

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0084798

(43) 공개일자 2020년07월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 35/30 (2015.01) *A61K 8/98* (2006.01)*A61P 17/00* (2006.01) *A61Q 19/00* (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 35/30 (2013.01)*A61K 8/981* (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0176256

(22) 출원일자 2019년12월27일

심사청구일자 2019년12월27일

(30) 우선권주장

1020190000629 2019년01월03일 대한민국(KR)

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

홍성희

서울특별시 광진구 아차산로70길 61, 503동 1202호 (광장동, 광장현대아파트)

이슬비

서울특별시 양천구 목동서로 340, 923동 402호 (신정동, 목동신시가지아파트9단지)

(74) 대리인

이처영, 장제환

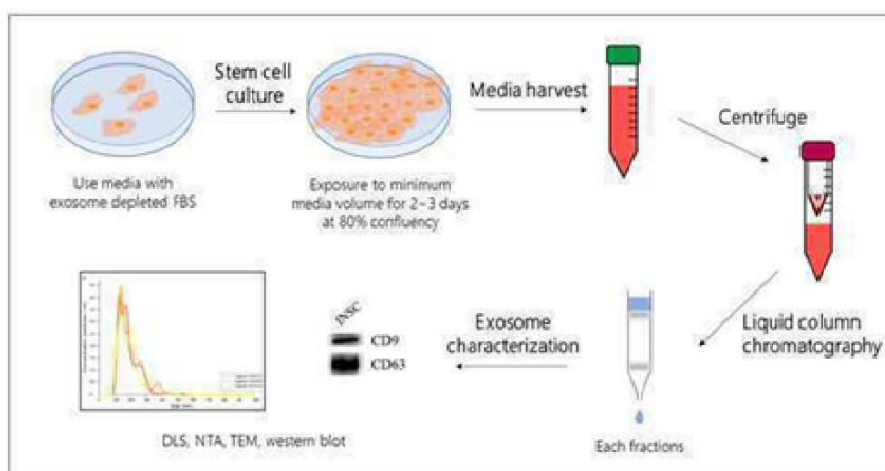
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 신경줄기세포 유래 엑소좀(exosomes)을 함유하는 아토피 치료용 약학조성물

(57) 요약

본 발명은 신경줄기세포 유래 엑소좀(exosomes) 또는 신경줄기세포 유래 엑소좀(exosomes)을 함유하는 신경줄기세포 배양액을 유효성분으로 함유하는 아토피 치료용 약학조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 17/00 (2018.01)

A61Q 19/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711064846

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 (원천)바이오의료기술개발사업

연구과제명 소분자화합물만을 이용한 인간 섬유아세포의 직접교차분화-기반 신경줄기세포전환 원천기술 개발연구

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교

연구기간 2018.01.01 ~ 2018.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

신경줄기세포 유래 엑소좀(exosomes) 또는 신경줄기세포 유래 엑소좀(exosomes)을 함유하는 신경줄기세포 배양액을 유효성분으로 함유하는 아토피 치료용 약학조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 엑소좀(exosomes)은 50~150nm 크기인 것을 특징으로 하는 약학조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 엑소좀(exosomes)은 CD63 및 CD9 양성인 것을 특징으로 하는 약학조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 신경줄기세포는 태아 뇌의 뇌실영역 유래 세포를 불활성화시킨 세포인 것을 특징으로 하는 약학조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 엑소좀은 아넥신 1(annexin 1), 클러스테린 이소형2(isoform 2 of clusterin), N-아세틸 무라모이-L-알라닌 아미데이즈(isoform 2 of N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase) 및 트랜스크립션 인터미디에리 팩터 1 베타(transcription intermediary factor 1 beta)를 포함하는 것을 특징으로 하는 약학조성물.

청구항 6

신경줄기세포 유래 엑소좀(exosomes) 또는 신경줄기세포 유래 엑소좀(exosomes)을 함유하는 신경줄기세포 배양액을 유효성분으로 함유하는 아토피 피부염 완화를 위한 피부 외용제.

청구항 7

신경줄기세포 유래 엑소좀(exosomes) 또는 신경줄기세포 유래 엑소좀(exosomes)을 함유하는 신경줄기세포 배양액을 유효성분으로 함유하는 아토피 피부염 완화를 위한 기능성 화장품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 신경줄기세포 유래 엑소좀(exosomes) 또는 신경줄기세포 유래 엑소좀(exosomes)을 함유하는 신경줄기세포 배양액을 유효성분으로 함유하는 아토피 치료용 약학조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] 아토피성 피부염은 산업화에 따른 환경 공해, 식품첨가물 사용의 증가, 서구식 주거 형태로 인한 다양한 항원에 노출 그리고 과도한 위생에 따른 면역저항력이 떨어져 생기는 피부질환이다. 환경적인 요인이 대부분을 차지하며, 부모가 아토피성 피부염을 앓을 경우, 자손이 같은 질병을 앓을 확률이 매우 높고 유전적으로 각질 세포에서 피부 보호 장벽을 형성하는 filaggrin이라는 단백질을 암호화하는 유전자 FLG에 유전적 변이가 생겨 아토피가 발병된다는 보고가 있어 가족력과 유전적인 요소도 작용하는 질병이다. 증상으로는 심한 가려움증과 피부 건조, 습진 등의 병변을 동반하는 것으로 알려져 있고 병변의 분포와 반응 양상은 연령에 따라 다르게 나타나 유아 아토피와 성인 아토피로 나누어진다.
- [0004] 피부 장벽이 위와 같은 환경적 또는 유전적 이유로 인해 잘 형성되지 않거나 이미 생긴 병변을 지속해서 긁게 되면서 피부 장벽이 손상을 입으면 외부의 특정 항원에 대한 민감도가 높아진다. 이에 따라 항원을 제시하는 수지상세포가 과다하게 침윤되며 이 세포들은 또 간지러움을 유발하는 매개체와 면역 세포를 불러일으키는 사이토카인과 케모카인을 분비한다. 이러한 증상이 반복되면 피부가 두꺼워지는 태선화 증상이 나타난다.
- [0005] 이러한 아토피성 피부염 치료하는 방법으로는 궁극적으로 원인을 제거하는 치료법은 개발되지 않은 상태이며, 대부분 가려움증을 치료하기 위한 항히스타민제 복용, 과도한 면역반응을 억제하기 위한 면역조절제, 국소 또는 전신성 스테로이드제의 사용 그리고 손상입은 피부장벽을 보호하기 위한 피부장벽 구성 단백질인 세라마이드 등을 포함하는 보습제 도포 등이 치료법으로 사용된다.
- [0006] 아토피 치료법 중 대중적으로 사용되는 스테로이드제의 경우 장기간 사용 시 소아 성장과 발달에 악영향을 미치며 증상이 완화되었다고 해서 바로 끊으면 면역반응이 더 심하게 일어나는 부작용이 있다. 또한, 면역조절제의 사용은 피부에 작열감을 나타내는 부작용이 있으며 아토피 피부염 질환과 같은 만성질환에서 장기간 사용하기가 어려울뿐더러 완벽하게 치료되는 효과를 보기가 어려운 단점이 있다.
- [0007] 현재까지의 아토피 치료제 개발은 주로 가려움증을 완화하기 위한 비타민, 인지질을 이용한 보습제, 식습관 개선을 통한 아토피 완화를 위한 프로바이오틱스, 아토피 피부병변에 면역 세포를 침윤시키고 지속적 면역반응을 일으키는 인터류킨을 저해하기 위한 인터류킨 저해제 위주로 치료제 개발이 이루어지고 있고 근래에는 제대혈, 골수 및 지방 유래 중간엽 줄기세포의 면역억제와 면역 조절 능력을 이용하여 줄기세포 유래 산물과 줄기세포 자체를 이용한 치료제 연구가 진행되고 있다.
- [0008] 본 발명은 제대혈, 골수 및 지방 유래 중간엽 줄기세포가 아닌 인간의 뇌실 영역에 존재하는 신경줄기세포를 배양하여 신경줄기세포의 면역억제 성질과 특성을 그대로 반영하고 있는 세포외 소포체인 세포밖소포체(exosomes)와 배양배지를 이용하여 줄기세포 기반 아토피 피부염 치료제를 개발하는 것이다. 본 발명의 기반이 되는 종래기술에는 대한민국 특허공개 제2014-0024310호에서는 골수 유래 중간엽 줄기세포의 배지에서 엑소좀을 분리하고, 이를 폐질환 치료에 이용할 수 있음을 제시하였고, 대한민국 특허공개 제2015-0108795에서는 염증성 뇌 질환에 줄기세포 유래 엑소좀을 처리하여 뇌 조직 손상과 뉴런의 사멸을 억제함을 보였으나 어떤 종류의 줄기세포인지 명시되지 않았다. 마지막으로 대한민국 특허공개 제2013-00116552호에서는 골수유래 중간엽 줄기세포 유래 엑소좀이 신경질환에 대한 치료제로 쓰일 수 있다는 것이 개시되어 있다.
- [0009] 이처럼 염증성 질환에 사용이 가능한 다양한 성체 조직으로부터 얻어진 중간엽 줄기세포 유래 엑소좀을 분리하는 기술이 출원되어 있으나, 인간 신경줄기세포로부터 얻어진 엑소좀에 대한 항염증 효과 또는 아토피 완화 효과에 대한 것은 알려진 바가 없다.
- [0010] 이에, 본 발명자들은 아토피 억제효과를 갖는 염증억제인자를 다수 포함하는 엑소좀을 분리하고자 예의 노력한 결과, 인간 뇌의 뇌실영역에서 추출한 신경줄기세포 배양액 유래 엑소좀이 염증 억제인자를 다수 포함하고 있으면서, 아토피 억제 효과를 나타내고 있다는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0012] 본 발명의 목적은 아토피 억제 효과가 우수한 줄기세포 유래 엑소좀을 함유하는 아토피 치료용 약학조성물을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0014]

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 신경줄기세포 유래 엑소좀(exosomes) 또는 신경줄기세포 유래 엑소좀(exosomes)을 함유하는 신경줄기세포 배양액을 유효성분으로 함유하는 아토피 치료용 약학조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0016]

본 발명에 따르면, 기존의 스테로이드 치료제와 면역조절제를 사용하였을 때, 소아 성장과 발달에 악영향을 미치며, 피부 작열감을 나타내었던 부작용 없이, 아토피 피부염을 치료할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0018]

도 1은 신경줄기세포 배양액으로부터 세포 외 소포체(extracellular vesicles)을 추출하는 방법의 전반적인 내용으로 원심분리와 column을 이용한 liquid column chromatography로 50~150nm사이즈에 해당하는 exosome만을 순수하게 분리해 내는 방법을 나타내었다.

도 2a와 b는 엑소좀이라고 추정되는 분획(fraction)인 6~10에 해당되는 분리된 세포 외 소포체들의 사이즈를 확인하기 위해 DLS(dynamic light scattering)과 NTA(nanoparticle tracking analysis)를 실시하여 분석한 도표이며, 도 2c는 엑소좀의 마커로 알려진 CD63과 CD9의 발현을 western blotting으로 확인하였고 도 2d에서 엑소좀과 같은 소포체의 특이 모양인 cup-shaped vesicle을 TEM(transmission electronic microscope)로 확인하였다.

도 3의 a 및 b는 신경줄기세포 배양액을 HaCaT 세포주에 처리하였을 때 TNF α 와 IFN γ 에 의한 염증반응을 억제하는 것을 보여주는 리얼타임 qPCR 결과를 나타낸 것으로, 염증성 사이토카인인 IL-6와 TNF α 가 감소한 것을 보여주는 도면이며 c, d 및 e는 염증성 케모카인의 발현이 감소되는 것을 보여주는 도면이다.

도 4a는 신경줄기세포 배양액이 처리된 RAW264.7세포주의 모양 변화를 관찰한 것으로, 신경줄기세포 배양액만 처리한 경우를 염증을 일으키지 않음을 입증한 도면이고, 도 4b와 도 4c는 RAW264.7세포주에 LPS에 의한 염증성 사이토카인인 IL-6의 발현과 활성산소종 중 하나인 nitric oxide(NO)의 생성에 관여하는 iNOS(induced nitric oxide synthase)의 유전자 발현을 감소시킴을 보여주는 도면이고, 도 4d는 신경줄기세포 배양액이 처리에 의해 iNOS에 의해 생성된 NO가 감소되는 것을 보여주는 도면이다.

도 5a는 신경줄기세포 배양액을 HaCaT에 처리한 후 TNF α 와 IFN γ 로 염증을 유도하였을 때, 염증성 사이토카인인 IL-1 β 가 배양액의 농도 의존적으로 단백질 발현량이 감소하는 것을 나타낸 웨스턴 블롯 결과이며, 도 5b는 염증성 사이토카인과 케모카인의 발현을 조절하는 전사인자인 NF-kB의 인산화가 감소되는 것을 나타낸 웨스턴 블롯 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 신경줄기세포 배양액으로부터 분리한 엑소좀이 TNF α 와 IFN γ 에 의한 염증반응을 억제할 수 있는지 알기 위해서 HaCaT에 엑소좀을 처리한 후 염증성 사이토카인인 TNF α 의 발현량을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 7a, 7b, 7c의 경우 T-cell과 macrophage 활성화와 침윤에 관련한 케모카인의 발현이 엑소좀에 의해 감소하였는지 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 8a는 초록색의 형광 염료인 PKH67로 염색한 신경줄기세포 엑소좀이 HaCaT에 처리하였을 때 세포 내부로 들어가는 것을 ICC(immunocytochemistry)로 확인한 도면이며 도 8b는 엑소좀 처리를 한 후 염증성 사이토카인의 발현을 조절하는 전사인자인 NF-kB의 인산화가 감소한 것을 western blotting으로 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 9는 NC/Nga 마우스에 각각 NSC-CM(신경줄기세포 배양액), SC-Exo(신경줄기세포 배양액 유래 엑소좀) 및 타크로리무스를 처리하는 실험 방법을 도식화한 것이다.

도 10은 NC/Nga 마우스에 각각 NSC-CM(신경줄기세포 배양액), SC-Exo(신경줄기세포 배양액 유래 엑소좀) 및 타크로리무스를 21일간 처리 후의 마우스 피부를 나타낸 것이다.

도 11은 NC/Nga 마우스에 각각 NSC-CM(신경줄기세포 배양액), SC-Exo(신경줄기세포 배양액 유래 엑소좀) 및 타

크로리무스를 21일간 처리 후, 희생하여 수득한 피부조직을 H&E 염색한 결과를 나타낸 것이다.

도 12는 NC/Nga 마우스에 아토피 유발 물질 DNCB (Dinitrochlorobenzene)을 처리한 다음, NSC-Exo(신경줄기세포 유래 엑소좀)을 처리하여 마우스의 혈청 내 IgE 발현이 감소한 결과를 나타낸 것이다.

도 13은 NC/Nga 마우스에 각각 NSC-CM(신경줄기세포 배양액), SC-Exo(신경줄기세포 배양액 유래 엑소좀) 및 타 크로리무스를 21일간 처리 후, 희생하여 수득한 피부조직을 toluidine blue O 염색한 결과를 나타낸 것이다.

도 14는 신경줄기세포 배양액으로부터 분리한 엑소좀 내의 단백질을 LC-MS로 분석 한 후, DAVID v6.8 프로그램을 이용하여, 선천면역반응과 관련된 단백질을 선정한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0019] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [0021] 본 발명에서는 제대혈, 골수 및 지방 유래 중간엽 줄기세포가 아닌 인간의 뇌실 영역에 존재하는 신경줄기세포를 배양하여 신경줄기세포의 면역억제 성질과 특성을 그대로 반영하고 있는 세포의 소포체인 엑소좀과 이를 포함하는 배양매지를 이용하여 줄기세포 기반 아토피 피부염 치료제를 개발하는 것이다.
- [0022] 염증성 질환에 사용이 가능한 다양한 성체조직으로부터 얻어진 중간엽 줄기세포 유래 엑소좀을 분리하는 기술은 알려져 있으나, 인간 신경줄기세포로부터 얻어진 엑소좀에 대한 항염증 효과 또는 아토피 완화 효과에 대한 것은 알려진 바가 없다. 특히, 본 발명에 사용되는 신경줄기세포 배양액 유래 엑소좀은 염증 억제인자를 다수 포함하고 있음을 프로테오믹스 분석으로 증명하고 있고, 이러한 인자들이 아토피 억제 효과를 나타내고 있다.
- [0023] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, 신경줄기세포 유래 엑소좀(exosomes) 또는 신경줄기세포 유래 엑소좀(exosomes)을 함유하는 신경줄기세포 배양액을 유효성분으로 함유하는 아토피 치료용 약학조성물에 관한 것이다.
- [0024] 본 발명에 있어서, 상기 엑소좀(exosomes)은 50~150nm 크기인 것을 특징으로 할 수 있고, 상기 엑소좀(exosomes)은 CD63 및 CD9 양성인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0025] 본 발명에 있어서, 상기 신경줄기세포는 뇌실영역 유래 세포인 것을 특징으로 할 수 있으며, 더욱 바람직하게는 태아 뇌의 뇌실영역 유래 세포를 불활성화시킨 줄기세포인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0026] 본 발명에서는 면역 조절과 억제를 할 수 있는 항염증 인자를 운반하는 체제인 신경줄기세포 유래 엑소좀과 이를 함유하는 배양액을 이용하여 위와 같은 문제들을 해결하고자 한다.
- [0027] 본 발명의 일 양태에서, 인간 외배엽 유래 신경줄기세포의 배양액과 그 배양액으로부터 추출한 엑소좀은 다양한 항염증성 인자와 사이토카인을 포함하여 TNF α (Tumor Necrosis Factor alpha)와 IFN γ (Interferon gamma)에 의한 과도한 염증반응을 억제하였다. 특히 염증반응에 직접 관여하는 NF- κ B의 인산화를 억제하여 궁극적으로 염증성 사이토카인의 발현을 억제함을 확인하였다. 또한, 적용 측면에서 줄기세포를 직접 피부에 이식하거나 정맥주사의 적용 방법은 폐색전이나 타 세포로의 분화 가능성 등의 부작용을 지니고 있으나 줄기세포의 유효 성분을 포함하고 있는 배양액과 엑소좀을 이용한다면 쉽게 적용할 수 있는 이점이 있다.
- [0028] 본 발명의 다른 양태에서는 아토피성 피부염 마우스 모델인 NC/Nga 마우스에 신경줄기세포의 배양액과 그 배양액으로부터 추출한 엑소좀 및 양성대조군으로 티크로리무스를 21일간 처리한 경우, 신경줄기세포 배양액과 그 유래 엑소좀, tacrolimus를 처리한 군에서 피부 딱지와 건조함이 완화되고, 피부두께도 정상에 가깝게 얇아지는 것을 확인하였다.
- [0029] 본 발명의 일 양태에서는 신경줄기세포 배양액으로부터 분리한 엑소좀 내의 단백질을 TMT(Tandem mass tag) mass spectrometry 방법을 이용하여 분석하고, 엑소좀 내에서 항염증에 관여하는 면역반응 억제 인자로 아넥신 1(annexin 1), 클러스테린 이소형2(isoform 2 of clusterin), N-아세틸무라모이-L-알라닌 아미데이즈(isoform 2 of N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase) 및 트랜스크립션 인터미디어리 팩터 1 베타(transcription intermediary factor 1 beta)를 선별하였다.
- [0030] 본 발명의 의약 조성물은 수용성 용액으로 제조할 수 있다. 바람직하게는, 한스 용액 (Hank's solution), 링거

용액(Ringer's solution) 또는 물리적으로 완충된 염수와 같은 물리적으로 적절한 완충용액을 사용할 수 있다. 수용성 주입(injection) 현탁액은 소듐 카복시메틸 셀룰로스, 솔비톨 또는 텍스트란과 같이 현탁액의 점도를 증가시킬 수 있는 기질을 첨가할 수 있다. 덧붙여서, 활성 성분의 현탁액은 적합한 유질의 주입 현탁액(oily injection suspensions)으로 제조될 수 있다. 적합한 친지성 용매 또는 담체는 참기름과 같은 지방산 또는 에틸 올레이트, 트리글리세라이드 또는 리포솜과 같은 합성 지방산 에스테르를 포함한다. 복수양이온성 비지질 아미노 폴리머(polycationic amino polymers)도 운반체로서 사용될 수 있다. 임의로, 현탁액은 화합물의 용해도를 증가시키고 고농도의 용액을 제조하기 위해 적합한 안정화제 또는 약제를 사용할 수 있다.

[0031] 본 발명의 치료용 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함할 수 있으며, 약제학적으로 허용되는 담체는 담체, 보조제 및 비히클을 포함하며 총괄적으로 “약제학적으로 허용되는 담체”라고 한다. 본 발명의 의약 조성물에 사용될 수 있는 약제학적으로 허용되는 담체로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 이온 교환, 알루미나, 알루미늄 스테아레이트, 레시틴, 혈청 단백질(예, 사람 혈청알부민), 완충 물질(예, 여러 인산염, 글리신, 소르브산, 칼륨 소르베이트, 포화 식물성 지방산의 부분적인 글리세라이드 혼합물), 물, 염 또는 전해질(예, 프로타민 설페이트, 인산수소이나트륨, 인산수소칼륨, 염화나트륨 및 아연 염), 교질성 실리카, 마그네슘 트리실리케이트, 폴리비닐 피롤리돈, 셀룰로즈-계 기질, 폴리에틸렌 글리콜, 나트륨 카복시메틸셀룰로스, 폴리아릴레이트, 왁스, 폴리에틸렌-폴리옥시프로필렌-차단 중합체, 폴리에틸렌 글리콜 및 양모지 등이 포함된다.

[0032] 본 발명에서 용어, “예방”이란 본 발명의 조성물의 투여로 아토피를 방지하거나 지연시키는 모든 행위를 의미하며, “치료”란 본 발명의 조성물의 투여로 아토피의 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다. 상기 아토피 치료는 아토피가 발생할 수 있는 임의의 포유동물에 적용이 가능하며, 그 예로 인간 및 영장류뿐만 아니라, 소, 돼지, 양, 말, 개 및 고양이 등 가축을 제한없이 포함하나, 바람직하게는 인간일 수 있다.

[0033] 본 발명에서 “투여”는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며, 상기 조성물들의 투여 경로는 약물이 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비강내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여 등이 될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 그러나 경구 투여 시, 펩타이드는 소화가 되기 때문에 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제형화하는 것이 바람직하다.

[0034] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 치료할 질환, 투여 경로, 환자의 연령, 성별 및 체중 및 질환의 중증도 등의 여러 관련 인자와 함께, 활성성분인 약물의 종류에 따라 결정된다.

[0036] 다른 관점에서, 본 발명은 신경줄기세포 유래 엑소솜(exosomes) 또는 신경줄기세포 유래 엑소솜(exosomes)을 함유하는 신경줄기세포 배양액을 유효성분으로 함유하는 아토피 피부염 완화를 위한 피부 외용제에 관한 것이다.

[0037] 또 다른 관점에서, 본 발명은 신경줄기세포 유래 엑소솜(exosomes) 또는 신경줄기세포 유래 엑소솜(exosomes)을 함유하는 신경줄기세포 배양액을 유효성분으로 함유하는 아토피 피부염 완화를 위한 기능성 화장품 조성물에 관한 것이다.

[0038] 기능에 따라, 본 발명의 화장품 조성물은 용액(로션형 조성물), 농축 용액, 젤, 연고, 에멀션(크림, 유제), 소포 분산, 파우더, 조밀 파우더(dense powder), 페이스트 또는 고형제 등의 다양한 형태로 제공될 수 있다. 더 자세히 설명하자면, 본 발명의 화장품 조성물은 볼렌지, 크림(안면 크림, 핸드 크림, 보습 크림, 햇빛 차단 크림), 크림 파우더, 아이 라이너, 아이 세도우, 아이브로우 펜슬, 파운데이션, 로션, 마스크라, 마이크로에멀션, 연고, 포마드 및 루즈 등의 다양한 형태 내에서 분산될 수 있으나 이에 한정되지 않는다. 이들은 거품 또는 스프레이의 형태로 적용할 수 있는 추진제를 포함한 압착 팩으로 포장될 수 있다.

[0039] 본 발명에 따른 의약 조성물의 경구 투여는 목적하는 치료가 국소 적용으로 접근이 용이한 부위 또는 기관과 관련이 있을 때 특히 유용하다. 피부에 국소적으로 적용하는 경우, 의약 조성물은 담체에 현탁 또는 용해된 활성 성분을 함유한 적합한 연고로 제형되어야 한다. 본 발명의 화합물을 국소 투여하기 위한 담체로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 광유, 유동 파라핀, 백색 와셀린, 프로필렌 글리콜, 폴리옥시에틸렌, 폴리옥시프로필렌 화합물, 유화 왁스 및 물이 포함된다. 다른 방도로서, 의약 조성물은 담체에 현탁 또는 용해된 활성 화합물을 함유한 적합한 로션 또는 크림으로 제형될 수 있다. 적합한 담체로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 광유, 솔비탄 모노스테아레이트, 폴리솔베이트 60, 세틸 에스테르 왁스, 세테아릴 알코올, 2-옥틸도데카놀, 벤질 알코올 및 물이 포함된다. 본 발명의 의약 조성물은 또한 직장 좌제에 의해 또한 적합한 관장제로 하루 장관으로 국소

적용할 수 있다. 국소 적용된 경피 패치가 또한 본 발명에 포함된다.

- [0040] 본 명세서에서 설명된 엑소좀 또는 신경줄기세포 배양액을 다양한 형태의 화장품 조성물에 첨가할 수 있다. 예를 들어, 이들은 표피, 두발 및 점막을 보호하는 약학적 조성물; 피부 및 표면적 체성장용 메이크업 조성물; 치아미백제 등의 치아용 조성물 또는 콜레글리아(collegria)와 같은 안과용 조성물 등에 첨가될 수 있다.
- [0041] 상기 화장품 조성물에는 천연 또는 인공 왁스가 함유될 수 있다. 천연 왁스에는 라놀린, 밀랍, 스퍼마세티(spermaceti) 또는 라놀린 알콜, 경화 또는 아세틸화 라놀린, 라놀린 지방산 또는 아세틸화 라놀린 알콜 등의 라놀린 유도체와 같은 동물성과 카나우바(carnauba), 칸텔릴라(candelilla), 카폭(kapok), 쌀, 경화 조조바(jojoba), 알파(alfa) 또는 야판(yapan)왁스 또는 코르크(cork)섬유, 사탕수수 왁스, 코코아 버터 등의 식물성이 있다. 대안적으로, 무기 왁스에는 파라핀, 몬탄, 리그나이트, 페트로라툼, 페트로라툼 왁스 또는 미소결정화 왁스, 세레신, 또는 오조케라이트 등이 포함될 수 있다. 사용되는 합성 왁스의 예에는 피서-트롭쉬 합성에 의해 얻은 폴리에틸렌 왁스 및 포화 C10-C40 카르복실산 및 포화 C10-C40 알콜의반응 산물인 미리스틸 미리스테이트와 같은 선형 에스테르가 포함된다. 사용되는 그 밖의 왁스에는 칼슘 라놀레이트 또는 스테아레이트 또는 경화 코코넛유 등이 포함된다.
- [0042] 상기 화장품 조성물에는 식물성 또는 동물성 오일의 개질 또는 비개질 오일이 포함될 수 있다. 예를 들어, 스위트 아몬드오일, 아보카도 오일, 캐스터 오일올리브 오일, 조조바 오일, 해바라기 오일, 밀눈 오일, 참깨 오일, 땅콩 오일, 포도씨 오일, 두유, 홍화 오일, 코코넛 오일, 메이즈 오일, 헤즐넛 오일, 카라이트 버터, 팜 오일, 살구씨 오일, 칼로필럼 오일 또는 파하이드로스쿠알렌 등이 있다. 더욱이, 오일 상은 액체 파라핀, 액체 페트로라툼 등과 같은 무기 오일일 수 있다. 상기 오일은 이소프로필 미리스테이트, 이소프로필 팔미테이트, 2-에틸헥실 팔미테이트, 페니실린 오일(스테아릴 옥토네이트)와 같은 지방산 에스테르, 올레, 팔미트, 스테아르, 베헨, 리놀레, 라놀레산과 같은 불포화 지방산 또는 C8-C16의 이소파라핀과 같은 휘발성 또는 비휘발성 이소파라핀 등일 수 있다.
- [0043] 더욱이, 상기 오일은 올레일 알콜, 세틸 알콜 및 스테아릴 알콜과 같은 C12-C18의 지방 알콜 등일 수 있다.
- [0044] 에멀션으로 제공된다면, 본 발명의 유화된 조성물은 오일 상 및 수성 상을 포함한다. 상기 오일 상은 조성물 총 중량에 대하여 약 1 내지 약 75 중량%의 범위로 제공되는 것이 좋으며, 더 좋기로는 약 5 내지 약 60 중량%, 가장 좋기로는 약 40 내지 약 60 중량%로 제공되는 것이 바람직하다.
- [0045] 수성 상에는 수성 젤 및 화장품 에멀션에 일반적으로 사용되는 보조제를 포함한다. 수성 상은 약 0.5 내지 약 20 중량%가 제공될 수 있으며, 저급 C2-C6 모노알콜 및/또는 글리세롤, 부티렌 글리콜, 이소프렌 글리콜, 프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜과 같은 폴리올 등이 포함될 수 있다.
- [0046] 유화된 화장품 조성물을 제조하기 위하여 유화제가 사용될 수 있다. 소망하는 에멀션 효과를 나타내는 한 어떠한 양의 미용적으로 허용가능한 유화제도 사용이 가능하다. 유화제는 알려진 염 및 계면활성제로부터 선택된다. 유화제는 스테아르산, 소르비탄 세스퀴놀레이트, 폴리에틸렌 글리콜(PEG-30), 디폴리하이드록시스테아레이트, 레시틴, 마그네슘 스테아레이트, 및 이들의 유도체 및 혼합물에서 선택하는 것이 바람직하다. 상기 유화제는 조성물 총 중량에 대하여 약 0.5 내지 약 30 중량%의 범위로 제공되는 것이 좋으며, 더 좋기로는 약 1 내지 약 12 중량%, 더욱 좋기로는 약 4 내지 약 8 중량%로 사용되는 것이 바람직하다.
- [0047] 본 발명은 또한 증점제를 사용할 수 있다. 화장품에 정상적으로 사용되는 모든 증점제를 사용할 수 있다. 이러한 예에는 개질 마그네슘 실리케이트(벤통젤 VS38, Rheox), 디스테아릴디메틸암모늄 클로라이드(벤통 38 CE, Rheox)에 의해 개질된 헥토자이트, 가교결합된 폴리아크릴산 및 구아 검 및 개질 또는 비개질된 셀룰로오스와 같은 개질 점토 등이 포함된다.
- [0048] 본 발명의 조성물은 막형성 조성물을 포함할 수 있다. 상기 막형성 조성물은 예를 들어, 아크릴, 폴리에스테르 및/또는 폴리우레탄 폴리머의 분산 수용액, 예컨대, 부분적으로 중성화된 비닐 아세테이트/비닐 p-3차-부틸/벤조에이트/크로톤산공중합체의 분산 수용액과 같은 폴리머의 분산 수용액에서 선택될 수 있다.
- [0049] 본 발명의 조성물에는 착색제가 포함될 수 있다. 이러한 착색제는 수용액 또는 유기 용매에 불용성인 무기 또는 유기 안료일 수 있으며, 수용액 또는 유기 물질에 가용성인 염료가 될 수 있다.
- [0050] 윤활제는 또 다른 선택적 성분이다. 윤활제는 일반적으로 상기 조성물이 손에서 부드럽고 매끄러운 느낌을 형성하도록 돕는다. 이러한 예에는 C12-C15 알콜의 벤조산 에스테르, 시클로메티콘, 디메티콘과 같은 휘발성 실리콘 및 이들의 유도체 등이 있다. 본 발명에서 활용할 수 있는 실리콘 함유 화합물에는 시클로메티콘 테트라머 및

펜타머(다우 코닝 244 또는 245 유체로서 구득) 또는 스테아틸 디메티콘 (다우 코닝 2503 화장품 왁스로서 구득)과 같은 비휘발성 실리콘 또는 시클로메티콘폴리올, 디메티콘폴리올, 세틸 디메티콘 코폴리올, 페닐 메티콘, 페닐 트리메티콘과 같은 이들의 유도체가 포함된다. 당업자는 실리콘 함유 화합물은 유화제로 작용한다는 사실을 이해할 것이다.

- [0051] 실리콘 함유 화합물은 조성물 총 중량에 대하여 약 1 내지 약 50 중량%의 범위로 제공되는 것이 좋으며, 더 좋기로는 약 5내지 약 30 중량%, 가장 좋기로는 약 10 내지 약 25 중량%로 제공되는 것이 바람직하다.
- [0052] 보습제 또한 상기 화장품 조성물에 첨가될 수 있다. "보습제"는 습윤제 등의 피부에 보습효과를 제공하는 시약을 말한다.
- [0053] 보습제는 보습효과를 주는 양이 제공된다. 보습제의 예에는 글리세린, 부틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜, 소르비톨, 소듐PCA, 글루탐 E-10, 글루탐 E-20 등이 있다. 보습제는 조성물 총 중량에 대하여 약 0.1 내지 약 10 중량%의 범위로 제공되는 것이 좋으며, 더 좋기로는 약 0.1 내지 약 5 중량%, 가장 좋기로는 약 1 내지 약 5 중량%로 제공되는 것이 바람직하다.
- [0054] 추가적으로, 연화제가 필요에 따라 포함될 수 있다. 상기 조성물에는 1종 이상의 연화제가 사용되는 것이 좋다. 연화제는 피부 표면에 부드럽고 매끄러운 감촉을 주기 위해 사용된다. 이들은 피부 수화 수준 및/또는 피부 액화 장벽에 상당한 영향을 미치지 않고 효과를 낼 수 있다. 연화제의 예에는 아보카도 오일, 올리브 오일, 해바라기 오일과 같은 식물성 트리글리세라이드, 소르비탄 올레이트, 미리스틸 미리스테이트, 이소프로필 미리스테이트, 글리콜 올레이트, 석유, 글리세린, 페트롤라툼, 광유 젤리와 같은 유기산 에스테르 등이 포함된다. 연화제는 조성물의 약 1 내지 약 50 %의 범위로 제공되는 것이 좋으며, 더 좋기로는 약 5 내지 약 40 중량%, 가장 좋기로는 약 10 내지 약 25 중량%로 제공되는 것이 바람직하다.
- [0055] 추가적으로, 본 발명의 화장품 조성물에는 항산화제가 포함될 수 있다. 항산화제는 천연이거나 합성일 수 있다. 그 예로서는 토코페롤, 비타민 E 리놀레이트, 비타민 E, 비타민 E POE 석시네이트, 비타민 E 아세테이트, 아스코르브산, 아스코르빌 팔미테이트 및 아스코르빌 PMG 등의 비타민 E 유도체가 포함된다. 예컨대, 단일 산소소와 같은 유해한 산화물을 중성화하기 위해 유효량이 사용된다. 이들은 약 0.1 내지 약 5 중량%의 범위로 제공되는 것이 좋으며, 더 좋기로는 약 0.5 내지 약 1 중량%로 제공되는 것이 바람직하다.
- [0056] 상기 화장품 조성물에는 예를 들어, PPG-2-미리스틸 에테르 프로피네이트, 이소프로필 팔미테이트 등의 알려진 크림과 같은 조성물 내의 연화제의 오일감을 줄여주는 성분을 함유할 수 있다. 이 성분이 필요하다면, 약 1 내지 약 30 %의 양으로 제공되는 것이 좋으며, 더 좋기로는 약 5 내지 약 25 중량%, 가장 좋기로는 약 10 내지 약 25 중량%로 제공되는 것이 바람직하다.
- [0057] 상기 조성물의 산성을 좋기로는 pH 약 6 내지 8의 소망하는 범위로 조절하기 위해서 pH 조절제가 일반적으로 사용된다.
- [0058] 그 예로는 아미노메틸프로판올이 있다. 이 pH 조절제는 소망하는 pH 범위로 pH를 변화시키기 위한 유효량으로 첨가된다.
- [0059] 조성물 총 중량의 0.4 중량% 미만으로 사용되는 것이 바람직하다.
- [0060] 햇빛 차단제가 필요에 따라 포함될 수 있다. "햇빛 차단제"이라는 표현은 피부를 침투하는 자외선을 흡수, 차단 또는 예방하는 유용한 것을 의미한다. 햇빛 차단제는 좋기로는 이산화티타늄, 또는 산화아연, 더 좋기로는 폴리머 물질 또는 화장용으로 허용가능한 피복으로 피복된 햇빛 차단제가 바람직하다. 햇빛 차단제의 예에는 알루미늄 스테아레이트로 피복된 미소화된 이산화티타늄, C9-C15의 폴리플루오로알킬 포스페이트, 산화아연으로 피복된 폴리머, 아미노벤조산(PABA) 및 이들의 에스테르, 벤조페논-3, 옥틸 살리실레이트, 멘틸 안트라닐레이트, 페닐벤즈이미다졸 술폰산 등이 있다.
- [0061] 상기 조성물의 평형은 부가제, 충전제, 유기 용매(알콜 및 오일), 완충 용액, 향수, 자체 태닝제(tanning agent) (디하이드록시 아세톤) 등의 종래의 첨가제와 그 밖의 화장용으로 허용가능한 담체 및 충전제로 구성되어 있다. 본 발명의 화장품 조성물에 사용할 수 있는 그 밖의 종래의 첨가제에는 분산제 및 보존제를 포함한다. 종래의 첨가제의 양은 전형적으로 조성물 총 중량에 대하여 약 0 내지 약 20 중량%의 범위로 제공되며, 좋기로는 약 1 내지 약 15 중량%, 더 좋기로는 약 4 내지 약 10 중량%로 제공되는 것이 바람직하다.
- [0062] 남은 백분율 또는 조성물의 평형은 물임을 이해할 것이다. 물은 상기 조성물을 피부로 분산시키는 담체로서 작용한다. 사용되는 물은 탈이온화수 또는 증류수인 것이 바람직하며, 물의 양은 전형적으로 약 10 내지 80 중량

%, 가장 좋기로는 약 20 내지 40 중량%인 것이 바람직하다.

[0063]

양호한 구체적 실시상태에서, 본 발명의 화장품 조성물은 크림 또는 로션 또는 연고이나 가장 바람직한 것은 크림이다. 담체는 물이 바람직하다. 선호되는 크림 조성물은 엑소좀 또는 신경줄기세포 배양액 성분을 첨가하고도 고품질을 보장하기위하여 당업자에게 알려진 필수적인 일반 화장품 성분을 함유한 수중유 에멀션으로 제형화되었다. 선호되는 구체적 실시상태에서, 이러한 성분에는 조성물의 약 0.5 내지 약 1 중량%의 범위의 페트콜라툼, 특히 백색 페트콜라툼, 조성물의 약 0.5 내지 약 1 중량%의 범위의 라놀린 알콜, 조성물의 약 3 내지 약 6 중량%의 범위의 PPG-2-미리스틸 에테르 프로피오네이트, 조성물의 약 5 내지 약 10 중량%의 범위의 석유, 조성물의 약 0.2 내지 약 0.8 중량%의 범위의 트리에탄올아민, 조성물의 약 2 내지 약 4 중량%의 범위의 글리세롤, 특히 증류된 글리세롤, 조성물의 약 15 내지 약 20 중량%의 범위의 스테아르산, 조성물의 약 10 내지 약 15 중량%의 범위의 이소프로필 팔미테이트가 포함되는 것이 바람직하며 잔여분은 물이다. 화장품 또는 약학적 조성물 내에는 소망하는 특정 크림 제형에 따라 전술한 것들뿐만 아니라 향산화제 및 착색제와 같은 방향제, 향수 비타민 및 그 밖의 당업자에게 알려진 일반 성분이 포함될 수 있다.

[0065]

[실시예]

[0066]

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0068]

실시예 1: 신경줄기세포 배양액의 제조

[0069]

태아 뇌의 뇌실영역(ventricular zone)에서 분리한 성체 신경줄기세포 (neural stem cells, NSCs)를 불멸화 (immortalizing)시켜 세포주를 얻었다. 14주 된 태아 신경 신경세포 조직을 0.1% 콜라게네이즈와 0.1% 히알루로니다아제 용액에서 37℃, 1시간 동안 처리하고, 0.05% 트립신-EDTA를 2~3분 처리하여 단일세포로 분리한 후, 신경줄기세포 특이 마커(CD45-/CD133+/CD34-)를 이용하여 FACS로 신경줄기세포를 분리하였다. 이를 N2 supplements, 0.2mg/ml 헤파린, 20ng/ml bFGF (basic fibroblast growth factors), 20ng/ml EGF(epidermal growth factor) 및 10ng/ml LIF가 첨가된 인간 뉴로스피어 배양배지에서 배양하였다. 10~14일 경과 후, 형성된 뉴로스피어(neurospheres)에 콜라게네이즈를 처리하여 단일세포로 분리하고 retroviral vector를 이용하여 v-myc 유전자를 형질도입하고 항생제 선별과정을 통해 얻은 세포를 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), 10% FBS (fetal bovine serum), 및 1% 페니실린/스트렙토마이신이 포함된 비유도성 배지에서 배양하였다 (Flax JD et al., Nature Biotechnology, vol.16, 1998; Lim H-C et al., Neuroscience Letters 45, pp175-180, 2008). 150mm 배양 접시에 상기 세포를 5×10^5 개를 분주하고, 배양 배지 15ml를 첨가 후 37℃, 5% CO₂ incubator에서 80% 컨플루언트(confluence) 시에 배양액을 수득하였다. 이때, 배양배지는 DMEM, 10% FBS, 및 1% 페니실린/스트렙토마이신이 포함된 비유도성 배지였고, 배양 후 비접착성 세포들은 제거하였다. 상기 과정으로 배양된 신경줄기세포를 계대배양하는 과정에서 배양액을 원심분리하여 상등액을 여과하여 수득하였다.

[0071]

실시예 2: 신경줄기세포 유래 엑소좀의 분리

[0072]

실시예 1에서 수득한 불멸화된 신경줄기세포를 150mm culture dishd 상기 세포를 5×10^5 개를 분주하고 배양하다가 80% 컨플루언트 시에 배양 배지를 13.5ml 첨가 후 37℃, 5% CO₂ incubator에서 이틀간 배양 후 배양 배지를 얻었다. 얻은 배지를 10,000g, 30분, 4℃에서 원심분리하여 세포찌꺼기를 제거하고 0.22 μm의 보틀 탑 필터에 거른 후 아미콘100k 튜브를 이용하여 4℃, 5,000g에서 15분 동안 원심분리하여 배지를 농축시켰다. 농축된 배지를 세파로오스 2b 비드로 채워져있는 컬럼에 한 회당 최대 수용 부피인 500 μl를 넣어 액체 컬럼 크로마토그래피 방법으로 세포 외 소포체를 크기별로 얻어내었다. 컬럼은 사용 전, autoclaved PBS로 두 번 내려서 충분히 세척 한 후, 500 μl의 시료를 넣고, 컬럼을 통과하여 나오는 용액 500 μl를 1 분획(fraction)으로 정하고 여섯 번째 분획부터 열 번째 분획까지를 모아 세포의 소포체 중에서도 50~150nm 크기의 세포밖 소포체라고 불리는 엑소좀(exosomes)을 얻었다(도 1). 상기 과정으로 얻은 엑소좀은 -80℃에서 보관을 하며 분리한 소포체가 엑소좀인지 확인하기 위하여, 웨스턴블롯을 통해 엑소좀 특이 마커인 CD63, CD9을 검출하였고(도 2c), DLS (dynamic

light scattering)과 NTA (nanoparticle tracking analysis)를 통해서 엑소좀의 크기에 해당하는지 크기별 분포도와 개수를 확인하였다(도 2 a 및 b). 또한, 엑소좀의 특정 모양이라고 할 수 있는 컵형(cup-shaped) 또는 도넛형(doughnut shaped) 비히클인지 확인하기 위해 TEM(transmission electronic microscope)을 이용하여 전자현미경 사진으로 엑소좀의 특징적인 모양을 확인하였다(도 2c).

[0074] **실시예 3: 신경줄기세포 배양액의 항염증 효과 확인**

[0075] 인간 피부 각질세포주인 HaCaT(ATCC) 를 12웰에 2.5×10^4 개씩 깔고 신경줄기세포 배양액 10%, 50%, 100%를 48시간 처리한 후, TNF α (10ng/ml)와 IFN- γ (10ng/ml)를 6시간 동안 처리하여 염증을 일으키고 PBS로 세포를 씻어준 후 트립신-EDTA로 세포를 얻어 신경줄기세포 배양액과 신경줄기세포 유래 엑소좀의 항염증 효과를 리얼타임 qPCR로 확인하였다. TNF α (10ng/ml)와 IFN- γ (10ng/ml)로 염증을 유도할 시 염증성 사이토카인인 IL-6, TNF α 그리고 면역세포를 이끄는 chemotaxi의 역할을 하는 케모카인 TARC, RANTES, MCP-1의 RNA 발현을 확인하였다.

[0076] 그 결과, 도 3에서 확인할 수 있듯이, 신경줄기세포 배양 배지 처리에 의하여, 상기 염증성 사이토카인과 케모카인의 발현이 감소되는 것을 확인할 수 있다.

[0077] 또한, 면역세포에서도 신경줄기세포 배양액의 항염증 효과를 확인하기 위하여, 쥐 대식세포주인 RAW264.7 (한국 세포주은행 KCLB NO: 40071) 에 신경줄기세포 배양액을 각각 10%, 50% 및 100% 농도로 48시간 처리한 후, 배양액 존재 하에 LPS(100ng/ml)를 처리하여 염증 유발 후에 배양액의 항염증 효과를 리얼타임 qPCR로 확인하였고 nitric oxide 생성량은 Griess reagent로 1:1 (v/v)으로 반응 후 548nm에서 스펙트로포토메터로 흡광도를 측정하였다. LPS에 의해 유도되는 염증성 사이토카인 중 IL-6와 가려움증을 유발하는 PGE2를 생성하는데 중요한 COX-2, 활성 산소 종인 nitric oxide를 생성하는 induced NOS (nitric oxide synthase)의 유전자 발현과 iNOS의 최종산물인 nitric oxide의 농도가 신경줄기세포 배양액을 처리함에 따라 감소한 것을 도 4 b, c 및 d에서 확인할 수 있으며 신경줄기세포 배양액 자체는 대식세포를 활성화시키지 않는다는 것을 도 4a의 대식세포의 모양을 보고 확인할 수 있다.

[0079] **실시예 4: 신경줄기세포 배양액의 NF- κ B (nuclear factor-kappa B) 전사인자의 인산화 억제 및 IL-1 β 의 발현 억제 확인**

[0080] 실시예 3의 신경줄기세포 배양액과 동일 조건으로 처리한 HaCaT를 trypsin-EDTA를 처리하여 얻은 세포에 lysis buffer를 이용하여 단백질을 수득하고, Bradford assay를 통해 단백질을 정량하였다. 이를 이용하여 NF- κ B와 phospho-NF- κ B의 항체를 이용하여 염증반응을 매개하는 전사인자인 NF- κ B의 인산화 정도를 웨스턴 블롯으로 확인하였고 염증성 사이토카인인 IL-1 β 의 mature form의 발현 정도를 알아보기 위해 IL-1 β antibody를 이용하여 그 발현 증감을 확인하였다. 그 결과, 처리한 신경줄기세포 배양액의 농도에 따라 인산화율이 감소된 것을 도 5 a와 b에서 확인할 수 있다.

[0082] **실시예 5: 신경줄기세포 배양액으로부터 분리한 엑소좀의 HaCaT로의 내재화 확인**

[0083] PKH67로 엑소좀의 막을 염색하기 위해서 24웰에 커버슬립을 깔고 그 위에 1×10^4 개의 HaCaT를 깔고 단백질 농도 기준 엑소좀 1 μ g/ml을 24시간 처리한 후 4% PFA(paraformaldehyde)로 냉장에서 하룻밤 동안 고정하였다. PBS로 2회 세척한 후 0.1% Triton X-100을 5분 동안 처리하여 핵 내로 염색이 될 수 있도록 하였다(도 8a). 10% NDS(normal donkey serum)으로 블로킹한 후, 세포질의 액틴(actin)을 염색시키기 위해 액틴 항체를 2% NDS에 1:500으로 희석하여 세포에 처리해 주었다.

[0085] **실시예 6: 신경줄기세포 배양액으로부터 분리한 엑소좀의 항염증 효과 확인**

[0086] HaCaT 세포를 12웰에 2.5×10^4 개씩 분주하고 분리한 엑소좀을 500 μ g/ml 농도로 48시간 동안 노출 후, TNF α (10ng/ml)와 IFN- γ (10ng/ml)를 6시간 동안 처리하여 염증을 일으키고 PBS로 세포를 씻어준 후, 트립신-EDTA로 처리하여, 세포를 수득하고, 신경줄기세포 유래 엑소좀의 항염증 효과를 리얼타임 qPCR로 확인하였다.

- [0087] 그 결과, 도 6 및 도 7a~c에 나타난 바와 같이, 엑소좀의 처리에 의해 염증성 사이토카인 TNF α 와 케모카인인 TARC, MCP-1, RANTES의 발현이 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 또한 상기 동일 조건에서 염증반응에 관여하는 전사인자인 NF- κ B(nuclear factor kappa B)의 인산화 정도를 웨스턴블롯으로 확인해본 결과, 엑소좀 처리에 따라 인산화된 NF- κ B의 단백질 발현이 감소하는 것을 확인할 수 있었다(도 8b).
- [0089] **실시예 7: 아토피 피부염 쥐 모델에서 신경줄기세포 배양액과 신경줄기세포 배양액 유래 엑소좀의 항염증 효과 확인**
- [0090] NC/Nga 마우스(Charles river, Orient 수입)는 아토피성 피부염 질환 모델 쥐로 인간의 아토피성 피부염과 유사한 증상을 보여준다. SPF(Specific Pathogen Free) 조건에서는 염증이 일어나지 않으나, 일반적인 조건(conventional condition)에서는 아토피 피부염과 유사한 임상 증상을 보이며 아토피성 피부염 완화 실험에 적합하기에 이에 *in vivo* 실험을 진행하였다.
- [0091] 도 9에 나타난 바와 같이, 먼저 8주령의 수컷 NC/Nga 마우스 25마리를 SPF 시설에서 1주일간 적응시키고 실험 시작하기 5일 전 제모크림과 동물용 이발기를 이용하여 3cm x 4cm 크기로 등 털을 제거하였다. 이후 negative, AD-induced, NSC-CM(신경줄기세포 배양액), NSC-Exo(신경줄기세포 배양액 유래 엑소좀), 타크로리무스(tacrolimus; Protopic ointment 0.03%, Astellas Pharma)로 다섯 마리씩 각 다섯 그룹으로 나누었다.
- [0092] 여기서, 타크로리무스는 아토피성 피부염에 사용되는 면역억제제이다.
- [0093] 실험 시작 4일 전 음성대조 그룹을 제외한 나머지 그룹에 1% DNCB (olive oil: acetone = 1:3) 200ul를 등 피부에 도포하여 감작시켰다. 실험 시작 당일부터 0.2% DNCB (200ul)를 등에 이틀에 한 번 발라주어 아토피 증상을 유지시키고 NSC-CM (100ug), NSC-Exo (500ug) 및 tacrolimus (100ug)를 각각의 그룹에 매일 21일간 환부에 도포하였다. 21일 실험 종료시점에는 환부 피부 조직을 얻어 조직검사를 수행하였다.
- [0094] 그 결과, 도 10에 나타난 바와 같이, 실험 시작 일주일 후 아토피 피부염을 유발시킨 군에서는 각질이 일어나며 딱지가 앉는 증상이 나타났으며 2주 후 부터는 신경줄기세포 배양액과 그 유래 엑소좀, tacrolimus를 처리한 군에서 피부 딱지와 건조함이 완화되었다. 특히 털이 자란 모습을 보면 아토피 유발 군에 비해 시약을 처리한 군에서 보다 고르게 자란 것을 확인할 수 있으며, 아토피 군에서는 피부가 일어난 상태이기에 털도 고르지 못하고 덩어리째 뽑히는 증상을 보였다.
- [0095] 21일 째 희생하여 얻은 피부 조직을 4% 파라포름알데하이드에 고정하고 파라핀 블록을 만들었으며 약 7um로 절단하여 H&E 염색을 진행하였다. 그 결과, 도 11에 나타난 바와 같이, 아토피 유발 군에서는 염증과 각질세포의 과다증식으로 인해 표피가 두꺼워진 것을 확인할 수 있으며, 반면 신경줄기세포 배양액, 엑소좀, tacrolimus를 처리한 군에서 두꺼워진 표피가 다시 얇아진 것을 확인할 수 있다.
- [0096] 또한 비만세포의 탈과립을 확인하기 위하여 toluidine blue O 염색을 진행하였다. 비만세포가 염증성 사이토카인에 의해 탈과립하면 histamine을 분비하여 가려움증을 유발시키는데, 도 13에 나타난 바와 같이, 아토피를 유발시킨 군에서는 검붉은 보라색으로 염색된 비만세포가 과다침윤된 것을 육안으로 확인할 수 있다. 반면, 신경줄기세포 배양액과 엑소좀을 처리한 군에서는 비만세포의 침윤이 감소된 것을 확인할 수 있다.
- [0098] **실시예 8: 아토피 피부염 쥐 모델에서 신경줄기세포 배양액에서 분리한 엑소좀의 항염증 효과 확인**
- [0099] *In vivo* 수준에서의 신경줄기세포 배양액에서 분리한 엑소좀의 항염증 효과를 확인하기 위해, 특정 항원에 대한 항체 반응을 측정할 수 있는 효소 결합 면역 침강 분석법 (Enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)을 이용하였다. 8주령의 수컷 NC/Nga 마우스는 세 그룹 (정상 마우스, 아토피가 유도된 마우스, 신경줄기세포 유래 엑소좀을 처리한 마우스)으로 나누고, 각 그룹당 5마리의 마우스를 실험에 사용하였다. 실시예 7과 동일하게 음성대조 그룹 (정상 마우스)을 제외한 나머지 그룹에 1% DNCB를 처리하여 아토피를 유도하였다. 각 그룹에서 무작위로 2마리씩 선택하여 마우스의 심장에서 채취한 혈액에서 혈청 (Serum)을 분리한 다음, 혈청에서 Mouse immunoglobulin E (IgE)의 발현을 확인하였다.
- [0100] 구체적으로 살펴보면, KOMA ELISA KIT (K3231082P)를 사용하여 미리 코팅된 플레이트에 Standard, Control 그리고 Serum을 첨가하여 플레이트의 항체 (Primary Antibody)와 반응할 수 있도록 incubation 시켰고, 여러 번의 세척 과정 후 검출 항체 (Secondary Antibody)를 반응시켰다. 검출 항체는 효소-항체-혈청 복합체와 반응하

여 신호를 측정할 수 있도록 해주며, 이 항체에 색깔을 띠는 물질 (Pink-ONE TMB)을 표지하여 상온에서 적절한 수준까지 발색 반응을 진행하였다. 발색이 충분히 진행되면 정지 용액 (stop solution)을 이용하여 발색 반응을 종료시키고, 마지막으로 마이크로 플레이트 리더기 (Microplate Reader)를 이용하여 450nm에서 흡광도 값을 측정하였다.

[0101] 그 결과, 아토피 유발 물질을 처리하지 않은 정상 마우스 (Negative Control), 아토피 유발 물질인 DNCB가 처리된 마우스 (Vehicle), 아토피 유발 물질인 DNCB 및 신경줄기세포 유래 엑소좀이 처리된 마우스 (NSC-Exo)를 비교했을 때, DNCB 및 엑소좀이 처리된 마우스 (DNCB + NSC-Exo)에서 아토피가 유발된 마우스 (vehicle)보다 IgE의 발현이 1/3 수준으로 더 낮게 나오는 것을 확인할 수 있었다 (도 12). 이는 신경줄기세포 유래 엑소좀에 의해 염증 반응이 완화되었음을 나타내는 것이다.

[0103] 실시예 9: 신경줄기세포 배양액으로부터 분리한 엑소좀의 단백질체 분석

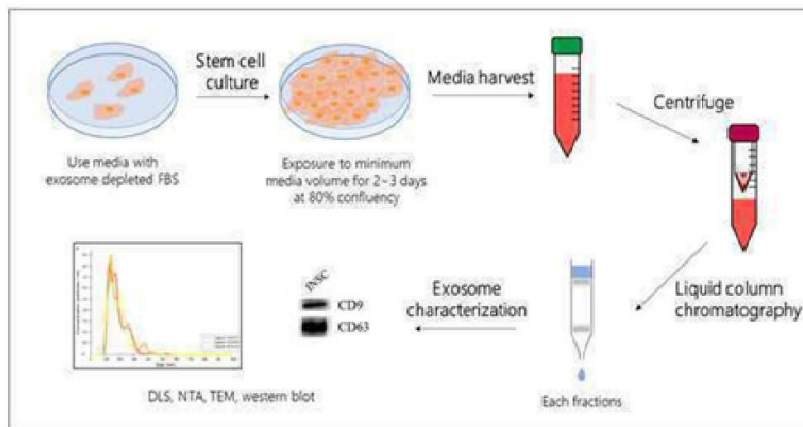
[0104] 실시예 2의 신경줄기세포 배양액으로부터 분리한 엑소좀 내의 단백질을 분석하기 위해 TMT(Tandem mass tag) mass spectrometry 방법을 이용하였다.

[0105] 먼저, 엑소좀을 용해버퍼(lysis buffer)를 이용하여 소포체막을 깨트려 내부의 단백질을 노출시킨 후, BCA(Bicinchoninic acid) assay를 이용하여 단백질을 정량하였다. 동량의 단백질에 트립신/EDTA를 처리하여 펩타이드 단위로 만들고 동위원소가 붙은 tandem mass tag를 peptide에 반응시켰다. 준비된 시료를 High pH 분획 방법을 이용하여 미리 시료를 여러 부분으로 분획 후 LC-MS (liquid chromatography mass spectrometry)로 분석한 결과에서 총 2685개의 단백질이 검출되었으며, 도 14에 나타낸 바와 같이, DAVID (The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) v6.8 프로그램을 이용하여 선천면역반응과 관련된 단백질 130개를 선정하였다. 그 중, 특정 단백질을 정성하기 위한 펩타이드의 수를 PSMs (The Number of Peptide Spectrum Matches)라고 하며 특정 단백질에서만 검출되는 펩타이드를 유니크 펩타이드(Unique Peptides)라고 한다. PSMs의 값이 10 이상 그리고 Unique Peptides 값이 2 이상인 즉, 정성과 정량이 가능한 수치의 단백질들을 선별하였고 총 73개의 단백질 목록을 얻었다. 마지막으로 Pubmed, Google Schola, UniPort, String 웹사이트를 통해 면역반응 억제와 관련되어있는 아넥신 1(annexin 1), 클러스테린 이소형2(isoform 2 of clusterin), N-아세틸무라모이-L-알라닌 아미데이즈(isoform 2 of N-acetylmuramoy-L-alanine amidase) 및 트랜스크립션 인터미디에리 팩터 1 베타(transcription intermediary factor 1 beta)를 최종적으로 선별하였다.

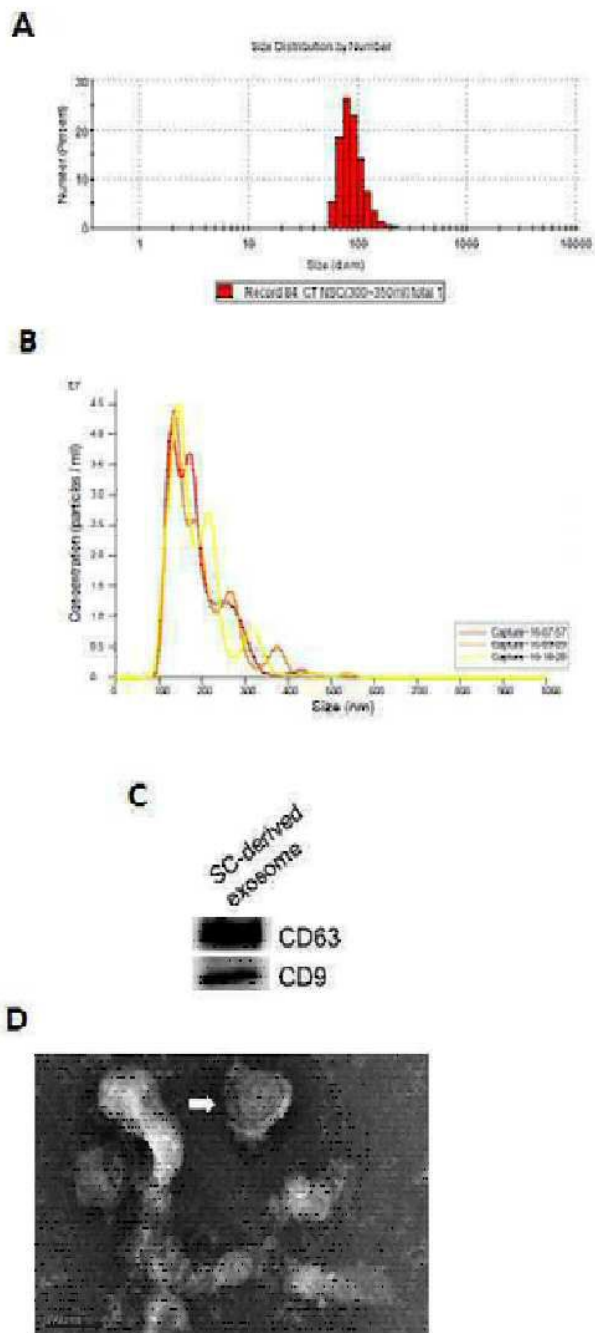
[0107] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

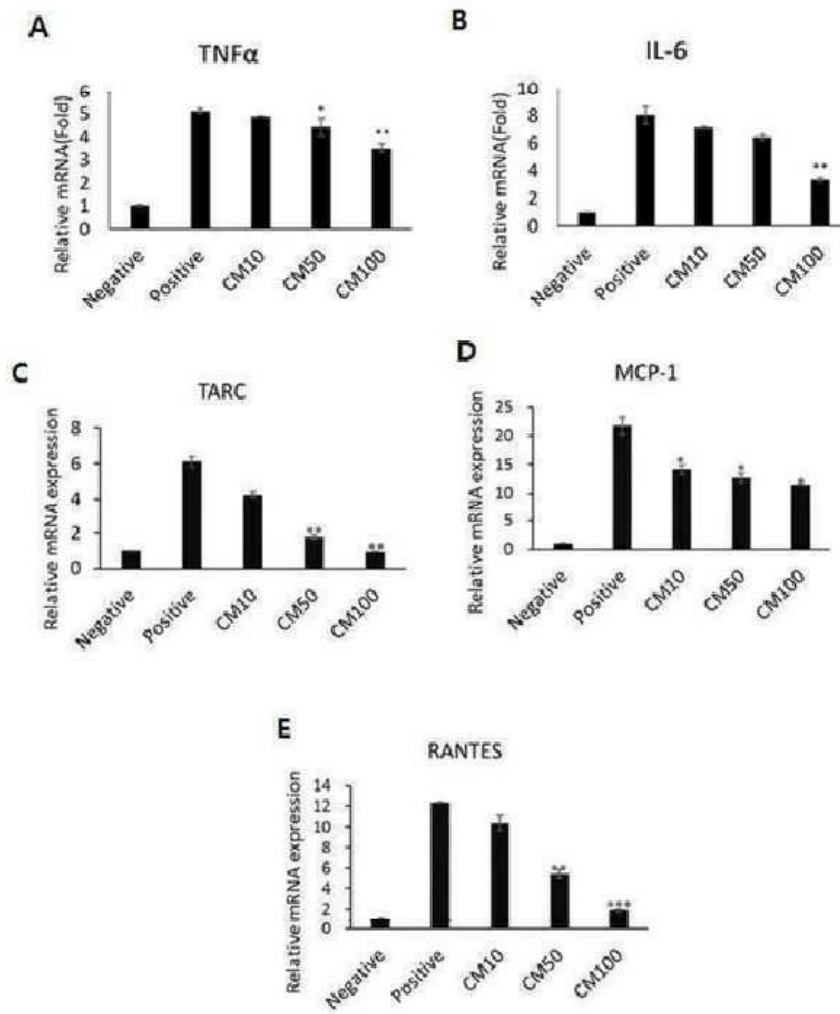
도면1



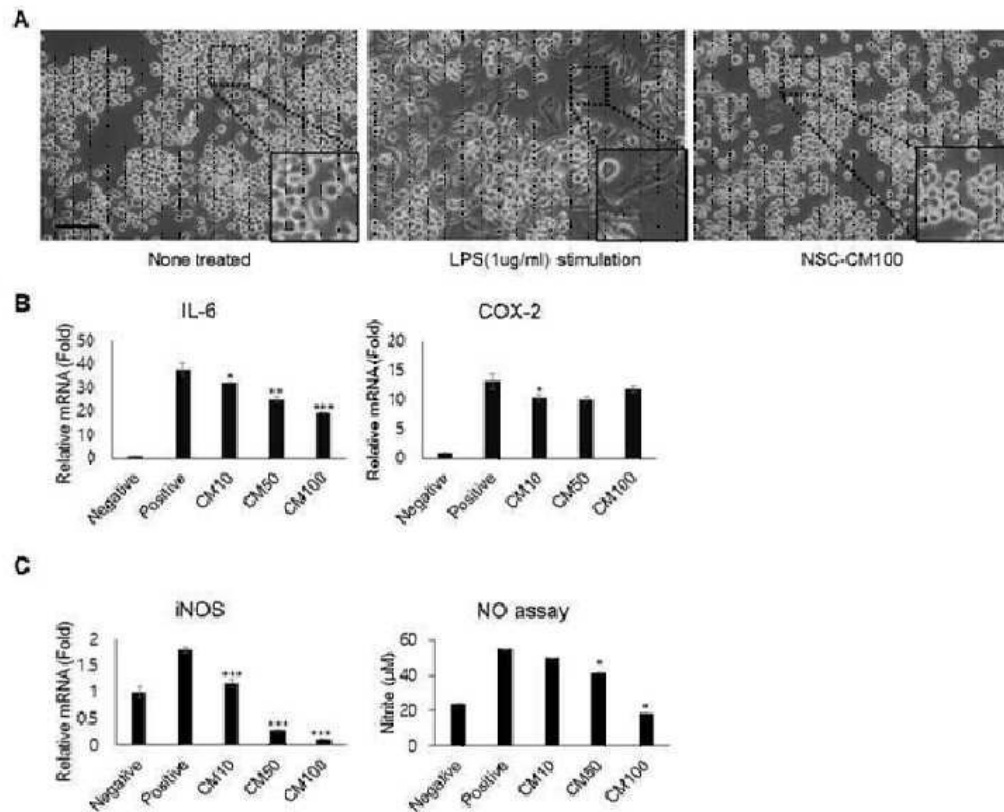
도면2



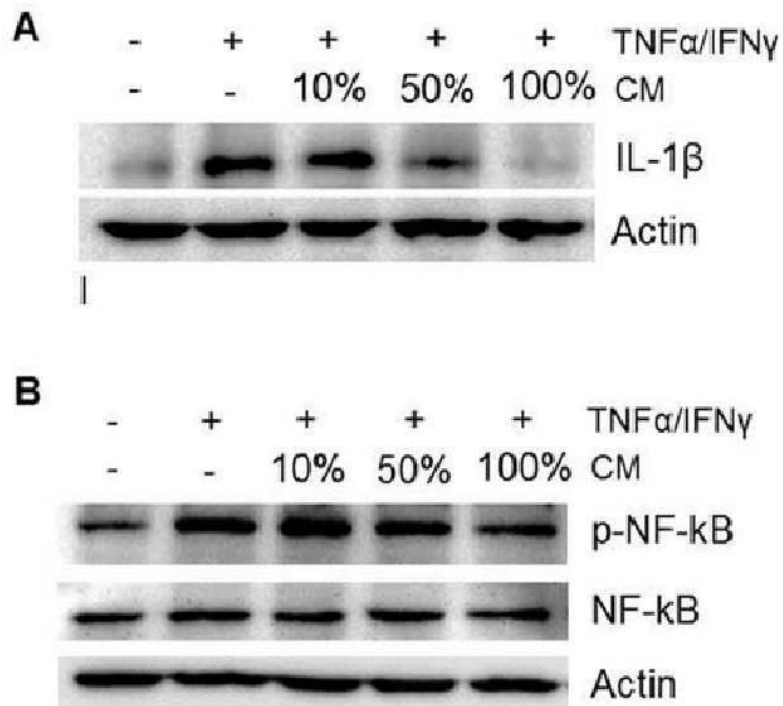
도면3



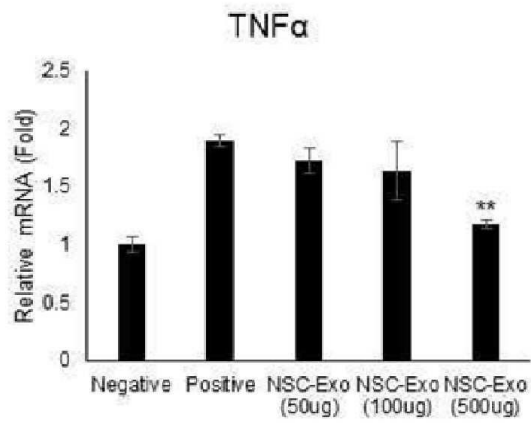
도면4



도면5

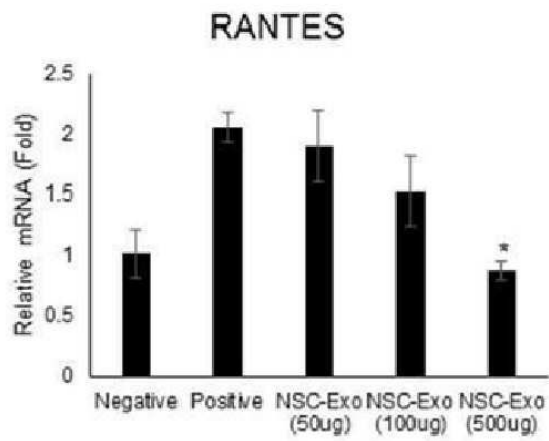


도면6

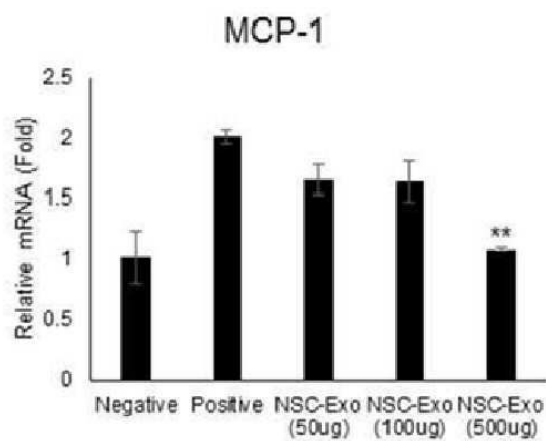


도면7

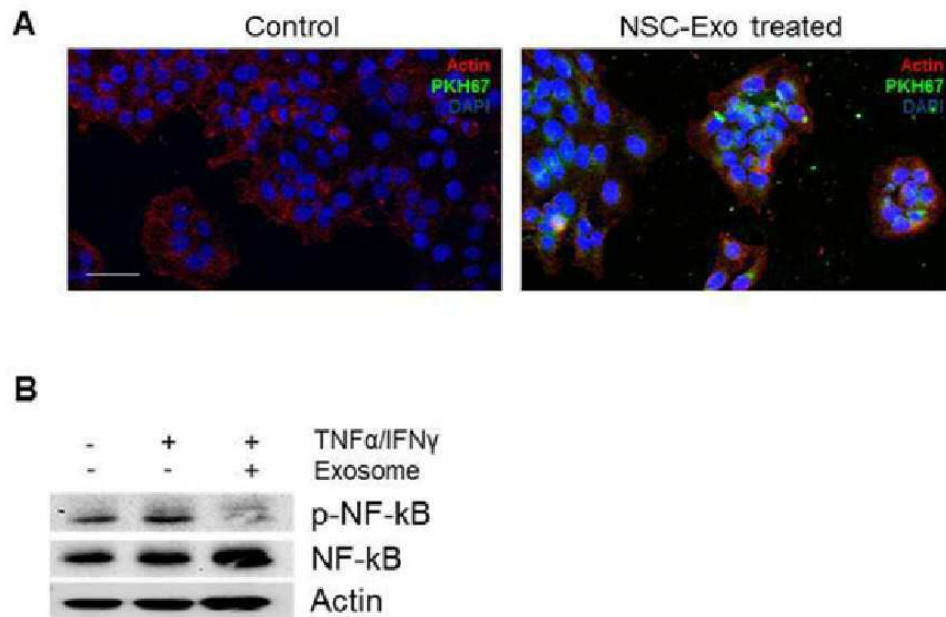
A



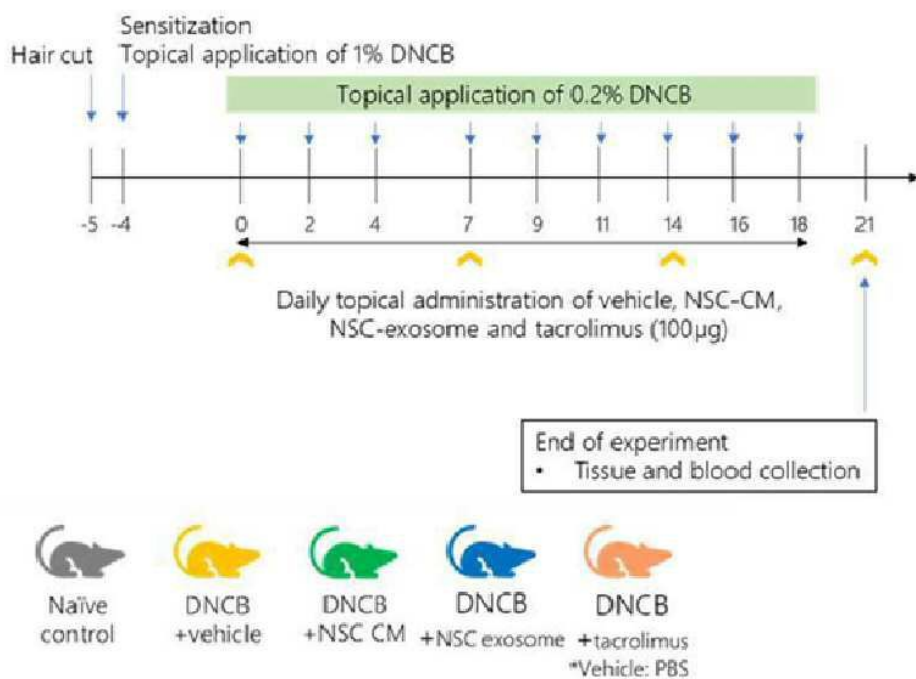
B



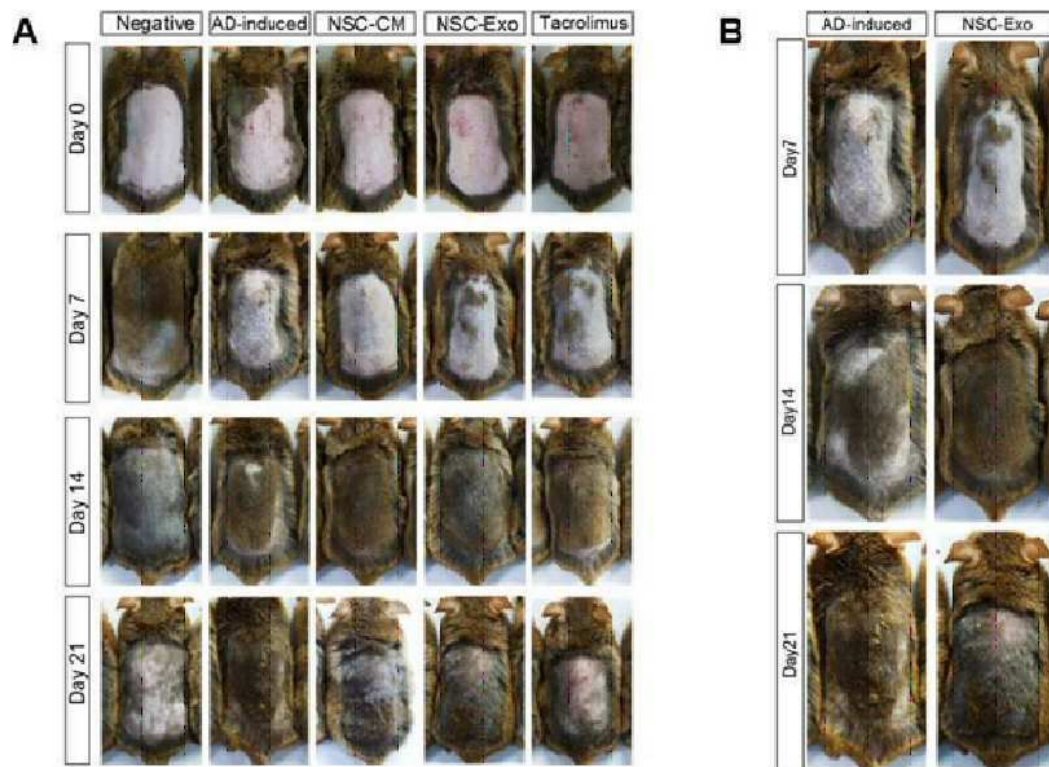
도면8



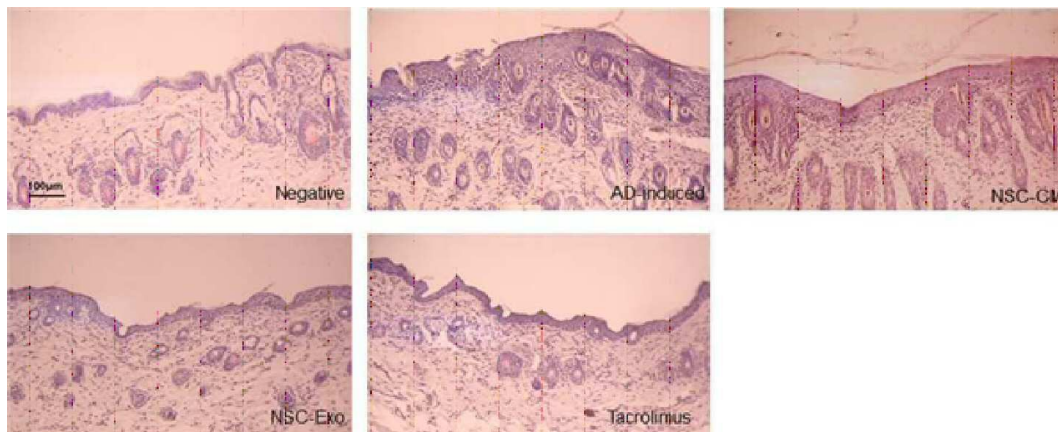
도면9



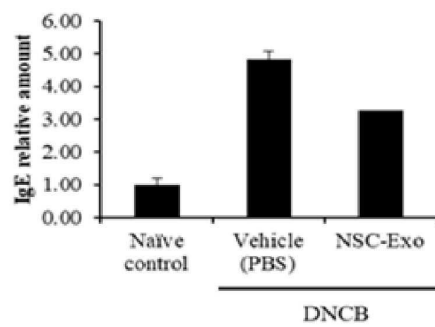
도면10



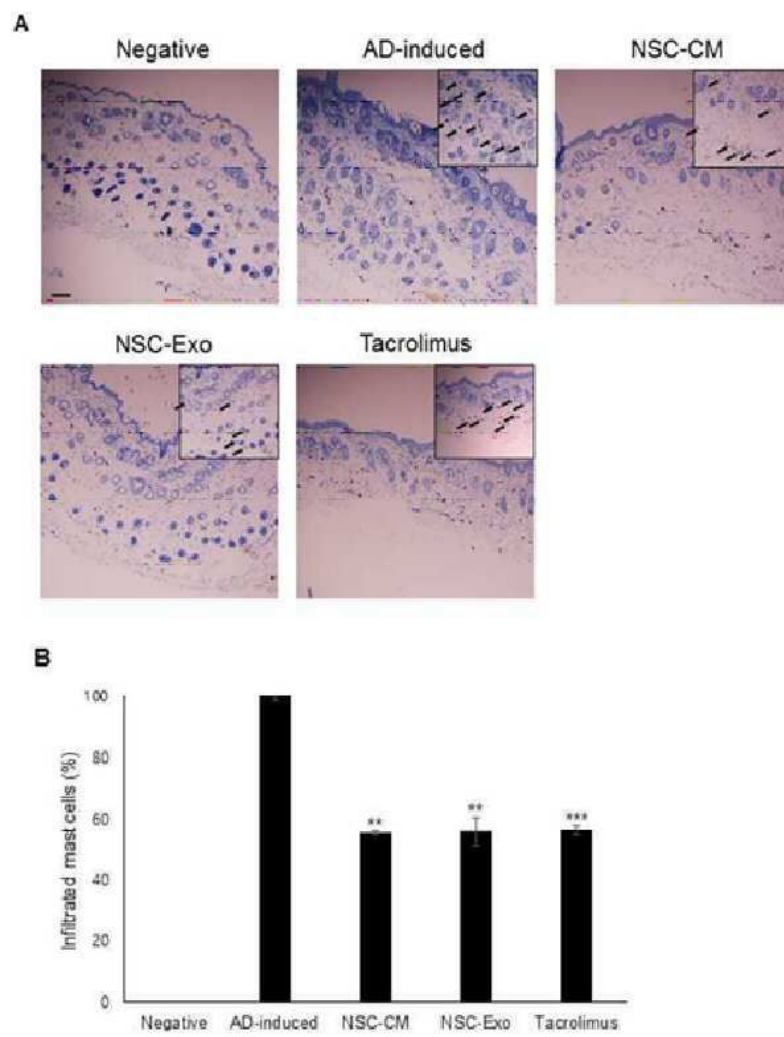
도면11



도면12



도면13



도면14

