

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호

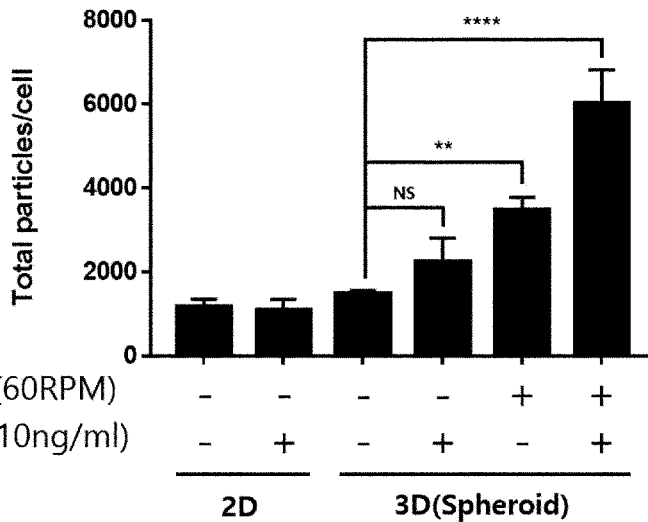
(43) 국제공개일
2021년 11월 4일 (04.11.2021) WIPO | PCT

WO 2021/221471 A1

- (51) 국제특허분류: *C12N 5/0775* (2010.01) *A61K 35/28* (2006.01)
C12M 1/32 (2006.01) *A61P 29/00* (2006.01)
C12M 3/06 (2006.01) *A61P 3/10* (2006.01)
C12M 1/00 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2021/005408
- (22) 국제출원일: 2021년 4월 28일 (28.04.2021)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2020-0051640 2020년 4월 28일 (28.04.2020) KR
- (71) 출원인: 건국대학교 산학협력단 (KONKUK UNIVERSITY INDUSTRIAL COOPERATION CORP) [KR/KR]; 05029 서울시 광진구 능동로 120, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 조쌍구 (CHO, Ssang-Goo); 05039 서울시 광진구 아차산로49길 82, B동 203호, Seoul (KR). 김세희 (KIM, Sehee); 04726 서울시 성동구 금호산길 8, 103동 1002호, Seoul (KR). 임경민 (LIM, Kyung Min); 05010 서울시 광진구 군자로4길 5, 203, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 충현 (CHUNG HYUN PATENT & LAW FIRM); 06779 서울시 서초구 동산로 23 베텔회관 8층, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD,

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING EXTRACELLULAR VESICLES FROM THREE-DIMENSIONALLY CULTURED STEM CELLS

(54) 발명의 명칭: 3차원 배양된 줄기세포로부터 세포의 소포체를 제조하는 방법



(57) Abstract: The present invention relates to a method for producing extracellular vesicles from three-dimensionally cultured stem cells, and the method of the present invention can produce stem cell-derived extracellular vesicles with a high yield by the orbital shaking culture of stem cell aggregates in the presence of TGF-β and thus can be advantageously used in an industrial scale mass-production process of exosomes that can be utilized as a pharmaceutical ingredient substituting for a cell therapeutic agent. Furthermore, the exosomes obtained by the method of the present invention have significantly improved immunoregulatory functions compared with exosomes produced by a conventional method, and therefore can also be applied as an excellent therapeutic composition for various inflammations or autoimmune diseases.

(57) 요약서: 본 발명은 3차원 배양된 줄기세포로부터 세포의 소포체를 제조하는 방법에 관한 것으로, 본 발명의 방법은 TGF-β 존재 하에서 줄기세포 응집체를 회전 진탕 배양(orbital shaking culture)함으로써 줄기세포 유래 세포의 소포체를 높은 수율로 수득할 수 있어, 세포 치료제를 대체하는 약리성분으로 활용될 수 있는 엑소좀을 산업적 규모로 대량 생산하는 공정에 유용하게 이용될 수 있다. 아울러, 본 발명의 방법으로 수득된 엑소좀은 종래 방법으로 생산된 엑소좀에 비하여 면역조절 기능 또한 현저히 개선되어, 다양한 염증 또는 자가면역질환에 대한 우수한 치료 조성물로도 적용될 수 있다.

WO 2021/221471 A1

SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역
내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE,
LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유
럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK,
MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수
하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))

명세서

발명의 명칭: 3차원 배양된 줄기세포로부터 세포외 소포체를 제조하는 방법

기술분야

[1] 본 발명은 줄기세포의 3차원 배양을 통해 줄기세포 유래 세포외 소포체를 고수율로 수득하는 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

[3] 세포외 소포체는 인간과 동물은 물론, 곤충, 식물, 미생물 등 다양한 진핵 세포에서 분비되는 다양한 크기의 지질 이중막 구조의 소포체로서, 이 중 나노수준의 입경을 가지는 미세 소포체를 엑소좀(exosome)이라 한다. 엑소좀은 세포가 함유하는 단백질, 핵산, 지질, 탄수화물 등 특정 분자들을 포함하면서, 지질 이중층으로 이들 분자들을 안정적으로 보호하고 분비 후 다른 세포로 이들을 전달하는 정보 전달 역할을 한다.

[4] 한편 줄기세포를 이용한 재생의학 또는 면역질환 치료에 있어서, 살아있는 줄기세포를 병변부에 직접 이식하는 세포 치료법을 대체하는, 줄기세포로부터 유래된 세포외 소포체를 이용한 치료법이 전임상 시험에서 효능을 보이고 있으며, 몇몇 질병치료에 있어 임상 단계에 진입한 사례도 보고되고 있다. 줄기세포에서 분비되는 엑소좀은 줄기세포가 가지고 있는 항염증 활성 및 재생(self-renewal) 활성과 관련된 핵심 인자를 함유하고 있는 것으로 알려져 있다. 따라서, 세포를 이용하지 않아 치료적 유효량의 세포 확보 및 유지 등의 문제가 있는 기존 세포 치료제의 단점을 극복할 수 있는 새로운 접근으로서 각광받고 있다. 그러나, 일반적으로 유핵세포가 분비하는 엑소좀 개수는 세포 당 1000개 정도에 불과하다. 따라서 엑소좀을 이용한 치료제 기술에서 세포로부터 분리된 엑소좀의 수율을 향상시키는 것은 매우 중요한 문제이다.

[5] 일반적으로 엑소좀은 세포 배양액으로부터 분리되는 방식으로 수득한다. 일반적인 줄기세포 배양 시 2차원 배양을 하는데, 이 경우 다량의 엑소좀을 얻기 위해서는 많은 양의 세포를 배양해야 하기 때문에 결과적으로 비용의 증가를 가져온다. 또한 다수의 세포를 배양한 대량의 세포배양액에서 엑소좀을 분리하는 것은 상당한 노동을 필요로 한다. 엑소좀의 분리 및 정제에는 원심분리 및 TFF(tangential flow filtration)를 주로 사용하는데, 원심분리의 경우 적용할 수 있는 용량이 한정되어 있어 대량의 세포 배양액에서 엑소좀을 분리하는 데에 적합하지 않으며, TFF는 원심분리에 비하여 대량 공정에 적합하다는 장점이 있지만, TFF과정 도중 발생하는 전단 스트레스(shear stress) 및 엑소좀의 손실 등 해결해야 할 문제점들이 많다. 이러한 문제점을 해결하기 위해서 적은 수의 세포 및 소량의 배양액으로 다량의 엑소좀을 수득할 수 있는 효율적인 추출

방법의 개발이 요구되고 있다.

[6]

[7] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

[8]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[9] 본 발명자들은 다양한 유익 성분을 함유하면서도 지질 이중막으로 구성되어 그 자체로 안정적인 약물 전달 시스템으로도 기능하는 줄기세포 유래 세포외 소포체, 구체적으로는 중간엽 줄기세포 유래 엑소좀의 효율적인 수득 방법을 개발하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 줄기세포 응집체를 3차원 배양함으로써 인 비보 조건과 유사한 물리적, 생물학적, 공간적 환경을 제공하면서 동시에 TGF- β (Transforming growth factor beta) 추가계(superfamily) 사이토카인을 첨가할 경우, 엑소좀의 수율 뿐 아니라 염증성 질환 등에 대한 치료 효과와 같은 줄기세포고유의 면역조절 효과 또한 현저하게 향상됨을 발견함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[10] 따라서 본 발명의 목적은 줄기세포 유래 세포외 소포체(extracellular vesicle)의 제조 방법을 제공하는 데 있다.

[11] 본 발명의 다른 목적은 상기 방법으로 제조된 줄기세포 유래 세포외 소포체를 유효성분으로 포함하는 염증 또는 자가면역 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 데 있다.

[12]

[13] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

[14]

기술적 해결방법

[15] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 줄기세포 유래 세포외 소포체(extracellular vesicle)의 제조 방법을 제공한다:

[16] (a) 대상체로부터 분리된 줄기세포를 배양하여 세포 응집체(cell aggregate)를 형성하는 단계; 및

[17] (b) 상기 세포 응집체를 TGF- β (Transforming growth factor beta)를 포함하는 배양액에서 3차원 배양하는 단계.

[18] 본 발명자들은 다양한 유익 성분을 함유하면서도 지질 이중막으로 구성되어 그 자체로 안정적인 약물 전달 시스템으로도 기능하는 줄기세포 유래 세포외 소포체, 구체적으로는 중간엽 줄기세포 유래 엑소좀의 효율적인 수득 방법을

개발하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 줄기세포 응집체를 3차원 배양함으로써 인 비보 조건과 유사한 물리적, 생물학적, 공간적 환경을 제공하면서 동시에 TGF- β (Transforming growth factor beta) 초가계(superfamily) 사이토카인을 첨가할 경우, 엑소좀의 수율 뿐 아니라 염증성 질환 등에 대한 치료 효과와 같은 줄기세포고유의 면역조절 효과 또한 현저하게 향상됨을 발견하였다.

- [19] 본 명세서에서 용어 "세포밖 소포체(extracellular vesicle)"는 다양한 세포에서 다낭체와 원형질막의 융합을 통해 세포 밖 환경으로 분비되는 30-1,000 nm 범위 직경의 지질 이중막 구조의 소낭을 의미한다.
- [20] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 방법으로 제조되는 세포외 소포체는 30 - 150 nm의 평균 직경을 가지며, 보다 구체적으로는 50 - 120 nm의 평균 직경을 가진다. 이러한 범위의 미세 직경을 가지는 세포외 소포체를 엑소좀(exosome)이라 한다.
- [21] 본 명세서에서, 용어“줄기세포(stem cell)”는 조직을 구성하는 각 세포로 분화(differentiation)되기 전 단계의 미분화 세포로서, 특정 분화 자극(환경) 하에서 특정 세포로 분화할 수 있는 능력을 가지는 세포들을 총칭한다. 줄기세포는 세포분열이 정지된 분화된 세포와는 달리 세포분열에 의해 자신과 동일한 세포를 생산(self-renewal)할 수 있고, 분화 자극이 가해지면 자극의 성격에 따라 다양한 세포로 분화될 수 있는, 분화의 유연성(plasticity)을 가지고 있는 것이 특징이다.
- [22] 본 발명에서 이용되는 줄기세포는 줄기세포의 특성, 즉 미분화, 무한정 증식 및 특정세포로의 분화능을 가져 재생하고자 하는 조직으로 분화 유도가 가능한 세포라면 제한 없이 이용될 수 있다.
- [23] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명에서 이용되는 줄기세포는 중간엽 줄기세포이다.
- [24] 본 명세서에서 용어“중간엽 줄기세포”는 지방세포, 골세포, 연골세포, 근육세포, 신경세포, 심근세포로의 분화가 가능한 다분화능(multipotency)을 가진 줄기세포를 의미한다. 중간엽 줄기세포는 소용돌이 모양의 형태와 기본적인 세포표면 표식자 CD73(+), CD105(+), CD34(-), CD45(-)의 발현 정도를 통하여 식별될 수 있으며, 다분화능과 함께 면역 반응을 조절하는 기능도 가진다.
- [25]
- [26] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 단계 (a)는 다중 웰(multi-well) 배양 용기에서 줄기세포를 부유 배양(suspension culture)함으로써 수행된다.
- [27] 본 명세서에서 용어“부유배양(suspension culture)”은 배양대상 세포를 기질(substrate) 등에 고정시키지 않은 채로 배양액 내에서 부유(floating)하는 상태로 배양하는 것을 말한다. 이에, 용어“부유배양”은“3차원 배양(3-dimensional culture)”과 동일한 의미로 사용된다. 부착(adhesion) 의존성인 줄기세포는 부유배양 시에 세포 응집을 일으키며, 이러한 응집에 포함되지 못하고 홀로

부유하는 세포는 세포사(apoptosis)를 유발하여 사멸하게 되므로 세포는 그 부착 특성에 맞는 환경이 조성되어야 한다. 본 발명에 따르면, 복수의 웰을 가지는 다중 웰에서 줄기세포를 부유배양 함으로써 웰 크기에 따른 크기의 세포 응집체가 형성된다. 이에, 본 발명은 동일한 크기와 모양을 가지는 규격화된 줄기세포 응집체를 대량으로 수득할 수 있다.

- [28] 본 명세서에서 용어“세포 응집체(aggregate)”는 단일층(monolayer)이 아닌 3차원적인 성장이 허용된 부유 배양 등의 환경에서 배양된 세포가 자가 조립(self aggregation)을 하면서 형성된 3차원 구조의 세포 응집 덩어리를 의미한다. 3차원 배양의 결과로 만들어진 세포 응집체는 줄기세포가 유래한 생체 내 조직과 유사한 환경을 제공하며, 크기 및 자가 조립된 세포의 수에 따라 구형(sphere)일 수도 있고 구형 이외의 형태일 수도 있다. 구형의 세포 응집체는 스페로이드(spheroid)라고 불리우나, 스페로이드는 기하학적으로 완전한 구형일 필요는 없다.
- [29] 본 명세서에서 용어“세포 배양액”는 당, 아미노산, 각종 영양물질, 무기질 등과 같이 세포의 성장 및 증식에 필수적인 요소를 포함하는, 인 비트로에서 세포 성장 및 증식을 위한 혼합물을 의미한다.
- [30] 세포 배양용 배지에 추가적으로 포함될 수 있는 성분은 예를 들어 글리세린, L-알라닌, L-아르기닌 하이드로클로라이드, L-시스테인 하이드로클로라이드-모노하이드레이트, L-글루타민, L-히스티딘 하이드로클로라이드-모노하이드레이트, L-리신 하이드로클로라이드, L-메티오닌, L-프롤린, L-세린, L-트레오닌, L-발린, L-아스파라긴-모노하이드레이트, L-아스파르트산, L-시스틴 2HCl, L-글루탐산, L-이소류신, L-류신, L-페닐알라닌, L-트립토판, L-티로신 디소듐염 디하이드레이트, i-이노시톨, 티아민 하이드로클로라이드, 나이아신아미드, 피리독신 하이드로클로라이드, 바이오틴, D-판토텐산칼슘, 엽산, 리보플라빈, 비타민 B₁₂, 염화나트륨(NaCl), 탄산수소나트륨(NaHCO₃), 염화칼륨(KCl), 염화칼슘(CaCl₂), 인산수소나트륨 모노하이드레이트(NaH₂PO₄-H₂O), 황산동 펜타하이드레이트(CuSO₄-5H₂O), 황산제이철 헵타하이드레이트(FeSO₄-7H₂O), 염화마그네슘(무수), 황산마그네슘(MgSO₄), 인산수소이나트륨(Na₂HPO₄), 황산아연 헵타하이드레이트(ZnSO₄-7H₂O), D-글루코즈(덱스트로즈), 소듐 피루베이트, 히포크산틴 Na, 리놀렌산, 리포산, 푸트레신 2HCl 및 티미딘을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [31] 본 발명에 따른 세포 배양용 배지는 인위적으로 제조하여 사용하거나, 혹은 상업적으로 시판되는 것을 구입하여 사용할 수 있다. 상업적으로 시판되고 있는 배양용 배지의 예는 IMDM(Iscove's Modified Dulbecco's Medium), α-MEM(Alpha Modification of Eagle's Medium), F12(Nutrient Mixture F-12) 및 DMEM/F12(Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12)를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[32]

[33] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 다중 웰(multi-well) 배양 용기는 웰 당 300 - 500 μ m의 크기를 가진다. 보다 구체적으로는 350-450의 크기를 가지며, 가장 구체적으로는 약 400 μ m의 크기를 가진다

[34]

본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 부유배양은 상기 다중 웰(multi-well) 배양 용기 내 웰 당 300- 500개의 세포를 분주함으로써 이루어진다. 보다 구체적으로는 350- 450개, 가장 구체적으로는 약 400개의 세포를 분주한다.

[35]

본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명에서 이용되는 TGF- β 는 TGF- β 1, TGF- β 2 또는 TGF- β 3이며, 보다 구체적으로는 TGF- β 3이다.

[36]

본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 단계 (b)는 상기 세포 응집체를 부유 상태에서 회전 진탕 배양(orbital shaking culture) 함으로써 수행된다.

[37]

보다 구체적으로는, 상기 회전 진탕 배양은 50 - 70 rpm의 회전속도로 수행된다. 보다 구체적으로는 53 - 67 rpm, 보다 구체적으로는 55 - 65 rpm, 가장 구체적으로는 57 - 63 rpm의 회전속도로 수행된다.

[38]

[39]

본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 방법은 상기 단계 (b)에서 수득한 배양액으로부터 복수 회의 원심분리를 통해 세포의 소포체를 분리하는 단계를 추가적으로 포함한다.

[40]

종래 방법으로 배양된 줄기세포로부터 원심분리를 통해 세포의 소포체를 수득할 경우 원심분리의 용량 한계로 인해 충분한 양의 세포의 소포체를 확보하기 어려웠으나, 본 발명의 방법으로 배양된 줄기세포는 세포 당 세포의 소포체의 분비량이 현저하게 증가됨으로써 원심분리 만으로도 치료적 유효량의 세포의 소포체를 용이하게 수득할 수 있다.

[41]

[42]

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 본 발명의 방법으로 제조된 줄기세포 유래 세포의 소포체를 제공한다.

[43]

본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 본 발명의 방법으로 제조된 줄기세포 유래 세포의 소포체를 유효성분으로 포함하는 염증 또는 자가면역 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[44]

본 발명에서 이용되는 줄기세포 유래 세포의 소포체에 대해서는 이미 상술하였으므로, 과도한 중복을 피하기 위해 그 기재를 생략한다.

[45]

본 명세서에서 용어“예방”은 질환 또는 질병을 보유하고 있다고 진단된 적은 없으나, 이러한 질환 또는 질병에 걸릴 가능성이 있는 대상체에서 질환 또는 질병의 발생을 억제하는 것을 의미한다.

[46]

본 명세서에서 용어“치료”는 (a) 질환, 질병 또는 증상의 발진의 억제; (b) 질환, 질병 또는 증상의 경감; 또는 (c) 질환, 질병 또는 증상을 제거하는 것을 의미한다. 본 발명의 조성물은 T 세포 매개 면역활성을 효율적으로 억제함으로써

과도하거나 원치 않는 면역반응을 원인으로 하는 다양한 염증 또는 자가면역 질환의 증상의 발전을 억제하거나, 이를 제거하거나 또는 경감시키는 역할을 한다. 따라서, 본 발명의 조성물은 그 자체로 이들 질환 치료의 조성물이 될 수도 있고, 혹은 염증 또는 자가면역 질환에 대한 치료효과를 가지는 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.

[47] 본 명세서에서 용어“투여”본 발명의 조성물의 치료적 유효량을 대상체에 직접적으로 투여함으로써 대상체의 체내에서 동일한 양이 형성되도록 하는 것을 말하며, “이식”또는“주입”과 동일한 의미를 가진다.

[48] 본 발명에서 용어“치료적 유효량”은 본 발명의 조성물을 투여하고자 하는 개체에게 치료적 또는 예방적 효과를 제공하기에 충분한 정도로 함유된 조성물의 함량을 의미하며, 이에“예방적 유효량”을 포함하는 의미이다.

[49] 본 명세서에서 용어“대상체”는 제한 없이 인간, 마우스, 래트, 기니아 피그, 개, 고양이, 말, 소, 돼지, 원숭이, 침팬지, 비비 또는 붉은털 원숭이를 포함한다. 구체적으로는, 본 발명의 대상체는 인간이다.

[50] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물로 예방 또는 치료되는 자가면역질환 또는 염증성 질환은 예를 들어 류마티스 관절염, 반응성 관절염, 1형 당뇨병, 2형 당뇨병, 전신성 홍반성 낭창, 다발성경화증, 특발성섬유성폐포염, 다발성근염, 피부근염, 국한피부경화증, 전신피부경화증, 대장염, 염증성 장질환, 조르젠신드롬(Sjorgen's syndrome), 레이노현상(Raynaud's phenomenon), 베첵병(Bechet's disease), 가와사키병(Kawasaki's disease), 원발성담즙성경화증(primary biliary sclerosis), 원발성경화성담관염(primary sclerosing cholangitis), 궤양성대장염(ulcerative colitis), 이식편대숙주병(Graft-versus-host disease, GVHD) 및 크론병(Crohn's disease)을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[51] 본 발명의 조성물이 약제학적 조성물로 제조되는 경우, 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다.

[52] 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.

- [53] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 구체적으로는 경구, 정맥, 피하 또는 복강 투여될 수 있다.
- [54] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 바람직한 투여량은 성인 기준으로 0.001-100 mg/kg 범위 내이다.
- [55] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액, 시럽제 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [56] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 본 발명의 줄기세포 유래 세포의 소포체를 유효성분으로 포함하는 조성물을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 염증 또는 자가면역 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [57]
- [58] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 퍼옥시레독신-4 (Peroxiredoxin-4), 티오레독신 환원효소 1(Thioredoxin reductase 1) 및 프로스타글란딘 G/H 신타아제 2(prostaglandin G/H synthase 2)로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 단백질을 고발현하는 줄기세포 유래 세포의 소포체(extracellular vesicle)를 제공한다.
- [59] 본 발명에 따르면, 본 발명의 방법으로 배양된 중간엽 줄기세포에서 분리한 세포의 소포체, 예를 들어 엑소솜은 종래의 방법으로 수득한 엑소솜과 비교하여 단백질 발현 프로파일에 있어서도 명확한 차이를 보인다. 하기 실시예에서 보는 바와 같이, 상기 3가지 단백질은 2차원 배양 또는 TGF- β 3 처리 없이 3차원 배양만 적용한 중간엽 줄기세포 유래 엑소솜에 비해 유의하게 고발현되는 단백질로서, 본 발명의 방법에 의해 수득된 엑소솜의 조성 자체도 종래에 존재하지 않던 신규한 조성을 가짐을 알 수 있다.
- [60] 본 명세서에서 용어“고발현”은 본 발명의 방법에 의하지 않고 종래 방법에 의해 수득한 중간엽 줄기세포 유래 엑소솜과 비교하여 특정 단백질 등의 엑소솜 내 함량, 분비량 또는 발현량이 측정 가능할 정도로 유의하게 증가한 것을 의미하며, 구체적으로는 함량, 분비량 또는 발현량이 40% 이상 증가한 것을 의미하고, 보다 구체적으로는 60% 이상 증가한 것을 의미하며, 보다 더 구체적으로는 80% 이상 증가한 것을 의미하고, 가장 구체적으로는 100% 이상 증가한 것을 의미한다.
- [61] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 세포의 소포체는 HSP90- β (heat shock protein 90- β), 네프릴리신(Neprilysin), T-복합체 단백질 1(TCP1)

서브유닛- α , 필라민-A(Filamin-A), 40S 리보솜 단백질 S3, 미오신-9, 트랜스알돌라제, 패신(Fascin), 티오레독신 환원효소 1, RUVBL 2(RuvB-like 2)로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 단백질을 추가적으로 고발현한다.

- [62] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 세포외 소포체는 코로닌-1A(Coronin-1A), 프로릴 4-하이드록실레이즈 서브유닛 α -2(Prolyl 4-hydroxylase subunit α -2) 및 퓨린 뉴클레오사이드 포스포릴라아제(purine nucleoside phosphorylase)로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 단백질에 대해 양성이다. 본 발명에 따르면, 상기 3가지 단백질은 2차원 배양 또는 TGF- β 3 처리 없이 3차원 배양만 적용한 중간엽 줄기세포 유래 엑소솜에서는 검출되지 않는 단백질로서, 본 발명의 방법에 의해 수득된 엑소솜은 전혀 새로운 단백질 발현 프로파일을 가짐을 알 수 있다.

[63]

발명의 효과

- [64] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[65] (a) 본 발명은 3차원 배양된 줄기세포로부터 세포외 소포체를 제조하는 방법을 제공한다.

[66] (b) 본 발명의 방법은 TGF- β 존재 하에서 줄기세포 응집체를 회전 진탕 배양(orbital shaking culture)함으로써 줄기세포 유래 세포외 소포체를 높은 수율로 수득할 수 있어, 세포 치료제를 대체하는 약리성분으로 활용될 수 있는 엑소솜을 산업적 규모로 대량 생산하는 공정에 유용하게 이용될 수 있다.

[67] (c) 아울러, 본 발명의 방법으로 수득된 엑소솜은 종래 방법으로 생산된 엑소솜에 비하여 면역조절 기능 또한 현저히 개선되어, 다양한 염증 또는 자가면역질환에 대한 우수한 치료 조성물로도 적용될 수 있다.

[68]

도면의 간단한 설명

[69] 도 1은 본 발명의 방법에 따른 중간엽 줄기세포 3차원 배양과정을 나타낸 그림으로, 배아체 형성(도 1a) 및 회전 교반기를 이용한 3D 배양(도 1b) 과정을 각각 보여준다.

[70] 도 2는 각 배양조건에 따른 엑소솜 수율을 나타낸 그림이다.

[71] 도 3은 TGF- β 처리에 의한 PDI 값의 변화를 나타내는 그림으로, TGF- β 를 처리한 3D 진탕 배양 조건에서는 단일 피크(one peak)가 나타남을 보여준다.

[72] 도 4는 TGF- β 가 T 세포 증식에 미치는 영향을 보여주는 그림이다. 각각PHA를 이용하여 PBMC의 증식을 유발한 뒤 음성 대조군(무처리군), 양성 대조군(MSC 처리군), 3D 진탕 배양 조건 만을 적용한 엑소솜(3D-EV), 3D 진탕 배양 조건 하에서 TGF- β 3를 배양액에 첨가하여 얻어진 엑소솜(T-3D-EV)의 T 세포 억제효과를 확인하였다(도 4a). 그 결과, TGF- β 를 처리한 3D 진탕 배양 조건을 통해 수득한 엑소솜(T-3D-EV)이 가장 현저한 T 세포 억제효과를 가지는 것으로

확인되어(도 4b 및 4c), 본 발명의 방법으로 인해 수득된 엑소좀은 수율 뿐 아니라 기능도 강화되었음을 보여준다.

- [73] 도 5a는 동적 광산란(dynamic light scattering, DLS) 분석을 통해 엑소좀의 크기를 조사한 결과를 보여주는 그림이다. 도 5b는 엑소좀의 형태 및 구조를 투과전자현미경(TEM)으로 관찰한 결과이다. 도 5c는 CD9, CD63, Flotillin-1 및 Alix의 발현을 확인하기 위한 웨스턴 블롯팅 분석 결과를 나타낸다. 도 5d는 유세포 분석을 통해 엑소좀 표면의 면역 표현형 분석을 수행한 결과를 보여준다.
- [74] 도 6은 본 발명의 엑소좀에 의한 피부상피세포(Keratinocyte, HaCaT)에서의 상처 치유 능력을 조사한 결과를 나타낸다.
- [75] 도 7은 클러스터링 분석을 통해 도출된 4개의 클러스터 중 본 발명의 방법으로 수득한 엑소좀인 T-3D-EV 시료에서 특이적으로 변화하는 단백질을 보여주는 그림이다.
- [76] 도 8은 본 발명의 엑소좀에서 특징적인 발현 양상을 보이는 단백질들의 생물학적 특징을 비교 분석한 결과를 보여준다.
- [77] 도 9는 도출된 세 개 클러스터의 단백질들의 생물학적 기능 및 이의 면역관련 특징을 보여주는 그림이다.
- [78] 도 10은 주성분 분석(Principal component analysis)을 통해 각 그룹 간의 분리 정도를 Discrimination index를 사용하여 나타낸 결과를 보여준다.
- [79] 도 11은 유전자 세트 농축 분석 결과로, 농축된 유전자 세트, 표준화된 농축 점수(NES) 및 p-값을 각각 보여준다.
- [80] 도 12는 본 발명에서 농축된 유전자 그룹을 도시한 그림이다.
- [81] 도 13 및 14는 본 발명의 방법으로 수득한 엑소좀에서 3D 배양군에 비해 2배 이상 증가 또는 감소한 단백질(도 13) 및 본 발명의 방법으로 수득한 엑소좀에서만 발현된 단백질(도 14)를 각각 나열한 그림이다.
- [82] 도 15는 본 발명의 방법으로 수득한 엑소좀에서 염증 관련 단백질의 발현 양상을 보여주는 그림이다.

[83]

발명의 실시를 위한 형태

- [84] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[85]

[86] 실시예

[87] 실시예 1: 중간엽 줄기세포의 3차원 세포 배양

[88] 줄기세포의 3차원 세포배양을 위해 웰당 400 μ m 크기의 마이크로웰 약 7000개를 포함하는 AggreWell™400(STEMCELL Technologies; #34425)에 F127

용액을 처리하고 웰당 약 400개의 텃줄유래 중간엽 줄기세포(서울대병원, 건국대학교 생명윤리위원회 승인번호:001355-201705-BR-181)를 씨당하여 120~200 μ m 직경 범위의 균일한 스페로이드(spheroid)를 생산하였다. 비-흡착 배양 접시에 TGF- β 3가 포함된 배양액에 스페로이드를 씨당한 후 3일간 회전 진탕기(orbital shaker, INFORS HT Celtron; #69455)로 60 rpm, 37°C로 진탕 배양(shaking culture)하였다. 3일 후 얻어진 배양액에서 엑소솜을 분리하였다.

[89]

[90] **실시예 2: 엑소솜 분리 및 정량**

[91] 배양액을 300g로 10분간 원심분리하여 세포 찌꺼기를 제거하고, 2000g로 10분간 원심분리 후 상등액을 새로운 튜브로 옮긴 다음 다시 10,000g로 30분간 원심분리하여 다시 상등액을 187,000g로 2시간 동안 원심분리하여 펠렛에서 엑소솜을 수득하였다. 배양액에서 엑소솜을 분리한 후 NTA 장비(NS300, NANOSIGHT System)를 이용하여 제조자의 지시에 따라 NTA(nanoparticle tracking analysis)를 수행함으로써 엑소솜의 수 및 피크(peak)를 확인하였다. 그 결과, 진탕(shaking, 60 rpm) 없이 3D 배양만 적용한 경우 일반적인 2D 배양 환경과 수율에 큰 차이가 없어, 3차원 배양 자체에 의한 효과는 유의하지 않은 것으로 나타났다. 아울러, 진탕(60 rpm) 없이 3D 배양에서 TGF- β 3만 첨가하거나, TGF- β 3 없이 3D 진탕 배양 조건만을 적용한 경우에 비하여, 3D, 진탕(60 rpm) 및 TGF- β 3를 모두 적용한 군에서 현저한 수율 증가를 확인할 수 있었다(도 2). 아울러, TGF- β 를 처리한 3D 진탕 배양 조건에서는 단일 피크(one peak)가 나타남으로써 균질의 엑소솜이 생산되는 것으로 확인되었다(도 3).

[92]

[93] **실시예 3: PBMC 증식 어세이**

[94] 실시예 2의 방법으로 수득한 엑소솜에 대해 종래에 보고된 방법에 따라(Hsu, P.J., et al. *J. Vis. Exp.* (106), e53265, doi:10.3791/53265(2015)) PBMC 증식 어세이를 수행함으로써 TGF- β 를 처리한 배양액에서 얻어진 엑소솜이 대조군(일반 세포배양액)에 비해 T 세포 억제 효과가 있는지를 확인하였다. 혈액(건국대학교병원, 건국대학교 생명윤리위원회 승인번호:7001355-201705-BR-181)에서 피콜(ficoll)을 이용하여 PBMC를 분리한 다음 배양 5일 뒤 CFSE(Carboxyfluorescein succinimidyl ester, Invitrogen; #C34554)로 PBMC를 염색하고 유세포 분석을 통해 PBMC의 증식을 확인하였다. PHA(Phytohaemagglutinin, Sigma; #L1668)를 처리하여 T 세포의 증식이 수반되는 염증환경을 유도한 뒤 중간엽 줄기세포 자체의 PBMC 억제 효과를 양성 대조군으로 설정한 후 일반 세포배양액에서 얻어진 엑소솜(EV); 3D 진탕 배양 조건만을 적용한 엑소솜(3D-EV)와, 3D 진탕 배양 조건 하에서 TGF- β 3를 배양액에 첨가하여 얻어진 엑소솜(T-3D-EV)의 PBMC 억제 효과를 확인하였다(도 4a). 그 결과, TGF- β 를 처리한 3D 진탕 배양 조건을 통해 수득한 본 발명의 엑소솜이 43.1%에 달하던 MSC 처리군의 증식성 T 세포를 9.6%까지

감소시켜 양성 대조군에 비해서도 80%에 가까운 현저한 감소율을 보이면서 가장 우수한 T 세포 억제효과를 나타냈다(도 4b 및 4c). 이에, 본 발명의 방법을 통해 수득된 엑소좀은 수율 뿐 아니라 기능도 크게 강화되었음을 알 수 있었다.

[95]

[96] 실시예 4: 각 엑소좀의 특성 분석

[97] 엑소좀의 크기는 Nano Zetasizer(Malvern Instruments, Malvern, UK)를 이용한 동적 광산란(dynamic light scattering, DLS) 분석을 통해 조사하였으며, EV의 수는 나노입자 추적 분석기 NS300(Nanosight, Amesbury, UK)을 이용하여 측정하였다. 엑소좀의 형태 및 구조는 80kV에서 투과전자현미경(TEM, JEM-1010, Nippon Denshi, Tokyo, Japan)을 이용하여 분석하였으며, 관찰 결과 엑소좀의 형태는 컵 또는 구형이었다(도 5b).

[98] Grid(Formvar/Carbon 300 Mesh, Copper_FCF300-CU 50/pk) 위에 엑소좀을 부착하고, 1% 포스포텅스텐산 수화물(sigma, P4006)를 이용하여 음성염색을 실시하였다. 엑소좀-관련 양성 마커를 확인하기 위해, 면역블롯팅으로 CD9(ab263023, abcam), CD63(ab134045, abcam), Flotillin-1(#18634, CST), Alix(#2171, CST) 단백질의 발현을 조사하였다. 웨스턴 블롯팅 결과 엑소좀의 양성 마커는 발현이 되었고, 엑소좀 음성 마커인 GM130(#12480, CST) 단백질 발현은 관찰되지 않았다.

[99]

[100] 유세포 분석을 통해 엑소좀 표면의 면역 표현형 분석을 수행하였다. 먼저, 엑소좀의 크기는 유세포분석기를 이용하여 분석할 수 없는 크기이기 때문에 엑소좀의 양성마커인 CD9 항체가 결합되어 있는 2.7um Dynabead(10620D, invitrogen, Exosome-Human CD9 Flow Detection Reagent (from cell culture))를 엑소좀에 붙여 크기를 키워준 후 CD9-BV421(BD Bioscience, 743047), CD63-PE(BD Bioscience, 556020), CD81-APC(macs miltenyi biotec, M130-119-787) 항체로 표지하였다. 후에 유세포 분석기(Beckman Coulter, CytoFlex Flow Cytometry Analyzer)를 이용하여 표지된 항체에서 생성되는 형광강도를 측정하였다. 그 결과, 엑소좀에서 CD9, CD63, CD81의 형광 발현량이 96% 이상 발현되는 것을 확인하였다. 분리된 엑소좀이 엑소좀 양성마커가 96~98% 발현되는 것으로 미루어보아 균질한 엑소좀이 분리되었음을 확인할 수 있다.

[101]

[102] 실시예 5: 각 엑소좀의 상처 치유능 분석(Wound healing Assay)

[103] 엑소좀의 피부상피세포(Keratinocyte, HaCaT)에서의 치유 능력을 평가하기 위해, HaCaT 세포를 배양접시에 접종하고 90%까지 키운 후 1000 μ l 팁 끝을 이용하여 길게 상처를 냈다. 이후 엑소좀(1E+10 particles/ml)이 포함된 세포 배양배지(Dulbecco's Modified Eagle's Medium-high glucose, D6429, sigma)로 교체 후, 일정한 시간마다 상처부위를 촬영하여 상처가 치유되는 능력을 분석하였다.

[104] 그 결과, 엑소좀을 처리한 군에서 모두 음성대조군보다 빠르게 상처부위가

달히는 것을 확인하였으며, 3D 진탕 배양만 적용한 군(3D-EV) 보다 TGF- β 3 및 3D 진탕 배양을 모두 적용한 군(T-3D-EV)에서 더욱 빠르게 상처부위가 달히는 것을 확인하였다(도 6).

[105]

[106] 실시예 6: 엑소좀 발현 단백질의 분석

[107] 단백질 추출 및 정량 분석

[108] 각 겔에서 염색된 단백질들은 in-gel digestion 방법을 통해 펩타이드를 제조하고 추출하였다. 상세하게는, 단백질의 탈염색을 위해 50 mM 이탄산암모늄과 50% 아세트나이트릴이 구성된 용액과 100% 아세트나이트릴 용액을 이용하여 수행한 후, 50 mM의 디티오프레itol(dithiothreitol)을 이용하여 37°C에서 이황화 결합(disulfide bond)을 환원시키고, 55 mM의 요오드아세트아미드(iodoacetamide)를 이용하여 빛 차단 조건에서 알킬화 반응을 수행한 후, 100% 아세트나이트릴 용액을 이용하여 탈수화 과정을 수행하였다. 50 mM 이탄산암모늄에 녹여져 있는 LysS/트립신 혼합 프로테아제를 사용하여 펩타이드를 제조하였다. 추출된 펩타이드는 0.1% 포름산으로 녹여 액체크로마토그래피(Liquid chromatography, LC)와 결합된 질량분석을 수행하였다. 질량분석 장비는 장비는 Q-Exactive Plus (Thermo, USA)을, 액체크로마토그래피는 UltiMate™ 3000 RSLCnano System (Thermo, USA)를 사용하였으며 펩타이드 시료는 5 μ l씩 주입하여 250 μ l/min의 유속으로 NanoLC와 연동된 이온 트랩 질량 분석기(Ion trap mass spectrometer)로 분석을 수행하였다. LC는 용액 A(5% 디메틸설폭시화물, 0.1% 포름산)와 용액 B(95% 아세트나이트릴, 0.1% 포름산, 5% 디메틸설폭시화물)의 농도 구배 150분을 포함하여 총 200분 동안 분리하며 사용하는 분석 컬럼은 C18(2 μ m, 100 Å)을 충전한 내직경 75 μ m, 외직경 360 μ m, 길이 50cm의 융합 실리카 모세관 컬럼을 사용하여 펩타이드 혼합체를 분리하였다. 분리된 펩타이드는 질량분석기로 주입하여 스펙트럼 데이터를 획득하였다. 오비트랩(Orbitrap) MS 분석은 350~1800 m/z 범위에 대해 이온 트랩 MS로 1번의 서베이 스캔(survey scan, 해상도 70,000) 후에 HCD(Higher energy collision dissociation, 27% energy level) 방식을 이용하여 오비트랩 MS를 이용, 20번의MS/MS(해상도 17,500) 분석을 수행하였다. 20초의 dynamic exclusion option을 통해 중복된 펩타이드 이온 검출을 최소화하였다. 이온 트랩의 Auto gain control target setting은 Full MS에 대해서는 3E06를, FT MS/MS에 대해서는 1E5을 사용하였다. 획득한 RAW 파일을 Andromeda 알고리즘 기반의 데이터 베이스 분석 소프트웨어인 MaxQuant (version 1.6.10.43, <https://www.maxquant.org/>)를 이용하여 정성 분석 및 비표지 정량 분석을 수행하였다. 시스테인(Cysteine)에는 시스테인 카바미도메틸화를 고정값(Fixed modification)으로 처리하고, 메티오닌(Methionine)에 산화를 변동값(Variable modification)으로 하여 수행하였다. 단백질 서열 데이터베이스는 2019년 10월 발표된 인간 SwissProt database를 사용하며 비표지 정량을 위해서 MaxLFQ

알고리즘을 사용하여 단백질 정량값을 도출하였다. 동정된 단백질들을 Perseus (<http://www.perseus-framework.org>)를 이용하여 히트 맵(heat map) 및 클러스터링 분석과 주성분 분석을 수행하였다. 각 클러스터의 단백질의 특징을 확인하기 위해 ClueGO, ShinyGO v0.60, GSEA 프로그램을 사용하였다.

[109] 정량분석을 수행하여 얻은 데이터에서 각 시료에 따라 단백질 발현 패턴의 변화를 지표로 정량법을 통하여 단백질체를 정량하고, 시료 간의 패턴 변화에 따라 단백질들의 군을 4개의 클러스터(cluster)로 분류하였다. 4개의 클러스터 중 본 발명의 방법으로 수득한 엑소솜인 T-3D-EV 시료에서 특이적으로 변화하는 단백질들을 선별하여 이를 도 7에 도시하였다.

[110]

[111] 단백질의 생물학적 특징 비교 분석

[112] 본 실험은 T-3D-EV에서 특이적인 특징을 가지는 단백질을 발굴하기 위해 비교군으로서 TGF- β 3 처리 없이 3D 진탕 배양만 적용한 군(3D-EV) 및 2D 배양 군(2D-EV)에서의 단백질 발현 양상을 비교분석하였다. 도 8에 나타낸 바와 같이, T-3D-EV에서 특이적으로 변화하는 단백질 그룹은 해당(glycolytic) 과정, 상처 치유 염증 반응 관련 연결 조직 대체, 혈소판 형성, 오탄당 인산 경로, 산화 지점 등의 특징이 확인되었고, 다른 비교군과 확연한 차이가 관찰되었다. 도 9에 나타낸 바와 같이, 또 다른 생물학적 특징 비교 분석 역시 T-3D에서 면역관련 특징이 관찰되었다.

[113]

[114] 주성분 분석

[115] 주성분 분석(Principal component analysis)은 각 시료 그룹 간 얼마나 명확히 분리가 되었는지를 Discrimination index를 사용하여 나타낸다. 도 10에 나타낸 데이터는 시료 처리 방법에 따라 3회 반복 질량분석한 결과로서 제1 주성분 값의 기여율은 60.2% 였고, 제2 주성분 값의 기여율은 28.9%였다. 그 결과 시료 처리 방법에 따라 관찰된 단백질들의 정성 및 정량적 특징 간에 큰 패턴의 차이를 확인하였다. 또한 3D-EV 또는 T-3D-EV 간의 패턴 거리에 비해 이들과 2D-EV 간의 거리가 더 먼 것으로 보아 2D 방법과 3D 방법 간의 차이로 단백질의 변화가 관찰되는 것으로 추측할 수 있다.

[116]

[117] 유전자 세트 농축 분석

[118] 유전자 세트 농축 분석은 GSEA 모델을 이용하여 수행하였다. 농축 점수(Enrichment score)는 해당 세트에 포함된 유전자가 표현형에서 일치하는 방식으로 유의하게 차별적으로 발현될 때 유전자의 예비 특정화된 클래스를 부여한다. 표준화된 농축 점수는 농축 점수를 유전자 세트 내의 유전자의 수에 대해 조정함으로써 계산하였다. 명목상 p-값은 감수성 및 내성 표지를 치환하고 귀무(null) 분포를 생성하기 위해 표준화된 농축 점수를 재계산함으로써 결정된다. 도 11은 본 분석에서의 유전자 세트 농축 분석 결과로, 농축된 유전자

세트, 표준화된 농축 점수 (NES) 및 p-값이 제시되었으며, NES가 높고 p-값이 낮을수록, 발견이 유의할 가능성이 더 크다. 본 분석에서 농축된 유전자 그룹은 도 12에 도시하였다.

[119]

[120] T-3D-EV 특이적 단백질의 동정

[121] TGFb를 첨가한 그룹에서 유의미하게 변화되는 단백질 그룹을 찾기 위해 서로 간의 쌍 비교를 수행하였다. 관찰된 단백질들은 3D-EV 대비 T-3D-EV에서 2배 이상 증가 또는 감소하고, Benjamini-hochberg FDR이 0.05이하라는 2가지 기준 하에 선별하였다. 또한 T-3D 시료에만 발견된 단백질들도 포함하였다. 선별된 단백질은 도 13 및 도 14에 나타내었다.

[122]

[123] EV내 존재하는 단백질 분석시 도 15에서 보는 바와 같이 항산화 단백질 및 염증관련 인자들이 발현되고 있는 것을 확인할 수 있다.

[124] 세포의 스트레스반응 중 대표적인 것이 ROS 생성 및 이로 인한 세포 산화환원 조절 네트워크 활성화이다. ROS는 자유 라디칼로서 세포 내 고분자 물질인 단백질과 DNA를 공격하여 구조 및 활성의 변화를 유도하며, 이로써 DNA 수리, 세포주기 조절 및 세포의 성장/사멸에 관여한다.

[125] 포유동물에는 6가지 유형의 퍼옥시레독신이 존재하는데, 이들은 각종 세포 및 조직에 널리 분포되어 조직에서 발생하는 H₂O₂를 제거하는데 주요한 항산화 단백질로 작용한다. 티오레독신 시스템은 이렇게 ROS 등에 의하여 유발된 스트레스를 해소하기 위하여 작동되는 대표적인 세포 내 방어체계로서 활성산소에 의해 산화된 단백질을 가역적 산화-환원 반응으로 복구시키는 ROS 스캐빈저로서의 기능과 함께 다양한 세포 방어 시스템에 광범위하게 관여하는데, 세포의 생존유도인자로서 뿐 아니라, 항사멸(anti-apoptotic), 항염증(anti-inflammatory) 및 면역조절(immuno-regulatory)인자로서도 작용하여 세포의 방어체계를 관장하는 핵심단백질로 알려져 있다. 이러한 항산화제 단백질인 퍼옥시레독신-4 (Peroxiredoxin-4)와 티오레독신 환원효소(Thioredoxin reductase)가 본 발명의 방법으로 수득한 엑소좀인 T-3D-EV에서 높은 수준으로 발현됨을 확인하였다(도 15).

[126]

[127] 또한 T-3D-EV에서 COX-2의 발현도 높은 것으로 나타났다(도 15). 일반적으로 염증 반응은 외부로부터 물리적, 화학적 자극이나 세균 감염에 대한 생체조직의 방어 반응의 하나이며, 손상된 조직을 수복하거나 재생하려는 기전이다. 체내에서 염증 반응이 일어나면 대식세포와 같은 염증 세포들은 일산화질소(NO), 프로스타글란딘E2(PGE2), 종양괴사인자(tumor necrosis factor- α , TNF- α), 인터루킨-1 β (IL-1 β)등 염증매개 물질을 분비한다. PGE2의 합성은 포스포리파아제 A2에 의해 막 인지질(membrane phospholipid)로부터 아라키돈산이 만들어지는 것으로 시작된다. 아라키돈산은 효소작용에 의해

프로스타글란딘 G2가 되고 다시 불안정한 대사산물인 프로스타글란딘 H2가 되는데, 이 두 과정은 COX(cyclooxygenase)에 의해 촉진된다. COX는 두 종류 이상의 아형 효소(isoenzyme)가 존재하는데 이들 중 COX-1은 지속적으로 발현하여 혈소판 응집, 위점막 보호, 신기능 조절 등의 생리적 기능을 담당하고, COX-2는 염증 등의 자극에 의해 발현되며 COX-2에 의해 생성된 프로스타글란딘이 염증반응과 세포증식에 관여한다고 알려져 있다. 따라서, COX-2가 T-3D-EV에서 높게 발현되는 것은 본 발명의 엑소솜 면역관련 세포에 처리했을 때 염증 반응 조절에 관여하기 때문인 것으로 판단된다.

[128]

[129] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

청구범위

- [청구항 1] 다음의 단계를 포함하는 줄기세포 유래 세포의 소포체(extracellular vesicle)의 제조 방법:
 (a) 대상체로부터 분리된 줄기세포를 배양하여 세포 응집체(cell aggregate)를 형성하는 단계; 및
 (b) 상기 세포 응집체를 TGF- β (Transforming growth factor beta)를 포함하는 배양액에서 3차원 배양하는 단계.
- [청구항 2] 제 1 항에 있어서, 상기 줄기세포는 중간엽 줄기세포인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 3] 제 1 항에 있어서, 상기 단계 (a)는 다중 웰(multi-well) 배양 용기에서 줄기세포를 부유 배양(suspension culture)함으로써 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 4] 제 3 항에 있어서, 상기 다중 웰(multi-well) 배양 용기는 웰 당 300 - 500 μ m의 크기를 가지는 마이크로웰 플레이트인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 5] 제 3 항에 있어서, 상기 부유배양은 상기 다중 웰(multi-well) 배양 용기 내 웰 당 300 - 500개의 세포를 분주함으로써 이루어지는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 6] 제 1 항에 있어서, 상기 TGF- β 는 TGF- β 3인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 7] 제 1 항에 있어서, 상기 단계 (b)는 상기 세포 응집체를 부유 상태에서 회전 진탕 배양(orbital shaking culture)함으로써 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 8] 제 7 항에 있어서, 상기 회전 진탕 배양은 50 - 70 rpm의 회전속도로 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 9] 제 1 항에 있어서, 상기 방법은 상기 단계 (b)에서 수득한 배양액으로부터 복수 회의 원심분리를 통해 세포의 소포체를 분리하는 단계를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 10] 제 1 항에 있어서, 상기 세포의 소포체는 30 - 150 nm의 평균 직경을 가지는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 11] 제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항의 방법으로 제조된 줄기세포 유래 세포의 소포체.
- [청구항 12] 제 11 항의 줄기세포 유래 세포의 소포체를 유효성분으로 포함하는 염증 또는 자가면역 질환의 예방 또는 치료용 조성물.
- [청구항 13] 제 12 항에 있어서, 상기 자가면역질환 또는 염증성 질환은 류마티스 관절염, 반응성 관절염, 1형 당뇨병, 2형 당뇨병, 전신성 홍반성 낭창, 다발성경화증, 특발성섬유성폐포염, 다발성근염, 피부근염, 국한피부경화증, 전신피부경화증, 대장염, 염증성 장질환,

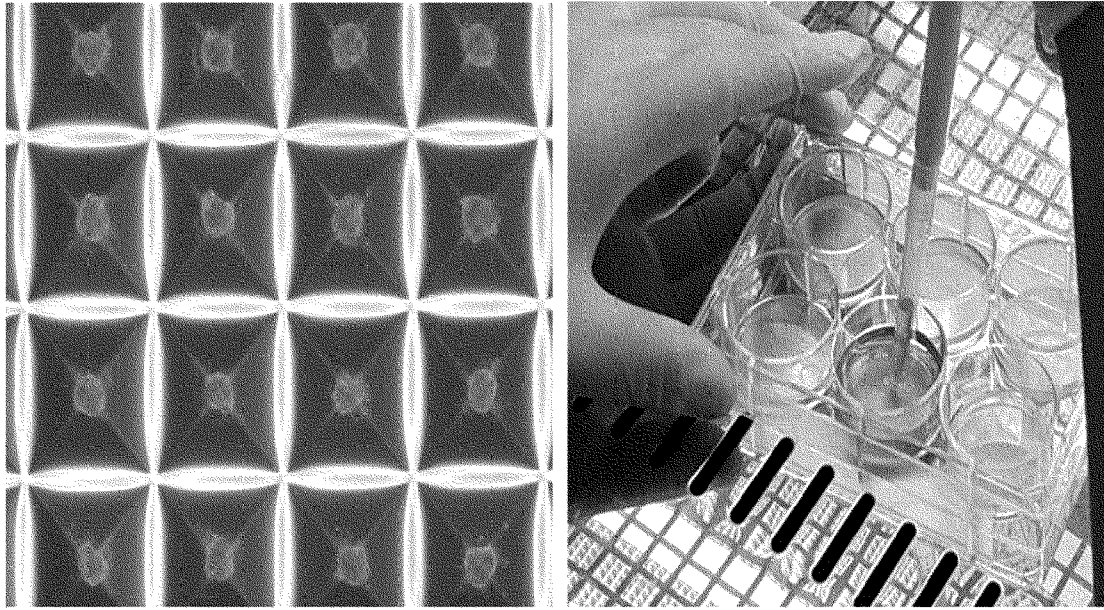
조르젠신드롬(Sjorgen's syndrome), 레이노현상(Raynaud's phenomenon),
 베첵병(Bechet's disease), 가와사키병(Kawasaki's disease),
 원발성담즙성경화증(primary biliary sclerosis),
 원발성경화성담관염(primary sclerosing cholangitis),
 궤양성대장염(ulcerative colitis), 이식편대숙주병(Graft-versus-host disease,
 GVHD) 또는 크론병(Crohn's disease)인 것을 특징으로 하는 조성물.

[청구항 14] 퍼옥시레독신-4 (Peroxiredoxin-4), 티오레독신 환원효소 1(Thioredoxin reductase 1) 및 프로스타글란딘 G/H 신타아제 2(prostaglandin G/H synthase 2)로 구성된 균으로부터 선택되는 하나 이상의 단백질을 고발현하는 줄기세포 유래 세포외 소포체(extracellular vesicle).

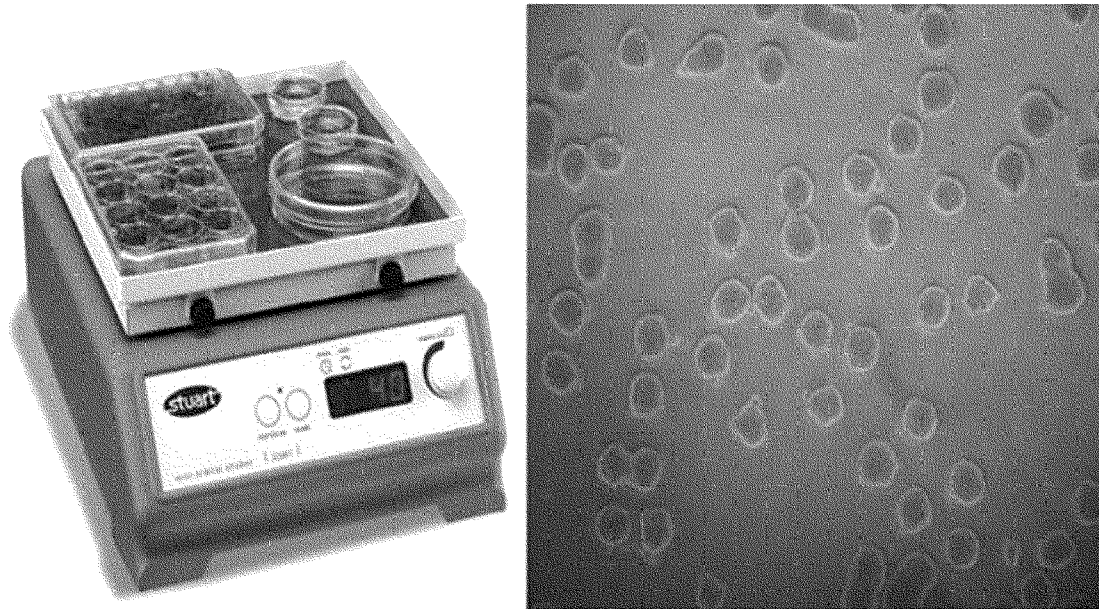
[청구항 15] 제 14 항에 있어서, 상기 세포외 소포체는 HSP90- β (heat shock protein 90- β), 네프릴리신(Neprilysin), T-복합체 단백질 1(TCP1) 서브유닛- α , 필라민-A(Filamin-A), 40S 리보솜 단백질 S3, 미오신-9, 트랜스알돌라제, 패신(Fascin), 티오레독신 환원효소 1, RUVBL 2(RuvB-like 2)로 구성된 균으로부터 선택되는 하나 이상의 단백질을 추가적으로 고발현하는 것을 특징으로 하는 줄기세포 유래 세포외 소포체.

[청구항 16] 제 14 항에 있어서, 상기 세포외 소포체는 코로닌-1A(Coronin-1A), 프롤일 4-하이드록실레이즈 서브유닛 α -2(Prolyl 4-hydroxylase subunit α -2) 및 퓨린 뉴클레오사이드 포스포릴라아제(purine nucleoside phosphorylase)로 구성된 균으로부터 선택되는 하나 이상의 단백질에 대해 양성인 것을 특징으로 하는 줄기세포 유래 세포외 소포체.

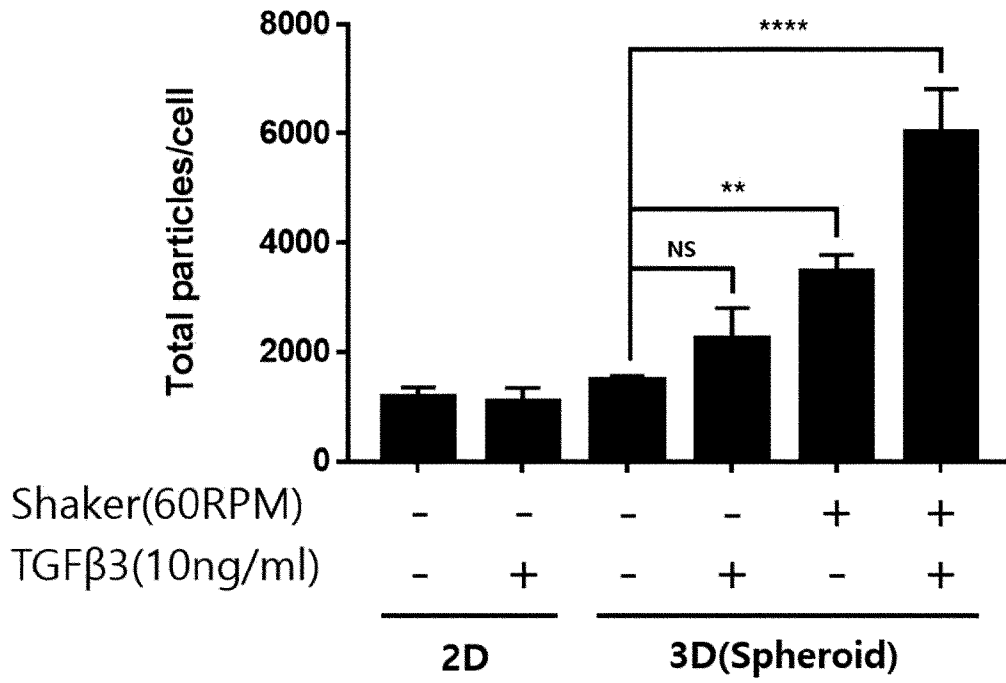
[도 1a]



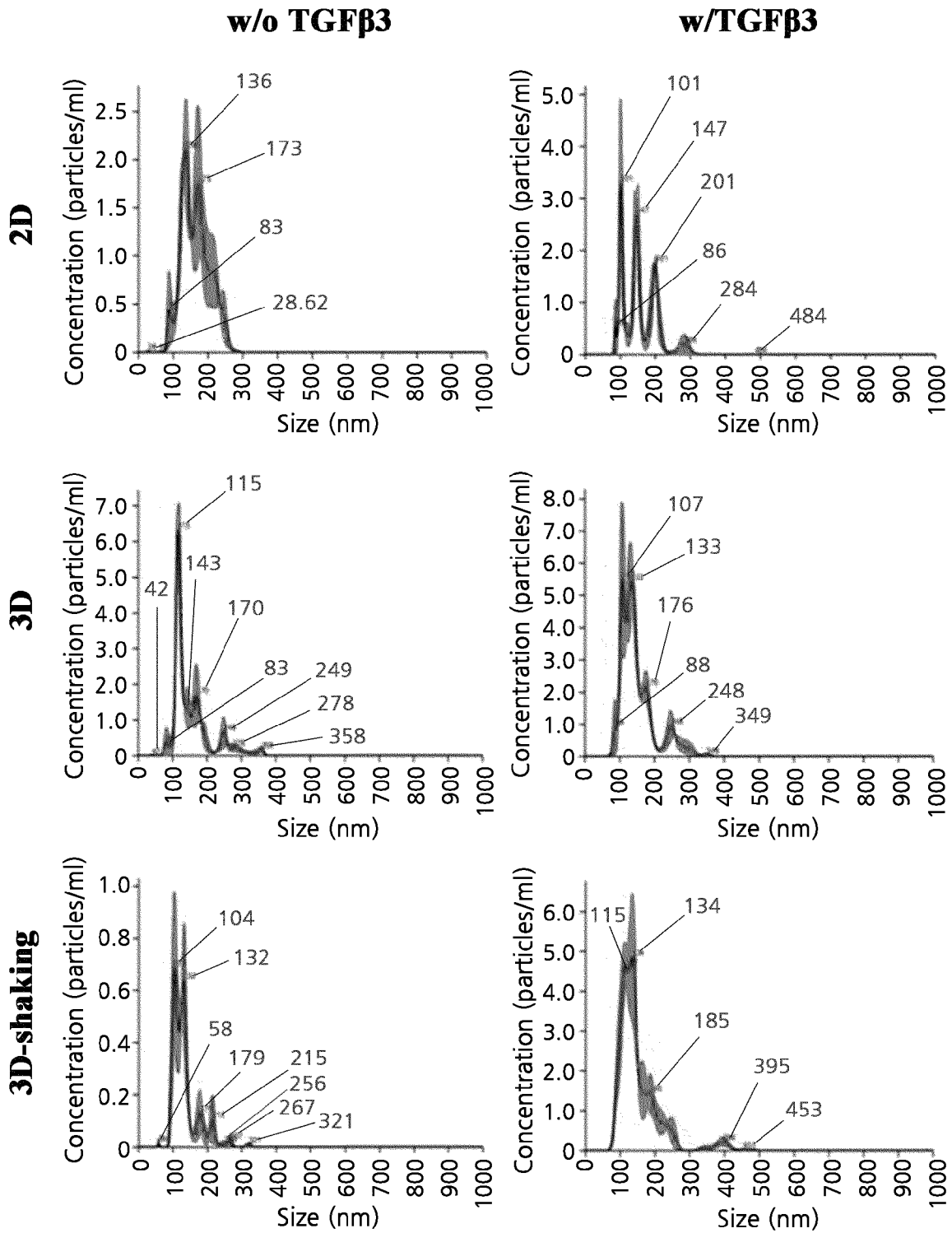
[도 1b]



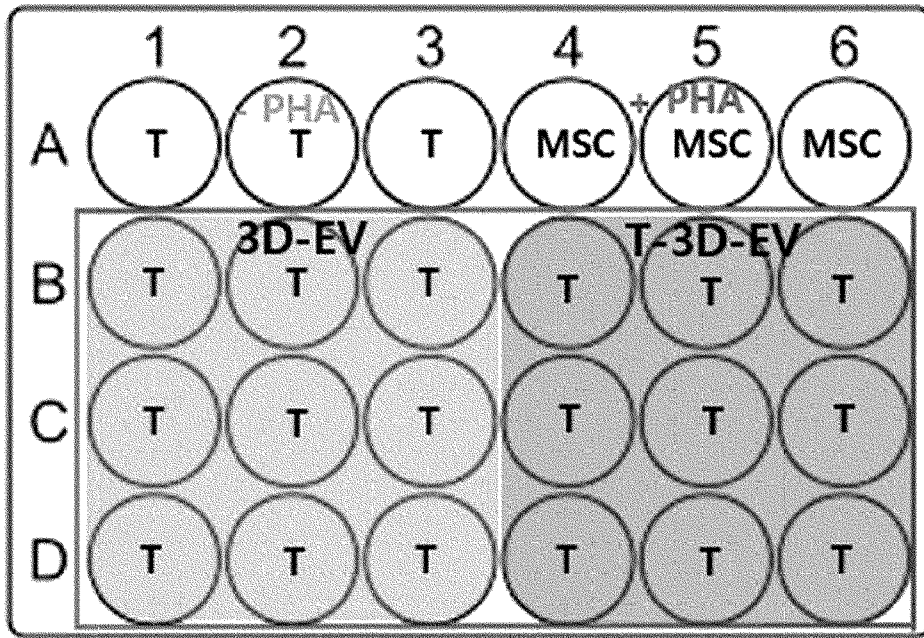
[도2]



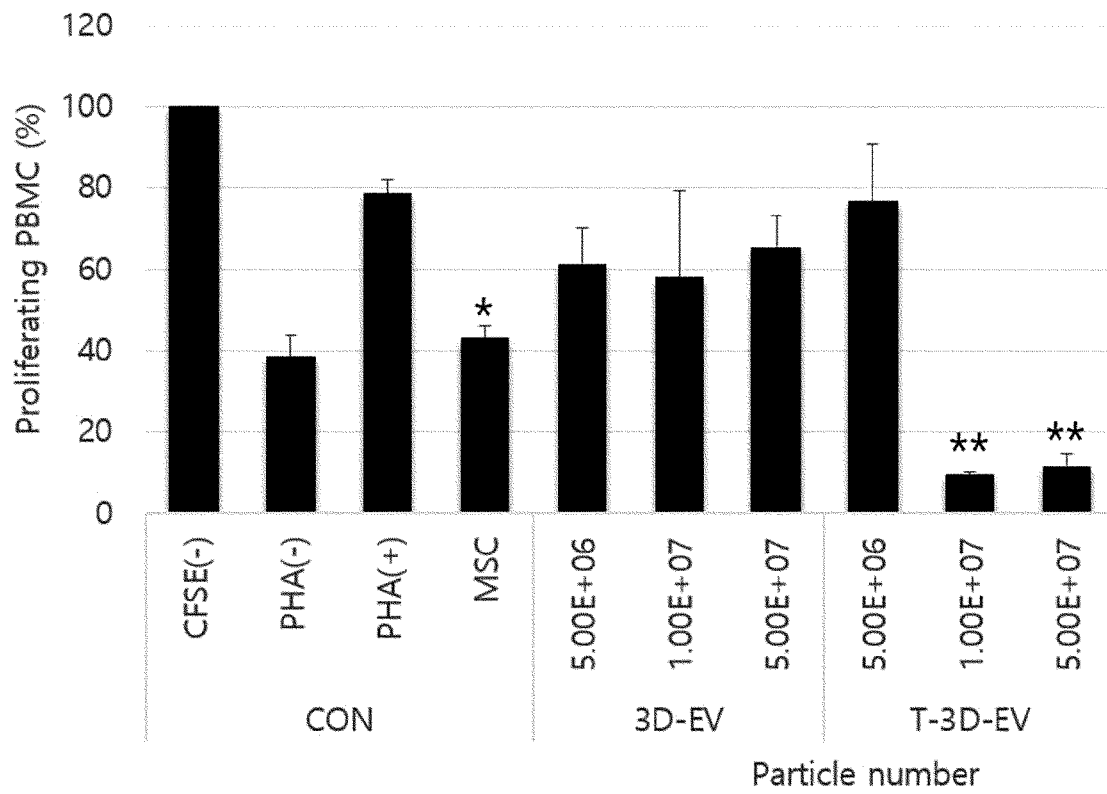
[도3]



[도4a]

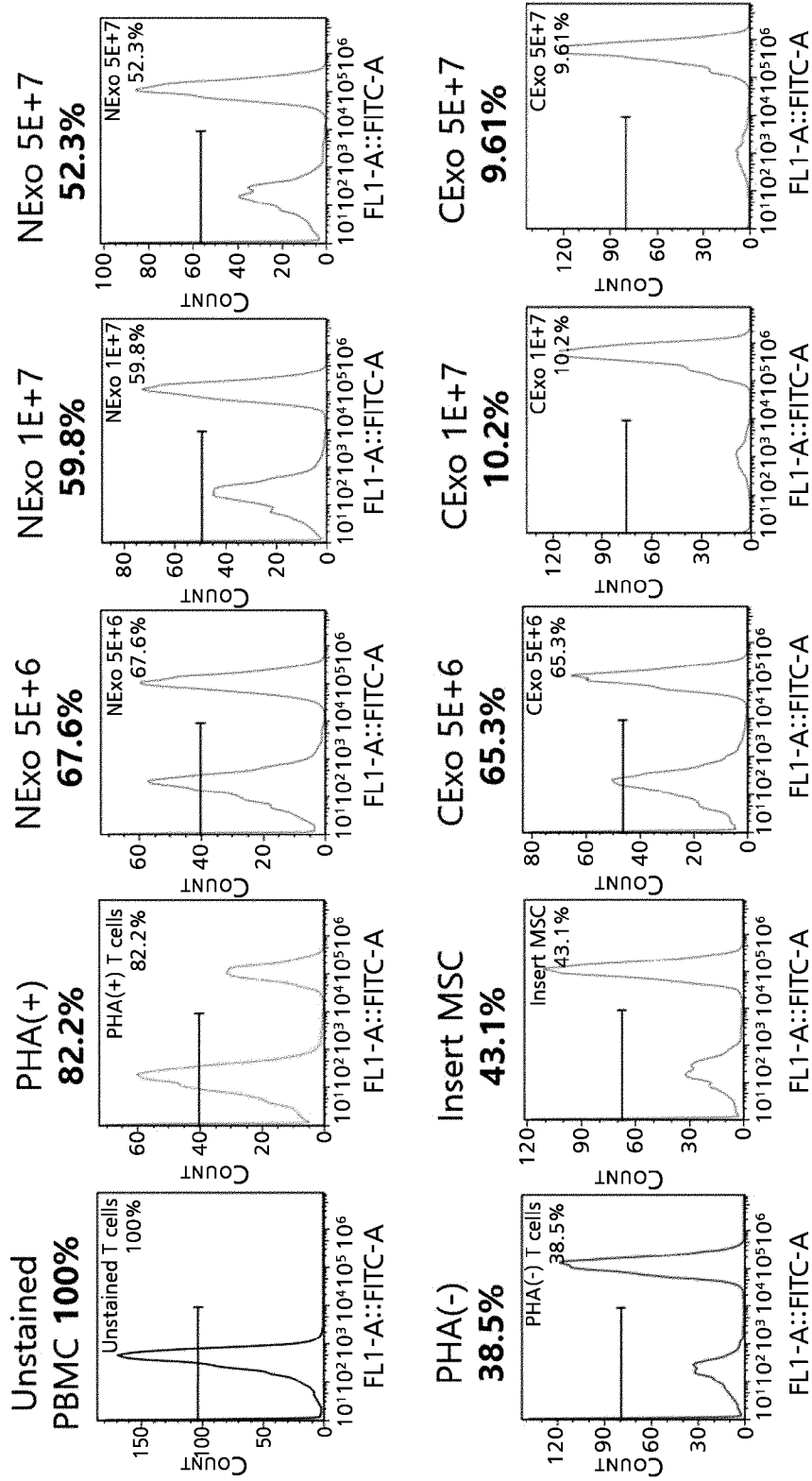


[도4b]



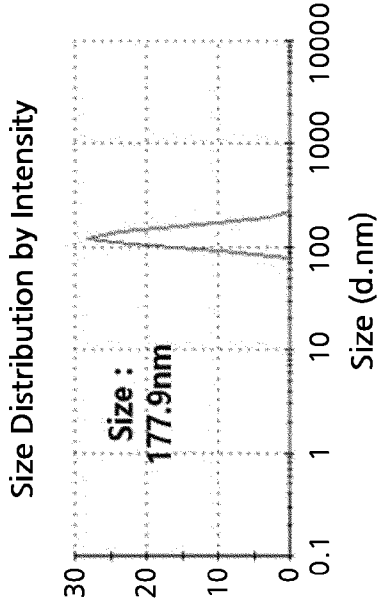
* p < 0.005
 ** P < 0.0005

[Fig 4c]

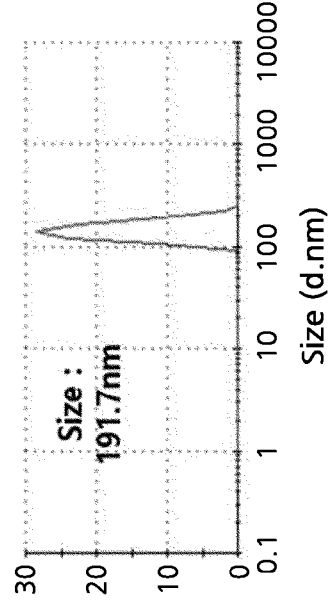


[도5a]

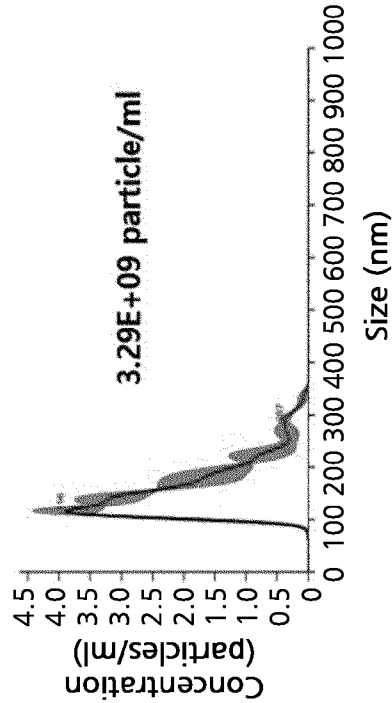
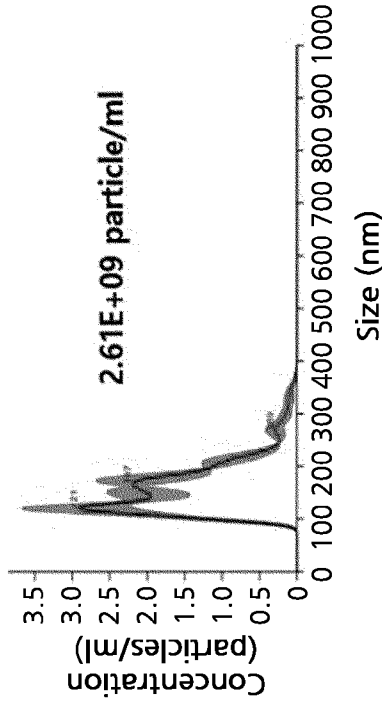
DLS



DLS



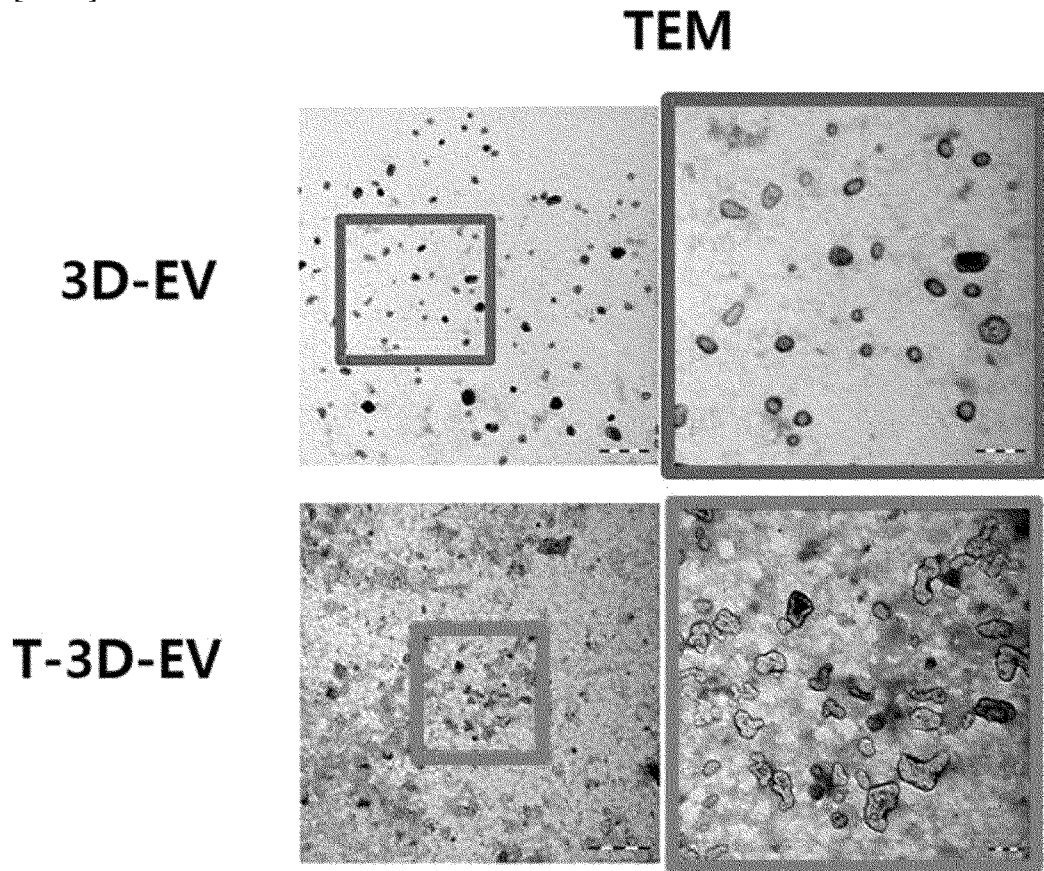
NTA



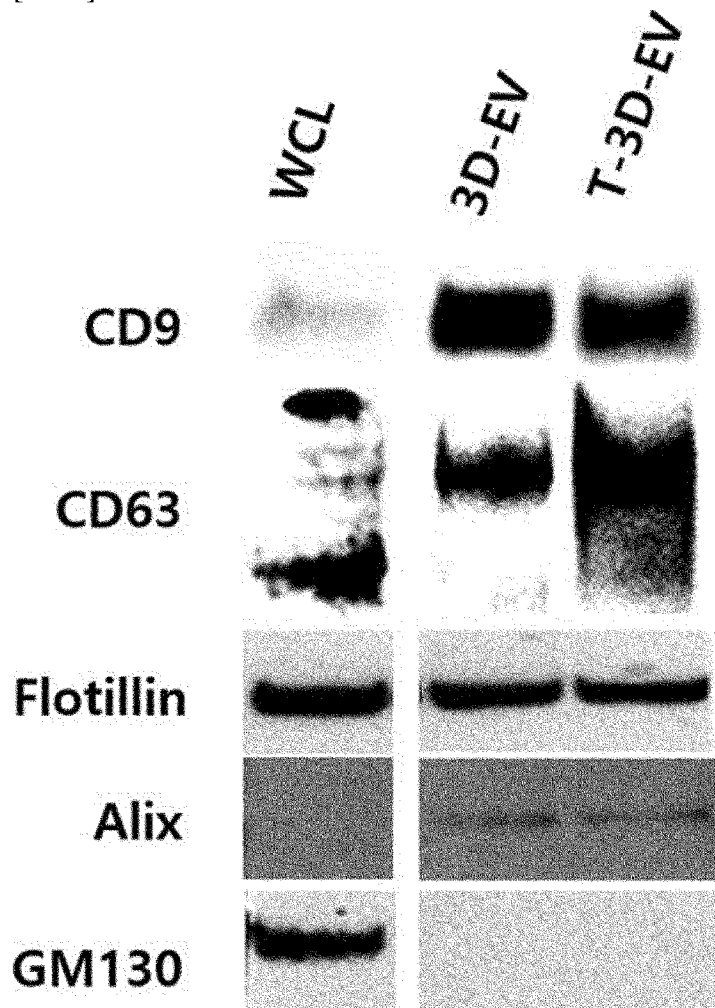
3D-EV

T-3D-EV

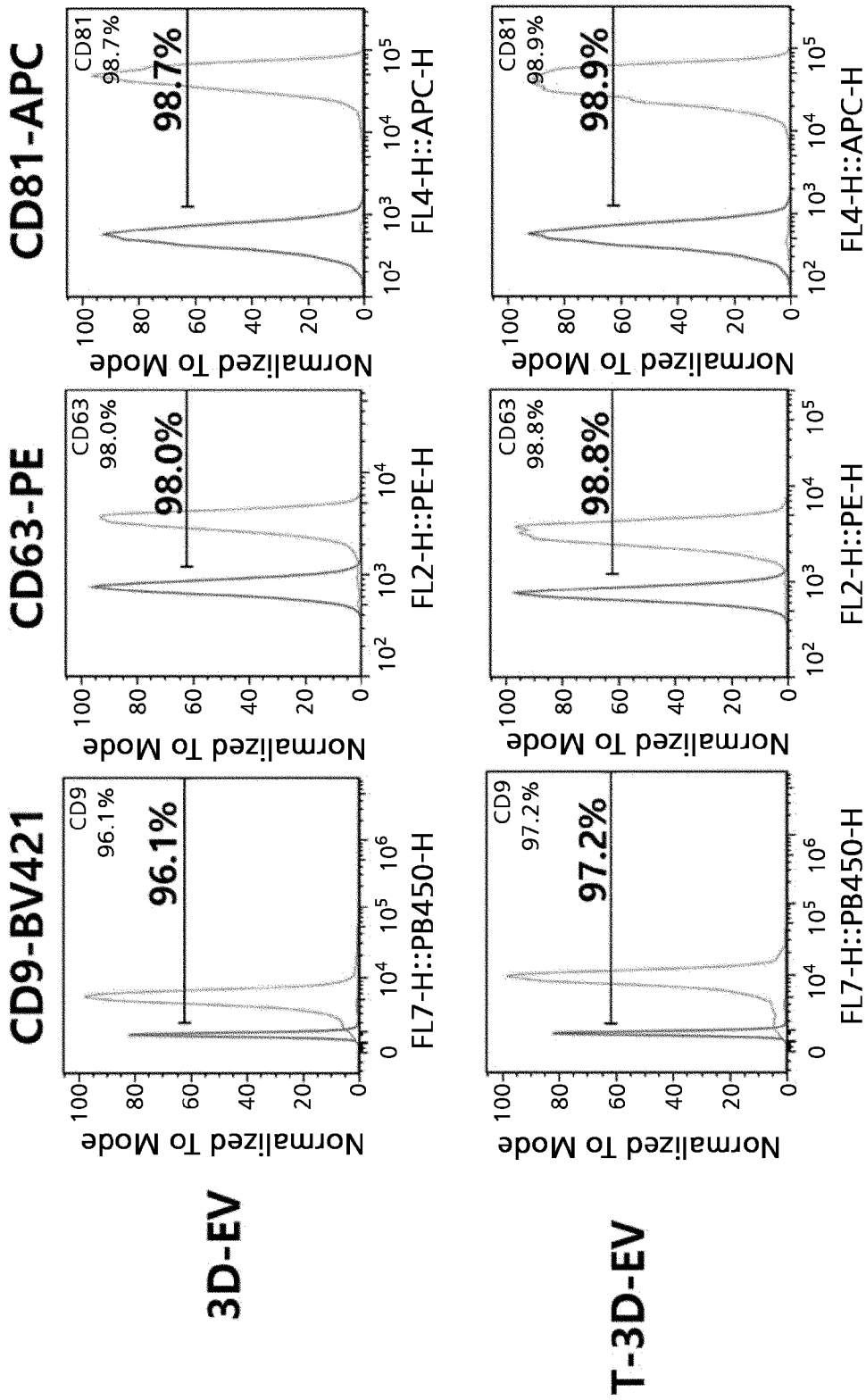
[도5b]



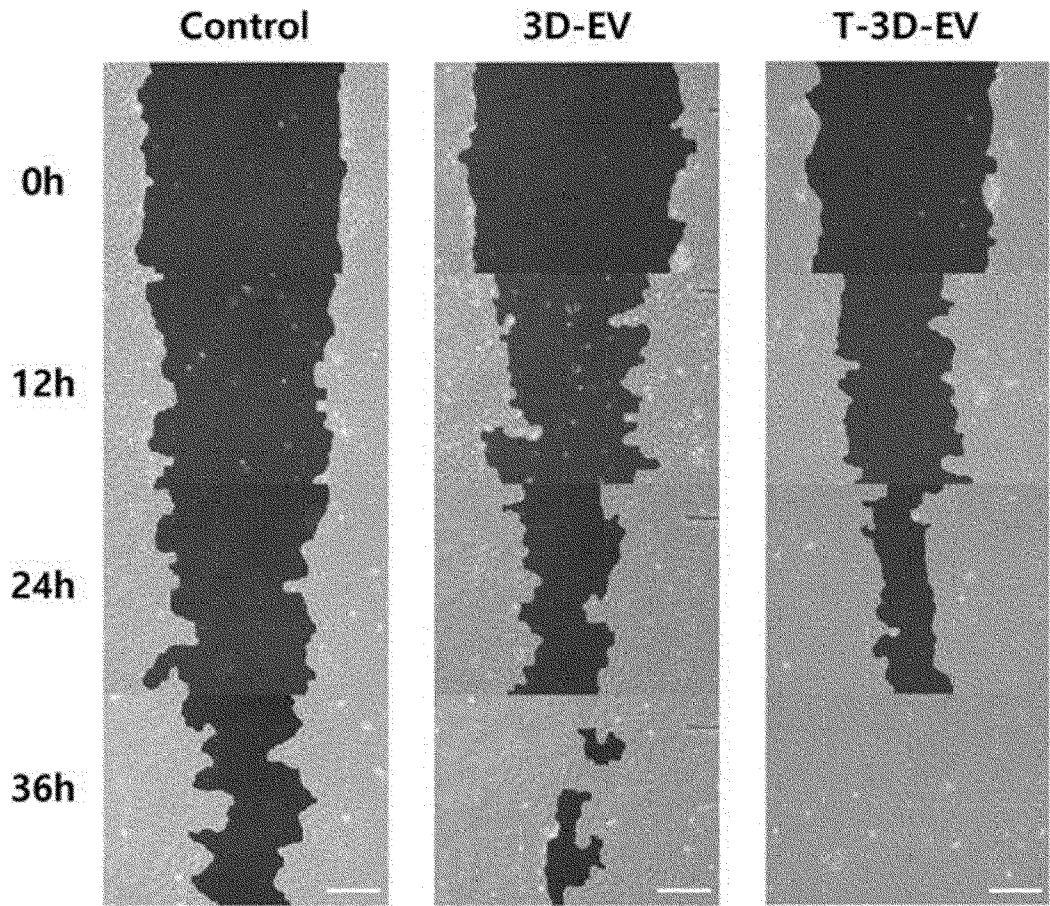
[도5c]



[도5d]

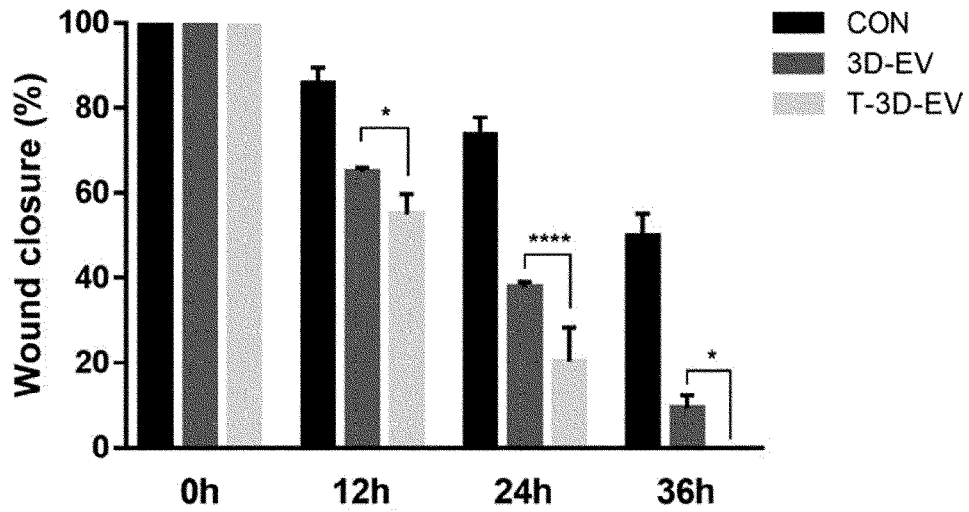


[도6a]

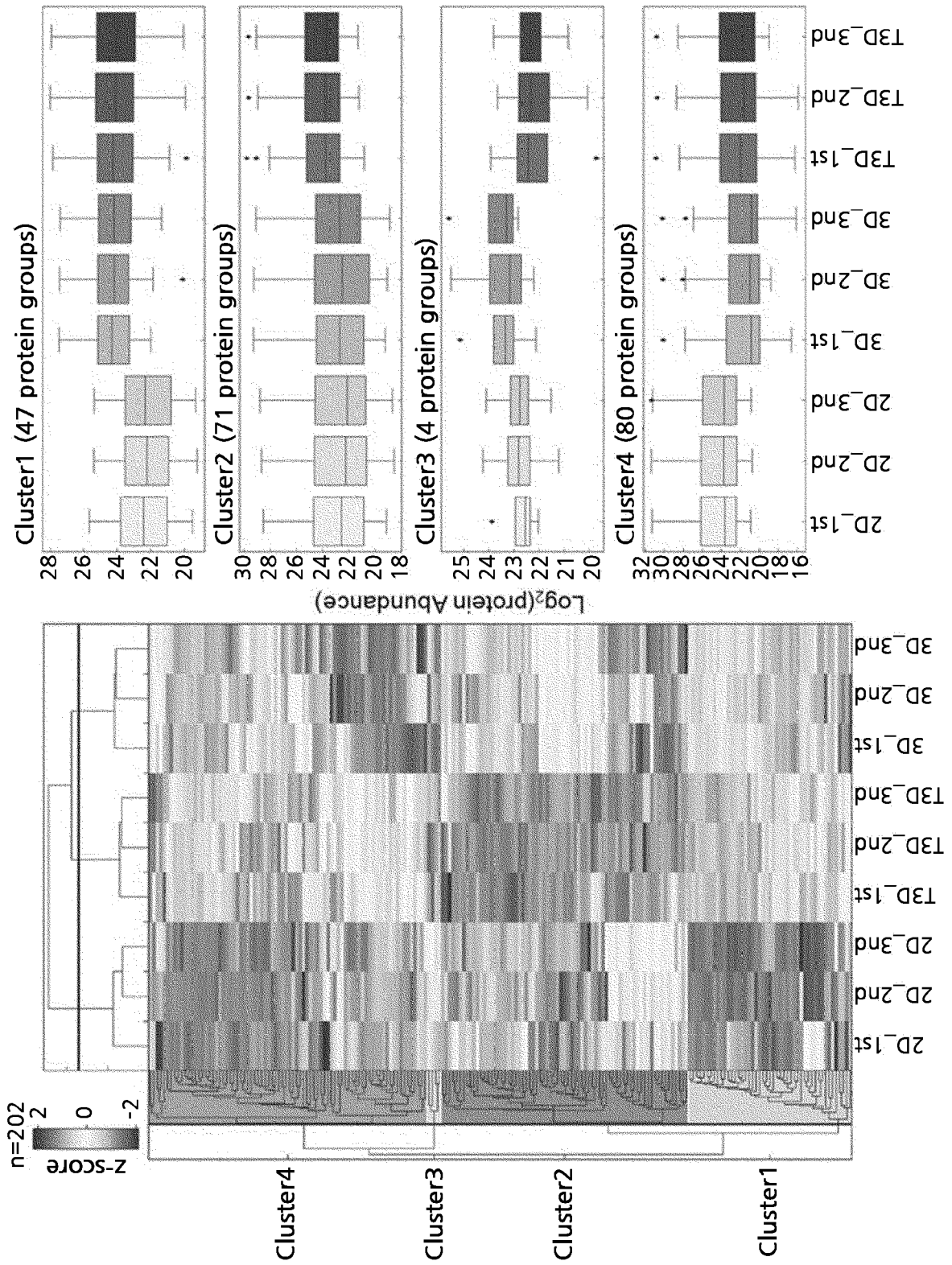


Scale bar : 200um

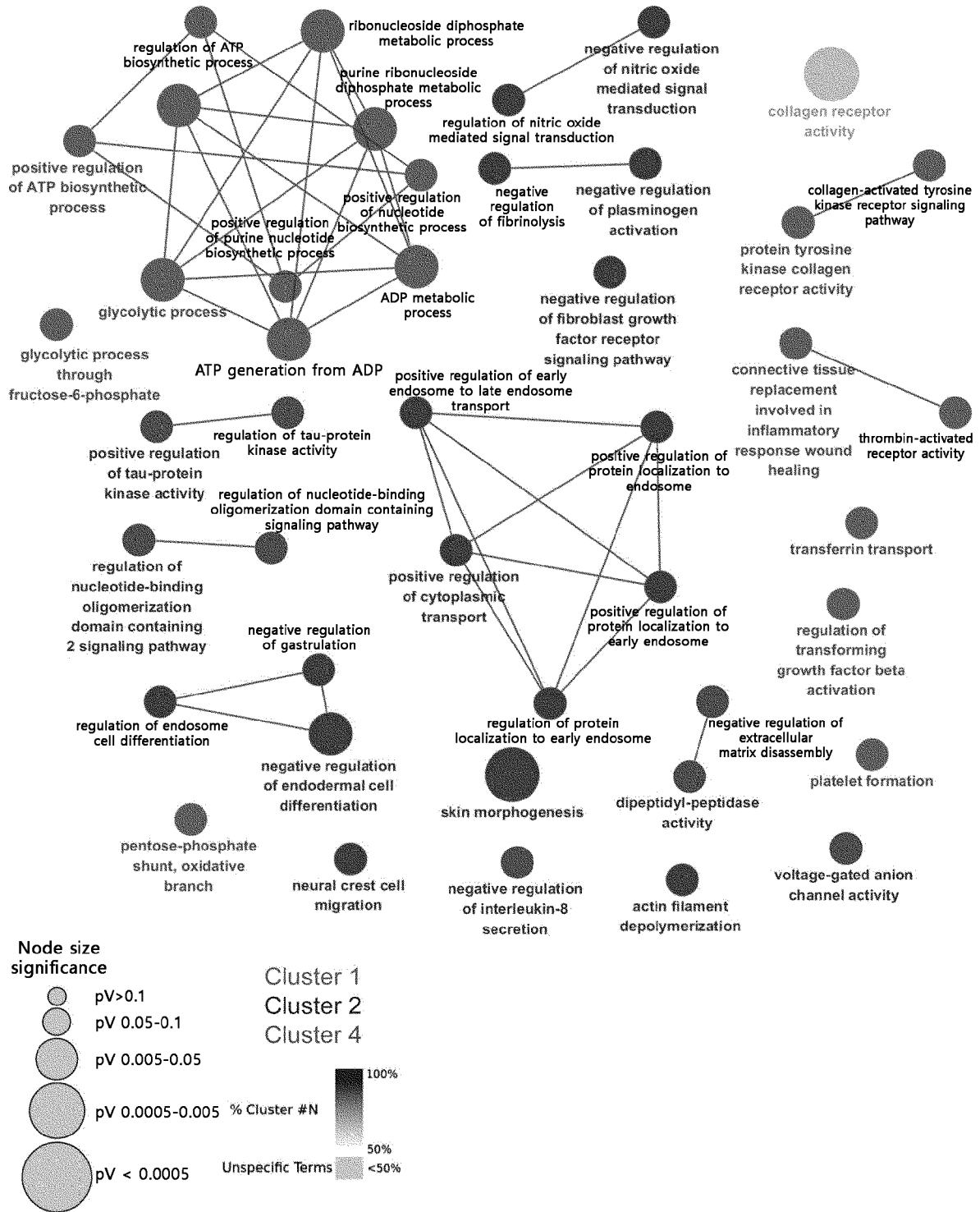
[도6b]



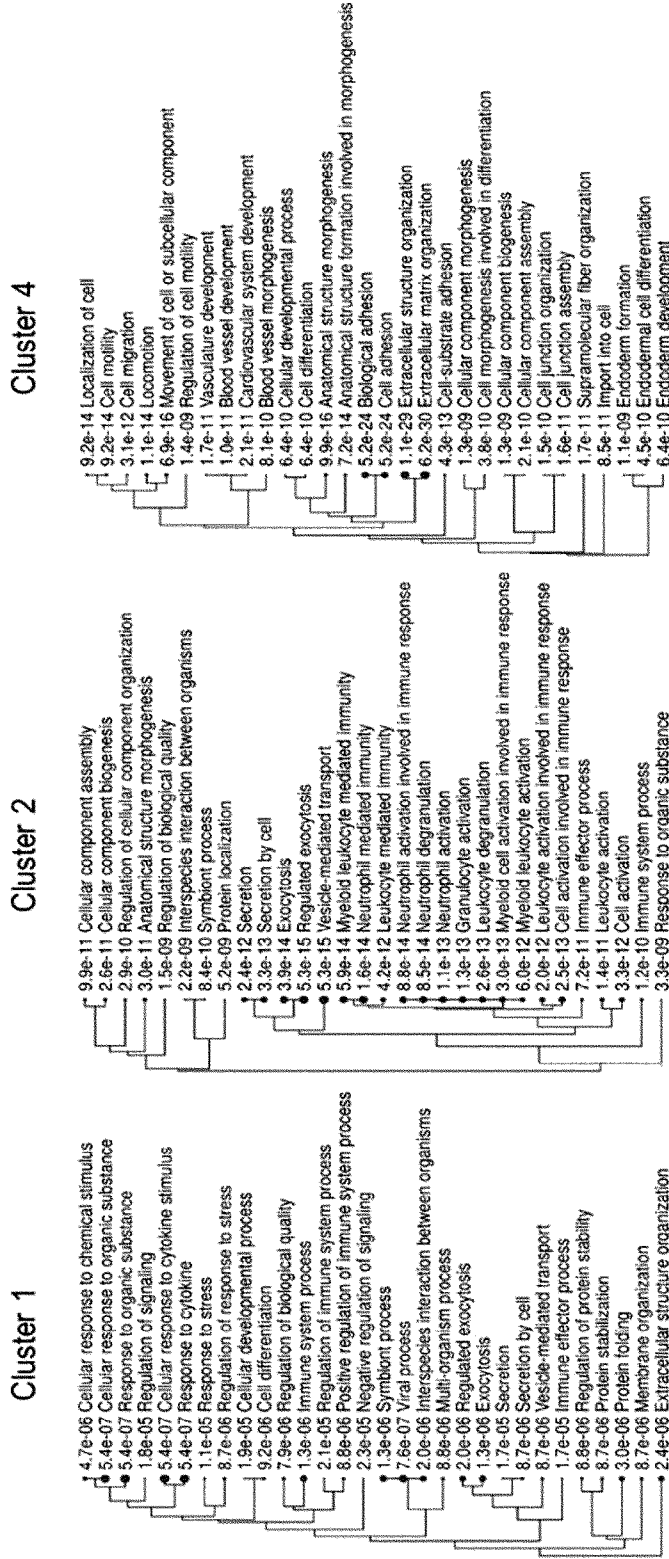
[도7]



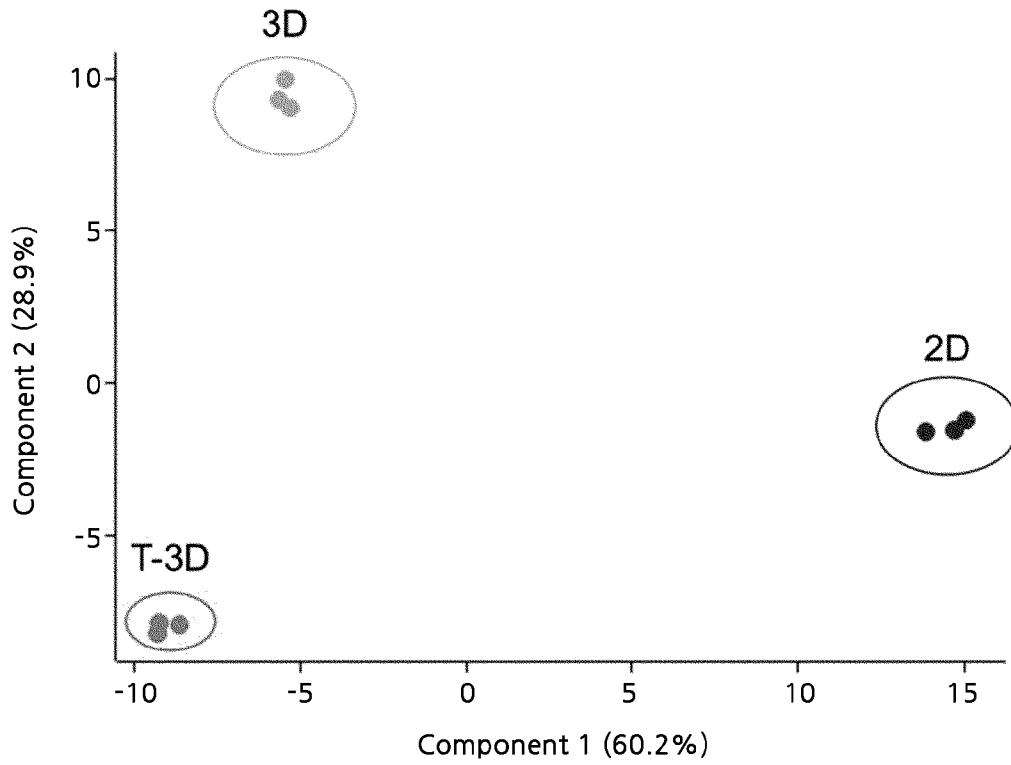
[도8]



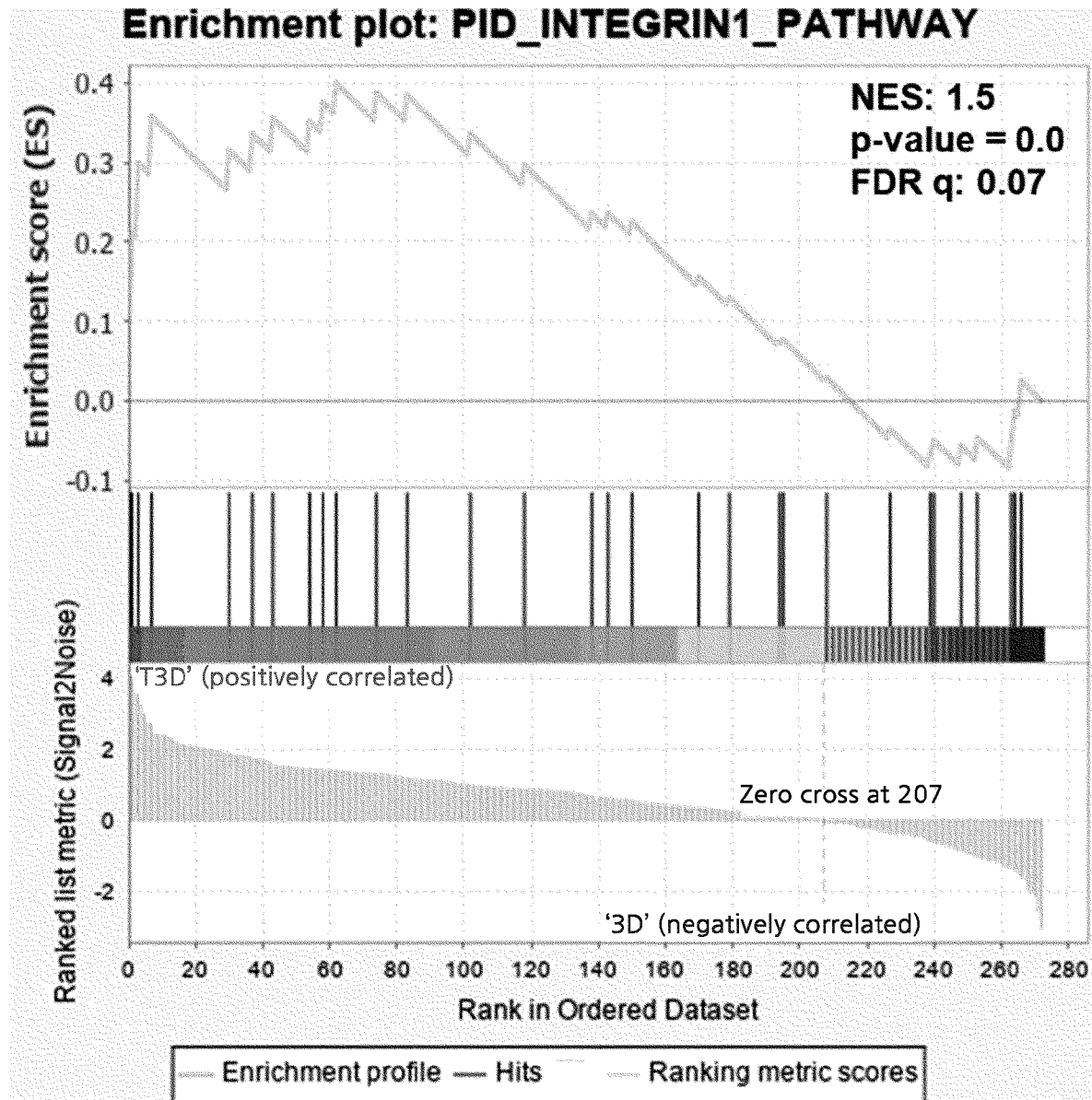
[도9]



[도 10]



[도11]



[도 12]

SampleName	Symbol	Source	HGNC Symbol	Acc	HGNC
	PLAU	plasminogen activator urokinase	[Source:HGNC Symbol:Acc:HGNC:9052]		
	ITGA11	integrin subunit alpha 11	[Source:HGNC Symbol:Acc:HGNC:6136]		
	COL6A2	collagen type VI alpha 2 chain	[Source:HGNC Symbol:Acc:HGNC:2212]		
	COL6A3	collagen type VI alpha 3 chain	[Source:HGNC Symbol:Acc:HGNC:2213]		
	COL6A1	collagen type VI alpha 1 chain	[Source:HGNC Symbol:Acc:HGNC:2211]		
	CSG34	chondroitin sulfate proteoglycan 4	[Source:HGNC Symbol:Acc:HGNC:2466]		
	ITGA2	integrin subunit alpha 2	[Source:HGNC Symbol:Acc:HGNC:6137]		
	THBS1	thrombospondin 1	[Source:HGNC Symbol:Acc:HGNC:11785]		
	LAMB1	laminin subunit beta 1	[Source:HGNC Symbol:Acc:HGNC:6486]		
	TGM2	transglutaminase 2	[Source:HGNC Symbol:Acc:HGNC:11778]		
	ITGB1	integrin subunit beta 1	[Source:HGNC Symbol:Acc:HGNC:6153]		
	FN1	fibronectin 1	[Source:HGNC Symbol:Acc:HGNC:3778]		
	ITGAV	integrin subunit alpha V	[Source:HGNC Symbol:Acc:HGNC:6150]		
	COL18A1	collagen type XVIII alpha 1 chain	[Source:HGNC Symbol:Acc:HGNC:2195]		
	FRN1	fibrillin 1	[Source:NCBI gene:Acc:2200]		
	ITGA5	integrin subunit alpha 5	[Source:HGNC Symbol:Acc:HGNC:6141]		
	THBS2	thrombospondin 2	[Source:HGNC Symbol:Acc:HGNC:11786]		
	LAMC1	laminin subunit gamma 1	[Source:HGNC Symbol:Acc:HGNC:6492]		
	COL5A1	collagen type V alpha 1 chain	[Source:HGNC Symbol:Acc:HGNC:2209]		
	ITGA1	integrin subunit alpha 1	[Source:HGNC Symbol:Acc:HGNC:6134]		
	LAMA5	laminin subunit alpha 5	[Source:HGNC Symbol:Acc:HGNC:6485]		
	ITGA4	integrin subunit alpha 4	[Source:HGNC Symbol:Acc:HGNC:6140]		
	ITGA6	integrin subunit alpha 6	[Source:HGNC Symbol:Acc:HGNC:6142]		
	COL1A1	collagen type I alpha 1 chain	[Source:HGNC Symbol:Acc:HGNC:2197]		
	TGFBI	transforming growth factor beta induced	[Source:HGNC Symbol:Acc:HGNC:11771]		
	COL1A2	collagen type I alpha 2 chain	[Source:HGNC Symbol:Acc:HGNC:2198]		
	NID1	nidogen 1	[Source:HGNC Symbol:Acc:HGNC:7821]		
	COL2A1	collagen type II alpha 1 chain	[Source:HGNC Symbol:Acc:HGNC:2200]		
	COL81	COL81 molecule	[Source:HGNC Symbol:Acc:HGNC:1701]		
	COL5A2	collagen type V alpha 2 chain	[Source:HGNC Symbol:Acc:HGNC:2210]		

[도 13]

1st majority protein IDs	Gene	Protein names	p-value (T3D/3D, -log10)	q-value (T3D/3D)	Log2 (T3D/3D)
P08238	HSP90AB1	Heat shock protein HSP 90-beta	4.28882	0.001106	1.03307
P08473	MME	Nepriylsin	1.8344	0.041772	1.61467
P17987	TCP1	T-complex protein 1 subunit alpha	3.67557	0.002723	1.41192
P21333-2	FLNA	Filamin-A	3.54842	0.002753	1.52024
P23396	RPS3	40S ribosomal protein S3	1.76862	0.045868	2.59041
P35579	MYH9	Myosin-9	6.45115	9.13E-05	1.36562
P37837	TALDO1	Transaldolase	2.45703	0.013941	1.80988
Q16658	FSCN1	Fascin	4.10155	0.001361	1.1779
Q16881-5	TXNRD1	Thioredoxin reductase 1, cytoplasmic	3.21074	0.004072	2.61529
Q9Y230-2	RUVBL2	RuvB-like 2	3.52163	0.002753	1.75975

[도 14]

Majority protein IDs	Protein names	Gene	Abundance In 2D	Abundance In 3D	Abundance In T3D
P31146	Coronin-1A	CORO1A	0	0	21.1821
O15460-2; O15460	Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-2	P4HA2	0	0	20.9957
P00491	Purine nucleoside phosphorylase	PNP	0	0	20.3867

[도 15]

Gene Symbol	Description	2D-EV	3D-EV	T-3D-EV	Remarks
PRDX4	Peroxiredoxin-4	18.7522869	19.51365045	20.51830492	Up
TXNRD1	Thioredoxin reductase 1	18.35393979	17.62553368	19.17649096	Up
PTGS2(COX-2)	Prostaglandin G/H synthase 2	13.63213734	15.82555179	17.02167561	Up

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/005408

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C12N 5/0775(2010.01)i; C12M 1/32(2006.01)i; C12M 3/06(2006.01)i; C12M 1/00(2006.01)i; A61K 35/28(2006.01)i; A61P 29/00(2006.01)i; A61P 3/10(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N 5/0775(2010.01); A61K 35/28(2006.01); A61K 35/30(2006.01); C12N 5/071(2010.01); C12N 5/077(2010.01); G01N 33/50(2006.01)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models: IPC as above Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 줄기세포(stem cell), 세포외 소포체(extracellular vesicle), 세포 응집체(cell aggregate), TGF- β , 3차원 배양(3D cell culture), 염증(inflammation), 자가면역(autoimmune)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-2019-0080723 A (HWANG, In Hu) 08 July 2019 (2019-07-08) See paragraphs [0068]-[0078] and [0181]; and claims 1 and 4.	1-13
Y	COSENZA, Stella et al. Mesenchymal stem cells derived exosomes and microparticles protect cartilage and bone from degradation in osteoarthritis. Scientific Reports. 2017, vol. 7, 16214. See abstract; page 1, first paragraph; page 2, Materials and Methods section; and figures 1 and 2.	1-13
X	HARTING, Matthew T. et al. Inflammation-stimulated mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles attenuate inflammation. Stem Cells. 2018, vol. 36, pp. 79-90. See abstract; page 84, right column; page 86, right column; and figure 6.	14
Y		15,16
Y	US 2015-0079046 A1 (RENEURON LIMITED) 19 March 2015 (2015-03-19) See paragraphs [0010], [0011], [0054], [0343] and [0344]; and tables 18-21.	15,16
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 13 September 2021		Date of mailing of the international search report 14 September 2021
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/005408

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2020-0040818 A (CHILDREN'S MEDICAL CENTER CORPORATION) 20 April 2020 (2020-04-20) See entire document.	1-16
A	JOO, Hyeon Su et al. Current knowledge and future perspectives on mesenchymal stem cell-derived exosomes as a new therapeutic agent. <i>Int. J. Mol. Sci.</i> 22 January 2020, vol. 21, no. 727. See entire document.	1-16

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The invention of group 1 (claims 1-13) pertains to a method for preparing an extracellular vesicle derived from stem cells,

The invention of group 2 (claims 14-16) pertains to an extracellular vesicle derived from stem cells.

The technical feature shared by both of the inventions of groups 1 and 2 pertains to an extracellular vesicle derived from stem cells, but the feature corresponds to a technology found in the cited document (KR 10-2019-0080723 A).

Therefore, the inventions of groups 1 and 2 have no common special technical feature which makes a contribution over the prior art under PCT Rule 13.2, and thus lack unity of invention.

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on Protest**
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
 - The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
 - No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2021/005408

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR	10-2019-0080723	A	08 July 2019	None			
US	2015-0079046	A1	19 March 2015	CN	104321062	A	28 January 2015
				CN	104321062	B	25 September 2018
				CN	104703609	A	10 June 2015
				CN	104703609	B	19 February 2019
				CN	105120879	A	02 December 2015
				CN	105142646	A	09 December 2015
				EP	2833893	A1	11 February 2015
				EP	2833893	B1	29 August 2018
				EP	2877187	A1	03 June 2015
				EP	2877187	B1	12 June 2019
				EP	2956146	A1	23 December 2015
				EP	2956146	B1	07 November 2018
				EP	2956147	A1	23 December 2015
				EP	3470073	A1	17 April 2019
				JP	2015-513906	A	18 May 2015
				JP	2015-529450	A	08 October 2015
				JP	2016-507550	A	10 March 2016
				JP	2016-513095	A	12 May 2016
				JP	2019-013234	A	31 January 2019
				JP	2020-072718	A	14 May 2020
				JP	6450673	B2	09 January 2019
				JP	6644851	B2	12 February 2020
				KR	10-1993027	B1	30 September 2019
				KR	10-2015-0004822	A	13 January 2015
				KR	10-2015-0059168	A	29 May 2015
				US	2015-0164955	A1	18 June 2015
				US	2015-0366897	A1	24 December 2015
				US	2016-0002597	A1	07 January 2016
				US	2019-0388475	A1	26 December 2019
				WO	2013-150303	A1	10 October 2013
				WO	2014-013258	A1	23 January 2014
				WO	2014-125276	A1	21 August 2014
				WO	2014-125277	A1	21 August 2014
KR	10-2020-0040818	A	20 April 2020	CN	111212653	A	29 May 2020
				EP	3668319	A1	24 June 2020
				EP	3668319	A4	19 May 2021
				JP	2020-531011	A	05 November 2020
				US	2021-0128630	A1	06 May 2021
				WO	2019-035880	A1	21 February 2019

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 5/0775(2010.01)i; C12M 1/32(2006.01)i; C12M 3/06(2006.01)i; C12M 1/00(2006.01)i; A61K 35/28(2006.01)i; A61P 29/00(2006.01)i; A61P 3/10(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 5/0775(2010.01); A61K 35/28(2006.01); A61K 35/30(2006.01); C12N 5/071(2010.01); C12N 5/077(2010.01); G01N 33/50(2006.01) 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 줄기세포(stem cell), 세포의 소포체(extracellular vesicle), 세포 응집체(cell aggregate), TGF-β, 3차원 배양(3D cell culture), 염증(inflammation), 자가면역(autoimmune)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	KR 10-2019-0080723 A (황인후) 2019.07.08 단락 [0068]-[0078], [0181]; 및 청구항 1, 4 참조.	1-13
Y	COSENZA, STELLA 등, "Mesenchymal stem cells derived exosomes and microparticles protect cartilage and bone from degradation in osteoarthritis." Scientific Reports, 2017, 7권, 16214 요약; 페이지 1, 첫 번째 단락; 페이지 2, Materials and Methods 섹션; 및 도면 1, 2 참조.	1-13
X Y	HARTING, MATTHEW T. 등, "Inflammation-stimulated mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles attenuate inflammation." Stem Cells, 2018, 36권, 페이지 79-90 요약; 페이지 84, 우측 컬럼; 페이지 86, 우측 컬럼; 및 도면 6 참조.	14 15,16
Y	US 2015-0079046 A1 (RENEURON LIMITED) 2015.03.19 단락 [0010], [0011], [0054], [0343], [0344]; 및 표 18-21 참조.	15,16
A	KR 10-2020-0040818 A (철드란즈 메디컬 센터 코퍼레이션) 2020.04.20 전체 문헌 참조.	1-16
<input checked="" type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일	
2021년09월13일(13.09.2021)	2021년09월14일(14.09.2021)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소	심사관	
대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대 전청사)	정다원	
팩스 번호 +82-42-481-8578	전화번호 +82-42-481-5373	

C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	JOO, HYEON SU 등, "Current knowledge and future perspectives on mesenchymal stem cell-derived exosomes as a new therapeutic agent." Int. J. Mol. Sci., 2020.01.22., 21권, 727호 전체 문헌 참조.	1-16

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

제1군 발명(청구항 1-13)은 줄기세포 유래 세포외 소포체의 제조 방법에 관한 것이고,
제2군 발명(청구항 14-16)은 줄기세포 유래 세포외 소포체에 관한 것입니다.

제1군 발명 및 제2군 발명의 공통된 기술적 특징은 줄기세포 유래 세포외 소포체에 있으나, 이는 인용문헌 (KR 10-2019-0080723 A)에 공지된 기술에 해당합니다.

따라서 제1군 발명 및 제2군 발명은 PCT 규칙 13.2에서 규정된 선행기술에 대하여 기여한 공통되는 특별한 기술적 특징이 없으므로 발명의 단일성이 없습니다.

1. 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

- 이의신청에 관한 기재 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2019-0080723 A	2019/07/08	없음	
US 2015-0079046 A1	2015/03/19	CN 104321062 A	2015/01/28
		CN 104321062 B	2018/09/25
		CN 104703609 A	2015/06/10
		CN 104703609 B	2019/02/19
		CN 105120879 A	2015/12/02
		CN 105142646 A	2015/12/09
		EP 2833893 A1	2015/02/11
		EP 2833893 B1	2018/08/29
		EP 2877187 A1	2015/06/03
		EP 2877187 B1	2019/06/12
		EP 2956146 A1	2015/12/23
		EP 2956146 B1	2018/11/07
		EP 2956147 A1	2015/12/23
		EP 3470073 A1	2019/04/17
		JP 2015-513906 A	2015/05/18
		JP 2015-529450 A	2015/10/08
		JP 2016-507550 A	2016/03/10
		JP 2016-513095 A	2016/05/12
		JP 2019-013234 A	2019/01/31
		JP 2020-072718 A	2020/05/14
		JP 6450673 B2	2019/01/09
		JP 6644851 B2	2020/02/12
		KR 10-1993027 B1	2019/09/30
		KR 10-2015-0004822 A	2015/01/13
		KR 10-2015-0059168 A	2015/05/29
		US 2015-0164955 A1	2015/06/18
		US 2015-0366897 A1	2015/12/24
		US 2016-0002597 A1	2016/01/07
		US 2019-0388475 A1	2019/12/26
		WO 2013-150303 A1	2013/10/10
		WO 2014-013258 A1	2014/01/23
		WO 2014-125276 A1	2014/08/21
		WO 2014-125277 A1	2014/08/21
KR 10-2020-0040818 A	2020/04/20	CN 111212653 A	2020/05/29
		EP 3668319 A1	2020/06/24
		EP 3668319 A4	2021/05/19
		JP 2020-531011 A	2020/11/05
		US 2021-0128630 A1	2021/05/06
		WO 2019-035880 A1	2019/02/21