

명세서

발명의 명칭: 피부 유래 엑소솜을 통해 근손실 억제 또는 근생성 촉진 효과를 나타내는 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 세포외 소포체에서 마이크로RNA-26a(miRNA-26a)의 수준을 증가시키는 조성물 및 상기 조성물을 포함하되, 피부 유래 엑소솜을 통해 근손실 억제 또는 근생성 촉진 효과를 나타내는 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 근육(muscle)은 사람의 운동 능력 기관으로서의 역할뿐만 아니라 뼈와 혈관, 신경, 간, 심장, 췌장 등 신체 전반에 걸쳐 영향을 미친다. 뼈는 근육에 의해 당겨지고 밀어지면서 그 힘에 의해 밀도를 유지하기 때문에 근육이 힘을 잃으면 뼈도 약해져 골다공증이 생기기 쉽다. 또, 근육이 줄어들면 근육에서 만들어지는 여러 가지 물질의 영향으로 새로운 혈관과 신경이 생겨나는 것을 방해하며, 궁극적으로는 인지기능 저하를 유발할 수 있다.
- [3] 근육 손실 또는 근감소는 대략 30세에 시작되어 평생 동안 진행되는 과정으로 이 과정에서 근육 조직량, 근섬유의 수 및 크기가 점진적으로 감소한다. 근손실의 결과는 근육량과 근력의 점진적인 소실이다. 경증의 근력 손실은 일부 관절(예: 무릎)에 대한 스트레스를 증가시키며, 관절염 또는 낙상에 취약하게 만들 수 있다. 또한, 빠르게 수축하는 근섬유가 느리게 수축하는 근섬유보다 노화의 영향을 많이 받는다. 따라서 노화가 진행됨에 따라 근육의 빠른 수축이 어려워지며, 이로 인해 생활의 불편함이 초래된다.

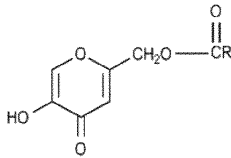
발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [4] 상기와 같은 상황에서 본 발명자들은 섬유아세포에 특정 물질을 처리하면 세포에서 분비되는 엑소솜에서 마이크로RNA-26a(miRNA-26a)의 수준이 증가되고, 상기 엑소솜이 근감소에 관여하는 유전자의 발현은 감소시키는 반면, 근생성에 관여하는 유전자의 발현은 증가시키는 것을 확인하였다.
- [5] 따라서, 본 발명의 목적은 베타인 (betaine), 동백나무꽃 추출물, 카멜리아사이드 A (camelliaside A), 미리세틴 (myricetin), 나린제닌 (Naringenin), 노빌레틴 (nobiletin), 코질카복시다이펩타이드-23 (Kojyl carboxy dipeptide-23), L-카르노신 (L-carnosine) 및 카퍼트라이펩타이드 (copper Tripeptide)로 이루어진 군에서 선택되는 물질 또는 이들의 조합을 포함하는, 세포외 소포체에서 마이크로RNA-26a(miRNA-26a)의 수준을 증가시키는 조성물을 제공하는 것이다.
- [6] 본 발명의 다른 목적은 상기 조성물을 유효성분으로 포함하고, 피부 유래 엑소솜을 통해 근손실 억제 또는 근생성 촉진 효과를 나타내는 조성물을

제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [7] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명의 일 양상은 베타인, 동백나무꽃 추출물, 카멜리아사이드 A, 미리세틴, 나린제닌, 노빌레틴, 코질카복시다이펩타이드-23, L-카르노신 및 카퍼트라이펩타이드로 이루어진 군에서 선택되는 물질 또는 이들의 조합을 유효성분으로 포함하는, 세포외 소포체에서 마이크로RNA-26a의 수준을 증가시키는 조성물(이하, 마이크로RNA-26a 수준 증가용 조성물로 기재함)을 제공한다.
- [8] 베타인은 트리메틸글라이신(trimethylglycine, TMG)으로도 불리우며, 사탕수수, 비트, 구기자 등의 식물에 다량 함유되어 있고, 피부 보습력이 뛰어난 것으로 알려져 있어 화장품 원료로 사용되고 있다. 미리세틴은 산화방지제, 피부컨디셔닝제 등으로 사용되고, 나린제닌 또한 피부컨디셔닝제로 사용되는 화장품 원료이다.
- [9] 코질카복시다이펩타이드-23은 산화방지제, 금속이온봉쇄제, 피부보호제 기능을 하는 하기 구조를 갖는 화합물이다:
- [10] [화학식 1]
- [11]
- 
- [12] 상기 화학식 1에서 R은 다이펩타이드-23이다.
- [13] 카퍼트라이펩타이드는 트라이펩타이드의 구리복합체(GHK-Cu)로 피부 컨디셔닝제로 사용되며, 카멜리아사이드 A는 녹차(*Camellia sinensis*)에 포함된 성분으로 주름 개선 효과가 있는 것으로 알려져 있다 (국내 등록특허 제10-0757175호). 또한, 노빌레틴은 감귤 과피에 다량으로 존재하는 폴리페톡시 플라본으로 항염 효과가 우수한 것으로 알려져 있다 (국내 공개특허 제2018-0046245호).
- [14] L-카르노신은 히스티니과 알라닌의 두 가지 아미노산으로 구성되어 있는 디펩타이드로 항산화, 항당뇨 활성을 갖는 것으로 알려져 있어 영양제, 보충제로 사용되고 있다.
- [15] 상기 기재한 바와 같이 본 발명의 조성물에 사용되는 물질들은 화장품, 영양제 원료이거나 또는 천연물에서 유래한 것이므로 인체에 사용해도 안전하다.
- [16] 본 발명에서 사용된 용어, "추출물"은 추출 처리에 의하여 얻어지는 추출액, 상기 추출액의 희석액이나 농축액, 상기 추출액을 건조하여 얻어지는 건조물, 상기 추출액의 조정제물이나 정제물, 또는 이들의 혼합물 등 추출액 자체 및 추출액을 이용하여 형성 가능한 모든 제형의 추출물을 포함한다. 본 발명의 상기 추출물은, 상기 각각의 해당 식물의 천연, 잡종 또는 변종 식물로부터 추출될 수

있고, 식물 조직 배양물로부터도 추출이 가능하다.

- [17] 상기 동백나무꽃 추출물의 추출 방법은 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용하는 방법에 따라 추출될 수 있다. 상기 추출 방법의 비제한적인 예로는, 용매 추출법, 열수 추출법, 초음파 추출법, 여과법, 환류 추출법 등을 들 수 있으며, 이들은 단독으로 수행되거나 2종 이상의 방법을 병용하여 수행될 수 있다.
- [18] 상기 동백나무꽃 추출물에 사용되는 추출 용매는 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술 분야에서 공지된 임의의 용매를 사용할 수 있다. 구체적으로 동백나무꽃 추출물은 물, 에틸아세테이트, 디클로로메탄, 탄소수 1 내지 4의 알코올 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 용매로 추출될 수 있으며, 바람직하게는 에탄올을 용매로 하여 추출될 것일 수 있다.
- [19] 액상의 동백나무꽃 추출물은 감압여과 등의 방법으로 식물의 건조 과채물과 분리된 후 농축 또는 건조의 과정을 거칠 수 있다. 예를 들어, 상기 액상의 추출물을 진공회전농축기로 감압농축한 농축액일 수 있고, 상기 액상의 추출물을 건조하여 분말화된 추출물을 얻을 수도 있다. 이렇게 농축 또는 분말화된 추출물은 필요에 따라 물, 알코올, DMSO(dimethyl sulfoxide) 또는 이들의 혼합용매에 가용하여 사용될 수 있다.
- [20] 본 발명자들은 피부 섬유아세포에 상기 물질을 각각 처리하여 배양한 후 엑소좀을 분리하면 상기 물질을 처리하지 않은 경우와 비교하여 엑소좀에서 마이크로RNA-26a(miRNA-26a)의 수준이 증가되는 것을 확인하였다(표 1). 따라서, 상기 세포의 소포체는 이에 제한되지는 않으나, 섬유아세포, 구체적으로 피부 섬유아세포에서 분비되는 것일 수 있다.
- [21] 본 명세서에 사용된 용어, "세포외 소포체(extracellular vesicle)"는 단백질, 지질, 핵산 등의 물질을 세포 사이에 교환할 수 있게 하여 생리적 신호 전달의 매개체 역할을 하는 매우 작은 크기의 세포 외부 방출 소낭을 말하며, 거의 모든 세포가 세포외 소포체를 분비한다. 크기와 생성 과정에 따라 크게 엑소좀(exosome)과 미세소낭(microvesicle, 마이크로베지클)로 분류된다. 생성 과정을 보면 엑소좀은 세포 내부에서 소낭이 생성되어 세포막이 안쪽으로 접히면서 분비되며 크기가 30 내지 200 nm 정도이고, 미세소낭은 세포막이 바깥으로 튀어나와 분리되면서 세포 밖으로 분비되며 크기가 50 내지 1000 nm 정도이다.
- [22] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 세포외 소포체는 엑소좀일 수 있다.
- [23] 본 발명의 구체예에 따르면, 상기 마이크로RNA-26a 수준 증가용 조성물은 유효성분(피부 유래 엑소좀 분비 촉진 물질)을 조성물의 총 중량 대비 0.00001 wt% 이상으로 포함할 수 있다. 보다 구체적으로는 유효성분을 조성물의 총 중량 대비 0.00001 wt% 이상, 0.0001 wt% 이상, 0.0005 wt% 이상, 0.001 wt% 이상, 0.005 wt% 이상, 0.01 wt% 이상, 0.05 wt% 이상, 0.1 wt% 이상, 0.5 wt% 이상, 1.0 wt% 이상, 5.0 wt% 이상, 10 wt% 이상 또는 50 wt% 이상이고, 70 wt% 이하로 포함하는 것일 수 있다. 바람직하게는, 상기 조성물은 유효성분을 0.00001 wt%

내지 10 wt% 또는 0.005 내지 10 wt%로 포함하는 것일 수 있다.

- [24]
- [25] 본 발명의 다른 양상은 상기 마이크로RNA-26a 수준 증가용 조성물을 유효성분으로 포함하는 근손실 억제 또는 근생성 촉진용 조성물을 제공한다.
- [26] 이미 기재한 바와 같이, 상기 마이크로RNA-26a 수준 증가용 조성물을 세포, 구체적으로 피부세포에 처리하면 마이크로RNA-26a의 수준이 증가된 세포의 세포체, 구체적으로 엑소좀을 얻을 수 있다.
- [27] 한편, 엑소좀은 세포 간 커뮤니케이션 수단으로 사용된다고 잘 알려져 있다. 예를 들어 뼈 속의 줄기세포에서 분비된 엑소좀이 심장에 도착하여 신호를 전달하거나 하는 식이다. 몸 속 장기들간의 신호 전달은 주로 호르몬이 담당한다고 알려져 있던 과거에 비해, 최근에는 엑소좀 역시 장기들 사이의 신호 전달에 사용된다고 밝혀졌다. 피부는 신체의 가장 큰 장기이므로 엑소좀 분비가 매우 활발할 것으로 예상되나 피부에서 분비되는 엑소좀의 역할에 대한 연구는 많이 되어 있지 않다.
- [28] 엑소좀의 이러한 커뮤니케이션 기능은 본 발명에서도 확인할 수 있다. 구체적으로 근섬유세포에 베타인 등의 물질을 직접 처리하면 근손실 및 근생성 관련 유전자의 발현에 유의미한 변화가 없으나, 상기 물질을 처리하여 획득한 miRNA-26a의 수준이 증가된 엑소좀을 처리하면 유의미한 수준으로 근손실 관련 유전자의 발현은 감소하고, 근생성 관련 유전자의 발현은 증가하는 것을 확인하였다 (도 4 내지 7, 도 9 및 10). 이러한 실험 결과는 섬유아세포에서 유래하고, miRNA-26a의 수준이 증가된 엑소좀이 근섬유세포에서 근생성 촉진 및 근손실 억제 관련 신호 전달에 관여한다는 것을 의미한다.
- [29] 상기 근손실 관련 유전자는 머프1(MURF1), 아트로진-1(atrogin-1) 및 마이오스타틴 (myostatin)으로 이루어진 군에서 선택되고, 근생성 관련 유전자는 마이오디(myoD)일 수 있다.
- [30] 본 발명의 근손실 억제 또는 근생성 촉진용 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로든 제조될 수 있으며, 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 젤, 크림, 로션, 파우더, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등으로 제형화될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 상세하게는, 본 발명의 조성물은 섬유아세포에 작용하므로 크림, 로션, 연고 또는 젤의 제형을 가질 수 있으며, 피부 외용제 형태로 사용될 수 있다. 이러한 제형의 조성물은 당해 분야의 통상적인 방법에 따라 제조될 수 있다.
- [31] 본 발명의 근손실 억제 또는 근생성 촉진용 조성물은 유효성분 이외에 일반적인 화장품 조성물에 포함되는 성분을 추가로 포함할 수 있다. 포함될 수 있는 배합 성분으로는 보습제, 에몰리엔트제, 계면 활성제, 유기 및 무기안료, 유기 분체, 자외선 흡수제, 방부제, 살균제, 산화 방지제, 식물 추출물, pH 조절제, 알코올, 색소, 향료, 혈행촉진제, 냉감제, 제한제 정제수 등을 들 수 있다.

- [32] 본 발명의 제형이 크림 또는 젤인 경우에는 담체 성분으로 동물섬유, 식물섬유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.
- [33] 본 발명의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄히드록시드, 칼슘 스테arate 또는 폴리아미드파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진제를 포함할 수 있다.
- [34] 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액의 경우에는 담체 성분으로 용매, 용매화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸카보네이트, 에틸아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다.
- [35] 본 발명의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상 희석제 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타하드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다.
- [36]
- [37] 본 발명의 또 다른 양상은 상기 마이크로RNA-26a 수준 증가용 조성물을 유효성분으로 포함하는 근육 감소 관련 근육 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [38] 상기 근육 감소 관련 근육 질환은 근감소증(Sarcopenia), 근위축증(muscular atrophy), 근이영양증(muscular dystrophy) 및 근무력증으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [39] 근감소증은 영양 부족, 운동량 감소, 노화 등으로 인해 정상적인 근육의 양과 근력 및 근기능이 감소하는 질환을 말하며, 근위축증은 유전 등의 원인으로 인해 대칭적인 근육의 약화나 소실이 나타나는 임상적, 유전학적으로 다양한 질환군을 의미한다.
- [40] 근이영양증 또는 근디스트로피(muscular dystrophy, MD)는 운동기를 약화시키고 운동 능력을 방해하는 근육병증으로 점진적으로 골격근이 약화되고, 근육 단백질이 결핍되며, 근육 세포와 조직이 괴사되는 특징이 있다. 근무력증은 근육의 힘이 비정상적으로 약해지거나 피로해지는 질환으로 제대로 치료를 받지 않으면 갑작스럽게 근력약화가 심해질 수 있고 심한 경우에 호흡근육까지 약해져서 호흡마비가 초래될 수도 있다.
- [41] 상기 약학적 조성물에서 언급된 용어 또는 요소 중 상기 마이크로RNA-26a 수준 증가용 조성물에 대한 설명에서 언급된 것과 같은 것은, 청구된 마이크로RNA-26a 수준 증가용 조성물에 대한 설명에서 언급된 바와 같은

것으로 이해된다.

- [42] 본 발명의 약학적 조성물은 유효성분 이외에 약학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있다. 이때, 약학적으로 허용되는 담체는 제제시 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아, 고무, 인산칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세 결정성 셀룰로스, 폴리비닐 피로리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필 히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [43] 본 발명의 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여(예를 들어, 피부 도포, 정맥 내, 피하, 복강 내 주사 또는 국소에 적용)할 수 있으나, 비경구 투여인 것이 바람직하다.
- [44] 경구 투여의 목적으로 본 발명의 유효성분을 정제, 캡셀제, 추잉정, 분말제, 액제, 현탁제 등의 제제로 제형화하는 경우, 아라비아 고무, 옥수수 전분, 미세결정질 셀룰로오스 또는 젤라틴과 같은 결합제, 인산이칼슘 또는 락토스와 같은 부형제, 알긴산, 옥수수 전분 또는 감자 전분과 같은 붕해제, 스테아르산마그네슘과 같은 활택제, 슈크로스 또는 사카린과 같은 감미제 및 페퍼민트, 메틸 살리실산염 또는 과일향과 같은 향미제가 포함될 수 있다.
- [45] 또한, 상기 비경구 투여 형태로는 경피 투여형 제형일 수 있으며, 예를 들어 주사제, 점착제, 연고, 로션, 젤, 크림, 스프레이, 현탁제, 유제, 좌제, 패취 등의 제형일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [46] 또한, 상기 약학 조성물은 피부 외용제 형태일 수 있으며, 상기 피부 외용제는 피부 외부에서 도포되는 어떠한 것이라도 포함할 수 있는 총칭으로서 다양한 제형의 의약품이 여기에 포함될 수 있다.
- [47] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서 '약학적으로 유효한 양'은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 약학적 조성물은 1 $\mu\text{g/kg}$ 내지 200 mg/kg , 바람직하게는 50 $\mu\text{g/kg}$ 내지 50 mg/kg 용량으로 1일 1회, 또는 1일 3회로 분할하여 투여할 수 있다. 상기 투여량은 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것이 아니다.
- [48] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

- [49]
- [50] 본 발명의 또 다른 양상은 세포에 베타인, 동백나무꽃 추출물, 카멜리아사이드 A, 미리세틴, 나린제닌, 노빌레틴, 코질카복시다이펩타이드-23, L-카르노신 및 카퍼트라이펩타이드로 이루어진 군에서 선택되는 물질 또는 이들의 조합을 세포에 처리하여 얻어지는 세포의 소포체를 유효성분으로 포함하는 조성물(이하, 세포의 소포체 조성물로 기재함), 상기 세포의 소포체 조성물을 유효성분으로 포함하는 근손실 억제 또는 근생성 촉진용 조성물을 제공한다.
- [51] 본 발명자들은 피부 유래 섬유아세포에 상기 기재된 물질들을 처리하면 섬유아세포에서 분비되는 엑소솜에서 마이크로RNA-26a의 수준이 증가되는 것을 확인하였고, 상기 엑소솜이 근손실 억제 또는 근생성 촉진 효과를 갖는 것을 확인하였다(도 4 내지 7, 9 및 10).
- [52] 상기 세포의 소포체 조성물에서 언급된 용어 또는 요소 중 상기 마이크로RNA-26a 수준 증가용 조성물에 대한 설명에서 언급된 것과 같은 것은, 청구된 마이크로RNA-26a 수준 증가용 조성물에 대한 설명에서 언급된 바와 같은 것으로 이해된다.
- [53]
- [54] 본 발명의 또 다른 양상은 하기 단계를 포함하는 마이크로RNA-26a의 수준이 증가된 세포의 소포체를 생산하는 방법을 제공한다:
- [55] 세포에 베타인, 동백나무꽃 추출물, 카멜리아사이드 A, 미리세틴, 나린제닌, 노빌레틴, 코질카복시다이펩타이드-23, L-카르노신 및 카퍼트라이펩타이드로 이루어진 군에서 선택되는 물질 또는 이들의 조합을 처리하는 단계; 및
- [56] 세포 배양 배지로부터 세포의 소포체를 회수하는 단계.
- [57] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 세포는 피부 유래 섬유아세포이고, 상기 세포의 소포체는 엑소솜일 수 있으나 이에 제한되지 아니한다.
- [58] 한편, 세포 배양액으로부터 세포의 소포체 및/또는 엑소솜을 분리하는 방법은 실시예 1-2에 개시된 바와 같다. 그러나 세포 배양액으로부터 세포의 소포체 및/또는 엑소솜을 분리하는 방법으로는 전술한 바와 같은 분리 방법 외에도 당업계에 알려진 다양한 방법을 이용할 수 있다.
- [59] 예를 들어, 세포의 소포체 및/또는 엑소솜의 분리를 위해, 초미세여과법 (ultrafiltration), 밀도구배원심법 (density gradient centrifugation), 접선흐름여과법 (Tangential flow Filtration), 크기 배제 크로마토그래피 (size exclusion chromatography), 이온 교환 크로마토그래피 (ion exchange chromatography), 면역친화성 분리법 (immunoaffinity capture), 미세유체기술분리법 (microfluidics-based isolation), 침전법 (exosome precipitation), 또는 폴리머 기반 침전법 (polymer based precipitation) 등 공지된 분리방법을 사용할 수 있다. 그러나 엑소솜 분리 방법은 전술한 바와 같은 방법들에 제한되는 것이 아니며, 당 업계에서 사용되고 있거나 향후 사용될 수 있는 다양한 분리 방법이 채택 가능한 것임은 물론이다.

발명의 효과

- [60] 본 발명의 일 예에 따른 세포의 소포체에서 마이크로RNA-26a의 수준을 증가시키는 조성물을 이용하면 마이크로RNA-26a의 수준이 증가된 엑소좀을 제조할 수 있다. 상기 엑소좀은 근감소에 관여하는 바이오마커인 머프1(MURF1), 아트로진-1(atrogin-1), 마이오스타틴 (myostatin)의 발현은 감소시키고, 근생성에 관여하는 마이오디(myoD)의 발현은 증가시킬 수 있으므로 상기 세포의 소포체에서 마이크로RNA-26a의 수준을 증가시키는 조성물은 근소멸 근손실 억제 또는 근생성 촉진 용도로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [61] 도 1은 섬유아세포(A) 및 근섬유세포(B)에 서로 다른 농도의 베타인을 처리한 후 세포 생존율을 확인한 결과이다.
- [62] 도 2는 근섬유세포에 형광 표지된 섬유아세포 유래 엑소좀을 처리한 후 세포 내로 흡수되는지 여부를 확인한 결과이다.
- [63] 도 3은 서로 다른 농도의 베타인을 처리하여 분리한 섬유아세포 유래 엑소좀에서 miRNA-26a의 수준을 확인한 결과이다.
- [64] 도 4는 근섬유세포에 베타인 또는 섬유아세포 유래 엑소좀을 처리한 후 근손실 마커인 머프1, 아트로진1 및 마이오스타틴의 발현 수준을 확인한 결과이다.
- [65] 도 5는 근섬유세포에 베타인 또는 섬유아세포 유래 엑소좀을 처리한 후 근생성 마커인 MyoD의 발현 수준을 확인한 결과이다.
- [66] 도 6은 근섬유세포에 베타인 또는 섬유아세포 유래 엑소좀을 처리한 후 근손실 마커인 머프1, 아트로진1 및 마이오스타틴의 단백질 수준을 확인한 결과이다.
- [67] 도 7은 근섬유세포에 베타인 또는 섬유아세포 유래 엑소좀을 처리한 후 근생성 마커인 MyoD의 단백질 수준을 확인한 결과이다.
- [68] 도 8은 근섬유세포에 텍사메타손을 처리한 후 miRNA-26a 유사체의 처리 농도에 따른 머프1 및 MyoD의 발현 수준을 확인한 결과이다.
- [69] 도 9는 섬유아세포에 동백나무꽃 추출물을 처리한 후 분리한 엑소좀에서 miRNA-26a의 수준을 확인한 결과이다.
- [70] 도 10은 동백나무꽃 추출물 또는 동백나무꽃 추출물을 처리한 섬유아세포에서 분리한 엑소좀을 근섬유세포에 처리한 후 근손실 마커인 머프1(A) 및 마이오스타틴(B)의 발현 수준을 확인한 결과이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [71] 이하 하나 이상의 구체예를 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 하나 이상의 구체예를 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[72]

- [73] 실시예 1: 엑소좀 분리 및 분석

[74] **1-1. 베타인의 세포 독성 확인**

[75] 사람 피부 진피세포는 성인 샘플에서 분리된 Normal Human Dermal Fibroblasts (NHDF, 섬유아세포)를 LONZA (Cat. CC-2511)에서 구입하였다. 근섬유세포는 C3H 마우스로부터 분리 배양한 근원세포(myoblast)인 C2C12 세포를 ATCC(CRL-1772)에서 구입하였다.

[76] 96-웰 플레이트(well plate)에 계대 배양한 passage 27인 사람 진피세포(human fibroblast) HS68(이하, FB로 기재함) 또는 C2C12를 1×10^4 개/웰 농도로 접종하여 5% CO₂, 37°C 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 세포에 상이한 농도의 베타인을 처리하여 24시간 동안 추가로 배양하고, 대조군 (control)으로는 무처리군을 사용하였다. PBS로 세포를 세척한 후, CCK-8 (DONGJIN, CK04-11)으로 2시간 추가 배양하였으며, 마이크로플레이트 리더기 (microplate reader)로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 결과에서 대조군의 값을 100으로 하여 베타인 처리 농도에 따른 상대적인 세포 생존율을 계산하였다.

[77] 그 결과, 베타인을 처리하여도 FB 및 C2C12의 생존율에 변화가 없는 것을 확인하였다 (도 1의 A 및 B).

[78]

[79] **1-2. 엑소좀 분리**

[80] 계대 배양한 passage 27인 FB에 베타인을 48시간 동안 처리한 배지를 모아 3000xg에서 30분 동안 원심분리하였다. 원심분리 후 상층액만 회수하여 Ultra-15 Centrifugal Filter Units (Amicon®, MERCK, C7715)로 옮겨 담고, 4000xg에서 40분 동안 원심분리하였다. 상층액만 회수하여 Total Exosome Isolation Reagent (Invitrogen, Cat No #4478539)를 상층액 부피의 1/2만큼 첨가하여 4°C에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 다음날 10000xg에서 1시간 동안 원심분리하고, 상층액을 석션(suction)으로 제거한 후 최종 엑소좀 펠렛은 PBS에 재현탁시켰다. 본 실시예에서 수득한 엑소좀은 이하에서 "섬유아세포 유래 엑소좀"으로 기재한다.

[81] 섬유아세포(FB) 유래 엑소좀의 크기를 확인하기 위해 Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, UK)로 동적 광산란(dynamic light scattering)을 측정하였고 측정 결과는 Dynamic V6 software로 분석하였다.

[82] 분석 결과, 섬유아세포 유래 엑소좀의 크기는 50 내지 150 nm 범위인 것으로 나타났다.

[83] 또한, 섬유아세포(FB) 유래 엑소좀 정량을 위해 EXOCET Exosome Quantitation Kit (System Biosciences, USA)로 405nm에서 흡광도를 측정하였다.

[84] 분석 결과를 바탕으로 모든 실험군에 섬유아세포 유래 엑소좀을 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 처리하였다.

[85]

[86] **1-3. 섬유아세포 엑소좀의 세포 흡수 여부 확인**

[87] 섬유아세포 유래 엑소좀이 C2C12 세포 내로 흡수되는지 확인하였다. C2C12 세포를 Lab-Tek chamber slides (Nunc Penfield, NY)에 1.5×10^4 개 접종하여

배양하고, 섬유아세포 유래 엑소솜에는 bodipy TR ceramide 염색 시약을 20분 동안 처리한 후 클린업 키트(cleanup kit)로 여분의 염색 시약을 제거하였다. 염색 시약이 라벨링된 섬유아세포 유래 엑소솜을 C2C12 세포에 30분 동안 처리한 후 공초점 현미경으로 관찰하였다.

[88] 관찰 결과, C2C12 세포에서 엑소솜을 나타내는 붉은 점 모양의 신호를 확인할 수 있어 섬유아세포 유래 엑소솜이 세포 내로 흡수되는 것을 알 수 있었다 (도 2).

[89]

[90] **1-4. 베타인을 처리한 섬유아세포 유래 엑소솜에서 miRNA-26a 수준 확인**

[91] 75T 플라스크에 FB 세포를 2×10^6 개 접종하여 24시간 동안 배양한 후 베타인(0.1, 1 및 10 mM)을 처리하였다. 48시간 동안 추가로 배양한 후 실시예 1-2의 방법에 따라 엑소솜을 분리하고, 배양 배지에서 분리한 엑소솜으로부터 RNeasy plus mini kit (Qiagen, 독일)로 제조사의 프로토콜에 따라 microRNA(이하 miRNA로 기재함)를 추출하였다.

[92] Real-time qPCR은 성숙(mature) RNA를 타겟하는 taqman probe로 진행하였다. 세포 내 타겟 miRNA의 상대적인 발현량은 miRNA 정량시 하우스키핑 유전자(housekeeping gene)로 사용하는 RNU48의 발현량으로 평준화시킨 뒤, 상대적인 %로 표시하였다. 엑소솜 내의 miRNA-26a의 상대적인 발현량은 섬유아세포 엑소솜의 miRNA 정량시 하우스키핑 유전자로 사용하는 microRNA-26a의 발현량으로 평준화시킨 뒤, 상대적인 %로 표시하였다. 모든 real-time qPCR 분석은 applied biosystems 7500 (Applied Biosystems) 기기를 사용하였다.

[93] 분석 결과, 베타인을 처리하지 않은 대조군과 비교하여 베타인을 처리한 FB 세포에서 분리한 엑소솜에서는 miRNA-26a의 수준이 증가하는 것을 확인할 수 있었다 (도 3).

[94]

[95] **1-5. 추가적인 엑소솜 분리**

[96] FB에 하기 표 1의 물질을 처리하여 실시예 1-1의 방법과 동일하게 엑소솜을 분리하고, 실시예 1-4의 방법에 따라 엑소솜에서 miRNA-26a의 수준을 확인하였다.

[97] [표1]

분류	소재명	농도	fold change (vs. control)	p-value
peptide	Kojyl carboxy dipeptide-23 (Creative BioMart, COS-515)	10ppm	1.483	*
	Copper Tripeptide (Biosynth carbosynth, FC138108)		1.743	**
	L-carnosine (Sigma Aldrich, C9625)	5ppm (0.0005%)	1.537	*
Chemical	Betaine (Sigma Aldrich, W422312)	1mM	1.821	**
	Camelliaside A (Biosynth carbosynth, OC33270)	1ppm	1.956	**
flavonols	Myricetin (Sigma Aldrich, M6760)	25uM	1.599	*
flavanones	Naringenin(Sigma Aldrich, N5893)	10uM	1.854	***
Flavones	Nobiletin(Sigma Aldrich, N1538)	30uM	1.447	**
추출물	동백나무꽃 추출물	50ppm	3.618	***

[98]

[99] 실시예 2: 근섬유세포의 유전자 발현 변화 확인

[100] 2-1. 근손실/근생성 마커 발현 변화 확인_qPCR

[101] C2C12 세포를 6-웰 플레이트에 1.5×10^5 개/웰 농도로 접종하여 24시간 동안 배양하였다. 이후, 2% 말 혈청(horse serum)이 첨가된 배지로 교환하고, 72시간 동안 추가로 배양하여 C2C12 세포의 분화를 촉진시켰다. 분화가 완료된 후 베타인 0.5 mM 또는 실시예 1-2에서 수득한 섬유아세포 유래 엑소솜(약 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 처리하여 48시간 동안 추가로 배양하였다. RNeasy plus mini kit로 total RNA를 추출하고, SuperScript™ III (Invitrogen, 미국)로 cDNA를 합성하였다. 이후 타겟 유전자의 taqman probe로 qPCR을 진행한 후 분석하였다.

[102] 분석 결과, 근섬유세포인 C2C12 세포에 베타인을 직접 처리하면 대조군과 비교하여 근손실 마커인 머프1 (MURF1, muscle ring finger 1)과 아트로진-1 (atrogin-1)의 발현은 약간 증가하고, 마이오스타틴 (myostatin)의 발현은 거의 유사한 수준인 것을 확인하였다. 그러나 세 유전자 모두 유의미한 수준의 변화는 아니었다. 반면, C2C12 세포에 섬유아세포 유래 엑소솜을 처리하면 근손실

마커인 머프1, 아트로진-1 및 마이오스타틴의 발현이 유의미한 수준으로 감소하는 것을 알 수 있었다 (도 4의 A 내지 C).

- [103] 또한, 근섬유세포인 C2C12 세포에 베타인을 직접 처리하면 대조군과 비교하여 근생성 마커인 MyoD (myogenic differentiation 1)의 발현이 증가하였으나 유의미한 수준은 아니었다. 반면, 섬유아세포 유래 엑소솜을 처리하면 근생성 마커인 MyoD의 발현이 유의미한 수준으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다 (도 5).

[104]

[105] **2-2. 근손실/근생성 마커 발현 변화 확인_웨스턴 블롯 (western blotting)**

- [106] C2C12 세포를 6-웰 플레이트에 5×10^5 개/웰 농도로 접종하여 24시간 동안 배양하였다. 이후, 2% 말 혈청이 첨가된 배지로 교환하고, 72시간 동안 추가로 배양하여 C2C12 세포의 분화를 촉진시켰다. 분화가 완료된 후 베타인(0.1, 0.5 mM) 또는 섬유아세포 유래 엑소솜을 처리하여 48시간 동안 추가로 배양하였다. 이후 C2C12 세포에 단백질 분해효소 저해제가 포함된 용해 버퍼 (1% NP40, 0.05 M Tris-HCl, pH 7.5, 0.15 M NaCl 및 0.01 M $MgCl_2$)를 첨가하여 세포를 용해시키고, BCA (bovine carbonic anhydrase) 방법으로 단백질 농도를 측정하였다. 정량한 단백질을 SDS-PAGE로 분리하여 PVDF 막으로 옮기고, 항체로 각 근손실 마커의 단백질 발현량을 확인하였다.

- [107] 확인 결과, C2C12 세포에 베타인을 0.1 또는 0.5 mM 농도로 직접 처리하면 근손실 마커의 발현에 변화가 없으나, 섬유아세포 유래 엑소솜을 처리하면 근손실 마커인 머프1 (muscle Ring-finger protein-1), 아트로진 1 및 마이오스타틴의 발현이 감소하는 것을 확인할 수 있었다 (도 6). 또한, 근생성 마커인 MyoD의 발현은 C2C12 세포에 베타인을 직접 처리하면 변화가 없으나 섬유아세포 유래 엑소솜 처리에 의해서는 증가하는 것을 알 수 있었다 (도 7).

[108]

[109] **실시예 3: miRNA-26a에 의한 유전자 발현 변화 확인**

- [110] 베타인 처리로 섬유아세포 유래 엑소솜 속에서 miRNA-26a의 수준이 증가하는 것을 확인하였으므로 miRNA-26a에 의한 근손실 억제와 근생성 촉진 효능을 다음과 같이 확인하였다. C2C12 세포에 근손실을 유발한다고 알려진 덱사메타손(dexamethasone)을 100 μ M 처리하고, miRNA-26a 유사체(mimic)를 10 및 20 nM 처리하여 배양하였다. 이후 웨스턴 블롯으로 근손실 및 근생성 마커의 발현 변화를 확인하였다.

- [111] 확인 결과, miRNA-26a 유사체 처리에 의하여 근손실 억제 마커인 머프1의 발현은 감소하고 근생성 촉진 마커인 MyoD의 발현은 증가하는 것을 알 수 있었다 (도 8).

[112]

[113] **실시예 4: 동백나무꽃 추출물을 처리한 엑소솜의 효능 확인**

- [114] **4-1. 동백나무꽃 추출물 제조 및 엑소솜 분리**

- [115] 동백꽃(*Camellia Japonica Flower*)을 열풍건조기를 이용하여 50°C에서 밤새 건조시키고 분쇄하였다. 건조시킨 동백꽃 (100g)을 70%(v/v) 에탄올로 실온에서 밤새 추출하였다. 여과 과정을 거친 후 회전식 진공 증발기로 용매를 제거하고 동결건조시켜 동백꽃 추출물을 제조하였다.
- [116] 이후 섬유아세포(FB)에 동백나무꽃 추출물을 48시간 동안 처리한 후 상기 실시예 1-2의 방법에 따라 엑소좀을 분리하였다. 또한 실시예 1-4의 방법에 따라 배양 배지에서 분리한 엑소좀에서 miR-26a의 수준을 확인하였다. 확인 결과, 무처리군인 대조군(Control)과 비교하여 동백나무꽃 추출물을 50 ppm 농도로 처리한 FB에서 분리한 엑소좀은 miRNA-26a의 수준이 증가된 것을 확인할 수 있었다(도 9).
- [117]
- [118] **4-2. 근손실/근생성 마커 발현 변화 확인_qPCR**
- [119] C2C12 세포를 6-웰 플레이트에 1.5×10^5 개/웰 농도로 접종하여 24시간 동안 배양하였다. 이후, 2% 말 혈청이 첨가된 배지로 교환하고, 72시간 동안 추가로 배양하여 C2C12 세포의 분화를 촉진시켰다. 분화가 완료된 후 동백나무꽃 추출물 50 ppm 또는 실시예 4-1에서 수득한 엑소좀(약 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 처리하여 48시간 동안 추가로 배양하였다. 이후 실시예 2-1의 방법에 따라 qPCR로 타겟 유전자의 발현 변화를 확인하였다.
- [120] 그 결과, 무처리군인 대조군 및 동백나무꽃 추출물을 직접 처리한 실험군과 비교하여 실시예 4-1에서 수득한 엑소좀을 처리한 실험군에서 근손실 마커인 머프1과 마이오스타틴의 발현이 유의미하게 감소하는 것을 알 수 있었다 (도 10의 A 및 B).