명세서

발명의 명칭: CD47 과발현 중간엽 줄기세포를 포함하는 폐 질환 예방 또는 치료용 조성물

기술분야

[1] CD47을 과발현하는 중간엽 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 폐 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[2] 폐(lung)는 인체에서 호흡을 담당하는 필수적인 기관으로, 공기의 들숨과 날숨을 통해 산소를 얻고 이산화탄소를 배출하는 기관이다. 이러한 폐는 생명 현상의 유지를 위해 기능하고, 폐에서 체액 성분이 활발하게 상피 세포를 통해 흡수 또는 배출되며, 경우에 따라서는 흡입형 약물의 전달 통로가 될 수 있다.

[3] 이러한 폐에 나타나는 폐 질환 중에서 대표적인 질환인 천식(Asthma)은 지난 20년 동안 발병률이 두 배로 증가하고 오늘날 8~10%의 세계 인구에 영향을 미치고 있는 질환이며, 주로 기도의 만성 염증에 의해 일어난다. 천식은 비특이적 자극에 대한 기도 과민성(Airway HyperResponsiveness, AHR) 및 기도 개형(Airway Remodeling)을 특징으로 하며, 후자는 섬유아세포(Fibroblast) 및 근섬유아세포(Myofibroblasts)의 세포성 변화와 기도의 구조적 변화를 일으키는 동적 과정을 수반한다. 천식의 종류에는 기관지 천식 및 심장성 천식 등이 있는데, 단순히 천식은 보통의 경우 기관지 천식을 의미한다. 천식이 반복되면 섬유화 및 기도 개형이 발생하면서 영구적인 폐 기능 저하를 초래하기도 한다.

[4] 천식과 함께 대표적인 폐 질환의 하나로 꼽히는 만성 폐쇄성 폐 질환(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)은 비가역적인 기도 폐색을 동반한다는 점에서 천식과 차이가 있다. 기도 및 폐 실질 염증에 의한 세기관지 및 폐 실질의 병리학적 변화에 의해 발생하는 질환으로 폐쇄성 세기관지염 및 폐기종을 특징으로 한다. 만성 폐쇄성 폐 질환의 종류에는 만성 폐쇄성 기관지염(Chronic obstructive bronchitis), 만성 세기관지염(Chronic bronchiolitis) 및 폐기종(Emphysema)이 있으며, 호흡 곤란, 기침, 가래 등의 증상이 나타나고, 만성 기관지염 환자 중의 대다수에서 나타난다고 알려져 있다.

[5] 또한, 폐 섬유증(pulmonary fibrosis)은 일종의 만성 간질성 폐 질환으로서, 림프구, 대식세포 등 염증 세포의 폐 간질 침윤, 섬유아세포 증식 및 섬유성 결합 조직의 폐 간질 침적을 통하여 심각한 호흡 장애를 일으키는 폐 질환이다. 폐의 섬유화가 진행됨에 따라 여러가지 합병증이 나타나는데, 폐활량 감소와 산소 확산 장애로 발생하는 전신성 저산소증, 섬유 조직이 수축함에 따라 폐 동맥 및 모세혈관이 눌려 발생하는 폐 고혈압, 폐 순환 장애로 우심실에 혈액이 고여 유발되는 심부전, 그 외에도 혈전증, 폐렴 등이 있다. 또한 염증과 섬유화로 인해 폐암 발병률이 증가할 수 있다.

[6] 이와 같이 다양한 폐 질환은 대부분 염증 또는 섬유화와 관련되어 있으며, 현재까지 이를 동시에 개선할 수 있는 폐 질환 치료제는 알려져 있지 않은 상황이다.

[7] 이에, 본 발명자들은 염증 또는 섬유화와 관련된 다양한 폐 질환을 부작용 없이 효과적으로 치료하기 위하여 예의 노력한 결과, CD47을 과발현하는 제대혈 유래 중간엽 줄기세포가 항염증 및 항섬유화 효과를 나타내는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[8] 본 발명의 목적은, 항염증 및 항섬유화 효과를 나타내는 폐 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는데 있다.

[9] 본 발명의 다른 목적은, CD47을 발현하는 중간엽 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 폐 질환을 치료하는 방법을 제공하는데 있다.

[10] 본 발명의 또 다른 목적은, CD47을 발현하는 중간엽 줄기세포를 폐 질환의 치료에 사용하기 위한 치료제의 제조에 사용하기 위한 용도를 제공하는데 있다.

과제 해결 수단

[11] 상기 목적을 달성하기 위하여, 일 양상은 CD47을 발현하는 중간엽 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 폐 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[12] 용어, "CD47(Cluster of Differentiation 47)"은 인테그린 관련 단백질(integrin associated protein, IAP)라고도 불리우며, 리간드 트롬보스폰딘-1(thrombospondin-1, TSP-1) 및 신호 조절 단백질 알파(signal-regulatory protein alpha, SIRPα)에 결합하고, 인간 세포에서 발현되는 세포 표면 당단백질을 의미한다. 종양 조직에서 CD47의 발현을 억제하는 경우에 CTLA 및 PD-1을 표적으로 하여 T 세포 매개 적응 면역의 식세포 작용을 유도함으로써 일부 암 치료 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다. CD47의 활성화는 P13K/Akt 경로를 통한 향상된 암 세포의 증식과 상관관계가 있는 것으로 밝혀졌다. 면역 반응 외에도 CD47은 세포 사멸, 증식, 부착 및 이동을 포함한 다양한 세포 과정에 관여한다.

[13] 용어, "중간엽 줄기세포(Mesenchymal Stem cells, MSCs)"는 수정란이 분열하여 생긴 중배엽에서 분화된 연골, 골조직, 지방조직, 골수의 기질(stroma) 등에 존재하는 줄기세포를 의미할 수 있고, 포유류, 예를 들면 인간을 포함한 동물의 중간엽 줄기세포를 포함할 수 있다. 중간엽 줄기세포는 줄기세포능(stemness)과 자기재생능(self-renewal)을 유지하고 연골세포, 조골세포, 근육세포, 지방세포를 포함한 다양한 세포로 분화할 수 있는 능력을 가지며, 골수(bone marrow), 지방조직(adipose tissue), 재대혈(umbilical cord blood), 활막(synovial membrane), 골조직(trabecular bone), 근육, 슬개건하 지방(infrapatellar fat pad) 등에서 추출할

수 있다. 중간엽 줄기세포는 T 림프구, B 림프구의 활성, 증식을 억제하며, 자연 살해 세포(natural killer cell, NK cell)의 활성을 억제하고, 수지상세포(dendritic cell)와 대식세포(macrophage)의 기능을 조절하는 면역조절 능력을 가지고 있으므로 동종이식(allotransplantation)과 이종이식(xenotransplantation)이 가능한 세포이다.

[14] 상기 중간엽 줄기세포는 CD47의 발현이 증가되도록 유전적으로 조작된 것일 수 있다.

[15] 용어 "유전적 조작(genetic engineering)" 또는 "유전적으로 조작된(genetically engineered)"은 세포에 대하여 하나 이상의 유전적 변형(genetic modification)을 도입하는 행위를 의미할 수 있다.

[16] 상기 발현(expression) 증가 또는 과발현(overexpression)은 주어진 유전적으로 조작되지 않은 모세포(예를 들어, 야생형)가 갖는 내재적 단백질의 발현과 비교하여, 동일한 타입의 단백질의 발현이 보다 더 높은 수준을 갖는 것을 의미할 수 있다.

[17] 상기 유전적으로 조작된 중간엽 줄기세포는 CD47을 암호화하는 외인성 유전자(exogenous gene)가 도입된 재조합 벡터를 포함하는 것일 수 있다.

[18] 일 구현예에서, CD47을 암호화하는 외인성 유전자가 도입된 바이러스 벡터를 이용하여 CD47을 과발현하는 중간엽 줄기세포를 제조할 수 있다.

[19] 상기 외인성 유전자는, 상기 중간엽 줄기세포 또는 숙주 세포에서 그 모세포에 비하여 CD47의 활성이 증가되기에 충분한 양으로 발현된 것일 수 있다. 상기 외인성 유전자는 발현 벡터를 통하여 모세포 내로 도입된 것일 수 있다. 또한, 상기 외인성 유전자는 선형 폴리뉴클레오티드 형태로 모세포 내로 도입된 것일 수 있다. 또한, 상기 외인성 유전자는 세포 내에서 발현 벡터(예를 들어, 플라스미드)로부터 발현되는 것일 수 있다. 또한, 상기 외인성 유전자는 안정적인 발현을 위하여 세포 내의 유전물질(예를 들어, 염색체)에 삽입되어 발현되는 것일 수 있다. 또한, 상기 외인성 유전자는 유전자에 작동 가능하게 연결된 외인성 프로모터에 의해 적절히 조절되는 것일 수 있다. 상기 폴리뉴클레오티드의 발현량 강화는 발현 조절 서열의 치환 또는 돌연변이에 의한 변형, 폴리뉴클레오티드 서열 자체의 변이 도입, 개시 코돈의 교체, 염색체에 삽입하는 것 또는 벡터를 통해 도입하는 것에 의한 카피수 증가, 또는 이의 조합에 의한 것일 수 있다.

[20] 용어, "작동가능하게 연결된"은 조절 서열(예, 프로모터)과 상기 폴리뉴클레오티드 서열 사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절 서열은 상기 폴리뉴클레오티드 서열의 전사 및/또는 번역을 조절하게 된다. 상기 조절 서열은 상기 폴리뉴클레오티드의 발현량을 증가시킬 수 있는 강력한 프로모터일 수 있다. 상기 조절 서열은 코리네박테리움 속 또는 다른 미생물에서 유래한 프로모터일 수 있다. 상기 프로모터는 예를 들면, trc 프로모터, gap 프로모터, tac 프로모터, T7 프로모터, lac 프로모터, trp 프로모터, araBAD

프로모터 또는 cj 1 내지 7 프로모터일 수 있다. 상기 조절 서열은 예를 들면, 코리네박테리움 속 미생물에서 라이신 생합성 경로 상의 주요 유전자의 프로모터 서열을 더 높은 프로모터 활성을 갖도록 변형시킨 것일 수 있다.

[21] 용어, "벡터"는 적합한 숙주 세포 내에서 목적 유전자를 발현시킬 수 있도록 유전자의 조절 서열과 염기서열을 함유하는 폴리뉴클레오티드 제조물을 의미할 수 있다. 혹은 숙주 세포 내로 도입시켜 숙주의 게놈상의 내생적(endogenous) 유전자의 조절 서열을 바꾸거나, 게놈상의 특정 부위에 발현 가능한 목적 유전자를 삽입할 수 있도록 상동 재조합이 가능한 염기서열을 함유하는 폴리뉴클레오티드 제조물을 의미할 수 있다. 그러므로, 상기 벡터는 숙주 내로의 도입 혹은 염색체 삽입 여부를 확인하기 위한 선별 마커(selection marker)를 추가로 포함할 수 있는데, 선별 마커는 약물 내성, 영양 요구성, 세포 독성제에 의한 내성 또는 표면 단백질의 발현과 같은 선택 가능한 표현형을 부여하는 마커들이 사용될 수 있다. 선택제가 처리된 환경에서는 선별 마커를 발현하는 세포만 생존하거나, 다른 표현 형질을 나타내므로, 형질전환된 세포를 선별할 수 있다. 상기 벡터는 플라스미드 벡터, 렌티바이러스 벡터, 코즈미드 벡터 및 박테리오파아지 벡터, 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터 및 아데노-연관 바이러스 벡터와 같은 바이러스 벡터를 포함할 수 있다. 또한, 상기 재조합 벡터로 사용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드(예를 들면, pSC101, pGV1106, pACYC177, ColE1, pKT230, pME290, pBR322, pUC8/9, pUC6, pBD9, pHC79, pIJ61, pLAFR1, pHV14, pGEX 시리즈, pET 시리즈 및 pUC19 등), 파지(예를 들면, λgt4λB, λ-Charon, λΔz1 및 M13 등) 또는 바이러스(예를 들면, SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있다.

[22] 상기 재조합 벡터는, 전형적으로 클로닝을 위한 벡터 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 상기 발현용 벡터는 당업계에서 식물, 동물 또는 미생물에서 외래의 단백질을 발현하는 데 사용되는 통상의 것을 사용할 수 있다. 상기 재조합 벡터는 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있다.

[23] 상기 재조합 벡터는 원핵 세포 또는 진핵 세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다. 예를 들어, 사용되는 벡터가 발현 벡터이고, 원핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터(예를 들어, pLλ 프로모터, CMV 프로모터, trp 프로모터, lac 프로모터, tac 프로모터, T7 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 라이보좀 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 진핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 벡터에 포함되는 진핵 세포에서 작동하는 복제원점은 f1 복제원점, SV40 복제원점, pMB1 복제원점, 아데노 복제원점, AAV 복제원점 및 BBV 복제원점 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 포유동물 세포의 게놈으로부터 유래된 프로모터(예를 들어, 메탈로티오닌 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터(예를 들어, 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, 사이토메갈로바이러스 프로모터 및 HSV의 tk프로모터)가 이용될 수

있으며, 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 서열을 일반적으로 갖는다.

[24] 상기 재조합 세포는 상기 재조합 벡터를 적절한 숙주 세포에 도입시킴으로써 얻어진 것일 수 있다. 상기 숙주세포는 상기 재조합 벡터를 안정되면서 연속적으로 클로닝 또는 발현시킬 수 있는 세포로서 당업계에 공지된 어떠한 숙주 세포도 이용할 수 있으며, 원핵 세포로는, 예를 들어, E. coliJM109, E. coliBL21, E. coli RR1, E. coli LE392, E. coli B, E. coli X 1776, E. coli W3110, 바실러스 서브틸리스, 바실러스 츄린겐시스와 같은 바실러스 속 균주, 그리고 살모넬라 티피무리움, 세라티아 마르세슨스 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균과 균주 등이 있으며, 진핵 세포에 형질 전환시키는 경우에는 숙주 세포로서, 효모(Saccharomyce cerevisiae), 곤충 세포, 식물 세포 및 동물 세포, 예를 들어, Sp2/0, CHO(Chinese hamster ovary) K1, CHO DG44, PER.C6, W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, Huh7, 3T3, RIN, MDCK 세포주 등이 이용될 수 있다.

[25] 상기 중간엽 줄기세포는 탯줄, 제대혈, 태반, 골수, 지방조직, 근육, 양수, 양막 및 치수로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나에서 유래된 것일 수 있다.

[26] 용어 "분리된 세포", 예를 들어, "분리된 중간엽 줄기세포" 또는 "유래된 세포", 예를 들어, "유래된 중간엽 줄기세포"등은 세포가 기원하는 조직, 예를 들어, 제대혈로부터 실질적으로 분리된 세포를 의미한다.

[27] 상기 탯줄(umbilical cord)은 포유류의 태아가 태반에서 성장할 수 있도록 모체와 배를 연결해주는 줄을 의미할 수 있으며, 일반적으로 와튼 젤리(Wharton's jelly)로 둘러싸인 3개의 혈관, 즉, 2개의 배꼽 동맥과 1개의 배꼽 정맥으로 구성된 조직을 의미할 수 있으며, 제대로 불리기도 한다.

[28] 상기 제대혈은 포유 동물의 태반과 태아를 연결하는 탯줄정맥으로부터 채취된 혈액을 의미할 수 있다. 상기 제대혈은 출산시 공여자의 탯줄정맥으로부터 용이하게 채취할 수 있다. 구체적으로, 정상 질식 분만의 경우에는 출산 후 자궁 내에 아직 태반이 남아있는 상태에서 밖으로 만출된 제대정맥으로부터 채취할 수 있으며, 제왕 절개의 경우에는 출산 후 태반 역시 자궁 밖으로 만출된 상태에서 제대정맥으로부터 채취할 수 있다.

[29] 일 구현예에서, 상기 중간엽 줄기세포는 제대혈 유래일 수 있다.

[30] 상기 중간엽 줄기세포는 세포 집단의 20% 내지 99%가 CD47을 발현하는 것일 수 있다.

[31] 상기 중간엽 줄기세포는 세포 집단의 적어도 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 약 99%, 또는 30% 내지 100%, 30% 내지 99%, 30% 내지 98%, 30% 내지 97%, 40% 내지 99%, 50% 내지 99%, 60% 내지 99%, 70% 내지 99%, 80% 내지 99% 또는 90% 내지 99%가 CD47을 발현하는 것일 수 있다.

[32] 일 구현예에서, 대조군 중간엽 줄기세포 집단의 약 29%가 CD47을 발현하였으며, CD47을 암호화하는 외인성 유전자가 도입된 재조합 벡터를 포함하는 중간엽 줄기세포 집단의 약 96%가 CD47을 발현하는 것을 확인할 수

있다.

[33] 구체적으로, 상기 유전적으로 조작되지 않은 중간엽 줄기세포 집단의 20% 내지 85%, 20% 내지 70%, 20% 내지 60%, 25% 내지 50%가 CD47을 발현할 수 있다. 상기 유전적으로 조작된 중간엽 줄기세포 집단의 80% 내지 100%, 85% 내지 99%, 90% 내지 99%는 CD47을 발현할 수 있다.

[34] 상기 중간엽 줄기세포는 i) CD90, CD105, CD73 및 CD166로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 마커에 대하여 양성이고, ii) CD14 또는 HLA-DR 마커에 대하여 음성일 수 있다.

[35] 용어, "양성 또는 +"은 중간엽 줄기세포 특이적 마커와 관련하여, 그 마커가 기준이 되는 다른 세포와 비교하였을 때 더 많은 양, 또는 더 높은 농도로 존재하는 것을 의미할 수 있다. 즉, 세포는 어느 마커가 세포 내부 또는 표면에 존재하기 때문에 그 마커를 이용하여 그 세포를 하나 이상의 다른 세포 유형과 구별할 수 있으면 그 마커에 대하여 양성이 된다. 또한 세포가 배경 값보다 더 큰 값으로 신호, 예를 들어 세포 측정 장치의 신호를 낼 수 있는 만큼의 양으로 그 마커를 발현하고 있다는 것을 의미할 수 있다. 예를 들어 세포를 CD90 특이적인 항체로 검출 가능하게 표지할 수 있고, 이 항체로부터의 신호가 대조군(예를 들어, 배경 값)보다 검출 가능하게 더 크면 그 세포는 "$CD90^{+}$"이다.

[36] 용어, "음성 또는 -"은 특정 세포 마커에 특이적인 항체를 사용하여도 배경 값에 비교하여 그 표지를 검출할 수 없음을 의미할 수 있다. 예를 들어 CD14에 특이적인 항체로 세포를 검출 가능하게 표지할 수 없으면 그 세포는 "$CD14^{-}$"이다.

[37] 일 구현예에서, 유전적으로 조작된 CD47 과발현 중간엽 줄기세포 집단과 유전적으로 조작되지 않은 중간엽 줄기세포 집단에서 동일하게 98% 이상이 CD90, CD105, CD73 및 CD166 마커를 발현하고, 1% 이하가 CD14 및 HLA-DR 마커를 발현하는 것을 확인할 수 있다. 따라서, 유전적으로 조작된 CD47 과발현 중간엽 줄기세포도 중간엽 줄기세포 특이적 특성을 유지하는 것을 확인할 수 있다.

[38] 상기 중간엽 줄기세포는 CD9, CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD166, 및 HLA-abc로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 마커에 대하여 양성일 수 있다.

[39] 상기 중간엽 줄기세포는 CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD14, CD15, CD16, CD19, CD20, CD22, CD33, CD36, CD38, CD61, CD62E, CD133 및 HLA-DR로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 마커에 대하여 음성일 수 있다.

[40] 상기 중간엽 줄기세포는 감소된 면역원성을 나타내는 것일 수 있다.

[41] 일 구현예에서, CD47 과발현 중간엽 줄기세포를 PBMC 또는 NK 세포와 공배양한 경우에, 활성화된 PBMC와 NK 세포에 의한 세포 사멸 효과가 감소하는 것을 확인할 수 있다. 따라서, 상기 CD47 과발현 중간엽 줄기세포를 투여한 경우에 자가 유래가 아니여도 활성화된 PBMC 또는 NK 세포에 의한

면역 반응을 회피할 수 있으므로, 투여한 세포의 생체 내 생존률이 증가할 수 있다.

[42] 상기 폐 질환은 천식, 폐렴, 만성 폐쇄성 폐 질환, 기관지염, 폐기종, 폐 고혈압 또는 폐 섬유증일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[43] 상기 중간엽 줄기세포는 폐 조직의 염증 반응을 감소시킬 수 있다.

[44] 상기 중간엽 줄기세포는 M1 대식세포를 감소시키고, M2 대식세포를 증가시킬 수 있다.

[45] M1 대식세포는 염증 반응을 유발하고, M2 대식세포는 염증 반응을 감소시키고 손상된 조직을 복구시키는 역할을 한다.

[46] 일 구현예에서, 천식 마우스 모델에 CD47 과발현 중간엽 줄기세포를 정맥 투여한 결과, CD47 과발현 중간엽 줄기세포가 폐 조직까지 잘 이동했으며, 폐 조직의 염증 반응을 유발하는 M1 대식세포 특이적 마커의 발현을 감소시키고, 손상된 조직을 복구시키는 M2 대식세포 특이적 마커의 발현을 증가시키는 것을 확인할 수 있다. 또한, 천식 마우스 모델의 기관지 폐포 세척액(BALF)의 염증성 사이토카인의 발현 및 호중구 세포수를 감소시키는 것을 확인할 수 있다.

[47] 따라서, 상기 CD47 과발현 중간엽 줄기세포는 천식을 비롯한 폐 조직의 염증 반응과 관련된 질환의 예방 또는 치료 용도로 사용될 수 있다.

[48] 상기 CD47을 과발현하는 중간엽 줄기세포는 α-SMA(α-smooth muscle actin) 및 MMP-13(matrix metalloproteinase-13)의 발현을 감소시킬 수 있다.

[49] 일 구현예에서, CD47 과발현 중간엽 줄기세포와 인간 폐 섬유아세포(Human Pulmonary Fibroblasts, HPF)를 공배양한 결과, 섬유화 특이적 마커의 발현이 감소하는 것을 확인할 수 있다.

[50] 따라서, 상기 CD47 과발현 중간엽 줄기세포는 섬유증을 비롯한 폐 조직의 섬유화와 관련된 질환이 예방 또는 치료 용도로 사용될 수 있다.

[51] 다른 양상은 상기 CD47 과발현 중간엽 줄기세포 배양액을 유효성분으로 포함하는 폐 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[52] 상기 CD47 과발현 중간엽 줄기세포 배양액은 상기 CD47 과발현 중간엽 줄기세포를 적합한 배지에서 계대배양하는 과정에서 배양액을 수득한 후 여과하는 단계를 통하여 수득할 수 있다.

[53] 다른 양상은 상기 CD47 과발현 중간엽 줄기세포 또는 이의 세포 집단을 유효성분으로 포함하는 세포치료제 또는 약학적 조성물을 제공한다.

[54] 상기 세포치료제 또는 약학적 조성물은 폐 질환의 예방 또는 치료용인 것일 수 있다.

[55] 또 다른 양상은 CD47 과발현 중간엽 줄기세포 또는 이의 세포 집단을 의약의 제조에 사용하기 위한 용도를 제공한다.

[56] 일 구체예에 따르면, 상기 용도는 CD47을 발현하는 중간엽 줄기세포를 폐 질환의 치료에 사용하기 위한 치료제의 제조에 사용하기 위한 용도일 수 있다.

[57] 또 다른 양상은 상기 CD47 과발현 중간엽 줄기세포 또는 이의 세포 집단을

치료학적으로 유효한 양 또는 약학적으로 유효한 양으로 개체에 투여하는 단계를 포함하는 폐 질환 치료 방법을 제공한다.

[58] 상기 세포치료제 또는 약학적 조성물은 치료학적으로 유효한 양 또는 약학적으로 유효한 양으로 환자에 투여될 수 있다.

[59] 용어, "치료"는 질환, 장애 또는 병태, 또는 그의 하나 이상의 증상의 경감, 진행 억제 또는 예방을 지칭하거나, 그를 포함하며, "유효성분"은 질환, 장애 또는 병태, 또는 그의 하나 이상의 증상의 경감, 진행 억제 또는 예방에 유효한 세포 집단 또는 조성물을 의미할 수 있다.

[60] 용어, "투여하는," "도입하는" 및 "이식하는"은 상호교환적으로 사용되고 일 구현예에 따른 조성물의 원하는 부위로의 적어도 부분적 국소화를 초래하는 방법 또는 경로에 의한 개체내로의 일 구현예에 따른 조성물의 배치를 의미할 수 있다. 일 구현예에 따른 조성물의 세포 또는 세포 성분의 적어도 일부를 생존하는 개체 내에서 원하는 위치로 전달하는 임의의 적절한 경로에 의해 투여될 수 있다. 개체 투여 후 세포의 생존 기간은 짧으면 수 시간, 예를 들면 24시간 내지 수일 내지 길면 수년일 수 있다. 상기 약학적 조성물은 치료학적으로 유효한 양 또는 약학적으로 유효한 양으로 환자에 투여될 수 있다.

[61] 용어 "치료학적으로 유효한 양" 또는 "약학적으로 유효한 양"이란 폐 질환을 예방 또는 치료하는데 유효한 세포 집단 또는 조성물의 양으로서, 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미한다. 상기 유효량의 수준은 환자의 건강 상태, 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

[62] 상기 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[63] 구체적으로, 상기 약학적 조성물에서 상기 CD47 과발현 중간엽 줄기세포의 유효량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중(kg) 당 약 $1X10^6$ ~ $1X10^7$ cells의 세포를 단회 혹은 반복하여 투여할 수 있다. 투여 경로, 질병의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로, 범위는 이에 한정되지 않는다.

[64] 중복되는 내용은 본 명세서의 복잡성을 고려하여 생략하며, 본 명세서에서 달리 정의되지 않은 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상적으로 사용되는 의미를 갖는 것이다.

발명의 효과

[65] 일 양상에 따른 CD47을 과발현하는 중간엽 줄기세포는 자가 유래가 아닌 경우에도 생체 내에서 높은 생존률 및 폐 조직으로의 이동능을 나타내고, 폐 조직의 염증 반응을 감소시키며, 섬유화를 억제하는 효과를 나타내므로 폐의 염증 또는 섬유화와 관련된 다양한 폐 질환의 예방 또는 치료 용도로 널리 활용될 것이다.

도면의 간단한 설명

[66] 도 1은 일 양상에 의한 CD47 과발현 중간엽 줄기세포(MSC O.E.)와 대조군 중간엽 줄기세포(MSC V.C.)의 CD47 발현율을 확인한 결과이다.

[67] 도 2는 일 양상에 의한 CD47 과발현 중간엽 줄기세포(MSC O.E.)와 대조군 중간엽 줄기세포(MSC V.C.)의 중간엽 줄기세포 특이적 마커의 발현 정도를 비교한 결과이다.

[68] 도 3는 일 양상에 의한 CD47 과발현 중간엽 줄기세포(MSC O.E.)와 대조군 중간엽 줄기세포(MSC V.C)를 천식 마우스 모델에 투여한 후, 폐 조직에서의 염증 개선 효과를 비교한 결과이다.

[69] 도 4는 일 양상에 의한 CD47 과발현 중간엽 줄기세포(MSC O.E.)와 대조군 중간엽 줄기세포(MSC V.C)를 천식 마우스 모델에 투여한 후, 폐 조직에서 M1 대식세포 특이적 마커인 CD11b의 발현 변화를 면역세포화학염색을 통하여 확인한 결과이다.

[70] 도 5는 일 양상에 의한 CD47 과발현 중간엽 줄기세포(MSC O.E.)와 대조군 중간엽 줄기세포(MSC V.C)를 천식 마우스 모델에 투여한 후, 폐 조직에서 M1 대식세포 특이적 마커인 CD11b를 발현하는 세포의 개수를 측정한 결과이다.

[71] 도 6은 일 양상에 의한 CD47 과발현 중간엽 줄기세포(MSC O.E.)와 대조군 중간엽 줄기세포(MSC V.C)를 천식 마우스 모델에 투여한 후, 폐 조직에서 M2 대식세포 특이적 마커인 CD163의 발현 변화를 면역세포화학염색을 통하여 확인한 결과이다.

[72] 도 7은 일 양상에 의한 CD47 과발현 중간엽 줄기세포(MSC O.E.)와 대조군 중간엽 줄기세포(MSC V.C)를 천식 마우스 모델에 투여한 후, 폐 조직에서 M2 대식세포 특이적 마커인 CD163을 발현하는 세포의 개수를 측정한 결과이다.

[73] 도 8은 일 양상에 의한 CD47 과발현 중간엽 줄기세포(MSC O.E.)와 대조군 중간엽 줄기세포(MSC V.C)를 천식 마우스 모델에 정맥 투여한 후, 폐 조직으로 이동 여부를 면역세포화학염색을 통하여 확인한 결과이다.

[74] 도 9는 일 양상에 의한 CD47 과발현 중간엽 줄기세포(MSC O.E.)와 대조군 중간엽 줄기세포(MSC V.C)를 천식 마우스 모델에 정맥 투여한 후, 폐 조직으로 이동한 CD47 과발현 중간엽 줄기세포의 개수를 측정한 결과이다.

[75] 도 10은 일 양상에 의한 CD47 과발현 중간엽 줄기세포(MSC O.E.)와 대조군 중간엽 줄기세포(MSC V.C)를 천식 모델에 투여한 후, 기관지 폐포 세척액(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)에서 염증성 사이토카인의 발현

변화를 확인한 결과이다.

[76] 도 11은 일 양상에 의한 CD47 과발현 중간엽 줄기세포(MSC O.E.)와 대조군 중간엽 줄기세포(MSC V.C)를 천식 모델에 투여한 후, BALF에서 호중구 세포수의 변화를 확인한 결과이다.

[77] 도 12는 일 양상에 의한 CD47 과발현 중간엽 줄기세포(MSC O.E.)와 대조군 중간엽 줄기세포(MSC V.C)를 각각 활성화된 말초 혈액 단핵세포(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)와 공배양한 후, 중간엽 줄기세포의 생존변화를 면역세포화학염색을 통하여 확인한 결과이다.

[78] 도 13은 일 양상에 의한 CD47 과발현 중간엽 줄기세포(MSC O.E.)와 대조군 중간엽 줄기세포(MSC V.C)를 각각 PBMC와 공배양한 후, 중간엽 줄기세포의 생존률을 측정한 결과이다.

[79] 도 14는 일 양상에 의한 CD47 과발현 중간엽 줄기세포(MSC O.E.)와 대조군 중간엽 줄기세포(MSC V.C)를 각각 활성화된 자연 살해 세포(natural killer cell, NK cell)와 공배양한 후, 중간엽 줄기세포의 생존 변화를 면역세포화학염색을 통하여 확인한 결과이다.

[80] 도 15는 일 양상에 의한 CD47 과발현 중간엽 줄기세포(MSC O.E.)와 대조군 중간엽 줄기세포(MSC V.C)를 활성화된 NK 세포를 공배양한 후, 중간엽 줄기세포의 생존률을 측정한 결과이다.

[81] 도 16은 일 양상에 의한 CD47 과발현 중간엽 줄기세포(MSC O.E.)와 대조군 중간엽 줄기세포(MSC V.C)를 인간 폐 섬유아세포(Human Pulmonary Fibroblasts, HPF)와 공배양한 후, 섬유화 특이적 마커의 발현량 변화를 확인한 결과이다.

발명의 실시를 위한 형태

[82] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[83]

[84] **제조예 1. 제대혈로부터 중간엽 줄기세포의 분리**

[85] 건강한 산모의 동의를 얻어 분만 과정에서 공여되는 제대정맥으로부터 수득한 기증 제대혈을 피콜 하이팩 그라디언트(Ficoll-Hypaque gradient)로 원심분리하여 단핵구 세포를 수득한 후, 중간엽 줄기세포 배양 배지에서 배양하여 제대혈 유래 중간엽 줄기세포를 수득하였다.

[86]

[87] **조예 2. CD47 과발현 중간엽 줄기세포의 제조**

[88] CD47 과발현 렌티바이러스를 생산하기 위하여, plenti-suCMV-RSV-GFP 벡터에 CD47 ORF(Open reading frame) 서열을 EZ-Fusion HT Cloning Kit(#EZ015, Enzynomics)를 이용하여 클로닝하였다. plenti-suCMV-RSV-GFP-CD47, pMD2.G 및 psPAX2 벡터를 293T 세포에 트랜스펙션하여 렌티바이러스를 패키징하였다.

바이러스 입자를 함유하는 배지를 수집하고 중간엽 줄기세포에 처리하여 형질도입하였다. 항생제인 퓨로마이신(#ant-pr-1, Invivogen)을 2일 동안 처리하여 형질도입된 줄기세포만을 선별 및 배양하여 CD47 과발현 중간엽 줄기세포(Overexpression, O.E)를 제조하였다. CD47 발현량 및 기능 분석을 위한 대조군 중간엽 줄기세포(Vector control, V.C)는 backbone vector인 plenti-suCMV-RSV-GFP를 이용하여 상기 CD47 과발현 중간엽 줄기세포 제조와 동일한 방법으로 렌티바이러스 패키징, 형질도입, 항생제 선별을 통하여 제조하였다.

[89]

[90] **실시예 1. CD47 과발현 중간엽 줄기세포의 특성 분석**

[91] 제조예 2에서 제조한 CD47 과발현 중간엽 줄기세포의 특성을 분석하기 위하여, 다음과 같이 웨스턴 블랏(Western blot)과 유세포 분석(Flow cytometry)을 수행하였다.

[92] 웨스턴 블랏 방법을 보다 구체적으로 설명하면, 대조군 중간엽 줄기세포, CD47 과발현 중간엽 줄기세포 각각에 RIPA lysis buffer(#78440, Thermo Scientific)를 처리한 후 얼음에서 30분 동안 반응시켜 세포를 파쇄하였다. 이 세포 파쇄액을 원심분리한 후 상등액만을 모아 BCA Protein Assay Kit(#23225, Thermo Scientific)를 이용하여 정량화하였다. 단백질 추출액 10 ㎍을 10% SDS-PAGE를 이용하여 분리한 후 멤브레인에 트랜스퍼하였다. blocking buffer(0.1% Tween 20, 5% BSA in tris buffered saline)로 1시간 동안 실온(room temperature)에서 반응시킨 후 1차 항체를 처리하여 4℃에서 밤새도록 반응시켰다. 사용한 1차 항체로는 CD47(#MA5-11895, Thermo Scientific), b-actin(#A5441, Sigma)이다. TBST로 3회 세척 후 2차 항체를 실온에서 1시간 동안 반응시키고, 세척 후 ChemiDoc MP System(Bio-rad)을 이용하여 단백질 밴드를 분석하였다.

[93] 세포 표면에서의 CD47 과발현 확인을 위하여 유세포 분석을 시행하였다. 보다 구체적으로 설명하면, CD47 단백질 발현의 유세포 분석을 위해 실온에서 15분 동안 PE Mouse Anti-human CD47(#556046, BD Biosciences)로 세포를 염색하였다. 상응하는 PE Mouse IgG1, k Isotype(#555749, BD Biosciences)를 대조군으로 사용하였다. PBS로 1회 세척 후 1% PFA로 고정하고 MACS Quant기기(MACS Quantify)에서 단백질 발현량을 분석하고, 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[94] 도 1에 나타낸 바와 같이, 대조군 중간엽 줄기세포 집단(MSC V.C.)과 비교하여 CD47 과발현 줄기세포 집단(O.E.)에서 CD47 단백질 발현량이 현저하게 증가한 것을 확인하였다. 구체적으로, CD47를 발현하는 세포수가 대조군1 중간엽 줄기세포에서는 29.42%였으나, CD47 과발현 중간엽 줄기세포에서는 96.02%로 증가하였다.

[95]

[96] 또한, 대조군 중간엽 줄기세포 집단(MSC V.C.)과 CD47 과발현 줄기세포 집단(MSC O.E.)에서 중간엽 줄기세포 특이적 마커의 발현량을 상기 기재된

방법으로 유세포 분석을 통하여 비교하고, 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[97] 도 2에 나타낸 바와 같이, 대조군 중간엽 줄기세포 집단(MSC V.C.)과 CD47 과발현 줄기세포 집단(MSC O.E.)에서 동일하게 중간엽 줄기세포 특이적 마커인 CD90, CD105, CD73 및 CD166을 발현하는 세포 수가 98% 이상이였으며, CD14 및 HLA-DR을 발현하는 세포 수는 1% 이하인 것을 확인하였다. 이를 통하여, CD47 과발현 유도로 인해 중간엽 줄기세포의 특이적 표현형이 변화되지 않는다는 것을 알 수 있었다.

[98]

[99] **실시예 2. 천식 동물 모델에 CD47 과발현 중간엽 줄기세포 투여에 따른 폐 조직에서의 효과 확인(in-vivo)**

[100] C57BL/6J 암컷 마우스(6주령)를 Orient Bio Inc.에서 구입하여 1주일 동안 순화시켰다. 천식을 유도하기 위해, 마우스에 Ovalbumin(OVA; Sigma-Aldrich) 100 μg과 Alum(Sigma-Aldrich) 2 mg을 0일차 및 7일차(총 2회)에 복강투여하였다. 이후, 제조예 2에서 제조한 CD47을 과발현하는 중간엽 줄기세포는 20일차에 복강 투여하였다(5 x 10^5 cells/100 μL/마우스). 21~23일차에 마우스를 마취한 후 OVA(30 μL/마우스) 50 μg를 비강으로 투여하였다. 24일차에 모든 마우스를 희생시키고 정맥 카테터를 사용하여 식염수 2 ㎖로 기관지 폐포 세척액(Bronchoalveolar lavage fluid, BALF)을 수득하였다.

[101]

[102] **실시예 2.1 폐 조직의 염증 변화 확인**

[103] 수득한 폐 조직 절편을 Hematoxyling and Eosin(H&E) 염색하여 조직 분석을 수행하고 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[104] 도 3에 나타낸 바와 같이, 대조군 중간엽 줄기세포(MSC V.C.) 투여군에서도 폐 조직의 염증이 개선되었으나, CD47 과발현 중간엽 줄기세포(MSC O.E.) 투여군에서 대조군 중간엽 줄기세포 투여군과 비교하여 염증 개선의 정도가 현저하게 증가한 것을 확인하였다.

[105]

[106] **실시예 2.2 폐 조직에서 M1 대식세포 특이적 마커의 발현 변화 확인**

[107] 폐조직 절편을 Integrin Alpha M(CD11b; Abbexa)로 1:40 농도로 면역세포화학염색하고, 이차 항체로 Cy3 Rabbit anti-mouse IgG1(Jackson ImmunoResearch Europe Ltd.)를 붙여서 CD11b의 발현 정도를 확인하였다. 폐 조직 내 세포의 핵은 4',6-diamidino-2-phenylindole(DAPI)로 염색하고 그 결과를 도 4 및 도 5에 나타내었다.

[108] 도 4 및 도 5에 나타낸 바와 같이, 천식 마우스 모델에 CD47 과발현 중간엽 줄기세포(MSC O.E.)를 투여한 경우에, 대조군중간엽 줄기세포(MSC V.C.) 투여군과 비교하여 M1 대식세포 특이적 마커인 CD11b의 발현량이 감소한 것을 확인하였다.

[109]

[110] **실시예 2.3 폐 조직에서 M2 대식세포 특이적 마커의 발현 변화 확인**

[111] 폐조직 절편을 Scavenger Receptor Cysteine-Rich Type 1 Protein M130(CD163; Abbexa)로 1:30 농도로 면역세포화학염색하고, 이차항체로 Alexa 488 Rabbit anti-mouse IgG1(Jackson ImmunoResearch Europe Ltd.)를 붙여서 CD163의 발현정도를 확인하였다. 폐 조직 내 세포의 핵은 DAPI로 염색하고 그 결과를 도 6 및 도 7에 나타내었다.

[112] 도 6 및 도 7에 나타낸 바와 같이, 천식 마우스 모델에 CD47 과발현 중간엽 줄기세포(MSC O.E.)를 투여한 경우에, 대조군 중간엽 줄기세포(MSC V.C.) 투여군과 비교하여 M2 대식세포 특이적 마커인 CD163의 발현량이 증가한 것을 확인하였다.

[113]

[114] **실시예 2.4 정맥 투여 후 폐 조직으로 이동한 세포 수의 확인**

[115] 폐조직 절편을 Anti-beta 2 Microglobulin antibody(β-2MG; Abcam)로 1:300 농도로 면역세포화학염색하고, 이차 항체로 Alexa 488 Rabbit anti-mouse IgG1(Jackson ImmunoResearch Europe Ltd.)를 붙여서 β-2MG의 발현 정도를 확인하였다. 폐 조직 내 세포의 핵은 DAPI로 염색하고, 그 결과를 도 8 및 도 9에 나타내었다.

[116] 도 8 및 도 9에 나타낸 바와 같이, 천식 마우스 모델에 CD47 과발현 중간엽 줄기세포(MSC O.E.)를 투여한 경우에, 대조군 중간엽 줄기세포(MSC V.C.) 투여군과 비교하여 폐 조직에서 β-2MG의 발현 정도가 높은 것을 확인하였다. 이를 통하여, 정맥 투여 후 폐 조직으로 이동한 중간엽 줄기세포 수가 CD47 과발현 중간엽 줄기세포(MSC O.E.)이 더 많은 것을 알 수 있었다.

[117]

[118] **실시예 3. 천식 동물 모델에 CD47 과발현 중간엽 줄기세포 투여에 따른 BALF에서의 효과 확인(in-vivo)**

[119] **실시예 3.1 BALF에서 염증성 사이토카인의 발현 변화 확인**

[120] 실시예 2에서 수득한 BALF를 4℃, 1000 rpm 조건에서 10분 동안 원심분리한 후 분리한 상층액에서 mouse tumor necrosis factor-α(mTNF-α; R&D systems)를 효소면역측정법(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA)으로 정량하고, 그 결과를 도 10에 나타내었다.

[121] 도 10에 나타낸 바와 같이, 천식 마우스 모델에 CD47 과발현 중간엽 줄기세포(MSC O.E.)를 투여한 경우에, 대조군 중간엽 줄기세포(MSC V.C.) 투여군과 비교하여 염증성 사이토카인인 mTNF-α의 분비량이 가장 적은 것을 확인하였다.

[122]

[123] **실시예 3.2 BALF에서 호중구 세포수의 감소 효과 확인**

[124] 실시예 2에서 수득한 BALF를 원심분리하여 가라앉힌 세포를 Diff-Quik 염색하고, 호중구(neutrophil) 세포 수를 측정하고 그 결과를 도 11에 나타내었다.

[125] 도 11에 나타낸 바와 같이, 천식 유도 마우스 모델에서 증가한 호중구의 수는 중간엽 줄기세포 투여군에서 감소하였으며, 특히 CD47 과발현 중간엽 줄기세포(MSC O.E.) 투여군에서 가장 많이 감소한 것을 확인하였다.

[126]

[127] **실시예 4. CD47 과발현 중간엽 줄기세포의 면역조절 효과 확인(in-vitro)**

[128] **실시예 4.1 PBMC와의 공배양을 통한 면역조절 효과 확인**

[129] 조건별 중간엽 줄기세포를 Recombinant human interleukin 2(hIL-2; miltenyi Biotec) 10 ng/mL과 Phytohemagglutinin-L(PHA; Roche) 5 μg/mL로 활성화시킨 Human peripheral blood mononuclear cells(PBMC; AllCells)와 공동배양 하였다. 24시간 후, 중간엽 줄기세포에서 발현되고 있는 GFP 형광을 형광현미경으로 관찰 및 계수하고 그 결과를 도 12 및 도 13에 나타내었다.

[130] 도 12 및 도 13에 나타낸 바와 같이, CD47 과발현 중간엽 줄기세포(MSC O.E.)의 경우에 70.3%의 세포가 생존하였으며, 대조군 중간엽 줄기세포(MSC V.C.)는 44.5%의 세포가 생존한 것을 확인하였다. 이를 통하여, CD47 과발현 중간엽 줄기세포(MSC O.E.)가 대조군 중간엽 줄기세포(MSC V.C.)와 비교하여 활성화된 PBMC로 인한 세포 사멸에 더 강하다는 것을 알 수 있었다.

[131]

[132] **실시예 4.2 NK 세포와의 공배양을 통한 면역조절 효과 확인**

[133] 조건별 중간엽 줄기세포를 2주 동안 IL-2 50 IU와 5% Human serum(HS; Sigma-aldrich)으로 활성화시킨 Human natural killer cells(NK cell; Lonza)와 공동배양 하였다. 3시간 후, 중간엽 줄기세포에서 발현되고 있는 GFP 형광을 형광현미경으로 관찰 및 계수하고 그 결과를 도 14 및 도 15에 나타내었다.

[134] 도 14 및 도 15에 나타낸 바와 같이, CD47 과발현 중간엽 줄기세포(MSC O.E.)의 경우에 63.8%의 세포가 생존하였으며, 대조군 중간엽 줄기세포(MSC V.C.)는 26.1%의 세포가 생존한 것을 확인하였다. 이를 통하여, CD47 과발현 중간엽 줄기세포(MSC O.E.)가 대조군 중간엽 줄기세포(MSC V.C.)와 비교하여 활성화된 NK cell로 인한 세포 사멸에 더 강하다는 것을 알 수 있었다.

[135]

[136] **실시예 5. CD47 과발현 중간엽 줄기세포의 항섬유화 효과 확인(in-vitro)**

[137] 인간 일차 폐 섬유아세포(Human primary lung fibroblast, HLF; ATCC)에 섬유화 유도 물질인 TGF-β1(R&D systems) 5 ng/mL을 24시간 동안 처리한 후, 1 μm pore size의 transwell(BD Falcon)을 사용하여 동량의 중간엽 줄기세포와 공동배양 하였다. 공배양 완료 후, trizol(Invitrogen)을 이용하여 HLF의 RNA를 얻고 amfirivert cDNA systhesis platinum master mix(GenDEPOT)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성한 cDNA로부터 대표적인 섬유화 마커인 alpha-smooth muscle actin(α-SMA)와 Matrix Metalloproteinase-13(MMP-13)의 발현량을 확인하기 위하여, 중합효소연쇄반응(quantitative real time polymerase chain reaction, qPCR)을 LightCycler 480(Roche)로 수행하고 그 결과를 도 16에 나타내었다.

PCR에서 사용한 프라이머 서열은 하기 표 1에 기재된 바와 같다.

[138] [표1]

유전자명	염기서열	서열번호
α-SMA (FORWARD)	5'TTG CCT GAT GGG CAA GTG AT 3'	1
α-SMA (REVERSE)	5'TAC ATA GTG GTG CCC CCT GA 3'	2
MMP-13 (FORWARD)	5'TCC TCT TCT TGA GCT GGA CTC ATT 3'	3
MMP-13 (REVERSE)	5'CGC TCT GCA AAC TGG AGG TC 3'	4

[139] 도 16에 나타낸 바와 같이, 대조군 중간엽 줄기세포(MSC O.E.)에 비해 CD47 과발현 중간엽 줄기세포(MSC O.E.)와 공배양한 HLF 조건에서 대표적인 섬유화 마커인 α-SMA과 MMP-13의 발현이 가장 감소한 것을 확인하였다.

청구범위

[청구항 1] CD47을 발현하는 중간엽 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 폐 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 2] 청구항 1에 있어서,
상기 중간엽 줄기세포는 CD47의 발현이 증가되도록 유전적으로 조작된 것인, 폐 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 3] 청구항 2에 있어서,
상기 유전적으로 조작된 중간엽 줄기세포는 CD47을 암호화하는 유전자가 도입된 재조합 벡터를 포함하는 것인, 폐 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 4] 청구항 1에 있어서,
상기 중간엽 줄기세포는 세포 집단의 20% 내지 99%가 CD47을 발현하는 것인, 폐 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 5] 청구항 1에 있어서,
상기 중간엽 줄기세포는
i) CD90, CD105, CD73 및 CD166로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 마커에 대하여 양성이고,
ii) CD14 또는 HLA-DR 마커에 대하여 음성인, 폐 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 6] 청구항 1에 있어서,
상기 중간엽 줄기세포는 탯줄, 제대혈, 태반, 골수, 지방조직, 근육, 양수, 양막 및 치수로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나에서 유래된 것인, 폐 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 7] 청구항 1에 있어서,
상기 중간엽 줄기세포는 감소된 면역원성을 나타내는 것인, 폐 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 8] 청구항 1에 있어서,
상기 중간엽 줄기세포는 폐 조직의 염증 반응을 감소시키는 것인, 폐 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 9] 청구항 1에 있어서,
상기 CD47을 발현하는 중간엽 줄기세포는 M1 대식세포를 감소시키고, M2 대식세포를 증가시키는 것인, 폐 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 10] 청구항 1에 있어서,
상기 CD47을 발현하는 중간엽 줄기세포는 α-SMA(α-smooth muscle actin) 및 MMP-13(matrix metalloproteinase-13)의 발현을 감소시키는 것인, 폐 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 11] 청구항 1에 있어서,
상기 폐 질환은 천식, 폐렴, 만성 폐쇄성 폐 질환, 기관지염, 폐기종, 폐고혈압 또는 폐 섬유증인, 폐 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 12] CD47을 발현하는 중간엽 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 폐 질환을 치료하는 방법.

[청구항 13] CD47을 발현하는 중간엽 줄기세포를 폐 질환의 치료에 사용하기 위한 치료제의 제조에 사용하기 위한 용도.