



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0016163
(43) 공개일자 2020년02월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/15 (2014.01) A61K 38/17 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 35/15 (2013.01)
A61K 38/1709 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0072785
(22) 출원일자 2019년06월19일
심사청구일자 2019년06월19일
(30) 우선권주장
1020180091437 2018년08월06일 대한민국(KR)

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
이지희
서울특별시 양천구 목동 중앙로7길32 102동 302호 (목동 이편한세상아파트)
(74) 대리인
김순웅

전체 청구항 수 : 총 12 항

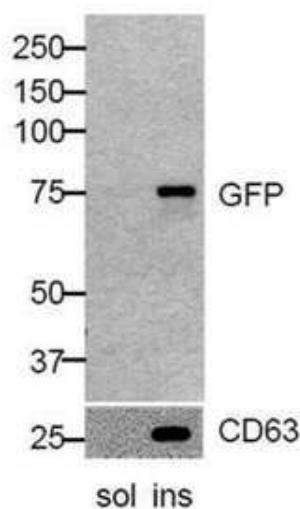
(54) 발명의 명칭 사멸화 세포 처리 대식 세포 유래 엑소좀을 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 사멸화 세포로부터 유래된 엑소좀을 포함하는 암의 예방 또는 치료용 조성물, 이의 용도, 및 이를 이용한 암의 치료 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따른 엑소좀 조성물은 암세포로 흡수되고 암세포에서 상피-간엽 세포 전환을 억제하고, 암세포의 침윤을 억제함으로써 암의 예방 또는 치료에 우수한 효과가 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2010-0027945

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기초연구사업-선도연구센터육성사업-기초의학분야(MRC)

연구과제명 조직손상 방어 연구센터-내인성 염증 치유 및 조직 복구 프로그래밍 강화를 통한 조직손상
개선 연구(1세부)

기 여 율 1/1

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2010.09.01 ~ 2019.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

사멸화 세포 처리된 대식 세포로부터 유래된 엑소좀을 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 사멸화 세포는 상피 암세포(epithelial cancer cells)인 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 대식 세포는 골수유래 대식세포 (bone marrow-derived macrophage) 또는 단핵구 유래 대식세포 (monocyte-derived macrophages)인 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 대식 세포는 소교세포(microglia), 조직구(histiocytes), 호프바우어세포(Hofbauer cells), 혈관사이세포(mesangial cells), 쿠퍼세포(Kupffer cells), 복강 대식세포(peritoneal macrophages), 폐포 대식세포 (alveolar macrophage), 표피 또는 진피 대식세포 (epidermal or dermal macrophages), 가장자리구역 대식세포 (marginal zone macrophages), 금속친화성 대식세포 (metallophilic macrophages), 적수 대식세포 (Red pulp macrophages), 백수 대식세포 (white pulp macrophages) 및 파골세포(osteoclasts)로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 엑소좀은 PTEN 단백질을 포함하는 것인 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 암은 폐암, 유방암, 전립선암 및 대장암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 암의 예방 또는 치료는 암의 침투 또는 전이 억제에 의한 것인 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 사멸화 세포 처리된 대식 세포로부터 유래된 엑소좀은 사멸화 세포와 대식세포를 함께 배양하여 얻은 배양액으로부터 분리된 것인 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 9

사멸화 세포 처리된 대식 세포로부터 유래된 엑소좀을 포함하는 암의 전이 억제용 약학 조성물.

청구항 10

(a) 사멸화 세포를 대식 세포와 배양하는 단계;

(b) 상기 (a) 단계의 배양액으로부터 상층액을 분리하는 단계; 및

(c) 상기 (b) 단계의 상층액으로부터 엑소좀을 분리하는 단계를 포함하는 사멸화 세포 처리된 대식 세포로부터 엑소좀을 분리하는 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 (a) 단계의 사멸화 세포를 대식세포와 배양하는 단계는 사멸화 세포가 포함된 X-VIVO 또는 무혈청 DMEM 배지에 대식세포를 10 내지 30시간 동안 배양하는 것인, 사멸화 세포 처리된 대식 세포로부터 엑소좀을 분리하는 방법.

청구항 12

제10항에 있어서, 상기 (c) 단계의 상기 (b) 단계의 상층액으로부터 엑소좀을 분리하는 단계는 원심분리, 초원심분리 또는 이들 모두에 의한 분리인 사멸화 세포 처리된 대식 세포로부터 엑소좀을 분리하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 사멸화 세포 처리 대식세포 유래된 엑소좀을 포함하는 암의 예방 또는 치료용 조성물, 이의 용도, 및 이를 이용한 암의 치료 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] EMT(epithelial-mesenchymal transition, 상피세포의 간엽화 현상)는 상피세포가 간엽세포로 바뀌는 것으로 한 종류의 세포가 다른 종류의 세포로 분화하는 세포 형성성(cell plasticity)의 한 가지 형태이다. 최근에 EMT가 태생기의 조직 형성과 분화 외에도 조직의 재생과 섬유화, 암의 발생과 전이 과정에 다양한 역할을 하고 있다는 사실이 알려져 있다.

[0003] 암의 진행과정에서는 종양세포의 국소적 침습(local invasion)과 전이가 일어나는데 이 과정에서 상피성 종양세포의 상피세포의 간엽전환(epithelial-mesenchymal transition, EMT)이 동반된다. 이 과정에서 간엽성 표현형을 나타내기 위해 특정 유전자의 전사 프로그램이 변화하며, 세포의 이동성이 증가하고, 세포-세포 사이, 혹은 세포-세포외기질 사이 상호작용이 변화한다고 알려져 있다.

[0004] 암이 생명에 위협이 되는 가장 큰 원인은 암세포의 전이성에 있으며, 암으로 인한 사망의 대부분은 암 전이로 설명된다. 현재 임상적으로 입증된 보편적인 암 치료 방법이 외과 수술이지만, 원인이 되는 암이 제거되더라도 다른 조직으로 전이된 암세포에 의해 환자의 치료가 어렵게 된다. 따라서 암 정복은 실질적으로는 암 전이와의 싸움이라 볼 수 있으며, 현재 암 전이 기전에 관해 많은 연구가 진행되고 있으나, 이렇다 할 치료제 개발로 이어지지는 못하고 있는 실정이다.

[0005] 한편, 엑소좀은 MVB(Multivesicular bodies)가 원형질막과 융합되어 생성되는 엑소좀과 원형질막에서 직접 방출되어 생성되는 마이크로베시클(microvesicle)을 총칭하는 것으로 세포밖 소포체(extracellular vesicle)라고도 한다.

[0006] 최근 연구 보고에 따르면 엑소좀을 통해 세포 간 신호 전달 및 폐기 관리와 같은 과정에서 중요한 역할을 한다고 보고 되어 있어, 최근 임상 적용에 대한 관심이 증가하고 있다.

[0007] 엑소좀은 다양한 세포들로부터 분비되는 막 구조의 작은 소낭(대략 30-100 nm의 직경)으로서, 전자현미경을 통한 연구에서 원형질막으로부터 직접 떨어져 나가는 것이 아니라 다낭체(multivesicular bodies, MVBs)라고 불리는 세포 내 특정 구획에서 기원하며 세포 밖으로 방출, 분비되는 것이 관찰되었다. 즉, 다낭체와 원형질막의 융합이 일어나면 소낭들은 세포 밖 환경으로 방출되는데, 이것을 엑소좀이라고 한다. 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, 사멸세포, 줄기세포 등도 살아 있는 상태에서 엑소좀을 생산하여 분비한다고 알려졌다.

[0008] 이러한 엑소좀은 이의 유래에 따라 매우 다른 특징을 가지고 있는 다양한 물질들을 포함하고 있기 때문에 특정 세포 유래에 따른 특성에 관한 연구 개발을 진행할 필요가 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 사멸화 세포에 노출된 대식세포(macrophage)로부터 유래된 엑소좀이 암세포로 도달하고 암세포에서 상피-간엽 세포 전환을 억제하고, 암세포의 침윤을 억제함으로써 암의 예방 또는 치료에

우수한 효과를 나타냄을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0010] 본 발명의 목적은 사멸화 세포 처리된 대식 세포로부터 유래된 엑소솜을 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 목적은 사멸화 세포 처리된 대식 세포로부터 유래된 엑소솜을 포함하는 암의 전이 억제용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 목적은 사멸화 세포 처리된 대식 세포로부터 엑소솜을 분리하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명은 사멸화 세포 처리된 대식 세포로부터 유래된 엑소솜을 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0014] 본 발명에서 사멸화 세포(apoptotic cell)는 상피 암세포(epithelial cancer cells)를 이용하는 것이 바람직하며, 본 발명의 구체적인 실시예에 의하면 상피 암 세포인 것이 가장 바람직하다. 예를 들어, 344SQ 세포, A549 세포, MDA-MB-231 세포, COLO320HSR 세포, PC3 세포 등이 있으며, 이에 한정되지 않는다.

[0015] 상기 사멸화 세포는 상피 암세포를 100 내지 400 nm 파장으로 5 내지 30분 동안 자외선을 조사하는 것이 바람직하며, 150 내지 350 nm 파장으로 5 내지 20분 동안 자외선을 조사하는 것이 더욱 바람직하며, 200 내지 300 nm 파장으로 10 내지 15분 동안 자외선을 조사하는 것이 가장 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0016] 상기 상피 암세포는 자외선 조사된 후, 10% FBS가 첨가된 RPMI 1604 배지에서 1 내지 10% CO₂ 조건하에서 30 내지 40℃ 온도로 1 내지 5시간 동안 배양할 수 있다.

[0017] 상기 대식세포는 마우스 및 인간 유래 어느 것이든 가능하며, 골수유래 대식세포 (bone marrow-derived macrophage) 또는 단핵구 유래 대식세포 (monocyte-derived macrophages)일 수 있다. 또한, 소교세포 (microglia), 조직구(histiocytes), 호프바우어세포(Hofbauer cells), 혈관사이세포(mesangial cells), 쿠퍼세포(Kupffer cells), 복강 대식세포(peritoneal macrophages), 폐포 대식세포 (alveolar macrophage), 표피 또는 진피 대식세포 (epidermal or dermal macrophages), 가장자리구역 대식세포 (marginal zone macrophages), 금속친화성 대식세포 (metallophilic macrophages), 적수 대식세포 (Red pulp macrophages), 백수 대식세포 (white pulp macrophages) 및 파골세포(osteoclasts)로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[0018] 상기 처리는 사멸화 세포와 대식세포를 함께 배양하는 것을 의미할 수 있다. 즉, 사멸화 세포와 대식세포를 함께 배양하여 얻은 배양액으로부터 분리된 엑소솜일 수 있다.

[0019] 이의 방법은 예컨대 다음과 같을 수 있다. 사멸화 세포로 대식 세포를 자극 시키기 전, 20 내지 30시간 동안 X-VIVO 또는 무혈청 DMEM 배지에서 배양한다. 본 발명의 구체적인 실시예에 의하면 X-VIVO 배지에서 24시간 동안 배양하여 혈청-결핍 상태로 만드는 것이 가장 바람직하다. 자극하기 위해, 배양 배지를 사멸화 세포가 포함된 X-VIVO 또는 무혈청 DMEM 배지로 교체할 수 있다. 배지 교체 후 10 내지 30시간 동안 사멸화 세포와 대식세포를 함께 배양하는 것이 바람직하며, 15 내지 25시간 동안 배양하는 것이 더욱 바람직하며, 18 내지 24시간 동안 배양하는 것이 가장 바람직하다.

[0020] 상기 엑소솜(exosome)은 세포들로부터 분비되는 40~120 nm 크기의 나노소포체로, 면역학적으로 중요한 단백질인 주조직적합체(main histocompatibility complex, MHC)와 열 충격 단백질(heat shock protein)을 포함하여 강력한 항종양 면역 반응을 유도하며, 항염증성의 마이크로 RNA(microRNA)와 콜라겐(collagen)의 축적을 조절하는 마이크로 RNA(microRNA)를 포함한다. 또한, 다른 세포 및 조직에 결합하여 막 구성요소, 단백질, RNA를 전달하는 등 다양한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

[0021] 본 발명에서 엑소솜을 분리하는 방법에는 제한이 없으며, 예를 들면 배양액에서, 원심분리, 초고속 원심분리, 필터에 의한 여과, 겔 여과 크로마토그래피, 프리-플로우 전기영동, 모세관 전기영동, 폴리머를 이용한 분리 등의 방법 및 이들의 조합을 이용하여 분리할 수 있으며, 바람직하게는 원심분리/초원심분리이다. 이때, 원심분리/초원심분리는, 100 내지 300,000 g, 바람직하게 150 내지 150,000 g에서 순차적으로 원심분리를 수행하여 세포 찌꺼기, 비-엑소솜 분획, 죽은 세포 등을 제거할 수 있다.

[0022] 본 발명의 약학 조성물은 암의 예방 또는 치료에 우수한 효과를 가진다.

[0023] 구체적으로, 엑소솜은 암세포로 흡수(uptake)되며, EMT 작용을 억제하고 Akt/p38 신호 cascade 억제하여 암세포

의 침투 및 전이를 억제한다. 이에 따라 암의 예방, 치료 및 전이 억제에 우수한 효과를 가진다. 더욱이 본 발명에 따른 엑소좀의 이용은 사멸화세포, 대식세포 또는 조정 배지를 직접 투여하는 것과 대비하여 인체에 안전하고 소량의 투여로써도 우수한 작용 효과를 나타낼 수 있다는 장점을 지닌다.

- [0024] 또한 본 발명에 따른 엑소좀은 다양한 성분을 함유하면서도 특히 PTEN 단백질을 함유함으로써 암의 EMT 작용을 억제하고 Akt/p38 신호 cascade 억제를 통한 암 전이에 우수한 효과를 보인다.
- [0025] 보다 구체적으로, 본 발명은 EMT(epithelial-mesenchymal transition)를 억제하는 것을 특징으로 하며, EMT 억제작용으로 인한 암세포 이동 및 침투 등 암 전이 초기 단계를 억제하는 것을 특징으로 한다. EMT는 상피세포가 간엽세포로 바뀌는 현상으로, 암 형성 및 전이 과정에서 E-cadherin 등의 세포 접착 물질이 소실되고 형태학적 변화가 유발되어 상피성 종양세포의 변화를 유발시켜 EMT가 암의 진행 및 전이 과정에 다양한 역할을 한다고 알려져 있다. 본 발명의 구체적인 실시예에서는 TGF- β 1을 처리하여 세포의 EMT를 유발하고 이를 엑소좀을 통하여 억제하였다.
- [0026] 본 발명에 있어서 암은 특정 암종에 한정되지 않은 다양한 암종 중 선택되는 것일 수 있다. 예컨대, 폐암, 유방암, 전립선암 및 대장암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [0027] 본 발명에 있어서, 약학 조성물에 유효성분으로 포함되는 본 발명에 따른 엑소좀은, 이에 제한되지는 않으나, 1 내지 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로, 또는 5 내지 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로, 또는 10 내지 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 약학 조성물에 포함되어 개체에 처리될 수 있다.
- [0028] 본 발명에 따른 약학 조성물은 단독의 항암 요법으로 이용될 수 있다.
- [0029] 또한 본 발명에 따른 약학 조성물은 상황에 따라 필요하다면 방사선 또는 항암제와 동시, 분리 또는 순차적으로 사용될 수 있다.
- [0030] 구체적으로, 상기 약학 조성물은 개별 치료제로 투여하거나, 방사선 또는 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 방사선 치료 또는 항암 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 또한, 단일 또는 다중 투여될 수 있으며, 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하다.
- [0031] 발명에 있어서, 상기 약학 조성물은 약학적으로 유효한 양의 엑소좀을 단독으로 포함하거나 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다. 상기에서 약학적으로 유효한 양이란 암의 증상을 예방, 개선 및 치료하기에 충분한 양을 의미한다.
- [0032] 본 발명에 따른 엑소좀의 약학적으로 유효한 양은 암의 증상 정도, 환자의 연령, 체중, 건강상태, 성별, 투여 경로 및 치료 기간 등에 따라 적절히 변화될 수 있다. 예컨대 적절한 투여량은 0.0001 내지 100 mg/체중kg일 수 있다.
- [0033] 또한, 상기 "약학적으로 허용되는"이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 조성물을 의미한다. 상기 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 또한, 충전제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0034] 상기 본 발명의 암 예방 또는 치료용 약학 조성물은 약학적 분야에서 통상의 방법에 따라 환자의 신체 내 투여에 적합한 단위투여형의 제제로 제형화시켜 투여할 수 있다. 이러한 목적에 적합한 제형으로는 비경구투여 제제로서 주사용 앰플과 같은 주사제, 주입 백과 같은 주입제, 및 에어로졸 제제와 같은 분무제 등이 바람직하다. 상기 주사용 앰플은 사용 직전에 주사액과 혼합 조제할 수 있으며, 주사액으로는 생리 식염수, 포도당, 만니톨, 링거액 등을 사용할 수 있다. 또한, 주입 백은 염화폴리비닐 또는 폴리에틸렌 재질의 것을 사용할 수 있으며, 박스터 (Baxter), 벡톤 디킨슨(Becton-Dickinson), 메드셉(Medcep), 내셔널 호스피탈 프로덕츠(National Hospital Products) 또는 테루모(Terumo)사의 주입 백을 예시할 수 있다.
- [0035] 상기 약학 조성물에는 상기 유효성분 외에 하나 또는 그 이상의 약학적으로 허용가능한 통상의 불활성 담체, 예를 들어, 주사제의 경우에는 보존제, 무통화제, 가용화제 또는 안정화제 등을, 국소 투여용 제제의 경우에는 기제 (base), 부형제, 윤활제 또는 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

- [0036] 이렇게 제조된 본 발명의 조성물 또는 약학적 제제는 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 비경구, 경구 등의 다양한 경로로 투여될 수 있으며, 투여 방법은 당업계에서 통상적으로 사용하는 모든 방식에 의해 투여될 수 있다. 이에 제한되지는 않으나, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관 내 (intracerebroventricular) 주사 등에 의해 투여될 수 있다.
- [0037] 구체적으로, 투여 방법은 이에 제한되지는 않으나, 엑소좀을 정맥 내로 투여(정맥주사; Intravenous injection)하거나, 대상체의 폐 또는 기관 내로 투여(국소 투여; Topical administration)하거나, 흡입(inhalation)에 의해 투여될 수 있다. 또한, 상기 엑소좀은 네블라이저 (nebulizer)를 사용하여 투여될 수 있으며, 기관 내 튜브를 사용하여 투여될 수 있다.
- [0038] 본 발명에서 개체란 상기 내성 암이 발병된 인간을 포함한 모든 동물을 의미하며, 본 발명의 조성물을 개체에 투여함으로써, 암을 치료할 수 있다.
- [0039] 본 발명에서 치료란 본 발명의 약학 조성물을 투여함으로써, 암이 호전되거나 이롭게 변경시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0040] 본 발명에서 투여란 어떠한 적절한 방법으로 대상에게 본 발명의 약학 조성물을 도입하는 행위를 의미하며, 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있다.
- [0041] 본 발명은 또한 사멸화 세포 처리된 대식 세포로부터 유래된 엑소좀을 포함하는 암의 전이 억제용 약학 조성물을 제공한다.
- [0042] 앞서 살핀바와 같이, 본 발명에 따른 조성물은 암세포로 흡수(uptake)되며, EMT 작용을 억제하고 Akt/p38 신호 cascade 억제하여 암세포의 침투 및 전이를 억제한다. 이에 따라 암의 전이 억제용 조성물로 이용될 수 있다.
- [0043] 본 발명은 사멸화 세포 처리된 대식 세포로부터 유래된 엑소좀을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 암의 치료 방법을 제공한다.
- [0044] 본 발명에 "사멸화 세포 처리된 대식 세포로부터 유래된 엑소좀", "암", "투여" 등의 용어는 상기에서 설명한 바와 동일하다.
- [0045] 상기 대상체는 동물을 말하며, 전형적으로 본 발명의 사멸화 세포 처리된 대식 세포로부터 유래된 엑소좀을 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.
- [0046] 사멸화 세포 처리된 대식 세포로부터 유래된 엑소좀을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 암의 전이 억제 방법을 제공한다.
- [0047] 본 발명은 또한 암의 치료를 위한 약제의 제조에서 사멸화 세포 처리된 대식 세포로부터 유래된 엑소좀의 용도를 제공한다.
- [0048] 본 발명은 또한 암의 치료에 사용하기 위한 사멸화 세포 처리된 대식 세포로부터 유래된 엑소좀을 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0049] 본 발명은 또한 암의 치료를 위한 사멸화 세포 처리된 대식 세포로부터 유래된 엑소좀의 용도를 제공한다.
- [0050] 본 발명은 또한 사멸화 세포 처리된 대식 세포로부터 엑소좀을 분리하는 방법을 제공한다.
- [0051] 본 발명에 따른 사멸화 세포 처리된 대식 세포로부터 엑소좀을 분리하는 방법은 아래 단계를 포함할 수 있다 :
- [0052] (a) 사멸화 세포를 대식 세포와 배양하는 단계;
- [0053] (b) 상기 (a) 단계의 배양액으로부터 상층액을 분리하는 단계; 및
- [0054] (c) 상기 (b) 단계의 상층액으로부터 엑소좀을 분리하는 단계.
- [0055] 상기 (a) 단계에 있어서 사멸화 세포와 대식세포의 배양은 예를 들어 사멸화 세포가 포함된 X-VIVO 또는 무혈청 DMEM 배지에 대식세포를 10 내지 30시간 동안, 바람직하게 15 내지 25시간 동안, 보다 바람직하게 18 내지 24시간 동안 배양하는 단계를 포함할 수 있다. 이러한 배양을 통해 엑소좀이 위 배양액에 다량 포함될 수 있다.
- [0056] 상기 (b) 단계에 있어서, 배양액으로부터 상층액을 분리하는 통상의 상층액 분리 방법에 의한 배양액으로부터의

상층액 분리이다. 예컨대 통상의 상층액 분리 원심분리 조건 하에 분리할 수 있다.

[0057] 상기 (c) 단계에 있어서, 상기 (b) 단계의 상층액으로부터 엑소좀을 분리하는 단계는 통상의 알려진 엑소좀 분리 방법을 이용할 수 있다. 예컨대, 원심분리, 초고속 원심분리, 필터에 의한 여과, 겔 여과 크로마토그래피, 프리-플로우 전기영동, 모세관 전기영동, 폴리머를 이용한 분리 등의 방법 및 이들의 조합을 이용하여 분리할 수 있으며, 바람직하게는 원심분리/초원심분리이다. 이때, 원심분리/초원심분리는, 100 내지 300,000 g, 바람직하게 150 내지 150,000 g에서 순차적으로 원심분리를 수행하여 세포 찌꺼기, 비-엑소좀 분획, 죽은 세포 등을 제거할 수 있다.

[0058] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

발명의 효과

[0059] 본 발명의 약학 조성물은 암세포로 흡수되고 암세포에서 상피-간엽 세포 전환을 억제하고 Akt/p38 신호 cascade를 하향 조절함으로써, 암세포의 침윤을 억제하여 암의 예방 또는 치료와 암의 전이 억제에 우수한 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0060] 도 1은 항-GFP 및 CD63 항체를 사용하여 웨스턴 블랏 분석을 통해 비수용성 구획에서 엑소좀 PTEN의 존재를 확인한 결과를 나타낸다. (sol: 수용성, Ins: 불용성)

도 2는 본 발명에 따른 엑소좀과 344SQ 또는 A549 세포 처리 후, GFP 형광을 공초점 현미경을 통해 분석한 암세포로 uptake를 확인한 결과를 나타낸다.

도 3은 과발현 GFP-PTEN 인간 대식세포 주로부터 수거된 엑소좀으로 함께 배양 후 344SQ 또는 A549 세포로부터의 용해물을 웨스턴 블랏으로 분석하여 엑소좀의 uptake를 확인한 결과를 나타낸다.

도 4는 사멸화 암 세포로 자극된 대식세포로부터의 정제된 엑소좀의 EMT 억제, Akt/p38 signal cascades의 인산화 억제를 확인한 결과를 나타낸다. (h: 시간, ExoCM: 사멸세포 미처리 대식세포로부터 엑소좀 ExoApoSQCM: 사멸세포 처리 대식세포로부터 엑소좀)

도 5는 344SQ의 정상 acini를 엑소좀을 함유하는 3D Matrigel에 자라게 하고 항-b-카테닌(녹색) 및 DAPI로 염색한 결과를 나타낸다.

도 6은 344SQ 세포에서 증가된 PTEN의 수준이 엑소좀에서 분비된 PTEN에 의한 것이고 엑소좀의 특정 분자에 의한 세포 자체의 자극을 통한 PTEN의 발현이 아닌 것을 확인한 결과를 나타낸다.

도 7의 a는 20 μ M GW4869로 전처리되거나 되지 않은 ApoSQ-stimulated RAW 세포의 조건배지로부터 분리된 엑소좀의 TEM 이미지이다. 스케일 바는 20 nm를 나타낸다.

도 7의 b는 GW4869로 전처리되거나 비히클(식염수 내 2 % DMSO)로 전처리된 ApoSQ-stimulated RAW 세포의 조건배지로부터 엑소좀의 크기 분포 분석을 나타낸다. 가로 축은 입자 크기 (nm)를 나타내고, 세로 축은 입자 농도 (x 10⁶ particles/ml)를 나타낸다. 붉은색 바는 s.e.m을 나타내고, 값은 세개의 독립된 실험으로부터 모드(mode) 또는 평균 크기 $\pm$ s.e.m를 나타낸다.

도 8은 apoptotic 344SQ 세포(ExoApoSQ CM)로 또는 apoptotic 344SQ 세포없이(ExoCM) RAW 조건 배지로부터 분리된 엑소좀으로 처리 12시간 후 344SQ 세포에서 PTEN mRNA의 qPCR 분석을 나타낸다. 실험은 3회 반복 수행된 결과를 나타낸다 (mean $\pm$ s.e.m.).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0061] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[0062] **실시예 1. 사멸화 세포 유래 엑소좀의 제조**

[0063] GFP-PTEN 과발현 대식세포를 제조하여 사용하였다. GFP-PTEN 과발현 대식세포의 제조를 위해서 표준 렌티바이러스

스 transduction을 수행하였다. HEK293T 세포를 TransIT®-LT1 Transfection Reagent (MIR 2300, Mirus Bio, Madison, WI, USA)를 사용하여 pLV-EGFP-PTEN, packaging (psPAX2) 및 envelope (pCMV-VSV-G) 벡터로 감염시키고 밤새 배양하였다. 렌티바이러스 transduction을 위해 시약을 신선한 배지로 대체하고 바이러스 상층액을 형질감염 후 24시간마다 수집하였다. THP-1 monocyte로부터 분화된 인간 대식세포(hMΦ)를 매 바이러스 수집 시간 4시간 동안 8 µg/ml polybrene로 상층액을 노출시키고 감염된 세포를 1 µg/ml 함유 푸로마이신 함유 배지를 사용하여 선택하여 제조하였다. 이를 통해 GFP-PTEN 과발현 대식세포를 제조하였다.

[0064] 또한, 사멸화 또는 괴사된 세포를 제조하기 위해, 344SQ 세포 또는 A549 세포는 254 nm 파장으로 10분 동안 자외선 조사된 후, 10% FBS가 첨가된 RPMI-1640 배지에서 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 2시간 동안 배양하였다. Wright-Giemsa 염색 시료와 현미경을 이용한 세포 핵 형태 평가에서 대략 70 내지 80%의 세포 사멸이 자외선 조사 세포에서 나타남을 확인하였다. 용해된 괴사(necrotic) 상피 암세포는 여러 번의 동결-해동 사이클로 수득하였다. 세포의 사멸 및 괴사는 아넥신 V-FITC/요오드화프로피디움(Annexin V-FITC/propidium iodide)(BD Biosciences, San Jose, CA)으로 염색한 후, FACSCalibur system(BD Biosciences)을 이용한 유세포 분석(flow cytometric analysis)을 수행하여 확인하였다.

[0065] 그리고 나서, 상기 과발현 대식세포와 사멸화 A549 세포와 공동배양을 수행하였다.

[0066] 구체적으로, 위 GFP-PTEN 과발현 대식세포를 자극하기 전에 24시간 동안 X-VIVO 10 배지 (04-380Q, Lonza) 하에서 Serum-starved 조건을 제공하였다. 자극을 위하여 배양 배지를 사멸화 또는 괴사된 세포 (apoptotic 344SQ 또는 apoptotic A549 세포, 1.5×10^6 cells/ml)를 포함하는 X-VIVO 10 배지로 교체하였다. 24시간 후 상층액을 원심분리를 통해 획득하고 엑소좀 정제를 위해 조건배지로 사용하였다.

[0067] 위 획득된 상층액을 200 g, 20,000 g 및 100,000 g의 순차적 원심분리 대상으로 하여 죽은 세포, 세포 찌꺼기, 비-엑소좀 분획을 제거하였다. 프로테아제 억제제를 포함하는 ice-cold PBS로 엑소좀 펠렛을 세척하고, 초원심 분리(Optima L-100K, Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA)를 오염된 단백질을 제거하기 위해 100,000 g에서 70분 동안 반복하였다. 엑소좀 펠렛을 프로테아제 억제제를 포함하는 RIPA 버퍼로 현탁하여, 엑소좀을 제조하였다.

[0068] 실시예 2. 제조된 엑소좀의 확인

[0069] 위 제조된 엑소좀을 확인하기 위하여 웨스턴 블랏을 수행하였다.

[0070] 웨스턴 블랏을 항-CD63 (ab216130, Abcam) 또는 항-GFP PTEN (9559, Cell Signaling Technology)로 조건 배지 내 엑소좀-PTEN의 확인을 위해 수행하였다.

[0071] 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0072] 도 1에서 확인되는 바와 같이, 비수용성 구획에서 엑소좀 및 이에 포함된 PTEN의 존재를 확인하였다.

[0073] 실시예 3. 암세포로의 엑소좀의 Uptake 확인

[0074] 상기 실시예 1의 제조된 GFP-PTEN 과발현 THP-1 대식세포를 150 mm 배양 접시에 70 % confluency에 도달할 때까지 키웠다. 그리고 나서, 사멸 A549 세포로 24시간 자극하고, 조건 배지를 순차적 원심분리하였다. 엑소좀 펠렛을 200 µl 무혈청 RPMI로 현탁하여 엑소좀을 제조하였다. 그리고 나서, 세포 (공초점 현미경을 위한 1×10^5 세포 또는 웨스턴 블랏을 위한 3×10^5 세포로 A549 또는 344SQ)를 50 µl의 정제된 엑소좀에 24시간 동안 노출하였다.

[0075] 세포에서 GFP-PTEN을 직접 형광을 통해 시각화하고 또한 총 세포 용해물을 사용하여 항-GFP로 확인하였다. 그 결과를 도 2에 나타내었다. 도 2에서 확인되는 바와 같이, 엑소좀 GFP-PTEN의 흡수(uptake)가 확인되었다.

[0076] 또한 위 실험 조건과 유사하게 웨스턴 블랏을 통해서 엑소좀 GFP-PTEN이 암세포에 흡수되는 것을 항-GFP 항체로 다시 확인하여 그 결과를 도 3에 나타내었다. 도 3에서 확인되는 바와 같이, 엑소좀을 암 세포로 흡수하는 것을 웨스턴 블랏을 통해서도 확인하였다.

[0077] 상기 결과를 통해서 사멸화 세포에 노출된 대식세포로부터 유래된 엑소좀이 암세포로의 이동 및 흡수(uptake)를 확인하였다.

[0078] 실시예 4. 엑소좀의 EMT 및 Akt/p38 신호 cascade의 하향조절 확인

[0079] EMT 및 Akt/p38 신호 cascade, 암 세포 침투에 대한 대식세포로부터 분비된 엑소좀의 영향을 확인하기 위해 상기 실시예 1의 ApoSQ-exposed CM(사멸화 세포에 노출된 대식세포를 포함하는 조건 배지)으로부터 정제된 엑소좀 또는 사멸화세포에 노출되지 않은 대식세포로부터 정제된 엑소좀을 TGF- β 1과 344SQ 세포에 처리하였다.

[0080] 이를 분석한 결과를 도 4에 나타내었다.

[0081] 도 4의 a는 EMT 신호의 단백질 발현 변화를 확인한 결과를 나타낸다. 도 4의 a에서 확인되는 바와 같이 실시예 1에 따른 엑소좀은 EMT 신호를 하향 조절함으로써 EMT 효과를 억제하였다.

[0082] 도 4의 b 및 c는 Akt/p38 신호 cascade를 나타낸다. 도 4의 b 및 c에서 확인되는 바와 같이 실시예 1에 따른 엑소좀은 Akt/p38 신호 cascade를 하향조절함으로써 암의 침투 및 전이를 억제하는 효과를 나타낸다.

[0083] 실시예 5. 엑소좀의 항-침투 효과 확인

[0084] 5,000 cells/well을 포함하는 단일 세포 현탁액을 8 웰 플레이트 내 solidified Growth Factor Reduced Matrigel (Corning Inc)에 위치시켰다. 10% FBS 및 2% Matrigel을 포함하는 RPMI1640 내 세포를 배양하고 배양액을 일주간 매 2일 또는 3일에 교환하였다. 배양 후, 세포를 TGF- β 1 (10 ng/ml) and 2% Matrigel를 포함하는 조건 배지로 처리하고, 그리고 나서 12시간 동안 배양하면서 cclipse TE-300 microscope (Nikon)으로 촬영하였다. 배양 조건에서는 ApoSQ-exposed CM(사멸화 세포에 노출된 대식세포를 포함하는 조건 배지)으로부터 정제된 엑소좀 또는 사멸화세포에 노출되지 않은 대식세포로부터 정제된 엑소좀을 TGF- β 1과 함께 또는 없이 344SQ 세포에 처리하였다.

[0085] 상기 반응 후, 344SQ 세포를 상온에서 8분간 4% PFA 용액으로 고정시켰다. Matrigel 3-D 배양에서 344SQ acini, 파라핀 포매 종양 또는 동결 피부 조직을 염색하기 위해, 포말린 고정을 30분 동안 상온에서 수행하고 IF-Wash buffer (PBS 내 0.05% NaN₃, 0.1% BSA, 0.2% Triton X-100 and 0.05% Tween-20)를 사용하였다. 고정 후, 시료를 각각 5분 동안 워싱 버퍼로 3회 워싱하고 5분간 상온에서 PBS 내 0.5 % Triton X-100로 permeabilize하였다. PBS 내 5% BSA 및 Mouse IgG Blocking Reagent가 ICC 및 IHC를 위해 각각 사용되었다. 이어서, 항체로 염색된 모든 슬라이드는 DAPI를 포함하는 Vectashield Mounting Medium로 마운팅되고 confocal microscope (LSM 800, Carl Zeiss)로 이미지화하였다.

[0086] 그 결과를 도 5에 나타내었다. 도 5에 나타낸 바와 같이 정제된 엑소좀으로 처리가 3D Matrigel 배양에서 TGF- β 1에 의해 유도되는 344SQ 세포의 polarized acinar 구조 형성 억제효과를 반전시켰다. 이러한 결과는 엑소좀 처리로 인한 항-침투 효과가 나타남을 의미한다.

[0087] 실시예 6. 엑소좀 PTEN에 의한 효과 확인

[0088] 대식세포로부터 엑소좀의 특정 분자에 의한 자극될 수 있는 암세포 자체에서의 PTEN 발현에 의한 효과가 아님을 확인하기 위하여, siRNA를 형질감염시킨 ApoSQ-stimulated 대식세포로부터 정제된 엑소좀을 처리하여 시험을 수행하였다.

[0089] RAW 264.7 세포를 하기 표 1의 2종의 PTEN siRNA 또는 대조군 siRNA 서열로 형질 감염시켰다.

[0090] [표 1]

PTEN (#1)	5'-CAGGAAUGAACCAUCUACA-3' (서열번호 1)
PTEN (#1)	5'-UGUAGAUGGUUCAUCCUG-3' (서열번호 2)
PTEN (#2)	5'- CUGAGUAGAAACAAGAGUA-3' (서열번호 3)
PTEN (#2)	5'- UACUCUUGUUUCUACUCAG-3' (서열번호 4)

[0091]

[0092] 구체적으로, GeneSilencer® siRNA Transfection Reagent (Genlantis Inc)을 사용하여 제조사 매뉴얼에 따라 100 nM의 최종 농도로 상기 서열 또는 control siRNA (SN-1003 AccuTarget™ Negative Control; Bioneer Inc)로 RAW 264.7 세포를 형질 감염 시켰다. 밤새 형질 감염 후, 세포를 24시간 더 배양하고 apoptotic 344SQ 세포로 자극하였다.

[0093] 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[0094] 도 6의 a는 형질전환 결과 PTEN 발현이 억제되었음을 확인한 결과를 나타낸다.

[0095] 도 6의 b에 따르면, 대조군 siRNA-transfected 대식세포로부터 엑소좀 처리에 이어서 344SQ 세포에서 PTEN 수준이 12시간 및 24시간에 증가하였다. 그러나, PTEN knockdown 대식세포로부터 엑소좀의 처리는 PTNE 수준에 변화를 가져오지 못했다. 이 결과는 344SQ 세포에서 증가된 PTEN의 수준이 대식세포에서 분비된 엑소좀으로부터 유래된 PTEN에 의한 것이고 엑소좀의 특정 분자에 의한 세포 자체의 자극을 통한 PTEN의 발현이 아닌 것을 보여준다.

[0096] **실시예 7. 전달을 위한 엑소좀의 역할 확인**

[0097] 전달을 위한 엑소좀의 역할을 입증하기 위하여, 엑소좀 biogenesis/release 억제제인 GW4869 20 μ M으로 Raw 세포를 전처리하고, 이어서 ApoSQ로 처리하였다. 대식세포로부터 분비된 엑소좀은 순차적 원심분리를 통해 분리하였고, 투과 전자 현미경(TEM)을 통해 형태학적으로 분석하고 NanoSight를 사용하여 나노파티클 추적 분석(NTA)로 특징화하였다.

[0098] 구체적으로 TEM은 다음 방법으로 수행하였다. 엑소좀을 10 μ l로 나눈 것을 1 시간 동안 상온에서 4 % 파라포름 알데히드로 고정하였다. 고정된 엑소좀 용액 6 μ l을 탄소 안정화된 그리드로 코팅된 구리 메쉬 포름바(Formvar)에 도포하고, 5분간 그리드로 흡수시킨 후, TEM(H-7650; Hitachi)을 사용하여 80 kV의 가속 전압에서 분석하였다. iTEM software를 이미지를 얻기 위해 사용하였다.

[0099] 구체적으로 나노파티클 추적 분석은 NanoSight NS300 system (Malvern Instruments, United Kingdom)을 이용하여 수행하였다. 100 nm 및 200 nm의 NanoSight 폴리스티렌 라텍스 캘리브레이션 비드를 기기 성능 체크를 위해 적용하였다. 엑소좀의 크기는 light scattering 및 Brownian motion을 기반으로 결정하였고, NTA 3.0으로 Stokes-Einstein equation을 사용하여 계산하였다. NTA 소프트웨어를 입자(입자/ml)의 농도 및 입자 분포(nm)를 측정하기 위해 사용하였고, 3회 반복 측정을 수행하였다.

[0100] 도 7의 a에서 확인할 수 있는 바와 같이, TEM은 나노 크기 베지클을 함유하는 분리물을 보여주었고, GW4869로 처리된 샘플에서 감소된 것을 보여주었다.

[0101] 또한, 도 7의 b에서 확인할 수 있는 바와 같이, GW4869의 전처리 유무는 대식세포로부터 엑소좀의 크기 분포에 영향을 주지 않았으며, 엑소좀의 농도만이 GW4869 처리로 인해 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

[0102] **실시예 8. recipient 344SQ 세포에서 증가된 PTEN 단백질 수준이 엑소좀의 특정 분자에 의해 자극된 PTEN mRNA 전사에 의한 초기 phase에 영향을 받는 것인지에 관한 확인**

[0103] ApoSQ 조건 배지 또는 조건배지로부터 정제된 엑소좀 처리 12시간에 344SQ 세포 내 PTEN mRNA 발현을 실험하였다.

[0104] 구체적으로, 앞서는 실험조건과 유사하게 6-well 플레이트에서 3 회 반복으로 80 % 컨플루언스에 이를 때까지 세포를 키운 후 추출하였다. 그리고 나서 Real-Time PCR 시스템 (AppliedBiosystems, Step One Plus)을 이용하여 정량적 분석을 수행하였으며, Real-Time PCR 시스템에 사용된 PTEN 유전자에 대한 프라이머 서열은 아래와 같이 서열번호 5 및 6에 나타내었다.

[0105] [표 2]

	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')
PTEN	CCATTACCCGGCTGCGGTCC (서열번호 5)	TCGCTGATGCCCTCGCTCT (서열번호 6)

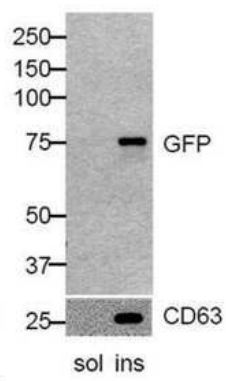
[0106]

[0107] 그 결과를 도 8에 나타내었다. recipient 344SQ 세포에서 PTEN mRNA의 과다는 정제된 엑소좀의 12시간 후 영향을 보이지 않았다. 이들 결과는 recipient 344SQ 세포에서 증가된 PTEN 단백질 수준이 엑소좀의 특정 분자에 의해 자극된 PTEN mRNA 전사에 의한 초기 phase에 영향을 받지 않는 내용을 보여준다.

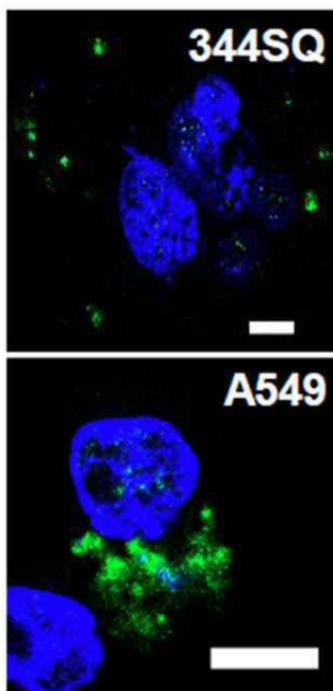
[0108] 상기 결과들로부터 사멸화 세포로부터 유래된 엑소좀을 포함하는 암의 예방 또는 치료용 조성물이 암세포로 도달하고 암세포에서 상피-간엽 세포 전환을 억제하고, 암세포의 침윤을 억제함으로써 암의 전이 예방 또는 치료에 우수한 효과가 있음을 암시한다.

도면

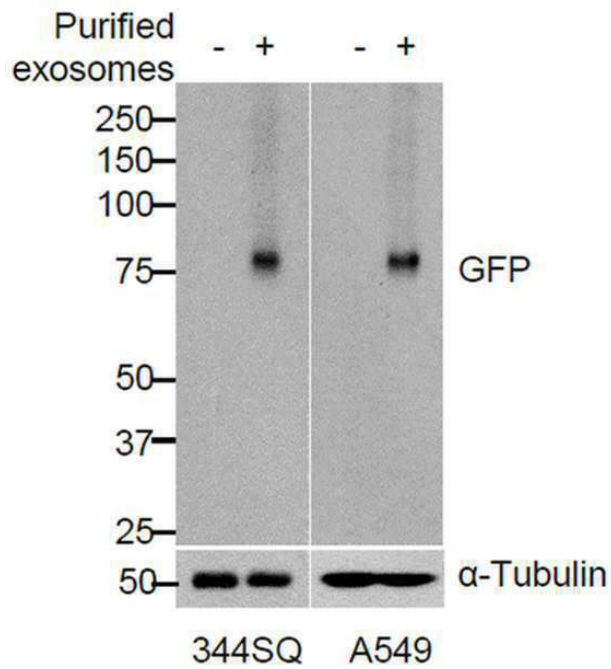
도면1



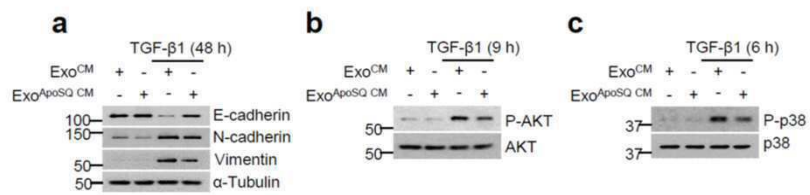
도면2



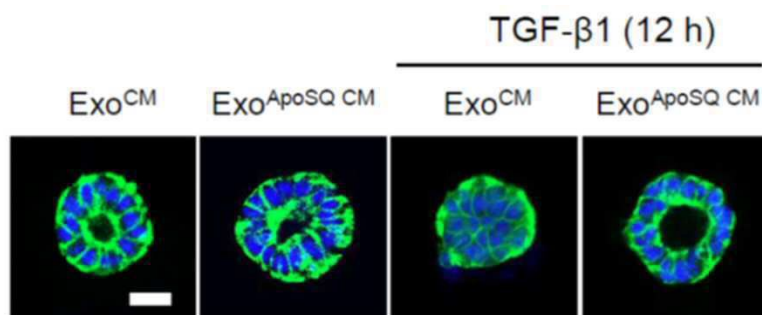
도면3



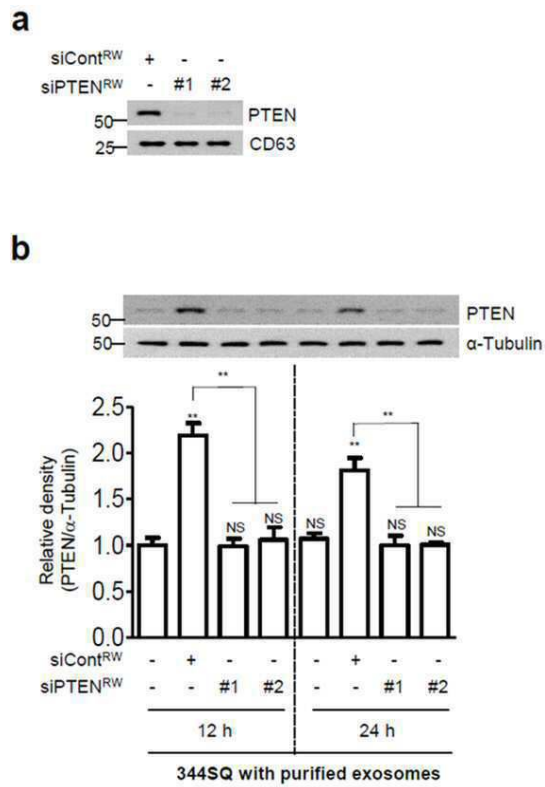
도면4



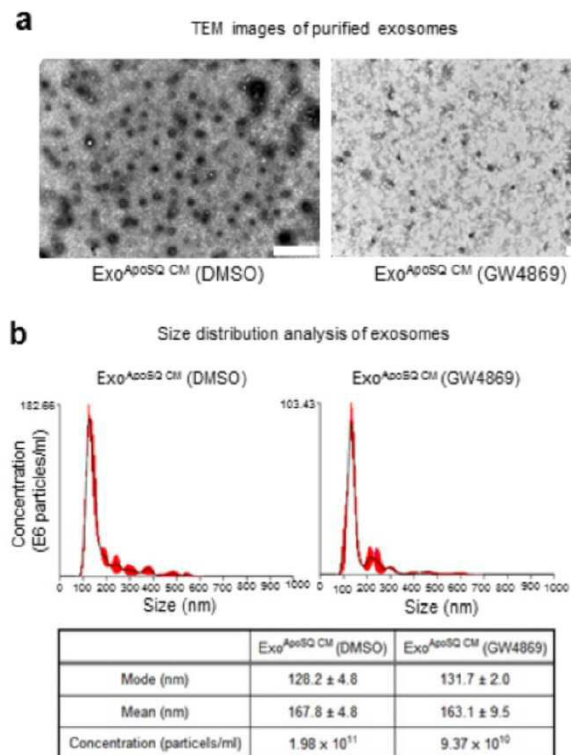
도면5



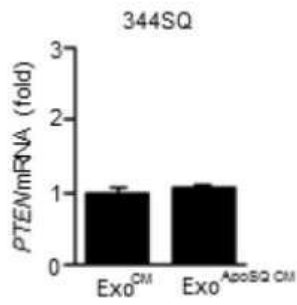
도면6



도면7



도면8



서열 목록

<110> EWHA UNIVERSITY - INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION

<120> Composition for preventing or treating cancer comprising exosome
derived from macrophage treated with apoptotic cell

<130> EWHA1.11

<150> KR 2018/0091437

<151> 2018-08-06

<160> 6

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PTEN(#1)

<400> 1

caggaaugaa ccaucuaca

19

<210> 2

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PTEN(#1)

<400> 2

uguagauggu ucauuccug

19

<210> 3

<211> 19

<212> RNA

<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PTEN(#2)	
<400>	3	
cugaguagaa	acaagagua	19
<210>	4	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PTEN(#2)	
<400>	4	
uacucuuguu	ucuacucag	19
<210>	5	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PTEN Forward Primer	
<400>	5	
ccattacccg	gctgcggtcc	20
<210>	6	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PTEN Reverse Primer	
<400>	6	
tcgctgatgc	ccctcgtct	20