



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년06월17일
(11) 등록번호 10-1990004
(24) 등록일자 2019년06월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/127 (2006.01) A23L 33/10 (2016.01)
A61K 31/663 (2006.01) A61P 19/00 (2006.01)
C12N 5/077 (2010.01)
(52) CPC특허분류
A61K 9/1271 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2018-0012886
(22) 출원일자 2018년02월01일
심사청구일자 2018년02월01일
(56) 선행기술조사문헌
Yoonhee Bae et al., Bull. Korean Chem. Soc.
2018, Vol. 39, p.97-104 (2018.1.3.)
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
인제대학교 산학협력단
경남 김해시 인제로 197, 내 (어방동,
인제대학교)
충남대학교 산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
배윤희
부산광역시 진구 복지로 75 인제대학교 의과대학
심혈관대사질환 연구센터
한진
부산광역시 서구 천마로 57, 1동 162호 (남부민동, 대동맨션)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태백

전체 청구항 수 : 총 11 항

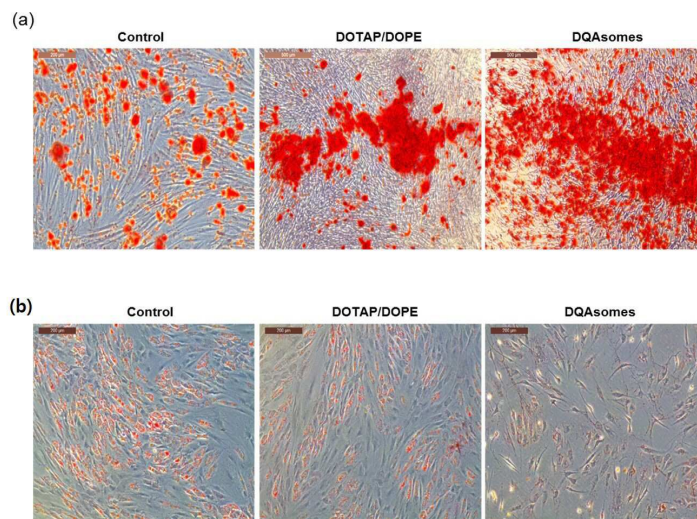
심사관 : 정의준

(54) 발명의 명칭 미토콘드리아 표적화 나노 리포솜을 유효성분으로 함유하는 골질환 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 미토콘드리아 표적화 나노 리포솜을 유효성분으로 함유하는 골질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 본 발명에 따른 미토콘드리아 표적화 나노 리포솜(디큐에이솜)은 인간 지방 유래 중간엽 줄기세포에 친화성을 가지고, 중간엽 줄기세포에서 골아세포로의 분화를 촉진시키며, 상기 나노 리포솜에 약물 또는 생리활성 물질의 봉입이 가능하여 세포 기반 치료, 뼈 조직 공학 및 재생 의학 분야에 활용이 가능하다. 따라서 상기와 같은 효과를 가지는 본 발명의 나노 리포솜은 골질환 예방 또는 치료용 약물 조성물, 골질환 예방 또는 개선용 건강식품 조성물 등으로 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류

A61K 31/663 (2013.01)
A61P 19/00 (2018.01)
C12N 5/0654 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/306 (2013.01)
C12N 2501/00 (2013.01)
C12N 2506/03 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

KR101720458 B1
 KR101752999 B1
 KR101791585 B1
 Volkmar Weissig et al., Pharmaceutical Research , Vol. 15(2), 1998

(72) 발명자

고경수

서울특별시 강남구 삼성로 150, 미도아파트 212동 601호

최준식

대전광역시 유성구 엑스포로123번길 65-38, 203동 1102호

이슬기

전라북도 전주시 완산구 양지2길 10, 105동 102호 (평화동2가, 동신아파트)

송수정

경상북도 포항시 북구 학산로59번길 7, 3동 205호 (학산동, 코오롱아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2010-0020224
 부처명 교육부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 이공분야 대학중점연구소지원사업
 연구과제명 심혈관 및 대사질환센터
 기 여 율 60/100
 주관기관 인제대학교
 연구기간 2016.05.01 ~ 2017.04.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2016R1D1A1A09917141
 부처명 교육부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 이공학개인지초연구지원사업
 연구과제명 합성 및 생체고분자를 이용한 치료용 생체모사 고분자 나노입자 개발 연구
 기 여 율 40/100
 주관기관 충남대학교 산학협력단
 연구기간 2016.11.01 ~ 2019.10.31

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

디큐에이좀(DQAsome)을 유효성분으로 함유하는 골질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 디큐에이좀은 데큐알리니움(Dequalinium)의 자기조립에 의해 형성되는 것을 특징으로 하는 골질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 디큐에이좀의 평균 직경은 100 내지 250 nm인 것을 특징으로 하는 골질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 디큐에이좀은 중간엽 줄기세포에서 골 형성 분화를 촉진하고, 지방 형성 분화를 억제하는 것을 특징으로 하는 골질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 골질환은 골다공증, 골절, 골다공증성 골절, 골소실증, 골결손, 당뇨병성 골절, 불유합 골절, 골형성 부전증, 골연화증, 골연화증성 골절, 골형성 장애, 골염, 퇴행성 골질환 및 부정교합으로 이루어지는 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 골질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 디큐에이좀은 약물 또는 생리활성 물질을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 골질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 약물은 알렌드로네이트, 리세드로네이트, 이반드로네이트, 파미드로네이트, 졸레드로네이트, 인카드로네이트 또는 네리드로네이트를 포함하는 비스포스포네이트; 칼시토닌; 및 부갑상선 호르몬;으로 이루어지는 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 골질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 8

제 6항에 있어서, 상기 생리활성 물질은 펩타이드, 단백질, 호르몬제 또는 유전자인 것을 특징으로 하는 골질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 9

디큐에이좀(DQAsome)을 유효성분으로 함유하는 골질환 예방 또는 개선용 건강식품 조성물.

청구항 10

시험관 내에서(in vitro) 디큐에이좀을 중간엽 줄기세포에 처리하는 단계;를 포함하는 중간엽 줄기세포에서 골아세포로의 분화 촉진 방법.

청구항 11

디큐에이좀(DQAsome)을 유효성분으로 함유하는 중간엽 줄기세포에서 골아세포로의 분화 촉진용 시약 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 미토콘드리아 표적화 나노 리포솜을 유효성분으로 함유하는 골질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 성인 골수에서 유래된 간엽 줄기세포(Mesenchymal stem cells; MSC)는 자기 복제가 가능한 접착성, 다능성 및 비조혈성 세포이다. MSC는 시험관 내에서(in vitro) 뼈, 연골, 힘줄, 근육 및 지방 세포와 같은 성숙한 세포 유형으로 분화할 수 있다. 또한, MSC는 중앙 및 전이성 질환 치료에 있어서 상처, 허혈 또는 특정 중앙 미세환경에 표적화된 전달을 위한 잠재적인 매개체 역할을 할 수 있다. 또한, MSC는 연골세포, 골아세포 및 지방세포로 증식하고 분화할 수 있다. 골아세포 및 지방세포는 교차분화에 의해 상호 연관되어 있다. 뼈 조직 공학 및 재생 의학 분야에서 중요한 과정인 지방생성을 억제하고 골 형성을 증가시킴으로써 다양한 골 형성 질환을 억제하거나 치료할 수 있다. 또한, 선택적으로 분화할 수 있는 MSC의 능력은 손상되거나 병이 있는 조직에 대한 치료용 조직 재생 전략에 활용될 수 있다. 조직 재생을 위한 MSC 치료에서 MSC의 운명은 실리콘, 텐드리머, 리포솜과 같은 생체 물질 및 나노기술을 개발하는데 중요하다. 특히, 골 형성 분화는 시험관 내 배양 시스템에서 나노입자를 봉입함으로써 조절될 수 있다. 그래핀(graphene) 계열의 나노입자인 그래핀(Graphene; G)과 산화그래핀(graphene oxide; GO) 나노입자는 세포 증식 및 분화를 촉진하여 생체 의학 응용분야의 기반을 마련한다. 흥미롭게도 항암제인 금과 셀레늄 나노입자의 사용은 MSC의 골 분화를 촉진시키는 것으로 밝혀졌다. 그러나 골 형성 분화를 유도하는 분자 메커니즘은 아직까지 명확하게 밝혀진 바가 없다.

[0003] 디큐에이솜(DQAsomes)은 친유성 양이온이 비편재화된 단일 사슬 양친매성 분자(bola amphiphilic molecules)이다. 디큐에이솜은 살아있는 세포에서 음으로 하전된 미토콘드리아 막을 가로지르는 전기화학적 구배에 반응하여 미토콘드리아 내부에 축적된다. 디큐에이솜이 미토콘드리아 특이 전달 벡터로 사용된 이전 보고에 따르면, 미토콘드리아 계층 pmtGFP와의 복합체는 비특이 세포 내 이입(endocytosis) 경로 및 미토콘드리아 표적화를 통해 세포 내로 전달된 다음 미토콘드리아에 축적된다. 디큐에이솜은 항균제로 50년 이상 사용되어 왔으며, 비발암성 섬유아세포 보다 많은 암세포들에서 높은 세포사멸 활성을 유도함으로써 항암 활성 나타내는 것으로 알려져 있다. 또한, 디큐에이솜은 미토콘드리아 막 전위의 감소, 반응성 산소종(reactive oxygen species; ROS)의 과잉 생성, ATP의 고갈, 미토겐 활성화 단백질 키나아제 신호전달 경로(mitogen-activated protein kinase signaling pathway)의 활성화, 미토콘드리아 의존 세포사멸 경로(mitochondrial dependent apoptotic pathway)로 인한 미토콘드리아 기능장애로 발생하는 세포 사멸 또는 괴사 효과를 나타내는 것으로 보고된 바 있으나, 골질환과의 연관성은 현재까지 밝혀진 바 없다.

선행기술문헌

특허문헌

[0004] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-0683641호 (2007.02.09 등록)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 목적은 미토콘드리아 표적화 나노 리포솜을 유효성분으로 함유하는 골질환 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 디큐에이솜(DQAsome)을 유효성분으로 함유하는 골질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0007] 또한, 본 발명은 디큐에이솜(DQAsome)을 유효성분으로 함유하는 골질환 예방 또는 개선용 건강식품 조성물을 제

공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 시험관 내에서(in vitro) 디큐에이좀을 중간엽 줄기세포에 처리하는 단계;를 포함하는 중간엽 줄기세포에서 골아세포로의 분화 촉진 방법을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 디큐에이좀(DQAsome)을 유효성분으로 함유하는 중간엽 줄기세포에서 골아세포로의 분화 촉진용 시약 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명에 따른 미토콘드리아 표적화 나노 리포좀(디큐에이좀)은 인간 지방 유래 중간엽 줄기세포에 친화성을 가지고, 중간엽 줄기세포에서 골아세포로의 분화를 촉진시키며, 상기 나노 리포좀에 약물 또는 생리활성 물질의 봉입이 가능하여 세포 기반 치료, 뼈 조직 공학 및 재생 의학 분야에 활용이 가능하다. 따라서 상기와 같은 효과를 가지는 본 발명의 나노 리포좀은 골질환 예방 또는 치료용 약학 조성물, 골질환 예방 또는 개선용 건강식품 조성물 등으로 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 미토콘드리아 표적화 나노 리포좀(디큐에이좀)의 형태를 나타낸 것이다.

도 2는 디큐에이좀의 투과 전자 현미경 이미지를 나타낸 것이다.

도 3은 인간 지방 유래 중간엽 줄기세포(AD-MSC)에 디큐에이좀을 처리한 후, 디큐에이좀의 세포 활성도를 세포 독성 및 젖산 탈수소 효소(LDH) 방출 분석으로 확인한 결과이다.

도 4는 AD-MSC에 디큐에이좀을 처리한 후, 세포주기를 유세포 분석으로 확인한 결과이다.

도 5는 AD-MSC에 디큐에이좀을 처리한 후, 세포사멸을 유세포 분석으로 확인한 결과이다.

도 6(a)는 AD-MSC에 디큐에이좀을 처리한 후, 골 형성 분화를 알리자린 레드 S 염색으로 확인한 결과이며, 도 6(b)는 지방 형성 분화를 오일 레드 O 염색으로 확인한 결과이다.

도 7은 AD-MSC에 디큐에이좀을 처리한 후, 골 형성 분화를 투과 전자 현미경으로 확인한 결과이다.

도 8은 AD-MSC에 디큐에이좀을 처리한 후, 골 형성 분화를 주사 전자 현미경으로 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 본 발명의 발명자들은 디큐에이좀이 처리된 인간 지방 유래 중간엽 줄기세포의 효과를 분석한 결과, 세포독성, 세포막 손상, 세포주기 변화, 세포 사멸 등의 영향 없이 줄기세포 표현형 특성을 유지시키며, 골아세포로의 분화를 촉진하는 것을 확인하며 본 발명을 완성하였다.

[0014] 본 발명은 디큐에이좀(DQAsome)을 유효성분으로 함유하는 골질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다. 테큐알리니움은 양쪽 말단에 미토콘드리아를 표적하는 말단기가 존재하며, 중심부터 탄소사슬이 있는 구조를 지니고 있어, 이러한 구조적인 특성으로 인하여 자기조립(self-assembly)이 가능하고, 가운데 사슬이 접히거나 혹은 일렬로 배열되는 하나의 레이저를 가지는 구조 때문에 100 내지 250 nm의 평균 직경을 가지는 입자를 형성한다.

[0015] 상기 디큐에이좀은 중간엽 줄기세포에서 골 형성 분화를 촉진하고, 지방 형성 분화를 억제할 수 있다.

[0016] 상기 골질환은 골다공증, 골절, 골다공증성 골절, 골소실증, 골결손, 당뇨병성 골절, 불유합골절, 골형성 부전증, 골연화증, 골연화증성 골절, 골형성 장애, 골염, 퇴행성 골질환 및 부정교합으로 이루어지는 군에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.

[0017] 상기 디큐에이좀은 약물 또는 생리활성 물질을 더 포함할 수 있다.

[0018] 상기 약물은 알렌드로네이트, 리세드로네이트, 이반드로네이트, 파미드로네이트, 졸레드로네이트, 인카드로네이트 또는 네리드로네이트를 포함하는 비스포스포네이트; 칼시토닌 및 부갑상선 호르몬;으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며 골질환 치료제로 사용되는 모든 약물의 사용이 가능하다.

[0019] 상기 "생리활성 물질"은 동물 또는 사람의 체내에서 생리적인 기능을 촉진 또는 억제하여 목적하는 생물학적 또는 약리학적 효과를 유도할 수 있는 물질로서, 동물 또는 사람에게 투여하기 적합한 화학적 또는 생물학적 물질 또는 화합물을 의미하며, (1) 감염 예방과 같은 원하지 않은 생물학적 효과를 예방하여 유기물에 대한 예방 효

과를 가지고, (2) 질병으로 생기는 컨디션을 경감시키며, 예를 들어 질병의 결과로 생기는 고통 또는 감염을 완화시키며, (3) 유기물로부터 질병을 완화, 감소 또는 완전히 제거할 수 있는 역할을 수행할 수 있다. 또한, 상기 "생리활성물질"은 "약물" 또는 "치료제"의 용어와도 상호 교환적으로 사용될 수 있다.

[0020] 상기 생리활성 물질로는 펩타이드, 단백질, 호르몬제 또는 유전자로서 인간성장호르몬, 백혈구성장인자, 적혈구성장인자, 대식세포 성장인자, 신경성장인자, 엔지오스테틴, 코르티솔, 인슐린, 갑상선 자극 호르몬, 글루카곤, 테트라하이드로바이오프테린, 단일 항체, 백신류, 플라스미드 DNA(plasmid DNA; pDNA) 및 siRNA로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.

[0022] 본 발명의 조성물이 약학 조성물인 경우, 투여를 위하여, 상기 기재한 유효성분 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다. 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[0023] 본 발명의 약학 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용할 수 있다. 상세하게는 제형화할 경우 통상 사용하는 충전제, 중량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형 제제로는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이러한 고형 제제는 상기 유효성분 외에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트, 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 첨가하여 조제될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 과제를 포함한다. 비수성 용제 및 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 오일, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔, 마크로솔, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤 젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0024] 본 발명의 약학 조성물의 적합한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 시간에 따라 다르지만, 당 업자에 의해 적절하게 선택될 수 있는 바, 상기 조성물의 일일 투여량은 바람직하게는 0.001 mg/kg 내지 50 mg/kg이며, 필요에 따라 일일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있다.

[0026] 또한, 본 발명은 디큐에이좀(DQAsome)을 유효성분으로 함유하는 골질환 예방 또는 개선용 건강식품 조성물을 제공한다.

[0028] 본 발명의 조성물이 건강식품 조성물인 경우, 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 충전제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 천연 과일 주스, 합성 과일 주스 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 또한, 건강식품 조성물은 육류, 소세지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 껌류, 아이스크림류, 스프, 음료수, 차, 기능수, 드링크제, 알코올 및 비타민 복합제 중 어느 하나의 형태일 수 있다.

[0029] 또한, 상기 건강식품 조성물은 식품첨가물을 추가로 포함할 수 있으며, 식품첨가물로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한 식품의약품안전처에 승인된 식품첨가물공전의 총칙 및 일반 시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.

[0030] 상기 식품첨가물공전에 기재된 품목으로 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산 칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성품, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고령색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨 제제, 면류 첨가 알칼리제, 보존료제제, 타르색소 제제 등의 혼합 제제류 등을 들 수 있다.

[0031] 이때, 건강식품 조성물을 제조하는 과정에서 식품에 첨가되는 본 발명에 따른 조성물은 필요에 따라 그 함량을 적절히 가감할 수 있다.

[0033] 또한, 본 발명은 시험관 내에서(in vitro) 디큐에이좀을 중간엽 줄기세포에 처리하는 단계;를 포함하는 중간엽 줄기세포에서 골아세포로의 분화 촉진 방법을 제공한다.

- [0035] 또한, 본 발명은 디큐에이좀(DQAsome)을 유효성분으로 함유하는 중간엽 줄기세포에서 골아세포로의 분화 촉진용 시약 조성물을 제공한다.
- [0037] 이하에서는 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.
- [0039] **실시예 1: 시약**
- [0040] 테큐알리니움 클로라이드(Dequalinium chloride), 나일 레드(Nile Red) 및 프로피디움 요오드화물(propidium iodide; PI)은 Sigma-Aldrich(Seoul, Korea)에서 구입하였다. 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine; DOPE), 1,2- 디올레오일-3-트리메틸암모늄-프로판 (1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane; DOTAP) 및 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-(카복시플루오레세인)은 Avanti Polar 및 Lipids (Alabaster, AL, USA)에서 구입하였다. EZ-Cytox 및 EZ-LDH 시약은 Daeil Lab Service(Seoul, Korea)에서 구입하였다. CD31 및 FITC-Annexin V 세포사멸 검출 키트는 BD Pharmingen(Franklin Lakes, NJ, USA)에서 구입하였으며, CD73, CD105, CD146, 오스테오폰틴(osteopontin) 및 오스테오칼신(osteocalcin)은 Millipore(Billerica, MA, USA)에서 구입하였다. 오일 레드 O(Oil red O) 및 알리자린 레드 S(Alizarin red S)는 Sigma-Aldrich에서 구입하였다. H2DCFDA는 Invitrogen(Carlsbad, CA, USA)에서 구입하였다.
- [0042] **실시예 2: 디큐에이좀 및 DOTAP/DOPE 제조**
- [0043] 디큐에이좀(DQAsomes)은 이전 논문(Drug Deliv. 2000 Jan-Mar;7(1):1-5.)을 참고하여 제조하였다. 간략하게, 테큐알리니움 클로라이드를 둥근 바닥 플라스크에 첨가하고 메탄올을 이용하여 최종 농도가 10 mM 되도록 용해하였다. 이후 회전 증발기(rotary evaporator)로 20분 동안 메탄올을 날려 제거한 뒤, 제조된 테큐알리니움 필름을 5 mM HEPES 버퍼에 넣어 분산시켰다. 분산시킨 용액을 1시간 동안 음파처리(sonication)한 뒤, 10,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 금속 입자를 제거하였다. 마지막으로 디큐에이좀은 0.8 μ m의 기공 사이즈를 가지는 실린지 필터로 여과한 후 보관하였다.
- [0044] DOTAP/DOPE는 세포 침투성 리피드 DOTAP과 융합성 리피드인 DOPE를 이용하여 제조하였다. 간략하게, 10 mg의 DOTAP/DOPE(molar ratio, DOTAP/DOPE=50:50)를 유리 플라스크를 첨가하고 클로로포름을 이용하여 용해하였다. 각각의 시료는 질소 가스로 유기 용매를 날려 제거한 뒤, 남은 유기 용매를 제거하기 위해 진공에서 1시간 동안 보관하였다. 이후 5 mM HEPES 버퍼(pH 7.4)에 분산시켜 1시간 동안 음파처리한 뒤, 각각의 시료는 0.8 μ m의 기공 사이즈를 가지는 실린지 필터로 여과한 후 보관하였다.
- [0045] 미토콘드리아를 표적화하는 나노 리포좀(디큐에이좀)의 형태는 도 1에 나타내었다. 테큐알리니움은 양쪽 말단에 미토콘드리아를 표적화하는 말단기가 존재하며, 중심부터 탄소사슬이 있는 구조를 지닌다. 상기 구조적인 특성으로 인하여 자기조립(self-assembly)이 가능하며, 가운데 사슬이 접히거나 혹은 일렬로 배열되는 하나의 레이저를 가지는 구조 때문에 100-200 nm의 나노 수준의 입자 형성이 가능하다. 본 발명에서는 리포좀의 대조군으로써, 가장 일반적으로 사용되고 있는 인지질의 종류인 DOTAP과 DOPE이 1:1의 몰비율로 구성된 리포좀을 사용하였다. DOTAP는 양이온성의 인지질로서 세포막 투과성을 높이며, DOPE는 융합 인지질로서 리포좀을 안정하게 해주는 특성을 지닌다. 도 2의 전자 현미경 이미지에서 볼 수 있듯이, DOTAP와 DOPE를 이용한 리포좀은 이중막으로 이루어진 구형의 리포좀 형태를 구성하며, 전달 효율이 우수하고 안정성이 뛰어나다.
- [0047] **실시예 3: DLS 및 제타 전위 분석**
- [0048] 디큐에이좀 및 DOTAP/DOPE의 크기 및 제타 전위를 분석하기 위해, 900 μ l의 멸균된 물에 각 시료를 희석하고, ELS-Z(Phyto, Otuka Electric, Kawasaki-shi, Japan) 및 Zetasizer NanoZS(Malvern Instruments, Malvern, UK) 기기를 이용하여 입자 크기 분포 및 제타 전위를 측정하였다.
- [0049] 그 결과, 하기 표 1과 같이, 디큐에이좀의 크기는 218.0 ± 4.02 nm, 제타 전위는 57.8 ± 1.15 mV였으며, DOTAP/DOPE의 크기는 240.5 ± 3.18 nm, 제타 전위는 65.2 ± 4.12 mV로 유사하였으며, 디큐에이좀 입자의 평균 크기는 210 nm인 것을 확인하였다. 또한, 디큐에이좀의 입자는 불규칙적인 구형의 형태를 나타내었다. 상기 입자는 실온 조건에서 장기 보관에도 응집 또는 침전 없이 안정하게 유지되었다.

표 1

Formulation	Size (nm)	Zeta potential (mV)
DOTAP/DOPE	240.5 ± 3.18	65.2 ± 4.12
DQAsomes	218.0 ± 4.02	57.8 ± 1.15

[0051]

[0053]

실시예 4: 세포 독성 분석

[0054]

리포솜의 양이온 표면은 세포막 내의 인지질과 결합하여 독성을 나타낼 수 있다. 이러한 세포 독성 효과는 나노 입자의 크기, 모양, 전하 및 기능에 의해 결정된다.

[0055]

디큐에이솜 및 DOTAP/DOPE의 세포 독성 여부는 EZ-Cytox 시약을 이용하여 측정하였다. 간략하게, 인간 지방 유래 중간엽 줄기세포를 96 웰 플레이트에 1.3×10^4 세포/웰 농도로 접종한 후, 지방 유래 성장배지 100 μ l, 100 U/ml 페니실린 및 스트렙토마이신을 포함하는 배지와 함께 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 12시간 동안 배양하였다. 이후 세포에 디큐에이솜, DOTAP/DOPE, 리포펙타민(Lipofectamine)을 다양한 농도로 처리하고, 24시간 및 48 시간 동안 배양한 다음 EZ-Cytox 시약을 각 웰 당 10 μ l씩 처리하고 2시간 동안 추가 배양하였다. 마이크로플레이트 리더기(VERSA max microplate reader)를 이용하여 450 nm에서 각 시료의 흡광도를 측정하여 상대적인 세포 생존율을 계산하였다.

[0056]

그 결과, 도 3(a) 및 도 3(b)를 참조하여 보면, 양성 대조군으로 사용된 DOTAP/DOPE 처리 세포가 가장 높은 세포 생존력을 유지하는 것을 확인하였다. 디큐에이솜 또한 농도 및 시간 의존적으로 중간엽 줄기세포 생존에 거의 영향을 미치지 않는 것을 확인할 수 있었다.

[0058]

실시예 5: LDH 방출 분석

[0059]

디큐에이솜이 대사 활동에 미치는 영향을 분석하기 위해, 세포 배양액에 존재하는 젖산 탈수소 효소(lactate dehydrogenase; LDH)의 활성을 측정하여 나노입자 처리된 세포의 세포막 손상 여부를 분석하였다. 인간 지방 유래 중간엽 줄기세포를 96 웰 플레이트에 1.3×10^4 세포/웰 농도로 접종한 후, 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 12시간 동안 배양하였다. 이후 세포에 디큐에이솜, DOTAP/DOPE, 리포펙타민(Lipofectamine)을 다양한 농도로 처리하고, 24시간 및 48시간 동안 배양하였다. Tween 20으로 배양된 세포를 양성 대조군으로 사용하였다. 각 시료의 배양액을 모은 후, 상온에서 10,000 rpm으로 5분 동안 원심분리하여 상등액을 취하고, LDH 방출 분석은 제조사에서 제공한 프로토콜을 참고하여 수행하였다. 마이크로플레이트 리더기를 이용하여 450 nm에서 각 시료의 흡광도를 측정하였다.

[0060]

그 결과, 도 3(c) 및 도 3(d)를 참조하여 보면, LDH 방출이 리포펙타민의 농도 및 시간 의존적으로 증가한 반면, 디큐에이솜은 중간엽 줄기세포에 손상을 거의 미치지 않는 것을 확인함으로써 디큐에이솜이 인간 지방 유래 중간엽 줄기세포와 생체 적합함을 확인하였다.

[0062]

실시예 6: 세포주기 분석

[0063]

세포의 세포주기 분포를 측정하기 위해, PI로 염색된 세포의 DNA 함량을 분석하였다. 인간 지방 유래 중간엽 줄기세포를 6 웰 플레이트에 1.8×10^5 세포/웰 농도로 접종한 후, 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 12시간 동안 배양하였다. 이후 세포에 디큐에이솜 및 DOTAP/DOPE를 각각 5 μ g/ml 농도로 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 그 다음 70% 에탄올을 이용하여 20°C에서 최소 4시간 이상 세포를 고정시켰다. 시료를 PBS로 1회 세척하고, RNase 10 mg/ml를 처리한 다음 상온에서 30분 동안 반응시켰다. 이후 각 시료에 PI 5 mg/ml를 처리하고 상온에서 5분 동안 반응시킨 후에 유세포 분석기(FACS Calibur system, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA)를 이용하여 디큐에이솜 및 DOTAP/DOPE의 세포주기를 측정하였다.

[0064]

그 결과, 도 4를 참조하여 보면, 디큐에이솜은 세포주기에 정지를 일으키지 않고, 세포주기에 영향을 미치지 않

는 것을 확인하였다.

[0066] 실시예 7: 세포사멸 분석

[0067] 디큐에이즘 및 DOTAP/DOPE의 세포사멸 활성을 측정하기 위해, FITC-Annexin V 세포사멸 검출 키트를 이용하여 실험을 수행하였다. 1×10^6 농도의 인간 지방 유래 중간엽 줄기세포에 디큐에이즘 및 DOTAP/DOPE를 각각 $5 \mu\text{g/ml}$ 농도로 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 시료를 PBS로 세척하고, 트립신 처리한 후, 결합 버퍼 $500 \mu\text{l}$ 에 현탁시켰다. 이후 각 시료에 $5 \mu\text{l/ml}$ FITC-Annexin V 및 $5 \mu\text{l/ml}$ PI를 처리하고 상온에서 15분 동안 반응시킨 후에 유세포 분석기를 이용해서 세포사멸을 측정하였다.

[0068] 그 결과, 도 5를 참조하여 보면, 디큐에이즘으로 처리된 세포는 세포사멸 또는 괴사를 나타내지 않았고, 또한 $5 \mu\text{g/ml}$ 의 농도가 이후 실험에 적합하다고 간주하였다. 상기 결과는 디큐에이즘이 나노입자로부터 내부화된 생체 적합성 물질임을 시사한다.

[0070] 실시예 8: 시험관 내 인간 지방 유래 중간엽 줄기세포 분화

[0071] 골 형성 및 지방 형성 분화를 측정하기 위해, 인간 지방 유래 중간엽 줄기세포를 24 웰 플레이트에 1.4×10^3 세포/웰 농도로 접종한 후, 37°C , 5% CO_2 배양기에서 12시간 동안 배양하였다. 이후 세포에 디큐에이즘 및 DOTAP/DOPE를 각각 $5 \mu\text{g/ml}$ 농도로 처리하였다. 세포가 플레이트에 100%의 밀집 상태로 자라면 배양 배지를 계통 특이 배지로 변경하여 골 형성 또는 지방 형성의 두 가지 상이한 유형 중 하나로 유도하였다. 분화 배지는 2주 동안 3일 마다 교체하였다. 골 형성 또는 지방 형성 분화의 정성분석과 정량분석은 배양 7일과 14일에 수행하였다.

[0072] 골 형성 분화를 분석하기 위해, 세포를 PBS로 세척하고, 70% 에탄올로 4°C 에서 10분 동안 고정시킨 다음 증류수로 3회 세척하였다. 이후 알리자린 레드 S로 부드럽게 흔들어 30분 동안 염색하고, 증류수로 4회 세척하였다. 분광광도계를 이용하여 550 nm 에서 흡광도를 측정하였다.

[0073] 지방 형성을 나타내는 지질 축적을 측정하기 위해, 세포를 PBS로 세척하고, 4% 파라포름 알데하이드로 실온에서 30분 동안 고정시켰다. 이후 오일 레드 O로 실온에서 20분 동안 염색한 다음 85% 프로필렌 글라이콜(propylene glycol) 용액으로 세척하였다. 분광광도계를 이용하여 550 nm 에서 흡광도를 측정하였다.

[0074] 그 결과, 도 6(a)를 참조하여 보면, 골 형성 분화 배지에서 배양된 양성 대조군 세포는 골아세포 유사 형태를 보여 세포 응집과 함께 침착된 결정성 칼슘을 생성하는 것을 확인하였다. 각각의 나노입자로 처리된 세포는 석회화된 결정의 존재와 같이, 골 형성 분화가 더 강화된 것을 확인할 수 있었다.

[0075] 도 6(b)를 참조하여 보면, 디큐에이즘 및 DOTAP/DOPE 처리에 의해 지방 형성 분화가 억제되는 것을 확인하였다.

[0077] 실시예 9: TEM 이미지 분석

[0078] 미세구조 분석을 위해, 인간 지방 유래 중간엽 줄기세포에 디큐에이즘 및 DOTAP/DOPE를 각각 처리하였다. 골 형성 분화 배지에서 14일간 배양한 후, 시료는 2.5% 글루타르알데하이드를 포함하는 0.1M 인산 나트륨 버퍼(pH 7.4)를 이용하여 4°C 에서 고정시켰다. 각 시료는 동일한 버퍼로 세척한 후 1% OsO_4 로 2시간 동안 고정시켰다. 고정 후, 시료는 아세톤으로 세척하고 탈수시킨 다음 Spurr 매질에 포매하였다. 초박절편기(ultra-microtome, UTC; Leica, Wetzlar, Germany)를 이용하여 절편을 제작하였고, 절편된 세포를 구리 격자 상에 놓고 우라닐 아세테이트(uranyl acetate) 및 리드 사이트레이트(lead citrate)로 이중 염색하였다. 최종 시료는 H-7600 투과 전자 현미경(Hitachi, Tokyo, Japan)을 이용하여 관찰하였다.

[0079] 나노입자로 처리되지 않은 세포는 양성 대조군(a)으로 사용하였고, DOTAP/DOPE(b)로 처리한 세포를 디큐에이즘(c)으로 처리한 세포와 비교하였다. 그 결과, 도 7을 참조하여 보면, 대조 세포와 DOTAP/DOPE로 처리한 세포(a, b)는 미성숙 소포체를 보였으나 디큐에이즘으로 처리한 세포는 확장된 거친 소포체를 보였다. 또한, 디큐에이즘으로 처리한 세포에는 풍부한 세포질 소포와 세포질 포함물 또는 다층 소용돌이 막이 관찰되었다.

[0081] 실시예 10: SEM 이미지 분석

[0082] 세포 형태를 분석하기 위해, 인간 지방 유래 중간엽 줄기세포에 디큐에이즘 및 DOTAP/DOPE를 각각 $5 \mu\text{g/ml}$ 농도로 처리하고 10일 동안 배양하였다. 세포를 수집하고 PBS로 2회 세척한 후 1차 고정액(2% 글루타르알데하이드 및 1.5% 파라포름알데하이드)으로 1시간 동안 고정시킨 다음 2% 사산화 오스뮴(osmium tetroxide)으로 1시간 동안 고정시켰다. 이후 시료를 에탄올 농도를 증가시키면서(30, 50, 70, 80, 90, 95 및 100%) 20분씩 탈수시키고,

에탄올 및 이소아밀 아세테이트(isoamyl acetate)로 대체하였다. 마지막으로, CO₂를 사용하여 시료를 건조시키고, PT로 코팅한 다음 Hitachi 4300 전계 방출형-주사 전자 현미경을 이용하여 관찰하였다.

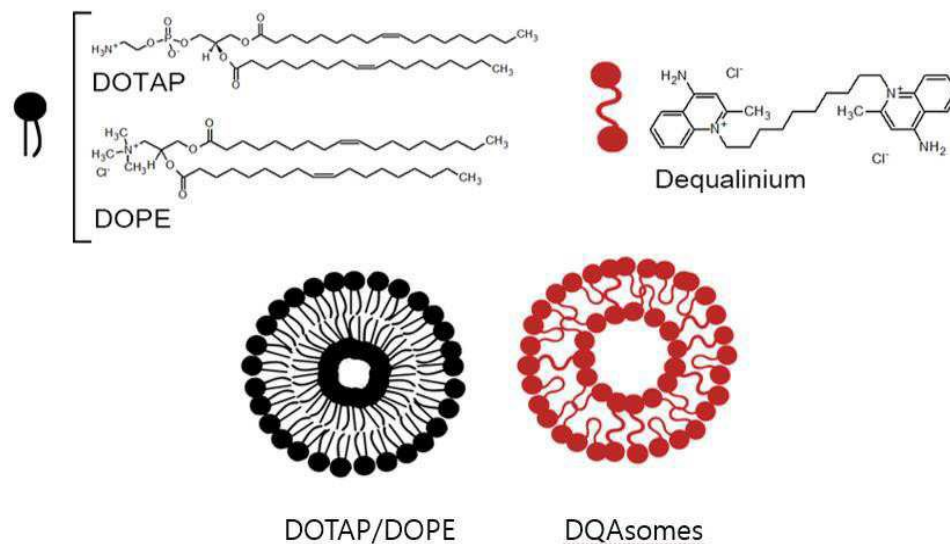
[0083] 그 결과, 도 8을 참조하여 보면, 처리되지 않은 세포는 양성 대조군(a, b)으로 사용하였고, DOTAP/DOPE로 처리한 세포(c, d)가 디큐에이즘으로 처리한 세포 보다 사상위족(filopodia, 화살표 머리) 뿐만 아니라 세포 퍼짐에 있어서 더 높은 수준을 나타내었다. 그러나 가늘고 긴 형태는 디큐에이즘으로 처리한 세포 (e, f)에서 관찰되었다. 특히, 디큐에이즘으로 처리된 세포의 세포질에서 소포 구조(f, 삽입된 이미지)가 발견되었다. 상기 결과는 디큐에이즘이 세포에서 골 형성 분화를 강화시킴을 시사한다.

[0085] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술한 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

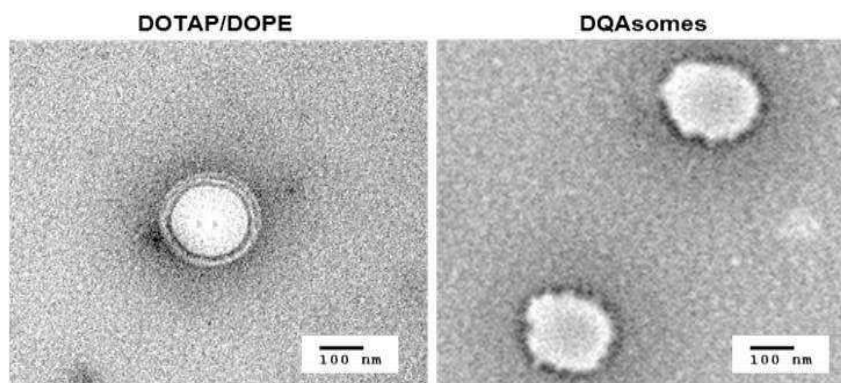
[0086] 본 발명의 범위는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

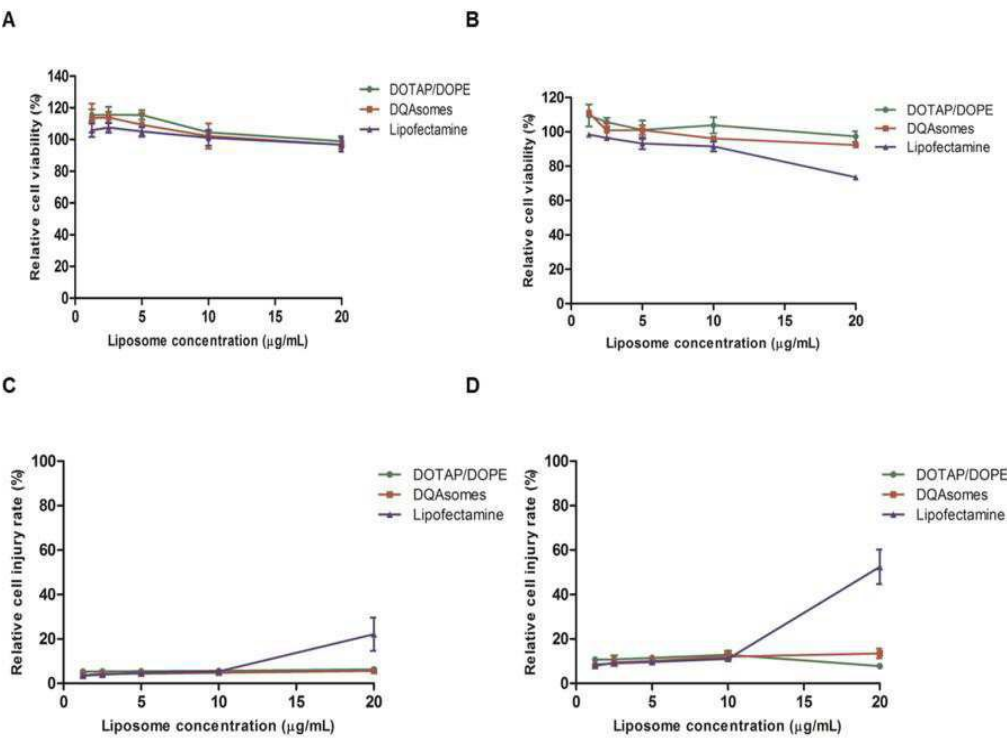
도면1



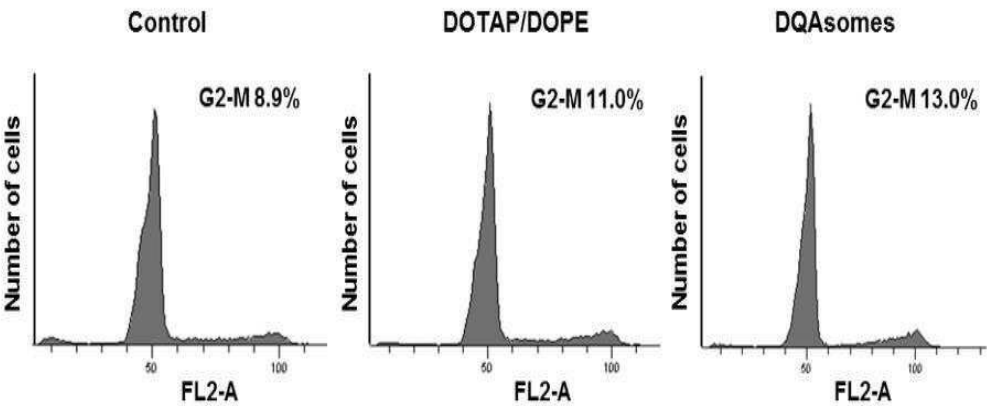
도면2



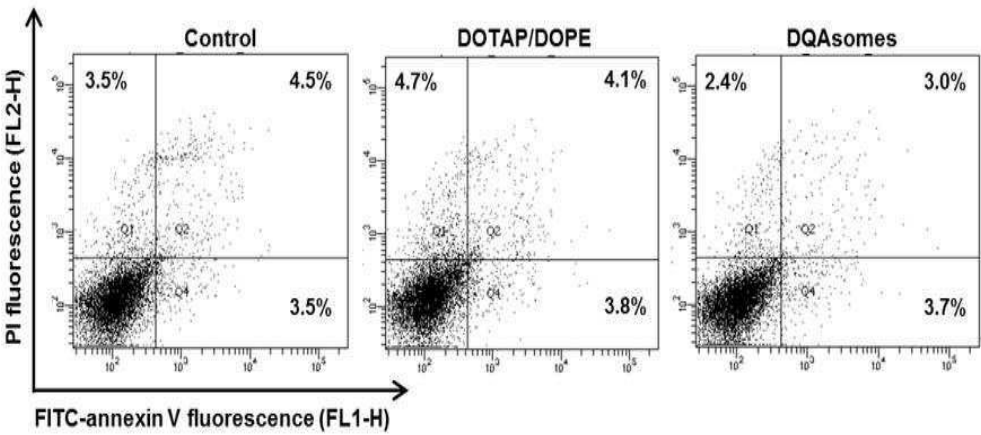
도면3



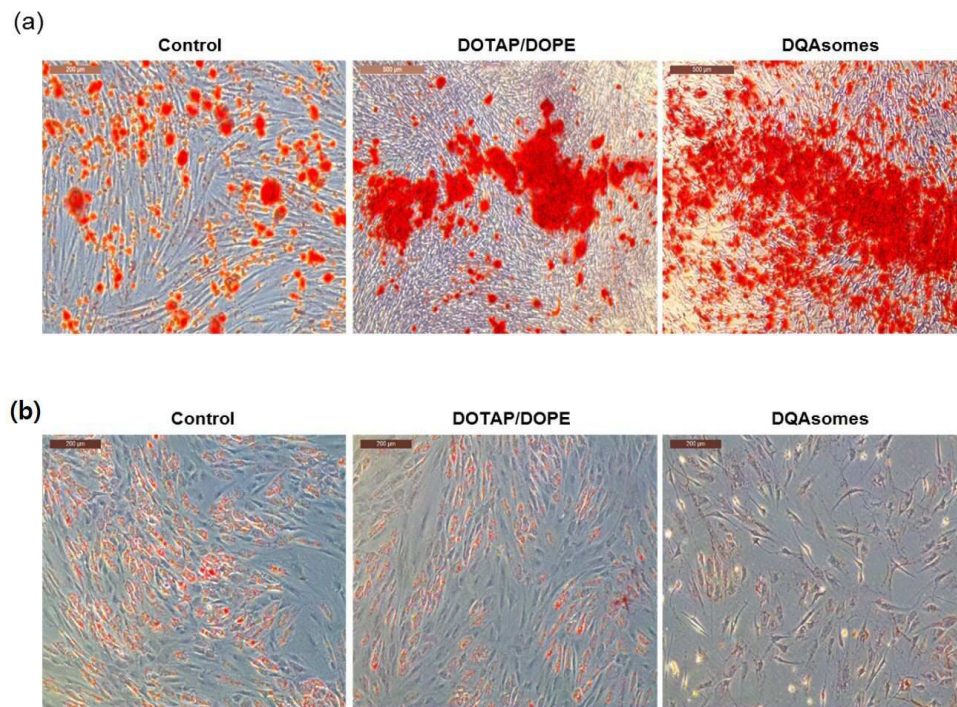
도면4



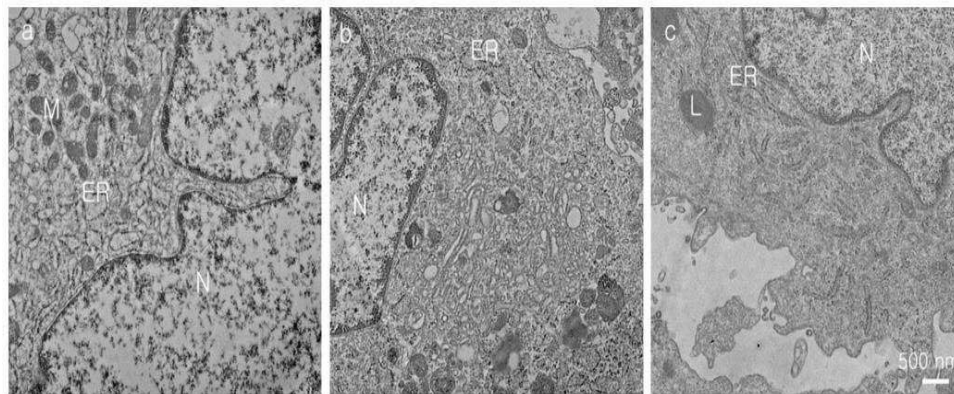
도면5



도면6



도면7



도면8

