

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2024-0150286
(43) 공개일자 2024년10월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/31 (2006.01) *A61P 17/02* (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 36/31 (2013.01)*A61P 17/02* (2018.01)

(21) 출원번호 10-2023-0046388

(22) 출원일자 2023년04월07일

심사청구일자 2023년04월07일

(71) 출원인

인천대학교 산학협력단

인천광역시 연수구 갯벌로 27, 인천대학교 이노베이션센터(송도동)

(72) 발명자

이원중

세종특별자치시 나성북1로 51, 603동 2003호(나성동, 나룻재마을 6단지)

강수진

경기도 안산시 상록구 안산천서로4길 14, 402호(월피동, 중앙맨션)

(74) 대리인

특허법인이룸리온

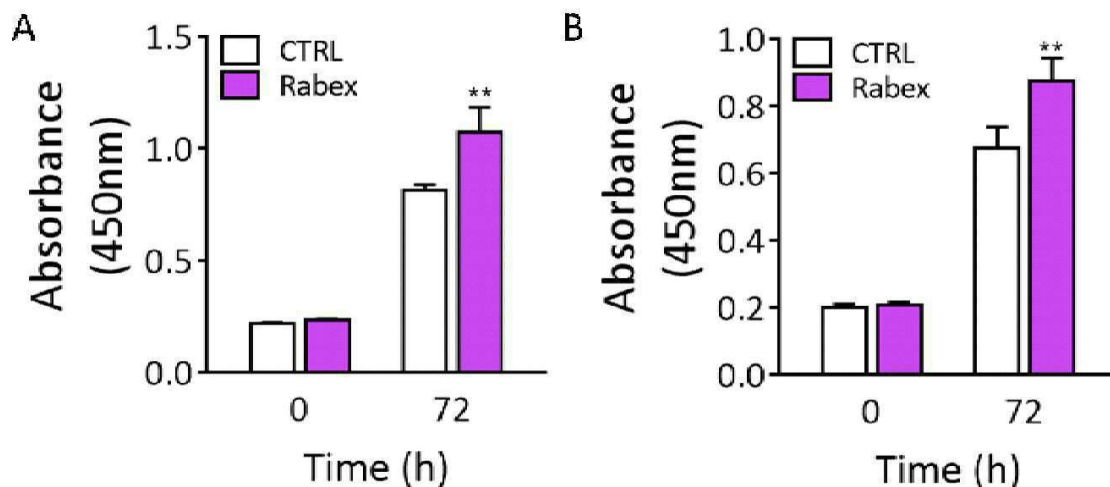
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 적체 유래 세포막 소포체를 유효성분으로 포함하는 피부 상처의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 적체 유래 세포막 소포체를 유효성분으로 포함하는 피부 상처의 예방, 치료 또는 개선용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 적체 유래 세포막 소포체가 세포의 증식 및 이동을 촉진하는 것에 의해 상처의 초기 치료 속도를 증가시켜 피부 상처 치료에 효과적인 상처 치료용 조성물을 제공한다.

대표도 - 도3



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711188699
과제번호	2022R1A2C1091989
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초 중견연구자지원
연구과제명	식물 세포막소포체 생산 공정 및 엔지니어링 플랫폼 기술 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	인천대학교 산학협력단
연구기간	2022.09.01 ~ 2027.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

적체에서 유래된 세포막 소포체(Rabex)를 유효성분으로 포함하는, 피부 상처의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 상처는 베임, 화상, 찰과상, 절단, 창상, 욕창, 동상, 천자 궤양성 창상, 자상, 활성산소에 의한 만성 피부창상, 인후 또는 구강 점막의 창상, 타박상, 절상, 열상, 좌상, 당뇨병성 궤양, 하지궤양, 고혈압허혈궤양, 정맥궤양, 족부궤양 및 피부궤양으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인, 피부 상처의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 세포막 소포체는 평균 직경이 50 내지 150nm인, 피부 상처의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 세포막 소포체는 크기 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography)로 분리된 것인, 피부 상처의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 세포막 소포체는 1×10^{11} particles/mL 농도로 포함되는, 피부 상처의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 적체 유래 세포막 소포체는 피부 세포의 증식을 촉진하는, 피부 상처의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 적체 유래 세포막 소포체는 피부 세포의 이동을 촉진하는, 피부 상처의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 8

제 1항에 있어서, 상기 적체 유래 세포막 소포체는 상처 조직에서 피부 상피의 복구 및 육아조직에 신생혈관 생성을 촉진하는, 피부 상처의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 9

적체에서 유래된 세포막 소포체(Rabex)를 유효성분으로 포함하는, 피부 상처의 예방 또는 치료용 약학 제제.

청구항 10

적체에서 유래된 세포막 소포체(Rabex)를 유효성분으로 포함하는, 피부 상처 개선용 의약외품 제제.

청구항 11

제 1항에 따른 상기 세포막 소포체를 제조하는 방법으로서,

- 적체의 착즙액을 제조하는 단계;
- 상기 착즙액에 대하여 한외여과를 수행하는 단계; 및

c) 상기 여과액에 대해 크기 배제 크로마토그래피를 수행하는 단계;를 포함하는 세포막 소포체의 제조방법.

청구항 12

제 11항에 있어서,

b) 단계의 상기 한외여과는 10내지 300 kDa의 컷오프(cut-off) 값을 가지는 것을 특징으로 하는, 세포막 소포체의 제조방법.

청구항 13

제 11항에 있어서,

c) 단계의 상기 크기 배제 크로마토그래피는 pH 6 내지 pH 8의 인산완충액(PBS)으로 평형화된 것을 특징으로 하는, 세포막 소포체의 제조방법.

청구항 14

제 11항에 있어서,

c) 단계의 상기 크기 배제 크로마토그래피는 정지상(stationary phase)의 포어(pore) 평균 직경이 35 내지 70nm 인것을 특징으로 하는, 세포막 소포체의 제조방법.

청구항 15

제 11항에 있어서,

상기 정지상은 수퍼텍스, 세파크릴, 세파텍스, 세파로오즈, 프락토겔, 토요필 및 Bio-Gel 중에서 선택되는 어느 하나의 겔 여과 매질인 것을 특징으로 하는, 세포막 소포체의 제조방법.

청구항 16

제 11항에 있어서,

상기 크기 배제 크로마토그래피의 용리액은 pH 6 내지 pH 8의 PBS 완충액인 것을 특징으로 하는, 세포막 소포체의 제조방법.

청구항 17

제 11항에 있어서,

상기 크기 배제 크로마토그래피로부터 얻은 각 분획물에 입도 분석을 수행하여, 50 내지 150nm의 평균 직경을 갖는 분획물을 선택하여 회수하는 것을 특징으로 하는, 세포막 소포체의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 적체 유래 세포막 소포체(Rabex)를 유효성분으로 포함하여, 피부 상처의 예방 또는 치료에 효과가 뛰어난 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 피부는 표피층(Epidermis), 진피층(Dermis) 및 피하층(Subcutaneous layer)의 세개의 층으로 이루어진다. 표피층은 피부의 가장 바깥쪽 층으로서, 피부를 보호하고 방어하는 기능을 수행하며, 각질세포, 편평세포 및 멜라닌 세포 등으로 이루어져 있다. 진피층은 피부의 중간층으로서, 주로 구조적인 지지 기능을 수행하며, 콜라겐, 탄력성 섬유 등 다양한 섬유로 이루어져 있다. 또한, 혈관, 신경, 모세혈관 및 림프관 등이 위치해 있어, 영양 공급, 감각 등 다양한 기능을 수행한다. 피하층은 피부의 가장 안쪽 층으로서, 주로 체온 조절과 충격 흡수 등의 역할을 수행하며, 지방세포와 섬유로 이루어져 있고, 혈관 및 신 경 등이 흐르고 있다.

[0003] 인간각질형성세포(HaCaT)는 성인 표피 세포에서 유래된 세포로, 표피세포 중 각질 형성에 관여하는 케라틴을 포

함하고 있으며, 피부 연구에서 광범위하게 사용되고 있다.

- [0004] 인간 피부 섬유 아세포(HDF)는 성인 피부의 진피층에서 유래된 세포로, 콜라겐 및 엘라스틴 등의 섬유를 합성하고, 세포 외 기질을 유지하는 역할을 하여, 피부 재생 및 치유연구 등 피부 관련 연구에서 다양하게 활용되고 있다.
- [0005] 상처는 외부의 압력에 의하여 외부 또는 조직의 연속성이 파괴되거나, 일부 영역에 결손이 생기는 상태이다. 상처를 입는 경우 통증, 출혈, 기능장애, 염증의 증상을 나타낼 수 있으며, 생체는 이에 반응하여 원래의 상태를 빨리 회복하려고 한다.
- [0006] 상피 상처는 베임, 화상, 찰과상, 절단, 창상, 욕창, 동상, 천자 궤양성 창상, 자상, 활성산소에 의한 만성 피부창상, 인후 또는 구강 점막의 창상, 타박상, 절상, 열상, 좌상, 당뇨병성 궤양, 하지궤양, 고혈압허혈궤양, 정맥궤양, 족부궤양 및 피부궤양으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 의미한다.
- [0007] 상처의 치유란 '세포가 재생, 분화, 증식되어 잃어버렸던 연속성을 다시 유지하는 것'으로 정의할 수 있다. 이러한 상처의 치유과정은 크게 염증단계, 증식단계, 재구성단계를 거치는 것으로 알려져 있다.
- [0008] 상처 치유는 일반적으로, 염증(inflammation), 증식(proliferation) 및 재형성(remodeling)의 3가지 단계를 수반하는 복잡한 과정이다. 첫 번째 단계는 지혈(haemostasis)을 달성하기 위한 응고(clotting), 그리고 세균 및 피사 조직을 파괴하기 위한 호중구의 보충, 그 이후에 대식세포의 보충을 수반한다. 두 번째 단계 동안, 혈관신생(angiogenesis)이 발생하고, 이때 내피세포가 상처 부위로 이동하고, 이와 동시에 섬유아세포가 상처 부위로 이동하여 육아 조직(granulation tissue)을 생산하는데 도움을 준다. 육아 조직의 형성은 재상피화(reepithelialization)가 일어날 수 있도록 한다. 최종 단계 동안, 콜라겐 생산과 파괴의 수준이 균등해지고, 치유된 상처는 최대 강도를 달성하기 위하여 천천히 변경된다. 상처 치유는 상기 과정 중에서 한가지라도 시기 적절하게 제대로 기능하지 않을 때, 지연되거나 손상되므로 만성적인 상태까지 달할 수 있다.
- [0009] 세포의 이동은 동물의 성장 및 생리 활동을 위해 필수적인 중요한 과정이다. 또한, 상처 치유 시 각종 세포의 이동은 상처 부위를 덮으며, 새로운 세포들이 형성되는 것을 도와 상처 치유에 중요한 역할을 담당한다. 이에 세포의 이동을 촉진하는 조성물들이 상처의 빠른 치유를 위한 상처 치료용 조성물로 개발되고 있다.
- [0010] 세포막 소포체는 다양한 크기를 가지며, 특히 이중 크기가 가장 작은 엑소좀(exosome)은 50~150nm의 작은 세포막성 수포이다. 세포막 소포체는 인간과 동물, 곤충, 식물, 미생물 세포에서 분비된다. 특히 이들은 세포가 갖고 있는 단백질, 핵산, 지질, 탄수화물 등 특정 분자들을 포함하고 있으며, 지질 이중층으로 둘러싸여 있어 이들 분자들을 안정적으로 보호하면서, 분비 후 다른 세포로 이들을 전달할 수 있는 특징이 있다. 생체 내 혈액, 소변, 침 등과 같은 체액에서 고농도로 발견되는 세포막 소포체는 이런 특징으로 인해 새로운 생물학적 소재로서 가능성을 갖고 있다.
- [0011] 배추속 식물(Brassica oleracea)은 양배추, 적채(Brassica oleracea L. var. capitata f. rubra.), 브로콜리, 콜리플라워, 콜라비, 콜라드, 브르셀 스프라우트 등을 포함한다.
- [0012] 식용식물 유래 세포막 소포체는 1) 천연물질로 부작용 이슈가 매우 적으며; 2) 경구투여를 통해 대장 도달이 가능할 뿐 아니라; 3) 음식으로 직접 식용하는 것에 비해 편의성이 높아 유아나 소아 대상으로 적용이 가능하고; 4) 식물로부터 대량 생산이 가능하여 건강기능식품의 새로운 패러다임 선도할 수 있으며; 5) 약리성분을 탑재하여 대장까지 전달할 수 있는 효율적인 약물 전달체로 적용이 가능하다는 장점이 있다.
- [0013] 하지만, 이런 이점에도 불구하고, 아직 식품으로 사용되는 식물 유래 세포막 소포체의 생물학적 기능 및 응용에 대한 연구 역시 체계적으로 이뤄지지 않았고, 현재까지 식물 유래 세포막 소포체가 상처의 치료에 영향을 미친다는 것에 대해서는 알려진 바 없다.
- [0014] 이러한 배경 하에, 본 발명에서는 배추속 식물 중에서도 적채, 빨간 양배추, 자색양배추 및 붉은 양배추라 불리는 적채를 사용하여, 적채 유래 세포막 소포체(Rabex)를 이용해 실험을 진행하였다. 본 발명자들은 인간각질형성세포(HaCaT)와 인간 피부 섬유 아세포(HDF)에서 적채 유래 세포막 소포체에 의해 세포의 증식 및 이동이 촉진되고, 상처 조직에서 상피가 복구되며, 육아조직에서 신생혈관이 생성됨을 규명하였다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0015] (특허문헌 0001) 대한민국등록특허공보 제10-2022-0162365호
(특허문헌 0002) 대한민국등록특허공보 제10-2021-0131231호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0016] 본 발명의 목적은 적채 유래 세포밖 소포체를 포함하는 피부 상처의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 데에 있다.
- [0017] 본 발명의 또 다른 목적은 피부 세포의 증식을 촉진하는 적채 유래 세포밖 소포체를 포함하는, 피부 상처의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 데에 있다.
- [0018] 본 발명의 또 다른 목적은 피부 세포의 이동을 촉진하는, 적채 유래 세포밖 소포체를 포함하는 피부 상처의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 데에 있다.
- [0019] 본 발명의 또 다른 목적은 상처 조직에서 피부 상피의 복구 및 육아조직에 신생혈관 생성을 촉진하는, 적채 유래 세포밖 소포체를 포함하는 피부 상처의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 데에 있다.
- [0020] 본 발명의 또 다른 목적은 적채 유래 세포밖 소포체를 포함하는 피부 상처의 예방 또는 치료용 약학 제제를 제공하는 데에 있다.
- [0021] 본 발명의 또 다른 목적은 적채 유래 세포밖 소포체를 포함하는 피부 상처 개선용 의약외품 제제를 제공하는 데에 있다.
- [0022] 본 발명의 또 다른 목적은 적채 유래 세포밖 소포체를 제조하는 제조방법을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

- [0023] 이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.
- [0024] 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다.
- [0025] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 적채 유래 세포밖 소포체(Rabex)를 유효성분으로 포함하는 피부 상처의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0026] 본 발명에 있어서, 상기 "적채"는 배추속 식물 중에서도 적채, 빨간 양배추, 자색양배추 및 붉은 양배추라 불리는 적채를 의미한다.
- [0027] 본 발명에 있어서, 상기 "세포밖 소포체(extracellular vesicle)"란 다양한 세포들로부터 분비되는 막 구조의 작은 소낭을 의미하며, 대략 30 내지 1,000 nm범위의 직경을 가지고, 다낭체와 원형질막의 융합을 통해 세포 밖 환경으로 방출된다.
- [0028] 또한, 세포밖 소포체는 평균 직경이 30 내지 150 nm인 엑소좀일 수 있고, 바람직하게는 50 내지 150 nm일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0029] 본 발명에 있어서, 상기 "유효성분으로 포함하는"이란 적채에서 유래된 세포밖 소포체의 효능이나 활성을 달성하는데 충분한 양을 포함하는 것을 의미한다. 본 발명의 적채 유래 세포밖 소포체는 과량 투여하여도 인체에 부작용이 없으므로 상기 세포밖 소포체가 본 발명의 조성물에 포함된 양적 상한은 통상의 기술자가 적절한 범위 내에서 선택하여 실시할 수 있다.
- [0030] 본 발명에 있어서, 상기 "포함"이란, 다른 구성을 제외하는 것이 아닌, 다른 구성을 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.
- [0031] 본 발명에 있어서, 상기 "세포밖 소포체"는 크기 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography)로 분리된 것일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0032] 본 발명에 있어서, 상기 "세포밖 소포체"는 1×10^{11} particles/mL 농도로 포함되는 것일 수 있으나, 이에 한정

되지 않는다.

- [0033] 또한, 본 발명의 다른 일 실시예에 따르면, 적체 유래 세포밖 소포체가 피부 세포의 증식을 촉진하는, 피부 상처의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0034] 또한, 본 발명의 또 다른 일 실시예에 따르면, 적체 유래 세포밖 소포체가 피부 세포의 이동을 촉진하는, 피부 상처의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0035] 본 발명에 있어서, 상기 "피부 세포"는 인간각질형성세포(HaCaT) 또는 인간 피부 섬유 아세포(HDF)일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0036] 또한, 본 발명의 또 다른 일 실시예에 따르면 적체 유래 세포밖 소포체가 상처 조직에서 피부 상피의 복구 및 육아조직에 신생혈관 생성을 촉진하는, 피부 상처의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0037] 또한, 본 발명의 일 실시예에 따르면 적체 유래 세포밖 소포체의 제조방법을 제공한다. 상기 제조방법은 통상의 방법이라면 특별히 제한되지 않으나, 바람직하게는 하기 단계들을 통해 수행되는 것일 수 있다.
- [0038] a) 적체의 착즙액을 제조하는 단계;
- [0039] b) 상기 착즙액에 대하여 한외여과를 수행하는 단계; 및
- [0040] c) 상기 여과액에 대해 크기 배제 크로마토그래피를 수행하는 단계.
- [0041] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 크기 배제 크로마토그래피에 적체 착즙액을 로딩 후 용리액을 전개시키면 적체 착즙액 중 크기가 작은 물질이 크기 배제 크로마토그래피 내부에 머무르게 되어, 크기가 큰 세포밖 소포체를 시료로부터 분리할 수 있다. 용출되는 물질의 분자량은 다공성 정지상의 크기, 구멍 크기, 컬럼의 길이 및 이동상의 유속 등에 따라 상이하며, 동일한 조건에서 용출되는 분자의 크기는 일정하다.
- [0042] 본 발명에 있어서, 상기 한외여과는 5 내지 300 kDa의 컷오프(cut-off) 값을 가지는 것일 수 있고, 바람직하게는 10 내지 300 kDa의 컷오프(cut-off) 값을 가질 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0043] 본 발명에 있어서, 상기 크기 배제 크로마토그래피는 pH 6내지 pH 8의 인산완충액(PBS)으로 평형화된 것일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0044] 본 발명에 있어서, 상기 크기 배제 크로마토그래피는 정지상(stationary phase)의 포어(pore) 평균 직경이 30 내지 75nm인것일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0045] 본 발명에 있어서, 상기 세포밖 소포체를 분리 및 정제하기 위한 방법으로는 한외여과 외로 고분자 침전법, 초고속 원심분리방법, 크기 배제 크로마토그래피 및 한외 여과의 일종인 접선 유동 여과(Tangential Flow Filtration, TFF)등이 사용될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0046] 구체적으로 상기 정지상은 수퍼텍스, 세파크릴, 세파텍스, 세파로오즈, 프락토겔, 토요겔 및 Bio-Gel 중에서 선택되는 어느 하나일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0047] 본 발명에 있어서, 상기 크기 배제 크로마토그래피의 용리액은 pH 6 내지 pH 8의 PBS 완충액인 것일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0048] 본 발명에 있어서, 상기 크기 배제 크로마토그래피로부터 얻은 각 분획물에 입도 분석을 수행하여, 50 내지 150nm의 평균 직경을 갖는 분획물을 선택하여 회수할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0049] 각 제형에 의한 조성물에 있어서, 상기 조성물 외 다른 구성을 피부 상처의 예방, 치료 또는 개선용 목적에 따라 당업자가 어려움 없이 선정하여 배합할 수 있으며, 이 경우 다른 원료와 동시에 적용할 경우 피부 세포의 증식 및 이동 효과, 상처 조직에서 상피의 복구력 및 육아조직에서 신생혈관 생성이 향상될 수 있다.
- [0050] 또한, 본 발명에 의한 조성물이 약학 조성물로 사용될 경우, 약학적으로 허용되는 형태의 제형에 적합한 담체, 부형제, 보조제 또는 희석제 등의 첨가물을 더 포함할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 다양한 형태로 제형화할 수 있다.
- [0051] 상기 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로즈 용액, 말토덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올, 락토스, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0052] 또한, 상기 성분들 이외에 항산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 계면활성제, 결합제, 윤활제(마그네슘스테아레이트, 탈크), 유화제, 습윤제, 감미제, 향미제, 현탁제 또는 보존제(벤즈알코늄 클로라이드, 메틸 파라벤, 프로필 파라벤 및 클로로부탄올) 등이 추가로 사용될 수 있다.
- [0053] 본 발명에 있어서, 상기 "조성물"은 액제, 로션제, 경구용 투여제, 스프레이제, 겔제, 연고제, 크림제, 패취제, 에어로졸제, 산제, 유제 또는 외용제로 제형화될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0054] 조성물은 개별 치료제로 투여되거나 다른 치료제와 병용 투여될 수 있고, 종래의 치료제와 동시에 또는 차례로 투여될 수 있으며, 단일 혹은 다중으로 투여될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0055] 본 발명에 있어서, 상기 "제제"는 통상의 방법에 따라 투여될 수 있다. 유효성분의 실제 투여량은 분화 및 증식 시키고자 하는 피부세포의 양, 투여경로, 투여시간, 투여방식, 환자의 체중, 연령 및 성별 등 여러 관련 인자에 따라 결정되어야 하므로, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하지 않는다.
- [0056] 본 발명에 있어서, 상기 "예방"이란 본 발명에 따른 조성물 및 약물 전달체 투여에 의해 뇌 질환을 발병을 억제하거나 지연시키는 모든 행위를 의미할 수 있다.
- [0057] 본 발명에 있어서, 상기 "치료"란 본 발명에 따른 조성물 및 약물 전달체 등에 의해 뇌질환의 증세가 호전되거나 이롭게 되도록 하는 모든 행위를 의미할 수 있다.
- [0058] 본 발명에 있어서, 상기 "개선"이란 증상의 정도가 완화되거나 감소시키는 모든 행위를 의미할 수 있다.

발명의 효과

- [0059] 본 발명의 적채 유래 세포막 소포체는 피부 세포의 증식 및 이동을 촉진하고, 상처 조직에서 상피를 복구시키며 육아조직에서 신생혈관을 생성하는 효능을 가지고 있으므로, 피부 상처의 예방, 치료 또는 개선에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0060] 도 1은 한외 여과 및 크기 배제 크로마토그래피를 이용하여 적채 유래 세포막 소포체의 분리 및 정제하는 모습을 촬영한 사진을 나타낸 것이다.
- 도 2는 적채 유래 세포막 소포체의 농도와 크기 분포도를 보여주는 그림이다.
- 도 3은 인간각질형성세포(HaCaT) 및 인간 피부 섬유 아세포(HDF)에서 적채 유래 세포막 소포체의 세포 증식능력을 평가한 그래프이다.
- 도 4는 인간각질형성세포(HaCaT)에서 적채 유래 세포막 소포체의 세포 이동능력을 평가한 그림이다.
- 도 5A는 마우스 상처 모델에서 적채 유래 세포막 소포체의 상처 치유 효과를 촬영한 사진을 나타낸 것이다.
- 도 5B는 마우스 상처 모델에서 적채 유래 세포막 소포체의 상처 크기 감소율의 변화를 나타낸 그래프이다.
- 도 6은 마우스 상처 모델에서 적채 유래 세포막 소포체가 상처 조직에 미치는 영향을 평가한 현미경으로 촬영한 사진을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0061] 이하 바람직한 실시예를 들어 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위는 이에 한정되지 않는다.

실시예 1

- [0062] 적채 유래 세포막 소포체의 분리 및 정제 방법
- [0063] 도 1에서 확인되는 바와 같이, 본 발명에서는 한외 여과 및 크기 배제 크로마토그래피를 이용하여 적채 유래 세포막 소포체의 분리 및 정제를 진행하였다.

실시예 2

- [0064] 적채 유래 세포막 소포체 크기 분포도 및 농도

[0065] 배추속 유래 세포막 소포체의 농도를 결정하기 위하여 나노입자추적분석(Nanoparticle tracking analyzer, NTA)을 이용한다. 우선 분리한 세포막 소포체 분획물(fraction)의 튜브를 각각 PBS로 1:1000의 농도로 희석시킨 후, 나노 입자 추적 분석 장치를 이용하여 세포막 소포체의 농도와 크기 분포도를 측정하였다.

[0066] 도 2A, 2B 및 2C는 각각 10 kDa, 100 kDa 및 300 kDa의 컷오프를 사용한 후 크기배제 크로마토그래피를 통해 분리한 적체 유래 세포막 소포체의 크기별 농도(세포막 소포체 입자수/mL)를 나타내는 그래프이고, 도 2D는 크기배제 크로마토그래피를 통해 분리한 적체 유래 세포막 소포체의 분획별(50-150nm) 농도(세포막 소포체 입자수/mL)와 크기(nm)를 나타내는 그래프이다.

실시예 3

[0067] 적체 유래 세포막 소포체에 대한 *in vitro* 실험

[0068] 3-1. 세포 이동 확인

[0069] 96-웰 세포 배양 플레이트(96-well cell culture plate)에 10%의 FBS, 1%의 페니실린 및 스트렙토마이신이 첨가된 DMEM을 사용하여 인간각질형성세포 (HaCaT)와 인간 피부 섬유 아세포(HDF)를 0.5×10^4 cell/cm²으로 세포를 접종하였다. 24시간 이후에 대조군 세포와 실험군 세포의 배지를 제거 후 PBS로 세척해주었다. 이때, 실험군 세포에는 1×10^{11} particles/mL 농도로 적체 유래 세포막 소포체를 넣어 배양하였으며, 대조군 세포에는 적체 유래 세포막 소포체 첨가 없이 일반 배양 배지를 이용하여 72시간 동안 배양하였다. 세포의 증식률은 WST-1을 통해 분석하였다. 모든 값은 평균±표준 편차(**p<0.01; n = 3)로 표시된다.

[0070] 도 3에서 확인되는 바와 같이, 적체 유래 세포막 소포체를 넣지 않은 대조군에 비해 적체 유래 세포막 소포체가 첨가된 경우 증식률이 인간각질형성세포(HaCaT) 및 인간 피부 섬유 아세포(HDF)에서 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해 적체 유래 세포막 소포체를 세포 배양액에 첨가하였을 때 세포의 증식이 촉진됨을 확인하였다.

[0071] 3-2. 세포 이동 촉진 확인

[0072] 적체 유래 세포막 소포체가 세포의 이동뿐만 아니라 세포의 이동을 촉진하는 것을 확인하기 위해 스크래치 분석(scratch assay)을 진행하였다. 24-웰 세포 배양 플레이트(24-well cell culture plate)에 10%의 FBS, 1%의 페니실린 및 스트렙토마이신이 첨가된 DMEM을 사용하여 인간각질형성세포(HaCaT)를 0.5×10^4 cell/cm²으로 세포를 접종하였다. 24시간 이후에 대조군 세포와 실험군 세포의 배지를 제거 후 PBS로 세척해주었다. 다시 PBS를 넣어준 후 200 μ L 피펫 끝으로 긁어 스크래치를 낸 후 떨어진 세포를 제거하기 위해 상층의 PBS를 제거하고, 배지를 넣어주었다. 이때, 실험군 세포에는 1×10^{11} particles/mL 농도로 적체 유래 세포막 소포체를 넣어 배양하였으며, 대조군 세포에는 적체 유래 세포막 소포체 첨가 없이 일반 배양 배지를 이용하여 12시간 및 36시간 동안 배양하였다.

[0073] 도 4에서 확인되는 바와 같이, 적체 유래 세포막 소포체를 넣지 않은 대조군에 비해 적체 유래 세포막 소포체가 첨가된 경우 상처 부분이 인간각질형성세포(HaCaT)에서 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해 적체 유래 세포막 소포체를 세포 배양액에 첨가하였을 때 세포의 이동을 촉진함을 확인하였다.

실시예 4

[0074] 창상 치유 효능에 대한 *in vivo* 실험

[0075] 4-1. 창상 유발 및 처치

[0076] 체중 15~17g의 6주령 C57BL/6 종 암컷 쥐를 ㈜라운 바이오(Raonbio, Korea)에서 구입하여 25±1℃ 습도 50±10%를 유지하고 명암은 주야 12시간으로 자동 조절하며 보관하였다. 또한, 사료와 물은 자유롭게 섭취하도록 하였으며, 모든 실험동물은 1주 동안 동물실 환경에 적응시킨 후, 실험에 사용하였다. 동물실험은 인천대학교 동물실험 윤리위원회에 적합함(인천대2021-05)을 승인 받고 실시하였다.

[0077] 마우스는 아이소플루레인(isoflurane)을 이용하여 흡입 마취법을 통해 마취시켰다. 전동 제모기와 모근제거크림을 이용하여 등쪽 털을 제거한 후, 8 mm 지름의 바이오피스 펀치를 사용하여 마우스의 등 표면에 8 mm 지름의 원형 절개 상처를 만들었다. 대조군 마우스에는 PBS를 처리하였고, 실험군 마우스에는 적체 유래 세포막 소포체를

1×10^{11} particles/mL의 농도로 처리하였다. 노출된 피부 창상은 테가덤(Tegaderm; 3M Health care)으로 커버한 후 3일 후까지 드레싱을 시행하였다.

[0078] 적체 유래 세포막 소포체가 상처에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 상처를 생성한 이후 0일, 1일, 2일, 3일, 6일, 9일 그리고 12일 뒤에 상처 부위를 카메라를 이용하여 촬영하였고, 투명 필름을 이용해 본 뜬 뒤, 이미지 제이(Image J) 소프트웨어를 사용하여 상처 크기를 분석하였다. 상처 크기 분석은 하기의 식을 이용하여 분석하였다.

[0079] $\% \text{ Wound size} = At / A0 \times 100$

[0080] At : 측정 당시의 상처 크기

[0081] A0: 최초 상처 크기

[0082] 도 5에서 확인되는 바와 같이, 대조군 및 실험군에서 시간에 따른 상처의 크기가 점차 감소하는 것을 확인하였고, 6일차에 적체 유래 세포막 소포체를 처리한 실험군에서 상처 회복률이 50%인 것을 보아 PBS를 처리한 대조군에 비하여 적체 유래 세포막 소포체를 처리한 실험군에서 상처 회복 속도가 빠른 것으로 나타났다.

[0083] 4-2. 조직학적 분석

[0084] 적체 유래 세포막 소포체가 상처 조직에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 마우스에 상처를 생성한 이후 10일 뒤에 상처 조직을 획득하였고, 이 상처 조직을 이용하여 조직병리학적 평가를 실시하였다.

[0085] 마우스 모델에서 얻어낸 상처 조직을 10% 포르말린(formalin)에 24 내지 48시간 동안 고정시켰다. 다음 에탄올(ethanol) 및 자일렌(Xylene)을 처리하여 탈수 과정을 진행하였고, 파라핀(paraffin)을 이용하여, 파라핀 블록(paraffin block)을 만들었다. 파라핀 블록을 $4\mu\text{m}$ 단위로 잘라 섹션(section)을 만든 다음, 파라핀을 제거하고, 탈수 처리하였다. 그 다음 각 섹션은 헤마톡실린(hematoxylin)으로 염색한 뒤, 이오신(eosin)으로 대비염색(counterstain)을 실시하였다. 그 후, 현미경(Leica Microsystems, Germany)을 이용하여 조직을 관찰하였다.

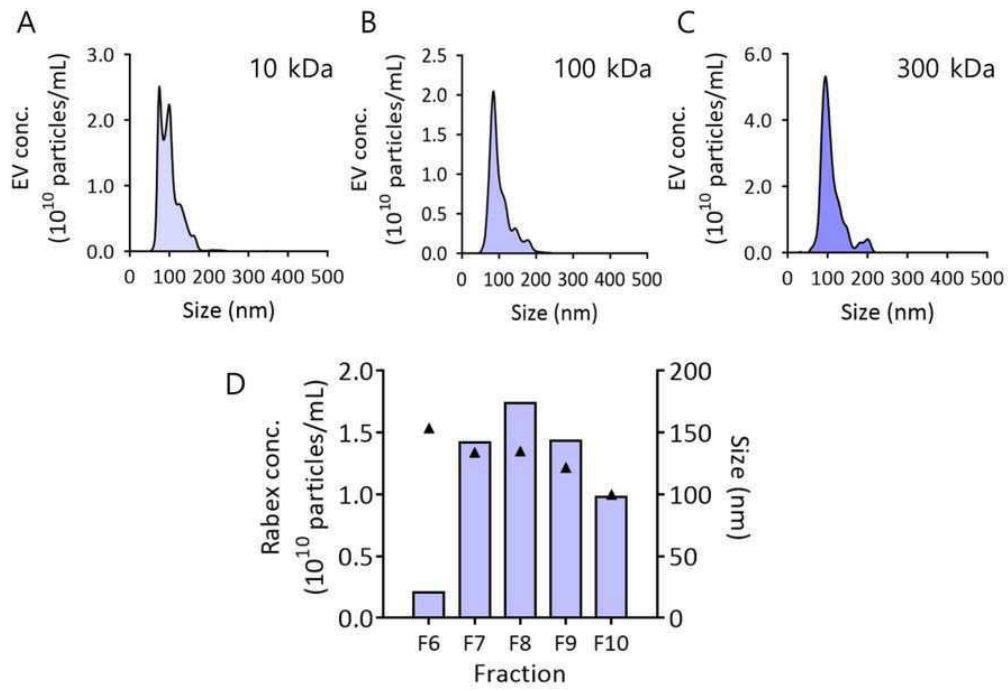
[0086] 도 6에서 확인되는 바와 같이, 대조군인 PBS를 바른 경우에는 상처가 완전히 아물지 않았으며, 상처 부위에 염증세포들이 존재하는 것으로 나타났다. 적체 유래 세포막 소포체를 처리한 경우에는 PBS에 비하여 상처가 복구되었고, 육아조직에 신생혈관이 생성되는 것으로 나타났다.

도면

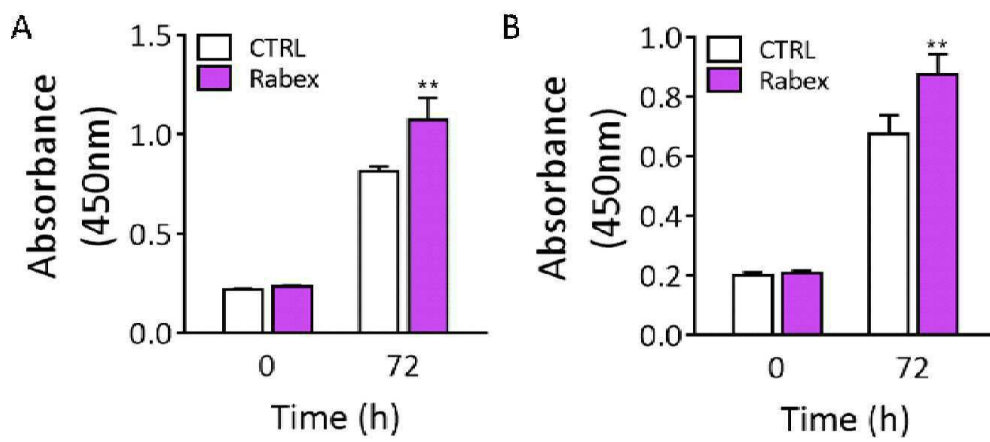
도면1



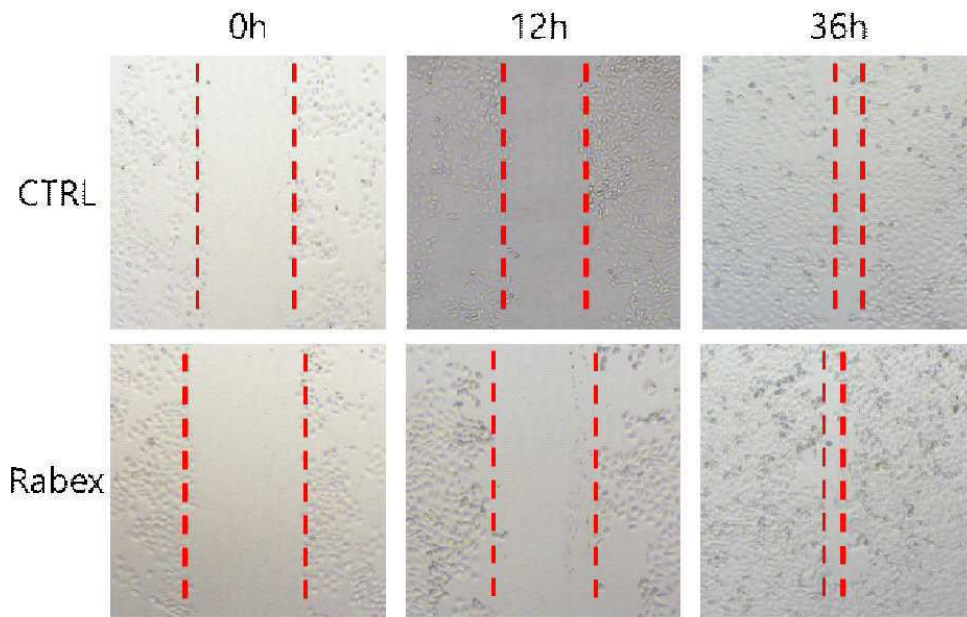
도면2



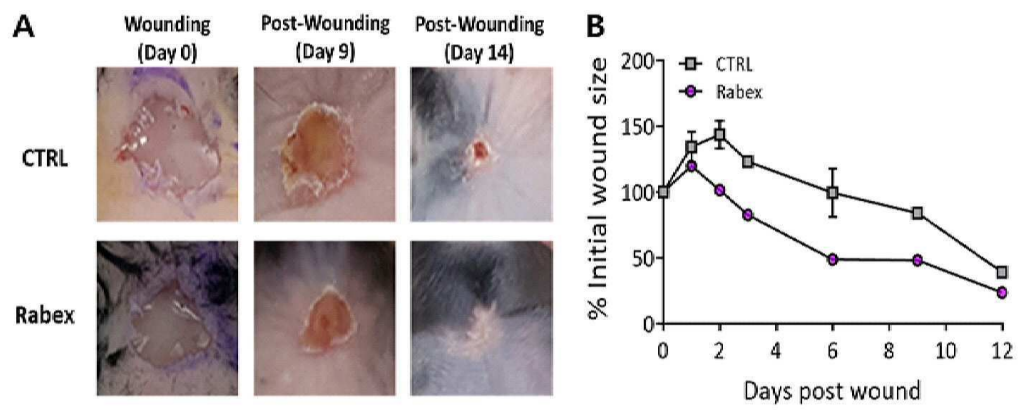
도면3



도면4



도면5



도면6

