(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0135929
(43) 공개일자 2024년09월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/00 (2006.01) *A61K 35/28* (2015.01)
A61N 1/04 (2006.01) *A61N 1/32* (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 9/0009 (2013.01)
A61K 35/28 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0028949
(22) 출원일자 2023년03월06일
심사청구일자 2023년03월06일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
마대중
서울특별시 강남구 역삼로 306, 106동 1001호
신영주
서울특별시 강남구 도산대로70길 25, 201동 801호(청담동, 청담2차 e편한세상아파트)
(74) 대리인
특허법인본

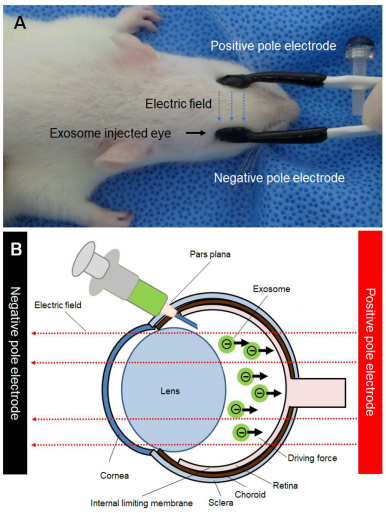
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 **전기천공법을 이용한 엑소좀의 망막 전달 방법**

(57) 요 약

본 발명은 전기천공법을 이용한 엑소좀의 망막 전달 방법에 관한 것이다. 본 발명은 전하를 갖는 약물을 안구 내에 주입하는 단계; 전류를 안구에 인가하여 망막과 각막 사이에 전기장을 형성함으로써, 안구 내 주입된 약물을 망막 내부로 전달하는 단계;를 포함하는, 전기천공에 의한 안구 내 약물 전달 방법을 제공한다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 9/0048 (2013.01)
A61N 1/0412 (2013.01)
A61N 1/327 (2013.01)
A61P 27/02 (2018.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711169961
과제번호 2021R1G1A1093576
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)
연구과제명 엑소좀을 이용한 망막변성질환 치료제 개발
기 여 율 1/1
과제수행기관명 한림대학교
연구기간 2021.09.01 ~ 2024.02.29

명 세 서

청구범위

청구항 1

전하를 갖는 약물을 안구 내에 주입하는 단계;

전류를 안구에 인가하여 망막과 각막 사이에 전기장을 형성함으로써, 안구 내 주입된 약물을 망막 내부로 전달하는 단계;를 포함하는, 전기천공에 의한 안구 내 약물 전달 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 약물은 10~100nm 크기의 엑소좀인, 전기천공에 의한 안구 내 약물 전달 방법.

청구항 3

제2항에 있어서,

망막과 각막 사이의 형성된 전기장은, 음전하를 약물이 주입된 안구의 각막에 인가하고 양전하를 약물이 주입되지 않은 다른 안구의 각막에 인가하여 망막에서 각막 방향으로 형성되는 것인, 전기천공에 의한 안구 내 약물 전달 방법.

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 약물은 인간 지방 유래 중간엽 줄기세포(human adipose-derived MSCS; hADSC)에서 유래한 엑소좀인, 전기천공에 의한 안구 내 약물 전달 방법.

청구항 5

전하를 갖는 약물을 안구 내에 주입하는 약물 공급부; 및

안구의 주변에 위치하여 전류를 인가하는 음극 전극 및 양극 전극;을 포함하는 안구 내 약물 전달 장치.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 약물은 10~100nm 크기의 엑소좀인, 안구 내 약물 전달 장치.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 음극 전극은 약물이 주입되는 안구의 주변에 위치하여, 약물이 주입되는 안구의 각막에 음전하를 인가하는 것이며,

상기 양극 전극은 약물이 주입되지 않는 안구의 주변에 위치하여, 약물이 주입되지 않은 안구의 각막에 양전하를 인가하고,

상기 전류를 인가하는 것에 의해 안구 내 각막과 망막 사이에 전기장이 형성되어, 약물이 망막 내부로 전달되는 것인, 안구 내 약물 전달 장치.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 약물은 인간 지방 유래 중간엽 줄기세포(human adipose-derived MSCS; hADSC)에서 유래한 엑소좀인, 안구

내 약물 전달 장치.

청구항 9

전하를 갖는 약물을 안구 내에 주입하는 약물 공급부; 및

안구의 주변에 위치하여 전류를 흐르게 하는 음극 전극 및 양극 전극;을 포함하고,

전류를 안구에 인가하여, 안구 내 주입된 약물을 망막 내부로 전달시키는 단계를 포함하는, 전기천공에 의한 안구 내 약물 전달 시스템.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 약물은 10~100nm 크기의 엑소좀인, 전기천공에 의한 안구 내 약물 전달 시스템.

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 음극 전극은 약물이 주입되는 안구의 주변에 위치하여, 약물이 주입되는 안구의 각막에 음전하를 인가하는 것이며,

상기 양극 전극은 약물이 주입되지 않는 안구의 주변에 위치하여, 약물이 주입되지 않은 안구의 각막에 양전하를 인가하고,

상기 전류를 인가하는 것에 의해 안구 내 각막과 망막 사이에 전기장이 형성되는 것인, 전기천공에 의한 안구 내 약물 전달 시스템.

청구항 12

제10항에 있어서,

상기 약물은 인간 지방 유래 중간엽 줄기세포(human adipose-derived MSCS; hADSC)에서 유래한 엑소좀인, 전기천공에 의한 안구 내 약물 전달 시스템.

청구항 13

제9항에 있어서,

상기 안구는 쥐의 안구인, 전기천공에 의한 안구 내 약물 전달 시스템.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 전기천공법을 이용한 엑소좀의 망막 전달 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 망막 변성은 신경절 세포, 광수용체 및 망막 색소 상피 세포를 포함하여 신경감각 망막 내의 여러 세포 유형의 악화로 인한 진행성 시력 상실을 특징으로 한다. 망막 변성은 연령 관련 황반과 같은 여러 질병에 의해 발생한다. 변성, 색소성 망막염, 스타르가르트병 및 녹내장은 전 세계적으로 돌이킬 수 없는 시력 손상 및 실명의 주요 원인 중 하나이다. 중간엽 줄기 세포(mesenchymal stem cells; MSC)는 성장 및 신경영양 인자, 면역 조절 특성, 항아폽토시스 특성 및 다계통 분화의 생산을 포함한 다양한 생물학적 기능으로 인해 망막 변성의 치료에 유망하다. 중간엽 줄기세포의 치료 효과의 기본 메커니즘은 잘 알려져 있지 않지만, 그 주변분비 효과가 추정된다.

[0003] 엑소좀은 단백질, mRNA 및 miRNA를 포함하는 직경 30-100nm의 인지질 이중층 세포외 소포이다. 이들은 세포 간 통신의 중요한 매개체로 보고되었으며 파라크린- 망막 변성의 MSC 기반 치료법을 대체할 수 있는 치료 물질로서

주목받고 있다.

[0004] 엑소좀은 유리체강내 주사를 통해 눈에 쉽게 전달될 수 있다. 유리체강에 주입된 엑소좀은 공동 전체에 확산에 의해 분포된다. 그러나 작용 대상은 눈 뒤쪽에 위치한 망막이다. 황반은 망막의 중심부로서 시각 기능의 많은 부분을 담당하는 부분으로 눈에서 가장 멀리 떨어진 눈의 뒤쪽에 위치한다. 또한, 엑소좀은 콜라겐의 망상 구조로 인하여 이동이 제한되며, 주입된 엑소좀은 빠른 속도로 안구 내에서 배출된다. 게다가, 망막에 엑소좀이 도달하더라도 처치 목표인 망막신경세포들에 도달하기 위해서는 망막 내 여러 물리적인 장벽을 통과해야 하고, 망막신경세포들은 식세포 작용이 없어 엑소좀을 세포 내로 흡수시키지 못한다. 따라서 유리체강내 주사를 통해 고농도의 엑소좀을 망막 및 황반부에 효과적으로 전달하기 어렵다.

[0005] 생체 내 전기천공법은 관심 물질을 조직에 전달하기 위한 비침습적 방법이며, 약물의 국소 전달 효율을 높이는 유용성 때문에 안과 분야에서 관심을 받아 왔다. 전기천공법은 전기 펄스를 순간적으로 인가하여 세포막의 투과성을 일시적으로 높여 물질을 전달하는 방법이다.

[0006] 본 연구에서, 우리는 생체 내 전기천공을 수행하여 인간 지방 유래 중간엽 줄기세포(human adipose-derived MSCS; hADSC)에서 유래한 유리체내 주사된 엑소좀의 망막 전달을 증가시키는 것을 확인했다. 이 새로운 기술은 엑소좀의 유리체강내 주입을 통해 망막 변성의 치료 효율을 향상시키는 데 기여할 것이다.

선행기술문헌

[0008] 1. Van Gelder RN, Chiang MF, Dyer MA, et al. Regenerative and restorative medicine for eye disease. Nat Med 2022;28(6):1149-1156; doi:10.1038/s41591-02201862-8

[0009] 2. Puertas-Neyra K, Usategui-Martín R, Coco RM, et al. Intravitreal stem cell paracrine properties as a potential neuroprotective therapy for retinal photoreceptor neurodegenerative diseases. Neural Regen Res 2020;15(9):1631-1638; doi:10.4103/1673-5374.276324

[0010] 3. Holan V, Palacka K, Hermankova B. Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy for Retinal Degenerative Diseases: Experimental Models and Clinical Trials. Cells 2021;10(3); doi:10.3390/cells10030588

[0011] 4. Mead B, Hill LJ, Blanch RJ, et al. Mesenchymal stromal cell-mediated neuroprotection and functional preservation of retinal ganglion cells in a rodent model of glaucoma. Cytotherapy 2016;18(4):487-96; doi:10.1016/j.jcyt.2015.12.002

[0012] 5. Fu S, Wang Y, Xia X, et al. Exosome engineering: Current progress in cargo loading and targeted delivery. NanoImpact 2020;20:100261; doi:10.1016/j.impact.2020.100261

[0013] 6. Lener T, Gimona M, Aigner L, et al. Applying extracellular vesicles based therapeutics in clinical trials - an ISEV position paper. J Extracell Vesicles 2015;4:30087; doi:10.3402/jev.v4.30087

[0014] 7. del Amo EM, Rimpelä A-K, Heikkinen E, et al. Pharmacokinetic aspects of retinal drug delivery. Prog Retin Eye Res 2017;57:134-185; doi:https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2016.12.001

[0015] 8. Stjernschantz J, Astin M. Anatomy and physiology of the eye. Physiological aspects of ocular drug therapy. In: Biopharmaceutics of ocular drug delivery. CRC Press: Boca Raton, FL; 2019; pp. 1-25.

[0016] 9. Eljarrat-Binstock E, Domb AJ. Iontophoresis: A non-invasive ocular drug delivery. J Control Release 2006;110(3):479-489; doi:https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.09.049

[0017] 10. Dezawa M, Takano M, Negishi H, et al. Gene transfer into retinal ganglion cells by in vivo electroporation: a new approach. Micron 2002;33(1):1-6; doi:https://doi.org/10.1016/S0968-4328(01)00002-6

[0018] 11. Mo X, Yokoyama A, Oshitari T, et al. Rescue of Axotomized Retinal Ganglion Cells by BDNF Gene Electroporation in Adult Rats. Invest Ophthalmol Vis Sci 2002;43(7):2401-2405

[0019] 12. Ishikawa H, Takano M, Matsumoto N, et al. Effect of GDNF gene transfer into axotomized retinal

ganglion cells using in vivo electroporation with a contact lens-type electrode. Gene Ther 2005;12(4):289-298; doi:10.1038/sj.gt.3302277

[0020] 13. Andrieu-Soler C, Doat M, Halhal M, et al. Enhanced oligonucleotide delivery to mouse retinal cells using iontophoresis. Mol Vis 2006;12:1098-107

[0021] 14. Sheppard J, Garg S, Lievens C, et al. Iontophoretic Dexamethasone Phosphate Compared to Topical Prednisolone Acetate 1% for Noninfectious Anterior Segment Uveitis. Am J Ophthalmol 2020;211:76-86; doi:10.1016/j.ajo.2019.10.032

[0022] 15. Behar-Cohen F, Halhal M, BenEzra D, et al. Reversal of corneal graft rejection by iontophoresis of methylprednisolone. Exp Eye Res 2002;43(13):2214-2214

[0023] 16. Horwath-Winter J, Schmut O, Haller-Schober E, et al. Iodide iontophoresis as a treatment for dry eye syndrome. 2005;89(1):40-44

[0024] 17. Kim J, You GE, Woo M, et al. Discovery of Lactoferrin as a Stimulant for hADSC-Derived EV Secretion and Proof of Enhancement of Resulting EVs through Skin Model. Int J Mol Sci 2021;22(20); doi:10.3390/ijms222010993

[0025] 18. de Melo J, Blackshaw S. In vivo electroporation of developing mouse retina. J Vis Exp 2011;52:2847; doi:10.3791/2847

[0026] 19. Kuriyan AE, Albini TA, Townsend JH, et al. Vision Loss after Intravitreal Injection of Autologous "Stem Cells" for AMD. N Engl J Med 2017;376(11):1047-1053; doi:10.1056/NEJMoa1609583

[0027] 20. Nuzzi R, Caselgrandi P, Vercelli A. Effect of Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes on Retinal Injury: A Review of Current Findings. Stem Cells Int 2020;2020:8883616; doi:10.1155/2020/8883616

[0028] 21. Wang Y, Tang Z, Gu P. Stem/progenitor cell-based transplantation for retinal degeneration: a review of clinical trials. Cell Death Dis 2020;11(9):793; doi:10.1038/s41419-020-02955-3

[0029] 22. Peeters L, Sanders NN, Braeckmans K, et al. Vitreous: a barrier to nonviral ocular gene therapy. Invest Ophthalmol Vis Sci 2005;46(10):3553-3561; doi:10.1167/iovs.05-0165

[0030] 23. Xu Q, Boylan NJ, Suk JS, et al. Nanoparticle diffusion in, and microrheology of, the bovine vitreous ex vivo. J Control Release 2013;167(1):76-84; doi:10.1016/j.jconrel.2013.01.018

[0031] 24. Midekessa G, Godakumara K, Ord J, et al. Zeta Potential of Extracellular Vesicles: Toward Understanding the Attributes that Determine Colloidal Stability. ACS Omega 2020;5(27):16701-16710; doi:10.1021/acsomega.0c01582

[0032] 25. Krueger TEG, Thorek DLJ, Denmeade SR, et al. Concise Review: Mesenchymal Stem Cell-Based Drug Delivery: The Good, the Bad, the Ugly, and the Promise. Stem Cells Transl Med 2018;7(9):651-663; doi:10.1002/sctm.18-0024

[0033] 26. Merodio M, Irache JM, Valamanesh F, et al. Ocular disposition and tolerance of ganciclovir-loaded albumin nanoparticles after intravitreal injection in rats. Biomaterials 2002;23(7):1587-94; doi:10.1016/s0142-9612(01)00284-8

[0034] 27. Gan L, Wang J, Zhao Y, et al. Hyaluronan-modified core-shell liponanoparticles targeting CD44-positive retinal pigment epithelium cells via intravitreal injection. Biomaterials 2013;34(24):5978-87; doi:10.1016/j.biomaterials.2013.04.035

[0035] 28. Friend DS, Papahadjopoulos D, Debs RJ. Endocytosis and intracellular processing accompanying transfection mediated by cationic liposomes. Biochim Biophys Acta 1996;1278(1):41-50

[0036] 29. Tuovinen L, Ruhanen E, Kinnarinen T, et al. Starch acetate microparticles for drug delivery into retinal pigment epithelium—in vitro study. J Control Release 2004;98(3):407-413

[0037] 30. Ruponen M, Ylä-Herttuala S, Urtti AJBeBA-B. Interactions of polymeric and liposomal gene delivery

systems with extracellular glycosaminoglycans: physicochemical and transfection studies. Biochim Biophys Acta 1999;1415(2):331341; doi:10.1016/s0005-2736(98)00199-0

[0038] 31. Bejjani RA, Andrieu C, Bloquel C, et al. Electrically Assisted Ocular Gene Therapy. Surv Ophthalmol 2007;52(2):196-208; doi:https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2006.12.005

[0039] 32. Beit-Yannai E, Tabak S, Stamer WD. Physical exosome:exosome interactions. J Cell Mol Med 2018;22(3):2001-2006; doi:10.1111/jcmm.13479

[0040] 33. Lurquin PF. Gene transfer by electroporation. Mol Biotechnol 1997;7(1):5-35; doi:10.1007/BF02821542

[0041] 34. Uemura A, Mizota A, Sato E, et al. Effect of in vivo Electroporation on Rat Retina. Invest Ophthalmol Vis Sci 2003;44(13):1904-1904

[0042] 35. Luan X, Sansanaphongpricha K, Myers I, et al. Engineering exosomes as refined biological nanoplatforms for drug delivery. Acta Pharmacol Sin 2017;38(6):754-763; doi:10.1038/aps.2017.12

발명의 내용

해결하려는 과제

[0043] 본 발명은, 약물을 안구의 망막 내부로 전달시키는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0044] 본 개시의 목적들은 이상에서 언급한 목적으로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 본 개시의 다른 목적 및 장점들은 하기의 설명에 의해서 이해될 수 있고, 본 개시의 실시 예에 의해 보다 분명하게 이해될 것이다. 또한, 본 개시의 목적 및 장점들은 특허 청구 범위에 나타낸 수단 및 그 조합에 의해 실현될 수 있음을 쉽게 알 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0045] 본 발명은 전하를 갖는 약물을 안구 내에 주입하는 단계; 전류를 안구에 인가하여 망막과 각막 사이에 전기장을 형성함으로써, 안구 내 주입된 약물을 망막 내부로 전달하는 단계;를 포함하는, 전기천공에 의한 안구 내 약물 전달 방법을 제공한다.

[0046] 상기 안구는 쥐, 곤충, 인간 등 동물의 안구를 의미하며, 바람직하게는 쥐 또는 인간의 안구를 의미한다.

[0047] 상기 망막과 각막 사이의 형성된 전기장은, 음전하를 약물이 주입된 안구의 각막에 인가하고 양전하를 약물이 주입되지 않은 다른 안구의 각막에 인가하여 망막에서 각막 방향으로 형성되는 것이다.

[0048] 상기 전기장은 전압 60~100, 바람직하게는 70~90, 더욱 바람직하게는 80V이고 지속 시간은 30~70ms, 바람직하게는 40~60ms, 더욱 바람직하게는 50ms인 펄스를 인가하여 형성된다. 각 펄스 사이의 간격은 800~1000ms, 바람직하게는 900~1000ms, 더욱 바람직하게는 950 ms이다.

[0049] 본 발명은 또한, 전하를 갖는 약물을 안구 내에 주입하는 약물 공급부; 및 안구의 주변에 위치하여 전류를 인가하는 음극 전극 및 양극 전극;을 포함하는 안구 내 약물 전달 장치를 제공한다.

[0050] 상기 약물 공급부는 약물을 안구 내에 주입할 수 있는 장치이면 제한되지 않으나, 약물을 저장하는 약물 저장부, 약물을 배출하는 노즐부, 저장부와 노즐부를 연결하는 라인부를 포함하는 장치일 수 있으며, 바람직하게는 주사기이다.

[0051] 상기 음극 전극은 약물이 주입되는 안구의 주변에 위치하여, 약물이 주입되는 안구의 각막에 음전하를 인가하는 것이며, 상기 양극 전극은 약물이 주입되지 않는 안구의 주변에 위치하여, 약물이 주입되지 않은 안구의 각막에 양전하를 인가하고, 상기 전류를 인가하는 것에 의해 안구 내 각막과 망막 사이에 전기장이 형성되어, 약물이 망막 내부로 전달되는 것이다.

[0052] 본 발명은 또한, 전하를 갖는 약물을 안구 내에 주입하는 약물 공급부; 및 안구의 주변에 위치하여 전류를 흐르게 하는 음극 전극 및 양극 전극;을 포함하고, 전류를 안구에 인가하여, 안구 내 주입된 약물을 망막 내부로 전달시키는 단계를 포함하는, 전기천공에 의한 안구 내 약물 전달 시스템을 제공한다.

[0053] 상기 약물은 10~100nm 크기의 엑소좀일 수 있다.

[0054] 상기 음극 전극은 약물이 주입되는 안구의 주변에 위치하여, 약물이 주입되는 안구의 각막에 음전하를 인가하는 것이며, 상기 양극 전극은 약물이 주입되지 않는 안구의 주변에 위치하여, 약물이 주입되지 않은 안구의 각막에 양전하를 인가하고, 상기 전류를 인가하는 것에 의해 안구 내 각막과 망막 사이에 전기장이 형성되는 것일 수 있다.

[0055] 상기 약물은 인간 지방 유래 중간엽 줄기세포(human adipose-derived MSCS; hADSC)에서 유래한 엑소좀일 수 있다.

[0056] 상기 안구는 쥐의 안구일 수 있다.

발명의 효과

[0057] 본 발명에 따르면, 전기천공법을 통해 약물, 바람직하게는 인간 지방 유래 중간엽 줄기세포에서 유래한 엑소좀을 안구에 투여하고, 망막 내부로 전달할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0058] 도 1은, 본 발명의 전기천공법에 의한 안구 내 약물 전달 방법을 나타낸 것으로, (A)는 전기 천공을 위해 쥐에 부착된 핀셋 전극의 방향으로서, 엑소좀을 주입한 눈에는 음극 전극을, 주입하지 않은 눈에는 양극 전극을 부착한 것을 나타낸 것이며, (B)는 전기장 및 엑소좀 움직임의 방향을 보여주는 흐름도로서, 빨간색 점선 화살표는 전기장의 방향을 나타내고 검은색 화살표는 음전하를 띤 엑소좀에 가해지는 구동력을 나타낸다.

도 2는, 전기천공법 실험 후 쥐의 망막의 대표 망막 평면 마운트 이미지를 나타낸 것으로서, A~C는 5× 배율로 촬영한 전체 망막 편평 마운트 이미지, D~F는 최종 배율 5배(축척 막대: 50㎛)로 얻은 동일한 눈의 시신경 중심 이미지를 나타낸다. (A, D): 대조군, (B, E): 전기천공을 하지 않은 그룹, (C, F): 전기천공을 수행한 그룹.

도 3은, 망막에서 엑소좀 흡수를 확인하는 각 그룹에 대한 대표적인 공초점 현미경 이미지(축척 막대: 20㎛)를 나타낸다. A~C는 전기 천공을 수행하지 않은 그룹에 대한 망막 표면에서 (A) 9, (B) 16 및 (C) 28 ㎛의 깊이에서의 이미지를 나타낸 것이고, D~F는 전기 천공을 수행한 그룹의 망막 표면에서 (D) 2.5, (E) 9.5 및 (F) 19.5 ㎛ 깊이에서의 이미지를 나타낸다.

도 4는, 각 그룹의 모든 눈의 망막에서 엑소좀 흡수의 정량화를 나타낸다. *P<0.05.

도 5는, 각 그룹에 대한 대표적인 망막 조직 절편을 헤마톡실린 및 에오신으로 염색한 이미지를 나타낸다(눈금 막대: 50 ㎛). (A) 대조군. (B) 전기천공법을 수행하지 않은 군. (C) 유리체강내 주사를 받은 후 전기천공법을 수행한 안구. (D)는 (C)의 반대쪽 안구.

도 6은, 말단 데옥시뉴클레오티딜 트랜스퍼라제-매개 데옥시우리딘 닉 엔드 라벨링(TUNEL)으로 염색된 전기천공 그룹에 대한 대표적인 망막 조직학적 절편의 이미지를 나타낸다(축척 막대: 50 ㎛). GCL, 신경절 세포층; INL, 내부 핵층; ONL, 외부 핵층; PRL, 광 수용체 층; TUNEL, 말단 데옥시뉴클레오티딜 트랜스퍼라제-매개 데옥시우리딘 닉 및 라벨링.

도 7은, Hoechst 33342(축척 막대: 50㎛)로 핵 염색 후 각 그룹에 대한 대표적인 망막 조직학적 절편의 이미지를 나타낸다. 왼쪽 열: 전기천공 수행하지 않은 그룹; 오른쪽 열: 전기천공 수행한 그룹.

도 8은, 각 그룹의 대표 각막 이미지를 나타낸다. (A) 대조군. (B) 전기천공법을 수행하지 않은 그룹. (C) 유리체강내 주사를 받은 눈에 전기천공법을 수행한 그룹. (D) (C)의 반대쪽 눈.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0059] 이하 본원을 실시예 및 실험예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예 및 시험예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본원의 범위가 이들 실시예 및 시험예에 한정되는 것은 아니다.

[0060] **실험 방법**

[0061] 인간 지방 유래 중간엽 줄기세포(hADSC) 분리 및 배양

[0062] 본 발명자들은 hADSC를 분리하고 배양했다. 구체적으로는, 지방 흡입 수술을 통해 정보에 입각한 동의를 얻은 30세 남성 환자로부터 얻은 인간 지방 조직을 0.075%(w/v) Type II 콜라게나아제(Sigma-Aldrich, St. Louis,

MO, USA)를 37°C에서 40분 동안 부드럽게 교반하였다. 분리된 hADSC는 α-minimum essential medium(α-MEM; Welgene, Gyeongsan, Gyeongsang, Republic of Korea), 10% fetal bovine serum(Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Germany) 및 5 ng/mL의 기본 섬유아세포 성장 인자(R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)를 포함하는 확장 배지에서 배양되었다. hADSC에는 확장 배지가 공급되었고 80% 합류점에서 계대배양되었다. 본 연구는 한림대학교 의료원 임상심사위원회(IRB)의 승인을 받았습니다(IRB no. 2017-118).

[0063] hADSC 조절 미디어 준비

[0064] 계대수 6의 hADSC를 2.5×10^3개 세포/cm^2의 밀도로 시딩하고 확장 배지에서 3일 동안 배양하였다. 80% 합류점에서 세포를 PBS(phosphate-buffered saline)로 1회 세척하고 α-MEM으로 24시간 동안 배양하였다. 조정 배지에서 hADSC의 잔여물을 PBS로 세척하여 제거했습니다. hADSC를 10% 입자 고갈된 혈청 대체물(XenoFree CTS; Gibco Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)을 포함하는 α-MEM을 함유하는 엑소좀 배지에서 2일 동안 배양하였다. 엑소좀을 포함하는 컨디셔닝된 배지를 수확하고 0.22-μm 바틀-탑 진공 필터(Corning, Inc., Corning, NY, USA)를 사용하여 여과했다.

[0065] hADSC 컨디셔닝 미디어에서 엑소좀 분리

[0066] 500-kDa 컷오프 중공 섬유 막(EMD Millipore Corp., Billerica, MA, USA)이 장착된 접선 유동 여과(tangential flow filtration; TFF) 시스템을 사용하여 hADSC 조절 배지에서 엑소좀을 분리했다. 컨디셔닝된 매체(1-2L)에 TFF 시스템을 적용했다. TFF 시스템의 유체 속도는 180rpm으로 유지되었다. 시스템의 압력은 1.5psi를 초과하지 않았다. 이후 필터에 PBS 12L를 첨가하여 잔류 엑소좀을 씻어내어 높은 수율을 얻었다. 얻어진 엑소좀을 0.22㎛ 바틀-탑 진공 필터(Corning, Inc.)에 통과시켰다.

[0067] ExoGlow에 의한 엑소좀의 형광 라벨링

[0068] 생체 내 추적을 위해 제조업체의 프로토콜에 따라 ExoGlow-Protein EV 라벨링 키트(System Biosciences, Palo Alto, CA, USA)로 엑소좀을 라벨링했다. 간단히 말해서, 엑소좀(100μg)을 1μL의 ExoGlow 및 12μL의 반응 완충액과 혼합하고 실온에서 30분 동안 배양했다. 미표지 염료는 크기 배제 컬럼(PD SpinTrap™ G-25; GE Healthcare, Little Chalfont, UK)을 사용하여 1분 동안 회전시켜 제거했다.

[0069] 동물

[0070] 40마리의 Sprague-Dawley 쥐(생후 6주)의 오른쪽 눈을 다음 두 그룹 중 하나에 무작위로 할당했다: 전기천공법(유리체강내 주사 후 전기천공술을 받은 쥐, n = 20) 및 전기천공법 없음(유리체강내 주사만 받은 쥐, n = 20). 각 쥐의 오른쪽 눈만 치료를 받았다. 주사 또는 전기천공을 실시하지 않은 무전기천공군 쥐의 왼쪽 눈을 대조군(대조군)으로 사용하였다. 모든 절차는 한림대학교 의료원 임상연구소(IACUC no. 2021-3-0315-05)의 기관 동물 관리 및 사용 위원회(IACUC)의 승인을 받았으며, 시력 연구 협회 및 안과 및 시력 연구에서 동물 사용에 대한 성명서에 따라 수행되었다.

[0071] 엑소좀 유리체강내 주입

[0072] 자일라진(Rompun; Bayer, Seoul, Korea) 10 mg/kg과 alfaxalone(Alfaxan Multidose; Careside, 성남, 대한민국) 20 mg/kg을 혼합하여 복강내 주사하여 쥐를 마취시켰다. 0.5% 프로파라카인 염산염(파라카인점안제, 한미약품, 대한민국 서울)을 이용하여 각막마취 후 0.5% 트로피카미드와 0.5% 페닐에프린의 혼합액(트로페린 점안제, 한미약품)을 이용하여 산동(mydriasis)을 시행하였다.

[0073] 유리체강내 주입 후 안압을 낮추고 엑소좀의 유출을 제한하기 위해 전방 천자를 시행하였다. 공막을 노출시키기 위해 평면부 결막을 절개한 후, 해밀턴 마이크로시린지(Hamilton, Reno, NV, 미국)에 연결된 33-게이지 블런트 니들을 사용하여 유리체강 내 공간으로 천천히 3.2 10^6 입자를 함유하는 엑소좀 서스펜션 10㎕를 주입하였다. 주입된 엑소좀의 역류를 방지하기 위해 바늘을 몇 초 동안 제자리에 유지하고 천천히 빼냈다.

[0074] 전기천공법

[0075] 엑소좀 주입 직후 양쪽 각막에 핀셋(Tweezertrodes Electrode; BTX, San Diego, CA, USA)의 양쪽 끝에 직경 5mm의 디스크 전극을 부착하였다. 음극 전극은 주사한 눈(우안)에, 양극 전극은 주사하지 않은 눈(좌안; 도 1A)에 두었다. 이로 인해, 주사한 안구의 각막과 망막 사이에 전기장이 형성된다. 상기 전기장은 음으로 하전된 엑소좀을 망막으로 이동시킨다.

[0076] 펄스 발생기(ECM 399 Generator; BTX, San Diego, CA, USA)를 사용하여 5개의 사각 펄스를 적용하여 전기천공을 수행하였다. 각 펄스의 전압은 80V(전계 강도는 40V/cm)이고 지속 시간은 50ms이다. 펄스 사이의 간격은 950 ms였다. 전기천공 시 양극에서 음극으로 전기장이 형성되고 음으로 하전된 엑소좀이 주입된 안구의 망막 표면을 향해 구동된다(도 1B).

[0077] 상기 전기장에 의해 엑소좀은 망막으로 이동되며, 높은 전압의 전류를 짧은 시간 동안 인가하는 펄스에 의하여 망막내 장벽이 일시적으로 약해져 망막 내부로 엑소좀이 전달된다.

[0078] 망막 평면 마운트

[0079] 엑소좀 주사 및 전기천공법 24시간 후 쥐를 안락사시키고 양쪽 눈을 적출하였다. 적출된 각 안구는 실온에서 밤새 10% 중성 완충 포르말린에 고정되었다. 각막, 수정체, 유리체액을 제거하여 안구를 준비하였다. 망막 표면을 PBS로 여러 번 세척하여 부착된 엑소좀을 제거하고 망막에 흡수되는 것을 방지하였다. 망막 조직을 공막과 맥락막으로부터 분리하여 유리 슬라이드에 평평하게 장착하고 Fluoroshield Mounting with DABCO(Immuno BioScience, Mukilteo, WA, USA)를 사용하여 장착했다. 슬라이드는 Leica DFC450 C 카메라(Leica, Wetzlar, Germany) 및 Zeiss LSM 710 공초점 현미경(미국 뉴욕주 화이트 플레인스)이 장착된 Leica DMi8 현미경을 사용하여 이미지화되었다.

[0080] 망막 조직학적 절편

[0081] 엑소좀 주사 및 전기천공법 24시간 후 쥐를 상기 기재된 바와 같이 마취시키고, PBS에 이어 4% 포름알데히드 용액으로 경심장 관류시켰다. 눈을 적출하고 즉시 24시간 동안 데이비슨 용액(32% 에탄올, 2.2% 중성 완충 포르말린 및 증류수 중 11% 빙초산)에 고정하고 일련의 증가하는 에탄올 농도(50, 70, 95, 및 100%), 4° C에서 PBS에 저장한다.

[0082] 냉동 절편을 위한 눈은 20% 수크로오스 최적 절단 온도 화합물(Sakura Finetek, Torrance, CA, USA)에 내장하고 급속 냉동하고 사용할 때까지 -80 ° C에서 보관했다. 5 μm 두께의 망막 동결 절편을 현미경 슬라이드에 수집하고 PBS로 10-15분 동안 세척하여 최적 절단 온도 화합물을 제거했다. 그 후, 핵을 Hoechst 33342(Sigma-Aldrich; 0.1% Triton X-100/PBS 중 10μg/ml)로 7분 동안 표지한 다음, PBS로 3회 세척했다. 그들은 VECTASHIELD Antifade Mounting Medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)의 커버 슬립 아래에 장착되었고 마지막으로 매니큐어로 밀봉되었다.

[0083] 파라핀 절편을 위한 눈을 파라핀에 침지하고, 5 μm로 절편하고, 헤마톡실린 및 에오신으로 염색하거나, 데드엔드 형광 측정 TUNEL 시스템(Promega, Madison , WI, USA)을 제조업체의 지침에 따라 사용하여 탈파라핀화 및 말단 데옥시뉴클레오티딜 트랜스퍼라제-매개 데옥시우리딘 닉 앤드 라벨링(TUNEL)을 수행한다. 절편은 Leica DFC450 C 카메라를 사용하여 검사했다.

[0084] 엑소좀 국소화 및 흡수 및 공동 국소화의 정량화

[0085] 망막에 흡수된 엑소좀을 정량화하기 위해 최종 배율 5배에서 얻은 시신경 유두 중심 영상을 분석하였다. 엑소좀의 수는 각 이미지에서 하이퍼필드당 ExoGlow(녹색 형광 염료) 양성 점을 세어 결정했다. 측정은 2명의 조사자에 의해 수행되었으며 조사자의 측정 평균은 추가 분석에 사용되었다.

[0086] 통계 분석

[0087] 데이터는 평균 ± 표준 편차로 표시된다. Mann-Whitney U-test는 두 그룹 사이의 망막에 의해 흡수된 엑소좀의 양을 비교하는 데 사용되었다. SPSS(버전 22.0; IBM, Armonk, NY, USA)가 통계 분석에 사용되었다. 통계적 유의수준은 P <0.05로 설정되었다.

[0089] **결과**

[0090] 망막 유리체강내 주사 및 전기천공법에 의한 엑소좀의 흡수

[0091] 본 발명자들은 망막에 흡수된 유리체강내 투여된 엑소좀의 분포와 양을 조사했다. 도 2는 각 그룹의 대표적인 평면 마운트 이미지를 나타낸다. 형광 엑소좀(녹색)은 유리체강내 엑소좀을 주사를 하지 않은 대조군의 망막 평면 마운트에서 관찰되지 않았다(도 2A 및 D). 대조적으로, 유리체강내 엑소좀 주사를 받은 비-전기천공 및 전기천공 그룹의 망막 평면 마운트에서 수많은 형광 엑소좀이 관찰되었다(도 2B 내지 F). 전기천공법을 사용하지 않

은 군(도 2C 및 F)보다 전기천공법을 사용한 군(도 2B 및 E)의 평면 마운트에서 더 많은 형광성 엑소좀이 관찰되었다.

[0092] 도 3은 망막에서 엑소좀 섭취를 확인한 대표적인 공초점 현미경 이미지를 나타낸다. 평면 마운트 이미지에서 관찰된 형광 엑소좀은 두 그룹 모두에서 망막 내부에 위치했다. 도 3에 나타낸 바와 같이, 엑소좀이 망막 내부로 전달된 것을 확인할 수 있다. 도 7은 두 그룹 모두에서 엑소좀이 망막의 내부 및 외부로 이동했음을 입증하는 대표적인 망막 조직 절편을 나타낸다.

[0093] 도 4는 각 군의 안구 망막에서의 엑소좀 흡수량을 정량한 결과이다. 전기천공법을 시행하지 않은 군(376.9 ± 175.4, P = 0.013)보다 전기천공법을 시행한 군(599.0 ± 307.5)에서 하이퍼필드당 더 많은 형광 엑소좀이 관찰되었다.

[0094] 전기천공법 후 조직 손상 평가

[0095] 유리체강내 주사 및 전기천공법 후 24시간에 채취한 망막 조직학적 절편은 전기천공법을 시행하지 않은 그룹과 전기천공법을 사용한 그룹의 망막에서 염증 반응이나 구조적 손상이 관찰되지 않았음을 보여주었다(도 5B 내지 D). TUNEL-양성 세포는 전기천공법 그룹의 망막에서 검출되지 않았다(도 6). 전기 천공 직후 각막에서 손상 징후가 관찰되지 않았다 (도 8의 C 및 D).

[0097] **논의**

[0098] 치료제를 유리체강으로 직접 투여하는 것은 망막 질환 치료에 상당한 이점을 제공한다. 그러나 유리체강으로의 MSC 이식의 안전성에 대한 우려는 계속되고 있다. 이식된 MSC의 원치 않는 분화가 우려된다. 최근 연령관련 황반변성 환자 3명에서 MSCs 유리체강내 주사 후 심각한 양측 시력상실이 발생하여 증식성 유리체망막병증 및 망막박리가 발생한 것으로 보고되었다. 중간엽 줄기세포의 이식으로 인해 발생할 수 있는 면역거부반응, 섬유화증식, 견인망막박리를 예방할 수 있다.

[0099] 유리체강은 수정체와 망막 사이의 공간으로, 풍부한 히알루로난 분자 클러스터와 결합된 콜라겐 섬유의 희박한 네트워크로 구성된 투명한 젤과 같은 연조직인 유리체액으로 채워져 있다. 공동은 확산을 통해 이동한다. 표면 전하는 유리체강의 확산에 중요하다. 양이온성 고분자 및 나노입자의 확산은 유리체 네트워크에서 음으로 하전된 히알루론산과의 상호작용으로 인해 극적으로 감소하는 반면 음으로 하전된 입자는 더 자유롭게 확산될 수 있다. 또한, 입자 크기는 유리체강의 확산도에 중요하다. 유리체 메쉬의 크기가 500 nm로 추정되기 때문에 약 500 nm 크기의 나노입자는 물의 약 절반의 확산도를 갖는 반면, 200 nm 미만 크기의 음이온성 나노입자는 물의 확산도와 비슷한 확산도를 갖는다. 엑소좀은 크기가 30~100 nm이고 음전하를 띤다. 따라서 유리체강 내 물과 유사한 확산성을 가질 수 있다. 대조적으로 중간엽 줄기세포의 크기는 15-30 μm이므로 유리체강에서의 확산성은 매우 낮은 것으로 추정된다.

[0100] 유리체강의 나노(50-500 nm) 및 미세입자(1-50 μm)는 방수 유출 경로를 포함하는 전방 경로를 통해 제거된다. 유리체강에서 더 큰 입자의 제거는 연장되며 그 반대의 경우도 마찬가지이다. 엑소좀보다 큰 크기의 나노입자(290~420nm)가 눈에서 1~2주 이내에 제거되는 것을 고려하면, 엑소좀의 안구내 제거는 훨씬 더 일찍 일어날 수 있다. 유리체강에 주입된 엑소좀은 확산에 의해 수동적으로 분포되고 눈에서 빠르게 제거된다. 따라서 망막과 황반에 도달하는 양은 많지 않을 것이다.

[0101] 유리체강에 주입된 치료제는 표적에 도달하기 전에 내부 및 외부 제한막과 같은 다양한 기계적 장벽을 만난. 일반적으로 세포에 의한 치료제의 흡수는 세포내이입 또는 식균작용에 달려 있다. 망막 색소 상피는 미크론 크기의 입자를 탐식할 수 있지만 망막 신경절 세포 및 광수용체 세포와 같은 신경 세포는 식균 작용을 할 수 없으며 치료제의 흡수가 제한된다. 또한 세포외 단백질과 글리코사미노글리칸은 세포에 의해 약 흡수를 방해한다.

[0102] 생체내 전기천공법의 기전은 1) 이온과 전기장의 상호작용으로 이온이 조직에 침투할 수 있는 구동력을 발생시키고, 2) 전류로 인해 조직 투과성이 증가하며, 3) 전기삼투 현상이 "용매 스트림"을 유도하는 용매의 벌크 이동을 유발한다. 이 실험에서, 음극 전극은 유리체강 내 주입된 눈의 각막에 위치하고 양극 전극은 다른 쪽 눈의 각막에 위치했다. 전기장의 방향은 시신경에서 유리체강내 주입된 눈의 각막 방향이었다. 엑소좀의 표면 전하가 음성이기 때문에 유리체강의 엑소좀은 망막 방향으로 이동했다. 고전압 및 짧은 지속 시간의 전기 펄스는 망막의 내부 제한막(즉, 뮐러 세포의 기저막) 및 망막 신경 세포의 엑소좀에 대한 세포막의 투과성을 증가시킬 수 있는 세포막의 일시적이고 가역적인 변화를 유도한다. 또한 용매 스트림은 망막으로의 엑소좀 전달을 증가시킬

수 있다.

[0103] 본 발명에서, 전기천공된 눈과 그 반대쪽 눈에서 망막의 구조적 손상이 관찰되지 않았다. 전기천공법을 시행한 눈에서는 망막에서 TUNEL 양성 세포가 관찰되지 않았으며, 이는 전기천공법에 의한 망막세포의 세포사멸이 일어나지 않았음을 시사한다. 또한, 전기천공법을 시행한 안구와 반대쪽 눈에서 확실한 열화상의 징후는 관찰되지 않았다. 기존 연구자들은 전계 강도가 >30 V/cm이면 각막의 열화상을 초래하고 >20 V/cm의 전기장 강도는 망막 손상을 초래한다고 보고했다. 기존 연구에서의 전기장은 40V/cm인 본 연구보다 약했다. 그러나 보고된 맥박 지속 시간은 99ms로 본 연구에서 사용된 것(50ms)보다 길었다. 이는 전달되는 에너지가 유사하더라도 펄스 지속 시간이 짧을수록 조직 손상이 적을 수 있음을 시사한다.

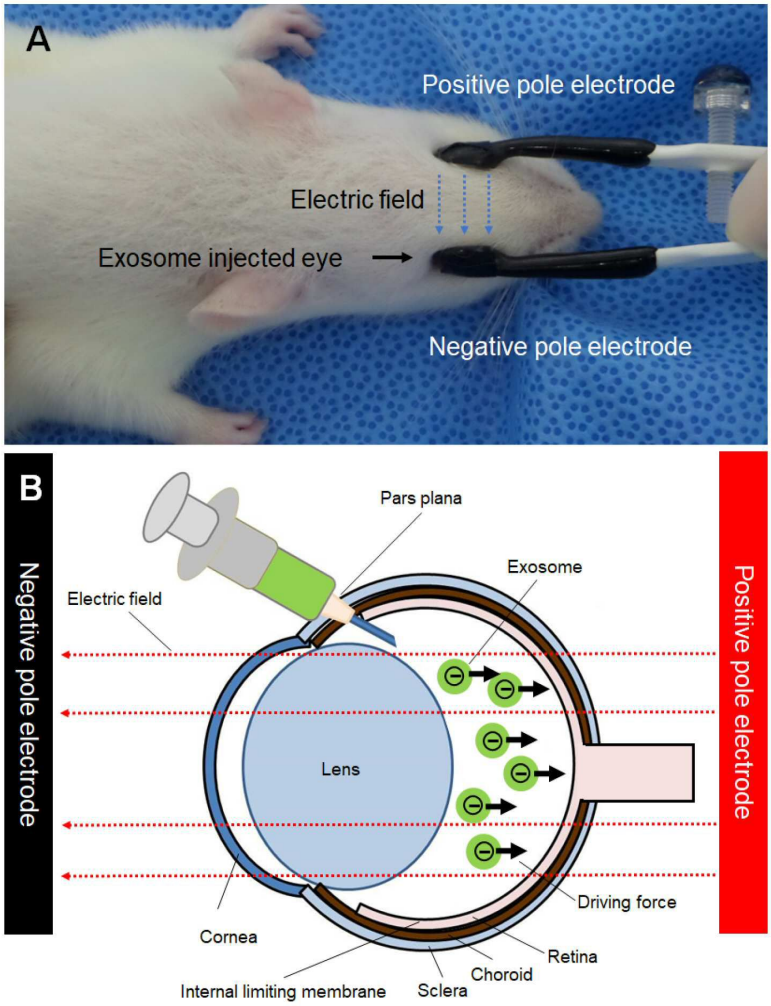
[0104] 본 연구는 생체 내 전기천공법이 유리체내 주입된 엑소좀의 망막 전달을 향상시킨다는 것을 처음으로 나타낸다. 이 전략은 항혈관 내피 성장 인자 항체 및 나노입자와 같은 다른 유리체강내 주사 약물을 전달하는 데 활용될 수 있으며 망막 변성의 치료를 위해 광범위하게 구현될 수 있다.

[0105] **결론**

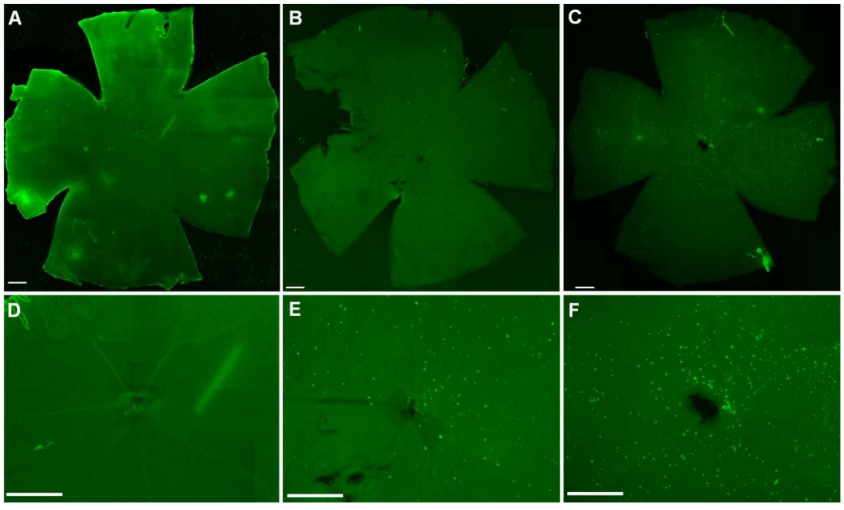
[0106] 본 연구는 생체 내 전기천공법이 유리체내 주입된 엑소좀의 망막 전달을 개선할 수 있음을 발견했다. 엑소좀을 천연 나노크기 전달 플랫폼으로 활용 시 화물 전달은 물론 엑소좀의 망막 전달을 높여 치료 효능을 높일 수 있다. 다양한 전기천공 매개변수를 사용한 추가 연구는 안전하고 효율적인 증강 유리체강내 주입을 위한 최적화된 프로토콜을 확립할 수 있다.

도면

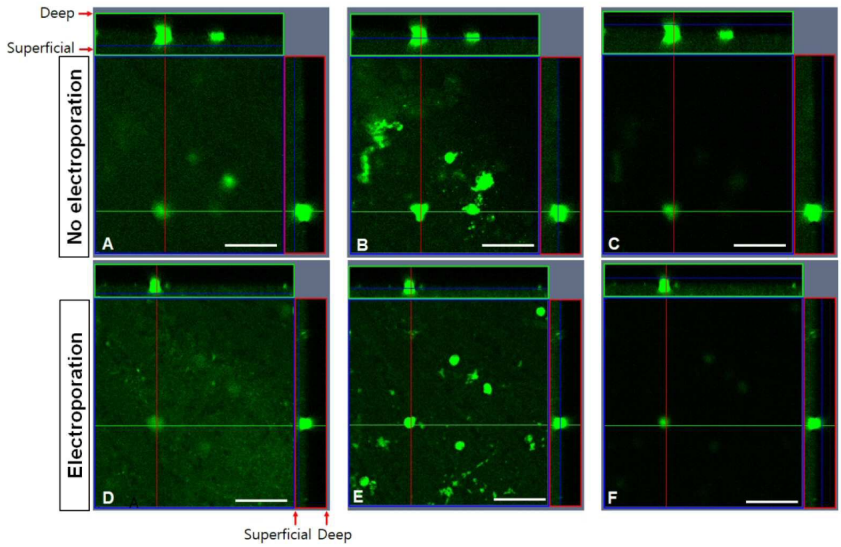
도면1


A
Positive pole electrode
Electric field
Exosome injected eye
Negative pole electrode
B
Negative pole electrode
Positive pole electrode
Pars plana
Exosome
Electric field
Lens
Driving force
Cornea
Retina
Choroid
Internal limiting membrane
Sclera

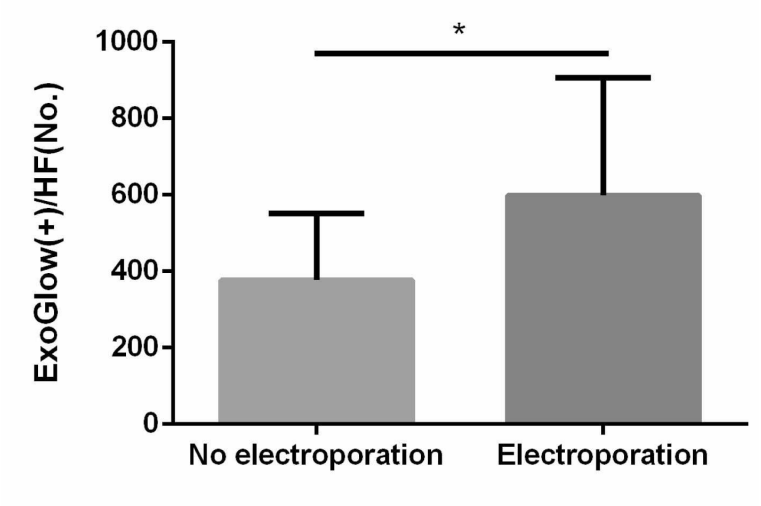
도면2


A
B
C
D
E
F

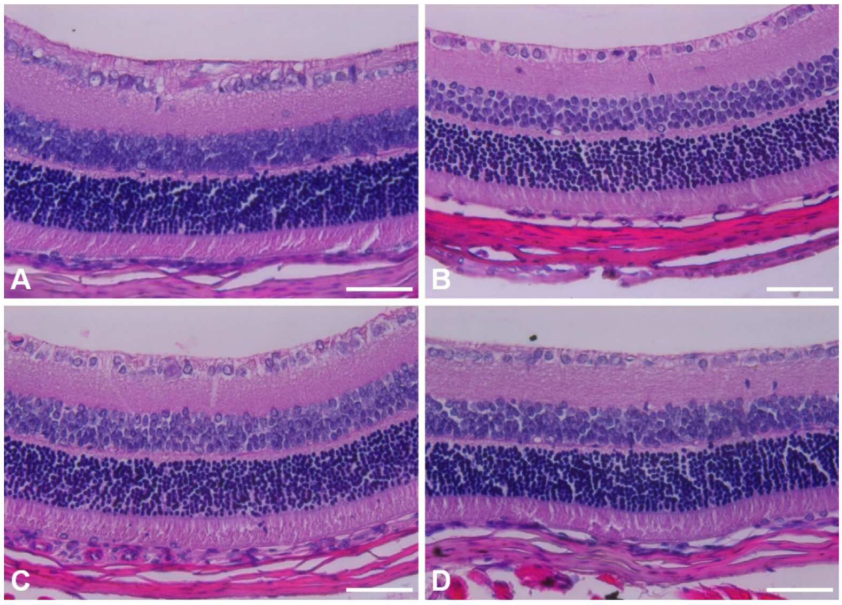
도면3


Deep
Superficial
No electroporation
Electroporation
A
B
C
D
E
F
Superficial Deep

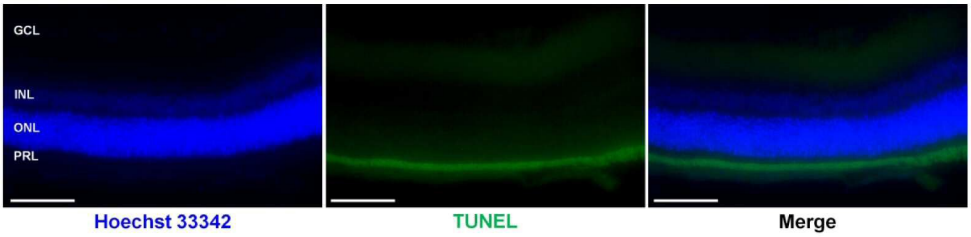
도면4


*
1000
800
600
400
200
0
ExoGlow(+)/HF(No.)
No electroporation
Electroporation

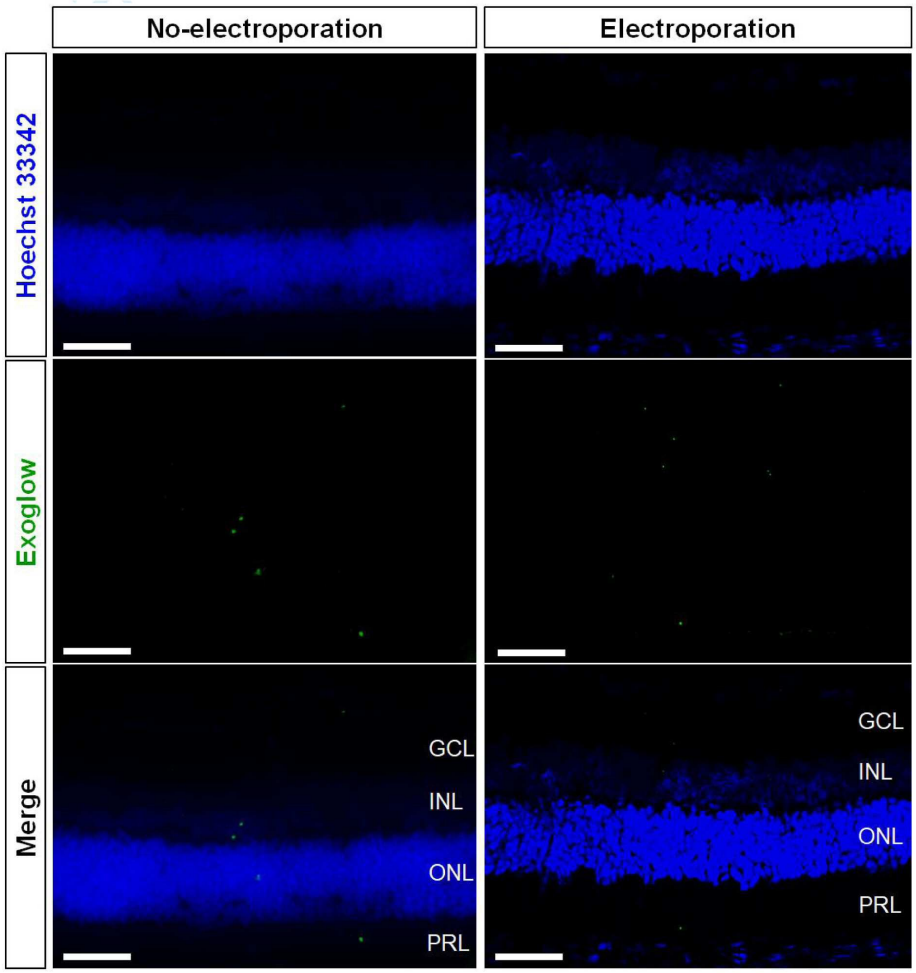
도면5



도면6



도면7


No-electroporation
Electroporation
Hoechst 33342
Exoglow
Merge
GCL
INL
ONL
PRL
GCL
INL
ONL
PRL

도면8

