

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구  
국제사무국

(43) 국제공개일  
2015년 12월 30일 (30.12.2015)



(10) 국제공개번호  
WO 2015/199499 A1

- (51) 국제특허분류:  
A61K 35/12 (2015.01) A61P 9/10 (2006.01)  
A61K 39/395 (2006.01) A61P 9/00 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2015/006588
- (22) 국제출원일: 2015년 6월 26일 (26.06.2015)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:  
10-2014-0080009 2014년 6월 27일 (27.06.2014) KR
- (71) 출원인: 연세대학교 산학협력단 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY) [KR/KR]; 120-749 서울시 서대문구 연세로 50, 연세대학교 공학원 1층, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 김동욱 (KIM, Dong Wook); 121-766 서울시 마포구 신수로 107 신촌삼익아파트 102동 702호, Seoul (KR). 김한수 (KIM, Han Soo); 411-370 경기도 고양시 일산서구 대산로 56 한신아파트 303동 1402호, Gyeonggi-do (KR).
- (74) 대리인: 양부현 (YANG, Boo Hyun); 151-832 서울시 관악구 남부순환로 1922 청동빌딩 301호, Seoul (KR).

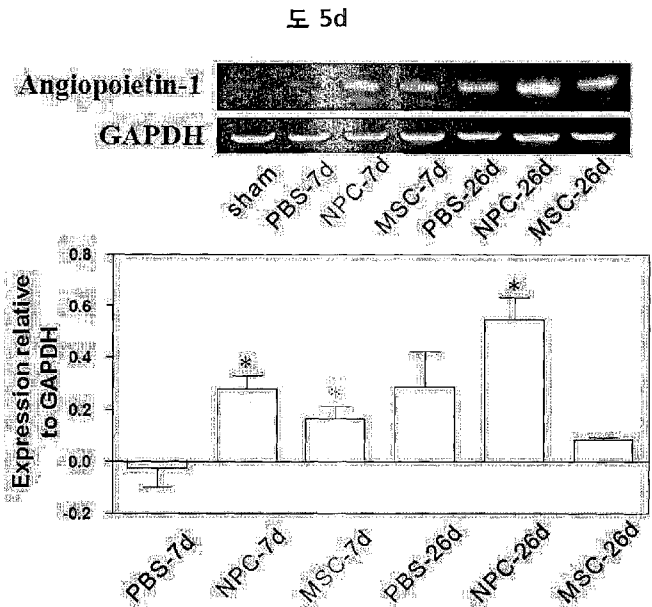
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, 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.
- (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 제 21 조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: COMPOSITION FOR TREATING ISCHEMIC DISEASES OR NEUROGENIC INFLAMMATION, CONTAINING, AS ACTIVE INGREDIENT, NEURAL PROGENITOR CELLS OR SECRETOME THEREOF

(54) 발명의 명칭 : 신경전구세포 또는 이의 분비단백체를 유효성분으로 포함하는 허혈성 질환 또는 신경염증 질환 치료용 조성물



(57) Abstract: The present invention provides a composition for treating ischemic diseases or neurogenic inflammation. PSA-NCAM-positive neural progenitor cells used in the present invention promote angiogenesis in injected tissue and inhibit an inflammatory response. The PSA-NCAM-positive neural progenitor cells can be simply isolated by using an anti-PSA-NCAM-antibody, and exhibit excellent angiogenic and anti-inflammatory activities compared with mesenchymal stem cells, and thus can be useful as a composition for effectively treating ischemic diseases caused by a vascular injury and nerve damage diseases caused by inflammation. In addition, a secretome of the neural progenitor cells of the present invention reduces the ischemic injury site and allows a neurological function to recover, and thus can be used as an agent for treating ischemic diseases and degenerative nervous system disorders such as nerve damage diseases caused by inflammation.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]

WO 2015/199499 A1



---

본 발명은 허혈성 질환 또는 신경염증 질환 치료용 조성물을 제공한다. 본 발명에서 이용되는 PSA-NCAM-양성 신경전구세포는 주입된 조직에서의 혈관신생을 촉진하고 염증반응을 억제한다. 상기 PSA-NCAM-양성 신경전구세포는 항-PSA-NCAM-항체를 이용하여 간단히 분리할 수 있으며, 중간엽 줄기세포에 비하여도 우수한 혈관신생 및 염증억제 활성을 보여, 혈관 손상으로 인한 허혈성 질환 및 염증으로 인한 신경손상 질환에 대한 효율적인 치료 조성물로서 유용하게 이용될 수 있다. 또한, 본 발명의 신경전구세포의 분비단백체는 허혈성 손상 부위를 감소시킬 뿐만 아니라, 신경 기능을 회복시키는바 허혈성 질환과 염증으로 인한 신경 손상 질환과 같은 퇴행성 신경계 질환의 치료제로서 이용될 수 있다.

【명세서】

【발명의 명칭】

신경전구세포 또는 이의 분비단백체를 유효성분으로 포함하는 허혈성 질환 또는 신경염증 질환 치료용 조성물

5 【기술분야】

본 발명은 신경전구세포 또는 이의 분비단백체(Secretome)를 유효성분으로 포함하는 허혈성 질환 또는 신경염증 질환 치료용 조성물에 관한 것이다.

【배경기술】

10 줄기세포는 그 다분화능으로 인하여, 다양한 질환의 유망한 치료 후보물질로 여겨진다. 예를 들어, 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cells, MSCs)는 쉽게 수득 및 분리가 가능하며 혈관신생을 촉진하고 염증을 억제하는 많은 영양인자를 분비한다(Caplan, A. I., & Dennis, J. E. (2006). *Journal of Cellular Biochemistry*, 98, 1076-1084). MSC의 이러한

15 특성은 인간 질병의 치료에 적용하기 위한 연구에서 고려되어 왔다. 최근의 연구에 의하면 MSC는 많은 동물모델 및 인간 임상치료(Chen, J., Li, Y., Katakowski, M., et al. (2003). *Journal of Neuroscience Research*, 73, 778-786; Kopen, G. C., Prockop, D. J., & Phinney, D. G. (1999). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96, 10711-10716)에서

20 조직 회복에 기여하는 것으로 밝혀졌다. 몇몇 보고들이 인 비트로에서 MSC가 뉴런(Bae, K. S., Park, J. B., Kim, H. S., Kim, D. S., Park, D. J., & Kang, S. J. (2011). *Yonsei Medical Journal*, 52, 401-412) 및 성상세포(astrocyte)(Kopen, G. C., Prockop, D. J., & Phinney, D. G. (1999). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96, 10711-

25 10716)를 포함하는 신경계열로의 분화능력을 언급하고 있으나, 이들 분화된 세포들이 인 비보에서 어떠한 기능을 하는지에 대한 명확한 증거는 없다. MSC의 유익한 효과는 세포 대체 보다는 측분비(paracrine) 기작에 의해 유도되는 것으로 보이며, 이에 MSC의 이식(transplantation)은 장기간 지속되는 개선이 아닌, 일시적이고 한정된 효과를 가질 것으로 보인다(Cho, S. R., Kim, Y. R., Kang, H. S., et al. (2009). *Cell Transplantation*, 18, 1359-1368).

30

이에 반하여, 배아줄기세포(embryonic stem cells, ESCs)는 3개의 배아 생식엽(embryonic germ layer)에서 유래하는 모든 특정 세포 형태로 분화할 수 있고, 강력한 자가재생 능력을 가지는 것으로 알려졌다. 주목할 만한 것은, ESC에서 유래한 신경전구세포(neural precursor cells, NPCs)는  
 5 우선적으로 뉴런, 성상세포 및 희소돌기아교세포(oligodendrocyte)를 포함하는 신경계열의 특정 형태의 세포로 분화하기 때문에 뇌조직 회복을 위한 세포원(cell source)으로 여겨진다는 것이다. 이들 세포는 또한 내생 신경전구세포의 생존 및 증식을 촉진하는 몇몇 인자를 분비한다(Capone, C., Frigerio, S., Fumagalli, S., et al. (2007). *PLoSOne*, 7, e373). 그러나,  
 10 ESC에서 분화된 NPCs 또는 NPCs의 배양액이 어떻게 질환모델에서 이식 후 기능의 개선에 기여하는지는 여전히 알려져 있지 않다.

본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그  
 15 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

#### 【발명의 상세한 설명】

#### 【기술적 과제】

본 발명자들은 허혈성 질환 또는 신경염증 질환의 근본적인  
 20 치료방법을 개발하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 표면에서 신경접착 분자인 PSA-NCAM을 발현하는 신경전구세포를 병변부위에 주입할 경우, 혈관의 신생이 촉진되고 염증반응이 억제됨으로써 혈관 손상으로 인한 허혈성 질환 및 염증으로 인한 신경조직의 손상을 효율적으로 치료할 수 있음을 발견함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다. 아울러, 줄기세포  
 25 이식과는 다른 접근방식으로서, 신경전구세포 분비단백체의 병변 부위로의 투여를 통하여 허혈성 손상부위를 감소시키고, 신경기능을 회복시킴으로써 허혈성 질환과 염증으로 인한 신경 손상 질환과 같은 퇴행성 신경계 질환을 효과적으로 치료할 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

따라서 본 발명의 목적은 허혈성 질환 또는 신경염증 질환 치료용  
 30 조성물을 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적은 허혈성 질환 또는 신경염증 질환의

치료방법을 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

5 【기술적 해결방법】

본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 PSA-NCAM(poly-sialylated neural cell adhesion molecule)-양성 신경전구세포(neural precursor cell)를 유효성분으로 포함하는 허혈성 질환 또는 신경염증 질환 치료용 조성물을 제공한다.

10 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 PSA-NCAM-양성 신경전구세포를 유효성분으로 포함하는 조성물을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 허혈성 질환 또는 신경염증 질환의 치료방법을 제공한다.

본 발명에 따르면, 본 발명의 조성물은 허혈성 질환 또는 신경염증 15 질환에 걸린 개체에서 허혈성 조직의 혈관을 복원하거나 염증반응을 억제함으로써 이의 증상의 발전을 억제하거나, 이를 제거하거나 또는 경감시키는 역할을 한다. 따라서, 본 발명의 조성물은 그 자체로 허혈성 질환 또는 신경염증 질환의 치료 조성물이 될 수도 있고, 혹은 다른 항-허혈/항-염증 조성물과 함께 투여되어 이들 질환에 대한 치료 보조제로 20 적용될 수도 있다. 이에, 본 명세서에서 용어 “치료” 또는 “치료제”는 “치료 보조” 또는 “치료 보조제”의 의미를 포함한다.

본 발명에 따르면, 본 발명의 조성물은 혈관신생 유발인자인 안지오펀이에틴-1(angiotensin-1)의 발현을 유의하게 증가시키며, 25 투여(또는 이식) 부위의 혈관 수 및 미세혈관 농도를 크게 증가시킨다. 따라서, 본 발명의 조성물은 혈관조직의 소실, 혈관생성의 결핍 또는 비정상적 혈관의 형성 등에 의해 혈류량이 감소된 개체에서 혈관 조직을 회복하거나 혈관의 수를 증가시킴으로써 혈류량을 회복시키는 효율적인 허혈성 질환 치료 조성물로 이용될 수 있다.

본 발명에 따르면, 본 발명의 조성물은 투여(또는 이식)된 30 신경조직에서의 반응성 미세아교세포 및 성상세포의 활성화를 억제한다. 미세아교세포(microglia)는 중추신경계에서 일차적인 면역 기능을 수행하는

세포로서, 활성화된 미세아교세포는 정상 상태의 미세아교세포와는 달리 포식작용을 활발히 하고, 세포증식을 하며, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-6 등과 같은 사이토카인, 케모카인, iNOS(inducible nitric oxide synthase), COX-2(cyclooxygenase-2) 등의 유전자를 발현시켜 염증매개 물질들을 생성한다.

5    활성화된 성상세포(astrocyte) 역시 염증성 사이토카인인 IL-6, TGF- $\beta$ , LIF 및 IL-1를 분비하며, 분비된 이들 사이토카인들은 다시 미세아교세포 및 성상세포를 활성화시킴으로써 조직 내 환경을 악화시킨다. 따라서, 미세아교세포 및 성상세포의 활성화를 억제하는 본 발명의 조성물은 염증 반응으로 인한 신경조직의 손상을 효과적으로 차단할 수 있다.

10    본 발명의 일구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 안지오펜이에틴-1의 발현을 증가시킨다.

본 명세서에서 사용된 용어, “발현의 증가”란 정상인에 비하여 유전자 또는 단백질의 발현이 측정 가능할 정도로 유의하게 증가하는 것을 말하며, 보다 구체적으로는 대조군에 비하여 발현량이 130% 이상이 되는 것을 말한다.

15    본 발명의 일구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 아교세포(glial cell) 또는 성상세포(astrocyte)의 활성화를 억제한다.

본 명세서에서 사용된 용어, “활성화의 억제”는 아교세포 또는 성상세포의 수, 기능 및 활성화의 저하를 야기하는 생체 내 변형을 의미하며, 예를 들어 이들 세포들의 특이적인 마커(예를 들어 CD68 또는 GFAP)의 발현이 유의하게 감소하거나, 탐지 불가능해지거나, 또는 무의미한 수준으로 존재하게 되는 것을 의미한다.

본 발명의 일구현예에 따르면, 본 발명에서 이용되는 PSA-NCAM-양성 신경전구세포는 전능성 줄기세포로부터 분화된 신경 로제트로부터 분리된다.

25    본 발명에 따르면, 본 발명에서 이용되는 PSA-NCAM-양성 신경전구세포는 전능성 줄기세포로부터 신경분화 자극을 통해 분화된 신경 로제트에서 항-PSA-NCAM-항체를 이용하여 분리될 수 있다.

30    본 발명의 또 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 신경전구세포의 분비단백체를 유효성분으로 포함하는 허혈성 질환 또는 신경염증 질환 치료용 조성물을 제공한다.

본 발명의 또 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 신경전구세포의 분비단백체를 유효성분으로 포함하는 조성물을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 허혈성 질환 또는 신경염증 질환의 치료방법을 제공한다.

5        본 명세서에서 사용된 용어, “신경전구세포의 분비단백체 (secretome)” 는 신경전구세포의 배양 시 신경전구세포로부터 외부(배양배지)로 분비된 단백질들의 집합체를 의미한다.

본 발명의 일구현예에 따르면, 본 발명의 분비단백체의 제조에 이용되는 신경전구세포는 전능성 줄기세포로부터 분화된 것이다.

10        본 발명의 일구현예에 따르면, 상기 신경전구세포는 전능성 줄기세포(예컨대, 배아줄기세포 또는 유도만능줄기세포)를 신경계열 세포로 분화 유도하여 형성된 신경로제트(neural rosette) 단계의 신경전구세포이다.

본 발명의 일구현예에 따르면, 상기 신경전구세포는 PSA-NCAM-양성  
15    신경전구세포이다.

본 발명의 다른 일구현예에 따르면, 상기 신경전구세포는 PSA-NCAM-음성 신경전구세포이다.

상기 PSA-NCAM-양성 혹은 음성 신경전구세포는 전능성 줄기세포로부터 신경분화 자극을 통해 분화된 신경 로제트에서 항-PSA-  
20    NCAM-항체를 이용하여 분리될 수 있다.

본 발명의 일구현예에 따르면, 상기 분비단백체는 신경전구세포를 동물세포 배양배지에서 배양하여 얻은 세포배양액에 함유된 형태이다. 즉, 본 발명의 조성물에는 신경전구세포의 분비단백체가 함유되어 있는 신경전구세포의 배양액이 포함될 수 있는 것이다.

25        본 발명의 일구현예에 따르면, 상기 신경전구세포의 세포배양액은 신경전구세포를 ITS(인슐린/트랜스페린/셀레늄) 및 bFGF(basic fibroblast growth factor)가 함유된 무혈청 동물세포 배양배지에서 배양한 후 세포를 제거하여 수득할 수 있다. 상기 배양에는, 계대 배양한 신경전구세포, 예를 들어, N2, B-27 및/또는 Gem21이 첨가된 bFGF-함유 동물세포 배양배지에서  
30    계대 배양(예컨대, 4계대 이상)하여 얻은 신경전구세포가 이용될 수 있다.

상기 배양배지에서의 세포의 제거는 원심분리, 여과와 같은 통상의

세포 분리방법을 사용하여 실시할 수 있다.

상기 동물세포 배양배지로는 신경전구세포의 배양 시 이용되는 통상의 배지를 제한 없이 사용할 수 있으며, 예를 들어 DMEM/F12를 사용할 수 있다.

5        본 발명의 일구현예에 따르면, 상기 신경전구세포는 인간 유도만능줄기세포로부터 분화된 것이며, 이 신경전구세포의 분비단백체는 하기의 단백질들을 포함한다:

          아그린(Agrin), 아넥신 A5(Annexin A5), BSG(Basigin),  
 비글리칸(Biglycan), 칼포닌-3(Calponin-3), 콕토신-유사  
 10 단백질(Coactosin-like protein), 코피린-1(Cofilin-1), 콜라겐 알파-2,  
 쿨린-3(Cullin-3), 데스트린(Destrin), 디스트로글리칸(Dystroglycan),  
 에프린-B2(Ephrin-B2), 엑스포틴-2(Exportin-2), 에즈린(Ezrin),  
 피브로넥틴, 피블린-1(Fibulin-1), Frizzled-related 단백질, 젤라틴-3  
 15 결합 단백질(Galectin-3 binding protein), 그라눌린(Granulins),  
 성장/분화 인자 11(Growth/differentiation factor 11),  
 합토글로빈(Haptoglobin), 헤포펙신(Hemopexin), High mobility group  
 protein B2, 호네린(Hornerin), 임포틴-9(Importin-9), 인슐린-유사 성장  
 인자 결합 단백질 2(Insulin-like growth factor-binding protein 2),  
 루프스 La 단백질(Lupus La protein), 대식세포 이동 억제 인자(Macrophage  
 20 migration inhibitory factor), 미드킨(Midkine), 모에신(Moesin),  
 뉴로필린 2(Neuropilin 2), 플레이오토트로핀(Pleiotrophin), 프로필린-  
 1(Profilin-1), 단백질 DJ-1(Protein DJ-1), 라딕신(Radixin), Secreted  
 frizzled-related protein-2, 셉틴-11(Septin-11), 탈린-1(Talin-1),  
 테스티칸(Testican), 티모포이에틴(Thymopoietin), 트랜스젤린-  
 25 3(Transgelin-3) 및 비멘틴(Vimentin).

          본 발명의 일구현예에 따르면, 상기 신경전구세포는 인간 배아줄기세포로부터 분화된 것이며, 이 신경전구세포의 분비단백체는 하기의 단백질들을 포함한다:

          아그린(Agrin), 아넥신 A2(Annexin A2), 아트락틴(Attractin),  
 30 비글리칸(Biglycan), 세룰로플라스민(Ceruloplasmin), 코피린-1(Cofilin-1),  
 콜라겐 알파-1, 코로닌-1X(Coronin-1X), 더미시딘(Dermicidin), DERP12,

에프린-B3, 엑소토신-2(Exostosin-2), 에즈린(Ezrin), 젤라킨-3 결합 단백질, 그라눌린(Granulins), 성장/분화 인자 11(Growth/differentiation factor 11), 합토글로빈(Haptoglobin), 헤모펙신(Hemopexin), High mobility group protein B2, 호네린(Hornerin), 인슐린-유사 성장 인자 결합 단백질 2(Insulin-like growth factor-binding protein 2), 루프수 La 단백질, 미드킨(Midkine), 모에신(Moesin), 멀티플 상피 성장 인자-유사 도메인 단백질 8(Multiple epidermal growth factor-like domains protein 8), 니도겐-1(Nidogen-1), 파라티모신(Parathymosin), 프로필린-2(Profilin-2), 단백질 DJ-1(Protein DJ-1), Secreted frizzled-related protein-2, 시크리토그라닌(Secretogranin), 탈린-1(Talin-1), 티모신 베타-4(Thymosin beta-4), TGFBI(Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3), 트랜스젤린(Transgelin) 및 비멘틴(Vimentin).

이하에서는, 상술한 본 발명의 조성물 및 치료방법에 공통으로 적용되는 내용에 관하여 기술한다.

본 명세서에서 사용된 용어, “줄기세포”는 조직을 구성하는 각 세포로 분화(differentiation)되기 전 단계의 미분화 세포들을 총칭하며, 특정 분화 자극(환경)에 의해 특정 세포로 분화할 수 있는 능력을 가지고 있다. 줄기세포는 세포분열이 정지된 분화된 세포와는 달리 세포분열에 의해 자신과 동일한 세포를 생산(self-renewal)할 수 있고, 분화 자극이 가해지면 특정 세포로 분화되고 이러한 분화는 다른 환경 또는 다른 분화 자극에 의해 다양한 세포로도 분화될 수 있는, 분화의 유연성(plasticity)을 가지고 있는 것이 특징이다.

본 발명에서 이용되는 줄기세포는 인 비트로에서 무한정 증식되며, 3종류의 모든 배아층(외배엽, 중배엽과 내배엽)으로부터 유래되는 다양한 세포로 분화될 수 있는 전능성 줄기세포(pluripotent stem cell)이다. 보다 구체적으로, 상기 전능성 줄기세포는 배아줄기세포(embryonic stem cells), iPSCs(induced pluripotent stem cells), 배아생식세포(embryonic germ cells) 또는 배아종양세포(embryonic carcinoma cells)이다.

배아줄기세포는 배반포의 내부세포괴(ICM)로부터 유래되고, 배아생식세포는 5-10 주령의 생식용기(gonadal ridge)의 원시생식세포로부터 유래된다.

유도만능줄기세포(iPSCs)는 비-전분화능 세포(예를 들면, 체세포)로부터 전능성을 부여하는 특정 유전자를 삽입하여 인공적으로 유래된 전분화능 줄기세포의 하나이다. 유도만능줄기세포는 줄기세포 유전자 및 단백질 발현, 염색체 메틸화, 배가시간(doubling time), 배아체 형성, 테라토마 형성, 생존성 키메라 형성, 교잡성 및 분화성을 가지는 면에서 전분화능 줄기세포(예를 들면, 배아줄기세포)와 동일하다고 여겨진다.

상기 용어, “신경 로제트(neural rosette)”는 인간 배아줄기세포의 신경분화 과정의 초기단계의 신경줄기세포를 말하며, 신경 로제트는 원주형의 방사상 형태를 갖는다. 상기 신경 로제트는 Pax6 및 Sox1 같은 초기 신경외배엽(neuroectodermal) 마커를 발현하는 세포로 구성되며, 다양한 뉴런 세포 및 신경교세포로 분화할 수 있다. 상기 신경분화 자극은 당업계에서 통상적으로 실시되는 방법들, 예를 들어, 무혈청 배지(Tropepe V et al., *Neuron*. 30:6578(2001)), FGFs(fibroblast growth factors), Wnt 및 RA(retinoic acid)와 같은 모르포겐(morphogens)의 처리(Ying QL et al. *Nat Biotechnol*. 21:183186(2003))에 의해 분화할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

상기 항체로는 폴리클로날 또는 모노클로날 항체를 사용할 수 있다. PSA-NCAM에 대한 항체는 당업계에서 통상적으로 실시되는 방법들, 예를 들어, 융합 방법(Kohler and Milstein, *European Journal of Immunology*, 6:511-519(1976)), 재조합 DNA 방법(미국 특허 제4,816,56호) 또는 파아지 항체 라이브러리 방법(Clackson et al, *Nature*, 352:624-628(1991) 및 Marks et al, *J. Mol. Biol.*, 222:58, 1-597(1991))에 의해 제조될 수 있다. 항체 제조에 대한 일반적인 과정은 Harlow, E. and Lane, D., *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, New York, 1999; Zola, H., *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1984; 및 Coligan, *CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY*, Wiley/Greene, NY, 1991에 상세하게 기재되어 있으며, 상기 문헌들은 본 명세서에 참조로서 삽입된다. 예를 들어, 단일클론 항체를 생산하는 하이브리도마 세포의 제조는 불사멸화 세포주를 항체-생산 림프구와 융합시켜 이루어지며, 이 과정에 필요한 기술은 당업자에게 잘

알려져 있으며 용이하게 실시할 수 있다. 폴리클로날 항체는 PSA-NCAM 항원을 적합한 동물에게 주사하고, 이 동물로부터 항혈청을 수집한 다음, 공지의 친화성(affinity) 기술을 이용하여 항혈청으로부터 항체를 분리하여 얻을 수 있다.

- 5           본 명세서에서, PSA-NCAM을 언급하면서 사용되는 용어 “항체”는 PSA-NCAM에 대한 특이 항체로서, PSA-NCAM 단백질에 대해 특이적으로 결합하며, 완전한 항체 형태뿐만 아니라 항체 분자의 항원 결합 단편을 포함한다. 완전한 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 구조이며 각각의 경쇄는 중쇄와 다이설파이드 결합으로  
10 연결되어 있으며, 항체 분자의 항원 결합 단편이란 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편으로서 Fab, F(ab'), F(ab')<sub>2</sub> 및 Fv을 포함한다.

항체를 이용한 PSA-NCAM-양성 신경전구세포 분리를 위하여, 형광-활성세포분류기(fluorescence-activating cell sorters: FACS), 자성활성세포분류기(magnetic activated cell sorter: MACS) 및 보체  
15 매개성 용해(complement-mediated lysis) 방법을 이용할 수 있다.

본 명세서에서 사용된 용어, “치료”는 (a) 질환, 질병 또는 증상의 발전의 억제; (b) 질환, 질병 또는 증상의 경감; 또는 (c) 질환, 질병 또는 증상을 제거하는 것을 의미한다. 본 발명의 조성물은 허혈성 질환 또는 신경염증 질환의 증상의 발전을 억제하거나, 이를 제거하거나 또는  
20 경감시키는 역할을 한다. 따라서, 본 발명의 조성물은 그 자체로 허혈성 질환 또는 신경염증 질환의 치료용 조성물이 될 수도 있고, 혹은 다른 항-허혈/항-염증 조성물과 함께 투여되어 이들 질환에 대한 치료 보조제로 적용될 수도 있다. 이에, 본 명세서에서 용어 “치료” 또는 “치료제”는 “치료 보조” 또는 “치료 보조제”의 의미를 포함한다.

25           본 명세서에서 사용된 용어, “허혈성 질환”은 혈관 손상에 따른 혈액 누수(blood leakage), 색전(embolism) 또는 경색(infarction) 등에 의해 혈류량이 감소하여 혈액공급이 차단된 조직이 괴사에 이르는 질환을 말한다.

본 발명의 일구현예에 따르면, 본 발명의 조성물로 치료 가능한  
30 허혈성 질환은 허혈성 심장질환, 심근경색, 협심증, 하지동맥 허혈성 질환, 사지말단부 허혈성 질환 및 허혈성 뇌혈관 질환으로 구성된 군으로부터

선택된다.

본 명세서에서 사용된 용어, “허혈성 심장질환”은 심장에 혈액을 공급하는 관상동맥이 손상되거나, 협소 또는 폐색되어 심장근육으로의 혈류가 감소하여 초래되는 질환을 의미한다. 보다 구체적으로는, 본 발명의  
5 조성물로 치료 가능한 허혈성 심장질환은 협심증, 심근경색증 및 심부전증으로 구성된 군으로부터 선택된다.

본 명세서에서 사용된 용어, “허혈성 뇌혈관 질환”은 뇌혈관이 손상되거나, 협소 또는 폐색되어 이로 인해 혈류를 공급받지 못한 뇌조직이 손상되는 질환을 의미한다. 보다 구체적으로는, 상기 허혈성 뇌혈관 질환은  
10 허혈성 뇌졸중이다.

본 명세서에서 사용된 용어, “신경염증 질환”은 염증 반응에 의한 신경 조직의 손상으로 초래되는 질환을 의미한다.

본 발명의 일구현예에 따르면, 본 발명의 조성물로 치료 가능한 신경염증 질환은 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병, 루게릭병,  
15 크로이츠펠트야콥병, 다발성 경화증, 근위축성 측삭 경화증, 미만성 루이소체병, 백색질뇌염, 측두엽간질 및 염증성 척수손상으로 구성된 군으로부터 선택된다.

본 명세서에서 사용된 용어, “투여” 또는 “투여하다”는 본 발명의 조성물의 치료적 유효량을 대상체에 직접적으로 투여함으로써 대상체의  
20 체내에서 동일한 양이 형성되도록 하는 것을 말한다. 따라서, 용어 “투여하다”는 본 발명의 유효성분(PSA-NCAM-양성 신경전구세포 또는 신경전구세포의 분비단백체)을 병변 부위에 주입하는 것을 포함하므로, 용어 “투여하다”는 “주입하다”와 같은 의미로 사용된다.

조성물의 “치료적 유효량”은 조성물을 투여하고자 하는 개체에  
25 치료적 또는 예방적 효과를 제공하기에 충분한 추출물의 함량을 의미하며, 이에 “예방적 유효량”을 포함하는 의미이다. 본 명세서에서 사용된 용어, “개체”는 제한 없이 인간, 마우스, 래트, 기니아 피그, 개, 고양이, 말, 소, 돼지, 원숭이, 침팬지, 비비 또는 붉은털 원숭이를 포함한다. 구체적으로는, 본 발명의 개체는 인간이다.

본 발명의 조성물이 약제학적 조성물로 제조되는 경우, 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본 발명의

약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘, 미네랄 오일, 식염수, PBS(phosphate buffered saline) 또는 배지 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 유효제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 *Remington's Pharmaceutical Sciences* (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.

본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 구체적으로는 비경구 투여, 보다 구체적으로는 근육 내(intramuscular) 투여, 뇌실(intracerebroventricular) 투여, 척수강(Intrathecal) 투여 또는 혈관 내(intravascular) 투여이다.

본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 일반적인 투여량은 성인 기준으로 1일 당  $10^2$ - $10^{10}$  세포이다.

본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액, 시럽제 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

**【유리한 효과】**

본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

(a) 본 발명은 허혈성 질환 또는 신경염증 질환 치료용 조성물을 제공한다.

(b) 본 발명에서 이용되는 PSA-NCAM-양성 신경전구세포는 주입된 조직에서의 혈관신생을 촉진하고 염증반응을 억제한다. 상기 PSA-NCAM-양성 신경전구세포는 항-PSA-NCAM-항체를 이용하여 간단히 분리할 수 있으며, 중간엽 줄기세포(MSC)에 비하여도 우수한 혈관신생 및 염증억제 활성을 보여, 혈관 손상으로 인한 허혈성 질환 및 염증으로 인한 신경손상 질환에 대한 효율적인 치료 조성물로서 유용하게 이용될 수 있다.

(c) 본 발명의 신경전구세포의 분비단백체는 허혈성 손상 부위를 감소시킬 뿐만 아니라, 신경기능을 회복시키는바 허혈성 질환과 염증으로 인한 신경 손상 질환과 같은 퇴행성 신경계 질환의 치료제로서 이용될 수 있다.

#### 【도면의 간단한 설명】

도 1은 NPC<sup>PSA-NCAM+</sup> 및 MSC를 이식한 랫트 허혈 뇌에서의 경색 부위 축소를 보여주는 그림이다. 도 1a는 실험 계획도를 보여주는 모식도이다. pMCAo 이후 1 일째에, 실험동물에 무작위로 NPC<sup>PSA-NCAM+</sup>, MSC 또는 PBS를 처리하였다(각각 n=10). 이식 후 26 일째에 실험동물을 희생시키고 뇌 조직에 대한 면역조직화학 분석을 진행하였다. 도 1b는 랫트 pMCAo 모델에서 MSCs 및 NPC<sup>PSA-NCAM+</sup> 이식이 이식 26 일째에 경색 크기에 미치는 효과를 보여주는 그림이다. PBS 군과 비교시 각각 \* $P < 0.05$  및 \*\* $P < 0.01$ 이다. 도 1c는 PBS, NPC<sup>PSA-NCAM+</sup> 또는 MSC를 처리한 랫트에서 이식 26 일째의 대표적 이미지를 보여주는 그림이다.

도 2는 NPC<sup>PSA-NCAM+</sup>를 이식한 랫트 뇌졸중 모델에서 행동능력의 향상을 보여주는 그림이다. 각각 체중변화(도 2a), 풋 폴트 검사(도 2b), 비대칭 검사(도 2c), 빔 균형 검사(도 2d), 포착가능 견인 검사(도 2e) 및 mNSS(도 2f) 결과를 나타낸다. 측정값은 ±표준오차로 표시하였다. PBS 군과 비교하여 각각 \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  및 \*\*\* $P < 0.001$ 이다.

도 3은 생존한 NPC<sup>PSA-NCAM+</sup>의 랫트 뇌조직으로의 편입 및 분화를 보여준다. 도 3a는 경색 부위를 나타낸다. 이식된 NPC<sup>PSA-NCAM+</sup>의 생존 및 증식을 26 일째에 시험하였다. Ki67(녹색) 또는 DCX(붉은색) 양성세포가 랫트 허혈 뇌에서 관찰되었다. 스케일바: 500  $\mu\text{m}$ . 도 3b는 도 3a의 고배율 사진이다. 스케일 바: 200  $\mu\text{m}$ . 도 3은 hNu(녹색) 및 DCX(붉은색)을 함께 발현하는 NPC<sup>PSA-NCAM+</sup> 세포의 일례를 보여주는 그림으로, 많은 이식된

NPC<sup>PSA-NCAM+</sup> 세포들이 hNu 양성을 보여 우수한 생존률과 손상된 뇌조직으로의 정착률을 보임을 알 수 있다. 스케일 바: 20 μm. 도 3d 는 MSC-이식군의 대부분에서 바늘관(needle tract) 주위에 몇몇 증식한 Ki67<sup>+</sup>hNu<sup>-</sup> 세포가 관찰됨을 보여주는 그림이다. 스케일 바: 200 μm. 도 3b 에서 왼쪽부터 DCX/DAPI, Ki67/DAPI, DCX/Ki67/DAPI, Tuj1/DAPI, Nestin/Ki67/DAPI 에 관한 사진이다. 도 3c 에서 왼쪽부터 시계방향으로 DAPI, hNu, hNu/DCX, DCX 에 관한 사진이다. 도 3d 에서 왼쪽부터 hNu/DAPI, Ki67/DAPI, hNu/Ki67 에 관한 사진이다.

도 4 는 랫트 뇌 조직에서 NPC<sup>PSA-NCAM+</sup>의 신경조직에의 기여 및 아교세포 활성화의 감소효과를 보여주는 그림이다. 도 4a 는 NPC<sup>PSA-NCAM+</sup>-이식된 랫트 뇌에서 hMito<sup>+</sup>(붉은색) 및 MAP2<sup>+</sup>(녹색) 세포가 관찰됨을 보여주는 그림이다. 스케일 바: 20 μm. 도 4b 는 이식된 세포의 이식 26 일째의 공초점 이미지이다. 공여자-유래 세포(녹색, hNu<sup>+</sup>)는 NPC<sup>PSA-NCAM+</sup> 이식부위에서 MAP2(붉은색)와 함께 위치하였다. DAPI, 파란색. 도 4c 는 반대측 선조체의 숙주 뉴런에 MAP2 와 함께 위치하는 hMi 가 없음을 보여주는 그림이다. 선조체에 MAP2<sup>+</sup> 세포가 두드러지게 존재하는 것을 알 수 있다. 스케일 바: 20 μm. 도 4d 는 NPC<sup>PSA-NCAM+</sup>-이식된 랫트뇌에 hMito<sup>+</sup>GFAP<sup>+</sup> 세포가 검출되지 않음을 보여주는 그림이다. 스케일 바: 20 μm. 도 4e 는 NPC<sup>PSA-NCAM+</sup>-이식 그룹에서 동측 선조체의 ED-1 양성이 유의하게 감소하고, MSC-이식 그룹에서는 그 정도가 덜함을 보여주는 그림이다. NPC<sup>PSA-NCAM+</sup>- 및 MSC-이식 그룹 모두 PBS 그룹과는 유의한 차이를 보였다. GFAP 의 발현은 MSC-또는 PBS 군에 비해 NPC<sup>PSA-NCAM+</sup>-이식 군에서 눈에 띄게 감소하였다. 스케일 바: 200 μm. ED1 또는 GFAP 양성 세포의 수를 최소 5 개의 별개의 현미경 영역에서 측정하였다. 측정값은 ±표준오차로 표시하였다. 각 그룹 간의 다중 비교시 \**P*<0.05 및 \*\*\**P*<0.001 이다.

도 5 는 NPC<sup>PSA-NCAM+</sup>가 이식된 랫트 허혈 뇌에서 혈관신생이 촉진됨을 보여주는 그림이다. 도 5a 는 PBS 군, NPC<sup>PSA-NCAM+</sup>- 또는 MSC-이식 군의 허혈성 뇌의 면역염색 결과를 각각 나타낸 그림이다. 스케일 바: 200 μm. 도 5b 는 NPC<sup>PSA-NCAM+</sup>-이식 부위의 숙주 기원 α-SMA-양성 혈관상피세포(붉은색)의 대표적인 이미지를 보여주는 그림이다. 스케일 바:20 μm. 도 5c 는 NPC<sup>PSA-NCAM+</sup>-또는 MSC-이식된 랫트에서 α-SMA-양성

미세혈관의 정량분석 결과를 보여주는 그림이다. 측정값은 ±표준오차로 표시하였다. \* NPC<sup>PSA-NCAM+</sup>군을 MSC 또는 PBS 군과 비교시 각각  $P < 0.05$  및  $P < 0.01$ . 도 5d 는 허혈성 뇌에서의 랫트-안지오프이에틴-1 발현량을 RT-PCR 로 NPC<sup>PSA-NCAM+</sup>(NPC) 또는 MSC 이식 7 일 및 26 일 후에 측정된 결과를 나타내는 그림이다. 안지오프이에틴-1 의 RT-PCR 증폭(위) 및 삼 대조군(기저값)에 대해 GAPDH-표준화한 mRNA 수준(아래)의 정량화 결과를 보여준다. 측정값은 ±표준오차로 표시하였다. \* PBS 군과 비교시  $P < 0.05$ .

도 6 은 NPC<sup>PSA-NCAM+</sup>, MSC 또는 PBS 를 이식한 허혈 뇌에서의 랫트 및 인간 신경영양 인자 발현수준을 RT-PCR 을 이용하여 조사한 결과를 나타낸 그림이다. 신경영양 인자의 RT-PCR 증폭 및 삼 대조군(기저값)(그룹 당  $n=3$ )에 대해 GAPDH-표준화한 mRNA 수준의 정량화 결과를 보여준다. 측정값은 ±표준오차로 표시하였다. \* PBS 군과 비교시  $P < 0.05$ .

도 7 은 PBS 대조군, 배지 대조군 및 분비단백체 처리군의 허혈성 병변 부위의 크기를 보여준다.

도 8 은 PBS 대조군, 배지 대조군 및 분비단백체 처리군의 체중 변화를 보여준다.

도 9 는 PBS 대조군, 배지 대조군 및 분비단백체 처리군의 행동 분석 결과를 보여준다. 도 9a 는 빔 균형 검사 결과이고, 도 9b 는 포착가능 견인 검사 결과이며, 도 9c 는 풋 플트 검사 결과이고, 도 9d 는 단위시간 당 행동의 활발함을 보여주는 라인 크로스(line cross) 결과를 보여준다.

도 10 은 PBS 대조군, 배지 대조군 및 분비단백체 처리군의 종합적인 행동신경 개선 효과(mNSS) 분석 결과를 보여준다.

도 7 내지 10 에서 \* $P$ value  $< 0.05$ , \*\* $P$  value  $< 0.01$ .

**【발명을 실시를 위한 형태】**

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

30 실시예

실시에 1. PSA-NCAM-양성 신경전구세포의 허혈성 질환과 신경염증 질환에 대한 치료 효과

#### 실험방법

#### 인간 MSC 및 인간 ESC-유래 NPC<sup>PSA-NCAM+</sup> 세포의 배양 및 분화

5 인간 세포의 사용은 의학연구윤리심의위원회(Institutional Review Board, IRB No. 4-2008-0643)의 승인을 받았다. 인간 골수는 사전 동의서를 제출한 건강한 성인 지원자의 후부장골능선에서 수득하였다. 요약하면, 골수 단핵세포를 밀도구배 원심분리(GE Healthcare, Uppsala, Sweden)를 이용하여 분리하고 10% FBS(Gibco, GrandIsland, NY)가 보충된 DMEM 에  
10 플레이팅한 뒤 37°C에서 5% CO<sub>2</sub> 를 포함하는 가슴 대기 하에서 배양하였다. 24 시간 뒤에, 비-흡착 세포를 세척하고 제거하였다. 배양액을 매 3 일마다 교체하고 90% 컨플루언시에 도달하였을 때 세포를 0.05% 트립신/EDTA (Invitrogen, Carlsbad, CA)를 이용하여 계대배양하였다.

3-5 계대의 흡착 MSC 를 본 실험에서 사용하였다. 신경 유도를 위하여,  
15 bFGF 가 없는 hESC 배지(Invitrogen) 상에서 hESC 에서 유래된 배아체(embryoid bodies, EBs)를 5  $\mu$ M DM(dorsomorphin)(Sigma, St. Louis, MO) 및 5-10  $\mu$ M SB431542(Calbiochem, San Diego, CA)를 포함하는 현탁액에서 4 일간 배양하고 이후 20 ng/ml bFGF 가 보충된 1X N2(Invitrogen) 배지에서 매트릭셀-코팅된 디쉬(BD Biosciences, Bedford,  
20 MA)에 5 일간 흡착시켰다(Kim, D. S., Lee, D. R., Kim, H. S., et al. (2012). *PLoSOne*, 7, e39715). 흡착된 EB 콜로니의 중심에 나타난 신경 로제트를 pulled 글래스 파이펫을 이용하여 주변의 평평한 세포로부터 조심스럽게 분리하였다. 작은 로제트 덩어리를 매트릭셀 코팅된 디쉬에  
25 씨딩하고 1XN2, 1XB27(Invitrogen)가 보충된 DMEM/F12 에서 배양하였다(Kim, D. S., Lee, J. S., Leem, J. W., et al. (2010). *Stem Cell Reviews and Reports*, 6, 270-281).

#### MACS 에 의한 PSA-NCAM-양성 NPC 의 분리

30 80-90% 컨플루언시의 확장된 신경 로제트를 10  $\mu$ M Y27632(Sigma)에 1 시간 동안 노출시켜 MACS 단계에 들어가긴 전 세포사가 일어나는 것을 방지하였다. Accutase(Invitrogen)를 이용하여 분리한 뒤에, 세포들( $\sim 1 \times 10^8$

cells)을 1% BSA 가 포함된 PBS 에서 블로킹하고, 마이크로비드(Miltenyi Biotec)가 접합된 항-PSA-NCAM 항체와 함께 4°C에서 15 분간 배양하였다. 집중적으로 세척한 뒤, 세포 현탁액을 MASC(magnetic activated cell sorting)에 넣고 컬럼에 남아있는 양성-표지된 세포를 튜브로 용리시켰다. 5 분리된 NPC<sup>PSA-NCAM+</sup>를 N2B27 배지 또는 20 ng/ml bFGF 가 추가된 NBG 배지(1XN2, 0.5XB27 및 0.5XG21 보충)(GeminiBio-Products, WestSacramento, CA)에 4-5X10<sup>5</sup> cells/cm<sup>2</sup> 농도로 다시 플레이팅하였다. 배양 배지는 매일 교체하였으며, 세포는 2-3 일마다 계대배양하였다.

10 **뇌졸중 모델의 확립 및 NPC<sup>PSA-NCAM+</sup>의 정위주입(stereotaxic injection)**

2 주령의 수컷 Sprague-Dawley 랫트(체중 약 250-300 g)를 N<sub>2</sub>O 대 O<sub>2</sub> 의 비율 70%-30% 하에서 3% 이소플로란(Hana Pharm, Seoul, Korea)으로 마취하였다. 좌측 총경동맥 및 외경동맥을 분리하고 4-0 수술용 봉합사로 15 연결하였다. 나일론 실을 좌측 내경동맥에 삽입하여 윌리스 고리까지 이동시켰으며(영구적 중대뇌동맥 폐색: permanent middle cerebral artery occlusion, pMCAo), 랫트를 희생시킬 때까지 실을 남겨두었다.

pMCAo 이후 2 일 뒤에 NPC<sup>PSA-NCAM+</sup>, MSCs 또는 PBS 의 정위주입을 수행하였다. 랫트를 졸레틸(VirbacS. A., France, 25mg/kg)로 마취하고 20 정위 외과수술도구(David Kopf Instruments, Tujunga, CA)에 위치시켰다. A26-게이지 바늘(Hamilton syringe, Hamilton, Reno, NV)을 좌측 선조체(striatum)(브레그마로부터의 좌표: 전후측(anteroposterior) +0.7 mm, 내외측(mediolateral)-2 mm 및 등배측(dorsoventral)-5.5 mm, 수막(meninges)으로부터 -2.5 mm)에 삽입하였다; 5 μl 의 NPC<sup>PSA-NCAM+</sup>, 25 MSCs(각각 1X10<sup>5</sup> cells/μl) 또는 PBS 를 5.5 mm 및 -2.5 mm 부위에 주입하였다. 모든 세포를 지속적인 교반을 통해 세포 응집을 막으면서 좌측 선조체에 1 μl/min 의 속도로 주입하였다. 9 마리의 실험동물이 pMCAo 수술 및 세포 이식 도중 사망하였다.

모든 동물을 AAALAC(Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care)가 승인한 시설에서 12 시간 명/암 사이클 30

하에서 길렀다. 동물 실험은 의학연구윤리심의위원회(Institutional Review Board, IRB No. 4-2011-0087)의 승인을 받았다.

**행동 검사**

5         풋 폴트 검사(Foot fault test): 풋 폴트 검사는 2 분 간의 시험 동안 등거리 격자판(equi-distant grid, 60 X 60 cm, 6 cm 거리) 상에서 앞발을 정확하게 위치시키는 정도를 측정한다. 상기 시험은 종래의 연구에 기초하여 변형된 절차에 따라 수행하였다[12, 13].

10         비대칭 행동검사(Asymmetric behavior test): 종래에 보고된 변형된 EBST(elevated body swing test)를 이용하였다. 랫트의 꼬리를 실험 구역 표면의 10 cm 까지 들어올린 후 측면 운동을 검사하였다. 우측 또는 좌측으로의 스윙(swing) 빈도를 1 분간 측정하였다. 비대칭 점수값은 다음과 같이 계산하였다; 0 점-몸통을 비틀, 좌측 또는 우측으로 스윙, 1 점-<math>30^{\circ}</math>로 비대칭적 비틀, 2 점->math>30^{\circ}</math>로 비대칭적 비틀. 몸통을 비트는 방향에 따라, 점수는 동측 비틀(동측 twist, 경색부위와 같은 쪽) 또는 반대측 비틀(contralateral twist, 경색 부위와 반대 쪽)으로 계산하였다.

20         빔 균형 검사(Beam balance test): 빔 보행기구는 빔(100 X 5 X 2 cm)으로 구성된다. 운동능력은 종래 연구에서 사용된 6 점 단위로 평가하였다; 1 점-빔 위에서 안정적인 자세 및 발로 균형을 이룸, 2 점-비의 측면을 움켜쥐고 흔들리는 동작을 함, 3 점-하나 이상의 발이 미끄러짐, 4 점-균형을 잡으려는 시도를 하나 떨어짐, 5 점-빔에 걸쳐 있으나 떨어짐, 점 6-균형을 잡으려는 시도 없이 떨어짐.

25         포착가능 견인 검사(Prehensile traction test): 검사 중 포착가능 여부는 랫트가 앞발로 수평방향의 로프에 매달릴 수 있는 능력을 통해 측정한다. 포착가능 견인 검사는 랫트의 근육 강도를 평가하기 위하여 행해졌다. 이 검사는 종래에 보고된 방법으로 실시하였다. 철막대(직경 2 cm, 길이 100 cm)를 수평으로 스펀지 고무패드(두께 7.5 cm)의 70 cm 위에 위치시켰다. 랫트의 앞발을 철막대에 위치시킨 뒤 풀어주었다. 랫트를

5 초간 철막대에 매달리도록 하였다. 떨어지는 데 걸리는 시간과 뒷다리를 철막대 위에 올려놓는지 여부를 통해 다음과 같이 점수를 계산하였다; 0 점 - 랫트가 5 초 동안 매달리고 뒷다리를 올려놓음, 1 점 - 랫트가 5 초 동안 매달리고 뒷다리를 올려놓지 못함; 2 점 - 랫트가 3-4 초 간 매달림, 3 점 - 랫트가 0-2 초 동안 매달림.

mNSS(Modified neurological severity score): 신경장애 점수는 운동, 감각 및 반사신경 검사를 복합하여 도출되며, 종래에 보고된 방법으로 실시하였다. 객관적인 정량화는 비대칭 행동 검사, 빔 균형 검사, 포착가능 견인 검사 오픈 필드 검사(회전빈도) 및 풋 폴트 검사에 기초하여 이루어지며 다음과 같이 점수를 계산하였다; 0 점-결함이 없음, 2 점-반대쪽 앞다리를 완전히 뺄는 데에 어려움이 있음( $3 \leq \text{front foot fault} < 10$ ), 4 점-반대쪽 앞다리를 뺄지 못함( $\text{front foot fault} \geq 10$ ), 6 점-반대측으로 다소 선회함( $1 \leq \text{회전 또는 비대칭 비틀림} < 5$ ), 8 점-심하게 선회함(회전 또는 비대칭 비틀림  $\geq 5$ ), 10 점-반대측으로 떨어짐(포착가능 견인  $\leq 2$ ).

**면역조직화학적 분석 및 정량화**

뇌 조직을 24 시간 동안 4% 포름알데히드로 고정하고 PBS 로 세척하였다. 파라핀 단면 제작을 위해, 누진 에탄올에서 조직을 탈수시키고 파라핀에 포매시켰다. 파라핀-포매된 뇌를 마이크로톰 상에서 5 mm 두께 층으로 절단하고, 자일렌에서 10 분 간 탈파라핀화한 뒤 누진 알콜에서 재수화하였다. 단면에 10 mM 시트르산을 1 시간 동안 처리한 뒤 PBS 및 0.5% 트리톤 X-100 을 함유하는 5% BSA 용액을 첨가하였다. 이후, 뇌 절편을 DCX (Abcam), Tuj1(Covance), hNu(Millipore, clone 235-1), GFAP(Millipore), Ki67(Leica Microsystems), hMito(Millipore), MAP2(Millipore), 인간 Nestin(Millipore, clone 10C2) 또는 ED-1(Abcam)(1:100)에 대한 1 차 항체와 함께 10-12 시간 동안 4°C에서 배양하였다. 1 차 항체와 함께 밤새 배양한 뒤에, 절편들을 PBS 로 세척하고 절편들을 형광 표지된 2 차 항체인항-라빗 IgG 와 31 시간 동안 배양하였다. 절편들을 다시 한번 PBS 로 세척하고 DAPI(4',6' -diamidino-2-phenylindole)를 이용하여 마운팅 하였다. 형광 현미경(Olympus IX71)를 이용하여 절편의 형광 이미지를

얻었다. 뇌조직 내에서 특정 항체와 반응하는 신경 세포의 수를 정확히 측정하기 위하여 블라인드 테스트를 이용하였다. 실험에 대해 미리 알지 못하는 세명의 실험자에게 슬라이드 내 5 개의 50 mm<sup>2</sup> 사각형 내에서의 ED-1<sup>+</sup> 세포 및 α-SMA<sup>+</sup> 혈관(직경 50 μm 이하)의 수를 세도록 하였다. 이후  
 5 조사자는 세명의 실험자의 결과를 종합하여 검출된 뉴런의 수를 정확하게 결정하였다.

이식 후 26 일 쯤에, 랫트(그룹당 10 마리)를 졸레틸(Virbac S.A., France, 25 mg/kg)로 마취하고 PBS 및 PBS 에 함유된 4% 파라포름알데히드(pH 7.5)로 관류하였다.

10 경색 부위 측정을 위하여, 뇌 절편을 헤마톡실린으로 염색하고 현미경(Zeiss, Oberkochen, Germany)으로 촬영하였다. 반대측 반구의 경색 면적에서 동측 반구의 경색 면적을 뺀 간접적인 손상 부위를 계산하였다. 상대적인 경색면적을 NIH Image J 프로그램(1.47 버전)으로 분석하였다. 반대측 반구와 비교한 간접적 손상의 평균 백분율을 표시하였다 14.

15 **역전사 종합효소 연쇄반응(RT-PCR)**

Trizol 시약(Invitrogen)을 이용하여 총 RNA 를 분리하였다. 표준 역전사(RT)를 Transcriptase II(Invitrogen)를 이용하여 우선 수행한 뒤 다음과 같은 프라이머 세트로 RT-PCR 을 수행하였다: 안지오포이에틴 1  
 20 정방향 프라이머: TGTGTCCATCAGCTCCAGTTGC(서열목록 제 1 서열), 역방향 프라이머: CGGCTACCATGCTCGAGATAGG(서열목록 제 2 서열)(Bioneer, Daejeon, Korea). PCR 산물을 1.2% 아가로스 겔에 돌린 후 브롬화 에티듬으로 염색하여 UV 광 하에서 밴드(약 400 bp)를 검출하였다. 마지막으로, 검출된 밴드를 NIH Image J 프로그램 (버전 1.47)으로 정량화하였다.

25 **통계적 분석**

데이터는 평균 ± 표준오차로 나타내었다. 행동검사 및 경색 면적의 데이터는 SPSS(Statistical Package for Social Sciences, 버전 20.0)을 이용하여 ANOVA 및 독립 t-검정으로 분석하였다. P-values<0.05 인 경우  
 30 통계적 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

실험결과

*NPC<sup>PSA-NCAM+</sup>의 이식은 숙주 뇌의 경색 부위를 감소시킨다.*

본 발명의 전체적인 실험설계는 도 1a 에 나타내었다. 신경조직의 손상 정도는 이식 26 일 후 헤마톡실린을 통해 정상적으로 염색되지 않은 뇌 부위(area)를 통해 평가하였다. 경색 부위는 대뇌 피질 및 선조체에서 주로 나타났다. 경색 부위는 MSCs 또는 NPC<sup>PSA-NCAM+</sup>를 이식한 경우보다 PBS 를 처리한 허혈성 뇌에서 명확하게 더 넓었다(도 1b). 반대측에 대한 경색 면적의 백분율은 NPC<sup>PSA-NCAM+</sup>(7.1±2.5%) 또는 MSC(14.9±1.9%)가 이식된 군에서 PBS 군(25.1±2.4 %)에 비해 유의하게 감소하였다(F=13.64, P<0.01). NPC<sup>PSA-NCAM+</sup>- 및 MSC-이식 군 간의 경색이 통계적으로 다르지는 않았으나, NPC<sup>PSA-NCAM+</sup>-이식군의 경색 면적은 MSC-이식군에 비하여 명백하게 더 좁았다(도 1c).

*NPC<sup>PSA-NCAM+</sup>의 이식은 랫트 뇌졸중 모델에서 행동능력을 향상시킨다.*

15 랫트의 체중은 pMCAo 후 첫째날 측정된 기저값에 비해 40 g 이 감소하였다. 체중 감소는 PBS-처리 랫트에서 7 일 후 정점에 다다랐다. MSC-이식 군에서, 체중은 이식 17 일 후 기저 단계까지 회복되었다. 그러나, NPC<sup>PSA-NCAM+</sup>-이식군에서는 PBS 군과 비교하여 이식 3 일 뒤부터 유의한 체중 회복이 관찰되었다(P<0.05)(도 2a). pMCAo 이후, 3 일(P<0.05)에서 20 13 일(P<0.01)사이까지 풋 폴트/라인 크로스 빈도는 PBS 군에 비해 NPC<sup>PSA-NCAM+</sup> 및 MSC 이식 군에서 유의하게 감소하였다(도 2b). 뿐만 아니라, NPC<sup>PSA-NCAM+</sup> 이식군은 13 일 째에 풋 폴트/라인 크로스가 MSC 이식 군과 비교하여도 유의하게 감소하였다. 그러나, 이러한 차이는 이후(이식 후 17 및 24 일) 체중 증가에 따른 활동성 감소로 인해 덜 두드러지게 되었다.

25 모든 랫트가 pMCAo 전에는 EBTS 에서 상대적으로 낮은 비대칭성을 보인 반면, pMCAo 후에는 모든 실험동물의 비대칭성이 명확히 관찰되었다. 이식 3 일 후, NPC<sup>PSA-NCAM+</sup>- 및 MSC-이식 군에서 동측 비틀기 행동을 보이기 시작했다. MSC-이식군이 이식 13 일 후까지 완만한 향상을 보인 반면(P<0.05), NPC<sup>PSA-NCAM+</sup>-이식군의 비대칭 행동점수는 이식 후 7 일째에 30 유의하게 감소하기 시작하여 24 일째까지 지속되었다(P<0.01)(도 2c).

5 NPC<sup>PSA-NCAM+</sup> 이식은 MSC-이식군 및 PBS 군에 비해 3 일에서 24 일 사이의 빔 균형 검사에서의 기능회복도 개선시켰다( $P < 0.01$ )(도 2d). NPC<sup>PSA-NCAM+</sup> 이식은 운동조정 능력을 반영하는 빔 위에서 유지하는 시간을 유의하게 증가시켰으나, MSC- 및 PBS-처리 군에서는 통계적인 차이점을 보이지 않았다.

앞발의 근육강도와 음의 상관관계를 가지는 포착가능 견인 점수는 NPC<sup>PSA-NCAM+</sup> 이식군에서 3-24 일 사이에 점차 감소하였다( $P < 0.01$ )(도 2e). MSC-이식군도 이식 7-24 일 후에 유사한 개선 패턴을 보였다.

10 신경 회복효과의 정량화를 표준화하기 위하여, 본 발명자들은 마지막으로 비대칭 행동점수, 빔 균형시험, 포착가능 견인 검사, 오픈 필드검사(회전 빈도, 데이터 미공개) 및 풋폴트 검사에 기반하여 mNSS 기준을 평가하였다. mNSS 는 점진적인 신경기능 회복이 PBS-처리군에 비하여 NPC<sup>PSA-NCAM+</sup> 및 MSC-이식군에서 3 일 후부터 두드러지기 시작함을 보여준다( $P < 0.05$ )(도 2f). 뿐만 아니라, NPC<sup>PSA-NCAM+</sup>-이식군은 7 일 이후부터 15 24 일까지 MSC-이식군에 비하여도 실질적인 개선을 보였다( $P < 0.01$ ). NPC<sup>PSA-NCAM+</sup>-이식군의 효과는 특히 3 일에서 7 일 사이에 명확해졌는데, 이를 통해 이식 초기 강력한 결분비(paracrine) 효과가 있음을 알 수 있다.

**이식된 NPC<sup>PSA-NCAM+</sup>는 숙주 뇌에서 생존하여 신경계로 분화한다.**

20 이식된 세포의 밀도를 추적하기 위하여, 본 발명자들은 26 일 째에 hNu(인간-특이적 핵), Ki67(증식세포 마커), DCX(신경모세포 마커), 네스틴(신경줄기세포 마커) 및 Tuj1(신경마커)에 대한 항체를 이용하여 조직학적 분석을 수행하였다. NPC<sup>PSA-NCAM+</sup>의 이식 뒤에, 대부분의 세포는 25 최초 이식 부위(예를 들어 선조체)에서 발견되었다. 이식된 NPC<sup>PSA-NCAM+</sup>의 생존, 증식 및 분화는 손상된 뇌에서의 Ki67<sup>+</sup>, DCX<sup>+</sup>, Tuj1<sup>+</sup> 및 네스틴<sup>+</sup>의 존재를 통해 확인하였다(도 3a 및 3b). 이식된 NPC<sup>PSA-NCAM+</sup> 세포의 다수는 DCX 또는 Tuj1 를 발현한 반면, 일부는 네스틴에 대해 양성이었다. 이식된 세포들의 유사분열 단계는 Ki67-면역반응성을 통해 조사하였다. hNu<sup>+</sup> 세포(9184 개)의 일부는 이식 26 일째에 Ki67 에 대해서도 양성이었다(432 개, 30 4.7%). NPC<sup>PSA-NCAM+</sup> 세포에서의 Tuj-1 면역반응성은 DCX 면역반응성과 광범위하게 중첩되었다(도 3b). 이들 DCX 면역반응성 세포들은 랫트 유래가

아닌 인간 유래의 세포들이며(도 3c), 이를 통해 뇌 경색부위의 감소는 이식된 세포의 융합에 부분적으로 기인함을 알 수 있다.

5 많은 이식된 NPC<sup>PSA-NCAM+</sup> 세포들이 우수한 생존률을 보이면서 손상된 조직으로 편입되었으나, hNu 를 발현하는 MSC 는 이식 26 일 후에 몇몇 세포만이 검출되었다(도 3d). 대부분의 이식된 NPC<sup>PSA-NCAM+</sup> 세포는 미성숙 신경세포(예를 들어 DCX 양성이고, 일부 Ki67 양성 세포)이다(도 3b). 반면, 이식된 MSCs(hNu<sup>+</sup> 세포)는 손상 부위에서 DCX 양성을 보이지 않았으며, 대부분의 MSC 이식군에서 소수의 증식 중인 hNu<sup>-</sup>Ki67<sup>+</sup> 세포가 바늘판 내 및 주위에 존재하였다(도 3d).

10 NPC<sup>PSA-NCAM+</sup>가 이식된 랫트에서 hMito<sup>+</sup>MAP2<sup>+</sup> 및 hNu<sup>+</sup>MAP2<sup>+</sup> 이중표지 세포가 검출되었으나(도 4a 및 4b), hMito<sup>+</sup>GFAP<sup>+</sup>(도 4d) 또는 hMito<sup>+</sup>GalC<sup>+</sup>(데이터 미공개) 공-염색 세포는 거의 검출되지 않음으로서, NPC<sup>PSA-NCAM+</sup> 세포는 신경계에 주로 기여하는 전구세포임을 알 수 있었다. 반대측 선조체에서 hMito<sup>+</sup> 세포는 거의 관찰되지 않았다(도 4c).

15

***NPC<sup>PSA-NCAM+</sup>의 이식은 숙주 뇌에서 반응성 아교세포의 활성을 억제한다.***

몇몇 GFAP(성상세포 마커)-양성 세포들이 바늘과 주변에서 발견되기는 했으나, GFAP 의 발현은 NPC<sup>PSA-NCAM+</sup> 이식군에서 눈에 띄게 낮았다(도 4e). 사실, GFAP-양성세포의 수는 NPC<sup>PSA-NCAM+</sup> 이식군에서 크게 감소하였고( $P < 0.001$ ), MSC-이식군에서는 그 감소 정도가 보다 낮았다(도 4e 및 4f). 이는 NPC<sup>PSA-NCAM+</sup> 이식이 반응성 성상세포의 활성화를 강하게 억제하고, 이로써 조직 재생에 유리한 환경을 조성함을 보여주는 것이다(Gonzalez, F. F., McQuillen, P., Mu, D., et al. (2007). *Developmental Neuroscience*, 29, 321-330).

25

허혈성 뇌졸중은 조직 손상에 의한 미세아교세포의 반대 반응을 유도한다. 이에, 본 발명자들은 이식 26 일 쯤에 CD68(활성 미세아교세포 마커)를 인식하는 ED1 항체를 이용하여 허혈 뇌조직에서의 미세아교세포 활성화를 조사하였다(도 4e). 주목할 만한 것은 ED1-양성 세포가 NPC<sup>PSA-NCAM+</sup>군에서 유의하게 감소하였고( $P < 0.001$ ), MSC-이식군은 보다 덜 감소하였다는 것이다( $P < 0.05$ )(도 4f). 비록 선조체 내의 Nu<sup>+</sup> 세포가 6 개월

30

뒤에 검출되기는 했지만, NPC<sup>PSA-NCAM+</sup>가 이식된 뇌의 이식부위 또는 다른 부위에서 테라토마의 흔적은 전혀 없었다.

***NPC<sup>PSA-NCAM+</sup> 이식은 숙주 뇌에서의 혈관신생을 촉진한다.***

5           평활근 액틴 마커인  $\alpha$ -SMA 의 항체를 이용하여 허혈성 뇌에서의 내생적 혈관신생을 조사하였다. 그 결과, NPC<sup>PSA-NCAM+</sup>-이식 랫트에서 MSC- 및 PBS-처리군에 비해  $\alpha$ -SMA 반응성 혈관의 수가 이식부위 주변에서 증가하였음을 관찰하였다(도 5a, 5b). 미세혈관의 정량적 분석을 통해  
10 NPC<sup>PSA-NCAM+</sup>-이식 랫트의  $\alpha$ -SMA+ 혈관이 MSC- 및 PBS-처리군의 그것에 비해 경색부위에서 증가하였음을 명확히 확인하였다(도 5c).

          이식 후 7 일 및 26 일에 RT-PCR 을 이용하여 뇌 조직에서의 혈관신생유발인자인 안지오포이에틴-1 의 발현수준을 조사한 결과, 26 일째 NPC<sup>PSA-NCAM+</sup> 이식 랫트에서의 발현수준은 다른 군에 비하여 유의하게  
15 높았으며( $P < 0.05$ )(도 5d), 이를 통해 장기간 생존한 NPC<sup>PSA-NCAM+</sup>에 의해 혈관 신생이 유도되었음을 알 수 있었다. NPC<sup>PSA-NCAM+</sup>-이식된 랫트는 26 일 짜에 7 일째보다 증가된 안지오포이에틴-1 패턴을 보인 반면, MSCs-처리 랫트의 안지오포이에틴-1 은 7 일째의 그것과 비교하여 변화가 없거나 조금 감소하였다. 그러나 MSCs-처리 랫트는 7 일째 PBS-처리군에 비하여 증가된  
20 패턴을 보였다( $P < 0.05$ ).

20

**실시에 2. 신경전구세포 분비단백체의 허혈성 질환과 신경염증 질환에 대한 치료 효과**

**실험재료 및 실험방법**

***인간 ESC-유래 NPC<sup>PSA-NCAM+</sup> 세포의 수득***

25           인간 세포의 사용은 의학연구윤리심의위원회(Institutional Review Board, IRB No. 4-2008-0643)의 승인을 받았다. 신경 유도를 위하여, bFGF 가 없는 hESC 배지(Invitrogen) 상에서 hESC 와 iPSC 에서 유래된 각 배아체(embryoid bodies, EBs)를 5  $\mu$ M DM(dorsomorphin)(Sigma, St. Louis, MO) 및 5-10  $\mu$ M SB431542(Calbiochem, San Diego, CA)를 포함하는  
30 현탁액에서 4 일간 배양하고, 이후 20 ng/ml bFGF 가 보충된 IX N2(Invitrogen)배지에서 매트릭셀-코팅된 디쉬(BD Biosciences, Bedford,

MA)에 5 일간 흡착시켰다(Kim, D. S., Lee, D. R., Kim, H. S., et al. (2012). Highly pure and expandable PSA-NCAM-positive neural precursors from human ESC and iPSC-derived neural rosettes. *PLoSOne*, 7, e39715). 흡착된 EB 콜로니의 중심에 나타난 신경 로제트를 글래스 파이펫을 이용하여 주변의 평평한 세포로부터 조심스럽게 분리하였다. 작은 로제트 덩어리를 매트릭셀 코팅된 디쉬에 씨딩하고, 1X N2, 1X B27(Invitrogen)이 보충된 DMEM/F12 에서 배양하였다(Kim, D. S., Lee, J. S., Leem, J. W., et al. (2010). Robust enhancement of neural differentiation from human ES and iPS cells regardless of their innate difference in differentiation propensity. *Stem Cell Reviews and Reports*, 6, 270-281).

80-90% 컨플루언시의 확장된 신경 로제트를 10  $\mu$ M Y27632(Sigma)에 1 시간 동안 노출시켜 MACS 단계에 들어가긴 전 세포사가 일어나는 것을 방지하였다. Accutase(Invitrogen)를 이용하여 분리한 뒤에, 세포들( $\sim 1 \times 10^8$  세포)을 1% BSA 가 포함된 PBS 에서 블로킹하고, 마이크로비드(Miltenyi Biotec)가 접합된 항-PSA-NCAM 항체와 함께 4°C에서 15 분간 배양하였다. 집중적으로 세척한 뒤, 세포 현탁액을 MASC(magnetic activated cell sorting)에 넣고 컬럼에 남아있는 양성-표지된 세포를 튜브로 용리시켰다. 분리된 NPC<sup>PSA-NCAM+</sup>를 N2B27 배지 또는 20 ng/ml bFGF 가 추가된 NBG 배지(1XN2, 0.5XB27 및 0.5XG21 보충)(GeminiBio-Products, WestSacramento, CA)에 4-5  $\times 10^5$  세포/cm<sup>2</sup> 농도로 다시 플레이팅하였다. 배양 배지는 매일 교체하였으며, 세포는 2-3 일마다 계대배양하였다.

#### 사람 전분화능 줄기세포 유래-신경전구세포(NPCs)에서 분비단백체 (secretome)의 분리

상기에서 수득한 사람 만능줄기세포 유래 신경전구세포(PSA-NCAM-양성 신경전구세포)를 기본 배양액(DMEM/F-12)에 N2(100X-최종농도 1X), B-27(50X- 최종농도 0.5X) 및 Gem21(50X-최종농도 0.5X)의 혈청 제거 보충제를 넣고, bFGF(20 ng/ml)를 첨가하여 매트릭셀(Matrigel) 코팅된 60 mm 디쉬에 4 계대 이상 반복 배양하여 증폭한 다음, 8-10 개의 디쉬에 약 90%까지 세포가 차게 배양하였다. 배양액을 제거한 후 인산완충용액으로 3 번 세척하고, 무혈청 기본 배양액(DMEM/F12)에 ITS(100X-최종농도 1X)와

bFGF(20 ng/ml)만을 첨가하여 24 시간 배양하였다. 대조군은, 세포가 없는 디쉬에 같은 양의 동일한 조성의 배양액(기본 배양액에 ITS 와 bFGF 를 같은 양으로 첨가)을 넣고, 배양기에서 24 시간 동안 배양한 후 회수한 것을 대조군으로 사용하였다. 배양액을 모두 모아 원심 분리하여(800 g 에서 5 30 분) 세포의 파편 등을 제거한 뒤 -70℃의 냉동고에 바로 얼린 후 필요 시 해동하여 사용하였다.

### 뇌졸중 모델의 제작

국소 뇌허혈에 의한 신경세포 손상에 대하여 신경세포 보호 효과를 10 측정하기 위하여 응용된 혈관 내 봉합사 삽입법(intraluminal suture method)을 사용하였다. Zia Longa(Zea Longa, et al, Stroke., 1989, 20, 84-91)가 개발한 방법인 국소 뇌허혈 모델로서 다른 모델과는 달리 임상적으로 유사하다는 장점이 있다. 이런 이유로 허혈-재관류(ischemia-reperfusion)에 대한 기전 연구나 여러 가지 약물의 효과를 스크리닝하는 데 15 적합한 모델이다.

일주일간의 순화 후, 호흡 마취기를 사용하여 실험동물(수컷 Sprague-Dawley rat, 체중 250-300 g)을 마취시켰으며, 마취제로 이소플루란(isoflurane)을 사용하였다. 먼저 흰쥐를 80% N<sub>2</sub>O 와 20% O<sub>2</sub> 가 섞인 혼합가스에 5%의 이소플루란으로 전신마취를 유도한 후 2-2.5%로 20 마취를 유지하였다. 뇌졸중 모델 제작을 위하여, 흰쥐의 왼쪽 목 피부를 절개한 후 안쪽으로 총경동맥(common carotid artery), 외경동맥(external carotid artery) 및 내경동맥(internal carotid artery)을 박리하여 도출한 뒤 각각의 혈관을 블랙 실크실로 살짝 묶어 혈류를 차단하였다. 총경동맥을 절반 정도 절단하고, 절단면을 통하여 나일론 봉합사의 끝 부분을 소작하여 25 라운드해서 0.40 mm가 되게 제작한 25 mm의 4-0 나일론 프로브(probe)를 25 삽입하였다. 외경동맥을 통해 삽입한 나일론 프로브를 내경동맥을 거쳐 중대뇌동맥 부위로 넣어 고정하여 총경동맥분지에서 약 18-20 mm 정도 삽입한 후 중대뇌동맥의 기시부를 막은 뒤 실로 고정하여 중대뇌동맥을 영구히 폐쇄한 다음 피부절개부위를 다시 봉합한 후 마취에서 자연회복 30 시켰다.

**뇌졸중 모델에 뇌동맥을 통한 분비단백체 주입 및 행동실험**

뇌졸중 유발 하루 뒤에 행동실험에 대한 기준점(baseline)을 확립한 후, 뇌졸중 모델 제작과 같은 방식으로 오른쪽 외경동맥을 통해 내경동맥 부위로 인슐린 주사기 바늘을 삽입한 후, 이를 통하여 분비단백체를 0.2 mg/kg(부피 50  $\mu$ l)만큼 동맥 주사하고, 대조군에는 같은 부피의 배양액 혹은 인산완충용액(PBS)을 투여하였다. 분비단백체 액을 주입한 후 14 일 동안 동물의 상태를 관찰하였으며, 주입 전 1 회, 주입 후 4 회에 걸쳐 몸무게를 측정하고 행동 분석을 실시하였다.

10           ① 상체 자세(torso twisting) 검사: 실험동물의 대뇌피질과 선조체 감각으로 간주되는 상체 자세를 시험하기 위하여, 비대칭 운동 행동을 측정하였다.

15           ② 빔 균형(beam balance) 검사: 실험동물이 좁은 빔 위에서 안정적으로 균형을 잡는 것을 통해 총 전정 운동 기능(gross vestibulomotor function)을 평가하였다.

20           ③ 풋 폴트 검사(foot-fault test): 운동에 있어서 운동 움직임(motor movement)의 조정(협동)과 통합(종합)을 검사할 때 사용하는 실험방법으로, 풋 폴트(Foot-fault)는 동물이 앞발이나 뒷발을 제자리에 두지 않거나(misplace), 발이 격자판 바(grid bar)사이로 떨어지는 경우로 정의하고, 풋 폴트는 정상적인 동물에 있어서는 특이하게 대칭적이다.

25           ④ 포착가능 견인 검사(Prehensile Traction test): 검사 중 포착가능 여부는 실험동물이 앞발로 수평방향의 로프에 매달릴 수 있는 능력을 통해 측정하였다. 포착가능 견인 검사는 실험동물의 근육 강도를 평가하기 위하여 행해졌다. 이 검사는 종래에 보고된 방법으로 실시하였다. 철막대(직경 2 cm, 길이 100 cm)를 수평으로 스펀지 고무패드(두께 7.5 cm)의 70 cm 위에 위치시켰다. 실험동물의 앞발을 철막대에 위치시킨 뒤  
30 풀어주었다. 실험동물을 5 초간 철막대에 매달리도록 하였다. 떨어지는데 걸리는 시간과 뒷다리를 철막대 위에 올려놓는지 여부를 통해 다음과 같이

점수를 계산하였다: 0 점 - 실험동물이 5 초 동안 매달리고 뒷다리를 올려놓음, 1 점 - 실험동물이 5 초 동안 매달리고 뒷다리를 올려놓지 못함, 2 점 - 실험동물이 3-4 초 간 매달림, 3 점 - 실험동물이 0-2 초 동안 매달림.

5           ⑤ 오픈 필드 검사(open-field test): 일반적인 보행활동 수준을 알아보는 데 사용되는 검사로, 동물의 행동양상과 특성을 직접 관찰하여 동물의 활동성, 정서성 및 행동패턴 등을 측정하였다.

10           ⑥ mNSS(modified Neural Sibiarity Score): 위의 다양한 검사를 통해 얻어진 운동, 감각, 균형, 반응 및 정서 검사 값의 종합 성적으로, 점수를 하기의 기준에 따라 계산하였다(한 개체 당 점수를 합산하여 mNSS 를 측정).

- 오픈 필드 검사(동물의 정서성, 활동성, 행동패턴 등을 측정)

움직임 없음: 3

15           1-20 회: 2

21-30 회: 1

30 회 이상: 0

- 포착가능 견인 검사(근력측정)

20           0-5 초: 3

6-10 초: 2

11-20 초: 1

21 초 이상: 0

25           - 빔 균형 검사(균형감각 측정)

0 점: 1 = 안정적 자세

2 = 빔의 측면을 잡고 약간 흔들리는 정도

1 점: 3 = 1 개 이상의 다리가 빔에서 탈락하는 경우

4 = 균형 잡으려고 노력하지만 떨어지는 경우

30           2 점: 5 = 균형을 잡지 못하고, 빔에 거꾸로 매달리다가 떨어지는 경우

6 = 빔 위에서 전혀 균형을 잡지 못하고 떨어지는 경우

- 풋 폴트 검사(운동협응 능력)

0-5 번: 0

5 6-10 초: 1

11-20 초: 2

21 초 이상: 3

- 상체 자세 검사(비대칭 운동 행동)

10 0 번: 2

1-4 번: 1

5 번 이상: 0

15 뇌허혈 유발 14 일 후에 흰쥐를 졸레틸로 마취한 후 개흉한 다음, 우심이를 절개하여 바늘을 좌심실에 주입한 후 펌프를 이용하여 인산완충용액을 심장에 관류시켜 혈액을 제거한 뒤 뇌조직을 적출하였다. 표본제작을 위한 조직절편을 브레그마(bregma)를 기준으로 파라핀에 포매하고, 손상된 뇌조직을 확인하기 위해 뇌조직 절편을 헤마톡실린에 염색하고 탈수한 뒤 고정한 다음 슬라이드를 디지털 카메라로 촬영한 후  
20 컴퓨터로 옮겼다. 이미지 분석프로그램(image J)을 사용하여 뇌경색 비율(%)을 하기 수학적 1로 계산하였다.

수학적 1

뇌경색 비율(%) = (정상 좌반구의 면적-뇌경색 부위의 정상조직의 면적)/정상 좌반구의 면적 X 100

25

**분비단백체 분석(Secretomics)**

hESC 유래의 신경전구세포의 분비단백체와 인간 iPSC 유래의 신경전구세포의 분비단백체는, 각각 4-12% 구매 노백스 비스-트리스젤(Invitrogen)로 SDS-PAGE 하여 분리한 다음 젤코드 블루  
30 염색시약(Pierce)으로 단백질 밴드가 보이도록 젤을 염색하였다. 염색된

젤은 동일한 크기의 10 밴드로 잘라인-젤 트립신 분해를 공지된 방법으로 수행하였다.

인-젤 분해에 의해 제조된 펩타이드를 Nano Ultra Performance 액체크로마토그래피(Eksigent Technologies)와 결합한 LinearTrap  
 5 Quadrupole (LTQ) 질량분광계(Thermo Finnigan)를 사용하여 분석하였다. 구체적으로, 트립신 처리한 펩타이드를 C18 레귤러 5 마이크론 사이즈 레진이 패키징된 분석 컬럼(75 마이크로미터 X 11 cm)에 적용하였다. 97% 용액 A(증류수에 0.1% 포름산)에서 60% 용액 B(아세트니트릴에 0.1% 포름산)로 유속 0.3 마이크로리터/시간의 조건에서 분선형 45 분 구배를  
 10 실시하였다. 분리된 펩타이드 이온을 나노 Electrospray Ionization (ESI) 소스로 전기분무 하였다. MS/MS 스펙트럼은 전체 MS 스캔을 단편으로 선별하여 가장 많은 5 가지 스펙트럼을 결과-의존 스캔으로 구하였다. 동적 배제에 대한 반복계수를 1 로, 반복 기간을 30 초로, 동적배제 기간을 180 초로, 배제 질량 너비를 1.5 Da 으로, 동작 배제리스트를 50 으로  
 15 설정하였다.

펩타이드 및 단백질 확인은 ipi.HUMAN v3.76 데이터베이스(89 378 엔트리)에서 터보-SEQUEST 알고리즘(Thermo Finnigan)을 사용하여 검색하였다. 데이터베이스 검색 후 스카프폴드 2(Proteome Software)를 이용하여 확인된 펩타이드 및 단백질을 확인하였다. SEQUEST 검색으로 얻은  
 20 펩타이드 중 0.95 이상의 펩타이드프로phet(PeptideProphet) 개연성을 갖는 한 세트의 펩타이드를 선별하였다. 또한, 0.99 이상의 프로테인프로phet(ProteinProphet) 개연성 및 2 개 이상의 고유 펩타이드를 갖는 단백질 리스트를 구하였다.

25 **통계 분석**

그룹간의 통계학적 유의도는 Tukey's correction 이 적용된 one-wat analysis of variance (ANOVA)를 이용하여 구하였으며, p value < 0.05 를 통계학적으로 유의한 것으로 판정하였다.

30 **실험결과**

뇌졸중 모델에서 신경전구세포의 분비단백체에 의한 질환의 개선을 보기 위해 다음의 3 개의 군으로 2 주간 실험을 수행하였다. 뇌졸중 유발 24 시간 후, 행동실험으로 질환의 유도가 확인된 흰쥐를 3 개 군으로 임의로 할당함 다음, 오른쪽 외경동맥으로 분비단백체(0.2 mg/kg, 부피 50  $\mu$ l), 배지 또는 PBS 를 동량(50  $\mu$ l) 주사하였다. 각 물질을 주입한 후 3, 7, 10 및 14 일에 동물의 상태와 체중을 확인하고, 행동 분석을 실시하였다.

【표 1】

그룹	설명
PBS 대조군	뇌졸중 유발 후 PBS 처리군
배지 대조군	뇌졸중 유발 후 신경전구세포 배양에 활용한 배지 처리군
분비단백체 처리군	뇌졸중 유발 후 신경전구세포 배양액 처리군

**허혈 병변 부위 분석 결과**

흰쥐에서 영구 MCAO 를 통한 뇌졸중의 유도는 광범위한 뇌병변의 손상을 유도하였다. 뇌졸중 유발 14 일 경과 후 뇌를 적출한 다음, TTC (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride) 염색으로 뇌의 손상 여부와 손상 부위를 확인하였다. TTC 염색은 세포 내의 정상 미토콘드리아 산화 효소 시스템(mitochondrial oxidative enzyme system)과 반응하여 염색되는데, 뇌허혈 손상을 받아 미토콘드리아가 손상되면 산화 시스템이 교란되어 염색이 되지 않아 흰색을 나타내므로 뇌의 손상부위를 구별할 수 있다.

도 7 에 나타난 바와 같이, 중뇌 동맥결찰에 의해 유발된 손상은 주로 오른쪽 뇌의 피질 부위와 선조체 부위에 발생하였다(도 7). 또한, 신경전구세포의 분비단백체 주입이 허혈성 병변 부위(infarct size)를 감소시켰다. PBS 대조군은 우뇌의 60% 가까이 손상되었고, 배지 대조군은 46% 정도가 손상되었으나, 분비단백체 처리군은 손상 부위가 29% 정도로 대조군에 비하여 손상 부위가 현저히 감소하였다.

**체중 분석 결과**

5 뇌졸중 유발이 흰쥐의 운동능력을 감소시켜 즉각적으로 체중의 감소가 7 일까지 진행되며, 다양한 치료제는 운동능력의 회복을 통해 체중의 증가를 유도한다. 분비단백체의 주입도 세포 이식과 유사하게 체중 증가를 유도하였다(도 8). 신경손상의 회복에서 가장 눈에 띄는 현상은 체중의 회복이다. 분비단백체 처리군은 PBS 대조군에 비해 유의한 개선을 보였다.

**행동 분석 결과**

10 분비단백체 처리군은 빔 균형 검사에서 두 대조군들에 비해 통계적으로 유의한 행동 개선효과를 보였으며, 이 효과는 치료 3 일째부터 나타나는 등 즉시적인 효과가 나타났다(도 9a).

또한, 포착가능 견인 검사(prehensile traction)에서도 치료(주입) 7 일째에 두 대조군 대비 통계적으로 유의한 효과를 보였다(도 9b).

15 나아가, 분비단백체 주입은 그물망에서의 실족(foot fault) 빈도를 감소시키는 효과를 보여주었다(도 9c). 단위시간 당 행동의 활발함을 측정하는 라인 크로스(line cross)도 개선되는 추세를 보여주었다(도 9d).

**종합적인 행동신경 개선 효과(mNSS) 분석 결과**

20 mNSS(Modified Neurological Severity Score test)는 신경학적 기능을 측정하기 위한 구성표이다. 운동(근육 상태)과 sensory(시각, 촉각 및 자기 수용(proprioceptive)) 항목으로 평가하였다. 정상은 0 점이며, 점수가 높을수록 기능 이상의 정도가 심한 것으로 판단한다. 도 10 에 나타난 바와 같이, mNSS 의 분석에서 분비단백체 처리군은 치료 초반부터 PBS 대조군과 배지 대조군 보다 훨씬 높은 치료 효과(행동 개선)를 보여주었다(도 10).

25 mNSS 검사에서 PBS 대조군은 뇌허혈을 유발시킨 1 일 후 평균 5.4 점에서 14 일 후 평균 5.5 점으로, 뇌졸중에 의한 신경행동학적 장애가 유지됨을 볼 수 있었다. 배지 대조군의 경우에는 일시적인 행동 개선 효과가 치료 3 일에 보였으나, 추가적인 개선 효과는 발휘하지 못하였다. 반면, 분비단백체 처리군의 경우에는 치료 3 일(mNSS 4.5 점)부터 10 일(mNSS 30 3 점)까지 지속적인 행동 개선 효과를 나타내었다.

**분비단백체 분석 결과**

iPSCs 유래의 신경전구세포로부터 얻은 분비단백체는 다음의 단백질들을 포함하고 있었다: 아그린(Agrin), 아넥신 A5(Annexin A5), BSG(Basigin), 비글리칸(Biglycan), 칼포닌-3(Calponin-3), 콕토신-유사 단백질(Coactosin-like protein), 코피린-1(Cofilin-1), 콜라겐 알파-2, 5 쿨린-3(Cullin-3), 데스트린(Destrin), 디스트로글리칸(Dystroglycan), 에프린-B2(Ephrin-B2), 엑스포틴-2(Exportin-2), 에즈린(Ezrin), 피브로넥틴, 피블린-1(Fibulin-1), Frizzled-related 단백질, 젤라틴-3 결합 단백질(Galectin-3 binding protein), 그래놀린(Granulins), 10 성장/분화 인자 11(Growth/differentiation factor 11), 합토글로빈(Haptoglobin), 헤모펙신(Hemopexin), High mobility group protein B2, 호네린(Hornerin), 임포틴-9(Importin-9), 인슐린-유사 성장 인자 결합 단백질 2(Insulin-like growth factor-binding protein 2), 루프스 La 단백질(Lupus La protein), 대식세포 이동 억제 인자(Macrophage migration inhibitory factor), 미드킨(Midkine), 모에신(Moesin), 15 뉴로필린 2(Neuropilin 2), 플레이오토로핀(Pleiotrophin), 프로필린-1(Profilin-1), 단백질 DJ-1(Protein DJ-1), 라딕신(Radixin), Secreted frizzled-related protein-2, 셉틴-11(Septin-11), 탈린-1(Talin-1), 테스티칸(Testican), 티모포이에틴(Thymopoietin), 트랜스젤린- 20 3(Transgelin-3), 비멘틴(Vimentin).

인간 배아줄기세포의 신경전구세포로부터 얻은 분비단백체는 다음의 단백질들을 포함하고 있었다: 아그린(Agrin), 아넥신 A2(Annexin A2), 아트락틴(Attractin), 비글리칸(Biglycan), 세룰로플라스민(Ceruloplasmin), 코피린-1(Cofilin-1), 콜라겐 알파-1, 코로닌-1X(Coronin-1X), 25 더미시딘(Dermicidin), DERP12, 에프린-B3, 엑소토신-2(Exostosin-2), 에즈린(Ezrin), 젤라틴-3 결합 단백질, 그래놀린(Granulins), 성장/분화 인자 11(Growth/differentiation factor 11), 합토글로빈(Haptoglobin), 헤모펙신(Hemopexin), High mobility group protein B2, 호네린(Hornerin), 인슐린-유사 성장 인자 결합 단백질 2(Insulin-like growth factor-binding protein 2), 루프수 La 단백질, 미드킨(Midkine), 모에신(Moesin), 멀티폴 30 상피 성장 인자-유사 도메인 단백질 8(Multiple epidermal growth factor-

like domains protein 8), 니도겐-1(Nidogen-1), 파라티모신(Parathymosin),  
프로필린-2(Profilin-2), 단백질 DJ-1(Protein DJ-1), Secreted frizzled-  
related protein-2, 시크리토그라닌(Secretogranin), 탈린-1(Talin-1),  
티모신 베타-4(Thymosin beta-4), TGFBI(Transforming growth factor-  
5 beta-induced protein ig-h3), 트랜스젤린(Transgelin), 비멘틴(Vimentin).

이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의  
통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한  
구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은  
10 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의  
등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

**【청구의 범위】**

**【청구항 1】**

PSA-NCAM(poly-sialylated neural cell adhesion molecule)-양성  
신경전구세포(neural precursor cell)를 유효성분으로 포함하는 허혈성  
5 질환 또는 신경염증 질환 치료용 조성물.

**【청구항 2】**

제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 안지오펜이에틴-1 의 발현을  
증가시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

**【청구항 3】**

10 제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 아교세포(glia cell) 또는  
성상세포(astrocyte)의 활성화를 억제하는 것을 특징으로 하는 조성물.

**【청구항 4】**

제 3 항에 있어서, 상기 조성물은 CD68 또는 GFAP 의 발현을  
감소시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

15 **【청구항 5】**

제 1 항에 있어서, 상기 PSA-NCAM-양성 신경전구세포는 전능성  
줄기세포로부터 분화된 신경 로제트로부터 분리된 것을 특징으로 하는  
조성물.

**【청구항 6】**

20 신경전구세포(neural precursor cell)의 분비단백체(secretome)를  
유효성분으로 포함하는 허혈성 질환 또는 신경염증 질환 치료용 조성물.

**【청구항 7】**

제 6 항에 있어서, 상기 신경전구세포는 전능성 줄기세포로부터  
분화된 것을 특징으로 하는 조성물.

25 **【청구항 8】**

제 6 항에 있어서, 상기 신경전구세포는 전능성 줄기세포로부터  
분화된 신경 로제트 단계의 신경전구세포인 것을 특징으로 하는 조성물.

**【청구항 9】**

30 제 6 항에 있어서, 상기 신경전구세포는 PSA-NCAM(poly-sialylated  
neural cell adhesion molecule)-양성 신경전구세포인 것을 특징으로 하는  
조성물.

【청구항 10】

제 6 항에 있어서, 상기 신경전구세포는 PSA-NCAM(poly-sialylated neural cell adhesion molecule)-음성 신경전구세포인 것을 특징으로 하는 조성물.

5 【청구항 11】

제 6 항에 있어서, 상기 분비단백체는 신경전구세포를 동물세포 배양배지에서 배양하여 얻은 세포배양액에 함유된 형태인 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 12】

10 제 11 항에 있어서, 상기 세포배양액은 신경전구세포를 ITS(인슐린/트랜스페린/셀레늄)와 bFGF(basic fibroblast growth factor)가 함유된 무혈청 동물세포 배양배지에서 배양한 후 세포를 제거하여 수득한 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 13】

15 제 6 항에 있어서, 상기 분비단백체는 하기의 단백질들을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물:

아그린(Agrin), 아넥신 A5(Annexin A5), BSG(Basigin), 비글리칸(Biglycan), 칼포닌-3(Calponin-3), 콕토신-유사 단백질(Coactosin-like protein), 코피린-1(Cofilin-1), 콜라겐 알파-2, 20 쿨린-3(Cullin-3), 데스트린(Destrin), 디스트로글리칸(Dystroglycan), 에프린-B2(Ephrin-B2), 엑스포틴-2(Exportin-2), 에즈린(Ezrin), 피브로넥틴, 피블린-1(Fibulin-1), Frizzled-related 단백질, 젤라틴-3 결합 단백질(Galectin-3 binding protein), 그라눌린(Granulins), 성장/분화 인자 11(Growth/differentiation factor 11), 25 합토글로빈(Haptoglobin), 헤포펙신(Hemopexin), High mobility group protein B2, 호네린(Hornerin), 임포틴-9(Importin-9), 인슐린-유사 성장 인자 결합 단백질 2(Insulin-like growth factor-binding protein 2), 루프스 La 단백질(Lupus La protein), 대식세포 이동 억제 인자(Macrophage migration inhibitory factor), 미트킨(Midkine), 모에신(Moesin), 30 뉴로필린 2(Neuropilin 2), 플레이오토트로핀(Pleiotrophin), 프로필린-1(Profilin-1), 단백질 DJ-1(Protein DJ-1), 라딕신(Radixin), Secreted

frizzled-related protein-2, 셉틴-11(Septin-11), 탈린-1(Talin-1), 테스티칸(Testican), 티모포이에틴(Thymopoietin), 트랜스젤린-3(Transgelin-3) 및 비멘틴(Vimentin).

**【청구항 14】**

5 제 6 항에 있어서, 상기 분비단백체는 하기의 단백질들을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물:

아그린(Agrin), 아넥신 A2(Annexin A2), 아트락틴(Attractin), 비글리칸(Biglycan), 세룰로플라스민(Ceruloplasmin), 코피린-1(Cofilin-1), 콜라겐 알파-1, 코로닌-1X(Coronin-1X), 더미시딘(Dermicidin), DERP12, 에프린-B3, 엑소토신-2(Exostosin-2), 에즈린(Ezrin), 젤라킨-3 결합 단백질, 그라눌린(Granulins), 성장/분화 인자 11(Growth/differentiation factor 11), 합토글로빈(Haptoglobin), 헤모펙신(Hemopexin), High mobility group protein B2, 호네린(Hornerin), 인슐린-유사 성장 인자 결합 단백질 2(Insulin-like growth factor-binding protein 2), 루프수 La 단백질, 미드킨(Midkine), 모에신(Moesin), 멀티플 상피 성장 인자-유사 도메인 단백질 8(Multiple epidermal growth factor-like domains protein 8), 니도젠-1(Nidogen-1), 파라티모신(Parathymosin), 프로필린-2(Profilin-2), 단백질 DJ-1(Protein DJ-1), Secreted frizzled-related protein-2, 시크리토그라닌(Secretogranin), 탈린-1(Talin-1), 티모신 베타-4(Thymosin beta-4), TGFBI(Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3), 트랜스젤린(Transgelin) 및 비멘틴(Vimentin).

**【청구항 15】**

25 제 1 항 또는 제 6 항에 있어서, 상기 허혈성 질환은 허혈성 뇌혈관 질환, 허혈성 심장질환, 심근경색, 협심증, 하지동맥 허혈성 질환 및 사지말단부 허혈성 질환으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

**【청구항 16】**

제 15 항에 있어서, 상기 허혈성 뇌혈관 질환은 허혈성 뇌졸중인 것을 특징으로 하는 조성물.

30 **【청구항 17】**

제 1 항 또는 제 6 항에 있어서, 상기 신경염증 질환은 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병, 루게릭병, 크로이츠펠트야콥병, 다발성 경화증, 근위축성 측삭 경화증, 미만성 루이소체병, 백색질뇌염, 측두엽간질 및 염증성 척수손상으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

5 **【청구항 18】**

제 5 항, 제 7 항 또는 제 8 항에 있어서, 상기 전능성 줄기세포는 배아줄기세포(embryonic stem cells), iPSCs(induced pluripotent stem cells), 배아생식세포(embryonic germ cells) 또는 배아종양세포(embryonic carcinoma cells)인 것을 특징으로 조성물.

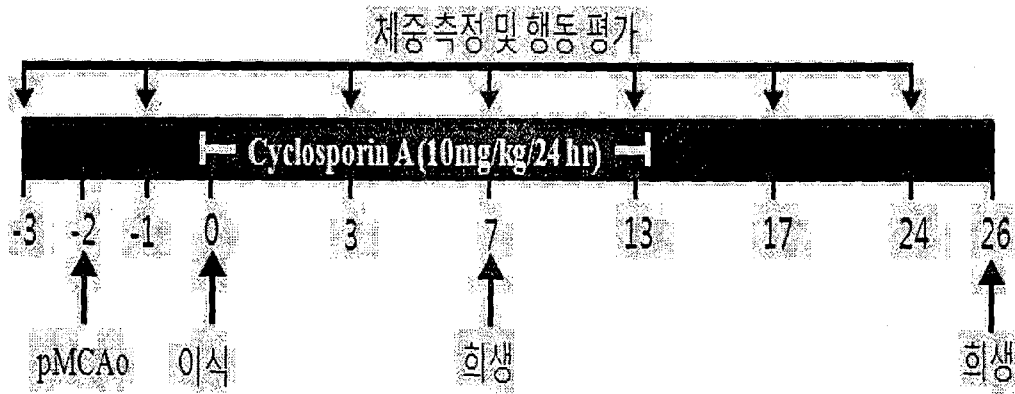
10 **【청구항 19】**

PSA-NCAM(poly-sialylated neural cell adhesion molecule)-양성 신경전구세포를 유효성분으로 포함하는 조성물을 이를 필요로하는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 허혈성 질환 또는 신경염증 질환의 치료방법.

15 **【청구항 20】**

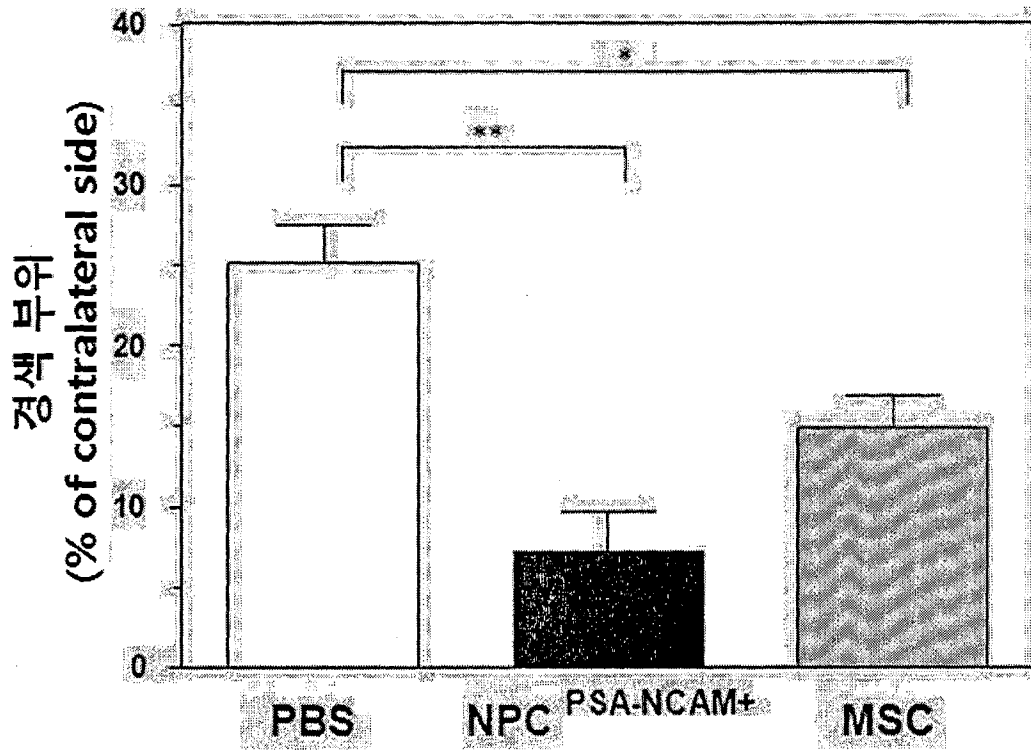
신경전구세포의 분비단백체를 유효성분으로 포함하는 조성물을 이를 필요로하는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 허혈성 질환 또는 신경염증 질환의 치료방법.

도 1a



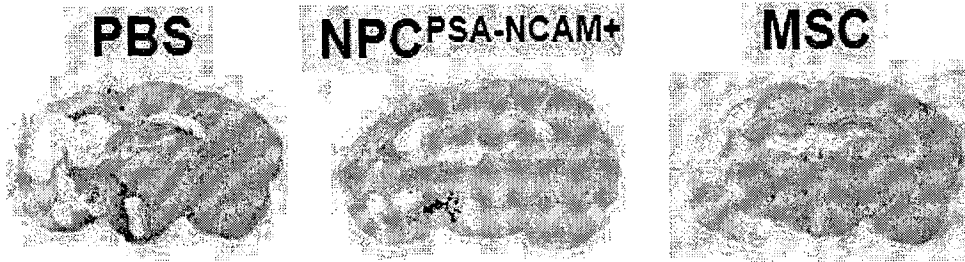
2/31

도 1b



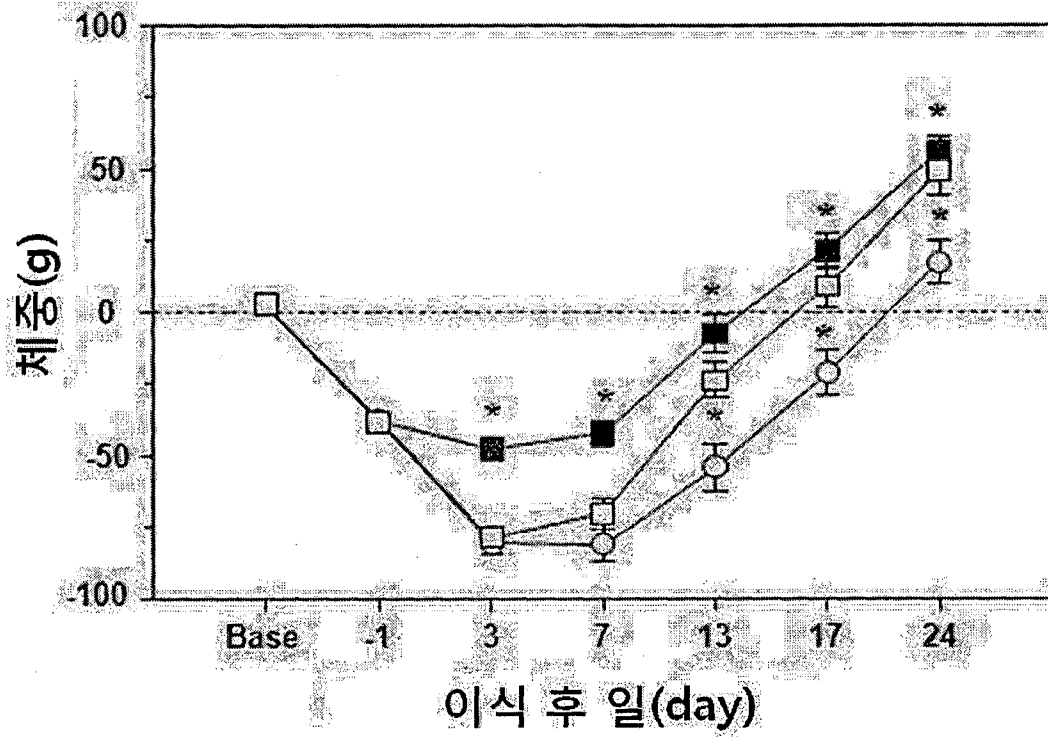
3/31

도 1c



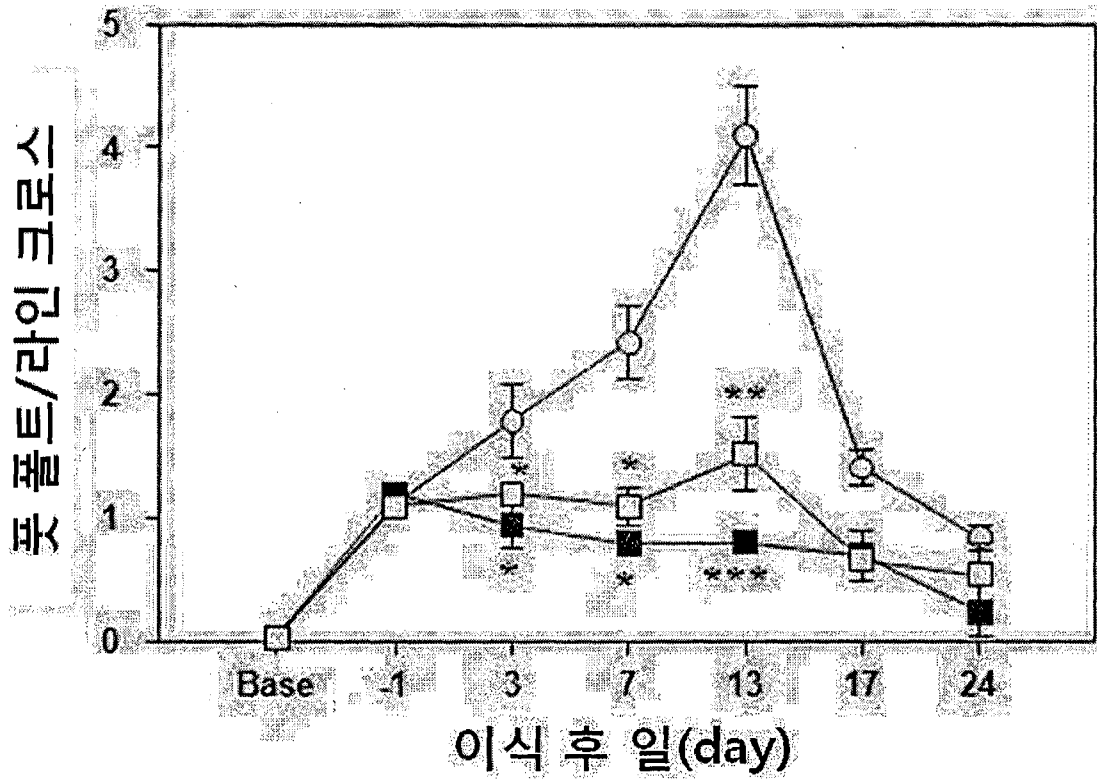
4/31

도 2a



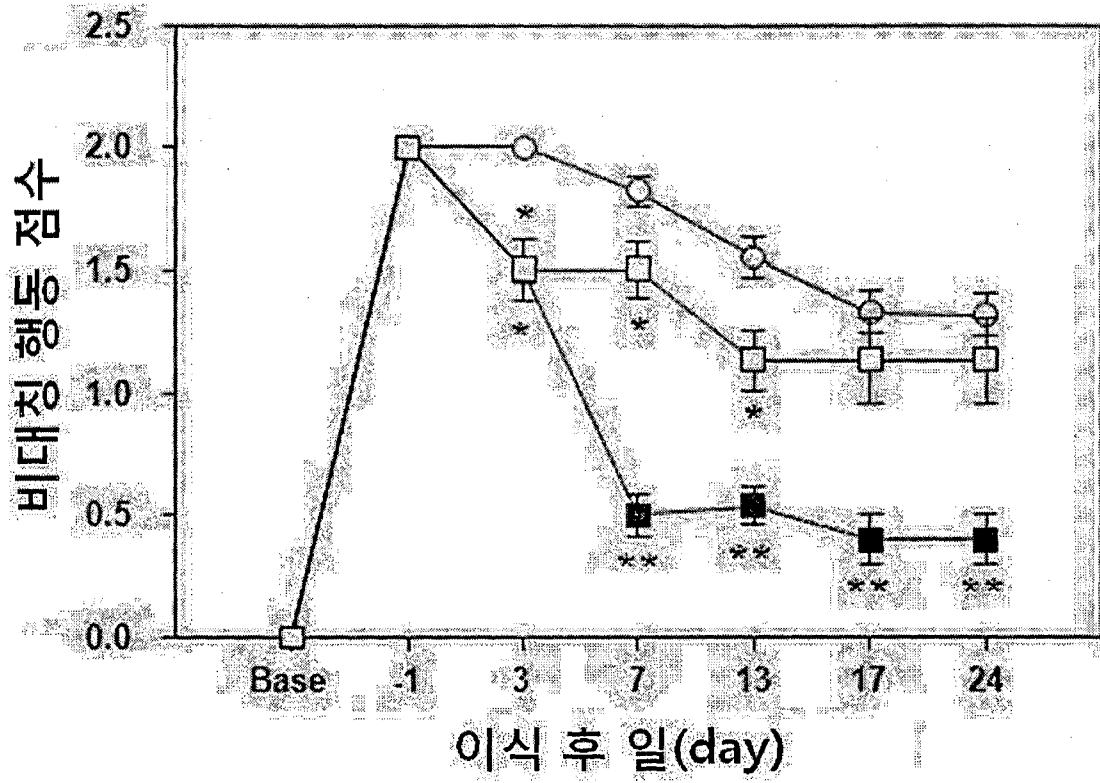
5/31

도 2b



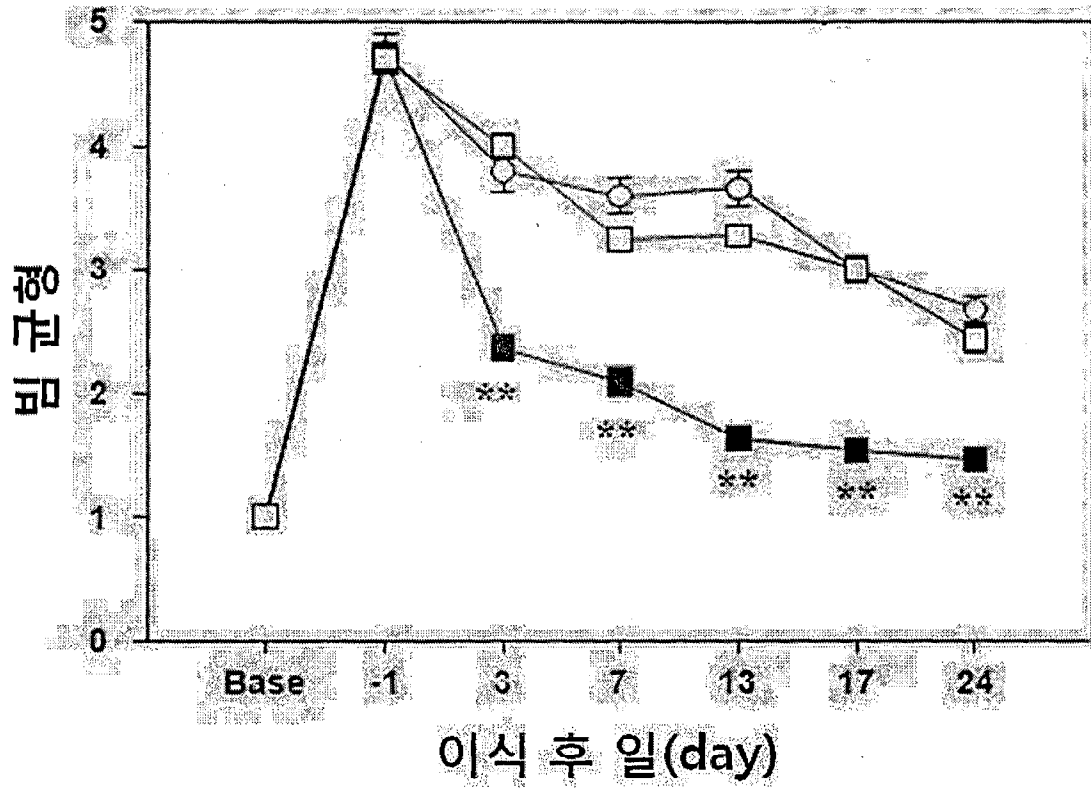
6/31

도 2c



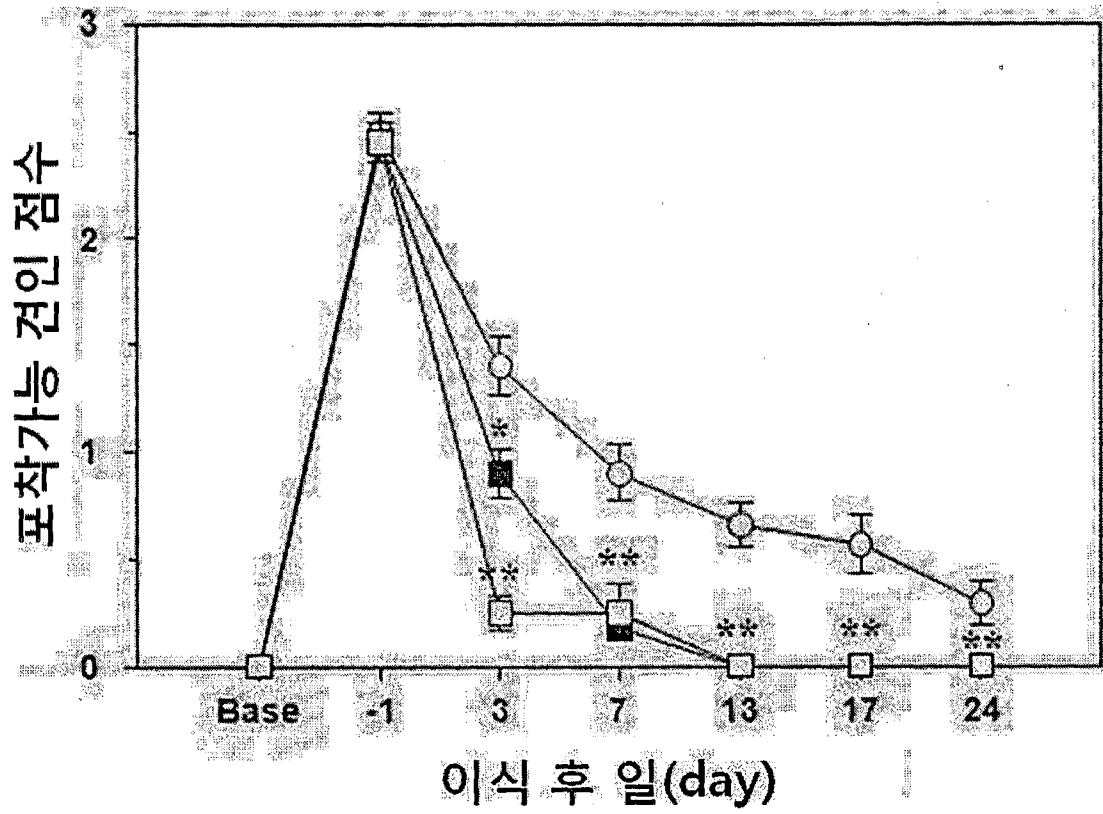
7/31

도 2d



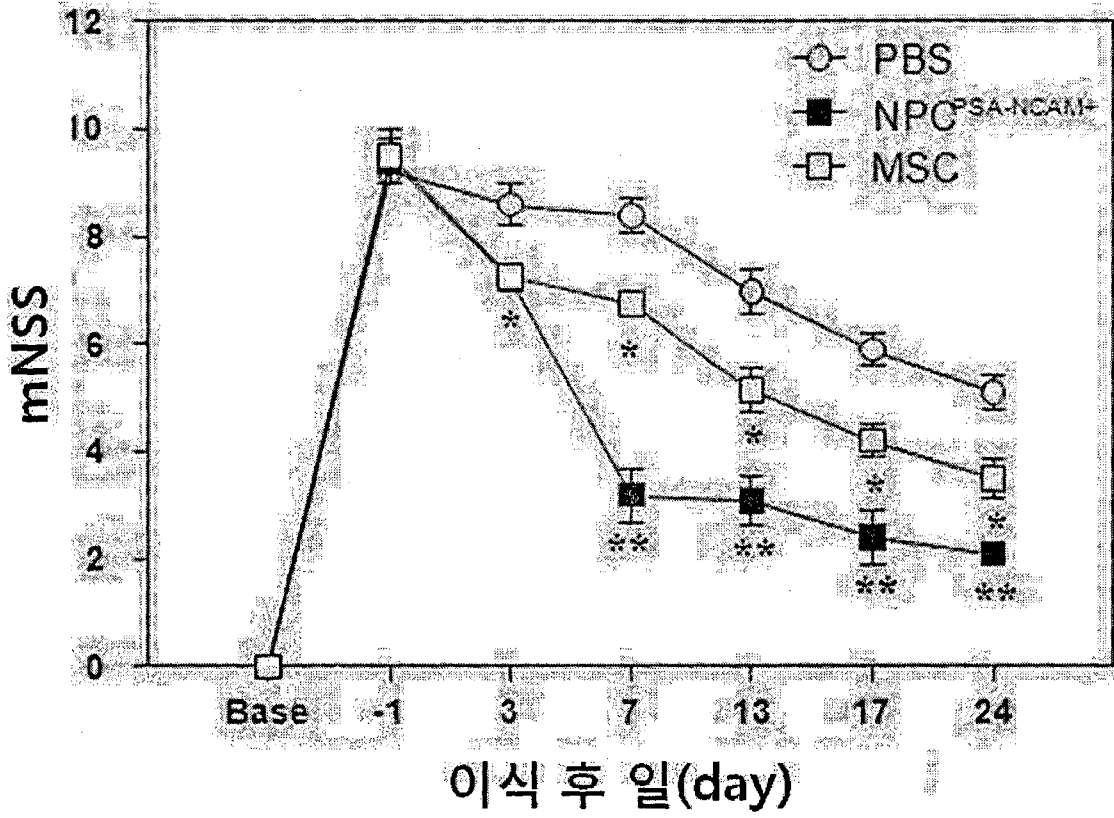
8/31

도 2e

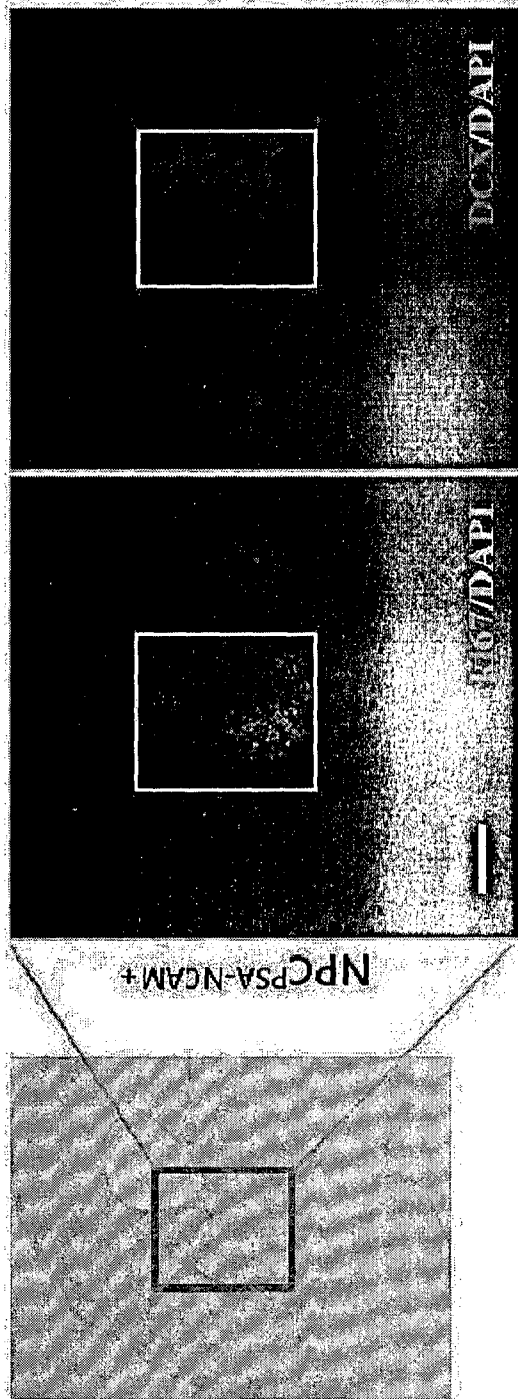


9/31

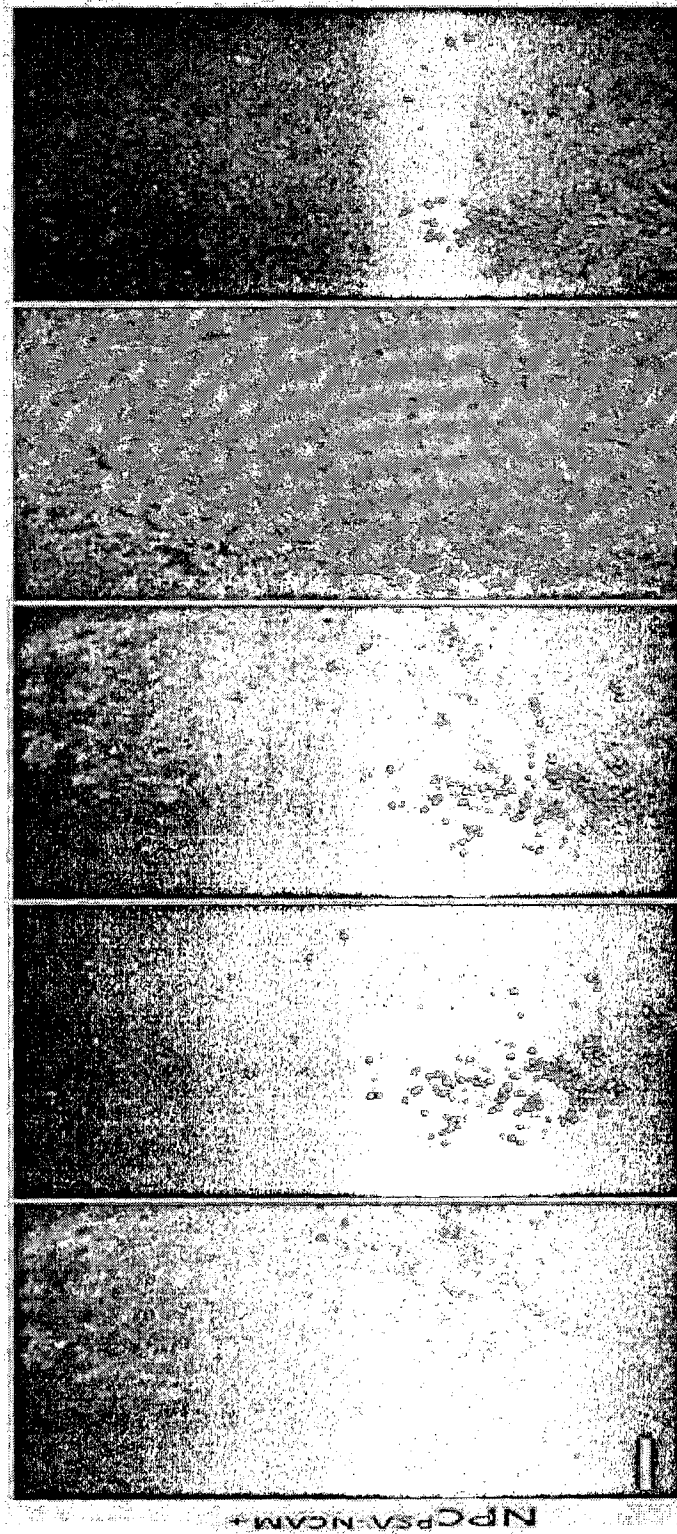
도 2f



도 3a



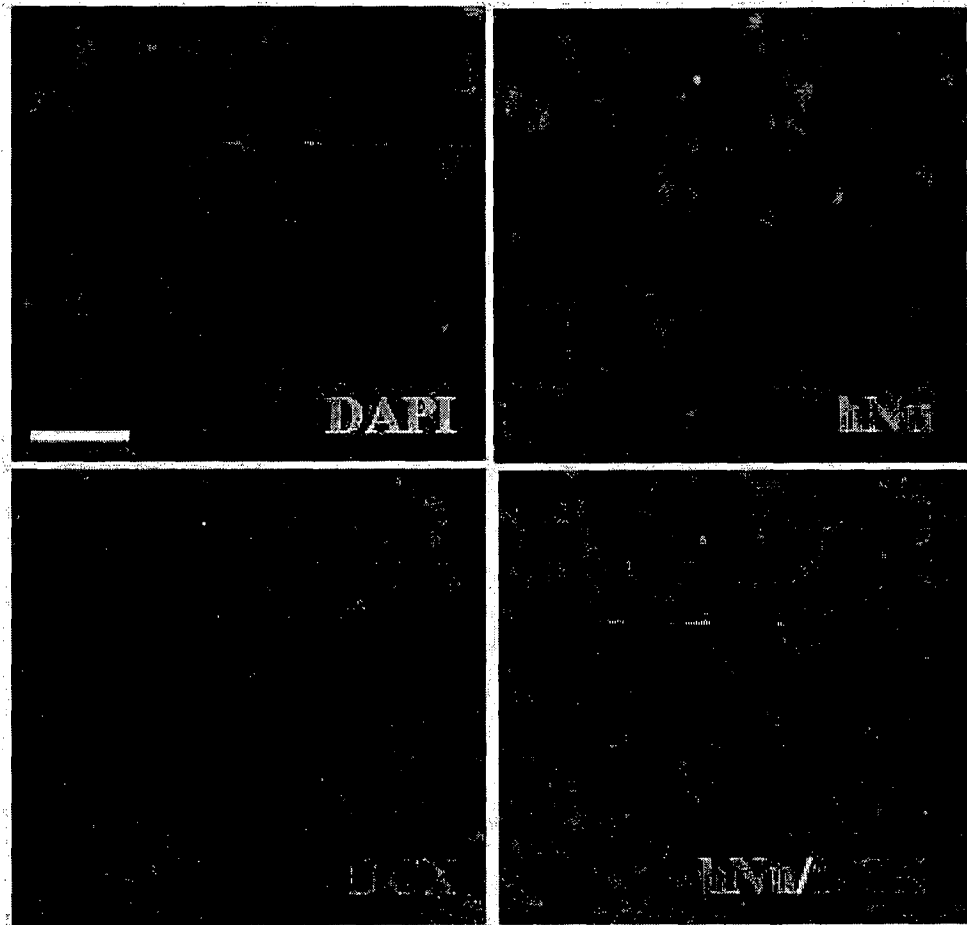
도 3b



12/31

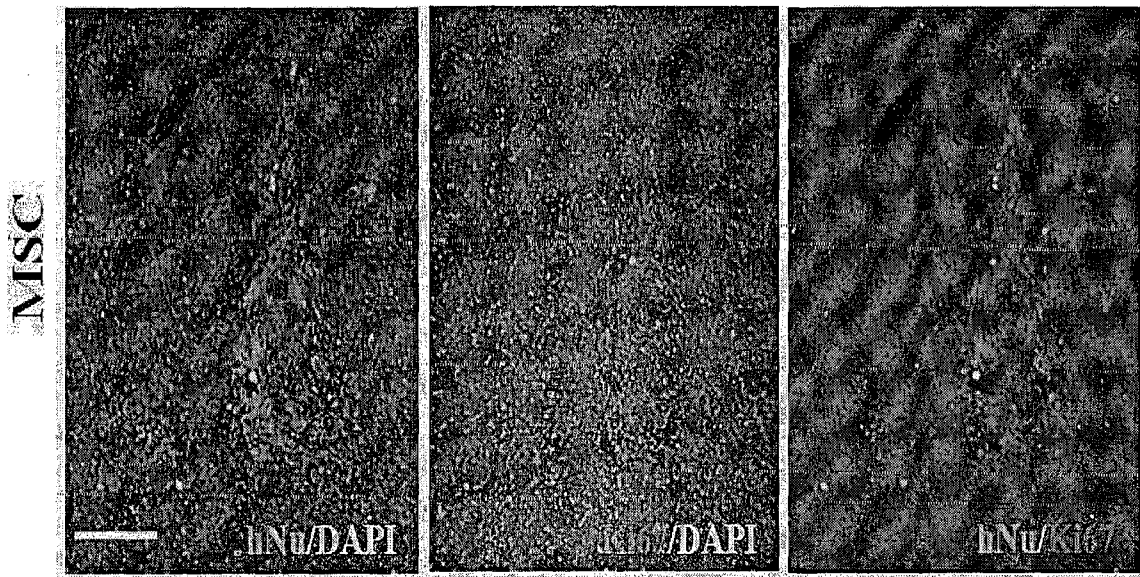
도 3c

NPC<sup>PSA-NCAM+</sup>



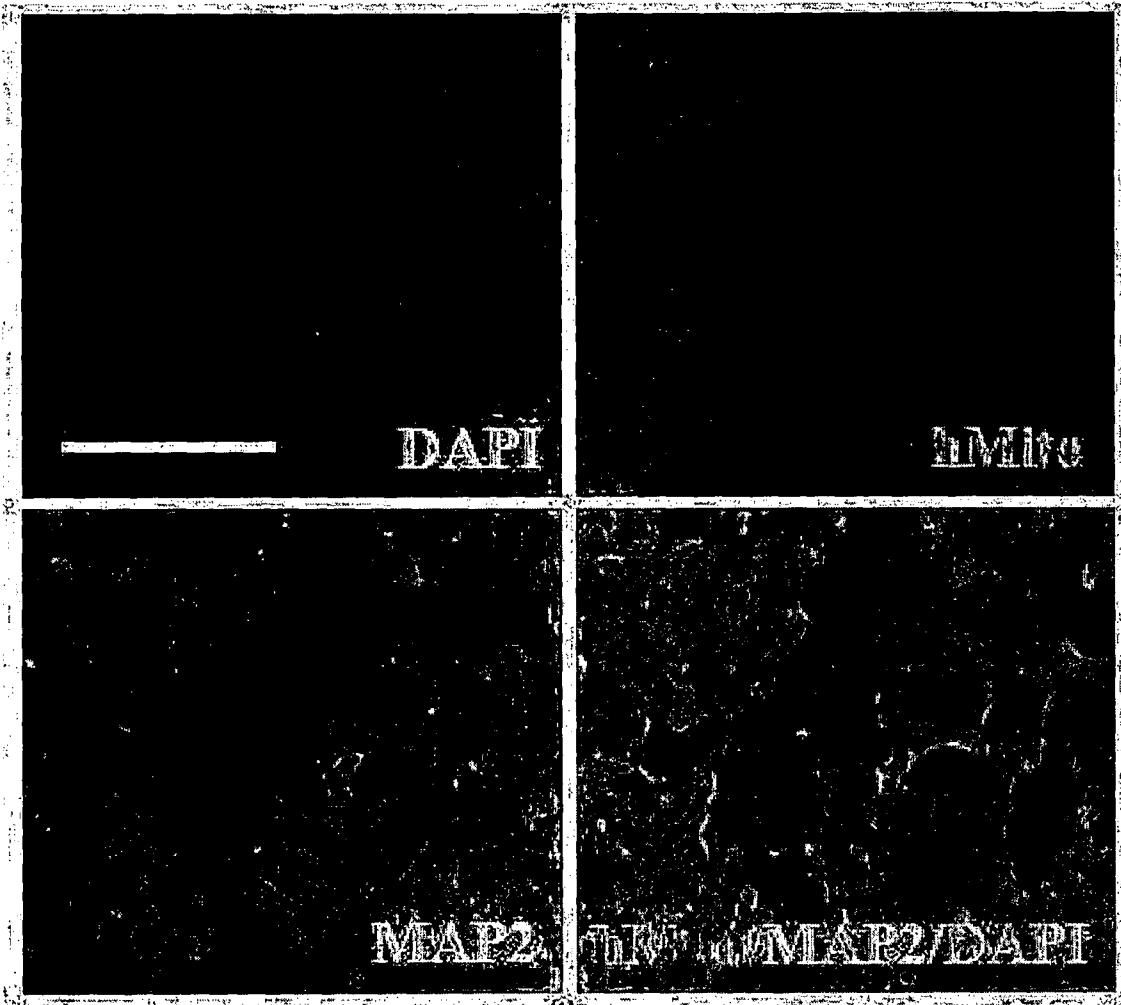
13/31

도 3d



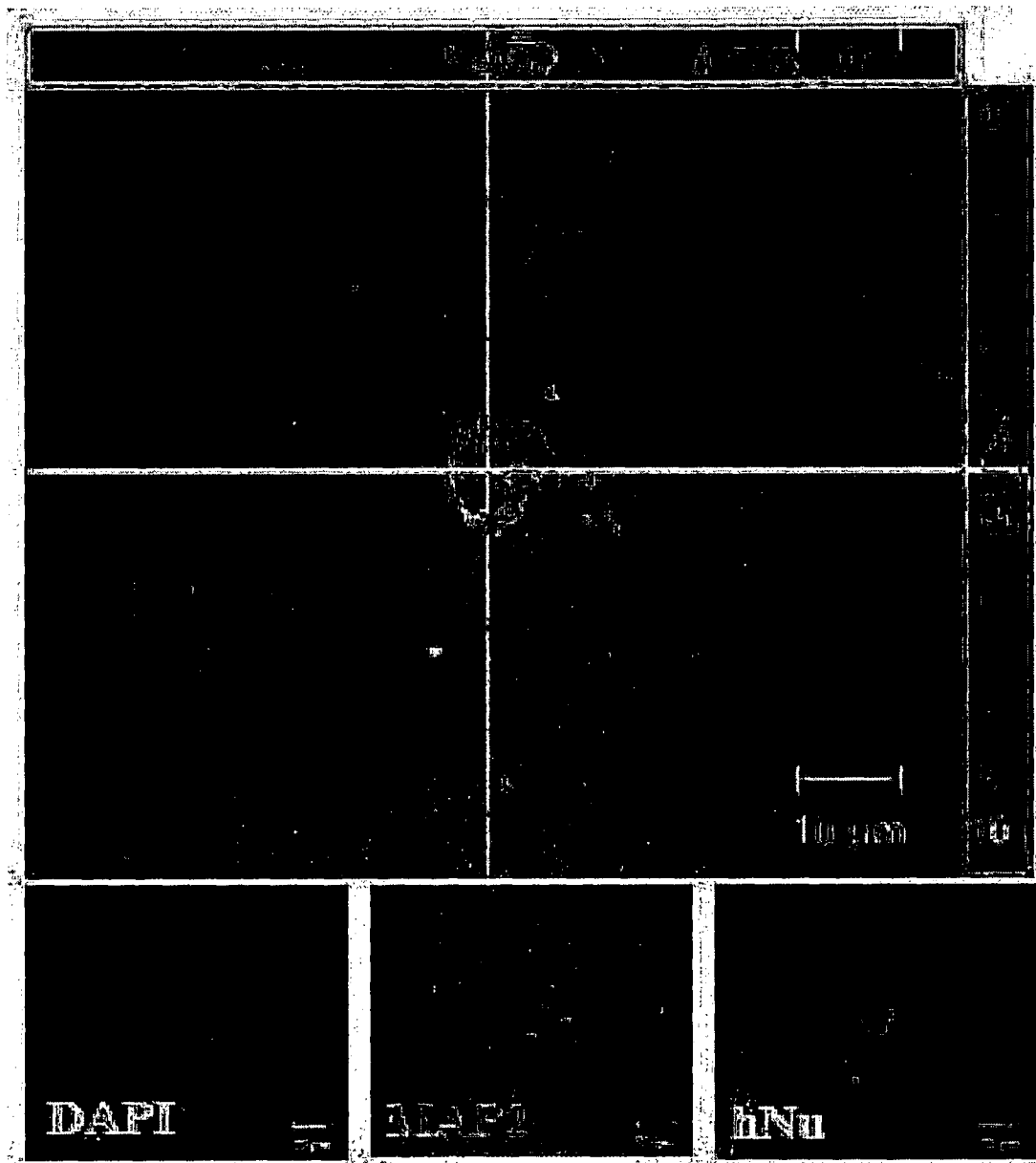
14/31

도 4a



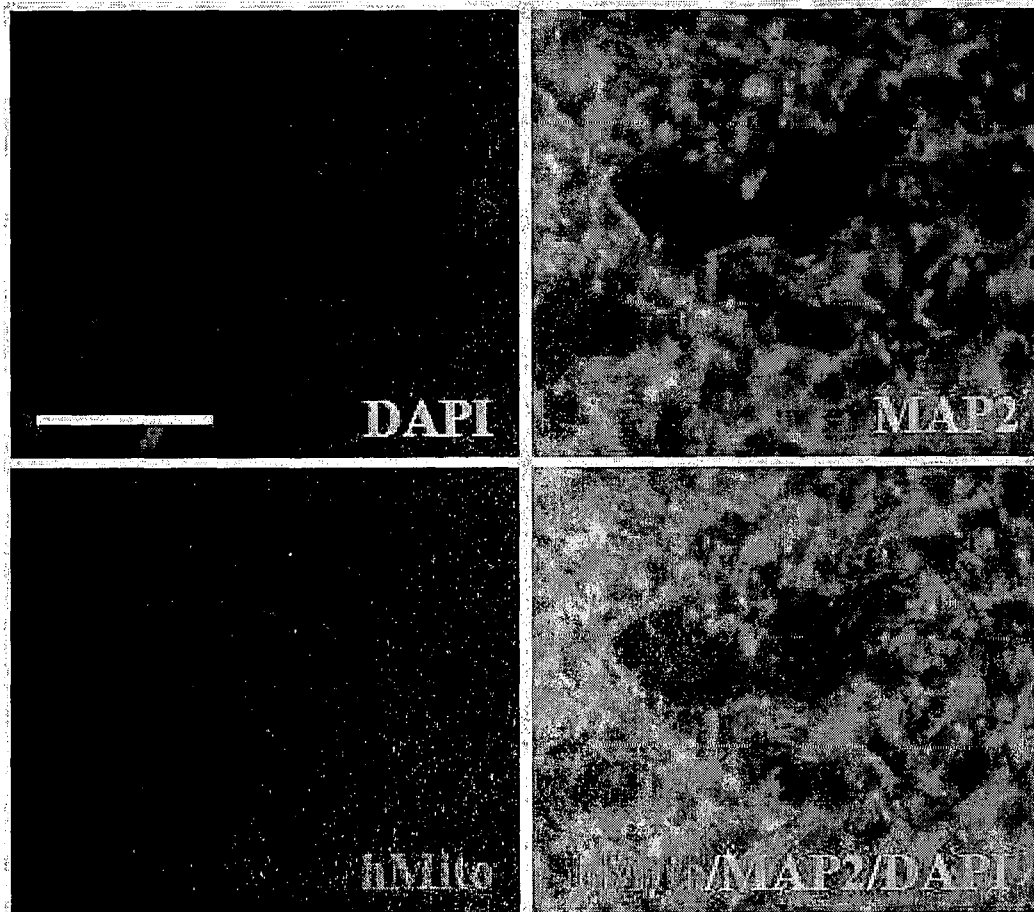
15/31

도 4b



16/31

도 4c

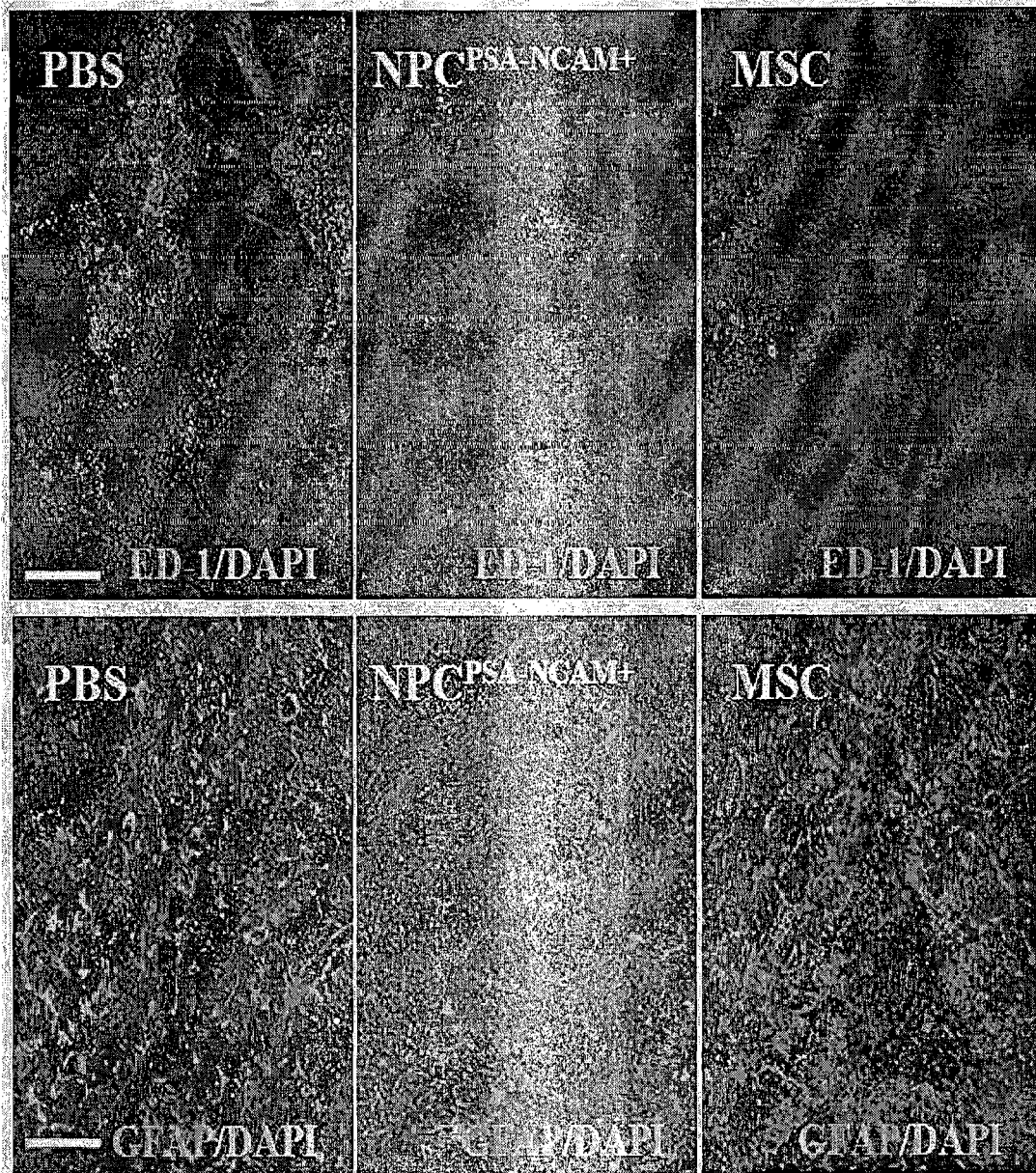


17/31

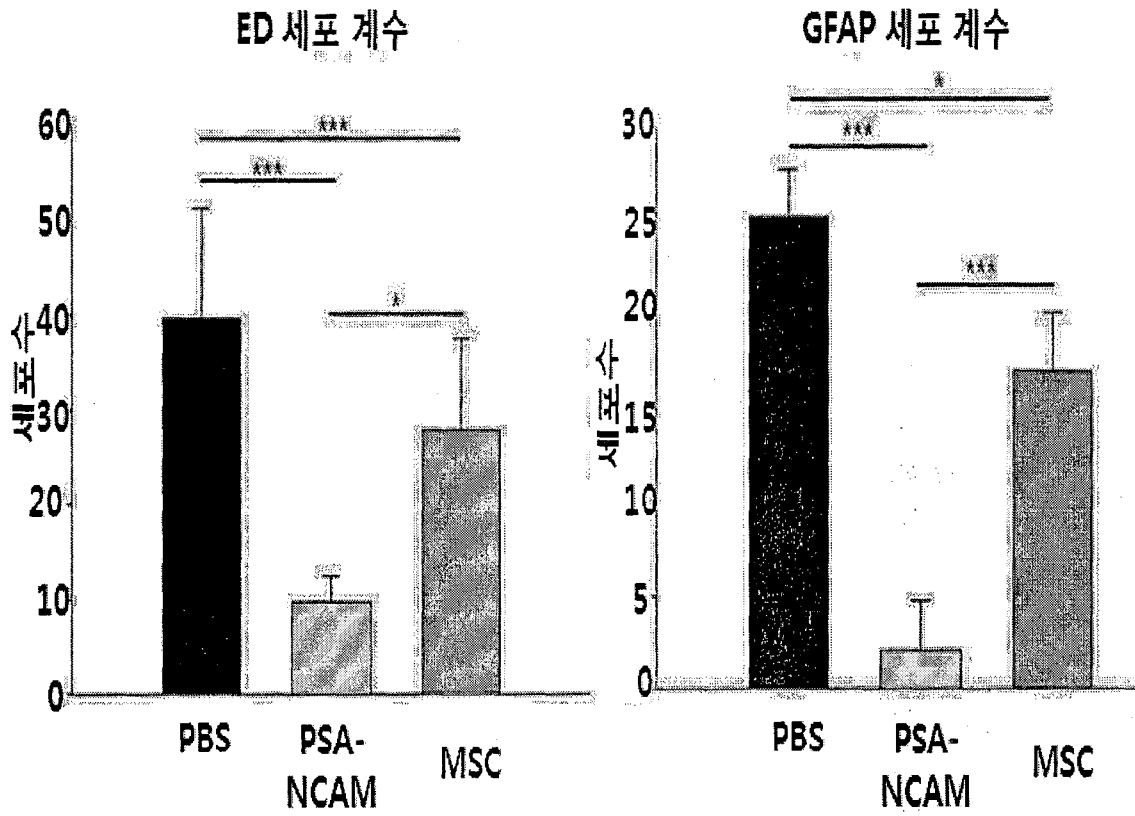
도 4d



도 4e

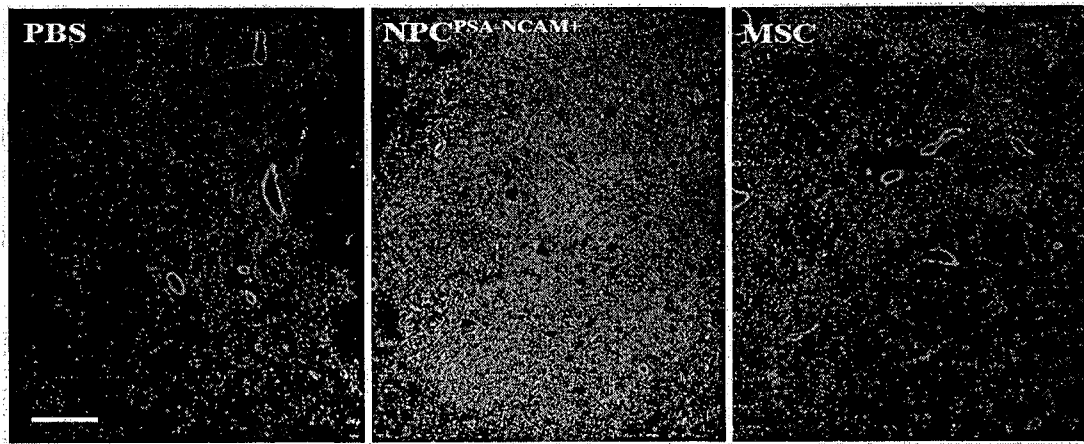


도 4f

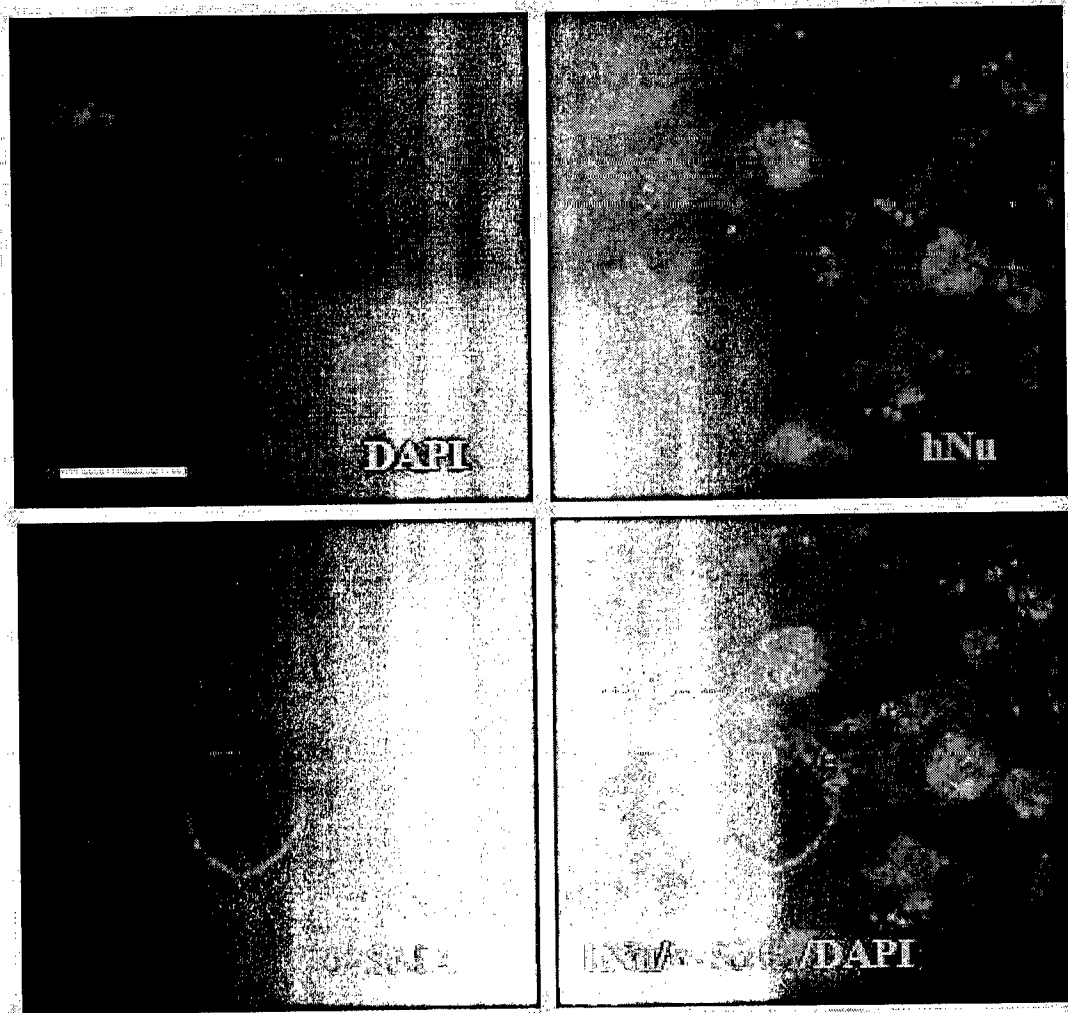


20/31

도 5a

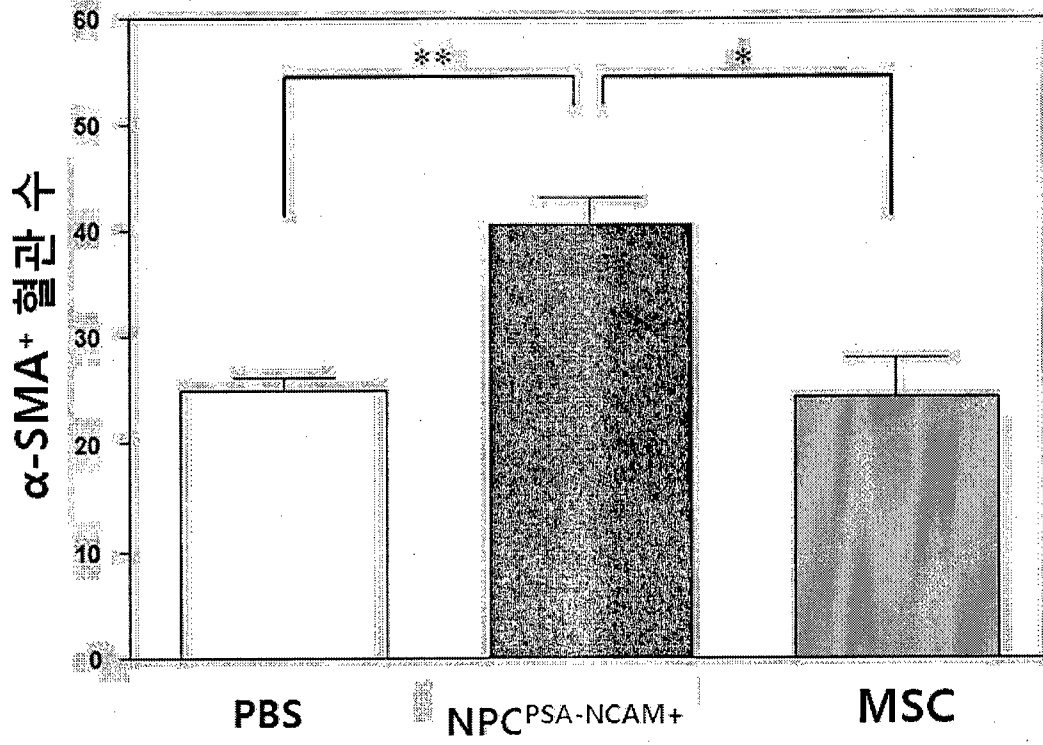


도 5b



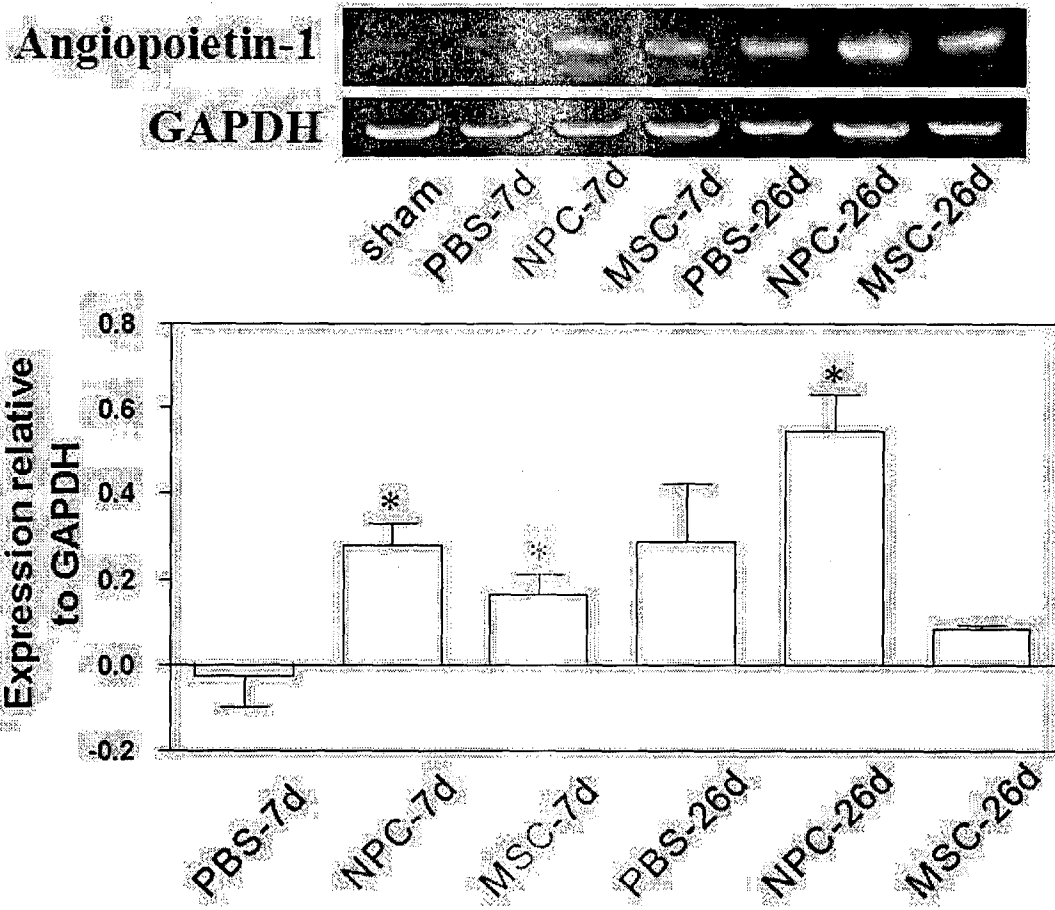
22/31

도 5c



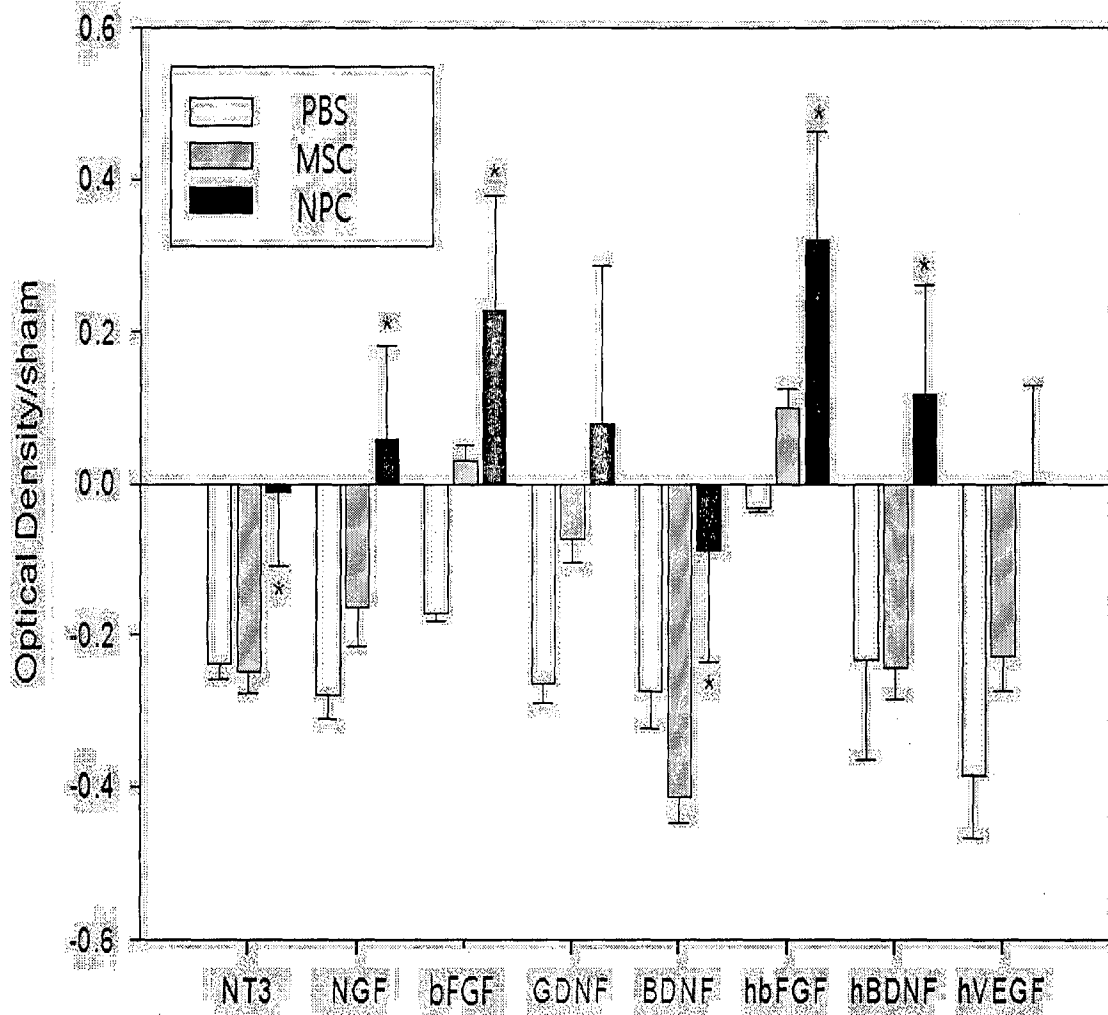
23/31

도 5d



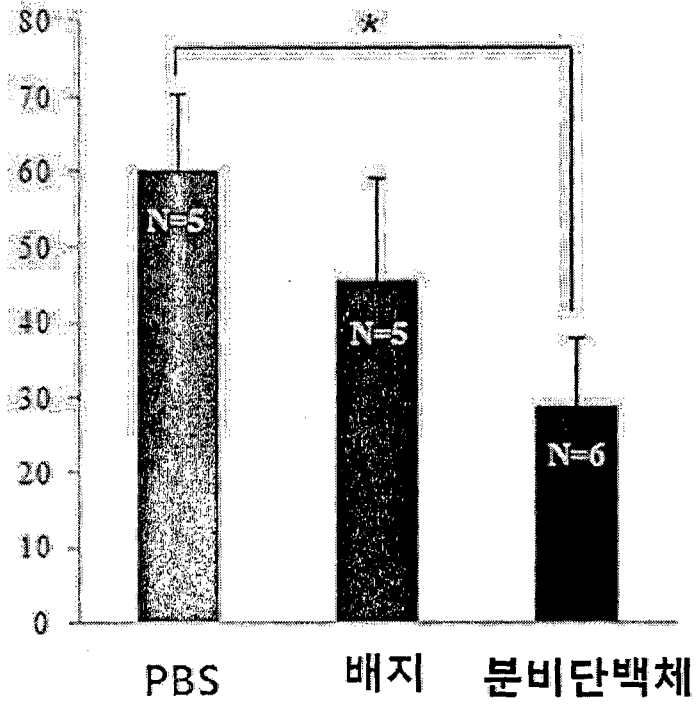
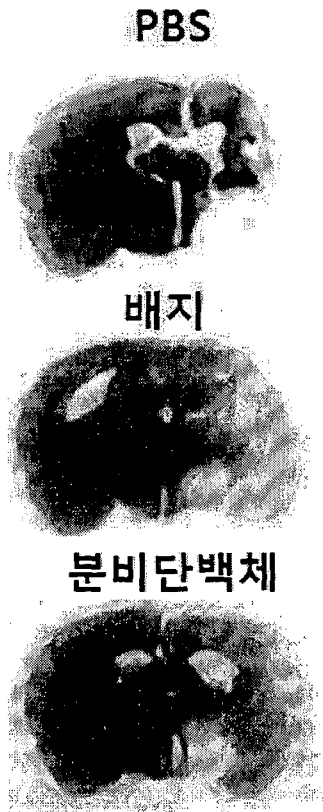
24/31

도 6

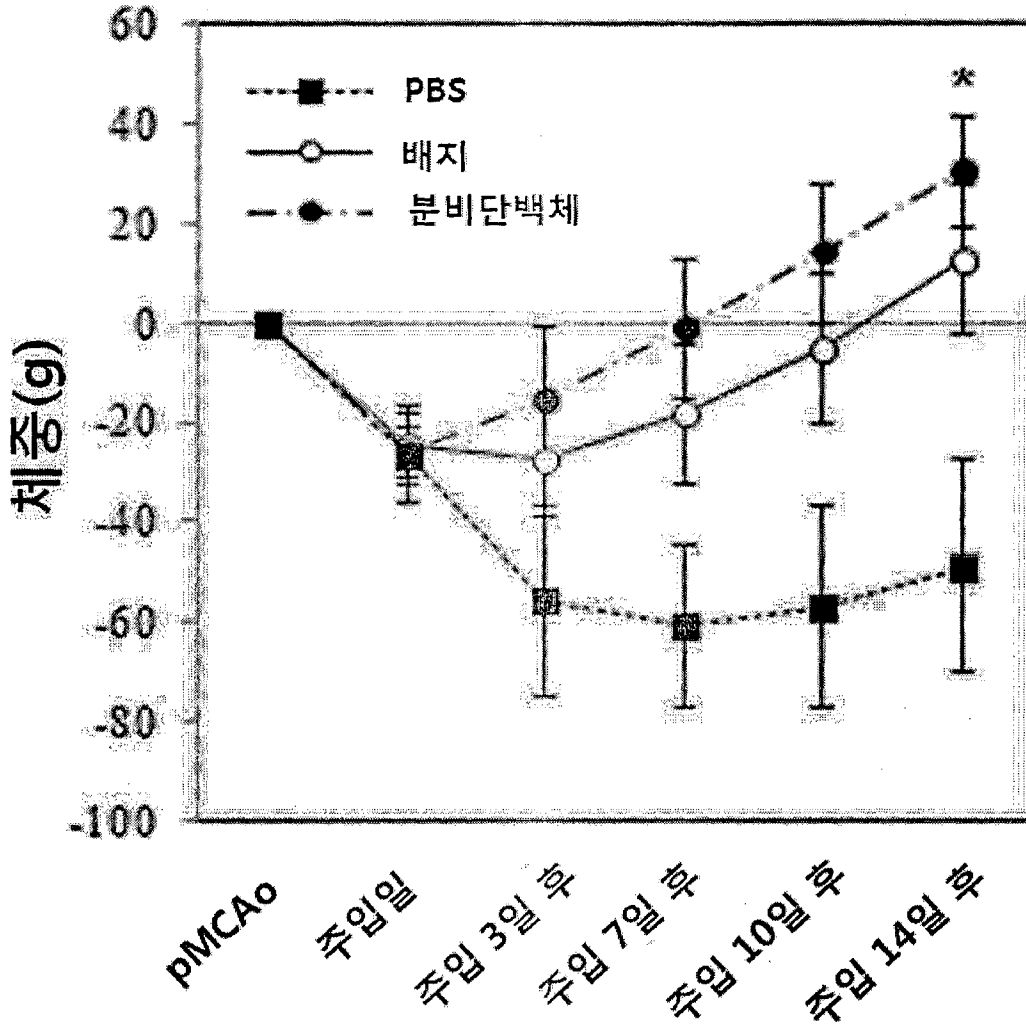


25/31

도 7

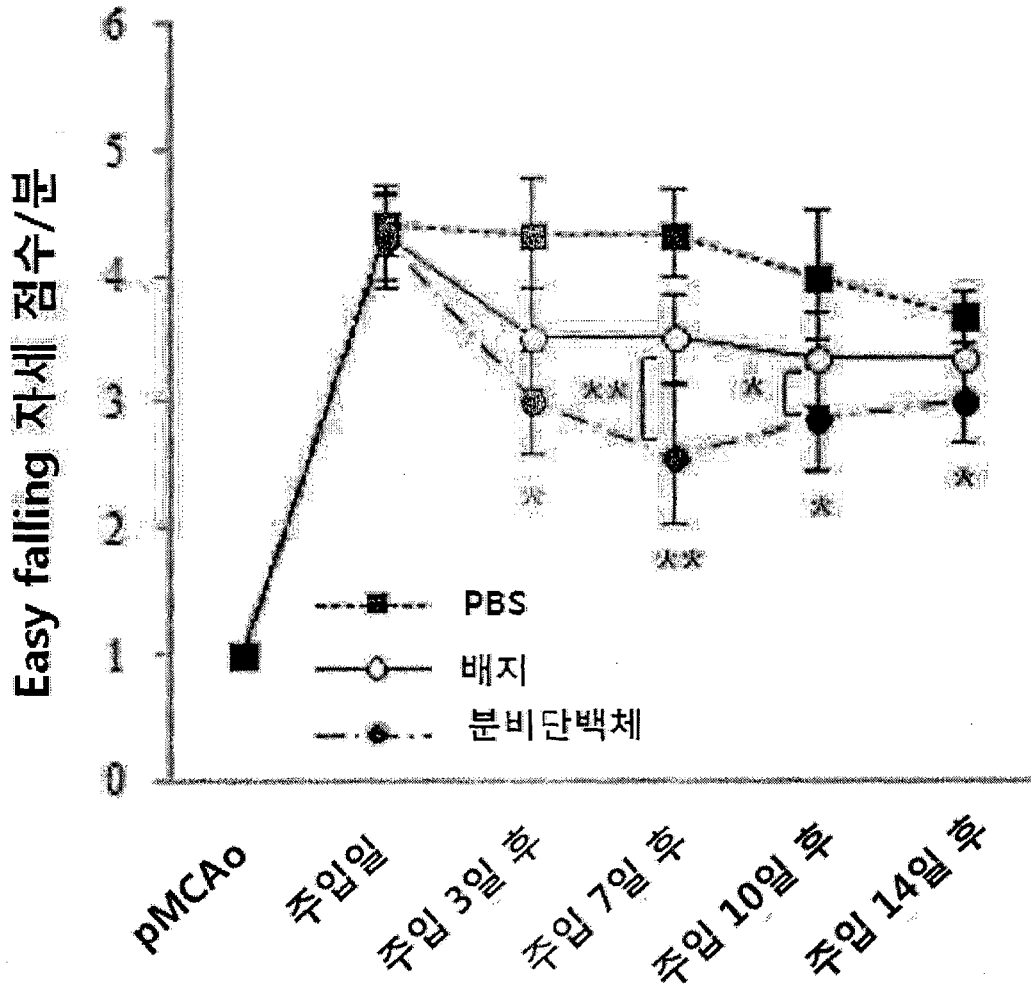


도 8



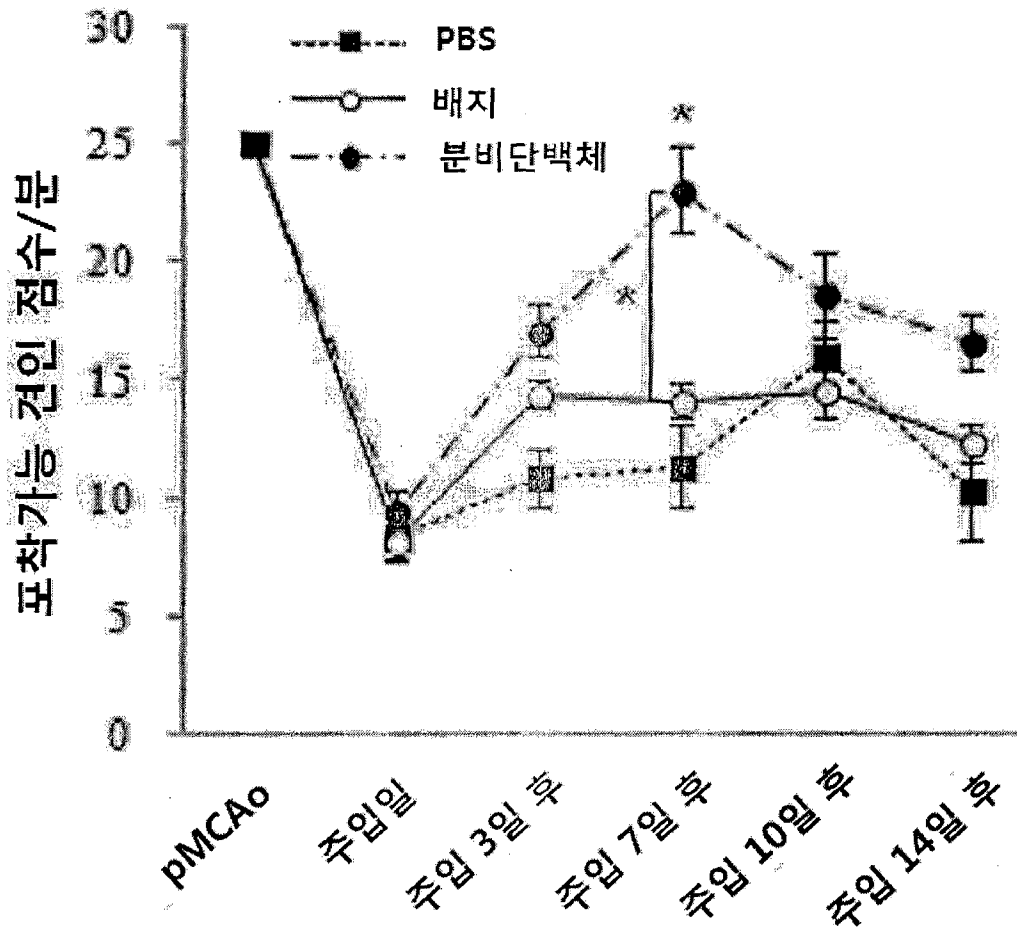
27/31

도 9a



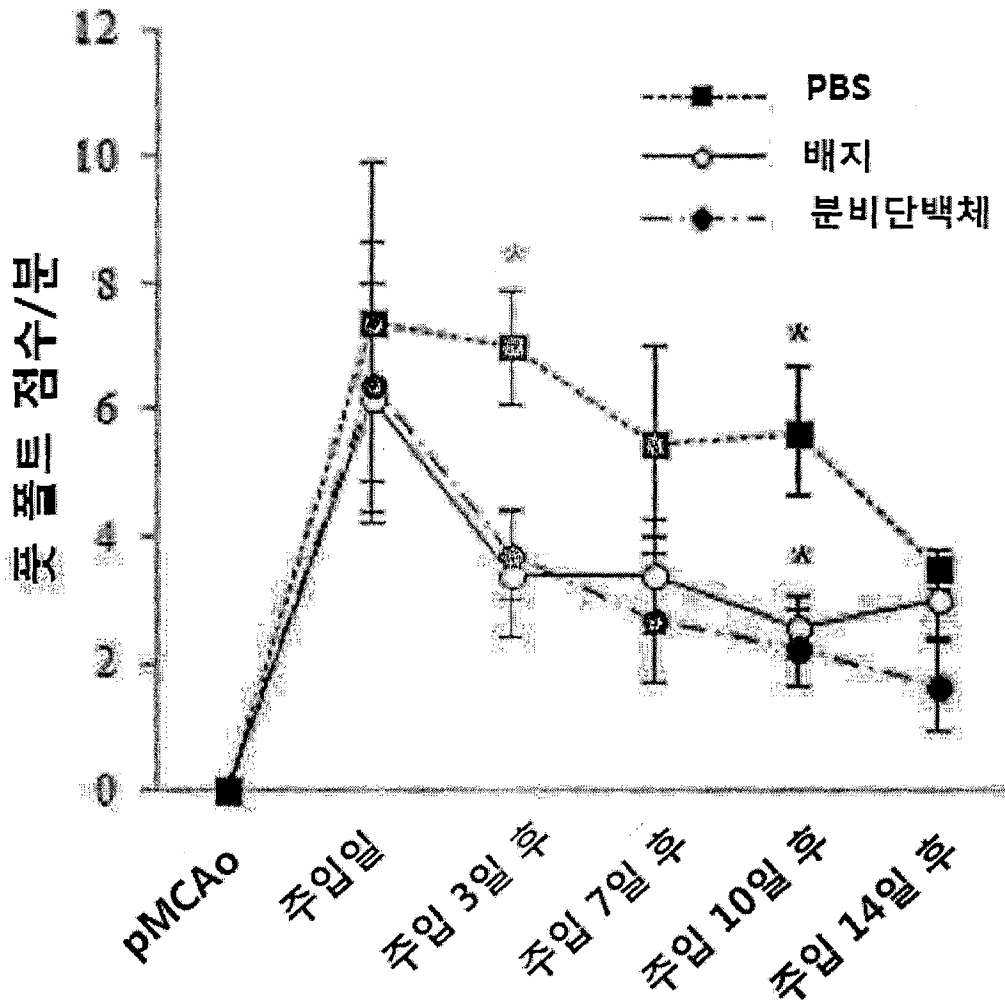
28/31

도 9b



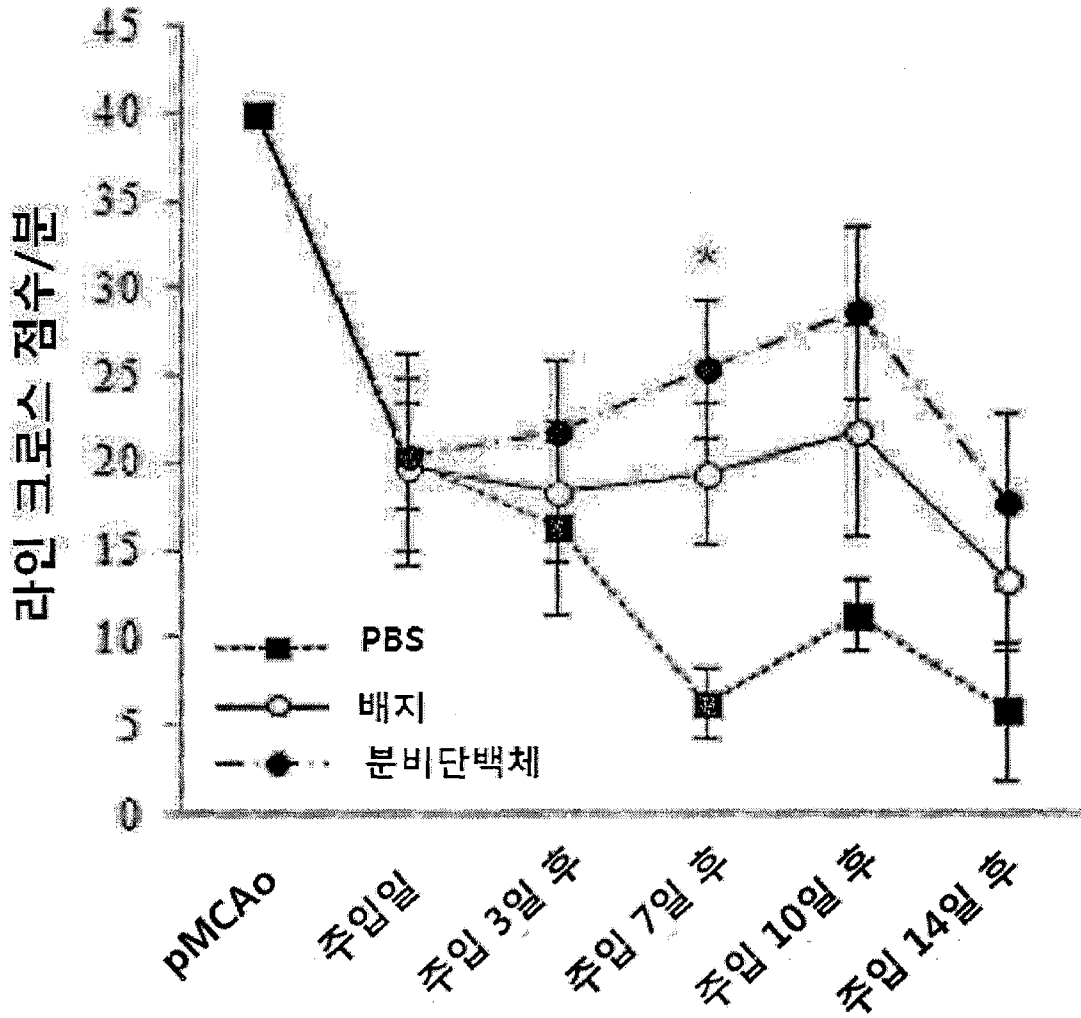
29/31

도 9c

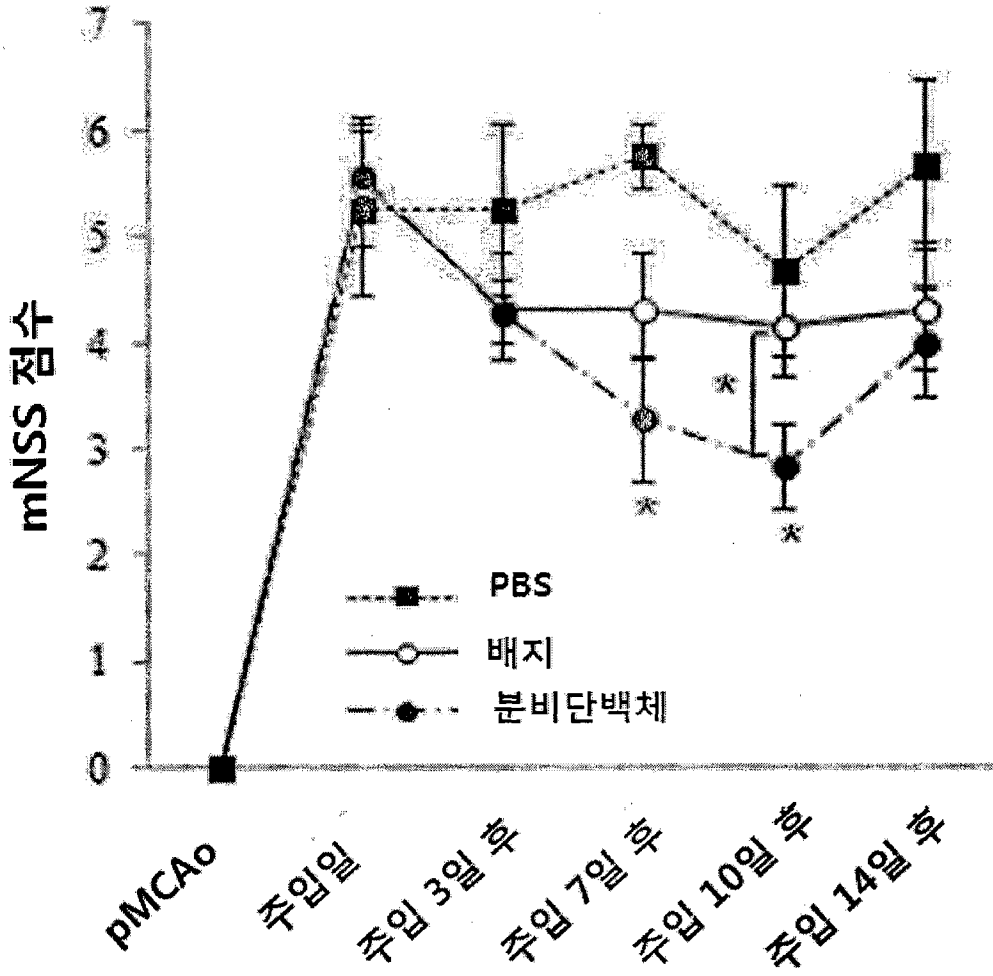


30/31

도 9d



도 10



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/KR2015/006588**

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

*A61K 35/12(2006.01)i, A61K 39/395(2006.01)i, A61P 9/10(2006.01)i, A61P 9/00(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 35/12; C12N 5/0797; A61K 39/395; A61P 9/10; A61P 9/00

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) &amp; Keywords: PSA-NCAM, neural precursor cells (NPCs), neuroinflammation, ischemic disease, secretome, Agrin, totipotent stem cell

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2014-0071512 A (KIDO, Tsuneo) 11 June 2014 See abstract, claims 1-43, and background art	1-5
A	See the entire document	6-18
A	DIBAJNIA et al., "Role of neural precursor cells in promoting repair following stroke", Acta Pharmacologica Sinica (2013) Vol. 34: pages 78-90 See the entire document	1-18
A	Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University, "Establishment of Clinically Applicable X Linked Adrenoleukodystrophy Patient Specific Reprogrammed Stem Cells", Health & Medical Technology R&D Program (2012) Report, Ministry of Health & Welfare See the entire document	1-18
A	KIM, Dae - Sung et al., "Highly Pure and Expandable PSA-NCAM-Positive Neural", PLoS ONE, July 2012, Volume 7, Issue 7, e39715, pages 1-12 See the entire document	1-18



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

"I" 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

"&amp;" document member of the same patent family


Date of the actual completion of the international search

01 OCTOBER 2015 (01.10.2015)

Date of mailing of the international search report

02 OCTOBER 2015 (02.10.2015)

Name and mailing address of the ISA/KR


 Korean Intellectual Property Office  
 Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,  
 Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/006588

**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.: **19-20**  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claims 19 and 20 pertain to a method for treatment of the human body by therapy, and thus pertain to 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/KR2015/006588**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2014-0071512 A	11/06/2014	CA 2821065 A1	19/07/2012
		CN103687941 A	26/03/2014
		EP 2663638 A1	20/11/2013
		JP 05-649745B2	07/01/2015
		JP 2014-503219A	13/02/2014
		TW201237169 A	16/09/2012
		TW201319253 A	16/05/2013
		WO 2012-095730 A1	19/07/2012

<b>A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))</b> A61K 35/12(2006.01)i, A61K 39/395(2006.01)i, A61P 9/10(2006.01)i, A61P 9/00(2006.01)i		
<b>B. 조사된 분야</b> 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 35/12; C12N 5/0797; A61K 39/395; A61P 9/10; A61P 9/00 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: PSA-NCAM, 신경전구세포, 신경염증, 허혈성질환, 분비단백체, 아그린, 전능성줄기세포		
<b>C. 관련 문헌</b>		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-2014-0071512 A (키도, 츠네오) 2014.06.11	1-5
A	요약, 청구항 1-43, 및 배경기술 참조 전체 문헌 참조	6-18
A	DIBAJNIA외 1명, "Role of neural precursor cells in promoting repair following stroke", Acta Pharmacologica Sinica (2013) Vol.34: 78-90쪽 전체 문헌 참조	1-18
A	연세대학교산업협력단, "임상적용 가능한 X-연관 부신백질이영양증 특이적 인간 역분화줄기세포 확립 및 효율적 세포치료법 개발과 기전 연구 시스템 구축", 보건의료기술진흥사업(2012) 보고서, 보건복지부 전체 문헌 참조	1-18
A	김대성외 13명, "Highly Pure and Expandable PSA-NCAM-Positive Neural", PLoS ONE, July 2012, Volume 7, Issue 7, e39715, 1-12쪽 전체 문헌 참조	1-18
<input type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 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 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2015년 10월 01일 (01.10.2015)	국제조사보고서 발송일 2015년 10월 02일 (02.10.2015)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-472-7140	심사관 신영신 전화번호 +82-42-481-8270	

**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: 19-20  
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉, 청구항 19-20은 치료에 의한 사람의 치료방법에 관한 것이므로 PCT 조약 제17조(2)(a)(i) 및 조약규칙 39.1(I V)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 10-2014-0071512 A	2014/06/11	CA 2821065 A1 CN103687941 A EP 2663638 A1 JP 05-649745B2 JP 2014-503219A TW201237169 A TW201319253 A WO 2012-095730 A1	2012/07/19 2014/03/26 2013/11/20 2015/01/07 2014/02/13 2012/09/16 2013/05/16 2012/07/19