



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0081638  
(43) 공개일자 2024년06월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 35/28 (2015.01) A23L 33/10 (2022.01)  
A61P 25/00 (2006.01) A61P 25/28 (2006.01)  
A61P 9/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 35/28 (2013.01)  
A23L 33/10 (2022.01)

(21) 출원번호 10-2022-0164564

(22) 출원일자 2022년11월30일

심사청구일자 2022년11월30일

(71) 출원인

한림대학교 산학협력단

강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)

(72) 발명자

전진평

서울특별시 은평구 진관3로 15-45, 1018동 402호  
(진관동, 은평뉴타운 구파발)

정혜리

강원도 춘천시 효평길 47-1(효자동)

윤동혁

충청북도 단양군 어상천면 어상천로 1589-8

(74) 대리인

특허법인본

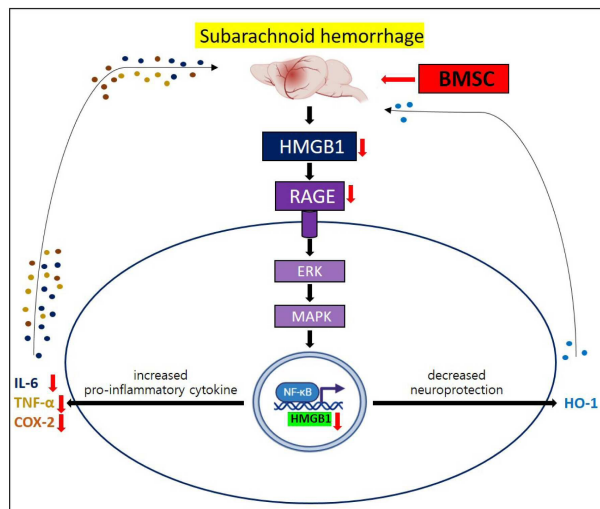
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 중간엽 줄기 세포를 포함하는 지주막하 출혈에 의한 질환 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 중간엽 줄기 세포를 포함하는 지주막하 출혈에 의한 질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 중간엽 줄기 세포를 포함하는 조성물은 지주막하 출혈 동물 모델에서 신경염증 및 인지기능 저해에 대해 개선 효과를 나타냄에 따라, 지주막하 출혈에 의한 질환의 예방, 치료 또는 개선용 조성물로서 유용할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

*A61P 25/00* (2018.01)

*A61P 25/28* (2018.01)

*A61P 9/00* (2018.01)

*A23V 2002/00* (2023.08)

*A23V 2200/322* (2013.01)

*A23V 2200/326* (2013.01)

*A23V 2250/204* (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

|             |                                  |
|-------------|----------------------------------|
| 과제고유번호      | 1711172968                       |
| 과제번호        | 2022R1A5A8019303                 |
| 부처명         | 과학기술정보통신부                        |
| 과제관리(전문)기관명 | 한국연구재단                           |
| 연구사업명       | 집단연구지원                           |
| 연구과제명       | 뇌혈관질환 전주기 관리를 위한 인공지능 디지털 헬스 플랫폼 |
| 기 여 율       | 1/1                              |
| 과제수행기관명     | 한림대학교                            |
| 연구기간        | 2022.06.01 ~ 2023.02.28          |

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

조성물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 지주막하 출혈은 동맥류 파열, 뇌혈관 기형, 고혈압성 동맥 경화증, 동맥염, 결합 조직 질환, 혈액 질환, 수술, 물리적 외상 또는 항응고 치료에 의한 것인, 조성물.

#### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 중간엽 줄기세포는 제대혈, 피부, 지방 또는 골수로부터 분리된 중간엽 줄기세포, 상기 분리된 중간엽 줄기세포로부터 계대 배양에 의해 증식된 중간엽 줄기세포 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 1종 이상의 세포인, 조성물.

#### 청구항 4

제1항에 있어서,

상기 중간엽 줄기세포는 IL-6, TNF- $\alpha$  및 COX-2의 mRNA 발현 수준을 감소시키는 것인, 조성물.

#### 청구항 5

제1항에 있어서,

상기 중간엽 줄기세포는 HMGB1, RAGE, TLR4 및 MyD88의 mRNA 발현 수준 및 NF- $\kappa$ B p65의 인산화 수준을 감소시키는 것인, 조성물.

#### 청구항 6

제1항에 있어서,

상기 중간엽 줄기세포는 원위 내부 경동맥의 벽 두께 및 내강 면적을 증가시키는 것인, 조성물.

#### 청구항 7

제1항에 있어서,

상기 중간엽 줄기세포는 행동 및 인지 기능을 개선하는 것인, 조성물.

#### 청구항 8

중간엽 줄기세포를 포함하는 지주막하 출혈에 의한 신경염증, 행동 및 인지 기능 개선을 위한 조성물.

#### 청구항 9

제8항에 있어서,

상기 중간엽 줄기세포는 제대혈, 피부, 지방 또는 골수로부터 분리된 중간엽 줄기세포, 상기 분리된 중간엽 줄기세포로부터 계대 배양에 의해 증식된 중간엽 줄기세포 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 1종 이상의 세포인, 조성물.

#### 청구항 10

제8항에 있어서,

상기 신경염증은 HMGB1 및 RAGE에 의해 매개된 것인, 조성물.

#### 청구항 11

제8항에 있어서,

상기 중간엽 줄기세포는 IL-6, TNF- $\alpha$  및 COX-2의 mRNA 발현 수준을 감소시키는 것인, 조성물.

#### 청구항 12

제8항에 있어서,

상기 중간엽 줄기세포는 HMGB1, RAGE, TLR4 및 MyD88의 mRNA 발현 수준 및 NF-kB p65의 인산화 수준을 감소시키는 것인, 조성물.

#### 청구항 13

제8항에 있어서,

상기 중간엽 줄기세포는 원위 내부 경동맥의 벽 두께 및 내강 면적을 증가시키는 것인, 조성물.

#### 청구항 14

중간엽 줄기세포를 포함하는 지주막하 출혈에 의한 질환 예방 또는 치료용 제제로서,

상기 제제는 뇌혈관내 투여 또는 정맥내 투여용인 제제.

#### 청구항 15

중간엽 줄기세포를 포함하는 지주막하 출혈에 의한 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

### 발명의 설명

#### 기술 분야

[0001] 본 발명은 중간엽 줄기 세포를 포함하는 지주막하 출혈에 의한 질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 골수 유래 중간엽 줄기 세포를 포함하는 지주막하 출혈에 의한 신경염증 및 인지기능 개선용 조성물에 관한 것이다.

#### 배경 기술

[0002] 지주막하출혈(Subarachnoid hemorrhage: SAH)은 두개강내 출혈의 아형(subtype)으로 혈관내의 혈액이 밖으로 유출(extravasation)되면서 지주막하공간(subarachnoid space)으로 들어가서 뇌실질(Brain parenchyma)의 주변부에 위치하는 뇌 조직에 다양한 염증 반응과 뇌세포 손상을 일으키는 질병이다.

[0003] 지주막하출혈은 뇌 주변을 전반적으로 감싸고 있는 지주막하공간에서 발생하는 출혈이기 때문에 뇌 전반에 걸쳐 손상을 일으키고, 이로 인해 발생 즉시 사망을 일으키거나 심각한 영구적 뇌손상을 초래하게 된다. 지주막하출혈의 원인으로는 두부의 외부적 충격으로 인한 외상(trauma), 뇌의 혈관벽의 변화로 인해 발생하는 뇌동맥류(aneurysm) 등을 들 수 있다. 또한, 예후 측면에 있어서 현대의학에서조차도 지주막하출혈은 여전히 사망률이 높고 예후가 나쁜 질환이다. 지주막하출혈 환자 중 10~15%는 병원에 도착하기도 전에 사망하며, 25%의 환자는 출혈이 발생한지 24시간 이내에 사망하게 된다. 또한, 발병 초기에 사망하지 않고 병원에 입원하더라도 2개월 이내에 평균 40%의 환자가 사망하며, 지주막하출혈 중 50%의 환자는 6개월 내에 사망하고, 종합적으로 환자 중 51~80%가 결국 사망하게 된다. 생존을 하게 되더라도 3주 이내에 재출혈(rebleeding), 뇌수종(hydrocephalus), 혈관연축(vasospasm)으로 인해 신경학적 합병증을 일으키고 대다수가 영구적인 뇌손상으로 인해 인지능력이 떨어져서 일상 생활이 불가능하고, 평생 침상 생활을 하게 되거나, 마비가 발생하여 걷지 못하게 된다.

[0004] SAH의 주요 연구는 재출혈(클리핑 대 코일링)을 효과적으로 방지하고 지연성 뇌허혈(DCI) 및 수두증과 같은 신

경학적 합병증을 최소화하여 생존율을 개선하는 것이다. 그러나 적절한 치료를 통해 유리한 신경학적 결과를 얻더라도 상당수의 SAH 생존자들은 운동 약화, 감각 변화 및 균형 문제와 같은 행동 장애, 그리고 다양한 시각 및 언어 기억 및 실행 영역에서 인지 기능 장애를 호소한다. 2보다 높은 Hunt-Hess 등급, 많은 양의 SAH 및 DCI는 행동 및 인지 기능 장애에 대한 잘 알려진 위험 요소이다. SAH는 기능적 연결성을 변경하여 행동 및 인지 기능 장애를 초래할 수 있다. 좋은 신경학적 결과에도 불구하고 지속적인 행동 및 인지 기능 장애는 삶의 질을 저하시킨다. 그럼에도 불구하고 SAH 환자에서 이를 치료하기 위한 치료법에 대한 연구는 퇴행성 신경질환이나 허혈성 뇌졸중에 비해 부족한 실정이다.

[0005] 다양한 뇌질환, 특히 퇴행성 뇌질환에서 줄기세포 치료가 연구되어 손상된 신경세포를 대체하고 손상된 신경회로를 줄기세포로 재구성할 것으로 기대된다. 다양한 종류의 줄기세포 중, 중간엽 줄기세포(MSC)는 주요 조직적합성 복합 클래스 I 분자를 덜 표현하고 접근 및 취급의 용이하여 면역 내성 측면에서 유리하다. SAH에서 MSC 처치에 대한 연구는 발작 후 초기 단계에서 신경 염증을 개선하는데 중점을 두었다. 또한 SAH 후 1시간에 골수 유래 줄기 세포(BMSC) 처리가 Notch1 의존성 신경염증 억제제를 통해 뇌 수분 함량 및 혈액-뇌 장벽(BBB) 투과성을 감소시키는 데 기여했다고 알려져 있다. 그러나 현재까지 MSC 처치가 행동 및 인지 기능 장애를 악화시키는 것과 관련이 있는지에 대한 연구는 거의 없다. 신경염 자체는 행동 및 인지 기능 장애의 잠재적 매개체로 널리 인식되고 있다. 특히, 고이동성 그룹 상자 단백질 1(HMGB1)은 뇌 손상 후 신경교 및 뉴런에서 방출되기 때문에 다양한 질병 조건에서 주목을 받았다. HMGB1은 지속적으로 톨유사 수용체(toll-like receptor; TLR) 및 진행성 당화 최종 생성물에 대한 수용체(receptor for advanced glycation end products; RAGE)에 결합하여 염증 반응을 활성화한다. 항-HMGB1 항체는 출혈 후 손상된 뇌의 산화 스트레스를 감소시켜 행동 성능을 개선한다. HMGB1, TLR 및 RAGE의 억제는 또한 알츠하이머병(AD) 및 당뇨병 관련 치매에서 아밀로이드-베타(AB) 로딩의 진행을 중단시키는 것으로 나타났다. 위의 사실을 고려하여 본 발명자들은 SAH 이후 행동 및 인지 기능 장애에서 BMSC의 치료 효과를 조사하고, 경증 SAH의 실험 모델에서 HMGB1 매개 신경염증과 관련된 기본 메커니즘을 탐구한다.

## 선행기술문헌

[0006] Skok M. Mesenchymal stem cells as a potential therapeutic tool to cure cognitive impairment caused by neuroinflammation. World J Stem Cells. 2021;13:1072-1083

[0007] Khalili MA, Anvari M, Hekmati-Moghadam SH, Sadeghian-Nodoushan F, Fesahat F, Miresmaeili SM. Therapeutic benefit of intravenous transplantation of mesenchymal stem cells after experimental subarachnoid hemorrhage in rats. J Stroke Cerebrovasc Dis. 2012;21:445-451

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0008] 본 발명은, 중간엽 줄기세포를 포함하는 지주막하 출혈에 의한 질환 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0009] 본 발명은 또한, 중간엽 줄기세포를 포함하는 지주막하 출혈에 의한 신경염증, 행동 및 인지 기능 개선을 위한 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0010] 본 발명은 또한, 중간엽 줄기세포를 포함하는 지주막하 출혈에 의한 질환 예방 또는 치료용 제제로서, 상기 제제는 뇌혈관내 투여 또는 정맥내 투여용인 제제를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0011] 본 개시의 목적들은 이상에서 언급한 목적으로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 본 개시의 다른 목적 및 장점들은 하기의 설명에 의해서 이해될 수 있고, 본 개시의 실시 예에 의해 보다 분명하게 이해될 것이다. 또한, 본 개시의 목적 및 장점들은 특허 청구 범위에 나타난 수단 및 그 조합에 의해 실현될 수 있음을 쉽게 알 수 있을 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0012] 본 발명의 한 구현예는, 중간엽 줄기세포를 포함하는 지주막하 출혈에 의한 질환 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0013] 상기 지주막하 출혈은 동맥류 파열, 뇌혈관 기형, 고혈압성 동맥 경화증, 동맥염, 결합 조직 질환, 혈액 질환, 수술, 물리적 외상 또는 항응고 치료에 의한 것일 수 있다.

- [0014] 상기 중간엽 줄기세포는 제대혈, 피부, 지방 또는 골수로부터 분리된 중간엽 줄기세포, 상기 분리된 중간엽 줄기세포로부터 계대 배양에 의해 증식된 중간엽 줄기세포 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 1종 이상의 세포일 수 있다.
- [0015] 상기 중간엽 줄기세포는 IL-6, TNF- $\alpha$  및 COX-2의 mRNA 발현 수준을 감소시키는 것일 수 있다.
- [0016] 상기 중간엽 줄기세포는 HMGB1, RAGE, TLR4 및 MyD88의 mRNA 발현 수준 및 NF-kB p65의 인산화 수준을 감소시키는 것일 수 있다.
- [0017] 상기 중간엽 줄기세포는 원위 내부 경동맥의 벽 두께 및 내강 면적을 증가시키는 것일 수 있다.
- [0018] 상기 중간엽 줄기세포는 행동 및 인지 기능을 개선하는 것일 수 있다.
- [0019] 본 발명의 한 구현예는, 중간엽 줄기세포를 포함하는 지주막하 출혈에 의한 신경염증, 행동 및 인지 기능 개선을 위한 조성물을 제공한다.
- [0020] 상기 신경염증은 HMGB1 및 RAGE에 의해 매개된 것일 수 있다.
- [0021] 본 발명의 한 구현예는, 중간엽 줄기세포를 포함하는 지주막하 출혈에 의한 질환 예방 또는 치료용 제제로서, 상기 제제는 뇌혈관내 투여 또는 정맥내 투여용인 제제를 제공할 수 있다.
- [0022] 상기 제제는 주사제 또는 주입제일 수 있다.
- [0023] 본 발명의 한 구현예는, 중간엽 줄기세포를 포함하는 지주막하 출혈에 의한 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공할 수 있다.

### 발명의 효과

- [0024] 본 발명에 따르면, 중간엽 줄기세포를 포함하는 지주막하 출혈에 의한 질환 예방 또는 치료용 조성물을 제공할 수 있다.
- [0025] 또한, 본 발명에 따르면, 중간엽 줄기세포를 포함하는 지주막하 출혈에 의한 신경염증, 행동 및 인지 기능 개선을 위한 조성물을 제공할 수 있다.
- [0026] 또한, 본 발명에 따르면, 중간엽 줄기세포를 포함하는 지주막하 출혈에 의한 질환 예방 또는 치료용 제제로서, 상기 제제는 뇌혈관내 투여 또는 정맥내 투여용인 제제를 제공할 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

- [0027] 도 1은 생체 내 지주막하 출혈 모델에서 본 발명의 일 구현예에 따른 중간엽 줄기 세포에 의한 치료 효과를 나타낸 것으로서, 중간엽 줄기 세포 투여는 주로 HMGB1 및 RAGE 축 매개 신경염증을 완화함으로써 행동 및 인지 기능 장애 개선 효과를 가질 수 있다.
- 도 2은 본 발명의 일 구현예에 따른 실험 방법을 나타낸 것이다.
- 도 3는 본 발명의 일 구현예에 따른 생체 내 SAH 모델에 대한 BMSC의 효과를 나타낸 도이며, (A)는 모델 유도 후 24시간 또는 72시간에 관찰된 식염수 또는 BMSC로 처리된 정상 대조군 및 생체내 SAH 모델의 대표적인 뇌 이미지, (B) 및 (C)는 치료 방법에 따른 신경학적 점수 및 뇌수분 함량 비교를 나타낸 도이다. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  및 \*\*\* $P < 0.001$ . 데이터는 평균  $\pm$  평균의 표준 오차(SEM)를 나타낸다.
- 도 4은 본 발명의 일 구현예에 따른 조직학적 검사, 신경 세포 사멸 및 염증 치료 효과를 나타낸 도이며, (A)는 SAH 유도 후 24시간 또는 72시간에 관찰된 식염수 또는 BMSC와 같은 치료 방법에 따른 원위 내부 경동맥의 헤마톡실린 및 에오신 염색에 대한 대표적인 관찰 단면 이미지를 나타내며, (B) 및 (C)는 IL-6 및 HMGB1의 면역조직화학 및 이들의 SAH 유도 후 24시간 또는 72시간에서 관찰된 치료 방법에 따른 생체내 SAH 모델에서의 정량화를 나타낸 그래프로서, (B)는 원위 내부 경동맥의 내강 면적 정량화 그래프, (C)는 원위 내부 경동맥의 벽 두께 정량화 그래프이며, (D)~(I)는 치료 방법에 따른 생체 내 SAH 모델에서 IL-6, TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  및 COX-2의 염증성 사이토카인 비교를 나타낸 그래프이다. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.005$  및 \*\*\*\* $P < 0.001$ .
- 도 5는 HMGB1/RAGE 축 염증의 변화를 나타낸 도이며, (A)~(D)는 치료에 기초한 생체내 SAH 모델에서 qRT-PCR을 사용하여 HMGB1, RAGE, TLR4 및 MyD88과 같은 HMGB1/RAGE 염증의 mRNA 발현 수준을 나타낸 그래프이며, (E) 및 (F)는 치료 방법에 따른 HMGB1, total NF-kB p65 및 phospho-NF-kB p65의 비교를 나타낸 그래프이다. \* $P < 0.05$ ,

\*\* P<0.01, \*\*\* P<0.005 및 \*\*\*\* P<0.001.

도 6는 행동과 인지 기능 장애 개선 효과를 나타낸 도이며, (A) 및 (B)는 빔 워킹, (C) 및 (D)는 Y-미로, (E) 및 (F)는 NOR 테스트를 통해 생체 내 SAH 모델에서 행동 및 인지 기능 장애에 대한 BMSC의 효과를 나타낸 도이다. \*P<0.05 및 \*\*P<0.01.

도 7의 (A)는 SAH 유도 전 훈련 및 기억 작업을 포함한 NOR 테스트의 대표적인 추적 이미지를 나타내고, (B) 및 (C)는 인식율을 나타낸 그래프이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0028] 본 명세서에서, "지주막하출혈(Subarachnoid hemorrhage, SAH)"은 뇌 표면의 동맥이 손상되어 출혈이 발생하는 것으로 뇌졸중의 일종이다. 지주막하출혈에 의해 혈액은 뇌와 두개골 사이의 공간으로 흘러 들어가고, 이는 뇌와 뇌척수 사이에서 완충 역할을 하는 뇌척수액과 혼합되며, 뇌 주위의 압력이 증가하고 (뇌압 상승), 뇌의 기능을 방해하며, 뇌손상을 유발할 가능성이 있다. 지주막하출혈은 대부분 뇌 표면의 돌출된 동맥벽이 파열되어 발생한다. 동맥의 돌출부위를 동맥류라고 하는데, 대개 이 동맥류가 파열이 원인이 된다. 또한, 지주막하출혈의 원인은 뇌혈관 기형, 고혈압성 동맥 경화증, 동맥염, 결합 조직 질환, 혈액 질환, 수술, 물리적 외상 또는 항응고 치료일 수 있다.
- [0029] 본 명세서에서, "예방"이란, 본 발명에 따른 조성물 또는 건강기능식품 조성물의 투여에 의해 지주막하출혈에 의한 질환, 또는 이의 적어도 하나 이상의 증상의 발생을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 또한, 재발을 예방하거나 방지하기 위해 상기 질병에 차도가 있는 대상의 치료를 포함한다.
- [0030] 본 명세서에서, "치료"란, 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 지주막하출혈에 의한 질환, 또는 이의 적어도 하나 이상의 증상을 완화, 감소, 또는 소멸시키는 등 그 증세를 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.
- [0031] 본 명세서에서, "개선"이란, 본 발명에 따른 건강기능식품의 섭취에 의해 지주막하출혈에 의한 질환, 또는 이의 적어도 하나 이상의 증상을 완화, 감소, 또는 소멸시키는 등 그 증세를 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.
- [0032] 본 명세서에서, "건강기능식품"이란, 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 포함하며, 영양 공급 외에도 본 발명의 목적상 지주막하출혈에 의한 질환, 또는 이의 적어도 하나 이상의 증상의 예방, 생체 방어, 면역, 회복 등의 생체 조절 기능이 효율적으로 나타나도록 가공된 의학, 의료 효과가 높은 식품을 의미한다.
- [0033] 본 명세서에서, "투여"란, 적절한 방법으로 개체에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며, 상기 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한, 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여, 뇌혈관내 투여될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0034] 본 발명에서 중간엽 줄기세포는 체내혈, 피부, 지방 또는 골수로부터 분리된 중간엽 줄기세포, 상기 분리된 중간엽 줄기세포로부터 계대 배양에 의해 증식된 중간엽 줄기세포 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 1종 이상의 세포일 수 있다.
- [0035] 본 발명에서 중간엽 줄기세포의 분리·배양에 사용가능한 배양 배지로는 10% 내지 30% FBS를 포함하는 세포 배양용 배지를 사용할 수 있으며, 세포 배양용 배지로는 돌베코 변형 이글 배지 (Dulbecco's modified eagle medium, DMEM), 최소 필수 배지 (minimal essential medium, MEM)를 비롯하여 알파-최소 필수 배지 ( $\alpha$ -MEM), 맥코이스(McCoys) 5A 배지, 이글스 기본 배지 (eagle's basal medium), CMRL (Connaught Medical Research Laboratory) 배지, 글래스고우 (Glasgow) 최소 필수 배지, (Ham's) F-12 배지, IMDM (Iscove's modified Dulbecco's medium), 리보비츠 (Liebovitz') L-15 배지, RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 배지 등 당업계에서 통상적으로 사용되는 세포배양용 배지는 모두 사용가능하며, DMEM 배지를 사용하는 것이 바람직하다.
- [0036] 본 발명의 조성물은, 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약학적으로 허용가능한 담체를 1종 이상 포함하여 제조할 수 있으며, 다양한 제형으로 제조할 수 있다.
- [0037] 본 발명의 조성물은 중간엽줄기세포에 의해 HMGb1 및 RAGE 매개 신경염증을 감소시키고, 행동 및 인지 기능 장



애를 개선시킬 수 있다.

[0038] 이하 본원을 실시예 및 실험예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예 및 시험예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본원의 범위가 이들 실시예 및 시험예에 한정되는 것은 아니다.

## [0040] 실시예

### [0041] 실험적 지주막하 출혈(subarachnoid hemorrhage; SAH) 모델

[0042] 실험에서 사용한 C57BL/6J 수컷 마우스는 8-10주령, 체중 20-25g이며, 한림대학교 실험동물자원센터에서 입수하였다. 동물에게 24℃, 55 ± 10% 습도에서 12시간 암/광 주기 하에서 규칙적인 음식과 물을 임의로 제공했다. SAH 모델은 혈관 내 천공 기술을 사용하여 도입되었다. 구체적으로는, 마우스를 산소 중 2.5% 이소플루란으로 마취했다. 목의 정중선을 수직으로 절개한 후 외경동맥과 총경동맥을 노출시켰다. 그 다음, 예리한 5-0 프롤렌을 외경동맥에 삽입하고 전진하여 전대뇌동맥과 중뇌동맥으로 구분되는 원위 내부 경동맥(distal internal carotid artery, distal ICA)에 궁극적으로 천공하였다. 가짜 수술 그룹의 마우스는 동맥 천공을 제외하고 동일한 절차를 거쳤다. 본 발명자들은 16 및 17의 수정된 가르시아 신경학적 점수 척도 점수를 기반으로 24시간에 평가된 경도 SAH 모델만 등록했다. 모든 동물 실험이 한림대학교 동물연구소(IACUC) 동물관리위원회(번호: 한림 R1 2021-50)에서 승인되었다.

### [0044] 골수 중간엽 줄기세포(bone marrow mesenchymal stem cells; BMSC) 배양

[0045] 본 발명자들은 BMSC를 배양했다. 세포는 고농도 글루코스 DMEM, 10% FBS, 100U/mL 페니실린/스트렙토마이신(Gibco, Grand Island, NY, USA)에서 100mm 배양 접시에  $1 \times 10^6$  세포의 밀도로 플레이팅되었다. 48시간 후, 부착되지 않은 세포를 배지에서 제거하고 부착된 단핵 세포인 BMSC에 새로운 배양 배지를 보충하였다. 이 실험에 사용된 모든 BMSC는 계대 5였다. BMSC( $3 \times 10^5$  개 세포)는 정맥내 투여되었다.

## [0047] BMSC 투여

[0048] 총 126마리의 수컷 C57BL/6J 마우스를 무작위로 6개 그룹으로 나누었다(도 2의 D 참조). SAH 유도 후 BMSC를 3시간에 1회, 3시간과 48시간에 2회 투여하고, 24시간과 72시간에 각각 치료 효과를 평가하였다. 그리고 그 결과를 식염수 투여와 비교하였다. 각 그룹의 세부 사항은 다음과 같다: 1) 정상 대조군; 2) 3시간에 식염수로 처리하고 24시간에 평가한 SAH; 3) 3시간에 BMSC로 처리하고 24시간에 평가한 SAH; 4) 3시간에 식염수로 처리하고 72시간에 평가한 SAH; 5) 3시간에 BMSC로 처리하고 72시간에 평가한 SAH; 6) 3시간 및 48시간에 2회 식염수 투여로 처리하고 72시간에 평가한 SAH; 및 7) 3시간 및 48시간에 2회 BMSC 투여로 처리되고 72시간에 평가한 SAH.

## [0049] 면역조직화학 및 Fluoro-Jade B(FJB) 염색

[0050] 냉동 절편된 뇌 조직을 증류수에 1분 동안 수화시키고 실온에서 15분 동안 0.06% 과망간산칼륨에 침지시켰다. 조직은 60분 동안 2% 말 혈청을 차단했다. 1차 항체를 희석하고 4℃에서 밤새 배양하였다. 조직을 인산완충식염수(PBS) 중 0.3% 과산화수소에 10분 동안 침지시켰다. 1차 항체는 HRP(horseradish peroxidase conjugated) 연결 2차 항체에 의해 검출되었다. HRP 활성은 3,3'-디아미노벤지딘(DAB) 기질로 검출되었다. 조직을 PBS에서 5분 동안 3회 세척하였다. 그런 다음 모든 조직을 Mayer의 헤마톡실린으로 대조 염색했다. 1차 항체는 BAX(1:100, Abcam, Cambridge, UK) 및 BCL-2(1:100, Abcam, Cambridge, UK)와 같이 사용되었다. 2차 항체는 염소 항-마우스 IgG(1:250, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) 및 염소 항-토끼 IgG(1:250, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)를 사용하였다. 염색된 뇌 조직은 광학 현미경(Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany)을 사용하여 관찰되었다. 면역 양성 세포는 Image J 소프트웨어(Image J 1.49v, National Institutes of Health, USA)로 측정 및 분석하였다.

[0051] Fluoro-Jade B(FJB) 염색은 이전 연구를 참조하여 수행되었다. 뇌 조직 슬라이드를 증류수에 1분 동안 수화시키고 실온에서 0.05% 과망간산칼륨에 15분 동안 침지시켰다. 슬라이드를 0.001% FJB(Histo-Chem Inc., AR, USA) 용액으로 30분 동안 염색했다. 염색된 슬라이드를 증류수에 5분간 3회 세척한 후 55℃ 어두운 조건에서 35분 이상 건조시킨 후 dibutylphthalate polystyrene xylene(Sigma-Aldrich Co., MO, USA)에 마운트했다. 염색된 뇌



조직은 형광 현미경(Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany)을 사용하여 450-490 nm에서 관찰되었다.

#### RNA 분리 및 정량적 RT-PCR

easy blue를 사용하여 뇌 조직의 총 RNA를 추출하고 Maxime RT PreMix Kits(iNtRON Biotechnology, Inc., MA, USA)를 사용하여 cDNA로 역전사했다. 정량적 실시간 증합효소 연쇄 반응(qRT-PCR)은 94℃에서 15초의 변성, 55℃에서 30초의 어닐링, 70℃에서 30초 연장을 포함하는 3단계 프로그램으로 SYBR Green PCR Kit(Applied Biosystems, CA, USA)를 사용하여 60주기 동안 각 샘플에 대해 3회 수행되었다. 증폭 특이성은 용융 곡선 분석으로 평가되었다. qRT-PCR에 대한 서열 프라이머는 표 1에 개시되어 있다. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)를 내인성 대조군으로 사용하였다.  $2^{-\Delta \Delta Ct}$  방법을 사용하여 qRT-PCR의 발현을 분석하였다.

표 1

| Genes         |         | Sequences 5' -3'         |
|---------------|---------|--------------------------|
| IL-6          | Forward | CCACGGCCTTCCCTACTT       |
|               | Reverse | TTGGGAGTGGTATCCTCTGTGA   |
| TNF- $\alpha$ | Forward | GCTGTCCCTGCGCTTCA        |
|               | Reverse | CTCGTCCCCAATGACATCCT     |
| COX-2         | Forward | CGAGGCCACTGATACCTATTGC   |
|               | Reverse | GCTGGCCTGGTACTCAGTAGGTT  |
| HMGB1         | Forward | GCCTCGCGGAGGAAAATC       |
|               | Reverse | AAGTTTGCACAAAGAATGCATATG |
| RAGE          | Forward | TCAACATCAGGGTCACAGAAAC   |
|               | Reverse | CAATGAGCAGAGCGGCTA       |
| TLR4          | Forward | GCCTTTCAGGGAATTAAGCTCC   |
|               | Reverse | AGATCAACCGATGGACGTGTAA   |
| MyD88         | Forward | TCATGTTCTCCATACCCTTGGT   |
|               | Reverse | AAACTGCGAGTGGGGTCAG      |
| GAPDH         | Forward | TTGATGGCAACAATCTTCAC     |
|               | Reverse | CGTCCCGTAGACAAAATGGT     |

#### 웨스턴 블롯

단백질 농도는 단백질분해효소 억제제 카테일이 보충된 방사선 면역침전 분석 완충액에서 뇌 조직의 용해 후 Pierce BCA 단백질 분석 키트(Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)를 사용하여 측정되었다. 단백질(15 ug)을 10-15% 나트륨 도데실 설페이트-폴리아크릴아미드(SDS PAGE) 겔 전기영동에 의해 분리하고 폴리비닐리덴 플루오라이드 막으로 옮겼다. 막을 1% BSA로 실온에서 1시간 동안 차단하고 1차 항체와 함께 4℃에서 밤새 인큐베이션하였다. 다음의 1차 항체가 사용되었다: IL-6(1:500, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), TNF- $\alpha$ (1:500, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), COX-2(1:1000, Abcam, Cambridge, MA, USA), HMGB1(1:1000, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), NF- $\kappa$ B p65(1:1000, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) 및 인산(phospho)-NF- $\kappa$ B p65(1:1000, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA). 블롯 막을 0.1% Tween 20이 포함된 트리스 완충 식염수로 15분 동안 3회 세척한 다음 HRP-연결된 이

차 항체와 함께 인큐베이션했다. 블롯을 1-5분 동안 X선 필름에 노출시키고 Image J 소프트웨어(Image J 1.49v, National Institutes of Health, USA)로 분석했다.

#### [0057] 뇌 수분 함량

[0058] 마우스 뇌의 습윤 중량을 측정된 다음 건조 중량을 얻기 위해 100° C의 오븐에서 3시간 동안 건조했다. 뇌부종은 다음 공식에 의해 측정되었다:

[0059] 뇌 함수율=[(습중량 - 건조중량)/습중량] x 100%

#### [0061] 행동 및 인지 기능 장애

[0062] 행동 평가는 수정된 가르시아 신경학적 점수 척도 점수와 이전 연구를 참조한 빔 보행 테스트를 사용하여 수행되었다. 빔 보행 테스트를 간략하게 설명하면 마우스는 조명이 있는 통로(폭 10cm, 길이 33cm)를 건너고 통로 끝에 위치한 반대편으로 직진한다(도 6의 A 참조). 그런 다음 뒷다리를 무독성 잉크로 코팅하고 쥐가 흰 종이 위의 작은 터널을 통과하도록 허용했다. 이 테스트는 동물당 10개의 명확하게 보이는 발자국이 얻어질 때까지 1-2번의 실험에서 기록되었다. 빔은 수평이고 테이블 위 50cm에 위치한다. 마우스는 직경이 2cm인 빔을 횡단한 다음 직경이 1cm인 빔을 횡단하도록 훈련되었다. 각 빔을 가로지르는 대기 시간과 낙하 대기 시간이 기록되었다.

[0063] 인지 기능 장애는 Y-미로와 새로운 객체 인식(novel object recognition; NOR) 테스트를 사용하여 평가되었다. Y-미로 테스트는 단기 공간 기억을 평가하는 데 사용되었다(도 6의 C 참조). 각 마우스는 A, B 및 C로 지정된 3개의 팔이 있는 흰색 Y-미로에 배치되었다. 각 팔의 치수는 40 x 12 x 10 cm(길이 x 높이 x 너비)였다. 각 마우스를 시작 팔의 끝에 놓고 5분 동안 미로를 통해 자유롭게 움직일 수 있도록 했다. 교대 행동은 세 개의 팔에 연속적으로 들어가는 것으로 정의되었다. 주요 결과는 자발적 교대(교대 지수 = 교대/최대 교대 x 100)였다. NOR 테스트의 모식도를 도 2의 A-C에 나타낸다. 마우스는 열린 사각형 필드(65 x 45 x 30cm)에서 10분씩 2일 동안 적응되었다. 그런 다음 마우스는 경기장의 반대쪽 사분면에서 두 개의 동일한 개체(A1 및 A2)를 훈련했다. 24시간 후, 마우스는 친숙한 물체 A1과 B1이라는 새로운 물체에 10분 동안 노출되었다. SAH 후 24시간 및 72시간 후 마우스 활동은 동일한 물체 A1과 C1이라는 새로운 물체 사이의 10분 동안 열린 필드 테스트에서 이동 거리로 평가되었다. 대상물 선호도는 마우스의 코와 대상물의 거리가 2cm 이내일 때 1회 측정하였다. 모든 마우스 행동 테스트는 비디오 추적 시스템에 의해 기록되었고 히트 맵 추적 이미지(NoldusEthoVision XT, Leeburg, VA, USA)를 사용하여 설명되었다.

#### [0065] 통계 분석

[0066] 모든 데이터는 평균의 표준 오차(SEM)가 있는 평균으로 표시되었다. 가능한 모든 페어-와이즈 비교에 대해 사후 Bonferroni 보정을 사용한 일원 분산 분석을 수행했다. <0.05, 0.01 및 0.001보다 작은 P 값은 그림에서 각각 \*, \*\* 및 \*\*\*로 표시된다. 모든 통계 분석은 GraphPad Prism 소프트웨어(v.8.0; GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA)를 사용하여 수행되었다.

#### [0068] 평가예

##### [0069] 평가예 1: 생체 내 SAH 모델에 대한 BMSC의 효과

[0070] 본 발명자들은 SAH 유도 후 신경학적 결손과 뇌부종에 대한 BMSC의 치료 효과를 조사했다(도 3). 대조군과 비교하여 3시간에 식염수를 투여한 경증 SAH는 기저 수조에서 확실한 혈전을 보였고 24시간과 72시간에 뇌부종이 증가하면서 신경학적 점수가 감소했다. 특히 72시간째에 혈병의 양이 시각적으로 감소했지만 신경학적 점수와 부종은 계속 악화되었다. 3시간에 BMSC를 투여한 경도 SAH는 식염수 투여를 사용한 경도 SAH와 비교하여 감소된 뇌부종과 함께 유의하게 개선된 신경학적 점수를 나타내었다(BMSC 처리군에서 17.3 ± 0.6 vs. 식염수 처리군에서 15.7 ± 0.6; p<0.005). 72시간에 측정했을 때, 신경학적 점수와 뇌부종은 24시간에 비해 유의한 개선을 나타내지 않았다. 투여 횟수에 따른 72시간 치료 효과의 차이를 알아보기 위해 모델 유도 4시간 후와 48시간 후에 BMSC를 2회 투여하였다. 우리의 예상과 달리, BMSC 투여로 2회 처리된 경도 SAH는 BMSC 투여 1회와 비교하여 신경학적 점수 및 뇌 수분 함량에 있어서 유사한 효과를 나타냈다.

[0071] **평가예 2: 조직학적 검사, 신경 세포 사멸 및 염증**

[0072] SAH 유도 후 24시간에 수행된 H&E 염색에 따르면, 식염수 투여를 사용한 경도 SAH는 BMSC 투여에 비해 증가된 원위 내부 경동맥의 벽 두께와 함께 원위 내부 경동맥의 내강(lumen) 면적 감소를 나타내었다(도 4의 A). 지주막하 공간의 두꺼운 혈액과 불룩한 부분의 두꺼운 지주막하층도 관찰되었다. 72시간에서의 H&E 염색은 불룩부에 얇은 층을 나타내었고 BMSC 투여 후 연강 아래 호중구 및 백혈구를 암시하는 침습 세포 감소를 보였다. BMSC 2회 투여는 원위 내부 경동맥의 더 큰 내강(lumen)을 나타내었지만 단일 BMSC 투여에 비해 유사한 벽 두께를 나타냈다(도 4의 B 및 C). IL-6, TNF- $\alpha$  및 COX-2의 mRNA 발현 수준은 대조군과 비교하여 SAH 유도 후 24시간 및 72시간 모두에서 BMSC 투여 후 유의하게 감소하였다(도 4의 D~I). 특히, IL-6 및 COX-2 단백질은 BMSC를 1회보다 2회 투여한 후에 더 많이 감소하였다.

[0073] **HMGB1/RAGE 축 염증의 변화**

[0074] BMSC 투여 후 HMGB1/RAGE 축의 염증 변화를 확인하기 위해 qRT-PCR 및 HMGB1을 사용하여 HMGB1, RAGE, TLR4 및 MyD88, 총 NF-kB p65 및 phospho-NF-kB p65를 웨스턴 블로팅을 사용하여 측정했다. BMSC 투여는 SAH 유도 후 HMGB1, RAGE, TLR4 및 MyD88의 mRNA 발현을 감소시켰다(도 5의 A, B, C 및 D). TLR4 및 MyD88 발현의 감소는 72시간에 현저했다. HMGB1의 발현과 NF-kB p65의 인산화 수준은 BMSC 투여 후 감소했다(도 5의 E 및 F). 특히, NF-kB p65는 단일 BMSC 투여에 비해 2번의 BMSC 투여에서 더 많이 감소하였다.

[0075] **행동과 인지 기능 개선**

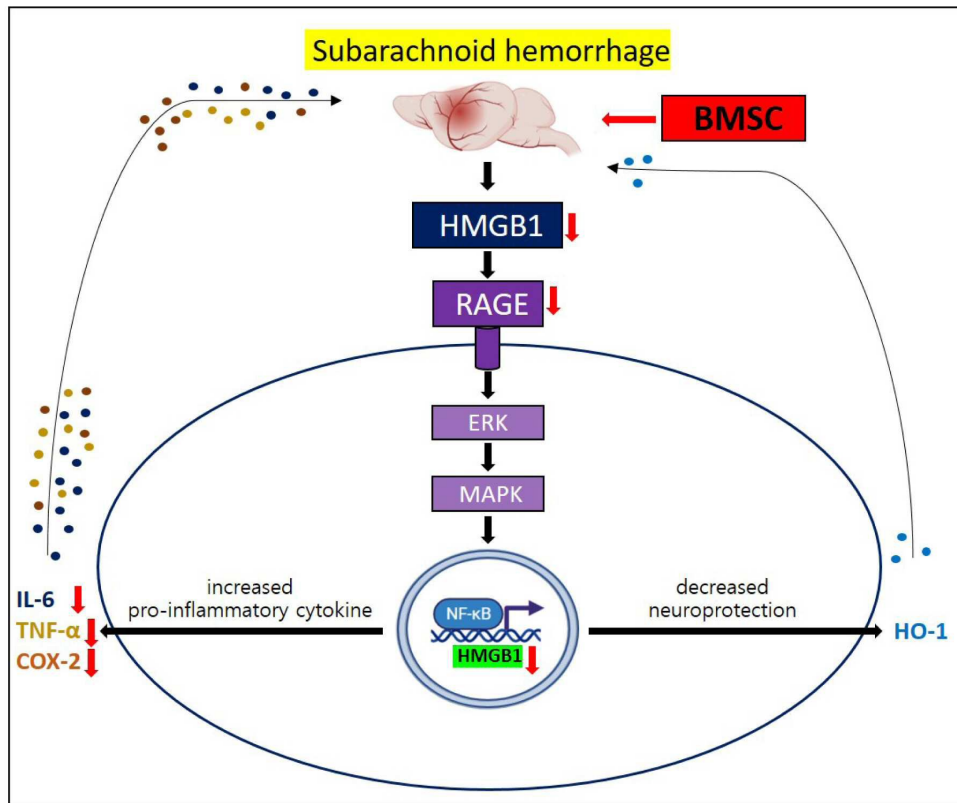
[0076] BMSC 투여는 운동 활동과 균형을 개선했다. 보행 시간당 미끄러짐 횟수가 크게 감소했다(도 6의 A 및 B). 또한 BMSC 투여 후 단기 기억 및 절차 작업 기억의 손상이 완화되었다. 특히, BMSC를 3시간과 48시간에 2회 투여한 경우, 1회 투여한 경우에 비해 더 많은 개선을 보였다(도 6의 C 및 D). NOR 테스트에서 훈련 단계 후 동일한 개체(A1 및 A2) 인식률과 친숙한 개체(A1)와 새로운 개체(B1) 인식률은 모든 그룹에서 유의하게 다르지 않았다(도 7). SAH 유도 후, 3h-BMSC로 처리된 SAH 모델에서 새로운 신규 물체(C1)의 인식 지수는 24시간에 식염수로 처리된 것보다 유의하게 더 높았다. 새로운 것에 대한 인식률은 식염수 투여군에 비해 BMSC를 3시간 및 48시간에 2회 투여했을 때 더 높았으나, 3시간에 1회 BMSC를 투여한 군과 유의한 차이는 없었다(도 6의 E 및 F).

[0077] **결론**

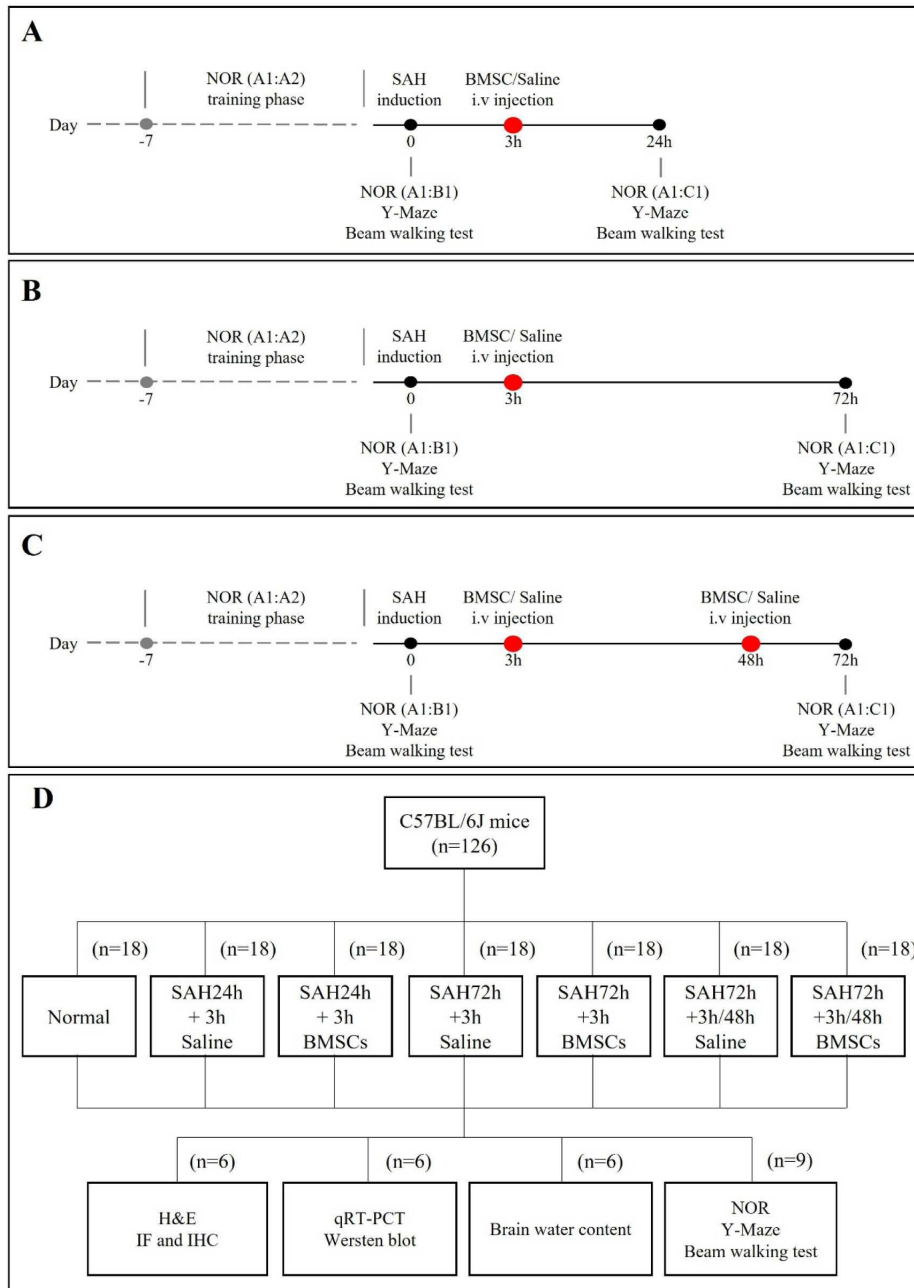
[0078] SAH 후 좋은 결과에도 불구하고 행동 및 인지 기능 장애는 여전히 지속되어 일상 활동을 제한한다. 그럼에도 불구하고 줄기 세포가 이러한 기능 장애의 회복에 미치는 영향에 초점을 맞춘 연구는 거의 없다. SAH와 달리 MSC 치료는 다양한 신경 장애에 대해 광범위하게 조사되었다. 기존 연구는 MSC 치료를 받은 다계통 위축증 환자가 더 나은 소뇌 기능 장애를 보였다는 것을 보여주었다. 또한 BMSC 투여는 AB의 감소를 촉진하고 해마에서 microRNA-146a의 발현을 증가시켜 인지 장애를 개선했다. 신경 염증은 신경 장애에서 중요한 역할을 하기 때문에 본 발명자들은 HMGB1-RAGE 축에 초점을 맞추었다. 본 발명은 SAH 유도 후 6시간에서 HMGB1의 발현이 증가함을 보여주었다. 3시간에서 BMSC의 단일 투여는 인지 장애의 개선에 기인한 반면 24시간 이내에 세포사멸사 및 염증성 사이토카인의 감소를 유지했지만 그 후 72시간에 다시 증가했다. BMSC를 투여하지 않은 경증 SAH 모델은 72시간 후에 다소 회복을 나타내었지만 치료 효과는 작았다. 또한, 염증의 차이는 24시간에 측정된 것과 비교하여 BMSC의 단일 투여 후 72시간에서 점진적으로 감소하였다. SAH는 시간이 지남에 따라 동적으로 변화하는 복잡한 병태생리학을 특징으로 한다. 재출혈을 예방하기 위한 초기 치료가 성공적이라도 SAH로 인한 EBI는 이후 신경학적 악화를 악화시킬 수 있다. 본 발명자들의 가설을 확인하기 위해 본 발명자들은 SAH 유도 후 3시간과 48시간에서 BMSC를 두 번 투여하고 단일 BMSC 투여와 치료 효과를 비교했다.

도면

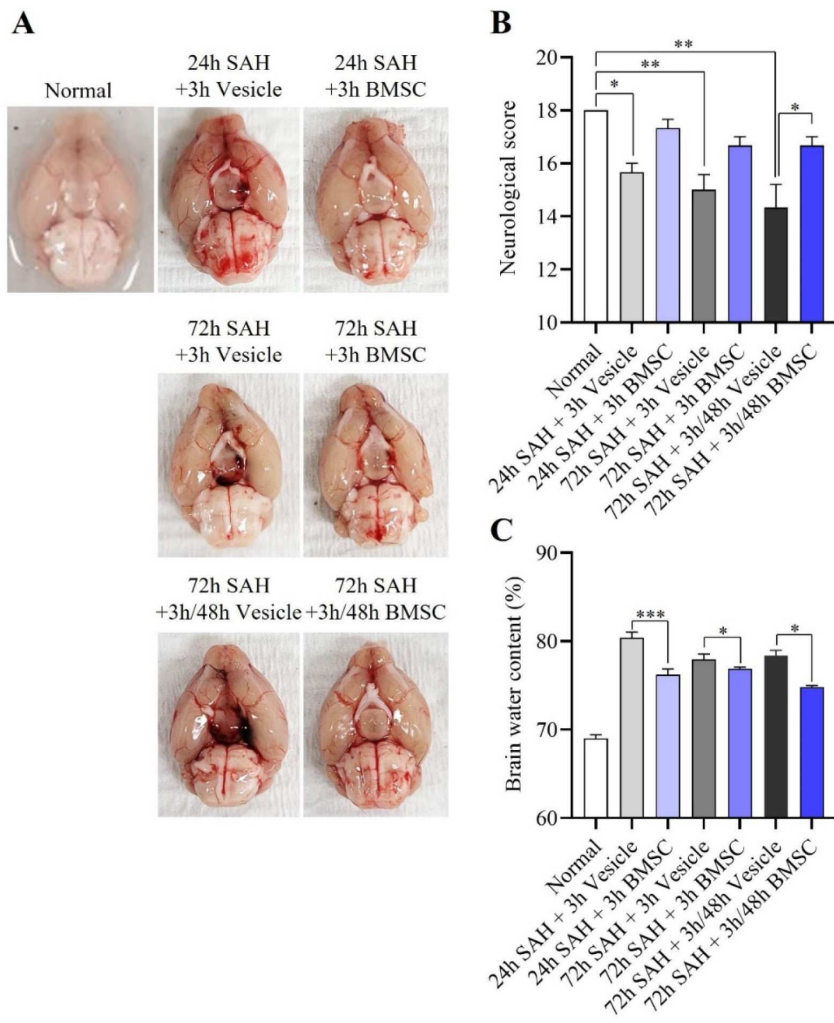
도면1



도면2

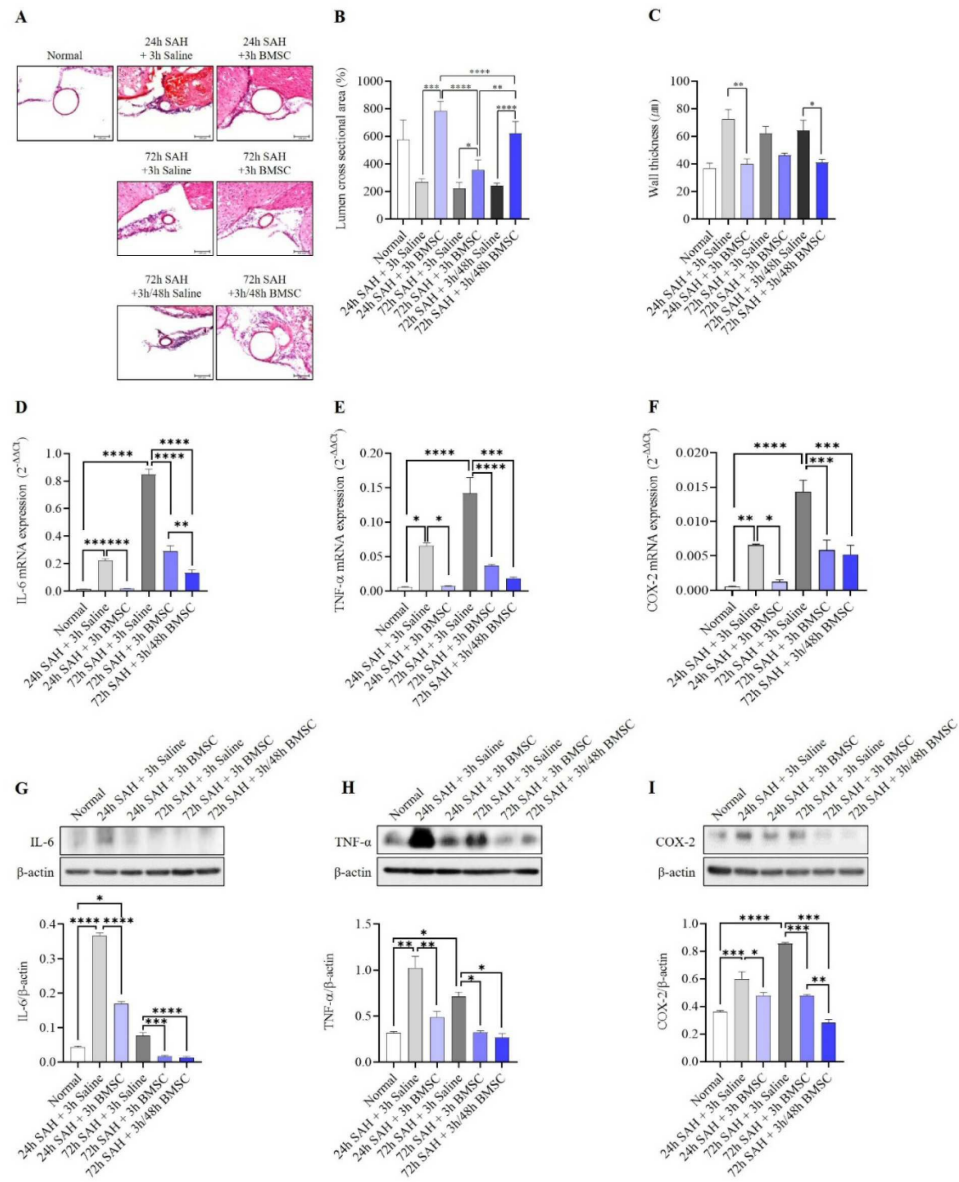


도면3

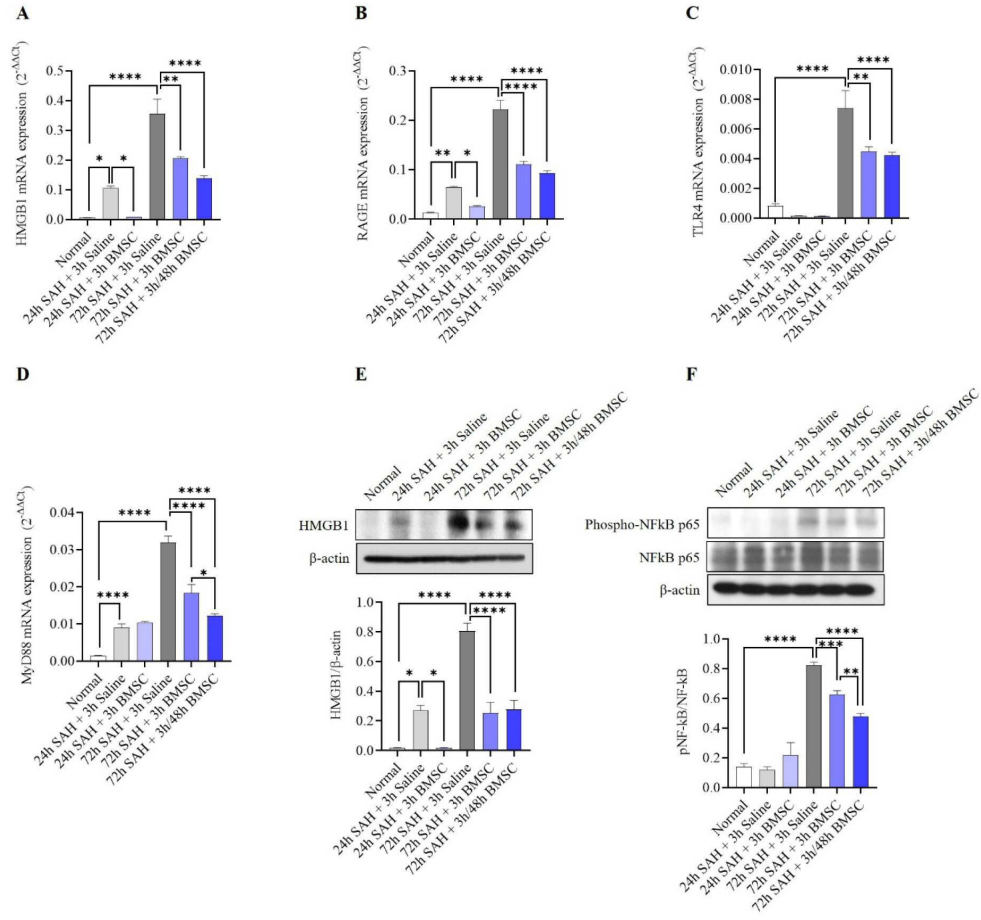




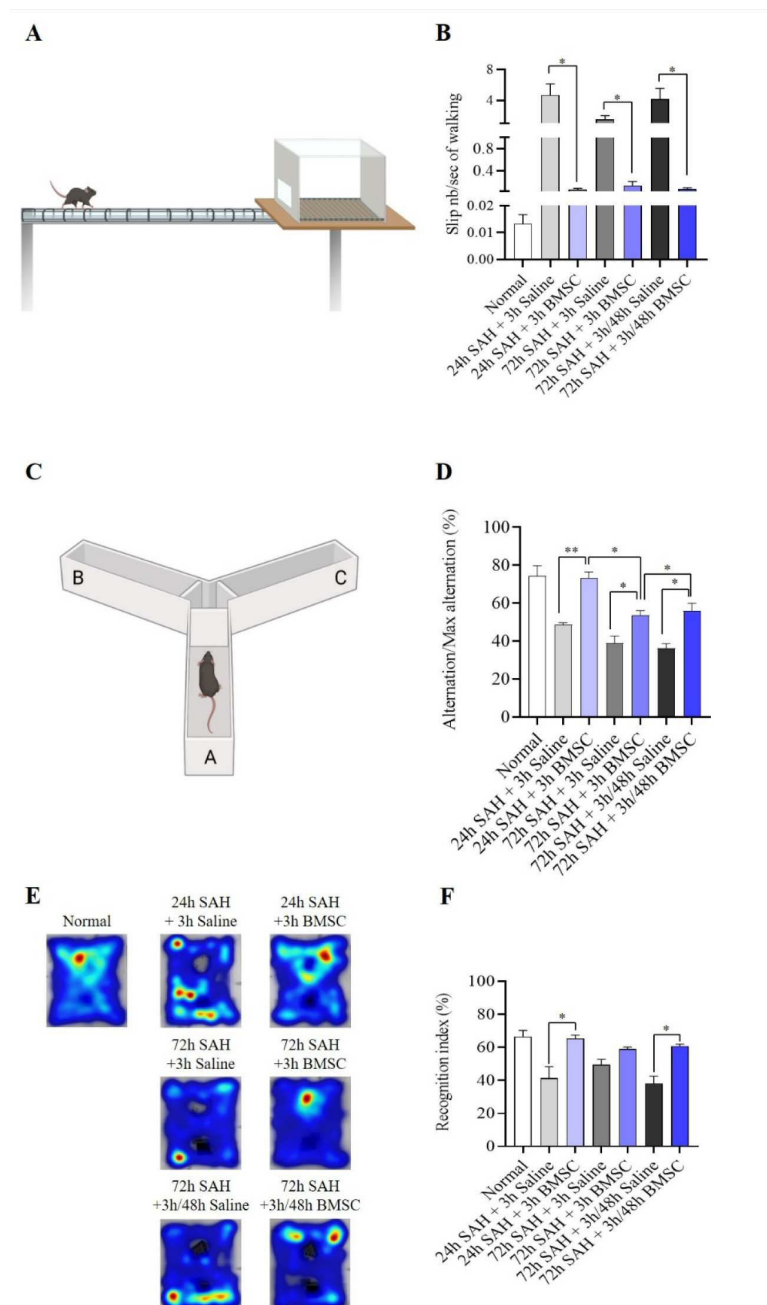
도면4



도면5



도면6



도면7

