

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0122196

(43) 공개일자 2019년10월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 35/28 (2015.01) A23L 33/10 (2016.01)

A61P 3/10 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 35/28 (2013.01)

A23L 33/10 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2019-0131603(분할)

(22) 출원일자 2019년10월22일

심사청구일자 없음

(62) 원출원 특허 10-2018-0033542

원출원일자 2018년03월22일

심사청구일자 2018년03월22일

(71) 출원인

이화여자대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)

(72) 발명자

박주원

서울특별시 양천구 목동동로 350, 512동 106호(목동, 목동신시가지아파트5단지)

유경하

서울특별시 강남구 영동대로118길 76, 102동 202호(삼성동, 삼성 대우 멤버스카운티1차)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김순웅

전체 청구항 수 : 총 4 항

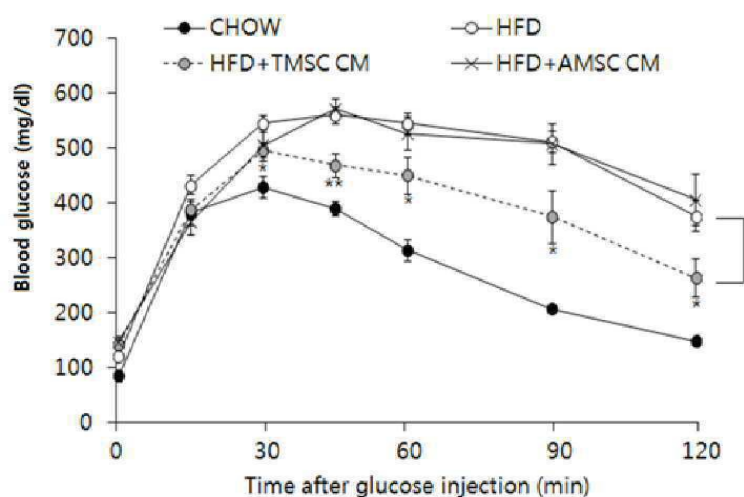
(54) 발명의 명칭 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정 배지를 포함하는 제2형 당뇨병 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 편도 유래 중간엽 줄기세포, 이의 조정 배지 또는 이들 모두를 유효성분으로 포함하는 제2형 당뇨병 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 제2형 당뇨병 예방, 개선 또는 치료용 조성물은 타 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정배지들과 상이한 단백질 프로파일을 가지고 이를 통해 우수한 내당능 장애 개선 효과, 인슐린 저항성 개선 효과를 가져서 제2형 당뇨병의 예방, 개선 및 치료에 우수한 효과를 가진다.

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류

A61P 3/10 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/328 (2013.01)

(72) 발명자

김유희

경기도 파주시 동패로 117, 202동 503호 (동패동, 교하 벽산아파트)

우소연

서울특별시 마포구 독막로 209, 103동 1501호 (신수동, 세양청마루아파트)

조인호

서울특별시 영등포구 당산로42길 13, 102동 1602호(당산동5가, 당산동1차 효성아파트)

조경아

서울특별시 강남구 개포로110길 43, 104동 605호(일원동, 개포한신아파트)

신선혜

인천광역시 서구 가경주로 29, 에이동 201호(가정동, 무궁화빌라)

이영해

서울특별시 강서구 강서로47마길 71, 청솔수아파트 동 405호(내발산동, 청솔수아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016R1D1A1B03935706

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기초연구사업(학술진흥)-기본연구지원사업

연구과제명 지방조직 리모델링에 미치는 스펙고지질의 역할 규명

기 여 율 1/2

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2017.11.01 ~ 2018.08.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017R1E1A1A01073021

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기초연구사업전략과제

연구과제명 에스트로겐 결핍 골다공증 치료를 위한 편도줄기세포의 응용

기 여 율 1/2

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2017.11.01 ~ 2022.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

편도 유래 중간엽 줄기세포를 유효 성분으로 포함하는 제2형 당뇨병 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 편도 유래 중간엽 줄기세포는 내당능을 개선하는 것인 제2형 당뇨병 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 편도 유래 중간엽 줄기세포는 인슐린 저항성을 개선하는 것인 제2형 당뇨병 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 편도 유래 중간엽 줄기세포는 calcium binding protein Cab45 precursor, MAC25, phospholipid transfer protein 및 Insulin-like growth factor-binding protein 5로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 발현하는 것인 제2형 당뇨병 예방 또는 치료용 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정 배지를 유효성분으로 포함하는 제2형 당뇨병 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0002] 본 발명은 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정 배지를 포함하는 제2형 당뇨병 예방 또는 개선용 식품 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 제2형 당뇨병은 인슐린 비의존성 당뇨병으로서, 세포가 췌장에서 생성된 인슐린에 효과적으로 반응하지 않는 경우에 발생하는데 이러한 상태를 인슐린 저항성이라고 부르며, 인슐린 저항성이 있는 사람들은 처음에는 정상적인 혈당을 유지하기 위해 추가적으로 더 많은 인슐린을 생산하나, 결국에는 인슐린 저항성이 진행하여 췌장이 인슐린 요구량을 감당할 수 없게 되어 혈당이 상승하게 된다. 현재 당뇨병 환자의 95%는 제2형 당뇨병에 걸린 것으로 알려져 있는데, 이는 서구화된 식습관에 다른 결과로 알려지고 있다. 제2형 당뇨병의 치료에는 간에서 생성되는 당의 양을 감소시키는 비구아나이드, 인크리틴의 분해억제제인 디펩티딜펩티다제-IV(DPP-IV) 저해제, 탄수화물 분해와 흡수 속도를 늦춰주는 알파-글루코시다제 억제제, 췌장을 직접 자극하여 인슐린을 분비하게 하는 설포닐유레아 그리고 우리 몸이 인슐린을 사용하고 당을 세포 내로 이동하는 것을 돕는 글리타존 등이 사용되고 있다. 그러나, 이들 제2형 당뇨병 치료제는 젖산과다증(비구아나이드), 간독성 또는 부종(글리타존), 복통과 설사(알파글루코시다제 억제제) 등의 부작용을 유발하는 것으로 알려져 있다.

[0004] 한편, 줄기세포(stem cell)는 생물 조직을 구성하는 다양한 세포들로 분화할 수 있는 세포로서 배아, 태아 및 성체의 각 조직에서 얻을 수 있는 분화되기 전 단계의 미분화 세포들을 총칭한다.

[0005] 치료 방법으로서 최근 줄기세포 및 조직공학을 이용한 이식치료가 개발되고 있다. 하지만, 이러한 이식 치료 기법으로는 치료효과가 뛰어나고 인체의 면역반응을 일으키지 않는 안정한 세포 치료제를 개발하기 어렵다는 문제가 있다. 그 동안 여러 가지 줄기세포를 이용하여 세포 치료제로써 활용하기 위한 시도들이 진행되고 있지만, 면역 조절 능력에 대한 확인은 아직 부분적으로만 진행되고 있다. 또한, 최근에는 줄기세포를 직접 손상된 조직에 이식하는 방법 이외에 줄기세포의 배양액에 포함된 매개성 물질의 탁월한 측분비 효과가 생체내 또는 생체의

실험에서 입증되고 있다. 줄기세포는 인체 내에서 일생 동안 세포의 성장과 재생에 관련된 다양한 성장인자와 사이토카인 등을 분비하고, 줄기세포 배양액에는 이러한 단백질 성분들이 함유되어 있으며, 세포이식 시의 부작용인 면역거부반응을 회피할 수 있으므로, 줄기세포 배양액은 치료제로 개발하기에 유리한 장점을 가지기 때문에 관련 연구개발이 진행되고 있다.

[0006] 상기와 같은 줄기세포 관련 연구를 진행하기 위해서는 줄기세포의 원활한 공급이 필요하다. 그러나, 중간엽 줄기세포 중에서도 몇몇 줄기세포는 그 이용에 있어서 세포를 얻는데 큰 제한이 있기 때문에 그 이용이 어렵다. 예를 들어, 제대혈, 지방조직으로부터 유래한 중간엽 줄기세포는 침습적인 방법을 이용해 얻어야만 한다. 가장 비침습적인 방법을 이용해 얻을 수 있는 세포는 골수채취를 통한 중간엽 줄기세포이지만, 골수채취는 마취가 필요하고 고통을 유발하여, 그 이용에 제한이 있다. 이에 대한 대안으로 환자 맞춤형 줄기세포를 분리하기 위해 말초혈액을 이용한 세포확득법 등이 요구되고 있으나 말초혈액만으로는 성인에서 분리할 수 있는 중간엽 줄기세포의 수가 너무 적고 분리방법이 경제적이지 못하며, 분리해낸다고 해도 세포치료에 사용가능한 양만큼 증식이 원활하지 않은 경우가 대부분이기에 좀 더 실용성을 높일 수 있는 대체 방안이 필요하다. 또한, 고령인 환자에서 얻는 성체 줄기세포는 낮은 연령에게서 얻는 세포들에 비해 세포능이 현저히 떨어지며 각종 인자들의 분비 및 줄기세포의 이동 능력 등이 떨어지기 때문에, 저연령의 환자로부터 자연스럽게 분리될 수 있거나 버려지는 조직으로부터 세포를 얻을 필요성이 있다. 또한, 이렇게 얻어진 세포는 실험에 용이한 양적 확보가 가능하고 세포의 계대 배양 시에 분화능이 잘 유지될 필요성이 있다.

[0007] 또한, 줄기세포들은 그 유래에 따라 그 특성이 상이하다.

[0008] 따라서 특정 질환에 대한 치료를 위해 질환에 따라 치료에 적합한 특성을 가지는 줄기세포를 선택하고 이의 특성을 이용하여 특정 질환에 대한 치료 방법을 개발할 필요가 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허공보 제10-2014-0096649호

(특허문헌 0002) 대한민국 공개특허공보 제10-2017-0123699호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 편도 유래 중간엽 줄기세포, 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정 배지 또는 이들 모두를 유효 성분으로 포함하는 제2형 당뇨병 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0011] 본 발명은 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정 배지를 포함하는 제2형 당뇨병 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명자들은 제2형 당뇨병을 예방 또는 치료할 수 있는 적합한 종류의 줄기세포를 확인하던 중, 편도 유래 중간엽 줄기세포, 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정 배지 또는 이들 모두가 타 유래 중간엽 줄기세포들과 대비하여 다른 프로파일을 가지며, 이에 의해 제2형 당뇨병의 예방 및 치료에 효과적임을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0013] 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.

[0014] 본 발명에 있어서, "편도 유래 중간엽 줄기세포 조정 배지"는 편도 유래 중간엽 줄기세포를 배양하여 수득된 배양액으로부터 편도 유래 중간엽 줄기세포가 제거된 배양액 또는 이의 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.

- [0015] 본 발명에서 용어 “예방”이란 본 발명에 따른 편도 유래 중간엽 줄기세포, 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정 배지 또는 이들 모두의 투여로 제2형 당뇨병의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 말한다. 본 발명에서 용어 “치료”는 본 발명에 따른 편도 유래 중간엽 줄기세포, 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정 배지 또는 이들 모두의 투여로 제2형 당뇨병의 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 말한다. 본 발명에서 용어 “개선”이란 본 발명의 조성물을 개체에 투여하거나 섭취시켜 제2형 당뇨병의 나쁜 상태를 좋게 하는 모든 행위를 의미한다.
- [0016] 본 발명에 있어서, 체장 베타세포의 면역반응에 의한 파괴로 인슐린 부족 현상에 기인하는 제1형 당뇨병과는 달리, 제2형당뇨병이란 서구식 식생활과 좌식생활로 인해 현대 사회에 급속히 퍼져나가고 있는 질환으로 간, 근육, 지방 조직을 포함한, 당을 사용하는 말초 조직에서 인슐린에 반응하지 않는 인슐린 저항성에 기인하며, 인슐린 저항성 때문에 생기는 상대적인 인슐린 부족상태부터 질환의 진행이 진행됨에 따라 인슐린 저항성이 동반된 인슐린 분비 장애까지 다양한 형태의 당뇨병을 총칭한다. 제2형당뇨병은 다양한 환경적 요인들과 다수의 유전적 요인이 복합적으로 작용하는 대사성 질환으로, 유전적 요인이 주요 원인인 제1형 당뇨병과는 전혀 다른 특성을 지니는 질환이다.
- [0017] 본 발명은 편도 유래 중간엽 줄기세포, 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정 배지 또는 이들 모두를 유효 성분으로 포함하는 제2형 당뇨병 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0018] 본 발명에 따른 편도 유래 중간엽 줄기세포, 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정배지 또는 이들 모두는 타 유래 중간엽 줄기세포 및 이의 조정 배지와 대비하여 상이한 단백질 프로파일을 가진다. 예를 들어, 골수 유래 중간엽 줄기세포, 지방 유래 중간엽 줄기세포 또는 이들의 조정배지와 대비하여, 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정배지는 calcium binding protein Cab45 precursor, MAC25, phospholipid transfer protein 및 Insulin-like growth factor-binding protein 5로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 발현하던가 이들 중 어느 하나 이상을 조정 배지 내 포함한다. 특히, 조정배지에서 발현된 phospholipid transfer protein은 diacylglycerol 및 인지질을 운반하는 역할을 하며, 제2형 당뇨 환자 혈액에서 변화가 보고된 바 있고, Insulin-like growth factor-binding protein 5는 동물 실험에서 결핍되었을 경우 몸무게 증가와 내당능장애를 유발한다는 보고가 있으므로, 제2형 당뇨병 예방 또는 치료 효능이 타 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정배지와 대비하여 우수한 예방, 개선 또는 치료 효과를 나타낼 수 있다. 본원 발명에 따른 편도 유래 중간엽 줄기세포, 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정배지 또는 이들 모두는 위와 같이 상이한 프로테오믹스 프로파일을 가지며, 이에 의하여 타유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정배지들보다 우수하게 제2형 당뇨병의 치료 효과를 가진다. 구체적으로, 편도 유래 중간엽 줄기세포, 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정배지 또는 이들 모두는 내당능 개선 효과, 인슐린 저항성 개선 효과를 통해 제2형 당뇨병의 예방 및 치료에 우수한 효과를 나타낸다.
- [0019] 또한, 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 높다는 점에서 주입해야 하는 세포, 조정 배지 및 이들 모두의 양을 자유롭게 조절할 수 있다.
- [0020] 본 발명에 있어서, 편도 유래 중간엽 줄기세포, 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정 배지 또는 이들 모두는 개체로부터 분리, 배양 및 특수한 조작을 통해 제조된 세포, 조직, 이의 조정 배지 및 이들 모두를 포함하며, 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품으로 사용되어 제2형 당뇨병에 사용될 수 있다.
- [0021] 본 발명에 있어서 제2형 당뇨병은 상기 언급된 바와 같다.
- [0022] 본 발명에 있어서, 편도 유래 중간엽 줄기세포는 당업계에서 알려진 방법에 따라 편도로부터 추출 가능하다. 예컨대, 대한민국등록특허 제10-1508413호 등에 기재된 방법에 따라 편도로부터 추출가능하다.
- [0023] 편도 유래 중간엽 줄기세포 배양액은 편도 유래 중간엽 줄기세포를 배양하고 세포를 제거한 후, 수득된 배양액, 배양 상층액 또는 이의 농축물이거나 이의 동결건조물일 수 있다.
- [0024] 본 발명에 있어서, 편도 유래 중간엽 줄기세포 배양액은 편도 유래 중간엽 줄기 세포를 혈청 배지에서 계대 배양한 후, 무혈청 배지에서 배양하여 수득될 수 있다.
- [0025] 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 배지에서 계대배양한 후, 무혈청 배지에서 계대 배양하여 수득되고, 이를 그대로 사용하거나 또는 원심분리나 필터를 이용한 여과에 의해 줄

기세포 및 거대분자를 제거한 후에 수득된 상층액을 사용할 수 있다. 또한, 수득된 상층액은 그대로 사용하거나 또는 농축하여 수득된 농축물로 사용할 수 있다.

- [0026] 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.
- [0027] 상기 혈청 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.
- [0028] 상기 무혈청 배지 중에서의 배양은 혈청 배지에서의 배양액을 제거하고, 세포를 인산염 완충용액으로 세척한 후에 수행될 수 있다.
- [0029] 바람직하게, 상기 혈청 배지는 5 내지 12% 우태아혈청 및 1%의 항생제가 보충된 DMEM 배지일 수 있다.
- [0030] 바람직하게, 상기 무혈청 배지는 DMEM 배지일 수 있다.
- [0031] 본 발명의 일 실시양태에 따르면, 편도 유래 중간엽 줄기세포 배양액은 편도로부터 단리된 편도 조직을 잘게 자른 후, 편도 조직을 배양 플레이트의 바닥에 부착시키고, 10% 우태혈청 및 1% 페니실린-스트렙토마이신이 보충된 DMEM 배지 중에서 37℃ 및 5% CO₂ 상태의 배양기에서 배양하는 단계, 세포의 밀도가 80%의 포화상태(confluence)에 도달했을 때, 세포를 분리하고 계대 배양시키는 단계, 세포를 3 내지 4일간 배양한 후, 인산염 완충용액으로 세척하는 단계, 세척된 세포를 혈청 및 항생제를 포함하지 않는 DMEM 배지에서, 37℃ 및 5% CO₂ 상태의 배양기에서 배양하는 단계에 의해 수득될 수 있다.
- [0032] 본 발명의 일 실시양태에 따르면, 편도 유래 중간엽 줄기세포 배양액은 편도 유래 중간엽 줄기세포 배양액을 원심분리나 여과시켜 세포를 제거하는 단계에 의해 수득될 수 있다.
- [0033] 본 발명에서 예방은 상기 조성물의 투여로 제2형 당뇨병의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미하며, 치료는 상기 조성물의 투여로 제2형 당뇨병의 증세가 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 의미한다.
- [0034] 본 발명의 편도 유래 중간엽 줄기세포를 포함하는 조성물은 1 ml 당 5.0×10⁶개 내지 1.0×10⁷개의 세포를 포함할 수 있다.
- [0035] 본 발명의 약학 조성물은 통상의 방법에 따라 액제, 현탁액, 에멀전, 로션, 연고, 동결건조제 등 다양한 제형으로 제제화될 수 있다.
- [0036] 본 발명의 약학 조성물은 약학적 분야의 통상의 방법에 따라 환자의 신체 내 투여에 적합한 단위투여형의 약학적 제제로 제형화시켜 투여할 수 있으며, 상기 제제는 1회 또는 수회 투여에 의해 효과적인 투여량을 포함한다. 이러한 목적에 적합한 제형으로는 비경구투여 제제로서 주사제, 주입제 등이 바람직하다. 또한, 상기 제2형 당뇨병 예방 또는 치료용 약학 조성물은 약학적으로 허용가능한 통상의 불활성 담체 및 희석제를 포함할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물에 포함될 수 있는 약학적으로 허용가능한 담체 및 희석제는 전분, 당, 및 만니톨과 같은 부형제, 칼슘 포스페이트 등과 같은 충전제 및 증량제, 카르복시메틸셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스 등과 같은 셀룰로오스 유도체, 젤라틴, 알긴산염, 및 폴리비닐 피롤리돈 등과 같은 결합제, 활석, 스테아린산 칼슘, 수소화 피마자유 및 폴리에틸렌 글리콜과 같은 윤활제, 포비돈, 크로스포비돈과 같은 붕해제, 폴리소르베이트, 세틸알코올, 및 글리세롤 등과 같은 계면활성제를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 상기 약학적으로 허용되는 담체 및 희석제는 편도 유래 중간엽 줄기세포, 이의 조정 배지 및 이를 이식받을 수혜자에 대해 생물학적 및 생리학적으로 친화적인 것일 수 있다. 희석제로는 이에 한정되지 않으나, 염수, 수용성 완충액, 용매 및/또는 분산제(dispersion media)를 들 수 있다. 이외에도, 예를 들어, 주사제의 경우에는 보존제, 무통화제, 가용화제 또는 안정화제 등을, 국소투여용 제제의 경우에는 기제(base), 부형제, 윤활제 또는 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 본 발명의 조성물은 동결되지 않은 채 사용되거나 차후 사용을 위해 동결될 수 있다. 동결되어야 할 경우, 표준 냉동보존제 (예를 들어 DMSO, 글리세롤, 에피라이프 (Epilife®) 세포 동결 배지 (Cascade Biologics))가 동결 전 세포 집단에 첨가될 수 있다.
- [0037] 또한, 당업계에서 통상적으로 사용하는 투여방법을 이용하여 이식 및 투여될 수 있으며, 바람직하게는 치료가

필요한 환자의 질환 부위에 직접 생착 또는 이식이 가능하나 이에 한정되지는 않는다. 또한, 상기 투여는 카테터를 이용한 비외과적 투여 및 질환부위 절개 후 주입 또는 이식 등 외과적 투여방법 모두 가능하다. 투여량은 줄기세포의 경우 10^5 내지 10^9 세포/kg 체중, 바람직하게는 5×10^5 내지 10^8 세포/kg 체중을 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 또한, 조정 배지의 경우 농축 정도에 따라 그 투여량이 달라질 수 있으나 $10 \mu\text{l/kg}$ 내지 1 ml/kg 체중을 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다.

- [0038] 그러나, 유효성분의 실제 투여량은 치료하고자 하는 질환, 질환의 중증도, 투여경로, 환자의 체중, 연령 및 성별 등의 여러 관련 인자에 비추어 결정되어야 하는 것으로 이해되어야 하며, 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0039] 본 발명은 또한 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정 배지를 포함하는 제2형 당뇨병 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0040] 본 발명은 통상적으로 이용되는 식품으로써 일반적으로 사용될 수 있다.
- [0041] 본 발명의 식품 조성물은 건강기능식품으로서 사용될 수 있다. 상기 "건강기능식품"이라 함은 건강기능식품에 관한 법률에 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 것을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.
- [0042] 본 발명의 식품 조성물은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 상기 "식품 첨가물"로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전처에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.
- [0043] 상기 "식품 첨가물 공전"에 수제된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨 제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류들을 들 수 있다.
- [0044] 본 발명의 식품 조성물은 조성물 총 중량에 대하여 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정배지를 0.01 내지 95 중량%, 바람직하게는 5 내지 90 중량%로 포함할 수 있다.
- [0045] 또한, 본 발명의 식품 조성물은 제2형 당뇨병의 예방 및/또는 개선을 목적으로, 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조 및 가공할 수 있다.
- [0046] 예를 들어, 캡슐 형태의 건강기능식품 중 경질캡슐제는 통상의 경질캡슐에 본 발명에 따른 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정배지, 및 부형제 등의 첨가제와의 혼합물을 충전하여 제조할 수 있으며, 연질캡슐제는 본 발명에 따른 식품 조성물 및 부형제 등의 첨가제와의 혼합물을 젤라틴 등 캡슐기체에 충전하여 제조할 수 있다. 상기 연질캡슐제는 필요에 따라 글리세린 또는 소르비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다.
- [0047] 상기 부형제, 결합제, 붕해제, 활택제, 교미제, 착향제 등에 대한 용어 정의는 당업계에 공지된 문헌에 기재된 것으로 그 기능 등이 동일 내지 유사한 것들을 포함한다 (대한약전 해설편, 문성사, 한국약학대학협의회, 제 5 개정판, p33-48, 1989).
- [0048] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한이 없으며, 통상적인 의미에서의 건강기능식품을 모두 포함한다.
- [0049] 본 발명은 편도 유래 중간엽 줄기세포, 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정배지 또는 이들 모두를 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 제2형 당뇨병의 치료방법을 제공한다.
- [0050] 본 발명에 "편도 유래 중간엽 줄기세포, 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정배지 또는 이들 모두", "제2형 당뇨병", "투여" 등의 용어는 상기에서 설명한 바와 동일하다.
- [0051] 상기 대상체는 동물을 말하며, 전형적으로 본 발명의 편도 유래 중간엽 줄기세포, 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정배지 또는 이들 모두를 이용한 치료로 유익한 효과를 나타낼 수 있는 포유동물일 수 있다. 이러한 대상체의 바람직한 예로 인간과 같은 영장류가 포함될 수 있다. 또한 이와 같은 대상체들에는 제2형 당뇨병의 증상을 갖거나 이와 같은 증상을 가질 위험이 있는 대상체들이 모두 포함될 수 있다.
- [0052] 본 발명은 또한 제2형 당뇨병의 치료를 위한 약제의 제조에서 편도 유래 중간엽 줄기세포, 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정배지 또는 이들 모두의 용도를 제공한다.
- [0053] 본 발명은 또한 제2형 당뇨병의 치료에 사용하기 위한 편도 유래 중간엽 줄기세포, 편도 유래 중간엽 줄기세포

의 조정배지 또는 이들 모두를 포함하는 조성물을 제공한다.

[0054] 본 발명은 또한 제2형 당뇨병의 치료를 위한 편도 유래 중간엽 줄기세포, 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정배지 또는 이들 모두의 용도를 제공한다.

발명의 효과

[0055] 본 발명의 제2형 당뇨병 예방, 개선 또는 치료용 조성물은 타 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정배지들과 상이한 단백질 프로파일을 가지고 이를 통해 우수한 내당능 장애 개선 효과, 인슐린 저항성 개선 효과를 가져서 제2형 당뇨병의 예방 및 치료에 우수한 효과를 가진다.

도면의 간단한 설명

[0056] 도 1은 고지방식이 제2형당뇨병 모델에서 편도 유래 중간엽 줄기세포의 효능을 확인하기 위한 실험 스케줄을 나타낸다.

도 2는 고지방식이 제2형당뇨병 모델에서 편도 유래 중간엽 줄기세포의 처리에 따른 주차별 몸무게 변화, 실험 시작 12주 후 공복 혈당 변화 및 12주 후 내당능 장애 개선 효과를 확인한 결과를 나타낸다. (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001)

도 3은 고지방식이 제2형당뇨병 모델에서 편도 유래 중간엽 줄기세포의 처리에 따른 췌장섬 밀도 증가 및 크기 감소를 확인한 결과를 나타낸다. (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001)

도 4는 고지방식이 제2형당뇨병 모델에서 편도 유래 중간엽 줄기세포의 처리에 따른 혈장 인슐린 농도 개선 및 인슐린 분비 감수성 개선을 확인한 결과를 나타낸다. (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001)

도 5는 고지방식이 제2형당뇨병 모델에서 편도 유래 중간엽 줄기세포 조정배지의 효능을 확인하기 위한 실험 스케줄을 나타낸다.

도 6은 고지방식이 제2형당뇨병 모델에서 편도 유래 중간엽 줄기세포 조정배지의 처리에 따른 내당능 장애 개선 효과를 확인한 결과를 나타낸다. (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001)

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0057] 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예, 제조예를 제시한다. 하기의 실시예, 제조예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예, 제조예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0058] <실시예 1> 지방 세포, 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이들의 조정배지의 제조

[0059] 편도 유래 중간엽 줄기세포(Tonsil-derived mesenchymal stem cell, T-MSC) 는 이대목동병원 이비인후-두경부 외과에서 편도적출술을 시행하는 환자로부터 적출된 편도조직(4-20세의 저연령층 조직, 임상윤리위원회 심의 통과: ECT 11-53-02)으로부터 얻었다. 이는 대한민국 등록 특허 제10-1508413호와 같이 제조되었으며, 편도 유래 중간엽 줄기세포 (7~8 passage)는 10% FBS, 1% 페니실린/스트렙토마이신이 보충된 DMEM 하에 배양되었다.

[0060] 조정 배지를 제조하기 위해 편도 유래 중간엽 줄기세포는 80 % confluency까지 배양되었고, 이에 도달한 후에 PBS로 2회 wash 후 FBS가 들어가지 않은 신선한 배양 배지로 교환되었다. 세포는 48 시간 추가로 배양되었고 조정 배지가 회수되었다. 조정 배지는 4℃에서 6시간 3300g로 원심분리에 의해 20배 농축되었다.

[0061] 지방 유래 중간엽 줄기세포(AT-MSC)는 RNL Bio에서 제공되는 동일 계대의 세포를 사용하였으며, 10% FBS, 1% 페니실린/스트렙토마이신이 보충된 DMEM 하에 배양되었다. 그 후 위 편도 유래 중간엽 줄기세포의 제조방법과 동일하게 지방 유래 중간엽 줄기세포의 조정배지를 제조하였다.

[0062] <실시예 2> 편도 유래 중간엽 줄기세포의 제2형 당뇨병 치료 효과 확인

[0063] 고지방식이 유도 제2형 당뇨병 모델을 이용하여, 편도 유래 중간엽 줄기세포의 제2형 당뇨병 치료 효과를 확인하였다. 고지방식이 유도 제2형 당뇨병 모델을 이용한 실험 스케줄을 도 1에 나타내었다.

[0064] 실험 및 절차는 이화여자대학교 동물 윤리위원회의 승인 하에 수행되었고, 모든 실험은 관련 규제 및 가이드라인 하에 수행되었다.

[0065] 제2형 당뇨는 고지방식이(Fat 60%)를 이용하여 유도하였다. 사용한 식이는 고지방식이 (D12492) (60% fat, 20%

carbohydrate, 20% protein, 5.24 kcal/g)와 일반 식이(D12450K) (10% fat, 70% carbohydrate, 20% protein, 3.85 kcal/g)이며 Research Diets (New Brunswick, NJ)회사 제품을 이용하였다. 6주령의 Balb/c마우스를 무작위로 일반 식이군과 고지방식이군으로 나누었고, 복강 주사를 이용한 4주 식이후, 편도 유래 중간엽 줄기세포를 주사하였다. 편도 유래 중간엽 줄기세포를 2주에 한번 2×10^6 세포의 양을 복강 주사하였다.

1. 내당능 장애 개선 확인

주차별 몸무게 변화, 실험 시작 12주 후 공복 혈당 변화 및 12주 후 내당능 장애 개선 효과를 확인하여 그 결과를 도 2에 나타내었다(Chow : 일반식이군, HFD: 고지방식이군, HFD+TMSC: 고지방식이+편도 유래 중간엽 줄기세포 투여군).

도 2의 (A)는 매 주차 별로 몸무게 변화를 확인하여, 이의 변화를 주차별로 확인한 결과를 나타낸다. 도 2의 (A)에서 확인되는 바와 같이, 편도 유래 중간엽 줄기세포의 투여에 의해 몸무게 증가가 감소됨을 확인하였다.

도 2의 (B)는 12주차에서 편도 유래 중간엽 줄기세포 주입 후 공복 혈당 감소 효과를 나타낸다. 도 2의 (B)에서 확인되는 바와 같이 공복 혈당 수준이 일반식이군의 혈당 수준에 이를 정도로 크게 감소됨을 확인하였다.

도 2의 (C)는 편도 유래 중간엽 줄기세포 주입 후 12주차에 내당능 개선 효과를 나타낸다. 도 2의 (C)에서 확인되는 바와 같이 편도 유래 중간엽 줄기세포의 투여는 혈중 글루코스의 양을 일반식이군과 유사한 수준까지 감소시키는 것이 확인되어 내당능 장애에 우수한 개선 효과가 있음을 확인하였다.

2. 췌장섬 보존 확인

편도 유래 중간엽 줄기세포 투여에 의한 췌장섬 변화를 확인하기 위해 조직학적 분석을 수행하였다.

조직학적 분석을 위하여 5 μ m 두께의 췌장 조직 파라핀 절편을 제작하여 인슐린을 녹색형광 염색하고, 핵을 파랑색 염색 (DAPI) 한 후 관찰하였다. 또한, 평균 췌장섬 밀도 및 크기를 Image J 프로그램을 통해 분석하고 그 결과를 도 3에 나타내었다(Chow : 일반식이군, HFD: 고지방식이군, HFD+TMSC: 고지방식이+편도 유래 중간엽 줄기세포 투여군).

도 3의 (A)는 현미경 분석 결과를 나타낸다. 도 3의 (B) 및 (C)는 췌장섬의 밀도 및 크기를 각각 분석한 결과를 나타낸다.

위 결과들에서 확인되는 바와 같이, 편도 유래 중간엽 줄기세포의 투여는 췌장섬의 밀도를 증가시키면서 그 크기를 감소시켜서 췌장섬을 정상수준과 유사하게 회복시키는 것을 확인할 수 있다.

3. 혈장 인슐린 농도 및 당농도 변화 확인

공복상태에서 당(glucose, 2g/kg) 복강 주사 후 15분 및 30분 후 혈장에서의 인슐린 농도를 측정하여, 그 결과를 도 4의 (A)에 나타내었다(Chow : 일반식이군, HFD: 고지방식이군, HFD+TMSC: 고지방식이+편도 유래 중간엽 줄기세포 투여군). 도 4의 (A)에서 확인되는 바와 같이, 편도 유래 중간엽 줄기세포의 투여는 인슐린 분비 수준을 증가시킴을 확인하였다.

또한, 췌장섬을 동물 췌장에서 분리한 후 외부 당농도를 변화시킴으로써 인슐린 분비 감수성을 측정하여, 그 결과를 도 4의 (B)에 나타내었다. 도 4의 (B)에서 확인되는 바와 같이 편도 유래 중간엽 줄기세포를 투여한 군에서 분리한 췌장섬의 외부당에 대한 인슐린 분비 감수성이 현저히 개선되는 것을 확인하였다.

위 결과들로부터 편도 유래 중간엽 줄기세포의 투여에 따른 제2형 당뇨병의 개선 효과를 확인하였다.

<실시예 3> 편도 유래 중간엽 줄기세포 조정배지의 제2형 당뇨병 치료 효과 확인

고지방식이 유도 제2형 당뇨병 모델을 이용하여, 편도 유래 중간엽 줄기세포의 제2형 당뇨병 치료 효과를 확인하였다. 고지방식이 유도 제2형 당뇨병 모델을 이용한 실험 스케줄을 도 5에 나타내었다.

실험 및 절차는 이화여자대학교 동물 윤리위원회의 승인 하에 수행되었고, 모든 실험은 관련 규제 및 가이드라인 하에 수행되었다.

제2형 당뇨병은 고지방식이(Fat 60%)를 이용하여 유도하였다. 사용한 식이는 고지방식이 (D12492) (60% fat, 20% carbohydrate, 20% protein, 5.24 kcal/g)와 일반 식이(D12450K) (10% fat, 70% carbohydrate, 20% protein, 3.85 kcal/g)이며 Research Diets (New Brunswick, NJ)회사 제품을 이용하였다. 6주령의 Balb/c마우스를 무작위로 일반 식이군과 고지방식이군으로 나누었고, 3주 식이후 편도 유래 중간엽 줄기세포 조정배지를 주사하였다.

편도 유래 중간엽 줄기세포 조정배지의 주사는 매주 1회 혈관 주사를 통해 수행하였다. 지방 유래 중간엽 줄기세포의 조정 배지에 대해서도 동일한 방법을 통해 실험군으로 실험을 수행하였다.

1. 내당능 장애 개선 확인

편도 유래 중간엽 줄기세포 조정배지 또는 지방 유래 중간엽 줄기세포의 조정배지의 투여 7주 후 내당능 장애 개선 효능을 확인하여 그 결과를 도 6에 나타내었다(Chow : 일반식이군, HFD: 고지방식이군, HFD+TMSC CM: 고지방식이+편도 유래 중간엽 줄기세포 조정배지 투여군, HFD+AMSC CM: 고지방식이+지방 유래 중간엽 줄기세포 조정배지 투여군).

도 6에서 확인되는 바와 같이, 편도 유래 중간엽 줄기세포 조정배지의 투여군에서 우수한 내당능 장애 개선 효과가 확인되었다. 반면, 지방 유래 중간엽 줄기세포의 조정배지 투여군에서는 내당능 장애 개선 효과를 전혀 확인할 수 없었다.

위 결과들로부터 편도 유래 중간엽 줄기세포 조정 배지의 투여에 따른 제2형 당뇨의 개선 효과를 확인하였다.

<실시예 4> 편도 유래 중간엽 줄기세포 및 이의 조정배지의 프로테오믹스 분석

편도 유래 중간엽 줄기세포 및 이의 조정배지는 줄기세포와 동일한 특성들을 가지면서도 편도 유래 중간엽 줄기세포 자체의 특이성을 가진다. 배지의 프로테오믹스 분석은 농축된 배지를 Electrospray ionization (ESI)와 matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) 기술 처리 후 QSTAR® XL Hybrid LC/MS/MS 기법을 이용하여 얻은 높은 수준의 MS/MS 데이터를 이용하여 분석하였다.

이에 따라, 프로테오믹스를 통해 편도 유래 중간엽 줄기세포 조정 배지에서 확인되는 단백질들을 골수 유래 또는 지방 유래 중간엽 줄기세포의 조정배지들의 것과 비교 분석하였다.

그 결과 아래와 같은 단백질이 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정배지에서만 확인되었다.

Calcium binding protein Cab45 precursor

MAC25

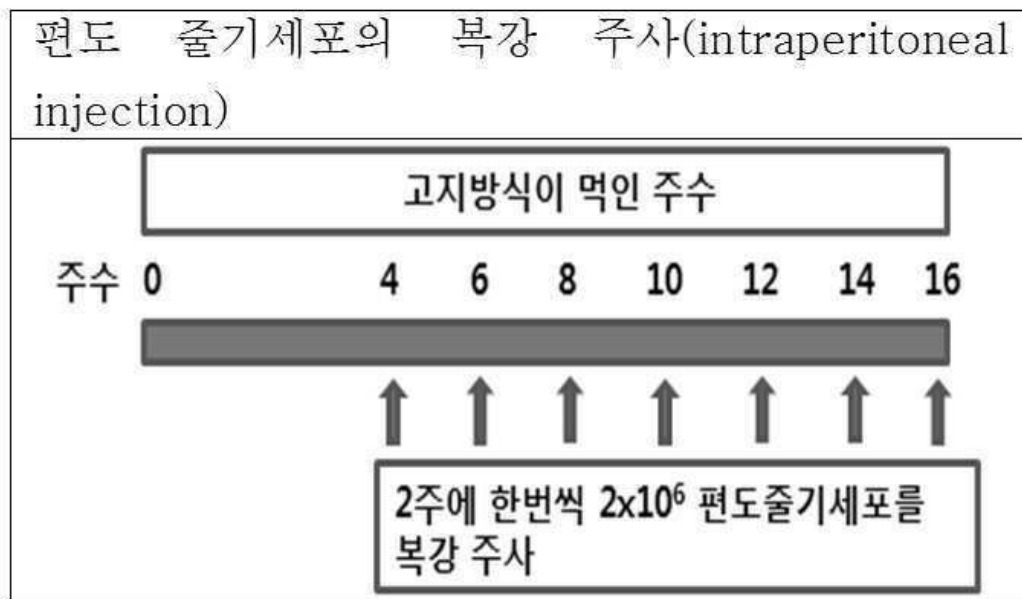
phospholipid transfer protein

Insulin-like growth factor-binding protein 5

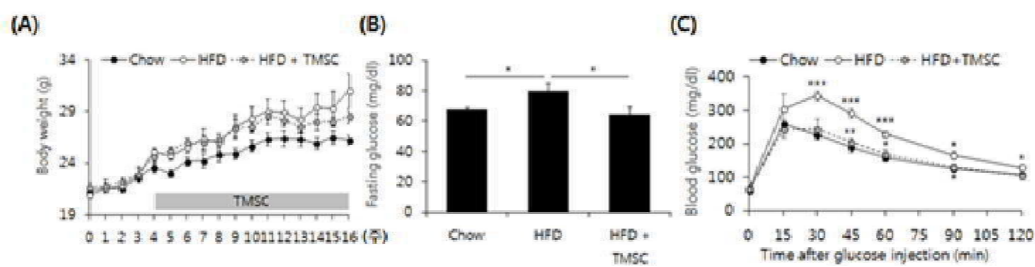
위 확인되는 바와 같이, 편도 유래 중간엽 줄기세포 조정 배지에서 골수 유래 또는 지방 유래 중간엽 줄기세포의 조정배지들에서 확인되지 않는 다양한 인자들이 확인되었으며, 이를 통해 편도 유래 중간엽 줄기세포 및 이의 조정배지가 타유래 중간엽 줄기세포와 일부 다른 특성을 지니는 것임을 확인하였다.

도면

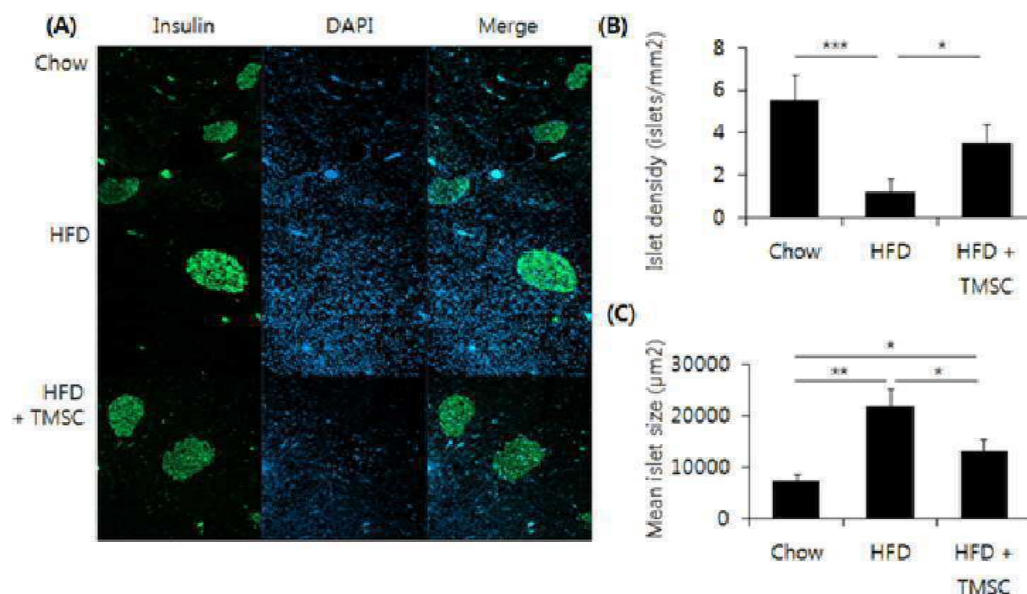
도면1



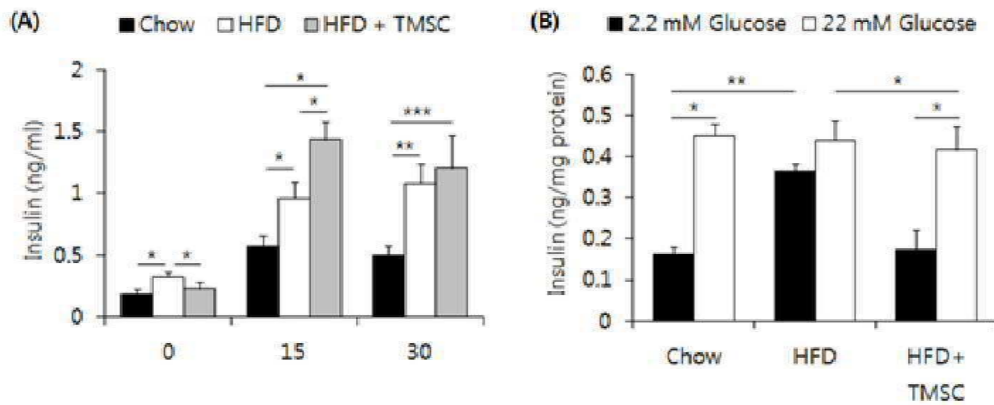
도면2



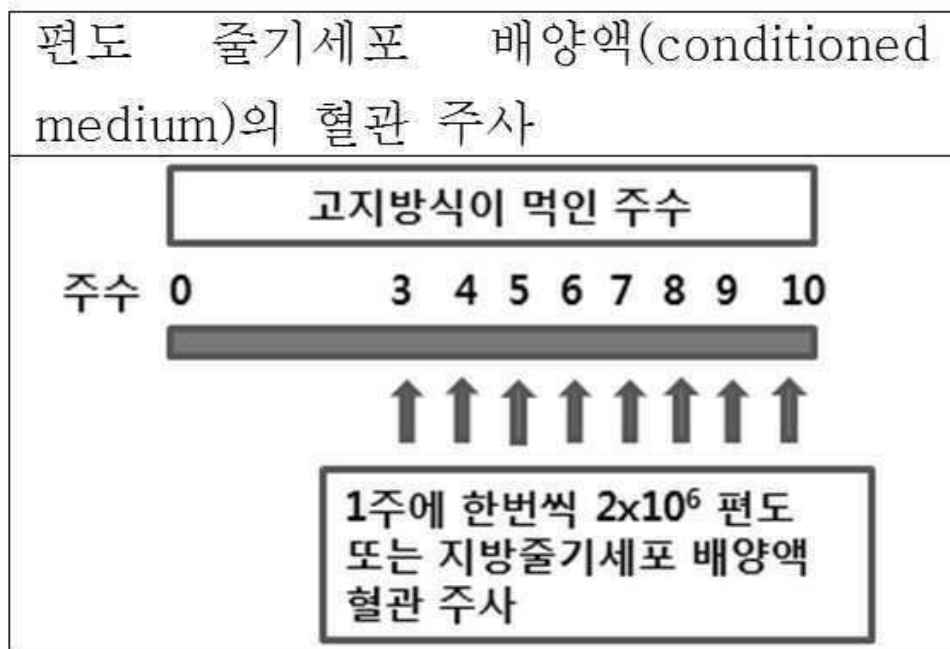
도면3



도면4



도면5



도면6

