



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0064745
(43) 공개일자 2019년06월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 35/28 (2015.01) A61K 35/35 (2014.01)

A61K 35/51 (2015.01) A61K 9/127 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 35/28 (2013.01)

A61K 35/35 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-0163897

(22) 출원일자 2017년12월01일

심사청구일자 2017년12월01일

(71) 출원인

주식회사 엠디문

서울특별시 성동구 아차산로 49, 1001호, 1002호
(성수동1가)

울산대학교 산학협력단

울산광역시 남구 대학로 93(무거동)

재단법인 아산사회복지재단

서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)

(72) 발명자

배신규

경기도 성남시 분당구 동원북로22번길 4, 402호(동원동, 반석그린빌)

오연목

서울특별시 용산구 이촌로 181, 104동 1101호(이촌동, 한강대우아파트)

(74) 대리인

이명진

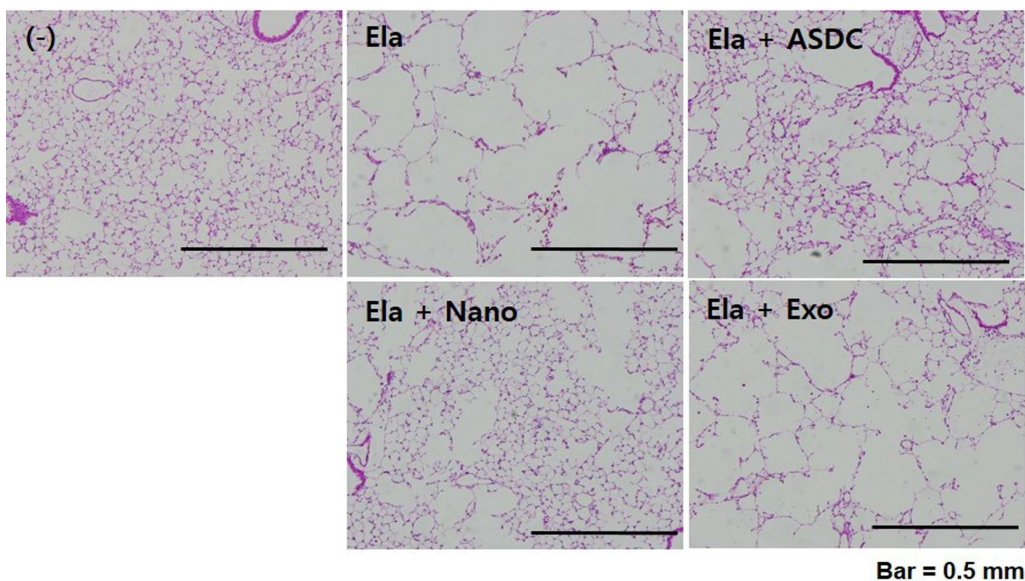
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **간엽줄기세포 유래 인공나노솜을 포함하는 폐질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물**

(57) 요약

본 발명은 간엽줄기세포 유래 인공나노솜(mesenchymal stem cell-derived artificial nanosomes)을 포함하는 폐질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로서, 본 발명의 인간 지방유래 간엽줄기세포로부터 유래된 인공나노솜은 간엽줄기세포 자체 및 인간 지방유래 간엽줄기세포로부터 유래된 자연엑소솜과 비교하여 현저히 우수한 폐포 재생 능력을 내므로 폐기종을 포함하는 각종 폐질환의 치료에 유용하게 사용될 수 있다. 또한 본 발명의 인공나노솜은 간엽줄기세포에 별도의 화학물질을 처리하지 않아도, 압출기 및 초고속원심분리기를 이용하는 간단한 생산 방법을 통하여 수득할 수 있다는 장점이 있다. 이에, 줄기세포 치료제가 갖는 부작용이 발생할 가능성이 낮다는 점과 함께, 간엽줄기세포 처리 시 단점으로 지적되는 치료 효율의 문제점 또한 해결할 수 있어, 향후, 폐질환 예방 또는 치료 및 폐세포 치료제로서 유용하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 35/51 (2013.01)

A61K 9/127 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI14C1487

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 보건산업진흥원

연구사업명 첨단의료기술개발

연구과제명 성체줄기세포 유래 인공나노소포체를 이용한 만성폐쇄성폐질환 치료기술개발

기 여 율 1/1

주관기관 서울아산병원

연구기간 2014.10.01 ~ 2016.09.30

명세서

청구범위

청구항 1

간엽줄기세포 유래 인공나노섬을 포함하는, 폐질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 간엽줄기세포 유래 인공나노섬은 폐포의 재생을 유도하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 간엽줄기세포는 지방, 제대, 제대혈, 또는 골수유래 간엽줄기세포인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 간엽줄기세포 유래 인공나노섬은 압출기 및 초고속원심분리기에 의하여 생산되는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 폐질환은 폐기종, 만성 기관지염, 폐렴, 폐고혈압, 만성폐쇄성 폐질환 및 천식으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 폐기종은 범소엽성 폐기종, 중심소엽성 폐기종, 간질성 폐기종, 및 대상성 폐기종으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 간엽줄기세포 유래 인공나노섬은 성장인자의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 간엽줄기세포 유래 인공나노섬을 포함하는 폐질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물 등에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 만성폐질환은 다양한 원인으로 폐염증이 발생하여 서서히 폐가 파괴되어 간다고 알려져 있다. 천식, 만성폐쇄성 폐질환(COPD), 폐섬유증 등의 급성 혹은 만성 호흡기 질환의 상당수는 기도 및 폐실질에 염증을 동반한 병태를 나타낸다. 침윤된 염증성 세포는 기관지 및 폐의 조직을 장해하고, 최종적으로는 각 질환에 특징적인 호흡 유량이나 산소 교환능의 저하라는 호흡 기능의 장해를 일으키게 된다. 따라서 염증성 호흡기 질환의 치료에는 항염증 작용을 갖는 약제가 응용되고 있고, 이미 경증 내지 중등도의 기관지 천식에서는 부신피질 스테로이드가 효과가 있음이 알려져 있다. 또한, 부신피질 스테로이드는 COPD의 악화를 예방하는 것으로도 보고되어 있는데, COPD의 병태에 대한 효과는 한정적이며, 폐섬유증에 있어서는 부신피질 스테로이드의 유효성이 명확하게 입증되지 않았다. 다른 한편으로, 부신피질 스테로이드는 면역 기능을 비특이적으로 억제할 뿐만 아니라, 전해질 이상, 소화성 궤양, 근질환, 행동 이상, 백내장, 골다공증, 골괴사, 및 발육 저해 등 다양한 부작용을 야기할 가능성이 있는 것으로 알려져 있다. 기관지 천식의 치료에 있어서는, 흡입 스테로이드제를 주류로 하는 치료의 침투에 의해, 발작에 의한 구급 외래 환자 수 및 입원 환자 수는 감소되고, 외래에서 컨트롤할 수 있는 환자가 늘고 있는 실정이며, 이와 같은 상황 하에서도 환자 수는 저하되지 않고, 여전히 치사적 발작에 의한 천식사가 존재하므로, 현재의 흡입 스테로이드제를 중심으로 하는 천식 치료제의 조합 요법으로는 여전히 충분한 치료에는 이르지 못하므로, 높은 치료 효과를 가지며 부작용이 경감된 새로운 치료제의 개발이 요망되고 있다.

[0004] 한편, 폐기종은 종말 세기관지(terminal bronchiole) 원위부 공기공간(airspace)의 파괴로 인하여 비정상적이며 영구적인 말초기도 및 폐포의 확장상태를 말하는데, 오랜 기간 이 질환을 앓게 되면 폐 속에서 산소와 이산화탄소를 교환하는 작은 파리주머니인 폐포와 모세혈관에 상당한 손상을 입게 되며, 이로 인해 폐고혈압, 특히 이차성 폐고혈압의 원인이 된다. 이러한 폐기종 및 폐고혈압을 예방 및 치료하기 위한 몇몇 물질들이 알려져 있지만, 그 종류가 한정되어 있을 뿐만 아니라 치료효과 또한 미비하여, 보다 효과적인 약제를 개발하기 위한 연구가 요구되고 있다. 폐기종은 최근 연구를 통해 엘라스타제와 관련이 있는 것으로 나타났으며, 호중구 엘라스타제(또는 백혈구 엘라스타제)는 카이모트립신(chymotrypsin)과 같은 패밀리에 속하는 세린 단백질분해효소(serine protease)이고, 다양한 기질 특이성을 나타낸다. 다른 세린 단백질분해효소와 함께 히스티딘(histidine), 아스파테이트(aspartate) 및 세린(serine) 잔기로 구성된 촉매 삼조원소(catalytic triad)로 이루어진 전하 전달 시스템을 가지고 있는데, 이 히스티딘, 아스파테이트 및 세린 잔기는 폴리펩티드의 1차 서열에서는 서로 분산되어 있지만, 3차 구조로 폴딩된 단백질에서는 서로 모여 있다. 호중구 엘라스타제는 콜라겐과 함께 탄성섬유를 구성하여 연결조직의 물리적 특성을 나타내는 엘라스틴을 분해하며, 내부식포 과정에 의해 면역체계 감퇴된 상태에서 살균물질의 역할을 하는 강력한 비특이적 세린 단백질분해효소로 염증, 폐기종 및 만성 폐색성 질병을 촉진시킨다. 지금까지 알려진 폐기종의 발달 원인으로는 염증, 엘라스타제, 매트릭스 메탈로프로테아제 불균형, 자가사멸 및 산화 스트레스의 조합이 있는데, 특히 엘라스틴에 대한 작용력이 뛰어난 효소인 폐지 채장 엘라스타제에 폐가 노출되면, 호중구 및 대식세포로 인해 급성 폐 염증반응이 유발되는 것으로 나타났다. 또한, 호중구 엘라스타제에 의해 활성 산소종(ROS)의 생성이 유도되는데, 연구 결과에 따르면, 호중구 엘라스타제에서 MUC5AC 메신저 RNA 레벨의 증가는 세포내부 산화물질의 생성 또는 세포 산화환원 상태의 변화에 의존적인 것으로 나타났고, 이는 ROS가 엘라스타제 매개 염증에서 어떤 역할을 한다는 것을 의미한다. 산화질소 또한 엘라스타제 매개 질병에서 주축 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

[0005] 상기와 같이, 폐기종을 비롯한 다양한 폐질환을 우수한 효율로 치료하기 위하여 새로운 치료제 개발에 대한 필요성이 존재하고 있는바, 이에 대한 연구가 계속 이루어지고 있다(한국 등록특허 10-1189655 참조).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명자들은 부작용이 적으면서도 폐기종을 비롯한 다양한 원인으로 파괴된 폐질환에 대하여 예방 및 치료 효과가 우수한 물질을 개발하기 위하여 예의 노력한 결과, 특히, 간엽줄기세포에서 유래된 인공나노섬이 폐포의 재생을 유도하는 효과가 우수하다는 사실을 확인하고, 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.

- [0008] 따라서 본 발명의 목적은 간엽줄기세포 유래 인공나노솜을 포함하는 폐 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0009] 또한, 본 발명의 다른 목적은 간엽줄기세포 유래 인공나노솜을 포함하는 폐질환 예방 또는 치료용 세포 치료제 조성물을 제공하는 것이다.
- [0011] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0013] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 간엽줄기세포 유래 인공나노솜을 포함하는 폐질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0014] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 간엽줄기세포 유래 인공나노솜은 폐포의 재생을 유도하는 것일 수 있다.
- [0015] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 간엽줄기세포는 체대, 체대혈, 골수, 근육, 신경, 피부, 양막, 태반, 또는 지방으로부터 유래되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 바람직하게는 인간 지방으로부터 유래되는 것일 수 있다.
- [0016] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 간엽줄기세포 유래 인공나노솜의 제조방법에는 제한이 없으나, 압출, 초음파 분쇄, 세포 용해, 균질화, 냉동-해동, 전기천공, 기계적 분쇄, 및 화학 물질 처리로 이루어진 군에서 선택된 방법을 사용하여 생산되는 것일 수 있고, 바람직하게는, 압출기 및 초고속원심분리기에 의하여 생산되는 것일 수 있다.
- [0017] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 폐질환은 폐기종, 천식, 폐렴, 결핵, 폐 고혈압, 폐암, 신생아 기관지폐 형성 장애증, 만성 폐쇄성 폐질환, 급성 기관지염, 만성 기관지염, 세기관지염, 기관지 확장증, 과민증, 폐실질염, 급성 연기 흡입, 열에 의한 폐 손상, 낭포성 섬유증, 허파파리 단백증, 알파-1-프로테아제 결핍, 폐 염증성 장애, 급성 호흡 곤란 증후군, 급성 폐 손상, 특발성 호흡 곤란 증후군 및 특발성 폐 섬유증으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 또한, 상기 폐질환이 폐기종인 경우, 상기 폐기종은 범소엽성 폐기종, 중심소엽성 폐기종, 간질성 폐기종, 및 대상성 폐기종으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.
- [0018] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 간엽줄기세포 유래 인공나노솜은 성장인자의 발현을 증가시키는 데, 상기 성장인자에는 제한이 없으나, 바람직하게는, 혈관내피성장인자(vascular endothelial growth factor; VEGF), 섬유아세포 증식인자2(fibroblast growth factor 2; FGF2), 및 간세포성장인자(hepatocyte growth factor; HGF)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 성장인자의 발현을 증가시키는 것일 수 있다.
- [0019] 또한, 본 발명은 간엽줄기세포 유래 인공나노솜을 포함하는, 폐질환 예방 또는 치료용 세포 치료제 조성물을 제공한다.
- [0020] 나아가, 본 발명은 간엽줄기세포 유래 인공나노솜을 포함하는 폐질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 폐질환의 예방 또는 치료방법을 제공한다.
- [0021] 아울러, 본 발명은 간엽줄기세포 유래 인공나노솜의 폐질환의 예방 또는 치료용도를 제공한다.

발명의 효과

- [0023] 본 발명의 간엽줄기세포 유래 인공나노솜(mesenchymal stem cell-derived artificial nanosomes)은 간엽줄기세포(mesenchymal stem cell) 자체, 및 간엽줄기세포 유래 자연엑소솜(mesenchymal stem cell-derived natural exosomes)과 비교하여 현저히 우수한 폐포 재생 능력을 나타내므로, 폐기종을 포함하는 각종 폐질환의 치료에 유용하게 사용될 수 있다. 또한, 간엽줄기세포 유래 인공나노솜은 간엽줄기세포에 별도의 화학물질을 처리하지 않아도, 압출기 및 초고속원심분리기를 이용하는 간단한 생산 방법을 통하여 수득할 수 있다는 장점이 있다. 이에, 줄기세포 치료제가 갖는 부작용이 발생할 가능성이 낮다는 점과 함께, 간엽줄기세포 처리 시 단점으로 지적

되는 치료 효율의 문제점 또한 해결할 수 있어, 향후, 폐질환 예방 또는 치료 및 폐세포 치료제로서 유용하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [0025] 도 1a는 인간 지방유래 간엽줄기세포로부터 유래된 인공나노솜을 투과 전자현미경으로 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 1b는 웨스턴 블롯(western blot)법을 이용하여 엑소솜 마커인 CD63, CD9, 및 CD81의 발현을 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 1c는 인간 지방유래 간엽줄기세포로부터 유래된 인공나노솜 및 인간 지방유래 간엽줄기세포로부터 유래된 자연엑소솜의 크기 분포를 도식화하여 나타낸 도이다.
- 도 2는 인간 지방유래 간엽줄기세포로부터 유래된 인공나노솜(Nano)과 인간 지방유래 간엽줄기세포로부터 유래된 자연엑소솜(Exo)을 처리하였을 때 세포 성장정도를 비교하여 나타낸 도이다.
- 도 3a는 인간 지방유래 간엽줄기세포로부터 유래된 인공나노솜, 인간 지방유래 간엽줄기세포로부터 유래된 자연엑소솜 및 간엽줄기세포의 폐포 재생 능력을 비교하여 나타낸 도이다.
- 도 3b는 인간 지방유래 간엽줄기세포로부터 유래된 인공나노솜, 인간 지방유래 간엽줄기세포로부터 유래된 자연엑소솜 및 간엽줄기세포의 폐포 재생 능력을 MLI 방법으로 나타낸 도이다.
- 도 4는 인간 지방유래 간엽줄기세포로부터 유래된 인공나노솜, 인간 지방유래 간엽줄기세포로부터 유래된 자연엑소솜 및 간엽줄기세포를 각 처리하였을 때, 이에 따른, 혈관내피성장인자(VEGF), 섬유아세포 증식인자2(FGF2), 및 간세포성장인자(HGF)의 발현량 변화를 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 5는 제대유래 간엽줄기세포로부터 유래된 인공나노솜 및 간엽줄기세포의 폐포 재생 능력을 비교하여 나타낸 도이다.
- 도 6은 제대유래 간엽줄기세포로부터 유래된 인공나노솜 및 간엽줄기세포의 폐포 재생 능력을 MLI 방법으로 나타낸 도이다.
- 도 7은 제대유래 간엽줄기세포로부터 유래된 인공나노솜 및 간엽줄기세포를 각 처리하였을 때, 이에 따른, 혈관내피성장인자(VEGF), 섬유아세포 증식인자2(FGF2), 및 간세포성장인자(HGF)의 발현량 변화를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0026] 본 발명자들은 폐기종을 비롯한 다양한 폐질환의 예방 또는 치료효과가 우수한 물질을 개발하기 위하여 예의 노력한 결과, 압출기(extruder)와 초고속원심분리기를 이용해 간엽줄기세포에서 유래된 인공나노솜을 제조하였으며, 상기 인공나노솜이 간엽줄기세포와 비교하였을 때, 손상 폐 조직에서의 폐포의 재생을 더욱 효과적으로 유도할 수 있다는 사실을 확인하고, 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.
- [0028] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0030] 본 발명은 간엽줄기세포 유래 인공나노솜을 포함하는 폐질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0031] 본 발명에서, "간엽줄기세포"란, 중간엽줄기세포라고도 하며, 영문으로mesenchymal stem cell로서, MSC라는 약어로 지칭하기도 한다. 상기 간엽줄기세포는 골수와 제대혈, 지방조직에서 채취하는 줄기세포의 하나로서 체내에 대략 100만개가 존재하는 것으로 알려져 있는데, 섬유모세포의 모양을 띄고 있으며, 실험관에서는 무한정 증식이 가능하고, 혈액줄기세포와 달리 지방, 골세포, 연골세포와 같은 중요한 세포계열로 분화할 수 있다.
- [0032] 또한, 본 발명에서, "나노솜"이란, 영문으로 nanosome으로 표기되며, 나노 크기의 리포솜(nanoscale liposome)을 말하는데, 미세한 크기의 구 형태를 띄고 있어 특정한 활성 성분을 조직 내부로 보내기 위해 활용될 수

있다.

- [0033] 또한, 본 발명에서, "만성 폐쇄성 폐질환(chronic obstructive pulmonary disease; COPD)"은 흡연 등의 유해한 입자나 공업용 가스의 흡입에 의해 폐에 비정상적인 염증 반응이 일어나면서 이로 인해 점차 기류 제한이 진행되어 폐 기능이 저하되고 호흡곤란을 유발하게 되는 호흡기 질환으로서, 보다 구체적으로 담배 연기와 같이 기도를 자극하는 물질이 기도와 기관지를 반복적으로 자극하면, 기관지 내의 이물질을 제거하기 위하여 분비되는 기관지 점액의 분비가 증가함으로 기관지의 부분적 또는 전체적 폐쇄를 일으킨다. 기관지가 폐쇄되면 폐포는 확장되고 손상되어 산소와 이산화탄소의 교환능력이 손상 받게 되며, 폐쇄된 폐포는 세균이 쉽게 감염되는데, 만성 폐쇄성 폐질환 환자에게 세균이 감염되면 가스교환의 심각한 장애로 동맥혈 산소압이 급격히 감소하는 상황이 발생하여, 호흡부전에 의하여 동맥혈 이산화탄소압이 상승하면 이산화탄소 혼수가 발생할 수도 있다. 만성 폐쇄성 폐질환의 한 종류로서 폐기종, 만성 기관지염 등이 이에 속할 수 있으나, 이로써 제한되는 것은 아니다.
- [0034] 본 발명에서 사용되는 용어, "예방"이란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 만성 폐쇄성 폐질환을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0035] 또한, 본 발명에서 사용되는 용어, "치료"란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 만성 폐쇄성 폐질환에 대한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [0036] 본 발명의 일 실시예에서는, 인간 지방유래 간엽줄기세포로부터 유래된 인공나노솜을 생산하기 위하여, 인간 지방유래 간엽줄기세포(ADSC)를 배양한 후, 상기 간엽줄기세포로부터 압출기(extruder) 및 초고속원심분리기를 이용하여 인공나노솜을 분리하였다(실시예 1 참조).
- [0037] 본 발명의 다른 실시예에서는, 엘라스타제 처리에 의해 유도된 폐기종 마우스 모델을 제작하여(실시예 2 참조), 실시예 1의 방법으로 생산한 지방유래 간엽줄기세포 유래 인공나노솜과 자연엑소솜의 폐포 재생 능력을 비교하였다(실시예 3 참조).
- [0038] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 실시예 2의 방법으로 제작된 폐기종 동물모델의 손상된 폐조직에 지방유래 간엽줄기세포 유래 인공나노솜과 자연엑소솜을 처리하여, 성장인자인 VEGF, FGF2, 및 HGF의 발현량의 변화를 확인하였다(실시예 4 참조).
- [0039] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 제대유래 간엽줄기세포 유래 인공나노솜을 제조하고(실시예 5 참조), 실시예 2의 방법으로 제작된 폐기종 동물모델의 손상된 폐조직에 제대유래 간엽줄기세포 유래 인공나노솜과 간엽줄기세포를 처리하여, 폐포 재생 능력을 비교하였으며(실시예 6 참조), 성장인자인 VEGF, FGF2, 및 HGF의 발현량의 변화를 확인하였다(실시예 7 참조).
- [0040] 본 발명의 약학적 조성물은 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 투여 경로를 통하여 투여될 수 있다. 즉 목적하는 방법에 따라, 경구 투여, 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여, 내피 투여, 비강 내 투여, 폐 내 투여, 직장 내 투여, 경막 내 투여, 흉강 내 투여될 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 바람직하게는 폐질환 치료를 위하여 폐내 또는 흉강 내 투여될 수 있다.
- [0041] 또한, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 더 포함할 수 있는데, 상기 약학적으로 허용 가능한 담체는 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 사이클로덱스트린, 텍스트로즈 용액, 말토덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올, 리포솜 등을 포함하지만 이에 한정되지 않으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액 등 다른 통상의 첨가제를 더 포함할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제, 윤활제 등을 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화 할 수 있다. 적합한 약학적으로 허용되는 담체 및 제제화에 관해서는 레밍턴의 문헌(Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 성분에 따라 바람직하게 제제화 할 수 있다.
- [0042] 또한, 본 발명에 따른 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명에 따른 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용

이하에 결정될 수 있다.

[0043] 구체적으로, 본 발명에 따른 조성물의 유효량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 1kg 당 0.001 내지 150mg, 바람직하게는 0.01 내지 100mg을 매일 또는 격일 투여하거나 1일 1 내지 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 투여 경로, 비만의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0044] 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 상기 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 폐질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[0045] 본 발명에서 "개체"란 질병의 치료를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐(mouse), 쥐(rat), 개, 고양이, 말 및 소 등의 포유류를 의미한다.

[0046] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 간엽줄기세포 유래 인공나노솜의 폐질환의 예방 또는 치료 용도를 제공한다.

[0048] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0050] 실시예 1. 지방 간엽줄기세포 유래 인공나노솜의 제조 및 자연엑소솜과의 비교

[0051] 1-1. 지방 간엽줄기세포 유래 인공나노솜의 제조

[0052] 인간 지방유래 간엽줄기세포(Adipose derived mesenchymal stem cell; ADSC)를 제조하기 위하여, 채취된 지방 조직을 완충액으로 세척한 후 적혈구 및 백혈구 등의 오염물질을 제거한 다음, 조직을 작은 절편으로 자른 후, collagenase II를 처리하여 결합조직을 분해하였다. 부유된 조직을 원심 분리하여 상층액을 버리고 침전된 층인 stromal vascular fraction(SVF)을 100um nylon mesh(BD falcon)로 여과시켜 효소처리가 되지 않은 세포기질을 제거하였다. 이를 다시 원심 분리하여 얻은 세포침전물에 성장 보충물(인비트로젠) 및 1% 페니실린이 보충된 MesenPRO RS™ 배지에서 37° C, 5% CO₂ 환경의 배양기로 배양하여 지방유래 간엽줄기세포를 수득하였다.

[0053] 상기 간엽줄기세포 7x10⁷를 인산완충식염수(phosphate buffered saline; PBS)에 재부유하고, 압출기(extruder)를 이용하여 10, 5, 및 1μm 막을 통과시킨 다음, 초고속원심분리기를 이용하여 인공나노솜을 분리하였다. 이때, opti-prep 밀도구배 용액 40% 및 10%로 1차 초고속원심분리를 한 후, 가운데층만 분리하여 100,000g force로 1 시간 동안 초고속원심분리를 진행해 펠렛(pellet)을 모아 PBS로 재부유하여, 상기 생산된 인공나노솜의 특성을 투과 전자현미경(transmission electron microscope; TEM)과 동적광산란법(Dynamic Light Scattering; DLS)으로 평가하고 확인하였다.

[0054] 그 결과, 도 1a에 나타난 바와 같이, 인공나노솜의 TEM 이미지를 획득할 수 있었으며, 또한, 도 1b에 나타난 바와 같이, 웨스턴 블롯(western blot)법을 이용하여 엑소솜 마커인 CD63, CD9, 및 CD81발현을 확인하였다. 동적광산란법을 통해 인공나노솜 및 자연엑소솜의 크기 분포를 도 1c로 도식화 하였다.

[0056] 1-2. 인공나노솜과 자연엑소솜의 비교

[0057] 인간 지방유래 간엽줄기세포로부터 유래된 인공나노솜(상기 실시예 1-1의 방법으로 제조)과 인간 지방유래 간엽줄기세포로부터 유래된 자연엑소솜의 세포성장정도를 비교하고자, Cell Counting Kit-8 (CCK 8) assay를 수행하였다.

[0058] 인간 지방유래 간엽줄기세포로부터 유래된 자연엑소솜을 수득하기 위하여, 인간 지방유래 간엽줄기세포가 배양 디쉬의 60%정도의 세포가 채워지면, exosome depleted FBS 10%가 포함된 배양배지로 배양액을 교환하여 48시간 동안 배양하여 배양액을 회수하였다. 배양액 자체를 300 g force 10분, 200 g force 10분, 10,000 g force 30분, 100,000 g force 70분 동안 원심분리한 후, 기타 불순물을 제거하기 위해 인산완충식염수로 세척 후 100,000 g force 70분 동안 다시 원심 분리하여 자연엑소솜을 수득하였다.

[0059] 상기 방법으로 수득된 자연엑소솜과 실시예 1-1의 방법으로 제조한 인공나노솜을 불멸화된 폐포상피세포

(alveolar epithelial cells; AEC)인 MLE-12 세포(mouse lung epithelial cell line)에 0.1 µg/ml 농도로 각각 24시간 처리해 세포성장정도를 평가하였다.

[0060] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 인공나노좀이 처리된 세포(Nano)는 자연엑소좀이 처리된 세포(Exo)보다 세포성장률이 20%이상 높은 것을 확인할 수 있었으며, 자연엑소좀이 처리된 세포의 성장률은 대조군인 NoTx(not treated cell)과 큰 차이가 없었다.

[0062] 실시예 2. 폐기종 동물모델의 제작

[0063] 마우스(mouse)는 C57BL/6, 6주령, 20g의 암컷(female)을 오리엔트바이오에서 구입한 다음, 1주일의 검수 기간을 거친 후 실험에 사용하였다.

[0064] 폐기종 동물모델을 확보하기 위하여 엘라스타제(elastase)를 마우스의 기도로 직접 투여한 질병동물모델을 제작하였다. 구체적으로, C57BL/6 마우스에 주사용 마취제를 복강 주사하여 마취가 된 마우스의 위 이빨을 bar에 걸어 기도가 곧게 펴지도록 고정시켰다. 그 후, 마우스 입을 벌려 혀를 한쪽으로 고정시킨 다음, 해부용 light를 목 쪽에 비추어 기도의 빈 공간에 빛이 세어 들어오는 것을 확인하고, 이곳에 엘라스타제 0.5unit/50ul를 긴 tip을 이용하여 마우스의 입을 통해 빛이 들어오는 통로로 넣어주었다(기도투여).

[0065] 상기와 같이, 엘라스타제를 투여한 다음, 해당 마우스를 좌우, 앞뒤로 흔들어 투여한 엘라스타제가 폐에 골고루 퍼지도록 하고, 마우스가 마취에서 깨어나는 것을 확인하였다. 엘라스타제 기도 투여 후 7일째, 상기 실시예 1-1의 방법으로 생산한 간엽줄기세포 유래 인공나노좀을 마우스에 주입하고, 그로부터 다시 일주일의 지난 후 해당 마우스를 희생하여 폐를 분리해 폐포 재생 능력 확인 실험을 진행하였다.

[0067] 실시예 3. 지방 간엽줄기세포 유래 인공나노좀의 폐포 재생 능력 확인

[0068] 인간 지방유래 간엽줄기세포로부터 유래된 인공나노좀, 인간 지방유래 간엽줄기세포로부터 유래된 인공나노좀 자연엑소좀 및 간엽줄기세포를 각 처리한 다음 폐포 재생 능력을 비교하기 위하여, 상기 실시예 2의 방법으로 제작된 엘라스타제 유도 폐기종 동물모델인 마우스를 희생시켜, 희생한 마우스로부터 폐를 분리한 뒤, 0.5% low-melting agarose를 카테터를 이용하여 삽입해 폐포가 잘 펴지도록 하였고, 이 후 4% 포르말린을 이용하여 폐조직을 고정한 다음, 파라핀 고정(paraffin embedment) 과정을 거쳐 H&E 염색(H&E staining)을 시행해 현미경으로 관찰하였다. 이때, 비교를 위하여 대조군(control)으로 엘라스타제를 주입하지 않은 '(-)'군을 사용하였고, 0.4U의 엘라스타제만 주입한 'Ela'군, 엘라스타제와 1×10^5 의 간엽줄기세포를 함께 처리한 'Ela + ADSC'군, 엘라스타제와 인간 지방유래 간엽줄기세포로부터 유래된 인공나노좀을 함께 처리한 'Ela + Nano'군, 및 엘라스타제와 인간 지방유래 간엽줄기세포로부터 유래된 자연엑소좀을 함께 처리한 'Ela + Exo'군으로 나누어 H&E 염색을 시행하였다.

[0069] 폐조직을 H&E로 염색하여 폐포의 재생 정도를 확인한 결과, 도 3a에 나타난 바와 같이, 'Ela + ADSC' 군 및 'Ela+Exo'가 처리된 폐포 조직에서는 재생이 잘 진행되지 않아 H&E 염색정도가 적고, 'Ela + Nano'군에서 폐포 조직의 재생이 되어 H&E 염색이 많이 된 것을 확인할 수 있었다. 이 결과는 'Ela + Nano'군이 폐포재생효과가 다른 군에 비하여 높게 나타나는 점을 확인할 수 있었다.

[0070] 또한, 도 3a에서 확인한 실험 결과를 MLI 방법으로 도 3b에 나타내었다.

[0071] 구체적으로, 상기 실시예 2-1의 방법으로 엘라스타제 처리에 의해 유도된 폐기종 마우스 모델에서의 폐조직의 변화는 폐포의 파괴 정도를 산출하는 MLI(mean linear intercept) 값을 이용하여 측정하였으며, MLI 측정은 H&E staining을 시행한 폐조직을 슬라이드 당 5지역으로 현미경 사진을 찍은 후, 1.0mm bar에 해당하는 선을 이미지 당 4개씩 그은 다음, 선 내 폐포의 수를 계산하였다. 각 이미지 당 폐포의 수를 계산한 후, 마우스 개체 당 폐포 수로 평균을 낸 다음, 평균 낸 폐포의 수를 1.0mm로 나누어 MLI 값을 산출하고, 상기 MLI 값은 두 명의 연구자에 의해 blinded condition으로 결정되었다.

[0072] 그 결과, 도 3b에 나타난 바와 같이, 폐포 재생률을 계산한 MLI 값을 측정하였을 때, 엘라스타제를 단독으로 처리한 'Ela'군의 경우 대조군인 '(-)'군에 비하여 MLI 값이 상승해 폐포 파괴의 정도가 높다는 것을 알 수 있으며, 'Ela + ADSC'군 및 'Ela+Exo'과 비교하여 'Ela+Nano'이 더 높은 폐포 재생효과를 나타낸다는 점을 확인할 수 있었다.

[0073] 상기로부터, 지방유래 간엽줄기세포 유래 인공나노솜은 우수한 폐포 재생효과를 나타낸다는 점을 알 수 있다.

[0075] 실시예 4. 지방 간엽줄기세포 유래 인공나노솜의 성장인자 발현 증가 확인

[0076] 상기 실시예 2의 방법으로 제작된 엘라스타제 유도 폐기종 동물모델의 손상된 폐조직에 인간 지방유래 간엽줄기세포로부터 유래된 인공나노솜, 자연엑소솜 및 간엽줄기세포를 각 처리하였을 때, 이에 따른, 혈관내피성장인자(vascular endothelial growth factor; VEGF), 섬유아세포 증식인자2(fibroblast growth factor 2; FGF2), 그리고 간세포성장인자(hepatocyte growth factor; HGF)의 발현량 변화를 측정하기 위하여, 상기 동물모델로부터 분리한 폐 조직 10mg에 RIPA 버퍼(Cell Signaling Technology, Danvers, MA)를 첨가하고, 균질화한 다음, Bradford assay를 이용해 단백질 정량을 수행하였다. 이때, VEGF, FGF-2 및 HGF 수준은 각 R&D systems(Minneapolis; MN)을 이용해 제공된 프로토콜에 따라 ELISA를 실시하여 측정하였다.

[0077] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, VEGF, FGF2 및 HGF의 발현량은 엘라스타제와 간엽줄기세포 유래 자연 엑소솜을 함께 처리한 군(Ela+Exo)에 비하여 엘라스타제와 간엽줄기세포 유래 인공나노솜을 함께 처리한 군(Ela+Nano)에서 현저하게 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

[0078] 이는, 상기 지방유래 간엽줄기세포 유래 인공나노솜이 폐기종에 의해 파괴된 폐포의 재생을 효과적으로 유도할 수 있는 잠재력이 있다는 것을 의미한다.

[0080] 실시예 5. 제대 간엽줄기세포 유래 인공나노솜의 제조

[0081] 인간 제대-유래 간엽줄기세포(mesenchymal stem cell; MSC)를 제조하기 위하여, 인간 태아의 탯줄에서 동맥, 정맥, 및 탯줄막을 제거하고, 조직을 작은 절편으로 자른 다음, 콜라게나아제(collagenase)를 처리하여 결합조직을 분해하였다. 이 후 DPBS를 첨가하여 원심분리한 다음, 상층액을 제거하고 low-glucose Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM-LG, Gibco)로 2번 세척하였으며, 분리된 세포를 1% 페니실린이 보충된 배지에 3.7 mg/mL 탄산수소나트륨(sodium bicarbonate) 및 10% FBS가 포함된 DMEM-LG으로 37℃, 5% CO₂ 환경의 배양기로 배양하여 제대유래 간엽줄기세포를 수득하였다.

[0082] 상기 간엽줄기세포 7×10^7 를 인산완충식염수(phosphate buffered saline; PBS)에 재부유하고, 압출기(extruder)를 이용하여 10, 5, 및 1 μ m 막을 통과시킨 다음, 초고속원심분리기를 이용하여 인공나노솜을 분리하였다. 이때, opti-prep 밀도구배 용액을 40% 및 10%로 1차 초고속원심분리를 한 후, 가운데 층만을 분리하여 100,000g force로 1시간 동안 초고속원심분리를 진행해 펠렛(pellet)을 모아 PBS로 재부유하여, 상기 인공나노솜의 특성을 동적광산란법과 전자현미경으로 평가하고 확인하였다.

[0084] 실시예 6. 제대 간엽줄기세포 유래 인공나노솜의 폐포 재생 능력 확인

[0085] 인간 제대유래 간엽줄기세포로부터 유래된 인공나노솜 및 간엽줄기세포를 각 처리한 다음 폐포 재생 능력을 비교하기 위하여, 상기 실시예 2의 방법으로 제작된 엘라스타제 유도 폐기종 동물모델인 마우스를 희생시켜, 희생한 마우스로부터 폐를 분리한 뒤, 0.5% low-melting agarose를 카테터를 이용하여 삽입해 폐포가 잘 퍼지도록 하였고, 이 후 4% 포르말린을 이용하여 폐조직을 고정한 다음, 파라핀 고정(paraffin embedment) 과정을 거쳐 H&E 염색(H&E staining)을 시행해 현미경으로 관찰하였다. 이때, 비교를 위하여 대조군(control)으로 엘라스타제를 주입하지 않은 'Normal'군을 사용하였고, 엘라스타제만 주입한 'Elastase'군, 엘라스타제와 간엽줄기세포를 함께 처리한 'MSCs'군, 엘라스타제와 함께 인간 제대유래 간엽줄기세포로부터 유래된 인공나노솜을 농도별로 처리한 'NVs(Nano Vesicles) 1/3x (0.5ug/ml), 1/15x (0.1ug/ml) 및 1x (1.5ug/ml)'군으로 나누어 H&E 염색을 시행하였다.

[0086] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 'MSCs'군에서는 폐포 조직에서 재생이 잘 진행되지 않아 H&E 염색정도가 적고, 인간 제대유래 간엽줄기세포로부터 유래된 인공나노솜을 가장 높은 농도로 처리한 'NVs 1x'군에서 가장 폐포 조직 재생이 잘 되어 H&E 염색이 많이 된 것을 확인할 수 있었다. 이처럼 제대유래 간엽줄기세포 유래 인공나노솜은 간엽줄기세포와 비교하여 농도 의존적으로 더 높은 재생효과를 나타내었다.

[0087] 또한, 폐포 재생률을 계산한 MLI 값을 측정하였을 때, 도 6에 나타난 바와 같이, 제대유래 간엽줄기세포 유래

인공나노섬은 간엽줄기세포와 비교하여 농도 의존적으로 더 높은 재생효과를 나타내었다.

[0088] 상기로부터, 제대유래 간엽줄기세포 유래 인공나노섬에서 우수한 폐포 재생효과를 나타낸다는 점을 알 수 있다.

[0090] **실시예 7. 제대 간엽줄기세포 유래 인공나노섬의 성장인자 발현 증가 확인**

[0091] 상기 실시예 2의 방법으로 제작된 엘라스타제 유도 폐기종 동물모델의 손상된 폐조직에 인간 제대유래 간엽줄기 세포로부터 유래된 인공나노섬 및 간엽줄기세포를 각 처리하였을 때, 이에 따른, 혈관내피성장인자(VEGF), 섬유아세포 증식인자2(FGF2), 그리고 간세포성장인자(HGF)의 발현량 변화를 측정하기 위하여, 상기 동물모델로부터 분리한 폐 조직 10mg에 RIPA buffer(Cell Signaling Technology, Danvers, MA)를 첨가하고, 균질화한 다음, Brad-ford assay를 이용해 단백질 정량을 수행하였다. 이때, VEGF, FGF-2 및 HGF 수준은 각, R&D systems(Minneapolis, MN)을 이용해 제공된 프로토콜에 따라 ELISA를 실시하여 측정하였다.

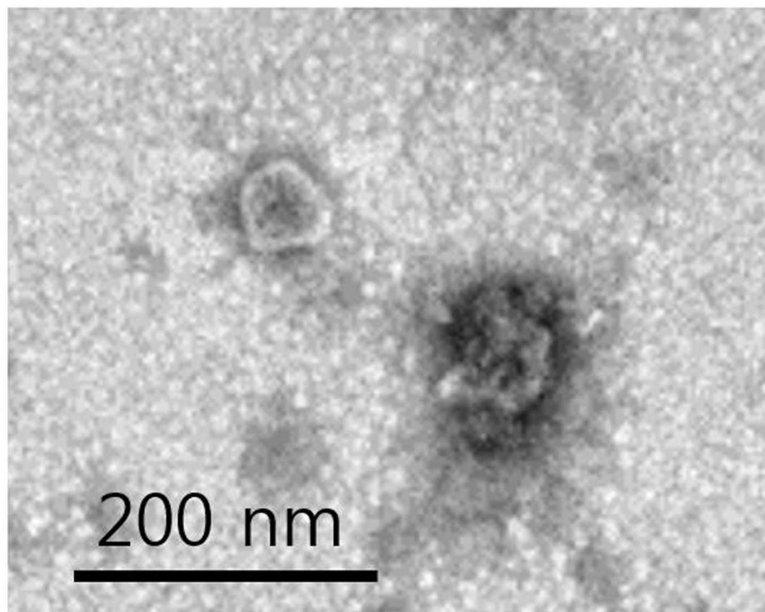
[0092] 그 결과, 도 7 나타낸 바와 같이, VEGF, FGF2 및 HGF의 발현량은 엘라스타제와 간엽줄기세포를 함께 처리한 군에 비하여 엘라스타제와 함께 인간 제대유래 간엽줄기세포로부터 유래된 인공나노섬을 함께 처리한 군에서 현저하게 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

[0093] 이는, 상기 제대유래 간엽줄기세포 유래 인공나노섬이 폐기종에 의해 파괴된 폐포의 재생을 효과적으로 유도할 수 있는 잠재력이 있다는 것을 의미한다.

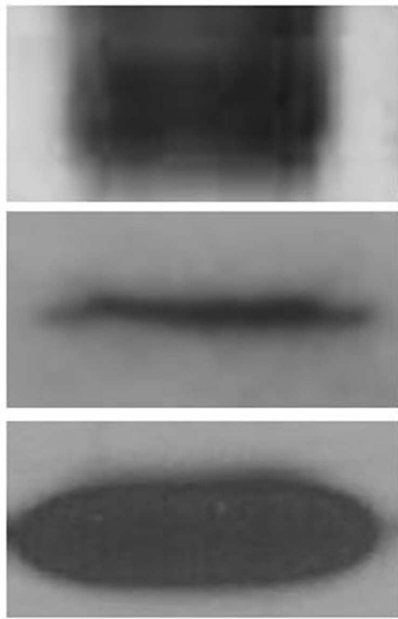
[0095] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

도면1a



도면1b

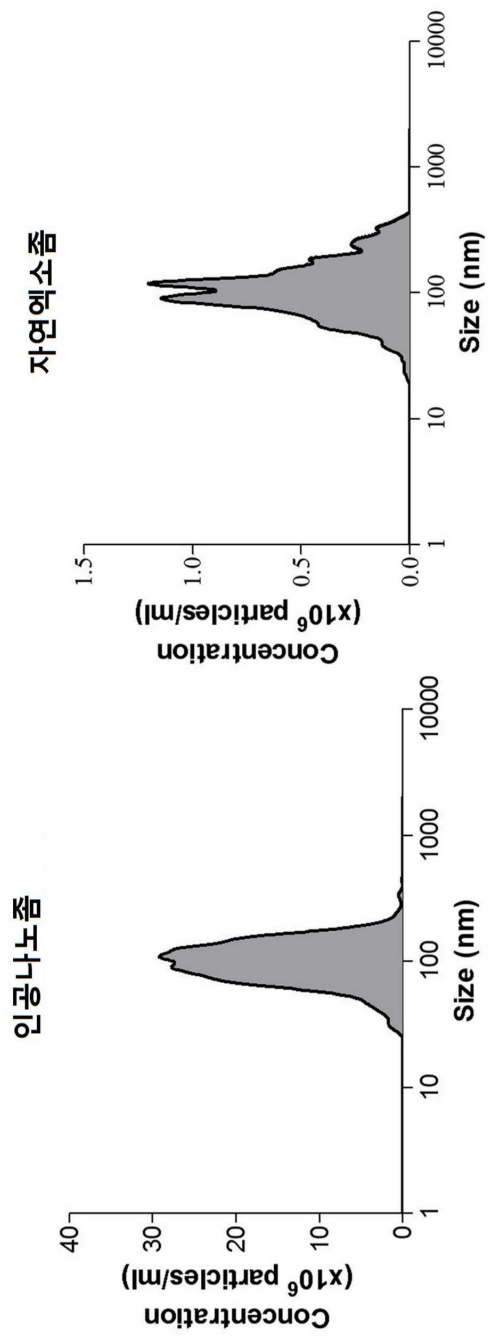


CD63

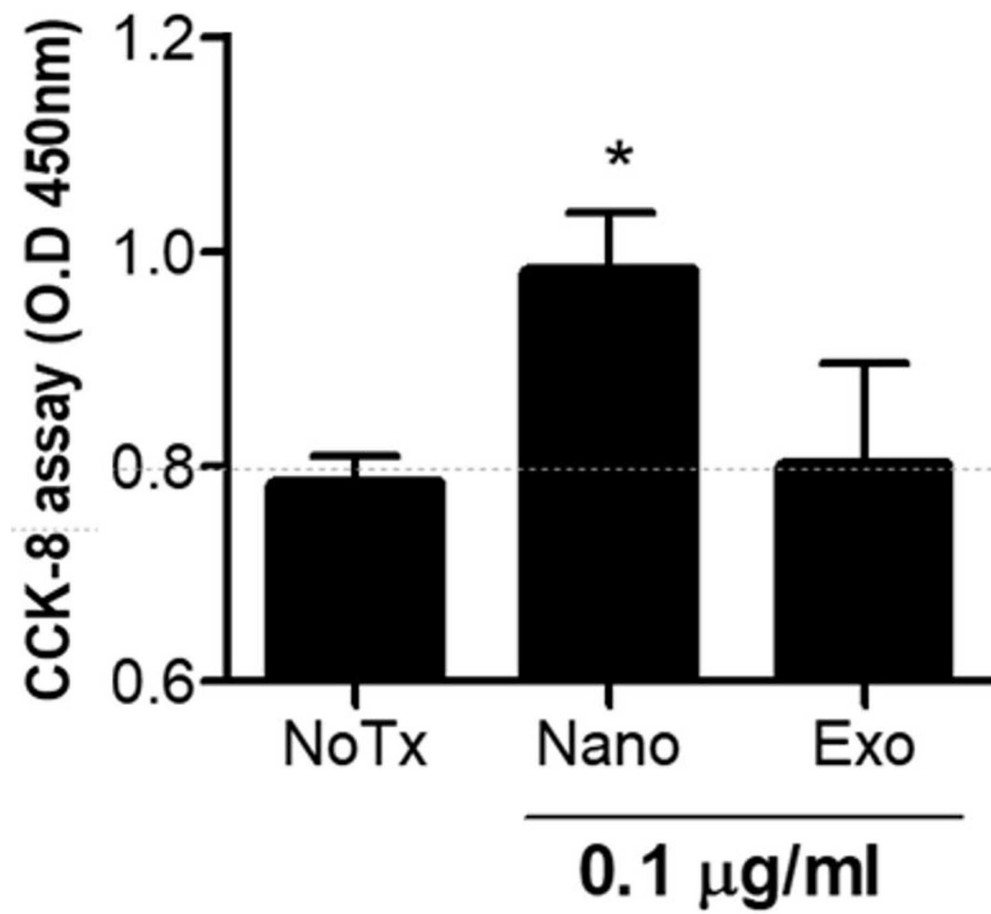
CD81

CD9

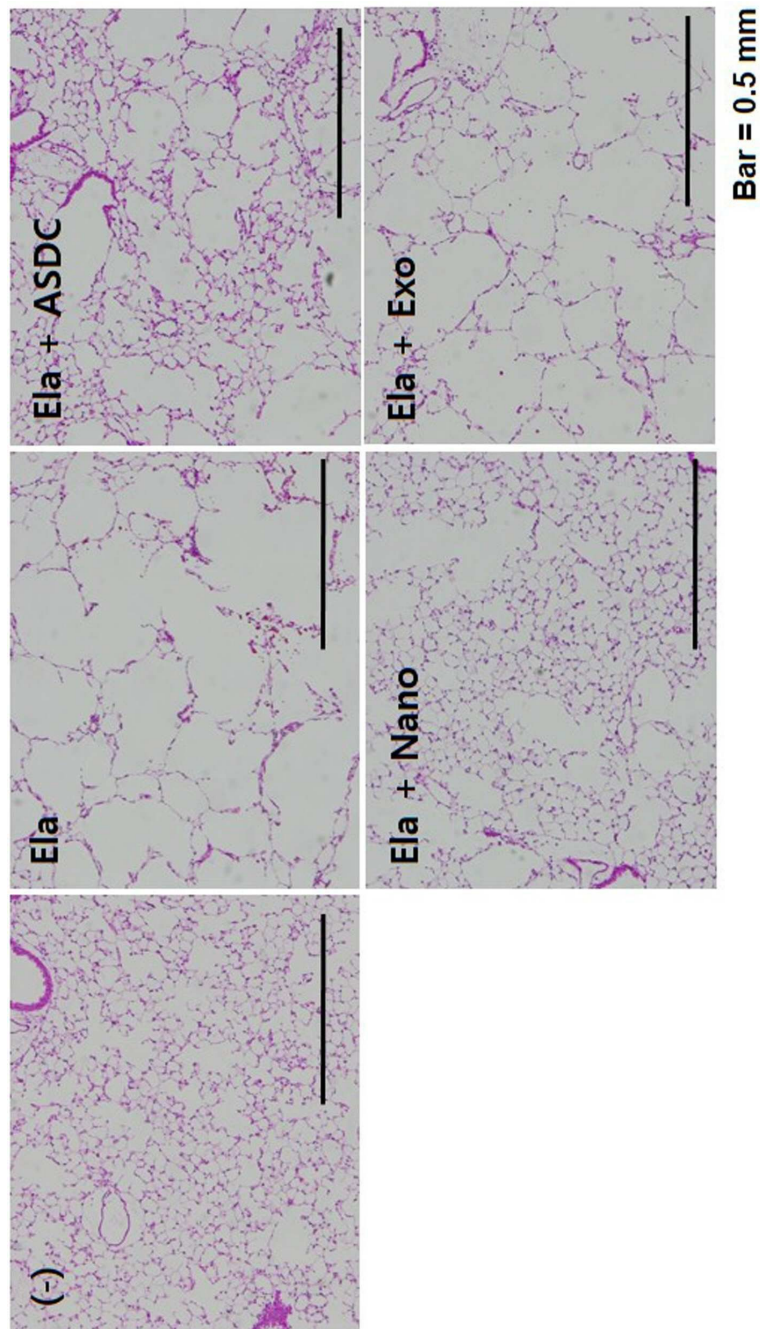
도면1c



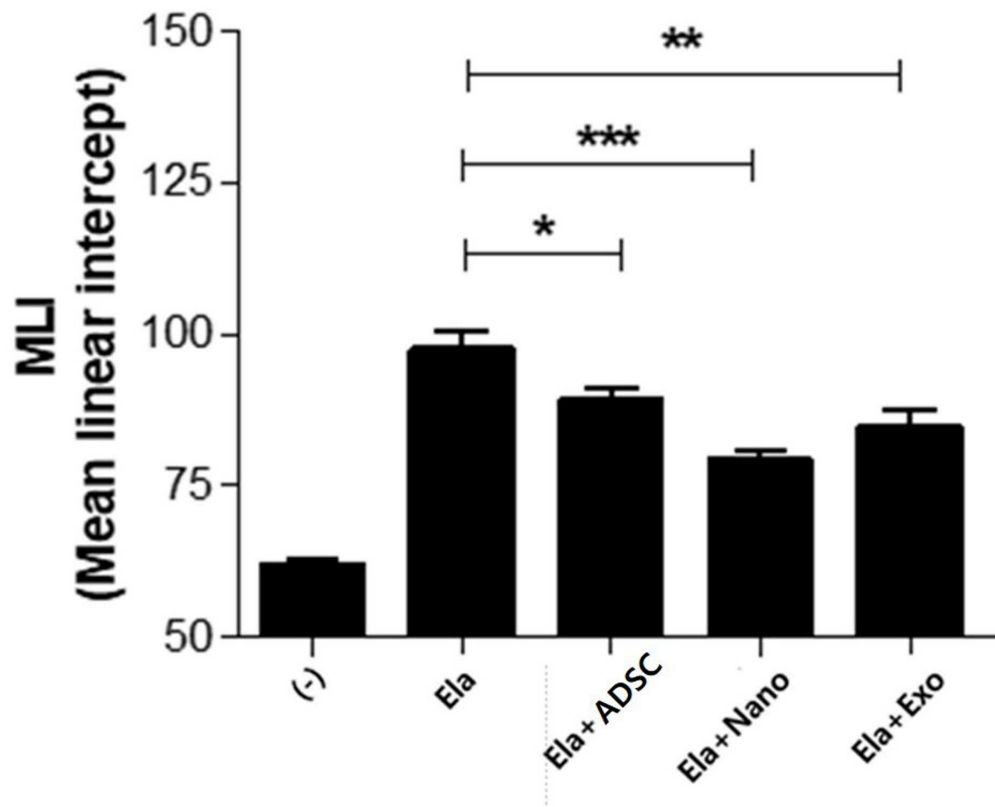
도면2



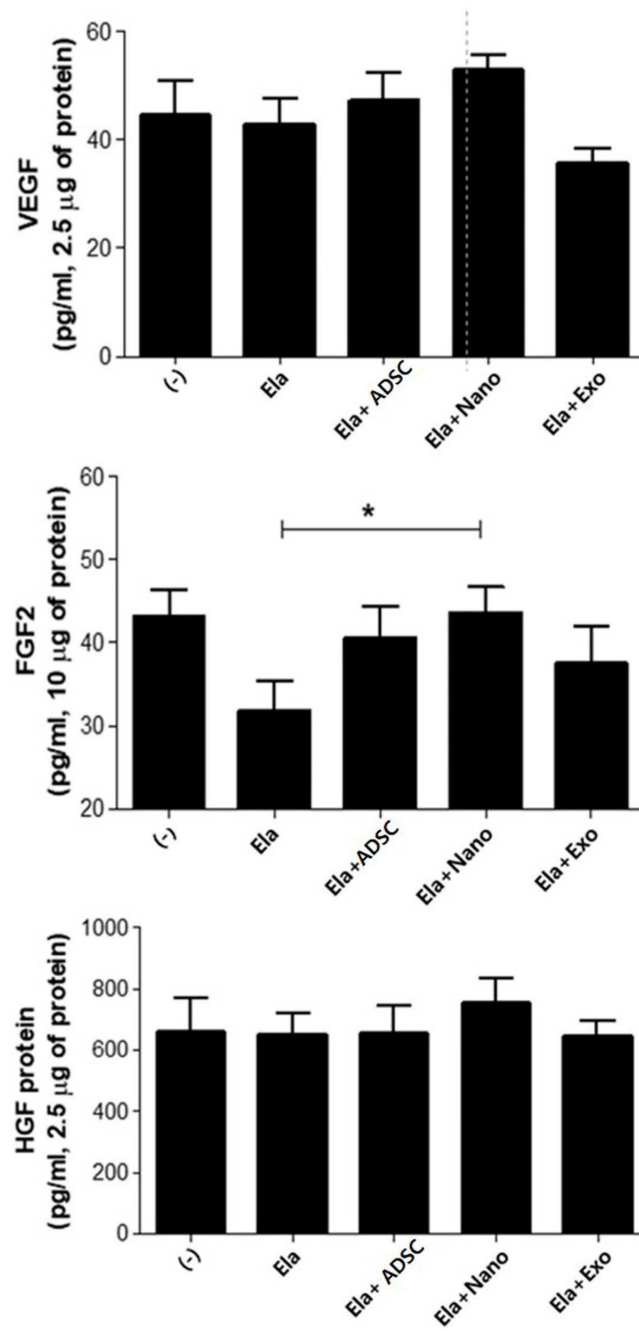
도면3a



도면3b

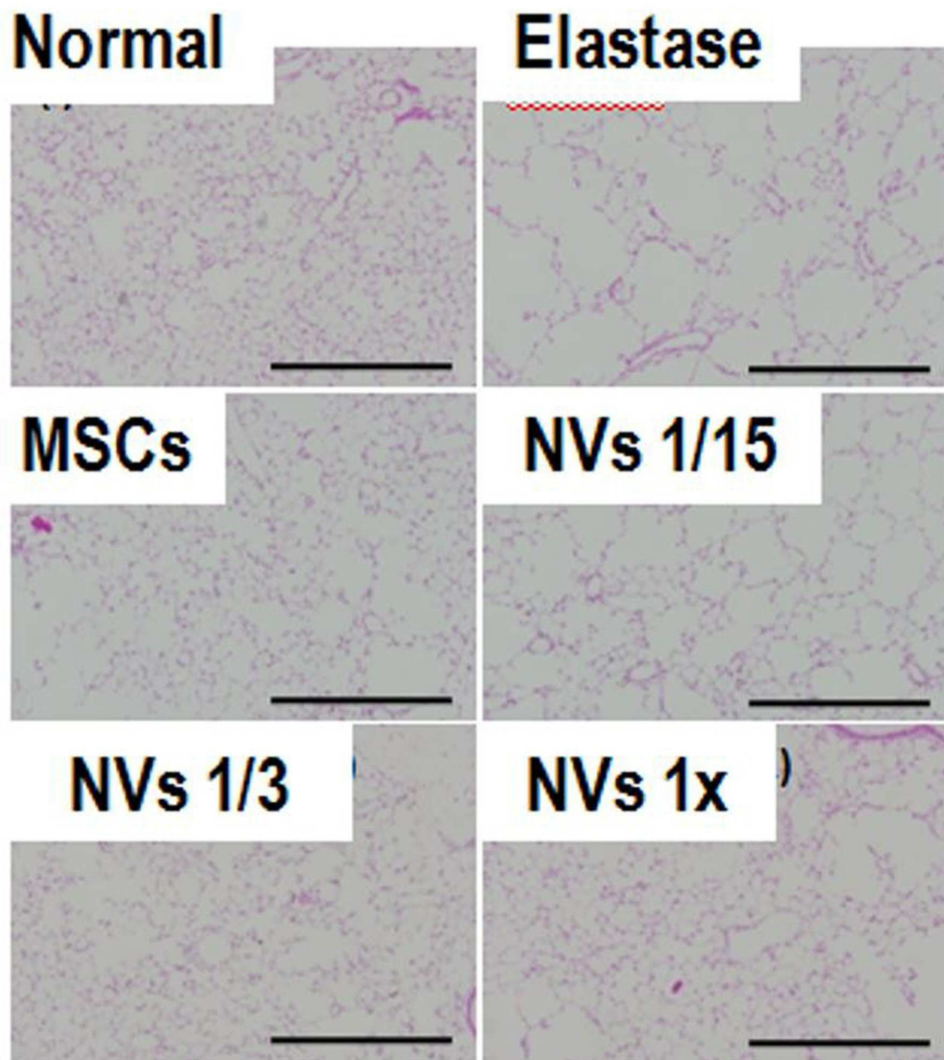


도면4



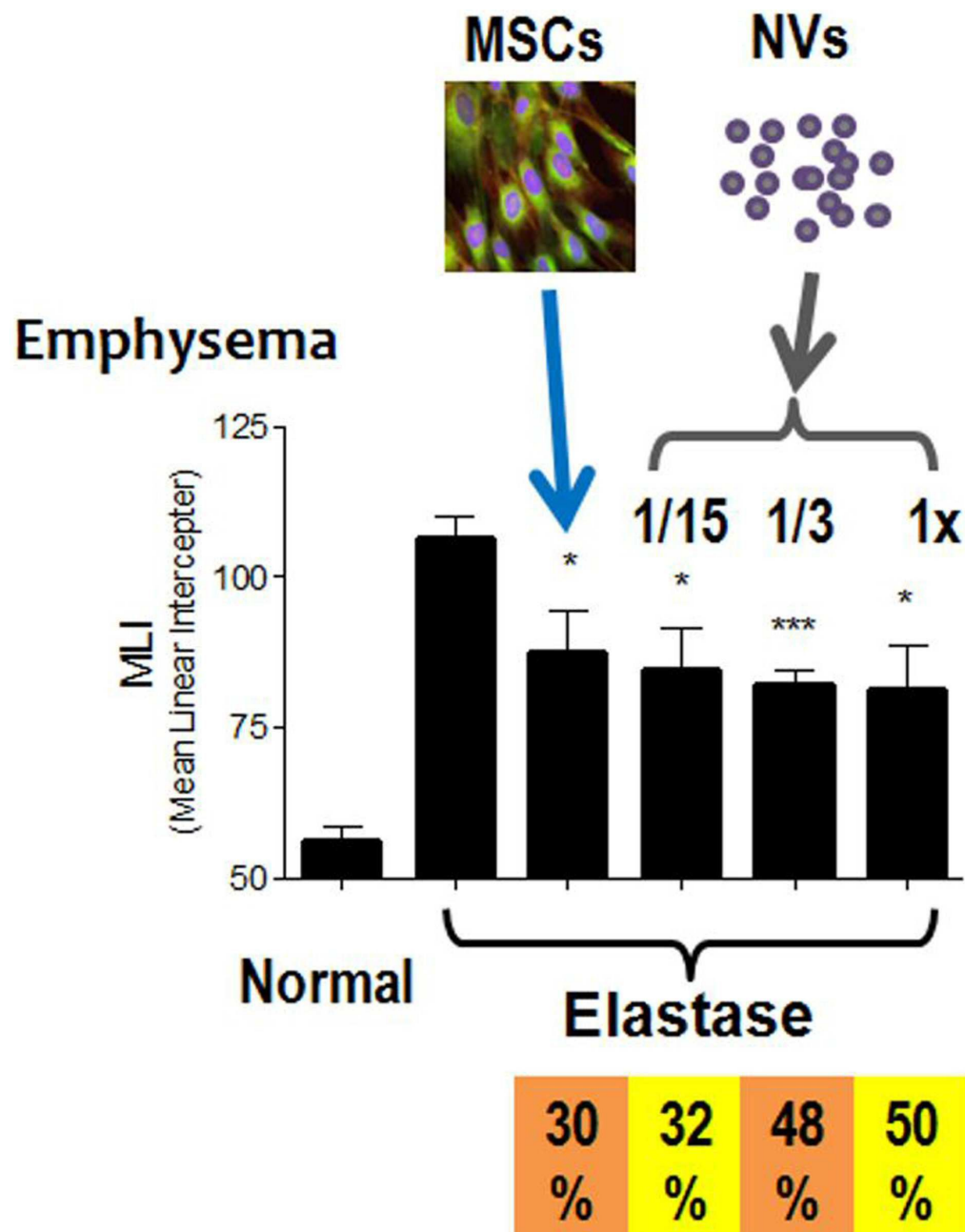
도면5

Microscopic



Bar = 1 mm

도면6



도면7

