(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0106957
(43) 공개일자 2025년07월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/50 (2006.01) *A23L 33/10* (2022.01)
A61K 31/216 (2006.01) *A61K 9/00* (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01) *A61P 29/00* (2023.01)
(52) CPC특허분류
A61K 9/5063 (2013.01)
A23L 33/10 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2024-0001596
(22) 출원일자 2024년01월04일
심사청구일자 2024년01월04일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
박진봉
서울특별시 도봉구 덕릉로 349, 406동 201호(창동, 주공4단지아파트)
한요한
전라북도 군산시 계산로 71, 쌍용예가 108-1604
김효인
1335 보일스톤 스트리트, 712호, 보스톤, 메사추세츠, 미국
(74) 대리인
최승욱, 성익재

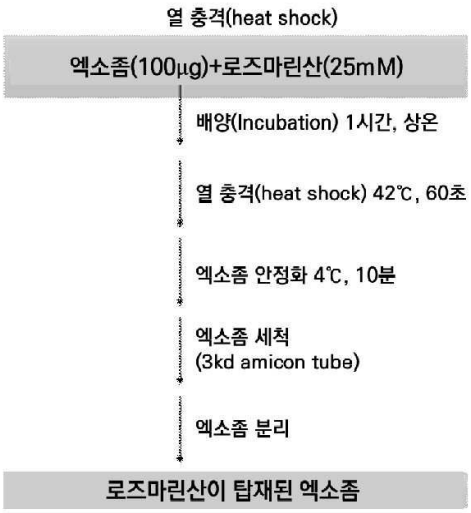
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **호흡기 염증성 질환의 치료용 조성물 및 이의 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 로즈마린산을 탑재한 엑소좀을 포함하는 호흡기 염증성 질환의 치료용 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명의 실시예에 따르면, 로즈마린산이 효율적으로 탑재된 엑소좀을 포함하는, 효과가 우수한 호흡기 염증성 질환의 치료용 조성물을 제조할 수 있고, 이를 폐 조직에 표적하여 전달할 수 있다.

대 표 도 - 도1a



(52) CPC특허분류
A61K 31/216 (2013.01)
A61K 9/0078 (2013.01)
A61K 9/5089 (2013.01)
A61P 11/00 (2018.01)
A61P 29/00 (2023.02)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/314 (2013.01)
A23V 2250/02 (2013.01)
A23V 2250/204 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1465040537
과제번호 HF23C0120000023
부처명 보건복지부
과제관리(전문)기관명 한국보건산업진흥원
연구사업명 (혁신법)한의약혁신기술개발사업(2023)
연구과제명 [보산원 1/3]분무 한약 엑소좀을 활용한 염증성 폐질환 치료제 개발
과제수행기관명 경희대학교 산학협력단
연구기간 2023.04.01 ~ 2025.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711194375
과제번호 00213024
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 세종과학펠로우십
연구과제명 [세종,1단계,1/3]치료용 단백질 club cell secretory protein 16 (CC16)을 탑재한 분무형 엑소좀의 급성 폐 손상 치료 효능 및 치료 기전 구명
과제수행기관명 경희대학교산학협력단
연구기간 2023.03.01 ~ 2028.02.29

명 세 서

청구범위

청구항 1

로즈마린산(Rosmarinic acid)을 탑재한 엑소좀을 포함하는 호흡기 염증성 질환의 치료용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 엑소좀은 혈청으로부터 유래된 것을 특징으로 하는 호흡기 염증성 질환의 치료용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 로즈마린산의 탑재 효율은 14.41 ± 0.68 %인 것을 특징으로 하는 호흡기 염증성 질환의 치료용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 호흡기 염증성 질환은 감기, 인플루엔자, 인두염, 급성 폐 손상, 세균성 폐렴, 폐색전증, 결핵, 급성 천식, 폐암 및 중증 급성 호흡기 증후군(SARS)을 포함하는 것을 특징으로 하는 호흡기 염증성 질환의 치료용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 조성물은 기도 내 투여 및 분무 투여 중 적어도 어느 하나를 통해 투여되는 것을 특징으로 하는 호흡기 염증성 질환의 치료용 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 조성물은 약학 조성물 또는 식품 조성물인 것을 특징으로 하는 호흡기 염증성 질환의 치료용 조성물.

청구항 7

엑소좀을 포함하는 엑소좀 용액을 준비하는 단계;

상기 엑소좀 용액과 로즈마린산 용액을 혼합 후 배양하여 배양액을 생성하는 단계;

상기 배양액에 열 충격(heat shock)을 가하여 로즈마린산이 탑재된 엑소좀을 생성하는 단계; 및

상기 로즈마린산이 탑재된 엑소좀을 안정화시키는 단계

를 포함하는 호흡기 염증성 질환의 치료용 조성물의 제조방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 엑소좀 용액을 준비하는 단계에서 상기 엑소좀은 혈청으로부터 분리하는 것을 특징으로 하는 호흡기 염증성 질환의 치료용 조성물의 제조방법.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 로즈마린 용액 및 상기 엑소좀 용액을 1:1 내지 10:1의 부피비로 혼합하는 것을 특징으로 하는 호흡기 염증성 질환의 치료용 조성물의 제조방법.

청구항 10

제7항에 있어서,

상기 열 충격은 42 ℃에서 가하는 것을 특징으로 하는 호흡기 염증성 질환의 치료용 조성물의 제조방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 호흡기 염증성 질환의 치료용 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 로즈마린산을 탑재한 엑소좀을 포함하는 호흡기 염증성 질환의 치료용 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 호흡기의 염증성 질환은 호흡 기관 및 조직에 염증성 반응이 발생하여 가스 교환을 어렵게 만드는 병리학적 상태로, 감기, 인플루엔자, 인두염과 같은 경증 질환부터 세균성 폐렴, 폐색전증, 결핵, 급성 천식, 폐암 및 중증 급성 호흡기 증후군(SARS)과 같은 생명을 위협하는 질환에 이르기까지 다양하게 존재한다.

[0004] 특히 호흡기의 염증성 질환 중 급성 폐 손상(ALI/ARDS, Acute Lung Injury/Acute Respiratory Distress Syndrome)은 심각한 호흡 문제를 일으키는 질환으로 폐포의 염증, 출혈, 외상 등의 다양한 증상을 나타내며, 폐의 기능이 급격하게 손상되어 산소 공급이 충분히 이루어지지 않아 호흡 곤란, 산소 공급 부족, 기침, 가슴 통증 등의 증상이 나타날 수 있다. 심각한 경우 생명을 위협할 수 있기 때문에 조기 치료와 관리가 환자의 생존 및 회복에 매우 중요하다. 또한, 급성 폐 손상은 바이러스 또는 박테리아로 인한 폐렴, 독성 물질에 대한 노출, 폐색전증 등의 다양한 원인으로 발생할 수 있다. 따라서 각각의 원인에 따라 적절한 치료 및 관리 접근법이 필요하며, 산소 치료 및 항염증 약물 등이 사용될 수 있다.

[0005] 급성 폐 손상 환자에게는 산소 공급이 중요하기 때문에 고농도의 산소를 제공하거나, 양압 호흡기를 사용하여 산소 치료를 시행한다. 심한 호흡 곤란을 겪는 경우, 기계 호흡기를 사용하여 호흡 보조를 제공하기도 한다. 하지만, COVID-19 대유행과 환자가 동시에 치료가 필요하게 되면 산소 공급 장비가 부족한 상황이 발생할 수 있으며 실제로 COVID-19 기간 동안 산소 공급 장비의 부족 현상이 발생하였다. 뿐만 아니라 입원 치료 및 의료 비용은 상당히 높기 때문에 초기의 치료 실패는 환자의 입원 기간을 증가시키며 중환자실 관리와 고급 의료 장비 사용으로 인한 과도한 병원비 부담을 증가시킨다. 따라서, 초기 적절한 치료를 통해 급성 폐 손상 심화와 치료로 인한 의료비 부담을 감소시키는 것은 매우 중요하게 여겨진다.

[0006] 현재 약물 치료로써 스테로이드 등이 초기 염증 반응을 억제하기 위해 사용된다. 약물치료는 항염증 작용 보이는 코르티코스테로이드, 항진균제, 이부프로펜, 항염증성 사이토카인제 및 응고 장애에 대한 조절제인 활성화된 단백질 C (activated protein C) 등 다양한 약제가 시도되고 있다. 하지만 이들 약제들은 임상에서 효과가 충분히 입증되지 않았다는 한계가 있다.

[0007] 폐 손상의 초기에 폐의 대식세포에서 분비하는 각종 사이토카인 (IL-1, IL-6, TNF-alpha 등)에 의해 폭발적인 염증 반응이 시작되고, 폐 조직으로 호중구의 침윤이 증가한다. 또한, 호중구에서 분비하는 단백 분해 효소에 의해 조직 손상이 심해지고, 폐포 주변의 소혈관 내에서 응고 반응(microvascular coagulation)이 일어나 소혈관 내 혈전이 형성되어 폐동맥압 상승과 우심 부전을 초래한다. 이번 COVID-19로 인한 급성 폐 손상에서 과잉 염증 반응으로 면역 물질인 사이토카인이 과다하게 분비돼 사이토카인 스톰(cytokine storm)을 초래하였고, 약물은 이 현상을 효과적으로 억제하지 못해 결과적으로 많은 사람들이 사망하였다.

[0008] 또한, 폐 손상이 진행되면 섬유아세포(fibroblast)의 증식으로 인해 폐의 섬유화가 진행될 수도 있다. 특히 세계적인 권위지인 Cell에 보고된 내용에 따르면 COVID-19 감염 후 회복된 사람의 폐에는 폐 섬유화가 될 수 있는 유전자가 매우 증가해 있다고 보고했으며, 이는 COVID-19 대공황을 극복할지라도 몇 년 뒤에는 다시 COVID-19 후유증인 폐 섬유화로 고통받는 경우가 매우 증가할 수 있음을 보여준다. 이와 같이 급성 폐 손상의 진행 시기에 따라 다양한 병리 현상이 일어나고 이들 각각을 목표로 한 약물 치료가 시도되었지만 현재까지도 특별한 치료제가 없는 실정이다.

[0009] 따라서 많은 연구와 중환자 치료의 발전에도 불구하고, 급성 폐 손상의 치료는 여전히 인공호흡기와 보존적 치료에 국한된 실정이다. 이와 같이 현재까지 개발 중이거나 시판되고 있는 약물은 아직 효과 검증이 끝나지 않았고 이번 COVID-19 기간동안 대부분 효과적이지 않았다. 따라서 새로운 유형의 급성 폐 손상 치료제 개발이 절실한 상황이다.

[0010] 로즈마린산(Rosmarinic acid)은 주로 로즈매리, 멘톨, 레몬밤, 페퍼민트, 백합 같은 허브 및 식물에서 발견되는 페놀화합물 중 하나로 다양한 생리활성이 보고되어 있다. 특히 항산화 특성, 항염증 작용, 면역 강화, 항균 효과, 항알러지, 혈압 조절 등의 효과를 보다. 또한 식품에도 풍부하게 함유되어 있어 그 활용 가능성이 높은데, 로즈마린산은 허브 차, 에센셜 오일, 건강 보조제 등 다양한 형태로 소비될 수 있다. 현재 로즈마린산은 그람 음성균의 세포막 성분에서 분리한 지질다당류(lipopolysaccharide; LPS)로 유도된 폐 손상에 대해서만 효과가 보고되었다. 하지만 LPS는 살아있어 증식이 가능한 박테리아가 아니며, 그 기원이 E.Coli(대장균)로 실제 임상과 비슷한 폐렴균으로 유도한 폐 손상이라고 보기 어렵다. 따라서 본 발명에서는 LPS뿐만 아니라 실제 폐렴균을 활용하여 로즈마린산의 효과를 확인하고자 한다. Klebsiella pneumoniae(폐렴막대균 또는 폐렴간균)은 그람 음성 박테리아로, 입, 피부, 장의 정상세균총에서 흔히 발견되며, 기도를 통해 인간과 동물의 폐, 특히 폐포에 파괴적인 변화를 일으키는 박테리아이다. 임상에서 최근 몇 년 동안 병원 감염에 있어 매우 중요한 병원체로 지목되고 있기도 하다. 따라서 Klebsiella pneumoniae로 유발한 폐렴을 활용하여 실험하는 것은 임상에서의 적용 가능성을 예측하는데 매우 중요하다. 따라서 로즈마린산의 폐렴균에 대한 폐 손상 보호 효과가 보고되지 않았을 뿐만 아니라, 엑소좀에 의한 약물 효과 개선에 대한 연구 보고는 전무하기 때문에 본 발명의 필요성이 충분한 상황이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0012] (특허문헌 0001) 한국 공개특허공보 제10-2021-0124088호, "로즈마린산 유도체, 로즈마린산-유래 입자 및 이를 포함하는 염증성 질환 치료용 조성물"

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명의 일 목적은 호흡기의 염증성 질환에 대해 유의성 있는 항염증 및 폐 손상 개선 효과를 나타내는 조성물을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 다른 목적은 호흡기 염증성 질환을 개선시키는 조성물을 표적 기관에 효과적으로 투여하는 방법을 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 또 다른 목적은 호흡기 염증성 질환을 개선시키는 조성물인 로즈마린산을 탑재한 엑소좀에 있어서, 탑재 효율을 향상시키는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0017] 본 발명의 호흡기 염증성 질환의 치료용 조성물은 로즈마린산(Rosmarinic acid)을 탑재한 엑소좀을 포함한다.

[0018] 일 실시형태에 따라서는, 상기 엑소좀은 혈청으로부터 유래될 수 있다.

[0019] 일 실시형태에 따라서는, 상기 로즈마린산의 탑재 효율은 14.41 ± 0.68 %일 수 있다.

[0020] 일 실시형태에 따라서는, 상기 호흡기 염증성 질환은 감기, 인플루엔자, 인두염, 급성 폐 손상, 세균성 폐렴, 폐색전증, 결핵, 급성 천식, 폐암 및 중증 급성 호흡기 증후군(SARS)을 포함할 수 있다.

[0021] 일 실시형태에 따라서는, 상기 조성물은 기도 내 투여 및 분무 투여 중 적어도 어느 하나를 통해 투여될 수 있다.

[0022] 일 실시형태에 따라서는, 상기 조성물은 약학 조성물 또는 식품 조성물일 수 있다.

[0023] 본 발명의 호흡기 염증성 질환의 치료용 조성물의 제조방법은 엑소좀을 포함하는 엑소좀 용액을 준비하는 단계, 상기 엑소좀 용액과 로즈마린산 용액을 혼합 후 배양하여 배양액을 생성하는 단계, 상기 배양액에 열 충격(heat shock)을 가하여 로즈마린산이 탑재된 엑소좀을 생성하는 단계 및 상기 로즈마린산이 탑재된 엑소좀을 안정화시키는 단계를 포함한다.

[0024] 일 실시형태에 따라서는, 상기 엑소좀 용액을 준비하는 단계에서 상기 엑소좀은 혈청으로부터 분리할 수 있다.

[0025] 일 실시형태에 따라서는, 상기 로즈마린 용액 및 상기 엑소좀 용액을 1:1 내지 10:1의 부피비로 혼합할 수 있다.

[0026] 일 실시형태에 따라서는, 상기 열 충격은 42 ℃에서 가할 수 있다.

발명의 효과

[0028] 본 발명의 실시예에 따르면, 로즈마린산 탑재 엑소좀을 포함하는 조성물은 호흡기의 염증성 질환에 대하여 항염증 및 폐 손상 개선 효과를 나타낼 수 있다.

[0029] 본 발명의 실시예에 따르면, 호흡기 염증성 질환을 개선시키는 조성물을 분무 투여하여 원하는 표적 기관에 효과적으로 투여할 수 있다.

[0030] 본 발명의 실시예에 따르면, 호흡기 염증성 질환을 개선시키는 조성물에 있어서, 엑소좀에 대한 로즈마린산의 탑재 효율을 향상시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0032] 도 1a는 로즈마린산 탑재 엑소좀의 제작 과정을 나타낸 순서도이다.

도 1b는 분리된 엑소좀을 전자현미경을 통해 확인한 결과이다.

도 1c 내지 도 1f는 엑소좀의 크기를 나노 입자 추적 분석기(NTA)를 통해 측정한 결과이다.

도 2a 내지 도 2c는 로즈마린산의 엑소좀 탑재량과 관련된 그래프이다.

도 3a 내지 도 3c는 EXO^{RA}를 통한 로즈마린산의 폐손상 보호 효과를 분석한 결과이다.

도 4a 내지 도 4c는 EXO^{RA}의 폐 손상으로 유도된 염증세포 증가 억제 효과를 분석한 결과이다.

도 5a 내지 도 5d는 EXO^{RA}의 폐 손상으로 유도된 염증성 인자 억제 효과를 분석한 결과이다.

도 6a 내지 도 6f는 박테리아로 유도한 폐 손상에 있어서 EXO^{RA}의 개선 효과를 분석한 결과이다.

도 7a 내지 도 7e는 네뷸라이저를 통한 EXO^{RA}의 폐 손상 보호 효과를 분석한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0033] 이하 첨부 도면들 및 첨부 도면들에 기재된 내용들을 참조하여 본 발명의 실시예를 상세하게 설명하지만, 본 발명이 실시예에 의해 제한되거나 한정되는 것은 아니다.

[0034] 본 명세서에서 사용된 용어는 실시예들을 설명하기 위한 것이며 본 발명을 제한하고자 하는 것은 아니다. 본 명세서에서, 단수형은 문구에서 특별히 언급하지 않는 한 복수형도 포함한다. 명세서에서 사용되는 "포함한다(comprises)" 및/또는 "포함하는(comprising)"은 언급된 구성요소, 단계, 동작 및/또는 소자는 하나 이상의 다른 구성요소, 단계, 동작 및/또는 소자의 존재 또는 추가를 배제하지 않는다.

[0035] 본 명세서에서 사용되는 "실시예", "예", "측면", "예시" 등은 기술된 임의의 양상(aspect) 또는 설계가 다른 양상 또는 설계들보다 양호하다거나, 이점이 있는 것으로 해석되어야 하는 것은 아니다.

[0036] 또한, '또는' 이라는 용어는 배타적 논리합 'exclusive or'이기보다는 포함적인 논리합 'inclusive or'를 의미한다. 즉, 달리 언급되지 않는 한 또는 문맥으로부터 명확하지 않는 한, 'x가 a 또는 b를 이용한다'라는 표현은 포함적인 자연 순열들(natural inclusive permutations) 중 어느 하나를 의미한다.

[0037] 또한, 본 명세서 및 청구항들에서 사용되는 단수 표현("a" 또는 "an")은, 달리 언급하지 않는 한 또는 단수 형태에 관한 것이라고 문맥으로부터 명확하지 않는 한, 일반적으로 "하나 이상"을 의미하는 것으로 해석되어야 한다.

[0039] 본 발명에 따른 호흡기 염증성 질환의 치료용 조성물은 로즈마린산(Rosmarinic acid)을 탑재한 엑소좀을 포함한다. 로즈마린산은 허브와 같은 식물에서 추출할 수 있는 페놀 화합물로, 항염증 작용을 나타내는 것으로 알려져 있다. 본 발명에서는 로즈마린산의 항염증 효과를 극대화시키기 위하여 로즈마린산이 탑재(로딩, loading)된 엑소좀을 제공하고자 한다. 본 명세서에서 로즈마린산이 탑재된 엑소좀은 로즈마린산이 엑소좀의 내부에 위치한 코어-쉘 형태의 로즈마린산-엑소좀 복합체를 의미한다.

[0041] 일 실시형태에 따라서는, 엑소좀은 혈청으로부터 유래될 수 있다. 250 μL의 혈청으로부터 약 1×10^8 개의 엑소좀을 분리할 수 있다고 보고되있으며, 약 2×10^8 ~ 20×10^8 개의 엑소좀은 인간 피험자들에게 분무 투여를 통해 전달 시 특별한 부작용을 유발한다는 보고가 없다. 따라서 호흡기 염증성 질환의 치료용 조성물을 인간에게 투여하기 위해 제조 시, 1 ~ 10 mL의 소량의 혈액으로도 충분하기 때문에 비교적 간단히 구할 수 있는 혈청에서 엑소좀을 분리할 수 있다.

[0043] 일 실시형태에 따라서는, 로즈마린산의 탑재 효율은 14.41 ± 0.68 %일 수 있다. 이때 로즈마린산의 탑재 효율은 엑소좀의 내부에 로즈마린산이 얼마나 잘 위치하여 복합체를 형성할 수 있는지를 의미하며, 하기와 같은 식으로 계산할 수 있다.

[0044] 로즈마린산의 탑재 효율 = (엑소좀 탑재를 위해 사용된 로즈마린산의 mol 수)/(실제 엑소좀에 탑재된 로즈마린산의 mol 수) X 100%

[0046] 일 실시형태에 따라서는, 호흡기 염증성 질환은 감기, 인플루엔자, 인두염, 급성 폐 손상, 세균성 폐렴, 폐색전증, 결핵, 급성 천식, 폐암 및 중증 급성 호흡기 증후군(SARS)을 포함할 수 있다. 이중 급성 폐 손상(Acute Lung Injury/Acute Respiratory Distress Syndrome; ALI/ARDS)은 초기에 폐 조직의 대식세포에서 분비하는 각종 면역물질인 사이토카인에 의해 폭발적인 염증 반응이 일어나고, 폐 조직으로 호중구의 침윤이 증가하는데,

호중구에서 분비하는 단백 분해 효소에 의해 폐 조직에 손상이 심하게 발생한다. 급성 폐 손상으로 인한 과잉 염증 반응은 사이토카인의 과다 분비를 유도하는데, 현재 스테로이드나 기타 항염증 약제를 초기 염증 반응을 억제하기 위한 치료제로 사용하고 있으나 사이토카인 폭풍을 막기에는 역부족이다. 로즈마린산을 탑재한 엑소좀은 대식세포, 호중구 등의 면역세포를 감소시키고, 사이토카인(IL-1β, IL-6, TNF-α), 케모카인(CXCL-1) 등의 염증성 인자를 억제하여 급성 폐 손상을 개선시킬 수 있다.

[0047] LPS로 유도된 급성 폐 손상 모델은 실험적으로 편리하고 빠른 염증반응의 유도가 가능하지만 실제 박테리아로 유도된 환자의 급성 폐 손상 현상과는 폐의 경직도, 탄성도 변화 등이 매우 다르다. 이는 인간의 급성 폐 손상에에 비해 LPS로 유도된 동물 모델의 한계점이다. 따라서, 인간에 대한 적용 가능성을 더욱 정확하게 예측하기 위해 LPS 뿐만 아니라 실제 폐렴균을 사용한 급성 폐 손상 실험은 매우 중요하다. 이에 본 발명에서는 급성 폐 손상 균 중 하나인 폐렴간균(Klebsiella Pneumoniae, 이하 K.P로 지칭)을 사용하여 유도한 급성 폐 손상에서 로즈마린산이 탑재된 엑소좀의 폐 손상 개선 효과를 확인하고자 한다.

[0048] 본 명세서에서, "개선"은 본 발명의 조성물을 이용하여 상기 열거한 질환들의 증상이 호전되도록 하거나 이롭게 되도록 하는 모든 행위를 의미한다.

[0049] 또한, 본 명세서에서, "치료"는 본 발명의 조성물을 이용하여 상기 열거된 질환들의 증상이 호전 또는 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[0051] 일 실시형태에 따라서는, 조성물은 기도 내 투여 및 분무 투여 중 적어도 어느 하나를 통해 투여될 수 있다. 기도 내 투여(intratracheal instillation)의 경우 조성물은 기도 삽관을 통해 연결된 튜브로 기도를 통해 폐에 직접 투여될 수 있다.

[0052] 분무 투여의 경우 투여된 조성물은 투여 대상의 폐를 표적으로 하여 분포될 수 있다. 분무 투여는 바람직하게는 네뷸라이저(Nebulizer)를 통해 수행될 수 있다. 네뷸라이저는 투여 물질을 분무 형태로 분사하여 폐로 직접적으로 전달할 수 있는 의료기계이다. 폐의 가장 깊숙한 부분인 폐포로의 약물 전달은 매우 어렵다. 실제로 1 μm 이하의 입자만이 폐포에 도달할 수 있다. 엑소좀은 평균 직경 200 nm 이하 크기의 소포체로써 크기를 고려할 때 폐의 가장 깊숙한 곳까지 도달할 수 있다. 따라서 액체에 현탁된 엑소좀은 네뷸라이저를 통해 폐의 가장 깊은 곳까지 고루 분포할 수 있다. 뿐만 아니라, 분무 투여 시에는 피하 주사, 경구 투여, 정맥 주사 등으로 약물을 투여하는 방법에 비하여 폐에 직접적으로 약물을 전달함으로써 폐 조직 전체에 고르게 조성물을 분포시킬 수 있다. 또한 네뷸라이저를 통해 투여된 조성물은 호흡기를 통해 이동하기 때문에 폐를 제외한 다른 기관에는 전달되지 않으므로 조성물의 전달량을 최대화하여 조성물의 효능을 극대화시킬 수 있다.

[0053] 또한, 기도 내 투여 방식(기도 삽관)과 분무 투여 방식(네뷸라이저)을 결합하는 경우, 의식이 없는 응급 환자의 경우에도 호흡 보조를 위해 기도 삽관된 튜브 장치에 네뷸라이저와 같은 분무 투여 장치를 결합한 형태로도 활용할 수 있다.

[0055] 일 실시형태에 따라서는, 조성물은 약학 조성물 또는 식품 조성물의 형태로 제공될 수 있다. 약학 조성물의 제형은 캡슐, 정제, 과립, 주사제, 연고제, 분말 또는 음료 형태일 수 있으며, 약학 조성물은 인간을 투여 대상으로 할 수 있다. 식품 조성물은 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 분말, 과립, 정제, 캡슐, 과자, 떡, 빵 등의 각종 식품류 형태로 제조될 수 있다. 로즈마린산을 포함하는 식품 조성물은 식물 추출물로 구성된 것이므로 독성 및 부작용이 거의 없다고 볼 수 있다.

[0057] 본 발명에 따른 호흡기 염증성 질환의 치료용 조성물의 제조방법은 엑소좀을 포함하는 엑소좀 용액을 준비하는 단계, 엑소좀 용액과 로즈마린산 용액을 혼합 후 배양(incubation)하여 배양액을 생성하는 단계, 배양액에 열충격(heat shock)을 가하여 로즈마린산이 탑재된 엑소좀을 생성하는 단계 및 로즈마린산이 탑재된 엑소좀을 안정화시키는 단계를 포함한다. 이후 안정화된 로즈마린산이 탑재된 엑소좀을 세척 및 분리하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0058] 생체 내로 약학 조성물 또는 식품 조성물을 전달 시에는 불순물 및 보존제와 같은 화합물을 최소화하는 것이 매우 중요하다. 따라서, 엑소좀에 약물을 탑재하는 방법 중 불순물의 개입을 최소화할 수 있는 방법으로 로즈마린산과 엑소좀을 단일 용기에 투입하여 배양(incubation)하는 방법을 선택하였고, 배양 공정에 열 충격(heat

shock) 공정을 결합하여 로즈마린산의 엑소좀 내 탑재 효율을 극대화하였다.

[0060] 열 충격(heat shock) 방식은 로즈마린산 탑재 시 엑소좀을 포함하는 조성물 전체에 온도를 고르게 전달하여 온도를 유지할 수 있는 매우 간단한 방법으로, 동일한 조건을 반복하는 재현성이 높다는 장점이 있다. 반면 초음파(sonication)를 통한 로즈마린산 탑재 방식은 초음파 처리 중에 조절되지 않는 국소적 열이 발생한다는 문제점이 있다. 로즈마린산은 이와 같은 국소적 열로 인해 응집 현상이 일어나 크기가 커지거나 구조적 안정성을 잃을 수 있다. 응집되거나 구조적 변형이 일어난 로즈마린산은 엑소좀 내부로 잘 투입되지 못할 뿐 아니라 기존의 약리적 효과 또한 상실할 가능성이 매우 크다. 또한, 초음파로 인한 로즈마린산의 응집은 실제 로즈마린산 탑재량의 측정을 방해한다. 응집 현상으로 인해 엑소좀에 탑재되지 않고 엑소좀 겉면에 응집된 양 또한 탑재된 양으로 계산되기 때문에 실제 로즈마린산의 탑재량보다도 훨씬 높게 측정되는 측정 오류가 발생하기도 한다. 이와 비슷한 현상으로 $CaCl_2$를 활용한 형질주입(transfection) 방식 역시 로즈마린산의 응집으로 인해 탑재량의 왜곡이 발생한다. 따라서, 본 발명에서는 외부 용매를 최소화하고 로즈마린산 탑재 조건을 균등하게 조절할 수 있는 배양(incubation) 방식에 열 충격(heat shock) 방식을 결합한 방법을 사용한다.

[0062] 일 실시형태에 따라서는, 엑소좀 용액을 준비하는 단계에서 엑소좀은 혈청으로부터 분리할 수 있다. 혈청에서 분리한 엑소좀은 인체 내에서 특별한 부작용이 보고되지 않았고, 엑소좀은 혈액에 다량 존재하기 때문에 적은 양의 혈액만을 이용하는 것이 가능하다. 또한, 혈청으로부터 분리한 엑소좀은 자가혈액유래 엑소좀일 수 있다. 보다 상세하게는, 마우스에서 분리한 혈청 유래 엑소좀을 같은 종의 마우스에 투여함으로써, 추후 인간에 적용 시 자가혈액유래 엑소좀을 통한 치료제 개발 가능성을 유추해볼 수 있다. 실제 임상 실험에서도 자가 혈청유래 엑소좀의 네뷸라이저를 통한 폐로의 투여는 특별한 부작용을 유도하지 않는다고 알려져 있다.

[0064] 일 실시형태에 따라서는, 로즈마린산 용액 및 엑소좀 용액은 1:1 내지 10:1의 부피비로 혼합할 수 있다. 바람직하게는 로즈마린산 용액 및 엑소좀 용액의 부피비는 1:1일 수 있다. 로즈마린산이 상기 비율을 초과하여 혼합되면 두 용매의 극성 차로 인해 로즈마린산 용액으로부터 로즈마린산이 석출되어 엑소좀에 탑재가 불가능할 수 있다. 로즈마린산이 상기 비율 미만으로 혼합되면 호흡기 염증성 질환에 대한 치료 효율이 감소할 수 있다.

[0065] 로즈마린산 용액은 로즈마린산을 DMSO(Dimethyl Sulfoxide)와 같은 용매에 용해시켜 제조할 수 있다. 이때 로즈마린산 용액의 농도는 25 mM일 수 있다. 또한, 엑소좀 용액은 PBS(phosphate-buffered saline)와 같은 용매에 현탁하여 제조할 수 있다. 이때 엑소좀 용액은 용매 100 μL에 엑소좀 100 μg을 현탁할 수 있다.

[0067] 도 1a는 로즈마린산 탑재 엑소좀의 제작 과정을 나타낸 순서도이다. 엑소좀 에 유효성분을 로딩하는 가장 기본적인 방법은 배양(incubation)하는 것이다. 하지만 이 방법은 유효성분의 탑재 효율이 높지 않다는 단점이 있다. 따라서 박테리아에 유전자를 도입하는 방식을 응용하여 열 충격(Heat shock) 방식을 로즈마린산 탑재 과정에 접목하였다.

[0068] 일 실시형태에 따라서는, 엑소좀 용액과 로즈마린산 용액은 25 ℃에서 최소 1 시간에서 최대 24 시간 동안 배양할 수 있다. 상기 시간 범위에서 엑소좀과 로즈마린산은 충분히 혼합되어 추후 열충격 과정에서 로즈마린산 탑재 함량을 극대화시킬 수 있다.

[0069] 일 실시형태에 따라서는, 배양액에 열 충격을 42 ℃에서 60초 동안 가할 수 있다. 열 충격 온도가 42 ℃ 미만이면 엑소좀 막의 투과성이 증가하지 않아 로즈마린산이 탑재되지 않을 수 있다. 열 충격 온도가 42 ℃를 초과하면 과도한 열 에너지로 인해 엑소좀이 파괴되거나 로즈마린산이 응집되거나 구조가 불안정해져 약리활성을 상실할 수 있다.

[0070] 일 실시형태에 따라서는, 엑소좀 안정화는 4 ℃ 에서 최소 10 분에서 최대 1 시간 동안 방치하여 달성할 수 있다. 너무 오랜 시간 방치하면 로즈마린산이 다시 엑소좀 밖으로 방출될 수 있다.

[0072] 본 명세서에서는 로즈마린산(Rosmarinic acid) 탑재 엑소좀을 EXO^{RA}로 명명하였다.

[0074] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0076] **[실시예 1]**

[0077] 1. 로즈마린산 준비

[0078] 순도가 높은 로즈마린산을 Sigma-aldrich에서 분말 상태(SC-202796A)로 구입하였다. 분말 상태의 로즈마린산을 DMSO에 필요한 농도로 용해시킨 뒤 사용하였다.

[0080] 2. 엑소좀 분리

[0081] 고순도의 엑소좀을 분리하기 위해 침전법을 사용하였으며, 상세하게는 ThermoFisher사의 Exosome Isolation Reagent (Cat# 4478360)를 초고속 원심분리기(ultracentrifuge) 방식과 결합하여 사용하였다. C57BL/6 마우스로부터 분리한 혈청 1 mL와 Exosome Isolation Reagent를 5:1 (혈청:Reagent)의 비율로 혼합하여 원심분리기(10,000g, 10분)를 통해 엑소좀을 분리하였다. 이때 엑소좀 이외의 불순물을 효과적으로 제거하여 의도치 않은 면역반응 등을 제어하기 위해 초고속 원심분리기(120,000g, 1시간)을 활용하여 분리된 엑소좀을 세척해 주었다. 초고속원심 분리 후, 침전된 엑소좀은 0.22 μm syringe filter로 불순물이 완전히 제거된 100 μL 멸균 PBS를 통해 현탁하였다.

[0083] 3. EXO^{RA} 제작

[0084] 100 μL의 PBS에 엑소좀을 100 μg 현탁한 엑소좀 용액과 DMSO에 농도 25 mM으로 녹인 로즈마린산 용액 100 μL를 잘 혼합하여 1시간 동안 25 ℃에서 배양하였다. 이후 42 ℃에서 60초 간 열 충격을 가하고, 엑소좀 안정화를 위해 4 ℃에서 10 분간 방치하였다. 이후 초고속 원심분리기 및 amicon tube를 활용한 엑소좀 세척과 분리를 통해 로즈마린산이 탑재된 엑소좀(EXO^{RA})을 수득하였다. 장기적인 보관은 -80 ℃의 deep-freezer에서 이루어졌다.

[0086] **[실험예 1] 엑소좀 검증**

[0087] 엑소좀은 평균 직경 200 nm 이하의 세포가 분비한 구형 소포체이다. 따라서 분리된 물질이 엑소좀인지 확인하기 위해서 분리된 물질의 모양 및 평균 입자 크기를 확인하는 것이 중요하다. 따라서 분리된 물질이 엑소좀인지 확인하기 위해 분리된 물질의 입자 모양 및 평균 사이즈를 측정하였다.

[0089] 앞서 언급한 내용대로 도 1a의 모식도에 설명된 방식으로 로즈마린산을 엑소좀에 탑재하였다. 도 1b는 분리된 엑소좀 및 로즈마린산을 탑재한 엑소좀을 전자현미경을 통해 확인한 결과이다. 도 1b를 참고하면, 로즈마린산을 탑재하기 전과 후의 엑소좀의 크기는 거의 동일함을 확인할 수 있다. 도 1c 내지 도 1f는 엑소좀의 크기를 나노 입자 추적 분석기(Nano tracking analysis; NTA)를 통해 측정한 결과이다. 도 1c, d, e를 통해 단일 엑소좀 및 로즈마린산이 탑재된 엑소좀의 평균 크기는 200 nm 이하이며, 이를 통해 도 1b에서 확인한 바를 수치 상으로 입증할 수 있다. 즉, 로즈마린산이 탑재되더라도 엑소좀의 평균 직경 크기에는 영향을 미치지 않았다.

[0090] 도 1f를 참고하면, 엑소좀 1 mg당 엑소좀의 개수 또한 그대로 유지되므로 로즈마린산의 탑재는 엑소좀의 품질에 영향을 미치지 않음을 확인할 수 있다.

[0092] **[실험예 2] 로즈마린산의 탑재량 측정**

[0093] 엑소좀 내 로즈마린산의 탑재량은 질량 분석법(Mass spectrometry)을 활용하여 측정하였다.

[0094] 도 2a 내지 도 2c는 로즈마린산의 엑소좀 탑재량과 관련된 그래프이다. 도 2a를 참고하면 도 2b에서 로즈마린산이 엑소좀에 성공적으로 탑재되었음을 확인할 수 있다. 또한 도 2c를 참고하면, 열 충격을 가하지 않고 단순 배합하여 배양 공정만 수행한 경우 로즈마린산의 탑재 효율은 0.1 % 이하, 로즈마린산과 엑소좀을 배합하여 배양 후 열 충격 공정을 수행한 경우 로즈마린산의 탑재 효율은 14.41 ± 0.68%로 나타났다. 따라서 열 충격 공정에 의해 로즈마린산의 탑재 효율이 극대화됨을 확인할 수 있다.

[0096] **[실험예 3] 급성 폐 손상 유발동물 모델에서 EXO^{RA}의 폐 손상 보호 효과**

[0097] 급성 폐 손상을 유발하기 위해 마우스(mouse)를 네 그룹(각 그룹당 7마리)으로 나누고, 그람 음성균(gram negative bacteria) 중 하나인 폐렴균 Klebsiella pneumoniae(이하, K.pneu 또는 K.P로 지칭)를 $1x10^6$ CFU의 농도로 50 μL의 멸균 PBS에 현탁하여 폐에 기도 내 주입(intratracheal instillation)하였다. 이때, K.pneu를 포함하지 않은 PBS를 주입한 정상 대조군(이하, PBS 그룹으로 지칭)을 실험에 추가하여 질병의 발현 여부를 K.pneu 주입군과 비교하여 확인하였다.

[0098] 2시간 후, 대조군으로 로즈마린산을 탑재하지 않은 엑소좀(EXO^{CON}), 농도 10μM의 로즈마린산을 탑재한 엑소좀(EXO^{RA}), 농도 100 μM의 로즈마린산(RA)을 각 마우스 그룹에 처리하여 로즈마린산이 K.pneu에 치료 효과를 갖는지와 그 효과가 엑소좀에 의해 증강되는지 확인하였다.

[0099] 도 3a 내지 도 3c는 EXO^{RA}를 통한 로즈마린산의 폐손상 보호 효과를 분석한 결과이다. 그래프에서 ***은 p-value < 0.001, *은 p-value < 0.05를 나타낸다. 도 3a는 폐 조직을 H&E 염색 후 광학 현미경으로 촬영한 이미지로, 폐 손상 정도 및 개선 정도를 수치화하여 도 3b에 나타내었다.

[0100] 도 3b는 각 마우스 그룹의 조직학적 급성 폐 손상 지수를 수치화한 그래프이다. 도 3b를 참고하면, LPS 미처리 그룹(Untreated)은 폐가 전혀 손상되지 않았고, LPS 처리 후 엑소좀만을 주입한 마우스 그룹(LPS + EXO^{CON})과 LPS만 처리한 마우스 그룹(LPS)은 폐 손상 지수가 가장 높고 유사하게 관찰되어, 단독으로 주입된 엑소좀만으로는 폐 손상을 치료할 수 없는 것으로 나타났다. 반면, LPS 처리 후 로즈마린산만을 주입한 마우스 그룹(LPS + RA)은 폐 손상 지수가 어느정도 호전되었고, LPS 처리 후 엑소좀과 로즈마린산의 복합 조성물을 주입한 마우스 그룹(LPS + EXO^{RA})에서는 폐 손상 지수가 가장 많이 완화되어 로즈마린산이 탑재된 엑소좀은 급성 폐 손상에 대한 치료 효과가 있음을 시사한다. 즉, 엑소좀을 통한 로즈마린산의 전달은 동량(10μM)의 로즈마린산 직접 투여에 비해 매우 개선된 효과를 나타내었다. 폐의 wet/dry 중량 비율(Lung wet dry weight ratio)은 폐 손상으로 인한 폐 부종 정도를 나타내는 지표로 수치가 높을 수록 심각한 폐 손상을 의미한다. 도 3c를 참고하면 LPS에 의해 증가된 폐의 wet/dry 중량 비율은 EXO^{RA} 및 RA 모두에서 감소하였다. 다만 EXO^{RA}는 15.25 % 개선시켰고, RA는 9.52 % 개선시켰으므로 RA 대비 EXO^{RA}로 인한 폐 부종 개선 효율은 62% 증가하였다.

[0102] **[실험예 4] EXO^{RA}의 폐 손상으로 유도된 염증세포 증가 억제 효과**

[0103] 도 4a 내지 도 4c는 EXO^{RA}의 폐 손상으로 유도된 염증세포 증가 억제 효과를 분석한 결과이다.

[0104] 도 4a는 LPS로 유도된 폐 염증 마우스 모델에 대해 폐 손상에 의한 염증세포의 증가를 H&E 염색(Staining)을 통해 확인한 결과이다. 이미지에서 M는 대식세포(macrophage), N은 호중구(neutrophil)을 의미한다. 도 4a를 참고하면, LPS 처리 그룹(PBS)과 LPS 처리 및 엑소좀을 주입한 그룹(LPS + EXO^{CON})에서는 LPS로 유도된 염증성 세포인 대식세포 및 호중구가 폐 내부에서 증가하였고, 이는 엑소좀만으로는 염증세포를 억제하는 효과가 없음을 의미한다. LPS 처리 및 로즈마린산이 탑재된 엑소좀을 주입한 그룹(LPS + EXO^{RA})과 LPS 처리 및 로즈마린산을 주입한 그룹(LPS + RA)에서는 EXO^{RA} 및 로즈마린산에 의해 대식세포 및 호중구가 감소하였고, 특히 EXO^{RA}의 치료 효과는 단독으로 주입된 로즈마린산에 비해 매우 우수한 결과를 보였다. 도 4a는 BAL(기관지 폐포 세척액) 세포에서 대식세포의 수를 카운팅한 그래프이고, 도 4b는 BAL(기관지 폐포 세척액) 세포에서 호중구의 수를 카운팅한

그래프이다. 도 4a에 따르면 LPS 처리 및 로즈마린산이 탑재된 엑소좀을 주입한 그룹(LPS + EXO^{RA})에서 대식세포 수 감소율은 LPS 처리만 수행한 그룹(LPS) 대비 58.39%, LPS 처리 및 로즈마린산을 주입한 그룹(LPS + RA)에서 호중구 수 감소율은 LPS 처리만 수행한 그룹(LPS) 대비 17.83%로 나타났다. 즉, 로즈마린산이 탑재된 엑소좀이 로즈마린산 대비 염증세포를 더욱 잘 억제시킴을 확인하였다.

[0106] **[실험예 5] EXO^{RA}의 폐 손상으로 유도된 염증성 인자 억제 효과**

[0107] 도 5a 내지 도 5d는 EXO^{RA}의 폐 손상으로 유도된 염증성 인자 억제 효과를 분석한 결과이다. LPS로 폐 염증이 유도된 마우스 모델에 대하여 폐 손상 기전을 확인하였다. ELISA 실험을 통해 확인해본 결과, LPS로 유도된 염증성 사이토카인(IL-1â, IL-6, TNF-α) 및 케모카인(CXCL-1) 관련 반응이 EXO^{RA} 및 로즈마린산에 의해 억제되었으며, 특히 EXO^{RA}의 치료 효과는 단독으로 주입된 로즈마린산과 비교하여 훨씬 우수함을 확인하였다.

[0109] **[실험예 6] 박테리아로 유도한 폐 손상에서 EXO^{RA}의 개선 효과**

[0110] 도 6a 내지 도 6f는 박테리아로 유도한 폐 손상에 있어서 EXO^{RA}의 개선 효과를 분석한 결과이다. 도 6a는 마우스에 K.P를 기도 내 투여(intratracheal instillation; IT)하고, 2 시간 이후 EXO^{CON}, EXO^{RA} 및 RA 중 어느 하나를 IT 투여하는 모습을 나타낸 모식도이다.

[0111] 도 6b 내지 도 6f를 통하여 로즈마린산 탑재 엑소좀(EXO^{RA}) 및 로즈마린산(RA) 모두 급성 폐 손상을 개선하였으며, EXO^{RA}의 폐 손상 개선 효과가 더 뛰어남을 확인하였다.

[0113] **[실험예 7] 네뷸라이저(Nebulizer)를 통한 EXO^{RA}의 폐렴균 유도 폐손상 치료 효과**

[0114] 급성 폐 손상을 유발하기 위해 마우스를 세 그룹(각 그룹당 7마리)으로 나누어 폐렴균 K.P를 $1x10^6$ CFU의 농도로 50 μL의 멸균 PBS에 현탁하여 기도 내 투여하였고, K.P 투여 2시간 후, EXO^{CON}, EXO^{RA} 및 RA 중 어느 하나를 네뷸라이저로 투여하였다.

[0115] 2시간 후, EXO^{CON}, EXO^{RA}, 로즈마린산을 각 그룹에 처리하여 로즈마린산이 K.pneu에 치료효과를 가지는지와 그 효과가 엑소좀에 의해 증강되는지 확인하였다.

[0116] 도 7a 내지 도 7e는 네뷸라이저를 통한 EXO^{RA}의 폐 손상 보호 효과를 분석한 결과이다. 도 7a에는 마우스에 네뷸라이저를 이용하여 로즈마린산을 탑재한 엑소좀을 투여하는 모습을 촬영한 이미지이다. 도 7b를 참고하면, EXO^{RA}이 네뷸라이저를 통해 폐 부위만을 표적하여 폐 전체에 골고루 분포된 모습을 확인할 수 있다.

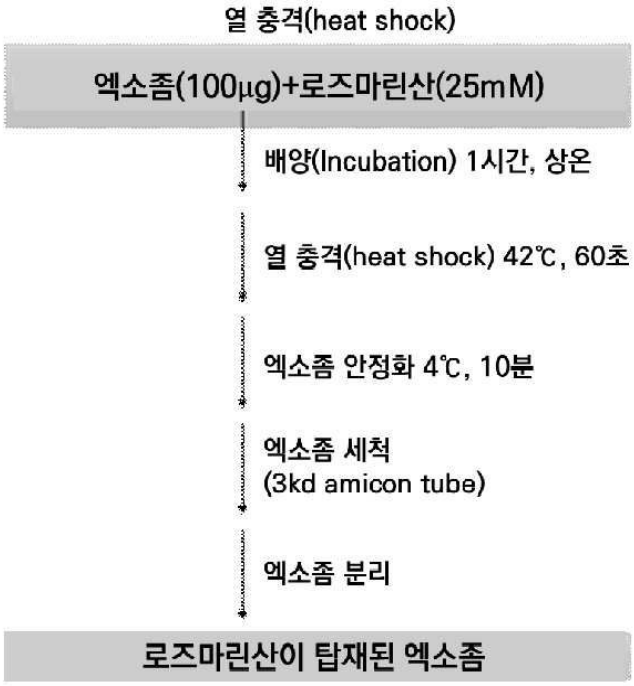
[0117] 도 7c 내지 도 7e를 통해 네뷸라이저로 전달된 로즈마린산(RA)이 폐 손상을 억제함을 확인하였고, 로즈마린산을 탑재한 엑소좀이 가장 우수한 폐 손상 억제 효과를 나타냄을 확인하였다.

[0118] 도 7b를 참고하면, K.pneu 처리 후 엑소좀을 단독으로 처리한 그룹(K.P + EXO^{CON})과 대비하여 K.pneu 처리 후 로즈마린산을 탑재한 엑소좀을 네뷸라이저로 투약한 그룹(K.P + EXO^{RA})의 폐 손상 개선 정도는 60.50%, K.pneu 처리 후 로즈마린산을 네뷸라이저로 투약한 그룹(K.P + RA)의 폐 손상 개선 정도는 35.19%로 나타났다.

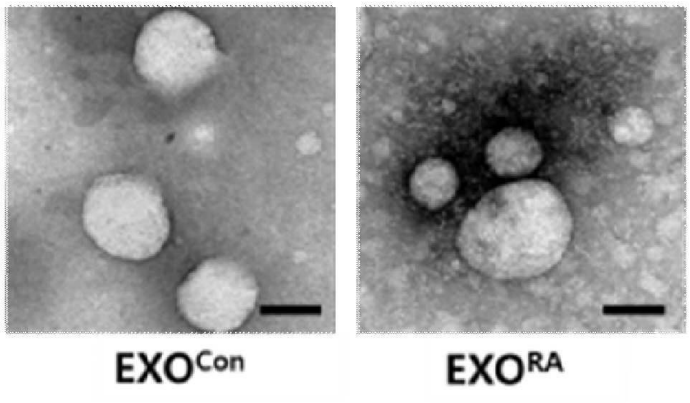
[0120] 이상과 같이 본 발명은 비록 한정된 실시예와 도면에 의해 설명되었으나, 본 발명은 상기의 실시예에 한정되는 것은 아니며, 본 발명이 속하는 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 이러한 기재로부터 다양한 수정 및 변형이 가능하다. 그러므로, 본 발명의 범위는 설명된 실시예에 국한되어 정해져서는 아니되며, 후술하는 특허청구범위뿐 아니라 이 특허청구범위와 균등한 것들에 의해 정해져야 한다.

도면

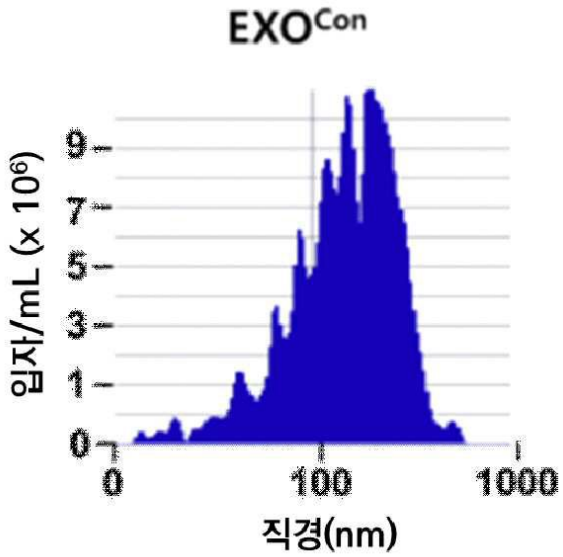
도면1a


열 충격(heat shock)
엑소좀(100μg)+로즈마린산(25mM)
배양(Incubation) 1시간, 상온
열 충격(heat shock) 42℃, 60초
엑소좀 안정화 4℃, 10분
엑소좀 세척
(3kd amicon tube)
엑소좀 분리
로즈마린산이 탑재된 엑소좀

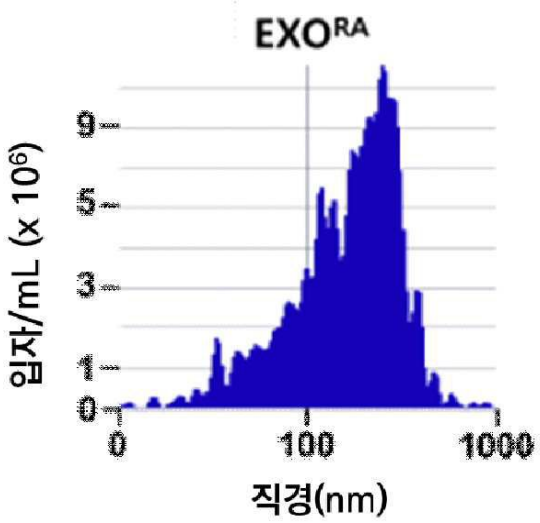
도면1b


EXOCon
EXORA

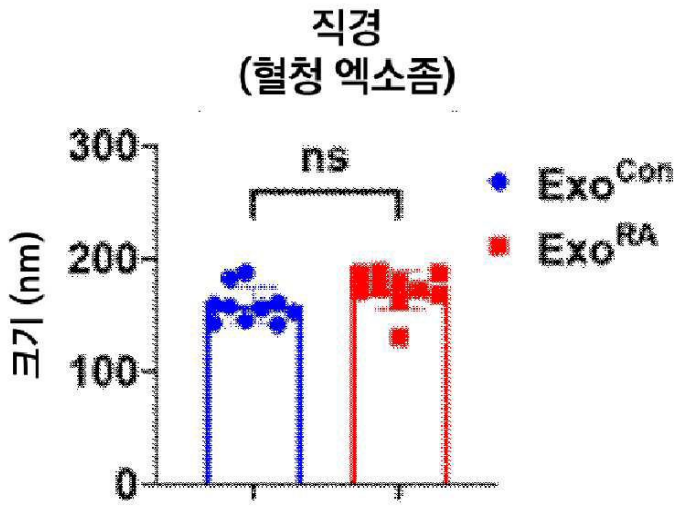
도면1c


EXOCon
입자/mL (x 10⁶)
9
7
5
3
1
0
0
100
1000
직경(nm)

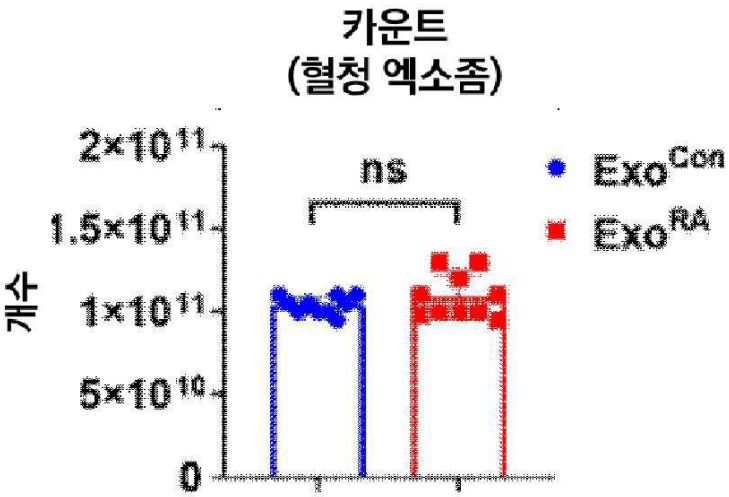
도면1d


EXORA
입자/mL (x 10⁶)
9
5
3
1
0
0
100
1000
직경(nm)

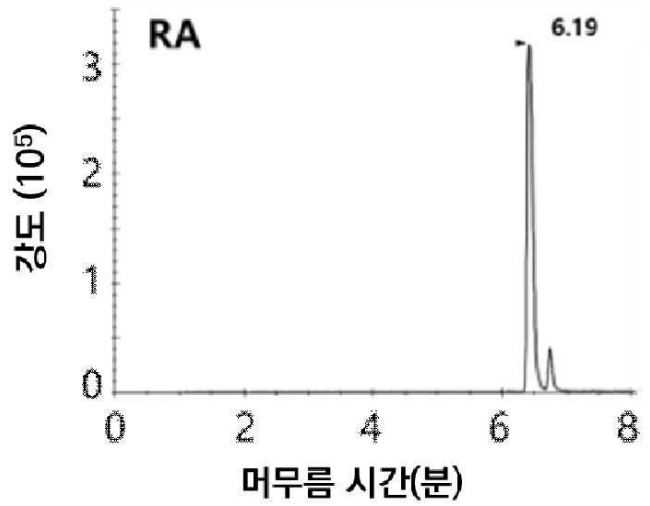
도면1e


직경
(혈청 엑소좀)
크기 (nm)
300
200
100
0
ns
Exo^Con
Exo^RA

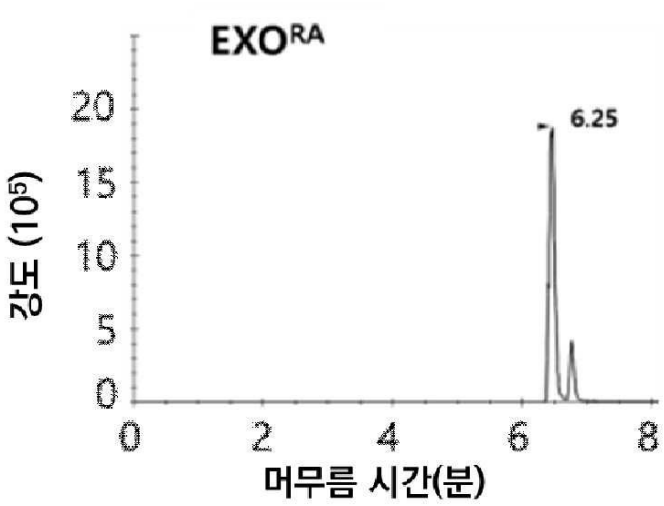
도면1f


카운트
(혈청 엑소좀)
개수
2×10^11
1.5×10^11
1×10^11
5×10^10
0
ns
Exo^Con
Exo^RA

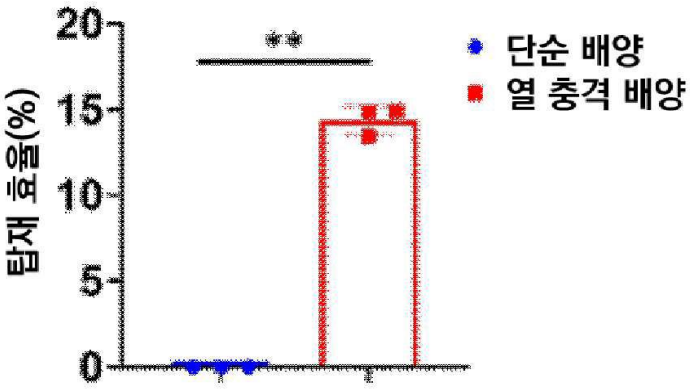
도면2a



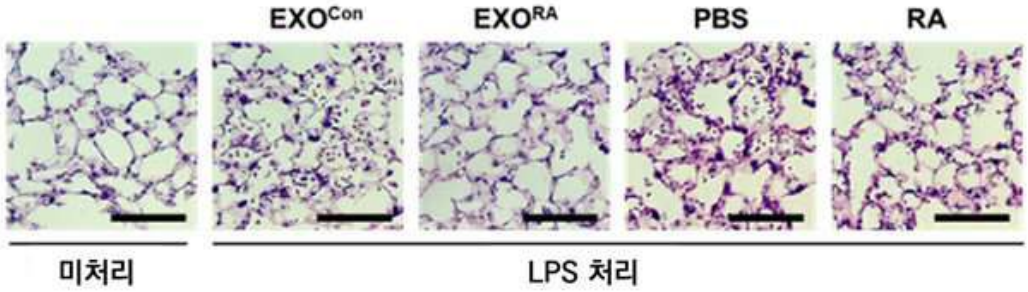
도면2b



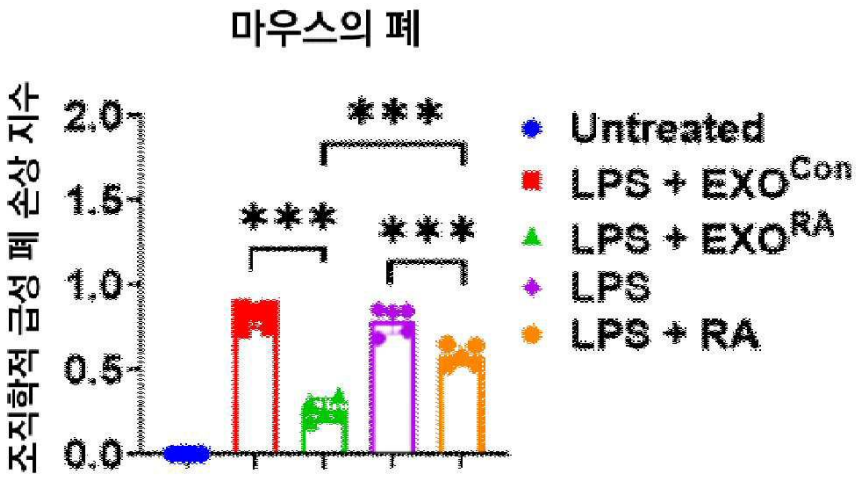
도면2c



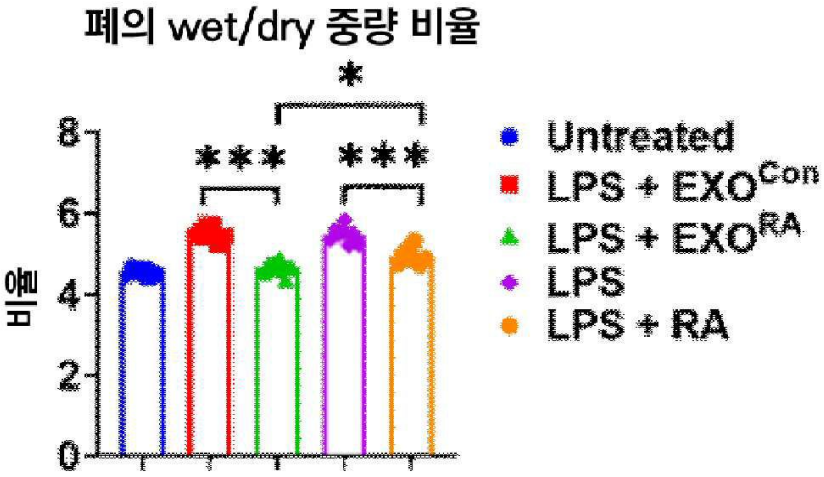
도면3a



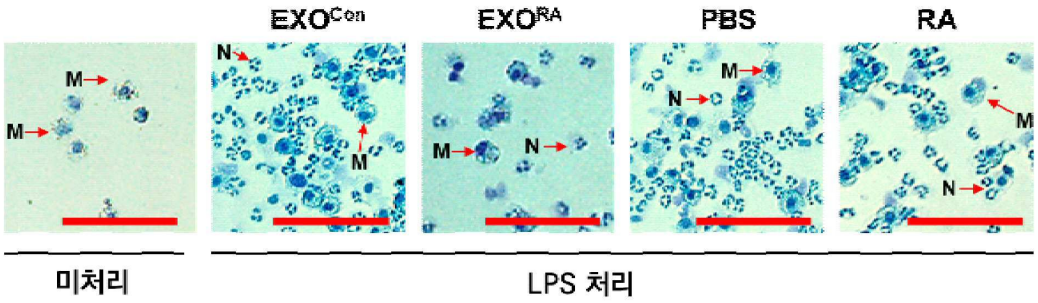
도면3b



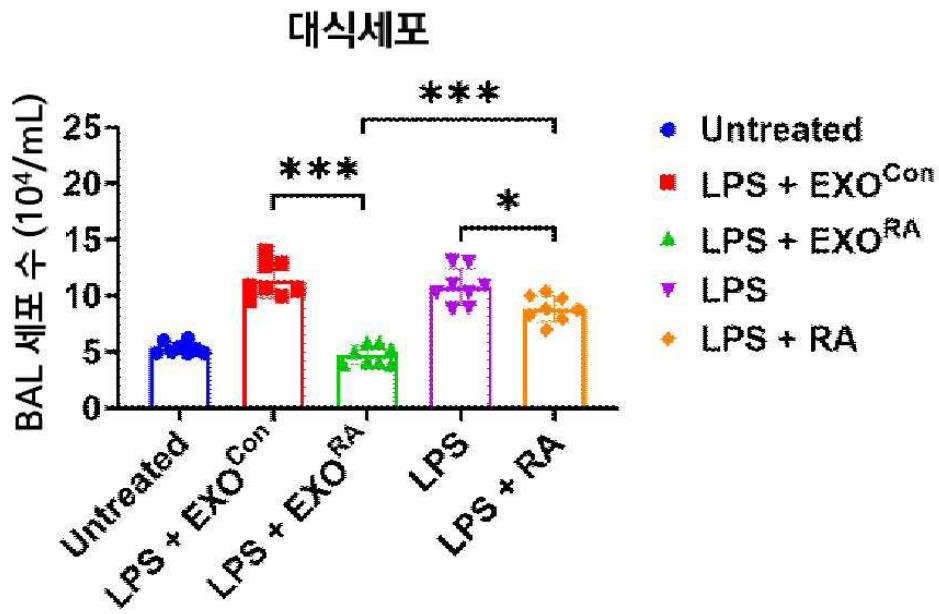
도면3c



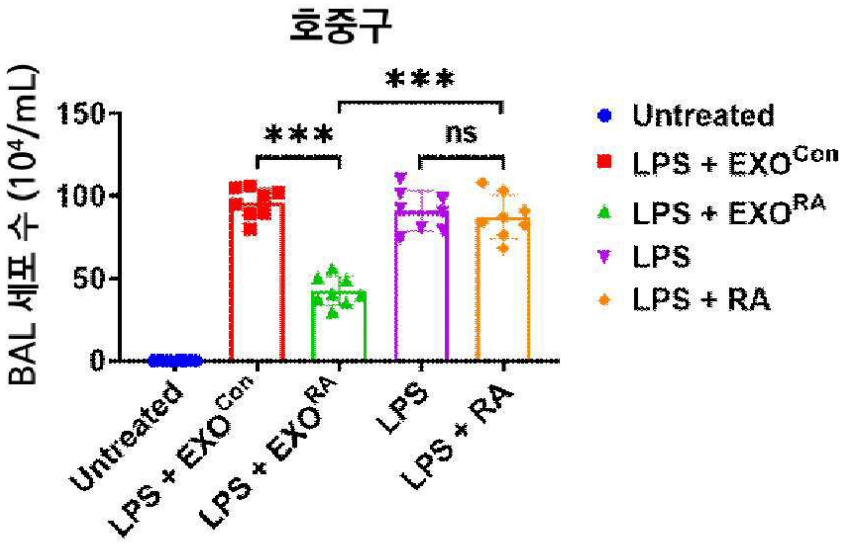
도면4a



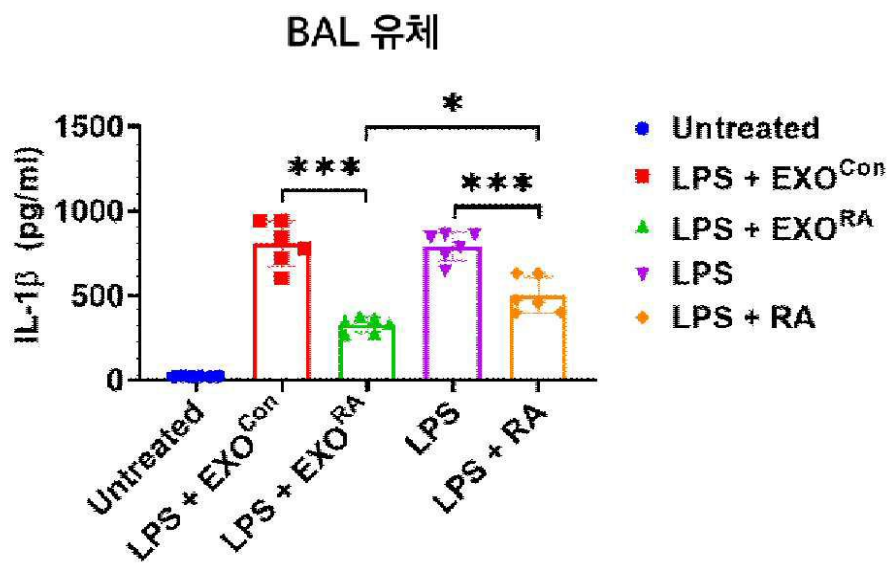
도면4b



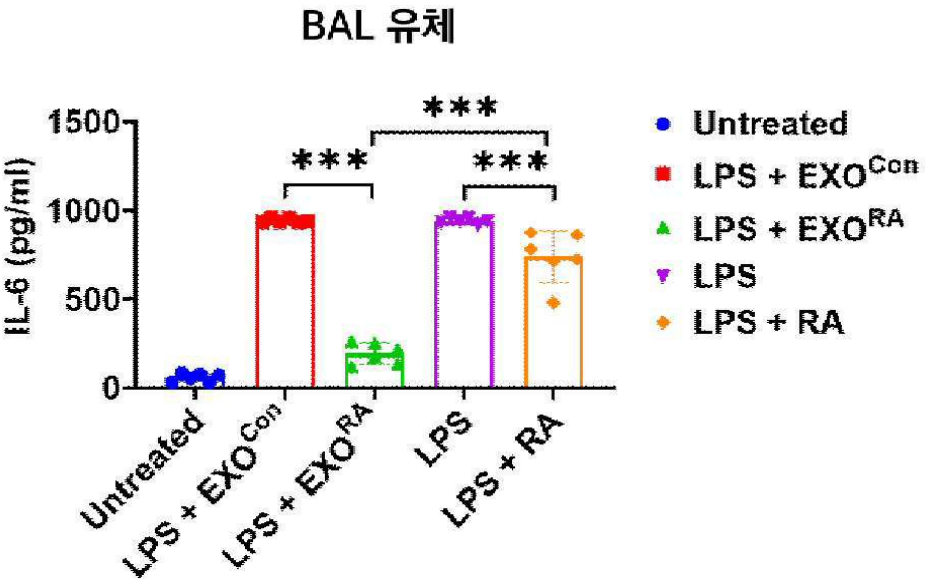
도면4c



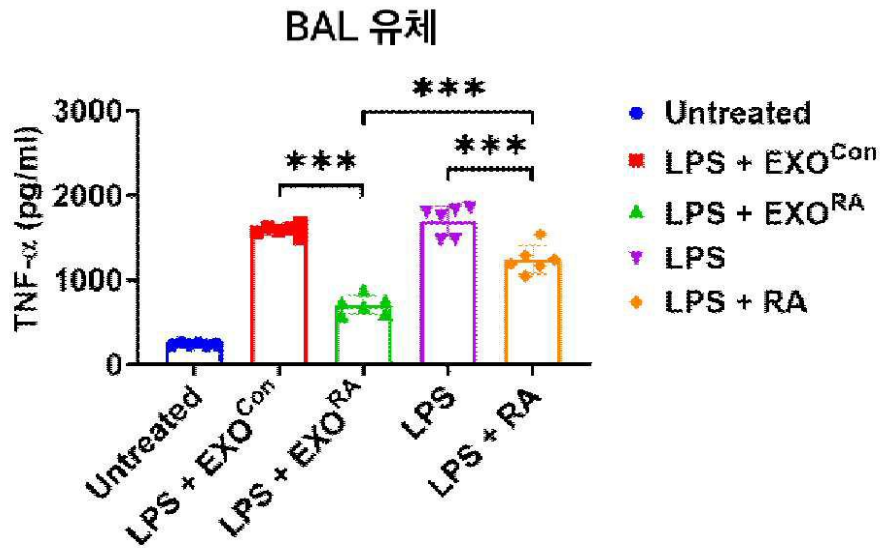
도면5a


BAL 유체
IL-1β (pg/ml)
1500
1000
500
0
*
***
***
Untreated
LPS + EXO^Con
LPS + EXO^RA
LPS
LPS + RA
Untreated
LPS + EXO^Con
LPS + EXO^RA
LPS
LPS + RA

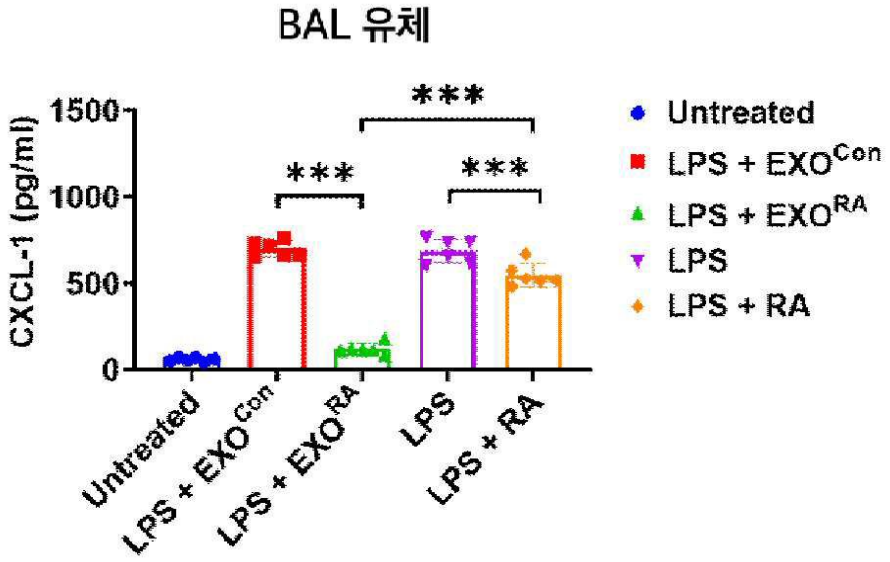
도면5b


BAL 유체
IL-6 (pg/ml)
1500
1000
500
0
***
***
***
Untreated
LPS + EXO^Con
LPS + EXO^RA
LPS
LPS + RA
Untreated
LPS + EXO^Con
LPS + EXO^RA
LPS
LPS + RA

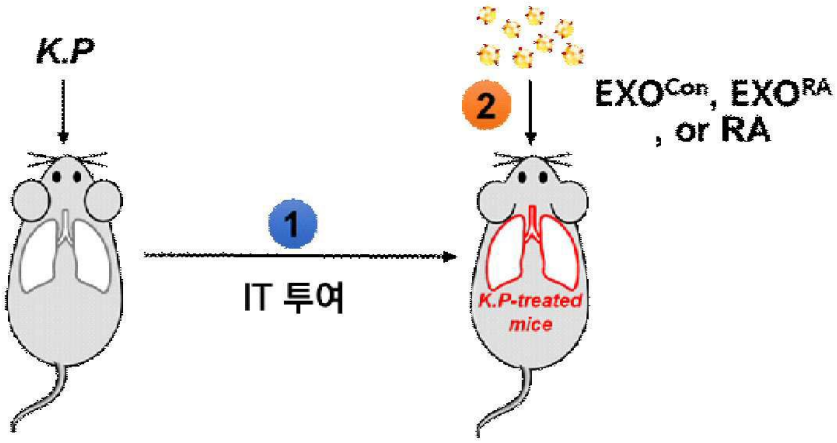
도면5c


BAL 유체
TNF-α (pg/ml)
3000
2000
1000
0
***
***
***
Untreated
LPS + EXO^Con
LPS + EXO^RA
LPS
LPS + RA
Untreated
LPS + EXO^Con
LPS + EXO^RA
LPS
LPS + RA

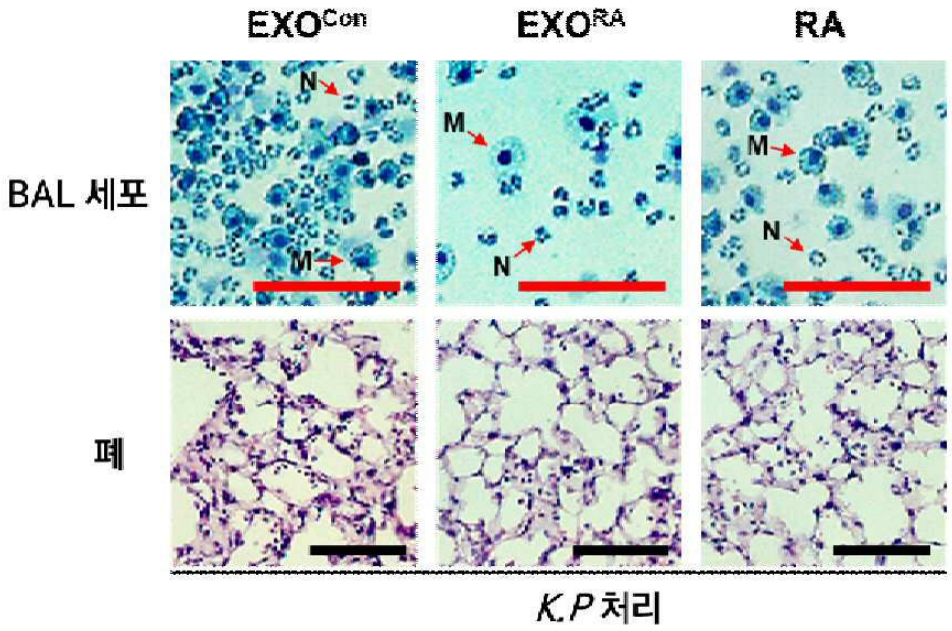
도면5d


BAL 유체
CXCL-1 (pg/ml)
1500
1000
500
0
***
***
***
Untreated
LPS + EXO^Con
LPS + EXO^RA
LPS
LPS + RA
Untreated
LPS + EXO^Con
LPS + EXO^RA
LPS
LPS + RA

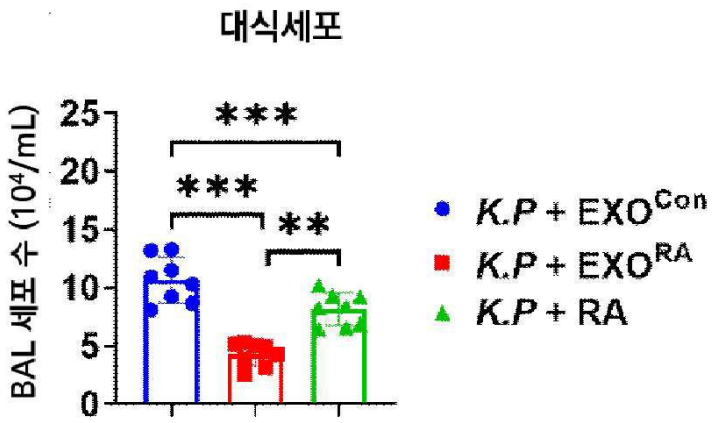
도면6a


K.P
1
IT 투여
2
EXOCon, EXORA
, or RA
K.P-treated
mice

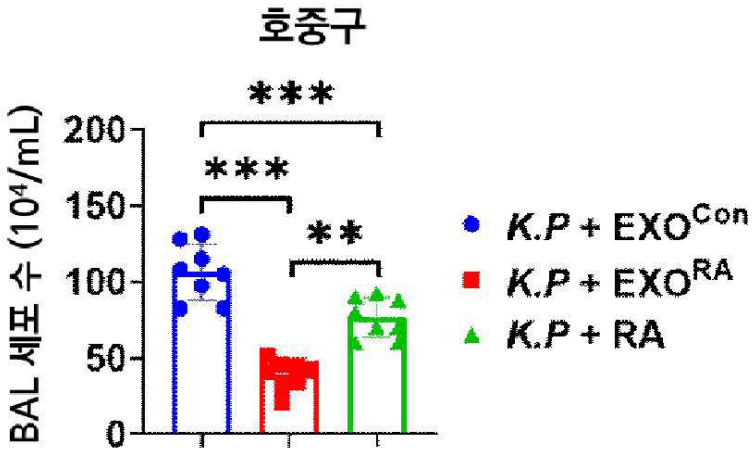
도면6b


EXOCon
EXORA
RA
BAL 세포
폐
N
M
K.P 처리

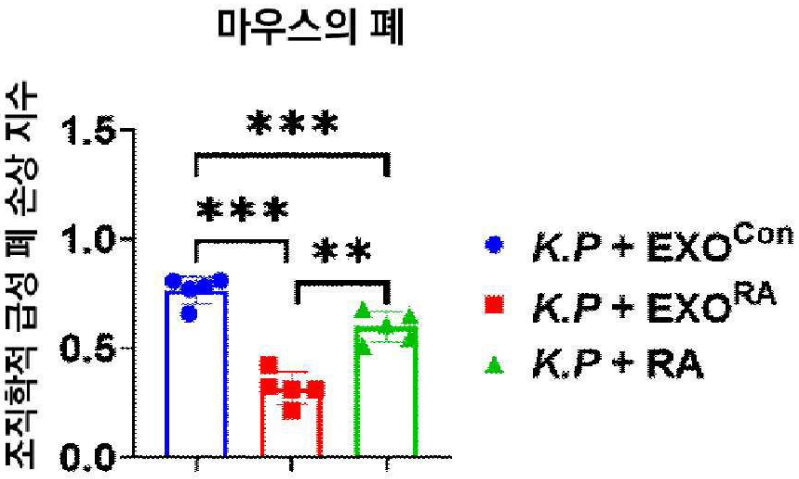
도면6c


대식세포
BAL 세포 수 (10^4/mL)
25
20
15
10
5
0
***
***
**
K.P + EXO^Con
K.P + EXO^RA
K.P + RA

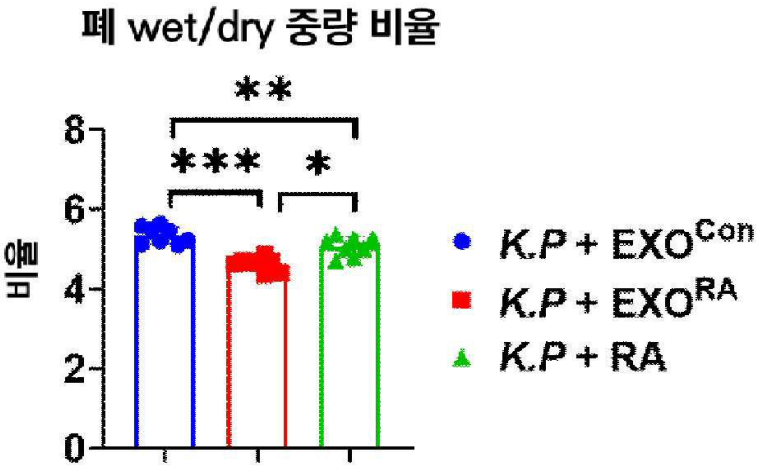
도면6d


호중구
BAL 세포 수 (10^4/mL)
200
150
100
50
0
***
***
**
K.P + EXO^Con
K.P + EXO^RA
K.P + RA

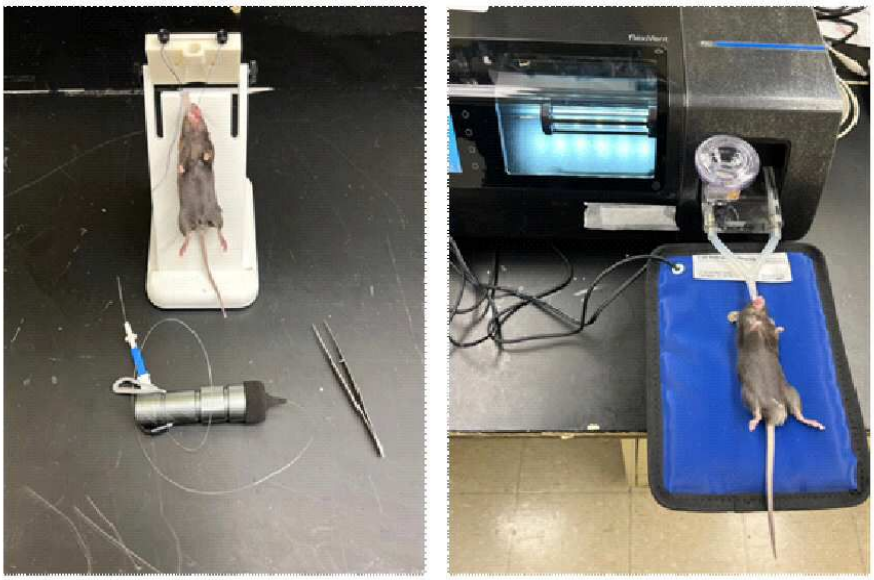
도면6e


마우스의 폐
조직학적 급성 폐 손상 지수
1.5
1.0
0.5
0.0
***
***
**
K.P + EXOCon
K.P + EXORA
K.P + RA

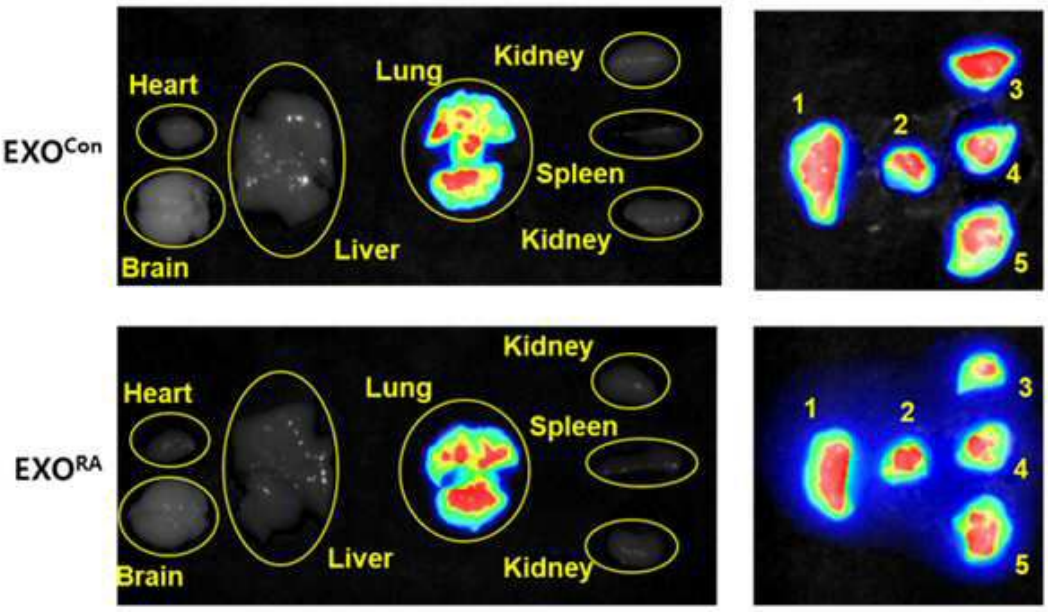
도면6f


폐 wet/dry 중량 비율
비율
8
6
4
2
0
**
***
*
K.P + EXOCon
K.P + EXORA
K.P + RA

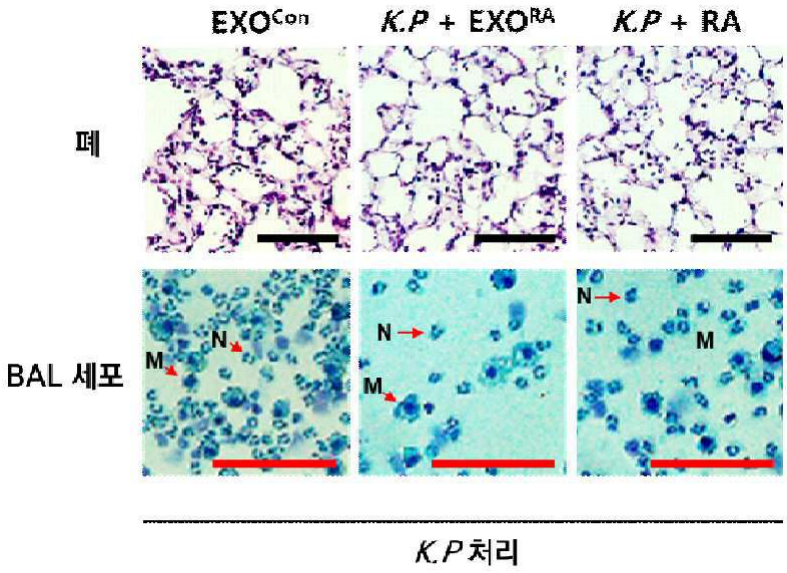
도면7a



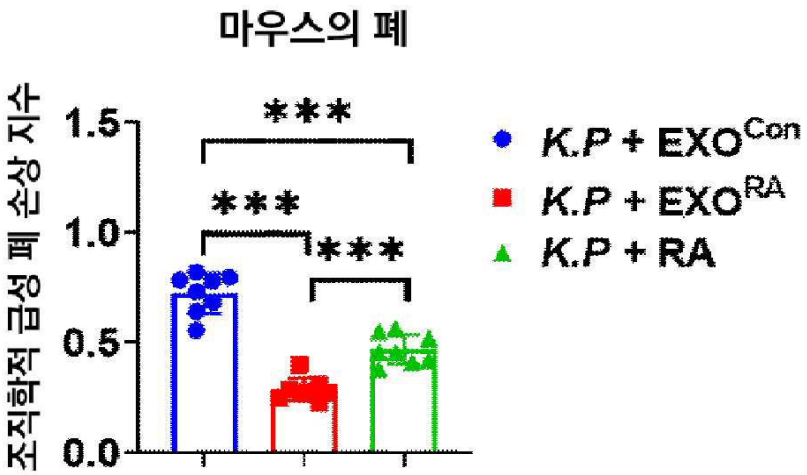
도면7b


EXOCon
Heart
Lung
Kidney
Spleen
Kidney
Brain
Liver
1
2
3
4
5
EXORA
Heart
Lung
Kidney
Spleen
Kidney
Brain
Liver
1
2
3
4
5

도면7c


EXO^Con
K.P + EXO^RA
K.P + RA
폐
BAL 세포
N
M
K.P 처리

도면7d


마우스의 폐
조직학적 급성 폐 손상 지수
1.5
1.0
0.5
0.0
***
***
***
K.P + EXO^Con
K.P + EXO^RA
K.P + RA

도면7e

