

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2020년 4월 30일 (30.04.2020) WIPO | PCT



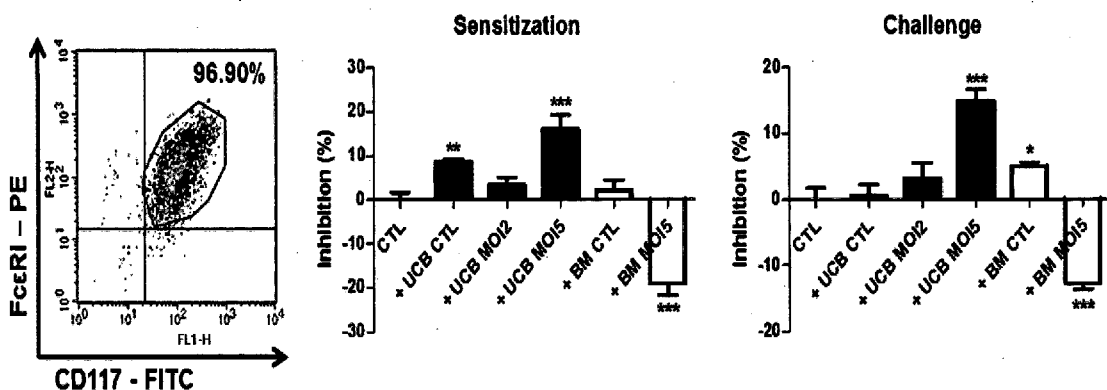
(10) 국제공개번호
WO 2020/085534 A1

- (51) 국제특허분류:
A61K 35/51 (2015.01) *A61K 8/66* (2006.01)
A61K 38/44 (2006.01) *A61Q 19/00* (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01) *C12N 9/02* (2006.01)
A61K 8/98 (2006.01) *C12N 15/86* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2018/012713
- (22) 국제출원일: 2018년 10월 25일 (25.10.2018)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (71) 출원인: 가톨릭대학교 산학협력단 (THE CATHOLIC UNIVERSITY OF KOREA INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 06591 서울시 서초구 반포대로 222, 가톨릭대학교 성의교정내 (반포동), Seoul (KR). 부산대학교 산학협력단 (PUSAN NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 46241 부산시 금정구 부산대학교63번길 2, 부산대학교 (장전동), Busan (KR).
- (72) 발명자: 김형식 (KIM, Hyung-Sik); 50612 경상남도 양산시 물금읍 부산대학교 49, 부산대학교 치의학전문대학원, Gyeongsangnam-do (KR). 김태윤 (KIM, Tae-Yoon); 06591 서울시 서초구 반포대로 222, 가톨릭대학교 성의교정내 의과대학 (반포동), Seoul (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 이룸리온 (ERUUM & LEEON INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM); 06575 서울시 서초구 사평대로 108, 3층 (반포동), Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, 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, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(54) Title: COMPOSITION COMPRISING SOD3-OVEREXPRESSED, CORD BLOOD-DERIVED STEM CELL AS ACTIVE INGREDIENT FOR PREVENTION OR TREATMENT OF ATOPIC DERMATITIS

(54) 발명의 명칭: SOD3를 과발현시킨 체대혈 유래 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 아토피 피부염의 예방 또는 치료용 조성물

【도 4】



(57) Abstract: The present invention relates to a pharmaceutical composition comprising superoxide dismutase 3 (SOD3)-overexpressed, cord blood stem cells as an active ingredient for prevention or treatment of atopic dermatitis. The composition according to the present invention exhibits an inhibitory effect against the degranulation of mast cells, which play as a core etiological factor in atopic dermatitis and as such, can be advantageously used to prevent or treat atopic dermatitis.

(57) 요약서: 본 발명은 슈퍼옥사이드 디스무타아제 3(superoxide dismutase 3, SOD3)를 과발현시킨 체대혈 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 아토피 피부염 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 조성물은 아토피 피부염 병인의 핵심 인자인 비만세포의 탈과립화를 억제하는 효과를 아토피 피부염 예방 또는 치료에 유용하게 이용될 수 있다.



(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))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

【명세서】**【발명의 명칭】**

SOD3를 과발현시킨 제대혈 유래 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 아토피 피부염의 예방 또는 치료용 조성물

【기술분야】

본 발명은 슈퍼옥사이드 디스무타아제 3(superoxide dismutase 3, SOD3)를 과발현시킨 제대혈 유래 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 아토피 피부염 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

【배경기술】

아토피성 피부염은 심한 가려움증을 수반하는 만성 염증성 피부 질환이다. 아토피성 피부염은 유전적 알레르기 성향, 다양한 환경 요인, 면역체계 이상 등이 복합적으로 작용하여 발생하는 것으로 알려져 있으나, 아직 구체적인 발병 메커니즘이 완전히 밝혀져 있지는 않다. 아토피성 피부염이 발병하면 피부 각질층의 세라마이드 양이 적어지고, 따라서 피부가 수분을 충분히 유지하기 힘들어져 결국 피부가 건조해지고 가려워진다. 피부가 건조해지고 손상되면, 각종 알러지 유발물질(allergen)이나 균이 쉽게 피부를 통과해 염증반응 등을 일으키게 된다.

아토피성 피부염 치료를 위해 사용되는 약물로는 보습제와 스테로이드제가 주로 사용되고 있다. 어린이 아토피성 피부염의 증상완화를 위해 보습제를 사용하는 부모가 91.9%에 달하고 있으나, 이 가운데 26%만이 사용 중인 보습제에 만족하고 있는 실정이며, 불만족스러운 가장 큰 이유는 효과가 없거나 일시적인 증상 완화에 그치기 때문인 것으로 조사된 바 있다.

스테로이드제(예를 들어, 부신피질 호르몬제 등)는 비장, 림프노드 및 골수에 있는 림프구, 단핵구를 고갈시켜 이들 세포들이 염증부위에 이르는 양을 줄이거나 대식세포와 중성구 및 항원항체의 면역작용을 방해함으로써, 염증반응을 억제한다. 그러나, 아토피성 피부염은 만성 피부 질환이기 때문에, 스테로이드제의

장기간 및 고용량 사용으로 인하여 다양한 부작용이 나타나는 문제가 있다. 예를 들어, 외형적인 변화로서 붓거나 얼룩다람쥐같이 늘어지는 양볼, 얼굴형이 둥글게 변하는 월상안(Moon-face), 들소의 등처럼 뒷목 부분이 굽어지는 현상(버팔로 험프-혹), 식욕의 급격한 증가로 인한 비만 등이 나타나며, 또한 지방 분포를 재분배하여 팔과 다리는 가늘어지는 한편, 얼굴과 배는 부어 오늘 듯 둥글게 커지는 현상을 일으킨다. 그리고 피부위축, 혈관확장, 탈색, 자반 등이 있고, 피부를 약화시키고, 약화된 피부로 인해 모세혈관이 드러날 수 있으며 쉽게 멍이 들기도 하고 심리적변화로는 신경과민, 초조, 우울증, 불면증이 나타나기도 한다. 또한, 내성이 생겨 사용할수록 효과가 떨어지게 되며, 고용량으로 사용하게 됨으로써 감염에 대한 감수성이 증가하여 흔히 보기 힘든 별난 감염을 일으키게 된다. 예를 들어, 당뇨, 백내장, 고혈압을 악화시키고, 혈액내 콜레스테롤과 중성지방의 수치를 증가시키며, 어린이에 있어서는 성장을 억제하고 6개월 이상 복용 시 어른이 되었을 때의 키가 줄어들기도 한다. 여러 형태의 쿠싱증후군(Cushings) 질환의 발현 및 뼈, 근육 및 피부과 같은 지지(supporting)조직의 부작용이 일어날 수 있으며 고혈압과 주요 감염에 대한 방어작용에 이상이 올 수 있다. 또한, 고관절, 견관절, 슬관절, 기타 다른 관절에서 뼈의 무혈관성 괴사를 일으킬 수 있으며, 위장관으로부터 칼슘의 흡수를 억제함으로써 뼈를 약화시켜 부러지기 쉽게 하고, 골다공증을 일으키기도 한다.

한편, 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cells, MSC)는 골수, 제대혈, 지방, 근육 등의 조직으로부터 분리될 수 있는 다분화능을 가진 세포로서, MSC의 기능에 관하여 다양한 연구가 진행되고 있다.

현재 중간엽 줄기세포를 얻을 수 있는 가장 대표적 기원 조직으로 골수(bone marrow)를 들 수 있다. 그러나, 골수에 존재하는 간엽 줄기세포는 제한적인 분화능과 증식능력으로 인해 그 응용범위가 한정적일 수밖에 없으며, 골수로부터 유래하는 한계로 인해 여러 단계의 기술이 필요하고, 기술 과정이 복잡하여 채취 대상자에게 시간적, 정신적 및 육체적 고통을 수반하는 것이 보통이다.

최근에는 제대혈에 많은 양의 줄기세포가 있는 것으로 알려지면서 연구가 활발히 이루어지고 있다. 제대혈이 조혈모세포의 풍부한 원천으로 알려진 이후, 임상적으로 제대혈을 이용하여 다양한 질환을 치료하고자 하는 시도가 많이 이루어지고 있으며, 자가이식 치료를 위하여 제대혈을 냉동시켜 수년 후 사용가능한

상태로 보존하는 제대혈은행이 국내에서도 활성화되고 있다.

제대혈은 골수와는 달리 분만과정에서 버려지는 제대(umbilical cord)에서 간단한 기술을 통해 얻을 수 있으며, 그 양에 비해 수많은 조혈모세포 및 줄기세포를 포함하고 있다. 특히 제대혈 이식시 나타날 수 있는 이식편대숙주반응이 골수이식에 비해 상당히 적어 제대혈에 포함되어 있는 줄기세포의 성상 확인 및 그의 임상예의 응용 확대를 위한 연구가 전세계적으로 이루어지고 있다.

활성산소를 제거할 뿐만 아니라 다른 항산화 효소가 작용할 수 있도록 하여 세포를 보호하는 기능을 가지는 SOD(superoxide dismutase)는 구리와 아연 원자를 가지고 있는 Cu/Zn SOD(SOD 1), 망간 원자를 가지고 있는 Mn-SOD(SOD 2) 및 세포 표면 또는 세포 외액에 존재하는 EC-SOD(extracellular superoxide dismutase)로 구분된다.

그 중 EC-SOD 단백질인 SOD3(superoxide dismutase 3, extracellular)는 세포 외부로 분비되며 인간의 정상형(wild-type, WT) SOD3 단백질의 아미노산 서열은 NCBI Genbank database의 NP_003093.2 등의 accession number로 공지되어 있다. 또한 인간의 SOD3 단백질을 암호화하는 mRNA의 염기서열은 NM_003102.2 등의 accession number로 공지되어 있다.

상기와 같이 제대혈 줄기세포에 대한 많은 연구가 수행되고 있지만 SOD3를 과발현시킨 제대혈 유래 줄기세포의 아토피 치료 효과에 대해서는 보고된 바 없다.

【발명의 상세한 설명】

【기술적 과제】

이에, 본 발명자들은 SOD3 과발현에 있어서 적합한 세포 원천을 확립하고 적합한 프로모터와 감염다중도(multiplicity of infection, MOI)를 파악한 후, 이를 이용하여 SOD3를 과발현시킨 제대혈 유래 줄기세포의 비만 세포 탈과립 억제 효과를 확인하여 본 발명을 완성하였다.

따라서 본 발명의 목적은 슈퍼옥사이드 디스무타아제 3(superoxide

dismutase 3, SOD3)를 과발현시킨 제대혈 유래 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 아토피 피부염 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

또한 본 발명의 목적은 슈퍼옥사이드 디스무타아제 3(superoxide dismutase 3, SOD3)를 과발현시킨 제대혈 유래 줄기세포로 구성되는 아토피 피부염 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

또한 본 발명의 목적은 슈퍼옥사이드 디스무타아제 3(superoxide dismutase 3, SOD3)를 과발현시킨 제대혈 유래 줄기세포로 필수적으로 구성되는 아토피 피부염 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 슈퍼옥사이드 디스무타아제 3(superoxide dismutase 3, SOD3)를 과발현시킨 제대혈 유래 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 아토피 피부염 예방 또는 개선용 화장료 조성물을 제공하는 것이다.

또한 본 발명의 목적은 슈퍼옥사이드 디스무타아제 3(superoxide dismutase 3, SOD3)를 과발현시킨 제대혈 유래 줄기세포로 구성되는 아토피 피부염 예방 또는 개선용 화장료 조성물을 제공하는 것이다.

또한 본 발명의 목적은 슈퍼옥사이드 디스무타아제 3(superoxide dismutase 3, SOD3)를 과발현시킨 제대혈 유래 줄기세포로 필수적으로 구성되는 아토피 피부염 예방 또는 개선용 화장료 조성물을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 아토피 치료용 제제를 제조하기 위한 슈퍼옥사이드 디스무타아제 3(superoxide dismutase 3, SOD3)를 과발현시킨 제대혈 유래 줄기세포의 용도를 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 슈퍼옥사이드 디스무타아제 3(superoxide dismutase 3, SOD3)를 과발현시킨 제대혈 유래 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 조성물의 유효량을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 것을 특징으로 하는 아토피 질환의 치료 방법을 제공하는 것이다.

【기술적 해결방법】

상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 슈퍼옥사이드 디스무타아제 3(superoxide dismutase 3, SOD3)를 과발현시킨 제대혈 유래 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 아토피 피부염 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

또한 본 발명은 슈퍼옥사이드 디스무타아제 3(superoxide dismutase 3, SOD3)를 과발현시킨 제대혈 유래 줄기세포로 구성되는 아토피 피부염 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

또한 본 발명은 슈퍼옥사이드 디스무타아제 3(superoxide dismutase 3, SOD3)를 과발현시킨 제대혈 유래 줄기세포로 필수적으로 구성되는 아토피 피부염 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 슈퍼옥사이드 디스무타아제 3(superoxide dismutase 3, SOD3)를 과발현시킨 제대혈 유래 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 아토피 피부염 예방 또는 개선용 화장품 조성물을 제공한다.

또한 본 발명은 슈퍼옥사이드 디스무타아제 3(superoxide dismutase 3, SOD3)를 과발현시킨 제대혈 유래 줄기세포로 구성되는 아토피 피부염 예방 또는 개선용 화장품 조성물을 제공한다.

또한 본 발명은 슈퍼옥사이드 디스무타아제 3(superoxide dismutase 3, SOD3)를 과발현시킨 제대혈 유래 줄기세포로 필수적으로 구성되는 아토피 피부염 예방 또는 개선용 화장품 조성물을 제공한다.

본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 아토피 치료용 제제를 제조하기 위한 슈퍼옥사이드 디스무타아제 3(superoxide dismutase 3, SOD3)를 과발현시킨 제대혈 유래 줄기세포의 용도를 제공한다.

본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 슈퍼옥사이드 디스무타아제 3(superoxide dismutase 3, SOD3)를 과발현시킨 제대혈 유래 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 조성물의 유효량을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 것을 특징으로 하는 아토피 질환의 치료 방법을 제공한다.

이하 본 발명을 상세히 설명한다.

성체 줄기세포에 속하는 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell, MSC)"는 뼈(bone), 연골(cartilage), 지방조직(fat tissue), 힘줄(건), 신경조직(nerve tissue), 섬유아세포(fibroblast) 및 근육세포(muscle cell) 등 구체적인 장기의 세포로 분화되기 전의 다분화 전구 세포(multipotent progenitor)를 말한다. 상기 MSC는 다분화능을 가지고 있으면서도, 배아줄기세포와는 달리 윤리적인 문제가 없고 기생종 발생의 위험이 없다는 점에서 향후 주력 세포로 평가받고 있다. 현재까지 다양한 연구를 통해 골수 줄기세포(bone marrow stem cell)가 근육 세포나 간세포로 분화하거나, 지방 조직으로 분화함이 보고되며 뇌, 골수, 말초혈액, 혈관, 근육 등 신체의 다양한 조직 유래 줄기세포가 비슷한 효과와 능력을 가질 것이라 예상되고 있다.

하지만 골수유래줄기세포와 지방유래 줄기세포의 표현형의 비교연구에서 두 세포가 전반적으로 유사하지만 지방유래 줄기세포는 CD29, CD44, CD90, CD105가 더 표현되며 HLA-DR과 c-kit은 표현되지 않아 골수유래 줄기세포와 다소 차이가 있음을 보였으며, 분화능력의 유지에 지방유래 줄기세포가 더 유리할 수 있다고 보고된 바 있다(Cell Physiol Biochem 2004;14:311-324 참고).

제대혈 유래 줄기세포는 모체와 태아를 연결하는 탯줄 내에 함유된 제대혈로부터 분리한 중간엽 줄기세포로 성체줄기세포 중에서 뛰어난 증식능을 보유하고 있다. 본 발명자들의 선행 연구 결과 세포 유래별로 확립된 최적의 배양액과 배양법을 이용하여 세포를 증식시켰을 때 골수 유래 줄기세포의 경우 1.5×10^5 세포를 175T flask에 seeding하여 약 7일 후 $1.5 \sim 2 \times 10^6$ 세포를 수득할 수 있는 반면(cm^2 당 약 1.2×10^4 세포 수득) 제대혈 유래 줄기세포의 경우 3×10^5 세포를 100mm dish에 seeding하여 약 3일 후 $2 \sim 3 \times 10^6$ 세포를 수득할 수 있었다(cm^2 당 약 4.5×10^4 세포 수득). 또한 초기 seeding한 세포 수 대비 10배의 세포수를 확보하기 위해 골수 유래 줄기세포가 약 7일이 소요됨에 비해 제대혈 유래 줄기세포는 약 3일이 소요되었다. 따라서 동일면적의 배양용기에서 제대혈 유래 줄기세포의 경우 골수 유래 줄기세포 대비 3~4배 이상의 세포수를 더 빠른 속도로 확보할 수 있다는 장점이 있다. 또한 바이러스 벡터의 도입에 세포의 증식 능력이 영향을 미칠 수

있다는 점을 고려할 때, 제대혈 유래 줄기세포가 골수 유래 줄기세포 등에 비해 바이러스 벡터 도입 효율이 높을 가능성이 있다.

본 발명의 발명자들은 이러한 점에 기반하여, 골수 유래 줄기세포와 제대혈 유래 줄기세포를 각각 SOD3를 과발현시키고 이의 아토피 치료제로의 가능성에 대하여 평가하고 비교하였다.

이를 위하여 먼저, 골수 또는 제대혈 중 SOD3 과발현에 적합한 세포 원천을 분석하였다. 골수 또는 제대혈 유래 줄기세포에 녹색형광단백질(Green fluorescent protein, GFP)로 표지한, SOD3 형질전환을 위한 바이러스를 농도별로 감염시킨 결과, 렌티바이러스를 통한 핵심인자 과발현을 위한 목적으로 제대혈 유래 줄기세포가 골수 유래 줄기세포보다 더 적합한 것을 확인하였다(실시예 1, 도 1 참조).

또한 많이 사용되는 두 가지 렌티바이러스성 프로모터(EF1a 프로모터 또는 CMV 프로모터)에 SOD3를 탑재한 뒤 발현 효율을 평가한 결과, CMV 프로모터의 발현 효율이 더 우수하며, 세포 내로 바이러스가 더 많이 유입되는 것을 확인하였다(실시예 2, 도 2 및 도 3참조).

상기에서 확인한 바를 기반으로, 렌티바이러스를 통해 SOD3를 과발현시킨 제대혈 유래 줄기세포와 골수 유래 줄기세포의 비만세포 탈과립에 대한 영향을 확인해 본 결과, 제대혈 유래 줄기세포는 우수한 비만세포 탈과립 억제 효과를 보인 반면, 골수 유래 줄기세포는 오히려 탈과립을 촉진하는 양상을 확인하였다(실시예 3, 도 4 참조).

알레르기 항원에 피부가 노출되면 랑게르한스 세포의 표면에 있는 IgE 수용체에 항원 특이 IgE가 결합하고, 이 항원의 표면에 있는 T 세포에 전달되어 T 세포가 활성화 된다. 이 경우 정상과 달리 알레르기성 피부질환, 특히, 아토피 피부염에서는 TH2가 활성화되어, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13 등의 사이토카인이 분비되고, 그 결과 B 세포에서 IgE의 생성이 촉진되고, 활성화된 비만세포의 탈과립을 촉진시켜 염증성 사이토카인과 히스타민이 유리된다.

실시예 3에 따르면 본 발명의 SOD3 과발현 제대혈 유래 줄기세포는 상기

비만세포의 탈과립에 있어서 우수한 억제 효과를 보이는 것을 확인할 수 있다. 특히 골수 유래 MSC는 오히려 탈과립을 촉진하는 양상을 보이는 바, 상기에서 기재한 바와 같이 줄기세포 기원별 다른 효과를 가짐을 확인하였다.

따라서 본 발명은 본 발명은 슈퍼옥사이드 디스무타아제 3(superoxide dismutase 3, SOD3)를 과발현시킨 제대혈 유래 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 아토피 피부염 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

또한 본 발명은 슈퍼옥사이드 디스무타아제 3(superoxide dismutase 3, SOD3)를 과발현시킨 제대혈 유래 줄기세포로 구성되는 아토피 피부염 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

또한 본 발명은 슈퍼옥사이드 디스무타아제 3(superoxide dismutase 3, SOD3)를 과발현시킨 제대혈 유래 줄기세포로 필수적으로 구성되는 아토피 피부염 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

본 발명의 줄기세포는 SOD3를 과발현하는 제대혈 유래 줄기세포로, 상기 SOD3는 단백질로 발현될 수 있고, 상기 SOD3 단백질은 음이온의 부동 변화(dismutation) 반응을 촉매하고, 세포 외부로 분비되어 세포외 기질(extracellular matrix)에 존재하며, 항혈관신생, 항화학주성, 항암활성 등의 효과를 나타낸다. 구체적으로는 피부암, 색소 침착성 질환, 광노화 등의 질환을 치료하는데 유효한 효과를 가지고 있으며, 혈관 신생에 의한 질병의 예방 및 치료에도 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 또한, 대장암, 폐암, 간암, 위암, 식도암, 췌장암, 담낭암, 신장암, 방광암, 전립선암, 고환암, 자궁경부암, 자궁내막암, 용모암, 난소암, 유방암, 갑상선암, 뇌암, 두경부암, 악성흑색종, 림프종 등의 암 질환에도 유효한 효과를 가지는 것으로 알려져 있다.

본 발명에서 SOD3는 인간 및 마우스를 포함하는 포유동물, 바람직하게는 인간으로부터 유래한 단백질을 의미하며, 가장 바람직하게는 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되는 인간의 정상형 SOD3 단백질의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다. 또는 서열번호 3 또는 서열번호 4로 표시되는 재조합 SOD3 단백질(209E-SOD3)의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다.

상기 인간의 정상형 SOD3는 N-말단 부위의 개시 메치오닌 아미노산을 포함하여 18번째의 알라닌까지는 시그널 펩타이드로 되어 있으며, 활성화된 SOD3는 상기 시그널 펩타이드가 제거된 222개의 아미노산으로 구성된다. SOD3의 C-말단 영역(아미노산 잔기 210번~215번)에는 헤파린 결합 도메인(heparin binding domain)을 가지고 있다. 시그널 펩타이드를 포함하는 240개의 아미노산으로 이루어진 전체 길이의 인간 SOD3의 아미노산 서열은 서열번호 1 또는 서열번호 2에 표시된 바와 같다.

또한 본 발명에서의 SOD3는 전체 길이의 인간 SOD3 중 N-말단 부위의 시그널 펩티드 및 C-말단 부위의 헤파린 결합 도메인이 포함된 13개의 아미노산(아미노산 잔기 210번~222번)이 제거된 209개의 아미노산으로 이루어진 것일 수도 있다. 상기 시그널 펩타이드와 헤파린 결합 도메인이 제거된 SOD3 단백질은 본 발명에서 209E-SOD3 또는 209E로 지칭할 수 있으며, 바람직하게는 서열번호 3 또는 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 가질 수 있다. 상기 209E-SOD3는 항-SOD3 항체와도 결합할 수 있으며, 정상형 SOD3와 동일한 효소 활성 및 ROS 제거 활성을 갖는 것으로 확인된 바 있다(대한민국 공개특허 제10-2008-0108876호).

본 발명에서의 SOD3는 정상형 SOD3 또는 209E-SOD3 단백질과 실질적으로 동등한 생리 활성을 갖는 기능적 동등물(functional equivalent), 기능적 유도체(functional derivative) 및 상기 SOD3 단백질의 단편이 모두 포함된다. 실질적으로 동등한 생리 활성이란 정상형 SOD3와 동등한 수준의 효소 활성 및/또는 세포의 분비 특성과 세포내 투과성을 갖는 것을 의미하며, SOD3와 동등한 효소 활성으로 인하여 줄기세포, 바람직하게는 중간엽 줄기세포에서 과발현되었을 때 줄기세포의 면역 및 염증 조절능력을 향상시키게 된다. 상기 줄기세포의 면역 및 염증 조절능력이란 구체적으로는 아토피성 피부염 병인의 핵심인자인 비만세포의 탈과립을 억제하는 것을 의미하며, 본 명세서에서 서술한 본 발명의 SOD3를 과발현하는 제대혈 유래 줄기세포가 갖는 특성에서 기재한 바와 같다.

상기 SOD3의 기능적 동등물은 바람직하게는 서열번호 1 내지 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 보다

바람직하게는 90% 이상의 서열 상동성(homology)을 갖는 폴리펩티드일 수 있다. 또한 상기 기능적 동등물은 본 발명의 SOD3의 아미노산 서열 중 일부가 부가, 치환 또는 결실의 결과 생성될 것일 수 있다. 상기에서 아미노산의 치환은 바람직하게는 보존적 치환이다. 천연에 존재하는 아미노산의 보존적 치환의 예는 다음과 같다: 지방족 아미노산(Gly, Ala, Pro), 소수성 아미노산(Ile, Leu, Val), 방향족 아미노산(Phe, Tyr, Trp), 산성 아미노산(Asp, Glu), 염기성 아미노산(His, Lys, Arg, Gln, Asn) 및 황 함유 아미노산(Cys, Met). 또한 상기 기능적 동등물에는 본 발명의 SOD3의 아미노산 서열상에서 아미노산의 일부가 결실된 변형체도 포함된다. 상기 아미노산의 결실 또는 치환은 바람직하게는 SOD3 단백질의 생리활성에 직접적으로 관련되지 않은 영역에 위치해 있다. 아울러 상기 SOD3의 아미노산 서열의 양 말단 또는 서열 내에 몇몇의 아미노산이 부가된 변형체도 포함된다. 예를 들어 209E-SOD3과 같이 SOD3의 효소 활성에는 영향을 주지 않으면서 SOD3 전체 길이의 일부분이 제거된 펩티드일 수 있으며, SOD3 단백질과 실질적으로 동등한 생리 활성을 갖는 SNP(small nucleotide polymorphism) 등 SOD3의 다형성(polymorphism) 단백질일 수도 있다.

본 발명의 기능적 동등물의 범위에는 본 발명의 SOD3 단백질의 기본 골격 및 이의 생리 활성을 유지하면서 단백질의 일부 화학 구조가 변형된 폴리펩티드 유도체도 포함된다. 예를 들어, 여기 한정되는 것은 아니지만, 본 발명의 SOD3 단백질의 안정성, 세포내 투과성, 저장성, 휘발성 또는 용해도 등을 변경시키기 위한 구조 변경이 이에 포함된다.

본 발명의 제대혈 유래 줄기세포는 포유류에서 유래한 것일 수 있으며 바람직하게는 인간에서 유래한 것일 수 있다. 제대혈 또는 태반 유래 중간엽 줄기세포는 골수 유래 중간엽 줄기세포보다 분화 능력 및 증식 능력이 뛰어난 특징을 지닌다.

본 발명에서 사용된 용어 제대혈은 포유동물의 태반과 태아를 연결하는 제대정맥으로부터 채취된 혈액을 말한다. 상기 제대혈은 출산시 공여자의 제대정맥으로부터 용이하게 채취할 수 있다. 보다 구체적으로, 정상질식분만의 경우에는 출산 후 자궁 내에 아직 태반이 남아있는 상태에서 밖으로 만출된

제대정맥으로부터 채취할 수 있다. 또는 제왕절개의 경우에는 출산 후 태반 역시 자궁 밖으로 만들어진 상태에서 제대정맥으로부터 채취한다.

본 명세서에서, 태반에서 채취된 줄기세포는 "태반 줄기세포"라는 용어로 기재될 수 있고, 이는 형상, 세포 표면 표지 또는 1차 배양 후 계대 수에 무관하게 포유류 태반에서 유래한 줄기세포 또는 전구세포로서 조직 배양 기질(tissue culture substrate), 예를 들어 조직 배양 플라스틱 또는 피브로넥틴 피복 조직 배양판에 부착하는 것을 말한다. 그러나 본 명세서에서 "태반 줄기세포"라는 용어는 영양막 세포(trophoblast)를 가리키는 것은 아니다. 세포는 줄기세포의 특징 중 적어도 하나, 예를 들어 적어도 하나 이상의 세포 유형으로 분화할 수 있는 능력 등을 갖추고 있으면 줄기세포이다.

태반 또는 제대혈로부터 당업계에 공지된 방법에 따라 중간엽 줄기세포를 분리할 수 있다. 상기 중간엽 줄기세포의 분리는 종래 알려진 어떤 분리방법에 의해서도 분리될 수 있다. 예를 들면, 밀도차를 이용한 분리법(density gradient fractionation), 면역선택(immunoselection) 및 감별 부착 분리법(differential adhesion separation) 등이 있다. 제대혈로부터 중간엽 줄기세포를 분리, 배양하는 방법은 기존에 사용되어 온 방법은 모두 사용할 수 있다.

상기에서 분리된 중간엽 줄기세포의 배양은 당업계에 공지된 세포 배양용 배지에서 수행할 수 있으며, 예를 들면, 이에 한정되지는 않으나, DMEM 배지, McCoy's 5A 배지, Eagle's basal 배지, CMRL 배지, Glasgow 최소 필수 배지, Ham's F-12 배지, Iscove's modified Dulbecco's 배지, Liebovitz' L-15 배지, RPMI 1640 배지 KSB-3 basal media 등이 있다. 또한, 본 발명에서 세포 배양 배지에는 필요에 따라 한 가지 이상의 보조 성분을 첨가할 수 있는데, 우태아혈청, 말 또는 인간 등의 혈청을 비롯하여, 미생물의 오염을 막기 위한 항생제 및 항진균제 등을 사용할 수 있다.

분리 또는 배양된 줄기세포는 사용 전까지 당업계에 공지된 방법에 의해 보관될 수 있다. 일반적으로 줄기세포는 동결보호(cyoprotection) 처리한 후 냉동

보관할 수 있다. 상기 동결보호 처리는 당업계에 공지된 DMSO, 글리세롤, 폴리비닐피롤리돈, 폴리에틸렌 글리콜, 알부민, 덱스트란, 수크로스, 에틸렌 글리콜, i-에리스리톨, D-리비톨, D-만니톨, D-솔비톨, i-이노시톨, D-락토스 또는 콜린 클로라이드와 같은 동결보호제를 이용하여 수행할 수 있다.

본 발명에 따른 SOD3를 과발현하는 체대혈 유래 줄기세포는 SOD3를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 발현 벡터를 줄기세포에 형질도입시켜 수득한 것일 수 있다.

본 명세서에서 용어 "발현(expression)"은 세포에서 단백질 또는 핵산의 생성을 의미하며, "과발현(overexpression)"은 정상적인 상태 또는 일반적인 상태보다 특정 유전자의 발현의 수준이 과도하게 증가한 것을 의미한다. 본 발명에서 SOD3를 과발현하는 줄기세포는 구체적으로는 SOD3 단백질의 발현 수준이 증가하여 SOD3 단백질의 활성이 증가되어 있는 줄기세포이다.

본 명세서에서 "폴리뉴클레오티드(polynucleotide)" 또는 핵산은 단일-또는 이중-가닥의 형태로 된 데옥시리보뉴클레오티드(DNA) 또는 리보뉴클레오티드(RNA)를 말한다. 다른 제한이 없는 한, 자연적으로 생성되는 뉴클레오티드와 비슷한 방법으로 핵산에 혼성화되는 자연적 뉴클레오티드의 공지된 아날로그도 포함된다.

줄기세포에서 SOD3를 과발현시키는 가장 일반적인 방법은 SOD3 유전자를 포함하는 폴리뉴클레오티드를 줄기세포에 인위적으로 또는 실험적으로 도입하여 SOD3 유전자의 복제개수(copy number)를 증가시키는 것이다. 원래의 세포가 가지고 있던 것이 아닌 외인성(exogenous) 폴리뉴클레오티드를 세포 내부로 주입하는 것을 형질감염(transfection), 그리고 이로 인하여 세포의 유전적 형질이 변화되는 현상을 형질전환(transformation)이라고 한다. 상기 외인성 폴리뉴클레오티드가 바이러스 또는 바이러스 유래 벡터를 통하여 세포 내부로 주입되는 과정을 형질도입(transduction)이라고 부른다. 본 명세서에서는 용어 '형질전환', '형질감염' 그리고 '형질도입' 이 외인성 폴리뉴클레오티드를 세포에 도입되어 정상형과 다른 유전적 형질을 갖게 된 것 또는 그러한 과정을 일컫는 것으로서

유사한 의미로 사용된다.

본 발명에서 SOD3를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 포유류에서 유래한 SOD3 유전자일 수 있다. 바람직하게는 서열번호 5 또는 서열번호 6으로 표시되는 인간의 정상형 SOD3를 암호화하는 염기서열을 포함하는 것일 수 있다. 또는 서열번호 7 또는 서열번호 8로 표시되는 209E-SOD3를 암호화하는 염기서열을 포함하는 것일 수 있다. 보다 상세하게는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어지는 SOD3는 서열번호 5로 표시되는 염기서열에 의하여 코딩될 수 있고, 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어지는 SOD3는 서열번호 6으로 표시되는 염기서열에 의하여 코딩될 수 있다. 또한 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어지는 SOD3는 서열번호 7로 표시되는 염기서열에 의하여 코딩될 수 있고, 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어지는 SOD3는 서열번호 8로 표시되는 염기서열에 의하여 코딩될 수 있다.

또한 상기 SOD3를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 인간의 SOD3의 염기서열, 바람직하게는 서열번호 5 내지 서열번호 8로 표시되는 염기서열과 실질적인 동일성을 나타내는 서열도 포함한다. 실질적인 동일성은 인간 SOD3를 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 염기서열과 비교 대상이 되는 임의의 다른 염기서열을 최대한 대응되도록 정렬하고, 당해 기술분야에서 통상적으로 이용되는 분석 방법과 알고리즘을 이용하여 서열을 비교 분석하는 경우, 최소 70% 이상의 상동성을 나타내는 서열을 의미한다. 상기 SOD3를 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 염기서열과 실질적으로 동일한 염기서열에 의해 암호화되는 단백질은 SOD3 단백질, 바람직하게는 서열번호 1 내지 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 단백질의 기능적 동등물일 수 있다. SOD3 단백질의 기능적 동등물에 대하여서는 본 명세서에서 앞서 서술한 바와 같다.

본 명세서에서 "재조합 발현 벡터"란 적합한 숙주세포에서 목적 단백질 또는 목적 핵산(RNA)을 발현할 수 있는 벡터로서, 폴리뉴클레오티드(유전자) 삽입물이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물을 말한다. 작동가능하게 연결된(operably linked)"이란 일반적 기능을 수행하도록 핵산 발현 조절 서열과 목적하는 단백질 또는 RNA를 코딩하는 핵산 서열이 기능적으로 연결(functional linkage)되어 있는 것을 말한다. 즉, 단백질 또는

RNA를 코딩하는 핵산 서열이 발현 조절 서열에 의해 유전자 발현이 가능하게 되는 방식으로 연결된 것을 의미하는 것으로, 예를 들어 프로모터와 단백질 또는 RNA를 코딩하는 핵산 서열이 작동가능하게 연결되어야 코딩하는 핵산 서열의 발현에 영향을 미칠 수 있다. 재조합 벡터와의 작동적 연결은 당해 기술분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용한다.

본 발명의 재조합 발현 벡터는 클로닝 분야에서 통상적으로 사용되는 벡터라면 그 종류가 특별히 제한되지 않으며, 그 예로는 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파아지 벡터 및 바이러스 벡터 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 바람직하게는 바이러스에서 유래한 벡터를 사용할 수 있다. 상기 플라스미드에는 대장균 유래 플라스미드(pBR322, pBR325, pUC118 및 pUC119, pET-22b(+)), 바실러스 서브틸리스 유래 플라스미드(pUB110 및 pTP5) 및 효모 유래 플라스미드(YEp13, YEp24 및 YCp50) 등이 있으며, 상기 바이러스는 렌티 바이러스, 레트로바이러스, 아데노바이러스 또는 백시니아 바이러스와 같은 동물 바이러스, 배쿨로 바이러스와 같은 곤충 바이러스 등이 사용될 수 있으며, 이에 제한되지 않으나 바람직하게는 렌티 바이러스를 사용할 수 있다.

본 발명에 따른 핵산을 포함하는 발현 벡터는 당업계에 공지된 방법, 예를 들어 이에 한정되지는 않으나, 일시적 형질감염(transient transfection), 미세주사, 형질도입(transduction), 세포융합, 칼슘 포스페이트 침전법, 리포솜 매개된 형질감염(liposome-mediated transfection), DEAE 덱스트란-매개된 형질감염(DEAE Dextran-mediated transfection), 폴리브렌-매개된 형질감염(polybrene-mediated transfection), 전기천공법(electroporation), 유전자 총(gene gun) 및 세포 내로 핵산을 유입시키기 위한 공지의 방법에 의해 줄기세포 내로 도입할 수 있다.

본 발명에 따른 SOD3를 과발현하는 줄기세포는 SOD3를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 발현 벡터를 바람직하게는 전기천공법 또는 바이러스로 매개되는 형질도입 방법을 이용하여 중간엽 줄기세포에 주입하여 형질전환한 것일 수 있다.

또한 본 발명의 줄기세포는 재조합 바이러스 벡터를 이용하여 다음의 단계를 거쳐 제조될 수 있다: (a) 서플벡터, SOD3를 암호화하는 핵산 및/또는 단백질 형질도입 도메인이 작동가능하게 연결된 DNA 컨스트럭트를 포함하는 재조합 바이러스 벡터를 제조하는 단계; (b) 상기 재조합 바이러스 벡터를 바이러스 생산 세포주에 형질감염시켜 SOD3 발현 재조합 바이러스를 제조하는 단계; 및 (c) 상기 SOD3 발현 재조합 바이러스로 제대혈 유래 줄기세포를 감염시키는 단계.

본 발명의 바이러스 벡터는 렌티바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 아데노연관바이러스(AAV) 벡터, 벡시니아바이러스 벡터, 허피스바이러스 벡터 및 아비폭스바이러스 벡터로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 한다. 바람직하게는 렌티바이러스 벡터일 수 있다.

또한 상기 바이러스 벡터, 즉 본 발명에서 사용되는 재조합 발현 벡터는 CMV 프로모터 또는 EF1a 프로모터를 포함하는 것이 바람직하며, EF1a 프로모터를 포함하는 것이 보다 바람직하다.

본 발명에 따른 약학적 조성물은 SOD3 과발현 제대혈 유래 줄기세포를 단독으로 함유하거나 약학적으로 허용되는 담체와 함께 적합한 형태로 제형화될 수 있으며, 부형제 또는 희석제를 추가로 함유할 수 있다. 상기에서 '약학적으로 허용되는'이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증 등과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 비독성의 조성물을 말한다.

약학적으로 허용되는 담체로는 예컨대, 경구 투여용 담체 또는 비경구 투여용 담체를 추가로 포함할 수 있다. 경구 투여용 담체는 락토스, 전분, 셀룰로스 유도체, 마그네슘 스테아레이트, 스테아르산 등을 포함할 수 있다. 아울러, 펩티드 제제에 대한 경구투여용으로 사용되는 다양한 약물전달물질을 포함할 수 있다. 또한, 비경구 투여용 담체는 물, 적합한 오일, 식염수, 수성 글루코오스 및 글리콜 등을 포함할 수 있으며, 안정화제 및 보존제를 추가로 포함할 수 있다. 적합한 안정화제로는 아황산수소나트륨, 아황산나트륨 또는 아스코르브산과 같은 항산화제가 있다. 적합한 보존제로는 벤즈알코늄 클로라이드, 메틸-또는 프로필-파라벤 및 클로로부탄올이 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 상기 성분들 이외에

윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제 등을 추가로 포함할 수 있다. 그 밖의 약학적으로 허용되는 담체 및 제제는 다음의 문헌에 기재되어 있는 것을 참고로 할 수 있다(Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995).

본 발명의 조성물은 인간을 비롯한 포유동물에 어떠한 방법으로도 투여할 수 있다. 예를 들면, 경구 또는 비경구적으로 투여할 수 있다. 비경구적인 투여방법으로는 이에 한정되지는 않으나, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장내 투여될 수 있다. 보다 바람직하게는 피하에 주입되는 것이나, 이에 제한되는 것은 아니다.

본 발명의 약학적 조성물은 상술한 바와 같은 투여 경로에 따라 경구 투여용 또는 비경구 투여용 제제로 제형화 할 수 있다.

경구 투여용 제제의 경우에 본 발명의 조성물은 분말, 과립, 정제, 환제, 당의정제, 캡슐제, 액제, 겔제, 시럽제, 슬러리제, 현탁액 등으로 당업계에 공지된 방법을 이용하여 제형화될 수 있다. 예를 들어, 경구용 제제는 활성성분을 고체 부형제와 배합한 다음 이를 분쇄하고 적합한 보조제를 첨가한 후 과립 혼합물로 가공함으로써 정제 또는 당의정제를 수득할 수 있다. 적합한 부형제의 예로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨 및 말티톨 등을 포함하는 당류와 옥수수 전분, 밀 전분, 쌀 전분 및 감자 전분 등을 포함하는 전분류, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 나트륨 카르복시메틸셀룰로오스 및 하이드록시프로필메틸-셀룰로오스 등을 포함하는 셀룰로오스류, 젤라틴, 폴리비닐피롤리돈 등과 같은 충전제가 포함될 수 있다. 또한, 경우에 따라 가교결합 폴리비닐피롤리돈, 한천, 알긴산 또는 나트륨 알기네이트 등을 붕해제로 첨가할 수 있다. 나아가, 본 발명의 약학적 조성물은 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

비경구 투여용 제제의 경우에는 주사제, 크림제, 로션제, 외용연고제, 오일제, 보습제, 겔제, 에어로졸 및 비강 흡입제의 형태로 당업계에 공지된 방법으로 제형화할 수 있다. 이들 제형은 모든 제약 화학에 일반적으로 공지된 처방서인 문헌(Remington's Pharmaceutical Science, 19th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995)에 기재되어 있다.

본 발명의 조성물의 총 유효량은 단일 투여량(single dose)으로 환자에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량(multiple dose)으로 장기간 투여되는 분할 치료 방법(fractionated treatment protocol)에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 질환의 정도에 따라 유효성분의 함량을 달리할 수 있다. 바람직하게 본 발명의 약학적 조성물의 바람직한 전체 용량은 1일당 환자 체중 1kg 당 약 $0.01\mu\text{g}$ 내지 10,000mg, 가장 바람직하게는 $0.1\mu\text{g}$ 내지 500mg일 수 있다. 그러나 상기 약학적 조성물의 용량은 제제화 방법, 투여 경로 및 치료 횟수뿐만 아니라 환자의 연령, 체중, 건강 상태, 성별, 질환의 중증도, 식이 및 배설을 등 다양한 요인들을 고려하여 환자에 대한 유효 투여량이 결정되는 것이므로, 이러한 점을 고려할 때 당 분야의 통상적인 지식을 가진 자라면 본 발명의 조성물의 적절한 유효 투여량을 결정할 수 있을 것이다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은 본 발명의 효과를 보이는 한 그 제형, 투여 경로 및 투여 방법에 특별히 제한되지 아니한다.

또한, 본 발명은 슈퍼옥사이드 디스무타아제 3(superoxide dismutase 3, SOD3)를 과발현시킨 제대혈 유래 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 아토피 피부염 예방 또는 개선용 화장품 조성물을 제공한다.

또한 본 발명은 슈퍼옥사이드 디스무타아제 3(superoxide dismutase 3, SOD3)를 과발현시킨 제대혈 유래 줄기세포로 구성되는 아토피 피부염 예방 또는 개선용 화장품 조성물을 제공한다.

또한 본 발명은 슈퍼옥사이드 디스무타아제 3(superoxide dismutase 3, SOD3)를 과발현시킨 제대혈 유래 줄기세포로 필수적으로 구성되는 아토피 피부염 예방 또는 개선용 화장품 조성물을 제공한다.

상기 화장품 조성물을 제조하기 위한 SOD3 과발현 제대혈 유래 줄기세포에 대하여서는 전술한 바와 같다. 본 발명의 화장품 조성물은 SOD3 과발현 제대혈 유래 줄기세포를 유효성분으로 함유하며 피부학적으로 허용 가능한 부형제와 함께 기초 화장품 조성물(화장수, 크림, 에센스, 클렌징 폼 및 클렌징 위터와 같은 세안제, 팩, 보디오일), 색조 화장품 조성물(화운데이션, 립스틱, 마스크라, 메이크업 베이스), 두발 제품 조성물(샴푸, 린스, 헤어컨디셔너, 헤어젤) 및 비누 등의 형태로 제조될 수 있다.

상기 부형제로는 이에 한정되지는 않으나 예를 들어, 피부연화제, 피부 침투 증강제, 착색제, 방향제, 유화제, 농화제 및 용매를 포함할 수 있다. 또한, 향료, 색소, 살균제, 산화방지제, 방부제 및 보습제 등을 추가로 포함할 수 있으며, 물성개선을 목적으로 점증제, 무기염류, 합성 고분자 물질 등을 포함할 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 화장료 조성물로 세안제 및 비누를 제조하는 경우에는 통상의 세안제 및 비누 베이스에 상기 SOD3 과발현 제대혈 유래 줄기세포를 첨가하여 용이하게 제조할 수 있다. 크림을 제조하는 경우에는 일반적인 수중유적형(O/W)의 크림베이스에 SOD3 과발현 제대혈 유래 줄기세포를 첨가하여 제조할 수 있다. 여기에 향료, 킬레이트제, 색소, 산화방지제, 방부제 등과 물성개선을 목적으로 한 단백질, 미네랄, 비타민 등 합성 또는 천연소재를 추가로 첨가할 수 있다. 본 발명의 화장료 조성물에 함유되는 SOD3 과발현 제대혈 유래 줄기세포의 함량은 이에 한정되지 않지만 전체 조성물 총중량에 대하여 0.001 내지 10 중량%인 것이 바람직하고, 0.01 내지 5 중량%인 것이 더욱 바람직하다. 상기 함량이 0.001 중량% 미만에서는 목적하는 아토피 피부염 치료 효과를 기대할 수 없고, 10 중량% 초과에서는 안전성 또는 제형상의 제조에 어려움이 있을 수 있다.

본 발명은 아토피 치료용 제제를 제조하기 위한 슈퍼옥사이드 디스무타아제 3(superoxide dismutase 3, SOD3)를 과발현시킨 제대혈 유래 줄기세포의 용도를 제공한다.

본 발명은 슈퍼옥사이드 디스무타아제 3(superoxide dismutase 3, SOD3)를 과발현시킨 제대혈 유래 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 조성물의 유효량을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 것을 특징으로 하는 아토피 질환의 치료 방법을 제공한다.

본 발명의 상기 ‘유효량’이란 개체에게 투여하였을 때, 아토피 피부염 질환의 개선, 치료, 예방, 검출, 진단 또는 아토피 피부염 질환의 억제 또는 감소 효과를 나타내는 양을 말하며, 상기 ‘개체’란 동물, 바람직하게는 포유동물, 특히 인간을 포함하는 동물일 수 있으며, 동물에서 유래한 세포, 조직, 기관 등일 수도 있다. 상기 개체는 상기 효과가 필요한 환자(patient)일 수 있다.

본 발명의 상기 ‘치료’는 아토피 피부염 질환 또는 아토피 피부염 질환의 증상을 개선시키는 것을 포괄적으로 지칭하고, 이는 아토피 피부염 질환을 치유하거나, 실질적으로 예방하거나, 또는 상태를 개선시키는 것을 포함할 수 있으며, 아토피 피부염 질환으로부터 비롯된 한 가지 증상 또는 대부분의 증상을 완화시키거나, 치유하거나 예방하는 것을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

본 발명의 용어 ‘~을 포함하는(comprising)’이란 ‘함유하는’ 또는 ‘특징으로 하는’과 동일하게 사용되며, 조성물 또는 방법에 있어서, 언급되지 않은 추가적인 성분 요소 또는 방법 단계 등을 배제하지 않는다. 용어 ‘~로 구성되는(consisting of)’이란 별도로 기재되지 않은 추가적인 요소, 단계 또는 성분 등을 제외하는 것을 의미한다. 용어 ‘필수적으로 구성되는(essentially consisting of)’이란 조성물 또는 방법의 범위에 있어서, 기재된 성분 요소 또는 단계와 더불어 이의 기본적인 특성에 실질적으로 영향을 미치지 않는 성분 요소 또는 단계 등을 포함하는 것을 의미한다.

【발명의 효과】

따라서, 본 발명은 SOD3 과발현 제대혈 유래 줄기세포를 유효 성분으로 포함하는 아토피 피부염 예방 또는 치료용 조성물 및 이를 이용한 아토피 피부염 치료 방법을 제공한다. 본 발명에 따른 조성물은 아토피 피부염의 핵심 병인인 비만세포의 탈과립을 억제하는 효과를 보이므로 아토피 피부염의 예방 또는 치료에 유용하게 이용될 수 있다.

【도면의 간단한 설명】

도 1은 SOD3 과발현에 적합한 세포 원천을 확립하기 위한 것으로, 골수 유래 줄기세포와 제대혈 유래 줄기세포 각각에 렌티바이러스를 이용하여 농도별로 감염시킨 후 감염다중도(MOI)를 확인하고 비교한 결과이다.

도 2는 발현 효율이 좋은 프로모터를 선별하기 위한 것으로, EF1a 프로모터와 CMV 프로모터의 MOI를 확인하고 비교한 결과이다.

도 3은 발현 효율이 좋은 프로모터를 선별하기 위한 것으로, EF1a 프로모터와 CMV 프로모터의 바이러스의 세포 내 도입 정도를 수치화한 VCN(virus vector copy number)을 분석한 결과이다.

도 4는 SOD3를 과발현시킨 제대혈 또는 골수 유래의 줄기세포의 비만세포 탈과립에 대한 영향을 확인한 결과이다.

【발명의 실시를 위한 형태】

이하 본 발명을 상세히 설명한다.

단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

실험방법

MSC의 배양 및 동정

인간의 제대혈에서 유래한 중간엽 줄기세포(hUCB-MSC)는 제공자의 동의하에 인간 탯줄의 혈액 샘플로부터 수집하였다. 탯줄 혈액 샘플은 채취 후 항응고제로 작용하는 구연산 인산 포도당을 포함하는 혈액수집팩에 보관하였다. 실험을 위한 처리는 24시간 이내에 실시하였다. Ficoll-Paque PLUS 농도 구매(Amersham Biosciences)하에 원심분리하여 단핵 세포 분획을 분리하였다. HBSS(Jeil Biotech Services)로 세척하고, 저혈당 Dulbecco의 변형된 Eagle 배양액(DMEM, Invitrogen Corp), 20% 우태아 혈청(Gibco-BRL), 2mM L-글루타민, 1mM 피루브산 나트륨 및 1%의 항생제/항진균제(Life Technologies)로 재현탁하였다. 항생제/항진균제는 100U/ml 페니실린, 100 µg/ml 스트렙토마이신, 25 µg/ml의 암포테리신B를 포함한다. 7일 후, 부착되지 않은 세포는 제거하고, 부착된 세포를 두 가지 배양액을 일주일마다 바꿔가며 배양하였다. 세포는 5% CO₂, 37℃의 습윤 조건에서 배양하였다. 융합성 세포의 약 60%를 0.1% 트립신-EDTA로 분리하였고, 배양 플레이트에 옮겨 담았다.

골수 유래 중간엽줄기세포(BM-MSC)의 배양을 위해 회수된 골수는 Ficoll-

Hypaque (비중 1.077)을 이용하여 백혈구연층을 분리하고 phosphate buffered saline(PBS)으로 두 번 세척 후 1×10^7 cells/dish의 농도로 100 mm culture dish (Nunc)에서 배양하였다. 배양액은 DMEM-Low glucose(GibcoBRL) 및 10% 우태아혈청(Gibco-BRL)을 사용하였다. 배양 시작 24시간 후 비부착세포들로 인한 중간엽줄기세포의 부착 및 증식이 감소되는 것을 막기 위하여 비부착세포를 흡입하여 제거하였다. 배지는 1주에 두 번씩 전체 교환하였으며, 부착 세포가 전체 면적의 70~80%가 되었을 때 0.05% Trypsin/EDTA (Gibco)를 사용하여 회수하여 175T Flask 하나 당 1.5×10^5 세포 씩 계대 배양하며 증식시켰다.

분리한 hUCB-MSC와 BM-MSC의 면역표현형을 분석하여 MSC와 관련된 항원 양성 마커의 존재와 조혈 계통 마커의 부재를 유동세포 분석법(Epics XL, Beckman Coulter)으로 조사하였다. 양성 마커로는 CD90(Thy-1), CD105(endoglin) 및 SH3(CD73)가 있으며, 조혈계통 마커로는 CD34, CD45 및 CD31과 같은 내피 세포 마커가 있다. 세포는 HLA class I에는 양성이었지만, HLA-DR에는 음성이었다. 각각의 형광표지 단일클론 항체는 Becton Dickinson에서 구입하였다(결과 도시하지 않음).

SOD3 형질전환

상기를 통해 준비한 hUCB-MSC 및 골수 유래 줄기세포에 전기천공법을 이용하여 SOD3를 형질전환시켰다. SOD3 형질도입을 위한 바이러스 발현 벡터 및 형질도입 조건은 렌티바이러스를 바이러스 발현 벡터로 사용하였다는 점 외에 종전 기술인 SOD3를 과발현하는 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 대한 특허와 동일하게 수행하였다(한국공개특허 10-2017-0032872의 실험방법 참고).

유세포 분석(Flow cytometry)

골수 유래 MSC와 제대혈 유래 MSC에 GFP가 tagging되어 있는 렌티바이러스를 농도별로 감염시킨 후 3일 뒤 GFP가 세포 내에서 얼마나 발현되는지 flow cytometry로 분석하였다.

발현 효율 비교

발현 효율이 좋은 바이러스 프로모터를 선별하기 위해 대표적으로 쓰이는 두 가지 렌티바이러스성 프로모터에 SOD3를 탑재한 뒤 발현 효율을 평가하였다. 렌티바이러스성 프로모터인 EF1a 프로모터 및 CMV 프로모터 각각에 SOD3를 탑재한 후 발현 효율을 평가하였다. SOD3가 탑재된 각각의 프로모터로부터 단백질을 추출한 후, 12% SDS-PAGE 젤에서 분리하였다. 이를 nitrocellulose membrane(Bio-Rad Laboratories Inc.)으로 이동시키고, 상기 membrane을 5% 탈지 분유로 blocking한 후, 1:1000으로 희석된 1차 항체 및 2차 항체와 각각 반응시켰다. 항체와 반응시킨 membranes를 PBST 용액으로 씻은 후, Enhanced Chemi-Luminescence 시약(Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, MA, USA)에 반응시키고, X-ray film에 노출시켜 정량 기준 단백질인 베타-튜불린(β -tubulin) 대비 SOD3 단백질 밴드를 분석하였다.

상기 방법에서 사용한 항체는 다음과 같다.

1차 항체: anti-SOD3 (Abcam, Cambridge, United Kingdom)

anti- β -tubulin (Abcam, Cambridge, United Kingdom)

2차 항체: anti-rabbit IgG (Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, MA, USA)

더불어 바이러스의 세포 내 도입 정도를 수치화하여 알아볼 수 있는 virus vector copy number(VCN) 를 Lenti-X Provirus Quantitation Kit(Qiagen)을 이용하여 real-time PCR로 분석하였다. 먼저 바이러스를 감염시키고 72시간이 경과한 세포 1×10^6 개의 genomic DNA를 제품 내 포함된 genomic DNA 분리 키트를 이용하여 추출한 뒤 정량을 하였다. 바이러스 양에 따른 표준 그래프를 그리기 위해 키트에 포함된 lenti-X provirus(스탠더드)를 단계적으로 다섯배씩 희석하여 provirus 카피 개수를 1×10^5 개부터 2×10^4 개, 4×10^3 개, 8×10^2 개, 1.6×10^2 개, 32개가 되도록 준비하였다. 앞서 정량한 샘플 genomic DNA 농도가 100ng/2ul, 20ng/2ul, 4ng/2ul, 0.8ng/2ul 이 되도록 희석해둔다. 최종 희석한 스탠더드와 샘플을 2ul씩 넣고 키트 내 포함된 특이 프라이머 1ul, 사이버그린 시약 10ul, DEPC 7ul와 섞어서 realtime PCR 반응을 수행하였다(수행조건: 95-60도 40사이클 반응). 결과가 나오면 스탠더드 값을 이용하여 표준 그래프를 그린 뒤 샘플에 대항하는 카피 개수를 계산하였다.

비만세포의 탈과립에 대한 영향 확인

아토피성 피부염 병인의 핵심 인자인 비만 세포(LAD2)를 배양하여 생체와 유사하게 IgE 및 anti-IgE로 활성화시켜 탈과립을 유도하였고 상기와 동일한 방법으로 SOD3를 과발현 시킨 골수 또는 제대혈 유래 줄기세포와의 공배양을 진행하였다. 먼저 실험 하루 전 24well plate (Nunc)에 줄기세포를 3×10^5 개 seeding 한 후 하루 동안 안정화를 시켰다. 다음 날 배양액을 제거하고 PBS(Gibco)로 2회 세척해 준 후 각 well에 줄기세포와 같은 갯수의 LAD2 세포와 함께 100ng/ml SCF(R&D systems), 100ng/ml IgE(R&D systems)가 포함된 StemPro™-34 SFM 배양액 (Gibco)을 500ul씩 넣어주고 24시간 배양하였다. 다음 날 약한 파이프팅으로 LAD2 세포와 배양액을 각 well로부터 수거한 뒤 PBS로 한번 세척 후 IgE를 제거하고 원심분리로 모아진 LAD2 세포는 다시 원래 있던 well에 넣어주었다. 이 후 anti-IgE 항체(R&D systems)가 포함된 StemPro™-34 SFM 배양액 500ul를 넣어서 1시간 동안 배양하며 반응시켰다. 1시간 후 반응을 끝내기 위해 얼음 위에 플레이트를 위치시키고 각 well에서 세포를 포함한 전체 상층액을 수거한 뒤 4도에서 원심분리를 하여 세포를 제외한 상층액을 새 튜브에 옮겼다. 각각의 상층액 60ul에 같은 볼륨의 7.5mM p-nitrophenyl-N-acetyl-b-D-glucosaminide(sigma)를 넣고 2시간 동안 37도에서 100-120rpm 속도로 흔들어주면서 반응을 시켰다. 반응이 끝나면 120ul의 0.2M Glycine(pH10.7)(Sigma)를 넣어준 뒤 410nm에서 흡광도를 측정하여 탈과립 정도를 비교하였다.

실시예 1: SOD3 과발현 적합 세포 원천 확립

골수 또는 제대혈 유래 줄기세포 중 SOD3가 과발현에 적합한 세포를 선별하기 위하여 각각의 줄기세포에 GFP가 tagging되어 있는 렌티바이러스를 농도별로 감염시킨 후 GFP의 발현 정도를 MOI를 통해 분석하였다. 그 결과 도 1과 같이, 제대혈 유래 MSC는 2MOI 부터 95% 이상의 GFP 발현을 보였으나 골수 유래 MSC는 10MOI에서도 60%에 못 미치는 GFP 발현 효율을 보였다. 따라서 렌티바이러스를 통한 핵심인자 과발현을 위한 목적으로 제대혈 유래 MSC가 골수유래 MSC보다 더 적합함을 확인할 수 있었다.

실시예 2: 발현 효율이 우수한 프로모터 선정

보편적으로 사용되는 EF1a 프로모터와 CMV 프로모터의 SOD3 발현 효율을 비교하여 효율이 더 우수한 프로모터를 선정하였다. 더불어 바이러스의 세포 내 도입 정도를 수치화하여 알아볼 수 있는 virus vector copy number(VCN)를 real-time PCR로 분석하였다. 그 결과 도 2 및 도 3과 같이, EF1a 프로모터보다 CMV

프로모터가 같은 MOI에서 더 뛰어난 발현 효율을 보이는 것을 확인하였다. 더불어 MOI 값이 높을수록 더 높은 CVN 값을 가졌으며 CMV 프로모터를 가진 경우가 EF1a 프로모터 바이러스보다 훨씬 더 많이 세포 내로 바이러스가 들어감을 알 수 있었다.

따라서 바이러스 도입에 의한 세포 손상을 방지하기 위해 적절한 VCN 값이 10을 넘지 않는 MOI를 설정하였으며, 이 기준에 맞는 5MOI로 조건을 설정하고 효능 평가를 진행하였다.

실시예 3: SOD3 과발현 줄기세포 처리시 비만세포에 대한 영향 확인

아토피성 피부염 병인의 핵심 인자인 비만 세포의 탈과립에 있어서 본 발명에 따른 SOD3 과발현 줄기세포의 영향을 확인하고, 골수 또는 제대혈 유래에 따른 차이를 확인하였다. 그 결과 도 4와 같이, 탈과립 억제 정도를 측정한 결과 SOD3를 과발현 시킨 5MOI로 SOD3를 과발현시킨 제대혈 유래 MSC의 효과가 가장 좋은 반면 골수 유래 MSC는 오히려 탈과립을 촉진하는 양상을 확인하였다.

이 연구는 한국 정부가 후원하는 NRF의 바이오& 의료 기술 개발 프로그램인 MSIP(NRF-2016M3A9B6903020)의 지원을 받았다.

【산업상 이용가능성】

이상 살펴본 바와 같이 본 발명의 SOD3 과발현 제대혈 유래 줄기세포는 비만세포의 탈과립을 억제하는 효과를 보이므로 아토피 피부염의 예방 또는 치료에 유용하게 이용될 수 있다.

【청구의 범위】**【청구항 1】**

슈퍼옥사이드 디스무타아제 3(superoxide dismutase 3, SOD3)를 과발현시킨 제대혈 유래 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 아토피 피부염 예방 또는 치료용 약학 조성물.

【청구항 2】

제1항에 있어서,

상기 SOD3는 서열번호 1 내지 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열 중 선택된 어느 하나를 포함하는 것을 특징으로 하는 아토피 피부염 예방 또는 치료용 약학 조성물.

【청구항 4】

제 1항에 있어서,

상기 SOD3를 과발현하는 제대혈 유래 줄기세포는 SOD3를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 발현 벡터를 제대혈 줄기세포에 형질감염시켜 얻는 것을 특징으로 하는 아토피 피부염 예방 또는 치료용 약학 조성물.

【청구항 5】

제 4항에 있어서,

상기 재조합 발현 벡터는 렌티바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 아데노연관바이러스(AAV) 벡터, 벡시니아바이러스 벡터, 허피스바이러스 벡터 및 아비폭스바이러스 벡터로 이루어진 군에서 선택된 것을 특징으로 하는 아토피 피부염 예방 또는 치료용 약학 조성물.

【청구항 7】

제 4항에 있어서,

상기 SOD3를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 5 내지 서열번호 8로 표시되는 염기서열 중 선택된 어느 하나를 포함하는 것을 특징으로 하는, 아토피 피부염 예방 또는 치료용 약학 조성물.

【청구항 8】

제 4항에 있어서,

상기 재조합 발현 벡터는 CMV 프로모터 또는 EF1a 프로모터를 포함하는 것을 특징으로 하는 아토피 피부염 예방 또는 치료용 약학 조성물.

【청구항 9】

슈퍼옥사이드 디스무타아제 3(superoxide dismutase 3, SOD3)를 과발현시킨 제대혈 유래 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 아토피 피부염 예방 또는 개선용 화장료 조성물.

【청구항 10】

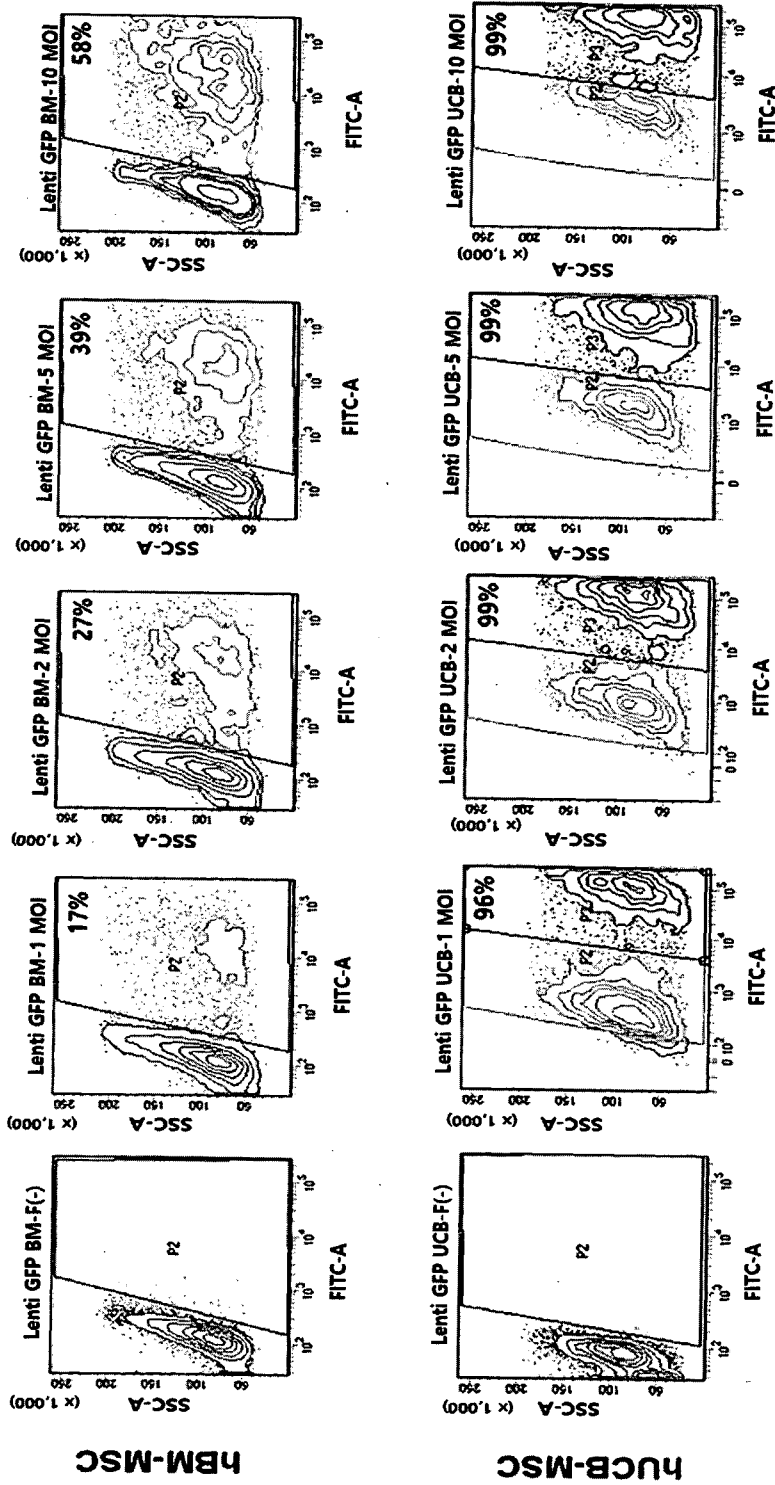
아토피 치료용 제제를 제조하기 위한 슈퍼옥사이드 디스무타아제 3(superoxide dismutase 3, SOD3)를 과발현시킨 제대혈 유래 줄기세포의 용도.

【청구항 11】

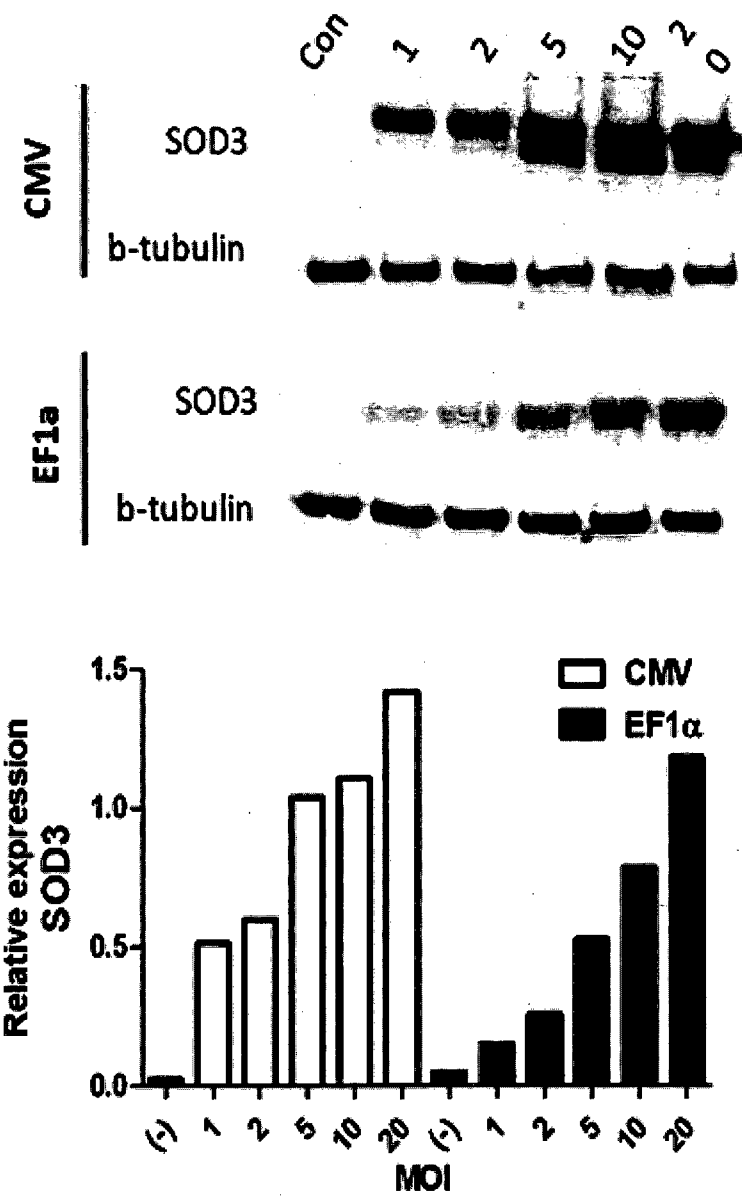
슈퍼옥사이드 디스무타아제 3(superoxide dismutase 3, SOD3)를 과발현시킨 제대혈 유래 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 조성물의 유효량을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 것을 특징으로 하는 아토피 질환의 치료 방법.

【도면】

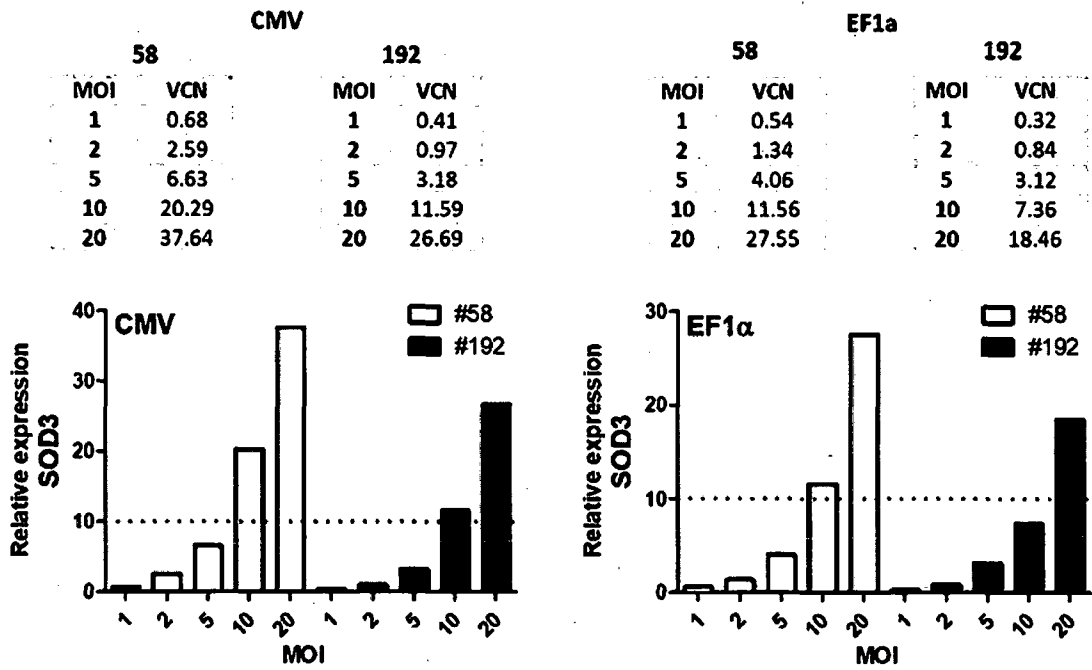
【도 1】



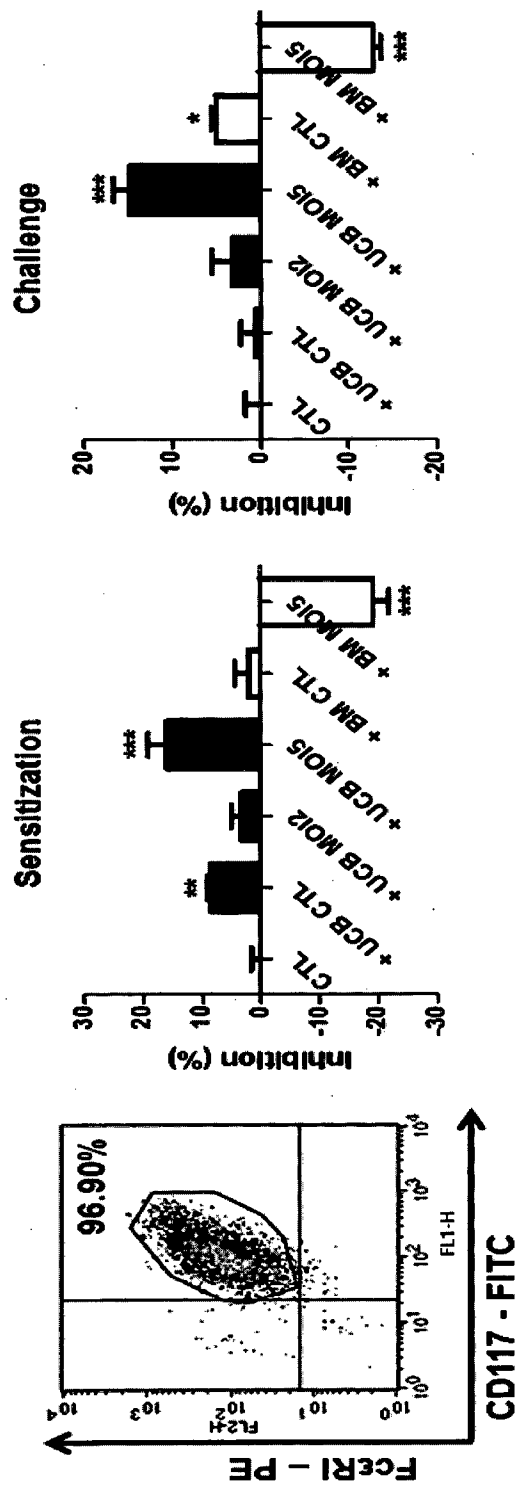
【도 2】



【도 3】



【도 4】



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2018/012713

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 35/51(2015.01)i, A61K 38/44(2006.01)i, A61P 17/00(2006.01)i, A61K 8/98(2006.01)i, A61K 8/66(2006.01)i, A61Q 19/00(2006.01)i, C12N 9/02(2006.01)i, C12N 15/86(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 35/51; A61K 35/28; A61K 35/50

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: SOD3, superoxide dismutase 3, stem cell, cord blood, atopy

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2017-0032872 A (KANGSTEM BIOTECH CO., LTD.) 23 March 2017 See abstract; sequence identifier nos. 1-4; paragraphs [0168], [0169]; claims 1-11.	1,2,4,5,7-10
X	SAH, S. K. et al. Enhanced therapeutic effects of human mesenchymal stem cells transduced with superoxide dismutase 3 in a murine atopic dermatitis-like skin inflammation model. Allergy. vol. 73, no. 12, pages 2364-2376, Electronic publication on 11 October 2018 See abstract; page 2366.	1,2,4,5,7-10
X	SAH, S. K. et al. Effects of Human Mesenchymal Stem Cells Transduced with Superoxide Dismutase on Imiquimod Induced Psoriasis-Like Skin Inflammation in Mice. Antioxid. Redox Signal. 2016, vol. 24, no. 5, pages 233-248 See abstract; pages 242, 243.	1,2,4,5,7-10
A	NCBI. GenBank Accession No. AAA66000.1. extracellular-superoxide dismutase (EC 1.15.1.1) [Homo sapiens]. 09 May 1995 See the entire document.	2



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

“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

24 JULY 2019 (24.07.2019)

Date of mailing of the international search report

24 JULY 2019 (24.07.2019)

Name and mailing address of the ISA/KR



Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu,
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2018/012713

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>NCBI. GenBank Accession No. BC014418.1. Homo sapiens superoxide dismutase 3, extracellular, mRNA (cDNA clone MGC:20077 IMAGE:4644224), complete cds. 08 December 2006 See the entire document.</p> <p>(Note: claims 3, 6 are omitted).</p>	7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2018/012713

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.: **11**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 11 pertains to a method for treatment of the human body, and thus pertains to a subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of 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).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2018/012713

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2017-0032872 A	23/03/2017	CN 108430480 A	21/08/2018
		EP 3351254 A1	25/07/2018
		JP 2018-527403 A	20/09/2018
		US 2018-0344774 A1	06/12/2018
		WO 2017-048097 A1	23/03/2017

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 35/51(2015.01)i, A61K 38/44(2006.01)i, A61P 17/00(2006.01)i, A61K 8/98(2006.01)i, A61K 8/66(2006.01)i, A61Q 19/00(2006.01)i, C12N 9/02(2006.01)i, C12N 15/86(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 35/51; A61K 35/28; A61K 35/50

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: SOD3, 슈퍼옥사이드 디스무타아제3, 줄기세포, 제대혈, 아토피

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-2017-0032872 A (주식회사 강스템바이오텍) 2017.03.23 요약; 서열번호 1-4; 단락 [0168], [0169]; 청구항 1-11 참조.	1,2,4,5,7-10
X	SAH, S. K. 등, `Enhanced therapeutic effects of human mesenchymal stem cells transduced with superoxide dismutase 3 in a murine atopic dermatitis-like skin inflammation model`, Allergy, 73권, 12호, 페이지 2364-2376, 전자공개 2018.10.11 초록; 페이지 2366 참조.	1,2,4,5,7-10
X	SAH, S. K. 등, `Effects of Human Mesenchymal Stem Cells Transduced with Superoxide Dismutase on Imiquimod Induced Psoriasis-Like Skin Inflammation in Mice`, Antioxid. Redox Signal., 2016, 24권, 5호, 페이지 233-248 초록; 페이지 242, 243 참조.	1,2,4,5,7-10
A	NCBI, GenBank Accession No. AAA66000.1, `extracellular-superoxide dismutase (EC 1.15.1.1) [Homo sapiens]`, 1995.05.09 전체 문헌 참조.	2

☒ 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

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2019년 07월 24일 (24.07.2019)

국제조사보고서 발송일

2019년 07월 24일 (24.07.2019)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

박태욱

전화번호 +82-42-481-3405



C(계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	<p>NCBI, GenBank Accession No. BC014418.1, ` Homo sapiens superoxide dismutase 3, extracellular, mRNA (cDNA clone MGC:20077 IMAGE:4644224), complete cds `, 2006.12.08 전체 문헌 참조.</p> <p>(주의 : 청구항 3, 6은 누락되어 있습니다).</p>	7

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: 11
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 11은 인체의 치료방법에 관한 것이므로 PCT 조약 제 17조(2)(a)(i) 및 조약규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
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.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

KR 10-2017-0032872 A

2017/03/23

CN 108430480 A

2018/08/21

EP 3351254 A1

2018/07/25

JP 2018-527403 A

2018/09/20

US 2018-0344774 A1

2018/12/06

WO 2017-048097 A1

2017/03/23