



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년04월29일
(11) 등록번호 10-1973284
(24) 등록일자 2019년04월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/28 (2015.01) A61K 35/50 (2015.01)
A61K 35/51 (2015.01) A61K 35/545 (2014.01)
A61K 38/48 (2006.01) A61K 9/00 (2006.01)
A61K 9/12 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 35/28 (2013.01)
A61K 35/50 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0142236
(22) 출원일자 2017년10월30일
심사청구일자 2017년10월30일
(65) 공개번호 10-2018-0084610
(43) 공개일자 2018년07월25일
(30) 우선권주장
1020170007355 2017년01월16일 대한민국(KR)
(56) 선행기술조사문헌
KR101661847 B1
KR101662405 B1
WO2015179227 A1*
KR1020160078946 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
사회복지법인 삼성생명공익재단
서울특별시 용산구 이태원로55길 48 (한남동)
(72) 발명자
장윤실
서울특별시 송파구 양재대로 1218, 317동 303호(방이동, 올림픽선수기자촌아파트)
박원순
서울특별시 서초구 명달로4길 30, 501동 903호(서초동, 서초5차대림이편한세상)
(74) 대리인
(뒷면에 계속)
특허법인(유한)아이시스

전체 청구항 수 : 총 11 항

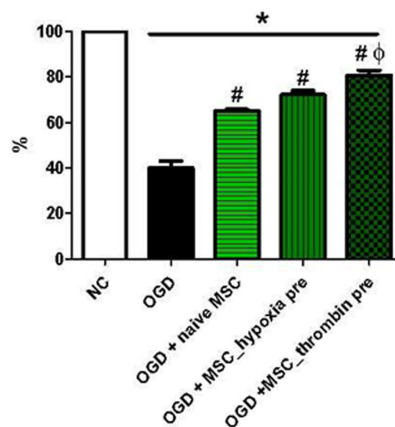
심사관 : 민경난

(54) 발명의 명칭 신생아 H I E 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은, 트롬빈 처리된 줄기세포 또는 이로부터 유래된 엑소좀(exosome)을 유효성분으로 포함하는, 신생아 저산소성 허혈성 뇌병증(Hypoxic Ischemic Encephalopathy; HIE)의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 이의 제조 방법에 관한 것이다. 본 발명에 의하면, 트롬빈 처리된 줄기세포 또는 이로부터 유래된 엑소좀이 트롬빈 미처리 군에 비하여 성장인자, 면역조절인자, 항산화인자 또는 재생인자의 발현이 증가되어 있을 뿐만 아니라, 신경세포 사멸 억제효과가 향상되는 바, 신생아 저산소성 허혈성 뇌병증(HIE)의 치료 효과가 우수하다는 장점이 있다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

A61K 35/51 (2013.01)
A61K 35/545 (2013.01)
A61K 38/4833 (2013.01)
A61K 9/0019 (2013.01)
A61K 9/12 (2013.01)

성동경

서울특별시 노원구 동일로227길 25, 1110동 904호
 (상계동, 상계주공11단지아파트)

(72) 발명자

안소윤

서울특별시 강남구 자곡로 36, 107동 305호(
 세곡동, 강남효성해링턴코트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI16C1061010016

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 첨단의료기술개발

연구과제명 심한 주산기 가사로 인한 신생아 저산소성허혈성 뇌손상 치료를 위한 트롬빈 유도 차세대
 줄기세포 치료제의 제형 개발과 생체 유효성 및 투여 방법 검증

기 여 율 1/1

주관기관 삼성서울병원

연구기간 2016.04.01 ~ 2016.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

트롬빈 처리된 줄기세포를 유효성분으로 포함하는, 신생아 저산소성 허혈성 뇌병증(Hypoxic Ischemic Encephalopathy; HIE)의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 줄기세포는 중간엽 줄기세포, 인간 조직 유래 중간엽 기질세포(mesenchymal stromal cell), 인간 조직 유래 중간엽 줄기세포 및 다분화능 줄기세포로 구성된 군에서 선택되는 줄기세포인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 중간엽 줄기세포는 제대, 제대혈, 골수, 지방, 근육, 신경, 피부, 양막 또는 태반에서 유래된 것임을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 신생아 저산소성 허혈성 뇌병증의 치료는 신경세포의 사멸 억제에 의한 것임을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 약학적 조성물은 뇌실 내 또는 혈관 내로 투여되는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 약학적 조성물은 배양배지, 사이토카인, 성장인자 및 유전자로 이루어진 군에서 선택되는 보조성분을 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 트롬빈 처리된 줄기세포는 트롬빈 미처리군에 비하여 성장인자, 면역조절인자, 항산화인자 또는 재생인자의 발현이 증가되어 있는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 8

제 7 항에 있어서, 상기 성장인자는 BDNF(brain-derived neurotropic factor), FGF(fibroblast growth factor), HGF(hepatocyte growth factor), NGF(nerve growth factor), 또는 VEGF(vascular endothelial growth factor)인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 9

제 1 항의 조성물을 함유하는, 신생아 저산소성 허혈성 뇌병증(Hypoxic Ischemic Encephalopathy; HIE)의 예방 또는 치료용 약학 제제.

청구항 10

제 9 항에 있어서, 상기 제제는 주사제형, 주입제형 또는 분무제형인 것을 특징으로 하는, 약학 제제.

청구항 11

제 9 항에 있어서, 상기 제제는 약학적으로 허용가능한 담체를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 약학 제제.

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은, 트롬빈 처리된 줄기세포 또는 이로부터 유래된 엑소좀(exosome)을 유효성분으로 포함하는, 신생아 저산소성 허혈성 뇌병증(Hypoxic Ischemic Encephalopathy; HIE)의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 신생아 저산소성 허혈성 뇌병증(Hypoxic Ischemic Encephalopathy; HIE)은 전체 신생아 사망원인의 23%를 차지하고 있으며, 심한 손상의 경우 약 50-100%가 사망하고 생존 환자 중 65-75%에서 중증의 운동/인지 장애, 경련 등이 평생 지속되는 것으로 보고되고 있다. HIE에 대한 현존하는 유일한 치료법은 저체온 요법이나, 효과가 미약하고 약 44%에서 사망 및 장기적인 신경학적 후유증에 시달리고 있으며, 특히 severe type에서는 개선의 효과가 없는 실정이다. 따라서, 신생아의 HIE는 그 난치성으로 인하여 효과적이고 뚜렷한 치료법의 개발이 매우 중요하고도 시급하다.

[0003] 더욱이, 국내 저조한 출산율 문제는 다양한 정부 지원 정책에도 불구하고 호전이 없는 바, 출생한 신생아의 질병 이환율을 낮추는 것이 가장 효율적이고 확실한 미래 유효 경제 인구수를 증가시키는 방법이 될 수 있을 것이다. 따라서, 전체 신생아 사망원인의 상당부분을 차지하고 생존시 심각한 합병증을 야기하는 신생아 저산소성 허혈성 뇌병증을 치료할 수 있는 차세대 고효능 치료제의 개발은, 저출산 국가에서 절실하고도 시기적으로 시급하다.

[0004] 한편, 줄기세포는 그 다분화능과 함께, 조직의 재생, 치료 및 면역 반응에 관여하는 세포로 알려져 있어, 이와 같은 특성을 이용하여 제대혈, 골수 등으로부터 중간엽 줄기세포를 분리배양하여 다양한 질환, 증상에 대한 치료제로 개발하고자 하는 노력이 있어왔다. 그러나, 이러한 줄기세포 자체를 이용한 치료법은 다음과 같은 한계와 부작용의 문제가 있어 왔다.

[0005] 첫째, 기본적으로 세포 치료제는 DNA transfer로 인한 발암(tumorigenicity) 가능성을 배제할 수 없고, 둘째, 줄기세포 자체의 큰 사이즈로 인하여 혈관 폐색(vascular obstruction)이나 심근경색을 유발할 수 있으며, 셋째, 제대혈과 같은 동종세포를 사용하여 이식시(동종이식) 세포 표면항원(surface antigen)으로 인한 거부반응의 문제가 있으며, 넷째, 일반적으로 세포 치료제는 제조공정이 까다롭고 보관운송에 제약이 많아 생산비용이 높다는 한계가 있다. 이와 같이, 줄기세포가 갖고 있는 원천적 한계로 인하여, 부작용을 줄이면서도 치료효과를 증진시키기 위한 방안들로서 유전자 조작을 이용한 효능개선 방법이 개발된 바 있으나(한국 공개특허 제10-2017-0099382호 등), 현재까지 뚜렷한 대안은 없는 실정이다.

[0006] 엑소좀은 다양한 세포들로부터 분비되는 막 구조의 작은 소낭(대략 30-100 nm의 직경)으로서, 전자현미경을 통한 연구에서 원형질막으로부터 직접 떨어져 나가는 것이 아니라 다낭체(multivesicular bodies, MVBs)라고 불리는 세포 내 특정 구획에서 기원하며 세포 밖으로 방출, 분비되는 것이 관찰되었다. 즉, 다낭체와 원형질막의 융합이 일어나면 소낭들은 세포 밖 환경으로 방출되는데, 이것을 엑소좀이라고 한다. 이러한 엑소좀이 어떤 분자적 기작에 의해 만들어지는지 확실히 밝혀진 바가 없으나, 적혈구 세포뿐만 아니라, B-림프구, T-림프구, 수지상 세포, 혈소판, 대식 세포 등을 포함한 다양한 종류의 면역 세포들과 종양 세포, 줄기세포 등도 살아 있는 상

태에서 엑소좀을 생산하여 분비한다고 알려졌다.

[0007] 특히, 줄기세포에서 유래된 엑소좀은 수용체 및 단백질뿐 아니라 핵 성분을 함유하고 있어 세포 간 커뮤니케이션 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 또한 상기 줄기세포에서 유래된 엑소좀은 줄기세포에 비해 동물 혈청을 상대적으로 적게 함유하고 있어 동물 혈청 감염에 의한 증상(zoonosis)의 위험성 역시 배제할 수 있다. 이러한 엑소좀의 특성을 고려할 때 엑소좀을 이용한 세포치료법은 기존의 줄기세포 치료법의 한계를 극복할 수 있는 새로운 패러다임이 될 것으로 기대된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 이에, 본 발명자들은 신생아 저산소성 허혈성 뇌병증(HIE)에 있어서, 기존의 줄기세포 치료제가 갖는 제약을 극복하면서도 치료 효능을 개선시키기 위해 예의 연구한 결과, 트롬빈 처리된 줄기세포/엑소좀이 기존의 naive 줄기세포의 세포안정성은 유지하면서도 다양한 성장인자 분비를 통하여 효능이 강화될 뿐만 아니라, 신경세포 사멸에 대한 보호효과가 naive 줄기세포에 비하여 현저하게 증가한다는 사실을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0009] 따라서, 본 발명의 목적은, 트롬빈으로 처리한 줄기세포 또는 이로부터 유래된 엑소좀을 포함하는, 신생아 저산소성 허혈성 뇌병증(HIE)의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 그러나, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명은, 트롬빈 처리된 줄기세포 또는 이로부터 유래된 엑소좀(exosome)을 유효성분으로 포함하는, 신생아 저산소성 허혈성 뇌병증(Hypoxic Ischemic Encephalopathy; HIE)의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0012] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 줄기세포는 중간엽 줄기세포, 인간 조직 유래 중간엽 기질세포(mesenchymal stromal cell), 인간 조직 유래 중간엽 줄기세포 및 다분화능 줄기세포로 구성된 군에서 선택되는 줄기세포인 것을 특징으로 한다.

[0013] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 중간엽 줄기세포는 제대, 제대혈, 골수, 지방, 근육, 신경, 피부, 양막 또는 태반에서 유래된 것임을 특징으로 한다.

[0014] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 신생아 저산소성 허혈성 뇌병증의 치료는 신경세포의 사멸 억제에 의한 것임을 특징으로 한다.

[0015] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 약학적 조성물은 개체의 뇌실 또는 혈관 내로 투여되는 것을 특징으로 한다.

[0016] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 약학적 조성물은 배양배지, 사이토카인, 성장인자 및 유전자로 이루어진 군에서 선택되는 보조성분을 더 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0017] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 트롬빈 처리된 줄기세포 또는 이로부터 유래된 엑소좀은 트롬빈 미처리군에 비하여 성장인자, 면역조절인자, 항산화인자 또는 재생인자의 발현이 증가되어 있는 것을 특징으로 한다.

[0018] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 성장인자는 BDNF(brain-derived neurotropic factor), FGF(fibroblast growth factor), HGF(hepatocyte growth factor), NGF(nerve growth factor), 또는 VEGF(vascular endothelial growth factor)인 것을 특징으로 한다.

[0019] 또한, 본 발명은, 상기 조성물을 함유하는, 신생아 저산소성 허혈성 뇌병증(HIE)의 예방 또는 치료용 약제제를 제공한다.

[0020] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 제제는 주사제형, 주입제형 또는 분무제형인 것을 특징으로 한다.

[0021] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 제제는 약학적으로 허용가능한 담체를 더 포함하는 것을 특징으로 한다.

- [0022] 또한, 본 발명은, (a) 줄기세포 배양 후 트롬빈을 처리하는 단계; (b) 상기 단계 (a)의 배양액에서 엑소좀을 분리하는 단계; 및 (c) 상기 단계 (b)에서 분리한 엑소좀을 유효성분으로 함유하는 조성물을 제조하는 단계를 포함하는, 상기 엑소좀 함유 약학적 조성물의 제조방법을 제공한다.
- [0023] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 단계 (a)의 트롬빈은 배지내에 1-1000 unit/ml 농도로 포함되는 것을 특징으로 한다.
- [0024] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 단계 (c)의 엑소좀은 원심분리를 이용하는 것을 특징으로 한다.
- [0025] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 원심분리는 5,000-500,000 g에서 10분 내지 5시간 동안 행해지는 것을 특징으로 한다.
- [0026] 또한, 본 발명은 트롬빈 처리된 줄기세포 또는 이로부터 유래된 엑소좀을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 신생아 저산소성 허혈성 뇌병증(HIE)의 예방 또는 치료방법을 제공한다.
- [0027] 또한, 본 발명은 트롬빈 처리된 줄기세포 또는 이로부터 유래된 엑소좀의 신생아 저산소성 허혈성 뇌병증(HIE)의 예방 또는 치료 용도를 제공한다.

발명의 효과

- [0028] 본 발명에 의하면, 트롬빈 처리된 줄기세포 또는 이로부터 유래된 엑소좀이 트롬빈 미처리군에 비하여 성장인자, 면역조절인자, 항산화인자 또는 재생인자의 발현이 증가되어 있을 뿐만 아니라, 신경세포 사멸 억제 효과가 향상되는바, 적은 양으로도 신생아 저산소성 허혈성 뇌병증(HIE)의 치료 효과가 우수하므로 치료제 생산 비용을 현저하게 낮출 수 있는 장점이 있다.
- [0029] 본 발명의 엑소좀 기반 치료제에 의하면, cell-free 제제이기 때문에 DNA가 포함되지 않아 발암의 위험성이 적고 세포 표면항원이 없어 이식거부 반응의 문제가 없다. 또한, 세포보다 size가 매우 작기 때문에 전신 투여시 미세혈관에 폐색을 일으킬 우려가 없으며, 세포가 아닌 분리물질로써 off the shelf 제품으로의 약제 개발이 가능하므로 제조단가를 줄일 수 있다.
- [0030] 따라서, 본 발명에 의하면 종래 줄기세포 치료제가 갖는 문제를 해결하면서도 치료 효능을 현저히 개선할 수 있는바, 신생아 저산소성 허혈성 뇌병증(HIE)의 치료에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0031] 도 1은, 줄기세포에 트롬빈 처리시 엑소좀의 분비가 활성화되는 과정을 TEM 이미지 분석을 통해 확인한 결과이다.
- 도 2는, 트롬빈 처리된 줄기세포 유래의 엑소좀에서 엑소좀 마커인 CD63 및 CD9가 정상적으로 발현되는지를 확인한 웨스턴 블랏 결과이다.
- 도 3은, 트롬빈 처리에 의해 줄기세포 및 엑소좀내 성장인자(BDNF, FGF, HGF, NGF, VEGF), 항염증 사이토카인(IL-6) 등의 발현이 증가됨을 보여주는 면역분석 결과이다.
- 도 4는, *in vitro* HIE 모델에서 트롬빈 처리 줄기세포에 대한 신경세포 사멸억제 효과를 보여주는 MTT assay 결과이다.
- 도 5는, *in vitro* HIE 모델에서 트롬빈 처리 줄기세포 유래의 엑소좀에 대한 신경세포 사멸억제 효과를 보여주는 MTT assay 결과이다.
- 도 6a 및 도 6b는, 동물모델을 이용하여 트롬빈 처리 줄기세포의 HIE의 치료 활성을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0032] 본 발명은, 트롬빈 처리된 줄기세포 또는 이로부터 유래된 엑소좀(exosome)을 유효성분으로 포함하는, 신생아 저산소성 허혈성 뇌병증(Hypoxic Ischemic Encephalopathy; HIE)의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0033] 본 발명에서 '줄기세포'란 미분화된 세포로서 자기 복제 능력을 가지면서 두 개 이상의 서로 다른 종류의 세포로 분화하는 능력을 갖는 세포를 말한다. 본 발명의 줄기세포는 자가 또는 동종 유래 줄기세포일 수 있으며, 인간 및 비인간 포유류를 포함한 임의 유형의 동물 유래일 수 있고, 상기 줄기세포가 성체로부터 유래된 것이든

배아로부터 유래된 것이든 이에 한정되지 않는다.

- [0034] 본 발명의 줄기세포는 배아 줄기세포 또는 성체 줄기세포를 포함하며, 바람직하게는 성체 줄기세포이다. 상기 성체 줄기세포는 중간엽 줄기세포, 인간 조직 유래 중간엽 기질세포(mesenchymal stromal cell), 인간 조직 유래 중간엽 줄기세포, 또는 다분화능 줄기세포일 수 있으며, 바람직하게는 중간엽 줄기세포이나, 이에 한정되지 않는다. 상기 중간엽 줄기세포는 제대, 제대혈, 골수, 지방, 근육, 신경, 피부, 양막 및 태반 등으로부터 유래된 중간엽 줄기세포일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0035] 본 발명에서 '제대혈'은 태반과 태아를 연결하는 제대정맥으로부터 채취된 혈액을 의미한다. 제대혈은 출산 시 자연적으로 발생하는 부산물로서, 여러 차례의 수술을 필요로 하는 골수 등의 일반 간엽조직보다 훨씬 채취가 용이하고, 골수 이식에 비해 제대혈 보관산업이 활성화되어 이미 인프라가 구축되어 있으므로 공여자를 구하는 것도 용이하다. 이와 더불어, 제대혈 유래 세포는 조직이나 장기 이식에서 거부반응을 일으키는 가장 중요한 원인인 조직적합항원 HLA-DR(class II)이 발현되지 않는 세포이므로, 기존의 이식수술시 문제가 되었던 거부반응 등의 면역반응을 유발하지 않거나 최소화할 수 있어, 자가유래 제대혈은 물론 타가유래 제대혈 또한 사용할 수 있다.
- [0036] 본 발명에서 '엑소좀(exosome)'이란 다양한 세포들로부터 분비되는 막 구조의 작은(대략 30-100 nm의 직경) 소낭을 의미하며, 다낭체와 원형질막의 융합이 일어나 세포 밖 환경으로 방출되는 소낭을 의미한다. 상기 엑소좀은 자연적으로 분비된 것이거나, 혹은 인공적으로 분비된 것을 포함한다.
- [0037] 본 발명에서, '저산소성 허혈성 뇌병증(Hypoxic Ischemic Encephalopathy; HIE)'이란 뇌에 심각한 산소부족으로 인하여 뇌의 기능이나 구조에 변화가 온 상태를 말하며 일시적으로 회복가능할 수도 있으나, 때론 회복불능인 영구적 손상이 오기도 한다.
- [0038] 본 발명에서, 'HIE의 예방 또는 치료'란, HIE의 경감, 완화 및 증상의 개선을 포함하며, HIE가 걸릴 가능성을 낮추는 것을 포함하는 의미이다.
- [0039] 본 발명에서, '트롬빈(thrombin) 처리된 줄기세포'는 비처리 줄기세포에 비하여 cell viability, oxidative function 등 세포 안정성에는 변화 없이 줄기세포의 주된 작용기전인 paracrine property의 증가로 인하여 줄기세포 기능/효능이 강화될 수 있다. 나아가 트롬빈 처리로 인하여, 줄기세포에서 유래된 엑소좀의 치료 효능을 강화시킬 뿐만 아니라, 엑소좀의 분비량을 증가시킬 수 있다.
- [0040] 이때, paracrine으로는 성장인자, 면역조절인자, 항산화인자 또는 재생인자가 증가될 수 있으며, 특히 성장인자는 세포 분열이나 생장, 분화를 촉진하는 단백질질의 생리활성물질을 의미하는 것으로, BDNF(brain-derived neurotrophic factor), FGF(fibroblast growth factor), HGF(hepatocyte growth factor), NGF(nerve growth factor), VEGF(vascular endothelial growth factor), IL-6(Interleukin-6) 등을 포함할 수 있다.
- [0041] 본 발명의 약학적 조성물은 개체에 다양한 경로로 특별한 제한없이 투여될 수 있으며, 예를 들면, 경구 또는 비경구 방식으로 투여될 수 있으나, 뇌실내 또는 혈관 내로 투여하는 것이 바람직하다.
- [0042] 본 발명의 약학적 조성물은 HIE의 치료 효과를 갖는 공지의 보조성분을 1종 이상 더 함유할 수 있다. 예를 들면, HIE 치료에 효과적인 유전자[예컨대, 항-염증성 사이토카인(anti-inflammatory cytokine) 유전자, 염증성 사이토카인(inflammatory cytokine)에 대한 siRNA 또는 안티-센스 프라이머(antisense primer)] 또는 이를 포함하는 발현벡터, 자가분비(autocrine) 또는 측분비(paracrine) 효과를 제공하는 사이토카인[예컨대, 인터루킨(interleukin)-10], 성장인자[예컨대, 케라틴 형성 세포 성장인자(Keratinocyte growth factor)], 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된 보조성분을 하나 이상 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0043] 본 발명의 약학적 조성물의 바람직한 투여량은 개체의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르며, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 상기 조성물의 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있으며, 이에 한정되지는 않는다.
- [0044] 본 발명의 약학적 조성물은 HIE의 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [0045] 본 발명의 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체를 더 포함할 수 있다. 예를 들어, 주사제의 경우에는 보존제, 무통화제, 가용화제 또는 안정화제 등을, 국소 투여용 제제의 경우에는 기제(base), 부형제, 윤활제 또는 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

- [0046] 본 발명의 조성물은 약학적 분야에서 통상의 방법에 따라 개체의 신체 내 투여에 적합한 단위투여형의 제제로 제형화시켜 투여할 수 있다. 이러한 목적에 적합한 제형으로는 비경구투여 제제로서 주사용 앰플과 같은 주사제, 주입 백과 같은 주입제, 및 에어로졸 제제와 같은 분무제 등이 바람직하다. 상기 주사용 앰플은 사용 직전에 주사액과 혼합 조절할 수 있으며, 주사액으로는 생리 식염수, 포도당, 링거액 등을 사용할 수 있다. 또한, 주입 백은 염화폴리비닐 또는 폴리에틸렌 재질의 것을 사용할 수 있다. 본 발명에서 투여는 임의의 적절한 방법으로 개체에게 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다.
- [0047] 본 발명의 약학적 조성물의 바람직한 투여량은 개체의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르며, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 상기 조성물의 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수 회 나누어 투여할 수도 있으며, 이에 한정되지는 않는다.
- [0048] 또한, 본 발명은, (a) 줄기세포 배양 후 트롬빈을 처리하는 단계; (b) 상기 단계 (a)의 배양액에서 엑소좀을 분리하는 단계; 및 (c) 상기 단계 (b)에서 분리한 엑소좀을 유효성분으로 함유하는 조성물을 제조하는 단계를 포함하는, 상기 엑소좀 함유 약학적 조성물의 제조방법을 제공한다.
- [0049] 본 발명에서 트롬빈 처리 농도는 줄기세포/엑소좀의 효능을 강화시키는 데 적합한 농도이면 족하고 특별한 제한은 없으나, 배지에 1-1000 unit/ml 농도로 포함되는 것이 바람직하다.
- [0050] 본 발명에서 엑소좀을 분리하는 방법에는 제한이 없으며, 예를 들면 배양액에서, 원심분리, 초고속 원심분리, 필터에 의한 여과, 겔 여과 크로마토그래피, 프리-플로우 전기영동, 모세관 전기영동, 폴리머를 이용한 분리 등의 방법 및 이들의 조합을 이용하여 분리할 수 있으며, 바람직하게는 원심분리/초원심분리이다. 이때, 원심분리/초원심분리는, 4℃, 5,000-500,000 g에서 10분 내지 5시간 동안 행하는 것이 바람직하다.
- [0051] 본 발명에서 세포 배양에 이용되는 배지는, 당, 아미노산, 각종 영양물질, 혈청, 성장인자, 무기질 등의 세포의 성장 및 증식 등에 필수적인 요소를 포함하는 생체 외(*in vitro*)에서 줄기세포 등의 세포의 성장 및 증식을 위한 혼합물을 의미한다. 본 발명에서 이용될 수 있는 배지는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium), MEM(Minimal Essential Medium), BME(Basal Medium Eagle), RPMI1640, DMEM/F-10 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium: Nutrient Mixture F-10), DMEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium: Nutrient Mixture F-12), α-MEM(α-Minimal essential Medium), G-MEM(Glasgow's Minimal Essential Medium), IMDM(Isocove's Modified Dulbecco's Medium) 및 KnockOut DMEM 등의 상업적으로 제조된 배지 또는 인위적으로 합성한 배지를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0053] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.
- [0055] **[실시예]**
- [0056] **실시예 1: 줄기세포에 트롬빈 처리에 의한 효능증강 유도**
- [0057] **1-1. 트롬빈에 의한 엑소좀 분리 유도**
- [0058] 인간 제대혈 유래 중간엽 줄기세포(3×10^5 개)를 60 mm 배양접시(orange scientific cat# 4450200)에 분주 후 1주일간 배양하였다. 배양접시에 세포가 포화 증식된 것을 확인한 후, 50 unit/ml 트롬빈(REYON Pharmaceutical.Co.,LTD)이 희석되어 있는 혈청프리-배양배지(MEM alpha media)로 교체하고, 다시 6시간 동안 배양하여 트롬빈 처리된 줄기세포를 수득하였다.
- [0059] 이후, 트롬빈 처리에 의해 중간엽 줄기세포에서 엑소좀의 분비가 활성화되는지 확인하기 위하여 엑소좀의 분비 과정을 TEM(Transmission Electronic Microscopy) 이미지를 통해 확인하였다. 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, 트롬빈에 의한 자극이 엑소좀의 분비를 유도함을 알 수 있었다.
- [0060] 또한, 상기 배양액을 원심분리 튜브에 나누어 담아 4℃, 100,000 rpm에서 30분간 원심분리하였으며, 상층액을 새 튜브에 옮겨 세포 잔여물(debris)을 제거하였다. 다시, 상기 상층액을 4℃, 100,000 rpm에서 2시간 동안 초원심분리한 후, 상층액을 더욱 제거하여 엑소좀을 수득하였다(최종 농도: 15 μg/ml).
- [0061] 이때, 수득한 산물이 엑소좀이 맞는지 확인하기 위하여, 공지의 엑소좀 마커인 CD63 및 CD9(System Bioscience, Mountain View, CA, USA)의 발현을 웨스턴 블랏을 통하여 검증하였다. 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 트롬빈 처리된 줄기세포에서 수득한 엑소좀은 정상적으로 CD63 및 CD9를 발현하고 있었는바, 엑소좀임을 권طم하였다.

[0063] **1-2. 트롬빈에 의한 줄기세포/엑소솜 효능 증강**

[0064] 상기 실시예 1-1에서 수득한 줄기세포 및 엑소솜이 트롬빈 처리에 의하여 성장인자나 IL-6와 같은 항염증 사이토카인 등의 발현이 증가되었는지 확인하였다.

[0065] 구체적으로는, 용해 완충액(lysis buffer)을 이용하여 막을 용해한 후, 세포/엑소솜 내의 단백질을 분리하여 BDNF, FGF, HGF, NGF, VEGF, IL-6의 양을 Procarta immunoassay kit(affymatrix, 미국)로 측정하였다.

[0066] 그 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이, 트롬빈 처리에 의해 BDNF(brain-derived neurotropic factor), FGF(fibroblast growth factor), HGF(hepatocyte growth factor), NGF(nerve growth factor), VEGF(vascular endothelial growth factor), IL-6(Interleukin-6)의 발현이, 트롬빈 비처리 줄기세포 또는 여기서 수득한 엑소솜(대조군; normal)에 비하여 증가되었음을 확인하였다.

[0067] 이러한 결과는 트롬빈 처리에 의해 줄기세포 또는 이로부터 유래된 엑소솜의 세포재생, 혈관재생, 항염증 효능이 증강됨을 의미하는 것이다.

[0069] **실시예 2: 신생아 저산소 허혈성 뇌병증(HIE)의 *in vitro* model 구축**

[0070] 임신 후 18.5일이 지난 SD rat의 하복부를 절개해 자궁에서 태아를 꺼낸 뒤 전뇌를 조심스럽게 적출하였다. 적출된 뇌조직에서 대뇌 피질부분만 조심스럽게 분리한 뒤 파이펫을 이용해 단일세포로 분리하여 신경세포 배양액에 넣어 배양을 한다. 배양 후 10일 이후에 "glucose가 첨가되지 않은 배지를 넣은 후 1% 저산소 조건(oxygen, glucose deprivation ; OGD)"하에 60분간 노출시킴으로써 신생아 HIE의 *in vitro* model을 구축하였다.

[0072] **실시예 3: 트롬빈 처리 줄기세포에 대한 *in vitro* 신경세포 사멸억제 효과**

[0073] 상기 실시예 2에서 구축한 신생아 HIE의 *in vitro* model에, 상기 실시예 1에서 수득한 트롬빈 처리 줄기세포를 처리한 후, MTT assay를 통하여 신경세포의 생존률을 측정하였다.

[0074] 그 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이, 정상 신경세포(NC)에 비하여 HIE의 *in vitro* model(OGD)에서는 oxygen/glucose deprivation 유발로 인하여 신경세포의 사멸이 유의하게 증가된 반면, 신생아 HIE *in vitro* model에 '트롬빈 처리 줄기세포로 처리한 군(OGD + MSC_thrombin pre)'에서는 트롬빈 비처리 줄기세포군(OGD + naive MSC) 또는 저산소 처리 줄기세포군(OGD + MSC_hypoxia pre)에 비하여 신경세포 사멸이 현저히 억제됨을 확인하였으며, 이를 통해 본 발명의 트롬빈 처리 줄기세포의 신경세포 보호 효과가 가장 우수함을 검증하였다.

[0076] **실시예 4: 트롬빈 처리 줄기세포 유래의 엑소솜에 대한 *in vitro* 신경세포 사멸억제 효과**

[0077] 상기 실시예 2에서 구축한 신생아 HIE의 *in vitro* model에, 상기 실시예 1에서 수득한 트롬빈 처리 줄기세포 유래의 엑소솜을 처리한 후, MTT assay를 통하여 신경세포의 생존률을 측정하였다.

[0078] 그 결과, 도 5에 나타낸 바와 같이, 정상 신경세포(NC)에 비하여 HIE의 *in vitro* model(OGD)에서는 oxygen/glucose deprivation 유발로 인하여 신경세포의 사멸이 유의하게 증가된 반면, 신생아 HIE *in vitro* model에 '트롬빈 처리 줄기세포 유래의 엑소솜으로 처리한 군(OGD + EV from MSC_thrombin pre)'에서는 트롬빈 비처리 줄기세포 유래의 엑소솜으로 처리한 군(OGD + EV from naive MSC) 또는 저산소 처리 줄기세포 유래의 엑소솜으로 처리한 군(OGD + EV from MSC_hypoxia pre)에 비하여 신경세포 사멸이 현저히 억제됨을 확인하였다.

[0079] 이를 통해, 본 발명의 트롬빈 처리 줄기세포와 마찬가지로 이로부터 유래된 엑소솜 역시 신경세포 보호 효과가 우수함을 검증하였다.

[0081] **실시예 5: 트롬빈 처리 줄기세포의 HIE의 치료 활성 검증(*in vivo*)**

[0082] 동물모델을 이용하여 트롬빈 처리 줄기세포의 HIE의 치료 활성을 확인하기 위하여 하기와 같이 실험을 진행하였다.

[0083] 현재 HIE 치료로 유일한 임상에서 적용하는 고식적 치료는 저체온 요법(Hypothermia)이다. 따라서, 동물실험에서도 임상환경과 유사하게 HIE 질병 후 저체온 요법으로 치료를 한 후, combined treatment로 줄기세포를 추가로 투여하면서 질병의 호전 여부를 확인하였고, 이때 실험을 위해 분류된 그룹은 하기와 같다:

[0084] (1) NC : 정상 대조군

[0085] (2) HIE+S : 질병 대조군 (질병 유도후 saline 처리)

[0086] (3) HIE+H+WJ : HIE 유도 후 Hypothermia 치료 후 트롬빈 비처리 줄기세포 처리

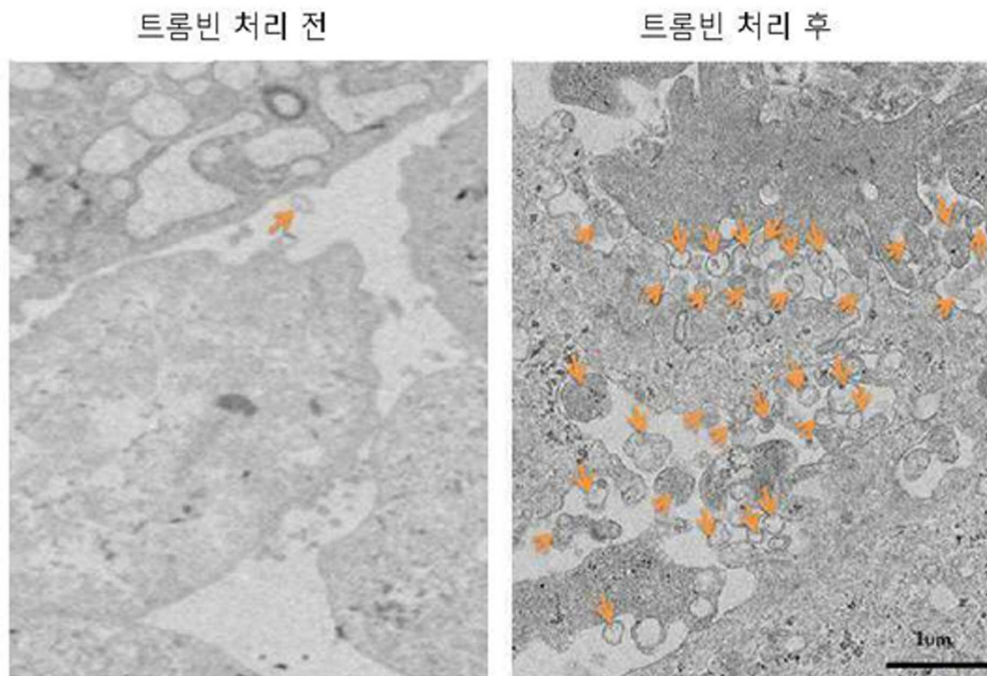
[0087] (4) HIE+H+Th.WJ : HIE 유도 후 Hypothermia 치료 후 트롬빈 처리 줄기세포 처리

[0088] 그 결과, 도 6a 및 도 6b에 나타난 바와 같이, 정상 NC 군에 비하여 질병을 유도한 HIE군은 모두 유의하게 뇌의 손상 영역증가함을 확인할 수 있었다. HIE 유발 이후 저체온 요법을 시행하고 트롬빈 비처리 줄기세포로 치료한 군의 경우 손상 영역의 호전 경향이 있으나 유의성을 보지 못한 반면, 트롬빈 처리 줄기세포로 치료한 군의 경우 손상 영역의 호전 경향이 더 크며 유의함을 확인할 수 있었다.

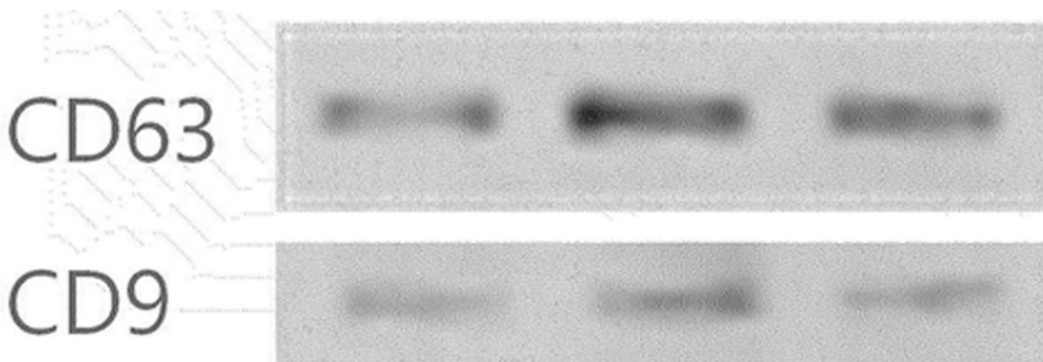
[0090] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해되어야 한다.

도면

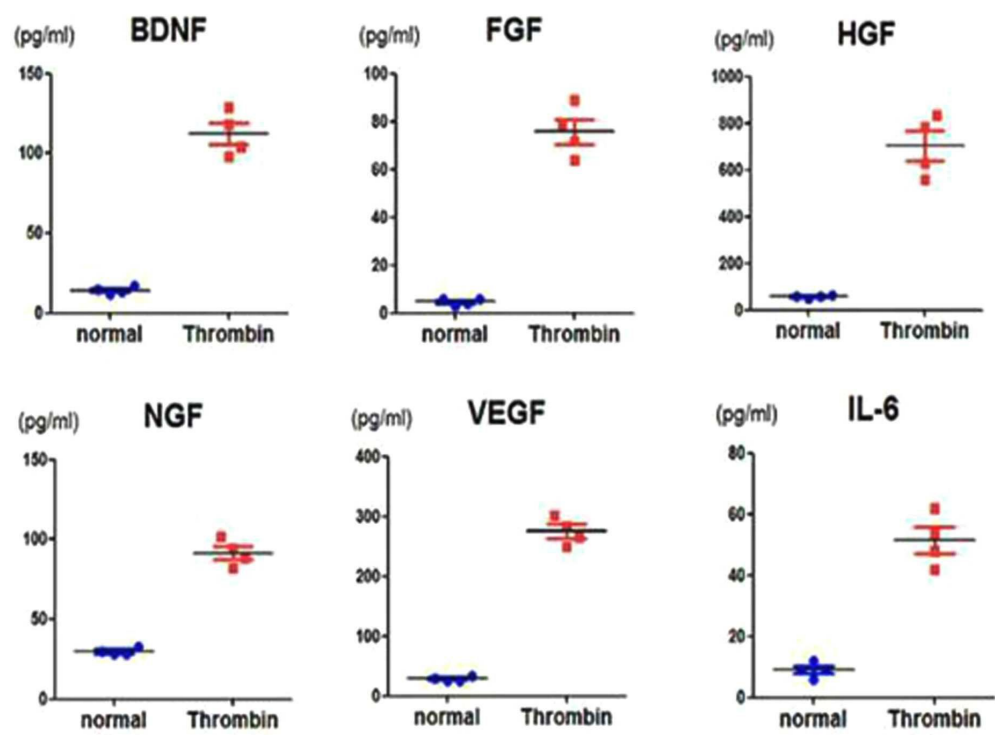
도면1



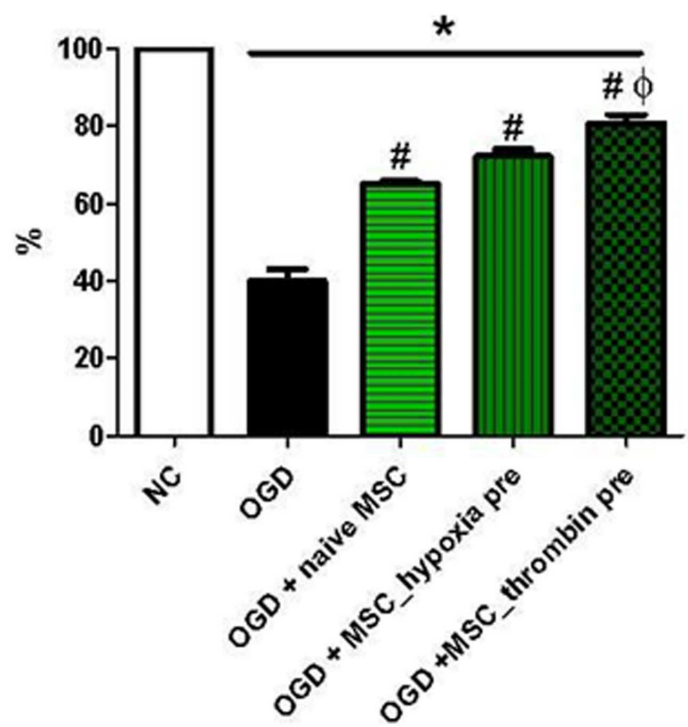
도면2



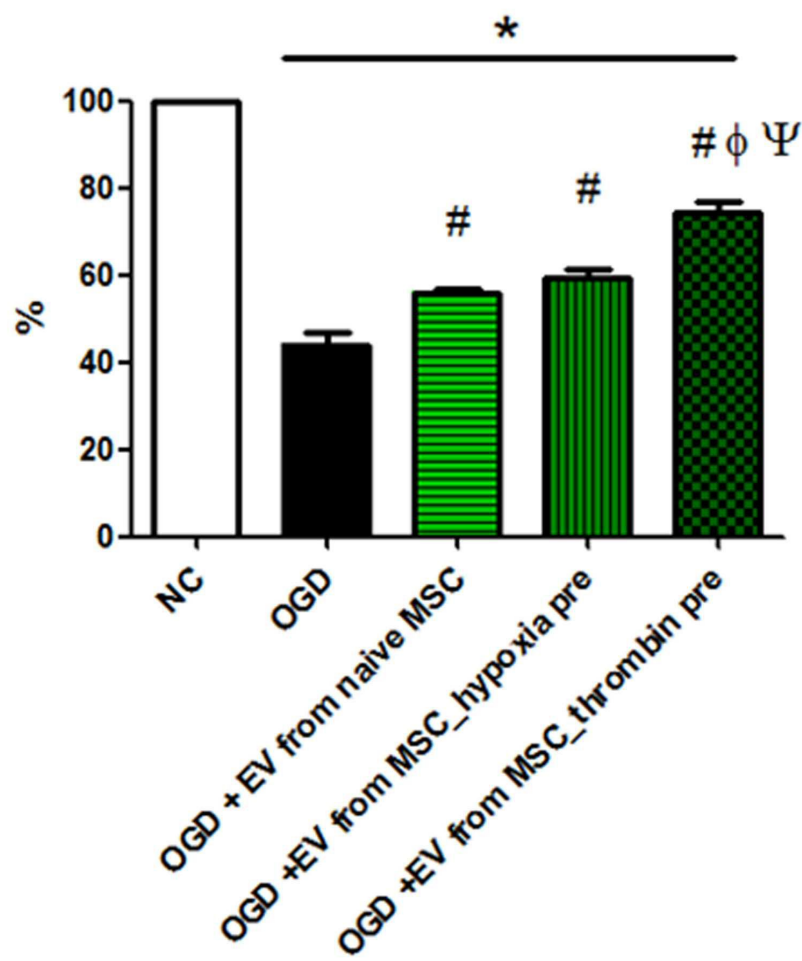
도면3



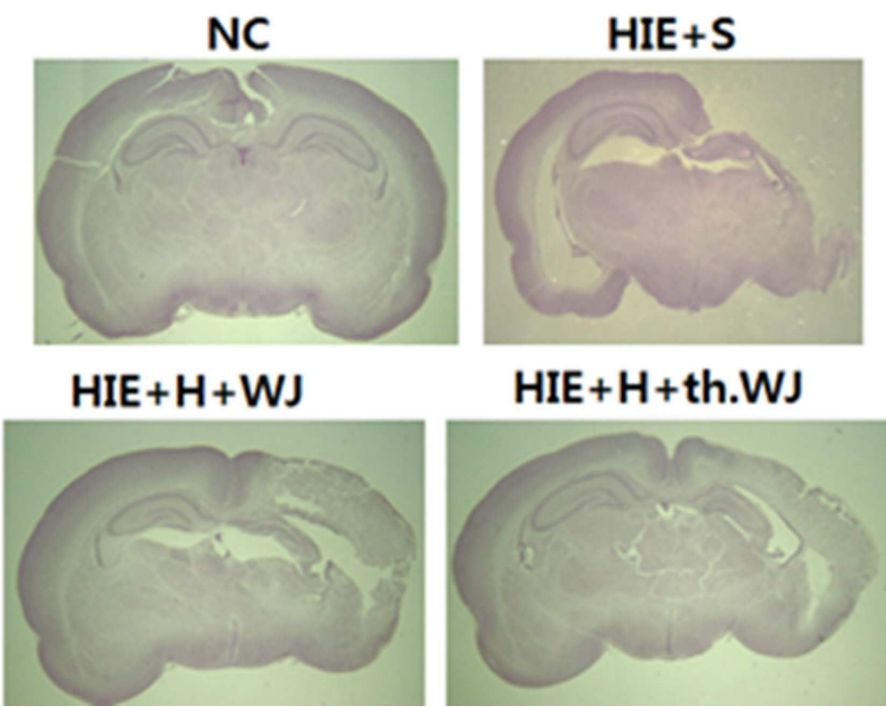
도면4



도면5



도면6a



도면6b

