

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2023년 9월 7일 (07.09.2023)



(10) 국제공개번호
WO 2023/167484 A1

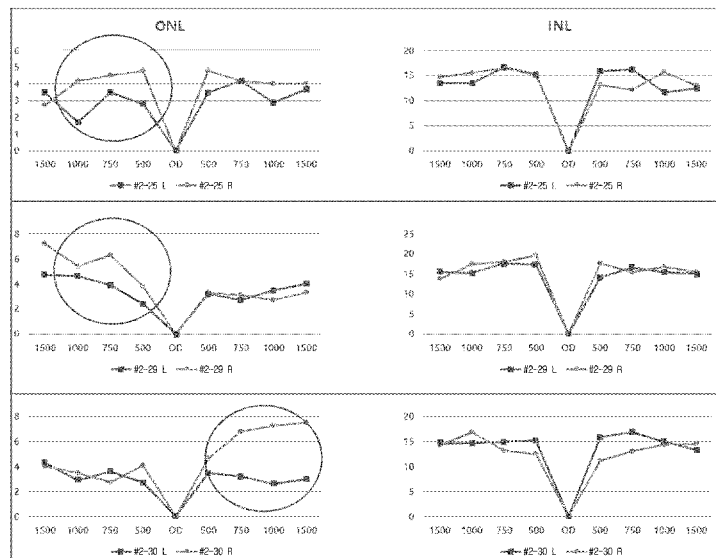
- (51) 국제특허분류:
A61K 35/28 (2006.01) *A61P 27/02* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2023/002770
- (22) 국제출원일: 2023년 2월 28일 (28.02.2023)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2022-0026547 2022년 3월 2일 (02.03.2022) KR
- (71) 출원인: 서울대학교병원 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY HOSPITAL) [KR/KR]; 03080 서울특별시 종로구 대학로 101, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 우세준 (WOO, Se Joon); 13620 경기도 성남시 분당구 구미로173번길 82 분당서울대학교병원, Gyeonggi-do (KR). 홍혜경 (HONG, Hye Kyoung); 13620 경기도 성남시 분당구 구미로173번길 82 분당서울대학교병원, Gyeonggi-do (KR). 서수인 (SEO, Soo In); 13620

경기도 성남시 분당구 구미로173번길 82 분당서울대학교병원, Gyeonggi-do (KR).

- (74) 대리인: 최우성 (CHOI, Woo-sung); 03151 서울특별시 종로구 종로5길 58 석탄회관빌딩 10층, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,

(54) Title: COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING RETINAL DEGENERATIVE DISEASE CONTAINING EXOSOMES EXTRACTED FROM MESENCHYMAL STEM CELLS

(54) 발명의 명칭: 중간엽 줄기세포로부터 추출된 엑소솜을 함유하는 망막변성질환 예방 또는 치료용 조성물



(57) Abstract: Provided is a composition for preventing or treating a retinal degenerative disease, capable of preventing or delaying retinal cell degeneration. The composition for preventing or treating a retinal degenerative disease contains exosomes extracted from human-derived mesenchymal stem cells as an active ingredient.

(57) 요약서: 망막세포의 변성을 예방하거나 지연시킬 수 있는 망막변성질환 예방 또는 치료용 조성물이 제공된다. 이 망막변성질환 예방 또는 치료용 조성물은, 인체 유래 중간엽 줄기세포로부터 추출된 엑소솜을 유효성분으로 함유한다.

[다음 쪽 계속]



WO 2023/167484 A1

TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

명세서

발명의 명칭: 중간엽 줄기세포로부터 추출된 엑소좀을 함유하는 망막변성질환 예방 또는 치료용 조성물 기술분야

- [1] 본 발명은 망막변성질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 중간엽 줄기세포로부터 추출된 엑소좀을 함유하는 망막변성질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 망막변성(retinal degeneration) 질환은 안구의 신경 조직인 망막과, 망막에서 가장 중요한 기능을 담당하는 황반에 유전적 이상, 노화, 염증, 혈관질환 등에 의한 병적인 변화가 발생하여 결국 실명에 이르는 질환을 총칭한다. 망막세포의 변성은 황반변성, 유전성 망막질환 등 중요 안과질환의 병리 기전이다. 망막세포는 신경계의 다른 세포와 마찬가지로 분열 및 재생 능력이 떨어지기 때문에, 망막세포가 소실될 경우 재생시키거나 손상된 세포를 대체할 수 있는 효과적인 방법이 없어서 현재까지 망막세포 변성에 대한 치료방법은 없는 상황이다. 망막세포의 변성을 막거나 지연시키는 치료 기술에 대한 연구가 절실히 요구되고 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [3] 본 발명이 해결하고자 하는 과제는, 망막세포의 변성을 예방하거나 지연시킬 수 있는 망막변성질환 예방 또는 치료용 조성물을 제공하고자 하는 것이다.
- [4] 본 발명이 해결하고자 하는 과제들은 이상에서 언급한 과제들로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제 해결 수단

- [5] 상기 과제를 달성하기 위한 본 발명의 일 실시예에 따른 망막변성질환 예방 또는 치료용 조성물은, 인체 유래 중간엽 줄기세포로부터 추출된 엑소좀을 유효성분으로 함유할 수 있다.
- [6] 상기 중간엽 줄기세포는 편도 유래 중간엽 줄기세포일 수 있다.
- [7] 상기 엑소좀은 1×10^{10} 내지 5×10^{11} particles/ml의 농도로 함유될 수 있다.
- [8] 상기 엑소좀은 100 내지 150 nm 크기를 가질 수 있다.
- [9] 상기 망막변성질환은 망막색소변성증(RP), 연령 관련 황반변성(AMD), 당뇨병성 망막병증, 유전성 망막질환, 포도막염, 망막혈관폐쇄, 시신경질환 및 녹내장으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다.
- [10] 기타 실시예들의 구체적인 사항들은 구체적인 내용 및 도면들에 포함되어 있다.

발명의 효과

- [11] 종래에 망막변성질환을 치료하기 위해 줄기세포를 안구 내에 직접 주사하는 줄기세포 치료가 시도되었으나, 안구 내 주사된 줄기세포가 섬유아세포(fibroblast)로 전환(transformation)되어 실명을 초래한 사례가 다수 보고되었다. 따라서, 안전성을 이유로 줄기세포 치료를 임상에 바로 적용하기는 어렵다. 반면 본 발명은 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 추출된 엑소좀을 유효성분으로 함유하는 조성물을 안구 내에 주사하기 때문에, 줄기세포 치료에 기인한 잠재적 위험을 피할 수 있다. 본 발명의 조성물에 포함된 엑소좀은 줄기세포의 분비 인자를 전달하는 매개체인 세포외소포체(extracellular vesicles, EV)로서, 항혈관, 항염증, 항섬유화, 면역조절, 신경보호 등의 효능을 가진다. 본 발명의 조성물은 망막세포(retina cell)의 세포자멸사(apoptosis)를 유발하는 물질의 독성을 억제함으로써 망막변성질환의 예방 또는 치료에 우수한 효과를 가진다.

도면의 간단한 설명

- [12] 도 1은 본 발명의 엑소좀에 대한 독성 실험 결과를 나타낸 그래프이다.
- [13] 도 2는 atRAL 처리 시 본 발명의 엑소좀에 의한 RPE19 cell의 세포 생존능을 측정한 그래프이다.
- [14] 도 3은 도 2의 RPE19 cell을 WST-1 assay로 처리하기 전에 현미경으로 관찰한 사진이다.
- [15] 도 4는 본 발명의 엑소좀에 의한 atRAL 독성의 억제 효과를 측정한 그래프이다.
- [16] 도 5는 본 실시예에 따라 형광 표지된 엑소좀의 현미경 사진을 나타낸 것이다.
- [17] 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 Pde6b 유전자 녹아웃 쥐 모델에서 외과립층(ONL)과 내과립층(INL)의 두께를 측정한 그래프이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [18] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 첨부되는 도면과 함께 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다. 명세서 전체에 걸쳐 동일 참조 부호는 동일 구성 요소를 지칭한다.
- [19] 본 발명은 인체 유래 중간엽 줄기세포로부터 추출된 엑소좀을 유효성분으로 함유하는 망막변성질환 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [20] 본 발명의 "중간엽 줄기세포"는 자기 복제 능력을 가지면서 두 개 이상의 새로운 세포(예를 들어, 뼈 세포, 연골세포, 근육세포, 지방세포 등)로 분화하는 능력을 가진 미분화된 줄기세포를 의미한다. 본 발명의 "중간엽 줄기세포"는 인체 유래, 동물 유래 또는 식물 유래 줄기일 수 있고, 바람직하게는 인체 유래 중간엽 줄

기세포일 수 있고, 더욱 바람직하게는 편도 유래 중간엽 줄기세포(Tonsil-derived Mesenchymal Stem Cell, T-MSC)일 수 있다.

[21] 본 발명의 "편도 유래 중간엽 줄기세포"는 목의 안쪽과 코의 뒷부분에 위치하여 외부에서 침입하는 세균 등의 물질로부터 일차적으로 우리 몸을 방어함과 동시에 림프상피 면역조직으로 작용을 수행하는 조직인 편도에서 유래된 자기 복제 능력을 가지면서 두 개 이상의 새로운 세포로 분화하는 능력을 가진 미분화된 줄기세포를 의미한다.

[22] 본 발명의 "엑소좀(exosome)"은 세포외소포체(extracellular vesicles, EV)로서 단백질, 지방, 대사물질(metabolite), 핵산 등과 같은 생체 유래 물질을 수용 세포로 전달하는 역할을 한다.

[23] 본 발명에서 "예방"이란 본 발명에 따른 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 추출된 엑소좀을 유효성분으로 포함하는 조성물을 투여하여 망막변성질환의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 말한다. 본 발명에서 "치료"는 본 발명에 따른 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 추출된 엑소좀을 유효성분으로 포함하는 조성물을 투여하여 망막변성질환의 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 말한다. 본 발명에서 "개선"이란 본 발명의 조성물을 개체에 투여하거나 섭취시켜 망막변성질환의 나쁜 상태를 좋게 하는 모든 행위를 의미한다.

[24] 본 발명에서 "망막변성질환"이란 안구의 신경 조직인 망막과, 망막에서 가장 중요한 기능을 담당하는 황반에 유전적 이상, 노화, 염증, 혈관질환 등에 의한 병적인 변화가 발생하여 결국 실명에 이르는 질환을 총칭한다. 예를 들어, 망막변성질환으로는 망막색소변성증(retinitis pigmentosa, RP), 연령 관련 황반변성(age-related macular degeneration, AMD), 당뇨병성 망막병증, 유전성 망막질환, 포도막염, 망막혈관폐쇄, 시신경질환, 녹내장 등이 있다.

[25] 본 발명의 일 실시예에 따른 조성물에는 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 추출된 엑소좀은 100 내지 150 nm 평균 크기(또는 평균 직경)을 가질 수 있다. 또한 본 발명의 일 실시예에 따른 조성물에는 상기 엑소좀이 1×10^7 내지 1×10^{12} particles/ml의 농도로, 바람직하게는 1×10^{10} 내지 1×10^{12} particles/ml의 농도로, 더욱 바람직하게는 1×10^{10} 내지 5×10^{11} particles/ml의 농도로 함유될 수 있다.

[26]

[27] 실시예 1. 인체 편도 유래 중간엽 줄기세포(T-MSC)로부터 엑소좀의 추출

[28]

[29] 본 실시예에 사용된 조건배지는 이화의료원 IRB(Institutional Review Board)에서 승인(EUMC 2019-08-004)을 받은 인체 유래물을 사용하여 (주)셀라토즈테라퓨틱스에서 제조한 편도 유래 중간엽 줄기세포(Tonsil derived Mesenchymal Stem Cell^{ew}, T-MSC^{ew})의 조건배지를 사용하였다.

[30] 엑소좀을 편도 유래 중간엽 줄기세포(T-MSC)로부터 추출하는 방법으로는 당 업계에 알려진 다양한 방법이 사용될 수 있다. 예를 들어, 줄기세포를 배양배지

(DMEM)에 배양한 다음, 무혈청 및 무항생제 배지에서 계대배양하고, 세포 배양 상층액을 회수하고, 회수한 세포 배양 상층액을 원심분리하고 220nm pore membrane filter로 여과하여 엑소좀을 분리하여 추출한다. 구체적으로, 배양배지를 300 x g, 15분간 그리고 2000 x g, 10분간 원심 분리하여 세포 파쇄물(cell debris)를 제거하고 220nm bottle-top membrane으로 filtration을 진행하였다(Cell debris removal 단계). 이어서 DI water 250 ml로 플러싱하여 storage agent를 제거하였다(Flushing 단계). DPBS(Ca^{2+} , Mg^{2+}) 250 ml 이상으로 플러싱하여 장치 내에 buffer 환경을 조성하였다(Buffer conditioning 단계). 250 ml 배지를 300 kDa MWCO TFF filter를 이용하여 5 내지 10ml 부피까지 농축(concentration)을 진행하였다(Concentration 단계). 이 때 feed pressure가 0.5bar를 넘지 않도록 제어하였다. Concentrated volume의 7 내지 10배 DPBS를 추가하고 다시 5 내지 10 ml 부피까지 diafiltration을 진행하였다(Diafiltration 단계). 이 때 7배 이상 희석 시 99% 이상의 small molecule removal이 가능하였다. 샘플 회수 후, 220nm bottle-top membrane으로 filtration을 진행하였다(Product recovery 단계). 이와 같이 추출된 엑소좀의 정보는 아래 표 1과 같다.

[31] [표1]

Total volume	5 ml
Mode size	114.2 ± 7.2 nm
Number concentrations	2.94X10 ¹¹ ± 2.97X10 ¹⁰ particles/ml
Protein concentrations	98.31 mg/ml

[32]

[33] 실시예 2. 엑소좀 독성 실험(Exosome toxicity test in vitro, RPE19)

[34]

[35] 망막색소상피(retinal pigment epithelium, RPE) 세포인 RPE19 cell을 96 well plate에 각각 5×10^3 cells/well로 분주하고 DMEM/F12(10% FBS, Penicillin-Streptomycin added) 세포 배양배지에서 24시간 동안 배양하였다. 상기 배양 후, 기존 배양배지를 제거하고 새로운 세포 배양배지로 교환한 후, 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 추출된 엑소좀(이를 'MSC derived EV' 또는 'EV'라 약칭함)을 0 또는 1×10^8 부터 5×10^{10} particles/ml까지 다양한 농도로 상기 well에 처리하였다. 엑소좀(EV) 처리 후 24, 48, 72 시간 뒤에 EZ-cytox 세포생존을 분석 시약(WST-1 cell viability assay kit; DoGenBio, Seoul, Korea)을 추가하고, 배양기에서 1.5시간 동안 반응시켰다. 마이크로플레이트 리더(microplate reader)를 사용하여 450nm에서 OD(optical density)값을 측정하였다.

[36] 도 1은 본 발명의 엑소좀에 대한 독성 실험 결과를 나타낸 그래프이다. 도 1에서, 대조군(None)으로 엑소좀(EV)을 처리하지 않은 RPE19 cell을 배양한 well의 OD값을 100%로 정하고 이를 기준으로 나머지 실험군의 OD값을 환산하였다. 도

1에 나타난 바와 같이, 본 실험군의 경우 엑소솜(EV)을 다양한 농도로 24, 48, 72 시간 동안 처리하였으나 대조군(None)에 비해 약 90% 이상의 세포 생존능(cell viability)를 나타내는 것으로 확인되어 세포 독성은 관찰되지 않았다.

[37]

[38] 실시예 3. 효능 실험(Efficacy test in vitro, RPE19)

[39]

[40] RPE19 cell을 96 well plate에 각각 5×10^3 cells/well로 분주하고 DMEM/F12(10% FBS, Penicillin-Streptomycin added) 세포 배양배지에서 24시간 동안 배양하였다. 상기 배양 후, 기존 배양배지를 제거하고 새로운 세포 배양배지로 교환한 후, 망막세포(retina cell)의 세포자멸사(apoptosis)를 유발하는 독성물질인 all-trans-retinal(이를 'atRAL'이라 약칭함)을 $25 \mu\text{M}$ 및 $50 \mu\text{M}$ 로 처리하였다. 여기에 추가로 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 추출된 엑소솜(MSC derived EV)을 0 또는 1×10^7 부터 1×10^{10} particles/ml까지 10배수의 농도로 well에 처리하였다. 이로부터 3시간 뒤에 EZ-cytox 세포생존율 분석 시약(WST-1 cell viability assay kit; DoGenBio, Seoul, Korea)을 추가하고, 배양기에서 1.5시간 동안 반응시켰다. 마이크로플레이트 리더를 사용하여 450nm에서 OD값을 측정하였다.

[41] 도 2는 atRAL 처리 시 본 발명의 엑소솜에 의한 RPE19 cell의 세포 생존능을 측정한 그래프이다. 도 2에서, 대조군(None)으로 엑소솜(EV)을 처리하지 않은 RPE19 cell을 배양한 well의 OD값을 100%로 정하고 이를 기준으로 나머지 실험군의 OD값을 환산하였다. 도 2에 나타난 바와 같이, 엑소솜(EV)을 추가하지 않고 atRAL $25 \mu\text{M}$ 을 처리한 실험군은 대조군(None)에 비해 약 30%의 세포 생존능(cell viability)를 가지는 것으로 확인되었고, 엑소솜(EV)을 추가하지 않고 atRAL $50 \mu\text{M}$ 을 처리한 실험군은 대조군(None)에 비해 약 10%의 세포 생존능(cell viability)를 가지는 것으로 확인되었다. 반면 엑소솜(EV)을 추가하여 처리한 경우 이러한 세포 생존능의 감소 현상은 약화되는 것으로 확인되었다. 특히 atRAL $25 \mu\text{M}$ 에 엑소솜(EV)을 1×10^{10} particles/ml로 처리한 실험군의 세포 생존능(cell viability)은 약 85%로 나타났으며, atRAL $50 \mu\text{M}$ 에 엑소솜(EV)을 1×10^{10} particles/ml로 처리한 실험군의 세포 생존능(cell viability)은 약 90%로 나타났다. 따라서 위 실험을 통해 atRAL에 의한 망막 독성이 본 발명의 엑소솜(EV)에 의해 억제되는 것이 확인되었다.

[42] 도 3은 도 2의 RPE19 cell을 WST-1 assay로 처리하기 전에 현미경으로 관찰한 사진이다. 도 3에 나타난 바와 같이, 엑소솜(EV) 처리 없이 atRAL만 처리한 실험군의 경우 세포의 수도 적어지고 세포의 모양이 둥글게 바뀌었으나, 엑소솜(EV)을 1×10^{10} particles/ml로 atRAL과 함께 처리한 경우 대조군(None) well과 비교하여 세포 모양에 큰 차이가 없는 것이 확인되었다.

[43]

[44] 실시예 4. 효능 실험(Efficacy test in vitro, RPE1)

[45]

[46] RPE1 cell을 96 well plate에 각각 5×10^3 cells/well로 분주하고 DMEM/F12(10% FBS, Penicillin-Streptomycin added) 세포 배양배지에서 24시간 동안 배양하였다. 상기 배양 후 기존 배양배지를 제거하고, 사멸된 세포에 염색되는 CytoTox Green dye(Incucyte CytoTox Green, Sartorius, cat#4633) 50 nM을 포함한 새로운 세포 배양배지로 교환한 후, atRAL을 50 μ M로 처리하였다. 여기에 추가로 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 추출된 엑소좀(MSC derived EV)을 0 또는 1×10^7 부터 1×10^{10} particles/ml까지 10배수의 농도로 well에 처리하였다.

[47]

이를 Incucyte live cell imaging 장비(Sartorius)를 사용하여 한 시간마다 bright field로 live cell을 관찰하였고, green fluorescence 관찰로 총 24시간 동안 사멸 세포를 확인하였다. 도 4는 본 발명의 엑소좀에 의한 atRAL 독성의 억제 효과를 측정한 그래프로서, 시간 별로 Green dye intensity 값을 측정한 결과이다. 도 4에 도시된 바와 같이, 엑소좀(EV)을 추가하지 않고 atRAL 시약을 처리한 실험군(B)의 경우 한 시간 후부터 사멸 세포의 증가로 green dye intensity 값이 약 18시간까지 꾸준히 증가하였다. 엑소좀(EV)을 추가 처리한 실험군(C, D, E, F)의 경우 엑소좀(EV)의 농도가 증가함에 따라 green dye intensity 값의 증가 기울기가 감소한 것이 확인되었다. 특히 엑소좀(EV)을 1×10^{10} particles/ml로 처리한 경우 약 14시간까지는 대조군(None)과 유사하게 안정적이었고 그 후 세포독성(cytotoxicity)이 상대적으로 약하게 발생하는 것이 확인되었다.

[48]

[49] 실시예 5. Far-red로 표지된 엑소좀의 위치화(Localization of F(red)-tagged EV with RPE1)

[50]

[51] RPE1 cell을 8 well chamber slide에 각각 1×10^4 cells/well로 분주하고 DMEM/F12(10% FBS, Penicillin-Streptomycin added) 세포 배양배지에서 24시간 동안 배양하였다. 상기 배양 후 기존 배양배지를 제거하고 새로운 세포 배양배지로 교환한 후, far-red fluorescence로 표지(tagging)한 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 추출된 엑소좀(MSC derived EV)을 5×10^9 particles/ml로 처리하였다. 3시간, 6시간, 16시간 및 24시간 후 배양배지 제거하고, 4% paraformaldehyde(PFA)를 사용하여 세포를 고정시킨 뒤 DAPI staining 후 형광현미경으로 관찰하였다. 도 5는 본 실시예에 따라 형광 표지된 엑소좀의 현미경 사진을 나타낸 것이다. 도 5에 도시된 바와 같이 엑소좀(EV) 처리 24시간 후에도 세포 내 엑소좀(EV)이 존재하는 것이 확인되었다. 즉, 본 실시예를 통해 엑소좀이 RPE1 세포질 내로 직접 이동하여 치료효과를 내는 것이 확인되었다.

[52]

[53] 실시예 6. Pde6b 유전자 녹아웃 쥐 모델(in vivo Pde6b knockout rat)

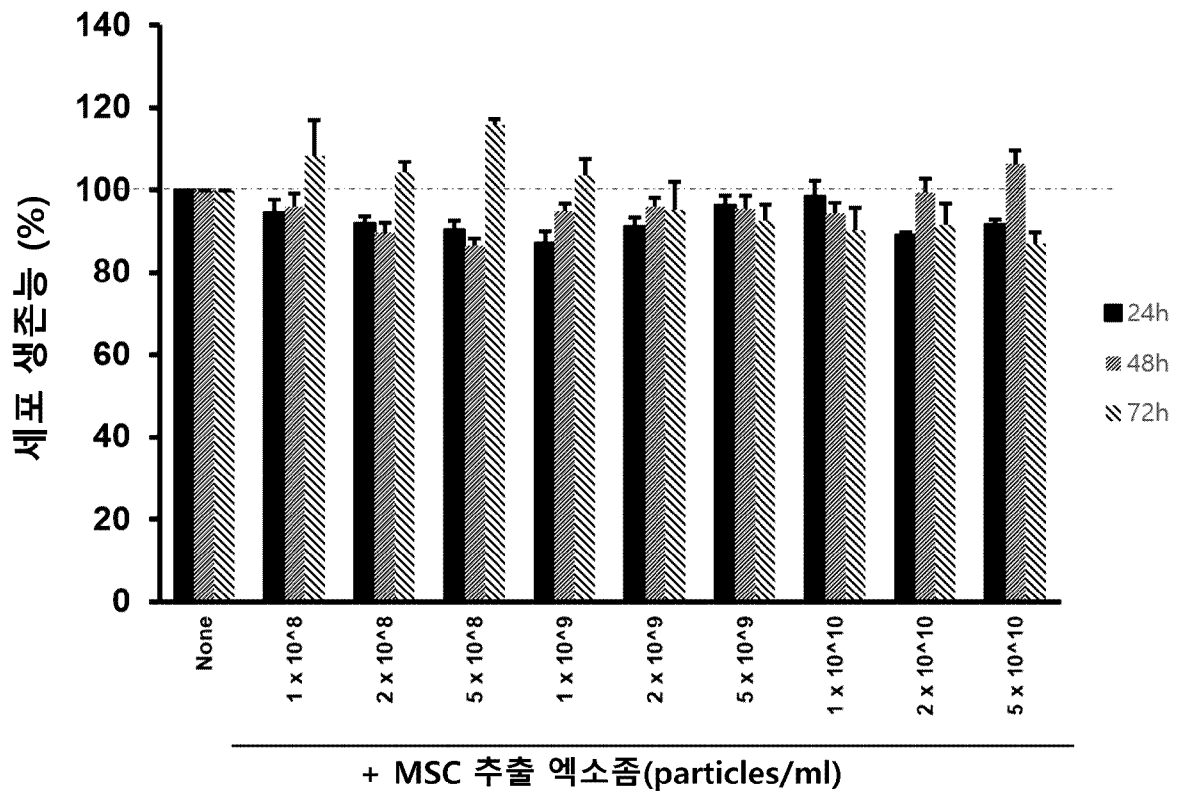
[54]

- [55] 앞선 in vitro 실시예를 바탕으로 in vivo에서 PDE6b knockout rat을 사용하여 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 추출된 엑소좀의 효능을 확인하였다. PDE6b knockout rat을 마취한 후 엑소좀(EV) 3×10^{11} particles/ml를 초자체내주사(intravitreal injection)한 후 안저촬영(fundus photography)을 실시하였다. 쥐 유리체(vitreous volume: 13-20 μ l) 내 엑소좀(EV)의 농도는 1.5×10^7 내지 2.3×10^7 particles/ μ l이다. 엑소좀(EV)을 주사한 후 15일 뒤 쥐 안구(rat eye ball)를 적출하여 paraffin block을 제작하였다. Paraffin block으로 만든 쥐 안구를 4 μ m 두께로 section하여 slide를 제작 후 H&E staining을 진행하였다. 슬라이드 스캐너(slide scanner)를 이용하여, 시신경 유두(optic disc)를 기준으로 좌우로 망막(retina)의 500, 750, 1000, 1500 μ m 지점의 외과립층(outer nuclear layer, ONL)과 내과립층(inner nuclear layer, INL)의 두께를 측정하였다. 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 Pde6b 유전자 녹아웃 쥐 모델에서 외과립층(ONL)과 내과립층(INL)의 두께를 측정한 그래프이다. 두께 측정 시 객관성 유지를 위해 시료 번호를 가리고 blind로 측정하였으며, 각 부위별로 3번씩 측정하여 평균 값을 도출하였다. 엑소좀(EV)을 주사하지 않은 좌안을 대조군(#2-25L, #2-29L, #2-30L)으로 사용하였고, 실험군(#2-25R, #2-29R, #2-30R)으로 사용된 우안에만 엑소좀(EV)을 주사하였다. 도 6에 도시된 바와 같이, 대조군인 좌안과 비교하여 엑소좀(EV)을 주사한 우안의 외과립층(ONL)의 두께가 증가된 것이 확인되었다. 실험군에서 시신경 유두(optic disc)를 기준으로 한쪽에만 외과립층(ONL)의 두께가 증가한 것은 해당 방향으로만 엑소좀(EV)을 주사하였기 때문이다.
- [56]
- [57] 이상 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시예를 설명하였지만, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

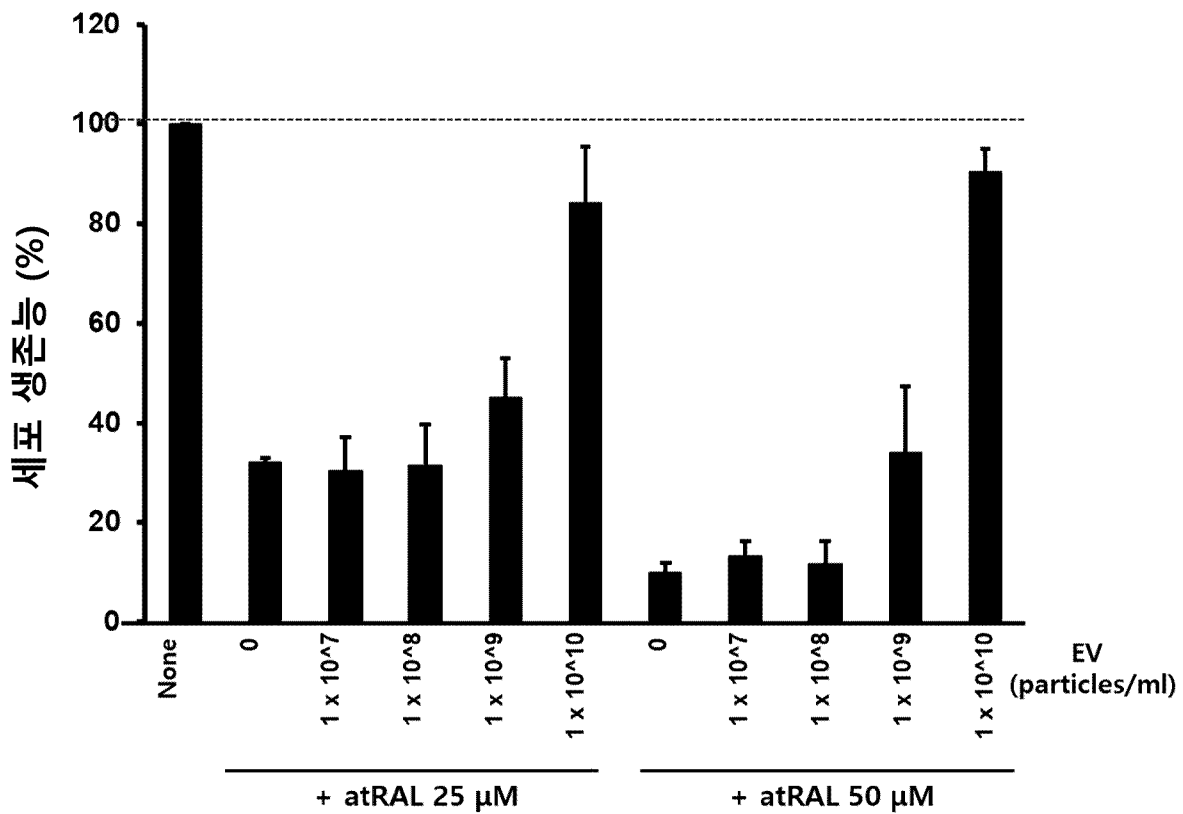
청구범위

- [청구항 1] 인체 유래 중간엽 줄기세포로부터 추출된 엑소좀을 유효성분으로 함유하는, 망막변성질환 예방 또는 치료용 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 중간엽 줄기세포는 편도 유래 중간엽 줄기세포인 것을 특징으로 하는, 망막변성질환 예방 또는 치료용 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 엑소좀은 1×10^{10} 내지 5×10^{11} particles/ml의 농도로 함유되는 것을 특징으로 하는, 망막변성질환 예방 또는 치료용 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 엑소좀은 100 내지 150 nm 크기를 가지는 것을 특징으로 하는, 망막변성질환 예방 또는 치료용 조성물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 망막변성질환은 망막색소변성증(RP), 연령 관련 황반변성(AMD), 당뇨병성 망막병증, 유전성 망막질환, 포도막염, 망막혈관폐쇄, 시신경질환 및 녹내장으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나인 것을 특징으로 하는, 망막변성질환 예방 또는 치료용 조성물.

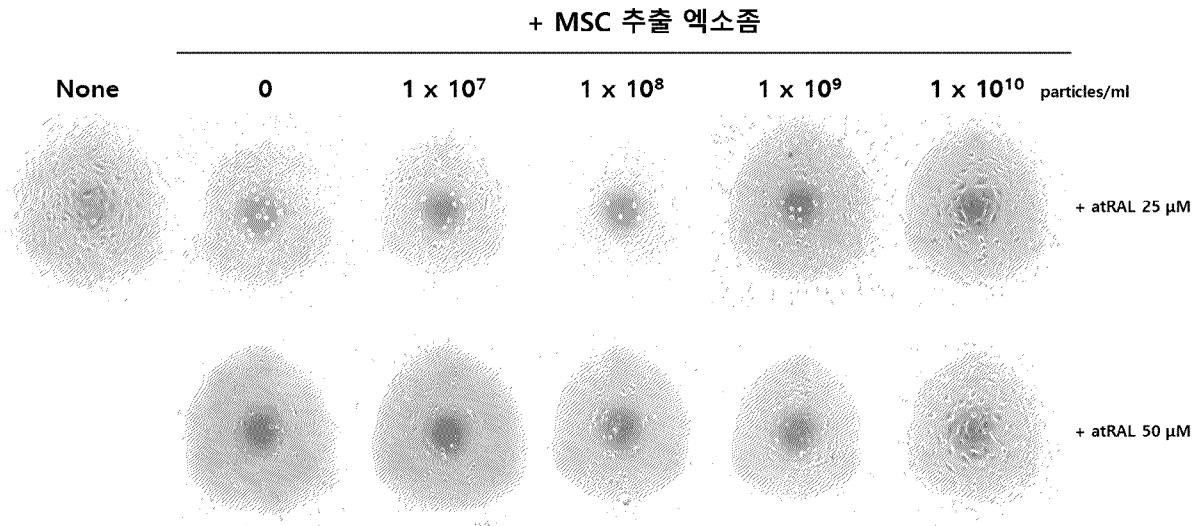
[도1]



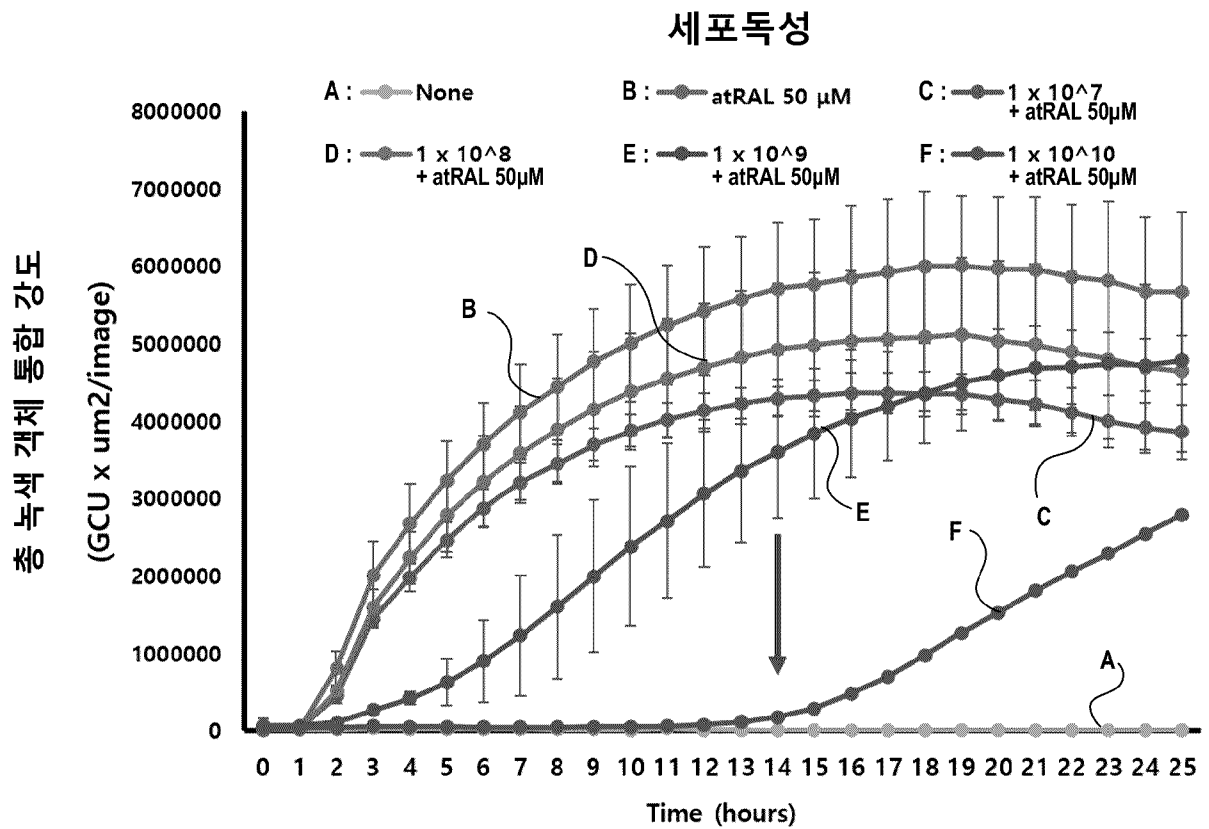
[도2]



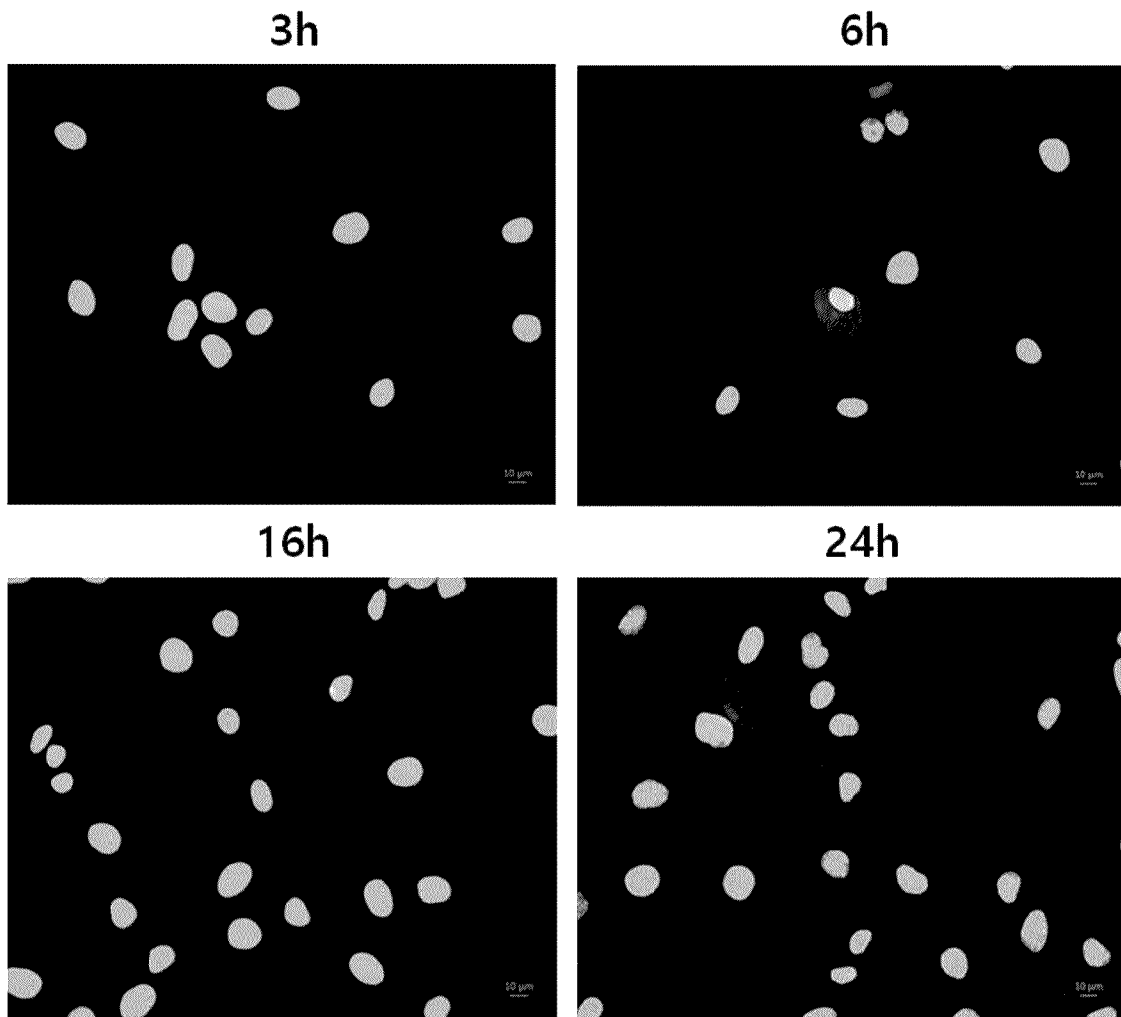
[도3]



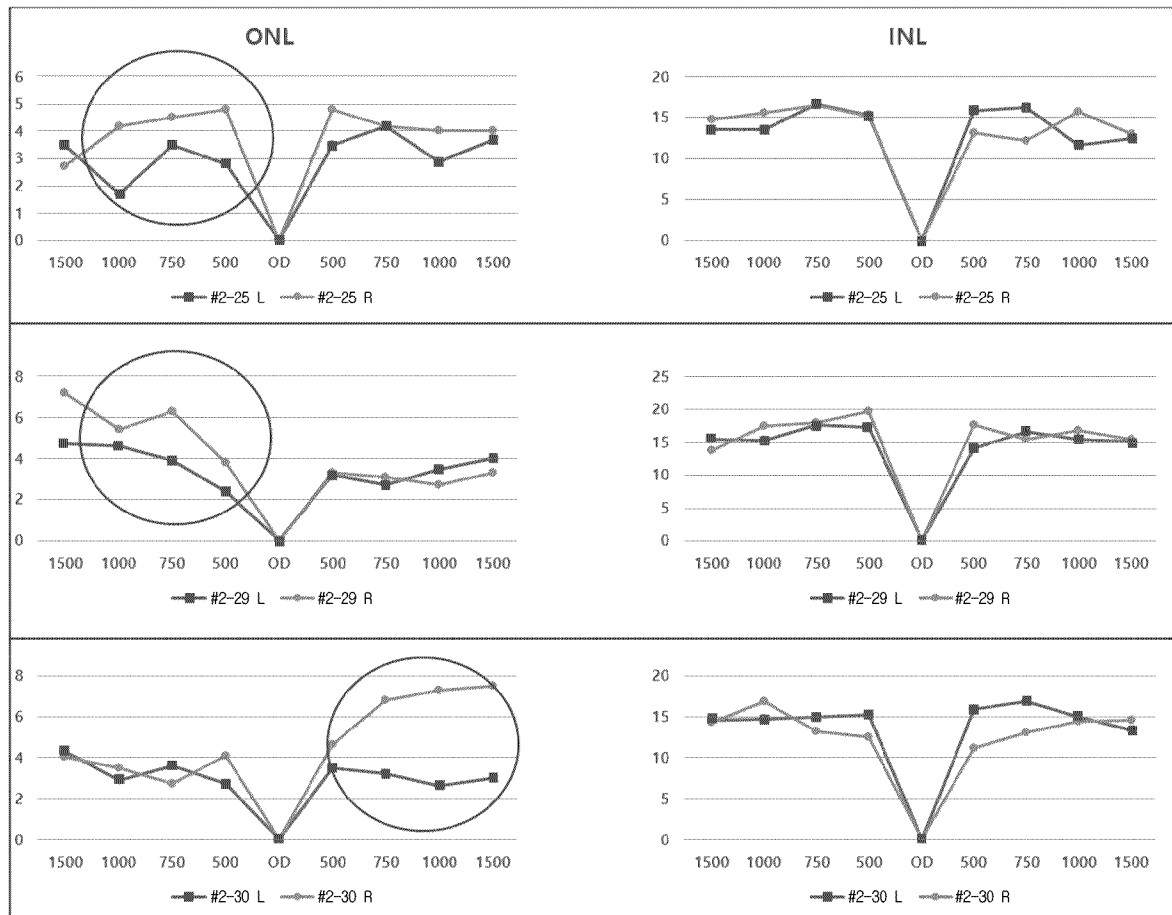
[도4]



[도5]



[도6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/002770

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 35/28(2006.01); A61P 27/02(2006.01);

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 35/28(2006.01); A61K 45/06(2006.01); A61K 9/127(2006.01); A61P 27/02(2006.01); C12N 15/113(2010.01); C12N 5/079(2010.01); C12N 5/0797(2010.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 편도 중간엽 줄기세포(tonsil mesenchymal stem cell), 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell), 엑소좀(exosome), 망막변성(retina degeneration), 망막(retina)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	MATHEW, B. et al. Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles and Retinal Ischemia-Reperfusion. Biomaterials. 2019, vol. 197, pp. 146-160 (published online: 09 January 2019). See abstract and pages 147-158.	1,3-5 2
A	KR 10-2017-0049775 A (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION et al.) 11 May 2017 (2017-05-11) See paragraphs [0028]-[0034].	1-5
A	KR 10-1993027 B1 (RENEURON LIMITED) 30 September 2019 (2019-09-30) See paragraphs [0012]-[0021].	1-5
A	KR 10-2021-0125530 A (BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) 18 October 2021 (2021-10-18) See paragraphs [0011]-[0015].	1-5



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“D” document cited by the applicant in the international application

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

09 June 2023

Date of mailing of the international search report

12 June 2023

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/002770**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2021-0292758 A1 (THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES) 23 September 2021 (2021-09-23) See paragraphs [0005]-[0011].	1-5
A	SAFWAT, A. et al. Adipose mesenchymal stem cells-derived exosomes attenuate retina degeneration of streptozotocin-induced diabetes in rabbits. Journal of Circulating Biomarkers. 2018, vol. 7, inner pp. 1-10. See inner pages 1-2.	1-5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2023/002770

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR	10-2017-0049775	A	11 May 2017	KR	10-1982801	B1	30 May 2019
KR	10-1993027	B1	30 September 2019	AU	2013-245406	A1	10 October 2013
				AU	2013-245406	A1	02 October 2014
				AU	2013-291761	A1	26 February 2015
				AU	2013-291761	A1	23 January 2014
				AU	2014-217614	A1	20 August 2015
				AU	2014-217614	A1	21 August 2014
				AU	2014-217615	A1	21 August 2014
				AU	2014-217615	A1	20 August 2015
				BR	112014024541	A2	08 August 2017
				CA	2868506	A1	10 October 2013
				CA	2879322	A1	23 January 2014
				CA	2900895	A1	21 August 2014
				CA	2900897	A1	21 August 2014
				CN	104321062	A	28 January 2015
				CN	104703609	A	10 June 2015
				CN	105120879	A	02 December 2015
				CN	105142646	A	09 December 2015
				EP	2833893	A1	11 February 2015
				EP	2877187	A1	03 June 2015
				EP	2956146	A1	23 December 2015
				EP	2956147	A1	23 December 2015
				EP	3470073	A1	17 April 2019
				ES	2691296	T3	26 November 2018
				ES	2705052	T3	21 March 2019
				JP	2015-513906	A	18 May 2015
				JP	2015-529450	A	08 October 2015
				JP	2016-507550	A	10 March 2016
				JP	2016-513095	A	12 May 2016
				JP	2019-013234	A	31 January 2019
				JP	2020-072718	A	14 May 2020
				JP	2022-115954	A	09 August 2022
				KR	10-2015-0059168	A	29 May 2015
				SG	11201406336	A	27 November 2014
				SG	11201500329	A	27 February 2015
				SG	11201506284	A	29 September 2015
				US	2015-0079046	A1	19 March 2015
				US	2015-0164955	A1	18 June 2015
				US	2015-0366897	A1	24 December 2015
				US	2016-0002597	A1	07 January 2016
				US	2019-0388475	A1	26 December 2019
				WO	2013-150303	A1	10 October 2013
				WO	2014-013258	A1	23 January 2014
				WO	2014-125276	A1	21 August 2014
				WO	2014-125277	A1	21 August 2014
KR	10-2021-0125530	A	18 October 2021	AU	2020-217747	A1	02 September 2021
				AU	2020-217747	A1	13 August 2020
				CA	3129248	A1	13 August 2020
				CN	113710234	A	26 November 2021
				EP	3920889	A1	15 December 2021

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2023/002770

Patent document cited in search report				Publication date (day/month/year)			Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)		
							JP	2022-519718	A	24 March 2022		
							US	2022-136011	A1	05 May 2022		
							WO	2020-163705	A1	13 August 2020		
US	2021-0292758	A1	23 September 2021	US	11058729	B2	13 July 2021					
				US	2019-224242	A1	25 July 2019					

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 35/28(2006.01)i; A61P 27/02(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 35/28(2006.01); A61K 45/06(2006.01); A61K 9/127(2006.01); A61P 27/02(2006.01); C12N 15/113(2010.01); C12N 5/079(2010.01); C12N 5/0797(2010.01) 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 편도 중간엽 줄기세포(tonsil mesenchymal stem cell), 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell), 엑소좀(exosome), 망막변성(retina degeneration), 망막(retina)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X A	MATHEW, B., 등, Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles and Retinal Ischemia-Reperfusion, Biomaterials, 2019년, 197권, 페이지 146-160 (온라인공개: 2019.01.09.) 요약 및 페이지 147-158	1,3-5 2
A	KR 10-2017-0049775 A (서울대학교산학협력단 등) 2017.05.11 단락 [0028]-[0034]	1-5
A	KR 10-1993027 B1 (레뉴런 리미티드) 2019.09.30 단락 [0012]-[0021]	1-5
A	KR 10-2021-0125530 A (보드 오브 리전즈, 더 유니버시티 오브 텍사스 시스템) 2021.10.18 단락 [0011]-[0015]	1-5
A	US 2021-0292758 A1 (THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICE) 2021.09.23 단락 [0005]-[0011]	1-5
☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2023년06월09일(09.06.2023)		국제조사보고서 발송일 2023년06월12일(12.06.2023)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-5373

C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	SAFWAT, A., 등, Adipose mesenchymal stem cells-derived exosomes attenuate retina degeneration of streptozotocin-induced diabetes in rabbits, Journal of Circulating Biomarkers, 2018년, 7권, 내부페이지 1-10 내부페이지 1-2	1-5

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2017-0049775 A	2017/05/11	KR 10-1982801 B1	2019/05/30
KR 10-1993027 B1	2019/09/30	AU 2013-245406 A1	2013/10/10
		AU 2013-245406 A1	2014/10/02
		AU 2013-291761 A1	2015/02/26
		AU 2013-291761 A1	2014/01/23
		AU 2014-217614 A1	2015/08/20
		AU 2014-217614 A1	2014/08/21
		AU 2014-217615 A1	2014/08/21
		AU 2014-217615 A1	2015/08/20
		BR 112014024541 A2	2017/08/08
		CA 2868506 A1	2013/10/10
		CA 2879322 A1	2014/01/23
		CA 2900895 A1	2014/08/21
		CA 2900897 A1	2014/08/21
		CN 104321062 A	2015/01/28
		CN 104703609 A	2015/06/10
		CN 105120879 A	2015/12/02
		CN 105142646 A	2015/12/09
		EP 2833893 A1	2015/02/11
		EP 2877187 A1	2015/06/03
		EP 2956146 A1	2015/12/23
		EP 2956147 A1	2015/12/23
		EP 3470073 A1	2019/04/17
		ES 2691296 T3	2018/11/26
		ES 2705052 T3	2019/03/21
		JP 2015-513906 A	2015/05/18
		JP 2015-529450 A	2015/10/08
		JP 2016-507550 A	2016/03/10
		JP 2016-513095 A	2016/05/12
		JP 2019-013234 A	2019/01/31
		JP 2020-072718 A	2020/05/14
		JP 2022-115954 A	2022/08/09
		KR 10-2015-0059168 A	2015/05/29
		SG 11201406336 A	2014/11/27
		SG 11201500329 A	2015/02/27
		SG 11201506284 A	2015/09/29
		US 2015-0079046 A1	2015/03/19
		US 2015-0164955 A1	2015/06/18
		US 2015-0366897 A1	2015/12/24
		US 2016-0002597 A1	2016/01/07
		US 2019-0388475 A1	2019/12/26
		WO 2013-150303 A1	2013/10/10
		WO 2014-013258 A1	2014/01/23
		WO 2014-125276 A1	2014/08/21
		WO 2014-125277 A1	2014/08/21
KR 10-2021-0125530 A	2021/10/18	AU 2020-217747 A1	2021/09/02
		AU 2020-217747 A1	2020/08/13
		CA 3129248 A1	2020/08/13
		CN 113710234 A	2021/11/26
		EP 3920889 A1	2021/12/15

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		JP 2022-519718 A	2022/03/24
		US 2022-136011 A1	2022/05/05
		WO 2020-163705 A1	2020/08/13
US 2021-0292758 A1	2021/09/23	US 11058729 B2	2021/07/13
		US 2019-224242 A1	2019/07/25