



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0133539
(43) 공개일자 2020년11월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 35/26 (2015.01) A01K 67/00 (2014.01)
A61K 35/28 (2015.01) A61K 49/00 (2006.01)
A61P 1/02 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 35/26 (2013.01)
A01K 67/00 (2018.05)

(21) 출원번호 10-2019-0058919

(22) 출원일자 2019년05월20일

심사청구일자 2019년05월20일

(71) 출원인

한림대학교 산학협력단

강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)

(72) 발명자

박혜상

강원도 춘천시 삭주로 77 춘천성심병원 이비인후과

정혜리

경기도 구리시 용달말로52번길 31-8 동지타운 10 2동 402호

이재준

강원도 춘천시 삭주로 77 춘천성심병원 마취통증의학과

(74) 대리인

김남혁

전체 청구항 수 : 총 11 항

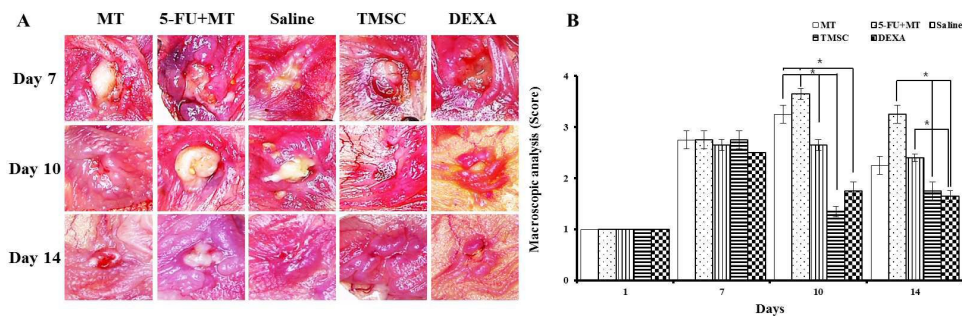
(54) 발명의 명칭 편도유래 줄기세포를 포함하는 구강 점막염 치료용 조성물, 및 구강 점막염 동물모델 제조방법

(57) 요약

본원은 편도 유래 줄기세포를 포함하는 구강 점막염 예방 또는 치료용 약학 조성물, 편도 유래 줄기세포를 포함하는 암치료 보조용 약학 조성물, 구강 점막염 동물 모델 제조방법 및 상기 방법으로 제조된 동물 모델을 이용하는 구강 점막염 치료제 스크리닝 방법에 관한 것이다.

본원의 구강 점막염 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 암치료 보조용 약학 조성물은 암 치료과정에서 발병할 수 있는 구강 점막염 치료에 이용할 수 있으며, 암 치료의 부작용을 효율적으로 억제할 수 있다. 또한, 본원의 구강 점막염 동물 모델 제조방법 및 상기 방법으로 제조된 동물 모델을 이용한 구강 점막염 치료제 스크리닝 방법을 이용하여 구강 점막염 치료제를 효율적으로 발굴 할 수 있다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

A61K 35/28 (2013.01)
A61K 49/0008 (2013.01)
A61P 1/02 (2018.01)
A61P 35/00 (2018.01)
A01K 2267/0393 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	NRF-2017M3A9E8033206
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	임상의과학자 연구역량강화사업
연구과제명	3D 프린터 기술을 이용한 환자 맞춤형 기관절개관 개발
기 여 율	1/2
과제수행기관명	한림대학교 산학협력단
연구기간	2019.01.01 ~ 2019.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	NRF-2017R1D1A1B04034145
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학개인지초연구지원사업
연구과제명	3D 바이오 프린팅 방법을 이용한 환자 맞춤형 기관재생기술 개발
기 여 율	1/2
과제수행기관명	한림대학교 산학협력단
연구기간	2019.03.01 ~ 2020.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

편도 유래 줄기세포(tonsil-derived stem cell)를 포함하는, 구강 점막염 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 조성물은 신생혈관 생성을 촉진시키는 것을 특징으로 하는, 구강 점막염 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 조성물은 상처 수축을 촉진시키는 것을 특징으로 하는, 구강 점막염 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 구강 점막염은 항암화학요법 또는 방사선 치료에 의해 발생된 것을 특징으로 하는, 구강 점막염 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 조성물은 CD31(cluster of differentiation 31), TGF- β (Transforming growth factor- β) 및 NOX4(NAPDH oxidase 4)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 단백질의 발현수준이 증가하는 것을 특징으로 하는, 구강 점막염 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

편도 유래 줄기세포를 포함하는, 암치료 보조용 약학 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 조성물은 항암화학요법 또는 방사선 치료에 의하여 유발되는 구강 점막염을 억제하는 효과를 나타내는 것인, 암치료 보조용 약학 조성물.

청구항 8

인간을 제외한 동물에 5-플루오로우라실(5-fluorourasil, 5-FU)를 투여하는 단계 및 기계적 외상을 가하는 단계

를 포함하는, 구강 점막염 동물 모델의 제조방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 방법은 제조 0일째, 2일째 및 4일째에 5-플루오로우라실(5-fluorourasil, 5-FU)를 투여하는 단계 및 제조 1일째, 2일째 및 4일째에 기계적 외상을 가하는 단계를 포함하는 것인, 구강 점막염 동물 모델의 제조방법.

청구항 10

(a) 제8항 또는 제9항의 방법으로 제조된 구강 점막염 동물 모델에, 구강 점막염 치료 후보물질을 투여하는 단계; 및

(b) 상기 후보물질의 투여에 따른 구강 점막염 증상 정도를 확인하는 단계

를 포함하는, 구강 점막염 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 구강 점막염 치료 후보물질에 따라 구강 점막염 증상이 완화되는 경우 상기 후보물질을 구강 점막염 치료제로 판단하는 것인, 구강 점막염 치료제의 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본원은 편도 유래 줄기세포를 포함하는 구강 점막염 예방 또는 치료용 약학 조성물, 편도 유래 줄기세포를 포함하는 암치료 보조용 약학 조성물, 구강 점막염 동물 모델 제조방법 및 상기 방법으로 제조된 동물 모델을 이용하는 구강 점막염 치료제 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 구내염, 또는 구강 점막염(Oral mucositis, OM)은 암치료를 위한 방사선 또는 항암화학요법 치료 중 흔하게 발생하는 심한 합병증 중의 하나로서, 항암화학요법을 받는 환자의 20-40%에서 발생할 수 있다고 알려져 있다. 구내염은 임상적으로 점막의 발적부터 심각한 궤양까지 나타날 수 있으며, 구강 통증, 연하곤란으로 인해 영양분 섭취의 저하 및 삶의 질 저하를 초래할 수 있으며, 이는 항암치료의 지연 또는 중단을 초래하여 암의 치료 및 생존률에 영향을 미칠 수 있다.

[0004] 현재까지 알려진 구강 점막염의 치료방법은 1) 구강 점막염 예방 및 2) 통증조절, 영양공급 및 이차감염의 예방 및 치료 등으로 크게 2가지로 나눌 수 있으며, 대한민국 공개특허 제10-2017-0102639호에 따르면 단삼(Salviae Miltiorrhizae Radix) 추출물을 유효성분으로 포함하는 구강 점막염 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 대해 개시하고 있으나, 현재까지 줄기세포를 이용한 구강 점막염 치료에 대해서는 알려진 바 없다.

[0005] 또한, 현재 알려진 구강 점막염 동물 모델의 경우, 모델 제작 과정에서 구강 궤양의 크기를 균일하지 못하게 제작되고 있다는 단점이 있다.

[0007] 이에 본 발명자들은 구강 점막염 치료제 및 구강 점막염 동물 모델 제작 방법을 개발하고자 노력한 결과, 편도 유래 줄기세포를 포함하는 신규한 구강 점막염 예방 또는 치료용 조성물 및 신규한 구강 점막염 동물 모델 제작 방법을 개발하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2017-0102639호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본원의 제 1 측면은, 편도 유래 줄기세포(tonsil-derived stem cell)를 포함하는, 구강 점막염 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.
- [0011] 본원의 제 2 측면은, 편도 유래 줄기세포를 포함하는, 암치료 보조용 약학 조성물을 제공하는 것이다.
- [0012] 본원의 제 3 측면은, 인간을 제외한 동물에 5-플루오로우라실 (5-fluorourasil, 5-FU)를 투여하는 단계 및 기계적 외상을 가하는 단계를 포함하는, 구강 점막염 동물 모델의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0013] 본원의 제 4 측면은, (a) 상기 구강 점막염 동물 모델의 제조방법으로 제조된 구강 점막염 동물 모델에, 구강 점막염 치료 후보물질을 투여하는 단계; 및 (b) 상기 후보물질의 투여에 따른 구강 점막염 증상 정도를 확인하는 단계를 포함하는, 구강 점막염 치료제의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0015] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본원에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 출원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 출원의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 출원의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.
- [0017] 본원의 제 1 측면은, 편도 유래 줄기세포(tonsil-derived stem cell)를 포함하는, 구강 점막염 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0018] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, "편도(tonsil)"는 목의 안쪽과 코의 뒷부분에 위치하여, 외부에서 침입하는 세균 등의 물질로부터 일차적으로 우리 몸을 방어함과 동시에 림프상피 면역조직으로 작용을 수행하는 조직을 의미한다. 상기 편도는 인두편도, 귀인두관편도, 구개편도, 혀편도 등을 포함할 수 있으며, 본원에 있어서 상기 편도는 편도유래의 중간엽 줄기세포를 제공하는 원천조직으로 사용될 수 있다.
- [0019] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, "줄기세포(stem cell)"는 자기 복제 능력을 가지면서 두 개 이상의 새로운 세포로 분화하는 능력을 갖는 세포를 의미하며, 만능 줄기세포(totipotent stem cell), 전분화능 줄기세포(pluripotent stem cells), 다분화능(다능성) 줄기세포(multipotent stem cells)로 분류할 수 있다. 만능 줄기세포(totipotent stem cells)란, 하나의 완전한 개체로 발생해 나갈 수 있는 만능의 성질을 가진 세포로 난자와 정자의 수정 이후 8세포기까지의 세포가 이러한 성질을 가지며 이 세포를 분리하여 자궁에 이식하면 하나의 완전한 개체로 발생해 나갈 수 있는 세포를 의미한다. 전분화능 줄기세포(pluripotent stem cells)란, 외배엽, 중배엽, 내배엽층 유래의 다양한 세포와 조직으로 발생할 수 있는 세포로서, 수정 4-5일 후 나타나는 배반포(blastocyst)의 안쪽에 위치한 내세포괴(inner cell mass)에서 유래하며, 이를 배아줄기세포라 하며, 다양한 다른 조직 세포로 분화되지만 새로운 생명체를 형성하지는 못하는 세포를 의미한다.
- [0020] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, "편도 유래 줄기세포(tonsil-derived stem cell)"는 편도에서 유래한 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cells; MSCs)를 의미하며, 중간엽 줄기세포란, 골, 연골, 지방, 골수간질, 근육, 신경 등으로 분화될 수 있는 미분화된 줄기세포를 의미하는데, 성인에서는 일반적으로 골수에 머물러 있지만 제대혈, 말초혈액, 기타 조직 등에도 존재한다. 본원의 편도 유래 줄기세포는 편도 줄기세포 또는 편도 유래 중간엽 줄기세포로도 불릴 수 있다.
- [0021] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 편도 유래 줄기세포는 편도선 절제수술을 받은 환자에서 분리한 편도선 조직

으로부터 채취하여 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0022] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 구강 점막염 예방 또는 치료용 약학 조성물은 편도 유래 줄기세포의 배양액을 추가로 포함하는 것일 수 있다.
- [0023] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, "편도 유래 줄기세포의 배양액"은 편도 유래 줄기세포를 배양하여 수득된 배양액 자체, 또는 그로부터 편도 유래 줄기세포가 제거된 배양 상층액을 의미하는 것일 수 있으며, "편도 유래 줄기세포 배양 상층액", "편도 유래 줄기세포 조건 배양액" 또는 "편도 유래 중간엽 줄기세포 배양 배지"와 호환적으로 사용될 수 있다.
- [0024] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, "구강 점막염(Oral mucositis, OM)"은 입 속 상피세포를 파괴해 통증과 궤양, 출혈을 동반하는 질환으로서, 구내염 또는 구강내 점막염이라고도 불린다. 상기 구강 점막염은 항암화학요법 또는 방사선치료 후 흔히 발생하는 부작용으로서, 최근에는 암환자 치료 중 가장 심각한 부작용으로 알려져 있으며, 중증 환자는 음식을 전혀 삼킬 수 없을 정도로 심각한 통증을 유발하고, 삶의 질을 떨어뜨릴 뿐만 아니라, 이차적으로 탈수, 영양실조, 전신 감염의 위험 요인으로 작용하여 치료의 지연이나 중단을 유발할 수도 있어서 예방 및 치료가 중요하다. 일반적인 구강 점막염은 다양한 인자가 관여하여 발생하는 것으로 알려져 있다. 스트레스, 외상, 유전적 문제 등의 소인을 바탕으로 박테리아와 같은 감염과 같은 악화인자와 타액과 점막 각화도 같은 구강을 보호하는 방어인자들의 복합적인 상호작용으로 발생한다. 반면, 항암제로 유발된 구강 점막염의 경우는 다른 양상을 보인다. 항암제가 분열중인 상피모세포에 비특이적인 손상을 입혀 나타나는 상피조직에 국한된 현상으로서, 항암제의 독성이 기저 상피세포층에 손상을 입히고, 이는 상피의 재생능을 떨어뜨려 결국 클론원성 세포사, 위축, 그리고 궤양에 이르는 상피 변화가 초래된다.
- [0025] 또한, 암세포의 분열에 영향을 주는 메토틱세이트와 플루오로우라실과 같은 약물은 40-60%에 가까운 구강 점막염의 발생률을 보이며, 메토틱세이트와 에토포사이드는 침으로 분비되어 경구 독성을 증가시키게 된다. 방사선 요법 그리고/또는 골수 이식을 위해 투여되거나 병행되는 치료의 빈도 역시 구강 점막염의 주요 원인이다. 실제로 항암 방사선 치료를 구강을 포함하는 두경부 영역에 시행하는 경우 치료 환자의 거의 100%에서 구강 점막염이 발생한다는 보고가 있다.
- [0026] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 구강 점막염은 항암화학요법 또는 방사선 치료에 의해 발생된 것을 특징으로 하는 것일 수 있으며, 구체적으로, 5-플루오로우라실(5-fluorourasil, 5-FU)에 의해 발생하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0027] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, "항암화학요법"은 암을 치료하기 위해 약물을 사용하는 것으로 항암제를 이용한 내과적인 약물 치료를 의미한다. 상기 항암제는 세포가 자라는 주기에 영향을 미쳐 성장이나 증식을 멈추게 하여 암세포를 파괴하는 역할을 하며, 이 때 한 종류의 항암제만 쓰기도 하고, 여러 가지 다른 기전의 항암제를 같이 사용함으로써 효과를 증진시킬 수 있으므로, 주로 두 가지 이상의 항암제를 조합하여 치료하기도 한다.
- [0028] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, "5-플루오로우라실(5-fluorourasil, 5-FU)"은 항대사성 약물에 속하는 항암제로서, 암세포가 자라는 데 필요한 정상 세포내 영양분과 비슷하나 암세포가 이 약을 받아들였을 때 암세포의 성장을 방해하는 작용을 하며, 주로 결장암, 직장암, 유방암 치료에 사용되나 이외에도 난소암, 자궁암, 간암, 식도암, 폐암, 악암, 설암 등에 다른 항암제와 같이 사용된다. 또한, 5-플루오로우라실과 같은 약물은 40-60%에 가까운 구강 점막염의 발생률을 보이며, 이와 같은 암치료 부작용으로 인해 항암치료의 지연이나 중단을 유발할 수 있다.
- [0029] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, "방사선 치료" 또는 "방사선 요법"이란 방사선이 발생하는 장치(라이나 치료기) 또는 방사성 동위원소를 이용하여 고에너지 방사선을 조사하여 암세포를 죽이는 치료법으로서, 암세포에 집중적으로 방사선을 조사하여 암세포를 파괴하고 더 이상 증식되는 것을 막는다.
- [0030] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 구강 점막염 예방 또는 치료용 약학 조성물은 신생혈관 생성을 촉진시키는 것을 특징으로 하는 것일 수 있다. 구체적으로, 신생혈관 생성은 조직재생뿐만 아니라 상처 치유 과정에서 필수적인 요소로서, 본원의 조성물은 구강 점막염 병변 및 병변 주위 조직의 신생혈관 생성을 촉진시킴으로서 구강 점막염을 예방 또는 치료할 수 있다.
- [0031] 본원의 일 구현예에 따르면 상기 구강 점막염 예방 또는 치료용 약학 조성물은 상처 수축을 촉진시키는 것을 특징으로 하는 것일 수 있다. 구체적으로, 신속하고 효과적인 상처 봉합 과정에서 매우 중요한 요소인 상처 수축은 섬유아세포의 근섬유아세포로의 적절한 분화에 의해 발생하는 것으로서, 본원의 조성물은 구강 점막염 병변

및 병변 주위 조직의 섬유아세포의 분화 및 상처 수축을 촉진시킴으로서 구강 점막염을 예방 또는 치료할 수 있다.

[0032] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 구강 점막염 예방 또는 치료용 약학 조성물은 CD31(cluster of differentiation 31), TGF- β (Transforming growth factor- β) 및 NOX4(NAPDH oxidase 4)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 단백질의 발현수준이 증가하는 것을 특징으로 하는 것일 수 있다.

[0033] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, "CD31(cluster of differentiation 31)"은 130kDa 크기의 세포막에 존재하는 당단백질이며, 혈관 내피세포뿐만 아니라 혈소판, 단핵구, 백혈구에도 존재하는 것으로 알려져 있다. 또한, 상기 CD31은 조직재생 및 상처 치유에서 필수적인 요소인 신생혈관 생성과 관련 있는 단백질로서, 본원의 조성물은 구강 점막염 병변 및 병변 주위 조직의 CD31의 발현수준이 증가시킴으로서 구강 점막염을 예방 또는 치료할 수 있다.

[0034] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, "TGF- β (Transforming growth factor- β)"는 상처 치유 과정에서 중심적 역할을 하는 단백질로서, 섬유아세포의 근섬유아세포로의 분화에 결정적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 따라서, 본원의 조성물은 구강 점막염 병변 및 병변 주위 조직의 TGF- β 의 발현수준이 증가시킴으로서 상처 치유 과정을 촉진시켜 구강 점막염을 예방 또는 치료할 수 있다.

[0035] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, "NOX4(NAPDH oxidase 4)"는 신장, 혈관 내피세포, 파골세포, 평활근세포, 섬유모세포, 지방세포, 췌도세포, 배아 줄기세포 등 여러 세포에 존재하며 활성산소종(reactive oxygen species, ROX) 생성과 관련 있는 것으로 알려져 있으며, 상기 NOX4는 효과적인 상처 수축에 관여하는 것으로 알려져 있다. 따라서, 본원의 조성물은 구강 점막염 병변 및 병변 주위 조직의 NOX4의 발현수준이 증가시킴으로서 상처 수축을 촉진시켜 구강 점막염을 예방 또는 치료할 수 있다.

[0036] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 구강 점막염 예방 또는 치료용 약학 조성물은 MMP2(Matrix Metalloproteinase-2)의 발현 수준이 감소하는 것을 특징으로 하는 것일 수 있다.

[0037] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, "MMP2 (Matrix Metalloproteinase-2)"는 72 kDa type IV 콜라게나제(collagenase) 또는 젤라티나제 A(gelatinase A)로 알려져 있는 효소로서, 사멸한 단백질을 제거하여 궤양 부위를 청소하고 새로운 세포가 성장하도록 하는 역할을 하지만, MMP2는 세포성장 및 궤양치유에 필요한 세포기질단백질까지 제거하므로, MMP2 단백질을 적절히 억제시키는 것이 구강 점막염 치료에 중요하다.

[0038] 본원의 일 실시예에 따르면, 구강 점막염 동물 모델(5-FU+MT 군)에 편도 유래 줄기세포를 주입한 TMSC 군의 경우 실험시간이 경과할수록 MMP2의 발현수준이 점차 감소되며, 14일째에서는 TMSC 군의 MMP2 발현 수준이 다른 군에 비해 현저히 낮은 것을 확인하였는 바, 편도 유래 줄기세포는 구강 점막염이 발생한 후 MMP2를 감소시키는 데에 효과적인 것을 알 수 있다.

[0039] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, "치료"란, 본원의 약학 조성물의 투여에 의해 구강 점막염이 억제되거나 지연되는 모든 행위를 의미한다.

[0040] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, "예방"이란, 본원의 약학 조성물의 투여에 의해 구강 점막염의 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.

[0041] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 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 포함할 수 있다. 이러한 목적에 적합한 제형으로는 비경구투여 제제로서 주사제, 주입제 등이 바람직하다. 또한, 상기 약학 조성물은 약학적으로 허용가능한 통상의 불활성 담체 및 희석제를 포함할 수 있다. 본원의 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 봉해제, 폴리소르베이트, 세틸알코올, 및 글리세롤 등과 같은 계면활성제를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 상기 약학적으로 허용되는 담체 및 희석제는 편도 유래 줄기세포 및 이를 이식 받을 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. 본원의 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.

- [0042] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 조성물은 구강 점막염을 예방 또는 치료하기 적절한 양의 편도 유래 줄기세포를 포함할 수 있으며, 본원의 일 실시예에 따르면, 2×10^4 개의 편도 유래 줄기세포를 구강 점막염 병변에 주입하였으나, 이제 제한되는 것은 아니며, 상기 투여량은 구강 점막염의 진행 상태, 환자의 연령, 체중, 증상의 특성 및 정도, 현재 치료법의 종류, 치료 회수, 투여 형태 및 경로 등 다양한 요인에 따라 달라질 수 있으며, 해당 분야의 전문가들에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0043] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 구강 점막염 예방 또는 치료용 약학 조성물은 구강 점막염을 치료하기 위하여, 또는 구강 점막염의 발병을 억제하기 위하여 약학적으로 효과적인 양으로 투여될 수 있으며 상기 투여량은 구강 점막염의 진행 상태, 환자의 연령, 체중, 증상의 특성 및 정도, 현재 치료법의 종류, 치료 회수, 투여 형태 및 경로 등 다양한 요인에 따라 달라질 수 있으며, 해당 분야의 전문가들에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 본원의 조성물은 상기한 약리학적 또는 생리학적 성분을 함께 투여하거나 순차적으로 투여할 수 있으며, 또한 추가의 종래의 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 이러한 투여는 단일 또는 다중 투여일 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.
- [0045] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 구강 점막염 예방 또는 치료용 약학 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 구강 점막염의 예방 또는 치료 방법을 제공한다. 구체적으로, 본원의 구강 점막염의 예방 또는 치료 방법은 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0046] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, "개체"란, 본원의 약학 조성물을 투여하여 구강 점막염이 경감, 억제 또는 치료될 수 있는 상태 또는 구강 점막염을 앓고 있거나 그러한 위험이 있는 인간을 포함한 마우스, 래트, 햄스터, 돼지, 소, 가축 등의 모든 동물을 의미한다.
- [0047] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, "투여"란, 적절한 방법으로 개체에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며, 본원의 약학 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여될 수 있지만, 이에 제한되지 않으며, 구체적으로 구강 점막염이 발생한 병변 또는 병변 주위에 직접 투여하는 것일 수 있다. 또한, 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.
- [0049] 본원의 제2측면은, 편도 유래 줄기세포를 포함하는, 암 치료 보조용 약학 조성물을 제공한다. 제1측면과 중복되는 내용은 제2측면의 암 치료 보조용 약학 조성물에도 공히 적용된다.
- [0050] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, "암 치료 보조"란, 암 치료용 약학 조성물의 투여에 의하여 유발될 수 있는 부작용을 예방 또는 치료하여, 보다 안전한 암 치료를 도모할 수 있는 효과를 의미하는 것일 수 있다.
- [0051] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 암 치료용 약학 조성물의 투여에 의하여 유발될 수 있는 부작용은 구강 점막염일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0052] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 조성물은 항암화학요법 또는 방사선 치료에 의하여 유발되는 구강 점막염을 억제하는 효과를 나타내는 것일 수 있다.
- [0053] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 조성물은 항암화학요법 또는 방사선 치료 등을 포함하는 암 치료용 조성물 또는 암 치료 방법과 병용하여 투여될 수 있으며, 상기 병용 투여는 동시, 순차적, 또는 역순으로 병용 투여되는 것일 수 있다.
- [0054] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 암 치료 보조용 약학 조성물은 암 치료에 따르는 부작용을 치료 또는 억제하기 위하여, 약학적으로 효과적인 양으로 투여될 수 있으며 상기 투여량은 부작용의 진행 상태, 환자의 연령, 체중, 증상의 특성 및 정도, 현재 치료법의 종류, 치료 회수, 투여 형태 및 경로 등 다양한 요인에 따라 달라질 수 있으며, 해당 분야의 전문가들에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 본원의 조성물은 상기한 약리학적 또는 생리학적 성분을 함께 투여하거나 순차적으로 투여할 수 있으며, 또한 추가의 종래의 치료제와 병용하여 투여될

수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 이러한 투여는 단일 또는 다중 투여일 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.

[0055] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 암치료 보조용 약학 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 암치료 부작용 예방 또는 치료 방법을 제공한다. 구체적으로, 본원의 암치료 부작용 예방 또는 치료 방법은 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0056] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, "개체"란, 본원의 약학 조성물을 투여하여 암 치료 부작용이 경감, 억제 또는 치료될 수 있는 상태; 또는 암 치료 부작용을 앓고 있거나 그러한 위험이 있는 인간을 포함한 쥐, 생쥐, 가축 등의 모든 동물을 의미한다.

[0057] 본원의 명세서 전체에서 사용되는 용어, "투여"란, 적절한 방법으로 개체에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며, 본원의 약학 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여될 수 있지만, 이에 제한되지 않으며, 구체적으로 암 치료 부작용이 발생한 병변 또는 병변 주위에 직접 투여하는 것일 수 있다. 또한, 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

[0059] 본원의 제3측면은, 인간을 제외한 동물에 5-플루오로우라실(5-fluorourasil, 5-FU)을 투여하는 단계 및 기계적 외상을 가하는 단계를 포함하는, 구강 점막염 동물 모델의 제조방법을 제공한다. 제1측면 및 제2측면과 중복되는 내용은 제3측면의 구강 점막염 동물 모델의 제조방법에도 공히 적용된다.

[0060] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 방법은 항암화학요법 또는 방사선 치료에 의한 구강 점막염 동물 모델의 제조 방법일 수 있다.

[0061] 본원의 명세서 전체에서 사용되는 용어, "구강 점막염 동물 모델"이란, 다양한 구강 점막염 증상이 발현될 수 있도록 제작된 동물 모델을 의미한다. 상기 동물은 인간을 제외한 동물이라면 특별히 이에 제한되지는 않으나 마우스(mouse), 랫트(rat), 햄스터, 토끼, 염소, 침팬지, 원숭이 등의 포유동물이 될 수 있고, 구체적으로는 햄스터일 수 있다.

[0062] 본원의 일 실시예에 따르면, 구강 점막염 동물 모델을 제작하기 위해, 7주령, 무게 90 g 내지 120 g의 수컷 시리아 골든 햄스터를 사용하였다.

[0063] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 방법은 햄스터의 볼점막 주머니에 구강 점막염을 유도하는 것일 수 있으며, 구체적으로 양측 볼점막 주머니에 구강 점막염을 유도하는 것일 수 있다. 구체적으로, 햄스터의 볼점막은 구강 점막의 연장으로서, 쉽게 관찰이 가능한 바, 구강 염증과 관련된 동물모델로 유용하게 이용될 수 있다. 또한, 햄스터의 볼점막의 가장 주요한 역할은 먹이 등을 저장하는 것으로서, 먹이를 섭취할 때 직접적으로 닿는 부분은 아니므로 유의한 통증을 일으키지 못해, 상기 동물 모델의 경우 유의한 체중 감소를 확인하지 못할 수 있다.

[0064] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 방법에서 5-플루오로우라실을 투여하는 방법은 경구 투여, 피하 투여, 복강 투여, 근육 투여, 정맥 투여, 피내 투여일 수 있고, 구체적으로는 복강 투여일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0065] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 방법은 5-플루오로우라실을 일정 기간 동안 투여하는 것일 수 있다. 상기의 일정 기간이란, 5-플루오로우라실로 인해 구강 점막염을 발병 시킬 수 있는 기간을 말하는 것으로서, 1 내지 7 일, 2 내지 6일 또는 3 내지 5일 동안 5-플루오로우라실을 투여하는 것일 수 있고, 구체적으로 동물 모델 제작 0일째, 2일째 및 4일째에 5-플루오로우라실을 투여하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0066] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 방법에서 상기의 5-플루오로우라실 1일 투여량은 구강 점막염을 유도할 수 있을 정도의 투여량을 말하는 것으로서, 하루에 투여된 코카인의 양은 30mg/kg 내지 90mg/kg, 40mg/kg 내지 80mg/kg 또는 50mg/kg 내지 70mg/kg일 수 있고, 구체적으로는 60mg/kg일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0067] 본원의 명세서 전체에서 사용되는 용어, "기계적 외상(mechanical trauma)"이란, 물리적으로 자극을 주어 상처를 만드는 것을 의미하는 것으로서, 구체적으로 구강 점막염을 유도하기 위해 동물의 점막 부위에 상처를 만드

는 것일 수 있다.

- [0068] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 기계적 외상은 점막의 내층을 제거한 후, 표피에 자극, 스크래치 또는 상처를 만드는 것일 수 있으며, 구체적으로 바이오피스 펀치를 이용하여 점막의 내층을 제거하고, 바늘을 이용하여 내층이 제거된 점막에 표피 스크래치를 만드는 것일 수 있다.
- [0069] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 방법은 기계적 외상을 일정 기간 동안 가하는 것일 수 있다. 상기의 일정 기간이란, 기계적 외상으로 인해 구강 점막염을 발병 시킬 수 있는 기간을 말하는 것으로서, 1 내지 7일, 2 내지 6일 또는 3 내지 5일 동안 기계적 외상을 가하는 것일 수 있고, 구체적으로 동물 모델 제작 1일째, 2일째 및 4일째에 기계적 외상을 가하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0070] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 방법은 제조 0일째, 2일째 및 4일째에 5-플루오로우라실(5-fluorourasil, 5-FU)를 투여하는 단계 및 제조 1일째, 2일째 및 4일째에 기계적 외상을 가하는 단계를 포함하는 것일 수 있다.
- [0071] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 동물 모델 제조방법은 5-플루오로우라실 투여 및 기계적 외상을 중단하고 회복시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기의 회복 기간은 5-플루오로우라실 투여 및 기계적 외상으로 인해 구강 점막염의 증상이 발현될 수 있는 기간을 말하는 것으로서, 1 내지 7일, 2 내지 6일 또는 2 내지 4일 동안 제조방법은 5-플루오로우라실 투여 및 기계적 외상을 중단하여 회복시키는 것일 수 있고, 구체적으로 3일 동안 5-플루오로우라실 투여 및 기계적 외상을 중단하고 회복시키는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0072] 보다 구체적으로, 본원의 구강 점막염 동물 모델 제조방법은 약 5일간 5-플루오로우라실 투여 및 기계적 외상을 가하는 단계 및 약 3일간 5-플루오로우라실 투여 및 기계적 외상을 중단하여 회복시키는 단계를 포함하는 것으로서, 구강 점막염 동물 모델을 제조하는데 약 8일의 시간만이 소모되는 바, 단기간에 구강 점막염 동물 모델을 제조할 수 있으므로, 구강 점막염 연구 등에 유용하게 이용될 수 있다.
- [0074] 본원의 제4측면은 (a) 상기 방법으로 제조된 구강 점막염 동물 모델에, 구강 점막염 치료 후보물질을 투여하는 단계; 및 (b) 상기 후보물질의 투여에 따른 구강 점막염 증상 정도를 확인하는 단계를 포함하는, 구강 점막염 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다. 제1측면 내지 제3측면과 중복되는 내용은 제4측면의 구강 점막염 치료제의 스크리닝 방법에도 공히 적용된다.
- [0075] 상기의 증상 정도를 확인하는 단계란, 병세의 진행 또는 회복에 관해 확인하는 단계를 의미한다. 본원의 목적상 상기 증상 정도를 확인하는 단계는 개체에서 발생된 구강 점막염을 치료할 수 있는 후보물질을 본원의 구강 점막염 동물 모델에 투여한 후, 구강 점막염의 진행상황을 확인하여 상기 후보물질이 상기 구강 점막염을 치료할 수 있는지의 여부를 평가하는 일련의 과정으로 이해될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다. 구체적으로, 상기의 구강 점막염의 증상 정도를 확인하여, 증상이 완화되는 경우에는, 상기의 후보물질을 구강 점막염 치료제로 판단할 수 있다.
- [0076] 또한, 본원의 구강 점막염 동물 모델을 이용하여 구강 점막염 치료제를 스크리닝하는 데에 있어서, 구강 점막염에 대해 전체적인 치료 효능을 갖는 치료제를 스크리닝할 수 있으며, 구강 점막염의 구체적인 증상별 치료 효능을 갖는 치료제를 스크리닝 할 수도 있다. 구체적으로, 구강 점막염에 의한 점막의 발적, 충혈, 출혈, 상피궤양 및 농의 상태 각각에 대한 치료 효능을 확인함으로써, 각 증상에 대한 치료제를 판단할 수 있다.
- [0077] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 방법은 항암화학요법 또는 방사선 치료에 의한 구강 점막염 치료제의 스크리닝 방법일 수 있다.
- [0078] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 방법은 상기 구강 점막염 치료 후보물질에 따라 구강 점막염 증상이 완화되는 경우 상기 후보물질을 구강 점막염 치료제로 판단하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

발명의 효과

- [0080] 본원의 구강 점막염 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 암치료 보조용 약학 조성물은 암 치료과정에서 발병할 수 있는 구강 점막염 치료에 이용할 수 있으며, 암 치료의 부작용을 효율적으로 억제할 수 있다. 또한, 본원의 구강 점막염 동물 모델 제조방법 및 상기 방법으로 제조된 동물 모델을 이용한 구강 점막염 치료제 스크리닝 방법을 이용하여 구강 점막염 치료제를 효율적으로 발굴 할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0082] 도 1은 구강 점막염 모델 제작 과정을 나타낸 도면이다.
- 도 2는 실험군 설계 및 실험 진행에 대한 전반적인 과정을 나타낸 도면이다.
- 도 3은 실험 진행에 따른 몸무게 및 섭취량 변화를 나타낸 도면이다.
- 도 4는 실험 진행에 따른 육안 검사 결과를 나타낸 도면이다.
- 도 5는 실험 7일째의 육안 검사 결과를 나타낸 도면이다.
- 도 6은 실험 진행에 따른 조직 검사 결과를 나타낸 도면이다.
- 도 7은 실험 진행에 따른 CD31에 대한 면역형광검사 결과를 나타낸 도면이다.
- 도 8은 실험 진행에 따른 MMP2에 대한 면역형광검사 결과를 나타낸 도면이다.
- 도 9는 실험 진행에 따른 TGF- β 에 대한 면역형광검사 결과를 나타낸 도면이다.
- 도 10은 실험 진행에 따른 NOX4에 대한 면역형광검사 결과를 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0083] 이하, 아래 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 단, 아래 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

[0085] 실시예 1: 편도 유래 줄기세포의 제조 및 배양

- [0087] 편도 유래 줄기세포(tonsil-derived MSCs)의 추출 및 배양은 기존의 공지된 방법을 이용하였다. 구체적으로, 편도절제술을 시행 받은 10세 여자환자의 조직을 이용하였으며, 수술로 얻어진 편도 조직을 얇게 저민 후에, 고농도 글루코스 DMEM [210 U/mL collagenase type I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 및 10 mg/mL DNase (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) 포함] 배지에 37°C에서 30분간 넣어 조직을 녹였다. 상기 녹인 조직은 철망(wire mesh)으로 필터링 한 후, 고농도 글루코스DMEM 배지/20% 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)에서 2차례 세척한 후, 고농도 글루코스DMEM 배지/10% 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)에서 1차례 세척하였다. 다음으로, Ficolle-Paque (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) 농도구배 원심분리기를 이용하여 단핵구(mononuclear cell)를 수득하였으며, 상기 수득하나 세포 1×10^6 개를 100-mm 배양 접시에 분주하고 고농도 글루코스 DMEM, 10% FBS, 100 U/mL 페니실린/스트렙토마이신(Gibco, Grand Island, NY, USA) 배지에서 배양하였다. 배양 48시간 후에 접시에 붙어 자라는 점착성 단핵구 세포(adherent mononuclear cell)로 계대배양을 수행하였다.

[0089] 실시예 2: 구강 점막염(Oral mucositis) 모델 제작

- [0091] 구강 점막염 모델을 제작하기 위해 7주령, 무게 90 g 내지 120 g의 수컷 시리아 골든 햄스터(Syrian golden hamsters)(Japan SLC, Nagoya, Japan)를 이용하였으며, 하기와 같은 방법으로 제작하였다.
- [0092] (1) 0, 2, 4일째에 햄스터에 60 mg/kg 5-FU(5-fluorourasil)를 복강 주사함.
- [0093] (2) 1일째에 8mm 바이오피스 펀치를 사용하여 햄스터 볼점막 주머니 점막의 내층을 제거한 후, 노출된 볼점막 주머니에 18 게이지 바늘을 이용하여 표면 스크래치(superficial scratch)를 가함(도 1).
- [0094] (3) 2일째 및 4일째에 추가적으로 표면 스크래치 가하여 기계적 외상(mechanical trauma, MT)을 가함(1일째에 만든 구강 점막염 위치 내에서 시행).

[0095] 본원의 구강 점막염 동물 모델은 바이오피스 펀치를 사용하여 동일한 크기의 점막염을 유발하고, 주사침을 이용하여 점막을 자극하였는 바, 이는 기존의 동물 모델보다 구강 점막염 치료 등의 연구에 있어 유용하게 이용할 수 있다.

[0097] **실시예 3: 실험군 설계**

[0099] 실험군은 하기의 5개의 군으로 설계하였다(도 2).

[0100] (1) MT: 기계적 외상만 유도, n=6

[0101] (2) 5-FU+MT: 5-FU 복강 주사 및 기계적 외상 유도, 실시예 2의 구강 점막염 모델, n=6

[0102] (3) TMSC: 5-FU+MT 군에 편도 유래 줄기세포 주입, n=6

[0103] (4) DEXA: 5-FU+MT 군에 덱사메타손(dexamethasone) 주입, n=6

[0104] (5) saline: 5-FU+MT 군에 생리식염수 주입, n=6

[0106] 실험에 이용된 동물 수는 각 군당 총 3마리이며, 양측 볼점막 주머니에 실험을 시행하였기 때문에 각 군당 총 샘플 수는 각 6개이다.

[0107] TMSC 군의 경우, 2×10^4 개의 편도 유래 줄기세포가 포함된 성장 배지와 Matrigel® (MA, BD Biosciences, San Jose, CA, USA)을 1:2의 비율로 섞어 총 100 μ l로 만든 후, 이를 실험일 7일차에 구강 점막염 주변 점막 하에 주사하였다.

[0108] DEXA 군의 경우, 항염증 물질로서 임상에서 구강 점막염 치료제로 널리 알려진 덱사메타손 이인산나트륨(Dexamethasone disodium phosphate)(Ilsung Pharmaceuticals Co., Seoul, Republic of Korea, 5 mg/ml)을 인산완충생리식염수(phosphate-buffered saline, PBS, pH 7.4)에 혼합하여 1 mg/kg 의 용액으로 제조한 후, 실험일 7일차에 구강 점막염 주변 점막 하에 주사하였다.

[0109] Saline 군의 경우 생리식염수 100 μ l을 실험일 7일차에 구강 점막염 주변 점막 하에 주사하였다.

[0111] **실시예 4: 치료 평가(Assessment)**

[0113] **실시예 4-1: 무게 및 섭취량 확인**

[0115] 실험에 사용한 모든 15마리의 햄스터의 무게 및 구강섭취량은 동물의 상태를 확인하기 위해 매일 측정하였다.

[0117] **실시예 4-2: 구강 점막염 상태의 육안 소견(Gross analysis)**

[0119] 볼점막 주머니의 구강 점막염의 육안적 상태는 사진을 촬영하여 심각도를 평가하였으며, 점막의 발적, 충혈, 출혈, 상피궤양, 농의 상태를 기준에 제안된 방식에 입각하여 0-5점으로 평가하였다.

[0120] 구체적으로, 볼점막 주머니는 점막염의 중증도를 특정 짓기 위해 촬영하였다. 중증도를 평가하고, 홍반, 충혈, 출혈, 상피 궤양 및 농양을 기준에 공지된 방법에 기초하여 하기와 같이 0점에서 5점으로 평가하였다.

[0121] 0점: 건강한 점막으로서, 침식이나 혈관 확장의 흔적이 없음.

[0122] 1점: 홍반이 존재하지만, 점막 침식의 흔적은 없음.

- [0123] 2점: 심한 홍반, 혈관 확장 및 표면 침식
- [0124] 3점: 점막의 하나 이상의 면에 궤양이 존재하며, 25% 이하의 영역에만 궤양이 존재, 심한 홍반 및 혈관확장
- [0125] 4점: 볼 점막의 약 50%에 궤양이 존재
- [0126] 5점: 볼 점막의 모든 부위에 궤양이 존재하여, 조직을 노출시키는 것이 불가능함.

[0128] **실시예 4-3: 조직 검사(Histologic analysis)**

- [0130] 실험에 참여한 동물은 한림대학교성심병원 연구소의 동물실험 지침에 따라 안락사시켰다. 실험 표본은 파라핀 블록에 넣은 뒤 7 μ m 두께의 절편으로 절단 하였고, 상기 절편을 헤마톡실린-에오신(hematoxylin-eosin, H&E)으로 염색하였다.

[0132] **실시예 4-4: 면역형광검사 (Immunohistochemical analysis)**

- [0134] 조직의 면역형광검사를 위해 다음과 같이 수행하였다. 구체적으로, 절편 조직 슬라이드를 조직-건조 오븐에서 60℃, 40분동안 인큐베이션시키고, 탈파라핀화된 조직을 10 mM 나트륨 구연산염 완충액 (pH 6.0)을 이용하여 전 자레인지에서 변성시킨 후, 블로킹 완충액으로 60분동안 블로킹시켰다. 다음으로, 1차 항체를 희석시킨 후, 25℃, 16시간동안 상기 블로킹된 조직과 인큐베이션시키고, 상기 조직을 0.3% 과산화수소가 포함된 10% PBS로 10분동안 처리하였다. 다음으로, 조직과 반응한 1차 항체를 검출하기 HRP(horseradish peroxidase)과 연결된 2차 항체를 이용하여 반응을 진행하였고, HRP 활성은 3,3-디아미노벤지딘 (diaminobenzidine, DAB) 기질을 이용하여 검출하였다. 상기 조직은 PBS로 3번 세척하였다. 본 실험에서 사용한 모든 조직은 Mayer's hematoxylin으로 대조염색하였다.
- [0135] 1차 항체는 다음의 제품을 이용하였다: 항-TGF- β 1 항체 (1:100, Abcam, Cambridge, UK), 마우스 항-CD31 항체 (1:100, BD Pharmingen, NJ, USA), 항-MMP2 항체 (8B4) (1:100, Santa Cruz Biotechnology Inc.), 및 항-NOX4 항체(1:500, Cusabio Technol LLC, Houston, TX, USA).
- [0136] 2차 항체는 다음의 제품을 이용하였다: 염소 항-마우스 IgG 항체(1:500, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) 및 염소 항-토끼 IgG, (1:500, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA).
- [0137] 구강 점막 조직은 광학 현미경(Carl Zeiss Microscopy GmbH, Zeiss, Germany)을 이용하여 관찰하였고, 면역-양성 세포는 Image J program (ImageJ 1.49v, National Institutes of Health, USA)를 이용하여 측정되었다.

[0139] **실시예 4-5: 통계적 분석 (Statistical analysis)**

- [0141] 실험에 및 실시예의 모든 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차로 표현하였다. 또한, GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA)을 이용하여 실험 결과의 통계적 분석을 수행하였으며, p 값은 스튜던트 T 검정 (Student 's t test)을 이용하여 통계적 유의성을 *p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.005로 설정하였다.

[0143] **실험예 1: 실험군의 몸무게 및 섭취량 확인**

- [0145] 각 실험군의 실험 0일째의 평균 몸무게는 MT 군은 141.4 $\pm$ 5.5 g, 5-FU+MT 군은 139.5 $\pm$ 3.5 g, saline 군은 146.9 $\pm$ 20.5 g, TMSC 군은 138.9 $\pm$ 0.1 g, DEXA 군은 145.6 $\pm$ 16.4 g으로서 각 군간에 큰 차이는 없었으며, 모든 군에서 시간에 따른 유의한 몸무게 변화는 관찰되지 않았다(도 3A).
- [0146] 또한, 섭취량을 실험 0일째와 비교하여 비율로 나타냈을 때, 모든 군에서 실험 4-10일째 및 실험 11-14일째에 0

일제와 비교하여 섭취량이 40 내지 60% 감소하였으나, 각 군간의 통계적으로 유의한 차이는 없었는 바, 모든 군에서 시간에 따른 유의한 몸무게 변화는 관찰되지 않았다(도 3B).

[0148] 실험예 2: 실험군의 구강 점막염 상태 육안 소견 확인

[0150] 실시예 4-2의 방법을 이용하여, 실험군의 구강 점막염 상태를 육안으로 확인하였다. 육안적으로 MT 군은 점막의 미란 및 궤양이 7일째에 관찰되었으며, 14일 이내에 자연 치유된 것이 확인되었다. 반면 5-FU+MT 군은 저명한 점막염, 상피의 파열 및 괴사가 7일째 및 10일째에 보였으며, 14일째에는 궤양이 약간 호전되긴 했으나 여전히 심한 점막 발적 및 궤양이 존재하는 것으로 확인되었다. 또한, TMSC 군은 10일째에 거의 정상적으로 회복이 되었으나(약간의 점막 파열 및 발적만 확인), DEXA 군은 10일째에 궤양 및 중증도의 점막 발적이 관찰되었으며, 14일째에는 TMSC 군의 점막파열은 회복이 되었고, DEXA 군도 궤양이 호전된 양상을 보이는 것을 확인하였다(도 4A).

[0151] 각 실험군의 시간 경과에 따른 평균 그로스 점수(gross score)는 도 4B에 기재하였다. 구체적으로, 평균 그로스 점수는 7일째에는 실험군 별로 차이가 없었으나(도 5), 10일째에는 TMSC 군과 DEXA 군이 MT 군, 5-FU+MT 군 및 saline 군과 비교하여 통계적으로 유의하게 그로스 점수가 낮은 것이 확인되었으며, TMSC 군의 그로스 점수가 DEXA 군에 비교하여 낮게 나온 것이 확인되었다. 또한, 14일째에는 TMSC 군을 제외한 모든 군에서, 10일째와 비교하여 그로스 점수가 낮아진 것이 확인되었다. 또한, MT 군, TMSC 군 및 DEXA 군은 5-FU+MT 군 및 saline 군과 비교하여 그로스 점수가 낮았으며, TMSC 군 및 DEXA 군의 그로스 점수는 5-FU+MT 및 saline 군보다 통계적으로 유의하게 낮은 것이 확인되었다.

[0152] 상기 결과로부터, 육안 소견 결과, 편도 유래 줄기세포를 주입한 TMSC 군이 기존에 치료제로 사용되는 텍사메타손을 주입한 DEXA 군보다 빠른 시간에 구강 점막염 상태가 호전된 것을 확인하였는 바, 편도 유래 줄기세포를 포함하는 조성물이 현저히 우수한 구강 점막염 치료 효과를 갖는 다는 것을 알 수 있다.

[0154] 실험예 3: 실험군의 조직 검사 결과 확인

[0156] 실시예 4-3의 방법을 이용하여, 실험군의 구강 점막 상태를 조직 검사로 확인하였다. MT 군의 경우, 실험 10일째 및 14일째에서 정상 연골 조직으로서의 완전한 상피화를 나타냈으나, 5-FU+MT 군 및 saline 군의 경우, 10일째 및 14일째에 염증세포의 침윤을 동반한 상피 결손 및 섬유화를 동반한 출혈 영역이 관찰되었다.

[0157] 또한, TMSC 군의 경우 10일째에 완전한 상피화를 나타냈으나, DEXA 군의 경우 10일째에 염증 세포의 침윤 및 파립 형성과 함께 상피 결손이 관찰되었다. 14일째의 경우 DEXA 군 또한 완전한 상피화가 관찰되었다(도 6).

[0158] 상기 결과로부터, 조직 검사 결과 다른 실험군과 비교하여 빠른 시간에 상피화가 진행되는 것을 확인하였는 바, 편도 유래 줄기세포를 포함하는 조성물이 현저히 우수한 구강 점막염 치료 효과를 갖는 다는 것을 알 수 있다.

[0160] 실험예 4: 실험군의 면역형광검사 결과 확인

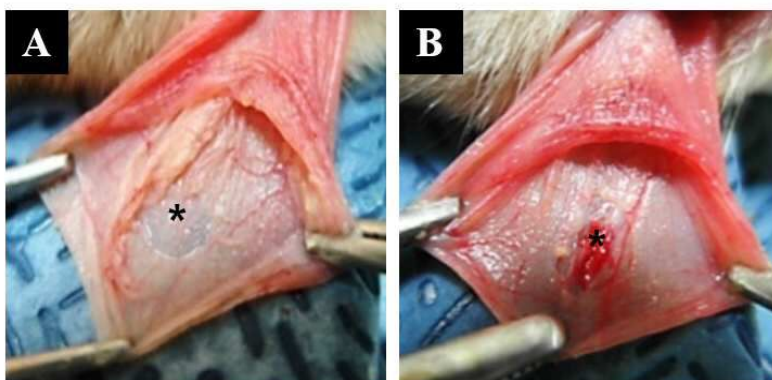
[0162] 실시예 4-4의 방법을 이용하여, 각 실험군의 CD31, MMP2, TGF- β 및 NOX4의 발현 수준을 평가하였다.

[0163] 구체적으로, 면역형광검사를 통해 CD31의 발현수준을 확인한 결과, 실험 10일째에 MT 군 및 TMSC 군은 다른 군과 비교하여 CD31의 발현수준이 증가되었으며, TMSC군의 경우 5-FU+MT 군 및 saline 군과 비교하여 통계적으로 유의하게 CD31의 발현수준이 증가되어 있었으며, MT 군과 비교하여서도 증가되어 있는 것이 확인되었다. 또한, 5-FU+MT 군은 10일째 통계적으로 유의하게 CD31 발현수준이 감소되어 있으며, 10-14일째에 약간 증가되는 결과를 나타내었고, DEXA 군은 5-FU+MT, saline군과 비교하여 10일째 CD31 발현수준이 증가되었으나, 이 수치는 MT 군에 비교하여서는 낮았다. 14일째에는 모든 군에서 10일째와 비교하여 CD31 발현수준이 증가되었으며, 특히 TMSC 군은 DEXA 군과 비교하여 통계적으로 유의하게 CD31 발현수준이 증가된 것이 확인되었다(도 7).

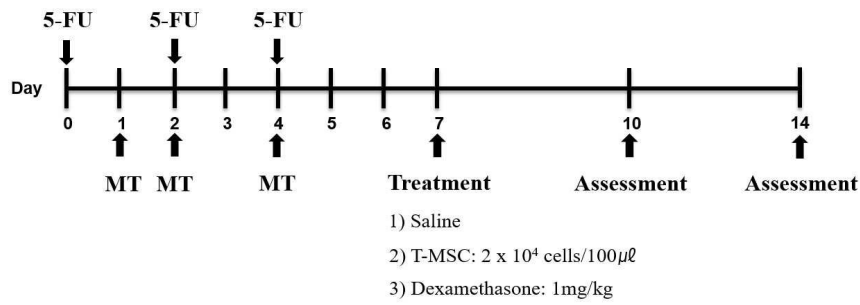
- [0164] 다음으로, 면역형광검사를 통해 MMP2의 발현수준을 확인한 결과, TMSC 군은 10일째에 MMP2 발현수준이 가장 높게 나타났으며, 10 내지 14일째 점차 감소하였으며, DEXA군도 10일째에 MMP2 발현수준이 5FU+MT 군보다 높게 나타났다. 또한, 14일째에는 TMSC 군에서 MMP2 발현수준이 가장 낮게 나타났으나, 10일째 및 14일째에 군 간에 통계적 유의성은 보이지 않았다(도 8).
- [0165] 다음으로, 면역형광검사를 통해 TGF- β 의 발현수준을 확인한 결과, 10일째에 TMSC 군은 TGF- β 가 상피 및 점막 하에 강하게 발현되었고, 이는 정상 점막, MT 군, 5-FU+MT 군과 비교하여 유의하게 높았으며, 특히 5-MT+FU 군과 비교하여 특징적으로 높았다($p<0.01$). 또한, 14일째에 TGF- β 의 발현수준은 TMSC 군 및 DEXA 군에서 MT 군, 5-FU+MT 군, 및 saline 군보다 높았고, 특히 5-FU+MT 군과 비교하여 통계적 유의성을 가진 것이 확인되었다(도 9).
- [0166] 마지막으로, 면역형광검사를 통해 NOX4의 발현수준을 확인한 결과, 10일째에 TMSC 군은 다른 군과 비교하여 NOX4 발현수준이 증가되었으며, 정상 점막 및 5-FU+MT 군과 비교하였을 때 통계적으로 유의하게 높은 것을 확인하였다. 또한, 14일째에는 군 간에 유의한 차이는 없었다(도 10).
- [0167] 상기 결과로부터, 조직 재생 또는 상처 치유와 관련된 신생혈관 생성을 촉진하는 CD31의 발현수준, 상처 치유와 관련된 섬유아세포 분화를 촉진하는 TGF- β 의 발현수준 및 상처 수축과 관련된 NOX4의 발현수준은, TMSC 군의 경우 다른 실험군과 비교하여 빠른 시간에 발현 수준이 유의하게 높은 것을 확인하였는 바, 편도 유래 줄기세포를 포함하는 조성물이 현저히 우수한 구강 점막염 치료 효과를 갖는 다는 것을 알 수 있다.
- [0169] 상기 실험예들의 결과를 종합해보면, 본원에서 제작한 구강 점막염 동물 모델에 편도 유래 줄기세포를 주입한 TMSC 군의 경우 현저히 우수한 구강 점막염 치료 효과가 있는 것을 육안 소견, 조직 검사 및 면역형광검사 등을 통해 확인하였는 바, 편도 유래 줄기세포를 포함하는 조성물은 구강 점막염 치료 또는 암치료 보조용으로 유용하게 사용할 수 있다.
- [0171] 이상의 설명으로부터, 본원이 속하는 기술분야의 당업자는 본원이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예 및 실험예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본원의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

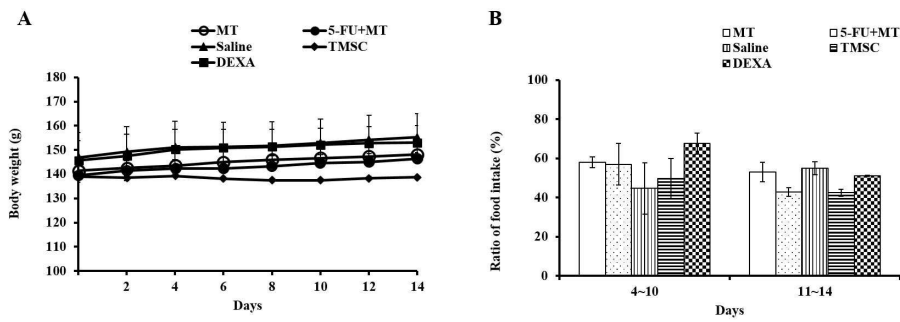
도면1



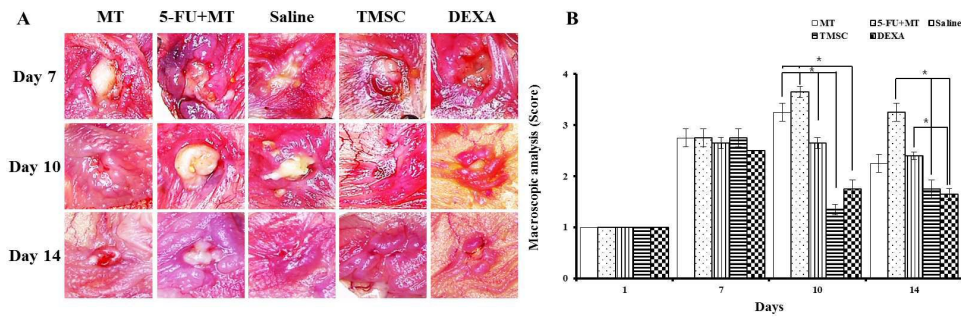
도면2



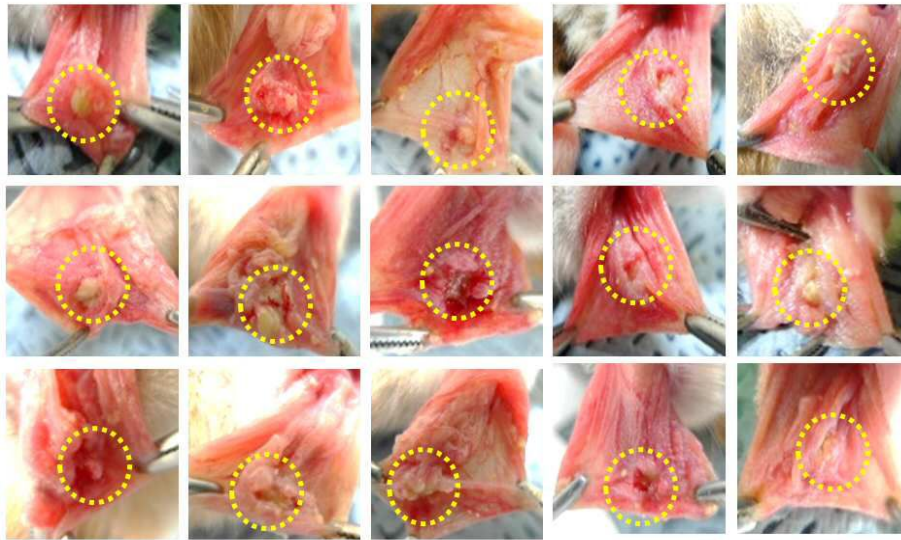
도면3



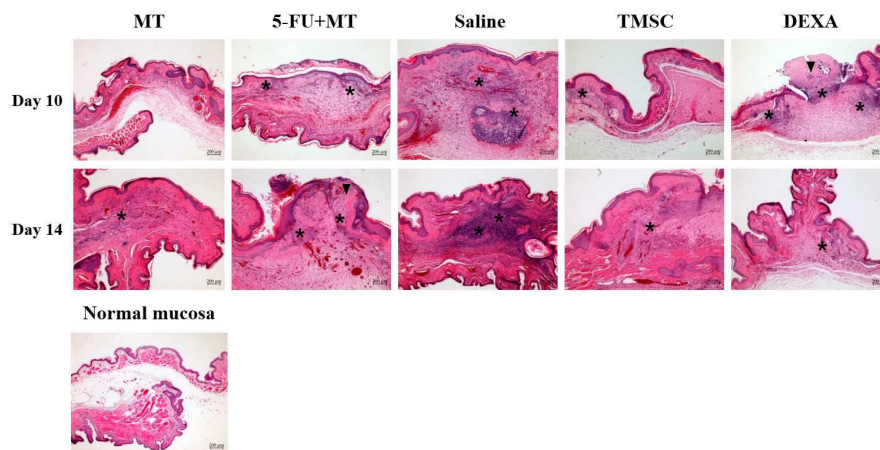
도면4



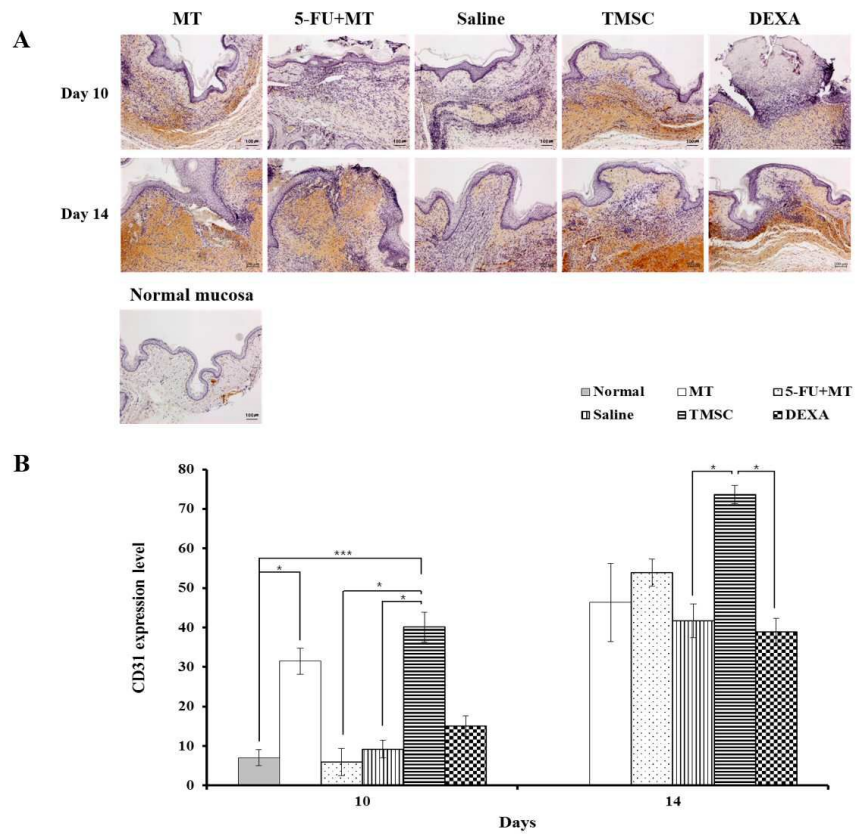
도면5



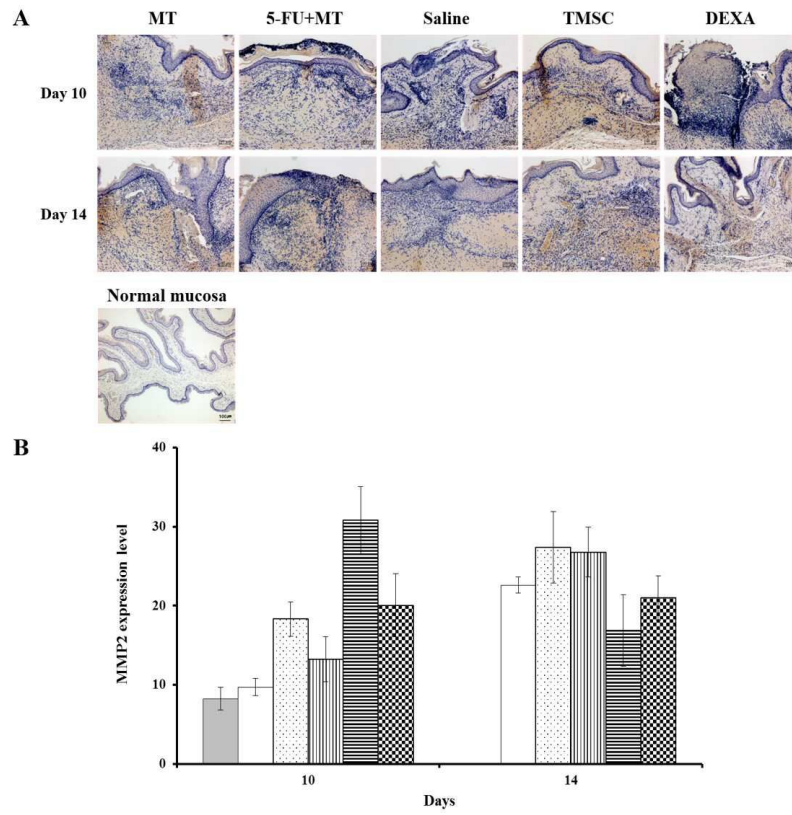
도면6



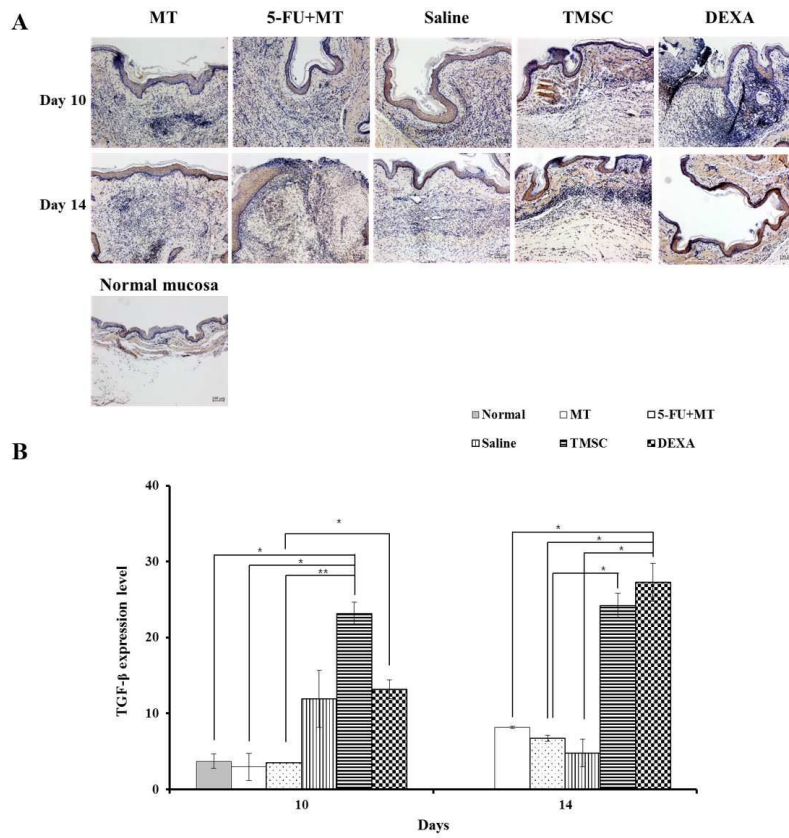
도면7



도면8



도면9



도면10

