

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2022 년 1 월 13 일 (13.01.2022)



(10) 국제공개번호

WO 2022/010181 A1

(51) 국제특허분류:

A61K 35/28 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

A61P 25/16 (2006.01)

A61K 49/00 (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2021/008371

(22) 국제출원일:

2021 년 7 월 1 일 (01.07.2021)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2020-0083640 2020 년 7 월 7 일 (07.07.2020) KR

(71) 출원인: 가톨릭대학교 산학협력단 (THE CATHOLIC UNIVERSITY OF KOREA INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 06591 서울시 서초구 반포대로 222, Seoul (KR).

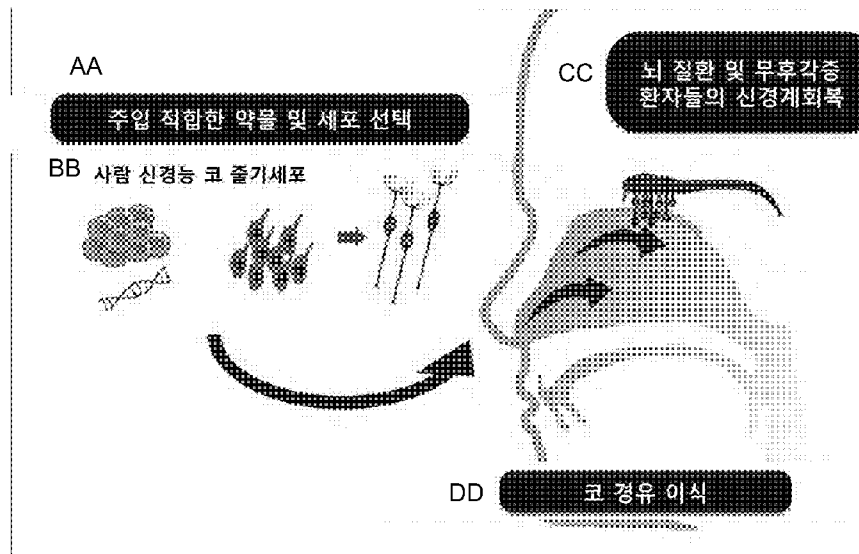
(72) 발명자: 김성원 (KIM, Sung Won); 06001 서울시 강남구 압구정로 151, 101동 404호, Seoul (KR). 김도현 (KIM, Do Hyun); 06544 서울시 서초구 신반포로 270, 125동 601호, Seoul (KR). 임정연 (LIM, Jung Yeon); 06090 서울시 강남구 학동로 68길 29, 106동 802호, Seoul (KR). 박선화 (PARK, Sun Hwa); 08753 서울시 관악구 신림로68길 29-10, 801호, Seoul (KR). 전정호 (CHUN, Jung Ho); 05797 서울시 송파구 문정로 55, 102동 404호, Seoul (KR). 전신수 (JEUN, Sin-Soo); 06701 서울시 서초구 남부순환로 2183, 102동 1502호, Seoul (KR). 박순아 (PARK, Soon A); 03013 서울시 종로구 홍지문길 56, 2동 203호, Seoul (KR).

(74) 대리인: 이명진 (LEE, Myoung-Jin); 06158 서울시 강남구 테헤란로 445, 13층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT,

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING BRAIN AND NERVOUS SYSTEM DISEASES

(54) 발명의 명칭: 뇌신경계질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물



AA ... Select cells and drug suitable for injection

BB ... Human neural crest nasal stem cells

CC ... Recovery of nervous system of brain disease and anosmia patients

DD ... Transplant through nose

(57) Abstract: The present invention relates to a pharmaceutical composition comprising nasal inferior turbinate-derived mesenchymal stem cells as an active ingredient, the composition being administered by intranasal or intramaxillary administration by means of an olfactory mucosa subepithelial injection, etc., in order to bypass the blood-brain barrier through a parolfactory pathway. The present invention relates to a method in which stem cells, etc. are injected intranasally, thereby enabling various therapeutic material including the stem cells to be efficiently delivered to the brain and nervous system through the olfactory organ and a trigeminal nervous system pathway, and thus, through the method, it was confirmed that side effects occurring as a result of an entire body being exposed to a drug may be reduced, and further, a sufficient amount of inferior turbinate-derived mesenchymal stem cells may be obtained safely

[다음 쪽 계속]

AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

at a desired time at low cost with high efficiency, and it was confirmed that side effects are few by means of the composition sharing the same genetic origin with an individual being administered therewith, while the composition exhibits an excellent effect which is the same as or greater than the effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells or adipose-derived mesenchymal stem cells, and thus, by intranasally administering various therapeutic material including the nasal inferior turbinate-derived mesenchymal stem cells, the composition is expected to be capable of minimizing side effects and utilized for preventing or developing a treatment for brain and nervous system diseases.

(57) 요약서: 본 발명은 후각신경주위 경로로 혈액-뇌 장벽을 우회하기 위해, 후각 점막 상피하 주사 등으로 비강 내 투여 또는 상악골 내 투여하는 것을 특징으로 하는 코 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물에 관한 것으로서, 줄기세포 등을 비강 내로 주입하여 후각기관과 3차 신경계 통로를 통해 줄기세포를 포함한 다양한 치료물질을 뇌신경계에 효율적 전달이 가능한 방법으로서 이를 통하여 전신에 약물이 노출되어 생기는 부작용을 감소시킬 수 있음을 확인하였고, 또한, 안전하게 원하는 시기에 충분한 양을 저비용, 고효율로 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포를 획득할 수 있고, 투여하는 개체와 유전적 기원이 동일하여 부작용이 적으면서도 골수 유래 중간엽 줄기세포나 지방 유래 중간엽 줄기세포와 동등하거나 그 이상의 우수한 효과를 확인하였는 바, 코 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포를 포함한 다양한 치료물질을 비강 내로 투여하여 부작용을 최소화하면서도 뇌신경계 질환 예방 또는 치료 개발 용도로도 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

명세서

발명의 명칭: 뇌신경계질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물 기술분야

- [1] 본 발명은 뇌신경계질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 코 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 뇌신경계질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물로, 비공이나 상약동을 통해 비중격, 후각점막상피, 후각점막상피에 근접한 상비갑개 및 중비갑개를 포함한 부위로의 투여를 통해 뇌혈관장벽을 우회하여 뇌신경계질환 예방 및 치료용 약학적 조성물의 전달 수율을 극대화하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [2] 본 출원은 2020년 7월 7일에 출원된 한국특허출원 제10-2020-0083640호에 기초한 우선권을 주장하며, 해당 출원의 명세서 및 도면에 개시된 모든 내용은 본 출원에 원용된다.

[3]

배경기술

- [4] 사람이 수명이 늘어가고, 고령화 사회로 진행하면서, 뇌졸중, 치매, 파킨슨병 등의 뇌신경계 질환이 늘어가고 있다. 상기 뇌신경계 질환들은 특정 뇌세포의 사멸 또는 퇴화가 일시적 또는 오랜 기간에 걸쳐 진행되는 것이 특징인데, 한번 죽은 뇌세포는 재생이 되지 않기 때문에 결국 치명적인 뇌기능의 손실로 이어진다. 특히, 인지기능, 감각기능, 운동기능, 전신기능의 진행성 저하를 수반하는 뇌기능 부전은 결국 성격과 행동의 변화를 가져오고, 환자들이 스스로 자신을 돌볼 수 없는 지경에 이르게 한다.
- [5] 위와 같은 뇌신경계 질환의 성공적인 치료를 위해서는 약물을 뇌신경계에 효율적으로 전달하는 것이 매우 중요하다. 그러나, 뇌신경계 조직이 단단한 두개골(skull)과 혈액뇌장벽(BBB, blood brain barrier)으로 둘러싸여 있기 때문에 치료 약물의 전달 효율이 매우 낮다. 또한 기존의 일반적인 약물 투여 방법인 정맥 또는 동맥투여의 경우 환부에 필요한 약물보다 많은 양의 약물 투여가 필요하고 이에 따른 부작용을 수반하는 문제점이 있다.
- [6] 한편, 최근 줄기세포를 이용한 뇌신경계질환 치료 분야의 학문과 기술이 눈부시게 발전하면서 실제 임상에 적용되는 사례가 많아져 줄기세포 치료가 뇌신경계질환의 중요한 분야로 자리 잡게 되었다. 줄기세포를 이용한 신경계질환 치료 연구에 있어 높은 증식력과 전분화능을 갖는 사람 배아줄기세포 및 역분화 줄기세포에 대한 많은 기대가 모아졌으나, 아직까지는 이들 줄기세포를 사용하는데 있어 안전성 및 윤리적인 문제 등이 뒤따르고 있는 실정이다. 이러한 상황에서 많은 연구자들은 배아줄기 세포의 대안으로서 성체줄기세포에 관심을 가지게 되었고, 그 중 높은 자기 복제 능력과 더불어

다양한 조직 세포로의 분화 능력을 가지고 있는 중간엽 줄기세포를 이용해 다양한 연구와 치료 등의 목적으로 사용하고 있다.

- [7] 특히, 중간엽 줄기세포는 골수 및 제대혈, 지방조직 등 다양한 조직에서 분리할 수 있으며 안전하고 윤리적인 문제가 없어 임상적용에 매우 유용한 세포이나, 뇌신경계질환에 대한 줄기세포치료제의 유효한 치료 효과를 확인한 임상시험이 드물고 중간엽 줄기세포 공급원의 양은 제한되어 있으며, 공급원의 상태 및 배양 정도에 따라 세포의 특성을 잃을 수 있는 문제점이 있다. 나아가, 상기 중간엽 줄기세포를 획득하기 위한 수술은 극심한 통증을 동반하거나 전신마취나 척추마취가 필요할 수 있으며, 획득되는 중간엽 줄기세포의 양이 매우 적고 임상적으로 충분한 양을 배양하는 과정에서 많은 시간과 비용이 소모될 뿐만 아니라, 감염과 세포 손실의 위험성이 높다는 문제점이 제기되고 있다. 따라서 공여부에 손상을 주지 않고 다량의 세포를 획득할 수 있으며 난치성 신경계질환 치료에 대한 충분한 잠재력을 갖는 중간엽 줄기세포 치료제 개발에 대한 연구가 시급한 상황이다.

- [8] 한편, 코 하비갑개 조직은 좌우양쪽의 비강 하외측에 있는 폐각상을 나타내는 독립한 작은 뼈로, 상악골 및 구개골에 부착하고 있다. 본 발명자들은 폐기되는 사람의 코 하비갑개 조직으로부터 중간엽 줄기세포를 분리하여 최근 연골세포, 골세포, 지방세포, 및 신경세포로 분화 가능함을 보고하였다(KR10-1327076).

- [9] 이에, 본 발명자들은 이러한 문제점들을 극복하기 위한 대안으로, 기존의 중간엽 줄기세포 공여부보다 접근성이 다양한 사람 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포를 포함하는 뇌신경계질환 예방 및 치료용 약학적 조성물을 비공이나 상악동을 통해 비중격이나 후각점막상피 및 후각점막상피에 근접한 상비갑개 및 중비갑개 부위를 포함한 비강 내에 투여함으로써 최소 침습의 직접적인 뇌전달을 통하여 뇌혈관장벽을 우회하여 뇌신경계질환 예방 및 치료용 약학적 조성물의 전달 수율을 극대화하는 뇌신경계질환 치료에 효과적인 치료제 및 기술을 개발하고자 하였다.

[10]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [11] 본 발명자들은 뇌신경계질환에 효과적인 신규 치료제를 개발하기 위해 연구하던 중, 코 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포를 비강 내 투여하게 되면 정맥 내 투여 등 다른 투여 경로와 비교하여 뇌신경계질환에 효율적인 치료 효과가 있음을 실험적으로 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [12] 이에, 본 발명의 목적은 세포, 약물, 생물학적 제제 등을 유효성분으로 포함하는 뇌신경계질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물로, 비공이나 상악동을 통해 비중격이나 후각점막상피 및 후각점막상피에 근접한 상비갑개 및 중비갑개 부위를 포함한 비강 내 투여하여 최소 침습의 직접적인 뇌전달을 통하여

뇌혈관장벽을 우회하여 뇌신경계질환 예방 및 치료용 약학적 조성물의 전달 수율을 극대화하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

- [13] 또한, 본 발명의 다른 목적은 코 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 뇌신경계질환 치료용 줄기세포 치료제로, 비공 또는 상악동을 통해 비강 내 투여하며, 상기 비강은 비중격, 후각점막상피, 후각점막상피에 근접한 상비갑개, 및 중비갑개 부위로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 부위를 포함하는 것을 특징으로 하는, 줄기세포 치료제를 제공하는 것이다.
- [14] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 후보물질 또는 약물이 비공 또는 상악동을 통해 비강 내 투여되며, 상기 비강은 비중격, 후각점막상피, 후각점막상피에 근접한 상비갑개, 및 중비갑개 부위로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 부위를 포함하는 것을 특징으로 하는, 동물모델을 제공하는 것이다.
- [15] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 (a) 동물모델의 피검체에 후보물질을 투여하는 단계; 및 (b) 상기 피검체의 뇌 조직을 모니터링하는 단계를 포함하는, 뇌신경계질환 치료물질의 스크리닝 방법으로, 상기 투여는 비공 또는 상악동을 통해 비강 내 투여하며,
- [16] 상기 비강은 비중격, 후각점막상피, 후각점막상피에 근접한 상비갑개, 및 중비갑개 부위로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 부위를 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법을 제공하는 것이다.
- [17]
- [18] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.
- [19]

기술적 해결방법

- [20] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 코 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 뇌신경계질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물로, 비공 또는 상악동을 통해 비강 내 투여하며, 상기 비강은 비중격, 후각점막상피, 후각점막상피에 근접한 상비갑개, 및 중비갑개 부위로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 부위를 포함하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물을 제공한다.
- [21] 본 발명의 일 구현예로, 상기 조성물은 코 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포를 투여개체의 체중 kg 당 5×10^5 내지 3×10^7 세포수로 투여하는 것을 특징으로 하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [22] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 비강 내 투여는 주사에 의한 국부투여, 및 분배기를 통한 투여로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 것일

수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [23] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 분배기를 통한 투여는 에어로졸 또는 점적 전달 시스템의 형태를 통해 투여하는 것을 특징으로 하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [24] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 주사에 의한 국부투여는 후각점막상피하 주사(Subolfactory mucosal injection)를 통해 투여하는 것을 특징으로 하는 것일 수 있으며, 비공이나 상악동을 통해 비중격이나 후각점막상피 및 후각점막상피에 근접한 상비갑개 및 중비갑개 부위를 포함한 비강 내 투여하는 것이나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [25] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 주사에 의한 국부투여는 후각점막부위의 두개저(skull base) 사골판(Cribriform plate)을 통과한 뇌경막하 주사(Intradural injection through cribriform plate)를 통해 투여하는 것을 특징으로 하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [26] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 주사에 의한 국부투여는 두개저 사골판과 뇌경막하를 통과한 뇌실(Ventricle) 내 주사(Intraventricular injection)를 통해 투여하는 것을 특징으로 하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [27] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 비강 내 투여는 투여하고자 하는 부위의 상악골을 일부 제거하고 이를 통해 비강 내 투여하는 것을 특징으로 하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [28] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 뇌신경계질환은 알츠하이머, 치매, 파킨슨병, 뇌졸중, 대뇌 허혈성 뇌졸중, 뇌내출혈, 헌팅턴병, 다발경화증, 척수 기능장애, 외상성 뇌손상, 뇌염, 및 퇴행성 뇌질환으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [29] 본 발명의 또 다른 구현예로, 코 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 뇌신경계질환 치료용 줄기세포 치료제로, 비공 또는 상악동을 통해 비강 내 투여되며, 상기 비강은 비중격, 후각점막상피, 후각점막상피에 근접한 상비갑개, 및 중비갑개 부위로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 부위를 포함하는 것을 특징으로 하는, 줄기세포 치료제를 제공한다.
- [30] 또한, 본 발명은 코 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 뇌신경계질환의 예방 또는 치료 방법으로서, 상기 약학적 조성물은 비공 또는 상악동을 통해 비강 내 투여되며, 상기 비강은 비중격, 후각점막상피, 후각점막상피에 근접한 상비갑개, 및 중비갑개 부위로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택된 것을 특징으로 하는, 방법을 제공한다.
- [31] 또한, 본 발명은 코 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물의 뇌신경계질환의 예방 또는 치료 용도로서, 상기 약학적 조성물은 비공 또는 상악동을 통해 비강 내 투여되며, 상기 비강은 비중격,

후각점막상피, 후각점막상피에 근접한 상비갑개, 및 중비갑개 부위로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택된 것을 특징으로 하는, 용도를 제공한다.

[32] 또한, 본 발명은 코 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포의 뇌신경계질환 예방 또는 치료 약제의 제조를 위한 용도로서, 상기 코 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포는 비공 또는 상악동을 통해 비강 내 투여되며, 상기 비강은 비중격, 후각점막상피, 후각점막상피에 근접한 상비갑개, 및 중비갑개 부위로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택된 것을 특징으로 하는, 용도를 제공한다.

[33] 또한, 본 발명은 (a) 동물모델의 피검체에 후보물질을 투여하는 단계; 및 (b) 상기 피검체의 뇌 조직을 모니터링하는 단계를 포함하는, 뇌신경계질환 치료물질의 스크리닝 방법으로, 상기 투여는 비공이나 상악동을 통해 비강 내 투여하며,

[34] 상기 비강은 비중격, 후각점막상피, 후각점막상피에 근접한 상비갑개, 및 중비갑개 부위로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택된 것을 특징으로 하는, 방법을 제공한다. 상기 비강은 비중격이나 후각점막상피 및 후각점막상피에 근접한 상비갑개 및 중비갑개 부위를 포함한 비강 내 투여하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[35] 또한, 본 발명은 후보물질 또는 약물이 비공 또는 상악동을 통해 비강 내 투여되며, 상기 비강은 비중격, 후각점막상피, 후각점막상피에 근접한 상비갑개, 및 중비갑개 부위로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 부위를 포함하는 것을 특징으로 하는, 동물모델을 제공한다.

[36] 또한, 본 발명은 상기 동물모델의 뇌신경계질환 치료물질의 스크리닝 용도를 제공한다.

[37]

발명의 효과

[38] 본 발명자들은 후각신경주위 경로(Peri-olfactory pathway)로 혈액-뇌 장벽(Blood-Brain-Barrier; BBB)을 우회하기 위해 줄기세포 등을 비강 내로 주입하면 후각기관(olfactory)과 3차 신경계 통로(trigeminal neural pathways)를 통해 뇌에 전달할 수 있는데, 위 방법을 통해 줄기세포를 포함한 다양한 치료물질을 뇌신경계에 효율적 전달할 수 있으며, 전신에 약물이 노출되어 생기는 부작용을 감소시킬 수 있음을 확인하였다. 뿐만 아니라, 비공이나 상악동을 통해 비중격이나 후각점막상피 및 후각점막상피에 근접한 상비갑개 및 중비갑개 부위를 포함한 비강 내 투여하는 비강 내 투여는 전신에 약물이 노출되는 정맥 내 투여 방법과 비교하여 뇌신경계질환 치료 효과가 우수하고, 상악골 내 주사 방법의 경우 세포 투여시 두개골을 노출시킬 필요가 있는 반면 본 발명의 투여방법은 그럴 필요가 없어, 반복적인 투여에 효과적이다.

[39] 또한, 기존의 중간엽 줄기세포가 획득 과정에서 극심한 통증을 동반하고, 충분한 양을 배양하는 과정에서 많은 시간과 비용이 소모되는 반면, 본 발명의

코 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포는 안전하게 획득할 수 있고, 원하는 시기에 충분한 양을 획득할 수 있으므로 저비용, 고효율로 중간엽 줄기세포를 획득할 수 있고, 투여하는 개체와 유전적 기원이 동일하여 부작용이 적으면서도 골수 유래 중간엽 줄기세포나 지방 유래 중간엽 줄기세포와 동등하거나 그 이상의 우수한 효과를 확인 하였는 바, 코 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포를 포함한 다양한 치료물질을 비강 내로 투여하여 부작용을 최소화하면서도 뇌신경계 질환 예방 또는 치료를 위하여 매우 유용하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

[40]

도면의 간단한 설명

- [41] 도 1은 주입 적합한 약물 및 코 하비갑개 유래 줄기세포를 선택하여, 코 경유 이식을 통해 뇌질환 및 무후각증 환자들의 신경계를 회복할 수 있다는 것을 나타낸 본 발명의 개요도이다.
- [42] 도 2는 상비갑개와 비중격 후상부의 후각점막상피를 노란 타원형 부위로 표시하여 세포 및 약물의 투여 위치를 표현한 도이다.
- [43] 도 3은 후각점막상피하 주사(Subolfactory mucosal injection) 투여의 위치와 투여 후 후각신경 주위 통로(Periolfactory pathway)를 통한 약물 흡수 경로를 간략하게 표시한 도이다.
- [44] 도 4는 뇌경막하 주사(Intradural injection)투여의 위치와 그에 따른 약물 흡수 경로를 간략하게 표시한 도이다.
- [45] 도 5는 뇌실 내 주사(Intraventricular injection)투여의 위치와 그에 따른 약물 흡수 경로를 간략하게 표시한 도이다.
- [46] 도 6은 동물실험에서 세포 및 약물 전달 경로를 확인하기 위하여, 바늘을 길이별로 준비하고, 후각점막상피 손상으로 인한 출혈을 방지하기 위해, 혈관내 튜브 카테타도 길이 별로 함께 준비한 도이다.
- [47] 도 7은 래트를 마취시킨 후 래트의 후각점막상피까지 바늘을 사용하여 주입하는 것을 나타낸 도이다.
- [48] 도 8은 후각점막상피하에 Trypan blue 주사한지 한 시간 후의 경과를 확인한 도이다.
- [49] 도 9는 래트의 뇌 경막하에 trypan blue 주사한지 한시간 후에 경과를 확인한 도이다.
- [50] 도 10은 래트의 뇌 경막하에 pkh26으로 염색한 코 하비갑개 유래 줄기세포(hNTSCs, human Nasal Turbinate derived Stem Cells)를 주입한 뒤 3일 후의 경과를 확인한 도이다.
- [51] 도 11은 베타아밀로이드를 과발현 하는 알츠하이머병 마우스 동물모델에서 대조군으로 PBS, 실험군으로 사람 하비갑개 유래 줄기세포 (hNTSCs)를 3가지 방법 (intracranial injection, nasal dropping, intravenous injection)으로 동물모델에 이식하고, 6주 후에 watermaze test 방법으로 기억/학습 능력의 변화를 확인한

도이다.

[52] 도 12는 베타아밀로이드를 과발현 하는 알츠하이머병 마우스 동물모델에서 대조군으로 PBS, 실험군으로 사람 하비갑개 유래 줄기세포 (hNTSCs)를 2가지 방법 (intracranial injection, nasal dropping)으로 동물모델에 이식하고 6주 후에 면역염색 방법으로 human nuclei antibody를 이용하여 마우스 뇌에 생착된 hNTSCs을 확인한 도이다.

[53] 도 13은 베타아밀로이드를 과발현 하는 알츠하이머병 마우스 동물모델에서 대조군으로 PBS, 실험군으로 사람 하비갑개 유래 줄기세포 (hNTSCs)를 3가지 방법 (intracranial injection, nasal dropping, intravenous injection)으로 동물모델에 이식하고 6주 후에 면역염색 방법으로 베타아밀로이드 및 면역반응에 중요한 microglial cell marker인 Iba-1 발현을 확인한 도이다.

[54] 도 14는 베타아밀로이드를 과발현 하는 알츠하이머병 마우스 동물모델에서 대조군으로 PBS, 실험군으로 사람 하비갑개 유래 줄기세포 (hNTSCs)를 3가지 방법 (intracranial injection, nasal dropping, intravenous injection)으로 동물모델에 이식하고 6주 후에 면역염색 방법으로 베타아밀로이드 및 신경세포 marker인 NeuN 발현을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

[55] 도 15는 토끼의 외부 상악골을 개방하여 세포, 약물 또는 생물학적 제제 등 약물을 투여할 수 있음을 나타내는 도이다.

[56]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[57] 본 발명자들은 후각신경주위 경로(Peri-olfactory pathway)로 혈액-뇌 장벽(Blood-Brain-Barrier; BBB)을 우회하기 위해 줄기세포 등을 비강 내로 주입하면 후각기관(olfactory)과 3차 신경계 통로(trigeminal neural pathways)를 통해 뇌에 전달할 수 있는데, 이는 줄기세포를 포함한 다양한 치료물질을 뇌신경계에 효율적 전달이 가능한 방법으로서 이를 통하여 전신에 약물이 노출되어 생기는 부작용을 감소시킬 수 있음을 확인하였고, 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포는 안전하게 획득할 수 있고, 원하는 시기에 충분한 양을 획득할 수 있으므로 저비용, 고효율로 중간엽 줄기세포를 획득할 수 있고, 투여하는 개체와 유전적 기원이 동일하여 부작용이 적으면서도 골수 유래 중간엽 줄기세포나 지방 유래 중간엽 줄기세포와 동등하거나 그 이상의 우수한 효과를 확인하였는 바, 코 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포를 포함한 다양한 치료물질을 비강 내로 투여하여 부작용을 최소화하면서도 뇌신경계 질환 예방 또는 치료 가능성이 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[58]

[59] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

[60]

[61] 본 발명의 일 실시예에서는 상비갑개와 비중격 후상부의 후각점막상피를 세포

및 약물의 투여 위치로 선정하고, 후각점막상피하, 뇌경막하, 및 뇌실 내를 주사에 의한 비강 내 국부투여 경로로 선정하였다(실시예 2 참조).

[62] 본 발명의 다른 실시예에서는 래트 후각점막상피하에 trypan blue(20 μ L)를 주사한 경우 뇌경막하까지는 trypan blue가 착색되어 있고, 구강 안까지는 소량 착색되어 있는 것을 확인하였고, 뇌경막하에 trypan blue(10 μ L)를 주사한 경우엔 소뇌에 trypan blue가 착색되어 있는 것을 확인하였으며, 뇌경막하에 코 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포(1×10^5 /10 μ L)를 pkh26(red)로 염색하여 주사한 경우는 염색된 코 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포가 소뇌에 있음을 확인하였다(실시예 3 참조).

[63] 본 발명의 또 다른 실시예에서는 알츠하이머 마우스 동물모델에서 비강 내 투여하는 경우, 정맥 투여와 비교하여 마우스의 기억/학습 능력의 회복 효과가 매우 우수함을 확인하였다(실시예 4-1 참조).

[64] 본 발명의 또 다른 실시예에서는 알츠하이머 마우스 동물모델에서 정맥 투여하는 경우 뇌에서 사람 하비갑개 유래 줄기세포(hNTSCs, human Nasal Turbinate derived Stem Cells)의 생존이 확인되지 않은 반면, 비강 내 투여하는 경우 하비갑개 유래 줄기세포가 잘 생존함을 확인하였다(실시예 4-2 참조).

[65] 본 발명의 또 다른 실시예에서는 알츠하이머 마우스 동물모델에서 비강 내 투여하는 경우, 정맥 투여와 비교하여 베타아밀로이드의 발현 감소가 더 크게 나타나는 것을 확인하였다(실시예 4-3 참조).

[66] 본 발명의 또 다른 실시예에서는 알츠하이머 마우스 동물모델에서 비강 내 투여하는 경우, 베타아밀로이드의 발현은 감소하고 신경세포의 발현이 크게 증가하는 것을 확인하였다(실시예 4-4 참조).

[67] 따라서, 본 발명은 코 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 뇌신경계질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 및 뇌신경계질환 치료용 줄기세포 치료제를 제공할 수 있다.

[68] 본 발명에서 사용되는 용어 "줄기세포(stem cell)"란, 개체를 구성하는 세포나 조직의 근간이 되는 세포로서 그 특징은 반복 분열하여 자가 재생(self-renewal)할 수 있고, 환경에 따라 특정한 기능을 지닌 세포로 분화할 수 있는 다분화 능력을 갖는 세포를 의미한다. 태아의 발생과정 중 모든 조직에서 생겨나며, 성인이 되어서도 골수, 상피조직 등 세포가 활발히 교체되는 일부 조직에서 발견된다. 줄기세포는 분화 가능한 세포의 종류에 따라 수정란이 첫 분열을 시작할 때 형성되는 전능성 줄기세포(totipotent stem cells)와, 이 세포들이 계속 분열해 만들어진 포배 내막에 있는 만능성 줄기세포(pluripotent stem cells), 그리고 성숙한 조직과 기관 속에 존재하는 다능성 줄기세포(multipotent stem cells)로 분류된다. 이때, 다능성 줄기세포는, 이 세포가 포함되어 있는 조직 및 기관에 특이적인 세포로만 분화할 수 있는 세포로서 태아기, 신생아기, 및 성체기의 각 조직 및 장기의 성장과 발달은 물론 성체조직의 항상성 유지와 조직 손상 시 재생을 유도하는 기능에 관여하고 있다. 이러한 조직 특이적 다능성 세포들을

충칭하여 성체 줄기세포라고도 한다.

- [69] 성체 줄기세포로 분류되는 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell)는 재생의학의 재료로 각광받고 있는 세포로, 골수, 제대혈, 탯줄 혈액 등의 조직에서 채취될 수 있으며, 혈액 줄기세포와 달리 지방조직세포, 골세포, 연골세포, 신경세포, 심근세포 등 다양한 인체 조직을 구성하는 세포로의 분화능을 가진다. 본 발명에서는 사람 하비갑개 조직으로부터 분리한 중간엽 줄기세포를 이용하였다.
- [70] 성체 중간엽 줄기세포 중 골수 유래 중간엽 줄기세포 및 지방 조직 유래 중간엽 줄기세포는 획득하기 위한 수술에 극심한 통증을 동반하고 시간이 많이 소요되며, 획득되는 중간엽 줄기세포의 양이 매우 적고 임상적으로 충분한 양을 배양하는 과정에서 많은 시간과 비용이 소모되며 감염과 세포 손실의 위험성이 높다는 단점이 있다. 또한, 탯줄 혈액 유래 중간엽 줄기세포는 필요로 하는 시기에 얻기 어려우며 장기간 보관해야 하는 문제점을 갖고 있다.
- [71] 반면, 사람 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포의 경우 획득하기 위한 수술에 출혈 및 통증이 매우 적고 시간이 적게 소요되며, 이비인후과 영역에서 최다빈도로 시행되는 하비갑개 수술(비염 수술) 과정의 폐기 하비갑개 조직에서 분리한 중간엽 줄기세포의 재활용을 통해 중간엽 줄기세포를 지속적으로 확보할 수 있고, 줄기세포의 증식능이 상기 골수 유래 및 지방 조직 유래 중간엽 줄기세포보다 높다는 장점이 있다.
- [72] 본 발명에서 사용되는 용어 "세포 치료제"는 사람으로부터 분리, 배양 및 특수한 조작을 통해 제조된 세포 및 조직으로 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품으로서, 세포 혹은 조직의 기능을 복원시키기 위하여 동종 또는 이종세포를 체외에서 증식, 선별하거나 다른 방법으로 세포의 생물학적 특성을 변화시키는 등의 일련의 행위를 통하여 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품을 지칭한다. 세포 치료제는 세포의 분화정도에 따라 크게 체세포 치료제, 줄기세포 치료제로 분류되며, 본 발명은 특히 줄기세포 치료제에 관한 것이다.
- [73] 본 발명에서 사용되는 용어 "뇌신경계질환"이란, 특정 뇌세포의 사멸 또는 퇴화가 일시적 또는 오랜 기간에 걸쳐 진행되는 것이 특징인데, 한번 죽은 뇌세포는 재생이 되지 않기 때문에 결국 치명적인 뇌기능의 손실로 이어진다. 특히, 인지기능, 감각기능, 운동기능, 전신기능의 진행성 저하를 수반하는 뇌기능 부전은 결국 성격과 행동의 변화를 가져오고, 환자들이 스스로 자신을 돌볼 수 없는 지경에 이르게 하는 질병으로서, 알츠하이머, 치매, 파킨슨병, 뇌졸중, 대뇌 허혈성 뇌졸중, 뇌내출혈, 헌팅턴병, 다발경화증, 척수 기능장애, 외상성 뇌손상, 뇌염, 및 퇴행성 뇌질환으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [74] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 상기 부형제는 예를 들어, 희석제, 결합제, 붕해제, 활택제, 흡착제, 보습제, 필름-코팅 물질, 및

제어방출첨가제로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.

- [75] 본 발명에 따른 약학적 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 서방형 과립제, 장용과립제, 액제, 점안제, 엘실릭제, 유제, 현탁액제, 주정제, 트로키제, 방향수제, 리모나아데제, 정제, 서방형정제, 장용정제, 설하정, 경질캡셀제, 연질캡셀제, 서방캡셀제, 장용캡셀제, 환제, 틸크제, 연조엑스제, 건조엑스제, 유동엑스제, 주사제, 캡슐제, 관류액, 경고제, 로션제, 파스타제, 분무제, 흡입제, 패취제, 멸균주사용액, 또는 에어로졸 등의 외용제 등의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 상기 외용제는 크림, 젤, 패치, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니먼트제, 파스타제 또는 카타플라스마제 등의 제형을 가질 수 있다.
- [76] 본 발명에 따른 약학적 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 올리고당, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.
- [77] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.
- [78] 본 발명에 따른 정제, 산제, 과립제, 캡슐제, 환제, 트로키제의 첨가제로 옥수수전분, 감자전분, 밀전분, 유당, 백당, 포도당, 과당, 디-만니톨, 침강탄산칼슘, 합성규산알루미늄, 인산일수소칼슘, 황산칼슘, 염화나트륨, 탄산수소나트륨, 정제 라놀린, 미결정셀룰로오스, 덱스트린, 알긴산나트륨, 메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 카올린, 요소, 콜로이드성실리카겔, 히드록시프로필스타치, 히드록시프로필메칠셀룰로오스(HPMC) 1928, HPMC 2208, HPMC 2906, HPMC 2910, 프로필렌글리콜, 카제인, 젯산칼슘, 프리모젤 등 부형제; 젤라틴, 아라비아고무, 에탄올, 한천가루, 초산프탈산셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스칼슘, 포도당, 정제수, 카제인나트륨, 글리세린, 스테아린산, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 메칠셀룰로오스나트륨, 메칠셀룰로오스, 미결정셀룰로오스, 덱스트린, 히드록시셀룰로오스, 히드록시프로필스타치, 히드록시메칠셀룰로오스, 정제셀락, 전분호, 히드록시프로필셀룰로오스, 히드록시프로필메칠셀룰로오스, 폴리비닐알코올, 폴리비닐피롤리돈 등의 결합제가 사용될 수 있으며, 히드록시프로필메칠셀룰로오스, 옥수수전분, 한천가루, 메칠셀룰로오스, 벤토나이트, 히드록시프로필스타치, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 알긴산나트륨, 카르복시메칠셀룰로오스칼슘, 구연산칼슘, 라우릴 황산나트륨, 무수규산, 1-히드록시프로필셀룰로오스, 덱스트란, 이온교환수지, 초산폴리비닐, 포름알데히드처리 카제인 및 젤라틴, 알긴산, 아밀로오스,

구아르고무(Guar gum), 중조, 폴리비닐피롤리돈, 인산칼슘, 겔화전분, 아라비아고무, 아밀로펙틴, 펙틴, 폴리인산나트륨, 에칠셀룰로오스, 백당, 규산마그네슘알루미늄, 디-소르비톨액, 경질무수규산 등 봉해제; 스테아린산칼슘, 스테아린산마그네슘, 스테아린산, 수소화식물유(Hydrogenated vegetable oil), 탈크, 석송자, 카올린, 바셀린, 스테아린산나트륨, 카카오지, 살리실산나트륨, 살리실산마그네슘, 폴리에틸렌글리콜 4000, 6000, 유동파라핀, 수소첨가대두유(Lubri wax), 스테아린산알루미늄, 스테아린산아연, 라우릴황산나트륨, 산화마그네슘, 마크로폴(Macrogol), 합성규산알루미늄, 무수규산, 고급지방산, 고급알코올, 실리콘유, 파라핀유, 폴리에틸렌글리콜지방산에테르, 전분, 염화나트륨, 초산나트륨, 올레인산나트륨, dl-로이신, 경질무수규산 등의 활택제;가 사용될 수 있다.

[79] 본 발명에 따른 액제의 첨가제로는 물, 묽은 염산, 묽은 황산, 구연산나트륨, 모노스테아린산슈크로스류, 폴리옥시에틸렌소르비톨지방산에스테르류(트윈에스테르), 폴리옥시에틸렌모노알킬에테르류, 라놀린에테르류, 라놀린에스테르류, 초산, 염산, 암모니아수, 탄산암모늄, 수산화칼륨, 수산화나트륨, 프롤아민, 폴리비닐피롤리돈, 에칠셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스나트륨 등이 사용될 수 있다.

[80] 본 발명에 따른 시럽제에는 백당의 용액, 다른 당류 혹은 감미제 등이 사용될 수 있으며, 필요에 따라 방향제, 착색제, 보존제, 안정제, 현탁화제, 유화제, 점조제 등이 사용될 수 있다.

[81] 본 발명에 따른 유제에는 정제수가 사용될 수 있으며, 필요에 따라 유화제, 보존제, 안정제, 방향제 등이 사용될 수 있다.

[82] 본 발명에 따른 현탁제에는 아카시아, 트라가칸타, 메틸셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스나트륨, 미결정셀룰로오스, 알긴산나트륨, 히드록시프로필메틸셀룰로오스, HPMC 1828, HPMC 2906, HPMC 2910 등 현탁화제가 사용될 수 있으며, 필요에 따라 계면활성제, 보존제, 안정제, 착색제, 방향제가 사용될 수 있다.

[83] 본 발명에 따른 주사제에는 주사용 증류수, 0.9%염화나트륨주사액, 링겔주사액, 덱스트로스주사액, 덱스트로스+염화나트륨주사액, 피이지(PEG), 락테이티드 링겔주사액, 에탄올, 프로필렌글리콜, 비휘발성유-참기름, 면실유, 낙화생유, 콩기름, 옥수수기름, 올레인산에칠, 미리스트산 이소프로필, 안식향산벤젠과 같은 용제; 안식향산나트륨, 살리실산나트륨, 초산나트륨, 요소, 우레탄, 모노에칠아세트아마이드, 부타졸리딘, 프로필렌글리콜, 트윈류, 니정틴산아미드, 헥사민, 디메틸아세트아마이드와 같은 용해보조제; 약산 및 그 염(초산과 초산나트륨), 약염기 및 그 염(암모니아 및 초산암모늄), 유기화합물, 단백질, 알부민, 펩톤, 검류와 같은 완충제; 염화나트륨과 같은 등장화제; 중아황산나트륨(NaHSO_3) 이산화탄소가스, 메타중아황산나트륨(Na_2S

$_2O_3$), 아황산나트륨(Na_2SO_3), 질소가스(N_2), 에칠렌디아민테트라초산과 같은 안정제; 소듐비셀파이드 0.1%, 소듐포름알데히드 설포실레이트, 치오우레아, 에칠렌디아민테트라초산디나트륨, 아세톤소듐비셀파이드와 같은 황산화제; 벤질알코올, 클로로부탄올, 염산프로카인, 포도당, 글루콘산칼슘과 같은 무통화제; 시엠시나트륨, 알긴산나트륨, 트윈 80, 모노스테아린산알루미늄과 같은 현탁화제를 포함할 수 있다.

- [84] 본 발명에 따른 좌제에는 카카오지, 라놀린, 위텟솔, 폴리에틸렌글리콜, 글리세로젤라틴, 메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스, 스테아린산과 올레인산의 혼합물, 수바날(Subanal), 면실유, 낙화생유, 야자유, 카카오버터+콜레스테롤, 레시틴, 라네트왁스, 모노스테아린산글리세롤, 트윈 또는 스팬, 임하우젠(Imhausen), 모놀렌(모노스테아린산프로필렌글리콜), 글리세린, 아덱스솔리두스(Adeps solidus), 부티룸 태고-G(Buutyrum Tego-G), 세베스파마 16(Cebes Pharma 16), 헥사라이드베이스 95, 코토마(Cotomar), 히드록코테 SP, S-70-XXA, S-70-XX75(S-70-XX95), 히드록코테(Hydrokote) 25, 히드록코테 711, 이드로포스탈(Idropostal), 마사에스트라리움(Massa estrarium, A, AS, B, C, D, E, I, T), 마사-MF, 마수폴, 마수폴-15, 네오수포스탈-엔, 파라마운드-B, 수포시로(OSI, OSIX, A, B, C, D, H, L), 좌제기제 IV 타입(AB, B, A, BC, BBG, E, BGF, C, D, 299), 수포스탈(N, Es), 웨코비(W, R, S, M, Fs), 테제스터 트리글리세라이드 기제(TG-95, MA, 57)와 같은 기제가 사용될 수 있다.
- [85] 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다.
- [86] 경구 투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.
- [87] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소, 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있고, 바람직하게는 코 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포를 투여개체의 체중 kg 당 5×10^6 내지 3×10^7 세포수로 투여하는

것을 특징으로 하나 이에 제한되는 것은 아니다.

- [88] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 치료효과를 증진시키기 위하여, 바람직하게는 병용되는 약물과 동시에(simultaneous), 별도로(separate), 또는 순차적(sequential)으로 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 구체적으로, 본 발명에 따른 약학적 조성물의 유효량은 환자의 연령, 성별, 상태, 체중, 체내에서 활성 성분의 흡수도, 불활성을 및 배설속도, 질병종류, 병용되는 약물에 따라 달라질 수 있다.
- [89] 상기 비강 내 투여는 주사에 의한 국부투여 및 분배기를 통한 투여로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [90] 본 발명에서 사용되는 용어 "분배기"는 엄격하게 정의된 양의 약물을 코에 직접 투여할 수 있는 것을 의미하며, 에어로졸 또는 점적 전달 시스템의 형태를 통해 투여할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [91] 상기 "주사에 의한 국부투여"는 후각점막상피하 주사(Subolfactory mucosal injection), 후각점막부위의 두개저(skull base) 사골판(Cribriform plate)을 통과한 뇌경막하 주사(Intradural injection through cribriform plate), 또는 두개저 사골판과 뇌경막하를 통과한 뇌실(Ventricle) 내 주사(Intraventricular injection)를 통해 투여할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [92] 본 발명에서 사용되는 용어 "후각점막"이란, 냄새 감각을 위한 수용기를 갖고 있는 코 안의 영역을 의미한다.
- [93] 본 발명에서 사용되는 용어 "두개저(skull base)"란, 두개골중 두개강의 하방을 구성하는 부위의 총칭을 의미하며, 내(상)면에서 본 부위를 내두개저, 외(하)면에서 본 부위를 외두개저라고 한다.
- [94] 본 발명에서 사용되는 용어 "사골판(Cribriform plate)"이란, 뇌의 문측 기저부에 있는 골격 구조를 의미하며, 후각 수용기의 세포체가 위치해 있는 후점막이 이를 따라 배열되어 있다.
- [95] 본 발명에서 사용되는 용어 "상악동"이란, 부비강의 윗부분으로 넓은 중격이 전후 상악동을 구분한다.
- [96] 본 발명에서 사용되는 용어 "비중격"이란, 코안(비강)을 좌우로 나누는 칸막이 벽으로서 주로 연골과 골판으로 구성되어 콧등과 코끝을 지지하며 점막으로 덮여 있는 구조물을 의미하며, 코중격연골(비중격연골)이 앞쪽에 위치해 있고 별집뼈 수직판(사골 수직판)과 보습뼈(서골), 위턱뼈 능선(상악골릉)과 입천장뼈능선(구개릉)이 뒤쪽에 위치하고 있어 콧등(비배)과 코끝(비첨)을 지지하는 형태를 가진다.
- [97] 본 발명에서 사용되는 용어 "상비갑개"란, 비강의 외측벽 위쪽에서 아래쪽으로 돌출한 작은 조개껍질 모양의 뼈의 돌기 또는 그 점막으로 뒤덮인 부위를 말한다. 이것은 독립한 뼈가 아니며 아래쪽은 중비갑개와의 사이에

상비도(上鼻道)를 만든다. 또한 이 뒤 위쪽에 작은 최상비갑개가 존재하는 경우가 있다.

- [98] 본 발명에서 사용되는 용어 "중비갑개"란, 비강(鼻腔)의 외측벽의 대략 중앙에서 하방(下方)으로 돌출한 패각(貝殼)상의 뼈의 돌기 그 자체와 이것이 접착으로 덮힌 부분을 말한다. 이의 상방은 상비갑개(上鼻甲介)와의 사이에 상비도(上鼻道)를, 하방은 하비갑개(下鼻甲介)와의 사이에 중비도(中鼻道)를 만든다. 또한, 이 뼈는 독립된 것이 아니고 사골(篩骨)의 일부이다.
- [99] 본 발명에서 사용되는 용어 "뇌경막"이란, 수막 중 가장 외측에 있는 강인한 결합조직성의 막을 의미하며, 뇌경막은 두겹으로 되어있고, 외층은 본래의 골박이 이행해 온 것이고 혈관이나 신경이 많으며, 내층은 고유의 경막이고 탄성섬유를 포함하는 층층한 결합조직이다.
- [100] 본 발명에서 사용되는 용어 "뇌실"이란, 인간의 뇌 내부에 있는 공간을 말하며 뇌실막에 싸여있다. 뇌실은 가쪽뇌실, 제3뇌실, 제4뇌실의 세가지가 있으며 모두 연결되어 있는 연속적인 공간으로서, 뇌실 내부는 뇌척수액이라고 하는 액체로 채워져 있으며 이 액체는 매일 일정한 양이 생산되고 분해되면서 뇌실계를 순환한다.
- [101] 본 발명에서 사용되는 용어 "비강 내 투여"란, 투여하고자 하는 부위의 상악골을 일부 제거하고 투여하는 것을 특징으로 하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 구체적으로, 개체의 상악골 부위를 개방 후 관찰되는 후각망울(olfactory bulb) 부위를 통하여 뇌 내 국부 투여 후 상악골을 다시 닫고 봉합하는 과정으로 투여를 하는 것일 수 있다.
- [102] 본 발명의 약학적 조성물은 치료할 질환, 투여 경로, 환자의 연령, 성별, 체중 및 질환의 중등도 등의 여러 관련 인자와 함께 활성성분인 약물의 종류에 따라 결정된다. 구체적으로, 본 발명에 따른 조성물의 유효량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 1 kg 당 0.001 내지 150 mg, 바람직하게는 0.01 내지 100 mg을 매일 또는 격일 투여하거나 1일 1 내지 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 투여 경로, 비만의 중등도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [103] 본 발명에서 사용되는 용어 "개체"란 질병의 치료를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐(mouse), 쥐(rat), 개, 고양이, 말, 및 소 등의 포유류일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [104] 본 발명에서 사용되는 용어 "투여"란 임의의 적절한 방법으로 개체에게 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다.
- [105] 본 발명에서 사용되는 용어 "예방"이란 목적하는 질환의 발병을 억제하거나 지연시키는 모든 행위를 의미하고, "치료"란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 목적하는 질환과 그에 따른 대사 이상 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미하며, "개선"이란 본 발명에 따른 조성물의 투여에

의해 목적하는 질환과 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 감소시키는 모든 행위를 의미한다.

[106]

[107] 또한, 본 발명은 (a) 동물모델의 피검체에 후보물질을 투여하는 단계; 및 (b) 상기 피검체의 뇌 조직을 모니터링하는 단계를 포함하는, 뇌신경계질환 치료물질의 스크리닝 방법으로, 상기 투여는 비공 또는 상악동을 통해 비강 내 투여하며, 상기 비강은 비중격, 후각점막상피, 후각점막상피에 근접한 상비갑개, 및 중비갑개 부위로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 부위를 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법을 제공한다.

[108] 본 발명 스크리닝 방법을 언급하면서 사용되는 용어 "후보물질"은 본 발명의 뇌신경계질환에 영향을 미치는지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에서 이용되는 미지의 물질을 의미한다. 상기 후보물질은 siRNA(small interference RNA), shRNA(short hairpin RNA), miRNA(microRNA), 리보자임(ribozyme), DNase, PNA(peptide nucleic acids), 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 항체, 앵타머, 천연추출물 또는 화학물질을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[109] 또한, 상기 (a) 단계에서 사용되는 세포는 실험동물의 형태로 제공될 수 있으며, 후보물질과의 접촉은 비강 내 투여 또는 상악골 내 투여되는 것을 특징으로 한다.

[110] 본 발명의 상기 (b) 단계에서 모니터링은 mRNA의 발현량 측정 또는 단백질 발현량 측정을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[111] 본 발명의 상기 (b) 단계에서 상기 mRNA의 발현량 측정은 RT-PCR, 정량적 또는 반정량적 RT-PCR(Quantitative or semi-Quantitative RT-PCR), 정량적 또는 반정량적 리얼 타임 RT-PCR(Quantitative or semi-Quantitative real-time RT-PCR), 노던 블롯(northern blot) 및 DNA 또는 RNA 칩(chip)으로 이루어지는 군에서 하나 이상 선택된 방법을 이용하여 측정되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[112] 본 발명의 상기 (b) 단계에서 상기 단백질 발현량 측정은 웨스턴 블롯, ELISA, 방사선면역분석법, 방사면역확산법, 오우크테로니(Ouchterlony) 면역확산법, 로케트 면역전기영동, 면역조직화학염색, 면역침전분석, 보체고정분석, FACS 및 단백질 칩으로 이루어진 군에서 하나 이상 선택된 방법을 이용하여 측정되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[113] 본 발명에서, 대조군은 후보물질을 처리하지 않은 동물모델일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[114] 본 명세서에서, 모니터링하고자 하는 뇌 조직은 바람직하게는 두개골 내 생체조직으로, 뇌 조직, 뇌 세포, 또는 뇌 혈관일 수 있으며, 바람직하게는 대뇌 세포, 대뇌 조직, 또는 대뇌 혈관일 수 있고, 보다 바람직하게는 대뇌 피질, 해마체 또는 신경 조직일 수 있으나, 이로써 제한되는 것은 아니다.

[115]

- [116] 또한, 본 발명은 후보물질 또는 약물이 비공 또는 상악동을 통해 비강 내 투여되며, 상기 비강은 비중격, 후각점막상피, 후각점막상피에 근접한 상비갑개, 및 중비갑개 부위로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 부위를 포함하는 것을 특징으로 하는, 동물모델을 제공한다.
- [117] 본 발명에서, 용어 "후보물질"은 상기 설명한 바와 같다.
- [118] 본 발명에서, 용어 "약물"은 siRNA(small interference RNA), shRNA(short hairpin RNA), miRNA(microRNA), 리보자임(ribozyme), DNAzyme, PNA(peptide nucleic acids), 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 항체, 앵타머, 세포, 천연추출물 또는 화합물질을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [119] 상기 세포는 줄기세포를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [120] 상기 동물모델은 인간을 제외한 포유동물을 이용하여 제조될 수 있으며, 상기 인간을 제외한 포유동물은 원숭이, 랫트, 생쥐, 토끼, 개, 영장류 등일 수 있으며, 바람직하게는 쥐과(Muridae) 동물일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [121]
- [122] 본원 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성 요소를 "포함" 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성 요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다. 본원 명세서 전체에서 사용되는 정도의 용어 "약", "실질적으로" 등은 언급된 의미에 고유한 제조 및 물질 허용오차가 제시될 때 그 수치에서 또는 그 수치에 근접한 의미로 사용되고, 본 발명의 이해를 돕기 위해 정확하거나 절대적인 수치가 언급된 개시 내용을 비양심적인 침해자가 부당하게 이용하는 것을 방지하기 위해 사용된다. 본원 명세서 전체에서 사용되는 정도의 용어 "~(하는) 단계" 또는 "~의 단계"는 "~를 위한 단계"를 의미하지 않는다.
- [123] 본원 명세서 전체에서, 마쿠시 형식의 표현에 포함된 "이들의 조합(들)"의 용어는 마쿠시 형식의 표현에 기재된 구성 요소들로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 혼합 또는 조합을 의미하는 것으로서, 상기 구성 요소들로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 포함하는 것을 의미한다.
- [124] 본원 명세서 전체에서, "A 및/또는 B"의 기재는 "A 또는 B, 또는 A 및 B"를 의미한다.
- [125] 어떤 실시예가 달리 구현 가능한 경우에 특정한 단계는 설명되는 순서와 다르게 수행될 수도 있다. 예를 들어, 연속하여 설명되는 두 단계는 실질적으로 동시에 수행될 수도 있고, 설명되는 순서와 반대의 순서로 수행될 수도 있다.

[126]

발명의 실시를 위한 형태

- [127] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[128]

[129] **[실시예]**[130] **실시예 1. 사람 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포(hNTSCs)의 분리 및 배양**

[131] 수술 전 환자의 동의하에 하비갑개 절제술 시행과정에서 하비갑개 조직을 채취하였으며, 상기 하비갑개 조직을 채취한 직후 겐타마이신(국제약품공업, 성남, 대한민국)이 포함된 생리식염수로 3-5회 세척하였다.

[132] 상기 과정을 통해 채취한 하비갑개 조직으로부터 사람 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포를 분리하기 위하여, 먼저 상기 채취한 조직을 4°C에서 냉장 보관한 후, 실온에서 항생-항진균 용액(Gibco, Gaithersburg, MD)으로 3회 세척하였다. 그 다음, 다시 중성 PBS(phosphate buffered saline)으로 2회 세척한 뒤, 작은 수술용 가위를 이용하여 0.5mm³ 크기로 잘게 절단하였다.[133] 절단한 조직을 100mm 배양용 접시에 놓고 소독된 슬라이드 글라스로 덮어 배양용 접시에 유착시켰고, 10% FBS(fetal bovine serum)가 포함된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Media) 배지를 넣어 37°C, 5% CO₂ 환경의 배양기에서 배양하였다. 2-3주간 배양한 다음, 슬라이드 글라스를 제거한 후 배양액에 부유하는 세포를 세척하여 버리고, 트립신을 사용해서 배양용 접시 바닥에 붙은 사람 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포를 바닥으로부터 떼어내어 3대까지 계대 배양된 세포를 사용하였다.

[134]

[135] **실시예 2. 주사에 의한 비강 내 국부투여 경로**

[136] 도 1에 나타난 바와 같이, 본 발명자들은 신경계를 보다 빠르고 효율적으로 회복시키기 위해, 실시예 1에 나타난 바와 같이, 사람 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포를 분리 및 배양한 후 상기 분리 및 배양한 사람 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포 및 약물을 코를 경유하여 주사로 국부투여하였다.

[137] 도 2에 나타난 바와 같이, 노란타원부위로 표시된 상비갑개와 비중격 후상부의 후각점막상피를 세포 및 약물의 투여 위치로 선정하였다.

[138] 상기 표시된 부위를 통한 구체적인 국부투여 경로는, 도 3에 나타난 바와 같이, 후각점막상피하에 주사를 투여하여, 후각 신경주위 통로를 통해 약물이 흡수되는 경로가 있고, 도 4에 나타난 바와 같이, 두개저 사골판을 통과한 뇌경막하에 주사를 투여하여 약물이 흡수되는 경로가 있으며, 도 5에 나타난 바와 같이, 두개저 사골판 및 뇌경막하를 통과한 뇌실 내에 주사를 투여하여 약물이 흡수되는 경로가 있다.

[139]

[140] **실시예 3. 세포 및 약물 전달 경로 확인을 위한 래트 실험 준비 및 결과**

[141] 상기 실시예 2에 나타난 바와 같이, 3가지의 국부투여 경로에 세포 및 약물을 전달하기 위하여, 각각 래트마다 콧구멍에서부터 후각점막상피, 뇌경막, 및 뇌실의 길이가 조금씩 차이를 보이므로, 도 6에 나타난 바와 같이, 바늘을 길이별로 준비하였다. 또한, 래트의 후각 점막상피 손상으로 인한 출혈을

방지하기 위하여, 혈관 내 튜브 카테타도 길이 별로 함께 준비하였다.

[142] 그 후, 도 7에 나타난 바와 같이, 래트를 마취한 후 옆으로 눕힌 다음, 각각 래트의 후각점막상피까지의 길이에 맞는 카테타를 선택하여 주입할 부분에 고정 시킨 후, 각 길이에 맞는 바늘을 사용하여 주입하였다.

[143] 그 결과, 도 8에 나타난 바와 같이, 래트의 후각점막상피하에 trypan blue(20 μ L)를 주사한 후, 한시간 뒤에 투여 주변 부분들을 관찰한 결과, 뇌경막하까지는 trypan blue가 착색되어 있고, 구강 안까지는 소량 착색되었으나, 기도(trachea)부터 다른 장기로의 이동은 확인 할 수 없었다.

[144] 또한, 도 9에 나타난 바와 같이, 뇌경막하에 trypan blue(10 μ L)를 주사한 후, 한시간 뒤에 소뇌에서 trypan blue가 착색되어 있는 것을 확인하여, 소뇌로의 전달 경로의 가능성을 확인하였다.

[145] 또한, 도 10에 나타난 바와 같이, 뇌경막하에 사람 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포(1×10^5 /10 μ L)를 pkh26(red)로 염색하여 주사한 후, 래트를 희생하여 소뇌를 관찰하였을 때, 염색된 사람 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포가 소뇌에 있음을 확인하였다.

[146] 즉, 실시예 2에 나타난 바와 같은 경로를 통해 세포 및 약물을 주사로 국부투여 할 경우, 뇌경막하 또는 소뇌로 효율적으로 세포 및 약물을 전달할 수 있다는 것을 알 수 있다.

[147]

[148] 실시예 4. 베타아밀로이드 과발현 알츠하이머 마우스 동물모델에서 비강 내 투여의 효과 확인

[149] 실시예 4-1. 하비갑개 유래 줄기세포(hNTSCs) 비강 내 투여에 따른 기억/학습 능력 변화 확인

[150] 베타아밀로이드를 과발현 하는 알츠하이머병 마우스 동물모델에서 대조군으로 PBS, 실험군으로 사람 하비갑개 유래 줄기세포 (hNTSCs)를 3가지 방법 (intracranial injection, IC; nasal dropping, IN; intravenous injection, IV)으로 동물모델에 이식하고, 6주 후에 watermaze test 방법으로 기억/학습 능력의 변화를 관찰하였다.

[151] 알츠하이머병 마우스 동물모델은 5XFAD 유전자 과발현 마우스(transgenic mice)를 사용하였다. 5XFAD 형질 전환 마우스는 인간 프레세닐린 1 상 Swedish (K670N, M671L), Florida(I716V), 및 London(V717I) 가족성 알츠하이머병(FAD) 돌연변이와 함께, 인간 아밀로이드 베타(A4) 전구체 단백질 695(APP)를 과발현한다. 상기 마우스 동물모델은 베타아밀로이드 단백질의 전구체인 아밀로이드 전구체 단백질과 이를 분해하여 베타아밀로이드 단백질 합성에 중요한 역할을 하는 프레세닐린 1 효소가 과발현되어 알츠하이머병의 증상을 보인다.

[152] 그 결과, 도 11에 나타난 바와 같이, PBS를 주입한 그룹에 비해 줄기세포를 이식한 그룹에서 기억/학습 능력이 빠르게 회복되었으며 IV에 비해 IC, IN

방법으로 세포를 이식한 그룹에서 치료효과가 더 높게 나타나는 것을 확인하였다.

[153]

[154] 실시예 4-2. 하비갑개 유래 줄기세포(hNTSCs) 비강 내 투여에 따른 기억/학습 능력 변화 확인

[155] 베타아밀로이드를 과발현 하는 알츠하이머병 마우스 동물모델에서 대조군으로 PBS, 실험군으로 사람 하비갑개 유래 줄기세포 (hNTSCs)를 3가지 방법 (intracranial injection; IC, nasal dropping; IN, intravenous injection; IV)으로 동물모델에 이식하고 6주 후에 면역염색 방법으로 human nuclei antibody를 이용하여 마우스 뇌에 생착된 hNTSCs를 확인하였다.

[156] 그 결과, 도 12에 나타난 바와 같이, IC, IN 방법으로 줄기세포를 이식한 모델의 뇌에서 hNTSCs가 잘 생존하고 있음을 확인하였다. 그러나 IV 방법으로 세포를 이식한 모델의 뇌에서는 면역염색 결과 hNTSCs의 생존이 전혀 확인되지 않았다.

[157]

[158] 실시예 4-3. 하비갑개 유래 줄기세포(hNTSCs) 비강 내 투여에 따른 Iba-1(Ionized calcium-binding adaptor protein-1) 발현 확인

[159] 베타아밀로이드를 과발현 하는 알츠하이머병 마우스 동물모델에서 대조군으로 PBS, 실험군으로 사람 하비갑개 유래 줄기세포 (hNTSCs)를 3가지 방법 (intracranial injection, nasal dropping, intravenous injection)으로 동물모델에 이식하고 6주 후에 면역염색 방법으로 베타아밀로이드 및 면역반응에 중요한 microglial cell marker인 Iba-1 발현을 확인하였다.

[160] 그 결과, 도 13에 나타난 바와 같이, PBS를 주입한 그룹에 비해 줄기세포를 이식한 베타아밀로이드 및 Iba-1 발현이 감소하였으며 IV에 비해 IC, IN 방법으로 세포를 이식한 그룹에서 베타아밀로이드 발현 감소가 더 크게 나타나는 것을 확인하였다.

[161]

[162] 실시예 4-4. 하비갑개 유래 줄기세포(hNTSCs) 비강 내 투여에 따른 NeuN(neuronal nuclei) 발현 확인

[163] 베타아밀로이드를 과발현 하는 알츠하이머병 마우스 동물모델에서 대조군으로 PBS, 실험군으로 사람 하비갑개 유래 줄기세포 (hNTSCs)를 비강 내 점적 투여(nasal dropping)로 동물모델에 이식하고 6주 후에 면역염색 방법으로 베타아밀로이드 및 신경세포 marker인 NeuN 발현을 확인하였다.

[164] 그 결과, 도 14에 나타난 바와 같이, PBS를 주입한 그룹에 비해 IC, IN 방법으로 줄기세포를 이식한 그룹에서 베타아밀로이드 발현은 감소하고 신경세포 발현이 크게 증가하는 것을 확인하였다.

[165] 결과적으로, IC 방법으로 줄기세포를 이식하는 경우 뇌에 직접 세포를 전달할 수 있어 치료효과는 높을 수 있으나 IN 세포 이식방법은 세포 이식 방법의 안전성 및 세포의 반복 투여를 고려하였을 때 안전할 뿐만 아니라 치료에

효과적임을 확인하였다.

[166]

[167] 실시예 5. 상악골 내 투여 경로 탐색

[168] 비강 내 투여 경로 외에도 본 발명의 코 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포를 투여할 수 있는 경로를 모색하였다.

[169] 그 결과, 도 15에 나타난 바와 같이, 본 발명자들은 토끼의 상악골을 개방하였는 바, 토끼와 같은 중동물에서 외부 상악골 접근법(external transmaxillary approach)으로도 투여가 가능함을 확인하였다.

[170]

[171] 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 이해해야 한다.

[172]

산업상 이용가능성

[173] 본 발명자들은 후각신경주위 경로(Peri-olfactory pathway)로 혈액-뇌 장벽(Blood-Brain-Barrier; BBB)을 우회하기 위해 줄기세포 등을 비강 내로 주입하면 후각기관(olfactory)과 3차 신경계 통로(trigeminal neural pathways)를 통해 뇌에 전달할 수 있는데, 위 방법을 통해 줄기세포를 포함한 다양한 치료물질을 뇌신경계에 효율적 전달할 수 있으며, 전신에 약물이 노출되어 생기는 부작용을 감소시킬 수 있음을 확인하였다. 뿐만 아니라, 비공이나 상악동을 통해 비중격이나 후각점막상피 및 후각점막상피에 근접한 상비갑개 및 중비갑개 부위를 포함한 비강 내 투여하는 비강 내 투여는 전신에 약물이 노출되는 정맥 내 투여 방법과 비교하여 뇌신경계질환 치료 효과가 우수하고, 상악골 내 주사 방법의 경우 세포 투여시 두개골을 노출시킬 필요가 있는 반면 본 발명의 투여방법은 그럴 필요가 없어, 반복적인 투여에 효과적이므로, 산업상 이용가능성이 있다.

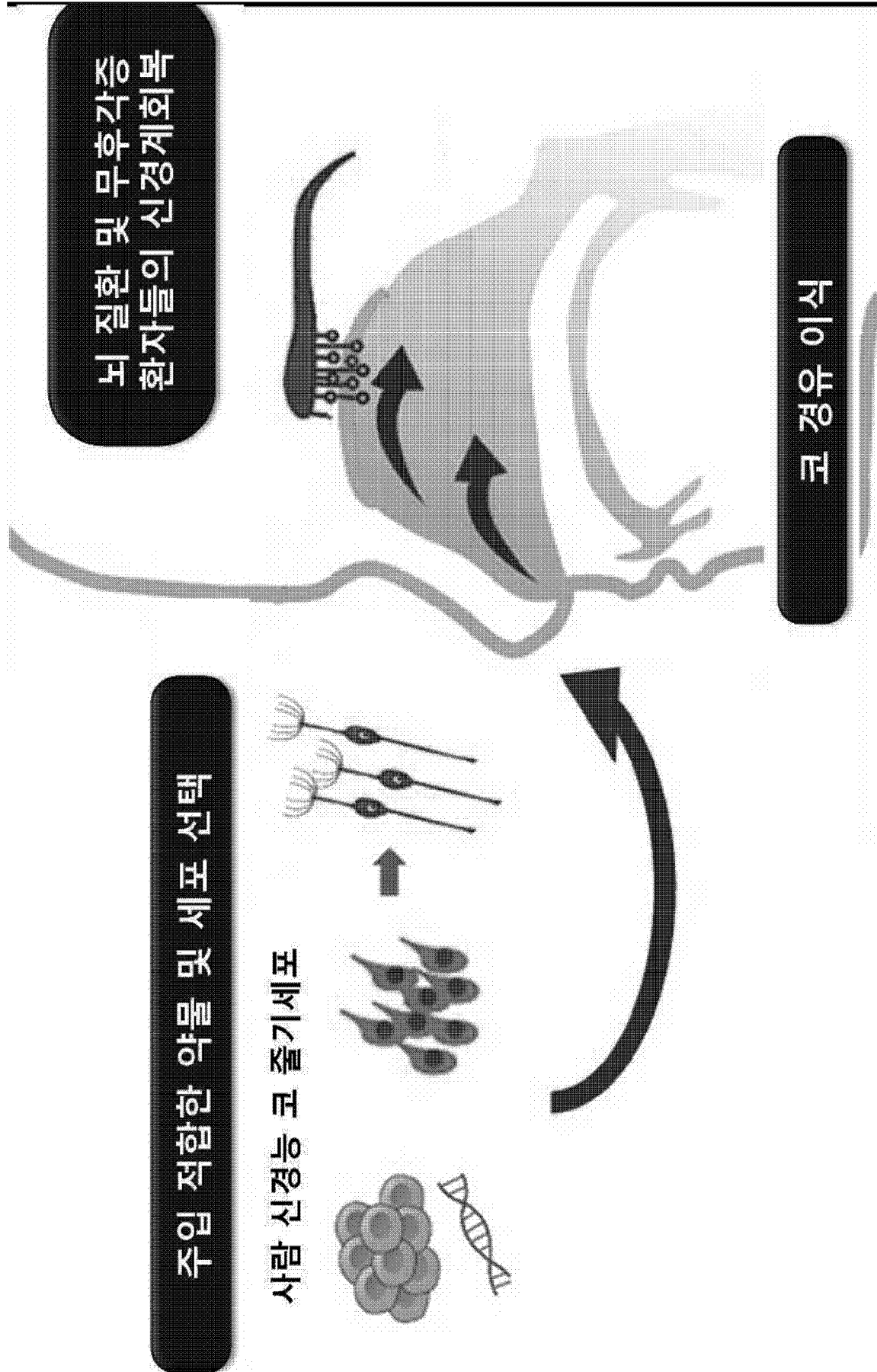
청구범위

- [청구항 1] 코 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 뇌신경계질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물로, 비공 또는 상악동을 통해 비강 내 투여하며, 상기 비강은 비중격, 후각점막상피, 후각점막상피에 근접한 상비갑개, 및 중비갑개 부위로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택된 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 조성물은 코 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포를 투여개체의 체중 kg 당 5×10^5 내지 3×10^7 세포수로 투여하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 비강 내 투여는 주사에 의한 국부투여, 및 분배기를 통한 투여로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.
- [청구항 4] 제3항에 있어서, 상기 분배기를 통한 투여는 에어로졸 또는 점적 전달 시스템의 형태를 통해 투여하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.
- [청구항 5] 제3항에 있어서, 상기 주사에 의한 국부투여는 후각점막상피하 주사(Subolfactory mucosal injection)를 통해 투여하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.
- [청구항 6] 제3항에 있어서, 상기 주사에 의한 국부투여는 후각점막부위의 두개저(skull base) 사골판(Cribriform plate)을 통과한 뇌경막하 주사(Intradural injection)를 통해 투여하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.
- [청구항 7] 제3항에 있어서, 상기 주사에 의한 국부투여는 두개저 사골판과 뇌경막하를 통과한 뇌실(Ventricle) 내 주사(Intraventricular injection)를 통해 투여하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.
- [청구항 8] 제1항에 있어서, 상기 비강 내 투여는 투여하고자 하는 부위의 상악골을 일부 제거하고 이를 통해 비강 내로 투여하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.
- [청구항 9] 제1항에 있어서, 상기 뇌신경계질환은 알츠하이머, 치매, 파킨슨병, 뇌졸중, 대뇌 허혈성 뇌졸중, 뇌내출혈, 헌팅턴병, 다발경화증, 척수 기능장애, 외상성 뇌손상, 및 뇌염으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.
- [청구항 10] 제1항 내지 제9항 중에 어느 하나에 따른 약학적 조성물을 포함하는,

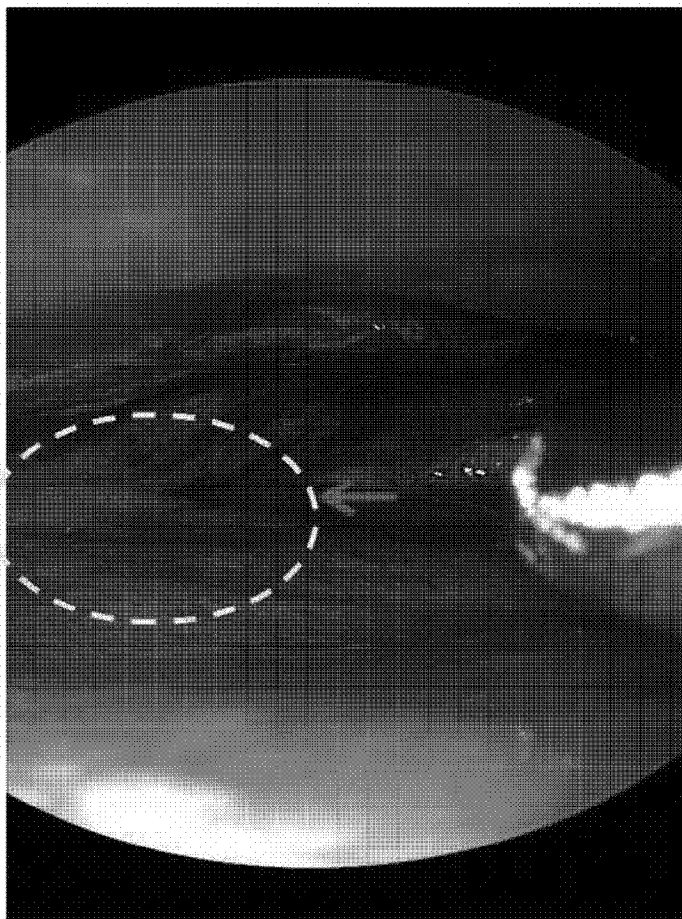
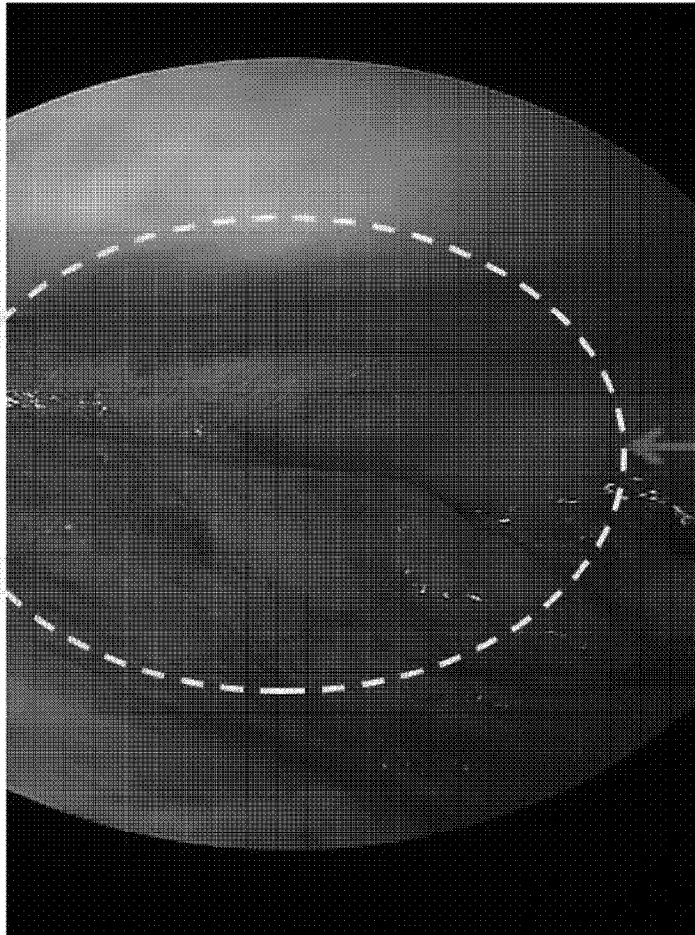
- 뇌신경계질환 치료용 줄기세포 치료제.
- [청구항 11] 후보물질 또는 약물이 비공 또는 상악동을 통해 비강 내 투여되며, 상기 비강은 비중격, 후각점막상피, 후각점막상피에 근접한 상비갑개, 및 중비갑개 부위로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택된 것을 특징으로 하는, 동물모델.
- [청구항 12] 제11항에 있어서, 상기 비강 내 투여는 주사에 의한 국부투여, 및 분배기를 통한 투여로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 동물모델.
- [청구항 13] 제12항에 있어서, 상기 분배기를 통한 투여는 에어로졸 또는 점적 전달 시스템의 형태를 통해 투여하는 것을 특징으로 하는, 동물모델.
- [청구항 14] 제12항에 있어서, 상기 주사에 의한 국부투여는 후각점막상피하 주사(Subolfactory mucosal injection)를 통해 투여하는 것을 특징으로 하는, 동물모델.
- [청구항 15] 제12항에 있어서, 상기 주사에 의한 국부투여는 후각점막부위의 두개저(skull base) 사골판(Cribriform plate)을 통과한 뇌경막하 주사(Intradural injection)를 통해 투여하는 것을 특징으로 하는, 동물모델.
- [청구항 16] 제12항에 있어서, 상기 주사에 의한 국부투여는 두개저 사골판과 뇌경막하를 통과한 뇌실(Ventricle) 내 주사(Intraventricular injection)를 통해 투여하는 것을 특징으로 하는, 동물모델.
- [청구항 17] 제11항에 있어서, 상기 비강 내 투여는 투여하고자 하는 부위의 상악골을 일부 제거하고 이를 통해 비강 내로 투여하는 것을 특징으로 하는, 동물모델.
- [청구항 18] (a) 동물모델의 피검체에 후보물질을 투여하는 단계; 및
(b) 상기 피검체의 뇌 조직을 모니터링하는 단계를 포함하는, 뇌신경계질환 치료물질의 스크리닝 방법으로, 상기 투여는 비공 또는 상악동을 통해 비강 내 투여하며, 상기 비강은 비중격, 후각점막상피, 후각점막상피에 근접한 상비갑개, 및 중비갑개 부위로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택된 것을 특징으로 하는, 방법.
- [청구항 19] 코 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 뇌신경계질환의 예방 또는 치료 방법으로서, 상기 약학적 조성물은 비공 또는 상악동을 통해 비강 내 투여되며, 상기 비강은 비중격, 후각점막상피, 후각점막상피에 근접한 상비갑개, 및 중비갑개 부위로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택된 것을 특징으로 하는, 방법.

- [청구항 20] 코 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물의 뇌신경계질환의 예방 또는 치료 용도로서,
상기 약학적 조성물은 비공 또는 상악동을 통해 비강 내 투여되며,
상기 비강은 비중격, 후각점막상피, 후각점막상피에 근접한 상비갑개, 및 중비갑개 부위로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택된 것을 특징으로 하는, 용도.
- [청구항 21] 코 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포의 뇌신경계질환 예방 또는 치료 약제의 제조를 위한 용도로서,
상기 코 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포는 비공 또는 상악동을 통해 비강 내 투여되며,
상기 비강은 비중격, 후각점막상피, 후각점막상피에 근접한 상비갑개, 및 중비갑개 부위로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택된 것을 특징으로 하는, 용도.
- [청구항 22] 제11항의 동물모델의 뇌신경계질환 치료물질의 스크리닝 용도.

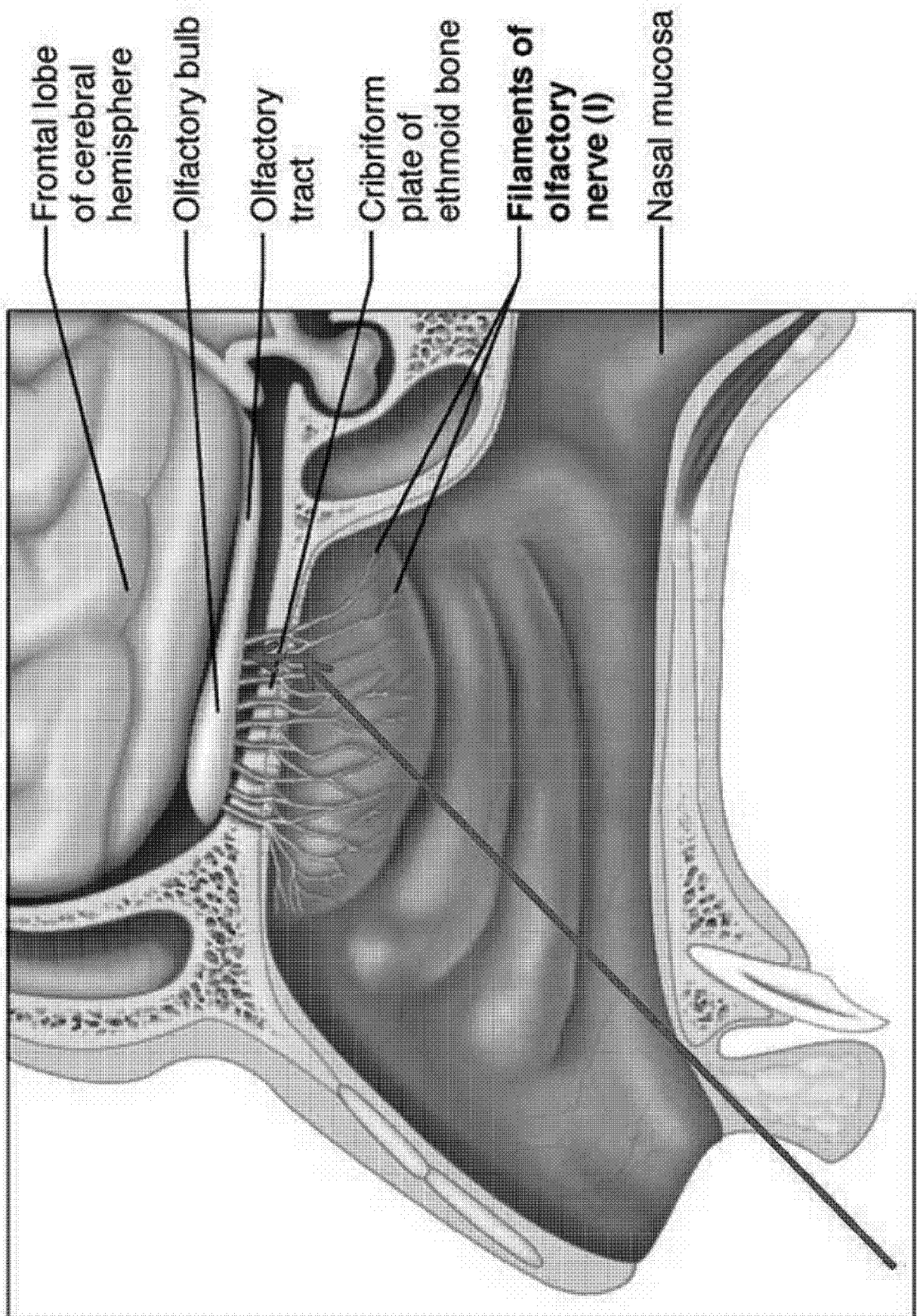
[도 1]



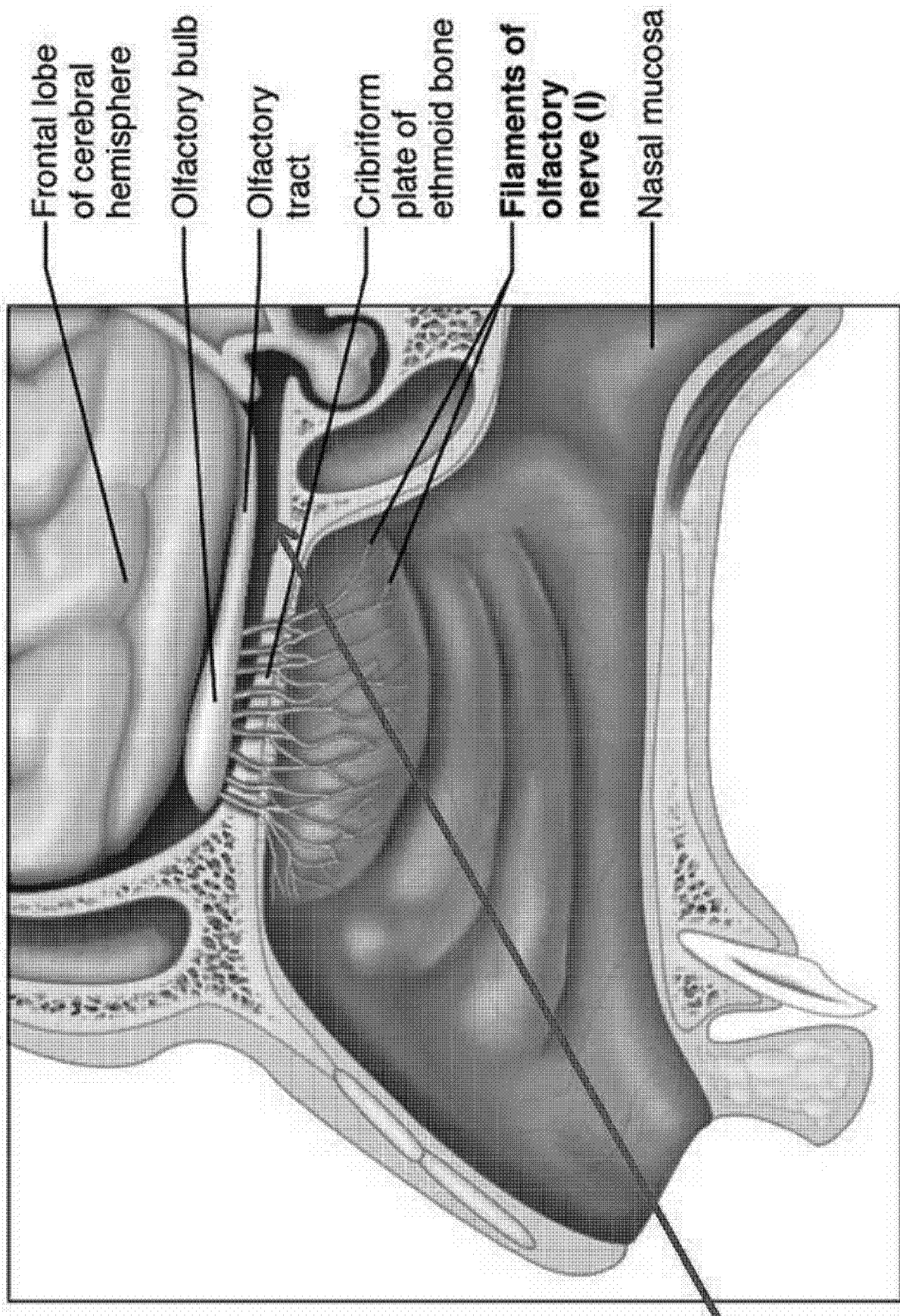
[도2]



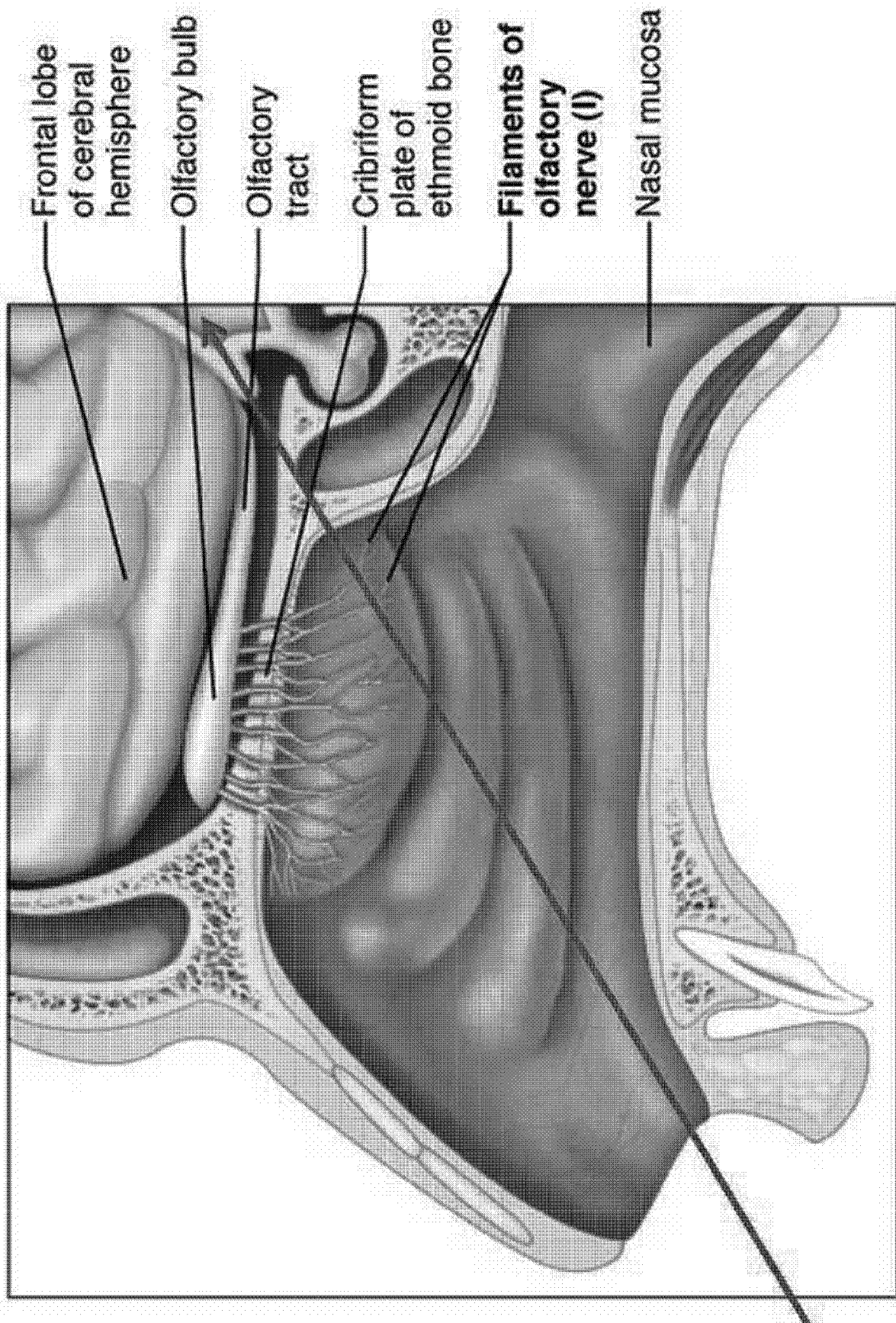
[도3]



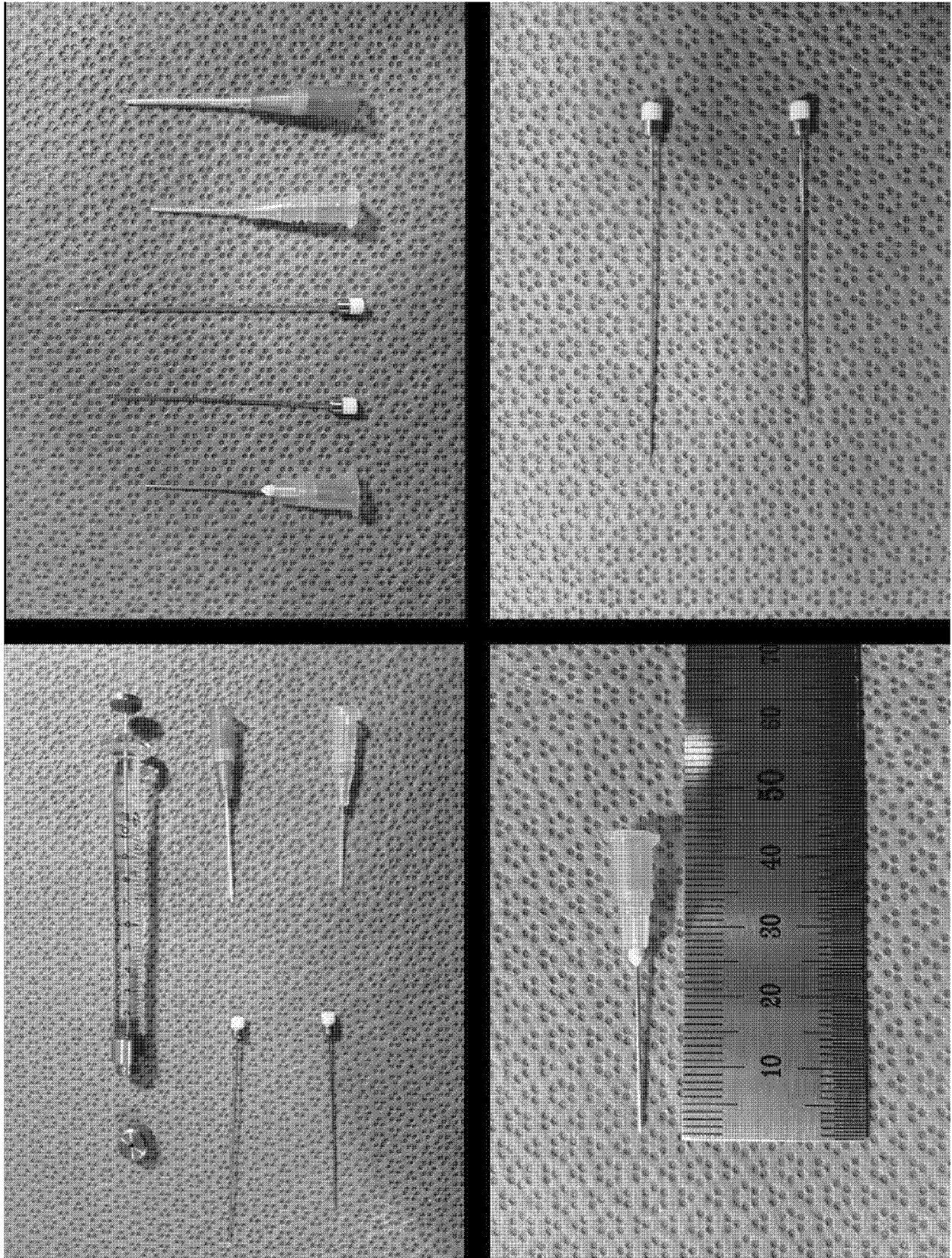
[도4]



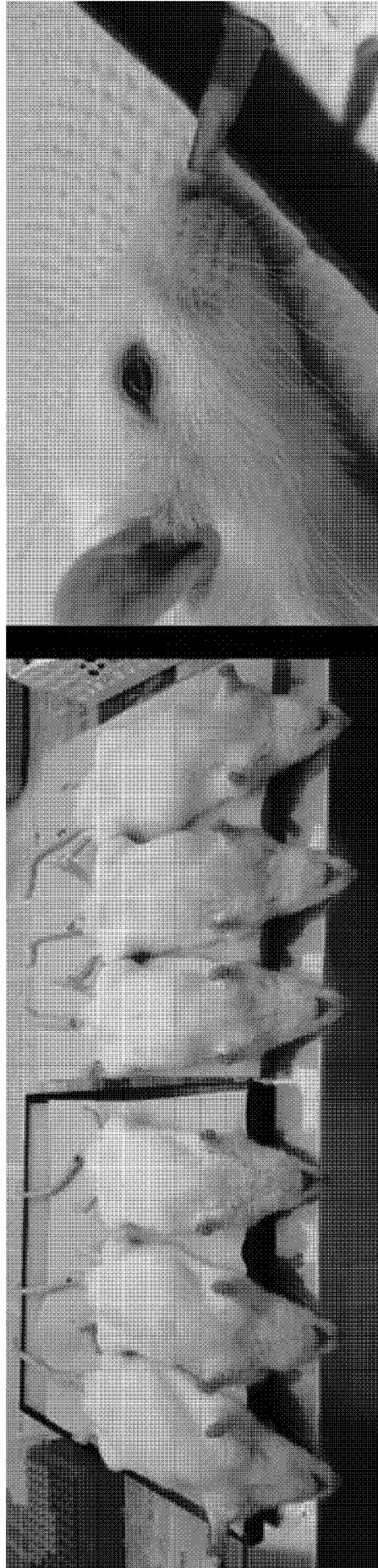
[도5]



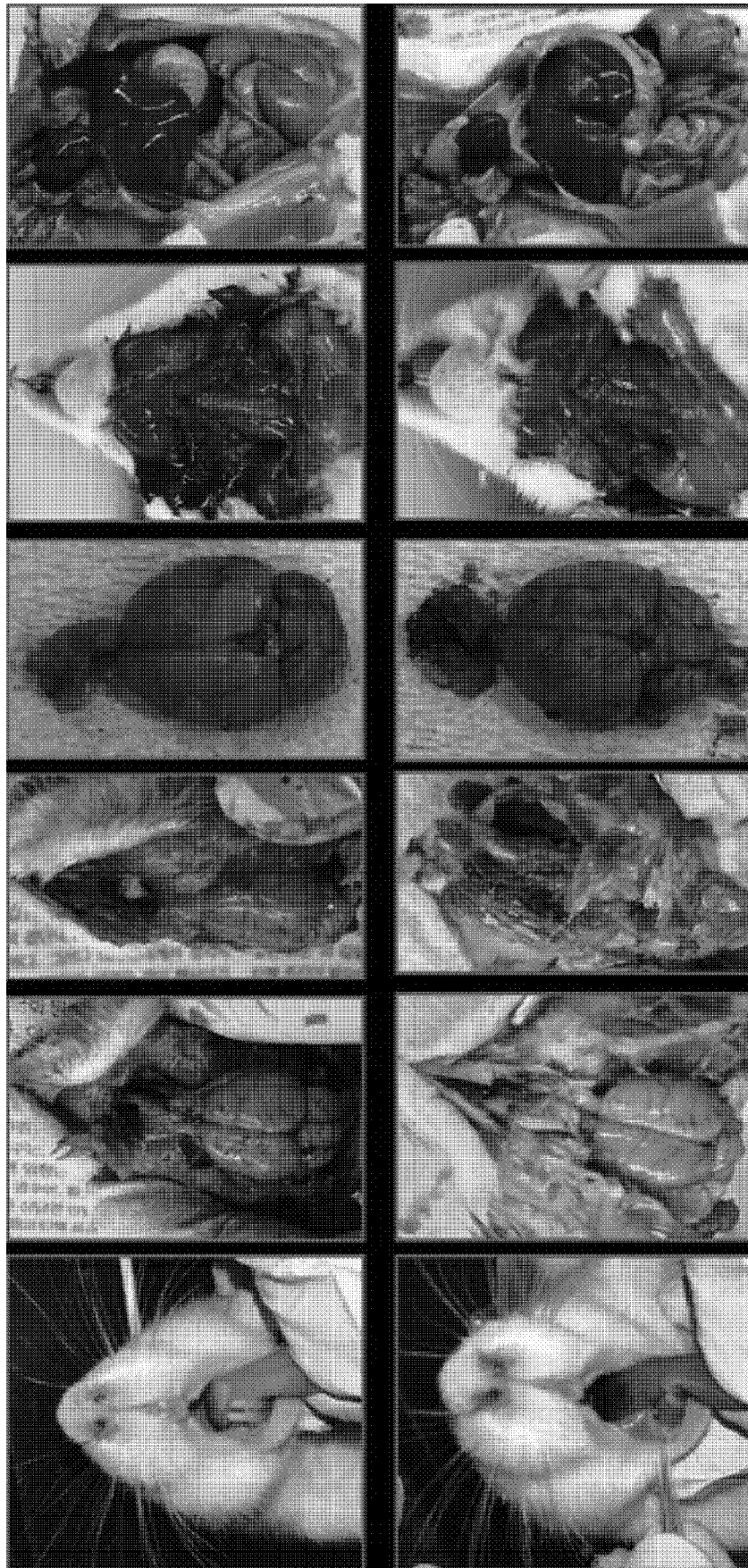
[도6]



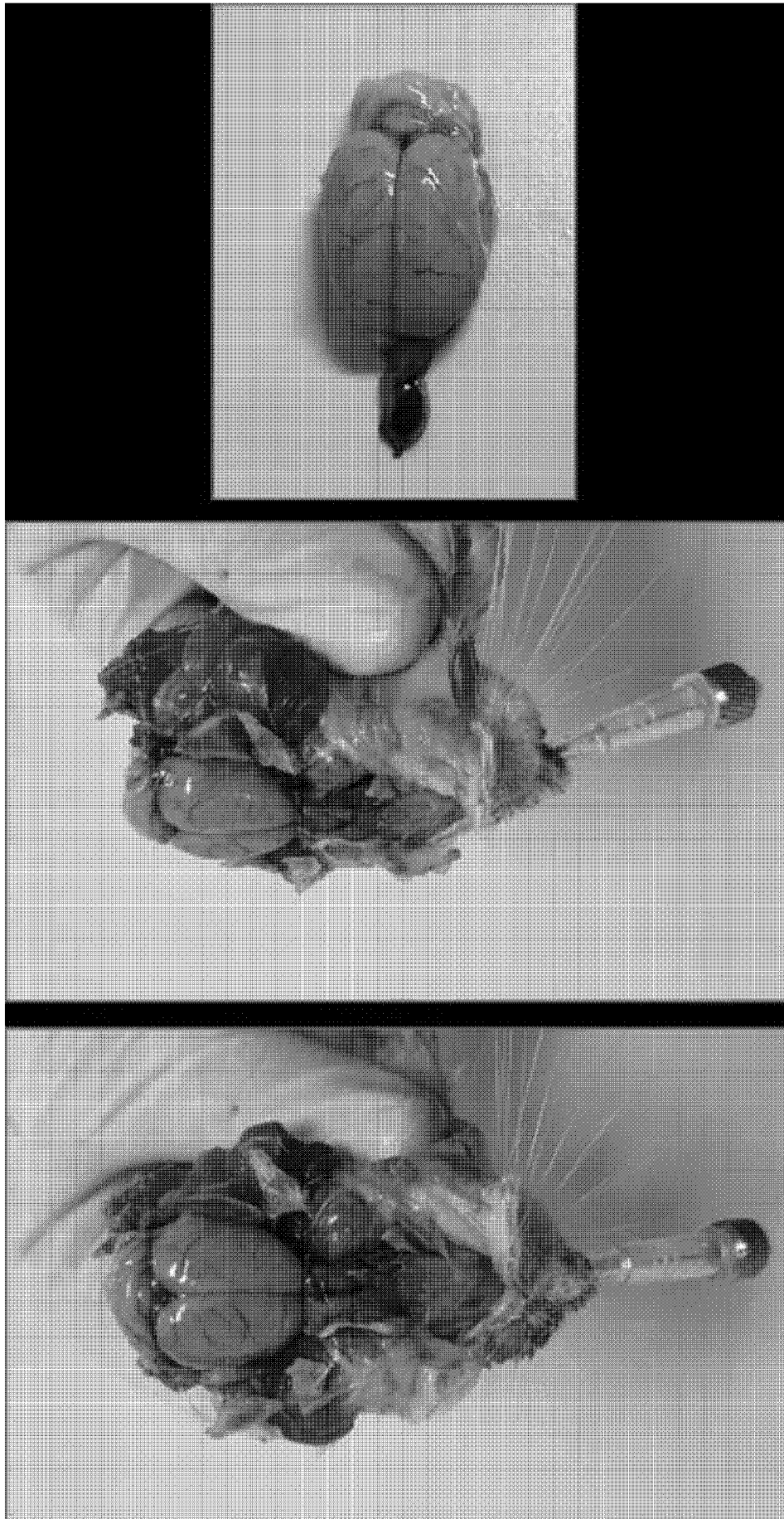
[도7]



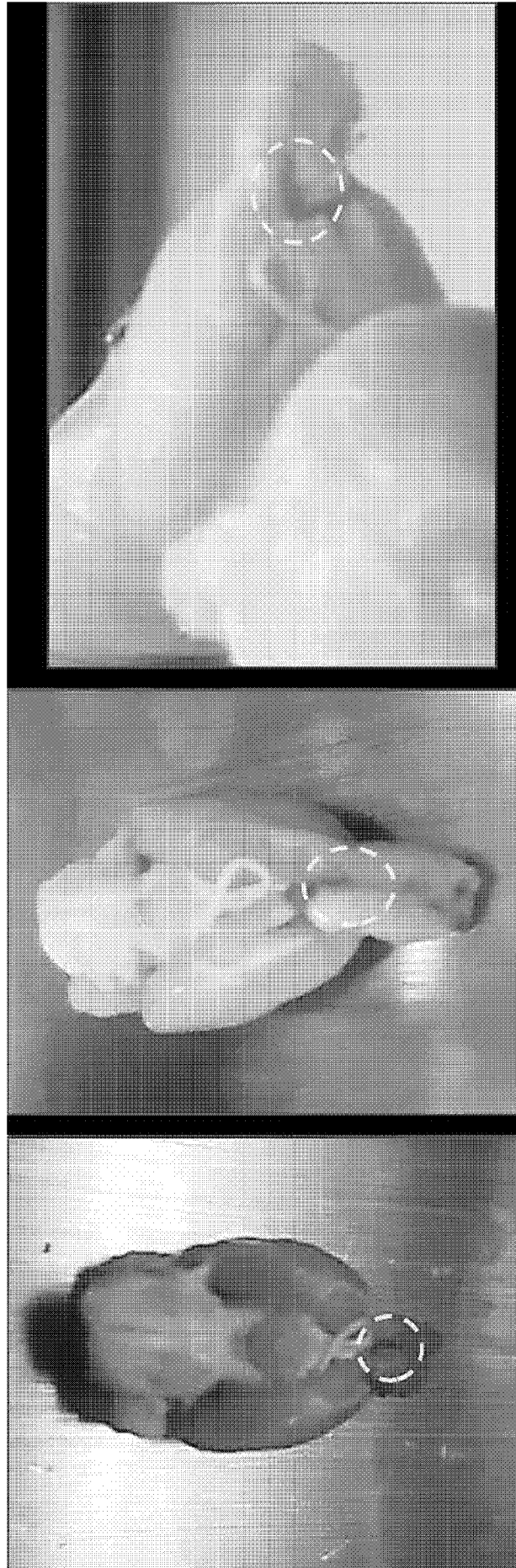
[도8]



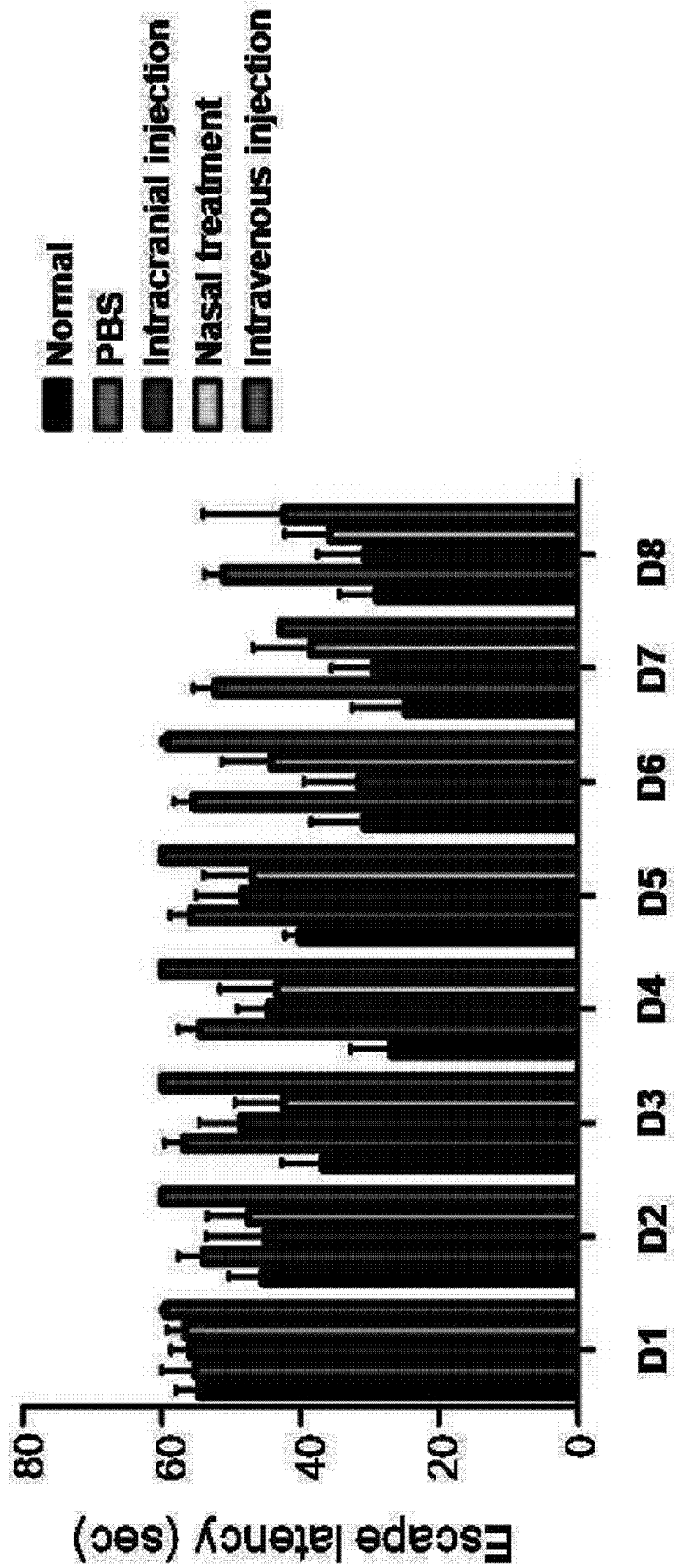
[도9]



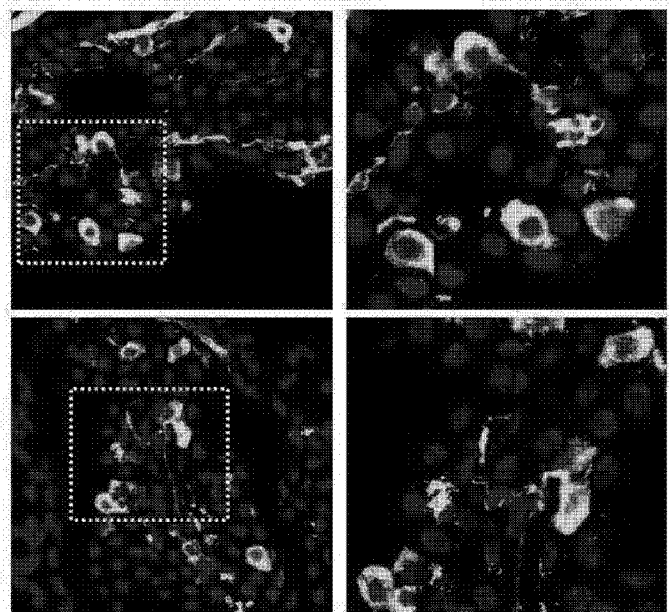
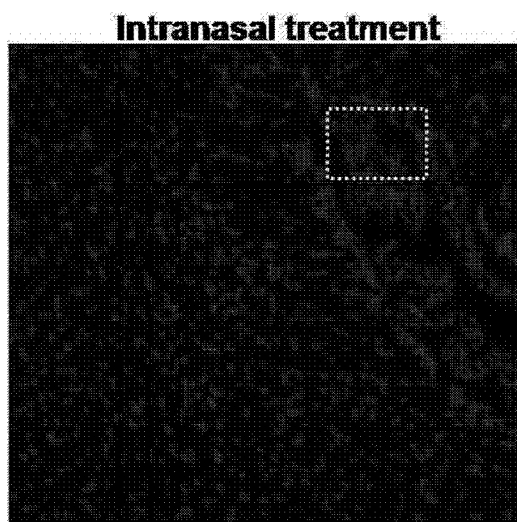
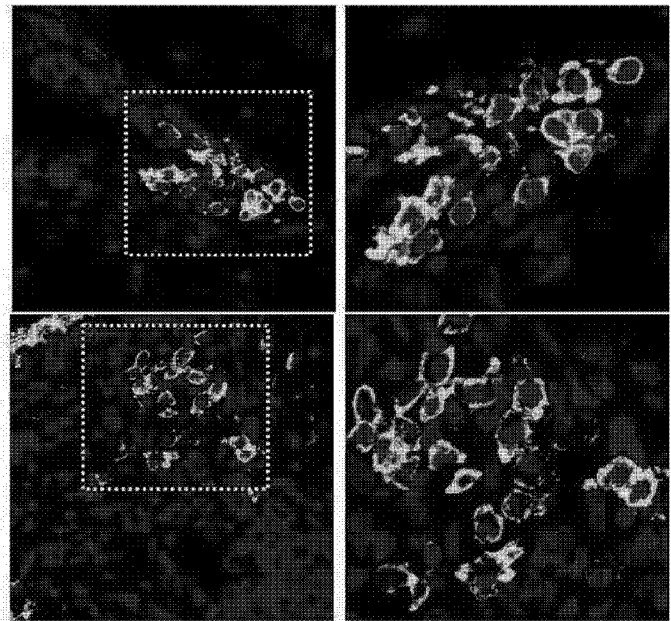
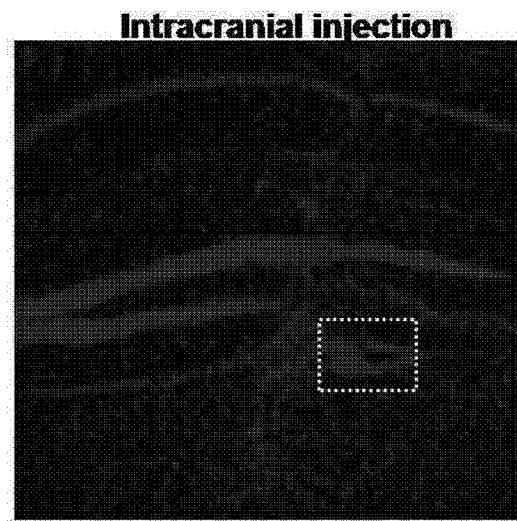
[도10]



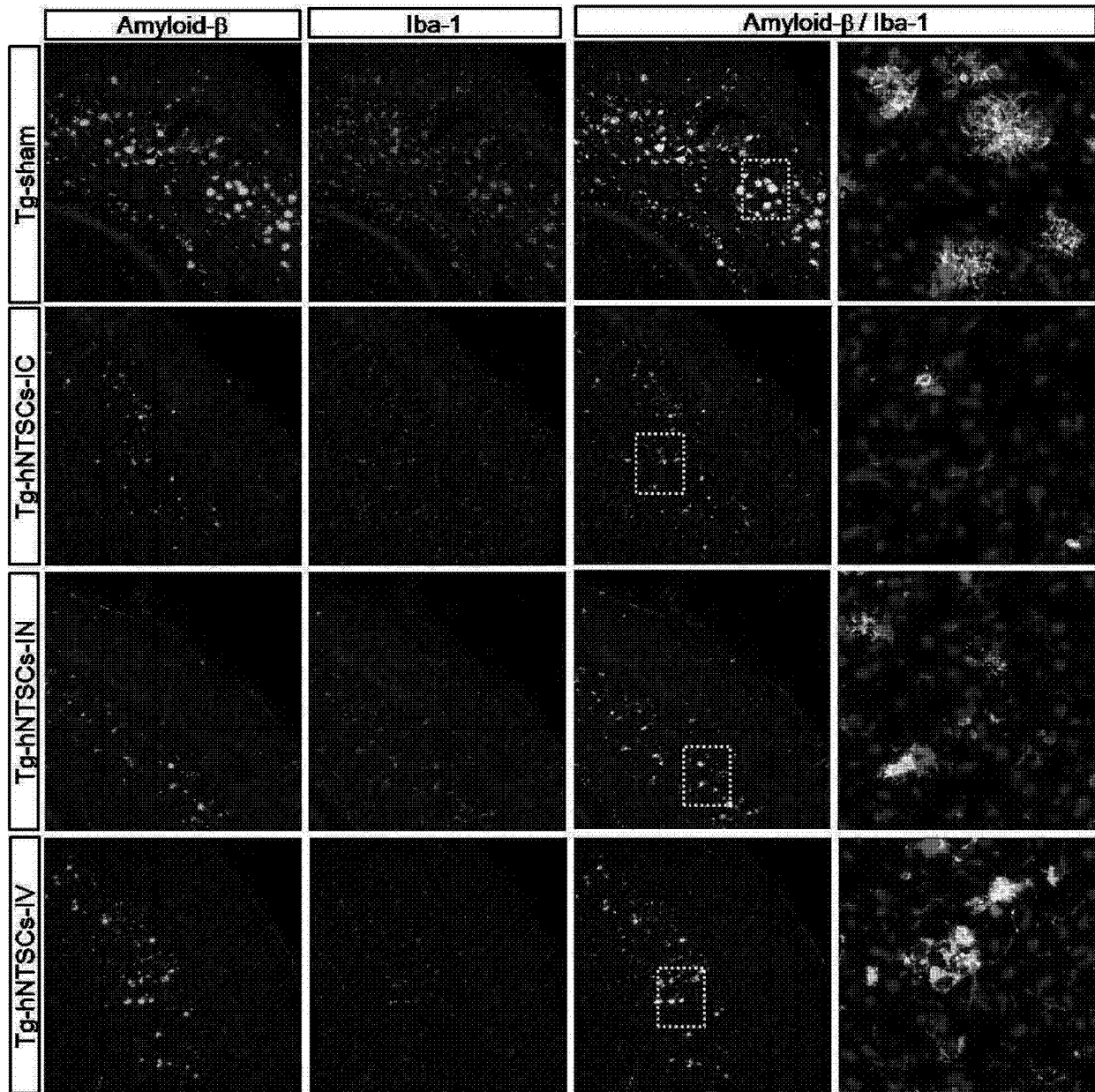
[도11]



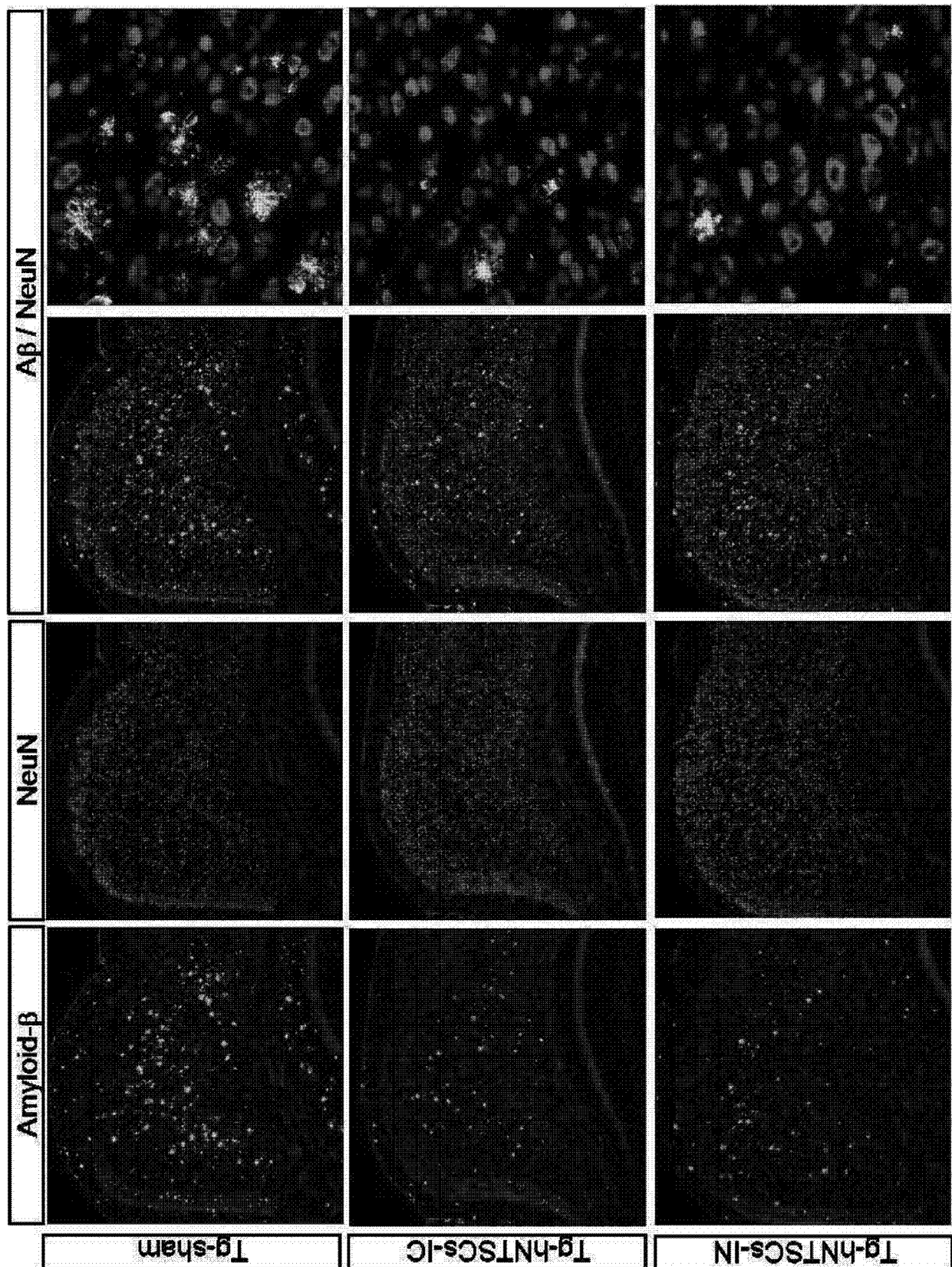
[도12]



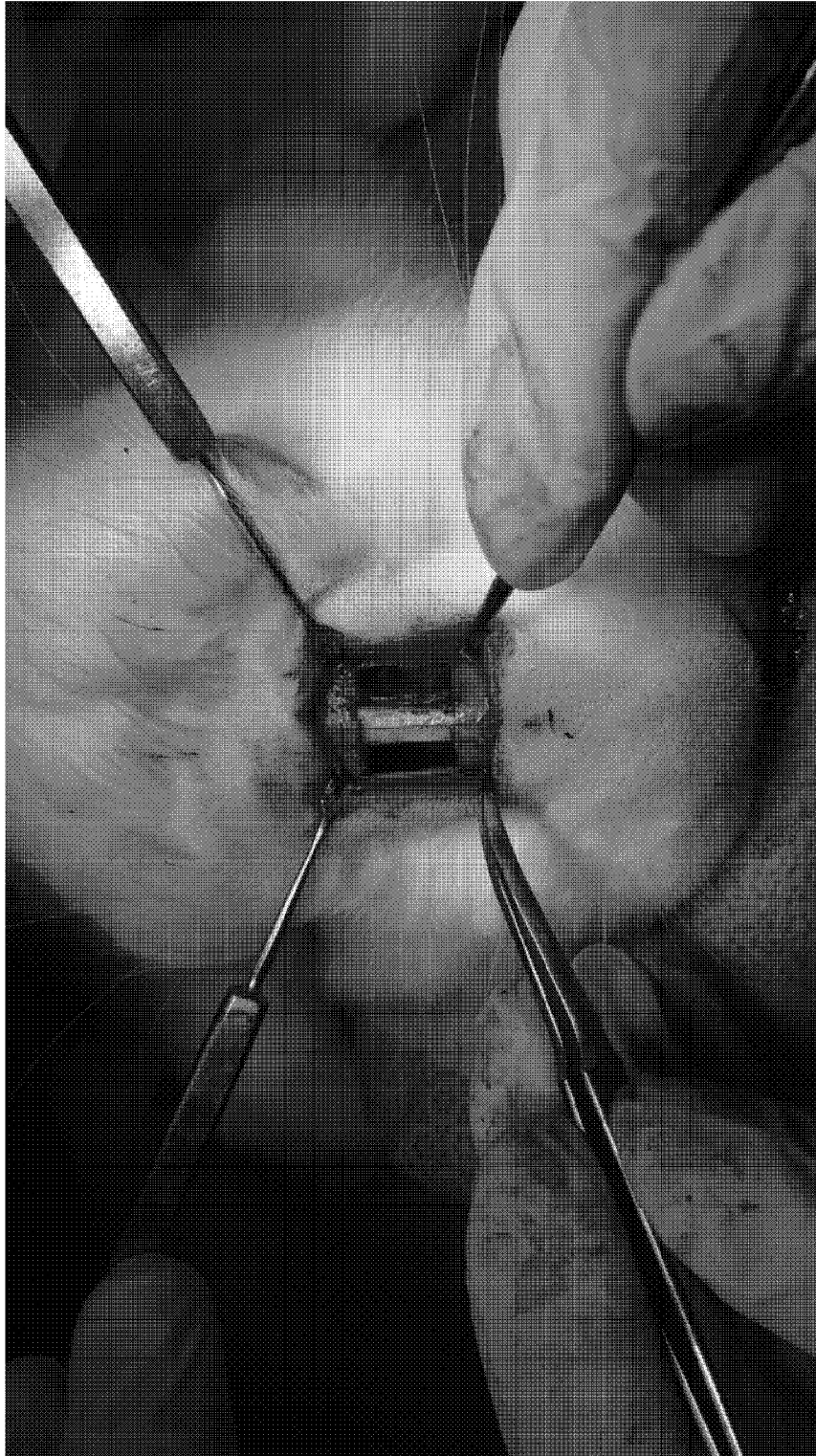
[도13]



[도14]



[도15]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/008371

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K 35/28(2006.01)i; A61K 9/00(2006.01)i; A61P 25/28(2006.01)i; A61P 25/16(2006.01)i; A61K 49/00(2006.01)i; A01K 67/027(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																	
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K 35/28(2006.01); A61B 5/00(2006.01); A61K 8/19(2006.01); A61K 9/12(2006.01); G01N 33/50(2006.01) Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models: IPC as above Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 하비갑개(inferior nasal concha), 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell), 비강 내 투여(intranasal administration), 주사(injection), 뇌신경질환(cranial nerve disease)																	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>KR 10-2020-0004208 A (THE CATHOLIC UNIVERSITY OF KOREA INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 13 January 2020 (2020-01-13) See paragraphs [0035] and [0039]; example 1; and claim 4.</td> <td>1-18,20-22</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 2016-0339059 A1 (MERIDA, Marco) 24 November 2016 (2016-11-24) See paragraphs [0006], [0017] and [0036]; and claims 1-2 and 9.</td> <td>1-18,20-22</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>TANG, Yilin et al. Intranasal delivery of bone marrow stromal cells preconditioned with fasudil to treat a mouse model of parkinson's disease. Neuropsychiatric Disease and Treatment. 23 January 2020, vol. 16, pp. 249-262. See page 257.</td> <td>6-7,15-16</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>YU-TAEGER, Libo et al. Intranasal administration of mesenchymal stem cells ameliorates the abnormal dopamine transmission system and inflammatory reaction in the R6/2 mouse model of huntington disease. Cells. 2019, vol. 8, article no. 595, pp. 1-22. See entire document.</td> <td>1-18,20-22</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	Y	KR 10-2020-0004208 A (THE CATHOLIC UNIVERSITY OF KOREA INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 13 January 2020 (2020-01-13) See paragraphs [0035] and [0039]; example 1; and claim 4.	1-18,20-22	Y	US 2016-0339059 A1 (MERIDA, Marco) 24 November 2016 (2016-11-24) See paragraphs [0006], [0017] and [0036]; and claims 1-2 and 9.	1-18,20-22	Y	TANG, Yilin et al. Intranasal delivery of bone marrow stromal cells preconditioned with fasudil to treat a mouse model of parkinson's disease. Neuropsychiatric Disease and Treatment. 23 January 2020, vol. 16, pp. 249-262. See page 257.	6-7,15-16	A	YU-TAEGER, Libo et al. Intranasal administration of mesenchymal stem cells ameliorates the abnormal dopamine transmission system and inflammatory reaction in the R6/2 mouse model of huntington disease. Cells. 2019, vol. 8, article no. 595, pp. 1-22. See entire document.	1-18,20-22
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.															
Y	KR 10-2020-0004208 A (THE CATHOLIC UNIVERSITY OF KOREA INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 13 January 2020 (2020-01-13) See paragraphs [0035] and [0039]; example 1; and claim 4.	1-18,20-22															
Y	US 2016-0339059 A1 (MERIDA, Marco) 24 November 2016 (2016-11-24) See paragraphs [0006], [0017] and [0036]; and claims 1-2 and 9.	1-18,20-22															
Y	TANG, Yilin et al. Intranasal delivery of bone marrow stromal cells preconditioned with fasudil to treat a mouse model of parkinson's disease. Neuropsychiatric Disease and Treatment. 23 January 2020, vol. 16, pp. 249-262. See page 257.	6-7,15-16															
A	YU-TAEGER, Libo et al. Intranasal administration of mesenchymal stem cells ameliorates the abnormal dopamine transmission system and inflammatory reaction in the R6/2 mouse model of huntington disease. Cells. 2019, vol. 8, article no. 595, pp. 1-22. See entire document.	1-18,20-22															
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.																	
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family																	
Date of the actual completion of the international search 19 October 2021		Date of mailing of the international search report 19 October 2021															
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.															

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/008371

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2017-011326 A1 (GUPTA, Sanjay) 19 January 2017 (2017-01-19) See entire document.	1-18,20-22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/008371

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **19**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 19 pertains to a method for treatment of the human body by therapy (PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv)).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2021/008371

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR	10-2020-0004208	A	13 January 2020	KR	10-2259791	B1	03 June 2021
US	2016-0339059	A1	24 November 2016	US	10335435	B2	02 July 2019
WO	2017-011326	A1	19 January 2017	US	2017-0007540	A1	12 January 2017
				US	2020-0121590	A1	23 April 2020

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 35/28(2006.01)i; A61K 9/00(2006.01)i; A61P 25/28(2006.01)i; A61P 25/16(2006.01)i; A61K 49/00(2006.01)i; A01K 67/027(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 35/28(2006.01); A61B 5/00(2006.01); A61K 8/19(2006.01); A61K 9/12(2006.01); G01N 33/50(2006.01) 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 하비갑개(inferior nasal concha), 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell), 비강 내 투여(intranasal administration), 주사(injection), 뇌신경질환(cranial nerve disease)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	KR 10-2020-0004208 A (가톨릭대학교 산학협력단) 2020.01.13 단락 [0035], [0039]; 실시예 1; 청구항 4 참조.	1-18,20-22
Y	US 2016-0339059 A1 (MERIDA, MARCO) 2016.11.24 단락 [0006], [0017], [0036]; 청구항 1-2, 9 참조.	1-18,20-22
Y	TANG, YILIN 등, 'Intranasal delivery of bone marrow stromal cells preconditioned with fasudil to treat a mouse model of parkinson's disease', Neuropsychiatric Disease and Treatment, 2020.01.23, 16권, 페이지 249-262 페이지 257 참조.	6-7,15-16
A	YU-TAEGER, LIBO 등, 'Intranasal administration of mesenchymal stem cells ameliorates the abnormal dopamine transmission system and inflammatory reaction in the R6/2 mouse model of huntington disease', Cells, 2019, 8권, article no. 595, 페이지 1-22 전체 문헌 참조.	1-18,20-22
A	WO 2017-011326 A1 (GUPTA, SANJAY) 2017.01.19 전체 문헌 참조.	1-18,20-22
☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2021년10월19일(19.10.2021)		국제조사보고서 발송일 2021년10월19일(19.10.2021)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 정다원 전화번호 +82-42-481-5373

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: **19**
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 19는 치료에 의한 사람의 처치방법에 관한 것입니다(PCT 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)).
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2020-0004208 A	2020/01/13	KR 10-2259791 B1	2021/06/03
US 2016-0339059 A1	2016/11/24	US 10335435 B2	2019/07/02
WO 2017-011326 A1	2017/01/19	US 2017-0007540 A1	2017/01/12
		US 2020-0121590 A1	2020/04/23