

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2025년 4월 24일 (24.04.2025) WIPO | PCT

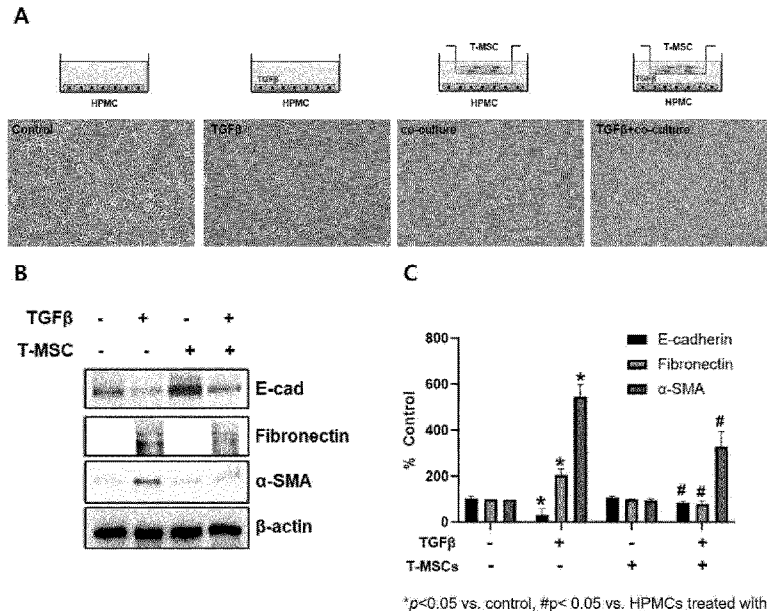


(10) 국제공개번호
WO 2025/084581 A1

- (51) 국제특허분류:
A61K 35/28 (2006.01) *A61P 7/08* (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01) *A61M 1/28* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2024/012286
- (22) 국제출원일: 2024년 8월 19일 (19.08.2024)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2023-0139400 2023년 10월 18일 (18.10.2023) KR
10-2024-0080455 2024년 6월 20일 (20.06.2024) KR
- (71) 출원인: 이화여자대학교 산학협력단 (EWHHA UNIVERSITY - INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION) [KR/KR]; 03760 서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (KR).
- (72) 발명자: 강덕희 (KANG, Duk Hee); 03710 서울특별시 서대문구 가재울로 45, 103동 1706호 (KR). 김달아 (KIM, Dal-ah); 02803 서울특별시 성북구 종암로25길 30, 109동 1301호 (KR). 조철호 (JO, Chor ho); 01909 서울특별시 노원구 마들로 111, 18동 302호 (KR).
- (74) 대리인: 김경교 등 (KIM, Kyeonggyo et al.); 06194 서울특별시 강남구 테헤란로70길 13, 2층 (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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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,

(54) Title: TONSIL-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELL-CONTAINING COMPOSITION FOR ALLEVIATING, PREVENTING, OR TREATING PERITONEAL FIBROSIS

(54) 발명의 명칭: 편도 유래 중간엽 줄기세포를 포함하는 복막 섬유증의 개선, 예방 또는 치료용 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to a composition for alleviating, preventing, or treating peritoneal fibrosis-related diseases, the composition containing tonsil-derived mesenchymal stem cells or a conditioned medium thereof. The tonsil-derived mesenchymal stem cells or the conditioned medium thereof according to the present invention are highly effective in inhibiting peritoneal EMT, and thus can be advantageously used for alleviating and treating peritoneal fibrosis.

(57) 요약서: 본 발명은 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정배지를 포함하는 복막 섬유증 관련 질환의 개선, 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정배지는 우수한 복막 EMT 억제 효과를 보유함에 따라, 복막 섬유증의 개선 및 치료에 유용하게 이용될 수 있다.

[다음 쪽 계속]

WO 2025/084581 A1

ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,
ME, 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 제21조(3))

명세서

발명의 명칭: 편도 유래 중간엽 줄기세포를 포함

하는 복막 섬유증의 개선, 예방 또는 치료용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정배지를 포함하는 복막 섬유증의 개선, 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 섬유증은 섬유아세포에 의한 세포외 기질(ECM)의 비정상적인 생성, 축적 및 침착이 일어나는 질환으로, 지속적인 감염, 자가면역 반응, 알레르기성 반응, 화학적 손상 및 조직 손상을 포함하는 다양한 자극에 의해 유도되는 만성 염증 반응의 최종 결과에 해당한다.
- [3] 섬유증 중에서도 특히 복막 섬유증(PF, Peritoneal fibrosis)은, 신부전증 치료를 위한 장기간 복막 투석에 의해 발생한다는 특징을 가지고 있으며, 지속적인 외래 복막 투석(CAPD, Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis) 환자의 복막 구조 변화 및 한외 여과 장애의 주요 원인으로 꼽히고 있다. 복막 섬유화의 극단적인 형태인 피막 형성 복막 경화증(ESP, Encapsulating Peritoneal Sclerosis)은 복막 투석을 지속하기 어렵게 만들며, 섬유화-경화증의 특성상 정상 기능으로 복귀가 불가능하기 때문에 한번의 진단만으로도 매우 치명적인 경과를 보인다. 따라서, 복막 섬유증은 그 어떤 섬유증보다도 예방 목적이 우선시되고 있다.
- [4] 복막 섬유증의 경우 복막 중피 세포(MCs, Mesothelial Cells)의 상피-중간엽 전이(EMT, Epithelial-to-mesenchymal transition) 및 세포외기질(ECM) 단백질의 축적이 특징적으로 나타난다. 형질전환 성장 인자(TGF, Transforming Growth Factor)- β 는 복막 섬유증 발달에서 핵심 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 구체적으로, 복막 투석에 의해 복막 섬유증이 진행된 경우, EMT 수준과 관련이 있는 GPR 78/94의 증가가 관찰되며, 상피 세포 마커로 알려진 E-cadherin의 발현 감소와 중간엽 세포 마커로 알려진 α -SMA 및 Fibronectin의 발현 증가가 함께 관찰된다. EMT는 가역적 과정으로 알려져 있기 때문에, EMT 억제는 복막 기능을 보존하기 위한 치료적 타겟으로 고려될 수 있다.
- [5] 한편, 성체 줄기세포는 기관 재생과 면역반응 조절 능력을 가지는 것으로 알려져 있으며 관련 연구가 활발히 진행되고 있다. 현재 임상 및 연구에서 사용되고 있는 성체 줄기세포의 공급원은 골수, 지방 세포, 제대혈 등이 있다. 그러나, 종래의 성체 줄기세포는 조직을 채취하는 과정이 침습적이고, 충분한 양을 얻기 어려워 사용에 제한점이 있다. 최근에는 편도선의 조직에서 중간엽 줄기세포를 추출한 연구 결과가 보고되어, 상기 편도조직이 성체 줄기세포의 새로운 공급원으로 주목되고 있다. 편도 유래 줄기세포는 다른 성체 줄기세포와 동일한 수준의 줄기

세포능을 나타내며, 편도선 절제 수술 시 버려지는 조직으로부터 얻을 수 있어 재료의 공급이 비교적 원활한 장점이 있다.

- [6] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정배지를 포함하는 조성물이 복막의 EMT를 억제하고 복막 섬유증을 개선, 예방 또는 치료하는 효과가 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 발명의 하나의 목적은 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정배지를 포함하는 복막 섬유증 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.
- [8] 또한, 본 발명의 다른 목적은 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정배지를 포함하는 복막 투석액을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [9] 본 발명은 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정배지를 포함하는 복막 섬유증 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [10] 본 발명에 있어서, 편도 유래 중간엽 줄기세포란 목의 안쪽과 코의 뒷부분에 위치하여 외부에서 침입하는 세균 등의 물질로부터 일차적으로 우리 몸을 방어함과 동시에 림프상피 면역조직으로 작용을 수행하는 조직인 편도에서 유래된 자기 복제 능력을 가지면서 두 개 이상의 새로운 세포로 분화하는 능력을 가진 미분화된 줄기세포를 의미한다.
- [11] 본 발명에 따른 편도 유래 중간엽 줄기세포는 타 유래 줄기세포와 대비하여 기원 조직인 편도의 획득이 용이하며 수술 후 버려지는 편도 조직의 재활용이 가능하고 초기 수득율이 매우 높은 장점이 있다.
- [12] 특히, 본 발명에 따른 편도 유래 중간엽 줄기세포는 항섬유화 및 항산화 특성을 가진다. 이러한 특성은 타 유래 중간엽 줄기세포와 대비하여 항섬유인자 (HGF, BMP7) 및 항산화효소(Catalase, glutathione peroxidase (GPx), superoxide dismutase (SOD)) 발현이 높다는 점에서 차별성을 가진다.
- [13] 보다 구체적으로, 본 발명에 따른 편도 유래 중간엽 줄기세포는 HGF, BMP7, Catalase, GPx, 및 SOD로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 높은 비율로 발현한다. 이러한 발현 수준의 높음은 예를 들어, 지방 유래 중간엽 줄기세포, 제대혈 유래 중간엽 줄기세포 및/또는 골수 유래 중간엽 줄기세포와 대비하여 적어도 5 %, 10 %, 15 %, 20%, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 110 %, 120 %, 130 %, 150 %, 200 %, 300 %, 400 % 또는 그 이상의 높은 발현 수준을 언급한다.
- [14] 또한, 본 발명에 따른 편도 유래 중간엽 줄기세포는 상피세포 마커로 알려진 ZO-1 및 E-cadherin의 발현 증진 및 중간엽 세포 마커로 알려진 fibronectin 및 α -SMA의 발현 억제 효과를 가지며, 타 유래 중간엽 줄기세포 대비 우수한 E-cadherin 증진 및 fibronectin 억제 효과를 나타내는 점에서 차별성을 가진다.

- [15] 본 발명에 있어서, "편도 유래 중간엽 줄기세포 조정배지"는 편도 유래 중간엽 줄기세포를 배양하여 수득된 배양액으로부터 편도 유래 중간엽 줄기세포가 제거된 배양액 또는 상층액을 의미하며, "편도 유래 중간엽 줄기세포 배양 상층액", "편도 유래 중간엽 줄기세포 조건 배양액" 또는 "편도 유래 중간엽 줄기세포 배양 배지"와 호환적으로 사용될 수 있다.
- [16] 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정배지는 편도 유래 중간엽 줄기세포를 배양하고 세포를 제거한 후, 수득된 배양액, 배양 상층액 또는 이의 농축물이거나 이의 동결건조물일 수 있다. 편도 유래 중간엽 줄기세포는 줄기세포 배양용 배지를 사용하여 통상적으로 배양될 수 있다. 편도 유래 중간엽 줄기세포 배양액은 편도 조직으로부터 수득된 편도 유래 중간엽 줄기세포를 혈청 또는 무혈청 배지에서 배양하여 수득된 것일 수 있다. 이를 원심분리나 필터를 이용한 여과에 의해 줄기세포 및 거대분자를 제거한 후에 수득된 상층액을 사용할 수 있다. 또한, 수득된 상층액은 그대로 사용하거나 또는 농축하여 수득된 농축물로 사용할 수 있다. 편도 유래 중간엽 줄기세포의 배양을 위한 배양용 배지 및 배양 조건은 본 발명이 속하는 기술분야에서 잘 알려져 있으며, 통상의 지식을 가진 자가 적절하게 선택하거나 변형하여 이용할 수 있다.
- [17] 상기 배지는 편도 유래 중간엽 줄기세포와 동일한 세포형을 유지하고 보관하는데 적합한 배지로서, 혈청이 보충된 DMEM 배지일 수 있다. 혈청은 우태아혈청(FBS)일 수 있으나, 이에 한정되지 않으며, 혈청 배지의 총 중량에 대해 1 내지 10 중량%일 수 있다. 필요에 따라, 항생제, 항진균제 및 마이코플라스마 억제제 등을 포함할 수 있으며, 이들은 배지의 총 중량에 대해 1 중량%일 수 있다. 항생제는 페니실린-스트렙토마이신 등 세포 배양에서 통상적으로 사용되는 항생제를 포함하고, 항진균제는 암포테리신-B(fungizone) 등을 포함하며, 마이코플라스마 억제제는 겐타마이신, 시프로플록사신, 타일로신 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 상기 배지는 무혈청 배지일 수 있다. 바람직하게, 상기 무혈청 배지는 low glucose DMEM 배지일 수 있다. 본 발명의 일 실시양태에 따르면, 편도 유래 중간엽 줄기세포 조정배지는 편도 유래 중간엽 줄기세포를 무혈청 Low glucose DMEM 하에 배양하여 세포를 제거한 상층액을 농축한 것이다.
- [18] 복막 세포에 EMT를 유도하는 경우 상피 세포 마커로 알려진 ZO-1 및 E-cadherin의 발현이 감소하고, 중간엽 세포 마커로 알려진 α -SMA 및 fibronectin의 발현이 증가한다. 이에 대하여, 본 발명에 따른 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정배지의 처리는 EMT가 유도된 복막 세포에서 ZO-1 및 E-cadherin의 발현을 증진시키고, α -SMA 및 fibronectin의 발현을 감소시킴으로써 EMT와 관련된 작용을 최소화하고 치료 효능을 크게 증진시킬 수 있다. 특히, 본 발명에 따른 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정배지는 타 유래 중간엽 줄기세포, 예컨대 지방 유래 중간엽 줄기세포(AD) 또는 골수 유래 중간엽 줄기세포(BM)에 대비하여 E-cadherin 발현 증진 및 fibronectin 발현 억제에 보다 우수한 효과를 갖는다.

- [19] 즉, 본 발명에 따른 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정배지는 복막의 EMT(epithelial-mesenchymal transition)를 억제하는 효과가 있다.
- [20] 본 발명에 있어서, "EMT"는 상피세포가 중간엽 세포로 표현형 변이되는 것을 의미한다. 구체적으로 EMT는 세포간 결합이 느슨해지고 세포 골격이 변하면서 조직이 운동성을 획득하는 현상으로, 세포가 본래의 세포 표현형을 상실하고 간엽세포의 표현형으로 전환되는 것을 말한다. EMT가 유도되면 섬유 아세포의 축적을 초래할 수 있으며, EMT의 유도는 복막 섬유화의 초기 메커니즘으로 중요하게 인식된다.
- [21] 이에 본 발명에 따른 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정배지는 복막의 EMT(epithelial-to-mesenchymal transition)를 초기부터 억제함으로써 치료 효과를 크게 증진시킬 수 있는 장점을 가진다. 복막 섬유증의 경우 투석회수가 증가함에 따라 섬유증과 관련된 증상이 크게 악화되고 진행될 수 있다. 이와 같은 복막 섬유증의 특성에 있어서 초기 단계의 섬유증 증상의 시작을 늦추고 증상의 악화를 최소화하는 것이 매우 중요하다. 본 발명에 따른 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정배지는 위와 같은 복막 섬유화의 초기 메커니즘에 주된 증상을 치료하고 최소화하여 복막 투석의 가능 기간을 크게 증가시키고, 복막 투석에 의해 발생하는 이차적 질환을 예방하는데 우수한 효능을 가질 수 있다.
- [22] 본 발명에 따른 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정배지는 중간엽세포 관련 인자의 발현을 억제하는 효과가 있다.
- [23] 예를 들어, 본 발명에 따른 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정배지는 α -SMA 및 Fibronectin으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 유전자 발현을 억제하는 효과가 있다.
- [24] 본 발명에 따른 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정배지는 상피세포 관련 인자의 발현을 증가시키는 효과가 있다.
- [25] 예를 들어, 본 발명에 따른 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정배지는 ZO-1 및 E-cadherin으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 유전자 발현을 증진하는 효과가 있다.
- [26] 본 발명에 따른 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정배지는 α -SMA 및 Fibronectin으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 유전자 발현을 억제하고, ZO-1 및 E-cadherin으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 유전자 발현을 증진하는 효과가 있다.
- [27] 한편, 복막 투석액에 대한 지속적인 노출은 복막 EMT를 진행시키며 조직 내 산화 스트레스, 염증성 손상, 소포체 스트레스, 세포사멸, 염증소체 등을 유발하여, 궁극적으로 복막 섬유증을 초래하는 것으로 알려져 있다. 특히, TGF- β 신호전달 경로를 통한 복막 섬유화 기전이 잘 알려져 있으며, 산화스트레스의 유도가 복막 EMT 초기 기전에 관여한다고 알려져 있다.

- [28] 이와 관련하여, 본 발명은 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정배지가 산화 스트레스, 소포체 스트레스, 세포사멸, 염증소체 등을 억제함으로써, EMT와 관련된 작용을 최소화하는 효과가 있음을 확인하였다.
- [29] 본 발명의 일 실시양태에 따르면, 복막 EMT를 유도하는 경우 세포 내에서 산화 스트레스가 증가함과 더불어, 활성 산소종(ROS)의 생성 효소로 알려진 NADHP oxidase 4(NOX4)의 발현이 증가하고, 산화 스트레스 관련 마커인 8-OHdG(8-hydroxy-2'-deoxyguanosine), NT(nitrotyrosin) 및 4-HNE(4-Hydroxynonenal)의 발현이 증가하고, SOD2 및 GSH(Glutathione)의 발현이 감소한다. 이에 대하여, 본 발명에 따른 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정배지는 NOX4, 8-OHdG 및 NT의 단백질 발현을 감소시키고, SOD2 및 GSH(Glutathione)의 단백질 발현을 증진시킴으로써 세포 내 산화 스트레스를 억제하여 EMT와 관련된 작용을 최소화하고 치료 효능을 크게 증진시킬 수 있다.
- [30] 따라서, 본 발명에 따른 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정배지는 세포 내 산화 스트레스를 억제하는 효과가 있다.
- [31] 본 발명에 따른 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정배지는 NOX4, 8-OHdG, 및 NT로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 발현을 억제하는 효과가 있다.
- [32] 본 발명에 따른 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정배지는 SOD2 및 GSH로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 발현을 증진하는 효과가 있다.
- [33] 본 발명에 따른 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정배지는 NOX4, 8-OHdG 및 NT로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 발현을 억제하고, SOD2 및 GSH로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 발현을 증진하는 효과가 있다.
- [34] 또한, 본 발명의 일 실시양태에 따르면, 복막 EMT를 유도하는 경우 소포체 스트레스가 증가함과 더불어, 소포체 스트레스 관련 마커인 GRP 78/94(glucose regulatory protein 78/94), IRE1(inositol-requiring enzyme 1), ATF6(Activating transcription factor 6), CHOP(C/EBP homologous protein), p-PERK(phosphorylated protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase), p-eIF2 α (phosphorylated Eukaryotic Initiation Factor 2 alpha) 및 ATF4(Activating transcription factor 4)의 발현이 증가한다. 이에 대하여, 본 발명에 따른 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정배지는 GRP 78, IRE1, ATF6 및 CHOP의 단백질 발현을 감소시킴으로써 소포체 스트레스를 억제하여 EMT와 관련된 작용을 최소화하고 치료 효능을 크게 증진시킬 수 있다.
- [35] 따라서, 본 발명에 따른 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정배지는 소포체 스트레스를 억제하는 효과가 있다.

- [36] 본 발명에 따른 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정배지는 GRP 78, IRE1, ATF6 및 CHOP로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 발현을 억제하는 효과가 있다.
- [37] 또한, 본 발명의 일 실시양태에 따르면, 복막 EMT를 유도하는 경우 세포사멸이 증가함과 더불어, 세포사멸 관련 마커인 Bcl-2(B-cell lymphoma-2)의 발현이 감소하고, Bax(Bcl-2-associated X protein), Bad(Bcl-2-associated agonist of cell death), cytochrome C, cleaved caspase-3, p53 및 cleaved PARP(poly ADP ribose polymerase)의 발현이 증가한다. 이에 대하여, 본 발명에 따른 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정배지는 Bax, cleaved caspase-3 및 cleaved PARP의 단백질 발현을 감소시킴으로써 세포사멸을 억제하여 EMT와 관련된 작용을 최소화하고 치료 효능을 크게 증진시킬 수 있다.
- [38] 따라서, 본 발명에 따른 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정배지는 세포사멸을 억제하는 효과가 있다.
- [39] 본 발명에 따른 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정배지는 Bax, cleaved caspase-3 및 cleaved PARP로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 발현을 억제하는 효과가 있다.
- [40] 또한, 본 발명의 일 실시양태에 따르면, 복막 EMT를 유도하는 경우 염증소체가 증가함과 더불어, NLRP3 염증소체 관련 마커인 NLRP3(NLR family pyrin domain containing 3), ASC(Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD), cleaved-caspase-1 및 IL-1 β (Interleukin 1 beta)의 발현이 증가한다. 이에 대하여, 본 발명에 따른 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정배지는 NLRP3 및 ASC의 단백질 발현을 감소시킴으로써 염증소체를 억제하여 EMT와 관련된 작용을 최소화하고 치료 효능을 크게 증진시킬 수 있다.
- [41] 따라서, 본 발명에 따른 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정배지는 염증소체를 억제하는 효과가 있다.
- [42] 본 발명에 따른 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정배지는 NLRP3 및 ASC로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 발현을 억제하는 효과가 있다.
- [43] 본 발명의 일 실시양태에 따르면, 복막 섬유증 유발 랫드 모델에 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정배지를 포함하는 조성물을 투여 시 복막의 흡수 및 수송 기능을 개선하고 복막 두께가 감소하는 효과가 있음을 확인하였다.
- [44] 즉, 본 발명에 따른 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정배지는 복막 섬유증을 예방 또는 치료하는 효과가 있다.
- [45] 한편, 복막 섬유증이 유도된 랫드 동물모델에서 복막배액 SOD 활성 저하를 보여준 바 있으며, 특히, 복막 중피세포에서는 항섬유 인자로 알려진 간세포성장인자(HGF) 및 골형성인자7(BMP7)를 합성한다고 알려졌고, 고포도당 혹은 TGF- β 이 복막 HGF 및 BMP7의 생성을 감소시킨다고 알려져 있으므로 복막투석에 의한 복막 항섬유화 기전을 이해하는 좋은 마커가 될 수 있다.

- [46] 본 발명에 따른 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정배지는 HGF, BMP7, Catalase, GPx 및 SOD로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 높은 함량으로 함유한다.
- [47] 본 발명에 따른 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정배지는 항섬유 인자로 알려진 HGF, BMP7 및 항산화효소로 알려진 Catalase, GPx, SOD를 높은 함량으로 함유함으로써 항섬유 특성 및 항산화 특성을 나타낸다. 특히, 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정배지는 지방 유래 중간엽 줄기세포(AD) 또는 골수 유래 중간엽 줄기세포(BM)에 대비하여 상기 항섬유 인자 및 항산화효소를 보다 높은 함량으로 발현하며, 보다 우수한 항섬유 및 항산화 특성을 나타낸다. 이로써 항섬유 및 항산화 특성의 측면에서 복막 섬유증에 대한 치료 효능을 크게 증진시킬 수 있다.
- [48] 본 발명에서 "복막 섬유증"은 복막이 섬유화된 상태를 의미하는 것으로서 복막에 섬유세포가 비정상적으로 형성된 것을 말한다. 예를 들어, 복막후 섬유증(Retroperitoneal fibrosis) 또는 피막 형성 복막 경화증(encapsulating peritoneal sclerosis)을 포괄하는 의미로 사용되나, 이로 한정되지 않는다. 복막의 섬유화는 예를 들어, 복막 투석에 의해서 발생할 수 있다.
- [49] 본 발명에서 사용되는 용어 "예방"은 조성물의 투여로 복막 섬유증을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 본 발명에 있어서, "치료"란 조성물의 투여로 상기 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [50] 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 포함할 수 있으며, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제제화될 수 있다.
- [51] 상기 약학적으로 허용가능한 담체는 당업계에서 통상적으로 사용되는 것들, 예컨대 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등을 포함하나 이에 국한되지 않는다. 또한, 본 발명의 약학 조성물은 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제, 기타 약학적으로 허용가능한 첨가제를 포함할 수 있으나, 이에 국한되지 않는다.
- [52] 본 발명의 약학 조성물이 경구용 고형 제제로 제제화된 경우 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등을 포함하며, 이러한 고형제제는 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토즈, 젤라틴 등을 포함할 수 있으며, 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제 등을 포함하나 이에 국한되지 않는다.

- [53] 본 발명의 약학 조성물이 경구용 액상 제제화된 경우 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등을 포함하며, 물, 리퀴드 파라핀 등의 희석제, 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 포함하나 이에 국한되지 않는다.
- [54] 본 발명의 약학 조성물이 비경구용으로 제제화된 경우 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제를 포함하며, 비수성 용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르류 등을 포함하나 이에 국한되지 않는다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있으나 이에 국한되지 않는다.
- [55] 상기 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 본 발명의 용어 "약학적으로 유효한 양"이란 의학적 예방 또는 치료에 적용가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 예방 또는 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 질환의 중증도, 약물의 활성, 환자의 연령, 체중, 건강, 성별, 환자의 약물에 대한 민감도, 사용된 본 발명 조성물의 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 사용된 본 발명의 조성물과 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 예를 들면, 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정배지는 1일 0.0001 내지 100 mg/kg 으로 투여할 수 있으며, 상기 투여는 하루에 한 번 또는 수회 나누어 투여할 수도 있다.
- [56] 본 발명의 약학 조성물은 랫트, 랫드, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로, 예를 들면, 경구 투여, 경막내, 내이, 복강 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막, 설하 또는 뇌혈관 내 주사에 의해 투여될 수 있으며, 이에 국한되지 않는다.
- [57] 본 발명의 약학 조성물은 조성물 총 중량에 대하여 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정배지를 0.01 내지 95 중량%, 바람직하게는 1 내지 80 중량%로 포함할 수 있다.
- [58] 본 발명의 약학 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있다. 또한 본 발명의 약학 조성물은 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [59] 본 발명의 용어 "대상체"는 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여에 의해 증상이 호전될 수 있는 동물 또는 인간을 포함한다. 본 발명에 따른 치료용 조성물을 개체에게 투여함으로써, 복막 섬유증을 효과적으로 예방 및 치료할 수 있다.
- [60] 본 발명의 용어 "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 인간 또는 동물에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며, 본 발명에 따른 치료용 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 경구 또는 비경구 투여될 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 치료용 조성물은 유효성분이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

- [61] 본 발명의 다른 하나의 양태는 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정배지의 치료학적으로 유효량을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 복막 섬유증의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [62] 본 발명에서 용어 "편도 유래 중간엽 줄기세포", "편도 유래 중간엽 줄기세포 조정배지" 또는 "복막 섬유증"은 전술한 바와 같다.
- [63] 본 발명의 용어 "개체"란 복막 섬유증이 발병하였거나 발병할 수 있는 모든 동물을 의미하며, 전형적으로 본 발명의 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정배지를 이용한 치료로 유익한 효과를 나타낼 수 있는 동물일 수 있으나, 복막 섬유증 증상을 갖거나 이러한 증상을 가질 가능성이 있는 개체이면 제한없이 포함한다. 전술한 바와 같이, 본 발명의 약학 조성물을 개체에게 투여함으로써 상기 복막 섬유증을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다.
- [64] 본 발명의 다른 하나의 양태는 복막 섬유증의 예방 또는 치료를 위한 의약을 제조하기 위한 본 발명의 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정배지의 용도를 제공한다.
- [65] 본 발명의 다른 또 하나의 양태는 복막 섬유증의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정배지를 포함하는 조성물을 제공한다.
- [66] 본 발명의 다른 또 하나의 양태는 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정배지를 포함하는 복막 투석액을 제공한다.
- [67] 상기 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정배지는 앞서 설명한 바와 같다. 본 발명의 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정배지는 복막 세포의 EMT를 억제하므로, 복막 투석액 중에 포함되어 복막 섬유화 및 복막 섬유증을 개선, 지연, 예방 또는 치료할 수 있다.
- [68] 본 발명의 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정배지를 포함하는 복막 투석액은 삼투제, 완충액, 전해질 및 이들의 조합으로 구성된 군에서 선택된 어느 하나 이상을 포함할 수 있다. 예를 들어 삼투제는 포도당, 포도당 중합체(예를 들어, 말토덱스트린, 아이코덱스트린), 포도당 중합체 유도체, 시클로덱스트린, 변성전분, 히드록시에틸 전분, 폴리올, 과당, 아미노산, 펩티드, 단백질, 아미노당, 글리세롤, N-아세틸 글루코사민(NAG) 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 완충액은 중탄산염, 락테이트, 피루베이트, 아세테이트, 시트레이트, 트리스(즉, 트리스히드록시메틸아미노메탄), 아미노산, 펩티드, 또는 그들의 조합을 포함할 수 있다.
- [69] 전해질은 나트륨, 칼륨, 마그네슘, 칼슘 및 염화물을 포함할 수 있다.
- [70] 본 발명의 복막 투석액은 하나 이상의 투석 성분(투석 용액의 요소 또는 구성 성분) 및 치료적 유효량의 유효물질을 포함할 수 있으며, 복막 섬유화 및 복막 섬유증을 개선, 완화, 예방 또는 치료하기 위한 성분으로 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정배지를 포함한다. 상기 복막 투석액은 투석 농축물일 수 있으며, 투석액에는 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정배지가 포함될 수 있다.

다. 상기 복막 투석액은 단일 용기 내의 단일 투석 용액 또는 별도로 수용된 또는 다중-챔버를 가진 용기의 투석부로 사용될 수 있으며, 복막 투석 시 기존에 사용되는 투석액과 동시에 또는 시간차를 두고 환자에게 투여될 수 있다.

- [71] 본 발명은 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정배지를 포함하는 복막 섬유증 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [72] 본 발명의 용어, "개선"이란, 본 발명의 조성물의 투여로 복막 섬유증이 호전 또는 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [73] 본 발명의 식품 조성물에 있어, 상기 편 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정배지는 바람직하게 식품 조성물 대비 0.00001~0.01 중량% 포함되는 것이 좋다. 0.00001 중량% 미만일 경우에는 그 효과가 미비하고, 0.01 중량%를 초과하는 경우에는 사용량 대비 효과 증가가 미미하여 비경제적이다.
- [74] 본 발명의 식품 조성물은 일 예로, 면류, 검류, 유제품류, 아이스크림류, 육류, 곡류, 카페인 음료, 일반음료, 초콜릿, 빵류, 스낵류, 과자류, 사탕, 피자, 젤리, 알코올성 음료, 술, 비타민 복합제 및 그 밖의 건강보조식품류 중 선택되는 어느 하나 일 수 있으나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다.
- [75] 본 발명의 식품 조성물을 식품 첨가물로 사용할 경우, 이를 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.
- [76] 본 발명에서 식품 조성물은 건강기능식품을 포함한다.
- [77] 상기 "건강기능식품"이라 함은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, "기능성"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.
- [78] 본 발명의 식품 조성물 및 건강기능식품은 추가 성분을 포함할 수 있다. 예들 들어, 비오틴(biotin), 폴레이트(folate), 판토텐산(panthotenic acid), 비타민 A, C, D, E, B1, B2, B6, B12, 니아신(niacin) 등을 포함할 수 있다. 또한, 크롬(Cr), 마그네슘(Mg), 망간(Mn), 구리(Cu), 아연(Zn), 철(Fe), 칼슘(Ca) 등의 미네랄을 포함할 수 있다. 또한, 시스테인, 발린, 라이신, 트립토판 등의 아미노산을 포함할 수 있다. 또한, 방부제(소르빈산 칼륨, 벤조산나트륨, 살리실산, 디히드로초산나트륨 등), 착색제(타르색소 등), 발색제(아질산 나트륨, 아초산 나트륨 등), 표백제(아황산나트륨), 살균제(표백분과 고도 표백분, 차아염소산나트륨 등), 팽창제(명반, D-주석산수소칼륨 등), 강화제, 유화제, 증점제(호료), 피막제, 산화방지제(부틸히드록시아니솔(BHA), 부틸히드록시톨루엔(BHT) 등), 조미료(MSG 글루타민산나트륨 등), 감미료(둘신, 사이클레메이트, 사카린, 나트륨 등), 향료(바닐린, 락톤류 등), 검기초제, 거품억제제, 용제, 개량제 등의 식품 첨가물(food additives)을 첨가할 수 있다. 상기 첨가물은 식품의 종류에 따라 선별되고 적절한 양으로 사용될 수 있다.

발명의 효과

- [79] 본 발명의 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정배지는 우수한 복막 EMT 억제 효과를 보유함에 따라, 복막 섬유증의 개선 및 치료에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [80] 도 1은 복막 중피 세포(HPMC)의 단독 배양 조건 및 편도 유래 중간엽 줄기세포(T-MSC)와의 공동 배양 조건에서 TGF- β 의 처리 시 세포 형태 변화를 나타낸 이미지(A)와, 세포 마커 발현 변화를 나타낸 이미지(B) 및 그래프(C)이다.
- [81] 도 2는 복막 중피 세포(HPMC)의 일반 배양 조건 및 편도 유래 중간엽 줄기세포 조정배지(T-MSC CM) 처리 배양 조건에서 TGF- β 의 처리 시 세포 형태 변화를 나타낸 이미지(A)와, 세포 마커 발현 변화를 나타낸 이미지(B) 및 그래프(C)이다.
- [82] 도 3은 중피 세포(Met5A)에 TGF- β 의 처리 후 각 유래 별 중간엽 줄기세포 조정배지(T-MSC CM, AD-MSC CM, BM-MSC CM)를 처리함에 따른 세포 마커 발현 변화를 나타낸 그래프(A, B) 및 이미지(C)이다.
- [83] 도 4는 복막 중피 세포(HPMC)의 단독 배양 조건 및 편도 유래 중간엽 줄기세포(T-MSC)와의 공동 배양 조건에서 TGF- β 의 처리 시 산화스트레스 변화를 DCF-DA 염색(A) 및 MitoSox 염색(B)을 통해 확인한 이미지이다.
- [84] 도 5는 복막 중피 세포(HPMC)의 일반 배양 조건 및 편도 유래 중간엽 줄기세포 조정배지(T-MSC CM) 처리 배양 조건에서 TGF- β 의 처리 시 NOX 발현 차이를 면역염색을 통해 확인한 이미지이다.
- [85] 도 6은 복막 투석 랫드 모델을 구축하기 위한 동물 실험의 스케줄 및 실험군 편성을 나타낸 이미지이다.
- [86] 도 7은 복막 투석 랫드 모델에서 카테터 삽입 및 모니터링 과정을 보여주는 이미지이다.
- [87] 도 8은 복막 투석 랫드 모델을 이용한 동물 실험에서 NC, PD, PP, PV군의 복막 두께를 Sirius Red 염색으로 확인한 이미지이다.
- [88] 도 9는 복막 투석 랫드 모델을 이용한 동물 실험에서 전체 실험군(NC, NP, NV, PD, PP, PV)에서 상피세포 및 중간엽세포 관련 마커인 ZO-1, E-cadherin, fibronectin 및 α -SMA의 단백 발현을 면역탁본법으로 확인한 이미지(A) 및 이를 정리한 그래프(B)이다.
- [89] 도 10은 복막 투석 랫드 모델을 이용한 동물 실험에서 NC, PD, PP, PV군의 SOD2 및 nitrotyrosine (NT) 발현을 면역염색을 통해 확인한 이미지이다.
- [90] 도 11은 복막 투석 랫드 모델을 이용한 동물 실험의 전체 실험군(NC, NP, NV, PD, PP, PV)에서 산화 스트레스에 관여하는 8-OHdG, NT, 4-HNE, SOD2 및 GSH의 단백 발현을 면역탁본법으로 확인한 이미지(A) 및 이를 정리한 그래프(B)이다.

- [91] 도 12는 복막 투석 랫드 모델을 이용한 동물 실험의 전체 실험군(NC, NP, NV, PD, PP, PV)에서 소포체 스트레스에 관여하는 GRP 78/94, IRE1, ATF6, CHOP, p-PERK, p-eIF2 α 및 ATF4의 단백질 발현을 면역탁본법으로 확인한 이미지(A) 및 이를 정리한 그래프(B)이다.
- [92] 도 13은 복막 투석 랫드 모델을 이용한 동물 실험의 전체 실험군(NC, NP, NV, PD, PP, PV)에서 세포사멸에 관여하는 Bcl-2, Bax, Bad, cytochrome C, cleaved caspase-3, p53 및 cleaved PARP의 단백질 발현을 면역탁본법으로 확인한 이미지(A) 및 이를 정리한 그래프(B)이다.
- [93] 도 14는 복막 투석 랫드 모델을 이용한 동물 실험의 전체 실험군(NC, NP, NV, PD, PP, PV)에서 NLRP3 염증소체에 관여하는 NLRP3, ASC, cleaved-caspase-1 및 IL-1 β 의 단백질 발현을 면역탁본법으로 확인한 이미지(A) 및 이를 정리한 그래프(B)이다.
- [94] 도 15는 복막 투석 랫드 모델을 이용한 동물 실험에서 전체 실험군(NC, NP, NV, PD, PP, PV)의 주차 별 체중 변화를 나타낸 그래프이다.
- [95] 도 16은 복막 투석 랫드 모델을 이용한 동물 실험에서 전체 실험군(NC, NP, NV, PD, PP, PV)의 복막 조직에 T-MSC의 생착 여부를 human nuclei 항체 염색으로 확인한 이미지이다.
- [96] 도 17은 복막 투석 랫드 모델을 이용한 동물 실험에서 전체 실험군(NC, NP, NV, PD, PP, PV)의 복막 기능을 복막 평형 검사(PET)를 통해 확인한 그래프이다.
- [97] 도 18은 각 유래 별 중간엽 줄기세포(T-MSC, AD-MSC, BM-MSC)에서 항섬유인자인 HGF 및 BMP7의 발현을 확인한 도이다.
- [98] 도 19는 각 유래 별 중간엽 줄기세포(T-MSC, AD-MSC, BM-MSC)에서 항산화 효소인 Catalase, GPx 및 SOD의 발현을 확인한 도이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [99] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 이에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.
- [100] 본 연구에서 사용되는 모든 물질들은, 다른 언급이 없는 한 Sigma-Aldrich 및 Sellechem으로부터 구입하여 사용하였다.
- [101] **실험예 1. 복막 중피 세포(HPMC)의 분리 및 유지**
- [102] 복막 중피 세포(HPMC)는 표준적인 방법(Stylianou's method)에 따라 사람의 장간막(omentum)을 0.05% 트립신-0.02% EDTA로 20분 동안 처리하여 배양한 뒤 원심분리를 통해 분리하였다. 상기 세포는 10% FBS, 100 U/ml 페니실린, 100 μ g/ml 스트렙토마이신 및 26 mmol/L NaHCO₃를 함유하는 배지 M199에서 배양되었다.
- [103] 실험에 사용된 배지는 2일에 한 번씩 교체되었다.
- [104] **실험예 2. 복막 중피 세포(HPMC) 및 편도 유래 중간엽 줄기세포(T-MSC)의 공동 배양**

- [105] 6웰 플레이트에 각각의 웰(well)마다 2×10^5 개의 복막 중피세포(HPMC)를 시딩하고, 트랜스웰 인서트(transwell insert)에는 편도 유래 중간엽 줄기세포(T-MSC, passage 6)를 시딩하였다. 다음날, 아래쪽에는 복막 중피세포, 위쪽에는 편도 유래 중간엽 줄기세포가 위치하도록 트랜스웰 시스템을 통해 48시간 동안 배양함으로써 복막 중피 세포(HPMC) 및 편도 유래 중간엽 줄기세포(T-MSC)의 공동 배양을 수행하였다. 배양 배지는 10% FBS 및 1% P/S를 포함하는 셀라토즈테라퓨틱스에서 제공한 CNSM배지를 사용하였다.
- [106] **실험예 3. 복막 중피 세포(HPMC)에 편도 유래 중간엽 줄기세포 조정배지(T-MSC CM) 처리 배양**
- [107] 6웰 플레이트에 각각의 웰(well)마다 2×10^5 개의 복막 중피세포(HPMC)를 시딩하고 24시간 이후 편도 유래 중간엽 줄기세포 조정배지(T-MSC CM)을 48시간 동안 처리하여 배양함으로써 복막 중피 세포(HPMC) 및 편도 유래 중간엽 줄기세포 조정배지(T-MSC CM) 처리 배양을 수행하였다. 편도 유래 중간엽 줄기세포 조정배지(T-MSC CM)는 편도 유래 중간엽 줄기세포(T-MSC passage 6)를 2일 동안 배양한 배지를 3-kDa Amicon Ultra Centrifugal filter unit(EMD Millipore)을 사용하여 4,500 rpm, 4°C에서 1시간동안 원심분리하여 농축시킨 후 사용하였다.
- [108] **실시예 1. HPMC 및 T-MSC 공동배양 시 TGF- β 처리로 인한 세포 형태 변화 및 세포 마커 발현 변화**
- [109] TGF- β 로 유도된 복막 EMT에서 T-MSC의 효과를 규명하기 위해, 단독 배양한 HPMC(실험예 1) 및 T-MSC와 공동배양한 HPMC(실험예 2)를 준비하고 각 그룹에 1ng/ml의 TGF- β 를 처리하여 세포 형태 변화 및 세포 마커 변화를 관찰하였다.
- [110] 먼저, 단독 배양한 HPMC에 TGF- β 처리 시 세포가 직육면체 모양에서 길쭉한 방추 모양으로 형태 변화가 나타나는 것을 현미경을 통해 관찰하였다. 반면, T-MSC와 공동배양한 HPMC의 경우 TGF- β 처리 시 세포 형태 변화가 완화된 것을 확인하였다(도 1A).
- [111] 또한, 48시간 단독 배양한 HPMC와, T-MSC와 공동배양한 HPMC를 준비하고 각 그룹에 1ng/ml의 TGF- β 를 처리한 후 western blotting을 통해 세포 마커 변화를 관찰하였으며(도 1B), 대조군 대비 마커 변화를 그래프로 나타내었다(도 1C).
- [112] 실험 결과, 단독 배양한 HPMC에 TGF- β 처리 시 상피 세포 마커인 E-cadherin이 감소하고, 중간엽 세포 마커인 α -SMA 및 Fibronectin이 증가하는 것을 확인하였다. 반면, T-MSC와 공동 배양한 HPMC의 경우, TGF- β 처리에 의한 E-cadherin의 감소와 α -SMA 및 Fibronectin의 증가 등 마커 발현 변화가 현저히 완화된 것을 확인하였다.
- [113] 정리하면, 편도 유래 중간엽 줄기세포(T-MSC)가 TGF- β 로 유도된 세포 형태의 변화와 E-cadherin, α -SMA 및 fibronectin의 발현 변화를 완화시킴을 확인하였으며, 이는 편도 유래 중간엽 줄기세포가 복막 중피 세포(HPMC)에서 일어나는

EMT를 완화시킴을 의미한다. 이를 통해, 편도 유래 중간엽 줄기세포가 파라크린 효과등을 통해 복막 섬유증에 치료 효능을 나타낼 수 있음을 확인하였다.

[114] 실시예 2. HPMC에 T-MSC CM 처리 배양 시 TGF- β 처리로 인한 세포 형태 변화 및 세포 마커 발현 변화

[115] 상기 실시예 1과 같은 방식으로, TGF- β 로 유도된 복막 EMT에서 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정배지(T-MSC CM)의 효과를 규명하기 위해 단독 배양한 HPMC(실험예 1) 및 T-MSC CM 처리 배양 한 HPMC(실험예 3)를 준비하고 각 그룹에 1ng/ml의 TGF- β 를 처리하여 세포 형태 변화 및 세포 마커 변화를 관찰하였다.

[116] 실시예 1과 마찬가지로, 먼저 단독 배양한 HPMC에 TGF- β 처리 시 세포가 직육면체 모양에서 길쭉한 방추 모양으로 형태 변화가 나타나는 것을 현미경을 통해 관찰하였다. 반면, T-MSC CM 처리 배양한 HPMC의 경우 TGF- β 처리 시 세포 형태 변화가 완화된 것을 확인하였다(도 2A).

[117] 또한, 48시간 단독 배양한 HPMC와, T-MSC CM 처리 배양한 HPMC를 준비하고 각 그룹에 1ng/ml의 TGF- β 를 처리한 후 western blotting을 통해 세포 마커 변화를 관찰하였으며(도 2B), 대조군 대비 마커 변화를 그래프로 나타내었다(도 2C).

[118] 실험 결과, 단독 배양한 HPMC에 TGF- β 처리 시 상피 세포 마커인 E-cadherin이 감소하고, 중간엽 세포 마커인 α -SMA 및 Fibronectin이 증가하는 것을 확인하였다. 반면, T-MSC CM 처리 배양한 HPMC의 경우, TGF- β 처리에 의한 E-cadherin의 감소와 α -SMA 및 Fibronectin의 증가 등 마커 발현 변화가 현저히 완화된 것을 확인하였다.

[119] 정리하면, 편도 유래 중간엽 줄기세포 조정배지(T-MSC CM)가 TGF- β 로 유도된 세포 형태의 변화와 E-cadherin, α -SMA 및 fibronectin의 발현 변화를 완화시킴을 확인하였으며, 이는 편도 유래 중간엽 줄기세포 조정배지가 복막 중피 세포 (HPMC)에서 일어나는 EMT를 완화시킴을 의미한다. 이를 통해, 편도 유래 중간엽 줄기세포 조정배지가 파라크린 효과 등을 통해 복막 섬유증에 치료 효능을 나타낼 수 있음을 확인하였다.

[120] 실시예 3. 중피 세포(Met5A)에서 T-MSC 및 타 유래 중간엽 줄기세포 조정배지의 EMT 억제 효과 비교

[121] T-MSC와 타 유래 중간엽 줄기세포의 EMT 억제 효과를 비교하기 위해, 중피 세포주인 Met5A에 2ng/ml의 TGF- β 를 처리하여 EMT를 유도하고, 이후 각 유래 별 중간엽 줄기세포 조정배지(T-MSC CM, AD-MSC CM, BM-MSC CM)를 처리했을 때 세포 형태 변화 및 세포 마커 변화를 관찰하였다.

[122] 먼저, 중피 세포주인 Met5A에 TGF- β 를 처리하고 48시간 후 세포 형태를 관찰한 결과, 세포가 직육면체 모양에서 길쭉한 방추 모양으로 형태 변화가 나타나는 것을 현미경을 통해 관찰하였다. 이후 편도 유래 중간엽 줄기세포 조정배지 (T-MSC CM), 지방 유래 중간엽 줄기세포 조정배지(AD-MSC CM) 또는 골수 유래 중간엽 줄기세포 조정배지(BM-MSC CM)를 각각 처리하고 24시간 후 세포 형

태를 관찰한 결과, TGF- β 처리에 의해 발생했던 세포 형태 변화가 완화되는 것을 확인하였다(도에 나타내지 않음).

- [123] 또한, 중피 세포주인 Met5A에 TGF- β 를 처리하여 EMT를 유도하고 각 유래 별 중간엽 줄기세포 조정배지(T-MSC CM, AD-MSC CM, BM-MSC CM)를 처리했을 때 이에 의한 세포 마커 변화를 western blotting 및 RT-PCR을 통해 확인하였다(도 3A 내지 3C).
- [124] 실험 결과, 중피 세포주(Met5A)에 TGF- β 처리 시 상피 세포 마커인 E-cadherin의 발현이 감소하고, 중간엽 세포 마커인 Fibronectin의 발현이 증가하는 것을 확인하였다. 이후 T-MSC CM, AD-MSC CM 또는 BM-MSC CM을 각각 처리하고 24시간 후 세포 마커 변화를 관찰한 결과, 감소했던 E-cadherin의 발현이 증가하고, 증가했던 fibronectin의 발현이 감소 또는 유지되는 것을 확인하였다. 특히, T-MSC CM을 처리한 조건에서 E-cadherin의 발현 증가 및 Fibronectin의 발현 감소 효과가 AD-MSC CM 또는 BM-MSC CM 처리 조건 대비 현저히 우수함을 확인하였다.
- [125] 정리하면, 편도 유래 중간엽 줄기세포 조정배지(T-MSC CM)가 TGF- β 로 유도된 세포의 형태 변화와 E-cadherin 및 fibronectin의 발현 변화를 완화시킴을 확인하였다. 특히, AD-MSC CM 또는 BM-MSC CM 등 타 유래 중간엽 줄기세포 조정배지에 대비하여, T-MSC CM의 E-cadherin 발현 증진 및 Fibronectin 발현 억제 효과가 보다 우수함을 확인하였으며, 이를 통해 T-MSC CM이 타 유래 중간엽 줄기세포 조정배지 대비 EMT 억제에 더 효과적임을 알 수 있다.
- [126] 실시예 4. T-MSC의 산화 스트레스 억제 효과
- [127] TGF- β 로 유도된 복막 세포의 EMT에 대하여 T-MSC의 효과를 규명하기 위해, 단독 배양한 HPMC(실험예 1) 및 T-MSC와 공동 배양한 HPMC(실험예 2)를 준비하고 각 그룹에 1ng/ml의 TGF- β 를 처리한 후 DCF-DA 염색 및 MitoSox 염색을 통해 산화 스트레스 변화를 관찰하였다(도 4A 및 4B).
- [128] 실험 결과, 단독 배양한 HPMC 및 T-MSC와 공동 배양한 HPMC 모두 형광을 띠는 세포가 많이 관찰되지 않았다. 그러나, 단독 배양한 HPMC에 TGF- β 를 처리한 경우 형광을 띠는 세포가 증가하였으며, T-MSC와 공동배양 한 HPMC의 경우 TGF- β 처리에도 형광을 띠는 세포가 크게 증가하지 않음을 확인하였다.
- [129] 이를 통해, 편도 유래 중간엽 줄기세포(T-MSC)가 TGF- β 로 유도된 세포 내 산화 스트레스의 증가를 억제하는 효과가 있음을 확인하였다.
- [130] 실시예 5. T-MSC CM의 NOX4 발현 억제 효과
- [131] TGF- β 로 유도된 복막 세포의 NOX4 발현에 대하여 T-MSC CM의 효과를 규명하기 위해, 단독 배양한 HPMC(실험예 1) 및 T-MSC CM 처리 배양한 HPMC(실험예 3)를 준비하고 각 그룹에 1 ng/ml의 TGF- β 를 처리한 후 면역염색을 통해 NOX4 발현 변화를 관찰하였다(도 5).
- [132] NOX4는 미토콘드리아에 위치하고 mtROS생성과 관련이 있다고 알려져 있어, 공초점 현미경을 사용하여 NOX4 염색과 Mitotracker™ 적색 염색을 통해 TGF- β

에 의해 NOX4의 발현 증가가 HPMC 세포의 미토콘드리아에 위치하는지 조사하였다.

[133] 실험 결과, 단독배양한 HPMC에 TGF- β 를 처리한 경우 세포의 미토콘드리아에서 NOX4의 발현이 증가하였으나, T-MSC CM 처리 배양한 HPMC의 경우 TGF- β 처리에 의해 NOX4 발현이 크게 증가하지 않음을 확인하였다.

[134] 이를 통해, 편도 유래 중간엽 줄기세포 조정배지(T-MSC CM)가 TGF- β 로 유도된 미토콘드리아 내 NOX4 발현을 억제하여, 산화 스트레스를 억제하는 효과가 있음을 확인하였다.

[135] 실험예 4. 복막 투석에 의한 섬유증 유발 랫드 모델 확립

[136] T-MSC를 이용한 동물 실험을 수행하기 위해, 복막 투석에 의한 복막 섬유증 유발 랫드 모델을 구축하였다.

[137] 동물 실험을 위한 실험군을 아래와 같이 편성하였다.

[138] [표 1]

[139]

NC (n=2)	정상 대조군
NP (n=2)	NC군에 T-MSC 복강 주사
NV (n=2)	NC군에 T-MSC 정맥 주사
PD (n=4)	복막 투석 대조군
PP (n=4)	PD군에 T-MSC 복강 주사
PV (n=4)	PD군에 T-MSC 정맥 주사

[140] 구체적으로, 실험 시작 7일 전에 미리 투석액 주입을 위한 카테터를 삽입하였다. 실험이 시작된 후, 복막 투석 실험군(PD, PP, PV)에게는 20 mM의 메틸글리옥살(methylglyoxal, MGO)을 포함하는 4.25% 피지오닐 투석액 100 mL/kg을 매일 투여하였으며, 그 중 PP군 및 PV군에는 실험 2주 째에 편도 유래 중간엽 줄기세포(1.0×10^7 cells)를 1회 추가로 투여(PP군: 복강(카테터 연결 포트) 주사, PV군: 정맥 주사)하였다. 복막 투석을 수행하지 않은 실험군(NC, NP, NV)에게는 카테터를 삽입하되 투석액은 투여하지 않았으며, 그 중 NP군 및 NV군에는 실험 2주 째에 편도 유래 중간엽 줄기세포(1.0×10^7 cells)를 1회 투여(NP군: 복강 주사, NV군: 정맥 주사)하였다. 실험 3주 후에는 투여를 종료하고 각 실험군의 복막 기능을 평가한 후 복막 조직을 분석하였다. 상기 복막 투석에 의한 섬유증 유발 랫드 모델을 이용한 동물 실험의 스케줄 및 실험군 편성을 정리하여 도 6에 나타내었다.

[141] 상기 복막 투석에 의한 섬유증 유발 랫드 모델에서 카테터 삽입 및 모니터링을 다음과 같이 수행하였다.

- [142] 먼저, 복막투석액 주입을 위한 카테터 삽입은 실험쥐를 호흡 마취시킨 후, 좌측 옆으로 눕힌 다음 우측 수술 부위에 알코올을 뿌려준 뒤, 동물용 clipper를 이용하여 절개 부위보다 넓은 부위(약 4 - 6 cm²)를 털을 제모하였다. 이후 피부를 약 0.3 - 0.5 cm 정도 절개하고 절개 부분이 노출된 인접한 근육층을 피부로부터 분리시키면서 실험동물 등쪽을 거쳐 후두부 밑까지 같은 방법으로 진행하였다. 복막 손상을 최소화하고자 직경 약 1 - 2 mm 정도(실제로 도관이 삽입될 만큼의 구멍)의 근육층을 가위로 절개하여 도관의 첫번째 cuff을 넣고, 도관이 빠지지 않도록 비-흡수성 봉합사로 봉합하였다. 카테터를 분리했던 피부와 근육층 사이에 넣어가면서 등쪽의 가장 끝 쪽(후두부)으로 밀어 넣었다. 비-흡수성 봉합사를 이용하여 근육과 피부를 각각 봉합하였다. 포비딘 용액을 봉합부위에 걸쳐 도포하고 호흡 마취기를 분리하여 실험동물이 마취에서 깨어나 잘 움직이는지 모니터링 하였다. 이후 상처가 회복되면서 체모가 자랄 때까지 약 1주일 동안 하루에 2회 모니터링하였다.
- [143] 상기 복막 투석 랫드 모델에서 카테터 삽입 및 모니터링 과정을 보여주는 이미지를 도 7에 나타내었다.
- [144] 실시예 6. 복막 섬유증 유발 랫드 모델에서 T-MSC가 복막 섬유화에 미치는 영향
- [145] 상기 실험에 4에 따른 각 실험군에서 T-MSC가 복막 섬유화에 미치는 영향을 조사하기 위해, 모든 실험군의 복막 조직을 수집하여 파라핀 절편을 제작하고, Sirius Red 염색을 통해 복막 조직의 콜라겐 축적을 비교하였다(도 8 참조).
- [146] 실험 결과, NC군에 비해 PD군에서 복막 두께가 증가하였으며, PD군에 비해 PP군 및 PV군에서 복막 두께가 감소함을 확인하였다. 결과적으로, 복막 투석액 주입으로 인해 PD군에서 복막 섬유화가 진행되었고, T-MSC를 복강 주사(PP군) 또는 정맥 주사(PV군)할 경우 복막 섬유화가 완화된 것을 확인하였다.
- [147] 또한, 각 실험군의 복막 조직으로부터 단백질을 정량하고 상피세포 및 중간엽 세포 마커의 발현을 immunoblot(면역탁본법)을 통해 확인하였다(도 9A 및 9B 참조).
- [148] 실험 결과, NC군에 비해 PD군에서 상피세포 마커인 ZO-1 및 E-cadherin 단백질 발현이 감소하였고, PD군에 비해 PP군 및 PV군에서 회복되는 것을 확인하였다. 한편, 중간엽세포 마커인 fibronectin 및 α -SMA 단백질 발현은 NC군에 비해 PD군에서 증가하였으며, PD군에 비해 PP군 및 PV군에서 α -SMA 단백질 발현이 유의하게 완화된 것을 확인하였다.
- [149] 이를 통해, 복막 투석으로 인해 PD군에서 복막 섬유화가 진행되며, T-MSC를 복강주사(PP군) 또는 정맥 주사(PV군)할 경우 복막 섬유화가 완화된 것을 확인하였다.
- [150] 실시예 7. 복막 섬유증 유발 랫드 모델에서 T-MSC가 산화 스트레스에 미치는 영향

- [151] 상기 실험에 4에 따른 각 실험군에서 T-MSC가 산화 스트레스에 미치는 영향을 조사하기 위해, 각 복막 조직으로부터 산화스트레스 마커인 SOD2 및 nitrotyrosin(NT)에 대하여 면역염색을 수행하였다(도 10 참조).
- [152] 실험 결과, SOD2 염색은 NC군에 비해 PD군에서 감소하였으며, PD군에 비해 PP군 및 PV군에서 증가함을 확인하였다. 또한 NT 면역염색 결과, NC군에 비해 PD군에서 증가하였으나, PD군에 비해 PP군 및 PV군에서 감소함을 확인하였다.
- [153] 이를 통해, 복막 투석액 주입으로 PD군에서 산화 스트레스가 증가하였으며, T-MSC 복강 및 정맥 주사를 통해 산화 스트레스가 완화됨을 확인하였다.
- [154] 또한, 각 실험군에서 복막 산화 스트레스 인자인 8-OHdG(8-hydroxy-2'-deoxyguanosine), NT, 4-HNE(4-Hydroxynonenal), SOD2 및 GSH(Glutathione)의 발현을 immunoblot(면역탁본법)을 통해 확인하였다(도 11A 및 11B 참조).
- [155] 실험 결과, NC군에 비해 PD군에서 8-OHdG, NT 및 4-HNE 단백질 발현이 유의하게 증가한 반면, SOD2 및 GSH 단백질 발현은 유의하게 감소한 것을 확인하였다. PD군에서 증가하였던 8-OHdG 단백질은 T-MSC를 복강(PP군) 및 정맥(PV군) 주사하였을 때 유의하게 감소하였으나 NT 및 4-HNE 단백질 발현에는 큰 차이가 없었다. PD군에서 감소하였던 항산화인자인 SOD2 및 GSH 단백질 발현은 PP군 및 PV군에서 그 발현이 회복되는 것을 확인하였다.
- [156] 이를 통해, 복막 투석액 주입으로 PD군에서 산화 스트레스가 증가하며, T-MSC 복강 및 정맥 주사를 통해 산화 스트레스가 완화됨을 확인하였다.
- [157] 실시예 8. 복막 섬유증 유발 랫드 모델에서 T-MSC가 소포체 스트레스에 미치는 영향
- [158] 상기 실험에 4에 따른 각 실험군에서 T-MSC가 소포체 스트레스에 미치는 영향을 조사하기 위해, 소포체 스트레스에 관여하는 GRP 78/94(glucose regulatory protein 78/94), IRE1(inositol-requiring enzyme 1), ATF6(Activating transcription factor 6), CHOP(C/EBP homologous protein), p-PERK(phosphorylated protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase), p-eIF2 α (phosphorylated Eukaryotic Initiation Factor 2 alpha) 및 ATF4(Activating transcription factor 4) 단백질의 발현을 immunoblot(면역탁본법)을 통해 확인하였다(도 12A 및 12B 참조).
- [159] 실험 결과, NC군에 비해 PD군에서 GRP78/94, IRE1, ATF6, CHOP, pPERK, p-eIF2 α 및 ATF4 단백질 발현이 증가하였고, PD군에 비해 PP군 및 PV군에서 GRP78, IRE1, ATF6 및 CHOP 단백질 발현이 감소한 것을 확인하였다.
- [160] 이를 통해, 복막 투석액 주입으로 PD군에서 소포체 스트레스가 증가하며, T-MSC 복강 및 정맥 주사를 통해 소포체 스트레스가 완화됨을 확인하였다.
- [161] 실시예 9. 복막 섬유증 유발 랫드 모델에서 T-MSC가 세포사멸에 미치는 영향
- [162] 상기 실험에 4에 따른 각 실험군에서 T-MSC가 세포사멸에 미치는 영향을 조사하기 위해, 세포사멸에 관여하는 Bcl-2(B-cell lymphoma-2), Bax(Bcl-2-associated X protein), Bad(Bcl-2-associated agonist of cell death), cytochrome C,

cleaved caspase-3, p53 및 cleaved PARP(poly ADP ribose polymerase) 단백질의 발현을 immunoblot(면역탁본법)을 통해 확인하였다(도 13A 및 13B 참조).

- [163] 실험 결과, NC군에 비해 PD군에서 Bcl-2 단백질 발현이 감소하였고, Bax, Bad, cytochrome C, cleaved caspase-3, p53, cleaved PARP 단백질 발현이 증가하였다. 또한, PD군에 비해 PP군 및 PV군에서 모두 cleaved caspase-3 단백질이 감소하였고, Bax 단백질은 PP군에서, cleaved PARP 단백질은 PV군에서 감소한 것을 확인하였다.
- [164] 이를 통해, 복막 투석액 주입으로 PD군에서 복막 조직의 세포사멸이 증가하며, T-MSC 복강 및 정맥 주사를 통해 세포사멸이 억제됨을 확인하였다.
- [165] 실시예 10. 복막 섬유증 유발 랫드 모델에서 T-MSC가 NLRP3 염증소체에 미치는 영향
- [166] 상기 실험에 4에 따른 각 실험군에서 T-MSC가 NLRP3 염증소체에 미치는 영향을 조사하기 위해, NLRP3 염증소체에 관여하는 NLRP3(NLR family pyrin domain containing 3), ASC(Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD), cleaved-caspase-1 및 IL-1 β (Interleukin 1 beta) 단백질의 발현을 immunoblot(면역탁본법)을 통해 확인하였다(도 14A 및 14B 참조).
- [167] 실험 결과, NC군에 비해 PD군에서 NLRP3, ASC, cleaved caspase-1 및 IL-1 β 단백질 발현이 증가하였고, PD군에 비해 PP군에서 ASC 단백질 발현이 감소하였으며, PV군에서 NLRP3 단백질 발현이 감소한 것을 확인하였다.
- [168] 이를 통해, 복막 투석액 주입으로 PD군에서 NLRP3 염증소체가 증가하며, T-MSC 복강 및 정맥 주사를 통해 NLRP3 염증소체가 억제됨을 확인하였다.
- [169] 실시예 11. 복막 섬유증 유발 랫드 모델에서 T-MSC가 체중 변화에 미치는 영향
- [170] 상기 실험에 4에 따라 복막 섬유증 유발 랫드 모델을 구축하는 동안 각 실험군의 체중 변화를 비교하였다(도 15 참조).
- [171] 실험이 시작된 D0에서는 전체 실험군 사이에 체중 편차가 크지 않았으나, 실험이 진행될수록 복막투석을 수행한 실험군(PD, PP, PV)에서 체중 저하가 진행되었으며, 실험이 종료되는 D21에서는 PD군, PP군, PV군 순서로 체중 저하가 크게 나타났다.
- [172] 이를 통해 복막 섬유증 유발 랫드 모델에서 T-MSC의 투여가 대상체의 체중 저하를 억제하는 효과가 있는 것을 확인하였다.
- [173] 실시예 12. 복막 섬유증 유발 랫드 모델에서 T-MSC의 복막 내 생착 확인
- [174] 상기 실험에 4에 따라 복막 섬유증 유발 랫드 모델을 구축한 후, 각 실험군의 복부 조직을 human nuclei 항체를 이용해 염색함으로써 T-MSC의 생착 여부를 확인하였다(도 16 참조).
- [175] 전체 실험군 중 PV군 및 PP군에서만 T-MSC의 생착이 관찰되었다.
- [176] 이를 통해 복막 투석액 주입으로 PD군에서 복막 섬유화가 진행되었으며, T-MSC를 복강 주사(PP군) 또는 정맥 주사(PV군)할 경우 섬유화된 부분에 T-MSC가 도달하고 적어도 7일 이상 T-MSC의 생착이 유지됨을 확인하였다.

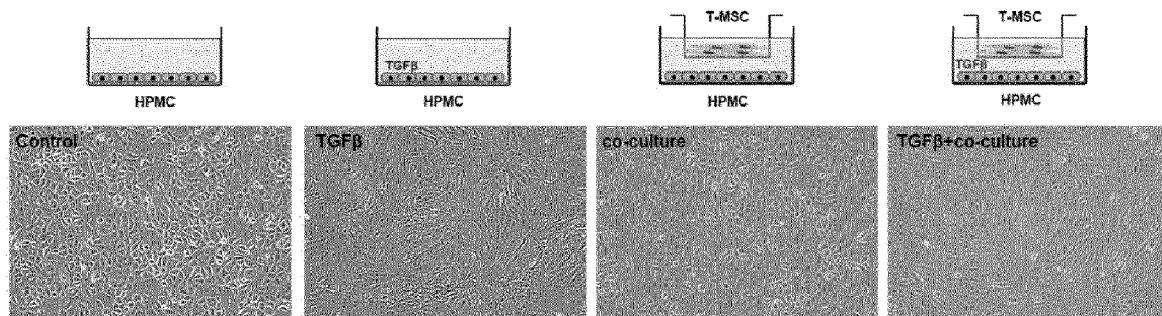
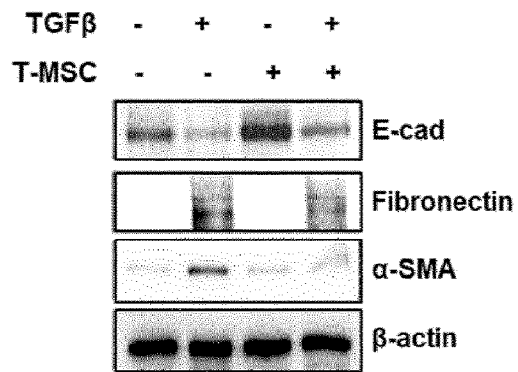
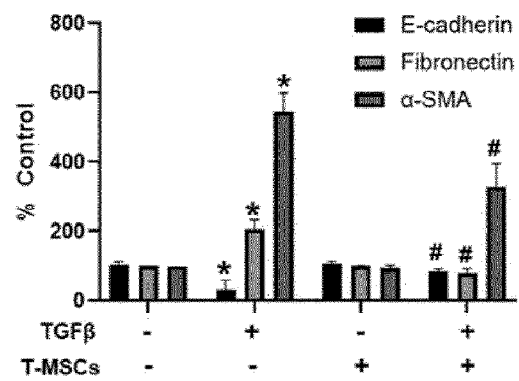
- [177] 실시예 13. 복막 섬유증 유발 랫드 모델에서 T-MSC가 복막 기능에 미치는 영향
- [178] 상기 실험예 4에 따라 복막 섬유증 유발 랫드 모델을 구축한 후, 각 실험군의 복막 평형 검사(PET, Peritoneal Equilibration Test)를 시행하여 비교하였다(도 17 참조).
- [179] 구체적으로, 각 실험군에 100 mL/kg의 복막 투석액을 복강 주사하였다. 배액(D, Dialysate) 검체는 복막 투석액 주입 전(D0)과 2시간 후(D2)에, 혈액(P, Plasma) 검체는 2시간 후(P2)에 수집하였다. 복막 평형 검사의 복막 이동 지표로는 투석액 주입 전과 주입하고 2시간 후의 배액-배액 비율에 대한 포도당 농도(D2/D0 Glucose) 및 투석액을 주입하고 2시간이 경과했을 때의 배액-혈액 비율에 대한 크레아티닌 농도(D2/P2 Cr)를 사용하였다. 각 지표들은 모두 AU680 자동분석기(Beckman Coulter, Brea, USA)를 통해 측정하였다.
- [180] 실험 결과, D2/D0 Glucose는 NC군에 비해 PD군에서 유의하게 감소한 반면, PD군에 비해 PP군 및 PV군에서는 유의하게 증가하였다. 또한, D2/P2 Cr은 NC군에 비해 PD군에서 유의하게 증가하였으나, PD군에 비해 PP군 및 PV군에서는 유의하게 감소하였다.
- [181] 이를 통해, 복막 투석액 주입으로 PD군의 복막 기능이 현저히 저하되었으며, T-MSC를 복강 주사(PP군) 또는 정맥 주사(PV군)할 경우 복막의 흡수 및 수송 기능이 개선됨을 확인하였다.
- [182] 실시예 14. T-MSC 및 타 유래 중간엽 줄기세포의 항섬유인자 발현 비교
- [183] T-MSC 및 타 유래 중간엽 줄기세포의 항섬유 특성을 비교하기 위해, HMPC(대조군), T-MSC, AD-MSC 및 BM-MSC로부터 항섬유 관련 유전자인 HGF, BMP7의 발현 수준을 Western blotting을 통해 확인하고 이를 도 18에 나타내었다.
- [184] 비교 결과, T-MSC의 경우 AD-MSC 및 BM-MSC 대비 HGF, BMP7의 발현 수준이 유의하게 높은 것을 확인하였으며, 이를 통해 T-MSC의 항섬유 특성이 AD-MSC 및 BM-MSC 대비 유의하게 높은 것을 알 수 있다.
- [185] 실시예 15. T-MSC 및 타 유래 중간엽 줄기세포의 항산화효소 발현 비교
- [186] T-MSC 및 타 유래 중간엽 줄기세포의 항산화 특성을 비교하기 위해, HMPC(대조군), T-MSC, AD-MSC 및 BM-MSC로부터 항산화 관련 유전자인 Catalase, GPx, SOD의 발현 수준을 Western blotting을 통해 확인하고 이를 도 19에 나타내었다.
- [187] 비교 결과, T-MSC의 경우 AD-MSC 및 BM-MSC 대비 Catalase, GPx, SOD의 발현 수준이 유의하게 높은 것을 확인하였으며, 이를 통해 T-MSC의 항산화 특성이 AD-MSC 및 BM-MSC 대비 유의하게 높은 것을 알 수 있다.

청구범위

- [청구항 1] 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정배지를 포함하는 복막 섬유증 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정배지는 복막의 EMT(epithelial-mesenchymal transition)를 억제하는 것인, 약학 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정배지는 중간엽세포 관련 인자의 발현을 억제하는 것인, 약학 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정배지는 상피세포 관련 인자의 발현을 증가시키는 것인, 약학 조성물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정배지는 세포 내 산화 스트레스를 억제하는 것인, 약학 조성물.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정배지는 소포체 스트레스를 억제하는 것인, 약학 조성물.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정배지는 세포 사멸을 억제하는 것인, 약학 조성물.
- [청구항 8] 제1항에 있어서, 상기 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정배지는 염증소체를 억제하는 것인, 약학 조성물.
- [청구항 9] 제1항에 있어서, 상기 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정배지는 HGF, BMP7, Catalase, GPx 및 SOD으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상을 높은 함량으로 함유하는 것인, 약학 조성물.
- [청구항 10] 제1항에 있어서, 상기 복막 섬유증은 복막 투석에 의해 발생하는 것인, 약학 조성물.
- [청구항 11] 제1항에 있어서, 상기 복막 섬유증은 복막후 섬유증(Retroperitoneal fibrosis) 또는 피막 형성 복막 경화증(encapsulating peritoneal sclerosis)인, 약학 조성물.
- [청구항 12] 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정배지를 포함하는 복막 투석액.
- [청구항 13] 제12항에 있어서, 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정배지는 복막의 EMT(epithelial-mesenchymal transition)를 억제하는 것인, 복막 투석액.
- [청구항 14] 제12항에 있어서, 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정배지는 HGF, BMP7, Catalase, GPx 및 SOD으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상을 높은 함량으로 함유하는 것인, 복막 투석액.
- [청구항 15] 복막 섬유증의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정배지를 포함하는 조성물.
- [청구항 16] 복막 섬유증의 예방 또는 치료를 위한 의약을 제조하기 위한 본 발명의 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정배지의 용도.

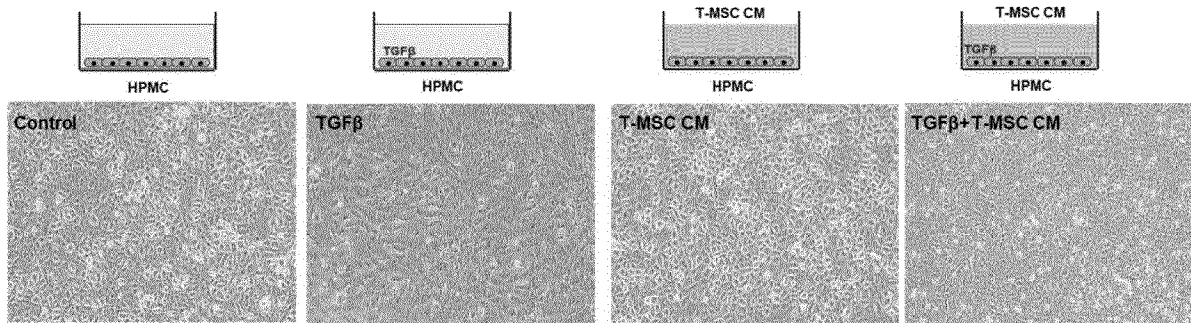
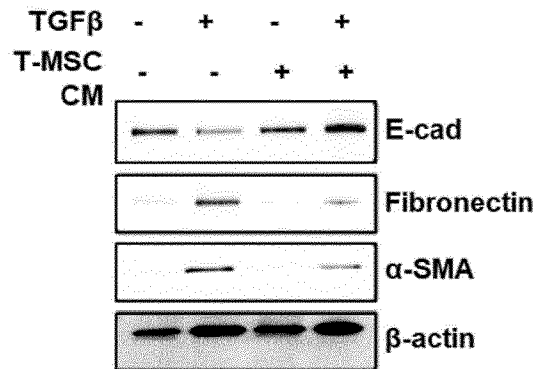
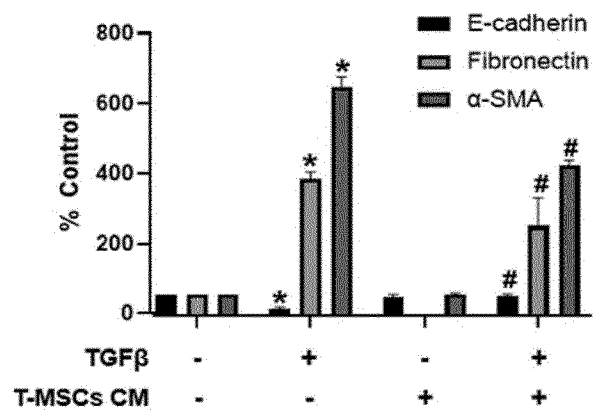
- [청구항 17] 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정배지의 치료학적으로 유효량을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 복막 섬유증의 예방 또는 치료 방법.
- [청구항 18] 제15항에 있어서, 상기 복막 섬유증은 복막후 섬유증(Retroperitoneal fibrosis) 또는 피막 형성 복막 경화증(encapsulating peritoneal sclerosis)인, 조성물.
- [청구항 19] 제16항에 있어서, 상기 복막 섬유증은 복막후 섬유증(Retroperitoneal fibrosis) 또는 피막 형성 복막 경화증(encapsulating peritoneal sclerosis)인, 용도.
- [청구항 20] 제17항에 있어서, 상기 복막 섬유증은 복막후 섬유증(Retroperitoneal fibrosis) 또는 피막 형성 복막 경화증(encapsulating peritoneal sclerosis)인, 방법.

[도 1]

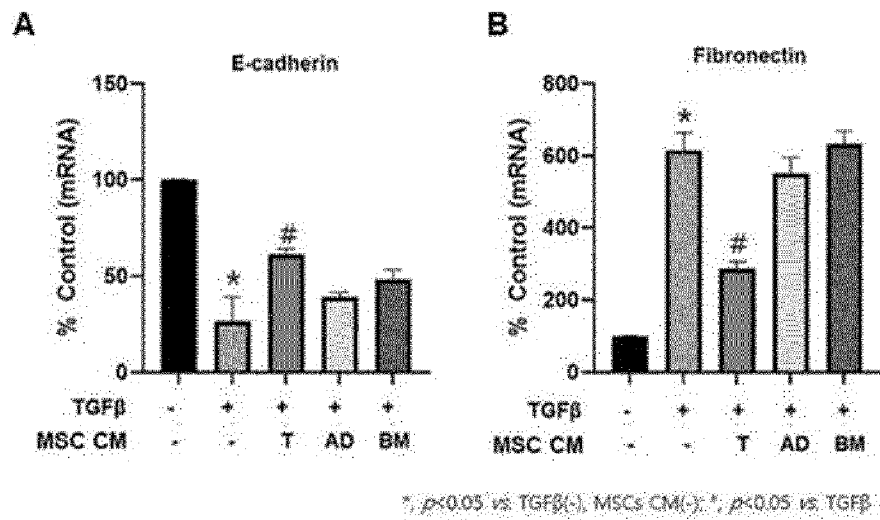
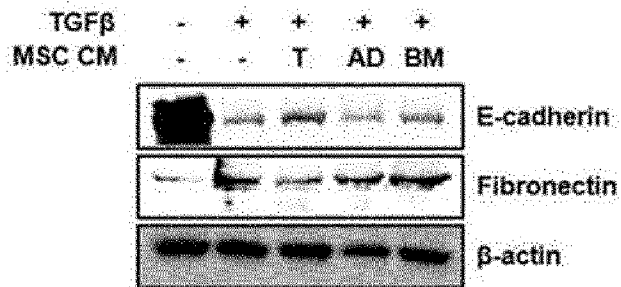
A**B****C**

* $p < 0.05$ vs. control, # $p < 0.05$ vs. HPMCs treated with TGF-β

[도2]

A**B****C*** $p < 0.05$ vs. control, # $p < 0.05$ vs. HPMCs treated with TGF-β

[도3]

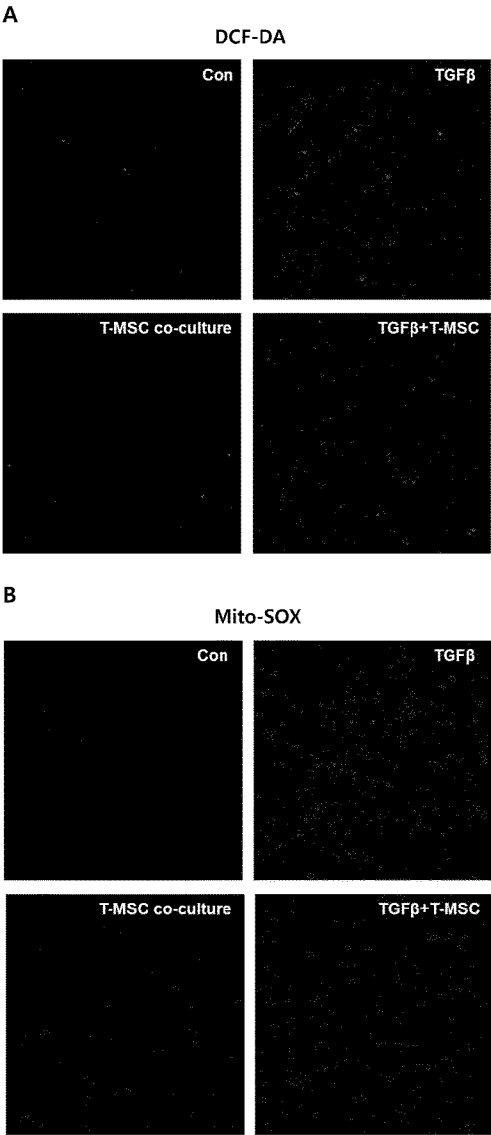
**C**

T: Tonsil-derived mesenchymal stem cell

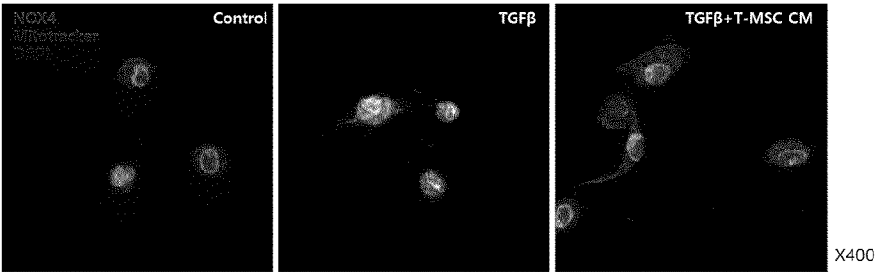
AD: Adipose-derived mesenchymal stem cell

BM: Bone Marrow-derived mesenchymal stem cell

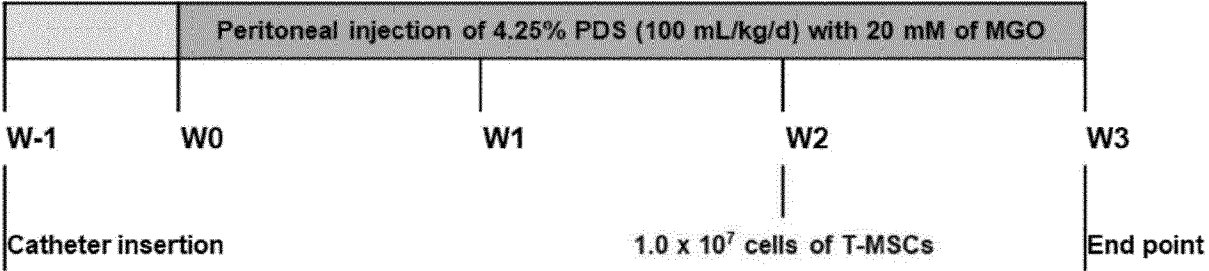
[도4]



[도5]



[도6]

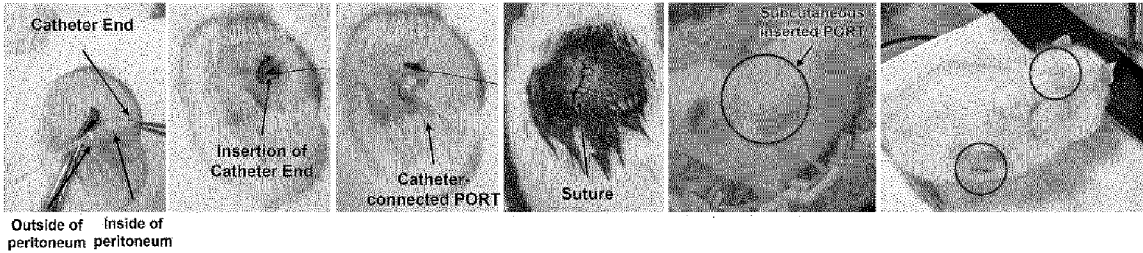


Groups:

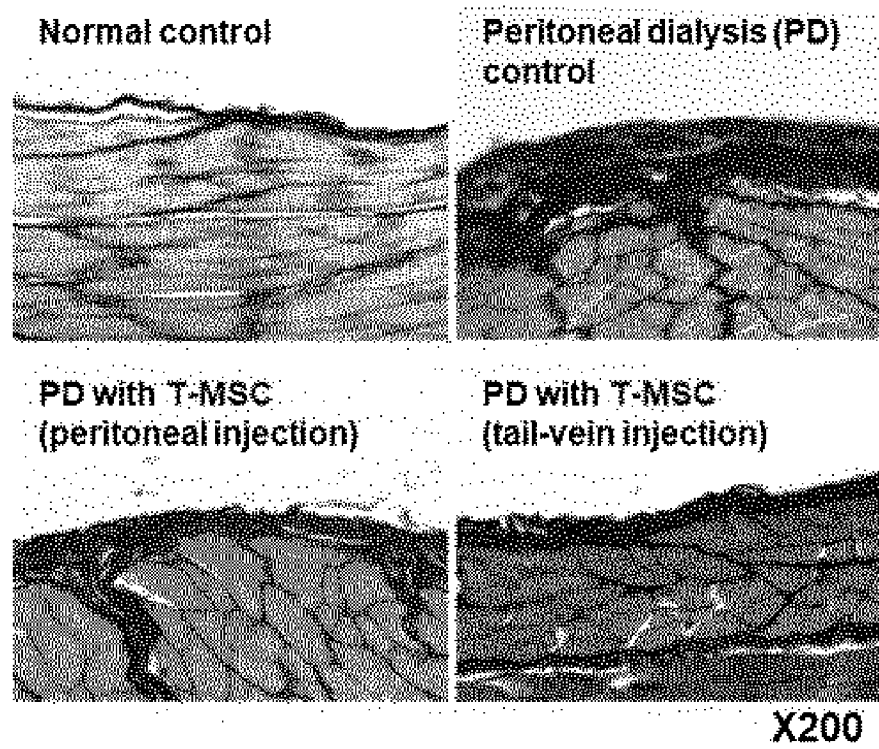
- NC: non-treated normal control rats
- NP: NC rats with IP injected T-MSCs
- NV: NC rats with IV injected T-MSCs
- PD: Peritoneal dialysis (PD) control rats
- PP: PC rats with IP injected T-MSCs
- PV: PC rats with IV injected T-MSCs

[도7]

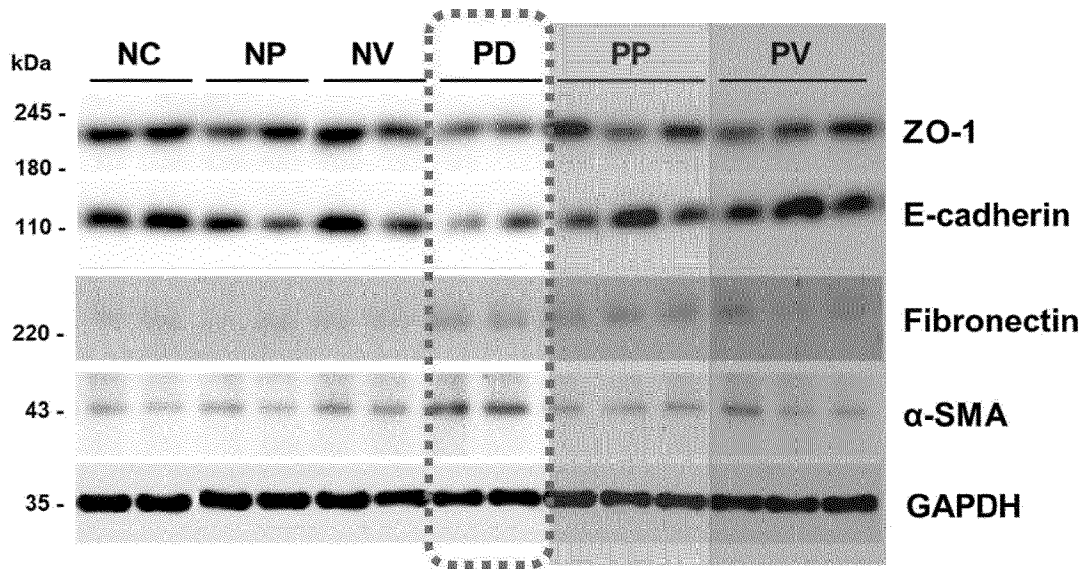
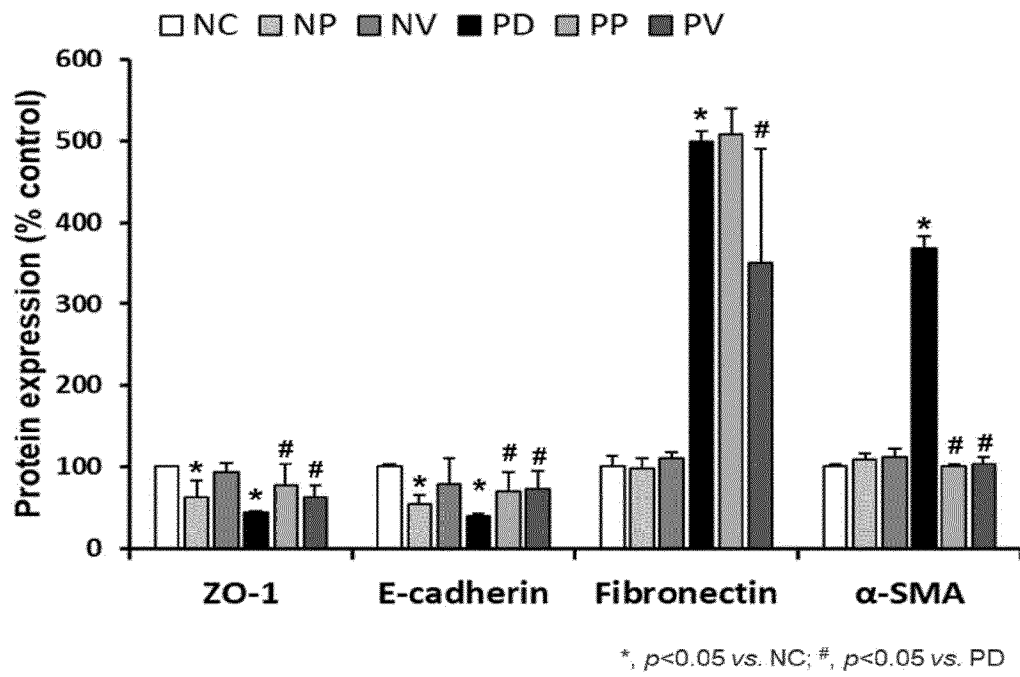
Catheter insertion operation and Monitoring



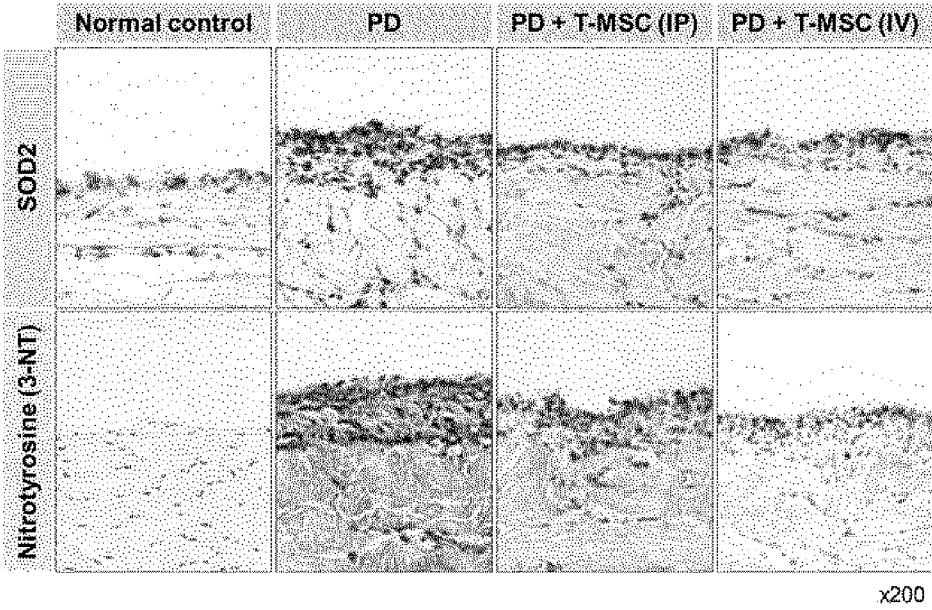
[도8]



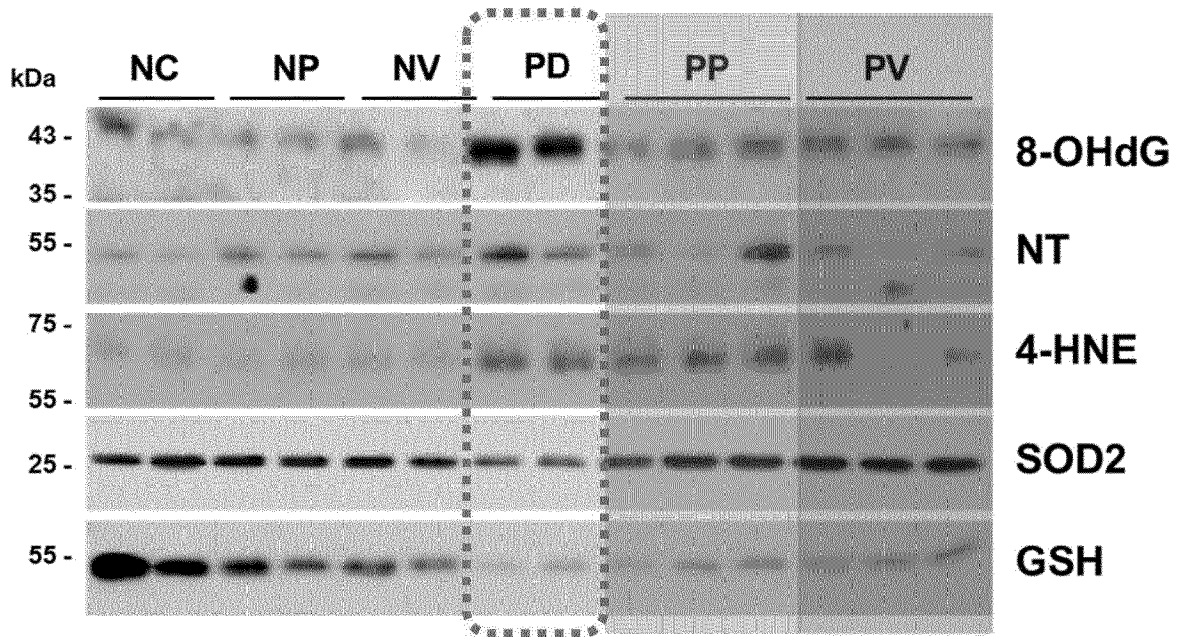
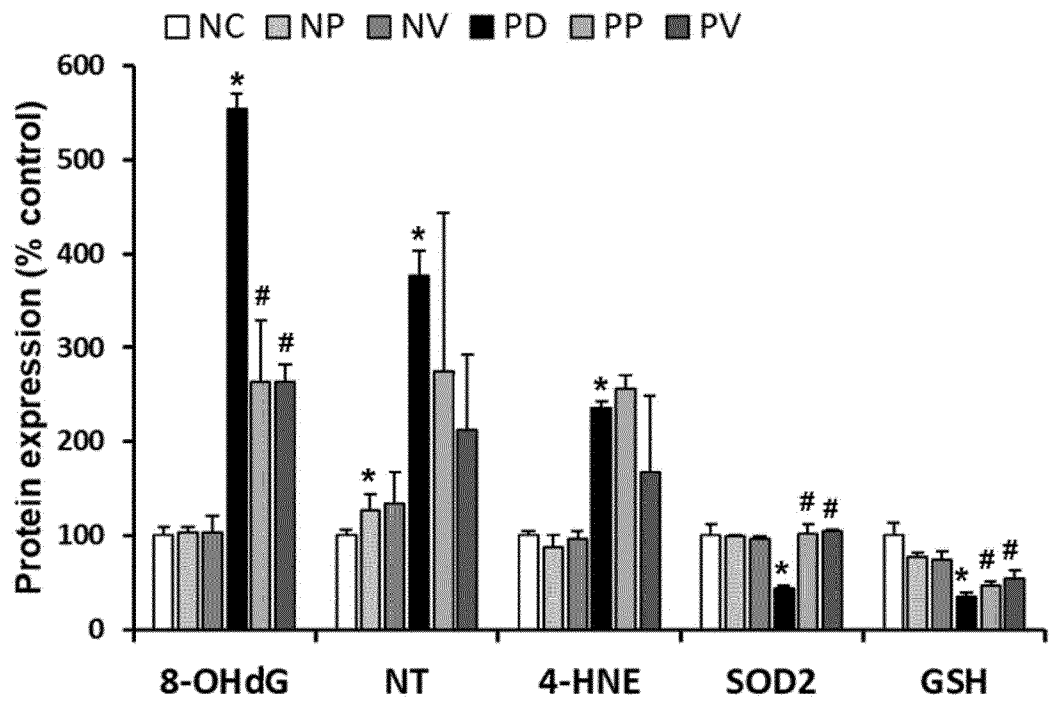
[도9]

A**B**

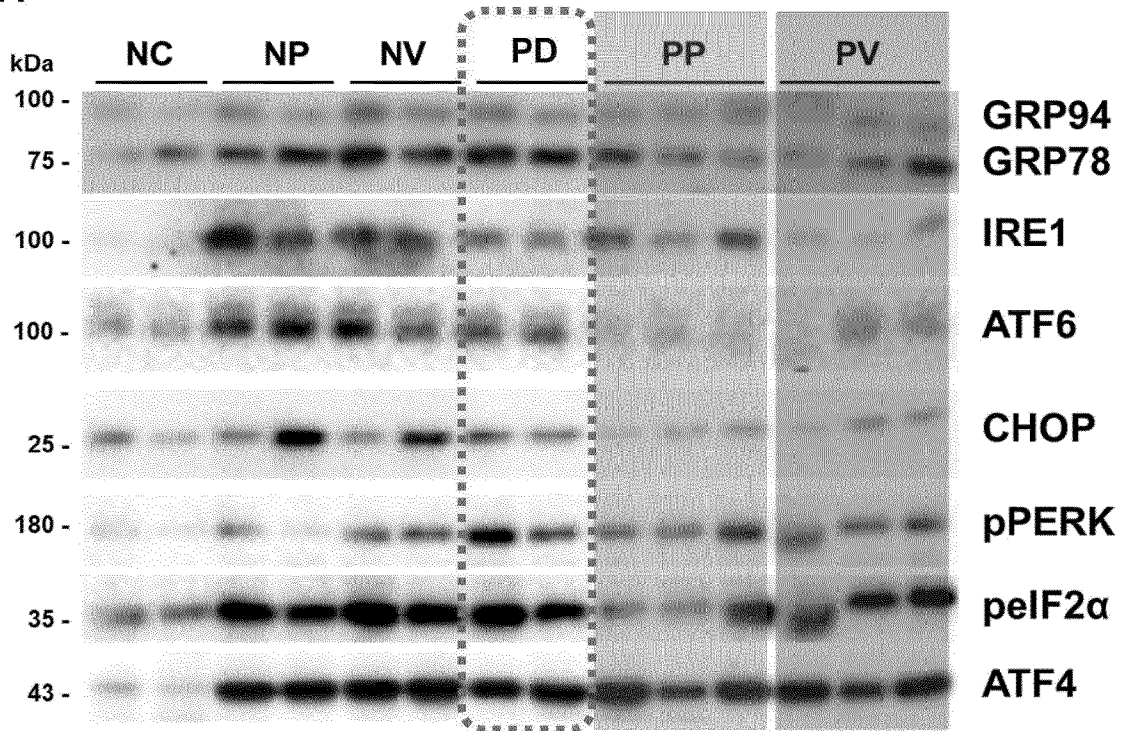
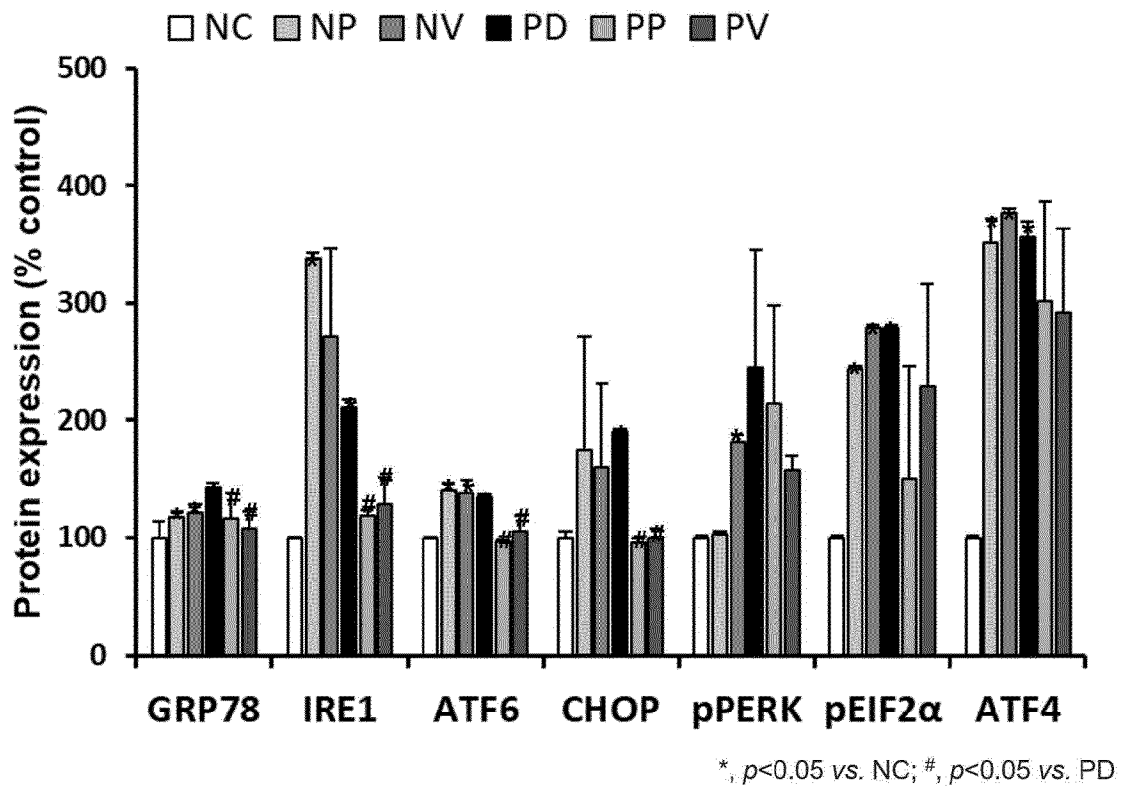
[도10]



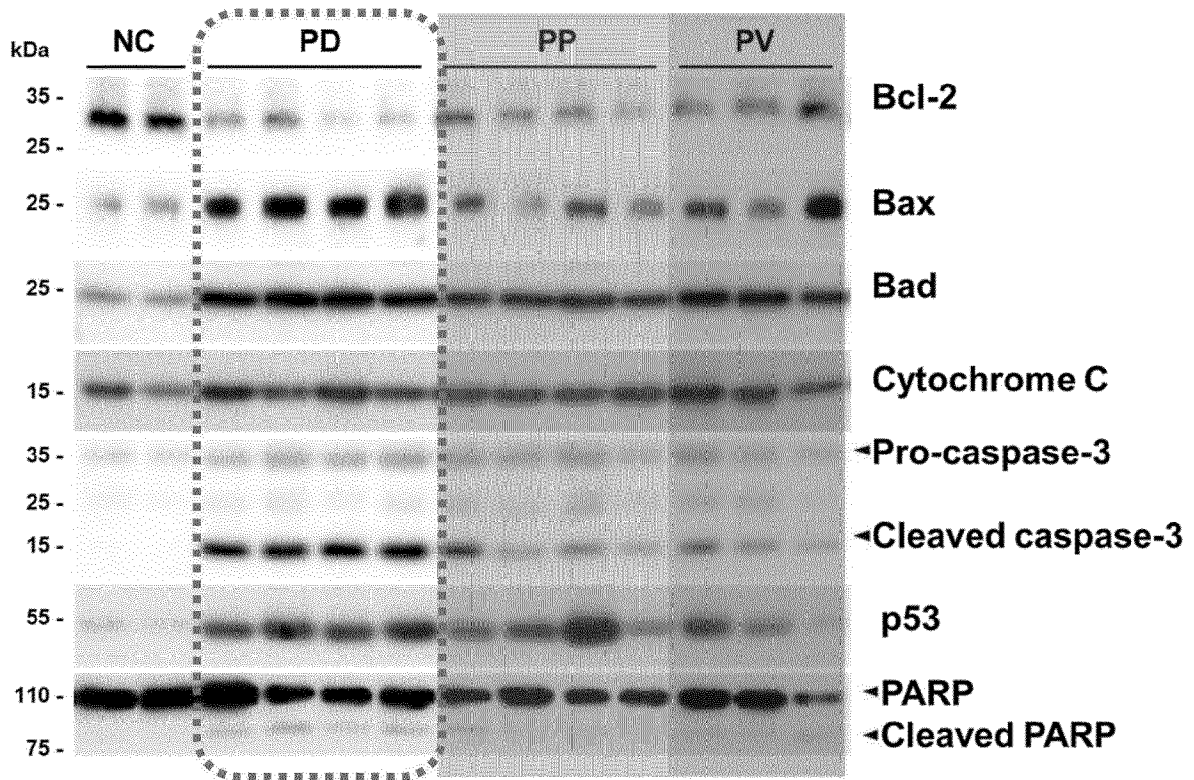
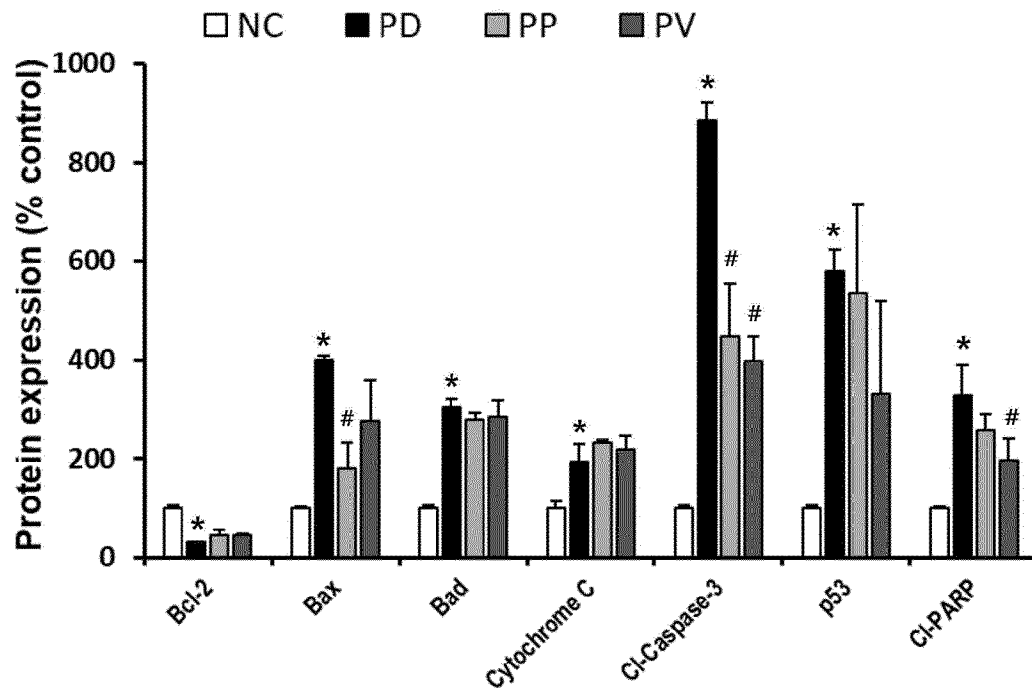
[도11]

A**B***, $p < 0.05$ vs. NC; #, $p < 0.05$ vs. PD.

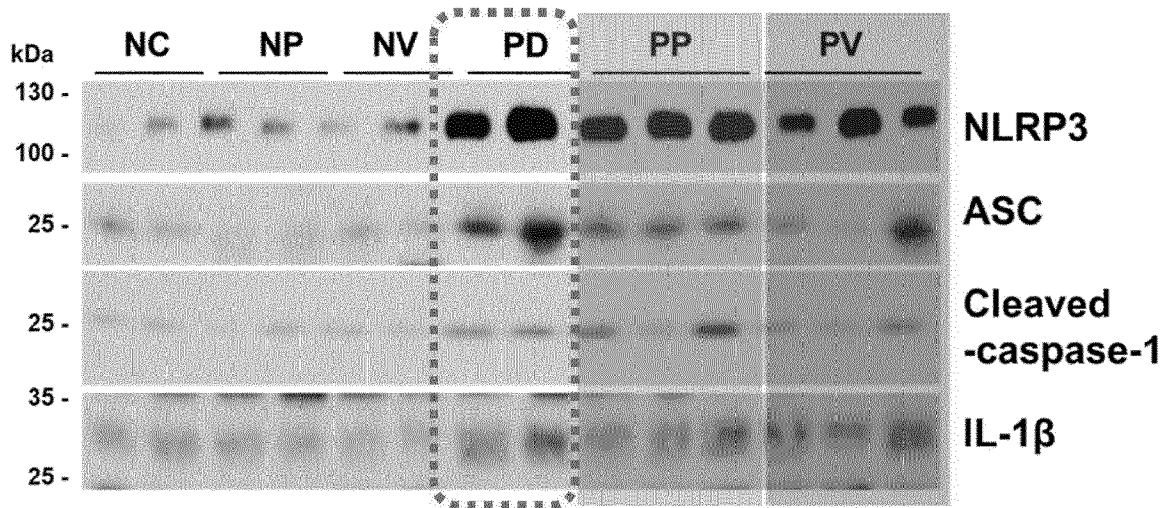
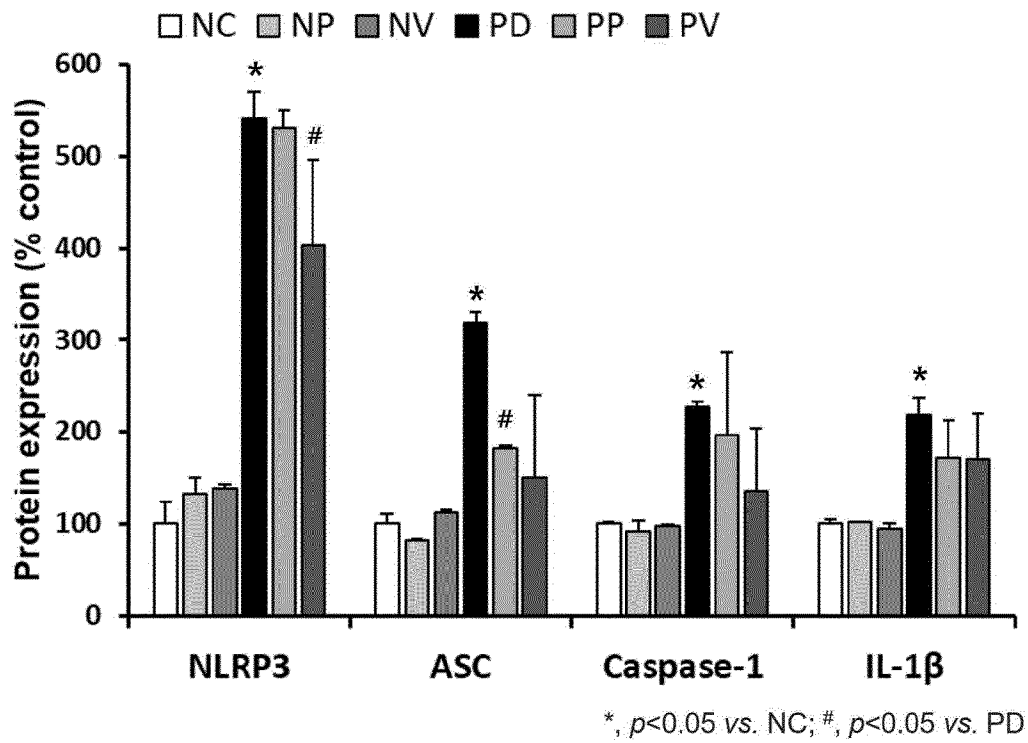
[도12]

A**B**

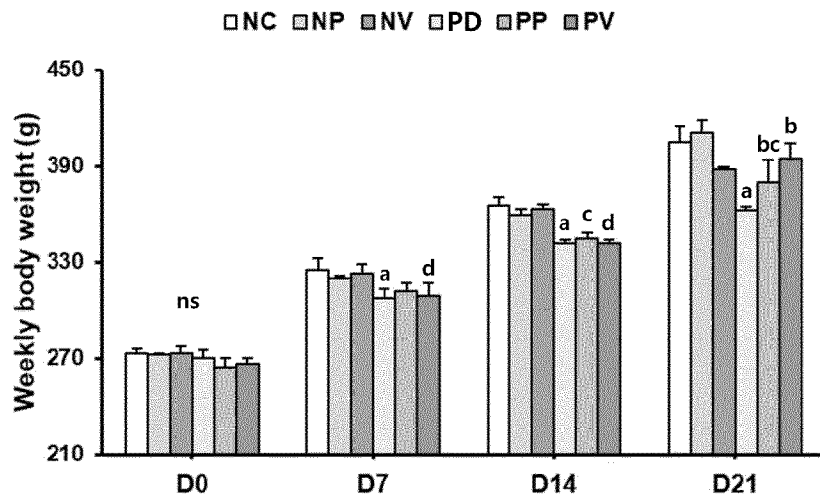
[도13]

A**B***, $p < 0.05$ vs. NC; #, $p < 0.05$ vs. PD

[도14]

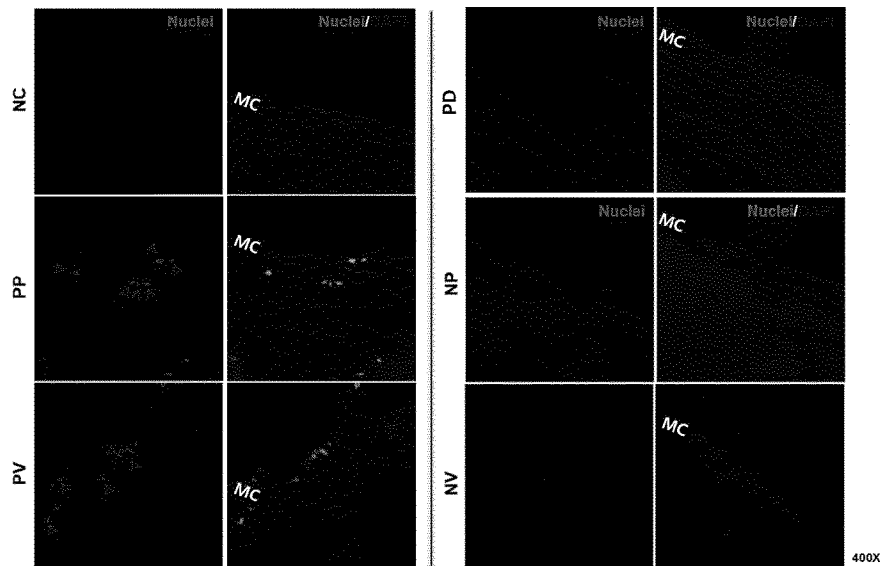
A**B**

[도15]



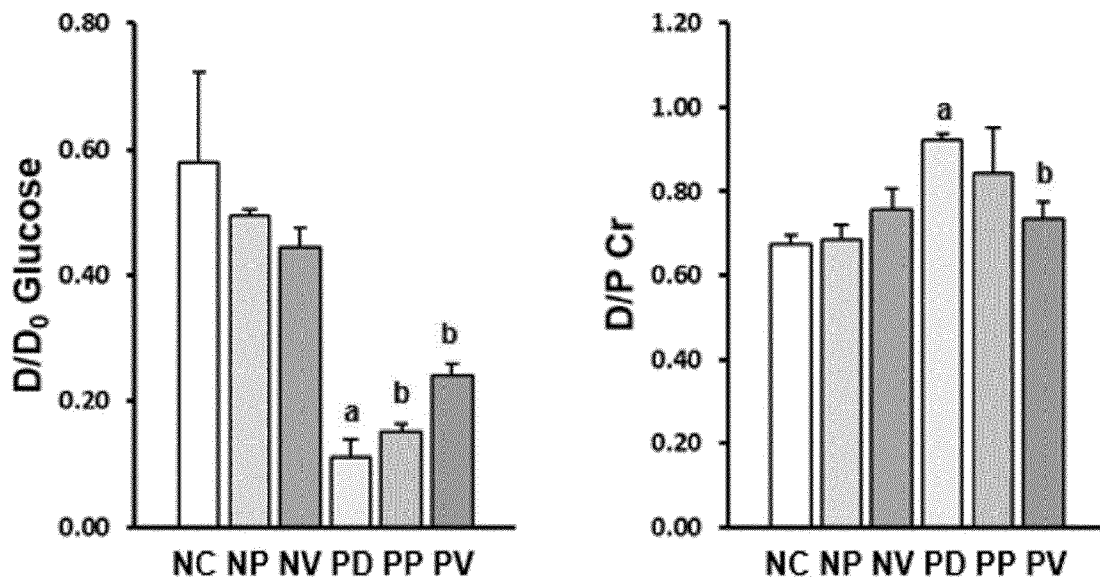
Data are represented by mean $\pm$ SD. *, $P < 0.05$ by ANOVA Test among groups;
 ns, not significant; ^a, <0.05 vs. NC; ^b, <0.05 vs. PD; ^c, <0.05 vs. NP; ^d, <0.05 vs. NV.

[도16]



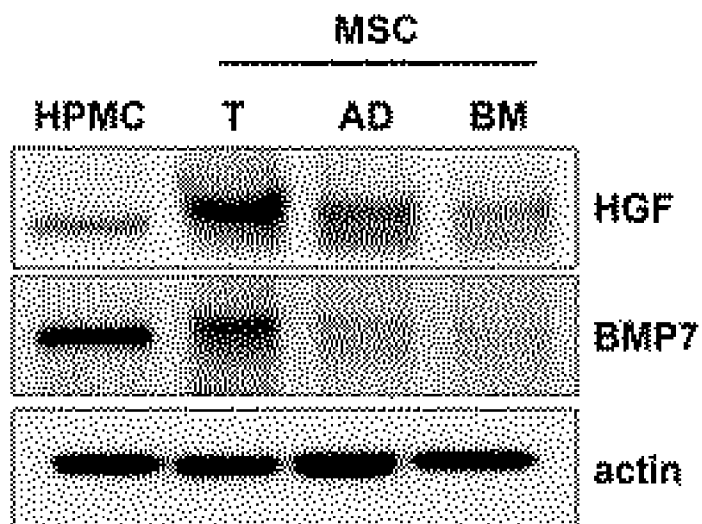
[도17]

Peritoneal Equilibration Test (PET)

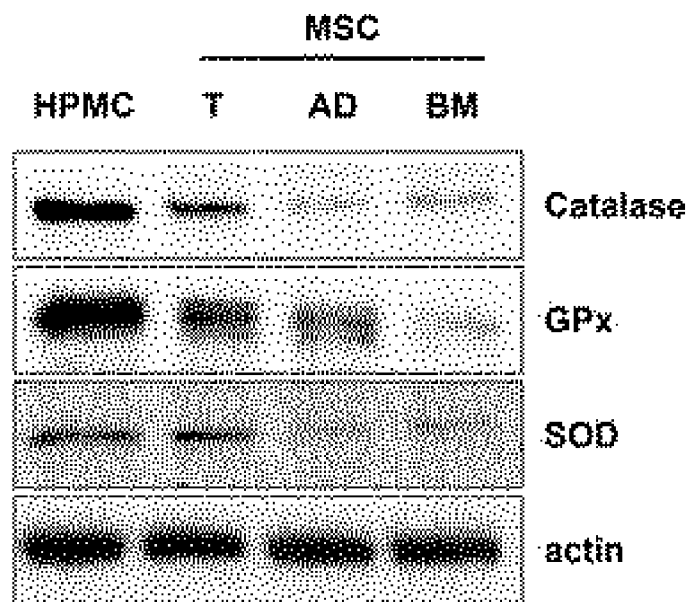


Data are represented by mean $\pm$ SD. ^ap<0.05 vs. NC; ^bp<0.05 vs. PD

[도18]



[도 19]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/012286

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 35/28(2006.01)i; A61P 43/00(2006.01)i; A61P 7/08(2006.01)i; A61M 1/28(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 35/28(2006.01); A23L 33/10(2016.01); A23L 33/18(2016.01); A61K 35/12(2006.01); A61K 35/26(2006.01);
A61K 35/30(2006.01)

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: 편도 유래 중간엽 줄기세포 (tonsil-derived mesenchymal stem cell), 복막 섬유증 (peritoneal fibrosis), EMT (epithelial-mesenchymal transition), 복막후 섬유증 (retroperitoneal fibrosis), 피막 형성 복막 경화증 (encapsulating peritoneal sclerosis), HGF, BMP7, catalase, GPx, SOD

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-2020-0056794 A (EWHA UNIVERSITY - INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION) 25 May 2020 (2020-05-25) See claims 1 and 4; and paragraph [0019].	1-16,18,19
Y	KR 10-2133151 B1 (NOVMETAPHARMA CO., LTD. et al.) 13 July 2020 (2020-07-13) See claims 1-3 and 10; and paragraphs [0003] and [0018].	1-16,18,19
A	KR 10-2019-0114678 A (EWHA UNIVERSITY - INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION) 10 October 2019 (2019-10-10) See claim 1; and paragraph [0019].	1-16,18,19
A	KR 10-2020-0051827 A (ASTELLAS INSTITUTE FOR REGENERATIVE MEDICINE) 13 May 2020 (2020-05-13) See paragraphs [0009] and [0216]-[0219].	1-16,18,19



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

“D” document cited by the applicant in the international application

“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

09 December 2024

Date of mailing of the international search report

09 December 2024

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/012286

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2014-0135367 A (EWHA UNIVERSITY - INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION) 26 November 2014 (2014-11-26) See claim 1.	1-16,18,19
A	KR 10-2020-0133539 A (INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, HALLYM UNIVERSITY) 30 November 2020 (2020-11-30) See abstract; and claims 1-11.	1-16,18,19
A	KR 10-2023-0043587 A (PLCOSKIN CO., LTD.) 31 March 2023 (2023-03-31) See abstract; claims 1-12; and paragraph [0008].	1-16,18,19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/012286

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.: **17, 20**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 17 and 20 pertain to a method for treatment of the human body by surgery or therapy, as well as a diagnostic method (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).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2024/012286

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR	10-2020-0056794	A	25 May 2020	KR	10-2152659	B1	07 September 2020
				WO	2020-101212	A1	22 May 2020
KR	10-2133151	B1	13 July 2020	BR	112021019262	A2	30 November 2021
				CA	3131850	A1	01 October 2020
				CN	113766924	A	07 December 2021
				CN	113766925	A	07 December 2021
				EP	3949976	A1	09 February 2022
				EP	3949976	B1	09 October 2024
				EP	3967321	A1	16 March 2022
				JP	2022-528087	A	08 June 2022
				JP	2022-528857	A	16 June 2022
				JP	7224006	B2	17 February 2023
				JP	7330471	B2	22 August 2023
				KR	10-2140910	B1	04 August 2020
				US	2022-0193179	A1	23 June 2022
				US	2022-0202897	A1	30 June 2022
				WO	2020-197356	A1	01 October 2020
				WO	2020-197359	A1	01 October 2020
KR	10-2019-0114678	A	10 October 2019	KR	10-2526447	B1	26 April 2023
				WO	2019-190218	A1	03 October 2019
KR	10-2020-0051827	A	13 May 2020	CN	104136034	A	05 November 2014
				CN	108478599	A	04 September 2018
				EP	2785359	B1	29 August 2018
				EP	3449929	A1	06 March 2019
				JP	2015-500810	A	08 January 2015
				JP	2018-027954	A	22 February 2018
				JP	2019-142958	A	29 August 2019
				JP	2022-027796	A	14 February 2022
				JP	2024-067032	A	16 May 2024
				JP	6526130	B2	05 June 2019
				JP	6983195	B2	17 December 2021
				KR	10-2014-0127209	A	03 November 2014
				KR	10-2021-0044904	A	23 April 2021
				KR	10-2023-0059838	A	03 May 2023
				KR	10-2108245	B1	08 May 2020
				KR	10-2246369	B1	29 April 2021
				KR	10-2525175	B1	21 April 2023
				US	2013-0183272	A1	18 July 2013
				US	2014-0072537	A1	13 March 2014
				US	2015-0272994	A1	01 October 2015
				US	2016-0038543	A1	11 February 2016
				US	8961956	B2	24 February 2015
				US	8962321	B2	24 February 2015
				WO	2013-082543	A1	06 June 2013
KR	10-2014-0135367	A	26 November 2014	KR	10-1520536	B1	14 May 2015
KR	10-2020-0133539	A	30 November 2020	KR	10-2210807	B1	01 February 2021
KR	10-2023-0043587	A	31 March 2023	JP	2024-535392	A	30 September 2024
				US	2024-0316110	A1	26 September 2024
				WO	2023-048339	A1	30 March 2023

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 35/28(2006.01)i; A61P 43/00(2006.01)i; A61P 7/08(2006.01)i; A61M 1/28(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 35/28(2006.01); A23L 33/10(2016.01); A23L 33/18(2016.01); A61K 35/12(2006.01); A61K 35/26(2006.01); A61K 35/30(2006.01) 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: 편도 유래 중간엽 줄기세포 (tonsil-derived mesenchymal stem cell), 복막 섬유증 (peritoneal fibrosis), EMT (epithelial-mesenchymal transition), 복막후 섬유증 (retroperitoneal fibrosis), 피막 형성 복막 경화증 (encapsulating peritoneal sclerosis), HGF, BMP7, catalase, GPx, SOD		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	KR 10-2020-0056794 A (이화여자대학교 산학협력단) 2020.05.25 청구항 1, 4; 단락 [0019]	1-16,18,19
Y	KR 10-2133151 B1 (주식회사 노브메타파마 등) 2020.07.13 청구항 1-3, 10; 단락 [0003], [0018]	1-16,18,19
A	KR 10-2019-0114678 A (이화여자대학교 산학협력단) 2019.10.10 청구항 1; 단락 [0019]	1-16,18,19
A	KR 10-2020-0051827 A (아스텔라스 인스티튜트 포 리제너러티브 메디슨) 2020.05.13 단락 [0009], [0216]-[0219]	1-16,18,19
A	KR 10-2014-0135367 A (이화여자대학교 산학협력단) 2014.11.26 청구항 1	1-16,18,19
☒ 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 “D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2024년12월09일(09.12.2024)		국제조사보고서 발송일 2024년12월09일(09.12.2024)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-5373

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2020-0133539 A (한림대학교 산학협력단) 2020.11.30 요약; 청구항 1-11	1-16,18,19
A	KR 10-2023-0043587 A (주식회사 플코스킨) 2023.03.31 요약; 청구항 1-12; 단락 [0008]	1-16,18,19

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: **17, 20**
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 17, 20은 수술 또는 치료에 의한 사람의 처치방법 및 진단방법에 관한 것입니다(PCT 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)).
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.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2020-0056794 A	2020/05/25	KR 10-2152659 B1	2020/09/07
		WO 2020-101212 A1	2020/05/22
KR 10-2133151 B1	2020/07/13	BR 112021019262 A2	2021/11/30
		CA 3131850 A1	2020/10/01
		CN 113766924 A	2021/12/07
		CN 113766925 A	2021/12/07
		EP 3949976 A1	2022/02/09
		EP 3949976 B1	2024/10/09
		EP 3967321 A1	2022/03/16
		JP 2022-528087 A	2022/06/08
		JP 2022-528857 A	2022/06/16
		JP 7224006 B2	2023/02/17
		JP 7330471 B2	2023/08/22
		KR 10-2140910 B1	2020/08/04
		US 2022-0193179 A1	2022/06/23
		US 2022-0202897 A1	2022/06/30
		WO 2020-197356 A1	2020/10/01
		WO 2020-197359 A1	2020/10/01
KR 10-2019-0114678 A	2019/10/10	KR 10-2526447 B1	2023/04/26
		WO 2019-190218 A1	2019/10/03
KR 10-2020-0051827 A	2020/05/13	CN 104136034 A	2014/11/05
		CN 108478599 A	2018/09/04
		EP 2785359 B1	2018/08/29
		EP 3449929 A1	2019/03/06
		JP 2015-500810 A	2015/01/08
		JP 2018-027954 A	2018/02/22
		JP 2019-142958 A	2019/08/29
		JP 2022-027796 A	2022/02/14
		JP 2024-067032 A	2024/05/16
		JP 6526130 B2	2019/06/05
		JP 6983195 B2	2021/12/17
		KR 10-2014-0127209 A	2014/11/03
		KR 10-2021-0044904 A	2021/04/23
		KR 10-2023-0059838 A	2023/05/03
		KR 10-2108245 B1	2020/05/08
		KR 10-2246369 B1	2021/04/29
		KR 10-2525175 B1	2023/04/21
		US 2013-0183272 A1	2013/07/18
		US 2014-0072537 A1	2014/03/13
		US 2015-0272994 A1	2015/10/01
		US 2016-0038543 A1	2016/02/11
		US 8961956 B2	2015/02/24
		US 8962321 B2	2015/02/24
		WO 2013-082543 A1	2013/06/06
KR 10-2014-0135367 A	2014/11/26	KR 10-1520536 B1	2015/05/14
KR 10-2020-0133539 A	2020/11/30	KR 10-2210807 B1	2021/02/01
KR 10-2023-0043587 A	2023/03/31	JP 2024-535392 A	2024/09/30
		US 2024-0316110 A1	2024/09/26
		WO 2023-048339 A1	2023/03/30