

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2022-0151785
(43) 공개일자 2022년11월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/23 (2006.01) *A23L 33/105* (2016.01)*A61K 8/9789* (2017.01) *A61P 25/28* (2006.01)*A61P 9/10* (2006.01) *A61Q 19/00* (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 36/23 (2013.01)*A23L 33/105* (2016.08)

(21) 출원번호 10-2021-0058990

(22) 출원일자 2021년05월07일

심사청구일자 2021년05월07일

(71) 출원인

인천대학교 산학협력단

인천광역시 연수구 아카데미로 119 (송도동)

(72) 발명자

이원중

대전광역시 유성구 엑스포로 448, 102동 202호(전민동, 엑스포아파트)

김도경

인천광역시 연수구

(74) 대리인

특허법인이룸리온

전체 청구항 수 : 총 16 항

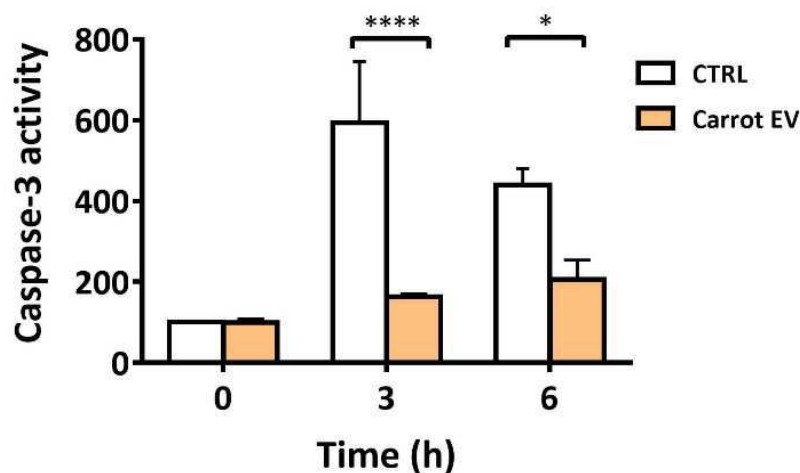
(54) 발명의 명칭 당근 유래 나노베지클을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌 질환, 심근 허혈 또는 재관류 손상의 예방, 개선 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 당근 유래 나노베지클을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 당근 유래 나노베지클은 식용 식물인 당근에서 유래된 천연 화합물로 생체 친화적이며, 혈액 내 용해도 및 안정성이 우수한 이점이 있으며, 신경모세포종 및 심장근원세포에서의 세포자멸사 활성 및 카스파아제-3 활성을 억제하는 효능을 가질 뿐만 아니라 항산화 효과를 가지고 있어 퇴행성 뇌 질환의 치료, 개선 또는 예방에 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도8



(52) CPC특허분류

A61K 8/9789 (2017.08)

A61P 25/28 (2018.01)

A61P 9/10 (2018.01)

A61Q 19/00 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/322 (2013.01)

A23V 2200/326 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

당근에서 유래된 나노베지클(nanovesicle)을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌 질환, 심근 허혈 또는 재관류 손상의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 나노베지클은 평균 직경이 50 내지 200 nm인 것인 퇴행성 뇌 질환, 심근 허혈 또는 재관류 손상의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 나노베지클은 크기 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography)로 분리된 것인 퇴행성 뇌 질환, 심근 허혈 또는 재관류 손상의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 나노베지클은 신경모세포종 및 심장근원세포에서의 세포자멸사(apoptosis) 활성 및 카스파아제-3 활성을 억제하는 것인 퇴행성 뇌 질환, 심근 허혈 또는 재관류 손상의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 퇴행성 뇌 질환은 파킨슨병(Parkinson's disease), 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 헌팅턴병(Huntington disease), 경도인지장애(mild cognitive impairment), 대뇌 아밀로이드 맥관병증, 다운 증후군, 아밀로이드성 뇌졸중(stroke), 전신성 아밀로이드병, 노인성 치매, 근위축성 측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis), 척수소뇌성 운동실조증(spino cerebellar atrophy), 뚜렛 증후군(Tourette's syndrome), 프리드리히 보행실조(Friedrich's ataxia), 루이스체 치매(Lewy Body dementia), 진행성 핵상마비(progressive supranuclear palsy) 및 전두측두엽 치매(frontotemporal dementia)로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것인 퇴행성 뇌 질환, 심근 허혈 또는 재관류 손상의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 약학 조성물은 과립제, 산제, 정제, 피복제, 캡슐제, 액제, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 및 주사 액제로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 제형인 것인 퇴행성 뇌 질환, 심근 허혈 또는 재관류 손상의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 7

당근에서 유래된 나노베지클(nanovesicle)을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌 질환, 심근 허혈 또는 재관류 손상의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 건강기능식품 조성물은 캡슐, 정제, 분말, 과립, 액상, 환, 편상, 페이스트상, 시럽, 겔, 젤리 및 바로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 제형인 것인 퇴행성 뇌 질환, 심근 허혈 또는 재관류 손상의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 9

당근에서 유래된 나노베지클(nanovesicle)을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌 질환, 심근 허혈 또는 재관류 손상의 예방 또는 개선용 화장품 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 화장품 조성물은 현탁액, 유탁액, 페이스트, 겔, 크림, 아토피용 비누, 클렌징 폼, 클렌징 크림, 클렌징 워터, 목욕제, 스킨 소프트너, 스킨 토너, 로션, 크림, 에센스, 아스트린젠트, 유액, 젤, 립스틱, 분무제, 샴푸, 린스, 트리트먼트, 바디클렌저, 팩, 마사지제, 페이스파우더, 콤팩트, 파운데이션, 투웨이케이크 및 메이크업베이스로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 제형인 것인 퇴행성 뇌 질환, 심근 허혈 또는 재관류 손상의 예방 또는 개선용 화장품 조성물.

청구항 11

제1항에 따른 당근에서 유래된 나노베지클(nanovesicle)을 제조하는 방법으로서,

당근 착즙액을 제조하는 단계;

상기 당근 착즙액을 여과하여 여과액을 수득하는 단계; 및

상기 여과액을 추출하여 나노베지클을 회수하는 단계;

를 포함하는 나노베지클의 제조방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 여과액을 수득하는 단계에서 여과는 한외여과(ultrafiltration, UF) 또는 접선유동여과(tangential flow filtration, TFF) 방법에 의해 수행되는 것인 나노베지클의 제조방법.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 한외여과는 5 내지 300 kDa의 컷오프(cut-off) 값을 가지는 것인 나노베지클의 제조방법.

청구항 14

제11항에 있어서,

상기 나노베지클을 회수하는 단계에서 추출은 크기 배제 크로마토그래피 방법에 의해 수행되는 것인 나노베지클의 제조방법.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 크기 배제 크로마토그래피는 pH 7.4의 인산완충액(PBS)으로 평형화된 것인 나노베지클의 제조방법.

청구항 16

제14항에 있어서,

상기 크기 배제 크로마토그래피로부터 얻은 각 분획물에 입도 분석을 수행하여 50 내지 200 nm의 평균 직경을 갖는 분획물을 선택하여 회수하는 것인 나노베지클의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 당근 유래 나노베지클을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌 질환, 심근 허혈 또는 재관류 손상의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 세포밖 소포체(Extracellular vesicle)는 인간, 동물, 식물, 미생물 등 모든 세포에서 특정 매커니즘에 의해 분비된다. 이러한 소포체들은 다양한 크기를 가지는데, 이중 크기가 가장 작은 엑소좀(exosome)은 50 내지 200 nm 범위의 다양한 크기를 갖는 세포막성 수포이다. 세포밖 소포체는 단백질, 지질, 핵산, 화합물 등 모세포로부터 유래한 물질을 포함하고 있으며, 생체 내에서는 이러한 물질들을 세포 또는 조직으로 전달하는 운송체 역할을 가지고 있다.

[0003] 식물에도 이런 세포밖 소포체와 유사한 나노 입자들이 있는데, 이들은 엑소좀 유사 나노베지클(exosome-like nanovesicle) 또는 나노베지클(nanovesicle) 등으로 불리고 있다. 인간 세포 유래 세포밖 소포체는 그 기능이 제한되어 있고, 대량 생산을 하기 위해서는 비용 및 설비가 많이 요구된다. 또한 소태아혈청(Fetal bovine serum, FBS)과 같은 동물 유래 물질을 사용하기 때문에 안전성 이슈를 갖고 있다. 반면 식물 유래 나노베지클의 경우, 안정성 이슈로부터 자유롭기 때문에 생리활성 기능이 규명될 경우 기능성 식품, 의약품, 화장품으로서의 가치가 높다.

[0004] 특히 식용 식물 유래 나노베지클은 천연물질로 세포독성, 면역원성 같은 부작용이 적으며, 체액에서 안정성을 가진다. 또한 최근 연구에서 식물 유래 나노베지클이 혈액 뇌 관문(Blood-Brain barrier)을 통과할 수 있다는 연구가 있으며, 식물 유래 나노베지클을 이용한다면 약물 전달이 어려워 치료의 한계를 가지고 있는 파킨슨병, 알츠하이머병과 같은 뇌 질환의 치료제로 사용될 수 있다.

[0005] 그러나 식용 식물에는 항세포자멸, 항염증, 항산화와 같은 천연 화합물이 존재하는데, 이중 용해도가 낮은 물질들은 유기용매를 이용하여 추출하는데 이러한 추출물을 사용하게 될 경우 유기용매에 의한 부작용 및 혈액 내 용해도의 문제로 세포 전달이 어려운 문제가 있다.

[0006] 기존에는 초고속 원심분리 방법에 의해 식용 식물에 함유된 천연 화합물을 분리 정제하였으나, 순도가 낮고 불순물이 존재하여 원하는 수준의 생물학적 활성 효과를 얻지 못하였다. 또한 불순물을 전혀 포함하지 않으면서

식용 식물에 있는 순수 세포밖 소포체만을 이용하여 퇴행성 뇌 질환, 심근 허혈 또는 재관류 손상을 개선, 예방 및 치료용 조성물로 적용한 사례는 아직 개발이 미흡한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제2011-0082480호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 상기와 같은 문제 해결을 위하여, 본 발명은 당근에서 유래된 나노베지클을 유효 성분으로 포함하는 퇴행성 뇌 질환, 심근 허혈 또는 재관류 손상의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것을 그 목적으로 한다.
- [0009] 또한 본 발명은 퇴행성 뇌 질환, 심근 허혈 또는 재관류 손상의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 것을 그 목적으로 한다.
- [0010] 또한 본 발명은 퇴행성 뇌 질환, 심근 허혈 또는 재관류 손상의 예방 또는 개선용 화장품 조성물을 제공하는 것을 그 목적으로 한다.
- [0011] 또한 본 발명은 나노베지클의 제조방법을 제공하는 것을 그 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0012] 본 발명은 당근에서 유래된 나노베지클(nanovesicle)을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌 질환, 심근 허혈 또는 재관류 손상의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0013] 또한 본 발명은 당근에서 유래된 나노베지클(nanovesicle)을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌 질환, 심근 허혈 또는 재관류 손상의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0014] 또한, 본 발명은 당근에서 유래된 나노베지클(nanovesicle)을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌 질환, 심근 허혈 또는 재관류 손상의 예방 또는 개선용 화장품 조성물을 제공한다.
- [0015] 또한 본 발명은 상기 당근에서 유래된 나노베지클(nanovesicle)을 제조하는 방법으로서, 당근 착즙액을 제조하는 단계; 상기 당근 착즙액을 여과하여 여과액을 수득하는 단계; 및 상기 여과액을 추출하여 나노베지클을 회수하는 단계;를 포함하는 나노베지클의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0016] 본 발명에 따른 당근 유래 나노베지클은 식용 식물인 당근에서 유래된 천연 화합물로 생체 친화적이며, 혈액 내 용해도 및 안정성이 우수한 이점이 있다. 또한 본 발명의 당근 유래 나노베지클은 신경모세포종 및 심장근원세포에서의 세포자멸사 활성 및 카스파아제-3 활성을 억제하는 효능을 가질 뿐만 아니라 항산화 효과를 가지고 있어 퇴행성 뇌 질환, 심근 허혈 또는 재관류 손상의 치료, 개선 또는 예방에 유용하게 이용될 수 있다.
- [0017] 본 발명의 효과는 이상에서 언급한 효과로 한정되지 않는다. 본 발명의 효과는 이하의 설명에서 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 할 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0018] 도 1은 상기 실시예 1에서 제조된 불순물을 제외한 당근 유래 나노베지클이 포함된 당근 착즙액 농축 결과를 나타낸 사진이다.
- 도 2는 크기 배제 크로마토그래피를 이용한 상기 실시예 1에서 제조된 당근 유래 나노베지클의 분리 및 정제 과정과 정제된 33개의 분획물을 나타낸 사진이다.
- 도 3은 본 발명의 실시예 1에서 제조된 당근 유래 나노베지클의 농도 및 크기 분포도를 나타낸 그래프이다.
- 도 4는 본 발명의 실시예 1에서 제조된 당근 유래 나노베지클 첨가에 의한 인간 신경모세포종(SH-SY5Y)에서의

세포독성 평가 그래프이다.

도 5는 본 발명의 실시예 1에서 제조된 당근 유래 나노베지클 첨가에 의한 인간 신경모세포종(SH-SY5Y)에서의 항세포자멸 효과를 비교한 그래프이다.

도 6은 본 발명의 실시예 1에서 제조된 당근 유래 나노베지클 첨가에 의한 심장근원세포(H9C2)에서의 세포독성 평가 그래프이다.

도 7은 본 발명의 실시예 1에서 제조된 당근 유래 나노베지클 첨가에 의한 심장근원세포(H9C2)에서의 항세포자멸 효과를 비교한 그래프이다.

도 8은 본 발명의 실시예 1에서 제조된 당근 유래 나노베지클 첨가에 의한 심장근원세포(H9C2)에서 카스파아제-3의 활성 변화를 평가한 그래프이다.

도 9는 본 발명의 실시예 1에서 제조된 당근 유래 나노베지클 첨가에 의한 심장 근원세포(H₉C₂)에서 Nrf-2, SOD-1의 발현을 평가한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0019] 이하 본 발명을 실시예 및 도면과 함께 상세하게 설명한다.
- [0020] 본 발명은 당근 유래 나노베지클을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌 질환, 심근 허혈 또는 재관류 손상의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.
- [0021] 본 명세서에서 "유효성분으로 포함하는"이란 본 발명의 당근 유래 나노베지클의 퇴행성 뇌 질환, 심근 허혈 또는 재관류 손상의 개선, 치료 또는 예방 효능 또는 활성을 달성하는 데 충분한 양을 포함하는 것을 의미한다.
- [0022] 본 명세서에서 "예방"이란 본 발명에 따른 조성물을 개체에 투여하여 신경모세포종 및 심장근원세포에서의 세포자멸사 활성 및 카스파아제-3 활성을 억제하거나 지연시키거나 완화하는 모든 행위를 의미할 수 있다.
- [0023] 본 명세서에서 "치료"란 본 발명에 따른 조성물을 퇴행성 뇌 질환, 심근 허혈 또는 재관류 손상의 의심 개체에 투여하여 그 증세가 호전되도록 하거나 이롭게 되도록 하는 모든 행위를 의미할 수 있다.
- [0024] 기존에는 당근을 이용하여 초고속 원심분리 방법에 의해 당근 유래 엑소좀 유사 나노파티클을 수득하고 이를 이용하여 대식세포에서의 항염 및 항산화 효과를 연구가 보고 되었다. 그러나 초고속 원심분리 방법에 의해 수득된 당근 유래 엑소좀 유사 나노파티클은 순도가 낮고 불순물이 존재하여 엑소좀 유사 나노파티클 자체가 가진 효능을 검증하는데 한계가 있으며, 그 효과에서도 기대하는 수준의 효과를 제대로 발현하지 못하는 단점이 있었다.
- [0025] 이에 본 발명에서는 초고속 원심분리 방법이 아닌 크기 배제 크로마토그래피(Size Exclusion Chromatography, SEC)를 이용하여 범용성이 매우 높은 식용 식물인 당근으로부터 고순도 및 고품질의 나노베지클을 분리 정제하고, 이렇게 분리한 당근 유래 나노베지클의 항세포자멸 및 항산화 효과를 규명하였다. 즉, 본 발명의 당근 유래 나노베지클은 불순물을 함유한 엑소좀 유사 나노파티클이 아닌 순수 당근 유래 나노베지클만이 가진 효능 확인이 가능하였다.
- [0026] 이러한 본 발명의 당근 유래 나노베지클은 식용 식물인 당근에서 유래된 천연 화합물로 동물 유래 물질에 비해 생체 친화적이며, 혈액 내 용해도 및 안정성이 우수한 이점이 있다. 또한 상기 당근 유래 나노베지클은 파킨슨병 유도제(6-OHDA)와 과산화수소를 유도체로 사용하여 신경모세포종 및 심장근원세포에서의 세포자멸사 활성 및 카스파아제-3 활성을 억제하는 효능을 가질 뿐만 아니라 항산화 효과를 가지고 있어 퇴행성 뇌 질환, 심근 허혈 또는 재관류 손상의 치료, 개선 또는 예방에 유용하게 이용될 수 있다. 또한 항산화 효과를 가짐으로써 노화를 억제할 수 있으며, 나아가 피부 세포의 사멸을 억제하여 상처 치료에도 효과적인 이점이 있다.
- [0027] 구체적으로 본 발명은 당근에서 유래된 나노베지클(nanovesicle)을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌 질환, 심근 허혈 또는 재관류 손상의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0028] 상기 나노베지클은 평균 직경이 50 내지 200 nm, 바람직하게는 50 내지 180 nm, 더욱 바람직하게는 50 내지 150 nm, 가장 바람직하게는 100 내지 150 nm일 수 있다. 상기 나노베지클은 단백질, 지질, 핵산, 화합물 등 모세포로부터 유래한 유효 성분을 포함하고 있으며, 생체 내에서 이러한 물질들을 세포 또는 조직으로 전달하는 운송체 역할을 할 수 있다.

- [0029] 상기 나노베지클은 당근의 조직 또는 세포를 포함하는 당근 착즙액에 대해 크기 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography)로 분리된 것일 수 있다. 상기 크기 배제 크로마토그래피는 기존의 초고속 원심분리법에 비해 분리 및 정제 시 불순물의 함량을 크게 낮추고 고유의 약리학적 및 약물 전달적 활성을 그대로 유지하는 고순도 및 고품질의 당근 유래 나노베지클을 수득할 수 있다. 이때, 상기 당근 착즙액은 당근으로부터 채취, 분리하거나, 또는 이로부터 유래한 관심 성분의 유효량을 함유하고 있는 가공되지 않거나 또는 전처리된 것일 수 있다.
- [0030] 상기 나노베지클은 파킨슨병 유도제(6-OHDA)와 과산화수소를 유도체로 사용하여 파킨슨병, 심근 허혈 또는 재관류 손상을 생체 외(in vitro)에서 구현함으로써 유도된 신경모세포종 및 심장근원세포에서의 세포자멸사(apoptosis) 활성 및 카스파아제-3 활성을 억제할 뿐만 아니라 항산화 효과도 동시에 갖는 이점이 있다.
- [0031] 상기 퇴행성 뇌 질환은 파킨슨병(Parkinson's disease), 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 헌팅턴병(Huntington disease), 경도인지장애(mild cognitive impairment), 대뇌 아밀로이드 맥관병증, 다운 증후군, 아밀로이드성 뇌졸중(stroke), 전신성 아밀로이드증, 노인성 치매, 근위축성 측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis), 척수소뇌성 운동실조증(spino-cerebellar atrophy), 뚜렛 증후군(Tourette's syndrome), 프리드리히 보행실조(Friedrich's ataxia), 루이소체 치매(Lewy Body dementia), 진행성 핵상마비(progressive supranuclear palsy) 및 전두측두엽 치매(frontotemporal dementia)로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [0032] 상기 심근 허혈 또는 재관류 손상은 심혈관 질환으로서, 구체적인 예로는 심근경색 또는 협심증일 수 있다.
- [0033] 본 발명의 약학 조성물은 당근 유래 나노베지클을 포함하는 유효성분이 퇴행성 뇌 질환, 심근 허혈 또는 재관류 손상을 억제하거나, 이를 제거하거나 또는 경감시키는 역할을 한다. 따라서, 본 발명의 약학 조성물은 그 자체로 이들 질환 치료의 조성물이 될 수도 있고, 혹은 다른 약리성분과 함께 투여되어 상기 질환에 대한 치료 보조제로 적용될 수도 있다. 이에, 본 명세서에서 용어 "치료" 또는 "치료제"는 "치료 보조" 또는 "치료 보조제"의 의미를 포함한다.
- [0034] 본 발명의 약학 조성물은 상기 유효 성분 이외에 약학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등을 사용할 수 있다.
- [0035] 상기 약학 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효 성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 약학 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다.
- [0036] 본 발명에서 사용되는 용어 "투여"는 임의의 적절한 방법으로 개체에 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다. 이때, 개체는 본 발명의 조성물을 투여하여 퇴행성 뇌 질환, 심근 허혈 또는 재관류 손상의 증상이 호전될 수 있는 질환을 가진 인간, 원숭이, 개, 염소, 돼지 또는 쥐 등 모든 동물을 의미한다.
- [0037] 상기 약학 조성물의 제제 형태는 과립제, 산제, 정제, 피복제, 캡슐제, 액제, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 및 주사 액제로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 제형일 수 있다. 예를 들어, 정제 또는 캡슐제의 형태로의 제제화를 위해, 유효 성분은 에탄올, 글리세롤, 물 등과 같은 경구, 무독성의 약학적으로 허용 가능한 불활성 담체와 결합될 수 있다. 또한, 원하거나 필요한 경우 적합한 결합제, 윤활제, 붕해제 및 발색제 또한 혼합물로 포함될 수 있다. 적합한 결합제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 젤라틴, 글루코스 또는 베타-락토오스와 같은 천연 당, 옥수수 감미제, 아카시아, 트래커캔스 또는 소듐올레이트와 같은 천연 및 합성 검, 소듐 스테아레이트, 마그네슘 스테아레이트, 소듐 벤조에이트, 소듐 아세테이트, 소듐 클로라이드 등을 포함한다. 붕해제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 메틸 셀룰로스, 아가, 벤토니트, 잔탄 검 등을 포함한다.
- [0038] 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용 가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다.
- [0039] 본 발명의 약학 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구 투여인 경우에는 정맥 내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있으며, 바람직하게는 경구 투여이다.
- [0040] 본 발명의 약학 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식,

투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 소망하는 치료 또는 예방에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 약학 조성물의 1일 투여량은 0.001 내지 10 g/kg, 바람직하게는 10 내지 500 mg/kg, 더욱 바람직하게는 100 내지 300 mg/kg을 1일 1 내지 4회 투여할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0041] 본 발명의 약학 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체 및 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0042] 한편, 본 발명의 나노베지클의 1일 투여량은, 10 내지 1,000 mg/kg일 수 있으며, 바람직하게는 20 내지 600 mg/kg일 수 있고, 더욱 바람직하게는 50 내지 400 mg/kg일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 100 내지 300 mg/kg일 수 있고, 가장 바람직하게는 200 내지 300 mg/kg일 수 있다. 본 발명의 나노베지클의 투여량의 상기 하한치 미만인 경우에는 세포자멸사 억제 및 카스파아제-3 억제 활성이 원하는 정도로 나타나지 않을 수 있고, 상기 상한치를 초과하는 경우에는 투여량이 증가하는 만큼 세포자멸사 억제, 카스파아제-3 억제 및 항산화 효과가 증가하지 않을 수 있다. 나노베지클은 천연물로서 과량 투여하여도 인체에 부작용이 없으므로 본 발명의 조성물 내에 포함되는 나노베지클의 양적 상한은 당업자가 적절한 범위 내에서 선택하여 실시할 수 있다.

[0043] 한편, 본 발명은 당근에서 유래된 나노베지클(nanovesicle)을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌 질환, 심근 허혈 또는 재관류 손상의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0044] 본 발명에서의 용어, "나노베지클", "퇴행성 뇌 질환", "심근 허혈 또는 재관류 손상"은 상기에서 기재한 바와 같다.

[0045] 본 발명의 용어 "개선"이란, 본 발명의 나노베지클을 포함하는 조성물의 투여로 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 것을 의미한다.

[0046] 본 발명의 상기 건강기능식품 조성물을 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다.

[0047] 상기 식품의 종류는 특별히 제한되지 않으며, 통상적인 의미에서의 식품을 모두 포함한다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 비제한적인 예로는, 육류, 소세지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 또는 비타민 복합제 등을 들 수 있다.

[0048] 상기 건강기능식품이란, 상기 나노베지클을 캡슐, 정제, 분말, 과립, 액상, 환, 편상, 페이스트상, 시럽, 젤, 젤리 또는 바(bar) 형태로 제제화한 것일 수 있고, 또는 음료, 차류, 향신료, 껌, 과자류 등의 식품소재에 첨가하여 일반 식품 형태로 제조한 것으로, 이를 섭취할 경우 건강상 특정한 효과를 가져오는 것을 의미하나, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있다.

[0049] 상기 건강기능식품은, 일상적으로 섭취하는 것이 가능하기 때문에 매우 유용하다. 이와 같은 건강기능식품에 있어서의 나노베지클의 첨가량은, 대상인 건강기능식품의 종류에 따라 달라 일률적으로 규정할 수 없지만, 식품 본래의 맛을 손상시키지 않는 범위에서 첨가하면 되며, 대상 식품에 대하여 통상 0.01 내지 50 중량%, 바람직하기로는 0.1 내지 20 중량%의 범위이다. 또한, 캡슐, 정제, 분말, 과립, 액상, 환, 편상, 페이스트상, 시럽, 젤, 젤리 또는 바(bar) 형태의 건강기능식품의 경우에는 통상 0.1 내지 100 중량%, 바람직하기로는 0.5 내지 80 중량%의 범위에서 첨가하면 된다.

[0050] 상기 건강기능식품은 유효성분으로서 나노베지클 뿐만 아니라, 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함할 수 있으며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소, 조미제 및 향미제를 포함한다. 상술한 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스, 올리고당 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 사이클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 향미제로서 천연 향미제 [타우마틴, 스테비아 추출물 (예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등)] 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 사용할 수 있다.

[0051] 예컨대, 본 발명의 건강기능식품이 드링크제와 음료류로 제조되는 경우에는 본 발명의 나노베지클 이외에 구연산, 액상과당, 설탕, 포도당, 초산, 사과산, 과즙, 및 각종 식물 추출액 등을 추가로 포함시킬 수 있다.

[0052] 또한, 본 발명은 당근에서 유래된 나노베지클(nanovesicle)을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌 질환, 심근 허

혈 또는 재관류 손상의 예방 또는 개선용 화장료 조성물을 제공한다.

- [0053] 본 발명에서의 용어, "나노베지클", "퇴행성 뇌 질환", "심근 허혈 또는 재관류 손상"은 상기에서 기재한 바와 같다.
- [0054] 본 발명의 나노베지클을 유효성분으로 포함하는 화장료 조성물은 퇴행성 뇌질환, 심근 허혈 또는 재관류 손상에 대해 항산화 효과를 가짐으로써 노화를 억제할 수 있으며, 나아가 피부 세포의 사멸을 억제하여 상처 치료에도 효과적인 이점이 있다.
- [0055] 본 발명의 당근에서 유래된 나노베지클을 유효성분으로 포함하는 화장료 조성물은 현탁액, 유탁액, 페이스트, 겔, 크림, 아토피용 비누, 클렌징 폼, 클렌징 크림, 클렌징 워터, 목욕제, 스킨 소프트너, 스킨 토너, 로션, 크림, 에센스, 아스트린젠트, 유액, 젤, 립스틱, 분무제, 샴푸, 린스, 트리트먼트, 바디클렌저, 팩, 마사지제, 페이스파우더, 콤팩트, 파운데이션, 투웨이케이크 및 메이크업베이스로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 제형일 수 있다.
- [0056] 본 발명의 화장료 조성물은 보조제로 부형제를 포함할 수 있다. 상기 부형제로는 이에 한정되지는 않으나 예를 들어, 피부연화제, 피부 침투 증강제, 착색제, 방향제, 유화제, 농화제 및 용매를 포함할 수 있다. 또한, 향료, 색소, 살균제, 산화방지제, 방부제 및 보습제 등을 추가로 포함할 수 있으며, 물성개선을 목적으로 점증제, 무기염류, 합성 고분자 물질 등을 포함할 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 화장료 조성물로 세안제 및 비누를 제조하는 경우에는 통상의 세안제 및 비누 베이스에 본 발명의 바이아릴아미드 유도체를 첨가하여 용이하게 제조할 수 있다. 크림을 제조하는 경우에는 일반적인 수중유적형(O/W)의 크림베이스에 본 발명의 바이아릴아미드 유도체를 첨가하여 제조할 수 있다. 여기에 향료, 킬레이트제, 색소, 산화방지제, 방부제 등과 물성개선을 목적으로 한 단백질, 미네랄, 비타민 등 합성 또는 천연소재를 추가로 첨가할 수 있다.
- [0057] 또한, 본 발명은 상기 당근에서 유래된 나노베지클(nanovesicle)을 제조하는 방법으로서, 당근 착즙액을 제조하는 단계; 상기 당근 착즙액을 여과하여 여과액을 수득하는 단계; 및 상기 여과액을 추출하여 나노베지클을 회수하는 단계;를 포함하는 나노베지클의 제조방법을 제공한다.
- [0058] 본 명세서에서 용어 "당근 착즙액"은 당근에 열이나 효소를 가하지 않고 기계적, 물리적인 힘을 가하여 당근 내부에 포함된 유용성분을 외부로 유출시켜 얻어진 액상의 유체를 의미한다.
- [0059] 상기 당근 착즙액을 제조하는 단계는 당근을 준비한 후, 당근을 가압하여 착즙액을 제조할 수 있다. 상기 당근은 가압하기 전에 세척하는 과정을 추가로 진행할 수 있다.
- [0060] 상기 당근의 세척은 흐르는 물을 이용하여 상기 준비된 식물을 세척하는 것일 수 있으나, 예를 들어 PBS 또는 탄산수소나트륨이 용해된 정제수를 이용하여 수행될 수도 있다. 상기 탄산수소나트륨은 식품첨가물로 널리 사용되는 것으로 독성이 없기 때문에 당근의 세척과정에 사용할 수 있다.
- [0061] 상기 당근에 함유되어 있는 영양성분이 용이하게 착즙되도록, 상기 세척단계와 착즙단계 사이에 상기 당근을 평균 직경이 1 내지 60 mm로 분쇄되는 단계를 추가로 수행할 수 있다.
- [0062] 이후, 상기 당근 착즙액을 여과하여 고형물을 제거하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 고형물은 1 mm 이상의 평균 직경을 갖는 것일 수 있다.
- [0063] 또한, 상기 고형물이 제거된 당근 착즙액의 여과물을 원심분리하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 원심분리 단계는 7,000 내지 9,000 x g로 1차 원심분리 후 이의 상층액을 19,000 내지 21,000 x g로 2차 원심분리 함으로써 수행된다.
- [0064] 상기 여과액을 수득하는 단계에서 여과는 한외여과(ultrafiltration, UF) 또는 접선유동여과(tangential flow filtration, TFF) 방법에 의해 수행될 수 있고, 바람직하게는 한외여과 방법에 의해 수행될 수 있다.
- [0065] 특히, 상기 한외여과는 비균질 혼합용액을 구성하는 각각의 물질을 압력 또는 농도구배에 의해 반투과성 막을 따라 분리시키는 막-기반분리공정을 의미한다. 한외여과 막은 일정한 컷오프 값을 갖는 기공 크기를 갖는다. 본 발명에서 이용하는 한외여과는 5 내지 300 kDa의 컷오프(cut-off) 값을 가지며, 가장 바람직하게는 100 내지 300 kDa의 컷오프(cut-off) 값을 가진다.
- [0066] 상기 여과액을 수득하는 단계는 추출 전에 수행될 수도 있으며, 추출이 완료 후에 수행될 수도 있다. 바람직하게는 상기 여과 단계와 상기 추출 단계를 순차적으로 수행될 수 있다. 이와 같이 여과 후 추출을 수행할 경우 여과를 통한 농축으로 시료의 부피가 감소한 뒤 추출될 때 보다 효율적인 분리공정이 이루어질 수 있다.

- [0067] 상기 나노베지클을 회수하는 단계에서 추출은 크기 배제 크로마토그래피 방법에 의해 수행될 수 있다.
- [0068] 본 명세서에서 용어 "크기배제 크로마토그래피(Size Exclusion Chromatography, SEC)"는 비균질 혼합물을 구성하는 각각의 물질 중 정지상의 비드 포어(bead pore) 직경보다 크기가 작은 물질은 포어에 진입하여 상대적으로 느리게 용출되고, 크기가 큰 물질은 포어에 진입하지 않고 이동상을 따라 빠르게 용출됨으로써, 이로부터 유발되는 각 물질의 크기에 따른 이동속도 차이에 기반하여 물질을 분리하는 크로마토그래피를 의미한다.
- [0069] 상기 크기 배제 크로마토그래피는 pH 6 내지 8의 인산완충액(PBS)으로 평형화된 것일 수 있다.
- [0070] 상기 크기 배제 크로마토그래피로부터 얻은 각 분획물에 입도 분석을 수행하여 50 내지 200 nm, 바람직하게는 50 내지 180 nm, 더욱 바람직하게는 50 내지 150 nm, 가장 바람직하게는 100 내지 150nm의 평균 직경을 갖는 분획물을 선택하여 회수할 수 있다.
- [0071] 기존에는 식용 식물 유래 나노베지클을 분리 및 정제하기 위해 고분자 침전법 또는 초고속 원심분리방법의 경우 나노베지클 이외의 당근 유래 불순물이 많이 나올 수 있으며, 가혹한 원심분리 조건에 따라 파쇄되는 경우가 있다. 이에 따라 나노베지클이 아닌 다른 불순물들을 제외하고 불순물을 포함한 효과가 아닌 순수 당근 유래 나노베지클의 효과만을 확인하기 위해 크기 배제 크로마토그래피를 이용할 경우 고순도 나노베지클을 분리 및 정제할 수 있다. 즉, 상기 크기 배제 크로마토그래피를 이용할 경우 당근으로부터 천연 화합물을 추출하는 것이 아닌 당근에 있는 세포막 소포체인 나노베지클을 고순도 및 고효율로 분리 및 정제할 수 있다.
- [0072] 이하 본 발명을 실시예에 의거하여 더욱 구체적으로 설명하겠는 바, 본 발명이 다음 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [0073] **실시예 1: 당근 유래 나노베지클 제조**
- [0074] 당근 600 g을 착즙기를 이용하여 당근 착즙 용액을 수득하였다. 상기 당근 착즙 용액은 원심 분리기(Centrifugation)에 넣고 크기가 큰 불순물들을 제거한 후 얻은 상층액을 이용하여 당근 유래 나노베지클을 분리하였다. 구체적으로 Amicon Ultra-15 100kDa 원심분리기(Centrifugal filter)(Merck Millipore, Cat. No: UFC910024)에 당근 착즙 용액 13 mL를 넣어준 후 5,000x g, 3 h 및 4 °C의 조건에서 원심분리한 후, 얻어진 상층액 500 μ L를 0.2 μ m의 시린지 필터를 진행하여 Eppendorf 튜브 1.5 mL (SPL, Cat.No : 50015)에 옮겼다.
- [0075] qEVoriginal/70 nm(Izon science, Cat.No: SP1)을 실험 클램프 스탠드에 고정된 후 컬럼(column) 내부의 저장 용액을 제거하였다. 그 다음 1X PBS (pH 7.4) 용액 10 mL을 이용하여 평형을 진행하였다. 다음으로 이전 단계에서 여과된 용액을 qEV original 컬럼에 주입 후 용액이 모두 크로마토그래피 비드로 내려가면 PBS 용액을 넣어 주었다. 이때 크기 배제 크로마토그래피가 받는 중력의 힘을 일정하게 유지하기 위하여 PBS 용액이 일정한 부피인 2 mL을 넘지 않도록 주입하였다. Eppendorf 튜브 1.5 mL에 500 μ L씩 담으며 하나의 분획물(fraction)로 칭하였고, 총 33개의 분획물을 얻었다.
- [0076] 도 1은 상기 실시예 1에서 제조된 불순물을 제외한 당근 유래 나노베지클이 포함된 당근 착즙액 농축 결과를 나타낸 사진이다.
- [0077] 도 2는 크기 배제 크로마토그래피를 이용한 상기 실시예 1에서 제조된 당근 유래 나노베지클의 분리 및 정제 과정과 정제된 33개의 분획물을 나타낸 사진이다.
- [0078] 상기 도 1 및 2를 참조하면, SEC 상에서 당근에 작은 화합물들(뒷쪽 분획물)은 모두 나노베지클과 분리되었고, 나노베지클이 색을 띄는 이유는 나노베지클 내에 당근 내 특정 성분이 포함되어 있음을 보여 주었다. 나노베지클은 이런 특정 성분을 안전하고 안정적으로 체내 전달하는 역할을 할 수 있으며, 특히 불용성 물질들 역시 잘 탑재할 수 있음을 짐작할 수 있었다.
- [0079] **실험예 1: 당근 유래 나노베지클 크기 분포도 및 농도와 순도 분석**
- [0080] 상기 실시예 1에서 제조된 당근 유래 나노베지클의 농도와 순도를 결정하기 위해 나노입자추적분석(Nanoparticle tracking analyzer, NTA)과 단백질 정량화의 BCA (Bicinchoninic acid) assay를 이용하여 분석하였다. 분리한 상기 실시예 1의 당근 유래 나노베지클을 1:1000의 희석을 진행한 후 나노 입자 추적 분석 장치를 이용하여 나노베지클의 농도와 평균 크기를 측정하였다. 그 다음으로 사용한 분획물의 단백질 농도를 정량화하기 위해 BCA assay를 이용하여 분석하였다. 그 결과는 도 3에 나타내었다.
- [0081] 도 3은 상기 실시예 1에서 제조된 당근 유래 나노베지클의 농도 및 크기 분포도를 나타낸 그래프이다. 상기 도 3을 참조하면, 당근 유래 나노베지클의 나노입자는 그 크기가 100 내지 300 nm에 주로 분포하는 것을 알 수 있

었다.

[0082] **실험예 2: 인간 신경모세포종에서 당근 유래 나노베지클의 세포독성 평가**

[0083] 96-well cell culture plate에 10% FBS과 1% 페니실린과 스트렙토마이신이 첨가된 DMEM을 사용하여 신경모세포종(SH-SY5Y)을 5×10^4 cell/cm²으로 세포를 접종하였다. 24시간 후에 배지를 제거한 후 PBS로 세척하였다. 이때, 실험군 세포에 1×10^9 particles/mL부터 1×10^{12} particles/mL의 농도까지 농도별로 세포 배양액과 함께 배양하였다. 세포의 활성 정도는 WST-1을 통해 분석하였다. 모든 값은 평균±표준 편차(*p<0.1, **p<0.01 및 ***p<0.001; n = 3)로 표시하였다. 그 결과는 도 4에 나타내었다.

[0084] 도 4는 상기 실시예 1에서 제조된 당근 유래 나노베지클 첨가에 의한 인간 신경모세포종(SH-SY5Y)에서의 세포독성 평가 그래프이다. 상기 도 4를 참조하면, 당근 유래 나노베지클을 넣지 않은 대조군(CTRL)과 비교하여 고농도(1×10^{12} particles/mL)의 당근 유래 나노베지클 처리를 비교하였을 때 세포 활성이 떨어지지 않는 것을 확인하였다. 이를 통해 당근 유래 나노베지클은 인간 신경모세포종(SH-SY5Y)에서 세포 독성이 없음을 확인하였다. 모든 값은 평균±표준 편차(*p<0.1, **p<0.01 및 ***p<0.001; n = 3)로 표시되었다.

[0085] **실험예 3: 인간 신경모세포종에 파킨슨병 유도제(6-OHDA) 처리 시 세포 생존율 분석**

[0086] 96-well cell culture plate에 10% FBS과 1% 페니실린과 스트렙토마이신이 첨가된 DMEM을 사용하여 인간 신경모세포종(SH-SY5Y)을 5×10^4 cell/cm²으로 세포를 접종하였다. 24시간 후에 배지를 제거한 후 PBS로 세척하였다. 이때, 실험군 세포에 1×10^{11} particles/mL 농도로 당근 유래 나노베지클을 넣어 배양하였으며, 대조군 세포는 당근 유래 나노베지클의 처리없이 일반 배양 배지를 이용하여 배양하였다. 24시간이 지난 후 파킨슨병 유도제인 6-OHDA를 200 μ m를 실험군 세포와 대조군(CTRL) 세포 모두에 처리하여 세포자멸을 일으켰다. 처리 6시간 후의 세포 생존율을 Trypan blue assay를 통해 분석하였다. 모든 값은 평균±표준 편차(*p<0.1, **p<0.01 및 ***p<0.001; n = 5)로 표시되었다. 그 결과는 도 5에 나타내었다.

[0087] 도 5는 상기 실시예 1에서 제조된 당근 유래 나노베지클 첨가에 의한 인간 신경모세포종(SH-SY5Y)에서의 항세포자멸 효과를 비교한 그래프이다. 상기 도 5를 참조하면, 당근 유래 나노베지클을 넣지 않은 대조군(CTRL)의 경우에 6-OHDA 처리 후 6시간일 때 생존율이 50% 이하로 급격하게 감소함을 확인할 수 있었다. 반면, 당근유래 나노베지클을 처리한 실험군 세포의 경우 농도 의존적으로 세포자멸을 막아주는 것을 확인하였다. 이를 통해 당근 유래 나노베지클을 세포 배양액에 첨가하였을 때 6-OHDA에 의한 세포자멸을 막아주는 것을 확인하였으며, 결과적으로 당근 유래 나노베지클이 파킨슨병에 대한 치료제로서의 가능성을 확인할 수 있었다.

[0088] **실험예 4: 심장근원세포에서 당근 유래 나노베지클의 세포독성 평가**

[0089] 96-well cell culture plate에 10% FBS과 1% 페니실린과 스트렙토마이신이 첨가된 DMEM을 사용하여 심장근원세포(H9C2)를 1×10^4 cell/cm²로 세포를 접종하였다. 24시간 후에 배지를 제거한 후 PBS로 세척하였다. 이때 실험군 세포에 1×10^9 particles/mL로부터 1×10^{12} particles/mL의 농도까지 농도별로 세포 배양액과 함께 배양하였다. 세포의 활성 정도는 WST-1을 통해 분석하였다. 모든 값은 평균±표준 편차(*p<0.1, **p<0.01 및 ***p<0.001; n = 3)로 표시되었다. 그 결과는 도 6에 나타내었다.

[0090] 도 6은 상기 실시예 1에서 제조된 당근 유래 나노베지클 첨가에 의한 심장근원세포(H9C2)에서의 세포독성 평가 그래프이다. 상기 도 6을 참조하면, 당근 유래 나노베지클을 넣지 않은 대조군(CTRL)과 비교하여 고농도(1×10^{12} particles/mL)의 당근 유래 나노베지클 처리를 비교하였을 때 세포 활성이 떨어지지 않는 것을 확인하였다. 이를 통해 당근 유래 나노베지클은 심장 근원세포에서 세포 독성이 없음을 확인하였다.

[0091] **실험예 5: 심장근원세포에 활성산소에 의한 세포자멸 유발 시 세포 생존율 분석**

[0092] 96-well cell culture plate에 10% FBS과 1% 페니실린과 스트렙토마이신이 첨가된 DMEM을 사용하여 심장근원세포(H9C2)를 1×10^4 cell/cm²으로 세포를 접종하였다. 24시간 후에 배지를 제거한 후 PBS로 세척하였다. 이때, 실험군 세포에 1×10^{11} particles/mL 농도로 당근 유래 나노베지클을 넣어 배양하였으며, 대조군(CTRL) 세포는 당근 유래 나노베지클 처리 없이 일반 배양 배지를 이용하여 배양하였다. 24시간이 지난 후 활성산소를 일으키는 500 μ m의 과산화수소(H₂O₂)를 실험군 세포와 대조군 세포 모두에 처리하여 세포 내부에 활성산소를 일으켰다.

처리 6시간, 12시간 후의 세포 생존율을 Trypan blue assay를 통해 분석하였다. 모든 값은 평균±표준 편차 (*p<0.1, **p<0.01 및 ***p<0.001; n = 3)로 표시되었다. 그 결과는 도 7에 나타내었다.

[0093] 도 7은 상기 실시예 1에서 제조된 당근 유래 나노베지클 첨가에 의한 심장근원세포(H9C2)에서의 항세포자멸 효과를 비교한 그래프이다. 상기 도 7을 참조하면, 당근 유래 나노베지클을 넣지 않은 대조군(CTRL)의 경우에 과산화수소(H₂O₂)처리 후 12 시간일 때 생존율이 50% 이하로 급격하게 감소함을 볼 수 있었다. 반면, 당근 유래 나노베지클을 처리한 실험군 세포의 경우 농도 의존적으로 세포자멸을 막아주는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해 당근 유래 나노베지클을 세포 배양액에 첨가하였을 때 활성산소에 의한 세포자멸을 억제할 수 있음을 확인하였다.

[0094] **실험예 6: 심장근원세포에 활성산소 유발 시 카스파아제 활성 억제 분석**

[0095] 활성 산소에 의한 다운 스트림 중 Caspase-3의 활성 변화가 당근 유래 나노베지클에 의해 일어나는지 확인하기 위해 Caspase-3 활성 평가를 진행하였다.

[0096] 6-well cell culture plate에 10% FBS와 1% 페니실린과 스트렙토마이신이 첨가된 DMEM을 사용하여 심장근원세포(H₉C₂)를 1×10^4 cell/cm²로 세포를 접종하였다. 24시간 후 대조군(CTRL) 및 실험군 세포의 배지를 제거한 후에 PBS로 세척하였다. 실험군 세포에는 1×10^{11} particles/mL 농도로 당근 유래 나노베지클을 넣어 배양하였으며, 대조군은 나노베지클 없이 배양하였다. 당근 유래 나노베지클 처리 24시간 후에 500 μm의 과산화수소(H₂O₂)를 각각 대조군 및 실험군에 처리하였고, Caspase-3 활성을 평가하기 위하여 Ac-DEVD-AFC(N-Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-Trifluoromethylcoumarin)을 사용하였다. 세포를 수확하고 PBS로 두 번 세척한 후 200 μl 용균 완충액(RIPA(radioimmunoprecipitation assay) 완충액 990 μl에 프로테아제(protease) 억제제 10 μl를 첨가하여 준비함)으로 용해시켰다. BCA(bicinchoninic acid) 분석을 사용하여 수행되었다. 1X 반응 완충액(Ac-DEVD-AFC 기질을 DMSO(dimethyl sulfoxide)에 용해시키고 1X HEPES(1,4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)를 세포 용해물과 37 °C에서 1 시간 동안 반응시킨 후 black 384-well plate에 옮겨 파장 400 및 505 nm에서 각각 Varioskan™ LUX Multimode Reader를 사용하여 형광 강도를 측정하였다. 그 결과는 도 8에 나타내었다.

[0097] 도 8은 상기 실시예 1에서 제조된 당근 유래 나노베지클 첨가에 의한 심장근원세포(H9C2)에서 카스파아제-3의 활성 변화를 평가한 그래프이다. 상기 도 8을 참조하면, 세포 내 활성산소를 일으켜 세포자멸을 유도하기 위해 처리한 과산화수소(H₂O₂)는 H9C2 세포에서 세포 내 카스파아제(caspase)의 활성을 증가시켰으며, 과산화수소를 3 시간 처리했을 때 당근 유래 나노베지클을 처리한 실험군에서는 대조군에 비하여 카스파아제(caspase) 활성이 약 3배 정도 감소한 것을 확인하였다. 따라서 당근 유래 나노베지클이 과산화수소(H₂O₂)에 의해 유도된 caspase-3의 활성을 억제한다는 것을 나타내었다. 모든 값은 평균±표준 편차 ***p<0.001; n = 3)로 표시되었다.

[0098] **실험예 7: 심장근원세포에 활성산소 유발 시 세포 내 Nrf-2, SOD-1의 발현 분석**

[0099] 과산화수소(H₂O₂)에 의한 세포 내 과도한 활성산소에 대응하여 산화적 스트레스로부터 방어하는 항산화 물질인 Nrf-2(Nuclear factor erythroid 2-related factor 2) 및 SOD-1(Superoxide dismutase [Cu-Zn])의 변화량을 확인하기 위해 qRT-PCR을 수행하였다. 6-well cell culture plate에 10% FBS와 1% 페니실린과 스트렙토마이신이 첨가된 DMEM을 사용하여 심장근원세포(H₉C₂)를 1×10^4 cell/cm²로 세포를 접종하였다. 24 시간 후 대조군(CTRL) 및 실험군 세포의 배지를 제거한 후에 PBS로 세척하였다. 실험군(Carex) 세포에는 1×10^{11} particles/mL 농도로 상기 실시예 1의 당근 유래 나노베지클을 넣어 배양하였고, 대조군(CTRL)은 나노베지클 없이 배양하였다. 당근 유래 나노베지클 처리 24 시간 후에 500 μm의 과산화수소(H₂O₂)를 각각 대조군 및 실험군에 처리하였다. 그 다음 FavorPrep™ Tri-RNA Reagent 을 이용하여 RNA를 추출하였다. microplate reader을 이용하여 RNA 정량을 하였다. cDNA는 ReverTra Ace™ qPCR RT Kit를 사용하여 역전사 효소반응 PCR(RT-PCR)을 통해 cDNA를 합성하였다. quantitative PCR은 THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix을 사용하여 cDNA, primer를 혼합하여 40 cycle을 수행하였다. 사용된 primer는 하기 표 1과 같다. 실험 결과는 도 9에 나타내었다.

표 1

Nrf-2	Forward: ATATTCCAGCCACGTTGAG
	Reverse: AACTTGCTCCATGTCCTGCT
SOD-1	Forward: GAATTTCATGGCGACGAAGGCC
	Reverse: GGATCCTTATTGGGCGATCCCA
GAPDH	Forward: GACATGCCGCGCTGGAGAAAC
	Reverse: AGCCCAGGATGCCCTTAGT

[0100]

[0101]

도 9는 상기 실시예 1에서 제조된 당근 유래 나노베지클 첨가에 의한 심장 근원세포(H₉C₂)에서 Nrf-2, SOD-1의 발현을 평가한 그래프이다. 상기 도 9를 참조하면, 과산화수소(H₂O₂)에 의해 Nrf-2의 발현이 감소하였으며, 당근 유래 나노베지클을 처리하였을 때 대조군에 비하여 Nrf-2의 발현이 약 3배 정도 증가함을 확인하였다.

[0102]

또한 세포 내 활성산소 제거를 위한 방어 기작으로 SOD-1의 발현이 과산화수소(H₂O₂)를 처리하였을 때 그렇지 않은 경우에 비하여 6배 증가하였으며, 당근 유래 나노베지클을 처리한 실험군의 경우 대조군에 비하여 SOD-1의 발현이 3배 감소함을 확인하였다. 따라서 당근 유래 나노베지클이 과산화수소(H₂O₂)에 의한 활성산소 생성에 대응하여 세포 내 항산화 작용에 관여함을 확인하였다. 모든 값은 평균±표준 편차 (*p<0.1, **p<0.01 및 ***p<0.001; n = 6)로 표시되었다.

[0103]

이상과 같이, 활성산소(Reactive oxygen species, ROS)는 생체 내에서 식균 세포(Phagocytic cell)가 호흡하는 동안 계속해서 만들어지는데, 이는 외부에서 침입한 박테리아나 바이러스 등을 파괴하는데 중요한 역할을 한다. 그러나 활성산소가 특정 요인에 의해 생체 내에서 필요이상으로 생성될 경우, 단백질 변형, 단일 가닥 DNA의 절단 유발을 통해 효소의 불활성 또는 변성을 일으키며, 미토콘드리아의 역기능, 세포자멸(apoptosis) 등을 초래하게 된다. 따라서 활성산소에 의한 세포자멸은 심혈관 질환, 뇌 질환, 염증질환, 노화 등 다양한 질병을 유발하게 된다. 이에 따라 항세포자멸(anti-apoptosis) 효과를 가지는 약물의 중요성이 커지며, 인체에 무해하며 항세포자멸 및 항산화 효과가 높은 천연 물질의 개발이 요구되고 있다.

[0104]

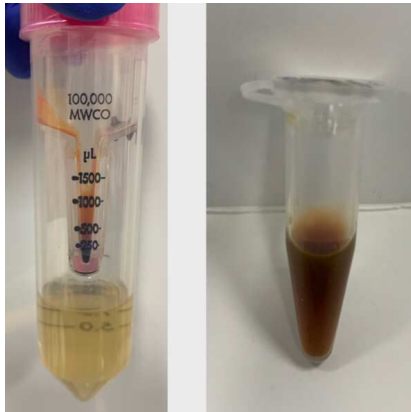
본 발명의 당근 유래 나노베지클은 인체 내에 처리가 가능하도록 크기배제 크로마토그래피를 통해 고순도 나노베지클 정제를 진행한 결과, 당근 유래 나노베지클은 인간 신경모세포종 및 심장근원세포에서 세포자멸을 일으키는 유도제에 의한 세포자멸을 억제함을 확인하였다. 또한 당근 유래 나노베지클은 인간 신경모세포종과 심장근원세포 외에 다양한 세포에서도 이러한 효과를 가질 수 있음을 알 수 있었다.

[0105]

따라서, 본 발명의 항세포자멸 활성을 가지는 당근 유래 나노베지클은 범용성 식물인 당근으로부터 대량 생산이 가능하기 때문에 생산 수율이 낮은 동물세포 유래 엑소좀을 대체하여 나노베지클의 경제적 생산을 구현할 수 있다. 또한 식물 추출물과 비교하여 용매에 의한 세포독성이 없으며, 추출물에 비해 세포 내 투과가 용이하고, 식물 내 지용성 화합물을 나노베지클 내에 탑재가 가능하며, 생체 내에서 안정성을 가지기 때문에 식물에서 유래한 천연 화합물들을 효과적으로 세포에 전달할 수 있도록 할 수 있다. 이러한 당근 유래 나노베지클에 다양한 약물을 탑재하여 질병 치료 시 약물 전달체로 활용될 수 있다.

도면

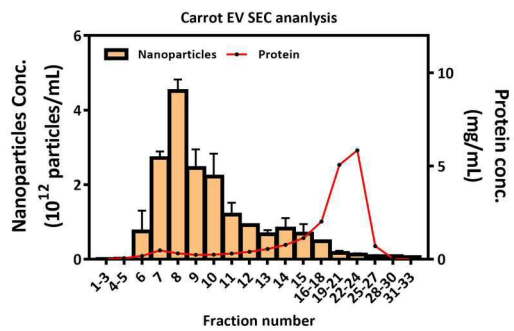
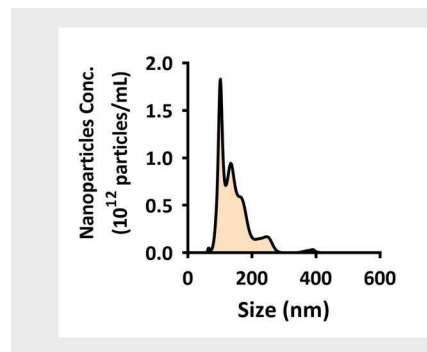
도면1



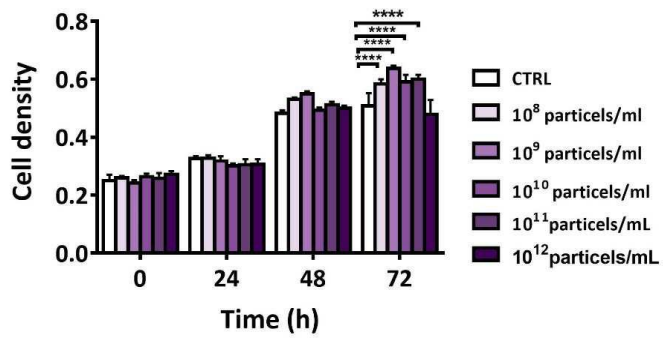
도면2



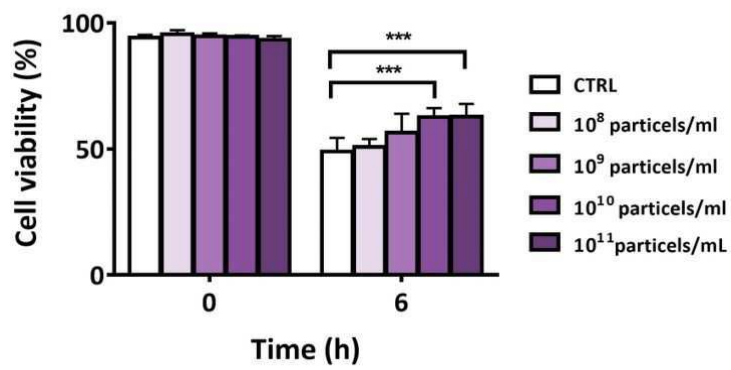
도면3



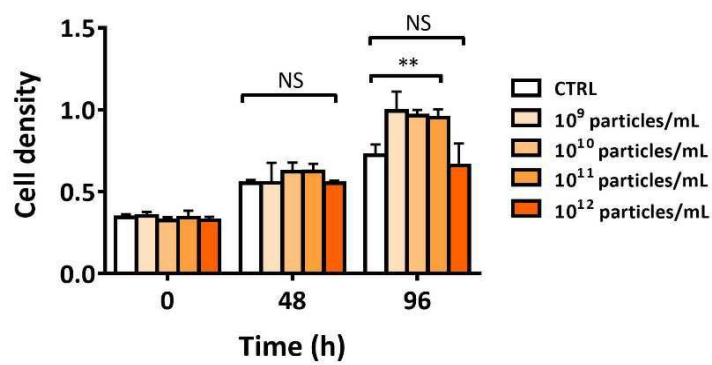
도면4



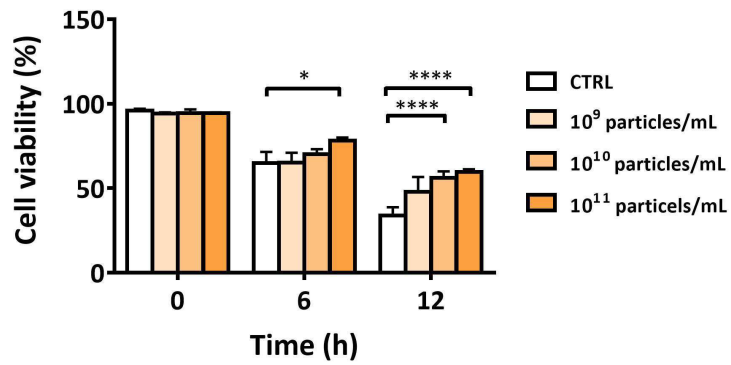
도면5



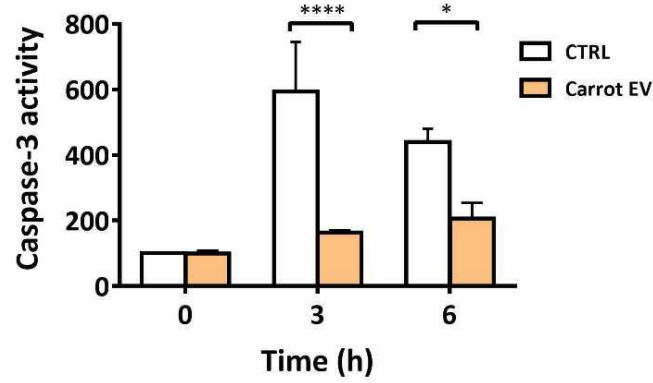
도면6



도면7



도면8



도면9

