



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0056794
(43) 공개일자 2020년05월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

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

A61K 38/17 (2006.01) A61P 35/04 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 35/28 (2013.01)

A23L 33/10 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2018-0140916

(22) 출원일자 2018년11월15일

심사청구일자 2018년11월15일

(71) 출원인

이화여자대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)

(72) 발명자

유경하

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

우소연

서울특별시 동대문구 왕산로19다길 7, 202호(제기동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김순웅

전체 청구항 수 : 총 14 항

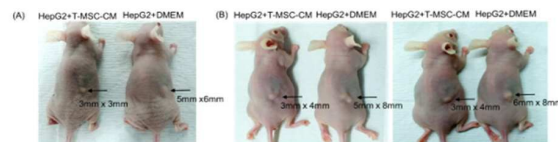
(54) 발명의 명칭 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정 배지를 포함하는 암 전이 억제용 조성물

(57) 요약

본 발명은 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정배지를 유효성분으로 포함하는 암 전이 억제, 암의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 조성물은 타 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정배지들과 상이한 단백질 프로파일을 가지고 이를 통해 EMT 억제작용으로 인한 암세포 이동 및 침투 등 암 전이를 초기 단계부터 억제하고 암세포 사멸을 유도하여, 암의 전이 억제와 암의 예방, 개선 및 치료에 우수한 효과를 가진다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

A61K 38/177 (2013.01)

A61P 35/04 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/308 (2013.01)

(72) 발명자

김한수

서울특별시 양천구 목동서로2길 22, 112동 310호(목동, 한신청구아파트)

박주원

서울특별시 양천구 목동동로 350, 506동 101호(목동, 목동신시가지아파트5단지)

김유희

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

조경아

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

박민화

경기도 부천시 상일로 71, 1816동 505호(상동, 반달마을 건영, 동아, 선경아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711069899

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 개인기초연구(과기정통부)

연구과제명 에스트로겐 결핍 골다공증 치료를 위한 편도줄기세포의 응용

기 여 율 1/1

주관기관 이화여자대학교

연구기간 2018.03.01 ~ 2019.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정배지를 유효 성분으로 포함하는 암 전이 억제용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정 배지는 무혈청 배지에서 배양된 배양액, 배양상층액 또는 이의 농축물인 암 전이 억제용 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정 배지는 CD109를 포함하는 것인 암 전이 억제용 약학 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정 배지는 EMT(epithelial-mesenchymal transition)를 억제하는 것인 암 전이 억제용 약학 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 암은 전이 암인 암 전이 억제용 약학 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 암은 폐암, 유방암, 간암, 대장암, 위암, 뇌암, 췌장암, 갑상선암, 피부암, 골수암, 림프종, 자궁암, 자궁경부암, 신장암 및 흑색종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 암 전이 억제용 약학 조성물.

청구항 7

편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정배지를 유효 성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정 배지는 무혈청 배지에서 배양된 배양액, 배양상층액 또는 이의 농축물인 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 9

제7항에 있어서, 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정 배지는 CD109를 포함하는 것인 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 10

제7항에 있어서, 암은 폐암, 유방암, 간암, 대장암, 위암, 뇌암, 췌장암, 갑상선암, 피부암, 골수암, 림프종, 자궁암, 자궁경부암, 신장암 및 흑색종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 11

편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정 배지를 포함하는 암 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정 배지는 무혈청 배지에서 배양된 배양액, 배양상층액

또는 이의 농축물인 암 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 13

제11항에 있어서, 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정 배지는 CD109를 포함하는 것인 암 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 14

제11항에 있어서, 암은 폐암, 유방암, 간암, 대장암, 위암, 뇌암, 췌장암, 갑상선암, 피부암, 골수암, 림프종, 자궁암, 자궁경부암, 신장암 및 흑색종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 암 예방 또는 개선용 식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정 배지를 유효성분으로 포함하는 암 전이 억제용 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0002] 본 발명은 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정 배지를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.
- [0003] 본 발명은 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정 배지를 포함하는 암 예방 또는 개선용 식품 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0004] 일반적으로 '종양(tumor)'은 신체 조직의 자율적인 과잉 성장에 의해 비정상적으로 자라난 덩어리를 의미하며, 양성종양(benign tumor)과 악성종양(malignant tumor)으로 구분할 수 있다. 양성종양이 비교적 성장 속도가 느리고 전이(metastasis; 종양이 원래 발생한 곳에서 멀리 떨어진 곳으로 이동함)되지 않는 것에 반해 악성종양은 주위 조직에 침윤하면서 빠르게 성장하고 신체 각 부위에 확산되거나 전이되어 생명을 위협하게 된다. 악성종양을 암과 동일한 의미로 생각할 수 있다.
- [0005] 상피간엽이행(EMT; epithelial-to-mesenchymal transition)은 상피세포가 전이 능력과 침윤능력을 가지는 세포로 변환하는 과정이며 이는 척추동물과 무척추동물 모두에서의 태생기에 조직과 기관의 발생을 포함하는 형태학적 발생의 기본적인 현상으로 간주되었지만 과학의 발전과 더불어 성인의 상처 치유 및 암의 생성, 진행과정에 있어서도 EMT가 중요하게 작용함이 입증되었다. EMT에서 가장 초기에 일어나고 가장 중요한 과정은 E-카데린(E-cadherin)에서 N-카데린(N-cadherin)으로 전환하는 카데린 변환이다. E-카데린은 막성 당단백질로 세포의 영역은 인접 세포의 E-카데린 분자와 결합하여 세포 간의 부착을 유지하고, 세포 내 영역은 α -, β - 및 p120 카데린과 결합하여 상피 세포의 극성과 세포골격을 형성한다. E-카데린은 TGF- β , Integrin, Wnt, RTK(receptortyrosine kinase), Notch 등 세포증식과 세포소멸에 관여하는 다양한 신호체계에 의해 조절된다. 이중 TGF- β 는 SMAD나 PI3K/AKT(phosphatidylinositol 3-kinase/serine-threonine kinase)에 작용하는데 이중 PI3K/AKT는 EMT를 활성화시키는데 중요한 역할을 담당한다고 보고되고 있다.
- [0006] 편도 유래 중간엽 줄기세포(Tonsil-derived mesenchymal stem cell conditioned medium)는 목의 안쪽과 코의 뒷부분에 위치하여 외부에서 침입하는 세균 등의 물질로부터 일차적으로 우리 몸을 방어함과 동시에 림프 상피면역 조직으로 작용을 수행하는 조직인 편도에서 유래된 자기 복제 능력을 가지면서 두개 이상의 새로운 세포로 분화하는 능력을 가진 미분화된 줄기세포를 의미한다. 편도 유래 중간엽 줄기세포에 관하여는, 피부 염증 질환에 대한 치료 효능, 만성 염증성 장질환에 대한 치료 효능 등에 관하여 보고된 바가 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0007] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허공보 제10-2016-0140451호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명은 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정 배지를 유효성분으로 포함하는 암 전이 억제용 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0009] 본 발명은 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정배지를 유효 성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0010] 본 발명은 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정 배지를 포함하는 암 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

과제의 해결 수단

- [0011] 본 발명자들은 암을 예방 또는 치료할 수 있는 적합한 종류의 세포 유래 물질들을 확인하던 중, 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정배지가 타 유래 중간엽 줄기세포들과 대비하여 다른 프로파일을 가지며, 이에 의해 암의 예방 및 치료, 특히 암의 전이 억제에 효과적임을 확인하여 본 발명을 완성하였다.
- [0012] 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 편도에 서 유래된 자기 복제 능력을 가지면서 두 개 이상의 새로운 세포로 분화하는 능력을 가진 미분화된 줄기세포를 의미한다.
- [0013] 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.
- [0014] 본 발명에서 용어 “예방”이란 본 발명에 따른 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정배지의 투여로 암의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 말한다. 본 발명에서 용어 “치료”는 본 발명에 따른 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정배지의 투여로 암의 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 말한다. 본 발명에서 용어 "개선"이란 본 발명의 조성물을 개체에 투여하거나 섭취시켜 암의 나쁜 상태를 좋게 하는 모든 행위를 의미한다.
- [0015] 본 발명에서 용어 “암 전이”는 악성 종양이 발병한 장기에서 떨어져 다른 조직으로 전파하는 상태를 말한다.
- [0016] 본 발명에서 전이 암일 수 있다. 즉, 암 세포가 원발 장기를 떠나 다른 장기로 이동하여 증식되어 발생한 암을 의미한다. 암이 신체 다른 부분으로 퍼지는 것은 크게 원발암에서 암 조직이 성장하여 직접적으로 주위 장기를 침습하는 것과 멀리 있는 다른 장기로 혈관이나 림프관을 따라 원격 전이를 하는 것으로 구분할 수 있다. 바람직하게는 다른 원발암에서 암이 위의 장기로 전이된 것을 의미할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 보다 상세하게 상기 전이암은 상피 중간엽 전이 과정을 통해 전이(metastasis) 및/또는 재발이 일어난 암이거나, 암 치료용 약물에 대한 내성을 가져 치료가 어려운 암일 수 있다.
- [0017] 이러한 암의 예로는 폐암, 유방암, 간암, 대장암, 위암, 뇌암, 췌장암, 갑상선암, 피부암, 골수암, 림프종, 자궁암, 자궁경부암, 신장암 및 흑색종로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.
- [0018] 본 발명은 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정 배지를 유효성분으로 포함하는 암 전이 억제용 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0019] 본 발명의 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정 배지는 병리현상의 전단계로 알려진 EMT(epithelial-mesenchymal transition)를 억제하는 것 특징으로 하며, EMT 억제작용으로 인한 암세포 이동 및 침투 등 암 전이를 초기 단계부터 억제한다.
- [0020] 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정배지는 타 유래 중간엽 줄기세포 및 이의 조정 배지와 대비하여 상이한 단백질 프로파일을 가진다.
- [0021] 구체적으로, 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정 배지는 다른 유래 중간엽 줄기세포 및 이의 배지와 다르게 CD109를 다량 함유하면서 TGF- β 수용체와 경쟁하여 TGF- β 와 결합함으로써 정상적인 TGF- β 신호전달을 저해하고, 이에 따라 EMT 억제를 통해 암의 전이를 억제한다.

- [0022] 또한, EMT에 관여하는 유전자들의 발현을 크게 억제하여 EMT 진행을 억제함으로써 암의 전이를 억제한다.
- [0023] 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 조정 배지의 양을 자유롭게 조절할 수 있다.
- [0024] 본 발명에 있어서, 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정배지는 개체로부터 분리, 배양 및 특수한 조작을 통해 제조된 것을 포함하며, 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품으로 사용되어 암에 사용될 수 있다.
- [0025] 본 발명에 있어서 암은 상기 언급된 바와 같다.
- [0026] 본 발명에 있어서, 편도 유래 중간엽 줄기세포는 당업계에서 알려진 방법에 따라 편도로부터 추출 가능하다. 예컨대, 대한민국등록특허 제10-1508413호 등에 기재된 방법에 따라 편도로부터 추출가능하다.
- [0027] 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정 배지는 편도 유래 중간엽 줄기세포를 배양하고 세포를 제거한 후, 수득된 배양액, 배양 상층액 또는 이의 농축물이거나 이의 동결건조물일 수 있다.
- [0028] 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.
- [0029] 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.
- [0030] 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.
- [0031] 상기 배지는 무혈청 배지일 수 있다. 바람직하게, 상기 무혈청 배지는 low glucose DMEM 배지일 수 있다.
- [0032] 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.
- [0033] 본 발명은 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정배지를 유효 성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0034] 본 발명에서 예방은 상기 조성물의 투여로 암의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미하며, 치료는 상기 조성물의 투여로 암의 증세가 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 의미한다.
- [0035] 본 발명에 따른 암 예방 또는 치료용 약학 조성물은 EMT(epithelial-mesenchymal transition)를 억제하여 암의 진행을 억제함으로써 암 세포 사멸을 유도하고 암의 전이를 억제하여 암의 예방 및 치료에 우수한 효과를 가진다.
- [0036] 본 발명의 약학 조성물은 통상의 방법에 따라 액제, 현탁액, 에멀전, 로션, 연고, 동결건조제 등 다양한 제형으로 제제화될 수 있다.
- [0037] 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 암 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, 세틸

알코올, 및 글리세롤 등과 같은 계면활성제를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 상기 약학적으로 허용되는 담체 및 희석제는 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 기재(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.

[0038] 또한, 당업계에서 통상적으로 사용하는 투여방법을 이용하여 투여될 수 있으며, 바람직하게는 치료가 필요한 환자의 질환 부위에 직접 투여가 가능하나 이에 한정되지는 않는다. 또한, 상기 투여는 카테터를 이용한 비외과적 투여 및 질환부위 절개 후 주입 등 외과적 투여방법 모두 가능하다. 투여량은 농축 정도에 따라 그 투여량이 달라질 수 있으나 10 μ l/kg 내지 1 ml/kg 체중을 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다.

[0039] 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.

[0040] 본 발명은 또한 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정 배지를 포함하는 암 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0041] 본 발명은 통상적으로 이용되는 식품으로써 일반적으로 사용될 수 있다.

[0042] 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 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.

[0043] 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.

[0044] 상기 "식품 첨가물 공전"에 수재된 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.

[0045] 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.

[0046] 또한, 본 발명의 식품 조성물은 암의 예방 및/또는 개선을 목적으로, 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조 및 가공할 수 있다.

[0047] 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.

[0048] 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).

[0049] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한이 없으며, 통상적인 의미에서의 건강기능식품을 모두 포함한다.

[0050] 본 발명은 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정배지를 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 암의 치료방법을 제공한다.

[0051] 본 발명에 "편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정배지", "암", "투여" 등의 용어는 상기에서 설명한 바와 동일하다.

[0052] 상기 대상체는 동물을 말하며, 전형적으로 본 발명의 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정배지를 이용한 치료로

유익한 효과를 나타낼 수 있는 포유동물일 수 있다. 이러한 대상체의 바람직한 예로 인간과 같은 영장류가 포함될 수 있다. 또한 이와 같은 대상체들에는 암의 증상을 갖거나 이와 같은 증상을 가질 위험이 있는 대상체들이 모두 포함될 수 있다.

[0053] 본 발명은 또한 암의 치료를 위한 약제의 제조에서 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정배지의 용도를 제공한다.

[0054] 본 발명은 또한 암의 치료에 사용하기 위한 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정배지를 포함하는 조성물을 제공한다.

[0055] 본 발명은 또한 암의 치료를 위한 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정배지의 용도를 제공한다.

발명의 효과

[0056] 본 발명의 조성물은 타 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정배지들과 상이한 단백질 프로파일을 가지고 이를 통해 EMT 억제작용으로 인한 암세포 이동 및 침투 등 암 전이를 초기 단계부터 억제하고 암세포 사멸을 유도하여, 암의 전이 억제와 암의 예방, 개선 및 치료에 우수한 효과를 가진다.

도면의 간단한 설명

[0057] 도 1은 유래를 달리하는 중간엽 줄기세포의 조정배지에서의 CM109 분비량을 확인한 결과를 나타낸다.

도 2는 TGF- β 처리에 의한 암 세포에서의 EMT 반응 유도를 확인한 결과를 나타낸다.

도 3은 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정배지 처리에 따른 암 세포의 증식 억제 및 전이 억제를 확인한 결과를 나타낸다.

도 4는 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정배지 처리에 따른 EMT 관련 유전자의 발현 변화를 확인한 결과를 나타낸다.

도 5는 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정배지 처리에 따른 암 세포주 이식 마우스 동물 모델에서의 암조직 형성 억제를 확인한 결과를 나타낸다.

도 6은 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정배지 처리에 따른 암세포 증식 억제 효과를 확인한 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0058] 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.

[0059] <실시예 1> 지방, 골수 또는 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이들의 조정배지의 제조

[0060] 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)으로부터 얻었다. 이는 대한민국 등록 특허 제10-1508413호의 제조방법과 유사하게 제조되었다.

[0061] 위 제조된 줄기세포로부터 조정 배지를 제조하기 위하여 Low glucose DMEM 로 편도 유래 중간엽 줄기세포를 배양하였다. 100mm culture tissue plate에 confluency 70-80% 가 되었을 때, 배지를 걷어내고 세포가 접시에 붙은 상태에서 PBS 로 네 번 세척 한 후 무혈청 배지 (Low glucose DMEM) 를 첨가하였다. 48시간 후, 배지를 걷어 1300 rpm 에서 5분간 원심분리 한 후 0.2 μ m filter 로 상층액을 여과시킨다. 여과된 배지는 centrifugal filtration (cut-off of 3K, Amicon Ultra-15, Millipore) 으로 20배 농축하여 실험에 이용하거나 -80° C에서 보관하였다.

[0062] 지방 유래 중간엽 줄기세포(AT-MSC)는 RNL Bio에서 제공되는 동일 계대의 세포를 사용하였으며, 골수 중간엽 줄기세포의 경우 서울 연세대학교 세브란스 병원 세포치료센터로부터 제공되는 동일 계대의 세포를 사용하였다. 조정 배지의 제조의 경우 위 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터의 조정 배지와 동일한 조건 하에 제조를 하였다.

[0063] <실시예 2> 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정 배지의 특성 확인

[0064] 유래를 달리하는 줄기세포의 조정배지의 특성을 확인하기 위하여 분비되는 단백질의 차이를 웨스턴 블랏을 통해 확인하였다.

[0065] 구체적으로, 골수 중간엽 줄기세포, 지방 중간엽 줄기세포, 편도 줄기세포로부터 수득한 조정배지 각 25 μ l 를

10% SDS PAGE 에서 전기영동하여 단백질을 분리시키고 PVDF membrane (Millipore) 에 전이시켰다. 전이된 membrane 은 5% 탈지분유액에 1시간동안 블로킹 한 후에 TBST 용액으로 3번 세척하였다. 일차 항체인 anti-CD109 antibody (B-9, mouse monoclonal, Santacruz Biotechnology)와 4° C에서 16시간 동안 반응시킨 후 TBST 용액으로 3번 세척하고 2차 항체인 anti-mouse antibody 와 1시간동안 상온에서 반응시켰다. TBST 로 세 번 세척한 뒤 ECL kit (Thermo scientific) 로 발색시켜 ImageQuant LAS 3000 (Fujifilm) 로 촬영하였다.

[0066] 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0067] 도 1의 A는 서로 다른 공여자들로부터의 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정배지(T-MSC-CM1, CM2, CM3)의 CD109을 확인한 결과를 나타낸다. 도 1의 A에서 확인할 수 있는 바와 같이, 모두 동일하게 높은 수준으로 CD109가 분비된 것을 확인할 수 있었다.

[0068] 반면, 도 1의 B는 유래가 다른 줄기세포의 조정 배지에서 분비 차이를 확인한 결과를 나타낸다. 도 1의 B에서 확인할 수 있는 바와 같이, 지방 유래(AD-MSC-CM) 및 골수 유래(BM-MSC-CM) 모두 CD109가 거의 확인되지 않고 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정 배지에서만 높게 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

[0069] 이는 TGF-β 시그널을 억제하는 단백질인 CD109 등이 EMT의 작용을 효과적으로 억제할 수 있고, 이러한 작용 효과가 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정배지를 통해서만 이루어질 수 있음을 보여준다.

[0070] <실시예 3> 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정배지 투여에 의한 TGF-β 유도 EMT 반응 억제

[0071] HepG2 세포를 6 well plate 에 seeding 하여 MEM 배지 (10% FBS, 1% penicillin / streptomycin)로 배양하였다. TGF-β 를 각각 0, 20, 50 ng/ml 농도로 첨가하여 72시간동안 배양하였다. 한편, 편도 줄기세포 조정배지의 첨가 효과를 확인하기 위해, 20 ng/ ml 농도의 TGF-β를 처리한 군에 편도 줄기세포의 조정배지 (10⁶ 세포로부터 얻은 양, 250ul)을 첨가하여 배양하였다.

[0072] 또한, TGF-β (20ng/ml) 를 처리하여 72시간 동안 배양한 HepG2 세포, TGF-β (20ng/ml) 와 편도 줄기세포 조정배지 (10⁶ 세포로부터 수득, 250 ul)을 함께 첨가하여 72시간 동안 배양한 HepG2 세포, 정상 대조군 HepG2 세포를 모아서 Trizol reagent (Invitrogen) 를 사용하여 전체 RNA 를 분리하였다. 분리한 전체 RNA 1ug에 5X Reverse transcription premix (ELPIS BIOTECH) 를 첨가하여 42° C에서 1시간동안 반응시켜 cDNA 를 합성 하였다. EMT 마커 유전자들인 human CD44, human CD133, human CD151, human EPCAM, human p53, human K19 의 발현을 하기 표 1의 특이적인 프라이머로 StepOnePlus real-time PCR system (Applied biosystems)에서 증폭시켜 확인하였다. 각 유전자들의 발현은 housekeeping 유전자인 gapdh 의 발현량으로 normalization 하였다. 각 샘플 간의 상대적인 발현량 차이는 2^{-ΔΔCT} 방법을 이용하여 산출하였다.

[0073] [표 1]

human CD44	5'-CTGCCGCTTTGCAGGTGTA-3' (서열번호 1)
	5'- CATTGTGGGCAAGGTGCTATT -3' (서열번호 2)
human CD133	5'- AGTCGGAAGTGGCAGATAGC -3' (서열번호 3)
	5'- GGTAAGTGTGTACTGGGCAAT-3' (서열번호 4)
human CD151	5'- ATGGGTGAGTTCAACGAGAAGA-3' (서열번호 5)
	5'- GCAGGCTGATGTAGTCACTCT-3' (서열번호 6)
human EPCAM	5'- AATCGTCAATGCCAGTGTACTT-3' (서열번호 7)
	5'- TCTCATCGCAGTCAGGATCATAA-3' (서열번호 8)
human P53	5'- GTTCCGAGAGCTGAATGAGG-3' (서열번호 9)
	5'- TCTGAGTCAGGCCCTTCGT-3' (서열번호 10)
human K19	5'- ACCAAGTTTGAGACGGAACAG-3' (서열번호 11)
	5'- CCCTCAGCGTACTGATTTTCT-3' (서열번호 12)
GAPDH	5'- GGTAAGTGGATATTGTTGCCATCAATG -3' (서열번호 13)
	5'- GGAGGGATCTCGTCTCTGGAAGATGGTG -3' (서열번호 14)

[0074]

[0075] 이와 별도로, HepG2 세포를 5uM 농도의 CFSE로 태깅 한 후 TGF-β (20ng/ml) 를 넣어 72시간 동안 배양하였다. 여기에 편도 줄기세포의 조정배지 (10⁶ 세포로부터 얻은 양, 250ul)을 첨가하거나 첨가하지 않고 배양하였다. 72시간후 유세포 분석기로 CFSE 형광 정도를 측정하였다.

[0076] TGF-β 처리에 의한 EMT 반응 유도를 확인하여, 그 결과를 도 2에 나타내었다.

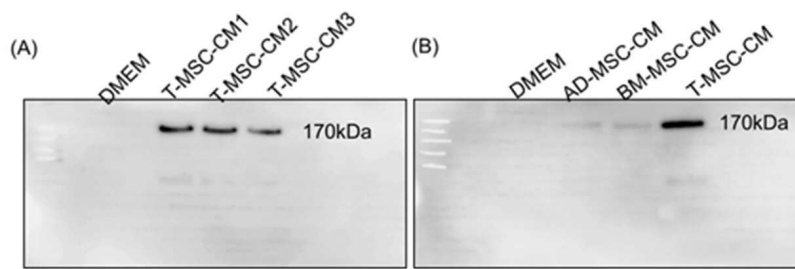
[0077] 도 2의 A에서 확인되는 바와 같이, 간암 세포주인 HepG2 세포에 TGF-β 를 첨가하여 72시간 배양한 결과, 세포

의 두드러진 증식을 확인할 수 있었다.

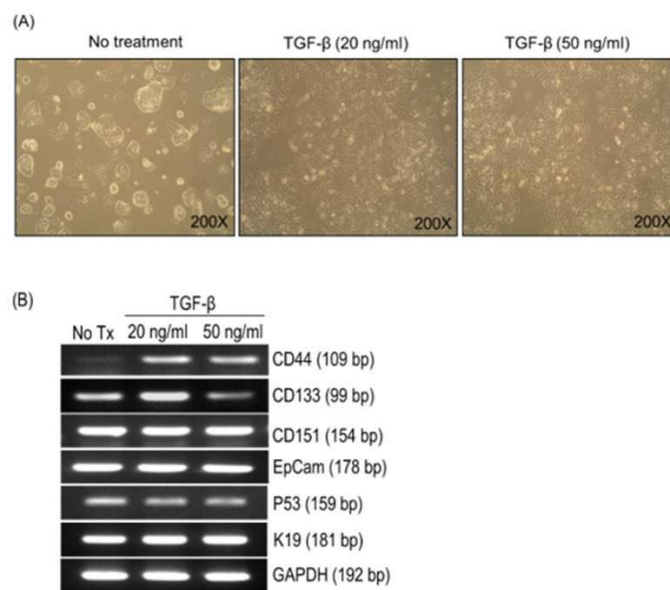
- [0078] 또한, EMT 관련 마커 유전자의 발현 변화를 본 결과, CD44, CD133, CD151, K19 가 20 ng/ml의 농도에서도 뚜렷하게 증가한 것을 확인할 수 있었다.
- [0079] 편도 줄기세포 조정배지에 의한 간암 세포주 증식 억제 효과를 확인하여, 그 결과를 도 3에 나타내었다.
- [0080] 도 3의 A는 현미경을 통하여 확인한 세포 증식 억제 효과를 나타내며, 3의 B는 CFSE 형광 측정에 따른 세포 증식 억제 효과를 나타낸다. CFSE는 살아있는 세포의 세포질에 염색되어 형광 정도를 측정하면 몇 번의 분열을 거쳤는지 알 수 있는데, 도 3의 히스토그램 상의 서로 다른 색깔의 peak 는 증식한 세포들의 generation을 의미한다. 도 3에서 확인되는 바와 같이 편도 유래 중간엽 줄기세포의 투여는 EMT 반응이 유도된 간암 세포에서 세포 증식을 억제하는 것을 확인할 수 있었다.
- [0081] 편도 줄기세포 조정배지에 의한 EMT 억제 효과를 확인하여, 그 결과를 도 4에 나타내었다. 도 4에서 확인되는 바와 같이, TGF- β 처리에 의해 증가된 CD44, CD133, CD151, K19 및 EPCAM의 발현 수준이 모두 감소하는 것을 확인할 수 있었다.
- [0082] 위 결과를 통해 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정배지가 EMT를 억제하여 암의 예방 및 치료에 우수한 효과를 나타내는 것을 확인할 수 있다.
- [0083] <실시예 3> 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정배지 투여에 의한 암 조직 형성 억제
- [0084] Balb/c nude 마우스 (수컷, 5주령)의 옆구리에 HepG2 세포 3×10^6 개를 이식하였다. 이때, 세포를 DMEM 배지에 부유시켜 주사하거나 혹은 편도 세포 조정배지 (7X105개 세포로부터 얻음)에 부유시켜 주사하였다. 그리고나서, Balb/c nude 마우스에 HepG2 세포 3×10^6 개를 이식하고 5일 후, 육안으로 보이는 암 조직을 분리하여 MEM 배지에 담아 잘게 chopping 하였다. Chopping 한 세포 부유액을 그대로 100mm plate에 seeding 하여 3일 후 배지를 걷어내고 현미경으로 관찰하였다.
- [0085] 위 결과를 도 5 및 6에 나타내었다.
- [0086] 도 5는 세포 이식후 5일(A) 및 9일(B)이 지났을 때 암의 크기를 확인한 결과를 나타낸다. 일반 DMEM 배지에 부유시켜 이식한 경우와 비교하여, 이식 부위에서 암 조직의 크기가 현저히 억제되었음을 확인하였다.
- [0087] 도 6은 간암 세포주 이식 마우스 모델에서 분리한 암 조직의 체외 배양시 편도 줄기세포 조정배지 이식군에서 분리한 조직 세포가 느리게 증식함을 보여준다.
- [0088] 도 6의 A는 배양 2일 및 9일째의 현미경 사진을 나타낸다. 마우스에 세포를 이식한 부위에 형성된 암조직을 분리하여 세포 부유액을 배양해본 결과 편도 줄기세포 조정배지를 함께 이식했던 마우스 유래의 암조직 세포들이 더디게 증식하는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 도 6의 B에서 확인되는 바와 같이, 배양 이틀째 현미경을 통해 세포들의 cluster를 확인하여 보면, 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정배지에서 배양한 조직이 클러스터 형성이 더 적게 이루어짐을 확인할 수 있었다. 이는 DMEM에서 키운 세포들이 세포간 상호작용이 활발하여 증식이 빠르게 진행된 반면, 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정 배지를 처리한 그룹은 그러한 작용이 적음을 보여준다.
- [0089] 위 확인되는 바와 같이, 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정 배지는 EMT (epithelial to mesenchymal transition)를 억제함으로써 암의 생성 및 진행을 억제하고 우수한 항암 효과를 가진다. 특히, 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정배지의 효과는 골수 유래 또는 지방 유래 중간엽 줄기세포의 조정배지들에서 확인되지 않는 인자들에 의한 것으로, 이를 통해 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정배지가 타유래 중간엽 줄기세포 및 이의 조정배지와 다른 특성을 지니고 암의 전이 억제, 암의 예방 및 치료에 우수한 효과를 나타내는 것을 확인하였다.

도면

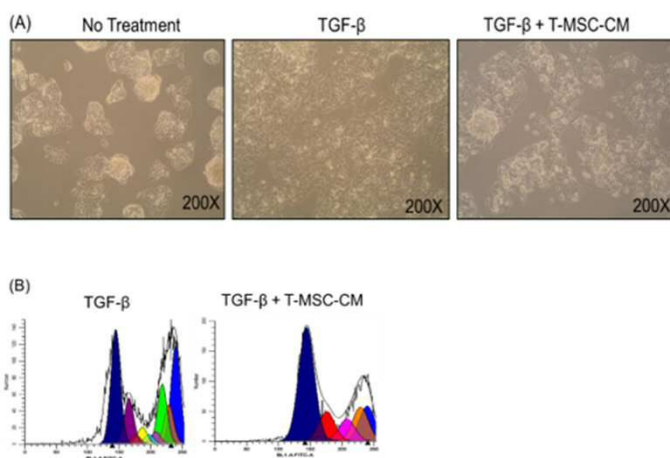
도면1



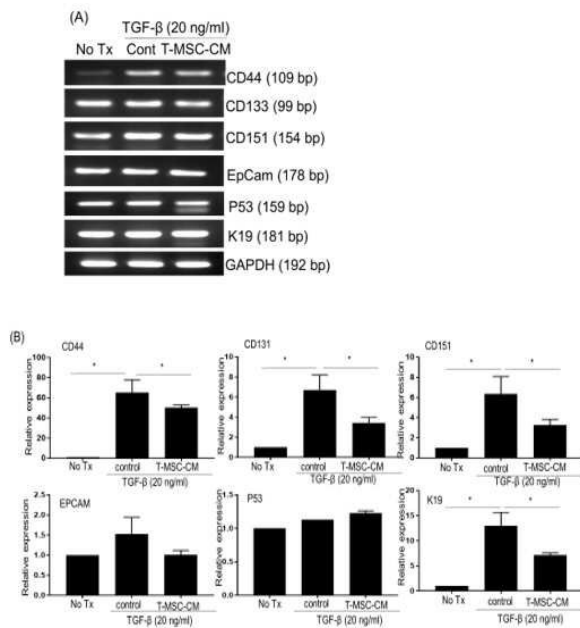
도면2



도면3



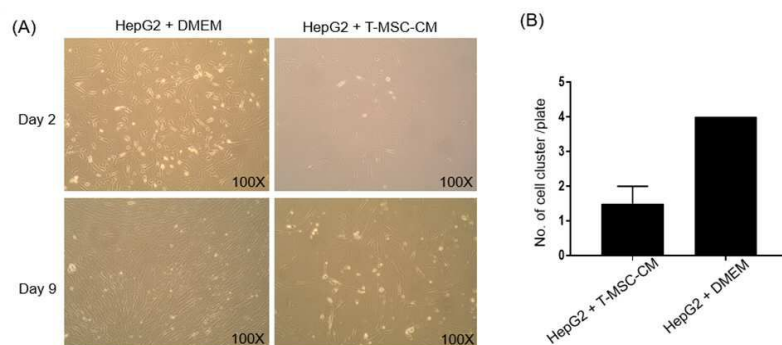
도면4



도면5



도면6



서열목록

- <110> EWAH UNIVERSITY - INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION
- <120> A COMPOSITION FOR INHIBITING CANCER METASTASIS COMPRISING
TONSIL-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELL CONDITIONED MEDIUM
- <130> EHWA1.50P

<160> 14
 <170> KoPatentIn 3.0
 <210> 1
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Human CD44 forward primer
 <400> 1
 ctgccgcttt gcaggtgta 19
 <210> 2
 <211> 21
 <212> DNA
 <213>
 > Artificial Sequence
 <220><223> Human CD44 reverse primer
 <400> 2
 cattgtgggc aagtgctat t 21
 <210> 3
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Human CD133 forward primer
 <400> 3
 agtcggaaac tggcagatag c 21
 <210> 4
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Human CD133 reverse primer
 <400> 4
 ggtagtggtg tactgggcc a 22
 <210> 5
 <211> 22
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human CD151 forward primer

<400> 5

atgggtgagt tcaacgagaa ga 22

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human CD151 reverse primer

<400> 6

gcaggctgat gtagtcactc t 21

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human EPCAM forward primer

<400> 7

aatcgtcaat gccagtgtac tt 22

<210> 8

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human EPCAM reverse primer

<400> 8

tctcatcgca gtcaggatca taa 23

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human p53 forward primer

<400> 9

gttccgagag ctgaatgagg 20

<210> 10

<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Human p53 reverse primer	
<400>	10	
tctgagtcag gcccttcgt		19
<210>	11	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Human K19 forward primer	
<400>	11	
accaagtttg agacggaaca g		21
<210>	12	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Human K19 reverse primer	
<400>	12	
ccctcagcgt actgatttcc t		21
<210>	13	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	GAPDH forward primer	
<400>	13	
ggtaaagtgg atattgttgc catcaatg		28
<210>	14	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	GAPDH reverse primer	
<400>	14	
ggagggatct cgctcctgga agatggtg		28