



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년02월17일

(11) 등록번호 10-2500871

(24) 등록일자 2023년02월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*A61K 35/28* (2015.01) *A61K 35/44* (2015.01)  
*A61P 27/16* (2006.01) *C12N 5/0775* (2010.01)

(52) CPC특허분류  
*A61K 35/28* (2013.01)  
*A61K 35/44* (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-0108563(분할)

(22) 출원일자 2022년08월29일

심사청구일자 2022년08월29일

(65) 공개번호 10-2022-0124137

(43) 공개일자 2022년09월13일

(62) 원출원 특허 10-2020-0092762

원출원일자 2020년07월27일

심사청구일자 2020년07월27일

(56) 선행기술조사문헌

Niliksha Gunewardene et al. Innervation of cochlear hair cells by human induced pluripotent stem cell-derived neurons in vitro. Stem cells international, pp.1-10 (2016.02.07.)\*

Jae-Hong Lee et al. Neural differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells: applicability for inner ear therapy. Korean J Audiology, v.16(2), pp.47-53 (2012.08.20.)\*

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

연세대학교 원주산학협력단

강원도 원주시 흥업면 연세대길 1

(72) 발명자

서영준

서울특별시 강남구 선릉로 8, 213동 1203호 (개포동, 래미안블레스타지)

박동준

강원도 원주시 나비허리길 1, 102동 702호

박정은

강원도 원주시 혁신로 91, 506동 603호

(74) 대리인

김보정

전체 청구항 수 : 총 8 항

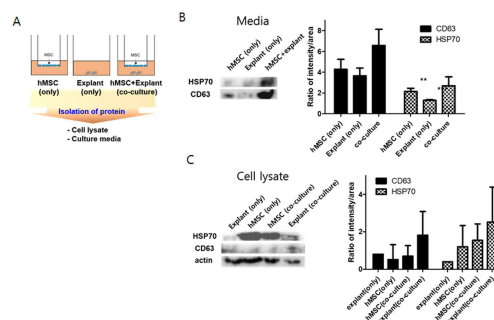
심사관 : 박희연

(54) 발명의 명칭 중간엽줄기세포 유래 엑소솜을 유효성분으로 포함하는 난청 예방용 조성물

## (57) 요약

본 발명은 중간엽줄기세포 유래 엑소솜을 유효성분으로 함유하는 난청 예방용 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 중간엽줄기세포 배양액에 포함된 엑소솜, 및 중간엽줄기세포 및 와우 외식편의 공동배양액에 포함된 엑소솜 내에 HSP70 단백질이 높게 내재되어 있어 이독성 약물에 의해 유발되는 와우의 내유모세포 및 외유모세포 손상을 예방하는 효과가 나타나므로, 본 발명의 중간엽줄기세포의 배양액 및 이로부터 분리된 엑소솜, 본 발명에 따라 획득한 중간엽줄기세포 및 와우 외식편의 공동배양액 및 이로부터 분리된 엑소솜을 난청 예방용 조성물의 유효성분으로 유용하게 이용할 수 있다.

## 대표도 - 도6



(52) CPC특허분류

**A61P 27/16** (2018.01)

**C12N 5/0663** (2013.01)

**C12N 2502/1358** (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711106271
과제번호	2020R1A2C1009789
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중견연구자지원사업
연구과제명	나노입자를 이용한 청각 지지세포의 생체 내 직접교차 분화 기전 연구 및 효율성 증
대 기술 개발	
기 여 율	1/2
과제수행기관명	연세대학교 원주산학협력단
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업	
과제고유번호	1465035588
과제번호	HH21C0009000022
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	범부처 재생의료기술개발사업
연구과제명	급성 난청 재생치료를 위한 줄기세포 유래 세포외소포 치료제 “SPISOME” 의 비임
상 연구	
기 여 율	1/2
과제수행기관명	연세대학교원주산학협력단
연구기간	2022.02.01 ~ 2022.12.31

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

중간엽줄기세포 및 인간을 제외한 개체에서 분리된 와우 외식편(Cochlear explant)을 공동배양 배지 내에서 공간적으로 분리하여 공동배양한 후 회수한 중간엽줄기세포 및 와우 외식편의 공동배양액 또는 이로부터 분리된 엑소솜을 유효성분으로 포함하는, 난청 예방용 약학 조성물.

#### 청구항 2

삭제

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 중간엽줄기세포 및 와우 외식편의 공동배양액은 중간엽줄기세포가 트랜스웰 상부 챔버에 위치하고, 와우 외식편이 트랜스웰 하부 챔버에 위치하여, 중간엽줄기세포와 와우 외식편을 공동배양 배지에서 공간적으로 분리하고 공동배양하여 획득한 것을 특징으로 하는, 난청 예방용 약학 조성물.

#### 청구항 4

제1항에 있어서, 상기 공동배양은 12시간 이상 수행되는 것을 특징으로 하는, 난청 예방용 약학 조성물.

#### 청구항 5

제1항에 있어서, 상기 중간엽줄기세포와 와우 외식편의 공동배양액 및 이로부터 분리된 엑소솜은 HSP70 단백질을 포함하는 것을 특징으로 하는, 난청 예방용 약학 조성물.

#### 청구항 6

1) 중간엽줄기세포와 인간을 제외한 개체에서 분리된 와우 외식편을 공동배양 배지 내에서 공간적으로 분리하여 공동배양하는 단계; 및

2) 공동배양한 중간엽줄기세포 및 와우 외식편의 세포 배양 상층액을 회수하는 단계를 포함하는, 난청 예방을 위한 중간엽줄기세포 및 와우 외식편의 공동배양액의 제조 방법.

#### 청구항 7

제6항에 있어서, 상기 단계 1)에서 상기 중간엽줄기세포는 트랜스웰 상부 챔버에 위치하고, 와우 외식편은 트랜스웰 하부 챔버에 위치하여, 중간엽줄기세포와 와우 외식편이 공동배양 배지 내에서 공간적으로 분리되어 공동배양되는 것을 특징으로 하는, 제조방법.

#### 청구항 8

제6항에 있어서, 상기 단계 1)에서 공동배양은 12시간 이상 수행되는 것을 특징으로 하는, 제조방법.

## 청구항 9

- 1) 중간엽줄기세포와 인간을 제외한 개체에서 분리된 와우 외식편을 공동배양 배지 내에서 공간적으로 분리하여 공동배양하는 단계; 및
- 2) 공동배양한 중간엽줄기세포 및 와우 외식편의 세포 배양 상층액을 회수하는 단계; 및
- 3) 회수한 세포 배양 상층액으로부터 엑소좀을 분리 및 정제하는 단계를 포함하는, 난청 예방을 위한 중간엽줄기세포 및 와우 외식편의 공동배양액으로부터 분리된 엑소좀 제조 방법.

## 발명의 설명

### 기술 분야

- [0001] 본 발명은 중간엽줄기세포 유래 엑소좀을 유효성분으로 함유하는 난청 예방용 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 중간엽줄기세포 배양액 또는 이로부터 분리된 엑소좀, 또는 중간엽줄기세포 및 와우 외식편(Cochlear explant)의 공동배양액 또는 이로부터 분리된 엑소좀을 유효성분으로 포함하는, 난청 예방용 약학 조성물에 관한 것이다.

### 배경 기술

- [0003] 청각소실 즉, 난청(Hearing loss)은 소리를 전달하는 기관인 외이와 중이가 염증 같은 질병에 감염되었을 경우 생기는 전음성 난청(Conductive hearing loss)과 소리를 감지하는 기관인 달팽이관, 전기적 에너지로 소리를 전달하는 청신경 및 소리의 변별, 이해 등 종합적인 역할을 하는 청각을 담당하는 뇌에 문제가 생겨 발생하는 감각신경성 난청(Sensorineural hearing loss)로 나뉘며, 전 인구의 약 15-20%가 가지고 있는 흔한 질환이다.
- [0004] 감각신경성 난청은 미로염이나 뇌수막염 등의 염증성 질환, 소음, 이독성 약물, 측두골 골절 등의 외상, 노인성 난청, 메니에르병, 갑상선 기능저하 등의 대사이상, 뇌의 허혈성 질환, 백혈병 등의 혈액 질환, 다발성 경화증 등의 신경학적 이상, 면역 이상, 청신경 종양 등의 종양성 질환 또는 골질환 등에 의해 발생할 수 있다.
- [0005] 아미노글리코사이드(Aminoglycoside)계 항생제는 대표적인 이독성(Ototoxicity) 약물 중 하나이다. 스트렙토마이신(Streptomycin), 카나마이신(Kanamycin), 겐타마이신(Gentamicin), 네오마이신(Neomycin), 아미카신(Amikacin), 토브라마이신(Tobramycin), 네틸마이신(Netilmicin), 디베카신(Dibekacin) 및 시소마이신(Sisomicin) 등이 포함되며 이는 일반 항생제에 잘 반응하지 않는 그람음성균 감염, 결핵, 심부감염 등에 주로 사용된다. 아미노글리코사이드계 항생제는 내이에서 청력과 평형 기능장애를 유발하는 이독성과 신장독성 등의 부작용을 가지고 있는데, 이는 과다복용뿐만 아니라 치료용량으로 장기간 복용시 발생할 수 있으며 일부에서는 단기간 적정용량에도 이독성이 발생하는 경우도 있다. 아미노글리코사이드계 항생제에 의한 이독성은 사용자의 약 15%에서 전정기능 장애, 10-30%에서 청력감소를 보이며 주로 4000Hz 이상의 고주파수에서 급격한 고도난청의 형태로 양측 귀 모두에 발생한다. 특히, 미국에서는 약 400 만 명의 환자가 아미노글리코사이드계 항생제로 치료를 받고 있으며, 이들 중 상기 항생제를 정맥 내로 투여받은 환자의 최대 10%가 아미노글리코사이드에 의해 난청(Hearing loss)으로 고통받고 있다.
- [0006] 시스플라틴(Cisplatin) 항암제 또한 대표적인 이독성 약물 중 하나로, 청력과 평형기능 장애와 같은 심각한 부작용을 야기시키며, 비가역적 양측성 감각신경성난청을 유발한다. 이러한 시스플라틴 항암제 이독성은 시스플라틴 복용자의 약 30%에서 청력장애를 일으키며, 소아의 경우 약 50%로 청력장애 발생빈도가 더 높은 것으로 보고되고 있다. 그러나, 시스플라틴의 우수한 항암 치료 효과 때문에 현재까지도 널리 사용되고 있다.
- [0007] 이러한 난청은 일시적일 수 있지만 대부분의 환자에서는 돌이킬 수 없는 상태로 발병한다. 난청의 발병 초기에는 예측이 어려우며, 항생제의 1회 투여 후에도 현저한 난청이 발생할 수 있다. 또한 난청은 항생제 또는 항암 치료 완료 후 몇 주 또는 몇 달이 지나서 발생하기도 하기 때문에, 약물을 투여한 환자에서 난청이 발병한 후에 약물에 의한 이독성을 판정하는 경우가 많다. 따라서 환자의 난청 발병 이전에 잠재적인 치료의 대안을 마련하는 것이 필요하다.
- [0009] 한편, 중간엽 줄기세포(Mesenchymal stem cell)는 스트로마 기원의 세포로 자기 재생(Self-renewal)의 특징을 가지고 있으며 골, 연골, 지방조직, 근육, 건, 인대, 신경조직 등으로 분화할 수 있어 세포 치료요법에 적합한 세포로 주목받고 있다. 예컨대 골형성 부전증, 심근 경색, 폐손상 및 뇌 경색 등 손상된 조직의 재생에 유용하다고 보고된 바 있으며, 현재 여러 연구들에서 중간엽 줄기세포의 분화능 및 재생능을 이용하여 치료제로 사용

하려는 시도가 이루어지고 있다.

[0011] 이에 본 발명자들은 난청 발병 이전에 난청이 유발되는 것을 예방할 수 있는 물질을 개발하기 위해 노력한 결과, 중간엽줄기세포에서 분리한 엑소좀 내에 HSP70 단백질이 포함되어 있어 이독성 약물에 의해 유발되는 와우의 내유모세포 및 외유모세포의 손상을 예방하는 효과가 나타나고, 본 발명에 따라 중간엽줄기세포와 와우 외식편(Cochlear explant)을 공동배양하여 획득한 배양액 내에서 HSP70 단백질 및 상기 단백질을 내재한 엑소좀이 증가하는 것을 확인하여, 본 발명을 완성하게 되었다.

## 선행기술문헌

### 특허문헌

[0013] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2013-0012552호

### 비특허문헌

[0014] (비특허문헌 0001) Doreen Rosenstrauch, et al. Stem cell therapy for ischemic heart failure. Tex Heart Inst J. 2005; 32(3): 339-347.

(비특허문헌 0002) Rojas M, et al. Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in Repair of the Injured Lung, Am J Respir Cell Mol Biol. 2005; 33:145-52.

(비특허문헌 0003) Y Takada et al. Ototoxicity-induced loss of hearing and inner hair cells is attenuated by HSP70 gene transfer. Methods & Clinical Development. 2015; 2:15019.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0015] 본 발명의 목적은 중간엽줄기세포(Mesenchymal stem cell, MSC) 유래 엑소좀을 유효성분으로 포함하는, 난청 예방용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0017] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 중간엽줄기세포(mesenchymal stem cell, MSC) 배양액 또는 이로부터 분리된 엑소좀을 유효성분으로 포함하는, 난청 예방용 약학 조성물을 제공한다.

[0018] 또한, 본 발명은 중간엽줄기세포 및 와우 외식편(Cochlear explant)의 공동배양액 또는 이로부터 분리된 엑소좀을 유효성분으로 포함하는, 난청 예방용 약학 조성물을 제공한다.

[0019] 또한, 본 발명은

[0020] 1) 중간엽줄기세포와 와우 외식편을 공동배양 배지에서 공동배양하는 단계; 및

[0021] 2) 공동배양한 중간엽줄기세포 및 와우 외식편의 세포 배양 상층액을 회수하는 단계를 포함하는, 난청 예방을 위한 중간엽줄기세포 및 와우 외식편의 공동배양액의 제조 방법을 제공한다.

[0022] 아울러, 본 발명은

[0023] 1) 중간엽줄기세포와 와우 외식편을 공동배양 배지에서 공동배양하는 단계; 및

[0024] 2) 공동배양한 중간엽줄기세포 및 와우 외식편의 세포 배양 상층액을 회수하는 단계; 및

[0025] 3) 회수한 세포 배양 상층액으로부터 엑소좀을 분리 및 정제하는 단계를 포함하는, 난청 예방을 위한 중간엽줄기세포 및 와우 외식편의 공동배양액으로부터 분리된 엑소좀 제조 방법을 제공한다.

### 발명의 효과

[0027] 본 발명의 중간엽줄기세포 배양액에 포함된 엑소좀 및 중간엽줄기세포, 및 와우 외식편의 공동배양액에 포함된

엑소솜 내에 HSP70 단백질이 높게 내재되어 있어 이독성 약물에 의해 유발되는 와우의 내유모세포 및 외유모세포 손상을 예방하는 효과가 나타나므로, 중간엽줄기세포의 배양액 및 이로부터 분리된 엑소솜, 본 발명에 따라 획득한 중간엽줄기세포 및 와우 외식편의 공동배양액 및 이로부터 분리된 엑소솜을 난청 예방용 조성물의 유효 성분으로 유용하게 이용할 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0029]

도 1은 기저회전(Basal turn), 중간회전(Middle turn) 및 첨단회전(Apical turn)의 와우 외식편(Cochlear explant)에 시스플라틴(Cisplatin)을 처리한 후 내유모세포(Inner hair cell, IHC) 및 외유모세포(Outer hair cell, OHC)의 세포생존율을 확인한 도이다:

도 1A는 와우 외식편에 시스플라틴을 처리하는 방법을 모식화한 도이고;

도 1B는 시스플라틴 처리 후 기저회전, 중간회전 및 첨단회전의 와우 외식편에서 IHC 및 OHC의 세포생존을 면역형광분석법으로 확인한 도이며; 및

도 1C는 시스플라틴 처리 후 기저회전, 중간회전 및 첨단회전의 와우 외식편에서 IHC 및 OHC의 세포생존율을 그래프화한 도이다.

도 2는 인간 골수로부터 분리한 중간엽줄기세포(Mesenchymal stem cell, MSC) 및 이로부터 유래된 세포외소포(Extracellular vesicular, EV)를 확인한 도이다:

도 2A는 인간 골수로부터 분리한 MSC를 CD 마커를 이용하여 확인한 도이고;

도 2B는 인간 골수로부터 분리한 MSC 및 이로부터 유래된 EV 내 엑소솜을 확인한 도이며; 및

도 2C는 인간 골수로부터 분리한 MSC로부터 유래된 EV 내 엑소솜 크기 및 농도를 확인한 도이다.

도 3은 기저회전, 중간회전 및 첨단회전의 와우 외식편과 인간 골수로부터 분리한 MSC를 공동배양하고, 시스플라틴 처리 후 IHC 및 OHC의 세포생존율을 확인한 도이다:

도 3A는 와우 외식편과 인간 골수로부터 분리한 MSC를 공동배양하는 방법을 모식화한 도이고;

도 3B는 와우 외식편과 인간 골수로부터 분리한 MSC를 공동배양 시점 및 시스플라틴 처리 시점을 달리한 그룹을 모식화한 도이며;

도 3C는 와우 외식편과 인간 골수로부터 분리한 MSC를 공동배양하고, 시스플라틴 처리 후 기저회전, 중간회전 및 첨단회전의 와우 외식편에서 IHC 및 OHC의 세포생존을 면역형광분석법으로 확인한 도이고; 및

도 3D는 와우 외식편과 인간 골수로부터 분리한 MSC를 공동배양하고, 시스플라틴 처리 후 기저회전, 중간회전 및 첨단회전의 와우 외식편에서 IHC 및 OHC의 세포생존율을 그래프화한 도이다.

도 4는 와우 외식편과 인간 골수로부터 분리한 MSC를 2, 12, 18, 24 및 48시간 동안 공동배양한 후, MSC를 제거하고 시스플라틴을 처리한 기저회전 및 중간회전의 와우 외식편에서 IHC 및 OHC의 세포생존율을 확인한 도이다:

도 4A는 와우 외식편과 인간 골수로부터 분리한 MSC를 2, 12, 18, 24 및 48시간 동안 공동배양한 후, MSC를 제거하고 시스플라틴을 처리한 기저회전 및 중간회전의 와우 외식편에서 IHC 및 OHC의 세포생존을 면역형광분석법으로 확인한 도이고; 및

도 4B는 와우 외식편과 인간 골수로부터 분리한 MSC를 2, 12, 18, 24 및 48시간 동안 공동배양한 후, MSC를 제거하고 시스플라틴을 처리한 기저회전 및 중간회전의 와우 외식편에서 IHC 및 OHC의 세포생존율을 그래프화한 도이다.

도 5는 기저회전, 중간회전 및 첨단회전의 와우 외식편에 인간 골수로부터 분리한 MSC 유래 엑소솜을 처리하고, 시스플라틴 처리 후 IHC 및 OHC의 세포생존율을 확인한 도이다:

도 5A는 와우 외식편에 인간 골수로부터 분리한 MSC 유래 엑소솜을 처리하는 방법을 모식화한 도이고;

도 5B는 기저회전, 중간회전 및 첨단회전의 와우 외식편에 인간 골수로부터 분리한 MSC 유래 엑소솜을 처리하고, 시스플라틴 처리 후 IHC 및 OHC의 세포생존 면역형광분석법으로 확인한 도이며; 및

도 5C는 기저회전, 중간회전 및 첨단회전의 와우 외식편에 인간 골수로부터 분리한 MSC 유래 엑소솜을



처리하고, 시스플라틴 처리 후 IHC 및 OHC의 세포생존율을 그래프화한 도이다.

도 6은 와우 외식편 단독 배양, 인간 골수로부터 분리한 MSC 단독 배양 또는 와우 외식편과 인간 골수로부터 분리한 MSC를 공동배양한 후, 와우 외식편, MSC, 이들의 배양액에서 엑소좀 마커 및 HSP70 단백질 발현을 확인한 도이다:

도 6A는 와우 외식편 단독 배양, 인간 골수로부터 분리한 MSC 단독 배양 또는 와우 외식편과 인간 골수로부터 분리한 MSC 공동배양 후, 와우 외식편, MSC, 이들의 배양액을 획득하는 방법을 모식화한 도이고;

도 6B는 와우 외식편 단독 배양, 인간 골수로부터 분리한 MSC 단독 배양 또는 와우 외식편과 인간 골수로부터 분리한 MSC 공동배양 후, 이들의 배양액에서 엑소좀 마커 및 HSP70 단백질 발현을 확인한 도이며; 및

도 6C는 와우 외식편 단독 배양, 인간 골수로부터 분리한 MSC 단독 배양 또는 와우 외식편과 인간 골수로부터 분리한 MSC 공동배양 후, 와우 외식편 및 MSC에서 엑소좀 마커 및 HSP70 단백질 발현을 확인한 도이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] 이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.

[0032] 본 발명은 중간엽줄기세포(mesenchymal stem cell, MSC) 배양액 또는 이로부터 분리된 엑소좀을 유효성분으로 포함하는, 난청 예방용 약학 조성물을 제공한다.

[0033] 본 발명에서, 상기 "중간엽줄기세포 배양액"은 중간엽줄기세포를 배양 배지에서 배양한 세포 배양 상층액을 지칭한다. 중간엽줄기세포 배양액은 중간엽줄기세포 배양 과정에서 세포로부터 분리되는 여러 가지 생리활성 물질을 함유하고 있다. 예컨대, 중간엽줄기세포 배양 과정에서 세포로부터 HPS70을 포함하는 엑소좀을 분리하여 와우의 내유모세포(Inner hair cell) 및 외유모세포(Outer hair cell)의 손상으로부터 보호할 수 있다.

[0034] 또한, 상기 중간엽줄기세포는 인간, 원숭이, 돼지, 말, 소, 양, 개, 고양이, 생쥐, 토끼 등 모든 포유동물 유래의 중간엽줄기세포를 포함하나, 구체적으로 인간 유래의 중간엽줄기세포일 수 있다.

[0035] 또한, 상기 중간엽줄기세포는 골수, 지방, 제대, 제대혈 또는 편도 유래 중간엽줄기세포일 수 있고, 구체적으로 골수 유래 중간엽줄기세포일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0036] 또한, 상기 중간엽줄기세포는 통상의 배지에서 통상의 배양방법에 따라 배양할 수 있다. 상기 배지는 특정 세포를 배양하기 위하여 배양대상 즉 배양체가 되는 세포가 필요로 하는 영양물질을 포함하는 것으로 특수한 목적을 위한 물질이 추가로 첨가되어 혼합될 수 있다. 상기 배지는 배양기 또는 배양액이라도 하며, 천연 배지, 합성 배지 또는 선택 배지를 모두 포함하는 개념이다. 예를 들어 상기 중간엽줄기세포의 배지는 중간엽줄기세포를 배양하기 위한 배지라면 제한되지 않고 사용될 수 있으며, 예컨대 상업적으로 사용될 수 있는 배지로서 저-글루코스 DMEM 배지 등이 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 중간엽줄기세포는  $1 \times 10^3$  내지  $1 \times 10^{10}$ 의 세포수로, 구체적으로  $1 \times 10^4$  내지  $1 \times 10^7$ 의 세포수로 접종하고, 35 내지 40℃, 바람직하게는 36 내지 38℃의 온도 및 4 내지 6% CO<sub>2</sub> 조건에서 수행하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0037] 본 발명에서, 상기 "엑소좀"은 세포로부터 분리되는 막 구조의 소포체(vesicle)로, 다른 세포 및 조직에 결합하여 막 구성요소, 단백질, 핵산 등을 전달하는 등 다양한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 엑소좀과 유사한 조성을 갖는 소포체(예를 들어, 엑소좀-유사 소포체) 또는 미세소포체(microvesicle)를 모두 포함하는 것을 의미한다. 구체적으로 상기 엑소좀은 중간엽줄기세포로부터 분리되는 막 구조의 소포체로서, CD63 양성을 나타내고, HPS70을 포함하여 와우의 내유모세포 및 외유모세포의 손상으로부터 보호할 수 있다.

[0038] 또한, 상기 엑소좀은 40 내지 180 nm의 지름을 가질 수 있고, 구체적으로 50 내지 150 nm의 지름을 가질 수 있으며, 보다 구체적으로 60 내지 100 nm의 지름을 가질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 분리 대상이 되는 세포 종류, 분리방법 및 측정방법에 따라 엑소좀의 지름이 가변될 수 있다.

[0039] 또한, 상기 엑소좀은 당업계에서 알려진 엑소좀 분리 방법을 이용하여 제조할 수 있고, 예를 들어 하기 단계로 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다:

[0040] 1) 중간엽줄기세포를 배양 배지에 배양하는 단계;

[0041] 2) 세포 배양 상층액을 회수하는 단계;

- [0042] 3) 회수한 세포 배양 상층액을 원심분리하는 단계; 및
- [0043] 4) 엑소좀을 분리 및 정제하는 단계.
- [0044] 본 발명에서, 상기 난청은 감각신경성 난청(sensorineural hearing loss)일 수 있고, 상기 감각신경성 난청은 구체적으로 이독성 난청, 바이러스 감염에 의한 코르티 기관(Organ of Corti) 손상-유도성 난청, 만성 중이염-유도성 난청, 노인성 난청, 소음성 난청, 돌발성 난청, 자가면역성 난청, 혈관 허혈성 난청, 두부손상성 난청 또는 유전성 난청일 수 있으며, 보다 구체적으로 이독성 난청일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0045] 또한, 상기 이독성 난청은 이독성 약물에 기인한 것으로, 상기 이독성 약물은 구체적으로 시스플라틴(Cisplatin), 카르보플라틴(Carboplatin), 아미카신(Amikacin), 아르베카신(Arbekacin), 카나마이신(Kanamycin), 겐타마이신(Gentamicin), 네오마이신(Neomycin), 네틸마이신(Netilmicin), 디베카신(Dibekacin), 시소마이신(Sisomycin), 스트렙토마이신(Streptomycin), 토브라마이신(Tobramycin), 리보도마이신(Livodomyacin), 파로모마이신(Paromomycin), 아세트아조라미드(Acetazolamide), 푸로세미드(Furosemide), 부메타니드(Bumetanide) 또는 에타크린산(Ethacrynic acid)일 수 있고, 보다 구체적으로 시스플라틴일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0046] 또한, 상기 감각신경성 난청은 와우의 내유모세포, 내유모세포 또는 주변조직의 손상에 기인한 것일 수 있다.
- [0048] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 와우 외식편(Cochlear explant) 및 인간 골수 유래 중간엽줄기세포를 획득하였다.
- [0049] 또한, 본 발명자들은 상기 중간엽줄기세포를 배양하고, 배양액 내 세포외소포(Extracellular vesicular, EV)를 확인한 결과, EV의 대부분이 100 nm 미만의 엑소좀임을 확인하였다.
- [0050] 또한, 상기 배양액을 원심분리하여 엑소좀을 포함하는 펠렛(Pellet)을 획득하고, 이를 와우 외식편에 처리한 후 시스플라틴을 처리한 결과, 와우 외식편의 유모세포의 생존율이 우수하게 나타남을 확인하였고, 상기 배양액에서 와우 외식편과 비교하여 엑소좀 마커인 CD63 및 HSP70 단백질 발현이 높게 나타남을 확인하였다.
- [0051] 따라서, 본 발명자들은 중간엽줄기세포 배양액 내에 HSP70을 포함하는 엑소좀이 포함되어 있고, 이에 따라 이독성 약물에 의해 유발되는 청각 유모세포 손상을 예방하는 효과를 확인하였으므로, 중간엽줄기세포 배양액 및 이로부터 분리된 엑소좀을 난청 예방용 조성물의 유효성분으로 유용하게 이용할 수 있다.
- [0053] 또한, 본 발명은 중간엽줄기세포 및 와우 외식편(Cochlear explant)의 공동배양액 또는 이로부터 분리된 엑소좀을 유효성분으로 포함하는, 난청 예방용 약학 조성물을 제공한다.
- [0054] 본 발명에서, 상기 "중간엽줄기세포 및 와우 외식편(Cochlear explant)의 공동배양액"은 중간엽줄기세포 및 와우 외식편을 공동배양 배지에서 공동배양한 배양 상층액을 지칭한다. 구체적으로 상기 중간엽줄기세포 및 와우 외식편의 공동배양액은 중간엽줄기세포와 와우 외식편을 공동배양 배지에서 공간적으로 분리하고 공동배양한 배양 상층액일 수 있고, 보다 구체적으로 중간엽줄기세포가 트랜스웰 상부 챔버에 위치하고, 와우 외식편이 트랜스웰 하부 챔버에 위치하여, 중간엽줄기세포와 와우 외식편을 공동배양 배지에서, 예컨대 동일한 배지를 공유하거나 또는 각각의 배양 배지 내에서 공간적으로 분리하고 공동배양한 배양 상층액일 수 있다. 이와 같이 배양하는 경우, 중간엽줄기세포와 와우 외식편의 상호작용에 의하여, 중간엽줄기세포에서는 와우 외식편에 영향을 줄 수 있는 다양한 물질을 공동배양 배지로 분비할 수 있으며, 이를 통해 중간엽줄기세포에서는 청각 유모세포의 손상을 억제할 수 있는 인자, 예컨대, HSP70 단백질 및 이를 포함하는 엑소좀이 공동배양 배지에서 증가할 수 있다.
- [0055] 본 발명에서, 상기 중간엽줄기세포 및 와우 외식편은 당업계에 알려진 방법으로 분리될 수 있고, 통상의 배지에서 생육 가능하다. 예를 들어, 상기 중간엽줄기세포의 배지는 중간엽줄기세포를 배양하기 위한 배지라면 제한되지 않고 사용될 수 있으며, 예컨대 상업적으로 사용될 수 있는 배지로서 저-글루코오스 DMEM 배지 등이 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 와우 외식편의 배지는 외식편을 배양하기 위한 배지라면 제한되지 않고 사용될 수 있으며, 예컨대 상업적으로 사용될 수 있는 배지로서 DMEM/F12 배지일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 이에 상기 공동 배양 배지는 중간엽줄기세포를 배양하기 위한 배지 및/또는 와우 외식편을 배양하기 위한 배지일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0056] 또한, 상기 중간엽줄기세포 및 와우 외식편은 통상의 배양방법에 따라 공동배양할 수 있다. 예를 들어, 상기 중간엽줄기세포는  $1 \times 10^3$  내지  $1 \times 10^{10}$ 의 세포수로, 구체적으로  $1 \times 10^4$  내지  $1 \times 10^7$ 의 세포수로 접종하고, 35 내지



40℃, 바람직하게는 36 내지 38℃의 온도 및 4 내지 6% CO<sub>2</sub> 조건에서 수행하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0057] 또한, 상기 공동배양은 12시간 이상, 구체적으로 18시간 이상, 보다 구체적으로 18시간 내지 48시간 동안 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0058] 또한, 상기 중간엽줄기세포는 인간, 원숭이, 돼지, 말, 소, 양, 개, 고양이, 생쥐, 토끼 등 모든 포유동물 유래의 중간엽줄기세포를 포함하나, 구체적으로 인간 유래의 중간엽줄기세포일 수 있다.
- [0059] 또한, 상기 중간엽줄기세포는 골수, 지방, 제대, 제대혈 또는 편도 유래 중간엽줄기세포일 수 있고, 구체적으로 골수 유래 중간엽줄기세포일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0060] 본 발명에서, 상기 엑소솜은 구체적으로 중간엽줄기세포 및/또는 와우 외식편으로부터 분리되는 막 구조의 소포체로서, CD63 양성을 나타내고, HSP70 단백질을 포함하여 와우의 내유모세포 및 외유모세포의 손상으로부터 보호할 수 있다. 특히, 상기 엑소솜은 중간엽줄기세포 및 와우 외식편의 상호작용으로 각각에서 분리하는 엑소솜보다 HSP70의 발현이 증가되어 와우의 내유모세포 및 외유모세포의 손상으로부터 보호 효과가 보다 향상된다.
- [0061] 또한, 상기 엑소솜은 40 내지 180 nm의 지름을 가질 수 있고, 구체적으로 50 내지 150 nm의 지름을 가질 수 있으며, 보다 구체적으로 60 내지 100 nm의 지름을 가질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 분리 대상이 되는 세포 종류, 분리방법 및 측정방법에 따라 엑소솜의 지름이 가변될 수 있다.
- [0062] 본 발명에서, 상기 난청은 감각신경성 난청(sensorineural hearing loss)일 수 있고, 상기 감각신경성 난청은 구체적으로 이독성 난청, 바이러스 감염에 의한 코르티 기관 (Organ of Corti) 손상-유도성 난청, 만성 중이염-유도성 난청, 노인성 난청, 소음성 난청, 돌발성 난청, 자가면역성 난청, 혈관 허혈성 난청, 두부손상성 난청 또는 유전성 난청일 수 있으며, 보다 구체적으로 이독성 난청일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0063] 또한, 상기 이독성 난청은 이독성 약물에 기인한 것으로, 상기 이독성 약물은 구체적으로 시스플라틴(Cisplatin), 카르보플라틴(Carboplatin), 아미카신(Amikacin), 아르베카신(Arbekacin), 카나마이신(Kanamycin), 겐타마이신(Gentamicin), 네오마이신(Neomycin), 네틸마이신(Netilmicin), 디베카신(Dibekacin), 시소마이신(Sisomycin), 스트렙토마이신(Streptomycin), 토브라마이신(Tobramycin), 리보도마이신(Livodomycin), 파로모마이신(Paromomycin), 아세타졸아미드(Acetazolamide), 푸로세미드(Furosemide), 부메타니드(Bumetanide) 또는 에타크린산(Ethacrynic acid)일 수 있고, 보다 구체적으로 시스플라틴일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0064] 또한, 상기 감각신경성 난청은 와우의 내유모세포, 내유모세포 또는 주변조직의 손상에 기인한 것일 수 있다.
- [0066] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 획득한 와우 외식편 및 인간 골수 유래 중간엽줄기세포를 트랜스웰을 이용하여 공간적으로 분리된 상태에서 공동배양하고, 중간엽줄기세포를 제거한 상태에서 시스플라틴을 처리한 결과, 즉 중간엽줄기세포를 와우 외식편에 전처리한 후 시스플라틴을 처리한 결과, 와우 외식편의 유모세포의 생존율이 우수하게 나타나는바, 와우 외식편과 공동배양된 중간엽줄기세포가 이독성 약물에 의한 청각 유모세포 손상을 예방하는 효과가 있음을 확인하였다.
- [0067] 또한, 본 발명자들은 상기 와우 외식편과 18시간 이상 공동배양된 중간엽줄기세포가 시스플라틴에 의한 와우 외식편의 유모세포 손상을 예방하는 효과가 보다 우수함을 확인하였다.
- [0068] 또한, 본 발명자들은 상기 중간엽줄기세포 및 와우 외식편의 공동배양액에서 와우 외식편 배양액과 비교하여 엑소솜 마커인 CD63 및 HSP70 단백질 발현이 높게 나타남을 확인하였다.
- [0069] 따라서, 본 발명자들은 중간엽줄기세포 및 와우 외식편의 공동배양액 내에 HSP70을 포함하는 엑소솜이 증가하고, 이에 따라 이독성 약물에 의해 유발되는 청각 유모세포 손상을 예방하는 효과가 보다 향상되는 것을 확인하였으므로, 중간엽줄기세포 및 와우 외식편의 공동배양액 및 이로부터 분리된 엑소솜을 난청 예방용 조성물의 유효성분으로 유용하게 이용할 수 있다.
- [0071] 본 발명에 따른 약학 조성물은 중간엽줄기세포 배양액 또는 이로부터 분리된 엑소솜을 유효성분으로 포함할 수 있고, 중간엽줄기세포 및 와우 외식편의 공동배양액 또는 이로부터 분리된 엑소솜을 유효성분으로 포함할 수 있으며, 약학적으로 허용 가능한 담체 및/또는 첨가물을 포함할 수 있다. 다만, 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성별, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있고, 당업자라면 이러한 요인들을 고려하여 투여량을 적절히 조절할 수 있다.

투여 횟수는 1회 또는 임상적으로 용인 가능한 부작용의 범위 내에서 2회 이상이 가능하고, 투여 부위에 대해서도 1개소 또는 2개소 이상에 투여할 수 있다. 인간 이외의 동물에 대해서도, kg당 인간과 동일한 투여량으로 하거나, 또는 예를 들면 목적의 동물과 인간과의 기관(심장 등)의 용적비(예를 들면, 평균값) 등으로 상기의 투여량을 환산한 양을 투여할 수 있다. 가능한 투여 경로에는 경구, 설하, 비경구(예를 들어, 피하, 근육내, 동맥내, 복강내, 경막내, 또는 정맥내), 직장, 국소(경피 포함), 흡입, 및 주사, 또는 이식성 장치 또는 물질의 삽입을 포함할 수 있다. 또한, 치료의 대상동물로서는, 인간 및 그밖의 목적으로 하는 포유동물을 예로 들 수 있고, 구체적으로는 인간, 원숭이, 마우스, 래트, 토끼, 양, 소, 개, 말, 돼지 등이 포함된다.

[0072] 본 발명에 따른 약학 조성물에 포함되는 약학적으로 허용가능한 담체 및/또는 첨가물은 예를 들어, 멸균수, 생리식염수, 완충제(인산, 구연산, 그 밖의 유기산 등), 안정제, 염, 산화방지제(아스코르브산 등), 계면활성제, 현탁제, 등장화제, 또는 보존제 등을 포함할 수 있다. 국소 투여를 위해, 생체고분자(Biopolymer) 등의 유기물, 하이드록시아파타이트 등의 무기물, 구체적으로는 콜라겐 매트릭스, 폴리락트산 중합체 또는 공중합체, 폴리에틸렌글리콜 중합체 또는 공중합체 및 그의 화학적 유도체 등과 조합시키는 것도 포함할 수 있다. 일 구체예에 따른 약학적 조성물이 주사에 적당한 제형으로 조제되는 경우에는, 중간엽줄기세포 및/또는 와우 외식편이 약학적으로 허용가능한 담체 중에 용해되어 있거나 또는 용해되어 있는 용액상태로 동결된 것일 수 있다.

[0073] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 그 투여방법이나 제형에 따라 필요한 경우, 현탁제, 용해보조제, 안정화제, 등장화제, 보존제, 흡착방지제, 계면활성화제, 희석제, 부형제, pH 조정제, 무통화제, 완충제, 환원제, 산화방지제 등을 적절히 포함할 수 있다. 상기에 예시된 것들을 비롯하여 본 발명에 적합한 약학적으로 허용되는 담체 및 제제는 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed., 1995]에 상세히 기재되어 있다. 또한, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질 중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 분말, 과립, 정제 또는 캡슐 형태일 수 있다.

[0075] 또한, 본 발명은

[0076] 1) 중간엽줄기세포와 와우 외식편을 공동배양 배지에서 공동배양하는 단계; 및

[0077] 2) 공동배양한 중간엽줄기세포 및 와우 외식편의 세포 배양 상층액을 회수하는 단계를 포함하는, 난청 예방을 위한 중간엽줄기세포 및 와우 외식편의 공동배양액의 제조 방법을 제공한다.

[0078] 아울러, 본 발명은

[0079] 1) 중간엽줄기세포와 와우 외식편을 공동배양 배지에서 공동배양하는 단계; 및

[0080] 2) 공동배양한 중간엽줄기세포 및 와우 외식편의 세포 배양 상층액을 회수하는 단계; 및

[0081] 3) 회수한 세포 배양 상층액으로부터 엑소좀을 분리 및 정제하는 단계를 포함하는, 난청 예방을 위한 중간엽줄기세포 및 와우 외식편의 공동배양액으로부터 분리된 엑소좀 제조 방법을 제공한다.

[0082] 본 발명의 방법에 있어서, 상기 중간엽줄기세포, 와우 외식편, 공동배양 방법 및 난청은 앞서 난청 예방용 조성물에서 설명한 바와 동일하므로, 구체적인 설명은 상기 내용을 원용하고 이하에서는 제조 방법 특유한 구성에 대해서만 설명하도록 한다.

[0083] 본 발명의 방법에 있어서, 상기 단계 1)에서 상기 중간엽줄기세포와 와우 외식편은 공동배양 배지에서, 예컨대 동일한 배지를 공유하거나, 또는 각각의 배지 내에서 공간적으로 분리되어 공동배양될 수 있고, 보다 구체적으로 상기 중간엽줄기세포는 트랜스웰 상부 챔버에 위치하고, 와우 외식편은 트랜스웰 하부 챔버에 위치하여, 중간엽줄기세포와 와우 외식편이 공동배양 배지 내에서 공간적으로 분리되어 공동배양될 수 있다.

[0084] 또한, 상기 단계 1)에서 공동배양은 12시간 이상, 구체적으로 18시간 이상, 보다 구체적으로 18시간 내지 48시간 동안 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0085] 본 발명자는 중간엽줄기세포 및 와우 외식편을 공동배양하여 획득한 배양액에서 HSP70 단백질 및 이를 포함하는 엑소좀이 증가하여 이독성 약물에 의해 유발되는 와우의 내유모세포 및 외유모세포 손상을 예방하는 효과가 나타남을 확인하였으므로, 본 발명에 따른 공동배양액 및 이로부터 분리된 엑소좀 제조 방법을 난청 예방을 위한 공동배양액 및 이로부터 분리된 엑소좀의 제조 방법으로 유용하게 이용할 수 있다.

[0087] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.

- [0088] 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.
- [0090] <실시예 1> 인간 골수에서 중간엽줄기세포(Mesenchymal stem cell; MSC) 분리
- [0091] 인간 골수는 서면 동의를 얻은 후 원주 세브란스 기독교 병원에서 이식 치료를 받은 환자의 장골능(Iliac crest)으로부터 획득하였다. 흡입물(Aspirate)을 Vacutainers K2 EDTA(BD Biosciences)로 수집하였다. 단핵 세포를 PBS로 1 : 5로 희석하고, Ficoll hypaque 용액(Gibco BRL, USA)을 사용하여 실온에서 20분 동안  $435 \times g$ 에서 밀도 구배 원심 분리를 수행하여 분리하였다. 세포 분획을 수집하고  $cm^2$  당  $5 \times 10^3$  세포의 분주 밀도에서 10% FBS(Gibco BRL, USA) 및 항생제-항진균제(Thermofisher Scientific, USA)를 포함하는 DMEM-저글루코오스 배지(Gibco BRL, USA)를 사용하여 배양하였다. 플레이트를 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 조건에서 48시간 동안 유지하였다. 그 다음, 플레이트를 PBS로 세척하여 비부착된 세포를 제거하고 배지를 교체하였다. 배지는 48 내지 72 시간마다 교체하였다. 70% Confluency에 도달하였을 때,  $1 \times 10^6$  세포를 T75 플라스크(Thermofisher Scientific, USA)로 계대 배양하였다.
- [0093] <실시예 2> 와우 외식편(Cochlear explant) 분리 및 배양
- [0094] 출생 후 2 내지 4일된 ICR 마우스를 DBL사(한국)에서 구입하여 사용하였다. 70% 에탄올로 소독한 후, 칼날을 이용하여 마우스의 머리를 제거하고, 두개골을 시상면으로 절단하였다. 와우(Cochlea)는 피부와 측두골을 순차적으로 제거한 후 분리하였다. 분리한 와우를 차가운 HEPES/HBSS 용액(1×HBSS 및 10 mM HEPES)에 넣었다. 와우 젤리 뼈(Cochlear jelly bone)를 제거한 후, 혈관선조(Stria vascularis)를 제거하고 나선 신경절(Spiral ganglion)에서 분리하여 유모세포(Hair cell)를 포함하는 코르티 기관을 획득하였다. 이때, 와우를 중심에서 세 부분, 즉 첨단회전(Apical turn), 중간회전(Middle turn) 및 기저회전(Basal turn)으로 나누어 각각에서 코르티 기관을 획득하였다. 그다음, 개막(Tectorial membrane)을 제거한 후, 기저막(Basilar membrane)이 아래를 향하도록 9 mm 직경의 플라스틱 커버슬립(SPL 생명 과학, 한국)에 코르티 기관을 조심스럽게 위치하도록 하여 와우 외식편(Cochlear explant)을 얻었다. 커버슬립을 24-웰 배양디쉬에 위치하도록 하고, 1 ml의 외식편(Explant) 배양 배지(10% FBS, 1% N2 보충제 및 10 µg/ml의 암피실린이 포함된 DME/F12 배지)를 웰 내부에 첨가하였다. 또한, 와우 외식편을 약물 처리 및 MSC와의 공동배양 전에 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 조건의 인큐베이터로 옮겼다.
- [0096] <실험예 1> 와우 외식편을 이용한 이독성 난청 유도 확인
- [0097] 항암제로 사용되는 시스플라틴(Cisplatin)의 과다 사용에 의해 이독성 난청이 유발된다고 알려져 있다. 또한, 와우의 외유모세포(Outer hair cell, OHC) 및 내유모세포(Inner hair cell, IHC)가 손상되면 난청을 초래하게 되는 것으로 알려져 있다. 이에, 와우 외식편에서 이독성 난청이 유도되는지 알아보기 위하여, 와우 외식편에 시스플라틴을 농도별로 처리하고 면역형광분석을 통해 OHC 및 IHC의 세포생존율을 확인하였다.
- [0098] 구체적으로, 상기 <실시예 2>에서 획득한 와우 외식편에 20, 40, 80, 100 및 120 µM의 시스플라틴(Sigma, USA)을 24시간 동안 처리하였다(도 1A). 처리 완료 후, 와우 외식편을 4% 포르말린을 포함하는 PBS로 15분 동안 고정하고, PBS로 3 회 세척하였다. 그다음, 0.1% 트리트론 X-100을 포함하는 PBS로 10분 동안 인큐베이션한 후, 4% BSA를 포함하는 PBS로 30분 동안 블로킹하였다. 이후, 토끼 항-마우스 미오신 7a(Myosin 7a) 1차 항체(1 : 400, abcam)로 1시간 동안 인큐베이션 하였다. PBS로 3회 세척한 후, Phalloidine Alexa Fluor 647(1 : 1000, abcam)를 갖는 염소 항-토끼 IgG (H + L) Alexa Fluor 488 항체(1 : 500, abcam)로 1시간 동안 인큐베이션하였다. PBS로 세척한 후, 커버슬립을 슬라이드로 옮기고 DAPI(Sigma, USA)를 갖는 Fluoroshield 한 방울을 커버슬립에 부드럽게 떨어뜨렸다. 커버슬립을 투명한 매니큐어로 밀봉하고 형광현미경으로 관찰하고(도 1B), OHC 및 IHC 수를 측정하여 세포 생존율을 계산하였다(도 1C).
- [0099] 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, 와우 외식편에서 시스플라틴의 농도에 따라 청각 유모세포 사멸이 증가하므로, 시스플라틴에 의해 청각 유모세포가 손상되어 이독성 난청이 유도됨을 확인하였다. 특히, 첨단회전에서 100 µM의 시스플라틴이 OHC의 EC50 값을 나타내지만, 중간회전 및 기저회전에서는 OHC가 거의 사멸하는 것을 확인하였다(도 1C).
- [0100] 따라서, 와우 외식편에서 이독성 난청 유도를 위한 시스플라틴 농도로 중간회전 및 기저회전에서도 OHC의 EC50 값을 나타내는 농도인 80 µM을 선택하였고, 80 µM 시스플라틴 처리 그룹을 양성 대조군으로 하였다.

- [0102] <실험예 2> FACS를 이용한 MSC 확인
- [0103] MSC 및 이로부터 유래된 물질에 의한 이독성 난청 예방 또는 치료 효과를 알아보기 위하여, 상기 <실시예 1>에서 인간 골수에서 분리한 MSC 및 이로부터 유래된 세포외소포(Extracellular vesicular, EV)의 특성을 FACS를 이용하여 확인하였다.
- [0104] 구체적으로, ISCT(International Society for Cellular Therapy)(REF)에 기술된 바와 같이 MSC에 대한 표준을 사용하여 상기 <실시예 1>에서 분리한 MSC의 면역 프로파일을 유세포 분석법(FACS)으로 평가하였다. 세포 표면 마커는 인간 MSC(hMSC) 분석 키트(BD sciences, USA)를 사용하여 분석하였다. 제조사의 절차에 따라 hMSC Positive Cocktail(CD90 FITC, CD105 PerCP-Cy5.5 및 CD73 APC) 및 PE hMSC Negative Cocktail(CD34, CD11b, CD19, CD45, HLA-DR)을 양성 및 음성 대조군으로 사용하였다. 키트의 hMSC Positive Isotype Control Cocktail(mIgG1κ FITC, mIgG1κ PerCP-Cy5.5 및 mIgG1κ APC) 및 PE hMSC Negative Isotype Control Cocktail(mIgG1κ PE 및 mIgG2aκ PE) 또한 아이소타입 대조군으로 사용하였다. FACS Aria3 유세포 분석기(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)를 사용하여 샘플을 분석하였다. 또한, FACS Diva 소프트웨어를 사용하여 데이터를 분석하였다(도 2A).
- [0105] 또한, 상기 <실시예 1>에서 분리한 MSC 유래 EV를 관찰하기 위하여, 상기 <실시예 1>에서 분리한 MSC 및 이를 배양한 배양 배지를 각각 분리한 후 상기 <실험예 1>에 기재된 바와 같이 면역형광분석을 수행하였다. 이때 1차 항체로 엑소솜 마커인 CD63 항체를 이용하였다(도 2B).
- [0106] 아울러, 상기 배양 배지에 포함된 MSC 유래 EV의 특성을 알아보기 위하여, 상기 배양 배지를 원심분리하여 펠렛(Pellet) 및 상층액(Supernatant)를 획득하였다. 그다음, 획득한 펠렛에 포함된 EV의 크기 및 농도를 NTA(Nanoparticle Tracking Analyzer)를 이용하여 측정하였다(도 2C).
- [0107] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 상기 <실시예 1>에서 분리한 MSC가 CD90, CD105, CD73 및 CD44 양성을 나타냄을 확인하였다(도 2A). 또한, MSC 내 및 배양 배지에서 CD63 양성의 엑소솜을 확인하였다(도 2B). 아울러, MSC 유래 EV가 약  $72.4 \pm 6.2$  nm의 크기를 갖고  $2.48 \times 10^{10} \pm 1.28 \times 10^9$  농도를 나타내는 것을 확인하였다(도 2C).
- [0108] 상기의 결과를 통해 <실시예 1>에서 분리한 MSC 유래 EV의 대부분이 100 nm 미만의 엑소솜임을 확인하였다.
- [0109]
- [0110] <실험예 3> MSC 전처리에 의한 와우 외식편에서 이독성 난청 예방 효과 확인
- [0111] MSC에 의한 이독성 난청 예방 또는 치료 효과를 알아보기 위하여, MSC와 와우 외식편을 공동배양하고, 시스플라틴을 상기 <실험예 1>에서 확인한 이독성 난청 유도를 위한 최적 농도로 처리한 후, 면역형광분석을 통해 OHC 및 IHC의 세포생존율을 확인하였다.
- [0112] 구체적으로, 도 3A의 모식도와 같이 상기 <실시예 1>에서 분리한 MSC를  $1 \times 10^4$ 개의 세포수로 내부웰(Inner well)에 분주하고 MSC 배양 배지를 처리하였다. 상기 내부웰은 0.4 μm 공극 크기의 폴리카보네이트 막을 포함하여 세포가 통과할 수 없도록 하였다. 그다음, 상기 <실시예 2>에서 배양한 와우 외식편이 외부웰에 존재하는 상태에서 공동배양하였다. 또한, 도 3B의 모식도와 같이 와우 외식편과 MSC의 공동배양 및 와우 외식편에 시스플라틴 처리 시점을 달리하여 실험을 수행하였다. 구체적으로 MSC 공동처리 그룹(Co-treat)은 와우 외식편에 시스플라틴 처리 24시간 전에 MSC와 와우 외식편을 공동배양하고, MSC와 와우 외식편 공동배양하에 80 μM의 시스플라틴을 24시간 동안 처리하였다. MSC 전처리 그룹(Pre-treat)은 시스플라틴 처리 24시간 전에 MSC와 와우 외식편을 공동배양하고, MSC가 포함된 내부웰을 제거한 상태에서 80 μM의 시스플라틴을 24시간 동안 처리하였다. MSC 후처리 그룹(Post-treat)은 와우 외식편에 80 μM의 시스플라틴 처리 24시간 후, MSC와 24시간 동안 공동배양하였다.
- [0113] 각 그룹의 실험 종료 후 상기 <실험예 1>에 기재한 방법과 동일한 방법으로 면역형광분석을 통해 OHC 및 IHC의 세포생존율을 확인하였다.
- [0114] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 공동처리 그룹의 경우 48시간 후 와우 외식편의 중간회전 및 기저회전의 OHC가 대부분 사멸하는 것을 확인하였다. 특히, 부동섬모(Stereocilia)는 OHC에서 사라졌고, IHC는 생존한 것을 확인하였다. 후처리 그룹의 경우에도 OHC가 손상되어 있음을 확인하였다. 반면, 전처리 그룹은 OHC가 일렬로 생존하여 있고, 부동섬모도 관찰되었다(도 3C).



- [0115] 또한, 세포의 수를 확인한 결과, 전처리 그룹은 OHC의 생존력이 중간회전에서  $86 \pm 2.14\%$ , 기저회전에서  $84 \pm 5.4\%$ 로 나타났다(도 3D). 그러나, 공동처리 그룹 및 후처리 그룹의 세포 생존율은 각각 중간회전에서  $18.2 \pm 13.2\%$  및  $38.4 \pm 19.5\%$ 로 나타났다. 또한, 세포 생존율은 공동처리 그룹에서  $25.3 \pm 2.6\%$ 이고 후처리 그룹에서  $24.2 \pm 3\%$ 로 나타났다(도 3D).
- [0116] 상기 결과를 통해 와우 외식편과 공동배양된 MSC가 시스플라틴에 의한 IHC 및 OHC 손상을 예방하는 효과가 있음을 알 수 있다. 반면, 시스플라틴에 의해 이미 손상된 OHC는 상기 MSC에 의한 영향이 미비한 것을 알 수 있다.
- [0118] **<실험예 4> MSC 전처리 시간에 따른 와우 외식편에서 이독성 난청 예방 효과 확인**
- [0119] MSC 전처리 시간에 따른 와우 외식편에서 이독성 난청 예방 효과를 알아보기 위하여, MSC와 와우 외식편의 공동배양 시간을 달리하여 공동배양하고 MSC를 제거한 후, 와우 외식편에 시스플라틴을 처리하고 면역형광분석을 통해 OHC 및 IHC의 세포생존율을 확인하였다.
- [0120] 구체적으로, 상기 <실험예 3>에 기재된 방법과 동일한 방법으로 전처리 그룹(Pre-treat)을 제작하되, MSC와 와우 외식편의 공동배양 시간을 2, 12, 18, 24 및 48시간으로 달리하였다. 각 그룹의 실험 종료 후 상기 <실험예 1>에 기재한 방법과 동일한 방법으로 면역형광분석을 통해 OHC 및 IHC의 세포생존율을 확인하였다.
- [0121] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 12시간 전처리 그룹에서 OHC가 사멸하는 것을 확인하였다. 한편, OHC의 세포 생존율은 18시간 이상 전처리 그룹에서 점차 증가하였으며, 이때 중간회전에서 세포 생존율은 각각  $66.7 \pm 3\%$ (18시간 전처리 그룹),  $81.8 \pm 8\%$ (24시간 전처리 그룹) 및  $82.8 \pm 6.3\%$ (48시간 전처리 그룹)로 나타났다. 기저회전에서 OHC의 세포 생존율은 중간회전보다 높았으며, 이때 기저회전에서 세포 생존율은 각각  $78.8 \pm 8\%$ (18시간 전처리 그룹),  $91 \pm 3\%$ (24시간 전처리 그룹) 및  $93 \pm 9\%$ (48시간 전처리 그룹)로 나타났다. 특히, 시스플라틴에 의해 손상된 OHC의 비율은 MSC의 노출 시간에 따라 감소하는 것을 확인하였다(도 4A 및 도 4B).
- [0122] 상기 결과를 통해 와우 외식편과 18시간 이상 공동배양된 MSC가 시스플라틴에 의한 IHC 및 OHC 손상을 예방하는 효과가 보다 우수함을 알 수 있다.
- [0124] **<실험예 5> MSC 유래 엑소솜 전처리에 의한 와우 외식편에서 이독성 난청 예방 효과 확인**
- [0125] MSC로부터 유래된 엑소솜에 의한 와우 외식편에서 이독성 난청 예방 효과를 알아보기 위하여, MSC와 와우 외식편의 공동배양 시간을 달리하여 공동배양하고 MSC를 제거한 후, 와우 외식편에 시스플라틴을 처리하고 면역형광분석을 통해 OHC 및 IHC의 세포생존율을 확인하였다.
- [0126] 구체적으로, 도 5A의 모식도와 같이 상기 <실시예 2>에서 분리 및 확인한 엑소솜을 10배 농도가 되도록 제조하였다. 그 다음, 상기 <실험예 3>의 MSC 전처리 그룹과 비교하기 위하여  $\times 1$ ,  $\times 3$  및  $\times 5$ 로 희석한 후 상기 <실시예 2>에서 배양한 와우 외식편에 24시간 동안 처리하고, 엑소솜 처리 완료 후  $80 \mu\text{M}$ 의 시스플라틴을 24시간 동안 처리하였다. 또한, MSC 유래 엑소솜이 포함되지 않은 그룹과 비교하기 위하여 상기 <실시예 2>에서 획득한 상층액을 상기에 기재된 방법과 동일한 방법으로 처리하고, 처리 완료 후  $80 \mu\text{M}$ 의 시스플라틴을 24시간 동안 처리하였다.
- [0127] 각 그룹의 실험 종료 후 상기 <실험예 1>에 기재한 방법과 동일한 방법으로 면역형광분석을 통해 OHC 및 IHC의 세포생존율을 확인하였다.
- [0128] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 엑소솜이 포함되지 않은 상층액 전처리 그룹(Supernatant)에서는 침단회전, 중간회전 및 기저회전 모두에서 현저한 IHC 및 OHC의 세포사멸이 나타나는 반면, 엑소솜 전처리 그룹의 경우 침단회전, 중간회전 및 기저회전 모두에서 IHC 및 OHC의 세포생존율이 우수한 것을 확인하였다(도 5B 및 도 5C).
- [0129] 상기 결과를 통해 MSC 유래 엑소솜이 시스플라틴에 의한 IHC 및 OHC 손상을 예방하는 효과가 있음을 알 수 있다.
- [0131] **<실험예 6> 와우 외식편과 공동배양한 MSC 및 이로부터 유래된 엑소솜 내 HSP70 단백질 발현 확인**
- [0132] HSP70은 청각 유모세포의 손상을 억제하는 효과가 있는 것으로 알려져 있다(Y Takada et al. 2015). 또한, 상기 <실험예 3> 및 <실험예 4>를 통해 와우 외식편에 MSC를 전처리한 그룹에서 시스플라틴에 의한 IHC 및 OHC 손상을 예방하는 효과를 확인하였다. 이에, 와우 외식편과 공동배양한 MSC 및 이로부터 유래된 엑소솜의 이독성 난청 예방 효과를 확인하기 위하여, 이들에서 HSP70 단백질을 발현을 웨스턴 블롯 분석으로 확인하였다.
- [0133] 구체적으로, 도 6A의 모식도와 같이 상기 <실시예 1>에서 획득한 MSC 및 상기 <실시예 2>에서 획득한 와우 외식

편을 상기 <실험예 3>에 기재된 방법과 동일한 방법으로 24시간 동안 공동배양한 후 원심분리하여 세포 및 배양액을 획득하였다. 그 다음, 상기 세포 및 배양액 내의 엑소좀 단백질을 얻기 위해서 용해 버퍼(lysis buffer)를 사용하여 15분간 반응시킨 후 원심분리하여 세포 용해물을 얻었다. 각 샘플의 농도는 Bradford assay를 통해 60  $\mu$ g으로 정량화 하였다. 그 다음, 12% 아크릴아마이드 겔(acrylamide gel)로 전기영동하여 분리하고, PVDF 멤브레인에 옮겼다. 멤브레인은 1차 항체로 엑소좀 마커인 CD63 항체 및 HSP70 항체 각각과 4°C에서 하룻밤 동안 반응하였고, 2차 항체로 HRP-접합된 IgG 항체로 1시간 동안 실온에서 반응하였다. 이후, ChemiDOC을 사용하여 면역 반응성 밴드를 검출하고 그래프화하였다. 또한, 대조군으로 와우 외식편 없이 MSC만 배양한 그룹 및 MSC 없이 와우 외식편만 배양한 그룹을 이용하였다.

[0134] 그 결과, 도 6에 나타낸 바와 같이, MSC만 배양한 그룹[hMSC(only)]의 배양액에서 와우 외식편만 배양한 그룹[Explant(only)]의 배양액에 비해 CD63 및 HSP70 단백질 발현이 높게 나타나는 것을 확인하였다. 또한, MSC 및 와우 외식편을 공동배양한 그룹[co-culture]의 배양액에서 CD63 및 HSP70 단백질 발현이 보다 높게 나타나는 것을 확인하였다(도 6B).

[0135] 상기 결과를 통해 MSC 유래 엑소좀 및 와우 외식편과 공동배양된 MSC 유래 엑소좀 내에 HSP70 단백질이 높게 내재되어 있어 IHC 및 OHC 손상을 억제하고, 이를 통해 난청을 예방하는 효과가 있음을 알 수 있다. 또한, 상기 와우 외식편과 MSC의 공동배양액 내에 HSP70 단백질이 내재된 엑소좀이 보다 높게 포함되어 있어 난청 예방 효과가 보다 우수함을 알 수 있다.

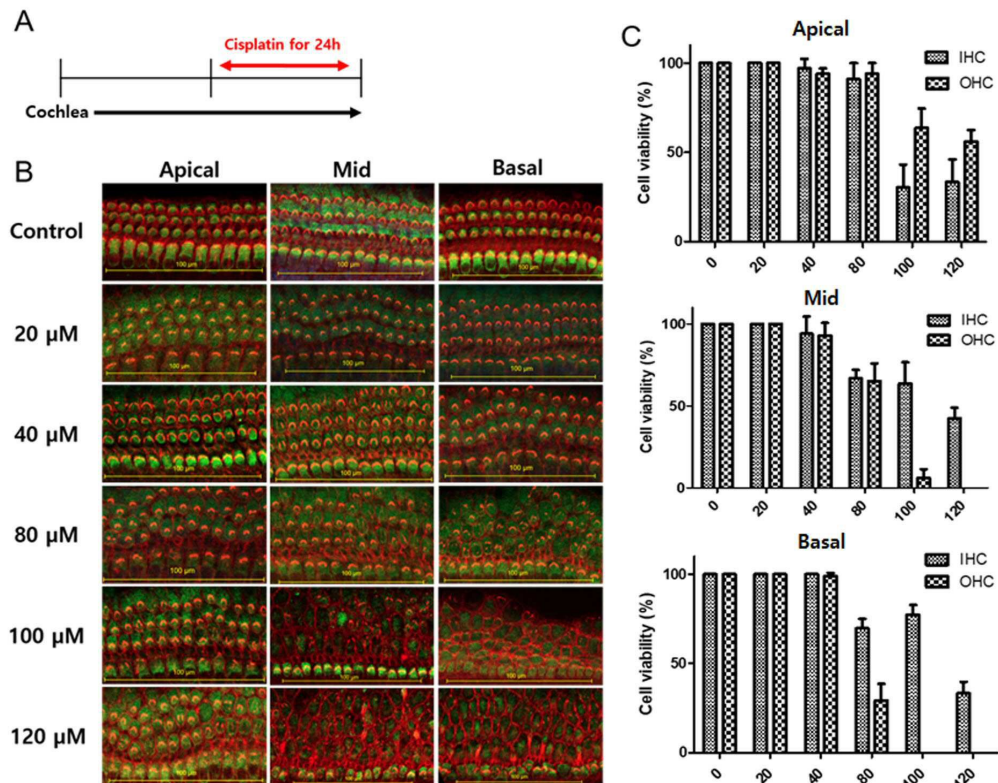
[0137] 또한, MSC만 배양한 그룹의 MSC[hMSC(only)]에 비해 MSC 및 와우 외식편을 공동배양한 그룹의 MSC[hMSC(co-culture)]에서 CD63 및 HSP70 단백질 발현이 높게 나타나는 것을 확인하였다. 또한, MSC 및 와우 외식편을 공동배양한 그룹의 와우 외식편[explant(co-culture)]에서 CD63 및 HSP70 단백질 발현이 보다 높게 나타나는 것을 확인하였다.

[0138] 상기 결과를 통해 와우 외식편과 공동배양한 MSC에서 HSP70 단백질 및 상기 단백질을 내재한 엑소좀이 증가하여 IHC 및 OHC 손상 억제 효과가 향상되고, 이로 인해 우수한 난청 예방 효과를 나타낼 수 있음을 알 수 있다. 또한, MSC 뿐만 아니라 MSC와 공동배양한 와우 외식편에서도 HSP70 단백질 및 상기 단백질을 내재한 엑소좀이 증가하여 IHC 및 OHC 손상을 억제할 수 있고, 이로 인해 우수한 난청 예방 효과를 나타낼 수 있음을 알 수 있다.

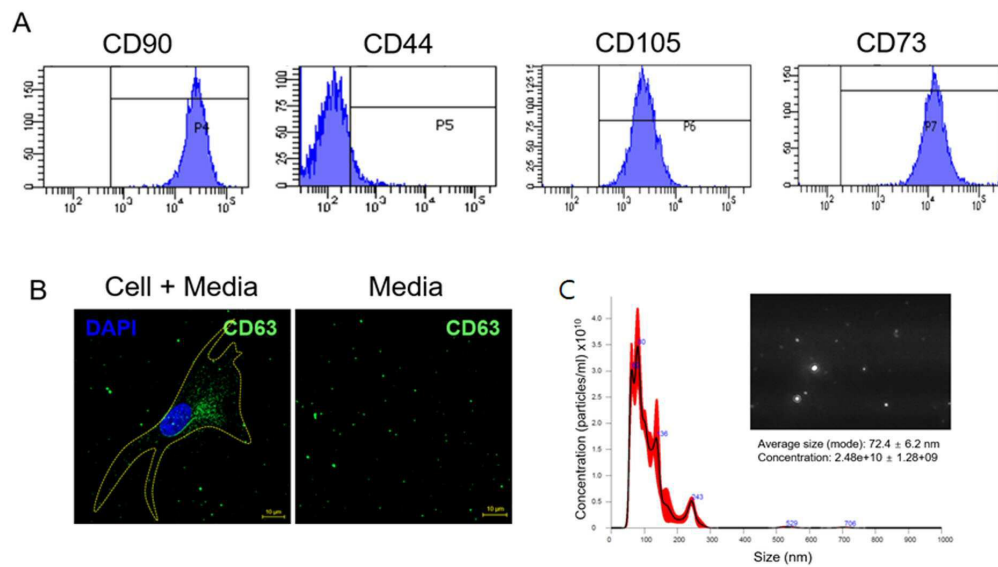


도면

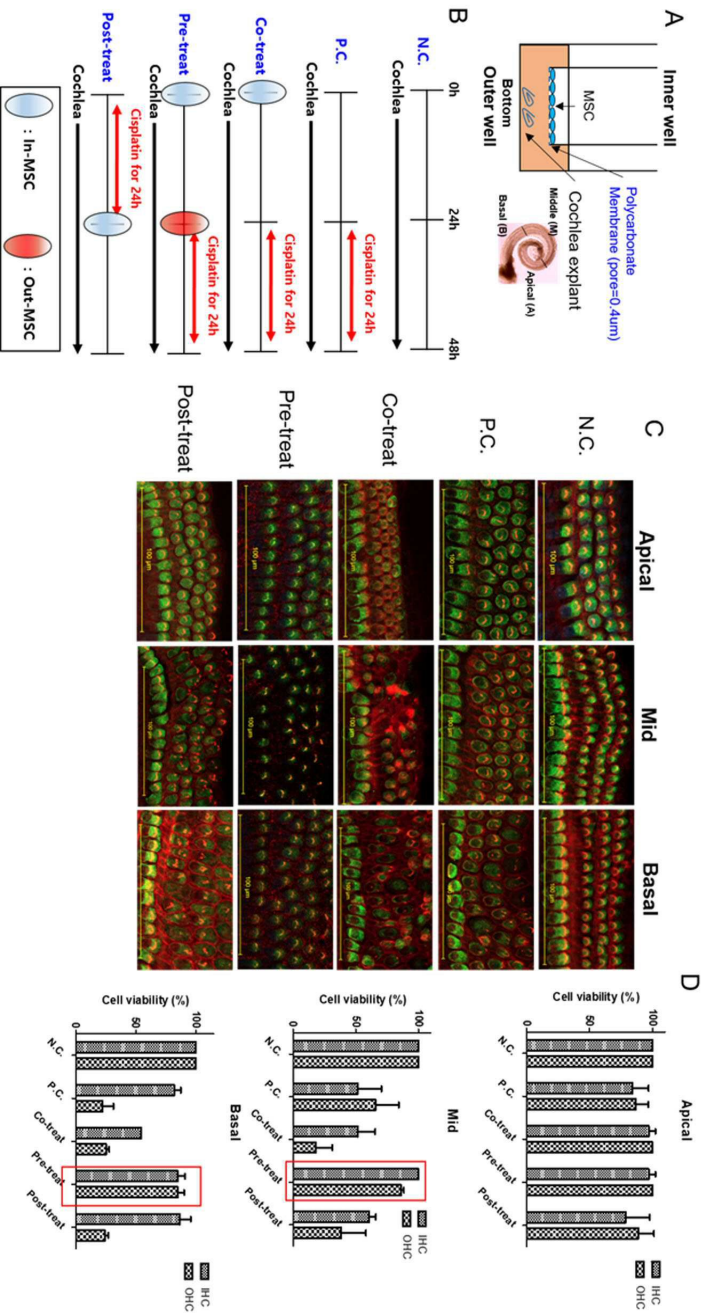
도면1



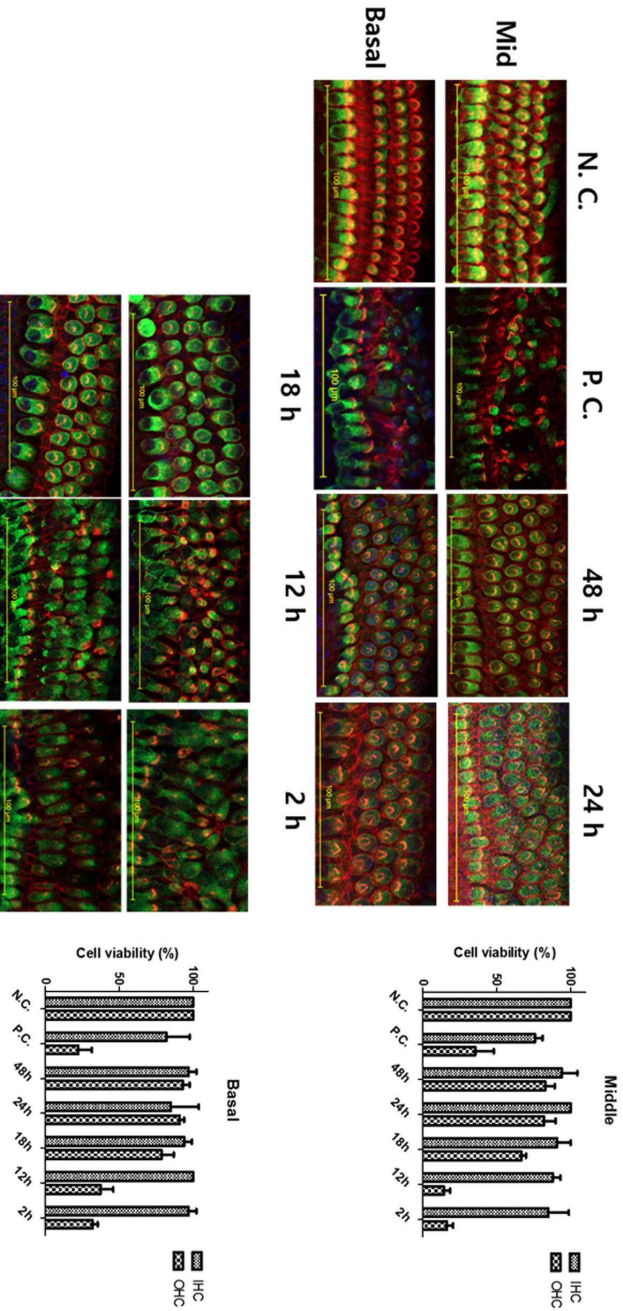
도면2



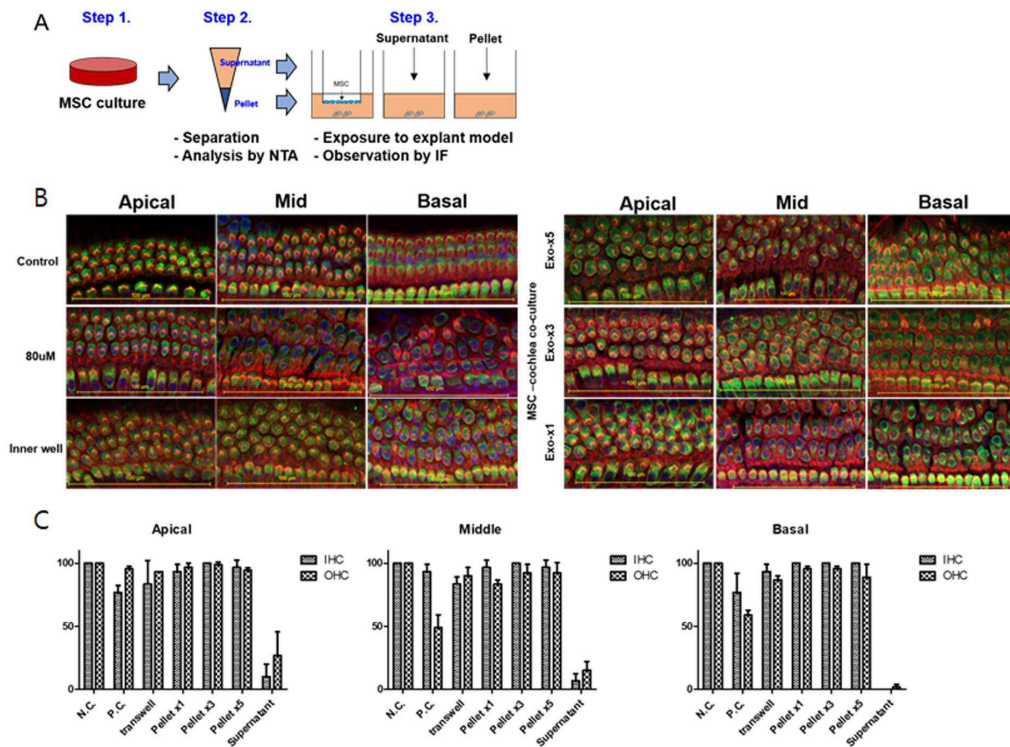
도면3



도면4



도면5



도면6

