



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년02월14일
(11) 등록번호 10-1947699
(24) 등록일자 2019년02월07일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/28 (2015.01) *A61K 35/42* (2015.01)
A61K 38/17 (2006.01) *A61P 29/00* (2006.01)
C07K 14/785 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2013-7026715
- (22) 출원일자(국제) 2012년03월09일
심사청구일자 2017년03월09일
- (85) 번역문제출일자 2013년10월10일
- (65) 공개번호 10-2014-0024310
- (43) 공개일자 2014년02월28일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2012/028524
- (87) 국제공개번호 WO 2012/125471
국제공개일자 2012년09월20일
- (30) 우선권주장
61/451,981 2011년03월11일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

WO2006071796 A2*

WO2011010966 A1

KR1020120002361 A

KR1020100122087 A*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

전체 청구항 수 : 총 25 항

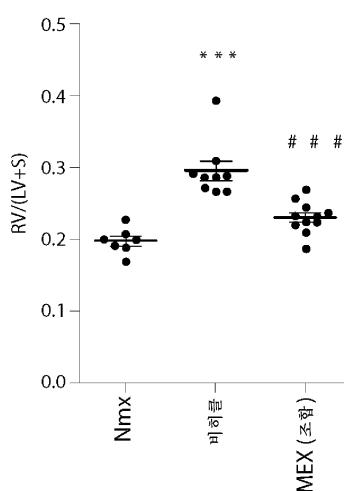
심사관 : 민경난

(54) 발명의 명칭 중간엽 줄기 세포 엑소솜에 관련된 방법 및 조성물

(57) 요약

본 발명은 중간엽 줄기 세포 (MSC)에서 유래된 엑소솜(exosome)을 포함하는 조성물, 및 염증성 폐 질환을 비롯한 특정 폐 질환에 걸린 대상체에서 상기 조성물을 사용하는 방법을 제공한다.

대 표 도 - 도17b



명세서

청구범위

청구항 1

폐 고혈압(PH) 및 기관지폐 이형성증(BPD)으로부터 선택되는 염증성 폐 질환에 걸렸거나 상기 염증성 폐 질환이 발달될 위험에 처한 인간 대상체에서 사용하기 위한, 폐 전달용으로 제제화된 유효량의 단리된 인간 중간엽 줄기 세포(MSC) 엑소솜(exosome) 및 폐 계면활성제를 포함하는 제약 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 단리된 인간 MSC 엑소솜이 인간 제대로부터 단리된 것인 제약 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 인간 대상체가 임신 37주 전에 출생한 것인 제약 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 인간 대상체에게 산소가 투여되었거나 또는 인간 대상체가 인공호흡기를 달고 있는 것인 제약 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 대상체가 4주령 미만인 것인 제약 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 단리된 인간 MSC 엑소솜이 출생 1일 이내에 투여되는 것인 제약 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 단리된 인간 MSC 엑소솜이 출생 1시간 이내에 투여되는 것인 제약 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 폐 계면활성제가 단리된 천연 발생 계면활성제 또는 합성 계면활성제인 제약 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 폐 계면활성제가 소 폐 또는 돼지 폐로부터 유래된 것인 제약 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단리된 인간 MSC 엑소솜 및 폐 계면활성제가 정맥내로 투여되는 것인 제약 조성물.

청구항 11

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단리된 인간 MSC 엑소솜 및 폐 계면활성제가 대상체의 폐 또는 기관(trachea)에 투여되는 것인 제약 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 단리된 인간 MSC 엑소솜 및 폐 계면활성제가 흡입에 의해 투여되는 것인 제약 조성물.

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 단리된 인간 MSC 엑소솜 및 폐 계면활성제가 에어로졸로 투여되는 것인 제약 조성물.

청구항 14

제11항에 있어서, 상기 단리된 인간 MSC 액소솜 및 폐 계면활성제가 네뷸라이저(nebulizer)를 사용하여 투여되는 것인 제약 조성물.

청구항 15

제11항에 있어서, 상기 단리된 인간 MSC 액소솜 및 폐 계면활성제가 기관내 튜브를 사용하여 투여되는 것인 제약 조성물.

청구항 16

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단리된 인간 MSC 액소솜 및 폐 계면활성제가 대상체에게 반복적으로 투여되는 것인 제약 조성물.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 단리된 인간 MSC 액소솜 및 폐 계면활성제가 대상체에게 2회 투여되는 것인 제약 조성물.

청구항 18

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단리된 인간 MSC 액소솜 및 폐 계면활성제가 대상체에게 연속적으로 투여되는 것인 제약 조성물.

청구항 19

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단리된 MSC 액소솜이 대상체에 대해 자가성(autologous)인 제약 조성물.

청구항 20

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단리된 MSC 액소솜이 대상체에 대해 동종이계성(allogeneic)인 제약 조성물.

청구항 21

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폐 질환이 기관지폐 이형성증(BPD)인 제약 조성물.

청구항 22

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폐 질환이 폐 고혈압(PH)인 제약 조성물.

청구항 23

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체가 주혈흡충증에 걸렸거나 주혈흡충증이 발달될 증가된 위험에 처한 것인 제약 조성물.

청구항 24

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체가 세포 또는 장기 이식을 받고 있지 않은 것인 제약 조성물.

청구항 25

기관지폐 이형성증(BPD)에 걸렸거나 BPD가 발달될 위험에 처한 인간 대상체에서 사용하기 위한, 폐 전달용으로 제제화된 유효량의 단리된 인간 중간엽 줄기 세포 (MSC) 액소솜(exosome) 및 폐 계면활성제를 포함하는 제약 조성물이며, 상기 BPD가 비-염증성 원인을 갖는 것인 제약 조성물.

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

발명의 설명

기술 분야

관련 출원

[0001] 본 출원은 2011년 3월 11일에 출원되고 발명의 영문 명칭이 "METHODS AND COMPOSITIONS RELATING TO MESENCHYMAL STEM CELL EXOSOMES"인 미국 가특허 출원 일련 번호 61/451,981을 우선권으로 청구하고, 이의 내용은 전문이 본원에 참고로 포함된다.

정부 지원 연구

[0004] 본 발명은 미국 국립 심장, 폐 및 혈액 연구소(National Heart Lung and Blood Institute)가 수여한 허가 번호 R01 HL055454 및 R01 HL085446 하에 정부 지원으로 이루어졌다. 정부는 본 발명에 일정한 권리가 있다.

배경 기술

[0005] 미숙아는 만기에 태어난 유아 또는 거의 만기에 태어난 유아보다 더 높은 비율로 특정 만성 폐 (또는 호흡기) 질환 (또는 병태)를 앓거나 또는 이것이 발달될 위험에 처한다. 유아의 폐 및 호흡 능력이 손상되기 때문에, 이러한 질환은 종종 치사성이다. 미숙아의 생존율 증가는 이같은 폐 질환의 발생 증가에 이르렀다. 염증은 폐 고혈압 (PH 또는 PAH), 천식, 만성 폐쇄성 폐 질환(COPD), 특발성 폐 섬유증 (IPF), 및 유아의 만성 폐 질환 (기관지폐 이형성증 (BPD)으로 또한 공지됨)이 포함되는 다중 폐 질환의 주요 병리생리학적 특색이다. 미숙아의 생존율 증가는 BPD 및 이의 연관된 합병증 (생애 첫 1년의 2차 PH, 천식 및 재입원율 증가가 포함됨)의 발생 증가에 이르렀다. BPD는 미숙의 통상적인 합병증이고 (문헌 [Kinsella et al., Lancet, 2006, 367:1421-1431]; [Stenmark and Abman, Annu Rev Physiol, 2005, 67:623-661]), 일부 연구에서는 임산 29주 미만에 출생한 조산아의 35-40%까지에 영향을 미칠 수 있다. 이의 기저 원인에는 발달 중인 폐의 기계적 손상, 산소 독성, 감염, 및 결과적인 폐 염증 및 손상이 포함된다. 연성 환기(gentle ventilation) 전략, 및 코르티코스테로이드와 같은 항염증제의 사용이 BPD를 제어하려는 시도들에 수반되었다. 그러나, 이러한 치료들은 성공이 제한적이었고, 허용되지 않는 부작용이 있었다 (문헌 [Baveja and Christou, Semin Perinatol, 2006, 30:209-218]). 이러한 만성 폐 질환의 장기 효과가 또한 문제였고, 지속적인 폐 손상 및 신경발달 지연이 이에 포함되었다. PH는 BPD의 심각한 합병증이고, 높은 사망률과 연관된다. 이는 다른 형태의 폐 질환 예컨대 COPD와 또한 연관된다. 더욱 최근에는, PH가 염증을 수반하는 메커니즘을 통해 주혈흡충증의 주요 합병증인 것으로 인지되었다. 주혈흡충증은 특정 세계 지역에서 유병률이 매우 높고, 2차 PH와 고도로 연관되어, 잠재적으로는 세계적으로 이러한 혈관 질환의 발생을 극적으로 증가시킨다.

발명의 내용

[0006] 본 발명은 중간엽 줄기 세포 (MSC)에서 유래된 엑소솜(exosome)을 포함하는 조성물, 및 폐 질환의 치료 및/또는 예방에서의 이의 사용 방법을 제공한다.

[0007] 한 측면에서, 본 발명은 기관내 투여 또는 흡입에 의한 투여용으로 제제화된 단리된 중간엽 줄기 세포 (MSC) 엑소솜을 포함하는 조성물을 제공한다. 한 측면에서, 본 발명은 정맥내 투여용으로 제제화된 단리된 중간엽 줄기 세포 (MSC) 엑소솜을 포함하는 조성물을 제공한다.

[0008] 또 다른 측면에서, 본 발명은 단리된 중간엽 줄기 세포 (MSC) 엑소솜 및 폐 계면활성제를 포함하는 조성물을 제공한다.

[0009] 또 다른 측면에서, 본 발명은 단리된 중간엽 줄기 세포 (MSC) 엑소솜 및 폐 코르티코스테로이드를 포함하는 조성물을 제공한다. 폐 코르티코스테로이드는 메틸프레드니솔론일 수 있지만, 이에 한정되지는 않는다.

[0010] 다른 측면에서, 본 발명은 에어로졸화된 단리된 중간엽 줄기 세포 (MSC) 엑소솜, 및 에어로졸화된 단리된 MSC 엑소솜을 포함하는 조성물을 제공한다.

[0011] 또 다른 측면에서, 본 발명은 폐 질환의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 단리된 중간엽 줄기 세포 (MSC) 엑소솜의 조성물을 제공한다. 또 다른 측면에서, 본 발명은 단리된 중간엽 줄기 (MSC) 엑소솜을 포함하는, 폐 질환의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 제약 조성물을 제공한다.

- [0012] 또 다른 측면에서, 본 발명은 폐 질환을 치료 또는 예방하는 약제로서 사용하기 위한 단리된 중간엽 줄기 세포 (MSC) 액소솜의 조성물을 제공한다.
- [0013] 또 다른 측면에서, 본 발명은 폐 질환에 걸렸거나 폐 질환이 발달될 위험에 처한 대상체에게 유효량의 단리된 중간엽 줄기 세포 (MSC) 액소솜을 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다.
- [0014] 또 다른 측면에서, 본 발명은 대상체에서 폐 질환을 치료 또는 예방하기 위한 단리된 중간엽 줄기 세포 (MSC) 액소솜의 용도, 또는 폐 질환을 치료 또는 예방하기 위한 약제의 제조에 있어서 단리된 중간엽 줄기 세포 (MSC) 액소솜의 용도를 제공한다.
- [0015] 또 다른 측면에서, 본 발명은 폐 질환에 걸렸거나 폐 질환이 발달될 위험에 처한 대상체에게 유효량의 단리된 MSC 액소솜을 투여하는 것을 포함하는 폐 질환의 치료 또는 예방 방법에서 사용하기 위한 단리된 중간엽 줄기 세포 (MSC) 액소솜을 제공한다.
- [0016] 또 다른 측면에서, 본 발명은 폐 질환에 걸렸거나 폐 질환이 발달될 위험에 처한 대상체에게 유효량의 단리된 중간엽 줄기 세포 (MSC) 액소솜을 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다.
- [0017] 다양한 실시양태가 하기 기술된 바와 같이 본 발명의 다양한 측면에 동등하게 적용된다. 일부 실시양태에서, 폐 질환은 염증성 폐 질환이다. 일부 실시양태에서, 염증성 폐 질환은 폐 고혈압, 천식, 기관지폐 이형성증 (BPD), 알레르기 또는 특발성 폐 섬유증이다. 일부 실시양태에서, 폐 질환은 폐 혈관 질환이다. 일부 실시양태에서, 폐 질환은 급성 폐 손상이다. 일부 실시양태에서, 급성 폐 손상은 폐혈증과 연관되거나 인공호흡기-유도 급성 호흡 곤란 증후군 (ARDS)이다.
- [0018] 일부 실시양태에서, 대상체는 주혈흡충증에 걸렸거나 주혈흡충증이 발달되기 쉽다.
- [0019] 일부 실시양태에서, 대상체는 신생아이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 유아이다. 일부 실시양태에서, 대상체의 연령은 3-18세이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 성인이다. 임의의 이러한 실시양태에서, 대상체는 조산되었을 수 있다. 일부 실시양태에서, 대상체는 임신 35주 미만에 출생하였다. 일부 실시양태에서, 대상체는 임신 26주 미만에 출생하였다.
- [0020] 일부 실시양태에서, 단리된 MSC 액소솜은 제2 작용제와 함께 사용된다. 일부 실시양태에서, 제2 작용제는 스테로이드, 항산화제 또는 흡입성 산화질소이다. 일부 실시양태에서, 스테로이드는 코르티코스테로이드이다. 일부 실시양태에서, 코르티코스테로이드는 메틸프레드니솔론이다. 일부 실시양태에서, 항산화제는 슈퍼옥시드 디스뮤타제(superoxide dismutase)이다.
- [0021] 일부 실시양태에서, 단리된 MSC 액소솜은 출생 1시간 이내에 투여된다. 일부 실시양태에서, 단리된 MSC 액소솜은 출생 1개월 이내에 투여된다.
- [0022] 일부 실시양태에서, 단리된 MSC 액소솜은 정맥내로 투여된다. 일부 실시양태에서, 단리된 MSC 액소솜은 대상체의 폐 또는 기관내로 투여된다. 일부 실시양태에서, 단리된 MSC 액소솜은 흡입에 의해 투여된다. 일부 실시양태에서, 단리된 MSC 액소솜은 에어로졸로 투여된다. 일부 실시양태에서, 단리된 MSC 액소솜은 네뷸라이저 (nebulizer)를 사용하여 투여된다. 일부 실시양태에서, 단리된 MSC 액소솜은 기관내 튜브를 사용하여 투여된다.
- [0023] 일부 실시양태에서, 단리된 MSC 액소솜은 폐 계면활성제와 함께 투여 또는 제제화된다. 일부 실시양태에서, 폐 계면활성제는 단리된 천연 발생 계면활성제이다. 일부 실시양태에서, 폐 계면활성제는 소 폐 또는 돼지 폐로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 폐 계면활성제는 합성 계면활성제이다.
- [0024] 일부 실시양태에서, 단리된 MSC 액소솜은 대상체에게 반복적으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 단리된 MSC 액소솜은 대상체에게 2회 투여된다. 일부 실시양태에서, 단리된 MSC 액소솜은 대상체에게 연속적으로 투여된다.
- [0025] 일부 실시양태에서, 단리된 MSC 액소솜은 제대혈 MSC로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 단리된 MSC 액소솜은 골수 MSC로부터 유래된다.
- [0026] 일부 실시양태에서, 단리된 MSC 액소솜은 대상체에 대해 자가성(autologous)이다. 일부 실시양태에서, 단리된 MSC 액소솜은 대상체에 대해 동종이계성(allogeneic)이다.
- [0027] 일부 실시양태에서, 대상체는 세포 또는 장기 이식을 받고 있지 않다.

[0028]

따라서, 또 다른 측면에서, 본 발명은 폐 질환에 걸린 또는 폐 질환이 발달될 위험에 처한 4주령 미만의 인간 대상체에서 사용하기 위한, 폐 전달용으로 제제화된 유효량의 단리된 인간 중간엽 줄기 세포 (MSC) 액소솜 및 폐 계면활성제를 포함하는 제약 조성물을 제공한다. 유사하게, 본 발명은 폐 질환에 걸린 또는 폐 질환이 발달될 위험에 처한 4주령 미만의 인간 대상체에게 폐 전달용으로 제제화된 유효량의 단리된 인간 중간엽 줄기 세포 (MSC) 액소솜 및 폐 계면활성제를 투여하는 것을 포함하는, MSC 액소솜의 사용 방법을 제공한다. 유사하게, 본 발명은 폐 전달용으로 제제화된 유효량의 단리된 인간 중간엽 줄기 세포 (MSC) 액소솜 및 폐 계면활성제의, 폐 질환에 걸린 또는 폐 질환이 발달될 위험에 처한 4주령 미만의 인간 대상체에서의 용도를 제공한다. 일부 실시양태에서, 단리된 인간 MSC 액소솜은 인간 제대 (예를 들어, 워튼 젤리(Wharton's Jelly))로부터 단리된다. 일부 실시양태에서, 인간 대상체는 임신 37주 전에 출생하였다. 일부 실시양태에서, 인간 대상체에게 산소가 투여되었거나 또는 인간 대상체가 인공호흡기를 달고 있었다. 일부 실시양태에서, 인간 대상체는 기관지폐 이형성증에 걸렸거나 기관지폐 이형성증이 발달될 위험에 처해 있다. 일부 실시양태에서, 기관지폐 이형성증은 비-염증성이다. 일부 실시양태에서, 단리된 인간 MSC 액소솜은 출생 1일 이내에 투여된다. 일부 실시양태에서, 단리된 인간 MSC 액소솜은 출생 1시간 이내에 투여된다.

[0029]

또 다른 측면에서, 본 발명은 단리된 MSC 액소솜과 특징이 유사하거나 동일한 합성 MSC 액소솜, 이같은 합성 MSC 액소솜을 포함하는 조성물, 및 이의 사용 방법을 제공한다. 본 발명은 합성 MSC 액소솜이 단리된 MSC 액소솜과 동일한 방식으로 제제화 및 사용될 수 있다는 것을 구상한다. 합성 액소솜은 하기의 단백질 중 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 또는 8개 모두를 포함할 수 있다: 합토글로빈 (접속 번호 q61646), 갈렉틴-3-결합 단백질 (접속 번호 q07797), 트롬보스폰딘-2 (접속 번호 q03350), 락타드헤린 (접속 번호 q21956), 지방세포 인핸서(enhancer)-결합 단백질 1 (접속 번호 q640n1), 비멘틴 (접속 번호 p20152), 프로테아솜 서브유닛 알파 유형 2 (접속 번호 p49722), 및 아밀로이드 베타 A4 단백질 (접속 번호 p12023). 이러한 액소솜들은 비내 또는 기관내 투여, 또는 흡입용으로 제제화되는 것을 포함하여, 단리된 MSC 액소솜에 대해 본원에 기술된 바와 같이 제제화될 수 있다. 이들은 폐 계면활성제 또는 기타 치료제와 함께 제제화 및/또는 투여될 수 있다.

[0030]

본 발명의 이러한 측면 및 실시양태 및 기타 측면 및 실시양태가 본원에서 더욱 상세하게 기술될 것이다.

도면의 간단한 설명

[0031]

도 1. BM-MSC로부터의 분비 인자들이 항-염증성이다. 폐 내의 대식 세포의 저산소-유도 침윤에 대한 BM-MSC-CM의 효과 (a). 비히를 또는 BM-MSC-CM 또는 MLF-CM을 주사한 마우스 ($n > 8$)를 48시간 동안 저산소 (8.5% O_2)에 노출시켰고, 저산소 마우스, 뿐만 아니라 대등한 연령의 정상산소 대조군 마우스로부터의 BALF를 수집하였다. BALF 내의 폐포 대식세포의 개수를 키무라(Kimura) 염색으로 계수하였다. 저산소 마우스 및 정상산소 대조군 마우스로부터의 무세포 BALF 내의 단백질의 비교 면역블롯(immunoblot) 분석 (b). 동일한 군 ($n > 8$) 내의 개별적인 마우스로부터의 등가 부피의 무세포 BALF를 폴링(pooling)하고, 등가 부피의 폴링된 BALF로부터의 단백질을 MCP-1 (상부) 및 HIMF/FIZZ1 (하부)에 대해 특이적인 항체를 사용하여 웨스턴 블롯(western blot)에 의해 분석하였다. 동일한 블롯으로부터의 IgA 신호에 대한 표준화에 의해 MCP-1 및 HIMF의 상대 강도가 표현된다.

도 2. 무세포 BM-MSC-컨디셔닝 배지로부터의 액소솜의 단리. BM-MSC-CM 또는 MLF-CM 내의 액소솜을 한외여과 및 크기 배제 크로마토그래피에 의해 단리하였다. BM-MSC-CM 내의 단백질의 1.6% (w/w)가 액소솜과 연관되었고, 크기 배제 크로마토그래피로부터의 분획 내의 액소솜을 전자 현미경 검사로 가시화하였다 (a - d). BM-MSC-CM으로부터의 액소솜의 단리를 확증하기 위해, 공극 부피의 분획 ($v_e = v_o$) (a) 및 컬럼의 공극 부피와 총 부피 사이의 분획 ($v_o < v_e < v_t$) (b)을 30,000 배율의 음성 염색 전자 현미경 검사로 분석하였다. BM-MSC-CM (c) 또는 MLF-CM (d)로부터 단리된 액소솜의 형태학 및 크기 분포가 동일하였다. 액소솜과 연관된 단백질에 대한 웨스턴 블롯 분석 (e-f). 각각의 샘플 내의 3 μ g 단백질을 CD63, 14-3-3s, 모에신, 대식세포 콜로니 자극 인자 (mCSF), 오스테오포린 (OPN), 및 다이서(dicer)에 대한 항체를 사용하여 웨스턴 블롯에서 검정하였다. 양성 대조군용으로, BM-MSC 전체 세포 용해물의 35 μ g 단백질을 사용하였다.

도 3. MEX가 저산소-유도 급성 폐 염증을 억제한다. 비히를 또는 MEX 또는 BM-MSC-CM의 액소솜이 없는 분획 또는 FEX를 주사한 마우스 ($n > 7$)를 48시간 동안 저산소 (8.5% O_2)에 노출시키고, 저산소 마우스 및 대등한 연령의 정상산소 마우스의 BALF를 수집하였다. 각각의 마우스로부터의 BALF 내의 폐포 대식세포의 개수를 키무라 염색으로 계수하였다 (a). 저산소 마우스 및 정상산소 대조군 마우스로부터의 무세포 BALF 내의 단백질의 비교 면역블롯 분석 (b). 동일한 군 ($n > 7$) 내의 개별적인 마우스로부터의 등가 부피의 무세포 BALF를 폴링하

고, 등가 부피의 풀링된 BALF로부터의 단백질을 MCP-1 (상부) 및 HIMF/FIZZ1 (하부)에 대해 특이적인 항체를 사용하여 웨스턴 블롯에 의해 분석하였다. 동일한 블롯으로부터의 IgA 신호에 대한 표준화에 의해 MCP-1 및 HIMF의 상대 수준이 표현된다.

도 4. MEX의 단일 및 다중 투여에 의한 저산소-유래 폐 염증에 대한 경시 효과. 제0일에 비히클 (a) 또는 MEX (b)를 주사한 마우스를 지시된 기간 동안 저산소 (8.5% O₂)에 노출시켰다. 다중 주사 실험에 대해, 제0일에 MEX를 제공한 마우스를 4일 동안 저산소에 노출시켰다. 제4일의 동일한 용량의 MEX의 2차 주사에 이어서 지시된 일수 동안 저산소에 추가로 노출시켰다 (c). 저산소 컨디셔닝의 선택된 기간에 BALF를 수집하고, 개별적인 마우스로부터의 BALF 내의 폐포 대식세포의 개수를 계수하였다. 동일한 군 (n > 7) 내의 개별적인 마우스로부터의 등가 부피의 무세포 BALF를 풀링하고, 풀링된 BALF의 10% (v/v)로부터의 단백질을 MCP-1 및 HIMF에 대해 특이적인 항체를 사용하여 웨스턴 블롯에 의해 분석하였다 (d).

도 5. MEX가 저산소-유도 PAH를 억제한다. 비히클 (제0일 및 제4일) 또는 MEX (제0일 및/또는 제4일), 또는 FEX (제0일 및 제4일)를 1회 또는 2회 주사한 마우스 (n > 7)를 저산소 (8.5% O₂)에 3주 기간 동안 노출시켰다 (a). 저산소 마우스 및 정상산소 대조군 마우스의 RVSP (b) 및 풀톤 지수(Fulton's Index) (c)를 실험 기간 말기에 측정하였다. 각각의 군 내의 무작위로 선택된 마우스 (n = 4)로부터의 파라핀-매립 폐 절편을 α -SMA에 대해 면역염색하여, 폐 세동맥 혈관벽을 강조하였다 (d). 영상에 대한 기본 배율: 400 \times . 각각의 군으로부터의 직경이 20 ~ 30 μ m인 소형 폐 세동맥을 선택하여, 혈관벽 두께를 측정하였고, 이는 전체 혈관 면적의 백분율로서 표현되었다. 데이터는 평균 \pm SEM (n = 군 당 40 ~ 50개의 세동맥)으로 표현된다.

도 6. MSC-유래 엑소솜의 정제. 엑소솜을 세파크릴(Sephacryl) S-400 겔 여과 칼럼 크로마토그래피로 정제하였다. 음성 전하를 띠는 형광성 50 nm 나노입자를 S-400 칼럼에 적용하고, 엑소솜 정제와 동일한 조건으로 용출시켰다 (a). 엑소솜 정제로부터, 등가 부피의 각각의 분획을 10% 변성 폴리아크릴아미드 겔 (b) 및 1.2% 아가로스 겔 전기영동 (c) 양쪽 모두에서 분리시켰다. 아가로스 겔에 대한 블롯을 항-CD81 항체로 염색하였다 (d).

도 7. MSC-유래 엑소솜 및 엑소솜이 없는 분획의 비교 생화학 분석. 엑소솜 분획 (M) 및 엑소솜이 없는 분획 (MF)의 양쪽 폴 내의 등가량의 단백질을 변성 12% 폴리아크릴아미드 겔에서 분리시켰다 (a). 0.5% SDS의 부재 (왼쪽, b) 또는 존재 (오른쪽, b) 하의 엑소솜 분획 및 엑소솜이 없는 분획의 양쪽 폴 내의 등가량의 단백질, 뿐만 아니라 50 nm 나노입자가 로딩된 1.2% 아가로스 겔을 콜로이드 블루(colloidal blue)로 염색하였다. 엑소솜 분획 및 엑소솜이 없는 분획의 양쪽 폴 내의 등가량의 단백질이 로딩된 1.2% 아가로스 겔을 핵산에 대해 에티듐 브로마이드로 염색하거나 (왼쪽, c), 단백질에 대해 콜로이드 블루로 염색하였다 (오른쪽, c). 1.2% 아가로스 겔 및 12% 변성 폴리아크릴아미드 겔 양쪽 상에서 분리된 엑소솜 분획 및 엑소솜이 없는 분획의 양쪽 폴 내의 등가량의 단백질이 로딩된 겔에 대한 블롯을 항-CD81 및 항-SPP-1 항체로 면역염색하였다 (d). M, 엑소솜 분획의 폴; MF, 엑소솜이 없는 분획의 폴; N, 음성 전하를 띠는 형광성 50 nm 나노구체(nanosphere).

도 8. 폐에서의 HIMF/FIZZ-1/Retnl a의 저산소-유도 분비. 마우스를 지시된 기간에 걸쳐 등압 저산소 (8.5% O₂)에 노출시켰다. 동일한 군 내의 각각의 개별적인 마우스로부터의 부피 (a) 및 양 (b)에 의해 표준화된 BAL 내의 단백질을 풀링하고, 14% 폴리아크릴아미드 겔에서 분리시켰다. 특이적 항체를 사용하여 웨스턴 블롯 분석에 의해 HIMF, 리소자임, 및 IgA의 수준을 평가하였다.

도 9. MSC-유래 엑소솜이 폐에서의 HIMF/FIZZ-1/Retnl a의 저산소-유도 분비를 억제한다. 꼬리 정맥에 의해 10 μ g의 MEX (M) 또는 비히클 (V)을 주사한 마우스를 지시된 기간에 걸쳐 등압 저산소 (8.5% O₂)에 노출시켰다. 동일한 군 내의 각각의 개별적인 마우스로부터의 부피 (a) 및 양 (b)에 의해 표준화된 BAL 내의 단백질을 풀링하고, 14% 폴리아크릴아미드 겔 전기영동에서 분리시켰다. 특이적 항체를 사용하여 웨스턴 블롯 분석에 의해 HIMF, 리소자임, 및 IgA의 수준을 평가하였다.

도 10. MSC-유래 엑소솜이 폐에서의 HIMF/FIZZ-1/Retnl a의 저산소-유도 분비를 억제한다. 꼬리 정맥에 의해 10 μ g의 MEX (M) 또는 비히클 (V)을 주사한 마우스를 지시된 기간에 걸쳐 등압 저산소 (8.5% O₂)에 노출시켰다. 각각의 개별적인 마우스로부터의 10 μ g의 BAL 단백질을 14% 폴리아크릴아미드 겔 전기영동에서 분리시켰다 (a, b). 동일한 군 내의 각각의 개별적인 마우스로부터의 양에 의해 표준화된 BAL 내의 단백질을 풀링하고, 14% 폴리아크릴아미드 겔 전기영동에서 분리시켰다 (c). 특이적 항체를 사용하여 웨스턴 블롯 분석에 의해 HIMF, 리소자임, 및 IgA의 수준을 평가하였다.

도 11. MSC-유래 엑소솜이 폐 조직에서의 HIF2 α 의 저산소-유도 상향조절을 억제한다. 꼬리 정맥에 의해 10 μg 의 MEX 또는 비히클을 주사한 마우스를 지시된 기간에 걸쳐 등압 저산소 (8.5% O_2)에 노출시켰다. 개별적인 폐 조직 균질화물로부터의 등가량의 단백질을 변성 폴리아크릴아미드 겔 전기영동에서 분리시켰다. HIF2 α 및 액틴의 수준을 특이적 항체를 사용하여 웨스턴 블롯 분석에 의해 검출하였다 (a, b). HIF2 α /액틴에 대한 상대 강도를 밀도측정 분석에 의해 평가하였다 (c). **, 정상산소에 대해 $p < 0.01$ ($n = 4 \pm \text{SD}$, 일원 분산분석); ##, 비히클 (저산소, 2일)에 대해 $p < 0.01$ ($n = 4 \pm \text{SD}$, 일원 분산분석).

도 12. MSC-유래 엑소솜이 폐 조직에서의 NFkB p65의 저산소-유도 활성화를 억제한다. 꼬리 정맥에 의해 10 μg MEX 또는 비히클을 주사한 마우스를 지시된 기간에 걸쳐 등압 저산소 (8.5% O_2)에 노출시켰다. 개별적인 폐 조직 균질화물로부터의 등가량의 단백질을 변성 폴리아크릴아미드 겔 전기영동에서 분리시켰다. p65, 인산화-p65 (S536), 및 액틴의 수준을 특이적 항체를 사용하여 웨스턴 블롯 분석에 의해 검출하였다 (a, b). P-p65/액틴에 대한 상대 강도를 밀도측정 분석에 의해 평가하였다 (c). *, 정상산소에 대해 $p < 0.05$ ($n = 4 \pm \text{SD}$, 일원 분산분석); ##, 비히클 (저산소, 2일)에 대해 $p < 0.01$ ($n = 4 \pm \text{SD}$, 일원 분산분석).

도 13. MSC-유래 엑소솜이 폐 조직에서의 STAT3의 저산소-유도 활성화를 억제한다. 꼬리 정맥에 의해 10 μg MEX 또는 비히클을 주사한 마우스를 2일 동안 등압 저산소 (8.5% O_2)에 노출시켰다. 개별적인 폐 조직 균질화물로부터의 등가량의 단백질을 변성 폴리아크릴아미드 겔 전기영동에서 분리시켰다. STAT3, 인산화-STAT3 (Y705) 및 액틴의 수준을 특이적 항체를 사용하여 웨스턴 블롯 분석에 의해 검출하였다 (a). P-STAT3/STAT3에 대한 상대 강도를 밀도측정 분석에 의해 평가하였다 (b). **, 정상산소에 대해 $p < 0.01$ ($n = 4 \pm \text{SD}$, 일원 분산분석); ##, 비히클에 대해 $p < 0.01$ ($n = 4 \pm \text{SD}$, 일원 분산분석).

도 14. MSC-유래 엑소솜이 폐 조직에서의 STAT3의 저산소-유도 활성화를 억제한다. 꼬리 정맥에 의해 10 μg MEX 또는 비히클을 주사한 마우스를 지시된 기간에 걸쳐 등압 저산소 (8.5% O_2)에 노출시켰다. 개별적인 폐 조직 균질화물로부터의 등가량의 단백질을 변성 폴리아크릴아미드 겔 전기영동에서 분리시켰다. 인산화-STAT3 (Y705) 및 액틴의 수준을 특이적 항체를 사용하여 웨스턴 블롯 분석에 의해 검출하였다 (a, b). P-STAT3/액틴에 대한 상대 강도를 밀도측정 분석에 의해 평가하였다 (c). ***, 정상산소 또는 비히클 (저산소, 7일) 또는 MEX (저산소, 2일 및 7일)에 대해 $p < 0.001$ ($n = 4 \pm \text{SD}$, 일원 분산분석); ###, 비히클 (저산소, 2일)에 대해 $p < 0.001$ ($n = 4 \pm \text{SD}$, 일원 분산분석); ns 정상산소 대 MEX (저산소, 2일) ($n = 4 \pm \text{SD}$, 일원 분산분석).

도 15. MSC-유래 엑소솜이 폐 조직에서의 저산소-유도 HIMF 상향조절을 억제한다. 꼬리 정맥에 의해 10 μg MEX 또는 비히클을 주사한 마우스를 7일 동안 등압 저산소 (8.5% O_2)에 노출시켰다. 개별적인 폐 조직 균질화물로부터의 등가량의 단백질을 변성 폴리아크릴아미드 겔 전기영동에서 분리시켰다. HIMF 및 액틴의 수준을 특이적 항체를 사용하여 웨스턴 블롯 분석에 의해 검출하였다 (a). HIMF/액틴에 대한 상대 강도를 밀도측정 분석에 의해 평가하였다 (b). **, 정상산소에 대해 $p < 0.01$ ($n = 4 \pm \text{SD}$, 일원 분산분석); #, 비히클에 대해 $p < 0.05$ ($n = 4 \pm \text{SD}$, 일원 분산분석); MEX 대 정상산소 사이는 통계적으로 유의하지 않음 ($n = 4 \pm \text{SD}$, 일원 분산분석).

도 16. MSC-유래 엑소솜이 폐 조직에서의 저산소-유도 HIMF 상향조절을 억제한다. 꼬리 정맥에 의해 10 μg MEX 또는 비히클을 주사한 마우스를 지시된 기간에 걸쳐 등압 저산소 (8.5% O_2)에 노출시켰다. 개별적인 폐 조직 균질화물로부터의 등가량의 단백질을 변성 폴리아크릴아미드 겔 전기영동에서 분리시켰다. HIMF 및 액틴의 수준을 특이적 항체를 사용하여 웨스턴 블롯 분석에 의해 검출하였다 (a, b). HIMF/액틴에 대한 상대 강도를 밀도측정 분석에 의해 평가하였다 (c, d). ***, 저산소증에 대해 $p < 0.001$ ($n = 4 \pm \text{SD}$, 일원 분산분석); **, 저산소증에 대해 $p < 0.01$ ($n = 4 \pm \text{SD}$, 일원 분산분석); #, 비히클에 대해 $p < 0.05$ ($n = 4 \pm \text{SD}$, 일원 분산분석).

도 17. MSC-유래 엑소솜이 만성 저산소-유도 우심 비대를 보호한다. 지시된 기간에 꼬리 정맥에 의해 10 μg MEX (M) 또는 비히클 (V)을 주사한 마우스를 3주 동안 등압 저산소 (8.5% O_2)에 노출시켰다 (a). 개별적인 마우스로부터의 심장을 프로세싱한 후, RV/(LV+S) 비를 측정하였다 (b). ***, 저산소증에 대해 $p < 0.001$ ($n = 9$, 일원 분산분석); ###, 비히클에 대해 $p < 0.001$ ($n = 11$, 일원 분산분석); MEX와 정상산소 사이는 통계적으로 유의하지 않음 (일원 분산분석).

도 18. FPLC (고속 단백질 액체 크로마토그래피)에 의한 MSC 엑소솜 정체의 고해상도 프로파일. 상부 패널:

MSC 엑소솜 정제의 고속 단백질 액체 크로마토그래피. 매트릭스: 하이프렙(HiPrep) 세파크릴 S-400. 이동상: 포스페이트 완충 염수, 300 mM. 유량: 0.5 mL/분. 농축된 컨디셔닝 배지를 칼럼에 적용하고, 용출된 단백질을 A280에 의해 모니터링하였다. 단리된 MSC 엑소솜 (MEX)은 65.5 mL에서 용출되었다. 50 nm 직경의 나노입자의 분자 크기 표준물이 MSC 엑소솜과 함께 용출되었다. 하부 패널: 용출물의 분획들을 천연 폴리아크릴아미드 전기영동 젤에 적용하고, 이어서 전체 단백질에 대해 염색하였다. MEX 분획은 컨디셔닝 배지 내의 별크(bulk) 단백질과 별개로, 고분자량 형태와 같이 이동하였다.

도 19. 마우스 또는 인간 기원의 MEX가 STAT3의 저산소 활성화를 억제한다. (a) 10 μ g MEX 제제로 처리된 개별적인 동물의 폐로부터의 전체 단백질 추출물. 오른쪽 패널: 2일 동안의 저산소 노출이 마우스 폐에서의 Tyr-705의 인산화 (pY-STAT3)를 통해 STAT3 활성화를 초래하였고, 이것이 마우스 기원의 MEX로 처리하는 것에 의해 방지되었다. 오른쪽 패널: STAT3 활성화의 정량. 모든 군에 대해, n=4, 일원 분산분석: **, 정상산소에 대해 p<0.01. **, PBS에 대해 p<0.01. (b) 저산소 (1% O₂, 5시간)에 노출된 인간 폐 동맥 내피 세포 (hPAEC)의 1차 배양이 STAT3의 강건한 활성화를 나타내고, 이는 인간 제대 기질로부터의 MSC에 의해 분비된 MEX (hUC-MEX)의 존재 하에 효율적으로 억제된다. hUC-MSC로 컨디셔닝된 배지 (hUC-ExD-CM)의 미세소포(microvesicle)-고갈 분획은 STAT3 활성화에 대한 효과가 없다.

도 20. MEX 처리가 miR-17 마이크로RNA 수퍼페밀리의 저산소 유도를 억제하고, 폐에서의 항-증식성 miR-204의 수준을 증가시킨다. 10 μ g MEX 제제로 처리된 동물로부터의 전체 마우스 폐 내의 마이크로RNA 수준. miR 수준을 저산소 노출 7일에 qPCR에 의해 평가하였고, 이는 정상산소 군의 평균과 비교하여 제시된다. (a) miR-17~92, miR-106b~25 및 miR-106a~363 클러스터를 나타내는 선택된 miR. (b) 저산소 신호전달에서 수반되는 것으로 보고된 선택된 miR. (c) MEX 처리 시의 폐 세동맥-특이적 miR-204의 기저 수준의 상향조절. 점은 개별적인 동물에서의 발현 수준을 나타낸다. NRX: 정상산소; HPX: 저산소. 모든 군에 대해, n=4, 일원 분산분석: **, p<0.01; ¶, 정상산소에 대해 p < 0.001; §, PBS에 대해 p < 0.001.

도 21. 이러한 연구의 결과를 통합하는 한 비제한적인 가설의 도식. 저산소는 폐 내의 면역조정인자의 Th1/Th2 균형을 이동시켜, 별법적인 활성화된 폐포 대식세포 (AA-AMΦ)를 초래하고, 초기 단계에서, 폐 상피에서의 HIMF의 발현을 유도한다. 혈관구조에 대한 HIMF 분열촉진 작용은 Th2 시토카인, 예컨대 IL-4를 요구한다. 증식 쪽으로의 이동의 결과에는 STAT3 신호전달의 저산소 활성화 및 마이크로RNA의 miR-17 패밀리의 상향조절이 포함된다. MEX 처리는 폐에서의 초기 저산소 신호를 방해하여, 염증 및 HIMF 전사 상향조절 양쪽 모두를 억제한다. 또한, MEX 처리가 miR-204 수준을 직접적으로 상향조절할 수 있어, STAT3-miR-204-STAT3 피드-포워드 (feed-forward) 루프(loop)를 중단시키고, 균형을 항-증식 상태 쪽으로 이동시킨다.

도 22. 인간 위튼 젤리 (WJ) MSC로부터의 엑소솜에 대해 특이적인 마커. 하기 공급원으로부터의 50 nm 분획 (E1)의 웨스턴 블롯 분석: UC: 컨디셔닝되지 않은 MSC 성장 배지. MPD UC: 미세입자-고갈 성장 배지. 성장 배지 내의 엑소솜 마커를 폴리에틸렌 글리콜 침전에 의해 제거한다. hMEX: WJ MSC로부터의 엑소솜. hFEX: 인간 피부 섬유모세포로부터의 엑소솜. 테트라스파닌 CD9 및 CD81이 엑소솜 분획에서 강화된다.

도 23. mMEX가 마우스 폐 섬유모세포에서의 HIF1a의 저산소 상향조절 및 STAT3의 인산화를 억제한다. 마우스 폐 섬유모세포를 지시된 바와 같이 마우스 골수 MSC-유래 엑소솜 (mMEX)의 존재 또는 부재 하에 저산소에 노출시켰다. 저산소-유도성 인자 (HIF) 안정화 및 인산화에 의한 STAT3 활성화 (P-STAT3)를 웨스턴 블롯팅에 의해 결정하였다.

도 24. 마우스 골수 유래 MSC로부터의 엑소솜 (mMEX, 1 μ g/mL) 또는 마우스 폐 섬유모세포로부터의 엑소솜 (mFEX, 1 μ g/mL)으로 처리된 hPAEC를 1% O₂에 6시간 동안 노출시켰다. STAT3의 저산소 활성화 (P-STAT3), 전체 STAT3 및 HIF2 α 안정화를 웨스턴 블롯팅에 의해 결정하였다. NRX: 정상산소. PBS: 저산소 대조군.

도 25. 위튼 젤리 MSC로부터의 엑소솜 (hMEX, 1 μ g/mL) 또는 인간 피부 섬유모세포로부터의 엑소솜 (hFEX, 1 μ g/mL)으로 처리된 인간 PAEC를 1% O₂에 6시간 동안 노출시켰다. s Stat=3 활성화 (P-STAT3) 및 전체 STAT3을 웨스턴 블롯팅에 의해 결정하였다. NRX: 정상산소. PBS: 저산소 대조군.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

본 발명은, 부분적으로, 중간엽 줄기 세포로부터 유래된 엑소솜이, 염증성 폐 질환을 포함하지만 이에 한정되지 않는 특정 폐 질환에 치료 효과를 제공한다는 뜻밖의 발견을 기초로 한다.

- [0033] 광범위하게, 본 발명은 중간엽 줄기 세포 (MSC)-유래 엑소솜 (중간엽 줄기 세포 엑소솜 또는 MSC 엑소솜으로 상호교환가능하게 지칭됨)의 조성물, 및 염증성 폐 질환을 포함하지만 이에 한정되지 않는 특정 폐 질환의 치료 및/또는 예방에서의 이의 사용 방법에 관한 것이다.
- [0034] 엑소솜 및 엑소솜 제제
- [0035] 본 발명의 엑소솜은 중간엽 줄기 세포로부터 방출된 막 (즉, 지질 2층) 소포이다. 이는 직경이 약 30 nm 내지 100 nm 범위이다. 전자 현미경 검사에 의하면, 엑소솜은 컵 모양의 형태인 것으로 보인다. 이는 약 100,000×g에서 침강하고, 수크로스에서의 부력 밀도가 약 1.10 내지 약 1.21 g/ml이다. 엑소솜은 미세소포 또는 나노소포로 지칭될 수 있다.
- [0036] 엑소솜은 다수의 단백질 및/또는 핵산 (RNA 종 예컨대 miRNA 포함)을 포함할 수 있다. 엑소솜에서 발현될 수 있는 단백질에는 앤리스(Alix), TSG101, CD63, CD9, CD81, 모에신, HSP70, 다이서(Dicer), M-CSF, 오스테오포틴, 및 표 1에 열거된 단백질 중 하나 이상 (상기 열거된 단백질 중 임의의 것과 이러한 단백질 중 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개 또는 8개의 임의의 조합물 포함)이 포함된다. 일부 실시양태에서, 엑소솜 (하기에서 논의된 합성 엑소솜 포함)은 miRNA, 다이서, M-CSF, 오스테오포틴, 및 표 1의 단백질 중 하나 이상 (표 1의 단백질 모두 포함)을 포함한다.
- [0037] 본 발명의 일부 측면은 단리된 엑소솜에 관한 것이다. 본원에서 사용된 바와 같이, 단리된 엑소솜은 이의 천연 환경으로부터 물리적으로 분리된 것이다. 단리된 엑소솜은, 전체적으로 또는 부분적으로, 자신이 천연적으로 존재하는 조직 또는 세포 (중간엽 줄기 세포 포함)로부터 물리적으로 분리될 수 있다. 본 발명의 일부 실시양태에서, 단리된 엑소솜의 조성물은 중간엽 줄기 세포와 같은 세포가 없을 수 있거나, 또는 컨디셔닝 배지가 없거나 실질적으로 없을 수 있다. 일부 실시양태에서, 단리된 엑소솜은 조작되지 않은 컨디셔닝 배지 내에 존재하는 엑소솜보다 더 높은 농도로 제공될 수 있다.
- [0038] 중간엽 줄기 세포 배양물로부터의 컨디셔닝 배지로부터 엑소솜이 단리될 수 있다. 중간엽 줄기 세포로부터 엑소솜을 수확하는 방법이 실시예에서 제공된다. 간략하게, 이같은 방법은 먼저 중간엽 줄기 세포를 표준 조건 하에 이들이 약 70% 전면성장에 도달할 때까지 배양한 후, 세포를 무혈청 배지에서 24시간 동안 배양하고, 이어서 컨디셔닝 배지를 수확하여, 세포 및 세포 잔해물을 제거하기 위해 400×g에서 10분 및 12000×g에서 10분 동안의 분별 원심분리에 적용하는 것을 수반한다. 그 후, 정화된 컨디셔닝 배지를 100 kDa MWCO 필터 (밀리포어((Millipore))를 사용하여 한외여과로 농축한 후, 다시 12000×g에서 10분 동안 원심분리한다. 그 후, 농축된 컨디셔닝 배지를 PBS-평형화 크로마(Chroma) S-200 칼럼 (클론텍(Clontech))에 로딩/loading)하고, PBS로 용출시키고, 350-550 μl의 분획을 수집함으로써 크기 배제 크로마토그래피를 사용하여 엑소솜을 단리한다. 엑소솜을 함유하는 분획을 확인하고, 잠재적으로 풀링한다. 표준 브래드포드(Bradford) 검정법 (바이오-래드 (Bio-Rad))을 사용하여 단백질 농도를 측정한다. 강화된 엑소솜 제제의 분취량을 -80°C에서 보관할 수 있다.
- [0039] 정화된 컨디셔닝 배지의 100,000×g에서의 초원심분리에 의해 엑소솜을 또한 정제할 수 있다. 수크로스 쿠션 내로의 초원심분리에 의해 이를 또한 정제할 수 있다. 수지상 세포로부터의 엑소솜 정제를 위한 GMP 방법이 문헌 [J Immunol Methods. 2002;270:211-226]에 기술되어 있다.
- [0040] 규정된 구멍 크기의 나일론 막 필터를 통해, 분별 여과에 의해 엑소솜을 또한 정제할 수 있다. 더 큰 구멍 크기를 통과하는 1차 여과는 세포 단편 및 잔해물을 유지시킬 것이다. 더 작은 구멍 크기를 통과하는 후속 여과는 엑소솜을 유지시킬 것이고, 이를 더 작은 크기의 오염물로부터 정제할 것이다.
- [0041] 본 발명은 본원에 기술된 단리된 MSC 엑소솜의 특성 중 일부 또는 모두를 지니는 합성 엑소솜의 사용을 또한 구상한다. 이러한 합성 엑소솜은 (MSC 또는 MSC-CM으로부터 유래 및 단리되거나 보다는) 시험관 내에서 합성될 것이다. 이는 표 1 또는 도 22에 열거된 단백질 중 하나 이상 (2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 또는 이를 초과하는 개수 포함)이 있는 합성 리포솜일 수 있다. 이는 이러한 단백질 중 하나 이상 (2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 또는 이를 초과하는 개수 포함)을 코딩하는 핵산을 포함할 수 있거나 또는 그렇지 않을 수 있다. 리포솜 합성은 당업계에 주지되어 있고, 시판원으로부터 리포솜을 구입할 수 있다. MSC 또는 MSC-CM으로부터 유래 및 단리된 엑소솜에 관하여 본원에 기술된 다양한 조성물, 제제, 방법 및 용도가 합성 리포솜의 정황에서 또한 구상된다는 것을 이해하여야 한다.
- [0042] 본 발명은 엑소솜의 즉각적인 사용 또는 별법으로 엑소솜의 단기 및/또는 장기 보관, 예를 들어, 사용 전에 냉동보존 상태에서 보관하는 것을 구상한다. 프로테이나제(proteinase) 억제제가 동결 배지에 전형적으로 포함되는데, 이들이 장기 보관 냉동 엑소솜 무결성을 제공하기 때문이다. 엑소솜 활성의 상실 증가와 연관되기 때문

에 -20°C 에서 동결시키는 것은 바람직하지 않다. 활성을 보존하기 때문에 -80°C 에서의 급속 동결이 더욱 선호된다. (예를 들어 문헌 [Kidney International (2006) 69, 1471-1476] 참조.) 엑소솜 생물학적 활성의 보존을 강화하기 위해 동결 배지에 대한 첨가제가 사용될 수 있다. 이같은 첨가제는 무손상 세포의 냉동보존에 사용된 것과 유사할 것이고, DMSO, 글리세롤 및 폴리에틸렌 글리콜을 포함할 수 있지만 이에 한정되지는 않는다.

표 1

FEX에 비해 MEX와 연관된 특이적이고 풍부한 단백질

확인	접속번호	MS/MS 스펙트럼	서열 커버리지(%)	FEX에서의 MS/MS 스펙트럼
합토글로빈	981646	100	15.9	2
갈색린-3-결합 단백질	907797	39	43.7	0
트롬보스폰딘-2	903330	36	23.5	0
락타드헤린	921956	32	38.5	2
지방세포 인웨서-결합 단백질 1	984081	27	39.1	3
비멘린	920152	28	35.0	0
프로테아솔 서브유닛 알파 유형-2	949722	26	50.9	3
아밀로이드 베타 A4 단백질	912023	25	27.1	2

* 특정 단백질에 대해 총 MS/MS 히트가 >25이고 서열 커버리지에서의 MEX/FEX 비가 >3일 때 데이터가 제시되었다

[0043] 중간엽 줄기 세포

중간엽 줄기 세포는 뉴런 세포, 지방세포, 연골세포, 글모세포, 근육세포, 심장 근육, 및 기타 내피 및 상피 세포로 분화되는 능력이 있는 전구 세포이다. (예를 들어, 문헌 [Wang, Stem Cells 2004;22(7):1330-7]; [McElreavey;1991 Biochem Soc Trans (1):29s]; [Takechi, Placenta 1993 March/April; 14 (2); 235-45]; [Takechi, 1993; Kobayashi; Early Human Development;1998; July 10; 51 (3); 223-33]; [Yen; Stem Cells; 2005; 23 (1) 3-9] 참조.) 이러한 세포는 유전자 또는 단백질 발현에 의해 표현형으로 정의될 수 있다. 이러한 세포는 CD13, CD29, CD44, CD49a, b, c, e, f, CD51, CD54, CD58, CD71, CD73, CD90, CD102, CD105, CD106, CDw119, CD120a, CD120b, CD123, CD124, CD126, CD127, CD140a, CD166, P75, TGF- β 1R, TGF- β 2R, HLA-A, B, C, SSEA-3, SSEA-4, D7 및 PD-L1 중 하나 이상을 발현하는 것으로 (따라서 이에 대해 양성인 것으로) 특성화되었다. 또한 이러한 세포는 CD3, CD5, CD6, CD9, CD10, CD11a, CD14, CD15, CD18, CD21, CD25, CD31, CD34, CD36, CD38, CD45, CD49d, CD50, CD62E, L, S, CD80, CD86, CD95, CD117, CD133, SSEA-1, 및 AB0를 발현하지 않는 것으로 (따라서 이에 대해 음성인 것으로) 특성화되었다. 따라서, 중간엽 줄기 세포는 이의 차별적인 잠재력에 따라 표현형으로 및/또는 기능적으로 특성화될 수 있다.

[0044] 골수, 혈액, 골막, 진피, 제대혈 및/또는 바탕질 (예를 들어, 워튼 젤리), 및 태반을 포함하지만 이에 한정되지 않는 다수의 공급원으로부터 중간엽 줄기 세포를 수확할 수 있다. 중간엽 줄기 세포를 수확하는 방법이 실시예에서 더욱 상세하게 기술된다. 본 발명에서 사용될 수 있는 기타 수확 방법에 대해 미국 특허 번호 5486359를 또한 참조할 수 있다.

[0045] 본 발명의 방법에서의 사용이 구상되는 중간엽 줄기 세포, 따라서 엑소솜은 치료될 대상체와 동일한 대상체로부터 유래될 수 있거나 (따라서, 대상체에 대해 자가성으로 지칭될 것이다), 또는 바람직하게는 동일 종인 상이한 대상체로부터 유래될 수 있다 (따라서, 대상체에 대해 동종이계성으로 지칭될 것이다).

[0046] 본원에서 사용된 바와 같이, 본 발명의 측면 및 실시양태가 달리 지시되지 않는 한 세포, 뿐만 아니라 세포 집단에 관련된다는 것을 이해하여야 한다. 따라서, 세포가 언급되는 경우, 달리 지시되지 않는 한 세포 집단이 또한 구상된다는 것을 이해하여야 한다.

[0047] 본원에서 사용된 바와 같이, 단리된 중간엽 줄기 세포는 이의 천연 환경으로부터의 하나 이상의 성분으로부터의 물리적 분리를 포함하여 이의 천연 환경으로부터 물리적으로 분리된 중간엽 줄기 세포이다. 따라서, 단리된 세포 또는 세포 집단은 시험관 내에서 또는 생체 외에서 조작된 세포 또는 세포 집단을 포함한다. 예를 들어, 단리된 중간엽 줄기 세포는 중간엽 줄기 세포가 수확된 조직 내의 세포의 50% 이상, 바람직하게는 60% 이상, 더욱 바람직하게는 70% 이상, 더욱 더 바람직하게는 80% 이상으로부터 물리적으로 분리된 중간엽 줄기 세포일 수 있다. 일부 예에서, 단리된 중간엽 줄기 세포는 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상, 또는 100%의 본원에서 표현형으로 및/또는 기능적으로 정의된 바와 같은 중간엽 줄기 세포인 집단 내에 존재한다. 바람직하게는, 출발 세포 집단에 비교하여 단리된 제제에서 중간엽 줄기 세포 대 기타 세포의 비가 증가된다.

[0048] 조직 배양 플라스틱에 대한 부착을 기초로, 당업계에 공지된 방법을 사용하여, 예를 들어, 골수 단핵 세포, 제

대혈, 지방 조직, 태반 조직으로부터 중간엽 줄기 세포가 단리될 수 있다. 예를 들어, 시판되는 골수 흡인물로부터 중간엽 줄기 세포를 단리할 수 있다. FACS를 포함하지만 이에 한정되지 않는 당업계에 공지된 방법을 사용하여 세포 집단 내의 중간엽 줄기 세포의 강화를 달성할 수 있다.

[0051] 시판 배지를 중간엽 줄기 세포의 성장, 배양 및 유지에 사용할 수 있다. 이같은 배지에는 둘베코 변형 이글 배지 (DMEM)가 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다. 중간엽 줄기 세포의 성장, 배양 및 유지에 유용한 이같은 배지 내의 성분에는 아미노산, 비타민, 탄소원 (천연 및 비천연), 염, 당, 식물 유래 가수분해물, 피루브산나트륨, 계면활성제, 암모니아, 지질, 호르몬 또는 성장 인자, 완충제, 비-천연 아미노산, 당 전구체, 지표물, 뉴클레오시드 및/또는 뉴클레오티드, 부티레이트 또는 유기물, DMSO, 동물-유래 생성물, 유전자 유도제, 비-천연 당, 세포내 pH 조절제, 베타인 또는 삼투보호제, 미량 원소, 미네랄, 비-천연 비타민이 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다. 시판 조직 배양 배지를 보충하는데 사용될 수 있는 추가적인 성분에는, 예를 들어, 동물 혈청 (예를 들어, 소 태아 혈청 (FBS), 송아지 태아 혈청 (FCS), 말 혈청 (HS)), 항생제 (예를 들어, 페니실린, 스트렙토마이신, 네오마이신 슬레이트, 앰포테리신 B, 블라스티시딘, 클로람페니콜, 아목시실린, 바시트라신, 블레오마이신, 세팔로스포린, 클로르테트라사이클린, 제오신, 및 푸로마이신이 포함되지만 이에 한정되지는 않음), 및 글루타민 (예를 들어, L-글루타민)이 포함된다. 중간엽 줄기 세포 생존 및 성장은 적합한 호기성 환경, pH 및 온도의 유지에 또한 좌우된다. 당업계에 공지된 방법을 사용하여 중간엽 줄기 세포를 유지시킬 수 있다. (예를 들어 문헌 [Pittenger et al., Science, 284:143-147 (1999)] 참조.)

대상체

[0053] 본 발명의 방법은 인간 대상체, 농업용 가축 (예를 들어, 소, 돼지 등), 경주 동물 (예를 들어, 말), 반려 동물 (예를 들어, 개, 고양이 등) 등이 포함되는, 이로부터 이익이 유래될 것 같은 임의의 대상체에 수행될 수 있다. 본 발명의 다양한 측면에서, 인간 대상체가 바람직하다. 일부 측면에서, 인간 대상체 및 인간 MSC 엑소솜이 사용된다.

[0054] 대상체는 본 발명의 엑소솜을 사용하는 치료를 받아들이는 폐 질환 (또는 병태)에 걸린 대상체일 수 있거나, 또는 이같은 질환 (또는 병태)이 발달될 위험에 처한 대상체일 수 있다. 이같은 대상체에는 신생아, 특히 낮은 임신 연령에 출생한 신생아가 포함된다. 본원에서 사용된 바와 같이, 인간 신생아는 출생 시점부터 약 4주령까지의 인간을 지칭한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 인간 유아는 약 4주령 내지 약 3세의 인간을 지칭한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 낮은 임신 연령은 소정의 종에 대한 정상적인 임신 기간 이전에 발생한 출생 (또는 분만)을 지칭한다. 인간에서, 완전한 임신 기간은 약 40주이고, 37주 내지 40주 초과 범위일 수 있다. 인간에서, 낮은 임신 연령은, 조산과 유사하게, 임신 37주 이전에 발생하는 출생으로 정의된다. 따라서 본 발명은 임신 37주 이전에 출생한 대상체의 예방 및/또는 치료를 구상하고, 더 짧은 임신 기간 (예를 들어, 임신 36주 이전, 35주 이전, 34주 이전, 33주 이전, 32주 이전, 31주 이전, 30주 이전, 29주 이전, 28주 이전, 27주 이전, 26주 이전, 또는 25주 이전)에 출생한 대상체를 포함한다. 전형적으로, 이같은 미숙아는 신생아로서 치료될 것 이지만, 본 발명은 심지어 신생아 단계 너머까지, 그리고 아동기 및/또는 성인기 내로 이들의 치료를 구상한다. 특정 대상체는 특정 형태의 폐 질환, 예를 들어, 폐 고혈압에 대한 유전적 소질이 있을 수 있고, 이러한 대상체가 또한 본 발명에 따라 치료될 수 있다.

질환의 예방 및 치료 방법

[0056] 본 발명은 특정 폐 질환의 예방 및 치료를 구상한다. 질환 예방은 질환이 나타나는 가능성 자체를 감소시키는 것 및/또는 질환 발병을 지연시키는 것을 의미한다. 질환 치료는 질환의 증상을 감소시키거나 제거하는 것을 의미한다.

[0057] 본 발명은 다수의 폐 질환을 예방 및/또는 치료하는 것을 의도한다. 이러한 질환에는 폐 고혈압 (PH) (폐 동맥 고혈압 (PAH)으로 또한 지칭됨), 천식, 기관지폐 이형성증 (BPD), 알레르기, 사르코이드증, 및 특발성 폐 섬유증과 같은, 그러나 이에 한정되지 않는 염증성 폐 질환이 포함된다. 이러한 질환에는 염증성 성분이 없을 수 있는 폐 혈관 질환이 또한 포함된다. 본 발명에 따라 치료될 수 있는 또 다른 폐 병태에는 폐혈증 또는 환기와 연관될 수 있는 급성 폐 손상이 포함된다. 이러한 후자 병태의 예는 청소년 및 성인에서 발생하는 급성 호흡곤란 증후군이다.

[0058] 폐 고혈압은 정상 수준보다 폐 높은 폐 동맥에서의 혈압을 특징으로 하는 폐 질환이다. 증상에는 숨참, 특히 신체 활동 동안의 흉부 통증, 쇠약, 피로, 기절, 특히 운동 동안의 어지러움, 현기증, 비정상적인 심장음 및 잡음, 경정맥 충혈, 복부, 다리 및 발목 내의 유체 정체, 및 손톱 바닥의 푸른색 착색이 포함된다.

- [0059] 기관지폐 이형성증은 산소가 제공되었거나 인공호흡기에 있었던 신생아, 또는 조산된 신생아, 특히 많이 조산된 신생아 (예를 들어, 임신 32주 이전에 출생한 신생아)를 괴롭히는 병태가다. 이는 신생아 만성 폐 질환으로 또한 지칭된다. BPD의 원인에는 기계적인 손상, 예를 들어 환기 결과로서의 손상, 산소 독성, 예를 들어 산소 요법의 결과로서의 산소 독성, 및 감염이 포함된다. 이러한 질환은 시간에 따라 비-염증성에서 염증성으로 진행될 수 있다. 증상에는 푸른색 피부, 만성 기침, 가쁜 호흡, 및 숨참이 포함된다. BPD에 걸린 대상체는 호흡기 세포융합 바이러스 감염과 같은 감염에 대해 더욱 감수성이다. BPD에 걸린 대상체에서 폐 고혈압이 발달될 수 있다.
- [0060] 급성 호흡 곤란 증후군 (ARDS) (호흡 곤란 증후군 (RDS) 또는 성인 호흡 곤란 증후군으로 또한 공지됨)은 폐 손상 또는 급성 질병의 결과로서 발생하는 병태가다. 폐에 대한 손상은 환기, 외상, 화상, 및/또는 흡기의 결과일 수 있다. 급성 질병은 감염성 폐렴 또는 폐혈증일 수 있다. 이는 중증 형태의 급성 폐 손상으로 간주되고, 종종 치사성이다. 이는 폐 염증, 기체 교환 손상, 및 염증 매개물의 방출, 저산소혈증, 및 다발성 장기 부전을 특징으로 한다. ARDS는 흉부 X선에서의 양측성 침윤의 존재 하의 200 mmHg 미만의 흡기 산소 (FiO_2)의 분수로서의 동맥 산소 분압 (PaO_2)의 비로서 또한 정의될 수 있다. 300 mmHg 미만의 PaO_2/FiO_2 비 + 양측성 침윤이 급성 폐 손상을 가리고, 이는 종종 ARDS의 전구물이다. ARDS 증상에는 숨참, 빈호흡, 및 낮은 산소 수준으로 인한 정신혼동이 포함된다.
- [0061] 특발성 폐 섬유증은 원인이 알려지지 않은 폐의 흉터형성 또는 비후를 특징으로 한다. 이는 50-70세의 사람에서 가장 종종 발생한다. 이의 증상에는 숨참, 규칙적인 기침 (전형적으로는 마른 기침), 흉부 통증, 및 활성 수준 감소가 포함된다.
- [0062] 예방 및/또는 치료는 일부 경우에 MSC 액소솜을 단독으로 사용하는 것 또는 하나 이상의 제2 작용제와 함께 사용하는 것을 수반할 수 있다. 대상체는 기계적인 시술 예컨대 외인성 산소 투여와 함께 또는 외인성 산소 투여 없이 환기시키는 것에 또한 적용될 수 있다.
- [0063] 신생아, 특히 임신 연령이 낮은 신생아에 관하여, 본 발명은 출생으로부터 4주, 3주, 2주, 1주, 6일, 5일, 4일, 3일, 2일, 1일, 12시간, 6시간, 3시간 또는 1시간 이내에 MSC 액소솜을 투여하는 것을 구상한다. 일부 중요한 예에서, 출생 1시간 이내에 MSC 액소솜이 투여된다.
- [0064] 본 발명은 BPD와 같은, 그러나 이에 한정되지 않는 폐 질환을 가리키는 증상의 부재 하에서도 MSC 액소솜을 투여하는 것을 추가로 구상한다.
- [0065] 본 발명은 MSC 액소솜의 2회, 3회, 4회, 5회 또는 이를 초과하는 횟수의 투여를 포함하는, MSC 액소솜의 반복 투여를 또한 구상한다. 일부 예에서, MSC 액소솜이 연속적으로 투여될 수 있다. 반복 또는 연속 투여는 치료되는 병태의 중증도에 따라 수시간 (예를 들어, 1-2시간, 1-3시간, 1-6시간, 1-12시간, 1-18시간 또는 1-24시간), 수일 (예를 들어, 1-2일, 1-3일, 1-4일, 1-5일, 1-6일 또는 1-7일) 또는 수주 (예를 들어, 1-2주, 1-3주 또는 1-4주)의 기간에 걸쳐 일어날 수 있다. 투여가 반복되지만 연속적이지는 않은 경우, 투여 사이의 시간은 시간 (예를 들어, 4시간, 6시간 또는 12시간), 일 (예를 들어, 1일, 2일, 3일, 4일, 5일 또는 6일), 또는 주 (예를 들어, 1주, 2주, 3주 또는 4주)일 수 있다. 투여 사이의 시간은 동일할 수 있거나 또는 상이할 수 있다. 예로서, 질환 증상이 악화되는 것으로 보이면, MSC 액소솜이 더욱 빈번하게 투여될 수 있고, 그 후 증상이 안정화되거나 줄어들면, MSC 액소솜이 덜 빈번하게 투여될 수 있다.
- [0066] 일부 중요한 예에서, MSC 액소솜은 출생 24시간 이내에 1회 이상 투여된 후, 출생 1주일 이내에 1회 이상 더 투여된다. 더욱 더 바람직하게는, MSC 액소솜은 출생 1시간 이내에 1회 이상 투여된 후, 출생 3-4일 이내에 1회 이상 더 투여된다.
- [0067] 일부 예에서, 저용량의 MSC 액소솜의 반복된 정맥내 투여가 일어날 수 있다. 저용량의 MSC 액소솜이 뮤린 대상체에게 정맥내로 투여된 경우에, MSC 액소솜이 2-4일마다 투여되었을 때 최대 활성이 달성되었다는 것이 본 발명에 따라 발견되었다. 이러한 실험에서, 100 ng의 MSC 액소솜이 평균적으로 20 그램 마우스에게 투여되었고, 이는 5 μ g/kg의 용량에 상응한다. 더 높은 용량이 사용되었을 때 (예를 들어, 20 g 마우스 당 10 μ g 또는 0.5 mg/kg), 단일 정맥내 투여가 장기 보호를 달성하는데 충분하였다. 따라서, 본 발명은 낮은 투여량 형태의 MSC 액소솜의 반복 투여, 뿐만 아니라 높은 투여량 형태의 MSC 액소솜의 단일 투여를 구상한다. 낮은 투여량 형태는 비제한적으로 1-50 μ g/kg 범위일 수 있는 한편, 높은 투여량 형태는 비제한적으로 51-1000 μ g/kg 범위일 수 있다. 특히, 질환의 중증도, 대상체의 건강, 및 투여 경로에 따라, 저용량 또는 고용량 MSC 액소솜의 단일 또

는 반복 투여가 본 발명에 의해 구상된다는 것이 이해될 것이다.

[0068] 투여, 제약 조성물, 유효량

MSC 액소솜은, 전형적으로는 제약상 허용되는 담체와 조합되었을 때, 제약상 허용되는 제제 (또는 제약상 허용되는 조성물)에서 사용 (예를 들어, 투여)될 수 있다. 이같은 제제는 제약상 허용되는 농도의 염, 완충제, 보존제, 혼화성 담체를 일상적으로 함유할 수 있고, 다른 (즉, 제2) 치료제를 임의로 포함할 수 있다.

[0070] 제약상 허용되는 담체는 예방적으로 또는 치료적으로 활성인 작용제를 전달 또는 운송하는데 수반되는, 제약상 허용되는 물질, 조성물 또는 비허클, 예컨대 액체 또는 고체 충전제, 희석제, 부형제, 용매 또는 캡슐화 물질이다. 각각의 담체는 제제의 다른 성분과 혼화성이고 대생에게 해롭지 않다는 점에서 "허용성"이어야 한다. 제약상 허용되는 담체로서의 역할을 할 수 있는 물질의 일부 예로는 당, 예컨대 락토스, 글루코스 및 수크로스; 글리콜, 예컨대 프로필렌 글리콜; 폴리올, 예컨대 글리세린, 소르비톨, 만니톨 및 폴리에틸렌 글리콜; 에스테르, 예컨대 에틸 올레아이트 및 에틸 라우레이트; 완충제, 예컨대 수산화마그네슘 및 수산화알루미늄; 발열원이 없는 물; 등장성 염수; 렇거 용액; 에틸 알콜; 포스페이트 완충제 용액; 및 제약 제제에서 사용되는 기타 비-독성 혼화성 물질이 포함된다.

[0071] 제2 치료제. 액소솜이 하나 이상의 제2 치료제와 함께 투여될 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, 치료제는 폐 질환 예컨대 본원에서 논의된 것들의 예방, 치료 및/또는 관리에서 사용될 수 있는 임의의 작용제를 지칭한다. 이는 계면활성제, 흡입성 산화질소, 알미트린 비스메실레이트, 면역조정인자, 및 항산화제를 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다. 면역조정인자의 예로는 메틸프레드니솔론과 같은, 그러나 이에 한정되지는 않는 스테로이드 및 코르티코스테로이드가 포함된다. 항산화제의 예로는 슈퍼옥시드 디스뮤타제가 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다.

[0072] 폐 고혈압을 포함하지만 이에 한정되지 않는 특정 폐 질환의 치료 또는 관리에서 사용되는 특정 제2 치료제에는 산소, 항응고제 예컨대 와파린 (쿠마딘(Coumadin)); 이뇨제 예컨대 푸로세미드 (라식스(Lasix)[®]) 또는 스피로노락톤 (알닥톤(Aldactone)[®]); 칼슘 채널 차단제; 칼륨 예컨대 K-dur[®]; 수축촉진제 예컨대 디곡신; 혈관확장제 예컨대 니페디핀 (프로카디아(Procardia)[®]) 또는 딜티아제 (카르디제(Cardizem)[®]); 엔도텔린 수용체 길항제 예컨대 보센탄 (트라클리어(Tracleer)[®]) 및 암브리센탄 (리테어리스(Letairis)[®]); 프로스타시클린 유사체 예컨대 에포프로스테놀 (플로란(Flolan)[®]), 트레프로스티닐 소듐 (리모듈린(Remodulin)[®], 티바소(Tyvaso)[®]), 및 일로프로스트 (벤타비스(Ventavis)[®]); 및 PDE-5 억제제 예컨대 실데나필 (레바티오(Revatio)[®]) 및 타달라필 (애드서카(Adcirca)[®])이 포함된다.

[0073] 계면활성제. MSC 액소솜이 폐 계면활성제와 함께 투여될 수 있다. 폐 계면활성제는 (예를 들어, 폐포 벽이 서로 부착하는 것을 방지함으로써) 폐 기도를 개방시켜 두는데 유용한 지질단백질 혼합물이다. 폐 계면활성제는 인지질 예컨대 디팔미토일포스파티딜콜린 (DPPC), 포스포티딜콜린 (PC), 포스포티딜글리세롤 (PG); 클레스테롤; 및 단백질 예컨대 SP-A, B, C 및 D로 구성될 수 있다. 폐 계면활성제는 천연 발생 공급원 예컨대 소 또는 돼지 폐 조직으로부터 유래될 수 있다. 예로는 앤비오팩트(Alveofact)TM (소 폐 세척액에서 유래됨), 큐로서프 (Curosurf)TM (다진 돼지 폐에서 유래됨), 인파서프(Infasurf)TM (송아지 폐 세척액에서 유래됨) 및 서반타 (Survanta)TM (다진 소 폐로부터 유래되고, DPPC, 팔미트산 및 트리팔미틴이 포함되는 추가 성분이 있음)가 포함된다. 폐 계면활성제는 또한 합성일 수 있다. 예로는 엑소서프(Exosurf)TM (DPPC와 헥사데칸올 및 타일록사 폴로 구성됨), 퓨액틴트(Pumactant)TM 또는 인공 폐 확장 화합물 (ALEC: Artificial Lung Expanding Compound) (DPPC 및 PG로 구성됨), KL-4 (DPPC, 팔미토일-올레일 포스파티딜글리세롤, 팔미트산, 및 SP-B와 흡사한 합성 펩티드로 구성됨), 벤티큐트(Venticute)TM (DPPC, PG, 팔미트산, 및 재조합 SP-C로 구성됨)가 포함된다. 상업적인 공급원으로부터 폐 계면활성제를 수득할 수 있다.

[0074] 유효량. 본 발명의 제제는 유효량으로 투여된다. 유효량은 단독으로 원하는 결과를 자극하는 작용제의 양이다. 절대적인 양은 투여용으로 선택된 물질, 투여가 단일 용량 또는 다중 용량인지 여부, 및 연령, 신체 상태, 사이즈, 체중 및 질환 상태가 포함되는 개별적인 환자 파라미터가 포함되는 다양한 요인에 좌우될 것이다. 이러한 요인들은 당업자에게 주지되어 있고, 일상적일 뿐인 실험으로 다루어질 수 있다.

[0075] 투여 경로. MSC 액소솜은 폐로의 전달을 달성하는 임의의 경로에 의해 투여될 수 있다. 전신 투여 경로 예컨대 정맥내 볼루스 주사 또는 연속 주입이 적절하다. 더욱 직접적인 경로 예컨대 비내 투여, 기관내 투여 (예를

들어, 삽관에 의한투여), 및 흡입 (예를 들어, 입 또는 코를 통한 에어로졸에 의한 흡입)이 또한 본 발명에 의해 구상되고, 일부 예에서, 특히 신속한 작용이 필요한 경우에 더욱 적합할 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, 에어로졸은 기체 내에 소형 입자로서 분산된 액체의 혼탁액이고, 이는 이같은 입자를 함유하는 스프레이 또는 미세 미스트를 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 에어로졸화는 액체 혼탁액을 소형 입자 또는 액적으로 전환시킴으로써 에어로졸을 생산하는 공정이다. 이는 에어로졸 전달 시스템 예컨대 가압 팩 또는 네뷸라이저를 사용하여 행해질 수 있다. 네뷸라이저에는 에어-제트 (즉, 함기성), 초음파, 및 진동-메쉬(mesh) 네뷸라이저가 포함되고, 이때 디클로로디플루오로메탄, 트리클로로플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로메탄, 이산화탄소 또는 기타 적절한 기체와 같은, 그러나 이에 한정되지 않는 적절한 추진제가 예를 들어 사용된다. 네뷸라이저에 더하여, 폐 전달을 위한 기타 장치에는 계량 흡입기 (MDI) 및 건조 분말 흡입기 (DPI)가 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다. 동결건조 액소솜 및 적절한 분말 기재 예컨대 락토스 또는 전분을 함유하는, 흡입기 또는 취입기에서 사용하기 위한 예를 들어 젤라틴의 캡슐 및 카트리지가 제제화될 수 있다.

[0076] 액소솜은, 이를 전신에 전달하는 것이 바람직한 경우에, 볼루스 주사 또는 연속 주입에 의한 것이 예를 들어 포함되는 주사에 의한 비경구 투여용으로 제제화될 수 있다. 주사용 제제는 보존제가 첨가된 또는 첨가되지 않은 단위 투여량 형태로, 예를 들어, 앰풀 또는 다중 용량 용기 내에 제시될 수 있다.

[0077] 조성물은 유성 또는 수성 비히클 내의 수용성 혼탁액, 용액 또는 에멀션과 같은 형태를 취할 수 있고, 배합제 예컨대 혼탁제, 안정화제 및/또는 분산제를 함유할 수 있다. 적절한 친지성 용매 또는 비히클에는 지방유 예컨대 참기름, 또는 합성 지방산 에스테르, 예컨대 에틸 올레이트 또는 트리글리세리드가 포함된다. 수성 주사 혼탁액은 혼탁액의 점도를 증가시키는 물질, 예컨대 소듐 카르복시메틸 셀룰로스, 소르비톨 또는 텍스트란을 함유할 수 있다. 임의로, 혼탁액은 적절한 안정화제 또는 용해도를 증가시키는 작용제를 또한 함유할 수 있다. 별법으로, 액소솜은 사용 전에 적절한 비히클, 예를 들어, 발열원이 없는 멸균수로 구성시키기 위한 동결건조 또는 기타 분말 또는 고체 형태일 수 있다.

[0078] 본 발명에 따라 치료되는 대상체에게 투여될 기타 작용제가 경구 투여, 비내 투여, 기관내 투여, 흡입, 정맥내 투여 등이 포함되는 임의의 적절한 경로에 의해 투여될 수 있다는 것을 이해하여야 한다. 당업자는 이같은 제2 작용제에 대한 관례적인 투여 경로를 알 것이다.

0079] 키트

본 발명은 포장 및 표지된 제약 제품을 또한 포함한다. 이러한 제작품 또는 키트는 밀폐되어 밀봉된 유리 바이알 또는 플라스틱 앰풀 또는 기타 컨테이너와 같은 적합한 용기 또는 컨테이너 내의 적합한 단위 투여량 형태를 포함한다. 단위 투여량 형태는 예를 들어 에어로졸에 의한 폐 전달용으로 적절하여야 한다. 바람직하게는, 제작품 또는 키트는 제약 제품을 투여하는 방법이 포함되는 사용 방법에 대한 설명서를 추가로 포함한다. 설명서는 개업의, 기술자 또는 대상체에게 당해 질환 또는 장애를 적합하게 예방 또는 치료하는 방법에 대해 조언하는 정보물을 추가로 함유할 수 있다. 달리 말하면, 제작품은 실제 용량, 모니터링 절차 및 기타 모니터링 정보를 포함하지만 이에 한정되지 않는, 사용하기 위한 투약 체계를 지시 또는 제안하는 설명서를 포함한다.

[0081] 임의의 제약 제품과 같이, 포장 물질 및 컨테이너는 보관 및 운송 동안 제품의 안정성을 보호하도록 디자인된다.

[0082] 키트는 정맥내 주사 또는 네뷸라이저에서의 사용을 위해 직접적으로 사용될 수 있거나 생리식염수로 희석될 수 있는 무균 수성 혼탁액, 또는 기관내 투여를 위한 계면활성제로의 희석물 또는 계면활성제와의 조합물 내에 MSC 액소솜을 포함할 수 있다. 따라서 키트는 희석 용액 또는 작용제, 예컨대 염수 또는 계면활성제를 또한 함유할 수 있다. 따라서 키트는 폐 전달 장치 예컨대 네뷸라이저 또는 1회용 성분 예컨대 마우스피스(mouthpiece), 노스피스(nosepiece) 또는 마스크를 또한 포함할 수 있다.

0083] 실시예

0084] 개요

[0085] 저산소는 추후에 저산소성 폐 고혈압 (HPH)이 발달되는 것에 결정적인 염증유도성 매개물의 상승과 함께 대식세포의 별법적인 활성화에 의해 구현되는 폐에서의 염증성 응답을 유도한다. 중간엽 기질 세포 (MSC) 이식은 질환의 실험 모델에서 폐 염증, 혈관 리모델링 및 우심 부전을 방지하고, HPH를 억제한다. 이러한 연구에서, 본 발명가들은 MSC가 이에 의해 HPH에서 보호적인 측분비 메커니즘을 조사하는 것을 목표로 하였다.

[0086] 본 발명가들은 마우스 MSC-컨디셔닝 배지를 분획화하여 생체내 저산소 신호전달에 영향을 미치는 생물학적으로

활성인 성분을 확인하였고, 분비된 막 미세소포인 엑소솜이 HPH의 뮤린 모델에서 대식세포의 저산소성 폐 유입 및 염증유도성 및 증식유도성 매개물 (단핵구 화학유인제 단백질-1 및 저산소-유도성 분열촉진 인자가 포함됨)의 유도를 억제하였음을 결정하였다. MSC 엑소솜 (MEX)의 정맥내 전달이 혈관 리모델링 및 HPH 발달을 방지하였다. 저용량 MEX의 다중 투여가 초기 저산소 염증 응답을 완전히 억제하였고, 폐 고혈압 및 우심실 병리학을 호전시켰다. 단일한 고용량의 MEX가 만성 저산소에 의해 유도된 혈관 리모델링 및 PH 발달을 방지하는데 충분한 것으로 확인되었다. 대조적으로, 섬유모세포-유래 엑소솜 및 MEX-고갈 배지는 효과가 없었다. MEX는 신호변환물질 및 전사 활성화제 3 (STAT3)의 저산소 활성화 및 마이크로RNA 클러스터의 miR-17 수퍼페밀리의 상향조절을 억제한 한편, 인간 PH에서 발현이 감소되는 주요 마이크로RNA인 miR-204의 폐 수준을 증가시켰다. 인간 제대 MSC에 의해 생산된 MEX가 단리된 인간 PAEC에서 STAT3 신호전달을 억제하였고, 이는 저산소성 STAT3 활성화에 대한 MEX의 직접적인 효과를 실연한다.

[0087] 이러한 연구는 MEX가 폐에 대한 다면발현성 보호 효과를 발휘하고, 저산소에 의해 유도되는 특이적 STAT3-매개 과증식 경로의 억제를 통해 PH를 방지할 수 있다는 것을 가리킨다.

물질 및 방법

[0089] 골수-유래 중간엽 줄기 세포의 단리. 골수-유래 중간엽 줄기 세포 (BM-MSC)를 이전에 기술된 바와 같이 5-7주령 FVB/s 마우스의 대퇴골 및 경골로부터 단리하였다. 간략하게, 각각의 경골 및 대퇴골의 끝부분을 절단하여 골수를 노출시키고, 뼈들을 개조된 원심분리 투브 내로 삽입하였다. 투브를 1분 동안 $400 \times g$ 에서 원심분리하여 골수를 수집하였다. 웰럿을 21-케이지 바늘을 통해 3 ml α -최소 필수 배지 (α -MEM)에 재현탁시킨 후, $70-\mu\text{m}$ 나일론 메쉬 필터를 통해 여과하였다. 골수 세포를 피콜-파크((Ficoll-Paque) (아머샴(Amersham)) 밀도 구배상에 층상화시키고, 원심분리하고, 플레이팅하였다. 배지를 2-3일마다 교환하면서 플라스틱 부착성 세포를 배양물에서 유지시켰다. 2-3세대 후, 공개된 프로토콜 및 국제 세포 요법 협회 (ISCT: International Society for Cellular Therapy) 지침¹에 따라 면역고갈을 수행하였다. 형광-활성화 세포 분류기 (모플로(MoFlo))에서 적합한 형광-태그(tag) 항체 (BD 바이오사이언시즈(BD Biosciences))를 사용하여 CD11b, CD14, CD19, CD31, CD34, CD45, 및 CD79 α 항원에 대해 음성적으로 세포를 선별하고, 추가로 증식시킨 후, 상기와 같이 CD73, CD90, CD105, c-kit 및 Sca-1 항원에 대해 양성적으로 선별하였다. 시그마(Sigma)에서 모든 시약을 구입하였다. 계대 7-12 사이의 단리된 세포를 컨디셔닝 배지의 생산 및 엑소솜 단리에 사용할 수 있었다. 단리 및/또는 배양된 세포를 컨디셔닝 배지 또는 엑소솜의 생산 전에 냉동보존할 수도 있었다.

[0090] 1차 마우스 폐 섬유모세포의 단리. 1차 마우스 폐 섬유모세포 (MLF) 배양물이 표준 방법에 따라 유래되었다.

[0091] *MSC-컨디셔닝 배지 (MSC-CM)의 제조.* 냉동 보존된 MSC를 완전 배지 (10% FBS (하이클론(Hyclone)), 10% 말 혈청 (하이클론), 및 5 mM L-글루타민 (깁코(Gibco))이 보충된 α MEM (인비트로젠(Invitrogen))과 함께 플레이팅한 후, 표준 배양 조건 하에 인큐베이션하였다. 배양물로부터 24시간 동안 생산된 무혈청 MSC-CM을 $400 \times g$ 에서 10분 및 $12,000 \times g$ 에서 20분의 분별 원심분리에 의해 정화하였다. 무혈청 MSC-CM을 100 kDa MWCO 필터 장치 (밀리포어)로 한외여과에 의해 250배 농축한 후, $12,000 \times g$ 에서 20분 동안의 원심분리에 의해 추가로 정화하였다.

[0092] 세파크릴 S-400 젤 여과 크로마토그래피에 의한 엑소솜 정제. MSC-CM의 250 \times 농축물을 PB2XS 완충제 (300 mM NaCl이 보충된 20 mM 인산나트륨 완충제 (pH 7.4))로 예비-평형화된 S-400 칼럼 (14 \times 300 mm, 파마시아 (Pharmacia)) 상에 적용하고, 일정한 유량 (0.4 ml/분)으로 용출시켰다. 각각의 분획으로부터의 등가 부피 (0.8 ml)를 변성 10% 폴리아크릴아미드 젤 또는 천연 1.2% 아가로스 젤에 적용한 후, CD81 (산타 크루즈 (Santa Cruz)) 및 SPP-1 (오스테오폰틴) (R&D 시스템즈(R&D Systems))에 대한 특이적인 항체로의 면역염색이 이어졌다. 천연 아가로스 젤에서의 이동이 더 높은 CD81 및 SPP-1 양쪽 모두에 대해 양성인 분획을 풀링하고, 엑소솜 제제로 사용하였다 (도 1). 풀링된 엑소솜을 즉각적으로 사용할 수 있거나, 또는 액체 질소에서 순간 동결시킨 후 -80°C에서 보관할 수 있었다.

[0093] 전자 현미경 분석. 정제된 엑소솜을 글로 방전(glow discharge)에 30초 노출시킴으로써 친수성 이게 된 탄소-코팅 그리드(grid)에 흡착시켰다. 과량의 액체를 제거하고, 엑소솜을 0.75% 우라닐 포르메이트로 30초 동안 염색하였다. 과량의 우라닐 포르메이트를 제거한 후, 그리드를 JEOL 1200EX 투과 전자 현미경에서 시험하고, 영상을 AMT 2k CCD 카메라로 기록하였다.

[0094] 엑소솜의 프로테옴 분석. 30 μg 의 엑소솜 단백질을 12% 변성 PAGE에서 분리하고, 이어서 서열분석 등급 트럼신 (프로메가(Promega))으로 소화시켰다. 하버드 미량화학 및 프로테오믹스 분석 시설(Harvard Microchemistry

and Proteomics Analysis Facility)에서 미세모세관 역상 HPLC 나노(nano)-정전분무 텐덤(tandem) 질량 분광법(μLC/MS/MS)에 의해 써모(Thermo) LTQ-Orbitrap 질량 분광계 상에서 서열 분석을 수행하였다. 그 후, 생성된 웹티드 MS/MS 스펙트럼을 하버드 미량화학 시설(Harvard Microchemistry Facility)에서 개발된 프로그램 및 SEQUEST 알고리즘을 사용하여 종 특이적 서열과 상호관련시켰다.

[0095]

웨스턴 블로트 분석. 엑소솜을 특성화하는 실험에서, 엑소솜 분획 또는 엑소솜이 없는 분획으로부터의 3 μg 단백질을 12% 폴리아크릴아미드 겔 전기영동에서 분리한 후, 0.45 μm PVDF 막 (밀리포어)으로 옮겼다. 5% 탈지유로 차단한 후, 폴리클로날 염소 항-CD63 (산타 크루즈), 항-CD81 (산타 크루즈), 항-mCSF (R&D 시스템즈), 항-오스테오판틴 (R&D 시스템즈), 폴리클로날 토끼 항-모에신 (에이비캡(Abcam)), 항-14-3-3 패밀리 (에이비캡), 및 모노클로날 항-다이서 (에이비캡)를 적합한 페옥시다제(peroxidase)-접합 2차 항체와 함께 사용하여 특이적 신호를 검출하였다. 대조군용으로, BM-MSC 추출물의 35 μg 단백질을 병행하여 사용하였다. BALF 내의 단백질의 분석을 위해, 동일한 군 내의 개별적인 마우스로부터의 등가 부피의 무세포 BALF를 풀링한 후, 20% 트리클로로아세트산 (TCA)에 의해 칠야로 침전시켰다. 그 후, 1× 소듐 라우릴 술페이트 (SDS)-로딩 완충제에 재현탁된 단백질 펠릿을 변성 트리스-트리신 폴리아크릴아미드 겔에서 분리시켰다. 0.2 μm PVDF 막 (밀리포어)으로 옮긴 후, 블로트를 0.1% 트윈 20 (시그마)을 함유하는 PBS 내의 5% 탈지유로 1시간 동안 차단하고 나서, 1:1,000로 희석된 토끼 폴리클로날 항-단핵구 화학유인제 단백질-1 (MCP-1) 항체 (에이비캡), 항-저산소 유도성 분열촉진 인자 (HIMF/FIZZ1/Relma) 항체 (에이비캡), 항-인터루킨-10 (에이비캡) 및 항-인터루킨-6 (IL-6) 항체 (산타 크루즈)와 함께 철야로 4°C에서 인큐베이션하였다. 로딩 대조군으로서의 마우스 면역글로불린 A (IgA)를 검출하기 위해, 1:5,000으로 희석된 염소 항-마우스 IgA 항체 (에이비캡)를 사용하였다. 페옥시다제-접합 항-토끼 2차 항체 (산타 크루즈)를 1:50,000 희석으로 사용하여, 강화된 화학발광 시약 (피어스(Pierce)) 또는 루미-라이트^{플러스} (Lumi-Light^{PLUS}) (로슈(Roche))에 의해 면역반응성 밴드를 가시화하였다.

[0096]

동물 및 저산소 노출. 8주령 FVB 수컷 마우스를 찰스 리버 래버토리즈(Charles River Laboratories) (매사추세츠주 월밍턴)으로부터 수득하거나, 또는 보스턴 아동 병원(Children's Hospital Boston)의 동물 시설에서 사육하였다. 각각의 군의 마우스를 다양한 실험 기간 동안 플렉시글라스(Plexiglas) 챔버 (옥시사이클러(OxyCycler), 뉴욕주 레드필드의 바이오스페리克斯(BioSpherix))에서 8.5% 산소에 노출시켰다. CO₂를 제거하도록 환기를 조정하여, 5,000 ppm (0.5%) (평균 범위 1,000-3,000 ppm)을 초과하지 않게 하였다. 공기 정제기를 통한 활성탄 여과 및 환기에 의해 암모니아를 제거하였다. 모든 동물 프로토콜은 아동 병원의 동물 실험 윤리 위원회(Children's Hospital Animal Care and Use Committee)의 승인을 받았다.

[0097]

저산소-유도 급성 폐 염증 마우스 모델. 마우스에 왼쪽 경정맥을 통해 컨디셔닝 배지 (40 μg/kg) 또는 엑소솜 (4 μg/kg) 또는 엑소솜이 없는 컨디셔닝 배지 (4 μg/kg)를 주사하였다. 대조군으로서, 50 μl의 PBS 또는 배양 배지를 병행하여 주사하였다. 주사하고 나서 3시간 후, 언급된 실험 기간 동안 마우스를 연속적으로 등압 저산소 (8.5% O₂)에 노출시켰다. 경시적인 실험에서, 저산소에 노출시키고 나서 4일 후에 오른쪽 경정맥에서 추가적인 MEX 주사를 수행하였다.

[0098]

저산소-유도 PAH 마우스 모델. 제0일 및 저산소 노출 후 제4일에 엑소솜 또는 대조군을 주사한 마우스를 전체적인 3주 동안 연속적으로 저산소에 노출시킨 후, 펜토바르비탈 (50 mg/kg, i.p.)로 마취시켰다. 이전에 기술된 바와 같이², 폐흉 접근법 및 파워랩(PowerLab) 시스템 (에이디인스트루먼츠(ADI Instruments), 콜로라도주 콜로라도 스프링스)을 사용하여 우심실 수축기압 (RVSP)을 측정하였다. 압력 측정 후, 폐에 PBS를 관류시키고, 4% 파라포름알데히드로 폐를 팽창시켜, 폐 구조를 고정시켰다. 그 후, 고정된 폐를 파라핀에 매립하고, 면역조직화학 분석용으로 절편화하였다. 우심실 비대의 평가인 풀톤 지수 측정 (우심실 질량과 좌심실 + 격막 질량의 비, RV/[LV+S])을 위해 심장을 즉각적으로 분석하였다.

[0099]

기관지폐포 세척 및 폐포 대식세포 계수. 동물을 2,2,2-트리브로모에탄올 (250 mg/Kg i.p.)로 마취시키고, 기관에 캐뉼러를 삽입하고, 끝이 무딘 바늘을 설치하였다. 기관지폐포 세척액 (BALF)을 PBS (0.8 ml, 0.8 ml, 0.8 ml, 및 0.9 ml)의 순차적인 투여에 의해 수집하고, 약 3 ml의 개별적인 BALF를 회수하였다. BALF 내의 세포를 400×g에서 5분 동안의 원심분리로 수집하고, 키무라 염색 용액에 재현탁시켜 BALF 내의 전체 폐포 대식세포를 선택적으로 계수하였다.

[0100]

면역조직화학 분석. 폐 조직 절편을 자일렌에서 탈파라핀화시키고, 슬라이스 상에서 재수화시켰다. 1시간 동안 조직을 차단한 후, 1:125 희석도의 모노클로날 항-마우스 α-SMA 항체 (시그마)와 함께 4°C에서 철야로 인큐베이션함으로써 면역조직화학 분석을 수행하였다. 내인성 페옥시다제를 메탄올 내의 3% H₂O₂ (시그마)로 불활

성화시킨 후, 2차 항체 및 페옥시다제 염색을 제조사의 설명서에 따라 수행하였다 (벡터 래버리토리즈(Vector laboratories), 캘리포니아주 버링게임). $400\times$ 배율 하에 포착된 절편 내의 직경이 $30\ \mu\text{m}$ 미만인 혈관에서 α -SMA 염색을 측정함으로써 혈관벽 두께를 평가하였다.

[0101] 인간 제대 워튼 젤리로부터의 인간 MSC 단리. 인간 제대 워튼 젤리에서 유래된 MSC (hUC-MSC)를 공개된 방법 (문헌 [Mitchell, K. E. et al., 2003, Stem Cells 21:50-60]; 및 [Penolazzi, L. et al., 2011, J Cell Physiol])에 따라 이를 가볍게 변형시켜서 단리하였다. 제대를 저온 무균성 PBS로 2회 행구고, 세로로 절단하고, 동맥 및 정맥을 제거하였다. 연질 젤 조직을 긁어내고, 잘게 다지고 ($2\text{-}3\ \text{mm}^2$), 10% 소 태아 혈청 (하이클론), 2 mM L-글루타민, 및 페니실린/스트렙토마이신이 보충된 DMEM/F12 (1:1) (인비트로젠)와 함께 100 mM 접시 (접시 당 15개의 조각)에 직접 놓고, 5일 동안 37°C 에서 5% CO_2 의 습식 대기에서 인큐베이션하였다. 조직 및 배지를 제거한 후, 플레이트를 PBS로 3회 세정하고, 부착된 세포를 배양하고, 신선한 배지를 주 당 3회 교체하였다. 70-80% 전면성장에서, 세포를 수집하고, CD34 (밀테니바이오텍(Miltenebiotec)) 및 CD45 (밀테니바이오텍)에 대한 PE 접합 항체로 염색하였다. 항-PE-마이크로비드 (밀테니바이오텍) 및 MSCS 칼럼 (밀테니바이오텍)을 사용하여 제조사의 설명서에 따라 면역고갈을 수행하였다. CD34 및 CD45 음성 접단을 추가로 증식시켰고, 모플로 유동 세포측정법 (베크만 쿨터(Beckman Coulter))을 사용하여 인간 MSC의 특성화에 특이적인 형광-표지 항체들의 세트 (BD 바이오사이언시즈)를 사용함으로써 MSC 마커 (CD105, CD90, CD44, 및 CD73)의 발현 및 CD11b, CD19, 및 HLA-DR의 부재에 대해 선별하였다.

[0102] 컨디셔닝 배지 제조. 혈청에서 유래된 미세소포에서 오염을 배제하기 위해, 세포 배양물 중식 및 컨디셔닝 배지 수집에 사용된 혈청을 $100,000\times\text{g}$ 에서 18시간 동안의 초원심분리로 정화하였다. MSC를 소 태아 혈청 (FBS, 하이클론) 및 10% (v/v) 말 혈청 (하이클론)이 보충된 α -MEM 배지에서 배양하였다. MLF를 10% FBS 및 2 mM L-글루타민 (깁코)이 보충된 둘베코 최소 필수 배지 (DMEM, 인비트로젠)에서 배양하였다. 70% 전면성장의 배양물을 PBS로 2회 세정하고, 2 mM L-글루타민이 보충된 무혈청 배지와 함께 24시간 동안 표준 배양 조건 하에 인큐베이션하였다. 컨디셔닝 배지를 수집하고, 세포 및 잔해물을 $400\times\text{g}$ 에서 5분, $2,000\times\text{g}$ 에서 10분, 및 $13,000\times\text{g}$ 에서 30분의 분별 원심분리에 의해 제거하였다. 이어서, 정화된 컨디셔닝 배지를 $0.2\ \mu\text{m}$ 필터 단위로 여과하고, 울트라셀(Ultracel)-100K (밀리포어) 원심분리 필터 장치를 사용하여 0.1 - 0.5 mg/ml의 단백질 농도 범위로 농축하였다. 컨디셔닝 배지 내의 단백질 수준을 브래드포드 검정법 (바이오-래드)에 의해 결정하였다.

[0103] 시험관내 저산소. 인간 PAEC를 갑코로부터 구입하고, LSGS (인비트로젠)가 보충된 M200 배지에서 배양하였다. 80% 전면성장에서, 엑소솜 분획 ($1\ \mu\text{g}/\text{ml}$), 또는 hUC-MSC 컨디셔닝 배지의 엑소솜-고갈 분획 ($1\ \mu\text{g}/\text{ml}$)의 존재 또는 부재 하에 인비보2(inVivo2) 워크스테이션 (루스킨 테크놀러지(Ruskin Technology), 영국 브리젠프)에서 세포를 1% O_2 에 5시간 동안 노출시켰다. 세포를 용해시키고, 전체 세포 용해물 내의 단백질을 8% SDS-폴리아크릴아미드 젤 전기영동에서 분리시킨 후, 포스포-STAT3 및 STAT3 (셀 시그널링(Cell Signaling))에 대한 웨스턴 블롯 분석이 이어졌다.

[0104] 엑소솜 단리. $50\ \mu\text{l}$ 의 농축된 컨디셔닝 배지를 $20\ \text{mM}$ 인산나트륨 (pH 7.4) 및 $300\ \text{mM}$ NaCl을 함유하는 완충제로 예비-평형화된 크로마 스피n(CHROMA SPIN) S-1000 칼럼 (클론텍)에 적용하였다. 각각의 분획 ($0.1\ \text{ml}$)을 중력에 의해 순차적으로 수집하였다. 대규모 제조를 위해, $1.5\ \text{ml}$ 의 정화 및 농축된 컨디셔닝 배지를 AKTA 정제기 크로마토그래프 시스템 (GE 헬스케어(GE Healthcare), 뉴욕주 퍼스카타웨이)을 사용하여 상기 완충제에서 예비-평형화된 16/60 하이프렙 세파크릴 S-400 HR의 칼럼 상에 주입하였다. $0.5\ \text{ml}/\text{분}$ 의 유량으로 분획 ($1\ \text{ml}$)을 수집하였다. $50\ \text{nm}$ 직경의 폴리스티렌 나노구체 (포스포렉스(Phosphorex), 매사추세츠주 폴리버)를 크기 기준 물질로 사용하였고, 이러한 표준물의 체류 부피에 상응하는 용출 분획을 풀링하고, 추가로 분석하였다.

[0105] 단백질 추출 및 면역블로팅. BALF ($3\ \text{ml}$)를 $420\times\text{g}$ 에서 10분 동안 원심분리하고, 무세포 BALF 상청액을 단백질 분석에 사용하였다. 동일한 군 내의 개별적인 동물로부터의 등가 부피의 BALF 표본을 풀링하고 ($1\ \text{ml}$), 20% 트리클로로아세트산 (시그마)에 의해 단백질을 철야로 침전시켰다. $1\times$ 소듐 라우릴 술페이트 (SDS)-로딩 완충제에 용해된 각각의 단백질 펠릿의 30%와 등가인 분획을 변성 15% 폴리아크릴아미드 젤에서 분리시켰다. $0.2\ \mu\text{m}$ PVDF 막 (밀리포어)으로 끓긴 후, 블롯을 5% 탈지유로 차단하고, 1:1,000로 희석된 토끼 폴리클로날 항-단핵구 화학유인체 단백질-1 (MCP-1) 항체 (에이비캠), 항-저산소-유도성 분열촉진 인자 (HIMF/FIZZ1/Relm a) 항체 (에이비캠)와 함께 철야로 4°C 에서 인큐베이션하였다. 마우스 면역글로불린 A (IgA)를 검출하기 위해, 1:5,000으로 희석된 염소 항-마우스 IgA 항체 (에이비캠)를 사용하였다. 페옥시다제-접합 항-토끼 2차 항체 (산타 크루즈)를 1:20,000 희석으로 사용하여, 강화된 화학발광 시약 (피어스) 또는 루미-라이트 플러스 (로슈)에 의해 면역반응성 밴드를 가시화하였다.

- [0106] 전체 폐 조직으로부터의 단백질의 분석을 위해, 동결된 폐 조직을 2 mM 폐닐메탄술포닐 플루오라이드 (시그마)를 함유하는 저온 PBS에서 폴리트론(Polytron)에 의해 5초 동안 다지고, 3,000×g에서 3분 동안 원심분리하였다. 다진 조직 펠렛을 3,000×g에서 각각 3분 동안의 원심분리에 의해 2 mM PMSF를 함유하는 저온 PBS로 2회 세정하고, 깨끗해진 백색 조직 조각을 프로테아제(protease) 억제제 카테일 (로슈) 및 포스파타제(phosphatase) 억제제 카테일 (써모)을 함유하는 RIPA 완충제로 용해시켰다. 40 μ g의 폐 조직 추출물을 10-20% 구배 겔 (인비트로젠)에서 분리시켰다. 면역블로팅에서 사용된 항체는 MCP-1, HIMF, IL-6, 혈관 내피 성장 인자 (에이비캠), 전체 STAT3, 및 포스포-STAT3 (Y705) (셀 시그널링)에 대한 것이었다. 로딩 대조군으로서, 마우스 모노클로날 β -액틴 항체 (시그마)를 사용하였다.
- [0107] 엑소솜 제제를 12% 폴리아크릴아미드 겔 상에서 분리시킨 후, 0.45 μ m PVDF 막 (밀리포어)으로 옮겼다. 염소 폴리클로날 항-CD63 (1:1,000; 산타 크루즈) 항체, 폴리클로날 토끼 항-CD81 (1:1,000, 산타 크루즈), 및 모노클로날 항-다이서 (1:1,000, 에이비캠)를 사용하였다. 특이적 단백질 밴드를 가시화하기 위해, 상기 기술된 것과 동일한 ECL 시약을 사용하였다. NIH의 이미지J(ImageJ) 프로그램을 적합한 배경 차감 후에 밀도측정 분석을 통한 정량에 사용하였다.
- [0108] 마이크로RNA 정량. 전체 폐 RNA를 문헌 [Chomczynski & Sacchi, 1987 Anal Biochem 162:156-159]의 방법으로 추출하고, 750 ng을 각각의 표적 마이크로RNA에 대한 특이적 프라이머와 함께 역전사효소에 대한 주형으로서 사용하였다 (택맨 역전사 키트(TaqMan Reverse Transcription Kit), 캘리포니아주 포스터 시티의 어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems)). 각각의 역전사 반응은 소형 핵 RNA sno202에 대한 프라이머를 또한 포함하였고, 이는 내부 대조군으로서 사용되었다. 지시된 마이크로RNA 및 내부 대조군에 대해 특이적인 프로브의 존재 하에 37.5 ng의 cDNA를 UNG가 없는 택맨 만능 마스터 믹스(universal master mix) II (어플라이드 바이오시스템즈)와 함께 각각의 20 μ l qPCR 반응에 사용하였다 (택맨 마이크로RNA 검정법, 어플라이드 바이오시스템즈). 스텝원 플러스(StepOne Plus) 플랫폼 (어플라이드 바이오시스템즈)에서 50°C에서 2분, 95°C에서 10분, 이어서 15초 동안 95°C, 1분 동안 60°C의 사이클 40회로 증폭을 수행하였다.
- [0109] 결과
- [0110] BM-MSC가 저산소-유도 급성 염증성 응답을 억제하는 인자들을 분비한다. BM-MSC의 치료 능력이 폐 손상의 여러 동물 모델에서 관찰되었다. 본 발명가들은 먼저 BM-MSC가 이의 측분비 방식에 의해 저산소-유도 폐 염증에 관련되었다는 것을 결정하였다. 저산소 노출은 2일 이내에 유의한 대식세포의 폐 축적 및 염증유도성 매개물의 상승을 초래한다². 이러한 동물 모델에 대한 BM-MSC의 측분비 잠재력을 테스트하기 위해, BM-MSC-컨디셔닝 배지 (BM-MSC-CM) 또는 비히를 또는 MLF-컨디셔닝 배지 (MLF-CM)를 제공한 마우스를 등압 저산소에 2일 동안 노출시켰다. 결과적으로, 대식세포의 저산소-유래 급성 폐 유입이 BM-MSC-CM 처리에 의해 차단된 한편, 비히를 또는 MLF-CM을 주사한 마우스는 폐에서의 유의한 대식세포 축적을 나타냈고 폐 (도 1a), 이는 BM-MSC가 대식세포를 폐 내로 동원하도록 신호를 보내는 저산소-유래 폐 염증성 응답을 억제하는 인자(들)을 분비한다는 것을 시사한다. 저산소 컨디셔닝이 염증유도성 매개물의 폐 수준을 상향조절한다는 것이 관찰되었기 때문에, 마우스로부터의 무세포 BALF를 저산소-응답성 염증유도성 매개물인 MCP-1 및 HIMF/FIZZ1에 대한 비교 분석에 적용하였다. 비히를 또는 MLF-CM을 주사한 마우스에서, 폐에서의 MCP-1 및 HIMF 양쪽 모두의 분비 수준이 48시간 동안의 저산소 노출에 의해 유의하게 증가하였다. 대조적으로, 저산소에 의한 이러한 매개물의 상승이 BM-MSC-CM으로 처리된 마우스에서 효과적으로 억제되었다 (도 1b). 종괄적으로, BM-MSC의 분비 인자(들)은 폐에서의 MCP-1 및 HIMF/FIZZ1의 저산소-유도 상향조절을 차단하는 것을 통해 대식세포의 폐 동원을 방지하는 항염증제이다.
- [0111] BM-MSC가 엑소솜을 분비한다. 본 발명가들은 한외여과 및 크기 배제 크로마토그래피를 포함하는 절차에 의해 BM-MSC-CM 내의 소포를 단리하였다. 표 2는 이러한 실험에서 달성된 강화 정도를 나타낸다. 도 2에 요약된 바와 같이, BM-MSC-CM 내의 분비 단백질의 약 1.6 % (w/w)가 이의 엑소솜과 연관될 수 있었다. MLF-유래 엑소솜(FEX)을 대조군으로서 단리하였고, 병행하여 분석하였다. 전자 현미경 분석에서, 엑소솜은 칼럼의 공극 부피 내의 분획에서만 관찰되었고, 이는 8,000 kDa 미만의 분자를 배제하는 크기 배제 크로마토그래피가 엑소솜을 강화하는데 고도로 선택적이라는 것을 시사한다 (도 2a, 2b). 또한, BM-MSC-CM 및 MLF-CM의 등가 분획으로부터의 엑소솜의 전자 현미경 사진은 양쪽 세포 유형으로부터 박리된 엑소솜이 전형적인 엑소솜의 물리적 파라미터 예컨대 30 내지 100 nm 범위의 직경 비균질성 및 오목한 형태학적 특징을 나타냈음을 확증하였다 (도 2c, 2d). BM-MSC-유래 엑소솜 (MEX)의 단백질 함량에 관하여, 웨스턴 블로트 분석은 MEX가 전형적인 엑소솜 단백질 예컨대 CD63 및 모에신에 대해 양성이었고, 또한 단핵구 콜로니 자극 인자 (mCSF) 및 오스테오포린 (OPN/SPP1)이 포함

되는 면역조정 단백질과 고도로 연관되었음을 나타냈다. 수많은 기능적으로 다양한 신호전달 단백질에 결합할 수 있는 분자량 약 30 kDa의 소형 폴리펩티드인, 14-3-3 패밀리의 일부 아이소형(isoform)이 엑소솜과 공동으로 정제되었고, 이는 14-3-3 아이소형의 특정 부분집합이 MEX와 연관된다는 것을 가리킨다. 또한, 세포질 내에서의 마이크로RNA 성숙의 특정 프로세싱 단계를 촉매하는 다이서가 엑소솜 분획에서만 검출되었고, 이는 마이크로RNA가 엑소솜의 또 다른 구성성분이라는 것을 강력하게 시사한다. 정제 절차 동안 수득된 엑소솜이 없는 분획에서 mCSF 및 OPN, 뿐만 아니라 CD63 및 모에신이 또한 풍부하게 검출되었다는 것을 주지하는 것이 흥미롭고, 이는 엑소솜이 없는 분획 내의 이들의 가용성 아이소형의 존재, 또는 엑소솜 표면과의 약하거나 낮은 친화력 히프을 시사한다 (도 2e). 비교 웨스턴 분석에서, MEX가 FEX와 비교하여 CD63, 다이서, mCSF, 및 오스테오폰틴 면에서는 고도로 강화되는 한편, CD81은 FEX에서 더욱 풍부하다는 것이 밝혀졌다 (도 2f). 결과적으로, MEX는 크기 및 형태학 면에서 전형적인 엑소솜의 물리적 특성을 보존하고, FEX와 비교하여 다이서 및 면역 조정인자가 고도로 강화되었다. 본 발명가들은 질량 분광법에 의해 2가지 상이한 세포 유형으로부터의 엑소솜 간의 비교 프로테옴 분석을 추가로 수행하여, MEX의 생리학적 역할을 추가로 조사하였다.

[0112] *BM-MSC의 항염증 역할이 이의 분비 엑소솜에 의해 매개되었다.* 본 발명가들은 저산소-유도 급성 폐 염증의 실험 모델에서 BM-MSC-유래 엑소솜이 생리학적으로 기능성인지 여부를 추가로 조사하였다. 정제된 MEX를 주사한 마우스를 8.5% O₂의 등압 저산소에 노출시켰다. 48시간 동안 저산소에 연속적으로 노출시킨 후, 본 발명가들은 대식세포의 저산소-유래 폐 유입이 MEX 투여에 의해 효과적으로 방지되었음을 관찰하였다. 대조적으로, FEX 또는 BM-MSC-CM의 엑소솜이 없는 분획은 대식 세포의 폐 유입을 방지하지 못했다 (도 3a). 무세포 BALF로부터의 전체 단백질을 면역블롯 분석을 사용하여 연구하였다. 저산소에 의한 분비형 염증유도성 매개물 예컨대 MCP-1 및 HIMF/FIZZ-1의 상향조절이 MEX 투여에 의해 완전히 폐지된 한편, 이는 비히클 또는 FEX 주사에 의해 차단되지 않았다 (도 3b). 흥미롭게, BM-MSC-CM의 엑소솜이 없는 분획은 이러한 염증유도성 매개물의 저산소-유도 상향조절을 억제하지 못했다. 엑소솜 분획과 엑소솜이 없는 분획 사이에 단백질 함량에서의 다른 차이가 거의 없었고, 이는 엑소솜 내의 핵산이 이러한 응답에서 중요할 수 있다는 가능성을 시사한다. 이러한 데이터는 엑소솜 상에 특이적으로 국소화된 BM-MSC-유래 분비 인자가 염증유도성 매개물 MCP-1 및 HIMF/FIZZ1를 상향조절하는 저산소-유래 신호를 차단함으로써 저산소-유도 폐 염증성 응답을 효과적으로 억제한다는 것을 강조한다.

[0113] *MEX 투여가 저산소-유도 폐 염증 응답을 폐지한다.* 본 발명가들은 BM-MSC가 대식세포를 폐로 동원하는 저산소 신호를 폐지하는 엑소솜을 분비한다는 것을 관찰하였고, 저산소 노출이 2일 이내에 폐에서의 급성 염증성 응답에 이른다는 것을 또한 관찰하였다. 본 발명가들은 저산소 노출 7일 내지 11일까지 폐 염증성 응답에 대한 단일 또는 다중 MEX 처리의 경시적인 과정을 추가로 조사하였다. 비히클을 주사한 군에서, 마우스는 저산소 노출 2일까지 대식세포의 급성 폐 유입 및 MCP-1 및 HIMF/FIZZ1 양쪽 모두의 폐 수준의 극적인 상승을 나타냈고, 이 때 염증성 피크가 저산소 노출 7일에 해소되었다. 감소성인 폐포 대식세포 개수 및 폐 MCP-1 수준과 달리, 높은 수준의 HIMF/FIZZ1이 7일의 연속적인 저산소 노출 동안 지속되었고, 이는 MCP-1이 대식세포의 폐 유입을 주로 조절하는 한편 HIMF/FIZZ1은 저산소에 대한 응답에서 별개의 역할을 할 수 있다는 것을 시사한다 (도 4a, 4d). 중요하게, 단일 MEX 주사는 저산소 하에 저산소-유도 염증성 응답을 4일을 초과하여 억제할 수 없었고, 따라서 저산소-응답성 폐 염증이 주사 4일 후 시작되었고, 7일에 피크였으며, 그 후 11일에 해소되었다 (도 4b, 4d). 더욱 중요하게, 저산소 노출의 4번째 날의 추가적인 MEX 주사가 저산소 하의 폐 염증의 차단을 11일까지 지속시켰다 (도 4c). MEX에 의한 HIMF/FIZZ1 조절에 관하여, 단일 MEX 주사가 4일의 저산소 동안 HIMF/FIZZ1의 저산소-유도 상향조절을 억제할 수 있었다. 추가적인 MEX 주사는 저산소 7일에 HIMF/FIZZ1의 상향조절을 폐지할 수 없었고, 이는 다른 일시적인 조절 경로가 이러한 응답에서 수반되었을 수 있음을 시사한다. 총괄적으로, 저산소-유도 급성 폐 염증이 단일 MEX 주사에 의해 일시적으로 억제되었고, 저산소에 대한 폐 응답을 중화할 수 있는 항염증 효과가 순차적인 다중 투여에 의해 유지되었다.

[0114] *BM-MSC-유래 엑소솜에 의해 억제된 저산소-유도 PAH.* 이러한 연구에서, 본 발명가들은 MCP-1 및 HIMF가 폐에서 저산소에 의해 유의하게 상향조절되었다는 것과 이러한 저산소-유도 상향조절이 MEX 처리에 의해 현저하게 약화되었다는 것을 관찰하였다. 따라서, 본 발명가들은 MEX가 PAH의 중요한 매개물 양쪽 모두를 차단함으로써 저산소-유도 PAH를 방지할 수 있는 것으로 가정하였다. 이러한 가정을 테스트하기 위해, MEX 또는 대조군으로서의 FEX 또는 PBS를 제공한 후 3주 동안 마우스를 저산소에 노출시켰다. 실험 기간 말기에, RVSP를 측정하였고, 심장 조직을 RV 비대에 대해 프로세싱하였다. 도 5b 및 5c는 모든 저산소 마우스가 대등한 연령의 정상산소 마우스와 비교하여 상승된 RVSP 및 풀톤 지수를 제시하였음을 나타냈다. 대조적으로, PBS 또는 FEX가 제공된 마우스와 비교하여 MEX가 제공된 마우스에 대해 유의한 개선이 관찰되었다. 또한, 단일 MEX 주사가 제공된 마우스

와 비교하여, 제4일에 추가적인 MEX 주사가 제공된 마우스는 만성 저산소 하에 유의하게 감소된 RVSP 및 RV 비대를 나타냈고, 이는 MEX의 반복 투여가 만성 저산소에 응답하여 폐동맥압 및 심실 벽 두께를 호전시킨다는 것을 가리킨다. 다중 MEX 처리가 저산소-유도 폐 혈관 리모델링을 약화시킬 수 있는지 여부를 조사하기 위해, 폐 혈관을 알파-SMA 항체로 염색함으로써 저산소 폐의 조직학적 절편을 형태측정에 의해 분석하였다 (도 5d). 직경 20~30 μm 범위 이내의 소형 폐 세동맥의 중앙값 혈관 벽 두께의 백분율을 결정하였다. 대등한 연령의 정상 산소 대조군 마우스와 비교하여, 만성 저산소에 의한 소형 폐 세동맥의 현저하게 증가된 두께가 PBS 또는 FEX로 처리된 마우스에서 관찰된 한편, 대조군과 MEX로 처리된 마우스 사이에서는 혈관 벽 두께에 대해 유의한 차이가 관찰되지 않았고, 이는 MEX가 저산소-유도 폐 혈관 리모델링의 프로세스를 방지할 수 있다는 것을 가리킨다 (도 5e).

[0115] MEX가 다양한 면역조정 인자를 포함한다. 본 발명가들은 저산소-유도 급성 폐 염증 및 만성 저산소에 의한 폐 동맥 고혈압 양쪽 모두에 대한 MEX의 극적인 효과를 관찰하였다. 이들의 분자 메커니즘을 조사하기 위해, 본 발명가들은 고성능 액체 크로마토그래피 질량 분광법 (HPLC-MS/MS)에 의해 MEX 및 FEX 양쪽 모두의 포괄적인 프로테옴 프로파일링을 수행하였다. 총 273개의 단백질이 MEX에서 높은 신뢰도로 확인되었고, 단백질의 35%가 FEX에서 또한 검출되었다. MEX와 연관된 상당한 단백질들을 프로파일링하기 위한 높은 신뢰도를 달성하기 위해, 본 발명가들은 높은 (>25) MS/MS 스펙트럼 수 및 서열 커버리지에서의 높은 (>3) MEX/FEX 비의 단백질을 확인하였다. 8개의 단백질이 이러한 기준에 맞았고, 이들이 표 1에 열거된다. 이러한 단백질 중에서, MEX에서 3개가 독특하였고, 5개가 고도로 강화되었다. MEX에서의 독특한 단백질 중 하나인 갈렉틴-3-결합 단백질 (LGALS3BP/MAC2BP)은 천식의 특질인 TH2 시토카인의 전사를 억제함으로써 면역조정 활성을 보유하는 것으로 나타난 분비 단백질이다³⁴. 이는 렉틴 패밀리, 인테그린, 라미닌 및 피브로네틴이 포함되는 세포 표면 및 매트릭스 상의 다양한 단백질과 상호작용할 수 있다. 이러한 상호작용이 세포의 단백질에 대한 종양 세포 부착을 조정하는 것에서 연루됨에 따라³⁵, MEX 표면 상의 GAL3BP가 주입된 MEX를 리간드 특이적 방식으로 수용자 세포의 표면에 표적화하는 중요한 역할을 할 수 있다. MEX 내의 또 다른 독특한 단백질인 트롬보스폰딘-2는 종양 성장 및 혈관신생의 강력한 내인성 억제제로서 작용하는 것으로 공지되어 있고³⁶, 염증유도성 시토카인 IFN- γ 및 TNF- α 의 생산을 억제하는 것으로 공지되어 있다³⁷. 수지상세포-유래 엑소솜의 주요 성분³⁸인 락타드헤린 (MFGE8)은 세포 사망 및 아폽토시스에서 역할을 하는 것으로 보고되었고, 이때 이는 아폽토시스성 세포 상에 노출된 포스파티딜세린을 특이적으로 인식하고, 인테그린_{av} 및 인테그린₆₃을 발현하는 세포에 결합하는 것에 의해 아폽토시스성 세포의 식세포성 소거를 촉진한다^{39, 40}. MEX 표면에서, 락타드헤린은 MEX를 이의 수용자 세포 유형에 표적화하는 것에서 수반될 수 있다. 또한, 직접적인 단백질-단백질 상호작용에 의해, 알츠하이머병에서의 축적된 노인성 판 내의 주요 성분인 아밀로이드 베타-펩티드 (Abeta)의 식세포성 소거에서 락타드헤린이 또한 수반된다는 것이 보고되었다. 엑소솜 분획 내에 Abeta가 풍부한 것은 락타드헤린과 Abeta 사이의 직접적인 상호작용에 기인할 것이다. 지방세포-인핸서-결합 단백질 1 (AEBP1) (대동맥 카르복시펩티다제 (carboxypeptidase)-유사 단백질 (ACLP)로 또한 칭해짐)은 상처 치유 및 에너지 항상성에서 중요한 생리학적 역할을 한다. 엑손 7-16이 결여된 마우스는 불완전한 상처 치유를 나타내고, AEBP1-무효(null) 마우스는 식이-유도 비만에 저항성이다⁴¹. 표 1 및 도 22는 마우스 및 인간 MEX에서 확인된 다양한 매개물을 기술한다.

[0116] 마우스 또는 인간 기원의 MEX가 저산소에 의한 STAT3 활성화의 억제를 매개한다. 초기의 저산소는 Tyr-705에서의 인산화를 통해 마우스 폐에서의 STAT3 활성화를 초래하였고, STAT3 단백질의 전체 수준에 대해서는 어떠한 효과도 없었다. 이러한 활성화가 MEX 처리에 의해 효율적으로 억제되었다 (도 19a). STAT3은 다수의 시토카인 및 성장 인자의 신호전달 경로에 불가결한 전사 인자이고, STAT3 활성화는 호흡기 상피 염증성 응답에서 결정적인 역할을 한다. 중요하게, 지속적인 생체외 STAT3 활성화가 특발성 폐 동맥 고혈압 (IPAH) 환자로부터의 PAEC (문헌 [Masri, F.A. et al., 2007, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 293:L548-554]) 및 폐 동맥 평활근 세포 (PASMC) (문헌 [Paulin, R. et al., 2011, Circulation 123:1205-1215])에서 관찰된 과증식성 및 아폽토시스-저항성 표현형에 연결되었다. 따라서, 저산소성 STAT3 활성화의 억제가 MEX 처리의 다면발현성 보호 효과를 설명할 수 있었다.

[0117] 이러한 저산소 신호전달의 억제가 마우스 기원의 MEX에 특이적인 성질이 아니라는 것을 증명하기 위해, 인간 제대 기질로부터의 MSC (hUC-MSC) (문헌 [Mitchell, K. E. et al.] 및 [Penolazzi, L. et al.])를 단리하고, 엑소솜-강화 (hUC-MEX) 및 엑소솜-고갈 (hUC-ExD-CM) 분획을 본원에 기술된 바와 같이 크기 배제 크로마토그래피를 통해 hUC-MSC 컨디셔닝 배지로부터 제조하였다. 도 19b에 도해된 바와 같이, hPAEC를 저산소에 노출시키는

것은 Tyr-705 인산화에 의한 STAT3의 강건한 활성화를 초래하였다. hUC-MEX로의 처리가 이러한 응답을 완전히 폐지한 반면, 미세소포가 고갈된 분획은 효과가 없었다. STAT3 활성화의 억제가 인간 및 마우스 기원 양쪽 모두의 MEX가 공유하는 성질이라는 실연하는 것에 더하여, 이러한 결과는 폐 혈관 세포에서의 저산소 신호전달의 직접적인 억제가 MEX 처리가 부여하는 보호의 기초를 이루는 1차 기능이라는 것을 강하게 시사한다.

[0118] MEX 처리가 *miR-17* 마이크로RNA 수퍼페밀리의 저산소 유도를 억제하고, 폐 내의 항증식성 *miR-204*의 수준을 증가시킨다. STAT3 (VEGF 또는 IL-6에 의해 활성화됨)은 PAEC 내의 마이크로RNA의 *miR-17~92* 클러스터의 전사를 직접적으로 조절하여, *miR-17*의 표적인 골 형태형성 단백질 수용체-2 (BMPR2)의 수준 감소를 초래하는 것으로 보고되었다 (문헌 [Brock, M. et al., 2009, Circ Res 104:1184-1191]). 따라서, 본 발명가들은 마이크로RNA의 *miR-17~92* 클러스터 및 이의 보존된 파라로그(paralog) 클러스터인 *miR-106b~25* 및 *miR-106a~363*에 대한 저산소 및 MEX 처리의 효과를 평가하였다. 이러한 마이크로RNA 클러스터들은 G1기/S기 전이에서 수반되는 유전자들의 어레이를 표적화하면서 증식유도성인 것으로 가정되었고 (문헌 [Cloonan, N. et al., 2008, Genome Biol 9:R127]), 배아 폐 형태발생에서 중심적인 역할을 하는 것을 보고되었다 (문헌 [Carraro, G., 2009, Dev Biol 333:238-250]). 본 발명가들은 *miR-17* 수퍼페밀리의 3개 모두의 클러스터를 나타내는 선택된 마이크로RNA들이 폐에서 저산소에 의해 상향조절되었고, 이러한 전사 활성화가 MEX 처리에 의해 효율적으로 억제되었다는 것을 발견하였다 (도 20a). 흥미롭게, 저산소 신호전달 네트워크에 수반되는 마이크로RNA, 예컨대 심장 근육세포에서 HIF1 α 를 안정화시키는 것으로 보고된 마이크로RNA인 *miR-199a-5p* (문헌 [Rane, S. et al., 2009, Circ Res 104:879-886]), *miR-199*와 동일한 숙주 유전자를 공유하는 *miR-214* (문헌 [Watanabe, T. et al., 2008, Dev Dyn 237:3738-3748]), 또는 직접적인 HIF1 α 조절 하의 하이포사미어(hypoxamir)인 *miR-210* (문헌 [Chan, S.Y. et al., 2010, Cell Cycle 9:1072-1083])의 수준이 MEX 처리에 의해 영향을 받지 않았고 (도 20b), 이는 특이적인 저산소-조절 신호전달 경로에 대한 MEX의 표적화된 효과를 가리킨다.

[0119] 중요하게, 본 발명가들은 MEX 처리가 STAT3에 의해 전사적으로 억제되지만 또한 피드-포워드 조절 루프에서 STAT3의 활성화를 억제하는 원위 폐 동맥에서 강화된 마이크로RNA (문헌 [Courboulin, A. et al., 2011, J Exp Med 208:535-548])인 *miR-204*의 폐 수준의 증가를 초래하였음을 관찰하였다 (도 20c). IPAH 환자로부터 단리된 PASM의 증식성 및 항-아폽토시스성 표현형은 *miR-204*의 수준에 역으로 관련되었고, 외인성 *miR-204*를 PH 동물의 폐로 전달하는 것은 확립된 질병을 호전시켰다. 따라서, 본 발명가들은 이러한 결과를 MEX 처리가, 저산소 노출의 초기 단계에 STAT3 활성화를 억제하는 것에 의해, 폐 혈관구조에서의 증식유도성 *miR-17* 수퍼페밀리의 저산소 유도를 방지하고, 원위 폐 혈관에서의 STAT3-*miR-204*-STAT3 피드-포워드 루프를 차단한다는 것을 가리키는 것으로서 해석한다. 이는 폐 혈관구조에서 균형을 항-증식 상태 쪽으로 이동시키고, 만성 저산소 하의 혈관 리모델링을 방지한다. 도 21은 MEX에 의해 조정되는, PH 발달에서 작동성인 것으로 제안된 저산소 신호전달 경로의 개략도이다.

[0120] 요약하면, MSC-컨디셔닝 배지를 크기 배제 크로마토그래피를 통해 분획화하여, 저산소-유도 폐 염증 및 HPH에 대해 보호하는 생물학적으로 활성인 성분을 확인하였다. MEX가 MSC 작용의 결정적인 벡터라는 것이 발견되었다: MEX는 대식세포의 저산소성 폐 유입을 효율적으로 억제하였고, 저산소 폐에서 염증유도성 및 분열 촉진 매개물 예컨대 MCP-1, IL-6, 및 저산소-유도 분열촉진 인자 (HIMF; FIZZ1/ RELM- α /RETNL α)의 상향조절을 차단하였다. 신호 변환물질 및 전사 활성화제 (STAT3)의 억제에 의해 증명되는 바와 같이, 저산소 폐에서 활성화된 증식유도성 경로가 또한 MEX 처리로 차단되었다. 이는 인간 PH 및 질환의 실험 모델 양쪽에서 하향조절된 원위 폐 세동맥에서 강화된 마이크로RNA (문헌 [Courboulin, A. et al.])인 *miR-204*의 폐 수준 증가를 초래하였다. 저산소가 STAT3의 조절 제어 하에 있는 것으로 나타난 마이크로RNA인 폐 조직 내의 마이크로RNA 클러스터의 *miR-17* 패밀리의 구성원들을 상향조절한다는 것과 MEX 처리가 이러한 증식유도성 신호를 효율적으로 억제한다는 것이 또한 발견되었다. 인간 제대-유래 MSC의 배양 배지로부터 단리된 MEX는 저산소성 증식 신호전달 경로에 대해 마우스 MEX와 유사한 억제 효과가 있었다. 배양된 hPAEC에서의 STAT3의 저산소성 활성화를 인간 MEX가 유의하게 억제하였다. 대조적으로, 엑소솜-고갈 MSC-배양 배지는 생체 내에서 또는 시험관 내의 배양 세포에 대해 생리학적 효과가 없었고, 이는 MEX를 MSC 측분비 기능의 주요 이펙터로서 가리킨다.

표 2

MSC-유래 액소ーム의 정제

단계	부피	농도	전체 단백질 (mg)	수율 (%)
무질 청 MSC - 컨디셔닝	25	28.91	7,228	100
한의여파 (100 kDa MWCO)	1	7,184.70	7,185	99.4
S-400 칼럼 크로마토그래피	4.5	166	747	10.4

[0121]

참고문헌

1. Dominici, M., et al., *Cyotherapy* **8**, 315- 317 (2006).
2. Minamino, T., et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 8798- 8803 (2001).
3. Steiner, M.K., et al., *Circ Res* **104**, 236-244, 228p following 244 (2009).
4. Egashira, K., et al., *FASEB J* **14**, 1974-1978 (2000).
5. Ikeda, Y., et al., *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **283**, H2021-2028 (2002).
6. Teng, X., et al., *Circ Res* **92**, 1065-1067 (2003).
7. Angelini, D.J., et al., *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **296**, L582-593 (2009).
8. Yamaji-Kegan, K., et al., *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **291**, L1159-1168 (2006).
9. Daley, E., et al., *J Exp Med* **205**, 361-372 (2008).
10. Angelini, D.J., et al., *Am J Respir Cell Mol Biol* **41**, 553-561 (2009).
11. Rojas, M., et al., *Am J Respir Cell Mol Biol* **33**, 145-152 (2005).
12. Ortiz, L.A., et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 8407-8411 (2003).
13. Xu, J., et al., *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **293**, L131- 141 (2007).
14. Baber, S.R., et al., *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **292**, H1120-1128 (2007).
15. Aslam, M., et al., *Am J Respir Crit Care Med* **180**, 1122-1130 (2009).
16. van Haaften, T., et al., *Am J Respir Crit Care Med* **180**, 1131- 1142 (2009).
17. Lee, R.H., et al., *Cell Stem Cell* **5**, 54-63 (2009).
18. Lee, J.W., et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 16357-16362 (2009).
19. Valadi, H., et al., *Nat Cell Biol* **9**, 654-659 (2007).
20. Aoki, N., et al., *Endocrinology* **148**, 3850-3862 (2007).
21. Segura, E., et al., *J Immunol* **179**, 1489- 1496 (2007).
22. Viaud, S., et al., *PLoS One* **4**, e4942 (2009).
23. Kovar, M., et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 11671-11676 (2006).
24. O'Neill, H.C. & Quah, B.J., *Sci Signal* **1**, pe8 (2008).
25. Girl, P.K. & Schorey, J.S., *PLoS One* **3**, e2461 (2008).
26. Yu, S., et al., *J Immunol* **178**, 6867-6875 (2007).
27. Chalmin, F., et al., *J Clin Invest* **120**, 457-471 (2010).
28. Al-Nedawi, et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 3794-3799 (2009).
29. Ratajczak, J., et al., *Leukemia* **20**, 847-856 (2006).
30. Yuan, A., et al., *PLoS One* **4**, e4722 (2009).
31. Zitvogel, L., et al., *Nat Med* **4**, 594-600 (1998).
32. Wieckowski, E.U., et al., *J Immunol* **183**, 3720-3730 (2009).
33. Bruno, S., et al., *J Am Soc Nephrol* **20**, 1053-1067 (2009).
34. Kalayci, O., et al., *Ann Allergy Asthma Immunol* **93**, 485-492 (2004).
35. Ulmer, T.A., et al., *J Cell Biochem* **98**, 1351-1366 (2006).
36. Streit, M., et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 14888-14893 (1999).
37. Park, Y.W., et al., *Am J Pathol* **165**, 2087-2098 (2004).
38. Thery, C., et al., *J Cell Biol* **147**, 599-610 (1999).
39. Hanayama, R., et al., *Science* **304**, 1147-1150 (2004).
40. Borisenko, G.G., et al., *Cell Death Differ* **11**, 943-945 (2004).
41. Ro, H.S., et al., *Obesity (Silver Spring)* **15**, 288-302 (2007).
42. Liu, T., et al., *J Immunol* **173**, 3425- 3431 (2004).
43. Stutz, A.M., et al., *J Immunol* **170**, 1789-1796 (2003).
44. Nair, M.G., et al., *J Exp Med* **206**, 937-952 (2009).
45. Pesce, J.T., et al., *PLoS Pathog* **5** e1000393 (2009)

[0123]

등가물

[0125]

본 발명은 이의 용도 면에서 하기의 설명에서 기재되거나 도면에서 도해된 성분들의 구조 및 배열의 상세사항에 한정되지 않는다. 본 발명은 다른 실시양태가 가능하고, 다양한 방식으로 실행되거나 수행될 수 있다. 또한, 본원에서 사용된 어법 및 전문 용어는 설명의 목적을 위한 것이고, 한정적인 것으로 간주되지 않아야 한다. 본원에서 "포함되는", "포함하는", 또는 "있는", "함유하는", "수반하는" 및 이의 변형이 사용되는 것은 그 뒤에 열거되는 항목 및 이의 등가물, 뿐만 아니라 추가적인 항목을 포함하도록 의도된다.

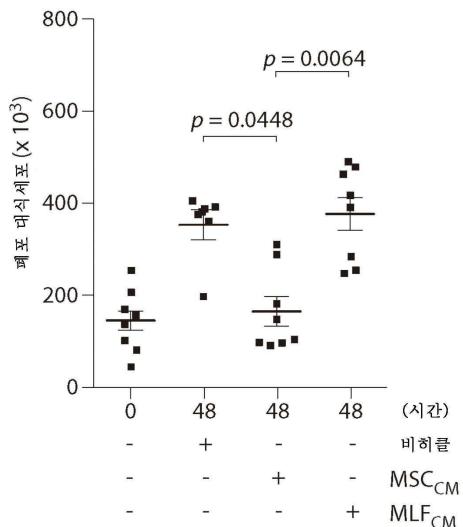
[0126]

본 발명의 1가지 이상의 실시양태의 몇몇 측면이 이렇게 기술되었지만, 다양한 변경, 변형 및 개선이 당업자에게 쉽게 발생할 것임을 이해하여야 한다. 이같은 변경, 변형 및 개선은 본 개시내용의 일부인 것으로

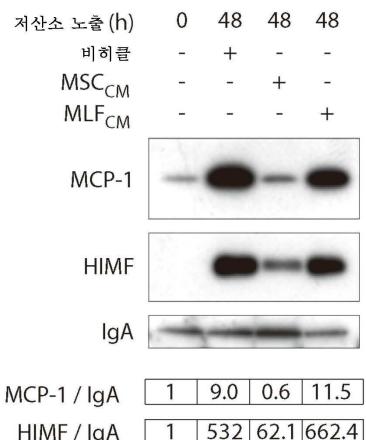
의도되고, 본 발명의 취지 및 범주 이내인 것으로 의도된다. 따라서, 상기의 설명 및 도면은 예의 방식일 것이다.

도면

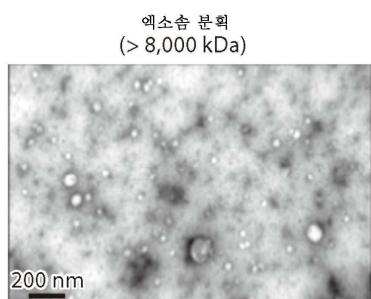
도면 1a



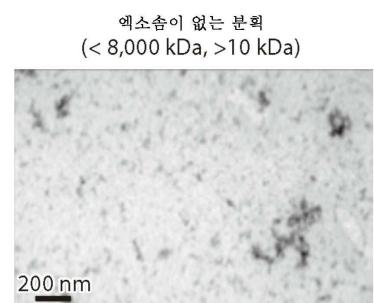
도면 1b



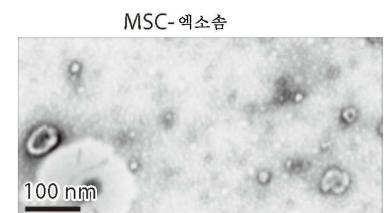
도면 2a



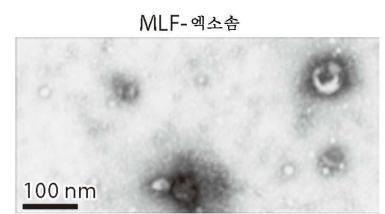
도면2b



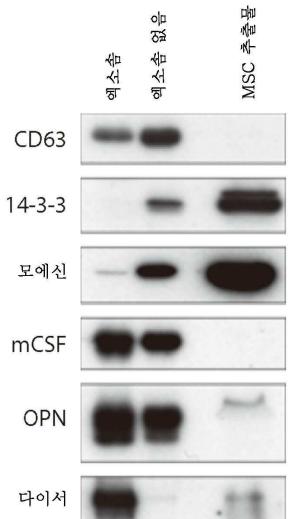
도면2c



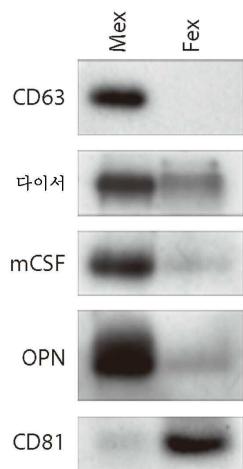
도면2d



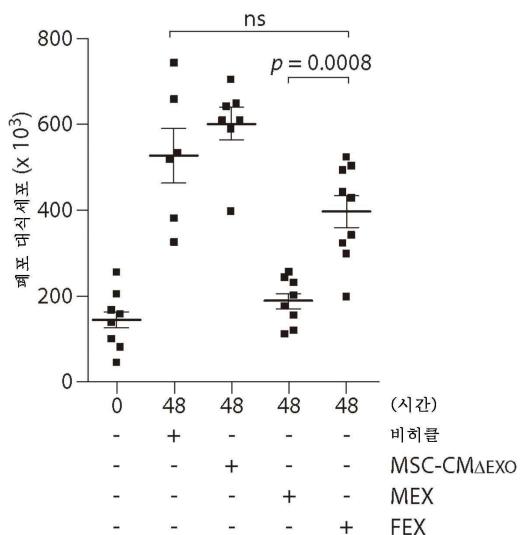
도면2e



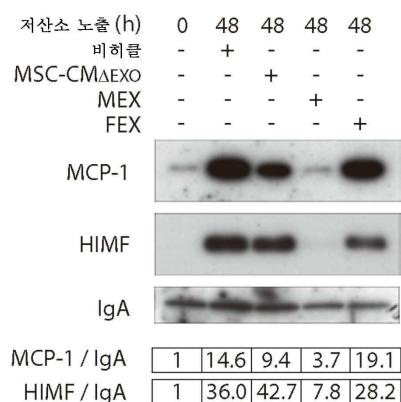
도면2f



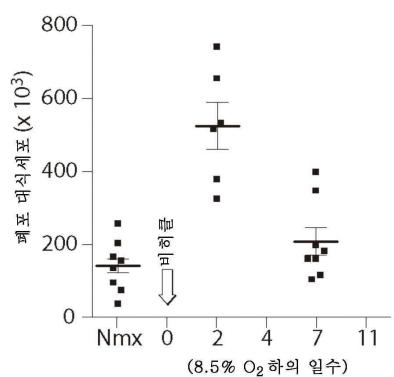
도면3a



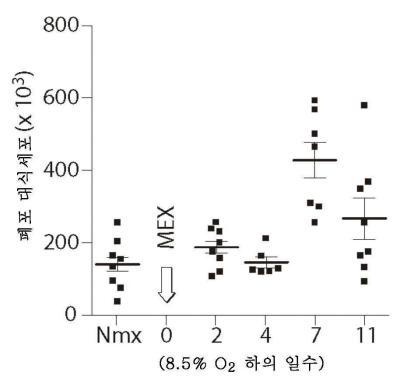
도면3b



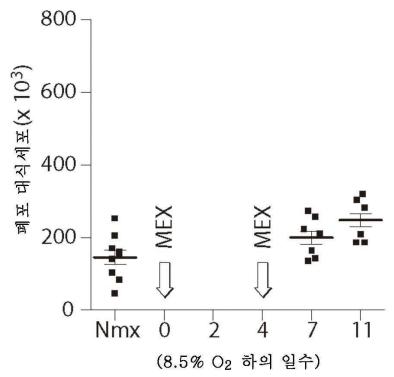
도면4a



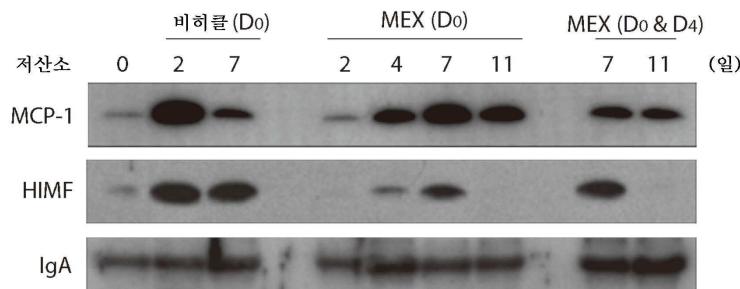
도면4b



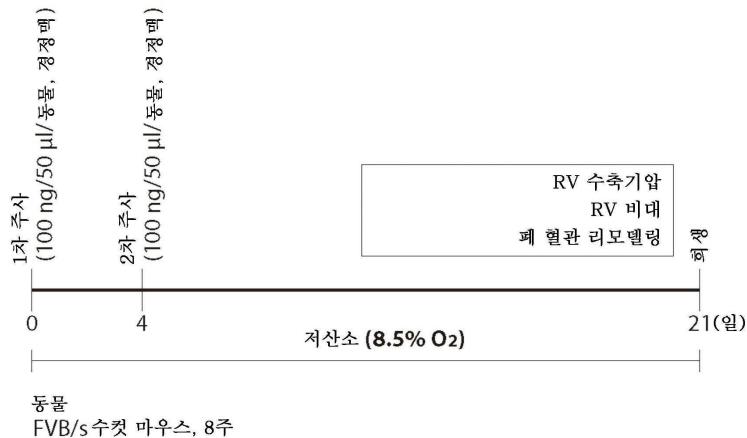
도면4c



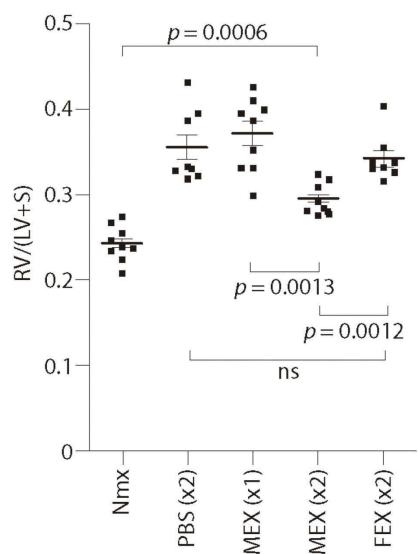
도면4d



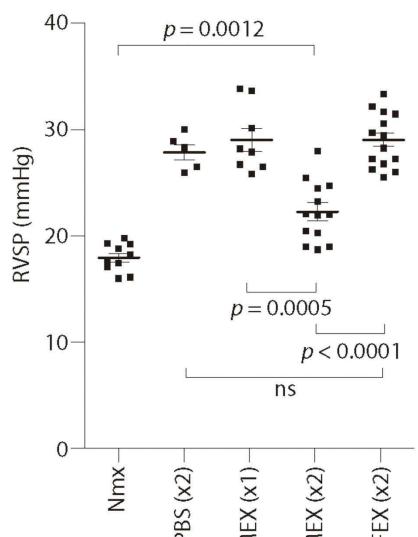
도면5a



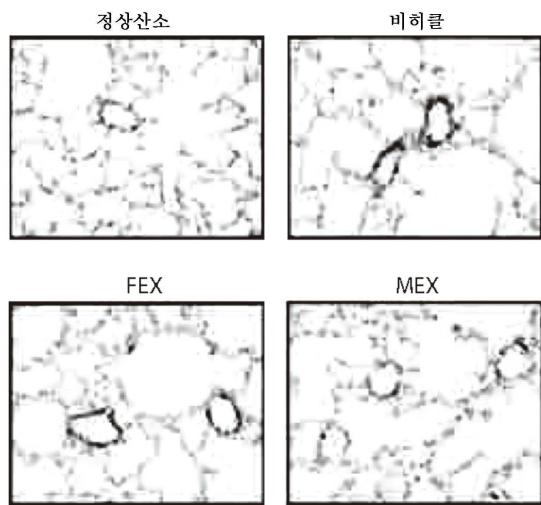
도면5b



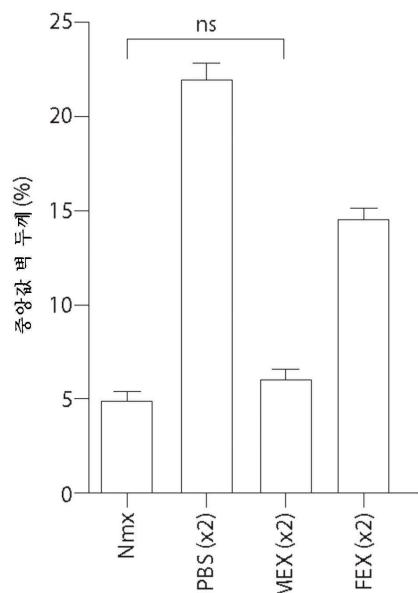
도면5c



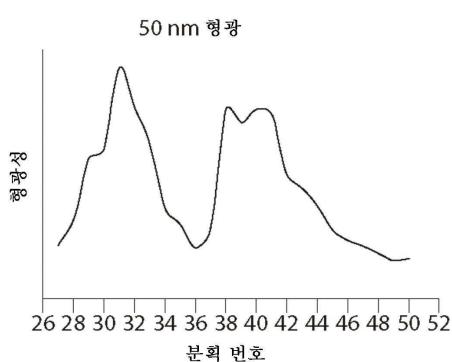
도면5d



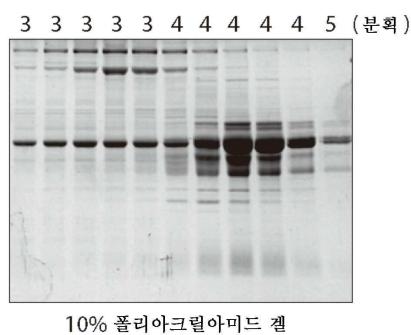
도면5e



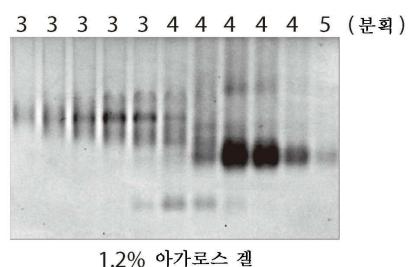
도면6a



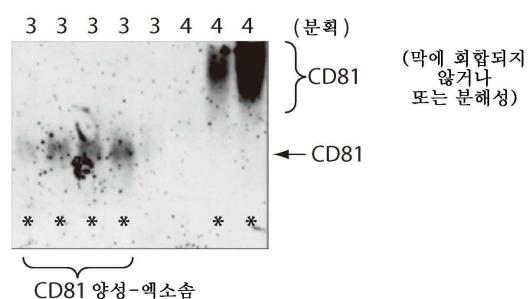
도면6b



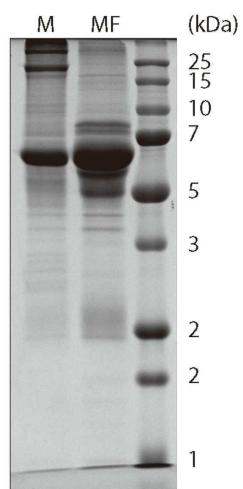
도면6c



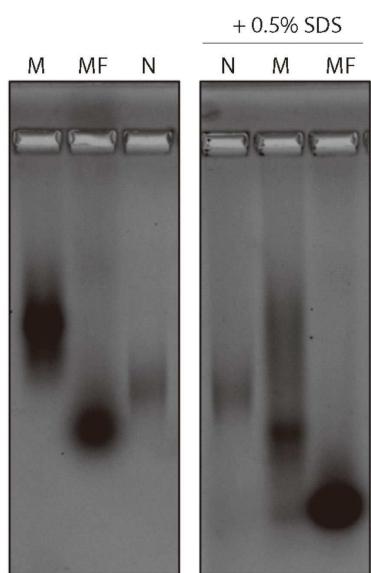
도면6d



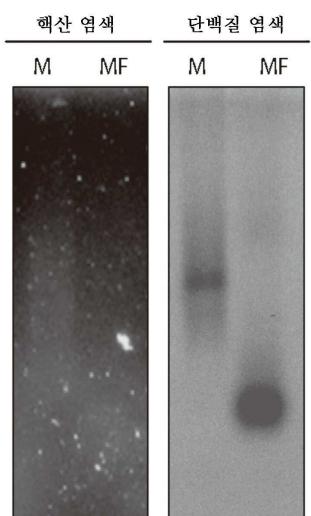
도면7a



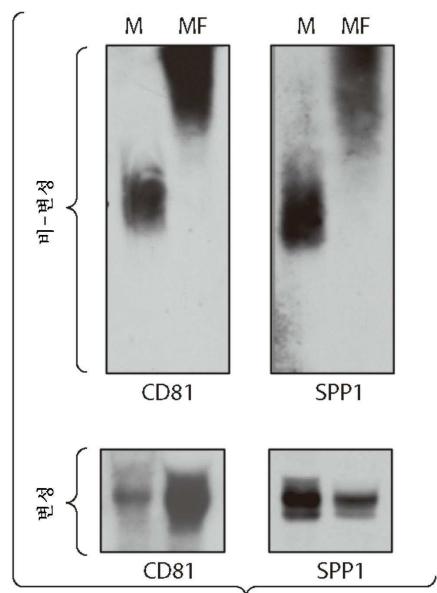
도면7b



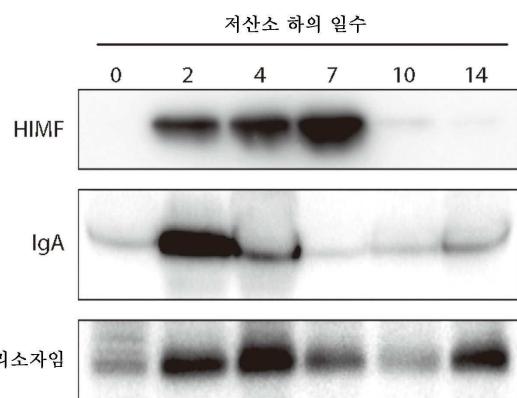
도면7c



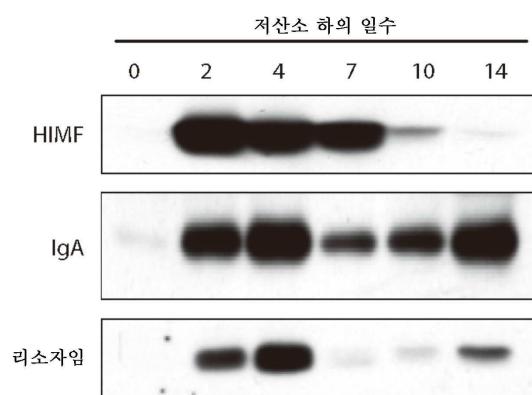
도면7d



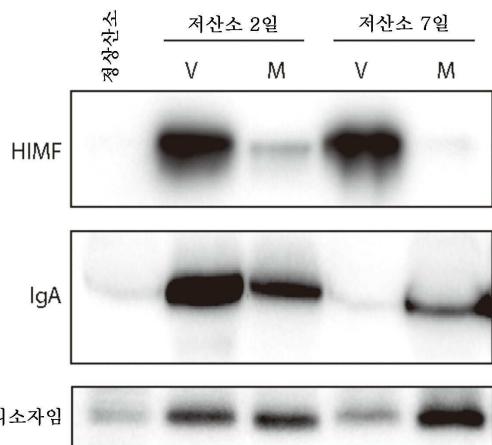
도면8a



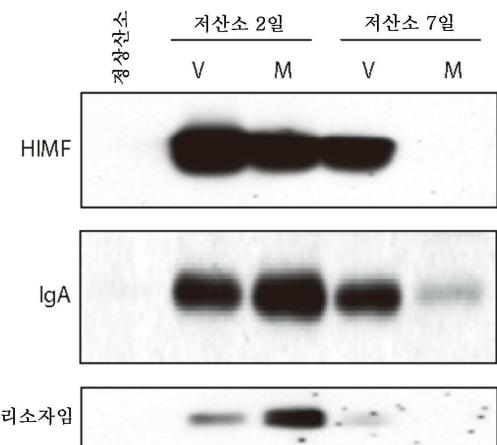
도면8b



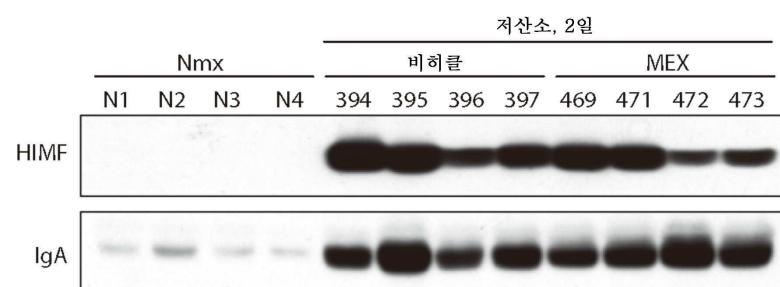
도면9a



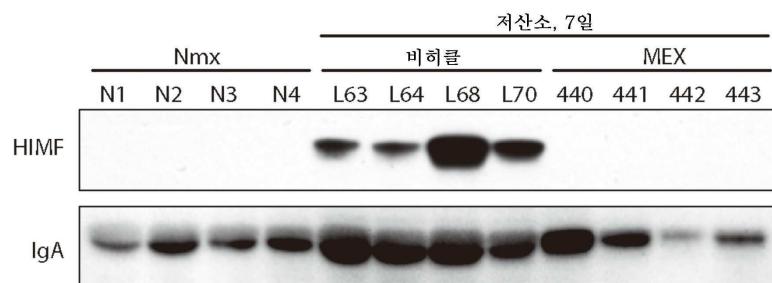
도면9b



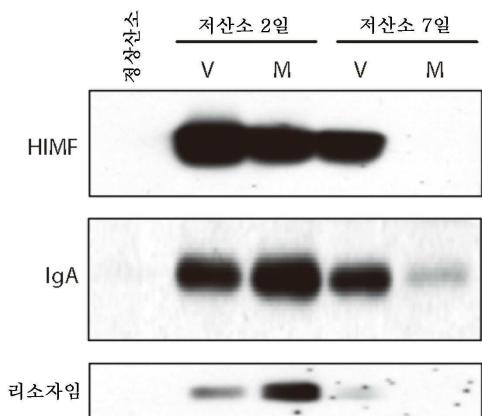
도면10a



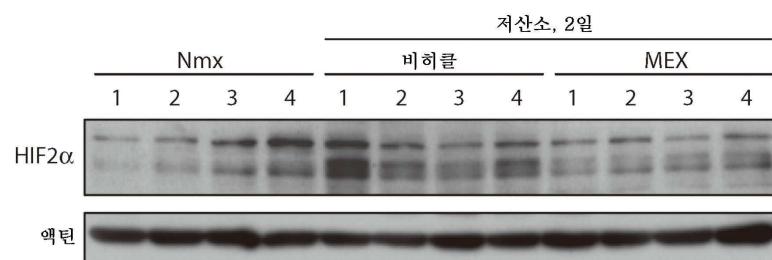
도면10b



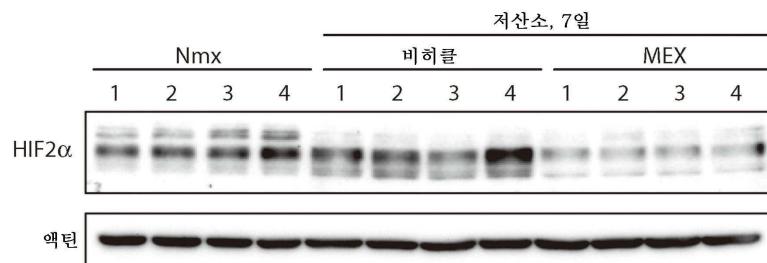
도면10c



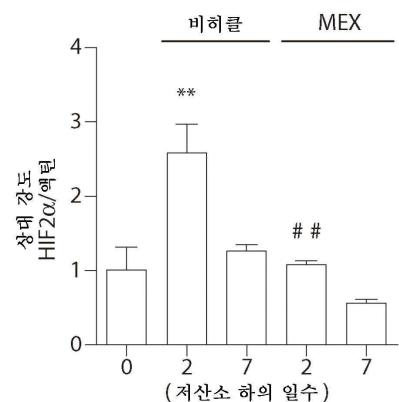
도면11a



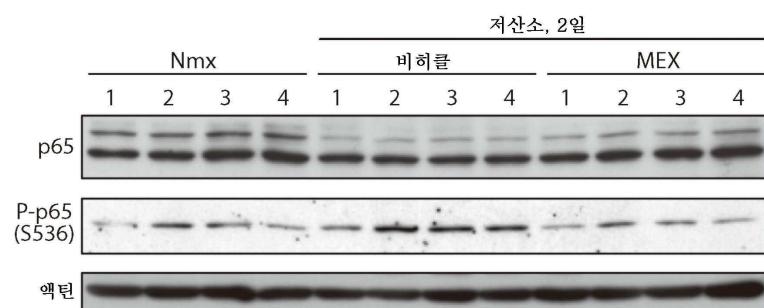
도면11b



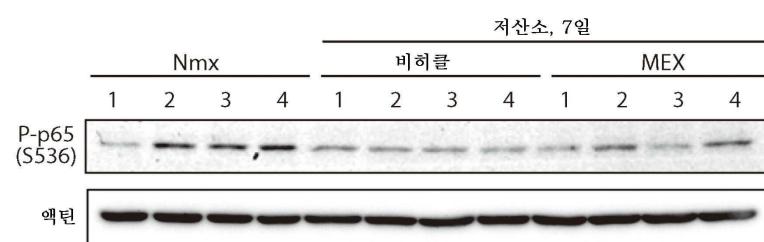
도면11c



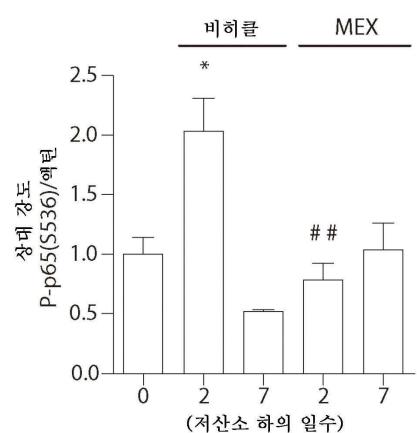
도면12a



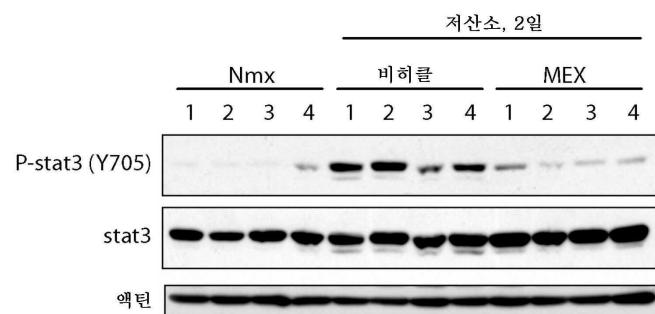
도면12b



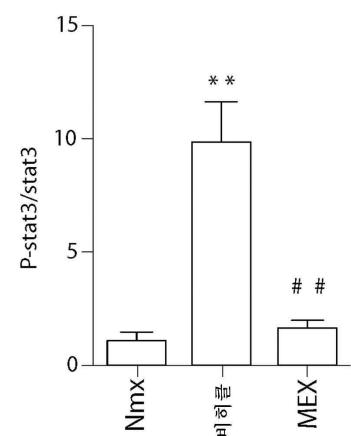
도면12c



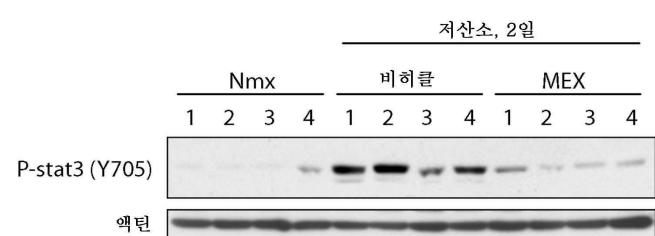
도면13a



도면13b



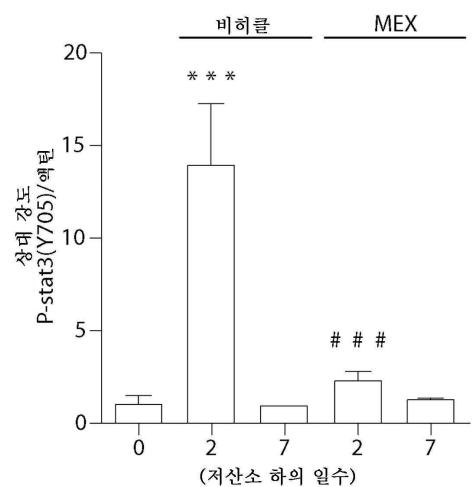
도면14a



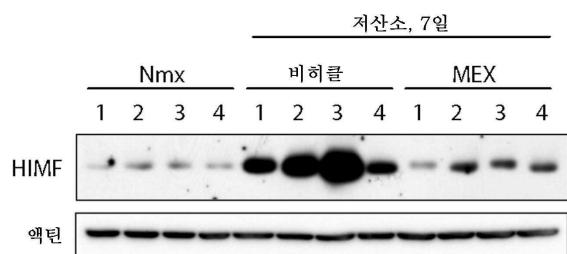
도면14b



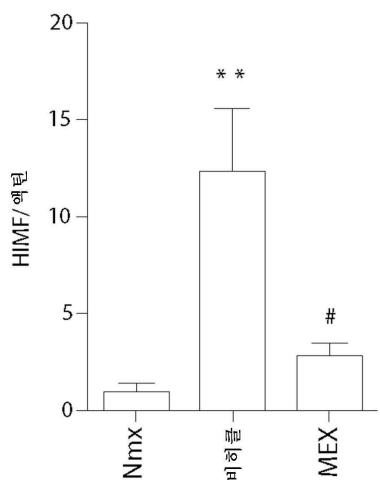
도면14c



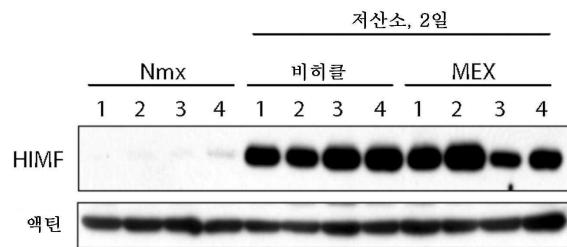
도면15a



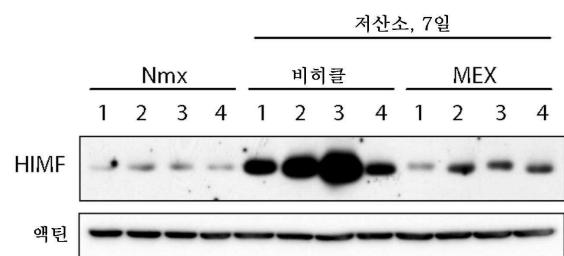
도면15b



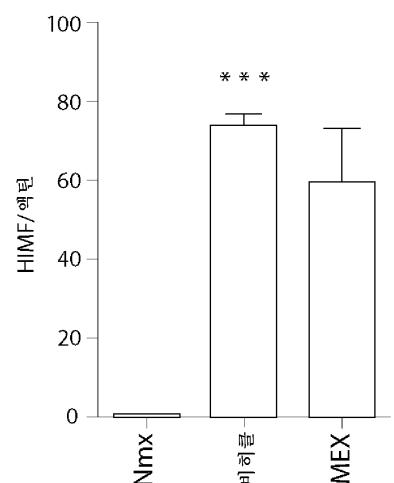
도면16a



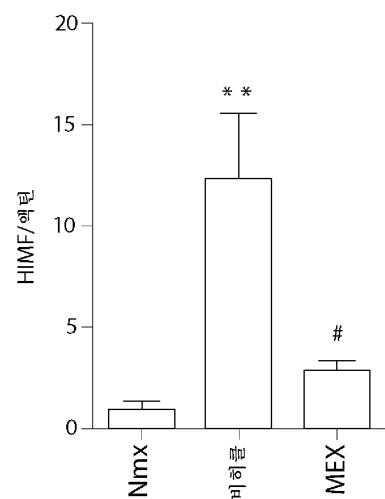
도면16b



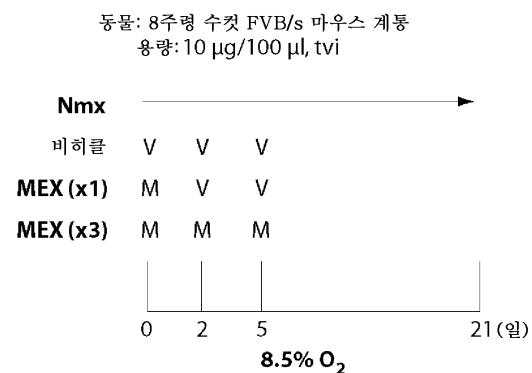
도면16c



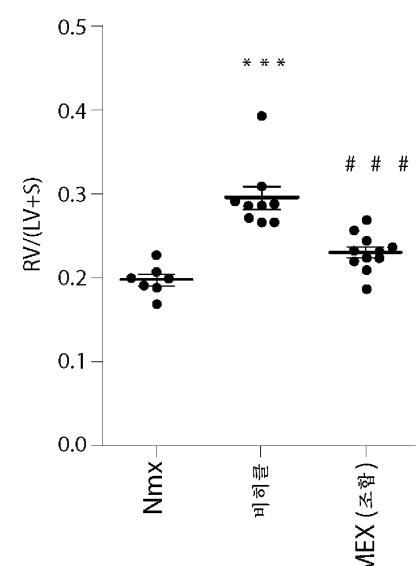
도면16d



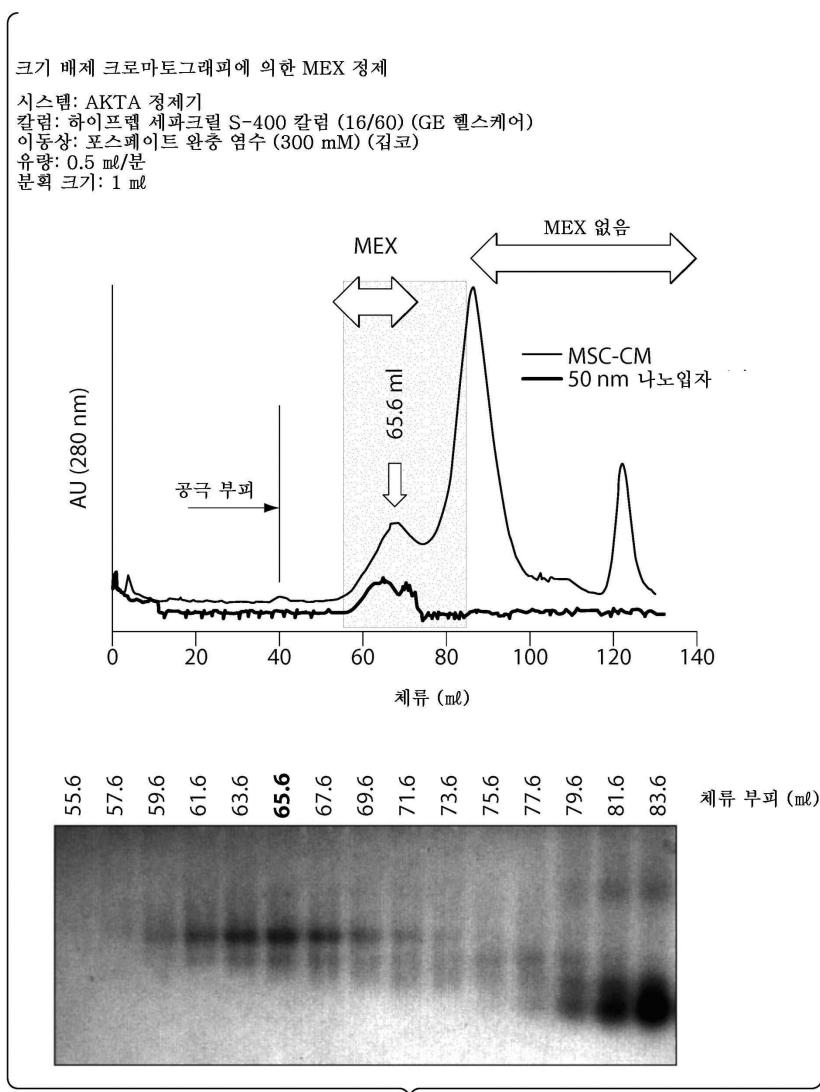
도면17a



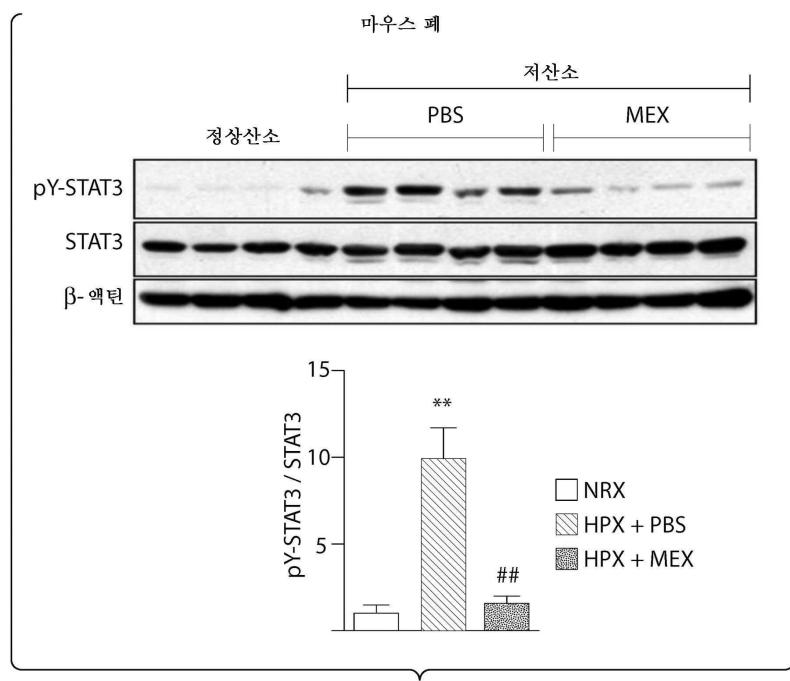
도면17b



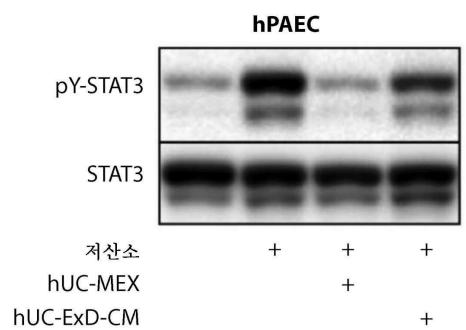
도면18



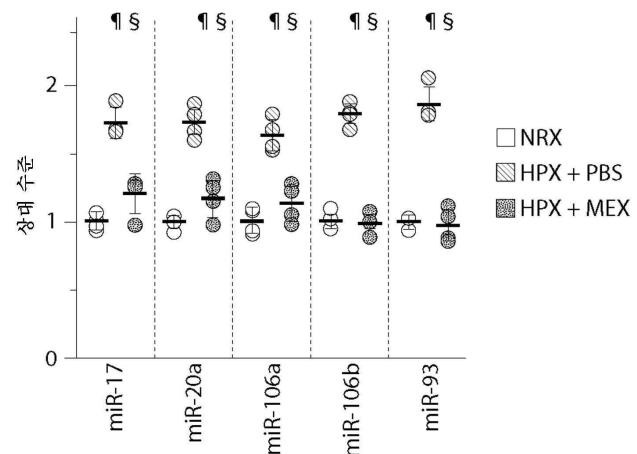
도면19a



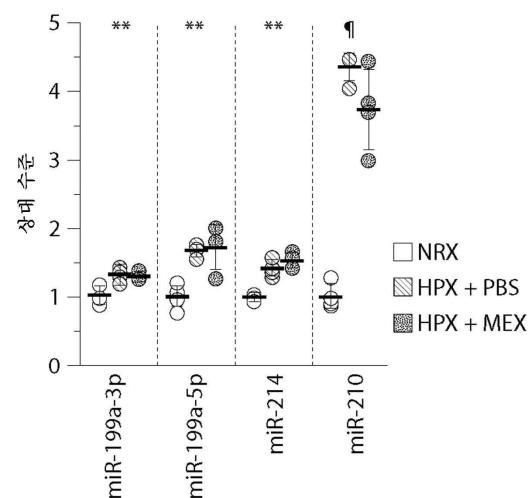
도면19b



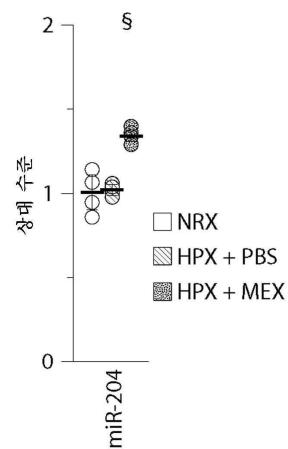
도면20a



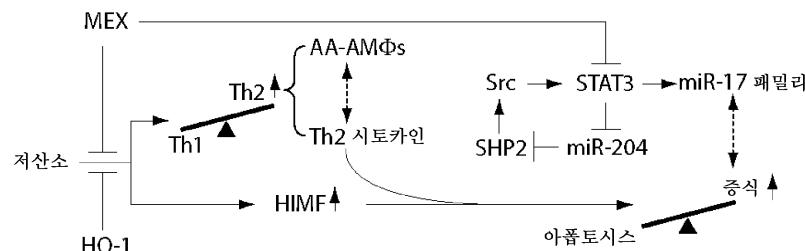
도면20b



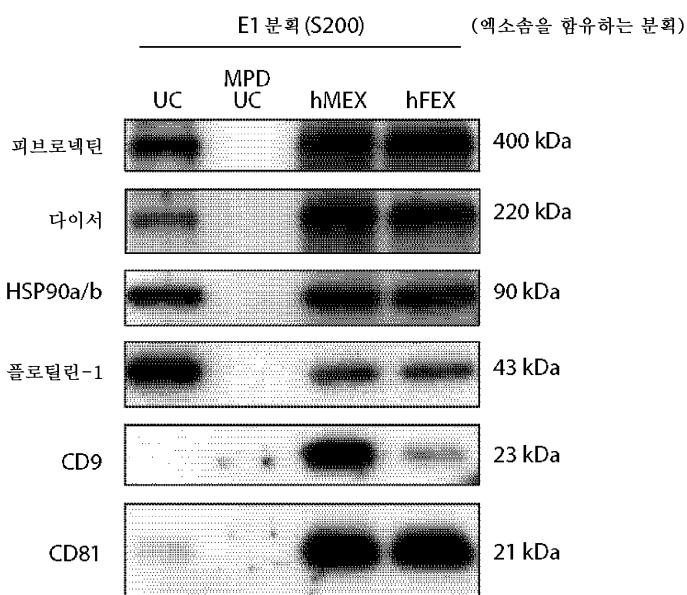
도면20c



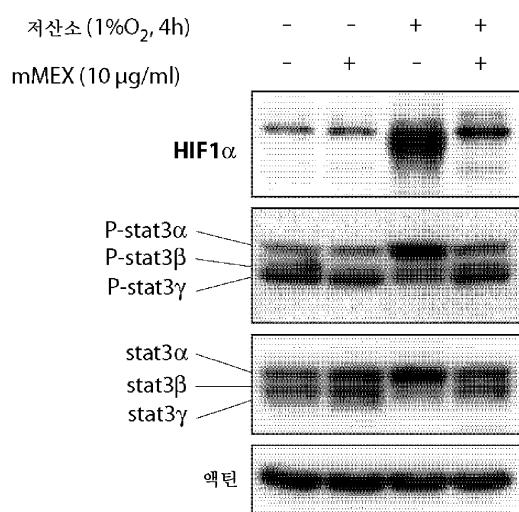
도면21



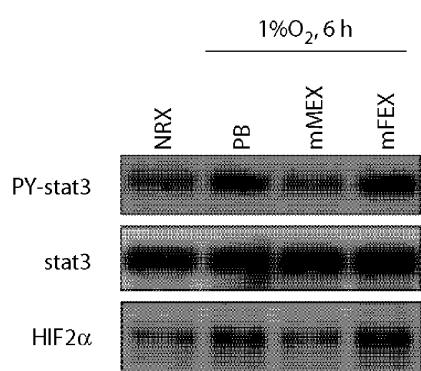
도면22



도면23



도면24



도면25

