



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0159793
(43) 공개일자 2024년11월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/50 (2006.01) A61K 31/713 (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 9/5063 (2013.01)
A61K 31/713 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-0054817
(22) 출원일자 2024년04월24일
심사청구일자 2024년04월24일
(30) 우선권주장
1020230055456 2023년04월27일 대한민국(KR)

(71) 출원인
한국과학기술연구원
서울특별시 성북구 화랑로14길 5 (하월곡동)
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암
동5가)
(72) 발명자
양유수
서울특별시 성북구 화랑로14길 5
장호충
서울특별시 성북구 화랑로14길 5
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김영철, 김 순 영

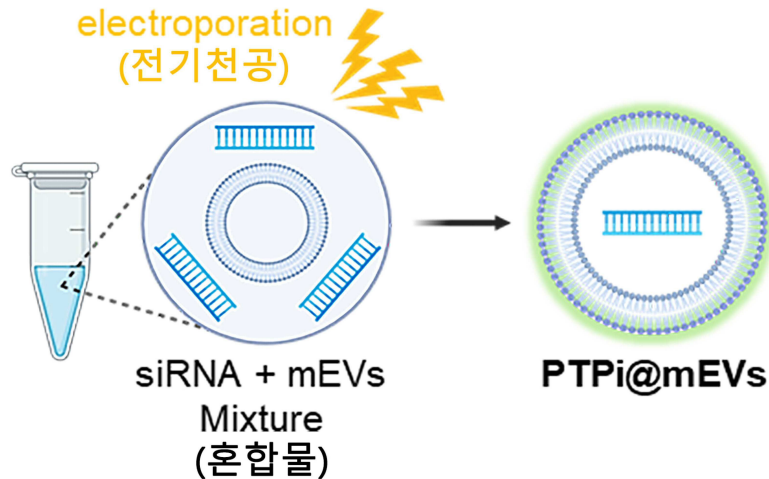
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 우유 유래 엑소좀을 유효성분으로 포함하는 신장 기능 개선용 조성물

(57) 요약

본원에는 핵산 올리고머가 봉입된 우유 유래 엑소좀을 유효성분으로 포함하는 신장 기능 장애의 개선용 조성물이 개시된다. 상기 조성물은 PTP1B siRNA가 봉입된 우유 유래 엑소좀을 유효성분으로 포함한다. 상기 조성물은 신장 손상에 의해 증가된 혈액요소질소 및/또는 크레아티닌 수치를 감소시키고 및/또는 신장 세포에서 염증 반응을 감소시키는 효과를 제공한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 13/12 (2018.01)

(72) 발명자

박대호

서울특별시 성북구 화랑로14길 5

김명규

서울특별시 강동구 고덕로62길 76, 6동 1403호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711196505
과제번호	2E32320
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국과학기술연구원
연구사업명	한국과학기술연구원연구운영비지원(주요사업비)
연구과제명	초연결 의료기기 리버스 중개연구
과제수행기관명	한국과학기술연구원
연구기간	2023.01.01 ~ 2023.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711195616
과제번호	2022M3E5F2018170
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	혁신신약기초기반기술개발
연구과제명	염증성 장질환 치료를 위한 혁신형 siRNA 경구 치료제 개발
과제수행기관명	한국과학기술연구원
연구기간	2023.01.01 ~ 2023.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

핵산 올리고머가 봉입된 우유 유래 엑소솜을 유효성분으로 포함하는, 신장 기능 장애의 개선용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 핵산 올리고머는 siRNA인, 신장 기능 장애의 개선용 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 핵산 올리고머는 PTP1B siRNA인, 신장 기능 장애의 개선용 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 우유 유래 엑소솜은 소 우유 유래 엑소솜인, 신장 기능 장애의 개선용 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 핵산 올리고머가 봉입된 우유 유래 엑소솜은 조성물 전체 중량을 기준으로 0.001 내지 10 중량%로 포함된 것인, 신장 기능 장애의 개선용 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서,

상기 신장 기능 장애는 급성 신장 손상 및/또는 신장염에 의해 유발된 것인, 신장 기능 장애의 개선용 조성물.

청구항 7

제 6항에 있어서,

상기 급성 신장 손상은 허혈-재관류 손상 (ischemia-reperfusion injury, IRI)으로 유도된 급성 신장 손상 또는 패혈증으로 유도된 급성 신장 손상인, 신장 기능 장애의 개선용 조성물.

청구항 8

제 6항에 있어서,

상기 신장염은 신우신장염 또는 사구체신장염인, 신장 기능 장애의 개선용 조성물.

청구항 9

제 1항에 있어서,

상기 신장 기능 장애의 개선은 신장 손상에 의해 증가된 혈액요소질소 및/또는 크레아티닌 수치를 감소시키는 것인, 신장 기능 장애의 개선용 조성물.

청구항 10

제 1항에 있어서,

상기 신장 기능 장애의 개선은 신장 세포에서 염증 반응을 감소시키는 것인, 신장 기능 장애의 개선용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 개시물에는 핵산 올리고머가 봉입된 우유 유래 엑소좀을 유효성분으로 포함하는 신장 기능 장애의 개선용 조성물이 개시된다.

배경 기술

[0002] 신장은 인체의 정상적인 생리를 유지하고 조절하는 항상성을 담당하는 중요한 기관 중 하나이다. 이러한 신장은 외과적 처치 (허혈-재관류, ischemia-reperfusion), 신장의 급작스런 여과 장애, 요독의 축적, 전해질과 산-염기 평형의 불균형, 항암제 혹은 조영제 등의 다양한 약물 혹은 신독성을 가진 화학 물질 등의 외부 요인에 의해 손상될 수 있고, 이러한 손상은 수시간에서 수일 동안 발생할 수 있다. 손상 과정에서 분비되는 전염증성 사이토카인의 분비가 신장 손상의 심화를 유도할 수 있고, 급성 신장 손상 (Acute kidney injury, AKI)을 야기하기도 한다. 신장 손상의 회복 단계에서 M2 표현형 대식세포가 증가하는데, 이를 통해 항염증성 사이토카인 분비, 혈관 생성, 신장 구조 회복 등이 유도되며, 이러한 기전들이 원활히 수행되지 않을 때 만성 콩팥병 (Chronic kidney disease)으로 진행된다.

[0003] 현재 신장 손상 개선을 위한 치료제가 없으며, 현재 치료제로 사용되고 있는 것들은 특정 질병 인자를 표적하지 않아서 신장 손상의 수동적 개선 효과만을 기대할 수 있을 뿐이다.

[0004] 한편, 엑소좀은 직경 30 내지 150 nm의 세포외 소포체의 한 종류이며, 다양한 종류의 세포에서 분비된다. 이러한 엑소좀은 세포간 정보를 전달해 주는 중요한 역할을 한다는 사실이 알려지면서 차세대 약물전달기술에 사용되기 시작했다. 엑소좀은 세포로부터 분리, 정제하여 사용하는 것이 일반적이다. 그러나, 세포가 분비하는 엑소좀의 양이 너무 작고, 높은 순도를 확보하기에 어려우며, 비교적 불안정한 물성을 지녀 대량 생산에 한계가 있다.

[0005] 최근, 식품 유래 엑소좀이 각광을 받고 있다. 이러한 식품 유래 엑소좀은 손쉽게 구할 수 있으며 일반적으로 안전하다. 우유 유래 엑소좀은 우유로부터 엑소좀을 높은 수율로 분리, 정제할 수 있고, 급격한 환경 변화, 예를 들어 pH나 온도 등에도 높은 안정성을 유지하는 장점이 있다. 또한, 세포로부터 엑소좀을 분리하는 것과 비교할 때, 우유로부터 엑소좀을 분리하는 데 약 6시간 정도 소요될 뿐이어서 대량 생산에 유리하며, 우유 유래 엑소좀은 생체이용율이 높아 약물의 경구투여가 가능하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) KR 10-2021-0098431 A

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 일 측면에서, 본 개시물은 핵산 올리고머가 봉입된 우유 유래 엑소솜을 유효성분으로 포함하는 신장 기능 장애의 개선용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 일 측면에서, 본 개시물은 핵산 올리고머가 봉입된 우유 유래 엑소솜을 유효성분으로 포함하는, 신장 기능 장애의 개선용 조성물을 제공한다.

[0009] 예시적인 일 구현예에서, 상기 핵산 올리고머는 siRNA인 것일 수 있다.

[0010] 예시적인 일 구현예에서, 상기 핵산 올리고머는 PTP1B siRNA인 것일 수 있다.

[0011] 예시적인 일 구현예에서, 상기 우유 유래 엑소솜은 소 우유 유래 엑소솜인 것일 수 있다.

[0012] 예시적인 일 구현예에서, 상기 핵산 올리고머가 봉입된 우유 유래 엑소솜은 조성물 전체 중량을 기준으로 0.001 내지 10 중량%로 포함된 것일 수 있다.

[0013] 예시적인 일 구현예에서, 상기 신장 기능 장애는 급성 신장 손상 및/또는 신장염에 의해 유발된 것일 수 있다.

[0014] 예시적인 일 구현예에서, 상기 급성 신장 손상은 허혈-재관류 손상 (ischemia-reperfusion injury, IRI)으로 유도된 급성 신장 손상 또는 패혈증으로 유도된 급성 신장 손상인 것일 수 있다.

[0015] 예시적인 일 구현예에서, 상기 신장염은 신우신장염 또는 사구체신장염인 것일 수 있다.

[0016] 예시적인 일 구현예에서, 상기 신장 기능 장애의 개선은 신장 손상에 의해 증가된 혈액요소질소 및/또는 크레아티닌 수치를 감소시키는 것일 수 있다.

[0017] 예시적인 일 구현예에서, 상기 신장 기능 장애의 개선은 신장 세포에서 염증 반응을 감소시키는 것일 수 있다.

발명의 효과

[0018] 일 측면에서, 본 개시물에 개시된 기술은 핵산 올리고머가 봉입된 우유 유래 엑소솜을 유효성분으로 포함하는 신장 기능 장애의 개선용 조성물을 제공하는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 일 실시예에 따른 PTP1B siRNA의 우유 유래 엑소솜 내 봉입 과정의 모식도를 나타낸 것이다.

도 2는 일 실험예에 따른 우유 유래 엑소솜 내 PTP1B siRNA의 봉입 효율 평가 결과를 나타낸 것이다 (***; $p < 0.001$).

도 3은 일 실험예에 따라 우유 유래 엑소솜 내 PTP1B siRNA의 봉입 후 안정성 여부를 평가한 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 일 실험예에 따라 PTP1B siRNA가 봉입된 우유 유래 엑소솜의 신장 세포 내 흡수 여부를 평가한 결과를 나타낸 것이다 (****; $p < 0.0001$).

도 5는 일 실험예에 따른 PTP1B siRNA가 봉입된 우유 유래 엑소솜의 신장질환에 대한 효능 평가 결과를 나타낸 것이다 (*; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$, ***; $p < 0.001$, ****; $p < 0.0001$).

도 6은 일 실험예에 따른 PTP1B siRNA가 봉입된 우유 유래 엑소솜의 신장질환에 대한 효능 평가 결과를 나타낸 것이다 (*; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$).

도 7은 일 실험예에 따른 PTP1B siRNA가 봉입된 우유 유래 엑소솜의 대식세포 염증 반응에 대한 효능 평가 결과를 나타낸 것이다.

도 8은 일 실험예에 따른 PTP1B siRNA가 봉입된 우유 유래 엑소솜의 염증성 장질환에 대한 효능 평가 결과를 나타낸 것이다 (***; $p < 0.001$).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0020] 이하, 본 개시물을 상세히 설명한다.
- [0021] 일 측면에서, 본 개시물은 핵산 올리고머가 봉입된 우유 유래 엑소좀을 유효성분으로 포함하는, 신장 기능 장애의 개선용 조성물을 제공한다.
- [0022] 다른 측면에서, 본 개시물은 신장 기능 장애의 개선에 사용하기 위한 핵산 올리고머가 봉입된 우유 유래 엑소좀을 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0023] 다른 측면에서, 본 개시물은 신장 기능 장애의 개선을 위한 핵산 올리고머가 봉입된 우유 유래 엑소좀을 포함하는 조성물의 용도를 제공한다.
- [0024] 다른 측면에서, 본 개시물은 신장 기능 장애의 개선을 위한 핵산 올리고머가 봉입된 우유 유래 엑소좀을 포함하는 조성물의 비치료적 용도를 제공한다.
- [0025] 다른 측면에서, 본 개시물은 신장 기능 장애의 개선용 조성물을 제조하는데 있어서 핵산 올리고머가 봉입된 우유 유래 엑소좀을 포함하는 조성물의 용도를 제공한다.
- [0026] 다른 측면에서, 본 개시물은 신장 기능 장애의 개선에 유효한 양의 핵산 올리고머가 봉입된 우유 유래 엑소좀을 포함하는 조성물을 이를 필요로 하는 대상에게 투여하는 것을 포함하는 신장 기능 장애의 개선 방법을 제공한다.
- [0027] 예시적인 일 구현예에서, 상기 핵산 올리고머가 봉입된 우유 유래 엑소좀을 포함하는 조성물은 약학 조성물, 비치료적 경구투여용 조성물 또는 식품 조성물의 형태를 갖는 것일 수 있다.
- [0028] 예시적인 일 구현예에서, 상기 핵산 올리고머가 봉입된 우유 유래 엑소좀을 포함하는 조성물은 약학 조성물, 비치료적 경구투여용 조성물 또는 식품 조성물의 형태로 대상에게 투여 또는 적용되는 것일 수 있다.
- [0029] 본원에서 유효성분은 단독으로 목적으로 하는 활성을 나타내거나 또는 그 자체로는 활성이 없는 담체와 함께 목적으로 하는 활성을 나타낼 수 있는 성분을 의미한다.
- [0030] 예시적인 일 구현예에서, 상기 신장 기능 장애의 개선용 조성물은 약학 조성물인 것일 수 있다.
- [0031] 예시적인 일 구현예에서, 상기 약학 조성물은 신장 기능 장애를 예방, 개선 및/또는 치료하는 것일 수 있다.
- [0032] 예시적인 일 구현예에서, 상기 신장 기능 장애의 개선용 조성물은 비치료적 경구투여용 조성물인 것일 수 있다.
- [0033] 예시적인 일 구현예에서, 상기 신장 기능 장애의 개선용 조성물은 식품 조성물인 것일 수 있다.
- [0034] 예시적인 일 구현예에서, 상기 신장 기능 장애의 개선용 조성물은 건강기능식품 조성물인 것일 수 있다.
- [0035] 예시적인 일 구현예에서, 상기 건강기능식품 조성물은 신장 기능 장애를 개선하는 것일 수 있다.
- [0036] 예시적인 일 구현예에서, 상기 우유 유래 엑소좀은 20 내지 300 nm의 직경을 갖는 것일 수 있다. 다른 예시적인 일 구현예에서, 상기 우유 유래 엑소좀은 20 nm 이상, 30 nm 이상, 40 nm 이상, 50 nm 이상, 60 nm 이상, 70 nm 이상, 80 nm 이상, 90 nm 이상 또는 100 nm 이상이고, 300 nm 이하, 250 nm 이하, 200 nm 이하, 150 nm 이하 또는 100 nm 이하의 직경을 갖는 것일 수 있다. 우유 유래 엑소좀을 이용할 경우, 엑소좀 분리에 수 일의 시간이 소요되는 일반적인 세포 배양액 유래 엑소좀과 비교하여 약 6시간의 짧은 시간 안에 엑소좀을 분리할 수 있는 이점이 있다.
- [0037] 예시적인 일 구현예에서, 상기 우유 유래 엑소좀은 소 우유 유래 엑소좀인 것일 수 있다.
- [0038] 예시적인 일 구현예에서, 상기 핵산 올리고머는 엑소좀의 내부 공간에 위치하여 봉입될 수 있다. 상기 "엑소좀의 내부 공간에 위치하여 봉입된다"는 것은, 핵산 올리고머가 엑소좀의 내부 공간에 완전히 들어가 봉입되는 것을 의미하며, 부착, 흡착 또는 접착 등의 방식으로 엑소좀의 표면에만 존재하는 것이 아닌 것을 말한다.
- [0039] 예시적인 일 구현예에서, 상기 핵산 올리고머는 상기 엑소좀 중량을 기준으로 0.1 내지 1.2 중량%로 포함될 수 있다. 예를 들어, 상기 핵산 올리고머는 0.1 중량% 이상, 0.2 중량% 이상, 0.3 중량% 이상, 0.4 중량% 이상, 0.5 중량% 이상, 0.6 중량% 이상, 0.7 중량% 이상, 0.71 중량% 이상, 0.72 중량% 이상, 0.73 중량% 이상, 0.74 중량% 이상, 0.75 중량% 이상, 0.76 중량% 이상, 0.77 중량% 이상, 0.78 중량% 이상, 0.79 중량% 이상, 또는 0.8 중량% 이상이고, 1.2 중량% 이하, 1.1 중량% 이하, 1 중량% 이하, 0.9 중량% 이하, 0.95 중량% 이하, 0.9

중량% 이하, 0.89 중량% 이하, 0.88 중량% 이하, 0.87 중량% 이하, 0.86 중량% 이하, 0.85 중량% 이하, 0.84 중량% 이하, 0.83 중량% 이하, 0.82 중량% 이하, 또는 0.81 중량% 이하로 포함될 수 있다.

- [0040] 예시적인 일 구현예에서, 상기 핵산 올리고머는 전기천공에 의해 우유 유래 엑소좀 내에 봉입된 것일 수 있다.
- [0041] 예시적인 일 구현예에서, 상기 핵산 올리고머는 RNA 올리고머인 것일 수 있다.
- [0042] 예시적인 일 구현예에서, 상기 핵산 올리고머는 타겟 유전자 발현을 제어하는 작은 RNA (small RNA)인 것일 수 있다.
- [0043] 예시적인 일 구현예에서, 상기 핵산 올리고머는 siRNA인 것일 수 있다.
- [0044] 예시적인 일 구현예에서, 상기 핵산 올리고머는 PTP1B (Protein tyrosine phosphatase 1B) 단백질 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 또는 활성을 억제하는 것일 수 있다.
- [0045] 예시적인 일 구현예에서, 상기 핵산 올리고머는 PTP1B 단백질 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 또는 활성을 억제하는 RNA 올리고머인 것일 수 있다.
- [0046] 예시적인 일 구현예에서, 상기 핵산 올리고머는 PTP1B siRNA인 것일 수 있다. 상기 PTP1B siRNA는 PTP1B의 발현을 저해하는 siRNA를 말한다. PTP1B의 발현 억제는 염증을 감소시키는 것으로 알려져 있다. 그러나, PTP1B siRNA가 봉입된 우유 유래 엑소좀은 대식세포 염증 반응을 억제하지 못하였고 염증성 장질환에 대해서도 치료 효과가 없는 것으로 나타났다. 반면, PTP1B siRNA가 봉입된 우유 유래 엑소좀은 신장 세포에서 염증 반응을 억제하고 신장 기능 장애를 현저하게 개선하는 것으로 나타났다. 이는 PTP1B siRNA가 우유 유래 엑소좀 내에 봉입되어 신장 기능 장애를 특이적으로 개선하는 효과가 있음을 의미한다.
- [0047] 예시적인 일 구현예에서, 상기 PTP1B siRNA는 하기 서열번호 1의 센스 (sense) 서열 및 서열번호 2의 안티센스 (antisense) 서열로 구성된 것일 수 있다. 하기 서열에서 "t"는 RNA의 우라실 (uracil)로 해석된다.
- [0048] 서열번호 1: 5'-ccaggaagataatgactat-3'
- [0049] 서열번호 2: 5'-atactcattatcttcctgg-3'
- [0050] 예시적인 일 구현예에서, 상기 핵산 올리고머가 봉입된 우유 유래 엑소좀은 상기 조성물 전체 중량을 기준으로 0.001 내지 10 중량%로 포함된 것일 수 있다. 다른 예시적인 일 구현예에서, 상기 함량은 0.001 중량% 이상, 0.01 중량% 이상, 0.1 중량% 이상, 1 중량% 이상, 2 중량% 이상, 3 중량% 이상, 4 중량% 이상, 또는 5 중량% 이상이고, 10 중량% 이하, 9 중량% 이하, 8 중량% 이하, 7 중량% 이하, 6 중량% 이하, 5 중량% 이하, 4 중량% 이하, 3 중량% 이하, 2 중량% 이하, 또는 1 중량% 이하인 것일 수 있다.
- [0051] 상기 신장 기능 장애는 신장 기능이 장애를 받은 상태를 말한다. 생체의 내부환경을 유지할 수 없게 된 상태를 신부전이라고 하는데, 상기 신장 기능 장애는 신부전에 이르지 않은 가벼운 장애까지 포함하는 것을 의미한다. 상기 신장 기능 장애는 신장 기능의 일부 또는 전부에 이상이 생긴 것으로, 급성 또는 만성 신장질환을 포함하는 것을 의미한다.
- [0052] 예시적인 일 구현예에서, 상기 신장 기능 장애는 급성 신장 손상 및/또는 신장염에 의해 유발된 것일 수 있다.
- [0053] 예시적인 일 구현예에서, 상기 핵산 올리고머가 봉입된 우유 유래 엑소좀을 포함하는 조성물 및/또는 신장 기능 장애의 개선용 조성물은 급성 신장 손상 및/또는 신장염의 예방, 개선 및/또는 치료용인 것일 수 있다.
- [0054] 예시적인 일 구현예에서, 상기 급성 신장 손상 (acute kidney injury, AKI)은 허혈-재관류 손상 (ischemia-reperfusion injury, IRI)으로 유도된 급성 신장 손상 또는 패혈증으로 유도된 급성 신장 손상인 것일 수 있다.
- [0055] 예시적인 일 구현예에서, 상기 신장염은 신장에 염증이 생긴 질환으로, 신우신장염 또는 사구체신장염인 것일 수 있다. 사구체는 혈액에서 소변을 거르는 곳이며, 신우는 사구체에서 걸러진 소변이 재흡수 등의 과정을 거쳐 수뇨관으로 내려오는 통로이다. 신우신장염은 주로 균에 의한 직접적인 염증으로 생기며, 사구체신장염은 병원균보다는 류머티스 관절염이나 류머티스성 심질환처럼 다른 곳의 세균 감염에 대한 몸의 이상 면역반응 때문에 발생한다. 신장염은 발병 기간에 따라 급성과 만성으로 나뉘 수 있다.
- [0056] 예시적인 일 구현예에서, 상기 신장 기능 장애의 개선은 혈액요소질소 및/또는 크레아티닌 수치를 감소시키는 것일 수 있다.
- [0057] 예시적인 일 구현예에서, 상기 신장 기능 장애의 개선은 증가된 혈액요소질소 및/또는 크레아티닌 수치를 감소

시키는 것일 수 있다.

- [0058] 예시적인 일 구현예에서, 상기 신장 기능 장애의 개선은 신장 손상에 의해 증가된 혈액요소질소 및/또는 크레아티닌 수치를 감소시키는 것일 수 있다.
- [0059] 예시적인 일 구현예에서, 상기 혈액요소질소는 정상군에 비해 급성 신장 손상 시 약 2배 내지 4배 증가한 수치를 나타내며, 본 개시물의 일 측면에 따른 상기 조성물은 상기 증가된 혈액요소질소 수치를 약 30 내지 55% 감소시킬 수 있다. 예를 들어, 급성 신장 손상 시 혈액요소질소 수치는 정상군에 비해 2배 이상, 2.5배 이상, 또는 3배 이상이고, 4배 이하, 또는 3.5배 이하의 수준으로 증가하며, 혈액요소질소 수치가 증가된 대상에게 조성물을 투여할 경우, 증가된 혈액요소질소 수치를 30% 이상, 31% 이상, 32% 이상, 33% 이상, 34% 이상, 35% 이상, 36% 이상, 37% 이상, 38% 이상, 39% 이상, 또는 40% 이상이고, 55% 이하, 54% 이하, 53% 이하, 52% 이하, 51% 이하, 50% 이하, 49% 이하, 48% 이하, 47% 이하, 46% 이하, 45% 이하, 44% 이하, 43% 이하, 42% 이하, 또는 41% 이하 만큼 감소시킬 수 있다.
- [0060] 예시적인 일 구현예에서, 상기 크레아티닌 수치는 정상군에 비해 급성 신장 손상 시 약 4배 내지 8배 증가한 수치를 나타내며, 본 개시물의 일 측면에 따른 상기 조성물은 상기 증가된 크레아티닌 수치를 약 45 내지 65% 감소시킬 수 있다. 예를 들어, 급성 신장 손상 시 크레아티닌 수치는 정상군에 비해 4배 이상, 5배 이상, 또는 6배 이상이고, 8배 이하, 또는 7배 이하의 수준으로 증가하며, 크레아티닌 수치가 증가된 대상에게 조성물을 투여할 경우, 증가된 크레아티닌 수치를 45% 이상, 46% 이상, 47% 이상, 48% 이상, 49% 이상, 또는 50% 이상이고, 65% 이하, 64% 이하, 63% 이하, 62% 이하, 61% 이하, 60% 이하, 59% 이하, 58% 이하, 57% 이하, 56% 이하, 55% 이하, 54% 이하, 53% 이하, 52% 이하, 또는 51% 이하 만큼 감소시킬 수 있다.
- [0061] 예시적인 일 구현예에서, 상기 신장 기능 장애의 개선은 신장 세포에서 염증 반응을 감소시키는 것일 수 있다.
- [0062] 예시적인 일 구현예에서, 상기 약학 조성물은 방부제, 안정화제, 수화제 또는 유화 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염 및/또는 완충제 등의 약제학적 보조제 또는 기타 치료적으로 유용한 물질을 추가로 함유할 수 있으며, 통상적인 방법에 따라 다양한 경구 투여제 또는 비경구 투여제 형태로 제형화할 수 있다.
- [0063] 상기 경구 투여제는 예를 들면, 정제, 환제, 경질 및 연질 캡슐제, 액제, 현탁제, 유화제, 시럽제, 분제, 산제, 세립제, 과립제, 펠렛제 등이 있으며, 이들 제형은 계면 활성제, 희석제 (예: 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로오스 및 글리신), 활택제 (예: 실리카, 탈크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및 폴리에틸렌 글리콜)를 함유할 수 있다. 정제는 또한 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분페이스트, 젤라틴, 트라가칸스, 메틸셀룰로오스, 나트륨 카복시메틸셀룰로오스 및 폴리비닐피롤리딘과 같은 결합제를 함유할 수 있으며, 경우에 따라 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨 염과 같은 붕해제, 흡수제, 착색제, 향미제 및 감미제 등의 약제학적 첨가제를 함유할 수 있다. 상기 정제는 통상적인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 의해 제조될 수 있다.
- [0064] 또한, 상기 비경구 투여 형태로는 경피 투여형 제형일 수 있으며, 예를 들어 주사제, 점적제, 연고, 로션, 젤, 크림, 스프레이, 현탁제, 유제, 패취 등의 제형일 수 있다.
- [0065] 예시적인 일 구현예에서, 상기 약학 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구, 비경구, 직장, 국소, 경피, 정맥 내, 근육 내, 복강 내, 피하 등으로 투여할 수 있으며, 약학 조성물의 유효성분은 투여받을 대상의 연령, 성별, 체중, 병리 상태 및 그 심각도, 투여 경로 또는 처방자의 판단에 따라 달라질 것이다. 이러한 인자에 기초한 적용량 결정은 당업자의 수준 내에 있으며, 이의 1일 투여 용량은 예를 들어 0.001 mg/kg/일 내지 100 mg/kg/일, 또는 0.5 mg/kg/일 내지 50 mg/kg/일이 될 수 있다.
- [0066] 예시적인 일 구현예에서, 상기 식품 조성물은 건강기능식품 조성물인 것일 수 있다.
- [0067] 예시적인 일 구현예에서, 상기 식품 조성물은 액상 또는 고체 상태의 제형일 수 있고, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강보조 식품류 등이 있고, 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 음료인 형태로 사용될 수 있다. 각 제형의 식품 조성물은 해당 분야에서 통상적으로 사용되는 성분들을 제형 또는 사용 목적에 따라 당업자가 어려움 없이 적의 선정하여 배합할 수 있다.
- [0068] 예시적인 일 구현예에서, 상기 식품 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가성분으로 포함할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 예로는 모노사카라이드, 포도당, 과당 등의 디사카라이드, 말토스, 슈크로스 등의 폴리사카라이드, 텍스트린, 시클로텍스트린 등의 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당 알코올 등이 있다. 상기 향미제로는 천연 향미제 (타우마틴, 스테비아 추출물) 및 합성 향

미제 (예를 들어 사카린, 아스파르탐 등)를 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 개시물에 개시된 조성물 100 중량부 당 일반적으로 약 0.01 내지 0.04 중량부, 또는 0.02 내지 0.03 중량부이다.

[0069] 예시적인 일 구현예에서, 상기 식품 조성물은 일 측면에서 여러 가지 영양제, 비타민, 광물 (전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제 (치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그 염, 알긴산 및 그 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산 화제 등을 포함할 수 있다. 다른 측면에서 천연 과일 주스 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 포함할 수 있다. 상기 성분들은 독립적으로 또는 조합하여 사용될 수 있다. 상기 첨가제의 비율은 다양할 수 있으나, 본 개시물에 개시된 조성물 100 중량부 당 약 0.001 내지 20 중량부의 범위에서 선택될 수 있다.

[0070] 다른 측면에서, 본 개시물은 상기 핵산 올리고머가 봉입된 우유 유래 엑소좀을 포함하는 조성물 및/또는 신장 기능 장애의 개선용 조성물의 제조방법으로, (a) 우유로부터 엑소좀을 분리하는 단계; (b) 분리된 엑소좀을 전기천공하여 엑소좀 표면에 미세공극을 형성시키는 단계; 및 (c) 상기 (b) 단계의 전기천공된 엑소좀과 핵산 올리고머를 혼합하는 단계를 포함하는, 핵산 올리고머가 봉입된 우유 유래 엑소좀을 포함하는 조성물의 제조방법을 제공한다.

[0071] 또 다른 측면에서, 본 개시물은 상기 핵산 올리고머가 봉입된 우유 유래 엑소좀을 포함하는 조성물 및/또는 신장 기능 장애의 개선용 조성물의 제조방법으로, (a) 우유로부터 엑소좀을 분리하는 단계; (b) 상기 분리된 엑소좀과 핵산 올리고머를 혼합하는 단계; 및 (c) 상기 혼합물에 전기천공을 가하는 단계를 포함하는, 핵산 올리고머가 봉입된 우유 유래 엑소좀을 포함하는 조성물의 제조방법을 제공한다.

[0072] 예시적인 일 구현예에서, 상기 제조방법은 (c) 단계 후, (d) 엑소좀 내부로 봉입되지 않은 핵산 올리고머를 제거하는 단계를 더 포함하는 것일 수 있다.

[0073] 예시적인 일 구현예에서, 상기 (a) 단계는 (i) 3,000 내지 15,000 ×g에서 30분 내지 2시간 동안 원심분리하여 상층액을 수득하는 단계; (ii) 상기 상층액을 30,000 내지 100,000 ×g에서 1시간 내지 5시간 동안 원심분리하여 중간 층을 수득하는 단계; (iv) 상기 중간 층을 여과하는 단계; 및 (iii) 상기 여과액을 5,000 내지 15,000 ×g에서 30분 내지 1시간 30분 동안 원심분리하여 엑소좀을 수득하는 단계를 포함할 수 있다.

[0074] 예시적인 일 구현예에서, 상기 (a) 단계 후, 10,000 내지 15,000 ×g에서 5분 내지 15분 동안 원심분리 및 여과하여 잔여 불순물을 제거하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0075] 예시적인 일 구현예에서, 상기 전기천공은 250 내지 350 v의 전압을 가하는 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 전압은 250 v 이상, 255 v 이상, 260 v 이상, 265 v 이상, 270 v 이상, 275 v 이상, 280 v 이상, 285 v 이상, 290 v 이상, 295 v 이상 또는 300 v 이상이고, 350 v 이하, 345 v 이하, 340 v 이하, 335 v 이하, 330 v 이하, 325 v 이하, 320 v 이하, 315 v 이하, 310 v 이하, 305 v 이하 또는 300 v 이하일 수 있다.

[0076] 예시적인 일 구현예에서, 상기 전기천공은 3 내지 7회의 펄스를 가하는 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 펄스는 3회 이상, 4회 이상, 또는 5회 이상이고, 7회 이하 또는 6회 이하일 수 있다.

[0077] 예시적인 일 구현예에서, 상기 전기천공은 20 내지 40 ms의 시간 동안 펄스를 가하는 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 펄스는 20 ms 이상, 21 ms 이상, 22 ms 이상, 23 ms 이상, 24 ms 이상, 25 ms 이상, 26 ms 이상, 27 ms 이상, 28 ms 이상, 29 ms 이상 또는 30 ms 이상이고, 40 ms 이하, 39 ms 이하, 38 ms 이하, 37 ms 이하, 36 ms 이하, 35 ms 이하, 34 ms 이하, 33 ms 이하, 32 ms 이하, 31 ms 이하, 또는 30 ms 이하의 시간 동안 가하는 것일 수 있다.

[0078] 이하, 실시예를 통하여 본 개시물을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 개시물을 예시하기 위한 것으로서, 본 개시물의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0079] 실시예 1. 우유 유래 엑소좀 (mEVs)의 분리

[0080] 엑소좀은 다음과 같이 4 °C에서 연속 원심분리에 의해 제조되었다. 소 유래의 시판 저온살균우유 (매일유업)를 JA-14 로터 (Avanti J-E, Beckman Coulter, USA)가 있는 고속 원심분리기를 사용하여 30분 동안 5,000 ×g 및 1시간 동안 12,000 ×g에서 원심분리하였다. 상층액은 40 μm 스트레이너 (93040, SPL, 한국)에 통과시키고 사용할 때까지 -80 °C에서 보관하였다. 여과된 우유를 45 Ti 로터 (Optima XE-100, Beckman Coulter, USA)가 있는 초원심분리기를 통해 1시간 동안 35,000 ×g 및 최대 가속/데칼 (accel/decal)에서 3시간 동안 70,000 ×g으로 원심분리하였다. 용액을 3개의 층으로 분리하고, 중간층을 구멍 크기 0.8, 0.45, 0.2 μm (16592-K, 16555-

K, 16534-K, Sartorius Stedim Biotech, Germany)의 시린지 필터로 순차적으로 여과하였다. 엑소솜으로 간주되는 펠렛을 100,000 ×g에서 1시간 동안 원심분리하여 수득하였다. 엑소솜을 돌베코의 인산완충식염수 (DPBS, LB001, Welgene, 한국)에 재현탁하고 4 °C에서 밤새 회전시켰다. 엑소솜 사용 전 잔여 불순물 제거를 위해 300K Amicon Ultra-0.5 Centrifugal Filter (UFC5100, Merck, Germany)를 이용하여 10분 동안 12,000 ×g에서 원심분리를 진행하였으며, Pierce BCA Protein Assays Kit (23225, ThermoFisher Scientific, USA)를 이용하여 정량하였다.

실시예 2. 핵산 올리고머가 봉입된 우유 유래 엑소솜의 제조 1

상기 실시예 1에서 분리된 우유 유래 엑소솜에 핵산 올리고머로 하기 표 1의 서열을 갖는 PTP1B siRNA를 다음과 같이 전기천공 (electroporation)을 이용하여 봉입하였다 (도 1 참조). 500 μg (1.2×10^{10} particles)의 우유 유래 엑소솜과 500 pmol의 PTP1B siRNA를 전기천공 버퍼에 섞어주었다. 전기천공 전용 버퍼 (GenePulser Electroporation Buffer, Bio-Rad, USA)를 사용하였으며, 우유 유래 엑소솜과 PTP1B siRNA이 혼합된 혼합물 및 전기천공 버퍼는 1 : 2의 중량비의 양으로 사용하였다. 10분간 얼음에서 예비 인큐베이션 (pre-incubation)을 진행한 후, 우유 유래 엑소솜과 PTP1B siRNA가 함유된 전기천공 버퍼를 예비 냉장된 큐벳 (Pre-chilled cuvette)에 투입하였다. 이후, 지수적 감쇠 (exponential decay) 과형으로 200 V (전압), 1,000 μF (전기용량), 샘플 저항 값에 맞추어 전기천공을 실시하였다. 10분간 아이스 인큐베이션 (ice incubation)한 다음 10분간 37 °C에서 인큐베이션하여 핵산 올리고머로 PTP1B siRNA가 봉입된 우유 유래 엑소솜 (PTPi@mEVs)을 수득하였다.

표 1

PTP1B siRNA	5'-CCAGGAAGAUAAUGACUAAU-3' 3'-GGUCCUUCUAAUACUGAUA-5'
-------------	---

실시예 3. 핵산 올리고머가 봉입된 우유 유래 엑소솜의 제조 2

상기 실시예 1에서 분리된 우유 유래 엑소솜에 핵산 올리고머로 상기 표 1의 서열을 갖는 PTP1B siRNA를 다음과 같이 전기천공 (electroporation)을 이용하여 봉입하였다. RNA-free 10× PBS를 DEPC (diethyl pyrocarbonate) Water로 1/50로 희석하여 로딩 버퍼를 준비하였다. 상기 우유 유래 엑소솜 500 μg (4×10^{10} particles)을 상기 준비된 500 μl의 로딩 버퍼에 부유하여 300 V, 20 ms, 5 pulse, 1s interval의 조건으로 전기천공을 실시하였다. 전기천공된 우유 유래 엑소솜을 즉시 EP tube에 옮긴 후 PTP1B siRNA를 500 pmol의 농도로 첨가하고 수차례 섞어주었다. 섞어준 다음, 3시간 동안 4 °C에서 셰이커 위에서 반응시켰다. 반응물을 30kDa-Amicon tube에 넣고 12,000 g에서 10분 동안 원심분리하여 봉입되지 않은 Free-PTP1B를 하층액을 통해 제거하였다. 필터에 걸린 PTP1B siRNA가 봉입된 우유 유래 엑소솜 (PTPi@mEVs)을 PBS에 부유하여 저장하였다.

실험예 1. 우유 유래 엑소솜 내 핵산 올리고머의 봉입 효율 및 안정성 평가

상기 실시예 2에서 제조된 핵산 올리고머가 봉입된 우유 유래 엑소솜에 대해 PTP1B siRNA의 봉입 효율 및 봉입 후 엑소솜의 안정성을 다음과 같이 평가하였다.

PTP1B siRNA가 봉입된 우유 유래 엑소솜을 2% agarose gel에 로딩하여 100 V의 조건으로 20분간 전기영동을 실시하였다. 500 μg의 우유 유래 엑소솜 (mEVs) 및/또는 500 pmol의 PTP1B siRNA (PTPi siRNA)의 존재 하에서 전기천공을 처리하지 않은 샘플을 비교군으로 사용하여 동일한 조건으로 전기영동을 실시하였다. 봉입되지 않은 PTP1B siRNA 밴드의 강도 (intensity)를 기준으로 (도 2에서 가장 왼쪽 실험군 기준) 봉입 효율을 계산하였다. 봉입 효율을 측정한 결과, 약 19.96%의 봉입 효율로 PTP1B siRNA가 우유 유래 엑소솜 내에 봉입된 것을 확인하였다 (도 2 참조).

상기 실시예 1에서 얻은 우유 유래 엑소솜 (mEVs)과 실시예 2에서 얻은 PTP1B siRNA가 봉입된 우유 유래 엑소솜 (PTPi@mEVs) 50 μg 각각을 1 mL의 DW (distilled water)에 첨가하여 DLS (dynamic light scattering, Zetasizer Nano ZS, Malvern Panalytical, UK)를 측정하였다. 또한, 200 mesh copper grid에 상기 실시예 1에서 얻은 우유 유래 엑소솜 (mEVs)과 실시예 2에서 얻은 PTP1B siRNA가 봉입된 우유 유래 엑소솜 (PTPi@mEVs) 10 μg 각각을 부착하여 TEM (transmission electron microscopy, Talos F200X G2 TEM, FEI, USA) 이미지를 실시하였다. 그 결과, 전기천공 이후에도 우유 유래 엑소솜 고유의 물리적 특성이 잘 유지되는 것을 확인하였다.

(도 3 참조).

- [0090] 또한, 상기 실시예 3에서 제조된 핵산 올리고머가 봉입된 우유 유래 엑소솜에 대해서도 PTP1B siRNA의 봉입 효율을 평가한 결과, 상기 실시예 2에서 제조된 핵산 올리고머가 봉입된 우유 유래 엑소솜의 봉입 효율과 유의적인 차이가 없는 것을 확인하였다.
- [0091] **실험예 2. 핵산 올리고머가 봉입된 우유 유래 엑소솜의 신장 세포 내 흡수 여부 평가**
- [0092] 상기 실시예 2에서 제조된 핵산 올리고머가 봉입된 우유 유래 엑소솜이 신장 세포 내로 흡수되는지 여부를 다음과 같이 평가하였다.
- [0093] 본 실험예에서 사용된 신장 세포주는 인간 근위 세뇨관 세포 (Human proximal tubular cell, HK-2)로, 고려대학교 의과대학 신장내과로부터 제공 받아 사용하였다. 신장 세포 내 흡수 여부 평가를 위해 35 Φ 컨포칼 디쉬 (Confocal Dish, 101350, SPL Life Sciences, Korea)에 3.0×10^5 개의 HK-2 세포를 시딩하고 24시간 동안 세포 안정화를 진행하였다.
- [0094] 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 Cy5.5 형광으로 표지된 우유 유래 엑소솜 내에 FAM 형광으로 표지된 PTP1B siRNA를 봉입한 다음, 500 μg의 PTPi@mEVs (95 pmol PTP1B siRNA)를 상기 HK-2가 시딩된 컨포칼 디쉬 배지에 처리하였다. 처리 4시간 후, 세포 내로 흡수되지 않은 잔여 PTPi@mEVs는 37 °C로 예열된 DPBS를 이용하여 워싱하였고, 4% 파라포름알데히드 (4% Paraformaldehyde in PBS (pH 7.4), P2205, 바이오세상, 한국) 2 mL을 처리하여 상온에서 10분간 세포를 고정하였다. 예열된 DPBS를 이용하여 고정액을 워싱하고, 1/1000배 희석된 회색스트 용액 (Hoechst 33258, H3569, Invitrogen, USA)을 이용하여 세포 핵을 염색하였다.
- [0095] 염색 이후, 공초점 현미경 (Confocal Laser Scanning Microscope TCS SP8, Leica, Germany)으로 관찰한 결과, PTP1B siRNA를 단독 처리했을 때 관찰되지 않던 신장 세포 내 PTP1B siRNA의 전달이 PTP1B siRNA를 우유 유래 엑소솜 내에 봉입하였을 때 PTP1B siRNA가 신장 세포로 전달되는 것을 확인하였다 (도 4의 A 참조). 또한, 우유 유래 엑소솜과 PTP1B siRNA의 형광 상관성을 분석한 결과, 0.6821로 강한 상관관계를 보여 PTP1B siRNA가 우유 유래 엑소솜 내에 잘 봉입되어 있음을 확인하였다 (도 4의 B 참조).
- [0096] 또한, 상기 HK-2 신장 세포 1.0×10^5 개를 PBS 500 μL에 시딩하여 1.5 mL Microcentrifuge tube에 분주하였다.
- [0097] 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 Cy5.5 형광으로 표지된 우유 유래 엑소솜 내에 Alexa488 형광으로 표지된 PTP1B siRNA를 봉입한 다음, 500 μg의 PTPi@mEVs (95 pmol PTP1B siRNA)를 상기 HK-2 신장 세포에 처리하였다. 처리 1시간 후, 원심분리기 (Low speed centrifuge, T04B, Hanil, 대한민국)를 이용하여 1,200 rpm으로 3분간 원심분리하여 세포 내로 흡수되지 않은 PTPi@mEVs를 제거하였고, 예열된 DPBS를 이용하여 워싱하였다.
- [0098] 워싱 이후, 유세포 분석기 (CytoFLEX A00-1-1102, Beckman Coulter, USA)로 분석한 결과, 우유 유래 엑소솜 내로 PTP1B siRNA를 봉입한 실험군에서만 신장 세포 내로 PTP1B siRNA가 흡수되었음을 확인하였다 (도 4의 C 및 D 참조).
- [0099] **실험예 3. 핵산 올리고머가 봉입된 우유 유래 엑소솜의 신장질환에 대한 효능 평가**
- [0100] 상기 실시예 2에서 제조된 핵산 올리고머가 봉입된 우유 유래 엑소솜이 손상된 신장 기능의 회복 및 염증 완화 효능이 있는지 여부에 관해 다음과 같이 평가하였다.
- [0101] 급성 신장 손상 모델 마우스는 다음과 같은 방법으로 확립하였다. (1) 동물의 스트레스를 줄이기 위하여 반입 후 검역, 순화 기간을 7일 이상 가졌다. (2) 복강 내 마취 후 양쪽 등을 절개하여 신장 동맥/요관을 동시에 결찰하여 급성 신손상을 유도하였다. (3) 결찰 26분 뒤 클립을 풀어서 혈액의 재관류를 눈으로 확인한 뒤 4-0 나일론 봉합사로 절개부위를 봉합하였다. (4) 대조군은 아무런 전처치를 하지 않고 등을 열었다가 동일한 시간을 노출한 뒤 다시 닫았다 (실험군과 마찬가지로 4-0 나일론 봉합사로 절개부위를 봉합하였다). (5) 수술에 의한 2차 감염을 방지하기 위하여, 봉합 후 70% 에탄올로 수술 부위를 닦아 주고 포비돈 용액을 도포하였다. (6) 마취에서 완전히 회복될 때까지 온열패드 위에서 체온을 유지할 수 있도록 초기 마취 이후 1시간 동안 경과를 관찰하였다. (7) 24시간 후 체중을 측정하여 기존보다 15% 이상 감소하거나 먹이를 먹지 못하는 모습을 보이거나 활동성이 현저하게 저하되는 등 고통스러운 모습을 보일 경우 안락사를 계획하였다. 주로 사용하는 마취제 진통제 항생제 파일에는 케토프로펜 (Ketoprofen), 케토롤락 (Ketorolac)만 기재되어 있는데 두 약물은 신기능에 영향

을 미칠 수 있어서 사용할 수 없기 때문에 40 °C로 따뜻하게 데운 생리식염수 0.5 cc를 피하 수액 공급만 하였다.

[0102] 급성 신손상을 유발하기 6시간 전에 2시간 간격으로 상기 실시예 2에서 얻은 PTP1B siRNA가 봉입된 우유 유래 엑소좀 (PTPi@mEVs) 250 µg/200 µL (in PBS) 또는 PBS 200 µL를 각각 24 게이지 굵기의 경구용 바늘 (Oral Zonde Needle, ZD-S-124, 정도비엔피, 한국)을 이용해 총 3회 경구 투여하였다 (그룹 당 5마리씩 무작위로 구성). 마지막 투여 2시간 후, 상술한 급성 신장 손상을 유발하였고, 24시간 후 모든 실험군으로부터 혈액을 채취하고 신장 조직을 적출하였다. 혈액은 BUN 및 크레아티닌 측정에 사용하였고, 신장 조직은 조직 무게의 50배 볼륨의 RIPA 버퍼에서 갈아 조직 용해물을 만든 후 ELISA를 실시하였다. 또한, 적출한 신장을 파라핀에 임베딩 (embedding)하고 파라핀 블록을 잘라 조직 절편을 슬라이드 글라스에 부착하였다. 파라핀 제거 후 TUNEL 염색 시약, Ly6G, F4/80 특이적 항체를 사용하여 신장 조직 내 병변을 확인하였다.

[0103] 신장 기능 회복 여부 확인을 위해 대표적 신장 기능 지표인 혈액요소질소 (blood urea nitrogen, BUN) 및 크레아티닌 (creatinine)을 측정했을 때, 허혈/재관류 손상에 의해 증가했던 BUN 및 크레아티닌 수치가 PTP1B siRNA가 봉입된 우유 유래 엑소좀의 투여에 의해 감소됨을 확인하였다 (도 5의 A 참조).

[0104] ELISA를 이용하여 조직 내 전염증성 사이토카인의 변화량을 확인했을 때, 신장 손상에 의해 증가했던 전염증성 인자들의 수치가 PTP1B siRNA가 봉입된 우유 유래 엑소좀의 투여에 의해 감소됨을 확인하였다 (도 5의 B 참조).

[0105] 도 6은 신장 조직 내 병변을 확인한 결과를 나타낸 것이다. 조직 내 신장 세포 사멸 여부를 확인하기 위해 TUNEL 염색을 실시한 결과, PTP1B siRNA가 봉입된 우유 유래 엑소좀의 투여에 의해 신장 세포 사멸이 감소됨을 확인하였다. 또한, Ly6G 및 F4/80 염색을 통해 조직 내 염증 관련 세포의 침윤을 확인했을 때, PTP1B siRNA가 봉입된 우유 유래 엑소좀의 투여에 의해 신장 조직 내 염증 관련 세포의 침윤이 감소됨을 확인하였다.

[0106] 실험예 4. 핵산 올리고머가 봉입된 우유 유래 엑소좀의 염증성 장질환에 대한 효능 평가

[0107] 상기 실시예 3에서 제조된 핵산 올리고머가 봉입된 우유 유래 엑소좀이 대식세포 염증 반응 및 염증성 장질환에 미치는 영향에 관해 다음과 같이 평가하였다.

[0108] 1×10^6 개의 RAW 264.7 대식세포 (40071, 한국세포주은행, Korea)를 35 mm의 세포 배양 디쉬에 깔아주고 오버 나이트 배양하였다. PBS (Phosphate buffered saline)로 세척 과정을 거쳐 10% FBS (Fetal Bovine Serum)와 1% AA (Antibiotic-antimycotic)가 포함되지 않는 (-/-) DMEM 배지로 교체한 다음, 상기 실시예 3에서 얻은 250 pmol PTP1B siRNA가 봉입된 250 µg 우유 유래 엑소좀을 처리하였다. Free siR 그룹은 봉입되지 않은 250 pmol PTP1B siRNA를 처리하였고, Free mExo 그룹은 상기 실시예 1에서 얻은 250 µg 우유 유래 엑소좀을 처리하였다. 이후, (+/+) DMEM 배지로 갈아주고 한 번 더 오버나이트 배양하였으며, 1.0 µg/ml 농도의 LPS (Lipopolysaccharide)를 4시간 동안 처리하였다.

[0109] 그 결과, 중합효소 연쇄반응 (PCR)을 통해 LPS를 처리하지 않은 그룹보다 LPS를 처리한 그룹에서 전염증성 사이토카인 TNF-α의 발현이 증가하는 것을 확인하였다. PTP1B siRNA가 봉입된 우유 유래 엑소좀은 전염증성 사이토카인의 발현을 억제하지 못한 것으로 나타났고, 오히려 유의미하게 전염증성 사이토카인의 발현을 증가시키는 것으로 나타났다. 따라서, PTP1B siRNA가 봉입된 우유 유래 엑소좀은 신장 세포에서 신손상에 의한 염증 억제 효과와 달리 대식세포의 염증 반응을 낮추지 못한 것을 확인하였다 (도 7 참조).

[0110] PTP1B siRNA가 봉입된 우유 유래 엑소좀의 염증성 장질환에 대한 효능은 다음과 같이 평가하였다. 먼저, BALB/c (8주령, 암컷) 마우스를 그룹 당 5마리씩 무작위로 구성하여 7일간 순화시키고, 7일간의 순화 후, 각각의 마우스에 약물을 경구투여하였다 (Group 1,2: PBS, Group 3: PTPi@mEVs 10mg/kg).

[0111] Group 1: 대조군 (Sham)

[0112] Group 2: DSS + PBS 처리군 (IBD+PBS)

[0113] Group 3: DSS + PTP1B siRNA가 봉입된 우유 유래 엑소좀 처리군 (IBD+PTP1B)

[0114] 약물은 첫 번째 투여일 기준으로 3일 간격으로 투여되었으며, 총 3회 투여하였다. 약물의 첫 번째 투여 24시간 후 마우스의 정상 식수 (Autoclaved tap water)를 DSS (dextran sulfate sodium)를 2.5%로 녹인 식수 (Autoclaved tap water)로 교체하였다. 2.5% DSS를 8일간 투여 후 정상 식수로 교체하였다. 세 번째 약물 투여 3일 후 마우스를 희생시키고 대장을 채취하였고, 질병 활동 지수 (Disease Activity Index, DAI)는 아래와 같이 평가하였다.

[0115] 첫 번째 약물 투여일부터 마우스의 체중을 측정하였고, 각 개체의 대변을 확인하여 아래 표 2의 질병활성도 점수에 따라 질병 활동 지수를 평가하였다. 대변의 질병활성도 측정은 주관을 제외시키기 위해 3인의 실험자가 측정하여 평균값으로 계산하였다.

표 2

질병활성도	체중 감소 (%)	출혈	대변의 일관성
0	없음	없음	일반
1	1-5%	변에 혈액 약간 있음	부드러움
2	6-10%	변에 혈액 있음	매우 부드러움
3	11-18%	변과 항문에 혈액 있음	물기가 많음
4	>18%	변과 항문에 혈액 많음	설사

[0117] 그 결과, PTP1B siRNA가 봉입된 우유 유래 엑소솜은 신장질환에 대한 치료 효과와 달리 염증성 장질환에 대해 치료 효과를 제공하지 못하는 것을 확인하였다 (도 8 참조).

[0118] 본 개시물의 일 측면에 따른 조성물의 제형예를 아래에서 설명하나, 다른 여러 가지 제형으로도 응용 가능하며, 이는 본 개시물을 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

[0119] 제형예 1. 연질캡셀제

[0120] 실시예 2에서 얻은 PTP1B siRNA가 봉입된 우유 유래 엑소솜 150 mg, 팜유 2 mg, 팜경화유 8 mg, 황납 4 mg 및 레시틴 6 mg을 혼합하고, 통상의 방법에 따라 1 캡슐당 400 mg씩 충전하여 연질캡셀제를 제조하였다.

[0121] 제형예 2. 정제

[0122] 실시예 2에서 얻은 PTP1B siRNA가 봉입된 우유 유래 엑소솜 150 mg, 포도당 100 mg, 홍삼 추출물 50 mg, 전분 96 mg 및 마그네슘 스테아레이트 4 mg을 혼합하고 30% 에탄올 수용액을 40 mg 첨가하여 과립을 형성한 후, 60 °C에서 건조하고 타정기를 이용하여 정제로 타정하였다.

[0123] 제형예 3. 과립제

[0124] 실시예 2에서 얻은 PTP1B siRNA가 봉입된 우유 유래 엑소솜 150 mg, 포도당 100 mg, 홍삼 추출물 50 mg 및 전분 600 mg을 혼합하고 30% 에탄올 수용액을 100 mg 첨가하여 과립을 형성한 후, 60 °C에서 건조하여 과립을 형성한 다음 포에 충전하였다. 내용물의 최종 중량은 1 g으로 하였다.

[0125] 제형예 4. 드링크제

[0126] 실시예 2에서 얻은 PTP1B siRNA가 봉입된 우유 유래 엑소솜 150 mg, 포도당 10 g, 홍삼 추출물 50 mg, 구연산 2 g 및 정제수 187.8 g을 혼합하고 병에 충전하였다. 내용물의 최종 용량은 200 ml로 하였다.

[0127] 제형예 5. 건강식품의 제조

[0128] 실시예 2에서 얻은 PTP1B siRNA가 봉입된 우유 유래 엑소솜... 1000 mg

[0129] 비타민 혼합물

[0130] 비타민 A 아세테이트.....70 µg

[0131] 비타민 E 1.0 mg

[0132] 비타민 B1..... 0.13 mg

[0133] 비타민 B2 0.15 mg

[0134] 비타민 B6..... 0.5 mg

[0135] 비타민 B12..... 0.2 µg

[0136] 비타민 C..... 10 mg

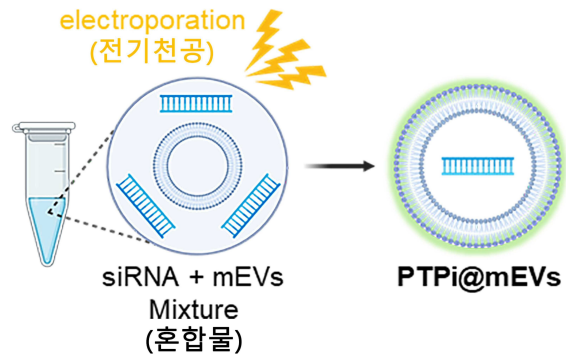
[0137] 비오틴..... 10 µg

[0138] 니코틴산아미드..... 1.7 mg

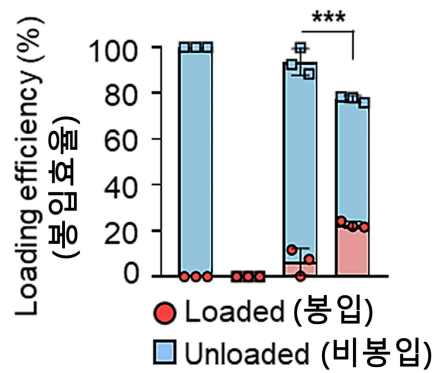
- ul style="list-style-type: none; padding-left: 0;">
- [0139] 엽산..... 50 μ g
- [0140] 판토텐산 칼슘..... 0.5 mg
- [0141] 무기질 혼합물
- [0142] 황산제1철..... 1.75 mg
- [0143] 산화아연..... 0.82 mg
- [0144] 탄산마그네슘..... 25.3 mg
- [0145] 제1인산칼륨..... 15 mg
- [0146] 제2인산칼슘..... 55 mg
- [0147] 구연산칼륨..... 90 mg
- [0148] 탄산칼슘..... 100 mg
- [0149] 염화마그네슘..... 24.8 mg
- [0150] 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.
- [0151] **제형예 6. 건강음료의 제조**
- [0152] 실시예 2에서 얻은 PTP1B siRNA가 봉입된 우유 유래 엑소좀... 1000 mg
- [0153] 구연산..... 1000 mg
- [0154] 올리고당..... 100 g
- [0155] 매실농축액..... 2 g
- [0156] 타우린..... 1 g
- [0157] 정제수를 가하여 전체..... 900 ml
- [0158] 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음 약 1시간 동안 85 $^{\circ}$ C에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2 ℓ 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관하였다. 이후, 통상의 방법에 따라 건강음료 조성물 제조에 사용할 수 있다.
- [0159] 상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 제형예로 혼합 조성하였지만 수요계층이나, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라 그 배합 비율을 임의로 변형 실시하여도 무방하다.
- [0160] 이상, 본 개시물의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시 태양일 뿐이며, 이에 의해 본 개시물의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 개시물의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의해 정의된다고 할 것이다.

도면

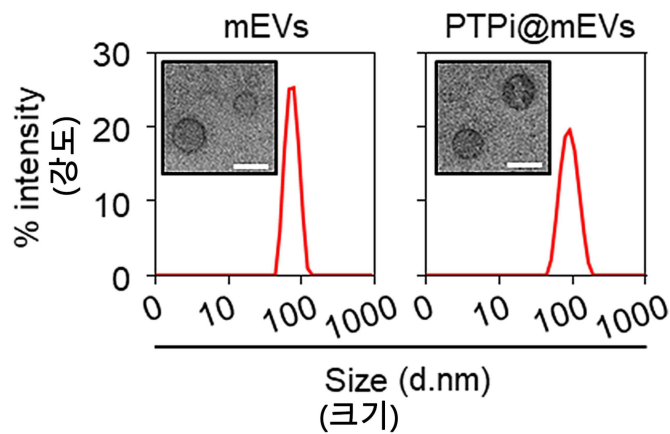
도면1



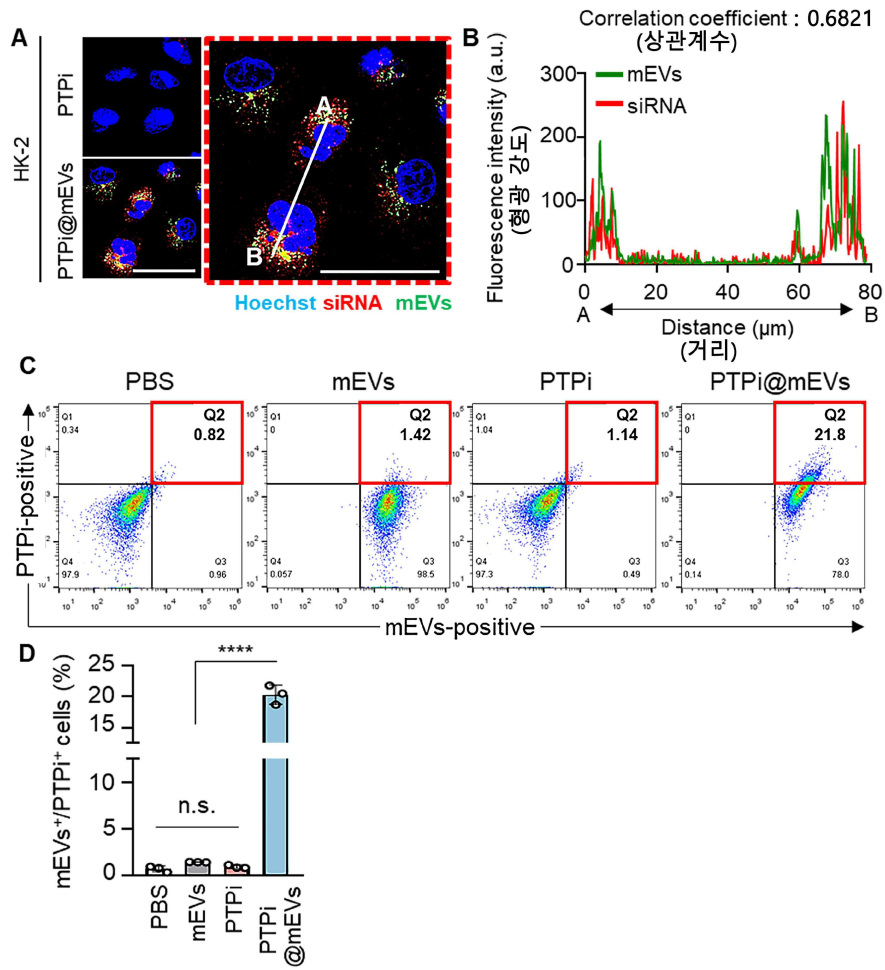
도면2



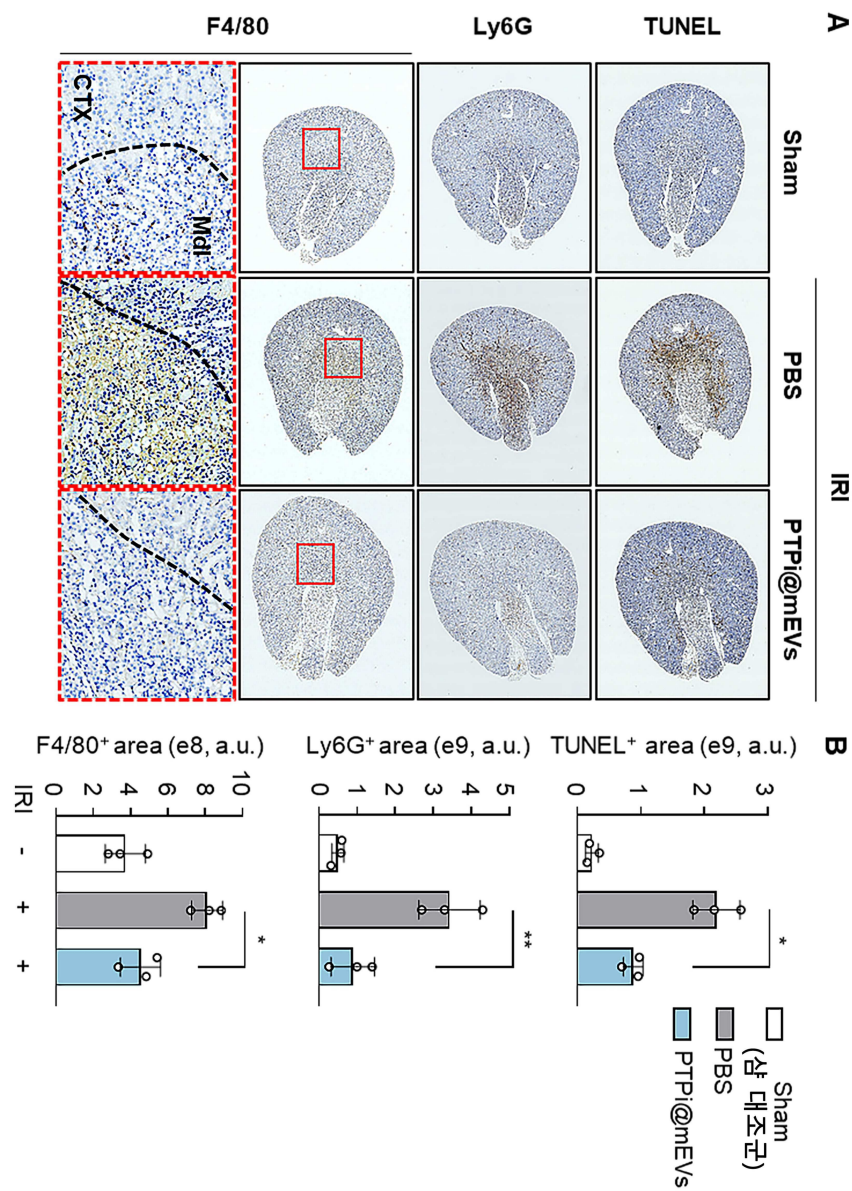
도면3



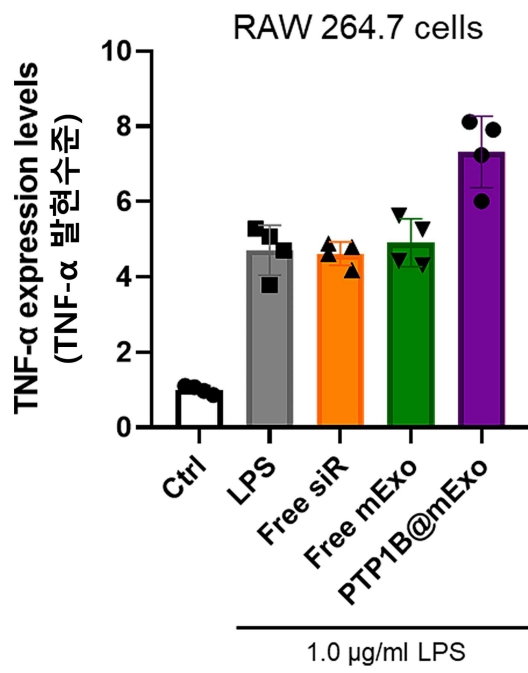
도면4



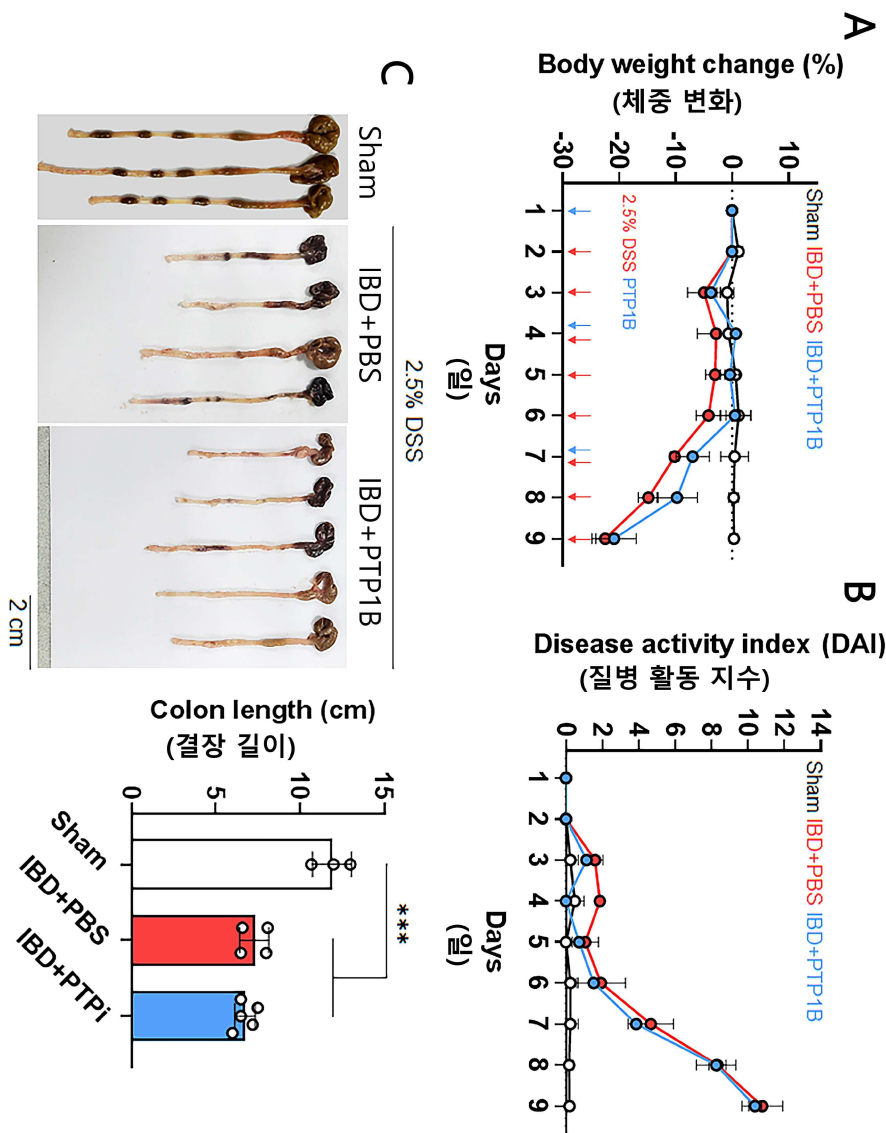
도면6



도면7



도면8



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.