



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년06월10일
 (11) 등록번호 10-1405620
 (24) 등록일자 2014년06월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 A61K 35/44 (2006.01) A61K 35/28 (2006.01)
 A61K 35/12 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2012-0099413
 (22) 출원일자 2012년09월07일
 심사청구일자 2012년09월07일
 (65) 공개번호 10-2014-0032745
 (43) 공개일자 2014년03월17일
 (56) 선행기술조사문헌
 KR1020100100855 A*
 EP2298328 A1
 [논문1] KOREAN JOURNAL OF PEDIATRICS (2007)
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
 사회복지법인 삼성생명공익재단
 서울특별시 용산구 이태원로55길 48 (한남동)
 (72) 발명자
 장윤실
 서울 송파구 양재대로 1218, 317동 303호 (방이동, 올림픽선수기자촌아파트)
 박원순
 서울 서초구 명달로4길 30, 대림E편한세상아파트 501동 903호 (서초동, 서초5차)
 (74) 대리인
 특허법인이름

전체 청구항 수 : 총 10 항

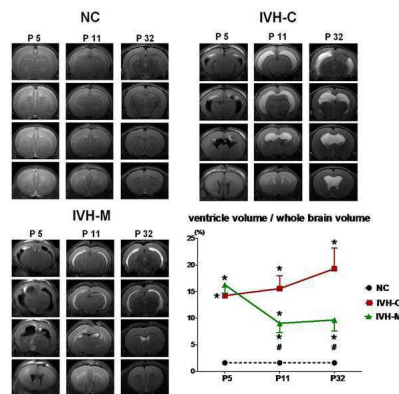
심사관 : 윤소라

(54) 발명의 명칭 **중간엽 줄기세포를 포함하는 미숙아 뇌실 내 출혈 치료용 조성물**

(57) 요약

본 발명의 중간엽 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 미숙아 뇌실내 출혈 예방 또는 치료용 조성물은 뇌실 확장을 막고 염증성 사이토카인을 감소시키는 등 미숙아 뇌실 내 출혈의 치료에 유리한 효과를 보인다. 미숙아 뇌실내 출혈에 속발적으로 발생할 수 있는 뇌수두증 또한 효과적으로 예방, 치료할 수 있다. 그리고, 위와 같은 뇌실내 출혈로 손상된 뇌의 조직학적, 생화학적인 회복 효과뿐만 아니라, 행동학적인 감각 운동 능력 또한 유의하게 호전시키는 효과를 보였다. 또한 중간엽줄기세포는 면역거부반응을 일으킬 소지가 적고 증식, 분화 및 조절물질 분비능력이 우수하므로 유용한 치료원으로 이용할 수 있다. 따라서 미숙아 뇌실 내 출혈 및 뇌수두증의 예방 및 치료에 중요하게 응용될 수 있을 것으로 기대된다.

대표도 - 도2



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A110445

부처명 보건복지부

연구사업명 중개 중점연구(순방향)

연구과제명 미숙아 뇌실내출혈 치료를 위한 인체 체대혈 유래 중간엽 줄기세포 치료제 개발 탐색

기 여 율 1/1

주관기관 삼성서울병원

연구기간 2011.05.01 ~ 2014.03.31

특허청구의 범위

청구항 1

중간엽 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 미숙아 뇌실내 출혈(IVH)에 의한 질환 예방 또는 치료용 조성물로서, 상기 뇌실내 출혈에 의한 질환은 뇌수두증, 신경교증식증(gliosis) 또는 뇌염증이고, 상기 조성물은 뇌실내 투여 또는 혈관내 투여용인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 중간엽 줄기세포가, 제대혈, 피부, 지방 또는 골수로부터 분리된 중간엽줄기세포, 상기 분리된 중간엽 줄기세포로부터 계대 배양에 의해 증식된 중간엽 줄기세포 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 세포인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 중간엽 줄기세포는 자가이식(autograft) 또는 동종이식(allograft)이 가능한 것임을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 조성물이 배양배지, 항-염증성 사이토카인 (anti-inflammatory cytokine) 유전자, 염증성 사이토카인 (inflammatory cytokine)에 대한 siRNA 또는 안티-센스 프라이머 (anti-sense primer) 또는 이를 포함하는 발현벡터, 인터루킨 (interleukin)-10, 성장인자 (growth factor), 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 보조성분을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 6

삭제

청구항 7

제 1항에 있어서,

상기 조성물은 뇌실 확장을 막는 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 8

제 1항에 있어서,

상기 조성물은 세포 자살(apoptosis)을 막고 신경교증식증(gliosis)을 감소시키는 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 9

제 1항에 있어서,
상기 조성물은 신경세포의 수초화를 증가시키는 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 10

제 1항에 있어서,
상기 조성물은 뇌척수액의 염증성 사이토카인을 감소시키는 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 11

제 1 항의 조성물로부터 제조된 미숙아 뇌실내 출혈(IVH)에 의한 질환 예방 또는 치료용 제제로서,
상기 뇌실내 출혈에 의한 질환은 뇌수두증, 신경교증식증(gliosis) 또는 뇌염증이고,
상기 제제는 뇌실내 투여 또는 혈관내 투여용인 것을 특징으로 하는 제제.

청구항 12

제 11항에 있어서, 상기 제제가 주사제 또는 주입제임을 특징으로 하는 미숙아 뇌실내 출혈에 의한 질환 예방 또는 치료용 제제.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 중간엽 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 미숙아 뇌실 내 출혈 예방 또는 치료용 조성물 및 뇌수두증 예방 또는 치료용 조성물 등에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 세계보건기구(WHO)에 의하면 재태 기간 37주 미만 또는 최종 월경일로부터 259일 미만에 태어난 아기를 미숙아(preterm infant) 또는 조산아라고 한다. 반면 재태 기간과 상관 없이 출생 체중을 기준으로 하여 출생 체중이 2,500g 미만인 경우는 저체중 출생아(LWB, low birth weight), 출생 체중이 1,500g 미만인 경우는 극소 저체중 출생아(VLBW, very low birth weight), 그리고 출생 체중이 1,000g 미만인 경우는 초극소 저체중 출생아(ELBW, extremely low birth weight)라고 분류하기도 한다. 미숙아는 폐의 발달이 미숙해 혼자 힘으로 호흡이 불가능할 뿐 아니라 심장은 물론 여러 장기들이 모두 미숙하여 여러 가지 질환을 안고 있는 경우가 많다. 신생아 시기 이후 평생 장기적으로 후유증이 남는 가장 대표적인 미숙아의 신경학적 합병증으로 미숙아 뇌실 내 출혈이 있다. 뇌출혈이 생기면 대개 뇌실 주변에서 출혈이 생겨 뇌실 내로 혈액이 흘러 들어가게 된다. 미숙아 뇌실 내 출혈의 단계는 하기의 4단계로 나누어진다.

[0003] ① 1단계 : 뇌실과 인접한 바로 아랫부분의 뇌 조직에 국한된 작은 출혈

[0004] ② 2단계 : 출혈이 뇌실 내에서만 있을 때

[0005] ③ 3단계 : 출혈이 많아 뇌실이 팽창된 경우

[0006] ④ 4단계 : 뇌실 뿐 아니라 뇌 조직 안에도 출혈이 있음

[0007] 1단계 및 2단계의 출혈은 미숙아에서 흔하며, 대부분의 경미한 출혈들은 피가 흡수되면서 저절로 회복이 되나 일부에서는 뇌수두증(뇌실 내에 있는 뇌척수액이 많아져 머리가 커지는 질병), 경련, 뇌성마비 등의 합병증이 생긴다. 뇌성마비가 생기면 사지, 특히 다리가 뻣뻣해져 성인까지 평생토록 지속되는 장기적인 발달 지연 및 운동장애 후유증을 초래한다.

- [0008] 흔하게 성인에서 관찰되는 뇌출혈과 미숙아에서 유발되는 뇌실내 출혈은, 그 유발 원인, 위치, 병태생리, 치료법이 완전히 다른 질병의 유형을 띄고 있으며 미숙아의 뇌실내 출혈은 뚜렷하게 유효한 치료법이 아직까지 밝혀져 있지 않아 신생아 합병증의 가장 큰 난제로 남아있다. 성인의 경우 일차성 자발성 뇌 출혈은 중 대뇌 혈관들의 과열로 인한 뇌 실질로의 출혈이 가장 빈도가 높으나, 미숙아들의 뇌출혈은 뇌실(대뇌의 중심부에 있는, 뇌척수액으로 차있는 공간) 주변에 있는 혈관이 풍부한 germinal matrix 부위에서 출혈이 생겨서 뇌실 안으로 출혈이 생기는 뇌실내 출혈이 주된 뇌 출혈의 형태이다. 뇌 출혈의 기점이 성인의 경우 중 대뇌 동맥의 분지가 분포하는 기저핵 부위가 가장 빈번한 반면, 미숙아의 경우는 지지 구조가 부실한 germinal matrix에서 출혈이 되어 그 발발 위치 또한 상이점이 있다. 또한, 미숙아는 해부 생리학적인 기관의 미성숙으로 인하여, 두뇌의 혈압을 일정하게 유지하기 어려워서 대뇌 혈관에 미치는 압력의 변화가 심하고, 고혈당이나 전해질의 급격한 변화로 인하여 혈관내의 혈장 농도 또한 그 변동이 급격하며, 체온의 변화, 호흡 상태와 대사 상태에 의한 체내 산성도의 변화 등의 신체의 미성숙함과 관련된 원인들에 의하여 뇌출혈이 유발되는 반면, 성인의 경우 종양, 외상, 고혈압, 당뇨 등의 혈관성 질환 등의 원인들에 의하여 뇌 출혈이 발발하여 그 기전과 병태생리 또한 상당한 차이가 있다. 위와 같이 성인과 미숙아가 뇌출혈의 원인, 종류, 해부학적 그리고 생리학적인 병태생리의 차이가 커서, 치료법 또한 각각 상황에 따라 달라지게 된다. 최근 줄기세포를 이용하여 성인의 뇌 경색 및 출혈의 치료에 대해 많은 연구가 이루어지고 있다. 그러나, 미숙아의 뇌실내 출혈은 높은 발병율에도 불구하고 줄기세포 적용 연구가 세계적으로 보고된 바 없었다.
- [0009] 한편, 여러 종류의 줄기세포 중에서, 중간엽 줄기세포는 alloreactive 림프구 증식을 유발하지 않고, 원숭이에게 자가가 아닌 동종의, 주 조직적합성이 맞지 않는, 중간엽 줄기세포를 이식하였을때 거부 반응 없이 잘 받아들였다는 보고가 있다. 중간엽 줄기세포가 이렇듯 낮은 면역원성을 갖는 원인은, 중간엽 줄기세포의 다양한 분비 물질들이 주변 환경의 면역 반응을 낮추도록 유도하는 것에 기인한다.
- [0010] 따라서, 본 연구자들은 미숙아의 뇌실내 출혈과 이로 인하여 유발되는 뇌 수두증의 예방 및 치료를 위하여, 자가가 아닌 동종의, 그리고 면역원성이 낮아 이식의 거부가 적은, 중간엽 줄기세포를 사용하는 것이 가장 이상적이고 합리적인 방안으로 결론지었고, 이를 동물실험을 통하여 성공적으로 세계에서 최초로 입증하여 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명자들은 상기와 같은 종래 기술상의 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로, 이용이 용이하고 이식이 유리한 중간엽 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 미숙아 뇌실 내 출혈 예방 또는 치료용 조성물 및 이에 속발적으로 발생하는 뇌수두증 예방 또는 치료용 조성물 등을 제공함을 그 목적으로 한다.
- [0012] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0013] 본 발명은 중간엽 줄기세포를 유효성분으로 포함하는, 미숙아 뇌실 내 출혈 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다. 중간엽 줄기세포를 투여하여 미숙아 뇌실 내 출혈을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.
- [0014] 뇌실 내 출혈시, 응고된 혈액이 뇌실을 막거나 이 혈액이 흡수되는 과정에서 지주막에 염증이 발생하여 뇌척수액 흐름에 장애가 생겨 뇌수두증이 발병할 확률이 높다. 따라서 본 발명의 일 구현예로, 상기 미숙아 뇌실 내 출혈은 속발적으로 뇌수두증을 유발하는 것을 특징으로 한다.
- [0015] 여러 종류의 줄기세포들 중에서 중간엽 줄기세포가 가장 치료 효과가 우수하다는 것은 본 발명자들의 이전 연구들에서도 반복적으로 관찰되고 있다. 고농도 산소로 폐손상을 유도한 모델에서, 면역학적으로 건강한 신생백서에 인간의 중간엽 줄기세포를 기도내로 투여하였을때, 폐의 병리 조직학적인 이상반응이 유발되지 않았으며, 이 백서를 성인시기까지 키워서 관찰한 연구에서 또한, 폐를 비롯한 전신의 각종 장기에서도 병리 조직학적 이상소견은 없었다. E.coli 세포를 기도내로 투여하여 급성 폐 손상을 유도한 성인 mouse 동물모델에서도, 중간엽 줄기세포를 기도내 혹은 정맥내로 투여하였을 때, 중간엽 줄기세포를 받지 못한 동물에 비하여 폐 간질의 부종,

폐 실질의 염증반응, 폐 실질의 출혈이 더 감소하는 경향이 보였다. 이는 이중이식에도 불구하고, 중간엽 줄기세포의 낮은 면역원성으로 인하여 면역 거부반응이 없었음을 잘 보여주는 실례라 하겠다.

- [0016] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 중간엽 줄기세포는 자가이식(autograft) 또는 동종이식(allograft)이 가능한 것임을 특징으로 한다.
- [0017] 종래의 연구에서는 줄기세포를 자가이식하여 뇌실내 출혈을 투여하는 내용을 다루고 있었다. 그러나 본 발명자들은 자가 중간엽 줄기세포를 사용하지 않고, 동종 중간엽 줄기세포를 사용하여 본 발명을 완성하였다. 이는, 미숙아 뇌실 내 출혈이 주로 1000그램 미만의 초극소 미숙아에서 발생하므로, 1000그램도 채 되지 않은 극도의 미숙아에서 자가 중간엽 줄기세포를 획득하기 위하여 골수, 피부, 지방 등의 조직을 얻는 것이 거의 불가능에 가깝기 때문이다. 그 중 가장 가능성이 높은 것은 제대혈로부터 중간엽 줄기세포를 분리하는 것인데, 그 또한 1000그램도 되지 않은 미숙아에서는 그 제대혈의 양이 상대적으로 매우 적고, 주산기의 산모 태아 상태가 혈액학적으로 불안정한 경우가 많아 자가 제대혈을 얻는 것이 현실성이 거의 없다. 또한, 적은 양의 제대혈이라도 얻게 되는 경우에도, 그 제대혈 중에서, 중간엽 줄기세포만을 선택적으로 다시 분리하게 되면, 유용하게 획득하는 중간엽 줄기세포의 양은 극소량이 될 것이다. 세포치료에서 치료 효과를 획득하기 위한 가장 중요한 요소는 세포의 주입 양과, 세포를 주는 시점이다. 본 실험에서, 치료적 효과를 얻기위한 유효 중간엽 줄기 세포양은 몸무게 1kg 당 10^7 개이며, 중간엽 줄기세포 투여 시기는 뇌실내 출혈이 유발되고 24시간 이후였다. 미숙아 뇌실내 출혈이 발생하는 시기가 대부분 생후 3일 이내의 매우 이른 시점임을 감안하였을때, 미숙아에서 얻은 자가 제대혈에서 유효한 효과를 도출할 만큼의 세포의 양을 수일 내 단기간에 배양하는 것은 현실적으로 불가능했다.
- [0018] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 중간엽 줄기세포는 제대혈, 지방, 피부, 또는 골수로부터 유래한 중간엽줄기세포, 상기 분리된 중간엽 줄기세포로부터 계대 배양에 의해 증식된 중간엽 줄기세포 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 세포인 것을 특징으로 한다.
- [0019] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 조성물이 배양배지, 항-염증성 사이토카인 (anti-inflammatory cytokine) 유전자, 염증성 사이토카인(inflammatory cytokine)에 대한 siRNA 또는 안티-센스 프라이머 (anti-sense primer) 또는 이를 포함하는 발현벡터, 인터루킨 (interleukin)-10, 성장인자 (growth factor), 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 보조성분을 추가로 포함하는 것을 특징으로 한다. 그러나 보조성분은 이에 제한되지 않는다.
- [0020] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 조성물이 환자의 뇌실 내에 투여되거나 혈관 내 주입되는 것을 특징으로 한다. 그러나 투여 방법은 이에 제한되지 않는다.
- [0021] 본 발명의 조성물은 뇌실 확장으로 인한 뇌량 조직의 손실을 회복시키는 기능을 가지며, 세포 사멸을 막고 신경교증식증(gliosis)을 감소시키는 것을 특징으로 한다. 또한 신경세포의 수초화를 증가시키고, 뇌척수액의 염증성 사이토카인을 감소시키는 효과도 있다.
- [0022] 또한 본 발명은 상기 조성물로부터 제조된 뇌실 내 출혈 치료용 제제를 제공한다. 제제의 종류에는 제한이 없으나, 바람직하게는 주사제 또는 주입제가 될 수 있다.

발명의 효과

- [0023] 본 발명의 중간엽 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 미숙아 뇌실내 출혈 예방 또는 치료용 조성물은 뇌실 확장을 막고 염증성 사이토카인을 감소시키는 등 미숙아 뇌실 내 출혈의 치료에 유리한 효과를 보인다. 미숙아 뇌실내 출혈에 속발적으로 발생할 수 있는 뇌수두증 또한 효과적으로 예방할 수 있다. 그리고, 위와 같은 뇌실내 출혈로 손상된 뇌의 조직학적, 생화학적인 회복 효과 뿐만 아니라, 행동학적인 감각 운동 능력 또한 유의하게 호전시키는 효과를 보였다. 또한 중간엽 줄기세포는 면역거부반응을 일으킬 소지가 적고 증식, 분화 및 조절물질 분비능력이 우수하므로 유용한 치료원으로 이용할 수 있다. 따라서 미숙아 뇌실 내 출혈의 치료에 중요하게 응용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [0024] 도 1은 뇌실 내 출혈 백서의 뇌조직을 형광현미경으로 관찰하였을 때 치료용 세포제가 뇌 조직에 안착된 모습을

나타낸 도이다.

도 2는 뇌실 내 출혈 유도된 이후 줄기 세포를 뇌실 내로 투여받은 백서의 (IVH-M) 경우, 줄기 세포를 투여받지 않은 백서 (IVH-C)에 비해 뇌실 확장의 정도가 감소했음을 나타낸 도이다.

도 3은 뇌실 내 줄기 세포 투여로 인하여 뇌실에 연결한 뇌 실질인 뇌량 두께가 증가했음을 나타낸 도이다.

도 4는 줄기 세포를 투여받은 IVH-M 군과 투여받지 않은 IVH-C 군에서 자멸사한 세포 수 및 뇌의 gliosis의 정도를 비교한 도이다.

도 5는 줄기 세포 투여로 인하여 손상된 신경세포의 수초화의 정도가 증가했음을 나타낸 도이다.

도 6은 IVH-M 군과 IVH-C 군에서 염증성 cytokine 분비량을 비교한 도이다.

도 7은 제대혈 유래 중간엽 줄기세포와 제대혈 유래 단핵구 세포의 효과를 비교한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 본 발명의 미숙아 뇌실내 출혈에서 치료 약제로 사용하고자 하는 중간엽 줄기세포는, 인체의 제대혈에서 분리, 배양하여 증폭시켜 사용하였다. 이 세포는 CD105 (99.6%) 와 CD73 (96.3%) 표지자가 발현되고, CD34 (0.1%), CD45 (0.2%), CD14 (0.1%)는 거의 발현되지 않는다. 또한, HLA-AB 에 양성이고, 보통 HLA-DR 에는 음성이며, 다분화 표지자인 Oct4 와 SSEA-4가 발현된다. 이 세포가 골수아세포, 연골세포, 지방세포 등으로 분화되는 것을 in vitro에서 확인하였고, 이 분화능은 10번째 passage까지 지속되었다.

[0026] 제대혈을 채취 분리하는 방법은 다음과 같다. 정상 질식분만의 경우에는 아기출산 후 자궁 내에 아직 태반이 남아있는 상태에서 밖으로 만출된 제대정맥으로부터 채취하거나, 제왕절개의 경우에는 아기 출산 후 태반 역시 자궁 밖으로 만출된 상태에서 제대정맥으로부터 채취한다. 출산 후 자궁 밖으로 만출된 제대정맥으로부터 제대혈을 채취할 때는, 신생아가 태어난 후 태반과 태아를 연결하고 있던 제대정맥으로부터 무균적 조작법에 의해 채취한다. 이때, 출산 후 자궁에서 태반박리가 일어나기 전에 제대혈을 채취하거나, 또는 태반박리가 일어난 후 체외에서 제대혈을 채취하는 두 가지 방법 모두 사용할 수 있다. 제왕절개의 경우에는 태반박리가 일어난 후 체외에서 제대혈을 채취하는 방법을 사용하며, 제대정맥을 확보한 후에 채취침을 이용하여 항응고제가 함유된 제대혈 채취백 (주머니)에 제대혈을 채취한다.

[0027] 채취된 제대혈로부터 중간엽 줄기세포를 분리·배양하는 방법으로는 대한민국 공개특허 제2003-0069115호의 방법을 비롯하여 당업계에 공지된 통상의 방법 (Pittinger MF et al. Science, 284: 143-7, 1999; 및 Lazarus HM et al. Bone Marrow Transplant, 16: 557-64, 1995)을 사용할 수 있으며, 그 중 한 예를 들면 다음과 같다. 먼저, 채취된 제대혈을, 예를 들어, 피콜-하이팩 농도구배 (Ficoll-Hypaque gradient)를 이용하여 원심분리함으로써 조혈모세포 및 간엽 줄기세포를 포함하는 단핵구 세포들을 분리한 후, 여러 번 세척하여 이물질들을 제거한다. 세척 후 적절한 밀도로 단핵세포들을 배양용기에 심어 배양하면, 단일층을 이루면서 세포들이 증식하는데, 이 중 위상차 현미경으로 관찰되는 모양이 동질성 (homogeneous)이면서, 방추형 모양 (spindle shape)의 긴 형태의 세포들의 집락 (colony) 형태로 증식하는 세포가 중간엽 줄기세포이다. 이후 세포가 배양되어 자라게 되면 계대배양을 실시하여, 필요한 만큼의 세포수가 될 때까지 증식시킨다.

[0028] 본 발명에서 중간엽 줄기세포의 분리·배양에 사용가능한 배양 배지로는 10% 내지 30% FBS를 포함하는 세포 배양용 배지를 사용할 수 있으며, 세포 배양용 배지로는 돌베코 변형 이글 배지 (Dulbecco's modified eagle medium, DMEM), 최소 필수 배지 (minimal essential medium, MEM)를 비롯하여 알파-최소 필수 배지 (α-MEM), 맥코이스(McCoys) 5A 배지, 이글스 기본 배지 (eagle's basal medium), CMRL (Connaught Medical Research Laboratory) 배지, 글래스고우 (Glasgow) 최소 필수 배지, (Ham's) F-12 배지, IMDM (Iscove's modified Dulbecco's medium), 리보비츠 (Liebovitz') L-15 배지, RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 배지 등 당업계에서 통상적으로 사용되는 세포배양용 배지는 모두 사용가능하며, DMEM 배지를 사용하는 것이 바람직하다. 배양시에는 상기 배지 1 ml에 약 $5 \times 10^3 \sim 2 \times 10^4$ 개의 세포가 존재하도록 세포를 현탁한다.

[0029] 본 발명에서는, 상기와 같이 채취된 제대혈을 원심분리하여 단핵세포들을 분리하고, 적절한 밀도로 배양용기에 심어 배양한 후, 적정 밀도에 달하면 계대배양하여 세포를 증식시켰다.

[0030] 본원 발명의 조성물은 세포를 현탁하기 위한 배지, 뇌질환 치료에 효과적인 유전자 (예: 항-염증성 사이토카인 (anti-inflammatory cytokine) 유전자, 염증성 사이토카인 (inflammatory cytokine)에 대한 siRNA 또는 안티-센스 프라이머 (antisenseprimer)) 또는 이를 포함하는 발현벡터, 자가분비 (autocrine) 또는 측분비

(paracrine) 효과를 제공하는 사이토카인 (예: 인터루킨 (interleukin)-10), 성장인자 (growth factor) (예: 케라틴 형성 세포 성장인자(Keratinocyte growth factor)), 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 보조성분을 하나 이상 추가로 포함할 수 있다. 이 때, 배지는 상기 배양용 배지와 동일한 종류의 배지일 수 있으며, 혈청, 항생제 및 항진균제는 전혀 포함하지 않는다.

[0031] 여기서, 상기 유전자 또는 이를 포함하는 발현벡터는 당업계에서 공지된 방법, 예를 들어 바이러스성 형질감염 또는 비-바이러스 기반 기법 등을 이용하여 본 발명의 세포에 전달되거나, 상기 세포와 단순히 조합될 수 있다. 이때, 유전자의 도입은 아데노바이러스성 형질전환, 유전자 총, 리포좀-매개 형질전환 및 레트로바이러스 또는 렌티바이러스-매개 형질전환, 플라스미드, 아데노-부속 바이러스를 포함하나 이에 한정되지 않는 당업자에게 공지된 임의의 기법에 의해 수행될 수 있다. 또한, 상기 세포는 유전자를 장시간에 걸쳐 세포에 방출 또는 전달할 수 있는 유전자 전달 매체를 지니는 담체 물질과 함께 이식될 수 있다.

[0032] 본 발명의 조성물은 동결되지 않은채 사용되거나 차후 사용을 위해 동결될 수 있다. 동결되어야 할 경우, 표준 냉동보존제 (예를 들어 DMSO, 글리세롤, 에피라이프 (Epilife 세포 동결 배지 (Cascade Biologics))가 동결전 세포 집단에 첨가될 수 있다.

[0033] 또한, 상기 조성물은 약학적 분야에서 통상의 방법에 따라 환자의 신체 내 투여에 적합한 단위투여형의 제제로 제형화시켜 투여할 수 있다.

[0034] 본 발명의 조성물은, 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약학적으로 허용가능한 담체를 1종 이상 포함하여 제조할 수 있으며, 다양한 제형으로 제조할 수 있다.

[0035] 상기 조성물을 개체에 투여하여 암 등 세포증식성 질병을 예방 또는 치료할 수 있다. 본 발명에서 개체란 질병의 치료를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는 인간, 또는 비-인간인 영장류, 생쥐(mouse), 쥐(rat), 개, 고양이, 말, 및 소 등의 포유류를 의미한다.

[0036] 본 발명의 약학적 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여경로, 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나 바람직하게는, 1일 0.001 내지 100 mg/체중kg으로, 보다 바람직하게는 0.01 내지 30 mg/체중kg으로 투여한다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 여러 번에 나누어 투여할 수도 있다.

[0037] 상기 주사용 앰플은 사용 직전에 주사액과 혼합 조제할 수 있으며, 주사액으로는 생리 식염수, 포도당, 만니톨, 링거액 등을 사용할 수 있다. 이렇게 제조된 본 발명의 조성물 또는 약학적 제제는 당업계에서 통상적으로 사용하는 투여방법을 이용하여 이식 및 기타 용도에 사용되는 다른 줄기세포와 함께 또는 그러한 줄기세포와의 혼합물의 형태로 투여될 수 있으며, 바람직하게는 치료가 필요한 환자의 뇌실 내에 직접 생착 또는 이식하거나 기도 에 직접 이식 또는 주입하는 것이 가능하나 이에 한정되지는 않는다. 또한, 상기 투여는 카테터를 이용한 비외과적 투여 및 흉부 절개후 주입 또는 이식 등 외과적 투여방법 모두 가능하나 카테터를 이용한 비외과적 투여방법이 보다 바람직하다. 또한 통상의 방법에 따라 비경구적으로, 예를 들면 직접 병변에 투여하는 것 외에 조절계 줄기세포 이식의 일반적 방법인 혈관 내 주입에 의한 이식도 가능하다. 유효성분의 실제 투여량은 치료하고자 하는 질환, 질환의 중증도, 투여경로, 환자의 체중, 연령 및 성별 등의 여러 관련 인자에 비추어 결정되어야 한다.

[0038] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0039] **실시예 1. 뇌실 내 출혈 모델 동물 준비**

[0040] 뇌실 내 출혈 모델을 만들기 위해, 어미 백서의 꼬리 정맥에서 채취한 총 200 ul의 혈액을, 생후 4일된 신생 백서에게 일산화질소(NO) 흡입 마취 하에 stereotaxic frame을 이용하여 오른쪽, 왼쪽 각각 100 ul씩 31 gauze 주사기로 5분에 걸쳐서 천천히 양측 뇌실 내로 투여하였다. 모델링 후 1일 이후인, 출생 5일째에 뇌실 내 출혈 모델링을 시행 한 신생 백서의 뇌를 7-teslar MRI 을 이용하여 촬영하고, 뇌실 내 출혈의 정도를 확인하였다.

[0041] Brain MRI 이미지는, Image J 프로그램을 이용하여 뇌실의 확장 정도를 volumetric analysis를 시행하여, 전체 뇌실의 volume /전체 뇌의 volume 을 구하였다. 뇌실 내 출혈이 유도된 백서들은 모두 생후 5일 MRI 에서, 정상

백서 (NC)에 비하여, 상당량의 뇌실 내 혈액으로 인한 심각한 뇌실 확장의 소견이 보였다.

[0042] 실시예 2. 뇌실 내 출혈 모델 동물에 제대혈 간엽 줄기세포 조성물 투여

[0043] 출생 6일째에 인체 제대혈에서 추출한 중간엽 줄기세포 1×10^5 개를 10 ul PBS 에 희석하여, NO 흡입 마취 하에 stereotaxic frame을 이용하여, 신생 백서에의 오른쪽 뇌실 내로 천천히 투여하였다.

[0044] 출생 11일째에 모든 신생 백서의 뇌를 7-teslar MRI (T2,Flash)를 이용하여 촬영하여 뇌실 확장 정도를 추적 관찰 하였다.

[0045] 출생 32 일째 마지막으로 뇌 MRI (T2,Flash) 를 촬영하여, 뇌실 확장 정도를 추적 관찰 하였다.

[0046] 실시예 3. 조직 절편의 준비

[0047] 마지막 뇌 MRI 관찰 이후, 신생 백서에게 케타민을 복강 내 주사하여 마취를 시행한 후 31 gauze 주사기로 cistern magna를 tap 하여 CSF 를 채취하여 급속 냉동시켜 -70도에 보관하였다. 사지 고정 후 흉곽을 절개하여 심장과 폐 조직을 드러나게 하여 23 게이지 바늘을 좌심실 내에 고정한 후 우심방을 천자하여 4% paraformaldehyde를 관류시켰다. 이후 skull 을 절개하고, 조심스럽게 뇌 조직을 채취하여 4% 포르말린에 고정 하거나, 혹은 뇌실 주의 부분을 잘라내어 질소 가스를 이용하여 급속 냉동 시켜, -70도에 냉동 보관하였다.

[0048] 실시예 4. 줄기세포 조성물의 뇌실 내 분포

[0049] 붉은 형광을 띠는 PKH26과 Flash MRI 에서 low intensity signal 을 보이는 SPIO (Superparamagnetic iron oxide) 로 세포 표식을 실시하여 치료용 세포제를 뇌실 내 이식한, 뇌실 내 출혈 백서의 뇌조직을 형광현미경으로 관찰하였을 때 치료용 세포제가 뇌 조직에 안착된 소견을 관찰할 수 있었다 (도 1). 또한, 세포 이식 후의 시점인 생후 11일과 생후 32일째 촬영한 뇌 flash MRI 영상을 관찰한 결과, 뇌실 주변과 뇌 조직에 분포된 세포의 low signal intensity 부위가 면역형광으로 관찰한 PKH26 양성 세포의 분포 부위와 일치하였다.

[0050] 실시예 5. 줄기세포 조성물 투여군과 비투여군의 비교 관찰

[0051] 5-1. 뇌량(corpus callosum) 두께의 관찰

[0052] 24시간 동안 고정된 뇌 조직 절편을 파라핀에 포매 시킨 후 5um 의 두께로 잘라 헤마톡시린 에오신 염색하여 광학 현미경 하에서 관찰하고 corpus callosum 의 두께를 bregma level 에서 확인하였다.

[0053] 이후 생후 11일에 추적 관찰한 뇌 MRI 에서, 뇌실 내 출혈 유도된 이후 줄기 세포를 뇌실 내로 투여 받은 백서의 (IVH-M) 경우, 줄기 세포를 투여 받지 않은 백서 (IVH-C)에 비해 뇌실 확장의 정도가 통계적으로 의미 있게 감소하였다 (도 2).

[0054] 위의 줄기세포 투여 받은 군에서 뇌실 확장이 감소되는 소견은 생후 32일 추적 관찰한 뇌 MRI 에서도 지속되었다 뇌조직의 coronal section 을 헤마톡시린 이오신 염색 후 관찰한 뇌량 두께는, 정상 백서 (NC) 에 비하여 뇌실 내 출혈 모델링 백서에서 현저하게 얇아졌다. 그러나, 뇌실 내로 세포 치료제를 투여 받은 IVH-M 군은, 비투여 IVH-C 군에 비하여, 유의하게 뇌량 두께가 두꺼웠다.

[0055] 이로써 뇌실 내 출혈 모델링 이후 지속적으로 심화되는 뇌실의 확장이 뇌실 내 줄기 세포 투여로 인하여 호전되어, 뇌실에 연접한 뇌 실질인 뇌량 두께도 같이 호전되는 것을 관찰 할 수 있었다 (도 3).

[0056] 5-2. 세포의 자살(apoptosis) 정도, 뇌의 gliosis 정도, 뇌 수초화 정도를 측정

[0057] 파라핀을 제거한 조직 절편(Deparaffinized tissue section)에서 면역 형광 염색 방법으로, immunofluorescent terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick end labeling (TUNEL), neuronal specific glial fibrillary acidic protein (GFAP), myelin basic protein (MBP)를 사용하여, 각각 세포의 사멸 정도, 뇌의 gliosis 정도, 뇌 수초화 정도를 측정하였다. 각각 뇌 Bregma에서 +0.95 mm to

-0.11mm 위치에서 3개의 section 을 무작위로 선정하고, 이 중 현미경으로 무작위 부위를 각각 3회 검사하여, 이들의 평균치로 통계적 분석을 시행하였다.

[0058] 1) 줄기세포 조성물 투여시 자멸한 세포 수 감소(TUNEL 염색)

[0059] 뇌 조직의 coronal section 을 면역형광 염색 후 뇌실 주변 조직에서 측정된 TUNEL 양성의 세포 수는, 즉 자멸한 세포의 수는, 정상 백서 (NC) 에 비하여 뇌실 내 출혈 모델링 백서에서 현저하게 증가하였다. 그리고, 자멸사한 세포 수는 줄기 세포를 투여받은 IVH-M 군에서, 투여 받지 않은 IVH-C 군에 비하여 의미 있게 감소하였다 (도 4).

[0060] 2) 줄기세포 조성물 투여시 gliosis 정도 감소(GFAP 염색)

[0061] 뇌의 gliosis 의 정도를 측정된 GFAP 또한 세포 자멸사와 유사한 경향성을 보였다 (도 4).

[0062] 3) 줄기세포 조성물 투여시 수초화 증가(MBP 염색)

[0063] 수초화의 정도를 측정하는 MBP 염색의 intensity 또한, 정상 (NC) 에 비하여 뇌 뇌실 내 출혈 모델링 백서에서 현저하게 감소하였다. 줄기 세포 치료를 받은 IVH-M 군에서는 줄기 세포를 투여 받지 못한 IVH-C 군에 비하여, 뇌실 내 출혈로 인하여 감소된 MBP intensity가 유의하게 증가하였다. 즉, 줄기 세포 투여로 인하여 손상된 수초화의 정도가 유의하게 호전되었음을 알 수 있다 (도 5).

[0064] 5-3. 줄기세포 조성물 투여시 뇌척수액의 염증성 사이토카인 감소

[0065] 급속 냉동한 뇌실 주위 조직과 뇌 척수 액으로는 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 방법으로 염증성 사이토카인 (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α) 을 측정하였다.

[0066] 뇌실 주변의 조직과 뇌 척수 액으로 정량한 염증성 cytokine은 정상 (NC) 에 비하여 뇌 뇌실 내 출혈 모델링 백서에서 현저하게 그 농도가 증가하였다. IVH-M 군에서는 IVH-C 군에 비하여, 뇌실 내 출혈로 인하여 유도된 염증성 cytokine이 유의하게 감소하였다 (도 6). 위의 소견으로, 뇌실 내 출혈 손상으로 인하여 증가한 뇌실 주변 조직의 염증이, 줄기 세포 치료로 인하여 호전됨을 확인할 수 있었다.

[0067] 실시예 6. 제대혈 유래 중간엽 줄기세포와 제대혈 유래 단핵구세포의 효과 비교

[0068] 제대혈 유래 세포의 뇌실 내 출혈 치료 효과에 대한 선행 문헌이 있으므로, 본원 발명의 중간엽 줄기세포의 효과를 제대혈의 가장 많은 분획을 차지하는 단핵구 세포의 효과와 비교하기 위해 하기의 실험을 수행하였다.

[0069] Rat L2 세포를 배양하여, H₂O₂ 를 60분 동안 처리한 이후, 제대혈 유래 중간엽 줄기세포와 제대혈 유래 단핵구 세포를 각각 co-culture 하였다.

[0070] 이후, Rat L2 cell 의 survival 과 L2 cell 에서 분비하는 cytokine을 분석하였을 때, 제대혈 유래 중간엽 줄기세포와 같이 culture 한 L2 cell 에서 (HUM group), 제대혈 유래 단핵구 세포와 같이 culture한 L2 cell (HMN group) 에 비하여 cell 의 survival이 우수하게 나타났다. 또한 restorative function에 작용하는 growth factors 인 VEGF,HGF를 유의하게 더 많이 분비 하고, 또한 염증을 낮추는 immunomodulating effect에 매우 중요한 LIF(leukemia inhibitory factor) 의 분비량이 유의하게 높았다.

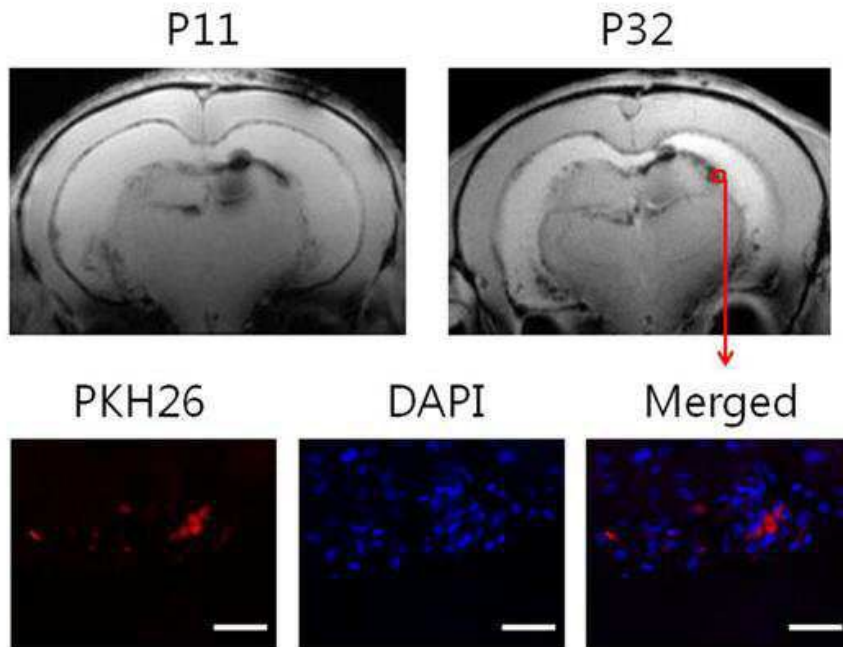
[0071] 이로써, oxidative stress 상황에서 중간엽 줄기세포가 제대혈 유래 단핵구 세포에 비하여 주변 세포의 생존율을 높이고 염증을 낮추는 사이토카인 및 발달과 보호에 작용하는 성장인자들을 유의하게 더 많이 분비하는 것을 알 수 있었다(도 7).

[0072] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해

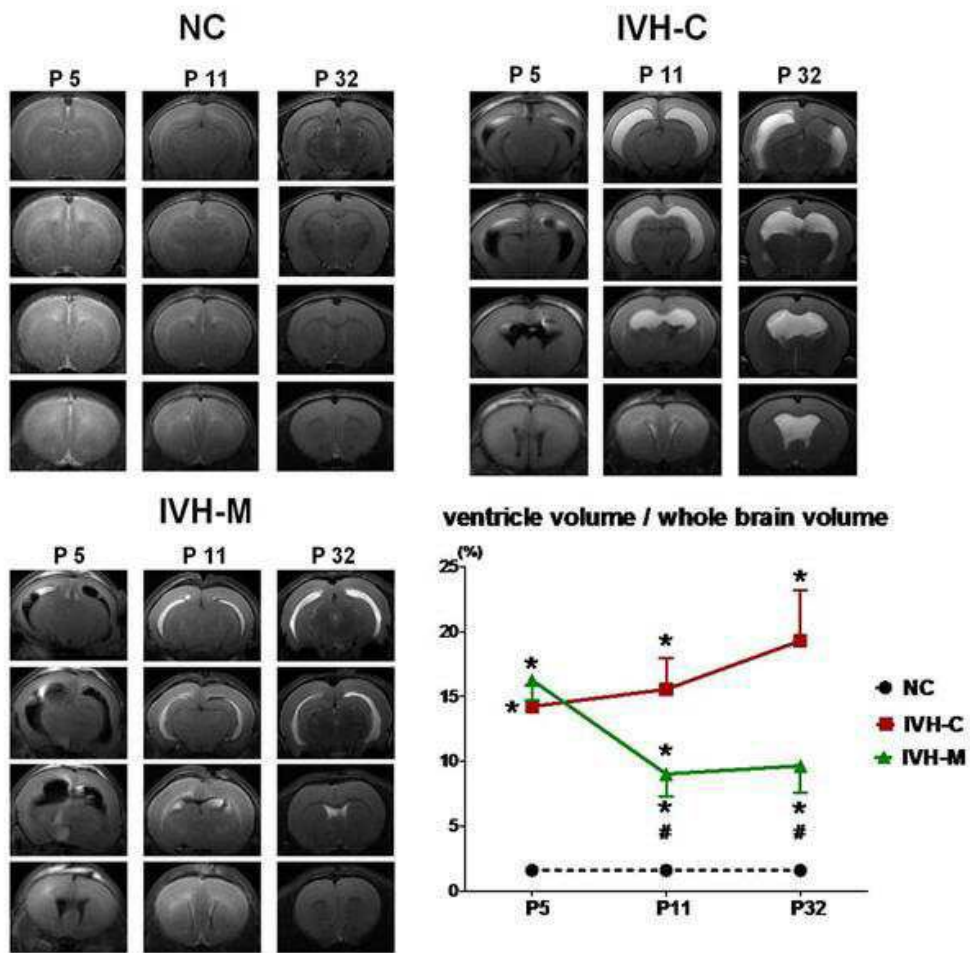
할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며, 한정적이 아닌 것으로 이해해야 한다.

도면

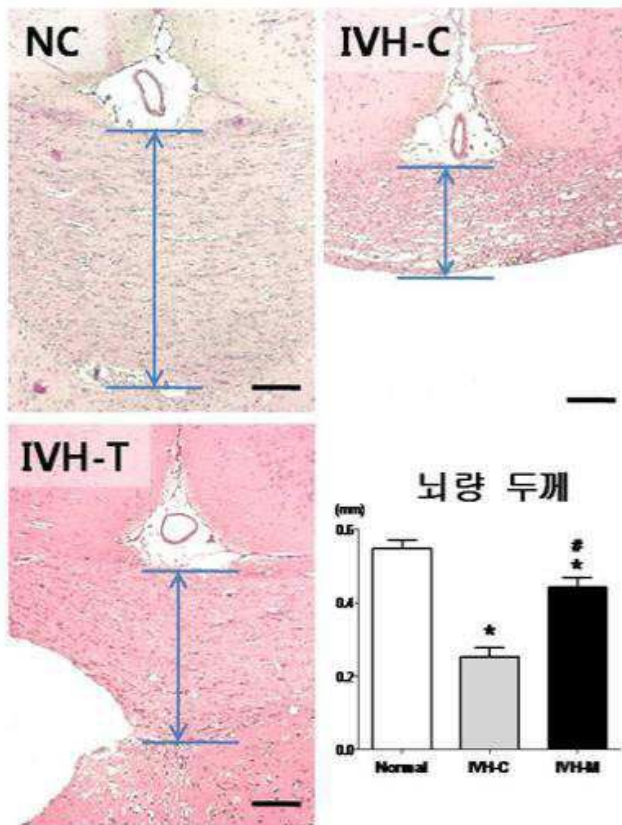
도면1



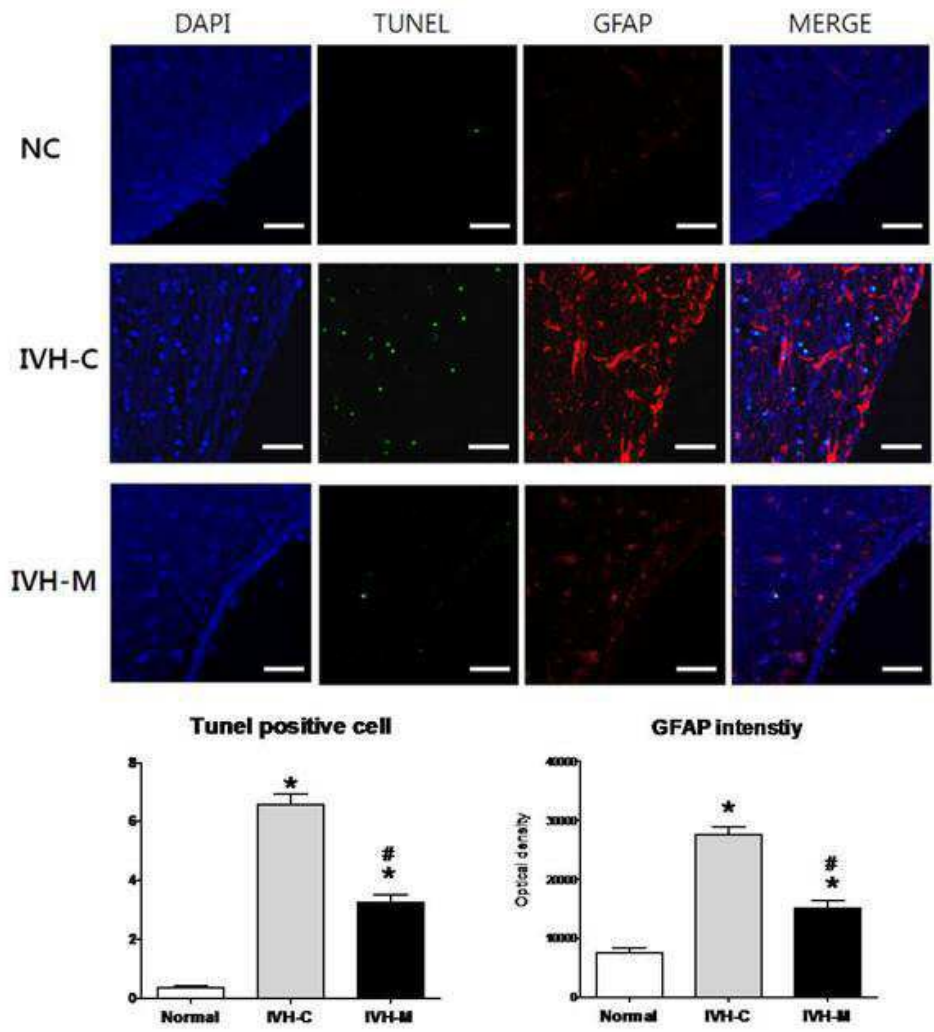
도면2



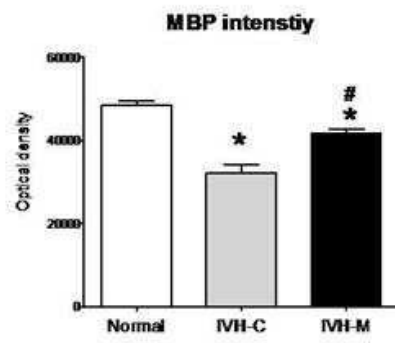
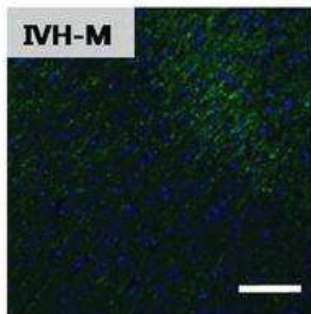
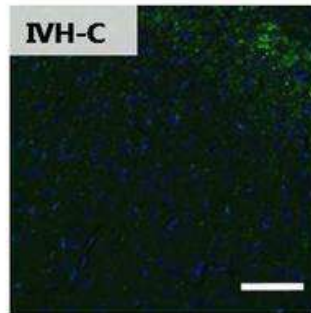
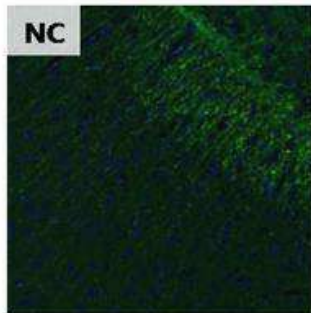
도면3



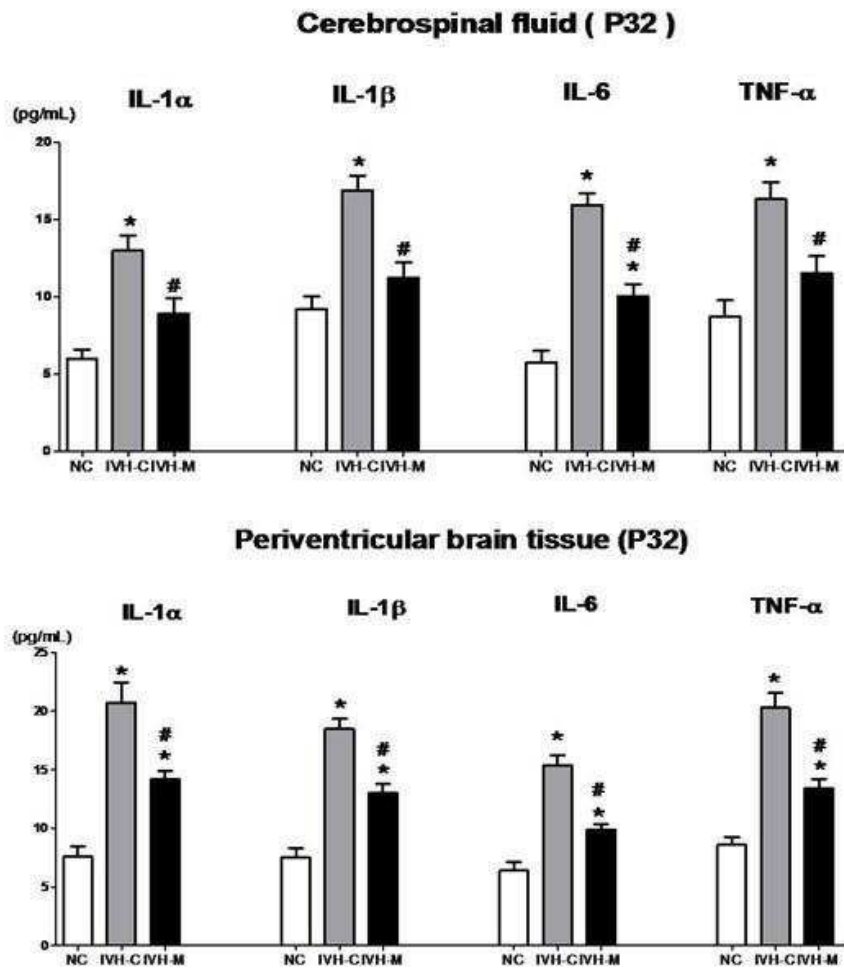
도면4



도면5



도면6



도면7

