



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0010264
(43) 공개일자 2024년01월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/258 (2006.01) A23K 10/30 (2016.01)
A23L 33/105 (2016.01) A61K 8/14 (2006.01)
A61K 8/9789 (2017.01) A61P 29/00 (2023.01)
A61Q 19/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 36/258 (2013.01)
A23K 10/30 (2016.05)

(21) 출원번호 10-2022-0087609

(22) 출원일자 2022년07월15일

심사청구일자 2023년07월11일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

이연희

서울특별시 강남구 압구정로29길 71, 25동 1306호(압구정동, 현대아파트)

김연경

서울특별시 종로구 낙산길 198, 207동 1208호(창신동, 창신쌍용아파트 2지구)

(74) 대리인

특허법인정진

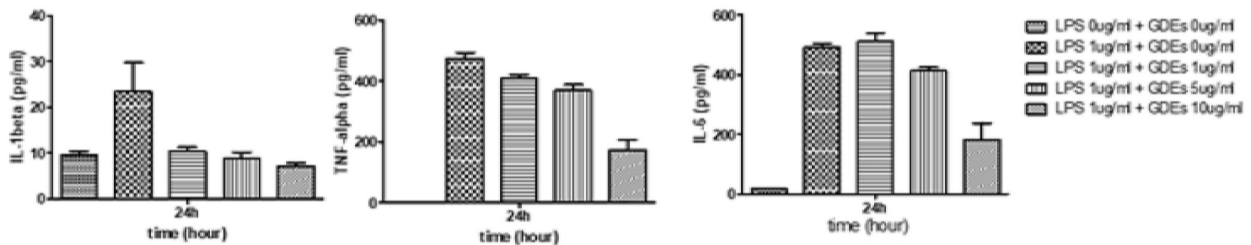
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 인삼 유래의 엑소좀-유사 나노베지클을 포함하는 항염 조성물 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 인삼 유래의 엑소좀-유사 나노베지클을 포함하는 항염 조성물 및 이의 용도에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 본 발명의 인삼-유래 엑소좀-유사 나노베지클은 생체 내 독성을 가지지 않으면서도, NO 생성을 억제하고, 염증 유발인자인 iNOS 및 COX-2의 발현을 억제하고, 전염증성 사이토카인인 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 의 발현을 억제하는 등 우수한 항염증 효과를 가지므로, 약학, 화장품, 식품 등 다양한 분야에서 유용하게 사용될 수 있다. 또한, 본 발명의 인삼-유래 엑소좀-유사 나노베지클은 별도의 장비 공급이나 인력없이도 용이하게 획득할 수 있고 또한 대량 수득이 가능한 바, 이를 활용할 경우 경제성이 우수하다.

대표도 - 도9



(52) CPC특허분류

A23L 33/105 (2016.08)

A61K 8/14 (2013.01)

A61K 8/9789 (2017.08)

A61P 29/00 (2023.02)

A61Q 19/00 (2013.01)

A23V 2002/00 (2023.08)

A23V 2200/324 (2013.01)

A23V 2250/2124 (2013.01)

A61K 2236/30 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711164586

과제번호 2020R1F1A1070072

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 개인기초연구(과기정통부)

연구과제명 턱관절 관절염에 중간엽줄기세포 유래 엑소솜을 이용한 새로운 재생 치료전략에 대한 연구

기 여 율 1/1

과제수행기관명 경희대학교

연구기간 2020.06.01 ~ 2023.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

인삼 유래의 엑소좀-유사 나노베지클(Ginseng-derived exosome like nanoparticles, GDE)을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 치료 또는 예방용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 GDE는, 50 내지 500 nm의 직경을 갖는 것인, 염증성 질환의 치료 또는 예방용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 GDE는, 음의 표면 전하가 -100 내지 -10 mV인 것인, 염증성 질환의 치료 또는 예방용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 GDE는, iNOS(inducible nitric oxide synthase), COX-2(cyclooxygenase2), TNF- α (tumor necrosis factor), IL(interleukin)-1 β 및 IL-6로 이루어진 군으로부터 선택된 1 종 이상의 발현을 억제하는 것인, 염증성 질환의 치료 또는 예방용 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 GDE는, 다음 단계를 포함하는 방법으로 제조된 것인, 염증성 질환의 치료 또는 예방용 약학적 조성물:

(a) 인삼액을 획득하는 단계; 및 (b) 상기 인삼액을 수크로즈 밀도 구배(sucrose gradient) 및 초원심분리하여 인삼 유래의 엑소좀-유사 나노베지클(Ginseng-derived exosome like nanoparticles, GDE)을 획득하는 단계.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 (b) 단계의 수크로즈 밀도 구배 및 초원심분리는 다음 단계를 포함하는 것인, 염증성 질환의 치료 또는 예방용 약학적 조성물:

(b-1) 65 내지 70% 수크로즈를 용기에 첨가하는 단계;

(b-2) 20 내지 35%의 수크로즈를 상기 (b-1)의 수크로즈와 층을 이루도록 첨가하여 수크로즈 쿠션층을 형성시키는 단계;

(b-3) 상기 (b-2) 단계의 수크로즈 쿠션층 상부에 (a) 단계의 인삼액을 첨가하는 단계;

(b-4) 80,000 내지 150,000g 에서 60 내지 100분 동안 초원심분리를 수행하는 단계; 및

(b-5) 상기 수크로즈 쿠션층 사이에 형성된 인산 유래 엑소좀 유사 나노베지클 층을 획득하는 단계.

청구항 7

제6항에 있어서,

(b-6) 상기 (b-5) 단계에서 수득된 엑소좀 유사 나노베지클 층을 수크로즈 층 상부에 첨가하고, 150,000 내지 250,000g 에서 60 내지 100분 동안 초원심분리를 수행하여 엑소좀 유사 나노베지클을 획득하는 단계;를 더 포함하며,

상기 수크로즈 층은 용기 하단에서 상부 방향으로

55 내지 65% 수크로즈 층;

40 내지 50% 수크로즈 층;

25 내지 35% 수크로즈 층; 및

5 내지 10% 수크로즈 층; 이 순차적으로 적층된 것인, 염증성 질환의 치료 또는 예방용 약학적 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 엑소좀 유사 나노베지클은 25 내지 35% 수크로즈 층 및 5 내지 10% 수크로즈 층의 중간층에서 수득하는 것인, 염증성 질환의 치료 또는 예방용 약학적 조성물.

청구항 9

제5항에 있어서,

상기 (a) 단계의 인삼액은, 인삼 분쇄물을 1500g 내지 2000g에서 10 내지 30분 동안 원심분리한 후, 5000g 내지 15,000g에서 30분 내지 90분 동안 원심분리하는 단계;를 통해 제조된 것인, 염증성 질환의 치료 또는 예방용 약학적 조성물.

청구항 10

제5항에 있어서,

상기 (b) 단계는 1회 내지 10회 실시하는 것인, 염증성 질환의 치료 또는 예방용 약학적 조성물.

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 염증성 질환은 천식, 알레르기성 및 비-알레르기성 비염, 만성 및 급성 비염, 만성 및 급성 위염 또는 장염, 궤양성 위염, 궤양성 대장염, 급성 및 만성 신장염, 급성 및 만성 간염, 만성 폐쇄성 폐질환, 폐섬유증, 폐혈증, 과민성 대장 증후군, 염증성 통증, 편두통, 두통, 허리 통증, 섬유 근육통, 근막 질환, 바이러스 감염, 박테리아 감염, 곰팡이 감염, 화상, 외과적 또는 치과적 수술에 의한 상처, 프로스타글라딘 E 과다 증후군, 아테롬성 동맥 경화증, 통풍, 관절염, 류머티즘성 관절염, 강직성 척추염, 호지킨병, 췌장염, 결막염, 홍채염, 공막염, 포도막염, 아토피 피부염, 건선, 접촉성피부염, 습진성 피부염, 광선피부염, 지루피부염, 포진성피부염, 편평태선, 경화태선, 괴저성 농피증, 천포창, 수포성 표피박리증, 알러지, 피부과민증, 습진 및 다발성 경화증으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1 종 이상인 것인, 염증성 질환의 치료 또는 예방용 약학적 조성물.

청구항 12

인삼 유래의 엑소좀-유사 나노베지클(Ginseng-derived exosome like nanoparticles, GDE)을 유효성분으로 포함하는 항염증용 피부 외용제 조성물.

청구항 13

인삼 유래의 엑소좀-유사 나노베지클(Ginseng-derived exosome like nanoparticles, GDE)을 유효성분으로 포함하는 항염증용 화장품 조성물.

청구항 14

인삼 유래의 엑소좀-유사 나노베지클(Ginseng-derived exosome like nanoparticles, GDE)을 유효성분으로 포함하는 항염증용 식품조성물.

청구항 15

인삼 유래의 엑소좀-유사 나노베지클(Ginseng-derived exosome like nanoparticles, GDE)을 유효성분으로 포함하는 항염증용 건강기능성 식품조성물.

청구항 16

인삼 유래의 엑소좀-유사 나노베지클(Ginseng-derived exosome like nanoparticles, GDE)을 유효성분으로 포함하는 항염증용 사료 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 인삼 유래의 엑소좀-유사 나노베지클을 포함하는 항염 조성물 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 엑소좀은 세포막의 구조와 동일한 이중인지질막으로 이루어진 수십 내지 수백 나노미터 크기의 소포체로서 세포가 분비하는 세포 간 신호전달 매개체로서 이를 통해 전달된 다양한 세포 신호는 표적 세포의 활성화, 성장, 이동, 분화, 탈분화, 사멸(apoptosis), 괴사(necrosis)를 포함한 세포 행동을 조절한다고 알려져 있다.

[0004] 엑소좀은 유래된 세포의 성질 및 상태에 따라 특이적인 유전물질과 생체활성 인자들이 포함되어 있는데, 엑소좀은 분비하는 기원 세포(공여 세포)의 상태를 반영하며, 어떤 세포에서 분비되었는가에 따라 다양한 생물학적 활성을 나타내고, 세포들 사이에 유전 물질과 단백질을 옮기면서 세포 간 상호작용에 중요한 역할을 한다.

[0005] 이러한 엑소좀이 어떤 분자적 기작에 의해 만들어지는지 확실히 밝혀진 바가 없으나, 적혈구 세포뿐만 아니라, B-림프구, T-림프구, 수지상 세포, 혈소판, 대식 세포 등을 포함한 다양한 종류의 면역 세포들과 종양 세포, 줄기세포 등도 살아 있는 상태에서 엑소좀을 생산하여 분비한다고 알려졌다.

[0006] 종래 엑소좀은 주로 바이오마커로 사용되어 왔을 뿐, 엑소좀 자체의 효능을 이용하여 엑소좀을 특정 용도로 사용하는 기술은 아직 개발이 미흡한 실정이다.

[0007] 또한, 엑소좀 관련 연구의 대부분을 차지하고 있는 동물의 줄기세포에서 분리되는 엑소좀은 포함된 인자가 목적

이외의 효과를 나타낼 수 있고, 엑소좀의 분리에 있어 줄기세포가 포함될 수 있다는 점에서 안정성의 문제가 있다.

[0008] 이에 대한 대안으로 식물세포의 엑소좀에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으나, 아직 미진한 상태이다. 최근 연구에서 식물 세포에서 유래된 엑소좀-유사 나노 입자(exosome-like nanovesicles)는 포유동물 세포에서 유래된 엑소좀과 나노 크기의 소낭 구조 및 나노 입자 조성물이 유사한 것으로 보고된 바 있으나(An, Q, Huckelhoven, R, Kogel, KH and van Bel, AJ (2006). Multivesicular bodies participate in a cell wall-associated defence response in barley leaves attacked by the pathogenic powdery mildew fungus. Cell Microbiol 8: 1009-1019)(Regente, M, Pinedo, M, Elizalde, M and de la Canal, L (2012). Apoplastic exosomelike vesicles: a new way of protein secretion in plants Plant Signal Behav 7: 544-546), 식물 세포에서 유래된 엑소좀 유사 막 구조 소낭체의 특정 용도에 대해서는 알려진 바가 거의 없다.

[0009] 인류가 오랜 기간 섭취해 온 인삼 역시, 면역 증강에 유익한 것으로 검증된 식물로, 인삼 유래 추출물이나 단일 성분의 항노화와 같은 일부 효능은 보고된 바 있으나, 복합 생리 활성 물질인 인삼 유래 엑소좀 유사 막 구조 소낭체(GDE; Ginseng-derived exosome like nanoparticles)의 항염 효능에 관해서는 보고된 바가 없다.

[0010] 따라서, 이러한 식물 엑소좀으로부터 유래된 엑소좀-유사 나노베지클의 특성을 고려할 때 이를 이용하는 경우, 안전하게 다양한 질환을 치료할 수 있을 뿐만 아니라, 기존의 치료제의 한계를 극복할 수 있는 새로운 패러다임이 될 것으로 기대된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 이에, 본 발명자들은 식물로부터 유래되어 인체에 안전하면서 효과적인 치료제를 개발하고자 예의연구 노력 결과, 인삼의 식물세포로부터 분리하여 획득한 인삼 유래의 엑소좀 유사 나노베지클이 탁월한 항염 효과를 발휘함을 규명함으로써, 본 발명을 완성하였다.

[0013] 따라서, 본 발명의 일 목적은, 인삼 유래의 엑소좀-유사 나노베지클(Ginseng-derived exosome like nanoparticles, GDE)을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 치료 또는 예방용 약학적 조성물을 제공하는 데 있다.

[0014] 또한, 본 발명의 다른 목적은, 인삼 유래의 엑소좀-유사 나노베지클(Ginseng-derived exosome like nanoparticles, GDE)을 유효성분으로 포함하는 항염증용 피부 외용제 조성물을 제공하는 데 있다.

[0015] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은, 인삼 유래의 엑소좀-유사 나노베지클(Ginseng-derived exosome like nanoparticles, GDE)을 유효성분으로 포함하는 항염증용 화장품 조성물을 제공하는 데 있다.

[0016] 또한, 본 발명의 다른 목적은, 인삼 유래의 엑소좀-유사 나노베지클(Ginseng-derived exosome like nanoparticles, GDE)을 유효성분으로 포함하는 항염증용 식품조성물을 제공하는 데 있다.

[0017] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은, 인삼 유래의 엑소좀-유사 나노베지클(Ginseng-derived exosome like nanoparticles, GDE)을 유효성분으로 포함하는 항염증용 건강기능성 식품조성물을 제공하는 데 있다.

[0018] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은, 인삼 유래의 엑소좀-유사 나노베지클(Ginseng-derived exosome like nanoparticles, GDE)을 유효성분으로 포함하는 항염증용 사료 조성물을 제공하는 데 있다.

[0020] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명 및 청구범위에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0022] 본 명세서에서 사용한 용어는 단지 설명을 목적으로 사용된 것으로, 한정하려는 의도로 해석되어서는 안된다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한

것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.

[0023] 또한, 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 실시 예가 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.

[0025] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0027] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 인삼 유래의 엑소좀-유사 나노베지클(Ginseng-derived exosome like nanoparticles, GDE)을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 치료 또는 예방용 약학적 조성물을 제공한다.

[0028] 본 발명에서 염증성 질환의 치료 또는 예방용 약학적 조성물은 항염증용 조성물로서, 구체적으로, 산화 질소의 생성을 억제하고, 염증 유발인자 및 전염증성 사이토카인의 발현을 억제함으로써 염증성 질환을 예방 또는 치료하는 것일 수 있다.

[0029] 본 발명의 인삼은 본 발명의 목적을 달성할 수 있는 한, 임의의 인삼 종류 및 부위를 이용할 수 있다.

[0030] 예컨대, 인삼속(*Panax species*) 식물의 종자, 뿌리, 줄기, 잎 및 열매로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되지 않으며, 구체적인 인삼속 식물로는 고려인삼(*Panax ginseng*), 화기삼(*Panax quinquefolium*), 전칠삼(*Panax notoginseng*), 죽절삼(*Panax japonicum*), 삼엽삼(*Panax trifolium*), 히말라야삼(*Panax pseudoginseng*) 또는 베트남삼(*Panax vietnamensis*) 등이 있고, 가공여부와 생육환경에 따른 홍삼, 수삼, 백삼, 재배삼, 장뇌삼 또는 산양산삼, 산삼배양근을 포함하는 산삼 등 품종이나 종류에 제한이 없이 사용 가능하다.

[0031] 본 명세서에서 "엑소좀-유사 나노베지클(Ginseng-derived exosome like nanoparticles, GDE)"은 세포에서 분비되어 세포외 공간으로 방출된 나노크기의 세포외 소낭, 즉 세포막 베지클(extracellular vesicle)을 의미하는 것으로서, 상기 엑소좀 유사 나노베지클은 엑소좀을 포함하며 나노 크기의 베지클 구조 및 그 조성물이 엑소좀과 유사한 베지클을 모두 포함하는 것을 의미한다.

[0032] 상기 엑소좀 유사 나노베지클은 다포체(multivesicular body)가 외포 작용으로 원형질막과 융합하여 세포외 공간으로 방출된다. 또한, 상기 엑소좀 유사 나노베지클은 세포막 성분으로 이루어진 지질 이중막에 의해 내부와 외부가 구분되며, 세포의 세포막 지질과 막 단백질, 유전 물질 및 세포질 성분을 가지고 있어 세포의 성질과 상태를 간접적으로 파악할 수 있게 해준다. 또한, 상기 엑소좀 유사 나노베지클은 다른 세포 및 조직에 결합하여 막 구성요소, mRNAs, miRNAs, 단백질(성장 호르몬, 사이토카인 등) 등을 전달해 주고, 이들 전달 물질을 수용 세포에 전달해 줌으로써 세포-세포 간 소통을 매개하는 세포외 전달체로 작용한다.

[0033] 본 명세서에서 "인삼 유래의 엑소좀-유사 나노베지클"은 인삼 세포에서 분비된 나노 크기의 엑소좀 유사 베지클을 의미한다. 상기 엑소좀 유사 베지클은 인삼의 세포외액(extracellular fluid)으로부터 분리될 수 있으며, 분리된 엑소좀 유사 나노베지클은 전체적으로 또는 부분적으로 본래 존재하는 조직 또는 세포로부터 물리적으로 분리될 수 있다.

[0034] 밀도 구배는 밀도가 다른 물질을 구분할 때 가장 많이 사용되는 방법으로서, 본 명세서에 따른 엑소좀 유사 나노베지클은 밀도가 구분되어 밀도 구배를 통해 분리할 수 있다. 구체적인 예로는 수크로즈(sucrose), 피콜(ficoll), 글리세롤(glycerol), 염화세슘(cesium chloride), 이오딧사놀(iodixanol) 등의 밀도 기울기 분리재료를 이용하여 실시할 수 있으나, 바람직하게는 수크로즈(sucrose)이다.

[0035] 따라서, 본 발명 조성물의 유효성분인 엑소좀 유사 나노베지클은, 인삼액에 수크로즈 밀도 구배(sucrose gradient) 및 초원심분리를 함께 실시하여 제조(분리)된 것을 특징으로 한다.

[0036] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 GDE는, 다음 단계를 포함하는 방법으로 제조된다:

[0037] (a) 인삼액을 획득하는 단계; 및 (b) 상기 인삼액을 수크로즈 밀도 구배(sucrose gradient) 및 초원심분리하여

인삼 유래의 엑소좀-유사 나노베지클(Ginseng-derived exosome like nanoparticles, GDE)을 획득하는 단계.

[0038] 또한, 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 제조 방법의 상기 (b) 단계는 다음 단계를 포함한다:

[0039] (b-1) 65 내지 70% 수크로스를 용기에 첨가하는 단계;

[0040] (b-2) 20 내지 35%의 수크로스를 상기 (b-1)의 수크로스와 층을 이루도록 첨가하여 수크로즈 쿠션층을 형성시키는 단계;

[0041] (b-3) 상기 (b-2) 단계의 수크로즈 쿠션층 상부에 (a) 단계의 인삼액을 첨가하는 단계;

[0042] (b-4) 80,000 내지 150,000g 에서 60 내지 100분 동안 초원심분리를 수행하는 단계; 및

[0043] (b-5) 상기 수크로즈 쿠션층 사이에 형성된 인삼 유래 엑소좀 유사 나노베지클 층을 획득하는 단계.

[0044] 또한, 상기 (b) 단계는 (b-6) 상기 (b-5) 단계에서 수득된 엑소좀 유사 나노베지클 층을 수크로즈 층 상부에 첨가하고, 150,000 내지 250,000g 에서 60 내지 100분 동안 초원심분리를 수행하여 엑소좀 유사 나노베지클을 획득하는 단계;를 더 포함하며, 상기 수크로즈 층은 용기 하단에서 상부 방향으로 55 내지 65% 수크로즈 층; 40 내지 50% 수크로즈 층; 25 내지 35% 수크로즈 층; 및 5 내지 10% 수크로즈 층; 이 순차적으로 적층된 것이다.

[0045] 또한, 상기 (b-6) 단계의 상기 엑소좀 유사 나노베지클은 25 내지 35% 수크로즈 층 및 5 내지 10% 수크로즈 층의 중간층에서 수득된 것이다.

[0046] 또한, 상기 (a) 단계의 인삼액은 상기 (a) 단계의 인삼액은, 인삼 분쇄물을 1500g 내지 2000g에서 10 내지 30분 동안 원심분리한 후, 5000g 내지 15,000g에서 30분 내지 90분 동안 원심분리하는 단계;를 통해 제조된 것이다.

[0047] 상기 (b) 단계는 본 발명의 목적을 달성할 수 있는 한, 적절하게 실시될 수 있으며, 1회 내지 10회 실시될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0048] 본 발명에서 상기 엑소좀 유사 나노베지클은 본 발명의 목적을 달성할 수 있는 한, 그 크기(직경)에 제한없이 이용할 수 있으나, 바람직하게는 50 내지 500 nm의 직경을 갖는 세포막 베지클일 수 있다. 예컨대, 상기 엑소좀 유사 베지클은 50 nm 이상, 60 nm 이상, 70 nm 이상, 80 nm 이상, 90 nm 이상 또는 100 nm 이상이면서, 500 nm 이하, 450 nm 이하, 400 nm 이하, 350 nm 이하, 300 nm 이하, 250 nm 이하, 200 nm 이하, 150 nm 이하 또는 100 nm 이하의 직경을 갖는 세포막 베지클일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는, 바람직하게는 100 내지 110 nm의 직경을 갖는다.

[0049] 본 발명에서 상기 엑소좀 유사 나노베지클은 본 발명의 목적을 달성할 수 있는 한, 그 음 표면 전하에 제한없이 이용할 수 있으나, 바람직하게는 -100 내지 -10 mV, 보다 바람직하게는 -50 내지 -10 mV, 가장 바람직하게는 -20 내지 -15 mV의 표면 전하를 갖는다.

[0050] 본 발명의 엑소좀 유사 나노베지클은 예컨대, 표적 세포에서 원하는 기능을 효율적으로 수행할 수 있도록 막 성분이 화학적 또는 물리적으로 변형된 것일 수 있다. 예를 들어, 엑소좀 유사 나노베지클의 막 성분이 티올기(-SH) 또는 아민기(-NH₂)를 이용하여 화학적인 방법으로 변형되거나, 엑소좀 유사 나노베지클에 표적유도 물질, 세포막 융합 물질, 폴리에틸렌글리콜을 화학적으로 결합시켜 막 성분이 화학적으로 변형된 것을 포함할 수 있다.

[0051] 또한, 추가적으로, 본 발명의 엑소좀 유사 나노베지클을 선별하기 위해 겔 여과(gel filtration) 또는 한외여과(ultrafiltration)를 사용할 수 있으며, 크기가 작은 분자를 제거하기 위해 여과 대신 투석을 사용할 수 있다.

[0052] 본 발명자들은 생리학적으로 유효한 항염 활성을 갖는 인삼-유래 엑소좀 유사 나노베지클을 개발하고자 예의 노력한 결과, 최적 조건에 따라 분리된 엑소좀 유사 나노베지클이 탁월한 항염 효능을 발휘함을 규명하였다.

[0053] 본 발명의 엑소좀 유사 나노베지클은 용이하고 안전하게 인삼으로부터 분리된 것이므로, 생체에 적합하며, 이에 의약 또는 기능성 식품으로 개발하는 데 매우 유리할 수 있다.

[0054] 또한, 본 발명의 엑소좀 유사 나노베지클은 iNOS(inducible nitric oxide synthase), COX-2(cyclooxygenase2), TNF- α (tumor necrosis factor), IL(interleukin)-1 β 및 IL-6로 이루어진 군으로부터 선택된 1 종 이상의 염증 유발인자 또는 사이토카인의 발현을 억제하는 탁월한 항염 효과를 발휘한다.

[0055] 또한, 종래의 엑소좀을 기반으로 하는 나노베지클은 균질하지 못하기 때문에 많은 한계를 가지고 있다. 예를 들어, 종래의 천연물 유래 엑소좀 유사 나노베지클은 의약 및 기능성 식품으로 개발하는 데 있어서 일정한 품질을

가지는 원료를 공급하는 것이 매우 어려웠다.

- [0056] 그러나, 본 발명의 최적 조건에 따라 분리된 엑소좀 유사 나노베지클은 탁월한 생리학적 활성을 나타내면서도 세포독성이 없고 동일한 고순도로 대량 생산이 가능하므로 상술한 문제점을 해결할 수 있는 방안을 제시한다.
- [0057] 본 발명에서 사용되는 용어, "치료"는 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 상처에 대한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [0058] 본 발명에서 상기 염증성 질환은, 염증을 주병변으로 하는 질병을 총칭하는 의미로서, 본 발명의 조성물이 효과를 발휘하는 한, 임의의 종류의 염증성 질환을 포함할 수 있으며, 예컨대, 천식, 알레르기성 및 비-알레르기성 비염, 만성 및 급성 비염, 만성 및 급성 위염 또는 장염, 궤양성 위염, 궤양성 대장염, 급성 및 만성 신장염, 급성 및 만성 간염, 만성 폐쇄성 폐질환, 폐섬유증, 폐혈증, 과민성 대장 증후군, 염증성 통증, 편두통, 두통, 허리 통증, 섬유 근육통, 근막 질환, 바이러스 감염, 박테리아 감염, 곰팡이 감염, 화상, 외과적 또는 치과적 수술에 의한 상처, 프로스타글라딘 E 과다 증후군, 아테롬성 동맥 경화증, 통풍, 관절염, 류머티즘성 관절염, 강직성 척추염, 호지킨병, 췌장염, 결막염, 홍채염, 공막염, 포도막염, 아토피 피부염, 건선, 접촉성피부염, 습진성 피부염, 광선피부염, 지루피부염, 포진성피부염, 편평태선, 경화태선, 괴저성 농피증, 천포창, 수포성 표피박리증, 알러지, 피부과민증, 습진 및 다발성 경화증으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1 종 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0059] 본 발명의 약학적 조성물은 본 발명의 목적 효과를 위하여 약학적 유효량의 본 발명의 엑소좀 유사 나노베지클을, 세포 독성없이 목적으로 하는 유효한 치료 효과를 기대할 수 있는 농도라면, 임의의 농도로 포함될 수 있다.
- [0060] 본 명세서에서 용어 "약학적 유효량"은 상술한 GDE의 효능 또는 활성을 달성하는 데 충분한 양을 의미한다.
- [0061] 본 발명의 조성물이 약학적 조성물로 이용되는 경우, 본 발명의 약학적 조성물은 통상의 방법에 따라 다양한 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 예컨대, 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽 등의 경구형 제형으로 제형화할 수 있고, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 또한, 상기 조성물은 동결건조된 제형일 수 있다. 상기 조성물은 즉시 사용 가능하도록 (ready-to-use) 밀봉된 포장재 또는 포장 용기에 담긴 동결건조된 제형일 수 있다.
- [0062] 본 발명의 조성물은 엑소좀 유사 나노베지클과 함께 염증성 질환에 대하여 예방 또는 치료 효과를 갖는 공지의 유효성분을 1 종 이상 함유할 수 있다.
- [0063] 본 발명의 조성물은 약학적으로 허용 가능한 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 이때 약학적으로 허용 가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이드알실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엷, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당 등이 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 약학적으로 허용 가능한 첨가제는 상기 조성물에 대해 0.1 ~ 90 중량부로 포함되는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0064] 본 발명의 조성물은 실제 임상투여 시에 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제할 수 있으며, 당해 기술 분야에 알려진 적합한 제제는 문헌(Remington's Pharmaceutical Science, 최근, Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 것을 이용하는 것이 바람직하다.
- [0065] 상기 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트(Calcium carbonate), 수크로스(Sucrose) 또는 락토오스(Lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 또한, 상기 경구 투여를 위한 액상제제에는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0066] 상기 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

- [0067] 본 발명의 약학적 조성물의 투여량은 상기 약학적 조성물의 제제화 방법, 투여 방식, 투여 시간 및/또는 투여 경로 등에 의해 다양해질 수 있으며, 상기 약학적 조성물의 투여로 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 투여 대상이 되는 개체의 종류, 연령, 체중, 일반적인 건강 상태, 질병의 증세나 정도, 성별, 식이, 배설, 해당 개체에 동시 또는 이시에 함께 사용되는 약물 기타 조성물의 성분 등을 비롯한 여러 인자 및 의학 분야에서 잘 알려진 유사 인자에 따라 다양해질 수 있으며, 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 목적하는 치료에 효과적인 투여량을 용이하게 결정하고 처방할 수 있다.
- [0068] 본 발명의 약학적 조성물의 투여 경로 및 투여 방식은 각각 독립적일 수 있으며, 그 방식에 있어 특별히 제한되지 아니하며, 목적하는 해당 부위에 상기 약학적 조성물이 도달할 수 있는 한 임의의 투여 경로 및 투여 방식에 따를 수 있다.
- [0069] 또한, 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 인삼 유래의 엑소좀-유사 나노베지클(Ginseng-derived exosome like nanoparticles, GDE)을 포함하는 항염증용 피부 외용제 조성물을 제공한다. 본 발명에서 상기 항염증용 조성물은 염증성 질환의 예방, 개선 또는 치료용 피부 외용제 조성물일 수 있다.
- [0070] 또한, 본 발명은 인삼 유래의 엑소좀-유사 나노베지클(Ginseng-derived exosome like nanoparticles, GDE)을 포함하는 항염증용 화장품 조성물을 제공한다. 본 발명에서 상기 항염증용 조성물은 염증 억제 또는 완화용 화장품 조성물일 수 있다.
- [0071] 본 발명에 있어서, 상기 피부 외용제 또는 화장품 조성물은 연고제, 크림제, 젤제, 로션제, 액제, 드레싱제, 패취제, 수포제, 테이프제, 연무제, 외용산제 및 스프레이제 등으로 제형화될 수 있다.
- [0072] 본 발명의 조성물에는 일반적으로 피부 외용제 또는 화장품 조성물에 사용되는 임의의 성분이 사용될 수 있다.
- [0073] 예를 들어, 연고제, 크림제, 젤제 및 로션제의 경우, 백색와셀린(와셀린), 황색와셀린, 라놀린, 정제 밀랍, 세타놀, 스테아릴 알콜, 스테아르산, 수소첨가유, 탄화수소젤, 폴리에틸렌 글리콜, 액체 파라핀 및 스쿠알란과 같은 기재; 올레산, 이소프로필 미리스테이트, 글리세롤 트리이소옥타노에이트, 크로타미톤, 디에틸 세바케이트, 디이소프로필 세바케이트, 디이소프로필아디페이트, 헥실라우레이트, 지방산, 지방산 에스테르, 식물성유, 지방산 알콜 및 알콜과 같은 용매 또는 안정화제; 토코페롤 유도체, L-아스코르브산, 디부틸히드록시톨루엔 및 부틸히드록시아니솔과 같은 항산화제; p-히드록시벤조에이트와 같은 방부제; 글리세린, 프로필렌 글리콜 및 소듐히알루로네이트와 같은 연석제; 폴리옥시에틸렌 유도체, 글리세롤 지방산 에스테르, 수크로스 지방산 에스테르, 소르비탄 지방산 에스테르, 프로필렌 글리콜 지방산 에스테르 및 레시틴과 같은 계면활성제; 카르복시비닐폴리머, 크산검, 카르복시메틸 셀룰로스 및 소듐 카르복시메틸 셀룰로스, 히드록시프로필 셀룰로스 및 히드록시프로필메틸 셀룰로스와 같은 증점제; 안정화제; 보존제; 흡착 촉진제; 및 기타 적당한 충전제들이 첨가될 수 있다.
- [0074] 수포제의 경우, 폴리아크릴산과 폴리아크릴산 공중합체와 같은 점착제; 알루미늄실레이트, 알루미늄 포타슘 실레이트, 알루미늄 클로라이드, 마그네슘 알루미늄노메타실리케이트 및 디히드록시알루미늄 아미노아세테이트와 같은 가교제; 소듐 폴리아크릴레이트, 폴리비닐알콜, 폴리비닐피롤리돈, 젤라틴, 소듐알기네이트, 카르복시메틸셀룰로스, 소듐 카르복시메틸 셀룰로스, 히드록시프로필 셀룰로스와 히드록시프로필메틸 셀룰로스와 같은 증점제; 글리세린, 폴리에틸렌글리콜 (마크로골), 폴리에틸렌글리콜과 1,3-부탄디올과 같은 다가알콜; 폴리옥시에틸렌 유도체와 같은 계면활성제; l-멘톨과 같은 향료; p-히드록시벤조에이트와 같은 방부제; 정제수; 및 기타 적당한 충전제가 첨가될 수 있다.
- [0075] 테이프제의 경우, 스티렌-이소프렌-스티렌 블록 공중합체 및 아크릴레이트 수지와 같은 점착제; 아크릴성 포화 탄화수소 수지, 수소 첨가된 로신 수지 및 테르펜 수지와 같은 점착 수지; 액체 검과 액체 파라핀과 같은 유연제; 디부틸히드록시톨루엔과 같은 항산화제; 폴리에틸렌글리콜과 같은 다가알콜; 올레산과 같은 흡착 촉진제; 폴리옥시에틸렌 유도체와 같은 계면활성제; 및 기타 적당한 충전제가 첨가될 수 있다. 그밖에, 소듐 폴리아크릴레이트와 폴리비닐알콜과 같은 물흡수성 폴리머와 소량의 정제수가 물을 함유하는 테이프제의 제조에 첨가될 수 있다.
- [0076] 연무제의 경우, 백색와셀린(와셀린), 황색와셀린, 라놀린, 정제 밀랍, 세타놀, 스테아릴 알콜, 스테아르산, 수소첨가유, 탄화수소젤, 폴리에틸렌글리콜, 액체 파라핀 및 스쿠알란과 같은 기재; 올레산, 이소프로필 미리스테이트, 글리세롤 트리이소옥타노에이트, 크로타미톤, 디에틸세바케이트, 디이소프로필 세바케이트, 이소프로필아디페이트, 헥실라우레이트, 지방산, 지방산 에스테르, 식물성유, 지방족 알콜 및 알콜과 같은 용매 또는 안정화제; 토코페롤 유도체, L-아스코르브산, 디부틸히드록시톨루엔 및 부틸히드록시아니솔과 같은 항산화제; p-

히드록시벤조에이트와 같은 방부제; 글리세린, 프로필렌 글리콜 및 소듐히알루로네이트와 같은 연석제; 폴리옥시에틸렌 유도체, 글리세롤 지방산 에스테르, 수크로스 지방산 에스테르, 소르비탄 지방산 에스테르, 프로필렌 글리콜 지방산 에스테르 및 레시틴과 같은 계면 활성제 연고, 크림, 젤 또는 로션에 사용되는 것과 같은 카르복시비닐 폴리머, 크산검, 카르복시메틸 셀룰로스 및 소듐 카르복시메틸 셀룰로스, 히드록시프로필 셀룰로스 및 히드록시프로필메틸 셀룰로스와 같은 증점제; 안정화제; 완충제; 감미제 현탁제; 유화제; 조미료; 방부제; 흡착 촉진제 및 기타 적당한 충전제들이 첨가될 수 있다.

[0077] 외용산제의 경우, 감자전분, 쌀전분, 옥수수 전분, 탈크 및 산화아연과 같은 충전제, 및 기타 적당한 첨가제들이 첨가될 수 있다.

[0078] 상기 화장품 조성물에는 인삼 유래 엑소좀 유사 나노베지클 이외에 기능성 첨가물 및 일반적인 화장품 조성물에 포함되는 성분이 추가로 포함될 수 있다. 상기 기능성 첨가물로는 수용성 비타민, 유용성 비타민, 고분자 펩티드, 고분자 다당, 스펅그 지질 및 해초 엑기스로 이루어진 군에서 선택된 성분을 포함할 수 있다. 이외에 포함되는 배합 성분으로서는 유지 성분, 보습제, 에몰리엔트제, 계면 활성제, 유기 및 무기 안료, 유기 분체, 자외선 흡수제, 방부제, 살균제, 산화 방지제, 식물 추출물, pH 조정제, 알콜, 색소, 향료, 혈행 촉진제, 냉감제, 제한(制汗)제, 정제수 등을 들 수 있다.

[0079] 상기 화장품 조성물은 제형이 특별히 한정되지 않으며, 목적하는 바에 따라 적절히 선택할 수 있다. 예를 들어, 스킨로션, 스킨소프너, 스킨토너, 아스트린젠트, 로션, 밀크로션, 모이스처 로션, 영양로션, 맛사지크림, 영양크림, 모이스처크림, 핸드크림, 파운데이션, 에센스, 영양에센스, 팩, 비누, 클렌징폼, 클렌징로션, 클렌징크림, 바디로션 및 바디클린저로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 제형으로 제조될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0080] 본 발명의 제형이 페이스트, 크림 또는 젤인 경우에는 담체 성분으로서 동물섬유, 식물섬유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.

[0081] 본 발명의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄히드록시드, 칼슘 실리카이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.

[0082] 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액의 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용매화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다.

[0083] 본 발명의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다.

[0084] 본 발명의 제형이 계면-활성제 함유 클린징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아미드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 유, 리놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.

[0085] 본 발명의 피부 외용제 또는 화장품 조성물은 피부나 점막에 적용되는 조성물에 배합되는 공지의 각종 성분을 배합하여 제조될 수 있으며, 피부 외용제 또는 화장품 조성물을 제조하는데 잘 알려진 방법에 따라, 필요에 따라 적당한 기제와 함께, 각 성분을 잘 혼합하여 제조될 수 있으며 이와 같이 제조된 제제는 필요에 따라 병변에 적용된다.

[0086] 본 발명에 따른 엑소좀-유사 나노베지클은 본 발명의 피부 외용제 또는 화장품 조성물 총 중량에 대하여 0.0001 내지 50 중량%, 바람직하게는 1 내지 30 중량%로 포함된다. 그 함량이 0.0001 중량% 미만일 경우에는 항염증 효과를 달성할 수 없으며, 50 중량%를 초과할 경우에는 제제화가 어렵고 사용감이 저하될 수 있다.

[0088] 또한, 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 인삼 유래의 엑소좀-유사 나노베지클(Ginseng-

derived exosome like nanoparticles, GDE)을 유효성분으로 포함하는 항염증용 식품조성물 및 이를 함유하는 건강기능식품을 제공한다.

- [0089] 본 발명의 조성물이 식품 조성물로 이용되는 경우, 본 발명의 식품 조성물은 염증으로 인해 발병하는 질환의 예방 또는 개선 효과를 가지는 식품을 의미하는 것으로, 장기적으로 복용하였을 때 인체에 무해해야 한다.
- [0090] 본 발명에서 사용되는 용어, "개선"이란 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면, 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미한다. 이때, 상기 조성물은, 관련 질환의 발병 단계 이전 또는 발병 후, 치료를 위한 약제와 동시에 또는 별개로서 사용될 수 있다.
- [0091] 본 발명의 식품 조성물은 환제, 분말, 과립, 침제, 정제, 캡슐 또는 액제 등의 형태를 포함할 수 있으며, 본 발명의 GDE를 첨가할 수 있는 식품의 종류에는 별다른 제한이 없으며, 예를 들어 각종 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강보조 식품류 등이 있다.
- [0092] 상기 식품 조성물에는 본 발명의 인삼 유래의 엑소좀-유사 나노베지클 이외에도 다른 성분을 추가할 수 있으며, 그 종류는 특별히 제한되지 않는다. 예를 들어, 통상의 식품과 같이 여러 가지 생약 추출물, 식품학적으로 허용 가능한 식품보조첨가제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.
- [0093] 본 발명에서 용어, "식품보조첨가제"란 식품에 보조적으로 첨가될 수 있는 구성요소를 의미하며, 각 제형의 건강기능식품을 제조하는데 첨가되는 것으로서 당업자가 적절히 선택하여 사용할 수 있다. 식품보조첨가제의 예로는 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 향진제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등이 포함되지만, 상기 예들에 의해 본 발명의 식품보조첨가제의 종류가 제한되는 것은 아니다.
- [0094] 상기 천연 탄수화물의 예는 포도당, 과당 등의 단당류; 말토스, 수크로스 등의 이당류; 및 텍스트린, 시클로텍스트린 등의 다당류와, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알코올이 있으며, 상기한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴 등), 스테비아 추출물(레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.
- [0095] 본 명세서에서 사용되는 용어 "건강기능식품"은 식품에 물리적, 생화학적, 생물공학적 수법 등을 이용하여 해당 식품의 기능을 특정 목적에 작용, 발현하도록 부가가치를 부여한 식품군이나 식품 조성이 갖는 생체방어리듬조절, 질병방지와 회복 등에 관한 체내조절기능을 생체에 대하여 충분히 발현하도록 설계하여 가공한 식품을 의미한다. 본 발명의 목적상 상기 건강기능식품은 항염증 활성을 증진시키기 위한 것으로, 예를 들어, 사이코카인의 생성에 의한 염증 질환들을 예방 및 개선하기 위한 건강기능식품을 의미한다.
- [0096] 여기서, '기능성'이란 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻는 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.
- [0097] 상기 식품 조성물은 기능성 식품(functional food), 영양보조제(nutritional supplement), 건강식품(health food) 및 식품첨가제(food additives) 등의 모든 형태를 포함한다. 상기 유형들은 당업계에 공지된 통상적인 방법에 따라 다양한 형태로 제조할 수 있다.
- [0098] 본 발명에 있어서 식품 조성물은 당업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조가능하며, 상기 제조 시에는 당업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한 상기 식품 조성물의 제형 또한 식품 조성물로 인정되는 제형이면 제한 없이 제조될 수 있다.
- [0099] 상기 식품 조성물은 상기 약학적 조성물과 동일한 방식으로 제제화되어 건강기능식품으로 이용될 수 있으며, 각종 식품에 첨가될 수 있다.
- [0100] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 수프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.
- [0101] 본 발명의 실시예에서, 본 발명의 식품 조성물은 식품 첨가물일 수 있다. 상기 식품 첨가물은 상기 인삼 유래의 엑소좀-유사 나노베지클을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합

하게 결정될 수 있다.

[0102] 본 발명의 실시예에서, 본 발명의 식품 조성물은 건강음료 조성물일 수 있다. 상기 건강음료 조성물은 인삼 유래의 엑소좀-유사 나노베지클 외에 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 포함할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토오스, 수크로오스와 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml 당 일반적으로 약 0.01 내지 10 g, 바람직하게는 약 0.01 내지 0.1 g 이다.

[0103] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 포함할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 포함할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.01 내지 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0105] 또한, 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 인삼 유래의 엑소좀-유사 나노베지클(Ginseng-derived exosome like nanoparticles, GDE)을 유효성분으로 포함하는, 항염증용 사료 조성물을 제공한다.

[0106] 본 발명의 사료 조성물의 원료인 인삼 유래의 엑소좀-유사 나노베지클은 건조된 상태로 공급될 수도 있으며, 별도의 건조과정을 수행하지 않고 그대로 이용될 수도 있다. 상기 인삼 유래의 엑소좀-유사 나노베지클을 단독으로 사용할 수도 있으며, 종래 공지된 사료 첨가제 또는 사료와 병용하여 사용할 수도 있다. 또한 공지된 사료 첨가제 또는 사료에 첨가되는 각종 부형제들도 역시 포함될 수 있다. 본 발명의 사료 조성물에는 동물사료에 통상적으로 사용되는 영양제, 방부제, 보존제, 향생제, 비타민 등의 미량 영양성분 등이 더 포함될 수 있다. 상기 영양제, 방부제, 보존제, 향생제, 미량 영양 성분 등은 해당 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 당업자가 통상적으로 사료에 첨가하는 함량으로 임의 선택하여 사용할 수 있다.

[0107] 상술한 본 발명의 인삼 유래의 엑소좀-유사 나노베지클을 유효성분으로 포함하고 있어, 항염 효과를 나타낼 뿐만 아니라, 안전하므로, 이를 사용할 경우 염증성 질환 예방 또는 개선에 기여할 수 있다.

발명의 효과

[0110] 본 발명은 인삼-유래 엑소좀-유사 나노베지클은 생체 내 독성을 가지지 않으면서도, NO 생성을 억제하고, 염증 유발인자인 iNOS 및 COX-2의 발현을 억제하고, 전염증성 사이토카인인 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 의 발현을 억제하는 등 우수한 항염증 효과를 가지므로, 약학, 화장품, 식품 등 다양한 분야에서 유용하게 사용될 수 있다. 또한, 본 발명의 인삼-유래 엑소좀-유사 나노베지클은 별도의 장비 공급이나 인력없이도 용이하게 획득할 수 있고 또한 대량 수득이 가능한 바, 이를 활용할 경우 경제성이 우수하다.

도면의 간단한 설명

[0112] 도 1은 본 발명의 GDE의 분리방법을 도식화한 것이다.

도 2a 및 2b는 LC-MS/MS를 이용한 본 발명의 GDEs의 분석 결과를 보여준다.

도 3a 내지 3d는 본 발명의 GDEs의 분석 결과를 보여준다. 도 3a는 본 발명의 초원심분리 결과 분리 정제 산물인 GDEs를 보여주고, 도 3b는 상기 도 3a의 상기 GDEs (녹색 구간)의 농도를 보여주며, 도 3c는 본 발명의 GDEs의 NTA 검사 결과를 보여주고, 도 3d는 해당 구간의 DLS(dynamic light scattering) 결과를 보여준다. 해당 구간의 NTA, DLS로 농도, 크기 등을 보았을 때 순수 GDE임을 확인할 수 있다.

도 4는 본 발명의 GDE의 안정성을 확인한 결과를 보여준다.

도 5는 RAW264.7에서의 본 발명의 GDEs의 세포독성 효과를 보여준다.

도 6은 LPS로 염증작용을 유도한 RAW264.7에서의 본 발명의 GDEs의 사이토카인 억제 효과를 보여준다.

도 7은 LPS로 염증작용을 유도한 RAW264.7에서의 본 발명의 GDEs의 NF-kappa B 신호 메커니즘 관련 단백질의 발현 억제 효과를 보여준다.

도 8은 마우스 BMM 세포에서의 본 발명의 GDEs의 세포독성 효과를 보여준다.

도 9는 LPS로 염증작용을 유도한 마우스 BMM 세포에서의 본 발명의 GDEs의 사이토카인 억제 효과를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 실시예를 통하여 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

실시예 1. 본 발명의 인삼 유래의 엑소좀-유사 나노베지클 (GDE; Ginseng-derived exosome like nanoparticles) 제조

본 발명자들은 본 발명의 인삼 유래의 엑소좀-유사 나노베지클 (GDE; Ginseng-derived exosome like nanoparticles)을 하기와 같이 제조하였다(도 1).

먼저, 4년근 Panax 인삼을 1X PBS(phosphate-buffered saline)가 들어있는 블렌더에 넣어 갈고 순차적으로 2000g 에서 20분, 10000g 에서 60분의 2회 고속원심분리하여 파편을 제거한 인삼액(juice)을 제조하였다. 68% (v/v) 및 27% (v/v) 의 수크로즈 쿠션 용액을 두 층을 서로 혼합하지 않고 폴리카보네이트 병에 천천히 첨가하였다. 상기 두 개의 수크로즈 층 위로 인삼액을 쌓아 올려준 뒤 100,000g, 90 분 조건으로 초원심분리하였다. 이 후, 두 개의 수크로즈 쿠션층 사이의 나노소포체를 포함하고 있는 층(인삼 유래 EV)을 수집하였다. 이어서, 인삼 유래의 엑소좀-유사 나노베지클(Ginseng-derived exosome like nanoparticles, GDE)를 분리정제하기 위해 수크로즈 구배(8/30/45/60%)(v/v)를 사용하여 200,000g, 90 분 조건으로 첫번째 초원심분리하였다. 이때, 8% (v/v) 수크로즈층 위로 인삼유래 나노베지클층을 쌓아주었다. 두 번째 초원심분리 후 GDE를 포함하는 층을 8% (v/v)와 30% (v/v) 수크로즈 층 사이에서 얻을 수 있다.

상기 두 번째 초원심분리 후 8%와 30% 자당 층 사이에 위치한 GDE를 포함하는 층을 분리하고 상기 산물의 상층액을 분리하여 최종산물로서 순수 GDE를 획득하였다.

실시예 2. 본 발명의 GDE 성분 분석

본 발명자들은 상기 실시예 1에서 획득한 GDE의 성분을 확인하고자 통상적인 LC-MS/MS 방법을 이용한 정성적인 분석을 수행하였다.

그 결과, 도 2a 및 2b에 나타난 바와 같이, 인삼의 유효성분인 진세노사이드(ginsenoside) 중 Rb1, Rg1, Rg3가 GDE에 얼마나 포함되어 있는지 분석했을 때, GDE 1ml를 기준으로 Rb1이 2475ng/ml로 가장 많이 포함되어 있었으며, Rg1 675ng/ml, Rg3 84ng/ml이 들어있는 것으로 확인되었다.

또한, 본 발명자들은 DLS, NTA 및 TEM을 사용하여 GDE의 크기 분포, Zeta 전위 및 형태를 평가하였다.

그 결과, 도 3b 내지 3d에 나타난 바와 같이, GDE는 1ml당 2.05×10^{13} 의 상당한 양의 갯수를 가지며, 200nm 미만의 크기를 가지고 있는 것을 알 수 있었다. 또한, GDE는 평균 직경이 105.8 nm이고 음의 표면 전하가 -20.7 mV 인 구형인 것으로 밝혀졌다. 또한, TEM을 이용하여 GDE는 베지클 형태의 나노입자임을 확인하였다.

(3) GDE 안정성

본 발명자들은 동결건조된 GDE의 단백질과 총 RNA 농도를 측정하여 정량 분석을 수행하였고 90일 동안 GDE의 안정성을 평가하였다.

그 결과 도 4에 나타난 바와 같이, 동결건조된 GDE의 단백질과 총 RNA 농도 측정 결과 60일까지 안정성이 유지되는 것을 확인하였다.

[0130] **실시예 3. LPS로 염증작용을 유도한 RAW264.7에서 GDE의 항염 효과 확인**

[0131] 본 발명자들은 LPS로 염증작용을 유도한 RAW264.7에서 GDE의 항염 효과를 확인하고자 하였다.

[0132] RAW264.7 세포는 마우스 유래 macrophage로서, LPS (lipo-polysaccharide)로 자극을 주면 M1, 즉, 염증이 유발된 세포 상태가 된다. 이에, RAW264.7 세포에 LPS (1ug/ml)와 GDE를 농도별(0,1,5,10,20ug/ml)로 함께 처리하여 하기와 같이 GDE의 염증 억제 효과를 검증하였다.

[0134] (1) RAW264.7 세포에서 GDE의 세포독성 측정

[0135] 먼저, 본 발명자들은 GDE의 세포독성을 측정하였다.

[0136] 간략하게는, 96 well plate에 RAW264.7 1×10^4 개의 세포와 200ul의 배지 10% FBS와 1% PS (페니실린과 스트렙토마이신)이 첨가된 DMEM (Dulbecco's Modified Essential Medium)를 넣었다. 상기 plate를 5% CO₂ 농도와 37℃를 유지하는 배양기에서 전배양하였다. 24시간 후에 전에 있던 배지를 제거하고, GDE를 배지에 섞어 농도별로 0-160ug/ml로 처리하였다. 그 후 24시간 후에 배지를 제거하고, 각 well당 WST 20ul와 배지 180ul를 첨가하였다. 2시간 배양한 후 각 well에서 100ul의 배지를 다른 plate로 옮겼다. plate reader를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0137] 그 결과, 도 5에 나타낸 바와 같이, RAW264.7에서 GDE를 농도 별로 24시간 동안 처리했을 때, 40ug/ml 이하의 GDE 농도에서 독성을 보이지 않았을 뿐만 아니라, 대조군과 비교하여 GDE를 처리한 군은 RAW264.7의 증식이 촉진된 것으로 나타났다.

[0139] (2) RAW264.7 세포에서 GDE의 사이토카인(cytokine) 조절 확인

[0140] 본 발명자들은 염증 유발 시 GDE의 사이토카인(cytokine) 발현 억제 수준을 확인하였다.

[0141] 간략하게는, RAW264.7 세포를 48well에 2×10^4 개를 넣고 전배양한 후, LPS (1ug/ml)과 GDE 농도별 (0/1/5/10ug/ml)로 넣은 DMEM으로 배지를 교체하였다. 7시간 24시간 후에 배지 부분만 수거한 후 -20℃에 보관하였다. 수거한 상층액을 ELISA kit를 이용하여 분석하였다.

[0142] 그 결과, 도 6에 나타낸 바와 같이, LPS로 염증을 일으키는 M1상태의 RAW264.7 세포에 GDE를 농도별로 처리한 군은, GDE를 처리 않고 LPS로만 염증을 유도한 군에 비해서, GDE의 농도가 높아질수록 TNF- α 및 IL-6의 발현을 현저하게 억제하는 효과를 나타냈다.

[0144] (3) RAW264.7 세포에서 NF-kappa B 신호 메커니즘 확인

[0145] 본 발명자들은 염증 유발 시 GDE에 의한 NF-kappa B 신호 메커니즘을 확인하였다.

[0146] NF-kappa B 신호 전달 체계에서는 LPS로 자극된 RAW264.7 세포는 NF-kappa B의 활성화로 인하여 여러 가지 사이토카인이 분비될 뿐만 아니라, 하위 단계 유전자인 iNOS나 COX2의 발현량 증가로 염증 반응 물질의 양이 증가한다. iNOS는 NO를 생성하며, COX2는 PEG2 (prostaglandin 2)의 양을 증가시킨다.

[0147] 간략하게는, RAW 264.7 세포를 60mm plate에 4×10^5 개를 전배양시켰다. 24시간 후 GDE 농도별 (0/10/20ug/ml)로 넣은 DMEM으로 배지를 교체하였다. 2시간 후에 LPS (1ug/ml)을 처리한 후 22시간 더 배양시켰다. protease inhibitor와 phosphorylation을 중단시키는 Phostop을 넣고, RIPA 버퍼200ul를 넣어 스크래퍼로 세포를 긁어내어 수거한 후, 12000rpm에서 20분동안 원심분리하였다. 상층액을 분리하여, BCA assay로 단백질을 정량하였다. 20ug의 단백질과 5x SDS loading buffer를 섞어 95℃에서 단백질을 안정화시킨후 각 샘플을 SDS-PAGE를 실시하였다. 분리된 단백질은 PVDF 멤브레인에 200mA로 1시간 동안 트랜스퍼하였다. 멤브레인을 10분 blocking buffer에서 블로킹한 후 blocking buffer에 1:1000으로 1차 antibody를 넣어 4℃에서 16시간 동안 천천히 교반하여 반응시켰다. 멤브레인을 1X TBST로 10분간 3번 세척하고, 2차 antibody를 blocking buffer 1:2500 희석하여 넣고, 1시간 동안 교반시켰다. 브레인을 1X TBST로 10분간 3번 세척하고, 멤브레인에 chemiluminescence 반응을

일으키는 용액을 넣어 분석 기기에서 결과를 분석하였다.

[0148] 그 결과, 도 7에 나타낸 바와 같이, COX2의 경우 GDE만 처리한 군은 단백질의 발현을 볼 수 없었고, LPS만 처리된 군에 비하여, LPS와 GDE를 처리한 군은 농도가 높아지면서 COX2 양이 약간 감소하는 것으로 나타났다.

[0149] iNOS은 역시 GDE만 처리한 군은 단백질의 발현을 볼 수 없었고, LPS만 처리된 군에 비하여, LPS와 GDE를 10ug/ml 처리한 군은 농도가 감소하는 것으로 나타났고, LPS와 GDE 20ug/ml 처리한 군에서는 iNOS가 발현이 억제되는 것을 볼 수 있었다.

[0151] 실시예 4. LPS로 염증작용을 유도한 BMM (mouse bone marrow-derived macrophage)에서 GDE의 항염 효과 확인

[0152] 본 발명자들은 LPS로 염증작용을 유도한 BMM (mouse bone marrow-derived macrophage)에서 GDE의 항염 효과를 확인하고자 하였다.

[0153] ICR 6주령 수컷 마우스의 대퇴골에서 bone marrow macrophage를 채취하고, 채취된 세포들은 M-CSF로 macrophage로 분화시키고 5일 정도가 지나면 실험에 사용하였다. 직접 마우스 생체에서 뽑아낸 BMM 세포를 LPS로 유도하여 M1 세포 상태로 염증 유발시켰을 때 GDE가 미치는 영향을 살펴볼 수 있다.

[0155] (1) 마우스 BMM 세포에서 GDE의 세포독성 측정

[0156] 본 발명자들은 마우스 BMM 세포에서 GDE의 세포독성을 측정하였다.

[0157] 간략하게는, 96 well plate에 5×10^3 개의 세포와 200ul의 배지, 10% FBS와 1% PS (페니실린과 스트렙토마이신)이 첨가된 MEM alpha (Minimun Essential Medium)를 넣었다. 그 세포를 5% CO₂ 농도와 37℃를 유지하는 배양기에서 전배양하였다. 2시간 후에 전에 있던 배지를 제거하고, GDE를 배지에 섞어 농도별로 0-30ug/ml로 처리하였다. 이어서, 24시간 및 96시간 후 전에 있던 배지를 제거하고, 각 well당 WST 20ul와 배지 180ul를 첨가하였다. 2시간 배양한 후 각 well에서 100ul의 배지를 다른 plate로 옮겼다. plate reader를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0158] 그 결과, 도 8에 나타낸 바와 같이, 마우스 BMM (bone marrow derived macrophage) 세포에 GDE를 농도 별로 처리했을 때, 10g/ml 이하의 농도에서는 GDE를 처리하지 않은 군과 비교하면, GDE를 처리한 경우 마우스 BMM 세포의 증식을 촉진시키는 것으로 나타났다.

[0160] (2) 마우스 BMM 세포에서 GDE의 사이토카인 조절 확인

[0161] 본 발명자들은 염증 유발 시 GDE의 사이토카인(cytokine) 발현 억제 수준을 확인하였다.

[0162] 간략하게는, 마우스 BMM 세포를 48well에 2×10^4 개를 넣고, 전배양한 후, LPS (1ug/ml)와 GDE 농도별 (0/1/5/10ug/ml)로 넣은 배지로 교체하였다. 24시간 후에 배지 부분만 수거하였다. 수거한 상층액을 ELISA kit를 이용하여 분석하였다.

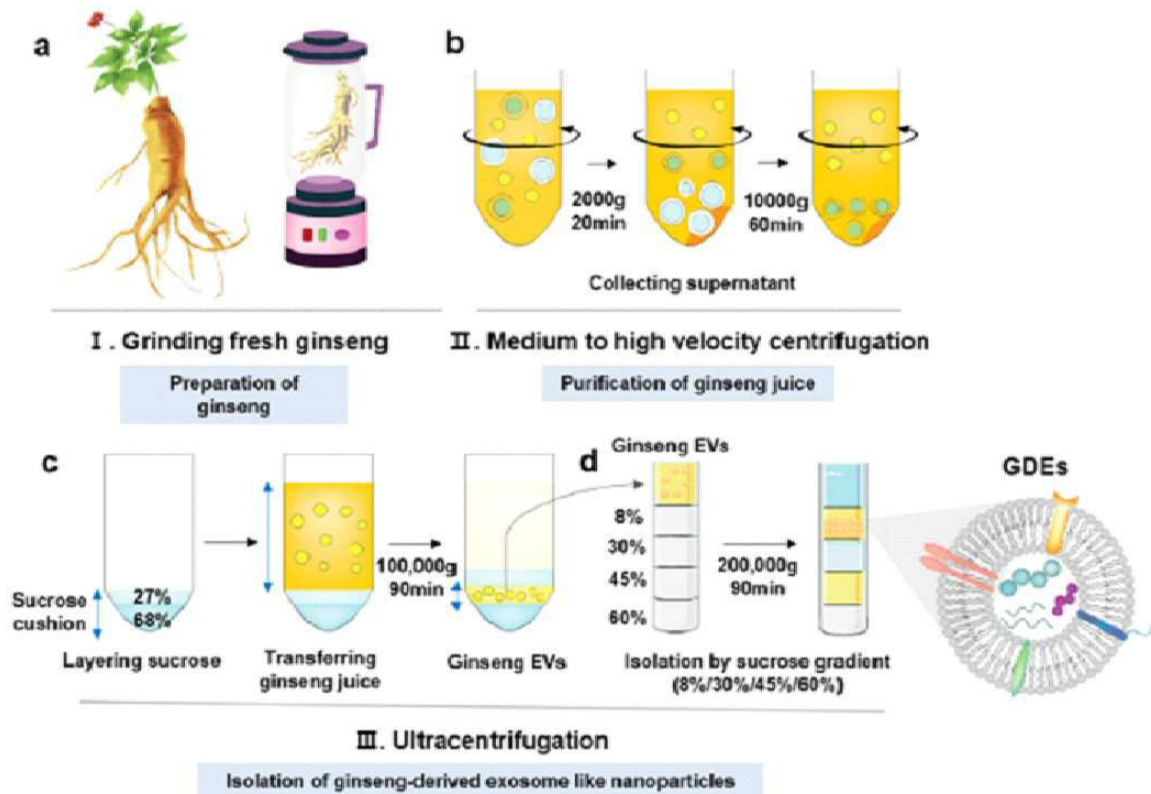
[0163] 그 결과, 도 9에 나타낸 바와 같이, LPS만 처리한 군에 비해서 GDE를 농도 별로 처리한 군은 TNF- α , IL-6 및 IL-1 β 를 탁월하게 억제하였다.

[0164] 따라서, 본 발명의 GDE는 염증 관련 질환에 효과적인 치료제임을 입증한다.

[0166] 이상으로, 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

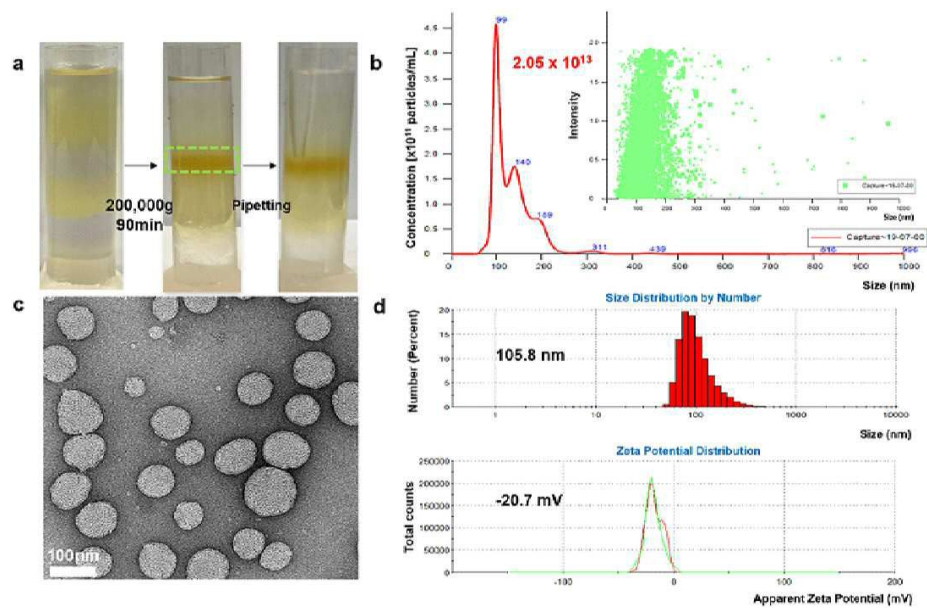
도면1



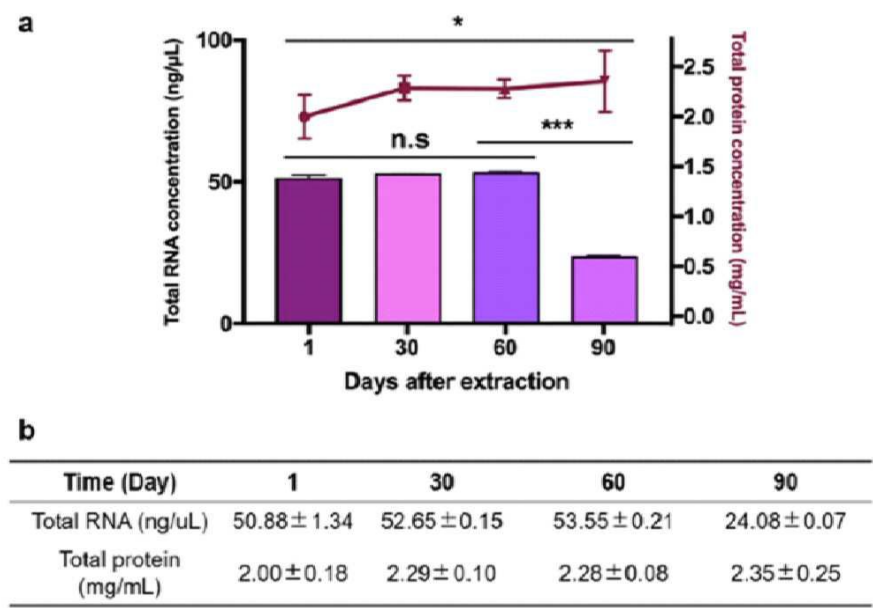
도면2



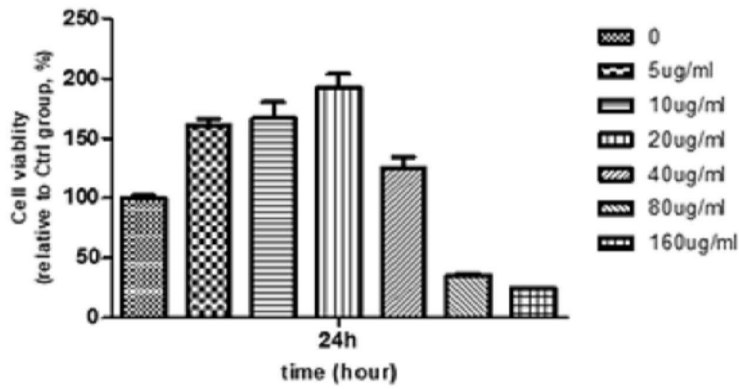
도면3



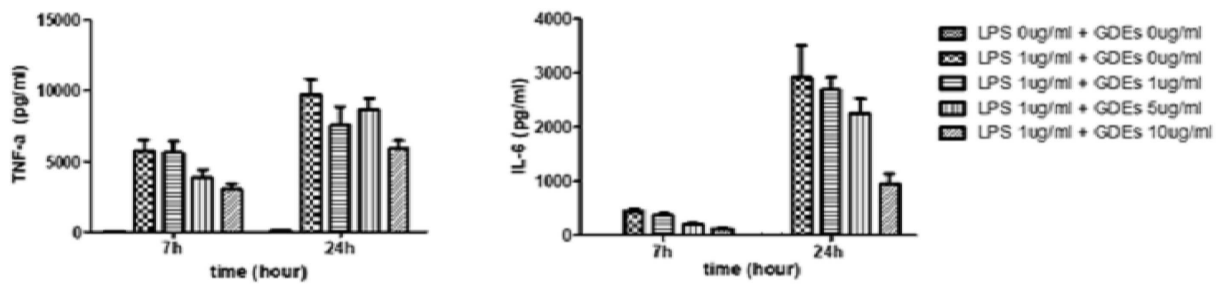
도면4



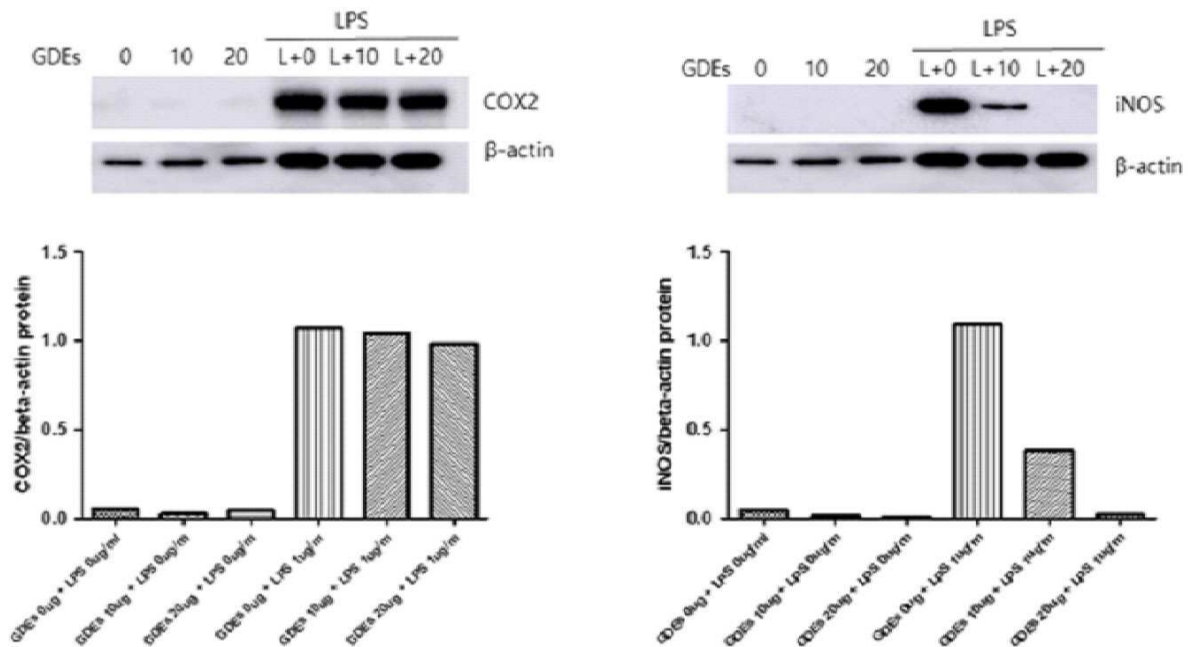
도면5



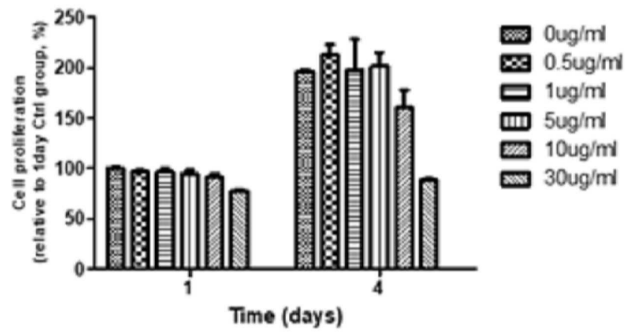
도면6



도면7



도면8



도면9

