(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0151343
(43) 공개일자 2024년10월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/079 (2010.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0618 (2013.01)
C12N 2509/10 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0047208
(22) 출원일자 2023년04월11일
심사청구일자 2023년04월11일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
충남대학교병원
대전광역시 중구 문화로 282 (대사동)
(72) 발명자
허준영
대전광역시 유성구 상대남로 26, 913동 102호 (상대동, 도안신도시9블록 트리풀시티아파트)
이민정
대전광역시 서구 가수원로 6, 503동 104호 (가수원동, 은아아파트5단지)
안종훈
대전광역시 서구 갈마로117번길 23, 824호 (갈마동, 광도푸른아파트)
(74) 대리인
최규환

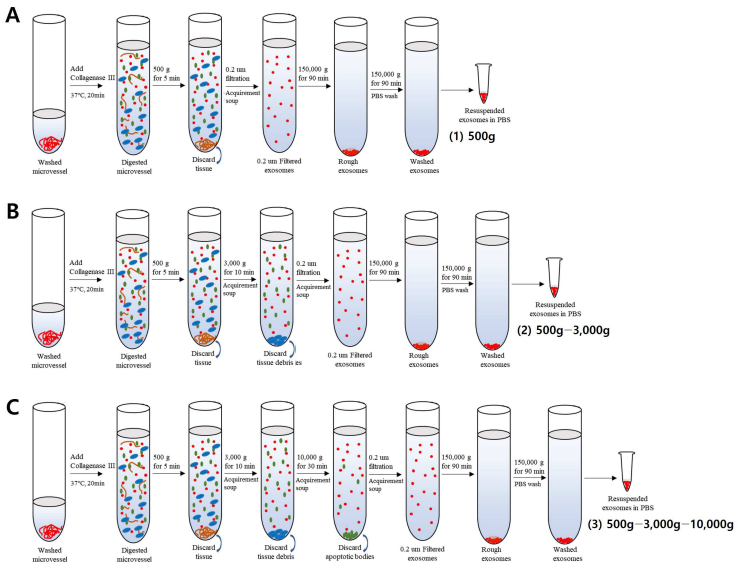
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **초원심분리를 이용한 뇌 미세혈관 유래 엑소좀의 분리 방법**

(57) 요 약

본 발명은 초원심분리를 이용한 뇌혈관 유래 엑소좀의 분리 방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 방법을 이용하면 뇌혈관 유래 엑소좀을 고순도로 분리할 수 있으며, 연속공정이 가능함에 따라 뇌혈관 유래 엑소좀을 쉽고 간단하게 대량 생산할 수 있을 것이다.

대 표 도 - 도3



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1465037340
과제번호 HR22C1734040022
부처명 보건복지부
과제관리(전문)기관명 한국보건산업진흥원
연구사업명 연구중심병원 육성 R&D
연구과제명 Centennial-care Ubiquitous Hospital (CNUH) 플랫폼
기 여 율 3/10
과제수행기관명 충남대학교병원
연구기간 2022.07.01 ~ 2022.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711169233
과제번호 2017R1A5A2015385
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 집단연구지원
연구과제명 감염 제어 컨버전스 연구센터
기 여 율 3/10
과제수행기관명 충남대학교
연구기간 2022.03.01 ~ 2023.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711155734
과제번호 2022R1A2C2002756
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구
연구과제명 뇌혈관장벽 붕괴 초기 및 수복 과정에서의 미토콘드리아 미접힘 단백 반응의 역할 및 신호전달 체계화 연구
기 여 율 4/10
과제수행기관명 충남대학교
연구기간 2022.03.01 ~ 2023.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

뇌조직으로부터 미세혈관을 분리하는 단계; 및

상기 분리된 미세혈관에 콜라게나아제를 처리하고 초원심분리를 수행하는 단계;를 포함하는, 뇌혈관 유래 엑소좀(exosome)의 분리 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 초원심분리는 400~600 g에서 3~7분, 2,000~4,000 g에서 8~12분, 9,000~11,000 g에서 28~32분의 순서로 순차적으로 수행하는 것을 특징으로 하는, 뇌혈관 유래 엑소좀의 분리 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 분리 방법은 초원심분리 수행 후, 여과하는 단계 및 120,000~180,000 g에서 80~100분 동안의 원심분리하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 뇌혈관 유래 엑소좀의 분리 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 분리 방법은

(1) 뇌조직을 분쇄하고 원심분리를 수행한 후, 상층액을 제거하는 단계;

(2) 상기 상층액이 제거된 침전물에 11~20%(w/v) 덱스트란(dextran)을 첨가하고 원심분리를 수행한 후, 상층액을 제거하여 미세혈관을 분리하는 단계;

(3) 상기 분리된 미세혈관에 콜라게나아제를 처리하고 30~40℃에서 10~30분 동안 반응시켜 미세혈관을 분해하는 단계;

(4) 상기 미세혈관 분해물을 400~600 g에서 3~7분 동안 원심분리를 수행하여 제1 상층액을 획득하는 단계;

(5) 상기 제1 상층액을 새로운 원심분리 용기에 옮기고, 2,000~4,000 g에서 8~12분 동안 원심분리를 수행하여 제2 상층액을 획득하는 단계;

(6) 상기 제2 상층액을 새로운 원심분리 용기에 옮기고, 9,000~11,000 g에서 28~32분 동안 원심분리를 수행하여 제3 상층액을 획득하는 단계;

(7) 상기 제3 상층액을 여과하여 획득한 여과액을 새로운 원심분리 용기에 옮기고, 120,000~180,000 g에서 80~100분 동안 원심분리를 수행한 후, 상층액을 제거하고 제1 펠렛을 획득하는 단계; 및

(8) 상기 제1 펠렛을 PBS로 현탁하고, 120,000~180,000 g에서 80~100분 동안 원심분리를 수행한 후, 상층액을 제거하고 제2 펠렛을 획득하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는, 뇌혈관 유래 엑소좀의 분리 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 단계 (3)에서 콜라게나아제 외에 프로테아제 저해제 및 포스파타아제 저해제를 추가로 처리하는 것을 특징으로 하는, 뇌혈관 유래 엑소좀의 분리 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 방법으로 분리된 뇌혈관 유래 엑소좀.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 순차적인 초원심분리를 통해 뇌 미세혈관 유래의 엑소좀을 고순도로 분리할 수 있는 방법에 관한 것

이다.

배 경 기 술

[0002] 엑소좀(exosome)은 세포가 세포 외부로 방출하는 직경 20~100 nm 정도의 소낭성 입자로, 세포내 단백질, 지질, 핵산을 내포하여 세포 간 신호전달에 주요한 역할을 수행한다. 엑소좀은 세포막의 구조와 동일한 인지질 이중막 형태로 이루어져 있어 내부의 물질을 안정적으로 유지할 수 있고, 생체 유래 물질이라는 점에서 체내 면역반응에 대한 거부 정도가 낮아 안전성이 우수하며, 표적 전달률이 높아 약물 전달 능력이 매우 우수하다. 따라서, 엑소좀의 표면막 또는 내막에 치료용 단백질을 탑재시켜 표적 세포에 효과적으로 전달할 수 있으므로, 엑소좀을 이용한 약물 전달 시스템 개발에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 미국의 제약회사 코디악(Codiak Bioscience)은 엑소좀을 이용한 혈액암 치료제 후보 물질 및 림프종 치료제 후보 물질을 개발중이며, 스위스의 제약회사 론자(Lonza)는 엑소좀의 생산, 정제, 분석법 등 공정 개발 분야에 대한 연구를 활발히 진행하고 있다. 그러나, 엑소좀이 가지는 희소성 및 가치에도 불구하고 엑소좀을 이용한 제품의 상업화 단계까지 도달하는데는 기술적인 진입 장벽이 존재한다. 이는 엑소좀의 분리 기술 및 대량 생산과 연계되는데, 순도가 높은 엑소좀을 분리하는 데는 많은 시간이 소요되고 작업의 복잡성으로 인해 생산 수율이 매우 낮은 문제점이 있기 때문이다. 엑소좀 분리 기술로 많이 사용되고 있는 방법은 크로마토그래피 및 막여과법 등이 있으나, 단백질 오염 및 시료의 손실 가능성 등의 단점이 있다.

[0003] 한편, 혈액뇌관문(Blood-brain barrier, BBB)은 혈액 속의 물질 중 선택된 일부 물질만이 뇌 속으로 이동할 수 있도록 하는 중추신경계통의 미세혈관 구조로, 혈관과 조직이 매우 촘촘하게 그물을 형성하여 해로운 물질이 뇌로 도달하는 것을 막는다. 예를 들면 물, 산소, 이산화탄소, 전신마취제 등은 뇌로 들어올 수 있게 하지만, 세균이나 대다수의 항암제 같은 물질들이 뇌로 이동하는 것은 차단한다. 엑소좀은 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell), 혈액 또는 체액 등으로부터 분리될 수 있다고 보고된 바 있으나, 혈액뇌관문의 역할을 하는 뇌 미세혈관(microvessel)으로부터 엑소좀을 분리하는 기술에 대한 연구는 보고된 바 없다.

[0004] 한편, 한국등록특허 제1980482호에는 '엑소좀을 분리하기 위한 다중 컬럼 및 엑소좀 분리 방법'이 개시되어 있고, 한국등록특허 제2403851호에는 '모유두전구세포로부터 분리된 엑소좀 및 이의 용도'이 개시되어 있으나, 본 발명의 '초원심분리를 이용한 뇌혈관 유래 엑소좀의 분리 방법'에 대해서는 기재된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 마우스의 뇌 조직에서 분리한 미세혈관에서 엑소좀의 존재를 확인하였고, 상기 미세혈관에 콜라게나아제를 처리하고 순차적인 초원심분리 과정을 통해 순도 높은 엑소좀을 분리할 수 있는 최적의 조건을 확립함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 뇌조직으로부터 미세혈관을 분리하는 단계; 및 상기 분리된 미세혈관에 콜라게나아제를 처리하고 초원심분리를 수행하는 단계;를 포함하는, 뇌혈관 유래 엑소좀(exosome)의 분리 방법을 제공한다.

[0007] 또한, 본 발명은 상기 방법으로 분리된 뇌혈관 유래 엑소좀을 제공한다.

발명의 효과

[0008] 본 발명에 따른 방법을 이용하면 뇌혈관 유래 엑소좀을 고순도로 분리할 수 있으며, 연속공정이 가능함에 따라 뇌혈관 유래 엑소좀을 쉽고 간단하게 대량 생산할 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0009] 도 1은 마우스의 대뇌 피질(cortex)에서 미세혈관(microvessel)을 분리하는 과정을 나타내는 모식도이다.

도 2는 마우스의 대뇌 피질에서 분리한 미세혈관 내 엑소좀(exosome)을 확인하기 위해 엑소좀 마커인 CD63(red) 및 내피 세포 마커인 CD31(green)에 대한 항체를 이용하여 염색한 후, 형광 현미경으로 촬영한 사진이다. 스케일 바(scale bar)=20 μm.

도 3은 순차적인 원심분리를 통한 엑소좀 분리 과정을 나타내는 모식도이다.

도 4는 순차적인 원심분리를 통해 분리된 입자의 수(A), 입자의 크기(B) 및 엑소좀 양성 입자의 수(C)를 측정한 결과이다. PKH67은 엑소좀 마커이다. *은 p<0.05이고, ***은 p<0.001이다.

도 5는 순차적인 원심분리를 통해 분리된 입자의 농도를 측정한 결과이다. 스케일 바(scale bar)=10 μm.

도 6은 초원심분리(Ultracentrifugation, UC) 또는 한외여과(Ultrafiltration, UF)에 따른 방법으로 엑소좀을 세척 또는 농축하는 과정을 나타내는 모식도이다.

도 7은 초원심분리(UC) 또는 한외여과(UF)를 통해 세척 또는 농축된 입자의 수(A), 입자의 크기(B) 및 엑소좀 양성 입자의 수(C)를 측정한 결과이다. PKH67은 엑소좀 마커이다. *은 p<0.05이다.

도 8은 초원심분리(UC) 또는 한외여과(UF)를 통해 세척 또는 농축된 입자의 농도를 측정한 결과이다. 스케일 바(scale bar)=10 μm.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0010] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 뇌조직으로부터 미세혈관을 분리하는 단계; 및 상기 분리된 미세혈관에 콜라게나아제를 처리하고 초원심분리를 수행하는 단계;를 포함하는, 뇌혈관 유래 엑소좀(exosome)의 분리 방법을 제공한다.

[0011] 본 발명에 따른 엑소좀의 분리 방법에 있어서, 상기 초원심분리는 바람직하게는 400~600 g에서 3~7분, 2,000~4,000 g에서 8~12분, 9,000~11,000 g에서 28~32분의 순서로 순차적으로 수행하는 것일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 500 g에서 5분, 3,000 g에서 10분, 10,000 g에서 30분의 순서로 순차적으로 수행하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0012] 또한, 본 발명에 따른 엑소좀의 분리 방법은 바람직하게는, 상기 순차적인 초원심분리를 수행한 후 여과하는 단계, 120,000~180,000 g에서 80~100분 동안의 초원심분리를 통해 세척 또는 농축하는 단계를 추가로 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0013] 본 발명의 일 구현 예에 따른 엑소좀의 분리 방법은, 구체적으로

[0014] (1) 뇌조직을 분쇄하고 원심분리를 수행한 후, 상층액을 제거하는 단계;

[0015] (2) 상기 상층액이 제거된 침전물에 11~20%(w/v) 덱스트란(dextran)을 첨가하고 원심분리를 수행한 후, 상층액을 제거하여 미세혈관을 분리하는 단계;

[0016] (3) 상기 분리된 미세혈관에 콜라게나아제를 처리하고 30~40℃에서 10~30분 동안 반응시켜 미세혈관을 분해하는 단계;

[0017] (4) 상기 미세혈관 분해물을 400~600 g에서 3~7분 동안 원심분리를 수행하여 제1 상층액을 획득하는 단계;

[0018] (5) 상기 제1 상층액을 새로운 원심분리 용기에 옮기고, 2,000~4,000 g에서 8~12분 동안 원심분리를 수행하여 제2 상층액을 획득하는 단계;

[0019] (6) 상기 제2 상층액을 새로운 원심분리 용기에 옮기고, 9,000~11,000 g에서 28~32분 동안 원심분리를 수행하여 제3 상층액을 획득하는 단계; 및

[0020] (7) 상기 제3 상층액을 여과하여 획득한 여과액을 새로운 원심분리 용기에 옮기고, 120,000~180,000 g에서 80~100동안 원심분리를 수행한 후, 상층액을 제거하고 제1 펠렛을 획득하는 단계; 및

[0021] (8) 상기 제1 펠렛을 PBS(phosphate buffered saline)로 현탁하고, 120,000~180,000 g에서 80~100동안 원심분리를 수행하여 세척 및 농축한 후, 상층액을 제거하고 제2 펠렛을 획득하는 단계;를 포함하는 것일 수 있고, 더욱 구체적으로

[0022] (1) 뇌조직을 분쇄하고 PBS를 첨가하여 원심분리를 수행한 후, 상층액을 제거하는 단계;

[0023] (2) 상기 상층액이 제거된 침전물에 15%(w/v) 덱스트란(dextran)을 첨가하고 원심분리를 수행한 후, 상층액을 제거하여 미세혈관을 분리하는 단계;

[0024] (3) 상기 분리된 미세혈관에 콜라게나아제를 처리하고 37℃에서 20분 동안 반응시켜 미세혈관을 분해하는 단계;

[0025] (4) 상기 미세혈관 분해물을 500 g에서 5분 동안 원심분리를 수행하여 제1 상층액을 획득하는 단계;

[0026] (5) 상기 제1 상층액을 새로운 원심분리 용기에 옮기고, 3,000 g에서 10분 동안 원심분리를 수행하여 제2 상층액을 획득하는 단계;

[0027] (6) 상기 제2 상층액을 새로운 원심분리 용기에 옮기고, 10,000 g에서 30분 동안 원심분리를 수행하여 제3 상층액을 획득하는 단계; 및

[0028] (7) 상기 제3 상층액을 여과하여 획득한 여과액을 새로운 원심분리 용기에 옮기고, 150,000 g에서 90분 동안 원심분리를 수행한 후, 상층액을 제거하고 제1 펠렛을 획득하는 단계; 및

[0029] (8) 상기 제1 펠렛을 PBS로 현탁하고, 150,000 g에서 90분 동안 원심분리를 수행하여 세척 및 농축한 후, 상층액을 제거하고 제2 펠렛을 획득하는 단계;를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0030] 본 발명에 따른 분리 방법에 있어서, 상기 단계 (3)에서 콜라게나아제 외에 프로테아제 저해제 및 포스파타아제 저해제를 추가로 처리할 수 있다.

[0031] 본 발명에 따른 분리 방법에 있어서, 상기 (8) 단계의 제2 펠렛은 뇌혈관 유래 엑소좀이다.

[0032] 본 발명은 또한, 상기 방법으로 분리된 뇌혈관 유래 엑소좀을 제공한다.

[0033] 본 발명에 따른 뇌혈관 유래 엑소좀은 10^{9}~10^{12} 입자/㎖의 농도인 것일 수 있으며, CD63 또는 PKH67의 마커를 발현하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 입자

[0035] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0037] **실시예 1. 마우스 뇌에서 미세혈관 분리 및 엑소좀 확인**

[0038] **1-1. 미세혈관 분리**

[0039] 마우스(C57BL/6, 8주령, 수컷, 두열바이오텍)에서 뇌를 적출하고 대뇌 피질(cortex)을 분리하여 차가운 PBS(phosphate buffered saline)가 담긴 통에 넣고 뇌에 붙은 이물질을 제거한 후, 차가운 PBS 2 ㎖이 담긴 분쇄용 유리용기에 넣었다. 이후, 분쇄 막대를 수직으로 조심스럽게 5번 움직여 조직을 곱게 갈고 15 ㎖ 용기에 옮겨 담은 후, 차가운 PBS를 7 ㎖까지 맞추어 넣고 1500 g, 4℃에서 5분 동안 원심분리하였다. 원심분리 후 상층액을 조심스럽게 제거하고 차가운 PBS에 녹인 15%(w/v) 덱스트란(D1449, TCI Chemicals)을 넣고 섞은 후, 초원심분리용 용기(344718, Beckman)에 옮겨 담고 15%(w/v) 덱스트란을 6 ㎖까지 추가로 넣고 교반하였다. 이후, 10,000 g, 4℃에서 15분 동안 원심분리한 후, 상층액 및 상층조직을 조심스럽게 제거하고 차가운 PBS를 사용하여 바닥에 모인 미세혈관을 떼어내어 세포 스트레이너(strainer)에 얹은 후 10 ㎖ PBS를 뿌려 미세혈관 외 조직을 씻어내어 뇌 미세혈관을 수득하였다(도 1).

[0041] **1-2. 엑소좀 존재 확인**

[0042] 뇌에서 분리한 미세혈관을 유리 슬라이드에 얹어 엑소좀 마커인 CD63(E-12, Santacruz) 및 내피세포 마커인 CD31(23864, abcam)에 대한 1차 항체를 4℃에서 16시간 동안 반응시켰다. 이후, 차가운 PBS로 5분간 3번 세척하고 형광 물질이 결합된 2차 항체를 4℃에서 2시간 동안 반응시키고 차가운 PBS로 5분간 3번 세척한 후, 수용성 형광전용 봉합용액으로 봉합을 진행하고, 공초점 현미경(LSM800, Zeiss)을 사용하여 형광 신호을 확인하였다.

[0043] 그 결과, 뇌에서 분리한 미세혈관에 엑소좀이 존재하는 것을 확인하였다(도 2).

[0045] **실시예 2. 순차적인 원심분리를 통한 엑소좀 분리 및 분석**

[0046] **2-1. 엑소좀 분리**

[0047] 상기 실시예 1-1의 미세혈관을 75 U/㎖ 콜라게나아제 Ⅲ(50-197-4394, stemcell) 500 ㎕와 프로테아제 저해제

(5892970001, Roche) 및 포스파타아제 저해제(4906845001, Roche)를 1:1로 넣은 차가운 PBS에 담아 37℃에서 5분마다 한번씩 뒤집어주며 총 20분 동안 반응시켜 미세혈관 분해물을 획득하였다. 이후, 3가지 방법의 순차적인 원심분리를 수행하여 엑소좀을 각각 분리하였다(도 3).

[0049] **(1) 첫 번째 방법: 500g**

[0050] ① 상기 미세혈관 분해물을 500 g, 4℃에서 5분 동안 원심분리를 수행하여 제1 상층액을 획득하였다.

[0051] ② 상기 제1 상층액을 0.2 ㎛ 필터(s6534, Staris)로 여과하여 잔여물을 제거하고 여과액을 획득하였다.

[0052] ③ 상기 여과액을 새로운 원심분리 용기에 옮긴 후, 차가운 PBS를 최종 12 ㎖이 되도록 넣고 150,000 g, 4℃에서 90분 동안 원심분리를 수행한 후, 상층액을 제거하고 제1 펠렛을 획득하였다.

[0053] ④ 상기 제1 펠렛에 차가운 PBS를 최종 12 ㎖이 되도록 넣어 현탁하고, 150,000 g, 4℃에서 90분 동안 원심분리를 수행하여 세척 및 농축한 후, 상층액을 제거하고 제2 펠렛(엑소좀)을 획득하였다.

[0054] ⑤ 상기 제2 펠렛을 차가운 PBS로 재현탁하여 -80℃에 보관하였다(도 3A).

[0056] **(2) 두 번째 방법: 500g-3,000g**

[0057] ① 상기 미세혈관 분해물을 500 g, 4℃에서 5분 동안 원심분리를 수행하여 제1 상층액을 획득하였다.

[0058] ② 상기 제1 상층액을 새로운 원심분리 용기에 옮기고, 3,000 g에서 10분 동안 원심분리를 수행하여 제2 상층액을 획득하였다.

[0059] ③ 상기 제2 상층액을 0.2 ㎛ 필터(s6534, Staris)로 여과하여 잔여물을 제거하고 여과액을 획득하였다.

[0060] ④ 상기 여과액을 원심분리 용기에 옮긴 후, 차가운 PBS를 최종 12 ㎖이 되도록 넣고 150,000 g, 4℃에서 90분 동안 원심분리를 수행한 후, 상층액을 제거하고 제1 펠렛을 획득하였다.

[0061] ⑤ 상기 제1 펠렛에 차가운 PBS를 최종 12 ㎖이 되도록 넣어 현탁한 후, 150,000 g, 4℃에서 90분 동안 원심분리를 수행하여 세척 및 농축한 후, 상층액을 제거하고 제2 펠렛(엑소좀)을 획득하였다.

[0062] ⑥ 상기 제2 펠렛에 차가운 PBS로 재현탁하여 -80℃에 보관하였다(도 3B).

[0064] **(3) 세 번째 방법 : 500g-3,000g-10,000g**

[0065] ① 상기 미세혈관 분해물을 500 g, 4℃에서 5분 동안 원심분리를 수행하여 제1 상층액을 획득하였다.

[0066] ② 상기 제1 상층액을 새로운 원심분리 용기에 옮기고, 3,000 g에서 10분 동안 원심분리를 수행하여 제2 상층액을 획득하였다.

[0067] ③ 상기 제2 상층액을 새로운 원심분리 용기에 옮기고, 10,000 g에서 30분 동안 원심분리를 수행하여 제3 상층액을 획득하였다.

[0068] ④ 상기 제3 상층액을 0.2 ㎛ 필터(s6534, Staris)로 여과하여 잔여물을 제거하고 여과액을 획득하였다.

[0069] ⑤ 상기 여과액을 원심분리 용기에 옮긴 후, 차가운 PBS를 최종 12 ㎖이 되도록 넣고 150,000 g, 4℃에서 90분 동안 원심분리를 수행한 후, 상층액을 제거하고 제1 펠렛을 획득하였다.

[0070] ⑥ 상기 제1 펠렛에 차가운 PBS를 최종 12 ㎖이 되도록 넣고 현탁한 후, 150,000 g, 4℃에서 90분 동안 원심분리를 수행하여 세척 및 농축한 후, 상층액을 제거하고 제2 펠렛(엑소좀)을 획득하였다.

[0071] ⑦ 상기 제2 펠렛에 차가운 PBS로 재현탁하여 -80℃에 보관하였다(도 3C).

[0073] **2-2. 분리된 엑소좀 분석**

[0074] 상기 3가지 방법((1) 500g, (2) 500g-3,000g, (3) 500g-3,000g-10,000g)으로 분리된 각각의 엑소좀을 이용하여

나노입자분석기(Zeta view, Particle metrix)를 통해 입자의 수, 입자의 크기 및 입자의 농도를 측정하였고, 입자를 엑소좀 마커인 PKH67(PKH67GL, Sigma)로 염색하여 엑소좀 양성 입자의 수를 측정하였다.

[0075] 그 결과, 3가지 방법의 순차적인 원심분리에 의한 입자의 크기 및 농도는 서로 유의미한 차이가 없는 것을 확인하였다. 그러나, 500g-3,000g-10,000g로 원심분리한 경우에는, 500g로 원심분리한 경우보다 입자의 수는 감소하였지만 엑소좀 양성 입자의 수는 현저하게 증가한 것을 확인하였다(도 4 및 도 5).

[0076] 상기 결과를 통해, 500g-3,000g-10,000g의 순차적인 원심분리 방법을 이용하면 뇌혈관 유래의 엑소좀을 고순도로 분리할 수 있음을 알 수 있었다.

[0078] **실시예 3. 한외여과를 통한 엑소좀 세척 또는 농축**

[0079] **3-1. 엑소좀 세척 또는 농축**

[0080] 초원심분리(Ultracentrifugation, UC) 또는 한외여과(Ultrafiltration, UF)에 따른 방법으로 세척 또는 농축한 후, 엑소좀의 수득율을 비교하였다.

[0081] 상기 실시예 1-1의 미세혈관을 75 U/㎖ 콜라게나아제 Ⅲ(50-197-4394, stemcell) 500 ㎕와 프로테아제 저해제(5892970001, Roche) 및 포스파타아제 저해제(4906845001, Roche)를 1:1로 넣은 차가운 PBS에 담아 37℃에서 5분마다 한번씩 뒤집어주며 총 20분 동안 반응시켜 미세혈관 분해물을 획득하였다. 상기 미세혈관 분해물을 500 g, 4℃에서 5분 동안 원심분리를 수행하여 제1 상층액을 획득하였다. 상기 제1 상층액을 새로운 원심분리 용기에 옮기고, 3,000 g에서 10분 동안 원심분리를 수행하여 제2 상층액을 획득하였다. 상기 제2 상층액을 새로운 원심분리 용기에 옮기고, 10,000 g에서 30분 동안 원심분리를 수행하여 제3 상층액을 획득하였다. 상기 제3 상층액을 0.2 ㎛ 필터(s6534, Staris)로 여과하여 여과액을 획득하였다.

[0083] **(1) 초원심분리로 세척 : UC**

[0084] ① 상기 여과액을 원심분리 용기에 옮긴 후, 차가운 PBS를 최종 12 ㎖이 되도록 넣고 150,000 g, 4℃에서 90분 동안 초원심분리를 수행한 후, 상층액을 제거하고 제1 펠렛을 획득하였다.

[0085] ② 상기 제1 펠렛에 차가운 PBS를 최종 12 ㎖이 되도록 넣어 현탁한 후, 150,000 g, 4℃에서 90분 동안 원심분리를 수행한 후, 상층액을 제거하고 제2 펠렛(엑소좀)을 획득하였다.

[0086] ③ 상기 제2 펠렛을 차가운 PBS로 재현탁하여 -80℃에 보관하여 원심분리 샘플(UC)로 사용하였다(도 6).

[0088] **(2) 한외여과로 농축 : UC**

[0089] ① 상기 여과액을 0.1 ㎛ 필터(16553, Staris)를 이용하여 여과하여 제1 여과액을 획득하였다.

[0090] ② 상기 제1 여과액을 10 kDa MWCO(UFC5010, Amicon) 필터가 장착된 원심분리 용기에 옮기고 12,000 g, 4℃에서 45분 동안 원심분리를 수행하여 농축시킨 후, 필터에 남은 펠렛(엑소좀)을 획득하였다.

[0091] ③ 상기 펠렛을 차가운 PBS로 재현탁하여 -80℃에 보관하여 한외여과 샘플(UF)로 사용하였다(도 6).

[0093] **3-2. 세척 또는 농축된 엑소좀 분석**

[0094] 상기 2가지 방법(초원심분리(UC), 한외여과(UF))으로 세척 또는 농축된 각각의 엑소좀을 이용하여 나노입자분석기(Zeta view, Particle metrix)를 통해 입자의 수, 입자의 크기 및 입자의 농도를 측정하였고, 입자를 엑소좀 마커인 PKH67(PKH67GL, Sigma)로 염색하여 엑소좀 양성 입자의 농도를 측정하였다.

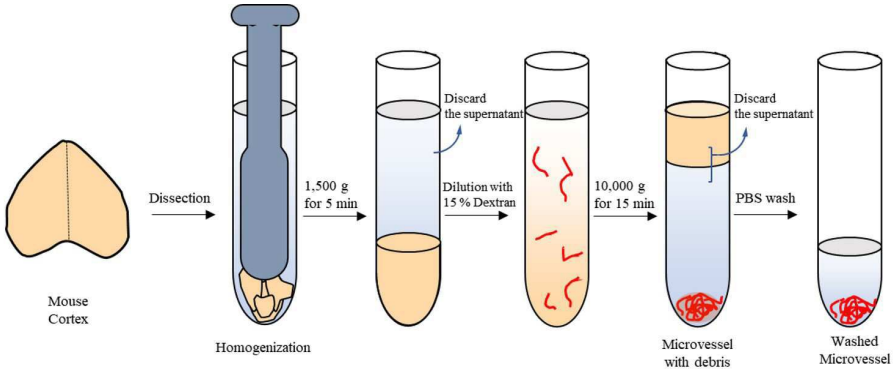
[0095] 그 결과, 초원심분리 또는 한외여과에 의한 입자의 수, 크기 및 농도는 서로 유의미한 차이가 없는 것을 확인하였다. 그러나, 초원심분리로 세척하였을 때의 엑소좀 양성 입자의 수는 한외여과로 농축하였을 때보다 현저하게 증가한 것을 확인하였다(도 7 및 도 8).

[0096] 상기 결과를 통해, 본 발명에 따른 순차적인 초원심분리 방법을 통한 엑소좀 세척 방법은 한외여과를 통한 엑소

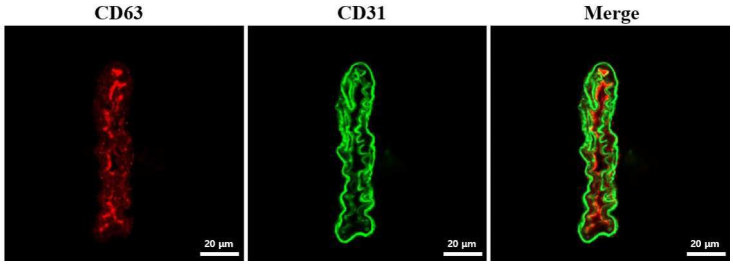
좀 농축 방법보다 엑소좀 수득율이 우수한 것을 알 수 있었다.

도면

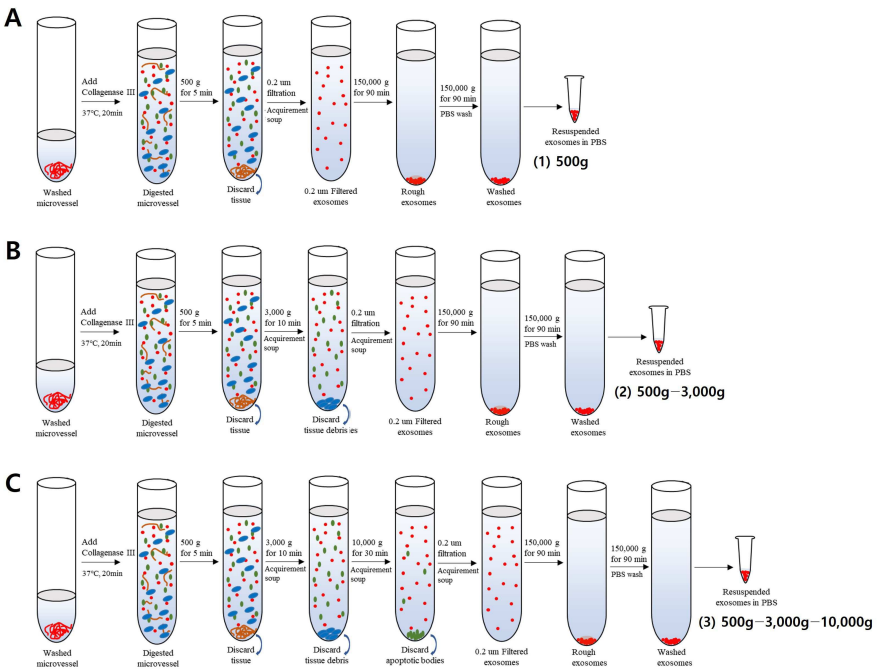
도면1



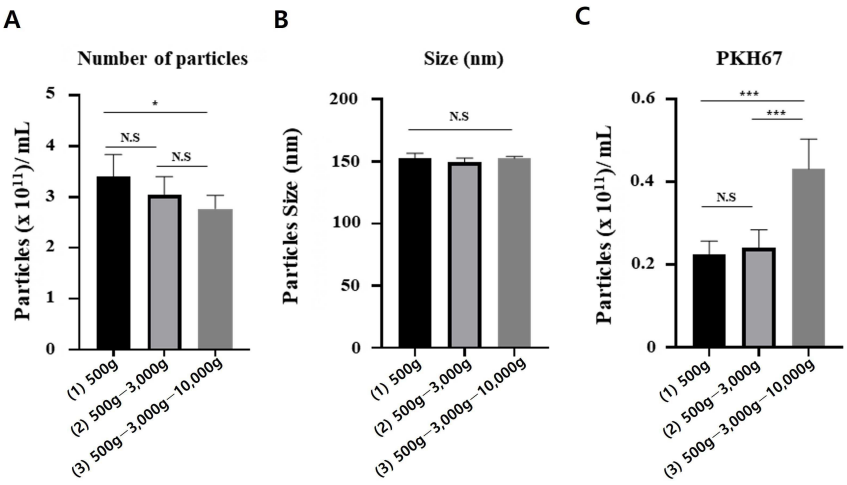
도면2



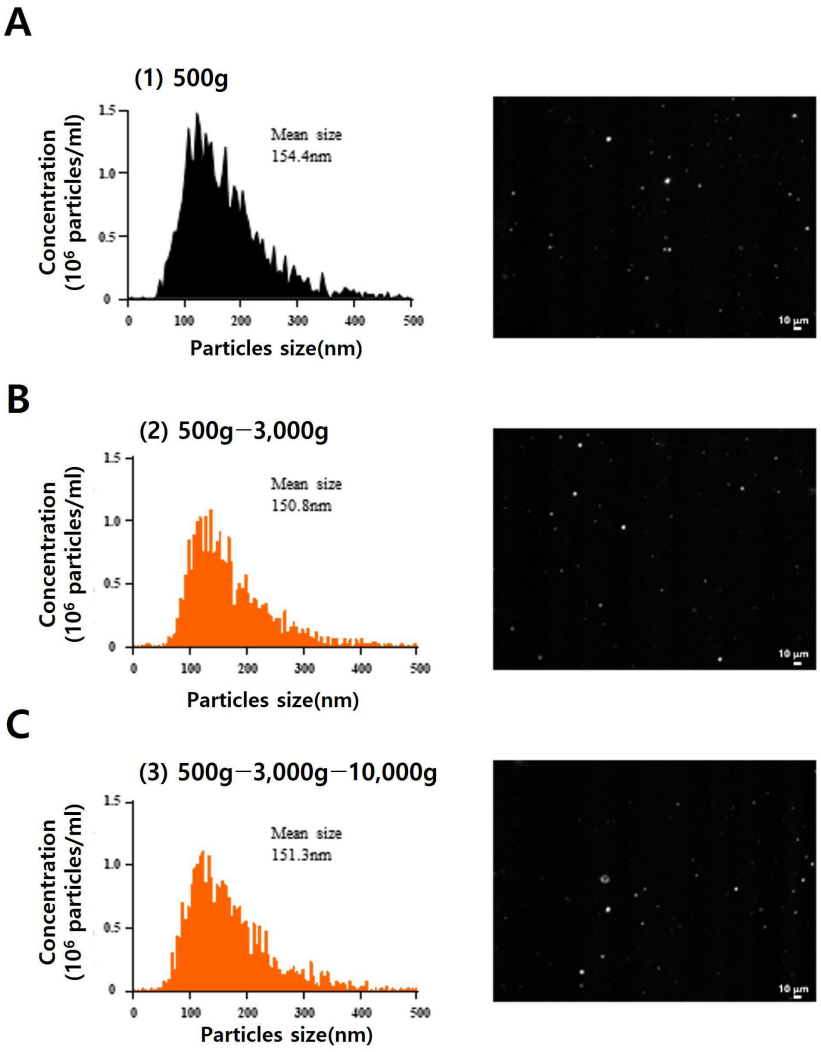
도면3



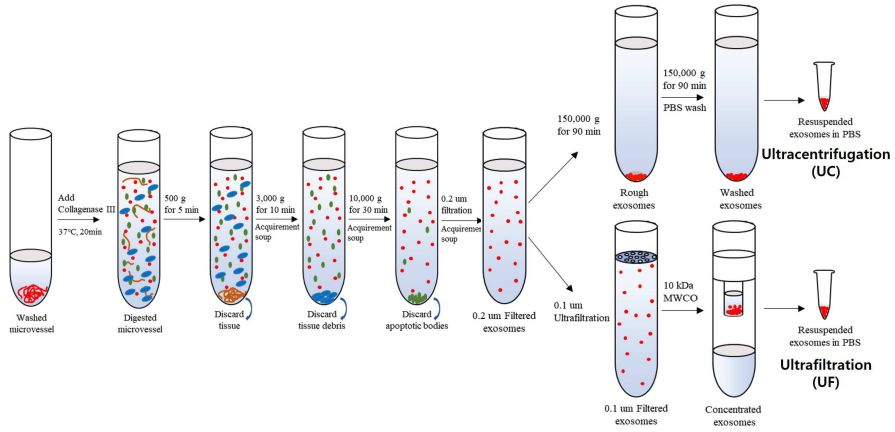
도면4


A
Number of particles
Particles (x 10^11)/mL
N.S
N.S
*
(1) 500g
(2) 500g−3,000g
(3) 500g−3,000g−10,000g
B
Size (nm)
Particles Size (nm)
N.S
C
PKH67
Particles (x 10^11)/mL
N.S
***
***

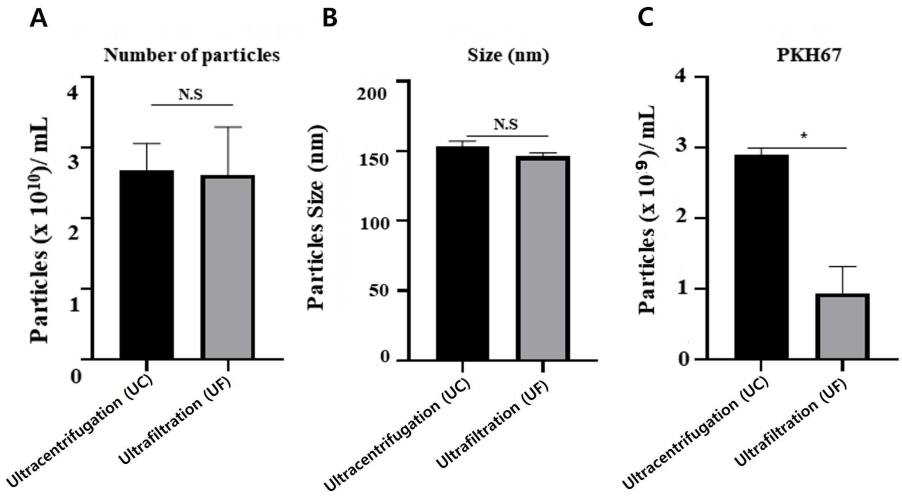
도면5


A
(1) 500g
Concentration (10^6 particles/ml)
Mean size 154.4nm
Particles size(nm)
B
(2) 500g−3,000g
Mean size 150.8nm
C
(3) 500g−3,000g−10,000g
Mean size 151.3nm

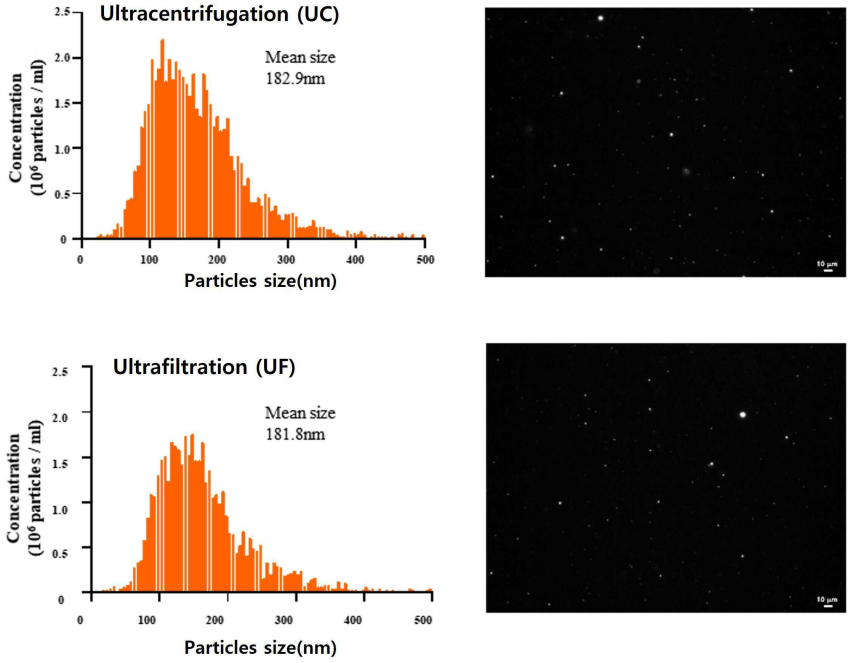
도면6


Add
Collagenase III
37℃, 20min
Washed
microvessel
500 g
for 5 min
Digested
microvessel
3,000 g
for 10 min
Acquirement
soup
Discard
tissue
10,000 g
for 30 min
Acquirement
soup
Discard
tissue debris
0.2 um
filtration
Acquirement
soup
Discard
apoptotic bodies
0.2 um Filtered
exosomes
150,000 g
for 90 min
Rough
exosomes
150,000 g
for 90 min
PBS wash
Washed
exosomes
Resuspended
exosomes in PBS
Ultracentrifugation
(UC)
0.1 um
Ultrafiltration
0.1 um Filtered
exosomes
10 kDa
MWCO
Concentrated
exosomes
Resuspended
exosomes in PBS
Ultrafiltration
(UF)

도면7


A
Number of particles
Particles (x 10^10)/ mL
N.S
Ultracentrifugation (UC)
Ultrafiltration (UF)
B
Size (nm)
Particles Size (nm)
N.S
Ultracentrifugation (UC)
Ultrafiltration (UF)
C
PKH67
Particles (x 10^9)/ mL
*
Ultracentrifugation (UC)
Ultrafiltration (UF)

도면8


Ultracentrifugation (UC)
Mean size
182.9nm
Concentration
(10⁶ particles / ml)
Particles size(nm)
Ultrafiltration (UF)
Mean size
181.8nm
Concentration
(10⁶ particles / ml)
Particles size(nm)