(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2020 년 11 월 5 일 (05.11.2020)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2020/222349 A1

(51) 국제특허분류:
A61K 35/30 (2006.01) *A61P 25/28* (2006.01)
A61K 31/7076 (2006.01) *A23L 33/10* (2016.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2019/006214

(22) 국제출원일: 2019 년 5 월 23 일 (23.05.2019)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2019-0050133 2019 년 4 월 29 일 (29.04.2019) KR

(71) 출원인: 동아대학교 산학협력단 (DONG-A UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION FOR INDUSTRY-ACADEMY COOPERATION) [KR/KR]; 49201 부산시 사하구 낙동대로550번길 37, 동아대학교 내 (하단동), Busan (KR).

(72) 발명자: 손은정 (SOHN, Eun Jung); 49201 부산시 서구 대신공원로 32, 동아대학교 의과대학 말초신경병증 연구센터, Busan (KR). 박환태 (PARK, Hwan Tae); 49201 부산시 서구 대신공원로 32, 동아대학교 의과대학 말초신경병증 연구센터, Busan (KR).

(74) 대리인: 두호특허법인 (DOOHO IP LAW FIRM); 06628 서울시 서초구 강남대로51길 1, 7층 (서초동, 511 타워), Seoul (KR).

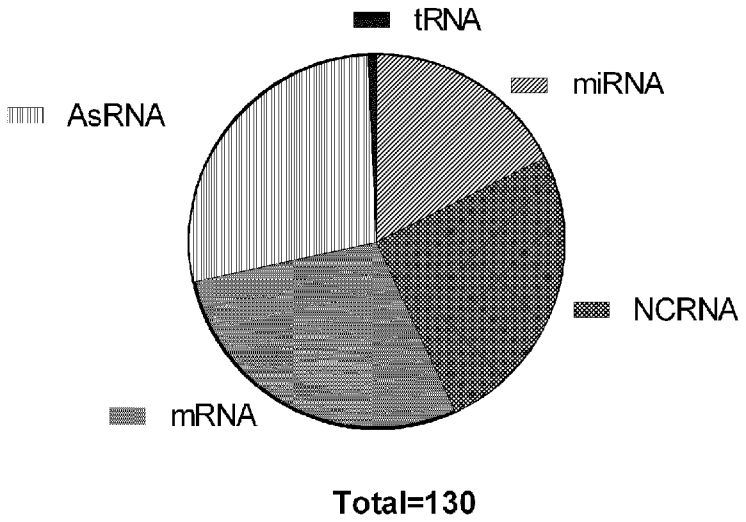
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:
— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) **Title:** PHARMACEUTICAL COMPOSITION AND HEALTH FUNCTIONAL FOOD FOR PREVENTING OR TREATING PERIPHERAL NEURODEGENERATIVE DISEASES

(54) **발명의 명칭:** 말초신경계 퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 건강기능식품



(57) **Abstract:** The present invention relates to a pharmaceutical composition and a health functional food contain exosomes derived from Schwann cells treated with cyclic adenosine-3', 5'-monophosphate (cAMP), thereby inhibiting the proliferation of Schwann cells so as to enable the prevention or treatment of peripheral neurodegenerative diseases.

(57) **요약서:** 본 발명은 cAMP(사이클릭 아데노신-3', 5'- 모노포스페이트) 처리한 슈반세포에서 유래된 엑소좀을 포함함으로써, 슈반세포 증식을 억제하여 말초신경계 퇴행성 질환을 예방 또는 치료할 수 있는 약학적 조성물 및 건강기능식품에 관한 것이다.

WO 2020/222349 A1

명세서

발명의 명칭: 말초신경계 퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 건강기능식품

기술분야

[1] 본 발명은 말초신경계 퇴행성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 건강기능식품에 관한 것이다.

배경기술

[2] 중추신경은 손상을 받으면 손상 부위에 낭종이 형성되고, 별아교세포(astrocyte)에 의한 아교세포 흉터(glial scar)에 의해서 손상된 신경세포가 재생이 되지 않는다. 반면, 말초신경에서는 손상된 신경이 재생되는데, 이는 슈반세포(Schwann cell)라고 불리는 한 종류의 아교세포가 중추신경을 구성하는 아교세포인 별아교세포, 희소돌기아교세포(oligodendrocyte) 및 미세아교세포(microglia)의 기능을 대신 수행함으로써 신경손상 시 형성되는 미엘린 덩어리를 제거하며, 세포증식을 통하여 축삭의 재생에 전반적인 영향을 미치기 때문이다. 상술한 바와 같이, 중추신경계 퇴행과 말초신경계 퇴행은 서로 다른 메커니즘을 가지므로, 중추신경계퇴행성 질환과 말초신경계 퇴행성 질환은 서로 다른 질환으로 간주되며, 퇴행성 말초신경계 퇴행성 질환의 치료 타겟 또한 중추신경 퇴행성 질환의 치료타겟과 달라, 상술한 두 질환의 치료제 개발은 다른 연구 접근방식이 필요하다.

[3] 말초신경이 손상되면 월러변성(Wallerian degeneration)이라고 불리는 변성 과정이 일어나고, 슈반세포(Schwann cell) 및 말초신경계의 글리아세포(glial cell)는 미성숙 상태로 탈분화되며, 상기 세포들은 미엘린(myelin)-관련 유전자를 발현하지 않게 된다. 상기 슈반세포의 탈분화 및 증식은 엑손(axon) 재생 및 말초신경의 재생과정 동안 일어나는 신경재분포(reinnervation)에 필수적이다. 엑손이 재생될 때, 슈반세포는 증식 및 이동하기 시작하며, 신경 내에서 엑손 재성장에 필요한 기질을 제공하는 기저판 튜브를 정렬한다. 그러나, 사르코 마리 투스병 또는 탈수초성 질환 등 말초신경계 퇴행성 질환의 경우, 슈반세포 탈분화는 탈수초화를 끊임없이 촉진시켜 신경이 재생되는 과정을 오히려 억제한다. 따라서, 슈반세포 탈분화 또는 증식을 억제하는 것은 말초신경계 퇴행성 질환의 치료 방법을 개발하는데 유용하게 이용될 수 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[4] 본 발명은 말초신경계 퇴행성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[5] 본 발명은 말초신경계 퇴행성 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하는

것을 목적으로 한다.

과제 해결 수단

[6] 1. cAMP(사이클릭 아데노신-3', 5'-모노포스페이트) 처리한 슈반세포에서 유래된 엑소좀을 포함하는 말초신경계 퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[7] 2. 위 1에 있어서, 상기 말초신경계 퇴행성 질환은 말초신경계 탈수초성 질환인 조성물.

[8] 3. 위 1에 있어서, 상기 말초신경계 퇴행성 질환은 길리엄-바레 증후군(Guillain-Barre syndrome), 또는 사르코 마리 투스병(Charcot-Marie-Tooth disease)인 조성물.

[9] 4. cAMP(사이클릭 아데노신-3', 5'-모노포스페이트) 처리한 슈반세포에서 유래된 엑소좀을 포함하는 말초신경계 퇴행성 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

[10] 5. 위 1에 있어서, 상기 말초신경계 퇴행성 질환은 말초신경계 탈수초성 질환인 건강기능식품.

[11] 6. 위 1에 있어서, 상기 말초신경계 퇴행성 질환은 길리엄-바레 증후군(Guillain-Barre syndrome), 또는 사르코 마리 투스병(Charcot-Marie-Tooth disease)인 건강기능식품.

발명의 효과

[12] 본 발명의 약학적 조성물은 슈반세포 증식을 억제하여, 슈반세포 증식에 따라 발생하는 말초신경계 퇴행성 질환에 대해 우수한 약효를 나타낼 수 있다.

[13] 본 발명의 건강기능식품은 슈반세포 증식을 억제하여, 슈반세포 증식에 따라 발생하는 말초신경계 퇴행성 질환을 예방 또는 개선할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[14] 도 1 및 도 2는 cAMP 처리한 슈반세포에서 엑소좀을 추출하여 RNA seq array를 적용한 결과를 보여주는 것이다.

[15] 도 3 내지 도 5는 cAMP 처리한 슈반세포에서 추출한 엑소좀에 microRNA, mRNA, AS RNA등이 존재하는 것을 보여주는 것이다.

[16] 도 6은 cAMP 처리한 엑소좀에서 miRNA 211, 92a-3p가 증가하는 반면 증식 마커인 HIF-1, CDK2, PDGFC을 감소하는 것을 qPCR를 통해 mRNA level에서 보여주는 것이다.

[17] 도 7은 microRNA 211-5p와 miRNA 211-3p 및 miRNA92a-3p의 표적 타겟을 통해 기능을 분석함으로써 증식에 관련된 기능이 포함됨을 보여주는 것이다.

[18] 도 8은 감소되는 mRNA 및 Antisense RNA에 대한 기능을 분석함으로써 증식에 관련되는 기능이 포함되는 것을 보여주는 것이다.

[19] 도 9는 cAMP 처리한 슈반세포에서의 엑소좀이 control 엑소좀 보다 슈반세포의 증식이 감소되는 것을 보여주는 것이다.

발명의 실시를 위한 형태

[20] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

[21]

[22] 본 발명은 약학적 조성물에 관한 것이다.

[23] 본 발명의 약학적 조성물은 cAMP(사이클릭 아데노신-3', 5'-모노포스페이트) 처리한 슈반세포 유래 엑소좀을 포함한다.

[24] 본 발명자들은 cAMP 처리한 슈반세포로부터 얻어진 엑소좀이 슈반세포의 증식을 억제함을 발견한 것에 착안하여 본 발명을 고안하였다.

[25] cAMP는 세포막에 존재하는 아데닐산사이클라제(adenylate cyclase)에 의하여 아데노신3인산(adenosine triphosphoric acid, ATP)에서 만들어지는 물질이며, cAMP는 호르몬작용의 세포내전달인자가 된다.

[26] cAMP의 유래는 특별히 한정되지 않으며, 예를 들면 인간을 포함하는 포유류 유래일 수 있고, 구체적으로는 인간 유래일 수 있다.

[27] 슈반세포(Schwann cell)란, 말초신경계 섬유가 생존할 수 있도록 유지해주는 글리아(glia) 세포의 일종이다. 상기 슈반세포는 신경 자극의 전도, 신경 발달 및 재생, 뉴런에 대한 영양 공급, 신경세포외 기질의 생성 등의 여러 역할을 수행하며, 말초 신경의 다양한 생물학적 행동에 깊이 관여하고 있다.

[28] 슈반세포의 유래는 특별히 한정되지 않으며, 예를 들면 인간을 포함하는 포유류 유래일 수 있고, 구체적으로는 인간 유래일 수 있다.

[29] 슈반세포는 탈분화하여 증식할 수 있다.

[30] 탈분화란, 분화상태에 있는 세포가 미분화한 상태로 변화하여 고유의 특성을 상실하고, 분열 능력을 다시 획득하는 현상을 의미한다. 슈반세포의 탈분화는 말초신경의 손상으로 인해 유도되는 것이므로, 상기 슈반세포의 탈분화는 신경 손상을 나타내는 표지로서 사용될 수 있다.

[31] 증식이란, 분열을 통하여 세포의 수가 늘어나는 것을 의미한다. 본 발명에서, 슈반세포의 증식은 슈반세포의 탈분화에 의하여 유도된 것이므로, 신경 손상을 나타내는 표지로서 사용될 수 있다.

[32] 엑소좀(exosome)이란 다양한 세포들로부터 분비되는 막 구조의 작은(대략 30-100 nm의 직경) 소낭을 의미하며, 다낭체와 원형질막의 융합이 일어나 세포 밖 환경으로 방출되는 소낭을 의미한다. 상기 엑소좀은 자연적으로 분비된 것이거나, 혹은 인공적으로 분비된 것을 포함한다.

[33] 슈반세포에 cAMP를 처리하면 슈반세포가 엑소좀을 분비한다. 본 발명은 이러한 슈반세포로부터 얻어진 엑소좀을 포함한다.

[34] 슈반세포는 예를 들면 계대배양된 것일 수 있고, 구체적으로 5 내지 7계대 배양된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[35] 예를 들면 cAMP는 슈반세포 1 내지 100 μg/mL의 용량으로 처리된 것일 수 있고, 보다 구체적으로, $1x10^6$ 내지 $1x10^7$개의 슈반세포에 cAMP가 100μM 내지

1000μM 처리될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[36] 엑소좀은 cAMP 처리 1일 내지 5일 후 분리된 것일 수 있고, 구체적으로는 1일 내지 3일 후 분리된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[37] 엑소좀은 당 분야에 공지된 방법, 장치를 사용하여 분리할 수 있고, 예를 들면 exosome kit를 사용하여 분리할 수 있다. 사용가능한 시판품의 예로는 Qiagen miRcury exosome kit를 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[38] 말초신경계 퇴행성 질환은 슈반세포의 증식에 의해 일어나는 말초신경계 탈수초성 질환일 수 있다. 예를 들면 길리엄-바레 증후군(Guillain-Barre syndrome), 사르코 마리 투스병(Charcot-Marie-Tooth disease), 만성 염증성 탈수초성 다발성 신경병증, 급성 염증성 탈수초성 다발 신경병증, 파라프로테인혈증성 탈 골수성 말초 신경 장애(Paraproteinaemic Demyelinating Neuropathy), 안면신경마비, 중증근무력증, 수근관증후군 등일 수 있고, 구체적으로는 길리엄-바레 증후군(Guillain-Barre syndrome), 사르코 마리 투스병(Charcot-Marie-Tooth disease) 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[39] 본 발명의 약학적 조성물은 상기 엑소좀을 단독으로 함유하거나 약학적으로 허용되는 담체와 함께 적합한 형태로 제형화 될 수 있으며, 부형제 또는 희석제를 추가로 함유할 수 있다. 상기 담체로는 모든 종류의 용매, 분산매질, 수중유 또는 유중수 에멀젼, 수성 조성물, 리포좀, 마이크로비드 및 마이크로좀이 포함된다.

[40] 약학적으로 허용되는 담체로는 예컨대, 경구 투여용 담체 또는 비경구 투여용 담체를 추가로 포함할 수 있다. 경구 투여용 담체는 락토스, 전분, 셀룰로스 유도체, 마그네슘 스테아레이트, 스테아르산 등을 포함할 수 있다. 아울러, 경구투여용으로 사용되는 다양한 약물전달물질을 포함할 수 있다. 또한, 비경구 투여용 담체는 물, 적합한 오일, 식염수, 수성 글루코오스 및 글리콜 등을 포함할 수 있으며, 안정화제 및 보존제를 추가로 포함할 수 있다. 적합한 안정화제로는 아황산수소나트륨, 아황산나트륨 또는 아스코르브산과 같은 항산화제가 있다. 적합한 보존제로는 벤즈알코늄 클로라이드, 메틸-또는 프로필-파라벤 및 클로로부탄올이 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현택제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[41] 본 발명의 조성물은 인간을 비롯한 포유동물에 어떠한 방법으로도 투여할 수 있다. 예를 들면, 경구 또는 비경구적으로 투여할 수 있다. 비경구적인 투여방법으로는 이에 한정되지는 않으나, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장내 투여일 수 있다.

[42] 본 발명의 약학적 조성물은 상술한 바와 같은 투여 경로에 따라 경구 투여용 또는 비경구 투여용 제제로 제형화 할 수 있다.

[43] 경구 투여용 제제의 경우에 본 발명의 조성물은 분말, 과립, 정제, 환제, 당의정제, 캡슐제, 액제, 겔제, 시럽제, 슬러리제, 현탁액 등으로 당업계에 공지된

방법을 이용하여 제형화될 수 있다. 예를 들어, 경구용 제제는 활성성분을 고체 부형제와 배합한 다음 이를 분쇄하고 적합한 보조제를 첨가한 후 과립 혼합물로 가공함으로써 정제 또는 당의 정제를 수득할 수 있다. 적합한 부형제의 예로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨 및 말티톨 등을 포함하는 당류와 옥수수 전분, 밀 전분, 쌀 전분 및 감자 전분 등을 포함하는 전분류, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 나트륨 카르복시메틸셀룰로오즈 및 하이드록시프로필메틸-셀룰로즈 등을 포함하는 셀룰로즈류, 젤라틴, 폴리비닐피롤리돈 등과 같은 충전제가 포함될 수 있다. 또한, 경우에 따라 가교결합 폴리비닐피롤리돈, 한천, 알긴산 또는 나트륨 알기네이트 등을 붕해제로 첨가할 수 있다. 나아가, 본 발명의 약학적 조성물은 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[44] 비경구 투여용 제제의 경우에는 주사제, 크림제, 로션제, 외용연고제, 오일제, 보습제, 겔제, 에어로졸 및 비강 흡입제의 형태로 당업계에 공지된 방법으로 제형화할 수 있다. 이들 제형은 모든 제약 화학에 일반적으로 공지된 처방서인 문헌(Remington's Pharmaceutical Science, 19th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA,1995)에 기재되어 있다.

[45] 본 발명의 조성물의 총 유효량은 단일 투여량(single dose)으로 환자에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량(multiple dose)으로 장기간 투여되는 분할 치료 방법(fractionated treatment protocol)에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 질환의 정도에 따라 유효성분의 함량을 달리할 수 있다. 바람직하게 본 발명의 약학적 조성물의 바람직한 전체 용량은 1일당 환자 체중 1㎏ 당 약 0.01㎍ 내지 10,000mg, 가장 바람직하게는 0.1㎍ 내지 500mg일 수 있다. 그러나 상기 약학적 조성물의 용량은 제제화 방법, 투여 경로 및 치료 횟수뿐만 아니라 환자의 연령, 체중, 건강 상태, 성별, 질환의 중증도, 식이 및 배설율 등 다양한 요인들을 고려하여 환자에 대한 유효 투여량이 결정되는 것이므로, 이러한 점을 고려할 때 당 분야의 통상적인 지식을 가진 자라면 본 발명의 조성물의 적절한 유효 투여량을 결정할 수 있을 것이다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은 본 발명의 효과를 보이는 한 그 제형, 투여 경로 및 투여 방법에 특별히 제한되지 아니한다.

[46] 본 발명의 약학적 조성물은 말초신경계 퇴행성 질환의 예방 또는 치료 효과를 가지는 공지의 천연물, 화합물 등과 병행하여 투여할 수 있다.

[47]

[48] 또한, 본 발명은 건강기능식품에 관한 것이다.

[49] 본 발명의 건강기능식품은 cAMP(사이클릭 아데노신-3', 5'-모노포스페이트) 처리한 슈반세포 유래 엑소좀을 포함하여, 말초신경계 퇴행성 질환을 예방 또는 개선할 수 있다.

[50] 본 발명의 건강기능식품은 상기 엑소좀을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용하고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다.

상기 엑소좀의 혼합량은 그의 사용 목적(예방, 건강 또는 개선, 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

[51] 상기 건강기능식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제 (치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 점증제, pH 조절제, 안정화제, 보존제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 또한, 본 발명의 건강기능식품은 과일 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 단독으로 또는 조합으로 사용될 수 있으며, 이러한 첨가제의 비율은 조성물 전체 중량당 0.001 내지 50 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[52] 상기 건강기능식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 엑소좀을 첨가할 수 있는 식품은 소세지, 육류, 빵, 초콜릿류, 스넥류, 캔디류, 과자류, 라면, 피자, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이 있다. 음료수로 제형화할 경우에 신규한 유산균 이외에 첨가되는 액체 성분으로는 이에 한정되지는 않으나, 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 모노사카라이드(예, 포도당, 과당 등), 디사카라이드(예, 말토오스, 수크로오스 등) 및 폴리사카라이드(예, 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당), 및 자일리톨, 소르비톨, 에리스리톨 등의 당 알코올일 수 있다.

[53]

[54] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다.

[55] **1. 실험 방법**

[56] **(1) cAMP 처리 후 슈반세포 유래 엑소좀 분리**

[57] 슈반세포를(passage 5 ~ 7) 준비하여 exosome free FBS를 사용한 슈반세포의 배지에서 배양하였다. 슈반세포가 95%로 100mm 페트리디시에 가득 차 있을 때($5x10^6$ 세포) 500uM cAMP를 처리한 후 이틀 동안 37℃ incubator에서 배양하였다. 이틀 후 배지만 모아서 Qiagen miRcury exosome kit를 이용하여 exosome을 분리하였다.

[58] **(2) 유전체 분석**

[59] cAMP를 처리한 배지와 그렇지 않은 배지(control)에서 각각 엑소좀을 분리한 후 NGS 기반 유전체 분석을 통해서 엑소좀에 존재하는 microRNA, antisense, mRNA, sncRNA등의 유전체를 분석하였다.

[60] **(3) 실시간 역전사 중합효소반응(Real-time RT-PCR)**

[61] cAMP를 처리한 배지와 그렇지 않은 배지(control)에서 각각 miRcurry exosome isolation kit(Qiagen)에 의해 엑소좀을 분리한 후 TRIzol reagent (Life Technologies)를 부가하여 제조업체의 설명서에 따라 RNA를 추출한 후, 0.5㎍의

RNA를 사용하여 miRNA-XRNA first strand synthesis(Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, California, USA)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. microRNA expression 확인을 위하여 qRT-PCR을 하였다. Lightcycler SYBR Green PCR mater mixture (Roche Applied Sciences)를 이용하여 Lightcycler TM instrument를 통해 분석을 수행하였다. qRT-PCR에 사용된 프라이머(primer)는 miRNA 211, and 92a-3p (Genolution, Korea)을 이용하였다. 또한 HIF-1, CDK2, PDGF의 expression을 알기 위해서는 TRIzol reagent (Life Technologies)를 부가하여 제조업체의 설명서에 따라 RNA를 추출한 후, 1㎍의 RNA를 사용하여 reverse transcriptase system(NEB)을 이용하여 cDNA를 합성하였다. HIF-1, CDK2, PDGF의 expression 확인을 위하여 qRT-PCR을 하였다. Lightcycler SYBR Green PCR mater mixture (Roche Applied Sciences)를 이용하여 Lightcycler TM instrument를 통해 분석을 수행하였다. qRT-PCR에 사용된 프라이머는 rat *Hypoxia-inducible factors* (HIF-1), rat *Cyclin-dependent kinase 2 (*CDK2); forward -5'TGG ATT TGG GAG AAC TGC -3 (서열번호 1); backward 5'- CGT GAA TGA CAG CAA AAC CAG-3'(서열번호 2), rat Platelet-derived growth factor C (PDGFC); forward- 5'- AGC CTC TAC AAG CCA ACA TG-3' (서열번호 3) backward 5'- CCG TAT GGA CAC AGA GAA GTT C-3'(서열번호 4). Rat Gapdh; forward 5'-GAC ATG CCG CCT GGA GAA AC-3'(서열번호 5) backward 5'- AGC CCA GGA TGC CCT TTA GT-3'(서열번호 6)을 이용하였고 gapdh는 loading control로 사용하였다.

[62] **(4) migration assay**

[63] 또한 migration 검정을 위해 슈반세포에 tip으로 wound를 일으켰다. 그 후, petridish에 cAMP 처리와 하지 않은 슈반세포 유래 엑소좀를 각각 동일 양으로 분리하여 슈반세포에 각각 첨가한 후, 16시간 배양한 후 crystal violet 염색을 수행하여, migration된 세포들을 counting하였다.

[64]

[65] **2. 결과**

[66] (1) 500uM cAMP 처리한 슈반세포의 배지에서 엑소좀을 추출하여 RNA seq array를 통해 엑소좀에 microRNA (17.6%), mRNA(28.4%), AS RNA (27.6%), snoRNA (25.3%) tRNA (0.7%) 등이 존재하는 것을 확인하였다(도 1 내지 도 5).

[67] (2) cAMP 처리한 슈반세포 유래의 엑소좀에서 miRNA 211, 92a-3p가 증가하는 반면 증식 marker인 HIF-1, CDK2, PDGFC을 감소하는 것을 qPCR를 통해 mRNA level에서 확인하였다(도 6).

[68] (3) microRNA 211-5p와 miRNA 211-3p 및 miRNA92a-3p의 표적 타겟을 통해 기능을 분석함으로써 증식에 관련된 기능이 포함됨을 확인하였다(도 7).

[69] (4) 감소되는 mRNA 및 Antisense RNA에 대한 기능을 분석함으로써 증식에 관련되는 기능이 포함됨을 확인하였다(도 8).

[70] (5) cAMP 처리한 슈반세포 유래의 엑소좀이 control 엑소좀 보다 슈반세포의 증식이 감소되는 것을 확인하였다(도 9).

청구범위

[청구항 1] cAMP(사이클릭 아데노신-3', 5'-모노포스페이트) 처리한 슈반세포에서 유래된 엑소좀을 포함하는 말초신경계 퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 2] 청구항 1에 있어서, 상기 말초신경계 퇴행성 질환은 말초신경계 탈수초성 질환인 조성물.

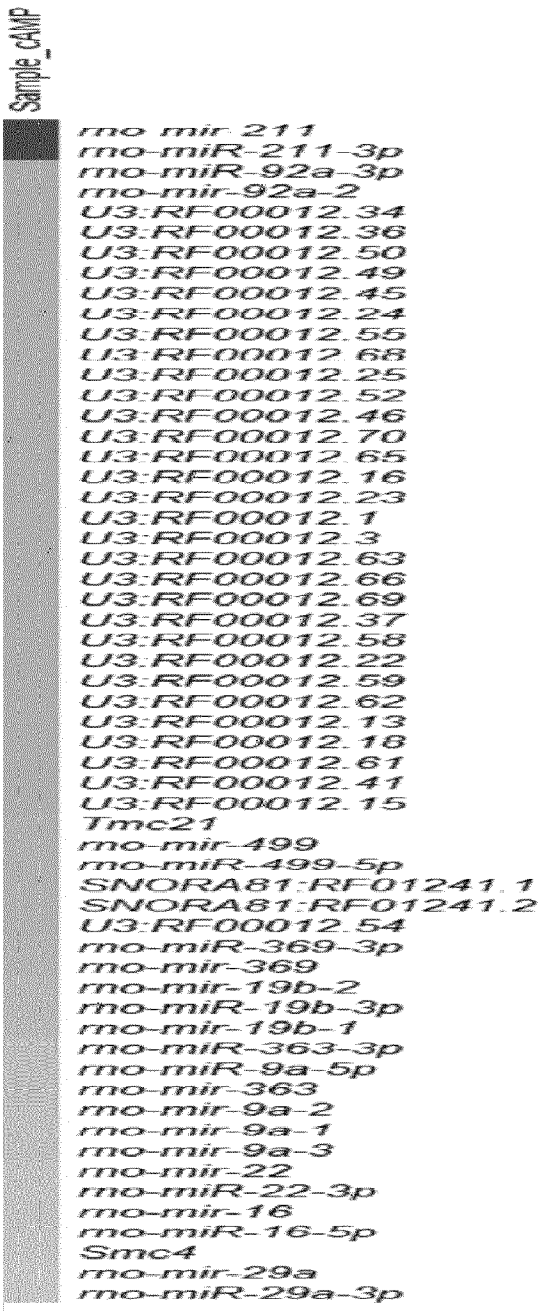
[청구항 3] 청구항 1에 있어서, 상기 말초신경계 퇴행성 질환은 길리엄-바레 증후군(Guillain-Barre syndrome), 또는 사르코 마리 투스병(Charcot-Marie-Tooth disease)인 조성물.

[청구항 4] cAMP(사이클릭 아데노신-3', 5'-모노포스페이트) 처리한 슈반세포에서 유래된 엑소좀을 포함하는 말초신경계 퇴행성 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

[청구항 5] 청구항 4에 있어서, 상기 말초신경계 퇴행성 질환은 말초신경계 탈수초성 질환인 건강기능식품.

[청구항 6] 청구항 4에 있어서, 상기 말초신경계 퇴행성 질환은 길리엄-바레 증후군(Guillain-Barre syndrome), 또는 사르코 마리 투스병(Charcot-Marie-Tooth disease)인 건강기능식품.

[도1]


Sample_cAMP
mo-mir-211
mo-miR-211-3p
mo-miR-92a-3p
mo-mir-92a-2
U3:RF00012.34
U3:RF00012.36
U3:RF00012.50
U3:RF00012.49
U3:RF00012.45
U3:RF00012.24
U3:RF00012.55
U3:RF00012.68
U3:RF00012.25
U3:RF00012.52
U3:RF00012.46
U3:RF00012.70
U3:RF00012.65
U3:RF00012.16
U3:RF00012.23
U3:RF00012.1
U3:RF00012.3
U3:RF00012.63
U3:RF00012.66
U3:RF00012.69
U3:RF00012.37
U3:RF00012.58
U3:RF00012.22
U3:RF00012.59
U3:RF00012.62
U3:RF00012.13
U3:RF00012.18
U3:RF00012.61
U3:RF00012.41
U3:RF00012.15
Tmc21
mo-mir-499
mo-miR-499-5p
SNORA81:RF01241.1
SNORA81:RF01241.2
U3:RF00012.54
mo-miR-369-3p
mo-mir-369
mo-mir-19b-2
mo-miR-19b-3p
mo-mir-19b-1
mo-miR-363-3p
mo-miR-9a-5p
mo-mir-363
mo-mir-9a-2
mo-mir-9a-1
mo-mir-9a-3
mo-mir-22
mo-miR-22-3p
mo-mir-16
mo-miR-16-5p
Smc4
mo-mir-29a
mo-miR-29a-3p

[도2]

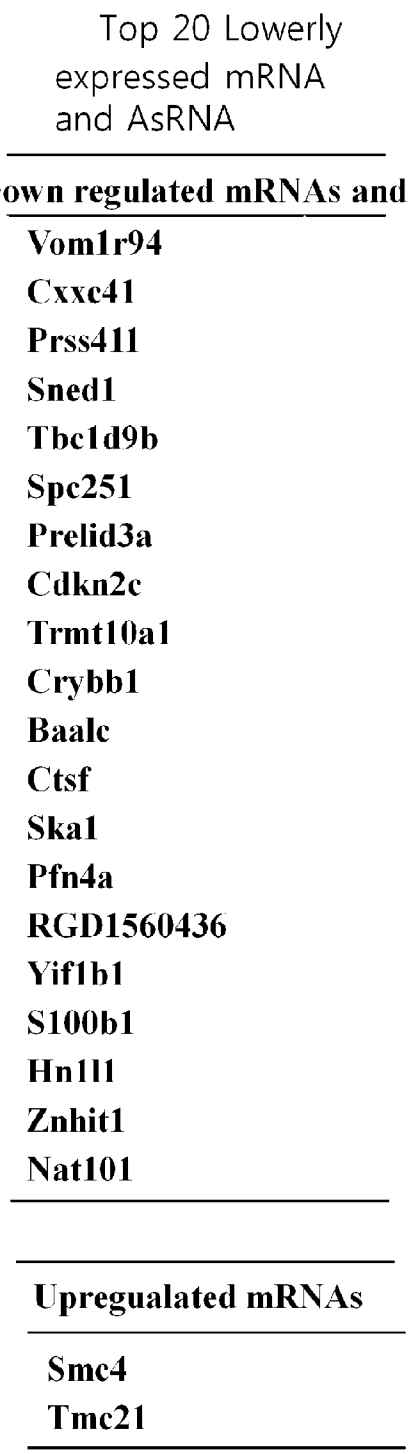
Atp13a3l
Tns3l
Dtx2l
Ift80
Pdgfc
Zcchc4
Echdc2l
Sult5a1l
Anxa6
Pigu1
Ephb2l
Tra2a
chr13.tRNA4006-GluCTC
Abcc2l
Entpd5l
Galp1
Lix1l
Mfn1l
Sdcbp2l
Ppa1l
Dnase1l3
Clpx
Oma1
Pcdh17
Hif1a
Zfp426
Slc43a2l
Psmb7l
Tm9sf4
Smc3
Cnr2
Hnf1b
Larp1b1
Bnc1l
Plekhh1l
Kif3a
Haus7
Zfp667
Mtg2l
Acadsb1
Asb16l
Sin3a1
Adck2
Sars2
Rnaseh2b
Npr1
Gpbp1l1l
Fyttd1l
Mfsd2a
Sars2l
Pdcd2
Lrrc39l
Nat10l
Znhit1
Hn1l1
S100b1
Yif1b1
RGD1560436
Pfn4l
Ska1
Ctsf
Baalc
Crybb1
Trmt10a1
Cdkn2c
Prelid3a
Spc25l
Tbc1d9b
Sned1
Prss4ll
Cxxc4l
Vom1r94

[도3]

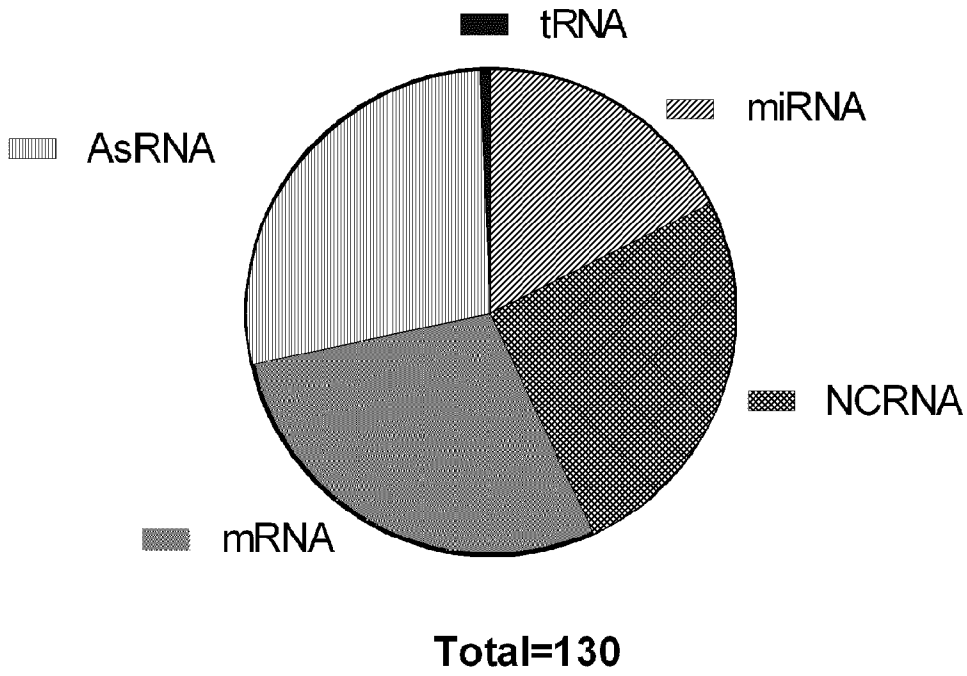
Top 20 highly expressed miRNA

Upregualted microRNAs
Rno-miR-211
Rno-miR-211-3p
Rno-miR-92a-3p
Rno-miR-92a-2
Rno-miR-499
Rno-miR-499-5p
Rno-miR-369-5p
Rno-miR-369
Rno-miR-19b-2
Rno-miR19b-1
Rno-miR-362-3p
Rno-miR-9a-2
Rno-miR-9a-1
Rno-miR-9a-3
Rno-miR-22
Rno-miR-22-3p
Rno-miR-16
Rno-miR-16-5p
Rno-miR-29a
Rno-miR-29a-3p

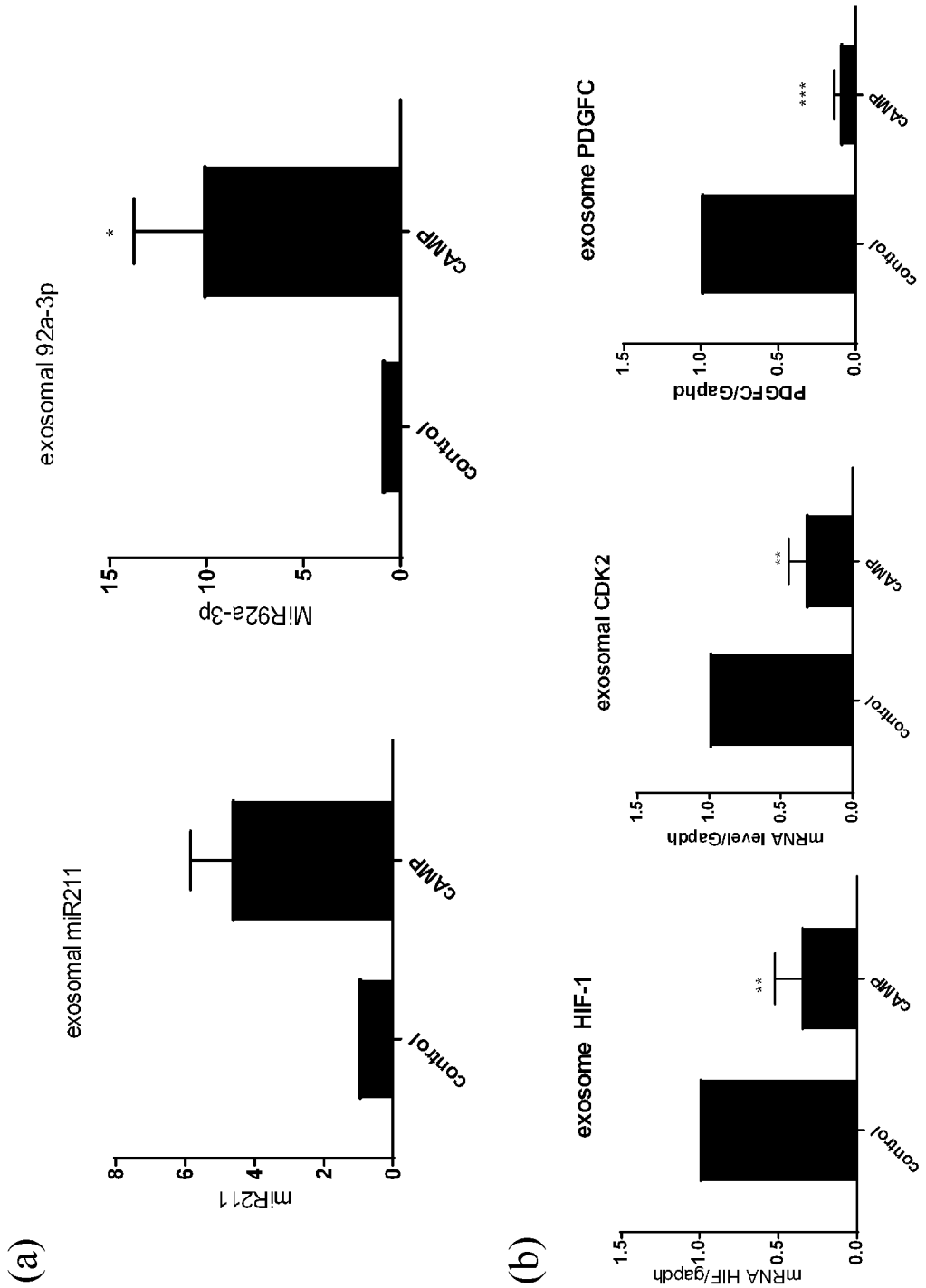
[도4]


Top 20 Lowerly expressed mRNA and AsRNA
Down regulated mRNAs and As RNA
Vom1r94
Cxxc41
Prss41l
Sned1
Tbc1d9b
Spc251
Prelid3a
Cdkn2c
Trmt10a1
Crybb1
Baalc
Ctsf
Ska1
Pfn4a
RGD1560436
Yif1b1
S100b1
Hn1l1
Znhit1
Nat101
Upregualated mRNAs
Smc4
Tmc21

[도5]

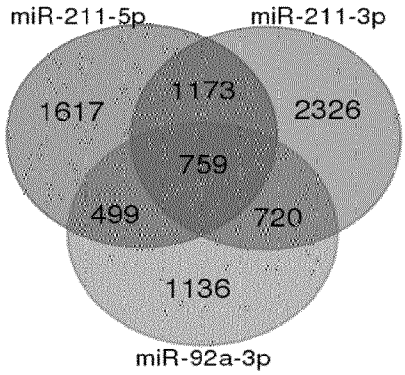


[도6]

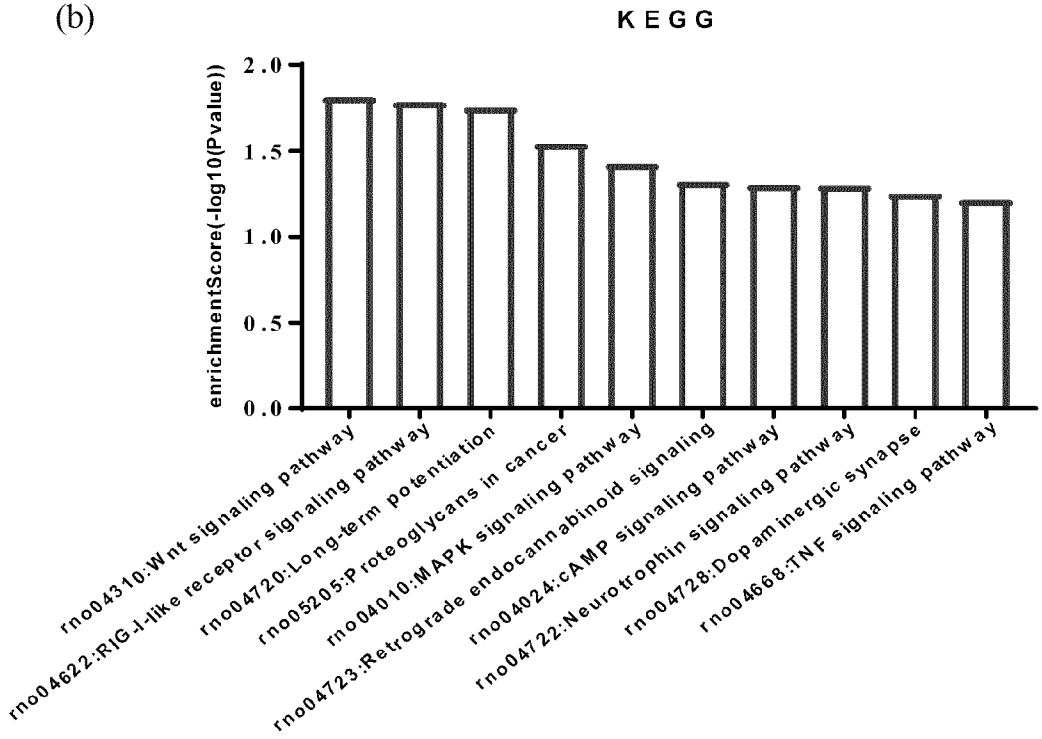

(a)
exosomal miR211
miR211
0
2
4
6
8
control
cAMP
exosomal 92a-3p
MiR92a-3p
0
5
10
15
*
control
cAMP
(b)
exosome HIF-1
mRNA HIF/gapdh
0.0
0.5
1.0
1.5
**
control
cAMP
exosomal CDK2
mRNA level/Gapdh
0.0
0.5
1.0
1.5
**
control
cAMP
exosome PDGFC
PDGFC/Gaphd
0.0
0.5
1.0
1.5
***
control
cAMP

[도7]

(a)

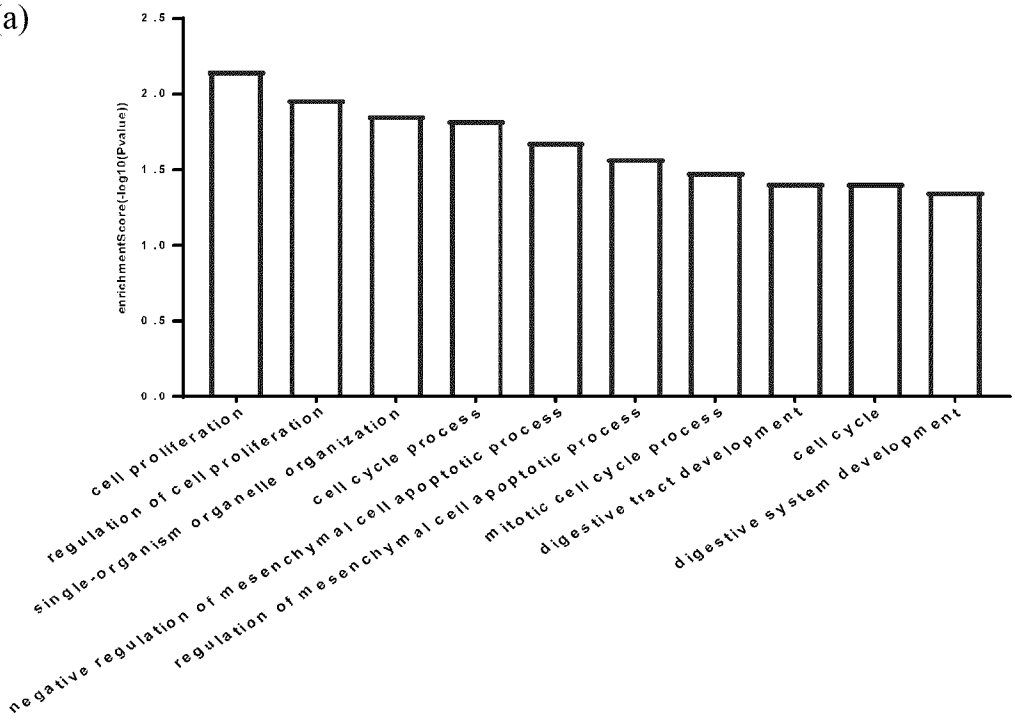

miR-211-5p
miR-211-3p
1617
1173
2326
759
499
720
1136
miR-92a-3p

(b)

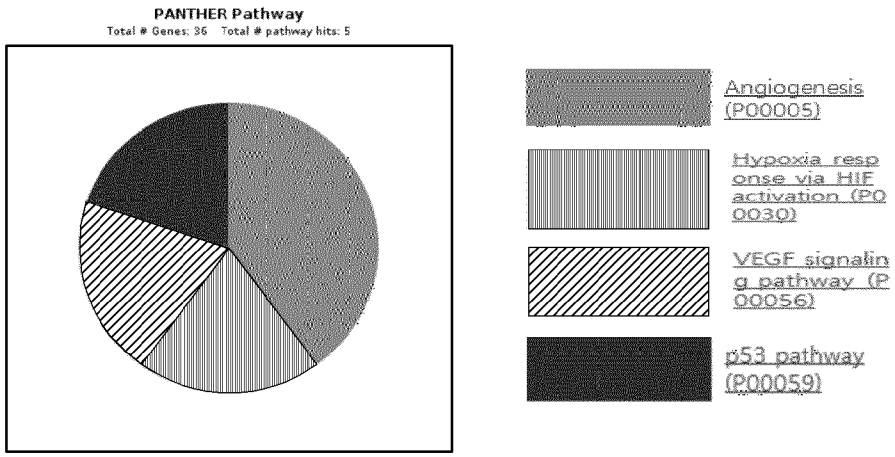

KEGG
enrichmentScore(-log10(Pvalue))
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
rno04310:Wnt signaling pathway
rno04622:RIG-I-like receptor signaling pathway
rno04720:Long-term potentiation
rno05205:Proteoglycans in cancer
rno04010:MAPK signaling pathway
rno04723:Retrograde endocannabinoid signaling
rno04024:cAMP signaling pathway
rno04722:Neurotrophin signaling pathway
rno04728:Dopaminergic synapse
rno04668:TNF signaling pathway

[도8]

(a)

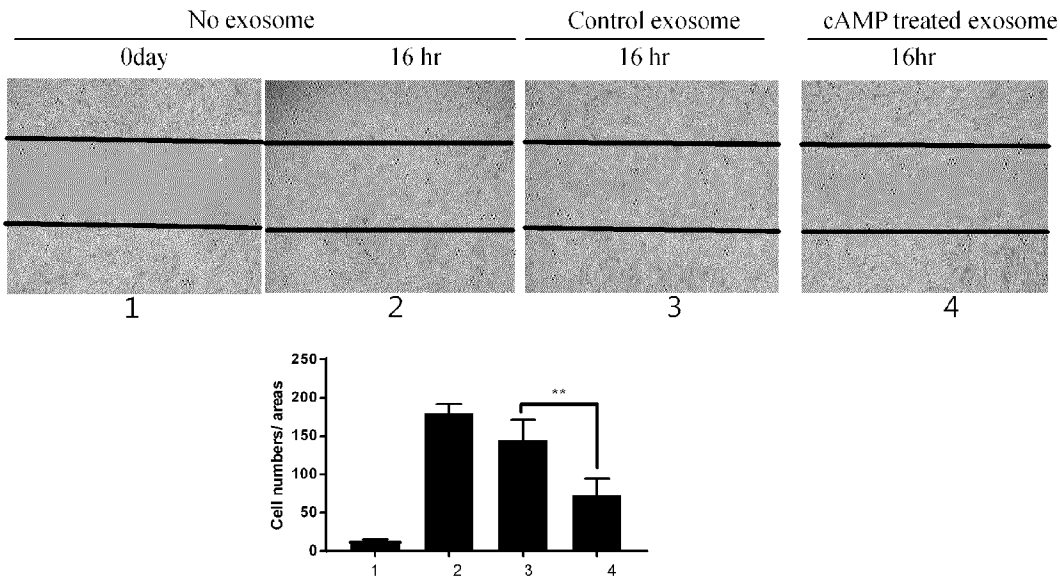

enrichmentScore(-log10(Pvalue))
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
cell proliferation
regulation of cell proliferation
single-organism organelle organization
cell cycle process
negative regulation of mesenchymal cell apoptotic process
regulation of mesenchymal cell apoptotic process
mitotic cell cycle process
digestive tract development
cell cycle
digestive system development

(b)

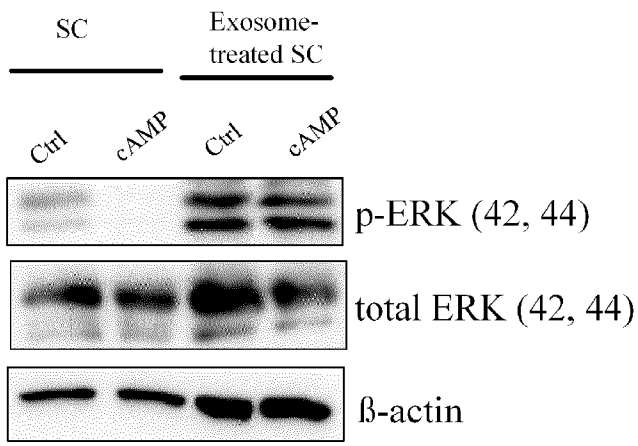

PANTHER Pathway
Total # Genes: 36 Total # pathway hits: 5
Angiogenesis (P00005)
Hypoxia response via HIF activation (P00030)
VEGF signaling pathway (P00056)
p53 pathway (P00059)

[도9]

(a)


No exosome
Control exosome
cAMP treated exosome
0day
16 hr
16 hr
16hr
1
2
3
4
Cell numbers/ areas
250
200
150
100
50
0
**
1
2
3
4

(b)


SC
Exosome-treated SC
Ctrl
cAMP
Ctrl
cAMP
p-ERK (42, 44)
total ERK (42, 44)
ß-actin

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2019/006214

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 35/30(2006.01)i, A61K 31/7076(2006.01)i, A61P 25/28(2006.01)i, A23L 33/10(2016.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 35/30; A61K 35/28; C12N 15/113; A61K 31/7076; A61P 25/28; A23L 33/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: cAMP, schwann cell, peripheral nervous system (PNS), degenerative disease

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SOHN, E. J. et al. exosome derived from differentiated schwann cells inhibits migration of schwann cells through alternation of microRNA. 2019 Annual Conference of the Korean Society of Neurodegenerative Disorder. 09 March 2019, abstract no. PE13 See the entire document.	1-6
A	SOHN, E. J. et al. MicroRNA Mediated Regulation of Schwann Cell Migration and Proliferation in Peripheral Nerve Injury. BioMed Research International. 30 April 2008, vol. 2018, thesis no.: 8198365, pages 1-7 See abstract; pages 2, 4.	1-6
A	LOPEZ-VERRILLI, M. A. et al. Schwann cell-derived exosomes enhance axonal regeneration in the peripheral nervous system. Glia. 2013, vol. 61, pages 1795-1806 See abstract; figures 1-2.	1-6
A	US 2017-0247708 A1 (HENRY FORD HEALTH SYSTEM) 31 August 2017 See the entire document.	1-6
A	CHING, R. C. et al. The role of exosomes in peripheral nerve regeneration. NEURAL REGENERATION RESEARCH. 2015, vol. 10, no. 5, pages 743-747 See the entire document.	1-6

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
17 JANUARY 2020 (17.01.2020)	**20 JANUARY 2020 (20.01.2020)**

Name and mailing address of the ISA/KR	Authorized officer
Korean Intellectual Property Office Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon, 35208, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2019/006214

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2017-0247708 A1	31/08/2017	DK 2791336 T3	26/02/2018
		EP 2791336 A2	22/10/2014
		EP 2791336 B1	29/11/2017
		EP 3336190 A1	20/06/2018
		ES 2661236 T3	28/03/2018
		NO 2855624 T3	14/04/2018
		US 10227593 B2	12/03/2019
		US 2015-0157666 A1	11/06/2015
		US 9555060 B2	31/01/2017
		WO 2013-090523 A2	20/06/2013
		WO 2013-090523 A3	22/08/2013

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2019/006214

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 35/30(2006.01)i, A61K 31/7076(2006.01)i, A61P 25/28(2006.01)i, A23L 33/10(2016.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
A61K 35/30; A61K 35/28; C12N 15/113; A61K 31/7076; A61P 25/28; A23L 33/10

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌
한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))
eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: cAMP, 슈반세포(schwann cell), 말초신경계(peripheral nervous system, PNS), 퇴행성 질환(degenerative disease)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	SOHN, E. J. 등, `exosome derived from differentiated schwann cells inhibits migration of schwann cells through alternation of microRNA`, 2019 대한퇴행성 신경질환학회 학술대회, 2019.03.09, 초록번호 PE13 전체 문헌	1-6
A	SOHN, E. J. 등, `MicroRNA Mediated Regulation of Schwann Cell Migration and Proliferation in Peripheral Nerve Injury`, BioMed Research International, 2008.04.30, 2018권, 논문번호: 8198365, 페이지 1-7 초록; 페이지 2, 4	1-6
A	LOPEZ-VERRILLI, M. A. 등, `Schwann cell-derived exosomes enhance axonal regeneration in the peripheral nervous system`, Glia, 2013, 61권, 페이지 1795-1806 초록; 도면 1-2	1-6
A	US 2017-0247708 A1 (HENRY FORD HEALTH SYSTEM) 2017.08.31 전체 문헌	1-6
A	CHING, R. C. 등, `The role of exosomes in peripheral nerve regeneration`, NEURAL REGENERATION RESEARCH, 2015, 10권, 5호, 페이지 743-747 전체 문헌	1-6

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2020년 01월 17일 (17.01.2020)	2020년 01월 20일 (20.01.2020)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관
박제현
전화번호 +82-42-481-3349

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2019/006214

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2017-0247708 A1	2017/08/31	DK 2791336 T3	2018/02/26
		EP 2791336 A2	2014/10/22
		EP 2791336 B1	2017/11/29
		EP 3336190 A1	2018/06/20
		ES 2661236 T3	2018/03/28
		NO 2855624 T3	2018/04/14
		US 10227593 B2	2019/03/12
		US 2015-0157666 A1	2015/06/11
		US 9555060 B2	2017/01/31
		WO 2013-090523 A2	2013/06/20
		WO 2013-090523 A3	2013/08/22