

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구  
국제사무국

(43) 국제공개일  
2019년 2월 14일 (14.02.2019)

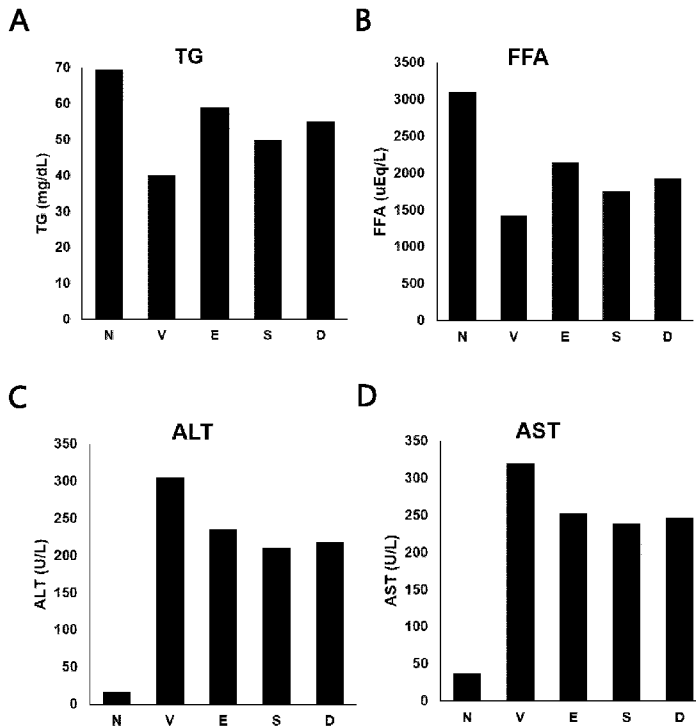


(10) 국제공개번호  
WO 2019/031729 A2

- (51) 국제특허분류: A61K 35/28 (2015.01) A61K 9/00 (2006.01)  
A61K 35/51 (2015.01) A23L 33/10 (2016.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2018/008325
- (22) 국제출원일: 2018년 7월 24일 (24.07.2018)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2017-0099328 2017년 8월 5일 (05.08.2017) KR  
10-2017-0162555 2017년 11월 30일 (30.11.2017) KR
- (71) 출원인: 주식회사 엑소코바이오 (EXOCOBIO INC.)  
[KR/KR]; 08594 서울시 금천구 가산디지털1로 19, 306호, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 이용원 (YI, Yong Weon); 07976 서울시 양천구 목동중앙본로2길 38-12, 202호, Seoul (KR). 조병성 (CHO, Byong Seung); 15835 경기도 군포시 번영로550번길 5, 137동 102호, Gyeonggi-do (KR).
- (74) 대리인: 이동기 (LEE, Dong-Ki); 07997 서울시 양천구 목동동로 293, 14층 1415호, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD,

(54) Title: USE OF COMPOSITION COMPRISING STEM CELL-DERIVED EXOSOME AS EFFECTIVE INGREDIENT IN ALLEVIATING NON-ALCOHOLIC SIMPLE STEATOSIS OR NON-ALCOHOLIC STEATOHEPATITIS

(54) 발명의 명칭: 줄기세포 유래의 엑소솜을 유효성분으로 포함하는 조성물의 비알콜성 단순 지방간 또는 비알콜성 지방간염의 개선 용도



(57) Abstract: The present invention provides a composition comprising a stem cell-derived exosome as an effective ingredient for preventing, relieving, alleviating, or treating non-alcoholic simple steatosis or non-alcoholic steatohepatitis. A composition of the present invention can prevent, relieve, alleviate, or treat non-alcoholic simple steatosis or non-alcoholic steatohepatitis by reducing or relieving fat accumulation or inflammation in hepatocytes or liver tissues, which acts as a cause of non-alcoholic simple steatosis or non-alcoholic steatohepatitis and by inducing the histological state of non-alcoholic simple steatosis or non-alcoholic steatohepatitis to moderate, improve, or change for the better.



WO 2019/031729 A2

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

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

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

---

(57) 요약서: 본 발명은 줄기세포 유래의 엑소솜을 유효성분으로 포함하는, 비알콜성 단순 지방간 또는 비알콜성 지방간염의 예방, 완화, 개선 또는 치료용 조성물을 제공한다. 본 발명의 조성물은 비알콜성 단순 지방간 또는 비알콜성 지방간염의 원인이 되는 간 세포 또는 간 조직 내의 지방 축적 및 염증을 감소 내지는 완화시키고, 비알콜성 단순 지방간 또는 비알콜성 지방간염의 조직학적 상태도 완화, 개선 내지는 호전시켜 비알콜성 단순 지방간 또는 비알콜성 지방간염을 예방, 완화, 개선 또는 치료할 수 있다.

## 명세서

### 발명의 명칭: 줄기세포 유래의 엑소솜을 유효성분으로 포함하는 조성물의 비알콜성 단순 지방간 또는 비알콜성 지방간염의 개선 용도

#### 기술분야

- [1] 본 발명은 줄기세포 유래의 엑소솜을 유효성분으로 포함하는 조성물의 비알콜성 단순 지방간 또는 비알콜성 지방간염의 개선 용도에 관한 것이다.
- [2] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 비알콜성 단순 지방간 또는 비알콜성 지방간염의 예방, 완화, 개선 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.
- [3] 추가로, 본 발명은 비알콜성 단순 지방간 또는 비알콜성 지방간염의 예방, 완화, 개선 또는 치료에 있어서 임상적 적용이 가능한 고순도이면서 입자크기 분포가 균일한 줄기세포 유래의 엑소솜을 대량으로 수득할 수 있고, 이와 같이 수득된 기능적 활성이 우수한 줄기세포 유래의 엑소솜을 유효성분으로 포함하는 조성물을 저가로 대량으로 제공할 수 있는 임상 및 상업적으로 뛰어난 기술에 관한 것이다.

#### 배경기술

- [4] 비알콜성 지방간은 과도한 알콜 섭취 없이 간 세포에 중성지방인 트리글리세라이드가 축적되는 것이 특징이다. 비알콜성 지방간은 현대인의 고지방 및 고탄수화물 섭취와 관련된 영양 과다에 따라 계속 증가하고 있다. 비만, 당뇨병인 경우 비알콜성 지방간이 흔히 관찰되지만, 다양한 인자가 비알콜성 지방간과 관련된 것으로 알려져 있다. 비알콜성 지방간을 지닌 성인의 80%가 인슐린 저항성 당뇨병 및 심장질환 등 대사이상 질환으로 발전된다고 보고되고 있다.
- [5] 병리학적으로, 비알콜성 지방간은 비알콜성 단순 지방간(non-alcoholic simple steatosis)과 염증을 동반한 비알콜성 지방간염(non-alcoholic steatohepatitis; NASH)으로 분류되는데, 장기간 망치 시, 간염, 간섬유, 간경변 등의 심각한 간 질환으로 이행될 수 있다. 비알콜성 지방간은 간 세포(hepatocyte)에서 지방의 축적(지방 침윤)을 갖는 것을 특징으로 한다. 비알콜성 단순 지방간은 비알콜성 지방간염(NASH)으로 진행할 수 있다. 비알콜성 지방간염(NASH)에서 지방 축적은 다양한 정도의 간의 염증 및 흉터와 관련되고, 많은 경우에 인슐린 저항성, 이상지질혈증 및 고혈압과 연관된다. 비알콜성 지방간염(NASH)은 과체중, 높은 콜레스테롤 및 트리글리세라이드 수치, 및/또는 인슐린 저항성을 갖는 사람들에서 종종 발생한다.
- [6] 비알코올성 지방간염의 발병은 투-히트 가설(2-hit hypothesis)에 의해 설명되고 있다. 처음에는 간 조직 내에 지방 축적이 일어난 후 간 조직 내의 지방 축적이 심해지면 염증반응이 일어나게 되고, 이에 따라 지방의 과산화 반응 및 염증의

악화가 초래된다. 비알콜성 지방간염 환자가 급속도로 증가하는 것에 비하여, 비알콜성 지방간염에 대한 탁월한 치료제는 아직 존재하지 않는다. 비만 인구의 증가와 더불어 비알콜성 지방간염 환자가 증가하면서, 비알콜성 지방간염 치료제 시장은 막대한 시장규모로 발전하였고, 비알콜성 지방간염의 발생 원인 및 기작이 밝혀지면서 비알콜성 지방간염의 치료제 개발에 많은 관심이 집중되고 있다. 그러나 안전하고 장기 복용이 가능한 비알콜성 지방간염의 치료제의 개발은 아직 미미한 수준이다.

- [7] 일반적으로 비알콜성 단순 지방간 또는 비알콜성 지방간염의 치료를 위해, 비만치료제, 인슐린저항치료제, 고지혈증치료제, 간세포 보호제, 항산화제 등이 사용된다. 그러나 이들 약물들은 비알콜성 단순 지방간 또는 비알콜성 지방간염의 본질적인 치료제가 아닌 증상 개선제로 이용되는 약물이며 장기 복용시 부작용이 있다. 따라서, 보다 안전하고 장기 복용이 가능하여 만성 질환인 비알콜성 단순 지방간 또는 비알콜성 지방간염의 치료에 적합한 새로운 치료용 조성물의 개발에 대한 요구는 커지고 있는 상황이다.
- [8] 특히, 한국에서는 비알콜성 단순 지방간 및 비알콜성 지방간염의 유병율이 높은 편임에도 불구하고, 비알콜성 단순 지방간 또는 비알콜성 지방간염의 예방, 개선, 완화 또는 치료를 위한 약제 개발 수준은 낮은 편이다. 이러한 문제점을 감안하여 천연물을 이용한 비알콜성 단순 지방간 또는 비알콜성 지방간염 치료제에 대한 연구가 진행되고 있다. 이러한 천연물을 원료로 하는 비알콜성 단순 지방간 또는 비알콜성 지방간염 치료제의 경우, 천연 추출물 내의 유효성분 함량이 적은 관계로 비알콜성 단순 지방간 또는 비알콜성 지방간염 치료 효과를 얻기 위해서는 많은 양의 사용이 필요하고, 이들 중 대부분은 천연물 소재라는 점을 마케팅에 활용하고 있을 뿐 비알콜성 단순 지방간 또는 비알콜성 지방간염 치료의 실질적 효능에 대해서는 과학적 연구가 좀더 필요한 상황이다.
- [9] 한편, 줄기세포를 이용한 조직 재생 및 치료 방법이 제안되고 있다. 배아줄기세포 또는 태아조직 유래 줄기세포는 분화능력 및 재생치료능력이 우수하고 거부반응이 적지만, 윤리적 문제로 임상에 적용될 수 없고 종양을 형성할 수 있는 위험성이 존재한다. 이에 대한 대안으로서 성체줄기세포를 이용한 조직 재생 및 치료 방법이 제안되었다. 그러나, 환자 자신의 성체줄기세포가 아닌 타인의 성체줄기세포를 사용한 경우 이식편대숙주병(graft-versus-host disease)을 일으킬 위험이 있고, 자가 성체줄기세포를 이용하여 치료를 하기 위해서는 환자로부터 성체줄기세포를 채취한 후 이를 배양하는 과정이 필요하여 복잡하고 비용이 많이 드는 문제가 있다.
- [10] 최근에는 전술한 바와 같은 줄기세포의 문제점을 감안하여 성체줄기세포를 배양하여 얻은 배양액을 이용하여 조직 재생 및 치료를 하고자 하는 시도가 있다. 그러나, 성체줄기세포 배양액에는 성체줄기세포가 분비하는 다양한 단백질, 사이토카인, 성장인자 등이 함유되어 있는 반면, 세포가 성장하면서

분비한 노폐물, 오염방지를 위해 첨가된 항생제, 동물유래 혈청 등의 성분도 포함되어 있기 때문에 손상된 조직에 사용할 경우 각종 위험에 노출될 가능성이 높다.

- [11] 최근 세포 분비물(secretome)에 세포의 행동(behavior)을 조절하는 다양한 생체활성인자가 포함되어 있다는 연구가 보고되고 있으며, 특히 세포 분비물 내에는 세포 간 신호전달 기능을 갖는 '엑소좀(exosome)'이 포함되어 있어 그 성분과 기능에 대한 연구가 활발히 진행 중에 있다.
- [12] 세포는 세포외 환경에 다양한 막(membrane) 유형의 소포체를 방출하는데, 통상 이러한 방출 소포체들을 세포외 소포체(Extracellular vesicles, EV)라고 부르고 있다. 세포외 소포체는 세포막 유래 소포체, 엑토좀(ectosomes), shedding 소포체(shedding vesicles), 마이크로파티클(microparticles), 엑소좀 등으로 불려지기도 하며, 경우에 따라서는 엑소좀과는 구별되어 사용되기도 한다.
- [13] 엑소좀은 세포막의 구조와 동일한 이중인지질막으로 이루어진 수십 내지 수백 나노미터 크기의 소포체로서 내부에는 엑소좀 카고(cargo)라고 불리는 단백질, 핵산(mRNA, miRNA 등) 등이 포함되어 있다. 엑소좀 카고에는 광범위한 신호전달 요소들(signaling factors)이 포함되며, 이들 신호전달 요소들은 세포 타입에 특이적이고 분비세포의 환경에 따라 상이하게 조절되는 것으로 알려져 있다. 엑소좀은 세포가 분비하는 세포 간 신호전달 매개체로서 이를 통해 전달된 다양한 세포 신호는 표적 세포의 활성화, 성장, 이동, 분화, 탈분화, 사멸(apoptosis), 괴사(necrosis)를 포함한 세포 행동을 조절한다고 알려져 있다. 엑소좀은 유래된 세포의 성질 및 상태에 따라 특이적인 유전물질과 생체활성 인자들이 포함되어 있다. 증식하는 줄기세포 유래 엑소좀의 경우 세포의 이동, 증식 및 분화와 같은 세포 행동을 조절하고, 조직 재생과 관련된 줄기세포의 특성이 반영되어 있다(Nature Review Immunology 2002 (2) 569-579).
- [14] 그러나, 엑소좀을 이용한 일부 질환의 치료에 대한 가능성 제시 등 다양한 연구가 이루어지고 있음에도 불구하고, 보다 면밀한 임상 및 비임상 연구가 필요하며, 특히 엑소좀이 작용하는 다양한 표적을 과학적으로 규명하여 엑소좀을 다양한 질환 치료에 응용할 수 있는 기술의 개발이 필요한 실정이다.
- [15] 본 발명자들은 비알콜성 단순 지방간 또는 비알콜성 지방간염과 관련하여 종래 알려진 단순 증상 완화 치료제에 비하여 효과가 뛰어나고 안전한 치료제를 개발하고자 노력하였다. 이에 본 발명자들은 줄기세포로부터 유래된 엑소좀의 새로운 용도에 대해 예의 연구를 거듭하던 중, 줄기세포 배양액으로부터 분리된 엑소좀이 전술한 바와 같은 줄기세포 자체나 줄기세포 배양액의 안전성 문제를 해결할 수 있고, 비알콜성 단순 지방간 또는 비알콜성 지방간염의 예방, 완화, 개선 또는 치료에 효과적임을 확인하여 본 발명을 완성하였다.
- [16] 한편, 상기한 배경기술로서 설명된 사항들은 본 발명의 배경에 대한 이해 증진을 위한 것일 뿐, 본 발명의 "선행 기술"로서 이용될 수 있다는 승인으로서 인용한 것은 아님을 이해하여야 한다.

## 발명의 상세한 설명

### 기술적 과제

- [17] 본 발명의 목적은 줄기세포 유래의 엑소좀을 유효성분으로 포함하는 조성물의 비알콜성 단순 지방간 또는 비알콜성 지방간염의 개선 용도를 제공하는데 있다.
- [18] 본 발명의 다른 목적은 상기 조성물을 포함하는 비알콜성 단순 지방간 또는 비알콜성 지방간염의 예방, 완화, 개선 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는데 있다.
- [19] 본 발명의 또 다른 목적은 고순도이면서 입자크기 분포가 균일한 줄기세포 유래의 엑소좀을 대량으로 수득할 수 있고, 이와 같이 수득된 기능적 활성이 우수한 줄기세포 유래의 엑소좀을 유효성분으로 포함하는 조성물을 제공하는데 있다.
- [20] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물을 이용하여 비알콜성 단순 지방간 또는 비알콜성 지방간염의 예방, 완화, 개선 또는 치료하는 방법을 제공하는데 있다.
- [21] 그러나, 전술한 바와 같은 본 발명의 과제는 예시적인 것으로, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다. 또한, 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

### 과제 해결 수단

- [22] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 본 발명은 줄기세포 유래의 엑소좀을 유효성분으로 포함하는, 비알콜성 단순 지방간 또는 비알콜성 지방간염의 예방, 완화, 개선 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [23] 또한, 본 발명은 비알콜성 단순 지방간 또는 비알콜성 지방간염의 예방, 완화, 개선 또는 치료에 있어서 임상적 적용이 가능한 고순도이면서 입자크기 분포가 균일한 줄기세포 유래의 엑소좀을 대량으로 수득할 수 있고, 이와 같이 수득된 기능적 활성이 우수한 줄기세포 유래의 엑소좀을 유효성분으로 포함하는 조성물을 저가로 대량으로 제공할 수 있는 임상 및 상업적으로 뛰어난 신규한 기술을 제공한다.
- [24] 본 명세서에서 용어, "엑소좀(exosomes)"은 세포막의 구조와 동일한 이중인지질막으로 이루어진 수십 내지 수백 나노미터(바람직하게는 대략 30~200 nm) 크기의 소포체를 의미한다(단, 분리 대상이 되는 줄기세포 종류, 분리방법 및 측정방법에 따라 엑소좀의 입자 크기는 가변될 수 있음)(Vasiliy S. Chernyshev et al., "Size and shape characterization of hydrated and desiccated exosomes", Anal Bioanal Chem, (2015) DOI 10.1007/s00216-015-8535-3). 엑소좀에는 엑소좀 카고(cargo)라고 불리는 단백질, 핵산(mRNA, miRNA 등) 등이 포함되어 있다. 엑소좀 카고에는 광범위한 신호전달 요소들(signaling factors)이 포함되며, 이들 신호전달 요소들은 세포 타입에 특이적이고 분비세포의 환경에 따라 상이하게 조절되는 것으로 알려져 있다. 엑소좀은 세포가 분비하는 세포 간 신호전달 매개체로서 이를 통해 전달된 다양한 세포

신호는 표적 세포의 활성화, 성장, 이동, 분화, 탈분화, 사멸(apoptosis), 괴사(necrosis)를 포함한 세포 행동을 조절한다고 알려져 있다.

- [25] 본 명세서에서 용어, "비알콜성 단순 지방간 또는 비알콜성 지방간염"이란 알코올에 기인하지 않은 간 세포 내의 지방 함량이 간 무게의 5% 이상인 경우로서, 간 조직 내에 지방(트리글리세라이드, 지방산 등)의 단순 축적이 일어난 상태, 간 지방증(hepatic steatosis) 상태, 간 조직 내의 지방 축적이 심해진 결과 간 조직 내에 염증반응이 일어난 질병 상태를 말한다. 선택적으로, 본 명세서에서 정의된 용어, "비알콜성 단순 지방간 또는 비알콜성 지방간염"은 간 조직 내에 축적된 지방이 과산화 반응하고 이에 따라 염증의 악화가 초래된 질병 상태를 포함할 수 있으나, 세포외 기질이 간 세포 내에 과다 침착된 상태인 간섬유화, 간경화, 간암으로 진행된 상태는 포함하지 않는다.
- [26] 또한, 본 명세서에서 용어, "비알콜성 단순 지방간 또는 비알콜성 지방간염의 완화, 개선 또는 치료"란 간 세포 또는 간 조직 내의 지방(예를 들어, 트리글리세라이드, 지방산 등) 축적, 혈중 트리글리세라이드 및 유리지방산(free fatty acid) 수치 증가, 체중 감소, NAS(NAFLD activity score) 감소, 조직학적 염증 지수(예를 들어, 과산화적 조직 손상의 지표인 TBARS 함량 등) 감소, 염증 괴사 감소 등과 같은 비알콜성 단순 지방간 또는 비알콜성 지방간염과 연관된 임상 증상 또는 지표를 개선 또는 완화하는 것, 상기 임상 증상 또는 지표와 관련된 질병 진행을 부분적으로 또는 전체적으로 지연, 억제 또는 예방하는 것, 비알콜성 단순 지방간에서 비알콜성 지방간염 지방간으로의 진행을 지연, 억제 또는 예방하는 것 등을 포함한다.
- [27] 예를 들어, "비알콜성 단순 지방간 또는 비알콜성 지방간염의 완화, 개선 또는 치료"란 거대공포성 지방증(macrovesicular steatosis) 스코어, 미세수포성 지방증(microvesicular steatosis) 스코어, 비대증(hypertrophy) 스코어, 간세포의 풍선변형(ballooning degeneration) 스코어, 및/또는 간 소엽 내 염증(lobular inflammation) 스코어 각각 또는 이들의 합계를 감소시키는 것, 혈중 트리글리세라이드 및 유리지방산(free fatty acid) 수치 증가, 간조직 내 TBARS 함량 감소 등 일 수 있다.
- [28] 한편, 태아, 제대, 제대혈 줄기세포로부터 분리된 엑소솜을 이용하여 간섬유화를 개선시키고자 한 보고가 있었다. 그러나 이들 종래기술은 비알콜성 단순 지방간 또는 비알콜성 지방간염의 예방, 완화, 개선 또는 치료에 관한 것이 아니고, 세포외 기질이 간 세포 내에 축적되어 발생된 섬유화에 의해 간기능이 상실된 간 조직의 재생 내지는 회복에 관한 것이었다. 따라서 줄기세포 배양액으로부터 분리 정제된 엑소솜을 사용할 때 간 세포 또는 간 조직 내의 지방 감소, 염증 감소 내지는 완화 효과, 즉 전술한 바와 같이 정의된 "비알콜성 단순 지방간 또는 비알콜성 지방간염의 예방, 완화, 개선 또는 치료" 효과가 있다는 것에 대해서는 공지된 바가 없었다.
- [29] 현재까지 대량 배양이 가능한 줄기세포를 배양한 후, 줄기세포 배양액으로부터

대량으로 경제적으로 분리 정제된 엑소솜을 비알콜성 단순 지방간 또는 비알콜성 지방간염의 예방, 완화, 개선 또는 치료에 임상적으로 적용가능하게 구현한 치료제는 개발된 바가 없다. 예를 들어, 지방에서 유래한 지방줄기세포(adipose-derived stem cells)는 지방 흡입술과 같은 간단한 시술에 의해 대량으로 입수가 가능하고 골수, 제대 또는 제대혈 등에 비해 약 40배 정도의 줄기세포가 있어 상업적으로는 가장 원가가 저렴하고 생산량이 많지만, 지방 내에 세포 잔해물, 노폐물, 단백질 및 거대입자와 같은 불순물이 많아 지방 유래 줄기세포 배양액으로부터 고순도이면서 입자크기 분포가 균일한 엑소솜을 경제적으로 대량으로 분리하는 것이 어렵다. 따라서, 경제성 측면에서 줄기세포 배양액으로부터 고순도의 입자크기 분포가 균일한 엑소솜을 대량으로 분리하는 것에는 기술적 장벽이 있다고 할 수 있다.

- [30] 본 발명의 조성물은 약학 조성물로 적용될 때, 유효성분으로 함유된 줄기세포 유래의 엑소솜이 비알콜성 단순 지방간 또는 비알콜성 지방간염의 예방, 완화, 개선 또는 치료에 유의적인 효과를 나타내며, 줄기세포 자체나 줄기세포 배양액의 안전성 문제를 해결할 수 있다. 따라서, 본 발명의 비알콜성 단순 지방간 또는 비알콜성 지방간염의 예방, 완화, 개선 또는 치료용 조성물에 포함된 줄기세포 유래의 엑소솜은 종래에 알려진 간섬유화 완화 내지는 개선과는 전혀 다른 메카니즘인 "간 세포 또는 간 조직 내의 지방 감소, 염증 감소 내지는 완화"를 통해 비알콜성 단순 지방간 또는 비알콜성 지방간염을 예방, 개선, 완화 내지는 치료하며 이러한 효능은 종래기술로부터 전혀 예측할 수 없는 것임을 명백히 밝혀 둔다.
- [31] 본 발명의 일 구체예의 비알콜성 단순 지방간 또는 비알콜성 지방간염의 예방, 완화, 개선 또는 치료용 조성물은, 줄기세포 유래의 엑소솜을 유효성분으로 포함한다.
- [32] 또한, 본 발명의 일 구체예의 조성물에 있어서, 상기 엑소솜은 하기의 단계들을 수행하여 수득될 수 있다: (a) 줄기세포 배양액에 트레할로오스를 첨가하는 단계, (b) 상기 트레할로오스가 첨가된 줄기세포 배양액을 여과하는 단계, (c) 상기 여과된 줄기세포 배양액으로부터, TFF(Tangential Flow Filtration)를 이용하여 엑소솜을 분리하는 단계, 및 (d) 탈염과 버퍼교환(diafiltration)에 사용되는 완충용액에 트레할로오스를 첨가하고, 상기 트레할로오스가 첨가된 완충용액을 이용한 TFF(Tangential Flow Filtration)를 이용하여, 상기 분리된 엑소솜에 대한 탈염과 버퍼교환(diafiltration)을 수행하는 단계.
- [33] 본 발명의 일 구체예의 조성물에 있어서, 상기 (d) 단계에서 탈염과 버퍼교환(diafiltration)에 사용되는 완충용액에 트레할로오스를 첨가하면, 입자크기 분포가 균일하고 순도가 높은 엑소솜을 효과적으로 수득할 수 있다(도 6A 내지 도 6E 참조). 본 발명에서는 TFF에 의한 엑소솜 분리 전의 사전 여과 과정((b) 단계)과 엑소솜 분리 후 TFF에 의한 탈염 및 버퍼교환 과정((d) 단계)에서 트레할로우스를 사용하는 것에 의해 고순도의 입자크기 분포가

균일한 엑소솜을 높은 수율로 수득할 수 있다.

- [34] 한편, 본 발명에 있어서 트레할로오스는 세포 잔해물, 노폐물, 단백질 및 거대 입자와 같은 불순물에 대해 엑소솜을 효율적으로 분별할 수 있는 기능을 부여한다.
- [35] 본 발명의 일 구체예의 조성물에 있어서, 상기 탈염과 버퍼교환은 연속적으로 수행하거나 단속적으로 수행할 수 있다. 시작 부피(starting volume)에 대하여 적어도 4배, 바람직하게는 6배 내지는 10배 이상, 보다 바람직하게는 12배 이상의 부피를 갖는 완충용액을 이용하여 탈염과 버퍼교환을 수행할 수 있다.
- [36] 본 발명의 일 구체예의 조성물에 있어서, TFF를 위해 MWCO(molecular weight cutoff) 100,000 Da(Dalton), 300,000 Da, 500,000 Da 또는 750,000 Da의 TFF 필터, 또는 0.05  $\mu\text{m}$  TFF 필터를 사용할 수 있다.
- [37] 본 발명의 일 구체예의 조성물에 있어서, 상기 (c) 단계는 TFF(Tangential Flow Filtration)를 이용하여 1/100 내지 1/25의 부피까지 농축하는 과정을 더 포함할 수 있다.
- [38] 본 발명의 일 구체예의 조성물에 있어서, 상기 여과된 줄기세포 배양액은 TFF 전에 초음파처리(sonication)될 수 있다.
- [39] 본 발명의 일 구체예의 조성물에 있어서, 상기 엑소솜은 거대공포성 지방증(Macrovesicular steatosis) 스코어, 미세수포성 지방증(Microvesicular steatosis) 스코어, 염증 스코어, 비대증(hypertrophy) 스코어, 및 TBARS(thiobarbituric acid) 수치를 감소시키는 것을 특징으로 한다. 추가적으로, 상기 엑소솜은 혈중 트리글리세라이드 및 유리지방산 수치를 증가시키고, ALT(alanine aminotransferase) 및 AST(aspartate aminotransferase) 수치를 감소시킬 수 있다.
- [40] 본 발명의 일 구체예의 조성물에서 상기 줄기세포의 종류는 제한되지 않으나, 바람직하게는 중간엽 줄기세포, 예를 들어 지방, 골수, 제대 또는 제대혈 유래 줄기세포일 수 있으며, 보다 바람직하게는 지방 유래 줄기세포일 수 있다. 상기 지방 유래 줄기세포의 종류는 병원체에 의한 감염의 위험이 없고 면역 거부 반응을 일으키지 않는 것이라면 제한되지 않으나, 바람직하게는 인간지방 유래 줄기세포일 수 있다.
- [41] 본 발명의 일 구체예에서 상기 비알콜성 단순 지방간 또는 비알콜성 지방간염은 고지방 및 고과당 식이에 의하여 유발된 것일 수 있다. 본 발명의 일 구체예에서 상기 약학 조성물은 비알콜성 단순 지방간을 갖고 있거나 비알콜성 지방간염을 겪는 환자의 간 세포 또는 간 조직 내에 축적된 지질의 감소 및 제거에 사용하기 위한 것일 수 있다.
- [42] 본 발명의 일 구체예의 조성물은 약학 조성물로 제조될 수 있다. 본 발명의 일 구체예의 조성물이 약학 조성물로 제조되는 경우, 본 발명의 일 구체예에 따른 약학 조성물은 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다.
- [43] 본 발명의 일 구체예의 약학 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제

또는 희석제 등을 포함할 수 있다. 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 텍스트로오스, 트레할로오스, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 카보네이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스(microcrystalline cellulose), 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 미네랄 오일 등을 들 수 있으며, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 일 구체예의 약학 조성물은 통상의 방법에 따라 산제, 환제, 정제, 캡슐제, 현탁제, 에멀전, 시럽, 과립제, 엘릭시르제(elixirs), 에어로졸 등의 경구투여용 제제, 외용제, 좌제, 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용할 수 있다.

[44] 본 발명의 일 구체예의 약학 조성물의 투여는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며, 상기 약학 조성물의 투여경로는 약물이 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 일 구체예의 약학 조성물은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여로는 경피 투여, 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 동맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 국소 투여, 직장 내 투여 등을 거론할 수 있다. 그러나, 이에 제한되는 것이 아니며 당업계에 알려진 다양한 투여 방법을 배제하지 않는다. 또한, 본 발명의 일 구체예의 약학 조성물은 활성 물질이 표적 조직 또는 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다. 또한, 본 발명의 일 구체예의 약학 조성물의 유효량은 치료 효과를 기대하기 위하여 투여에 요구되는 양을 의미한다.

[45] 본 발명의 일 구체예의 약학 조성물의 비경구 투여용 제제는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 또는 좌제일 수 있다. 본 발명의 일 구체예의 약학 조성물의 비경구 투여용 제제는 주사제로도 제조될 수 있다. 본 발명의 일 구체예의 주사제는 수성 주사제, 비수성 주사제, 수성 현탁 주사제, 비수성 현탁 주사제, 또는 용해 또는 현탁하여 사용하는 고형 주사제 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 일 구체예의 주사제는 그 종류에 따라 주사용 증류수, 식물유(예를 들어, 낙화생유, 참기름, 동백기름 등), 모노글리세리드, 디글리세리드, 프로필렌글리콜, 감피, 벤조산에스트라디올, 차살리실산비스무트, 아르세노벤졸나트륨, 또는 황산스트렙토마이신 중 적어도 1종을 포함할 수 있고, 선택적으로 안정제나 방부제를 포함할 수 있다.

[46] 본 발명의 일 구체예의 약학 조성물의 배합비율은 전술한 바와 같은 추가 성분들의 종류나 양, 형태 등에 따라서 적당하게 선택할 수 있다. 예를 들어, 주사제 전량에 대해, 본 발명의 약학 조성물은 약 0.1 내지 99 중량%, 바람직하게는 약 10 내지 90 중량% 정도 포함될 수 있다. 또한, 본 발명의 일 구체예의 약학 조성물의 적합한 투여량은 환자의 질환 종류, 질환의 경중, 제형의 종류, 제제화 방법, 환자의 연령, 성별, 체중, 건강 상태, 식이, 배설률, 투여 시간 및 투여 방법에 따라 조절될 수 있다. 예를 들어, 성인에게 본 발명의

일 구체예의 약학 조성물을 투여하는 경우, 하루에 0.001 mg/kg ~ 100 mg/kg의 용량으로 1 내지 수회에 나누어 투여할 수 있다.

- [47] 본 발명의 다른 구체예는 상기 약학 조성물의 치료학적으로 유효한 양을 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하는, 비알콜성 단순 지방간 또는 비알콜성 지방간염의 예방, 완화, 개선 또는 치료하는 방법을 제공한다.

### 발명의 효과

- [48] 본 발명의 조성물은 비알콜성 단순 지방간 또는 비알콜성 지방간염의 원인이 되는 간 세포 또는 간 조직 내의 지방 축적 및 염증을 감소 내지는 완화시키고, 비알콜성 단순 지방간 또는 비알콜성 지방간염의 조직학적 상태도 완화, 개선 내지는 호전시켜 비알콜성 단순 지방간 또는 비알콜성 지방간염을 예방, 완화, 개선 또는 치료할 수 있다. 따라서, 본 발명의 조성물은 비알콜성 단순 지방간 또는 비알콜성 지방간염의 예방, 완화, 개선 또는 치료용 약학 조성물로서 유용하게 사용될 수 있다.
- [49] 또한, 본 발명은 고순도이면서 입자크기 분포가 균일한 줄기세포 유래의 엑소좀을 저가로 대량으로 수득할 수 있다. 따라서, 본 발명은 기능적 활성이 우수한 줄기세포 유래의 엑소좀을 유효성분으로 포함하는 조성물을 저가로 대량으로 제공할 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물은 스케일-업(scale-up)이 가능하고 GMP(Good Manufacturing Practice)에도 적합하다.
- [50] 한편, 전술한 바와 같은 효과들에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

### 도면의 간단한 설명

- [51] 도 1은 본 발명의 일 구체예에 따라 줄기세포 배양액으로부터 엑소좀을 제조하는 방법에 있어서 엑소좀을 분리 및 정제하는 과정을 설명하는 플로우차트이다.
- [52] 도 2는 본 발명의 일 구체예에 따라 줄기세포 배양액으로부터 엑소좀을 제조하는 단계(step)별로 용액 내에 포함되어 있는 단백질의 총량 비율(Relative amount of protein)을 측정한 결과를 나타낸다. 각 단계별 단백질 총량의 비율은 줄기세포 배양액 전체에 대한 단백질 총량의 상대적 비율로 나타내었다. 실험 결과는 2개의 서로 다른 배치에서 얻어진 결과를 각각 도시하였다.
- [53] 도 3은 본 발명의 일 구체예에 따라 얻어진 엑소좀의 생산성(productivity)과 순도(purity)를 측정한 결과를 도시한 것이다. 엑소좀의 생산성은 "줄기세포 배양액(CM)단위 mL 당 얻어진 엑소좀의 입자수"로 계산하였고, 엑소좀의 순도는 "최종 분획물에 포함되어 있는 단백질 단위  $\mu\text{g}$  당 엑소좀의 입자수"로 계산하였다. 실험 결과는 5개의 서로 다른 배치(batch)에서 얻어진 결과를 도시하였다.
- [54] 도 4A 내지 도 4E는 본 발명의 일 구체예에 따라 얻어진 엑소좀의 물리적 특성 분석 결과를 도시한 것이다. "도 4A"는 TRPS(tunable resistive pulse sensing) 분석에 의한 입자 크기 분포와 입자수를 나타낸다. "도 4B"는 NTA(nanoparticle

- tracking analysis) 분석에 의한 입자 크기 분포와 입자수를 나타낸다. "도 4C"는 TEM(transmitted electron microscopy) 분석에 의한 입자 이미지를 배율에 따라 도시하였다. "도 4D"는 본 발명의 일 구체예에 따라 얻어진 엑소좀의 웨스턴 블랏 결과를 나타낸다. "도 4E"는 본 발명의 일 구체예에 따라 얻어진 엑소좀에 대한 마커 분석에 있어서 CD63 및 CD81에 대한 유세포분석 결과를 나타낸다.
- [55] 도 5A 내지 도 5C는 트레할로오스 첨가에 따라 입자크기 분포가 균일하고 순도가 높은 엑소좀이 수득되는 것을 보여주는 입자 크기 분포에 관한 NTA 분석 결과를 도시한다. 첨가된 트레할로오스의 양이 증가함에 따라 단일한 피크를 갖는 입자 크기 분포 결과를 얻을 수 있다.
- [56] 도 6A 내지 도 6C는 본 발명의 일 구체예에 따른 엑소좀의 제조과정에서 트레할로오스 첨가 여부에 따른 입자 크기 분포를 나타내는 NTA 분석 결과를 도시한다. "도 6A"는 제조 과정 전과정에서 트레할로오스를 첨가한 경우, "도 6B"는 세포 배양액을 동결 보관하였다가 해동한 후 트레할로오스를 첨가한 경우, "도 6C"는 트레할로오스를 첨가하지 않고 제조한 결과를 나타낸다. "도 6D"에는 도 6A 내지 도 6C의 방법에 의하여 분리한 엑소좀의 상대적인 생산성(Relative productivity)과 상대 농도(Relative concentration)를 비교한 결과를 도시하였다. "도 6E"에는 도 6A 내지 도 6C의 방법에 의하여 분리한 엑소좀의 평균 입자크기(Mean size)를 도시하였다.
- [57] 도 7은 인체 피부섬유아세포인 HS68 세포에 본 발명의 일 구체예에 따른 엑소좀 및/또는 세포의 소포체를 처리한 후 세포 독성이 없음을 확인한 결과를 도시한다.
- [58] 도 8은 RAW264.7 세포에 대해 LPS와 함께 본 발명의 엑소좀을 처리한 경우 LPS에 의해 유도되는 TNF- $\alpha$  및 IL-6의 mRNA 발현량이 감소한 것을 확인한 리얼타임 PCR 결과를 도시한 그래프이다.
- [59] 도 9는 본 발명의 일 구체예에 따른 엑소좀에 의한, 염증 반응의 일종인 NO 형성의 감소 효과를 확인한 실험 결과를 도시한다. 도 9에서 PBS는 인산염 완충용액(phosphate-buffered saline), DEX는 덱사메타손(dexamethasone), EXO는 엑소좀, CM은 지방줄기세포 배양액(conditioned media), CM-EXO는 엑소좀이 제거된 지방줄기세포 배양액(exosome-depleted conditioned media)을 나타낸다.
- [60] 도 10은 본 발명의 일 구체예에 따른 엑소좀에 의한, 염증성 사이토카인인 TNF- $\alpha$  형성의 감소 효과를 확인한 실험 결과를 도시한다. 도 10에서, PBS는 인산염 완충용액(phosphate-buffered saline), DEX는 덱사메타손(dexamethasone), 각 숫자는 엑소좀 처리량( $\mu\text{g/mL}$ )을 나타낸다.
- [61] 도 11A 내지 도 11C는 본 발명의 일 구체예에 따라 분리된 엑소좀에 의한 NO 형성 감소 효과와, 종래의 침전법(PPT)에 의해 분리된 엑소좀에 의한 NO 형성 감소 효과를 비교한 실험 결과를 도시한다. 도 11A는 종래의 침전법에 의해 분리된 엑소좀의 NTA 분석 결과이고, 도 11B는 본 발명의 일 구체예에 따른 방법에 의해 분리 정제된 엑소좀의 NTA 분석 결과이며, 도 11C는 NO 형성 감소

- 효과를 비교 도시한 그래프이다. NO 형성의 감소 정도는 양성대조군인 덱사메타손(Dex)에 의한 NO 형성 감소 정도에 대한 상대 비율(%)로 표시하였다.
- [62] 도 12는 비알콜성 지방간염이 유발된 생쥐(MCD 지방간염 동물모델 1)에 본 발명의 일 구체예에 따른 엑소솜을 처리한 결과, 간 조직 내의 염증 및 지방이 감소된 것을 나타내는 간 조직 염색 사진이다.
- [63] 도 13은 MCD 지방간염 동물모델 1에 본 발명의 일 구체예에 따른 엑소솜을 처리한 결과, 거대공포성 지방증(macrovesicular steatosis) 스코어, 미세수포성 지방증(microvesicular steatosis) 스코어, 및 염증 스코어가 감소한 결과를 나타내는 그래프이다.
- [64] 도 14는 비알콜성 지방간염이 유발된 생쥐(MCD 지방간염 동물모델 2)에 본 발명의 일 구체예에 따른 엑소솜을 처리한 결과, 혈중 트리글리세라이드 및 유리지방산(free fatty acid) 수치가 증가하고, ALT(alanine aminotransferase) 및 AST(aspartate aminotransferase) 수치가 감소한 결과를 나타내는 그래프이다.
- [65] 도 15는 MCD 지방간염 동물모델 2에 본 발명의 일 구체예에 따른 엑소솜을 처리한 결과, 미세수포성 지방증(microvesicular steatosis) 스코어 및 비대증(hypertrophy) 스코어가 감소한 결과를 나타내는 그래프이다.
- [66] 도 16은 MCD 지방간염 동물모델 2에 본 발명의 일 구체예에 따른 엑소솜을 처리한 결과, 간조직 내 TBARS 함량이 감소한 결과를 나타내는 그래프이다.

### 발명의 실시를 위한 형태

- [67] 이하 본 발명을 하기 실시예에서 보다 상세하게 기술한다. 다만, 하기 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 권리범위를 제한하거나 한정하는 것이 아니다. 본 발명의 상세한 설명 및 실시예로부터 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 기술자가 용이하게 유추할 수 있는 것은 본 발명의 권리범위에 속하는 것으로 해석된다. 본 발명에 인용된 참고문헌들은 본 발명에 참고로서 통합된다.
- [68] 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성 요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성 요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[69]

#### [70] 실시예

##### [71] 실시예 1: 세포의 배양

- [72] 마우스 대식세포주인 RAW264.7은 한국세포주은행에서 구입하여 배양하였다. 세포 배양을 위해 10% 우태아 혈청 (fetal bovine serum: ThermoFisher Scientific에서 구입) 및 1% 항생제-항진균제 (antibiotics-antimycotics: ThermoFisher Scientific에서 구입)가 함유된 DMEM (ThermoFisher Scientific에서 구입) 배지에 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 조건에서 계대 배양하였다.

- [73] 인체 피부 섬유아세포(human dermal fibroblast)인 HS68 세포는 ATCC에서

구입하여, 10% 우태아 혈청 (fetal bovine serum: ThermoFisher Scientific에서 구입) 및 1% 항생제-항진균제 (antibiotics-antimycotics: ThermoFisher Scientific에서 구입)가 함유된 DMEM (ThermoFisher Scientific에서 구입) 배지에 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 조건에서 계대 배양하였다.

[74] 당해 발명이 속하는 기술분야에 알려진 세포배양 방법에 따라 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 조건에서 지방 유래 줄기세포를 배양하였다. 그 다음, 인산염 완충용액(phosphate-buffered saline)(ThermoFisher Scientific에서 구입)으로 세척 후, 무혈청, 무페놀레드 배지로 교체하여 1일 내지 10일간 배양하고 그 상층액(이하, 배양액)을 회수하였다.

[75] 엑소좀의 분리 과정에서 입자크기 분포가 균일하고 순도가 높은 엑소좀을 수득하기 위하여 배양액에 트레할로오스를 2 중량% 첨가하였다. 트레할로오스를 첨가한 후 배양액을 0.22 µm 필터로 여과하여 세포 잔해물, 노폐물 및 거대 입자 등의 불순물을 제거해 주었다. 여과된 배양액은 즉시 분리 과정을 통해 엑소좀을 분리하였다. 또한, 여과된 배양액은 냉장고(영상 10°C 이하)에서 보관한 후 엑소좀 분리에 사용하였다. 또한, 여과된 배양액은 -60°C 이하의 초저온 냉동고에서 동결 보관하였다가 해동시킨 후 엑소좀 분리를 수행하였다. 이후, 배양액으로부터 접선흐름여과장치(Tangential Flow Filtration; TFF)를 이용하여 엑소좀을 분리하였다.

[76]

[77] 실시예 2: TFF 방법에 의한 엑소좀의 분리 및 정제

[78] 실시예 1에서 0.22 µm 필터로 여과된 배양액으로부터 엑소좀을 분리, 농축, 탈염과 버퍼교환(diafiltration)을 위해 TFF(Tangential Flow Filtration) 방법을 사용하였다. TFF 방법을 이용하여 엑소좀을 분리, 농축하기 전 배양액을 초음파처리(sonication)하여 잠재적인 엑소좀의 덩어리를 풀어주었다. TFF 방법을 위한 필터로는 카트리지 필터(cartridge filter, 일명 hollow fiber filter; GE Healthcare에서 구입) 또는 카세트 필터(cassette filter; Pall 또는 Sartorius 또는 Merck Millipore에서 구입)를 사용하였다. TFF 필터는 다양한 분자량 차단(molecular weight cutoff; MWCO)에 의해 선택될 수 있다. 선택된 MWCO에 의해 선별적으로 엑소좀을 분리, 농축하였고, MWCO보다 작은 입자나 단백질, 지질, 핵산, 저분자 화합물 등은 제거하였다.

[79] 엑소좀을 분리, 농축하기 위하여 MWCO 100,000 Da(Dalton), 300,000 Da, 또는 500,000 Da의 TFF 필터를 사용하였다. 배양액을 TFF 방법을 이용하여 1/100 내지 1/25 정도의 부피가 될 때까지 농축하면서, MWCO보다 작은 물질들은 제거하여 엑소좀을 분리하였다.

[80] 분리, 농축된 엑소좀 용액은 TFF 방법을 이용하여 추가로 탈염과 버퍼교환(diafiltration)을 수행하였다. 이때, 탈염과 버퍼교환은 연속적으로 수행(continuous diafiltration)하거나 단속적으로 수행(discontinuous diafiltration)하였으며, 시작 부피(starting volume)에 대하여 적어도 4배,

바람직하게는 6배 내지는 10배 이상, 보다 바람직하게는 12배 이상의 부피를 갖는 완충용액을 이용하여 수행하였다. 완충용액에는 입자크기 분포가 균일하고 순도가 높은 엑소솜을 수득하기 위하여 PBS에 녹인 2 중량%의 트레할로오스를 첨가하였다. 트레할로오스 처리에 따라 고순도이면서 입자크기 분포가 균일한 엑소솜을 높은 수율로 수득할 수 있는 효과를 확인한 결과는 도 6A 내지 도 6E에 도시하였다.

[81]

[82] 실시예 3: 분리된 엑소솜의 특성 분석

[83]

분리된 엑소솜, 배양액, 및 TFF 분리과정의 분획물에서 단백질의 양은 BCA 발색법(ThermoFisher Scientific에서 구입) 또는 플루오로프로파일(FluoroProfile) 형광법(Sigma에서 구입)을 이용하여 측정하였다. 본 발명의 일 구체예의 TFF 방법에 의해 엑소솜이 분리, 농축되고 단백질, 지질, 핵산, 저분자 화합물 등이 제거되는 정도는 단백질 정량법에 의하여 모니터링하여 그 결과를 도 2에 도시하였다. 그 결과 본 발명의 일 구체예의 TFF 방법에 의하여 매우 효과적으로 배양액에 존재하는 단백질이 제거됨을 알 수 있었다.

[84]

본 발명의 일 구체예의 TFF 방법에 의해 엑소솜을 분리하는 경우 생산성과 순도를 독립적인 다섯 배치에서 비교한 결과를 도 3에 도시하였다. 독립적인 다섯 배치로부터 얻어진 결과를 분석한 결과, 본 발명의 일 구체예의 TFF 방법에 의하여 매우 안정적으로 엑소솜을 분리할 수 있음을 확인하였다.

[85]

분리된 엑소솜은 나노입자 트래킹 분석(nanoparticle tracking analysis: NTA; Malvern에서 구입) 또는 가변 저항펄스 감지(tunable resistive pulse sensing: TRPS; Izon Science에서 구입)에 의해 입자의 크기와 농도를 측정하였다. 분리된 엑소솜의 균일도와 크기는 투과전자현미경(transmitted electron microscopy: TEM)을 이용하여 분석하였다. 본 발명의 일 구체예에 따라 분리된 엑소솜의 TRPS, NTA, TEM 분석 결과는 도 4A 내지 도 4C에 도시하였다.

[86]

TFF 방법으로 엑소솜을 분리한 후, 트레할로오스의 첨가 여부에 따른 엑소솜의 크기 분포를 NTA 분석한 결과를 도 5A 내지 도 5C에 도시하였다. 트레할로오스 농도를 0 중량%, 1 중량% 및 2 중량%로 증가시켰고(도 5A 내지 도 5C의 위에서부터 아래), 3회 반복하여 실험하였다. 트레할로오스가 존재하지 않은 경우 300 nm 이상의 크기를 갖는 입자가 확인되는 반면, 트레할로오스의 첨가량을 늘려주면 300 nm 이상의 크기를 갖는 입자가 줄어들고 엑소솜의 크기 분포가 균일해지는 것을 확인하였다.

[87]

TFF 방법으로 엑소솜을 분리하는 과정에 트레할로오스의 첨가에 따른 효과를 추가로 조사하였다. 도 6A 내지 도 6C에서 보는 바와 같이 TFF 전과정에 PBS에 녹인 2 중량%의 트레할로오스를 첨가한 경우, 균일한 크기 분포를 갖는 엑소솜을 얻을 수 있었다(도 6A). 반면 트레할로오스를 첨가하지 않고 동결 보관하였던 배양액을 사용하되, 탈염과 버퍼교환 과정에서만 트레할로오스를 첨가하여 TFF 과정을 진행한 경우나, 트레할로오스를 전혀 첨가하지 않고 TFF

과정을 진행한 경우, 크기가 큰 입자가 많이 포함된 불균일한 엑소좀을 얻었다(도 6B 및 도 6C).

[88] 분리된 엑소좀의 상대적인 생산성과 농도를 비교한 결과, TFF 전과정에 트레할로오스를 첨가한 경우 매우 높은 생산성으로 엑소좀을 얻을 수 있었으며, 얻어진 엑소좀의 농도도 5배 이상 높았다(도 6D). NTA 분석 결과에서 나타난 바와 같이, 분리된 엑소좀의 평균 크기도 TFF 전과정에 트레할로오스를 첨가한 경우 200 nm로 균일하게 확인되었다(도 6E).

[89] 도 4D는 본 발명의 일 구체예의 방법에 따라 분리된 엑소좀에 대해 웨스턴 블랏을 수행한 결과로서, CD9, CD63, CD81 및 TSG101 마커의 존재를 확인하였다. 각 마커에 대한 항체로는 각각 항-CD9 (Abcam에서 구입), 항-CD63 (System Biosciences에서 구입), 항-CD81 (System Biosciences에서 구입), 및 항-TSG101 (Abcam에서 구입)을 사용하였다.

[90] 도 4E는 본 발명의 일 구체예의 방법에 따라 분리된 엑소좀에 대해 유세포분석기를 이용하여 분석한 결과로서 CD63 및 CD81 마커의 존재를 확인하였다. CD63에 대해 양성(positive)인 엑소좀을 분리하기 위하여 엑소좀-휴먼 CD63 분리/검출 키트(ThermoFisher Scientific에서 구입)를 제조사의 방법에 따라 사용하였고, PE-마우스 항-인간 CD63 (PE-Mouse anti-human CD63)(BD에서 구입) 및 PE-마우스 항-인간 CD81 (PE-mouse anti-human CD81)(BD에서 구입)을 사용하여 마커를 염색한 후, 유세포분석기 (ACEA Biosciences)를 이용하여 분석하였다.

[91] 상기 결과들을 종합하면, 본 발명은 접선희름여과를 이용한 분리 및/또는 정제 과정에서 트레할로오스를 첨가하여 고순도이면서 입자크기 분포가 균일한 엑소좀을 높은 수율로 경제적이면서 효율적으로 분리 및 정제할 수 있음을 확인할 수 있었다. 또한, 본 발명의 일 구체예의 분리방법의 공정들은 스케일-업이 가능하고 GMP에도 적합함을 알 수 있었다.

[92]

[93] 실시예 4: 엑소좀 처리에 따른 세포 독성 측정

[94] 인체 피부 섬유아세포인 HS68 세포에서 본 발명의 일 구체예의 분리 방법에 따라 수득된 엑소좀의 독성을 평가하기 위해 세포에 농도별로 엑소좀을 처리하고 세포의 증식율을 확인하였다. HS68 세포를 10% FBS를 포함한 DMEM에 세포를 현탁시킨 후 80 내지 90%의 밀집도(confluency)를 갖도록 분주하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 24시간 배양하였다. 24시간 후, 배양액을 제거하고 실시예 2에서 준비된 엑소좀을 농도 별로 처리하여 24 내지 72시간 동안 배양하면서 세포 생존율을 평가하였다. 세포 생존율을 WST-1 시약(WST-1 reagent)(Takara에서 구입), MTT 시약(Sigma에서 구입), 셀타이터-글로 시약(CellTiter-Glo reagent)(Promega에서 구입), 또는 아라마르 블루 시약(AlamarBlue reagent)(ThermoFisher Scientific에서 구입)과 마이크로플레이트 리더(microplate reader)(Molecular Devices에서 구입)를 이용하여 측정하였다.

[95] 비교군은 엑소좀이 처리되지 않은 일반 세포배양배지에서 배양된 세포수를 기준으로 하였고, 시험된 농도 범위 내에서 본 발명의 엑소좀에 의한 세포 독성이 나타나지 않음을 확인하였다(도 7).

[96]

[97] 실시예 5: 마크로파지 세포주를 이용한 염증 반응 측정

[98] RAW264.7 세포를 10% FBS를 포함한 DMEM 배지에 현탁시키고 이를 멀티웰 플레이트(multiwell plate)의 각 웰에 80 내지 90%의 밀집도(confluency)를 갖도록 분주하였다. 다음 날 LPS가 포함된 새로운 무혈청 배지에 희석한 본 발명의 엑소좀 (실시예 2에서 준비된 엑소좀)을 적정 농도로 1~24시간 동안 처리하여 배양하였다. 배양이 끝난 배양상층액을 취하고 배양액 내에 존재하는 NO 및 염증성 사이토카인을 측정하여 염증 반응을 확인하였다. 배양액 내의 염증 반응은 NO 검출키트(detection kit)(인트론바이오 혹은 프로메가에서 구입)를 이용하여 측정하였다. ELISA 키트 (R&D system에서 구입) 제조사의 매뉴얼대로 수행하여 LPS만을 처리한 군과 본 발명의 엑소좀이 함께 처리된 군의 염증성 사이토카인 TNF- $\alpha$  양을 확인하였다. 양성대조군으로 덱사메타손(dexamethasone) (Sigma에서 구입)을 처리하였다. 또한, 위와 같이 처리된 RAW264.7 세포로부터 얻은 총 RNA로부터 cDNA를 제조하였고 리얼타임 PCR 방법을 이용하여 TNF- $\alpha$  및 IL-6의 mRNA 변화량을 측정하였다. 상기 유전자들을 정량하기 위한 표준 유전자로서 GAPDH 유전자를 사용하였다. 리얼타임 PCR에 사용한 프라이머의 종류와 서열은 하기의 표 1과 같다.

[99]

[표1]

리얼타임 PCR에 사용된 프라이머 종류 및 염기서열

유전자	서열	
	정방향 프라이머 (5' → 3')	역방향 프라이머 (5' → 3')
TNF- $\alpha$	TCT CAT CAG TTC TAT GGC CCA GAC (서열번호 1)	GGC ACC ACT AGT TGG TTG TCT TTG (서열번호 2)
IL-6	GCC AGA GTC CTT CAG AGA GAT ACA (서열번호 3)	ATT GGA TGG TCT TGG TCC TTA GCC (서열번호 4)
GAPDH	GAC ATC AAG AAG GTG GTG AAG CAG (서열번호 5)	CCC TGT TGC TGT AGC CGT ATT CAT (서열번호 6)

[100] 친염증성 사이토카인으로 알려진 IL-6와 TNF- $\alpha$ 의 합성은 다양한 형태의 간 손상에 있어서 초기에 나타나는 현상들 중의 하나이다. TNF- $\alpha$ 는 인간과 동물의 비알콜성 지방간염(NASH)으로의 진행에 있어 중요한 역할을 하는 물질임이 보고된 바가 있고, 비알콜성 지방간염 환자의 간과 지방 조직에서 과발현된다(World J Gastroenterol 2012 February 28; 18(8): 727-735). 또한, 비알콜성 지방간염 동물 실험 모델에서 항-TNF- $\alpha$  항체를 처리하면 염증이

감소한다. 그리고 IL-6는 비알콜성 지방간염 환자의 혈청에서 농도가 증가되고, IL-6 유전자를 녹아웃시킨 마우스에서 비알콜성 지방간염이 감소된 것이 보고된 바가 있다(World J Gastroenterol 2012 February 28; 18(8): 727-735). 또한, IL-6는 시험관내(in vitro), 생체외(ex vivo) 및 인간 생체내(in vivo)에서 지방 산화(fat oxidation)를 증가시키는 것이 보고된 바가 있다(Tilg H, The Role of Cytokines in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease, Dig Dis 2010;28:179-.185). 따라서, 염증반응에 관여하는 대식세포에서 TNF- $\alpha$  및 IL-6의 생성량이나 발현량 변화를 분석하면 본 발명의 엑소솜이 간 세포 또는 간 조직 내의 염증을 감소 내지는 완화시키는 시험관내 효능을 평가할 수 있다. 이와 관련하여, 도 8에 도시된 바와 같이 생쥐의 대식세포인 RAW264.7 세포에 대해 LPS와 함께 본 발명의 엑소솜을 처리한 경우 친염증성 사이토카인으로서 비알콜성 지방간염의 발병 및 진행과 밀접한 관련이 있는 TNF- $\alpha$  및 IL-6의 mRNA 발현량이 감소한 것을 확인할 수 있었다.

[101] 다음으로, 도 9에 도시된 바와 같이, 생쥐의 대식세포인 RAW264.7 세포에 LPS 존재 하에서 본 발명의 엑소솜을 처리한 결과 LPS에 의해 유도되는 염증 반응인 NO 생성을 농도의존적으로 감소시킴을 확인하였다. 또한, 도 10에 도시된 바와 같이, 생쥐의 대식세포인 RAW264.7 세포에 LPS 존재 하에서 본 발명의 엑소솜을 처리한 결과 LPS에 의해 유도되는 염증성 사이토카인인 TNF- $\alpha$  생성을 감소시킴을 확인하였다.

[102] 상기와 같은 결과들은 본 발명의 엑소솜이 비알콜성 단순 지방간 또는 비알콜성 지방간염의 예방, 완화, 개선 또는 치료를 위해 유용한 기능적 활성, 즉 간 세포 또는 간 조직 내의 염증을 감소 내지는 완화시키는 활성을 갖는 것을 강력히 시사한다. 즉, 본 발명의 엑소솜을 유효성분으로 포함하는 조성물은 친염증성 사이토카인으로서 비알콜성 지방간염의 발병 및 진행과 밀접한 관련이 있는 TNF- $\alpha$  및 IL-6의 발현량 내지 생성량을 감소시키고, 이를 통해 비알콜성 단순 지방간 또는 비알콜성 지방간염을 완화 내지는 개선시킬 수 있을 것으로 기대된다.

[103]

[104] 실시예 6: 분리 방법에 따른 NO 형성 감소 효과의 비교

[105] 분리 방법에 따른 엑소솜의 NO 형성 감소 효과를 비교하기 위하여 본 발명의 일 구체예의 TFF 분리 정제에 의해 얻어진 엑소솜 이외에 종래의 침전법에 의해 분리된 엑소솜을 준비하였다. 침전법은 제조사(System Biosciences)의 프로토콜에 따라 시행하였다. 종래의 침전법에 의해 분리된 엑소솜(도 11A 참조)은 본 발명의 일 구체예의 TFF 방법에 의해 분리 정제된 엑소솜(도 11B 참조)과 비교하여 입자크기 분포의 균일도가 낮고 다양한 크기를 갖는 것을 확인하였다. 또한, 도 11C에 도시한 바와 같이 본 발명의 일 구체예의 TFF 방법에 의해 분리 정제된 엑소솜은 종래의 침전법에 의해 얻어진 엑소솜에 비해 훨씬 높은 수준으로 NO 형성을 억제함을 확인하였다. 이러한 결과들은 본 발명의 일

구체예에 따라 분리 정제된 엑소좀이 종래 방법에 따라 분리된 엑소좀에 비해 입자크기 분포의 균일도와 NO 형성 억제 측면에서 우수하다는 것을 보여주고 있다.

[106] 따라서, 본 발명의 일 구체예의 분리 방법에 따라 수득된 엑소좀은 종래의 분리 방법에 따라 수득된 엑소좀과 비교하여 성능 또는 기능적 활성(예를 들어, 입자크기 분포의 균일성, NO 생성 억제, 염증 반응 감소 등)이 훨씬 우수하고, 이와 같이 기능적 활성이 우수한 줄기세포 유래의 엑소좀을 유효성분으로 함유하는 본 발명의 조성물은 비알콜성 단순 지방간 또는 비알콜성 지방간염의 예방, 완화, 개선 또는 치료 면에서 종래기술 보다 훨씬 우수하다고 할 수 있다.

[107]

[108] 실시예 7: 비알콜성 지방간염 동물모델(MCD 지방간염 동물모델 1)

[109] 수컷 C57BL/6JmsSlc 생쥐(5주령, 중앙실험동물에서 구입)를 구매하여 7일 동안의 적응기를 통해 본 실험에 사용하였다. 적응기를 거친 생쥐는 아래와 같이 3군으로 분류하였다:

[110] (1) Normal("N"으로 표기): 정상 식이를 급여한 정상 대조군;

[111] (2) Vehicle(비알콜성 MCD 지방간염 유도군)("V"로 표기): MCD(Methionine Choline Deficient) 식이(새론바이오에서 구입)를 8주간 급여하여 비알콜성 지방간염을 유발한 음성 대조군;

[112] (3) 본 발명의 엑소좀 및/또는 세포외 소포체 처리군("E"로 표기): MCD 식이를 8주간 급여하여 비알콜성 지방간염을 유발한 후 실시예 2에서 준비된 엑소좀을 개체 당 0.8  $\mu\text{g}$ 의 용량으로 주 3회씩 2주간 혈관 내 투여(IV: intravenous injection)한 실험군.

[113] 실험시작 후 10주째에 생쥐를 희생시키고 부검하여 얻은 간 조직을 H&E 염색 및 오일 레드 O (Oil Red O) 염색을 하였다. H&E 염색 슬라이드를 관찰하여 검경을 진행하였다. 오일 레드 O 염색은 지방 면적을 분석하기 위하여 진행하였다. 그리고 간세포의 풍선변형(hepatocellular ballooning degeneration), 간 소엽 내 염증(lobular inflammation), 간문맥 염증(portal inflammation) 등과 같은 조직 병리를 관찰하였다.

[114] 도 12에 도시된 바와 같이, H&E 염색 결과로부터 본 발명의 엑소좀(실시예 2에서 준비된 엑소좀) 처리에 의해 간 조직 내의 염증이 감소한 것을 확인하였고, 오일 레드 O 염색 결과로부터는 본 발명의 엑소좀 처리에 의해 간 조직 내의 지방이 감소한 것을 확인하였다.

[115] 한편, 거대공포성 지방증(macrovesicular steatosis) 스코어, 미세수포성 지방증(microvesicular steatosis) 스코어, 비대증(hypertrophy) 스코어, 및 염증(inflammation) 스코어는 하기 표 2의 기준에 따라 채점하였다.

[116] [표2]  
조직학적 기준 (Histological criteria)

조직학적 특성	스코어(score)			
	0	1	2	3
지방증				
거대공포성 지방증	< 5 %	5-33 %	33-66 %	> 66 %
미세수포성 지방증	< 5 %	5-33 %	33-66 %	> 66 %
비대증 (Hypertrophy)	< 5 %	5-33 %	33-66 %	> 66 %
염증				
염증 병소 수/필드(Number of inflammatory foci/field)	< 0.5	0.5-1.0	1.0-2.0	> 2.0

[117] 상기 표 2와 같은 기준에 의거하여 지방증 스코어 및 염증 스코어를 채점한 결과, 본 발명의 엑소좀(실시에 2에서 준비된 엑소좀) 처리에 의해 거대공포성 지방증(Macrovesicular steatosis) 스코어, 미세수포성 지방증(Microvesicular steatosis) 스코어 및 염증 스코어가 감소한 것을 확인하였다(도 13A 내지 도 13C). 따라서, 본 발명의 엑소좀은 간 조직 내 지방 축적, 간지방증 및 간 조직 내의 염증을 감소시킬 수 있고, 간 조직 내 지방축적이 일어난 상태, 간 지방증 상태, 간 조직 내의 지방 축적이 심해진 결과 간 조직 내에 염증반응이 일어난 질병 상태로 정의되는 비알콜성 단순 지방간 및/또는 비알콜성 지방간염을 완화, 개선 또는 호전시키는 효과가 있다고 할 수 있다.

[118]

[119] 실시예 8: 비알콜성 지방간염 동물모델(MCD 지방간염 동물모델 2)

[120] 수컷 C57BL/6JJmsSlc 생쥐(5주령, 중앙실험동물에서 구입)를 구매하여 7일 동안의 적응기를 통해 본 실험에 사용하였다. 적응기를 거친 생쥐는 아래와 같이 5군으로 분류하였다:

[121] (1) Normal(도 14에서 "N"으로 표기): 정상 식이를 급여한 정상 대조군;

[122] (2) Vehicle(비알콜성 MCD 지방간염 유도군)(도 14에서 "V"로 표기): MCD(Methionine Choline Deficient) 식이(새론바이오에서 구입)를 13주간 급여하여 비알콜성 지방간염을 유발한 음성 대조군;

[123] (3) 본 발명의 엑소좀 처리군(도 14에서 "E"로 표기): MCD 식이를 13주간 급여하여 비알콜성 지방간염을 유발한 후 실시예 2에서 준비된 엑소좀을 개체당 0.03 µg, 0.15 µg 또는 0.8 µg의 용량으로 주 3회씩 4주간 혈관 내 투여(IV: intravenous injection)한 실험군;

[124] (4) 실리마린(Silymarin)(도 14에서 "S"로 표기): 상기와 같이 비알콜성 지방간염을 유발한 후, 실리마린을 200 mg/kg의 용량으로 매일 4주간 경구

투여한 실험군;

- [125] (5) 둘라글루타이드(dulaglutide)(도 14에서 "D"로 표기): 상기와 같이 비알콜성 지방간염을 유발한 후, 둘라글루타이드를 2 nmol/kg의 용량으로 이틀에 한번씩 4주간 피하 투여한 실험군.
- [126] 실험시작 후 17주째에 생쥐를 희생시키고 부검 시 채혈하여 혈액을 분석하였고, 부검하여 얻은 간 조직을 분석하였다.
- [127] 상기와 같이 얻은 혈액으로부터 분리한 혈청에 대해, 혈액생화학분석기(7180 히다찌에서 구입) 또는 ELISA 키트를 이용하여, 트리글리세라이드, 유리지방산(free fatty acid), ALT(alanine aminotransferase) 및 AST(aspartate aminotransferase) 수치를 분석하였다.
- [128] 그 결과, 본 발명의 엑소솜(실시예 2에서 준비된 엑소솜) 처리군에서 음성 대조군에 비해 혈중 트리글리세라이드(triglyceride; TG) 및 유리지방산(free fatty acid; FFA) 수치가 유의적으로 증가하였고, ALT(alanine aminotransferase) 및 AST(aspartate aminotransferase) 수치가 유의적으로 감소한 것을 확인하였다(도 14A 내지 도 14D). 본 발명의 엑소솜에 의한 혈중 트리글리세라이드 및 유리지방산(free fatty acid) 수치의 증가는 본 발명의 엑소솜이 간 조직 내 지방축적을 감소시키는 효과가 있음을 의미한다.
- [129] 또한, 부검하여 얻은 간 조직에 대해 조직 병리를 관찰하였고, 상기 표 2와 같은 기준에 의거하여 지방증 스코어를 부여하고 계산하였다. 그 결과, 본 발명의 엑소솜(실시예 2에서 준비된 엑소솜) 처리군에서 음성 대조군에 비해 미세수포성 지방증(Microvesicular steatosis) 스코어 및 비대증(hypertrophy) 스코어가 유의적으로 감소한 것을 확인하였다(도 15A 및 도 15B).
- [130] 추가로, 간 조직을 균질화시키고 균질물에 대해 TBARS(thiobarbituric acid) 분석을 수행하였다. TBARS 분석(Lipid peroxidation assay)을 위하여 지질 과산화 비색분석키트(Lipid Peroxidation (MDA) colorimetric assay kit)(Biovision, K739)를 사용하였다. 간 조직 10 mg을 300  $\mu$ L의 MDA 버퍼(BAT 3  $\mu$ L 포함)에 넣어 균질화하고 10분 동안 13,000 $\times$ g에서 원심분리한 후, 상층액 중 200  $\mu$ L를 분석샘플로 이용하였다. 0.1 M의 MDA 기준 물질을 희석하여 2 mM MDA 용액을 조제하였다. 증류수에 2 mM MDA 용액을 0, 2, 4, 6, 8, 10  $\mu$ L를 첨가하여 총 200  $\mu$ L의 기준 용액을 준비하였다. 이 기준 용액을 이용하여 MDA 표준곡선(standard curve)를 작성하여 분석에 이용하였다. 준비된 샘플 및 기준 물질 용액에 600  $\mu$ L의 TBA 용액을 넣어 95 °C에서 60 분간 반응시킨 뒤, 얼음에 10 분간 넣어 용액의 온도를 실온으로 낮추었다. 96 웰플레이트(well plate)에 200  $\mu$ L씩 분주한 후, 532 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도를 MDA 표준곡선(standard curve)에 대입하여 조직 내 MDA 양을 확인하여 TBARS(thiobarbituric acid) 함량을 정량하였다.
- [131] 그 결과, 본 발명의 엑소솜(실시예 2에서 준비된 엑소솜) 처리군에서 음성 대조군에 비해 TBARS(thiobarbituric acid) 함량이 유의적으로 감소한 것을

확인할 수 있었다(도 16). TBARS 함량은 조직의 과산화적 손상의 지표가 되므로, 본 발명의 엑소좀에 의한 TBARS 함량의 유의적인 감소는 간 조직 내 염증반응으로 인한 산화적 손상의 감소를 의미하고, 이는 궁극적으로 비알콜성 단순 지방간 및/또는 비알콜성 지방간염을 완화, 개선 또는 호전시키는 효과가 있음을 의미한다.

[132] 전술한 바와 같은 실험결과들을 종합하면, 본 발명의 엑소좀은 간 조직 내 지방 축적, 간지방증, 간 조직 내의 염증, 및 간 조직 내 염증반응으로 인한 산화적 손상을 감소시킬 수 있으므로, 비알콜성 단순 지방간 및/또는 비알콜성 지방간염을 완화, 개선 또는 호전시키는 효과가 있다고 할 수 있다.

[133] 이상, 본 발명을 상기 실시예를 들어 설명하였으나, 본 발명은 이에 제한되는 것이 아니다. 당업자라면 본 발명의 취지 및 범위를 벗어나지 않고 수정, 변경을 할 수 있으며 이러한 수정과 변경 또한 본 발명에 속하는 것임을 알 수 있을 것이다.

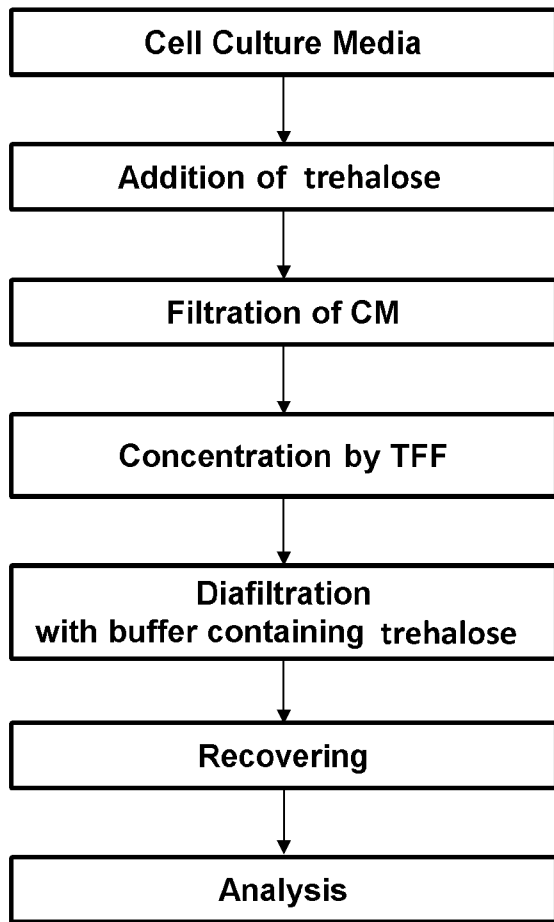
## 청구범위

- [청구항 1] 줄기세포 유래의 엑소좀을 유효성분으로 포함하는, 비알콜성 단순 지방간 또는 비알콜성 지방간염의 예방, 완화, 개선 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,  
상기 엑소좀은 하기의 단계들을 수행하여 수득되는, 약학 조성물:  
(a) 줄기세포 배양액에 트레할로오스를 첨가하는 단계, (b) 상기 트레할로오스가 첨가된 줄기세포 배양액을 여과하는 단계, (c) 상기 여과된 줄기세포 배양액으로부터, TFF(Tangential Flow Filtration)를 이용하여 엑소좀을 분리하는 단계, 및 (d) 탈염과 버퍼교환(diafiltration)에 사용되는 완충용액에 트레할로오스를 첨가하고, 상기 트레할로오스가 첨가된 완충용액을 이용한 TFF(Tangential Flow Filtration)를 이용하여, 상기 분리된 엑소좀에 대한 탈염과 버퍼교환(diafiltration)을 수행하는 단계.
- [청구항 3] 제2항에 있어서,  
상기 탈염과 버퍼교환은 연속적으로 수행하거나 단속적으로 수행하는 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.
- [청구항 4] 제2항에 있어서,  
시작 부피(starting volume)에 대하여 적어도 4배의 부피를 갖는 완충용액을 이용하여 탈염과 버퍼교환을 수행하는 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.
- [청구항 5] 제2항에 있어서,  
TFF(Tangential Flow Filtration)를 위해 MWCO(molecular weight cutoff) 100,000 Da, 300,000 Da, 500,000 Da 또는 750,000 Da의 TFF 필터, 또는 0.05  $\mu\text{m}$  TFF 필터를 사용하는 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.
- [청구항 6] 제2항에 있어서,  
상기 (c) 단계는 TFF(Tangential Flow Filtration)를 이용하여 1/100 내지 1/25의 부피까지 농축하는 과정을 더 포함하는, 약학 조성물.
- [청구항 7] 제2항에 있어서,  
상기 여과된 줄기세포 배양액은 TFF 전에 초음파처리(sonication)되는 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.
- [청구항 8] 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,  
상기 엑소좀은 거대공포성 지방증(Macrovesicular steatosis) 스코어, 미세수포성 지방증(Microvesicular steatosis) 스코어, 염증 스코어, 비대증(hypertrophy) 스코어, 및 TBARS(thiobarbituric acid) 수치를 감소시키는 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.
- [청구항 9] 제8항에 있어서,

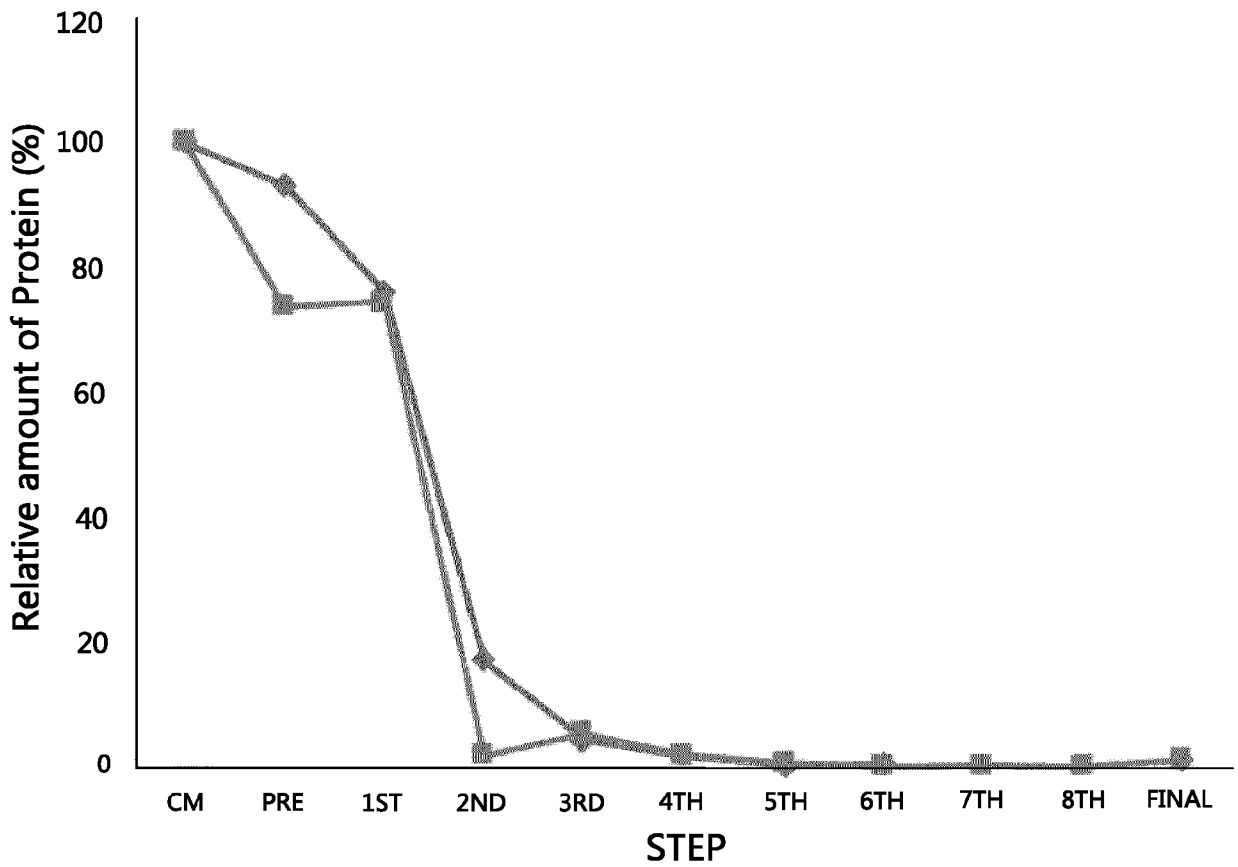
추가적으로, 상기 엑소좀은 혈중 트리글리세라이드 및 유리지방산 수치를 증가시키고, ALT(alanine aminotransferase) 및 AST(aspartate aminotransferase) 수치를 감소시키는 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

- [청구항 10] 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,  
상기 비알콜성 단순 지방간 또는 비알콜성 지방간염은 고지방 및 고과당 식이에 의하여 유발된 것임을 특징으로 하는, 약학 조성물.
- [청구항 11] 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,  
간 세포 또는 간 조직 내에 축적된 지질의 감소 및 제거에 사용되는 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.
- [청구항 12] 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 기재된 약학 조성물의 치료학적으로 유효한 양을 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하는, 비알콜성 단순 지방간 또는 비알콜성 지방간염의 예방, 개선, 완화 또는 치료하는 방법.

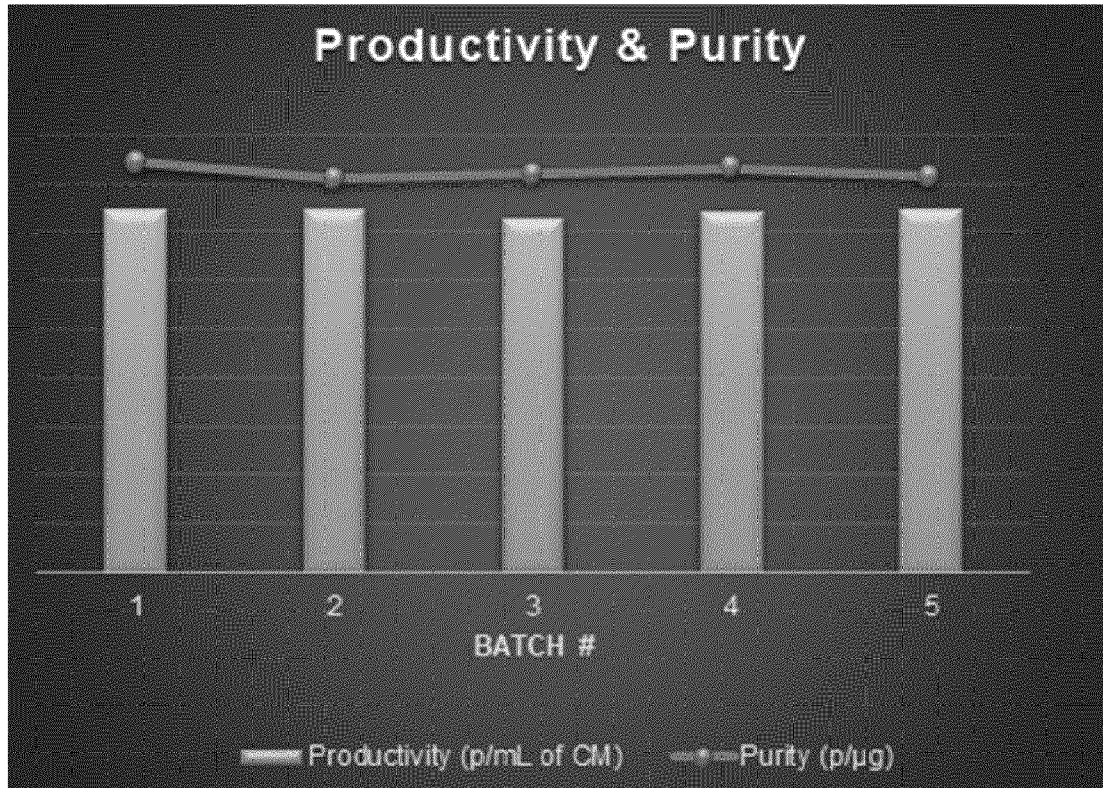
[도1]



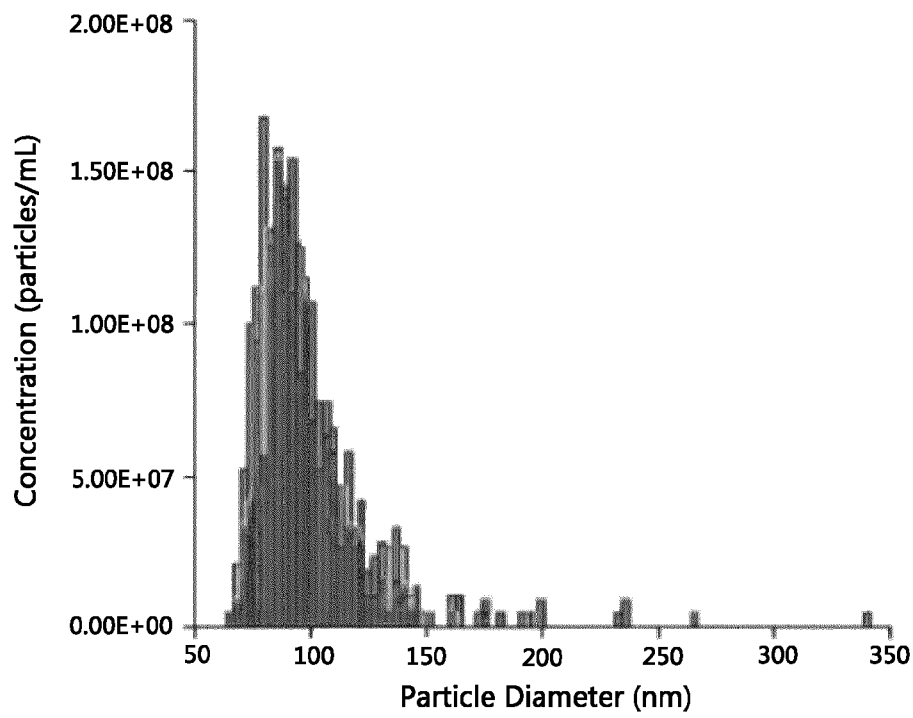
[도2]



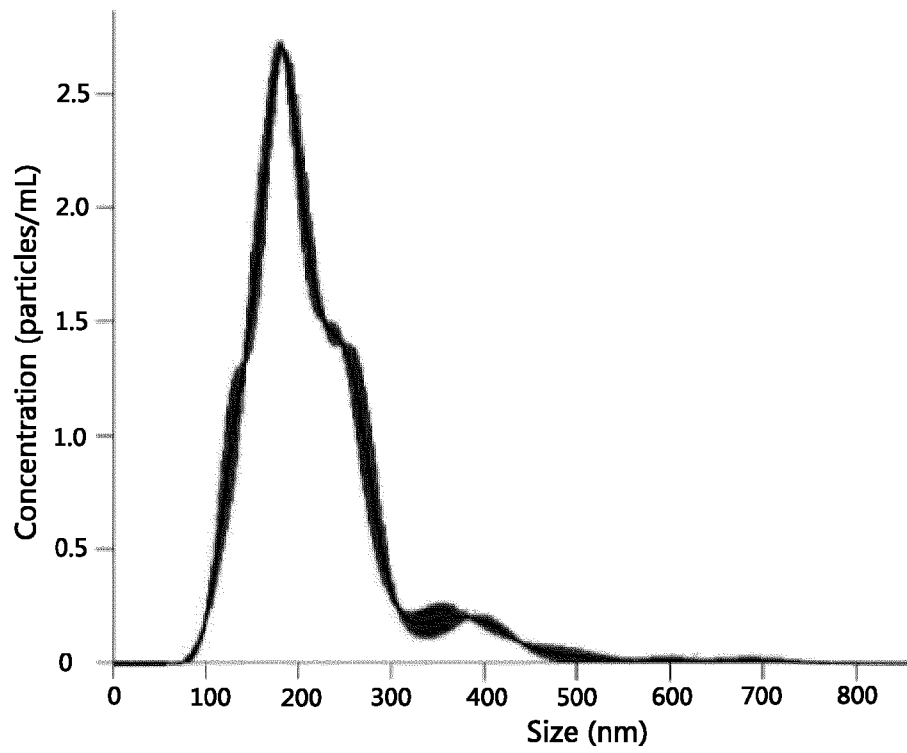
[도3]



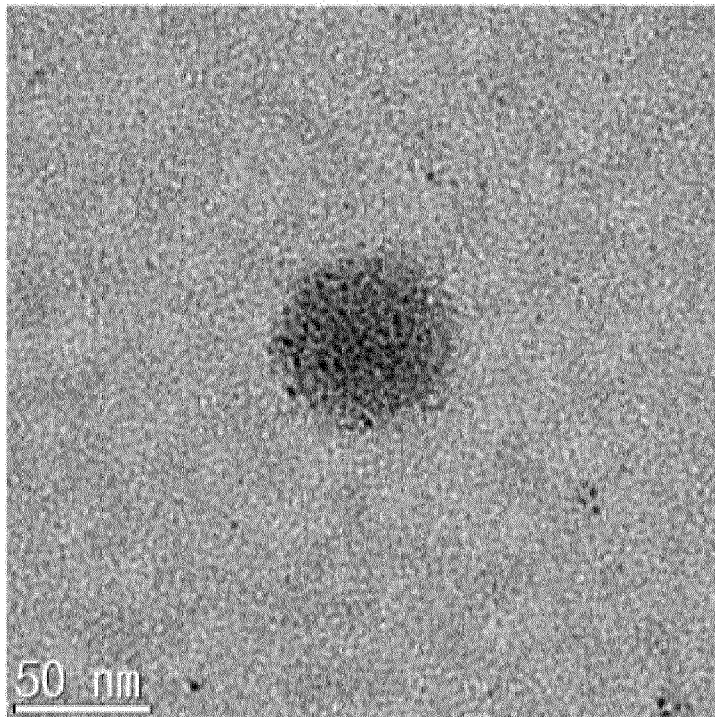
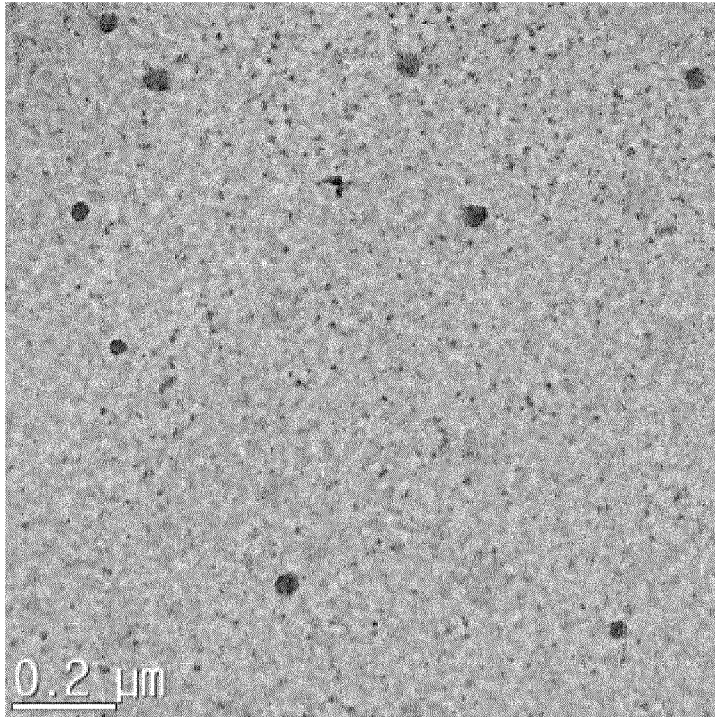
[도4a]



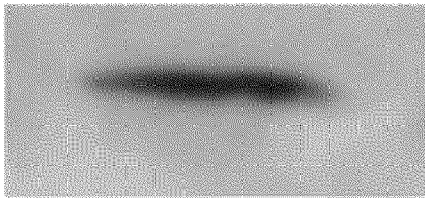
[도4b]



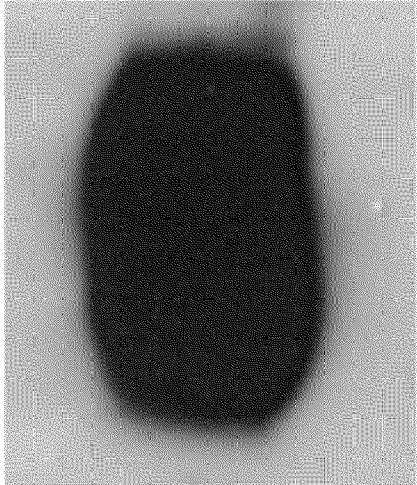
[도4c]



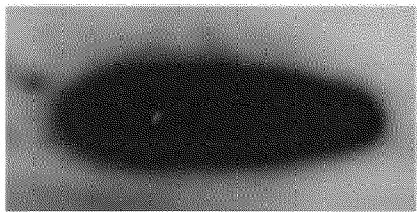
[도4d]



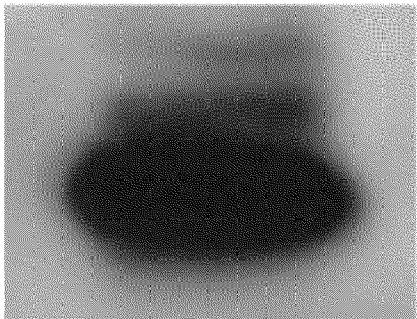
**CD9**



**CD63**

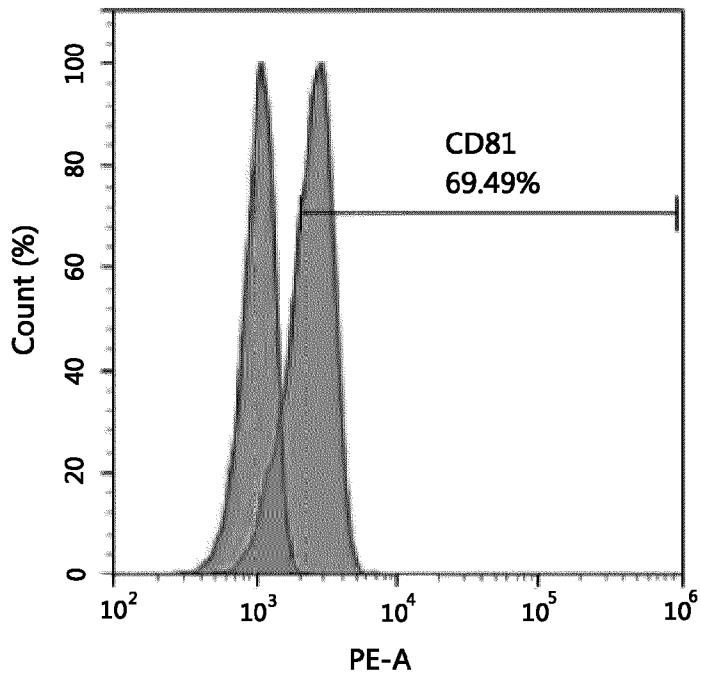
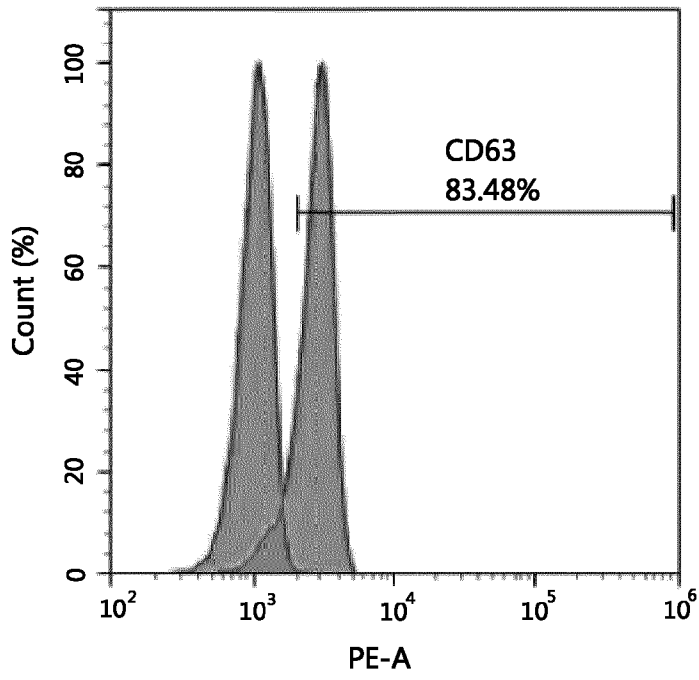


**CD81**

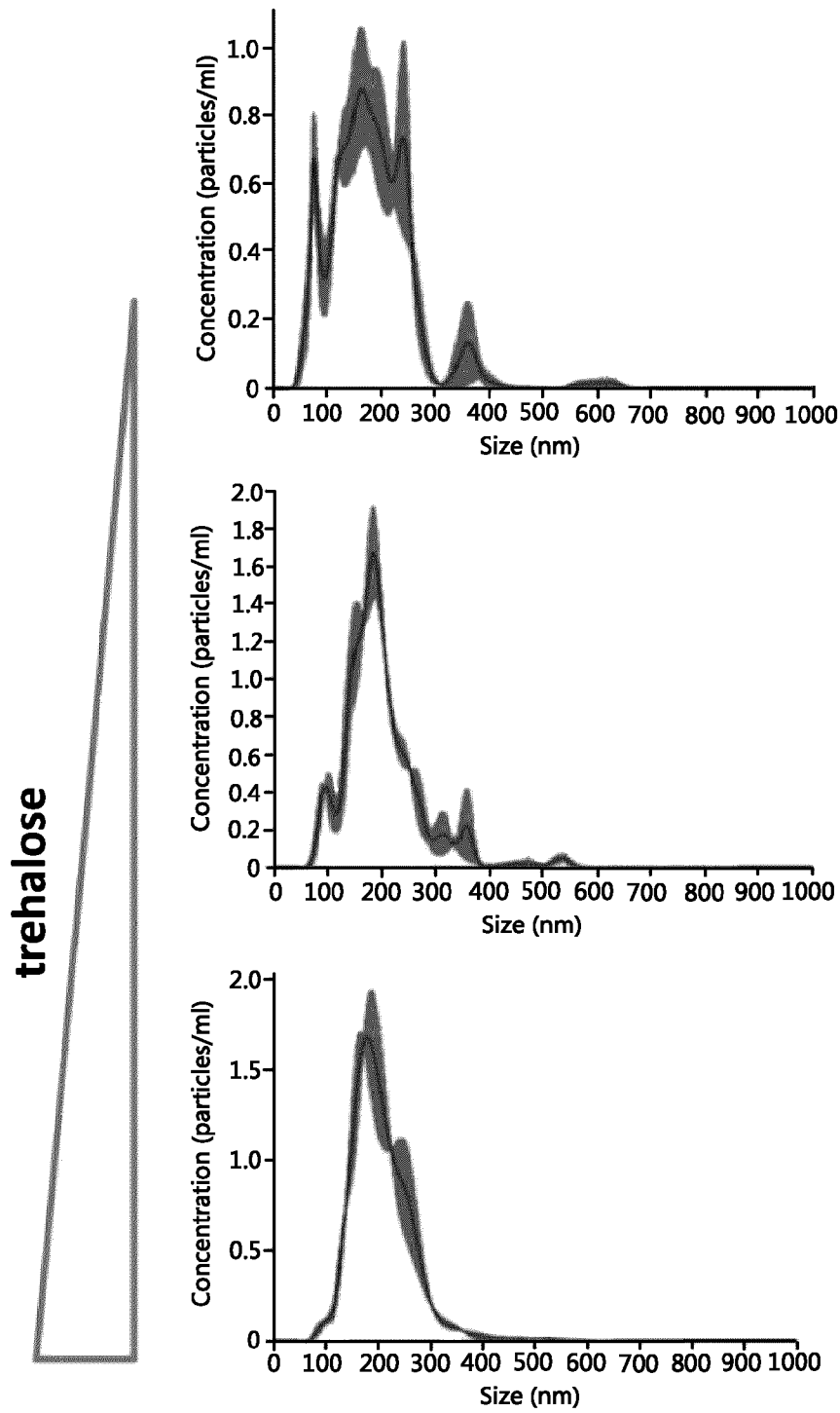


**TSG101**

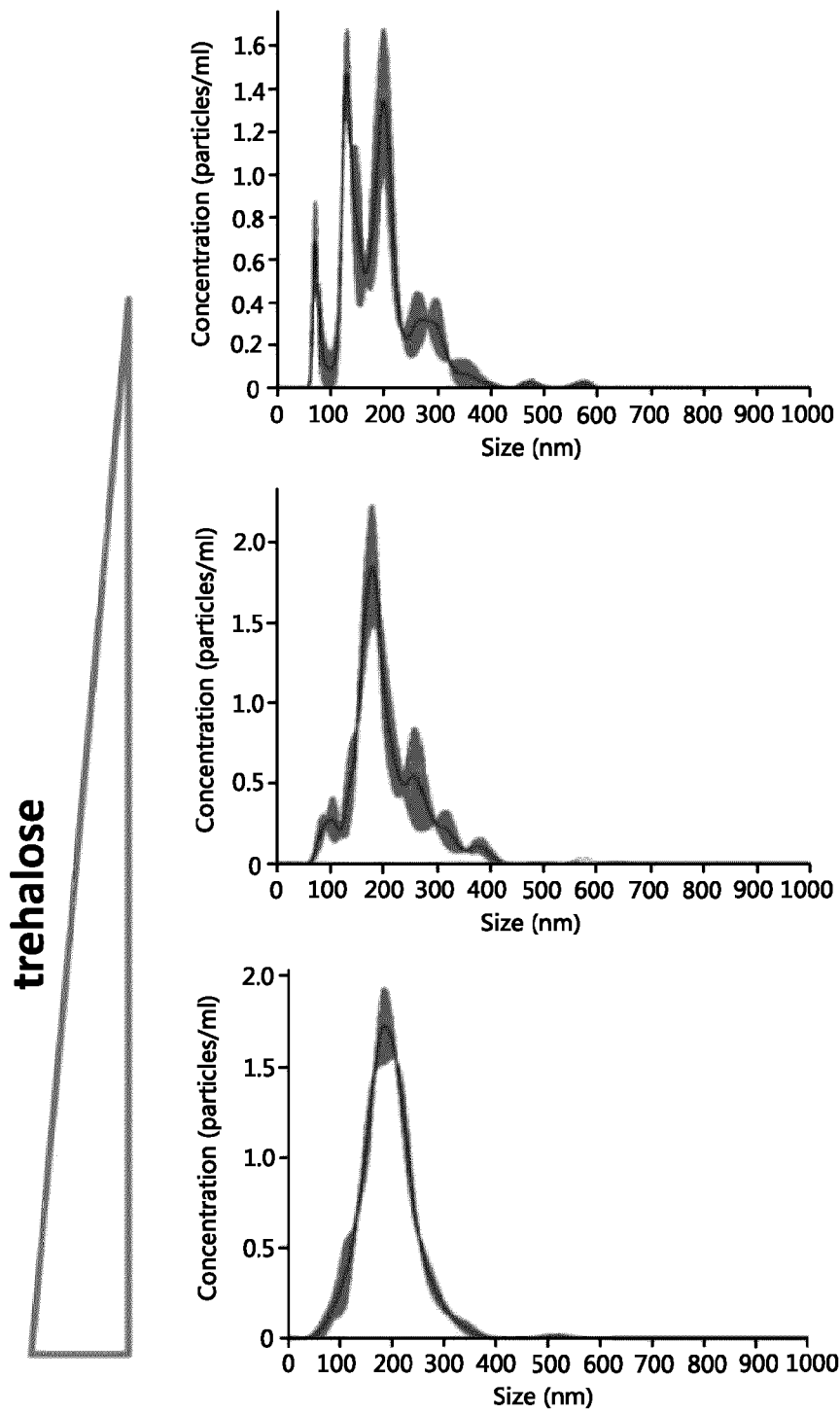
[도4e]



[도5a]

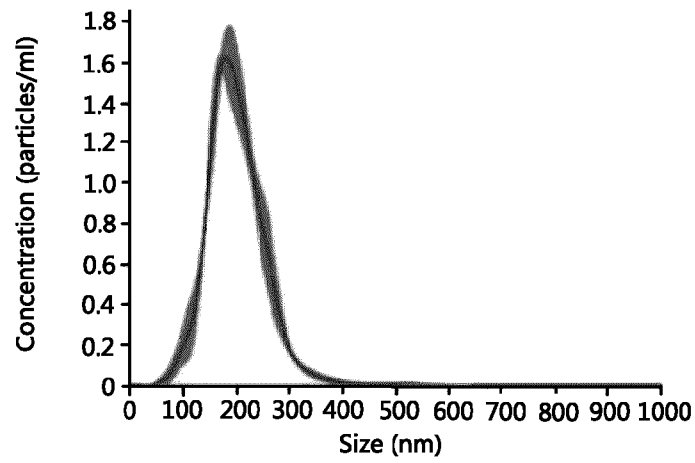
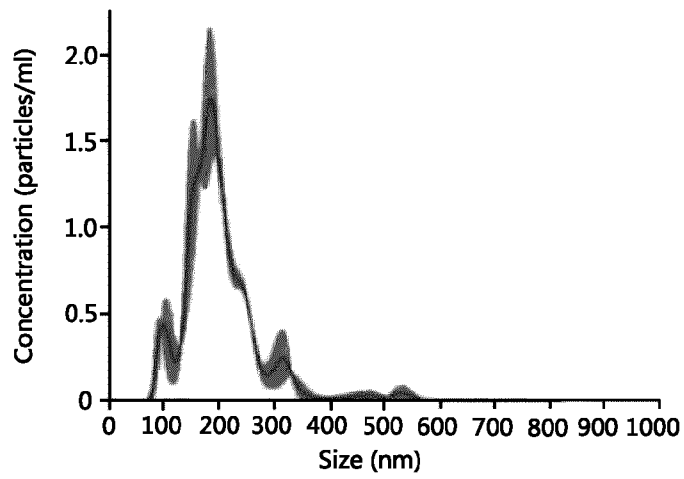
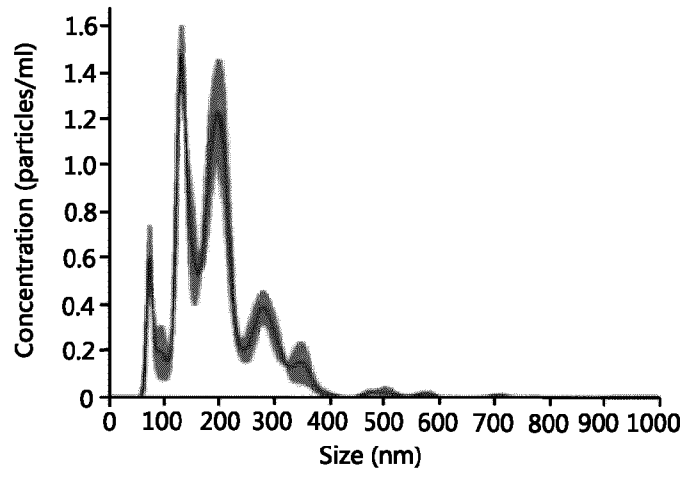


[도5b]

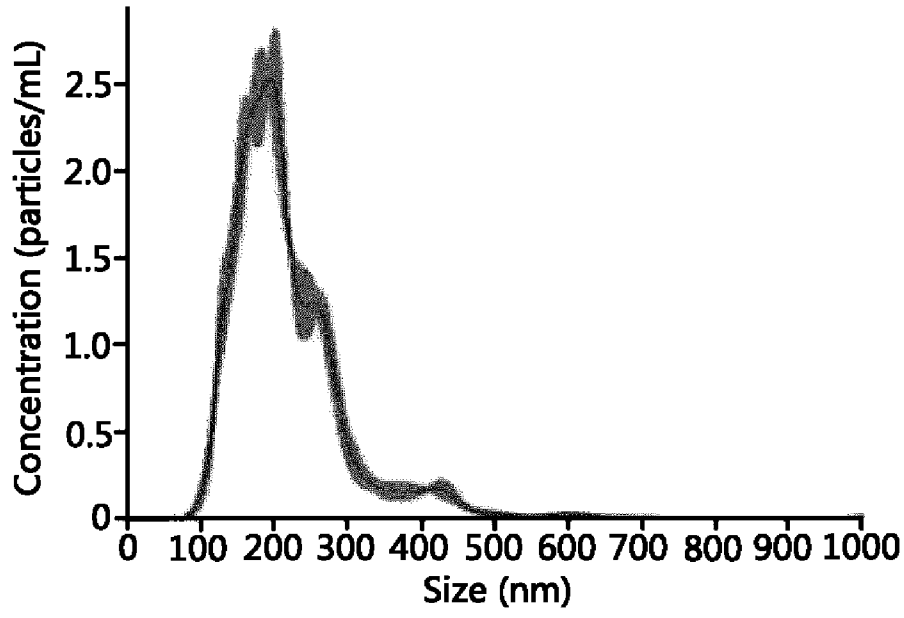


[도5c]

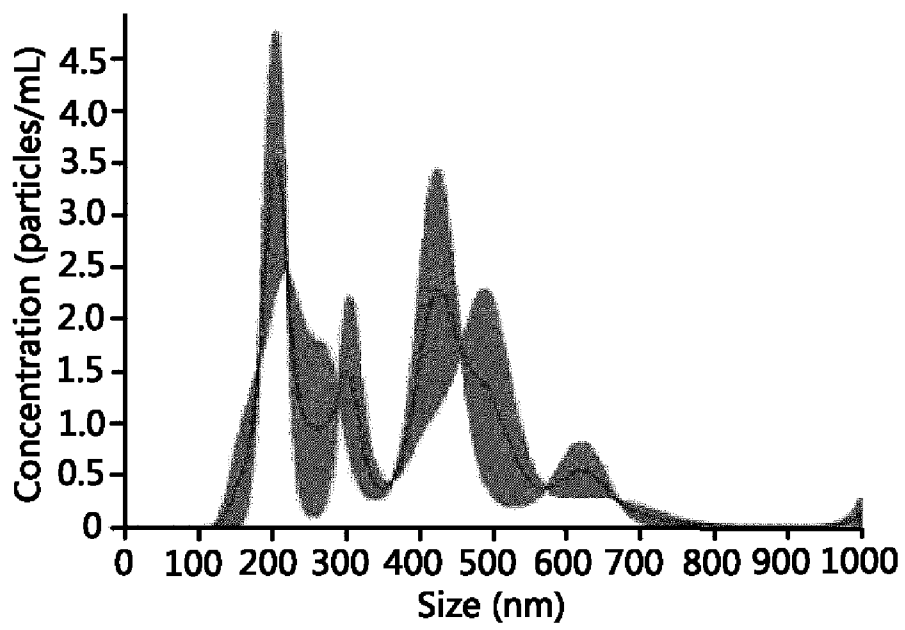
trehalose



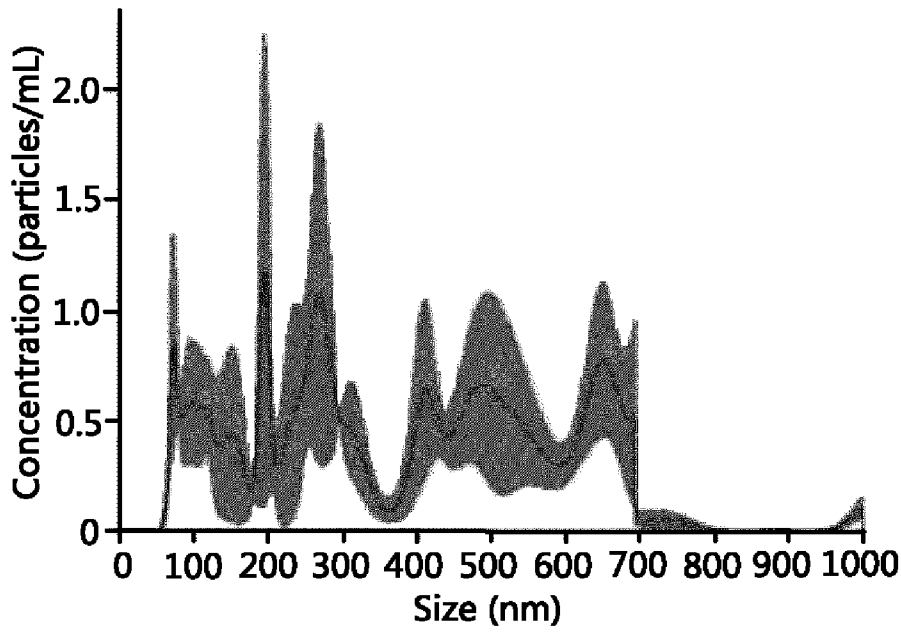
[도6a]



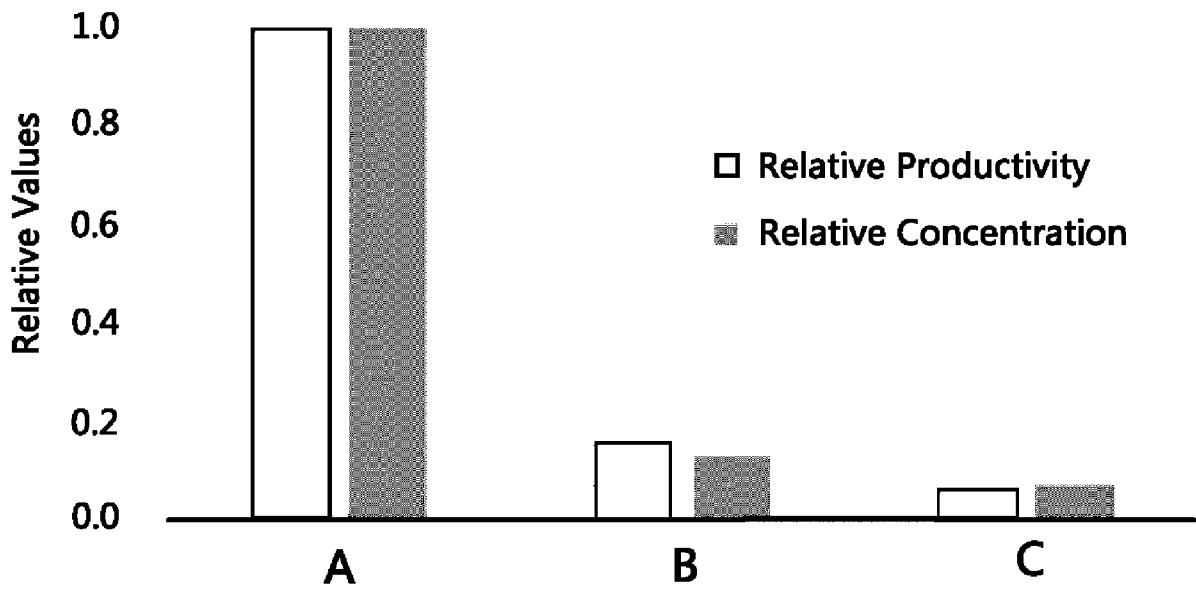
[도6b]



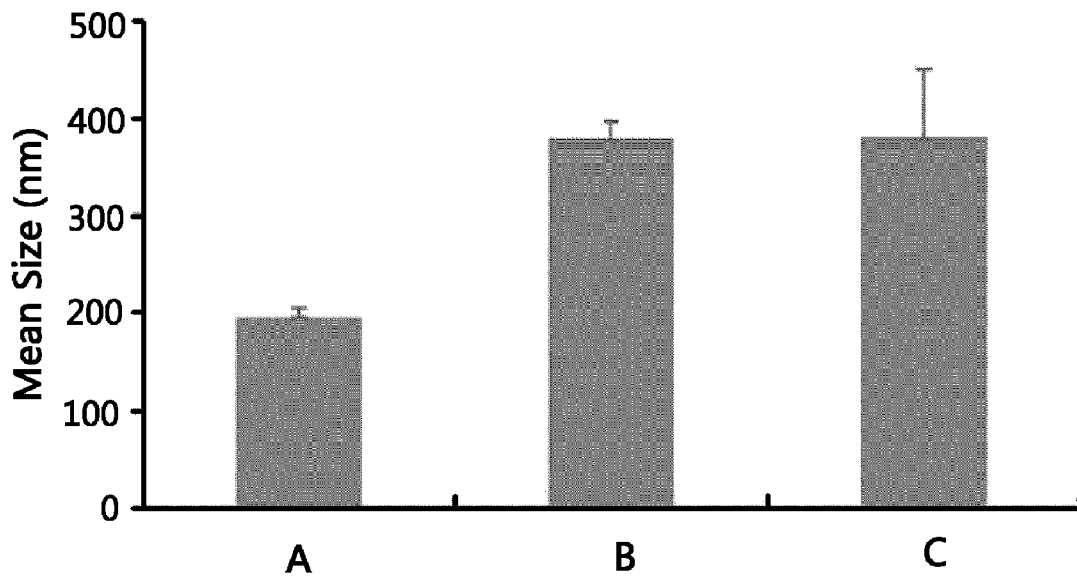
[도6c]



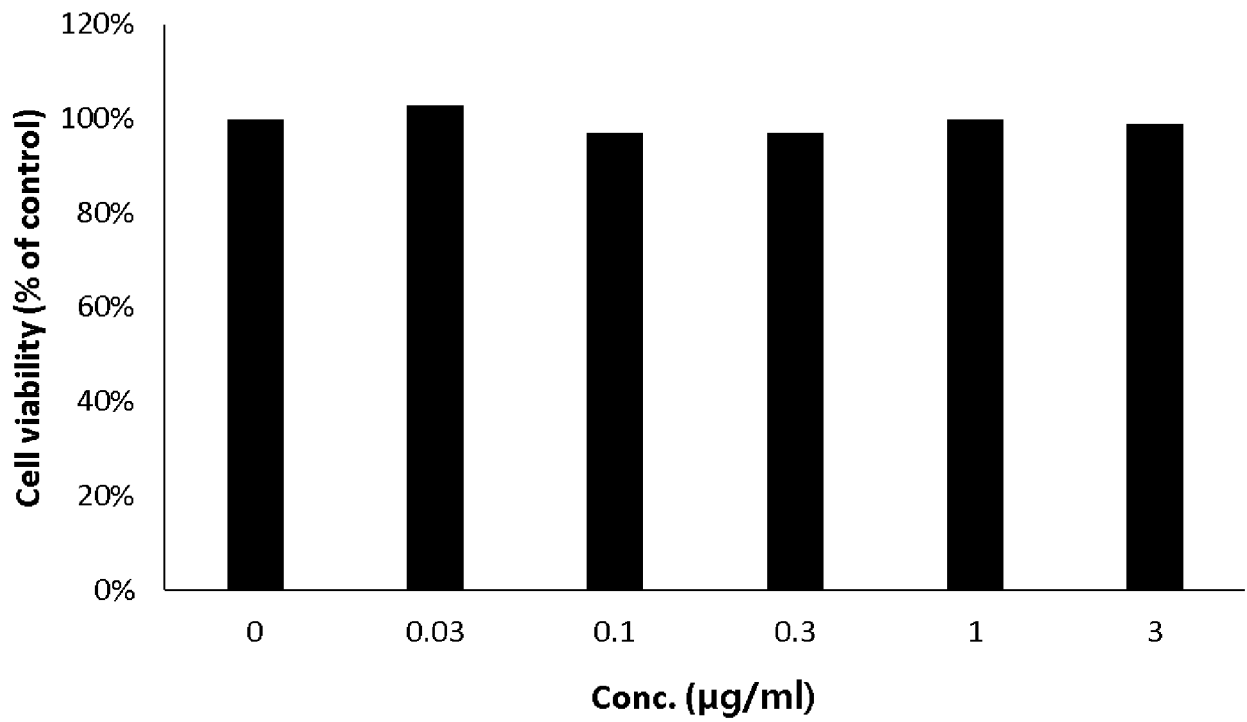
[도6d]



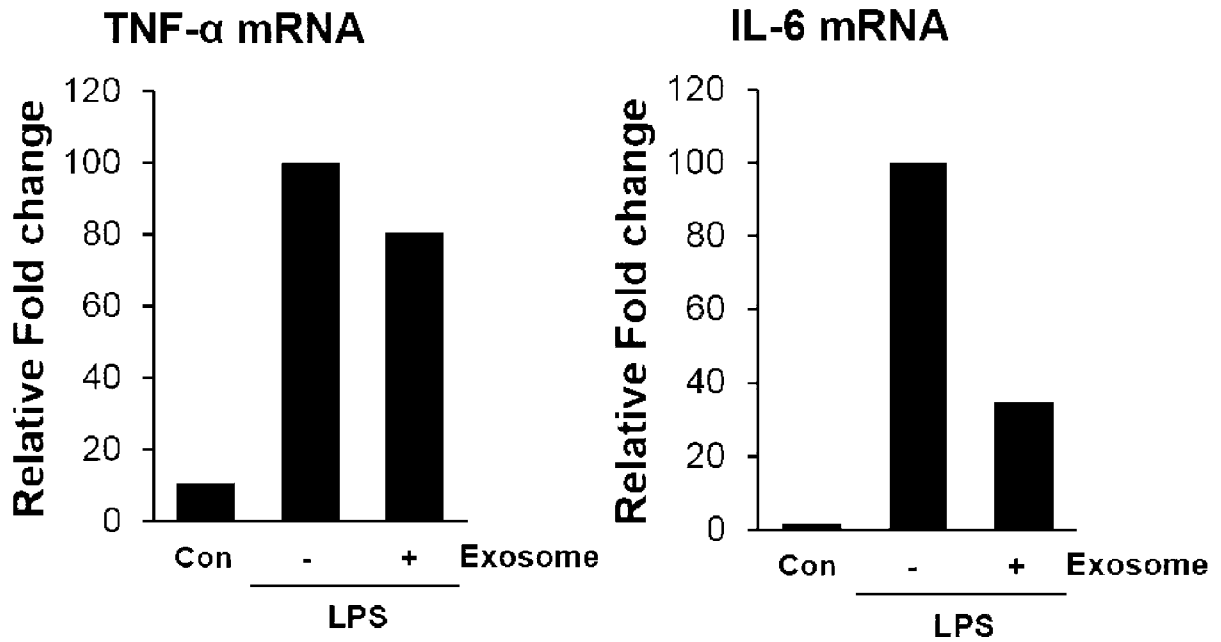
[도6e]



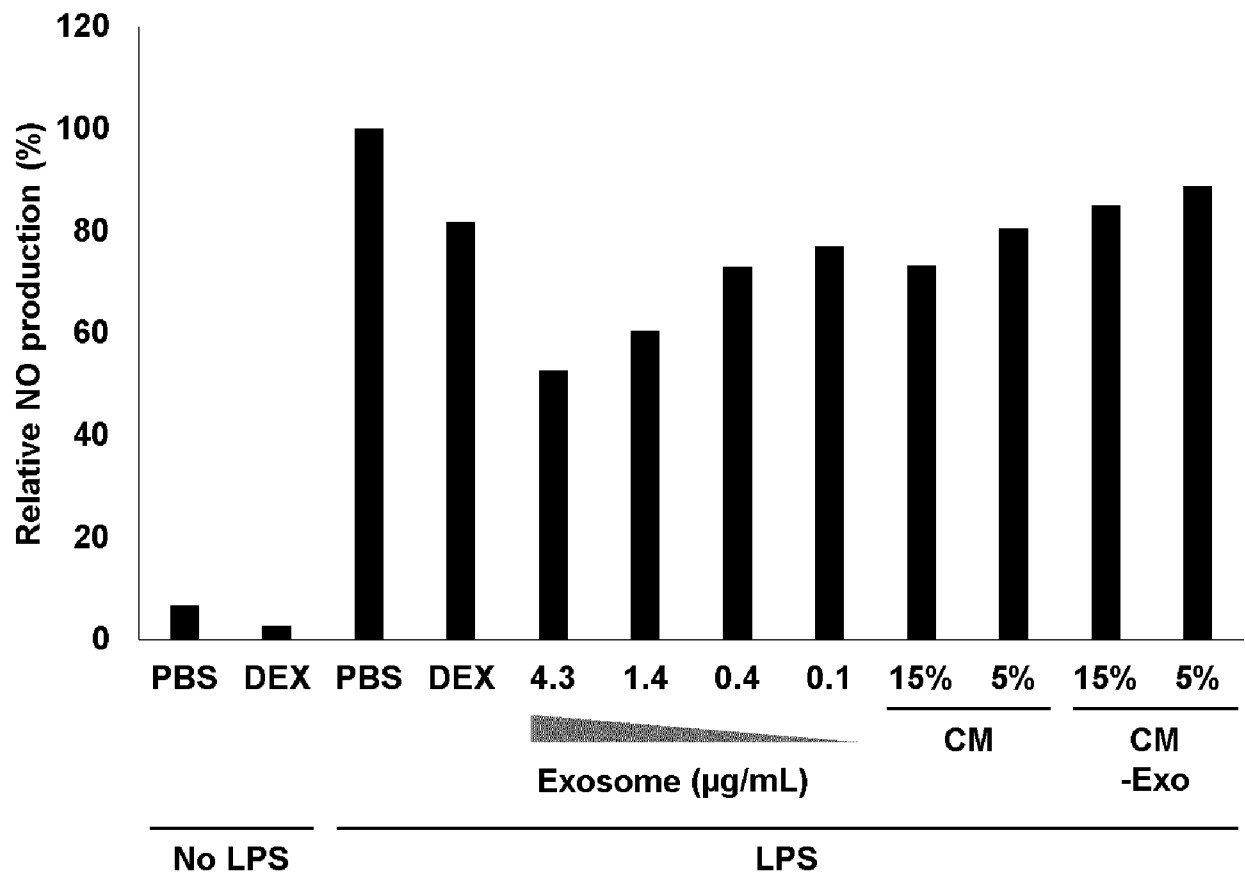
[도7]



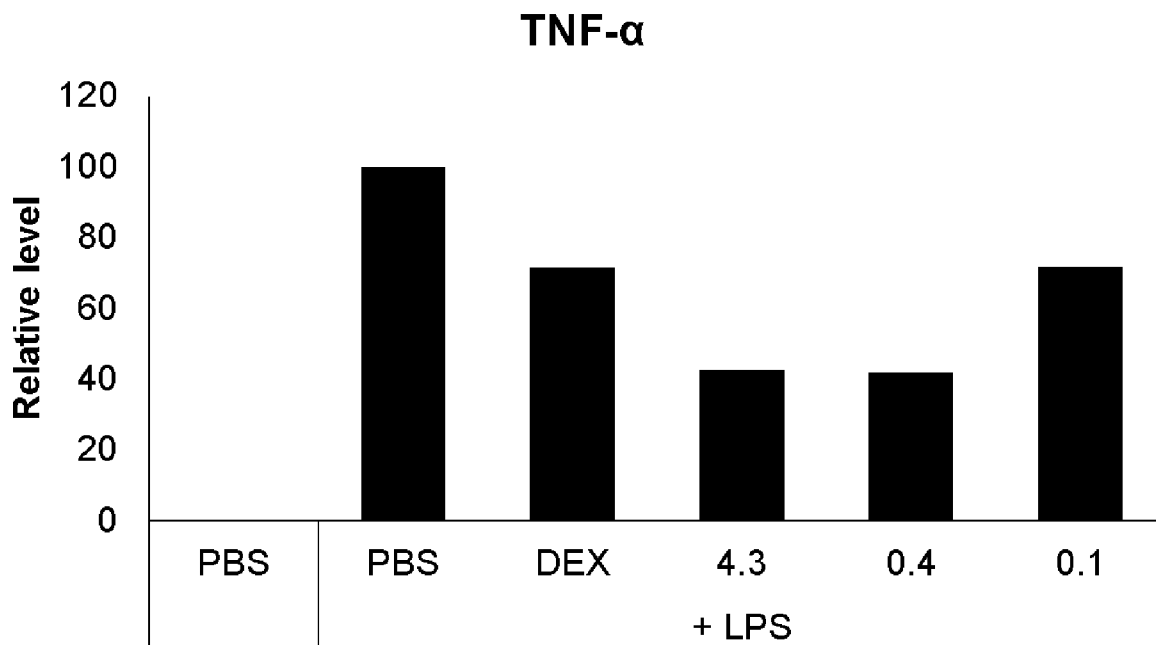
[도8]



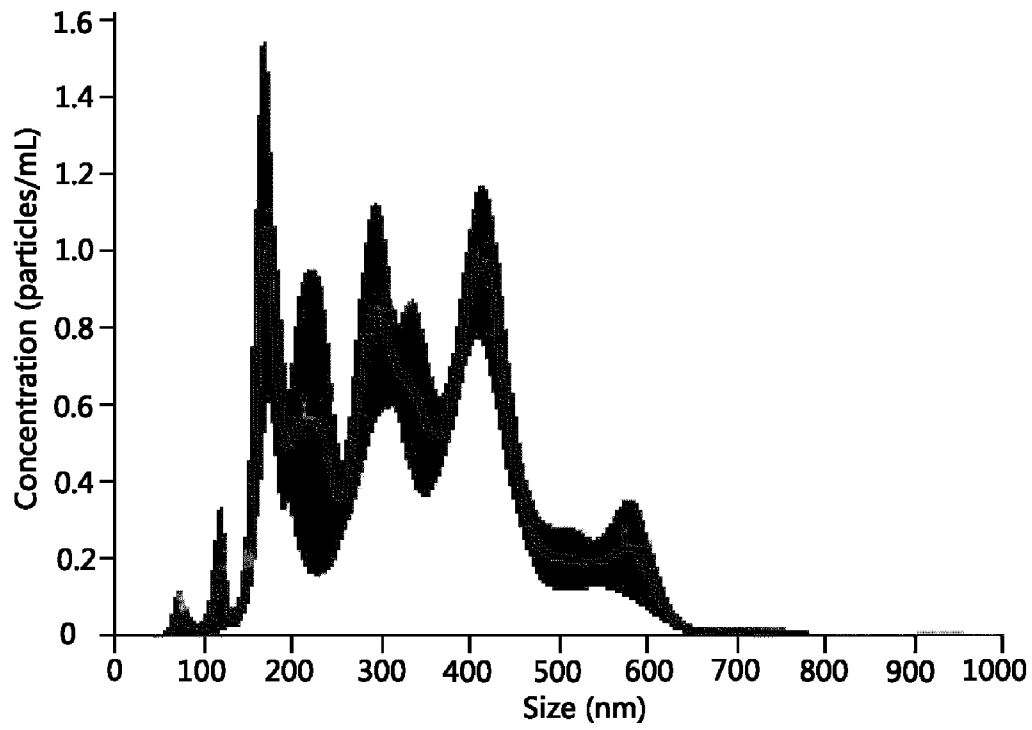
[도9]



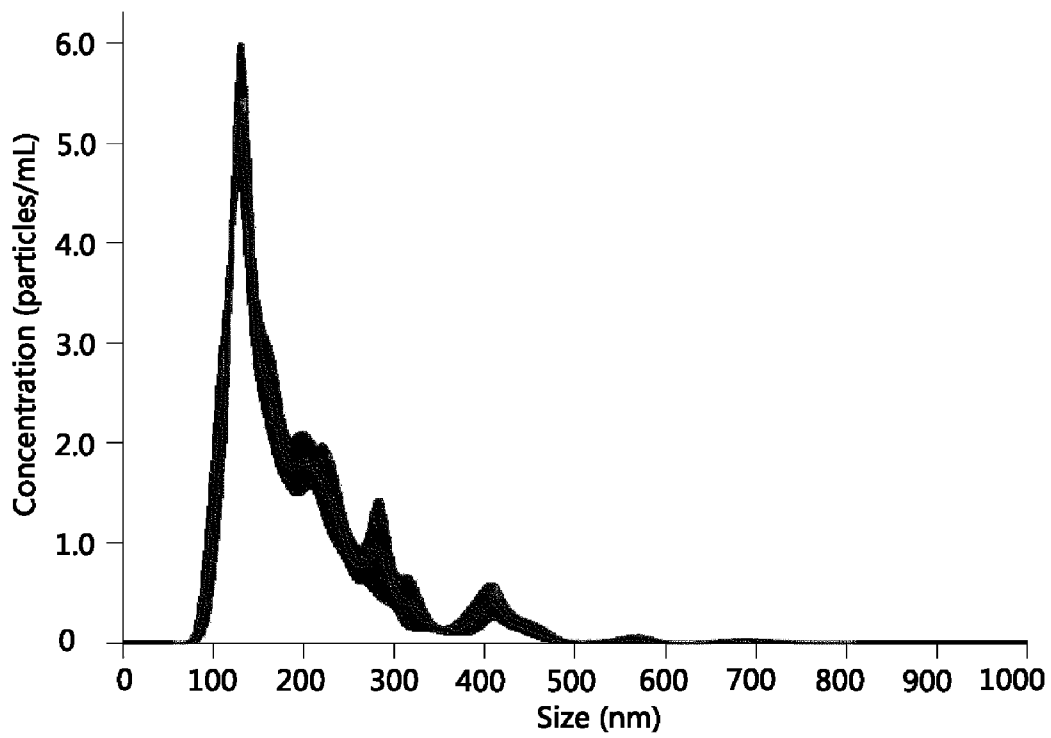
[도10]



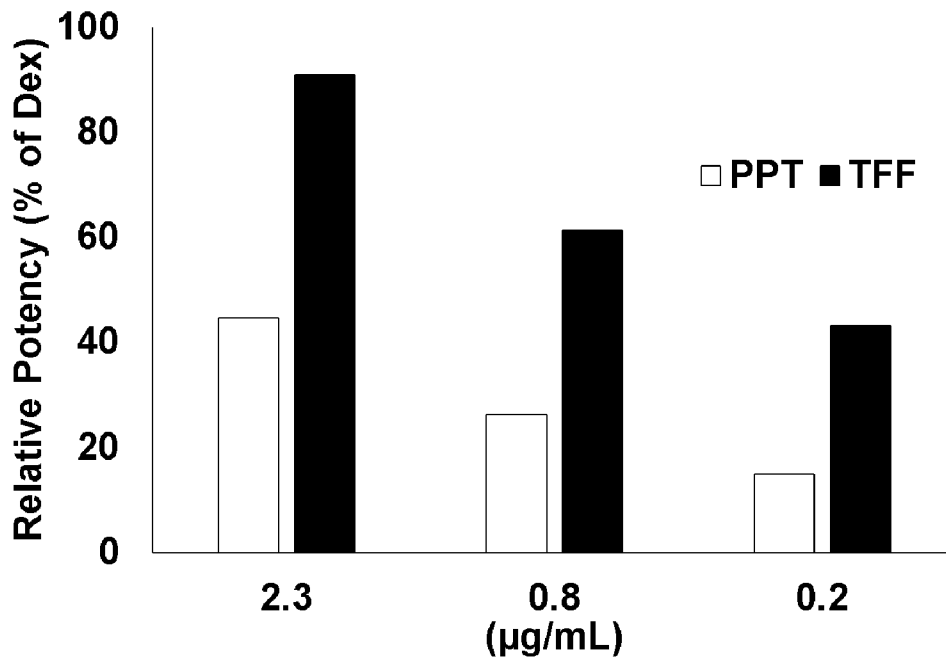
[도 11a]



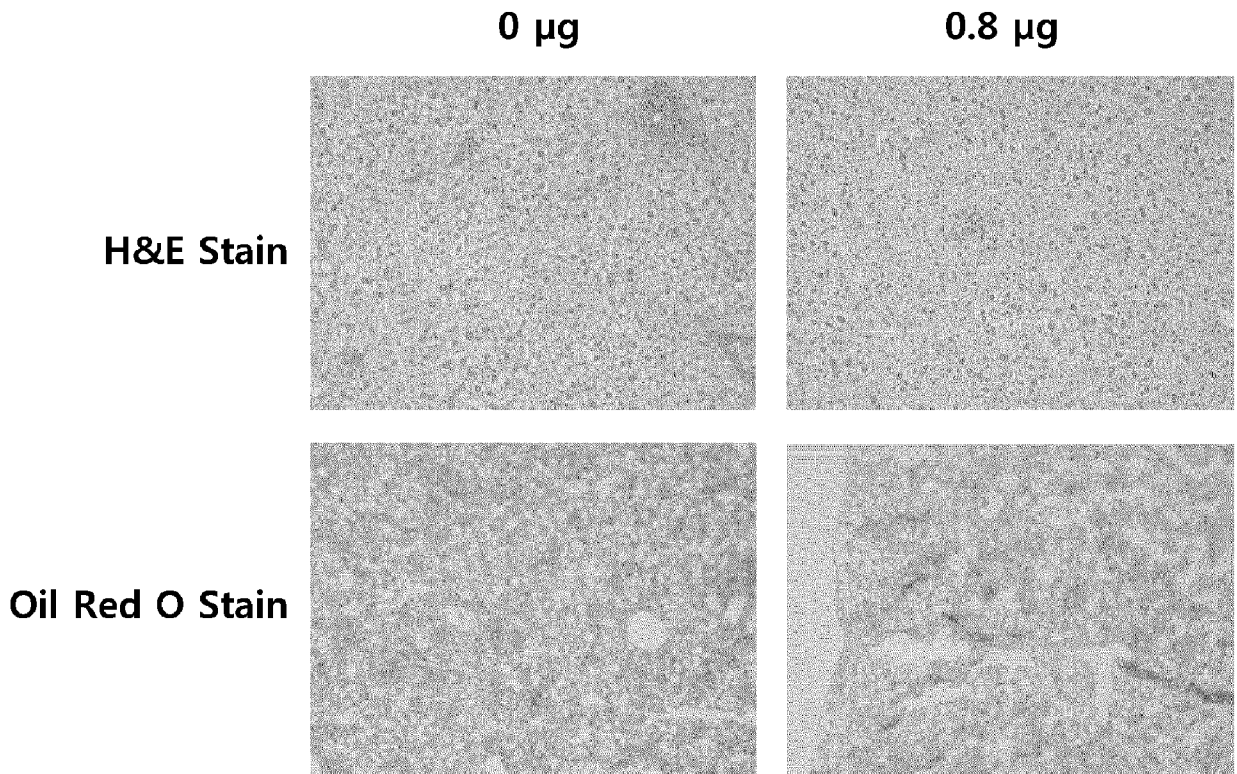
[도 11b]



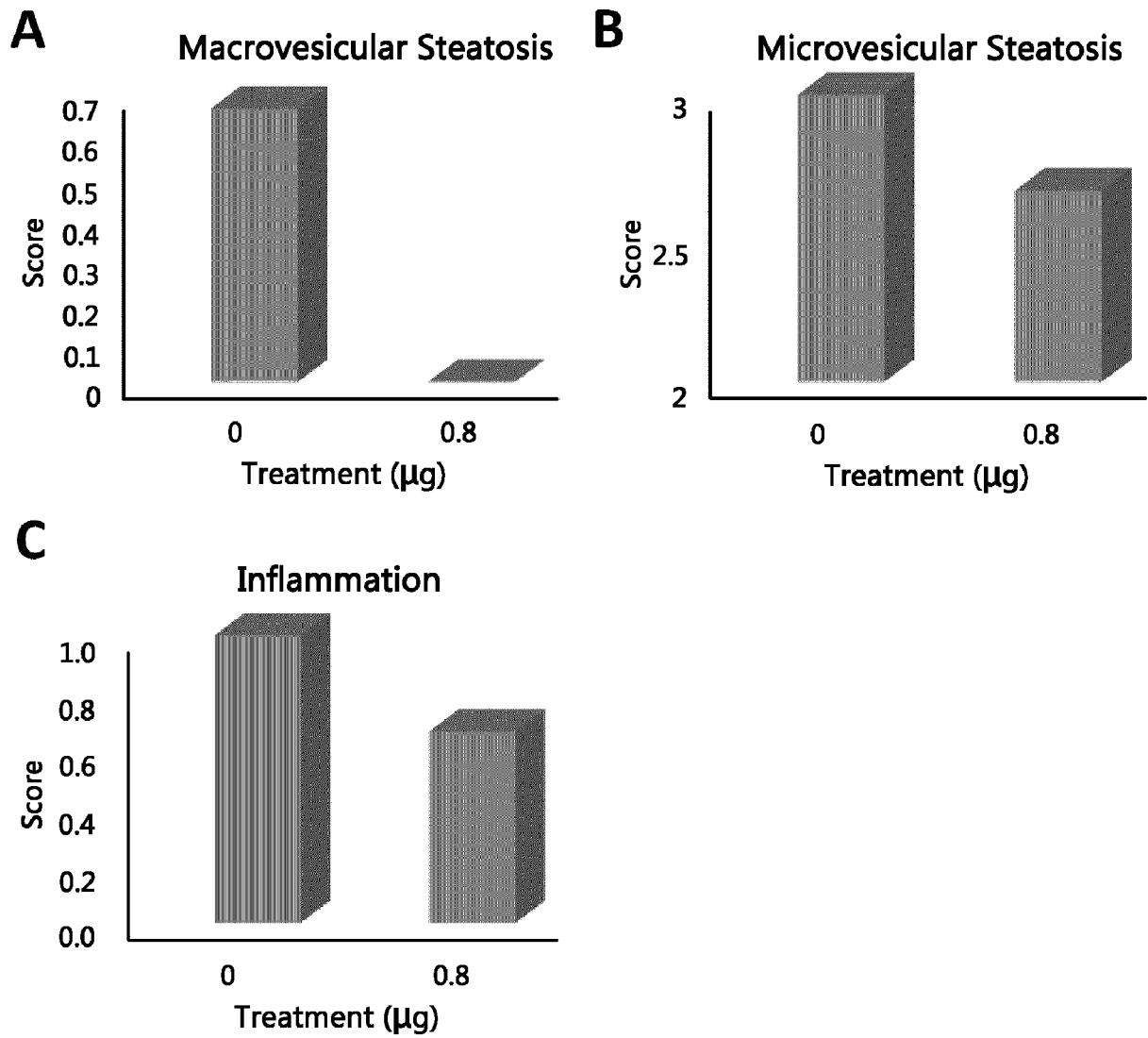
[도11c]



[도12]

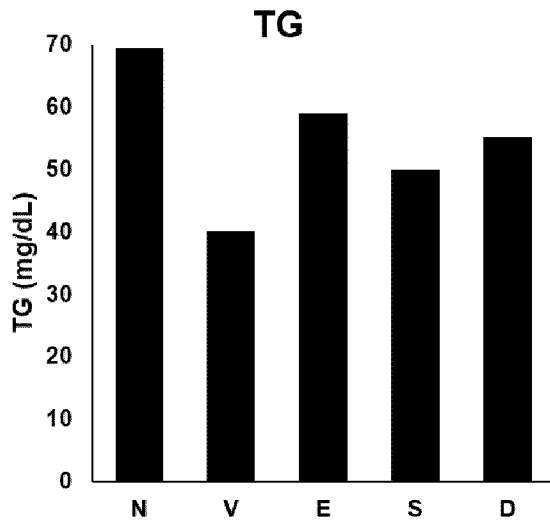


[도13]

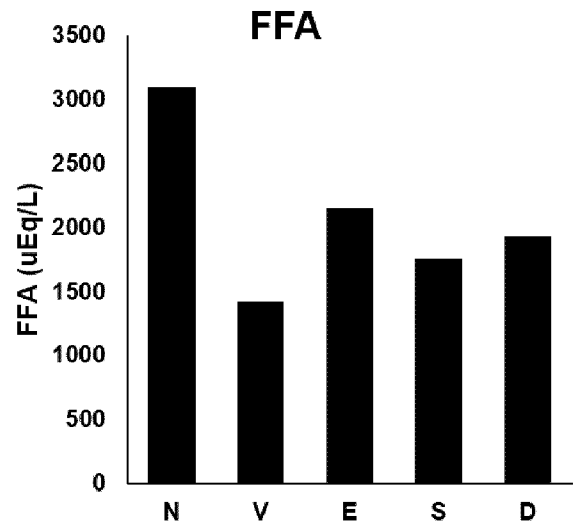


[도14]

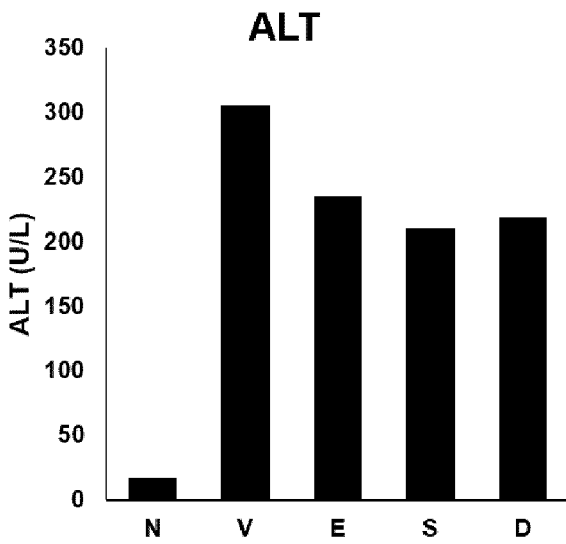
**A**



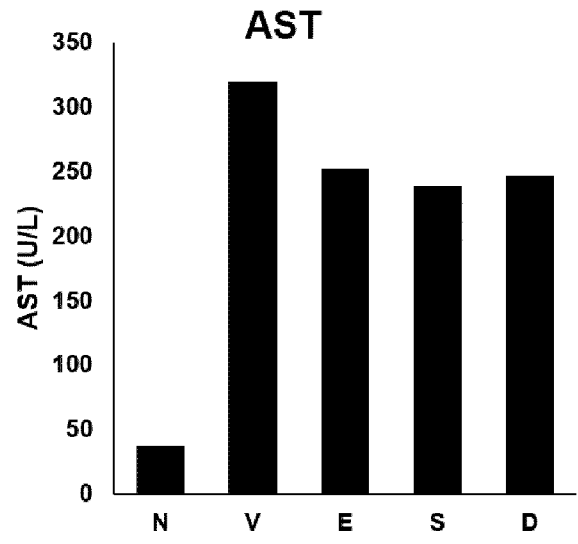
**B**



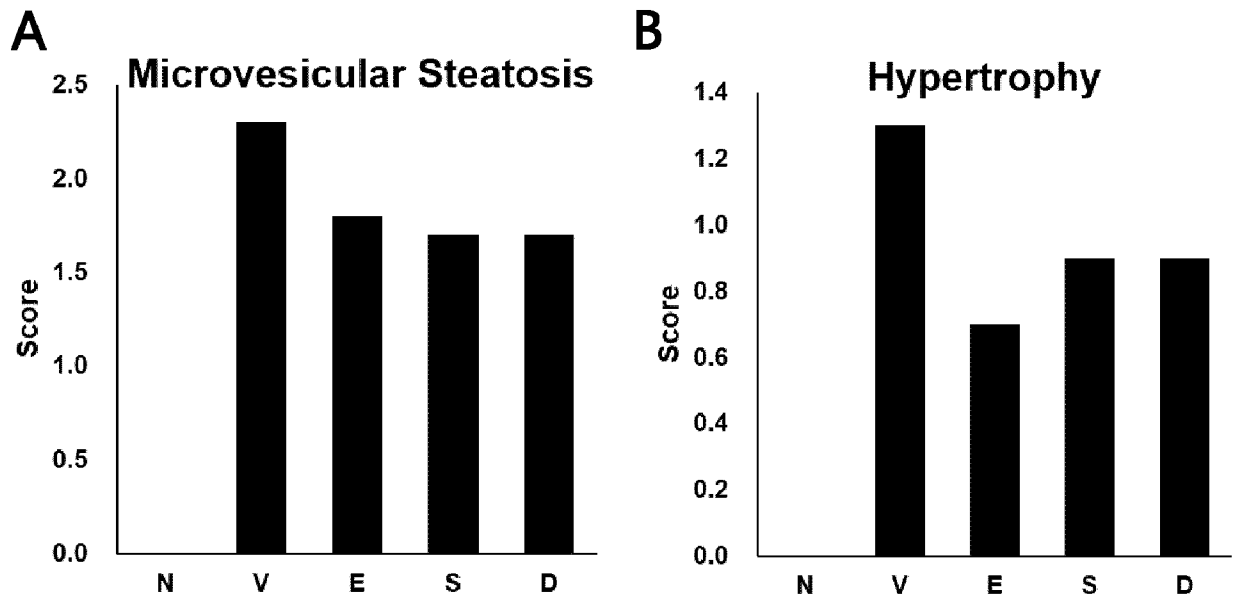
**C**



**D**



[도15]



[도16]

