

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2016 년 3 월 31 일 (31.03.2016)



(10) 국제공개번호
WO 2016/048052 A1

- (51) 국제특허분류:
A61K 35/44 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)
A61K 35/12 (2006.01) A61P 37/00 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2015/010065
- (22) 국제출원일: 2015 년 9 월 24 일 (24.09.2015)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2014-0128179 2014 년 9 월 25 일 (25.09.2014) KR
- (71) 출원인: 주식회사 강스템바이오테크 (KANGSTEM BIOTECH CO., LTD.) [KR/KR]; 08826 서울시 관악구 관악로 1, 서울대학교 수의과대학 생명공학연구동 81 동 2 층, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 김형식 (KIM, Hyung Sik); 08786 서울시 관악구 남부순환로 1802, 806 호, Seoul (KR). 이병철 (LEE, Byung Chul); 07069 서울시 동작구 신대방길 85, 105 동 1405 호, Seoul (KR). 서광원 (SEO, Kwang Won); 16300 경기도 수원시 장안구 파장로 6 번길 20, 101 동 902 호, Gyeonggi-do (KR). 강경선 (KANG, Kyung Sun); 06338 서울시 강남구 개포로 116 길 17, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 손민 (SON, Min); 06302 서울시 강남구 양재천로 163 STX R&D 센터 6 층 한일국제특허사무소, 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.

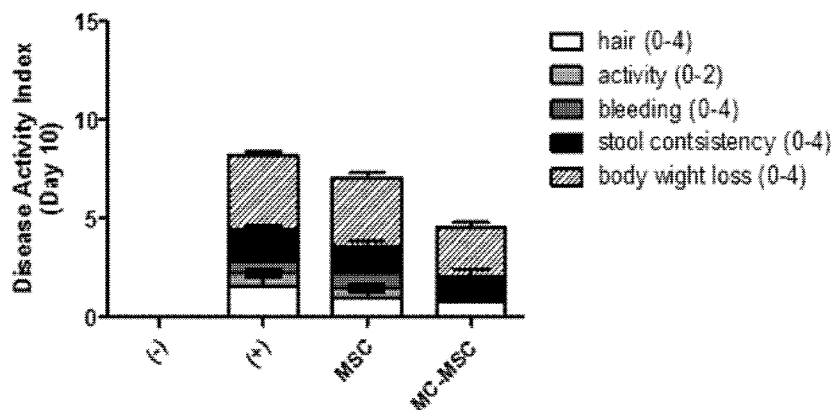
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, 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))
- 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR PREVENTION OR TREATMENT OF IMMUNE DISEASES OR INFLAMMATORY DISEASES, COMPRISING STEM CELL TREATED WITH MAST CELL GRANULES OR CULTURE THEREOF

(54) 발명의 명칭 : 비만세포 과립을 처리한 줄기세포 또는 그 배양물을 포함하는 면역질환 또는 염증질환의 예방 또는 치료용 약학조성물



(57) Abstract: The present invention relates to a pharmaceutical composition for prevention or treatment of immune diseases or inflammatory diseases, comprising a stem cell incubated by adding mast cell granules or a culture thereof to a stem cell.

(57) 요약서: 본 발명은 줄기세포에 비만세포 과립을 첨가하여 배양한 줄기세포 또는 그 배양물을 포함하는 면역질환 및 염증질환의 예방 또는 치료용 약학조성물에 관한 것이다.

WO 2016/048052 A1

명세서

발명의 명칭: 비만세포 과립을 처리한 줄기세포 또는 그 배양물을 포함하는 면역질환 또는 염증질환의 예방 또는 치료용 약학조성물
기술분야

[1] 본 발명은 줄기세포에 비만세포 과립을 첨가하여 배양한 줄기세포 또는 그 배양물을 포함하는 면역질환 및 염증질환의 예방 또는 치료용 약학조성물에 관한 것이다.

[2]

배경기술

[3] 면역시스템은 내부 및 외부의 병원성 물질로부터 인체를 보호하기 위해 다양한 세포로 구성된 방어 체계를 구축하고 있으며 이는 각각의 세포가 가진 특이적 기능 및 각 세포간의 신호 전달을 통해 이루어진다. 인체의 면역계는 면역을 억제하고 조절하는 면역 관용(tolerance)와 면역을 촉진하는 면역반응(immunity)로 크게 나뉘 볼 수 있는데 이 두 가지 면역 작용이 서로 균형을 이뤄 면역학적 항상성(immunological homeostasis)이 이루어지게 된다. 그러나 어떤 이유에서 이의 균형이 깨져 면역반응이 면역 관용보다 항진되어 있을 경우 면역 질환 및 염증 질환이 초래되게 된다.

[4]

[5] 면역 질환 또는 염증 질환의 예방 또는 치료를 위한 면역억제에는 그 반응만을 억제하는 특이적 억제제와 비특이적 억제제가 있으며, 이론적으로 특이적 억제제의 작용이 뛰어나야 하나, 비특이적 억제제가 주로 사용된다. 임상적으로 가장 흔히 사용되는 면역억제제로는 사이클로스포린(cyclosporine, Neoral, Cipol A), 아자치오프린(imuran), 프레드니솔론(일종의 스테로이드)이 있다. 위의 세 가지는 함께 병용했을 때가 따로 복용했을 때 보다 부작용이 적고 면역억제 효과도 가장 높은 것으로 판명되었다. 최근에는 FK 506, RATG, OKT3, Cellcept 등 여러 가지 면역억제제가 개발되어 사용되고 있다.

[6]

[7] 이들 면역억제제는 항원자극에서 항체생성에 이르는 과정 중 대식세포에 의한 항원의 탐식, 림프구 등에 의한 항원 인식, 세포 분열, T세포와 B세포의 분열, 항체 생성 등 몇 가지 과정을 저해시킴으로써 면역 억제를 야기한다. 대부분 항종양 활성을 가지고 있는데, 그 이유는 DNA 장애, DNA 합성 저지 등을 매개로 하여 세포 분열을 저지하기 때문이다.

[8]

[9] 그러나 이에 따른 대표적인 부작용으로 고혈압과 신독성(콩팥기능이 저하됨)이 있으며 이 부작용의 발생률이 높기 때문에 사용할 때 충분히 경과를 관찰해야 하는 등의 문제가 있어 왔다. 그 외 부작용으로 드물게 떨림, 발작,

간염, 담액 저류, 혈중 뇨산증가, 근육기력 저하, 조모증(hypertrichosis), 치은 비대(gingival hypertrophy)등이 있다. 흔히 쓰이는 억제제 중 아자치오프린은 백혈구수치의 감소, 빈혈, 혈소판 감소 등 골수 기능을 억제하기도 하며 췌장염, 간염, 담즙저류와 함께 드물게 탈모, 발열 등을 보이는 합병증이 있을 수 있다. 스테로이드 제제의 하나인 프레드니솔론은 면역 억제제 중 가장 먼저 사용되기 시작하였으며 가장 광범위한 억제 작용을 보인다. 식욕을 증진시켜주며 어깨와 등의 근육을 증가시키고 일시적으로는 행복감을 가져다주기도 하나 이러한 스테로이드제제는 동맥 경화증을 촉진시킬 뿐 아니라 고혈압, 위궤양, 당뇨, 성장 저해, 골다공증, 백내장, 녹내장 등을 일으키므로 주의해야 할 약물이다.

[10]

[11] 상기 부작용을 극복하기 위한 치료제로서, 바이오 의약품이 각광받기 시작했으며, 그 대표적인 것이 줄기세포 치료제이다. 줄기세포의 분화능력을 이용하여, 손상된 관절 조직을 재생 및 항염증 등의 치료에 응용하기 위하여 중간엽 줄기세포 연구에 대하여 보고되어 왔으나(미국특허등록번호 제6835377호), 치료 기전 등이 명확히 밝혀진 치료제는 드문 현실이다.

[12]

[13] 한편 비만세포(mast cell)는 염증반응에 관여하는 세포로서, IgE 항체가 활성화되고 외부의 다른 항원이나 알레르겐(allergen)에 의해서 교차(crosslink)되면, 여러 가지 다양한 신호기작(signalling pathway)에 의해 비만세포의 과립 안에 포집되어 있던 히스타민, 베타-헥소사미니다아제(β -hexosaminidase), 류코트리엔과 같은 염증유발 물질 등을 세포 외막(plasma membrane)으로 방출한다. 이렇게 방출된 염증유발 물질들은 염증을 유발하는 수용체와 사이토카인 등을 활성화시킴으로써 그 염증을 더욱 심화시키는 작용을 한다.

[14]

특히, 비만세포에서 이러한 물질들의 방출은 알레르기성 질환 등과 밀접한 연관이 있으며, 알레르기성 질환은 보편적으로 유전학적/면역학적으로 IgE 항체가 관련되고 후천적 요소 즉 환경적, 정신적 요인 인자들이 항원에 접촉, 노출에 의해 감작되어 발병되는 것으로 알려져 있다. 이 중 면역학적 요인은 현재 치료의 타겟이 되고 있으며, 면역학적 측면에서 이러한 알레르기성 물질들의 세포 외막으로의 방출을 제어함으로써 알레르기성 질환 치료제로 적용 가능하다고 할 것이다. 그러나 현재까지 이들 비만세포 내 과립을 추출하여 줄기세포에 처리할 경우, 줄기세포로부터 분비되는 염증조절인자 등의 발현을 오히려 증가시킴으로써 염증질환 또는 면역질환의 예방 또는 치료효과가 있다는 것은 알려지지 않았다.

[15]

발명의 상세한 설명
기술적 과제

- [16] 본 발명자들은 줄기세포에 비만세포 내 과립을 첨가하여 배양할 경우, 줄기세포에서 분비되는 염증조절인자의 발현이 현저히 증가함을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[17]

과제 해결 수단

- [18] 본 발명의 목적은 종래의 면역억제제 및 염증억제제를 대체할 수 있는 부작용이 없고 경제적인, 줄기세포에 비만세포 과립을 첨가하여 배양한 줄기세포 또는 그 배양물을 포함하는, 면역질환 또는 염증질환의 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공하는 것이다.
- [19] 본 발명의 다른 목적은 상기 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 면역질환 또는 염증질환의 예방 또는 치료 방법을 제공하는 것이다.
- [20] 본 발명의 다른 목적은 상기 줄기세포 또는 그 배양물을 피험체에 투여하는 단계를 포함하는 피험체의 면역반응 또는 염증반응을 억제하는 방법을 제공하는 것이다.
- [21] 본 발명의 다른 목적은 줄기세포에 비만세포 과립을 첨가하여 배양하는 단계를 포함하는 면역억제제 또는 항염증제의 제조 방법을 제공하는 것이다.
- [22] 본 발명의 다른 목적은 비만세포 과립을 첨가한 배지에서 줄기세포를 배양하는 단계를 포함하는 COX-2(Cyclooxygenase-2) 단백질의 대량 생산 방법을 제공하는 것이다.
- [23] 본 발명의 또 다른 목적은 줄기세포 및 비만세포 과립을 포함하는 이식체 및 복합체를 제공하는 것이다.
- [24] 본 발명의 또 다른 목적은 비만세포 과립을 첨가하여 배양한 줄기세포 또는 이의 배양물을 제공하는 것이다.

[25]

발명의 효과

- [26] 본 발명에 따른 줄기세포 또는 이의 배양물은 면역질환 및 염증질환의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 줄기세포는 염증조절인자 또는 세포이동 관련인자를 간편하고, 경제적이면서도 화학공정이 없이 향상된 수율로 생산할 수 있다. 본 발명에 따른 줄기세포 또는 이의 배양물은 부작용이 알려진 기존의 면역억제제 및 염증억제제를 대체하는, 부작용이 없고 경제적으로 사용될 수 있는 세포치료제로서 클론스병, 류마티스 관절염, 아토피 등 자가면역질환과 같은 면역질환 및 염증질환의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다.

[27]

도면의 간단한 설명

- [28] 도 1은 염증성 장질환 동물모델에 줄기세포 및 비만세포 과립을 처리한 줄기세포를 투여한 후, 염증성 장질환으로 인한 질병활성도(체중손실, 설사,

- 혈변, 활동성 등을 총괄한 질병의 지표 점수)의 변화를 보여주는 그래프이다.((-): 음성대조군 / (+): DSS로 염증성 장질환 유발 양성대조군 / MSC: 유발 후 제대혈 줄기세포 투여군 / MC-MSC: 유발 후 비만세포 선처리 제대혈 줄기세포 투여군)
- [29] 도 2는 아토피 피부염 동물모델에서 줄기세포 및 비만세포 과립을 처리한 줄기세포를 투여한 후 육안으로 병변을 관찰한 결과를 보여주는 그래프이다.((-): 음성대조군 / Df: 집먼지진드기로 아토피 피부염 유발 양성대조군 / Fibroblast: 유발 후 섬유아세포 피하투여군 / MSC: 유발 후 제대혈 줄기세포 투여군 / MC-MSC: 유발 후 비만세포 선처리 제대혈 줄기세포 투여군)
- [30] 도 3은 아토피 피부염 동물모델에서 줄기세포 및 비만세포 과립을 처리한 줄기세포를 투여한 후 조직병리학적 병변을 관찰한 결과를 보여주는 이미지이다. ((-): 음성대조군 / Df: 집먼지진드기로 아토피 피부염 유발 양성대조군 / Fibroblast: 유발 후 섬유아세포 피하투여군 / MSC: 유발 후 제대혈 줄기세포 투여군 / MC-MSC: 유발 후 비만세포 선처리 제대혈 줄기세포 투여군)
- [31] 도 4는 비만세포 과립의 선처리로 인한 COX-2의 발현량의 증가를 보여주는 이미지 및 그래프이다.((-): 음성대조군 / CM (culture media): 세포배양액 / CC (cell contents): 세포 내 함유물질 / MNC (mononuclear cell): 단핵구 / Mast Cell: 비만세포)
- [32] 도 5는 여러 종류의 제대혈 유래 줄기세포에서 비만세포 과립의 선처리로 인한 COX-2의 발현량의 증가를 보여주는 이미지 및 그래프이다.
- [33] 도 6은 비만세포 과립을 처리한 줄기세포의 PGE₂ 분비량의 증가를 보여주는 그래프이다.(MSC: 비만세포 과립을 처리하지 않은 제대혈 줄기세포 처리군, MC-MSC: 비만세포 과립을 처리한 제대혈 줄기세포 처리군)
- [34] 도 7은 비만세포 과립을 처리한 줄기세포의 면역세포 증식 억제능을 보여주는 그래프이다.((-): 음성대조군 / ConA: Concanavalin A 처리군, MSC: 비만세포 과립을 처리하지 않은 제대혈 줄기세포 처리군, MC-MSC: 비만세포 과립을 처리한 제대혈 줄기세포 처리군)

[35]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [36] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 줄기세포에 비만세포 과립을 처리하여 배양한 줄기세포 또는 그 배양물을 포함하는 면역질환 또는 염증질환의 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.

[37]

- [38] 본 발명에서는, 비만세포 과립, 구체적으로 제대혈 유래의 비만세포의 과립을 추출하여 이를 줄기세포에 처리한 경우, 그 줄기세포에서 분비되는 염증세포 억제인자(COX-2, PGE₂)의 발현이 증가하고, 이에 따라 면역 및 염증을 조절하는 것을 확인하였다. 또한, 염증질환 및 면역질환의 동물모델에 상기 줄기세포를 투여한 결과, 육안병변은 물론 조직병리학적 병변까지 개선시키는 효과가

있음을 확인하였다. 즉, 본 발명은 비만세포 과립이 처리된 줄기세포 및 그 배양물이 면역조절 및 염증조절을 위한 세포치료제로 이용될 수 있음을 확인하여, 줄기세포에 비만세포 과립 첨가하여 배양한 줄기세포 또는 그 배양물을 포함하는 면역질환 또는 염증질환의 예방 또는 치료용 약학조성물로 이용될 수 있음을 제시한다.

[39]

[40] 본 발명에서 "비만세포(mast cell)"는 척추동물의 결합 조직 등에 널리 분포하는 세포로서, 이 세포에는 히스타민(histamine), 세로토닌(serotonin), 헤파린(heparin), 베타-헥소사미니다아제(β -hexosaminidase) 및 류코트리엔 등의 염증 유발물질이 과립 형태로 함유되어 있다. 세포 붕괴로 인해 세포 안의 과립이 방출되면 이들에 대하여 조직에서 과민 반응(염증)이 일어난다. 이 세포는 혈액 응고 저지, 혈관의 투과성, 혈압 조절 등에 작용하는 것으로 알려져 있다.

[41] 상기 비만세포는 주로 골수 유래의 세포로 알려져 있으나, 본 발명에서는 제대혈 유래의 비만세포일 수 있다. 본 발명의 실시예에서는 제대혈로부터 분리한 단핵세포를 SCF(stem cell factor) 및 IL-6가 함유된 배지에서 배양함으로써 비만세포를 수득하였다.

[42] 본 발명에서 비만세포 과립은 비만세포 추출물이라고도 하며, 상기 비만세포 내 함유하고 있는 물질 뿐만 아니라 과립 내에 존재하는 물질, 즉 과립이 깨지면서 방출될 수 있는 물질 전체를 포함한다. 이에, 상기 비만세포 과립은 그 자체로 최적의 조합이 되어 우수한 효과를 나타낼 수 있으므로, 상기 비만세포에 포함되어 있는 염증 유발물질의 다양한 조합을 사용하는 것보다 본 발명의 목적을 달성하는데 더욱 유리하게 사용될 수 있다.

[43] 본 발명에 있어서, 비만세포 과립을 "첨가하여 배양"함에 있어서 예를 들어, 줄기세포의 배지에 상기 물질을 첨가하여 배양하는 것일 수 있다. 바람직하게는, 배지 1mL 당 10^2 내지 10^5 개의 비만세포 과립이 포함될 수 있으며, 상기 범위의 농도로 0.1 내지 200 시간 동안, 더욱 바람직하게는 1 내지 72 시간 동안 첨가하여 배양하는 것일 수 있다. 또한, 비만세포 과립을 첨가하여 배양한 후, 배지를 교체하여 배양하는 것일 수 있다.

[44] 본 발명에서 비만세포 과립을 처리하거나, 또는 이를 첨가하여 배양하는 것은 상기 과립 내에 함유되어 있는 염증유발 물질을 처리하는 것까지 본 발명의 범주에 속한다.

[45] 본 발명에서 "줄기세포"는 다양한 조직으로 분화할 수 있는 능력을 가진 세포, 즉 '미분화세포'일 수 있다.

[46] 본 발명에 있어서, 상기 줄기세포는 성체줄기세포, 만능줄기세포, 유도만능줄기세포(induced pluripotent stem cells) 또는 배아줄기세포일 수 있다.

[47] 다능성 줄기세포(multipotent stem cell)는 골수, 제대혈, 태반(또는 태반 조직세포), 지방(또는 지방조직 세포) 등의 다양한 성체 세포로부터 유래하는 다분화성의 성질을 갖는 줄기세포이다. 예를 들어, 골수(bone marrow)로부터

유래된 중간엽 줄기세포는 지방조직, 뼈/연골 조직, 근육조직으로 분화될 수 있는 다분화성에 의해 세포치료제로서의 개발을 위해 다양한 연구가 진행되고 있다.

- [48] 한편, 상기 성체줄기세포는 제대, 제대혈, 골수, 지방, 근육, 신경, 피부, 양막 및 태반으로 구성된 군에서 선택되는 조직으로부터 유래된 것일 수 있다. 또한, 상기 성체줄기세포는 중간엽 줄기세포, 중간엽 기질세포(mesenchymal stromal cell) 또는 다분화능 줄기세포일 수 있으며, 바람직하게는 인간 제대혈 유래 중간엽 줄기세포(Human Umbilical Cord Blood Mesenchymal Stem Cell; hUCB-MSC)일 수 있다. 각 조직에서 줄기세포를 얻는 방법은 종래 당업계에 공지된 방법에 의할 수 있으며, 본 발명의 실시예의 방법에 한정되지 않는다.

[49]

- [50] 본 발명에서 "배양물"은 줄기세포를 포함한 세포 배양액, 세포 배양액으로부터 줄기세포를 제거한 배양상등액, 및 이들의 희석액을 모두 포함할 수 있다. 상기 배양물의 조성은 통상의 줄기세포 배양에 필요한 성분뿐만 아니라, 줄기세포 증식에 상승적으로 작용을 하는 성분을 추가적으로 포함할 수 있으며, 이에 따른 조성은 당업계의 통상의 기술을 가진 자에 의하여 용이하게 선택될 수 있다.

[51]

- [52] 상기 줄기세포의 배양에 사용되는 배지로서는 당업계에서 줄기세포 배양에 적합하다고 알려져 있는 통상적인 배지를 사용할 수 있는데, 예를 들면 DMEM(Dulbecco's modified Eagle medium) 또는 Keratinocyte-SFM(Keratinocyte serum free medium)을 사용할 수 있다.

[53]

상기 줄기세포 배지는 첨가제로 보충될 수 있다. 일반적으로, 등장액 중의 중성 완충제(예컨대 인산염 및/또는 고농도 중탄산염) 및 단백질 영양분(예를 들면 혈청, 예컨대 FBS, 혈청 대체물, 알부민, 또는 필수 아미노산 및 비필수 아미노산, 예컨대 글루타민)을 함유할 수 있다. 나아가, 지질(지방산, 콜레스테롤, 혈청의 HDL 또는 LDL 추출물) 및 이 종류의 대부분의 보존액 배지에서 발견되는 기타 성분(예컨대 인슐린 또는 트랜스페린, 뉴클레오시드 또는 뉴클레오티드, 피루빈산염, 임의의 이온화 형태 또는 염인 당원, 예컨대 글루코스, 셀레늄, 글루코코르티코이드, 예컨대 히드로코르티손 및/또는 환원제, 예컨대 β -메르캅토에탄올)을 함유할 수 있다.

[54]

- [55] 본 발명의 실시예에서는 비만세포 과립을 첨가하여 배양한 줄기세포에서 염증세포 억제인자(염증조절인자)인 COX-2의 발현 및 PGE2의 분비량이 증가됨을 확인하였다. 상기 COX-2는 PGE2의 합성에 핵심 역할을 하는 효소로서 알려져 있으므로, COX-2의 발현수준이 증가함에 따라 PGE2의 합성량도 증가함은 자명하다. 또한 상기 PGE2는 염증 사이토카인인 인터류킨-1 β 및 TNF- α 와 같은 사이토카인의 분비를 억제하는 역할을 하는 것으로 보고되고 있다.

[56]

[57] 본 발명의 다른 실시예에서는, 비만세포 과립을 첨가하여 배양한 줄기세포가 면역세포의 증식을 억제함을 확인하였다. 과도한 면역세포의 증식은 과도한 염증반응 및 면역반응을 야기함에 따라, 상기 세포의 증식을 억제함으로써 비정상적인 염증반응 및 면역반응을 억제할 수 있다.

[58]

[59] 따라서, 본 발명에 따른 줄기세포 및 그 배양물은 면역질환 및 염증질환의 예방 및 치료에 유용하다.

[60]

본 발명에서 "염증질환"은 염증을 주병변으로 하는 질병을 총칭하는 의미로서, 이에 제한되지는 않으나 바람직하게는 부종, 피부염, 알레르기, 아토피, 천식, 결막염, 치주염, 비염, 중이염, 인후염, 편도염, 폐렴, 위궤양, 위염, 크론병, 대장염, 치질, 통풍, 간직성 척추염, 류마티스 열, 루푸스, 섬유근통(fibromyalgia), 건선관절염, 골관절염, 류마티스 관절염, 건관절주위염, 건염, 건초염, 근육염, 간염, 방광염, 신장염, 쇼그렌 증후군(sjogren's syndrome) 또는 다발성 경화증일 수 있다.

[61]

본 발명에서 "면역질환"이란 특정 면역 반응이 일어날 경우 문제가 되는 질환을 의미로서, 이에 제한되지는 않으나, 바람직하게는 자가면역질환, 이식거부, 이식편대숙주병 일 수 있으며, 자가면역질환은 크론씨병, 홍반병, 아토피, 류마티스 관절염, 하시모토 갑상선염, 악성빈혈, 에디슨씨 병, 제1형 당뇨병, 루푸스, 만성피로증후군, 섬유근육통, 갑상선기능저하증과 항진증, 경피증, 베체트병, 염증성 장질환, 다발성 경화증, 중증 근무력증, 메니에르 증후군(Meniere's syndrome), 길리안-바레 증후군(Guilian-Barre syndrome), 쇼그렌 증후군(Sjogren's syndrome), 백반증, 자궁내막증, 건선, 백반증, 전신성 경피증, 천식 또는 궤양성 대장염 등일 수 있다.

[62]

상기 면역질환 또는 염증질환은 자가면역질환, 이식거부, 이식편대숙주병, 관절염, 세균감염, 패혈증 또는 염증 등일 수 있으며, 상기 자가면역질환은 크론씨병, 홍반병, 아토피, 류마티스 관절염, 하시모토 갑상선염, 악성빈혈, 에디슨씨 병, 제1형 당뇨병, 루푸스, 만성피로증후군, 섬유근육통, 갑상선기능저하증과 항진증, 경피증, 베체트병, 염증성 장질환, 다발성 경화증, 중증 근무력증, 메니에르 증후군(Meniere's syndrome), 길리안-바레 증후군(Guilian-Barre syndrome), 쇼그렌 증후군(Sjogren's syndrome), 백반증, 자궁내막증, 건선, 백반증, 전신성 경피증, 천식 또는 궤양성 대장염 등일 수 있다.

[63]

본 발명에서 "예방"은 상기 조성물의 투여로 면역질환 또는 염증질환의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미하며, "치료"는 상기 조성물의 투여로 면역질환 또는 염증질환의 증세가 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 의미한다.

[64]

- [65] 또한, 본 발명에 따른 줄기세포 또는 이의 배양물은 1ml 당 1.0×10^5 개 내지 1.0×10^9 개, 바람직하게는 1.0×10^6 개 내지 1.0×10^8 개, 보다 바람직하게는 1.0×10^7 개의 세포를 포함할 수 있다.
- [66] 본 발명에 따른 줄기세포 또는 이의 배양물은 동결되지 않은 채 사용되거나 차후 사용을 위해 동결될 수 있다. 동결되어야 할 경우, 표준 냉동보존제 (예를 들어 DMSO, 글리세롤, 에피라이프 (Epilife) 세포 동결 배지 (Cascade Biologics))가 동결 전 세포 집단에 첨가될 수 있다.
- [67]
- [68] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 면역질환 또는 염증질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [69]
- [70] 본 발명의 용어 "투여"란 적절한 방법으로 개체에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미한다.
- [71]
- [72] 본 발명의 용어 "개체"란 면역질환 또는 염증질환이 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 포함한 쥐, 생쥐, 가축 등의 모든 동물을 의미한다. 구체적인 예로, 인간을 포함한 포유동물일 수 있다.
- [73]
- [74] 또한, 본 발명에 따른 줄기세포 또는 이의 배양물은 약학적 분야에서 통상의 방법에 따라 환자의 신체 내 투여에 적합한 단위투여형의 제제로 제형화시켜 투여할 수 있으며, 상기 제제는 1회 또는 수회 투여에 의해 효과적인 투여량을 포함한다. 이러한 목적에 적합한 제형으로는 비경구투여 제제로서 주사용 앰플과 같은 주사제, 주입 백과 같은 주입제, 및 에어로졸 제제와 같은 분무제 등이 바람직하다. 상기 주사용 앰플은 사용 직전에 주사액과 혼합 조제할 수 있으며, 주사액으로는 생리 식염수, 포도당, 만니톨, 링거액 등을 사용할 수 있다. 또한, 주입 백은 염화폴리비닐 또는 폴리에틸렌 재질의 것을 사용할 수 있으며, 박스터 (Baxter), 벡톤 디킨슨 (Becton Dickinson), 메드셉 (Medcep), 내셔널 호스피탈 프로덕츠 (National Hospital Products) 또는 테루모 (Terumo) 사의 주입 백을 예시할 수 있다.
- [75] 상기 약학적 제제에는 상기 유효성분 외에 하나 또는 그 이상의 약학적으로 허용가능한 통상의 불활성 담체, 예를 들어, 주사제의 경우에는 보존제, 무통화제, 가용화제 또는 안정화제 등을, 국소 투여용 제제의 경우에는 기제 (base), 부형제, 윤활제 또는 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [76] 이렇게 제조된 본 발명에 따른 줄기세포, 이의 배양물 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 질환 부위에 직접 생착 또는 이식하거나 복강에 직접 이식 또는 주입하는 것이 가능하나 이에

한정되지 않는다. 또한, 상기 투여는 카테터를 이용한 비외과적 투여 및 질환부위 절개 후 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 조혈계 줄기세포 이식의 일반적 방법인 혈관 내 주입에 의한 이식도 가능하다.

[77] 상기 줄기세포의 1일 투여량은 1.0×10^4 내지 1.0×10^{10} 세포/kg 체중, 바람직하게는 1.0×10^5 내지 1.0×10^9 세포/kg 체중을 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나, 유효성분의 실제 투여량은 치료하고자 하는 질환, 질환의 중증도, 투여경로, 환자의 체중, 연령 및 성별 등의 여러 관련 인자에 비추어 결정되어야 하는 것으로 이해되어야 하며, 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[78]

[79] 또 하나의 양태로서, 본 발명에 따른 비만세포 과립이 처리된 줄기세포 및 그 배양물을 투여함으로써 면역반응을 억제하거나 염증을 조절할 수 있는바, 본 발명은 줄기세포에 비만세포 과립을 첨가하여 배양한 줄기세포 또는 그 배양물을 피험체에 투여하는 단계를 포함하는 피험체의 면역반응 또는 염증반응의 억제방법을 제공한다.

[80] 본 발명에서 "피험체"란 소, 개, 돼지, 닭, 양, 말, 인간을 포함한 포유동물을 의미하나 이에 제한되는 것은 아니다. 아울러, 바람직하게는 비만세포 과립을 첨가하여 배양한 줄기세포 또는 그 배양물의 투여는 복강 또는 혈관 내 투여, 병변으로의 직접 투여 또는 관절의 활강(Synovial cavity) 내 투여 등일 수 있다.

[81] 상기 면역반응 또는 염증 반응의 억제는 면역질환 또는 염증질환의 예방 또는 치료하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[82]

[83] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 줄기세포에 비만세포 과립을 첨가하여 배양하는 단계를 포함하는, 면역억제제 또는 항염증제의 제조 방법을 제공한다.

[84] 본 발명에서 "면역억제제"란 상기에서 설명한 바와 같이, 줄기세포에 비만세포 과립을 첨가하여 배양하여 수득한 줄기세포 또는 그 배양물을 포함하는 제제로 면역 반응을 억제하여 면역질환을 치료할 수 있는 제제를 의미한다.

[85] 본 발명에서 "항염증제"란 상기에서 설명한 바와 같이, 줄기세포에 비만세포 과립을 첨가하여 배양하여 수득한 줄기세포 또는 그 배양물을 포함하는 제제로 염증을 억제하여 염증질환을 치료할 수 있는 제제를 의미한다.

[86]

[87] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 비만세포 과립을 첨가한 배지에서 줄기세포를 배양하는 단계를 포함하며, 배양시 상기 줄기세포에서 염증조절인자의 발현이 증가되는 것이 특징인 COX-2(Cyclooxygenase-2) 또는 PGE₂(Prostaglandin E2) 단백질의 대량 생산방법을 제공한다.

[88]

[89] 본 발명의 실시예에 따르면 비만세포 과립을 처리한 성체줄기세포는 염증조절인자로 알려진 COX-2의 발현 및 PGE₂의 합성량을 현저하게 증가시킴을 확인하였다(실험예 2 및 3). 이는, 본 발명의 줄기세포는, 염증 유발 사이토카인인 인터류킨-1 β 및 TNF- α 의 분비를 억제하는 PGE₂의 합성량을 증가시킴으로써, 염증 질환의 예방 또는 치료를 위한 치료제로 사용될 수 있음을 시사한다.

[90]

[91] 본 발명의 다른 실시예에 따르면 비만세포 과립을 비만세포 과립을 처리한 성체줄기세포는 면역세포의 증식을 억제함을 확인하였다(실험예 4). 이는, 본 발명의 줄기세포는 면역세포의 증식을 억제함으로써 면역 질환 또는 염증 질환의 예방 또는 치료를 위한 면역억제제로 사용될 수 있음을 시사한다.

[92]

[93] 본 발명에 있어서, 상기 단백질의 회수는 상기 줄기세포를 배양한 배지를 수거하여 원심 분리 및 여과하여 세포 및 부유물을 제거하고 나머지 상층액을 회수하여 얻을 수 있다.

[94]

[95] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 줄기세포 및 비만세포 과립을 포함하는 이식체를 제공하는 것이다.

[96] 본 발명에서 "이식체"란 손상된 부위를 외부로부터 격리하거나 이식된 세포나 분비된 치료 물질을 함유하는, 인체 또는 동물에 이식될 수 있는 물질을 의미한다. 이와 같은 이식체는 조직공학용 지지체로서 생분해성을 가지는 합성고분자와 천연재료 등 당업계에 다양하게 사용되는 물질을 구비할 수 있다. 본 발명의 이식체는 줄기세포 및 비만세포 과립을 포함하고 있기 때문에, 이식체로 인한 면역거부 반응 또는 염증반응을 야기하지 않는 장점이 있다. 따라서, 다양한 이식체를 체내에 이식하였을 경우 발생할 수 있는 면역거부 반응 또는 염증반응을 억제하기 위한 별도의 면역거부반응 억제제 또는 항염증제의 투여가 없어도 이식된 이식체가 생체 내에 면역거부 반응이나 염증 발생 없이 안정적으로 생착할 수 있다.

[97]

[98] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 지지체 상에서 비만세포 과립을 첨가하여 줄기세포를 배양한 후 상기 줄기세포를 제거한 이식체를 제공한다.

[99]

[100] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 지지체 상에서 줄기세포에 비만세포 과립을 첨가하여 배양하는 단계를 포함하는 이식체 제조 방법을 제공한다.

[101] 바람직하게는 배양단계 이후에 줄기세포를 제거하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[102]

[103] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 줄기세포 및 비만세포 과립을 포함하는

복합체를 제공한다. 상기 복합체는 세포 치료제로 사용할 수 있다.

[104]

[105] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 비만세포 과립을 첨가하여 배양한 줄기세포 또는 이의 배양물을 제공한다. 상기 배양물에는 면역질환 또는 염증질환을 예방 또는 치료할 수 있는 효과를 발휘할 수 있으며, COX-2, PGE₂ 등의 염증조절인자 등이 존재할 수 있다.

[106]

발명의 실시를 위한 형태

[107] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[108]

[109] **제조예 1. 동물모델 제조**

[110]

[111] 염증성 장질환 동물모델은 음수 내 Dextran sulfate sodium (DSS, 3%)을 섭취하게 하여 염증성 장질환을 유발시킴으로써 제조하였다.

[112] 아토피 피부염 동물모델은 집먼지 진드기 유래 연고를 6회 도포하여 유발시킴으로써 제조하였다.

[113]

[114] **실시예 1. 제대혈 단핵세포로부터 비만세포 내 과립의 추출**

[115]

[116] 제대혈로부터 분리한 단핵세포를 SCF(stem cell factor) 및 IL-6가 함유된 배지에서 6~8주간 배양하였고, 상기 단핵세포 중 비만세포 비율이 90% 이상이 되었을 때, 이를 급속 냉동 및 해동 과정을 3회 반복하여 비만세포 내 과립을 추출하였다.

[117]

[118] **실험예 1. 비만세포 내 과립을 처리한 중간엽 줄기세포의 투여 및 증상 변화 분석**

[119]

[120] 상기 실시예 1에서 추출한 비만세포 내 과립(약 1×10^4 개)을 제대혈 유래 중간엽 줄기세포를 함유한 8mL 배지에 48시간 동안 처리하였고 5회 수세 후, 상기 제대혈 유래 중간엽 줄기세포를 상기 제조예 1의 염증성 장질환, 아토피 피부염 두 가지 동물모델에 각각 복강, 피하 투여하였다.

[121] 줄기세포 투여 후 상기 두 동물모델의 증상 변화를 관찰한 결과, 염증성 장질환 동물모델에 제대혈 유래 중간엽 줄기세포를 투여한 경우, 질병활성도(체중손실, 설사, 혈변, 활동성 등을 총괄한 질병의 지표 점수) 측면에서 개선되었음을 확인하였다. 또한, 상기 실시예 1에서 추출한 비만세포 내 과립을 선처리한

제대혈 유래 중간엽 줄기세포를 투여한 경우에는 질병활성도의 개선효과가 보다 현저히 증진되었음을 확인하였다(도 1).

- [122] 뿐만 아니라 아토피 피부염 동물모델에서도 제대혈 유래 중간엽 줄기세포를 투여하였을 때, 육안 병변을 관찰하였을 때 뿐만 아니라(도 2), 조직병리학적 병변을 관찰하였을 때에도 개선효과를 관찰할 수 있었으며(도 3), 마찬가지로 상기 실시예 1에서 추출한 비만세포 내 과립을 선처리한 제대혈 유래 중간엽 줄기세포를 투여하였을 때보다 개선효과가 우수하였다.

[123]

[124] **실험예 2. COX-2 발현 수준의 분석**

[125]

- [126] 제대혈 유래 줄기세포가 분비하는 PGE_2 는 염증성 장질환 또는 아토피 피부염에 대한 치료효과에서 중요한 역할을 한다. 이에 비만세포 과립의 선처치로 인해 PGE_2 분비량에 변화가 있는지 확인하기 위하여, PGE_2 합성에 핵심 역할을 하는 효소인 COX-2의 발현수준을 측정하였다.

- [127] 그 결과, 비만세포 과립 처리 시 줄기세포에서의 COX-2의 발현량이 상당히 증가하였으며, 이러한 현상은 단핵구 배양액 또는 추출물을 처리한 경우에는 관찰되지 않았다. 한편, 비만세포 배양액을 처리했을 때는 COX-2 발현량이 약간 증가하는 정도에 그치는 것을 확인하였다(도 4).

- [128] 또한 여러 종류의 제대혈 유래 줄기세포에 대하여도 상기 비만세포 내 과립의 선처치로 인한 COX-2 발현량 증가는 공통적으로 관찰되는 현상임을 확인하였다(도 5).

[129]

[130] **실험예 3. 프로스타글란딘 E2(prostaglandin E2) 분비 수준의 분석**

[131]

- [132] 상기 실험예 2를 통해 핵심 면역조절인자중 하나인 프로스타글란딘(prostaglandin E2; PGE_2) 합성에 핵심 역할을 하는 효소인 COX-2의 발현수준이 증가함을 확인함에 따라, PGE_2 분비 수준을 측정하였다.

- [133] 구체적으로, 비만세포 과립을 처리한 뒤, 상업적으로 판매하는 PGE_2 측정 kit(R&D systems)를 사용하여 상기 줄기세포의 배양액 내에서 줄기세포의 PGE_2 분비량을 측정하였다.

- [134] 그 결과, 비만세포 과립을 처리한 줄기세포는, 상기 과립을 처리하지 않은 줄기세포에 비하여, PGE_2 의 분비량이 유의적으로 증가함을 확인하였고, 이는 COX-2의 발현이 증가함에 따른 결과임을 확인하였다(도 6).

[135]

[136] **실험예 4. 면역세포 증식 정도의 분석**

[137]

- [138] 면역세포의 과도한 증식은 면역질환 또는 염증질환을 악화시키는 요인이므로, 비만세포 과립을 처리한 줄기세포의 면역세포 증식에 대한 억제 효능을

분석하였다.

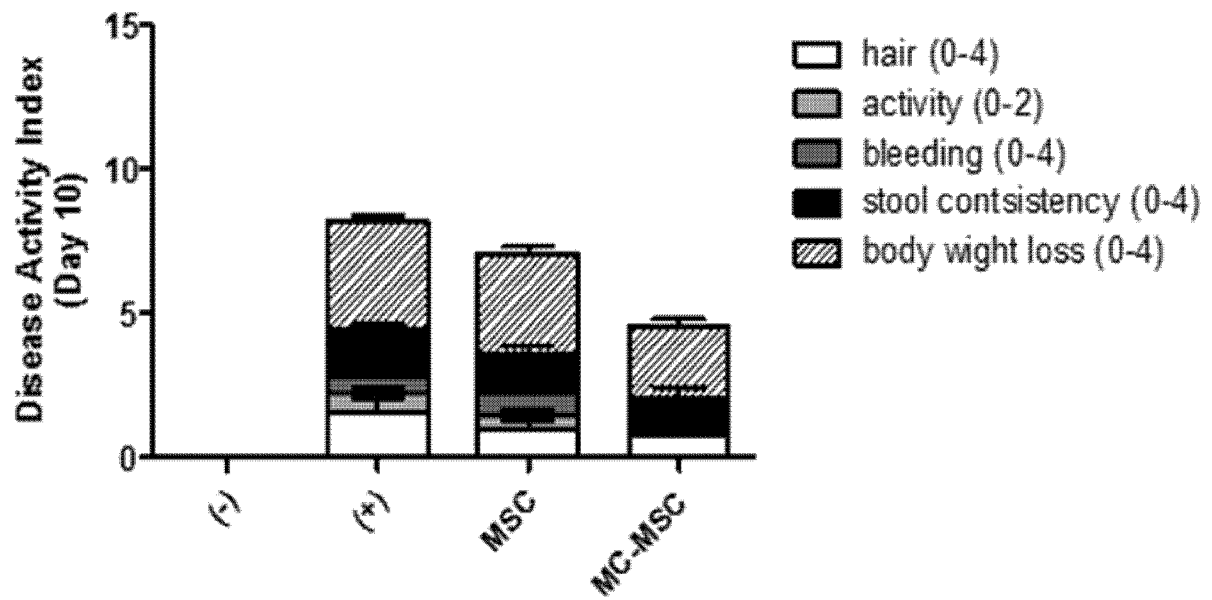
- [139] 구체적으로, 면역세포에 콘카나발린 A(Concanavalin A)를 처리하여 증식을 유도한 상태에서 비만세포 과립을 처치한 줄기세포 또는 상기 과립을 처치하지 않은 줄기세포와 공동배양을 하였다. 이후, BrdU incorporation assay를 통해 면역세포의 증식 억제 정도를 측정하였다.
- [140] 그 결과, Concanavalin A만을 처리하였을 때, 많은 수의 면역세포가 증식함을 확인하였다. 반면, 비만세포 과립을 처치한 줄기세포는, 상기 과립을 처치하지 않은 줄기세포에 비하여 유의적으로 면역세포의 증식을 억제함을 확인하였고, Concanavalin A가 처리되었음에도 불구하고, 음성 대조군과 비슷한 수준으로 면역세포의 증식을 억제함을 확인하였다(도 7).
- [141] 상기 결과를 통해, 본 발명의 비만세포 과립을 처치한 줄기세포는 면역억제제로 사용될 수 있음을 확인하였다.
- [142]

청구범위

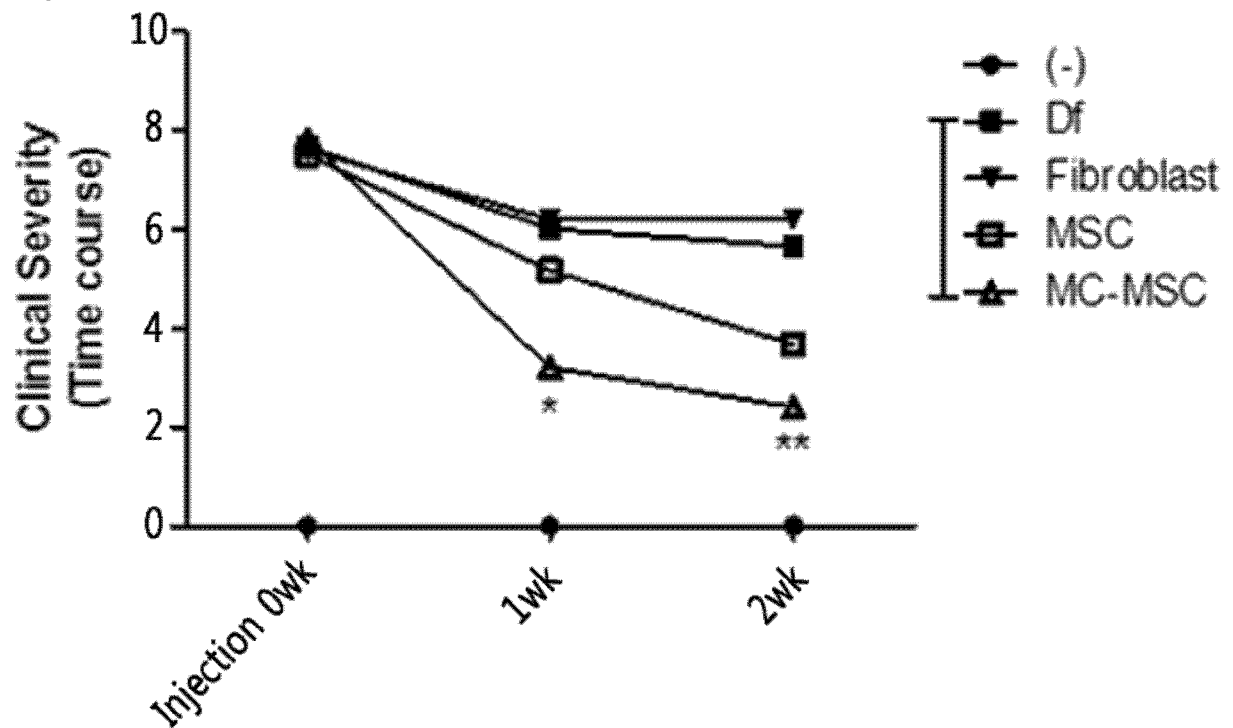
- [청구항 1] 줄기세포에 비만세포 과립을 첨가하여 배양한 줄기세포 또는 그 배양물을 포함하는 면역질환 또는 염증질환의 예방 또는 치료용 약학조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 비만세포는 체대혈 유래인 것을 특징으로 하는 약학조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 비만세포 과립은 히스타민(histamine), 세로토닌(serotonin), 헤파린(heparin), 베타-헥소사미니다아제(β -hexosaminidase) 및 류코트리엔(leukotriene)을 포함하는 것을 특징으로 하는 약학조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 비만세포 과립을 첨가하여 배양한 줄기세포는 줄기세포에서 COX-2(Cyclooxygenase-2)의 발현수준을 증가시키는 것을 특징으로 하는 약학조성물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 줄기세포는 성체줄기세포, 만능줄기세포, 유도만능줄기세포(induced pluripotent stem cells) 또는 배아줄기세포인 것을 특징으로 하는 약학조성물.
- [청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 성체줄기세포는 체대, 체대혈, 골수, 지방, 근육, 신경, 피부, 양막 및 태반으로 구성된 군에서 선택되는 조직으로부터 유래된 것을 특징으로 하는 약학 조성물.
- [청구항 7] 제5항에 있어서, 상기 성체줄기세포는 중간엽 줄기세포, 중간엽 기질세포(mesenchymal stromal cell) 또는 다분화능 줄기세포인 것을 특징으로 하는 약학조성물.
- [청구항 8] 제1항에 있어서, 상기 면역질환 또는 염증질환은 자가면역질환, 이식거부, 관절염, 이식편대숙주병, 세균감염, 패혈증 또는 염증인 것을 특징으로 하는 약학조성물.
- [청구항 9] 제8항에 있어서, 상기 자가면역질환은 크론씨병, 홍반병, 아토피, 류마티스 관절염, 하시모토 갑상선염, 악성빈혈, 에디슨씨 병, 제1형 당뇨, 루프스, 만성피로증후군, 섬유근육통, 갑상선기능저하증과 항진증, 경피증, 베체트병, 염증성 장질환, 다발성 경화증, 중증 근무력증, 메니에르 증후군(Meniere's syndrome), 길리안-바레 증후군(Guillian-Barre syndrome), 쇼그렌 증후군(Sjogren's syndrome), 백반증, 자궁내막증, 건선, 백반증, 전신성 경피증, 천식 및 궤양성 대장염으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 약학조성물.
- [청구항 10] 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 면역질환 또는 염증질환의 예방 또는 치료 방법.

- [청구항 11] 줄기세포에 비만세포 과립을 첨가하여 배양한 줄기세포 또는 그 배양물을 피험체에 투여하는 단계를 포함하는, 피험체의 면역 반응 또는 염증반응을 억제하는 방법.
- [청구항 12] 줄기세포에 비만세포 과립을 첨가하여 배양하는 단계를 포함하는, 면역억제제 또는 항염증제의 제조 방법.
- [청구항 13] 비만세포 과립을 첨가한 배지에서 줄기세포를 배양하는 단계를 포함하는, COX-2(Cyclooxygenase-2) 또는 PGE₂(Prostaglandin E2) 단백질의 대량 생산 방법.
- [청구항 14] 제11항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 비만세포는 제대혈 유래인 것을 특징으로 하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 15] 줄기세포 및 비만세포 과립을 포함하는 이식체.
- [청구항 16] 줄기세포 및 비만세포 과립을 포함하는 복합체.
- [청구항 17] 비만세포 과립을 첨가하여 배양한 줄기세포 또는 이의 배양물.

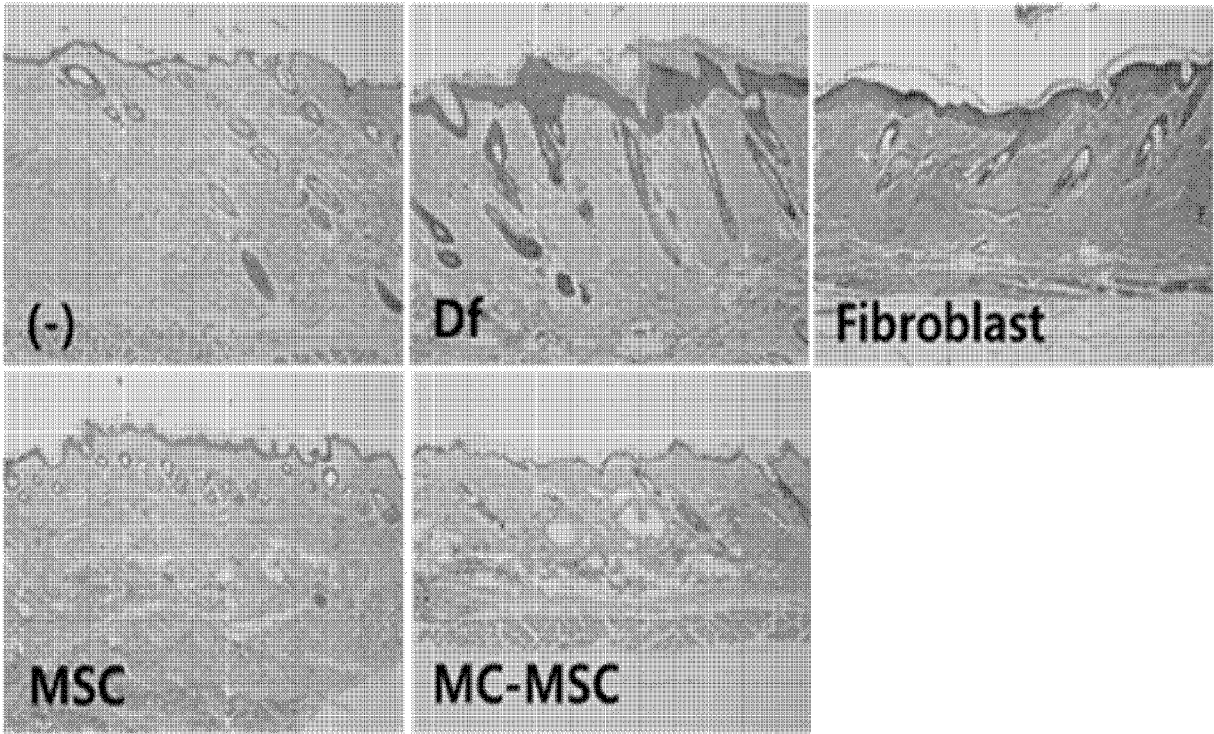
[Fig. 1]



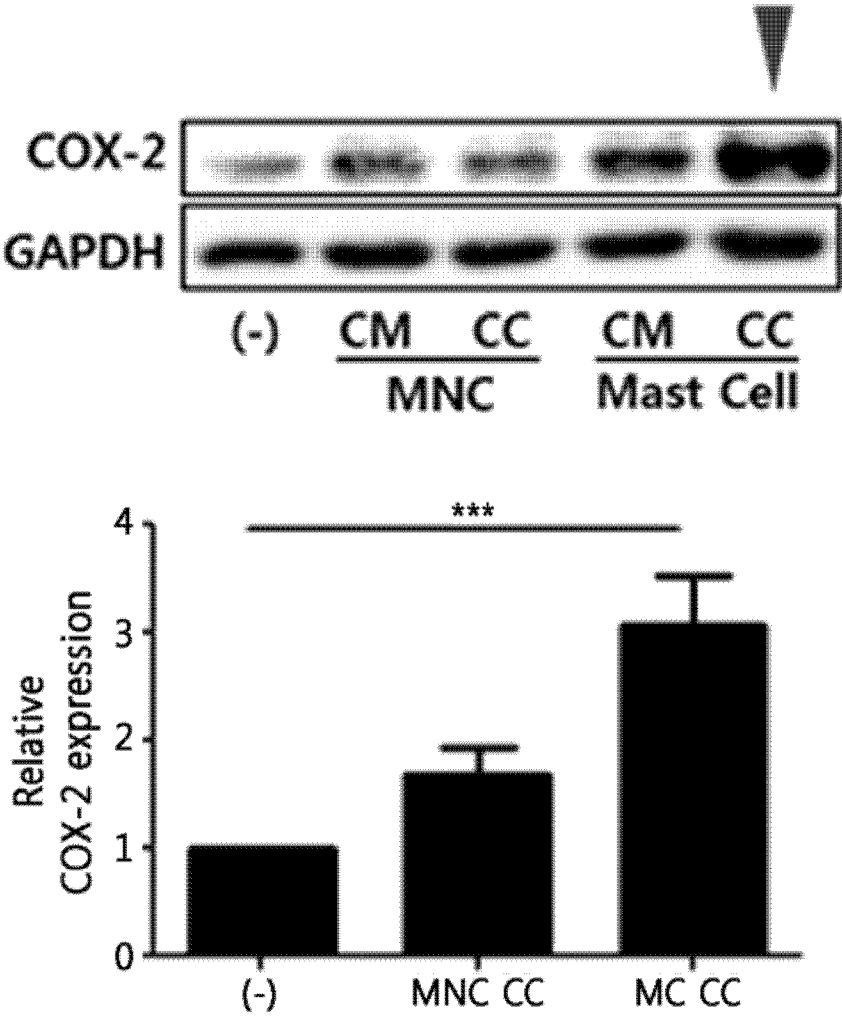
[Fig. 2]



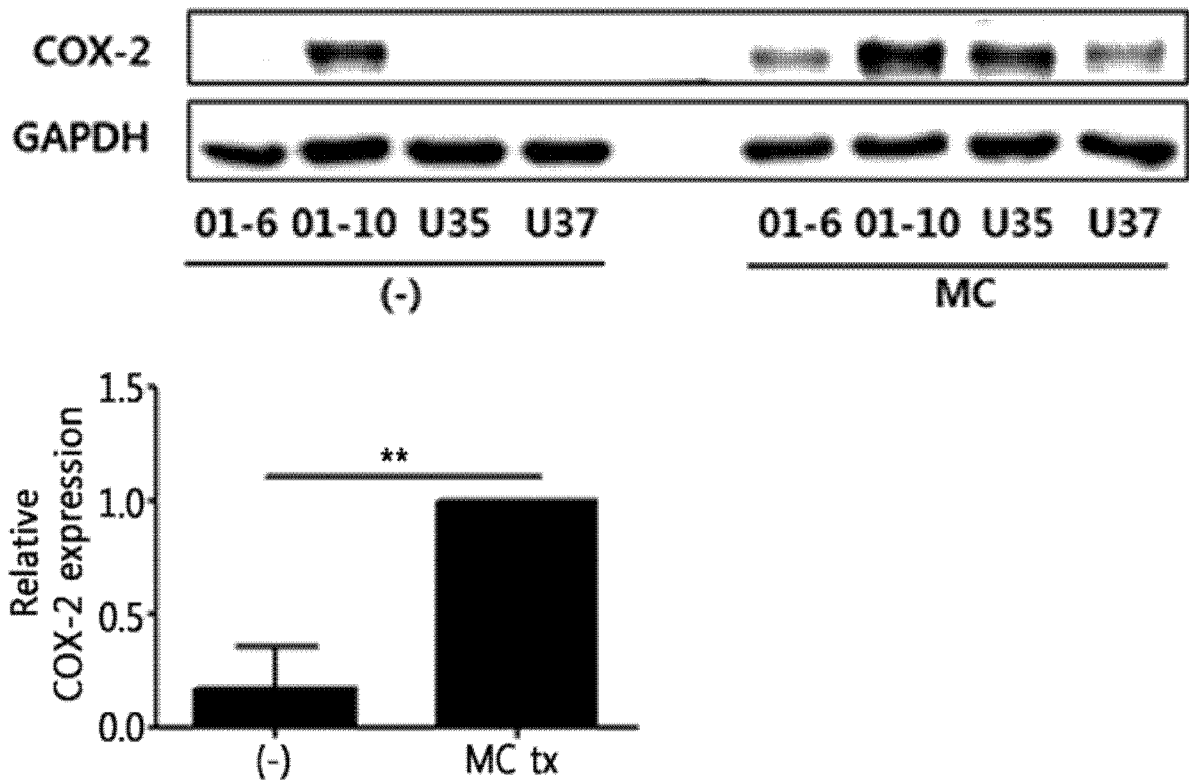
[Fig. 3]



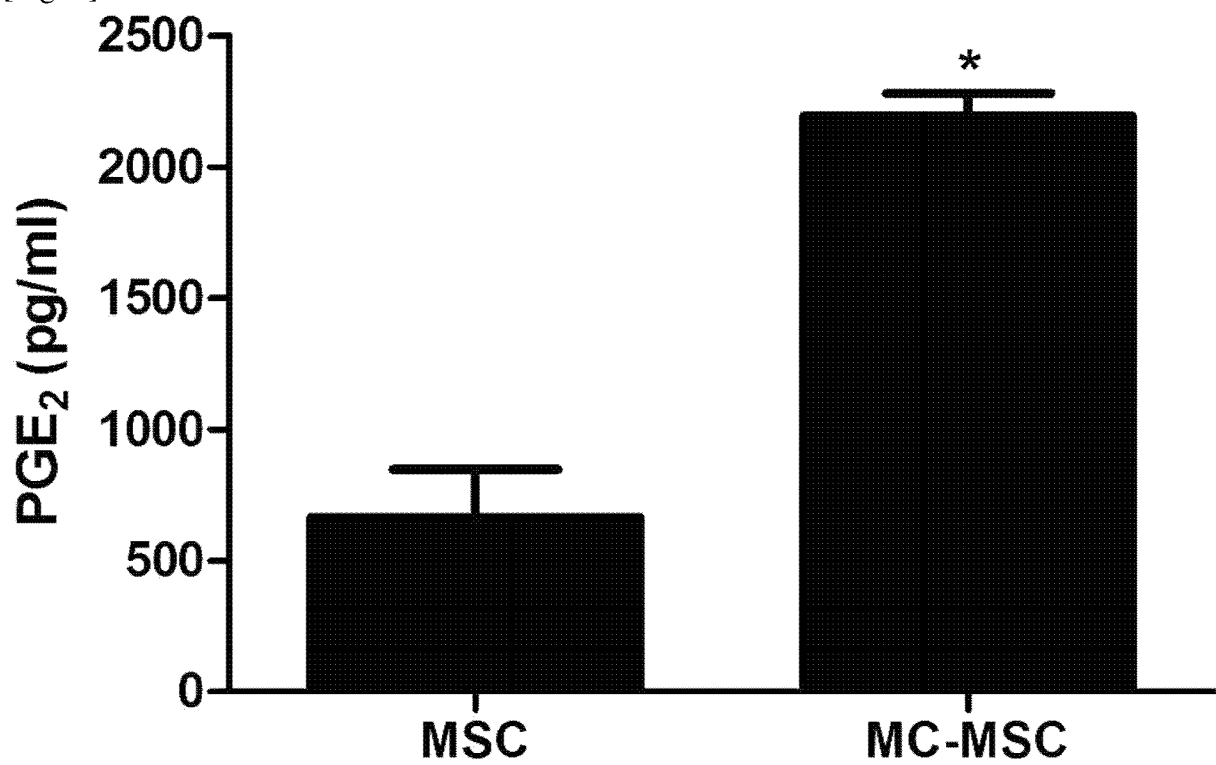
[Fig. 4]



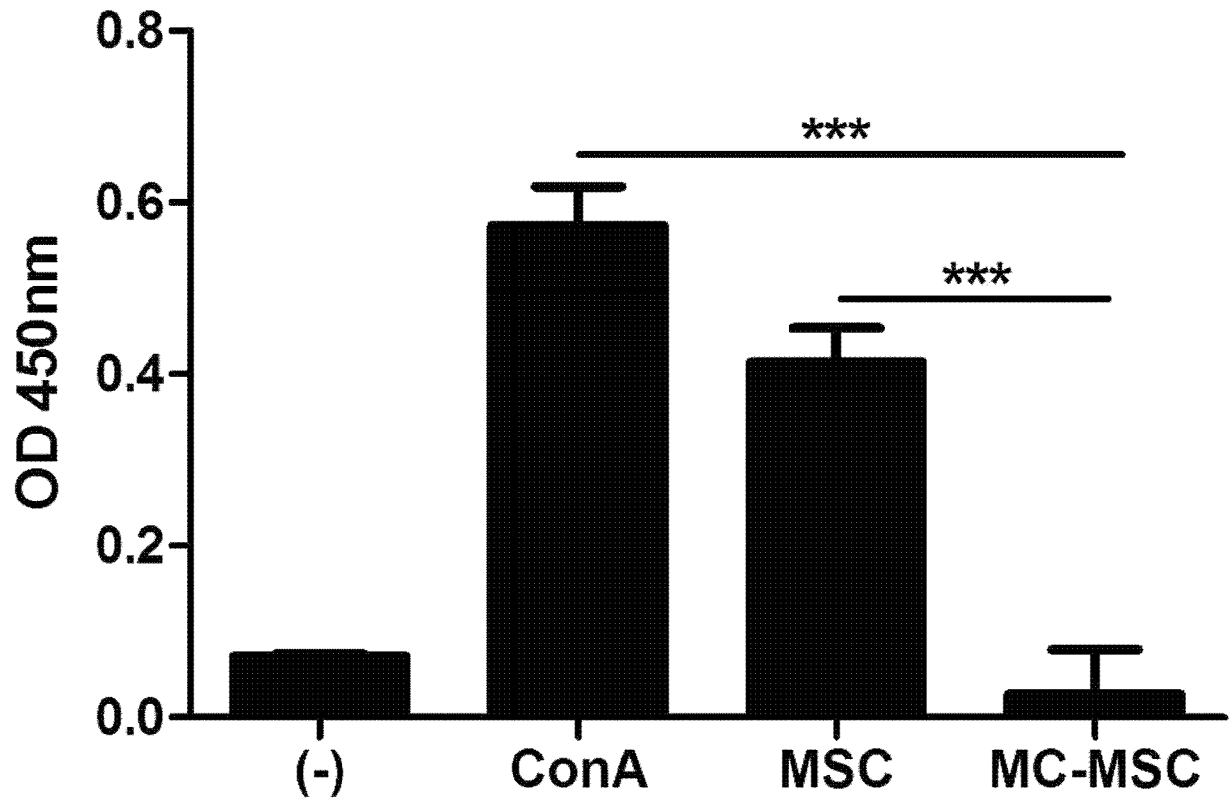
[Fig. 5]



[Fig. 6]



[Fig. 7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/010065**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****A61K 35/44(2006.01)i, A61K 35/12(2006.01)i, A61P 29/00(2006.01)i, A61P 37/00(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 35/44; C12N 5/0783; C12N 5/0775; A61K 35/12; A61P 29/00; A61P 37/00

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) & Keywords: stem cell, mast cell, immunosuppression, anti-inflammatory, COX-2, PGE2

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2013-0096661 A (KANG STEM HOLDINGS CO., LTD.) 30 August 2013 See abstract; paragraphs [0047]-[0052]; and claims 1-12.	1-9,12-13,15-17
A	KR 10-2010-0076031 A (TXCELL) 05 July 2010 See abstract; paragraphs [0055]-[0102].	1-9,12-13,15-17
A	LING, W. et al., "Mesenchymal stem cells use IDO to regulate immunity in tumor microenvironment", Cancer Research, March 2014, vol. 74, no. 5, pages 1576-1587 See abstract; and pages 1577-1582.	1-9,12-13,15-17
A	AKARASERREENONT, P. et al., "The expression of COX-2 in VEGF-treated endothelial cells is mediated through protein tyrosine kinase", Mediators of Inflammation, 2002, vol. 11, pages 17-22 See abstract.	1-9,12-13,15-17
A	DOMINGO-GONZALEZ, R. et al., "COX-2 expression is upregulated by DNA hypomethylation after hematopoietic stem cell transplantation", The Journal of Immunology, 2012, vol. 189, pages 4528-4536 See abstract.	1-9,12-13,15-17



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 JANUARY 2016 (22.01.2016)

Date of mailing of the international search report

22 JANUARY 2016 (22.01.2016)

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/KR2015/010065

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.: **10, 11, 14**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 10, 11 and 14 pertain to a method for treatment of the human body by surgery or 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/KR2015/010065

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2013-0096661 A	30/08/2013	WO 2013-125899 A1	29/08/2013
KR 10-2010-0076031 A	05/07/2010	EP 2205721 A1	14/07/2010
		JP 2011-500045 A	06/01/2011
		JP 5539886 B2	02/07/2014
		US 2010-0247577 A1	30/09/2010
		WO 2009-050282 A1	23/04/2009

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 35/44(2006.01)i, A61K 35/12(2006.01)i, A61P 29/00(2006.01)i, A61P 37/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 35/44; C12N 5/0783; C12N 5/0775; A61K 35/12; A61P 29/00; A61P 37/00

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: 줄기세포, 비만세포, 면역억제, 염증억제, COX-2, PGE2

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2013-0096661 A (주식회사 강스탬홀딩스) 2013.08.30 요약; 단락 [0047]-[0052]; 및 청구항 1-12 참조.	1-9, 12-13, 15-17
A	KR 10-2010-0076031 A (티엑셀) 2010.07.05 요약; 단락 [0055]-[0102] 참조.	1-9, 12-13, 15-17
A	LING, W. 등, 'Mesenchymal stem cells use IDO to regulate immunity in tumor microenvironment', Cancer Research, 2014년 03월, 74권, 5호, 페이지 1576-1587 초록; 및 페이지 1577-1582 참조.	1-9, 12-13, 15-17
A	AKARASERENONT, P. 등, 'The expression of COX-2 in VEGF-treated endothelial cells is mediated through protein tyrosine kinase', Mediators of Inflammation, 2002년, 11권, 페이지 17-22 초록 참조.	1-9, 12-13, 15-17
A	DOMINGO-GONZALEZ, R. 등, 'COX-2 expression is upregulated by DNA hypomethylation after hematopoietic stem cell transplantation', The Journal of Immunology, 2012년, 189권, 페이지 4528-4536 초록 참조.	1-9, 12-13, 15-17

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

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

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

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

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

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

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

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2016년 01월 22일 (22.01.2016)

국제조사보고서 발송일

2016년 01월 22일 (22.01.2016)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



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

팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관

이정아

전화번호 +82-42-481-8740



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: 10, 11, 14
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 10, 11 및 14는 수술 또는 치료에 의한 사람의 처치방법에 관한 것이므로 PCT 17(2)(a)(i) 및 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제조사할 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 10-2013-0096661 A	2013/08/30	WO 2013-125899 A1	2013/08/29
KR 10-2010-0076031 A	2010/07/05	EP 2205721 A1	2010/07/14
		JP 2011-500045 A	2011/01/06
		JP 5539886 B2	2014/07/02
		US 2010-0247577 A1	2010/09/30
		WO 2009-050282 A1	2009/04/23