



등록특허 10-2331880



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년11월29일

(11) 등록번호 10-2331880

(24) 등록일자 2021년11월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 9/00 (2006.01) A61K 47/46 (2017.01)

(52) CPC특허분류

A61K 9/0087 (2013.01)

A61K 47/46 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0010035

(22) 출원일자 2020년01월28일

심사청구일자 2020년01월28일

(65) 공개번호 10-2020-0094105

(43) 공개일자 2020년08월06일

(30) 우선권주장

1020190011312 2019년01월29일 대한민국(KR)

(56) 선행기술조사문헌

WO2018081514 A1*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

정보영

서울특별시 서초구 남부순환로 2343-10, 505동 1104호 (서초동, 서초3차대림이편한세상)

윤누리

서울특별시 서대문구 연세로 50 연세의료원 (신촌동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

리엔목특허법인

전체 청구항 수 : 총 7 항

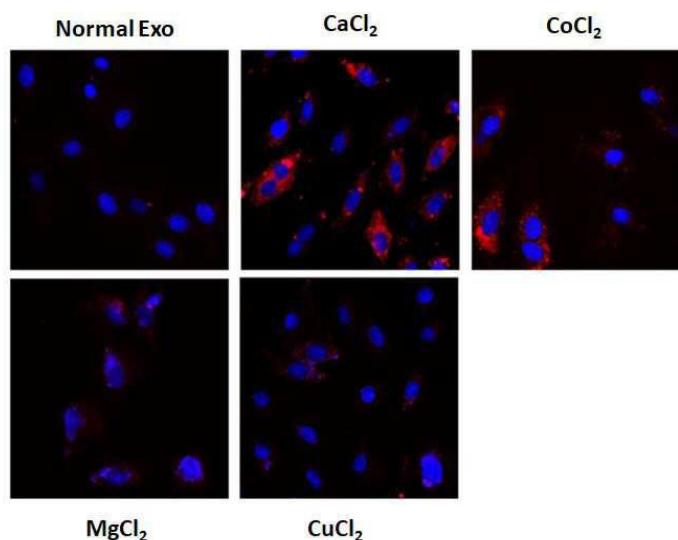
심사관 : 강덕희

(54) 발명의 명칭 엑소좀을 추출하는 방법 및 이에 이용되는 조성물

(57) 요약

일 양상은 엑소좀의 전달 효율을 향상시킬 수 있는 엑소좀 추출 방법 및 이를 위한 염화코발트(CoCl_2) 용액을 포함하는 엑소좀 추출 조성물을 제공한다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

김효은

서울특별시 서대문구 연세로 50 연세의료원 (신촌동)

강지영

서울특별시 서대문구 연세로 50 연세의료원 (신촌동)

문다솜

서울특별시 서대문구 연세로 50 연세의료원 (신촌동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI16C0058

부처명 보건복지부

과제관리(전문)기관명 한국보건산업진흥원

연구사업명 질환극복기술개발

연구과제명 유전자치료 기법으로 성분 강화된 줄기세포에서 추출한 미세소포체 및 엑소좀을 이

용한 심장 부정맥 치료법 개발

기 여 율 1/2

과제수행기관명 연세대학교 산학협력단

연구기간 2016.04.01 ~ 2019.03.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2017R1A2B3003303

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 중견연구

연구과제명 심장타겟 유전자 조작 엑소좀 개발 및 이를 이용한 심부전 치료제의 개발

기 여 율 1/2

과제수행기관명 연세대학교 산학협력단

연구기간 2017.03.01 ~ 2020.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

시료로부터 조추출된 엑소좀을 포함하는 용액에 염화코발트(CoCl_2) 용액을 첨가하여 혼합 용액을 제조하는 단계;
혼합 용액을 배양하는 단계;
배양된 용액을 분리하여 엑소좀을 추출하는 단계; 및
상기 추출된 엑소좀을 인간을 제외한 세포에 처리하는 단계를 포함하는, 세포로의 엑소좀 전달 효율을 향상시키는 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 염화코발트(CoCl_2)용액은 0.1 내지 0.3 M 염화코발트 용액인 것인, 엑소좀 전달 효율을 향상시키는 방법.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 시료는 혈장, 혈청, 혈액, 및 타액 중 어느 하나인 것인, 엑소좀 전달 효율을 향상시키는 방법.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 혼합 용액의 배양 단계는 35℃ 내지 40℃에서 배양하고, 이어서 0 내지 5℃에서 배양하는 단계를 포함하는 것인, 엑소좀 전달 효율을 향상시키는 방법.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 혼합 용액의 배양 단계는 37℃에서 5 내지 20분간 배양하고, 이어서 4℃에서 20분 내지 1시간 동안 배양하는 단계를 포함하는 것인, 엑소좀 전달 효율을 향상시키는 방법.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 엑소좀을 추출하는 단계는 10,000 내지 20,000rpm의 원심분리기를 이용하여 분리하는 것인, 엑소좀 전달 효율을 향상시키는 방법.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 엑소좀은 혈액 또는 혈장 유래인 것인, 엑소좀 전달 효율을 향상시키는 방법.

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

발명의 설명

기술 분야

엑소좀을 추출하는 방법 및 이에 이용되는 조성물에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0002] 엑소좀은 세포의 RNA 및 단백질을 운반하는 물질들이 들어있는 미세한 크기의 소포이다. 엑소좀은 여러 종류의 세포들로부터 분비되는 막 구조의 소낭체이며, 다른 세포 및 조직에 결합하여 막 구성요소, 단백질, RNA를 전달하는 등 다양한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 본래 엑소좀은 적혈구가 성숙되는 마지막 단계에서 세포 내 단백질을 배출하여 제거함으로써 적혈구 내에 헤모글로빈만 남기는 과정에서 발견되었다. 또한, 전자 현미경을 통한 연구에서 엑소좀이 원형질막(plasma membrane)으로부터 직접 떨어져 나가는 것이 아니라, 다낭체(Multivesicular bodies: MVBs)라고 불리는 세포 내 특정 구획에서 기원하여 세포 밖으로 방출, 분비되는 것으로 관찰되었다. 다낭체와 원형질막의 융합이 일어나면, 소낭들이 세포 밖 환경으로 방출되는데, 이것을 엑소좀이라 부른다.
- [0003] 최근 연구에 따르면 엑소좀은 세포 간 신호 전달 및 폐기 관리와 같은 과정에서 중요한 역할을 한다고 보고되었다(Edwin van der pol et al., Pharmacological Reviews July 2012, 64 (3) 676-705). 엑소좀은 질병에 대한 예후, 치료 및 건강과 질병을 위한 바이오 마커로 사용될 수 있는 잠재력을 갖고 있고, 최근 임상 적용에 대한 관심이 증가하고 있다. 하지만, 세포가 생성하는 엑소좀이 미량이므로 엑소좀 추출 및 전달 방법의 개선이 필요한 반면에, 엑소좀 전달 효율을 증가시킬 수 있는 방법에 대한 연구가 부족하다.
- [0004] 본 발명자들은 엑소좀 전달 효율을 개선시킬 수 있는 엑소좀 추출 방법 및 이에 사용되는 추출 조성물을 개발하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0005] (비특허문헌 0001) Edwin van der pol et al., Pharmacological Reviews July 2012, 64 (3) 676-705

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 일 양상은 엑소좀의 전달 효율을 향상시킬 수 있는 엑소좀의 추출 방법을 제공하는 것이다.
- [0007] 다른 일 양상은 엑소좀 추출 방법에 사용되는 엑소좀 추출 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0008] 일 양상은 엑소좀을 포함하는 시료에 염화코발트(CoCl_2) 용액을 첨가하여 혼합 용액을 제조하는 단계;
- [0009] 혼합 용액을 배양하는 단계; 및
- [0010] 배양된 용액을 분리하여 엑소좀을 추출하는 단계를 포함하는, 시료로부터 엑소좀을 추출하는 방법을 제공한다.
- [0011] 다른 일 양상은 상기 엑소좀의 추출 방법에 사용되는 염화코발트(CoCl_2) 용액을 포함하는 엑소좀 추출 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0012] 일 양상에 따른 엑소좀 추출 방법과 추출 조성물은 엑소좀의 전달 효율을 높일 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0013] 도 1은 일 구체예에 따른 엑소좀 전달 방법을 도식화한 그림이다.
- 도 2는 대조군(Nomal Exo), 염화칼슘 처리군(CaCl_2), 염화코발트(CoCl_2) 처리군, 염화마그네슘(MgCl_2) 처리군, 및 염화구리(CuCl_2) 처리군 각각에서 심장 세포주에 대한 엑소좀 전달 정도를 보여주는 공초점 형광 현미경 이미지이다.

도 3은 대조군(Nomal Exo), 염화칼슘 처리군(CaCl_2), 염화코발트(CoCl_2) 처리군, 염화마그네슘(MgCl_2) 처리군, 및 염화구리(CuCl_2) 처리군 각각에서 심장 세포주의 엑소좀 전달 정도를 보여주는 형광 강도를 나타낸 그래프이다.

도 4는 대조군(Nomal Exo), 염화칼슘 처리군(CaCl_2), 염화코발트(CoCl_2) 처리군, 염화마그네슘(MgCl_2) 처리군, 및 염화구리(CuCl_2) 처리군 각각에서 심장 세포주의 세포 생존률(viability)(%)을 보여주는 그래프이다.

도 5는 대조군(Nomal Exo), 아세트산코발트($\text{C}_4\text{H}_6\text{CoO}_4$) 처리군, 질산코발트($\text{Co}(\text{NO}_3)_2$) 처리군, 황산코발트수화물($\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 처리군 각각에서 심장 세포주에 대한 엑소좀 전달 정도를 보여주는 공초점 형광 현미경 이미지이다.

도 6은 대조군(Nomal Exo), 아세트산코발트($\text{C}_4\text{H}_6\text{CoO}_4$) 처리군, 질산코발트($\text{Co}(\text{NO}_3)_2$) 처리군, 황산코발트수화물($\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 처리군 각각에서 심장 세포주의 엑소좀 전달 정도를 보여주는 형광 강도를 나타낸 그래프이다.

도 7은 대조군(Nomal Exo), 아세트산코발트($\text{C}_4\text{H}_6\text{CoO}_4$) 처리군, 질산코발트($\text{Co}(\text{NO}_3)_2$) 처리군, 및 황산코발트수화물($\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 처리군 각각에서 심장 세포주의 세포 생존률(viability)(%)을 보여주는 그래프이다. 도 7에서와 같이, 각 처리군이 유사한 생존률을 보였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0014] 일 양상은 엑소좀을 포함하는 시료에 염화코발트(CoCl_2) 용액을 첨가하여 혼합 용액을 제조하는 단계;
- [0015] 혼합 용액을 배양하는 단계; 및
- [0016] 배양된 용액을 분리하여 엑소좀을 추출하는 단계를 포함하는, 시료로부터 엑소좀을 추출하는 방법을 제공한다.
- [0017] 본 명세서에서 엑소좀(Exosome)은 신체의 모든 세포에 의해 방출되는 엔도솜 유래의 지질 이중층을 갖는 작은 막 소포를 말한다. 엑소좀은 세포 간 신호를 전달하기 위하여, 단백질, DNA, RNA 등을 가지고 세포 밖으로 분비되는 작은 소낭을 가리킬 수 있으며, 예컨대 단백질, 지질, mRNA, 마이크로RNA (miRNA) 및 게놈 DNA를 포함할 수 있다. 또한, 엑소좀은 다른 세포 및 조직에 결합하여 막 구성요소, 단백질, RNA를 전달하는 등의 다양한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.
- [0018] 일 구체예에서, 엑소좀은 제한되지는 않으나, 사람 혈액으로부터 유래, 추출 또는 분리된 것일 수 있다. 또는, 엑소좀은 줄기세포로부터 추출된 것일 수 있으며, 예를 들어 지방 유래 줄기세포, 체대 유래 줄기세포 또는 골수 유래 줄기세포로부터 추출된 것일 수 있다.
- [0019] 일 구체예에서, 상기 엑소좀은 약 50 내지 200 nm의 직경, 또는 약 40 내지 150 nm, 또는 약 50 내지 150nm의 직경을 갖는 것일 수 있다. 상기 엑소좀의 직경은 예를 들어, 약 50 내지 130nm, 50 내지 110nm, 50 내지 90nm, 50 내지 70 nm, 70 내지 130 nm, 70 내지 110nm, 70 내지 90nm, 90 내지 130nm, 또는 90 내지 110nm일 수 있다.
- [0020] 일 구체예에서, 상기 염화코발트(CoCl_2)용액은 약 0.1 내지 0.3 M 염화코발트 용액일 수 있다. 일 구체예에서, 상기 염화코발트(CoCl_2)용액의 농도는 약 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 또는 0.3 M일 수 있다. 상기 염화코발트(CoCl_2)용액의 농도는 약 0.1 내지 0.3 M일 수 있다. 일 구체예에서, 상기 염화코발트(CoCl_2)용액의 농도는 약 0.2 M일 수 있다.
- [0021] 상기 염화코발트(CoCl_2)용액은 엑소좀을 포함하는 시료에 첨가되어 최종 농도가 약 10 내지 1000uM가 되도록 첨가될 수 있다. 상기 최종 농도는 약 100 내지 1000uM일 수 있다. 일 구체예에서, 상기 최종 농도는 약 100 내지 800uM, 200 내지 600uM, 250 내지 550 uM, 또는 250 내지 450uM 일 수 있다.
- [0022] 일 구체예에서, 상기 엑소좀을 포함하는 시료에 첨가하는 염화코발트(CoCl_2) 용액은 다른 1종 이상의 금속염을 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 금속염은 염화물일 수 있다. 예를 들어, 상기 염화물은 염화칼슘(CaCl_2), 염화마그네슘(MgCl_2), 염화구리(CuCl_2), 또는 이들의 혼합물일 수 있다.

- [0023] 일 구체예에서, 상기 시료는 혈장, 혈청, 혈액, 및 타액 중 어느 하나일 수 있다. 다른 구체예에서, 상기 시료는 혈장, 혈청 또는 혈액일 수 있다.
- [0024] 일 구체예에서, 상기 엑소솜은 혈액 또는 혈장 유래인 것일 수 있다. 일 구체예에서, 상기 엑소솜을 포함하는 시료는 혈장 유래 엑소솜 시료에 엑소퀵(ExoQuick)®을 첨가하여 얻은 것일 수 있다.
- [0025] 혈액은 몸 안의 세포에 산소와 영양소를 공급하고 세포의 신진대사에 의해 발생하는 이산화탄소와 노폐물을 회수하여 운반하는 역할을 하는 체액을 말한다. 혈장(plasma)은 혈액을 구성하는 액체 성분인데, 단백질을 비롯하여 다종 다양한 유기물이나 무기물이 녹아 있는 용매 역할을 한다. 혈청 또는 수액(serum)은 혈액의 일부 성분으로 혈장에서 피브리노겐이 제거된 나머지 노란색 액체 성분을 말한다.
- [0026] 상기 엑소솜을 포함하는 시료는 엑소솜을 시료로부터 조추출한 것일 수 있다. 상기 엑소솜을 포함하는 시료는 예컨대 사람의 혈액 또는 혈장에서부터 엑소솜을 조추출하여 인산완충식염수(phosphate-buffered saline: PBS)에 푼 것일 수 있다.
- [0027] 일 구체예에서, 상기 엑소솜을 시료로부터 조추출하는 방법은 예컨대 시판 엑소솜 분리 시약을 첨가하는 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 시약으로는 엑소퀵(ExoQuick)®(미국 특허 제2013/0337440 A1호)을 첨가하는 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 시약은 예를 들어, 시료 250 μ l를 기준으로 1 내지 200 μ l, 예컨대 10 내지 100 μ l, 50 내지 70 μ l의 양으로 첨가할 수 있다.
- [0028] 일 구체예에 따른 엑소솜 조추출물은 시료를 원심분리하고, 분리 시약을 첨가한 후에, 저온에 보관하고, 이어서 원심분리하여 얻을 수 있다.
- [0029] 일 구체예에서, 상기 혼합 용액의 배양 단계는 35℃ 내지 40℃에서 배양하고, 이어서 0℃ 내지 5℃에서 배양하는 단계를 포함하는 것일 수 있다. 일 구체예에서, 상기 혼합 용액의 배양 단계는 37℃에서 배양하고, 이어서 4℃에서 배양하는 단계를 포함하는 것일 수 있다. 일 구체예에서, 상기 혼합 용액의 배양 단계는 37℃에서 5 내지 20분간 배양하고, 이어서 4℃에서 20분 내지 1시간 동안 배양하는 단계를 포함하는 것일 수 있다.
- [0030] 일 구체예에서, 상기 엑소솜을 추출하는 단계는 10,000 내지 20,000rpm의 원심분리기를 이용하여 분리하는 것일 수 있다. 일 구체예에서, 상기 엑소솜을 추출하는 단계는 10,000 내지 15,000rpm, 예를 들어 13,000 rpm 원심분리기를 이용하여 분리하는 것일 수 있다.
- [0031] 다른 일 양상은 상기 엑소솜의 추출 방법에 사용되는 염화코발트(CoCl_2) 용액을 포함하는 엑소솜 추출 조성물을 제공한다.
- [0032] 일 구체예에 따른 엑소솜 추출 조성물에서 상기 염화코발트(CoCl_2)용액은 약 0.1 내지 0.3 M 염화코발트 용액일 수 있다. 일 구체예에서, 상기 염화코발트(CoCl_2)용액의 농도는 약 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 또는 0.3 M일 수 있다. 상기 염화코발트(CoCl_2)용액의 농도는 약 0.1 내지 0.3 M일 수 있다. 일 구체예에서, 상기 염화코발트(CoCl_2)용액의 농도는 약 0.2 M일 수 있다.
- [0033] 일 구체예에 따른 엑소솜 추출 조성물에서 상기 염화코발트(CoCl_2)용액은 엑소솜을 포함하는 시료에 첨가되어 최종 농도가 약 10 내지 1000 μ M가 되도록 첨가될 수 있다. 상기 최종 농도는 약 100 내지 1000 μ M일 수 있다. 일 구체예에서, 상기 최종 농도는 약 100 내지 800 μ M, 200 내지 600 μ M, 250 내지 550 μ M, 또는 250 내지 450 μ M 일 수 있다.
- [0034] 또 다른 일 양상은 상기 엑소솜 추출 방법을 이용하여 추출된 엑소솜을 포함하는 약물 전달체를 제공할 수 있다. 상기 엑소솜을 포함하는 약물 전달체는 추출된 엑소솜을 정맥 내로 투여(정맥주사)하거나, 대상체의 폐 또는 기관 내로 투여(국소 투여)하거나, 흡입(inhalation)의 방법으로 투여될 수 있다. 상기 엑소솜을 포함하는 약물 전달체는 약물을 목표 부위에 효율적으로 전달할 수 있는 약물 전달 시스템으로서 이용될 수 있다. 상기 엑소솜을 포함하는 약물 전달체는 심장질환, 피부질환의 치료 등을 위한 재생의학치료 기술로서 이용될 수 있다.
- [0035] 또 다른 일 양상은 상기 엑소솜 추출 방법을 이용하여 추출된 엑소솜을 이용한 질병 진단 방법, 또는 여기에 이용되는 진단 키트를 제공할 수 있다.
- [0037] 이하 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 하나 이상의 구체예를 예시적으로 설명

하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0039] **제조예 1: 엑소좀 조추출물의 제조**

[0040] 사람의 혈장(Plasma)에서 엑소좀을 조추출하였다. 조추출 방법으로는 사람의 혈장을 3000g로 15분 동안 원심분리하여 파편(debris)을 제거하고, 그 다음 ExoQuick®(SBI(System Bioscience), EXOQ20A-1)을 혈장 250 μ l 당 63 μ l의 양으로 첨가하여 30분 간 ice에 보관하였다. 그 다음 1500g로 30분 동안 원심분리하여 제조하였다.

[0042] **실시예 1: 염화코발트를 첨가한 혼합물로부터 엑소좀 추출물의 제조**

[0043] 사람의 혈장(Plasma)에서 엑소좀을 ExoQuick®을 사용하여 조추출한 뒤 인산완충용액(phosphate buffer saline, PBS) 1 mL에 풀어 준비하였다. 0.2 M 염화코발트(CoCl_2) 스탁(stock)을 준비하였다. 0.2 M 염화코발트(CoCl_2) 스탁을 최종 농도가 400 μ M로 되도록 첨가한 혼합물을 제조하였다.

[0044] 염화코발트(CoCl_2)를 첨가한 혼합물을 37°C 진탕(shaker) 배양기에 넣어 10분 동안 배양하였다. 그런 다음 엑소좀 추출 용액(Exo-Quick)을 첨가하여 30분간 4°C(ice)에서 보관하였다. 30분 경과 후 13,000rpm로 3분 동안 원심분리를 시행하여 엑소좀을 추출하였다. 추출한 엑소좀을 새로 PBS에 풀어 여과기(filter)를 이용하여 세척(washing)하여, 엑소좀 추출물을 제조하였다.

[0045] 도 1은 일 구체예(염화코발트 처리군)에 따른 엑소좀 전달 방법을 도식화한 그림이다. 도 1에서는 엑소좀을 조추출한 뒤 0.2 M 염화코발트(CoCl_2) 용액을 포함하는 PBS에 풀고; 이를 37°C에서 10분간 진탕 배양; ice (4°C냉장고)에서 30분간 배양; 엑소좀을 추출; 및 세척하여, 세포에 처리하는 단계를 포함하는, 엑소좀 전달 방법을 나타낸다. 0.2 M 염화코발트(CoCl_2) 용액 대신 동일한 농도의 다른 염소계열(CoCl_2 , MgCl_2 , CuCl_2) 용액을 사용한 시험군을 동일한 방법으로 제조하였다.

[0047] **비교예 1 : 염화칼슘을 첨가한 혼합물로부터 엑소좀 추출물의 제조**

[0048] 0.2 M 염화코발트 대신에 0.2 M 염화칼슘(CaCl_2)을 사용한 것을 제외하고는 실시예 1과 동일한 방법으로 엑소좀 추출물을 제조하였다.

[0050] **비교예 2 : 염화마그네슘을 첨가한 혼합물로부터 엑소좀 추출물의 제조**

[0051] 0.2 M 염화코발트 대신에 0.2 M 염화마그네슘(MgCl_2)을 사용한 것을 제외하고는 실시예 1과 동일한 방법으로 엑소좀 추출물을 제조하였다.

[0053] **비교예 3 : 염화구리를 첨가한 혼합물로부터 엑소좀 추출물의 제조**

[0054] 0.2 M 염화코발트 대신에 0.2 M 염화구리(CuCl_2)를 사용한 것을 제외하고는 실시예 1과 동일한 방법으로 엑소좀 추출물을 제조하였다.

[0056] **대조예 : 엑소좀 추출물의 제조**

[0057] 0.2 M 염화코발트를 첨가하지 않는 것을 제외하고는 실시예 1과 동일한 방법으로 엑소좀 추출물을 제조하였다. 구체적으로는 사람의 혈장에서 엑소좀을 조추출한 뒤 인산완충용액 1mL에 풀어 준비하였다. 이를 37°C진탕 배양기에 넣어 10분 동안 배양하였다. 그런 다음 엑소좀 추출 용액(Exo-Quick)을 첨가하여 30분간 4°C(ice)에서 보관하였다. 30분 경과 후 13,000rpm로 3분 동안 원심분리를 시행하여 엑소좀을 추출하였다. 추출한 엑소좀을 새로 PBS에 풀어 여과기를 이용하여 세척하여, 엑소좀 추출물을 제조하였다.

[0059] **시험예 1: 엑소좀의 전달 효율 측정 (1)**

[0060] 엑소좀을 처리하기 2일 전, H9C2 쥐 심장근육모 세포주를 6-웰 배양 접시에 배양하였다. 상기 세포에 실시예 1, 비교예 1 내지 3, 및 대조예에서 추출 및 세척하여 제조한 각각의 엑소좀 추출물을 처리하였다.

[0061] 배양된 H9C2 쥐 심장근육모 세포주에 각각 50 μ g의 실시예 1, 또는 비교예 1 내지 3을 처리한 군을 시험군으로 하였다. 또한, 배양된 H9C2 쥐 심장근육모 세포주에 50 μ g의 대조예를 처리한 군을 대조군으로 하였다.

[0062] 도 2 및 도 3에서 실시예 1의 엑소좀 추출물을 처리한 군을 염화코발트(CoCl_2) 처리군으로 나타내고, 비교예 1 내지 3의 엑소좀 추출물을 처리한 군을 각각 염화칼슘(CaCl_2) 처리군, 염화마그네슘(MgCl_2) 처리군, 및 염화구리

(CuCl₂) 처리군으로 나타내었다. 또한, 대조예를 처리한 군을 대조군(Nomal Exo)으로 나타내었다.

[0064] (1) 공초점 형광 현미경 관찰

실시에 1, 비교예 1 내지 3, 및 대조예로 각각 처리한 H9C2 쥐 심장근육모 세포주를 공초점 형광 현미경(Zeiss, LSM710)을 이용하여 관찰하고, 형광 이미지를 얻었다.

도 2는 대조군(Nomal Exo), 염화칼슘 처리군(CaCl₂), 염화코발트(CoCl₂) 처리군, 염화마그네슘(MgCl₂) 처리군, 및 염화구리(CuCl₂) 처리군 각각에서 심장 세포주에 대한 엑소좀 전달 정도를 보여주는 공초점 형광 현미경 이미지이다.

[0068] (2) 형광 강도 측정

실시에 1, 비교예 1 내지 3, 및 대조예로 각각 처리한 H9C2 쥐 심장근육모 세포주로부터 산출되는 형광 강도를 405nm와 543nm의 형광필터를 통해 측정하여, 형광 강도를 정량화하여 나타내었다.

도 3은 대조군(Nomal Exo), 염화칼슘 처리군(CaCl₂), 염화코발트(CoCl₂) 처리군, 염화마그네슘(MgCl₂) 처리군, 및 염화구리(CuCl₂) 처리군 각각에서 심장 세포주의 엑소좀 전달 정도를 보여주는 형광 강도를 나타낸 그래프이다.

도 2 및 도 3에서와 같이, H9C2 쥐 심장근육모 세포주에서는 대조군에 비하여, 염화코발트(CoCl₂) 처리군 또는 염화칼슘(CaCl₂) 처리군에서 엑소좀의 세포 내 흡수율이 유의하게 증가하였음을 확인하였다(p<0.05).

[0073] 시험예 2: 세포 생존률 측정 (1)

실시에 1, 비교예 1 내지 3, 및 대조예로 각각 처리한 H9C2 쥐 심장근육모 세포주의 세포 생존률(Cell viability)(%)를 MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium] 분석(assay)을 사용하여 측정하였다. 이 분석은 효소 결합 면역 흡착 검정 플레이트 리더기(Molecular Devices)를 통해 측정되었다. 도 4에서 실시예 1의 엑소좀 추출물을 처리한 군을 염화코발트(CoCl₂) 처리군으로 나타내고, 비교예 1 내지 3의 엑소좀 추출물을 처리한 군을 각각 염화칼슘(CaCl₂) 처리군, 염화마그네슘(MgCl₂) 처리군, 및 염화구리(CuCl₂) 처리군으로 나타내었다. 또한, 대조예를 처리한 군을 대조군(Nomal Exo)으로 나타내었다.

도 4는 대조군(Nomal Exo), 염화칼슘 처리군(CaCl₂), 염화코발트(CoCl₂) 처리군, 염화마그네슘(MgCl₂) 처리군, 및 염화구리(CuCl₂) 처리군 각각에서 심장 세포주의 세포 생존률(viability)(%)을 보여주는 그래프이다.

도 4에서와 같이, 염화마그네슘(MgCl₂) 처리 군에서는 낮은 세포 생존률을 보였으며, 염화코발트(CoCl₂) 처리군에서는 염화칼슘(CaCl₂)과 비슷하거나 다소 낮은 정도의 세포 생존률을 보였다.

염화칼슘(CaCl₂) 용액에서의 칼슘 이온의 경우 세포 내로 다량 흡수되면 세포 독성을 나타내거나, 인체 내 존재하는 칼슘 이온 농도와 중첩으로 인한 오차 발생이 커지고, 세포나 동물에서의 칼슘을 측정하는 실험에 있어서는 사용이 불가하여, 측정 방법으로 사용하기에 무리가 있으므로, 비슷한 정도의 세포 생존률을 보이는 염화코발트(CoCl₂) 용액을 사용할 수 있다.

[0079] 비교예 4 : 아세트산코발트를 첨가한 혼합물로부터 엑소좀 추출물의 제조

0.2 M 염화코발트 대신에 0.2 M 아세트산코발트(C₄H₆CoO₄)를 사용한 것을 제외하고는 실시예 1과 동일한 방법으로 엑소좀 추출물을 제조하였다.

[0082] 비교예 5 : 질산코발트를 첨가한 혼합물로부터 엑소좀 추출물의 제조

0.2 M 염화코발트 대신에 0.2 M 질산코발트(Co(NO₃)₂)를 사용한 것을 제외하고는 실시예 1과 동일한 방법으로 엑소좀 추출물을 제조하였다.

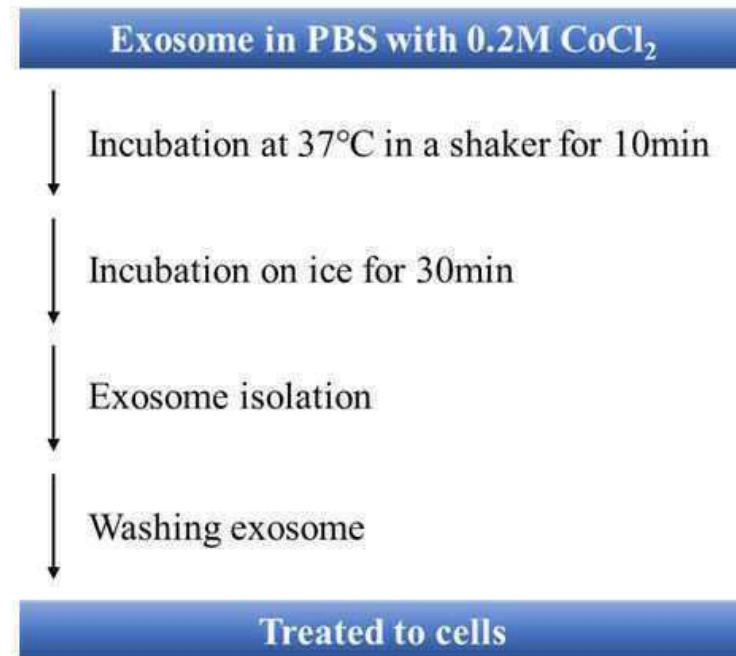
[0085] 비교예 6 : 황산코발트수화물을 첨가한 혼합물로부터 엑소좀 추출물의 제조

- [0086] 0.2 M 염화코발트 대신에 0.2 M 황산코발트수화물($\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)를 사용한 것을 제외하고는 실시예 1과 동일한 방법으로 엑소좀 추출물을 제조하였다.
- [0088] **시험예 3: 엑소좀의 전달 효율 측정 (2)**
- [0089] 엑소좀을 처리하기 2일 전, H9C2 쥐 심장근육모 세포주를 6-웰 배양 접시에 배양하였다. 상기 세포에 실시예 1, 비교예 4 내지 6, 및 대조예에서 추출 및 세척하여 제조한 각각의 엑소좀 추출물을 처리하였다.
- [0090] 배양된 H9C2 쥐 심장근육모 세포주에 각각 50 μg 의 실시예 1, 또는 비교예 4 내지 6을 처리한 군을 시험군으로 하였다. 또한, 배양된 H9C2 쥐 심장근육모 세포주에 50 μg 의 대조예를 처리한 군을 대조군으로 하였다.
- [0091] 도 5 및 도 6에서 실시예 1의 엑소좀 추출물을 처리한 군을 염화코발트(CoCl_2) 처리군으로 나타내고, 비교예 4 내지 6의 엑소좀 추출물을 처리한 군을 각각 아세트산코발트($\text{C}_4\text{H}_6\text{CoO}_4$) 처리군, 질산코발트($\text{Co}(\text{NO}_3)_2$) 처리군, 황산코발트수화물($\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 처리군으로 나타내었다. 또한, 대조예를 처리한 군을 대조군(Nom1 Exo)으로 나타내었다.
- [0093] **(1) 공초점 형광 현미경 관찰**
- [0094] 실시예 1, 비교예 4 내지 6, 및 대조예로 각각 처리한 H9C2 쥐 심장근육모 세포주를 공초점 형광 현미경(Zeiss, LSM710)을 이용하여 관찰하고, 형광 이미지를 얻었다.
- [0095] 도 5는 대조군(Nom1 Exo), 아세트산코발트($\text{C}_4\text{H}_6\text{CoO}_4$) 처리군, 질산코발트($\text{Co}(\text{NO}_3)_2$) 처리군, 황산코발트수화물($\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 처리군 각각에서 심장 세포주에 대한 엑소좀 전달 정도를 보여주는 공초점 형광 현미경 이미지이다.
- [0097] **(2) 형광 강도 측정**
- [0098] 실시예 1, 비교예 4 내지 6, 및 대조예로 각각 처리한 H9C2 쥐 심장근육모 세포주로부터 산출되는 형광 강도를 405nm와 543nm의 형광필터를 통해 측정하여, 형광 강도를 정량화하여 나타내었다.
- [0099] 도 6은 대조군(Nom1 Exo), 아세트산코발트($\text{C}_4\text{H}_6\text{CoO}_4$) 처리군, 질산코발트($\text{Co}(\text{NO}_3)_2$) 처리군, 황산코발트수화물($\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 처리군 각각에서 심장 세포주의 엑소좀 전달 정도를 보여주는 형광 강도를 나타낸 그래프이다.
- [0100] 도 5 및 도 6에서와 같이, H9C2 쥐 심장근육모 세포주에서는 대조군, 또는 아세트산코발트($\text{C}_4\text{H}_6\text{CoO}_4$) 처리군, 질산코발트($\text{Co}(\text{NO}_3)_2$) 처리군, 또는 황산코발트수화물($\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)에 비하여, 염화코발트(CoCl_2) 처리군에서 엑소좀의 세포 내 흡수율이 유의하게 증가하였음을 확인하였다($p < 0.05$).
- [0102] **시험예 4: 세포 생존률 측정 (2)**
- [0103] 실시예 1, 비교예 4 내지 6, 및 대조예로 각각 처리한 H9C2 쥐 심장근육모 세포주의 세포 생존률(Cell viability)(%)를 MTS 분석을 사용하여 측정하였다. 이 분석은 효소 결합 면역 흡착 검정 플레이트 리더기(Molecular Devices)를 통해 측정되었다. 도 7에서 실시예 1의 엑소좀 추출물을 처리한 군을 염화코발트(CoCl_2) 처리군으로 나타내고, 비교예 4 내지 6의 엑소좀 추출물을 처리한 군을 각각 아세트산코발트($\text{C}_4\text{H}_6\text{CoO}_4$) 처리군, 질산코발트($\text{Co}(\text{NO}_3)_2$) 처리군, 황산코발트수화물($\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 처리군으로 나타내었다. 또한, 대조예를 처리한 군을 대조군(Nom1 Exo)으로 나타내었다.
- [0104] 도 7은 대조군(Nom1 Exo), 아세트산코발트($\text{C}_4\text{H}_6\text{CoO}_4$) 처리군, 질산코발트($\text{Co}(\text{NO}_3)_2$) 처리군, 및 황산코발트수화물($\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 처리군 각각에서 심장 세포주의 세포 생존률(viability)(%)을 보여주는 그래프이다. 도 7에서와 같이, 각 처리군이 유사한 생존률을 보였다.
- [0105] 도 2 내지 도 7의 결과로부터 실시예 1에서 얻은 엑소좀 추출물로 처리한 염화코발트(CoCl_2) 처리군이 엑소좀의 전달 효율과 세포 생존률 모두를 고려할 때 대조군, 코발트 이외 다른 양이온을 포함하는 염 처리군, 또는 염소 이외 다른 음이온을 포함하는 염 처리군보다 우수한 효과를 나타냄을 알 수 있다.
- [0107] 이제까지 본 발명에 대하여 그 구체예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을

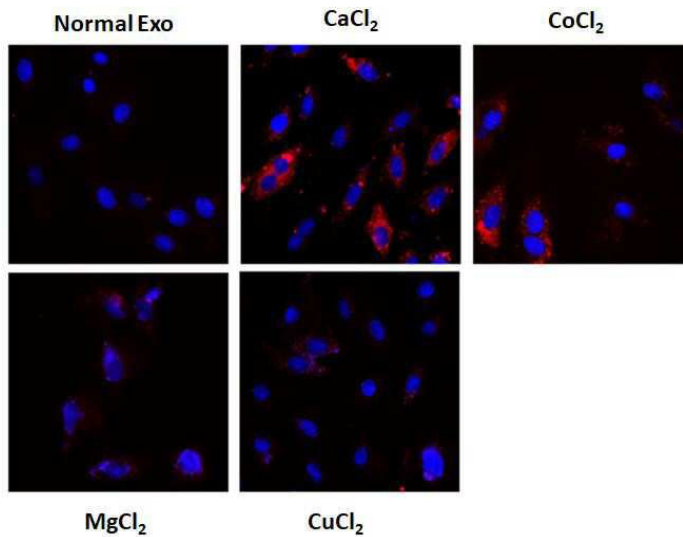
이해할 수 있을 것이다. 그러므로, 상기 개시된 구체예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

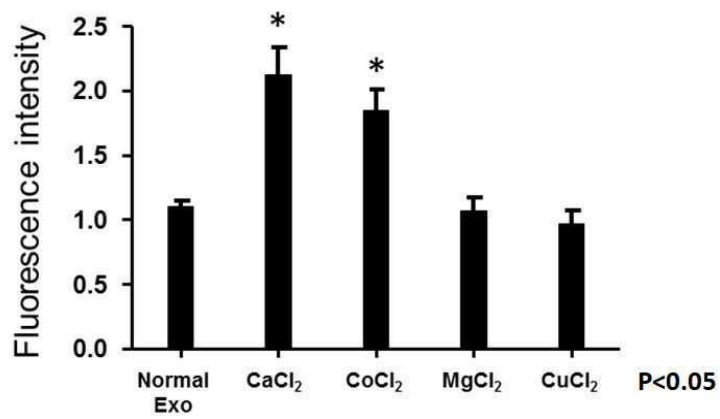
도면1



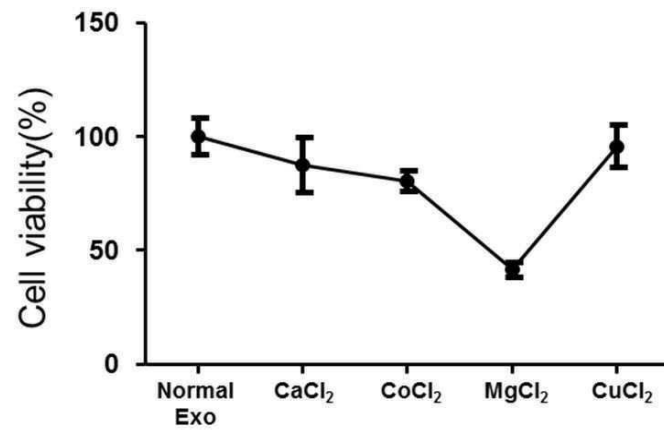
도면2



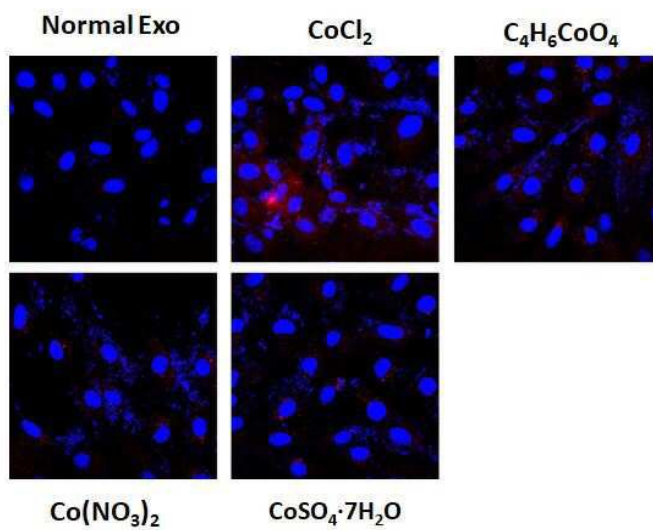
도면3



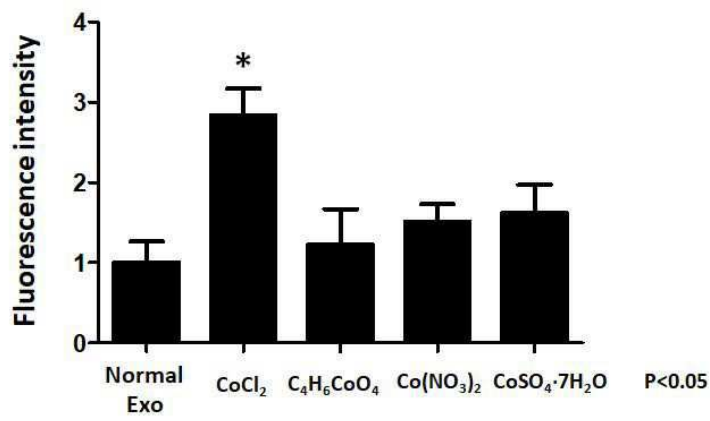
도면4



도면5



도면6



도면7

