

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2022-0148124
(43) 공개일자 2022년11월04일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01N 1/02 (2006.01) *C12N 1/04* (2017.01)
C12N 5/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A01N 1/0221 (2013.01)
C12N 1/04 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2022-0052810
 (22) 출원일자 2022년04월28일
 심사청구일자 2022년04월28일
- (30) 우선권주장
 1020210055116 2021년04월28일 대한민국(KR)

- (71) 출원인
 인천대학교 산학협력단
 인천광역시 연수구 아카데미로 119 (송도동)
 (주)에스엔이바이오
 서울특별시 강남구 일원로 81, 지하3층 운영사무
 실(일원동, 삼성서울병원 미래의학관)
- (72) 발명자
 차재민
 인천광역시 연수구 컨벤시아대로252번길 10, 160
 2동 2801호(송도동, 송도 더샵 파크에비뉴
 아파트)
 강우영
 경기도 부천시 계남로 72, 2226동 1005호(상동,
 진달래마을)
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인
 김순용

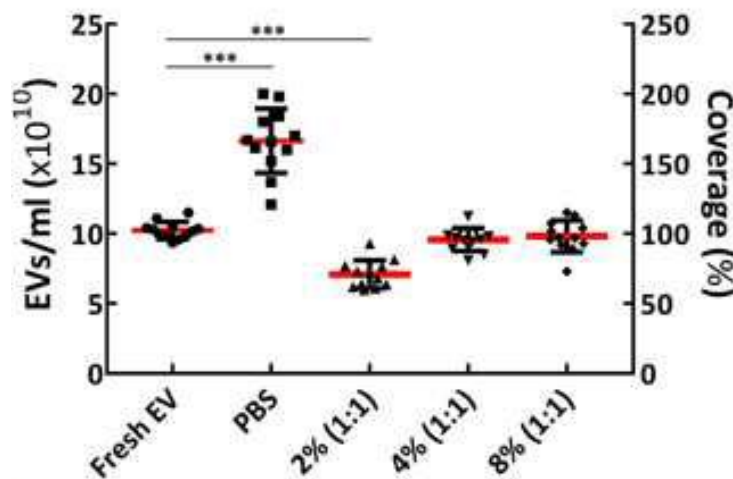
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 세포외소포 동결건조 보호제

(57) 요약

본 발명은 세포외소포의 기능 및 특성을 보존할 수 있는 세포외소포 동결건조 보호용 조성물 및 이를 이용한 세포외소포 동결건조 방법에 관한 것이다. 본 발명의 트레할로스 및 수크로오스는 세포외소포 동결건조 공정에 첨가되어 기존 동결건조보호제의 문제점인 결정 생성 및 재용해능 감소 문제점을 해결하는 것과 동시에, 세포외소포의 고유의 마커, 기능 인자의 발현 및 치료 효과를 유지시킬 수 있으므로, 세포외소포를 이용한 각종 치료제 생산에 다양하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

C12N 5/00 (2013.01)

C12N 2509/00 (2013.01)

(72) 발명자

김은희

서울특별시 서초구 서운로 197, 103동 2002호(서초동, 롯데캐슬래식아파트)

신은경

서울특별시 송파구 송파대로 167, 507호(문정동)

반재복

경기도 구리시 동구릉로85번길 76, 501동 701호(인창동, 아름마을인창래미안)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1425143561

과제번호 S2841543

부처명 중소벤처기업부

과제관리(전문)기관명 중소기업기술정보진흥원

연구사업명 창업성장기술개발(R&D)

연구과제명 표준화된 연구용 EV(Extracellular Vesicles) 생산법 개발 및 제품화

기 여 율 70/100

과제수행기관명 (주)에스엔이바이오

연구기간 2020.07.31 ~ 2021.07.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711117744

과제번호 2020R1F1A1072695

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)

연구과제명 질환 맞춤형 줄기세포 유래 엑소좀 치료제의 대량생산을 위한 고효율 3차원 줄기세포 배양 플랫폼 개발

기 여 율 30/100

과제수행기관명 인천대학교

연구기간 2020.06.01 ~ 2023.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

트레할로스 및 수크로오스를 포함하는, 세포외소포 동결건조보호용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 트레할로스 및 수크로오스는 각각 1 내지 10%(w/v)인 것을 특징으로 하는, 세포외소포 동결건조보호용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 트레할로스 및 수크로오스는 1: 0.05 내지 5 부피비로 혼합 포함되는 것인, 세포외소포 동결건조보호용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 트레할로스 및 수크로오스는 세포외소포 동결건조 및 재수화 과정에서 결정 형성을 감소시키는 것인, 세포외소포 동결건조보호용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 조성물은 세포외소포와 1:0.5 내지 5 부피비로 혼합되는 것인, 세포외소포 동결건조보호용 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 세포외소포는 엑소좀 또는 미세소포인, 세포외소포 동결건조보호용 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 세포외소포는 면역세포, 종양세포 또는 줄기세포 유래의 세포외소포인, 세포외소포 동결건조보호용 조성물.

청구항 8

트레할로스 및 수크로오스를 포함하는, 세포외소포 동결건조보호제.

청구항 9

동결건조보호제로 트레할로스 및 수크로오스 혼합물; 및

세포외소포; 를 포함하는 세포외소포 동결건조용 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 세포외소포는 혈관 재생능을 갖는 것인, 세포외소포 동결건조용 조성물.

청구항 11

- 1) 동결건조보호제인 트레할로스 및 수크로오스 혼합물을 세포외소포와 혼합하는 단계; 및
- 2) 상기 1) 단계의 혼합물을 동결건조시키는 단계를 포함하는, 세포외소포의 동결건조 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 2) 단계는 1) 단계의 혼합물을 -70 내지 -90℃에서 동결시킨 후, 3 내지 7일간 동결 건조시키는 단계를 포함하는 것인, 세포외소포의 동결건조 방법.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 세포외소포의 기능 및 특성을 보존할 수 있는 세포외소포 동결건조 보호용 조성물 및 이를 이용한 세포외소포 동결건조 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] 다양한 질환에서 줄기세포, 특히 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cells; MSC)를 이용한 치료법과 긍정적인 임상 결과들이 보고되어 왔다. 그러나 줄기세포치료제는 부작용으로 혈관 폐색, 종괴 형성, 응고장애 등 세포관련 부작용의 위험성이 있으며, 아직까지 임상시험을 통해 효능 검증이 필요한 상황이다. 줄기세포의 근거리 분비(paracrine) 효과가 주변 피부세포의 재생과 혈관 재생능력이 증진을 유도하는 것으로 알려져 있으며, 특히 세포외소포(extracellular vesicles; EV)가 주요 근거리 분비 효과의 효능인자로 알려져 있다.
- [0004] 세포외소포란 크기에 따라 엑소솜(exosome)과 미세소포(microvesicle)로 분류하는데 엑소솜은 직경 30~150nm이며, 미세소포는 100~1,000nm의 크기를 갖는다. 세포외소포는 세포막 일부가 혈중으로 떨어져 나온 것으로, 단백질과 핵 성분 모두를 함유하고 있어 세포간 커뮤니케이션을 매개하는 것으로 알려져 있다. 줄기세포 대신 세포외소포를 사용하는 것은 줄기세포의 사용에 따른 부작용을 최소화하여 안전성을 높일 뿐 아니라 생체 분포(biodistribution), 생산공정 측면에서도 유리하다.
- [0005] 그러나 세포외소포의 유용성에도 불구하고, 수득이 어려운 세포외소포를 분리 후 안정적으로 유지하고 보관할 수 있는 방법에 대한 기술 및 안정적인 제형에 대한 연구는 아직까지 부족한 상황이다.
- [0006] 따라서, 다양한 질병에 대한 치료물질로 활용가능한 세포외소포를 안정적으로 유지, 보관하기 위한 새로운 보존 방법에 대한 필요성이 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 이에 본 발명자들은 세포외소포를 안정적으로 유지 및 보관하기 위한 기술에 관해 연구하던 중, 동결건조과정에서 발생할 수 있는 문제점을 효과적으로 개선하고, 세포외소포 고유의 성질 및 기능을 보존할 수 있는 새로운 동결건조보호제를 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0009] 따라서 본 발명은 트레할로스 및 수크로오스를 포함하는, 세포외소포 동결건조보호용 조성물 및 이를 이용한 세포외소포 동결건조방법에 관한 것이다.

과제의 해결 수단

- [0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 트레할로스 및 수크로오스를 포함하는, 세포외소포 동결건조보호용 조성물을 제공한다.
- [0012] 또한 본 발명은 트레할로스 및 수크로오스를 포함하는, 세포외소포 동결건조보호제를 제공한다.
- [0013] 또한 본 발명은 동결건조보호제로 트레할로스 및 수크로오스 혼합물; 및 세포외소포; 를 포함하는 세포외소포 동결건조용 조성물을 제공한다.
- [0014] 또한 본 발명은 1) 동결건조보호제인 트레할로스 및 수크로오스 혼합물을 세포외소포와 혼합하는 단계; 및 2) 상기 1) 단계의 혼합물을 동결건조시키는 단계를 포함하는, 세포외소포의 동결건조 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0016] 본 발명의 트레할로스 및 수크로오스는 세포외소포 동결건조 공정에 첨가되어 기존 동결건조보호제의 문제점인 결정 생성 및 재용해능 감소 문제점을 해결하는 것과 동시에, 세포외소포의 고유 마커, 기능 인자의 발현 및 치료 효과를 유지시킬 수 있으므로, 세포외소포를 이용한 각종 치료제 생산에 다양하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0018] 도 1은 동결건조보호제로 DMSO, 트레할로스, 만니톨을 첨가하여 동결건조 및 재수화한 세포외소포를 육안으로 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 2는 트레할로스, 만니톨을 동결보호제로 처리하고 동결건조한 후, 재수화시키고 qNano 측정을 통해 수득 되는 세포외소포(EV)의 수 (A) 및 크기 분포(B)를 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 3의 A 및 B는 세포외소포(EV) 없이 PBS 단독, PBS에 희석한 만니톨 (A), 트레할로스 (B)만을 동결건조하고, 동결건조 후 나노 입자 형성을 XRD 피크 분석을 통해 확인한 결과를 나타낸 도이다. 도 3의 C는 PBS, 트레할로스(T) 0.07 또는 0.17%를 동결건조 후 재용해한 실험군에서 생성되는 불특정 나노 입자를 qNano 분석을 통해 확인한 결과를 나타낸 도이다 (Lyo: 동결 건조 실험군, -80: -80℃ 동결 후 재용해 실험군). 도 4의 D는 PBS, 트레할로스(T) 0.07%를 동결건조 후 형성되는 불특정 나노 입자들의 재용해를 상온에서 48시간 동안 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 4의 A는 세포외소포 (EV) 없이 동결건조 및 재용해 후 트레할로스(T) 단독 실험군 및 트레할로오스 및 수크로오스 (T+S) 혼합 동결건조 및 재용해 실험군에서 생성되는 불특정 나노 입자를 qNano 측정을 통해 확인한 결과를 나타낸 도이다(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).
- 도 4의 B는 세포외소포(EV) 없이 동결건조 및 재용해 후 트레할로스(T) 단독 실험군 및 트레할로오스 및 수크로오스(T+S) 혼합 동결건조 및 재용해 실험군에서 생성되는 불특정 나노 입자의 재용해 및 용해 속도를 20분 동안 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 4의 C는 세포외소포(EV) 없이 동결건조 및 재용해 후 트레할로스(T) 단독 실험군 및 트레할로오스 및 수크로오스(T+S) 혼합 동결건조 및 재용해 실험군에서 생성되는 결정을 XRD 분석을 통해 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 5는 2 내지 8% 트레할로오스 및 수크로오스 혼합 동결건조보호제를 처리 후 동결건조 및 재용해된 세포외소포 (EV)의 EV 입자수를 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 6은 트레할로오스 및 수크로오스 혼합 동결건조보호제 처리 후 동결건조 및 재수화된 세포외소포 (EV)의 크기 분포 변화를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 7은 Cryo-EM 데이터에서 각 실험군의 EV 형상을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 8은 2 내지 8% 트레할로오스 및 수크로오스 혼합 동결건조보호제 처리 후 동결건조 및 재수화된 세포외소포(EV)에서 총 단백질량의 변화를 확인한 결과를 나타낸 도이다 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

도 9는 2 내지 8% 트레할로오스 및 수크로오스 혼합 동결건조보호제 처리 후 동결건조 및 재수화된 세포외소포(EV)에서 총 RNA 양과 치료 효능과 관련된 miRNA 발현량의 변화를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 10은 2 내지 8% 트레할로오스 및 수크로오스 혼합 동결건조보호제(TS)처리 후 동결건조 및 재수화된 세포외소포(EV)에서 EV 마커 CD63의 발현을 확인한 결과를 나타낸 도이다(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

도 11은 PBS, VEGF, Fresh EV 및 트레할로오스 및 수크로오스 혼합 동결건조보호제(TS) 처리 후 동결건조 및 재수화된 세포외소포(EV)의 혈관재생 효과를 튜브 형성능 및 세포 이동능으로 확인한 결과를 나타낸 도이다(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0019] 본 발명은 트레할로스 및 수크로오스를 포함하는 세포외소포 동결건조보호용 조성물 및 이를 이용한 세포외소포 동결건조 방법을 제공한다.
- [0020] 본 발명에 따른 세포외소포 동결건조보호용 조성물은 기존 동결건조보호제의 문제점인 결정 생성 및 재용해능 감소 문제점을 해결하는 것과 동시에, 세포외소포의 고유의 마커, 기능 인자의 발현 및 치료 효과를 유지 또는 증가시킬 수 있다.
- [0021] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0022] 본 발명은 세포외소포 동결건조보호제로서, 트레할로스 및 수크로오스를 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 할 수 있고, 트레할로스 및 수크로오스를 포함하는 세포외소포 동결건조보호용 조성물 및 트레할로스 및 수크로오스를 포함하는 세포외소포 동결건조보호제를 제공한다. 이와 같이 트레할로스 및 수크로오스를 혼합하여 세포외소포에 처리하면, 트레할로스, 만니톨, 수크로오스와 같은 단일 성분들이 동결건조 과정에서 PBS 성분에 의해 염과 결정을 이뤄 형성되는 미확인 나노 입자 형성 문제점을 해결할 수 있을 뿐만 아니라, 동결건조된 세포외소포를 재용해시킬 때 용해 속도를 증가시킬 수 있다.
- [0023] 따라서 본 발명은 동결건조보호제로 트레할로스 및 수크로오스 혼합물; 및 세포외소포; 를 포함하는 세포외소포 동결건조용 조성물을 제공한다.
- [0025] 상기 트레할로스 및 수크로오스는 각각 1 내지 10%(w/v) 트레할로스 및 수크로오스 일 수 있으며, 바람직하게는 2 내지 9%(w/v), 더욱 바람직하게는 2 내지 8%(w/v) 일 수 있다. 1%(w/v) 미만의 트레할로스 또는 수크로오스를 사용하는 경우, 미확인 나노 입자 결정이 다수 발생하는 문제점이 있을 수 있고, 재용해 속도도 느려질 수 있다.
- [0026] 본 발명은 동결건조보호제의 유효성분으로 트레할로스 및 수크로오스를 혼합하여 첨가하는 것을 특징으로 하며, 상기 트레할로스 및 수크로오스는 바람직하게 1: 0.05 내지 5 부피비로 혼합될 수 있고, 더욱 바람직하게는 1:0.5 내지 3, 더욱더욱 바람직하게는 1:0.5 내지 2의 부피비로 혼합될 수 있다. 본 발명의 바람직한 일 구현예에서는 1:1 부피비로 혼합된 동결건조보호제를 이용하여 효과를 확인하였다.
- [0027] 본 발명의 동결건조보호용 조성물은 1 내지 10%(w/v) 트레할로스 및 수크로오스를 1: 0.05 내지 5 부피비로 혼합한 혼합물을 포함하는 것일 수 있고, 상기 농도의 트레할로스 및 수크로오스를 1: 0.1 내지 3, 더욱더욱 바람직하게는 1:0.5 내지 1의 부피비로 혼합한 혼합물을 포함하는 것일 수 있다.
- [0028] 본 발명의 트레할로스와 수크로오스의 혼합 동결건조보호제 조성은 세포외소포 동결건조 및 재수화, 재용해 과정에서 발생하는 결정형성을 감소시킬 수 있다.
- [0029] 동결건조보호제인 트레할로스 및 수크로오스는 동결건조 대상인 세포외소포와 1: 0.5 내지 5 부피 비, 바람직하게는 1: 0.5 내지 3 부피 비, 더욱 바람직하게는 1: 0.5 내지 2 부피비로 혼합될 수 있다.
- [0030] 상기 동결건조 보호제를 세포외소포에 혼합하고, -70 내지 -90℃에서 동결하고, 동결건조기에서 3 내지 7일간 동결건조시켜, 동결건조된 세포외소포를 제조할 수 있다.

- [0031] 동결건조 보호제는 PBS를 베이스로 희석 제조하며, 동결 건조 후 재용해 과정에는 멸균된 증류수를 이용할 수 있다. 이러한 과정을 통해, 세포외소포와 함께 동결건조된 PBS를 구성하는 화합물들이 다시 증류수에 용해되며 세포외소포가 PBS에서 보존되도록 할 수 있다.
- [0032] 본 발명의 동결건조 대상이 되는 세포외소포는 자연계 생물 개체로부터 분리된 세포로부터 분리된 세포외소포 또는 우유와 같은 성분으로부터 분리된 세포외소포일 수 있다. 또한, 상기 세포는 인간 및 비인간 포유류를 포함하는 임의 유형의 동물, 식물 유래일 수 있고, 다양한 종류의 면역세포, 종양세포, 줄기세포일 수 있으며, 바람직하게 상기 줄기세포는 중간엽 줄기세포, 만능줄기세포, 유도만능줄기세포 또는 배아줄기세포일 수 있다.
- [0033] 세포외소포 (Extracellular vesicle)는 세포 외부로 방출되는 소낭을 의미하고, 미세소포, 세포 자멸 수포체, 엑소솜 등을 포함한다. 따라서 본 발명은 트레할로스 및 수크로오스를 동결건조보호제로 첨가하여 그 목적을 달성할 수 있는 다양한 세포외소포를 제한없이 포함할 수 있으며, 예컨대 세포외소포는 엑소솜일 수 있다.
- [0034] 본 발명의 엑소솜은 다양한 동물, 식물, 세균(bacteria), 균류(fungi), 조류(algae) 등의 세포에서 분비되어 세포 외 공간으로 방출된 나노 크기의 베지클 구조를 갖고 있고 엑소솜과 유사한 조성을 갖는 베지클(예를 들어, 엑소솜-유사 베지클)을 모두 포함하는 것을 의미한다. 특히 본 발명의 엑소솜은 줄기세포로부터 유래된 엑소솜일 수 있다.
- [0035] 본 발명에 있어서, 상기 세포외소포는 치료적으로 유용한 효과를 나타내는 세포외소포일 수 있으며, 이러한 세포외소포의 동결건조과정에 본 발명의 동결건조보호제 조성물 및 동결건조보호제를 처리함으로써, 세포외소포의 고유한 특징, 성질, 치료적 효과는 동등한 수준 이상으로 유지될 수 있다.
- [0036] 본 발명에서는 트레할로스 및 수크로오스를 첨가하여 세포외소포를 동결건조하는 경우, 동결건조 과정 중 목적하지 않는 미확인 나노 입자 결정의 형성이 억제될 뿐만 아니라, 이들의 재수화, 용해 속도가 현저하게 빨라짐을 확인하였고, 나아가 세포외소포가 가지고 있는 총 단백질의 양, 총 RNA의 양에 대한 소실이 없고, 치료 효과를 나타내는 miRNA 수준 역시 동등하게 유지되는 것을 확인하였다. 또한 세포외소포의 마커인 CD63 역시 동결건조 전과 비교하여 유사하거나 증가된 발현 패턴을 나타내는 것을 확인하였다.
- [0037] 동결건조보호제에 의해 그 효능이 유지되는 세포외소포의 치료적 효능은 세포외소포 고유의 치료 효능인 폭넓은 재생 혹은 면역조절 효과일 수 있고, 예컨대 혈관 재생능일 수 있다. 본 발명의 동결건조보호제에 의해 동결된 세포외소포는 약학 조성물, 화장품 조성물, 식품 조성물, 피부 외용제 조성물로 사용될 수 있으며, 경구 또는 비경구로 투여될 수 있다.
- [0038] 본 발명의 동결건조된 세포외소포가 활용될 수 있는 혈관 신생이 필요한 질환의 종류는 이에 제한되는 것은 아니나, 화상, 궤양, 허혈, 동맥경화증, 협심증, 심근경색, 심혈관계 질환, 뇌혈관성 질환 및 탈모증으로 이루어진 군에서 선택되는 1 이상일 수 있고, 특히 심혈관계질환 또는 뇌혈관성 질환일 수 있다.
- [0039] 본 발명의 동결건조된 세포외소포가 포함되는 약학적 조성물은 상기 유효성분 외에 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 이밖에 다른 약학적 활성 성분이나 활성 혼합물을 더 포함할 수 있다.
- [0040] 본 발명의 약학적 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트 (Calcium carbonate), 수크로스 (Sucrose) 또는 락토오스 (Lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다.
- [0041] 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수용성제, 현탁제로는 프로필렌글리콜 (Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름,

에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔 (Witepsol), 마크로 골, 트윈 (Tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0042] 본 발명의 약학적 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0043] 본 발명의 약학적 조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관 내 (Intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0044] 본 발명의 상기 부형제, 결합제, 붕해제, 활택제, 교미제, 착향료 등에 대한 용어 정의는 당업계에 공지된 문헌에 기재된 것으로 그 기능 등이 동일 내지 유사한 것들을 포함한다.

[0046] 또한 본 발명은 1) 동결건조보호제인 트레할로스 및 수크로오스 혼합물을 세포외소포와 혼합하는 단계; 및 2) 상기 1) 단계의 혼합물을 동결건조시키는 단계를 포함하는, 세포외소포의 동결건조 방법을 제공한다.

[0047] 본 동결건조 방법에 대한 설명은 앞서 설명된 동결건조보호용 조성물, 동결건조 보호제에 관한 설명이 동일하게 적용될 수 있다.

[0048] 상기 동결건조 방법에 있어서, 2) 단계의 동결건조시키는 단계는 -70 내지 -90℃에서 동결시킨 후, 3 내지 7일간 동결건조시키는 단계를 포함하는 것일 수 있다. 상기 동결은 하룻밤동안 수행될 수 있으며, 동결건조 단계는 1 내지 7mTorr의 압력 하에서 수행되는 것일 수 있고, 1, 2, 또는 3차의 동결건조 과정을 수행하는 것일 수 있다.

[0050] 중복되는 내용은 본 명세서의 복잡성을 고려하여 생략하며, 본 명세서에서 달리 정의되지 않은 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상적으로 사용되는 의미를 갖는 것이다.

[0051] 본 명세서에서 달리 정의되지 않은 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상적으로 사용되는 의미를 갖는 것이다.

[0053] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0055] 실시예 1. 세포 배양 및 세포외소포 수거

[0056] 실험에 사용될 세포외소포 (Extracellular vesicle; 이하 EV)인 엑소좀의 수거를 위해 인간 골수 유래 줄기세포를 배양하였다. 세포는 100mm culture dish(SPL, 20100)에 2.5×10^5 cells의 농도로 배양되었으며 0.2μm로 필터된 low-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Life Technologies Corporation, CA, USA)와 10% Fetal bovine serum (FBS, Life Technologies Corporation)와 1% antibiotics-antimycotics (Life Technologies Corporation)의 배지로 배양되었다. P2에서 P6까지 80~90%마다 계대 배양을 수행하였으며, 37℃에서 5% CO₂의 조건으로 인큐베이터에서 배양하였다.

[0057] P6 이후 동일 조건으로 배양된 줄기세포를 low-glucose DMEM과 10% exosome depleted Fetal bovine serum (System Biosciences, Palo Alto, CA, USA)와 1% antibiotics-antimycotics으로 이루어진 배지로 5일간 배양하였다. 이후 배양액을 수확하여 4℃, 2500g, 10 min의 조건으로 원심분리를 하였고, 상층액만 따서 0.2μm로 필터하였다. 이렇게 수거된 medium은 즉시 Tangential flow filtration(TFF)을 진행하였고 각각 농축 및 버퍼교환(diafiltration)을 진행하여 시작 부피에 대하여 약 10배 정도의 농축을 수행하였다. 이때 membrane은 Minimate TFF 300K membrane (Pall Corporation, NY, USA)을 사용하였다. 상기와 같은 공정을 통해 엑소좀을 수거하고, 이를 이후 동결건조 실험에 사용하였다.

[0059] **실시예 2. 동결 건조 처리**

[0060] EV의 동결건조 수행을 위하여 실시예 1과 같이 EV를 수거한 뒤, 가변 저항 펄스 감지(Tunable resistive pulse sensing) 기술을 사용하는 qNano(IZON Ltd, Christchurch, New Zealand)에 의해 크기와 농도를 측정하였다. 이후 최종 농도가 1×10^{11} EVs/ml이 되도록 1:1 부피의 비율로 동결건조 보호제와 엑소솜을 혼합하였다. 엑소솜에 적합한 동결건조 보호제를 선별하기 위한 후보군으로 트레할로스(Sigma, St. Louis, MO, USA), 만니톨(Sigma), DMSO(Sigma) 및 수크로오스(Sigma)를 사용하였다.

[0061] 실험군으로 만니톨 0~5%(w/v), DMSO 0~10%(w/v), 트레할로스 0~4%(w/v) 농도를 단독 투여군으로 설정하였고, 각각 2 내지 8%(w/v) 농도의 수크로오스와 트레할로스를 1:1 부피비로 혼합한 혼합물을 실험군으로 사용하였다. 혼합된 후엔 -80℃에서 overnight한 후에 4일간 동결건조(-80℃, 5mTorr)를 진행하였다. 동결건조가 끝난 후에 밀봉하여 상온에 보관하였다. 이렇게 보관된 샘플은 실험에 사용하기 위해 재수화 과정을 거쳤으며, 재수화시 0.2 μm로 필터한 탈이온수를 원래 혼합물의 용량만큼 넣어준 뒤 37℃에서 30 분 동안 유지하여 사용하였다.

[0063] **실시예 3. 동결건조 후 육안 분석**

[0064] 동결건조 보호제로 DMSO 0 내지 10%, 만니톨 0.1 내지 5%, 트레할로스 0.03 내지 0.17%로 변화시키면서 엑소솜과 혼합하고, 동결 상태 및 재수화 이후의 상태를 육안으로 확인한 결과를 도 1에 나타내었다.

[0065] 도 1에 나타난 바와 같이, 트레할로스 및 만니톨의 경우, 육안 관찰 시 동결 건조 후 미세한 입자들이 존재하여 동결건조가 진행된 것을 확인할 수 있었으나, DMSO의 경우 동결 건조 후 얇은 필름과 같은 물질들이 형성되어 EV의 동결건조제로 DMSO가 부적절함을 확인하였다. 특히 DMSO 혼합군은 육안으로도 PBS에서 용해가 이루어지지 않고, 큰 입자들이 존재하는 것을 확인하였다. 반면, 트레할로스와 만니톨 혼합군은 재수화 후에도 육안상 모두 재용해가 잘 이루어진 것을 확인하였다.

[0067] **실시예 4. EV 농도 및 크기 분석**

[0068] 실시예 2와 같이 트레할로스, 만니톨을 동결보호제로 처리하고 동결한 후, 재수화시키고 qNano 측정을 통해 수득되는 EV의 수 및 크기를 확인하였다. qNano는 가변저항펄스감지(Tunable resistive pulse sensing) 기술을 통해 입자의 농도 및 크기를 측정하는 장비이다. 실험에 사용된 nanopore는 NP200이며, radial stretch는 46.5 mm이고 0.66 mV의 전압을 가해주고 0.075 ml의 샘플을 사용하여 샘플 내 EV의 농도 및 크기를 측정하였다. 모든 샘플은 최소 500개의 particle 측정을 통해 분석하였고, 모두 CPC100(100 mm, 1.4×10^{13} particles/ml, IZON Ltd)로 calibration을 진행하였다. 측정 결과를 도 2에 나타내었다. 한편 DMSO 처리군은 PBS에 용해가 잘 이루어지지 않아 qNano 측정이 불가하였다.

[0069] 도 2에 나타난 바와 같이, EV 단리 후 바로 qNano를 측정한 실험군인 Fresh EV 군과 같은 EV 개수를 동결건조보호제와 혼합하고 재수화하여 EV 수를 측정하였음에도 불구하고, 트레할로스와 만니톨 투여군 모두, 그리고 PBS 처리군에서 나노 입자의 수가 증가하는 것을 확인하였다. 이는 EV 외 다량의 미확인 나노 입자가 추가 생성되는 것을 의미하는 것으로, qNano의 나노 입자 크기 분포 분석 결과, 미확인 나노 입자의 크기도 80 내지 300nm 범위로 EV와 비슷한 크기를 갖는 것을 확인하였다.

[0071] **실시예 5. 동결건조 보호제 처리 후 EV의 XRD 분석**

[0072] 동결건조보호제가 PBS 성분에서 염과 결정을 이룰 수 있고, 특정 조건에서 결정화가 촉진될 수 있음이 알려져 있다. 실시예 4에서 확인한 것과 같은 EV 외 새로 생성된 미확인 나노입자를 확인하기 위하여, EV 없이 PBS 단독, PBS에 희석한 만니톨, 트레할로스만을 동결건조하였고, 동결건조 후 나노 입자가 형성되는지 여부를 XRD 피크 분석을 통해 확인하였다. Smartlab (Rigaku, JP)를 사용하여 Cu radiation (45kV x 200mA)에서 XRD를 측정하여 내부 구조를 분석하였다. 2θ의 범위는 2 내지 45로 하였으며, step size는 0.05°로 dwell time은 2sec으로 설정하여 분석을 수행하였고 그 결과를 도 3에 나타내었다. XRD 피크 분석에서 22 내지 23° 및 27 내지 28° 피크들은 PBS 성분에 의한 염화나트륨의 결정을 의미하고, 32 내지 33° 피크는 인산염의 결정을 의미한다.

- [0073] 도 3에 나타낸 바와 같이, 만니톨을 첨가하여 동결건조한 실험군(도 3의 A)의 XRD 피크 분석 결과, PBS 성분에 의한 염분 결정 외에도 다수의 피크들이 발생하였고, 이는 만니톨 성분에 의한 자체의 결정이 생성되는 것을 나타내는 결과이다. 만니톨은 결정성 동결보호제로 알려져 있으며, 총 3가지 형태의 결정을 가지고 있다. 이 중 대표적인 결정형 중 하나인 β 만니톨의 결정은 안정 상태의 결정으로 물에 잘 용해되지 않는다는 것이 알려져 있다. 한편, 트레할로스의 경우(도 3의 B), PBS 성분에 의한 염화나트륨의 결정과 인산염 결정에 대한 피크만 형성되는 것을 확인하였다.
- [0074] 도 3의 C는 EV 없이 PBS 또는 트레할로스 용액만 동결건조 한 후 재용해하였을 때, 기존에 없던 불특정 나노 입자가 형성되는 것을 qNano 분석으로 확인한 결과를 나타낸 도이다. -80°C 에서 동결건조 없이 동결만 수행한 후 녹인 실험군에서는(도면 내 -80° 으로 표시) 모두 재용해되어 이러한 나노 입자가 형성되지 않는 것을 확인하였고, qNano 측정에서 파티클이 측정되지 않았다. 한편 저농도의 트레할로스 첨가 실험군인 0.07% 트레할로스 실험군 (2mM) 또는 0.17% 트레할로스 실험군 (8mM) 은 PBS 단독 동결건조시 보다 더 많은 입자가 형성되었다.
- [0075] XRD 분석 결과, 트레할로스/PBS 용액 동결건조 시 생성된 불특정 나노 입자가 염화나트륨과 인산염인 것으로 추정되었으므로, 이들이 시간이 지나면서 점차 용해될 수 있는지 확인하였다. 상온에서 이들을 흔들면서 재용해시킨 결과 도 3의 D에서 확인되는 바와 같이, 약 48시간 후 거의 모든 염이 재용해되는 것을 확인하였다.
- [0076] 상기와 같은 결과를 종합하면, 트레할로스를 낮은 농도로 동결건조 보호제로 이용 시, 동결건조 과정에서 결정화된 염이 발생하고 이는 재용해에 긴 시간이 소요된다는 것을 확인하였다.
- [0078] **실시예 6. 동결건조 보호제 처리에 따른 결정성 감소 실험**
- [0079] 실시예 5에서 낮은 농도의 트레할로스를 동결건조 보호제로 사용하는 경우, 염 결정이 발생한다는 문제점을 확인하였으므로, 이를 해결하기 위하여 트레할로스의 농도를 2 내지 4%로 변화시킨 실험군, 트레할로스와 비결정성 동결 보호제로 알려진 수크로오스를 혼합한 실험군으로 나노 입자 형성 여부를 확인하였다. 2 내지 8% (w/v)의 트레할로스 및 수크로오스를 1:1 부피 비율로 혼합하여 동결건조보호제 실험군으로 사용하였다. 상기 실험군을 이용하여 EV 없이 동결건조보호제와 PBS를 혼합하고 재용해하여, qNano 분석 및 XRD 분석을 실시예 4, 5와 동일한 방법으로 수행하였다. 그 결과를 도 4에 나타내었다.
- [0080] 도 4의 A에 나타낸 바와 같이, 동결건조 및 재용해 직후 (3분 이내) qNano 측정 결과 PBS 단독 처리군에 비해, 2% 트레할로스 군에서 약간의 나노 입자가 측정되었고, 4% 트레할로스, 1:1 트레할로스 및 수크로오스 혼합물 처리군에서는 완전히 재용해되어 측정된 나노 입자가 없음을 확인하였다.
- [0081] 도 4의 B 에서는 재용해 시간에 따른 용해속도를 확인하였고, 동결건조보호제의 농도가 높을수록 용해속도가 빨라지는 경향이 있음을 확인하였다. 특히 트레할로스 및 수크로오스 혼합 용액은 재용해가 5분 이내 달성되어 매우 우수한 용해능을 나타내었다.
- [0082] 도 4의 C에 나타낸 바와 같이, 동결 건조보호제의 농도를 증가시킬수록 XRD 분석 피크도 감소하였고, 특히 트레할로스 및 수크로오스 혼합 용액은 결정 형성도가 매우 낮은 것을 확인하였다.
- [0083] 상기와 같은 결과를 통해 농도가 증가할수록 결정 발생 및 재용해능이 증가되며, 특히 트레할로스 및 수크로오스 혼합물이 동결건조 중 결정 발생율이 현저히 낮고, 재용해율이 우수하다는 사실을 확인하였다.
- [0084] 이러한 결과는 트레할로스 및 수크로오스 혼합물을 동결건조 보호제로 이용하여 EV를 동결건조하는 경우, 미확인 나노 입자 결정이 형성되지 않거나, 빠르게 재용해되므로, 상기 혼합물이 EV 수를 제어하여 환자에게 투여하는 것이 필요한 EV 치료제의 동결건조보호제로 적합하다는 것을 보여주는 결과이다.
- [0086] **실시예 7. 트레할로스 및 수크로오스 혼합 동결건조보호제의 결정 형성 억제 효과 확인**
- [0087] 트레할로스 및 수크로오스 혼합 동결건조보호제가 EV 치료제의 동결건조 보호제로 적절하다는 사실을 확인하였으므로, 실제 실시예 1에서 수득된 MSC-EV의 동결건조에 적용하였을 때, 재용해율을 추가 확인하였고, 그 결과를 도 5 및 도 6에 나타내었다. 실험군으로는 트레할로스 및 수크로오스 2, 4, 8%(w/v)를 1:1 부피비로 혼합한 동결건조 보호제를 실시예 2의 방법과 동일하게 EV에 처리하고 동결건조 및 재용해한 실험군, 동결건조보호제 없이 PBS에 담긴 EV 동결건조 및 재용해 실험군(0%), 동결건조하지 않은 EV 단리 직후의 EV 인 Fresh EV를 이용

하였다.

- [0088] 동결건조보호제 처리 후 동결건조 및 재용해하고, EV 입자수를 확인하였으며, 그 결과를 도 5에 나타내었다.
- [0089] 도 5에 나타낸 바와 같이, 동결건조 후 재용해 시 2% 농도의 트레할로스 및 수크로오스 혼합군에서는 통계적인 유의차는 없었지만 Fresh EV와 비교하여 나노 입자의 수가 약간 감소하는 것을 확인하였다. 반면, 4, 8% 실험군에서는 초기 동결건조된 EV 수를 거의 100% 보존하며 재용해되는 것을 확인하였다.
- [0090] 동결 건조 후 재용해 시, EV 크기의 변화를 확인하였고, 그 결과를 도 6에 나타내었다.
- [0091] 도 6에 나타낸 바와 같이, 동결건조보호제를 첨가한 실험군에서 Fresh EV와 유사한 크기 분포를 나타내었으나, PBS 단독 첨가 실험군에서는 다소 작은 크기의 나노 입자가 확인되었다.
- [0092] 또한, 각 실험군의 EV 입자 형상을 Cryo-EM을 통해 확인하였다. Fresh EV 실험군은 바로 사용 가능하지만, 동결건조된 실험군은 37℃에서 30분간 재용해 이후 실험에 사용하였다. 샘플링을 하기에 앞서 Grids (Quantifoil, R1.2/1.3, 200mesh, EMS)를 친수성 표면으로 만들기 위해 Glow discharge system (PELCO easiGlow™, Ted pella)를 사용하였다. 각 샘플을 grid에 4 ul를 올려놓고 4℃의 100% 습기를 유지해준 상태로 blot force 3을 1.5초간 가해주었다. 이후 샘플을 유리화 하기 위해 액체 에탄에서 Vitrobot Mark IV (FEI) 방법을 사용하여 동결을 진행하였다. 이후 gun type Lab6를 120 kV로 Talos L120C (FEI) 현미경으로 Nanobioimaging center (Seoul national university, Korea)에서 분석을 진행하였다. 그 결과를 도 7에 나타내었다.
- [0093] 도 7에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 동결건조보호제 없이 PBS 만을 이용하여 동결건조 및 재수화된 EV 에서는 염으로 추정되는 미세입자들이 백그라운드에서 다수 관찰되었으나, 트레할로스와 수크로오스 혼합 동결건조 보호제를 이용한 EV 에서는 미세 입자들이 거의 관찰되지 않는 것을 확인하였다.
- [0094] 상기와 같은 결과는 PBS를 이용한 동결건조군에서는 초기 동결건조된 EV 대비 약 2배 가까운 나노 입자가 확인되고, EV 크기 분포를 벗어나는 새로운 나노 입자가 확인되어 앞서 확인한 바와 같은 결정 형성 문제점이 있다는 것을 보여주는 결과이다. 반면, 트레할로스 및 수크로오스 혼합물을 동결건조보호제로 처리하는 경우, 이러한 결정 형성 문제점 없이, EV의 수를 보존하며 동결건조 후 재용해하여 EV를 수득할 수 있음을 확인하였다.
- [0096] **실시예 8. 트레할로스 및 수크로오스 혼합 동결건조보호제의 EV에 대한 영향 확인**
- [0097] EV 치료제의 동결건조보호제로 활용하기 위해서는, 동결건조 및 재용해 후 EV 손실이나 다른 물질 생성 없이 수득 되는 것이 중요할 뿐만 아니라, 동결건조 대상이 되는 EV의 성질 및 기능에 영향을 미치지 않는 것이 중요하다. 따라서, 트레할로스 및 수크로오스 혼합물을 동결건조보호제로 처리하고 동결 및 재용해한 EV에서 EV에 포함된 총 RNA가 손실없이 복원되는지, EV의 효능 인자인 miRNA의 변화를 유도하지 않는지 확인하였으며, EV 마커인 CD63 발현 변화를 확인하였다.
- [0098] 단백질 정량 분석은 하기와 같은 방법으로 수행하였다: 샘플을 모두 초고속 원심분리기(Beckman Coulter, CA, USA)로 120000g로 1hr만큼 원심분리한 뒤 상층액을 버리고 lysis를 진행하였다. Lysis는 RIPA(Life Technologies Corporation)로 진행하였고 BCA protein assay(Life Technologies Corporation)를 통해 단백질을 정량하였다.
- [0099] EV 마커인 CD63 분석은 ELISA를 통해 확인하였으며 다음과 같은 방법을 통해 수행하였다: ELISA는 제조업체의 매뉴얼에 따라 상용 키트로 수행하였다. CD63 (EH95RB, ThermoFisher Scientific, Inc, waltham, MA, USA) ELISA 키트에는 표준 단백질을 포함하고 있어서, 단백질 및 세포외소포의 양은 키트의 표준 곡선에 기초하여 결정된다. 분리된 Fresh EV와 동결건조된 EV를 전처리 과정없이 capture antibody가 코팅된 96well microplate에 Standard와 함께 EV를 동일한 양(200 uL/well)으로 분주한 후, 4° C에서 반응시켰다. 다음날, Sandwich 방식의 ELISA 방법에 따라 진행하여, 마이크로플레이트 리더기로 흡광도를 측정하였다.
- [0100] EV의 효능 인자인 miRNA 발현 분석은 qPCR 로 수행하였으며, 하기와 같이 진행하였다: Trizol™을 이용하여 제조업체의 지침에 따라 RNA를 추출하고 나노드롭(nanodrop)으로 RNA를 정량하였다. RNA는 역전사반응(reverse transcription; RT) 과정을 거쳐 cDNA로 만들고, 각각의 miRNA 및 mRNA에 적합한 Taqman probe를 사용하여 제조업체의 매뉴얼에 따라 Real Time PCR을 진행하였다.
- [0101] 상기와 같은 EV의 단백질 양, 총 RNA 복원율, miRNA 양, EV 마커 발현의 변화를 확인한 결과를 도 8 내지 도 10

에 나타내었다.

[0102] 도 8에 나타낸 바와 같이, PBS 처리군은 Fresh EV 대비 약 38%의 단백질 양 감소가 나타났으나, 본 발명의 트레할로스 및 수크로오스 혼합물을 동결건조보호제로 처리한 실험군에서는 단백질 감소가 적게 나타났고, 특히 4 및 8% 혼합군에서는 Fresh EV 군과 유사한 수준의 단백질 양이 측정되었다.

[0103] 도 9에 나타낸 바와 같이, 동결건조 후 재용해 시 총 RNA 복원율은 모든 실험군에서 통계적으로 유의한 차이를 나타내지 않았고, 치료 효능을 갖는 miRNA 발현도 모든 실험군에서 유의차 없이 고르게 발현하였다.

[0104] 도 10에 나타낸 바와 같이, EV 마커인 CD63 발현은 각 실험군간의 유의적 차이는 없었다.

[0106] 실시예 9. 동결건조보호제 처리 후 동결 해동된 EV의 혈관 재생능 검증

[0107] EV는 혈관 재생능을 가지고 있어, 각종 혈관 신생이 필요한 질환의 치료제로 활용 가능한 것으로 알려져 있다. 본 발명의 동결건조보호제와 혼합된 후 동결, 재용해된 EV가 EV가 가지고 있는 고유의 혈관 재생능을 동등한 정도로 유지하거나, 효과를 개선할 수 있는지 확인하기 위한 실험을 수행하였다. EV 혈관 재생능은 HUVEC 세포를 이용한 튜브 형성능 실험 및 세포 이동능 실험을 통해 확인하였다. 보다 구체적으로 실시예 1을 통해 수득한 EV에 의한 신생 혈관증식 효과를 보기 위해 Matrigel 위에 부착된 HUVEC에 EV를 처리하여 튜브 형성 효과를 확인하였다. 구체적으로 HUVEC을 20 % FBS, 5 U/mL 헤파린 및 3 ng/mL bFGF가 보충된 M199 배지 (Gibco)에서 배양하였다. 세포를 1.0×10^4 세포의 밀도로 μ -Slides Angiogenesis (ibidi, Graefelfing, Germany)에서 성장인자 감소 Matrigel Matrix (BD Bioscience, MA, USA)에 접종하고, 37°C, 5% CO₂ 환경 가습챔버에서 7 시간 동안 튜브를 형성하도록 하였다. 위상차 현미경 (Olympus)에서 이미지를 촬영하고, 튜브형 구조의 수를 ImageJ 소프트웨어를 사용하여 현미경 필드 (4배 배율)에서 정량화하였다.

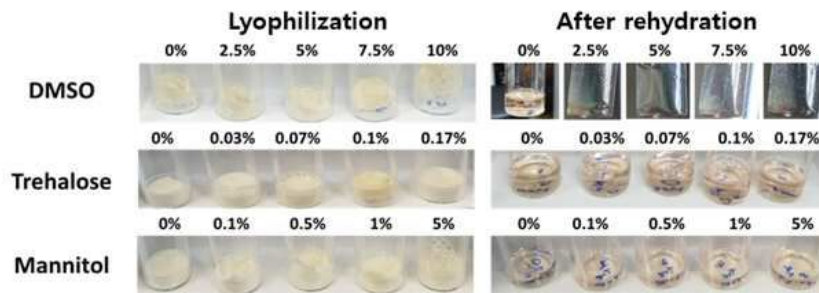
[0108] 세포 이동능 분석을 위하여, HUVEC은 20 % FBS, 5 U/mL 헤파린 및 3 ng/mL bFGF가 보충된 M199 배지 (Gibco)로 37°C, 5% CO₂ 환경 가습챔버에서 배양하였다. 1.0×10^5 세포를 24well 플레이트에서 100%가 되도록 배양한 후, MMC(2.5ug/ml)를 처리하여 세포의 분열을 정지시켰다. 세포를 피펫 팁을 사용하여 수직으로 긁은 다음 PBS로 세척하였다. 긁힌 자국을 위상차 현미경 (Olympus)에서 이미지를 촬영하여 해당 부위를 표시하였다. 긁힌 상처의 동일한 영역을 7시간 후에 다시 촬영한 후, ImageJ 소프트웨어를 사용하여 세포가 이동하여 상처 봉합된 정도를 측정하였다. 동결건조보호제 실험군으로는 트레할로스 및 수크로오스 0(PBS 처리 후 동결건조 및 재수화), 2, 4, 8%(w/v)를 1:1 부피로 혼합한 동결건조보호제를 처리하여 동결건조 및 재수화 EV 실험군, 동결건조보호제 처리없이 분리된 직후의 EV인 Fresh EV, 양성 대조군 VEGF 처리군 및 PBS 처리군을 이용하였다. 음성 대조군으로는 HUVEC에 PBS 처리한 실험군을 이용하였다. EV는 모두 5×10^8 EV/ml로 처리하였고, VEGF는 100ng/ml로 처리하였다. 혈관 신생능을 확인한 결과를 도 11에 나타내었다.

[0109] 도 11에 나타낸 바와 같이, 모든 EV 처리군은 VEGF를 처리한 실험군과 비슷한 수준의 혈관 재생 효과를 나타내었고 특히, 2, 4% 농도의 트레할로스 및 수크로오스 1:1 혼합물을 동결건조보호제로 처리하여 동결, 재용해된 EV를 처리한 실험군에서 우수한 혈관 재생 능력을 확인하였다. 이는 본 발명의 동결건조보호제를 처리하여 동결건조 후 재용해 시 EV가 가지고 있는 치료 효능 손실없이 유지, 복원될 수 있음을 보여주는 결과이다.

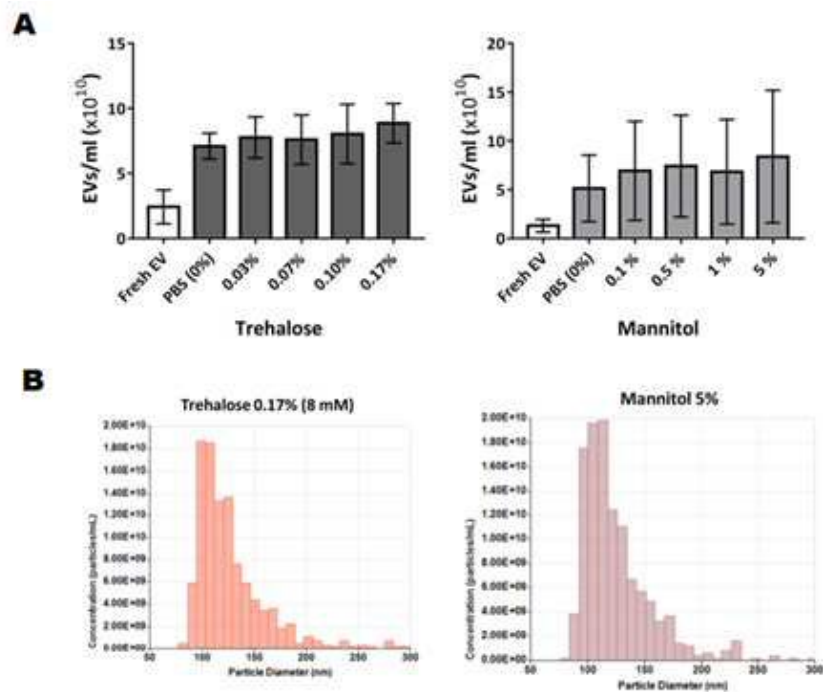
[0111] 이상, 본 발명내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의해 정의된다고 할 것이다.

도면

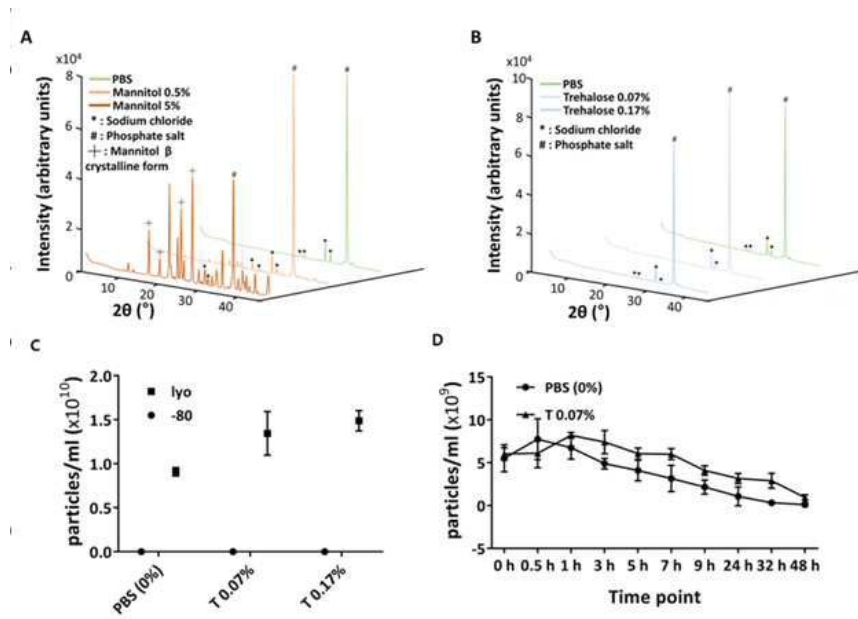
도면1



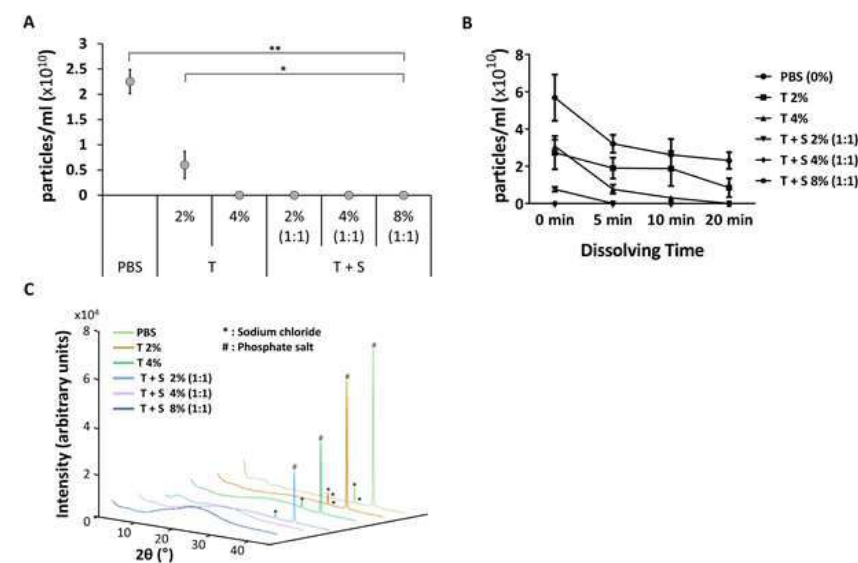
도면2



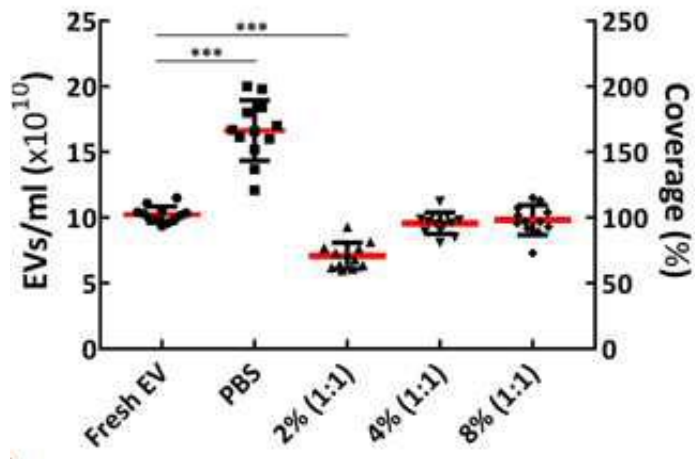
도면3



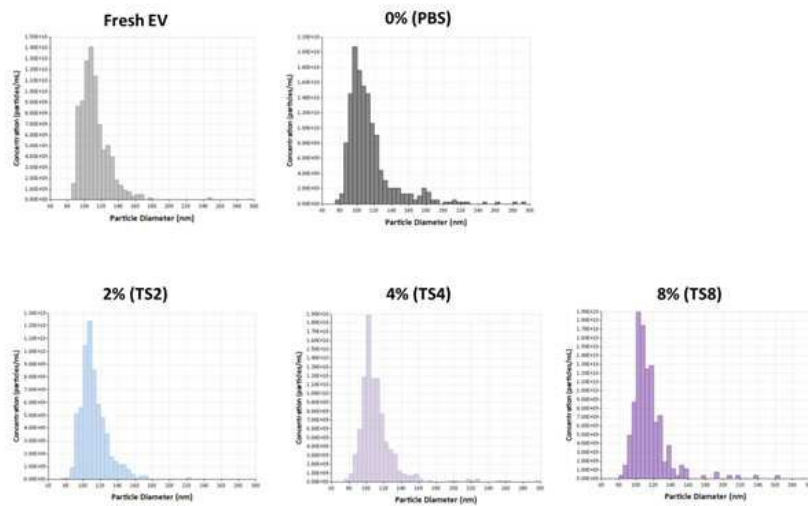
도면4



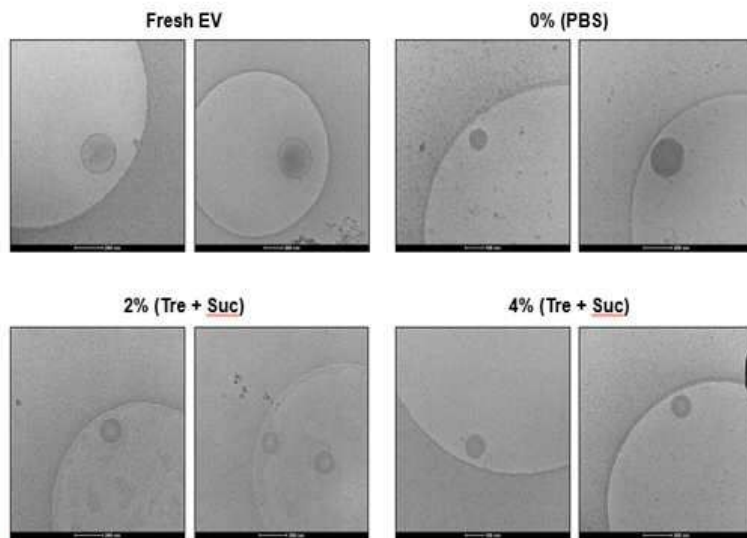
도면5



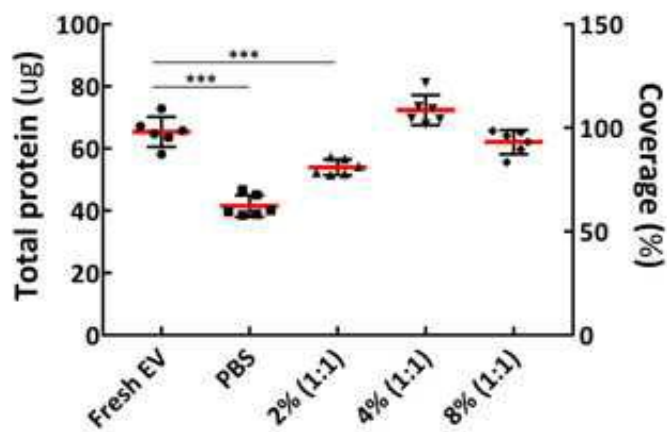
도면6



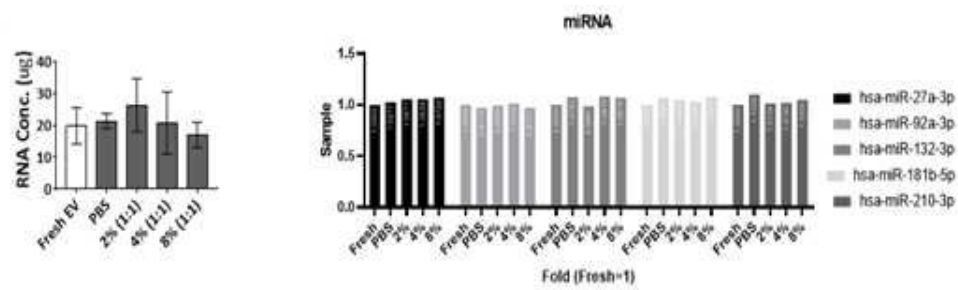
도면7



도면8

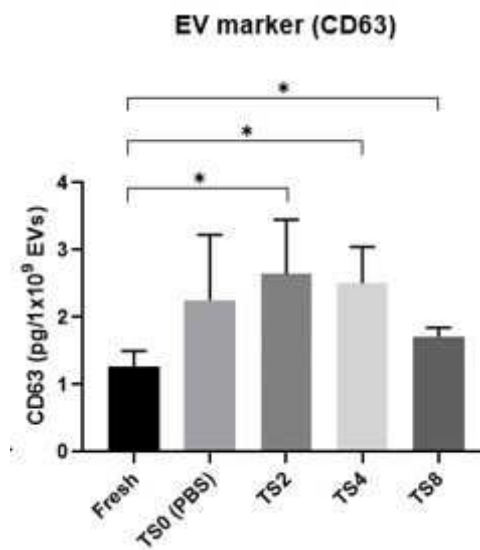


도면9



Gene Symbol	miRNA Function
hsa-miR-27a-3p	Angiogenesis, proliferation
hsa-miR-132-3p	Neurogenesis, Cell cycle
hsa-miR-210-3p	Cell cycle, Angiogenesis
hsa-miR-92a-3p	Proliferation, Migration
hsa-miR-181b-5p	Proliferation

도면10



도면11

