



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0137483
(43) 공개일자 2024년09월20일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/28 (2015.01) A61K 31/7105 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01) A61P 29/00 (2023.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 35/28 (2013.01)
A61K 31/7105 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2024-0032237
(22) 출원일자 2024년03월06일
심사청구일자 2024년03월06일
- (30) 우선권주장
1020230030066 2023년03월07일 대한민국(KR)

- (71) 출원인
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
- (72) 발명자
유진호
서울특별시 송파구 동남로 193, 305동 1003호
문경준
경기도 성남시 분당구 장미로 101, 801동 301호
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
이명진

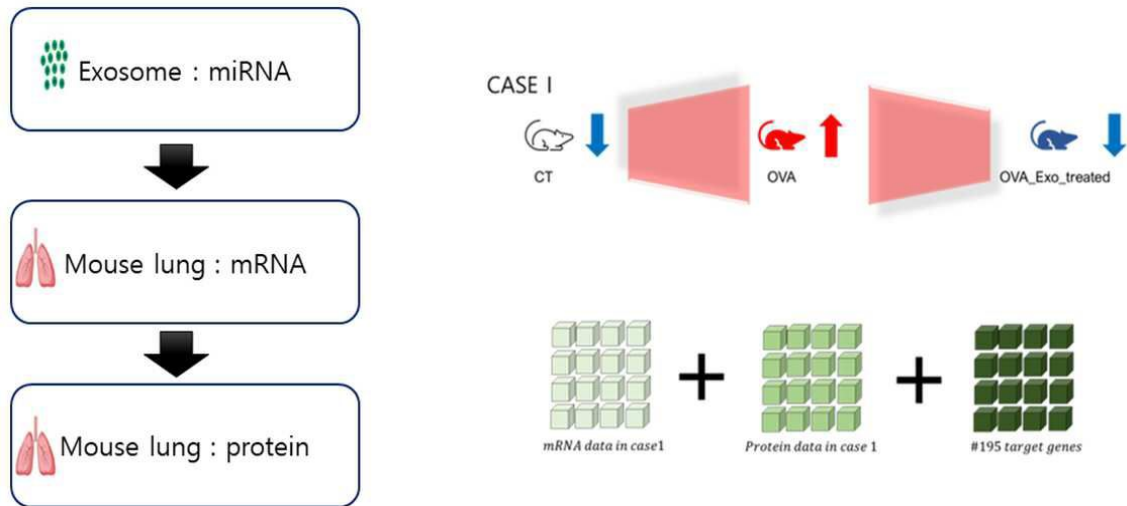
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 중간엽 줄기세포 엑소좀 유래 miRNA 또는 상기 miRNA를 포함하는 엑소좀을 유효성분으로 포함하는 폐 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 중간엽 줄기세포 엑소좀 유래 miRNA 또는 상기 miRNA를 포함하는 엑소좀을 유효성분으로 포함하는 폐 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, 본 발명에 따른 조성물을 폐 질환 동물 모델에 처리한 결과 염증 반응이 감소함에 따라 치료 효과가 확인되었다. 또한, 천식 질환 마우스 동물 모델에서의 폐 조직 내 mRNA, 및 단백질 변화를 확인하여 치료 효과를 나타내는 엑소좀 내 miRNA를 규명하였다. 따라서, 본 발명의 중간엽 줄기세포 유래 엑소좀 또는 상기 엑소좀 내 miRNA를 유효성분으로 포함하는 조성물은 폐 질환, 특히, 천식을 포함하는 다양한 염증성 폐 질환 치료제로 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 11/00 (2018.01)

A61P 29/00 (2023.02)

(72) 발명자

윤진

서울특별시 송파구 양재대로 1218, 103동 1302호

박아름

서울특별시 송파구 양재대로 1218, 136동 202호

임지연

서울특별시 강동구 성내로3길 38, 301호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1465035532

과제번호 HH21C0020010022

부처명 보건복지부

과제관리(전문)기관명 한국보건산업진흥원

연구사업명 범부처재생의료기술개발사업

연구과제명 중증 천식 치료제로서 면역조절 중간엽줄기세포 유래 엑소좀의 최적화와 치료 효능

검증

과제수행기관명 울산대학교 산학협력단

연구기간 2022.02.01 ~ 2022.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

중간엽 줄기세포 엑소좀 유래 miRNA, 또는 상기 miRNA를 포함하는 엑소좀을 유효성분으로 포함하는 폐 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 miRNA는 miR-24-3p, miR-6126, 및 miR-1285-3p로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것인, 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 miRNA를 포함하는 엑소좀은 중간엽 줄기세포 유래 엑소좀인 것인, 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 폐 질환은 염증성 폐 질환인 것인, 약학적 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 염증성 폐 질환은 천식, 폐기종, 만성 기관지염, 폐렴, 폐농양, 및 만성폐쇄성 폐질환으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것인, 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 조성물은 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상을 특징으로 하는 것인, 약학적 조성물:

- a) 호중구 및 호산구의 양 감소;
- b) 기관지 및 혈관 주위의 염증 세포 침윤 감소;
- c) 콜라겐 섬유 감소; 및
- d) 배상세포 감소.

청구항 7

중간엽 줄기세포 엑소좀 유래 miRNA, 또는 상기 miRNA를 포함하는 엑소좀을 유효성분으로 포함하는 조성물; 및

설명서를 포함하는 폐 질환 예방 또는 치료용 키트.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 miRNA는 miR-24-3p, miR-6126, 및 miR-1285-3p로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것인, 키트

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 중간엽 줄기세포 엑소좀 유래 miRNA 또는 상기 miRNA를 포함하는 엑소좀을 유효성분으로 포함하는 폐 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 폐는 동물이 숨을 쉴 수 있도록 호흡 기능을 수행하는 기관으로 심장과 함께 멈출 수 없는 중요한 기관이다. 그러나 최근 미세먼지, 황사, 대기오염 물질로 인해 폐질환을 겪는 환자가 급격히 늘고 있고, 더욱이 폐질환 환자의 경우 코로나 19에 더 취약한 것으로 알려지며 코로나19 대유행으로 인해 폐 건강의 중요성이 커지고 있다.

[0003] 폐 질환에는 폐렴, 천식, 폐섬유증, 만성 폐쇄성 폐질환 등이 있으며, 이 중 만성 폐쇄성 폐질환은 전 세계 인구 사망률 3위를 차지하고 대한민국에서도 4세 이상 발병률이 13.4%로 높은 수치를 나타내어 악명 높은 질환이다. 그러나, 만성 폐쇄성 폐질환을 포함하는 대부분의 폐 질환의 원인 및 증상이 매우 다양하고 복잡한 것으로 알려져 있다.

[0004] 한편, 엑소좀 (exosome)은 여러 종류의 세포들로부터 분비되는 막 구조의 작은 소낭이다. 엑소좀의 직경은 대략 30 내지 100nm인 것으로 보고되어 있다. 엑소좀은 전자 현미경을 통한 연구에서 원형질막으로부터 직접 떨어져 나가는 것이 아니라 다낭체 (multivesicular bodies, MVBs)라고 불리는 세포 내 특정 구획에서 기원하며 세포 밖으로 방출, 분비되는 것으로 관찰되었다. 즉, 다낭체와 원형질막의 융합이 일어나면, 소낭들은 세포 밖 환경으로 방출되는데, 이것을 엑소좀이라고 부른다. 이러한 엑소좀이 어떤 분자적 기작에 의해 만들어지는지 확실히 밝혀진 바가 없으나, 적혈구 세포뿐만 아니라, B-림프구, T-림프구, 수지상 세포, 혈소판, 대식 세포 등을 포함한 다양한 종류의 면역 세포들과 종양 세포, 줄기세포 등도 살아 있는 상태에서 엑소좀을 생산하여 분비한다고 알려져 있다.

[0005] 엑소좀은 세포-세포 간의 커뮤니케이션 (cell-cell communication) 및 세포성 면역을 중재하는 기능적인 역할을 수행하기 위해, 세포 내의 생체분자인 단백질, 생체활성 지질 및 RNA (miRNA)를 수송 (운반)하는 역할을 하므로 다양한 기능 및 종류의 질환에 있어서 연구의 대상이 되고 있다.

[0006] 그러나, 폐 질환, 특히, 염증성 폐질환과 관련하여 중간엽 줄기세포 유래 엑소좀 또는 상기 엑소좀 내 포함되는 miRNA의 역할은 아직까지 보고된 바 없다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) (대한민국 공개특허) 제10-2018-0005546호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 하나의 목적은 중간엽 줄기세포 엑소좀 유래 miRNA, 또는 상기 miRNA를 포함하는 엑소좀을 유효성분으로 포함하는 폐 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 중간엽 줄기세포 엑소좀 유래 miRNA, 또는 상기 miRNA를 포함하는 엑소좀을 유효성분으로 포함하는 조성물; 및 설명서를 포함하는 폐 질환 예방 또는 치료용 키트를 제공하는 것이다.

[0011] 그러나, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명은 중간엽 줄기세포 엑소좀 유래 miRNA, 또는 상기 miRNA를 포함하는 엑소좀을 유효성분으로 포함하는 폐 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0013] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 miRNA는 miR-24-3p, miR-6126, 및 miR-1285-3p로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0014] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 miRNA를 포함하는 엑소좀은 중간엽 줄기세포 유래 엑소좀일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0015] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 폐 질환은 염증성 폐 질환일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0016] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 염증성 폐 질환은 천식, 폐기종, 만성 기관지염, 폐렴, 폐농양, 및 만성폐쇄성 폐질환으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0017] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다:

[0018] a) 호중구 및 호산구의 양 감소;

[0019] b) 기관지 및 혈관 주위의 염증 세포 침윤 감소;

[0020] c) 콜라겐 섬유 감소; 및

[0021] d) 배상세포 감소.

[0022] 본 발명은 중간엽 줄기세포 엑소좀 유래 miRNA, 또는 상기 miRNA를 포함하는 엑소좀을 유효성분으로 포함하는 조성물; 및 설명서를 포함하는 폐 질환 예방 또는 치료용 키트를 제공한다.

[0023] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 miRNA는 miR-24-3p, miR-6126, 및 miR-1285-3p로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0025] 또한, 본 발명은 중간엽 줄기세포 엑소좀 유래 miRNA 또는 상기 miRNA를 포함하는 엑소좀을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 폐 질환 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[0026] 또한, 본 발명은 중간엽 줄기세포 엑소좀 유래 miRNA 또는 상기 miRNA를 포함하는 엑소좀을 유효성분으로 포함하는 조성물의 폐 질환 예방 또는 치료 용도를 제공한다.

[0027] 또한, 본 발명은 폐 질환 예방 또는 치료용 제제를 제조하기 위한 중간엽 줄기세포 엑소좀 유래 miRNA 또는 상기 miRNA를 포함하는 엑소좀을 유효성분으로 포함하는 조성물의 용도를 제공한다.

발명의 효과

[0028] 중간엽 줄기세포 엑소좀 유래 miRNA 또는 상기 miRNA를 포함하는 엑소좀을 유효성분으로 포함하는 폐 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 따르면, 본 발명의 조성물을 폐 질환 동물 모델에 처리한 결과 염증 반응이 감소되어 염증성 폐 질환에 대한 치료 활성이 확인되었다. 또한, 천식 질환 마우스 동물 모델에서의 폐 조직 내 mRNA, 및 단백질 변화를 확인하여 치료 효과를 나타내는 엑소좀 내 miRNA를 규명하였다. 따라서, 본 발명의 중간엽 줄기세포 유래 엑소좀 또는 상기 엑소좀 내 miRNA를 유효성분으로 포함하는 조성물은 폐 질환, 특히, 천식을 포함하는 다양한 염증성 폐 질환 치료제로 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0029] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 분석 방법을 나타낸 모식도이다.
- 도 2a 및 도 2b는 천식 질환 동물모델에 중간엽 줄기세포 유래 엑소솜을 처리한 결과 염증 세포의 종류별 증감을 나타내는 사진 및 그래프이다.
- 도 3은 중간엽 줄기세포 유래 엑소솜 처리에 따른 천식 질환 동물모델에서의 폐 조직학적 분석 결과를 나타낸 사진이다.
- 도 4는 중간엽 줄기세포 유래 엑소솜 내 miRNA 유무 검증 결과를 나타낸 QPCR 결과를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0030] 본 발명은 중간엽 줄기세포 엑소솜 유래 miRNA 또는 상기 miRNA를 포함하는 엑소솜을 유효성분으로 포함하는 폐 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0031] 본 발명에서, “중간엽 줄기세포”는 중간엽 줄기세포는 자가증식능, 다분화능 (multy-potency)을 가지고 있으며, 다양한 종류의 전구세포들이 있기 때문에 줄기세포주를 확보하기가 쉽고, 다분화성 줄기세포로서, 배아줄기세포 등의 만능줄기세포에 비해 훨씬 유전적으로 안정화되어 있다는 장점을 지니고 있다. 또한 항염증능, 면역조절능 때문에 연골재생, 심근경색 치료, 이식편대숙주질환의 치료 등을 위한 세포 치료제로 개발되어 왔으며, 이로부터 유래되는 엑소솜을 포함한 다양한 물질 역시 치료제로 개발되어 왔다.
- [0032] 본 발명의 조성물은 중간엽 줄기세포로부터 엑소솜을 추출하고 유효성분으로서 폐 질환 모델에 처리한 결과 염증 활성이 감소되는 등의 치료 효과를 확인하였다. 본 발명에서, 중간엽 줄기세포 엑소솜이란 중간엽 줄기세포로부터 유래된 엑소솜을 의미한다. 중간엽 줄기세포는 골수 (Bone marrow), 와튼 젤리 (Wharton' s jelly), 지방조직 (Adipose tissue) 등에서 채취할 수 있고, 본 발명에서는 와튼 젤리 유래 중간엽 줄기세포를 사용하였으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0033] 본 발명에서, 중간엽 줄기세포로부터 엑소솜을 추출하고, 상기 엑소솜으로부터 miRNA를 분리하기 위하여 당업계에서 일반적으로 수행되는 방법으로 중간엽 줄기세포를 전처리, 보관, 배양할 수 있다. 예를 들어, 중간엽 줄기세포로부터 엑소솜을 높은 수율로 추출하기 위하여 특정 방법으로 전처리하여 보관할 수 있고, 배양을 용이하게 하거나 miRNA를 높은 수준의 농도로 포함시키기 위해 기능 물질을 첨가할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0034] miRNA는 18-25 뉴클레오티드 (nucleotide, nt)로 구성된 작은 비-암호화 RNA로서, 표적 유전자의 3' -비번역 부위 (untranslated region, UTR)에 결합하여 유전자 발현을 조절하고, 인트론 (intron), 엑손 (exon) 또는 유전자간 부위 (intergenic region)로부터 공정된다. 첫째로, miRNA는 수천 개의 뉴클레오티드를 포함하는 초기 miRNA (pri-miRNA) 분자 내로 RNA 폴리머라아제에 의해 전사되고, pri-miRNA는 miRNA 전구체로 알려진 대략 70 nt 줄기 고리 중간체를 형성하기 위해 마이크로프로세서에 의해 연속적으로 공정된다. 그 후, pre-miRNA는 엑스포틴5 (Exportin-5, EXP5)와 공동인자 Ran-GTP를 통해 핵으로부터 세포질로 이동되고, 여기서 pre-miRNA는 RNase 엔도뉴클레아제 다이서에 의해 18-25 nt 성숙 miRNA 듀플렉스 (duplexe)로 공정된다. 성숙 miRNA 듀플렉스는 RNA-유도 침묵 복합체 (RNA-induced silencing complex, RISC) 내로 아르곤노트 (Argonaute) 단백질과 단일 가닥 RNA로서 통합되고, 이는 표적 mRNA의 절단 또는 번역 억제 중 어느 하나를 유도한다.
- [0035] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 miRNA는 miR-24-3p, miR-6126, 및 miR-1285-3p로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0036] 본 발명에서, 상기 miR-24-3p는 서열번호 1을 포함하는 염기 서열로 표시될 수 있고, miR-6126는 서열번호 2를 포함하는 염기 서열로 표시될 수 있으며, miR-1285-3p는 서열번호 3을 포함하는 염기 서열로 표시될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0037] 본 발명에서 상기 miRNA의 서열은 해당 miRNA의 종자 서열일 수 있다. “종자 서열 (seed sequence)”이란 miRNA가 타겟을 인식할 때 완전한 상보성을 가지고 결합하는 miRNA 내 일부 영역의 뉴클레오타이드 서열을 의미한다. 이는 miRNA가 타겟에 결합하기 위해 필수적으로 요구되는 부분이자 실질적으로 유효한 기능을 하는 부위이다. 즉, 본 발명에서 사용되는 miRNA는 이를 구성하는 핵산 분자의 작용성 증가물, 예를 들어, miRNA 핵산 분자의 일부 염기서열이 결실, 치환 또는 삽입에 의해 변형되더라도 상기 miRNA 핵산 분자와 기능적으로 동등한

작용을 할 수 있는 변이체를 포함하는 개념이다. 따라서, 본 발명에서 상기 miRNA는 서열번호 1 내지 3 중 어느 하나로 표시되는 폴리뉴클레오티드이거나, 혹은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 miRNA라면 제한 없이 포함될 수 있다.

[0038] 또한, 본 발명에서 아미노산 서열 및/또는 핵산 서열과 관련하여 본원에 사용된 용어 “퍼센트 동일성”, “서열 동일성”, “백분율 유사성”, “서열 유사성”, “서열 동일성 백분율” 등은 정렬된 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드 사이의 유사성을 최대화하고 동일하거나 유사한 잔기 또는 뉴클레오티드의 수, 총 잔기 또는 뉴클레오티드의 수, 및 서열 정렬에서 갭의 존재 및 길이의 함수인 서열의 정렬에 기초한 2개의 서열의 유사성 정도를 비교하여 결정된 척도를 지칭할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0039] 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열의 일부는 2개 서열의 최적 정렬을 위해, 참조 서열 (참가 또는 결실을 포함하지 않음)에 비해 참가 또는 결실 (즉, 갭)을 포함할 수 있다. 상기 백분율은 둘 다의 서열에서 동일한 핵산 염기 또는 아미노산 잔기가 나타나는 위치의 수를 결정하여 매칭되는 위치의 수를 산출하고, 매칭되는 위치의 수를 비교창에서 위치의 총수로 나누고, 그 결과에 100을 곱해서 서열 동일성 백분율을 산출함으로써 계산된다.

[0040] 둘 이상의 핵산 또는 폴리펩타이드 서열과 관련하여 용어 “동일한” 또는 백분율 “동일성”은 이하에 기재하는 디폴트 파라미터를 이용하는 BLAST 또는 BLAST 2.0 서열 비교 알고리즘을 이용하여 또는 수동 정렬 및 육안 검사에 의해 측정할 때 동일하거나 또는 동일한 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드의 구체화된 백분율 (즉, 비교 창 또는 표시된 영역에 대한 최대 대응도를 위해 비교되고 정렬될 때, 구체화된 영역에 대해 약 60%의 동일성, 바람직하게는 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 더 높은 동일성)을 갖는 둘 이상의 서열 또는 하위서열을 지칭한다 (예를 들어, NCBI 웹 사이트 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> 등 참조). 이어서, 이러한 서열은 “실질적으로 동일한” 것으로 언급된다.

[0041] 본 정의는 또한 시험 서열의 보완을 지칭하거나, 이에 적용될 수 있다. 상기 정의는 또한 결실 및/또는 참가를 갖는 서열뿐만 아니라 치환을 갖는 것을 포함한다. 이하에 기재하는 바와 같이, 선호되는 알고리즘은 갭 등을 설명할 수 있다. 바람직하게는, 동일성은 적어도 약 25개의 아미노산 또는 뉴클레오티드 길이인 영역에 걸쳐, 또는 더 바람직하게는 50 내지 100개의 아미노산 또는 뉴클레오티드 길이인 영역에 걸쳐 존재한다.

[0042] 아미노산 또는 뉴클레오티드 염기 “위치”는 N-말단 (또는 5' -단부)에 대해 이의 위치에 기반하여 참조 서열에서 각각의 아미노산 (또는 뉴클레오티드 염기)을 순차적으로 확인하는 숫자로 표시된다. 최적의 정렬을 결정할 때 고려되어야 하는 결실, 삽입, 절단, 융합 등으로 인해, 일반적으로 단순히 N-말단으로부터 계수함으로써 결정된 시험 서열의 아미노산 잔기 수는 참조 서열에서 이의 대응하는 위치의 수와 반드시 동일하지는 않을 것이다. 예를 들어, 정렬된 참조 서열에 대해 변이체가 결실을 갖는 경우에, 결실 부위에서 참조 서열 내 위치에 대응하는 변이체에 아미노산이 없을 것이다. 정렬된 참조 서열에 삽입이 있는 경우에, 삽입은 참조 서열에서 넘버링된 아미노산 위치에 대응하지 않을 것이다. 절단 또는 융합의 경우에, 대응하는 서열에서 임의의 아미노산에 대응하지 않는 참조 또는 정렬 서열 중 하나에 아미노산의 신장이 있을 수 있다.

[0043] 주어진 아미노산 또는 폴리뉴클레오티드 서열의 넘버링과 관련하여 사용될 때 “~에 관해 넘버링된” 또는 “~에 대응하는”이라는 용어는 주어진 아미노산 또는 폴리뉴클레오티드 서열이 참조 서열과 비교될 때 구체화된 참조 서열의 잔기의 넘버링을 지칭한다.

[0044] 또한, 본 발명에서 상기 miRNA는 상기한 바와 같이 성숙한 miRNA일 수 있으나, miRNA 전구체 (miRNA precursor), 일차 miRNA (pri-miRNA) 또는 플라스미드 (plasmid) 형태의 miRNA 전구체일 수 있다.

[0045] 또한, 본 발명에서 상기 miRNA는 단일 가닥 또는 이중 가닥 형태로 존재할 수 있다. 성숙 miRNA 분자는 주로 단일 가닥으로 존재하지만, 전구체 miRNA 분자는 이중 가닥을 형성할 수 있는 부분적인 자가-상보적인 구조 (예를 들어 스템-루프 구조)를 포함할 수 있다.

[0046] 또한, 본 발명의 상기 miRNA를 구성하는 핵산 분자 중 적어도 하나는, 인산 뼈대 구조 (phosphate backbone structure)가 황 원소로 치환한 형태인 포스포로사이오에이트 (phosphorothiolate) 구조가 포함되는 형태; DNA, PNA (petide nucleic acids) 또는 LNA (locked nucleic acid) 분자로 치환된 형태; 또는 당의 2' 수산화기가 메틸화, 메톡시화 또는 플르오르화 구조로 치환된 형태일 수 있다.

[0047] 본 발명의 상기 miRNA는 표준 분자 생물학 기술, 예를 들어 화학적 합성 방법 또는 재조합 방법을 이용하여 분리 또는 제조하거나, 시판되는 것을 사용할 수 있다. 특히, 본 발명의 miRNA는 당업계의 일반적인 기술에 의해

중간엽 줄기세포 유래 엑소솜으로부터 분리된 것일 수 있다.

- [0048] 본 발명에서, 상기 miRNA 핵산 분자를 발현 벡터에 포함된 형태로 제공할 수 있다. 발현 벡터는, 바람직하게는 발현 가능한 형태로 본 발명의 miRNA를 암호화하는 것으로 당업계에서 일반적으로 사용되는 방법에 따라 숙주에 도입할 수 있고, 이 때, 본 발명에서 상기 발현 벡터는 miRNA를 전달하기 위한 것이라면 제한 없이 사용될 수 있다. 또한, 본 발명에서 상기 발현 벡터는, 형질 전환된 세포의 선별을 용이하게 하기 위하여 선별 마커를 추가로 포함하는 것이 바람직할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명에서, 상기 발현 벡터가 숙주 세포에 도입되어 형질 전환된 형질 전환체로 제공될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0049] 본 발명에서, 상기 miRNA를 포함하는 세포 배양물을 유효성분으로 추가적으로 포함할 수 있고, 본 발명의 조성물은 상기 miRNA를 포함하는 엑소솜 (exosome)을 유효성분으로 포함할 수 있다.
- [0050] 본 명세서에서 “유효성분”은 직접 또는 간접으로 그 성분 자체가 가지고 있는 약리작용이 제제의 효능 및 효과로 기대되는 물질 또는 물질군으로서, 단독으로 목적으로 하는 활성을 나타내거나 또는 그 자체는 활성이 없는 담체 등과 함께 목적으로 하는 활성을 나타낼 수 있는 성분을 의미한다. 그 성분이 전체 조성물의 건조중량에 대하여 1 중량% 이상 포함될 수 있으며, 예컨대 10 중량% 내지 100 중량%, 20 중량% 내지 100 중량%, 30 중량% 내지 100 중량%, 40 중량% 내지 100 중량%, 50 중량% 내지 100 중량%, 60 중량% 내지 100 중량%, 70 중량% 내지 100 중량%, 80 중량% 내지 100 중량%, 90 중량% 내지 100 중량%, 10 중량% 내지 80 중량%, 20 중량% 내지 80 중량%, 30 중량% 내지 80 중량%, 40 중량% 내지 80 중량%, 50 중량% 내지 80 중량%, 60 중량% 내지 80 중량%, 또는 70 중량% 내지 80 중량% 포함되어 있을 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0051] 본 발명에서는 상술한 바와 같이 중간엽 줄기세포 유래 엑소솜을 처리한 결과 다양한 분석 방법을 통해 폐 질환, 특히, 천식 치료 활성이 우수함을 확인하였는 바, 본 발명의 조성물은 중간엽 줄기세포 유래 엑소솜을 유효성분으로 할 수 있다.
- [0052] 또한, 이에 더하여 본 발명에서 폐 질환 치료 활성을 나타내는 중간엽 줄기세포 유래 엑소솜 내에서 확인된 3종의 miRNA는 본 발명의 엑소솜 및/또는 조성물의 유효성분일 수 있다. 즉, 3종의 miRNA가 포함되어 있기 때문에 중간엽 줄기세포 유래 엑소솜의 폐 질환 치료 활성이 나타나는 것이다. 본 발명에서는 실시예를 통해 상기 총 3종의 miRNA를 포함하는 중간엽 줄기세포 유래 엑소솜을 천식 동물 모델에 처리하였을 때, 염증 반응이 억제되고, 염증 세포의 침윤 감소뿐만 아니라 치료 효과를 나타내는 조직학적 반응이 확인되었다는 점에서, 3종의 miRNA가 본 발명의 중간엽 줄기세포 유래 엑소솜이 폐 질환 예방 또는 치료용 조성물의 유효성분임을 증명하였다. 이 때, 3종의 miRNA는 본 발명의 표 1에서 개시하는 바와 같이 폐 질환과 관련된 상기 유전자를 타겟함으로써 폐 질환 치료 활성을 나타낼 수 있다. 구체적으로, miR-24-3p는 Agps (Alkylglycerone Phosphate Synthase) 또는 Pml (Promyelocytic Leukemia Protein); miR-6126는 Tardbp (TAR DNA binding protein), Mat2a (methionine adenosyltransferase 2A), Nxf1 (nuclear RNA export factor 1), 또는 Naa15 (N-alpha-acetyltransferase 15, NatA auxiliary subunit); 및 miR-1285-3p는 Mvd (mevalonate diphosphate decarboxylase), Mel (malic enzyme 1), Ppp3cb (protein phosphatase 3 catalytic subunit beta), Nxf1 (nuclear RNA export factor 1), Larpl (La ribonucleoprotein 1, translational regulator), 또는 Ifi30 (gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductas)를 타겟으로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0054] 본 발명에서, 폐 질환 예방 또는 치료용 조성물은 상기 miR-24-3p, miR-6126, 및 miR-1285-3p로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 miRNA와, 다른 miRNA를 추가적으로 더 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 miRNA의 폐 질환 치료 활성을 증가시키기 위한 중간엽 줄기세포 유래 엑소솜 내 포함되어 있는 기타 miRNA를 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0055] 본 발명에서, 상기 miRNA는 Mat2a, Ifi30, 또는 Nampt를 타겟으로 할 수 있다. 여기서, Mat2a (methionine adenosyltransferase 2A)는 ATP와 메티오닌으로부터 SAM (S-adenosylmethionine)을 생성하는 효소로, 과파인 유발 급성 폐 염증에 Mat2a의 억제제인 PF9366을 처리하였을 때 이에 대한 염증 치료 효과가 발생한다.
- [0056] 또한, Ifi30 (interferon gamma induced protein 30)은 인간에서 IFI30 유전자에 의해 암호화되는 효소로, 이 유전자에 의해 암호화된 단백질은 낮은 pH에서 단백질 이황화 결합을 감소시킬 수 있는 리소솜 티올 환원효소로 기능하는 것이 알려져 있다. 천식 또는 천식과 같은 염증 질환과 관련이 있는데, 특히, 면역계 과정에 관여하는 아지스로마이신 치료 후 가래에서 차등적으로 발현되는 유전자 중 하나이다.

- [0057] Nampt (visfatin)는 visceral adipose tissue에서 분비되는 일종의 adipocytokine으로 인슐린 저항성을 개선시키고 insulin 수용체에 작용하여 anti-diabetic effect를 유발한다고 알려져 있다. 이는, 천식군 및 대조군의 MBI 비교 결과, 천식군의 혈청에서의 수준이 대조군 대비 현저히 높은 것으로 알려진 바 있다.
- [0058] 따라서, 본 발명의 miRNA는 Mat2a, Ifi30, 및/또는 Nampt에 작용하여 폐 질환, 특히, 염증성 폐 질환에 대한 치료 효과를 나타낼 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0059] 본 발명에서, “엑소좀 (exosome)”이란 다양한 세포들로부터 분비되는 막 구조의 작은 소낭을 의미하며, 나노 베지클 (nanovesicle)로도 정의된다. 세포외소포체의 직경은 대략 30 내지 1,000nm이고, 엑소좀의 크기는 바람직하게는 평균 직경이 50 내지 200nm이며, 다낭체와 원형질막의 융합이 일어나 세포 밖 환경으로 방출되는 소낭을 의미한다.
- [0060] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 miRNA를 포함하는 엑소좀은 중간엽 줄기세포 유래 엑소좀일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0061] 본 발명에서, 엑소좀은 중간엽 줄기세포로부터 유래된 것일 수 있다. 예를 들어, 중간엽 줄기세포의 배양물로부터 엑소좀을 분리할 수 있고, 이 때 배양이란 엑소좀 및/또는 엑소좀 내 본 발명의 miRNA가 포함될 수 있도록 기능하는 기능성 물질을 포함하여 당업계에서 일반적으로 사용되는 방법을 통해 수행될 수 있으며, 예를 들면, 배양액에서, 원심분리, 초고속 원심분리, 필터에 의한 여과, 겔 여과 크로마토그래피, 프리-플로우 전기영동, 모세관 전기영동, 폴리머를 이용한 분리 등의 방법 및 이들의 조합을 이용하여 분리할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0062] 예를 들어, 본 발명의 일 실시예에 따르면, 중간엽 줄기세포를 다양한 조건에서 계대 배양한 후 원심분리기를 통해 엑소좀을 수득한 후 다시 배양하였다. 이후, 원심분리하여 획득한 상등액을 여과하였으며, 추가적으로 여과장치를 이용하여 엑소좀을 분리하였다. 이후, 다시 여과장치를 이용하여 농축해, 최종 엑소좀 농축액을 수득하였다.
- [0063] 따라서, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 중간엽 줄기세포로부터 엑소좀을 수득하는 방법을 제공한다:
- [0064] (S1) 중간엽 줄기세포를 계대배양하는 단계;
- [0065] (S2) 상기 계대배양된 중간엽 줄기세포를 재배양하여 엑소좀이 포함된 배지를 수득하는 단계;
- [0066] (S3) 상기 수득한 배지를 원심분리한 후 상등액을 여과하는 단계; 및
- [0067] (S4) 상기 여과된 배지를 여과 장치로 여과 및 농축하는 단계.
- [0068] 본 발명의 일 실시예에 있어서, (S2) 단계에서 계대배양된 중간엽 줄기세포는 (S1) 단계에서 6회 계대배양된 중간엽 줄기세포일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0069] 본 발명의 일 실시예에 있어서, (S3) 단계에서 여과는 여과막을 이용하여 수행될 수 있다. 또한, 상기 여과막은 0.22 μm 일 수 있고 상기 크기를 통해 엑소좀을 여과할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 상기 여과막의 여과 가능 크기와 당업계에서 동일한 것으로 인정되는 공극을 포함하는 여과막은 모두 사용될 수 있다.
- [0070] 본 발명의 일 실시예에 있어서, (S4) 단계에서 여과는 여과 장치를 사용하여 여과 및 농축될 수 있다. 본 발명에서는 여과 장치로 접선 유동 여과 장치로서 여과막 및 연동 펌프를 사용하였으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 여과 장치는 300 kDa의 분자량 차단 규격의 공극을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 상기 여과막의 여과 크기와 당업계에서 동일한 것으로 인정되는 공극을 포함하는 여과막은 모두 사용될 수 있다. 또한, 상기 접선 유동 여과는 배지를 50배 농축할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0071] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 방법은 (S5) 추가 농축하는 단계를 더 포함할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. (S5) 단계에서는 추가적으로 농축하는 단계를 더 수행하여 최종 엑소좀이 포함된 용액의 부피 또는 농축 정도를 미세하게 더 조절할 수 있다. 본 발명에서는, 정용여과를 10회 더 수행하였으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0072] 본 발명에서, 상기 엑소좀으로부터 miRNA를 분리하는 방법은 특별히 제한하지 않으며 당해 기술분야에서 일반적으로 사용되는 방법에 의해 수행될 수 있으나, 예를 들면 용혈 시약을 이용하여 엑소좀을 용혈시킨 뒤 폐놀계화합물을 이용하여 분리하는 방법 또는 컬럼 (column)을 이용하여 분리하는 방법을 수행할 수 있다. 본 발명에서는, 시판 키트를 사용하여 miRNA를 분리하였으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0073] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 폐 질환은 염증성 폐 질환일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0074] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 염증성 폐 질환은 천식, 폐기종, 만성 기관지염, 폐렴, 폐농양, 및 만성폐쇄성 폐질환으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0075] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다:
- [0076] a) 호중구 및 호산구의 양 감소;
- [0077] b) 기관지 및 혈관 주위의 염증 세포 침윤 감소;
- [0078] c) 콜라겐 섬유 감소; 및
- [0079] d) 배상세포 감소.
- [0080] 본 발명에서, 염증성 폐 질환에 대한 치료 효과와 관련하여, 본 발명에 따른 상술된 3종의 miRNA를 포함하는 중간엽 줄기세포 유래 엑소좀을 처리한 결과 폐포에서의 호중구 및 호산구의 수준이 낮아져 염증 감소가 확인되었을 뿐만 아니라 염증세포 침윤 활성이 감소되었다는 점에서 폐에 대한 항염증 활성이 증명되었으므로, 당업자라면 본 발명에 따른 상술된 3종의 miRNA의 염증성 폐 질환에 대한 치료 효과를 용이하게 예상할 수 있다.
- [0081] 본 발명에 따른 “약학적 조성물”은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 상기 부형제는 예를 들어, 희석제, 결합제, 붕해제, 활택제, 흡착제, 보습제, 필름-코팅 물질, 및 제어방출첨가제로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.
- [0082] 본 발명에 따른 약학적 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 서방형 과립제, 장용과립제, 액제, 점안제, 엘실릭제, 유제, 현탁액제, 주정제, 트로키제, 방향수제, 리모나아데제, 정제, 서방형정제, 장용정제, 설하정, 경질캡셀제, 연질캡셀제, 서방캡셀제, 장용캡셀제, 환제, 틸크제, 연조엑스제, 건조엑스제, 유동엑스제, 주사제, 캡슐제, 관류액, 경고제, 로션제, 파스타제, 분무제, 흡입제, 패취제, 멸균주사용액, 또는 에어로졸 등의 외용제 등의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 상기 외용제는 크림, 젤, 패치, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니먼트제, 파스타제 또는 카타플라스마제 등의 제형을 가질 수 있다.
- [0083] 본 발명에 따른 약학적 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 올리고당, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.
- [0084] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.
- [0085] 본 발명에 따른 정제, 산제, 과립제, 캡슐제, 환제, 트로키제의 첨가제로 옥수수전분, 감자전분, 밀전분, 유당, 백당, 포도당, 과당, 디-만니톨, 침강탄산칼슘, 합성규산알루미늄, 인산일수소칼슘, 황산칼슘, 염화나트륨, 탄산수소나트륨, 정제 라놀린, 미결정셀룰로오스, 텍스트린, 알긴산나트륨, 메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 카올린, 요소, 콜로이드성실리카겔, 히드록시프로필스타치, 히드록시프로필메칠셀룰로오스 (HPMC) 1928, HPMC 2208, HPMC 2906, HPMC 2910, 프로필렌글리콜, 카제인, 젖산칼슘, 프리모젤 등 부형제; 젤라틴, 아라비아고무, 에탄올, 한천가루, 초산프탈산셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스칼슘, 포도당, 정제수, 카제인나트륨, 글리세린, 스테아린산, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 메칠셀룰로오스나트륨, 메칠셀룰로오스, 미결정셀룰로오스, 텍스트린, 히드록시셀룰로오스, 히드록시프로필스타치, 히드록시메칠셀룰로오스, 정제셀락, 전분호, 히드록시프로필셀룰로오스, 히드록시프로필메칠셀룰로오스, 폴리비닐알코올, 폴리비닐 피롤리돈 등의 결합제가 사용될 수 있으며, 히드록시프로필메칠셀룰로오스, 옥수수전분, 한천가루, 메칠셀룰로오스, 벤토나이트, 히드록시프로필스타치, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 알긴산나트륨, 카르복시메칠셀룰로오스칼슘, 구연산칼슘, 라우릴황산나트륨, 무수규산, 1-히드록시프로필셀룰로오스, 텍스트란, 이온교환수지, 초산 폴리비닐, 포름알데히드처리 카제인 및 젤라틴, 알긴산, 아밀로오스, 구아르고무 (Guar gum), 중조, 폴리비닐피롤리돈, 인산칼슘, 겔화전분, 아라비아고무, 아밀로펙틴, 펙틴, 폴리인산나트륨, 에칠셀룰로오스, 백당, 규산마그네슘알루미늄, 디-소르비톨액, 경질무수규산 등 붕해제; 스테아린산칼슘, 스테아린산마그네슘, 스테아린산, 수소화식물유 (Hydrogenated vegetable oil), 탈크, 석송자, 카올린, 바셀린, 스테아린산나트륨, 카카오지, 살리실산나트륨, 살리실산마그네슘, 폴리에틸렌글리콜 4000, PEG 6000, 유동파라핀, 수소첨가대두유 (Lubri wax), 스테아린산알루미늄, 스테아린산아연, 라우릴황산나트륨, 산화마그네슘, 마크로골 (Macrogol), 합성규산알루미늄

늄, 무수규산, 고급지방산, 고급알코올, 실리콘유, 파라핀유, 폴리에틸렌글리콜지방산에테르, 전분, 염화나트륨, 초산나트륨, 올레인산나트륨, dL-로이신, 경질무수규산 등의 활택제가 사용될 수 있다.

[0086] 본 발명에 따른 액제의 첨가제로는 물, 묽은 염산, 묽은 황산, 구연산나트륨, 모노스테아린산슈크로스류, 폴리옥시에틸렌소르비톨지방산에스테르류 (트윈에스테르), 폴리옥시에틸렌모노알킬에테르류, 라놀린에테르류, 라놀린에스테르류, 초산, 염산, 암모니아수, 탄산암모늄, 수산화칼륨, 수산화나트륨, 프롤아민, 폴리비닐피롤리돈, 에칠셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스나트륨 등이 사용될 수 있다.

[0087] 본 발명에 따른 시럽제에는 백당의 용액, 다른 당류 혹은 감미제 등이 사용될 수 있으며, 필요에 따라 방향제, 착색제, 보존제, 안정제, 현탁화제, 유화제, 점조제 등이 사용될 수 있다.

[0088] 본 발명에 따른 유제에는 정제수가 사용될 수 있으며, 필요에 따라 유화제, 보존제, 안정제, 방향제 등이 사용될 수 있다.

[0089] 본 발명에 따른 현탁제에는 아카시아, 트라가칸타, 메칠셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스나트륨, 미결정셀룰로오스, 알긴산나트륨, 히드록시프로필메칠셀룰로오스, HPMC 1828, HPMC 2906, HPMC 2910 등 현탁화제가 사용될 수 있으며, 필요에 따라 계면활성제, 보존제, 안정제, 착색제, 방향제가 사용될 수 있다.

[0090] 본 발명에 따른 주사제에는 주사용 증류수, 0.9% 염화나트륨주사액, 링겔주사액, 텍스트로스주사액, 텍스트로스+염화나트륨주사액, 피이지 (PEG), 락테이트 링겔주사액, 에탄올, 프로필렌글리콜, 비휘발성유-참기름, 면실유, 낙화생유, 콩기름, 옥수수기름, 올레인산에칠, 미리스트산 이소프로필, 안식향산벤젠과 같은 용제; 안식향산나트륨, 살리실산나트륨, 초산나트륨, 요소, 우레탄, 모노에칠아세트아마이드, 부타졸리딘, 프로필렌글리콜, 트윈류, 니정틴산아미드, 헥사민, 디메틸아세트아마이드와 같은 용해보조제; 약산 및 그 염 (초산과 초산나트륨), 약염기 및 그 염 (암모니아 및 초산암모늄), 유기화합물, 단백질, 알부민, 펩톤, 검류와 같은 완충제; 염화나트륨과 같은 등장화제; 중아황산나트륨 (NaHSO_3), 이산화탄소가스, 메타중아황산나트륨 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$), 아황산나트륨 (Na_2SO_3), 질소가스 (N_2), 에틸렌디아민테트라초산과 같은 안정제; 소듐비셀파이드 0.1%, 소듐포름알데히드 설폭실레이트, 치오우레아, 에틸렌디아민테트라초산디나트륨, 아세톤소듐비셀파이드와 같은 황산화제; 벤질알코올, 클로로부탄올, 염산프로카인, 포도당, 글루콘산칼슘과 같은 무통화제; 시엠시나트륨, 알긴산나트륨, 트윈 80, 모노스테아린산알루미늄과 같은 현탁화제를 포함할 수 있다.

[0091] 본 발명에 따른 좌제에는 카카오지, 라놀린, 위템솔, 폴리에틸렌글리콜, 글리세로젤라틴, 메칠셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스, 스테아린산과 올레인산의 혼합물, 수바날 (Subanal), 면실유, 낙화생유, 야자유, 카카오버터+콜레스테롤, 레시틴, 라네트왁스, 모노스테아린산글리세롤, 트윈 또는 스팬, 임하우젠 (Imhausen), 모놀렌 (모노스테아린산프로필렌글리콜), 글리세린, 아덱스솔리두스 (Adeps solidus), 부티룸 태고-G (Buytyrum Tego-G), 세베스파마 16 (Cebes Pharma 16), 헥사라이드베이스 95, 코토마 (Cotomar), 히드록코테 SP, S-70-XXA, S-70-XX75 (S-70-XX95), 히드록코테 (Hydrokote) 25, 히드록코테 711, 이드로포스탈 (Idropostal), 마사에스트라리움 (Massa estrarium, A, AS, B, C, D, E, I, T), 마사-MF, 마수폴, 마수폴-15, 네오수포스탈-엔, 파라마운드-B, 수포시로 (OSI, OSIX, A, B, C, D, H, L), 좌제기제 IV 타입 (AB, B, A, BC, BBG, E, BGF, C, D, 299), 수포스탈 (N, Es), 웨코비 (W, R, S, M, Fs), 테제스터 트리글리세라이드 기제 (TG-95, MA, 57)와 같은 기제가 사용될 수 있다.

[0092] 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트 (calcium carbonate), 슈크로스 (sucrose) 또는 락토오스 (lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다.

[0093] 경구 투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜 (propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.

[0094] 본 발명에 따른 약학적 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, 유효

용량 수준은 환자 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

- [0095] 본 발명에 따른 약학적 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 본 발명이 속하는 기술분야에 통상의 기술자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0096] 본 발명의 약학적 조성물은 개체에게 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구 복용, 피하 주사, 복강 투여, 정맥 주사, 근육 주사, 척수 주위 공간 (경막내) 주사, 설하 투여, 볼점막 투여, 직장 내 삽입, 질 내 삽입, 안구 투여, 귀 투여, 비강 투여, 흡입, 입 또는 코를 통한 분무, 피부 투여, 경피 투여 등에 따라 투여될 수 있다.
- [0097] 본 발명의 약학적 조성물은 치료할 질환, 투여 경로, 환자의 연령, 성별, 체중 및 질환의 중증도 등의 여러 관련 인자와 함께 활성성분인 약물의 종류에 따라 결정된다. 구체적으로, 본 발명에 따른 조성물의 유효량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 1 kg 당 0.001 내지 150 mg, 바람직하게는 0.01 내지 100 mg을 매일 또는 격일 투여하거나 1일 1 내지 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 투여 경로, 질환의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0098] 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.
- [0099] 본 발명에서 “투여”란 임의의 적절한 방법으로 개체에게 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다. 본 발명에서 “예방”이란 목적하는 질환의 발병을 억제하거나 지연시키는 모든 행위를 의미하고, “치료”란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 목적하는 질환과 그에 따른 대사 이상 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미하며, “개선”이란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 목적하는 질환과 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 감소시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0101] 본 발명은 중간엽 줄기세포 엑소솜 유래 miRNA 또는 상기 miRNA를 포함하는 엑소솜을 유효성분으로 포함하는 조성물; 및 설명서를 포함하는 폐 질환 예방 또는 치료용 키트를 제공한다.
- [0102] 본 발명의 “키트”는 상기 구성 이외에도 중간엽 줄기세포 엑소솜으로부터 miRNA를 분리하기 위한 방법에 통상적으로 필요한 다른 구성 성분, 장치, 물질 등이 포함될 수 있다. 또한, 키트에 포함된 모든 구성은 1회 이상 횟수에 제한 없이 사용할 수 있으며, 각 물질을 사용하는 선후에는 제한이 없고, 각 물질의 적용은 동시에 진행될 수도 있고 미시에 진행될 수도 있다.
- [0103] 본 발명의 키트는 상기 제제, 및 설명서 이외에도 컨테이너를 포함할 수 있다. 상기 컨테이너는 상기 구성을 포장하는 역할을 할 수 있고, 보관 및 고정하는 역할을 할 수도 있다. 상기 컨테이너의 재질은 예컨대, 병, 통 (tub), 작은 봉지 (sachet), 봉투 (envelope), 튜브, 앰플 (ampoule) 등과 같은 형태를 취할 수 있고, 이들은 부분적 또는 전체적으로 플라스틱, 유리, 종이, 호일, 왁스 등으로부터 형성될 수 있다. 상기 용기는 처음에는 용기의 일부이거나 또는 기계적, 접착성, 또는 기타 수단에 의해 용기에 부착될 수 있는, 완전히 또는 부분적으로 분리가 가능한 마개를 장착할 수 있으며, 또한 주사바늘에 의해 내용물에 접근할 수 있는 스톱퍼가 장착될 수 있다. 상기 키트는 외부 패키지를 포함할 수 있으며, 외부 패키지는 구성 요소들의 사용에 관한 지시서를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0105] 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.
- [0106]
- [0107] [실시예]

[0109] **실시예 1. 중간엽 줄기세포 엑소좀 및 miRNA의 수득**

[0110] 실시예 1-1. 중간엽 줄기세포 엑소좀 수득

[0111] 중간엽 줄기세포 유래 엑소좀을 수득하기 위해 먼저 중간엽 줄기세포를 배양하였다. 와튼 젤리 (Wharton's jelly) 유래 중간엽 줄기세포를 T75 플라스크에 4,000 cells/cm²로 5% CO₂ 및 37°C 조건에서 배양하고, 전체 면적의 80% 이상 자랐을 때 계대 배양하였다. 상기 계대배양은 배지를 제거한 후 PBS로 1회 이상 부드럽게 세척하였고, 그 다음 트립플 (Tryple, Invitrogen)을 넣고 37°C 배양기에서 약 1분 배양하였다. 그 후, 10% FBS (Fetal bovine serum)를 포함한 배지에 넣어 반응을 중화한 후 세포를 모아 300g, 5분 조건에서 원심분리하였다. 세포 침전물을 FBS를 포함하는 배지에 재현탁하고 세포 수를 계산하여 배양하였다. 배지는 10% FBS, 항생제/항진균제 (페니실린/스트렙토마이신, 암포테리신 B)를 포함한 저농도 글루코스 DMEM을 사용하였다.

[0113] 엑소좀을 수득하기 위해 6계대 세포 배양 시 초고속 원심분리기를 이용해 엑소좀을 제거한 10% FBS를 포함한 배지에서 6일 동안 배양하였다. PBS로 5회 세척한 후 저농도 글루코스 DMEM 배지로 교체 후 2일 배양하여 엑소좀을 포함한 배지를 수득하였다.

[0115] 상기 수득한 배지는 2,500g에서 10분 동안 원심분리한 후 상등액을 모아 0.22 µm 여과막을 이용해 여과하였다.

[0116] 그 다음 접선 유동 여과 장치 (Tangential Flow Filtration, TFF)를 이용해 배지에서 엑소좀을 분리하였다. 접선 유동 여과는 300kDa의 분자량 차단 (MWCO) 규격의 공극을 가진 여과막 및 연동펌프 (Peristaltic pump)를 사용하였다. 접선 유동 여과를 통해 배지 (500ml)를 50배로 농축한 후 농축액 (10ml)과 동일 부피의 PBS로 정용여과 (diafiltration)를 10회 수행하여 최종 엑소좀 농축액을 수득하였다. 상기 수득한 엑소좀 농축액에 포함된 엑소좀을 확인하기 위해 단백질 정량, 파티클 수, 파티클 크기, 엑소좀 표지자 등을 확인 시험을 통해 엑소좀임을 확인하였다.

[0118] 실시예 1-2. 중간엽 줄기세포 엑소좀에 함유된 miRNA 수득

[0119] 실시예 1-1에서 분리된 엑소좀 농축액에서 엑소좀만을 침전시키기 위해 XENO-EVIMEDI KIT를 사용하였다. 엑소좀 농축액에 XENO-EVIMEDI 용액을 첨가하고 2시간 동안 상온에서 반응시킨 후 12,300g, 15분 동안 원심분리하여 침전시켰다. 상등액을 제거하고 원심분리를 1회 반복 수행하였다. 엑소좀 침전물은 miRNeasy Micro Kit (QIAGENTM miRNeasy Micro Kit Cat.NO 217084)를 사용하여 miRNA를 추출하였다.

[0121] 실시예 1-3. 엑소좀 함유 miRNA 프로파일링

[0122] 실시예 1-1에서 분리된 엑소좀에 함유된 miRNA의 전체 프로파일 확보를 위해 miRNA sequencing 분석을 전문 분석 업체에 의뢰하여 SMARTer smRNA-Seq for Illumina library kit를 이용해 분석하였다.

[0124] **실시예 2. 천식 질환 동물모델 구축**

[0125] 중간엽 줄기세포 유래 엑소좀의 천식 질환에 대한 치료 효과를 확인하기 위하여 천식 질환 동물 모델을 먼저 구축하였다. 구체적으로, 8주령 balb/c 암컷 마우스를 이용하여 2mg/kg 난백알부민 (ovalbumin, OVA)을 7일 간격으로 복강 내 주입하여 일주일 간격으로 총 3회의 감작과 2주간의 휴지기를 갖도록 하였다. 그 후, 4mg/kg OVA를 연속적으로 3일 동안 기관 내 투여 Challenge를 통해 천식 동물 모델을 구축하였고, Challenge 다음날 엑소좀을 10 µg, 25 µg, 50 µg 농도 별로 기관 내로 투여하였으며, 엑소좀 투여 후 5일 뒤에 부검을 수행하였다.

[0127] **실시예 3. 면역 세포 증감 분석에 따른 중간엽 줄기세포 유래 엑소좀의 천식 치료 효과 확인**

[0128] 중간엽 줄기세포 유래 엑소좀의 천식 질환에 대한 치료 효과를 확인하기 위하여 폐포 내 면역 세포의 증감 양상을 분석하였다. 먼저, 실시예 2에서 구축된 천식 질환 동물모델로부터 폐포 세척액을 수득하여 이를

분석하였다. 구체적으로, 2ml의 PBS로 기관 내 삽입하여 폐포 세척액 (bronchoalveolar lavage fluid)을 수득하였다. 그 후, 수득된 폐포 세척액을 원심분리하여 상층액은 -80℃에 보관하고, 전체 세포 수는 혈구계산판을 이용하여 계산하였다. 또한, BALF 세포는 Cytospin을 이용하여 슬라이드에 부착하였다. Diff quik kit를 이용하여 세포를 염색하였으며, 대식세포 (macrophages), 림프구 (lymphocytes), 호중구 (neutrophils), 및 호산구 (eosinophil)의 개수는 형태학적 지표 기준으로 구분하여 그래프로 나타내었다.

[0130] 그 결과, 중간엽 줄기세포 유래 엑소솜은 농도 의존적으로 기관지 폐포 세척액 호중구 및 호산구의 양을 감소시키고, 이에 따라 염증 반응 감소를 통해 천식 질환에 대한 치료 효과를 나타내는 것이 확인되었다 (도 2a 및 도 2b).

[0132] 실시예 4. 폐 조직학적 분석에 따른 중간엽 줄기세포 유래 엑소솜의 천식 치료 효과 확인

[0133] 중간엽 줄기세포 유래 엑소솜의 천식 질환에 대한 치료 효과를 확인하기 위하여 실시예 2에서 구축된 천식 질환 동물모델에서의 폐 조직학적 분석을 실시하였다. 구체적으로, 폐 조직은 0.5% agarose를 주입한 상태에서 4% 포름알데하이드에 넣어 16시간 이상 고정하였다. 그 후, 파라핀 포매를 하여 5μm 두께로 절편 하였으며, 이후 Hematoxylin-eosin (H&E), Periodic Acid-Schiff (PAS), Masson's trichrome (MT) 염색을 수행하였다

[0135] 그 결과, H&E 염색을 통해 엑소솜 농도 증가에 따른 기관지, 혈관 주위의 염증세포 침윤이 감소되는 것이 확인되었고, MT 염색을 통해 엑소솜 농도 증가에 따라 콜라겐 섬유도 감소되는 것으로 나타났다. 뿐만 아니라, PAS 염색결과에 따르면 점액을 분비하는 배상세포가 감소되었으며, 점수로 나타낸 결과 이는 통계적으로 유의한 수준인 것으로 확인되었다 (도 3).

[0137] 실시예 5. 천식 질환 치료 효과를 나타내는 엑소솜 내 miRNA 규명

[0138] 중간엽 줄기세포 유래 엑소솜에서 치료 효과를 나타내는 엑소솜 내 miRNA를 규명하기 위한 분석을 실시하였다. 구체적으로, 멀티오믹스 (multiomics) 기법을 이용하여 폐 조직 내 천식 질환과 관련된 유전자를 추출하였고, 이를 타겟으로 할 것으로 예상되는 miRNA를 분석하였다. 이 때, 엑소솜에 의한 천식 질환 마우스 폐 조직의 mRNA 및 단백질의 발현 변화를 분석하였고, 엑소솜에 함유된 miRNA 프로파일을 분석하여 상관관계 분석을 수행하였다.

[0140] 마우스 폐 조직의 mRNA, 및 단백질을 분석하고, 엑소솜에 함유된 miRNA 중 이를 타겟으로 할 것으로 예상되는 miRNA를 리스팅 (listing)한 결과, 천식 질환과 관련된 유전자의 발현 조절 가능성은 높으나 현재까지 알려지지 않아 신규성을 갖는 miRNA는 표 1과 같이 3개로 확인되었다.

표 1

[0142]

서열번호	명칭	서열(ref:miRBase)
1	miR-24-3p	>hsa-miR-24-3p MIMAT0000080 UGGCUCAGUUCAGCAGGAACAG
2	miR-6126	>hsa-miR-6126 MIMAT0024599 GUGAAGGCCCGCGGAGA
3	miR-1285-3p	>hsa-miR-1285-3p MIMAT0005876 UCUGGGCAACAAAGUGAGACCU

[0144] 또한, 서열번호 1 내지 3에 해당하는 miRNA가 타겟하는 유전자는 하기 표 2와 같다.

표 2

[0146]

서열번호	명칭	타겟 유전자	
1	miR-24-3p	Agps	Alkylglycerone Phosphate Synthase
		Pml	Promyelocytic Leukemia Protein
2	miR-6126	Tardbp	TAR DNA binding protein
		Mat2a	methionine adenosyltransferase 2A
		Nxf1	nuclear RNA export factor 1
		Naa15	N-alpha-acetyltransferase 15, NatA auxiliary subunit
3	miR-1285-3p	Mvd	mevalonate diphosphate decarboxylase
		Me1	malic enzyme 1
		Ppp3cb	protein phosphatase 3 catalytic subunit beta
		Nxf1	nuclear RNA export factor 1
		Larpl	La ribonucleoprotein 1, translational regulator
		Ifi30	gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductas

[0148] 실시예 6. 중간엽 줄기세포 유래 엑소솜 내 miRNA 존재 검증

[0149] 실시예 5에서 확인된 3종의 miRNA가 실시예 3 및 4에서 천식 치료 활성을 나타내는 것으로 증명된 본 발명의 중간엽 줄기세포 유래 엑소솜 내에 포함되는 것을 QPCR 검증을 통해 확인하였다.

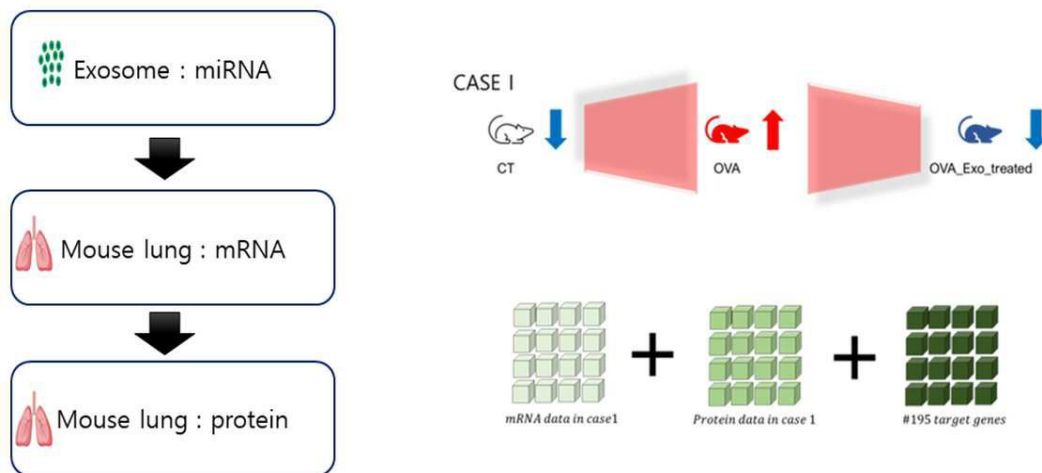
[0151] 그 결과, 표 1에서 확인된 신규한 3종의 miRNA인 miR-24-3p, miR-6126, 및 miR-1285-3p이 엑소솜 내에 존재하고 있음이 확인되었다 (도 4).

[0153] 결론적으로, 본 발명의 실시예에 따르면, 중간엽 줄기세포 유래 엑소솜을 처리하는 경우 염증에 의한 면역 세포의 수 또는 활성을 억제시킴에 따라 염증 반응을 감소시키고, 이와 같은 염증 반응 효과는 조직학적 분석에 의해서도 증명되었다. 나아가, 중간엽 줄기세포 유래 엑소솜의 폐 질환 예방 또는 치료 효과는 본 발명에서 개시된 신규한 3종의 miRNA에 의한 것이 확인되었다.

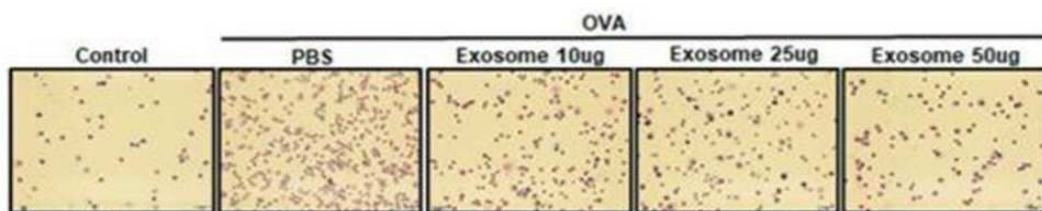
[0155] 진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야 한다.

도면

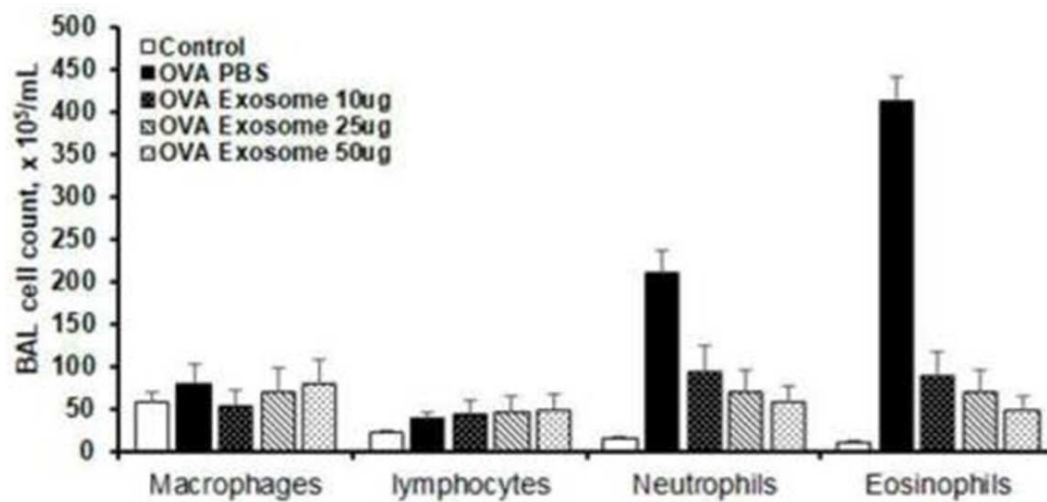
도면1



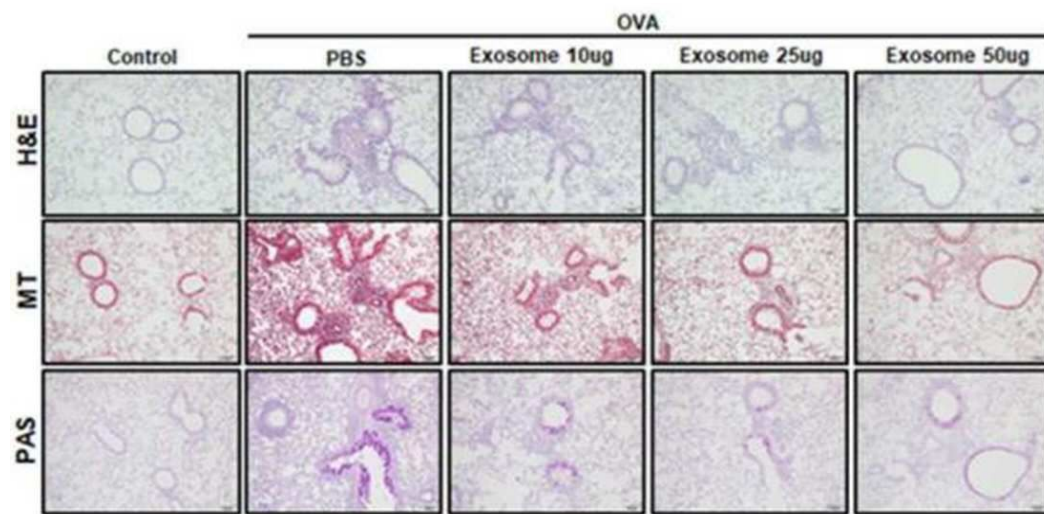
도면2a



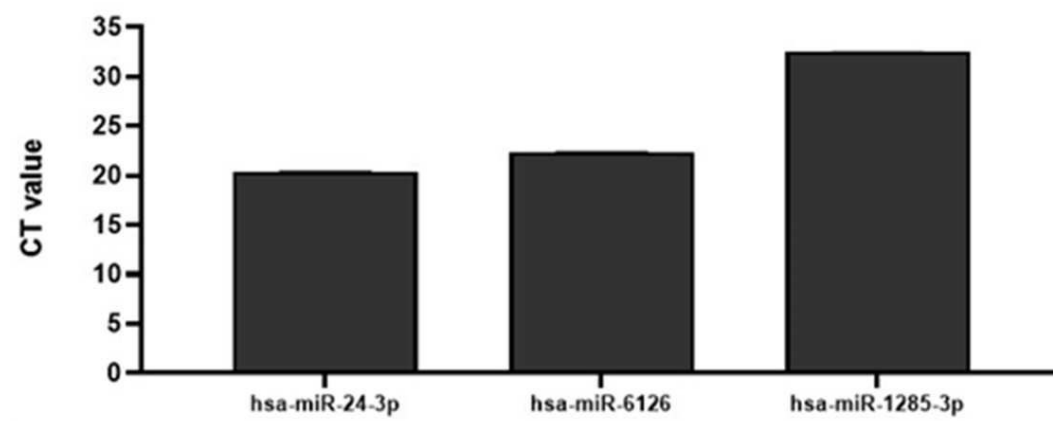
도면2b



도면3



도면4



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.