

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0044714

(43) 공개일자 2021년04월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 35/19 (2014.01) *A61K 35/16* (2015.01)*A61P 43/00* (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 35/19 (2013.01)*A61K 35/16* (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0132538

(22) 출원일자 2020년10월14일

심사청구일자 2020년10월14일

(30) 우선권주장

1020190127839 2019년10월15일 대한민국(KR)

(71) 출원인

인하대학교 산학협력단

인천광역시 미추홀구 인하로 100(용현동, 인하대학교)

(72) 발명자

최정석

인천광역시 연수구 해돋이로120번길 16, 207동 1401호(송도동, 송도풍림아이원2단지아파트)

김정미

서울특별시 영등포구 영신로 191, 105동 1902호(당산동3가, 동부센트레빌)

김지원

인천광역시 연수구 신송로118번길 6, 106동 1401호(송도동, 송도풍림아이원1단지아파트)

(74) 대리인

특허법인태백

전체 청구항 수 : 총 10 항

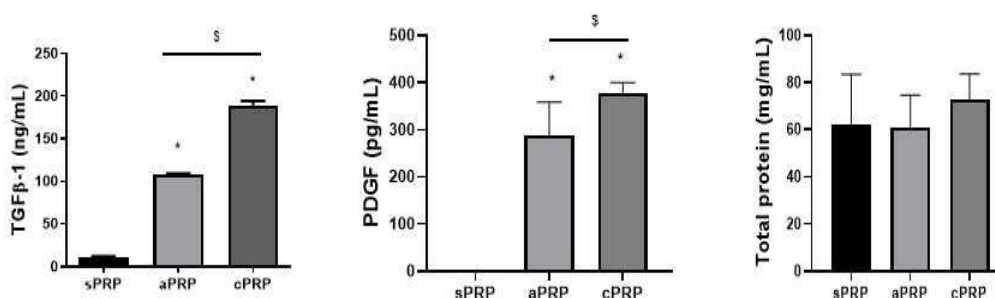
(54) 발명의 명칭 노화기인 타액선 기능손상 회복을 위한 혈소판 풍부 혈장 기반 치료 조성물

(57) 요약

본 발명은 노화에 따른 타액선 기능손상의 회복을 위한 혈소판이 풍부한 혈장 기반의 치료 조성물 및 이의 제조 방법에 관한 것으로, 혈소판 수가 조절된 혈소판 함유 혈장을 유효성분으로 포함하는 노화기인 타액선 기능손상 치료용 약학 조성물 등을 제공한다.

상기 혈소판 함유 혈장은 다양한 성장인자 및 단백질의 분비 또는 발현을 더욱 향상시키며, 노화에 따른 타액선 기능저하, 염증 또는 세포사멸을 억제함으로써, 보다 효과적으로 노화에 따른 타액선 기능손상을 치료할 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A61P 43/00 (2018.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711110982
과제번호 2014R1A5A2009392
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 집단연구지원(R&D)
연구과제명 저산소 표적 질환 연구센터
기 여 율 25/100
과제수행기관명 인하대학교
연구기간 2020.03.01 ~ 2021.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345312522
과제번호 2017R1A6A3A11027865
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 이공학학술연구기반구축(R&D)
연구과제명 방사능요오드로 인한 타액선 기능 손상 회복을 위한 혈소판 풍부 혈장 기반 치료법

개발

기 여 율 25/100
과제수행기관명 인하대학교
연구기간 2020.03.01 ~ 2020.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345318157
과제번호 2017R1D1A1B03030819
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(교육부)(R&D)
연구과제명 타액선 노화 과정에서 Wnt-PPAR 신호전달경로 제어를 통한 구강건조증 치료 인자 및

항노화 후보물질 발굴

기 여 율 25/100
과제수행기관명 인하대학교
연구기간 2020.03.01 ~ 2020.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711103932
과제번호 2019M3E5D1A02069612
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 혁신형의사과학자공동연구사업(R&D)
연구과제명 신경재생의 정합성 향상을 위한 혈소판 풍부혈장 탑재 신경도관 개발
기 여 율 25/100
과제수행기관명 인하대학교의과대학부속병원
연구기간 2020.01.01 ~ 2020.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

혈소판 수가 조절된 혈소판 함유 혈장을 유효성분으로 포함하는 노화기인 타액선 기능손상 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 혈소판 함유 혈장은,

개체로부터 수득한 혈액에서 분리한 혈소판 풍부 혈장(platelet rich plasma)의 혈소판 수를 $1 \times 10^7/\text{mL}$ 내지 $1 \times 10^9/\text{mL}$ 로 조절한 것을 특징으로 하는 노화기인 타액선 기능손상 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 혈소판 함유 혈장은,

10 내지 $30 \mu\text{M}$ 의 A23187 또는 1 내지 $20 \mu\text{g/mL}$ 의 콜라겐으로 활성화시킨 것을 특징으로 하는 노화기인 타액선 기능손상 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 혈소판 함유 혈장은,

형질전환성장인자- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), 혈소판-유래성장인자(PDGF), 섬유아세포성장인자(FGF), 혈관내피세포성장인자(VEGF), 상피세포성장인자(EGF), 인슐린-유사 성장인자(IGF), 혈소판-유래혈관형성인자(PDAF) 및 혈소판-유래표피성장인자(PDEGF)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 또는 둘 이상의 성장인자를 분비하는 것을 특징으로 하는 노화기인 타액선 기능손상 치료용 약학 조성물.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 혈소판 함유 혈장은,

혈소판 인자 4(platelet factor 4, PF-4), 펩티딜-프로릴 시스-트랜스 아이소머라제 A(peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A), 브릿징 인테그레이터 2(bridging integrator 2), 크레아틴 키나아제 B형(creatine kinase B-type), 트랜스겔린-2(transgelin-2), 알파-액티닌-1(alpha-actinin-1), 14-3-3 단백질 제타/델타(14-3-3 protein zeta/delta), 아데니일 사이클라제-관련 단백질 1(adenylyl cyclase-associated protein 1), 헤모글로빈 서브유닛 베타-2(hemoglobin subunit beta-2), 아포지질단백질 C-I(apolipoprotein C-I), 단백질 Mmrn1, 필라민 알파(filamin alpha), 뉴클레오사이드 디포스페이트 키나아제 B(nucleoside diphosphate kinase B), 뉴클레오사이드 디포스페이트 키나아제 A(nucleoside diphosphate kinase A), 단백질 Vtn, 튜불린 알파-4A 체인(tubulin alpha-4A chain), 피브리노겐 유사 2(fibrinogen-like 2), WD 반복-함유 단백질 1(WD repeat-containing protein 1), 빈쿨린(vinculin), Fermt3 단백질, C-반응성 단백질(C-reactive protein) 및 단백질 Tln1으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 또는 둘 이상의 단백질을 발현시키는 것을 특징으로 하는 노화기인 타액선 기능손상 치료용 약학 조성물.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 혈소판 함유 혈장은,

노화에 따른 타액선 기능저하, 염증 또는 세포사멸(apoptosis)을 억제하는 것을 특징으로 하는 노화기인 타액선 기능손상 치료용 약학 조성물.

청구항 7

개체로부터 수득한 혈액으로부터 혈소판 풍부 혈장을 분리하는 단계;

상기 분리된 혈소판 풍부 혈장의 혈소판 수를 조절하는 단계;

상기 혈소판 수가 조절된 혈소판 풍부 혈장에 혈소판 활성화 유도 약물을 처리하여 활성화시키는 단계; 및

상기 활성화된 혈소판 풍부 혈장을 원심분리하여 상등액을 수득하는 단계;를 포함하는 혈소판 수가 조절된 혈소판 함유 혈장의 제조방법.

청구항 8

제 7 항에 있어서,

상기 혈소판 수를 조절하는 단계는,

상기 분리된 혈소판 풍부 혈장을 2000 내지 4000rpm으로 10 내지 30분간 원심분리하여 혈소판 제거 혈장을 분리해, 혈소판 수가 $1 \times 10^7/\text{mL}$ 내지 $1 \times 10^9/\text{mL}$ 이 되도록 수행되는 것을 특징으로 하는 혈소판 수가 조절된 혈소판 함유 혈장의 제조방법.

청구항 9

제 7 항에 있어서,

상기 활성화시키는 단계는,

상기 혈소판 수가 조절된 혈소판 풍부 혈장을 30 내지 40℃에서 500 내지 1500rpm으로 1 내지 10분간 먼저 배양한 후, 10 내지 30 μM 의 A23187 또는 1 내지 20 $\mu\text{g/mL}$ 의 콜라겐을 처리하고 500 내지 1500rpm에서 10 내지 30분간 배양하여 수행되는 것을 특징으로 하는 혈소판 수가 조절된 혈소판 함유 혈장의 제조방법.

청구항 10

제 7 항에 있어서,

상기 혈소판 수가 조절된 혈소판 함유 혈장은,

노화기인 타액선 기능손상의 치료 또는 개선을 위한 제제로 사용되는 것을 특징으로 하는 혈소판 수가 조절된 혈소판 함유 혈장의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 노화에 따른 타액선 기능손상의 회복을 위한 혈소판이 풍부한 혈장 기반의 치료 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 인간의 타액은 이하선, 악하선 또는 설하선 같은 주 타액선과 구강 내에 있는 여러 개의 작은 타액선(소타액선)으로부터 생성된다. 주 타액선은 분비물을 선외 분비관(extraglandular excretory duct)을 통해서 내보내는 반면, 소 타액선은 점막 고유층(lamina propria)이나 구강 내 점막하층(submucosa) 내에 있고 분비물을 매우 짧은 분비관을 통해서 내보낸다.

[0003] 타액은 다음의 몇 가지 기능을 가지고 있다. 타액은 발음할 때 도움이 되는 습윤 효과(moistening effect) 이외에도 적절한 미각(taste)과 음식물을 삼킬 때 수화 작용제(wetting agent)로 작용하고, 항 세균 효과와 항 진균 효과가 있으며, 소화 효소를 포함하고 있어 소화를 시작하는 효과가 있다.

[0004] 타액 및 타액선의 기능은 인간의 경우, 만 21세를 정점으로 하여 그 기능이 점점 저하되어 만 60세가 되면 남녀 공히 그 기능이 10~50% 정도로 떨어진다. 노화는 타액의 분비율이나 분비량을 감소시키고 점도를 증가시키며, 타액 내 알파-아밀라아제(α -amylase)의 활성을 감소시킨다. 이외에도 타액 내 여러 단백질의 함량을 변화시킬 뿐만 아니라 타액선의 위축(atrophy)과 여러 단백질의 비정상적인 번역후변형(post-translational modification)을 일으킨다.

[0005] 또한, 노화시 타액과 관련된 가장 빈번한 증상인 구강건조증(xerostomia)에 있어서, 구강 조직은 보호막으로 작용하는 타액의 감소로 항 세균 효과나 항 진균 효과를 나타내는 비면역 글로불린 방어인자들의 보호를 받을 수 없어 쉽게 감염의 위험에 노출되어 있다. 이 경우 주로 사용되는 방법이 인공 타액의 사용이지만, 기존의 인공 타액은 면역 글로불린, 비면역 글로불린 방어인자와, 소화 효소인 알파-아밀라아제가 없으므로 세균 및 진균 감염에 대항할 수 없고 소화 기능을 도울 수 없는 문제점이 있다.

[0006] 인간 생활 중 구강 조직의 건강에서 타액의 중요성은 현대에 있어 노인 인구 증가에 따라 매우 커지고 있어, 노화로 인한 타액선 기능저하에 따른 효과적인 치료 방법이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2012-0092152호 (2012.08.20 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 노화기인 타액선 기능손상의 치료에 우수한 효과를 가진 혈소판 풍부 혈장 기반의 치료 조성물을 제공하는 데에 있다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 혈소판 풍부 혈장 기반의 치료 조성물을 제조하는 방법을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 혈소판 수가 조절된 혈소판 함유 혈장을 유효성분으로 포함하는 노화기인 타액선 기능손상 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 개체로부터 수득한 혈액으로부터 혈소판 풍부 혈장을 분리하는 단계; 상기 분리된 혈소판 풍부 혈장의 혈소판 수를 조절하는 단계; 상기 혈소판 수가 조절된 혈소판 풍부 혈장에 혈소판 활성화 유도 약물을 처리하여 활성화시키는 단계; 및 상기 활성화된 혈소판 풍부 혈장을 원심분리하여 상등액을 수득하는 단계;를 포함하는 혈소판 수가 조절된 혈소판 함유 혈장의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0012] 본 발명은 노화에 따른 타액선 기능손상의 회복, 재생 또는 치료를 위해 혈소판 풍부 혈장으로부터 제조된, 혈소판 수가 조절된 혈소판 함유 혈장을 유효성분으로 포함하는 치료 조성물에 관한 것으로, 상기 혈소판 함유 혈장은 다양한 성장인자 및 단백질의 분비 또는 발현을 더욱 향상시키며, 노화에 따른 타액선 기능저하, 염증 또는 세포사멸을 억제함으로써, 보다 효과적으로 노화에 따른 타액선 기능손상을 치료할 수 있다.

[0013] 또한, 상기 혈소판 함유 혈장은 혈소판의 수, 활성화 유도 약물 및 이의 농도를 특정 범위로 조절하여 제조됨으로써 그 효능을 일정하게 발휘할 수 있어, 사람마다 상이한 효능을 보이는 기존 치료제의 한계를 극복할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 본 발명의 실시예 1에 따른 혈소판 활성화도를 측정한 결과 그래프이다.

도 2는 본 발명의 실시예 1에 따른 혈소판 활성화 유도 약물 처리에 따른 성분 변화를 분석한 그래프이다.

도 3은 본 발명의 실시예 2에 따른 방사선 조사기인 세포 노화 및 세포 증식능을 확인한 결과이다.

도 4는 본 발명의 실시예 2에 따른 아밀라아제 및 SOD(superoxide dismutase)의 활성 변화를 나타낸 그래프이다.

도 5a 및 도 5b는 본 발명의 실시예 2에 따른 8-OHdG(8-hydroxydeoxyguanosine) 및 아폽토시스(apoptosis)의 발현 변화를 나타낸 것이다.

도 6은 본 발명의 실시예 2에 따른 AQP5, 아밀라아제, p21 유전자의 발현 변화를 나타낸 그래프이다.

도 7은 본 발명의 실시예 3에 따른 노화쥐에서의 신체적 변화 및 타액선 기능 변화를 나타낸 그래프이다.

도 8은 본 발명의 실시예 3에 따른 노화쥐 타액선 조직의 노화도 및 형태학적 변화를 관찰한 결과이다.

도 9는 본 발명의 실시예 3에 따른 노화쥐 타액선 조직의 기능 단백질, 염증 마커 및 아폽토시스 발현 변화를 관찰한 결과이다.

도 10은 본 발명의 실시예 3에 따른 노화쥐 타액선 조직의 다양한 유전자 발현 변화를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0015] 이하, 본 발명을 상세하게 설명하기로 한다.
- [0017] 본 발명자들은 혈소판 활성화에 따른 혈소판 분비물 함유 혈장(platelet releasate containing plasma)을 이용한 노화기인 타액선 기능손상 회복 치료제 개발에 중점을 두고, 혈소판 활성화 방법으로 stirring, 콜라겐(collagen) 및 A23187 (Ca⁺⁺ ionophore)을 사용하였다.
- [0018] 혈소판이 외부 자극에 의해 활성화 되면, 높은 농도의 성장인자(growth factor), 사이토카인(cytokine) 등을 분비하나, 건강한 정상인의 혈소판은 에피네프린(epinephrine), 노르에피네프린(nor-epinephrine), 도파민(dopamin) 뿐 아니라, 콜라겐, 트롬빈(thrombin)과 같은 응집 유도 물질에 대해서 상이한 반응을 보인다고 보고된 바 있다 [Thrombosis Research, 124(1), 2009, 90-95].
- [0019] 비활성화된 혈소판 풍부 혈장(platelet rich plasma, PRP)을 상처 부위에 직접 도포하게 되면 혈소판이 콜라겐에 직접적으로 접촉하게 된다. 콜라겐은 가장 강력한 혈소판 부착 및 응집 유도 약물로, 혈소판이 콜라겐에 노출되면 즉각 활성화되고 성장인자를 비롯한 다양한 분비물질을 분비하게 되는데, 이를 이용한 것이 기존의 PRP 치료법이다.
- [0020] 하지만, 앞서 언급했듯이 콜라겐 등에 의한 혈소판의 반응 정도가 사람마다 다르기 때문에, 본 발명자는 *in vitro*에서 콜라겐과 같은 혈소판 응집 유도 약물에 의한 혈소판 활성화를 규격화하여 사람마다 상이한 효능을 보이는 혈소판 기반 치료법의 한계점을 극복하고자 하였다.
- [0022] 본 발명은 혈소판 수가 조절된 혈소판 함유 혈장을 유효성분으로 포함하는 노화기인 타액선 기능손상 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0023] 상기 혈소판 함유 혈장은 개체로부터 수득한 혈액(전혈)에서 분리한 혈소판 풍부 혈장(platelet rich plasma)의 혈소판 수를 일정하게 조절한 뒤, A23187 또는 콜라겐과 같은 혈소판 활성화 유도 물질을 처리하여 활성화시킨 것으로, 혈소판 풍부 혈장 기반의 물질일 수 있다.
- [0024] 본 명세서에서, "혈소판 풍부 혈장(platelet rich plasma, PRP)"이란, 기준치보다 높은 혈소판 농도를 가진 혈장으로 정의될 수 있고, 상기 PRP는 "농축된 혈소판 풍부 혈장(concentrated Platelet-Rich Plasma, cPRP)", "혈장 풍부 성장 인자(plasma rich growth factor)", "혈소판 겔(platelet gel)", "혈소판이 (매우) 풍부한 혈장(plasma (very) rich in platelets)", "혈소판 풍부 혈장(platelet-enriched plasma)", "혈소판 분비물(platelet releasate)" 등의 여러 명칭으로 혼용될 수 있다.
- [0026] 보다 상세하게는, 상기 혈소판 함유 혈장은 개체로부터 수득한 혈액에서 분리한 혈소판 풍부 혈장의 혈소판 수

를 $1 \times 10^7/\text{mL}$ 내지 $1 \times 10^9/\text{mL}$, 바람직하게는 $3 \times 10^8/\text{mL}$ 내지 $5 \times 10^8/\text{mL}$, 보다 바람직하게는 $4 \times 10^8/\text{mL}$ 내지 $4.5 \times 10^8/\text{mL}$ 로 조절한 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0027] 또한, 상기 혈소판 함유 혈장은 10 내지 $30 \mu\text{M}$, 바람직하게는 $20 \mu\text{M}$ 의 A23187 또는 1 내지 $20 \mu\text{g/mL}$, 바람직하게는 $10 \mu\text{g/mL}$ 의 콜라겐으로 활성화시킨 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0028] 상기 개체는 포유동물일 수 있고, 예를 들어, 인간 및 영장류뿐만 아니라 소, 돼지, 말, 개 등의 가축 등을 포함할 수 있다.

[0030] 상기 혈소판 함유 혈장은 형질전환성장인자- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), 혈소판-유래성장인자(PDGF), 섬유아세포성장인자(FGF), 혈관내피세포성장인자(VEGF), 상피세포성장인자(EGF), 인슐린-유사 성장인자(IGF), 혈소판-유래혈관형성인자(PDAF) 및 혈소판-유래표피성장인자(PDEGF)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 또는 둘 이상의 성장인자를 분비할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0032] 또한, 상기 혈소판 함유 혈장은 혈소판 인자 4(platelet factor 4, PF-4), 펩티딜-프로릴 시스-트랜스 아이소머라제 A(peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A), 브릿징 인테그레이터 2(bridging integrator 2), 크레아틴 키나아제 B형(creatine kinase B-type), 트랜스겔린-2(transgelin-2), 알파-액티닌-1(alpha-actinin-1), 14-3-3 단백질 제타/델타(14-3-3 protein zeta/delta), 아데닐릴 사이클라제-관련 단백질 1(adenylyl cyclase-associated protein 1), 헤모글로빈 서브유닛 베타-2(hemoglobin subunit beta-2), 아포지질단백질 C-I(apolipoprotein C-I), 단백질 Mmrn1, 필라민 알파(filamin alpha), 뉴클레오사이드 디포스페이트 키나아제 B(nucleoside diphosphate kinase B), 뉴클레오사이드 디포스페이트 키나아제 A(nucleoside diphosphate kinase A), 단백질 Vtn, 튜불린 알파-4A 체인(tubulin alpha-4A chain), 피브리노겐 유사 2(fibrinogen-like 2), WD 반복-함유 단백질 1(WD repeat-containing protein 1), 빈쿨린(vinculin), Fermt3 단백질, C-반응성 단백질(C-reactive protein) 및 단백질 Tln1으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 또는 둘 이상의 단백질을 발현시킬 수 있고, 특히 혈소판 인자 4, 브릿징 인테그레이터 2, 크레아틴 키나아제 B형, 트랜스겔린-2, 아포지질단백질 C-I, 단백질 Mmrn1, 뉴클레오사이드 디포스페이트 키나아제 B, 단백질 Vtn, 피브리노겐 유사 2, 빈쿨린 또는 단백질 Tln1의 발현은 A23187 또는 콜라겐에 의한 활성화에 의해 더욱 향상될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0033] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 단백질은 stirring으로 활성화된 혈소판 함유 혈장(sPRP)에 비하여 콜라겐으로 활성화된 혈소판 함유 혈장(cPRP) 또는 A23187로 활성화된 혈소판 함유 혈장(aPRP)에서 2배 이상 높은 발현을 나타내었다.

[0035] 본 발명에 있어서, 상기 혈소판 함유 혈장은 노화에 따른 타액선 기능저하, 염증 또는 세포사멸을 억제하여 노화기인 타액선 기능손상에 따른 질환 또는 증상을 치료할 수 있다.

[0036] 본 명세서에서, "치료"란, 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여에 의해 노화기인 타액선 기능손상, 이에 따른 질환 또는 이의 적어도 하나 이상의 증상을 완화, 감소, 또는 소멸시키는 등 그 증세를 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.

[0038] 본 발명에 따른 약학 조성물은 약학적 분야의 통상적인 방법에 따라 제조될 수 있다. 상기 약학 조성물은 제형에 따라 약학적으로 허용가능한 적절한 담체와 배합될 수 있고, 필요에 따라, 부형제, 희석제, 분산제, 유화제, 완충제, 안정제, 결합제, 봉해제, 용제 등을 더 포함하여 제조될 수 있다. 상기 적절한 담체 등은 본 발명에 따른 혈소판 함유 혈장의 활성 및 특성을 저해하지 않는 것으로, 투여 형태 및 제형에 따라 달리 선택될 수 있다.

[0039] 상기 약학 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제, 희석제 등으로는 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시 벤조에이트, 프로필히드록시 벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등이 있다. 상기 조성물을 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를

사용하여 조제될 수 있다.

- [0041] 본 발명에 따른 약학 조성물은 어떠한 제형으로도 적용될 수 있고, 상세하게는 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [0042] 보다 상세하게는, 상기 경구형 제형 중 고형 제형은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등의 형태로, 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스, 락토오스, 솔비톨, 만니톨, 셀룰로오스, 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있고, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 포함될 수 있다. 또한, 캡슐제형의 경우 상기 언급한 물질 외에도 지방유와 같은 액체 담체를 더 포함할 수 있다.
- [0043] 상기 경구형 제형 중 액상 제형은 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0044] 상기 비경구 제형은 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 주사제, 동결건조 제제, 좌제 등이 포함될 수 있다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다. 이에 제한되지 않고, 당업계에 널리 공지된 적합한 제제를 모두 사용 가능하다.
- [0046] 또한, 본 발명에 따른 약학 조성물은 치료 효능의 증진을 위해 항산화제를 더 첨가할 수 있다. 상기 항산화제로는 티아민(thiamin, 비타민 B1), 리보플라빈(riboflavin, 비타민 B2), 나이아신(niacin, 비타민 B3), 판토텐산(pantothenic acid, 비타민 B5), 피리독신(pyridoxine, 비타민 B6) 및 코발라민(cobalamin, 비타민 B12) 등의 비타민 B군의 화합물과 비타민 C, 비타민 D, 비타민 E 등이 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않고, 당업계에 널리 공지된 적합한 제제를 모두 사용 가능하다.
- [0048] 본 발명에 따른 약학 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있다.
- [0049] 본 명세서에서, "약학적으로 유효한 양"이란, 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수해/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미한다.
- [0050] 상기 약학 조성물의 유효 용량 수준은 사용 목적, 환자의 연령, 성별, 체중 및 건강 상태, 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 달리 결정될 수 있다. 예를 들어, 일정하지는 않지만 일반적으로 0.001 내지 100mg/kg으로, 바람직하게는 0.01 내지 10mg/kg을 일일 1회 내지 수회 투여될 수 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0052] 본 발명에 따른 약학 조성물은 노화기인 타액선 기능손상이 발생할 수 있는 임의의 동물에 투여될 수 있고, 상기 동물은 예를 들어, 인간 및 영장류뿐만 아니라 소, 돼지, 말, 개 등의 가축 등을 포함할 수 있다.
- [0053] 상기 약학 조성물은 제제 형태에 따른 적당한 투여 경로로 투여될 수 있고, 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있다. 투여 방법은 특히 한정할 필요 없이, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피부 도포, 호흡기내 흡입, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내(intracerebroventricular) 주사 등의 통상적인 방법으로 투여될 수 있다.
- [0054] 본 발명에 따른 약학 조성물은 노화기인 타액선 기능손상의 예방 또는 치료를 위하여 단독으로 사용될 수 있고, 수술 또는 다른 약물 치료 등과 병용하여 사용될 수 있다.
- [0056] 또한, 본 발명은 개체로부터 수득한 혈액으로부터 혈소판 풍부 혈장을 분리하는 단계; 상기 분리된 혈소판 풍부 혈장의 혈소판 수를 조절하는 단계; 상기 혈소판 수가 조절된 혈소판 풍부 혈장에 혈소판 활성화 유도 약물을

처리하여 활성화시키는 단계; 및 상기 활성화된 혈소판 풍부 혈장을 원심분리하여 상등액을 수득하는 단계;를 포함하는 혈소판 수가 조절된 혈소판 함유 혈장의 제조방법을 제공한다.

- [0058] 상기 혈소판 풍부 혈장을 분리하는 단계는 1000 내지 2000rpm, 바람직하게는 1500rpm에서 1 내지 20분, 바람직하게는 10분 동안 원심분리함으로써, 상기 개체로부터 수득한 혈액으로부터 혈소판 풍부 혈장을 분리하여 수득할 수 있으나, 이에 제한되지 않고 당업계에 널리 공지된 방법을 이용하여 혈소판 풍부 혈장을 분리할 수 있다.
- [0059] 상기 혈소판 수를 조절하는 단계는 상기 분리된 혈소판 풍부 혈장을 2000 내지 4000rpm, 바람직하게는 3000rpm으로 10 내지 30분간, 바람직하게는 20분간 원심분리하여 혈소판 제거 혈장을 분리해, 혈소판 수가 1×10^7 /mL 내지 1×10^9 /mL, 바람직하게는 3×10^8 /mL 내지 5×10^8 /mL, 보다 바람직하게는 4×10^8 /mL 내지 4.5×10^8 /mL이 되도록 수행될 수 있다.
- [0060] 상기 혈소판 활성화 유도 약물을 처리하여 활성화시키는 단계는 상기 혈소판 수가 조절된 혈소판 풍부 혈장을 30 내지 40℃, 바람직하게는 37℃에서, 500 내지 1500rpm, 바람직하게는 1100rpm으로 1 내지 10분간, 바람직하게는 3분간 먼저 배양한 후, 10 내지 30 μ M, 바람직하게는 20 μ M의 A23187 또는 1 내지 20 μ g/mL, 바람직하게는 10 μ g/mL의 콜라겐을 처리하고 500 내지 1500rpm, 바람직하게는 1100rpm에서 10 내지 30분간, 바람직하게는 20분간 배양함으로써 수행될 수 있다.
- [0061] 상기 활성화된 혈소판 풍부 혈장을 원심분리하여 상등액을 수득하는 단계는, 상기 활성화된 혈소판 풍부 혈장을 1 내지 10℃, 바람직하게는 4℃에서 2000 내지 4000rpm, 바람직하게는 3000rpm으로 1 내지 20분간, 바람직하게는 10분간 원심분리하여 이의 상등액을 수득함으로써 수행될 수 있다.
- [0063] 상기 제조방법에 따라 제조된 혈소판 수가 조절된 혈소판 함유 혈장은 형질전환성장인자- β 1(TGF- β 1), 혈소판-유래성장인자(PDGF) 등 다양한 성장인자와 단백질을 분비 또는 발현시킬 수 있고, 노화에 따른 타액선 기능저하, 염증 또는 세포사멸을 억제할 수 있어, 노화기인 타액선 기능손상의 치료 또는 개선을 위한 제제로 사용될 수 있다.
- [0065] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.
- [0067] <실시예 1> 혈소판 풍부 혈장 기반의 혈소판 수가 조절된 혈소판 함유 혈장(PRP)의 제조 및 이의 활성화
- [0068] 1-1. 혈액 채취 및 혈소판 풍부 혈장에서 혈소판 수가 조절된 혈소판 함유 혈장(PRP)의 제조
- [0069] 호홉마취한 랫트(rat)의 심장에서 2.2% 시트르산 나트륨(sodium citrate) (1:9, v/v)이 담긴 일회용 주사기를 이용하여 전혈을 채취한 뒤, 1500rpm에서 10분 동안 원심분리하여 혈소판 풍부 혈장을 얻고, 3000rpm에서 20분 동안 원심분리하여 혈소판 제거 혈장을 분리하였다. 혈소판 수를 $4 \sim 4.5 \times 10^8$ /mL로 조정된 혈소판 풍부 혈장을 37℃, 1100rpm에서 3분간 미리 배양한 다음, 20 μ M A23187 또는 10 μ g/mL의 콜라겐을 처리하고 37℃, 1100 rpm에서 20분간 배양하여 혈소판을 활성화시킨 후, 4℃, 3000rpm에서 10분간 원심분리한 다음 상등액을 얻었다. 얻어진 상등액은 3 kDa MWCO centrifugal filter unit으로 농축시킨 후, 사용 직전까지 -80℃에서 보관하였다.
- [0071] 1-2. 혈소판 활성화도 측정
- [0072] 상기에 따라 수득한 혈소판 풍부 혈장에 콜라겐 또는 A23187의 약물을 처리하고 37℃, 1100 rpm에서 20분간 반응시킨 후, 4% 파라포름알데히드를 첨가하여 10분간 고정한 뒤, 20 μ L CD62P-FITC 항체를 넣고 상온에서 1시간 반응시킨 후, 유세포분석기를 이용하여 혈소판 활성화도를 측정하였다.

- [0074] 콜라겐 또는 A23187의 약물을 처리하여 혈소판 활성화도를 측정한 결과, 도 1과 같이, 콜라겐을 처리한 혈소판 함유 혈장(cPRP)에서 CD62P가 현저하게 발현되는 것으로 나타났다.
- [0076] 1-3. 혈소판 활성화 유도 약물 처리에 따른 성분 변화 확인
- [0077] stirring, A23187, 및 콜라겐 처리로 활성화된 혈소판의 성분 변화를 확인한 결과, 도 2와 같이, stirring으로 혈소판을 활성화시킨 혈소판 함유 혈장(sPRP)에 비해 A23187으로 혈소판을 활성화시킨 혈소판 함유 혈장(aPRP) 및 콜라겐으로 혈소판을 활성화시킨 혈소판 함유 혈장(cPRP)에서 혈소판 내부에 존재하는 대표적인 활성물질로 알려져 있는 형질전환성장인자(transforming growth factor beta 1, TGF- β 1), 혈소판유래성장인자(platelet-derived growth factor, PDGF) 및 총 단백질이 많이 분비되는 것으로 나타났으며, 특히 cPRP에서 가장 많은 양이 분비됨을 확인하였다.
- [0079] **<실시예 2> 방사선 조사 인간 태반 내피 세포(Human placental endothelial cells, HPEC)에서 혈소판 겔 처리에 따른 변화 분석**
- [0080] 2-1. 방사선 조사기인 세포 노화 및 세포 증식능 확인
- [0081] HPEC에서 방사선 조사기인 세포 노화 및 세포 증식은 각각 SA-b-gal(senescence-associated b-galactosidase) 염색과 CCK8 assay로 확인하였다.
- [0083] 그 결과, 도 3을 참조하면, 방사선을 조사하지 않은 상태에서는 실험한 4개의 그룹(Ctrl, 5% PL, 5% aPG 및 5% cPG) 모두에서 SA-b-gal은 몇몇 세포에서만 발현되었다. 방사선만 조사한 대조군(Ctrl) 그룹에서는 SA-b-gal이 대부분의 세포에서 발현되었으나, 방사선을 조사한 후 정상 혈장(PL) 또는 실시예 1에 따라 콜라겐으로 활성화시킨 혈소판 겔(cPG)을 처리한 그룹에서는 확연히 감소되었으며, 방사선을 조사한 후 실시예 1에 따라 A23187으로 활성화시킨 혈소판 겔(aPG)을 처리한 그룹에서는 약간 감소함을 확인하였다 (A).
- [0085] HPEC에 방사선을 조사하지 않은 그룹에 비해서 7 또는 15 Gy의 방사선을 조사한 그룹에서 시간 의존적으로 (3 또는 6일) 세포 증식이 감소됨을 확인하였다 (B).
- [0086] 3일 차에 HPEC의 세포 증식능을 확인해본 결과, 방사선을 조사하지 않았을 때 정상 그룹 대비 PL만 처리한 그룹에서는 변화가 없었으나, aPG를 처리한 그룹에서는 정상 그룹 대비 세포 증식이 현저히 감소하고, cPG를 처리한 그룹에서는 정상대비 세포 증식이 현저히 증가됨을 확인하였다. 방사선을 조사하기 전에 비하여 7Gy의 방사선을 조사했을 때 세포 증식능이 현저히 감소하였으며, 방사선을 조사한 후 aPG를 처리한 그룹에서의 세포 증식은 변화가 없었으나, cPG를 처리한 그룹에서는 정상 그룹보다 높은 증식능을 보였다 (D).
- [0087] 6일 차에 HPEC의 세포 증식능을 확인해본 결과, 방사선을 조사하지 않았을 때 정상 그룹 대비 PL 또는 cPG를 처리한 그룹에서 세포 증식능이 현저히 증가되었으며, aPG를 처리한 그룹에서는 현저히 감소됨을 확인하였다. 방사선을 조사하기 전에 비하여 7Gy의 방사선을 조사한 후 세포 증식능이 현저히 감소하였으며, 방사선을 조사한 후 aPG를 처리한 그룹에서의 세포 증식은 변화가 없었으나, PL 또는 cPG를 처리한 그룹에서는 정상 그룹보다 현저히 높은 증식능을 보였다 (E).
- [0088] 방사선을 처리하지 않은 그룹에 비해서 7Gy 방사선을 처리한 후 감소되었던 세포 증식능이 5% 그리고 10% cPG를 처리한 후 농도 의존적으로 증가됨을 확인하였다 (C).
- [0090] 2-2. 아밀라아제(amyase) 및 SOD(superoxide dismutase) 활성 변화 확인
- [0091] 혈소판 겔 처리에 따른 아밀라아제 및 SOD의 활성 변화를 관찰한 결과, 도 4와 같이, HPEC에 방사선을 조사하지 않았을 때 대비하여 7 또는 15Gy의 방사선을 조사함에 따라 아밀라아제 활성(amyase activity)이 감소되었으며, 감소된 아밀라아제 활성은 5% cPG를 처리함에 따라 현저히 증가되는 것으로 나타났다.
- [0092] 또한, 7 또는 15Gy 방사선 조사에 따라 농도 의존적으로 감소되었던 SOD 활성도 5% cPG를 처리함에 따라 현저히

증가됨을 확인하였다.

[0094] 2-3. 8-OHdG(8-hydroxydeoxyguanosine) 및 아폽토시스(apoptosis) 발현 변화 확인

[0095] 혈소판 겔 처리에 따른 8-OHdG 및 아폽토시스 발현 변화를 확인한 결과, 도 5a 및 도 5b와 같이, HPEC에 방사선을 조사하지 않았을 때 대비하여 7 또는 15Gy의 방사선을 조사함에 따라 산화 스트레스 유발 DNA 손상 마커인 8-OHdG의 발현이 증가되었으며, 5% cPG를 처리함에 따라 8-OHdG의 발현이 현저히 감소하는 것으로 나타났다 (5a).

[0096] 또한, 7 또는 15Gy의 방사선을 조사함에 따라 HPEC의 아폽토시스가 현저히 증가되었으며, 방사선을 조사한 후 5% cPG를 처리함에 따라 아폽토시스가 현저히 감소하는 것으로 나타났다 (5b).

[0098] 2-4. 유전자 발현 변화 확인

[0099] 혈소판 겔 처리에 따른 AQP5, 아밀라아제, p21 유전자의 발현 변화를 확인한 결과, 도 6과 같이, HPEC에 방사선을 처리했을 때 타액 상피 세포 마커(salivary epithelial cell marker)인 AQP5의 유전자 발현이 농도 의존적으로 감소하고, 세포 손상 마커인 p21의 유전자 발현은 농도 의존적으로 증가를 하였으나, 아밀라아제 유전자 발현에는 유의적인 차이를 보이지 않았다. 방사선을 처리한 HPEC에 5% cPG 처리를 한 뒤 AQP5의 유전자 발현은 정상수준보다 현저히 증가되었으며, p21의 발현은 정상수준으로 확연히 감소됨을 확인하였다.

[0101] **<실시예 3> 노화쥐 타액선 조직에서의 혈소판 겔 처리에 따른 변화 분석**

[0102] 3-1. 신체적 변화 및 타액선 기능 변화 확인

[0103] 노화쥐(C57BL/6)를 무작위적으로 세 그룹으로 나누어 혈소판 겔을 턱밑샘(submandibular gland)에 국소 주입한 후, 아무것도 처리하지 않은 그룹(22M), aPG를 처리한 그룹(22M-PA) 그리고 cPG를 처리한 그룹(22M-PC)을 노화되지 않은 쥐(3M)와 비교 분석한 결과, 도 7의 상단 그래프와 같이 3M 그룹에 비하여 22M, 22M-PA 및 22M-PC의 몸무게는 현저히 증가되는 양상을 보였으나, 타액선 무게에는 큰 차이를 보이지 않았다.

[0105] 타액선 기능을 평가하기 위하여 필로카르핀(pilocarpine)을 주사한 후, 처음 침이 분비되는 시간(lag time)과 일정시간 침이 분비되는 양(salivary flow rate)을 측정된 결과, 도 7의 하단 그래프와 같이 3M 그룹에 비해 증가되었던 22M 그룹의 lag time은 22M-PA와 22M-PC 그룹에서 3M과 비슷한 수준으로 회복됨을 확인하였으며, 3M 그룹에 비해 22M 그룹에서 감소되었던 salivary flow rate이 22M-PA와 22M-PC 그룹에서 증가됨을 확인하였다.

[0107] 3-2. 노화도 및 형태학적 변화 확인

[0108] 노화쥐 타액선 조직에서의 혈소판 겔 처리에 따른 노화도 및 형태학적 변화를 확인한 결과, 도 8과 같이, 3M 그룹에 비하여 22M 그룹의 타액선 조직에서는 염증 부위가 현저히 증가되어 있었으나, aPG를 처리한 22M+PA 및 cPG를 처리한 22M+PC 그룹에서는 염증 부위가 다소 감소됨을 확인하였다 (H&E).

[0109] 세포 노화 정도를 비교하기 위하여 β -gal 발현을 확인한 결과, 3M 그룹에 비해 22M 그룹에서 현저히 높은 β -gal 발현을 보인 반면, 22M+PA 및 22M+PC 그룹에서는 감소되는 양상을 보였다 (β -gal).

[0110] 또한, MT 발현을 비교 확인해본 결과, 3M 그룹에 비해서 22M 그룹에서는 높은 섬유화(fibrosis) 발현을 나타냈으나, 22M+PA에서 다소 감소되었으며, 22M+PC 그룹에서는 3M 그룹과 비슷한 정도로 감소됨을 확인하였다 (MT).

[0112] 3-3. 타액선 기능, 염증 마커 및 아폽토시스 확인

[0113] 노화쥐 타액선 조직에서의 혈소판 겔 처리에 따른 타액선 기능 단백질, 염증 마커 및 아폽토시스 발현 변화를 관찰한 결과, 도 9와 같이, 3M 그룹에 비하여 22M 그룹의 타액선 조직에서 CD4+ 호중구(neutrophil)의 발현이 현저히 증가되었으나, 22M+PA 및 22M+PC 그룹에서는 발현이 현저히 감소하였다.

- [0114] 타액선 기능 단백질인 AQP5, NKCC1의 발현을 비교한 결과, 3M 그룹의 선포세포(acinar cell)에서 정상적으로 발현이 되는 반면, 22M 그룹에서는 염증 인접부위의 선포세포에서 발현이 다소 감소되는 양상을 보였으며, 22M+PA 및 22M+PC 그룹에서는 정상적으로 발현됨을 확인하였다.
- [0115] 3M 그룹에서의 TUNEL positive cell의 발현에 비해서 22M 그룹에서의 발현이 현저히 증가되었으며, 22M+PA 및 22M+PC 그룹에서 TUNEL 발현이 현저히 감소되는 양상을 보였다.
- [0117] 3-4. 유전자적 발현 변화 확인
- [0118] 노화쥐 타액선 조직에서의 혈소판 겔 처리에 따른 다양한 유전자 발현 변화를 확인한 결과, 도 10과 같이, 3M 그룹에 비하여 22M 그룹의 타액선 조직에서 타액선 기능 유전자인 ANO1, AQP5 및 NLCC1의 mRNA 발현이 현저히 감소되었으며, 22M+PC 그룹에서 이들 유전자의 mRNA 발현이 증가되는 양상을 나타내었다.
- [0119] 3M 그룹에 비해서 22M 그룹에서 현저히 증가된 염증 관련 유전자 TNF α , IL6 및 p16의 발현은 22M+PA 및 22M+PC에서 감소됨을 확인하였다.
- [0121] **<실시예 4> 혈소판 수가 조절된 혈소판 함유 혈장 내 단백질 성분 분석**
- [0122] 4-1. 혈소판 수가 조절된 혈소판 함유 혈장 내 단백질 성분 분석
- [0123] 실시예 1에 따라 제조된 혈소판 수가 조절된 혈소판 함유 혈장 분석 샘플(1 mg of protein)은 Seppro Rat Spin Column (Sigma-Aldrich, USA)을 사용하여 동봉된 프로토콜에 따라 디플리션(depletion) 한 다음, LC-MS/MS 분석하여 단백질 성분 분석을 하였다.
- [0125] 4-2. LC-MS/MS 분석
- [0126] 상기 준비된 샘플은 0.1% 포름산에 희석하여 Q-Exactive Orbitrap hybrid mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)와 Ultimate 3000 system (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)으로 분석하였다. 펩타이드의 친수성 정도에 따라서 2 μ m C18 resin이 충전된 2cm $\times$ 75 μ m ID trap column 또는 2 μ m C18 resin이 충전된 50cm $\times$ 75 μ m ID analytical column을 각각 사용하였다.
- [0128] 4-3. 프로테옴(proteome) 데이터 분석
- [0129] Thermo Q-Exactive instrument에서 얻어진 MS/MS 데이터는 Andromeda of MaxQuant (version 1.5.8.3) MSConvert를 사용하여 mzXML로 변환하였다. mzXML 파일은 다음과 같은 파라미터를 사용하여 분석하였다;
- [0130] (a) enzyme: trypsin, (b) missed cleavage: 2, (c) fixed modification: carbamidomethyl (cysteine), (d) variable modification: oxidation (methionine), carbamyl (N-term), (e) precursor mass tolerance: up to 4.5ppm, (f) fragment mass tolerance: up to 20ppm.
- [0132] Cut-off probability score는 FDR < 0.01% 이하로 선정하였고, 확인된 펩타이드와 단백질 정보는 mass의 charge state, retention time, 및 peak area로 조정하였으며, 얻어진 정보들에서의 p-value와 fold change 값을 Perseus software (v1.5.8.5)를 이용하여 통계처리 하였다.
- [0134] 4-4. 분석 결과
- [0135] 하기 표 1 및 표 2는 실시예 4에 따라 혈장 내 단백질 성분을 분석한 결과이다.
- [0136] 하기 표 1은 stirring으로 활성화된 혈소판 함유 혈장(stirring-stimulated platelet releasate containing plasma, sPRP)에 비하여 콜라겐으로 활성화된 혈소판 함유 혈장(collagen-stimulated platelet releasate containing plasma, cPRP)에서 2배 이상 높은 발현을 보이는 단백질 리스트이다 (FDR < 0.01).

표 1

[0137]

Protein ID	Protein description	p-value	Fold change
sp P06765 PLF4_RAT	Platelet factor 4 OS=Rattus norvegicus GN=Pf4 PE=1 SV=1	0.004332	2.013

[0139]

하기 표 2는 sPRP에 비해서 A23187로 활성화된 혈소판 함유 혈장(A23187-stimulated platelet releasate containing plasma, aPRP)에서 2배 이상 높은 발현을 보이는 단백질 리스트이다.

표 2

[0140]

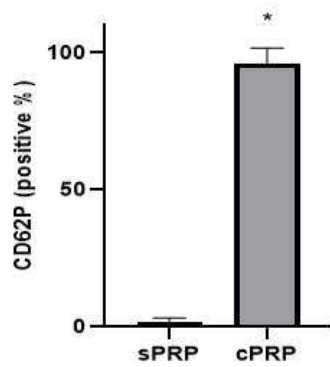
Protein description	p-value	Fold change
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A OS=Rattus norvegicus GN=Ppia PE=1 SV=2	0.000241	2.0282128
Bridging integrator 2 OS=Rattus norvegicus GN=Bin2 PE=1 SV=1	0.001407	-2.0382515
Creatine kinase B-type OS=Rattus norvegicus GN=Ckb PE=1 SV=2	0.002264	-2.0387434
Transgelin-2 OS=Rattus norvegicus GN=Tagln2 PE=2 SV=1	0.003215	-2.0397672
Alpha-actinin-1 OS=Rattus norvegicus GN=Actn1 PE=1 SV=1	0.001776	-2.0420255
14-3-3 protein zeta/delta OS=Rattus norvegicus GN=Ywhaz PE=1 SV=1	0.000272	-2.0421362
Adenylyl cyclase-associated protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Cap1 PE=1 SV=3	5.81E-05	-2.0636072
Hemoglobin subunit beta-2 OS=Rattus norvegicus PE=1 SV=2	3.66E-05	-2.0684969
Apolipoprotein C-I OS=Rattus norvegicus GN=Apoc1 PE=3 SV=1	0.012529	-2.0706274
Protein Mmrn1 OS=Rattus norvegicus GN=Mmrn1 PE=4 SV=1	0.000289	-2.0750899
Filamin alpha OS=Rattus norvegicus GN=Flna PE=2 SV=1	0.000615	-2.0805316
Nucleoside diphosphate kinase B OS=Rattus norvegicus GN=Nme2 PE=1 SV=1;	0.005986	-2.0974102
Nucleoside diphosphate kinase A OS=Rattus norvegicus GN=Nme1 PE=1 SV=1		
Protein Vtn OS=Rattus norvegicus GN=Vtn PE=2 SV=1	0.000446	-2.0987149
Tubulin alpha-4A chain OS=Rattus norvegicus GN=Tuba4a PE=2 SV=1	0.000181	-2.1126411
Fibrinogen-like 2 OS=Rattus norvegicus GN=Fgl2 PE=4 SV=1	5.21E-05	-2.1355209
WD repeat-containing protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Wdr1 PE=1 SV=3	0.000198	-2.1404986
Vinculin OS=Rattus norvegicus GN=Vcl PE=1 SV=1;	0.000152	-2.1855915
Vinculin OS=Rattus norvegicus GN=Vcl PE=1 SV=1		
Fermt3 protein OS=Rattus norvegicus GN=Fermt3 PE=2 SV=1	0.00049	-2.2124202
C-reactive protein OS=Rattus norvegicus GN=Crp PE=1 SV=1	0.00073	-2.2511876
Protein Tln1 OS=Rattus norvegicus GN=Tln1 PE=4 SV=1	0.000372	-2.2725207

[0142]

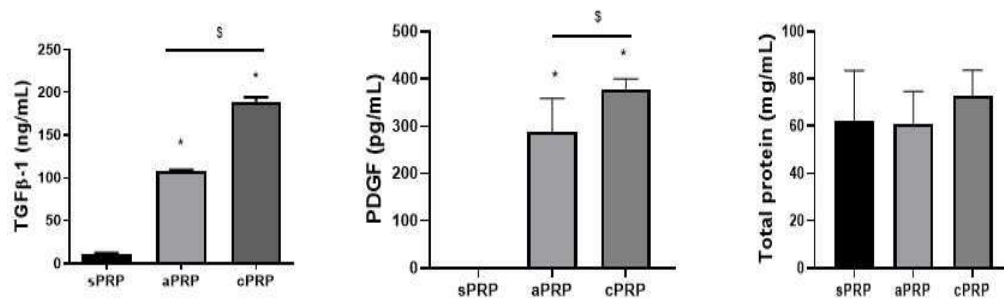
이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 즉, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다.

도면

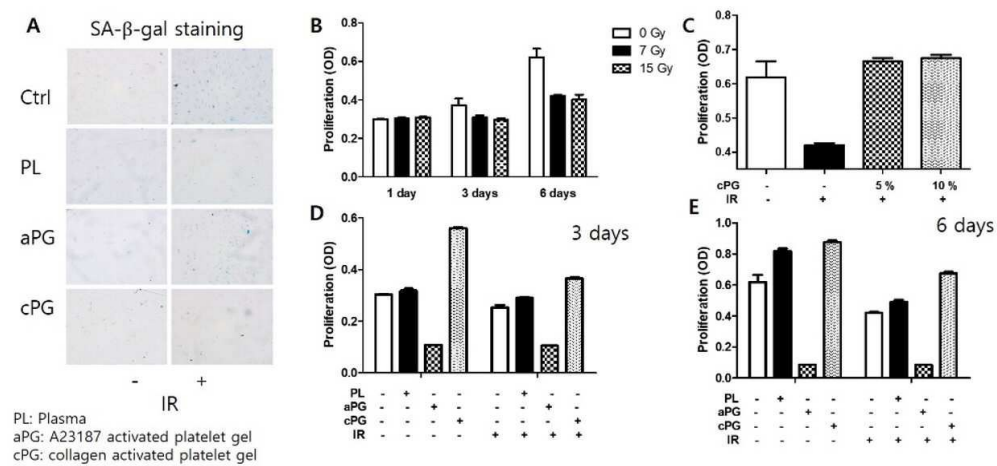
도면1



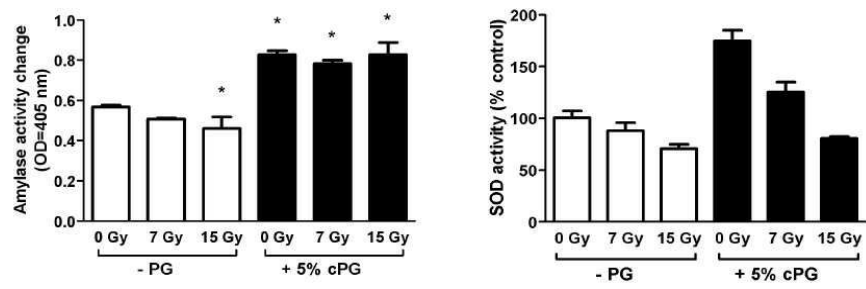
도면2



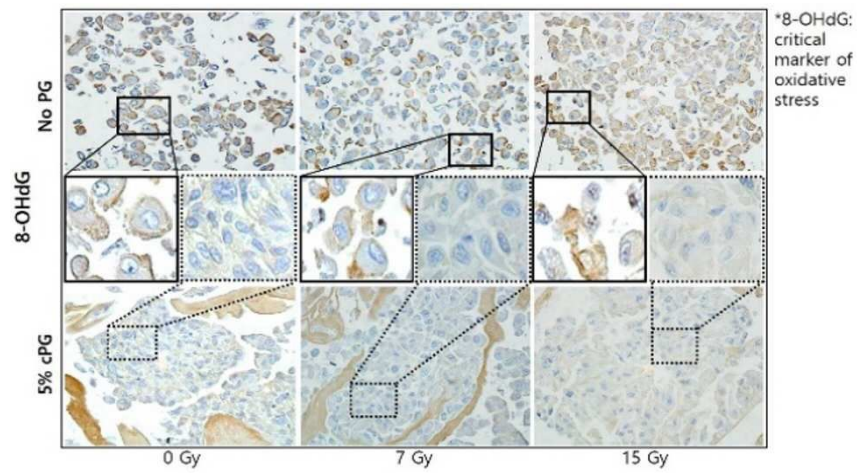
도면3



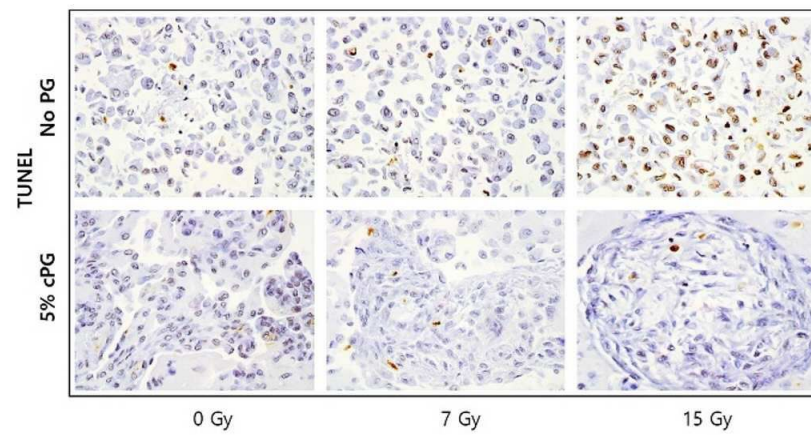
도면4



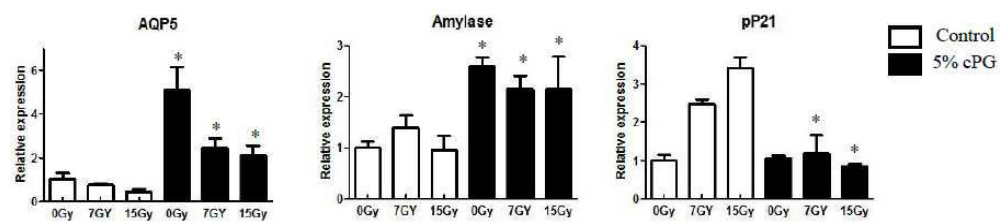
도면5a



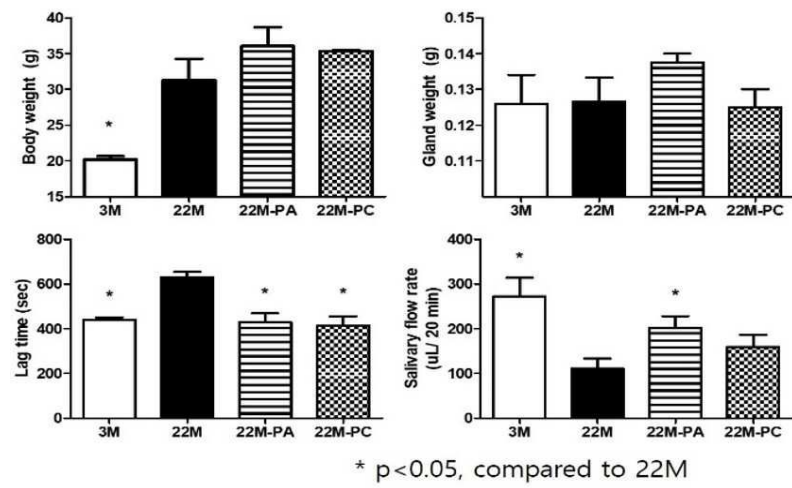
도면5b



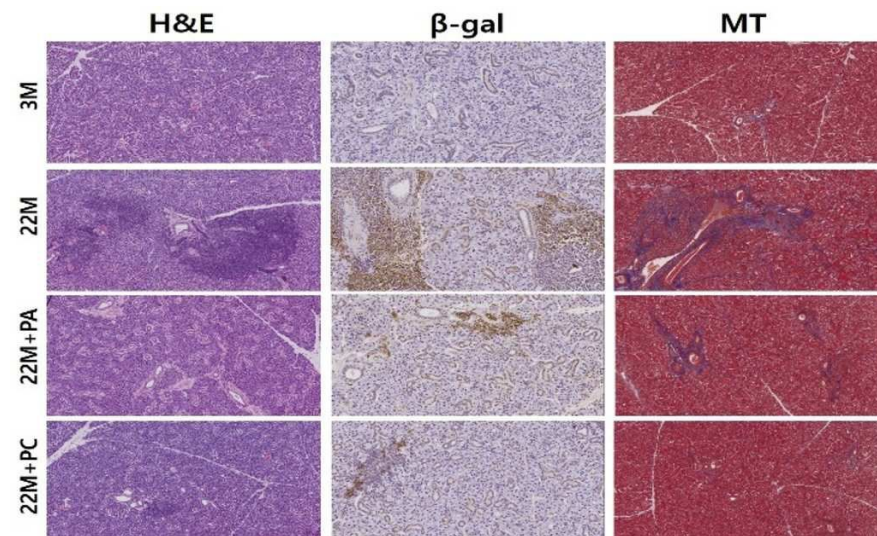
도면6



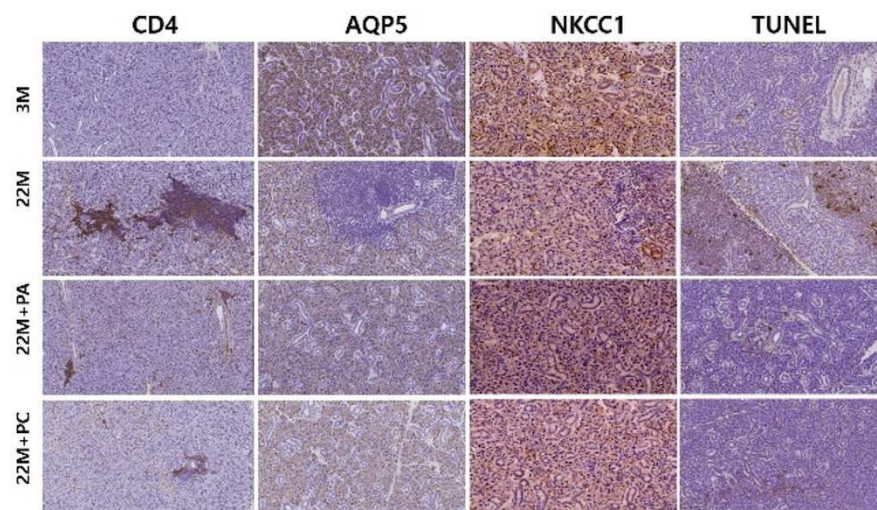
도면7



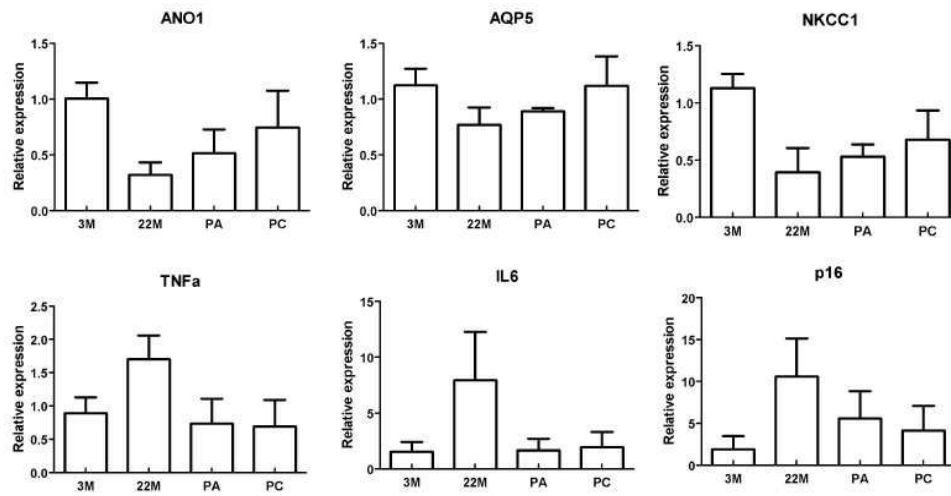
도면8



도면9



도면10



NKCC1: Na-K-Cl cotransporter
 TMEM16A (ANO1): voltage sensitive calcium-activated chloride channel
 AQP5: water channel protein
 p16: cellular senescence induced inflammation