

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2016년 8월 11일 (11.08.2016)



(10) 국제공개번호
WO 2016/126122 A2

- (51) 국제특허분류:
A61K 35/28 (2015.01) A61K 9/08 (2006.01)
A61K 35/51 (2015.01) A61K 47/36 (2006.01)
A61K 35/32 (2015.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2016/001230
- (22) 국제출원일: 2016년 2월 4일 (04.02.2016)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2015-0017349 2015년 2월 4일 (04.02.2015) KR
10-2016-0013293 2016년 2월 3일 (03.02.2016) KR
- (71) 출원인: 한양대학교 에리카산학협력단 (INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION HANYANG UNIVERSITY ERICA CAMPUS) [KR/KR]; 15588 경기도 안산시 상록구 한양대학로 55, Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: 조용우 (CHO, Yong Woo); 13599 경기도 성남시 분당구 내정로 152, 파크타운롯데아파트 133동 2601호, Gyeonggi-do (KR). 최지숙 (CHOL, Ji Suk); 15521 경기도 안산시 상록구 건건 8길 10, 대림아파트 117동 1102호, Gyeonggi-do (KR). 우창희 (WOO, Chang Hee); 14206 경기도 광명시 사성로 29-15, 상진

아트빌 B01호, Gyeonggi-do (KR). **최영찬 (CHOI, Young Chan)**; 15588 경기도 안산시 상록구 한양대학로 55, 한양대학교 5공학관 421호, Gyeonggi-do (KR). **조동규 (JO, Dong Gyu)**; 13834 경기도 과천시 별양로 66-11, 래미안슈르아파트 346동 902호, Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: 특허법인 다나 (DANA PATENT LAW FIRM); 06242 서울시 강남구 역삼로 3길 11, 광성빌딩 신관 4-6층, Seoul (KR).

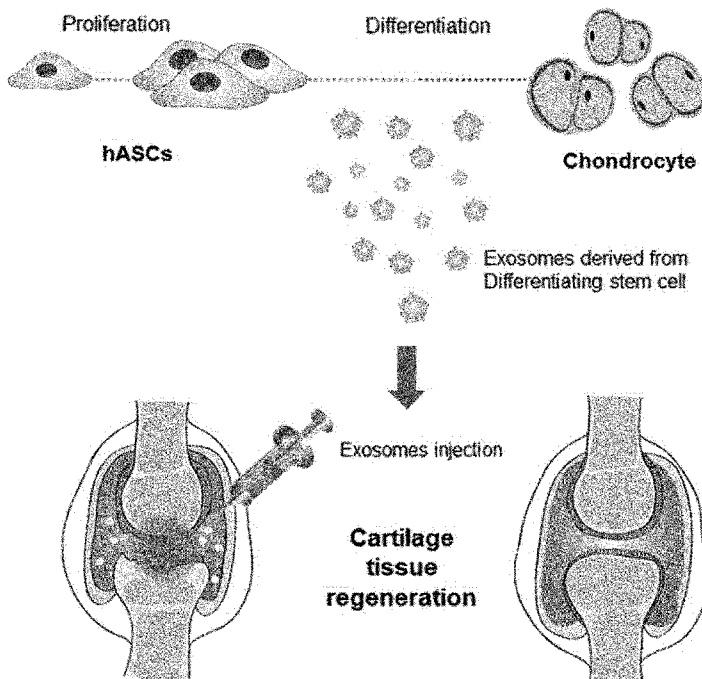
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, 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,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: COMPOSITION FOR CHONDROCYTE DIFFERENTIATION INDUCTION OR CARTILAGE TISSUE REGENERATION, CONTAINING EXOSOMES EXTRACTED FROM STEM CELLS DIFFERENTIATING INTO CHONDROCYTES

(54) 발명의 명칭: 연골세포로 분화되고 있는 줄기세포로부터 추출된 엑소좀을 포함하는 연골세포 분화 유도 또는 연골 조직 재생용 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to: a composition for chondrocyte differentiation induction or cartilage tissue regeneration, containing, as active ingredients, exosomes extracted from stem cells differentiating into chondrocytes; a medium composition for chondrocyte differentiation induction, an injection for cartilage tissue regeneration, and a pharmaceutical composition for treating cartilage disorders, all of which contain the composition; and a method for treating cartilage disorders. According to one specific embodiment of the present invention, the composition for chondrocyte differentiation induction or cartilage regeneration contains, as active factors, exosomes extracted from stem cells differentiating into chondrocytes. Exosomes to be secreted during stem cell differentiation contain growth factors associated with chondrocyte differentiation, and genes and proteins associated with stem cell proliferation and regeneration, and thus the induction of damaged cartilage tissue regeneration is excellent. In addition, an active material can be stably and rapidly delivered as a cell-derived vehicle into cells while side effects on a conventional cell therapeutic agent are minimized. Therefore, a patient's pain can be reduced through a simple operation by means of an injection composition for preventing and treating cartilage disorders, and cartilage disorders can be continuously and effectively treated after an operation.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]



WO 2016/126122 A2



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:

— 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))

본 발명은 연골세포로 분화되고 있는 줄기세포로부터 추출된 엑소솜을 유효성분으로 포함하는 연골세포 분화 유도 또는 연골조직 재생용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 연골세포 분화 유도용 배지 조성물, 연골조직 재생용 주사제, 연골 질환 치료용 약제학적 조성물 및 연골질환의 치료 방법에 관한 것이다. 본 발명의 구체예에 따른 연골세포 분화 유도 또는 연골 재생용 조성물은 연골세포로 분화하는 줄기세포로부터 추출한 엑소솜을 유효인자로 포함하고 있다. 줄기세포의 분화과정에서 분비되는 엑소솜은 줄기세포의 세포증식, 재생과 관련된 유전자, 단백질뿐만 아니라 연골세포 분화관련 성장인자들을 함유하고 있어 손상된 연골조직의 재생 유도가 뛰어나다. 또한, 기존 세포치료제에 대한 부작용은 최소화하면서 세포 유래 전달체로서 안정적이면서 신속하게 효능물질을 세포 내로 전달할 수 있다. 따라서 연골 질환의 예방 및 치료를 위한 주사제 조성물로서 간단한 시술로 환자의 고통을 줄여줄 뿐만 아니라 시술 후 지속적이면서 효과적인 연골 질환 치료가 가능하다.

명세서

발명의 명칭: 연골세포로 분화되고 있는 줄기세포로부터 추출된 엑소좀을 포함하는 연골세포 분화 유도 또는 연골조직 재생용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 연골세포로 분화되고 있는 줄기세포로부터 추출된 엑소좀을 유효성분으로 포함하는 연골세포 분화 유도 또는 연골조직 재생용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 연골세포 분화 유도용 배지 조성물, 연골조직 재생용 주사제, 연골 질환 치료용 약제학적 조성물 및 연골질환의 치료 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 연골 조직의 특성상 넓은 면적이 손상된 경우 자연 치유에 의한 조직 재생이 어렵기 때문에 인공관절, 관절연골 성형술, 미세천공술 등의 외과적 수술을 통한 치료가 이루어져 왔다. 하지만 기존의 방법은 절개로 인한 흉터가 남으며, 내구성이 떨어지는 섬유 연골로의 재생으로 어려운 시술방법에 비해 치료 효과가 떨어지는 문제점을 가지고 있다. 따라서 수술과정이 간편하고 빠른 치료효과를 내는 하이드로젤을 이용한 주사제로서, 히알루론산의 알킬렌디아민 가교물 하이드로젤을 이용한 관절내 투여용 주사액(대한민국 공개특허공보 제2013-0028012호), 콜라겐과 히알루론산이 포함된 연골조직 수복용 조성물(대한민국 등록특허공보 제1279812호), 클로드론산 및 히알루론산을 포함하는 골관절염 치료용약학적 제제(대한민국 공개특허공보 제2008-0082657호) 등이 개발되었다. 그러나 상기방법은 일시적인 통증 감소는 줄 수 있지만, 연골 조직으로의 재생 유도에는 부족한 점이 있기 때문에 연골 조직의 분화를 도와주는 유효인자들이 필요하다.
- [3] 현재 세포를 이용한 치료법의 경우 체외에서 배양된 세포를 다시 결손 부위에 이식하여 연골 조직의 재생을 유도하는 방법으로서 자가연골세포(대한민국 공개특허공보 제2013-0072983호), 태줄 유래 줄기세포(대한민국 공개특허공보 제2013-0009651호) 등을 이용한 치료 방법이 개발되었다. 하지만 자가연골세포 치료제의 경우 손상된 부위가 클 때 환자로 부터 채취하여 배양된 세포만으로는 치료에 한계가 있으며, 이식 수술까지 기본 2차례에 걸친 수술로 인한 환자의 고통과 경제적 부담이 크다. 줄기세포 치료의 경우 일반적으로 제대혈, 지방조직, 활막, 근육줄기 등의 줄기세포를 이용한 세포치료가 행해지고 있으나, 채취부위에 따른 세포 수와 분화능의 차이, 체외 배양시 세포의 탈분화로 인한 세포 표현형의 변화, 체내 이식 후 연골 세포로의 낮은 분화율과 세포 비후와 관련된 유전자 발현으로 세포 사멸과 함께 혈관 침투 유발로 연골세포의 석회화를 초래하는 문제점이 있다.
- [4] 이와 같이 종래기술에서는 환자에게서 얻은 연골세포나 성체줄기세포를

체외에서 배양하여 하이드로젤에 분산시킨 다음 다시 결손부위에 이식하는 방법으로 치료를 진행하였다. 직접 세포를 주입하기 때문에 정상 연골에 가까운 조직을 재생 시킬 수 있으나, 세포를 얻기 위한 불가피한 수술과정과 체외 배양 공정의 어려움, 손상 조직부위의 크기에 따른 세포수의 한계, 체내에서의 낮은 분화율의 문제점을 가지고 있다. 또한, 한번의 투여로는 일시적인 통증의 감소와 관절의 운동성을 증가시킬 순 있지만, 궁극적으로 손상된 연골조직의 재생에는 어려움이 있었다.

- [5] 이에 본 발명자들은 종래 문제점을 해결하기 위하여 연골세포로 분화되는 줄기세포로부터 엑소좀만을 추출하고, 추출한 엑소좀을 포함하는 조성물의 연골 재생 효과를 확인하여 본 발명을 완성하였다.
- [6] (특허문헌 1) 대한민국 공개특허공보 제2013-0028012호
- [7] (특허문헌 2) 대한민국 등록특허공보 제1279812호
- [8] (특허문헌 3) 대한민국 공개특허공보 제2008-0082657호
- [9] (특허문헌 4) 대한민국 공개특허공보 제2013-0072983호
- [10] (특허문헌 5) 대한민국 공개특허공보 제2013-0009651호

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [11] 본 발명의 목적은 연골세포로 분화되고 있는 줄기세포로부터 추출된 엑소좀을 유효성분으로 포함하는 연골세포 분화 유도 또는 연골조직 재생용 조성물을 제공하는 것이다.
- [12] 본 발명의 다른 목적은 상기 연골세포 분화 유도 또는 연골조직 재생용 조성물을 포함하는 연골세포 분화 유도용 배지 조성물을 제공하는 것이다.
- [13] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 연골세포 분화 유도 또는 연골조직 재생용 조성물을 포함하는 연골조직 재생용 주사제를 제공하는 것이다.
- [14] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 연골세포 분화 유도 또는 연골조직 재생용 조성물을 포함하는 연골질환 치료용 약제학적 조성물을 제공하기 위한 것이다.
- [15] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 연골세포 분화 유도 또는 연골조직 재생용 조성물의 치료적으로 유효한 양을 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하는 연골질환의 치료 방법을 제공하기 위한 것이다.

과제 해결 수단

- [16] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 일 구체예는 연골세포로 분화되고 있는 줄기세포로부터 추출된 엑소좀을 유효성분으로 포함하는 연골세포 분화 유도 또는 연골조직 재생용 조성물을 제공한다.
- [17] 본 발명에서 사용된 용어, "연골세포로 분화되고 있는 줄기세포"란, 도 1과 같이 연골세포 기원의 줄기세포로부터 연골세포로 분화하는 중에 있는 줄기세포를 의미한다. 이로부터 연골세포의 유전정보, 단백질, 성장인자를 함유하고 있는 엑소좀을 추출할 수 있다.

- [18] 구체적으로, 줄기세포가 연골세포로 분화할 때 세포의 모양 및 특성이 변하는데, 이 때 엑소솜을 추출하는 것이다. 따라서 일반 줄기세포로부터 엑소솜을 추출하는 것과 다르다고 볼 수 있다.
- [19] 본 발명에서 사용된 용어, "엑소솜(exosome)"이란 여러 종류의 세포들로부터 분비되는 막 구조의 소낭체로, 다른 세포 및 조직에 결합하여 막 구성요소, 단백질, RNA를 전달하는 등 다양한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.
- [20] 상기 연골세포로 분화되고 있는 줄기세포로부터 추출된 엑소솜은 줄기세포의 기본적인 특성을 가질 수 있고, 연골 분화시 중요한 성장인자, 여러 생체활성 단백질 및 유전자 정보 등을 함유할 수 있다.
- [21] 상기 엑소솜은 당업계에 알려진 엑소솜 추출 방법으로 이용하여 제조할 수 있고, 예를 들어
- [22] 1) 줄기세포를 증식하는 단계;
- [23] 2) 상기 증식된 줄기세포를 연골세포로 분화시키는 단계; 및
- [24] 3) 연골세포로 분화되고 있는 줄기세포로부터 엑소솜을 추출 및 정제하는 단계;를 포함하는 방법을 이용할 수 있다.
- [25] 상기 "연골세포 분화 유도"란 줄기세포(stem cell)가 연골세포로 분화(differentiation)되도록 유도하는 것을 의미할 수 있다.
- [26] 상기 "연골조직 재생"이란 손상된 연골조직을 복원하거나 또는 부족한 연골조직의 생성을 유도하여 연골조직을 재생(regeneration)하는 것을 의미할 수 있다.
- [27] 상기 연골세포로 분화되고 있는 줄기세포는 연골세포로 분화 가능한 성체 유래 줄기세포일 수 있다.
- [28] 상기 연골세포로 분화 가능한 성체 유래 줄기세포는 골수 줄기세포, 제대혈 줄기세포 또는 지방 유래 줄기세포일 수 있고, 예를 들어 지방 유래 줄기세포일 수 있다.
- [29] 상기 골수 줄기세포, 제대혈 줄기세포 또는 지방 유래 줄기세포는 인체, 동물 또는 식물 유래 줄기세포일 수 있다.
- [30] 본 발명에 따른 연골 재생용 조성물은 효과적인 연골 재생을 위한 효능 물질로서 연골세포로 분화하는 줄기세포에서 추출한 엑소솜을 사용한다는 점에서 종래 기술들과 차별성이 있다. 추출, 정제된 엑소솜에 담지된 세포의 증식 및 분화 관련 다양한 성장인자들에 의해 효과적으로 지속가능한 연골 조직의 재생이 이루어지며, 기존의 자가연골세포나 성체줄기세포의 체외 세포배양의 문제점, 섬유연골로의 재생, 또는 세포 사멸로 인한 조직의 석회화 등의 문제들을 해결할 수 있다.
- [31] 본 발명에 따른 연골세포로 분화되는 기간 동안 추출된 줄기세포 유래 엑소솜은 줄기세포의 특성뿐 아니라 연골세포로의 분화 관련 활성인자들만을 효과적으로 전달하여, 부작용은 최소화하면서 기존 줄기세포를 이용한 치료와 같은 효과를 기대할 수 있다.

- [32] 본 발명에 따른 연골세포로 분화되는 기간 동안 추출된 줄기세포 유래 엑소솜은 세포에서 분비되는 생체막 소포체이다. 또한 세포막과 유사한 지질 구조를 가지고 있기 때문에 체내에 주입되었을 때 주변 세포로의 흡수율이 뛰어나 효능 물질의 빠른 전달로 연골 조직의 효과적 재생 유도가 가능하다.
- [33] 본 발명의 다른 구체예는 상기 연골세포 분화 유도 또는 연골조직 재생용 조성물을 포함하는 연골세포 분화 유도용 배지 조성물을 제공한다.
- [34] 상기 배지 조성물은 엑소솜이 1 내지 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도, 구체적으로 1 내지 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도, 예를 들어 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 포함될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [35] 상기 연골세포 분화 유도용 배지 조성물은 줄기세포를 연골세포로 분화시키기 위하여 덱사메타손(dexamethasone), 인슐린(insulin), 아스코르브산(ascorbate), 연골형성 성장인자 IGF(Insulin-like Growth Factor) 및 TGF- β 1(Transforming Growth Factor β 1) 등의 분화유도물질을 추가로 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [36] 본 발명의 또 다른 구체예는 상기 연골세포 분화 유도 또는 연골조직 재생용 조성물을 포함하는 연골조직 재생용 주사제를 제공한다.
- [37] 상기 주사제는 인산완충식염수(phosphate-buffered saline, PBS)를 더 포함할 수 있다. 즉, 상기 주사제는 인산완충식염수에 연골세포 분화 유도 또는 연골조직 재생용 조성물을 담지하여 사용할 수 있다.
- [38] 상기 주사제는 인산완충식염수 대신 하이드로젤을 포함할 수 있다.
- [39] 상기 하이드로젤은 히알루론산, 젤라틴, 알지네이트, 키토산, 피브린, 엘라스틴, 콜라겐 및 메틸셀룰로오스로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상일 수 있고, 구체적으로 히알루론산 하이드로젤일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [40] 상기 주사제는 엑소솜이 1 내지 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도, 구체적으로 10 내지 900 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도, 보다 구체적으로 10 내지 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도, 예를 들어 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 포함될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [41] 상기 주사제는 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물의 연골 등의 손상 부위에 주사하여 투여할 수 있다.
- [42] 본 발명에 따른 연골 재생용 조성물은 주사제 조성물로서 체내 주입이 용이하기 때문에 수술 시간과 비용면에서 경제적이고, 이에 따라 환자의 고통, 후유증과 경제적 부담을 줄여준다. 또한 줄기세포가 연골세포로 분화될 때 추출된 엑소솜에는 세포외기질 유도체, 세포의 증식 및 분화와 관련된 여러 성장인자들이 포함되어 있어 손상된 연골 조직의 효과적인 재생 유도가 가능하다. 따라서 한 번의 시술로 장기적인 효과를 기대할 수 있어 지속적인 효과를 얻기 위해 주기적으로 시술을 해야 했던 기존의 문제점을 극복할 수 있다.
- [43] 본 발명의 또 다른 구체예는 상기 연골세포 분화 유도 또는 연골조직 재생용 조성물을 포함하는 연골 질환 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

- [44] 본 명세서에서 사용된 용어, “연골 질환”은 연골 조직의 손상으로부터 유래한 연골 질환일 수 있고, 구체적으로 골관절염, 변형성 관절증, 연골형성이상증, 퇴행성 관절염, 류마티스성 관절염, 골연화증, 섬유성 골염 및 무형성 골질환으로 구성되는 군으로부터 선택된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [45] 본 명세서에서 사용된 용어, “연골 질환의 치료”는 연골 질환 치료용 조성물을 관절 내 주사하여 손상된 연골을 재생하는 것에 의하여 연골 조직의 손상이 치료되는 것을 의미할 수 있다.
- [46] 상기 구체예에 따른 약학적 조성물은 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용된다. 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다.
- [47] 상기 구체예에 따른 약학적 조성물은 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴등이 사용될 수 있다.
- [48] 상기 구체예에 따른 약학적 조성물의 투여 형태는 이들의 약학적 허용 가능한 염의 형태로도 사용될 수 있고, 또한 단독으로 또는 타 약학적 활성 화합물과 결합뿐만 아니라 적당한 집합으로 사용될 수 있다. 상기 염으로는 약학적으로 허용되는 것이면 특별히 한정되지 않으며, 예를 들어 염산, 황산, 질산, 인산, 불화수소산, 브롬화수소산, 포름산 아세트산, 타르타르산, 젖산, 시트르산, 푸마르산, 말레산, 숙신산, 메탄술폰산, 벤젠술폰산, 톨루엔술폰산, 나프탈렌술폰산 등을 사용할 수 있다.
- [49] 상기 구체예에 따른 약학적 조성물은 목적하는 바에 따라 비경구 투여하거나 경구 투여할 수 있으며, 하루에 체중 1 kg당 0.1~500 mg, 1~100 mg의 양으로 투여되도록 1 내지 수회에 나누어 투여할 수 있다. 특정 환자에 대한 투여용량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강 상태, 식이, 투여 시간, 투여 방법, 배설률, 질환의 중증도 등에 따라 변화될 수 있다.
- [50] 상기 구체예에 따른 약학적 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 연고, 크림 등의

외용제, 좌제 및 멸균 주사용액 등을 비롯하여 약제학적 제제에 적합한 어떠한 형태로든 제형화하여 사용될 수 있다.

- [51] 상기 구체예에 따른 약학적 조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 비경구, 경구 등의 다양한 경로로 투여될 수 있으며, 투여의 모든 방식은 예상될 수 있으나 바람직하게는 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관 내(intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [52] 상기 구체예에 따른 약학적 조성물은 줄기세포를 연골세포로 분화시키기 위하여 덱사메타손(dexamethasone), 인슐린(insulin), 아스코르브산(ascorbate), 연골형성 성장인자 IGF(Insulin-like Growth Factor) 및 TGF- β 1(Transforming Growth Factor β 1) 등의 분화유도물질을 추가로 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [53] 본 발명의 또 다른 구체예는 상기 연골세포 분화 유도 또는 연골조직 재생용 조성물의 치료적으로 유효한 양을 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하는 연골질환의 치료 방법을 제공한다.
- [54] 상기 조성물은 상기 연골세포 분화 유도 또는 연골조직 재생용 조성물을 포함하는 연골질환 치료용 약제학적 조성물이거나, 상기 연골세포 분화 유도 또는 연골조직 재생용 조성물을 포함하는 연골 재생 주사제일 수 있다. 따라서, 상기 연골질환 치료용 약제학적 조성물 또는 연골 재생 주사제에 관하여 기재된 내용은 치료 방법에도 동일하게 적용될 수 있다.
- [55] 상기 포유동물은 연골질환을 앓고 있는 포유동물일 수 있으며, 예를 들어 연골질환을 앓고 있는 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등일 수 있다.
- [56] 상기 “치료적으로 유효한 양”이란 포유동물에서 연골질환 치료적 반응을 나타내기에 충분한 조성물의 양을 의미한다.
- [57] 상기 투여 형태는 비경구 투여와 경구 투여의 형태를 포함하나, 예를 들어 포유동물의 연골 등의 손상 부위에 주사하여 투여할 수 있다.
- [58] 본 발명의 일 실시예에서, 증식하는 줄기세포로부터 추출한 엑소솜(Adipose tissue-derived stem cell; ASC-EXO) 및 연골세포로 분화하는 줄기세포로부터 추출한 엑소솜(Chondrogenic differentiating stem cell-derived exosome; Chondro-EXO)의 크기를 확인한 결과, 각각의 평균 크기가 약 88.17 nm, 83.6 nm임을 확인할 수 있었다(도 3).
- [59] 본 발명의 다른 일 실시예에서, 줄기세포를 연골세포로 분화시키는 실험에서 본 발명에 따른 연골세포로 분화되는 줄기세포로부터 추출된 엑소솜(Chondro-EXO)을 함유하는 배지 조성물을 처리한 결과, 본 발명에 따른 엑소솜 처리시 21일 제부터 양성 대조군과 유사한 수준으로 세포 간 응축현상이 나타났으며, 연골 특이적 기질의 발현을 확인할 수 있었다. 그러나, 증식하는 줄기세포로부터 추출된 엑소솜(ASC-EXO) 및 음성대조군에서는 이러한 분화 특징이 발견되지 않았으며, 두 그룹의 경우 증식만 이루어지는 것을 확인하였다(도 5 및 6).

- [60] 본 발명의 또 다른 일 실시예에서, 본 발명에 따른 연골세포로 분화되는 줄기세포로부터 추출된 엑소좀(Chondro-EXO)을 포함하는 조성물은 생체 내 주입시 연골조직 재생 효과가 우수한 것을 확인하였다(도 7 및 8).

발명의 효과

- [61] 본 발명의 구체예에 따른 연골세포 분화 유도 또는 연골 재생용 조성물은 연골세포로 분화하는 줄기세포로부터 추출한 엑소좀을 유효인자로 포함하고 있다. 줄기세포의 분화과정에서 분비되는 엑소좀은 줄기세포의 세포증식, 재생과 관련된 유전자, 단백질뿐만 아니라 연골세포 분화관련 성장인자들을 함유하고 있어 손상된 연골조직의 재생 유도가 뛰어나다. 또한, 기존 세포치료제에 대한 부작용은 최소화하면서 세포 유래 전달체로서 안정적이면서 신속하게 효능물질을 세포 내로 전달할 수 있다. 따라서 연골 질환의 예방 및 치료를 위한 주사제 조성물로서 간단한 시술로 환자의 고통을 줄여줄 뿐만 아니라 시술 후 지속적이면서 효과적인 연골 질환 치료가 가능하다.

도면의 간단한 설명

- [62] 도 1은 연골세포로 분화되고 있는 줄기세포로부터 추출된 엑소좀과 이의 응용에 대한 모식도이다.
- [63] 도 2는 연골세포로 분화되고 있는 줄기세포로부터 엑소좀의 추출 시기에 대한 것으로 연골세포로 분화되고 있는 줄기세포의 모양 변화 관찰 및 알시안블루 염색(alcian blue staining)을 통한 연골 특이적 기질 합성을 확인한 도이다.
- [64] 도 3은 연골세포로 분화되고 있는 줄기세포로부터 추출된 엑소좀(Chondro-Exo)과 증식하는 줄기세포로부터 추출된 엑소좀(ASC-Exo)의 특성에 대한 도이다:
- [65] (a) Chondro-Exo의 구조 및 모양 (투과전자현미경, transmission electron microscope);
- [66] (b) Chondro-Exo의 크기 (나노입자분석기, dynamic light scattering);
- [67] (c) ASC-Exo의 구조 및 모양 (투과전자현미경, transmission electron microscope); 및
- [68] (d) ASC-Exo의 크기 (나노입자분석기, dynamic light scattering).
- [69] 도 4는 연골세포로 분화되고 있는 줄기세포로부터 추출된 엑소좀의 엑소좀 막 표면 마커(Exo-Check™ exosome antibody arrays)이다.
- [70] 도 5는 인간 지방유래 줄기세포를 연골세포로 분화유도한 결과이다; GM: 줄기세포 배양 배지(growth medium), ASC-EXO: 증식하고 있는 줄기세포로부터 추출된 엑소좀, Chondro-EXO: 연골세포로 분화되고 있는 줄기세포로부터 추출된 엑소좀, DM: 연골세포 분화배지(differentiation medium), 점선 표시: 세포 간 응축현상이 일어난 부분.
- [71] 도 6은 인간 지방유래 줄기세포를 연골세포로 분화유도 21일 후 분석한 결과이다; A: 알시안블루 염색(alcian blue staining)을 통한 연골 특이적 기질인

산성 점액 다당류(acid mucosubstance and acid mucin)의 합성 확인, B: 사프라닌-오 염색(safranin-o staining)을 통한 연골 특이적 기질인 프로테오글리칸(proteoglycan)의 합성 확인, GM: 줄기세포 배양 배지(growth medium), Chondro-EXO: 연골세포로 분화되고 있는 줄기세포로부터 추출된 엑소솜, DM: 연골세포 분화배지(differentiation medium).

[72] 도 7은 골관절염(osteoarthritis) 모델 마우스의 관절강 내에 연골세포로 분화되고 있는 줄기세포로부터 추출된 엑소솜(Chondro-EXO)와 대조군으로 인산완충식염수(phosphate-buffered saline, PBS)를 주입한 후 연골조직의 재생 정도를 확인하기 위해 사프라닌-오 염색(safranin-o staining)을 실시한 결과이다(knee joint, 100x); T: 경골(tibia), F: 대퇴골(femur).

[73] 도 8은 표 1을 바탕으로 골관절염의 유발 정도를 나타낸 Mankin score를 그래프로 나타낸 도이다; PBS: 인산완충식염수(음성대조군), Chondro-EXO: 연골세포로 분화되고 있는 줄기세포로부터 추출된 엑소솜, Femoral condyle: 대퇴부 관절부, Tibial plateau: 경골 고평부.

[74]

발명의 실시를 위한 형태

[75] 이하 본 발명을 하기 실시예에서 보다 상세하게 기술한다. 다만, 하기 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 권리범위를 제한하거나 한정하는 것이 아니다. 본 발명의 상세한 설명 및 실시예로부터 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 기술자가 용이하게 유추할 수 있는 것은 본 발명의 권리범위에 속하는 것으로 해석된다.

[76] <실시예 1> 연골세포로 분화되고 있는 줄기세포로부터 엑소솜의 추출

[77] 연골세포로 분화되고 있는 줄기세포로부터 엑소솜을 추출하기 위하여, 인간 지방유래 줄기세포를 일반 배양배지(10% fetal bovine serum, 1% penicillin/streptomycin를 함유하는 Dulbecco Modified Eagle Medium high glucose(DMEM))에서 80~90%정도 증식시킨 후 분화배지(5% fetal bovine serum, 1% penicillin/streptomycin, 100 nM dexamethasone, 0.15 mM ascorbic acid, 1X ITS (Insulin-Transferrin-Sodium selenite), 10 ng/mL TGF- β 1(Transforming Growth Factor β 1)를 함유하는 Dulbecco Modified Eagle Medium high glucose (DMEM))로 교체하고 총 5주간 배양함으로써 연골세포로 분화를 유도하였다.

[78] 분화 배지로 교체 후, 엑소솜을 추출하기 전에 줄기세포를 무혈청 배지이면서 페놀 레드(phenol red)가 없는 DMEM 배지로 교체하여 24시간 동안 유지한 후, 세포 배양 상층액을 회수하였다. 회수한 세포 배양 상층액을 300 xg에서 10분간 원심분리하여 세포를 제거하고, 2,000 xg에서 30분간 원심분리하여 세포 분비물을 제거하였다. 이후, 분자량 3,000의 필터가 장착된 원심분리 튜브(molecular weight cut off=3,000, amicon tube)를 이용하여 5,000 xg에서 60분간 원심분리를 하여 농축하였다. 농축 후 수득한 상층액은 엑소솜 분리

시약(exosome isolation reagent)과 1:0.5 비율로 혼합하고 4 °C에서 하루 동안 보관하였다. 그 후, 10,000 xg에서 60분간 원심분리를 통해 엑소좀 침전물을 얻은 후, 0.22 μ m 필터(exosome spin column)를 통해 여과하였고 인산완충식염수(phosphate-buffered saline, PBS)로 세척하였다. 세척한 엑소좀 침전물은 10,000 xg에서 60분간 원심분리한 후 PBS에 재현탁하였다. 상층액을 회수한 이후 다시 분화배지를 첨가하여 줄기세포의 연골세포 분화를 유도하였으며, 이러한 과정을 5주까지 반복하였다. 분화 배지 교체 2주 후부터, 연골세포로 분화시 관찰되는 세포 간 응축현상이 나타나기 시작하여 5주 후에는 콜로니가 생성되는 것을 확인하였다(도 2). 따라서 세포 모양의 변화가 확실하게 나타나는 분화유도 후 2주 후부터 5주까지의 기간 동안 회수한 상층액으로부터 엑소좀을 추출하였다.

[79] <비교예 1> 증식하는 줄기세포로부터 엑소좀의 추출

[80] 연골세포로 분화되고 있는 줄기세포로부터 추출한 엑소좀의 효능을 비교하기 위해 증식하는 인간 지방유래 줄기세포로부터 엑소좀(Adipose tissue-derived stem cell, ASC-EXO)을 추출하여 비교군으로 사용하였다. 구체적으로, 분화배지를 사용하지 않는 것을 제외하고는 실시예 1과 동일한 방법을 수행하여 증식하는 인간 지방유래 줄기세포로부터 엑소좀을 추출하였다.

[81] <실시예 2> 엑소좀의 현미경 분석

[82] 실시예 1의 연골세포로 분화되고 있는 줄기세포로부터 추출된 엑소좀과 증식하는 줄기세포로부터 추출된 엑소좀을 투과전자현미경(transmission electron microscope)과 나노입자분석기(dynamic light scattering)를 사용하여 크기 및 모양을 확인하고, 특정 단백질의 발현유무를 나타내는 엑소좀 안티바디 어레이(Exo-Check™ exosome antibody arrays)를 이용하여 엑소좀 막 표면 단백질을 확인하였다.

[83] 그 결과, 추출된 엑소좀의 모양을 투과전자현미경으로 확인할 수 있었으며(도 3a 및 3c), 각각의 크기는 평균적으로 약 83.6 nm(Chondro-EXO), 87.17 nm(ASC-EXO)인 것을 확인하였다(도 3b 및 3d).

[84] 또한, 엑소좀 안티바디 어레이를 이용하여 엑소좀 막 표면 마커들로 알려진(CD63, CD81, ALIX, FLOT1, ICAM1, EpCam, ANXA5 and TSG101) 엑소좀 특이적 마커들의 발현을 항체반응을 통해 확인하였다(도 4).

[85] <실시예 3> 엑소좀을 이용한 연골세포 분화유도

[86] 엑소좀을 이용하여 인간 지방유래 줄기세포의 연골세포 분화를 유도하기 위하여, 증식하고 있는 줄기세포로부터 추출된 엑소좀(ACS-EXO) 및 연골세포로 분화되고 있는 줄기세포로부터 추출된 엑소좀(Chondro-EXO)을 포함하는 배지 조성물을 이용하였다. 상기 배지 조성물은 엑소좀 10 μ g/mL 농도를 줄기세포 배양 배지(5% fetal bovine serum, 1% penicillin/streptomycin를 함유하는 Dulbecco Modified Eagle Medium high glucose(DMEM))에 추가하여 사용하였다.

- [87] 음성대조군(Growth medium, GM)으로 줄기세포 배양 배지(5% fetal bovine serum, 1% penicillin/streptomycin)를 함유하는 Dulbecco Modified Eagle Medium high glucose(DMEM))를 사용하였고, 양성대조군(Differentiation medium, DM)으로는 연골 분화 배지(5% fetal bovine serum, 1% penicillin/streptomycin, 100 nM dexamethasone, 0.15 mM ascorbic acid, 1X ITS (Insulin-Transferrin-Sodium selenite), 10 ng/mL TGF- β 1(Transforming Growth Factor β 1)를 함유하는 Dulbecco Modified Eagle Medium high glucose(DMEM))를 사용하였다.
- [88] 상기 배지 조성물은 3일에 한 번씩 35일간 교체하였으며, 연골세포로 분화가 유도된 줄기세포에 대하여 현미경을 이용하여 세포 모양 변화를 확인하였다.
- [89] 그 결과, 연골세포로 분화되고 있는 줄기세포로부터 추출된 엑소솜(Chondro-EXO)을 처리한 세포에서 21일째부터 양성대조군과 유사한 수준으로 세포 간 응축현상(precartilage condensation)이 나타나는 것을 확인할 수 있었으며, 음성대조군(GM)과 증식하는 줄기세포로부터 추출한 엑소솜(ASC-EXO)을 처리한 그룹에서는 세포 간 응축현상이 일어나지 않고 증식만 이루어진 것을 확인할 수 있었다(도 5).
- [90] <실시예 4> 엑소솜을 이용한 연골세포 분화능 분석
- [91] 엑소솜을 이용한 줄기세포의 연골세포 분화 유도를 확인하기 위하여, 연골세포로 분화되고 있는 줄기세포로부터 추출된 엑소솜(Chondro-EXO)을 포함하는 배지 조성물을 이용하였다. 상기 배지 조성물은 연골세포로 분화되는 줄기세포로부터 추출된 엑소솜 5, 10, 30, 50 μ g/mL 농도를 줄기세포 배양 배지(5% fetal bovine serum, 1% penicillin/streptomycin)를 함유하는 Dulbecco Modified Eagle Medium high glucose(DMEM))에 추가하여 사용하였다.
- [92] 음성대조군으로 줄기세포 배양 배지(5% fetal bovine serum, 1% penicillin/streptomycin)를 함유하는 Dulbecco Modified Eagle Medium high glucose(DMEM))를 사용하였고, 양성대조군으로는 연골 분화 배지(5% fetal bovine serum, 1% penicillin/streptomycin, 100 nM dexamethasone, 0.15 mM ascorbic acid, 1X ITS (Insulin-Transferrin-Sodium selenite), 10 ng/mL TGF- β 1(Transforming Growth Factor β 1)를 함유하는 Dulbecco Modified Eagle Medium high glucose(DMEM))를 사용하였다.
- [93] 이후, 21일 동안 배지 조성물을 3일에 한 번씩 교체하였으며, 연골세포로 분화된 줄기세포에 대하여 알시안블루 염색(alcian blue staining), 사프란닌-오 염색(safranin-o staining)을 이용하여 세포의 분화 여부를 분석하였다.
- [94] 그 결과, 연골세포로 분화되고 있는 줄기세포로부터 추출된 엑소솜(Chondro-EXO)을 처리시, 연골세포의 특이적 세포외기질(extracellular matrix)이 생성된 것을 확인할 수 있었다. 알시안블루 염색(alcian blue staining)은 연골 특이적 기질 중 산성 점액다당류(acid mucosubstance and acid mucin)를 파란색으로 염색시키며(도 6의 A), 사프란닌-오 염색(safranin-o staining)은 연골 특이적 기질 중 프로테오글리칸(proteoglycan)에 붉게 염색이 된다(도 6의 B).

- [95] 또한, 엑소솜을 줄기세포에 농도별로 처리하였을 때 각각의 염색을 통해 연골 특이적 기질이 생성된 것을 확인할 수 있었으며, 낮은 농도(5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)의 엑소솜이 포함된 배지에서도 줄기세포가 연골세포로 분화된 것을 확인하였다.
- [96] 따라서, 연골세포로 분화되고 있는 줄기세포로부터 추출된 엑소솜은 줄기세포로부터 연골세포로의 분화 유도 효과가 우수함을 확인할 수 있었다.
- [97] <실시에 5> 연골세포로 분화되고 있는 줄기세포로부터 추출된 엑소솜을 이용한 생체내(in vivo) 연골 재생 평가
- [98] 골관절염(osteoarthritis) 모델로 통상 사용되는 DMM(Destabilization of the medial meniscus) 관절염 유발 모델 마우스(mouse)를 이용하여 연골세포로 분화되고 있는 줄기세포로부터 추출된 엑소솜의 실제 생체내 연골조직 재생 효과를 확인하였다.
- [99] 구체적으로, 마우스의 무릎 주변을 깨끗이 제모한 후 수술도구를 이용하여 슬개골 측면을 따라 무릎 관절 부분을 1 cm 정도 절개하였다. 관절낭(joint capsule) 부분을 노출시켜 절개한 후 내측 반월상 연골(medial meniscus)에 연결되어 있는 내측 인대(medial meniscotibial ligament)를 잘라내고 관절낭(joint capsule)과 피부를 순서대로 닫아준 후 봉합사로 마무리하였다.
- [100] 수술 후 골관절염(osteoarthritis)이 진행되는 5주 쯤부터 10주까지 엑소솜이 포함된 조성물을 일주일에 한 번씩 관절강 내에 주사하였다. 엑소솜 조성물은 실시예 1의 연골세포로 분화되고 있는 줄기세포로부터 추출된 엑소솜을 인산완충식염수(phosphate-buffered saline, PBS)에 담지하여 제조하였다. 상기 엑소솜 조성물은 엑소솜의 최종 농도가 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이며, 마우스의 관절강 내에 6 μL 씩(마우스 1마리 기준 3 $\mu\text{g}/6 \mu\text{L}$) 주입하였다. 음성대조군으로는 인산완충식염수(PBS)를 사용하였다. 11주 후, 사프라닌-오 염색(safranin-o staining)을 이용하여 연골조직의 재생 여부를 확인하였다.
- [101] 그 결과, 음성대조군에 비해 연골세포로 분화되고 있는 줄기세포로부터 추출된 엑소솜이 포함된 조성물 처리시 연골 특이적 기질이 많이 합성되었으며 연골 표면(superficial zone)의 손상 없이 자연 연골과 유사하게 재생되었음을 확인하였다. 재생된 연골은 붉은색으로 염색되었다. 따라서 연골세포로 분화되는 줄기세포로부터 추출된 엑소솜이 포함된 조성물은 연골조직 재생 효과가 우수한 것을 확인하였다(도 7).
- [102] 또한, 골관절염을 평가하는 기본적인 조직병리학적 관찰인 Mankin score를 이용하여 골관절염시 유발되는 연골의 표면 손상, 연골세포, 염색성, 연골과 골의 경계인 타이드 마크(tide mark)의 변화를 기준으로 판단하여 점수를 부여하였다. 점수가 높을수록 골관절염의 유발 정도 즉, 연골의 손상 정도가 높은 것을 나타내며 Mankin score 결과를 하기 표 1 및 표 2에 나타내었다.

[103] [표1]

Femoral condyle

Group	Mankin Scores (Max=14)				
	Cartilage structure	Chondrocytes	Safranin-O staining	Tidemark	Sum
PBS	2.80±0.37	2.20±0.2	2.00±0.45	0	7.00±0.89
Chondro-EXO	1.80±0.37	0.80±0.2	1.80±0.58	0	4.60±0.87

[104] [표2]

Tibial plateau

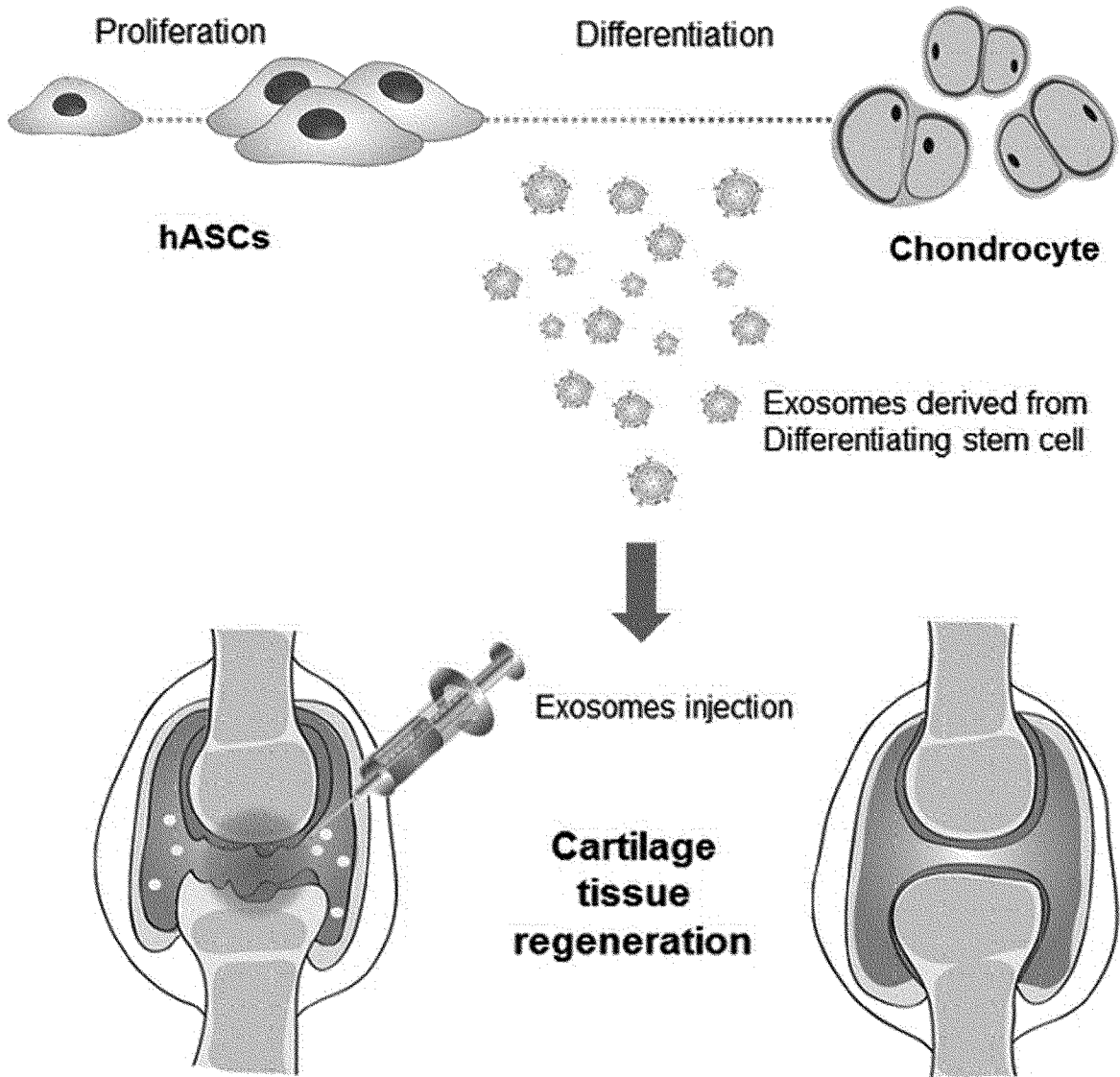
Group	Mankin Scores (Max=14)				
	Cartilage structure	Chondrocytes	Safranin-O staining	Tidemark	Sum
PBS	2.60±0.24	1.80±0.2	1.80±0.37	0	6.40±0.89
Chondro-EXO	2.00±0.32	1.20±0.2	1.40±0.40	0	4.60±0.68

[105] 상기 표의 결과에서 알 수 있는 바와 같이, 연골세포로 분화되고 있는 줄기세포로부터 추출한 엑소솜을 포함하는 조성물을 주입하였을 때, 연골의 표면 손상 및 세포 과다성(hypercellularity)이 낮고 연골 특이적 기질의 합성이 높은 것으로 판단되어 Mankin score의 감소가 인정되었다 (표 1, 표 2 및 도 8).

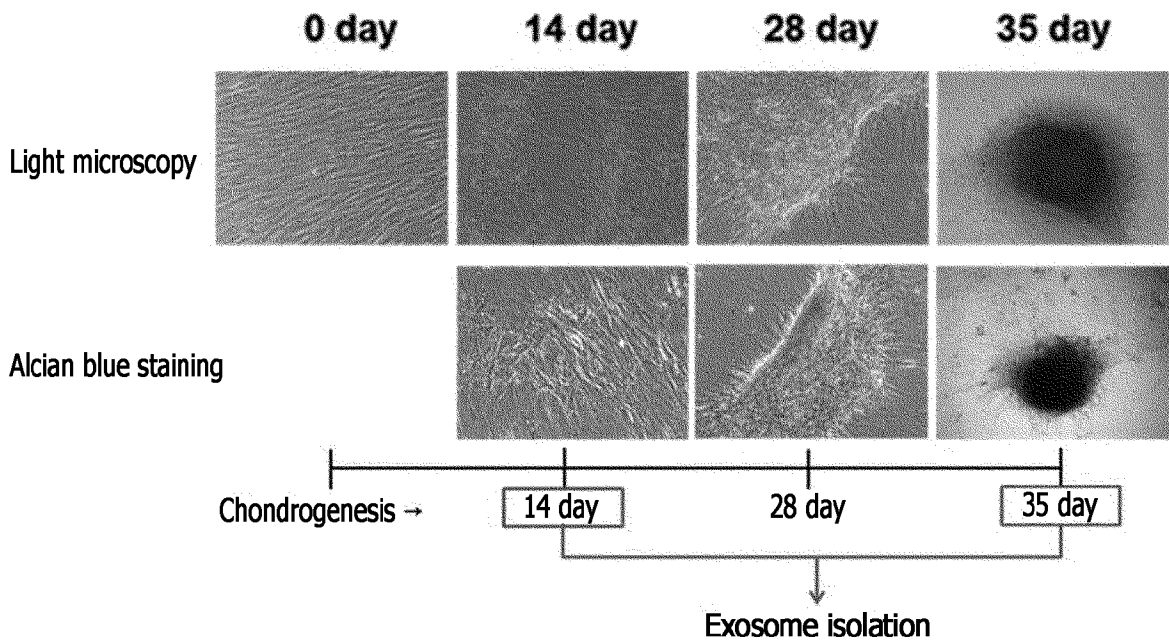
청구범위

- [청구항 1] 연골세포로 분화되고 있는 줄기세포로부터 추출된 엑소솜을 유효성분으로 포함하는 연골세포 분화 유도 또는 연골조직 재생용 조성물.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서, 상기 연골세포로 분화되고 있는 줄기세포는 연골세포로 분화 가능한 성체 유래 줄기세포인 것인 연골세포 분화 유도 또는 연골조직 재생용 조성물.
- [청구항 3] 제 2항에 있어서, 상기 연골세포로 분화 가능한 성체 유래 줄기세포는 골수 줄기세포, 제대혈 줄기세포 또는 지방 유래 줄기세포인 연골세포 분화 유도 또는 연골조직 재생용 조성물.
- [청구항 4] 제 3항에 있어서, 상기 골수 줄기세포, 제대혈 줄기세포 또는 지방 유래 줄기세포는 인체, 동물 또는 식물 유래 줄기세포인 연골세포 분화 유도 또는 연골조직 재생용 조성물.
- [청구항 5] 제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 포함하는 연골세포 분화 유도용 배지 조성물.
- [청구항 6] 제 5항에 있어서, 상기 배지 조성물은 엑소솜이 1 내지 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 포함되는 것인 연골세포 분화 유도용 배지 조성물.
- [청구항 7] 제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 따른 연골세포 분화 유도 또는 연골조직 재생용 조성물을 포함하는 연골조직 재생용 주사제.
- [청구항 8] 제 7항에 있어서, 상기 주사제는 엑소솜이 1 내지 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 포함되는 것인 연골조직 재생용 주사제.
- [청구항 9] 제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 포함하는 연골 질환 치료용 약제학적 조성물.
- [청구항 10] 제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 따른 조성물의 치료적으로 유효한 양을 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하는 연골 질환의 치료 방법.

[도1]

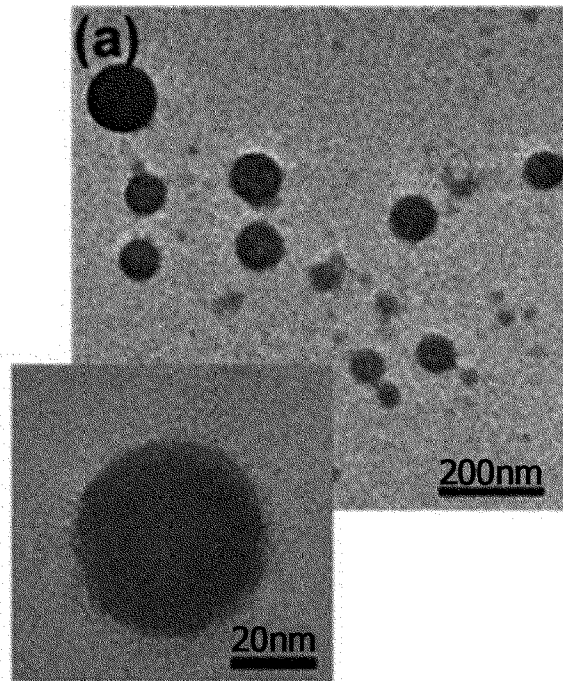


[도2]

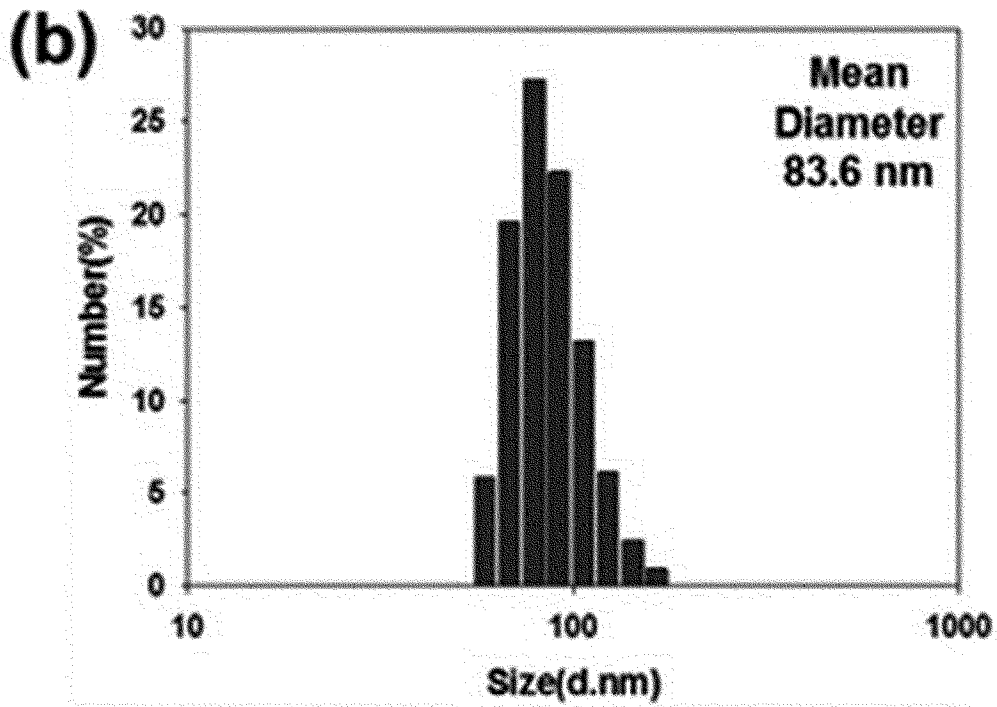


[도3a]

Chondro-Exo

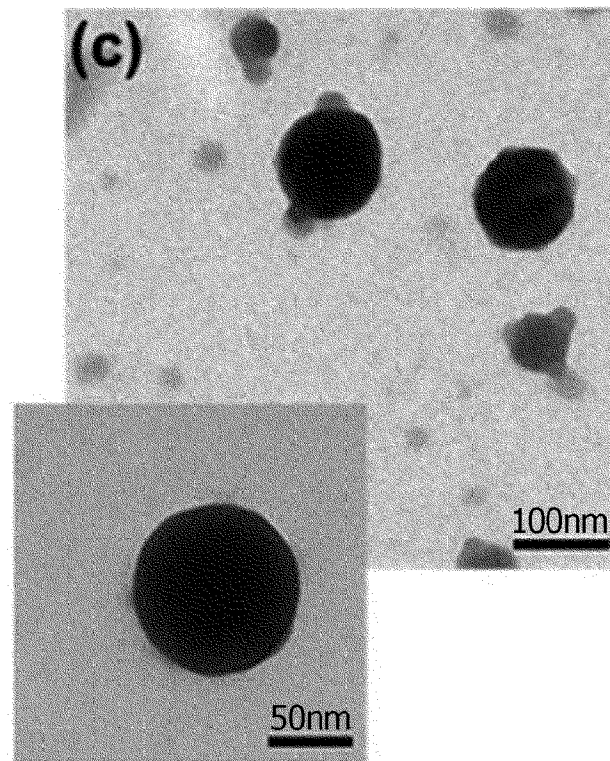


[도3b]

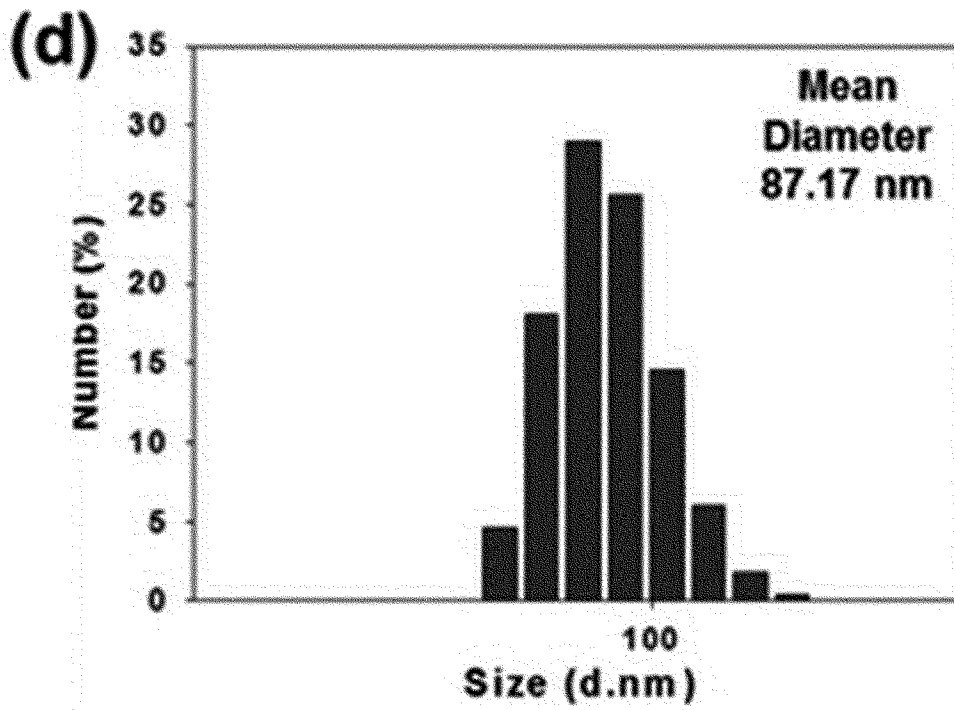


[도3c]

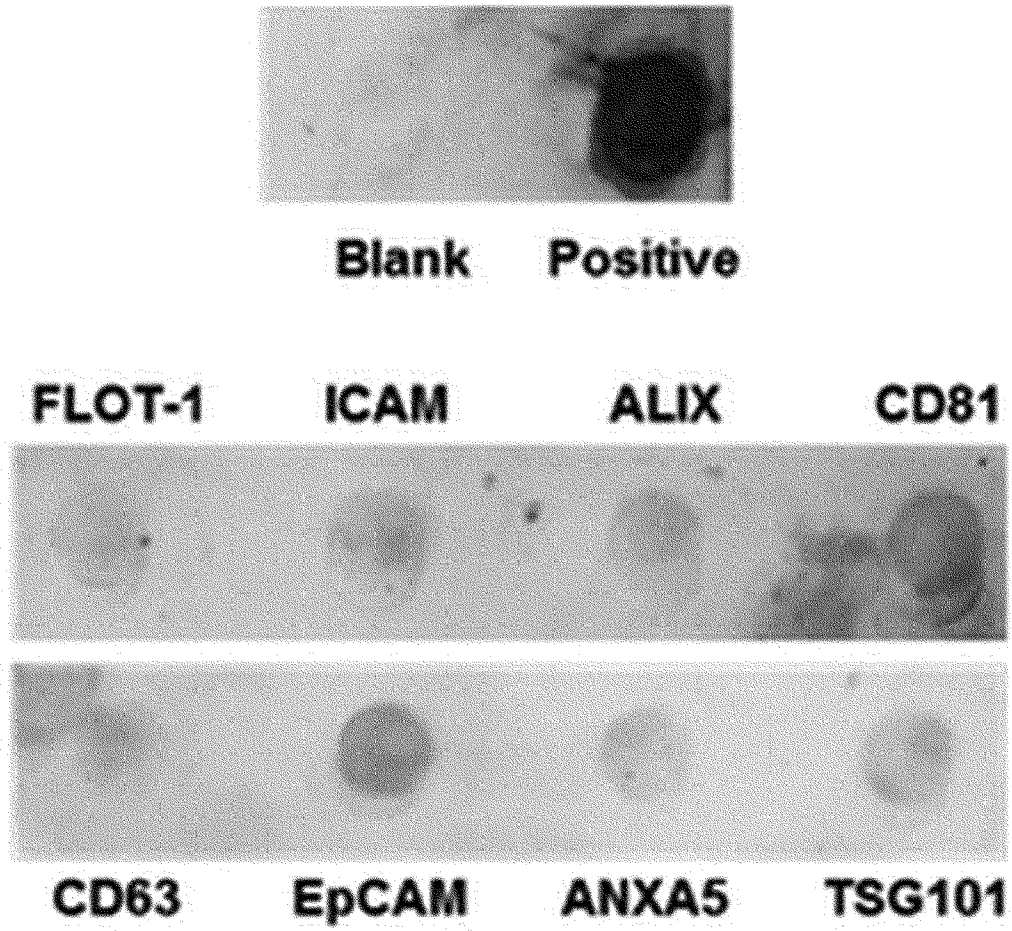
ASC-Exo



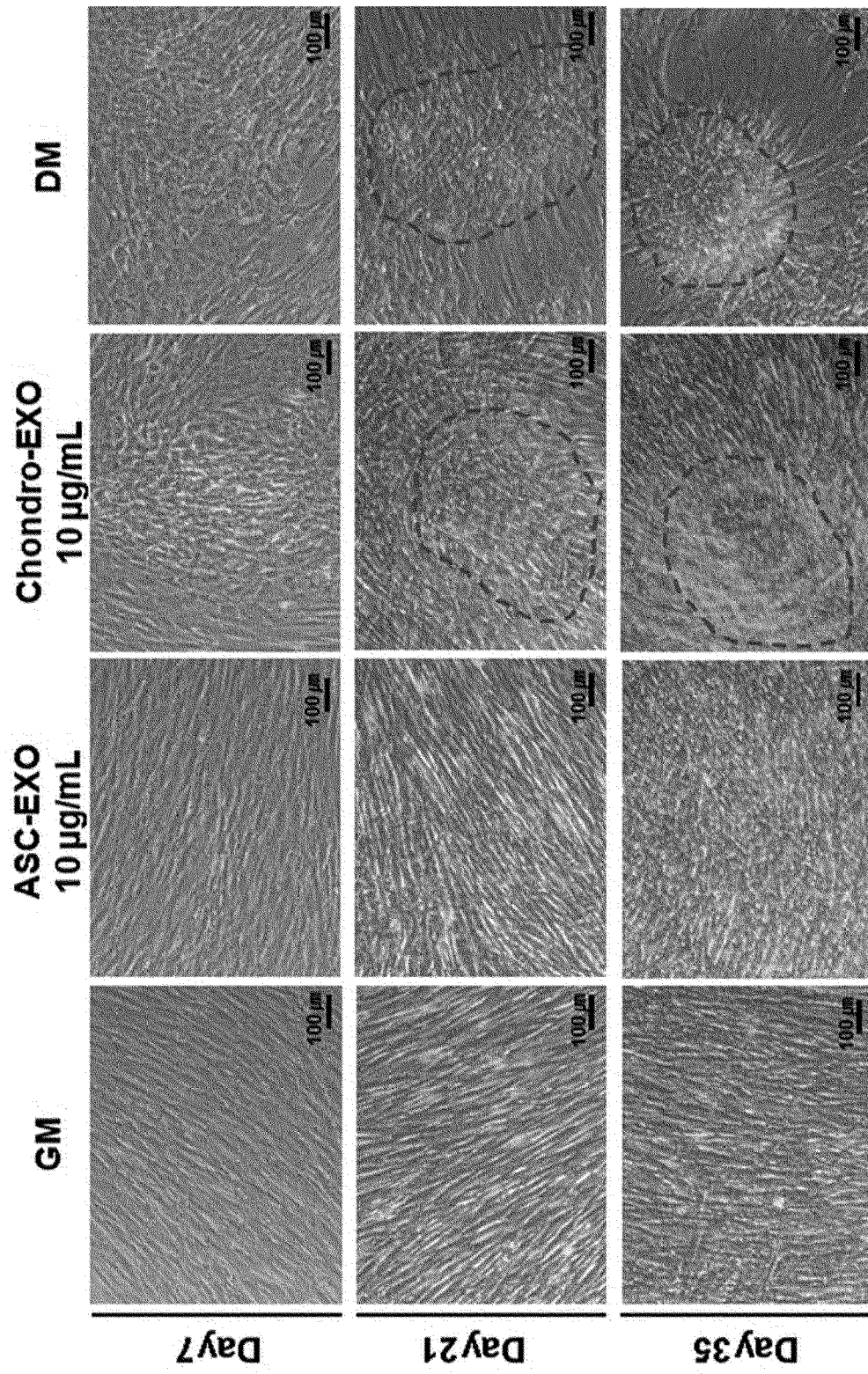
[도3d]



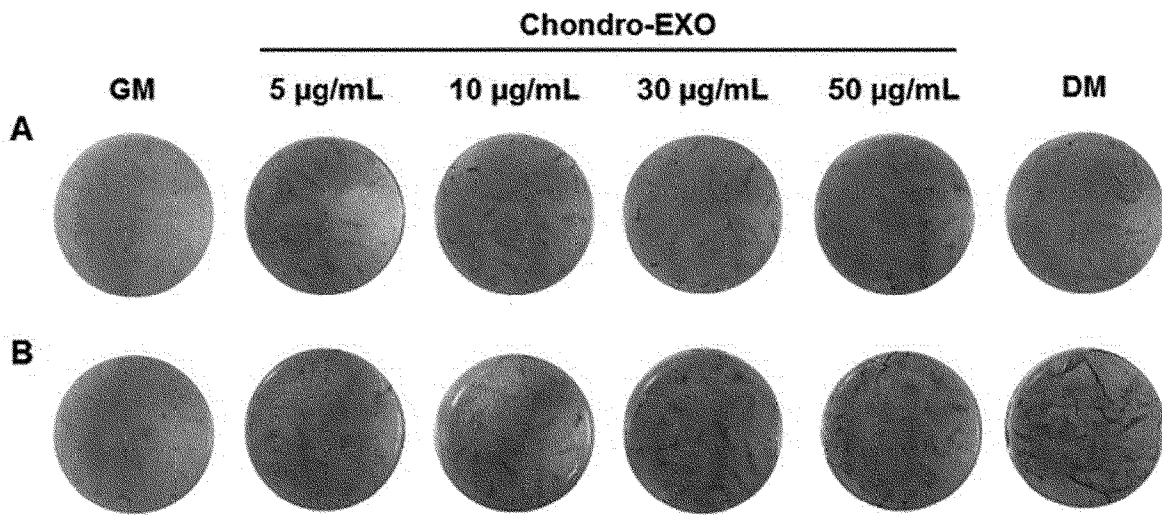
[도4]



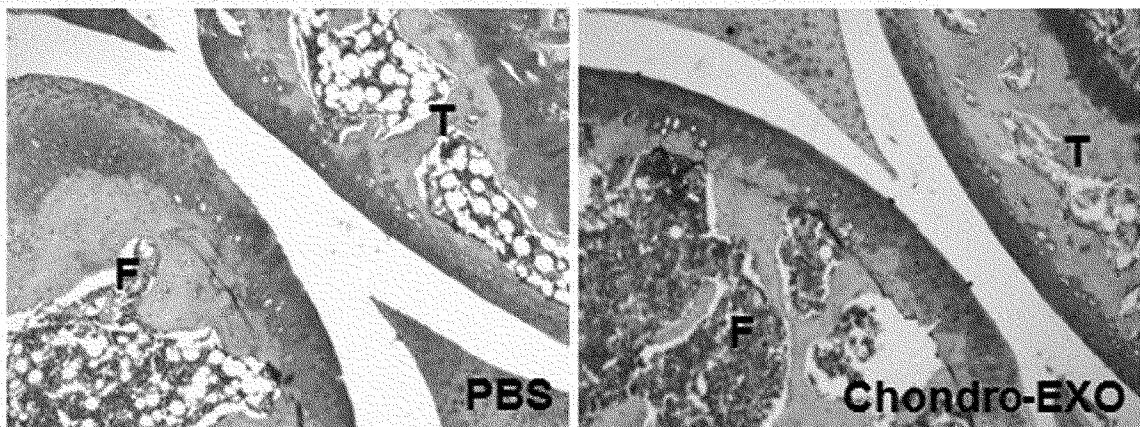
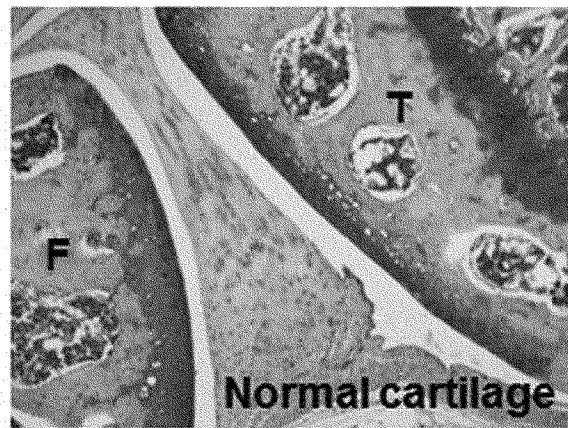
[도5]



[도6]



[도7]



[도8]

