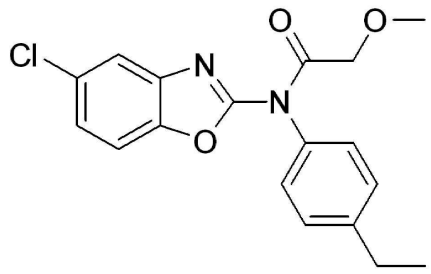
[0032] 달리 정의되지 않는 한, 분자 생물학, 미생물학, 단백질 정제, 단백질 공학, 및 DNA 서열 분석 및 당업자의 능력 범위 안에서 재조합 DNA 분야에서 흔히 사용되는 통상적인 기술에 의해 수행될 수 있다. 상기 기술들은 당업자에게 알려져 있고, 많은 표준화된 교재 및 참고저서에 기술되어 있다.

[0033] 본 명세서에 포함되는 용어를 포함하는 다양한 과학적 사전이 잘 알려져 있고, 당업계에서 이용가능하다. 본 명세서에 설명된 것과 유사 또는 등가인 임의의 방법 및 물질이 본원의 실행 또는 시험에 사용되는 것으로 발견되나, 몇몇 방법 및 물질이 설명되어 있다. 당업자가 사용하는 맥락에 따라, 다양하게 사용될 수 있기 때문에, 특정 방법학, 프로토콜 및 시약으로 본 발명이 제한되는 것은 아니다.

[0034] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 단수형은 문맥이 명확하게 달리 지시하지 않으면 복수의 대상을 포함한다. 또한, 달리 지시된 바가 없으면, 핵산은 각각 왼쪽에서 오른쪽, 5'에서 3' 방향으로 씌여지고, 아미노산 서열은 왼쪽에서 오른쪽, 아미노에서 카르복실 방향으로 씌여진다. 이하 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

[0035] 본 발명의 일 측면에 따르면, 하기 화학식 1의 화합물을 처리한 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 포함하는 척수손상 치료용 조성물이 제공된다.

[0036] [화학식 1]



[0037]

[0038] 상기 화합물의 명칭은 *N*-(5-클로로벤조[*d*]옥사졸-2-일)-*N*-(4-에틸페닐)-2-메톡시아세트아미드(*N*-(5-Chlorobenzo[*d*]oxazol-2-yl)-*N*-(4-ethylphenyl)-2-methoxyacetamide)일 수 있고, 화학적 합성법에 의해 제조될 수 있다.

[0039] 본 발명자들은 상기 화합물을 처리한 줄기세포를 척수 내로 주입시킴으로써 척수손상을 효과적으로 개선할 수 있음을 확인하였다.

[0040] 상기 화합물은 약제학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용할 수 있으며, 상기 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산 부가염이 유용할 수 있다.

[0041] 상기 화합물은 당해 기술 분야에서 통상적인 방법에 따라 약제학적으로 허용되는 산 부가염을 형성할 수 있다.

[0042] 유리산은 유기산 및 무기산이 사용될 수 있으며, 예컨대, 상기 무기산은 염산, 브롬산, 황산, 또는 인산 일 수 있으며, 상기 유기산은 구연산(Citric acid), 초산, 젖산, 주석산(Tartaric acid), 말레인산, 푸마르산(Fμ Maric acid), 포름산, 프로피온산(Propionic acid), 옥살산, 트리플루오로아세트산, 벤조산, 글루콘산, 메탄설폰산, 글리콜산, 숙신산(Succinic acid), 4-톨루엔설폰산, 벤젠설폰산, 살리실산, 니코틴산, 이소니코틴산, 피

콜린산, 글루탐산 또는 아스파르트산일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0043] 상기 “척수손상(SCI)”은 물리적인 충격 등 다양한 요인에 의해 척수 실질 조직이 손상되어, 손상 부위의 하측에서 말초 운동 근육, 감각 및 자율 신경계의 마비를 나타내는 임상 상태를 의미한다.

[0044] 상기 척수손상은 외상 또는 염증에 의해 유발될 수 있으며, 예컨대, 교통사고, 스포츠, 산재 등의 외상성 척수손상이나 염증, 출혈, 종양, 척추 변형 등의 비외상 척수손상일 수 있다.

[0045] 상기 염증은 급성 횡단성 척수염, 급성 파종성 척수염, 척수병증, 비호지킨 림프종, 수두증, 유전성 실조증, 신경매독, 미나마타병, 루게릭병 및 다발성 결화증으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상에 의해 유발될 수 있으나, 염증 유발을 통해 척수손상을 야기할 수 있으면 특별히 제한되는 것은 아니다.

[0046] 상기 “치료”는 척수손상의 증상을 개선하거나, 증상의 진행을 저지하는 것을 의미하며, 통상적으로 사용되는 치료의 의미를 포괄할 수 있다.

[0047] 상기 줄기세포는 중간엽줄기세포(mesenchymal stem cell)일 수 있고, 인간제대혈줄기세포 유래의 중간엽줄기세포일 수 있다.

[0048] 상기 "줄기세포(stem cell)"는 자기 복제 능력뿐만 아니라, 세포가 위치하는 환경의 영향을 받아 적절한 신호가 주어질 경우, 다중분화능(multi potency)의 특성에 의해 여러 가지 세포로 분화할 수 있는 세포이다.

[0049] 상기 줄기세포는 지방, 골수, 제대혈 및 태반 등에 포함되어 있으며, 척수손상, 심근경색, 뇌경색, 퇴행성 관절염 및 골절 등 다양한 세포손상질환을 치료하는데 활용될 수 있다. 상기 줄기세포는 자가 또는 동종 유래 줄기세포일 수 있으며, 인간 및 비인간 포유류를 포함한 임의 유형의 동물 유래일 수 있다.

[0050] 상기 “중간엽줄기세포”는 스트로마 기원의 세포로 자기 재생(self-renewal)의 특징을 가지고 있으며 골, 연골, 지방조직, 근육, 건, 인대, 신경조직 등으로 분화할 수 있어 세포 치료요법에 활용될 수 있다.

[0051] 상기 중간엽줄기세포는 골수에서 수득할 수 있으나, 골수에 존재하는 간엽 줄기세포는 제한적인 분화능과 증식능력으로 인해 응용범위가 한정적이며, 골수 이식을 위해 조직적합항원 비교를 통해 항원 표현형이 일치하여 이식편대 숙주반응을 보이지 않는 공여자를 찾아야 하는 문제가 있다.

[0052] 반면, 탯줄은 분만과정에서 간단한 시술을 통해 수득할 수 있으며, 수많은 조혈모세포 및 줄기세포를 포함하고 있으므로 탯줄, 태반, 제대혈 등에서 다량의 줄기세포를 분리할 수 있다.

[0053] 상기 중간엽줄기세포의 분리방법은 당업계에 널리 알려져 있다. 예컨대 인간 탯줄(Cord), 바르톤 젤리(Wharton's jelly), 제대혈, 태반, 지방, 골수, 편도, 인간 배낭(embryonic yolk sac), 제대, 피부, 말초혈액, 근육, 간, 신경 조직, 골막, 태아막, 활액막, 활액, 양막, 반월상연골, 전십자 인대, 관절 연골세포, 유치, 혈관주위세포, 지주골, 슬개골하 지방괴, 비장 및 흉선 등으로부터 분리 및 정제될 수 있다.

[0054] 상기 줄기세포는 상기 화합물을 처리하는 단계; 및 상기 화합물이 처리된 줄기세포를 (b) 96 내지 144시간 배양하는 단계;를 통해 수득할 수 있으며, 상기 줄기세포는 이동성 신경모세포(migrating neuroblast)로 분화된 것일 수 있다.

[0055] 도 3및 4를 참조하면, 상기 화합물을 포함하는 배지에서 MSC를 5일 간 배양하고 neural lineage marker를 이용하여 분화 상태를 확인한 결과, Nestin, GFAP는 거의 발현되지 않았으며, 약 90% 이상의 세포가 Tuj1-positive cell로 확인되었다.

[0056] 즉, 상기 화합물 처리 후 96 내지 144시간 배양 후 상기 줄기세포는 이동성 신경모세포로 분화될 수 있으며, 상기 분화세포를 생체 내로 투입함으로써 척수손상을 효과적으로 개선할 수 있다.

[0057] 상기 중간엽줄기세포는 세포 단독 혹은 배양기에서 배양된 상태로 생체 내로 주입될 수 있으며, 예컨대 린드발(1989, Arch. Neurol. 46: 615-31) 또는 더글라스콘치올카(Douglas Kondziolka, Pittsburgh,1998)의 임상 방법을 이용할 수 있다.

[0058] 상기 척수손상 치료용 조성물은 중간엽줄기세포 외 약학적으로 허용 가능한 통상의 담체를 포함할 수 있고, 주사제의 경우 보존제, 무통화제, 가용화제 또는 안정화제, 국소투여용 제제의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제 또는 보존제 등을 포함할 수 있다.

[0059] 상기 중간엽줄기세포는 10^4 내지 10^{10} cells/회 투여될 수 있으며, 바람직하게는 10^5 내지 10^9 cells/회 투여될

수 있으며, 가장 바람직하게는 1x10^6 cells/회 투여될 수 있으나, 증상이나 환자의 상태를 고려하여 달리할 수 있다.

[0060] 이하 실시예를 통해, 본 발명을 더욱 상술하나 하기 실시예에 의해 본 발명이 제한되지 아니함은 자명하다.

[0061] **실험방법**

[0062] **화합물 제조**

[0063] 질소가스 치환 하에서 디클로로메탄 10 mL에 녹인 5-클로로-*N*-(4-에틸페닐)벤조[*d*]옥사졸-2-아민(0.37 mmol, 1eq)에 $AlCl_3$(0.73 mmol, 2eq)를 가한 후 실온(15 내지 30℃)에서 10분간 교반하였다.

[0064] 빙수조(ice bath)에서 메톡시메틸카르보닐클로라이드(0.73 mmol, 2eq)을 가하고 실온(15 내지 30℃)에서 5시간 동안 교반하였다.

[0065] 증류수 10 mL를 가하고 EtOAc 10 mL로 3회 추출하였다. 유기층을 분리하여 10% HCl 수용액(10 mL)으로 2회, 포화 NaCl 수용액(10 ml)으로 2회 세척하고, $MgSO_4$로 건조시킨 후 용매를 감압 농축시켰다.

[0066] 침전물을 n-hexane: EtOAc: ether = 5: 2: 1(v/v/v)으로 감압 여과하여 화학식 1의 화합물을 수득하였다.

[0067] White powder(28%), mp 121.6-123℃; ^{1}H NMR(Acetone-d_6, 400 MHz) δ 7.653(d, *J*= 6.0 Hz, 1H), 7.533(d, *J*= 8.8 Hz, 1H), 7.357(m, 4H), 4.611(s, 2H), 3.367(s, 3H), 2.728(q, *J*= 7.6 Hz, 2H), 1.271(t, *J*= 7.6 Hz, 3H). HR-FABMS Calcd for $C_{18}H_{18}ClN_2O_3$(M^++H): 345.1006, Found: 345.1004.

[0068] 하기 실험에서 본 화합물을 L2로 지칭하였다.

[0069] **척수손상 동물모델 제조**

[0070] 성체 수컷 스프라귀 다우레이 래트(Sprague Dawley rat, 샘타코, 한국)에 클로랄하이드레이트 (500 mg/kg)를 복강 주입하여 마취한 후, 흉추 8번 내지 10번 부위를 노출시켰다.

[0071] 10 g 무게의 추를 일정 높이에서 떨어뜨려 인간 척수손상과 유사한 외상을 주고, 외상 강도를 컴퓨터에서 수치화할 수 있게 고안된 NYU 임팩터(Routes, 사이텍 코리아)를 사용한 척수 외상 동물 모델을 수행하였다.

[0072] 컴퓨터에 나타나는 손상 강도에 대한 데이터를 통하여 정해진 오차 범위 내에 일정한 손상이 가해진 것을 확인한 후 상처부위를 봉합하였다.

[0073] 상처 부위를 포비딘 액으로 소독한 후 2마리씩 케이지(cage)에 넣어 사육하였고, 하루 3회 인위적으로 방광을 마사지하여 배뇨를 촉진시켰다.

[0074] **세포 배양**

[0075] 강스템 바이오텍에서 분양받은 Passage 3의 MSC는 10% FBS(Gibco)와 supplements가 포함된 KSB3 basal medium에서 유지하였다.

[0076] 1회 계대배양 후 Passage 4의 MSC는 stock을 만들어 액체 질소에 보관하였다.

[0077] **줄기세포 분화**

[0078] 도 1을 참조하면, Passage 5의 MSC를 1.1 x 10^4/mL로 희석한 12 웰에 well당 1mL씩 seeding 하였다.

[0079] 4시간 후 40μM의 L1, L3, 또는 30μM의 L2(화학식 1)를 처리하였다.

[0080] 3일 후 신규 배지로 바꿔주고 화합물을 동일하게 처리한 후 2일간 더 배양하였다.

[0081] **줄기세포 척수 내 이식**

[0082] 도 2를 참조하면, 척수손상을 유발시키고 6주 후 쥐를 무작위 선별하여 하기 세 그룹으로 나누었다.

[0083] (1) 대조군 1(Saline group) : 줄기세포 대신 saline만 lesion site에 주입 (2) 대조군 2(MSC group) : 미분화된 중간엽줄기세포만 이식 (3) 실험군(MSC+L2 group) : 저분자화합물인 L2에 의해 분화시킨 Tuj1-positive neural stem cell 이식

[0084] 척수손상 쥐에 클로랄하이드레이트(500mg/kg)를 복강 주입하여 마취한 후, 수술 부위를 절개하고, glass pipette를 이용하여 손상부위(lesion epicenter)에 10㎕씩 시료를 주입하였다. 줄기세포를 주입한 실험군의 이식세포 수는 1 x 10^6개 였다.

[0085] **실험결과**

[0086] **행동학적 평가**

[0087] 이식 후 8주 동안 하기 3가지 행동학적 평가를 수행하였다(주 1회).

[0088] (1) BBB locomotor score : Open filed에서 쥐 뒷발 운동기능을 0-21점 점수 매기는 방법. 0점 : no movement, 21점 : normal

[0089] (2) Grid walk test : ladder 에 쥐를 걷게 하였을 때 발이 빠지는 횟수를 백분율로 산출

[0090] (3) Foot print analysis : 쥐의 발바닥에 잉크를 묻히고(앞발: 적색, 뒷발: 청색), 긴 상자를 걷게 하여 바닥에 찍힌 발바닥의 패턴을 분석하는 방법.

[0091] **비비비 오픈필드 스코어(BBB Open field score)**

[0092] BBB 테스트는 운동기능을 조절하는 다양한 신경 다발의 회복 정도를 복합적으로 평가하는 실험이다.

[0093] 0부터 21까지 점수를 나누어 뒷발을 전혀 사용하지 못하는 경우 0점, 정상 래트의 경우 21점을 주어 점수가 높아질수록 운동기능이 향상되었음을 의미한다.

[0094] 척수 외상을 가하기 3일 전부터 하루에 한번, 한 마리당 4분씩 오픈 필드 상자(가로 90㎝ × 세로 90㎝ × 높이 7㎝)에 래트를 올려놓고 상자 안에서 자유롭게 돌아다니도록 하여 사전 적응시켰다.

[0095] 척수 외상을 준 후 1일부터 일주일에 한번씩 3명의 훈련된 실험자들이 각 래트의 뒷발 움직임을 관찰하여 BBB 점수를 매겼고, 이들 3명의 BBB 점수의 평균값을 해당 쥐의 최종 BBB점수로 결정하였다.

[0096] 동물실험에 대한 개인의 편견을 배제하고자 테스트에 임하는 실험자들이 래트에 대한 정보를 알지 못하게 하였고, 각 쥐를 4분씩 관찰하여 점수를 산출하였다.

[0097] 관찰 결과 척수 외상을 받은 직후 모든 래트는 뒷발의 움직임이 전혀 없었으며 앞발에 의존하여 하반신을 끄는 현상이 관찰되었다.

[0098] 척수 외상 후 1 주일이 지난 후부터 spontaneous recovery가 나타났고, 4주 후에는 더 이상 운동기능 회복이 나타나지 않는 plateau 상태가 유지되어 만성 척수손상 모델이 확립되었다고 판단되었다.

[0099] 척수손상 6주차에 Saline 또는 분화하지 않은 MSC와 L2에 의해 5일동안 분화시킨 MSC를 이식한 뒤 일주일부터 saline만 이식한 그룹에 비해 MSC와 L2-treated MSC를 이식한 그룹의 BBB 점수가 높게 나타나기 시작했고 이식 후 8주까지 BBB 점수가 높은 상태를 유지하였다.

[0100] 척수외상을 준 지 14주(이식 후 8주) 경과 후 BBB 점수를 확인한 결과, Saline 래트(대조군 1)의 BBB 점수는 약 9점이었으며, 가만히 서 있을 때에만 몸무게를 지탱할 뿐, 걸을 때에는 계속 발 등으로 딛는 정도의 회복을 나타내었다.

[0101] 한편, MSC(대조군 2) 또는 L2-treated MSC(실험군)를 투여한 래트의 BBB 점수는 약 12점이었으며, 몸무게를 지탱하여 걸으며 걷는 동안 대략 50% 빈도로 앞발과 뒷발이 교차하게 되는 회복수준을 보여 대조군 1과 비교할 때 현저한 운동기능 회복 효과가 확인되었다(도 5A).

[0102] MSC와 L2-treated MSC를 이식한 경우, L2를 처리한 MSC를 이식했을 때 MSC 그룹 대비 BBB 점수가 일부 높아졌으나 유의한 차이는 확인되지 않았다.

[0103] **그리드 워크 테스트(Grid walk test)**

[0104] 앞발과 뒷발이 리듬 있게 교차하는 능력과 정확하게 뒷발을 디딜 수 있는지 평가하였다.

[0105] 1 m 길이의 금속 격자 판에 쥐를 통과하게 하여 발이 격자 아래로 떨어지는 빈도를 백분율(%)로 표시하였다.

[0106] 테스트 시작하기 3일 전부터 1m의 금속 격자에 각 래트당 하루 3회씩 지나가게 함으로서 실험 환경에 적응시켰고, 척수 외상 후 6주째 이식 직전에 처음 테스트를 실시하였다.

[0107] 금속 격자 판에 래트를 통과시킬 때 중간에 멈추는 것은 카운팅하지 않고 자발적으로 쉬지 않고 끝까지 통과하는 경우만 카운팅하여 3회씩 격자를 통과시켰다.

[0108] 비디오 카메라로 쥐의 움직임을 녹화하여 각 래트가 어느 그룹에 속하는지 모르는 2명의 실험자가 실험 결과를 분석하였다.

[0109] 실험 결과는 래트가 걸은 총 걸음 수에서 격자 아래로 뒷발이 빠진 걸음 수가 차지하는 비율을 백분율(%)로 나타내어 각 그룹의 평균값을 비교하였다.

[0110] 도 5B를 참조하면, 이식 전에는 세 그룹의 쥐 모두가 약 70% 정도의 에러율을 나타내었다.

[0111] 이식 후 1주 경과 시점에서 대조군 2 및 실험군의 에러율이 대조군 1에 비해 낮았다.

[0112] 특히, 실험군은 대조군 2에 비해 이식 1 내지 2주 내에 빠른 속도로 에러율이 감소하였고, 이식 후 8주 동안 가장 낮은 에러율을 나타내었다.

[0113] 상기 결과는 세 그룹 중에서 L2-treated MSC를 이식한 쥐가 더 정확하게 뒷발을 디디고, 걷는 능력이 증대되었음을 시사한다.

[0114] **발자국 분석(Foot print analysis)**

[0115] 척수 외상 후 래트의 뒷발 운동 기능 회복 정도를 평가하는 기준으로서 발자국 분석을 수행하였다.

[0116] 래트의 앞발에는 적색 잉크를 묻히고, 뒷발에는 청색 잉크를 묻혔으며, 하얀 종이가 깔린 좁은 통로(길이 1m, 너비 7cm)로 지나가게 하여 발자국을 관찰하였다.

[0117] 래트가 5초 내 통로를 통과하지 못하거나 중간에 멈추면 분석에서 제외하였으며, 한 동물 당 8회 테스트를 시행하였다.

[0118] 앞발과의 조화, 간격, 뒷발의 회전 정도, 뒷발 간 보폭, 양발 간 간격, 발가락의 끌림 등이 뒷발의 기능을 측정하는 지표로서 사용하였다.

[0119] 테스트 시작하기 3일 전부터 하루에 3회씩 통로를 지나가게 함으로써 실험 환경에 적응시켰다.

[0120] 도 5C를 참조하면, 일반적으로 척수신경 외상 이후 래트의 뒷발이 마비되어 뒷발을 끄는 궤적이 나타난다.

[0121] 손상 이후 6주째 모든 그룹의 래트는 걸을 때 다리가 몸을 지탱하지 못하여 뒷발(청색)의 발자국이 찍히지 않고 지속적인 발등의 끌림 현상이 관찰되었다.

[0122] 이식 8주 후 대조군 2는 회복 정도가 향상되어 일부 발가락 끌림 현상은 있었으나 발바닥으로 걸음을 걸을 수 있을 정도로 회복되어 뒷발의 발자국이 종이에 남았으며 발가락의 끌림으로 인해 뒷발 발자국 뒤로 짧게 끌리는 현상이 관찰되었다.

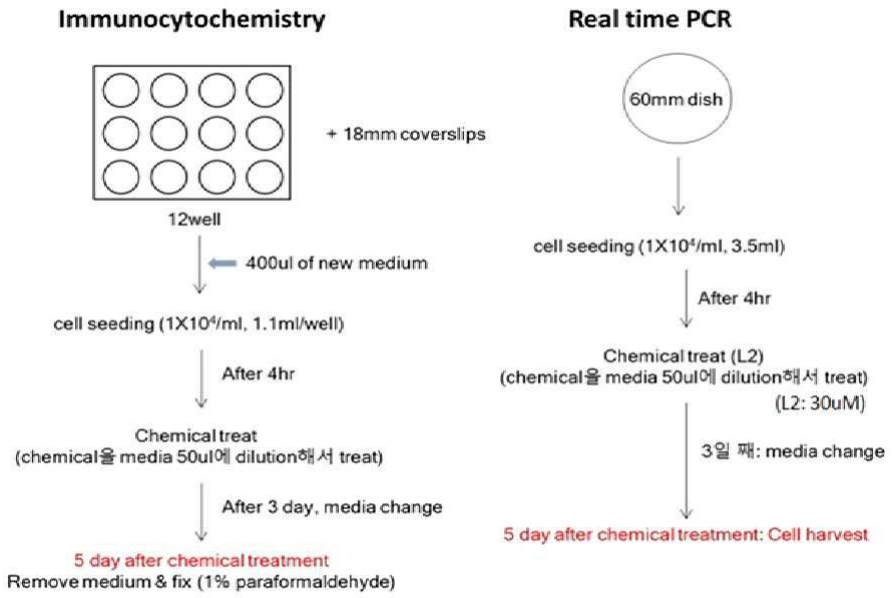
[0123] 반면, 실험군(L2-treated MSC 이식)은 발끌림 현상이 거의 관찰되지 않았으며, 앞발과 뒷발 사이의 간격이 좁아져 limb coordination이 향상되었다.

[0124] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

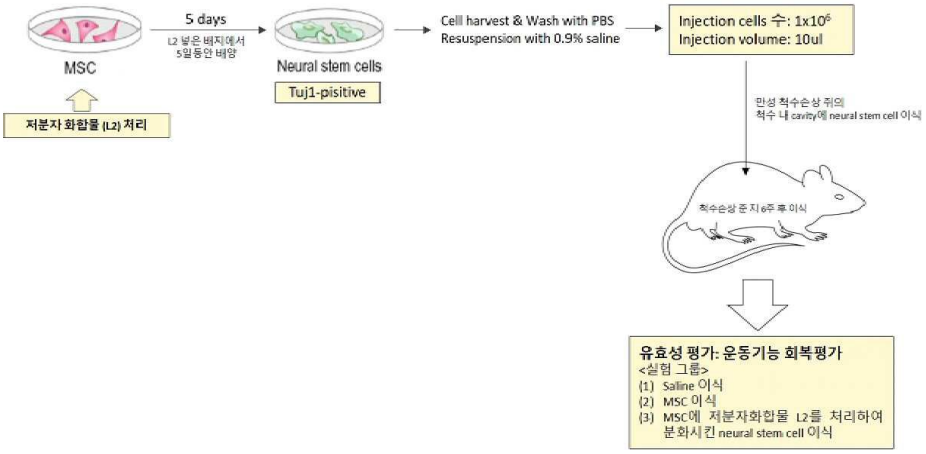
[0125] 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

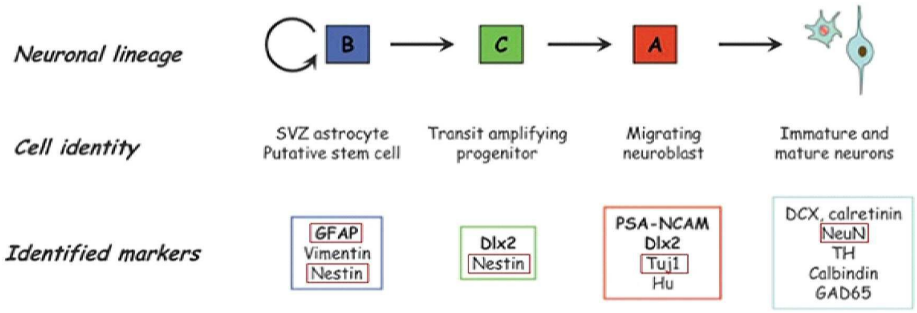
도면1



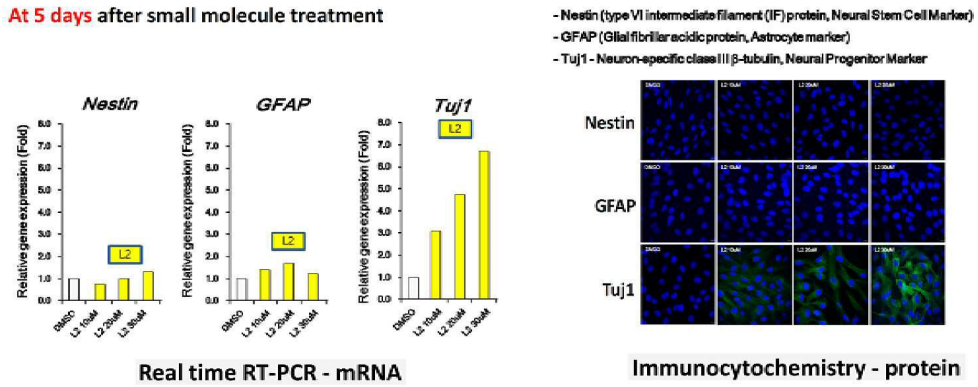
도면2



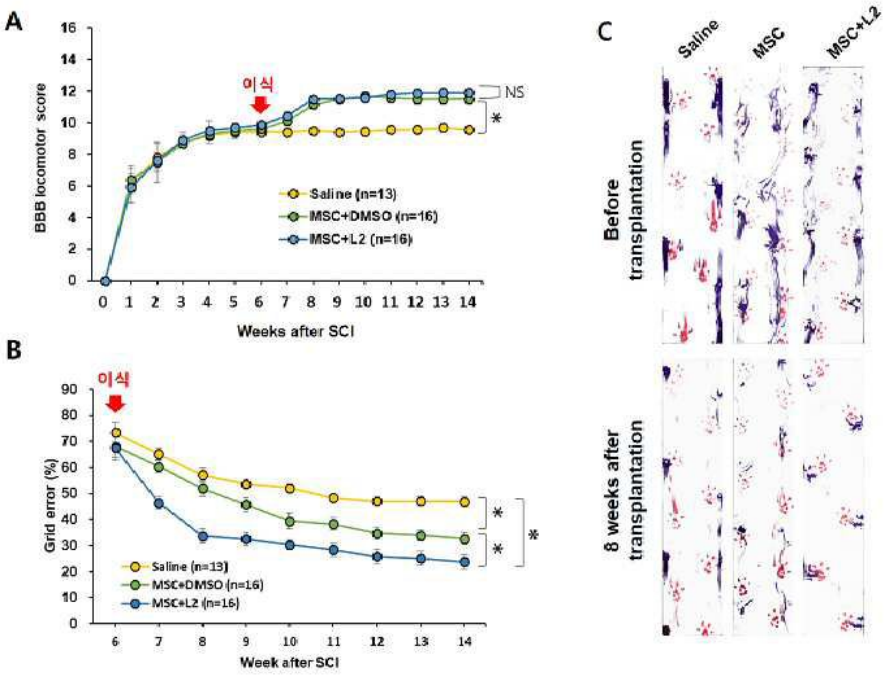
도면3



도면4



도면5



A. BBB locomotor score. B. Grid walk test. C. Foot print analysis