



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0149177
(43) 공개일자 2024년10월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/50 (2015.01) A61P 27/16 (2006.01)
C12N 5/071 (2010.01)
(52) CPC특허분류
A61K 35/50 (2013.01)
A61P 27/16 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2023-0044803
(22) 출원일자 2023년04월05일
심사청구일자 2023년04월05일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
송재준
서울특별시 서초구 신반포로 9, 73동 504호 (반포동, 반포아파트)
고윤영
서울특별시 양천구 목동동로 339, B904호 (목동, 목동트윈빌)
이찬미
서울특별시 구로구 구일로2길 60, 203동 201호 (구로동, 구일우성아파트)
(74) 대리인
특허법인 무한

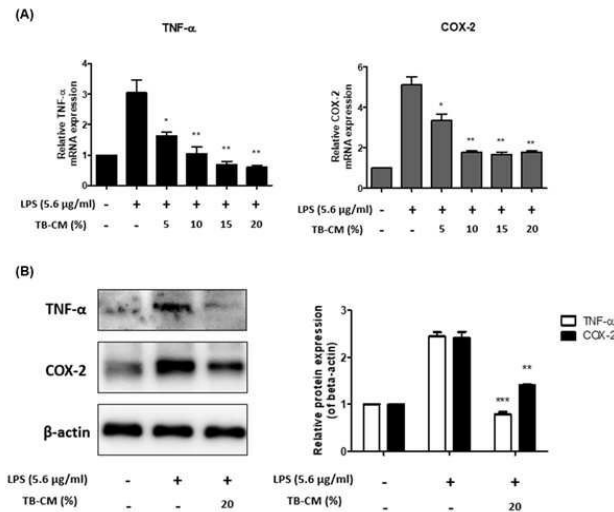
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 중이염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은, 인간영양막세포 배양액 및/또는 인간영양막세포 유래 미세소포체를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물에 관한 것으로서, 본 발명의 조성물은 LPS에 의하여 유발되는 염증 반응 관련 유전자의 발현을 억제하고, 세포생존율을 향상시키므로, 이비인후과영역의 염증성 질환 등에 대한 예방 또는 치료 효과를 기대할 수 있다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류
C12N 5/0682 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345350435
과제번호	2020R1I1A1A01063168
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축
연구과제명	융모막 Trophoblast 유래 엑소좀의 골재생 효능 연구
기 여 율	1/1
과제수행기관명	고려대학교 산학협력단
연구기간	2022.03.01 ~ 2023.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

인간영양막세포 배양액 또는 인간영양막세포 유래 미세소포체 중 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는, 중이염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 중이염은 세균성 중이염인, 중이염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 세균은 그람음성 세균인, 중이염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 조성물은 TNF- α , COX-2, MUC5AC 및 AQP-4으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자 발현을 감소시키는, 중이염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 조성물은 ENaC- α , ENaC- β , 및 ENaC- γ 로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자 발현을 증가시키는, 중이염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 인간영양막세포 배양액은 5 내지 30 부피%로 포함되며, 상기 인간영양막세포 유래 미세소포체는 1×10^7 내지 1×10^9 입자/mL의 농도로 포함되는, 중이염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함하는, 중이염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 조성물은 캡슐, 정제, 과립, 주사제, 연고제, 분말 또는 음료 형태인 것을 특징으로 하는, 중이염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 9

(a) 인간영양막세포주를 배양배지에 배양하는 단계;

(b) 미세소포체 고갈된(exosome depleted) 배양배지로 교체하여 24시간동안 더 배양하는 단계;

(c) 세포배양 상층액을 회수하는 단계; 및

(d) 회수된 상층액을 원심분리하고 여과멸균하는 단계;

를 포함하는, 인간영양막세포 배양액의 제조방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 단계 이후에

(e) 초고속 원심분리를 수행하는 단계;

를 더 포함하는, 인간영양막세포 유래 미세소포체의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 인간영양막세포 배양액 및/또는 인간영양막세포 유래 미세소포체를 유효성분으로 포함하는 중이염의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003]

중이염은 귀의 내부 기관이 완전 발육하는 7세 이전 소아의 경우 80 내지 90% 정도가 한두 번 이상 앓게 되는 흔한 질병이다.[Sugino H, Tsumura S, Kunimoto M, Noda M, Chikuie D, Noda C, et al. Influence of pneumococcal conjugate vaccine on acute otitis media with severe middle ear inflammation: A retrospective multicenter study. PLoS ONE. 2015;10:e0137546.] 귀 건강은 아이들에게 있어 언어습득과 인지발달의 비중이 크기 때문에 특히 강조되고 있다. 또한, 중이염은 보통 1주일 이내의 급성 중이염으로 나타나지만 만성 중이염으로 발전할 수 있다. 만성 중이염은 2주 이상 지속되며 내이에 심각한 염증과 청력 상실을 유발할 수 있다. 치료법으로 약물치료와 수술적 치료가 있으며 약물치료는 만성 중이염의 장기치료에 효과가 없고, 항생제에 대한 세균 내성의 많은 부분에서 문제가 대두되고 있다.[Lighthall JG, Kempton JB, Hausman F, MacArthur CJ, Trune DR. Control of middle ear inflammatory and ion homeostasis genes by transtympanic glucocorticoid and mineralocorticoid treatments. PLoS ONE. 2015;10:e0119228.]

[0004]

항생제의 대표적인 부작용으로는 항생제를 여러 차례 반복해서 복용할 경우, 항생제 내성균이 발생할 수 있는 것이다. 그 외에도 설사, 구토 등의 부작용을 유발하게 된다.[C. Lee Ventola, MS, The Antibiotic Resistance Crisis, P&R, April 2015, vol.40 No.4] 또한, 항생제는 우리 몸에 도움을 주는 유익균을 사멸시키거나 성장을 억제시키는 부작용이 있다. 그러나 건강보험심사평가원에서 보고된 바에 따르면 우리나라에서는 “유소아 급성 중이염”의 항생제 처방률이 84%를 넘는 반면에 네덜란드와 덴마크 등 해외에서는 항생제 처방률이 70%를 넘지

않고 있다고 보고했다.[건강보험심사평가원, 2015년 유소아 급성중이염 항생제 적정성 평가, 2015.11.16] 그만큼 습관적인 항생제 처방의 문제가 대두가 되고, 항생제에 대한 부작용이 큰 실정이다.

[0005] 이를 극복하기 위해 다양한 중이염치료제가 개발되고 있는데 특히 염증 치료에 관하여 줄기세포 배양액과 미세소포체(Extracellular Vesicles)가 개발되고 있다. 미세소포체는 마이크로베지클 (microvesicels), 엑소좀(Exosome) 등을 포함하는 30~1000 nm 크기의 구형 지질이중층 (Lipid-bilayer)으로 구성된 소포체(vesicle)이다. 엑소좀의 구조는 인지질 이중막 구조로 되어 있으며, 세포-세포간의 커뮤니케이션 및 세포성 면역을 중재하는 기능적 역할을 수행한다. 엑소좀은 세포막과 동일한 막 구조의 소낭체로, 다른 세포 및 조직에 막 구성요소, 단백질, RNA 등을 전달하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 중이염 연구에 있어서는 최근 중간엽줄기세포 유래물이 인간중이상피세포 중이염모델에서 염증 억제 효능을 가짐이 발표되었다.[Dong Jun Park, JeongEun Park, Tae Hoon Kong, Young Joon Seo Park, Alteration of payload in extracellular vesicles by crosstalk with mesenchymal stem cells from different origin. et al. J Nanobiotechnol (2021) 19:148.]

[0006] 본 발명자들은 세포로부터 유래된 배양액과 엑소좀을 이용하여 다양한 질환의 치료효과에 대한 연구를 진행하며, 그 중 중이염 억제 또는 치료를 위해 인간영양막세포 배양액과 엑소좀(미세소포체)를 이용하여 그 효능을 처음으로 발견하여 발명으로 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 상술한 종래기술의 문제점을 해결하기 위하여, 인간영양막세포 배양액 또는 인간영양막세포 유래 미세소포체 중 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는, 중이염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 인간영양막세포 배양액 및 인간영양막세포 유래 미세소포체의 제조방법을 제공한다.

[0010] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당해 기술분야의 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 인간영양막세포 배양액 또는 인간영양막세포 유래 미세소포체 중 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는, 중이염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0013] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 중이염은 세균성 중이염일 수 있다.

[0014] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 세균은 그람음성 세균일 수 있다.

[0015] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 조성물은 TNF- α , COX-2, MUC5AC 및 AQP-4으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자 발현을 감소시킬 수 있다.

[0016] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 조성물은 ENaC- α , ENaC- β , 및 ENaC- γ 로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자 발현을 증가시킬 수 있다.

[0017] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 인간영양막세포 배양액은 5 내지 30 부피%로 포함될 수 있으며, 상기 인간영양막세포 유래 미세소포체는 1×10^7 내지 1×10^9 입자/mL의 농도로 포함될 수 있다.

[0018] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있다.

[0019] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 조성물은 캡슐, 정제, 과립, 주사제, 연고제, 분말 또는 음료 형태일 수 있다.

[0020] 또한 본 발명은, (a) 인간영양막세포주를 배양배지에 배양하는 단계; (b) 미세소포체 고갈된(exosome depleted) 배양배지로 교체하여 24시간동안 더 배양하는 단계; (c) 세포배양 상층액을 회수하는 단계; 및 (d) 회수된 상층액을 원심분리하고 여과필균하는 단계; 를 포함하는, 인간영양막세포 배양액의 제조방법을 제공한다.

[0021] 또한 본 발명은, 상기 단계 이후에 (e) 초고속 원심분리를 수행하는 단계; 를 더 포함하는, 인간영양막세포 유래 미세소포체의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0023] 본 발명의 약학적 조성물은 인간영양막세포 배양액 및/또는 인간영양막세포 유래미세소포체를 유효성분으로 포함하여, LPS처리에 의해 유발되는 염증 반응 관련 유전자의 발현을 조절하고 세포 생존율을 향상시키므로, 중이염의 예방 및 치료에 효과가 있다. 따라서 본 발명의 조성물은, 이비인후과영역의 삼출성/만성/세균성 중이염 질환과 그 외에 세균에 의해 발생하는 만성 염증성 질환에도 예방 또는 치료 효과를 기대할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1은 본 발명에 따른 제조방법 모식도(A)와 제조된 미세소포체의 크기 분포(B)이다.

도 2는 LPS처리한 중이 상피세포의 모습을 현미경으로 나타낸 것(A), 세포생존율 분석(B), IC50 그래프(C) 및 염증마커의 mRNA 발현량(D)을 나타낸다.

도 3은 중이염 모델에 TB-CM을 처리한 후 현미경 사진(A) 및 세포생존율 분석(B) 결과이다.

도 4는 중이상피세포에서 염증관련 유전자 발현정도(A) 및 단백질발현량(B)를 나타낸다.

도 5는 중이염 반응에 관련된 유전자인 AQP4 및 ENaC 계열 유전자 (ENaC- α , ENaC- β 및 ENaC- γ)의 mRNA 발현을 도 5의 (A) 및 (B)로 나타낸 것이다.

도 6은 뮤신관련 발현을 확인하기 위한 형광현미경사진(A)과 유전자 발현(B)를 나타낸 것이다.

도 7은 LPS 유도 중이염모델에 TB-EV를 처리한 경우 세포생존율을 분석한 것이다.

도 8은 TB-EV 처리시 염증관련 마커 발현정도를 나타낸다.

도 9는 양막/용모막 추출물과 TB-CM의 세포생존율 비교실험결과를 나타낸다.

도 10은 양막/용모막 추출물과 TB-CM의 염증관련 마커 발현정도 비교실험결과를 나타낸다.

도 11은 양막/용모막 추출물과 TB-EV의 세포생존율 비교실험결과를 나타낸다.

도 12는 양막/용모막 추출물과 TB-EV의 염증관련 마커 발현정도 비교실험결과를 나타낸다.

도 13은 시판 항생제인 amoxicillin과 본 발명의 조성물의 세포생존율 비교실험결과를 나타낸다.

도 14는 시판 항생제인 amoxicillin과 본 발명의 조성물의 염증관련 마커 발현정도 비교실험결과를 나타낸다.

도 15는 지방유래 중간엽줄기세포 미세소포체와 본 발명의 인간영양막세포 유래 미세소포체의 세포생존율 비교 실험결과를 나타낸다.

도 16은 본 발명의 TB-CM과 TB-EV를 각각 처리하는 경우와 복합처리하는 경우의 세포생존율 비교실험결과를 나타낸다.

도 17은 본 발명의 TB-CM과 TB-EV를 각각 처리하는 경우와 복합처리하는 경우의 염증관련 마커 발현정도 비교 실험결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 본 발명자들은 인간 중이 상피세포주에 LPS를 처리하여 중이염 모델을 확립하였다. 확립된 중이염 모델에 인간 영양막세포주를 배양한 배양액 또는 이로부터 유래한 미세소포체를 처리하는 경우 세포생존율을 증가시키고, 염증 관련 유전자의 발현을 조절하여 중이염의 예방 또는 치료에 효과가 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0027] 본 발명은 인간영양막세포 배양액 또는 인간영양막세포 유래 미세소포체 중 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는, 중이염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0028] 본 명세서에서 사용되는 용어 "인간영양막세포"는 인간 태반의 일 구성부분으로서, 보다 구체적으로는 배포 외

부에 위치한 배자의 외배엽층으로, 난자를 자궁벽에 부착시키며 배자에 영양분을 공급하는 조직을 의미한다. 이것에서 용모막 및 양막이 유래하며, 영양막의 내세포층은 용모를 덮으며, 이를 세포영양막이라 부른다. 상기 인간영양막세포는 시판되는 세포주를 이용할 수 있고 또는 인간 산모의 출산 후 분리된 태반으로부터 추출되어 제공될 수 있다.

- [0029] 본 명세서에서 사용되는 용어 “인간영양막세포 배양액”은 상기 인간영양막세포를 체외배양한 배양액을 의미한다. 바람직하게는 항생제 및 FBS의 존재 하에 세포성장배지에서 체외배양될 수 있으며 구체적인 제조방법은 후술하는 바와 같다. 상기 인간영양막세포 배양액은 하기 인간영양막세포 유래 미세세포체를 포함할 수 있다.
- [0030] 본 명세서에서 사용된 용어 “인간영양막세포 유래 미세세포체”는 인간 영양막 세포가 포함하거나 외부로 분비하는 막성 소포체로서 내부에 지질, 핵산, 단백질, 대사물질 등 생물학적 활성을 보이는 다양한 물질을 포함하는 것을 의미한다. 상기 유래물은 엑소솜, 미세소포체, 세포외소포체, 마이크로베지클 또는 마이크로파티클 중 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나 이에 제한되지 않으며, 본 명세서에서는 “미세소포체”, “유래물” 및 “엑소솜”을 서로 같은 의미로써 교환적으로 사용될 수 있다. 상기 유래물은 바람직하게는 염증반응을 감소시키는 성분을 포함할 수 있다.
- [0031] 본 명세서에서 사용되는 용어 “예방”이란, 본 발명의 인간영양막세포 배양액 및/또는 인간영양막세포 유래 미세소포체로 인해 중이염이 억제되거나 그 발병이 지연되도록 하는 모든 행위를 의미한다.
- [0032] 본 명세서에서 사용되는 용어 “치료”란 인간영양막세포 배양액 및/또는 인간영양막세포 유래 미세소포체로 인해 중이염과 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도가 호전되거나 이롭게 되도록 하는 모든 행위를 의미한다.
- [0033] 상기 중이염은 특별히 발병 원인에 의해 한정되지 아니하나 바람직하게는 세균성 중이염일 수 있고, 더욱 바람직하게는 그람음성 세균에 의해 유발된 중이염일 수 있다. 본 발명의 실시예 1에서는 그람음성 세균의 세포벽 구성성분인 LPS(Lipopolysaccharide)를 인간 중이 상피세포주에 처리하여 중이염 모델을 확립하였다.
- [0034] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 조성물은 TNF- α , COX-2, MUC5AC 및 AQP-4으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자 발현을 감소시킬 수 있다.
- [0035] 본 명세서의 실시예 3 및 4의 방법으로, 중이염 관련 유전자의 발현을 관찰한 결과, 중이염 반응에 관련된 유전자 TNF- α , COX-2, MUC5AC 및 AQP-4의 발현은 모두 LPS 처리에 의해 모두 급격히 증가하는 반면, LPS 처리된 중이 상피세포에 대하여 인간영양막세포 배양액 및/또는 인간영양막세포 유래 미세소포체가 처리된 경우에는, 상기 중이염 관련 유전자들의 발현이 모두 감소되었으며, 각 유전자의 발현 정도는 LPS 처리되지 않은 정상 세포와 유사한 수준인 것을 확인할 수 있었다.
- [0036] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 조성물은 ENaC- α , ENaC- β , 및 ENaC- γ 로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자 발현을 증가시킬 수 있다. ENaC- α , ENaC- β 및 ENaC- γ 는 모두 중이 점막 상피에서 소듐(Na⁺) 채널을 통한 수분 흡수 조절에 관여하는 유전자로, 외부에서 들어오는 소리를 내이로 효과적으로 전달하기 위해 중이강을 수분이 없는 상태로 유지한다. 이에 대해, 중이 점막 상피세포에서의 염증 반응은 이러한 ENaC 계열의 유전자 발현을 억제한다.
- [0037] 본 발명자들은, LPS 처리된 중이 상피세포에서 상기 ENaC 계열 유전자의 발현이 모두 감소하는 반면, 인간영양막세포 배양액 및/또는 인간영양막세포 유래 미세소포체가 처리된 경우에는 상기 ENaC 계열 유전자의 발현이 증가하여, 일부 유전자의 경우 추출물 농도에 따라 LPS 처리 전과 비교하여도 향상된 발현 수준을 나타낼 수 있음을 확인하였다. 이는 상기 인간영양막세포 배양액 및/또는 인간영양막세포 유래 미세소포체가 LPS에 의하여 유발된 중이염의 치료 효과를 나타냄을 의미할 수 있다.
- [0038] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 인간영양막세포 배양액은 5 내지 30 부피%로 포함될 수 있으며, 상기 인간영양막세포 유래 미세소포체는 1×10^7 내지 1×10^9 입자/mL의 농도로 포함될 수 있다. 상기 배양액 및 미세소포체를 포함하는 조성물은 해당 농도범위에서 농도 의존적으로 염증반응을 억제하는 효과가 좋았음을 실시예 2 및 3에서 확인하였다. 인간영양막세포 배양액 및/또는 인간영양막세포 유래 미세소포체를 상기 농도보다 높은 농도로 포함하는 조성물도 본 발명의 조성물과 동일하거나 더 나은 중이염 예방 또는 치료효과를 가질 수 있다.
- [0039] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0040] 본 발명에서 사용되는 용어 “약학적으로 허용가능한 담체”는 임의의 대상 조성물 또는 성분을 하나의 기관, 또

는 신체의 부분으로부터 다른 기관, 또는 신체의 부분으로의 운반 또는 수송하는 것에 관여하는 액체 또는 고체 충전제, 희석제, 부형제, 용매 또는 캡슐화 물질과 같은 제약상 허용가능한 물질, 조성물 또는 비히클을 지칭하며, 본 발명의 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다.

[0041] 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 스테아린산 마그네슘 및 광물유를 들 수 있다.

[0042] 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여 경로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 구강, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장이 포함된다. 경구 또는 비경구 투하가 바람직하다. 본원에 사용된 용어 "비경구"는 피하, 피내, 정맥내, 근육내, 관절내, 활액낭내, 흉골내, 경막내, 병소내 및 두개골내 주사 또는 주입기술을 포함한다. 본 발명의 약학 조성물은 또한 피부 또는 점막 표면 도포를 위한 연고 형태로 제형화될 수 있다.

[0043] 본 발명의 약학적 조성물은 사용된 특정 화합물의 활성, 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 정식, 투여시간, 투여경로, 배출율, 약물 배합 및 예방 또는 치료될 특정 질환의 중증도를 포함한 여러 요인에 따라 다양하게 변할 수 있고, 상기 약학 조성물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은 환제, 당의정, 캡슐, 액제, 젤, 시럽, 슬러리, 현탁제, 정제, 과립, 주사제, 연고제, 분말 또는 음료의 형태로 제형화될 수 있다.

[0044] 또한 본 발명은, (a) 인간영양막세포주를 배양배지에 배양하는 단계; (b) 미세소포체 고갈된(exosome depleted) 배양배지로 교체하여 24시간동안 더 배양하는 단계; (c) 세포배양 상층액을 회수하는 단계; 및 (d) 회수된 상층액을 원심분리하고 여과멸균하는 단계; 를 포함하는, 인간영양막세포 배양액의 제조방법을 제공한다.

[0045] 또한 본 발명은, 상기 단계 이후에 (e) 초고속 원심분리를 수행하는 단계; 를 더 포함하는, 인간영양막세포 유래 미세소포체의 제조방법을 제공한다.

[0047] 본 발명은 다양한 변환을 가할 수 있고 여러 가지 실시예를 가질 수 있는 바, 이하 특정 실시예들을 도면에 예시하고 상세한 설명에 상세하게 설명하고자 한다. 그러나, 이는 본 발명을 특정한 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변환, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 본 발명을 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

[0049] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

[0050] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0052] <실시예 1> 인간영양막세포로부터 미세소포체 회수

[0053] 인간영양막세포 배양배지는 세포를 배양하는 과정에서 회수하였고, 회수한 배양액 (conditioned medium, CM) 으로부터 미세소포체(Extracellular vesicles, EV)를 추출하였다. 구체적으로, 인간영양막세포는 Human trophoblast cell line HTR-8/SVneo(ATCC사 Cat#: CRL-3271)를 사용하였으며, 5% 태아 소 혈청(fetal bovine serum, FBS) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신(penicillin/streptomycin, P/S)가 포함되어 있는 RPMI 1640(Gibco, Cat#: 11875-093) 배양 배지에서 배양하였다. 배양배지와 미세소포체를 추출하기 24시간 전에 미세소포체가 고갈된(exosome depleted) 5% FBS, 1% P/S가 포함되어 있는 배지로 교체하여 24시간 동안 배양한 후, 세포 배양 상층액을 회수하였다.

[0054] 회수한 세포배양 상층액은 300 xg, 4℃에서 10분간 원심 분리하는 단계와 여과멸균(Syringe filter, 공극크기: 0.22 μm)을 이용한 일차 필터링 단계를 거쳐 세포 잔해물 및 노폐물을 제거하여 인간영양막세포 배양액을 수득하였다.

- [0055] 세포 잔해물이 제거된 상층액을 초고속 원심분리기(Ultracentrifuge)를 이용하여 100,000 xg, 4℃에서 80분간 원심분리하고, 펠렛(pellet)을 PBS에 희석하여 인간영양막세포 미세소포체를 회수하였다. 회수된 미세소포체를 NTA 장비로 사이즈와 농도를 분석하여 도 1의 (B)에 나타내었다.
- [0057] <실시예 2> 인간 중이 상피세포주에서의 중이염 모델 확립
- [0058] 인간 중이 상피세포(Human middle epithelial ear cells, HMEECs)는 정상 중이 점막 상피세포에 인간 유두종 바이러스의 E6와 E7 유전자를 삽입하여 불멸화한 세포주 (House Ear Institute, Los Angeles, CA, USA)를 사용하였다. 상기 세포주는, 세포의 형태가 모세포와 같고 동물에 주입하여도 종양을 발생시키지 않으므로, 정상 중이 점막 상피세포의 생물 기능을 평가할 수 있는 세포주로 사용될 수 있다.
- [0059] 상기 중이 점막 상피세포(1×10^4 cells/well)에 세균의 세포막 구성 물질인 지질다당체 (LPS; Lipopolysaccharide)를 96-웰 플레이트(well plate)에 각각 0, 1, 1.5, 2.5, 3.5, 4.6, 6.5 및 10 $\mu\text{g/mL}$ 처리하여 24시간 동안 노출시킨 후 세포의 모습을 관찰하였으며, 대조군으로는 지질다당체가 처리되지 않은 인간 중이 상피세포를 사용하여 세포의 모습을 비교하여 도 2의 (A)에 나타내었다. 지질다당체 농도가 증가할수록 중이 상피세포의 수가 감소, 즉 생존율이 감소하는 것을 현미경 사진을 통해 확인하였고, 생존율이 감소하는 것을 확인하였다.
- [0060] 세포 생존율은 CCK-8 kit(Dojindo, Cat#: CK04-11)를 이용하여 450nm의 파장으로 흡광도를 측정하였다($n=4$). CCK-8 시약은 생존하고 있는 세포 내 탈수소효소와 반응하여 시약의 색소가 변하게 되어 세포 증식률과 세포 생존율에 대한 정량적인 평가를 실시할 수 있다. 구체적으로, 배양액을 제거하고 PBS 용액으로 세척한 후, 전체 배양액에서 10%(v/v) CCK-8 농도로 만들어 각각의 웰에 넣고 1시간 동안 37℃에서 반응시킨 후 흡광도를 측정하여 생존율을 분석해 이를 도 2의 (B)에 나타내었고, IC50을 계산하여 도 2의 (C)에 나타내었다. 또한, 지질다당체 농도에 따른 염증인자 마커 TNF- α 와 COX-2의 mRNA 발현량을 도 2의 (D)에 나타내었다. 도 2의 (C)에 따르면 유의한 지질다당체 농도는 IC50=5.6 $\mu\text{g/mL}$ 인 것으로 확인되었고, 염증 마커의 mRNA 발현량이 지질다당체 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다.
- [0062] <실시예 3> 인간영양막세포 배양액(TB-CM)의 중이염 모델에 대한 효과 확인
- [0063] 실시예 3-1. 세포 수 증가 효과
- [0064] 중이 상피세포에 지질다당체를 6-웰 플레이트에 각각, 5.6 $\mu\text{g/mL}$ 로 처리한 실험군을 준비하여 중이염 모델을 확립하였다. 각각의 웰에 인간영양막세포 배양액(TB-CM) 5 내지 30%(v/v)로 처리한 후, 24시간 노출하고 세포의 모습을 관찰하여 그 현미경 사진을 도 3의 (A)에 나타내었다. 대조군으로는 지질다당체는 처리되었으나 TB-CM이 처리되지 않은 인간 중이 상피세포와, 지질다당체 처리되지 않은 인간 중이 상피세포를 사용하였으며, TB-CM 처리군은 20% 처리한 세포의 모습을 비교하였다. 지질다당체 단독 처리 군에서는 50% 중이상피세포의 사멸이 관찰되었으나, TB-CM을 처리하였을 때, 정상 세포의 모습과 함께 세포 수가 증가하였다.
- [0065] 96-웰 플레이트에서 인간 중이 상피세포(1×10^4 cells/well)에 지질다당체를 5.6 $\mu\text{g/mL}$ 로 처리하고 TB-CM을 10%, 15%, 20%, 25% 및 30%로 처리하여 24시간 노출한 후 CCK-8 세포생존율 분석을 실시하여 그 결과를 도 3의 (B)에 나타내었다. 지질다당체를 처리한 중이 상피세포에서 TB-CM농도 의존적으로 세포 생존율이 증가함을 확인할 수 있었다.
- [0067] 실시예 3-2. 중이염 마커 유전자 발현 억제 효과
- [0068] 중이 상피세포(1×10^5 cells/well)에 지질다당체를 24-웰 플레이트에 5.6 $\mu\text{g/mL}$ 로 처리한 후, 24시간 동안 노출하여 세포를 배양해 중이염 모델을 확립하였다. TB-CM을 5%, 10%, 15% 및 20% 농도로 지질다당체 처리와 동시에 처리하였다.
- [0069] 배양된 중이 상피세포로부터 트리졸(TRIZol[®])을 이용하여 RNA를 추출하고, cDNA 합성 키트(TaKaRa, Cat#: 6110A)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. PCR 혼합물은 리버스 및 포워드 프라이머를 각각 5 pmol, 10 μl SYBER

green, 1 μ l cDNA로 만들어 총 부피를 20 μ l로 하였다. 실시간 정량적 중합효소연쇄반응은 Quant Studio 6 Flex real time PCR system(Thermo Fisher scientific)에서 수행되었다. 모든 반응은 독립적으로 3회 반복하여 GAPDH의 mRNA 발현 수준을 정규화하여 상대 정량화 방법을 사용하였다. 중이염 관련 유전자인 TNF- α 와 COX-2를 mRNA 발현 정도를 도 4의 (A)에 그래프로 나타내었다. 염증 반응에 관련된 유전자 TNF- α 와 COX-2의 mRNA 발현은 모두 지질다당체 처리에 의해 증가하고, TB-CM 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해, TB-CM가 염증 반응을 억제하는 것을 확인하였다.

[0070] 또한, 상기와 같은 방법으로 준비된 중이 상피세포에 0.5M EDTA 1:100, protease inhibitor Cocktail solution 1:100을 첨가한 단백질 분해 용액(RIPA buffer)을 4℃에서 1시간동안 분해되도록 한 후 4℃에서 10분 동안 7,500 x g 로 원심분리하고 상층액을 수집하였다. 세포를 용해하고 동일한 양의 단백질을 TNF- α (Santa Cruz Biotechnology, Cat#: SC-52746), COX-2(Abcam, Cat#: ab52237) 및 β -actin(cell signaling, Cat#: 8H10D10) 항체를 이용하여 면역 블로팅 방법으로 단백질 발현량을 확인하여 도 4의 (B)에 나타내었다. TNF- α 와 COX-2의 단백질 발현은 모두 지질다당체 처리에 의해 증가하고, TB-CM을 처리하면 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해, TB-CM이 중이염증 관련 주요 분자반응을 억제하는 것을 확인하였다.

[0071] 중이염 반응에 관련된 유전자인 AQP4 및 ENaC 계열 유전자(ENaC- α , ENaC- β 및 ENaC- γ)의 mRNA 발현을 위와 같은 방법으로 확인하여 각각 도 5의 (A) 및 (B)에 나타내었다. TB-CM농도 의존적으로 AQP4는 감소하였고, ENaC 계열은 증가하는 것을 확인하였으며, 유전자의 발현 정도는 지질다당체가 처리되지 않은 정상 세포와 유사한 수준인 것을 확인하였다.

[0073] 실시예 3-3. 중이염 관련 유전자 발현 억제 효과

[0074] 8 웰에 세포(2×10^5 cells/well)를 파종하고 24시간 동안 배양했다. 세포를 PBS로 두 번 세척하고, 배지에 TB-CM 10% 및 20%를 처리하고, 대조군으로는 아무것도 처리하지 않은 실험군, 지질다당체만 처리한 실험군을 사용하였다. 24시간 후, 중이 상피세포를 15분 동안 실온에서 4% 파라포름알데히드(paraformaldehyde)로 고정시키고, PBS로 5분 동안 2번 세척하였다. 세포를 투과성 솔루션(permeabilization solution)인 0.3% Triton X-100을 5분간, 3% 소혈청 알부민(PBS 안에)이 포함된 솔루션에 60분 동안 실온에서 두었다. MUC5AC 발현을 확인하기 위하여 1차 항체는 MUC5AC(Invitrogen, Cat#: MA1-38223)를 1시간 실온에서 처리한 후 2차 항체는 Alexa488-conjugated antibody (Invitrogen, Cat#: A11001)를 30분간 사용하였다. 핵 염색을 위해 4',6-diamidino-2-phenylindole(DAPI)가 포함된 조직학 장착 매체(sigma, Cat#: F6057-20ML)를 사용하여 커버슬립을 덮어 건조 및 이동을 방지하였다. 세포의 형광 현미경(Carl Zeiss, Cat#: LSM 700)사진을 도 6의 (A)에 나타내었다. MUC5AC, MUC1 및 MUC2는 PCR로 유전자 발현을 확인하여 도 6의 (B)에 나타내었다. 유전자인 MUC1, MUC2 및 MUC5AC의 mRNA 발현량과 MUC5AC 단백질 발현량이 TB-CM 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였다. 이를 통해 TB-CM이 중이염 관련 유전자 증가를 억제하는 것을 확인할 수 있었다.

[0076] <실시예 4> 인간영양막세포 유래 미세소포체(TB-EV)의 중이염 모델에 대한 효과 확인

[0077] 실시예 4-1. 세포 수 증가 효과

[0078] TB-EV는 1×10^7 , 1×10^8 및 1×10^9 파티클(particle)/mL의 농도로, TB-CM을 5%, 10% 및 20%를 처리하였고, 상기 실시예에서 제조된 TB-EV를 제거한 TB-CM(TB-EV depleted TB-CM)을 5%, 10% 및 20%를 처리한 후 중이 상피세포(1×10^4 cells/well)를 96-웰 플레이트에서 24, 48시간 배양하면서 각각 세포 생존율을 평가하여 도 7에 나타내었다. 도 7을 참조하면, 각각의 배양액과 미세소포체 농도 의존적으로 세포 생존율이 증가하는 것을 확인하였다. 특히, TB-CM에서 가장 높은 생존율을 보였으며, TB-EV에도 세포 생존율이 농도 의존적으로 증가하여 미세소포체에도 중이염 억제 유효성분이 있는 것을 확인하였다. 이를 통해 인간영양막세포 배양액 및 미세소포체 조성물이 중이염 상피세포 생존율에 있어서 효능이 우수한 것을 확인하였다.

[0080] 실시예 4-2. 중이염 마커 유전자 발현 억제 효과

[0081] 중이 상피세포(1×10^5 cells/well)에 지질다당체를 24-웰에 5.6 μ g/mL로 처리한 후, 24시간 동안 노출하여 중이

염 모델을 확립하였다. TB-EV를 1×10^7 , 1×10^8 및 1×10^9 파티클(particle)/mL 농도로 지질다당체를 처리와 동시에 처리하였다.

[0082] 염증 반응에 관련된 유전자 TNF- α 와 COX-2를 mRNA 발현 정도를 도 8에 나타내었다. TNF- α 와 COX-2의 mRNA 발현은 모두 지질다당체 처리에 의해 증가하고, TB-EV를 처리한 실험군에서는 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해, TB-EV도 중이염 관련 유전자 발현을 억제하는 것을 확인하였다.

[0084] <비교예 1> 양막 및 용모막 추출물과의 비교실험

[0085] 비교예 1-1. 양막 및 용모막 추출물과 인간영양막세포 배양액(TB-CM)의 비교

[0086] 양막 및 용모막 추출물은 다음과 같이 제조하였다. 탯줄을 중심으로 칼집을 내어 맞붙어 있는 양막과 용모막을 조심스럽게 분리하여 채취하였다. 채취한 각각의 양막과 용모막 조직을 다음과 같이 처리하였다. 채취한 양막 및 용모막을 각각 1% 페니실린/스트렙토마이신 항생제가 첨가된 PBS 또는 생리식염수로 세척하였다. 양막 및 용모막의 점액질과 혈액을 각각 제거한 후 균질기(homogenizer)를 이용하여 분쇄시켰다. 양막 및 용모막에 대하여 각각 1:1의 중량비로 완충용액 PBS를 넣고 하룻밤 동안 4℃에 방치하여 단백질을 방출되도록 하였다. 초음파 분쇄기를 이용하여 단백질 방출을 보조한 후, 원심분리기를 이용하여 추출물의 상층액을 수집하고 여과멸균(syringe filter)하여 -80℃에 보관하였다. 양막 및 용모막 추출물은 단백질의 농도를 측정하여 실험에 사용하였다.

[0087] TB-CM은 상기 실시예 1과 같이 제조하였다. LPS로 염증 유도된 중이상피세포(HMEEC)에 양막 및 용모막추출물(AME 및 CME)을 각각 100, 150 및 200 ug/mL농도로 처리하였고, TB-CM은 10, 15 및 20%를 처리하였다. 48시간 후 중이상피세포의 세포생존율 증가 효능과 중이염 염증 유전자 발현변화를 확인하여 이를 각각 도 9와 도 10에 나타내었다.

[0088] 도 9에 나타나는 바와 같이, TB-CM 처리군이 AME 및 CME 처리군과 t-test 또는 anova 군집비교 시 통계적으로 유의한 중이상피세포 생존율 증가 효능을 보였다. 또한, 도 10에 나타나는 바와 같이, 중이염 관련 TNF- α 와 COX-2 염증유전자 발현이 TB-CM 처리군에서 감소하였으며, 특히 COX-2 유전자 발현이 AME 및 CME와 비교하였을 때 TB-CM 처리군에서 유의하게 감소하는 것을 확인하였다.

[0090] 비교예 1-2. 양막 및 용모막 추출물과 인간영양막세포 미세소포체(TB-EV)의 비교

[0091] 양막 및 용모막 추출물은 상기 비교예 1-1과 같이 제조하였으며, 인간영양막세포 미세소포체(TB-EV)는 상기 실시예 1과 같이 제조하였다.

[0092] LPS로 염증 유도된 중이상피세포(HMEEC)에 양막 및 용모막추출물(AME 및 CME)을 각각 100, 150 및 200 ug/mL농도로 처리하였고, TB-EV는 1×10^7 , 1×10^8 및 1×10^9 파티클(particle)/mL의 농도로 처리하였다. 48시간 후 중이상피세포의 세포생존율 증가 효능과 중이염 염증 유전자 발현변화를 확인하여 이를 각각 도 11와 도 12에 나타내었다.

[0093] 도 11에 나타나는 바와 같이, TB-EV 처리군이 AME 및 CME 처리군과 t-test 또는 anova 군집비교 시 통계적으로 유의한 중이상피세포 생존율 증가 효능을 보여줌을 확인하였다. 또한, 도 12에 나타나는 바와 같이, 중이염 관련 TNF- α 와 COX-2 염증유전자 발현이 TB-EV 처리군에서 감소하였으며, 특히 COX-2 유전자 발현이 AME 및 CME와 비교하였을 때 TB-EV 처리군에서 유의하게 감소하는 것을 확인하였다.

[0095] <비교예 2> 시판항생제와의 비교실험

[0096] LPS로 염증유도된 중이상피세포(HMEEC)에 중이염 치료 항생제인 amoxicillin (유효농도 0.25 ug/mL)처리군, 본 발명의 TB-CM만 20%로 처리한 군, 본 발명의 TB-EV 10^9 particles/mL만 처리한 군, TB-CM 20%와 TB-EV 10^9 particles/mL를 모두 처리한 군으로 나누어 실험하였다. 24시간 및 48시간 후 중이상피세포의 세포생존율 증가 또는 회복 효능과 중이염 염증 유전자 발현변화를 확인하였다. 이를 각각 도 13 및 도 14에 나타내었다.

[0097] 도 13에 나타나는 바와 같이 영양막세포 배양액 또는 미세소포체 처리 군이 amoxicillin 항생제 처리군과 비교

시 통계적으로 유의하게 중이상피세포 생존율 증가 효능을 가짐을 확인하였으며, 특히 배양액과 미세소포체를 병용하는 경우 세포생존율이 더욱 증가됨을 확인하였다. 또한, 도 14에 나타나는 바와 같이 중이염 관련 TNF- α 와 COX-2 염증유전자 발현 분석 시 amoxicillin 항생제 처리군과 비교해보면 영양막세포 배양액 또는 미세소포체 처리 군에서 두가지 염증 유전자 모두 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다.

[0099] <비교예 3> 지방유래 중간엽줄기세포 유래 미세소포체와의 비교실험

[0100] 재생효과가 있는 것으로 알려진 중간엽줄기세포와 효과를 비교하기 위하여 다음과 같이 실험하였다. LPS로 염증 유도된 중이상피세포(HMEEC)에 인간영양막세포 유래 미세소포체(TB-EV)를 1×10^7 , 1×10^8 및 1×10^9 파티클 (particle)/mL의 농도로 처리하였다. 24시간 및 48시간 후 중이상피세포의 세포생존율 증가 효능을 확인하여 이를 도 15에 나타내었다.

[0101] 도 15를 참조하면, 중간엽줄기세포 미세소포체(AD-EV) 처리군과 비교 시 영양막세포 미세소포체(TB-EV) 처리군에서 24시간에서는 10^9 particles/mL에서, 48시간 후에는 모든 처리 농도에서 유의하게 중이상피세포 생존율 증가 효능이 확인되었다.

[0103] <비교예 4> 인간영양막세포 배양액과 미세소포체의 개별처리와 복합처리의 효과 비교

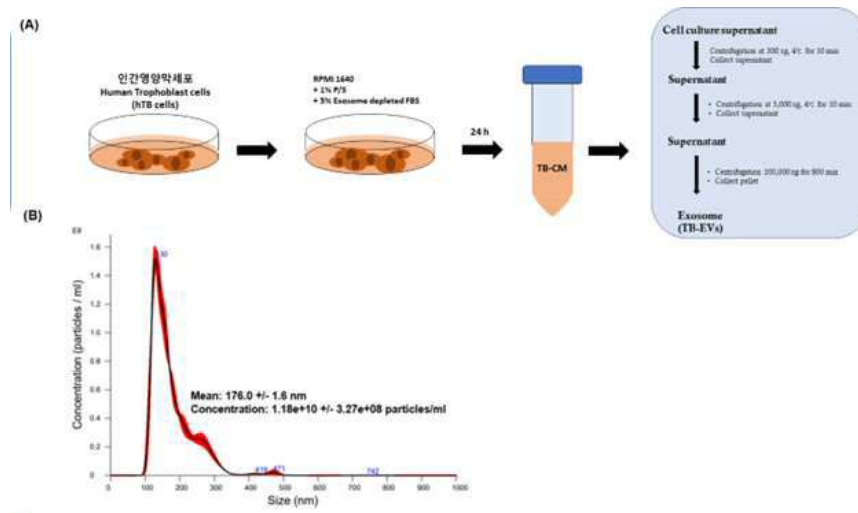
[0104] LPS로 염증 유도된 중이상피세포(HMEEC)에서 인간영양막세포 배양액 (유효농도 20%)과 미세소포체(유효농도 10^9 particles/mL)를 개별적으로 또는 복합 처리하였다. 24시간 및 48시간 후 중이상피세포의 세포생존율 증가 또는 회복 효능과 중이염 염증 유전자 발현변화를 관찰하여 각각 도 16과 도 17에 나타내었다.

[0105] 도 16을 통해 확인할 수 있듯이, 영양막세포 배양액과 미세소포체 단독 처리군과 복합처리군을 비교 시 통계적으로 영양막세포 배양액/엑소좀 복합처리군에서 유의적 중이상피세포 생존율 증가 효능이 확인되었다. 또한, 도 17을 참조하면 중이염 관련 TNF- α 와 COX-2 염증유전자 발현 분석 시에도 단독 처리군들 보다 복합 처리군에서 두가지 염증 유전자 모두 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다. 상기 비교예를 통해 인간영양막세포 배양액 및 미세소포체를 각각 처리하는 것 이상으로 이들을 복합처리하는 것의 효과가 우수함을 확인할 수 있었다.

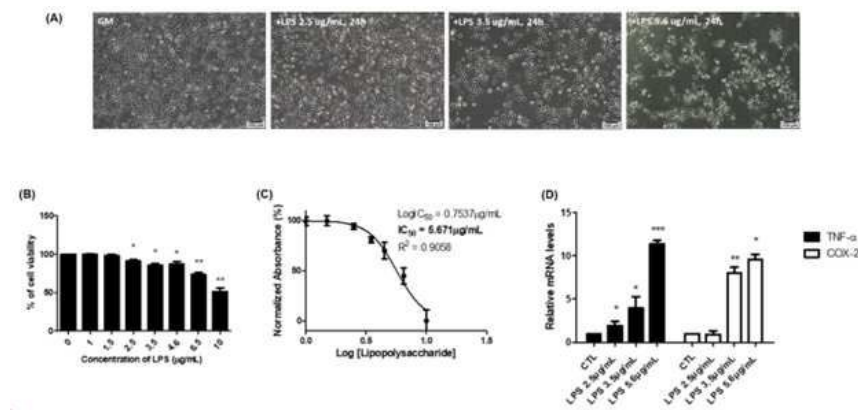
[0107] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

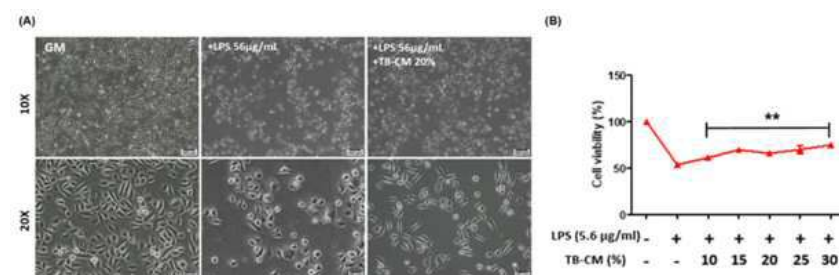
도면1



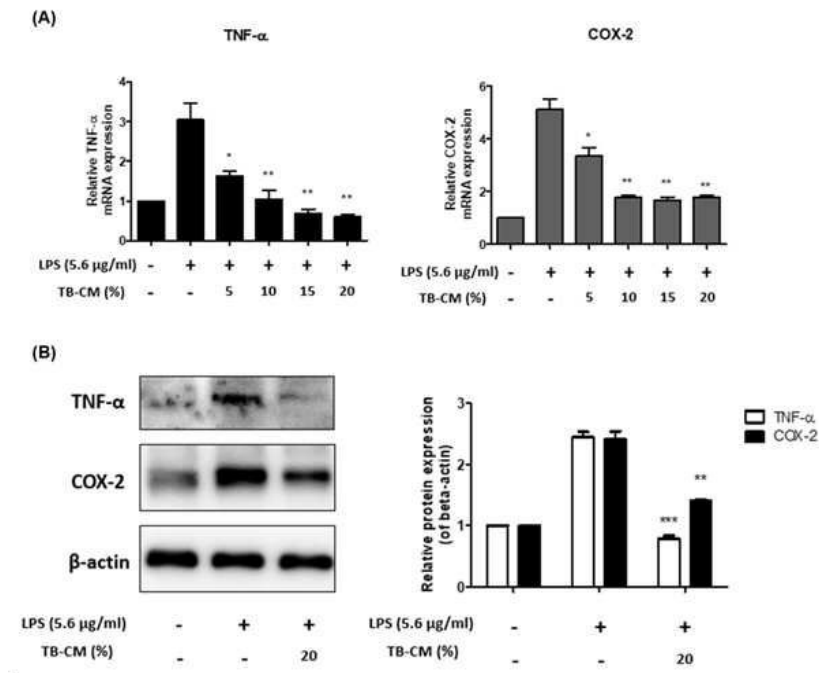
도면2



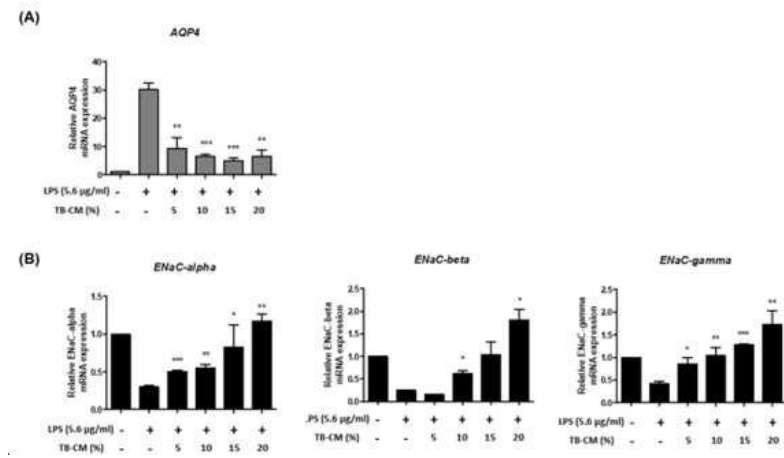
도면3



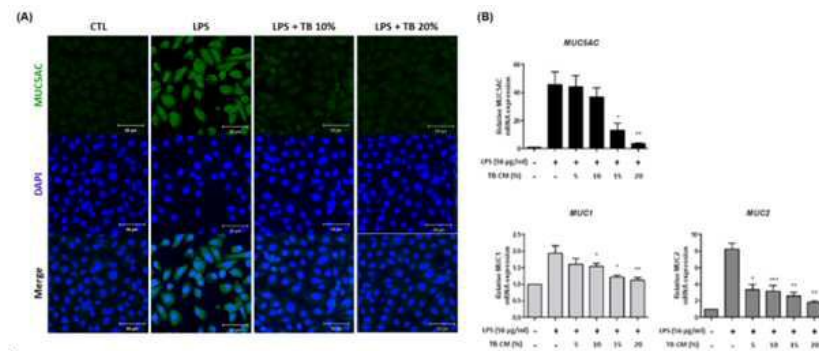
도면4



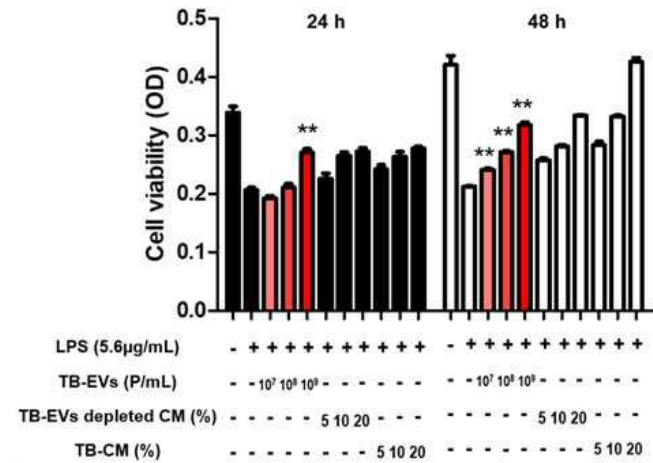
도면5



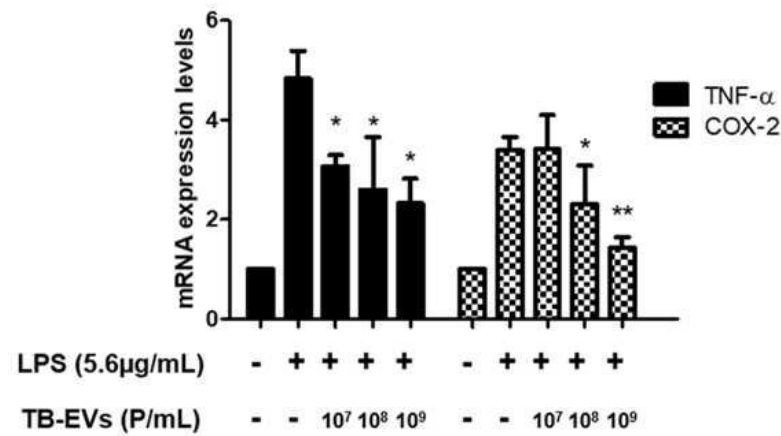
도면6



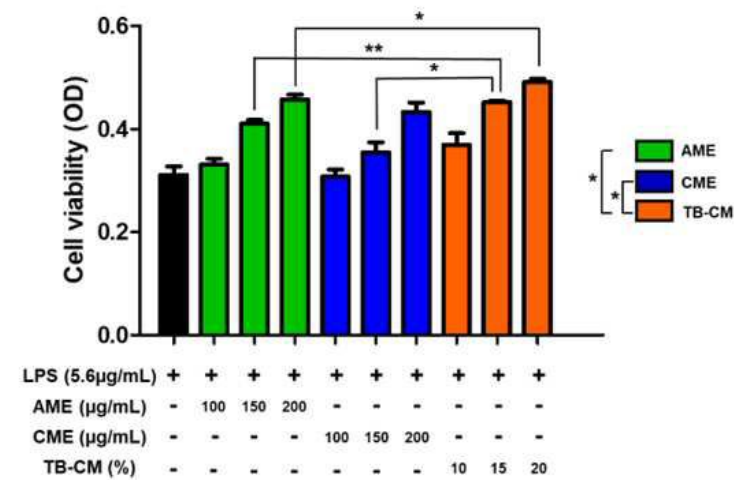
도면7



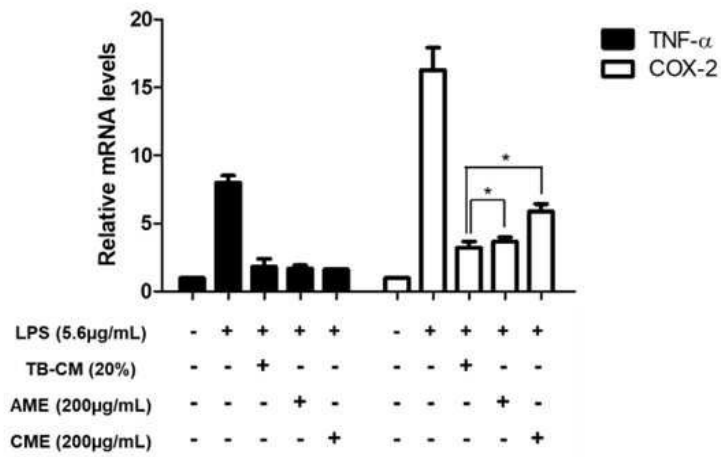
도면8



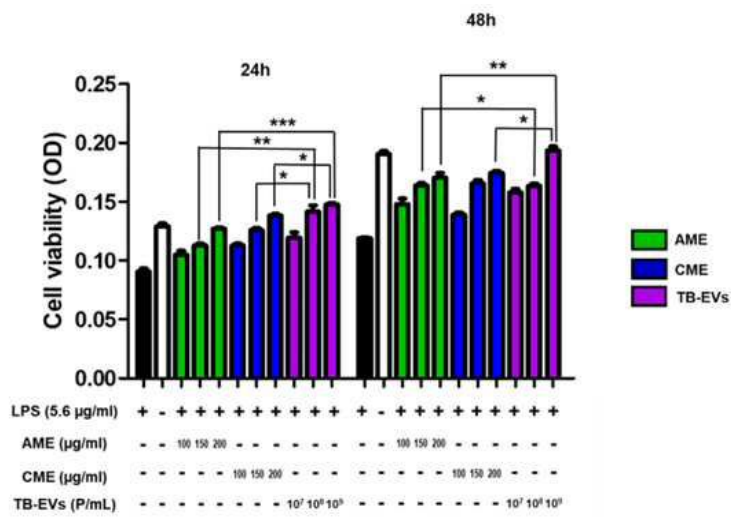
도면9



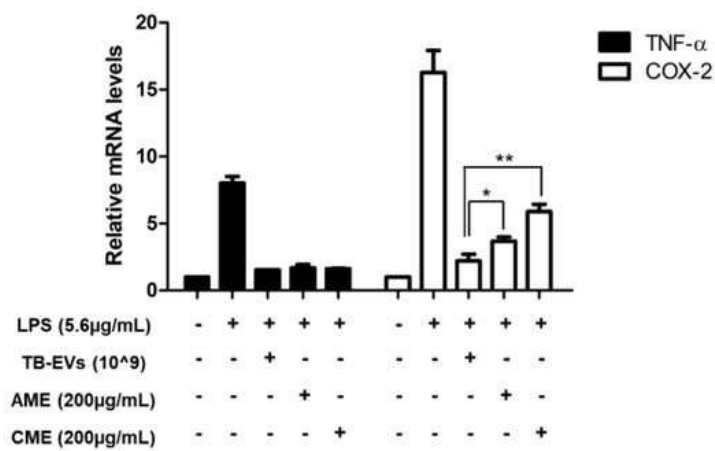
도면10



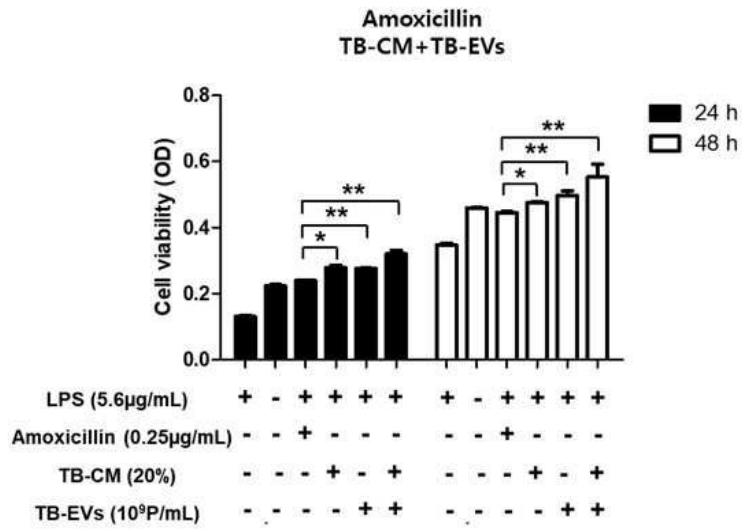
도면11



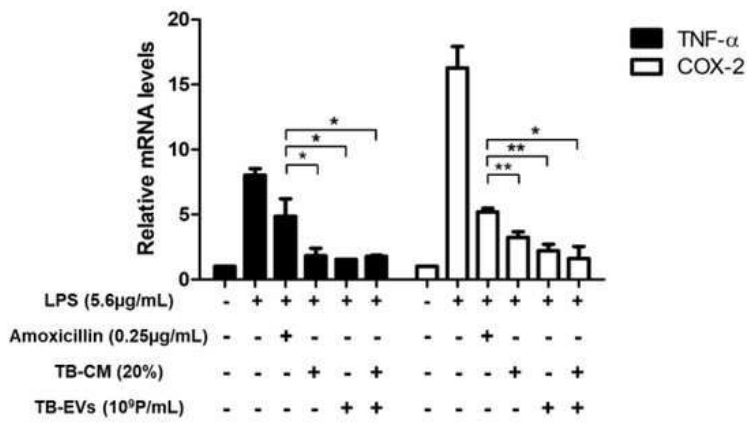
도면12



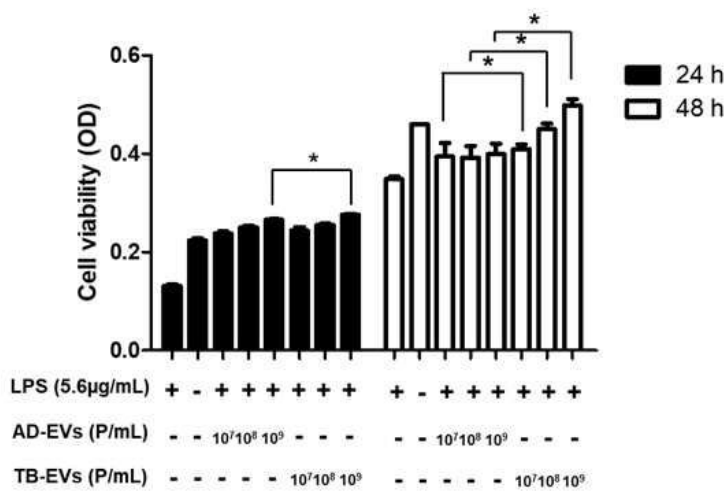
도면13



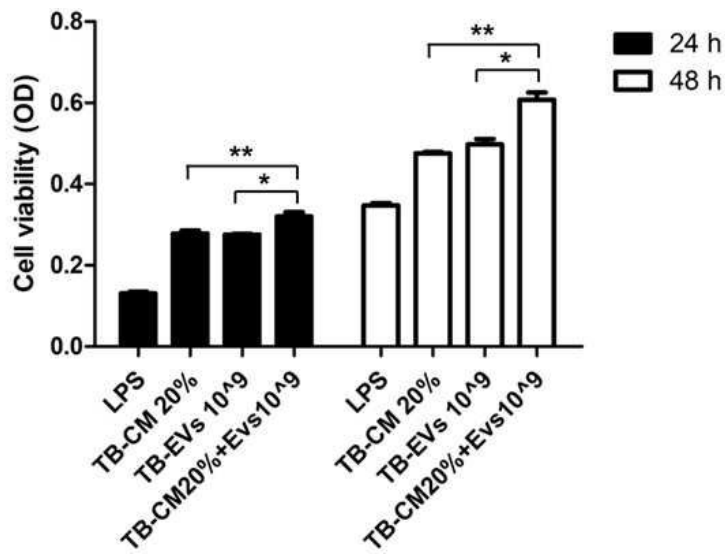
도면14



도면15



도면16



도면17

