



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0074720
(43) 공개일자 2019년06월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 35/28 (2015.01) A61K 38/17 (2006.01)

A61K 38/18 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 35/28 (2013.01)

A61K 38/1754 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-0176289

(22) 출원일자 2017년12월20일

심사청구일자 2018년07월02일

(71) 출원인

이화여자대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)

(72) 발명자

유경하

서울특별시 강남구 영동대로118길 76, 102동 202호 (삼성동, 삼성동대우엠버스카운티1차)

유소연

서울특별시 동대문구 왕산로19다길 7 (제기동) 36, 202호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김순웅

전체 청구항 수 : 총 14 항

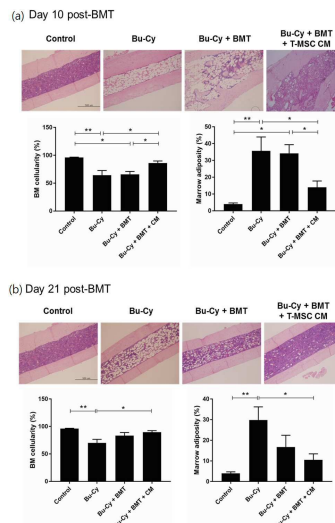
(54) 발명의 명칭 골수이식 후 생착 촉진용 조성물

(57) 요약

본 발명은 골수세포 생착 촉진용 조성물에 관한 것이며, 보다 구체적으로는 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정 배지 (Tonsil-derived mesenchymal stem cell conditioned medium)를 유효성분으로 포함하는 골수세포 생착 촉진용 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정 배지는 골수세포를 이식받은 개체에서 골수 세포 충실도 증가, 말초 혈액의 신속한 회복을 유도, 골수세포의 콜로니 형성 능력을 향상시키는 효능이 우수하고, 골수세포의 골수로의 동원을 활성화하며 골수세포의 유착분자를 변형함으로써 골수세포의 빠른 생착을 유도할 수 있어 골수부전의 예방 또는 치료에 현저한 효과를 보인다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A61K 38/18 (2013.01)

A61K 38/1833 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

A61P 35/02 (2018.01)

(72) 발명자

김유희

경기도 파주시 동패로 117, 202동 503호 (동패동, 벽산아파트)

박주원

서울특별시 양천구 목동동로 350, 506동 101호 (목동, 목동신시가지아파트5단지)

박민화

경기도 부천시 상일로 71, 1816동 505호 (상동, 반달마을 동아아파트)

김한수

서울특별시 양천구 목동서로2길 22, 112동 310호 (목동, 한신청구아파트)

조경아

서울특별시 강남구 개포로110길 43, 104동 605호 (일원동, 한신아파트)

명세서

청구범위

청구항 1

편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정 배지를 유효성분으로 포함하는 골수세포 생착 촉진용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 조성물은 IGFBP2 (insulin-like growth factor-binding protein 2), MMP1 (matrix metalloproteinase-1), SFRP1 (secreted frizzled-related protein 1), SDF-1 (stromal cell-derived factor 1), HGF (hepatocyte growth factor) 및 IGF-2 (insulin-like growth factor 2)로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 함유하는 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 조성물은 골수세포를 이식받은 개체에서 골수세포 충실도를 증가시키는 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 조성물은 골수세포를 이식받은 개체에서 혈중 순환 적혈구 수를 증가시키는 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 조성물은 골수세포의 동원 (recruiting) 활성을 가지는 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 조성물은 골수세포의 유착분자를 변형시키는 조성물.

청구항 7

편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정 배지 및 골수세포를 유효성분으로 포함하는 골수부전 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 골수세포는 골수 유래 조혈 모세포인 약학 조성물.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 골수부전은 급성 골수성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 재생불량성 빈혈, 다발성골수종, 악성 림프종, 골수증식종양, 골수형성이상증후군, 발작성 야간혈색소뇨증, 면역부전증, 혈색소 이상증, 판코니 빈혈, 전신성 홍반성 낭창 및 항암제 치료 이후의 이차적 골수

부전으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나의 질환인 약학 조성물.

청구항 10

제7항에 있어서, 상기 편도 유래 중간엽 줄기세포 조정 배지는 0.4 mg/ml 내지 1 mg/ml 농도로 포함되고, 골수 세포는 1.0×10^5 개/ml 내지 1.0×10^9 개/ml로 포함되는 약학 조성물.

청구항 11

제7항에 있어서, 상기 골수세포 및 편도 유래 중간엽 줄기세포 조정배지는 주사제 또는 주입제로 투여되는 약학 조성물.

청구항 12

편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정 배지를 유효성분으로 포함하는 골수세포 이식 보조제.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 이식 보조제는 골수세포의 이식이 필요한 개체에 골수세포의 이식과 동시 또는 이시에 투여되는 이식 보조제.

청구항 14

제12항에 있어서, 상기 이식 보조제는 골수세포의 이식 후 골수세포의 생착을 촉진시키는 이식 보조제.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 골수세포 생착 촉진용 조성물에 관한 것이며, 보다 구체적으로는 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정 배지 (Tonsil-derived mesenchymal stem cell conditioned medium)를 유효성분으로 포함하는 골수세포 생착 촉진용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 골수 이식은 백혈병, 재생 불량성 빈혈 등 난치성 혈액질환을 치료하기 위한 중추적인 치료법으로서, 골수 이식 후 생착까지 소요되는 약 2주간의 기간 동안에 골수의 기능이 얼마나 빠른 정도로 회복되느냐의 여부가 치료의 성공을 좌우하는 것으로 알려져 있다.

[0003] 이에 골수 기능의 신속한 회복을 위하여 골수 이식 후의 생착을 촉진하는 방법에 관한 연구가 계속되어 왔다. 관련 기술로 말초 골수전구세포를 이용하여 조혈모세포의 생착을 촉진시키고자 한 기술인, "말초 골수전구세포의 제조방법 및 상기 말초 골수전구세포를 함유하는 조혈모세포 생착 촉진용 조성물(대한민국 공개특허공보 제 10-2012-0084960호)", 스탯3 (STAT3) 분자의 활성화를 이용하여 조혈모세포의 생착을 촉진시키고자 한 기술인, "조혈모세포의 생착을 증가 방법(대한민국 공개특허공보 제10-2003-0068696호)"등이 보고된 바 있으나, 아직 임상에서 활용될 수 있는 생착 유도제의 개발로는 이어지지 못하고 있다. 이에, 골수 이식 후 생착을 효과적으로 촉진할 수 있는 제제의 개발이 시급한 실정이다.

[0004] 편도 유래 중간엽 줄기세포(Tonsil-derived mesenchymal stem cell conditioned medium)는 목의 안쪽과 코의 뒷부분에 위치하여 외부에서 침입하는 세균 등의 물질로부터 일차적으로 우리 몸을 방어함과 동시에 림프 상피

면역 조직으로 작용을 수행하는 조직인 편도에서 유래된 자기 복제 능력을 가지면서 두개 이상의 새로운 세포로 분화하는 능력을 가진 미분화된 줄기세포를 의미한다.

- [0005] 편도 유래 중간엽 줄기세포에 관하여는, 피부 염증 질환에 대한 치료 효능(대한민국 등록특허 제10-1775262호), 만성 염증성 장질환에 대한 치료 효능(대한민국 공개특허공보 제10-2017-0081613호), 면역 질환에 대한 치료 효능(대한민국 공개특허공보 제10-2016-0109358호) 등에 관하여 보고된 바가 있으나, 골수세포 이식에 있어서 생착을 촉진하는 효능에 관하여는 알려진 바가 없으며, 특히 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정 배지의 관련 효능에 관하여는 전혀 연구된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 본 발명은 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정 배지(Tonsil-derived mesenchymal stem cell conditioned medium)를 유효성분으로 포함하는 골수세포 생착 촉진용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0007] 본 발명은 또한 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정 배지 및 골수세포를 유효성분으로 포함하는 골수부전 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0008] 본 발명은 또한 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정 배지를 유효성분으로 포함하는 골수세포 이식 보조제를 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0009] 본 발명은 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정 배지(Tonsil-derived mesenchymal stem cell conditioned medium)를 유효성분으로 포함하는 골수세포 생착 촉진용 조성물을 제공한다.
- [0010] 본 발명에서 사용되는 용어, "편도 유래 중간엽 줄기세포(Tonsil-derived mesenchymal stem cell; T-MSC)"는 목의 안쪽과 코의 뒷부분에 위치하여 외부에서 침입하는 세균 등의 물질로부터 일차적으로 우리 몸을 방어함과 동시에 림프 상피 면역 조직으로 작용을 수행하는 조직인 편도에서 유래된 자기 복제 능력을 가지면서 두 개 이상의 새로운 세포로 분화하는 능력을 가진 미분화된 줄기세포를 의미한다.
- [0011] 본 발명의 편도 유래 중간엽 줄기세포는 타 유래 중간엽 줄기세포와 대비하여 세포 부착, 세포 분열 및 세포 외 기질 생성과 관련된 단백질과 Extra cellular로 발현되는 단백질의 비율이 높으며, 특히 IGFBP2 (insulin-like growth factor-binding protein 2), MMP1 (matrix metalloproteinase-1), SFRP1 (secreted frizzled-related protein 1), SDF-1 (stromal cell-derived factor 1), HGF (hepatocyte growth factor) 또는 IGF-2 (insulin-like growth factor 2) 등을 높게 발현하는 특징이 있다.
- [0012] 본 발명에서 편도 유래 중간엽 줄기세포는 당업계에 공지된 다양한 방법에 의해 추출될 수 있다. 예를 들어, 대한민국특허 제10-1508413호 등에 기재된 방법에 따라 편도로부터 추출가능하다.
- [0013] 본 발명에서 편도 유래 중간엽 줄기세포를 배양하는 방법은 당업계에 공지된 다양한 방법에 의해 배양될 수 있다.
- [0014] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 편도 유래 중간엽 줄기세포는 다음과 같은 방법으로 배양될 수 있다: 분리된 편도 유래 중간엽 줄기세포를 10% FBS, 100 IU/ml 페니실린 및 100 μ g/ml 스트렙토마이신(Welgene)이 첨가된 DMEM high glucose medium (Welgene, Gyeongsan, South Korea)에서 배양하였다. 배양 배지는 3 ~ 4일마다 교체하였다.
- [0015] 본 발명에서 사용되는 용어, "편도 유래 중간엽 줄기세포 조정 배지(Tonsil-derived mesenchymal stem cell conditioned medium; T-MSC CM)"는 편도 유래 중간엽 줄기세포를 배양하여 배양액만 수거한 배지로서, 편도 유래 중간엽 줄기세포 자체를 포함하지 않고 이의 배양액을 포함하는 배지를 말한다.
- [0016] 본 발명에서 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정 배지는 편도 유래 중간엽 줄기세포를 배양하고 세포를 제거한 후 수득된 배양액 자체, 배양 상층액 또는 이의 농축물이거나 이의 건조물일 수 있다.
- [0017] 본 발명의 편도 유래 중간엽 줄기세포 조정 배지는 분열중인 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 배지 내로 추출되어 나오는 성장인자, 사이토카인 등을 포함하는 배지로서, 상기 편도 유래 중간엽 줄기세포의 발현 특징에 따라 타 유래 중간엽 줄기세포 조정 배지와 유효성분의 구성이 상이하다. 구체적으로, 본 발명의 편도 유래 중간

엽 줄기세포 조정 배지는 세포 부착, 세포 분열 및 세포 외 기질 생성과 관련된 단백질과 Extra cellular로 발현되는 단백질을 높게 함유하고 있으며, 특히 IGFBP2 (insulin-like growth factor-binding protein 2), MMP1 (matrix metalloproteinase-1), SFRP1 (secreted frizzled-related protein 1), SDF-1 (stromal cell-derived factor 1), HGF (hepatocyte growth factor) 또는 IGF-2 (insulin-like growth factor 2) 등을 높게 함유하고 있어, 타 유래 중간엽 줄기세포 조정 배지 대비 우수한 재생능(세포 분열 및 증식) 및 조직 재생능(세포 부착)을 보이며, 골수 세포 충실도 증가, 말초 혈액 세포 회복 및 골수 세포 콜로니의 형성 능력이 우수하여 골수 이식 후 골수세포의 생장을 촉진하는 현저한 효과를 보인다.

[0018] 또한, 본 발명의 생장 촉진용 조성물은 상기 높게 함유된 인자들에 의해 골수세포의 골수로의 동원(recruiting)을 활성화하고 골수세포의 유착분자를 변형함으로써 골수세포의 생장을 촉진할 수 있다.

[0019] 또한, 편도 유래 중간엽 줄기세포 자체를 직접 투여하는 경우, 투여된 줄기세포 대부분이 사멸되어 골수세포 이식에 의한 치료효능이 크지 않고, 중간엽 줄기세포로부터 발현되는 성분들(예컨대, 사이토카인 등)의 농도가 낮아 골수부전 치료 시 다량의 줄기세포를 투여해야하는 문제점이 있으나, 본 발명의 편도 유래 중간엽 줄기세포 조정 배지는 안전성과 조건 배지 내 골수 생장을 촉진하는 유용성분의 함량이 높아 골수세포 이식치료의 효과를 현저히 증가시킬 수 있다.

[0020] 본 발명에서 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정 배지를 획득하는 방법은 당업계에 공지된 다양한 방법에 의해 획득될 수 있다.

[0021] 본 발명의 실시예에 따르면, 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정 배지는 다음과 같은 방법으로 획득될 수 있다: 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정 배지를 획득하기 위하여, 편도 유래 중간엽 줄기세포를 80%의 confluency가 될 때까지 배양한 후, 배양 배지를 새로운 배지로 교체하였다. 그 다음, 세포를 48시간 동안 더 배양한 후, 조정 배지를 수집하였다. 3,800×g에서 30분간 원심분리하여 3-kDa Amicon Ultra 원심 분리필터 유닛(Millipore, Darmstadt, Germany)을 사용해 조정 배지를 10배 농축시켰다.

[0022] 본 발명에서 사용되는 용어, "골수 세포(bone marrow cell; BMC)"는 골수를 이루는 세포들을 의미하는 것으로, 조혈 및 비조혈 줄기세포가 있으며, 조혈 줄기세포는 모든 형태의 혈액 세포로 분화할 수 있고, 순환계의 혈액 리니지(lineage)를 제공한다. 또한, 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell; MSC)라 불리우는 비조혈 줄기세포는 지방세포, 연골세포, 조골세포 등으로 분화할 수 있는 능력을 가지고 있다. 본 발명에서 골수 세포는 바람직하게 골수 유래 조혈모세포일 수 있다.

[0023] 본 발명에서 사용되는 용어, "조혈모세포(hematopoietic stem cell)"는 혈액을 구성하는 적혈구, 백혈구, 혈소판 등의 혈액 세포로 분화할 수 있는 능력을 지닌 세포를 의미하는 것으로, 골수와 말초 혈액에 존재한다.

[0024] 본 발명자들은 골수세포의 이식 시에 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정 배지를 함께 투여하는 경우, 골수세포의 생장이 촉진됨을 최초로 규명하였다. 구체적으로 골수 이식 시에 편도 유래 중간엽 줄기세포 조정 배지를 함께 이식받은 개체에서 골수세포 충실도(bone marrow cellularity)가 증가하고, 말초 혈액 세포가 빠르게 회복(혈중 순환 적혈구 수가 증가하는 등)됨을 확인하였다. 또한, 골수세포를 편도 유래 중간엽 줄기세포 조정 배지의 존재 하에 메틸셀룰로오스 배양 배지에서 배양한 경우, 골수세포의 콜로니 형성 능력이 향상됨을 확인하였다.

[0025] 구체적으로 본 발명의 일 실시예에서, 편도 유래 중간엽 줄기세포 조정 배지 처리에 따른 골수세포 충실도 및 골수 지방 축적량을 측정하기 위하여 Hematoxylin & eosin (H & E) 염색을 통해 조직학적 분석을 수행한 결과, 편도 유래 중간엽 줄기세포 조정 배지가 주입된 마우스 그룹은 편도 유래 중간엽 줄기세포 조정 배지 없이 이식된 그룹에 비해 골수세포 충실도가 증가된 것으로 확인되었으며, 이식된 세포가 골수에 더 빨리 모이고 더 왕성하게 증식한 것으로 확인되었다(도 2(a)).

[0026] 또한, 본 발명의 다른 실시예에서, 편도 유래 중간엽 줄기세포 조정 배지 처리에 따른 말초 혈액 세포의 회복 효과를 확인하기 위하여 혈액학적 분석을 수행한 결과, 편도 유래 중간엽 줄기세포 조정 배지를 주입한 경우 혈중 순환 적혈구 수가 유의하게 증가되어 말초 혈액 세포의 빠른 회복이 유도되는 것으로 확인되었다(도 3(a)).

[0027] 또한, 본 발명의 다른 실시예에서, 편도 유래 중간엽 줄기세포 조정 배지 처리에 따른 골수세포의 콜로니 형성 향상 효과를 확인하기 위하여 정상 마우스와 골수 부전 마우스의 골수세포를 분리하여 메틸셀룰로오스 콜로니 형성 분석을 수행하였다. 그 결과, 골수부전 마우스의 골수세포에 편도 유래 중간엽 줄기세포 조정 배지를 처리하여 배양한 경우, 이를 처리하지 않은 것에 비해 메틸셀룰로오스 배양 배지에서 콜로니 형성 능력이 향상되는

것으로 확인되었다(도 4).

- [0028] 본 발명에서 사용되는 용어, "골수 세포 충실도(bone marrow cellularity)"는 골수에서 뼈를 제외한 조혈 공간 중에서, 지방이 차지한 부위를 제외한 조혈 세포들이 차지하는 영역을 의미한다.
- [0029] 본 발명은 또한 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정 배지 및 골수세포를 유효성분으로 포함하는 골수부전 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0030] 상기 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정 배지는 상기에서 설명한 바와 같다.
- [0031] 본 발명의 골수부전 예방 또는 치료용 약학 조성물은 개체로부터 분리, 배양 및 특수한 조작을 통해 제조된 세포 및 조직으로 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품으로 사용되어 골수부전 예방 및 치료에 사용될 수 있다.
- [0032] 본 발명에서 예방은 상기 조성물의 투여로 골수부전의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미하며, 치료는 상기 조성물의 투여로 골수부전의 증세가 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 의미한다.
- [0033] 상기 골수세포는 골수로부터 분리된 세포로 조혈 및 비조혈 세포를 모두 포함하며, 구체적으로 골수 유래 조혈 모세포일 수 있다.
- [0034] 상기 골수부전(bone marrow failure)은 정상적 골수의 기능이 어떤 이유로든 상실하게 된 상태를 의미한다. 예컨대, 백혈구, 혈소판, 적혈구 등의 수치가 정상 수치와 대비하여 감소된 상태가 골수부전의 하나의 상태로 설명될 수 있다. 골수 부전은 백혈병, 골수이형성증, 재생불량성 빈혈과 같은 일차적인 골수부전과 항암 화학요법이나 방사선 치료법 등에 의해서 유발되는 이차적 골수부전을 포함한다. 예를 들어, 상기 골수부전은 급성 골수성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 재생불량성 빈혈, 다발성골수종, 악성 림프종, 골수증식종양, 골수형이상증후군, 발작성 야간혈색소뇨증, 면역부전증, 혈색소 이상증, 판코니 빈혈, 전신성 홍반성 낭창 또는 항암제 치료 이후의 이차적 골수부전일 수 있으나, 이로 제한되지 아니한다.
- [0035] 본 발명의 약학 조성물은 편도 유래 중간엽 줄기세포 조정배지 및 골수세포의 시너지 효과에 따른 골수부전 질환의 예방 또는 치료에 현저한 효과를 나타낸다. 구체적으로, 본 발명의 편도 유래 중간엽 줄기세포 조정 배지 및 골수세포는 이들 각각을 별도로 사용하는 것과 대비하여 이 둘을 조합하였을 때 현저한 시너지 효과를 가져 골수부전 치료에 현저한 효능을 나타내며, 이러한 시너지 효과는 편도 유래 중간엽 줄기세포 조정배지의 골수세포 생착 촉진능에 기인한 것일 수 있다.
- [0036] 본 발명의 조성물은 편도 유래 중간엽 줄기세포 조정배지를 0.4 mg/ml 내지 1 mg/ml 농도로 포함할 수 있으며, 골수세포를 1.0×10^5 개/ml 내지 1.0×10^9 개/ml, 구체적으로 1.0×10^6 개/ml 내지 1.0×10^8 개/ml의 농도로 포함할 수 있다.
- [0037] 상기 조성물은 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정배지 및 골수세포를 유효성분으로 포함하는 것 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함할 수 있다.
- [0038] 본 발명에서 사용될 수 있는 담체의 종류는 특별히 제한되지 아니하며 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 담체라면 어느 것이든 사용할 수 있다. 상기 담체의 비제한적인 예로는, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사 용액, 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 말토 텍스트린, 글리세롤, 에탄올 등을 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상을 혼합하여 사용될 수 있다.
- [0039] 또한, 본 발명의 조성물은 필요한 경우, 부형제, 희석제, 항산화제, 완충액 또는 정균제 등 기타 약학적으로 허용 가능한 첨가제들을 첨가하여 사용할 수 있으며, 증진제, 증량제, 습윤제, 봉해제, 분산제, 계면 활성제, 결합제 또는 윤활제 등을 부가적으로 첨가하여 사용할 수 있다.
- [0040] 본 발명의 조성물은 경구 투여 또는 비경구 투여를 위한 적합하고 다양한 제형으로 제제화되어 사용될 수 있으나, 보다 바람직하게는 비경구 투여를 위한 제형으로 제제화될 수 있고, 더욱 바람직하게는 주사제 또는 주입제로 제제화될 수 있다.
- [0041] 본 발명의 조성물을 비경구 투여용으로 제제화하기 위하여, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결 건조 제제, 외용제 등을 사용할 수 있으며, 상기 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 또한, 주사제

또는 주입제로 제제화하는 경우, 본 발명의 조성물을 안정제 또는 완충제와 함께 물에서 혼합하여 용액 또는 현탁액으로 제조하고 이를 앰플(ampoule) 또는 바이알(vial)의 단위 투여용으로 제제화할 수 있다.

[0042] 또한, 당업계에서 통상적으로 사용하는 투여방법을 이용하여 이식 및 투여될 수 있으며, 바람직하게는 치료가 필요한 환자의 질환 부위에 직접 생착 또는 이식이 가능하나 이에 한정되지는 않는다. 예컨대, 본 발명의 조성물은 직장, 피하, 근육, 복강, 정맥, 동맥, 뇌척수강내, 골수 내 등으로 투여가능하며, 바람직하게는 골수 내로 투여될 수 있다. 또한, 상기 투여는 카테터를 이용한 비외과적 투여 및 질환부위 절개 후 주입 또는 이식 등 외과적 투여방법 모두 가능하다.

[0043] 본 발명의 조성물은 골수부전을 앓고 있는 개체, 구체적으로 골수세포의 이식을 필요로 하는 개체에 있어서, 이식되었거나 이식될 예정의 골수세포가 생착이 신속하고 원활히 이루어질 수 있도록 골수 이식과 동시 또는 이시(골수 이식 전 또는 후 포함)의 적절한 시기에 투여될 수 있다.

[0044] 본 발명의 편도 유래 중간엽 줄기세포 조정배지와 동시 또는 이시에 골수 세포를 투여하는 경우, 편도 유래 중간엽 줄기세포 조정배지와 골수 세포의 투여량은 골수세포의 생착을 충분히 촉진시킬 수 있도록 적절히 조절될 수 있다. 편도 유래 중간엽 줄기세포 조정배지의 경우 1.0×10^3 내지 1.0×10^9 개, 바람직하게는 1.0×10^4 내지 1.0×10^8 개의 편도 유래 줄기세포를 배양하여 수득된 배양액을 포함하는 조성물일 수 있으며, 농축 정도에 따라 그 투여량이 달라질 수 있다. 또한, 골수 세포의 경우 1.0×10^5 내지 1.0×10^9 세포/kg, 바람직하게는 1.0×10^6 내지 1.0×10^8 세포/kg 체중을 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나, 유효성분의 실제 투여량은 치료하고자 하는 질환, 질환의 중증도, 투여경로, 환자의 체중, 연령 및 성별 등의 여러 관련 인자에 비추어 결정되어야 하는 것으로 이해되어야 하며, 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0045] 본 발명의 조성물의 유효량, 유효 투여량은 조성물의 제제화 방법, 투여 방식, 투여 시간 및/또는 투여 경로 등에 의해 다양해질 수 있으며, 조성물의 투여로 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 투여 대상이 되는 개체의 종류, 연령, 체중, 일반적인 건강 상태, 질병의 증세나 정도, 성별, 식이, 배설, 해당 개체에 동시 또는 이시에 함께 사용되는 기타 조성물의 성분 등을 비롯한 여러 인자 및 의학 분야에서 잘 알려진 유사 인자에 따라 다양해질 수 있으며, 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 목적하는 효과가 충분히 발휘될 수 있도록 투여량을 용이하게 결정할 수 있다.

[0046] 본 발명에서, "골수세포의 이식이 필요한 개체"는 이에 제한되는 것은 아니나, 급성 골수성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 재생불량성 빈혈, 관코니 빈혈, 면역부전증, 다발성 골수종, 골수증식증양, 골수형성이상증후군, 호지킨림프종 등과 같은 골수부전 질환을 앓고 있는 환자뿐만 아니라 항암제 투여 또는 방사선 조사 등으로 골수 세포가 손상되어 골수세포 이식을 필요로 하는 모든 개체를 포함할 수 있다.

[0047] 본 발명은 또한 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정 배지를 유효성분으로 포함하는 골수세포 이식 보조제를 제공한다.

[0048] 상기 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정 배지 및 골수세포는 상기에서 설명한 바와 같다.

[0049] 본 발명에서 골수세포 이식 보조제란 당업계에서 일반적으로 사용되는 골수세포이식 치료 또는 골수세포 치료제의 효과를 증진시키기 위하여 보조적으로 사용될 수 있는 제제를 말하며, 본 발명에 의한 보조제를 사용함으로써 골수이식이 필요한 개체에 골수이식 후 골수세포의 생착을 촉진하여 골수세포 또는 이를 포함하는 치료제의 효과를 증진시킬 수 있다.

[0050] 본 발명의 이식 보조제는 골수부전을 앓고 있는 개체, 구체적으로 골수세포의 이식을 필요로 하는 개체에 있어서, 이식되었거나 이식될 예정의 골수세포가 생착이 신속하고 원활히 이루어질 수 있도록 골수세포 이식과 동시 또는 이시(골수 이식 전 또는 후 포함)의 적절한 시기에 투여될 수 있다.

[0051] 본 발명의 이식 보조제는 IGFBP2 (insulin-like growth factor-binding protein 2), MMP1 (matrix metalloproteinase-1), SFRP1 (secreted frizzled-related protein 1), SDF-1 (stromal cell-derived factor 1), HGF (hepatocyte growth factor) 또는 IGF-2 (insulin-like growth factor 2) 등을 다량 함유하고 있어, 골수세포 이식 시 투여된 골수세포의 골수로의 동원을 활성화하고 이식된 골수세포의 유착분자를 변형함으로써 골수세포의 생착을 촉진시킬 수 있다.

[0052] 상기 이식 보조제는 골수세포의 이식 후 골수세포의 생착을 촉진시킬 수 있으며, 이에 따라 골수세포를 이식하여 치료하고자하는 대상 질환에 대한 효과를 현저히 향상시킬 수 있다. 상기 대상 질환은 이에 제한되지 않으나, 급성 골수성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 재생불량성 빈혈, 판코니 빈혈, 면역부전증, 다발성골수종, 골수증식종양, 골수형성이상증후군, 호지킨림프종 등과 같은 골수부전 질환을 앓고 있는 환자뿐만 아니라 항암제 투여 또는 방사선 조사 등으로 골수 세포가 손상되어 골수세포 이식을 필요로 하는 모든 개체를 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0053] 본 발명의 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정 배지는 골수세포를 이식받은 개체에서 골수 세포 충실도 증가, 말초 혈액의 신속한 회복을 유도, 골수세포의 콜로니 형성 능력을 향상시키는 효능이 우수하고, 골수세포의 골수로의 동원을 활성화하며 골수세포의 유착분자를 변형함으로써 골수세포의 빠른 생착을 유도할 수 있어 골수부전의 예방 또는 치료에 현저한 효과를 보인다.

도면의 간단한 설명

[0054] 도 1은 마우스 골수 이식, 약물 처리 및 편도 유래 중간엽 줄기 세포 조정 배지 처리의 실험 스케줄을 나타낸 도면이다.

도 2는 골수 이식 후의 조직학적 분석을 수행한 결과를 나타낸 것으로, (a)는 골수 이식 후 10일째에 수행한 H & E 염색 결과를 나타낸 사진 및 그래프이고, (b)는 골수 이식 후 21일째에 수행한 H & E 염색 결과를 나타낸 사진 및 그래프이다.

도 3은 골수 이식 후의 혈액학적 분석을 수행한 결과를 나타낸 것으로, (a)는 혈중 순환 적혈구 수를 측정한 그래프이고, (b)는 혈중 순환 백혈구 수를 측정한 그래프이다.

도 4는 골수 이식 후의 골수 세포의 콜로니 형성을 측정한 결과를 나타낸 사진 및 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0055] 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.

[0056] 실시예 1: 동종 골수 이식의 수행

[0057] 수용체인 8 주령의 암컷 BALB/c 마우스(H-2^d) 및 공여체인 수컷 C57BL/6 마우스(H-2^b)는 Orient Bio (성남, 대한민국)로부터 구입하였다. 수용체 마우스는 통상적인 조건하에서 21 ~ 23℃의 온도, 51 ~ 54%의 습도 및 12 시간의 명/암 사이클에서 음식과 물을 자유식으로 하여 사육하였다.

[0058] 그 다음, 수용체 마우스에 2일 동안 부설판(busulfan) (20 mg/kg/day)을 투여한 후, 4일 동안 사이클로포스파미드(cyclophosphamide) (100 mg/kg/day)를 주사하여 골수 제거를 유도하였다. 공여체 마우스의 골수 세포(BMC)는 대퇴골(femur)과 경골(tibia)에서 분리하였으며, 1.4×10^6 골수 세포를 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정 배지(T-MSC CM)와 함께 또는 골수 세포만을 수용체 마우스의 꼬리 정맥을 통해 이식하였다.

[0059] 편도 유래 중간엽 줄기세포 조정 배지와 골수세포를 함께 이식한 마우스의 경우, 2일 후에 편도 유래 중간엽 줄기세포 조정 배지를 다시 한 번 주사하였다. 골수 이식(BMT) 후, 10일 및 21일에 마우스를 희생시켰다. 실험과 절차는 이화여자대학교 의과대학 동물윤리위원 (ESM 16-0354)의 승인을 받았으며 모든 실험은 관련 지침 및 규정에 따라 수행되었다.

[0060] 실시예 2: 편도 유래 중간엽 줄기세포의 배양 및 조정 배지의 제조

[0061] 분리된 편도 유래 중간엽 줄기세포를 10% FBS, 100 IU/ml 페니실린 및 100 µg/ml 스트렙토마이신(Welgene)이 첨가된 DMEM high glucose medium (Welgene, Gyeongsan, South Korea)에서 배양하였다. 배양 배지는 3 ~ 4일마다 교체하였다.

[0062] 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정 배지를 수득하기 위하여, 편도 유래 중간엽 줄기세포를 80%의 confluency가 될 때까지 배양한 후, 배양 배지를 새로운 배지로 교체하였다. 그 다음, 세포를 48시간 동안 더 배양한 후, 조정 배지를 수집하였다. 3,800 X g에서 30분간 원심분리하여 3-kDa Amicon Ultra 원심 분리필터 유닛

(Millipore, Darmstadt, Germany)을 사용해 조정 배지를 10배 농축시켰다.

[0063] 실시예 3: 편도 유래 중간엽 줄기세포 조정 배지 처리에 따른 골수 세포 충실도 증가 효과 확인

[0064] 편도 유래 중간엽 줄기세포 조정 배지 처리에 따른 골수세포 충실도 및 골수 지방 축적량을 측정하기 위하여 다음과 같이 Hematoxylin & eosin (H & E) 염색을 통해 조직학적 분석을 수행하였다.

[0065] 상기 실시예 1에서 골수 이식을 수행하고 10일 후에, 수용체 마우스의 대퇴골을 분리하고 10% 포르말린 용액을 포함하는 PBS로 고정시켰다. 칼슘이 제거되고 파라핀이 매입된 대퇴골을 4 μ m로 절단한 다음, H & E 염색을 수행하였다. 염색된 절편을 올림푸스 BX50 광학 현미경(Tokyo, Japan)을 사용하여 관찰하고 X100 배율로 촬영하였다. NIH ImageJ 소프트웨어를 사용하여 골수 세포 충실도 및 지방 축적량을 계산하였다.

[0066] 상기 실험 결과, 도 2(a)에 나타난 바와 같이, 부설판-사이클로포스파미드(Bu-Cy) 처리에 의해 골수 세포 충실도가 현저하게 감소되었고, 골수(BMT) 이식된 마우스 그룹은 Bu-Cy 처리 마우스 그룹과 유사한 조직학적 외양을 보이는 것으로 확인되었다. 편도 유래 중간엽 줄기세포 조정 배지(T-MSC CM)가 주입된 마우스 그룹은 편도 유래 중간엽 줄기세포 조정 배지 없이 이식된 그룹에 비해 골수 세포 충실도가 증가된 것으로 나타났다. 편도 유래 중간엽 줄기세포 조정 배지 처리군은 대조군과 비슷한 골수 세포 충실도를 보였으며, 편도 유래 중간엽 줄기세포 조정 배지가 존재하는 경우, 이식된 세포가 골수에 더 빨리 모이고 증식한 것으로 확인되었다. 골수 지방 축적 변화는 대조군 또는 Bu-Cy + BMT + CM 군에 비해 Bu-Cy 또는 Bu-Cy + BMT 군에서 골수 지방 축적이 높은 것으로 나타나, 세포 충실도와 반대 방향의 결과를 보였다.

[0067] 또한, 골수 이식 이후 21일째에 골수 조직학 분석을 수행한 결과, 도 2(b)에 나타난 바와 같이, 이식된 골수 세포가 골수에 성공적으로 이식되었으며, 대조군과 비슷한 수준의 골수 세포 충실도를 나타내었다. 그러나 Bu-Cy 그룹과 비교했을 때, 편도 유래 중간엽 줄기세포 조정 배지 존재 시 골수 이식을 수행한 경우에만 유의한 증가를 보였다. 또한 골수 지방 축적량을 측정한 결과, Bu-Cy 처리군에서 유의한 증가를 보였으며 편도 유래 중간엽 줄기세포 조정 배지 주입에 의해 감소하는 것으로 확인되었다($n = 3$, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$).

[0068] 실시예 4: 편도 유래 중간엽 줄기세포 조정 배지 처리에 따른 말초 혈액 세포의 회복 효과 확인

[0069] 편도 유래 중간엽 줄기세포 조정 배지 처리에 따른 말초 혈액 세포의 회복 효과를 확인하기 위하여 다음과 같이 혈액학적 분석을 수행하였다.

[0070] 상기 실시예 1에서 골수 이식을 수행하고 21일 후에, 수용체 마우스에 이소플루란(isoflurane) (Hana Pharm, Seoul, Korea)을 사용하여 마취시키고 심장 천자(cardiac puncture)를 통해 혈액을 채취하였다. 혈액 샘플을 10% FBS, 10 mM EDTA 및 20 mM HEPES를 함유하는 PBS로 100배 희석시키고 Isoton II Diluent (Beckman Coulter, Indianapolis, IN, USA)에서 추가로 1,000배 희석하였다. 세포 크기 분석기(Beckman Coulter)가 장착된 Coulter 카운터를 사용하여 적혈구(RBC) 및 백혈구(WBC)의 수를 세었다.

[0071] 상기 실험 결과, 도 3(a)에 나타난 바와 같이, 편도 유래 중간엽 줄기세포 조정 배지 주입에 의해 적혈구 수가 대조군 마우스와 유사한 수준으로 회복된 반면, 혈중 순환하는 적혈구 수는 Bu-Cy 및 Bu-Cy + 골수 이식 마우스에서 유의하게 감소되는 것으로 확인되었다. 이는 편도 유래 중간엽 줄기세포 조정 배지의 주입이 말초 혈액 세포의 빠른 회복을 유도함을 나타내는 것이다.

[0072] 또한, 도 3(b)에 나타난 바와 같이, 혈중 순환 백혈구 수는 대조군 또는 편도 유래 중간엽 줄기세포 조정 배지가 주입된 마우스와 비교하여 Bu-Cy 처리 마우스에서 유의하게 증가하였다. 이는 편도 유래 중간엽 줄기세포 조정 배지 처리에 의한 전신성 염증(systemic inflammation)의 개선을 나타내는 것이다($n = 3$, $*p < 0.05$).

[0073] 실시예 5: 편도 유래 중간엽 줄기세포 조정 배지 처리에 따른 골수 세포의 콜로니 형성 향상 효과 확인

[0074] 편도 유래 중간엽 줄기세포 조정 배지 처리에 따른 골수 세포의 콜로니 형성 향상 효과를 확인하기 위하여 다음과 같이 메틸셀룰로오스 콜로니 형성 분석을 수행하였다.

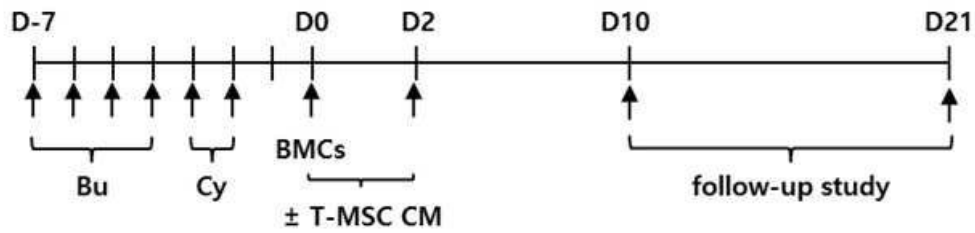
[0075] 상기 실시예 1에서 세포 독성 약물인 부설판 및 사이클로포스파미드(Bu-Cy) 투여를 완료한 다음 날, 대조군과 부설판 및 사이클로포스파미드 처리 마우스의 골수 세포를 대퇴골과 경골로부터 수득하여 콜로니 형성을 분석하였다. 상기 골수 세포는 편도 유래 중간엽 줄기세포 조정 배지의 존재 또는 부존재하에 제조자의 지시에 따라 메틸셀룰로오스 배양 배지인 MethoCult 배지(Stemcell technologies, Vancouver, BC, Canada)에서 배양하였다. 상기 골수 세포를 가습된 5% CO₂ 조건에서 37℃로 유지시켰다. 배양 14일 후, 위상차 현미경(배율; x100) 하에서 콜로니 형성을 측정하였다.

[0076] 상기 실험 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 편도 유래 중간엽 줄기세포 조정 배지를 처리한 마우스의 경우, 이를 처리하지 않은 마우스에 비해 골수 세포 콜로니 형성 능력이 향상되는 것으로 확인되었다.

[0077] 본 명세서는 본 발명의 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자이면 충분히 인식하고 유추할 수 있는 내용은 그 상세한 기재를 생략하였으며, 본 명세서에 기재된 구체적인 예시들 이외에 본 발명의 기술적 사상이나 필수적 구성을 변경하지 않는 범위 내에서 보다 다양한 변형이 가능하다. 따라서 본 발명은 본 명세서에서 구체적으로 설명하고 예시한 것과 다른 방식으로 실시될 수 있으며, 이는 본 발명의 기술 분야에 통상의 지식을 가진 자이면 이해할 수 있는 사항이다.

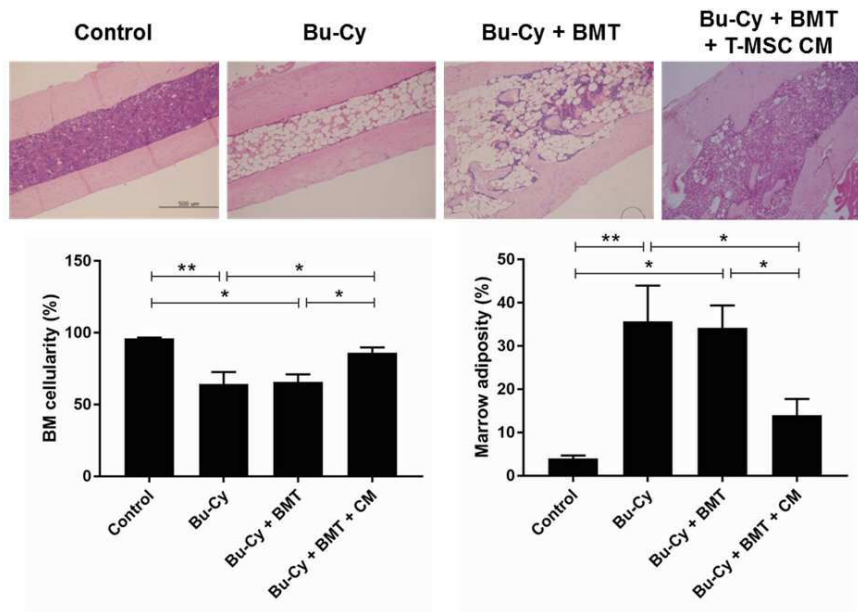
도면

도면1

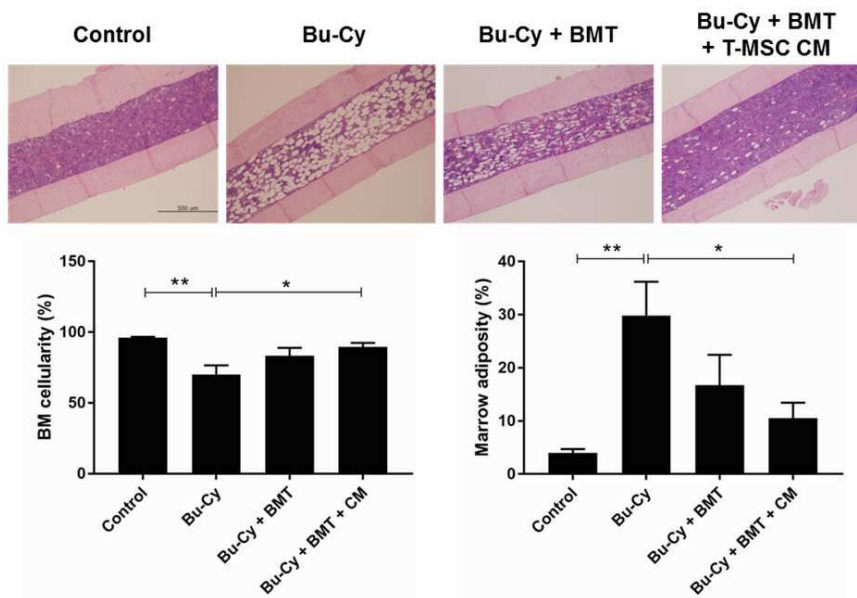


도면2

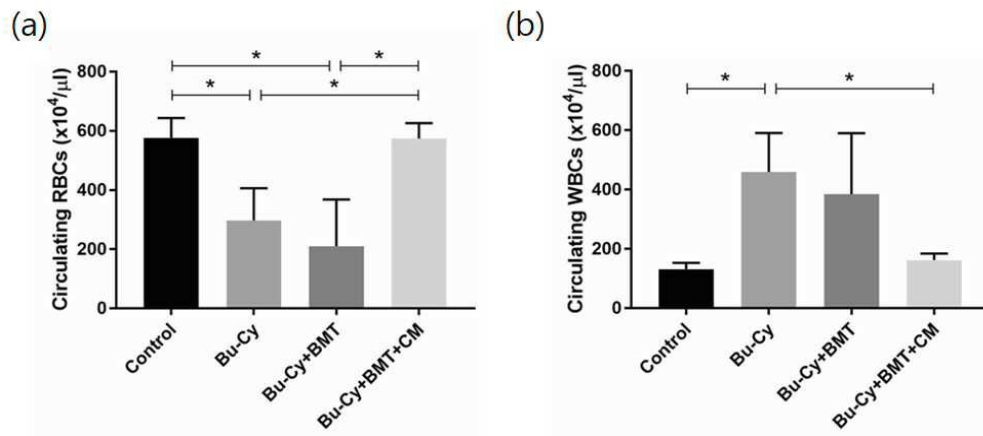
(a) Day 10 post-BMT



(b) Day 21 post-BMT



도면3



도면4

