

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2024-0104325
(43) 공개일자 2024년07월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 35/32 (2015.01) A23K 10/20 (2016.01)
A23L 33/10 (2022.01) A61K 8/98 (2006.01)
A61P 1/02 (2006.01) A61Q 11/00 (2006.01)
C12N 5/077 (2010.01)

(52) CPC특허분류

A61K 35/32 (2013.01)
A23K 10/20 (2016.05)

(21) 출원번호 10-2022-0186164

(22) 출원일자 2022년12월27일

심사청구일자 2022년12월27일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

허정선

서울특별시 성동구 마장로 137, 201동 501호

지주영

서울특별시 중랑구 망우로 346, 104동 1814호

(74) 대리인

특허법인정진

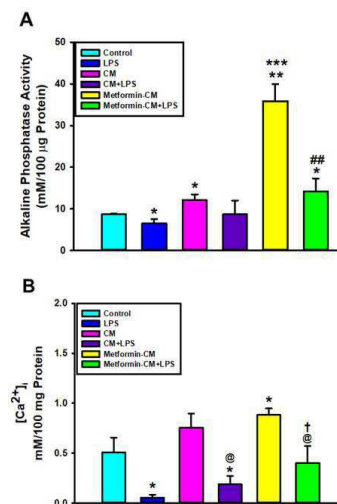
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 메트포민이 포함된 배지에서 배양한, 분비 단백체를 함유하는 치주인대줄기세포 배양액을 포함하는, 치주 질환 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 메트포민(Metformin)이 포함된 배지에서 배양한 치주인대줄기세포 배양액을 포함하는, 치주 질환 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 대한 것으로, 메트포민을 첨가한 배양액을 이용하여 배양한 치주인대줄기세포 조건 배양액(Metformin-conditioned medium, Metformin-CM)은 다양한 기능을 하며 서로 상호작용하는 분비 단백체를 포함하고 있으며, 치주인대줄기세포의 골분화 능력과 손상 시 회복시키는 효능을 현저히 증가시킬 수 있음을 확인한 바, 이를 치주염과 같은 치주 질환의 예방, 개선 또는 치료를 위한 다양한 분야에 유용하게 활용할 수 있다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

A23L 33/10 (2022.01)
A61K 8/981 (2013.01)
A61P 1/02 (2018.01)
A61Q 11/00 (2013.01)
C12N 5/0654 (2013.01)
C12N 5/066 (2013.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
C12N 2500/90 (2013.01)
C12N 2501/999 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711168476
과제번호	2021R1A2C1014077
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	치주인대줄기세포 유래 Secretome을 활용한 무세포 치료 기반 치주조직 재생 연구
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경희대학교 산학협력단
연구기간	2021.03.01 ~ 2024.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

메트포민(Metformin)이 포함된 배지에서 배양한 치주인대줄기세포 배양액을 포함하는, 치주 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 배양액은 치주인대줄기세포를 메트포민이 포함된 배지에서 24 내지 72시간 배양하여 수득한 것인, 약학적 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 배양액은 치주인대줄기세포 유래 분비 단백체를 포함하는 것인, 약학적 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 배양액은 치주인대줄기세포 배양액을 원심분리하여 수득한 상층액인 것인, 약학적 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 메트포민은 10 내지 100 μM 농도로 배지에 포함되는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서,

상기 배지는 무혈청 배지인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 7

제 1항에 있어서,

상기 배지는 α MEM(α Minimal essential Medium), DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium), MEM(Minimal essential Medium), BME(Basal Medium Eagle), RPMI1640, F-10, Ham's F12, GMEM(Glasgow's Minimal essential Medium) 및 IMDM(Iscove's Modified Dulbecco's Medium)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 8

제 1항에 있어서,

상기 배양액은 치아 유래 세포의 골분화 능력을 향상 또는 회복시키는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 9

제 8항에 있어서,

상기 치아 유래 세포는 치주인대줄기세포(periodontal ligament stem cells), 치수줄기세포(dental pulp stem cell) 및 치배 줄기세포(dental follicle precursor cells)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것인, 약학적 조성물.

청구항 10

제 1항에 있어서,

상기 치주 질환은 치주염(periodontitis), 치은염(gingivitis), 치조골 파손(alveolar bone breakage), 치조골 다공증(alveolar bone osteoporosis), 치조골연화증(alveolar bone osteomalacia), 치조골감소증(alveolar bone osteopenia), 잇몸 퇴축(gingival recession) 및 치아우식증(dental caries)으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상인 것인, 약학적 조성물.

청구항 11

메트포민(Metformin)이 포함된 배지에서 배양한 치주인대줄기세포 배양액을 포함하는, 치주 질환 예방 또는 개선을 위한 구강용 조성물.

청구항 12

메트포민(Metformin)이 포함된 배지에서 배양한 치주인대줄기세포 배양액을 포함하는, 치주 질환 예방 또는 개선용 의약품 조성물.

청구항 13

메트포민(Metformin)이 포함된 배지에서 배양한 치주인대줄기세포 배양액을 포함하는, 치주 질환 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 14

메트포민(Metformin)이 포함된 배지에서 배양한 치주인대줄기세포 배양액을 포함하는, 치주 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 15

메트포민(Metformin)이 포함된 배지에서 배양한 치주인대줄기세포 배양액을 포함하는, 치주 질환 예방 또는 개선용 사료첨가용 조성물.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 메트포민이 포함된 배지에서 배양한 치주인대줄기세포 배양액을 포함하는, 치주 질환 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 대한 것이다.

배경기술

[0003] 치주조직은 치은(잇몸), 백악질, 치주인대 및 치조골로 구성된 연조직과 경조직을 모두 포함하는 복잡한 기관이다. 치은은 치아의 지지와 저작과정에 관여하는 단순 결합조직인 반면에, 치주인대는 치아와 치조골 사이에 위치하여 치아를 악골에 부착 지지하며, 저작력과 같은 다양한 방향의 기계적 스트레스에 저항하고, 또한 감각기능을 하는 고도로 분화된 세포성 결합조직이다. 이러한 치주인대는 치조골측에 골모세포(osteoblast)와 파골세포(osteoclast), 치주인대의 중심측에 섬유모세포(fibroblast), Malassez 상피세포(epithelial rests of Malassez), 대식세포, 미분화 간엽세포, 신경 요소 그리고 혈관내피세포; 치근측에 위치하고 있는 백악모세포(cementoblasts) 등의 다양한 세포들로 구성되어 치조골, 치근 및 백악질의 수복과 재생에 관여하는 것으로 알려져 있다.

[0004] 치주 질환은 세균에 의해 야기되는 치아 지지조직의 염증상태를 말하며, 치은염 및 치주염으로 분리할 수 있다. 발병원인은 불량한 구강 위생상태로 인하여 구강 세균이 치면세균막을 형성하는데 있다. 치면세균막이란 침에 있는 끈끈한 물질을 접착제로 이용하여 세균이 치아 표면에 달라붙은 후 증식한 세균덩어리를 말한다. 치면세균막은 그냥 방치해 두면, 염증이 생겨 가끔 잇몸에서 피가 나고, 구취가 나는 경우가 있으며 이러한 증상을 치은염이라고 한다.

[0005] 치은염이 더 진행되면, 치아와 잇몸사이의 벌어진 틈이 더 깊어져서 치주낭이 생기고, 여기에 치주 질환을 일으키는 세균들이 번식하여 치주염이 발생한다. 치주염이 진행되면 치실질과 같은 약한 자극에도 잇몸에서 피가 나기도 하며 붓고, 종종 급성염증으로 변화되어 통증을 유발한다. 이러한 염증은 골을 만드는 기능을 저하시키고, 골을 흡수하는 작용이 높아져서 치조골이 점점 낮아지게 되어 치조골이 파괴되고 결국 치아를 상실하게 된다. 진행된 치주염은 치아 상실을 일으키는데 40세 이후의 성인에 있어서 치아를 뽑게 되는 원인 중 치주염이 차지하는 비율이 40%나 된다는 보고가 있을 정도로 치주염으로 인한 치아상실은 심각한 문제이다.

[0006] 치주 질환에서 치주인대와 치조골의 파괴는 이들 조직의 주성분인 교원질(collagen)의 분해에 의한 것이다. 이에 대한 정확한 기전(mechanism)은 아직 밝혀져 있지 않지만, 교원질의 분해는 숙주가 분비하는 콜라게나아제와 치주 질환 유발 세균으로부터 분비된 중성 단백질 분해 효소에 의한 것으로 알려져 있다. 따라서 콜라게나아제 효소 및 단백질 분해 효소의 활성을 억제함으로써 치주 질환의 진행을 억제하려는 연구가 시도되고 있다.

[0007] 치주 질환의 치료는 환자의 개선된 구강위생의 확립, 비외과적 혹은 외과적인 치석제거술, 치근활택술, 치은소파술과 신부착을 응용한 치주조직의 재생술들이 이용되어져 왔다. 그러나 이런 외과적인 치료 방법은 치료를 위해 치과를 가야 하는 번거로움으로 인해 효과적인 치료가 어렵고 또한 병의 예방보다는 병이 어느정도 진행되었을 경우 행하는 치료에 국한되어 있어, 치료를 하지 않을 경우 대부분이 만성으로 진행되는 경우가 대부분이다.

[0008] 부가적인 치료로 전신적인 항생제의 복용과 국소 서방형 제제가 사용되어 왔으나, 불필요한 부위에도 약물이 너무 많이 전달되어 그로 인한 부작용과 최근 사용되는 항생제에 대한 내성을 나타내는 치주 질환균이 분리된 예가 보고되고 있어 심각한 문제점을 안고 있다. 치주 질환으로 인하여 치아가 상실될 경우, 보철치료나 치과 임플란트 치료 등으로 인하여 환자의 부담이 급증하게 되며, 특히, 사회경제적 취약 계층에게 더욱 높은 진료 장벽이 될 수 있다. 따라서, 치아 상실에 이르기 전 손상된 조직을 재생할 수 있다면 치아 상실에 따르는 인공치아 또는 보철과 같은 치료의 수요를 줄여 경제적 사회적 부담을 경감시킬 수 있다.

[0009] 외과적 치료의 한계성과 항생제 사용의 문제점을 보완하고 치주 질환 예방 및 치료효과를 향상시키기 위해서는 질환에 의해 저하된 치주인대 줄기세포의 골분화능을 회복시킴으로써 파괴 및 소실된 치주조직을 원상회복시키는 효능을 지닌 제제의 개발이 절실히 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명자들은 치주염에 대해 우수한 치료 활성을 보이는 기술에 대하여 연구하던 중, 특정 물질을 첨가한 배지에 세포를 배양하여 수득한, 분비 단백체를 포함하는 조건 배양액(conditioned medium)이 우수한 치료 활성을 보임을 확인하여 본 발명을 완성하였다.
- [0012] 따라서 본 발명의 목적은 치주 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 다른 목적은 치주 질환 예방 또는 개선을 위한 구강용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 목적은 치주 질환 예방 또는 개선용 의약품 조성물을 제공하는 것이다.
- [0015] 본 발명의 또 다른 목적은 치주 질환 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.
- [0016] 본 발명의 또 다른 목적은 치주 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 것이다.
- [0017] 본 발명의 또 다른 목적은 치주 질환 예방 또는 개선용 사료첨가용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0019] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 메트포민(Metformin)이 포함된 배지에서 배양한 치주인대줄기세포 배양액을 포함하는, 치주 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0020] 또한 상기 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 메트포민(Metformin)이 포함된 배지에서 배양한 치주인대줄기세포 배양액을 포함하는, 치주 질환 예방 또는 개선을 위한 구강용 조성물을 제공한다.
- [0021] 또한 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 메트포민(Metformin)이 포함된 배지에서 배양한 치주인대줄기세포 배양액을 포함하는, 치주 질환 예방 또는 개선용 의약품 조성물을 제공한다.
- [0022] 또한 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 메트포민(Metformin)이 포함된 배지에서 배양한 치주인대줄기세포 배양액을 포함하는, 치주 질환 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0023] 또한 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 메트포민(Metformin)이 포함된 배지에서 배양한 치주인대줄기세포 배양액을 포함하는, 치주 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0024] 또한 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 메트포민(Metformin)이 포함된 배지에서 배양한 치주인대줄기세포 배양액을 포함하는, 치주 질환 예방 또는 개선용 사료첨가용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0026] 본 발명에 따르면 메트포민을 첨가한 배양액을 이용하여 배양한 치주인대줄기세포 조건 배양액(Metformin-conditioned medium, Metformin-CM)은 다양한 기능을 하며 서로 상호작용하는 다양한 분비 단백체를 포함하고 있으며, 치주인대줄기세포의 골분화 능력과 손상 시 회복시키는 효능을 현저히 증가시킬 수 있음을 확인한 바, 이를 치주염과 같은 치주 질환의 예방, 개선 또는 치료를 위한 다양한 분야에 유용하게 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0028] 도 1은 본 발명에 따른 메트포민(Metformin)을 첨가한 배양액을 이용하여 배양한 치주인대줄기세포 조건 배양액(conditioned medium, Metformin-CM로 기재)과 치주인대줄기세포를 배양하지 않은 α -MEM에 있어, 단백질 발현양상(Differentially Expressed Proteins, DEP)을 비교 분석하여 변화를 보인 단백질 및 이들의 기능 분포도를 확인한 결과이다.
- 도 2는 도 1에서 확인된, DEP에 있어 유의미한 변화를 나타낸 분비 단백질들을 생물학적 과정(biological process), 분자적 기능(molecular function) 또는 세포적 구성(cellular component)으로 분석한 결과이다.
- 도 3은 Metformin-CM 유래 분비 단백질의 단백질-단백질 상호작용을 확인한 결과이다.

도 4는 Metformin-CM이 치주인대줄기세포의 골세포로의 분화능에 미치는 영향을 확인한 결과로, 도 4A는 각 실험군의 ALP(alkaline phosphatase) 활성을 확인한 결과이고, 도 4B는 각 실험군의 세포내 칼슘 농도 (intracellular calcium content)를 확인한 결과이다. 상기 실험군은 LPS를 처리하지 않고 α -MEM 배지에서 배양한 치주인대줄기세포(대조군(Control로 표시)), LPS를 처리하고 α -MEM 배지에서 배양한 치주인대줄기세포인 (LPS로 표시), 메트포민을 포함하지 않는 배양액으로 치주인대줄기세포를 배양한 조건배양액으로 배양한 치주인대줄기세포(CM으로 표시), 메트포민을 포함하지 않는 배양액으로 치주인대줄기세포를 배양한 조건배양액으로 배양되고 LPS가 처리된 치주인대줄기세포(CM+LPS로 표시), 메트포민을 첨가하고 치주인대줄기세포를 배양한 조건 배양액으로 배양한 치주인대줄기세포(Metformin-CM으로 표시) 또는 메트포민을 첨가하고 치주인대줄기세포를 배양한 조건배양액으로 배양되고 LPS가 처리된 치주인대줄기세포(Metformin-CM-LPS로 표시)로 구성되었다.

도 5는 Metformin-CM이 치주인대줄기세포의 골세포로의 분화능에 미치는 영향을 확인한 결과로, 각 실험군의 석회화 결정 생성을 육안으로 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0029] 이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.
- [0030] 본 발명은 메트포민(Metformin)이 포함된 배지에서 배양한 치주인대줄기세포 배양액을 포함하는, 치주 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0031] 상기 약학적 조성물에 있어서, 상기 배양액은 치주인대줄기세포를 메트포민이 포함된 배지에서 24 내지 72시간 배양하여 수득한 것을 특징으로 한다. 바람직하게는 48 내지 72시간 배양하여 수득한 것일 수 있으며, 보다 바람직하게는 48시간 배양하여 수득한 것일 수 있다.
- [0032] 또한 상기 배양액은 치주인대줄기세포 유래 분비 단백체를 포함하는 것을 특징으로 한다. 상기 분비 단백질은 다양한 기능을 하며 서로 상호작용하는 것을 특징으로 한다. 더불어 이에 있어, 상기 배양액은 메트포민 (Metformin)이 포함된 배지에서 배양한 치주인대줄기세포 배양액을 원심분리하여 수득한 상층액일 수 있다. 상기 원심분리는 500 내지 2000 rpm으로 1 내지 10분간 수행될 수 있고, 바람직하게는 1000 내지 2000 rpm으로 1 내지 5분간 수행될 수 있으며, 보다 바람직하게는 1,000 rpm으로 3분간 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0033] 상기 메트포민은 10 내지 100 μ M 농도로 배지에 포함될 수 있으며, 바람직하게는 20 내지 70 μ M 농도로 포함될 수 있고, 보다 바람직하게는 50 μ M 농도로 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0034] 더불어 본 발명의 약학적 조성물에 있어서, 상기 배지는 무혈청 배지인 것을 특징으로 한다. 더불어 상기 배지는 당분야에 알려진 치주인대줄기세포를 배양할 수 있는 배지라면 제한없이 사용가능하다. α MEM(α Minimal essential Medium), DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium), MEM(Minimal essential Medium), BME(Basal Medium Eagle), RPMI1640, F-10, Ham' s F12, GMEM(Glasgow's Minimal essential Medium) 및 IMDM(Iscove's Modified Dulbecco's Medium)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 일실시예에서는 α MEM을 배지로 하여 치주인대줄기세포를 배양하였다.
- [0035] 더불어 본 발명의 다른 일실시예에 따르면, 본 발명의 메트포민(Metformin)이 포함된 배지에서 배양한 치주인대줄기세포 배양액은 치주인대 줄기세포의 골세포로의 분화능을 유의미하게 향상시켰으며, 치주염에 의해 저하된 골분화능 또한 회복시켰다. 따라서 본 발명의 약학적 조성물에 있어서, 상기 배양액은 치아 유래 세포의 골분화능력을 향상 또는 회복시키는 것을 특징으로 한다.
- [0036] 상기 치아 유래 세포는 치주인대줄기세포(periodontal ligament stem cells), 치수줄기세포(dental pulp stem cell) 및 치배 줄기세포(dental follicle precursor cells)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 바람직하게는 치주인대줄기세포(periodontal ligament stem cells)일 수 있다.
- [0037] 상기 치주 질환은 구강내 염증 및/또는 치아 유래 세포의 저하된 골분화능에 의해 유발된 질환일 수 있다. 바람직하게는 치주염(periodontitis), 치은염(gingivitis), 치조골 파손(alveolar bone breakage), 치조골다공증(alveolar bone osteoporosis), 치조골연화증(alveolar bone osteomalacia), 치조골감소증(alveolar bone osteopenia), 잇몸 퇴축(gingival recession) 및 치아우식증(dental caries)으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으며, 보다 바람직하게는 치주염(periodontitis)일 수 있다.
- [0038] 본 명세서에서 사용된 용어 "치료"는 유익하거나 바람직한 임상 결과를 얻기 위한 접근법으로서, 본 발명의 목

적을 위해 유익하거나 바람직한 임상적 결과를 감지 가능하거나 가능하지 않거나를 불문하고, 또한 부분적이든 전체적이든 상관없이 증상의 완화, 질환 정도의 감소, 질환의 안정화된(즉, 더 나빠지지 않는) 상태, 질환 진행의 지연 또는 속도감소, 질환 상태의 개선 또는 일시적 완화 및 경감을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 따라서, 치료는 치료법적 치료 및 예방적인 차원의 것들 모두를 가리키며, 치료할 필요가 있는 것들은 이미 질환을 가지고 있는 상태뿐만 아니라 질환이 예방되어야 할 상태를 포함한다. 또한 본 발명의 약학적 조성물을 개체에 투여하여 치주 질환의 증세가 호전되도록 하거나 이롭게 되도록 하는 모든 행위를 의미할 수 있다.

[0039] 본 발명에서 사용된 용어 "예방"은 본원에 따른 조성물의 투여 또는 도포로 본 조성물이 효과가 있는 질환의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 치주인대줄기세포의 골분화 능력을 향상 또는 회복시키는 효과가 있는 본 발명의 조성물은 염증 또는 골분화 저하로 인하여 유발되는 치주 질환의 초기 증상, 또는 나타나기 전에 복용 또는 투여할 경우 이러한 질환을 예방할 수 있다는 것은 당업자에게 자명할 것이다.

[0040] 본 발명의 약학적 조성물은 치주 질환이 발병되거나, 발병할 가능성이 있는 "개체"에 투여될 수 있으며, 상기 "개체"는 인간을 포함한 모든 동물을 의미할 수 있다.

[0041] 본 발명의 약학적 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 상기 약학적 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 본 발명의 락토바실러스 람노시스, 이의 배양액, 이의 추출물 및 이의 무세포 상등액으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상과 콜라겐 가수분해물 혼합에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제에는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0042] 본 발명의 약학적 조성물의 투여량은 치료받을 대상의 연령, 성별, 체중과, 치료할 특정 질환 또는 병리 상태, 질환 또는 병리 상태의 심각도, 투여경로 및 처방자의 판단에 따라 달라질 것이다. 이러한 인자에 기초한 투여량 결정은 당업자의 수준 내에 있으며, 일반적으로 투여량은 0.01mg/kg/일 내지 대략 2000mg/kg/일의 범위이다. 더 바람직한 투여량은 0.1mg/kg/일 내지 1000mg/kg/일이다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0043] 본 발명의 약학적 조성물은 쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있으며, 비경구, 경구 모두 사용할 수 있으나, 바람직하게는 비경구로 투여될 수 있다.

[0044] 비경구 투여를 위한 형태로는 치약, 구강세정제, 국소 투여제(크림, 연고, 드레싱 용액, 분무제, 기타 도포제등) 등을 들 수 있다. 상기 국소 투여제의 제형의 일 예로는, 본 발명에 따른 치주 질환을 예방 또는 치료하기 위한 약학적 조성물을 수용성 고분자를 포함하는 필름 또는 패치에 고정하여 치아 및 주변부위에 부착할 수 있도록 제형화한 것일 수 있다.

[0045] 본 발명에 있어서, 치주 질환을 예방 또는 치료하기 위한 약학적 조성물은 유효성분인 메트포민이 포함된 배지에서 배양한 치주인대줄기세포 배양액 외에, 치주 질환의 치료 효과 상승을 위하여 이미 안전성이 검증되고 치주 질환 치료 효과를 갖는 것으로 공지된 임의의 화합물이나 천연 추출물을 추가로 포함할 수 있다.

[0046] 또한 본 발명의 치주 질환을 예방 또는 치료하기 위한 약학적 조성물은 치주 질환의 외과적 치료와 더불어 사용될 수 있다.

[0047] 더불어 본 발명은 메트포민(Metformin)이 포함된 배지에서 배양한 치주인대줄기세포 배양액을 포함하는, 치주 질환 예방 또는 개선을 위한 구강용 조성물을 제공한다.

- [0048] 상기 구강용 조성물은 포함된 메트포민이 포함된 배지에서 배양한 치주인대줄기세포 배양액의 치아 유래 세포의 골분화능 향상 또는 회복 능력을 기반으로, 치주 조직의 염증 염증 반응 및 치조골(잇몸뼈) 손실로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 예방, 개선 또는 완화를 위하여 사용될 수 있다.
- [0049] 상기 구강용 조성물은, 구강의 위생 또는 치조골 손실 완화를 위하여 사용할 수 있는 모든 종류 및 제형으로 제공될 수 있다. 이의 예로서, 치약, 양치액, 껌, 구강 스프레이, 구강용 젤, 구강 연고제 및 구강용 패치 등이 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 또한 상기 구강용 조성물은 칫솔, 치실, 치간칫솔, 혀클리너, 구강용 티슈 등의 구강위생용품에 적용될 수 있다.
- [0050] 상기 본 발명의 구강용 조성물이 치약류인 경우, 유효성분으로 메트포민이 포함된 배지에서 배양한 치주인대줄기세포 배양액을 포함하는 것 외에, 연마제, 점결제, 보습제, 발포제, 감미료, 미백제 또는 향미제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0051] 상기 연마제로는 수산화알루미늄, 무수규산, 규산알루미늄, 제2인산칼슘 2 수산화물 및 무수물, 제3인산칼슘, 탄산칼슘, 피로인산칼슘, 불용성 메타인산나트륨, 제3인산마그네슘, 탄산마그네슘, 황산칼슘, 폴리메타아크릴산 메틸, 등을 단독 또는 복합적으로 사용할 수 있다. 상기 연마제의 함량은 전체 조성물을 기준으로 통상 20 중량% 내지 90 중량%일 수 있으나, 상기 함량에 의해 한정되는 것은 아니다. 상기 구강용 조성물이 페이스트상 조성물일 경우에는 상기 점결제는 가라기닌, 각종 점증용 셀룰로오스 유도체, 잔탄검, 트라가칸트 검(tragacanth gum) 등의 검류, 폴리비닐 알콜, 폴리아크릴산 나트륨, 폴리아크릴산/말레인산 공중합체, 카르복시비닐 폴리머 등의 합성 고분자 유도체 등의 유기계 점결제와 실리카, 라포나이트 등의 무기계 점결제 등을 단독 또는 복합적으로 사용할 수 있다. 상기 점결제의 함량은 전체 조성물을 기준으로 통상 0.3 중량% 내지 5 중량%일 수 있으나, 상기 함량에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [0052] 또한, 상기 구강용 조성물에는 그 제조시 보습제로 솔비톨, 글리세린, 에틸렌글리콜, 프로필렌글리콜, 폴리에테르 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0053] 또한, 상기 구강용 조성물에는 향료 또는 감미제 등을 추가로 포함할 수 있다. 상기 감미제는 수크로즈, 락토오스, 말토오스, 솔비톨, 크실리톨, 나트륨시클라메이트, 글리세린, 사카린나트륨, 스테비오사이드, 아스파탐 등일 수 있고, 상기 향료는 페퍼민트, 멘톨, 아네톨, 오이게놀, 리모넨, 시트로네올, 알파터피네올, 살리실메틸, 시네올, 리나롤, 에틸리나롤, 바닐린, 티몰, 스피아민트유, 세지유, 로즈마리유, 계피유 등일 수 있으며, 상기 감미제 또는 향료는 단독으로 또는 복합적으로 사용될 수 있다.
- [0054] 또한, 본 발명의 구강용 조성물에는 발포성분으로 사용되는 계면활성제나 추가 효능성분이 단독으로 또는 복합적으로 포함될 수 있으며, 상기 발포성분으로 사용되는 계면활성제는 음이온 계면활성제, 비이온 계면활성제 및 양이온 계면활성제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있고, 보다 구체적으로는 음이온성 계면활성제인 라우릴황산나트륨, 비이온성 계면활성제인 폴리옥시에틸렌폴리옥시프로필렌의 공중합체(폴록사머), 폴리옥시에틸렌경화피마자유, 폴리옥시에틸렌솔비탄 지방산에스테르 등이 제한없이 사용될 수 있다.
- [0055] 본 발명의 구강용 조성물이 치약인 경우에는, 유효성분으로 메트포민이 포함된 배지에서 배양한 치주인대줄기세포 배양액을 포함하는 것을 제외하고는 통상적인 치약 제조방법으로 제조될 수 있으며, 본 발명의 구강용 조성물이 양치용액인 경우에는 통상적인 용액제에 메트포민이 포함된 배지에서 배양한 치주인대줄기세포 배양액을 혼합하고 양치용액으로 제형화하여 제조될 수 있으며, 하루 2 내지 10회 구강을 세척함으로써 치주 질환을 예방, 개선 또는 치료할 수 있다.
- [0056] 또한, 본 발명의 구강용 조성물이 구강 세척제(세정제)인 경우에는, 치약 담체, 보다 상세하게는 비독성 알콜을 추가로 포함할 수 있다. 본 발명에 있어서, 상기 메트포민이 포함된 배지에서 배양한 치주인대줄기세포 배양액은 조성물 총 중량 대비 0.00001 내지 10 중량%로 포함될 수 있으며, 바람직하게는 조성물 총 중량 대비 0.0005 내지 5중량%로 포함될 수 있고, 더욱 바람직하게는 조성물 총 중량 대비 0.005 내지 1중량%로 포함될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0057] 또한 본 발명은 메트포민(Metformin)이 포함된 배지에서 배양한 치주인대줄기세포 배양액을 포함하는, 치주 질환 예방 또는 개선용 의약품들을 제공한다.
- [0058] 본 발명에 있어서, 상기 "의약품"은 사람이나 동물의 질병을 진단, 치료, 개선, 경감, 처치 또는 예방할 목적으로 사용되는 물품들 중 의약품보다 작용이 경미한 물품들을 의미하는 것으로, 예를 들어 약사법에 따르면 의약품이란 의약품의 용도로 사용되는 물품을 제외한 것으로, 사람 및/또는 동물의 질병 치료나 예방에 쓰이는

제품, 인체에 대한 작용이 경미하거나 직접 작용하지 않는 제품 등이 포함된다.

- [0059] 본 발명의 상기 메트포민이 포함된 배지에서 배양한 치주인대줄기세포 배양액을 의약외품 첨가물로 사용하는 경우, 이를 그대로 첨가하거나 다른 의약외품 또는 의약외품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 함께 사용되는 다른 성분들과의 혼합비율은 사용 목적(예를 들어, 예방, 개선 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다.
- [0060] 본 발명에 있어서, 상기 의약외품 조성물은 연고제, 크림제, 겔제, 로션제, 액제, 드레싱제, 패취제, 수포제, 테이프제, 연무제, 외용산제 및 스프레이제 등으로 제형화될 수 있다.
- [0061] 더불어 본 발명은 메트포민(Metformin)이 포함된 배지에서 배양한 치주인대줄기세포 배양액을 포함하는, 치주 질환 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0062] 또한 본 발명은 메트포민(Metformin)이 포함된 배지에서 배양한 치주인대줄기세포 배양액을 포함하는, 치주 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0063] 본 발명에 따른 식품 조성물은 기능성 식품(functional food), 영양 보조제(nutritional supplement), 건강식품(health food), 식품 첨가제(food additives) 등의 모든 형태를 포함한다.
- [0064] 본 발명에 있어서 용어, "건강기능식품"이란 건강보조의 목적으로 특정성분을 원료로 하거나 식품 원료에 들어 있는 특정성분을 추출, 농축, 정제, 혼합 등의 방법으로 제조, 가공한 식품을 말하며, 상기 성분에 의해 생체 방어, 생체리듬의 조절, 질병의 방지와 회복 등 생체조절기능을 생체에 대하여 충분히 발휘할 수 있도록 설계되고 가공된 식품을 말하는 것으로서, 질병의 예방 또는 건강의 회복 등과 관련된 기능을 수행할 수 있는 것을 말한다.
- [0065] 본 발명에 따른 식품 조성물 또는 건강기능식품 조성물은 당업계에 공지된 통상적인 방법에 따라 다양한 형태로 제조할 수 있다.
- [0066] 예를 들면, 건강식품으로는 본 발명의 메트포민이 포함된 배지에서 배양한 치주인대줄기세포 배양액을 과립화, 캡슐화 및 분말화하여 섭취하거나 차, 주스 및 드링크의 형태로 제조하여 음용하도록 할 수 있다. 또한, 본 발명의 메트포민이 포함된 배지에서 배양한 치주인대줄기세포 배양액을 치주 질환 예방, 개선 또는 치료 효과 있다고 알려진 공지의 물질 또는 활성 성분과 함께 혼합하여 조성물의 형태로 제조할 수 있다.
- [0067] 또한, 기능성 식품으로는 음료(알콜성 음료 포함), 과일 및 그의 가공식품(예: 과일통조림, 병조림, 잼, 마멀레이드 등), 어류, 육류 및 그 가공식품(예: 햄, 소시지콘비이프 등), 빵류 및 면류(예: 우동, 메밀국수, 라면, 스파게티, 마카로니 등), 과즙, 각종 드링크, 쿠키, 엿, 유제품(예: 버터, 치즈 등), 식용식물유지, 마아가린, 식물성 단백질, 레토르트 식품, 냉동식품, 각종 조미료(예: 된장, 간장, 소스 등) 등에 본 발명의 메트포민이 포함된 배지에서 배양한 치주인대줄기세포 배양액을 첨가하여 제조할 수 있다.
- [0068] 본 발명의 식품 조성물 중 상기 본 발명의 메트포민이 포함된 배지에서 배양한 치주인대줄기세포 배양액의 바람직한 함유량으로는 이에 한정되지 않지만 예를 들어 최종적으로 제조된 식품 중 0.01 내지 80 중량%일 수 있으며, 바람직하게는 최종적으로 제조된 식품 중 0.01 내지 50 중량%일 수 있다.
- [0069] 또한, 본 발명의 식품 조성물을 식품 첨가제의 형태로 사용하기 위해서는 분말 또는 농축액 형태로 제조하여 사용할 수 있다.
- [0070] 더불어 본 발명은 메트포민(Metformin)이 포함된 배지에서 배양한 치주인대줄기세포 배양액을 포함하는, 치주 질환 예방 또는 개선용 사료첨가용 조성물을 제공한다.
- [0071] 본 발명의 용어 "사료"란, 동물이 먹는 임의의 천연 또는 인공 구정식, 한끼식 등 또는 상기 한끼식의 성분을 의미하며, 본 발명에 따른 메트포민이 포함된 배지에서 배양한 치주인대줄기세포 배양액을 포함하는 사료첨가용 조성물은 당업계에 공지된 다양한 형태의 사료로 제조가능하며, 바람직하게는 농후 사료, 조사료 및/또는 특수 사료가 포함될 수 있으나, 이로 제한되는 것은 아니다.
- [0072] 본 발명에서 용어, "사료첨가용 조성물"은 "사료첨가제"를 의미할 수 있으며, 이는 동물에 있어 질병 증상의 완화, 영양소 보충 및 체중감소 예방, 사료 내 섬유소의 소화 이용성 증진, 유질개선, 번식장애 예방 또는 수태율 향상, 하절기 고온 스트레스 예방 등 다양한 효과를 목적으로 사료에 첨가하는 물질을 포함한다.
- [0073] 본 발명의 사료첨가용 조성물은 사료관리법상의 보조사료에 해당하며, 탄산수소나트륨, 벤토나이트(bentonite),

산화마그네슘, 복합광물질 등의 광물질제제, 아연, 구리, 코발트, 셀레늄 등의 미량 광물질인 미네랄제제, 케로틴, 비타민 A D, E, 니코틴산, 비타민 B 복합체 등의 비타민제, 메티오닌, 라이신 등의 보호아미노산제, 지방산 칼슘염 등의 보호지방산제, 생균제(유산균제), 효모배양물, 곰팡이 발효물 등의 생균, 효모제 등이 추가로 포함될 수 있다.

[0074] 상기 사료 중 농후사료로는 밀, 귀리, 옥수수 등의 곡류를 포함하는 중자열매류, 곡물을 정제하고 얻는 부산물로서 쌀겨, 밀기울, 보릿겨 등을 포함하는 겨류, 콩, 유채, 깨, 아마인, 코코야자 등을 채유하고 얻는 부산물인 깻묵류와 고구마, 감자 등에서 녹말을 뺀 나머진인 녹말찌꺼기의 주성분인 잔존녹말질류 등의 찌꺼기류, 어분, 물고기찌꺼기, 어류에서 얻은 신선한 액상물(液狀物)을 농축시킨 것인 피시솔루블(fish soluble), 육분(肉粉), 혈분, 우모분, 탈지분유, 우유에서 치즈, 탈지유에서 카제인을 제조할 때의 잔액인 웨이(whey)를 건조한 건조웨이 등의 동물질사료, 효모, 클로렐라, 해조류가 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0075] 상기 사료 중 조사료로는 약초, 목초, 풋배기 등의 생초(生草)사료, 사료용 순무, 사료용 비트, 순무의 일종인 루터베어거 등의 뿌리채소류, 생초, 풋배기작물, 곡실(穀實) 등을 사일로에 채워 놓고 젖산발효시킨 저장사료인 사일리지(silage), 약초, 목초를 베어 건조시킨 건초, 종축용(種畜用) 작물의 짚, 콩과 식물의 나뭇잎이 있으며, 이에 제한되지 않는다. 특수사료에는 굴껍데기, 암염 등의 미네랄 사료, 요소나 그 유도체인 디우레이드 이소부탄 등의 요소사료, 천연사료원료만을 배합했을 때 부족하기 쉬운 성분을 보충하거나, 사료의 저장성을 높이기 위해서 배합사료에 미량으로 첨가하는 물질인 사료첨가물, 식이보조제가 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0076] 본 발명에 따른 상기 사료첨가용 조성물은 당업계에 공지된 다양한 사료 제조방법에 따라 적절한 유효 농도 범위에서 메트포민이 포함된 배지에서 배양한 치주인대줄기세포 배양액을 첨가하여 제조 가능하다.

[0077] 본 발명에 따른 사료 첨가제는 치주 질환 예방 또는 개선을 목적으로 하는 개체이면 제한없이 적용가능하다. 예를 들면, 원숭이, 개, 고양이, 토끼, 모르모트, 랫트, 마우스, 소, 양, 돼지, 염소 등과 같은 비인간 동물, 조류 및 어류 등 어느 개체에도 적용이 가능하다.

[0079] 상술한 본 발명의 내용은 상호 모순되지 않는 한, 서로 동일하게 적용되며, 당해 기술분야의 통상의 기술자가 적절한 변경을 가해 실시하는 것 또한 본 발명의 범주에 포함된다.

[0081] 이하 본 발명을 실시예를 통해 상세하게 설명하나 본 발명의 범위가 하기 실시예로만 한정되는 것은 아니다.

[0083] **실시예 1. 메트포민(Metformin)을 첨가한 배양액을 이용하여 배양한 치주인대줄기세포 조건 배양액(conditioned medium) 준비**

[0084] 먼저 10mL의 무혈청 α-MEM(α Minimal essential Medium)(Gibco®)에 50 μM 메트포민(Sigma-Aldrich®)을 첨가하였다. 이를 이용하여 치주인대줄기세포(5×10^6 개/100 mm cell culture dish, Celprogen Inc. USA)를 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 48시간동안 배양하였다. 그후 배양액을 수집하고 1,000 rpm으로 3분간 원심분리하여 상층액을 수집해 분비 단백체를 포함하는 메트포민-조건 배양액(Metformin-conditioned medium, 이하 Metformin-CM로 기재)을 수득하였다.

[0086] **실시예 2. Metformin-CM의 분비 단백질 분석**

[0087] 액체크로마토그래피 질량분석법(LC-MS/MS)을 이용하여 상기 실시예 1을 통해 수득한 Metformin-CM의 분비 단백체를 분석하였다. 이를 위하여 Ultimate 3000 system이 장착된 Q-Exactive Orbitrap hybrid mass spectrometer(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)을 사용하였으며, HPLC 컬럼(column)으로는 3 μm C18 resin이 장착된 2 cm x 75 μm ID trap column과 2 μm C18 resin이 장착된 50 cm x 75 μm ID analytical column을 사용하였다. 이때 치주인대줄기세포를 배양하지 않은 α-MEM(control) 또는 메트포민을 포함하지 않는 배양액으로 치주인대줄기세포를 배양한 조건배양액(CM)을 대조군으로 이용하였다.

[0088] 이를 통해 분석된 배수 변화(fold change) ≥ 2와 P-value < 0.05 구간에서 단백질 발현 양상(Differentially

Expressed Proteins, DEP)을 보인 Metformin-CM의 분비 단백질의 기능 분포도를 도 1에 나타내었다. 이때 치주인대줄기세포를 배양하지 않은 α -MEM을 대조군으로 하여 Metformin-CM의 분비 단백질의 기능을 확인하였다.

[0089] 그 결과 Metformin-CM의 경우 α -MEM 대비 62개의 단백질이 DEP에 있어 유의미한 변화를 보임이 확인되었다. 상기 확인된 분비 단백질의 기능 분포도를 확인한 결과 도 1에 나타낸 바와 같이, Metformin-CM에 포함된 분비 단백질은 특히 세포 이동(Cell migration), 염증 반응(Inflammatory response), 분비(Secretion) 또는 혈관신생(Angiogenesis) 기능을 하는 것으로 파악되었다.

[0090] 더불어 Metformin-CM 유래 62개 분비 단백질(fold change ≥ 2 와 P -value < 0.05)을 DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) 프로그램을 이용한 Gene Ontology (GO) functional enrichment analysis를 통해 생물학적 과정(biological process), 분자적 기능(molecular function) 또는 세포적 구성(cellular component)으로 분석한 결과를 도 2에 나타내었다.

[0091] 도 2에 나타낸 바와 같이, Metformin-CM 유래 62개 분비 단백질은 생물학적 과정 범주에서는 중간 미세섬유 조직(intermediate filament organization) 및 각질화(keratinization)에 많은 분비 단백질들이 분포하는 것으로 나타났다. 또한 세포적 구성에는 세포기질(cytosol) 및 세포밖의 엑소좀(extracellular exosome) 구성체에 집중되어 있었으며, 분자적 기능에 있어서는 단백질 결합(protein binding)에 분비 단백질이 분포되어 있음을 확인하였다.

[0093] 실시예 3. Metformin-CM 유래 분비 단백질의 단백질-단백질 상호작용(Protein-Protein Interaction) 확인

[0094] 더불어 STRING 프로그램을 사용하여 Metformin-CM 유래 분비 단백질의 단백질-단백질 상호작용을 확인하였다. 보다 구체적으로 STRING 프로그램을 통해 62개의 분비 단백질 중 둘 이상의 단백질 분자 사이에서 확립된 높은 특이성의 상호작용을 확인해 도 3에 나타내었다. 그 중 10개 이상의 단백질-단백질 상호작용을 나타내는 상위 10개의 단백질을 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

STRING analysis with a Highest confidence score (0.4)

Gene name	Protein description	#Interacting proteins
KRT14	Keratin, type I cytoskeletal 14	16
KRT1	Keratin, type II cytoskeletal 1	16
S100A7	Protein S100-A7	17
KRT5	Keratin, type II cytoskeletal 5	17
ALB	Albumin	18
ACTB	Actin, cytoplasmic 1	19
CDSN	Corneodesmosin	19
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	20
FLG	Filaggrin	20
DSG1	Desmoglein-1	20

[0095]

[0097] 실시예 4. Metformin-CM의 염증 반응에 의해 감소된 치주인대줄기세포의 골세포로의 분화능에 미치는 영향 확인

[0098] 4-1. 치주인대줄기세포의 골세포 분화 배양 및 염증 반응 유도

[0099] 치주인대줄기세포(10^6 개)는 1% 항생제, 10% FBS가 함유된 α MED(α Minimal essential Medium)에서 37 °C, 5%

CO₂를 유지하면서 배양하였다. 골세포 분화는 각각의 CM과 Metformin-CM 조건 배양액에 5% FBS, 50 µg/ml 아스코빅산(ascorbic acid), 1 µM 덱사메타손(dexamethasone), 3 mM β-글리세로포스페이트(β-glycerophosphate)를 첨가하였으며 2-3일 간격으로 배지를 교환하여 유도하였다. 더불어 염증 반응을 유도하기 위해 구강에서 발견되며 치주 질환을 유발하는 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*) 세균의 내독소(endotoxin)로 작용하여 염증을 유발하는 리포 다당류(lipopolysaccharide, LPS (Sigma Chemical Company (St Louis, MO, USA)))를 5 µg/ml의 농도로 상기 CM 또는 Metformin-CM에 첨가하여 치주인대줄기세포를 배양한 후 골세포 분화능을 확인하였다.

[0101] 4-2. 염증 반응에 의해 감소된 치주인대줄기세포의 골세포로의 분화능에 Metformin-CM이 미치는 영향 확인

[0102] LPS가 처리된 치주인대줄기세포의 골세포로의 분화능에 Metformin-CM이 미치는 영향을 확인하였다. 이를 위하여 LPS를 처리하지 않고 α-MEM 배지에서 배양한 치주인대줄기세포(대조군(Control로 표시)), LPS를 처리하고 α-MEM 배지에서 배양한 치주인대줄기세포인(LPS로 표시), 메트포민을 포함하지 않는 배양액으로 치주인대줄기세포를 배양한 조건배양액으로 배양한 치주인대줄기세포(CM으로 표시), 메트포민을 포함하지 않은 배양액으로 치주인대줄기세포를 배양한 조건배양액으로 배양되고 LPS가 처리된 치주인대줄기세포(CM+LPS로 표시), 메트포민을 첨가하고 치주인대줄기세포를 배양한 조건배양액으로 배양한 치주인대줄기세포(Metformin-CM으로 표시) 또는 메트포민을 첨가하고 치주인대줄기세포를 배양한 조건배양액으로 배양되고 LPS가 처리된 치주인대줄기세포(Metformin-CM-LPS로 표시)의 실험군으로 분류하였다.

[0103] 상기 각 실험군의 치주인대줄기세포의 골세포로의 분화 능력을 각각 ALP(alkaline phosphatase) 활성과 세포내 칼슘 농도(intracellular calcium content) 및 그리고 석회화 결절 생성을 확인하였다.

[0104] ALP(alkaline phosphatase) 활성을 확인하기 위하여, 상기 실시예 4-1의 골세포 분화 배양 환경에서 치주인대줄기세포를 4일 동안 배양한 후 세포를 수집하여 당분야에 공지된 방법에 따라 단백질을 추출하였다. 추출된 단백질 시료에 200 µl의 pNPP(p-nitrophenylphosphate)를 첨가하여 37 °C에서 30분 동안 배양한 후 3 M NaOH로 반응을 중지시켰다. 이후 405 nm에서 흡광도를 측정한 후 mM/단백질 100 µg으로 환산하여 결과를 획득하였다. 더불어 세포내 칼슘 농도(intracellular calcium content)는 상기 실시예 4-1과 동일한 방법으로 7일 동안 치주인대줄기세포를 골분화 환경에서 배양한 후 calcium assay kit (BioAssay Systems, Hayward, CA, USA)를 이용하여 제조사의 지침에 따라 수행하였다. 이후 612 nm에서 흡광도를 측정한 후 mg/단백질 100 mg으로 환산하여 결과를 수집하였다. 또한 석회화 결절 양상은 2%알리자린 레드 S 용액(alizarin red S solution)을 이용하여 골분화된 치주인대줄기세포를 염색한 후 현미경을 이용하여 관찰하였다.

[0105] 확인된 ALP 활성은 도 4A에 나타내었고, 세포내 칼슘 농도는 도 4B에 나타내었으며, 석회화 결절 생성 결과는 도 5에 나타내었다.

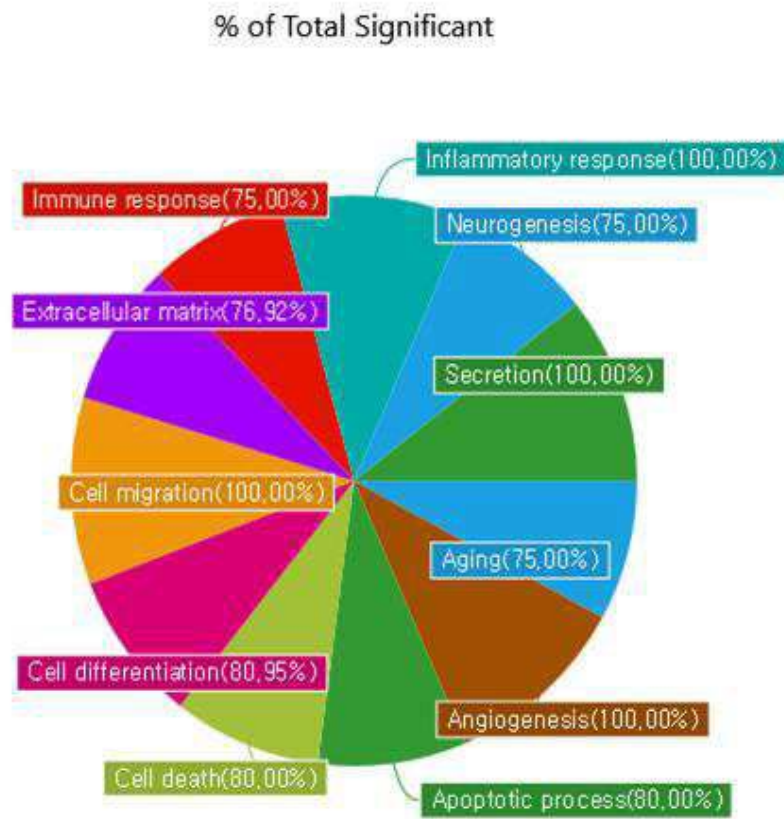
[0106] 그 결과, LPS 실험군은 Control 실험군에 비해 치주인대줄기세포의 골세포 분화능이 유의하게 감소되었음을 확인하였다. 한편 CM 실험군의 경우, ALP 활성과 세포내 칼슘 농도 수치 및 석회화 결절 형성이 대조군에 비해 현저히 증가한 것을 확인하였다. 또한 CM+LPS 실험군에서는 LPS에 의한 치주인대줄기세포의 골분화 감소 현상이 조금은 회복됨을 확인하였다. 특히 Metformin-CM 실험군은 대조군 및 CM 실험군대비 ALP 활성, 세포내 칼슘 농도 수치 및 석회화 결절 형성이 유의미하게 증가되었다. 또한 Metformin-CM-LPS 실험군에 있어서, LPS에 의해 감소되었던 치주인대줄기세포의 골분화 능력이 회복되었다.

[0107] 따라서 본 발명에 따른 Metformin-CM의 경우, 일반적인 치주인대줄기세포-조건 배양액(CM)에 비해 치주인대줄기세포의 골분화 능력과 손상 시 회복시키는 효능을 현저히 증가시킬 수 있음을 확인하였다(*P < 0.05, **P < 0.001 vs. control value; @P < 0.05, #P < 0.001 vs. CM value; †P < 0.05, ###P < 0.001 vs. Metformin-CM value).

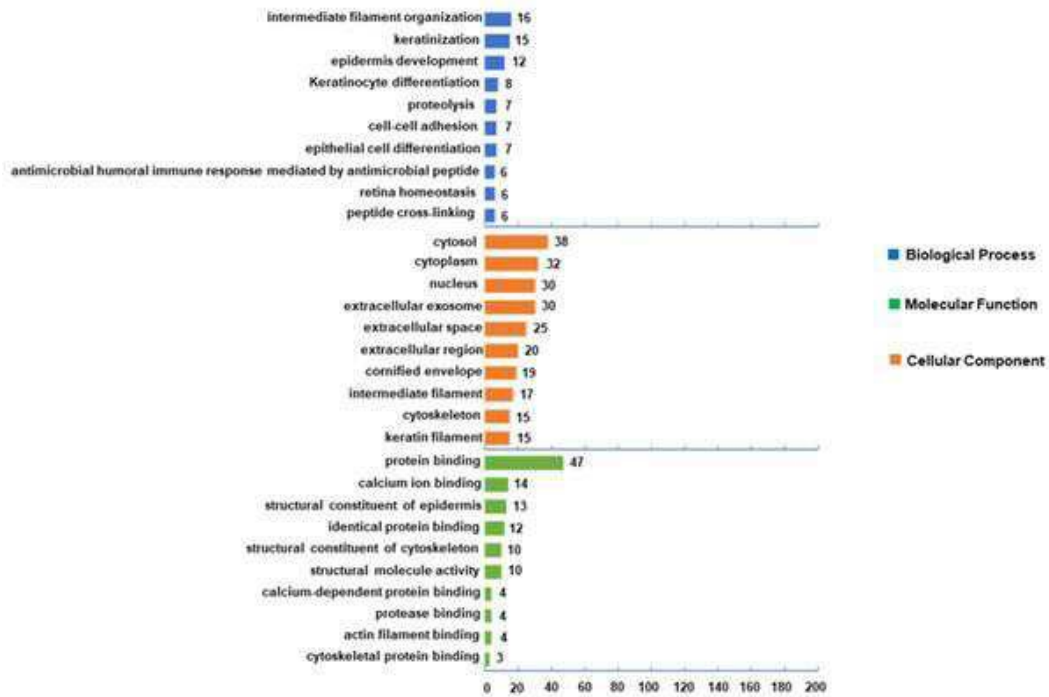
[0109] 종합적으로 메트포민을 첨가한 배양액을 이용하여 배양한 치주인대줄기세포 조건 배양액(Metformin-conditioned medium, Metformin-CM)은 다양한 기능을 하며 서로 상호작용하는 다양한 분비 단백질을 포함하고 있으며, 치주인대줄기세포의 골분화 능력과 손상 시 회복시키는 효능을 현저히 증가시킬 수 있음을 확인한 바, 이를 치주염과 같은 치주 질환의 예방, 개선 또는 치료를 위한 다양한 분야에 유용하게 활용할 수 있다.

도면

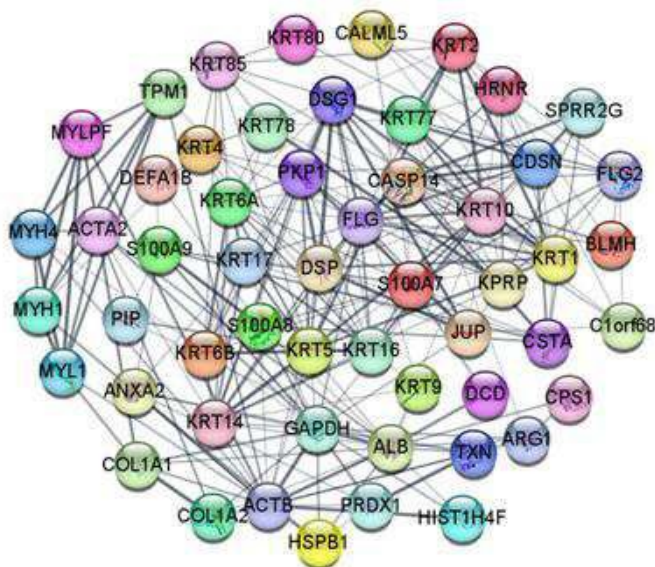
도면1



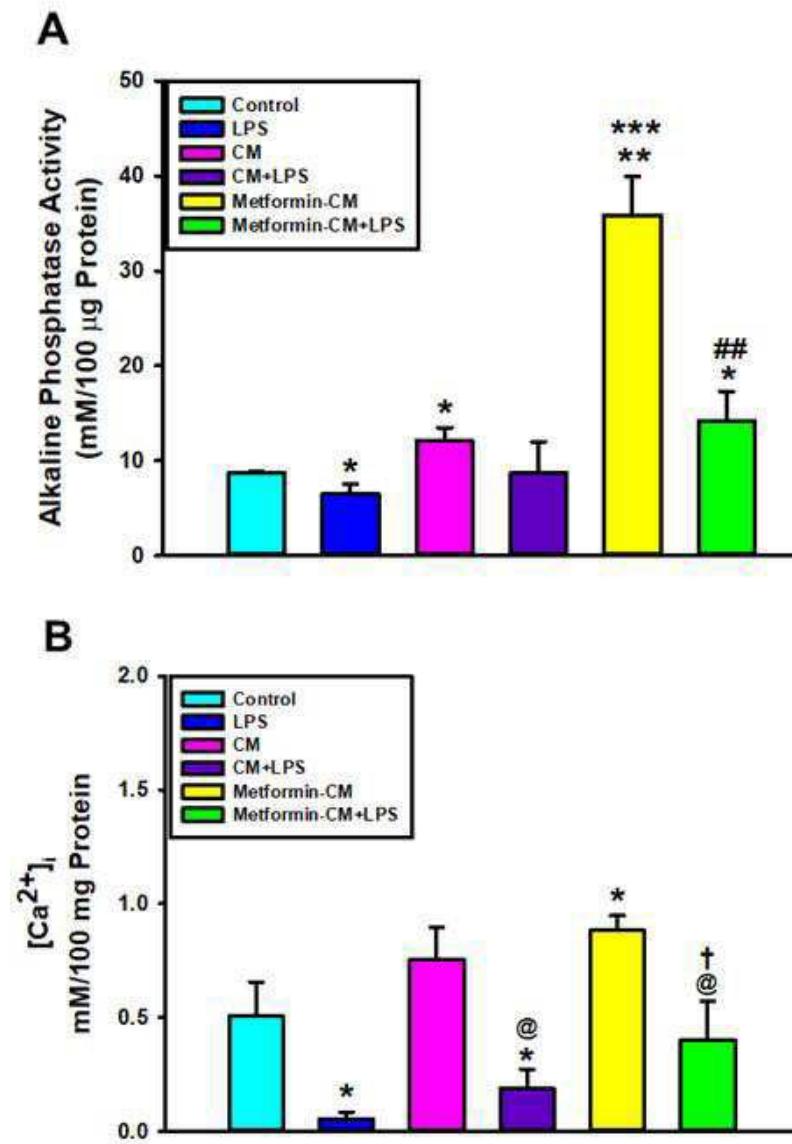
도면2



도면3



도면4



도면5

