



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0014839
(43) 공개일자 2022년02월07일

- | | |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
<i>A61K 35/28</i> (2015.01) <i>A23L 33/10</i> (2022.01)
<i>A61P 9/00</i> (2006.01) <i>A61P 9/10</i> (2006.01)
<i>C12N 5/0775</i> (2010.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
<i>A61K 35/28</i> (2013.01)
<i>A23L 33/10</i> (2022.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2021-0097634
(22) 출원일자 2021년07월26일
심사청구일자 2021년07월26일</p> <p>(30) 우선권주장
1020200094588 2020년07월29일 대한민국(KR)</p> | <p>(71) 출원인
브렉소젠 주식회사
서울특별시 송파구 법원로8길 9, 901호, 902호,
903호, 904호(문정동, 청림타워)</p> <p>(72) 발명자
김수
서울특별시 송파구 법원로8길 9, 9층
정선영
경기도 용인시 처인구 동부로 7, 101동 401호</p> <p>(74) 대리인
윤대웅</p> |
|--|--|

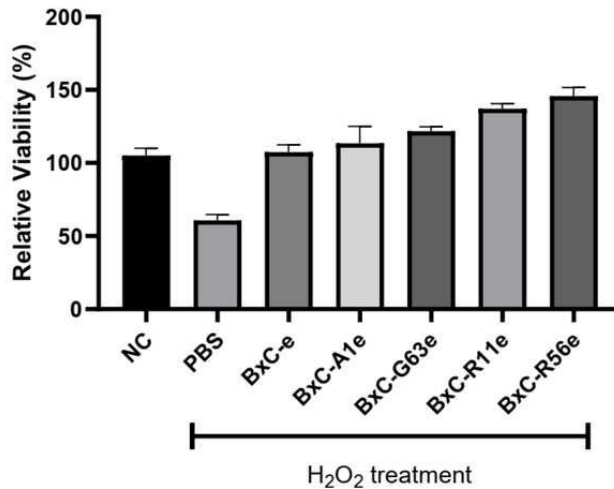
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **줄기세포 유래 엑소솜을 포함하는 조성물 및 이의 제조방법**

(57) 요약

본 발명은 줄기세포 유래 엑소솜을 포함하는 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 조성물은 항-염증, 섬유화 억제, 혈관 내피세포의 증식, 혈관 형성, 생존율 향상, 및 심근세포의 보호재생 효과가 우수하여, 심장질환, 염증성 질환, 면역 질환, 섬유화 질환 또는 혈관 질환의 예방 또는 치료제로 사용될 수 있다.

대표도 - 도3b



(52) CPC특허분류

A61P 9/00 (2018.01)

A61P 9/10 (2018.01)

C12N 5/0668 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/326 (2013.01)

A23V 2250/204 (2013.01)

C12N 2501/905 (2013.01)

C12N 2509/10 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

BxC 줄기세포 유래의 엑소솜, BxC-A1 줄기세포 유래의 엑소솜, BxC-I10 줄기세포 유래의 엑소솜, BxC-G63 줄기세포 유래의 엑소솜, BxC-R11 줄기세포 유래의 엑소솜 및 BxC-R56 줄기세포 유래의 엑소솜으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 엑소솜을 포함하는, 심장질환의 완화, 억제, 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 심장질환은 협심증 (Angina Pectoris), 심근경색 (Myocardial Infarction), 심장판막증 (Valvular disease), 심부전 (Cardiac failure), 심장비대 (Cardiac Hypertrophy), 부정맥 (Arrhythmia), 심낭염 (Pericarditis), 심내막염 (Endocarditis)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 심장질환은 허혈성 심장질환인 것인, 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 조성물은 BxC-R11 줄기세포 유래의 엑소솜을 포함하는 것인, 조성물.

청구항 5

다음 단계를 포함하는 심장질환의 완화, 억제, 예방 또는 치료용 약제학적 조성물의 제조방법:

유도만능줄기세포를 배지에서 배양하는 제1배양 단계;

배양된 유도만능줄기세포 중 SSEA-4 (-) 세포를 분리하고 배양하여 BxC 줄기세포로 분화시키는 선별 배양 단계;

BxC 줄기세포를 배양하여 중간엽 줄기세포로 분화시키는 제2배양 단계;

중간엽 줄기세포에 피오글리타존, 포볼 12-미리스테이트 13-아세트산, 엑센딘-4, 히알루론산, 레스베라트롤로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 물질을 전처리 하는 전처리 단계;

전처리된 중간엽 줄기세포를 배양하여 엑소솜을 생산하는 생산 단계; 및

중간엽 줄기세포 또는 이의 배양물로부터 엑소솜을 분리하는 분리 단계.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 생산 단계는 엑소솜이 제거된 우태아 혈청 (Fetal bovine serum; FBS)으로 상기 중간엽 줄기세포를 배양하는 추가 배양단계를 포함하는 것인, 방법.

청구항 7

BxC 줄기세포 유래의 엑소솜, BxC-A1 줄기세포 유래의 엑소솜, BxC-I10 줄기세포 유래의 엑소솜, BxC-G63 줄기세포 유래의 엑소솜, BxC-R11 줄기세포 유래의 엑소솜 및 BxC-R56 줄기세포 유래의 엑소솜으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 엑소솜을 포함하는, 심장질환의 완화, 억제 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 심장질환은 협심증 (Angina Pectoris), 심근경색 (Myocardial Infarction), 심장판막증 (Valvular disease), 심부전 (Cardiac failure), 심장비대 (Cardiac Hypertrophy), 부정맥 (Arrhythmia), 심낭염 (Pericarditis), 심내막염 (Endocarditis)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 조성물.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 심장질환은 허혈성 심장질환인 것인, 조성물.

청구항 10

제7항에 있어서, 상기 조성물은 BxC-R11 줄기세포 유래의 엑소솜을 포함하는 것인, 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 줄기세포 유래 엑소솜을 포함하는 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 항-염증, 섬유화 억제, 혈관 내피세포의 증식, 혈관 형성, 생존을 향상, 및 심근세포의 보호, 재생 효과가 우수한 중간엽 줄기세포 또는 이의 배양물에서 분리된 엑소솜을 포함하는 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 미세소포체 (Extracellular Vesicles)는 마이크로베지클 (Microvesicles), 엑소솜 (Exosome) 등을 포함하는 30~1000 nm 크기의 구형 지질이중층 (lipid-bilayer)으로 구성된 소포체 (vesicle)이다.

[0003] 엑소솜의 지질이중층은 기원 세포 (공여세포)와 같은 인지질 이중막 구조로 되어 있으며, 세포가 세포외로 분비하는 물질의 구성체로 세포-세포간의 커뮤니케이션 및 세포성 면역 중재 등의 기능적인 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다.

[0004] 엑소솜은 기원 세포 특유의 생물학적 기능을 반영하는 세포특이적 구성 성분을 함유하며, 인지질, mRNA, miRNA 외에도 다양한 수용성 단백질, 외재성 단백질 및 막관통 단백질 성분 등을 포함한다.

[0005] 이러한 엑소솜은 비만세포, 림프구, 성상세포, 혈소판, 신경세포, 내피세포, 상피세포 등 모든 동물 세포에서 배출되며 혈액, 소변, 점액, 타액, 담즙액, 복수액, 뇌척수액 등의 다양한 체액에서 발견된다. 엑소솜은 뇌혈관 장벽 (Blood-Brain Barrier; BBB)도 통과할 수 있으며, 표피 세포와 내피세포의 세포막 투과가 가능할 정도로 선택적 투과성이 높아 특정 약물의 나노캐리어 (nanocarrier)인 DDS (drug delivery system) 개발에도 활용되고 있다.

[0006] 중간엽 줄기세포에서 분비하는 엑소솜 및 마이크로베지클 (microvesicle)은 세포-세포간 커뮤니케이션 (cell-to-cell communication)에 관여하며 줄기세포가 가지는 재생의학적 치료 효능을 보인다고 알려져 있다.

[0007] 줄기세포를 체내에 이식한 후에 장기간의 생존 없이 세포에서 분비되는 파라크린 인자 (paracrine factors)에 트로픽 효과 (trophic effect)를 가져오는 것이 알려져 있고, 이러한 인자에는 성장인자 (growth factor), 케모카인 (chemokine), 사이토카인 (cytokine) 등과 같은 저분자가 엑소솜과 같은 세포외 소포체 (extracellular vesicle)에 의하여 분비되며, 이러한 엑소솜은 줄기세포에서 유래한다. 따라서 엑소솜은 줄기세포의 특성을 규명하고 이의 치료적 효능을 평가하는데 활용되고 있다. 나아가, 최근에는 중간엽 줄기세포 자체를 사용하지 않고 중간엽 줄기세포가 분비하는 엑소솜을 이용하여 다양한 질환의 치료효과에 대한 연구가 활발하게 진행 중이며, 학계 및 산업계에서는 이를 통해 기존의 줄기세포 치료법의 한계를 극복할 수 있는 새로운 대안이 될 수 있을 것으로 예상된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 이에 본 발명자들은 줄기세포 또는 이의 배양액에서 분리된 조성물을 개발하였고, 본 발명에 따른 조성물은 항-염증, 섬유화 억제, 혈관 내피세포의 증식, 형성 또는 생존을 향상, 및 심근세포의 보호·재생 효과가 월등히 우수한 것을 확인하였다.

[0009] 이에, 본 발명의 목적은 줄기세포 유래의 엑소솜을 포함하는 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 줄기세포 유래의 엑소솜을 포함하는 조성물의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 줄기세포 유래의 엑소솜을 포함하는 심장질환의 완화, 억제, 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 심장질환의 완화, 억제, 예방 또는 치료용 조성물의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 목적은 심장질환의 완화 또는 치료 방법을 제공하는 것이다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 목적은 줄기세포 유래의 조성물의 심장질환의 완화, 억제, 예방 또는 치료용도를 제공하는 것이다.
- [0015] 본 발명의 또 다른 목적은 줄기세포 유래의 엑소좀을 포함하는 염증성 질환의 완화, 억제, 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0016] 본 발명의 또 다른 목적은 염증성 질환의 완화, 억제, 예방 또는 치료용 조성물의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0017] 본 발명의 또 다른 목적은 염증성 질환의 완화 또는 치료 방법을 제공하는 것이다.
- [0018] 본 발명의 또 다른 목적은 줄기세포 유래의 조성물의 염증성 질환의 완화, 억제, 예방 또는 치료용도를 제공하는 것이다.
- [0019] 본 발명의 또 다른 목적은 줄기세포 유래의 엑소좀을 포함하는 면역 질환의 완화, 억제, 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0020] 본 발명의 또 다른 목적은 면역 질환의 완화, 억제, 예방 또는 치료용 조성물의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0021] 본 발명의 또 다른 목적은 면역 질환의 완화 또는 치료 방법을 제공하는 것이다.
- [0022] 본 발명의 또 다른 목적은 줄기세포 유래의 엑소좀을 포함하는 조성물의 면역 질환의 완화, 억제, 예방 또는 치료용도를 제공하는 것이다.
- [0023] 본 발명의 또 다른 목적은 줄기세포 유래의 엑소좀을 포함하는 섬유화 질환의 완화, 억제, 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0024] 본 발명의 또 다른 목적은 섬유화 질환의 완화, 억제, 예방 또는 치료용 조성물의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0025] 본 발명의 또 다른 목적은 섬유화 질환의 완화 또는 치료 방법을 제공하는 것이다.
- [0026] 본 발명의 또 다른 목적은 줄기세포 유래의 조성물의 섬유화 질환의 완화, 억제, 예방 또는 치료용도를 제공하는 것이다.
- [0027] 본 발명의 또 다른 목적은 줄기세포 유래의 엑소좀을 포함하는 혈관 질환의 완화, 억제, 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0028] 본 발명의 또 다른 목적은 혈관 질환의 완화, 억제, 예방 또는 치료용 조성물의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0029] 본 발명의 또 다른 목적은 혈관 질환의 완화 또는 치료 방법을 제공하는 것이다.
- [0030] 본 발명의 또 다른 목적은 줄기세포 유래의 조성물의 혈관 질환의 완화, 억제, 예방 또는 치료용도를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0031] 본 발명은 줄기세포 유래 엑소좀을 포함하는 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 조성물은 심장 질환, 염증성 질환, 면역 질환, 섬유화 질환, 피부 결손 및 혈관 질환의 치료 또는 예방에 있어 우수한 효과를 나타낸다.
- [0032] 본 발명자들은 이에 본 발명에 따른 조성물은 항-염증, 섬유화 억제, 혈관 내피세포의 증식, 형성 또는 생존율 향상, 및 심근세포를 보호 및 재생할 수 있는 것을 확인하였다.
- [0033] 이하 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.
- [0035] 본 발명의 일 양태는, 줄기세포 유래의 엑소좀 (exosome)을 포함하는 조성물이다.
- [0036] 본 명세서상의 용어 “엑소좀”은 세포 유래성 소포체로, 거의 모든 진핵 생물의 체액에 존재하는 것으로, LDL 단백질보다는 크지만, 적혈구보다는 훨씬 작은 30-100 nm 정도의 직경을 갖는 소포체를 의미한다. 엑소좀은 다중소포체 (multivesicular bodies)가 세포막과 융합될 때 세포로부터 방출되거나, 세포막으로부터 곧바로 방출

될 수 있고, 응고, 세포간 신호전달 등과 같은 중요하면서도 특화된 기능을 수행한다는 점이 잘 알려져 있다.

- [0037] 본 명세서상의 용어 "줄기세포 (Stem cell)"는 미분화된 세포로서 자기 복제 능력을 가지면서 두 개 이상의 서로 다른 종류의 세포로 분화하는 능력을 갖는 세포를 의미한다.
- [0038] 본 발명의 일 구현예에서, 줄기 세포는 자가 또는 동종 유래 줄기세포일 수 있고, 인간 및 비인간 포유류를 포함한 임의 유형의 동물 유래일 수 있으며, 성체로부터 유래된 줄기세포일 수 있고, 배아로부터 유래된 줄기세포일 수 있다. 예를 들어, 줄기세포는 배아 줄기세포, 성체 줄기세포, 유도만능줄기세포 (induced pluripotent stem cell; iPSC), 유도만능 줄기세포 유래 중간엽 줄기세포, BxC 줄기세포, BxC-A1 줄기세포, BxC-I10 줄기세포, BxC-G63 줄기세포, BxC-R11 줄기세포 및 BxC-R56 줄기세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0039] 본 명세서상의 용어 "성체 줄기세포 (adult stem cell)"는 제대혈이나 성인의 골수, 혈액 등에서 추출되는 세포로 구체적 장기의 세포로 분화되기 직전의 세포를 의미하며, 필요한 때에 신체 내 조직으로 발달할 수 있는 능력을 보유한 미분화 상태의 세포를 의미한다.
- [0040] 본 발명의 일 구현예에서, 성체 줄기세포는 인간, 동물 또는 동물 조직 기원의 성체 줄기세포, 인간, 동물 또는 동물 조직 유래 중간엽 줄기세포 (mesenchymal stromal cell) 및 인간, 동물 또는 동물 조직 기원의 유도만능줄기세포로부터 유래된 중간엽 줄기세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0041] 본 발명에 있어서 인간, 동물 또는 동물 조직은 제대, 제대혈, 골수, 지방, 근육, 신경, 피부, 양막 및 태반으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0042] 본 발명에 있어서 인간 또는 동물의 다양한 조직 기원의 줄기세포는 조혈모세포, 유선 줄기세포, 장 줄기세포, 혈관내피 줄기세포, 신경 줄기세포, 후각신경 줄기세포 및 정소 줄기세포로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0043] 본 명세서상의 용어 "배아 줄기세포 (embryonic stem cell)"는 배아의 발생과정에서 추출한 세포로, 수정란이 모체의 자궁에 착상하기 직전인 포배기 배아에서 내세포괴 (inner cell mass)를 추출하여 체외에서 배양한 것을 의미한다.
- [0044] 배아 줄기세포는 개체의 모든 조직의 세포로 분화할 수 있는 다능성 (多能性, pluripotent)이거나 전능성 (全能性, totipotent)이 있는 자가재생능 (selfrenewal)을 갖는 세포를 의미하며, 넓은 의미로는 배아 줄기세포로부터 유래한 배아체 (embryoid bodies)도 포함하는 것을 의미한다.
- [0045] 본 발명에 있어서 줄기세포는 인간, 원숭이, 돼지, 말, 소, 양, 개, 고양이, 생쥐, 토끼 등의 모든 유래의 배아 줄기세포를 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0046] 본 명세서상의 용어 "유도만능줄기세포 (induced pluripotent stem cell; iPSC)"는 분화된 세포들로부터 인위적인 역분화 과정을 통해 다능성 분화능을 가지도록 유도된 세포들을 의미하며, "역분화줄기세포"와 동일한 의미로 사용될 수 있다.
- [0047] 인위적인 역분화 과정은 레트로바이러스, 렌티바이러스 및 센다이바이러스를 이용한 바이러스-매개 또는 비바이러스성 벡터 이용, 단백질 및 세포 추출물 등을 이용하는 비바이러스-매개 역분화 인자의 도입에 의해 수행되거나, 줄기세포 추출물, 화합물 등에 의한 역분화 과정을 포함할 수 있다.
- [0048] 유도만능줄기세포는 배아 줄기세포와 거의 동일한 특성을 가지며, 구체적으로는, 유사한 세포 모양을 가지고, 유전자, 단백질 발현이 유사하며, in vitro 및 in vivo에서 전분화능을 가지고, 테라토마 (teratoma)를 형성하며, 생쥐의 배반포 (blastocyst)에 삽입시켰을 때, 키메라 (chimera) 생쥐를 형성하고, 유전자의 생식선 전이 (germline transmission)가 가능하다.
- [0049] 본 발명의 일 구현예에서, 줄기세포는 BxC 줄기세포일 수 있다.
- [0050] 본 발명의 일 구현예에서, 조성물은 BxC 줄기세포 유래의 엑소솜을 포함하는 것일 수 있다.
- [0051] 본 명세서 상의 용어 "중간엽 줄기세포 (mesenchymal stem cell; MSC)" 는 중간엽에서 유래한 줄기세포를 의미한다. 중간엽 줄기세포는 조골세포, 연골세포, 지방세포 또는 근세포로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 세포로 분화할 수 있다. 중간엽 줄기세포는 모든 유형의 성체 조직에서 분리될 수 있으며, 예를 들어, 골수 지

방 조직, 태줄 또는 말초 혈액에서 분리될 수 있다. 중간엽 줄기세포의 군집 (MSC population)은 특이적인 표현형 (phenotype)을 나타내는 것으로 정의될 수 있다. 유도만능줄기세포에서 분화된 중간엽 줄기세포의 군집은 통상의 중간엽 줄기세포의 군집과 동일한 표현형 특성을 보일 수 있고, 중간엽 줄기세포의 군집은 CD105, CD73, CD90 마커를 95% 이상 발현하고, CD45, CD34, SSEA-4를 2% 이하로 발현하는 줄기세포의 군집으로 이해될 수 있다.

[0052] 본 명세서 상의 용어 “BxC 줄기세포” 는 유도만능줄기세포 (iPSC)를 배양한 후 SSEA-4 (stage-specific embryonic antigen 4) 단백질을 발현하지 않는 유도만능줄기세포의 군집을 분리한 후, 추가적으로 배양하여 제조될 수 있다. BxC 줄기세포는 유도만능줄기세포에서 중간엽 줄기세포로 완전히 분화되기 직전 단계의 세포이고, 추가 배양을 통해 완전한 중간엽 줄기세포의 성질을 갖게 될 수 있다. 따라서, BxC 줄기세포 군집의 표현형은 중간엽 줄기세포 군집과 완전히 동일한 표현형을 나타내는 것은 아니고, 중간엽 줄기세포 군집의 표현형과 96% 내지 99.9%의 범위로 유사한 표현형을 나타낼 수 있다. 예를 들어, 유도만능줄기세포 군집은 CD90 단백질을 0.3%로 발현하나 중간엽 줄기세포 군집은 99.7%로 CD90 단백질을 발현하고, BxC 줄기세포 군집은 중간엽 줄기세포의 약 98%인 96.9%의 비율로 발현할 수 있다. 이에 따라, BxC 줄기세포는 유도만능줄기세포를 배양한 후 SSEA-4 단백질을 발현하지 않는 유도만능 줄기세포를 추가적으로 배양하여 중간엽 줄기세포로 완전히 분화시키지 않고 96% 내지 99.9% 분화시킨 줄기세포로 정의될 수 있다. BxC 줄기세포는 동일하게 유도만능줄기세포에서 분화된 중간엽 줄기세포에 비해 줄기세포성 (stemness)가 우수하고, 기능성과 관련된 단백질을 다량 분비할 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 BxC 줄기세포는 계대를 9번 이상 거듭할 경우 동일 조직 유래의 중간엽 줄기세포(MSC)와 비교하여 10배 이상 증식능의 차이가 나타나며, 12 번 이상의 횟수로 계대를 하여도 증식능의 감소가 관찰되지 않는다. 또한, BxC 줄기세포는 일반적인 중간엽 줄기세포에 비하여 세포 증식능과 관련된 마커인 Ki67의 발현량도 2배 이상 높게 나타난다. 그리고, BxC 줄기세포는 동일하게 유도만능줄기세포에서 분화된 중간엽 줄기세포에 비해 ANKRD1, CPE, NKAIN4, LCP1, CCDC3, MAMDC2, CLSTN2, SFTA1P, EPB41L3, PDE1C, EMILIN2, SULT1C4, TRIM58, DENND2A, CADM4, AIF1L, NTM, SHISA2, RASSF4, 및 ACKR3로 이루어진 군으로부터 선택된 1 이상의 유전자를 더 높은 수준으로 발현할 수 있고, DHRS3, BMPER, IFI6, PRSS12, RDH10, 및 KCNE4로 이루어진 군으로부터 선택된 1 이상의 유전자를 더 낮은 수준으로 발현할 수 있다.

[0053] 본 명세서상의 용어 "줄기세포능"이란 모든 세포를 생성할 수 있는 능력이 있는 만능성 (pluripotency) 및 자기와 닮은 세포들을 무한정 만들어 낼 수 있는 자기재생능 (self-renewal)을 의미하고, 예를 들어, 미분화 세포를 미분화 상태를 유지하면서 줄기세포의 증식능 (Proliferation)을 증가시키거나, 텔로머라제 활성을 증가시키거나, 줄기세포성 인자 (stemness acting signals)의 발현을 증가시키거나 세포 이동 활성을 증가시키는 것을 말하며, 이들 특징 중 하나 이상이 나타나는 것을 포함할 수 있다.

[0054] 본 발명의 일 구현예에서, 줄기세포는 피오글리타존 (pioglitazone), 포볼 12-미리스테이트 13-아세트산 (Phorbol 12-myristate 13-acetate; PMA), 엑센딘-4 (exendin-4), 히알루론산 (hyaluronic acid), 레스베라트롤 (resveratrol)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상으로 전처리된 것일 수 있다.

[0055] 본 명세서 상의 용어 “전처리” 는 중간엽 줄기세포의 배지에 특정 물질을 첨가하여 배양하는 과정을 의미한다. 예를 들어, 전처리는 유도만능줄기세포에서 분화가 완료된 중간엽 줄기세포를 피오글리타존 (pioglitazone), 포볼 12-미리스테이트 13-아세트산 (Phorbol 12-myristate 13-acetate; PMA), 엑센딘-4 (exendin-4), 히알루론산 (hyaluronic acid) 및 레스베라트롤 (resveratrol)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 물질을 첨가한 배지에 추가적으로 배양하는 과정을 의미한다.

[0056] 본 발명의 일 구현예에서, 유도만능줄기세포 유래 중간엽 줄기세포는 피오글리타존, 포볼 12-미리스테이트 13-아세트산, 엑센딘-4, 히알루론산, 레스베라트롤로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상으로 전처리된 것일 수 있다.

[0057] 본 발명의 일 구현예에서, 유도만능 줄기세포 유래 중간엽 줄기세포는 히알루론산으로 전처리된 것일 수 있다.

[0058] 본 발명의 일 구현예에서, 유도만능 줄기세포 유래 중간엽 줄기세포는 피오글리타존으로 전처리된 것일 수 있다.

[0059] 본 발명의 일 구현예에서, 유도만능 줄기세포 유래 중간엽 줄기세포는 포볼 12-미리스테이트 13-아세트산으로 전처리된 것일 수 있다.

[0060] 본 발명의 일 구현예에서, 유도만능 줄기세포 유래 중간엽 줄기세포는 엑센딘-4로 전처리된 것일 수 있다.

- [0061] 본 발명의 일 구현예에서, 유도만능 줄기세포 유래 중간엽 줄기세포는 레스베라트롤로 전처리된 것일 수 있다.
- [0062] 본 발명에 있어서 피오글리타존, 포볼 12-미리스테이트 13-아세트산, 엑센딘-4, 히알루론산, 레스베라트롤은 줄기세포의 줄기세포능 (Stemness) 및 증식능 (Proliferation)을 증가시키고, 줄기세포 유래 엑소좀의 수, 엑소좀 내 단백질 및 RNA의 함량을 증가시킬 수 있다.
- [0063] 본 발명에 있어서 조성물은 BxC 줄기세포 유래의 엑소좀 (BxC-e), BxC-A1 줄기세포 유래의 엑소좀 (BxC-A1e), BxC-I10 줄기세포 유래의 엑소좀 (BxC-I10e), BxC-G63 줄기세포 유래의 엑소좀 (BxC-G63e), BxC-R11 줄기세포 유래의 엑소좀 (BxC-R11e), BxC-R56 줄기세포 유래의 엑소좀 (BxC-R56e)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 엑소좀을 포함하는 것일 수 있다.
- [0064] 본 발명의 일 구현예에서, 조성물은 BxC-A1 줄기세포 유래의 엑소좀을 포함하는 것일 수 있다.
- [0065] 본 명세서 상의 용어 “BxC-A1 줄기세포”는 본 발명에 따른 BxC 줄기세포를 배양하여 중간엽 줄기세포로 완전히 분화시킨 후, 배지에 피오글리타존을 포함시켜 배양 (전처리)한 중간엽 줄기세포를 의미한다. 예를 들어, BxC-A1 줄기세포는 BxC 줄기세포를 추가 배양하여 중간엽 줄기세포로 완전히 분화시킨 후, 배지에 피오글리타존을 0.001 내지 1000 μM , 예를 들어, 3 μM 포함시켜 12 내지 48시간 동안 배양함에 따라 수득할 수 있다.
- [0066] 본 발명의 일 구현예에서, 조성물은 BxC-I10 줄기세포 유래의 엑소좀을 포함하는 것일 수 있다.
- [0067] 본 명세서 상의 용어 “BxC-I10 줄기세포”는 본 발명에 따른 BxC 줄기세포를 배양하여 중간엽 줄기세포로 완전히 분화시킨 후, 배지에 포볼 12-미리스테이트 13-아세트산 (PMA)을 포함시켜 배양 (전처리)한 중간엽 줄기세포를 의미한다. 예를 들어, BxC-I10 줄기세포는 BxC 줄기세포를 추가 배양하여 중간엽 줄기세포로 완전히 분화시킨 후, 배지에 포볼 12-미리스테이트 13-아세트산을 1 내지 1000 nM, 예를 들어, 50 nM 포함시켜 12 내지 48시간 동안 배양함에 따라 수득할 수 있다. BxC-I10 줄기세포는 아무 물질도 전처리되지 않은 중간엽 줄기세포에 비해 세포의 증식율이 약 220% 증가되며, 엑소좀 생산 효율과 엑소좀 유래 단백질의 양이 5배 이상으로 증가된다.
- [0068] 본 발명의 일 구현예에서, 조성물은 BxC-G63 줄기세포 유래의 엑소좀을 포함하는 것일 수 있다.
- [0069] 본 명세서 상의 용어 “BxC-G63 줄기세포”는 본 발명에 따른 BxC 줄기세포를 배양하여 중간엽 줄기세포로 완전히 분화시킨 후, 배지에 엑센딘-4 (Exendin-4)를 포함시켜 배양 (전처리)한 중간엽 줄기세포를 의미한다. 예를 들어, BxC-G63 줄기세포는 BxC 줄기세포를 추가 배양하여 중간엽 줄기세포로 완전히 분화시킨 후, 배지에 엑센딘-4를 0.01 내지 10000 nM, 예를 들어, 20 nM 포함시켜 12 내지 48시간 동안 배양함에 따라 제조될 수 있다. BxC-G63 줄기세포는 아무 물질도 전처리되지 않은 중간엽 줄기세포에 비해 세포의 증식율이 약 340% 증가되며, 엑소좀 생산 효율이 약 6 배 증가되며, 엑소좀 유래 단백질의 양이 5배 이상으로 증가된다.
- [0070] 본 발명의 일 구현예에서, 조성물은 BxC-R11 줄기세포 유래의 엑소좀을 포함하는 것일 수 있다.
- [0071] 본 명세서 상의 용어 “BxC-R11 줄기세포”는 본 발명에 따른 BxC 줄기세포를 배양하여 중간엽 줄기세포로 완전히 분화시킨 후, 배지에 히알루론산 (Hyaluronic acid)를 포함시켜 배양 (전처리)한 중간엽 줄기세포를 의미한다. 예를 들어, BxC-R11 줄기세포는 BxC 줄기세포를 추가 배양하여 중간엽 줄기세포로 완전히 분화시킨 후, 배지에 히알루론산을 0.1 내지 1000 $\mu\text{g/ml}$, 예를 들어, 40 $\mu\text{g/ml}$ 포함시켜 12 내지 48시간 동안 배양함에 따라 제조될 수 있다. BxC-R11 줄기세포는 아무 물질도 전처리되지 않은 중간엽 줄기세포에 비해 세포의 증식율이 약 360% 증가되며, 엑소좀 생산 효율이 약 5 배 증가되며, 엑소좀 유래 단백질의 양이 5배 이상으로 증가된다.
- [0072] 본 발명의 일 구현예에서, 조성물은 BxC-R56 줄기세포 유래의 엑소좀을 포함하는 것일 수 있다.
- [0073] 본 명세서 상의 용어 “BxC-R56 줄기세포”는 본 발명에 따른 BxC 줄기세포를 배양하여 중간엽 줄기세포로 완전히 분화시킨 후, 배지에 레스베라트롤 (resveratrol)을 포함시켜 배양 (전처리)한 중간엽 줄기세포를 의미한다. 예를 들어, BxC-R56 줄기세포는 BxC 줄기세포를 추가 배양하여 중간엽 줄기세포로 완전히 분화시킨 후, 배지에 레스베라트롤을 0.01 내지 10000 nM, 예를 들어, 10 nM 포함시켜 12 내지 48시간 동안 배양함에 따라 제조될 수 있다. BxC-R56 줄기세포는 아무 물질도 전처리되지 않은 중간엽 줄기세포에 비해 세포의 증식율이 약 1100% 증가되며, 엑소좀 생산 효율이 약 5 배 증가되며, 엑소좀 유래 단백질의 양이 5배 이상으로 증가된다.
- [0074] 본 발명의 일 구현예에서, 피오글리타존은 0.001 내지 1000 μM , 0.005 내지 500 μM , 0.01 내지 100 μM , 0.05 내지 50 μM , 0.1 내지 25 μM , 0.5 내지 15 μM , 1 내지 10 μM , 2 내지 6 μM 의 농도로 전처리 되는 것일 수 있고, 예를 들어, 3 μM 농도로 전처리 되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0075] 본 발명의 일 구현에서, 포볼 12-미리스테이트 13-아세트산은 1 내지 1000 nM, 5 내지 500 nM, 10 내지 250 nM, 10 내지 100 nM, 15 내지 80 nM, 20 내지 70 nM 농도로 전처리 되는 것일 수 있고, 예를 들어, 50 nM 농도로 전처리 되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0076] 본 발명의 일 구현에서, 엑센딘-4는 0.01 내지 10000 nM, 0.1 내지 5000 nM, 1 내지 1000 nM, 1 내지 100 nM, 10 내지 100 nM, 10 내지 50 nM, 10 내지 30 nM 농도로 전처리 되는 것일 수 있고, 예를 들어, 20 nM 농도로 전처리 되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0077] 본 발명의 일 구현에서, 히알루론산은 0.1 내지 1000 µg/ml, 0.5 내지 1000 µg/ml, 1 내지 500 µg/ml, 1 내지 200 µg/ml, 1 내지 100 µg/ml, 1 내지 80 µg/ml, 1 내지 60 µg/ml, 10 내지 60 µg/ml 농도로 전처리 되는 것일 수 있고, 예를 들어, 40 µg/ml 농도로 전처리 되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0078] 본 발명의 일 구현에서, 레스베라트롤은 0.01 내지 10000 nM, 0.1 내지 5000 nM, 0.5 내지 1000 nM, 1 내지 500 nM, 1 내지 100 nM, 5 내지 100 nM, 5 내지 30 nM 농도로 전처리 되는 것일 수 있고, 예를 들어, 10 nM 농도로 전처리 되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0079] 본 발명의 다른 양태는, 줄기세포 유래의 엑소솜을 유효성분으로 포함하는 약제학적 조성물이다.
- [0080] 본 발명에 있어서 약제학적 조성물은 유도만능 줄기세포 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 배양물로부터 분리된 엑소솜을 유효성분으로 포함하는 것일 수 있다.
- [0081] 본 발명에 있어서 약제학적 조성물은 피오글리타존 (pioglitazone), 포볼 12-미리스테이트 13-아세트산 (Phorbol 12-myristate 13-acetate; PMA), 엑센딘-4 (exendin-4), 히알루론산 (hyaluronic acid), 레스베라트롤 (resveratrol)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상으로 전처리된 줄기세포 유래의 엑소솜을 포함하는 것일 수 있다.
- [0082] 본 발명에 있어서 약제학적 조성물은 피오글리타존 (pioglitazone), 포볼 12-미리스테이트 13-아세트산 (Phorbol 12-myristate 13-acetate; PMA), 엑센딘-4 (exendin-4), 히알루론산 (hyaluronic acid), 레스베라트롤 (resveratrol)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상으로 전처리된 유도만능 줄기세포 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 배양물로부터 분리된 엑소솜을 포함하는 것일 수 있다.
- [0083] 본 발명에 있어서 약제학적 조성물은 BxC 줄기세포 유래의 엑소솜 (BxC-e), BxC-A1 줄기세포 유래의 엑소솜 (BxC-A1e), BxC-I10 줄기세포 유래의 엑소솜 (BxC-I10e), BxC-G63 줄기세포 유래의 엑소솜 (BxC-G63e), BxC-R11 줄기세포 유래의 엑소솜 (BxC-R11e) 및 BxC-R56 줄기세포 유래의 엑소솜 (BxC-R56e)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 엑소솜을 포함하는 것일 수 있다.
- [0084] 본 명세서에서 용어, “유효성분으로 포함하는”이란 줄기세포 또는 이의 배양물로부터 분리된 엑소솜의 특정 질환에 대한 완화, 억제, 예방 또는 치료 활성을 달성하는 데 충분한 양을 포함하는 것을 의미한다.
- [0085] 본 발명에 있어서 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있고, 예를 들어, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0086] 본 발명에 있어서 약제학적 조성물은 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0087] 본 발명에 있어서 약제학적 조성물은 경구 및 비경구로 투여할 수 있고, 예컨대 정맥 내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 국소 투여, 비강 내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여, 경막 내 투여, 안구 투여, 피부 투여 및 경피 투여 등으로 투여할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0088] 본 발명에 있어서 약제학적 조성물은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 투여량이 정해질 수 있으며, 소망하는 치료 또는 예방에 효과적인 투여량으로 결정 또는 처방될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 약제학적 조성물의 1일 투여량은 0.0001-1000 mg/kg 일 수 있다.
- [0089] 본 발명에 있어서 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화 함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용

액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 좌제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0090] 본 발명의 약제학적 조성물의 투여 용량은 환자의 나이, 몸무게, 성별, 투여형태, 건강상태 및 질환 정도에 따라 달라질 수 있으며, 의사 또는 약사의 판단에 따라 일정 시간간격으로 1일 1회 내지 수회로 분할 투여될 수도 있다. 예를 들어, 유효성분 함량을 기준으로 1일 투여량이 1 내지 1000 $\mu\text{g/ml}$ 일 수 있으나, 이는 평균적인 경우를 예시한 것으로서 개인적인 차이에 따라 그 투여량이 높거나 낮을 수 있다.
- [0091] 본 발명에 있어서 약제학적 조성물은 심장질환의 완화, 억제, 예방 또는 치료용 약제학적 조성물일 수 있다.
- [0092] 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 심장질환의 완화, 억제, 예방 또는 치료 효과가 우수하며, 특히, BxC 줄기세포 유래의 엑소솜 (BxC-e), BxC-A1 줄기세포 유래의 엑소솜 (BxC-A1e), BxC-I10 줄기세포 유래의 엑소솜 (BxC-I10e), BxC-G63 줄기세포 유래의 엑소솜 (BxC-G63e), BxC-R11 줄기세포 유래의 엑소솜 (BxC-R11e) 및 BxC-R56 줄기세포 유래의 엑소솜 (BxC-R56e)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 엑소솜은 별도의 물질이 전처리되지 않은 줄기세포로부터 분리된 엑소솜에 비해 혈관내피세포의 증식을, 생존율을 향상시키고, 심근세포를 재생하고 보호하는 효과가 우수하여 심장질환의 완화, 억제, 예방 및 치료에 이용될 수 있다 (도 3a 내지 6c 및 도 13a 내지 13d 참조).
- [0093] 본 발명에 있어서 “심장질환”은 협심증 (Angina Pectoris), 심근경색 (Myocardial Infarction), 심장판막증 (Valvular disease), 심부전 (Cardiac failure), 심장비대 (Cardiac Hypertrophy), 부정맥 (Arrhythmia), 심낭염 (Pericarditis), 심내막염 (Endocarditis)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0094] 본 발명의 일 구현예에서, 심장질환은 허혈성 심장질환일 수 있다.
- [0095] 본 명세서 상의 용어 “허혈성 심장질환 (ischemic heart disease)”은 심장에 혈액을 공급해주는 관상동맥이 좁아져 심장근육에 혈액 공급이 부족한 허혈현상이 나타나는 것을 의미한다. 대표적으로 협심증, 심근경색증이 포함되며 심한 경우 심정지를 유발하게 된다. 증상으로는 가슴 통증이 전형적이지만 많이 진행된 경우에는 심장 기능 저하로 인한 심부전으로 호흡 곤란, 부정맥을 유발하기도 하며 동맥경화증이 주요 원인으로 지목되고 있다.
- [0096] 본 발명의 일 구현예에서, 허혈성 심장질환은 협심증, 심근경색, 심부전으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0097] 본 발명에 있어서 약제학적 조성물은 염증성 질환의 완화, 억제, 예방 또는 치료용 약제학적 조성물일 수 있다.
- [0098] 본 명세서 상의 용어 “염증성 질환”은 아토피 피부염, 부종, 피부염, 알레르기, 천식, 결막염, 치주염, 비염, 중이염, 인후염, 편도염, 폐렴, 위궤양, 위염, 크론병, 대장염, 치질, 통풍, 강직성 척추염, 류마티스 열루푸스, 섬유근통 (fibromyalgia), 건선관절염, 골관절염, 류마티스관절염, 건관절주위염, 건염, 건초염, 근육염, 간염, 방광염, 신장염, 쇼그렌 증후군 (sjogren's syndrome) 및 다발성 경화증으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0099] 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 염증성 질환의 완화, 억제, 예방 또는 치료 효과가 우수하며, 본 발명의 구체적인 일 실시예에서 LPS로 자극하여 염증 반응이 유도된 대식세포에 본 발명에 따른 약제학적 조성물을 처리하여 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6의 발현량을 측정된 결과, 대조군에 비해 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6의 발현량이 상대적으로 크게 감소된 것을 확인하였다. (도 7a 내지 8c 참조)
- [0100] 또한, 본 발명의 구체적인 일 실시예에서 IL-4, IL-13으로 처리되어 유도된 재생성 대식세포에 본 발명에 따른 약제학적 조성물을 처리하여 CD206, ARG-1 및 IL-10의 발현량을 측정된 결과, 대조군에 비해 CD206, ARG-1 및 IL-10의 발현량이 크게 감소되지 않는 것을 확인하였다. (도 9a 내지 9c)
- [0101] 본 발명에 있어서 약제학적 조성물은 면역 질환의 완화, 억제, 예방 또는 치료용 약제학적 조성물일 수 있다.
- [0102] 본 명세서 상의 용어 “면역 질환”은 특정 면역 반응이 일어날 경우 문제가 되는 질환을 의미하는 것으로서, 면역질환은 자가면역질환, 이식거부, 이식편대숙주병 일 수 있다.
- [0103] 자가면역질환은 크론씨병, 홍반병, 아토피, 류마티스 관절염, 하시모토 갑상선염, 악성빈혈, 에디슨씨 병, 제1형 당뇨병, 루프스, 만성피로증후군, 섬유근육통, 갑상선기능저하증과 항진증, 경피증, 베체트병, 염증성 장질환, 다발성 경화증, 중증 근무력증, 메니에르 증후군(Meniere's syndrome), 길리안-바레 증후군(Guillian-Barre

syndrome), 쇼그렌 증후군(Sjogren's syndrome), 백반증, 자궁내막증, 건선, 백반증, 전신성 경피증, 천식 또는 궤양성 대장염 등일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0104] 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 면역 질환의 완화, 억제, 예방 또는 치료 효과가 우수하며, 본 발명의 구체적인 일 실시예에서 LPS로 자극하여 염증 반응이 유도된 대식세포에 본 발명에 따른 약제학적 조성물을 처리하여 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6의 발현량을 측정된 결과, 대조군에 비해 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6의 발현량이 상대적으로 크게 감소된 것을 확인하였다. (도 7a 내지 8c 참조)
- [0105] 또한, 본 발명의 구체적인 일 실시예에서 IL-4, IL-13으로 처리되어 유도된 재생성 대식세포에 본 발명에 따른 약제학적 조성물을 처리하여 CD206, ARG-1 및 IL-10의 발현량을 측정된 결과, 대조군에 비해 CD206, ARG-1 및 IL-10의 발현량이 크게 감소되지 않는 것을 확인하였다. (도 9a 내지 9c)
- [0106] 본 발명에 있어서 약제학적 조성물은 섬유화 질환의 완화, 억제, 예방 또는 치료용 약제학적 조성물일 수 있다.
- [0107] 본 명세서 상의 용어 “섬유화 질환”은 다양한 원인에 의해 장기의 일부가 굳는 현상이 나타나는 질환을 의미하며, 예를 들어, 신장 섬유화, 간 섬유화, 폐 섬유화 등을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0108] 본 명세서 상의 용어 “신장 섬유화”는 신장 조직에서 발생하는 과도한 염증반응, 상피세포의 섬유세포화 등과 같은 다양한 원인들로 인하여 신장조직 또는 혈관이 단단하게 굳어져 신장의 기능을 상실하게 되는 증상을 의미한다.
- [0109] 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 섬유화 질환의 완화, 억제, 예방 또는 치료 효과가 우수하며, 본 발명의 구체적인 일 실시예에서 TGF- β 1로 섬유화가 유도된 섬유아세포에 본 발명에 따른 약제학적 조성물을 처리하여 α -SMA 및 CTGF의 발현량을 측정된 결과, 대조군에 비해 α -SMA 및 CTGF의 발현량이 크게 감소한 것을 확인하였다. (도 10a 내지 12b 참조)
- [0110] 본 발명에 있어서 약제학적 조성물은 혈관 질환의 완화, 억제, 예방 또는 치료용 약제학적 조성물일 수 있다.
- [0111] 본 명세서 상의 용어 "혈관 질환"은 혈관 조직의 손상이 일어나고, 이에 의한 혈관 내막이 두꺼워지는 증상을 가지는 질환을 의미하며, 혈관 질환은 혈관 비후증, 불안정 협심증 (unstable angina), 심근 경색 (acute myocardial infarction), 죽상 경화증, 혈관재협착 (in-stent restenosis)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0112] 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 혈관 질환의 완화, 억제, 예방 또는 치료 효과가 우수하며, 본 발명의 구체적인 일 실시예에서 혈관내피세포 또는 과산화수소로 인해 손상된 혈관 내피세포에 본 발명에 따른 약제학적 조성물을 처리하여 혈관내피세포의 증식률, 생존율 및 혈관내피세포의 튜브 길이, 노드, 수를 측정된 결과, 대조군에 비하여 혈관내피세포의 증식률 및 생존율이 향상되고, 혈관내피세포의 튜브 길이, 노드, 수가 모두 증가된 것을 확인하였다. (도 4a 내지 6c 참조)
- [0113] 본 발명의 다른 양태는, 줄기세포 유래 엑소솜을 유효성분으로 포함하는 식품 조성물이다.
- [0114] 본 발명에 따른 식품 조성물은 상술한 약제학적 조성물과 동일하게 본 발명에 따른 줄기세포 유래의 엑소솜을 포함하므로, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.
- [0115] 본 발명에 따른 식품 조성물은 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함할 수 있으며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소, 조미제 및 향미제를 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0116] 본 발명에 따른 식품 조성물에 포함될 수 있는 탄수화물로는 포도당 과당 등의 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스, 올리고당 등의 디사카라이드, 텍스트린, 사이클로덱스트린 등과 같은 폴리사카라이드 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이 포함될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0117] 본 발명에 따른 식품 조성물에 포함될 수 있는 향미제는 타우마틴, 스테비아 추출물 등의 천연 향미제 및 사카린, 아스파탐 등의 합성 향미제를 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0118] 본 발명에 있어서 식품 조성물은 심장질환의 완화, 억제 또는 개선용 식품 조성물일 수 있다.
- [0119] 본 발명에 있어서 식품 조성물은 염증성 질환의 완화, 억제 또는 개선용 식품 조성물일 수 있다.
- [0120] 본 발명에 있어서 식품 조성물은 면역 질환의 완화, 억제 또는 개선용 식품 조성물일 수 있다.
- [0121] 본 발명에 있어서 식품 조성물은 섬유화 질환의 완화, 억제 또는 개선용 식품 조성물일 수 있다.

- [0122] 본 발명에 있어서 식품 조성물은 혈관 질환의 완화, 억제 또는 개선용 식품 조성물일 수 있다.
- [0123] 본 발명의 또 다른 양태는, 유도만능 줄기세포 유래 중간엽 줄기세포를 포함하는 세포 치료제이다.
- [0124] 본 명세서상의 용어 "세포 치료제"는 세포와 조직의 기능을 복원시키기 위하여 살아있는 자가 (autologous), 동종 (allogenic), 이종 (xenogenic) 세포를 체외에서 증식·선별하거나 여타한 방법으로 세포의 생물학적 특성을 변화시키는 등의 일련의 행위를 통하여 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품을 의미한다.
- [0125] 본 발명의 일 구현예에서, 세포 치료제는 줄기세포 치료제일 수 있다.
- [0126] 본 발명의 일 구현예에서, 유도만능 줄기세포 유래 중간엽 줄기세포는 BxC 줄기세포, BxC-A1 줄기세포, BxC-I10 줄기세포, BxC-G63 줄기세포, BxC-R11 줄기세포 및 BxC-R56 줄기세포로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 줄기세포를 포함하는 것일 수 있다.
- [0127] 본 발명에 있어서 세포 치료제는 심장질환의 완화, 억제, 예방 또는 치료용 세포 치료제일 수 있다.
- [0128] 본 발명에 있어서 세포 치료제는 염증성 질환의 완화, 억제, 예방 또는 치료용 세포 치료제일 수 있다.
- [0129] 본 발명에 있어서 세포 치료제는 면역 질환의 완화, 억제, 예방 또는 치료용 세포 치료제일 수 있다.
- [0130] 본 발명에 있어서 세포 치료제는 섬유화 질환의 완화, 억제, 예방 또는 치료용 세포 치료제일 수 있다.
- [0131] 본 발명에 있어서 세포 치료제는 혈관 질환의 완화, 억제, 예방 또는 치료용 세포 치료제일 수 있다.
- [0132] 본 발명의 또 다른 양태는, 다음 단계를 포함하는 줄기세포 또는 이의 배양물로부터 분리된 엑소솜을 포함하는 조성물의 제조방법이다:
- [0133] 줄기세포 또는 이의 배양물로부터 엑소솜을 분리하는 분리 단계.
- [0134] 본 발명에 있어서 방법은 유도만능 줄기세포 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 배양물로부터 분리된 엑소솜을 포함하는 조성물의 제조방법인 것일 수 있다.
- [0135] 본 발명의 일 구현예에서, 분리단계는 유도만능 줄기세포 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 배양물로부터 엑소솜을 분리하는 것일 수 있다.
- [0136] 본 발명의 일 구현예에서, 줄기 세포는 자가 또는 동종 유래 줄기세포일 수 있고, 인간 및 비인간 포유류를 포함한 임의 유형의 동물 유래일 수 있으며, 성체로부터 유래된 줄기세포일 수 있고, 배아로부터 유래된 줄기세포일 수 있다. 예를 들어, 줄기세포는 배아 줄기세포, 성체 줄기세포, 유도만능줄기세포 (induced pluripotent stem cell; iPSC), 유도만능 줄기세포 유래 중간엽 줄기세포, BxC 줄기세포, BxC-A1 줄기세포, BxC-I10 줄기세포, BxC-G63 줄기세포, BxC-R11 줄기세포 및 BxC-R56 줄기세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0137] 분리단계에서, 줄기세포의 배양 배지를 200-400xg에서 5 내지 20분간 원심분리하여 남아있는 세포와 세포 잔여물을 제거한 뒤, 상층액을 취하여 9,000-12,000xg로 60-80분간 고속 원심분리한 후, 다시 상층액을 취하여 90,000-120,000xg로 80-100분간 원심분리하고 상층액을 제거함으로써 하층에 남아 있는 엑소솜을 얻을 수 있다.
- [0138] 본 발명의 일 구현예에서, 방법은 유도만능 줄기세포 유래 중간엽 줄기세포를 피오글리타존, 포볼 12-미리스테이트 13-아세트산, 엑센딘-4, 히알루론산, 레스베라트롤로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상으로 전처리하는 전처리 단계를 더 포함하는 것일 수 있다.
- [0139] 본 발명의 일 구현예에서, 방법은 배양된 유도만능줄기세포 중 SSEA-4 (-) 세포를 분리하고 배양하여 BxC 줄기세포로 분화시키는 선별 배양 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0140] 본 발명의 일 구현예에서, 방법은 세포 배양 배지를 통해 줄기세포를 배양하는 세포 엑소솜 생산 단계를 더 포함하는 것일 수 있다.
- [0141] 본 발명에 따른 엑소솜 생산 단계는 줄기세포로부터 엑소솜의 분비 또는 생산을 유도하는 과정이고, 본 발명에 있어서 세포 배양 배지는 당해 분야에서 통상적으로 사용되는 줄기세포 배양용 배지를 모두 포함할 수 있으며, 예를 들어, DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), MEM (Minimal Essential Medium), BME (Basal Medium Eagle), RPMI 1640, 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),

KnockOut DMEM, E8 (Essential 8 Medium) 등의 상업적으로 제조된 배지 또는 인위적으로 합성한 배지가 이용될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0142] 본 발명의 일 구현예에서, 세포 배양 배지는 탄소원, 질소원, 미량원소 성분, 아미노산, 항생제 등의 성분을 더 포함할 수 있다.
- [0143] 본 발명의 일 구현예에서, 엑소솜 생산 단계는 엑소솜이 제거된 우태아 혈청 (Fetal bovine serum; FBS)으로 줄기세포를 배양하는 추가 배양단계를 포함하는 것일 수 있다.
- [0144] 세포배양 배지에 엑소솜을 제거한 FBS는 소 혈청유래의 엑소솜이 많이 포함되어 있는 일반 FBS와 달리 엑소솜이 제거되어 줄기세포가 분비하는 엑소솜 외에 FBS에서 유래된 엑소솜이 혼입되는 것을 방지할 수 있다.
- [0145] 본 발명의 또 다른 양태는, 다음 단계를 포함하는 엑소솜을 포함하는 조성물의 제조방법이다:
- [0146] 유도만능줄기세포를 배지에서 배양하는 제1배양 단계;
- [0147] 배양된 유도만능줄기세포 중 SSEA-4 (-) 세포를 분리하고 배양하여 BxC 줄기세포로 분화시키는 선별 배양 단계;
- [0148] BxC 줄기세포를 배양하여 중간엽 줄기세포로 분화시키는 제2배양 단계;
- [0149] 중간엽 줄기세포에 피오글리타존, 포볼 12-미리스테이트 13-아세트산, 엑센딘-4, 히알루론산, 레스베라트롤로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 물질을 전처리 하는 전처리 단계;
- [0150] 전처리된 중간엽 줄기세포를 배양하여 엑소솜을 생산하는 생산 단계; 및
- [0151] 중간엽 줄기세포 또는 이의 배양물로부터 엑소솜을 분리하는 분리 단계.
- [0152] 본 발명의 일 구현예에서, 제1배양 단계는 유도만능줄기세포를 FBS 및 bFGF를 포함하는 배지에서 1-10일간 배양하는 것일 수 있다.
- [0153] 본 발명의 일 구현예에서, 선별 배양 단계는 유도만능줄기세포 중 SSEA-4 (-) 세포를 분리하여 FBS 및 bFGF를 포함하는 배지에서 1-10일간 배양하여 BxC 줄기세포로 분화시키는 것일 수 있다.
- [0154] 본 발명의 일 구현예에서, 전처리 단계는 중간엽 줄기세포에 피오글리타존을 0.001 내지 1000 μM , 0.005 내지 500 μM , 0.01 내지 100 μM , 0.05 내지 50 μM , 0.1 내지 25 μM , 0.5 내지 15 μM , 1 내지 10 μM , 2 내지 6 μM 의 농도로 전처리 하는 것일 수 있고, 예를 들어, 3 μM 농도로 전처리하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0155] 본 발명의 일 구현예에서, 전처리 단계는 중간엽 줄기세포에 포볼 12-미리스테이트 13-아세트산을 1 내지 1000 nM, 5 내지 500 nM, 10 내지 250 nM, 10 내지 100 nM, 15 내지 80 nM, 20 내지 70 nM 농도로 전처리하는 것일 수 있고, 예를 들어, 50 nM 농도로 전처리하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0156] 본 발명의 일 구현예에서, 전처리 단계는 중간엽 줄기세포에 엑센딘-4를 0.01 내지 10000 nM, 0.1 내지 5000 nM, 1 내지 1000 nM, 1 내지 100 nM, 10 내지 100 nM, 10 내지 50 nM, 10 내지 30 nM 농도로 전처리하는 것일 수 있고, 예를 들어, 20 nM 농도로 전처리하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0157] 본 발명의 일 구현예에서, 전처리 단계는 중간엽 줄기세포에 히알루론산을 0.1 내지 1000 $\mu\text{g/ml}$, 0.5 내지 1000 $\mu\text{g/ml}$, 1 내지 500 $\mu\text{g/ml}$, 1 내지 200 $\mu\text{g/ml}$, 1 내지 100 $\mu\text{g/ml}$, 1 내지 80 $\mu\text{g/ml}$, 1 내지 60 $\mu\text{g/ml}$, 10 내지 60 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 전처리하는 것일 수 있고, 예를 들어, 40 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 전처리하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0158] 본 발명의 일 구현예에서, 전처리 단계는 중간엽 줄기세포에 레스베라트롤을 0.01 내지 10000 nM, 0.1 내지 5000 nM, 0.5 내지 1000 nM, 1 내지 500 nM, 1 내지 100 nM, 5 내지 100 nM, 5 내지 30 nM 농도로 전처리하는 것일 수 있고, 예를 들어, 10 nM 농도로 전처리하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0159] 본 발명의 일 구현예에서, 생산 단계는 엑소솜이 제거된 우태아 혈청 (Fetal bovine serum; FBS)으로 중간엽 줄기세포를 배양하는 추가 배양단계를 포함하는 것일 수 있다.
- [0160] 본 발명에 있어서 방법은 유도만능 줄기세포 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 배양물로부터 분리된 엑소솜을 유효성분으로 포함하는 심장질환의 완화, 억제, 예방 또는 치료용 약제학적 조성물의 제조방법일 수 있다.
- [0161] 본 발명에 있어서 방법은 유도만능 줄기세포 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 배양물로부터 분리된 엑소솜을 유

효성분으로 포함하는 염증성 질환의 완화, 억제, 예방 또는 치료용 약제학적 조성물의 제조방법일 수 있다.

- [0162] 본 발명에 있어서 방법은 유도만능 줄기세포 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 배양물로부터 분리된 엑소좀을 유효성분으로 포함하는 면역 질환의 완화, 억제, 예방 또는 치료용 약제학적 조성물의 제조방법일 수 있다.
- [0163] 본 발명에 있어서 방법은 유도만능 줄기세포 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 배양물로부터 분리된 엑소좀을 유효성분으로 포함하는 심유화 질환의 완화, 억제, 예방 또는 치료용 약제학적 조성물의 제조방법일 수 있다.
- [0164] 본 발명에 있어서 방법은 유도만능 줄기세포 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 배양물로부터 분리된 엑소좀을 유효성분으로 포함하는 혈관 질환의 완화, 억제, 예방 또는 치료용 약제학적 조성물의 제조방법일 수 있다.
- [0165] 본 발명의 또 다른 양태는, 다음 단계를 포함하는 심장질환의 완화 또는 치료 방법이다:
- [0166] 줄기세포 또는 이의 배양물로부터 분리된 엑소좀 (exosome)을 유효성분으로 포함하는 약제학적 조성물을 대상에게 투여하는 단계.
- [0167] 본 발명의 일 구현예에서, 줄기세포 또는 이의 배양물로부터 분리된 엑소좀은 BxC 줄기세포 유래의 엑소좀 (BxC-e), BxC-A1 줄기세포 유래의 엑소좀 (BxC-A1e), BxC-I10 줄기세포 유래의 엑소좀 (BxC-I10e), BxC-G63 줄기세포 유래의 엑소좀 (BxC-G63e), BxC-R11 줄기세포 유래의 엑소좀 (BxC-R11e) 및 BxC-R56 줄기세포 유래의 엑소좀 (BxC-R56e)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 엑소좀일 수 있다.
- [0168] 본 발명의 또 다른 양태는, 다음 단계를 포함하는 염증성 질환의 완화 또는 치료 방법이다:
- [0169] 줄기세포 또는 이의 배양물로부터 분리된 엑소좀 (exosome)을 유효성분으로 포함하는 약제학적 조성물을 대상에게 투여하는 단계.
- [0170] 본 발명의 일 구현예에서, 줄기세포 또는 이의 배양물로부터 분리된 엑소좀은 BxC 줄기세포 유래의 엑소좀 (BxC-e), BxC-A1 줄기세포 유래의 엑소좀 (BxC-A1e), BxC-I10 줄기세포 유래의 엑소좀 (BxC-I10e), BxC-G63 줄기세포 유래의 엑소좀 (BxC-G63e), BxC-R11 줄기세포 유래의 엑소좀 (BxC-R11e) 및 BxC-R56 줄기세포 유래의 엑소좀 (BxC-R56e)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 엑소좀일 수 있다.
- [0171] 본 발명의 또 다른 양태는, 다음 단계를 포함하는 면역 질환의 완화 또는 치료 방법이다:
- [0172] 줄기세포 또는 이의 배양물로부터 분리된 엑소좀 (exosome)을 유효성분으로 포함하는 약제학적 조성물을 대상에게 투여하는 단계.
- [0173] 본 발명의 일 구현예에서, 줄기세포 또는 이의 배양물로부터 분리된 엑소좀은 BxC 줄기세포 유래의 엑소좀 (BxC-e), BxC-A1 줄기세포 유래의 엑소좀 (BxC-A1e), BxC-I10 줄기세포 유래의 엑소좀 (BxC-I10e), BxC-G63 줄기세포 유래의 엑소좀 (BxC-G63e), BxC-R11 줄기세포 유래의 엑소좀 (BxC-R11e) 및 BxC-R56 줄기세포 유래의 엑소좀 (BxC-R56e)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 엑소좀일 수 있다.
- [0174] 본 발명의 또 다른 양태는, 다음 단계를 포함하는 심유화 질환의 완화 또는 치료 방법이다:
- [0175] 줄기세포 또는 이의 배양물로부터 분리된 엑소좀 (exosome)을 유효성분으로 포함하는 약제학적 조성물을 대상에게 투여하는 단계.
- [0176] 본 발명의 일 구현예에서, 줄기세포 또는 이의 배양물로부터 분리된 엑소좀은 BxC 줄기세포 유래의 엑소좀 (BxC-e), BxC-A1 줄기세포 유래의 엑소좀 (BxC-A1e), BxC-I10 줄기세포 유래의 엑소좀 (BxC-I10e), BxC-G63 줄기세포 유래의 엑소좀 (BxC-G63e), BxC-R11 줄기세포 유래의 엑소좀 (BxC-R11e) 및 BxC-R56 줄기세포 유래의 엑소좀 (BxC-R56e)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 엑소좀일 수 있다.
- [0177] 본 발명의 또 다른 양태는, 다음 단계를 포함하는 혈관 질환의 완화 또는 치료 방법이다:
- [0178] 줄기세포 또는 이의 배양물로부터 분리된 엑소좀 (exosome)을 유효성분으로 포함하는 약제학적 조성물을 대상에게 투여하는 단계.
- [0179] 본 발명의 일 구현예에서, 줄기세포 또는 이의 배양물로부터 분리된 엑소좀은 BxC 줄기세포 유래의 엑소좀 (BxC-e), BxC-A1 줄기세포 유래의 엑소좀 (BxC-A1e), BxC-I10 줄기세포 유래의 엑소좀 (BxC-I10e), BxC-G63 줄기세포 유래의 엑소좀 (BxC-G63e), BxC-R11 줄기세포 유래의 엑소좀 (BxC-R11e) 및 BxC-R56 줄기세포 유래의 엑소좀 (BxC-R56e)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 엑소좀일 수 있다.
- [0180] 본 발명에 따른 치료방법은 상술한 조성물과 동일하게 줄기세포 또는 이의 배양물로부터 분리된 엑소좀을 포함

하므로, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.

- [0181] 본 명세서 상의 용어 "치료"란, 본 발명에 따른 조성물의 투여로 질환이 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 말한다.
- [0182] 본 명세서 상의 용어 "투여"는 임의의 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 제공하는 것을 의미하며, 본 발명의 약제학적 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 일반적인 모든 경로를 통하여 경구 또는 비경구 투여될 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물은 유효성분을 표적 세포로 전달할 수 있는 임의의 장치를 이용해 투여될 수도 있다.
- [0183] 본 명세서 상의 용어 "대상"은, 특별히 한정되는 것은 아니지만, 예를 들어, 인간, 원숭이, 소, 말, 양, 돼지, 닭, 칠면조, 메추라기, 고양이, 개, 마우스, 쥐, 토끼 또는 기니아 피그를 포함하고, 예를 들어, 인간일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0184] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 약제학적 조성물은 단독으로 투여될 수 있으나, 일반적으로 투여방식과 표준 약제학적 관행 (standard pharmaceutical practice)을 고려하여 선택된 약제학적 담체와 혼합되어 투여될 수 있다.
- [0185] 본 발명의 또 다른 양태는, 줄기세포 유래의 엑소솜을 유효성분으로 포함하는 조성물의 심장질환의 완화, 억제, 예방 또는 치료용도이다.
- [0186] 본 발명의 또 다른 양태는, 줄기세포 유래의 엑소솜을 유효성분으로 포함하는 조성물의 염증성 질환의 완화, 억제, 예방 또는 치료용도이다.
- [0187] 본 발명의 또 다른 양태는, 줄기세포 유래의 엑소솜을 유효성분으로 포함하는 조성물의 면역 질환의 완화, 억제, 예방 또는 치료용도이다.
- [0188] 본 발명의 또 다른 양태는, 줄기세포 유래의 엑소솜을 유효성분으로 포함하는 조성물의 섬유화 질환의 완화, 억제, 예방 또는 치료용도이다.
- [0189] 본 발명의 또 다른 양태는, 줄기세포 유래의 엑소솜을 유효성분으로 포함하는 조성물의 혈관 질환의 완화, 억제, 예방 또는 치료용도이다.

발명의 효과

- [0190] 본 발명은 줄기세포 유래 엑소솜을 포함하는 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 조성물은 항-염증, 섬유화 억제, 혈관 내피세포의 증식, 혈관 형성, 생존율 향상, 및 심근세포의 보호·재생 효과가 우수하여, 심장질환, 염증성 질환, 면역 질환, 섬유화 질환, 혈관 질환의 예방 또는 치료제로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0191] 도 1a는 본 발명의 일 실시예 따른 BxC 줄기세포 유래 엑소솜 (BxC-e)의 크기 분포를 보여주는 그래프이다.
 도 1b는 본 발명의 일 실시예 따른 BxC 줄기세포 유래 엑소솜 (BxC-e)의 형태를 전자 현미경을 통해 관찰한 사진이다.
 도 2a는 본 발명의 일 실시예 따른 BxC-R11 줄기세포 유래의 엑소솜 (BxC-R11e)의 크기 분포를 보여주는 그래프이다.
 도 2b는 본 발명의 일 실시예 따른 BxC-R11 줄기세포 유래의 엑소솜 (BxC-R11e)의 형태를 전자 현미경을 통해 관찰한 사진이다.
 도 3a 본 발명의 일 실시예에 따른 BxC 줄기세포 유래의 엑소솜 (BxC-e), BxC-A1 줄기세포 유래의 엑소솜 (BxC-A1e), BxC-I10 줄기세포 유래의 엑소솜 (BxC-I10e), BxC-G63 줄기세포 유래의 엑소솜 (BxC-G63e), BxC-R11 줄기세포 유래의 엑소솜 (BxC-R11e) 또는 BxC-R56 줄기세포 유래의 엑소솜 (BxC-R56e)로 처리된 각각의 유도만능 줄기세포 유래 심근세포의 생존율을 나타내는 그래프이다.
 도 3b는 본 발명의 일 실시예에 따른 BxC-e 엑소솜, BxC-A1e 엑소솜, BxC-G63e 엑소솜, BxC-R11e 엑소솜 및 BxC-R56e 엑소솜으로 처리된 유도만능줄기세포 유래의 과산화수소를 통해 손상된 심근세포의 생존율을 나타내는 그래프이다.

도 3c는 과산화수소를 통해 손상된 유도만능줄기세포 유래의 심근세포에 본 발명의 일 실시예에 따른 BxC-e 엑소좀 또는 BxC-R11e 엑소좀으로 처리하여 심근세포의 활성산소가 감소된 결과를 나타내는 그림이다.

도 3d는 과산화수소를 통해 손상된 유도만능줄기세포 유래의 심근세포에 본 발명의 일 실시예에 따른 BxC-e 엑소좀 또는 BxC-R11e 엑소좀으로 처리하여 심근세포의 활성산소가 감소된 결과를 나타내는 그래프이다.

도 3e는 과산화수소를 통해 손상된 유도만능줄기세포 유래의 심근세포에 본 발명의 일 실시예에 따른 BxC-e 엑소좀, BxC-A1e 엑소좀, BxC-G63e 엑소좀, BxC-R11e 엑소좀 또는 BxC-R56e 엑소좀을 처리한 후 심근세포의 손상된 정도를 나타내는 LDH (lactate dehydrogenase) 수치를 나타내는 그래프이다.

도 4a는 PBS 처리된 혈관 내피세포 및 본 발명의 일 실시예에 따른 BxC-e 엑소좀, BxC-A1e 엑소좀, BxC-I10e 엑소좀, BxC-G63e 엑소좀 또는 BxC-R11e 엑소좀, BxC-R56e 엑소좀으로 처리된 각각의 혈관 내피세포 증식율을 나타내는 그래프이다.

도 4b는 과산화 수소 (H2O2)로 인해 손상되고 PBS 처리된 혈관 내피세포 및 과산화 수소로 인해 손상되고 BxC-e 엑소좀, BxC-A1e 엑소좀, BxC-I10e 엑소좀, BxC-G63e 엑소좀, BxC-R11e 엑소좀 또는 BxC-R56e 엑소좀으로 처리된 각각의 혈관 내피세포 증식율을 나타내는 그래프이다.

도 5a는 PBS가 처리된 인간 태줄 유래 혈관 내피 세포주 HUVEC를 배양한 결과를 나타내는 사진이다.

도 5b는 BxC-e 엑소좀이 처리된 인간 태줄 유래 혈관 내피 세포주 HUVEC를 배양한 결과를 나타내는 사진이다.

도 5c는 BxC-A1e 엑소좀이 처리된 인간 태줄 유래 혈관 내피 세포주 HUVEC를 배양한 결과를 나타내는 사진이다.

도 5d는 BxC-I10e 엑소좀이 처리된 인간 태줄 유래 혈관 내피 세포주 HUVEC를 배양한 결과를 나타내는 사진이다.

도 5e는 BxC-G63e 엑소좀이 처리된 인간 태줄 유래 혈관 내피 세포주 HUVEC를 배양한 결과를 나타내는 사진이다.

도 5f는 BxC-R11e 엑소좀이 처리된 인간 태줄 유래 혈관 내피 세포주 HUVEC를 배양한 결과를 나타내는 사진이다.

도 5g는 BxC-R56e 엑소좀이 처리된 인간 태줄 유래 혈관 내피 세포주 HUVEC를 배양한 결과를 나타내는 사진이다.

도 6a는 PBS, BxC-e 엑소좀, BxC-A1e 엑소좀, BxC-I10e 엑소좀, BxC-G63e 엑소좀, BxC-R11e 엑소좀 또는 BxC-R56e 엑소좀이 처리된 인간 태줄 유래 혈관 내피 세포주인 HUVEC를 배양하여 혈관 내피 세포의 튜브 길이를 측정된 결과를 나타내는 사진이다.

도 6b는 PBS, BxC-e 엑소좀, BxC-A1e 엑소좀, BxC-I10e 엑소좀, BxC-G63e 엑소좀, BxC-R11e 엑소좀 또는 BxC-R56e 엑소좀이 처리된 인간 태줄 유래 혈관 내피 세포주인 HUVEC를 배양하여 혈관 내피 세포의 튜브 연결 노드 수를 측정된 결과를 나타내는 사진이다.

도 6c는 PBS, BxC-e 엑소좀, BxC-A1e 엑소좀, BxC-I10e 엑소좀, BxC-G63e 엑소좀, BxC-R11e 엑소좀 또는 BxC-R56e 엑소좀이 처리된 인간 태줄 유래 혈관 내피 세포주인 HUVEC를 배양하여 혈관 내피 세포의 튜브 개수를 측정된 결과를 나타내는 사진이다.

도 7a는 인간 단핵구 세포주 THP-1을 PBS 또는 BxC-e 엑소좀을 포함하는 배지로 배양한 후, TNF- α 의 mRNA 발현 변화를 나타낸 그래프이다.

도 7b는 인간 단핵구 세포주 THP-1을 PBS 또는 BxC-e 엑소좀을 포함하는 배지로 배양한 후, IL-1 β 의 mRNA 발현 변화를 나타낸 그래프이다.

도 7c는 인간 단핵구 세포주 THP-1을 PBS 또는 BxC-e 엑소좀을 포함하는 배지로 배양한 후, IL-6의 mRNA 발현 변화를 나타낸 그래프이다.

도 8a는 인간 단핵구 세포주 THP-1을 PBS 또는 BxC-R11e 엑소좀을 포함하는 배지로 배양한 후, TNF- α 의 mRNA 발현 변화를 나타낸 그래프이다.

도 8b는 인간 단핵구 세포주 THP-1을 PBS 또는 BxC-R11e 엑소좀을 포함하는 배지로 배양한 후, IL-1 β 의 mRNA

발현 변화를 나타낸 그래프이다.

도 8c는 인간 단핵구 세포주 THP-1을 PBS 또는 BxC-R11e 엑소솜을 포함하는 배지로 배양한 후, IL-6의 mRNA 발현 변화를 나타낸 그래프이다.

도 9a는 인간 단핵구 세포주 THP-1을 PBS 또는 BxC-R11e 엑소솜을 포함하는 배지로 배양한 후, CD206의 mRNA 발현 변화를 나타낸 그래프이다.

도 9b는 인간 단핵구 세포주 THP-1을 PBS 또는 BxC-R11e 엑소솜을 포함하는 배지로 배양한 후, ARG-1의 mRNA 발현 변화를 나타낸 그래프이다.

도 9c는 인간 단핵구 세포주 THP-1을 PBS 또는 BxC-R11e 엑소솜을 포함하는 배지로 배양한 후, IL-10의 mRNA 발현 변화를 나타낸 그래프이다.

도 10a는 마우스 배아 섬유아세포주 CF-1을 PBS, BxC-e, 또는 BxC-R11e 엑소솜을 포함하는 배지로 배양한 후, α -SMA의 mRNA 발현 변화를 PCR을 통해 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 10b는 마우스 배아 섬유아세포주 CF-1을 PBS, BxC-e, 또는 BxC-R11e 엑소솜을 포함하는 배지로 배양한 후, CTGF의 mRNA 발현 변화를 PCR을 통해 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 11은 마우스 배아 섬유아세포주 CF-1을 PBS, BxC-e, 또는 BxC-R11e 엑소솜을 포함하는 배지로 배양한 후, α -SMA, CTGF, b-actin의 발현을 SDS-PAGE를 통해 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 12a는 마우스 배아 섬유아세포주 CF-1을 PBS, BxC-e, 또는 BxC-R11e 엑소솜을 포함하는 배지로 배양한 후, α -SMA의 발현량을 SDS-PAGE를 통해 측정된 결과를 나타낸 그래프이다.

도 12b는 마우스 배아 섬유아세포주 CF-1을 PBS, BxC-e, 또는 BxC-R11e 엑소솜을 포함하는 배지로 배양한 후, CTGF의 발현량을 SDS-PAGE를 통해 측정된 결과를 나타낸 그래프이다.

도 13a는 유도만능줄기세포 유래의 심근세포를 PBS, BxC-e, 또는 BxC-R11e 엑소솜을 포함하는 배지로 배양한 후, cTnT의 발현량을 PCR을 통해 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 13b는 유도만능줄기세포 유래의 심근세포를 PBS, BxC-e, 또는 BxC-R11e 엑소솜을 포함하는 배지로 배양한 후, hERG의 발현량을 PCR을 통해 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 13c는 유도만능줄기세포 유래의 심근세포를 PBS, BxC-e, 또는 BxC-R11e 엑소솜을 포함하는 배지로 배양한 후, Nav 1.7의 발현량을 PCR을 통해 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 13d는 유도만능줄기세포 유래의 심근세포를 PBS, BxC-e, 또는 BxC-R11e 엑소솜을 포함하는 배지로 배양한 후, MYH7의 발현량을 PCR을 통해 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0192] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[0194] **실시예 1: 유도만능줄기세포-유래 중간엽 줄기세포 배양**

[0195] 유도만능줄기세포 (induced pluripotent stem cell; iPSC)를 10%의 FBS (Fetal bovine Serum) 및 10 ng/ml의 bFGF를 첨가한 DMEM에서 7일간 배양하였다. 이 후, FACS 분석을 통하여 배양된 유도만능줄기세포 중 세포 표면에 SSEA-4 (stage-specific embryonic antigen 4) 단백질을 발현하지 않는 SSEA-4(-) 세포를 분리하여 유도만능줄기세포-유래 중간엽 줄기세포의 전구세포를 획득하였다. 이어서, 분리된 SSEA-4(-) 세포를 계대하여 10%의 FBS 및 10 ng/ml의 bFGF를 첨가한 DMEM 배지에서 7일간 추가 배양하여, BxC 줄기세포를 제작하였다.

[0196] 이 후, BxC 줄기세포를 High glucose DMEM (Gibco, USA), 10% FBS (HyClone, USA), 1% MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100X, Gibco, USA)를 포함하는 배양배지에서 추가 배양하여 유도만능줄기세포-유래 중간엽 줄기세포로 완전히 분화시켰다.

- [0198] 실시예 2: 유도만능줄기세포-유래 중간엽 줄기세포 유래 엑소좀 (BxC-e) 분리 및 특성 확인
- [0199] 2-1. BxC-e 엑소좀의 분리
- [0200] 실시예 1에서 배양된 유도만능줄기세포-유래 중간엽 줄기세포 배양배지를 수거하여 300xg에서 10분간 원심분리하여 남아있는 세포와 세포잔여물을 제거하였다. 원심분리 후 상층액을 수득해 0.22 μ m 필터를 이용하여 여과한 다음, 고속원심분리기 (high speed centrifuge)를 이용하여 10,000xg, 4°C에서 70분간 원심분리하였다.
- [0201] 이어서, 원심분리된 상층액을 다시 수득해 초원심분리기 (ultracentrifuge)를 이용하여 100,000xg, 4°C에서 90분간 원심분리하였다. 이 후, 상층액을 제거하고, 하층에 남아있는 엑소좀을 PBS (phosphate buffered saline)에 희석하여 유도만능줄기세포-유래 중간엽 줄기세포 유래 엑소좀 (이하, BxC-e 엑소좀)을 분리하였고, 이를 이하의 실험에 사용하였다.
- [0203] 2-2. BxC-e 엑소좀의 특성 확인
- [0204] 실시예 2-1에서 분리된 BxC-e 엑소좀의 크기 분포를 nanoparticle tracking assay (NanoSight NS300, Malvern Panalytical)를 이용하여 확인하고, 전자 현미경을 이용하여 엑소좀의 형태를 확인하였다.
- [0206] 그 결과, 도 1a 및 1b에서 확인할 수 있듯이, BxC-e 엑소좀은 엑소좀으로서의 특성을 가지는 것을 확인하였다.
- [0208] 실시예 3: 전처리 물질 처리에 따른 유도만능줄기세포-유래 중간엽 줄기세포 유래 엑소좀 분리
- [0209] 3-1. 히알루론산 전처리 엑소좀 (BxC-R11e) 분리
- [0210] 10% Fetal bovine Serum, 1% MEM Non-Essential Amino Acids Solution 및 히알루론산 40 μ g/ml이 포함된 High glucose DMEM 배양배지에 상기 실시예 1에서 제조된 유도만능줄기세포-유래 중간엽 줄기세포를 24시간 배양하여 히알루론산이 전처리된 유도만능줄기세포-유래 중간엽 줄기세포 (BxC-R11 줄기세포)를 제작하였다.
- [0211] 배양을 완료한 후, BxC-R11 줄기세포를 세척하고 엑소좀이 제거된 FBS를 10% 첨가한 배양배지에서 추가적으로 72시간 배양하였다.
- [0212] 72시간 배양 후, 전처리 물질이 처리된 배양배지를 수거하여 300xg에서 10분간 원심분리하여 남아있는 세포와 세포잔여물을 제거하였다. 이어서, 상층액을 취하여 0.22 μ m 필터를 이용하여 여과한 다음, 고속원심분리기 (high speed centrifuge)를 이용하여 10,000xg, 4°C에서 70분간 원심분리하였다. 그 다음, 원심분리된 상층액을 다시 취하여 초원심분리기 (ultracentrifuge)를 이용하여 100,000xg, 4°C에서 90분간 원심분리하여 상층액을 제거하고, 하층에 남아있는 엑소좀을 PBS에 희석하여 히알루론산 전처리 엑소좀 (이하, BxC-R11e 엑소좀)을 분리하였으며, 이를 이하의 실험에 사용하였다.
- [0214] 3-2. 피오글리타존 전처리 엑소좀 (BxC-A1e) 분리
- [0215] 10% Fetal bovine Serum, 1% MEM Non-Essential Amino Acids Solution 및 피오글리타존 (Pioglitazone, Sigma, USA) 3 μ M이 포함된 High glucose DMEM 배양배지에 상기 실시예 1에서 제조된 유도만능줄기세포-유래 중간엽 줄기세포를 24시간 배양하여 피오글리타존이 전처리된 유도만능줄기세포-유래 중간엽 줄기세포 (BxC-A1 줄기세포)를 제작하였다.
- [0216] 배양을 완료한 후, BxC-A1 줄기세포를 세척하고 엑소좀이 제거된 FBS를 10% 첨가한 배양배지에서 추가적으로 72시간 배양하였다.
- [0217] 72시간 배양 후, 전처리 물질이 처리된 배양배지를 수거하여 300xg에서 10분간 원심분리하여 남아있는 세포와 세포잔여물을 제거하였다. 이어서, 상층액을 취하여 0.22 μ m 필터를 이용하여 여과한 다음, 고속원심분리기 (high speed centrifuge)를 이용하여 10,000xg, 4°C에서 70분간 원심분리하였다. 그 다음, 원심분리된 상층액을 다시 취하여 초원심분리기 (ultracentrifuge)를 이용하여 100,000xg, 4°C에서 90분간 원심분리하여 상층액을 제거하고, 하층에 남아있는 엑소좀을 PBS에 희석하여 피오글리타존 전처리 엑소좀 (이하, BxC-A1e 엑소좀)을 분

리하였으며, 이를 이하의 실험에 사용하였다.

[0219] 3-3. 포볼 12-미리스테이트 13-아세트산 전처리 엑소솜 (BxC-I10e) 분리

[0220] 10% Fetal bovine Serum, 1% MEM Non-Essential Amino Acids Solution 및 포볼 12-미리스테이트 13-아세트산 (Phorbol 12-myristate 13-acetate; PMA, Sigma, USA) 50nM이 포함된 High glucose DMEM 배양배지에 상기 실시예 1에서 제조된 유도만능줄기세포-유래 중간엽 줄기세포를 24시간 배양하여 포볼 12-미리스테이트 13-아세트산이 전처리 된 유도만능줄기세포-유래 중간엽 줄기세포를 (BxC-I10 줄기세포)를 제작하였다.

[0222] 배양을 완료한 후, BxC-I10 줄기세포를 세척하고 엑소솜이 제거된 FBS를 10% 첨가한 배양배지에서 추가적으로 72시간 배양하였다.

[0223] 72시간 배양 후, 전처리 물질이 처리된 배양배지를 수거하여 300xg에서 10분간 원심분리하여 남아있는 세포와 세포잔여물을 제거하였다. 이어서, 상층액을 취하여 0.22 μm 필터를 이용하여 여과한 다음, 고속원심분리기 (high speed centrifuge)를 이용하여 10,000xg, 4℃에서 70분간 원심분리하였다. 그 다음, 원심분리된 상층액을 다시 취하여 초원심분리기 (ultracentrifuge)를 이용하여 100,000xg, 4℃에서 90분간 원심분리하여 상층액을 제거하고, 하층에 남아있는 엑소솜을 PBS에 희석하여 포볼 12-미리스테이트 13-아세트산 전처리 엑소솜 (이하, BxC-I10e 엑소솜)을 분리하였으며, 이를 이하의 실험에 사용하였다.

[0225] 3-4. 엑센딘-4 전처리 엑소솜 (BxC-G63e) 분리

[0226] 10% Fetal bovine Serum, 1% MEM Non-Essential Amino Acids Solution 및 엑센딘-4 (Exendin-4, Sigma, USA) 20 nM이 포함된 High glucose DMEM 배양배지에 상기 실시예 1에서 제조된 유도만능줄기세포-유래 중간엽 줄기세포를 24시간 배양하여 엑센딘-4가 전처리된 유도만능줄기세포-유래 중간엽 줄기세포 (BxC-G63) 줄기세포를 제작하였다.

[0227] 배양을 완료한 후, BxC-G63 줄기세포를 세척하고 엑소솜이 제거된 FBS를 10% 첨가한 배양배지에서 추가적으로 72시간 배양하였다.

[0228] 72시간 배양 후, 전처리 물질이 처리된 배양배지를 수거하여 300xg에서 10분간 원심분리하여 남아있는 세포와 세포잔여물을 제거하였다. 이어서, 상층액을 취하여 0.22 μm 필터를 이용하여 여과한 다음, 고속원심분리기 (high speed centrifuge)를 이용하여 10,000xg, 4℃에서 70분간 원심분리하였다. 그 다음, 원심분리된 상층액을 다시 취하여 초원심분리기 (ultracentrifuge)를 이용하여 100,000xg, 4℃에서 90분간 원심분리하여 상층액을 제거하고, 하층에 남아있는 엑소솜을 PBS에 희석하여 엑센딘-4 전처리 엑소솜 (이하, BxC-G63e 엑소솜)을 분리하였으며, 이를 이하의 실험에 사용하였다.

[0230] 3-5. 레스베라트롤 전처리 엑소솜 (BxC-R56e) 분리

[0231] 10% Fetal bovine Serum, 1% MEM Non-Essential Amino Acids Solution 및 레스베라트롤 (Resveratrol, Sigma, USA) 10nM이 포함된 High glucose DMEM 배양배지에 상기 실시예 1에서 제조된 유도만능줄기세포-유래 중간엽 줄기세포를 24시간 배양하여 레스베라트롤이 전처리 된 유도만능줄기세포-유래 중간엽 줄기세포 (BxC-R56 줄기세포)를 제작하였다.

[0232] 배양을 완료한 후, BxC-R56 줄기세포를 세척하고 엑소솜이 제거된 FBS를 10% 첨가한 배양배지에서 추가적으로 72시간 배양하였다.

[0233] 72시간 배양 후, 전처리 물질이 처리된 배양배지를 수거하여 300xg에서 10분간 원심분리하여 남아있는 세포와 세포잔여물을 제거하였다. 이어서, 상층액을 취하여 0.22 μm 필터를 이용하여 여과한 다음, 고속원심분리기 (high speed centrifuge)를 이용하여 10,000xg, 4℃에서 70분간 원심분리하였다. 그 다음, 원심분리된 상층액을 다시 취하여 초원심분리기 (ultracentrifuge)를 이용하여 100,000xg, 4℃에서 90분간 원심분리하여 상층액을 제거하고, 하층에 남아있는 엑소솜을 PBS에 희석하여 레스베라트롤 전처리 엑소솜 (이하, BxC-R56e 엑소솜)을 분리하였으며, 이를 이하의 실험에 사용하였다.

[0235] **실시예 4: 히알루론산 전처리 엑소좀 (BxC-R11e)의 엑소좀 특성 확인**

[0236] 실시예 3-1에서 분리된 BxC-R11e 엑소좀의 크기 분포를 nanoparticle tracking assay (NanoSight NS300, Malvern Panalytical)를 이용하여 확인하고, 전자 현미경을 이용하여 엑소좀의 형태를 확인하였다.

[0237] 그 결과, 도 2a 및 2b에서 볼 수 있듯이, BxC-R11e 엑소좀은 엑소좀으로서의 특성을 가지는 것을 확인하였다.

[0239] **실시예 5: BxC-e, BxC-R11e, BxC-A1e, BxC-I10e, BxC-G63e 및 BxC-R56e 엑소좀의 엑소좀 특이 마커 확인**

[0240] 상술한 실시예 2 및 실시예 3에서 분리한 BxC-e, BxC-R11e, BxC-A1e, BxC-I10e, BxC-G63e 및 BxC-R56e 엑소좀의 엑소좀 특이 마커를 확인하였다.

[0241] 20 µL의 BxC-e, BxC-R11e, BxC-A1e, BxC-I10e, BxC-G63e, BxC-R56e 엑소좀을 각 튜브에 넣은 후 100 µL MACSPlex buffer (Miltenyi Biotec, Germany)를 넣어 총 볼륨 120 µL를 만든다. MACSPlex Exosome Capture Beads (Miltenyi Biotec, Germany)를 블택싱하여 재현탁시켜 15 µL씩 엑소좀이 담긴 튜브에 넣어 혼합하였다. Orbital shaker에 각 튜브를 고정된 후 16시간 실온에서 섞어주었다. 500 µL의 MACSPlex Buffer (Miltenyi Biotec, Germany)를 추가한 후, 3000xg에서 5분 동안 원심분리 하였다. 원심분리 후 튜브의 500 µL의 상층액을 제거하고 각 튜브에 5 µL의 MACSPlex Exosome Detection Reagent (Miltenyi Biotec, Germany)를 넣고 혼합하였다. 이어서, 튜브를 실온에서 1 시간 동안 배양하고 500 µL의 MACSPlex Buffer (Miltenyi Biotec, Germany)를 추가한 후, 3000xg에서 5분 동안 원심분리 하였다. 원심분리 후 튜브의 500 µL의 상층액을 제거하고 500 µL의 MACSPlex Buffer를 다시 튜브에 추가하였다. 그 다음, 튜브를 15 분 동안 배양하고 3000xg에서 5분 동안 원심분리 하였다. 이 후, 500 µL의 상층액을 제거하고 Flow cytometry로 엑소좀 특이 마커의 발현을 확인하였으며, 그 결과를 표 1에 나타내었다.

표 1

[0242]

엑소좀 특이 마커	엑소좀					
	BxC-e	BxC-A1e	BxC-I10e	BxC-G63e	BxC-R11e	BxC-R56e
CD9	95%	100%	100%	96%	100%	100%
CD63	100%	100%	100%	100%	100%	100%
CD81	100%	100%	100%	100%	100%	100%

[0243] 확인 결과, 표 1에서 확인할 수 있듯이, 상기 실시예 2 및 3에서 분리한 BxC-e, BxC-R11e, BxC-A1e, BxC-I10e, BxC-G63e 및 BxC-R56e 엑소좀 모두 엑소좀 특이마커를 95% 이상 발현하였으며, 이에 따라 상기 실시예 2 및 3에서 분리한 모든 엑소좀은 엑소좀의 특성을 나타내는 것을 확인하였다.

[0245] **실시예 6: 심근세포 재생 효과 확인**

[0246] **6-1. 유도만능줄기세포 분화 심근세포 배양**

[0247] DMEM/F12+Glutamax™ (GIBCO, 10565-018)에 1:100으로 Matrigel hESC-qualified Matrix (BD Bioscience, 354277)을 희석하여 12well cell culture plate (SPL, 30012)에 0.5ml/well로 37 °C에서 1 시간 동안 코팅하였다. 유도만능줄기세포는 75T 플라스크에서 컨플루언시가 80~90%가 될 때까지 배양하였다. DPBS, no calcium, no magnesium (HYCLONE, SH30028.02) 5ml로 2번 세척한 후 Tryple™ Express (1X), no phenol red (GIBCO, 12604-021) 4ml 처리하여 37 °C에 4분간 두었다. DMEM/F12+Glutamax™ supplement에 10% FBS(GIBCO, 16000-044)가 들어간 배양액에 세포를 모아서 1000rpm 3min로 세포를 모아서 상층액을 제거하였다. 1ml mTeSRTM1 (STEMCELL Technologies, 85850)로 세포를 10번 정도 풀어준 후에 세포수를 측정 한 후, 세포는 1ml의 mTeSRTM1에 0.5x10⁶/well로 깔고, confluency가 90~95%가 될 때까지 2~4일간 매일 mTeSRTM1 1ml씩 배양액을 교체하였다. 컨플루언시가 90~95%가 된 유도만능 줄기세포를 CHIR99021 (Tocris, 4423) 6µM/ml + BMP4 (ProSpec, CYT-361) 10ng/ml + StemBead Activin-A (Stem Culture, SBAC5) 10ng/ml이 들어간 2ml RPMI1640 Medium (GIBCO, 11875-093) + B-27™ Supplement, minus insulin (GIBCO, A1895601) 배양액으로 배양하였다. 배양 후 48시간 후에 dPBS 1ml/well로 1번 wash하고 XAV939 (Sigma, X3004) 10µM/ml + L-Ascorbic acid

(Sigma, A5960) 50ug/ml가 들어간 2ml RPMI1640 Medium + minus insulin supplement로 배양액을 교체하였다. 48 시간 경과 후, DPBS 1ml/well로 1번 세척하고 Ascorbic Acid 50ug/ml가 들어간 2ml RPMI1640 Medium + minus insulin supplement로 배양액을 다시 교체하였다. 다시 48시간 경과 후에 dPBS 1ml/well wash, 2ml RPMI1640 Medium + B-27TM Supplement, minus vitamin A (GIBCO, 12587010)로 배양액을 교체하였다. 24시간 후, 배양된 세포의 박동을 관찰하여 심근세포로의 분화가 완료됨을 확인하였다.

[0248] 분화가 완료되어 박동이 관찰되는 심근세포를 12 웰플레이트를 이용하여 DMEM/F12+GlutamaxTM에 1:100으로 Matrigel hESC-qualified Matrix를 희석하여 10cm에 5ml/well로 37 °C에서 1 시간 동안 코팅하였다. dPBS 5ml로 2번 세척한 후 Tryple 4ml 처리하여 37 °C에 4분간 두었다. DMEM/F12에 10% FBS가 들어간 배양액에 세포를 모아 1000rpm 3min로 원심분리 후 상층액을 제거하였다. 1ml RPMI1640 + without VitaminA supplement로 세포를 10번 정도 풀어준 후에 세포수를 측정하였다. Y27632 5uM/ml이 들어간 10ml RPMI1640 + without VitaminA supplement 배양액을 10cm 디쉬에 넣고 세포수를 1×10^7 에 맞춰 넣어 주었다. 24시간 경과 후 10ml의 RPMI 1640 Medium, no glucose (GIBCO, 11879-020)로 배양액을 교체하고 2~4일 정도 심근세포의 순도를 체크하면서 유지하였다. 2~4일 후, 심근세포의 수율이 좋은 것으로 관찰되면 10ml RPMI1640 + without VitaminA supplement로 배양액을 교체하고 48시간의 회복기간을 두고 사용하거나, 세포 동결을 진행하였다. 세포를 바로 사용한 경우에는 48시간마다 RPMI1640 + without VitaminA supplement로 배양액을 교체하여 이하의 생존을 실험에 사용하였다.

[0250] **6-2. 심근세포 증식 효과 확인**

[0251] 엑소솜에 의한 심근세포 증식 확인을 위해 유도만능줄기세포에서 분화된 심근세포를 RPMI1640 + without VitaminA supplement를 이용하여 96 웰 플레이트에 분주한 후, 37°C 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 배양액 제거 후 DPBS로 세척한 뒤, RPMI1640에 BxC-e, BxC-R11e, BxC-A1e, BxC-I10e, BxC-G63e, BxC-R56e 엑소솜을 각각 100µg/ml 농도로 100µl씩 넣어 37°C 5% CO₂ 배양기에서 2일간 배양하였다.

[0252] 배양 후, 10µl의 Cell Counting Kit-8 (CCK-8, Enzo) 용액을 배양액에 넣어 37°C 5% CO₂ 배양기에서 2시간 배양 후, 색변화를 확인해 450nm 파장에서 흡광도를 측정하여 혈관 내피세포의 증식률을 확인하였고, 이를 도 3a 및 표 2에 나타내었다.

표 2

[0253]

	CTRL	e	A1e	G63e	R11e	R56e
심근세포생존율 (%)	102.6	126	139	143.3	158	168.6

[0254] 실험결과, 도 3a 및 표 2에서 확인할 수 있듯이, BxC-e, BxC-R11e, BxC-A1e, BxC-I10e, BxC-G63e 및 BxC-R56e 엑소솜 모두가 유의적으로 심근세포를 증식시키는 것을 확인하였다.

[0256] **6-3. 과산화수소로 손상된 심근세포의 생존율 증가 효과 확인**

[0257] 엑소솜에 의한 심근세포 증식 확인을 위해 유도만능줄기세포에서 분화된 심근세포를 RPMI1640 + without VitaminA supplement를 이용하여 96웰 플레이트에 분주한 후, 37°C 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 이어서, 배양된 세포에 손상을 주기 위해 과산화수소 (H₂O₂, Sigma, USA) 500 µM을 첨가한 배지로 교환하여 37 °C 5% CO₂ 배양기에서 2시간 동안 배양하였다.

[0258] 세포 손상 후, 엑소솜에 의한 심근세포의 증식 확인을 위해 DPBS로 플레이트를 세척한 뒤, RPMI1640 + without VitaminA supplement 배지에 BxC-e, BxC-R11e, BxC-A1e, BxC-I10e, BxC-G63e, BxC-R56e 엑소솜 각각을 100µg/ml 농도로 100µl씩 넣어 37°C 5% CO₂ 배양기에서 2일간 배양하였다.

[0259] 이 후, 10µl의 Cell Counting Kit-8 (CCK-8, Enzo) 용액을 배양액에 넣어 37°C 5% CO₂ 배양기에서 2시간 배양 한 뒤 색의 변화를 관찰하여 450nm로 흡광도를 측정해 혈관 내피세포의 생존율을 확인하였고, 이를 도 3b 및 표

3에 나타내었다.

표 3

	CTRL	H ₂ O ₂	e	A1e	G63e	R11e	R56e
심근세포 생존율 (%)	105	60.6	107.3	113.3	121.6	137	145.7

그리고, 도 3b 및 표 3에서 확인할 수 있듯이, BxC-e, BxC-R11e, BxC-A1e, BxC-I10e, BxC-G63e, BxC-R56e 엑소좀 처리군에서 손상된 심근세포의 생존율이 유의적으로 향상된 것을 확인하였다.

6-4. 과산화수소로 손상된 심근세포의 활성산소 감소 확인

유도만능줄기세포에서 분화된 심근세포를 RPMI1640 + without VitaminA supplement를 이용하여 24 웰 플레이트에 분주 한 후 37°C 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 이어서, 배양된 세포에 손상을 주기 위해 과산화 수소(H₂O₂) 500 μM을 첨가한 배지로 교환하여 37°C 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 심근세포 손상 후 엑소좀에 의한 심근세포의 활성 산소 감소를 확인하기 위해, 과산화 수소(H₂O₂) 500 μM을 첨가한 배지에 DPBS, BxC-e, BxC-R11e, BxC-A1e, BxC-I10e, BxC-G63e, BxC-R56e 엑소좀을 각각 100μg/ml 농도로 300μl씩 교환하여 37°C 5% CO₂ 배양기에서 1일간 배양하였다. 이후 활성산소를 측정 시약인 CellROX (Invitrogen, USA) 5 μM 과 CellTracker (Invitrogen, USA) 5 μM을 배양액에 넣은 후 37°C 5% CO₂ 배양기에서 30분간 배양하였다. 이후 DPBS로 세척한 후 4% 파라포름알데히드 (paraformaldehyde)로 고정하고 NucBlue 포함된 DPBS를 넣은 후, 형광 사진을 찍어 도 3c에 나타내었다. 그리고, 형광의 평균 강도를 측정하여 도 3d 및 표 4에 나타내었다.

표 4

	Negative control	H ₂ O ₂ PBS	H ₂ O ₂ e	H ₂ O ₂ R11e
Mean intensity	1.13	5.14	2.76	2.06

도 3c 내지 도 3d 및 표 4에서 확인할 수 있듯이, BxC-e, BxC-R11e 엑소좀을 처리한 유도만능줄기세포에서 분화된 심근세포에서 H₂O₂의 처리로 인해 세포 손상에 따라 발생한 활성산소가 감소함을 확인하였다.

6-5. 과산화수소로 손상된 심근세포의 세포독성 감소 확인

엑소좀에 의한 심근세포의 세포독성 감소 확인을 위해 유도만능줄기세포 분화 심근세포를 RPMI1640 + without VitaminA supplement를 이용하여 24 웰 플레이트에 분주 한 후 37°C 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 이어서, 과산화 수소(H₂O₂) 500 μM을 첨가한 배지에 DPBS와 BxC-e, BxC-R11e, BxC-A1e, BxC-I10e, BxC-G63e, BxC-R56e 엑소좀을 각각 100μg/ml 농도로 300μl씩 교환하여 37°C 5% CO₂ 배양기에서 6 시간 배양하였다. 이후 각각의 세포를 배양한 배지를 1.5mL 튜브에 옮겨 담은 후, 원심분리를 통해 부유된 세포를 가라 앉히고, 각각의 배지를 96 웰 플레이트에 10μl씩 옮겼다. LDH solution (Cell cytotoxicity assay kit, BIOMAX, Korea)을 각 웰 당 100μl씩 넣어 상온에서 30분간 반응 후 450nm 흡광도를 측정하여, 도 3e 및 표 5에 나타내었다.

표 5

	Negative control	H ₂ O ₂ PBS	H ₂ O ₂ e	H ₂ O ₂ A1e	H ₂ O ₂ I10e	H ₂ O ₂ G63e	H ₂ O ₂ R11e	H ₂ O ₂ R56e
LDH %	100.0	121.7	72.1	92.5	107.8	107.2	84.4	75.5

[0271] 실험 결과, 도 3e 및 표 5에서 확인할 수 있듯이, BxC-e, BxC-R11e, BxC-A1e, BxC-I10e, BxC-G63e 및 BxC-R56e 엑소좀을 처리한 심근세포에서의 H₂O₂로 인해 유발된 세포 독성이 감소된 것을 확인하였다.

[0273] 실시예 7: 혈관 내피세포의 증식, 생존 및 형성 효과 확인

[0274] 7-1. 혈관 내피세포 증식 효과 확인

[0275] 엑소좀에 의한 혈관 내피세포 증식 확인을 위해 인간 탯줄 유래 혈관 내피세포주인 HUVEC (human umbilical vein endothelial cells, LONZA, Switzerland)을 2% FBS가 첨가된 EGM-2 배지 (Lonza, Switzerland)를 이용하여 96웰 플레이트에 분주한 후, 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 배양액 제거 후 DPBS로 세척한 뒤, FBS를 제거한 각각의 EGM-2 배지에 BxC-e, BxC-R11e, BxC-A1e, BxC-I10e, BxC-G63e, BxC-R56e 엑소좀을 각각 100µg/ml 농도로 100µl씩 넣어 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 2일간 배양하였다.

[0276] 배양 후, 10µl의 Cell Counting Kit-8 (CCK-8, Enzo) 용액을 배양액에 넣어 37°C 5% CO₂ 배양기에서 2시간 배양 후, 색변화를 확인해 450nm 파장에서 흡광도를 측정하여 혈관 내피세포의 증식률을 확인하였고, 이를 도 4a 및 표 6에 나타내었다.

표 6

	PBS	e	A1e	I10e	G63e	R11e	R56e
혈관내피세포증식률 (%)	100	130	150	170	140	150	170

[0278] 실험결과, 도 4a 및 표 6에서 확인할 수 있듯이, BxC-e, BxC-R11e, BxC-A1e, BxC-I10e, BxC-G63e 및 BxC-R56e 엑소좀 모두가 유의적으로 혈관 내피세포를 증식시키는 것을 확인하였다.

[0280] 7-2. 과산화수소로 손상된 혈관 내피세포의 생존율 증가 효과 확인

[0281] 인간 탯줄 유래 혈관 내피 세포주인 HUVEC을 2% FBS가 첨가된 EGM-2 배지를 이용하여 96웰 플레이트에 분주한 후, 37°C 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 이어서, 배양된 세포에 손상을 주기 위해 과산화수소 (H₂O₂, Sigma, USA) 500 µM을 첨가한 배지로 교환하여 37°C 5% CO₂ 배양기에서 2시간 동안 배양하였다.

[0282] 세포 손상 후, 엑소좀에 의한 혈관 내피세포의 증식 확인을 위해 DPBS로 플레이트를 세척한 뒤, FBS를 제거한 각각의 EGM-2 배지에 BxC-e, BxC-R11e, BxC-A1e, BxC-I10e, BxC-G63e, BxC-R56e 엑소좀 각각을 100µg/ml 농도로 100µl씩 넣어 37°C 5% CO₂ 배양기에서 2일간 배양하였다.

[0283] 배양 후, 10µl의 Cell Counting Kit-8 (CCK-8, Enzo) 용액을 배양액에 넣어 37°C 5% CO₂ 배양기에서 2시간 배양 후, 색의 변화를 관찰하여 450nm로 흡광도를 측정해 혈관 내피세포의 생존율을 확인하였고, 이를 도 4b 및 표 7에 나타내었다.

표 7

	untx	H ₂ O ₂						
		PBS	e	A1e	I10e	G63e	R11e	R56e
혈관내피세포 생존율 (%)	100	70	90	100	100	90	110	100

[0285] 그리고, 도 4b 및 표 7에서 확인할 수 있듯이, BxC-e, BxC-R11e, BxC-A1e, BxC-I10e, BxC-G63e, BxC-R56e 엑소좀 처리군에서 손상된 혈관 내피세포의 생존율이 유의적으로 향상된 것을 확인하였다.

[0287] **7-3. 혈관형성능력 증가 효과확인**

[0288] -20℃에서 1시간동안 쿨링한 96웰 플레이트에 아이스에서 녹인 매트리지겔(Matrigel, BD bioscience)을 쿨링한 팁을 이용하여 버블이 생기지 않게 분주한 후 37℃ 5% CO₂ 배양기에서 1시간동안 배양하였다.

[0289] 인간 태줄 유래 혈관 내피 세포주인 HUVEC을 FBS를 첨가하지 않은 EGM-2 배지를 이용하여 매트리지겔이 덮힌 96웰 플레이트에 분주하였다. 이 후, 배지에 각각의 BxC-e, BxC-R11e, BxC-A1e, BxC-I10e, BxC-G63e, BxC-R56e 엑소좀을 100 µg/ml 농도로 넣었으며, 대조군은 엑소좀 대신 PBS를 넣었다.

[0290] 이어서, 배지를 37℃ 5% CO₂ 배양기에서 16시간 이내로 배양하여 사진을 찍었고, 이를 도 5a 내지 5g에 나타내었다. 그 다음, 사진을 Image J 프로그램을 이용하여 혈관 내피 세포의 튜브 길이, 튜브 연결 노드 (node), 튜브 개수를 정량하였으며, 이를 도 6a 및 6c 및 표 8 내지 표 10에 나타내었다.

표 8

[0291]

	PBS	e	A1e	I10e	G63e	R11e	R56e
혈관내피세포튜브 길이	0.26	0.28	0.29	0.3	0.3	0.28	0.3

표 9

[0292]

	PBS	e	A1e	I10e	G63e	R11e	R56e
혈관내피세포튜브 노드 수	38	66	80	77	79	88	80

표 10

[0293]

	PBS	e	A1e	I10e	G63e	R11e	R56e
혈관내피세포튜브 수	56	80	113	104	111	120	115

[0294] 그 결과, 도 6a 내지 6c 및 표 8 내지 10에서 확인할 수 있듯이, BxC-e, BxC-R11e, BxC-A1e, BxC-I10e, BxC-G63e, BxC-R56e 엑소좀은 혈관 내피 세포주의 튜브길이, 튜브노드 수, 튜브 수를 모두 향상시켰으며, 이에 따라, 본 발명에 따른 엑소좀들은 혈관 내피세포의 혈관형성 효과가 월등히 우수한 것을 확인하였다.

[0296] **실시예 8: BxC-e 엑소좀의 염증성 대식세포 억제 효과 확인**

[0297] 인간 단핵구 세포주인 THP-1 (ATCC, USA)을 1% 안티-안티 (Antibiotics-antimycotics, Gibco, USA), 10% FBS (HyClone) 및 Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, 200ng/ml, Sigma, USA)가 첨가된 RPMI1640 배지 (Gibco, USA)를 사용하여 35mm 디쉬에 분주하고 37℃5% CO₂ 배양기에서 2일간 배양하였다.

[0298] 배양 48시간 뒤, 세포가 디쉬에 붙은 것을 확인하였다. 이어서, 염증성 대식세포로 유도하기 위해 기존의 배양액 제거 후 DPBS (HyClone, USA)로 세척하고, Lipopolysaccharides (LPS, 100ng/ml, Sigma), Recombinant Human Interferon-gamma (INF-γ, 20ng/ml, R&D System, USA), 1% 안티-안티 및 10% FBS가 첨가된 RPMI1640 배지로 배양액을 바꾸어 37℃ 5% CO₂ 배양기에서 3일간 더 배양하여 염증성 대식세포 (M1)를 제조하였다.

[0299] 72시간 후, 엑소좀의 염증 억제 효과를 확인하기 위해 배양액을 제거한 뒤 DPBS로 세척하고 1% 안티-안티가 첨가된 RPMI1640배지에 BxC-e 엑소좀 50 µg/ml을 넣어 37℃ 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. 그 다음, 35mm 디쉬에 트리졸 용액 (TRIZol reagent, Invitrogen, USA) 1ml를 첨가하여 세포를 분해하였다. 이어서, 클로로포름 (Chloroform, Sigma, USA) 200µl를 첨가하고 볼텍스 (vortex)한 뒤, 4℃, 12,000rpm에서 15분간 원심분리하였다. 원심분리 후 상층액을 새 튜브로 옮기고 이소프로판올 (Isopropanol, Merck Millipore, USA) 500µl와 섞어주었다. 튜브를 50회 업&다운해주고 5분 동안 아이스에 방치한 후, 12,000rpm, 4℃에서 10분간 원심분리시켜 상층액을 제거하였다. 튜브의 남은 침전물에 70% 에탄올 1 ml를 가한 후, 12,000rpm, 4℃에서 5분 동안 원심분

리하였다. 이어서, 에탄올을 제거하고 RNA 침전물이 담긴 튜브를 건조한 뒤 nuclease free water를 사용하여 RNA 펠렛을 용해시켰다. Nanodrop을 이용하여 260 nm 및 280 nm 파장에서 추출된 RNA 시료의 농도를 측정하고 AccuPower CycleScript RT PreMix(dT₂₀) (K-2044, Bioneer, Korea)를 사용하여 cDNA를 합성하였다.

[0300] 이 후, 합성한 cDNA와 표 11의 프라이머를 사용하여 실시간 중합효소연쇄반응 (Real time PCR)를 이용하여 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6의 mRNA 발현 변화를 확인하여, 도 7a 내지 7c 및 표 12 내지 14에 나타내었다.

표 11

서열번호	명명	서열목록 (5' -> 3')	비고
1	TNF- α _primer1	GAGCTGAACAATAGGCTGTCCCA	TNF- α 정방향 프라이머
2	TNF- α _primer2	AGAGGCTCAGCAATGAGTGACAGT	TNF- α 역방향 프라이머
3	IL-1 β _primer1	ACAGCTGGAGAGTGTAGATCC	IL-1 β 정방향 프라이머
4	IL-1 β _primer2	CTGAGAGGTGCTGATGTACC	IL-1 β 역방향 프라이머
5	IL-6_primer1	ACAGCCACTCACTCTTCAG	IL-6 정방향 프라이머
6	IL-6_primer2	CCATCTTTTCAGCCATCTT	IL-6 역방향 프라이머

[0302] 실험 결과, 도 7a 내지 7c 및 표 12 내지 14에서 확인할 수 있듯이, 본 발명에 따른 BxC-e 엑소솜이 처리된 염증성 대식세포의 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6 상대적 발현량은 염증성 대식세포에 PBS만 처리된 대조군에 비해 각각 약 38%, 약 26%, 약 35% 감소시킬 수 있는 것을 확인하였다.

표 12

	MO	M1	
		PBS	BxC-e
TNF- α 발현량	1.0	7.2	4.5

표 13

	MO	M1	
		PBS	BxC-e
IL-1 β 발현량	1.0	5.4	4.0

표 14

	MO	M1	
		PBS	BxC-e
IL-6 발현량	1.0	4.3	2.8

[0306] 이와 같이, 본 발명자들은 상기 실험결과로 본 발명에 따른 BxC-e 엑소솜은 염증성 대식세포로부터 발현되는 염증성 사이토카인을 감소시키는 효과가 우수한 것을 확인하였다.

[0308] 실험예 9: BxC-R11e 엑소솜의 대식세포 조절 효과 확인

[0309] 9-1. 염증성 대식세포 억제효과

[0310] 인간 단핵구 세포주인 THP-1을 1% 안티-안티, 10% FBS 및 PMA (200ng/ml)가 첨가된 RPMI1640 배지를 사용하여 35mm 디쉬에 분주하고 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 배양기에서 2일간 배양하였다. 48시간 뒤 세포가 디쉬에 붙은 것이 확인되면 염증성 대식세포로 유도하기 위해 기존의 배양액을 제거하고 DPBS로 세척한 뒤, LPS (100ng/ml)와 INF- γ (20ng/ml), 1% 안티-안티 및 10% FBS가 첨가된 RPMI1640 배지로 배양액을 바꾸어 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 배양기에서 3일간 추가 배양하였다. 72시간 후, 엑소솜의 염증 억제 효과를 확인하기 위해 배양액 제거 후 배지를 DPBS로 세척하고 1% 안티-안티가 첨가된 RPMI1640 배지에 BxC-R11e 엑소솜 50 μ g/ml을 넣고 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배

양하였다. 그 다음, 35mm 디쉬에 트리졸 용액 (TRIZol reagent, Invitrogen, USA) 1ml를 첨가하여 세포를 분해하였다. 이어서, 클로로포름 (Chloroform, Sigma, USA) 200 μ l를 첨가하고 볼텍스 (vortex)한 뒤, 4 $^{\circ}$ C, 12,000rpm에서 15분간 원심분리하였다. 원심분리 후 상층액을 새 튜브로 옮기고 이소프로판올 (Isopropanol, Merck Millipore, USA) 500 μ l와 섞어주었다. 튜브를 50회 업&다운해주고 5분 동안 아이스에 방치한 후, 12,000rpm, 4 $^{\circ}$ C에서 10분간 원심분리시켜 상층액을 제거하였다. 튜브에 남은 침전물에 70% 에탄올 1 ml를 가한 후, 12,000rpm, 4 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 원심분리하였다. 이어서, 에탄올을 제거하고 RNA 침전물이 담긴 튜브를 건조한 뒤 nuclease free water를 사용하여 RNA 펠렛을 용해시켰다. Nanodrop을 이용하여 260 nm 및 280 nm 파장에서 추출된 RNA 시료의 농도를 측정하고 AccuPower CycleScript RT PreMix(dT₂₀) (K-2044, Bioneer, Korea)를 사용하여 cDNA를 합성하였다.

[0311] 이 후, 합성한 cDNA와 표 11의 프라이머를 사용하여 실시간 증합효소연쇄반응 (Real time PCR)를 이용해 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6의 mRNA 발현 변화를 확인하였고, 이를 8a 내지 8c 및 표 15 내지 17에 나타내었다.

표 15

[0312]

	MO	M1	
		PBS	R11e
TNF- α 발현량	1.0	7.2	2.0

표 16

[0313]

	MO	M1	
		PBS	R11e
IL-1 β 발현량	1.0	5.4	1.7

표 17

[0314]

	MO	M1	
		PBS	R11e
IL-6 발현량	1.0	4.3	1.2

[0315] 실험 결과, 도 8a 내지 8c 및 표 15 내지 17에서 확인할 수 있듯이, BxC-R11e 엑소솜이 처리된 염증성 대식세포로부터 발현되는 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6 상대적 발현량은 염증성 대식세포에 PBS만 처리된 대조군에 비해 각각 약 72%, 약 69%, 약 72% 감소된 것을 확인하였다. 이와 같이, 본 발명자들은 상기 실험결과로 본 발명에 따른 BxC-R11e 엑소솜은 염증성 대식세포로부터 발현되는 염증성 사이토카인을 감소시키는 효과가 우수한 것을 확인하였다.

[0317] **9-2. 재생성 대식세포 증진 효과 확인**

[0318] 인간 단핵구 세포주인 THP-1을 1% 안티-안티, 10% FBS 및 PMA (200ng/ml)가 첨가된 RPMI1640 배지를 사용하여 35mm 디쉬에 분주하고 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 배양기에서 2일간 배양하였다. 48시간 후 세포가 디쉬에 붙은 것을 확인하고, 재생성 대식세포로 유도하기 위해 기존의 배양액 제거 후 DPBS로 세척하였다. 이 후, Recombinant Human Interleukin-4 (IL-4, 20ng/ml, Peprotech, USA)와 Recombinant Human Interleukin-13 (IL-13, 20ng/ml, Prospec, Israel), 1% 안티-안티 및 10% FBS가 첨가된 RPMI1640 배지로 배양액을 바꾸어 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 배양기에서 3일간 더 배양하였다. 72시간 후, 엑소솜의 재생성 대식세포에 대한 효과를 확인하기 위해 배양액 제거 후 DPBS로 세척하고 1% 안티-안티가 첨가된 RPMI1640배지에 BxC-R11e 엑소솜 50 μ g/ml을 넣고 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. 그 다음, 35mm 디쉬에 트리졸 용액 (TRIZol reagent, Invitrogen, USA) 1ml를 첨가하여 세포를 분해하였다. 이어서, 클로로포름 (Chloroform, Sigma, USA) 200 μ l를 첨가하고 볼텍스 (vortex)한 뒤, 4 $^{\circ}$ C, 12,000rpm에서 15분간 원심분리하였다. 원심분리 후 상층액을 새 튜브로 옮기고 이소프로판올 (Isopropanol, Merck Millipore, USA) 500 μ l와 섞어주었다. 튜브를 50회 업&다운해주고 5분 동안 아이스에 방치한 후, 12,000rpm, 4 $^{\circ}$ C에서 10분간 원심분리시켜 상층액을 제거하였다. 남은 침전물에 70% 에탄올 1 ml

를 가한 후, 12,000rpm, 4°C에서 5분 동안 원심분리하였다. 이어서, 에탄올을 제거하고 RNA 침전물이 담긴 튜브를 건조한 뒤 nuclease free water를 사용하여 RNA 펠렛을 용해시켰다. Nanodrop을 이용하여 260 nm 및 280 nm 파장에서 추출된 RNA 시료의 농도를 측정하고 AccuPower CycleScript RT PreMix(dT₂₀) (K-2044, Bioneer, Korea)를 사용하여 cDNA를 합성하였다.

[0319] 이 후, 합성한 cDNA와 표 18의 프라이머를 사용하여 실시간 중합효소연쇄반응 (Real time PCR)를 이용하여 CD206, ARG-1 및 IL-10의 mRNA 발현 변화를 확인하였다.

표 18

서열번호	명명	서열목록 (5'→ 3')	비고
7	CD206_primer1	CACGATCCGACCCTTCCTTG	CD206 정방향 프라이머
8	CD206_primer2	GCTTGCACTATGTCTCCGCT	CD206 역방향 프라이머
9	ARG-1_primer1	CGGAGACCACAGTTGGCA	ARG-1 정방향 프라이머
10	ARG-1_primer2	CCTGGCACATCGGGAATCTT	ARG-1 역방향 프라이머
11	IL-10_primer1	TGAAAACAAGAGCAAGGCCG	IL-10 정방향 프라이머
12	IL-10_primer2	GCCACCCTGATGTCTCAGTT	IL-10 역방향 프라이머

[0321] 실험 결과, 도 9a 내지 9c 및 표 19 내지 21에서 확인할 수 있듯이, 본 발명에 따른 BxC-R11e 엑소솜이 처리된 재생성 대식세포로부터 발현되는 CD206, ARG-1 및 IL-10의 상대적 발현량을 재생성 대식세포에 PBS만 처리된 대조군에 비해 크게 감소되지 않는 것을 확인하였다.

표 19

	MO	M2	
		PBS	R11e
CD206 발현량	1.0	76	60

표 20

	MO	M2	
		PBS	R11e
ARG-1 발현량	1.0	58	41

표 21

	MO	M2	
		PBS	R11e
IL-10 발현량	1.0	9.3	6.5

[0325] 이와 같이, 본 발명자들은 상기 실험결과로 본 발명에 따른 BxC-R11e 엑소솜은 재생성 대식세포로부터 발현되는 사이토카인을 유지시키는 효과가 있음을 확인하였다.

[0327] **실험예 10: BxC-R11e 엑소솜의 섬유아세포 섬유화 억제 효과 확인**

[0328] **10-1. 실시간 중합효소연쇄반응을 통한 발현량 확인**

[0329] 마우스 배아 섬유아세포주인 CF-1 (ATCC, USA)을 1% 안티-안티 및 10% FBS가 첨가된 High glucose DMEM (Gibco, USA)배지를 사용하여 6웰 플레이트에 분주하고 37°C 5% CO₂ 배양기에서 1일간 배양하였다. 섬유화를 유도하기 위해 배양액을 Transforming Growth Factor-β1 human (TGF-β1, sigma) 20 ng/ml 및 1% 안티-안티가 첨가된 High glucose DMEM (Gibco, USA)배지로 교환한 후 37°C 5% CO₂ 배양기에서 2일간 배양하였다.

[0330] 이 후, 엑소솜의 섬유화 억제 효과를 확인하기 위하여 DPBS로 배지를 세척한 후 BxC-e, BxC-R11e 엑소솜이 각각

100µg/ml 첨가된 배지로 교환하고 37°C 5% CO₂ 배양기에서 1일간 배양하였다.

[0331] 모든 배양이 끝난 뒤, 35mm 디쉬에 트리졸 용액 (TRIZol reagent, Invitrogen, USA) 1ml를 첨가하여 세포를 분해하였다. 이어서, 클로로포름 (Chloroform, Sigma, USA) 200µl를 첨가하고 볼텍스 (vortex)한 뒤, 4°C, 12,000rpm에서 15분간 원심분리하였다. 원심분리 후 상층액을 새 튜브로 옮기고 이소프로판올 (Isopropanol, Merck Millipore, USA) 500µl와 섞어주었다. 튜브를 50회 업&다운해주고 5분 동안 아이스에 방치한 후, 12,000rpm, 4°C에서 10분간 원심분리시켜 상층액을 제거하였다. 남은 침전물에 70% 에탄올 1 ml를 가한 후, 12,000rpm, 4°C에서 5분 동안 원심분리하였다. 이어서, 에탄올을 제거하고 RNA 침전물이 담긴 튜브를 건조한 뒤 nuclease free water를 사용하여 RNA 펠렛을 용해시켰다. Nanodrop을 이용하여 260 nm 및 280 nm 파장에서 추출된 RNA 시료의 농도를 측정하고 AccuPower CycleScript RT PreMix(dT₂₀) (K-2044, Bioneer, Korea)를 사용하여 cDNA를 합성하였다.

[0332] 이 후, 합성한 cDNA와 표 22의 프라이머를 사용하여 실시간 중합효소연쇄반응 (Real time PCR)를 이용하여 α-SMA (Acta2) 및 CTGF의 mRNA 발현 변화를 확인하고, 그 결과를 도 10a 내지 도 10b 및 표 23 내지 24에 나타내었다.

표 22

서열번호	명명	서열목록 (5'→ 3')	비고
13	α-SMA _primer1	CCCAGACATCAGGGAGTAATGG	α-SMA 정방향 프라이머
14	α-SMA _primer2	TCTATCGGATACATTCAGCGTCA	α-SMA 역방향 프라이머
15	CTGF _primer1	CTTCTGCGATTTTCGGCTCC	CTGF 정방향 프라이머
16	CTGF _primer2	TACACCGACCCACCGAAGA	CTGF 역방향 프라이머

표 23

	Ctrl	TGF-β		
		PBS	e	R11e
α-SMA 발현량	1.0	1.8	1.0	1.0

표 24

	Ctrl	TGF-β		
		PBS	e	R11e
CTGF 발현량	1.0	1.6	1.3	1.3

[0336] 도 10a 내지 도 10b 및 표 23 내지 24에서 확인할 수 있듯이, BxC-e, BxC-R11e 엑소솜은 섬유화를 유도한 섬유아세포에서 섬유화관련 유전자와 단백질인 α-SMA 및 CTGF의 발현을 감소시키는 것을 확인하였고, 이를 통해 본 발명에 따른 엑소솜은 세포의 섬유화를 억제하는 효과가 있을 것으로 기대된다.

[0338] 10-2. SDS-PAGE를 통한 발현량 확인

[0339] 마우스 배아 섬유아세포주인 CF-1 (ATCC, USA)을 1% 안티-안티 및 10% FBS가 첨가된 High glucose DMEM (Gibco, USA)배지를 사용하여 6웰 플레이트에 분주하고 37°C 5% CO₂ 배양기에서 1일간 배양하였다. 섬유화를 유도하기 위해 배양액을 Transforming Growth Factor-β1 human (TGF-β1, Sigma) 20ng/ml 및 1% 안티-안티가 첨가된 High glucose DMEM (Gibco, USA)배지로 교환한 후 37°C 5% CO₂ 배양기에서 2일간 배양하였다.

[0340] 이 후, 엑소솜의 섬유화 억제 효과를 확인하기 위하여 DPBS로 배지를 세척한 후 BxC-e, BxC-R11e 엑소솜이 각각 100µg/ml 첨가된 배지로 교환하고 37°C 5% CO₂ 배양기에서 1일간 배양하였다.

[0341] 배양이 끝난 뒤, 배양액 제거 후 DPBS로 세척하고 TryPLE(Gibco)을 6웰 플레이트에 0.5ml 넣은 후 37°C 5% CO₂ 배양기에서 3분간 방치하였다. 세포가 떠오르면 FBS가 첨가된 배양액으로 세포 현탁액을 튜브에 모은 후,

5000rpm, 3분 원심분리하였다. 원심 분리 후 상층액은 버리고, 펠렛은 50 μ l의 NP40 cell lysis buffer (FNN0021, Invitrogen)로 30분간 ice에서 분해한 후 4 $^{\circ}$ C, 12000rpm, 10분간 원심분리한 후 상층액만 새로운 튜브에 모았다. 정량 후 샘플 버퍼로 희석하고 100 $^{\circ}$ C, 10분간 끓여 준 후 SDS-PAGE 걸고, membrane transfer를 진행하였다. α -SMA 및 CTGF의 항체를 버퍼의 1/1000 만큼 넣어 4 $^{\circ}$ C에서 16시간 반응시킨 후 TBST 버퍼로 세척하고 2차 항체는 버퍼의 1/2000 만큼 넣어 실온에서 1시간 반응시켰다. TBST 버퍼로 세척한 후 ECL 용액을 반응시킨 후 ChemiDoc을 이용하여 발현량을 측정하고 Multigauge 프로그램으로 정량하였고, 이를 도 11, 12a, 12b 및 표 25 내지 26에 나타내었다.

표 25

[0342]

	Ctrl	TGF- β		
		PBS	e	R11e
α -SMA 발현량	1.0	1.3	1.2	0.8

표 26

[0343]

	Ctrl	TGF- β		
		PBS	e	R11e
CTGF 발현량	1.0	2.3	2.0	1.6

[0344]

실시간 중합효소연쇄반응 결과와 마찬가지로, 11, 12a, 12b 및 표 25 내지 26에서 확인할 수 있듯이 BxC-e, BxC-R11e 엑소솜은 섬유화를 유도한 섬유아세포에서 섬유화관련 유전자와 단백질인 α -SMA 및 CTGF의 발현을 감소시키는 것을 확인하였고, 이를 통해 본 발명에 따른 엑소솜은 세포의 섬유화를 억제하는 효과가 있을 것으로 기대된다.

[0346]

실험예 11: BxC-e 및 BxC-R11e 엑소솜의 심근세포 기능 촉진 효과 확인

[0347]

분화가 완료된 유도만능줄기세포 유래 심근세포를 RPMI1640 + without VitaminA supplement 배지를 사용하여 6 웰 플레이트에 분주하고 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기에서 1일간 배양하였다. 이 후, 엑소솜의 심근세포의 기능을 촉진시키는 효과를 확인하기 위하여 DPBS로 배지를 세척한 후 BxC-e, BxC-R11e 엑소솜이 각각 100 μ g/ml 첨가된 배지로 교환하고 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기에서 1일간 배양하였다.

[0348]

모든 배양이 끝난 뒤, 35mm 디쉬에 트리졸 용액 (TRIZol reagent, Invitrogen, USA) 1ml를 첨가하여 세포를 분해하였다. 이어서, 클로로포름 (Chloroform, Sigma, USA) 200 μ l를 첨가하고 볼텍스 (vortex)한 뒤, 4 $^{\circ}$ C, 12,000rpm에서 15분간 원심분리하였다. 원심분리 후 상층액을 새 튜브로 옮기고 이소프로판올 (Isopropanol, Merck Millipore, USA) 500 μ l와 섞어주었다. 튜브를 50회 업&다운해주고 5분 동안 아이스에 방치한 후, 12,000rpm, 4 $^{\circ}$ C에서 10분간 원심분리시켜 상층액을 제거하였다. 남은 침전물에 70% 에탄올 1 ml를 가한 후, 12,000rpm, 4 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 원심분리하였다. 이어서, 에탄올을 제거하고 RNA 침전물이 담긴 튜브를 건조한 뒤 뉴클레아제-비함유수 (nuclease free water)를 사용하여 RNA 펠렛을 용해시켰다. Nanodrop을 이용하여 260 nm 및 280 nm 파장에서 추출된 RNA 시료의 농도를 측정하고 AccuPower CycleScript RT PreMix (dT20) (K-2044, Bioneer, Korea)를 사용하여 cDNA를 합성하였다.

[0349]

이 후, 합성한 cDNA와 표 27의 프라이머를 사용하여 실시간 중합효소연쇄반응 (Real time PCR)를 이용하여 cTNT, hERG, Nav1.7 및 MYH7의 mRNA 발현 변화를 확인하고, 그 결과를 도 13a 내지 13d 표 28 내지 31에 나타내었다.

표 27

[0350]

서열번호	명명	서열목록 (5' -> 3')	비고
17	cTNT_primer1	AGTGGGAAGAGGCAGACTGA	cTNT 정방향 프라이머
18	cTNT_primer2	CGAACTCTCTGCCTCCAAG	cTNT 역방향 프라이머
19	hERG_primer1	CAACCTGGCGACCAGATAG	hERG 정방향 프라이머
20	hERG_primer2	GGTGTGGGAGAGACGTTGC	hERG 역방향 프라이머
21	Nav1.7_primer1	GGTTTCAGCACAGATTCAGGTC	Nav1.7 정방향 프라이머

22	Nav1.7_primer2	CCAGCTGAAAGTGTCAAAGCTC	Nav1.7 역방향 프라이머
23	MYH7_primer1	CTTTGCTGTTATTGCAGCCATT	MYH7 정방향 프라이머
24	MYH7_primer2	AGATGCCAACTTTCCTGTGTC	MYH7 역방향 프라이머

표 28

[0351]

	Ctrl	BxC-e	BxC-R11e
cTnT 상대적 발현 량	1.0	6.67	8.65

표 29

[0352]

	Ctrl	BxC-e	BxC-R11e
hERG 상대적 발현 량	1.0	1.4	2.89

표 30

[0353]

	Ctrl	BxC-e	BxC-R11e
Nav 1.7 상대적 발 현량	1.0	2.74	5.89

표 31

[0354]

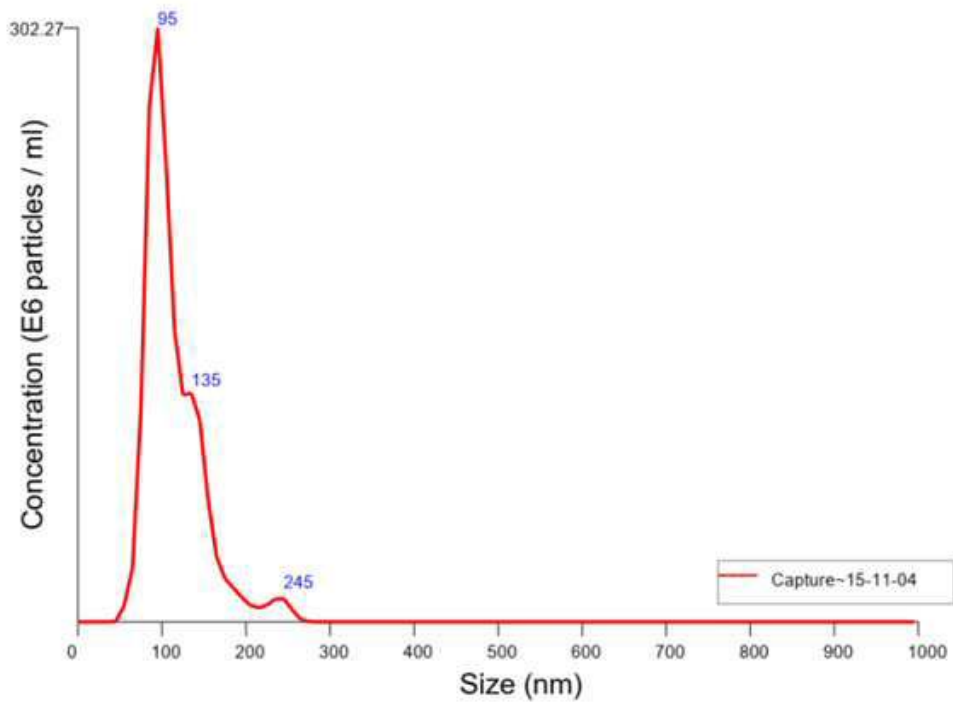
	Ctrl	BxC-e	BxC-R11e
MYH7 상대적 발현 량	1.0	2.76	3.03

[0355]

실험결과, 도 13a 내지 13d 및 표 28 내지 31에서 확인할 수 있듯이, BxC-e 엑소솜 및 BxC-R11e 엑소솜이 처리된 심근세포는, 대조군에 비해 cTnT, hERG, Nav1.7 및 MYH7의 mRNA 발현이 크게 증가한 것을 확인할 수 있었다. 이에 따라, BxC-e 엑소솜 및 BxC-R11e 엑소솜은 기능이 저하된 심근세포 또는 손상된 심근세포에 처리될 시, 심근세포의 기능을 현저하게 향상시킬 수 있을 것으로 기대된다.

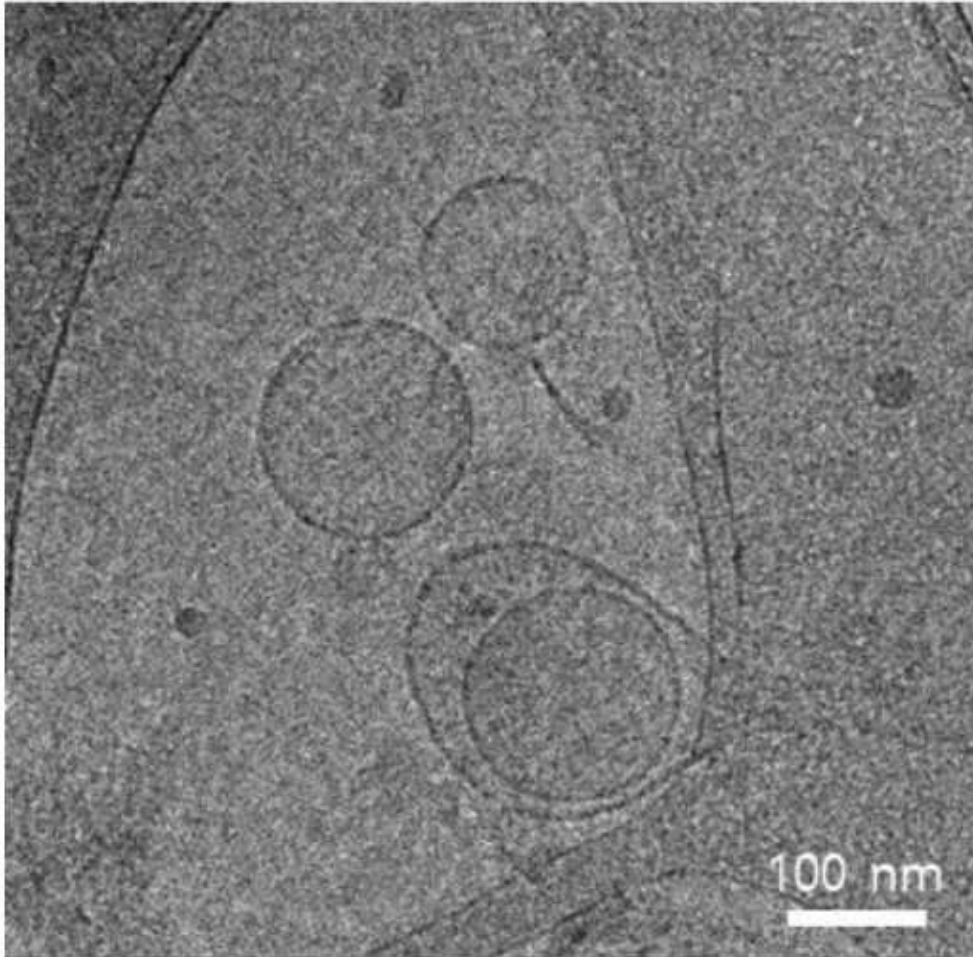
도면

도면1a

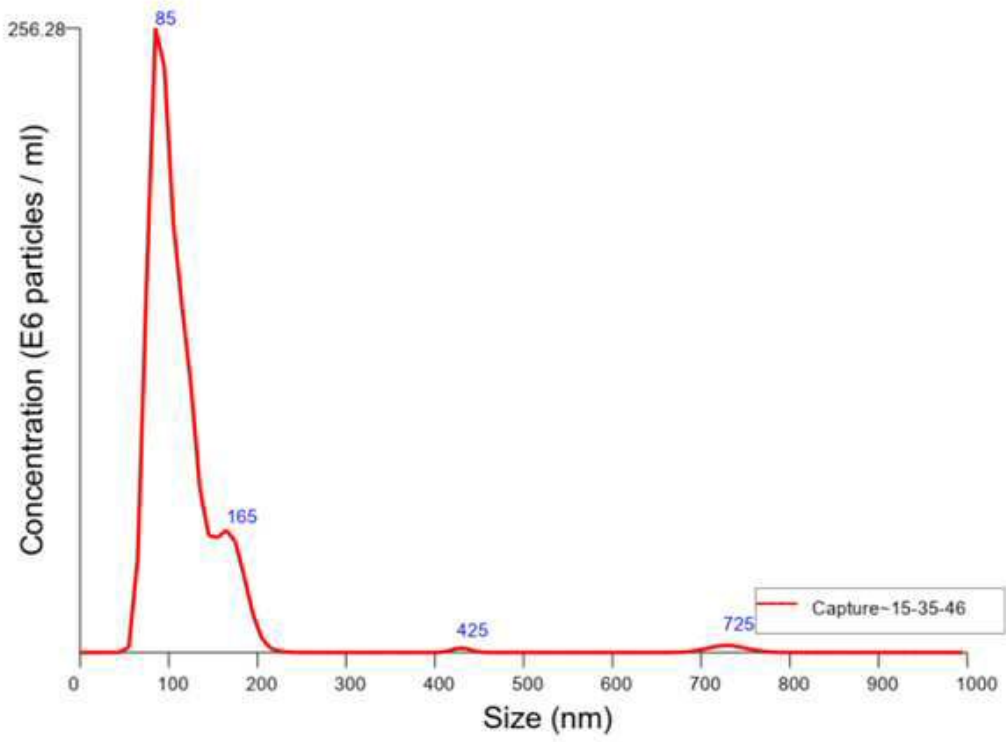


도면1b

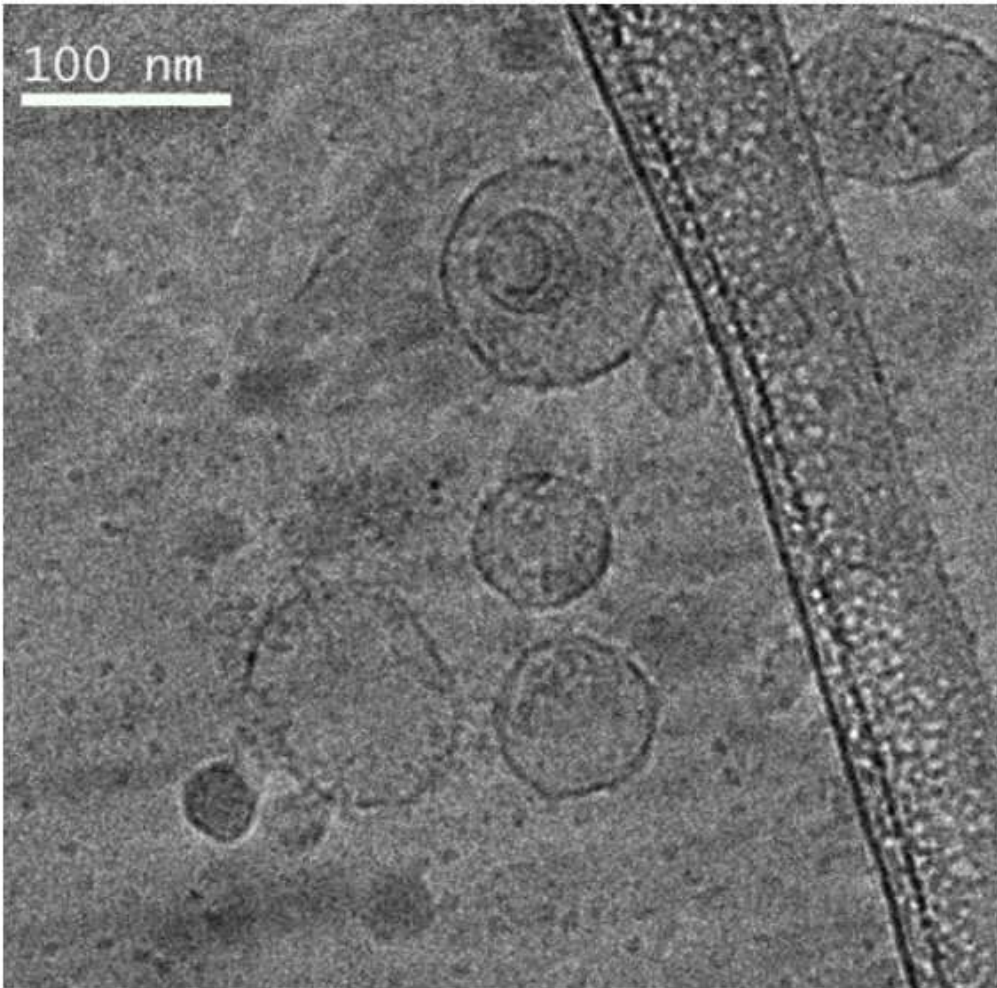
BxC-e



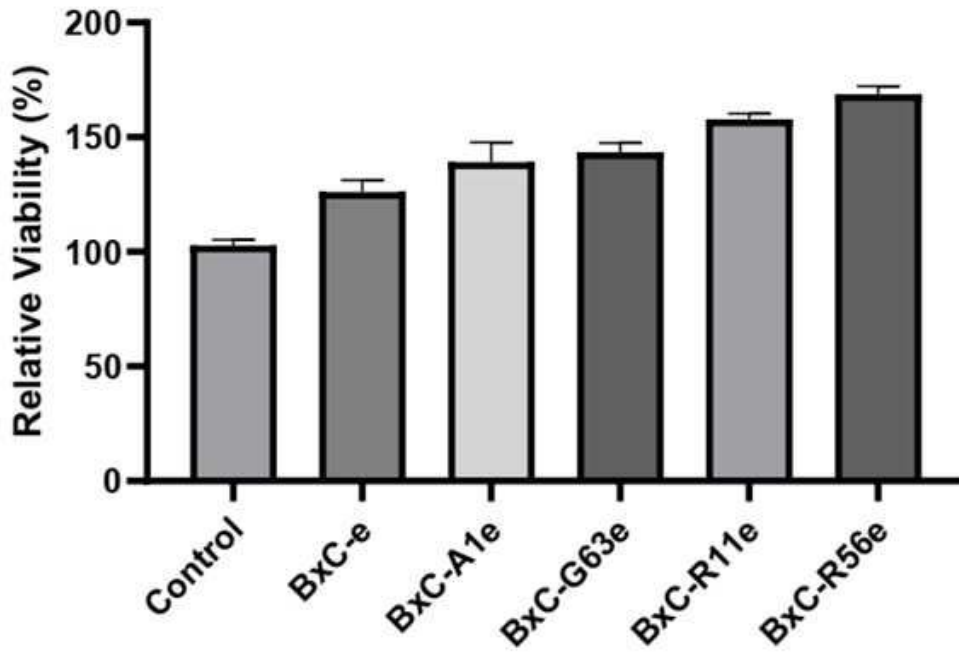
도면2a



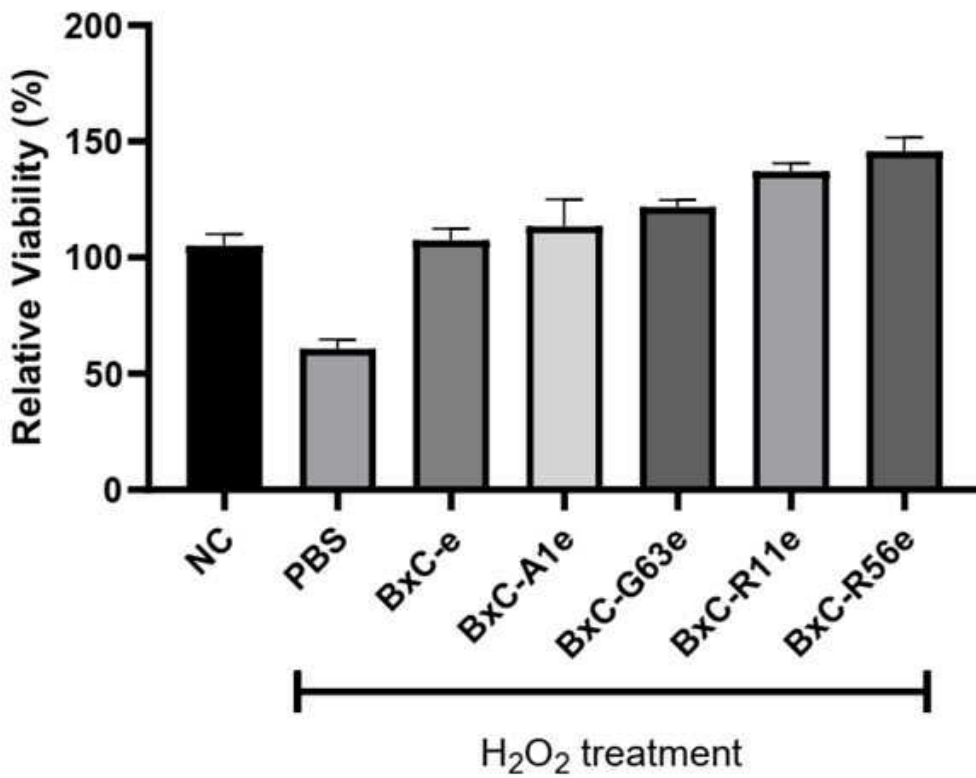
도면2b



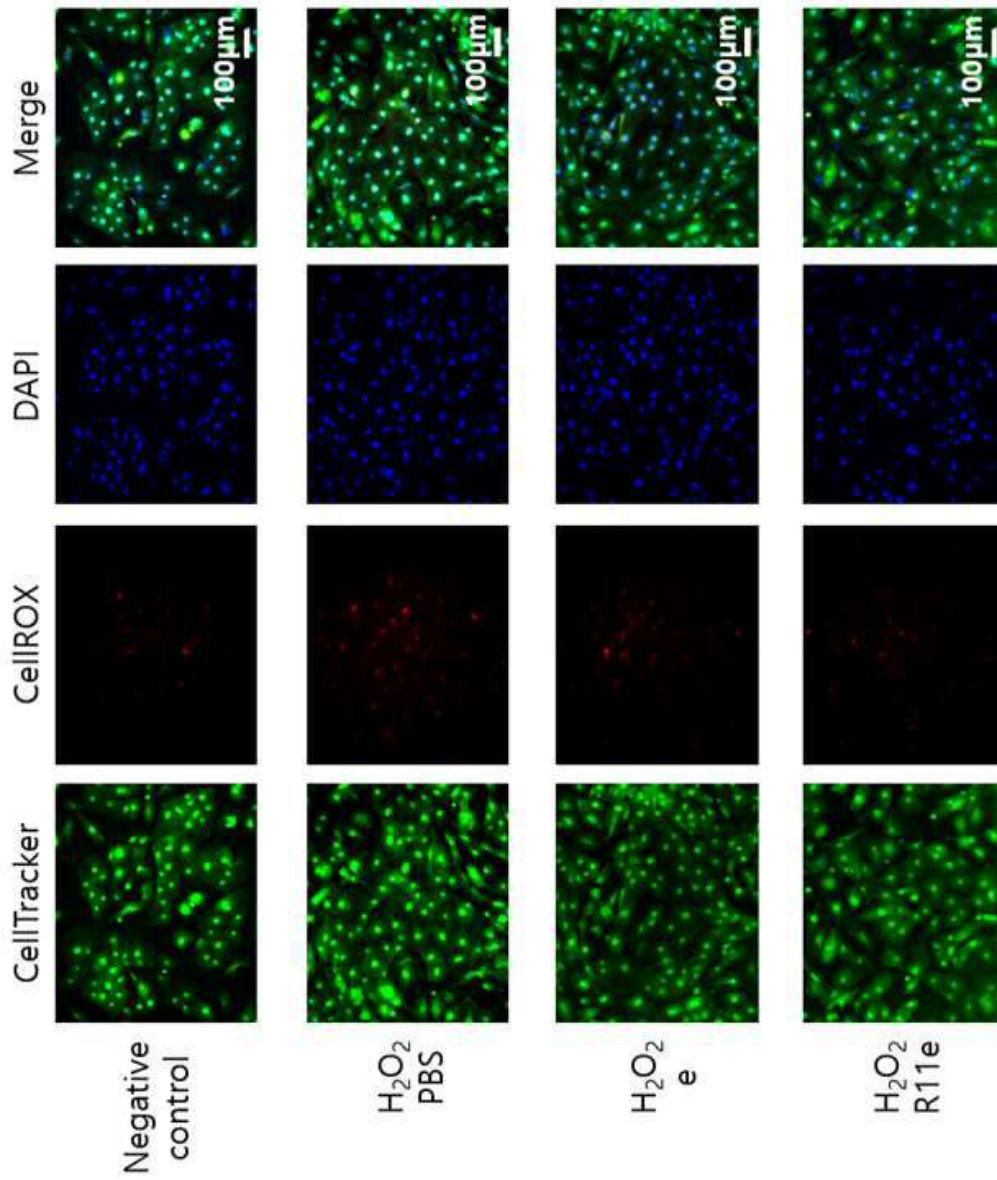
도면3a



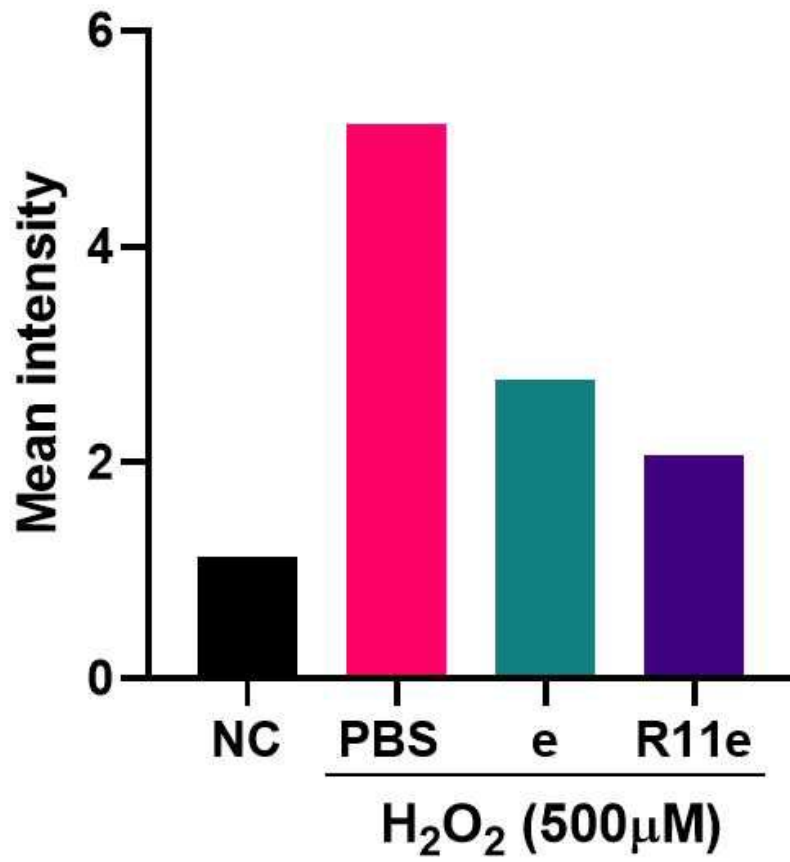
도면3b



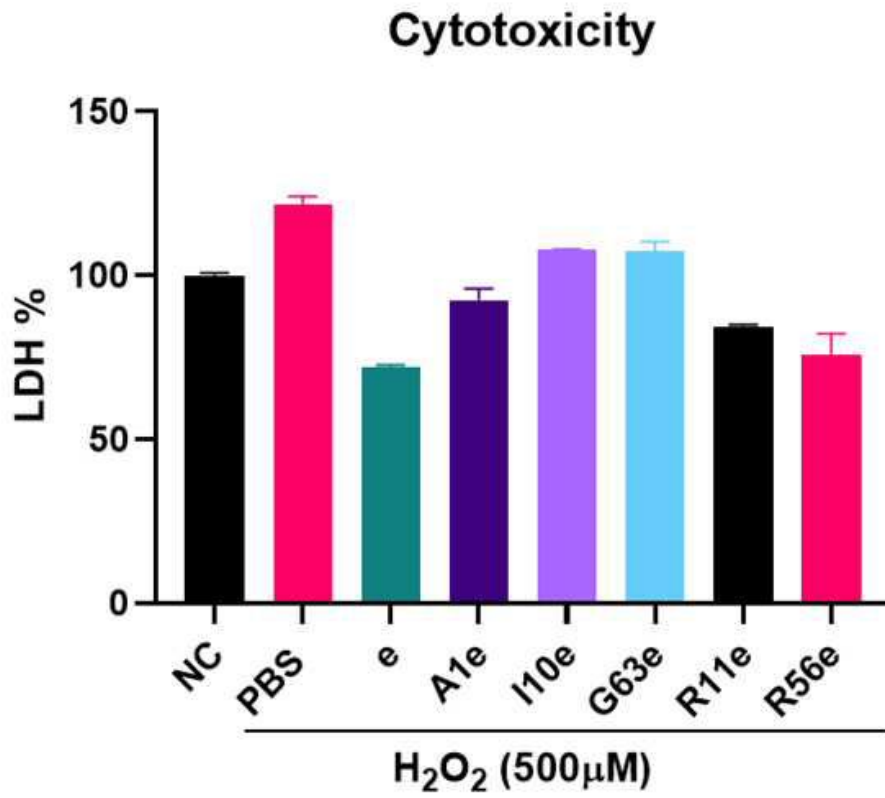
도면3c



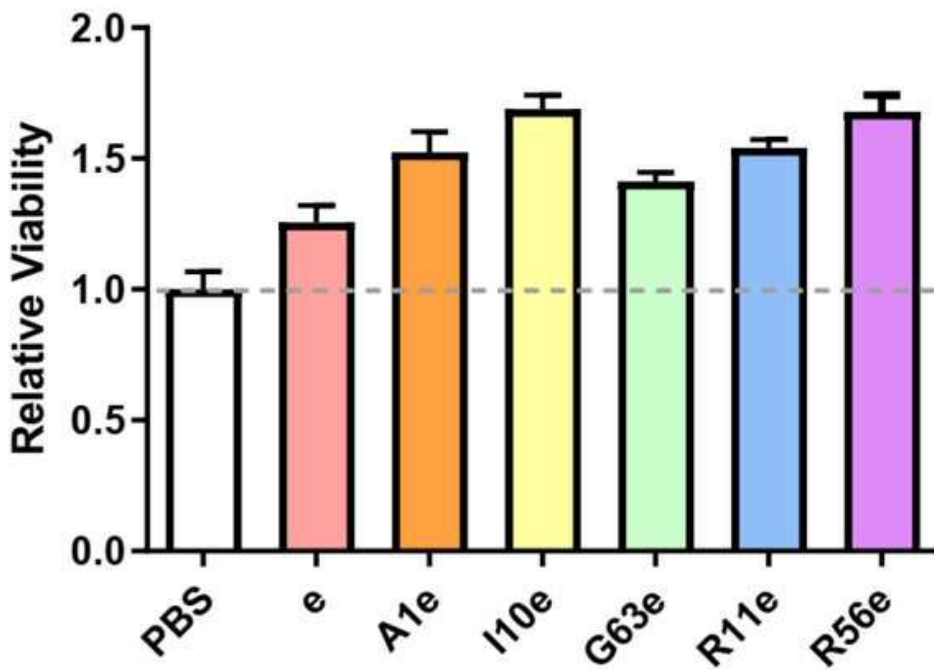
도면3d



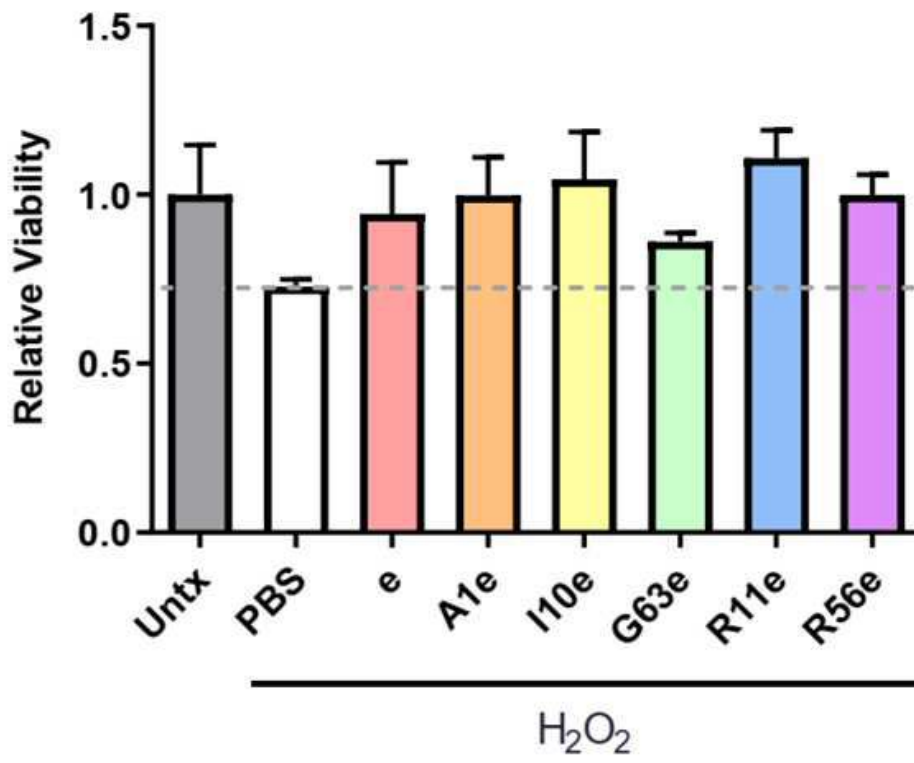
도면3e



도면4a



도면4b



도면5a

PBS



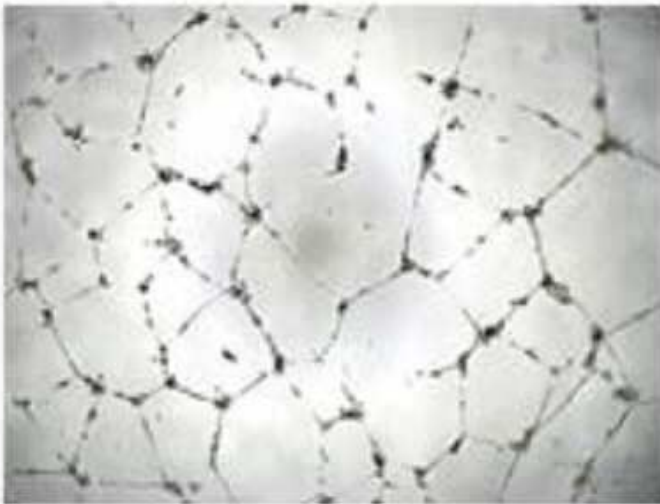
도면5b

e



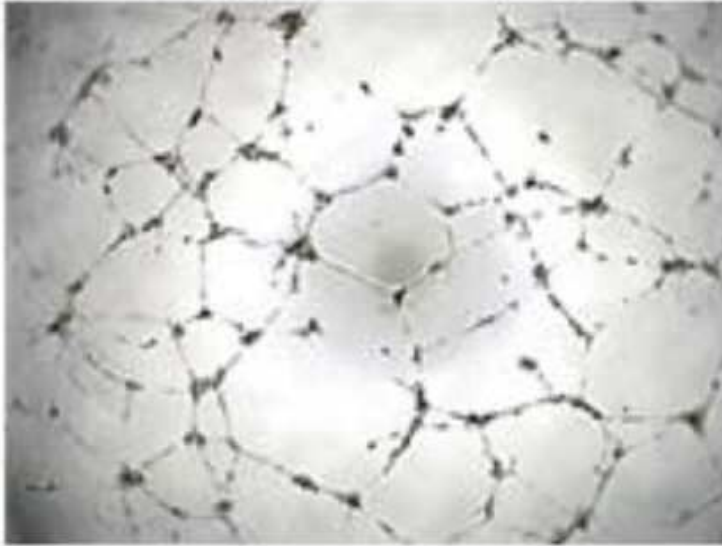
도면5c

A1e



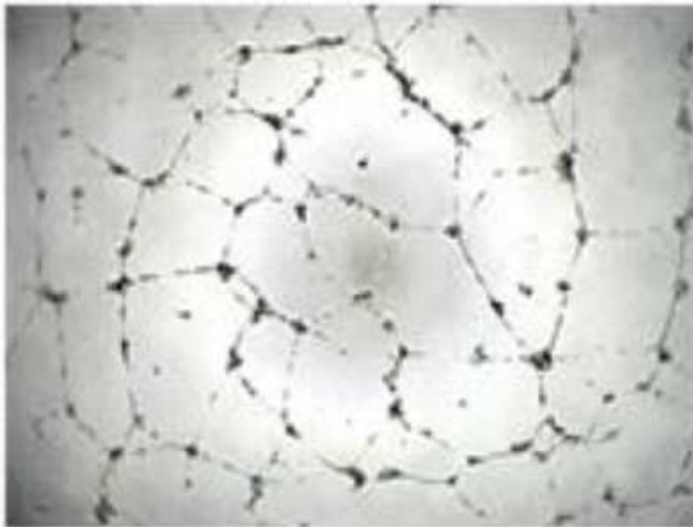
도면5d

I10e



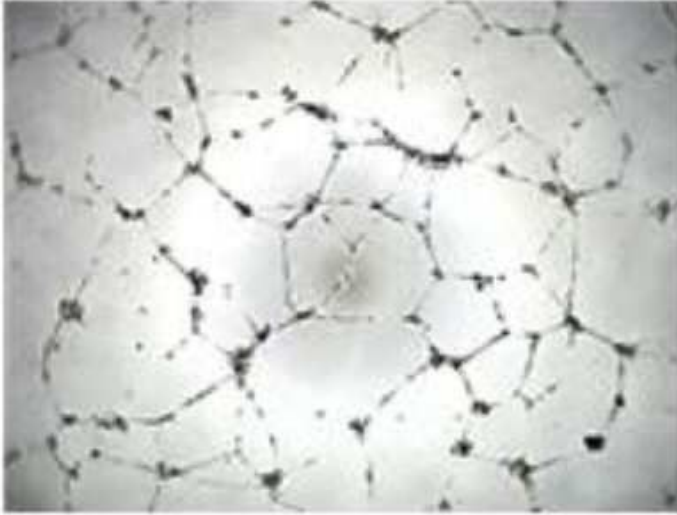
도면5e

G63e



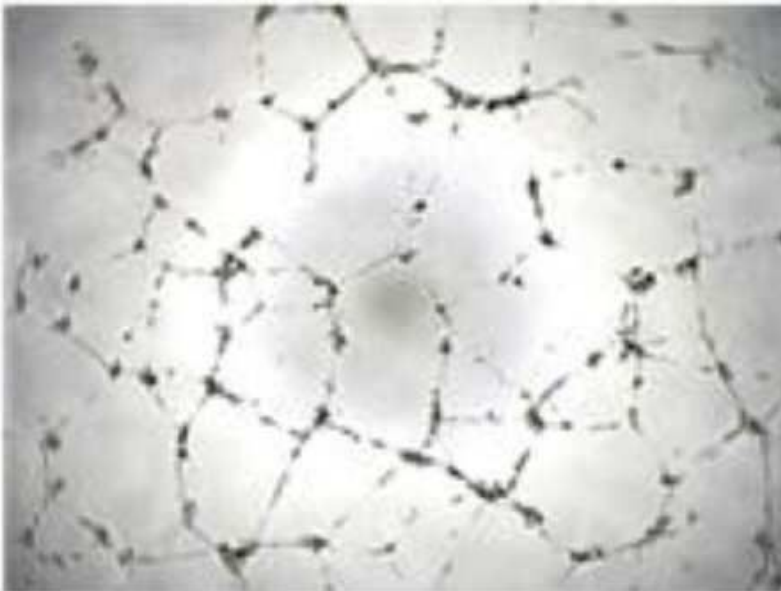
도면5f

R11e

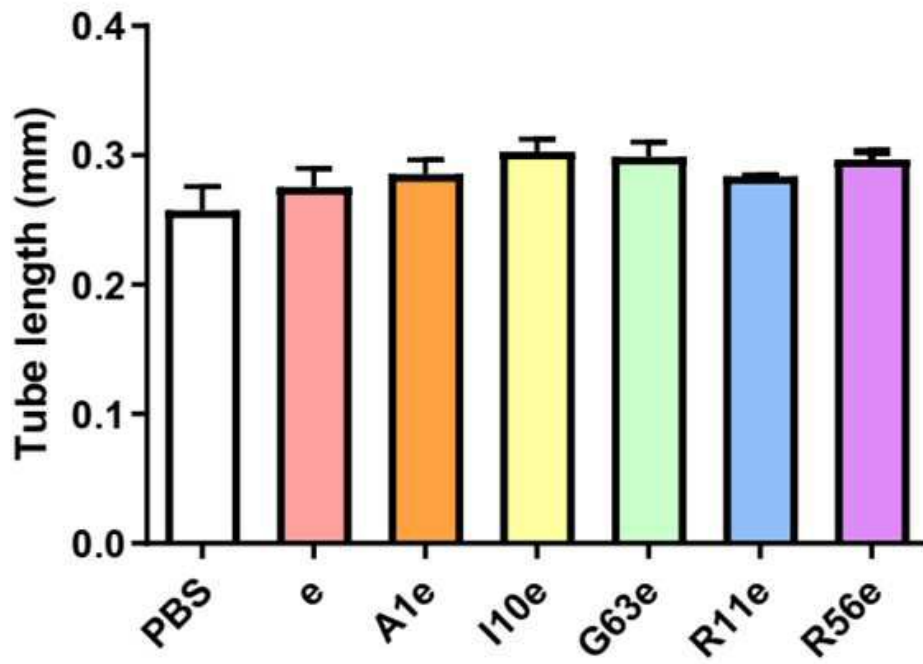


도면5g

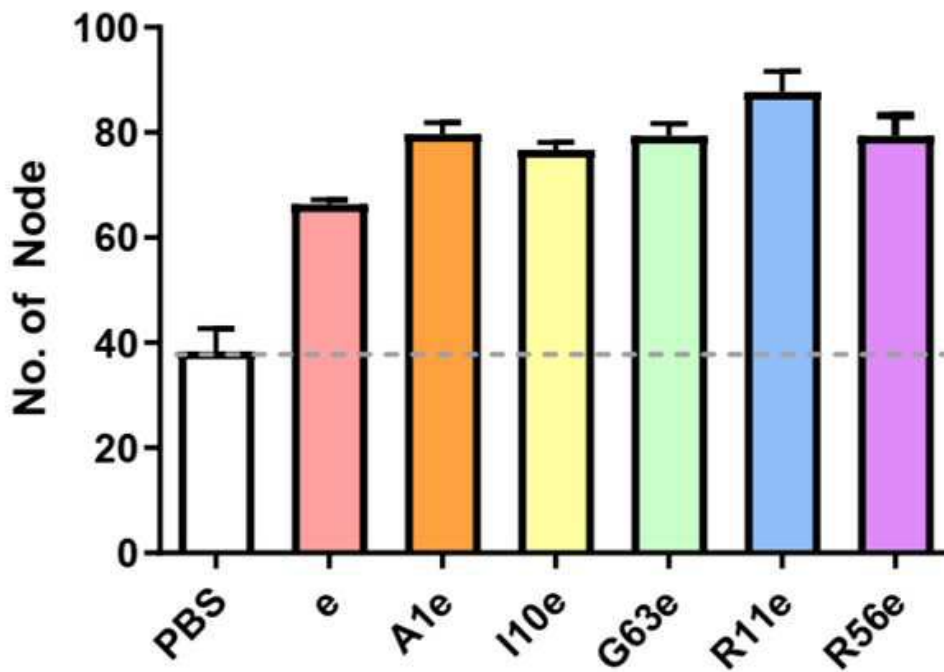
R56e



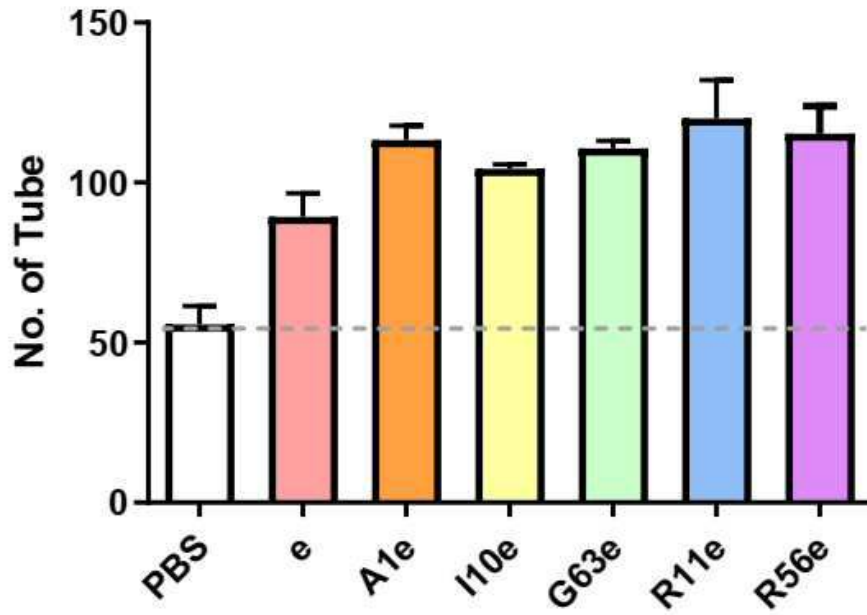
도면6a



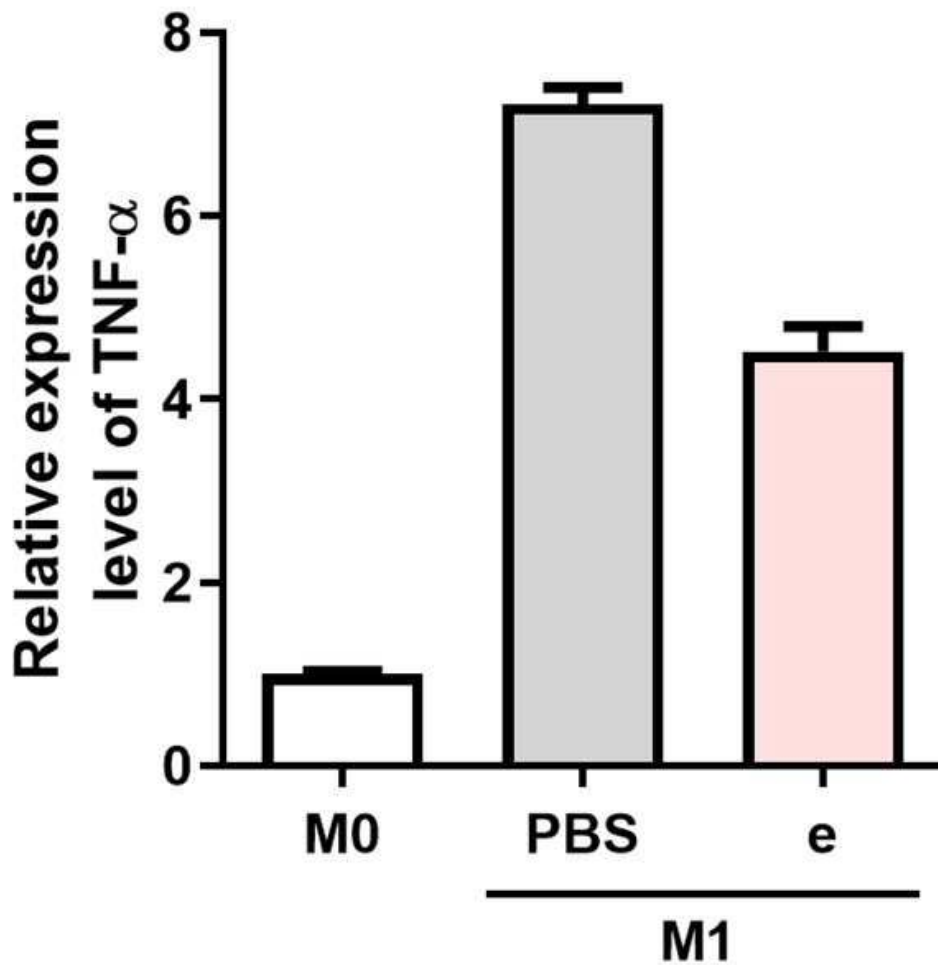
도면6b



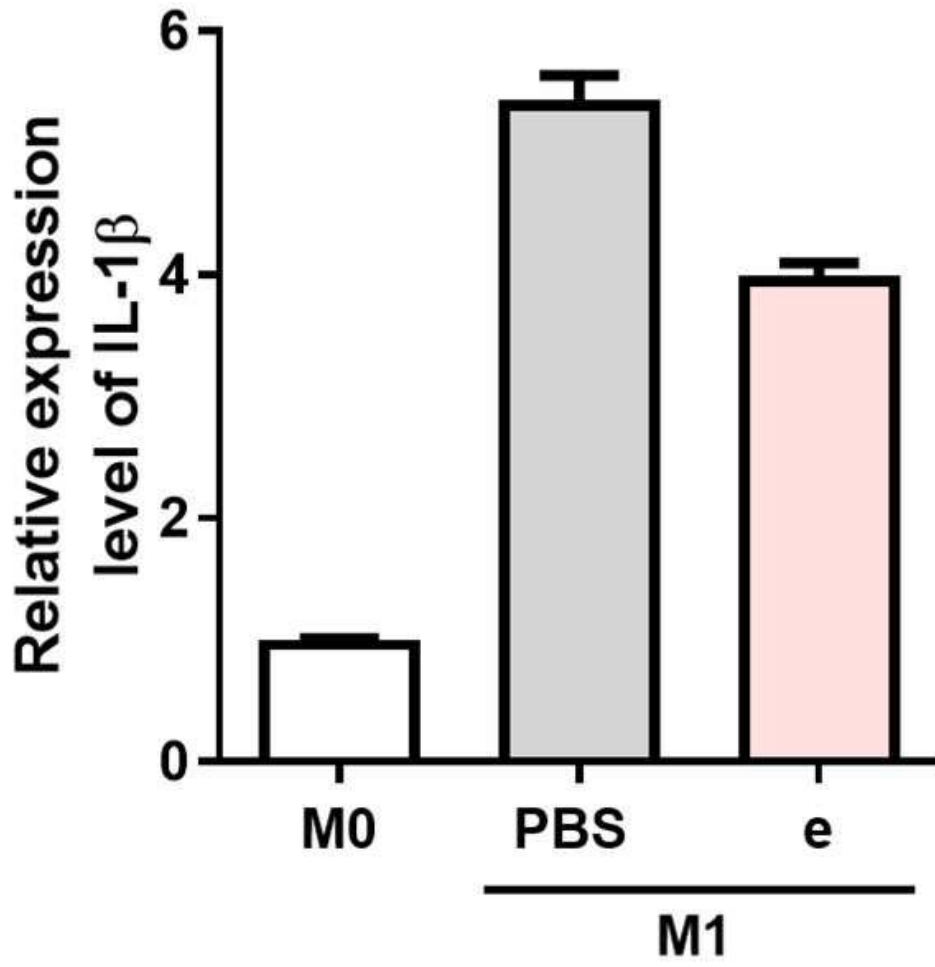
도면6c



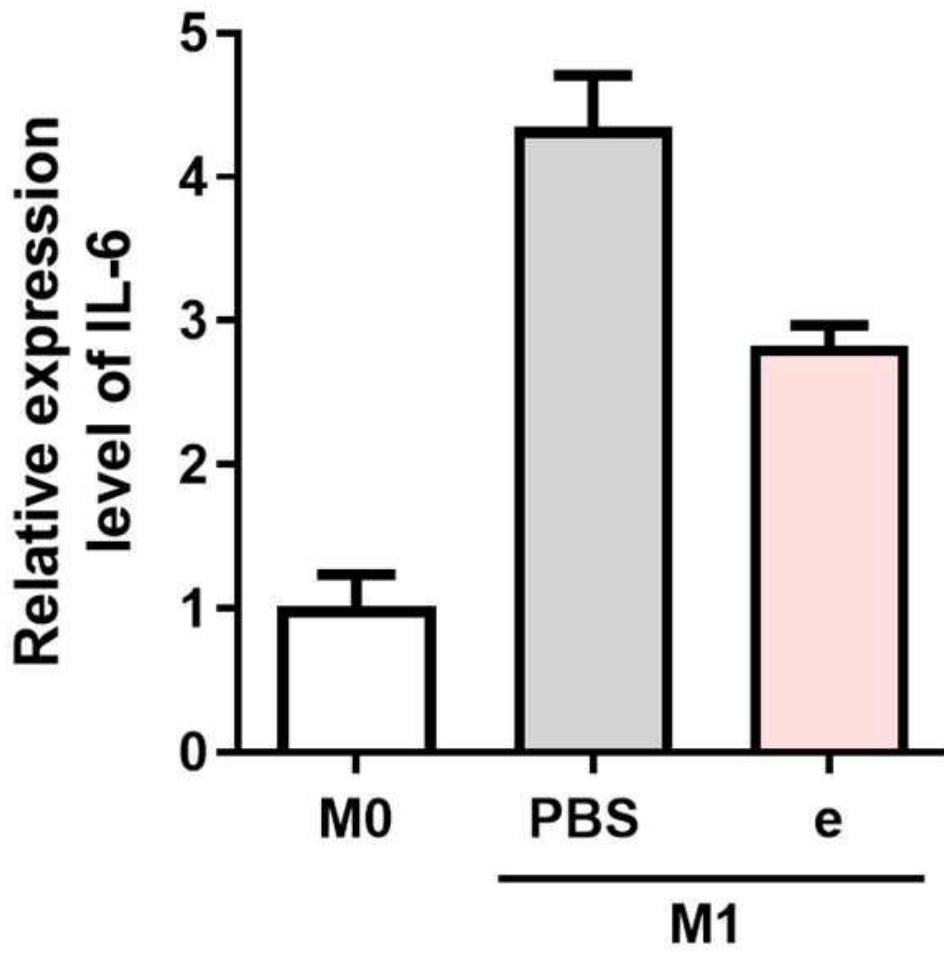
도면7a



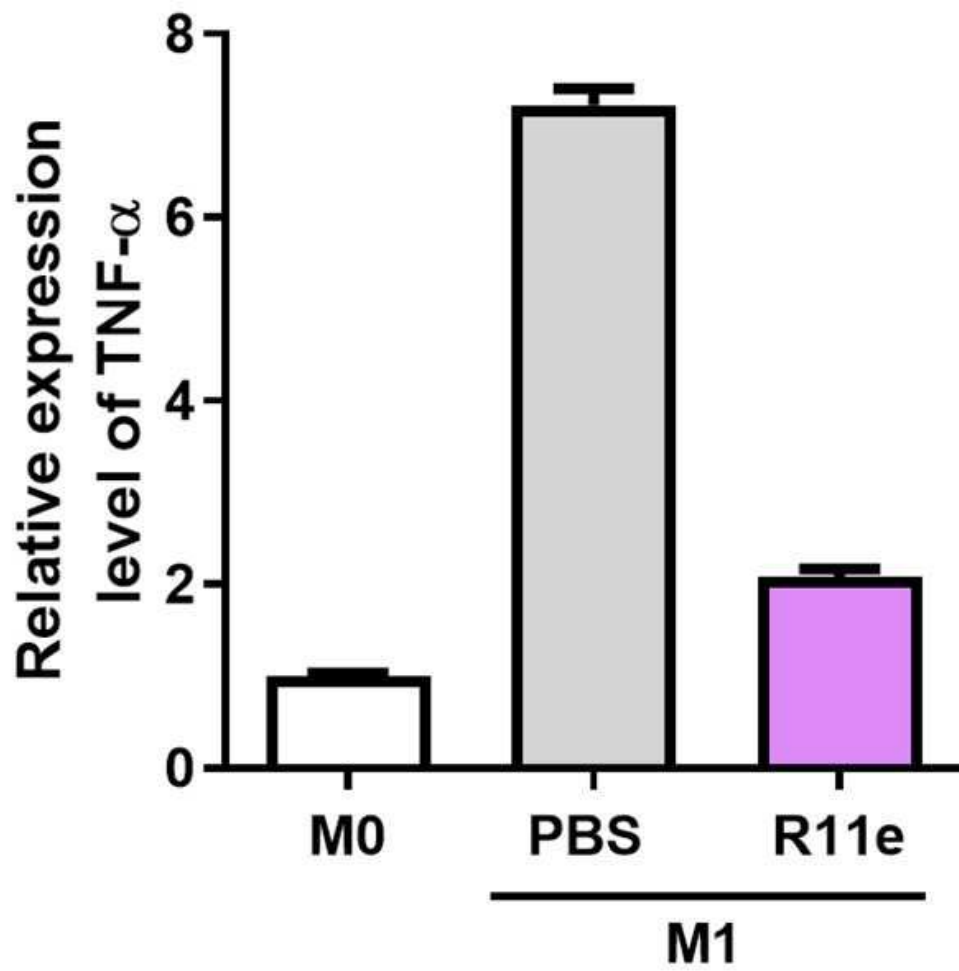
도면7b



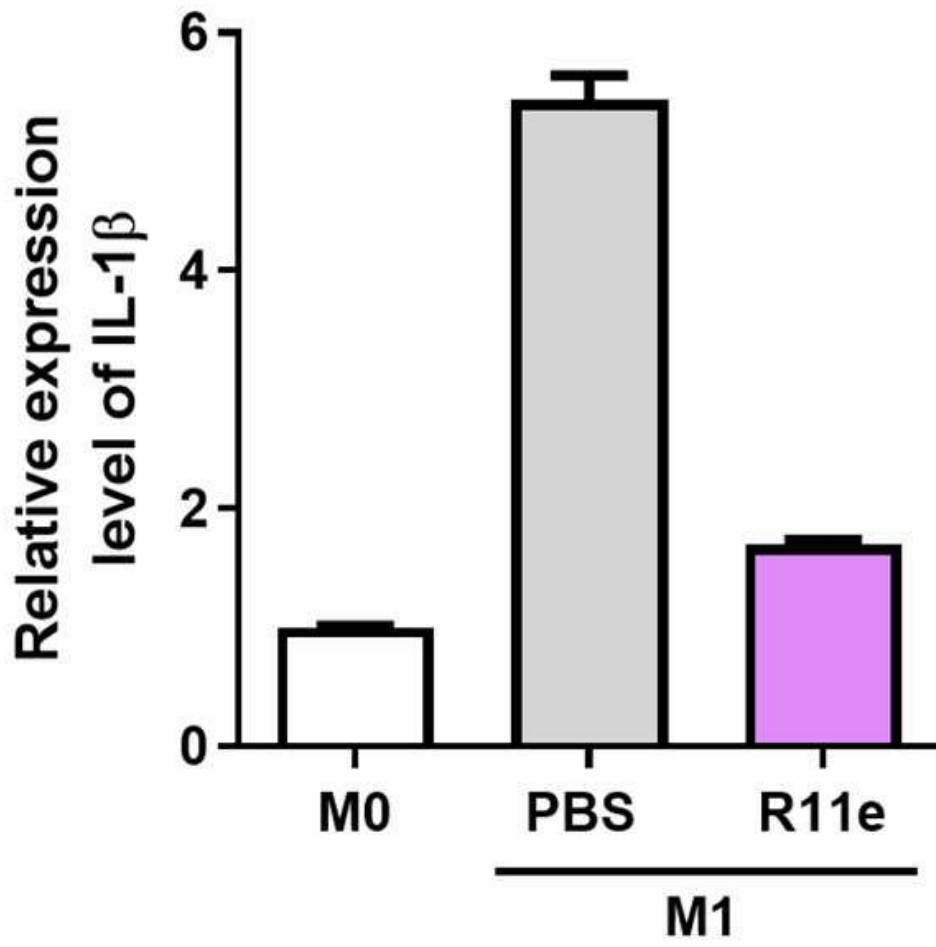
도면7c



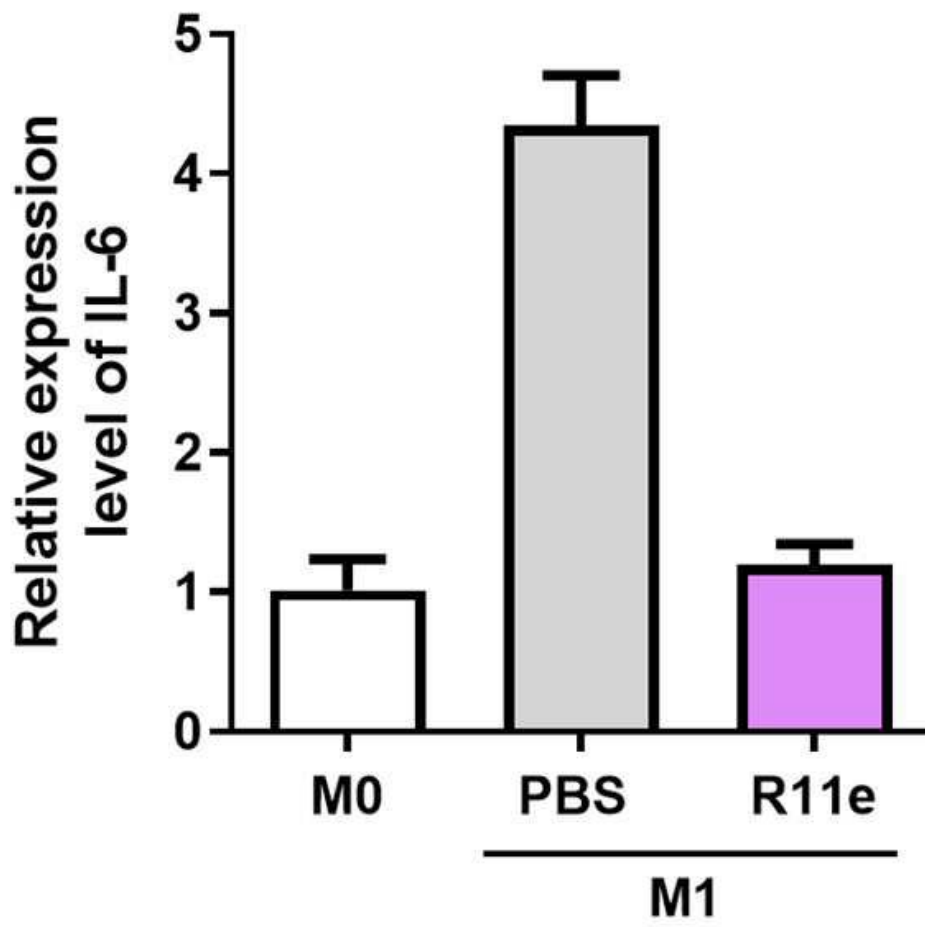
도면8a



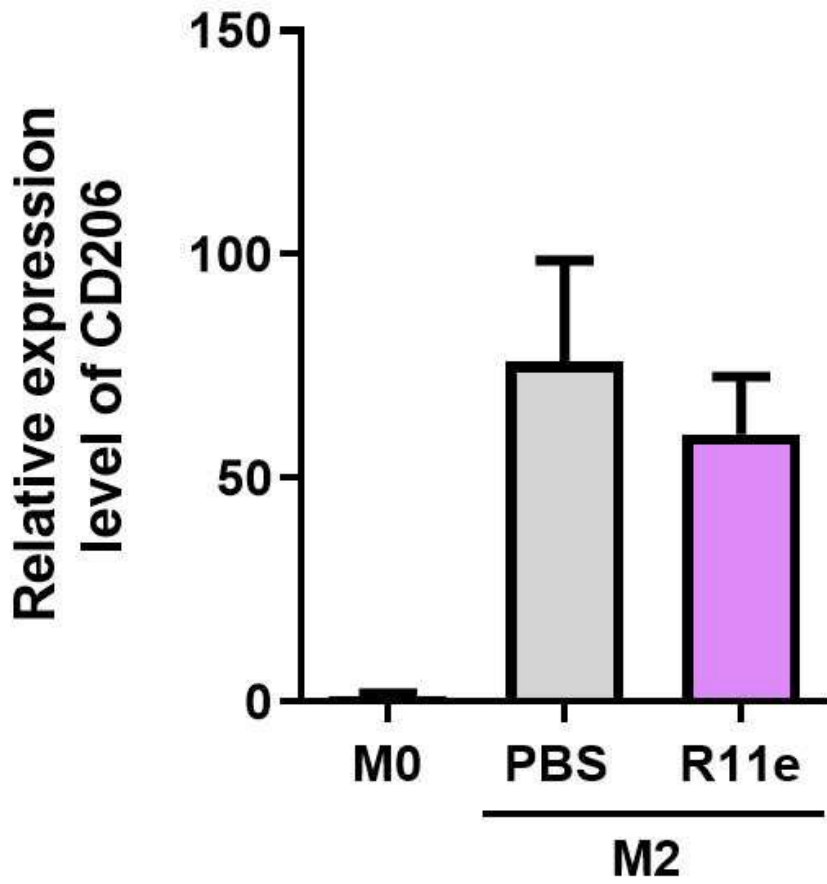
도면8b



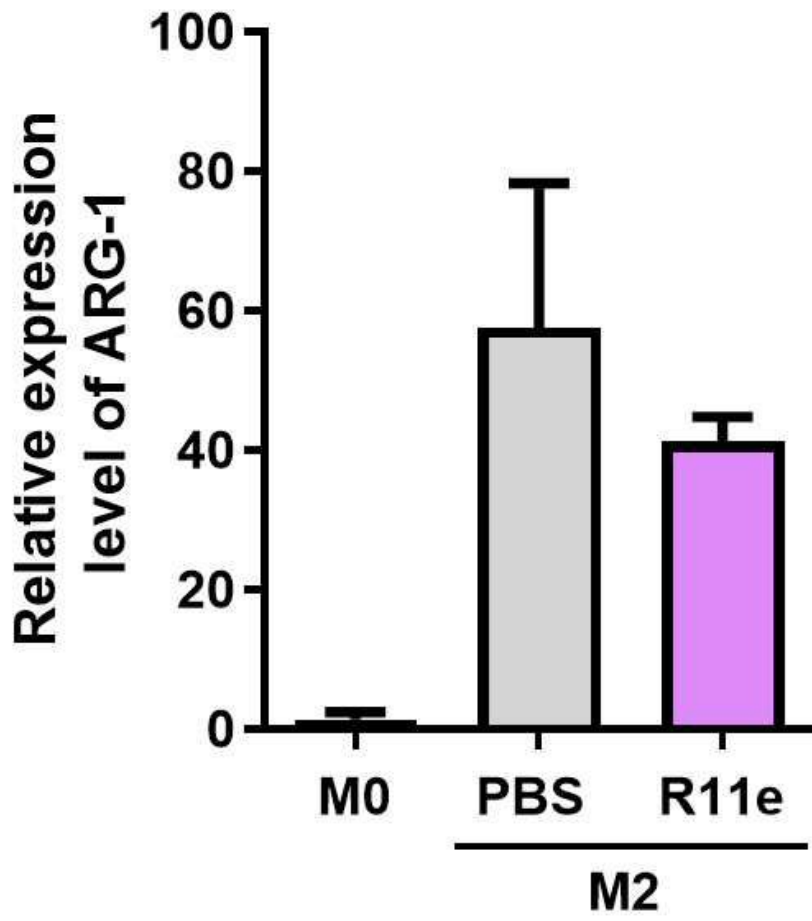
도면8c



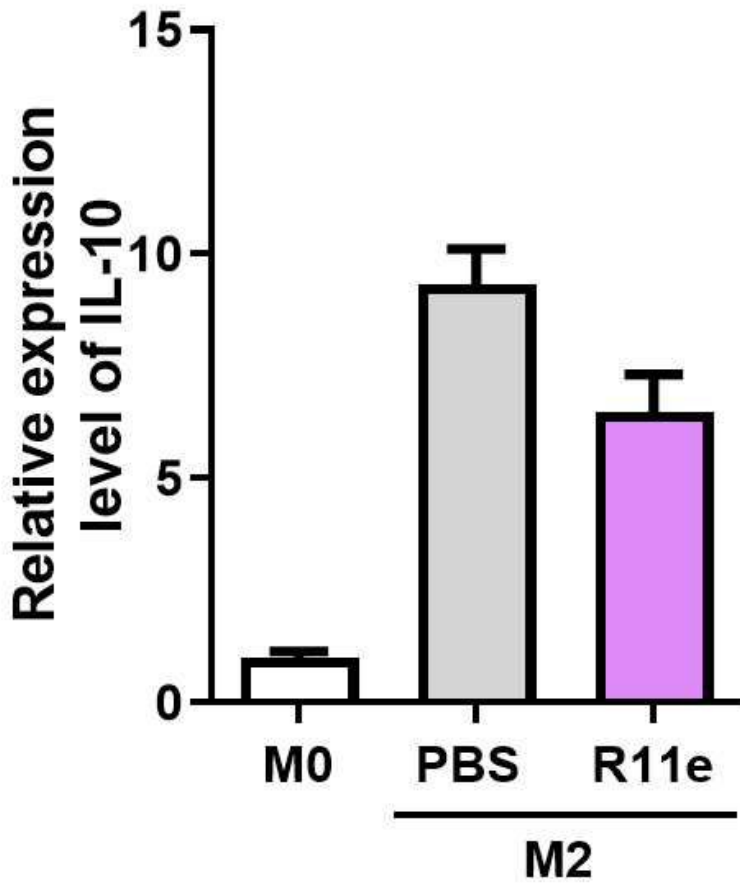
도면9a



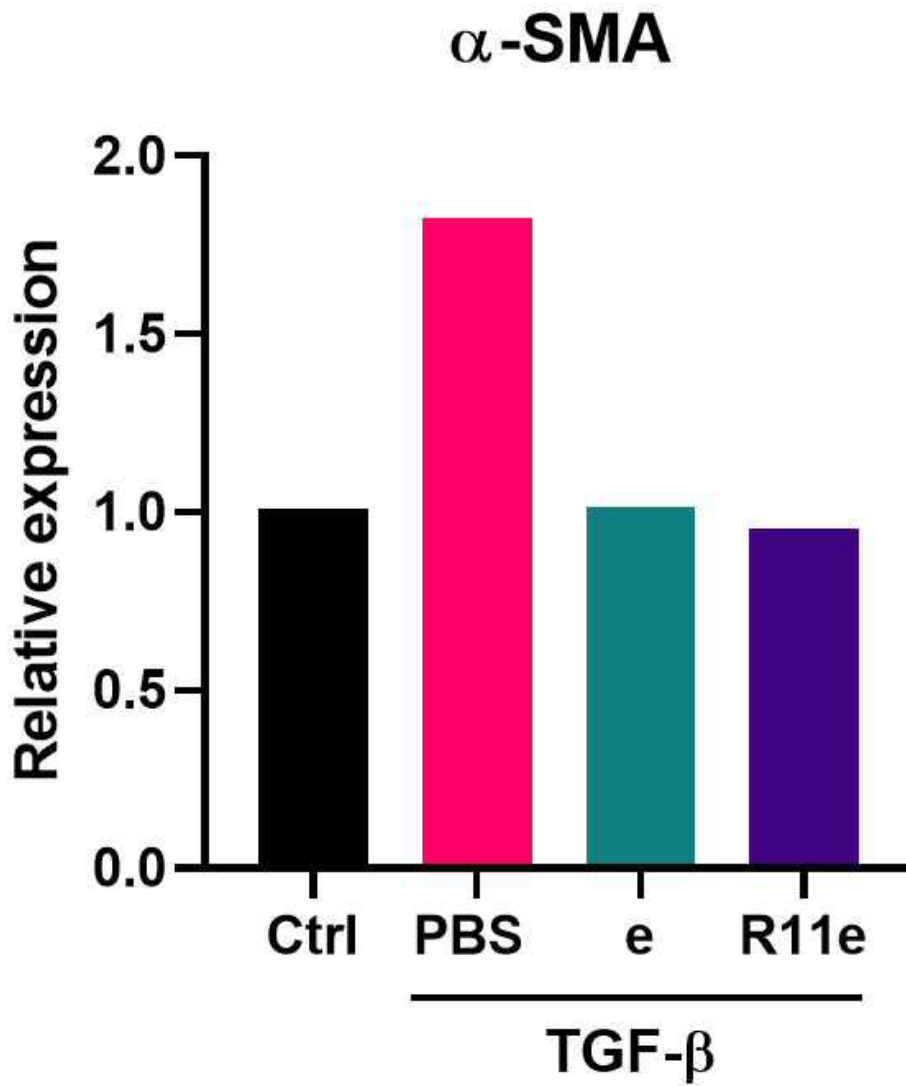
도면9b



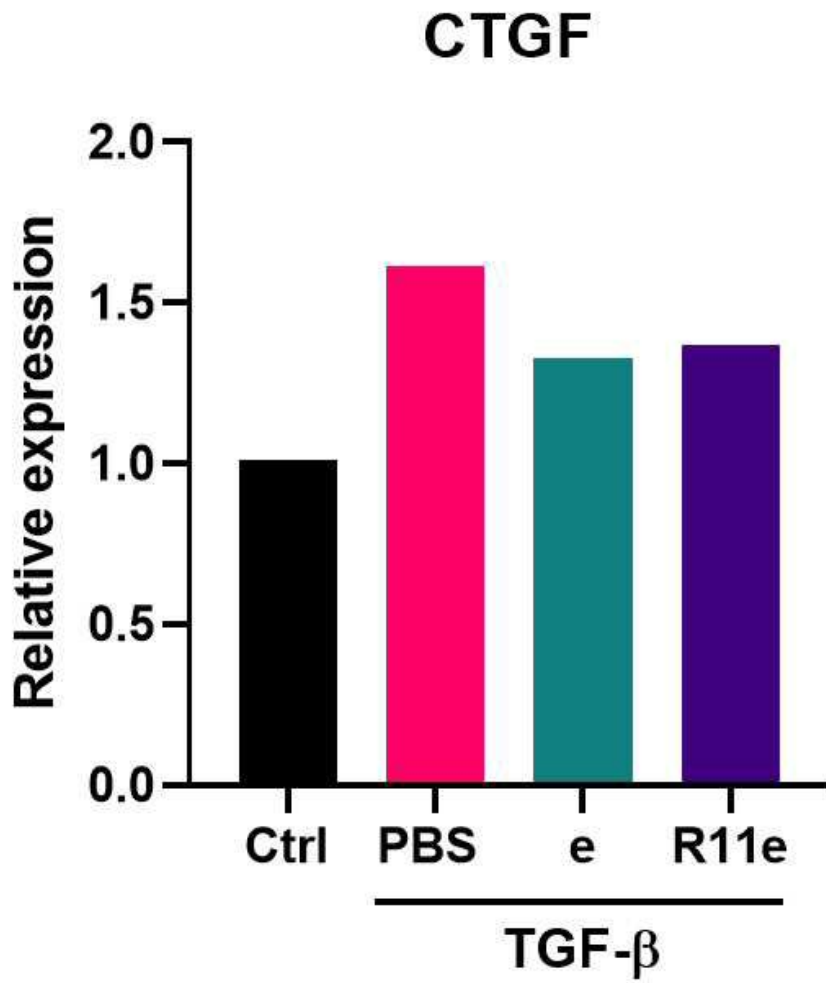
도면9c



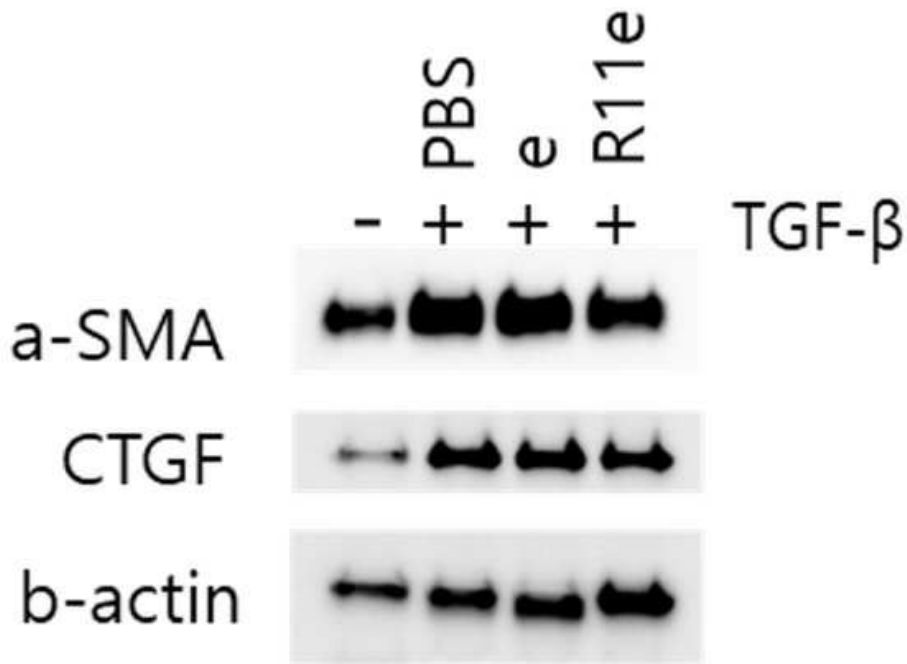
도면10a



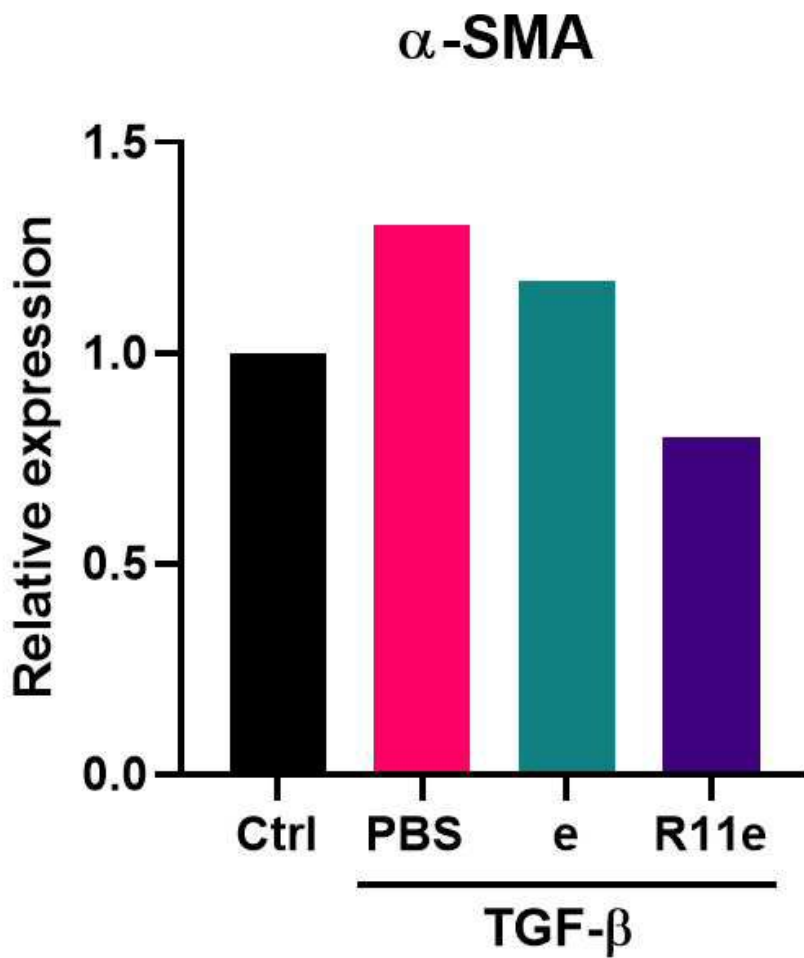
도면10b



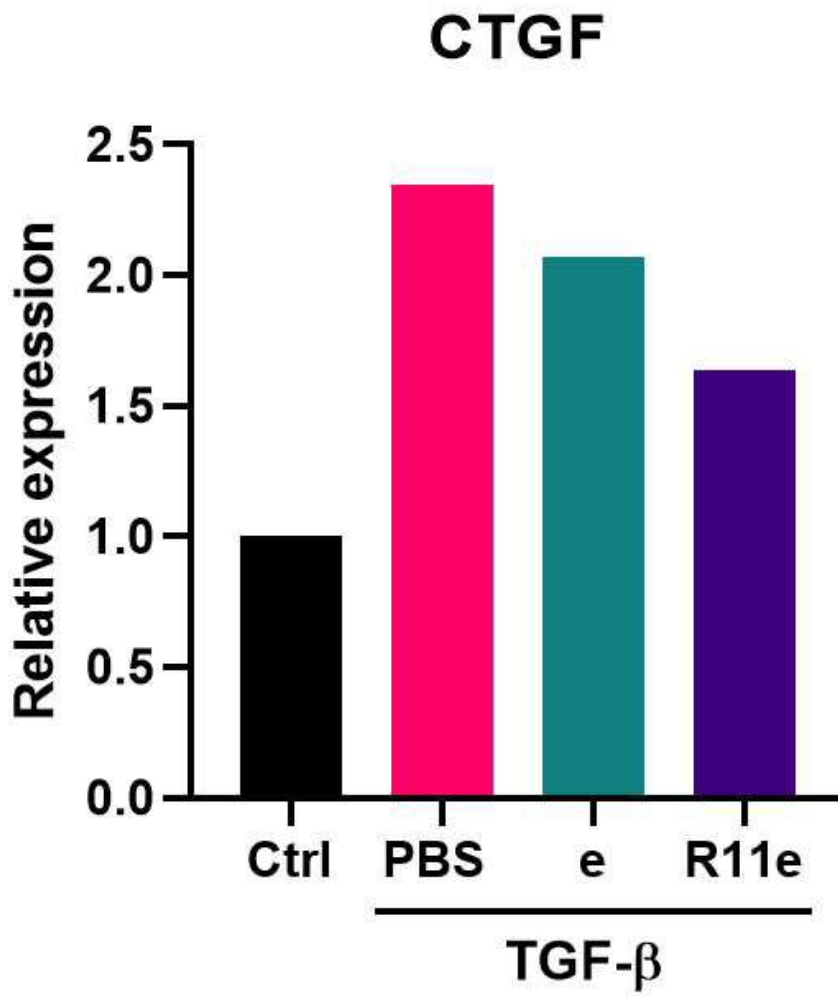
도면11



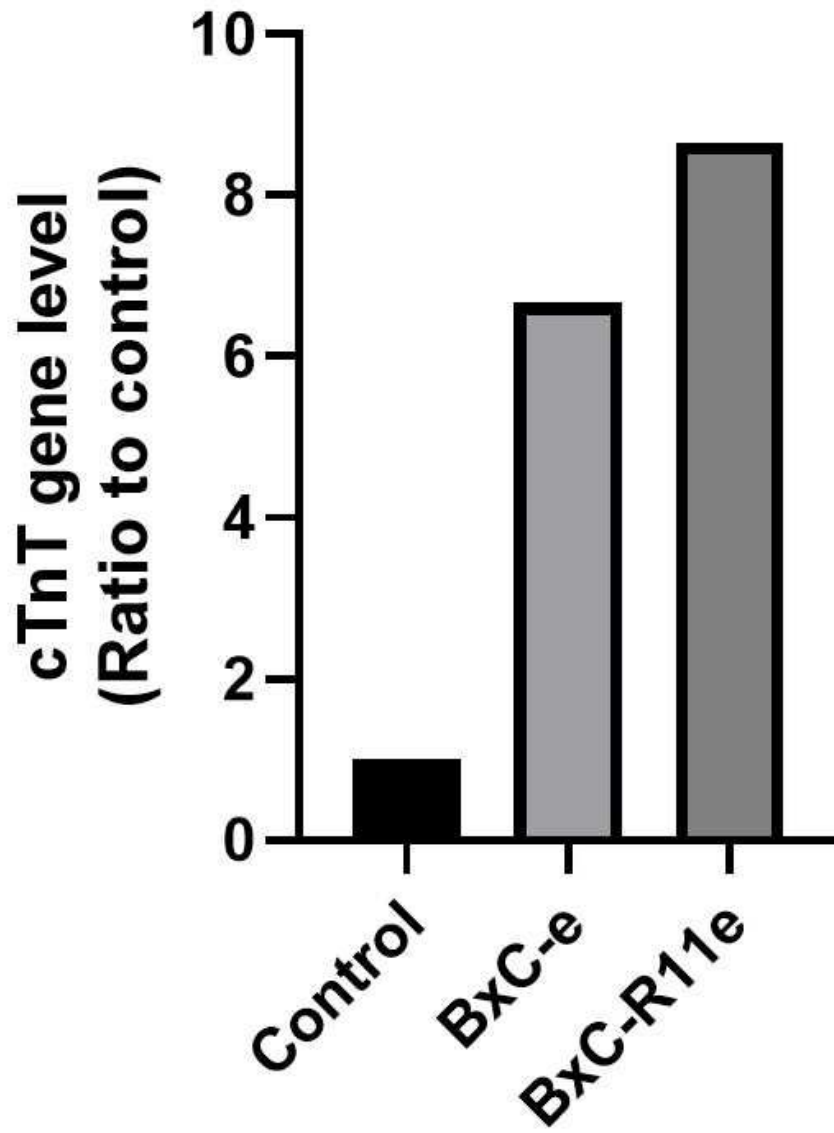
도면12a



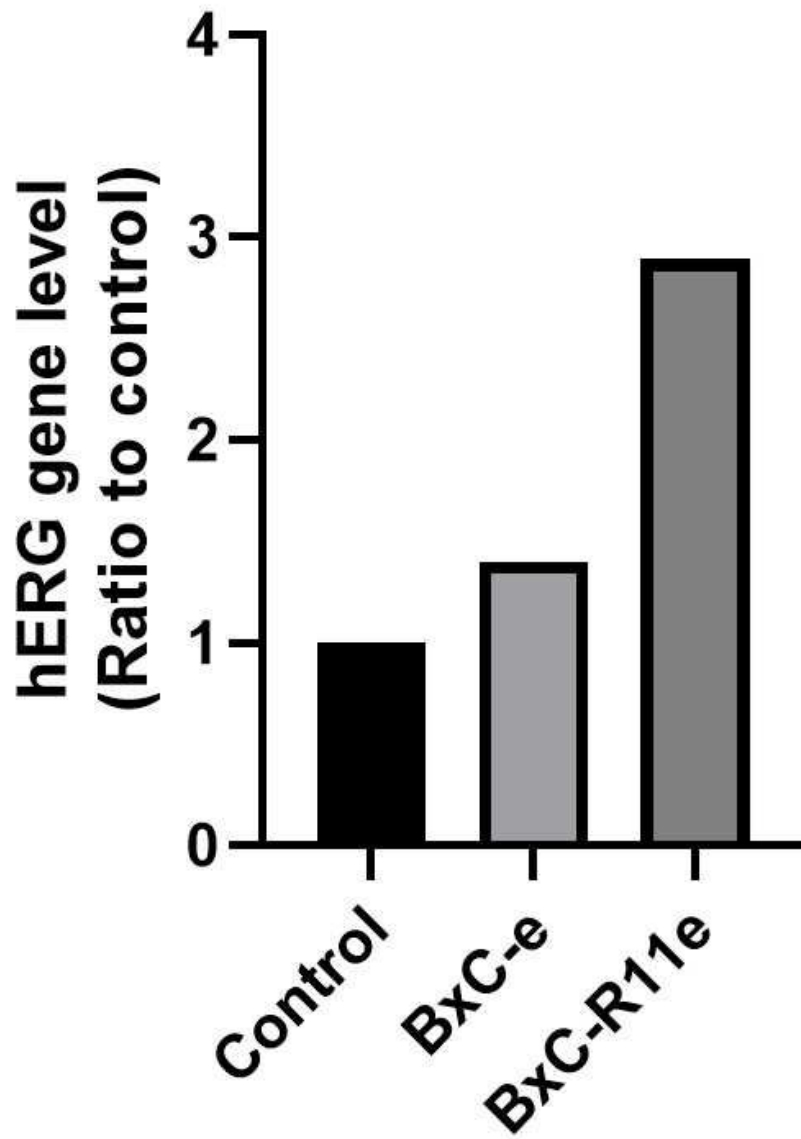
도면12b



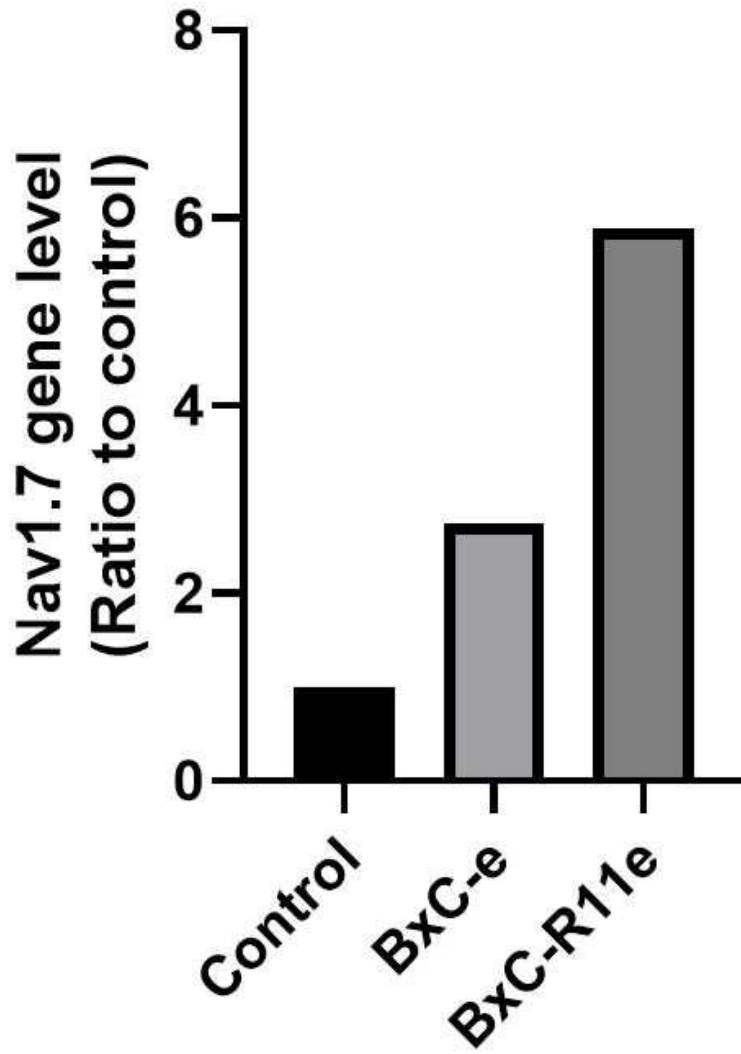
도면13a



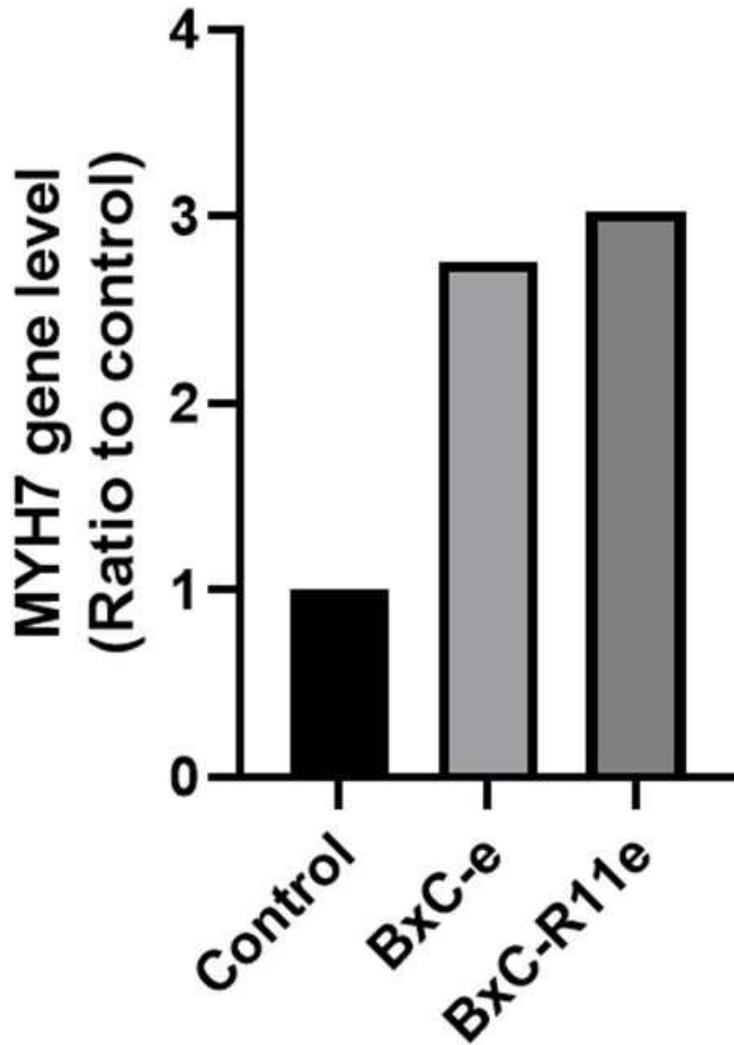
도면13b



도면13c



도면13d



서열목록

- <110> Brexogen Inc.
- <120> Stem cell-derived exosome-containing composition and method for manufacturing the same
- <130> PN200081P
- <150> KR 10-2020-0094588
- <151> 2020-07-29
- <160> 24
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 24
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

<220><223> TNF-a_primer1
 <400> 1
 gagctgaaca ataggctggt ccca 24
 <210> 2
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220><223> TNF-a_primer2
 <400> 2
 agaggctcag caatgagtga cagt 24
 <210> 3
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IL-1b_primer1
 <400> 3
 acagctggag agttagatc c 21
 <210> 4
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IL-1b_primer2
 <400> 4
 cttgagaggt gctgatgtac c 21
 <
 <210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IL-6_primer1
 <400> 5
 acagccactc acctcttcag 20
 <210> 6
 <211> 21

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IL-6_primer2
 <400> 6
 ccatcttttt cagccatctt t 21
 <210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CD206_primer1
 <400> 7
 cagcatccga cccttccttg 20

 <210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CD206_primer2
 <400> 8
 gcttgca gta tgtctccgct 20
 <210> 9
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ARG-1_primer1
 <400> 9
 cggagaccac agtttgca 19
 <210> 10
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ARG-1_primer2
 <400> 10
 cctggcacat cggaatctt 20

<210> 11
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IL-10_primer1
 <400> 11
 tgaaaacaag agcaaggccg 20
 <210> 12
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IL-10_primer2
 <400> 12
 gccaccctga tgtctcagtt 20
 <210> 13
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> a-SMA _primer1
 <400> 13

 cccagacatc agggagtaat gg 22
 <210> 14
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> a-SMA _primer2
 <400> 14
 tctatcggat acttcagcgt ca 22
 <210> 15
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CTGF_primer1
 <400> 15

cttctgcat ttcgctcc 19

<210> 16

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CTGF_primer2

<400> 16

tacaccgacc caccgaaga 19

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> cTNT_primer1

<400> 17

agtgggaaga ggcagactga 20

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> cTNT_primer2

<400> 18

cgaacttctc tgctccaag 20

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hERG_primer1

<400> 19

caacctgggc gaccagatag 20

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hERG_primer2
 <400> 20
 ggtgttgga gagacgttc 20
 <210> 21
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Nav1.7_primer1
 <400> 21
 ggtttcagca cagattcagg tc 22

 <210> 22
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Nav1.7_primer2
 <400> 22
 ccagctgaaa gtgtcaaagc tc 22
 <210> 23
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> MYH7_primer1
 <400> 23
 ctttgctggtt attgcagcca tt 22
 <210> 24
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> MYH7_primer2
 <400> 24
 agatgccaac tttcctgttg c 21