



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0005546
(43) 공개일자 2018년01월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 9/127 (2006.01) A61K 47/46 (2017.01)
A61K 48/00 (2006.01) A61K 8/14 (2006.01)
A61K 8/64 (2006.01) A61K 9/00 (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 9/127 (2013.01)
A61K 47/46 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2016-0085771

(22) 출원일자 2016년07월06일

심사청구일자 2017년07월10일

(71) 출원인

인천대학교 산학협력단

인천광역시 연수구 아카데미로 119 (송도동)

(72) 발명자

이원중

인천광역시 연수구 아카데미로 119, 생명공학부
29호관 511호(송도동, 인천대학교)

정승아

인천광역시 연수구 아카데미로 119, 생명공학부
29호관 511호(송도동, 인천대학교)

(74) 대리인

차준용

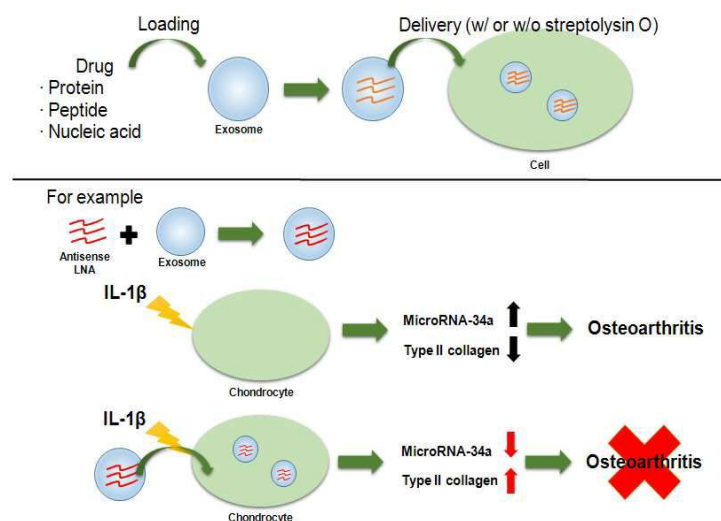
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 약물 이 탑재된 엑소좀 또는 나노베지클을 이용한 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 약물이 탑재된 엑소좀 또는 나노베지클을 이용한 약학적 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 생체 재료인 엑소좀(Exosome)과 이와 유사한 세포로부터 만들어 낸 나노베지클(나노소포체; Nanovesicle)에 유효 약물을 탑재하고 이를 관심질환의 대상세포에 전달함으로써, 다양한 질환에 대해 그 치료 효율을 극대화하면서 부작용은 최소화할 수 있는, 엑소좀 또는 나노베지클을 운반체로 사용한 새로운 질병 치료용 약학적 조성물, 질병 치료방법, 및 이를 포함하는 화장료 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 48/00 (2013.01)

A61K 8/14 (2013.01)

A61K 8/64 (2013.01)

A61K 9/0019 (2013.01)

A61Q 19/00 (2013.01)

A61K 2800/413 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

포유동물 세포로부터 만들어진 엑소좀(Exosome) 또는 나노베지클(Nanovesicle)을 포함하는 약학적 조성물로서, 상기 엑소좀 또는 나노베지클의 내부에는 대상질환을 치료, 억제 또는 예방하기 위한 약물이 탑재>Loading)되어 있으며,

상기 약물은 상기 엑소좀 또는 나노베지클을 운반체로 하여, 대상질환과 관련된 대상세포에 전달되는 것임을 특징으로 하는,

약물이 탑재된 엑소좀 또는 나노베지클을 이용한 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 엑소좀 및 나노베지클은 HEK293T 세포, HUVEC(Human umbilical vein endothelial cell), MSC(Mesenchymal stem cell), ESC(Embryonic stem cell) 또는 DC(Dendritic cell)로부터 만들어진 것임을 특징으로 하는,

약물이 탑재된 엑소좀 또는 나노베지클을 이용한 약학적 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 엑소좀은 HEK293T 세포를 엑소좀이 제거된 FBS(Fetal bovine serum)를 포함한 배지에서 배양한 후 분리함으로써 획득되는 것임을 특징으로 하는,

약물이 탑재된 엑소좀 또는 나노베지클을 이용한 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 약물은 단백질, 펩타이드 및 핵산 중에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는,

약물이 탑재된 엑소좀 또는 나노베지클을 이용한 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 대상질환은 골관절염(Osteoarthritis)이고, 상기 대상세포는 연골세포(Chondrocyte)인 것을 특징으로 하는,

약물이 탑재된 엑소좀 또는 나노베지클을 이용한 약학적 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 약물은 안티센스 LNA(Locked nucleic acid)이고, 상기 안티센스 LNA는 microRNA-34a와 결합하여 이를 작동 못하게 하는 것임을 특징으로 하는,

약물이 탑재된 엑소좀 또는 나노베지클을 이용한 약학적 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 안티센스 LNA는 하기 서열번호 1로 표시되는 것임을 특징으로 하는,

약물이 탑재된 엑소좀 또는 나노베지클을 이용한 약학적 조성물:

[서열번호 1]

5'-Cy3-ACAACCAGCTAAGACACTGCCA-3'.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 약학적 조성물은 경구, 직장 내, 혈관 내, 근육 내, 피하, 자궁 내, 뇌혈관 내 또는 뇌실 내로 투여되는 것을 특징으로 하는,

약물이 탑재된 엑소좀 또는 나노베지클을 이용한 약학적 조성물.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른, 약물이 탑재된 엑소좀 또는 나노베지클을 이용한 약학적 조성물을 포함하는,

주사제.

청구항 10

포유동물 세포로부터 만들어진 엑소좀(Exosome) 또는 나노베지클(Nanovesicle)을 포함하는 화장품 조성물로서,

상기 엑소좀 또는 나노베지클의 내부에는 피부조직을 재생하기 위한 약물이 탑재(Loaded)되어 있으며,

상기 약물은 상기 엑소좀 또는 나노베지클을 운반체로 하여 피부세포에 전달되는 것임을 특징으로 하는,

약물이 탑재된 엑소좀 또는 나노베지클을 이용한 화장품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 약물이 탑재된 엑소좀 또는 나노베지클을 이용한 약학적 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 생체 재료인 엑소좀(Exosome)과 이와 유사한 세포로부터 만들어 낸 나노베지클(나노소포체; Nanovesicle)에 유효 약물을 탑재하고 이를 관심질환의 대상세포에 전달함으로써, 다양한 질환에 대해 그 치료 효율을 극대화하면서 부작용은 최소화할 수 있는, 엑소좀 또는 나노베지클을 운반체로 사용한 새로운 질병 치료용 약학적 조성물, 질병 치료방법, 및 이를 포함하는 화장품 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 골관절염(Osteoarthritis)은 고령에서 흔히 나타나는 질환 중 하나로 연골의 점진적인 손상이나 퇴행성 변화로 인해 염증과 통증이 생기는 질환이다. 골관절염은 주로 II형 콜라겐(Type II collagen)과 프로테오글리칸(Proteoglycan), 아그레칸(Aggregan)과 같은 세포외 기질의 합성과 분해 사이 불균형으로 인해 유발되나, 이와 관련한 정확한 발병 원인은 잘 알려져 있지 않으며, 나이, 비만 및 유전적 요소들 또한 이에 영향을 주는 것으로 여겨지고 있다.
- [0003] 골관절염의 발병은 microRNA(miRNA)와도 관련되어 있다. miRNA는 19~22개의 뉴클레오타이드(Nucleotide)로 이루어진 small non-coding RNA로서 특정 mRNA와 결합하여 번역을 조절하는 역할을 한다. 특히 miRNA-34a(miR-34a)의 경우 p53에 의해 조절되고 유전자 발현의 재편성을 야기시키며 세포사멸을 촉진하는 작용을 한다. 따라서 miR-34a를 침묵시키는 것은 골관절염 발병을 억제시킬 수 있는 새로운 방법이 된다.
- [0004] 현재 골관절염의 치료에는 자가 연골 이식방법을 포함한 재생치료법과 세포가 없는 지지체를 이용하는 방법 등이 사용되고 있다. 그러나 이러한 방법들은 비용 대비 효능이 낮다는 단점이 존재한다. 따라서 전술한 바와 같이 특정 miRNA를 침묵시키는 방법이 골관절염 발병을 억제하는 효과적인 치료법이 될 수 있으며, miRNA를 억제하기 위해 잠금 핵산(Locked nucleic acid; LNA)의 사용이 고려될 수 있다.
- [0005] 엑소좀(Exosome)이란 30~100 nm의 크기를 갖는 작은 세포막성 수포로서 다양한 세포에서 분비되며 혈액, 소변, 침 등과 같은 체액에서 발견된다. 이러한 엑소좀은 특정 조직을 표적할 수 있으며 세포막을 투과할 수 있기 때문에 새로운 약물 전달체로 사용될 수 있다.
- [0006] 이에, 엑소좀과 같은 생체유래 물질을 적극 활용한 것으로서, 골관절염을 비롯한 다양한 질환에 대해 그 치료 효율을 극대화할 수 있는 새로운 치료제 및 치료방법에 대한 개발이 요구되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0007] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1629151호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명은 상기와 같은 종래의 요구를 충족시키기 위한 것으로, 인간 등 포유동물유래 생체 재료인 엑소좀 또는 나노베지클을 유효 약물을 대상세포에 전달하기 위한 운반체로 사용하는 새로운 접근법을 제공함을 기술적 과제로 한다.
- [0009] 구체적으로, 본 발명자들은 생체유래 물질인 엑소좀을 약물 전달체로 하여 miR-34a를 침묵시킬 수 있는 안티센스 LNA를 이에 탑재하고 세포에 전달하면 Type II collagen의 발현이 유지되고 miR-34a의 발현이 침묵되어 골관절염이 억제될 것으로 예측하고 예의 실험을 진행하였다.
- [0010] 그 결과, miR-34a를 침묵시키는 LNA가 엑소좀 내에 탑재되는 것을 확인하였고, 또한 이러한 엑소좀이 세포에 전달됨에 따라 실제로 Type II collagen의 양이 유지되고 miR-34a의 발현이 침묵되는 것을 구체적으로 확인하였다.
- [0011] 엑소좀 또는 나노베지클에 약물을 탑재하는 본 발명의 이러한 새로운 접근법은 골관절염뿐만 아니라 다양한 질환의 치료용으로 광범위하게 적용될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0012] 상기한 기술적 과제를 달성하고자, 본 발명은
- [0013] 포유동물 세포로부터 만들어진 엑소좀(Exosome) 또는 나노베지클(Nanovesicle)을 포함하는 약학적 조성물로서,
- [0014] 상기 엑소좀 또는 나노베지클의 내부에는 대상질환을 치료, 억제 또는 예방하기 위한 약물이 탑재(Load)되어

있으며,

- [0015] 상기 약물은 상기 엑소좀 또는 나노베지클을 운반체로 하여, 대상질환과 관련된 대상세포에 전달되는 것임을 특징으로 하는,
- [0016] 약물이 탑재된 엑소좀 또는 나노베지클을 이용한 약학적 조성물을 제공한다.
- [0017] 즉, 본 발명은 다양한 대상질환을 치료하기 위한 각종 유효 약물(의약품)을 세포유래 물질인 엑소좀 또는 나노베지클에 탑재(삽입)하여 대상세포에 전달, 즉 엑소좀 또는 나노베지클을 약물 운반체로 사용하는 최초의 개념을 선보인다. 여기서 상기 엑소좀(Exosome)은 세포에서 자연스럽게 만들어지는 세포유래 물질이고, 상기 나노베지클(나노소포체; Nanovesicle)은 세포로부터 강제적으로 뽑아내어 만들어 낸 세포유래 물질로서 세포밖소포체를 모사한 나노미터 크기의 베지클이다.
- [0018] 본 발명에 있어서, 약물 운반체로 사용되는 상기 엑소좀 또는 나노베지클은 임의의 모든 종류의 포유동물 세포(바람직하게는, 인간 세포)로부터 분리되거나 만들어진 것일 수 있으며, 예를 들어 HEK293T 세포, HUVEC(Human umbilical vein endothelial cell), MSC(Mesenchymal stem cell), ESC(Embryonic stem cell) 또는 DC(Dendritic cell)로부터 분리되거나 만들어진 것일 수 있다. 일 구체예로 상기 엑소좀은 HEK293T 세포를 엑소좀이 제거된 FBS(Fetal bovine serum)를 포함한 배지에서 배양한 후 분리함으로써 수득되는 것일 수 있다.
- [0019] 상기 약물은 대상질환을 치료하기 위한 유효성분으로서, 대상질환에 대해 약리학적 활성을 갖는 다양한 단백질, 펩타이드 및 핵산 중 선택된 하나 이상일 수 있다. 여기서 상기 핵산은 DNA, mRNA, miRNA, snoRNA, snRNA, rRNAs, tRNAs, siRNA, hnRNA 및 shRNA를 모두 아우르는 개념으로 사용된다. 또한 각종 약리학적 활성을 갖는 화합물도 본 발명에서의 약물(의약품)의 범주에 포함된다.
- [0020] 또한, 상기 약물은 필요시 SLO(Streptolysin O)를 사용하여 엑소좀(또는 나노베지클) 내부로 도입될 수 있다. 이때 SLO는 엑소좀(또는 나노베지클)의 콜레스테롤에 달라붙어 콜레스테롤을 밀어내어 세포 표면에 구멍을 뚫어 주는 역할을 하는바, 약물의 탑재가 보다 용이해진다.
- [0021] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 대상질환은 골관절염(Osteoarthritis)이고, 상기 대상세포는 연골세포(Chondrocyte)일 수 있으며, 이 경우 약물로는 안티센스 LNA(Locked nucleic acid), 예컨대 하기 서열번호 1로 표시되는 안티센스 LNA가 사용될 수 있다.
- [0022] [서열번호 1]
- [0023] 5'-Cy3-ACAACCAGCTAAGACACTGCCA-3'
- [0024] 골관절염을 치료하기 위해서는 연골세포 miRNA-34a의 과발현에 의한 세포 활성의 저하 및 Type II collagen의 합성량 감소를 억제해야 하는데, 본 발명에서는 엑소좀에 miRNA-34a를 저해할 수 있는 안티센스 LNA를 탑재하고 이를 연골세포에 전달하였으며, 그 결과 안티센스 LNA가 microRNA-34a와 상보적으로 결합(간섭)하고 microRNA-34a가 작동 못하게 되어 위 현상들이 효과적으로 억제되었다(도 1).
- [0025] 본 발명의 약물이 탑재된 엑소좀 또는 나노베지클을 이용한 약학적 조성물에는 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체가 더 포함될 수 있다. 예를 들어 주사제의 경우에는 보존제, 무통화제, 가용화제 또는 안정화제 등이, 국소 투여용 제제의 경우에는 기제(Base), 부형제, 윤활제 또는 보존제 등이 추가로 포함될 수 있다.
- [0026] 또한, 본 발명의 약물이 탑재된 엑소좀 또는 나노베지클을 이용한 약학적 조성물은 약학적 분야에서 통상의 방법에 따라 개체의 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 등을 들 수 있다. 이때 상기 주사용 앰플은 사용 직전에 주사액과 혼합 조제할 수 있으며, 주사액으로는 생리 식염수, 포도당, 링거액 등을 사용할 수 있다.
- [0027] 또한, 본 발명의 약물이 탑재된 엑소좀 또는 나노베지클을 이용한 약학적 조성물은 개체에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 예를 들어 인간 등의 포유동물의 경구, 직장 내, 혈관 내(정맥, 동맥 등), 근육 내, 피하, 자궁 내, 뇌혈관 내 또는 뇌실 내로 투여(예컨대, 주사 투여)될 수 있다.
- [0028] 또한, 본 발명에 따른 약학적 조성물의 바람직한 투여량은 개체의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여 경로 및 기간에 따라 다르며, 통상의 기술자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.

- [0029] 아울러, 본 발명의 약학적 조성물은 대상질환의 치료를 위해 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용될 수 있다.
- [0030] 본 발명의 다른 측면에 따르면,
- [0031] 포유동물 세포로부터 만들어진 엑소좀(Exosome) 또는 나노베지클(Nanovesicle)을 포함하는 화장료 조성물로서,
- [0032] 상기 엑소좀 또는 나노베지클의 내부에는 피부조직을 재생하기 위한 약물이 탑재(Loaded)되어 있으며,
- [0033] 상기 약물은 상기 엑소좀 또는 나노베지클을 운반체로 하여 피부세포에 전달되는 것임을 특징으로 하는,
- [0034] 약물이 탑재된 엑소좀 또는 나노베지클을 이용한 화장료 조성물이 제공된다.
- [0035] 즉, 본 발명의 약물이 탑재된 엑소좀 또는 나노베지클은 질병 치료제 등 약학적 조성물과 더불어, 인간의 손상된 피부를 재생하거나 보호하기 위한 다양한 기능성 화장품의 소재가 될 수 있다.
- [0036] 본 발명의 화장료 조성물은 약물(예컨대, Epidermal Growth Factor; EGF)이 탑재된 엑소좀(또는 나노베지클) 외에 지방 물질, 유기용매, 용해제, 농축제, 겔화제, 연화제, 항산화제, 현탁화제, 안정화제, 발포제(Foaming agent), 방향제, 계면활성제, 물, 이온형 또는 비이온형 유화제, 충전제, 금속이온봉쇄제, 킬레이트화제, 보존제, 비타민, 차단제, 습윤화제, 필수 오일, 염료, 안료, 친수성 또는 친유성 활성제, 지질소낭 등 화장품에 통상적으로 사용되는 임의의 다른 성분이 더 포함될 수 있다.
- [0037] 또한, 본 발명의 화장료 조성물의 외형은 화장품학 또는 피부과학적으로 허용가능한 매질 또는 기체를 함유한다. 이는 국소적용에 적합한 모든 제형으로서, 예컨대 용액, 겔, 고체, 반죽 무수 생성물, 수상에 유상을 분산시켜 얻은 에멀전, 현탁액, 마이크로에멀전, 마이크로캡슐, 미세과립구 또는 이온형(리포솜) 및 비이온형의 소낭 분산제의 형태로 제공될 수 있으며, 이들 제형은 당분야의 통상적인 방법에 따라 제조될 수 있다.
- [0038] 아울러, 본 발명의 화장료 조성물에서 상기 약물이 탑재된 엑소좀 또는 나노베지클은 전체 조성물 100 중량부에 대해 0.0001~10 중량부 정도로 포함될 수 있다.

발명의 효과

- [0039] 본 발명은 종래의 세포 치료 내지 조직공학적 접근과는 전혀 다른, 인간 등 포유동물의 생체유래 물질인 엑소좀(Exosome) 또는 나노베지클(Nanovesicle)을 약물의 운반체로 사용한 새로운 기술로서, 질병의 치료 효율을 극대화하면서 그 부작용은 극소화할 수 있는 장점이 있다.
- [0040] 또한, 본 발명은 LNA 이외의 다양한 약물 내지 의약품을 엑소좀 또는 나노베지클에 탑재하여 운반할 수 있는바, 연골세포 이외의 대상세포 및 골관절염 이외의 다양한 질병들에 대해서도 포괄적으로 적용될 수 있는 범용성을 지닌다.

도면의 간단한 설명

- [0041] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따라 엑소좀에 안티센스 LNA를 탑재하여 연골세포에 전달한 경우, 골관절염이 억제되는 메커니즘을 보여주는 전체 모식도이다.
- 도 2는 소 연골세포에 IL-1 β 를 농도별로 처리한 경우와 처리하지 않은 경우, 세포 성장 속도를 비교하여 나타낸 그래프이다.
- 도 3은 안티센스 LNA를 트랜스펙션한 경우와 하지 않은 경우, 소 연골세포에서 IL-1 β 에 의한 COL2A1의 양 감소를 비교하여 나타낸 그래프이다.
- 도 4는 안티센스 LNA가 세포에 침투되는지 여부를 확인시켜 주는 도면이다.
- 도 5는 안티센스 LNA가 탑재된 엑소좀이 세포에 전달되는지 여부를 확인시켜 주는 도면이다.
- 도 6은 안티센스 LNA가 탑재된 엑소좀의 경우와 안티센스 LNA가 탑재되지 않은 경우, COL2A1의 양이 유지되는지 여부를 비교하여 나타낸 그래프이다.
- 도 7은 안티센스 LNA가 탑재된 엑소좀의 경우와 안티센스 LNA가 탑재되지 않은 경우, miR-34a의 발현 수준을 비교하여 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0042] 이하, 실시예 및 실험예를 통해 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다. 그러나 이들 예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐 어떠한 의미로든 본 발명의 범위가 이들 예로 한정되는 것은 아니다.
- [0043] **실시예 및 실험예**
- [0044] **1. 엑소좀 분리를 위한 세포 배양**
- [0045] 1) 인간 배아 신장 세포주인 HEK293T 세포를 10% FBS(Fetal bovine serum)가 포함된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium) 배지에서 배양하였다. HEK293T 세포의 엑소좀에는 다른 세포의 엑소좀에 비해 DNA, RNA 등 유전 물질이 상대적으로 적게 존재하여 더 많은 물질을 엑소좀 내로 로딩할 수 있다.
- [0046] 2) 세포를 처음 웰(Well)에 씨딩(Seeding)하여 배양할 때, 엑소좀이 제거된 FBS를 포함한 DMEM 배지를 사용하였다. 이는 FBS에도 무수히 많은 엑소좀이 존재하기 때문에 이를 제거해 주어야만 HEK293T 세포로부터 나온 엑소좀만을 분리할 수 있기 때문이다.
- [0047] 3) 엑소좀이 없는 FBS는 다음과 같이 제작하였다.
- [0048] 먼저, FBS를 초고속 원심분리기가 가능한 폴리알로머(Polyallomer) 튜브에 옮겼다. 이후 이것을 초고속 원심분리기(Beckman coulter 사, Optima™, TLA-100.3)를 이용하여 4℃, 120,000 g에서 10시간 동안 원심분리하였다. 이어서 상층액을 0.2 μm 시린지 필터(Syringe filter)를 이용하여 여과하였다. 여과된 엑소좀이 제거된 FBS는 4℃에 보관하여 필요할 때 배지에 10%로 첨가하여 사용하였다.
- [0049] 4) 엑소좀이 제거된 FBS를 포함한 DMEM 배지를 사용하여 세포를 씨딩한 뒤, 37℃의 CO₂ 인큐베이터에서 72시간 동안 배양하였고, 이후 배지를 수거하여 엑소좀 분리에 사용하였다.
- [0050] **2. 세포 배양액으로부터 엑소좀의 분리**
- [0051] 1) HEK293T 세포로부터 엑소좀은 SBI사의 ExoQuick-TC™ kit(from tissue culture exosome precipitation solution media)를 사용하여 분리하였다. 엑소좀 분리방법은 다음과 같다.
- [0052] 2) 100 mm 디쉬(Dish)에서 배양된 HEK293T 세포 배양에서 수거된 배지를 상온, 3,000 g에서 15분 동안 원심분리를 하였다. 상층액을 ExoQuick-TC™ 시약(SBI, Cat. No: EXOTC50A-1)과 5대 1의 부피 비율로 섞었다. 균일한 용액이 되도록 잘 섞어준 후, 이것을 4℃에서 0/N 인큐베이션시켰다. 다음날 상온 1,500 g에서 30분 원심분리를 하였다. 가능한 완전하게 상층액을 제거한 뒤, 상온 1,500 g에서 5분간 추가적으로 원심분리를 하였다. 엑소좀이 있는 펠렛(Pellet)에 100 μL의 PBS를 첨가하여 재현탁하였다.
- [0053] **3. 소 연골세포(Bovine chondrocyte cell)에서의 IL-1β 영향 확인**
- [0054] 1) 염증성 사이토카인(Cytokine)인 인터루킨-1베타(IL-1β)를 세포에 처리함으로써 microRNA-34a(miR-34a)의 발현을 유도할 수 있었다. miR-34a 양이 증가함에 따라 세포의 아포토시스(Apoptosis)가 유발되며 이는 골관절염(OA) 발병의 주요한 요인 중 하나로 알려져 있다.
- [0055] 2) 먼저 miR-34a의 발현량을 확인하기 전 IL-1β(Thermo scientific, USA) 자체가 세포에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위한 실험을 진행하였다.
- [0056] 3) 24 웰에 세포를 2×10^4 cell/cm² 농도로 씨딩한 뒤, 24시간 후 IL-1β를 0 ng/mL, 1 ng/mL, 10 ng/mL의 농도로 처리하였다. IL-1β를 처리한 시점으로 24, 48, 72시간 후 세포 계수(Cell counting)를 진행하여 세포 성장 속도를 비교하였다.
- [0057] 4) 그 결과, IL-1β를 처리하지 않은 대조군(Control), 즉 0 ng/mL에 비해 1 ng/mL, 10 ng/mL의 농도를 처리한 경우 세포의 성장 속도가 더 느린 것을 확인할 수 있었다(도 2).
- [0058] **4. IL-1β 처리에 따른 소 연골세포에서의 COL2A1 발현량 확인**
- [0059] 1) OA가 유발되었을 때 COL2A1이 감소하고 miR-34a가 증가하게 되는데, 이를 확인하기 위해 *in vitro* 상에서 소 연골세포에 IL-1β를 처리한 뒤, 실시간 PCR(Real-time PCR)을 통해 분석하였다.

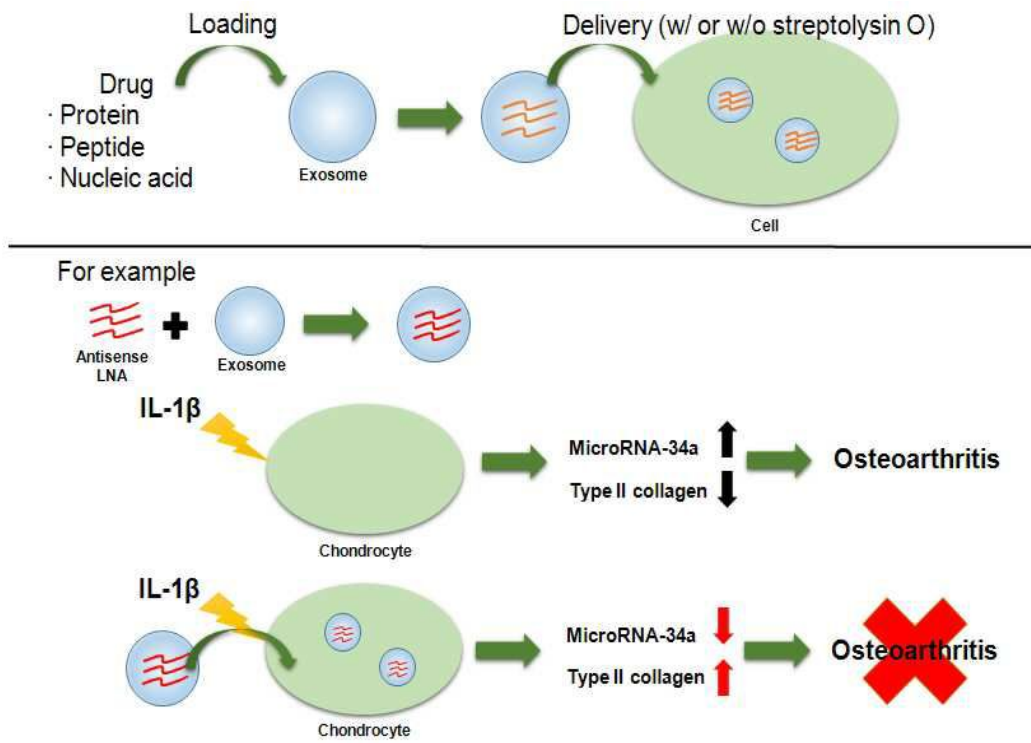
- [0060] 2) 먼저, 24 웰에 소 연골세포를 2×10^4 cell/cm² 농도로 씨딩하고 24시간 후 1 ng/mL 농도의 IL-1 β 를 처리하였으며 대조군으로 사용된 세포에는 IL-1 β 를 처리하지 않았다.
- [0061] 3) IL-1 β 를 처리하고 24시간 후 RNeasy mini Kit(Qiagen, Germany)를 사용하여 제작사의 매뉴얼에 따라 RNA를 추출 및 분리하고, 나노드롭(Nanodrop)(Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA)을 사용하여 RNA의 양 및 순도를 측정하였다.
- [0062] 4) COL2A1의 발현량을 확인하기 위한 실험은 ReverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix with gDNA Remover(TOYOBO, Japan)를 사용하여 prep한 RNA를 cDNA로 역전사하여 합성한 뒤, 실시간 PCR을 진행하여 수행하였다. PCR 반응 조건으로, 변성(Denaturation)은 96℃에서 15초, 어닐링(Annealing)은 60℃에서 20초, 익스텐션(Extension)은 72℃에서 40초 동안 총 40 사이클을 수행하였다.
- [0063] 5) 그 결과, IL-1 β 에 의해 소 연골세포에서 COL2A1이 감소되는 것을 확인할 수 있었다(도 3).
- [0064] **5. 소 연골세포에 안티센스 LNA 트랜스펙션(Transfection)을 통한 COL2A1의 발현량 확인**
- [0065] 1) OA 유발과 연관되어 있는 miR-34a의 억제를 보기 위하여 제작된 안티센스 LNA를 트랜스펙션 시약을 통해 그 효율을 확인하는 실험을 진행하였다.
- [0066] 2) 먼저, 24 웰에 소 연골세포를 2×10^4 cell/cm² 농도로 씨딩하고 24시간 후 200 nM 농도의 안티센스 LNA를 jetprime[®](Polyplus-transfection Inc., USA)을 사용하여 세포에 트랜스펙션하였다. 안티센스 LNA는 합성(Integrated DNA Technologies, Inc)하여 사용하였으며, 그 서열은 Cy3'/ A {C}A A{C}C {A}G{C} TAA {G}A{C} A{C}T {G}CC A- 3'였다. 대조군에는 안티센스 LNA를 처리하지 않고 트랜스펙션 시약만을 처리하였다.
- [0067] 3) 24시간 후 RNeasy mini Kit를 사용하여 제작사의 매뉴얼에 따라 RNA를 추출 및 분리하고, 나노드롭을 사용하여 RNA의 양 및 순도를 측정하였다.
- [0068] 4) COL2A1의 발현량을 확인하기 위한 실험은 ReverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix with gDNA Remover를 사용하여 prep한 RNA를 cDNA로 역전사하여 합성한 뒤, 실시간 PCR을 진행하여 수행하였다. PCR 반응 조건으로, 변성(Denaturation)은 96℃에서 15초, 어닐링(Annealing)은 60℃에서 20초, 익스텐션(Extension)은 72℃에서 40초 동안 총 40 사이클을 수행하였다.
- [0069] 5) 그 결과, 안티센스 LNA를 트랜스펙션한 경우 대조군과 달리 COL2A1의 양이 유지되는 것을 확인할 수 있었다(도 3).
- [0070] **6. 안티센스 LNA 자체의 세포 침투(Cell penetration) 여부 확인**
- [0071] 1) 안티센스 LNA가 소 연골세포에 침투(투과)되는지 확인하기 위한 실험을 진행하였다.
- [0072] 2) 세포 배양 슬라이드(Cell culture slide) 4 웰(SPL, 30104)에 소 연골세포를 5×10^4 cell/cm² 농도로 씨딩한 뒤 24시간 후 1 μ M 안티센스 LNA를 처리하였다.
- [0073] 3) 37℃에서 6시간 후 형광현미경을 통해 살펴본 결과, 안티센스 LNA가 세포에 침투되는 것을 확인하였다(도 4).
- [0074] **7. 안티센스 LNA가 탑재된 엑소좀의 세포 전달 확인**
- [0075] 1) 안티센스 LNA가 탑재된 엑소좀이 소 연골세포에 전달되는지 여부를 확인하기 위한 실험을 진행하였다.
- [0076] 2) 1 μ M 안티센스 LNA와 엑소좀, 대조군으로서 1 μ M 안티센스 LNA만 존재하는 에펜도르프 튜브(Eppendorf tube)를 37℃에서 2시간 반응시킨 뒤, 초고속 원심분리가 가능한 폴리알로머 튜브에 옮겼다. 초고속 원심분리기를 이용하여 4℃, 100,000 g에서 2시간 원심분리를 진행하였다.
- [0077] 3) 폴리알로머 튜브에 존재하는 상층액을 제거한 뒤, 여과(Filtration)된 1X Nuclease free PBS 1 mL를 첨가하여 세척 과정을 거쳤다. 여과된 1X Nuclease free PBS에 대조군과 엑소좀을 재현탁시킨 뒤 형광측정장치(Thermo scientific 사, Varioskan[™], Flash Multimode Reader)를 통해 여기(Excitation) 파장 550 nm, 방출(Emission) 파장 570 nm에서 형광을 측정하였다.
- [0078] 4) 형광 측정 후, 안티센스 LNA가 탑재된 엑소좀이 세포에 전달되는지 확인하기 위하여 다음 실험을

진행하였다.

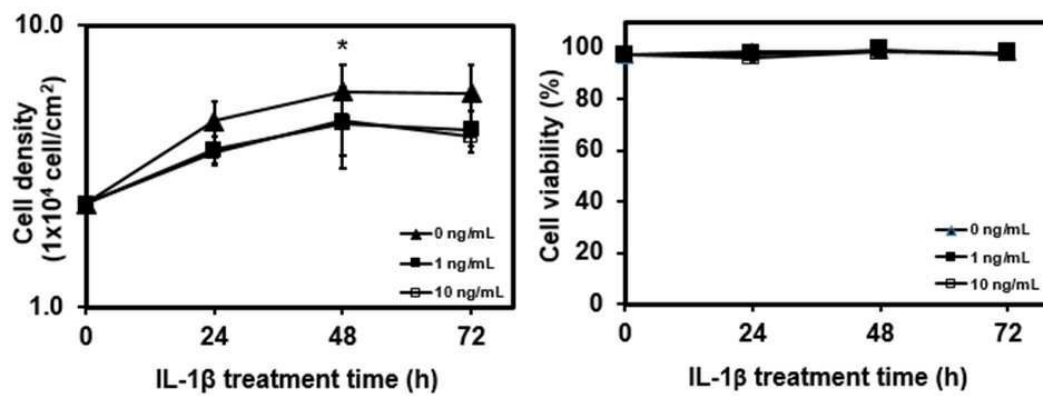
- [0079] Chambered Coverglass 4 well(NUNC™ Lab-Tek® chambered coverglass, 155383)에 소 연골세포를 5×10^4 cell/cm² 농도로 씨당한 뒤 24시간 후 안티센스 LNA가 탑재된 엑소솜과 세포를 37℃에서 6시간 동안 공배양(Co-culture)하였다. Confocal을 통해 엑소솜이 세포에 전달되는 것을 확인하였다(도 5).
- [0080] **8. 안티센스 LNA가 탑재된 엑소솜에 의한 소 연골세포의 COL2A1과 miR-34a의 발현량 확인**
- [0081] 1) 안티센스 LNA가 탑재된 엑소솜이 소 연골세포에 전달되어 안티센스의 기능을 제대로 발휘하는지 확인하기 위한 실험을 진행하였다.
- [0082] 2) 소 연골세포를 24 웰에 2×10^4 cell/cm² 농도로 씨당하고 24시간 후 각각의 웰에 안티센스 LNA가 탑재된 엑소솜, 안티센스 LNA가 없는 엑소솜 자체를 처리하였다. 24시간 후 0, 1 ng/mL의 IL-1 β 를 처리하고, 24시간 후 RNeasy mini Kit를 사용하여 제작사의 매뉴얼에 따라 RNA를 추출 및 분리하고, 나노드롭을 사용하여 RNA의 양 및 순도를 측정하였다.
- [0083] 3) COL2A1의 발현량을 확인하기 위한 실험은 ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover를 사용하여 prep한 RNA를 cDNA로 역전사하여 합성한 뒤, 실시간 PCR을 진행하여 수행하였다. PCR 반응 조건으로, 변성(Denaturation)은 96℃에서 15초, 어닐링(Annealing)은 60℃에서 20초, 익스텐션(Extension)은 72℃에서 40초 동안 총 40 사이클을 수행하였다.
- [0084] 4) miR-34a의 발현량 확인은 miScript II RT Kit를 이용하여 cDNA를 합성한 뒤, 실시간 PCR을 진행하여 수행하였다. PCR 반응 조건으로, 변성(Denaturation)은 94℃에서 15초, 어닐링(Annealing)은 55℃에서 30초, 익스텐션(Extension)은 70℃에서 35초 동안 총 40 사이클을 수행하였다.
- [0085] 5) 그 결과, 안티센스 LNA가 탑재된 엑소솜의 경우 안티센스 LNA가 탑재되지 않은 경우와 달리 IL-1 β 를 처리하지 않은 대조군과 유사하게 COL2A1의 발현량이 유지되고(도 6), miR-34a의 발현이 낮은 것(도 7)을 확인할 수 있었다.
- [0086] 6) 요컨대, 안티센스 LNA가 탑재된 엑소솜이 세포에 전달되어 특정 miRNA의 발현을 억제하였는바, 이를 통해 OA의 유발을 효과적으로 저해시킬 수 있으며, 운반체로서 나노베지클을 사용하는 경우 역시 같은 효과를 발휘할 것으로 여겨진다.

도면

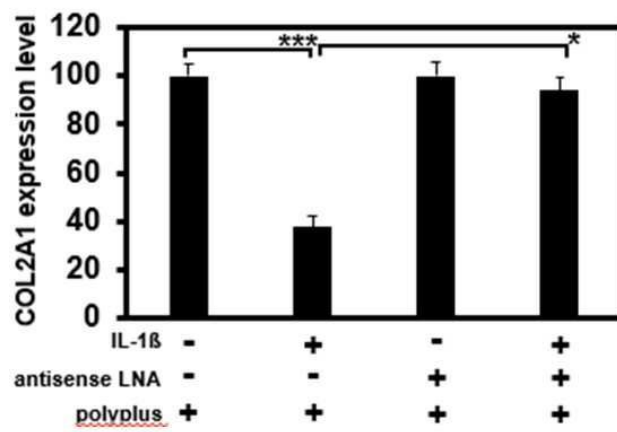
도면1



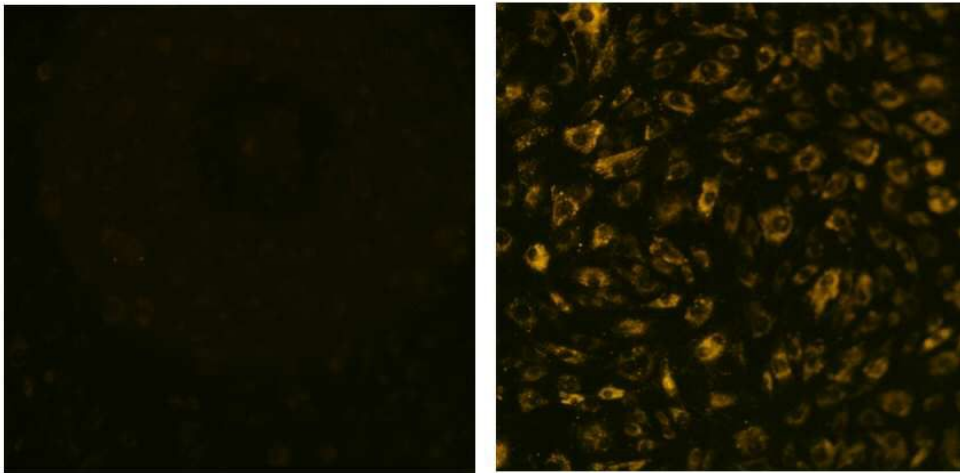
도면2



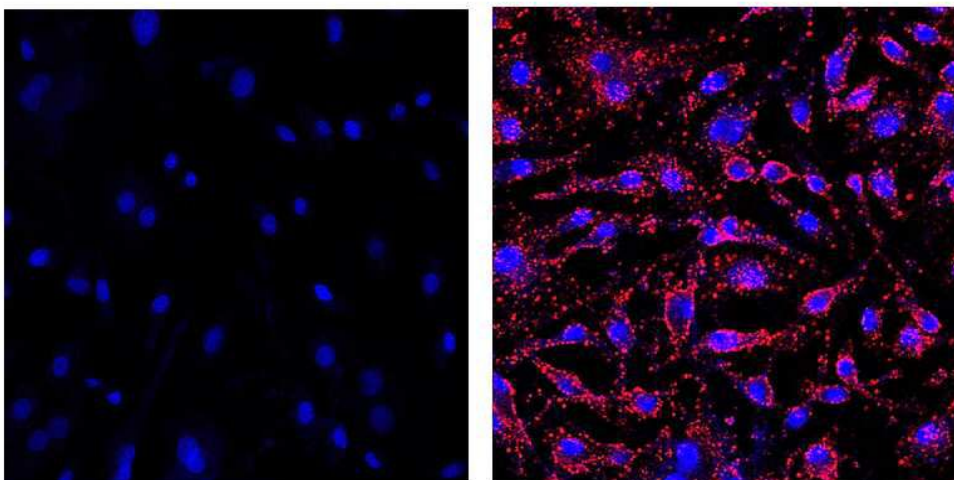
도면3



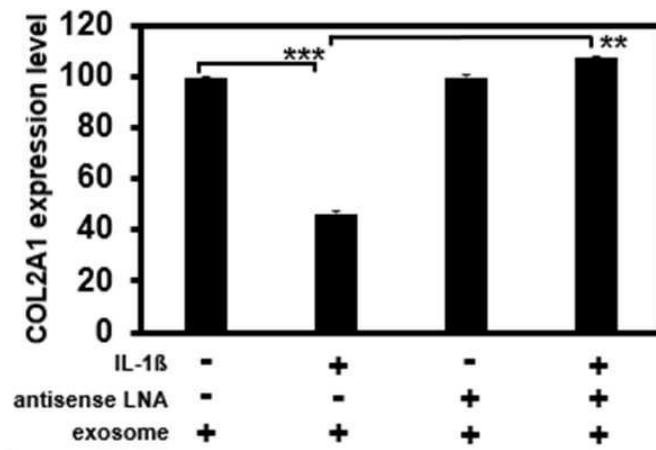
도면4



도면5



도면6



도면7

