



(19) 대한민국특허청(KR)
 (12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년05월24일
 (11) 등록번호 10-1860266
 (24) 등록일자 2018년05월15일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/28 (2015.01) *A61K 35/30* (2015.01)
A61K 35/34 (2015.01) *A61K 35/35* (2014.01)
A61K 35/50 (2015.01) *A61K 35/51* (2015.01)
A61K 38/48 (2006.01) *A61K 9/00* (2006.01)
A61K 9/12 (2006.01) *A61K 9/70* (2006.01)

- (52) CPC특허분류

A61K 35/28 (2013.01)

A61K 35/30 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-0080366

(22) 출원일자 2017년06월26일

심사청구일자 2017년06월26일

(65) 공개번호 10-2018-0003999

(43) 공개일자 2018년01월10일

(30) 우선권주장

1020160083703 2016년07월01일 대한민국(KR)

(56) 선행기술조사문헌

W02015088288 A1*

Stem Cells, 2015, 33, pp. 2158-2168*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

전체 청구항 수 : 총 16 항

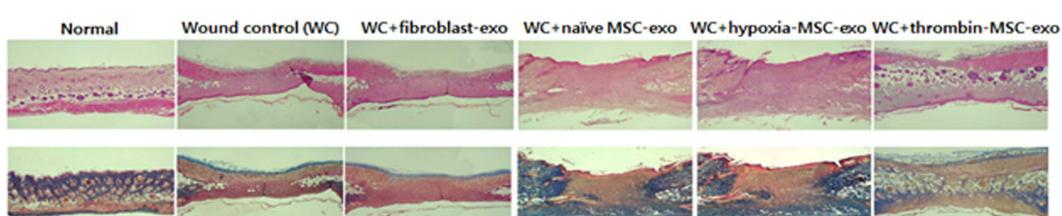
심사관 : 민경난

(54) 발명의 명칭 **트롬빈 처리 줄기세포에서 유래된 엑소좀을 포함하는 피부상처 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은, 트롬빈 처리된 줄기세포에서 유래된 엑소좀(exosome)을 유효성분으로 포함하는, 피부상처의 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 이를 함유하는 약학 제제, 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명의 엑소좀 기반 치료제에 의하면, cell-free 제제이기 때문에 발암의 위험성이 적고 이식거부 반응의 문제가 없을 뿐만 아니라, 전신 투여시 미세혈관에 폐색을 일으킬 우려가 없으며, 세포가 아닌 분리물질로써 off the shelf 제품으로의 약제 개발이 가능하므로 제조단가를 줄일 수 있고, 트롬빈 처리 효과에 의해 낮은 농도의 엑소좀으로도 혈관신생 및 피부상처 치료 효과가 우수하다는 장점이 있다.

대 표 도 - 도7



(52) CPC특허분류

A61K 35/34 (2013.01)*A61K 35/35* (2013.01)*A61K 35/50* (2013.01)*A61K 35/51* (2013.01)*A61K 38/4833* (2013.01)*A61K 9/0019* (2013.01)*A61K 9/12* (2013.01)*A61K 9/70* (2013.01)

(72) 발명자

성동경

서울특별시 노원구 동일로227길 25, 1110동 904호
(상계동, 상계주공11단지아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1465020463

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 첨단의료기술개발

연구과제명 심한 주산기 가사로 인한 신생아 저산소성허혈성 뇌손상 치료를 위한 트롬빈 유도 차세대 줄기세포 치료제의 제형 개발과 생체 유효성 및 투여 방법 검증

기여율 1/2

주관기관 삼성서울병원

연구기간 2016.04.01 ~ 2016.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711039908

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 개인연구지원

연구과제명 조직 재생 인자 함유 줄기세포 유래 엑소좀 다량 생산 및 치료 기전 연구

기여율 1/2

주관기관 삼성서울병원

연구기간 2016.06.01 ~ 2017.05.31

안소윤

서울특별시 강남구 자곡로 36, 107동 305호(세곡동, 강남효성해링턴코트)

명세서

청구범위

청구항 1

피부상처의 예방 또는 치료용 약학적 조성물로서,

상기 조성물은 트롬빈 처리된 줄기세포에서 유래된 엑소좀(exosome)을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 줄기세포는 중간엽 줄기세포, 인간 조직 유래 중간엽 기질세포(mesenchymal stromal cell), 인간 조직 유래 중간엽 줄기세포 및 다분화능 줄기세포로 구성된 군에서 선택되는 줄기세포인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 중간엽 줄기세포는 제대, 제대혈, 골수, 지방, 근육, 신경, 피부, 양막 또는 태반에서 유래된 것임을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 피부상처의 치료는 혈관내피세포 성장촉진으로 인한 혈관신생(angiogenesis)에 의한 것임을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 약학적 조성물은 배양배지, 사이토카인, 성장인자 및 유전자로 이루어진 군에서 선택되는 보조성분을 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 엑소좀은 성장인자, 면역조절인자, 항산화인자 또는 혈관신생인자의 발현이 증가되어 있는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 상기 성장인자는 BDNF(brain-derived neurotropic factor), FGF(fibroblast growth factor), HGF(hepatocyte growth factor), NGF(nerve growth factor), 또는 VEGF(vascular endothelial growth factor)인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 8

제 1 항의 조성물을 함유하는, 피부상처의 예방 또는 치료용 약학 제제.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 제제는 주사제형, 주입제형, 분무제형, 액상제형 또는 패취제형인 것을 특징으로 하는, 약학 제제.

청구항 10

트롬빈 처리된 줄기세포에서 유래된 엑소좀(exosome)을 유효성분으로 포함하는, 피부상처 개선용 의약외품 제제.

청구항 11

제 10 항에 있어서, 상기 피부상처의 개선은 혈관신생(angiogenesis)에 의한 것임을 특징으로 하는, 의약외품 제제.

청구항 12

제 10 항에 있어서, 상기 엑소좀은 성장인자, 면역조절인자, 항산화인자 또는 혈관신생인자의 발현이 증가되어 있는 것을 특징으로 하는, 의약외품 제제.

청구항 13

제 10 항에 있어서, 상기 의약외품 제제는 액제, 연고제, 크림제, 스프레이제, 패취제, 젤제 및 에어로졸제로 이루어지는 군으로부터 선택되는 피부 외용제 형태인 것을 특징으로 하는, 의약외품 제제.

청구항 14

하기의 단계를 포함하는, 제 1 항의 약학적 조성물의 제조방법:

- (a) 줄기세포 배양 후 트롬빈을 처리하는 단계;
- (b) 상기 단계 (a)의 배양액에서 엑소좀을 분리하는 단계; 및
- (c) 상기 단계 (b)에서 분리한 엑소좀을 유효성분으로 함유하는 조성물을 제조하는 단계.

청구항 15

제 14 항에 있어서, 상기 단계 (a)의 트롬빈은 배지내에 1-1000 unit/ml 농도로 포함되는 것을 특징으로 하는, 제조방법.

청구항 16

제 14 항에 있어서, 상기 단계 (b)의 엑소좀은 원심분리를 3,000-100,000g에서 10분 내지 5시간 행함으로써 분리하는 것을 특징으로 하는, 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은, 트롬빈 처리된 줄기세포에서 유래된 엑소좀(exosome)을 유효성분으로 포함하는, 피부상처(Skin Wound)의 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 이를 함유하는 약학 제제, 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 피부는 신체를 보호하는 방어막 역할로서 질환에 대한 신체의 1차 방어선이며, 표피(epidermis)가 미생물 침입에 대한 장벽을 제공한다. 따라서 상처, 화상, 찰과상 및 피부에 대한 기타 손상의 치료에서 일차적인 목적은 감염을 예방하기 위한 신속한 봉합(closure) 및 상처 치유이다.

[0003] 이때, 상처 치유는 일반적으로, 염증(inflammation), 증식(proliferation) 및 재형성(remodelling)의 3가지 단계를 수반하는 복잡한 과정이다. 첫 번째 단계는 지혈(haemostasis)을 달성하기 위한 응고(clotting), 그리고 세균 및 괴사 조직을 파괴하기 위한 호중구의 보충, 그 이후에 대식세포의 보충을 수반한다. 두 번째 단계 동안, 혈관신생(angiogenesis)이 발생하고, 이때 내피세포가 상처 부위로 이동하고, 이와 동시에 섬유아세포가 상처 부위로 이동하여 육아 조직(granulation tissue)을 생산하는데 도움을 준다. 육아 조직의 형성은 재상피화(reepithelialisation)가 일어날 수 있도록 한다. 최종 단계 동안, 콜라겐 생산과 파괴의 수준이 균등해지고, 치유된 상처는 최대 강도를 달성하기 위하여 천천히 변경된다. 상처 치유는 상기 과정 중에서 한가지라도 시기 적절하게 제대로 기능하지 않을 때, 지연되거나 손상되므로 만성적인 상태까지 달할 수 있다.

[0004] 만성 상처(chronic wound)는 8주 이상의 치료가 요구되는 피부가 열린 상처(open wound)로 정의되며, 손상된 치유 과정은 종종 당뇨병 합병증과 연관될 수 있는데 높은 사지 절단율과 심지어 사망 등의 심각한 결과에 이를 수 있다. 대략, 15%의 당뇨병 환자들이 치유되지 않는 만성 상처로 고통받고 있다. 따라서, 상처는 개인뿐만 아니라 사회적으로도 중요한 이슘이며, 초기에 조속히 치료해야 2차 감염의 위험을 줄일 수 있다.

- [0005] 효과적인 상처 치료는 세포외 매트릭스(extra-cellular matrix, ECM) 증착, 세포 증식/이동을 포함하는 복잡한 분자생물학적 이벤트를 통한 매우 조직화된 통합 조정을 필요로 한다. 만성 상처의 발생과 관련된 주요 인자 중 하나는 로컬 섬유아세포(local fibroblasts) 및 염증 세포(inflammatory cells)에 의해 분비되는 사이토카인 분비 계통의 손상이며, 이는 혈관형성(angiogenesis)의 감소를 유발시킨다.
- [0006] 한편, 줄기세포는 그 다분화능과 함께, 조직의 재생, 치료 및 면역 반응에 관여하는 세포로 알려져 있어, 이와 같은 특성을 이용하여 제대혈, 골수 등로부터 중간엽 줄기세포를 분리배양하여 다양한 질환, 증상에 대한 치료제로 개발하고자 하는 노력이 있어왔다.
- [0007] 그러나, 이러한 줄기세포 자체를 이용한 치료법은 다음과 같은 한계와 부작용의 문제가 있어 왔다.
- [0008] 첫째, 기본적으로 세포 치료제는 DNA transfer로 인한 발암(tumorigenicity) 가능성을 배제할 수 없고, 둘째, 줄기세포 자체의 큰 사이즈로 인하여 혈관 폐색(vascular obstruction)이나 심근경색을 유발할 수 있으며, 세째, 제대혈과 같은 동종세포를 사용하여 이식시(동종이식) 세포 표면항원(surface antigen)으로 인한 거부반응의 문제가 있으며, 네째, 일반적으로 세포 치료제는 제조공정이 까다롭고 보관운송에 제약이 많아 생산비용이 높다는 한계가 있다.
- [0009] 이와 같이, 줄기세포가 갖고 있는 원천적 한계로 인하여, 부작용을 줄이면서도 치료효과를 증진시키기 위한 방안들로서 유전자 조작을 이용한 효능개선 방법이 개발된 바 있으나, 현재까지 뚜렷한 대안은 없는 실정이다.
- [0010] 엑소좀은 다양한 세포들로부터 분비되는 막 구조의 작은 소낭(대략 30~100 nm의 직경)으로서, 전자현미경을 통한 연구에서 원형질막으로부터 직접 떨어져 나가는 것이 아니라 다낭체(multivesicular bodies, MVBs)라고 불리는 세포 내 특정 구획에서 기원하며 세포 밖으로 방출, 분비되는 것이 관찰되었다. 즉, 다낭체와 원형질막의 융합이 일어나면 소낭들은 세포 밖 환경으로 방출되는데, 이것을 엑소좀이라고 한다. 이러한 엑소좀이 어떤 분자적 기작에 의해 만들어지는지 확실히 밝혀진 바가 없으나, 적혈구 세포뿐만 아니라, B-림프구, T-림프구, 수지상 세포, 혈소판, 대식 세포 등을 포함한 다양한 종류의 면역 세포들과 종양 세포, 줄기세포 등도 살아 있는 상태에서 엑소좀을 생산하여 분비한다고 알려졌다.
- [0011] 특히, 줄기세포에서 유래된 엑소좀은 수용체 및 단백질뿐 아니라 핵 성분을 함유하고 있어 세포 간 커뮤니케이션 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 또한 상기 줄기세포에서 유래된 엑소좀은 줄기세포에 비해 동물 혈청을 상대적으로 적게 함유하고 있어 동물 혈청 감염에 의한 증상(zoonosis)의 위험성 역시 배제할 수 있다. 이러한 엑소周恩의 특성을 고려할 때 엑소좀을 이용한 세포치료법은 기존의 줄기세포 치료법의 한계를 극복할 수 있는 새로운 패러다임이 될 것으로 기대된다.
- [0012] 이와 관련하여, 한국공개특허 제2012-0133709호에는 피부세포로부터 획득한 엑소좀의 피부 재생 효과가 개시되어 있으나, 트롬빈 처리된 줄기세포 유래의 엑소좀이 기존보다 피부 상처 치료에 우수하다는 것은 전혀 알려진 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0013] 이에, 본 발명자들은 피부상처와 관련하여, 줄기세포 치료제가 갖는 제약을 극복하면서도 치료 효능을 개선시키기 위해 예의 연구한 결과, 줄기세포 유래의 엑소좀, 특히 트롬빈으로 처리한 줄기세포에서 유래된 엑소좀이 혈관신생 및 피부상처 치유효과가 현저하게 증가한다는 사실을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0014] 따라서, 본 발명의 목적은, 트롬빈으로 처리한 줄기세포에서 유래된 엑소좀을 포함하는, 피부상처의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0015] 그러나, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0016] 본 발명은, 트롬빈 처리된 줄기세포에서 유래된 엑소좀(exosome)을 유효성분으로 포함하는, 피부상처의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0017] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 줄기세포는 중간엽 줄기세포, 인간 조직 유래 중간엽 기질세포

(mesenchymal stromal cell), 인간 조직 유래 중간엽 줄기세포 및 다분화능 줄기세포로 구성된 군에서 선택되는 줄기세포인 것을 특징으로 한다.

- [0018] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 중간엽 줄기세포는 제대, 제대혈, 골수, 지방, 근육, 신경, 피부, 양막 또는 태반에서 유래된 것임을 특징으로 한다.
- [0019] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 피부상처의 치료는 혈관내피세포 성장촉진으로 인한 혈관신생(angiogenesis)에 의한 것임을 특징으로 한다.
- [0020] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 피부상처는 표피, 진피 또는 피하조직의 결손에 의한 것임을 특징으로 한다.
- [0021] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 약학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여되는 것을 특징으로 한다.
- [0022] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 약학적 조성물은 배양배지, 사이토카인, 성장인자 및 유전자로 이루어진 군에서 선택되는 보조성분을 더 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0023] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 엑소좀은 성장인자, 면역조절인자, 항산화인자 또는 혈관신생인자의 발현이 증가되어 있는 것을 특징으로 한다.
- [0024] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 성장인자는 BDNF(brain-derived neurotropic factor), FGF(fibroblast growth factor), HGF(hepatocyte growth factor), NGF(nerve growth factor), 또는 VEGF(vascular endothelial growth factor)인 것을 특징으로 한다.
- [0025] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 함유하는, 피부상처의 예방 또는 치료용 약학 제제를 제공한다.
- [0026] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 제제는 주사제형, 주입제형, 분무제형, 액상제형 또는 패취제형인 것을 특징으로 한다.
- [0027] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 제제는 약학적으로 허용가능한 담체를 더 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0028] 또한, 본 발명은 트롬빈 처리된 줄기세포에서 유래된 엑소좀(exosome)을 유효성분으로 포함하는, 피부상처 개선 용 의약외품 제제를 제공한다.
- [0029] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 피부상처의 개선은 혈관신생(angiogenesis)에 의한 것임을 특징으로 한다.
- [0030] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 엑소좀은 성장인자, 면역조절인자, 항산화인자 또는 혈관신생인자의 발현이 증가되어 있는 것을 특징으로 한다.
- [0031] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 의약외품 제제는 액제, 연고제, 크림제, 스프레이제, 패취제, 젤제 및 에어로졸제로 이루어지는 군으로부터 선택되는 피부 외용제 형태인 것을 특징으로 한다.
- [0032] 또한, 본 발명은 (a) 줄기세포 배양 후 트롬빈을 처리하는 단계; (b) 상기 단계 (a)의 배양액에서 엑소좀을 분리하는 단계; 및 (c) 상기 단계 (b)에서 분리한 엑소좀을 유효성분으로 함유하는 조성물을 제조하는 단계를 포함하는, 상기 약학적 조성물의 제조방법을 제공한다.
- [0033] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 단계 (a)의 트롬빈은 배지 내에 1-1000 unit/ml 농도로 포함되는 것을 특징으로 한다.
- [0034] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 단계 (c)의 엑소좀은 원심분리를 이용하는 것을 특징으로 한다.
- [0035] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 원심분리는 5,000-500,000g에서 10분 내지 5시간 동안 행해지는 것을 특징으로 한다.
- [0036] 또한, 본 발명은 트롬빈 처리된 줄기세포에서 유래된 엑소좀(exosome)을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 피부상처 치료방법을 제공한다.
- [0037] 또한, 본 발명은 피부상처를 예방 또는 치료하는 제제를 제조하는데 사용되는 트롬빈 처리된 줄기세포에서 유래된 엑소좀(exosome)의 용도를 제공한다.

발명의 효과

- [0038] 본 발명의 엑소좀 기반 치료제에 의하면, cell-free 제제이기 때문에 DNA가 포함되지 않아 발암의 위험성이 적

고 세포 표면항원이 없어 이식거부 반응의 문제가 없다.

[0039] 또한, 세포보다 size가 매우 작기 때문에 전신 투여시 미세혈관에 폐색을 일으킬 우려가 없으며, 세포가 아닌 분리물질로써 off the shelf 제품으로의 약제 개발이 가능하므로 제조단기를 줄일 수 있다.

[0040] 또한, 비처리 줄기세포에 비하여 트롬빈으로 처리한 줄기세포에서 유래된 엑소좀이 적은 양으로도 피부상처 치료 효과가 우수하므로, 치료적 용량의 엑소좀을 생성하기 위한 줄기세포의 요구량을 현저히 감소시켜 치료제 생산 비용을 현저하게 낮출 수 있는 장점이 있다.

[0041] 따라서, 본 발명에 의하면 종래 줄기세포 치료제가 갖는 문제를 해결하면서도 치료 효능을 현저히 개선할 수 있는 바, 피부상처의 치료에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0042] 도 1은, 줄기세포에 트롬빈 처리시 엑소좀의 분비가 활성화되는 과정을 TEM 이미지 분석을 통해 확인한 결과이다.

도 2는, 트롬빈 처리된 줄기세포 유래의 엑소좀에서 엑소좀 마커인 CD63 및 CD9가 정상적으로 발현되는지를 확인한 웨스턴 블랏 결과이다.

도 3은, 트롬빈 처리에 의해 엑소좀 내 성장인자(BDNF, FGF, HGF, NGF, VEGF), 항염증 사이토카인(IL-6) 등의 발현이 증가됨을 보여주는 면역분석 결과이다.

도 4a는, 트롬빈 처리 줄기세포 유래의 엑소좀이 농도 의존적으로 혈관신생효과를 발휘함을 보여주는 관 형성 어세이(tube formation assay) 결과이고, 도 4b는 이를 정량화한 그래프이다.

도 5a는, 엑소좀이 유래되는 세포의 종류에 따라 혈관신생효과에 차이가 남을 보여주는 관 형성 어세이(tube formation assay) 결과이고, 도 5b는 이를 정량화한 그래프이다.

도 6a는, *in vivo* 피부상처 동물모델에서 트롬빈 처리 줄기세포 유래의 엑소좀에 대한 피부상처 치유효과를 보여주는 결과이고, 도 6b는 이를 정량화한 그래프이다.

도 7은 *in vivo* 피부상처 동물모델에서 fibroblast 유래의 엑소좀(fibroblast exosome), 트롬빈 미처리 줄기세포 유래의 엑소좀(naive MSC exosome), 트롬빈 처리 줄기세포 유래의 엑소좀(thrombin MSC exosome) 및 hypoxia 전처리 줄기세포 유래의 엑소좀(hypoxia MSC exosome)의 피부상처 치유효과를 비교한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0043] 본 발명은, 트롬빈 처리된 줄기세포에서 유래된 엑소좀(exosome)을 유효성분으로 포함하는, 피부상처의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0044] 본 발명에서 '줄기세포'란 미분화된 세포로서 자기 복제 능력을 가지면서 두 개 이상의 서로 다른 종류의 세포로 분화하는 능력을 갖는 세포를 말한다. 본 발명의 줄기세포는 자가 또는 동종 유래 줄기세포일 수 있으며, 인간 및 비인간 포유류를 포함한 임의 유형의 동물 유래일 수 있고, 상기 줄기세포가 성체로부터 유래된 것이든 배아로부터 유래된 것이든 이에 한정되지 않는다.

[0045] 본 발명의 줄기세포는 배아 줄기세포 또는 성체 줄기세포를 포함하며, 바람직하게는 성체 줄기세포이다. 상기 성체 줄기세포는 중간엽 줄기세포, 인간 조직 유래 중간엽 기질세포(mesenchymal stromal cell), 인간 조직 유래 중간엽 줄기세포 또는 다분화능 줄기세포일 수 있으며, 바람직하게는 중간엽 줄기세포이나, 이에 한정되지 않는다. 상기 중간엽 줄기세포는 제대, 제대혈, 골수, 지방, 근육, 신경, 피부, 양막 및 태반 등으로부터 유래된 중간엽 줄기세포일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0046] 본 발명에서 '제대혈'은 태반과 태아를 연결하는 제대정맥으로부터 채취된 혈액을 의미한다. 제대혈은 출산 시 자연적으로 발생하는 부산물로서, 여러 차례의 수술을 필요로 하는 골수 등의 일반 간엽조직보다 훨씬 채취가 용이하고, 골수 이식에 비해 제대혈 보관성이 활성화되어 이미 인프라가 구축되어 있으므로 공여자를 구하는 것도 용이하다. 이와 더불어, 제대혈 유래 세포는 조직이나 장기 이식에서 거부반응을 일으키는 가장 중요한 원인인 조직적합항원 HLA-DR(class II)이 발현되지 않는 세포이므로, 기존의 이식수술시 문제가 되었던 거부반응 등의 면역반응을 유발하지 않거나 최소화할 수 있어, 자가유래 제대혈은 물론 타가유래 제대혈 또한 사용할 수 있다.

- [0047] 본 발명에서 '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.
- [0048] 본 발명에서, '피부상처'란, 표피, 진피 또는 피하조직의 결손을 포함하는 의미이다.
- [0049] 본 발명에서, '피부상처의 예방 또는 치료'란, 피부상처의 경감, 완화 및 증상의 개선을 포함하며, 피부상처가 생길 가능성을 낮추는 것을 포함하는 의미이다. 본 발명에서는 혈관내피세포(HUVEC)에 본 발명의 '트롬빈(thrombin)' 처리된 줄기세포'를 처리한 결과, 혈관내피세포의 성장이 촉진되어 혈관이 신생됨을 확인하였다.
- [0050] 혈관신생(angiogenesis)은 기존 혈관의 내피세포가 세포외 기질을 분해하고, 이동, 분열 및 분화하여 새로운 모세혈관을 형성하는 현상으로서, 상처치유의 생리적 과정에서 필수적으로 나타나는바, 혈관신생 효과를 확인함으로써 상처치유 효과를 검증할 수 있다. 즉, 혈관신생은 상처받은 피부 조직이 재생되기 위한 필수적인 상처 회복 과정에 반드시 수반되어야 한다. 상처의 초기 단계에는 세포의 파괴와 혈관의 파괴로 인한 염증반응이 일어나게 되고, 이 염증 반응 이후에 혈액성분의 탈혈관 현상, 혈소판의 활성화 및 혈액응고와 함께, 칼리크레인, 트롬빈, 및 플라스민 등과 같은 생물학적 매개물질이 형성되는 일련의 과정을 거치게 된다.
- [0051] 본 발명에서, '트롬빈(thrombin)' 처리된 줄기세포'는 비처리 줄기세포에 비하여 cell viability, oxidative function 등 세포 안정성에는 변화없이 줄기세포의 주된 작용기전인 paracrine property의 증가로 인하여 줄기세포 기능/효능이 강화될 수 있다. 나아가 트롬빈 처리로 인하여, 줄기세포에서 유래된 엑소좀의 치료 효능을 강화시킬 뿐만 아니라, 엑소좀의 분비량을 증가시킬 수 있다.
- [0052] 이때, paracrine으로는 성장인자, 면역조절인자, 항산화인자 또는 재생인자가 증가될 수 있으며, 성장인자는 세포 분열이나 생장, 분화를 촉진하는 단백질성의 생리활성물질을 의미하는 것으로, BDNF(brain-derived neurotropic factor), FGF(fibroblast growth factor), HGF(hepatocyte growth factor), NGF(nerve growth factor), VEGF(vascular endothelial growth factor), IL-6(Interleukin-6) 등을 포함할 수 있다. 특히, 혈관내피세포성장인자(VEGF)는 혈관형성을 조절하는 대표적인 단백질이다. VEGF는 혈관내피세포에 존재하는 VEGF 수용체 1, 2, 또는 3(VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3)과 결합하여 VEGF 수용체(VEGFR)의 타이로신 인산화를 유도하여 혈관내피세포의 활성화를 가져오며, 결국 혈관신생과정에 중요한 영향을 미치게 된다.
- [0053] 본 발명의 약학적 조성물은 개체에 다양한 경로로 특별한 제한없이 투여될 수 있으며, 예를 들면, 경구 또는 비경구 방식으로 투여될 수 있다.
- [0054] 본 발명의 약학적 조성물은 줄기세포 유래 엑소좀과 함께 피부상처의 치료 효과를 갖는 공지의 보조성분을 1종 이상 더 함유할 수 있다. 예를 들면, 피부상처 치료에 효과적인 유전자[예컨대, 항-염증성 사이토카인(anti-inflammatory cytokine) 유전자, 염증성 사이토카인(inflammatory cytokine)에 대한 siRNA 또는 앤티-센스 프라이머(antisense primer)] 또는 이를 포함하는 발현벡터, 자가분비(autocrine) 또는 측분비(paracrine) 효과를 제공하는 사이토카인[예컨대, 인터루킨 (interleukin)-10], 성장인자[예컨대, 케라틴 형성 세포 성장인자(Keratinocyte growth factor)], 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된 보조성분을 하나 이상 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0055] 본 발명의 약학적 조성물의 바람직한 투여량은 개체의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르며, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 상기 조성물의 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있으며, 이에 한정되지는 않는다.
- [0056] 본 발명의 약학적 조성물은 피부상처의 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [0057] 본 발명의 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체를 더 포함할 수 있다. 예를 들어, 주사제의 경우에는 보존제, 무통화제, 가용화제 또는 안정화제 등을, 국소 투여용 제제의 경우에는 기제(base), 부형제, 윤활제 또는 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0058] 본 발명의 조성물은 약학적 분야에서 통상의 방법에 따라 개체의 신체 내 투여에 적합한 단위투여형의 제제로 제형화시켜 투여할 수 있다. 이러한 목적에 적합한 제형으로는 비경구투여 제제로서 주사용 앰플과 같은 주사제, 주입 백과 같은 주입제, 및 에어로졸 제제와 같은 분무제 등이 바람직하다. 상기 주사용 앰플은 사용직전에 주사액과 혼합 조제할 수 있으며, 주사액으로는 생리 식염수, 포도당, 링거액 등을 사용할 수 있다. 또한, 주입 백은 염화폴리비닐 또는 폴리에틸렌 재질의 것을 사용할 수 있다. 본 발명에서 투여는 임의의 적절한

방법으로 개체에게 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다.

[0059] 본 발명의 약학적 조성물의 바람직한 투여량은 개체의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르며, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 상기 조성물의 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있으며, 이에 한정되지는 않는다.

[0060] 또한, 본 발명은 트롬빈 처리된 줄기세포에서 유래된 엑소좀(exosome)을 유효성분으로 포함하는, 피부상처 개선용 의약외품 제제를 제공한다.

[0061] 본 발명에서 의약외품 제제는 액제, 연고제, 크림제, 스프레이제, 패취제, 젤제 및 에어로졸제로 이루어지는 군으로부터 선택되는 피부 외용제 형태일 수 있으며, 구체적으로 소독청결제, 샤워폼, 가그린, 물티슈, 세제비누, 핸드워시, 가습기 충진제, 마스크, 연고제 또는 필터충진제 조성물로 이용될 수 있다.

[0062] 또한, 본 발명은, (a) 줄기세포 배양 후 트롬빈을 처리하는 단계; (b) 상기 단계 (a)의 배양액에서 엑소좀을 분리하는 단계; 및 (c) 상기 단계 (b)에서 분리한 엑소좀을 유효성분으로 함유하는 조성물을 제조하는 단계를 포함하는, 상기 약학적 조성물의 제조방법을 제공한다.

[0063] 본 발명에서 트롬빈 처리 농도는 줄기세포/엑소좀의 효능을 강화시키는 데 적합한 농도이면 족하고 특별한 제한은 없으나, 배지에 1-1000 unit/ml 농도로 포함되는 것이 바람직하다.

[0064] 본 발명에서 엑소좀을 분리하는 방법에는 제한이 없으며, 예를 들면 배양액에서, 원심분리, 초고속 원심분리, 필터에 의한 여과, 젤 여과 크로마토그래피, 프리-플로우 전기영동, 모세관 전기영동, 폴리머를 이용한 분리 등의 방법 및 이들의 조합을 이용하여 분리할 수 있으며, 바람직하게는 원심분리/초원심분리이다. 이때, 원심분리/초원심분리는, 4°C, 3,000-100,000g에서 10분 내지 5시간 동안 행하는 것이 바람직하다.

[0065] 본 발명에서 세포 배양에 이용되는 배지는, 당, 아미노산, 각종 영양물질, 혈청, 성장인자, 무기질 등의 세포의 성장 및 증식 등에 필수적인 요소를 포함하는 생체 외(*in vitro*)에서 줄기세포 등의 세포의 성장 및 증식을 위한 혼합물을 의미한다. 본 발명에서 이용될 수 있는 배지는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium), MEM(Minimal Essential Medium), BME(Basal Medium Eagle), RPMI1640, DMEM/F-10 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium: Nutrient Mixture F-10), DMEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium: Nutrient Mixture F-12), α-MEM(α-Minimal essential Medium), G-MEM(Glasgow's Minimal Essential Medium), IMDM(Isocove's Modified Dulbecco's Medium) 및 KnockOut DMEM 등의 상업적으로 제조된 배지 또는 인위적으로 합성한 배지를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0066] 또한, 본 발명은 트롬빈 처리된 줄기세포에서 유래된 엑소좀(exosome)을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 피부상처 치료방법을 제공한다.

[0067] 본 발명에서 "개체"란 질병의 치료를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐 (mouse), 쥐 (rat), 개, 고양이, 말 및 소 등의 포유류를 의미한다.

[0069] 이하, 본 발명의 이해를 돋기 위하여 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[실시예]

실시예 1. 줄기세포에 트롬빈 처리에 의한 엑소좀 분비 및 효능증강 유도

1-1. 트롬빈에 의한 엑소좀 분비 유도

[0074] 인간 제대혈 유래 중간엽 줄기세포(3×10^5 개)를 100 mm 배양접시(orange scientific cat# 4450200)에 분주 후 1 주일간 배양하였다. 배양접시에 세포가 포화 증식된 것을 확인한 후, 50 unit/ml 트롬빈(REYON Pharmaceutical Co., LTD)이 희석되어 있는 혈청프리-배양배지(MEM alpha media)로 교체하고, 다시 6시간 동안 배양하였다.

[0075] 이때, 트롬빈 처리에 의해 중간엽 줄기세포에서 엑소좀의 분비가 활성화되는지 확인하기 위하여 엑소좀의 분비 과정을 TEM(Transmission Electronic Microscopy) 이미지를 통해 확인하였다. 그 결과, 도 1에 나타낸 바와 같이, 트롬빈에 의한 자극이 엑소좀의 분비를 유도함을 알 수 있었다.

[0076] 이후, 상기 배양액을 원심분리튜브에 나누어 담아 4°C, 6,000 rpm에서 30분간 원심분리하였으며, 상층액을 새튜브에 옮겨 세포 잔여물(debris)을 제거하였다. 다시, 상기 상층액을 4°C, 100,000 rpm에서 2-4시간 동안 초원

심분리한 후, 상층액을 더욱 제거하여 엑소좀을 수득하였다(최종 농도: 15 $\mu\text{g/ml}$).

[0077] 이때, 수득한 산물이 엑소좀이 맞는지 확인하기 위하여, 공지의 엑소좀 마커인 CD63 및 CD9(System Bioscience, Mountain View, CA, USA)의 발현을 웨스턴 블랏을 통하여 검증하였다. 그 결과, 도 2에 나타낸 바와 같이, 트롬빈 처리된 줄기세포에서 수득한 엑소좀은 정상적으로 CD63 및 CD9를 발현하고 있었는바, 엑소좀임을 권유하였다.

1-2. 트롬빈에 의한 엑소좀 효능 증강

[0080] 상기 실시예 1-1에서 수득한 엑소좀이 트롬빈 처리에 의하여 성장인자나 IL-6와 같은 항염증 사이토카인 등의 발현이 증가되었는지 확인하였다.

[0081] 구체적으로는, 용해 완충액(lysis buffer)을 이용하여 상기 엑소좀 막을 용해한 후, 엑소좀 내의 단백질을 분리하여 엑소좀 내 BDNF, FGF, HGF, NGF, VEGF, IL-6의 양을 Procarta immunoassay kit(affymatrix, 미국)로 측정하였다.

[0082] 그 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이, 트롬빈 처리에 의해 엑소좀 내 BDNF(brain-derived neurotropic factor), FGF(fibroblast growth factor), HGF(hepatocyte growth factor), NGF(nerve growth factor), VEGF(vascular endothelial growth factor), IL-6(Interleukin-6)의 발현이, 트롬빈 비처리 줄기세포에서 수득한 엑소좀(대조군, normal)에 비하여 증가되었음을 확인하였다.

[0083] 이러한 결과는 트롬빈 처리에 의해 줄기세포 유래 엑소좀의 세포재생, 혈관재생, 항염증 효능이 증강됨을 의미하는 것이다.

실시예 2. *in vitro* 혈관신생 효과: 관 형성 어세이(tube formation assay)

2-1. 엑소좀 농도에 따른 효과

[0085] 본 발명의 '트롬빈 처리 줄기세포 유래의 엑소좀'이 혈관내피세포의 분화를 유도하여 관 형성(혈관신생)에 영향을 미칠 수 있는지 확인하기 위해 성장 인자 감소 마트리겔(Growth factor-reduced Matrigel, 10mg/ml)을 이용한 관 형성 어세이를 수행하였다.

[0086] 구체적으로, 인간 제대 정맥 내피세포(human umbilical vein endothelial cells; HUVECs)를 Low Serum Growth Supplement (LSGS) 포함된 Medium 200PRF 배지에서 12시간 동안 배양한 후 트립신을 처리하여 모으고 5% 우태아 혈청이 함유된 M199 배지에 재현탁하였다. 성장 인자 감소 마트리겔을 24 세포 배양 웰에 250 μl 씩 각각 분주하고 37°C CO₂ 배양기에서 중합화하였다. HUVEC 세포는 중합화된 마트리겔이 있는 웰에 웰당 4×10^4 cells의 농도로 넣고, 실시예 1에서 얻은 '트롬빈 처리 줄기세포 유래의 엑소좀'을 2.5 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도 별로 첨가하였다. 24시간 동안 37°C CO₂ 배양기에서 배양한 후 배양물을 사진으로 찍고($\times 40$), Image J (National Institute of Health) 공개 프로그램을 이용하여 형성된 튜브의 길이를 측정하였다.

[0087] 그 결과, 도 4a 및 4b에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 '트롬빈 처리 줄기세포 유래의 엑소좀'은 대조군(미처리군 NC)에 비하여 농도 의존적으로(dose-dependent) 혈관내피세포의 분화를 유도함으로서 관 형성을 증가시켰다.

2-2. 엑소좀 유래 세포별 평가

[0088] HUVEC 세포에, 트롬빈 미처리 줄기세포 유래의 엑소좀(MSC ECV), 트롬빈 처리 줄기세포 유래의 엑소좀(MSC throm ECV), 트롬빈 미처리 fibroblast 유래의 엑소좀(fibroblast ECV), 트롬빈 처리 fibroblast 유래의 엑소좀(fibroblast throm ECV)을 각각 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리한 것을 제외하고는, 상기 실시예 2-1과 동일한 방법으로 실험을 수행하였다.

[0089] 그 결과, 도 5a 및 5b에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 트롬빈 처리 줄기세포에서 수득한 엑소좀(MSC throm EC V)은, 트롬빈 미처리 줄기세포에서 수득한 엑소좀(MSC ECV)에 비하여 현저히 향상된 혈관생성능력을 보였다. 뿐만 아니라, fibroblast에서 수득한 엑소좀은 트롬빈 처리 유무에 관계없이 혈관생성능력을 전혀 발휘하지 못하였는바, 엑소좀이 유래되는 세포의 종류/능력에 따라 특이적으로 치료적 효능(혈관생성능력)이 결정됨을 알 수 있다.

실시예 3. *in vivo* 피부상처 치료 효과

[0090] 모든 동물실험은 삼성생명과학연구소 실험동물위원회(Research Animal Laboratory Committee of Samsung

Biomedical Research Institute, 대한민국)에 의해 승인을 받았고 기관의 가이드라인을 따랐다.

[0097] 먼저, adult rat의 등부분에 0.8mm biopsy punch로 피부를 편침하여 피부상처 동물모델을 제작한 후, fibroblast 유래의 엑소좀(fibroblast exosome), 트롬빈 미처리 줄기세포 유래의 엑소좀(naive MSC exosome), 트롬빈 처리 줄기세포 유래의 엑소좀(thrombin MSC exosome) 각각을 20ug씩 생리식염수(saline)에 혼합하여 총 10ul의 제제로 제조한 후, 상처 표면에 도포하였다.

[0098] 그 결과, 도 6a 및 6b에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 트롬빈 처리 줄기세포에서 수득한 엑소좀(thrombin MSC exosome)은, 트롬빈 미처리 줄기세포에서 수득한 엑소좀(naive MSC exosome)에 비하여 현저히 향상된 상처 치료 효과를 보였다. 뿐만 아니라, fibroblast에서 수득한 엑소좀은 대조군(saline)과 유사하게 상처 치료 효과를 전혀 발휘하지 못함을 확인할 수 있었다.

[0100] 추가적으로, SD-rat의 등 부위에 제모를 시행한 이후 punch biopsy로 손상을 유도한 후, fibroblast 유래의 엑소좀(fibroblast exosome), 트롬빈 미처리 줄기세포 유래의 엑소좀(naive MSC exosome), 트롬빈 처리 줄기세포 유래의 엑소좀(thrombin MSC exosome) 및 hypoxia 전처리 줄기세포 유래의 엑소좀(hypoxia MSC exosome) 각각을 도포한 후, 피부 회복 상태를 확인하였다.

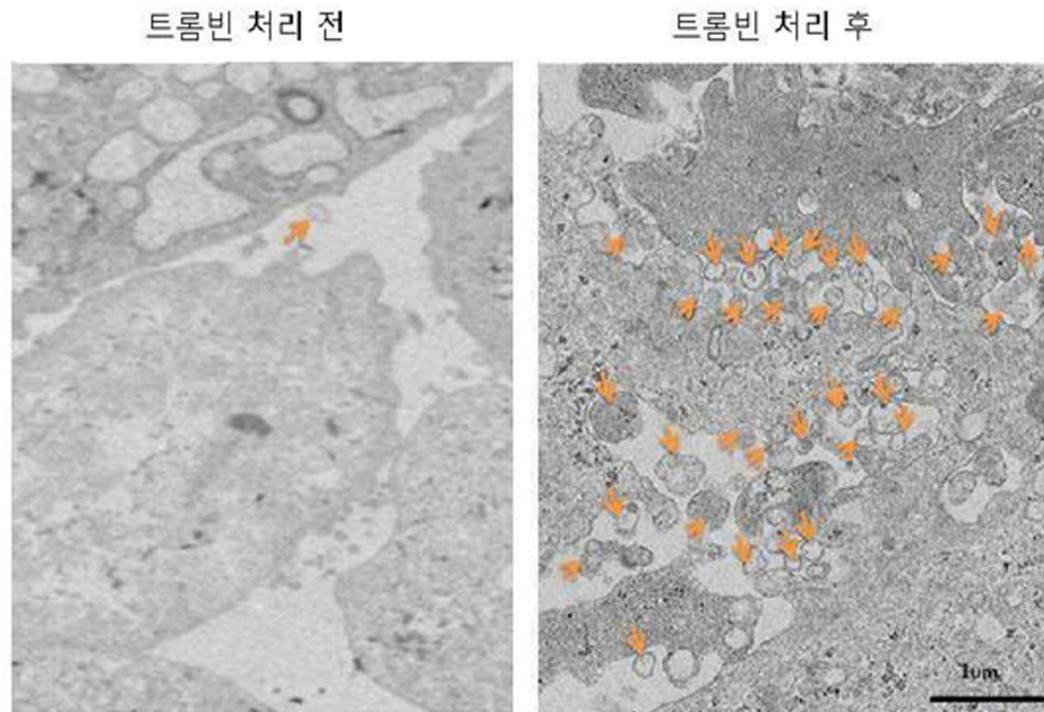
[0101] 그 결과, 도 7에 나타낸 바와 같이, 정상군(Normal)에 비하여 피부를 punch biopsy하여 손상을 준 wound control 군(WC)에서는 정상 피부 조직으로 회복되지 못한 소견을 보였고, 이는 fibroblast 유래의 엑소좀을 투여할 때도 동일한 소견을 나타내었다. 반면, 트롬빈 미처리 줄기세포 유래의 엑소좀(naive MSC exosome)과 hypoxia 전처리 줄기세포 유래의 엑소좀(hypoxia MSC exosome)에서는 다소 호전되는 경향을 나타내었고, 트롬빈 처리 줄기세포 유래의 엑소좀(thrombin MSC exosome)에서는 정상 조직에 가까운 피부 회복 상태를 나타내어 현저히 향상된 상처 치료 효과를 보임을 확인하였다.

[0102] 상기 결과들로부터, 엑소좀이 유래되는 세포의 종류/능력에 따라 특이적으로 치료적 효능이 결정됨을 알 수 있다.

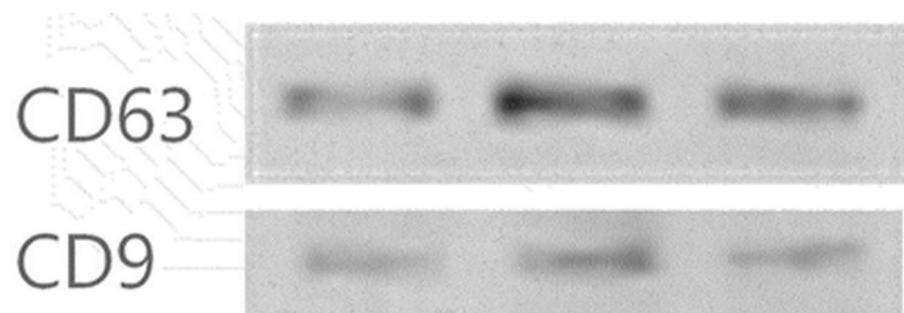
[0104] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해되어야 한다.

도면

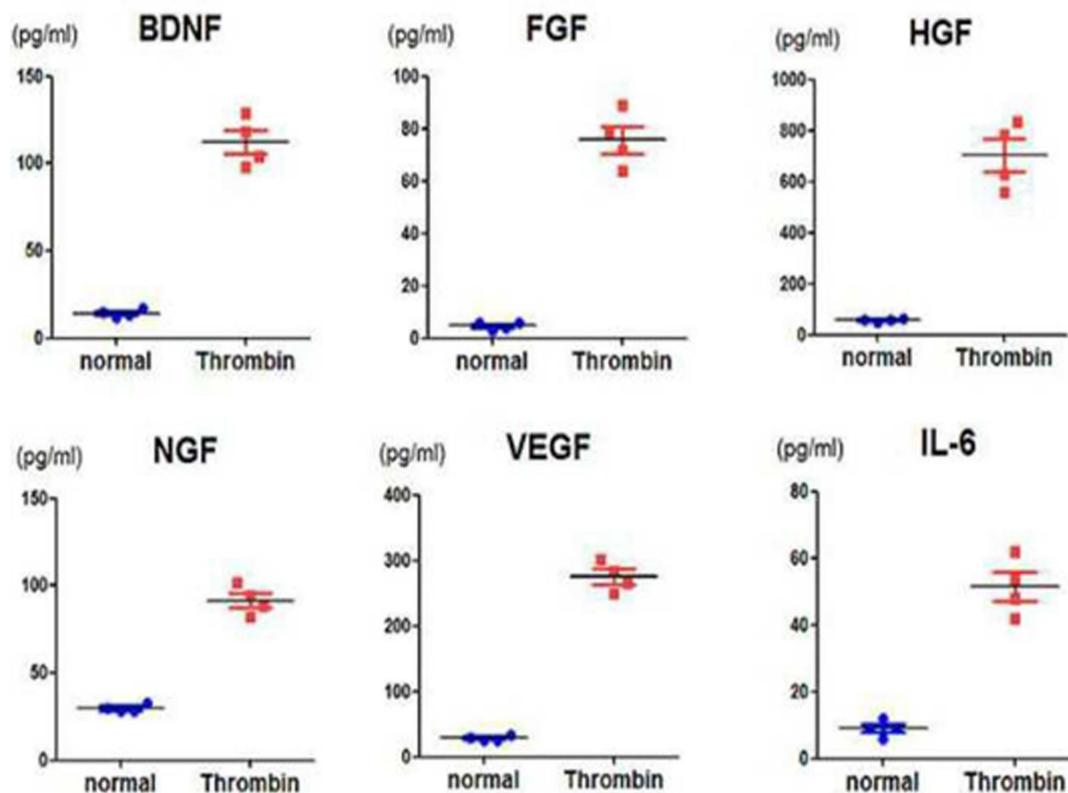
도면1



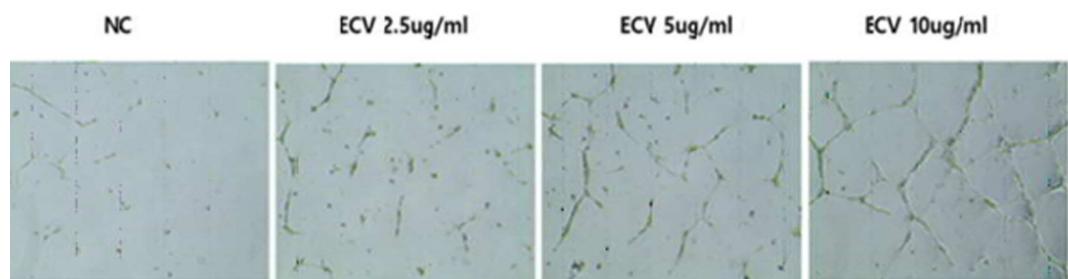
도면2



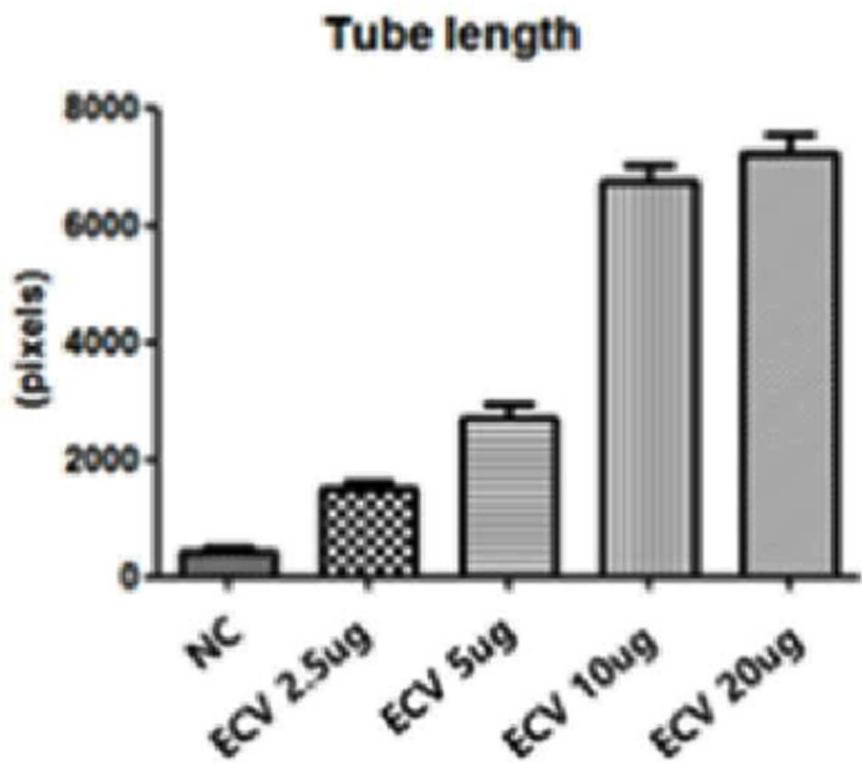
도면3



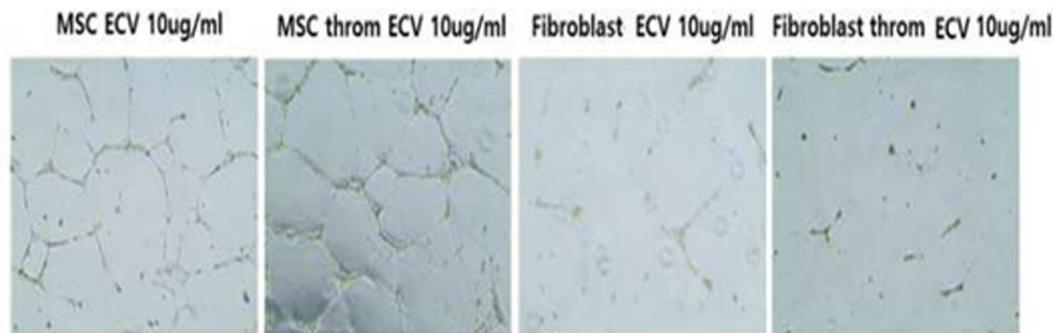
도면4a



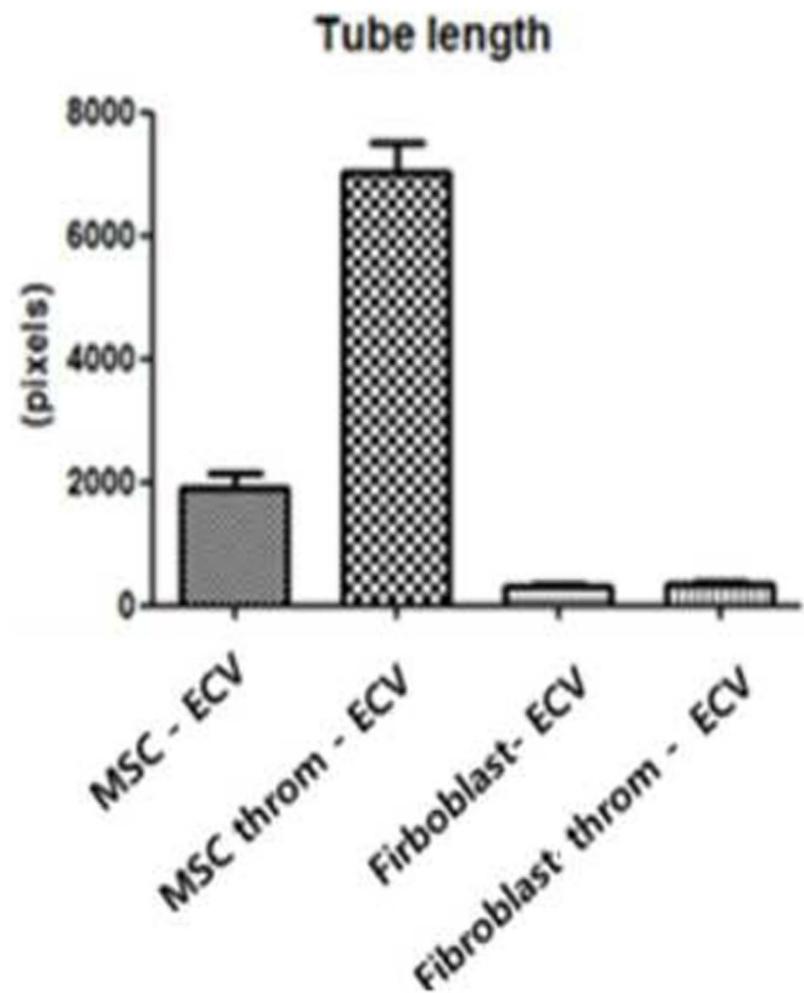
도면4b



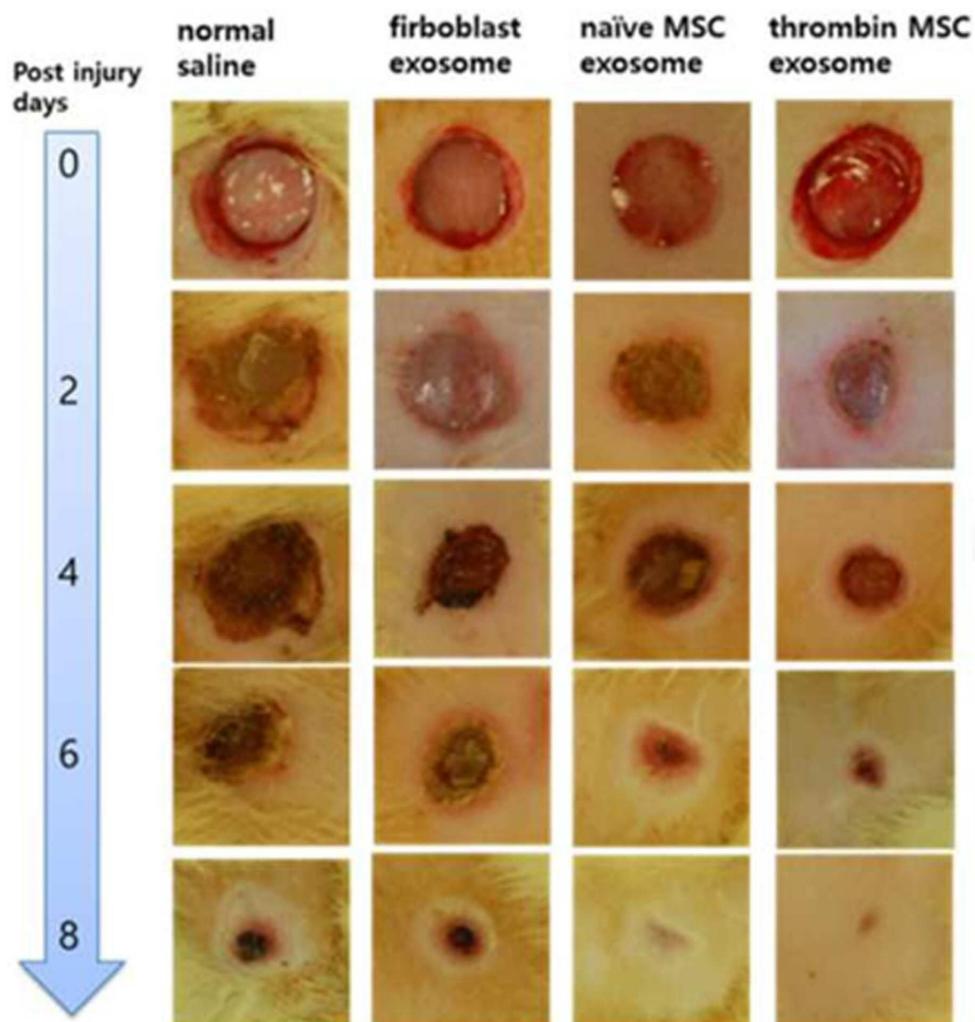
도면5a



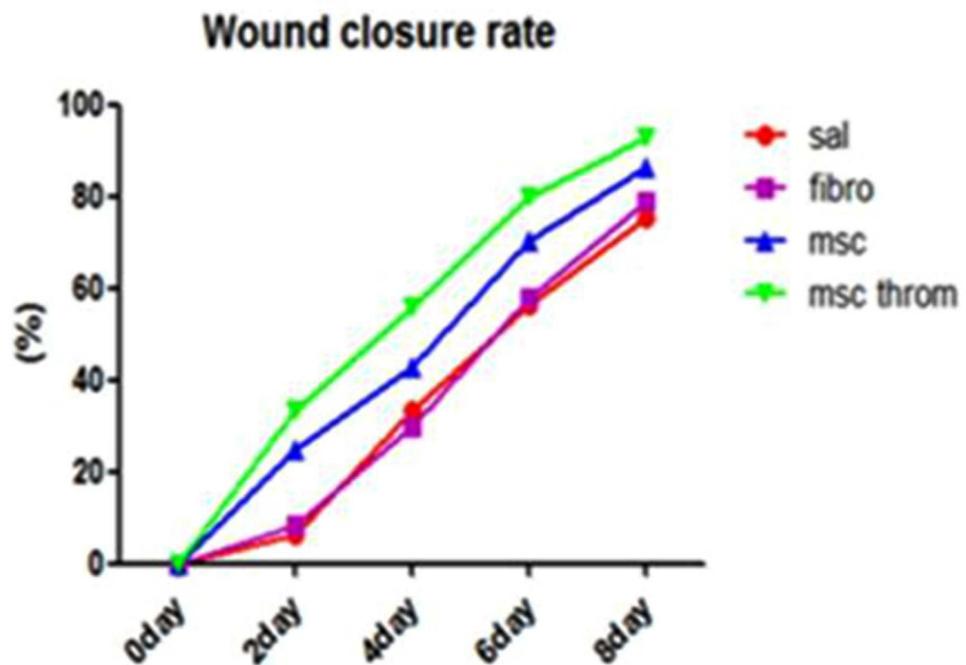
도면5b



도면6a



도면6b



도면7

