



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년04월02일

(11) 등록번호 10-2236399

(24) 등록일자 2021년03월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0775 (2010.01) C01G 49/02 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C12N 5/0662 (2013.01)
C01G 49/02 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0136417

(22) 출원일자 2019년10월30일

심사청구일자 2019년10월30일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020180111674 A*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

연세대학교 원주산학협력단

강원도 원주시 흥업면 연세대길 1

(72) 발명자

서영준

강원도 원주시 늘품로 199, 117동 804호(반곡동, 원주반곡아이파크)

박동준

강원도 원주시 나비허리길 1, 102동 702호(단구동, 정우월드피아)

기재홍

강원도 원주시 흥업면 연세대길 1, 백운관 409호(연세대학교 원주캠퍼스)

(74) 대리인

김보민

전체 청구항 수 : 총 16 항

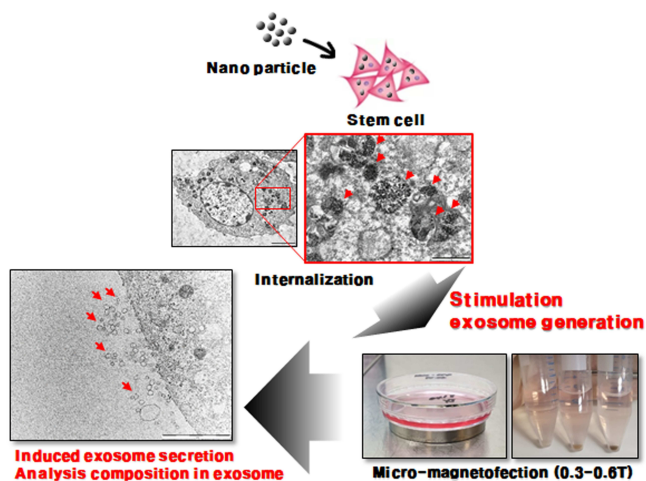
심사관 : 김정태

(54) 발명의 명칭 자성 나노입자 클러스터를 이용한 줄기세포 유래 엑소솜 생성 촉진 방법

(57) 요약

본 발명은 자성 나노입자 클러스터를 이용한 중간엽줄기세포 유래 엑소솜 생성 촉진 방법에 관한 것으로, 구체적으로, 고분자-자성 나노입자 클러스터(cluster)를 줄기세포에 처리하고 상기 줄기세포에 자기력을 가했을 때, 줄기세포 유래 엑소솜의 생성이 촉진되는 것을 확인하였으므로, 생체외(in vitro) 및 생체내(in vivo)에서 임상적 치료효능이 있는 양질의 엑소솜을 다량으로 제공할 수 있는 이점을 가진다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C01P 2004/64 (2013.01)

C01P 2006/42 (2013.01)

C12N 2529/00 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

- 1) 고분자-자성 나노입자 클러스터(cluster)를 줄기세포에 처리하는 단계; 및
- 2) 상기 단계 1)의 줄기세포에 자기력을 가하는 단계;를 포함하는 줄기세포 유래 엑소솜의 생성 촉진 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 단계 1)의 고분자는 생체적합성 고분자인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 생체적합성 고분자는,

폴리(베타-히드록시 에틸 메타아크릴레이트)(Poly(beta-hydroxyethyl Methacrylate), PHEMA); 폴리아크릴아미드(Polyacrylamide, PA); 폴리비닐 알코올(Polyvinyl Alcohol, PVA); 폴리아크릴산(Polyacrylic Acid, PAA), 그 염 및 그 유도체; 폴리메타아크릴산(Poly(metha acrylic Acid), PMAA) 또는 그 유도체; 폴리아크릴아미드(Poly(acrylic amide)) 또는 그 유도체; 폴리언데세노산(Poly(undecenoic acid)) 또는 그 유도체, 또는 상기 고분자의 공중합체; 덱스트란(Dextran) 또는 그 유도체, 폴리비닐피롤리돈(Polyvinylpyrrolidone, PVP); 폴리에틸렌 옥사이드(Polyethyleneoxide, PEO); 폴리에틸렌글리콜(Polyethyleneglycol, PEG) 또는 그 유도체; 폴리프로필렌글리콜(Polypropylene Glycol, PPG) 또는 그 유도체; 상기 폴리에틸렌글리콜 및 폴리프로필렌글리콜의 공중합체, 또는 이들의 모노에스테르화 유도체; 폴리(에틸렌옥사이드-b-프로필렌 옥사이드)(Poly(ethylene oxide-b-propylene oxide), PEO-PPO); 폴리-L-라이신(PolyL-L-lysine); 폴리에틸렌이민(Polyethylenimine); 폴리락트산(Poly lactic acid, PLA); 폴리글리콜산(Polyglycolic acid, PGA); 폴리(락트산-co-글리콜산)(Poly(lactic-co -glycolic acid), PLGA) 공중합체; 키토산(Chitosan); 히알루론산(Hyaluronic acid); 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 단계 1)의 자성은 초상자성인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 단계 1)의 자성 나노입자는,

산화 제2철(iron(II) oxide: FeO), 산화 제3철(iron(III) oxide, maghemite; Fe_2O_3 , $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$, $\beta\text{-Fe}_2\text{O}_3$, $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, $\epsilon\text{-Fe}_2\text{O}_3$), 마그네타이트(magnetite; Fe_3O_4) 및 산화 제2, 3철(iron(II, III) oxides; Fe_4O_5 , Fe_5O_6 , Fe_5O_7 , $\text{Fe}_{13}\text{O}_{19}$, $\text{Fe}_{25}\text{O}_{32}$)로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 단계 1)의 고분자-자성 나노입자 클러스터는 양전하로 표면 개질된 고분자-자성 나노입자 클러스터인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 양전하로 표면 개질된 고분자-자성 나노입자 클러스터는 고분자-자성 나노입자 클러스터 표면에 양이온성 형질 전환제가 부착된 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 양이온성 형질 전환제는,

폴리에틸렌이민(Polyethyleneimine, PEI), 페길레이티드 (Pegylated) 폴리에틸렌이민, 히스티딜레이티드 (Histidylated) 폴리에틸렌이민, 락토실레이티드 (Lactosylated) 폴리에틸렌이민, 엽산 공유결합형(Folate-conjugated) 폴리에틸렌이민, 멜리틴 공유결합형 (Melittin-conjugated) 폴리에틸렌이민 등의 폴리에틸렌이민 유도체; 폴리라이신(Polylysine), 스퍼민(Spermine), 프로타민 설페이트(Protamine sulfate), 폴리아미도아민 (Polyamidoamine, PAMAM), 폴리 프로필렌이민 (Polypropyleneimine), 폴리브렌 (Polybrene) 및 디이에이이 텍스트란 (DEAE-dextran)으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 단계 1)에서 고분자-자성 나노입자 클러스터를 1 내지 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 처리하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 줄기세포는 골수, 지방조직, 말초혈액, 간, 근육, 폐, 양수, 태반의 융모막 및 제대혈로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 조직으로부터 유래된 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 11

제8항에 있어서,

상기 줄기세포는 배아 줄기세포 또는 성체 줄기세포인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 성체 줄기세포는 중간엽줄기세포, 인간 조직 유래 중간엽 기질세포, 인간 조직 유래 중간엽줄기세포 및 다

분화능 줄기세포로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 성체 줄기세포인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 13

제1항에 있어서,

상기 단계 2)에서 자기력을 0.1 내지 2.0 T로 가하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 14

1) 고분자-자성 나노입자 클러스터(cluster)를 줄기세포에 처리하는 단계;

2) 상기 단계 1)의 줄기세포에 자기력을 가하는 단계; 및

3) 상기 단계 2)의 줄기세포로부터 엑소좀을 분리하는 단계;를 포함하는, 엑소좀 제조방법.

청구항 15

삭제

청구항 16

고분자-자성 나노입자 클러스터(cluster)를 포함하는 줄기세포 유래 엑소좀 생성 촉진용 조성물.

청구항 17

제16항에 있어서,

상기 조성물은 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), 및 KnockOut DMEM으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 배지에서 배양되는 것을 특징으로 하는, 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 자성 나노입자 클러스터를 이용한 줄기세포 유래 엑소좀 생성 촉진 방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로 고분자-자성 나노입자 클러스터를 이용한 줄기세포 유래 엑소좀 생성 촉진 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003]

줄기세포는 무한히 증식하는 자가 생산능을 가지며, 특정 조건에서 다양한 세포로 분화 가능한 세포로 잘 알려져 있다. 이러한 분화 능력을 이용하여 현재 의학으로 치료 불가능하거나 난치성인 질환을 치료할 수 있는 유일한 미래 치료제로서 줄기세포 치료제가 각광받고 있다. 줄기세포 치료제는 환자에서 추출한 줄기세포를 체외에서 심혈관계, 신경계, 연골계, 피부 등 필요한 계열의 세포로 분화 및 증식하여 다시 환자에 주입하는 방식으로 면역거부반응 없이 손상된 세포 및 조직을 재생할 수 있다.

[0004]

줄기세포 중에서도 중간엽줄기세포(mesenchymal stem cells, MSCs)는 면역 반응, 면역계 활동 및 염증과 질병에 대한 신체 반응의 조절에 있어서 그 역할이 수년 동안 널리 연구되어 왔다. 여러 연구에 의하면 배양된 중간엽 줄기세포는 체외와 생체 내에서 다른 세포 유형과 조직뿐만 아니라 뼈와 연골로 분화하는 능력을 가지고 있다. 또한, 중간엽줄기세포는 내피세포 성장인자(endothelial growth factor), IL-6(interleukin-6), IL-

8(interleukin-8) 등과 같은 다양한 사이토카인과 케모카인들을 분비함으로써 조직 재생과 손상 조직 내 혈관 형성을 촉진한다. 또한, 중간엽줄기세포는 세포 외 소포체(extracellular vesicle, EV)를 분비하는 것으로 알려져 있으며, 세포 외 소포체가 세포 간의 신호전달을 통해 세포의 운명, 기능, 분화 등 다방면에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.

[0005] 한편, 세포 외 소포체는 세포가 세포 외로 분비하는 막 구조의 소포체의 총칭으로 마이크로소포체(microvesicle), 엑소좀(exosome), 엑토좀(ectosome), 사멸체(apoptotic body) 등으로 구분된다. 이중 엑소좀은 약 40 내지 150 nm의 직경과 1.09 내지 1.18 g/ml의 밀도를 가지는 세포 외 소포체로 정의되는데, 다양한 종류의 활성 기능이 있다. 엑소좀은 기원 세포(공여세포) 특유의 생물학적 기능을 반영하는 세포특이적 구성 성분을 함유하며, 인지질, 메신저RNA(messengerRNA, mRNA), 마이크로RNA(microRNA, miRNA) 외에도 다양한 수용성 단백질, 외재성 단백질 및 막관통 단백질 성분 등을 포함한다. 엑소좀의 마커 단백질로는 CD63, CD81 등이 잘 알려져 있으며, 여기에는 주로 EGFR과 같은 세포 표면의 수용체, 신호전달에 관여하는 분자, 세포의 부착(adhesion)에 관여하는 단백질, 열충격 단백질(heat shock protein), 소포체 형성과 관련하는 Alix 등의 단백질이 포함되는 것으로 알려져 있다. 이러한 엑소좀은 다양한 종류의 체액, 예를 들어 침, 소변, 혈장, 혈청, 양수로부터 분리할 수 있고 여러 종류의 세포배양 상층액에서도 분리가 가능하다.

[0006] 아울러, 순수하게 분리한 엑소좀은 생체외(*in vitro*) 및 생체내(*in vivo*)에서 임상적 치료효능이 있는 것으로 밝혀지고 있어, 그동안 중간엽줄기세포를 이용하여 시도되던 여러 질환에 대해 엑소좀이 새로운 대안으로 떠오르고 있다. 엑소좀은 또한 면역조절 및 세포 간 신호전달 역할을 하며 세포의 기능적 변화를 유도하여 세포재생 프로그램을 활성화하며, 무세포계(cell free system)이므로 종양 형성의 위험이 없고 동결보존제 없이 영하 20℃에서 6개월간 생물학적 활성이 유지되는 상태로 보존되며 캡슐화(encapsulation)되어 있어 엑소좀 내 물질이 분해되지 않는 장점이 있다.

[0007] 다만, 이러한 우수한 효과에도 불구하고 엑소좀을 상업적으로 이용하기 위해서는 다량의, 그리고 양질의 엑소좀이 필요하다. 그러나 현재 중간엽줄기세포로부터 얻을 수 있는 엑소좀의 양은 매우 소량에 불과하고, 중간엽줄기세포 유래 엑소좀의 생산량을 증가시킬 수 있는 방법 및 물질에 대한 개발도 아직은 미비한 실정이다. 이에 따라 중간엽줄기세포 유래 엑소좀의 생산을 촉진하는 신규한 방법 및 물질 개발에 대한 필요성이 제기되었다.

[0008] 이에 본 발명자들은 중간엽줄기세포 내 엑소좀의 발생을 증가시킬 수 있는 방법을 개발하기 위해 노력한 결과, 자성 나노입자 클러스터의 표면 개질 성질 및 자성자극에 따라 중간엽줄기세포 내부로의 유입량이 달라지고, 이로 인해 엑소좀의 발생량이 영향을 받는 것을 확인하였다. 따라서 자성 나노입자 클러스터 및 자성자극을 이용하여 중간엽줄기세포에서 엑소좀의 발생 및 활성이 극대화할 수 있음을 밝혔으며, 이에 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 줄기세포 유래 엑소좀 생성 촉진 방법을 제공하기 위한 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 고분자-자성 나노입자 클러스터를 이용한 줄기세포 유래 엑소좀 생성 촉진 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명에서는 고분자-자성 나노입자 클러스터(cluster)를 줄기세포에 처리하고 상기 줄기세포에 자기력을 가했을 때, 줄기세포 유래 엑소좀의 생성이 촉진되는 것을 확인하였으므로, 본 발명에 따른 줄기세포 유래 엑소좀 생성 촉진 방법으로 생체외(*in vitro*) 및 생체내(*in vivo*)에서 임상적 치료효능이 있는 양질의 엑소좀을 다량으로 제공할 수 있는 이점을 가진다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 고분자-자성 나노입자 클러스터(cluster) 및 자성자극에 의해 줄기세포에서 엑소좀의 생성이 촉진되는 기전을 모식도로 나타낸 도이다.

도 2는 음전하(도 2, 위) 또는 양전하(도 2, 아래)로 표면 개질된 고분자-초상자성 나노입자 클러스터를 나타낸

도이다.

도 3a는 양전하로 표면 개질된 고분자-자성 나노입자 클러스터의 크기를 확인한 도이다.

도 3b는 고분자-자성 나노입자 클러스터의 제타 전위(ζ (zeta, z)-potential), SEM 및 TEM으로 관찰한 고분자-자성 나노입자 클러스터를 나타낸 도이다.

도 4는 고분자-자성 나노입자 클러스터의 표면 전하 및 농도에 따른 엑소좀의 발현 수준을 나타낸 도이다.

도 5는 발현된 엑소좀의 크기를 나타낸 도이다.

도 6은 자기력 세기에 따른 엑소좀 특이적 마커인 CD9, CD63 및 CD81의 발현 수준을 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.

본 발명은

1) 고분자-자성 나노입자 클러스터(cluster)를 줄기세포에 처리하는 단계; 및

2) 상기 단계 1)의 줄기세포에 자기력을 가하는 단계;를 포함하는 줄기세포 유래 엑소좀의 생성 촉진 방법을 제공한다.

상기 단계 1)의 고분자는 생체적합성 고분자일 수 있고, 보다 구체적으로 상기 생체적합성 고분자로 폴리(베타-히드록시 에틸 메타아크릴레이트)(Poly(beta-hydroxyethyl Methacrylate), PHEMA); 폴리아크릴아미드(Polyacrylamide, PA); 폴리비닐 알코올(Polyvinyl Alcohol, PVA); 폴리아크릴산(Polyacrylic Acid, PAA), 그 염 및 그 유도체; 폴리메타아크릴산(Poly(metha acrylic Acid), PMAA) 또는 그 유도체; 폴리아크릴아미드(Poly(acrylic amide)) 또는 그 유도체; 폴리운데세노산(Poly(undecenoic acid)) 또는 그 유도체, 또는 상기 고분자의 공중합체; 덱스트란(Dextran) 또는 그 유도체, 폴리비닐피롤리돈(Polyvinylpyrrolidone, PVP); 폴리 에틸렌 옥사이드(Polyethyleneoxide, PEO); 폴리에틸렌글리콜(Polyethyleneglycol, PEG) 또는 그 유도체; 폴리 프로필렌글리콜(Polypropylene Glycol, PPG) 또는 그 유도체; 상기 폴리에틸렌글리콜 및 폴리프로필렌글리콜의 공중합체, 또는 이들의 모노에스테르화 유도체; 폴리(에틸렌옥사이드-b-프로필렌 옥사이드)(Poly(ethylene oxide-b-propylene oxide), PEO-PPO); 폴리-L-라이신(Poly-L-lysine); 폴리에틸렌이민(Polyethylenimine); 폴리락트산(Poly lactic acid, PLA); 폴리글리콜산(Polyglycolic acid, PGA); 폴리(락트산-co-글리콜산)(Poly(lactic-co -glycolic acid), PLGA) 공중합체; 키토산(Chitosan); 히알루론산(Hyaluronic acid); 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

또한, 상기 단계 1)의 자성은 초상자성일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

상기 단계 1)의 자성 나노입자는 산화 제2철(iron(II) oxide: FeO), 산화 제3철(iron(III) oxide, magnetite; Fe₂O₃, α -Fe₂O₃, β -Fe₂O₃, γ -Fe₂O₃, ϵ -Fe₂O₃), 마그네타이트(magnetite; Fe₃O₄) 및 산화 제2, 3철(iron(II, III) oxides; Fe₄O₅, Fe₅O₆, Fe₅O₇, Fe₁₃O₁₉, Fe₂₅O₃₂)로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

또한, 상기 단계 1)에서 고분자-자성 나노입자 클러스터는 양전하로 표면 개질된 고분자-초자성 나노입자 클러스터인 것이 바람직하다.

상기 양전하로 표면 개질된 고분자-자성 나노입자 클러스터는 고분자-자성 나노입자 클러스터 표면에 양이온성 형질 전환제가 부착될 수 있고, 보다 구체적으로 상기 양이온성 형질 전환제로 폴리에틸렌이민(Polyethylenimine, PEI), 페길레이티드(Pegylated) 폴리에틸렌이민, 히스티딜레이티드(Histidylated) 폴리에틸렌이민, 락토실레이티드(Lactosylated) 폴리에틸렌이민, 엽산 공유결합형(Folate-conjugated) 폴리에틸렌이민, 멜리틴 공유결합형(Melittin-conjugated) 폴리에틸렌이민 등의 폴리에틸렌이민 유도체; 폴리라이신(Polylysine), 스퍼민(Spermine), 프로타민 설페이트(Protamine sulfate), 폴리아미도아민(Polyamidoamine, PAMAM), 폴리 프로필렌이민(Polypropyleneimine), 폴리브렌(Polybrene) 및 디이에이이 덱스트란(DEAE-dextran)으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 양이온성 형질 전환제가 부착될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

상기 단계 1)에서 고분자-자성 나노입자 클러스터(cluster)는 다음의 방법으로 제조될 수 있으나, 이에 한정되

지 않는다:

- [0028] a) 고분자를 용해하는 단계;
- [0029] b) 자성나노입자를 적가하는 단계;
- [0030] c) 단계 a)의 고분자 및 단계 b)의 자성나노입자를 혼합하는 단계;
- [0031] d) 단계 c)의 혼합물을 초음파 처리한 뒤 실온에서 교반하는 단계.
- [0032] 또한, 양전하로 표면 개질된 고분자-자성 나노입자 클러스터를 제조하기 위하여, 상기 단계 a)에 하기 단계 a')를 추가할 수 있다:
- [0033] a') 단계 a)에 양이온성 형질 전환체, 및 상기 양이온성 형질 전환체 및 고분자를 연결하는 링커를 추가 및 반응하여 양이온성 형질 전환체가 부착된 고분자를 획득하는 단계.
- [0034] 상기 링커는 구체적으로 N,N'-디사이클로헥실카르보디이미드(N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide, DCC) 및 N-하이드록시석신이미드(N-Hydroxysuccinimide, NHS)일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0035] 또한, 상기 단계 c)에서 혼합은 3 내지 7분 동안 볼텍싱하여 수행될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0036] 또한, 형광 표지된 고분자-자성 나노입자 클러스터를 제조하기 위하여 상기 단계 c)에서 형광 부착된 고분자를 추가할 수 있다.
- [0037] 또한, 상기 단계 d)에서 초음파 처리는 구체적으로 1 내지 5분 동안 수행될 수 있고, 보다 구체적으로 2 내지 4분 동안 수행될 수 있다. 상기 단계 d)에서 교반은 1 내지 24시간 동안 수행될 수 있고, 구체적으로 4 내지 8시간 동안 수행될 수 있으며, 보다 구체적으로 5 내지 7시간 동안 수행될 수 있다.
- [0038] 상기 방법으로 제조된 고분자-자성 나노입자 클러스터는 고분자와 자성 나노입자가 응집된 클러스터(cluster) 형태를 나타낸다.
- [0039] 또한, 상기 단계 1)에서 고분자-자성 나노입자 클러스터를 1 내지 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 처리할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0040] 상기 줄기세포는 골수, 지방조직, 말초혈액, 간, 근육, 폐, 양수, 태반의 용모막 및 제대혈로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 조직으로부터 유래되는 것일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0041] 또한, 상기 줄기세포는 배아 줄기세포 또는 성체 줄기세포일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0042] 상기 성체 줄기세포는 중간엽줄기세포, 인간 조직 유래 중간엽 기질세포, 인간 조직 유래 중간엽줄기세포 및 다분화능 줄기세포로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 성체 줄기세포인 것일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0043] 상기 단계 2)에서 자기력을 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6 또는 1.0 T 이상으로 가할 수 있고, 구체적으로 0.1 내지 2 T로 가할 수 있으며, 보다 구체적으로 0.3 내지 1T로 가할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0044] 또한, 본 발명은 1) 고분자-자성 나노입자 클러스터(cluster)를 줄기세포에 처리하는 단계;
- [0045] 2) 상기 단계 1)의 줄기세포에 자기력을 가하는 단계; 및
- [0046] 3) 상기 단계 2)의 줄기세포로부터 엑소좀을 분리하는 단계;를 포함하는 엑소좀의 제조방법 및 상기 제조방법에 따라 제조된 엑소좀을 제공한다.
- [0047] 또한, 본 발명은 고분자-자성 나노입자 클러스터(cluster)를 포함하는 줄기세포 유래 엑소좀 생성 촉진용 조성물을 제공한다.
- [0048] 상기 조성물을 배양하는데 이용되는 배지로는, 줄기세포의 배양에 이용되는 일반적인 어떠한 배지도 이용할 수 있다.
- [0049] 바람직하게는, 혈청(예컨대, 소태아 혈청, 말 혈청 및 인간 혈청)이 함유된 배지이며, 본 발명에서 이용될 수 있는 배지는, 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), 및 KnockOut DMEM일 수 있고, 더욱 바람직하게는 최소필수영양배지(minimum essential medium, MEM)

일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

- [0050] 또한, 상기 배지에는 다른 성분, 예를 들어 항생제 또는 항진균제(예컨대, 페니실린, 스트렙토마이신) 및 글루타민 등이 포함될 수 있다.
- [0052] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 고분자-자성 나노입자 클러스터 및 자성자극에 의해 중간엽줄기세포 유래 엑소좀 생성이 촉진되는 것을 확인하였다.
- [0053] 보다 구체적으로, 본 발명자들은 고분자-자성 나노입자 클러스터(cluster)를 줄기세포에 처리하고 상기 줄기세포에 자기력을 가했을 때, 줄기세포 유래 엑소좀의 생성이 촉진되는 것을 확인하였으므로, 상기 엑소좀의 발생을 극대화시키는 방법을 유용하게 이용할 수 있다.
- [0055] 이하 본 발명을 실시예, 실험예에 의해 상세히 설명한다.
- [0056] 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.
- [0058] **<실시예 1> 세포배양**
- [0059] 중간엽줄기세포(mesenchymal stem cell, MSC)는 Cyagen사(MUBMX-01001, US)로부터 구입하였다. 중간엽줄기세포를 10% 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)(Gibco, US) 및 항생제(antibiotics)(Antibiotic-Antimycotic, US)가 포함된 MEM- α 배지(Hyclone, US)에서 배양하였다. 상기 배양한 중간엽줄기세포를 DPBS(Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline)로 세척한 후 3일마다 배지를 교체하였고, 37°C, 5 % CO₂ 로 유지하였다.
- [0061] **<실시예 2> 음전하 표면개질 중합 클러스터드 초상자성 산화철(Polymeric clustered superparamagnetic iron oxide, PCS) 나노입자 합성**
- [0062] 중합 클러스터드 초상자성 산화철(Polymeric clustered superparamagnetic iron oxide, PCS) 나노입자는 산화철 기반 나노입자로 이루어졌으며, 나노입자의 크기는 약 100 nm이다. PCS 나노입자 처리 조건을 결정하기 위하여, 나노입자의 농도를 24시간 동안 20, 40 및 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 제조하였다.
- [0063] 음전하 표면개질 PCS 나노입자를 합성하기 위하여, 폴리(D, L-락타이드-코-글리콜라이드)(Poly(D, L-lactide-co-glycolide, PLGA))(50 : 50, M_w 38,000 내지 54,000)(Sigma-Aldrich, US), 초상자성 산화철 나노입자(Superparamagnetic iron oxide(SPIO) nanoparticles, SPIONs)(Sigma-Aldrich, US)를 사용하였고, 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필) 카르보디미드 히드로클로라이드(1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride, EDC)(Thermo-fisher Scientific, US) 및 N-하이드록시석신이미드(N-hydroxysuccinimide, NHS)를 형광 분자(fluorescence molecule) 사이의 링커(EDC-NHS)로 제조하기 위해 사용하였다. 또한, 세포 내의 나노입자를 검출하기 위해 형광 분자로 시아닌5.5(Cyanine5.5, Cy5.5)(Cyanine5.5 amine, Lumiprobe Co., US)을 사용하였다.
- [0064] 구체적으로, 330 mg의 PLGA를 60 mg의 EDC, 132 mg의 NHS 및 9.9 mg의 Cy5.5와 함께 DMSO 용액에 용해시키고 24시간 동안 배양하여 PLGA와 Cy5.5가 EDC-NHS에 의해 결합되도록 한 후, 반응 혼합물을 탈 이온수(deionized water)로 투석(M_w cutoff=10 k)하여 과량의 EDC, NHS 및 Cy5.5를 제거하여 PLGA-Cy5.5 형광 중합체(PLGA-Cy5.5)를 획득하였다.
- [0065] 그 다음, 0.4 mg의 PLGA-Cy5.5 및 0.1 mg의 PLGA를 0.1 ml의 DMSO에 용해시키고, 3 ml의 탈 이온수에 0.1 ml의 SPIONs(5 mg/ml)를 적가(drop wise)하였다. 이후 바이알(Vial)을 5분 동안 볼텍싱하고, 3분 동안 초음파 처리한 뒤 6시간 동안 실온에서 교반하여 음전하 표면개질 PCS 나노입자를 획득하였다. 상기 획득한 음전하 표면 개질 PCS 나노입자를 동결 건조하여 분말 시료를 얻었다(도 2, 위).
- [0067] **<실시예 3> 양전하 표면개질 중합 클러스터드 초상자성 산화철(Polymeric clustered superparamagnetic iron oxide, PCS) 나노입자 합성**
- [0068] 양전하 표면개질 PCS 나노입자를 하기와 같이 제조하였다. PCS 나노입자 처리 조건을 결정하기 위하여, 나노입자의 농도를 24시간 동안 20, 40 및 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 제조하였다.
- [0069] 양전하 표면개질 PCS 나노입자를 합성하기 위하여, 폴리(D, L-락타이드-코-글리콜라이드)(Poly(D, L-lactide-co-glycolide, PLGA))(50 : 50, M_w 38,000~54,000)(Sigma-Aldrich, US) 및 폴리에틸렌이민(Polyethyleneimine,

PEI) ($M_w \sim 25,000$ by LS, $M_n \sim 10,000$ by GPC)(Sigma-Aldrich, US)을 사용하였고, N,N'-디사이클로헥실카르보디이미드(N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide, DCC) 및 N-하이드록시석신이미드(N-Hydroxysuccinimide, NHS)를 PLGA와 PEI 사이의 링커로 제조하기 위해 사용하였다.

[0070] PLGA-PEI 공중합체를 합성하기 위하여, 330 mg의 PLGA, 113.67 mg의 PEI, 18.33 mg의 DCC 및 11 mg의 NHS를 100 ml의 DMSO 용액에 용해시키고 24시간 동안 배양한 후, 반응 혼합물을 탈 이온수로 투석(M_w cutoff=10 k)하여 과량의 DCC, NHS 및 PEI를 제거하였다. 얻어진 PLGA-PEI 공중합체 용액을 동결 건조하여 분말 시료를 얻었다.

[0071] PLGA-Cy5.5 형광 중합체는 상기 <실시예 2>에 기재된 방법과 동일한 방법으로 합성하였다.

[0072] 그 다음, PLGA-PEI 공중합체, PLGA-Cy5.5 및 SPIONs가 사용되었다. 0.4 mg의 PLGA-Cy5.5 및 0.1 mg의 PLGA-PEI를 0.1 ml의 DMSO에 용해시키고, 3 ml의 탈 이온수에 0.1 ml의 SPIONs(5 mg/ml)를 적가(drop wise)하였다. 이후 바이알(Vial)을 5분 동안 볼텍싱하고, 3분 동안 초음파 처리한 뒤 6시간 동안 실온에서 교반하여 양전하 표면 개질 PCS 나노입자를 획득하였다. 상기 획득한 양전하 표면 개질 PCS 나노입자를 동결 건조하여 분말 시료를 얻었다(도 2, 아래).

[0074] <실시예 4> 미세자성(micro-magnetofection)을 가하여 PCS 나노입자 처리한 중간엽줄기세포로부터 엑소좀 분리

[0075] 상기 <실시예 2 및 3>에서 제조한 PCS 나노입자를 상기 <실시예 1>의 중간엽줄기세포에 처리하고 자기력을 가한 후, 엑소좀을 분리하였다.

[0076] 구체적으로, 상기 <실시예 1>의 중간엽줄기세포 2×10^6 개를 세포 배양 플레이트에서 배양하였다. 그다음, 상기 <실시예 2 및 3>에서 제조한 PCS 나노입자를 상기 배양한 중간엽줄기세포에 24시간 동안 처리한 후, 자기력을 24시간 동안 가하였다. 이후, 세포배양 배지(cell culture media)를 회수하여 2,000 xg의 원심력으로 30분 동안 원심분리한 후, 상층액을 새로운 튜브로 옮겼다. 새로운 튜브로 옮긴 상층액에 0.5 볼륨(volume)의 엑소좀 분리 시약(cat.4478359, Thermo-fisher Scientific, US)을 첨가하고, 볼텍싱(vortexing) 또는 피펫팅(pipetting)으로 혼합하였다. 상기 혼합물을 6℃에서 밤새 배양한 후, 10,000 xg의 원심력으로 1시간 동안 6℃에서 원심분리하고, 상층액을 버리고 튜브의 바닥에 가라앉은 펠렛(pellet)을 회수하였다. 이후 회수한 펠렛은 1X PBS에 재현탁(re-suspended)하고, -20℃에서 장기간 보관하였다.

[0078] <실시예 5> 투과 전자 현미경(Transmission Electron Microscopy, TEM)

[0079] 세포를 4℃에서 2시간 동안 2.5 %의 글루타르알데하이드(glutaraldehyde)에 고정시키고, 2 % 한천(agar)으로 굳혔다. 이후 0.1 M의 카코딜레이트 완충액(cacodylate buffer)으로 세척한 뒤, 1 %의 오스뮴 테트록사이드(osmium tetroxide, OsO_4)에 고정시켰다. 탈수 단계는 50 내지 100 %의 에탄올을 사용하여 실시되고, 에폰 레진(Epon resin)에 내장되었다. 초박절편(ultrathin sections)은 초마이크로톰(ultramicrotome)을 사용하여 절단하고, 우라닐 아세테이트(uranyl acetate) 및 납 시트레이트(lead citrate)를 사용하여 염색하였다. 그다음, 63 kV 조건에서 TEM을 사용하여 관찰하였다.

[0081] <실시예 6> 웨스턴 블롯(Western blot)

[0082] 상기 <실시예 4>에서 엑소좀을 제조한 후, 엑소좀의 특이적 마커(specific markers)를 엑소좀 단백질에 의해 측정하였다. CD9(ab92726, Abcam, US), CD63(ab216130, Abcam, US) 및 CD81(ab109201, Abcam, US)에 대한 1차 항체(primary antibodies)가 1:1000으로 사용되었고, 염소 항-토끼 면역글로불린 G(Goat anti-rabbit immunoglobulin G, Goat anti-rabbit IgG)는 2차 항체(secondary antibody)로 사용되었다. SPSS(Statistical Package for the Social Science)(SPSS Inc., US)를 사용하여 엑소좀 단백질의 발현 수준을 측정하고 표준화하였다.

[0084] <실시예 7> 통계 분석

[0085] SPSS 통계 패키지 버전 21.0(SPSS statistical package version 21.0, SPSS Inc., US)을 사용하여 통계 분석을 수행하였다. 연속 변수(continuous variables)의 기술적 결과(descriptive results)는 정규 분포 변수(normally distributed variables)의 평균(mean) \pm 표준 편차(standard deviation, SD)로 표현하였다. 평균은 이원분산분석(two-way analysis of variance)을 이용해 비교하였고, 통계적 유의 수준은 0.05이다.

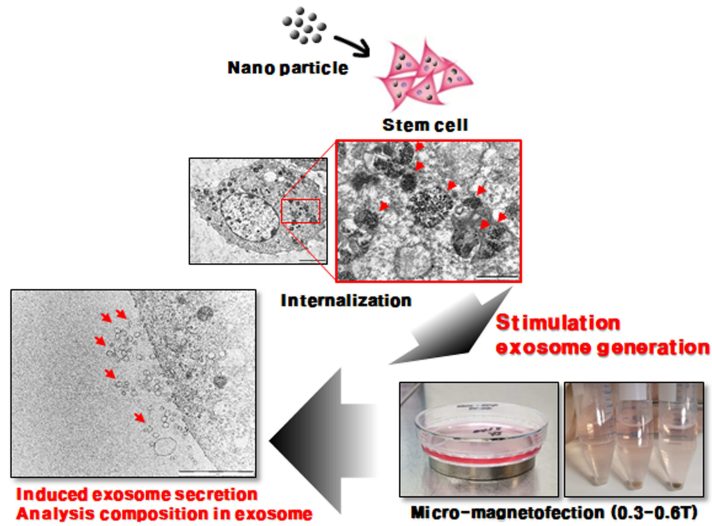
[0087] <실시예 1> PCS 나노입자의 특성 확인

- [0088] 상기 <실시예 3>에 따라 제조한 양전하로 표면 개질된 PCS 나노입자의 크기 및 표면 전하를 분석하였다.
- [0089] 구체적으로, 상기 <실시예 3>에 따라 제조한 양전하로 표면 개질된 PCS 나노입자의 크기 및 표면 전하를 DLS(dynamic light scattering) Zetasizer Nano-ZS90(Malvern Instruments Ltd., UK)로 측정하였다.
- [0090] 또한, 상기 PCS 나노입자를 카보닐-코팅된 400 메시 구리 그리드(CF400-CU-UL, Electron Microscopy Sciences, US)에 15분 동안 놓았다. 그다음, 2 % 우라닐 아세테이트 10 μ l를 상기 그리드 상에 10분간 둔 후, 건조하여 음성 염색하였다. 그다음, 전자현미경(JEM-2100F, JEOL Ltd, Japan)을 이용하여 63 kV 조건에서 TEM(transmission electron microscopic) 이미지를 획득하여 나노입자의 구조를 확인하였다. 또한, 전자현미경을 이용하여 SEM(scanning electron microscopic) 이미지를 획득하여 나노입자의 형태를 확인하였다.
- [0091] 그 결과, 도 3a 내지 도 3d에 나타난 바와 같이, 양전하로 표면 개질된 PCS 나노입자가 도 2에 나타난 바와 같이 PLGA와 산화철 나노입자가 응집된 클러스터(cluster) 형태를 나타내고, 양전하를 띠고 있음을 확인하였다. 이에 상기 PCS 나노입자를 고분자-자성 나노입자 클러스터로 명명하였고, 상기 양전하로 표면 개질된 PCS 나노입자는 양전하로 표면 개질된 고분자-자성 나노입자 클러스터로, 음전하로 표면 개질된 PCS 나노입자는 음전하로 표면 개질된 고분자-자성 나노입자 클러스터로 명명하였다.
- [0093] <실험예 2> 고분자-자성 나노입자 클러스터의 표면 전하 및 농도에 따른 엑소솜의 생성 정도 확인
- [0094] 고분자-자성 나노입자 클러스터의 표면 전하 및 농도에 따른 엑소솜의 생성 정도를 확인하기 위해, 상기 <실시예 2 및 3>에서 제조한 양전하/음전하로 표면 개질된 고분자-자성 나노입자 클러스터를 농도를 달리하여 중간엽줄기세포에 처리하고 미세자성을 가한 후 중간엽줄기세포에서 생성되는 엑소솜의 생성량을 분석하였다.
- [0095] 구체적으로, 상기 <실시예 4>에 기재된 방법과 동일한 방법으로 상기 <실시예 3>에서 제조한 양전하로 표면 개질된 고분자-자성 나노입자 클러스터를 40 μ g/ml 농도로 중간엽줄기세포에 처리하고, 0.3 T, 0.4 T, 0.6 T 및 1.0 T 세기의 자기력을 가하였다. 그다음, 상기 <실시예 5>에 기재된 방법과 동일한 방법으로 TEM 관찰을 통해 중간엽줄기세포로부터 엑소솜의 생성량을 분석하였다.
- [0096] 또한, 상기에 기재된 방법과 동일한 방법으로 상기 <실시예 3>에서 제조한 양전하로 표면 개질된 고분자-자성 나노입자 클러스터를 20, 40 및 60 μ g/ml 농도로 처리하고 자기력을 가한 후 중간엽줄기세포로부터 엑소솜의 생성량을 분석하였다.
- [0097] 대조군으로 고분자-자성 나노입자 클러스터를 무처리한 중간엽줄기세포를 이용하였다.
- [0098] 그 결과, 도 4 및 도 5에서 나타난 바와 같이, 음전하로 표면 개질된 고분자-자성 나노입자 클러스터를 처리하였을 때는 엑소솜이 발생되지 않았지만, 양전하로 표면 개질된 고분자-자성 나노입자 클러스터를 처리하였을 때는 엑소솜의 발생이 유도되었고, 양전하로 표면 개질된 고분자-자성 나노입자 클러스터의 농도가 높아질수록 그 양 또한 증가되는 것을 관찰할 수 있었다(도 4). 특히, 양전하로 표면 개질된 고분자-자성 나노입자 클러스터를 처리한 경우 자기력에 의해 단시간에 많은 양의 나노입자 클러스터가 유입되고, 엔도시토시스(endocytosis)에 의해 유입된 나노입자 클러스터는 엑소솜을 거쳐 리소솜으로 이동하는 것을 확인하였다. 또한, 리소솜 내에서 나노입자 클러스터는 그대로 있고, 엑소솜의 생성량만 증가하며, 생성되는 엑소솜은 91 내지 169 nm의 크기를 가지고 있는 것으로 나타났다(도 5).
- [0100] <실험예 3> 자기력 세기에 따른 엑소솜의 생성 정도 확인
- [0101] 자기력 세기에 따른 엑소솜의 생성 정도를 확인하기 위해, 상기 <실시예 3>에서 제조한 양전하로 표면 개질된 고분자-자성 나노입자 클러스터를 중간엽줄기세포에 처리하고 미세자성을 세기를 달리하여 가한 후 중간엽줄기세포에서 생성되는 엑소솜의 생성량을 분석하였다.
- [0102] 구체적으로, 상기 <실험예 3>에 기재된 방법과 동일한 방법으로 상기 <실시예 3>에서 제조한 양전하로 표면 개질된 고분자-자성 나노입자 클러스터를 20, 40 및 60 μ g/ml 농도로 처리하고 0.3 T, 0.4 T, 0.6 T 및 1.0 T 세기의 자기력을 가한 후 상기 <실시예 5>에 기재된 방법과 동일한 방법으로 웨스턴 블롯을 수행하여 엑소솜 단백질 발현량을 측정하였다.
- [0103] 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이, 자기력에 노출되는 동안 엑소솜 특이적 마커인 CD9, CD63 및 CD81의 발현이 모두 증가된 수준으로 나타나고, 가하는 자기력 세기가 강할수록 발현 또한 증가되는 것을 관찰할 수 있었다(도 6).
- [0105] 상기 결과들을 통해 나노입자 클러스터의 표면 개질이 제타-전위에 의해 차이를 일으키며, 음성(negative)의 성

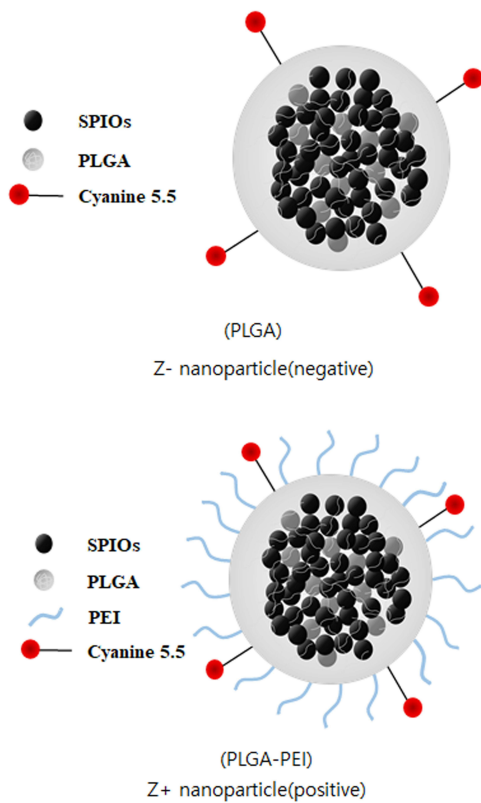
질보다는 양성(positive)의 성질을 가질수록 더 많은 양의 나노입자 클러스터가 줄기세포 내부로 유입되며, 이에 따라 자기력을 가했을 때 엑소좀의 생성량이 증가함을 알 수 있다.

도면

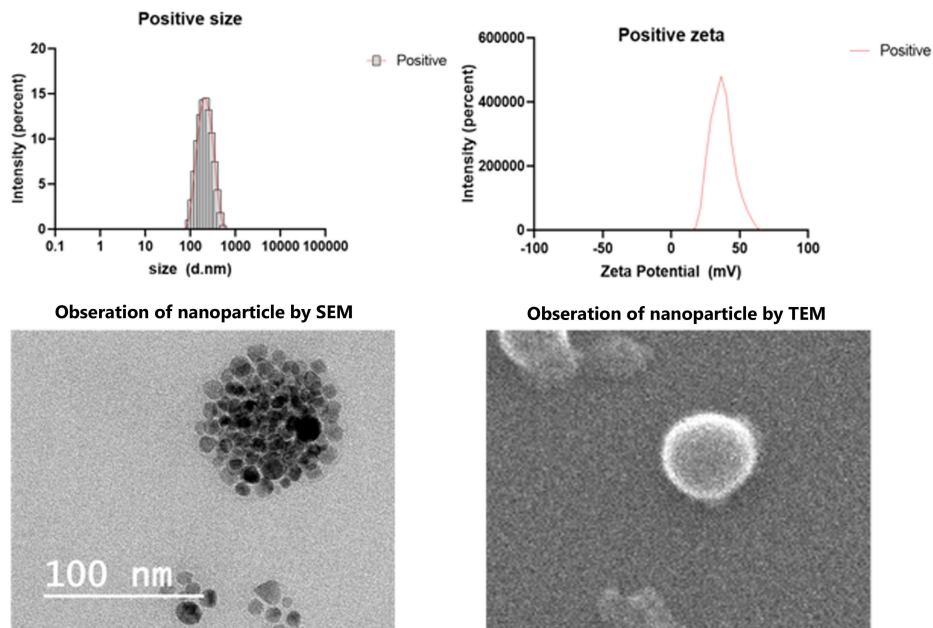
도면1



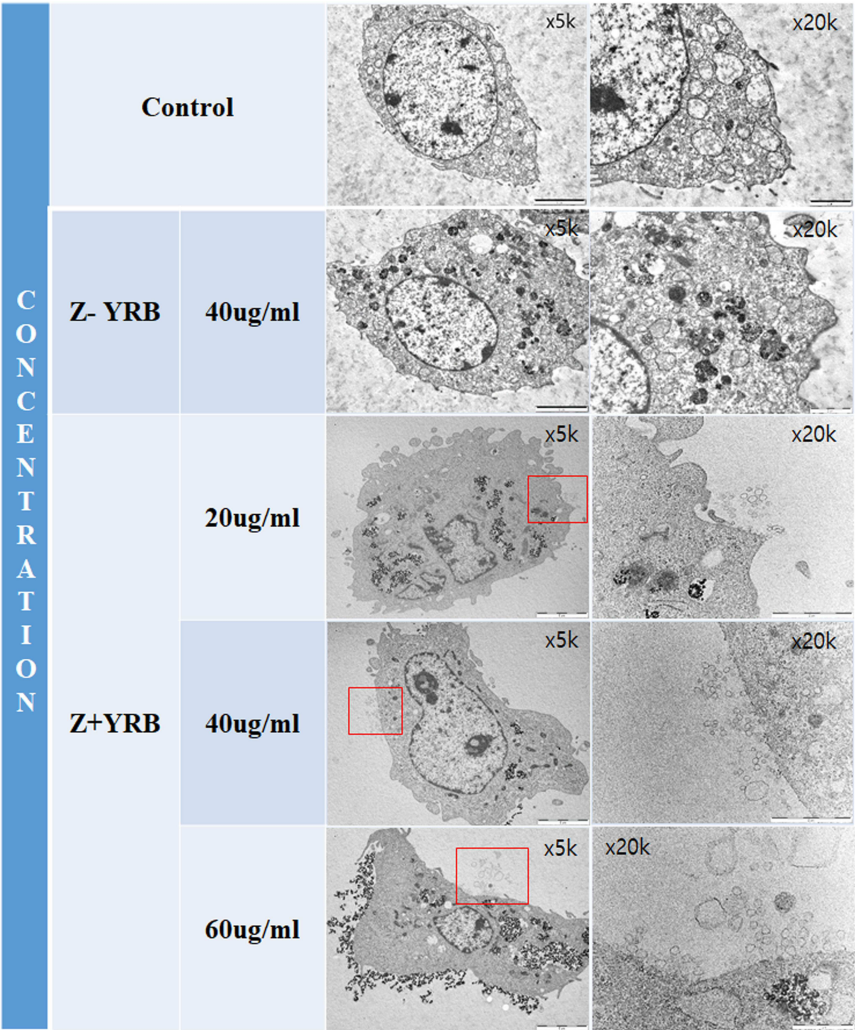
도면2



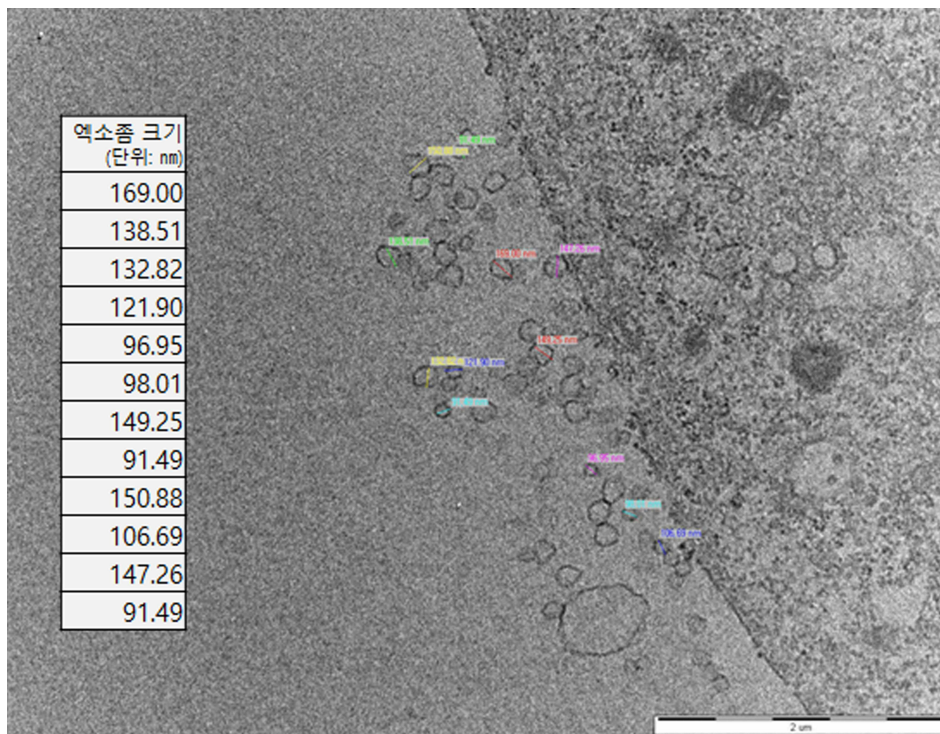
도면3



도면4



도면5



도면6

