(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0071112
(43) 공개일자 2025년05월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0775 (2010.01) *A61K 35/28* (2015.01)
A61P 29/00 (2023.01) *A61P 37/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0662 (2013.01)
A61K 35/28 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0157746
(22) 출원일자 2023년11월14일
심사청구일자 2023년11월14일

(71) 출원인
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
(72) 발명자
신동명
서울특별시 강동구 고덕로 131, 105동 2904호(암사동, 강동 롯데캐슬퍼스트아파트)
류채민
경기도 남양주시 다산지금로145번길 15, 7306동 1104호 (다산동, 다산 펜테리움 리버테라스Ⅰ)
이승운
서울특별시 중랑구 동일로 752, 108동 1403호(중화동, 중화한신아파트)
(74) 대리인
특허법인지평

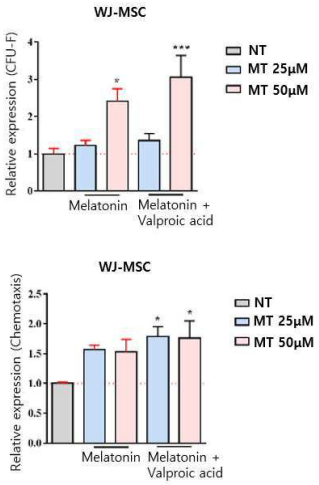
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 **멜라토닌을 포함하는 줄기세포 활성 촉진용 조성물 및 이를 이용한 줄기세포의 프라이밍 기법**

(57) 요 약

본 발명은 멜라토닌으로 프라이밍된 줄기세포의 기능성 증진을 세포 배양 모델에서 자가재생능, 생착률, 항염증, 면역억제능을 포함한 10가지 지표들을 통하여 입증하였다. 본 발명에 따라 프라이밍된 줄기세포는 분자학적 기전으로 cyclic adenosine monophosphate (cAMP) response element-binding protein-1 (CREB1)과 nuclear factor (erythroid-derived-2) like-2 (NRF2)를 포함하는 신호 전달을 통해 글루타치온 (Glutathione; GSH)의 활성이 증진되는 동시에, JAK1-STAT3 신호전달에 의한 PD-L1 단백질 발현이 증가되는 것을 확인하였다. 본 발명에 따라 프라미이된 줄기세포는 줄기세포능이 향상되어, 염증질환, 면역질환 등의 치료에 효과적으로 이용될 수 있다.

대 표 도 - 도1b



(52) CPC특허분류
A61P 29/00 (2023.02)
A61P 37/00 (2018.01)
C12N 2501/825 (2013.01)
C12N 2501/999 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711179439
과제번호 00040242
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 (재단)범부처재생의료기술개발사업단
연구사업명 범부처재생의료기술개발사업
연구과제명 줄기세포 기능성 지표 실시간 분석, 고감도 역가 측정 기술, 단일세포 분석법, 면역모니터링 분석법을 활용한간질성 방광염 타겟 줄기세포 치료제 플랫폼 기술 개발
기 여 율 1/1
과제수행기관명 울산대학교산학협력단
연구기간 2023.01.01 ~ 2023.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

멜라토닌 (Melatonin) 및 히스톤 탈아세틸화 저해제를 유효성분으로 포함하는 줄기세포 활성 촉진용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 히스톤 탈아세틸화 저해제는 발프로익산(valproic acid; VPA), 소듐 뷰티레이트(sodium butyrate; NaB), 니코틴아미드(nicotinamide; NAD) 및 서티놀(sirtinol)로 이루어진 군에서 선택된 적어도 어느 하나인, 줄기세포 활성 촉진용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 히스톤 탈아세틸화 저해제는 발프로익산(valproic acid; VPA)인, 줄기세포 활성 촉진용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

멜라토닌 (Melatonin) 및 히스톤 탈아세틸화 저해제는 2: 2 내지 5의 농도비로 혼합된 것인, 줄기세포 활성 촉진용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 줄기세포는 신경 줄기세포, 간 줄기세포, 조혈 줄기세포, 제대혈 줄기세포, 표피 줄기세포, 위장관 줄기세포, 내피 줄기세포, 근육 줄기세포, 중간엽 줄기세포 및 췌장 줄기세포로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 어느 하나의 세포인, 줄기세포 활성 촉진용 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 줄기세포 활성은 세포 이동성, 콜로니 형성능 및 항-염증 활성인, 줄기세포 활성 촉진용 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제 6항 중 어느 한 항의 조성물로 처리되어 활성이 촉진된 줄기세포.

청구항 8

분리된 줄기세포에 멜라토닌 및 히스톤 탈아세틸화 저해제를 처리하는 단계를 포함하는 줄기세포 활성 촉진 방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 히스톤 탈아세틸화 저해제는 발프로익산(valproic acid; VPA), 소듐 뷰티레이트(sodium butyrate; NaB), 니코틴아미드(nicotinamide; NAD) 및 서티놀(sirtinol)로 이루어진 군에서 선택된 적어도 어느 하나인, 줄기세포 활성 촉진 방법.

청구항 10

제8항에 있어서,

멜라토닌 (Melatonin) 및 히스톤 탈아세틸화 저해제는 2: 2 내지 5의 농도비로 혼합된 것인, 줄기세포 활성 촉진 방법.

청구항 11

멜라토닌 및 히스톤 탈아세틸화 저해제로 처리된 줄기세포 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 염증질환 또는 면역질환의 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 히스톤 탈아세틸화 저해제는 발프로익산(valproic acid; VPA), 소듐 뷰티레이트(sodium butyrate; NaB), 니코틴아미드(nicotinamide; NAD) 및 서티놀(sirtinol)로 이루어진 군에서 선택된 적어도 어느 하나인, 염증질환 또는 면역질환의 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 13

제11항에 있어서,

상기 염증질환 또는 면역질환은 골관절염, 류마티스 관절염(Rheumatoid Arthritis), 방광염, 간질성방광염, 천식(Asthma), 피부염(Dermititis), 아토피, 건선(Psoriasis), 낭섬유증(Cystic Fibrosis), 고형장기 이식 후기 및 만성 거부증(Post transplantation late and chronic solid organ rejection), 이식편대 숙주질환(graft-versus-host disease), 이식거부질환, 다발성 경화증(Multiple Sclerosis), 전신성 홍반성 루 푸스(systemic lupus erythematosus), 쇼그렌 증후군(Sjogren syndrome), 하시모토 갑상선(Hashimoto thyroiditis), 다발성근염(polymyositis), 경피증(scleroderma), 아디슨병(Addison disease), 백반증 (vitiligo), 악성빈혈(pernicious anemia), 사구체신염(glomerulonephritis) 및 폐섬유증(pulmonary fibrosis), 염증성장질환(Inflammatory Bowel Diesese), 크론병(Crohns disease), 자가면역성 당뇨 (Autoimmune Diabetes), 당뇨 망막증(Diabetic retinopathy), 비염(Rhinitis), 허혈-재관류 손상(Ischemia-reperfusion injury), 혈관성형술후 재협착(Post-angioplasty restenosis), 만성 폐색성 심장 질환(Chronic obstructive pulmonary disease; COPD), 그레이브병(Graves disease), 위장관 알러지(Gastrointestinal allergy), 결막염(Conjunctivitis), 죽상경화증(Atherosclerosis), 관상동맥질환(Coronary artery disease), 협심증(Angina), 암 전이, 소동맥 질환 및 미토콘드리아 질환(mitochondrial disease)으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 어느 하나의 질환인, 염증질환 또는 면역질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 줄기세포의 프라이밍 인자로 멜라토닌을 이용하는 경우, 줄기세포의 기능성이 향상됨을 확인하고 본 발명을 완성하였다. 본 발명에서는 멜라토닌 (Melatonin)및 발프로익산 (Valproic acid)의 저농도 혼합(Melatonin and Valproic acid; MT+VPA)을 통하여, 줄기세포의 기능성을 향상시키고, 동시에 안전성을 확보하는 프라이밍 기술을 개발하였다.

배 경 기 술

[0002] 성체중간엽줄기세포(MSC) 기반 줄기세포치료제는 이식 후 면역 반응 및 암 발생이 현저히 감소, 손상부위로 우선적으로 이동, 손상된 세포의 기능적 회복 및 면역조절 기능 등 여러 장점들로 여러 난치성 질환 치료제 개발의 중요 소스로 사용되고 있다.

[0003] 특히 신경계, 혈액계 및 근골격계 재생에 주로 활용되던 줄기세포치료제가 점차 중증 난치성 질환 (천식, 아토피피부염, 배뇨장애질환, 급성 신손상, 당뇨성 합병증, 기관지폐이형성증, 백혈병 등)과 항암치료제로 그 활용성이 확대되고 있으며, 특히 MSC의 면역조절 및 조직재생 촉진 능력에 기반한 당뇨, 류마티스관절염, SLE 등 면

역관련 만성 염증성질환과 이식거부반응에서의 유효성이 제시되고 있다.

[0004] 줄기세포치료제의 치료효능은 이식한 줄기세포가 직접 분화하여 재생을 유도하기 보다는 이식된 줄기세포로 부터 분비되는 특정 인자 즉 secretome에 의한 paracrine 효과에 의한 것이라 알려져 있다. 이식 후 분비된 다양한 secretome 인자들이 손상된 조직의 재생이나 면역세포들의 활성을 조절함으로써 결국 치료효능을 보인다는 것이 밝혀짐에 따라 MSC secretome 단백질의 종류와 기능들을 분석하고 이를 효율적으로 조절하여 활용함으로써 치료효능을 보다 향상시키고자는 연구가 활발하다.

[0005] 그러나, 이식 후 면역반응으로 인한 줄기세포의 낮은 생존율과 줄기세포능(stemness) 소실로 인해 일관성 없고 낮은 치료효능을 나타낸다는 점은 반드시 극복해야 할 문제점이며 또한 실용화 측면에서도 표준화된 줄기세포치료제 생산 프로토콜의 미비, 한정된 배양 능력과 배양 기술과 같은 기술적 한계점이 존재함에 따라 이를 해결할 수 있는 기반연구와 기술 개발이 절실하다.

[0006] 이에 본 발명자들은 임상 진입이 신속하게 가능한 고기능성 융합형 줄기세포 치료제 확보 기술을 개발하고, 단일세포 분석법 기반 고도화된 줄기세포 치료 기술에 대한 치료 유효성 기전 (Mode of Action, MoA) 근거 자료를 확보하여, 중증 난치성 천식 질환의 높은 미충족 의료 수요를 해결하고, 글로벌 시장 진출과 신뢰도를 확보할 수 있는 차세대 줄기세포 치료법을 개발하고자 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상기의 문제점을 해결하고 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서, 본 발명의 목적은 줄기세포의 활성(기능성)을 촉진시킬 수 있는 프라이밍 기법을 제공함에 있다.

[0008] 본 발명에 따르면, 줄기세포의 기능성을 향상시킬 수 있는 화합물의 조합 및 이들의 조합비를 제공함에 목적이 있다.

[0009] 본 발명은 또한, 기능성이 향상된 줄기세포를 이용하여 염증질환, 면역질환의 치료를 위한 줄기세포 치료제, 약학적 조성물을 제공함에 목적이 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 상술한 과제를 해결하기 위해, 본 멜라토닌 (Melatonin) 및 히스톤 탈아세틸화 저해제를 유효성분으로 포함하는 줄기세포 활성 촉진용 조성물을 제공한다.

[0011] 본 발명에서, 상기 히스톤 탈아세틸화 저해제는 발프로익산(valproic acid; VPA), 소듐 뷰티레이트(sodium butyrate; NaB), 니코틴아미드(nicotinamide; NAD) 및 서티놀(sirtinol)을 포함하나, 가장 바람직하게는 발프로익산(valproic acid; VPA)이다.

[0012] 본 발명에서, 멜라토닌 (Melatonin) 및 히스톤 탈아세틸화 저해제(바람직하게는 발프로익산)는 2: 2 내지 5의 농도비로 혼합될 수 있다. 본 발명의 바람직한 일 실시예에 따르면, 멜라토닌 및 발프로익산이 2:5의 농도비로 혼합된다.

[0013] 본 발명에서, 상기 줄기세포는 신경 줄기세포, 간 줄기세포, 조혈 줄기세포, 제대혈 줄기세포, 표피 줄기세포, 위장관 줄기세포, 내피 줄기세포, 근육 줄기세포, 중간엽 줄기세포 및 췌장 줄기세포을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0014] 본 발명에서, 상기 줄기세포 활성은 세포 이동성, 콜로니 형성능 및 항-염증 활성을 포함한다.

[0015] 본 발명은 또한, 상기의 줄기세포 활성 촉진용 조성물로 처리(프라이밍)되어 활성이 촉진된 줄기세포를 제공한다. 본 발명에 따라 활성이 촉진된 줄기세포는 세포 치료제로서 이용 가능하다.

[0016] 본 발명은 또한, 분리된 줄기세포에 멜라토닌 및 히스톤 탈아세틸화 저해제를 처리하는 단계를 포함하는 줄기세포 활성 촉진 방법을 제공한다.

[0017] 본 발명의 다른 일 실시예에서, 멜라토닌 및 히스톤 탈아세틸화 저해제로 처리된 줄기세포 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 염증질환 또는 면역질환의 예방 또는 치료용 약학조성물이 제공된다.

[0018] 본 발명에서, 상기 염증질환 또는 면역질환은 골관절염, 류마티스 관절염(Rheumatoid Arthritis), 방광염, 간질

성방광염, 천식(Asthma), 피부염(Dermititis), 아토피, 건선(Psoriasis), 낭섬유증(Cystic Fibrosis), 고형장기 이식 후기 및 만성 거부증(Post transplantation late and chronic solid organ rejection), 이식편대 숙주 질환(graft-versus-host disease), 이식거부질환, 다발성 경화증(Multiple Sclerosis), 전신성 홍반성 루 푸스(systemic lupus erythematosus), 쇼그렌 증후군(Sjogren syndrome), 하시모토 갑상선(Hashimoto thyroiditis), 다발성근염(polymyositis), 경피증(scleroderma), 아디슨병(Addison disease), 백반증(vitiligo), 악성빈혈(pernicious anemia), 사구체신염(glomerulonephritis) 및 폐섬유증(pulmonary fibrosis), 염증성장질환(Inflammatory Bowel Diesese), 크론병(Crohns disease), 자가면역성 당뇨(Autoimmune Diabetes), 당뇨 망막증(Diabetic retinopathy), 비염(Rhinitis), 허혈-재관류 손상(Ischemia-reperfusion injury), 혈관성형술후 재협착(Post-angioplasty restenosis), 만성 폐색성 심장 질환(Chronic obstructive pulmonary disease; COPD), 그레이브병(Graves disease), 위장관 알러지(Gastrointestinal allergy), 결막염(Conjunctivitis), 죽상경화증(Atherosclerosis), 관상동맥질환(Coronary artery disease), 협심증(Angina), 암 전이, 소동맥 질환 및 미토콘드리아 질환(mitochondrial disease)을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0019] 본 발명은 멜라토닌의 처리 시 줄기세포의 기능성이 촉진됨을 확인하고, 멜라토닌을 이용한 줄기세포의 프라이밍(혹은 촉진) 기법을 제공한다.

[0020] 본 발명은 또한, 줄기세포의 기능성의 촉진을 향상시킬 수 있는 멜라토닌과 발프로익산의 조합을 제공한다.

[0021] 본 발명의 멜라토닌 및 발프로익산은 줄기세포의 자가재생능, 세포 이동능을 향상시킨다. 본 발명에 따라 프라이밍된 줄기세포는 대상체에 투여되어 염증을 완화시키며, 면역반응을 완화시킬 수 있어, 줄기세포 치료제로서 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1a 및 도 1b는 본 발명의 일실시예에 따라 탯줄 유래 MSC (WJ-MSC)에 멜라토닌 또는 멜라토닌+발프로익산 조합을 각각 농도별로 처리한 후 분석한 결과이다. 도 1a 및 도 1b의 상단 이미지는, Colony forming unit을 확인한 결과이며, 하단 이미지는 Chemotaxis(세포 이동능)를 분석한 결과이다.

도 2a 및 도 2b는 본 발명의 일 실시예에 따라 VPA는 0.5mM로 고정하고, MT의 농도를 100 μM 부터 500 μM 까지 다르게 조절하여 처리한 후 자가재생능(CFU-F, 도 2b)과 세포이동능(Chemotaxis, 도 2a)을 측정한 결과이다.

도 3a 내지 도 3d는 WJ-MSC 4종 (#195, #140, #183, #202) 각각의 줄기세포에 MT+VPA를 처리한 후 줄기세포의 자가재생능 (Colony-Forming Unit-Fibroblast; CFU-F)을 분석한 결과이다.

도 4a 내지 도 4d는 WJ-MSC 4종 (#195, #140, #183, #202) 각각의 줄기세포에 MT+VPA를 처리한 후 줄기세포의 이동능(Chemotaxis)을 분석한 결과이다.

도 5는 인간 탯줄 유래 MSC에서 확립한 멜라토닌+발프로익산으로 프라이밍된 MSC 제조법의 범용성 연구를 위하여, 지방 유래 MSC 2 lots(AD-MSC#202, #195)에 멜라토닌, 발프로익산을 함께 처리한 후, 줄기세포의 자가재생능, 세포 이동능을 확인한 결과이다.

도 6은 멜라토닌+발프로익산으로 프라이밍된 MSC의 향상된 줄기세포성을 검증하기 위하여, Glutathione Recovery Capacity Assay를 통해 멜라토닌+발프로익산으로 프라이밍된 MSC의 항산화능을 분석한 결과이다.

도 7a 내지 도 7c는 본 발명의 일 실시예에 따라 멜라토닌+발프로익산으로 프라이밍된 MSC에서 CREB1-NRF2 associated gene pathway 등 다양한 기능에 관여하는 유전자 및 단백질들의 발현을 확인한 결과이다.

도 8a는 멜라토닌+발프로익산으로 프라이밍된 MSC에서 염증관련 사이토카인 TNFa와 IL6의 분비를 확인한 결과이며, 도 8b는 멜라토닌+발프로익산으로 프라이밍된 MSC에서 염증 관련 유전자 발현을 확인한 결과이다.

도 9는 멜라토닌+발프로익산으로 프라이밍된 MSC의 면역억제능을 확인하기 위하여 PBMC (Pheripheral Blood mononuclear cell)에 PHA(phytohemagglutinin)로 자극을 주어 면역반응을 유도한 후 T세포 자극 분석(T cell stimulation assay)을 수행한 결과이다.

도 10은 본 발명의 일 실시예에 따라 멜라토닌+발프로익산으로 프라이밍된 MSC의 혈관재생능 (pro-

angiogenesis)을 확인한 결과이다.

도 11a는 본 발명의 일 실시예에 따라 항산화능과 생착률 증진 MSC를 통한 항천식 치료 효능 평가를 위한 실험 과정의 모식도이다. 도 11의 b 내지 도 11e는 poly IC 유도 천식 동물 모델에 일반 배양한 MSC (N.T.) 및 멜라토닌+발프로익산으로 프라이밍된 MSC를 각각 이식한 후 7일 뒤에 폐 조직 염증 반응과 사이토카인 발현량 변화 (도 11c), 기관지폐포세척액 (bronchoalveolar lavage fluid; BALF) 내의 염증 세포 수와 사이토카인 변화 (도 11b, 도 11d 및 도 11e)를 분석한 결과이다.

도 12a 및 도 12b는 본 발명의 일 실시예에 따라 간질성 방광염 모델을 제작한 후, 줄기세포에 대한 전임상 효능 평가를 방광기능 검사 (Awake cystometry)를 통해 확인한 결과이다.

도 13은 본 발명의 일 실시예에 따라 멜라토닌+발프로익산으로 프라이밍된 MSC 투여에 따른 간질성 방광염 발병 진행 정도를 평가하기 위하여, 방광조직에서 Hematoxylin & Eosin (H&E) staining, Masson-trichrome staining, TB staining을 진행한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다. 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 후술되어 있는 실시 예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 게시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있으며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 게시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다. 명세서 전체에 걸쳐 동일 참조 부호는 동일 구성 요소를 지칭한다.

[0024] 다른 정의가 없다면, 본 명세서에서 사용되는 모든 용어(기술 및 과학적 용어를 포함)는 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 공통적으로 이해될 수 있는 의미로 사용될 수 있을 것이다. 또 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 용어들은 명백하게 특별히 정의되어 있지 않는 한 이상적으로 또는 과도하게 해석되지 않는다. 본 명세서에서 사용된 용어는 실시예들을 설명하기 위한 것이며 본 발명을 제한하고자 하는 것은 아니다. 본 명세서에서, 단수형은 문구에서 특별히 언급하지 않는 한 복수형도 포함한다.

[0025] 본 발명에서는 줄기세포의 기능성을 향상시키기 위한 프라이밍 기법으로서, 멜라토닌과 히스톤 탈아세틸화 저해제의 처리 방법을 제공한다. 본 발명에 따르면, 멜라토닌 및 히스톤 탈아세틸화 저해제의 처리에 따라 줄기세포의 자가재생능, 세포 이동능이 향상된다.

[0026] 본 발명의 줄기세포는 배양 전, 배양 중, 또는 배양 후 멜라토닌, 히스톤 탈아세틸화 저해제 또는 이들을 포함하는 조성물로 처리(treat)될 수 있다.

[0027] 본 명세서에서 사용되는 용어 '줄기세포'는, 자기복제능력을 가지면서 두 개 이상의 세포로 분화하는 능력을 갖는 세포를 말하며, 만능줄기세포(totipotent stem cell), 전분화능 줄기세포(pluripotent stem cell), 다분화능 줄기세포(multipotent stem cell)로 분류할 수 있다.

[0028] 본 발명의 줄기세포는 목적에 따라 적절히 제한 없이 선택될 수 있으며, 인간을 포함한 포유동물, 바람직하게는 인간으로부터 유래된 공지된 모든 조직, 세포 등의 성체 세포로부터 유래할 수 있다. 예를 들어, 골수, 제대혈, 태반(또는 태반 조직세포), 지방(또는 지방조직 세포) 등으로부터 유래할 수 있다.

[0029] 예컨대, 상기 줄기세포는 골수, 지방 조직, 근육 조직, ex vivo 배양된 자기조직 간엽 줄기 세포, 동종 이계 간엽 줄기 세포, 제대혈, 배 난황낭, 태반, 제대, 골막, 태아 및 사춘기 피부, 그리고 혈액으로부터 제한없이 얻어지는 줄기세포일 수 있으며, 태아 또는 출생직후 또는 성인으로부터 유래된 줄기세포일 수 있다.

[0030] 본 발명의 바람직한 실시예에 있어서, 상기 줄기세포는 신경 줄기세포, 간 줄기세포, 조혈 줄기세포, 제대혈 줄기세포, 표피 줄기세포, 위장관 줄기세포, 내피 줄기세포, 근육 줄기세포, 중간엽 줄기세포 및 췌장 줄기세포로 이루어진 군으로부터 선택되며, 보다 바람직하게는 간 줄기세포, 조혈 줄기세포, 제대혈 줄기세포 및 중간엽 줄기세포로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0031] 본 발명에서 상기 '히스톤 탈아세틸화 저해제'는 발프로익산(valproic acid; VPA), 소듐 뷰티레이트(sodium butyrate; NaB), 니코틴아미드(nicotinamide; NAD) 또는 서티놀(sirtinol)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 가장 바람직하게는 발프로익산(valproic acid; 이하 VPA라고도 함)이다.

[0032] 본 발명에서, '멜라토닌(melatonin, 이하 MT라고도 함)'은 뇌의 송과선에서 분비되는 생체 호르몬으로 의학적으로는 불면증 치료에 사용되는 약물이다. 생체내 멜라토닌은 밤과 낮의 길이 등과 같은 광주기를 감지하여 합성

되고, 사람의 수면-각성 리듬과 일상적, 계절적 생체리듬을 조절하며 자연적인 수면을 유도하는 작용을 하는 것으로 알려져있다.

[0033] 본 명세서에서 사용되는 용어 '프라이밍(Priming)'은 줄기세포의 치료 효능을 증진시키기 위하여 반응성(활성)이 향상되는 현상을 의미하며, 본 발명에서는 상기 프라이밍을 유도하는 히스톤 탈아세틸화 저해제 및 프라이밍 인자(priming factor)을 이용하여 해당 줄기세포의 활성을 촉진시킨다.

[0034] 본 발명에 있어서, '줄기세포 활성'은 줄기세포의 세포 이동성, 세포 증식능, 다능성(연골세포, 골세포 또는 지방세포 계통으로의 생체 외 분화), 콜로니 형성능 또는 항-염증 활성 등을 의미한다.

[0035] 본 발명은 멜라토닌 및 히스톤 탈아세틸화 저해제로 처리된 줄기세포 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 염증질환 또는 면역질환의 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.

[0036] 본 발명에서, '배양액'은 생체 외에서 줄기세포 성장 및 생존을 지지할 수 있게 하는 배지, 상기 배지에 포함된 배양된 줄기세포의 분비물 등을 포함한다. 배양에 사용되는 배지는 줄기세포의 배양에 적절한 당 분야에 서 사용되는 통상의 배지를 모두 포함한다. 세포의 종류에 따라 배지와 배양 조건을 선택할 수 있다. 배양에 사 용되는 배지는 바람직하게는 세포 배양 최소 배지(cell culture minimum medium: CCMM)로, 일반적으로 탄소원, 질소원 및 미량원소 성분을 포함한다. 이런 세포 배양 최소 배지에는 예들 들어, DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium), MEM(Minimal essential Medium), BME(Basal Medium Eagle), RPMI1640, F-10, F-12, αMEM(α Minimal essential Medium), GMEM(Glasgow's Minimal essential Medium), Iscove's Modified Dulbecco's Medium 등이 있으나, 이로 제한되지 않는다.

[0037] 또한 상기 배지는 페니실린(penicillin), 스트렙토마이신(streptomycin), 겐타마이신(gentamicin) 등의 항생제를 포함할 수 있다.

[0038] 본 발명에 있어서, '약학 조성물'은 약제학적으로 허용가능한 담체를 함유할 수 있으며, 상기 담체에는 이온 교환 수지, 알루미나, 알루미늄 스테아레이트, 레시틴, 혈청 단백질, 완충 물질, 물, 염, 전해질, 교질성 실리카, 마그네슘 트리실리케이트, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로즈계 기질, 폴리에틸렌 글리콜, 나트륨 카 르복시메틸셀룰로즈, 폴리아릴레이트, 왁스, 폴리에틸렌 글리콜 및 양모지가 포함될 수 있다.

[0039] 본 발명에 있어서, '약학 조성물'은 정맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 구강, 심장내, 골수내, 경막내, 경피, 장관, 피하, 설하 또는 국부 투여용으로 제형화하는 것을 특징으로 할 수 있고, 완충제, 항균성 보존제, 계면활성제, 산화방지제, 긴장성 조정제, 방부제, 증점제 또는 점도 개질제 등의 보조제를 추가로 함유할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 용액, 현탁액, 에멀젼, 겔 또는 분말의 제형으로 제조될 수 있다.

[0040] 본 발명의 약학 조성물의 적합한 투여량은 증상의 경중도, 환자의 체중, 연령, 성, 투여 방식 및 투여시간 등과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 소망하는 치료 또는 예방에 효과적인 투여량을 용이하게 결정할 수 있다.

[0041] 본 발명에서 '환자'는 통상 인간을 포함할 뿐 아니라 다른 동물, 예를 들어 다른 영장류, 설치류, 개, 고양이, 말, 양, 돼지 등을 포함할 수 있다. 본 발명의'환자'는 고형암으로 판정되거나, 의심되는 인간을 대상으로 포함한다(또는 인간을 제외한 대상을 포함한다.).

[0042] 한편, 본 발명은 상기 줄기세포, 이의 분비물, 배지 성분을 모두 포함하는 형태, 분비물 및 배지성분만을 포함하는 형태, 분비물만을 분리하여 단독으로 또는 줄기세포와 함께 사용하는 형태, 또는 줄기세포만을 투여하여 체내에서 분비물을 생성하는 형태로 사용하는 것도 모두 가능하다.

[0043] 상기 줄기세포는 통상적으로 당업계에 공지된 어떠한 방법을 이용하여 획득할 수 있다.

[0044] 본 발명의 히스톤 탈아세틸화 저해제 및 프라이밍 인자(priming factor)로 처리된 줄기세포는 특정 질환의 치료를 위한 세포치료제로 이용될 수 있으며, 상기 처리는 상기 분자들의 직접적인 처리 또는 전-처리일 수 있다.

[0045] 상기 "세포치료제"란, 세포와 조직의 기능을 복원하기 위하여 살아 있는 자가(autologous), 동종(allogenic), 이종(xenogenic) 세포를 체외에서 증식, 선별하거나 여타 방법으로 세포의 생물학적 특성을 변화시키는 등 일련의 행위를 통하여 치료, 진단, 예방 목적으로 사용되는 의약품을 의미한다.

[0046] 상기 세포 치료제는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 인체에 투여될 수 있다.

[0047] 본 발명에서, 상기 염증질환 또는 면역질환은 골관절염, 류마티스 관절염(Rheumatoid Arthritis), 방광염, 간질

성방광염, 천식(Asthma), 피부염(Dermititis), 아토피, 건선(Psoriasis), 낭섬유증 (Cystic Fibrosis), 고형장기 이식 후기 및 만성 거부증(Post transplantation late and chronic solid organ rejection), 이식편대숙주질환(graft-versus-host disease), 이식거부질환, 다발성 경화증(Multiple Sclerosis), 전신성 홍반성 루푸스(systemic lupus erythematosus), 쇼그렌 증후군(Sjogren syndrome), 하시모토 갑상선(Hashimoto thyroiditis), 다발성근염(polymyositis), 경피증(scleroderma), 아디슨병(Addison disease), 백반증(vitiligo), 악성빈혈(pernicious anemia), 사구체신염(glomerulonephritis) 및 폐섬유증 (pulmonary fibrosis), 염증성장질환(Inflammatory Bowel Diesese), 크론 병(Crohns disease), 자가면역성 당뇨(Autoimmune Diabetes), 당뇨 망막증(Diabetic retinopathy), 비염(Rhinitis), 허혈-재관류 손상(Ischemia-reperfusion injury), 혈관성형술후 재협착(Post-angioplasty restenosis), 만성 폐색성 심장 질환(Chronic obstructive pulmonary disease; COPD), 그레이브병(Graves disease), 위장관 알러지(Gastrointestinal allergy), 결막염(Conjunctivitis), 죽상경화증(Atherosclerosis), 관상동맥질환(Coronary artery disease), 협심증(Angina), 암 전이, 소동맥 질환 또는 미토콘드리아 질환(mitochondrial disease)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0049] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다.

실 시 예 1

[0050] **실험방법**

[0051] **1-1. 연구 승인**

[0052] 모든 동물 실험들은 울산대학교 의과대학의 동물실험윤리위원회로부터 승인받았다(IACUC-2020-12-141). 서울아산병원의 인체실험윤리위원회에서 승인한 가이드라인(IRB#: 2015-0303)에 따라 부모의 서면 동의를 얻은 후, 건강하고, 정상적이며, 만삭인 출생아로부터 인간 탯줄(umbilical cord; UC) 및 지방 샘플을 얻었다. UC 수집 전, 모든 임산부로부터 사전 동의를 얻었다.

[0054] **1-2. 세포 배양 및 MSCs의 시험관 내(in vitro) 특성 분석**

[0055] 10% 열 불활화된 우태아혈청(fetal bovine serum; FBS), 5 ng/ml 인간 상피 성장인자(Sigma-Aldrich), 10 ng/ml basic FGF 및 50 ng/ml long-R3 인슐린 유사 성장인자-1(ProSpec, Rehovot, Israel)을 포함하는 저농도 글루코스 DMEM에서, 인간 UC MSCs (UC-MSCs)을 배양하였다. 인간 지방 조직 유래 MSCs(adipose tissue derived MSCs; AD-MSCs)는 이전에 보고된 대로 확립하였고, UC-MSCs와 동일한 과정으로 유지시켰다. 본 발명에 사용된 모든 MSCs는 기능성을 확보하기 위해서 7 계대 이하로 확장시켰고, 37℃에서 5% CO2의 습윤 대기에서 유지시켰다. 세포 증식, 자가-재생을 위한 콜로니 형성 유닛(CFU)-섬유아세포, 혈소판-유래 성장 인자에 반응하는 트랜스-웰 이동(10 ng/mL PDGF-AA, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), 마트리젤 관-형성 분석을 통한 혈관형성능, 시험관 내(In vitro) 항-염증, 면역 조절 분석을 통한 동종 자극에 반응하는 억제 특성을 포함하는 시험관 내(In vitro) MSCs 세포 활성 분석은 이전에 보고된 대로 수행하였다. MSCs의 핵심 기능은 Image Pro 5.0 software (Media-Cybernetics, Rockville, MD, USA)를 이용하여 디지털 이미지 분석을 통해 정량화하였다. FACS 데이터 분석은 FlowJo software 7.6.5 (FlowJo, LLC, Ashland, OR, USA)를 사용하여 수행하였다.

[0057] **1-3. 살아있는 MSCs에서 GRC의 실시간 관측**

[0058] 다양한 배양 조건하에서 살아있는 모든 단일 세포의 GSH 변화를 실시간 추적하기 위해서, 본 발명자들은 X200 또는 X400 배율을 가진 Operetta High-Content Imaging System (HH12000000; PerkinElmer, Waltham, MA, USA)를 사용하여, GRC 분석을 수행하였다. 상기 GRC 분석은 살아있는 MSCs에서 GSH 동역학의 정성 및 정량 분석을 위해 비-파괴, 통합 및 이미지 기반 고처리 분석으로 수행되었다. GRC 분석은 GSH에 대한 가역적 화학 프로브인, FreSHtracer (Fluorescent real-time thiol tracer; Cell2in, Inc., Seoul, Korea)의 독특한 특성을 기반으로 하여 수행되었다. GSH와의 반응에서, FreSHtracer는 520 nm부터 430 nm까지 자외선-가시광선 흡광도의 λmax 스펙트럼 이동을 나타냈는데, 이는 580 nm (F580, λex 520 nm)에서의 형광 방출 세기는 감소하는 것으로 나타났고, 510 nm (F510, λex 430 nm)에서의 형광 세기는 증가하는 것으로 나타났다. FreSHtrace의 형광 비율

(fluorescence ratio; FR) 수치를 얻기 위해서, 430 및 520 nm에서 여기되는 형광 방출을 510 및 580 nm에서 각각 검출하였다. 상기 FreSHtrace의 형광 신호는 공초점 모드를 가진 Harmony High-Content Imaging and Analysis Software 3.1 (PerkinElmer)를 사용하여 분석하였다.

[0060] **1-4. 유전자 발현 및 웨스턴 블랏팅 분석**

[0061] 표시된 유전자들의 전사체에 대한 정량적 측정은 이전에 보고된 대로 50 ng의 총 RNA를 사용하여 수행하였다. 상기 유전자들의 상대 발현 수준은 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 방법을 사용하여 측정하였고, GAPDH는 내재성 대조군 유전자로서 사용되었다.

[0062] 웨스턴 블랏 분석을 위해, RIPA lysis buffer (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)로, 세포 추출물(30 ㎍)을 제조하였고, SDS-PAGE 젤 상에서 분리하였다. 표시된 단백질들의 발현 수준은 특정 항체들을 프로브로 하여 측정하였다. 표시된 단백질들에 대한 신호 밀도는 NIH Image J software를 사용하여 측정하고 정량화하였다.

[0064] **1-5. 통계적 분석**

[0065] 데이터는 Bonferroni post-hoc test와 함께, non-parametric Mann-Whitney test 또는 ANOVA (one- or two-way)를 사용하여 통계적으로 분석하였다. 모든 분석은 GraphPad Prism 7.0 software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA)를 사용하여 수행하였다. $p < 0.05$는 통계적으로 유의성이 있다고 판단하였다.

[0067] **1-6. LPS (Lipopolysaccharide) 유도 간질성방광염 (Interstitial cystitis, IC) 동물 모델 및 MT+VPA MSCs의 투여**

[0068] 모든 동물실험은 울산대학교 의과대학의 실험동물 운영위원회(Institutional Animal Care and Use Committee)의 승인을 받아 진행되었다(IACUC-2019-12-129). LPS-induced IC 랫트 모델에 LPS주입은 기존에 기재된 바대로 수행되었다. LPS-IC 동물 모델을 만들기 위하여, 8주의 암컷 Sprague-Dawley rats (OrientBio, Gapyong, Gyeonggi-do, Korea)에 매주 1회 PS+LPS 투여를 5주 동안 실시하여, IC를 유발시킨 질환 모델을 활용하여, M-MSC 줄기세포 치료 효능을 확인하였다. PS+LPS 투여가 이루어지고 5주 후에 복부 절개가 이루어졌고, PBS 비히클 또는 MT+VPA primed MSC는 기존에 보고된대로 500 μm 주사기와 26-게이지 바늘을 이용하여 방광의 전방벽과 원개(dome)의 점막하층으로 직접 주입되었다. MSCs 투여 1주일 후, 비마취 및 미제한 방광내압측정법(각성 방광내압측정) 및 조직학적 염색을 통하여, 각각 방광 배뇨 기능 및 조직 손상을 측정하였다.

[0070] **1-7. 어웨이크 방광내압측정법(awake cystometry)에 의한 방광내압측정도(cystometrogram)**

[0071] 방광내압측정도는 대사 케이지에 있는 마취되지 않고 억압되지 않은 랫트에서 수행되었다. 방광내압(intravesical pressure; IVP) 및 복강내압(intraabdominal pressure; IAP)의 기록을 위해서 기존의 보고대로 동시의 도뇨(catheterization)가 방광내압측정 전 3일 동안 수행되었다. 방광은 압력변환기(Research Grade Blood Pressure Transducer; Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA)와 미세주입펌프(microinjection pump, PHD22/2000 pump; Harvard Apparatus)에 연결된 부풀어지는 PE-50 카테터(Clay Adams, Parsippany, NJ)를 사용하여 접근되었다. 배뇨 부피(micturition volume; MV)는 물리적 변위변환기(Research Grade Isometric Transducer; Harvard Apparatus)에 연결된 체액집합관에 의해 계속적으로 기록되었고, 이때 멸균된 식염수는 0.4 ml/min 정도로 방광으로 주입되었다. IVP, IAP 및 MV는 50 Hz의 샘플링 레이트로 Acq Knowledge 3.8.1 software와 MP150 data acquisition system(Biopac Systems, Goleta, CA, USA)을 사용하여 계속적으로 기록되었다. 각 그룹에 5 마리의 동물을 사용하여 3번 반복된 배뇨로부터 평균값을 계산하였다(n= 5). NVC(Non-voiding contraction)는 IVP의 증가가 배뇨없이 기준치로부터 2cmH2O를 초과할 때부터 계산되었다. BP(bladder basal pressure)는 방광이 채워지는 동안의 가장 낮은 방광압이며, MP(micturition pressure)는 배뇨 주기 동안 최대 방광압이고, MV(micturition volume)은 배뇨되는 뇨의 부피이며, RV(residual volume)은 배뇨 후 잔존하는 뇨의 부피이다. BC(bladder capacity)는 MV와 RV를 합한 값이며, MI(micturition interval)은 배뇨 수축 사이의 간격을 말한다.

[0073] 1-8. Thelper (Th) type 2 반응 유도 천식 동물 모델 및 MT+VPA MSCs의 투여

[0074] 모든 동물실험은 울산대학교 의과대학의 동물실험 윤리위원회(IACUC-2015-12-061)에 의해 승인을 받았으며, 천식 마우스 모델을 제작하기 위해, 6주령의 BALB/c 마우스(오리엔트바이오, 가평, 경기도, 한국)를 사용하였다.

[0075] 0, 7 일 째에 2 mg Alum(Thermo, #77161, USA)로 복강 내 투여로 감작했고, 14, 15, 16, 21, 22, 23 일째에 50 μg OVA(Sigma, #A5503, USA)로 마취 후, 비강 내 투여로 challenge 하여 장애를 일으켰다. 상기 마우스는 17일째에 정맥 주사를 통하여 1.0X105개의 Navie MSC와 MT+VPA MSCs를 주입하였다. 마지막 면역화 후 24 시간 경과한 마우스로부터 BALF, 림프절, 및 폐조직을 수득하였다. 모노사이트, 호염기성구, 호중성구, 및 림프구의 수와 BALF와 폐조직에서 사이토카인 발현 변화는 종래에 기술한 바대로 측정하였다. 조직병리평가를 위해서, 폐에 대하여 오른쪽 심실을 통해서 5 ml PBS를 관류시키고 기관지를 통하여 1 ml PBS를 투입팽창시켰다. 상기 투입팽창시킨 폐는 10% 중성 완충 포르말린 용액에서 24 시간 동안 담금으로써 고정하였다. 상기 고정된 폐조직을 파라핀에 포매시키고 4μm 두께로 절편화하여 기관지 및 혈관 주위 영역에서 염증의 크기를 헤마토실린 및 에오신 염색으로 시험하였다. 주입한 MSC의 생착은 인간 β2-마이크로글로불린(ab15976; Abcam, USA)의 면역형광분석으로 결정하였고, FITC-표지된 이차 항체를 사용하여 시각화하였다. 핵은 4'-6-다이아미노-2-페닐인돌(DAPI; Sigam, USA)를 사용하여 상대적으로 염색하였다.

실 시 예 2

[0077] 줄기세포 기능고도화 핵심 기술 확립과 in vitro 및 in vivo 유효성 평가

[0078] 2-1. MSC 항산화능과 생착률 증진을 위한 저분자 화합물 발굴

[0079] 본 발명자들은 기확보하고 있는 MSC 기능 고도화를 위한 다양한 프라이밍(priming) 인자 중, 최적의 저분자 화합물 조합을 발굴하기 위하여, 멜라토닌(Melatonin, 이하 MT)과 앞서 발굴한 발프로익산(Valproic acid, 이하 VPA)의 조합(combination) 처리(treat)한 후 효능평가를 실시하였다.

[0080] 단일 공정 다기능성 MSC 확보를 위한 MT, VPA의 최적 혼합 조성을 확립하기 위하여, 항산화능 증진 배양액 조성물 (MT) 처리 조건을 탯줄 유래 MSC (WJ-MSC)에 농도별로 처리한 후 분석한 결과, MT를 세포에 단독으로 처리했을 때보다 MT+VPA 조합(combination)을 처리(treat) 했을 때, Colony forming unit (Self-renewal activity)가 용량 의존적으로(dose dependent) 증가하였고, Chemotaxis (cell migration activity)에서는 MT 25 μM 보다는 50 μM을 처리하였을 때 증가하는 결과가 나타났다. 따라서, MT+VPA 조합의 처리는 줄기세포의 기능강화 증진을 위한 후보 물질임을 알 수 있다. (도 1a 및 도 1b 참조)

[0081] 치료제로서 개발하기 위해서 최적의 시약 처리조건 (시간, 농도 등)을 확보하는 것이 중요하므로, 이하에서는 화합물을 따로 또는 함께 MSC에 처리하여 줄기세포의 기능을 평가하였다.

[0083] 2-2. 멜라토닌(MT), 발프로익산(VPA) 조합 처리 조건 확인

[0084] MT 및 VPA 조합(combination) 처리하였을 때 가장 극대화된 효과를 나타내는 조건을 찾기 위하여, VPA는 0.5mM로 고정하고, MT의 농도를 100 μM 부터 500 μM 까지 다르게 조절하여 처리한 후 자가재생능(CFU-F)과 세포이동능(Chemotaxis)을 측정하였다 (도 2a 및 도 2b).

[0085] 도 2a 및 도 2b를 참조하면, 최적의 MT+VPA 조합(combination) 처리(treat) 조건은 MT 200 μM, VPA 0.5mM임을 확인할 수 있다. 즉, MT와 VPA는 약 2:5의 비율로 처리되어야 세포의 활성이 가장 효과적으로 증가함을 확인할 수 있다.

[0087] 2-3. 멜라토닌(MT), 발프로익산(VPA) 조합 처리에 따른 줄기세포의 자가재생능 및 세포 이동능 확인

[0088] 본 실시예에서는 줄기세포 종류에 따라 MT+VPA을 처리한 후, 자가재생능과 세포의 이동능을 확인하였다. 도 3a 내지 도 3d 및 도 4a 내지 도 4d를 참조하면, WJ-MSC 4종 (#195, #140, #183, #202)에서 모두 MT+VPA 프라이밍(priming)에 의한 자가재생능 (Colony-Forming Unit-Fibroblast; CFU-F), 세포의 이동능(Chemotaxis)이 유의하

게 증가하는 것을 확인할 수 있다.

[0089] 또한, 인간 탯줄 유래 MSC에서 확립한 MT+VPA-MSC 제조법의 범용성 연구를 위하여, 서울아산병원 줄기세포센터로부터 임상 연구 수준의 지방 유래 MSC 2 lots (AD-MSC#202, #195)을 제공받아 MT, VPA를 함께 처리하였을 때, AD-MSC에서도 줄기세포의 자가재생능, 세포 이동능이 증가하는 것을 확인함으로써 MT+VPA MSC의 개발이 특정 세포군에 국한되지 않고 범용적으로 활용이 가능함을 확인하였다 (도 5 참조).

[0091] **2-3. 멜라토닌(MT), 발프로익산(VPA) 조합 처리에 따른 줄기세포성 향상 여부 확인**

[0092] MT+VPA 조합 처리에 따른 MSC의 향상된 줄기세포성을 검증하기 위하여 MSC의 기능유지에 중요한 지표가 되는 실험들을 수행하였다.

[0093] 첫번째로, ROS에 의한 저항성을 의미하는 대표적인 항산화 지표인 글루타티온(GSH)의 회복능을 실시간으로 측정할 수 있는 Glutathione Recovery Capacity Assay를 진행하였다. 해당 결과는 도 6에 나타나있으며, 도 6을 참조하면, MT+VPA 처리된 MSC가 Naive MSC (도 6에서 NT)에 비하여 높은 항산화도를 지니고 있다는 것을 확인할 수 있다.

[0094] 또한 기존 CREB1-NRF2 associated gene pathway 등 다양한 기능에 관여하는 유전자 및 단백질들의 발현을 비교분석한 결과 (도 7a 내지 도 7c), 대부분의 유전자 및 단백질 발현이 MT+VPA 처리된 MSC에서 증가하였다. 따라서, MT+VPA MSC가 Naive MSC에 비하여 치료능이 우수한 줄기세포임을 예상할 수 있다.

[0095] 즉, 본 실시예에 따르면, MT+VPA 조합은 줄기세포에서 ROS에 대한 저항성을 향상시키는 등, 줄기세포성을 향상시킬 수 있음을 알 수 있다.

[0097] **2-4. 멜라토닌(MT), 발프로익산(VPA) 조합 처리에 따른 줄기세포의 항 염증반응 확인**

[0098] MT+VPA MSC의 항-염증반응 (Anti-inflammation)을 측정한 결과, 대표적 염증관련 cytokine인 TNFa와 IL6의 분비가 감소되었으며 (도 8a), mTNF, mCCL2, mCCL7, mIL1-β, mIL6, mIL18 등 유전자 발현 또한 감소되었음을 확인하였다(도 8b).

[0100] **2-5. 멜라토닌(MT), 발프로익산(VPA) 조합 처리에 따른 줄기세포의 면역 억제능 확인**

[0101] 본 실시예에서는 MT+VPA 처리된 MSC의 면역억제능을 확인하기 위하여 PBMC (Pheripheral Blood mononuclear cell)에 PHA(phytohemagglutinin)로 자극을 주어 면역반응을 유도한 후 MSC의 억제능을 평가하는 T cell stimulation assay를 진행하였다. 도 9를 참조하면 MT+VPA의 처리 시 줄기세포에 우수한 면역억제능을 유도할 수 있음을 알 수 있다.

[0102] 또한, 도 10를 참조하면, MT+VPA 처리된 MSC의 혈관재생능 (pro-angiogenesis) 역시 안정적으로 증진되는 것을 확인할 수 있다.

실 시 예 3

[0104] **항산화능과 생착률 증진 MSC를 통한 항천식 치료 효능 평가**

[0105] 본 실시예에서는 MT+VPA 프라이밍(priming) MSC 기능 고도화의 in vivo 유효성 평가를 위하여, poly IC 유도 천식 동물 모델(OVA-induced)에 일반 배양한 MSC (N.T.)와 MT+VPA primed MSC를 이식한 후 7일 뒤에 폐 조직 염증 반응과 사이토 카인 발현량 변화, 기관지폐포세척액 (bronchoalveolar lavage fluid; BALF) 내의 염증 세포 수와 사이토카인 변화 등을 조사하였다 (도 11a 내지 도 11e).

[0106] 도 11b 내지 도 11e를 참조하면, MT+VPA 프라이밍(priming) MSC를 주입한 그룹의 개체에서 폐조직의 염증 반응과 염증성 사이토카인의 발현, BALF 내의 염증 세포 침윤 정도가 효과적으로 억제된 것을 확인할 수 있다.

[0107] MT+VPA MSC의 증진된 항천식 치료 효과의 기전을 연구한 결과 N.T. MSC를 이식한 그룹과 비교하여 MT+VPA primed MSC를 이식한 개체의 폐 조직에서 높은 생착률을 보이며, 생착된 세포 (human b2 microglobin; hB2M+)

는 type II alveolar (SFPTC+) 주변 세포 (SPFTC-)로 존재함을 확인할 수 있다.

실 시 예 4

[0109] **항산화능과 생착률 증진 MSC를 통한 LPS 유도 간질성방광염 치료 효능 평가**

[0110] 본 발명자들은 또한, protamine sulfate (PS)와 lipopolysacchariedㅣ (LPS)를 일주일에 한 번씩 5주동안 방광내에 주입하여 임상 표현형을 대변하는 간질성 방광염 랫 모델을 만들고 줄기세포에 대한 전임상 효능 평가를 방광기능 검사 (Awake cystometry)를 통해 확인하였다.

[0111] 본 실험에 따른 결과 도 12a 및 도 12b를 참조하면, LPS 투여 그룹 개체에서는 배뇨간격 (micturition interval, MI), 잔뇨량 (residual volumne, RV), 방광용적 (bladder capacity, BC)의 현저한 감소와 배뇨압 (micturition press, MP)이 증가되는 것을 확인함. MT+VPA 프라이밍 MSC 단회 투여로 LPS 모델에서 방광 기능 이상이 호전되는 것을 확인하여 간질성 방광염 질환 모델에 대한 줄기세포 전임상 효능을 확인할 수 있다.

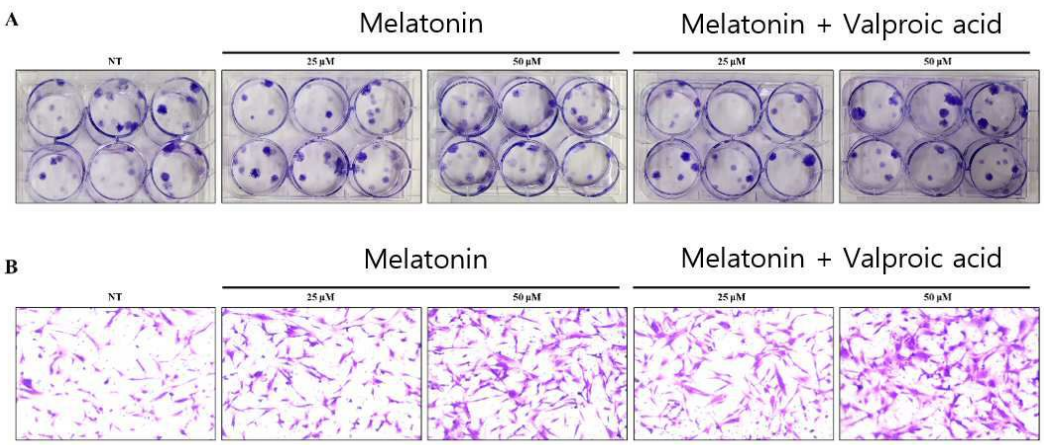
[0112] 또한, 본 실험에서는 간질성 방광염 발병 진행 정도를 평가하기 위하여, 방광조직에서 Hematoxylin & Eosin (H&E) staining, Masson-trichrome staining, TB staining을 실시한 결과, 도 13과 같이, LPS 유도 간질성 방광염 모델에서 심각한 염증 및 비만세포가 증가되어 있으며, 이러한 병리학적 소견들은 줄기세포 투여에 의하여 효과적으로 억제되는 것을 확인하였다.

[0114] 종합적으로, 멜라토닌(MT) 및 발프로익산(VPA) 조합의 처리는 줄기세포의 활성을 향상시켜, 줄기세포의 생착률을 증진시킬 뿐 아니라, 항염 및 항산화 등의 효과를 나타낸다는 것을 알 수 있다. 따라서, 줄기세포의 기능성을 향상시키고, 동시에 안전성을 확보하기 위한 프라이밍 기술로 멜라토닌(MT) 및 발프로익산(VPA)을 이용할 수 있다.

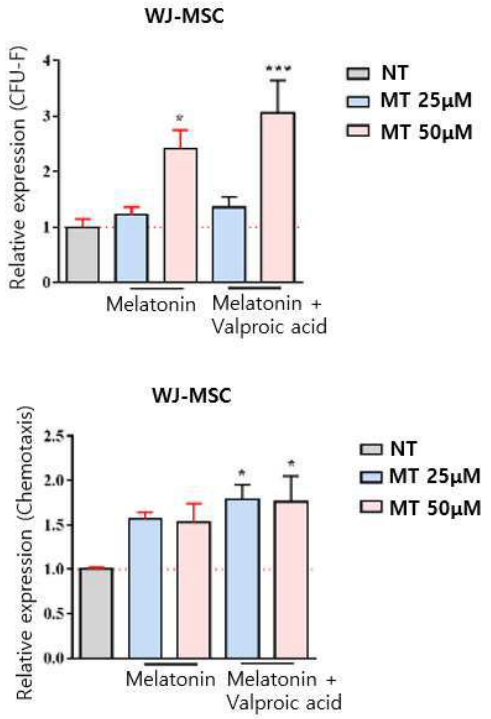
[0116] 상기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 상기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

도면

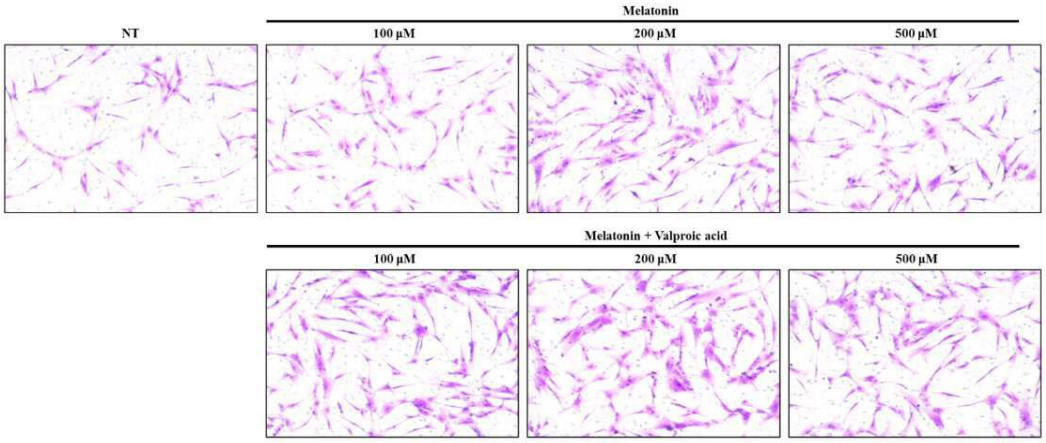
도면1a



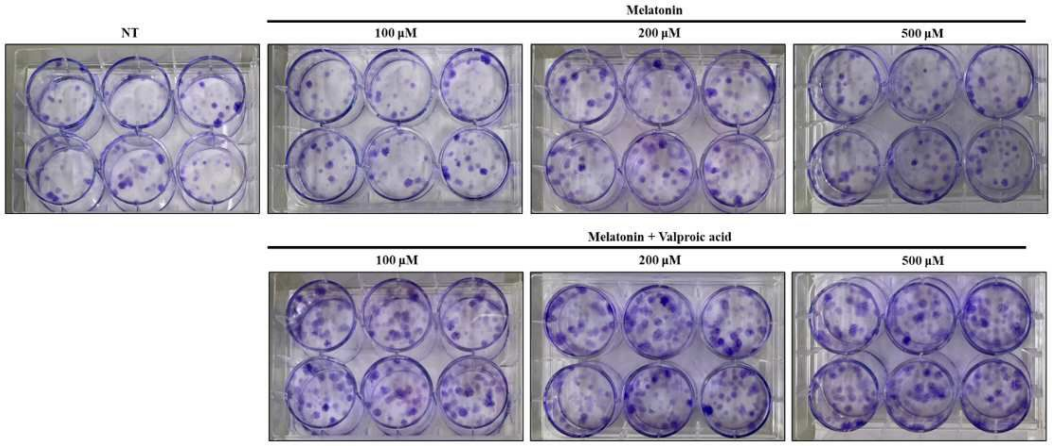
도면1b


WJ-MSC
Relative expression (CFU-F)
NT
MT 25μM
MT 50μM
Melatonin
Melatonin +
Valproic acid
WJ-MSC
Relative expression (Chemotaxis)
NT
MT 25μM
MT 50μM
Melatonin
Melatonin +
Valproic acid

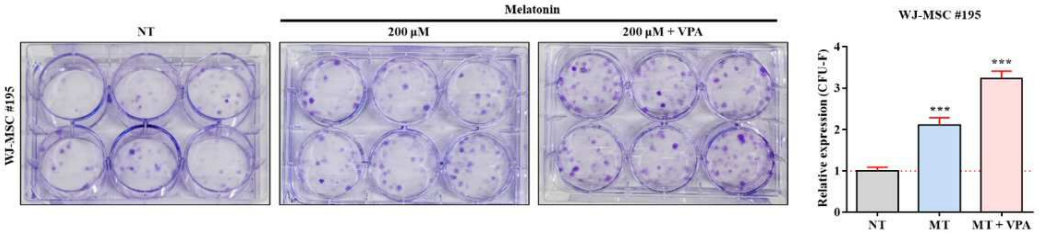
도면2a


Melatonin
NT
100 μM
200 μM
500 μM
Melatonin + Valproic acid
100 μM
200 μM
500 μM

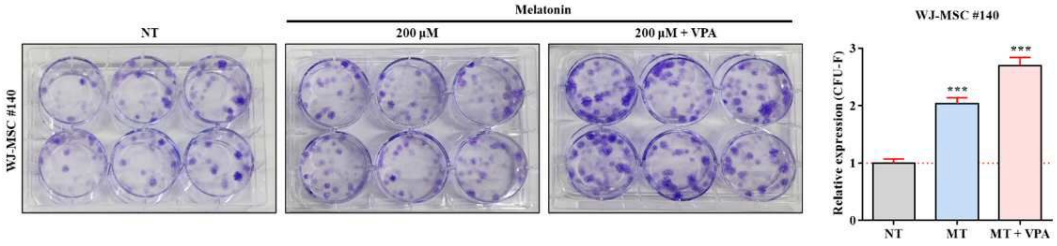
도면2b



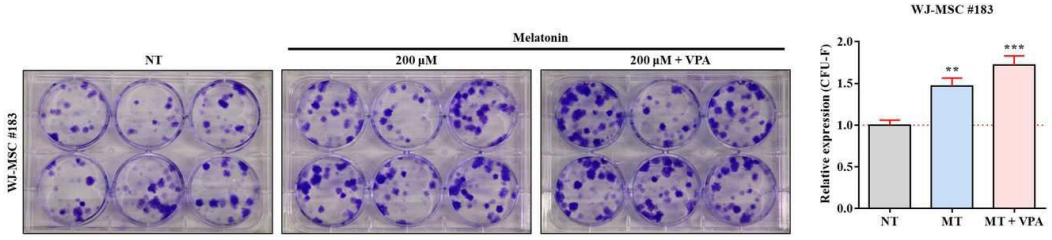
도면3a



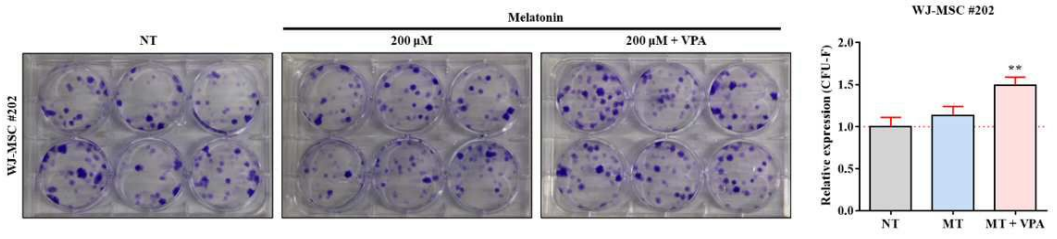
도면3b



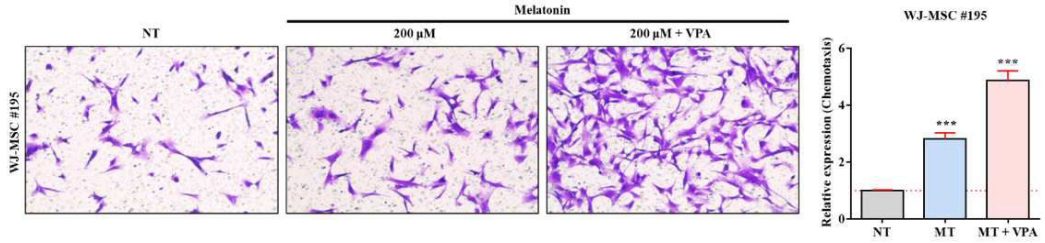
도면3c



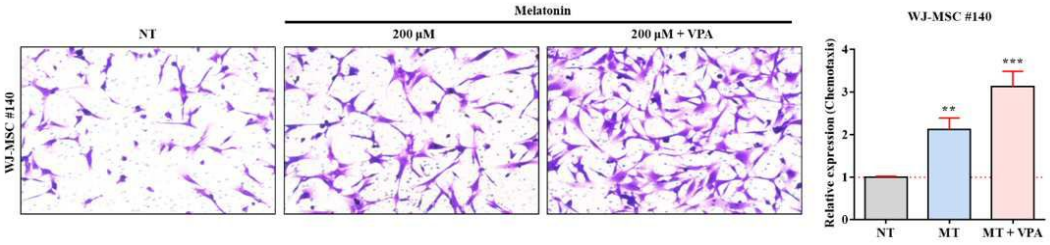
도면3d



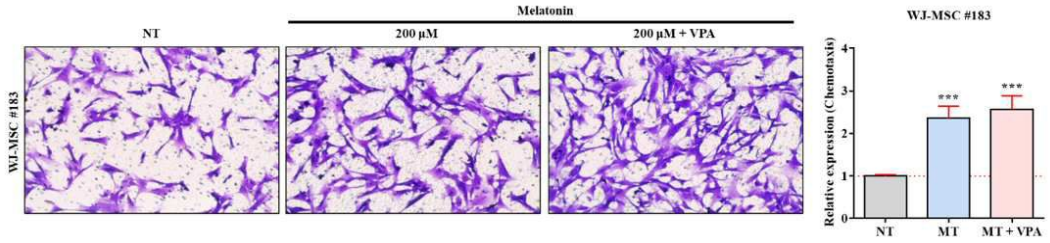
도면4a



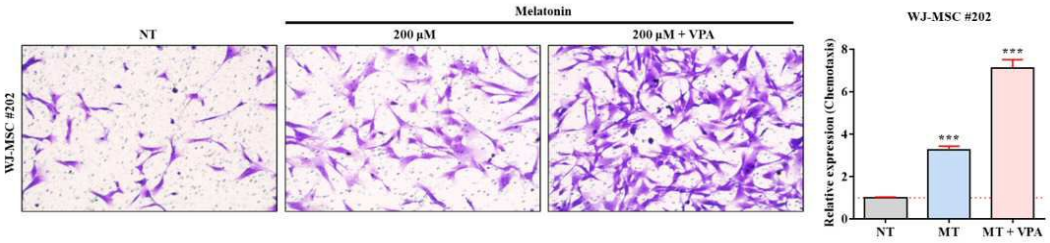
도면4b



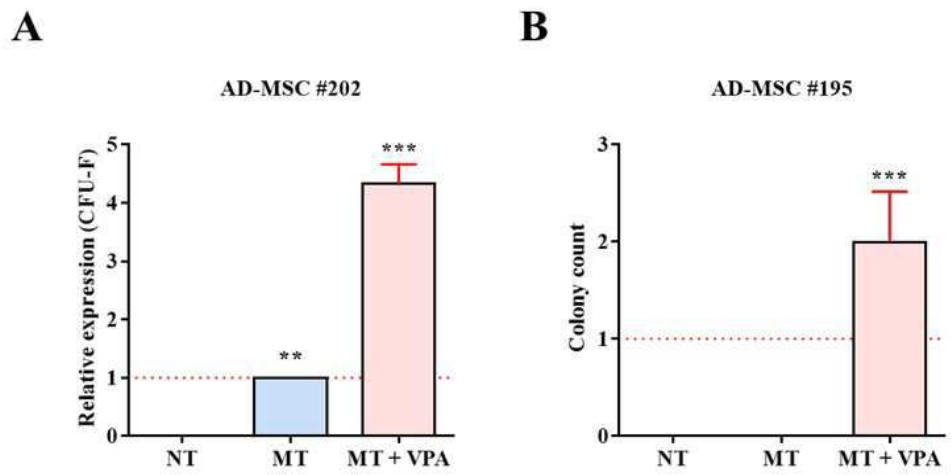
도면4c



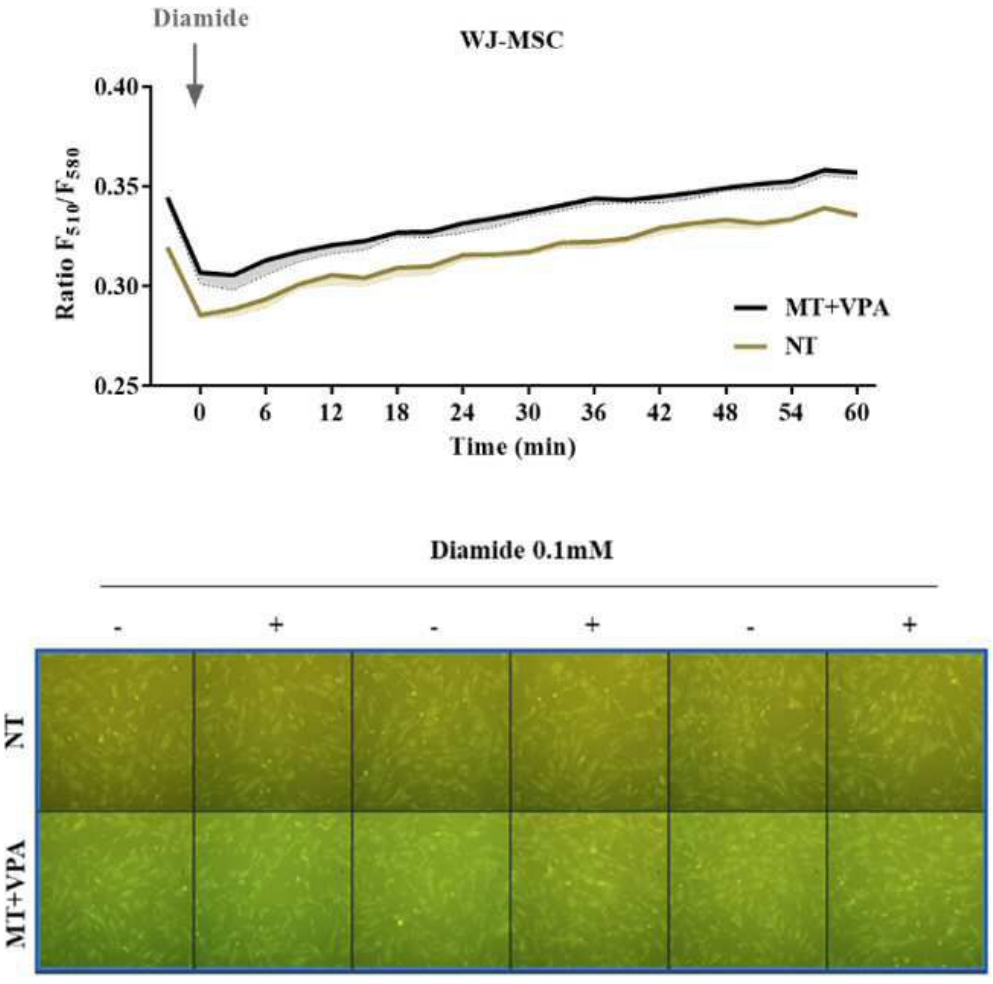
도면4d



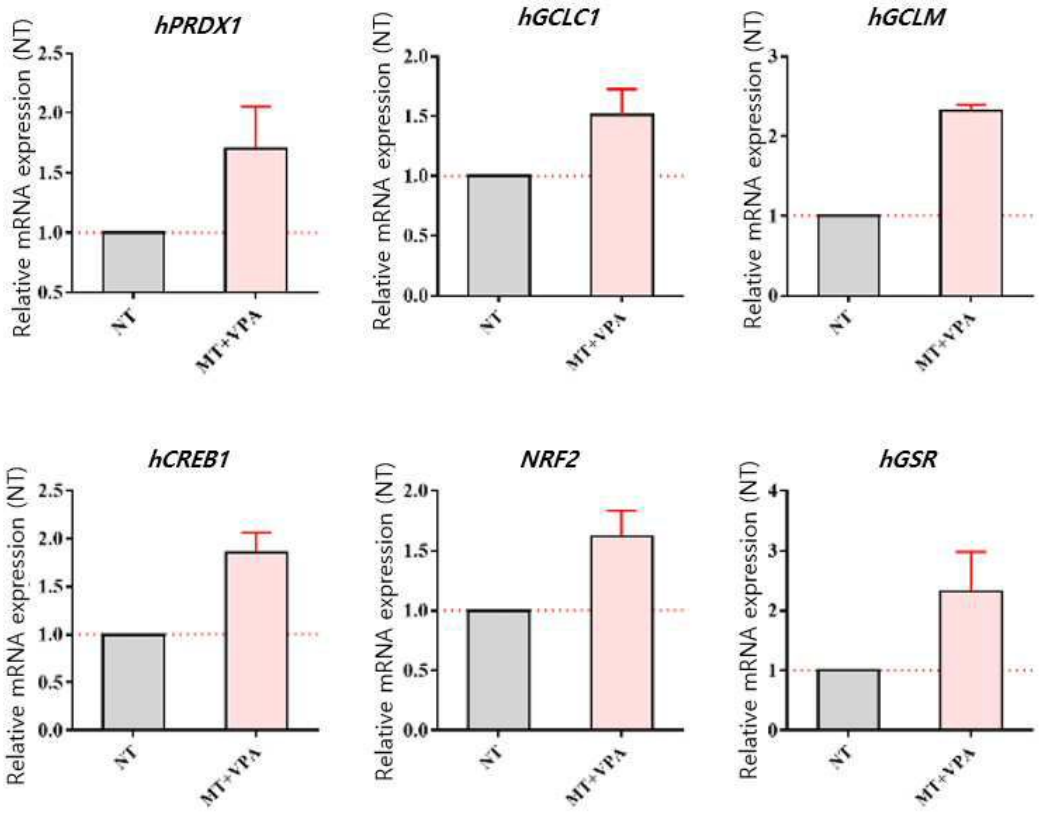
도면5


A
AD-MSC #202
Relative expression (CFU-F)
0
1
2
3
4
5
**
***
NT
MT
MT + VPA
B
AD-MSC #195
Colony count
0
1
2
3
***
NT
MT
MT + VPA

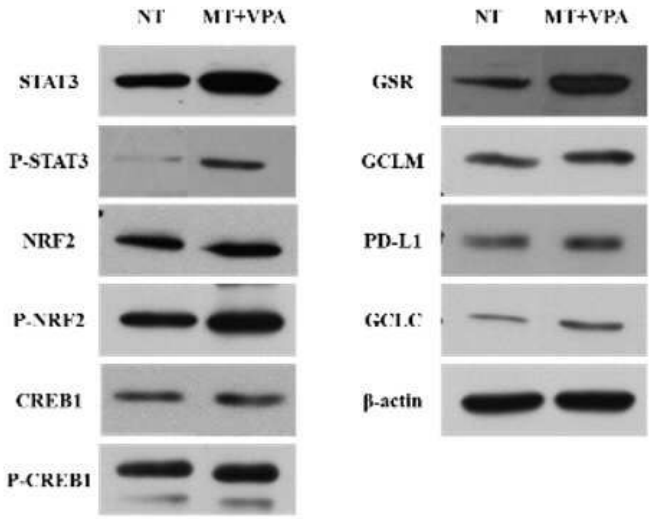
도면6


Diamide
WJ-MSC
Ratio F510/F580
0.25
0.30
0.35
0.40
0
6
12
18
24
30
36
42
48
54
60
Time (min)
MT+VPA
NT
Diamide 0.1mM
-
+
-
+
-
+
NT
MT+VPA

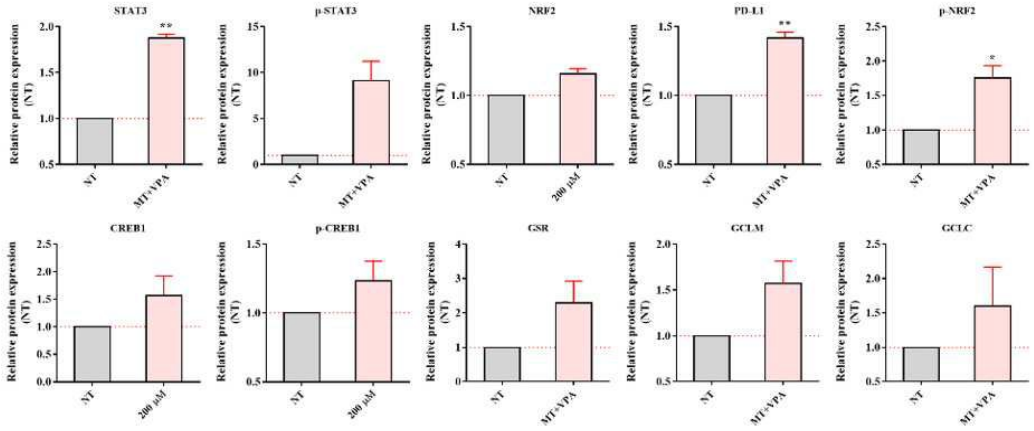
도면7a


hPRDX1
hGCLC1
hGCLM
hCREB1
NRF2
hGSR
Relative mRNA expression (NT)
NT
MT+VPA

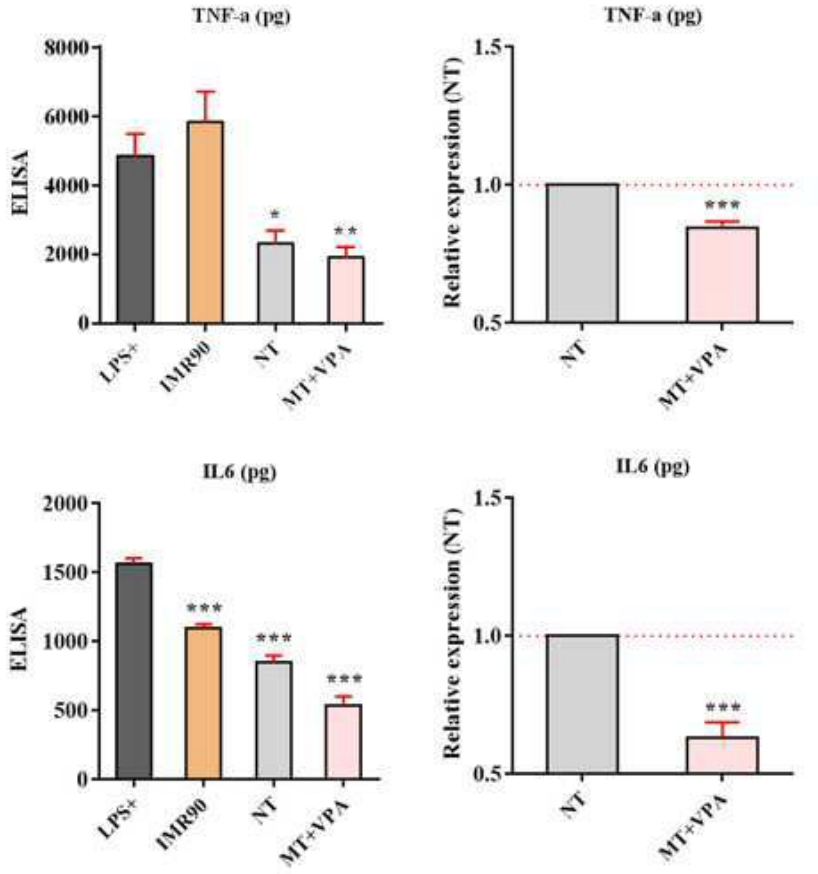
도면7b


NT
MT+VPA
STAT3
P-STAT3
NRF2
P-NRF2
CREB1
P-CREB1
GSR
GCLM
PD-L1
GCLC
β-actin

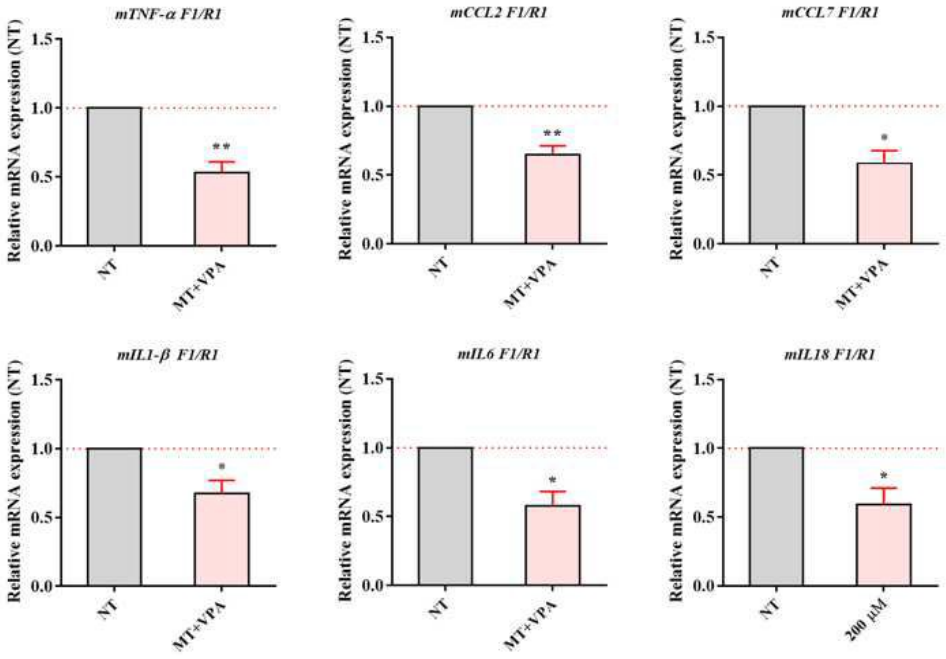
도면7c


STAT3
p-STAT3
NRF2
PD-L1
p-NRF2
CREB1
p-CREB1
GSR
GCLM
GCLC
Relative protein expression (NT)
NT
MT+VPA
200 μM

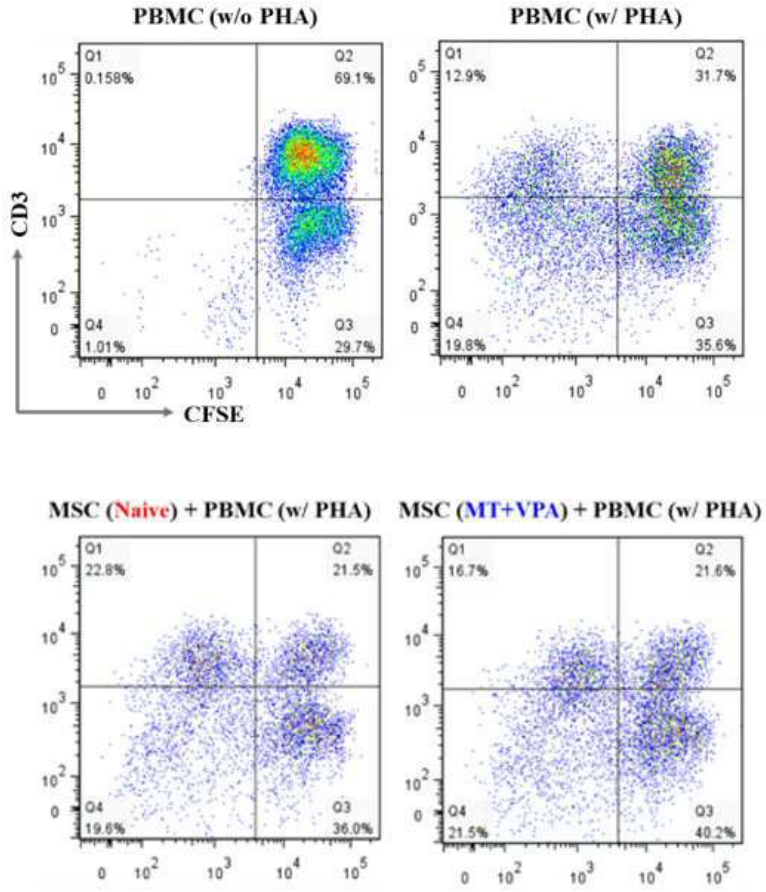
도면8a


TNF-a (pg)
ELISA
LPS+
IMR90
NT
MT+VPA
Relative expression (NT)
IL6 (pg)

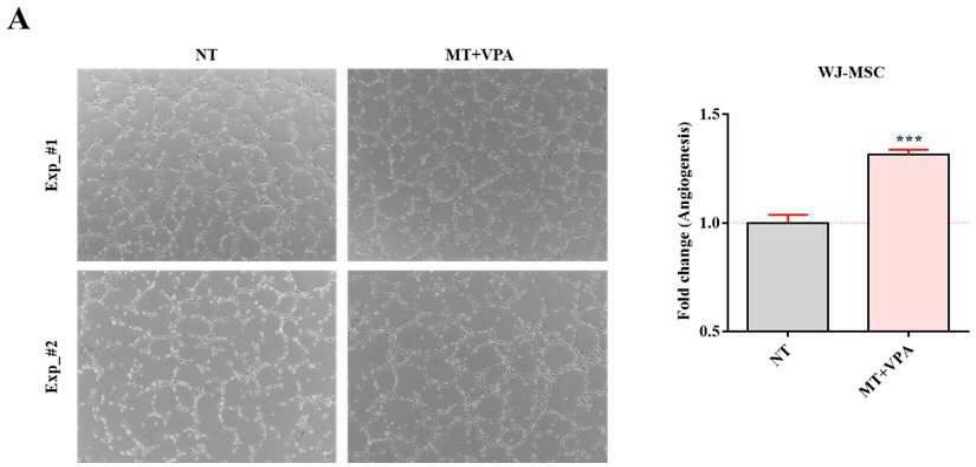
도면8b


mTNF-α F1/R1
mCCL2 F1/R1
mCCL7 F1/R1
mIL1-β F1/R1
mIL6 F1/R1
mIL18 F1/R1
Relative mRNA expression (NT)
1.5
1.0
0.5
0.0
**
*
NT
MT+VPA
200 μM

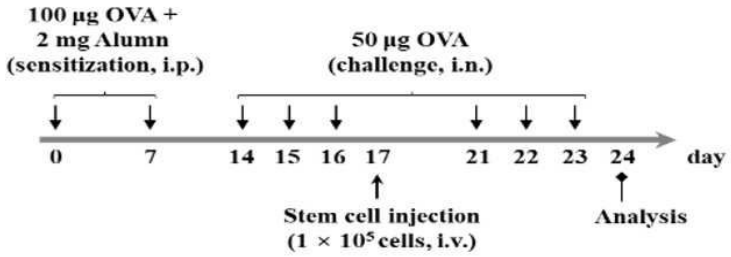
도면9


PBMC (w/o PHA)
PBMC (w/ PHA)
MSC (Naive) + PBMC (w/ PHA)
MSC (MT+VPA) + PBMC (w/ PHA)
CD3
CFSE
Q1
Q2
Q3
Q4
0.158%
69.1%
1.01%
29.7%
12.9%
31.7%
19.8%
35.6%
22.8%
21.5%
19.6%
36.0%
16.7%
21.6%
21.5%
40.2%

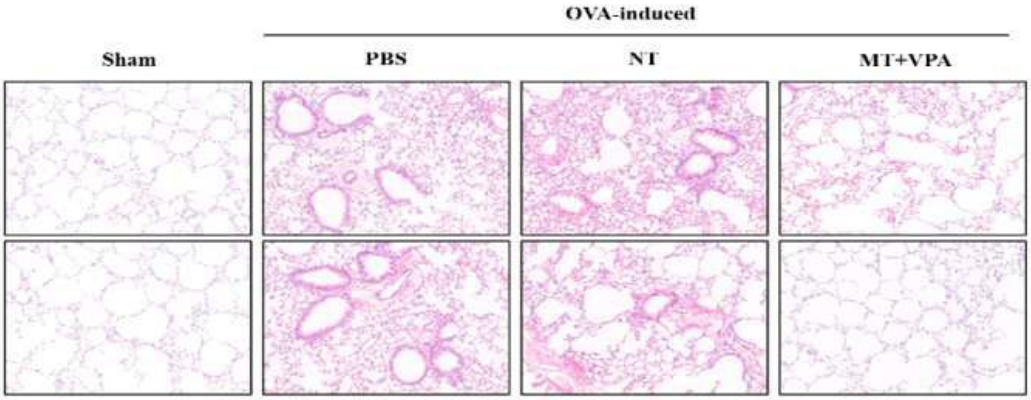
도면10



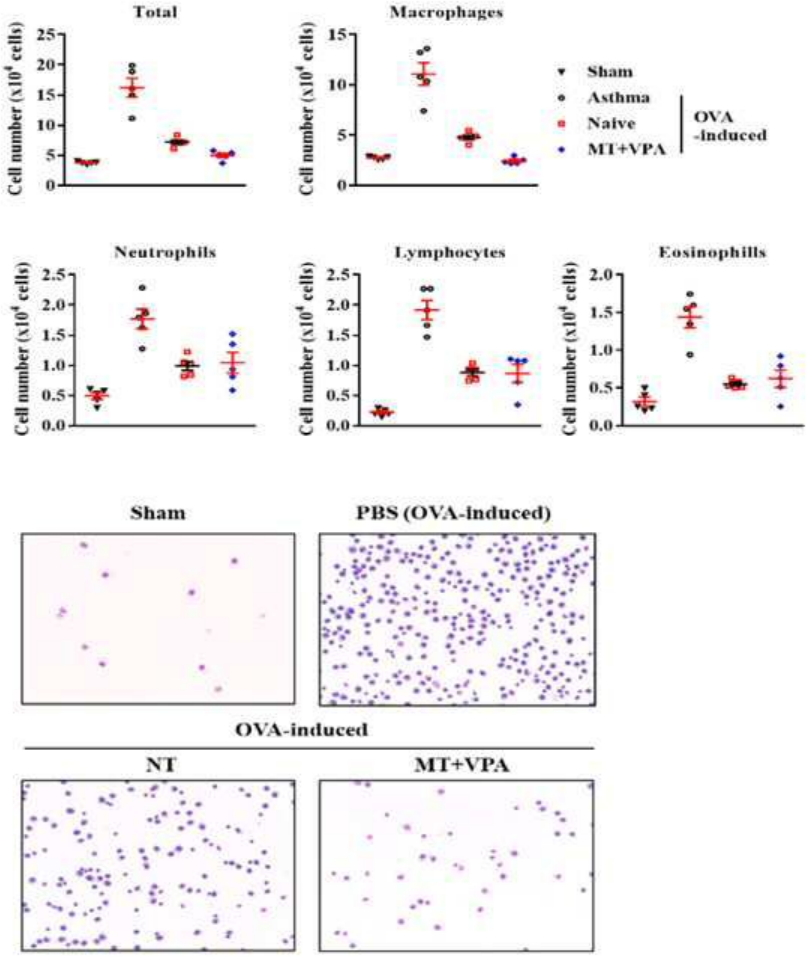
도면11a



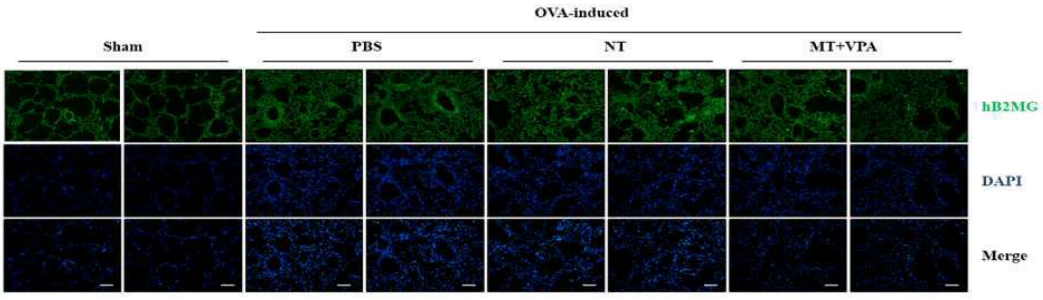
도면11b



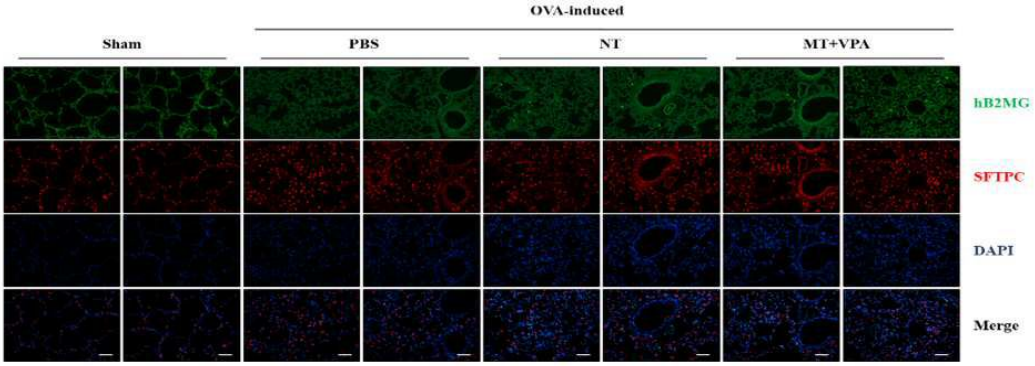
도면11c


Total
Macrophages
Neutrophils
Lymphocytes
Eosinophills
Cell number (x10⁴ cells)
Sham
Asthma
Naive
MT+VPA
OVA -induced
Sham
PBS (OVA-induced)
OVA-induced
NT
MT+VPA

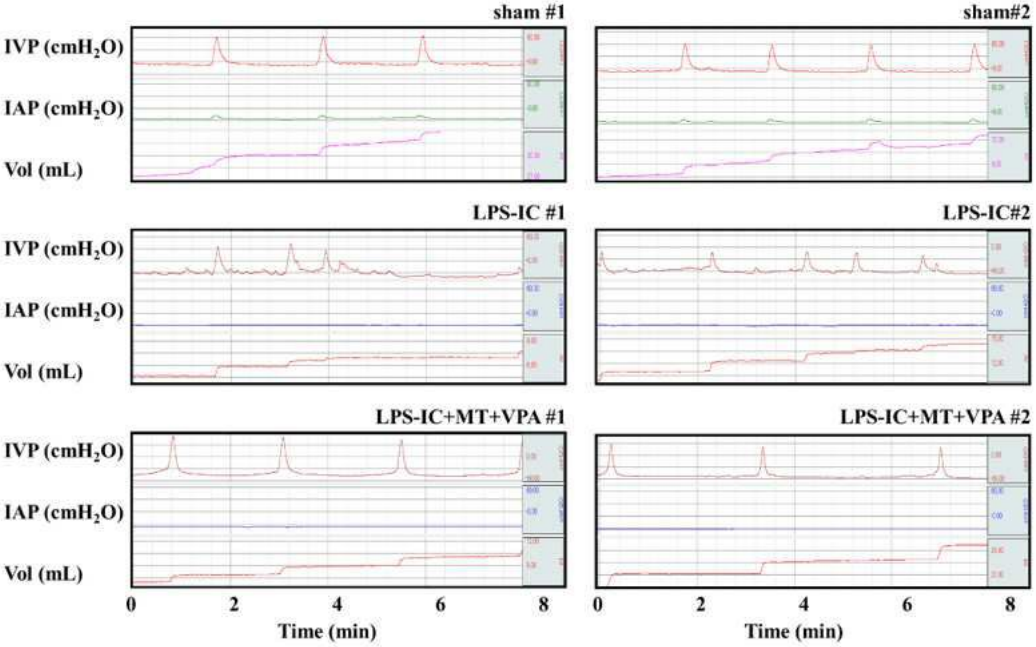
도면11d


OVA-induced
Sham
PBS
NT
MT+VPA
hB2MG
DAPI
Merge

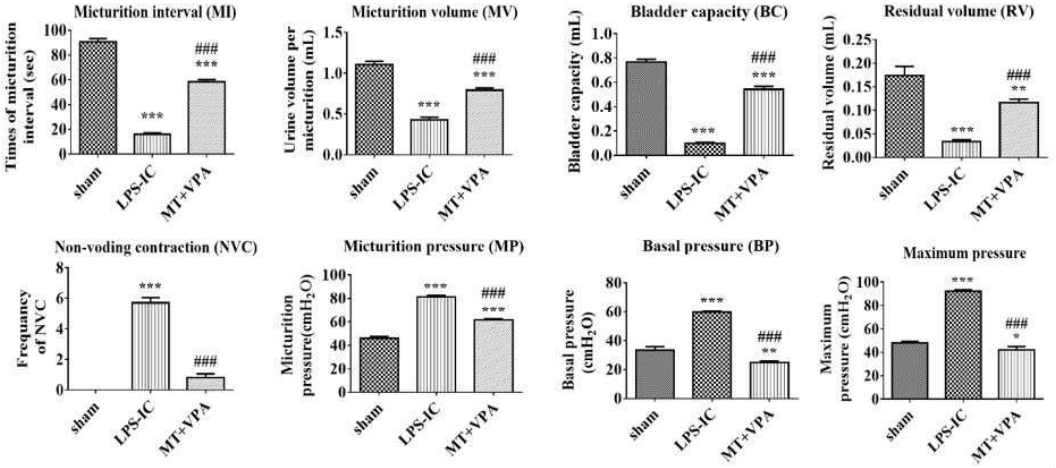
도면11e



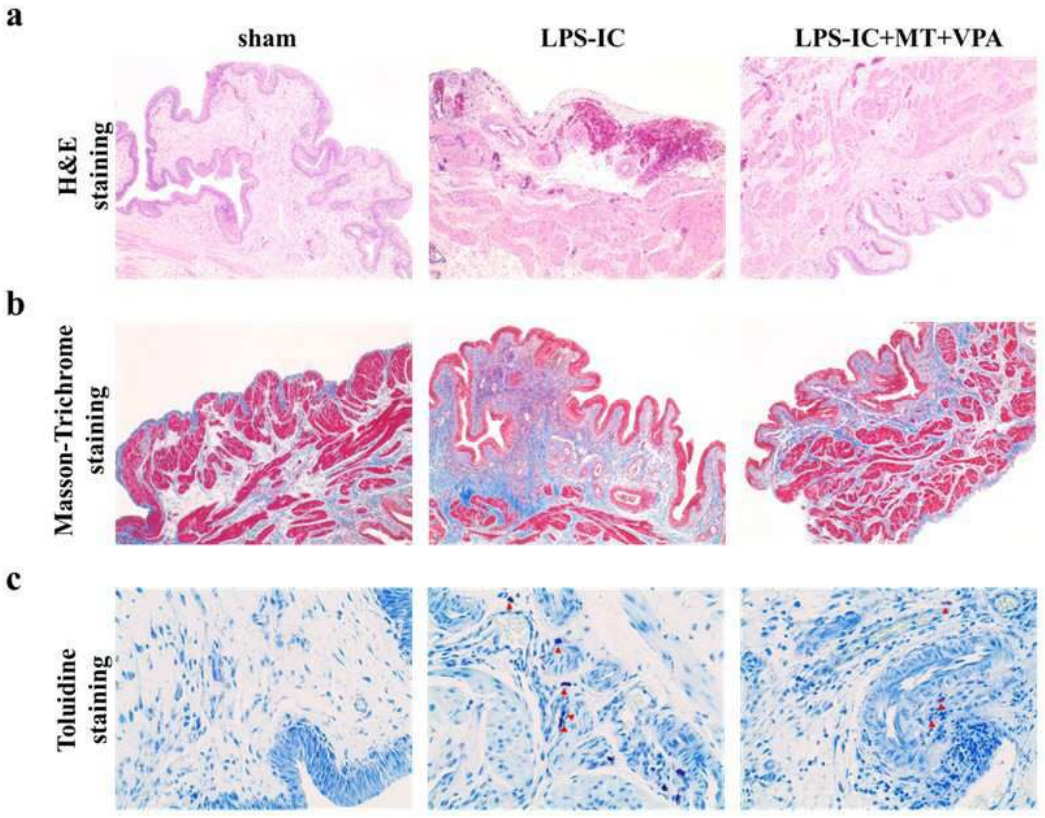
도면12a



도면12b



도면13


a
sham
LPS-IC
LPS-IC+MT+VPA
H&E staining
b
Masson-Trichrome staining
c
Toluidine staining