(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0042755
(43) 공개일자 2015년04월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/32 (2015.01) *A61K 9/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 35/32 (2013.01)
A61K 9/0014 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0037356(분할)
(22) 출원일자 2015년03월18일
심사청구일자 2015년03월18일
(62) 원출원 특허 10-2013-0106091
원출원일자 2013년09월04일
심사청구일자 2013년09월04일
(30) 우선권주장
1020120097974 2012년09월05일 대한민국(KR)

(71) 출원인
아주대학교산학협력단
경기도 수원시 영통구 월드컵로 206 (원천동)
(72) 발명자
민병현
서울 서초구 효령로68길 33, 101동 201호 (서초동, 서초동아이파크)
박소라
서울 서초구 효령로68길 33, 101동 201호 (서초동, 서초동아이파크)
이수정
경기 의정부시 용현로 143, 104동 405호 (민락동, 산들마을아파트)
(74) 대리인
특허법인태백

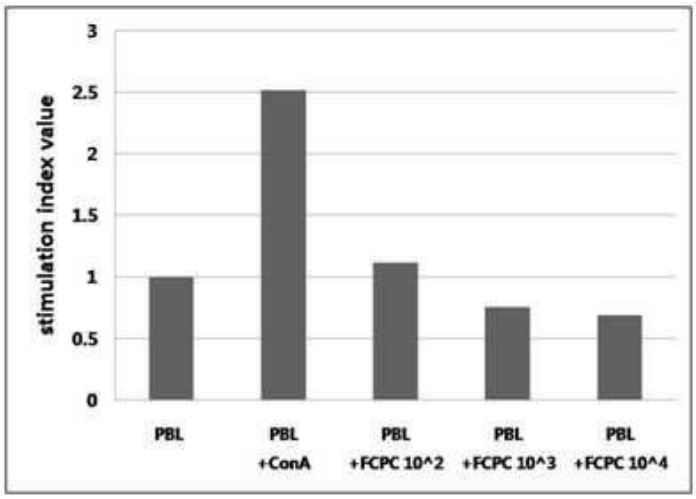
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **태아연골유래 세포를 이용한 자가면역질환 또는 이식거부질환의 예방 및 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 조직 이식 시 발생하는 면역반응을 억제/조절할 수 있는 태아연골유래 세포를 이용한 면역질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 상기 태아연골유래 세포는 면역반응을 일으키지 않고, 오히려 활성화된 림프구의 증식을 억제하고, 상기 활성화 림프구에서 생성되는 면역 싸이토카인의 발현을 제어하는 특성을 지니고 있고, 증식 능력과 다양한 세포조직으로의 분화능력이 성체줄기세포에 비해 월등하여 손상된 조직의 재생과 함께 이식 시 발생할 수 있는 면역반응을 조절할 수 있는 면역조절제로서 유용하게 사용할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 9/0019 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2011-0019730
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 바이오 의료기술개발사업
연구과제명 공학적 장기재생 기술 개발
기 여 율 1/1
주관기관 아주대학교 산학협력단
연구기간 2011.06.01 ~ 2016.05.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

태아연골유래 세포를 유효성분으로 함유하는 자가면역질환 또는 세포, 조직 또는 기관의 이식거부 질환의 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 태아연골유래 세포는 줄기세포의 표면항원 단백질을 발현하는 것을 특징으로 하는 자가면역질환 또는 세포, 조직 또는 기관의 이식거부 질환의 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 3

청구항 2에 있어서, 상기 태아연골유래 세포는 성인의 골수유래 중간엽줄기세포 특이 표면항원인 CD29, CD44, CD90 및 CD105를 발현하면서도, 배아줄기세포 특이 표면항원인 SSEA4와 Oct-4를 발현하는 것을 특징으로 하는 자가면역질환 또는 세포, 조직 또는 기관의 이식거부 질환의 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 태아연골유래 세포는

(a) 태아연골조직에서 연골세포를 분리하여 배양하는 단계;

(b) 상기 (a) 단계에서 분리 배양된 세포에서 중간엽줄기세포와 배아줄기세포의 표면항원 단백질을 동시에 발현하는 세포를 분리하는 단계; 및

(c) 상기 (b) 단계에서 분리된 세포의 증식능 및 다분화 능력을 검증하여 태아연골조직유래 줄기세포원을 수득하는 단계를 거쳐 수득되는 것을 특징으로 하는 자가면역질환 또는 세포, 조직 또는 기관의 이식거부 질환의 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 태아연골유래 세포는 활성화 림프구에서 생성되는 면역 싸이토카인의 발현을 제어하는 것을 특징으로 하는 자가면역질환 또는 세포, 조직 또는 기관의 이식거부 질환의 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 태아연골유래 세포는 면역반응에 관련된 TNF-α, IL-13 또는 IFN-γ의 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는 자가면역질환 또는 세포, 조직 또는 기관의 이식거부 질환의 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 태아연골유래 세포는 항염증 싸이토카인인 IL-10의 발현에 영향을 주지 않거나 IL-10의 발현을 증가시킴으로써 면역활성을 조절하는 것을 특징으로 하는 자가면역질환 또는 세포, 조직 또는 기관의 이식거부 질환의 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 조성물은 태아연골유래 세포 추출물 또는 분비물을 포함하는 것을 특징으로 하는 자가면역질환 또는 세포, 조직 또는 기관의 이식거부 질환의 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 9

청구항 1에 있어서, 상기 자가면역질환 또는 세포, 조직 또는 기관의 이식거부 질환은 인슐린 의존성 당뇨병, 크론병, 다발성 경화증, 피부경화증, 중증근육무력증, 하시모토병, 자가면역 혈구감소증, 쇼그렌 증후군 및 전

신홍반루푸스로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 자가면역질환 또는 세포, 조직 또는 기관의 이식거부 질환의 예방 또는 치료용 약학조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 손상된 조직을 재생하기 위한 새로운 면역조절용 조성물로서, 기존에 알려진 성체 줄기세포보다 증식력이나 세포 표현형 유지가 뛰어난 태아연골유래 세포를 이용한 면역질환의 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 난치성 조직 손상에 대한 치료 방법으로서 최근 줄기세포 및 조직공학을 이용한 이식치료법이 활발히 개발되고 있다. 하지만, 이러한 이식치료 기법으로는 치료효과가 뛰어나고 인체의 면역반응을 일으키지 않는 안정한 세포치료제를 개발하기 어렵다는 문제가 있다. 그 동안 여러 가지 성체 줄기세포를 개발하여 세포치료제로써 활용하기 위한 시도들이 진행되고 있지만, 면역반응이 없다는 것만 밝혀졌을 뿐 면역조절능력에 대한 확인은 아직 부분적으로만 진행되고 있다.

[0003] 성체줄기세포는 지방, 연골, 골, 근육세포 등으로 분화가 가능한 줄기세포로 증식이 잘되어 조직재생을 위한 임상적 가치가 높은 세포이다. 기존에 중간엽줄기세포(mesenchymal stem cells)와 같은 특정 성체줄기세포가 자체로 면역반응을 일으키지 않고 면역억제능력이 있다는 보고(Placenta-Derived Multipotent Cells Exhibit Immunosuppressive Properties That Are Enhanced in the Presence of Interferon-γ, STEM CELLS,2006)가 나오고 있지만, 아직까지 면역조절능력을 가진 줄기세포에 대한 연구보고는 없는 상황이다.

[0004] 생체의 면역작용을 강화하는 약물로 알려진 면역조절제는 여러 단계에서 면역응답기능에 장애가 생긴다고 증명된 암환자의 면역학적 배경을 바탕으로 치료에 면역촉진제 등을 사용하여 암환자의 면역기능을 증강하고 암에 대한 면역저항성도 유도하는, 이른바 비특이적 면역요법이 널리 시행되고 있다. 생균을 사용하는 경우, 역가의 안정성이나 부작용도 많으므로 정제한 균체성분으로서 세포벽 골격성분(CWS ; cell wall skeleton)이 자주 쓰인다. 면역조절제는 주로 암치료를 목적으로 사용되고 있다.

[0005] 따라서, 줄기세포 및 조직공학을 이용한 이식치료법을 시행 시 인체 내의 불필요한 면역반응을 선별적으로 조절할 수 있는 바람직한 면역조절제의 개발이 매우 중요한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 면역반응을 일으키지 않고, 오히려 활성화된 림프구의 증식을 억제할 수 있는 태아연골유래 세포를 이용한 면역질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명자는 태아연골조직으로부터 분리한 세포가 손상된 조직의 재생과 함께 이식 시 발생할 수 있는 면역반응을 조절함으로써 기존의 줄기세포의 한계점을 극복할 수 있다는 점을 밝혀내어 임상적으로 활용 가능한 면역조절용 조성물을 개발하기에 이르렀다.

[0008] 본 발명은 태아연골유래 세포를 유효성분으로 함유하는 면역질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0009] 상기 태아연골유래 세포는 줄기세포의 표면항원 단백질을 발현할 수 있으며, 일실시예로는 상기 태아연골유래 세포는 성인의 골수유래 중간엽줄기세포 특이 표면항원인 CD29, CD44, CD90 및 CD105를 발현하면서도, 배아줄기세포 특이 표면항원인 SSEA4와 Oct-4를 발현할 수 있다.

[0010] 상기 태아연골유래 세포는 활성화 림프구에서 생성되는 면역 싸이토카인의 발현을 제어할 수 있다.

[0011] 보다 상세하게는, 상기 태아연골유래 세포는 면역반응 또는 염증반응에 관련된 TNF-α, IL-13, IFN-γ의 발현은 억제할 수 있다. 또한, 상기 태아연골유래 세포는 항염증 싸이토카인인 IL-10의 발현은 영향을 주지 않거나 증

가시킴으로써 면역활성을 조절할 수 있다.

[0012] 상기 면역 조절용 조성물은 태아연골유래 세포 추출물(cell extracts) 또는 분비물(secreted molecules)을 포함할 수 있다.

[0013] 상기 태아연골유래 세포는 (a) 태아연골조직에서 연골세포를 분리하여 배양하는 단계; (b) 상기 (a) 단계에서 분리 배양된 세포에서 줄기세포의 표면항원 단백질을 발현하는 세포를 분리하는 단계; 및 (c) 상기 (b) 단계에서 분리된 세포의 증식능 및 다분화 능력을 확인하여 태아연골유래 줄기세포를 검증하는 단계를 통해 수득할 수 있다.

[0014] 상기 태아연골유래 세포의 면역조절은 (a) 태아연골조직에서 분리한 세포와 동종 전혈에서 분리한 림프구를 함께 배양 시 세포에 대한 림프구의 증식여부를 분석하는 방법, (b) 면역인터페론으로 알려진 인터페론 감마에 반응시킨 태아연골조직에서 분리한 세포의 특성을 분석하는 방법, 또는 (c) 상기 (a) 단계에서 배양 시 분비되는 면역조절 싸이토카인을 확인하는 방법 중 어느 하나 또는 둘 이상의 방법을 통해 분석할 수 있다.

발명의 효과

[0015] 본 발명에 따른 태아연골유래 세포는 면역반응을 일으키지 않고, 오히려 활성화된 림프구의 증식을 억제하고, 상기 활성화 림프구에서 생성되는 면역 싸이토카인의 발현을 제어하는 특성을 지니고 있고, 증식 능력과 다양한 세포조직으로의 분화능력이 성체줄기세포에 비해 월등하여 손상된 조직의 재생과 함께 이식 시 발생할 수 있는 면역반응을 조절할 수 있는 면역조절제로서 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 증식을 억제시킨 태아연골유래 세포와 동종의 혈액에서 분리한 림프구을 혼합배양 후 림프구의 증식을 분석한 결과 태아연골유래 세포가 면역반응을 유발하지 않음을 보여주는 것이다.

도 2는 증식을 억제시킨 태아연골유래 세포와 성인연골세포를 각각 ConA를 이용한 혼합림프구반응에 처리한 후 림프구의 증식을 분석한 결과 태아연골유래 세포가 콘카나발린 A에 의한 림프구의 활성화를 억제함을 보여주는 것이다.

도 3은 인터페론 자극 유무에 따른 태아연골유래 세포의 면역원성을 유세포분석기를 통하여 분석한 결과 태아연골유래 세포가 인터페론 감마(IFN-γ)에 의해 면역원성이 활성화되지 않음을 보여주는 것이다.

도 4는 증식을 억제시킨 태아연골유래 세포와 성인연골세포를 각각 콘카나발린 A를 이용한 혼합림프구 반응에 처리한 결과 태아연골유래 세포가 림프구에서 발현이 증가되는 면역 싸이토카인의 발현을 조절함을 보여주는 것이다.

도 5는 동물모델을 이용한 태아연골유래 세포의 염증 완화 효과를 보여주는 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0018] 본 발명은 손상된 조직의 재생과 함께 이식 시 발생할 수 있는 면역반응을 조절하여 기존의 줄기세포의 한계점을 극복할 수 있는 태아연골조직유래 세포를 유효성분으로 이용한 면역질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0019] 즉, 태아연골조직으로부터 세포를 분리하여 동종의 림프구와 반응시켜 면역반응을 분석한 결과, 면역반응을 일으키지 않고 면역 조절 능력이 있음을 확인함으로써 임상적으로 활용 가능한 면역질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0020] 상기 태아연골유래 세포는 (a) 태아연골조직에서 분리한 세포와 동종 전혈에서 분리한 림프구를 함께 배양 시 세포에 대한 림프구의 증식여부를 확인하거나, (b) 면역인터페론으로 알려진 인터페론 감마에 반응시킨 태아연골조직에서 분리한 세포의 특성을 분석하거나, 또는 (c) 상기 (a) 단계에서 배양 시 분비되는 면역조절 싸이토카인을 확인하는 등의 방법으로 면역조절 기능을 확인할 수 있지만, 태아연골조직유래 세포의 면역조절 기능 여부 분석은 당업자에게 알려진 통상의 방법에 의해서도 분석 가능하므로, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0021] 상기 태아연골유래 세포는 성인의 골수유래 중간엽줄기세포 특이 표면항원인 CD29, CD44, CD90 및 CD105를 발현

하면서도, 배아줄기세포 특이 표면항원인 SSEA4와 Oct-4를 발현할 수 있다.

[0022] 상기 태아연골유래 세포는 (a) 태아연골조직에서 연골세포를 분리하여 배양하는 단계; (b) 상기 (a) 단계에서 분리 배양된 세포에서 줄기세포의 표면항원 단백질을 발현하는 세포를 분리하는 단계; 및 (c) 상기 (b) 단계에서 분리된 세포의 증식능 및 다분화 능력을 확인하여 태아연골유래 줄기세포를 검증하는 단계를 통해 수득할 수 있다.

[0023] 상기 태아연골조직에서 분리된 연골세포는 12-15주의 유산된 태아로부터 채취하여 콜라게나아제(Collagenase)를 사용하거나 마쇄(trituration)를 통해 수득할 수 있다.

[0024] 상기 태아연골유래 세포는 줄기세포의 표면항원 단백질을 발현할 수 있으며, 일실시예로는 상기 태아연골유래 세포는 성인의 골수유래 중간엽줄기세포 특이 표면항원인 CD29, CD44, CD90 및 CD105를 발현하면서도, 배아줄기세포 특이 표면항원인 SSEA4와 Oct-4를 발현할 수 있다.

[0025] 상기 태아연골유래 세포는 활성화 림프구에서 생성되는 면역 싸이토카인의 발현을 제어할 수 있다. 보다 상세하게는, 상기 태아연골유래 세포는 면역반응 또는 염증반응에 관련된 TNF-α, IL-13, IFN-γ의 발현은 억제할 수 있다. 또한, 상기 태아연골유래 세포는 항염증 싸이토카인인 IL-10의 발현은 영향을 주지 않거나 증가시킴으로써 면역활성을 조절할 수 있다.

[0026] 일실시예로서, 상기 태아연골유래 세포에서의 중간엽줄기세포의 표면항원과 배아줄기세포의 표면항원의 동시 발현은 유세포분석(Fluorescent-Assisted Cell Sorting; FACS) 및 자기활성세포선별(Magnetic-Activated Cell Sorting; MACS) 방법을 포함한 면역화학적 분리 방법을 통해 분석할 수 있다.

[0027] 상기 태아연골유래 세포는 연골, 골, 근육, 피부 및 지방 세포를 포함하는 근골격계 조직세포; 신경세포; 간세포; 췌장세포; 심근세포; 및 혈관세포 중 어느 하나로 분화하는 다분화 능력을 가질 수 있다.

[0028] 기존에 알려진 면역조절제는 주로 암치료에 국한되어 사용되고 있어 조직 이식이나 조직재생에 관한 치료제 역할은 수행할 수 없는 한계가 있는데, 본 발명의 태아연골유래 세포는 세포치료제로써 많이 연구되는 성체줄기세포보다 증식력이나 분화능이 뛰어나며, 동종에 면역반응을 일으키지 않고 면역반응을 조절할 수 있는 능력이 있다. 즉, 일 실시예에 따르면, 상기 태아연골유래 세포는 동종의 림프구에 자극을 주지 않고, 림프구 활성화를 유도할 경우에는 오히려 림프구의 증식이 감소되며, 특히 면역반응에 연관된 TNF-α, IL-13, IFN-γ의 발현은 억제하나 항염증 싸이토카인으로 알려진 IL-10의 발현은 영향을 주지 않거나 증가시킴으로써 면역활성이 조절되는 특성을 가지고 있다.

[0029] 본 발명에 따른 면역조절용 조성물은 세포치료제를 포함하지만, 이에 한정되지 않고 다양한 치료제 형태로 활용될 수 있다. 상세하게는 태아연골유래 세포 추출물(cell extracts) 또는 분비물(secreted molecules)을 포함할 수도 있다. 태아연골유래 세포 추출물(cell extracts) 또는 분비물(secreted molecules)은 태아연골유래 세포로부터 얻어질 수 있는 모든 형태의 것을 의미할 수 있으며, 세포 자체뿐만 아니라, 그 현탁액 내지 배양액 또는 이들의 농축물, 페이스트상물, 건조물, 희석물 또는 상기 세포의 대사를 통해 만들어지는 모든 생성물을 의미할 수 있다.

[0030] 상기 면역질환은 자가면역질환, 염증성 질환 및 세포, 조직 또는 기관의 이식거부 질환일 수 있고, 상세하게는 관절염, 자가면역성 간염, 류마티스성 관절염, 골관절염, 인슐린 의존성 당뇨병, 궤양성 대장염, 크론병, 다발성 경화증, 자가면역성 심근염, 피부경화증, 중증근육무력증, 다발성 근육염/피부 근육염, 하시모토병, 자가면역 혈구감소증, 쇼그렌 증후군, 혈관염 증후군 및 전신홍반루푸스일 수 있지만, 이에 제한되지는 않는다.

[0031] 본 발명의 일실시예의 면역질환의 예방 또는 치료용 조성물은 약제학적으로 허용가능한 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 약제학적으로 허용가능한 담체로서 혼합하여 사용할 수 있다. 주사제의 경우는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장화제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있다. 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수화 투약 형태로 제조할 수 있다. 또한, 국소 투여 시에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다. 그러나, 본 발명은 이에 제한되는 것이 아니며, 본 발명의 기술분야에 속하는 당업자라면 다양한 형태로 본 발명의 면역질환의 예방 또는 치료용 조성물이 제제화될 수 있으며, 다양한 담체나 첨가제들을 포함

할 수 있음을 이해할 것이다.

[0032] 상기 조성물은 면역질환의 증상 정도에 따라 투여 방법이 결정되는데, 본 발명의 조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내 (intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다. 또한, 상기 조성물 중 유효성분의 투여량은 투여경로, 질병의 정도, 환자의 나이, 성별, 체중 등에 따라 달라질 수 있으며, 일일 1회 내지 수회 투여할 수 있다.

[0033] 본 발명에서 있어서, "줄기세포"란 여러 종류의 신체 조직으로 분화할 수 있는 능력을 가진 세포, 즉 미분화세포이다. 상기 줄기세포에는 사람의 배아를 이용해 만들 수 있는 배아줄기세포(전분화능줄기세포; pluripotent stem cells)와 혈구세포를 끊임없이 만드는 골수세포와 같은 성체줄기세포(다분화능줄기세포; multipotent stem cells)가 있다.

[0034] 본 발명에서 있어서, "배아줄기세포(Embryonic Stem Cell)"란 수정한지 14일이 안된 배아기의 세포로서, 장차 인체를 이루는 모든 세포와 조직으로 분화할 수 있기 때문에 '전능세포' 혹은 '만능세포'로 불린다. 수정란은 세포분열을 통해 배반포를 형성하는데 그 안쪽에 내세포괴라는 세포덩어리가 있어 이것이 배아를 형성한다. 이 내세포괴의 세포를 배반포로부터 분리하여 배양하면, 분화는 일어나지 않지만 분화 능력은 여전히 가지는 배아줄기세포가 된다.

[0035] 본 발명에서 있어서, "성체줄기세포(Adult Stem Cell)"란 제대혈(탯줄혈액)이나 다 자란 성인의 골수와 혈액 등에서 추출해낸 것으로, 뼈와 간, 혈액 등 구체적 장기의 세포로 분화되기 직전의 원시세포다. 여기에는 조혈모세포(Hematopoietic Stem Cell)와 재생의학의 재료로 각광받고 있는 중간엽줄기세포(Mesenchymal Stem Cell), 신경줄기세포(Neural stem cell) 등이 있다. 이밖에 간이나 표피, 췌장 등에도 줄기세포가 있다. 상기 성체 줄기세포는 증식이 어렵고 쉽게 분화되는 경향이 강한 대신에 여러 종류의 성체 줄기세포를 사용하여 실제 의학에서 필요로 하는 장기 재생을 할 수 있을 뿐 아니라 이식된 후 각 장기의 특성에 맞게 분화할 수 있는 특성을 지니고 있다.

[0036] 본 발명에 있어서, "중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell, MSC)"는 뼈(bone), 연골(cartilage), 지방(fat), 힘줄(건), 신경 조직(nerve tissue), 섬유아세포(fibroblast) 및 근육 세포(muscle cell) 등 구체적인 장기의 세포로 분화되기 전의 다분화 전구 세포 (multipotent progenitor)를 말한다.

[0037] 본 발명에서 있어서, "세포치료제"는 사람으로부터 분리, 배양 및 특수한 저작을 통해 제조된 세포 및 조직으로 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품(미국 FDA규정)으로서, 세포 혹은 조직의 기능을 복원시키기 위하여 살아있는 자가, 동종, 또는 이종세포를 체외에서 증식, 선별하거나 다른 방법으로 세포의 생물학적 특성을 변화시키는 등의 일련의 행위를 통하여 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품을 지칭한다. 세포치료제는 세포의 분화정도에 따라 크게 체세포치료제, 줄기세포치료제로 분류되며 본 발명은 특히 줄기세포치료제에 관한 것이다.

[0038] 이하, 본 발명을 실시예에 기초하여 보다 상세히 기술한다. 본 발명의 하기 실시예는 본 발명을 구체화하기 위한 것일 뿐 본 발명의 권리범위를 제한하거나 한정하는 것이 아님은 물론이다. 본 발명의 상세한 설명 및 실시예로부터 본 발명이 속하는 기술분야의 전문가가 용이하게 유추할 수 있는 것은 본 발명의 권리범위에 속하는 것으로 해석된다. 본 발명에 인용된 참고문헌은 본 발명에 참고로서 통합된다.

[0039]

[0040] **실시예 1. 태아연골유래 세포에 의한 림프구의 반응 확인**

[0041] 태아연골유래 세포와 인간말초혈액유래 림프구의 분리 및 배양을 위해 아주대학교 병원의 윤리위원회(IRB) 승인을 득하였으며, 태아연골유래 세포는 산본제일병원 또는 아주대병원의 산모로부터 수술 시 동의서를 받은 후 태아의 연골을 채취하였고, 인간말초혈액은 기증자 모집공고 후 건강한 기증자로부터 채혈하여 림프구를 분리하였다.

[0042] 태아연골유래 세포의 분리 방법 및 배양은 이전에 특허출원된 특허출원 제2013-0090233호[태아연골조직유래 줄

기세포원 및 이를 포함하는 세포치료제]에 상세 기술된 내용과 같이 수행하였다. 즉, 채취된 연골 조직은 인산완충염식염수(PBS)로 수 차례 세척 후 잘게 잘라 0.1% 콜라게나아제(collagenase), 1% 소혈청(fetal bovine serum, FBS)이 함유된 배양배지(DMEM)를 처리하여 37℃, 5% CO_2 조건의 인큐베이터에서 12시간 방치하여 세포를 분리하였다. 콜라게나아제에 의해 분리된 세포는 10% FBS가 함유된 배양배지로 세척하였으며 그 방법은 다음과 같다. 배양배지에 부유된 세포를 1700 rpm에서 10분간 원심분리 후 상층액을 제거하고 모아진 세포를 획득한 후 배양배지에 다시 부유시켰다. 이때 일부 세포를 트립판 블루(trypan Blue)로 염색 후 광학 현미경 하에서 혈구계수판을 이용하여 세포수를 측정하였다. 배양배지에 부유된 세포를 배양용기에 $8\times10^4/cm^2$의 농도로 분주한 후 37℃, 5% CO_2 조건의 인큐베이터에서 배양하였다. 계대배양은 세포가 배양용기의 80~90% 정도를 채웠을 때 이루어졌다.

[0043] 특허출원 제2013-0090233호에 개시된 바와 같이, 상기 얻어진 태아연골유래 세포는 유세포분석기 (FACScanto Ⅱ)를 이용한 분석 결과, 골수유래 중간엽 줄기세포의 세포표면인자로 널리 알려진 CD29(Integrin β1 chain), CD44(HA receptor), CD 90(Thy-1), CD105(Endoglin)를 높은 수준으로 발현하였으며, 또한 배아유래 줄기세포의 특이 마커인 SSEA-4와 Oct-4을 발현하는 것으로 확인되었다.

[0044] 그리고, 말초혈액유래 림프구의 분리는 피콜(Ficoll)을 사용하여 일반적으로 전혈에서 림프구를 분리하는 방법을 사용하였다.

[0045] 태아연골유래 세포에 의한 림프구의 반응을 확인하기 위하여 두 세포를 함께 배양하였다. 이때 태아연골유래 세포는 감마선(3000rad, 5분)을 처리하여 증식을 억제한 후 96well plate에 세포수를 10^2, 10^3 그리고 10^4개로 하여 분주하였다. 태아연골유래 세포 배양 16시간 후에 동종혈액에서 분리한 림프구를 같은 plate에 10^5개로 분주하여 4일간 함께 배양하였다. 이때, 태아연골유래 세포와 림프구의 세포 분주 비율을 1:1000, 1:100 그리고 1:10로 하였다. 그리고 분리된 림프구가 정상적으로 활성하는지를 확인하는 방법으로 림프구만 넣은 그룹 중 활성을 유도할 수 있도록 콘카나발린 A(concanavalin A; T cell mitogen)를 10㎍/㎖ 함께 넣어 4일간 배양하였다. 그 후에 부유해 있는 림프구와 상층액을 함께 채취하여 BrdU assay(Cell proliferation ELISA, BrdU, Roche Diagnostice, Germany)를 진행하였다.

[0046] 콘카나발린 A를 처리한 림프구는 처리하지 않는 림프구보다 증식이 증가됨을 보였다. 이것은 분리된 림프구가 정상적으로 활성화됨을 알 수 있었다. 그리고 태아연골유래 세포를 함께 처리한 그룹의 경우 림프구가 증식하지 않는다는 것을 확인하였다(도 1 참조). 이는 태아연골유래 세포에 의해서는 림프구를 활성화시키지 않는 특성을 지닌 것으로 판단되었다.

[0047]

[0048] **실시예 2. 태아연골유래 세포에 의한 말초혈액유래 림프구의 증식 감소/억제확인**

[0049] 태아연골유래 세포, 성인연골세포와 인간말초혈액유래 림프구의 분리 및 배양을 위해 아주대학교 병원의 윤리위원회(IRB) 승인을 득하였으며, 태아연골유래 세포는 산본제일병원 또는 아주대병원의 산모로부터 수술 시 동의서를 받은 후 태아의 연골을 채취하였고, 성인연골세포는 아주대병원 정형외과에서 인공연골 치환술을 받는 환자로부터 수술 시 동의서를 받은 후 연골조직을 채취하였다. 인간말초혈액은 기증자 모집공고 후 건강한 기증자로부터 채혈하여 림프구를 분리하였다.

[0050] 태아연골유래 세포의 분리 방법 및 배양은 앞선 실시예와 동일하게 수행하였으며, 말초혈액유래림프구의 분리는 피콜(Ficoll)을 사용하여 일반적으로 전혈에서 림프구를 분리하는 방법을 사용하였다.

[0051] 태아연골유래 세포의 림프구 증식 억제를 확인하기 위한 방법으로 혼합림프구 반응을 시행하였다. 이때 태아연골유래 세포는 감마선(3000rad, 5분)을 처리하여 증식을 억제한 후 96 well plate에 세포수를 10^3 그리고 10^4개로 하여 분주하였다. 태아연골유래 세포 배양 16시간 후에 동종혈액에서 분리한 림프구를 같은 plate에 10^5개 분주하여 4일간 함께 배양하였다. 이때, 태아연골유래 세포와 림프구의 세포 분주 비율을 1:100과 1:10으로 하였다. 그리고 림프구의 활성을 유도할 수 있도록 콘카나발린 A (T cell mitogen)를 10㎍/㎖ 함께 넣어 4일간 배양하였다. 그 후에 부유해 있는 림프구와 상층액을 함께 채취하여 BrdU assay(Cell proliferation ELISA, BrdU, Roche Diagnostice, Germany)를 진행하였다. 그리고, 비교군으로 사용된 성인연골세포 또한 같은 방법을 사용하여 실험을 진행하였다.

[0052] 콘카나발린 A를 처리한 림프구는 처리하지 않는 림프구보다 증식이 증가됨을 보였다. 그리고 태아연골유래 세포를 함께 처리한 그룹의 경우 태아연골유래 세포의 수가 증가할수록 림프구의 증식이 감소한 것을 확인하였다(도 2 참조). 태아연골유래 세포가 콘카나발린 A로 활성화된 림프구의 증식을 억제할 수 있는 특성을 지닌 것으로 판단되었다. 반면에 성인연골세포의 경우 림프구가 활성화되어 증식됨을 보였다. 이는 성인연골세포의 경우 림프구 증식을 억제하는 능력이 없다는 것을 알 수 있다.

[0053]

[0054] **실시예 3. 태아연골유래 세포의 면역원성 확인**

[0055] 면역인터페론으로 알려진 인터페론 감마(IFN-γ)를 200 Units/ml로 7일간 함께 처리함으로써 태아연골유래 세포에 세포매개성 면역반응을 유도한 후 태아연골유래 세포 표면의 특성을 유세포분석기를 통하여 확인하였다.

[0056] 백혈구의 1형으로 장기이식 시 타인의 장기가 체내에 들어오면 인체에서 이물로 인식하여 체외로 방출하려고 하며 심한 거부반응을 일으키는 것으로 알려진 사람백혈구항원(human leukocyte antigen, HLA) ABC와 DR을 분석하였다. 그 결과 태아연골유래 세포는 인터페론 자극에 상관없이 사람 백혈구항원이 나타나지 않는 것을 확인하였다(도 3 참조).

[0057] 또한, 면역반응에서 항원제시세포의 T세포로 신호전달 유도 시 활성화되는 공동자극 분자인 CD80, CD86 (B7.1, B7.2)의 활성이 나타나는지를 분석한 결과, CD80에서는 변화가 없음을 확인하였다(도 3 참조).

[0058]

[0059] **실시예 4. 태아연골유래 세포의 싸이토카인 생성**

[0060] 앞선 결과들을 통하여 태아연골유래 세포가 면역반응을 일으킬 수 있는 항원을 가지고 있지 않고, 동종 림프구의 증식을 억제하는 것을 확인하였다. 다음 실험으로는 태아연골유래 세포의 싸이토카인 생성을 확인하기 위하여 혼합림프구 반응을 시행하였다. 이때 태아연골유래 세포는 감마선(3000rad, 5분)을 처리하여 증식을 억제한 후 12 well plate에 세포수를 10^5 그리고 10^6개로 하여 분주하였다. 16시간 후에 분리한 림프구를 10^6 분주하였다. 이때, 태아연골유래 세포와 림프구의 세포 분주 비율을 1:10 그리고 1:1로 하였다. 그리고 림프구의 활성을 유도할 수 있도록 콘카나발린 A(T cell mitogen)를 10㎍/㎖ 함께 넣어 4일간 배양하였다. 비교군으로는 동종 림프구와 콘카나발린 A를 처리한 림프구, 그리고 태아연골유래 세포를 배양한 것으로 하였다. 배양 4일 후 상층액을 모은 후 부유해 있는 림프구를 제거하기 위하여 2000rpm, 5분간 원심분리 후 다시 상층액을 모아 싸이토카인-ELISA 분석(eBioscience, Ready-SET-Go ELISA set)을 진행하였다.

[0061] 급성면역반응이나 염증반응에 나타나는 싸이토카인인 종양괴사인자-알파(Tumor necrosis factor-alpha, TNF-α)는 콘카나발린 A에 의하여 활성화된 림프구 그룹에서는 생성이 되었지만, 태아연골유래 세포와 함께 배양한 그룹에서는 생성되지 않는 것을 확인하였다(도 4(A) 참조).

[0062] 또한, 활성화 보조성 T세포(helper T cell)에서 생성하는 림포카인인 인터루킨-13(interleukin-13, IL-13)과 염증반응이나 면역자극에 의해 T세포에서 생성되는 인터페론-감마(interferon-gamma, IFN-γ)의 경우, 태아연골유래 세포의 수와 림프구 수의 비율이 1:10보다 1:1의 경우 생산량이 감소하는 것을 확인하였다(도 4(B), 도 4(C) 참조).

[0063] 조절 T세포(regulatory T cell)이나 수지상세포에서 생성하는 인터루킨-10(interleukin-10, IL-10)은 자기조직을 공격하는 면역세포를 억제시켜 면역관용을 유도하여 항염증제로 활용이 되는 싸이토카인으로서, 태아연골유래 세포와 림프구를 반응시킬 경우 태아연골유래 세포의 비율이 커질수록 인터루킨-10의 생산량이 증가됨을 확인하였다(도 4(D) 참조).

[0064] 동일한 방법으로 성인의 골수에서 분리한 세포를 림프구와 반응시킬 경우, 태아연골유래 세포와 동일한 경향으로 인터페론-감마의 생성이 감소됨을 확인하였다(도 4(E) 참조). 하지만 면역관용에 작용하는 인터루킨-10의 생성은 세포 수가 증가할수록 감소함을 보였다(도 4(F) 참조).

[0065] **실시예 5. 태아연골유래 세포의 염증 부종 완화 효과**

[0066] 앞선 결과들을 통하여 태아연골유래 세포의 면역 관용을 확인할 수 있었고, 항염증인자인 인터루킨-10(interleukin-10, IL-10)이 증가되고 염증인자인 종양괴사인자-알파(Tumor necrosis factor-alpha, TNF-α)

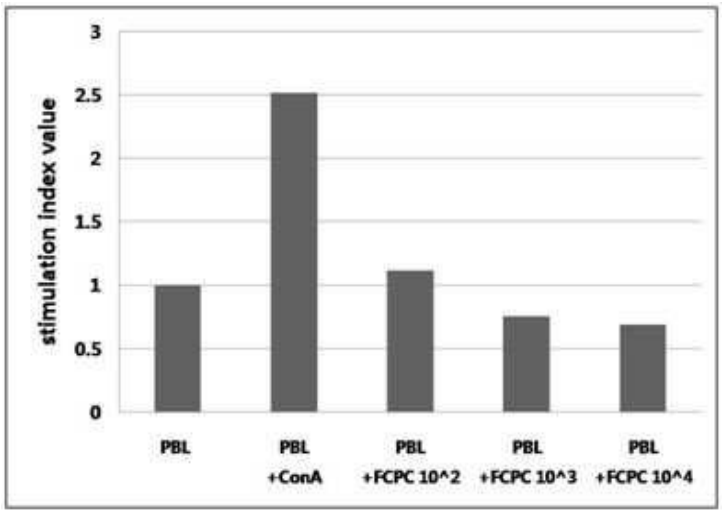
와 인터페론-감마(Interferon-gamma, IFN-γ)가 감소하는 것을 보였다. 다음 실험으로는 동물모델을 이용하여 태아연골유래 세포의 염증 완화 효과를 확인하였다. 랫트(Rat)의 무릎 관절강 내에 세포성 면역반응을 유도하는 물질인 완전프로인트항원보강제(Complete Freund's adjuvant, CFA)를 인슐린 주사기를 이용하여 100㎍의 함량인 100㎕를 주입하여 염증을 유도하였다. 완전프로인트항원보강제 주입 후 4일째 태아연골유래 세포 $5x10^6$ cells를 50㎕으로 만들어 인슐린 주사기를 이용하여 동일한 위치에 주입하였다. 비교군으로는 염증을 유도하지 않은 정상 랫트, 완전프로인트항원보강제와 태아연골유래 세포가 아닌 식염수(Phosphate buffered saline, PBS)를 주입한 랫트, 완전프로인트항원보강제 주입하여 염증을 유도한 후 아무것도 넣지 않은 랫트, 그리고 동일방법으로 염증 유도 후 임상에서 사용되는 염증 치료제인 트리암시놀론(Triamcinolone)을 0.5mg을 주입한 랫트로 하였다. 이때 모든 그룹에서는 동일한 양을 주입하였다. 이후 매일 랫트의 무릎 둘레를 측정하여 부종의 정도를 관찰하였다.

[0067] 완전프로인트항원보강제를 주입한 후 4일째 랫트의 무릎 둘레를 측정한 결과 정상 랫트에 비하여 둘레가 증가, 부종이 생긴 것을 확인하였다. 염증 완화를 위하여 관절내 주사를 하는 트리암시놀론은 스테로이드제로써 이를 처리한 그룹의 랫트는 약물 처리 후 2일째부터 무릎 둘레가 줄어듦으로써 부종이 감소함을 확인하였다(도 5 참조).

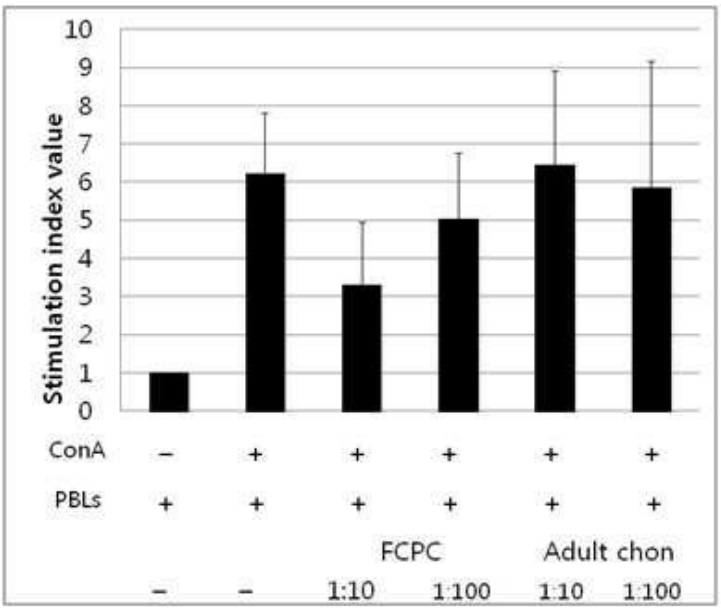
[0068] 면역조절 능력을 가지고 있는 태아연골유래 세포를 주입한 그룹의 랫트에서는 7일째부터 무릎 둘레가 줄어듦으로써 부종이 감소함을 확인하였다(도 5 참조).

도면

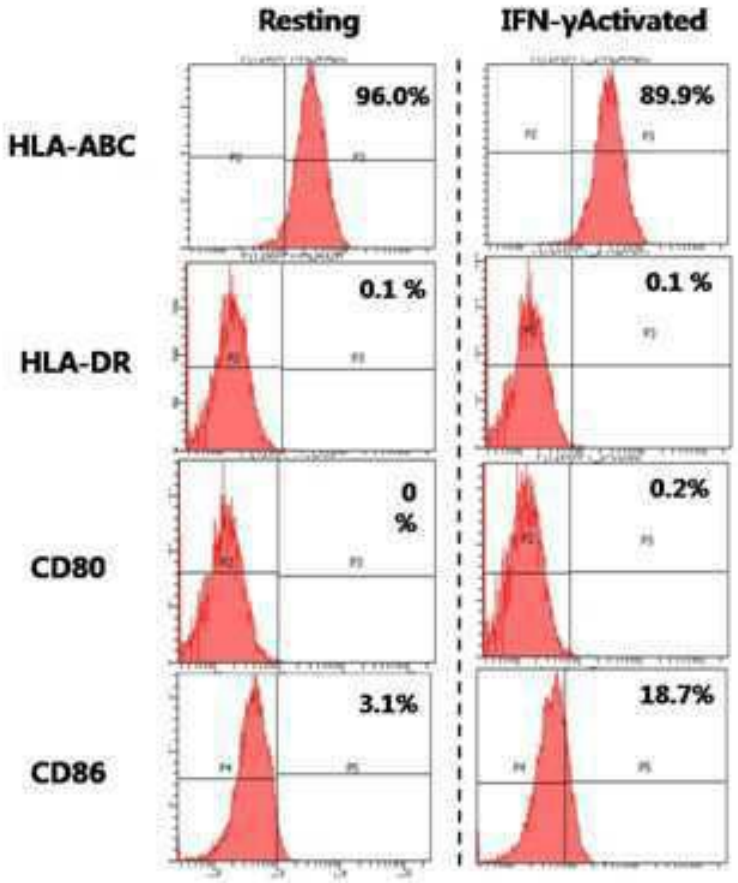
도면1



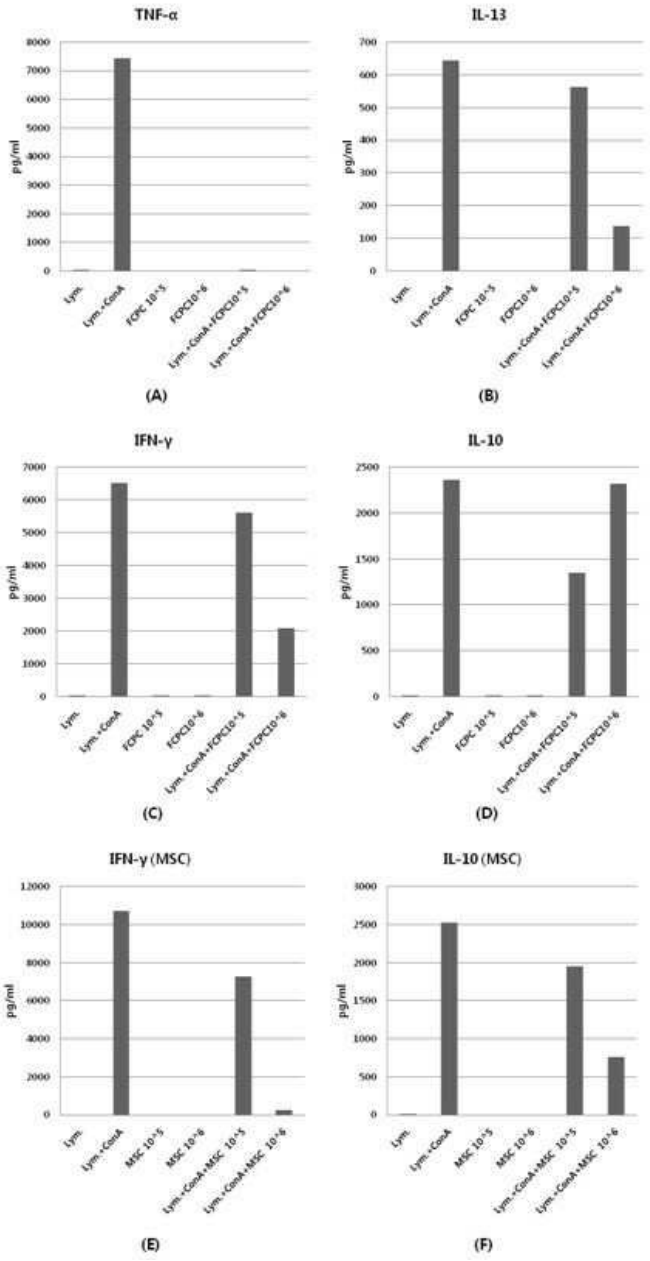
도면2


Stimulation index value
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
ConA
PBLs
FCPC
Adult chon
1:10
1:100
1:10
1:100

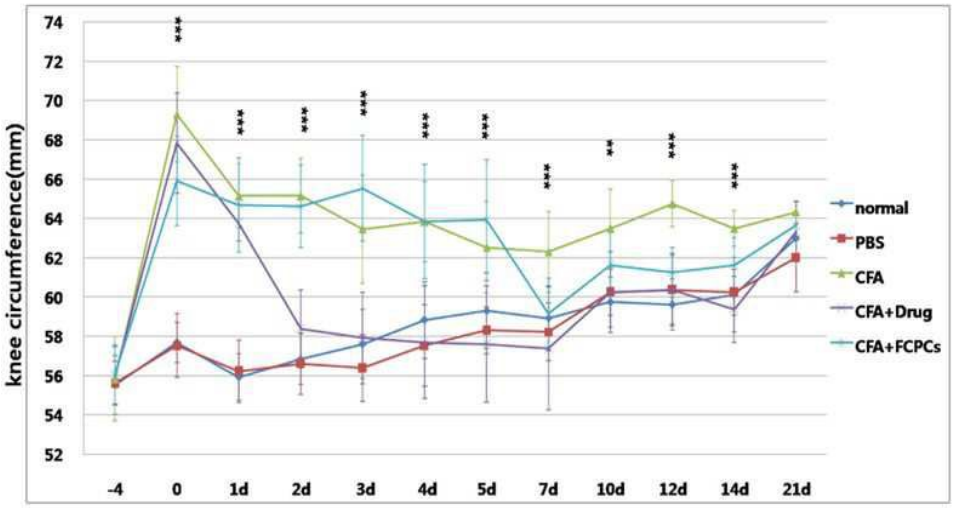
도면3


Resting
IFN-γActivated
HLA-ABC
HLA-DR
CD80
CD86
96.0%
89.9%
0.1 %
0.1 %
0 %
0.2%
3.1%
18.7%

도면4


TNF-α
IL-13
IFN-γ
IL-10
IFN-γ (MSC)
IL-10 (MSC)
pg/ml
Lym.
Lym.+ConA
FCPC 10^5
FCPC10^6
Lym.+ConA+FCPC10^5
Lym.+ConA+FCPC10^6
MSC 10^5
MSC 10^6
Lym.+ConA+MSC 10^5
Lym.+ConA+MSC 10^6
(A)
(B)
(C)
(D)
(E)
(F)

도면5


knee circumference(mm)
74
72
70
68
66
64
62
60
58
56
54
52
-4
0
1d
2d
3d
4d
5d
7d
10d
12d
14d
21d
normal
PBS
CFA
CFA+Drug
CFA+FCPCs